

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210406001

http://www.yyxxjz.cn/

朱鑫海, 张紫瑞, 周丽颖, 汤环宇, 敖士齐, 周一凡, 高晓建, 姜群, 张晓君. 嗜水气单胞菌感染翘嘴鳊头肾转录组分析. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 208–217  
ZHU X H, ZHANG Z R, ZHOU L Y, TANG H Y, AO S Q, ZHOU Y F, GAO X J, JIANG Q, ZHANG X J. Transcriptomic analysis of the head kidney of *Siniperca chuatsi* infected with *Aeromonas hydrophila*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 208–217

## 嗜水气单胞菌感染翘嘴鳊头肾转录组分析\*

朱鑫海 张紫瑞 周丽颖 汤环宇 敖士齐 周一凡  
高晓建 姜 群 张晓君<sup>①</sup>

(扬州大学动物科学与技术学院 江苏 扬州 225009)

**摘要** 嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是严重危害翘嘴鳊(*Siniperca chuatsi*)养殖生产的主要病原之一,为揭示嗜水气单胞菌感染翘嘴鳊后宿主基因表达水平的变化,筛选免疫相关基因,解析翘嘴鳊应答病原细菌感染的分子机制,本研究以病原嗜水气单胞菌感染翘嘴鳊,于感染 24 h 后,采集感染组与对照组翘嘴鳊头肾组织,采用 Illumina Hiseq 2000 进行了 RNA-Seq 分析,原始数据拼接后组装共获得 53 040 个单基因(unigene)。基因差异表达分析结果显示,感染组和未感染组翘嘴鳊存在 526 个差异表达基因,包括 254 个上调基因和 272 个下调基因,其中,免疫相关的显著上调的差异基因主要有炎症和免疫原性细胞因子白介素、补体系统、MHC I 型抗原提呈、溶菌酶、丝氨酸蛋白酶抑制因子、泛素蛋白连接酶等。GO 富集分析发现,差异基因主要涉及免疫应答反应和炎症反应等,经 KEGG 富集分析显示,89 个通路富集显著,免疫相关的代谢通路主要有内吞作用和吞噬体等。此外,实时荧光定量 PCR 验证结果表明,所选取 7 个差异表达免疫相关基因与 RNA-seq 结果具有相似的表达趋势。本研究为揭示翘嘴鳊对病原微生物感染的防御分子机制奠定了理论基础。

**关键词** 翘嘴鳊;嗜水气单胞菌;转录组;差异表达基因

**中图分类号** S917.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)04-0208-10

翘嘴鳊(*Siniperca chuatsi*)隶属鲈形目(Perciformes)、鲈科(Serranidae)、鳊属(*Siniperca*)。其肉味鲜美,营养丰富,具有很高的经济价值,是我国传统名贵鱼类之一,也是我国淡水养殖业重要的养殖品种(Chen *et al.*, 2021)。近年来,随着鳊鱼养殖规模的扩大及水环境的恶化,鳊鱼产业面临着严峻的病害问题,在病毒性疾病严重制约鳊鱼养殖业发展的同时,细菌病害也日趋严重。研究表明,可引起鳊鱼大规模死亡的细菌病原主要包括柱状嗜纤维菌(*Cytophaga columnaris*)(陈昌福等,

1995)、柱状屈挠杆菌(*Flavobacterium columnare*)(黄文芳等,1999)、鲍氏不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)(顾天钊等,2000)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)(安伟等,2014)、维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)(高金伟等,2016)、迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)(吴勇亮等,2018)等,可引起翘嘴鳊烂鳃、鳍背部明显充血、皮肤溃烂等病症。此外,嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是近年来引起翘嘴鳊发生败血症并造成大量死亡的主要病原(张悦等,2017),感染之后可导

\* 江苏省农业科技自主创新基金项目(CX(18)2012)资助 [This work was supported by Jiangsu Agricultural Science and Technology Innovation Fund (CX(18)2012)]. 朱鑫海, E-mail: 18761046291@163.com

<sup>①</sup> 通信作者: 张晓君, E-mail: zxxj9307@163.com

收稿日期: 2021-04-06, 收修改稿日期: 2021-06-01

致鳊鱼鳃小片呼吸上皮细胞肿胀变性,坏死脱落,鳃细胞、肝脏细胞、脾脏细胞和肾小管上皮细胞排列松散紊乱、严重肿大,出现大量空泡、坏死(Chen *et al.*, 2018)。

嗜水气单胞菌广泛分布于各种淡水水域,宿主范围十分广泛,是淡水鱼类最为常见的重要病原菌(秦莉等, 2014),也是一种典型的人-兽-鱼共染的病原菌(王艺等, 2019),可引起人胃肠道感染、胃肠道外感染及败血症等(张曼等, 2020; 李小艳等, 2020)。该菌对鳊鱼的危害颇为严重,感染后可引起肝、脾、肾等组织产生免疫反应,以抵御细菌感染。头肾作为鱼类重要的造血器官和免疫器官,其中的巨噬细胞与 B 淋巴细胞共同介导和参与免疫反应,维护鱼类的机体健康(田敬云等, 2005)。高通量测序技术(RNA-seq)能获得特定条件下生物体细胞或组织的所有转录本信息(曹梅等, 2021),被广泛应用于分析病菌感染宿主后的免疫应答。嗜水气单胞菌是危害鳊鱼养殖生产的主要病原,该菌感染鳊鱼引起的免疫反应却少有报道。因此,本研究利用 RNA-seq 技术对嗜水气单胞菌感染翘嘴鳊后进行转录组分析,筛选翘嘴鳊免疫相关的差异表达基因,开展 GO (gene ontology)分子功能注释和 KEGG 通路富集分析,并利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术对随机选取的 *IL-6* 等 7 个与免疫相关的差异表达基因(DEGs)进行相对定量分析,以期获得可能参与免疫反应的候选基因和调控通路,从而为解析翘嘴鳊免疫应答提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验鳊鱼与菌株

健康翘嘴鳊由江苏扬州市董氏特种水产有限公司提供,体重为(130±5) g。实验前,于水温为(26±2)℃的淡水循环养殖系统中暂养 1 周,以适应实验环境。

实验用嗜水气单胞菌 G3 菌株分离于发病翘嘴鳊,由本实验室保存(张悦等, 2017)。实验挑取纯培养菌株接种于 LB 培养液培养 16 h, 5000 r/min 离心 10 min, 弃上清液,用 pH 7.2 的无菌 PBS 缓冲液重悬菌体,并将菌悬液浓度调至  $2.3 \times 10^6$  CFU/mL。

### 1.2 人工感染实验

将健康的翘嘴鳊分为感染组与对照组。感染组每尾腹腔注射 100  $\mu$ L 嗜水气单胞菌悬浮液,对照组按同样方式和剂量注射无菌 PBS 缓冲液。注射 24 h 后,每组随机挑选 3 尾,取出头肾组织,于液氮中备用。

