

日本鳗鲡嗜水气单胞菌的分离鉴定与 免疫相关基因变化的研究

何 乐^{1,2}, 翟少伟^{1,2}, 冯建军^{1,2}, 江兴龙^{1,2}, 肖益群^{1,2}, 郭松林^{1,2}

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心, 福建 厦门 361021)

[摘要] 2018年1—2月, 饲养于集美大学疫苗中心的日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)出现了一定数量的死亡, 从病鱼脾脏中分离到一株优势菌株, 结合 Biolog 系统微生物鉴定和分离菌 16S rRNA 基因的测序结果, 显示该分离菌为嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)。采集自然感染嗜水气单胞菌前后的日本鳗鲡肝、脾、肾和粘液为 cDNA 模板, 采用荧光定量 PCR (real-time PCR) 法检测组织中 Toll 样受体 3 (*tlr3*)、肿瘤坏死因子 (*tnf-α*)、C 型溶菌酶 (*lysC*) 和环氧化酶 (*cox2*) 等免疫相关基因的表达变化。结果表明: 日本鳗鲡自然感染嗜水气单胞菌后, *tlr3*、*tnf-α*、*cox2* 均未发现显著性的变化, 但 *lysC* 的含量在日本鳗鲡脾脏和肾脏中均出现显著性上调, 即, 自然感染嗜水气单胞菌的日本鳗鲡的抗感染免疫功能与 C 型溶菌酶密切相关。

[关键词] 日本鳗鲡; 嗜水气单胞菌; 自然感染; 免疫相关基因

[中图分类号] S 917.1

Isolation and Identification of Pathogenic *Aeromonas hydrophila* from Japanese Eel (*Anguilla japonica*) and the Different Expression of Immune Related Genes After Eels Naturally Infected by *A. hydrophila*

HE Le^{1,2}, ZHAI Shaowei^{1,2}, FENG Jianjun^{1,2}, JIANG Xinglong^{1,2}, XIAO Yiqun^{1,2}, GUO Songlin^{1,2}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Engineering Research Center of the Modern Industry Technology for Eel, Ministry of Education, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: From January to February in 2018, some Japanese eel farmed in the vaccine center of Jimei University (Fujian Province, China) at 25 °C was infected by bacterial pathogens and showed a certain number of deaths. A dominant bacteria strain was isolated from the spleen of the diseased eels. By Biolog identification and 16S rRNA gene sequence analysis, the strain was identified as *Aeromonas hydrophila*. Then, RNA from kidney, spleen, liver and mucus of 5 diseased and 5 uninfected eels were extracted to detect the expressions of *tnf-α*, *lysC*, *cox2* and *tlr3* genes by quantitative real-time PCR. The results showed that the expression of *lysC* was significantly up-regulated between the infected and uninfected eels in spleen and kidney, but no significant difference was found in *tnf-α*, *cox2* and *tlr3* genes. The result indicated that the C-type lysozyme was closely related to the anti-infection immune function of Japanese eels naturally infected by *A. hydrophila*.

[收稿日期] 2018-05-26

[基金项目] 现代农业产业技术体系专项资金项目 (EARS-46); 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心开放课题 (RE201703)

[作者简介] 何乐 (1995—), 男, 硕士生, 从事鱼类病害与免疫防治研究。通信作者: 郭松林 (1976—), 教授, 硕导, 从事鱼类病害与免疫防治相关研究。E-mail: gsl@jmu.edu.cn

Keywords: Japanese eel; *Aeromonas hydrophila*; natural infection; immune-related gene

0 引言

鳗 (*Anguilla* spp.), 俗称鳗鲡, 隶属于鳗鲡目鳗鲡科。鳗鲡广泛分布于全球热带、亚热带和温带地区^[1], 是中国重要的出口创汇农产品之一^[2]。日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 经济价值高、味道鲜美、营养丰富, 深受我国和日本市场的欢迎。由于日本鳗鲡的苗种过度依赖于捕捞, 近年来该物种年产量严重下降^[3]。实际上, 集约化养殖导致日本鳗鲡细菌性疾病的发生日益频繁, 因此也严重影响了鳗鲡的养成^[4]。嗜水气单胞菌是鳗鲡重要的致病菌, 常见鳗鲡感染后出现败血症的报道^[5]。

有研究表明, 真骨鱼类的免疫反应过程受多个基因的调控^[6], 这些基因被称为免疫相关基因。近年来, 通过对鱼类接种灭活疫苗的研究发现了一些抗细菌感染相关的基因。使用福尔马林灭活的柱状黄杆菌免疫草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 后, 其肝、脾和头肾中的主要组织相容性抗原 (*mhc* - I)、肿瘤坏死因子 (*tnf* - α)、白细胞介素 (*il* - 1 β) 和干扰素 (*ifn* - I) 等 4 种基因的表达水平均发生不同程度的变化^[7]。有人将嗜水气单胞菌和大肠杆菌粗制脂多糖分别经腹腔注射草鱼, 结果发现, 免疫组草鱼头肾、脾脏、肾脏、肝脏和肠组织中多种免疫相关基因均出现不同程度的变化^[6]。已有的研究大多是通过人工感染鱼类得到 *tnf* - α 、*tlr4* 和 *lysC* 等相关免疫基因的变化^[6,8], 而日本鳗鲡的 *cox2* 基因虽然已经获得, 但是没有进一步的研究。迄今为止, 未见日本鳗鲡自然感染嗜水气单胞菌后对其免疫相关基因表达水平影响的相关报道。

