

水产动物营养与饲料团队

读书报告

报告人：曹慧

时间：2019年12月1日

Original Research ARTICLE



Front. Microbiol., 18 September 2019 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02156>

The Responses of Germ-Free Zebrafish (*Danio rerio*) to Varying Bacterial Concentrations, Colonization Time Points, and Exposure Duration

 [Fang Tan](#)¹,  [Samwel Mchele Limbu](#)^{1,2},  Ye Qian¹,  Fang Qiao¹,  [Zhen-Yu Du](#)^{1*} and  [Meiling Zhang](#)^{1*}

- ¹Laboratory of Aquaculture Nutrition and Environmental Health, School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai, China
- ²Department of Aquatic Sciences and Fisheries Technology, University of Dar es Salaam, Dar es Salaam, Tanzania

Impact Factor:4.259

目录

01



研究背景



02



材料与方法

03



结果与讨论



04



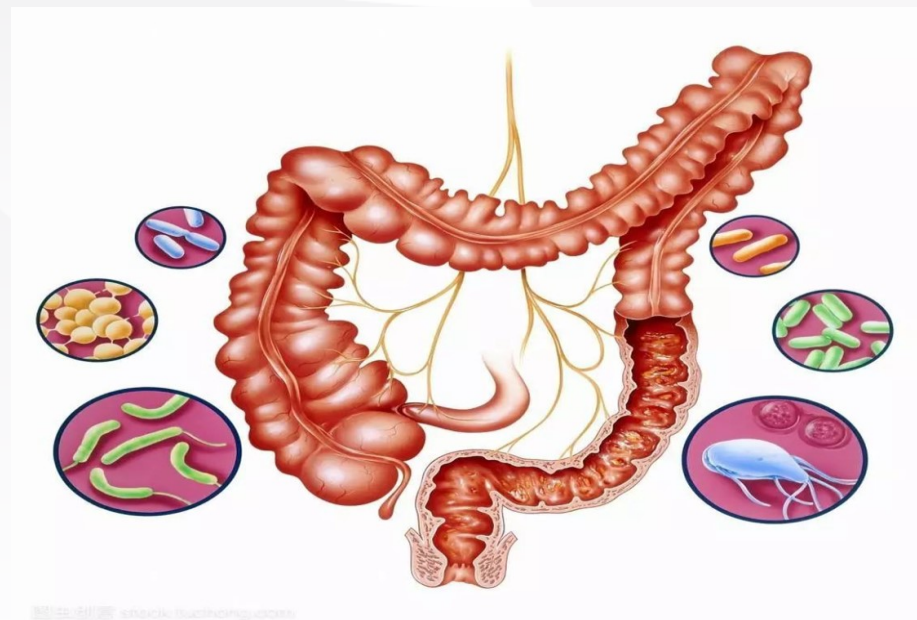
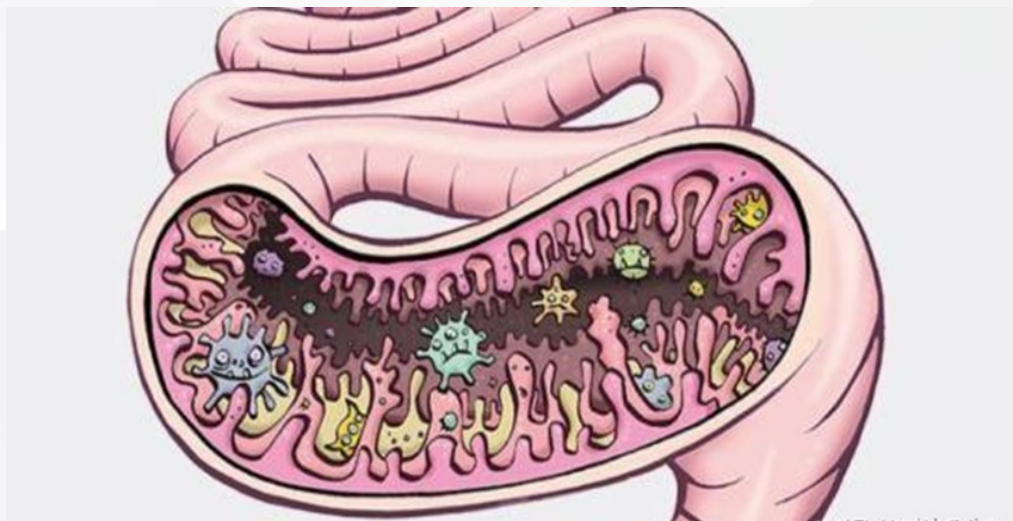
总结与收获

第

1

部分

研究背景

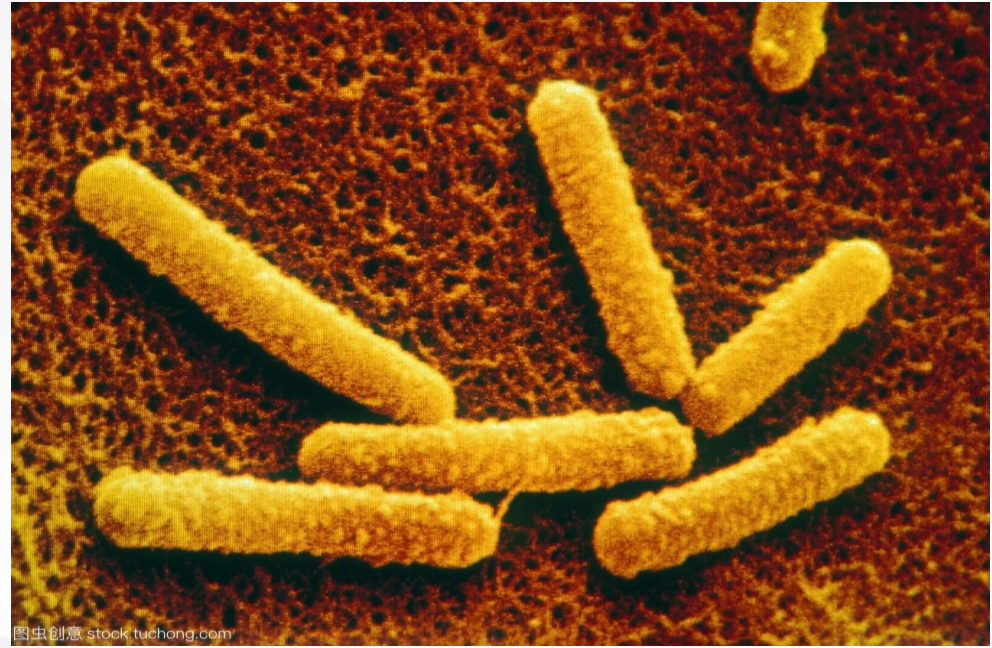
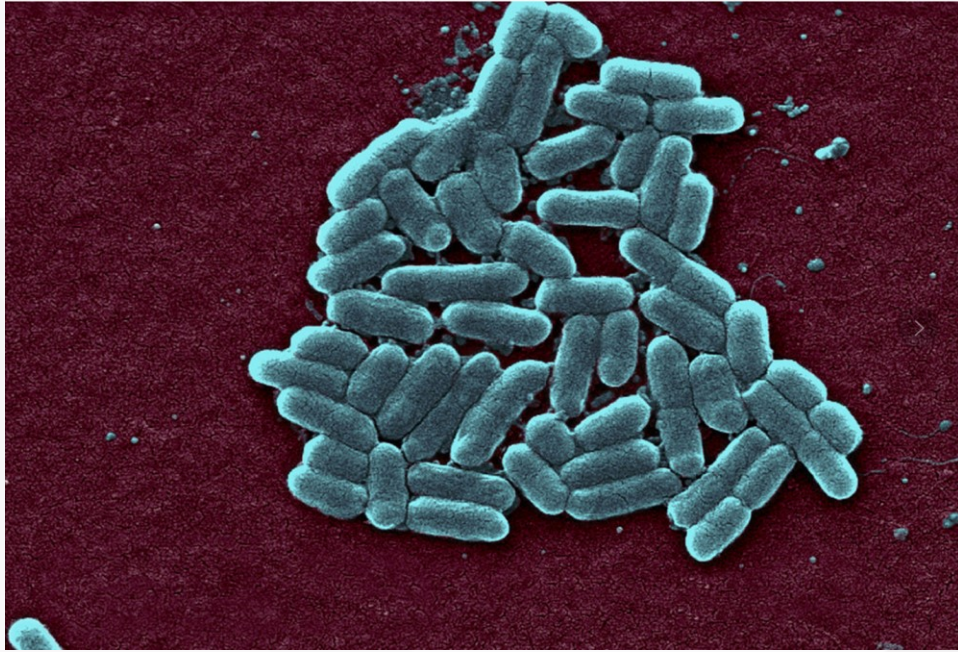


- 动物胃肠道内的微生物群在各种生理过程扮演着重要角色，包括免疫系统调节，肠道屏障增强，营养吸收，对病原体、行为和神经发育的影响。
- 肠道微生物与其宿主有十分复杂且动态的关系。
- 无菌(GF) 动物作为简单而强大的工具来阐明宿主和它们的肠道微生物之间的因果关系。



GF斑马鱼(*Danio rerio*)模型于2004年成功建立，斑马鱼容易在实验室饲养，产卵能力强，且幼鱼是透明的（从受精到成年早期），便于在体内观察肠道细菌。

