

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.01226

## cDNA 芯片技术筛选斑马鱼皮肤免疫相关差异表达基因

吕爱军<sup>1</sup>, 胡秀彩<sup>2</sup>, 薛军<sup>1</sup>, 王艺<sup>3</sup>, 李瑾年<sup>3</sup>

1. 徐州师范大学生命科学学院, 江苏 徐州 221116;
2. 江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏 徐州 221116;
3. 安徽农业大学动物科技学院, 安徽 合肥 230036

**摘要:** 研究旨在筛选与鱼类皮肤免疫相关的功能基因, 试图解释鱼类皮肤局部免疫应答的分子机制。采用斑马鱼 (*Danio rerio*) 基因 cDNA 芯片 (affymetrix), 以葡萄球菌 (*Staphylococcus* sp.) 感染诱导的成体斑马鱼为实验动物模型, 从斑马鱼皮肤组织中提取总 RNA, 经 Biotin 荧光标记与拥有 15 617 个 cDNA 片段的基因芯片杂交, 对斑马鱼皮肤组织中基因表达谱进行初步分析。在斑马鱼皮肤组织中共检测出 175 个差异表达基因, 其中有 150 个上调表达基因 (ratio > 2.0) 和 25 个下调表达基因 (ratio > 0.5); 在皮肤组织 150 个上调基因中, 91 个为已知功能基因, 59 个为未知功能基因。根据基因文库同源功能基因 (GO) 分析, 将 175 个差异表达基因分为 13 个主要的生物功能与代谢通路, 其中参与免疫应答相关基因包括鱼主要组织相容性复合体 (MHC) I 类基因区的基因 (*UEA*, *UFA*)、补体 (*C1q*, *C7-1*)、凝集素 (*HBL3*, *LGALSIL3*)、应急反应生长基因 (*EGR-1*)、肿瘤坏死因子超家族基因 (*TNFSF10L4*)、凝血因子 (*F5*)、转铁蛋白基因 (*TF-a*) 和一些蛋白酶等。结果证实, MHC I 类分子、补体、凝集素和蛋白酶等参与鱼类皮肤的抗葡萄球菌感染免疫应答, 为将来以斑马鱼感染模型研究皮肤局部与细菌的互作机制提供了科学参考; 同时表明采用基因芯片方法初探斑马鱼皮肤免疫系统是基本可行的。

**关键词:** 斑马鱼; 皮肤; 基因表达; 基因芯片

中图分类号: S943

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)06-1226-08

鱼类皮肤、鳃、肠道黏膜是机体与外界水环境接触的门户, 也是阻止病原微生物进入体内的第一道防线。鱼类的皮肤黏膜免疫不仅对宿主防御病原的侵入是必要的, 而且对现代水产养殖疫苗的应用也十分重要, 特别对控制水生致病菌。一直以来, 关于鱼类的机体系统免疫应答报道较多<sup>[1-3]</sup>。最近, 研究表明基因芯片技术可用于鱼类基因表达谱相关研究<sup>[4-7]</sup>。Wu 等<sup>[4]</sup>采用基因芯片方法研究猪链球菌 (*Streptococcus suis*) 感染的斑马鱼 (*Danio rerio*), 获得免疫应答、炎症反应、补体激活和防御应答相关基因等。Peatman 等<sup>[5]</sup>通过基因芯片技术研究鲍爱德华氏菌 (*Edwardsiella ictaluri*) 感染的鲇 (*Ictalurus furcatus*), 可诱导肝脏

的 MHC I 类分子相关通路早期激活。Ordas 等<sup>[6]</sup>以鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 感染斑马鱼胚胎, 认为与 Hegedus 等<sup>[7]</sup>以海分枝杆菌 (*Mycobacterium marinum*) 感染成体斑马鱼的基因表达谱存在共同抗感染应答机制。近年来, 与系统免疫相比较而言, 黏膜免疫已成为鱼类免疫学研究的热点<sup>[8-11]</sup>。对人和哺乳动物的研究表明<sup>[12-14]</sup>, 皮肤不仅具有非特异性免疫防御功能, 而且参与机体特异性免疫的抗原识别、免疫细胞激活及皮肤免疫应答等过程。与哺乳动物相比, 对鱼类皮肤免疫系统 (skin immune system, SIS) 的分子应答研究报道较少<sup>[15-17]</sup>。斑马鱼作为一种新型模式生物, 已广泛用于生长发育、遗传、免疫和生理病

收稿日期: 2011-03-22; 修订日期: 2011-05-30.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30800847); 江苏省高校“青蓝工程”项目 (2008).