### 1.3 RNA 提取、cDNA 文库构建和转录组测序

采用 Trizol 法提取感染组与对照组翘嘴鳊头肾组织总 RNA,设置 3 个重复, RNA 样品使用 DNase I 去除基因组 DNA。用 1% 琼脂糖凝胶初步评价 RNA 质量,并分别使用 NanoPhotometer<sup>®</sup> 分光光度计、Agilent 2100 生物分析仪进行 RNA 的纯度、浓度及完整性检测。使用 poly-Toligo-attached 磁珠纯化 mRNA,并利用随机引物和反转录酶合成第 1 条 cDNA;第 2 条 cDNA 由 DNA 聚合酶 I、RNase H、dNTPs 合成;cDNA 片段通过 AMPure XP 系统进行纯化,PCR 扩增获得 cDNA 文库;最后,在 Illumina Hiseq 2000 平台上测序。

### 1.4 转录组 *denovo* 组装和基因注释

将 Illumina Hiseq 高通量测序平台测得的原始数据去除接头(adapter)、包含 ploy-N 和低质量 reads 质控后,用软件 Trinity (<http://trinityrnaseq.sourceforge.net/>)进行序列拼接得到 unigene,使用 BLAST 算法 ( $E\text{-value} < 10^{-5}$ )对组装的 Unigene 序列进行遗传相似性比较,以进行蛋白质功能注释,包括 GO、COG (clusters of orthologous groups)、KOG (eukaryotic orthologous groups)、KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes)、Nr (non-redundant)、Swiss-Prot、Pfam 和 EggNOG (evolutionary genealogy of genes: non-supervised orthologous groups)数据库。

### 1.5 基因差异表达分析

通过 DESeq 软件对测序数据进行比对分析,并将错误发现率(false discovery rate, FDR)作为筛选差异表达基因(DEGs)的指标,筛选的标准是 Fold Change  $\geq 2$  且 FDR  $< 0.01$ ,将筛选出的 DEG 通过 GO 数据库进行 Pathway 注释并筛选富集 GO 条目和 Pathway 显著性筛选。

### 1.6 荧光定量 PCR 验证

利用 qRT-PCR 检测 7 个选择的免疫相关基因,以进一步验证转录组测序的准确性。采用 Primer Premier 5 设计特异性引物并合成,引物序列见表 1。qRT-PCR 反应体系共 20  $\mu$ L,其中,正反向引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.4  $\mu$ L、 $2 \times$ SuperMix 10  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 8.2  $\mu$ L、稀释的 cDNA 模板 1  $\mu$ L。反应程序:94℃, 5 min; 94℃, 10 s; 60℃, 30 s; 72℃, 15 s,共 40 个循环。以  $\beta$ -actin 为内参基因,用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算基因的相对表达量。

## 2 结果

### 2.1 测序数据及质量情况

利用 Illumina HiSeq 2000 对翘嘴鳊头肾组织进行测序, 拼接共获得 53 040 个的 unigene, 平均长度为 1236 bp, N50 为 2319 bp, 长度为 300~500 bp 的 unigenes 有 21 667 个, 约为全部 unigenes 的 40.85%。GC 含量区间为 48.23%~50.59%, Q30 $\geq$ 93.87% (表 2)。测序数据与拼接结果比对显示, 6 个样本中能定位到组装转录本上的 clean reads 所占的百分比在 71.86%~77.44%之间。

### 2.2 unigene 功能注释

将 unigene 与 GO、COG、KOG、KEGG、Nr、Swiss-Prot、Pfam 和 EggNOG 共 8 个数据库进行比对并注释, 共有 21 693 条 unigene 被注释(表 3)。

### 2.3 差异表达基因筛选

翘嘴鳊感染嗜水气单胞菌 24 h 后的头肾组织的转录组文库与对照组比较分析。结果显示, 翘嘴鳊头

表 1 qRT-PCR 所用引物

Tab.1 Primers for qRT-PCR

| 基因<br>Genes                           | 引物序列<br>Primers sequences (5'~3')                     | 产物长度<br>Product length/bp |
|---------------------------------------|---|---------------------------|
| 内参<br><i><math>\beta</math>-actin</i> | F: GGAGAAGCTGTGGTACGTCG<br>R: GTTGTAGGTGGTCTCGTGGA    | 202                       |
| 白介素<br><i>IL-6</i>                    | F: GGCTTCATCACCCAATACAGC<br>R: ATCACTGCTGATGTACAAGGC  | 193                       |
| 白介素<br><i>IL-8</i>                    | F: TGAAGATCAAGAAGGGCCGA<br>R: GATTCATGGCATGACGGCT     | 153                       |
| 白介素<br><i>IL-17</i>                   | F: TGCACCACCCAGAACTTAGC<br>R: TCATCGTCTGCCACAGGTA     | 178                       |
| 凝集素<br><i>Lectin</i>                  | F: GAGCACTGTTGTCTGGACG<br>R: AGCTGTATCAGTGTCTTTATGGGG | 198                       |
| 热休克蛋白<br><i>HSP60</i>                 | F: AGGAAGGAGGCAGAATCGTG<br>R: ACAACGAGAAACCCTCCCAC    | 136                       |
| 热休克蛋白<br><i>HSP70</i>                 | F: TCATCTGACAGCTTACCGCC<br>R: CCAGAACCGTCTGACACCTG    | 180                       |
| 热休克蛋白<br><i>HSP90</i>                 | F: TCCCAACAAAGAGGAACGCA<br>R: CCCACACCAAACCTGACCGAT   | 168                       |

表 2 样品测序数据与组装结果统计

Tab.2 Summary of sequencing and transcriptome assembly

| 样本<br>Samples | 读数<br>Read number | 总碱基数<br>Base number | 有效测序量<br>Clean reads | 比对数目<br>Mapped reads | 比对效率<br>Mapped ratio | GC 含量<br>GC content | Q30    |
|---------------|-------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|--------|
| Control-1     | 27 824 820        | 8 300 028 302       | 27 824 820           | 19 995 841           | 71.86%               | 48.23%              | 93.87% |
| Control-2     | 26 356 161        | 7 861 607 300       | 26 356 161           | 19 102 073           | 72.48%               | 49.38%              | 94.28% |
| Control-3     | 25 730 272        | 7 685 096 012       | 25 730 272           | 19 386 437           | 75.34%               | 49.92%              | 94.49% |
| AH-1          | 24 077 789        | 7 193 984 494       | 24 077 789           | 18 644 857           | 77.44%               | 50.59%              | 95.03% |
| AH-2          | 22 261 061        | 6 621 650 712       | 22 261 061           | 16 336 202           | 73.38%               | 49.72%              | 94.64% |
| AH-3          | 23 469 406        | 7 009 077 458       | 23 469 406           | 17 871 908           | 76.15%               | 50.51%              | 94.98% |

注: Control-1、Control-2、Control-3 为对照组; AH-1、AH-2、AH-3 为实验组。

Note: Control-1, Control-2, Control-3 were control groups; AH-1, AH-2, AH-3 were experimental groups.