由于患细菌性疾病的养殖鳗鲡常死于自然感染, 故研究日本鳗鲡自然状态下被细菌感染后的抗感染机制具有重要意义。本研究从自然发病的养殖日本鳗鲡脾脏中分离到 1 株嗜水气单胞菌, 以自然感染嗜水气单胞菌前后的日本鳗鲡不同组织的 cDNA 为模板, 研究已知的日本鳗鲡 4 种免疫相关基因的变化水平, 为鳗鲡抵抗嗜水气单胞菌感染的相关机制研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 样本来源

100 尾健康的日本鳗鲡购自福建省福清市某养殖场, 体重约为 (50 ± 10) g。分别饲养于集美大学疫苗中心的 4 个水族箱中, 每箱 25 尾, 每天换水, 全天 24 h 充氧, 水温控制在 25 ℃ 左右。投饵量为鳗鲡体重的 0.5%, 每天投喂 1 次。鳗鲡饲养 5 d 后, 取 5 条鳗鲡作为健康鳗鲡的 cDNA 模板。鳗鲡饲养约 14 d 后发现 30% 的日本鳗鲡出现脱黏症状 (见图 1)。取 5 尾出现明显症状的发病鳗鲡用于模板 cDNA 的分离。



图 1 日本鳗鲡感染嗜水气单胞菌后体表粘液严重脱落
Fig.1 The typical symptoms of Japanese eels infected with *A. hydrophila*, it showed obvious mucus shedding

1.2 细菌的分离与培养

无菌操作下, 用接种环挑取自然感染且具有典型患病症状的日本鳗鲡脾脏组织直接接种于胰蛋白胨大豆琼脂 (TSA) 平板上 (接种过程在超净工作台中严格按照操作流程进行无菌操作), 30 ℃ 孵育 24 h 后, 挑取平板上的单菌落, 并在 TSA 上划线以获得细菌的纯培养, 将纯化的细菌菌落保存于 TSA 琼脂试管斜面, 同时将其余纯培养物移至含有 20% 甘油的 TSB 肉汤中, 置于 -70 ℃ 冻存。

1.3 分离菌株的 16S rRNA 基因序列系统发育分析

1.3.1 细菌基因组 DNA 的提取

将分离到的细菌接种于培养基中 (TSB), 于摇床中培养 24 h (30 ℃)。取适量菌液 (1 mL), 离

心 5 min (12 000 r/min) 后弃上清。按照基因组 DNA 提取试剂盒 (GENERAY, 上海) 的操作手册, 提取细菌基因组。

1.3.2 16S rRNA 基因的扩增及 PCR 产物的纯化

参考相关文献^[9], 使用通用引物扩增分离菌的 16S rRNA 基因片段。引物 (GENERAY, 上海) 分别为 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R: 5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'。采用 ExTaq 聚合酶 PCR 反应试剂盒进行 PCR 扩增, PCR 反应条件为: 首先 95 ℃ 预变性 5 min; 然后进行 35 个循环, 分别为 95 ℃ (30 s), 55 ℃ (30 s), 72 ℃ (60 s); 最后 72 ℃ 彻底延伸 7 min。反应完成后, 待 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳后切下目的条带, 按照柱式 DNA 胶回收试剂盒的操作步骤回收 PCR 产物 (GENERAY, 上海)。回收产物送至厦门铂瑞生物科技有限公司进行测序分析。

表 1 Real time PCR 中所用引物
Tab. 1 Primers used in real time PCR

引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence (5'—3')	退火温度/℃ Annealing temperature	登录号 GenBank
<i>tlr3</i> -F <i>tlr3</i> -R	TGTGGTTCGTCAACTGGCT TGCGACATAGAGGGCGTAGA	55 55	KJ726740
<i>lysC</i> -F <i>lysC</i> -R	CCAAGCGTGTGGTCAGAGAT TGAGCCTTTGTGAGTGTGTCG	55 55	KM454476. 1
<i>tnf-α</i> -F <i>tnf-α</i> -R	TGAGCACCAGCAGAACTTGAA GTGCATAGAACTCGGAATGAGACT	55 55	JQ793636. 1
<i>cox2</i> -F <i>cox2</i> -R	GGAAATGGGAGCCCCTTACT GTTGGTTGTGTCCGCTGTA	55 55	KP888157. 1
<i>β-actin</i> -F <i>β-actin</i> -R	AATCCACGAGACCACCTTCAA GTTGGCGTACAGGTCCTTACG	55 55	GU001950. 1