考虑到其实用性和简便性，GF斑马鱼被广泛应用于益生菌和病原体在体内的功能筛选和评价。此外，还利用GF斑马鱼研究了细菌定殖对宿主生物过程的影响。



E. coli DH5 α 和*B. subtilis* WB800N是鱼类肠道中常见的共生菌，它们之前已经从健康鱼的肠道中被识别出来。

E. coli DH5 α 和*B. subtilis* WB800N易于荧光标记，它们能够表达绿色荧光蛋白(GFP)作为生物标志物。

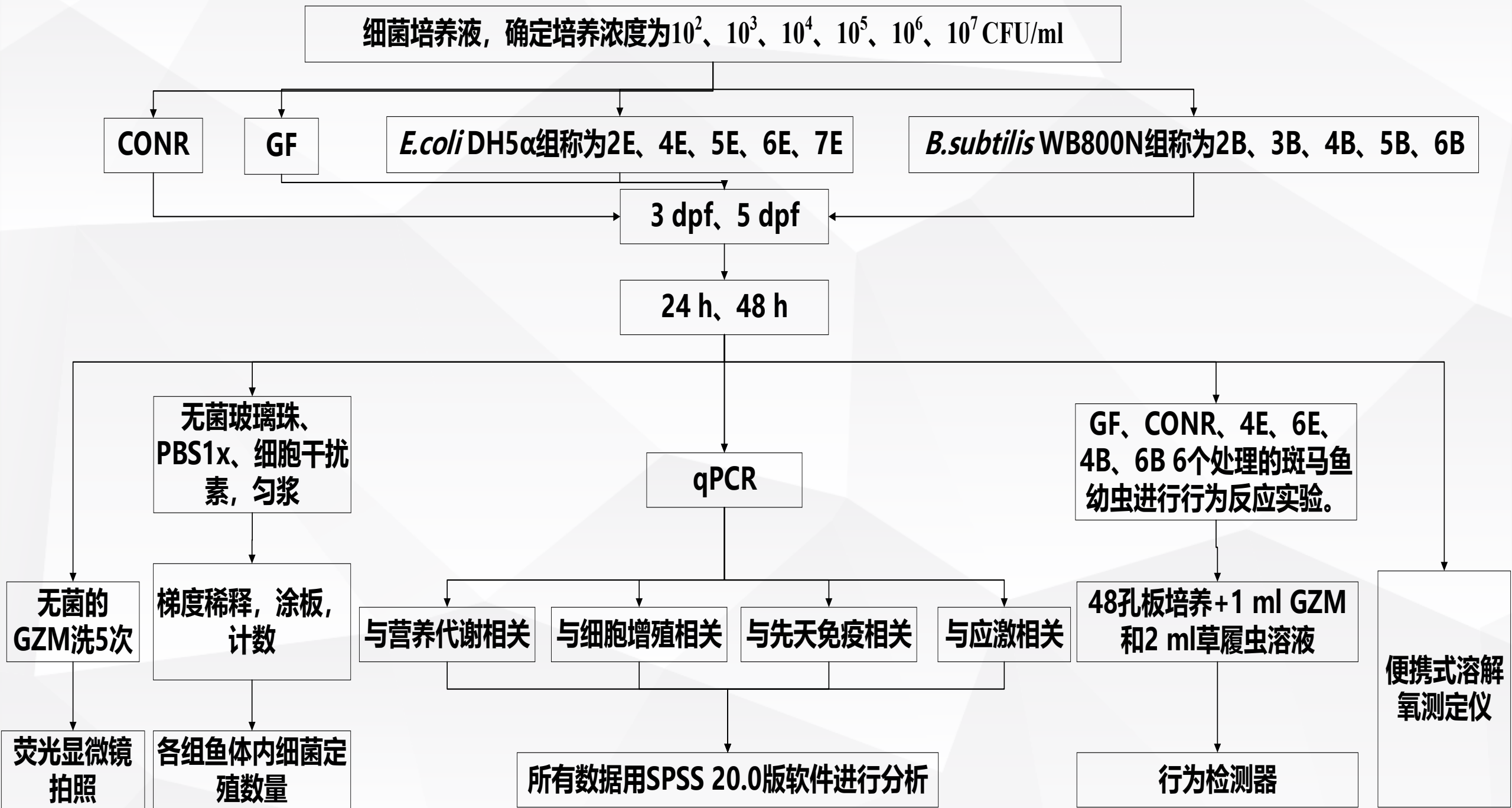
- 在目前的研究中，本文用*E.coli* DH5 α 和*B. subtilis* WB800N定殖的GF斑马鱼，与传统 (CONR)斑马鱼和GF斑马鱼进行比较，揭露GF斑马鱼的接种浓度、接种时间和暴露时间等条件在研究中地差异。
- 本文评估了定殖效率和宿主在营养代谢、先天免疫、细胞增殖、应激和不同细菌单一条件下的行为特征方面的反应。

