

张 钊,涂 娇,张小雪. 嗜水气单胞菌感染对黄鳝 *Moronecidin* 基因表达的影响[J]. 江苏农业科学,2019,47(10):188-192.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.10.042

# 嗜水气单胞菌感染对黄鳝 *Moronecidin* 基因表达的影响

张 钊<sup>1,2</sup>,涂 娇<sup>1</sup>,张小雪<sup>1</sup>

(1. 贵州大学动物科学学院,贵州贵阳 550025; 2. 贵州省遵义市红花岗区农业农村局,贵州遵义 563000)

**摘要:**为研究嗜水气单胞菌对黄鳝 *Moronecidin* 基因表达的影响,用不同浓度嗜水气单胞菌菌液感染健康黄鳝,采用荧光定量 PCR 方法分别检测染菌黄鳝脾脏、肾脏和肌肉中 *Moronecidin* 基因在感染后 12、24、48 h 的表达量。结果表明,*Moronecidin* 基因在健康黄鳝的上述 3 种组织器官中都有表达;腹腔注射嗜水气单胞菌后,该基因的表达量明显升高。随着感染时间的延长,3 种组织器官中 *Moronecidin* 基因的表达量在处理 1(菌液浓度为 1 亿 CFU/mL)均呈现逐渐升高的趋势,处理 2(菌液浓度为 2 亿 CFU/mL)脾脏中 *Moronecidin* 基因的表达量随处理时间延长而逐渐升高,而肾脏和肌肉中的表达量则呈先升高后降低的趋势;处理 3(4 亿 CFU/mL) *Moronecidin* 基因的表达量在 3 种组织器官中均逐渐降低。

**关键词:**黄鳝;嗜水气单胞菌;*Moronecidin* 基因

**中图分类号:** S917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)10-0188-05

鱼类依赖非特异性免疫系统通过产生各种免疫细胞<sup>[1-2]</sup>、免疫因子<sup>[3-4]</sup>等非特异性的识别并作用于病原体,达到清除体内抗原、抵御水生环境中各种病原体入侵的目的。抗菌肽(AMPs)是非特异性免疫系统的重要组成部分,存在于植物、动物以及人类等几乎所有的生命体中,具有抗菌谱广、高效、热稳定性强、不产生耐药性等特点<sup>[5-6]</sup>。研究发现,

抗菌肽除了具有直接抑制细菌、真菌、病毒和原虫的抗菌活性外,还具有增强免疫细胞趋化性<sup>[7]</sup>、抑制炎症<sup>[8-9]</sup>和激活免疫细胞<sup>[10]</sup>等生物学活性。

*Moronecidin* 抗菌肽属于 Piscidin(毒鱼豆素)家族,其家族成员包括 dicentracin、epinecidin、myxindin 以及胸腺素<sup>[11]</sup>等。2002 年 Lauth 等从杂交条纹鲈鱼(*Hybrid striped*)的鳃和皮肤中首次分离获得 *Moronecidin* 抗菌肽,并验证了它对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都有抗菌活性<sup>[12]</sup>;2008 年 Falco 等的研究表明,在感染病原体后,虹鳟各组织器官中 *Moronecidin* 抗菌肽的表达量最高<sup>[13]</sup>。同时,在其他鱼类体内也相继发现了 *Moronecidin* 抗菌肽,包括大西洋鳕鱼(*Gadus morhua*)<sup>[14]</sup>、真鲷(*Chrysophrys major*)<sup>[15]</sup>、欧洲鲈鱼

收稿日期:2018-10-15

基金项目:贵州省科学技术基金(编号:黔科合 J 字[2013]2120 号)。

作者简介:张 钊(1991—),男,贵州遵义人,硕士研究生,研究方向为水产动物繁殖与发育生物学。E-mail:1981967207@qq.com。

通信作者:张小雪,博士,教授,研究方向为水产动物繁殖与发育生物学。E-mail:zhangxx508@163.com。

光密度条件下能生存,在更深的海底也有分布<sup>[8]</sup>,但是,光密度低于  $10 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  时,贝壳丝状体生长过于缓慢,而直射光超过  $60 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  可引起丝状体死亡。本试验结果表明, $10 \sim 50 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  光密度条件下培养的贝壳丝状体能正常生长,并放散壳孢子,且提高光密度对贝壳丝状体生长有明显的促进作用;当光密度为  $10 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  时,深丰 1 号、深丰 2 号、WT 这 3 个品系的壳孢子放散量相对最多,随着光密度的增加,贝壳丝状体壳孢子放散量逐渐下降。因此,在  $10 \sim 50 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  范围内适当调整光密度,是调控贝壳丝状体生长以获得适当贝壳丝状体密度的有效方法。