1.3.3 序列分析与数据处理

使用 BLAST 检索工具对分离菌的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 数据库中进行相似性比对分析 (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。选取其中 8 种嗜水气单胞菌和 18 种本实验室分离到的气单胞菌序列, 并且根据《伯杰氏细菌鉴定手册》选取了 19 种其他种类的气单胞菌序列^[10], 然后使用 MEGA 5.0 软件, 通过邻接法^[11]建立细菌的系统发育树。

1.4 细菌生理生化鉴定

根据杭州滨和微生物有限公司的细菌微量生化反应管使用说明, 首先参考文献 [12] 对细菌纯化培养物基本生理指标进行初步测定, 包括: 葡萄糖产气、七叶苷、赖氨酸、精氨酸、甘露醇、蔗糖、V-P 反应、纤维二糖和鸟氨酸, 然后通过使用 Biolog 微孔板 (Biolog, 美国) 进行物种水平的鉴定。简而言之, 让纯化的细菌在 Biolog 专用培养基琼脂平板上生长。从琼脂平板表面选取 1 个细菌单菌落, 并在配套的接种液 (IF-A) 中悬浮至一定浓度。采用 12 道加样枪将细菌悬浮液移到专用的 96 孔微孔培养板中 (100 μL/孔)。微孔板置于生化培养箱, 30 ℃ 孵育 24 h。用 Biolog MicroStation™ 系统读取微板并与数据库中已有细菌的 95 个生化指标进行比较, 从而根据相似性鉴定细菌。

1.5 免疫相关基因的表达分析

分别取 5 尾健康和 5 尾患病的日本鳎, 用 1 × 10⁻⁵ 的丁香酚麻醉后, 迅速取粘液、肝、脾、肾等组织置于 RNA 保护液 (TIANGEN, 北京) 中, 并转移至超低温冰箱中保存备用。采用 RNA 提取试剂盒 (Promega, 美国) 提取各组织的总 RNA, 将总 RNA 样品进行 DNA 酶 I 处理, 运用核酸测定仪和 1.0% 的琼脂电泳检测总 RNA 样品的浓度和纯度。然后采用 PrimeScript™ 第一链 cDNA 试剂盒 (Promega, 美国) 合成 cDNA (操作过程参考说明书), 合成的 cDNA 保存于 -70 ℃。在定量板中加

入配制好的 10 μ L 反应体系：SYBR GreenSuperMix 5 μ L，超纯水 3.6 μ L，cDNA 模板 1 μ L，正向和反向引物（见表 1）各 0.2 μ L。根据说明书在 LightCycle480 系统（Roche，德国）上进行所有样品的扩增，简而言之，将 10 μ L 的反应体系 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s，然后进行 40 个循环（分别为 95 $^{\circ}$ C，10 s；55 $^{\circ}$ C，25 s；72 $^{\circ}$ C，15 s），最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。所得试验原始数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法处理完成后，将处理完成后的数据用 SPSS 22.0 进行单因素方差分析，以所得数据的平均值 \pm 标准误 (mean \pm S. E) 为依据作图。

2 结果

2.1 分离菌株的形态特征

分离菌株在 TSA 平板上菌落呈淡黄色、圆形，且边缘整齐（见图 2）。在电镜下观察到其菌落形态呈短杆状，类似椭圆形，具极生鞭毛（见图 3）。

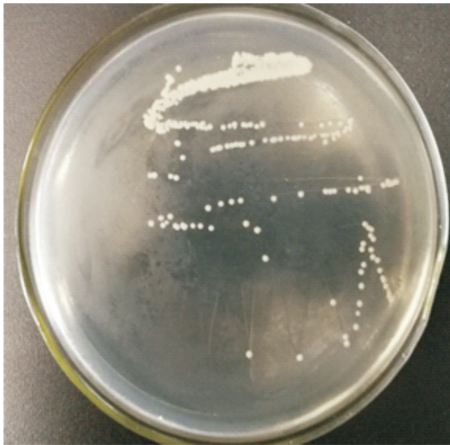


图 2 B101 菌株在 TSA 平板上的菌落形态
Fig.2 The morphological characteristics of strain B101 in TSA plate

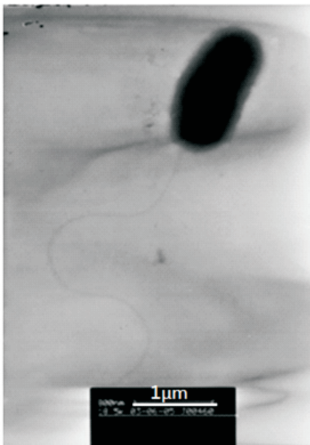


图 3 B101 菌株在电镜下的菌体形态
Fig.3 The morphological characteristics of strain B101 by electro microscope

2.2 分离菌株的 16S rRNA 基因序列的系统发育分析

将基因测序得到的分离菌的 16S rRNA 部分基因序列，通过 NCBI - blast 进行相似性比对后，发现分离菌与嗜水气单胞菌的相似性（99%）最高，系统发育树的结果也显示了分离菌与嗜水气单胞菌聚在一组中（见图 4）。