第

2

部分

材料与amp;方法



第

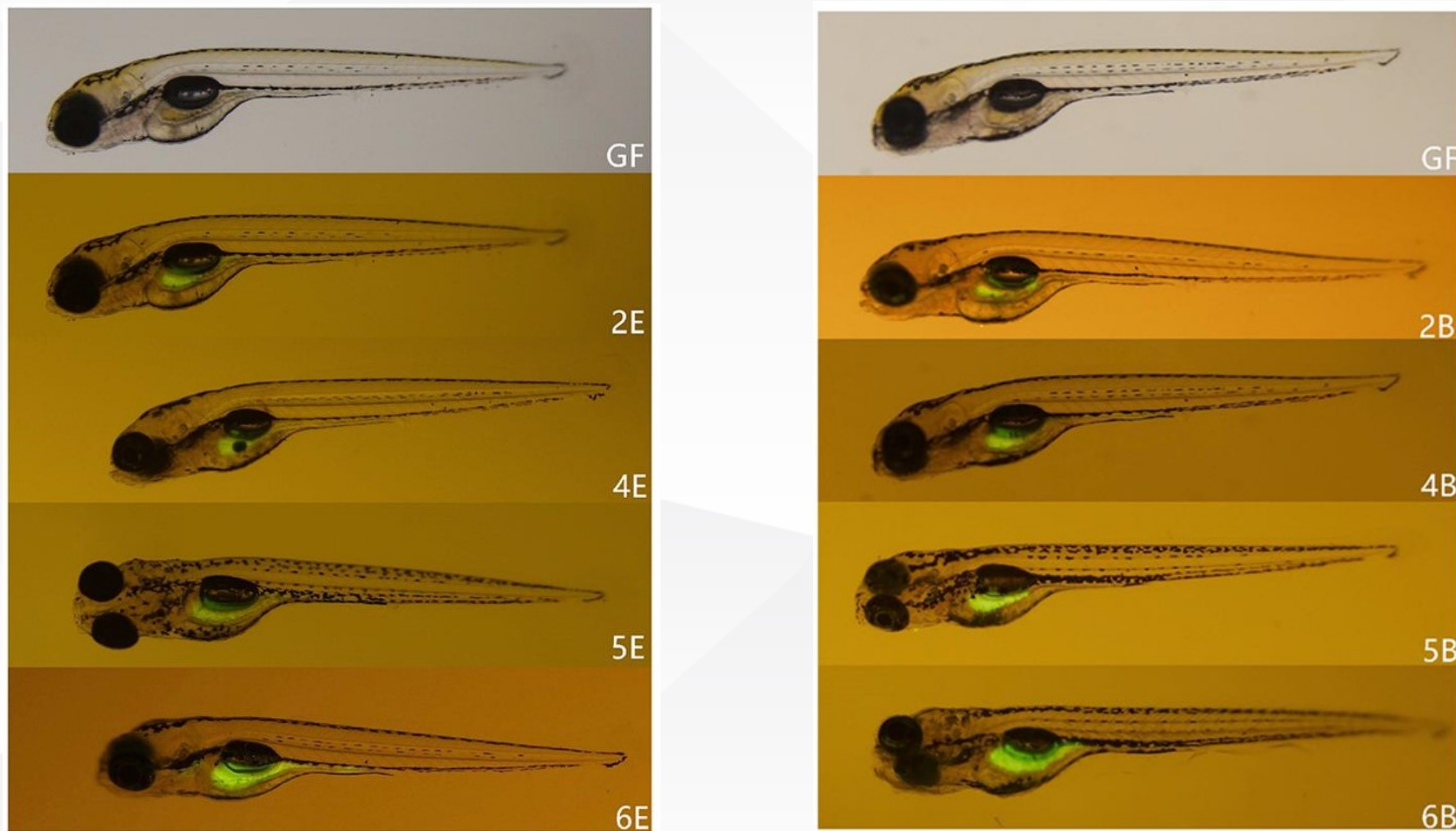
3

部分

结果

03 结果与讨论

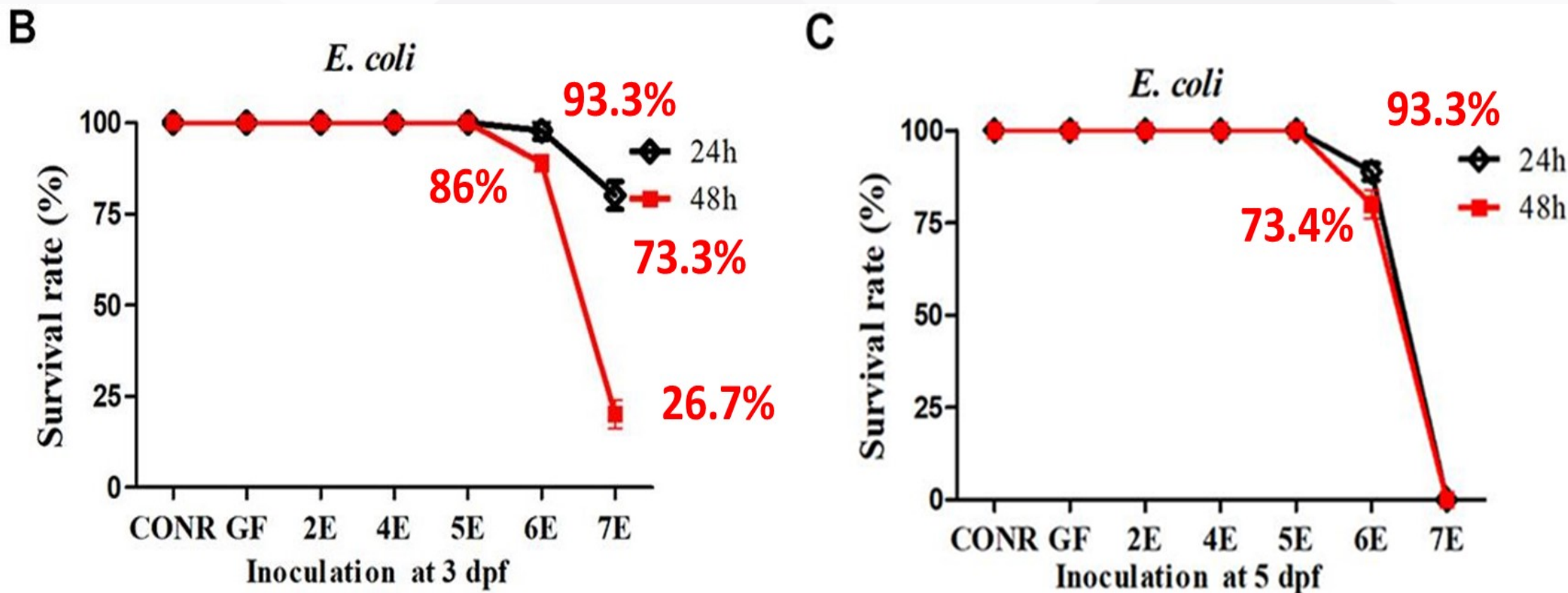
1. 单一菌种定殖成功



在4 dpf, *E.coli* DH5 α 、*B. subtilis* WB800N成功定殖于GF斑马鱼中。

03 结果与讨论

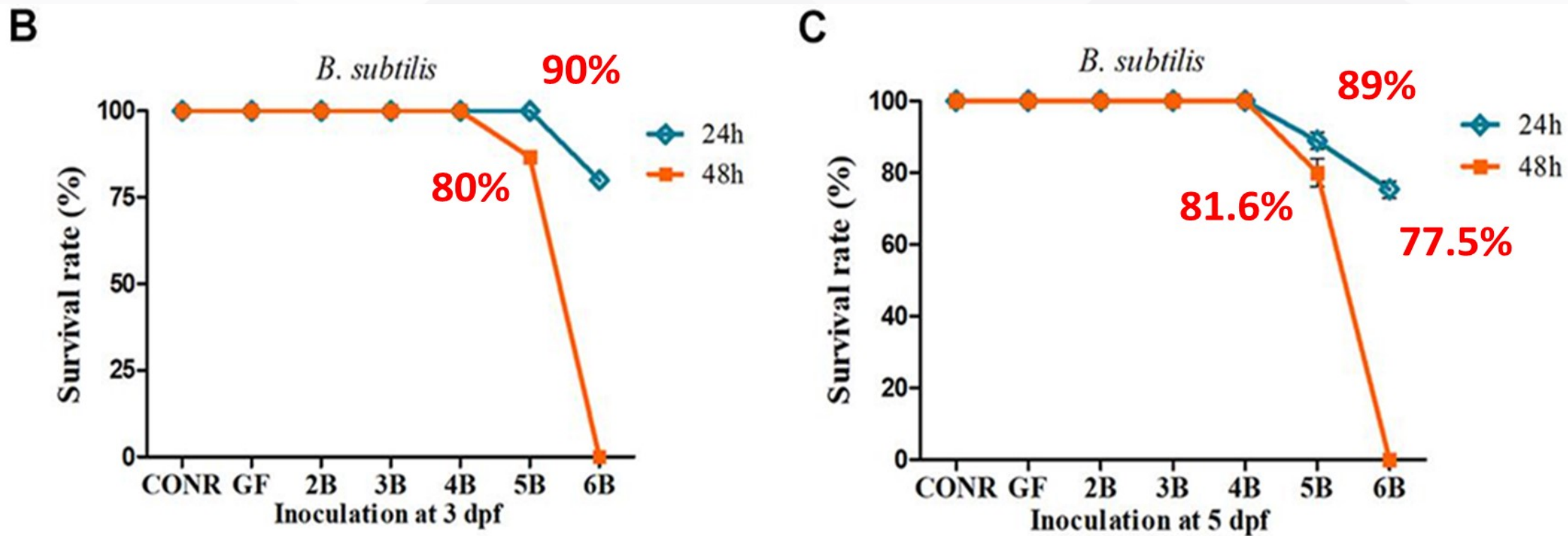
2.定殖后, GF的存活率- E组



除了6E组, 接触时间并不是影响存活率的重要因子。

03 结果与讨论

2.定殖后, GF的存活率-B组

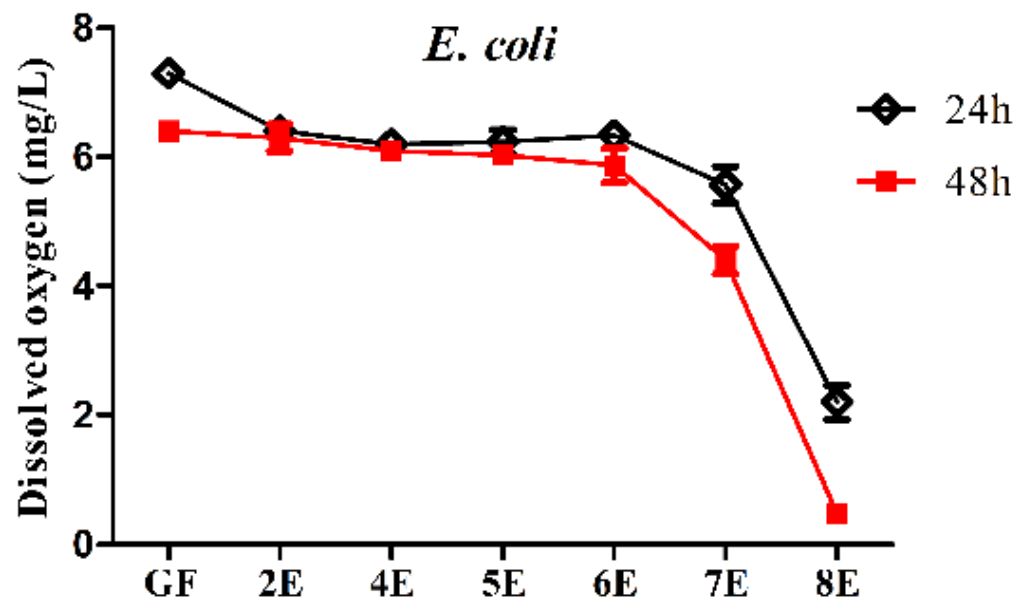


5 dpf的GF存活率比3 dpf的GF低。

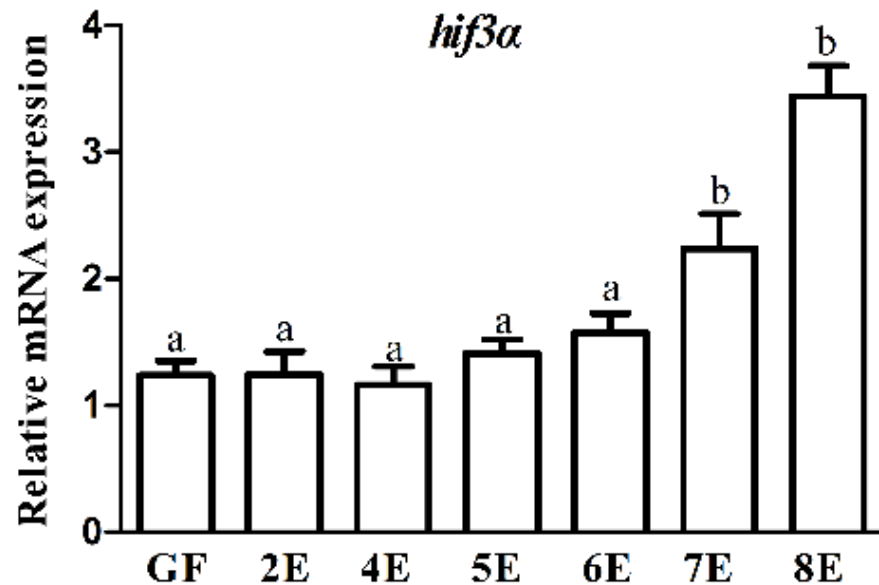
03 结果与讨论

3. 补充实验-E组

A



B

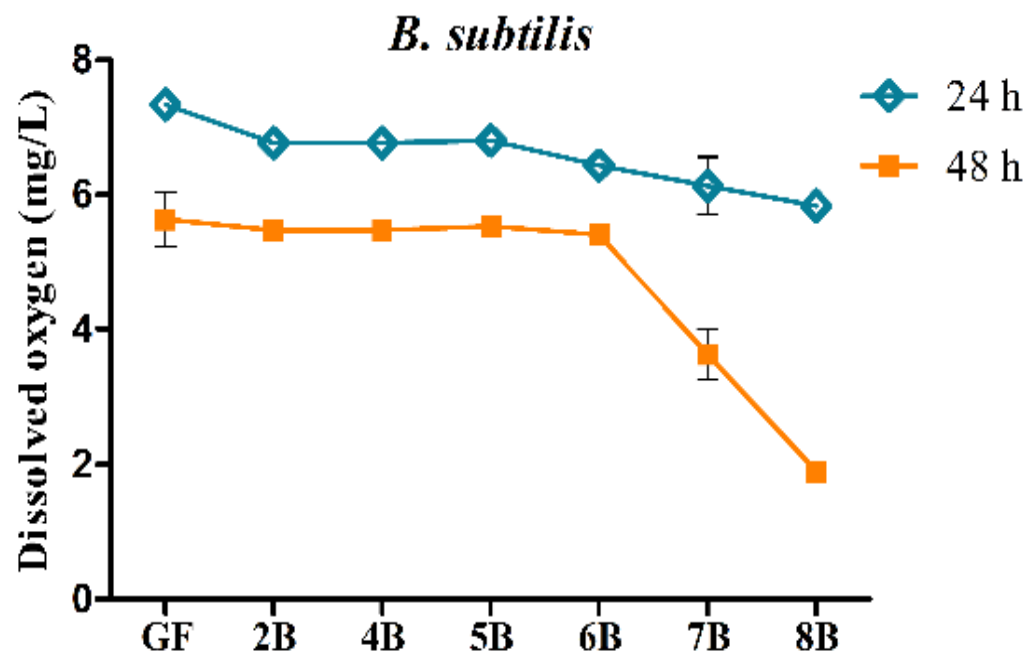


当细菌定殖浓度在 10^2 - 10^6 CFU/mL时, *hif3a*的表达水平没有显著差异。