本试验结果表明,培养温度在  $15 \sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$  时,贝壳丝状体的生长随温度的升高而明显加快,但  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  时贝壳丝状体壳孢子的放散量却相对最多,这是由于  $15 \text{ }^\circ\text{C}$  时贝壳丝状体生长较为缓慢,在相同培养时间条件下,导致获得的贝壳丝状体密度过低,总量相对较少,造成壳孢子放散量相对较少,而  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  时贝壳丝状体生长过快,藻丝过于密集,贝壳丝状体不能同步成熟,壳孢子也不能大量集中放散。因此, $20 \text{ }^\circ\text{C}$  是培养贝壳丝状体较为适宜的温度。

## 参考文献:

- [1] 严兴洪,李 琳,有贺祐胜. 坛紫菜减数分裂位置的杂交试验分析[J]. 水产学报,2006,30(1):1-7.
- [2] 何培民,秦 松,严小军,等. 海藻生物技术及其应用[M]. 北京:化学工业出版社,2007:99-105.
- [3] 王素平,姜红如. 条纹紫菜游离丝状体生态的研究[J]. 海洋水产研究,1983(5):1-5.
- [4] 汤晓荣,费修纛. 光温与坛紫菜自由丝状体生长发育的关系[J]. 海洋与湖沼,1997,28(5):475-482.
- [5] Kato M, Aruga Y. Comparative studies on the growth and photosynthesis of the pigmentation mutants of *Porphyra yezoensis* in laboratory culture[J]. Japan Journal of Phycology,1984,32:334-347.
- [6] 王素娟,张小平,徐志东,等. 坛紫菜营养细胞和原生质体培养的研究 I [J]. 海洋与湖沼,1986,17(3):217-221,271-272.
- [7] 马家海,蔡守清. 条纹紫菜的栽培与加工[M]. 北京:科学出版社,1996:77-84.
- [8] 陈昌生,纪德华,王秋红,等. 坛紫菜丝状体种质保存技术的研究[J]. 水产学报,2005,29(6):745-750.

(*Dicentrarchus labrax*)<sup>[16]</sup>、石斑鱼(*Epinephelus coioides*)<sup>[17]</sup>等。到目前为止, *Moronecidin* 抗菌肽仅被发现存在于鱼类中。有关 *Moronecidin* 基因的研究发现, 比目鱼完整的 *Moronecidin* 基因 cDNA 序列包含 1 个信号肽和磷酸腺苷(AMP)12 域<sup>[18]</sup>, 而条石鲷鱼中 *Moronecidin* 基因的编码区含有 204bp, 共 67 个氨基酸残基, 并预测其三级结构是一种两亲性螺旋结构<sup>[19]</sup>。前人关于 *Moronecidin* 基因的研究主要集中在海洋鱼类, 而有关该基因在淡水鱼黄鳝体内表达的情况尚未见报道。

本研究以黄鳝 *Moronecidin* 基因为研究对象, 通过荧光定量 PCR 技术检测该基因在感染嗜水气单胞菌后黄鳝脾脏等 3 种组织器官中的表达量变化, 为进一步探讨黄鳝免疫机制, 实现新型药物的开发提供依据。

## 1 材料与与方法

### 1.1 试验动物与菌株

试验用 60 尾黄鳝[体质量为(104.5 ± 13.1) g]采集于贵州省贵阳市花溪地区池塘和田间; 试验用嗜水气单胞菌菌株(编号: ATCC7966)由贵州大学动物科学学院陈江凤老师馈赠。

### 1.2 主要仪器设备和试剂

1.2.1 主要仪器设备 VD-650 超净工作台、101-2 型电热鼓风干燥箱、80-1 电动离心机、光学显微镜 CH20BIMF200、血球计数板、FA1004 电子天平、78-1 磁力加热搅拌器、HZQ-F160 型恒温摇床、高压灭菌锅、80-2112-21 型紫外分光光度仪、PTC-1148 PCR 扩增仪、DYY-6C 型电泳仪、NanoDrop 2000 超微量紫外分光光度计、C1000 Touch 荧光定量 PCR 仪、Universal Hood II 凝胶成像系统。