表 3 Unigene 注释统计

Tab.3 Summary of unigenes annotation

| 注释数据库<br>Anno database | 注释数目<br>Annotated number | 比率<br>Rate/% | 300 $\leq$ 长度<1000<br>300 $\leq$ Length<1000 | 长度 $\geq$ 1000<br>Length $\geq$ 1000 |
|------------------------|--------------------------|--------------|--|--------------------------------------|
| COG_Annotation         | 5401                     | 24.90        | 1499   | 3902                                 |
| GO_Annotation          | 12 675                   | 58.43        | 4588   | 8087                                 |
| KEGG_Annotation        | 13 377                   | 61.67        | 4378   | 8999                                 |
| KOG_Annotation         | 13 662                   | 62.98        | 4027   | 9635                                 |
| Pfam_Annotation        | 15 350                   | 70.76        | 4149   | 11 201                               |
| Swissprot_Annotation   | 17 904                   | 82.53        | 5454   | 12 450                               |
| eggNOG_Annotation      | 20 043                   | 92.39        | 6858   | 13 185                               |
| Nr_Annotation          | 21 576                   | 99.46        | 7911   | 13 665                               |
| All_Annotated          | 21 693                   | -            | 8000   | 13 693                               |

肾组织差异表达基因(DEGs)有 526 个, 其中, 差异表达上调基因有 254 个, 差异表达下调基因有 272 个(图 1)。此外, 翘嘴鲈感染嗜水气单胞菌后免疫相关的主要差异表达基因显示, 上调表达的基因主要有炎症和免疫原性细胞因子白介素(*IL-8*、*IL-6*、*IL-17*)、补体系统(*CRI*)、MHC I 型抗原提呈(*MHC I*)、抗菌肽溶

菌酶(*Lys*)、丝氨酸蛋白酶抑制因子(*Serpin*)、泛素蛋白连接酶(*E3*)等(表 4), 说明这些免疫相关基因参与到抵抗嗜水气单胞菌入侵的途径中, 对翘嘴鲈起到免疫保护作用。

### 2.4 差异表达基因的 GO 功能分类分析

为进一步探究病原嗜水气单胞菌感染翘嘴鲈后差异表达基因的功能, 对差异表达基因进行 GO 功能注释(图 2)。显著富集 GO 条目主要涉及生物学过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF), 分别为 22、17 和 23 个。细胞组分富集最显著的为细胞、细胞组分、生物膜和生物膜组分; 分子功能类富集最显著的为结合和催化活性; 生物学过程类富集最显著的为细胞过程和单个有机体过程。此外, 大量差异表达基因富集至与免疫相关的条目, 如免疫系统过程、对刺激的反应、抗氧化活性等。

### 2.5 差异基因 KEGG 富集分析

共富集到 89 个代谢通路, 选取前 20 位显著富集通路进行 KEGG 富集分析, 发现与免疫相关的代谢通路主要有内吞作用(endocytosis)、吞噬体(phagosome)、TGF-beta 信号通路(TGF-beta signaling pathway)、NOD 样受体信号通路(NOD-like receptor signaling pathway)等(图 3)。内吞作用代谢通路如图 4 所示, 表明嗜水

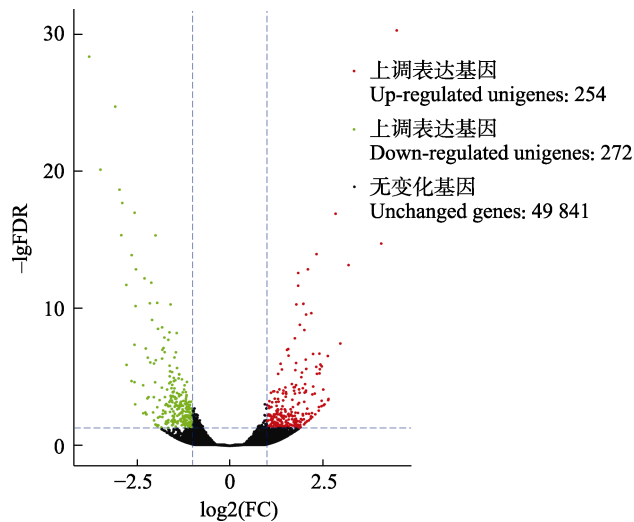


图 1 对照组和实验组差异表达基因火山图

Fig.1 Volcano plot of differentially expressed genes comparing control and infection groups

x 轴表示 fold change, y 轴表示差异表达的显著性。  
The x-axis represents fold change, the y-axis indicates significance of differential expression.

表 4 感染嗜水气单胞菌后差异表达的上调的主要免疫相关基因  
Tab.4 Up-regulated immune-related DEGs after *A. hydrophila* infection

| 基因名称 Gene name             | 基因编号 Gene ID    | 基因描述 Gene description               | 上调倍数 Increase multiple |
|----------------------------|-----------------|-------------------------------------|------------------------|
| 白介素 <i>IL-8</i>            | c75060.graph_c4 | Interleukin-8                       | 1.57                   |
| 白介素 <i>IL-6</i>            | c60619.graph_c0 | Interleukin-6                       | 2.05                   |
| 白介素 <i>IL-17</i>           | c74146.graph_c0 | Interleukin 17                      | 2.08                   |
| 溶菌酶 <i>Lys</i>             | c66833.graph_c0 | Lysozyme                            | 1.22                   |
| 补体系统 <i>CRI</i>            | c66684.graph_c0 | Complement receptor type 1          | 2.42                   |
| MHC I 型抗原提呈 <i>MHCI</i>    | c75121.graph_c0 | Antigen processing and presentation | 1.93                   |
| 丝氨酸蛋白酶抑制因子 <i>Serpin</i>   | c71188.graph_c0 | Serine protease inhibitor           | 1.13                   |
| 泛素蛋白连接酶 <i>E3</i>          | c48937.graph_c0 | E3 ubiquitin-protein ligase         | 1.78                   |
| B 型受体蛋白 <i>EPHB5</i>       | c68078.graph_c0 | Ephrin type-B receptor 5            | 1.74                   |
| G 蛋白偶联受体 <i>GPR142</i>     | c67158.graph_c0 | G-protein coupled receptor 142      | 2.40                   |
| 半乳糖凝集素相关蛋白 <i>Lgalsl-b</i> | c57980.graph_c0 | Galectin-related protein B          | 1.88                   |
| 黑素曲霉素 <i>Mreg</i>          | c68041.graph_c0 | Melanoregulin                       | 1.91                   |
| 转化生长因子 <i>TGFB3</i>        | c56868.graph_c0 | Transforming growth factor beta-3   | 2.17                   |
| 碳酸酐酶 <i>Cahz</i>           | c74871.graph_c2 | Carbonic anhydrase                  | 1.98                   |