2.3 分离菌株的生理生化鉴定

本次研究对分离菌进行初步检测的结果为葡萄糖产气，七叶苷、赖氨酸、精氨酸、甘露醇、蔗糖和 V - P 反应为阳性，纤维二糖和鸟氨酸为阴性。而 Biolog 自动微生物鉴定系统鉴定分离菌与嗜水气单胞菌的鉴定可能性（PROB）为 0.589，相似性指数（SIM）为 0.589，位距（DIST）为 6.037，嗜水气单胞菌部分特征性生理生化指标见表 2。结合分子鉴定结果确定该分离菌为嗜水气单胞菌。

2.4 免疫基因表达分析

在肝脏中，各基因的表达如图 5a 表示，与自然状态（健康状态）相比，*tlr3* 基本没有变化，*tnf* 有一定程度的上调，*cox2* 和 *lysC* 呈现一定程度的下降。在脾脏中，各基因的表达如图 5b 表示，*tlr3*、*tnf* - α 和 *cox2* 都呈现出一定程度的上调，*lysC* 出现显著性的上调。在肾脏中，各基因的表达如图 5c 表示，*tlr3*、*tnf* - α 和 *cox2* 呈现出一定程度的上调，*lysC* 出现显著性的上调。在粘液中，各基因的表达如图 5d 表示，*tlr3*、*cox2* 和 *lysC* 呈现出一定程度的上调，*tnf* 出现一定程度的下降。

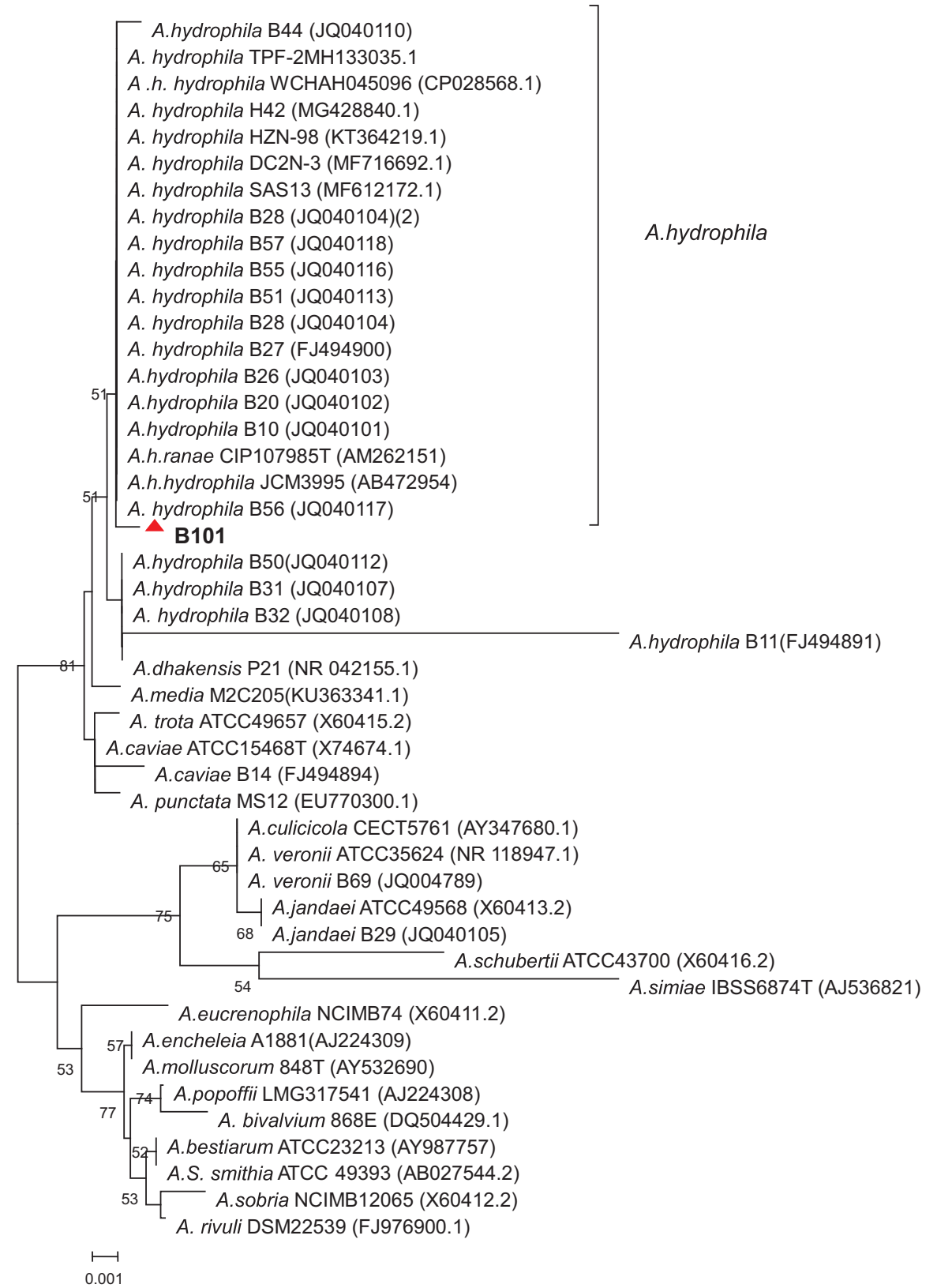


图 4 基于 46 种序列构建的 16S rRNA 基因序列系统发育树

Fig.4 Phylogenetic reconstructions based on individual analyses of the 16S rRNA of 46 sequences using the neighbour-joining method