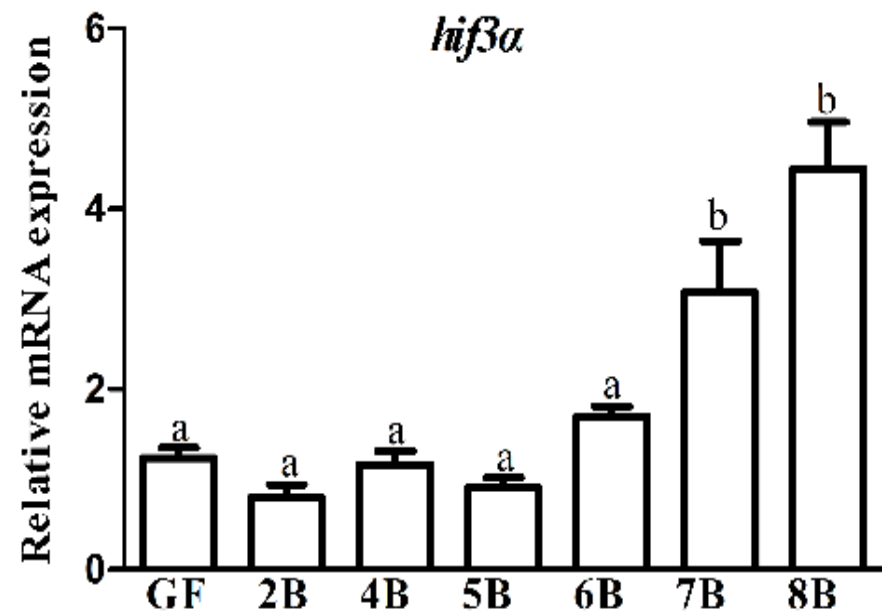
03 结果与讨论

3. 补充实验-B组

A



B

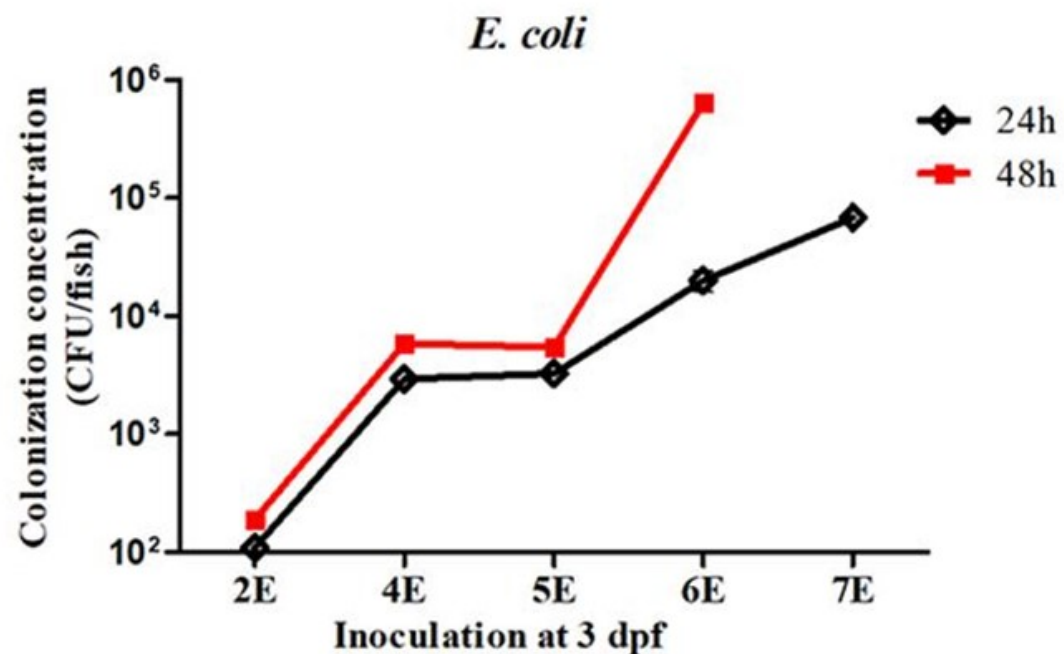


结果表明，定殖高浓度的细菌导致鱼死亡的原因是水中溶解氧的减少。

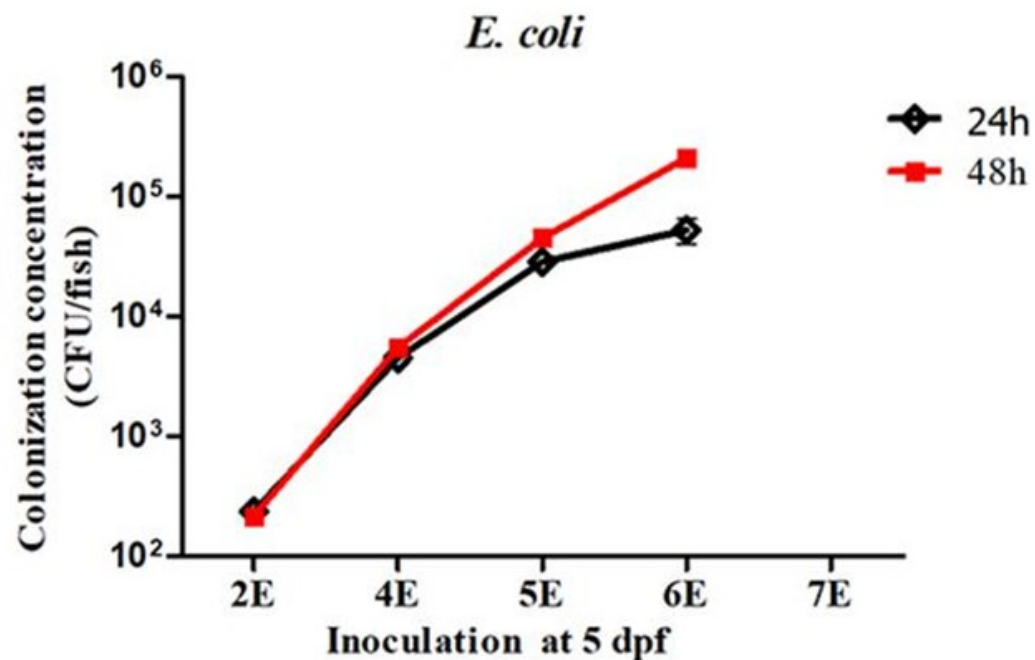
03 结果与讨论

4. GF个体中所含细菌浓度-E组

D



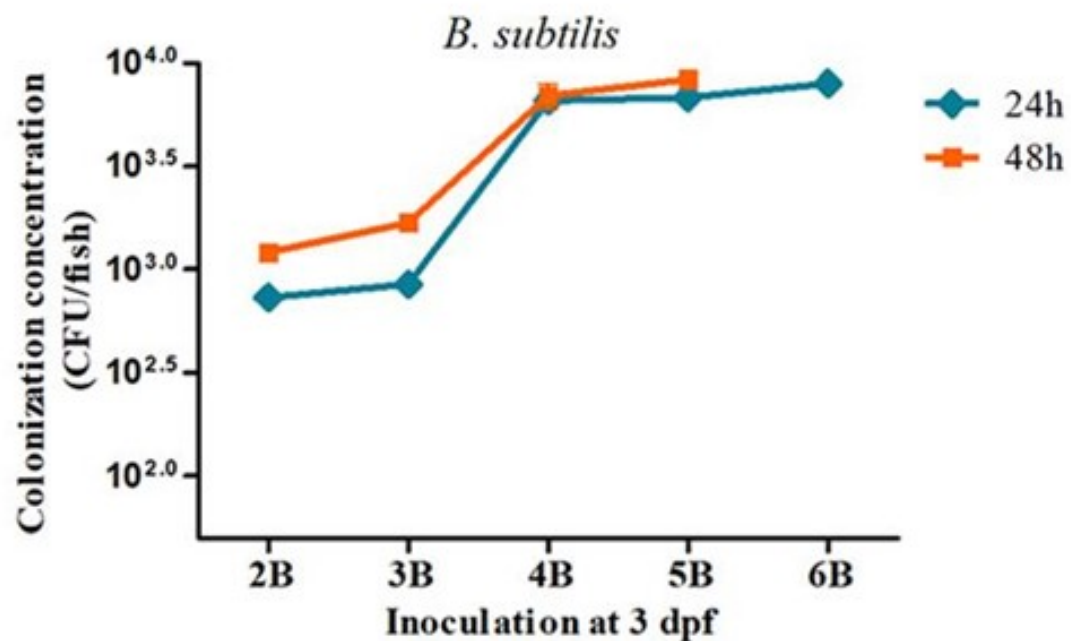
E



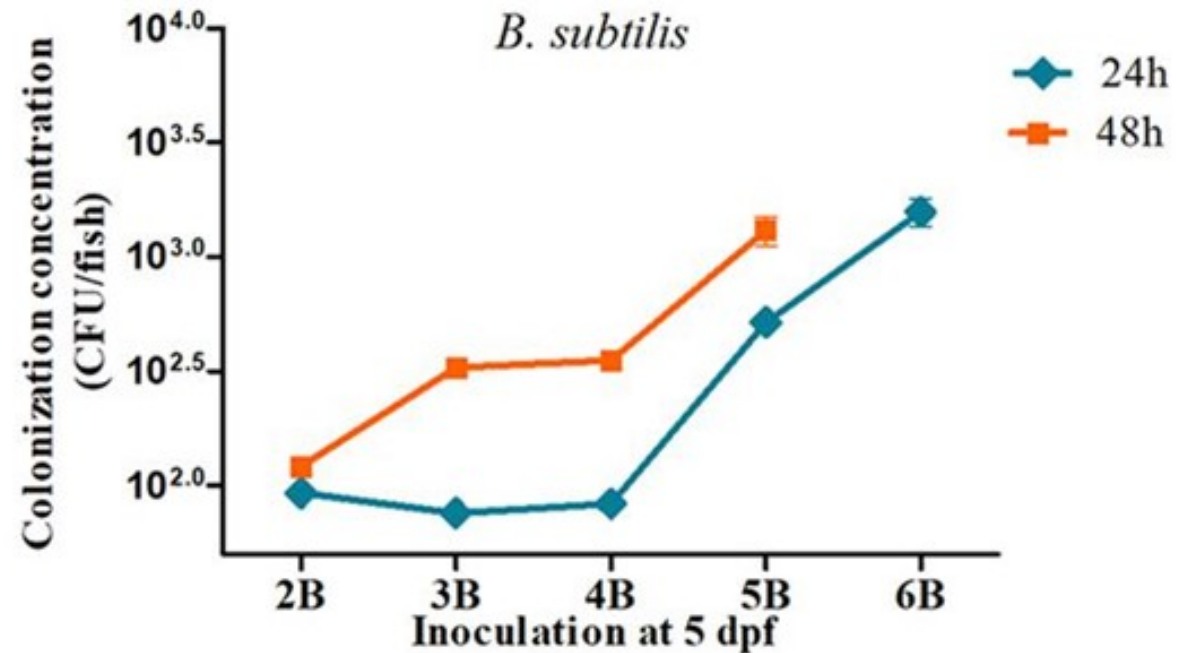
03 结果与讨论

4. GF个体中所含细菌浓度-B组

D



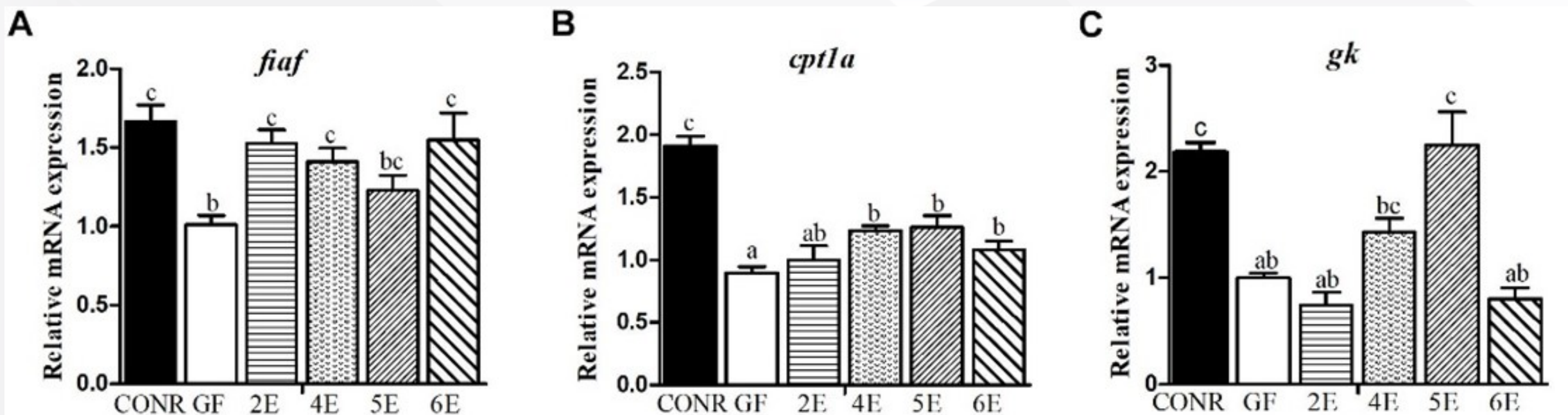
E



数据表明，最终浓度范围为 10^4 - 10^5 CFU/ml可保证斑马鱼的高存活率且对两种细菌的起有效的寄主反应。当接种菌具有较低的毒力因子或研究要求较高的定殖浓度时，细菌终浓度为 10^6 CFU/ml也是值得尝试的。

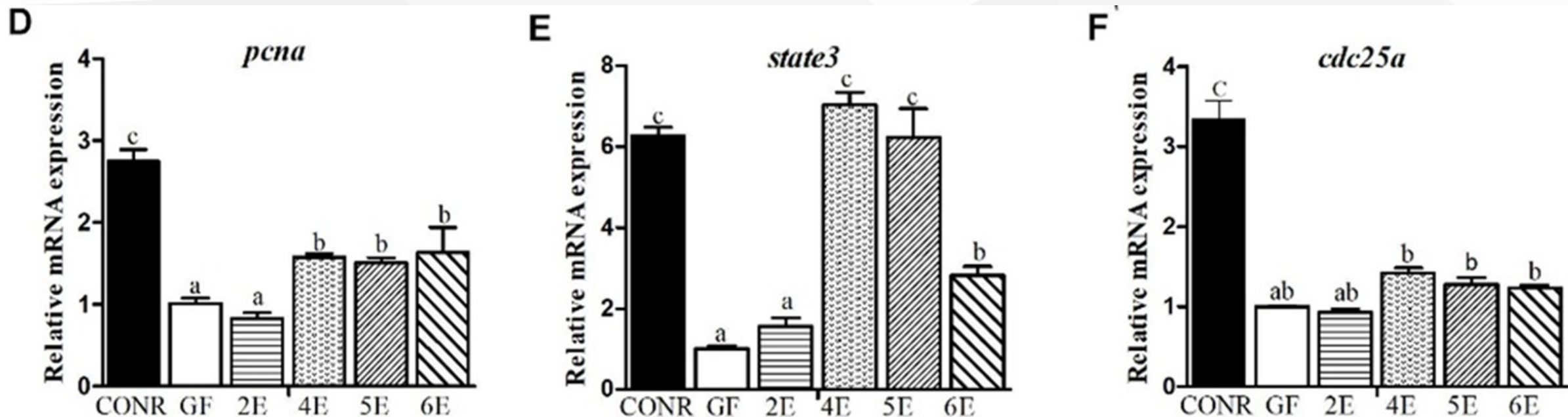
结果表明，延长接触时间至48 h，提高了定殖效率。但，文章结果显示，细菌培养24 h足以诱导有效的宿主反应。

