

基于 RNA-Seq 筛选鸭肠炎病毒感染鸭脾差异表达免疫相关基因

吴良涛^{1,2,3}, 郑敏^{1,2,3}, 华敏^{1,2,3}, 万润^{1,2,3}, 程振涛^{1,2,3}, 周碧君^{1,2,3}, 文明^{1,2,3*}

(1. 贵州大学动物科学学院, 贵阳 550025; 2. 贵州大学动物疫病研究所, 贵阳 550025;

3. 贵州省动物疫病与兽医公共卫生重点实验室, 贵阳 550025)

摘要: 为挖掘鸭肠炎病毒(duck enteritis virus, DEV)感染鸭的差异表达免疫相关基因, 本研究以 DEV GZ 株经腿部肌肉接种 50 d 鸭后, 于接种后 66、90 和 114 h 采集鸭脾组织样本, 提取总 RNA, 通过高通量 RNA-seq 技术测序, 应用 GO 和 KEGG 数据库进行比对注释, 并采用荧光定量 PCR 对部分差异表达基因进行验证, 结果显示: DEV 接种 66 h 时鸭脾的差异表达基因有 511 个, 参与免疫相关生物学过程的为 70 个, 其中上调基因 46 个, 下调基因 24 个; 90 h 时差异表达基因有 485 个, 参与免疫相关生物学过程的为 64 个, 其中上调基因 49 个, 下调基因 15 个; 114 h 时差异表达基因有 531 个, 参与免疫相关生物学过程的为 66 个, 其中上调基因 35 个, 下调基因 31 个。GO 数据库分析显示, 差异表达免疫相关基因主要涉及细胞黏附、抗原加工和呈递、补体激活等免疫反应过程; KEGG 数据库分析显示, 差异表达免疫相关基因主要富集在细胞黏附分子、ECM 受体互作、PPAR 等信号通路; 荧光定量 PCR 对 7 个差异表达基因进行检测显示, 差异表达基因相对表达量与 RNA-Seq 技术测序结果基本一致。这些结果为进一步阐明 DEV 感染机制和机体免疫应答机制奠定了基础。

关键词: RNA-Seq; 鸭肠炎病毒; 脾; 差异表达; 免疫相关基因

中图分类号: S858.325.3; S852.659.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)02-0297-10

Screening of Differentially Expressed Immune-related Genes from Duck Spleen with Duck Enteritis Virus Infection Based on RNA-Seq Technology

WU Liang-tao^{1,2,3}, ZHENG Min^{1,2,3}, HUA Min^{1,2,3}, WAN Run^{1,2,3},

CHENG Zhen-tao^{1,2,3}, ZHOU Bi-jun^{1,2,3}, WEN Ming^{1,2,3*}

(1. College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Institute for Animal Diseases, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 3. Key Laboratory of Animal Diseases and Veterinary Public Health in Guizhou Province, Guiyang 550025, China)

Abstract: The aim of the present study was to screen the differentially expressed immune-related genes from duck spleen by DEV infection. Ducks of 50 days old were selected to inoculate with DEV in leg muscle, and the duck spleens were collected at 66, 90 and 114 h after inoculation, and were extracted for total RNA, then sequencing by high-throughput RNA-Seq technology. The sequenced segments were compared and noted for screening of the differentially expressed immune-related genes by GO and KEGG database in NCBI. Some of the differentially expressed genes were selected to verify by real-time PCR technology. The results showed that there were 511 of the differentially expressed genes in duck spleen at 66 h after DEV infection, which 70 in-

收稿日期: 2016-09-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31260607; 31560703); 贵州省优秀青年科学人才培养计划项目(黔科合人字[2013]25号); 贵州省百层次创新型人才项目(黔科合人才[2016]4009号); 贵州省科技创新人才团队建设项目(黔科合人才团队[2015]4016号)

作者简介: 吴良涛(1988-), 男, 侗族, 贵州榕江人, 硕士生, 主要从事病毒学研究, E-mail: 826417155@qq.com

* 通信作者: 文 明, 博士, 教授, E-mail: as.mwen@gzu.edu.cn

volved in the biological immune process, including 46 up-regulated genes and 24 down-regulated genes. At 90 h after DEV infection, there were 485 of the differentially expressed genes, which 64 involved in the biological immune process, including 49 up-regulated genes and 15 down-regulated genes. At 114 h after DEV infection, there were 531 of the differentially expressed genes, which 66 involved in the biological immune process, including 35 up-regulated genes and 31 down-regulated genes. The differentially expressed immune-related genes were mainly involved in cell adhesion, antigen processing and presentation and complement activation through GO database analysis. And these genes were mainly enriched in the signaling pathways as cell adhesion molecule, ECM receptor interaction and PPAR, etc. The expressed contents of the selected 7 genes by the FQ-PCR, were basically the same with the sequencing results by RNA-Seq technology. These results provided a theoretical basis for further understanding of the mechanism of DEV infection and duck immune response.