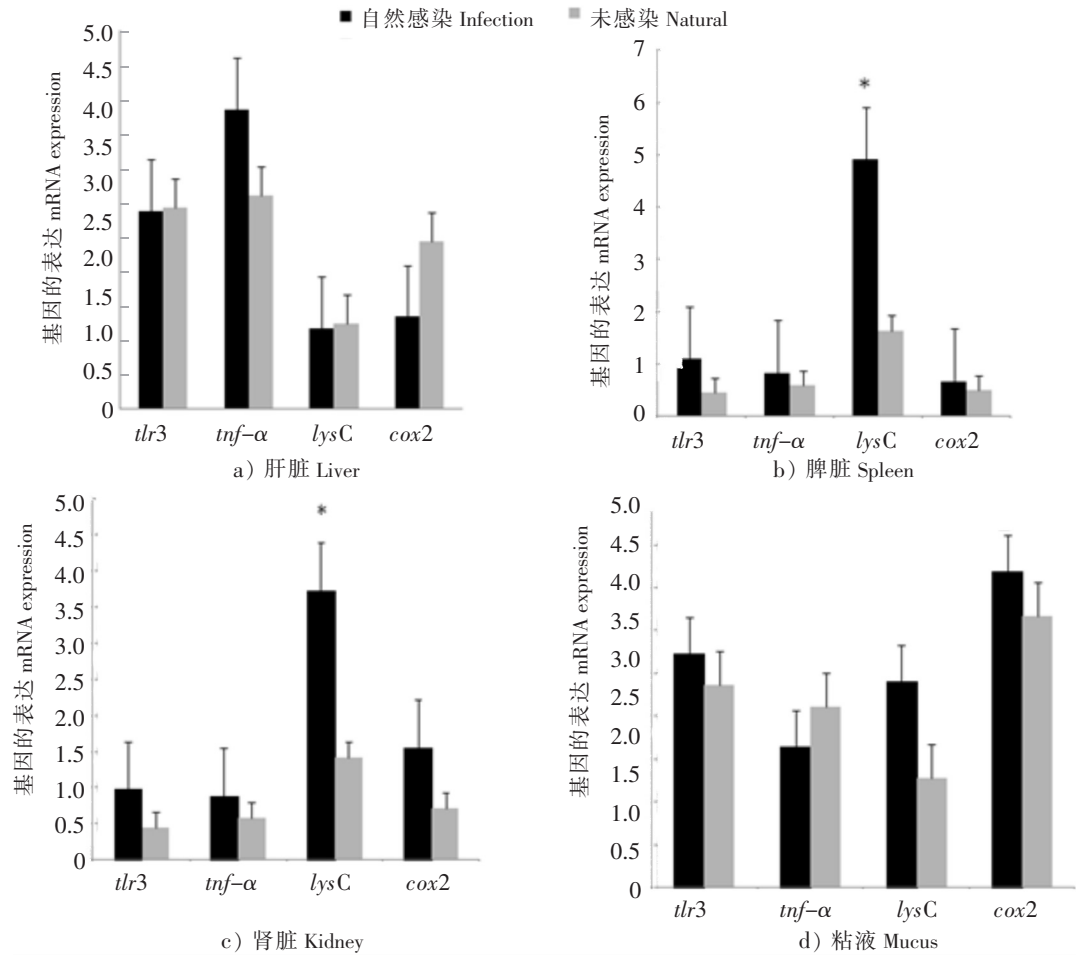
表 2 分离菌与嗜水气单胞菌的生化特征

Tab. 2 Biochemical characteristics of the isolated strain and *Aeromonas hydrophila*