5.不同浓度的*E.coli* DH5 α 对宿主的影响-营养代谢



与GF相比，定殖细菌的E组*fiaf*、*cpt1a*、*gk*的表达水平提高了

5.不同浓度的*E.coli* DH5 α 对宿主的影响-细胞增殖

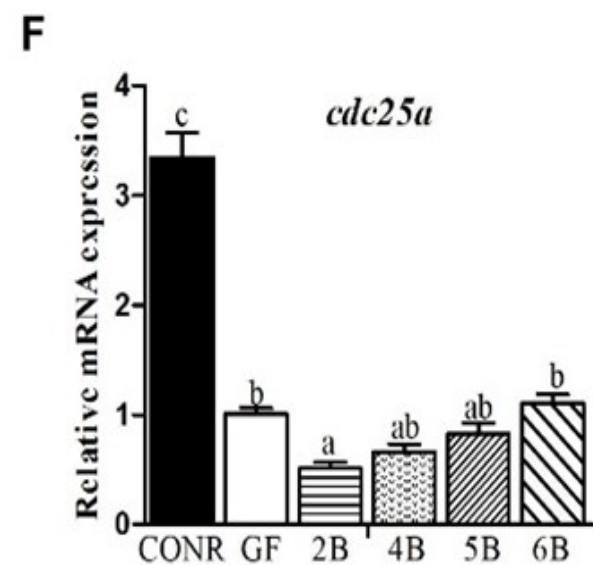
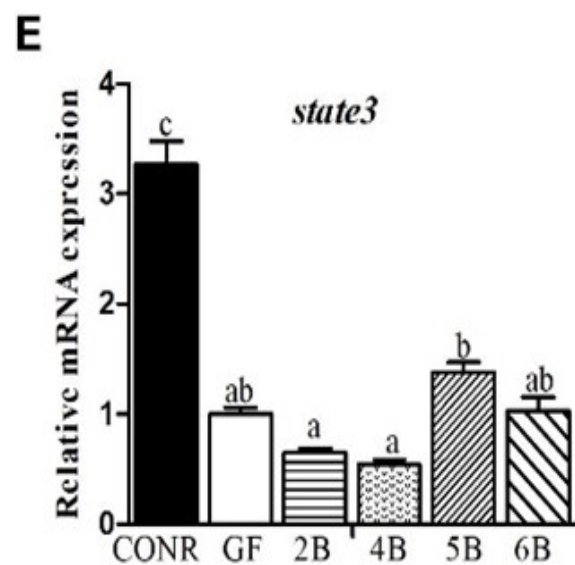
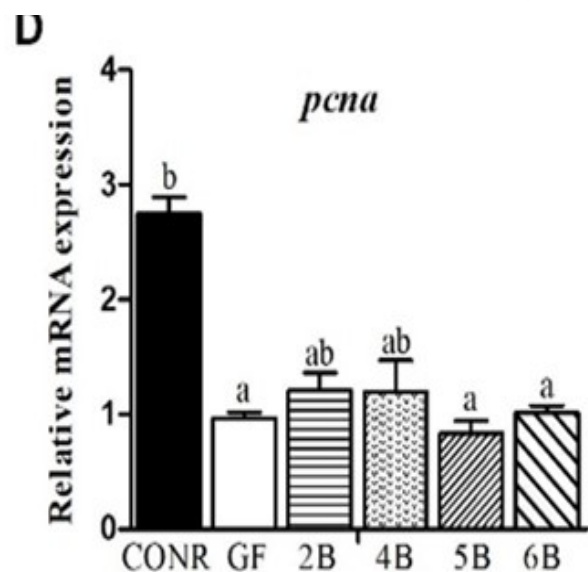
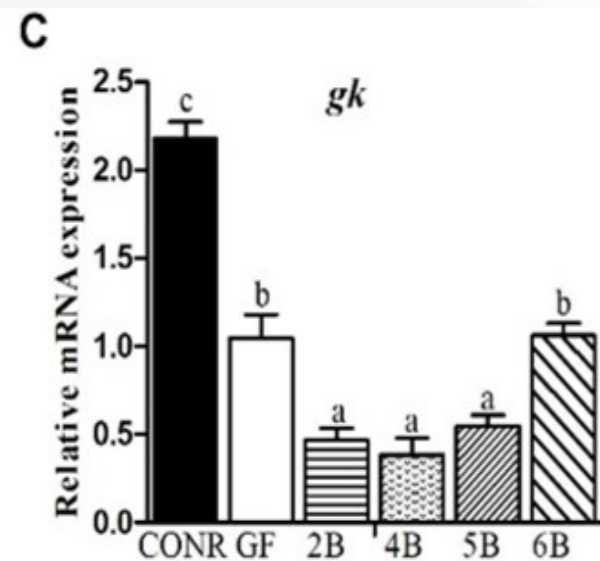
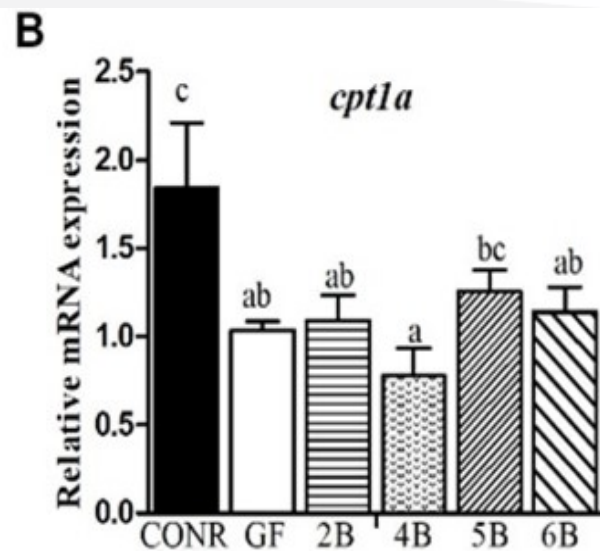
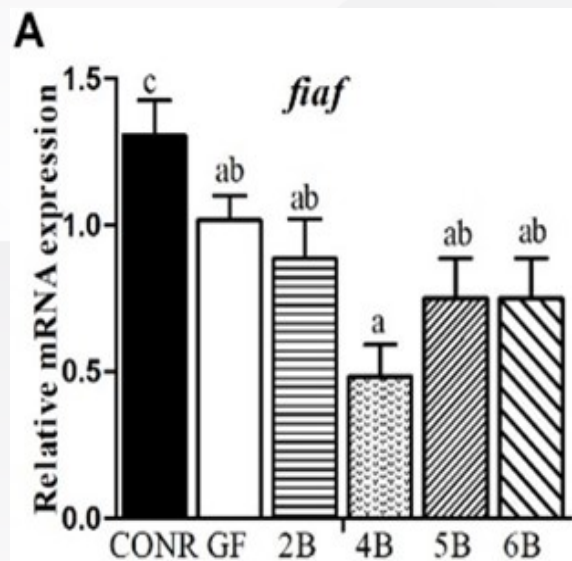


与GF相比, 4E、5E、6E组的GF的*pcna*、*state3*、*cdc5a*的表达水平提高了

03 结果与讨论

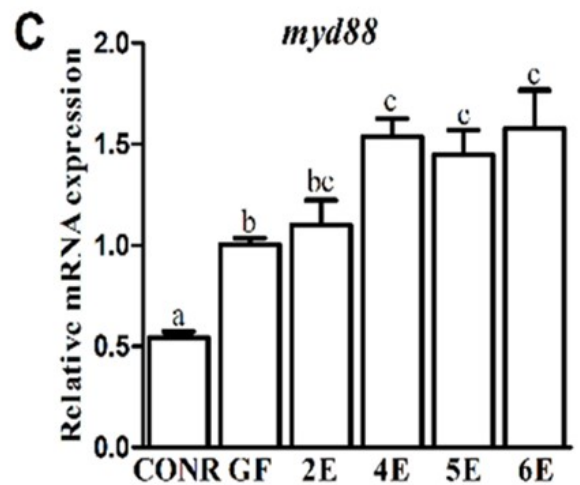
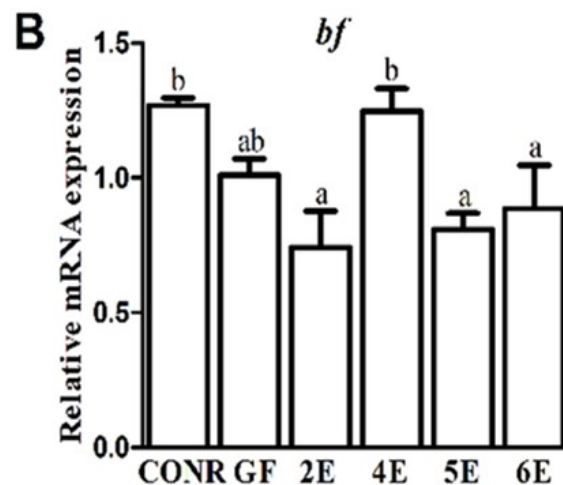
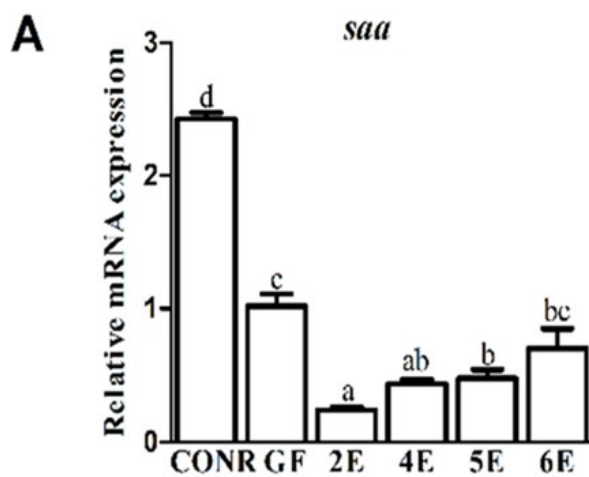
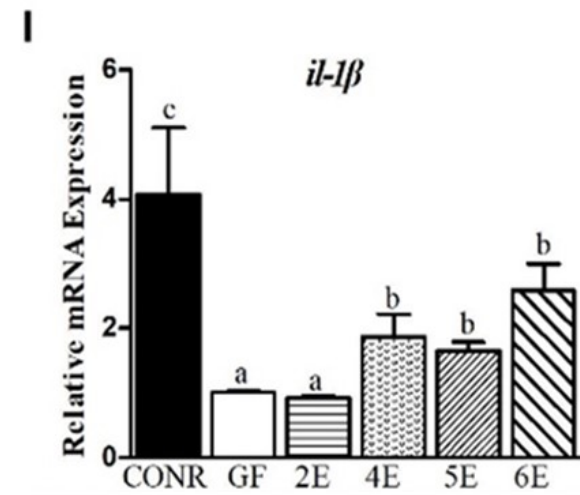
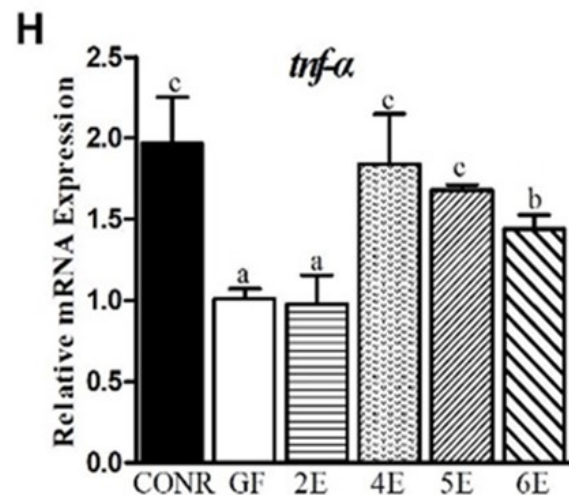
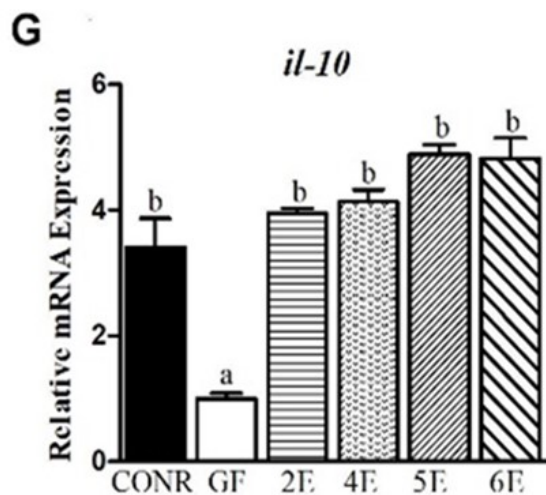
6.不同浓度的*B. subtilis* WB800N对宿主的影响-营养代谢和细胞增殖