Key words: RNA-Seq; DEV; spleen; differentially expression; immune-related genes

鸭肠炎病毒(duck enteritis virus, DEV)又称鸭瘟病毒(duck plague virus, DPV),为疱疹病毒科 α -疱疹病毒亚科马立克病毒属成员,具有典型的疱疹病毒结构,其基因组大小为 158 091 bp,为双股线性 DNA^[1]。DEV 可引起鸭、鹅和其他雁形目禽类发生一种急性、热性、败血性传染病,是目前危害水禽养殖业健康发展的重要病原之一^[2]。

病毒致病过程实质上是病毒与宿主相互作用过程,在此过程中宿主细胞基因表达谱特别是免疫应答基因发生改变,这正是病毒复制与增殖、宿主抗感染与康复的分子基础。目前,国内外学者对 DEV 开展多方面深入研究,取得了诸多进展,但主要集中在病毒的形态发生^[3]、基因结构^[4]、侵染过程^[5]及分子检测^[6]等方面,很少涉及到宿主抗病毒感染应答的差异表达基因。

研究基因差异表达的主要技术有差别杂交法、削减杂交法、DNA 微阵列分析法和高通量测序法等。RNA-Seq 作为第二代高通量测序方法,具有通量高、成本低、操作简单、灵敏度高且适用于未知基因组序列物种等优点,目前已被广泛应用于疾病发生发展机制的研究及相关功能基因的筛选^[7]。脾为动物体内最大的外周淋巴器官,是动物抵御病毒感染的产生免疫应答的重要场所。因此,本研究以脾为研究对象,采用 RNA-Seq 技术筛选 DEV 感染鸭与正常鸭的差异表达免疫相关基因,以期阐明 DEV 致病机制、宿主抗感染机制和抗病毒药物筛选提供重要信息。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

鸭肠炎病毒贵州株(DEV-GZ 株),由贵州省动

物疫病与兽医公共卫生重点实验室提供,TCID₅₀ 为 $3.16 \times 10^{-9} \cdot 0.1 \text{ mL}^{-1}$; 9 d 雏鸭 30 只,购自贵州省三穗县三穗麻鸭保种场,经血清学和病原学检测均为临床健康; TRIzol Regent、Sample Protector for RNA/DNA、PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)等,购自 TaKaRa 公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 动物感染与样本采集

取三穗麻鸭,随机分为 2 组,即试验组 20 只和对照组 10 只,隔离饲养,两组饲养管理条件一致。饲养至 50 d 时,试验组鸭腿部肌肉接种 DEV-GZ 株病毒液, $0.1 \text{ mL} \cdot \text{只}^{-1}$,于接种后 66、90 和 114 h 时捕杀,每次 5 只,采集脾组织,浸入 Sample Protector for RNA/DNA,干冰保存;对照组鸭注射灭菌生理盐水, $0.1 \text{ mL} \cdot \text{只}^{-1}$,于注射后 66 h 时捕杀,采集脾组织,如上处理;两组脾组织送至上海烈冰生物科技有限公司进行文库构建和测序。

1.3 测序文库构建与序列测序

提取脾组织总 RNA,经 Agilent 2200 质检合格后,利用 Illumina HiSeq 2000™ 测序平台对送检的脾组织样本进行文库构建和序列测序。

1.4 差异表达基因筛选与分析

运用 Fast-QC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>)软件评估测序数据质量后,采用 MapSplice 软件将过滤后 Clean Reads 比对到鸡基因组上,以 $\log_2\text{FC} > 1$ 或 < -1 且 $\text{FDR} < 0.05$ 为阈值筛选差异表达基因后,通过在线软件 DAVID 中 GO(gene ontology)和 KEGG(Kyoto encyclopedia of genes and genomes)数据库对差异表达基因

进行功能注释、富集分析和 Pathway 解释。

1.5 差异表达基因荧光定量 PCR 验证

随机选择上述 7 个差异表达的免疫相关基因,根据 GenBank 上该基因序列,利用 Primer 5.0 软件引物设计(内含参基因),见表 1;然后提取感染鸭和正常鸭脾组织总 RNA 样本,反转录为 cDNA 后进行荧光定量 PCR,反应体系为 SYBR premix Ex

Tag II (Tli RNaseH Plus) 5.0 μL 、PCR Forward Primer(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.5 μL 、PCR Reverse Primer(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.5 μL 、cNDA 1.0 μL 和 ddH₂O 3.0 μL ;扩增条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s 后,进入 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s 和 51~56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s 的 40 个循环;每个样本进行 3 次重复,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算相关基因 mRNA 转录水平。

表 1 差异表达基因的荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primers of the real-time PCR for differentially expressed genes

基因 Gene	引物名称 Primer	引物序列(5'→3') Sequence (5'→3')	产物长度/bp Product size	登录号 Accession number	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ Annealing temperature
SORBS2	SORBS2-F	CGATGCCCCAGGTTTCCTAA	193	XM_013106501.1	54
	SORBS2-R	TCTGGTTGGCACCATGTCTC			
DCHS2	DCHS2-F	GAGGTGGTCTTTCTCTGCC	149	XM_013100915.1	54
	DCHS2-R	GGCCCTTACAGTTCCAACCA			
LOC101791569	569-F	CTCATCGCCTCCGCCTAC	78	XM_005010655.2	56
	569-R	ATCCCTCCCCTTTGTGGT			
TLR5	TLR5-F	TGATGCCATTTGGAACAG	141	NM_001310824.1	52
	TLR5-R	ACTACTACCATAACGAGGA			
FERMT1	FERMT1-F	GGCTGGCTAGATTCATCCCG	184	XM_013096946.1	51
	FERMT1-R	CCTCCGTGCAGTCAACTTCT			
CD34	CD34-F	TGAGCTGATGCCTGTCTTGG	141	XM_013092242.1	51
	CD34-R	TTGCAGGTGTTGGACTCGTT			
CYR61	CYR61-F	GCAAAGATGCGCTGGATGAG	156	XM_013102178.1	51
	CYR61-R	CTCGACTTTGTGGCTCGGAT			
β actin	β -actin-F	GCTGTCTCTGTATGCCTCTG	235	AF416454.1	56
	β -actin-R	TCTCAGCTGTGGTGGTGAAG			

2 结果

2.1 总 RNA 测序质量评估

经 Agilent 2200 质检表明,送检样本总 RNA 均满足测序要求。随机选取对照组和感染组(66、90 和 114 h)总 RNA 样本进行转录组测序后,对原始序列数据和总 Reads 数进行质控过滤,统计高质量序列、总 Reads 数和序列 GC 含量(表 2),结果表明测序文库质量和测序结果可信度高。