测试项目 Test items	分离菌 The isolated bacteria	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	测试项目 Test items	分离菌 The isolated bacteria	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>
糊精 Dextrin	+	+	<i>L</i> - 天冬氨酸 <i>L</i> - aspartic acid	+	+
<i>D</i> - 麦芽糖 <i>D</i> - maltose	+	+	果胶 Pectin	+	B
<i>D</i> - 海藻糖 <i>D</i> - cellobiose	+	B	<i>L</i> - 丝氨酸 <i>L</i> - serine	+	+
<i>D</i> - 纤维二糖 <i>D</i> - cellobiose	-	B	林可霉素 Lincomycin	+	+
蔗糖 Sucrose	+	+	盐酸胍 Guanidine HCl	+	+
水苏糖 Stachyose	-	-	硫酸四癸钠 C ₁₄ H ₃₀ NaSO ₄	+	+
阳性对照 Positive control	+	+	<i>D</i> - 葡萄糖酸 <i>D</i> - gluconic acid	B	+
pH = 6	+	+	<i>D</i> - 葡萄糖醛酸 <i>D</i> - glucuronic acid	-	-
<i>D</i> - 棉籽糖 <i>D</i> - raffinose	-	-	葡萄糖醛酰胺 Glucuronamide	-	-
α - <i>D</i> - 乳糖 α - <i>D</i> - lactose	-	-	粘酸 Mucic acid	-	-
β - 甲基 - <i>D</i> - 葡萄糖苷 β - methyl - <i>D</i> - glucoside	+	+	奎尼酸 Quinic acid	-	-
<i>N</i> - 乙酰 - <i>D</i> - 氨基葡萄糖 <i>N</i> - acetyl - <i>D</i> - glucosamine	+	+	万古霉素 Vancomycin	+	+
<i>N</i> - 乙酰 - β - <i>D</i> - 氨基甘 露醇 <i>N</i> - acetyl - β - <i>D</i> - mannosamine	B	B	四唑紫 Tetrazolium violet	B	B
<i>N</i> - 乙酰 - <i>D</i> - 半乳糖胺 <i>N</i> - acetyl - <i>D</i> - galactosamine	+	+	四唑蓝 Tetrazolium blue	+	+
<i>D</i> - 水杨甙 <i>D</i> - salicin	-	B	对羟基苯乙酸 p - hydroxy - phenylacetic	-	-
α - <i>D</i> - 葡萄糖 α - <i>D</i> - glucose	+	+	柠檬酸 Citric acid	-	+
<i>D</i> - 甘露糖 <i>D</i> - mannose	+	B	<i>D</i> - 苹果酸 <i>D</i> - malic acid	-	-
<i>D</i> - 果糖 <i>D</i> - fructose	+	+	右旋乳酸 <i>D</i> - malic acid	B	B
<i>D</i> - 半乳糖 <i>D</i> - galactose	+	+	醋酸 Acetic acid	B	+
1% 乳酸钠 1% Sodium lactate	+	+	α - 羟基丁酸 α - hydroxy - butyric	B	B
<i>D</i> - 丝氨酸 <i>D</i> - serine	+	+	乙酰乙酸 Acetoacetic acid	B	B
<i>D</i> - 甘露醇 <i>D</i> - mannitol	+	+	丁酸钠 Butyrate - sodium	+	+
甘油 Glycerol	+	+	利福霉素 SV Rifamycin SV	+	+
<i>D</i> - 葡萄糖 - 6 - 磷酸 <i>D</i> - glucose - 6 - PO ₄	+	+	明胶 Gelatin	+	+
<i>D</i> - 果糖 - 6 - 磷酸 <i>D</i> - fructose - 6 - PO ₄	B	+	醋竹桃霉素 Oleandomycin	+	+

说明：“+”为阳性；“-”为阴性；“B”为临界值。

Notes：“+” is postive；“-” is negative；“B” is borderline.



说明:各组数据以平均值±标准误差显示(n=5),星号表示感染嗜水气单胞菌与自然状态(健康状态)比较有显著差异(P<0.05)。

Notes: Data are expressed as mean ± S.E.(n=5),asterisks indicate that the significantly difference from the natural state(healthy state) at P<0.05.

图 5 自然感染嗜水气单胞菌后日本鳗鲡的肝脏、脾脏、肾脏和粘液中 *tlr3*、*tnf-α*、*lysC* 和 *cox2* 四种免疫基因的表达

Fig.5 Expression of *tlr3*、*tnf-α*、*lysC* and *cox2* in liver,spleen,kidney and mucus of Japanese eel after natural infection with *A. hydrophila*

3 讨论

3.1 嗜水气单胞菌的危害

嗜水气单胞菌隶属于气单胞菌科 (*Aeromonadaceae*) 气单胞菌属 (*Aeromonas*), 可以感染一系列脊椎动物, 包括人类、爬行动物和鱼类^[13], 是水产养殖中常见的病原菌。该菌可引起水产动物出现败血症, 而且还常与其他病原菌共同感染, 已经对水产养殖业造成了严重的经济损失^[14]。近年来, 关于青鱼 (*Mylopharyngodon piceus*)^[15]、黄沙鳖 (*Truogx sinensis*)^[16]、红点鲃 (*Salvelinus fominalis*)^[17] 受嗜水气单胞菌感染并且致病的研究已有报道。

3.2 分离菌株的鉴定

现今鉴定微生物最常用的方法就是生化鉴定和 16S rRNA 基因的序列分析。由于 16S rRNA 基因在细菌菌属 (种) 内高度保守, 几乎可以对所有的细菌鉴定到属^[18], 但是由于其对同源种类无法准确区分, 不能准确反映关系较近的物种间的关系^[19], 所以需要其他鉴定方法作进一步的鉴定。Biolog 自动微生物鉴定系统检测细菌的原理是通过细菌对糖、醇、酸、醋、胺和大分子聚合物等 95 种碳源