作者简介: 吕爱军 (1973-), 副教授, 硕士生导师, 主要从事水产动物微生物及免疫学研究. E-mail: lajand@126.com

理等领域<sup>[18-19]</sup>。但是对于斑马鱼皮肤黏膜免疫的分子机制,目前仍不清楚。本研究以葡萄球菌(*Staphylococcus* sp.)感染诱导的成体斑马鱼为实验动物模型,通过基因芯片技术分析其皮肤免疫相关因子的应答机制,旨在为预防鱼类病害提供科学指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 斑马鱼和细菌** 成体斑马鱼购自江苏省徐州市某花鸟市场,带回实验室饲养于水族箱中,饲养用自来水经生物过滤器过滤并充分曝气,温度(26±1)℃、光照/黑暗周期(12/12)条件下饲养 2 周,确认健康后用于感染实验。葡萄球菌(*Staphylococcus* sp.)分离自草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)肠道中,由本实验室保存(待发表)。

**1.1.2 基因芯片** 本研究使用芯片为斑马鱼表达谱芯片(Zebrafish Genome Array, GPL1319),由美国 Affymetrix 公司研制,其包含的序列信息覆盖了来自 GenBank、UniGene 公共数据库中全部的斑马鱼基因组序列,包括 15 617 个探针,可用于超过 14 900 个转录本的基因表达研究。

### 1.2 方法

**1.2.1 斑马鱼感染试验** 以活菌浓度为  $5 \times 10^8$  cfu 的葡萄球菌对斑马鱼进行浸泡感染试验,浸泡时间为 10 min,观察斑马鱼发病和死亡情况,连续观察 7 d。对照组鱼浸泡于 0.65%氯化钠溶液。随机选取诱导 12 h 的感染组和对照组各 20 尾斑马鱼,取其背部皮肤组织样品混合后,贮存于液氮中备用。

**1.2.2 RNA 提取及 cRNA 的合成、标记和芯片杂交** RNA 提取、cDNA 合成、Biotin 标记、芯片杂交方法按 Affymetrix 公司提供的操作规程进行,3 个生物学重复,由北京博奥生物芯片公司完成。主要步骤为:斑马鱼皮肤总 RNA 经 Qiagen 公司的 RNeasy Mini Kit 纯化后,采用 Affymetrix One Cycle cDNA Synthesis Kit 合成单链 cDNA。新合成的 cDNA 纯化后,经 GeneChip<sup>®</sup> IVT Labeling Kit 完成 cDNA 的转录合成和 Biotin 荧光标记。

Biotin 荧光标记的 cDNA 片段纯化后,待芯片杂交液加入到芯片中,在 45℃ 60 r/min 条件下杂交反应持续 16h(Hybridization Oven 640, Affymetrix 公司)。杂交结束后,吸出芯片中杂交液,加入洗液,充分洗涤后,进行基因芯片扫描分析。

**1.2.3 芯片扫描和数据处理分析** 经杂交洗涤后的基因芯片采用 Affymetrix GeneChip Scanner 3000 进行扫描,通过对芯片灰度扫描图进行分析,将与斑马鱼基因芯片的 15 617 个基因杂交反应所获的数据应用 GeneChip Operating Software (GCOS1.4)进行数据分析。实验组与对照组基因表达量的比值大于 2 或小于 0.5 的基因点为表达差异基因。对筛选出的差异表达基因,参考 NCBI 公共数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)和 Affymetrix 公司的网站的数据库(<http://www.affymetrix.com>)查阅相关的基因信息,并对基因进行分类。为了获得葡萄球菌感染诱导变化基因的潜在功能,运用通路分析工具 GOstat 在(<http://bioinfo.capitalbio.com/mas3>)上进行通路(pathway)分析,以找出与斑马鱼皮肤免疫相关的特定差异基因。

## 2 结果与分析

### 2.1 斑马鱼感染试验

以葡萄球菌对斑马鱼浸泡感染试验,结果表明当饲养温度在 26℃左右时,12 h 病鱼体表黏液增多,游动迟缓,呼吸异常,个别鱼鳍条充血;其后症状逐渐加重,24 h 开始出现死亡,72 h 感染鱼全部死亡,呈现鳃、胸腹部皮肤淤血、出血,腹腔积液等症状,见表 1。对照组斑马鱼无病变症状。