1.2.2 主要试剂与试剂盒 无水乙醇、三氯甲烷、琼脂糖、Gold View 染液[生工生物工程(上海)股份有限公司]、

loading buffer[生工生物工程(上海)股份有限公司]、DM2000(鼎国生物公司)、FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒(TIANGEN)、TransStart<sup>®</sup> Tip GreenqPCR SuperMix(TransGen Biotech)、Taq PCR Master Mix(TransGen Biotech)。

### 1.3 试验方法

1.3.1 菌液培养及配制 制备 LB 固体培养基, 取储存的菌株涂抹在培养基上, 经复壮后转移到液体培养基中, 于 28 ℃ 恒温摇床培养 24 h, 取少量菌液离心提纯, 加入少量无菌生理盐水稀释后用平板活菌计数法测定菌液浓度。稀释菌液浓度至 4 亿 CFU/mL 备用。

1.3.2 试验分组感染 清洗养殖用水箱, 以 0.7% 生理盐水浸泡 1 d。将黄鳝随机分成 4 组, 每组 15 尾, 放入水箱用无氯水暂养 2 d。对照组每尾注射 0.2 mL 生理盐水。其余 3 组为处理组, 按照注射菌液的浓度分为处理 1(每尾黄鳝注射 0.2 mL 浓度为 1 亿 CFU/mL 的嗜水气单胞菌菌液)、处理 2(每尾黄鳝注射 0.2 mL 浓度为 2 亿 CFU/mL 的嗜水气单胞菌菌液)、处理 3(每尾黄鳝分别注射 0.2 mL 浓度为 4 亿 CFU/mL 的嗜水气单胞菌菌液)。注射后用乙醇棉球对注射部位进行消毒, 然后放入水箱中, 并加盖防逃。

1.3.3 组织取样 分别在感染嗜水气单胞菌 12、24、48 h 后进行取材, 每个浓度组各时间点分别取 5 尾黄鳝, 解剖并分别取肾脏、脾脏、肌肉等置于无酶冷冻管中, 迅速放入液氮冷冻后转入 -80 ℃ 冰箱中保存备用。

1.3.4 引物的设计与合成 根据转录组测序获得的抗菌肽 *Moronecidin* 基因序列, 并参考 GenBank 中该基因序列, 使用 Primer Premier 5.0 进行引物的设计, 参照王霞等的研究成果<sup>[20]</sup>, 内参基因选择黄鳝的  $\beta$ -actin 基因。引物合成由英潍捷基(上海)贸易有限公司完成, 用去离子水溶解后于 -20 ℃ 保存。引物序列信息如表 1 所示。

表 1 *Moronecidin* 和  $\beta$ -actin 基因引物

基因	引物序列 (5'→3')	退火温度 (℃)	产物长度 (bp)
<i>Moronecidin</i>	正向: CAAAGGAAAGCAGCAGTAG; 反向: CTTACAGGCTCAGAGGA	51.0	291
$\beta$ -actin	正向: TCCCTGTATGCCTGCTCGTA; 反向: TGGTGAAGCTGTAGCCTCTCTC	59.0	344

### 1.3.5 样品总 RNA 的提取及检测

1.3.5.1 总 RNA 的提取 使用天根生化科技(北京)有限公司生产的 RNAsimple Total RNA Kit 进行总 RNA 的提取。

1.3.5.2 总 RNA 的检测 对 RNA 样品进行超微量紫外分光光度和凝胶电泳双重检测。凝胶制备和电泳检测: 称取琼脂糖 0.66 g, 装入锥形瓶中, 加入 70 mL TAE 缓冲液, 加热煮沸后于室温静置冷却至 50 ℃ 左右, 加入核酸染料 5  $\mu$ L, 摇匀后迅速倒胶。将提取的总 RNA 样品置于冰上解冻, 取 1  $\mu$ L loading buffer(上样缓冲液)与 4  $\mu$ L RNA 样品混合, 点样, 电泳。

1.3.6 cDNA 第一链的合成 选择质量较高的 RNA 样品进行 cDNA 第一链的合成, 合成前将样品 RNA 浓度调成一致, 使用天根生化科技(北京)有限公司生产的试剂盒对提取的总 RNA 进行反转录, 按说明书步骤在冰上进行操作(为减少试验误差, 保证每个反应管准确加入反应液, 进行反应前将各反应液按比例混合配成混合液, 再分装到各管), 具体如下:

(1) 将 RNA 样品以及反转录试剂盒内所有试剂解冻后

置于冰上, 使用前用漩涡振荡器混匀并简短离心。

(2) 去除基因组: 配制混合液(2  $\mu$ L 5  $\times$  gDNA 缓冲液, 1  $\mu$ L 总 RNA, 用 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 补足至 10  $\mu$ L), 充分混匀并简短离心, 42 ℃ 条件下孵育 3 min 后置于冰上。