与GF相比, *fiaf*、*cpt1a*、*gk*、*pcna*、*state3*、*cdc5a*的表达水平没有受到显著影响; 与CONR相比, 它们的表达水平显著下调。引起宿主反应所需的菌株的浓度因菌种的不同而异。

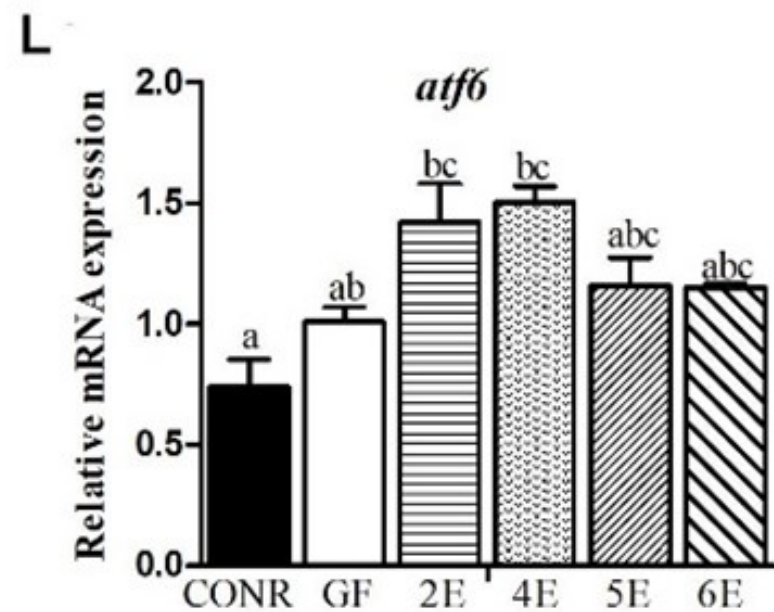
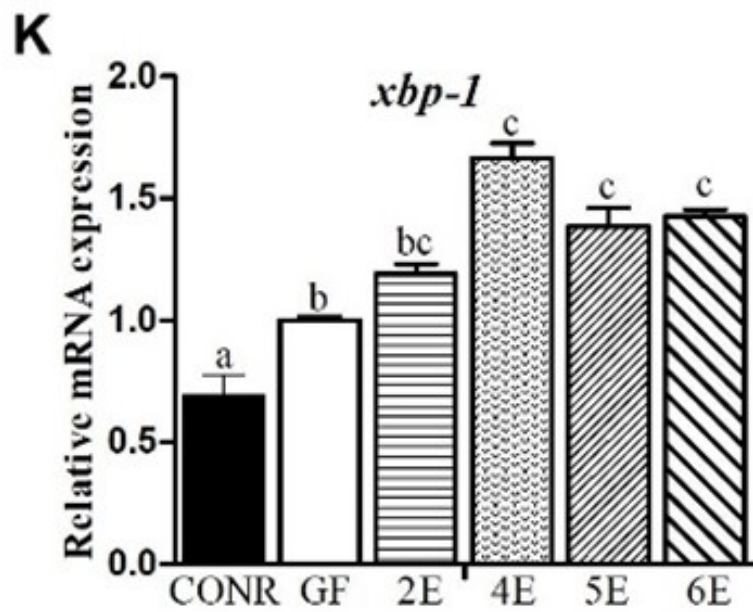
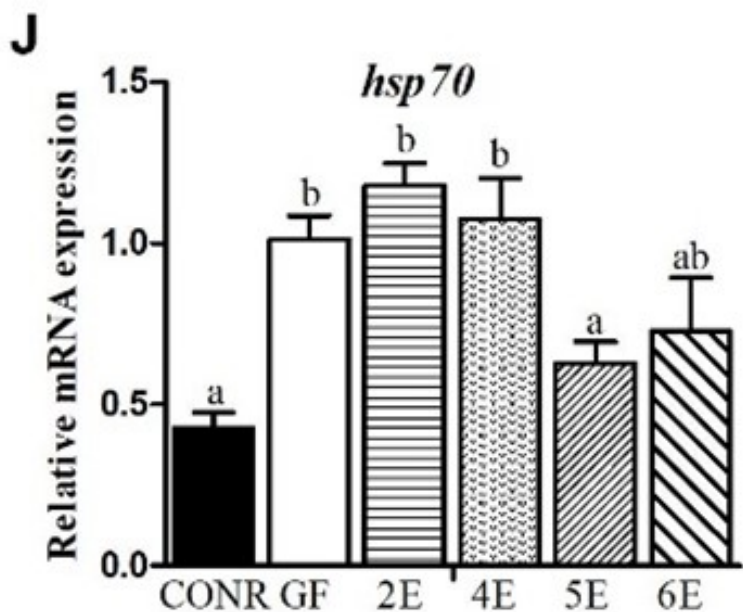


5.不同浓度的 *E.coli* DH5 α 对宿主的影响-免疫应答

与GF相比, *il-10*的表达水平显著提高; 除了浓度最低的2E外, *tnf- α* 、*il-1 β* 和*myd88*的表达水平也显著提高; *saa*的表达未被激活, *bf*的表达水平没有差别。



5.不同浓度的*E.coli* DH5 α 对宿主的影响-**应激**

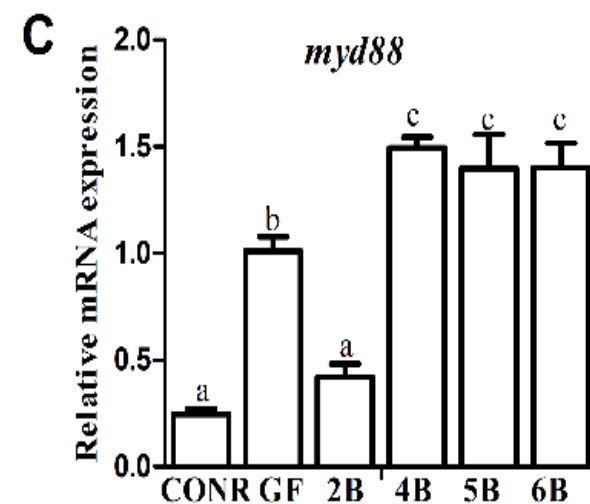
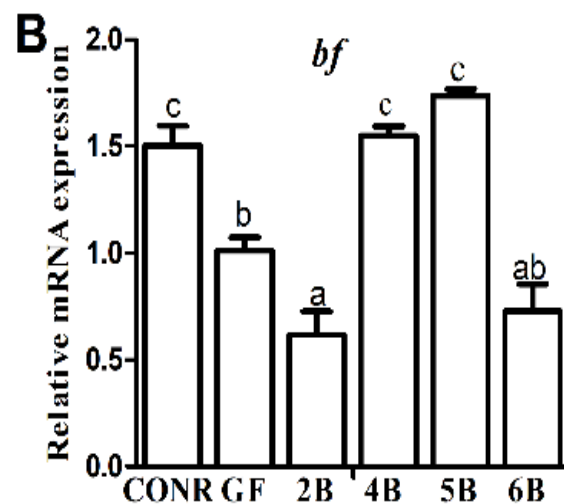
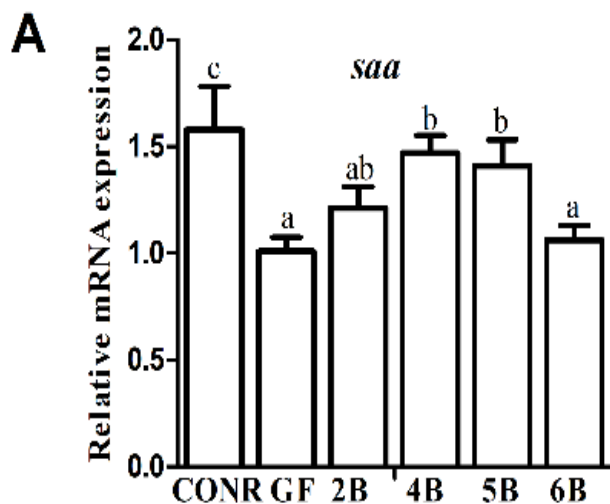
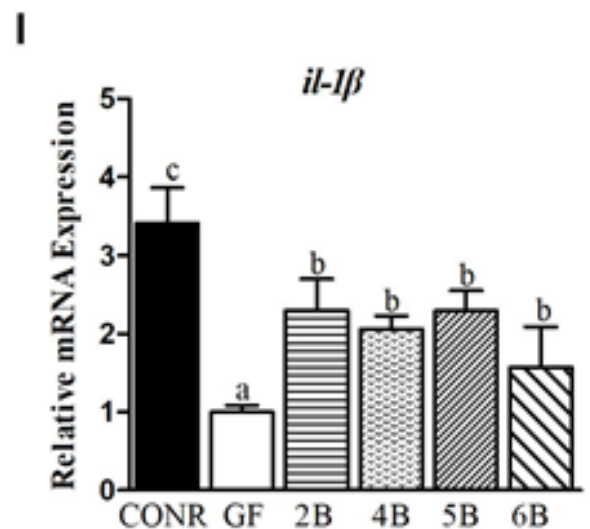
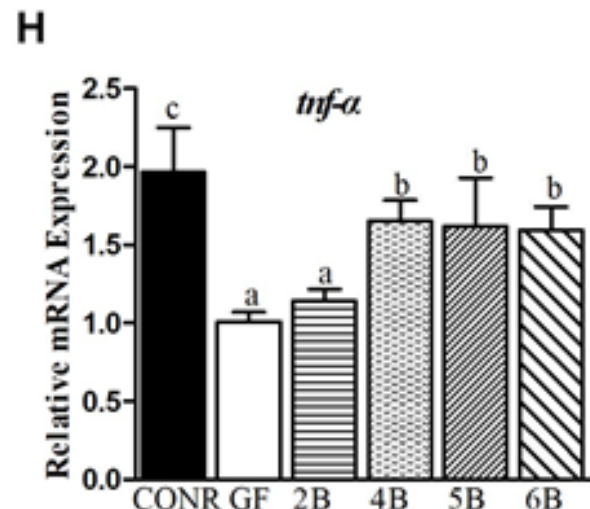
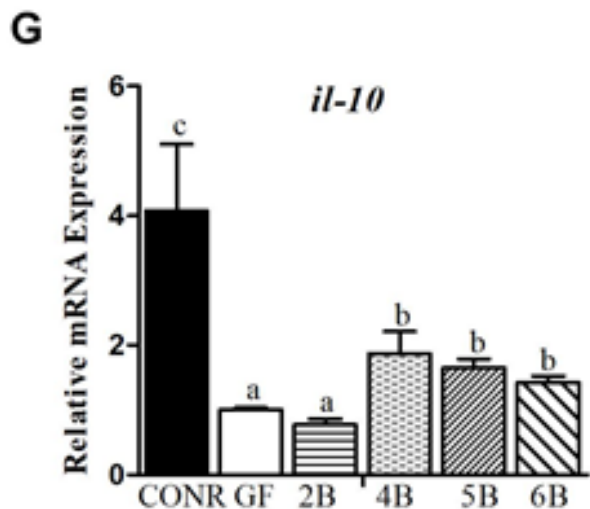