表 1 葡萄球菌感染斑马鱼试验  
Tab. 1 Pathogenicity assays in zebrafish by using *Staphylococcus* infection

分组 group	数量 number	时间/h time	致死率/% lethality rate
感染组 infected fish	20	12	0
		24	25
		48	60
		72	100
对照组 control fish	20	7 d	0

## 2.2 获得 175 个差异表达基因

从葡萄球菌感染诱导 12 h 的成体斑马鱼皮肤组织中提取总 RNA, 经 Biotin 荧光标记与拥有 15 617 个 cDNA 片段的斑马鱼基因芯片(affymetrix)杂交后, 共检测出 175 个差异表达基因, 其中有 150 个上调表达基因(ratio > 2.0)和 25 个下调表达基因(ratio > 0.5); 在皮肤组织 150 个上调基因中, 91 个为已知功能基因, 59 个为未知功能基因; 下调基因 8 个为已知功能基因, 17 个为未知功能基因。正常组与感染组 20 尾斑马鱼 175 个差异基因表达量的算术平均数, 通过显著性分析( $P > 0.01$ )、对数转换作聚类分析。结果显示, 在已知功能的基因中, 这些差异基因主要涉及应答细菌(response to bacteria)、应激反应(response to stimulus)和生物调控(biological regulation)等免疫应答相关基因, 主要包括主要组织相容性复合体(MHC)I 类基因区的基因(*UEA*, *UFA*)、补体(*Clq*, *C7-1*)、凝集素基因(*HBL3*, *LGALSIL3*)、应急反应生长基因(*EGR-1*)、凝血因子(*F5*)、肿瘤坏死因子超家族(*TNFSF10L4*)、巨球蛋白基因(*A2M*)、转铁蛋白基因(*TF-a*)、胶原蛋白基因(*COL10A1*)、纤维蛋白原(*FGA*)、载脂蛋白 A1 基因(*APOA1*)、钙/钙调蛋白激酶基因(*CAMK2D1*)、细胞色素氧化酶基因(*CYP3A65*, *CYP1A*)、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶基因(*PCK1*)、羧肽酶基因(*CPB1*)、1,6-二磷酸果糖酶基因(*FBP1B*)、谷胱甘肽过氧化物酶(*GPX1B*)、胞质-5'-核苷酸酶-II 基因(*NT5C2L1*)、解偶联蛋白 4 基因(*UCP4*)和卵黄蛋白原基因(*VTG3*)等重要功能基因。此外, 检测到多种蛋白质水解相关蛋白

酶, 涉及弹性蛋白酶(ELA1, ELA2, ELA2L, ELA3L)、羧肽酶(CPA5, CPB1)、组织蛋白酶(CTSL)、血管紧张肽转换酶(ACE2)、胰蛋白酶(TRY)、糜蛋白酶原(CTRB1)和糜蛋白酶(CTRL)等。

## 2.3 差异表达基因的功能注释分析

将 175 个差异表达数据输入芯片分子功能注释 MAS 系统, 进行通路(pathway)和 GO(gene ontology)分析, 从功能角度挖掘基因芯片数据信息。结果发现, 斑马鱼皮肤组织中 175 个差异表达基因主要涉及 22 种生物功能, 其中有 13 种生物功能差异表达基因比例超过 2.0%, 并且以细胞过程(cellular process)、生理过程(physiological process)和催化活性(catalytic activity)方面的差异表达基因最多, 占有比例依次为 14%、13.67%和 12.67%(图 1)。根据 175 个差异表达基因的 ratio 值, 依次将各个差异表达基因所涉及的分子功能途径进行统计分析, 在表 2 中列出的 13 个通路中, 涉及免疫应答(immune response)、蛋白质水解(proteolysis)、脂类代谢(lipid metabolism)、碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)、氧化还原作用(oxidation reduction)、转录调控(regulation of transcription)、几丁质代谢(chitin metabolism)等通路的差异表达基因较多。在蛋白质水解生物学过程中, 所涉及的 18 个基因均上调表达, 类似蛋白质水解功能的通路还有氧化还原作用、碳水化合物代谢和转录调控等 5 个通路基因数较多; 同时还有几丁质代谢、信号传导和细胞通讯等 4 个通路, 虽然其涉及的基因数较少, 但均是上调表达(表 2); 此外, MAPK 信号通路(*GADD45AL*)、Wnt