2.2 Mapping 结果统计及基因组结果分析

采用 MapSplice 软件对 RNA-Seq 数据进行对比发现,对照组与感染组(66、90 和 114 h)的映射率分别为 85.3%、83.2%、84.9%和 85.0%,特异映射

率分别为 84.0%、81.7%、83.6%和 83.7%(表 3);经对测序数据进行基因组结构分析显示,对照组和试验组 Reads 数主要分布在外显子区,其次为 3'端非编码区(图 1)。

2.3 差异表达基因筛选

采用 EB-Seq 算法即以 $\log_2\text{FC} > 1$ 或 < -1 、 $\text{FDR} < 0.05$ 为筛选标准,以鸡为 blast 物种,对测序文库序列进行差异表达基因分析,结果如表 4 所示:DEV 感染 66 h 时鸭脾差异表达基因有 511 个,其中上调基因 312 个、下调基因 199 个;感染 90 h 时差异表达基因有 485 个,其中上调基因 297 个、下调基因 188 个;感染 114 h 时差异表达基因有 531 个,其中上调基因 290 个、下调基因 241 个。

表 2 样本序列质控过滤前后质量数据统计结果

Table 2 Statistical results of sequences before and after RNA samples filtering

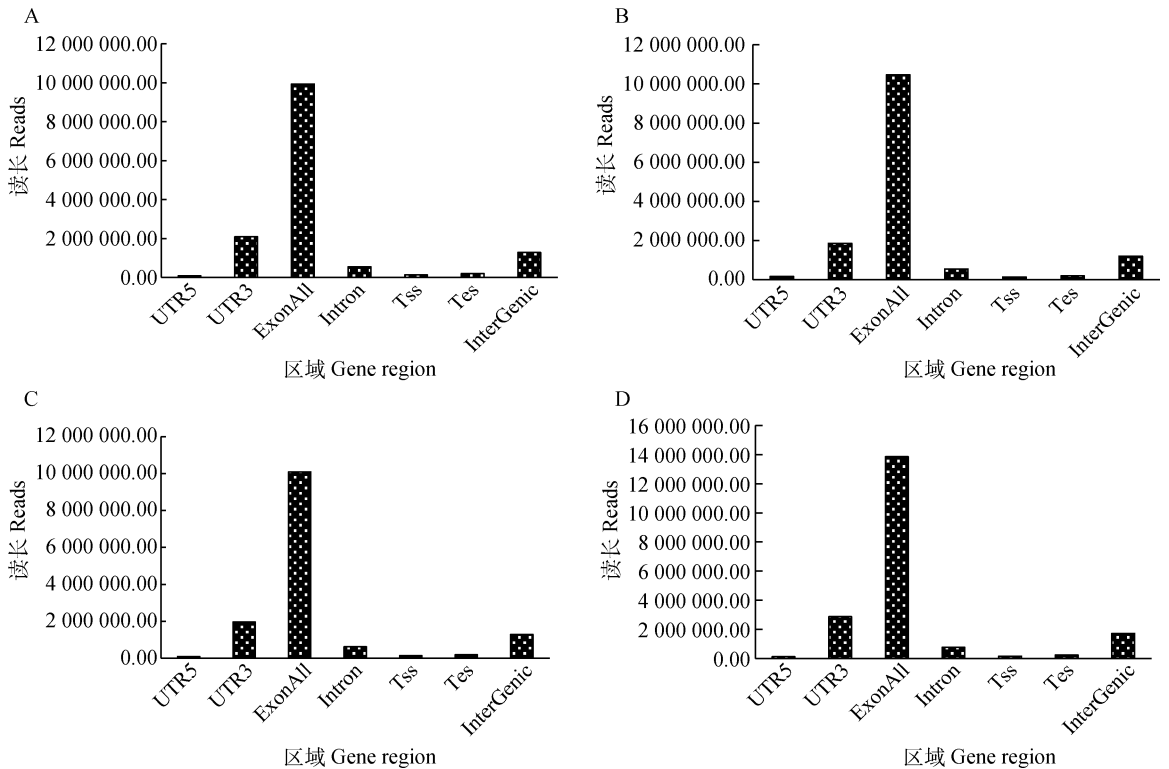
组别 Group	序列数据			总 Reads 数			GC 含量/%	
	Original sequence number			Total Reads number			GC content	
	质控前 Before QC	质控后 After QC	百分率/% Percentage	质控前 Before QC	质控后 After QC	百分率/% Percentage	质控前 Before QC	质控后 After QC
Control group	2 004 934 536	1 957 386 095	97.6	14 560 791	13 821 501	94.9	50	50
66 h group	2 064 739 022	2 011 289 368	97.4	15 550 697	14 698 154	94.5	51	51
90 h group	1 970 066 385	1 927 119 849	97.8	14 867 908	14 189 597	95.4	50	50
114 h group	2 705 407 101	2 638 788 181	97.5	20 703 992	19 296 736	93.2	50	50

“QC” represent “quality control”

表 3 样本 RNA-Seq 测序数据的 Mapping 分析统计结果

Table 3 Statistical results of Mapping for sequencing data of RNA-Seq

组别 Group	总数 Total	映射 Mapped	映射率/% Mapped Rate	特异性映射 Unique Mapped	特异性映射率/% Unique Mapped Rate
Control group	13 821 501	11 789 588	85.3	11 608 022	84.0
66 h group	14 698 154	12 222 147	83.2	12 011 402	81.7
90 h group	14 189 597	12 046 765	84.9	11 860 052	83.6
114 h group	19 296 736	16 401 533	85.0	16 149 701	83.7