(3) 配制混合液(2  $\mu$ L 10  $\times$  Fast RT Buffer, 1  $\mu$ L RT Enzyme Mix, 2  $\mu$ L FQ-RT Primer Mix, 用 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 补足至 10  $\mu$ L), 混匀, 简短离心。

(4) 将反转录反应中的 Mix, 加到 gDNA 去除步骤的反应液中, 充分混匀, 简短离心, 42 ℃ 孵育 15 min。

(5) 95 ℃ 孵育 3 min 后置于冰上, 所得 cDNA 用  $\beta$ -actin 引物进行扩增以检测质量, 用于后续试验或低温保存。

### 1.3.7 PCR 反应体系及程序

1.3.7.1 PCR 反应体系 20  $\mu$ L PCR 反应体系如下: Taq PCR Master Mix 10  $\mu$ L(1  $\times$ ), 模板 cDNA 1  $\mu$ L(0.1 ~ 10 ng), Primer F(10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L(0.5  $\mu$ mol/L), Primer R(10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L(0.5  $\mu$ mol/L), RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L。

1.3.7.2 *Moronecidin* PCR 反应程序 反应程序如下: 94 ℃

预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s, 51 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 10 s, 31 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。

1.3.8 琼脂糖凝胶电泳检测目的基因 称取 0.66 g 琼脂糖倒入锥形瓶中, 加入 60 mL 1 × TAE 缓冲液, 加热煮沸溶解后, 放置于室温下冷却至 50 ~ 60 °C (不烫手), 加入 5 μL Gold View 染液, 用玻璃棒搅拌均匀, 迅速倒入制胶板, 插入梳子。冷却凝固后取出梳子, 加样, 放入电泳槽, 100 V 电泳 20 min 左右, 凝胶成像。

1.3.9 *Moronecadin* 基因相对表达量的测定 以反转录所得 cDNA 作为荧光定量 PCR 的模板, 对 *Moronecadin* 基因的相对表达量进行测定, 建立标准曲线。反应体系和反应条件如下:

(1) 荧光定量 PCR 反应体系。20 μL 荧光定量 PCR 反应体系如下: 10 μL 2 × TransStart® Tip Green qPCR SuperMix, 0.4 μL (0.2 μmol/L) Primer - F, 0.4 μL (0.2 μmol/L) Primer - R, 2 μL 模板 cDNA, 7.2 μL RNase - Free ddH<sub>2</sub>O。

(2) 荧光定量 PCR 反应条件(两步法)。具体步骤如下: 94 °C 30 s; 94 °C 5 s, 51 °C 30 s, 39 个循环, 荧光信号采集; 95 °C 1 min, 51 °C 1 min, 95 °C 5 s, 得到溶解曲线。

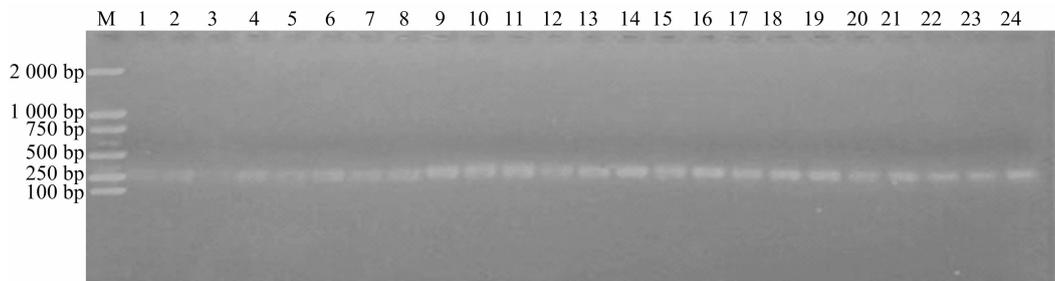
#### 1.4 数据统计与分析

本试验所得实时荧光定量 PCR 原始数据使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法进行处理, 分析 *Moronecadin* 基因在黄鳝肾脏等 3 种组织器官中的表达量。处理后的数据使用统计软件 SPSS 17.0 进行单因素统计分析, 所得数据均为平均值 ± 标准差,  $P < 0.05$  表示差异显著,  $P < 0.01$  表示差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 提取结果