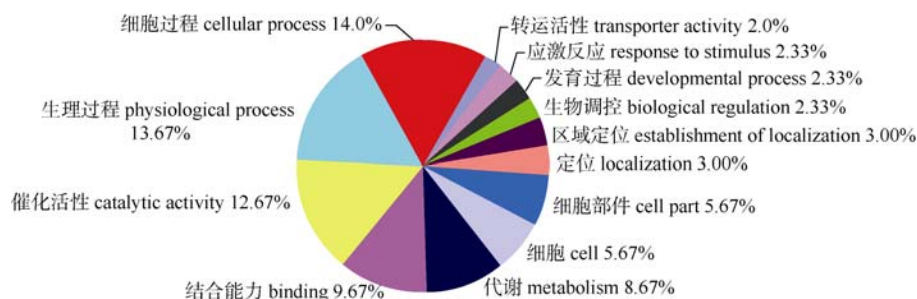


图 1 175 个差异表达基因的分子功能分类

Fig. 1 Functional annotations of 175 most differentially expressed genes

表 2 斑马鱼皮肤组织中 175 个差异基因最可能相关的代谢通路

Tab.2 Gene ontology and pathway in zebrafish skin

基因分类与通路名称 gene ontology and pathway	基因数目 count	<i>P</i>	<i>q</i>	基因符号 gene symbol
免疫应答 immune response	25	0.00014	0.00027	<i>PCK1, CPB1, A2M*, APOA1, F5, COL10A1, CYP3A65, C1q, C7-1, CYP1A, EGR1, FBPIB, FGA, GPX1B, HBL3, TF-<math>\alpha</math>, LGALSIL3, NT5C2L1, MHC1UFA, MHC1UEA, UCP4, TNFSF10L4*, VTG3*, CAMK2D1, SI-DKEY-91F15.6</i>
蛋白质水解 proteolysis	18	3.10E-25	1.1E-23	<i>TRY, ELA2L, ELA2, CPA5, ZGC:92041, CTRB1, CPA4, LOC562139, ELA3L, ACE2, ZGC:153968, CPB1, CTRL, CTSL.1, CPA1, ZGC:92511, ZGC:112266, ZGC:112368</i>
脂类代谢 lipid metabolism	8	1.90E-08	6.80E-08	<i>APOA1, APOA4, VTG3*, ZGC:110064, PLA2G1B, ZGC:194131, TF-<math>\alpha</math>, PLA2G12B</i>
转运 transport	8	0.0006	0.00093	<i>APOA1, RBP2A, UCP4, FABP2, UCP2L, FABP1B, FABP6, SLC6A19</i>
氧化还原作用 oxidation reduction	7	3.80E-08	1.20E-07	<i>CYP1A, ZGC:64106, F5, GPX1B, CYP3A65, HSD11B2, CYP3C1L2</i>
碳水化合物代谢 carbohydrate metabolism	6	0.000011	0.000026	<i>AMY2A, FBPIB, ZGC:55941, ZGC:55813, ZGC:56053, ZGC:55406</i>
转录调控 regulation of transcription	4	0.52	0.29	<i>EGR1, HER2, IRF2BP1, ZGC:77060</i>
几丁质代谢 chitin metabolism	3	8.40E-08	2.50E-07	<i>ZGC:55941, ZGC:56053, ZGC:55406</i>
信号传导 signal transduction	3	0.97	0.46	<i>PDK2, FGA, SI:RP71-57J15.4</i>
细胞通讯 cell communication	3	2.80E-07	3.50E-07	<i>ZGC:92035, ZGC:154009, ZGC:158846</i>
代谢 metabolism	3	1	0.46	<i>ZGC:64106, HSD11B2, ZGC:92254</i>
p53 信号通路 p53 signaling pathway	3	3.50E-07	3.50E-07	<i>CCNG2, GADD45AL, ZGC:153369*</i>
细胞周期 cell cycle	2	0.00035	0.00023	<i>GADD45AL, ZGC:153369*</i>

注: *P* 指 0~1 之间的概率值, *q* 指假阳性在阳性数据中的比值, “\*”示下调表达基因。

Note: *P* is a probability, with a value ranging from zero to one. *q* is the proportion of variables chosen as positive which are false positives. “\*” means down-regulated gene.