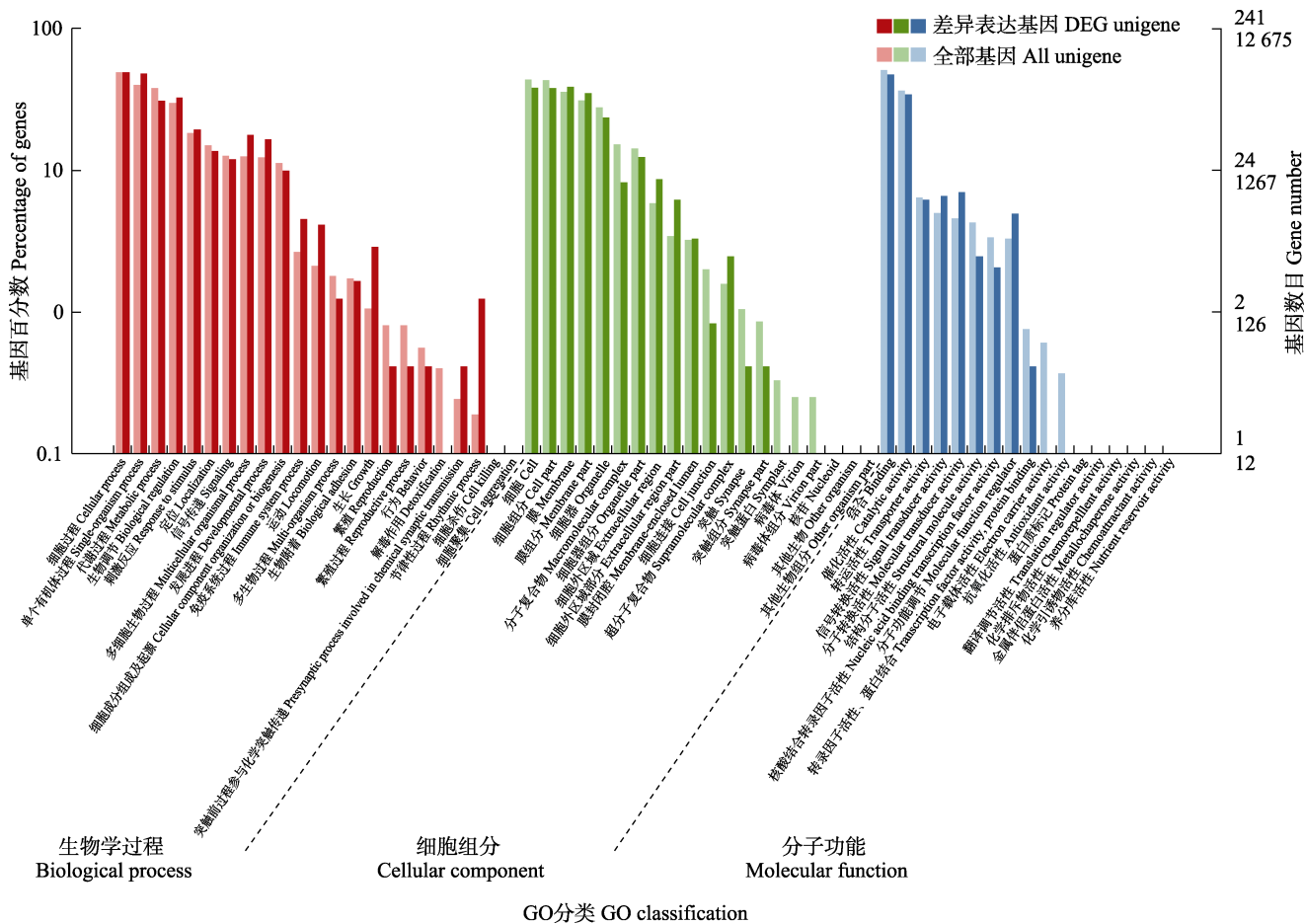


图 2 嗜水气单胞菌感染翘嘴鲌实验组与对照组表达差异基因 GO 分析  
 Fig.2 GO enrichment analysis of the differential expression genes between the infection and control groups

气单胞菌感染翘嘴鲌后引起 *TGFβ*、*dynaminn*、*ArfGAP*、*Arp2/3* 和 *caveolin* 等参与内吞作用的相关基因显著上调，而 *TGFβR*、*GPCR* 和 *Hsc70* 等参与内吞作用的相关基因显著下调；吞噬体代谢通路(图 5)表明，嗜水气单胞菌感染翘嘴鲌后引起 *avβ3*、*MR* 和 *TUBB* 等参与吞噬作用的相关基因显著上调，而 *IG* 和 *CALR* 等参与吞噬作用的相关基因显著下调。

### 2.6 免疫相关基因 qRT-PCR 验证

为了进一步验证 RNA-seq 数据的准确性，选择免疫相关基因 *IL-6*、*IL-8*、*IL-17*、*Lectin*、*HSP60*、*HSP70* 和 *HSP90* 进行 qRT-PCR 分析。结果显示，翘嘴鲌感染嗜水气单胞菌 24 h 后，免疫相关基因的荧光定量表达结果与转录组测序结果一致(图 6)，此结果验证了转录组测序数据的可靠性。

### 3 讨论

翘嘴鲌在养殖过程中遭受多种病原的感染，其中，嗜水气单胞菌感染会造成翘嘴鲌出血性败血症，

严重损伤肾脏、肝脏及脾脏等组织，造成坏死和解体等病理变化(Chen *et al.*, 2018)。本研究通过对嗜水气单胞菌感染翘嘴鲌头肾组织的转录本进行分析，挖掘免疫应答基因，为揭示翘嘴鲌抗嗜水气单胞菌感染的分子机制提供理论依据。目前，高通量测序技术在嗜水气单胞菌感染水产养殖动物后的宿主免疫反应研究中得到了广泛应用。Xu 等(2021)利用高通量测序技术比较了嗜水气单胞菌感染和未感染的黄鳍(*Monopterus albus*)脾脏组织中基因表达差异，其中，上调表达基因有 928 个，下调表达基因有 573 个。Yuan 等(2021)利用高通量测序技术比较了嗜水气单胞菌感染和未感染的大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)脾脏组织中基因表达差异，其中，上调表达基因有 1748 个，下调表达基因有 2120 个。Luo 等(2018)利用转录组测序技术检测嗜水气单胞菌感染的长江鲟(*Acipenser dabryanus Dumeril*)，结果显示，在感染的头肾组织中共检测到 1728 个 DEGs，其中，980 个上调表达基因和 748 个下调表达基因。本研究中，高通量测序结果显示，嗜水气单胞菌感染后，翘嘴鲌头肾组织存在