A. 对照组; B. 感染组 66 h; C. 感染组 90 h; D. 感染组 114 h

A. Control group; B. 66 h of infection group; C. 90 h of infection group; D. 114 h of infection group

图 1 RNA-Seq 测序数据 Reads 在基因组结构上的分布

Fig. 1 The distribution of Reads of RNA-Seq data in genome structure

表 4 DEV 感染后鸭脾差异表达基因

Table 4 Differentially expressed genes in duck spleen infected by DEV

组别 Group	差异表达基因 Differentially expressed genes	差异表达上调基因 Up-regulation genes	差异表达下调基因 Down-regulation genes
66 h	511	312	199
90 h	485	297	188
114 h	531	290	241

通过 NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov)和 UniProt(www.uniprot.org)数据库对 DEV 感染后 66、90 和 114 h 的前 5 个(Top5)上调和下调差异表达基因进行功能注释,结果如表 5 所示:感染 66 h 时,前 5 位差异表达上调基因为 mucin-12-like 基因和 4 个未知蛋白质基因,前 5 位差异表达下调基因均为未知蛋白质基因;感染 90 h 时,前 5 位差异表达上调基因为 Ig lambda chain V-1 region-like 基因、

Histone H2B 基因、translation initiation factor eIF-2B subunit delta-like 基因和 2 个未知蛋白质基因,前 5 位差异表达下调基因为 Sulfotransferase 基因、GRAM domain-containing protein 1B-like 基因和 3 个未知蛋白质基因;感染 114 h 时,前 5 位差异表达上调基因均为未知蛋白质基因,前 5 位差异表达下调基因为 GRAM domain-containing protein 1B-like 基因和 4 个未知蛋白质基因。

表 5 感染 66、90 和 114 h 的 Top5 上下调差异表达基因

Table 5 Top 5 up- or down-regulated differential genes in duck spleen after DEV infection

组别 Group	基因名称 Gene	试验组 RPKM	对照组 RPKM	log2FC (E/C)	FDR	Up/ down	基因描述 Description
66 h	LOC101791184 *	14.64	0	20	0.04	up	Mucin-12-like
	LOC101791724 *	19.14	0	20	0.003	up	Uncharacterized protein
	LOC101793756 *	14.64	0	20	0.04	up	Uncharacterized protein
	LOC101794943 *	18.01	0	20	0.01	up	Uncharacterized protein
	LOC101796065 *	19.14	0	20	0.003	up	Uncharacterized protein
	CACNA1S	0	15.51	-20	0.04	down	Uncharacterized protein
	CIDEA	0	15.51	-20	0.04	down	Uncharacterized protein
	JAKMIP3	0	16.54	-20	0.02	down	Uncharacterized protein
	LOC101791834 *	0	49.63	-20	7.58×10^{-10}	down	Uncharacterized protein
	LOC101792896 *	0	24.82	-20	2.12×10^{-4}	down	Uncharacterized protein
90 h	LOC101791625 *	16.63	0	20	0.01	up	Ig lambda chain V-1 region-like
	LOC101791724 *	86.10	0	20	0	up	Uncharacterized protein
	LOC101791964 *	18.59	0	20	0.003	up	Uncharacterized protein
	LOC101793992 *	23.48	0	20	1.68×10^{-4}	up	Histone H2B
	LOC101795370 *	16.63	0	20	0.01	up	Translation initiation factor eIF-2B subunit delta-like
	HS3ST4	0	17.58	-20	0.004	down	Sulfotransferase
	JAKMIP3	0	16.54	-20	0.01	down	Uncharacterized protein
	LOC101794771 *	0	27.92	-20	8.15×10^{-6}	down	Uncharacterized protein
LOC101800347 *	0	18.61	-20	0.002	down	GRAM domain-containing protein 1B-like	
LOC101801106 *	0	28.95	-20	4.45×10^{-6}	down	Uncharacterized protein	

(续表 5 Continued)

组别 Group	基因名称 Gene	试验组 RPKM	对照组 RPKM	log2FC (E/C)	FDR	Up/ down	基因描述 Description
114 h	<i>LTBP1</i>	812.08	404.32	1.01	4.92×10^{-5}	up	Uncharacterized protein
	<i>PDE7B</i>	864.06	429.14	1.01	3.89×10^{-5}	up	Uncharacterized protein
	<i>RPL24</i>	4 648.76	2 308.03	1.01	9.42×10^{-6}	up	Uncharacterized protein
	<i>ARHGEF12</i>	715.66	354.68	1.01	5.55×10^{-5}	up	Uncharacterized protein
	<i>ESAM</i>	137.86	68.25	1.01	0.03	up	Uncharacterized protein
	<i>LOC101792896</i> *	0	24.82	-20	1.27×10^{-6}	down	Uncharacterized protein
	<i>LOC101800347</i> *	0	18.61	-20	1.36×10^{-4}	down	GRAM domain-containing protein 1B-like
	<i>LOC101802592</i> *	0	16.54	-20	6.64×10^{-4}	down	Uncharacterized protein
	<i>LOC101798562</i> *	0.75	478.77	-9.31	0	down	Uncharacterized protein
	<i>APOLD1</i>	45.20	2 187.04	-5.60	0	down	Uncharacterized protein