信号通路(*CAMK2D1*)和钙信号通路等各涉及 1 个基因参与斑马鱼皮肤抗细菌感染免疫应答; 在免疫应答、脂类代谢、细胞周期和 p53 信号通路中涉及下调表达基因, 主要有肿瘤坏死因子超家族基因(*TNFSF*)、巨球蛋白基因(*A2M*)、卵黄蛋白原基因(*VTG3*)和未知功能基因(*ZGC:153369*)等基因表达下调。斑马鱼皮肤组织中免疫应答相关基因差异表达, 见表 3。

### 3 讨论

近年来, 研究发现鱼类的皮肤中含有大量的黏液细胞、巨噬细胞和抗体分泌细胞(antibody-secreting cells, ASC), 与其他活性物质组成了抵御病原微生物感染的有效防线<sup>[20]</sup>。最近相继从草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)、石斑鱼(*Epinephelus coioides*)等鱼

类的皮肤培养液中检测到特异性抗体<sup>[21-23]</sup>。鱼类皮肤分泌的抗体可以参与保护机体, 并防御病原的感染<sup>[8, 21]</sup>。研究表明, 浸泡免疫抗原摄取的部位主要在皮肤和鳃, 并且主要诱导局部免疫应答<sup>[24-27]</sup>。因此, 一般认为鱼类除了具有系统免疫应答, 还存在独立的黏膜免疫系统。

斑马鱼 cDNA 基因芯片是用来分析研究基因表达、筛选相关目的功能基因的最快捷、有效方法之一。本研究以葡萄球菌感染诱导的成体斑马鱼为实验模型, 通过基因芯片(affymatrix)技术分析其皮肤免疫相关的功能基因。所获实验结果证实, 应用基因芯片斑马鱼芯片在皮肤黏膜免疫应答研究和应用中是可行的, 并获得了较好的效果, 其中涉及 25 个免疫相关因子和 18 个蛋白质水解相关蛋白酶基因等。本研究初步报道斑马鱼皮肤黏膜免疫应答相关基因及其可能的调控机制, 这

表 3 斑马鱼皮肤组织中免疫应答相关基因差异表达  
Tab.3 Immune response related-gene in zebrafish skin

GenBank 登录号 GenBank ID	基因 gene	差异倍数 fold change	分子功能 molecular function
BM181749	<i>LGALS1L3</i>	13.844	糖结合
BC053122	<i>PCK1</i>	8.909	磷酸烯醇丙酮酸激酶活性等, GTP、嘌呤核苷酸结合
AI545080	<i>CPBI</i>	5.217	金属羧肽酶活性等, 锌离子结合
NM_131128	<i>APOA1</i>	4.668	脂质、胆固醇转运活性, 高密度脂蛋白(HDL)结合等
CD014748	<i>CYP3A65</i>	3.624	单氧酶、氧化还原酶活性, 血红素、铁离子结合等
BC053140	<i>MHC1UEA</i>	3.427	抗原递呈、加工等免疫应答
AW232570	<i>GPX1B</i>	2.974	氧化还原酶活性, 谷胱甘肽过氧化物酶活性等
AF137534	<i>MHC1UFA</i>	2.810	抗原递呈、加工, 细菌免疫应答等
BM957464	<i>TF-a</i>	2.699	转移酶活性, 铁离子结合
CD014253	<i>Clq</i>	2.644	无注释
BC053267	<i>FBP1B</i>	2.479	磷酸水解酶活性
AI397342	<i>COL10A1</i>	2.442	无注释
AB078927	<i>CYP1A</i>	2.410	单氧酶、氧化还原酶活性, 电子载体, 血红素、铁离子结合等
AW595366	<i>EGR1</i>	2.331	DNA 结合, 锌离子结合
BI430015	<i>NT5C2L1</i>	2.254	金属离子结合
BG729013	<i>FGA</i>	2.218	无注释
AI974197	<i>SI:DKEY-91F15.6</i>	2.183	蛋白质结合
AA497156	<i>C7-1</i>	2.081	无注释
AI793833	<i>CAMK2D1</i>	2.061	丝氨酸/苏氨酸蛋白质激酶活性, 钙调素依赖蛋白激酶活性, 转移酶活性, 钙调素、ATP 结合等
BC045464	<i>UCP4</i>	2.061	转移酶活性
NM_131570	<i>HBL3</i>	2.060	钙离子结合, 糖结合
AF515275	<i>F5</i>	2.027	氧化还原酶活性, 铜离子结合等
AI477604	<i>VTG3</i>	0.482	脂质转运活性
BM775973	<i>TNFSF10L4</i>	0.473	肿瘤坏死因子受体(TNFR)结合
BI983817	<i>A2M</i>	0.458	无注释