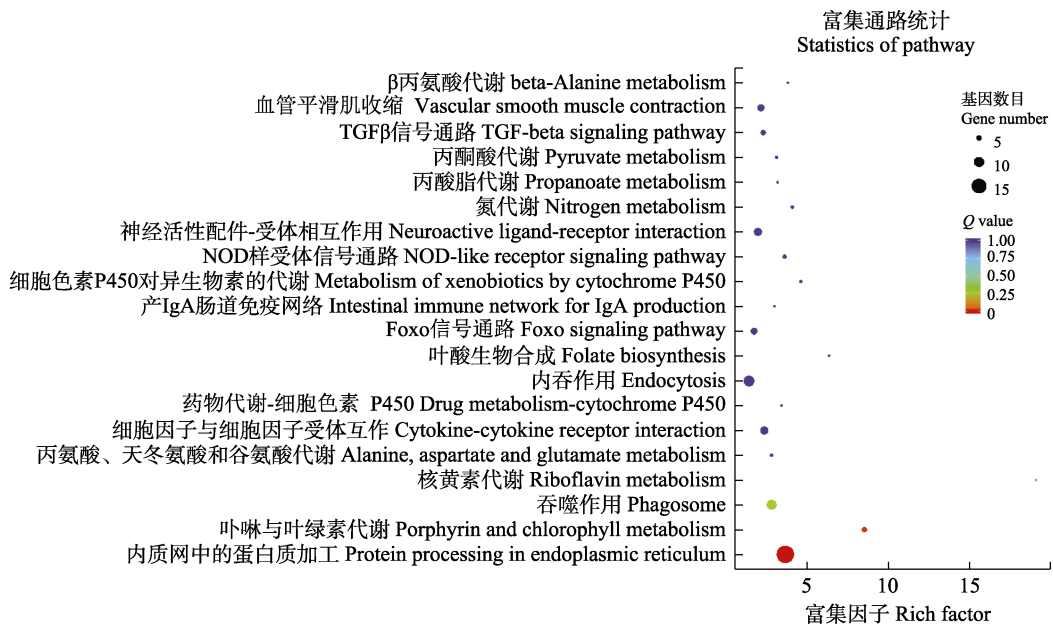


图 3 嗜水气单胞菌感染翘嘴鳊实验组与对照组表达差异基因 KEGG 通路富集分析  
Fig.3 KEGG pathway enrichment analysis of the differential expression genes between the infection and control groups

图中每个圆表示 1 个 KEGG 通路。  
Circle in the figure represents a KEGG pathway.

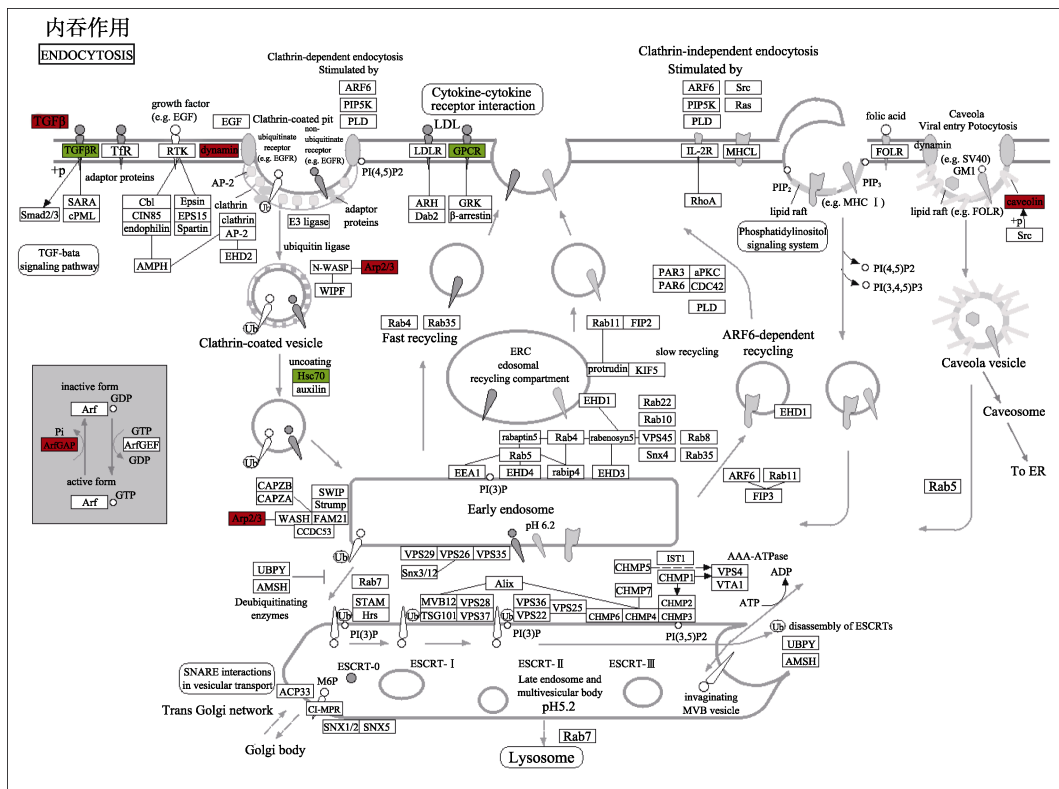


图 4 内吞作用的信号通路  
Fig 4 Pathway map of the endocytosis pathway in KEGG

基因表达上调和下调分别用红色和绿色方框表示，下同。  
The red boxes represent genes up-regulating, the green boxes represent genes down-regulating. The same as below.