* . 没有注释功能的蛋白质

* . Uncharacterized protein

2.4 差异基因 GO 分析

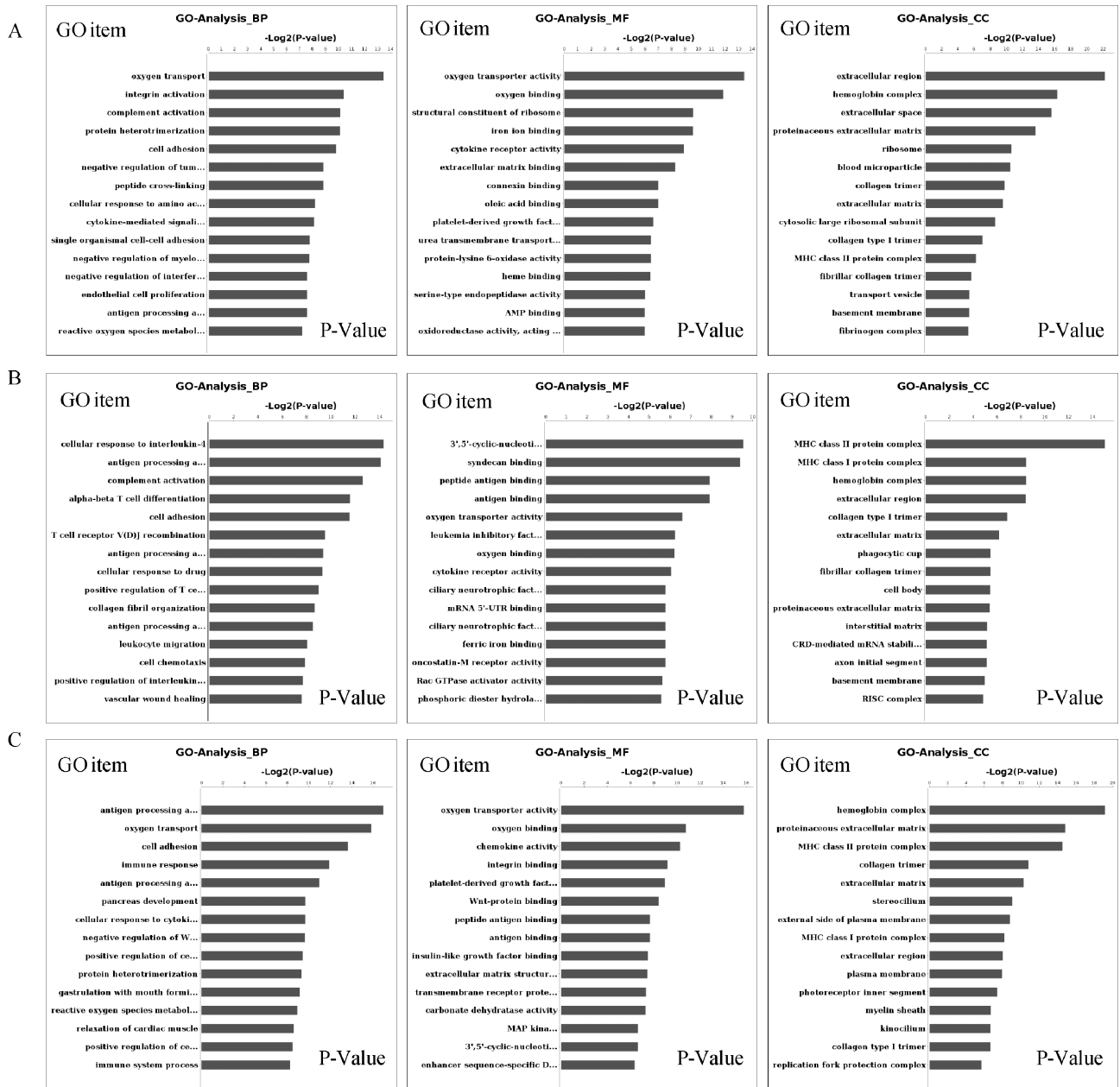
使用数据库 The Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>) 对差异基因进行 GO 功能注释, 包括生物学过程 (Biological process, BP)、分子功能 (Molecular function, MF) 和细胞组分 (Cellular component, CC), 结果如图 2 所示: 参与生物学过程主要表现为氧运输、抗原肽-MHC II 类分子复合物加工和呈递、细胞黏附等; 参与分子功能主要表现在氧运输活性、磷酸二酯酶活性、多配体聚糖结合等; 参与细胞组分主要表现在胞外区、MHC II 类蛋白复合物、血红蛋白复合物等。

将差异基因与 GO (gene ontology) 数据库的免疫相关基因进行比对分析, 结果如表 6 所示: DEV 感染 66 h 时, 参与免疫相关生物学过程的差异表达基因有 70 个, 其中上调基因 46 个和下调基因 24 个; 感染 90 h 时, 参与免疫相关生物学过程的差异表达基因有 64 个, 其中上调基因 49 个和下调基因 15 个; 感染 114 h 时, 参与免疫相关生物学过程的差异表达基因有 66 个, 其中上调基因 35 个和下调基因 31 个。这些基因主要涉及细胞黏附、抗原加工和呈递、补体激活等免疫反应过程。

表 6 参与免疫相关生物学过程的差异表达基因

Table 6 Differentially expressed genes involved in immune biological processes

组别 Group	已知功能基因 Known functional genes	差异表达免疫相关基因 Differentially expressed immune-related genes	差异表达免疫相关上调基因 Up-regulated differentially expressed immune-related genes	差异表达免疫相关下调基因 Down-regulated differentially expressed immune-related genes
66 h	313	70	46	24
90 h	362	64	49	15
114 h	498	66	35	31