与GF相比, *hsp70*的表达水平在5E、6E显著下调; *xbp-1*的表达水平在4E、5E、6E显著上调; *atf6*的表达水平相似。

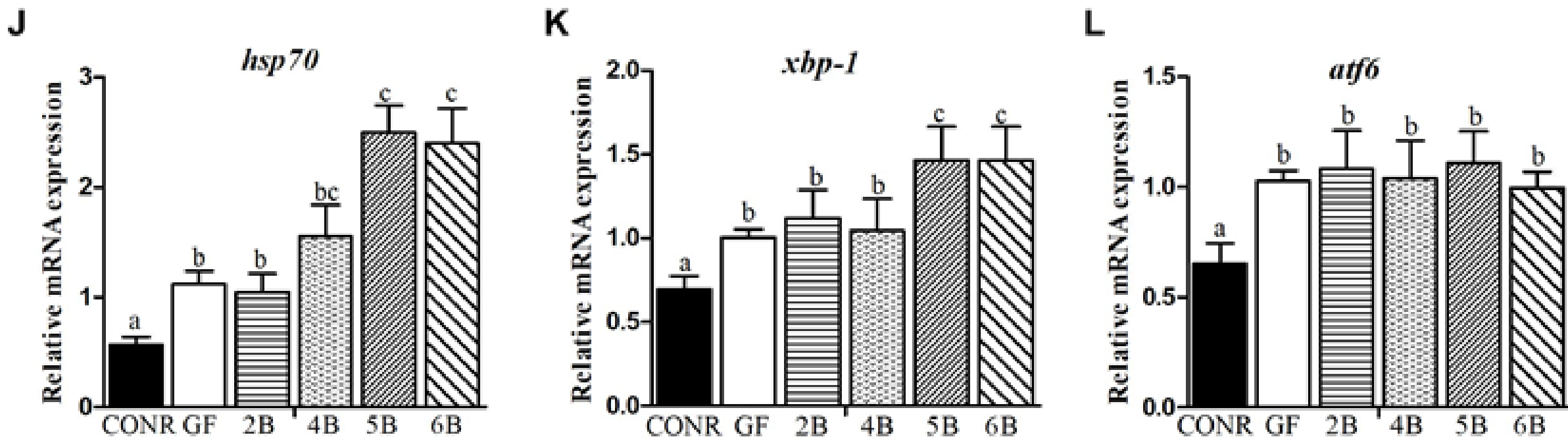
03 结果与讨论

6.不同浓度的*B. subtilis* WB800N对宿主的影响-免疫应答

与GF相比, *il-10*、*tnf- α* 、*il-1 β* 、*myd88*、*saa*、*bf*的表达水平显著上调, 特别是4E和5E组。



6. 不同浓度的*B. subtilis* WB800N对宿主的影响-应激

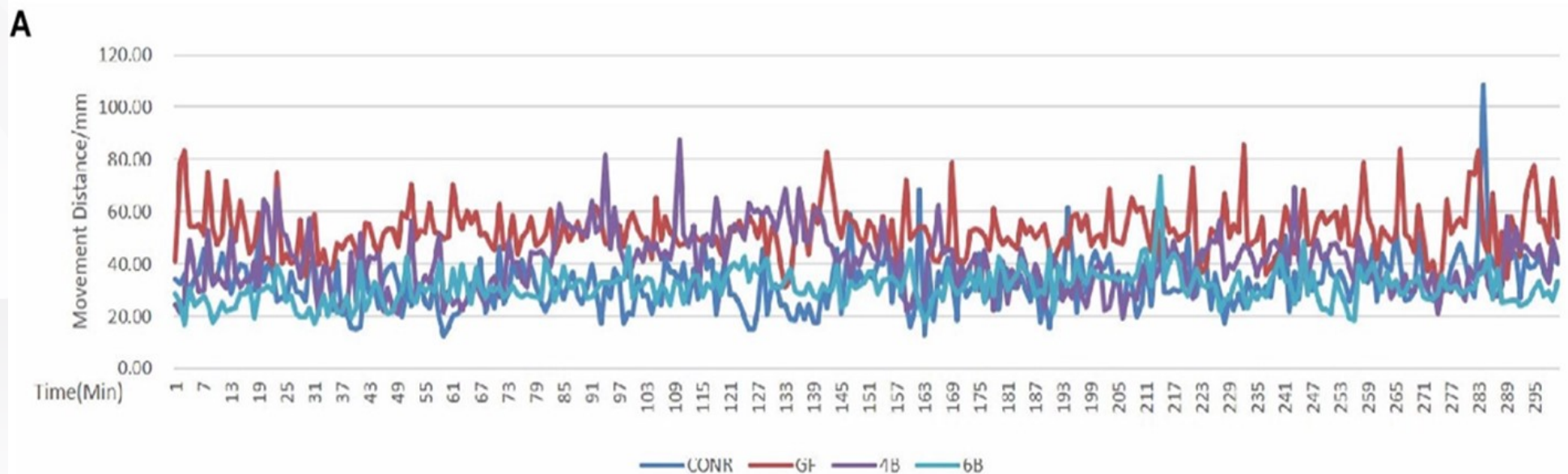
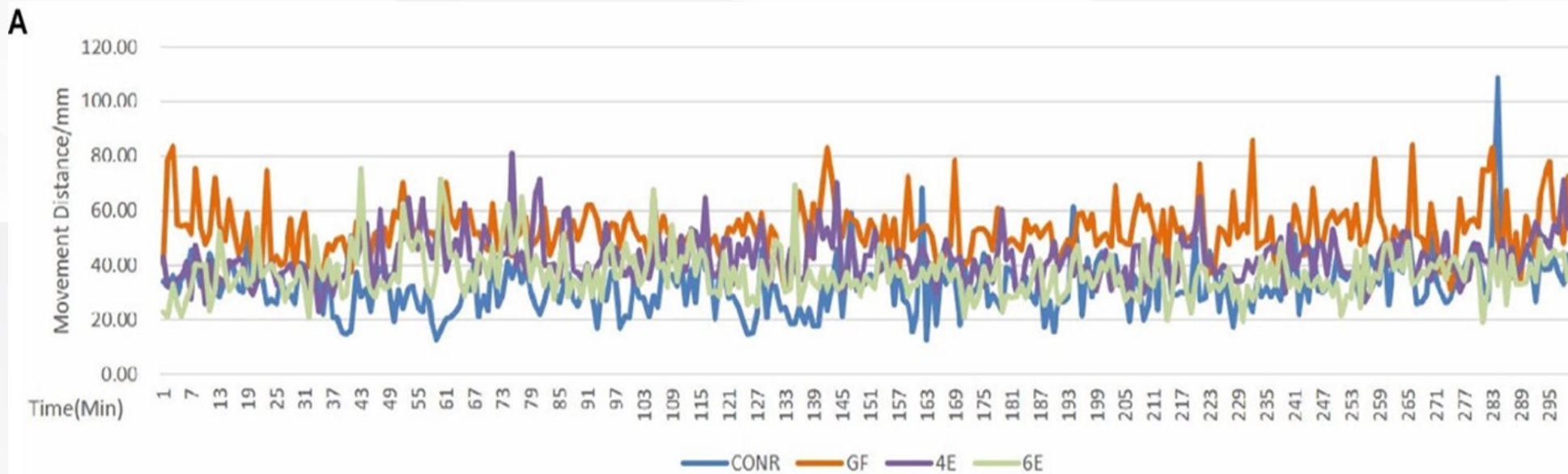


与GF相比, *hsp70*、*xbp-1*的表达水平在5E、6E显著上调; *atf6*的表达水平相似。与CONR相比, 所有的基因水平都显著上调。

在本研究中，基因表达数据表明，

- (1) *E.coli* DH5 α 主要诱导营养代谢、先天免疫和细胞增殖相关基因的表达；
B. subtilis WB800N主要上调先天免疫和应激反应相关基因的表达水平。
- (2) 引起宿主反应所需的菌株的浓度因菌种的不同而异。