试验共提取了 108 个总 RNA 样品。紫外分光光度计检



M—marker; 1~24—不同的加样孔  
图2 *Moronecadin* 基因 cDNA 扩增凝胶电泳

### 2.4 引物特异性检测

通过 qRT - PCR 技术检测分析感染嗜水气单胞菌后黄鳝各时间点脾脏、肾脏、肌肉组织中 *Moronecadin* 基因的表达量, 得到  $\beta$  - *actin* 基因扩增曲线和溶解曲线(图3)、*Moronecadin* 基因扩增曲线和溶解曲线(图4)。由图3和图4可以看出, 2 个基因扩增曲线均呈“S”形, 且曲线平行性好, 2 个基因的溶解温度分别为 82.5 °C 和 86.5 °C, 溶解曲线峰值单一, 说明设计的荧光定量引物特异性较好, 没有引物二聚体和产生非特异性扩增。

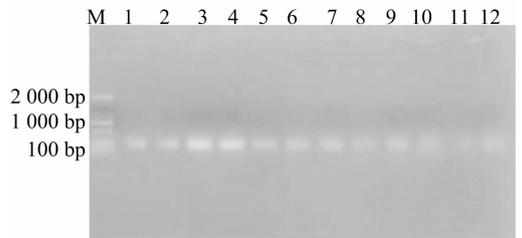
### 2.5 *Moronecadin* 基因表达量的变化

以  $\beta$  - *actin* 为内参作对照, 在不同处理浓度和处理时间下, 对 *Moronecadin* 基因在黄鳝 3 种组织器官中的相对表达量进行检测, 检测结果采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法进行计算, 结果以对照组

测显示, 总 RNA 的浓度在 130 ~ 800 ng/μL 之间, 且  $D_{260\text{nm}}/D_{280\text{nm}}$  值在 1.8 ~ 2.0 之间, 证明总 RNA 浓度和纯度较高。电泳检测结果显示, 28S 和 18S 条带清晰, 证明总 RNA 完整, 可用于后续 PCR 试验。

### 2.2 cDNA 检测及 $\beta$ - *actin* cDNA PCR 扩增结果

取 1 μL cDNA, 超微量紫外分光光度计测定结果显示, cDNA 浓度均在 1 000 ng/μL 以上, 且  $D_{260\text{nm}}/D_{280\text{nm}}$  值在 1.8 ~ 2.0 之间, 说明 cDNA 浓度较高且完整, 可用于下一步荧光定量 PCR 试验。由图 1 可知, 以反转录所得 cDNA 为模板, 用  $\beta$  - *actin* 引物进行扩增, 并通过凝胶电泳成像进行检测, 得到的条带分明, 无杂带, 每组获得的 DNA 片段均在 344 bp 左右, 说明  $\beta$  - *actin* 基因在黄鳝 RNA 样品中的表达稳定, 可作为内参基因使用。



1~12—不同的加样孔; M—marker  
图1  $\beta$  - *actin* cDNA PCR 扩增凝胶电泳结果

### 2.3 cDNA 的 PCR 扩增

分别在健康黄鳝 3 种组织器官样品中挑选 4 个 cDNA 样品作为模板, 对 *Moronecadin* 目的基因进行扩增, 用琼脂糖凝胶电泳检测并成像(图2), 所得条带单一明亮, 每组均扩增得到约 291 bp 的 DNA 片段, 说明 *Moronecadin* 基因在健康黄鳝中有表达。

12 h 的表达量为对照, 设置其数值为 1。

2.5.1 脾脏 *Moronecadin* 基因的表达 由图 5 可知, 随着试验时间的推移, 对照组脾脏 *Moronecadin* 基因的表达量有些许升高, 但差异不明显。处理 1 和处理 2 在感染嗜水气单胞菌后, *Moronecadin* 基因表达量均随着处理时间的延长而增加, 且增加显著 ( $P < 0.05$ ) 或极显著 ( $P < 0.01$ ); 处理 2 在感染 24 h 和 48 h 时 *Moronecadin* 基因表达量极显著提高 ( $P < 0.01$ ); 而处理 3 则随感染时间的延长, *Moronecadin* 基因表达量与对照相比呈先升高后降低的变化趋势, 且随着处理时间的延长, 表达量下降十分明显。与对照组相比, 各处理组 *Moronecadin* 基因表达量整体呈上调趋势, 处理 2 在感染 48 h 时, 基因表达量达到最高值。