的利用情况进行判定^[20],多应用于土壤和环境中微生物的检测^[21],此方法快速、简单,并且省却了配多种培养基的工作。本研究从患病的日本鳗鲡脾脏中分离纯化得到一株优势菌株,在 16S rRNA 基因系统发育树中,显示 B101 菌株与已报道的嗜水气单胞菌聚为一支,但是与本实验室分离到的 B50、B31、B32 和 B11 没有聚到一起,推测可能是细菌来源与毒力差异所致。分离菌的初步生理生化鉴定结果显示葡萄糖、麦芽糖、蔗糖和甘露醇等嗜水气单胞菌的重要鉴定指标均与杨宁等^[22]的鉴定结果一致。Biolog 鉴定结果中有 3 种重要的参数,即 PROB 值、SIM 值和 DIST 值,其中 SIM 值 ≥ 0.75 ,DIST 值 ≤ 0.50 ,PROB 值越接近 1 越好^[23],而本次研究结果显示分离菌与嗜水气单胞菌的 PROB 值为 0.589,SIM 值为 0.589,DIST 值为 6.237。参照《伯杰氏细菌鉴定手册》^[10]发现分离菌株的蔗糖、纤维二糖、水杨甙、山梨醇、醋酸、柠檬酸和果胶均与嗜水气单胞菌不同,而葡萄糖、D-麦芽糖、甘露糖、甘露醇、明胶、麦芽糖、棉子糖、乳糖和葡萄糖苷等重要指标的鉴定结果与嗜水气单胞菌的一致,说明 Biolog 系统虽鉴定结果为嗜水气单胞菌,但还存在一些差异。由于 Biolog 鉴定系统的参考菌株来自欧美等国,故这些差异很可能源于菌株来源的地域差异。结合本研究的生化鉴定和分子生物学鉴定结果,可以确定分离菌株为嗜水气单胞菌。

3.3 嗜水气单胞菌自然感染后对免疫相关基因表达的影响

鱼类免疫系统的主要功能是帮助机体识别和清除异物,以及防御和维护自身稳定。鱼类作为低等脊椎动物,同样具有非特异性和特异性免疫应答机制^[24]。本次研究选取健康和自然感染嗜水气单胞菌的日本鳗鲡组织作为 cDNA 模板,进行荧光定量 PCR,检测 *tlr3*、*tnf- α* 、*lysC* 和 *cox2* 免疫基因的变化。*tlr3* 位于细胞器膜上,是一种重要的病毒识别受体^[25],是由 T 细胞分泌的,可以参与机体炎症与免疫应答的调节,有发挥促进细胞进行一系列新陈代谢的作用^[26]。本次研究结果显示日本鳗鲡在感染嗜水气单胞菌后 *tlr3* 和 *tnf- α* 基本没有显著性的变化。Liu 等^[27]的研究结果表明牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 和虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 感染嗜水气单胞菌后, *tlr3* 没有显著性的变化。彭小云等^[6]研究发现草鱼在注射嗜水气单胞菌粗脂多糖后,其 *tnf- α* 也没有显著性的变化。本研究表明自然感染嗜水气单胞菌的日本鳗鲡 *tlr3* 和 *tnf- α* 不会产生显著性变化。溶菌酶被认为是鱼类中重要的抗菌分子之一,可以在机体免疫过程中加快细菌的死亡^[28],而 C 型是溶菌酶的一个类型。本研究结果显示 *lysC* 在病鳗的不同组织中呈现不同程度的上调,尤其是在肾脏和脾脏中出现显著性的升高,Ye 等^[8]曾研究过草鱼在感染嗜水气单胞菌后 *lysC* 在不同组织中出现一定程度的上调,推测这是由于物种或者感染途径不同所致。*cox2* 参与许多生物学和病理学过程,例如细胞的新陈代谢、免疫应答和防止外来物质入侵^[29]。本研究结果显示自然感染嗜水气单胞菌的日本鳗鲡 *cox2* 不会产生显著变化。*cox2* 在鱼类中感染嗜水气单胞菌的研究较少,有待进一步的研究。

4 结论

综上所述,自然感染嗜水气单胞菌的日本鳗鲡, *tlr3*、*tnf- α* 和 *cox2* 没有显著性的变化, *lysC* 则会出现不同程度的上调,尤其是在脾脏和肾脏中,说明 *lysC* 可以作为感染嗜水气单胞菌疾病的检测指标。

[参 考 文 献]

- [1] 罗鸣钟,关瑞章,李忠琴,等. 五种养殖鳗鲡鱼皮的氨基酸组成分析及评价 [J]. 营养学报, 2013, 35(4): 403-405.
- [2] 娄甜甜,齐兴柱,尹绍武,等. 鳗鲡种质资源的研究进展 [J]. 水产科学, 2007, 26(6): 366-369.
- [3] HAKOYAMA H, FUJIMORI H, OKAMOTO C, et al. Compilation of Japanese fisheries statistics for the Japanese eel, *Anguilla japonica*, since 1894: a historical dataset for stock assessment [J]. Ecological Research, 2016, 31(2): 1.
- [4] 樊海平,徐娟儿,黄晓汎. 福建省养殖鳗鲡细菌性疾病的调查与防治 [J]. 海洋湖沼通报, 1996(2): 66-70.
- [5] 杨求华. 养殖鳗鲡致病性气单胞菌的分离与鉴定 [D]. 厦门:集美大学, 2012.
- [6] 彭小云,刘红,陈孝煊,等. 嗜水气单胞菌和大肠杆菌 LPS 对草鱼免疫相关基因表达的影响 [J]. 华中农业大

学学报, 2014, 33(1): 67-72.