A. 感染组 66 h; B. 感染组 90 h; C. 感染组 114 h

A. 66 h after DEV infection; B. 90 h after DEV infection; C. 114 h after DEV infection

图 2 差异表达基因 GO 注释

Fig. 2 GO annotation of differentially expression genes

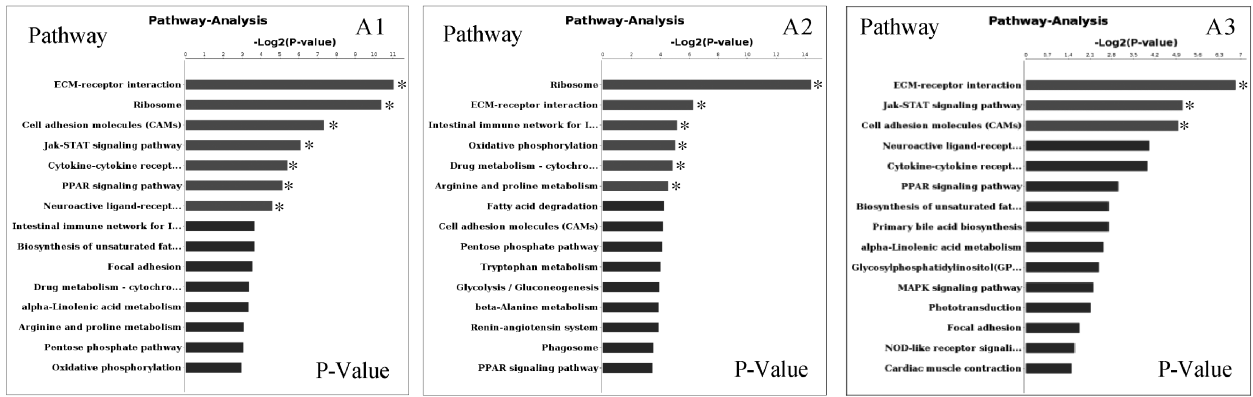
2.5 差异基因 KEGG 分析

应用 KEGG (www.kegg.jp/) 数据库, 以 $P < 0.05$ 为条件判定差异表达基因 Pathway 富集的显著性, 结果如图 3 所示: DEV 感染 66 h 时, Pathway 显著富集在 ECM 受体互作、核糖体、细胞黏附分子、JAT-STAT 信号通路、细胞因子-细胞因子受体互作、PPAR 信号通路、刺激神经组织配体-受体相互作用信号通路等, 其中差异表达上调基因显著富

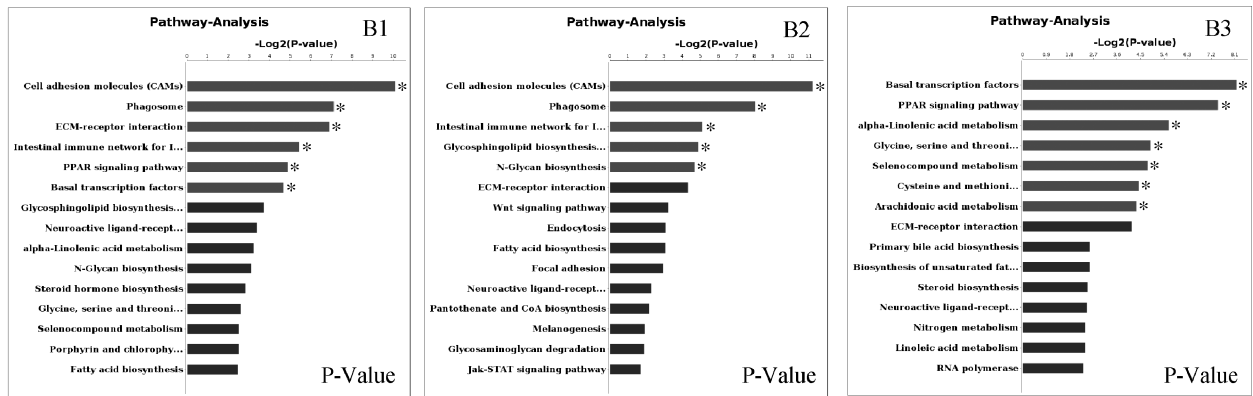
集在核糖体、ECM 受体互作、肠道免疫网络 IgA 分泌、氧化磷酸化、药物代谢与细胞色素 P450 和精氨酸和脯氨酸代谢等 6 个信号通路; 差异表达下调基因显著富集在 ECM 受体互作、JAK-STAT 信号通路和细胞黏附分子等 3 个信号通路。

DEV 感染 90 h 时, Pathway 显著富集在细胞黏附分子、吞噬体、ECM 受体互作、肠道免疫网络 IgA 分泌、PPAR 信号通路、基础转录因子信号通路

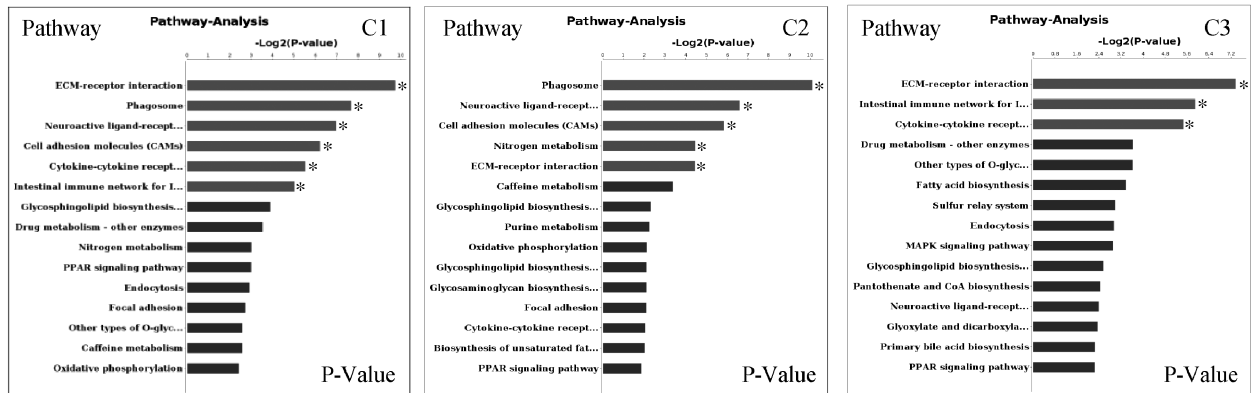
A



B



C



A1~A3. DEV 感染 66 h 时所有上调、下调信号通路；B1~B3. DEV 感染 90 h 时；C1~C3. DEV 感染 114 h 时所有上调、下调信号通路。* 表示差异显著