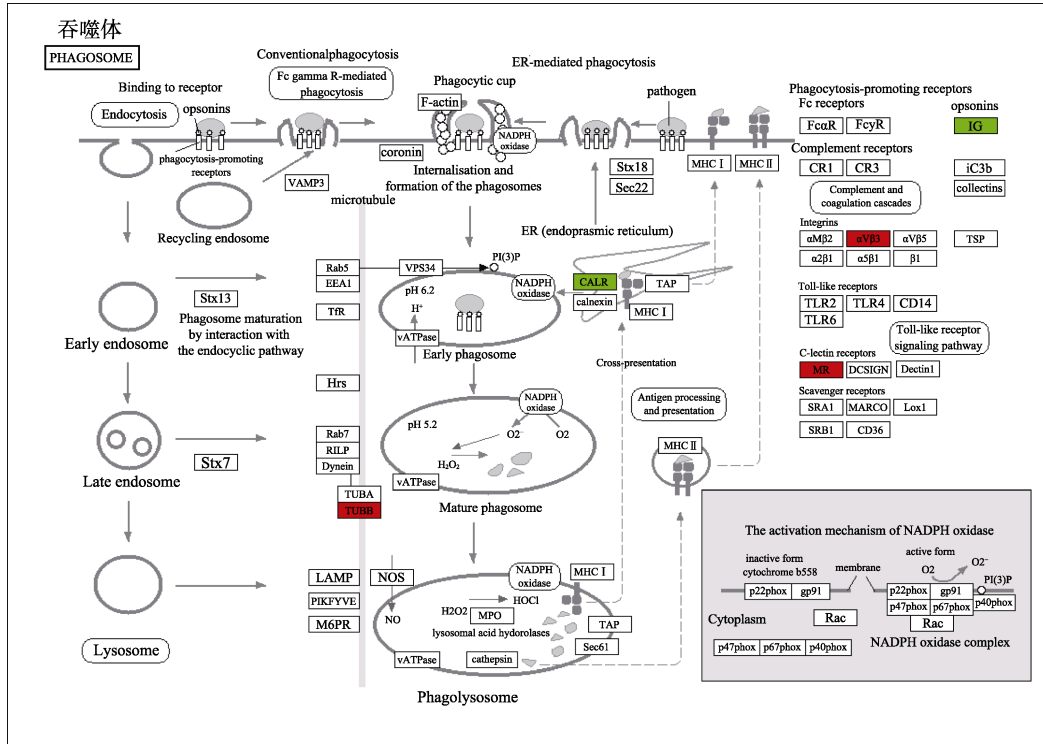


图 5 吞噬体的信号通路  
Fig.5 Pathway map of the phagosome pathway in KEGG

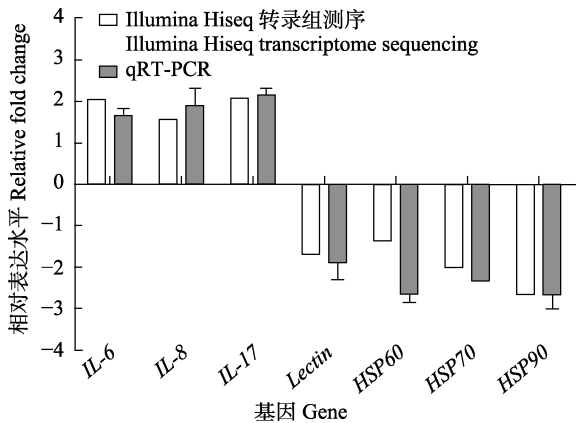


图 6 嗜水气单胞菌感染翘嘴鲌后  
差异表达基因 qRT-PCR 分析

Fig.6 Comparative analysis of qRT-PCR of differentially expressed genes of *S. chuatsi* infected with *A. hydrophila*

526 个差异表达基因，其中，差异表达上调基因有 254 个，差异表达下调基因有 272 个，大量基因都与炎症、免疫、防御反应相关，这可能与嗜水气单胞菌在翘嘴鲌体内大量复制和宿主抵抗细菌感染有关，表明嗜水气单胞菌进入翘嘴鲌体内后，可诱导机体的非特异性免疫应答反应。

病原生物感染水生动物后获得大量差异表达基因，为分析宿主免疫应答方式和免疫防御提供了数据支持(刘文静等, 2013)。本研究发现，嗜水气单胞菌

感染翘嘴鲌后，白介素 *IL-8*、*IL-6*、*IL-17*、补体系统受体 *C1R*、抗原提呈 *MHC I*、溶酶体 *Lys*、丝氨酸蛋白酶抑制因子 *Serpin* 和泛素蛋白连接酶 *E3* 等免疫相关基因表达显著上调，说明这些基因在感染中参与应答反应。其中，白介素 *IL* 是参与炎症反应，免疫调节，刺激 T 细胞、B 细胞增殖等免疫应答的关键因子 (McBeath *et al*, 2007)。类似的研究发现，大西洋鲑 (*Salmo salar*) 在接种杀鲑气单胞菌 (*Aeromonas salmonicida*) 疫苗后，*IL-8* 在其肝脏和肾脏中的表达显著升高 (Fast *et al*, 2007)。斑马鱼 (*Danio rerio*) 在接种迟缓爱德华氏菌减毒疫苗后，*IL-8* 基因出现明显的上调表达 (Yang *et al*, 2013)。MHC 分子属于免疫蛋白超家族，包括 MHC I 类分子和 MHC II 类分子，MHC I 类主要组织相容性复合抗原的功能是呈递细胞内病原产生的肽给  $CD8^+$  T 细胞，诱导 T 细胞活化并杀死靶细胞。费超 (2013) 研究发现，用减毒鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 注射斑马鱼能有效激发 *MHC I* 和 *MHC II* 免疫应答。溶菌酶基因在先天性免疫系统中充当着重要角色，负责抵抗病原微生物的入侵。Zhang 等 (2018) 研究发现，加州鲈 (*Micropterus salmoides*) 感染嗜水气单胞菌后，*lysozyme* 表达量显著提高。

为更好地了解病原宿主之间的免疫应答及由细菌感染引起的一系列免疫反应的分子机制，本研究对

嗜水气单胞菌感染翘嘴鲌后头肾组织差异表达基因进行GO富集和KEGG富集分析。GO富集分析显示,显著富集与免疫相关的GO条目有免疫系统过程、对刺激的反应、抗氧化活性等,说明嗜水气单胞菌感染翘嘴鲌,导致宿主产生强烈的免疫应答反应。KEGG富集分析显示,显著富集的免疫相关通路有内吞作用和吞噬体。内吞作用是细胞外物质通过质膜的变形运动进入胞内的过程,也是病原感染细胞的常见感染途径,在病原感染宿主细胞的早期发挥作用(Mayor *et al.*, 2007);从内吞作用通路可以看出(图4),显著上调基因(*TGFβ*、*dynamin*、*ArfGAP*、*Arp2/3*和*caveolin*)参与了网格蛋白(*clathrin*)介导的内吞途径,而发动蛋白(*dynamin*)是该内吞途径重要的蛋白,在网格蛋白介导的内吞过程中发挥“剪刀”的作用,将网格蛋白包被小窝与质膜分离(彭镜等, 2011);显著下调基因(*TGFβR*、*GPCR*和*Hsc70*)也参与了网格蛋白介导的内吞途径,并且G蛋白偶联受体(*GPCR*)信号通路受到了以β抑制蛋白(*β-arrestion*)为主的一系列辅助蛋白的负调节(殷琳等, 2019)。此外,吞噬作用在鱼类抵御病原细菌感染过程中发挥重要作用,对入侵的外源物质进行吞入和破坏(Zhao *et al.*, 2016; 王超等, 2020)。吞噬过程主要分3个步骤:首先,病原细菌黏附到吞噬细胞表面;其次,抗原受体复合物通过内吞途径形成吞噬体;最后,病原在吞噬体内被消除(Gotthardt *et al.*, 2002; 郇光富等, 2013; Keller *et al.*, 2017)。从吞噬体通路可以看出(图5),上调表达基因(*avβ3*、*MR*和*TUBB*)在病原识别到加工、运输、呈递中发挥重要作用,吞噬细胞表面的受体(*avβ3*和*MR*)首先识别病原,之后形成吞噬体,再通过微管蛋白(*TUBB*)等细胞骨架成分转运至溶酶体,微管蛋白在吞噬作用中起着重要作用(Gunning *et al.*, 2015)。