2.5.2 肾脏 *Moronecadin* 基因的表达 由图 6 可知, 随着试

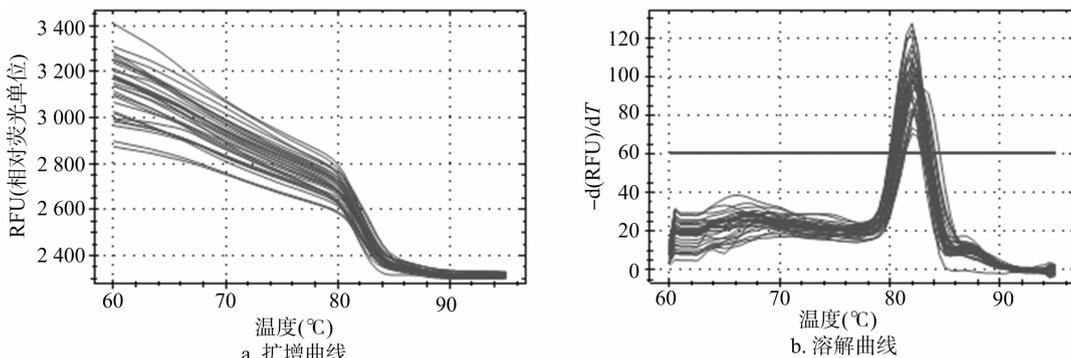


图3  $\beta$ -actin 基因扩增曲线与溶解曲线

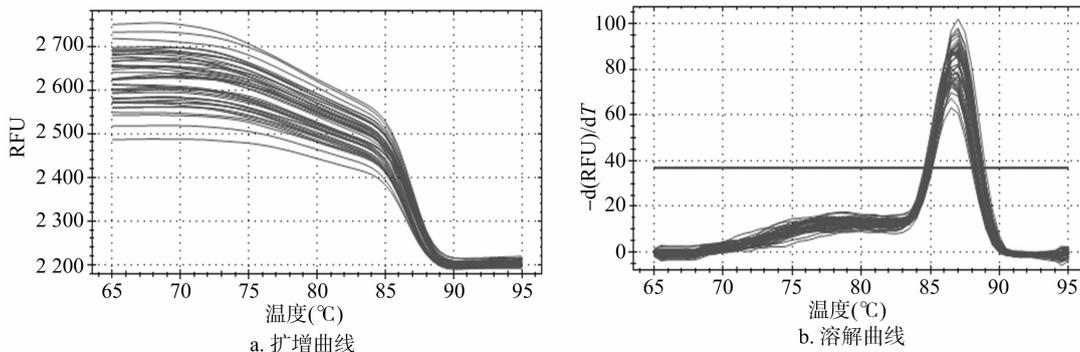


图4 *Moronecidin* 基因扩增曲线与溶解曲线

验时间的延长,对照组肾脏 *Moronecidin* 基因相对表达量有些许变化,但差异不明显。各处理组在感染初期,肾脏 *Moronecidin* 基因表达量均增加,随着处理菌液浓度的升高, *Moronecidin* 基因表达量在 12 h 内均增加;处理 2 在 24 h 达到最高值,而处理 3 在 12 h 与对照相比增加极显著;处理 2 的相对表达量在 12 ~ 48 h 内呈先增加后降低的趋势,处理 3 则持续降低。

2.5.3 肌肉 *Moronecidin* 基因的表达 由图 7 可知,对照组

肌肉中 *Moronecidin* 基因相对表达量变化不明显。与对照组相比,在感染嗜水气单胞菌后,黄鳍肌肉中 *Moronecidin* 基因表达量均升高;处理 1 该基因的表达量随着处理时间的增加而增加,而处理 2 先增加后降低,在感染 24 h 时该基因的相对表达量达最高值,差异极显著,但随着处理时间的延长,该基因表达量又明显下降;处理 3 在感染初期该基因的表达量最高,而后持续下降到对照组水平。