A1-A3. All, up- and down- regulated Pathway in 66 h of DEV infection; B1-B3. All, up- and down- regulated Pathway in 90 h of DEV infection; C1-C3. All, up- and down- regulated Pathway in 114 h of DEV infection. * show significant difference

图 3 差异表达基因 KEGG 注释

Fig. 3 KEGG annotation of differentially expressed genes

等,其中差异表达上调基因显著富集在细胞黏附分子、吞噬体、肠道免疫网络 IgA 分泌、球系列鞘糖脂生物合成和 N-糖链合成等 5 个信号通路;差异表达下调基因显著富集在基础转录因子、PPAR 信号通路、 α -亚麻酸代谢、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、硒化合物代谢、半胱氨酸/蛋氨酸代谢和花生四烯酸代谢等 7 个信号通路。

DEV 感染 114 h 时,Pathway 显著富集在 ECM 受体相互作用、吞噬体、刺激神经组织配体-受体相互作用、细胞黏附分子、细胞因子-细胞因子受体互作、PPAR 信号通路、肠道免疫网络 IgA 分泌信号通路等,其中差异表达上调基因显著富集在吞噬体、刺激神经组织配体-受体互作、细胞黏附分子、氮代谢和 ECM 受体互作等 5 个信号通路;差异表达下

调基因显著富集在 PPAR 信号通路、肠道免疫网络 IgA 分泌、细胞因子-细胞因子受体互作等 3 个信号通路。

2.6 荧光定量 PCR 验证差异基因

从随机选取上述参与免疫相关生物学过程中的 7 个差异表达基因,即 *SORBS2*、*DCHS2*、

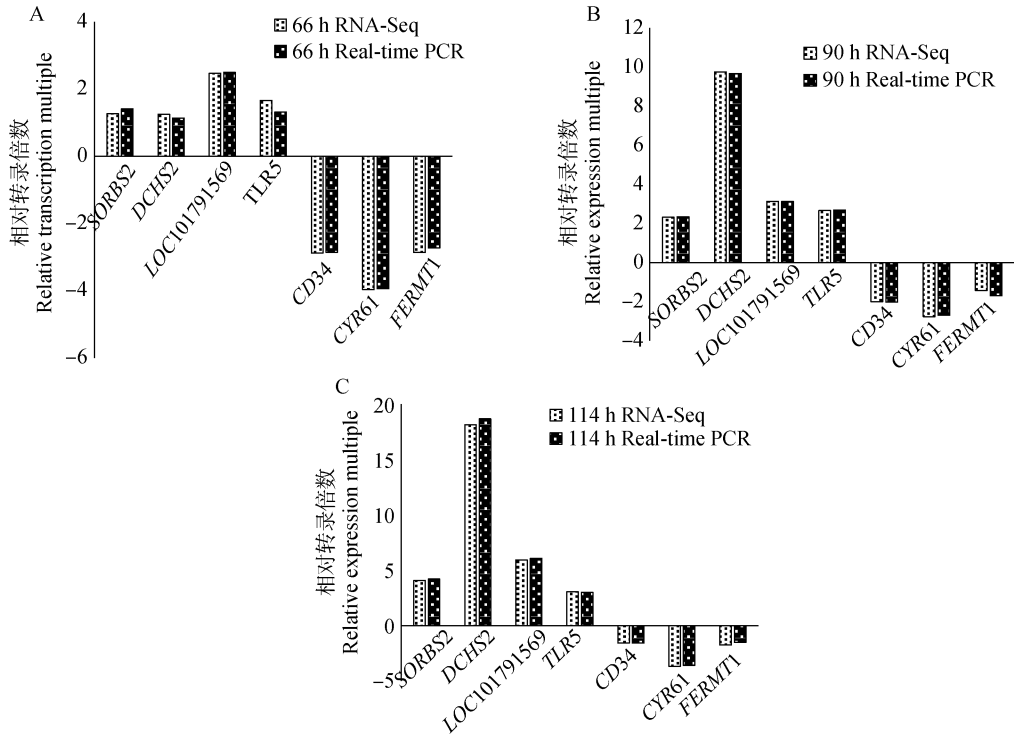


图 4 部分差异表达基因荧光定量 PCR 验证结果

Fig. 4 Verification of real-time PCR for some differentially expressed genes

3 讨论

鸭病毒性肠炎是由鸭肠炎病毒(DEV)感染引起鸭、鹅以及雁形目禽类发生的一种以血管损伤、体腔溢血、消化道出血坏死、淋巴器官受损和实质器官退行性变化为特征的急性、接触性、败血性传染病。由于鸭肠炎病毒常引起脾等免疫器官发生退行性病变,出现免疫抑制,从而导致其他病原的继发感染。脾是畜禽最大的外周免疫器官,是机体产生免疫应答的重要场所,具有调动免疫细胞和免疫分子参与抵抗病原感染的作用^[8]。因此,本研究选择脾作为 DEV 感染鸭免疫相关差异表达基因的研究对象,经测序分析发现,DEV 感染后脾组织有 500 个左右的差异表达基因,这为今后筛选得到更多更全的免疫相关差异表达基因提供了丰富的基础数据。

RNA-Seq 技术又称转录组测序技术,是把 mR-

LOC101791569、*TLR5*、*FERMT1*、*CD34* 和 *CYR61* 基因,以 $\beta actin$ 为内参基因,利用荧光定量 PCR 方法对感染 DEV 相应时间的鸭脾总 RNA 提取样本进行扩增,结果如图 4 所示:7 个差异表达基因的相对表达量与 RNA-Seq 技术测序结果基本一致。