为系统深入研究鱼类皮肤免疫系统(fish skin immune system, FSIS)的转录组学提供了参考依据。

近几年, 关于鱼类的系统免疫应答研究报道较多, 一些新分子技术的发展引起了人们对鱼类免疫相关因子的关注, 开始应用定量 RT-PCR、cDNA 微阵列芯片技术等检测牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)、鲤(*Cyprinus carpio*)等鱼类免疫相关基因<sup>[2-3]</sup>。在这些细胞因子中, 最近报道鲤鱼的 CXC 趋化因子介导嗜中性粒细胞的趋化现象, 以及 CXC 受体(CXCRs)参与鱼体上所寄生的日本鳃(*Argulus japonicus*)的急性感染<sup>[1]</sup>。基因表达研究表明, 一些免疫调节因子参与鱼类的先天与适应性免疫应答, 包括细胞因子白介素(IL-1, IL-8)、肿瘤坏死因子(TNF)、干扰素(IFN)、趋化因子(CXC,

CC)、Toll 样受体(TLRs)以及氧化酶环氧化酶(COX-2)、诱导型 NO 合酶(iNOS)等, *IL-1β* 和 *TNFα* 可通过激活 NF-κB 信号通路诱导一氧化氮(NO)的产生<sup>[2, 28]</sup>。除补体活性外, 其他体液免疫因子如急性时相蛋白(APP)、过氧化物酶(PO)、溶菌酶等也参与免疫调控。Rojo 等<sup>[29]</sup>采用 RT-PCR 方法对鳗利斯顿氏菌(*Listonella anguillarum*)腹腔注射感染的斑马鱼研究表明, 感染 22 h 后转铁蛋白基因(*TF-a*)、肿瘤坏死因子基因(*TNFa*)等均上调表达。本实验在斑马鱼皮肤抗葡萄球菌感染免疫应答中, 除补体、MHC 和 *TNF* 等免疫相关基因之外, 却未检测到 IL、IFN、TLRs、NF-κB 以及趋化因子等重要免疫分子, 提示鱼类皮肤免疫系统可能还有其他的免疫保护机制。

研究表明, 鱼类系统免疫与哺乳动物等具有类似的宿主免疫应答反应, 但是对鱼类皮肤黏膜免疫的分子机制, 目前仍不清楚。Meijer 等<sup>[30]</sup>采用 3 种不同的基因芯片(45 465 个基因)对海分枝杆菌感染成体斑马鱼的基因表达谱分析表明, 获得 159 个基因差异表达显著一致, 主要涉及炎症反应、信号转导等免疫相关基因。本实验结果检测葡萄球菌感染诱导的成体斑马鱼皮肤免疫相关基因, 主要涉及免疫应答、炎症反应、补体激活和信号转导相关基因等。由此可见, 本次实验与已报道的鱼类免疫相关因子有许多相同之处, 提示无论鱼类系统免疫或皮肤黏膜免疫, 很可能存在相似的保护机制。此外, Sar 等<sup>[31]</sup>采用基因芯片研究海分枝杆菌感染成体斑马鱼的基因表达谱, 结果表明影响多个信号级联反应, 主要包括 Wnt 通路和 TLR 通路。本研究发现 p53 信号通路、Wnt 信号通路和 MAPK 信号通路等参与斑马鱼皮肤抗细菌感染免疫应答, 这对研究鱼类皮肤免疫应答机制提供了有价值参考, 有待进一步探讨。

本研究首次采用斑马鱼 cDNA 基因芯片在皮肤免疫系统研究中进行了初步尝试, 结果证实方法基本可行, 推测 MHC I 类分子、补体、凝集素、凝血因子、转铁蛋白和蛋白酶等参与鱼类皮肤的抗感染免疫应答, 为将来以斑马鱼感染模型研究皮肤局部与病原的互作机制提供了科学依据。但由于此次实验所获的差异表达基因数量有限, 这对全面检测鱼类皮肤免疫全基因表达谱带来了局限, 因此结合 EST 序列分析或蛋白质组学分析方法进行补充研究, 将更有助于理解鱼类皮肤免疫应答的分子机制。