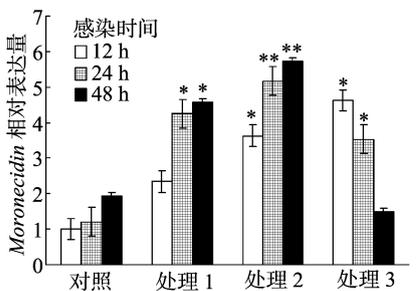


图5 感染嗜水气单胞菌后黄鳍脾脏 *Moronecidin* 基因的相对表达量

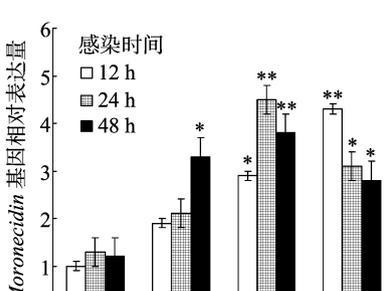


图6 感染嗜水气单胞菌后黄鳍脾脏 *Moronecidin* 基因的相对表达量

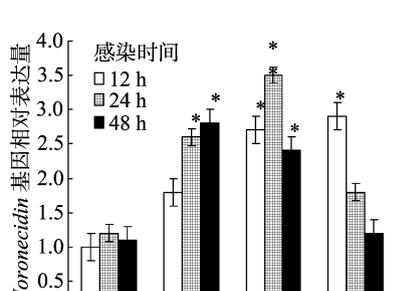


图7 感染嗜水气单胞菌后黄鳍肌肉 *Moronecidin* 基因的相对表达量

### 3 讨论

#### 3.1 *Moronecidin* 基因在不同鱼类器官中的表达量

研究表明, *Moronecidin* 基因在多种健康鱼类的各组织器官(如脾脏、肾脏、肝脏、肌肉、心脏、胃等)中均有表达,但表达量的差异并不显著。用细菌或病毒诱导后, *Moronecidin* 基因表达量显著升高,且在不同器官中的表达量变化情况不同:条石鲷 (*Oplegnathus fasciatus*) 在感染真鲷虹彩病毒后,

*Moronecidin* 基因表达量显著升高,且在脾脏中的表达量最高,在头肾和鳃中次之<sup>[19]</sup>;通过注射杀鲑气单胞菌进行诱导,提高了大西洋鲑鱼 (*Gadus morhua*) 脾脏、头肾中 *Moronecidin* 基因表达量,且脾脏中 24 h 时的表达量变化最显著<sup>[21]</sup>。与前人的研究结果类似,本试验中 *Moronecidin* 基因在健康黄鳍的脾脏、肾脏和肌肉中均有表达,且该基因的表达量在感染嗜水气单胞菌初期均明显上调,随注射菌液的浓度升高而发生显著变化。在脾脏中该基因的表达量相比另外 2 种组织器官

高,其次是肾脏,肌肉中的表达量相对较低。试验结果表明,在鱼类受到病菌感染时,*Moronecidin* 基因在免疫系统中的表达量显著增加,说明其编码的抗菌肽参与了抵抗病菌的侵扰。但对于不同的鱼和感染不同的菌时,其表达量升高的时间和升高的量却有所不同。

### 3.2 *Moronecidin* 基因的表达量与黄鳝脏器功能的相关性

在感染嗜水气单胞菌 48 h 后,处理 2 和处理 3 的 3 种组织器官中 *Moronecidin* 基因表达量均有下降趋势,推测原因可能是感染初期,黄鳝机体的免疫应答功能正常,*Moronecidin* 基因表达量随着感染时间和感染菌浓度的增加逐渐增加;但在感染后期,黄鳝身体的免疫功能不敌病菌的攻击,黄鳝脏器免疫应答能力下降,导致黄鳝抗菌肽合成能力降低。这是影响 *Moronecidin* 基因后期表达量的可能原因之一。

### 3.3 嗜水气单胞菌感染和取材时间的确定

研究表明,黄鳝在感染嗜水气单胞菌 12 h 后就开始表现出出血病的症状<sup>[22]</sup>,其脏器功能受到严重损伤,72 h 后全部死亡<sup>[23]</sup>。本试验根据前人的研究以及预试验的情况,选择在 48 h 内取材,以避免染菌黄鳝全部死亡而无材料可取的问题。

### 参考文献:

[1] Praveen K, Evans D L, Jaso - Friedmann L. Constitutive expression of tumor necrosis factor - alpha in cytotoxic cells of teleosts and its role in regulation of cell - mediated cytotoxicity [ J ]. *Molecular Immunology*, 2006, 43 ( 3 ): 279 - 291.

[2] Chaves - Pozo E, Muñoz P, López - Muñoz A, et al. Early innate immune response and redistribution of inflammatory cells in the bony fish gilthead seabream experimentally infected with *Vibrio anguillarum* [ J ]. *Cell & Tissue Research*, 2005, 320 ( 1 ): 61 - 68.

[3] Mitra A, Foster - Frey J, Rexroad C E, et al. Molecular characterization of lysozyme type II gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): evidence of gene duplication [ J ]. *Animal Biotechnology*, 2003, 14 ( 1 ): 7 - 12.

[4] Wang Q, Wang Y P, Xu P, et al. NK - lysin of channel catfish: gene triplication, sequence variation, and expression analysis [ J ]. *Molecular Immunology*, 2006, 43 ( 10 ): 1676 - 1686.