NA、small RNA 和 non-coding RNA 全部或部分,应用高通量测序技术进行测序分析的技术。RNA-Seq 可从全基因组水平上进行差异表达基因筛选,具有定量更准确、可重复性更高、检测范围更广、分析结果更可靠等优点,现已广泛应用于基因表达水平差异、全新转录本发现、转录本结构与变异、非编码区域功能等领域的研究^[9]。目前发现已有 RNA-Seq 应用于猪、兔、鸡等多种动物在感染病原微生物后脾转录组研究的报道^[10-15],但尚未发现有关 DEV 感染后鸭脾差异表达免疫相关基因的分析。本研究应用 RNA-Seq 技术对 DEV 感染后鸭脾总 RNA 进行测序分析发现,参与免疫相关生物学过程的差异表达基因在 60 个以上,主要包括涉及细胞黏附、抗原加工和呈递、补体激活等免疫反应过程的免疫相关基因,这为进一步阐明 DEV 免疫应答机制和筛选免疫靶基因奠定了基础。

本研究筛选得到的差异基因大多为 Uncharacterized protein 基因, 经对已知蛋白质基因进行 GO 功能和 KEGG 富集分析, 这些差异基因主要涉及生物学过程、分子功能和细胞组分等多个复杂过程, 这提示鸭肠炎病毒感染是一个涉及多层次调控水平(包括转录水平及转录后水平、翻译水平及翻译后水平等)、由多个基因参与的复杂分子过程。另外还发现, 同一个差异表达基因富集的信号通路在不同的感染阶段, 出现不同的表达变化, 如: 肠道免疫网络 IgA 分泌信号通路在 DEV 感染 66 和 90 h 时呈现上调趋势, 而在 114 h 时为下调趋势, 这可能与 DEV 感染早期刺激肠道黏膜免疫有关; 细胞黏附分子信号通路在 DEV 感染 66 h 时呈现下调趋势, 而在 90 和 114 h 时为上调趋势, 这可能与 DEV 感染后期诱导机体细胞免疫和体液免疫相关。这些研究结果为发现 DEV 感染新的信号通路、研究新表达差异基因的功能和探索 DEV 免疫应答的分子机制奠定了分子基础。但本研究筛选出的差异表达基因大多还是未知结构和功能的基因, 需有待进一步探究。

参考文献 (References):

- [1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1997.
YIN Z, LIU J H. Animal virology [M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1997. (in Chinese)
- [2] WITTER R L, SCHAT K. Diseases of poultry[M]. 11th ed. Ames: Iowa State University Press, 2003.
- [3] YUAN G P, CHENG A C, WANG M S, et al. Electron microscopic studies of the morphogenesis of duck enteritis virus [J]. *Avian Dis*, 2005, 49(1): 50-55.
- [4] LI Y F, HUANG B, MA X L, et al. Molecular characterization of the genome of duck enteritis virus [J]. *Virology*, 2009, 391(2): 151-161.
- [5] ARAVIND S, KAMBLE N M, GAIKWAD S S, et al. Adaptation and growth kinetics study of an Indian isolate of virulent duck enteritis virus in Vero cells [J]. *Microb Pathog*, 2015, 78: 14-19.
- [6] LIN M, JIA R Y, WANG M S, et al. The transcription analysis of duck enteritis virus UL49.5 gene using real-time quantitative reverse transcription PCR [J]. *Virus Genes*, 2013, 47(2): 298-304.
- [7] WANG Z, GERSTEIN M, SNYDER M. RNA-Seq;

a revolutionary tool for transcriptomics[J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(1): 57-63.

- [8] 崔治中, 崔保安. 兽医免疫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2013.
CUI Z Z, CUI B A. Veterinary immunology [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2013. (in Chinese)
- [9] LI F G, WANG L X, LAN Q J, et al. RNA-Seq analysis and gene discovery of *Andrias davidianus* using Illumina short read sequencing [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0123730.
- [10] CHEN H, LI C, FENG M, et al. Understanding *Haemophilus parasuis* infection in porcine spleen through a transcriptomics approach [J]. *BMC Genomics*, 2009, 10:64.
- [11] 侯玉臻, 赵丹彤, 刘国英, 等. 基于高通量测序技术分析家兔感染猪瘟兔化弱毒株后脾脏的转录组学变化 [J]. 病毒学报, 2016, 32(3): 316-323.
HOU Y Z, ZHAO D T, LIU G Y, et al. Transcriptome analysis of rabbit spleen with hog cholera lapinized virus infection based on high-throughput sequencing technology [J]. *Chinese Journal of Virology*, 2016, 32(3): 316-323. (in Chinese)
- [12] 赵玉辉. H5N1 亚型禽流感病毒感染鸡脾脏蛋白质组和转录组差异研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2015.
ZHAO Y H. Differential proteome and transcriptome analysis of splenic tissues of chickens infected with H5N1 subtype avian influenza virus [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2015. (in Chinese)
- [13] 张清瑞. 基于 RNA-Seq 的 DHAV-1 感染雏鸭的组织转录组分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
ZHANG Q R. Research on the transcriptome of DHAV-1 infected ducklings tissue through RNA-Seq [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2013. (in Chinese)
- [14] MU Y N, DING F, CUI P, et al. Transcriptome and expression profiling analysis revealed changes of multiple signaling pathways involved in immunity in the large yellow croaker during *Aeromonas hydrophila* infection [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11:506.
- [15] CHE R B, SUN Y N, WANG R X, et al. Transcriptomic analysis of endangered Chinese salamander: identification of immune, sex and reproduction-related genes and genetic markers [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e87940.