综上所述,本研究利用RNA-seq技术分析了翘嘴鲌感染嗜水气单胞菌后的应答反应,获得多个显著差异表达基因,这些差异表达基因参与了重要的信号通路,尤其是免疫信号通路。研究结果为揭示翘嘴鲌感染嗜水气单胞菌的应答机制提供参考,为嗜水气单胞菌引起翘嘴鲌细菌性败血症的防治提供理论基础。

## 参 考 文 献

- AN W, XIAO Y, GAO X H, *et al.* Isolation and identification of pathogenic *Pseudomonas fluorescens* from *Siniperca chuatsi*. Chinese Journal of Zoology, 2014, 49(5): 760–765 [安伟, 肖雨, 高晓华, 等. 鳊源致病性荧光假单胞菌的分离与鉴定. 动物学杂志, 2014, 49(5): 760–765]
- CAO M, WANG X Q, QING C X, *et al.* Transcriptome analysis of *Palaemon carinicauda* subjected to hypoxic stress. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(2): 112–123 [曹梅, 王兴强, 秦传新, 等. 脊尾白虾对低氧响应的转录组学分析. 渔业科学进展, 2021, 42(2): 112–123]
- CHEN C F, SHI W Z, LI J, *et al.* A preliminary study on the immune response against *Cytophaga columnaris* of mandarin fish (*Siniperca chuatsi* B.). Journal of Huazhong Agricultural University, 1995, 14(4): 377–380 [陈昌福, 史维舟, 李静, 等. 翘嘴鲌对柱状嗜纤维菌免疫反应的初步研究. 华中农业大学学报, 1995, 14(4): 377–380]
- CHEN K, ZHANG Z, LI J, *et al.* Different regulation of branched-chain amino acid on food intake by TOR signaling in Chinese perch (*Siniperca chuatsi*). Aquaculture, 2021, 530: 735792
- CHEN N, JIANG J J, GAO X J, *et al.* Histopathological analysis and the immune related gene expression profiles of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) infected with *Aeromonas hydrophila*. Fish and Shellfish Immunology, 2018, 83: 410–415
- FAST M D, JOHNSON S C, JONES S R M. Differential expression of the pro-inflammatory cytokines IL-1β-1, TNFα-1 and IL-8 in vaccinated pink (*Oncorhynchus gorbuscha*) and chum (*Oncorhynchus keta*) salmon juveniles. Fish and Shellfish Immunology, 2007, 22: 403–407
- FEI C. Zebrafish model-based transcription profiles of immune-related genes in responding to infection with wild type and attenuated strains of *Vibrio anguillarum* and *Edwardsiella tarda*. Master's Thesis of East China University of Science and Technology, 2013, 46–48 [费超. 斑马鱼为动物模型对鳗弧菌、迟钝爱德华氏菌野生株和减毒株感染应答的转录分析. 华东理工大学硕士学位论文, 2013, 46–48]
- GAO J W, LIANG L G, WANG Y B, *et al.* Identification and susceptibility test of pathogenic *Aeromonas veronii* isolated from *Siniperca chuatsi*. Microbiology China, 2016, 43(12): 2686–2692 [高金伟, 梁利国, 王亚冰, 等. 鳊源致病性维氏气单胞菌的鉴定及药敏试验. 微生物学通报, 2016, 43(12): 2686–2692]
- GOTTHARDT D, WARNATZ H J, HENSCHEL O, *et al.* High-resolution dissection of phagosome maturation reveals distinct membrane trafficking phases. Molecular Biology of the Cell, 2002, 13(10): 3508–3520
- GU T Z, LU C P, CHEN H Q. Invasion of an *Acinetobacter baumannii* strain isolated from mandarin fish. Chinese Journal of Veterinary Science, 2000, 20(5): 468–470 [顾天钊, 陆承平, 陈怀青. 鲍氏不动杆菌鳊鱼分离株的侵袭特性. 中国兽医学报, 2000, 20(5): 468–470]
- GUNNING P W, GHOSH DASTIDER U, WHITAKER S, *et al.* The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments. Journal of Cell Science, 2015, 128(11): 2009–2019
- HUANG W F, LI H Y, ZHANG J Y. The pathogen of bacterial