#### 参考文献:

- [1] Huising M O, Stolte E, Flik G, et al. CXC chemokines and leukocyte chemotaxis in common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Dev Comp Immunol*, 2003, 27(10): 875–888.
- [2] Kurobe T, Yasuike M, Kimura T, et al. Expression profiling of immune-related genes from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* kidney cells using cDNA microarrays[J]. *Dev Comp Immunol*, 2005, 29(6): 515–523.
- [3] Gonzalez S F, Huising M O, Stakauskas R, et al. Real-time gene expression analysis in carp (*Cyprinus carpio* L.) skin: inflammatory responses to injury mimicking infection with ectoparasites[J]. *Dev Comp Immunol*, 2007, 31(3): 244–254.
- [4] Wu Z, Zhang W, Lu Y, et al. Transcriptome profiling of zebrafish infected with *Streptococcus suis*[J]. *Microb Pathog*, 2010, 48(5): 178–187.
- [5] Peatman E, Terhune J, Baoprasertkul P, et al. Microarray analysis of gene expression in the blue catfish liver reveals early activation of the MHC class I pathway after infection with *Edwardsiella ictaluri*[J]. *Mol Immunol*, 2008, 45(2): 553–566.
- [6] Ordas A, Hegedus Z, Henkel CV, et al. Deep sequencing of the innate immune transcriptomic response of zebrafish embryos to *Salmonella* infection[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2010, doi:10.1016/j.fsi.2010.08.022.
- [7] Hegedus Z, Zakrzewska A, Agoston VC, et al. Deep sequencing of the zebrafish transcriptome response to *mycobacterium* infection[J]. *Mol Immunol*, 2009, 46(15): 2918–2930.
- [8] Xu DH, Klesius PH, Shelby RA. Cutaneous antibodies in excised skin from channel catfish, *Ictalurus punctatus Rafinesque*, immune to *Ichthyophthirius multifiliis*[J]. *J Fish Dis*, 2002, 25(1): 45–52.
- [9] Shoemaker CA, Xu DH, Shelby RA, et al. Detection of cutaneous antibodies against *Flavobacterium columnare* in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, (*Rafinesque*)[J]. *Aqua Res*, 2005, 36(8): 813–818.
- [10] Woo PT. Protective immunity in fish against protozoan diseases[J]. *Parassitologia*, 2007, 49(3): 185–191.
- [11] Subramanian S, MacKinnon SL, Ross NW. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species[J]. *Comp Biochem Physiol Part B: Biochem Molec Biol*, 2007, 148(3): 256–263.
- [12] Bos JD, Kapsenberg ML. The skin immune system SIS its cellular constituents and their interactions[J]. *Immunol Today*, 1986, 7: 235–240.
- [13] Evans A. Intra-dermal vaccination series. Part 3. Skin immune system[J]. *Pig Progress*, 2006, 22: 24–25.
- [14] Nestle FO, Nickoloff BJ. Deepening our understanding of immune sentinels in the skin[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117: 2382–2385.
- [15] Matejusová I, Felix B, Sorsa-Leslie T, et al. Gene expression profiles of some immune relevant genes from skin of susceptible and responding Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) infected with *Gyrodactylus salaris* (*Monogenea*) revealed by