- [7] 刘毅, 隗黎丽, 李莉, 等. 福尔马林灭活柱状黄杆菌对草鱼免疫相关基因表达的影响 [J]. 水生生物学报, 2008, 32(6): 794-801.
- [8] YE X, ZHANG L, TIAN Y, et al. Identification and expression analysis of the g-type and c-type lysozymes in grass carp *Ctenopharyngodon idellus* [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2010, 34(5): 501-509.
- [9] 郭松林. 鳎鲷病原菌的分类鉴定及相关免疫基础研究 [D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2006.
- [10] KRIEG N R, HOLT J G. Bergey's manual of determinative bacteriology [M] //Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994: 520-521.
- [11] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Molecular Biology & Evolution, 2007, 24(8): 1596.
- [12] 马子行, 余传霖. 气单胞菌属的分类和鉴定 [J]. 微生物与感染, 1992(1): 25-28.
- [13] JANDA J M, ABBOTT S L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity and infection [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2010, 23(1): 35-73.
- [14] 郭闯, 王永坤. 嗜水气单胞菌研究进展 [J]. 水产科学, 2003, 22(6): 48-51.
- [15] 梁利国, 谢骏. 青鱼病原嗜水气单胞菌分离鉴定、毒力因子检测及药敏试验 [J]. 生态学杂志, 2013, 32(12): 3236-3242.
- [16] 黄钧, 黄艳华, 胡大胜, 等. 黄沙鳖白底板病病原菌的分离鉴定及6种毒力基因检测 [J]. 水生生物学报, 2013, 37(5): 844-854.
- [17] 巴翠玉, 张雅斌, 杜晓燕, 等. 美洲红点鲑嗜水气单胞菌的分离鉴定及药敏试验 [J]. 中国兽医杂志, 2017, 53(1): 96-99.
- [18] DALSGAARD I, HØI L, SIEBELING R J, et al. Indole-positive *Vibrio vulnificus* isolated from disease outbreaks on a Danish eel farm [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1999, 35(3): 187-94.
- [19] WARD D M, WELLER R, BATESON M M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community [J]. Nature, 1990, 345 (6270): 63-65.
- [20] BOCHNER B. Breathprints at the microbial level [J]. Asm News, 1989, 55: 536-539.
- [21] RUTGERS M, WOUTERSE M, DROST S M, et al. Monitoring soil bacteria with community-level physiological profiles using BiologTM ECO-plates in the Netherlands and Europe [J]. Applied Soil Ecology, 2016, 97: 23-35.
- [22] 杨宁, 黄海, 张希, 等. 尼罗罗非鱼嗜水气单胞菌病的病原分离鉴定和药敏试验 [J]. 水产科学, 2014, 33(5): 306-310.
- [23] 刘宏媛, 李光辉, 罗惠波, 等. 大曲中酵母菌的分离及 Biolog 微生物系统分析鉴定 [J]. 食品与发酵科技, 2011, 47(1): 1-3.
- [24] 唐玫, 马广智. 鱼类免疫学研究进展 [J]. 免疫学杂志, 2002, 18(B06): 112-116.
- [25] 乔玮, 李言伟, 李安兴. 斜带石斑鱼 TLR3 基因的克隆及其在刺激隐核虫感染时的表达分析 [J]. 水生生物学报, 2012, 36(3): 385-392.
- [26] 卢翠玉, 李炎, 刘庆慧, 等. 免疫刺激诱导草鱼肿瘤坏死因子 TNF- α 的体外表达特征研究 [J]. 水生生物学报, 2016, 40(3): 481-487.
- [27] LIU F, TANG X, SHENG X, et al. Comparative study of the vaccine potential of six outer membrane proteins of *Edwardsiella tarda* and the immune responses of flounder (*Paralichthys olivaceus*) after vaccination [J]. Veterinary Immunology & Immunopathology, 2017, 185: 38-47.
- [28] 汤菊芬, 吴灶和, 简纪常, 等. 注射黄芪多糖对吉富罗非鱼 C 型溶菌酶基因表达量的影响 [J]. 广东海洋大学学报, 2011, 31(1): 58-61.
- [29] LIANG R, YAN X X, LIN Y, et al. Functional polymorphisms of the cyclooxygenase-2 gene and prognosis of hepatocellular carcinoma-a cohort study in Chinese people [J]. Genetics & Molecular Research Gmr, 2016, 15(2). DOI:10.4238/gmr.15028093.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)