- gill disease in mandarin fish *Siniperca chuatsi*. *Microbiology China*, 1999, 26(4): 246–250 [黄文芳, 李海燕, 张剑英. 翘嘴鳊烂鳃病病原的研究. *微生物学通报*, 1999, 26(4): 246–250]
- KELLER S, BERGHOFF K, KRESS H. Phagosomal transport depends strongly on phagosome size. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 17068
- LI X Y, LI Z Q, WANG Y Q, *et al.* Construction of *Aeromonas hydrophila* *acrA* deficient strain and determination of its physiological function. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(11): 63–69 [李小艳, 李泽琦, 汪玉倩, 等. 嗜水气单胞菌 *acrA* 缺失菌株的构建及其生理功能的测定. *生物技术通报*, 2020, 36(11): 63–69]
- LIU W J, YANG L S, LI X L, *et al.* Cloning and mRNA expression analysis of *Relish* gene in *Penaeus monodon* following immune stimulation. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(1): 50–60 [刘文静, 杨丽诗, 李晓兰, 等. 斑节对虾 *Relish* 基因的克隆及免疫刺激对其 mRNA 表达水平的影响. *中国水产科学*, 2013, 20(1): 50–60]
- LUO K, DI J, HAN P P, *et al.* Transcriptome analysis of the critically endangered Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*) head kidney response to *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 83: 249–261
- MAYOR S, PAGANO R E. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, 8: 603–612
- MCBEATH A J A, SNOW M, SECOMBES C J, *et al.* Expression kinetics of interferon and interferon-induced genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following infection with infectious pancreatic necrosis virus and infectious salmon anaemia virus. *Fish and Shellfish Immunology*, 2007, 22(3): 230–241
- PENG J, WU L, ZHANG C L, *et al.* The functional domain of Dynamin- I and its role in the endocytosis of synaptic vesicles. *Progress in Physiological Sciences*, 2011, 42(2): 121–124 [彭镜, 吴蕾, 张慈柳, 等. Dynamin- I 的功能结构域及其在突触囊泡内吞过程中的作用. *生理科学进展*, 2011, 42(2): 121–124]
- QING L, YIN J G, ZHANG W, *et al.* Isolation and identification of pathogenic *Aeromonas hydrophila* from *Esox lucius* around Urumqi in Xinjiang. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(5): 40–45 [秦莉, 殷建国, 张薇, 等. 白斑狗鱼 (*Esox lucius*) 致病性嗜水气单胞菌的分离与鉴定. *渔业科学进展*, 2014, 35(5): 40–45]
- TAI G F, YAN Q P, XU X J, *et al.* Establishment of quantitative model on eel peripheral blood leukocytes phagocytosing *Aeromonas hydrophila* in vitro. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(6): 68–74 [邵光富, 鄢庆彬, 徐晓津, 等. 鳗鲡外周血白细胞体外吞噬嗜水气单胞菌数量模型的建立. *渔业科学进展*, 2013, 34(6): 68–74]
- TIAN J Y, XIE H X, YAO W J, *et al.* Ontogenetic development of the pronephros and the distribution of B-lymphocytes in adult pronephros of the mandarin fish *Siniperca chuatsi*. *Acta Zoologica Sinica*, 2005, 51(3): 440–446 [田敬云, 谢海侠, 姚卫建, 等. 鳊鱼头肾的组织发生及成鱼头肾 B 淋巴细胞的分布. *动物学报*, 2005, 51(3): 440–446]
- WANG C, ZHANG L G, WU M M, *et al.* Important role of phagocytosis in the defense of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against *Aeromonas hydrophila* infection. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(3): 346–354 [王超, 张龙岗, 吴蒙蒙, 等. 吞噬作用在尼罗罗非鱼抵抗嗜水气单胞菌感染过程中的重要作用. *中国水产科学*, 2020, 27(3): 346–354]
- WANG Y, LIU W Z, FU S Z, *et al.* Etiology and genomic characteristics of an *Aeromonas hydrophila* strain isolated from *Ctenopharyngodon idella*. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(4): 1181–1191 [王艺, 刘文珍, 傅松哲, 等. 一株从草鱼中分离的嗜水气单胞菌的病原学及基因组特征. *水产学报*, 2019, 43(4): 1181–1191]
- WU Y L, MIAO P F, YU H, *et al.* Isolation, identification and drug susceptibility test of pathogenic *Edwardsiella tarda* in *Siniperca chuatsi*. *Journal of Southern Agriculture*, 2018, 49(4): 794–799 [吴勇亮, 苗鹏飞, 于辉, 等. 鳊鱼致病性迟缓爱德华氏菌的分离鉴定及药敏试验. *南方农业学报*, 2018, 49(4): 794–799]
- XU D D, HAN P P, XIA L H, *et al.* A comparative transcriptome analysis focusing on immune responses of Asian swamp eel following infection with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 2021, 539: 736655
- YANG D H, LIU Q, NI C S, *et al.* Gene expression profiling in live attenuated *Edwardsiella tarda* vaccine immunized and challenged zebrafish: Insights into the basic mechanisms of protection seen in immunized fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 2013, 40(2): 132–141
- YIN L, CHEN X, YANG X Y, *et al.* Mechanisms of  $\beta$ -arrestin-biased GPCR signal transduction and advances in drug research. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2019, 54(1): 66–72 [殷琳, 陈熙, 杨秀颖, 等. 偏向  $\beta$ -抑制蛋白的 GPCR 信号传导机制及药物研究进展. *药科学报*, 2019, 54(1): 66–72]
- YUAN X Y, ZHANG X T, XIA Y T, *et al.* Transcriptome and 16S rRNA analyses revealed differences in the responses of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) to early *Aeromonas hydrophila* infection and immunization. *Aquaculture*, 2021, 541: 736759
- ZHANG C N, ZHANG J L, LIU M, *et al.* Molecular cloning, expression and antibacterial activity of goose-type lysozyme gene in *Micropterus salmoides*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 82: 9–16
- ZHANG M, WANG Z G, GAO F, *et al.* Isolation, identification and pathogenicity analysis of *Aeromonas hydrophila* from *Pseudocrossocheilus bamaensis*. *Journal of Southern Agriculture*, 2020, 51(9): 2051–2060 [张曼, 王振光, 高峰,

- 等. 巴马拟缨鱼源嗜水气单胞菌分离鉴定及其致病力分析. 南方农业学报, 2020, 51(9): 2051–2060]
- ZHANG Y, GAO X J, YE J M, *et al.* Molecular characterization and establishment of LAMP detection method of pathogenic *Aeromonas hydrophila* isolated from *Siniperca chuatsi*. Acta Hydrobiologica Sinica, 2017, 41(6): 1225–1231 [张悦, 高晓建, 叶金明, 等. 翘嘴鲈病原嗜水气单胞菌分子特征及 LAMP 检测方法的建立. 水生生物学报, 2017, 41(6): 1225–1231]
- ZHAO L J, TU J G, ZHANG Y L, *et al.* Transcriptomic analysis of the head kidney of topmouth culter (*Culter alburnus*) infected with *Flavobacterium columnare* with an emphasis on phagosome pathway. Fish and Shellfish Immunology, 2016, 57: 413–418

(编辑 马璀璨)

## Transcriptomic Analysis of the Head Kidney of *Siniperca chuatsi* Infected with *Aeromonas hydrophila*

ZHU Xinhai, ZHANG Zirui, ZHOU Liying, TANG Huanyu, AO Shiqi, ZHOU Yifan, GAO Xiaojian, JIANG Qun, ZHANG Xiaojun<sup>①</sup>

(College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

**Abstract** *Aeromonas hydrophila* is one of the main pathogens seriously endangering mandarin fish farming and production. In order to explore the changes in host gene expression levels in *A. hydrophila* infection, screen for immune-related genes, and analyze the molecular mechanism of *Siniperca chuatsi* infected with *Aeromonas hydrophila* in response to pathogenic bacterial infection. The head kidney tissues of the infected and control groups were collected 24 h after inoculation and used for mRNA extraction, and transcriptome sequencing was performed using high-throughput sequencing technology. A total of 53 040 single genes (unigenes) were obtained from the original sequencing data through de novo assembly. The results of gene differential expression analysis showed that there were 526 differentially expressed genes, of which 254 were upregulated and 272 were down-regulated in the infected and control groups. Among the differentially expressed genes, several key genes involved in the immune response, such as interleukin-8, interleukin-6 receptor, interleukin 17 receptor, lysozyme, complement receptor type 1, antigen processing and presentation, serine protease inhibitor, and E3 ubiquitin-protein ligase were present. Gene ontology analysis revealed that the different genes were mainly involved in immune response and inflammation. A KEGG analysis showed that there were 89 significantly enriched and immune-related metabolic pathways mainly involved with endocytosis and phagosomes. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) verification was performed on seven DEGs, and the results showed that RT-qPCR was consistent with RNA-Seq analysis. These results lay a theoretical foundation for a follow-up study of gene function and in-depth exploration of the molecular defense mechanism of *S. chuatsi* against pathogenic microorganism infection.

**Key words** *Siniperca chuatsi*; *Aeromonas hydrophila*; Transcriptome; Different expression gene

① Corresponding author: ZHANG Xiaojun, E-mail: zxj9307@163.com