- suppressive subtractive hybridisation[J]. *Int J Parasitol*, 2006, 36(10–11): 1175–1183.
- [16] Skugor S, Glover KA, Nilsen F, et al. Local and systemic gene expression responses of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) to infection with the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*)[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 498.
- [17] Caipang CM, Lazado CC, Brinchmann MF, et al. Differential expression of immune and stress genes in the skin of Atlantic cod (*Gadus morhua*)[J]. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*, 2011, 6(2): 158–162.
- [18] 闫永健, 赵海滨, 郭炳冉, 等. UVB 辐射导致斑马鱼早期胚胎发育异常和 DNA 损伤的初步研究[J]. *中国水产科学*, 2010, 17(1): 69–77.
- [19] Sullivan C, Kim CH. Zebrafish as a model for infectious disease and immune function[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 25(4): 341–350.
- [20] Zhao X, Findly RC, Dickerson HW. Cutaneous antibody-secreting cells and B cells in a teleost fish[J]. *Dev Comp Immunol*, 2008; 32(5): 500–508.
- [21] Luo XC, Xie MQ, Zhu XQ, et al. Protective immunity in grouper (*Epinephelus coioides*) following exposure to or injection with *Cryptocaryon irritans*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 22(4): 427–432.
- [22] Grabowski LD, LaPatra SE, Cain KD. Systemic and mucosal antibody response in tilapia, *Oreochromis niloticus*, following immunization with *Flavobacterium columnare*[J]. *J Fish Dis*, 2004, 27(10): 573–581.
- [23] Lü AJ, Li ZQ, Zhang QY. Detection of cutaneous antibodies in excised skin explants from grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*, immune to *Scophthalmus maximus* rhabdovirus[J]. *J Fish Dis*, 2008, 31(8): 559–565.
- [24] Delamare-Deboutteville J, Wood D, Barnes AC. Response and function of cutaneous mucosal and serum antibodies in barramundi (*Lates calcarifer*) acclimated in seawater and freshwater[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2006, (1): 92–101.
- [25] Esteve-Gassent M D, Nielsen, M E, Amaro C. The kinetics of antibody production in mucus and serum of European eel (*Anguilla anguilla*) after vaccination against *Vibrio vulnificus*: development of a new method for antibody quantification in skin mucus[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2003, 15(1): 51–61.
- [26] Moore JD, Ototake M, Nakanishi T. Particulate antigen uptake during immersion immunization of fish: the effectiveness of prolonged exposure and the roles of skin and gill[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1998, 8(6): 393–407.
- [27] Olsen MM, Kania PW, Heinecke RD, et al. Cellular and humoral factors involved in the response of rainbow trout gills to *Ichthyophthirius multifiliis* infections: molecular and immunohistochemical studies[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2011, 30(3): 859–869.
- [28] Saeij JP, Van Muiswinkel WB, Groeneveld A, et al. Immune modulation by fish kinetoplastid parasites: a role for nitric oxide[J]. *Parasitology*, 2002, 124(1): 77–86.
- [29] Rojo I, de Ilarduya OM, Estonba A, et al. Innate immune gene expression in individual zebrafish after *Listonella anguillarum* inoculation[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 23(6): 1285–1293.
- [30] Meijer AH, Verbeek FJ, Salas-Vidal E, et al. Transcriptome profiling of adult zebrafish at the late stage of chronic tuberculosis due to *Mycobacterium marinum* infection[J]. *Mol Immunol*, 2005, 42(10): 1185–1203.
- [31] Sar AM, Spaink HP, Zakrzewska A, et al. Specificity of the zebrafish host transcriptome response to acute and chronic mycobacterial infection and the role of innate and adaptive immune components[J]. *Mol Immunol*, 2009, 46(11–12): 2317–2332.

## Differential expression of immune-related genes in the skin of zebrafish screened by cDNA microarray

LÜ Aijun<sup>1</sup>, HU Xiucui<sup>2</sup>, XUE Jun<sup>1</sup>, WANG Yi<sup>3</sup>, LI Jinnian<sup>3</sup>

1. School of Life Sciences, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116, China

2. Key Laboratory of Biotechnology for Medicinal Plants, Xuzhou 221116, China

3. College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

**Abstract:** The objective of this study is to screen the differential gene expression in response to a pathogenic infection in the skin of fish, and to provide a basis for understanding the fish skin immune mechanism at the molecular level. The immune response in the skin was analyzed by using *Staphylococcus*-induced zebrafish as a model, and applying the affymetrix zebrafish cDNA microarray hybridized to the skin tissues. Total RNAs were isolated from the skin tissues of adult fish, labeled with biotin, and hybridized to zebrafish cDNA gene chips. The expression profiles from the hybridization to 15 617 genes in the zebrafish cDNA array were analyzed by the GeneChip Operating Software (GCOS1.4). Out of 15 617 genes in zebrafish cDNA chips, a total of 175 was identified to be significantly expressed in the skin tissues, of which 150 were up-regulated and 25 were down-regulated. Among the 150 up-regulated genes, the functions of 91 genes were known and 59 were unknown. Furthermore, by using the Gene Ontology (GO) method the differential expression genes could be categorized into 13 functional groups, and some of them are considered as potential candidates in the fish skin immune response. Thus, several genes related to immune response in the skin were identified, including major histocompatibility complex class I genes (UEA, UFA), complement component (C1q, C7-1), lectin (HBL3, LGALS1L3), early growth response 1 (EGR-1), tumor necrosis factor superfamily (TNFSF10L4), coagulation factor V(F5), transferrin-a (TF-a), and several proteases. The Affymetrix zebrafish cDNA microarray is useful for identifying the functional genes involved in the skin immune defense of fish: that is, MHC I, complement, lectin, and proteases. However, future analysis of the function of these genes may contribute to an understanding of the mechanisms of *Staphylococcus* pathogenesis and mucosal bacterial interactions.

**Key words:** zebrafish; skin; gene expression; cDNA microarray

**Corresponding author:** LÜ Aijun. E-mail: lajand@126.com