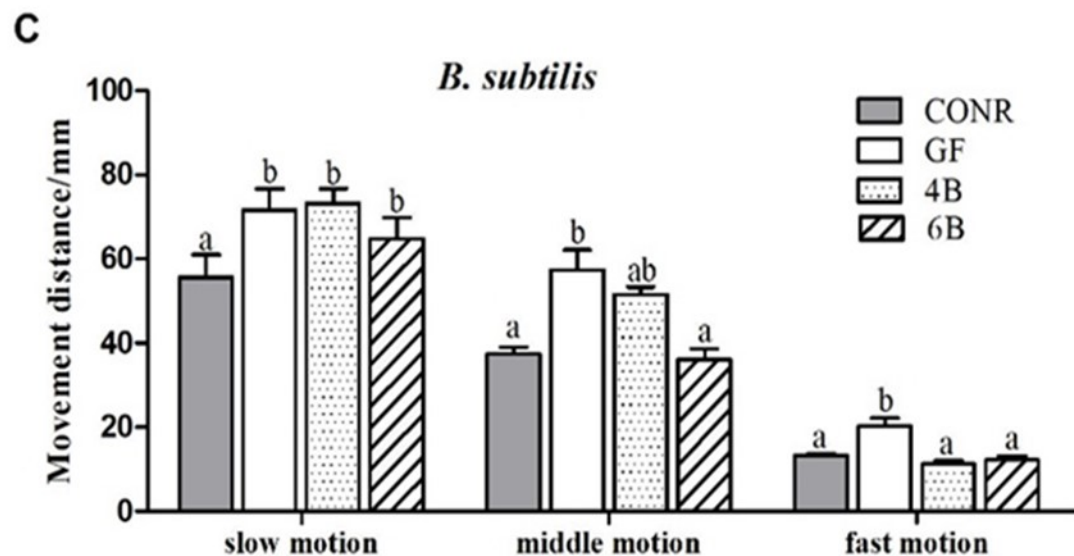
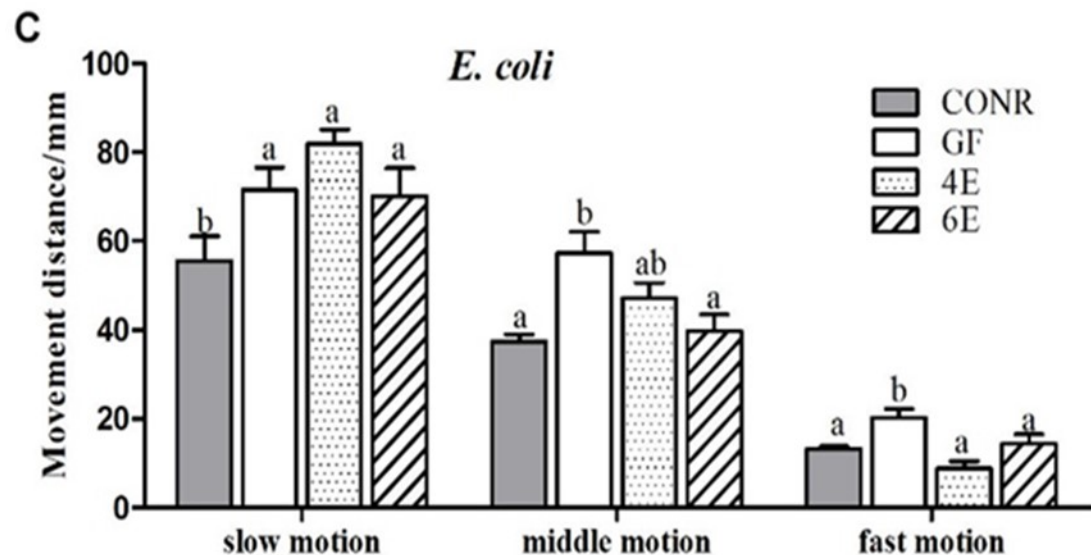
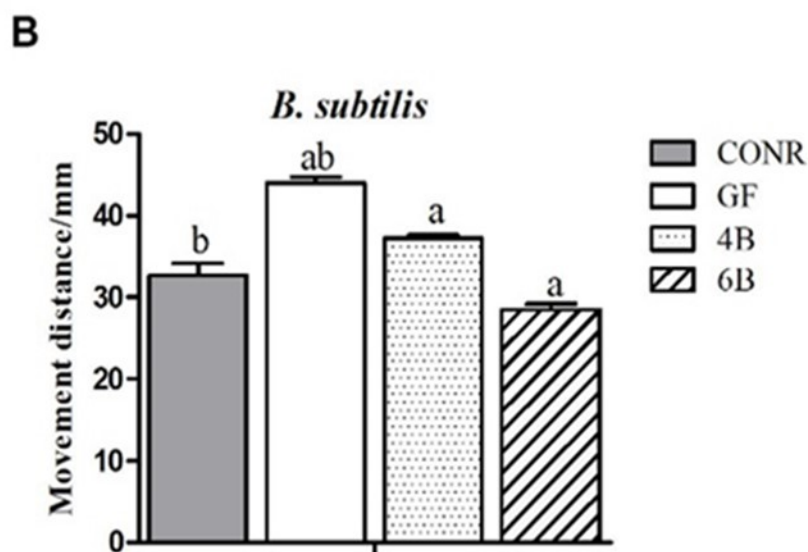
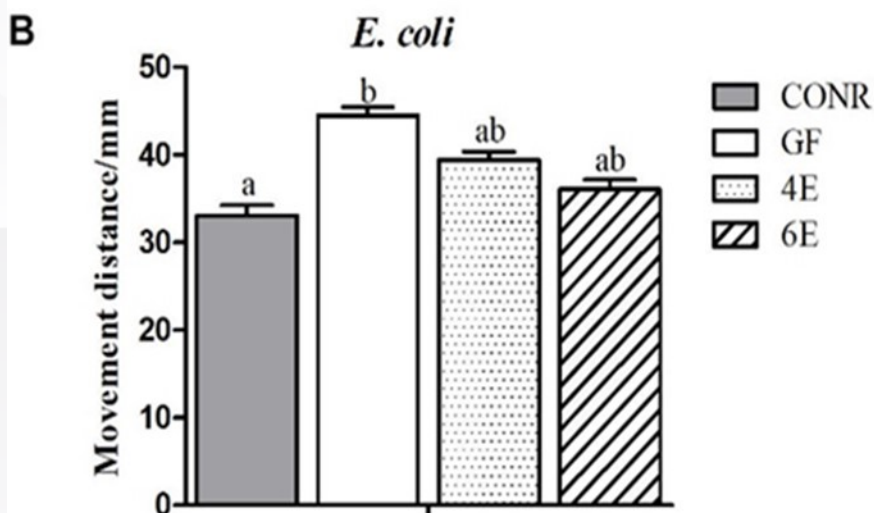
7.行为比较



数据显示，分别定殖两种细菌的GF斑马鱼活性水平均低于GF斑马鱼，高于CONR斑马鱼。

7. 行为比较

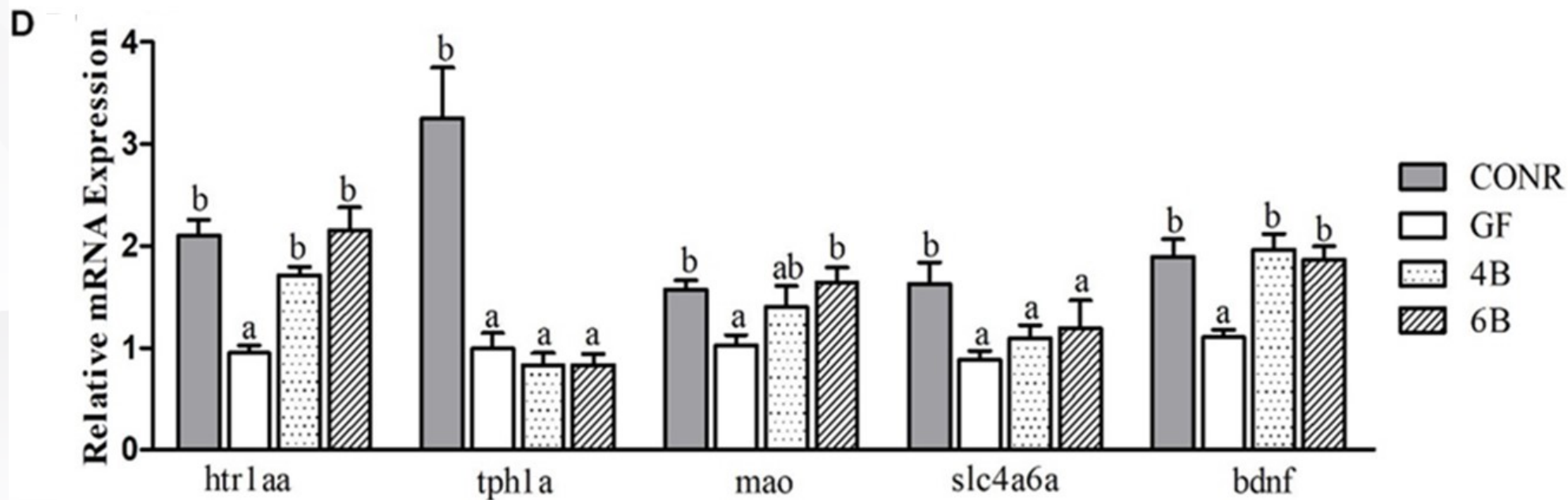
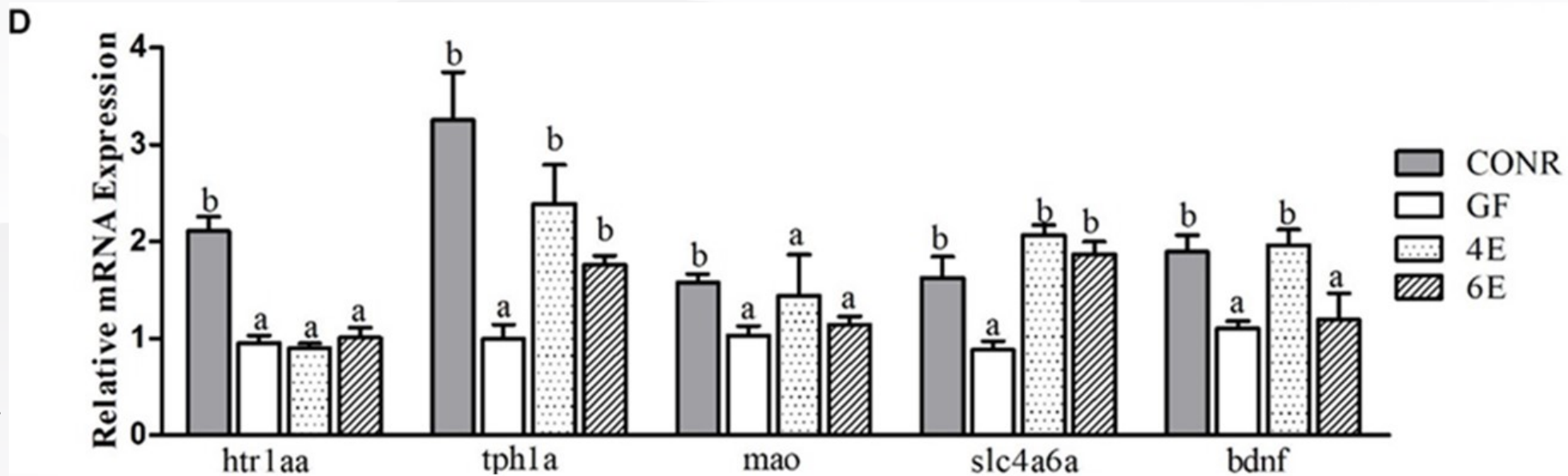
与GF相比, 4E、6E、4B、6B的运动距离和慢速没有显著的变化, 但中间速度运动和快速运动显著减少; 与CONR, 6B的运动距离减小。



03 结果与讨论

7.行为比较

结果显示, *E.coli* DH5 α 存在时, *tph1a*、*slc4a6a*、*bdnf*表达水平升高, 而*B. subtilis* WB800N存在时, *htr1aa*、*mao*、*bdnf*表达水平明显升高。



本文研究发现，接种浓度在 10^4 - 10^6 CFU/ml 时，*E.coli* DH5 α 和*B. subtilis* WB800N降低了宿主的多动行为，提示早期微生物定殖是正常神经行为所必需的。

这些结果表明，斑马鱼行为和神经发育过程中细菌的存在是必不可少的。

第

4

部分

总结与收获

本研究接种GFP标记物*E.coli* DH5 α 和*B. subtilis* WB800N, 探讨不同接种浓度、定殖时间和接触时间对无菌斑马鱼幼鱼的影响。

通过分析不同因素对存活率、定殖效率、营养代谢、应激反应、先天免疫、细胞增殖和神经发育等方面的影响。结果表明, 两种不同浓度的细菌对宿主产生了物种特异性反应, 且两种细菌均降低了GF斑马鱼的多动行为。

GFP标记*E.coli* DH5 α 和*B. subtilis* WB800N的方法

无菌斑马鱼行为研究



感谢您的观看与聆听



报告人：曹慧

时间：2019年12月1日