[5] Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms [ J ]. *Nature*, 2002, 415 ( 6870 ): 389 - 395.

[6] Madera L, Hancock R E. Anti - infective peptide IDR - 1002 augments monocyte chemotaxis towards CCR5 chemokines [ J ]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 464 ( 3 ): 800 - 806.

[7] Scott M G, Dullaghan E, Mookherjee N A, et al. An anti - infective peptide that selectively modulates the innate immune response [ J ]. *Nature Biotechnology*, 2007, 25 ( 4 ): 465 - 472.

[8] Chen W F, Huang S Y, Liao C Y, et al. The use of the antimicrobial peptide piscidin (PCD) - 1 as a novel anti - nociceptive agent [ J ]. *Biomaterials*, 2015, 53: 1 - 11.

[9] Shim D W, Heo K H, Kim Y K, et al. Anti - inflammatory action of an antimicrobial model peptide that suppresses the TRIF - dependent signaling pathway via inhibition of Toll - like receptor 4 endocytosis in lipopolysaccharide - stimulated macrophages [ J ]. *PLoS One*, 2015,

10 ( 5 ): e0126871.

[10] Coorens M, van Dijk A, Bikker F, et al. Importance of endosomal cathelicidin degradation to enhance DNA - Induced chicken macrophage activation [ J ]. *Journal of Immunology*, 2015, 195 ( 8 ): 3970 - 3977.

[11] Silphaduang U, Noga E J. Peptide antibiotics in mast cells of fish [ J ]. *Nature*, 2001, 414 ( 6861 ): 268 - 269.

[12] Lauth X, Shike H, Burns J C, et al. Discovery and characterization of two isoforms of moronecidin, a novel antimicrobial peptide from hybrid striped bass [ J ]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277 ( 7 ): 5030.

[13] Falco A, Brocal I, Pérez L, et al. *In vivo* modulation of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune response by the human alpha defensin 1, HNP1 [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24 ( 1 ): 102 - 112.

[14] Ruangsri J, Salger S A, Caipang C M, et al. Differential expression and biological activity of two piscidin paralogues and a novel splice variant in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32 ( 3 ): 396 - 406.

[15] Iijima N, Tanimoto N, Emoto Y, et al. Purification and characterization of three isoforms of chrysopsin, a novel antimicrobial peptide in the gills of the red sea bream, *Chrysophrys major* [ J ]. *European Journal of Biochemistry*, 2003, 270 ( 4 ): 675 - 686.

[16] Salerno G, Parrinello N, Roch P M. cDNA sequence and tissue expression of an antimicrobial peptide, dicentracin; a new component of the moronecidin family isolated from head kidney leukocytes of sea bass, *dicentrarchus labrax* [ J ]. *Comparative Biochemistry & Physiology Part B Biochemistry & Molecular Biology*, 2007, 146 ( 4 ): 521 - 529.

[17] Pan C Y, Chen J Y, Cheng Y S, et al. Gene expression and localization of the epinecidin - 1 antimicrobial peptide in the grouper (*Epinephelus coioides*), and its role in protecting fish against pathogenic infection [ J ]. *DNA & Cell Biology*, 2007, 26 ( 6 ): 403 - 413.

[18] Cole A M, Weis P, Diamond G. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder [ J ]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272 ( 18 ): 12008 - 12013.

[19] Bae J S, Shim S H, Hwang S D, et al. Expression analysis and biological activity of moronecidin from rock bream, *Oplegnathus fasciatus* [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 40 ( 2 ): 345 - 353.

[20] 王霞, 方晨, 韦明武, 等. 嗜水气单胞菌感染对黄鳝 hepcidin 抗菌肽基因表达的影响 [ J ]. *水产科学*, 2015, 34 ( 12 ): 773 - 777.

[21] Feng C Y, Johnson S C, Hori T S, et al. Identification and analysis of differentially expressed genes in immune tissues of Atlantic cod stimulated with formalin - killed, atypical *Aeromonas salmonicida* [ J ]. *Physiological Genomics*, 2009, 37 ( 3 ): 149.

[22] 何智, 任红梅, 杨德英, 等. 嗜水气单胞菌源黄鳝出血病的组织病理学研究 [ J ]. *淡水渔业*, 2010, 40 ( 4 ): 56 - 61.

[23] 彭彬, 杨光友, 陈晓利, 等. 黄鳝出血病病原菌的分离与鉴定 [ J ]. *淡水渔业*, 2011, 41 ( 3 ): 72 - 76.