



斑马鱼胚胎的简易无菌培养体系及单增李斯特菌感染试验

单颖, 张亦凯, 程昌勇, 方春, 彭金荣, 方维焕*

浙江大学动物科学学院, 浙江大学动物预防医学研究所, 浙江 杭州 310058

摘要: 【目的】斑马鱼的生活环境中微生物众多, 会激活其先天免疫系统, 从而影响相关试验结果, 因此需建立适合于感染与免疫研究的斑马鱼无菌培养体系。【方法】建立了基于受精卵短时消毒和温控正压无菌隔离器的培养流程; 根据无菌动物标准对斑马鱼胚胎及其生活环境进行微生物检测; 并通过定量PCR检测无菌斑马鱼先天免疫相关基因(TLRs)表达水平; 利用无菌斑马鱼胚胎模型进行了单增李斯特菌感染试验。【结果】本研究成功建立了斑马鱼培育的无菌操作系统, 无菌检验结果显示其生活环境及体内不含病原微生物, 先天免疫分子TLRs表达量较低或不表达, 而常规培养斑马鱼以及浸泡感染单增李斯特菌的无菌斑马鱼中这些基因转录水平较高。无菌斑马鱼对单增李斯特菌强毒株EGDe静脉注射感染很敏感, 100 CFU感染量能导致鱼在1周内全部死亡, 而其*mpl*或*plcB*基因缺失株感染后致死率显著下降(分别为70%和40%)。巨噬细胞在亲本株EGDe浸泡感染的鱼肠道周围聚集, 而*mpl*或*plcB*基因缺失株感染的鱼中几乎观察不到这一聚集现象。【结论】通过简易培养体系获得的无菌斑马鱼胚胎可用于先天免疫和病原感染机制等研究。

关键词: 无菌斑马鱼胚胎, 先天免疫, 单核细胞增生李斯特菌

单核细胞增生李斯特菌(简称单增李斯特菌)是一种重要的人畜共患病原, 人主要通过食用受污染的食物而感染。单增李斯特菌经口感染人后容易穿越肠道上皮屏障发生全身性感染, 因为人肠道上皮细胞上的E-钙黏蛋白是该菌InlA的结合受体^[1]。而斑马鱼E-钙黏蛋白在第16位氨基酸位点与人源E-钙黏蛋白相同。近年来, 斑马鱼作为一种新型的动物模型, 由于其胚胎数量多、通体

透明和遗传操作简易的特点, 广泛应用于生物学和医学领域的研究^[2-3]。以斑马鱼为模型研究李斯特菌感染的报道目前为止仅有3个。Menudier等比较了单增李斯特菌不同菌株对成年斑马鱼和小鼠的致病力^[4]。2006年Levraud等报道斑马鱼模型对单增李斯特菌浸泡感染并不易感^[5]。最近Corbo等简单描述了一种通过斑马鱼眼玻璃体注射感染李斯特菌的方法, 引起了中枢神经系统感染, 但结

基金项目: 农业部公益性行业专项(201303041)

*通信作者。Tel: +86-571-88982242; E-mail: whfang@zju.edu.cn

收稿日期: 2016-03-11; 修回日期: 2016-06-21; 网络出版日期: 2016-07-01

果并不明显^[6]。这些研究都是在普通饲养的斑马鱼成鱼或幼鱼上进行。自19世纪末期起,国外科学家相继培育出了多种无菌动物和SPF动物^[7-8]。1942年, Baker和Ferguson首次报道了无菌剑尾鱼的研究^[9]。目前国外已有学者描述了无菌斑马鱼的构建策略^[10],但由于操作繁琐复杂,应用此无菌斑马鱼模型的研究报道也十分有限^[11-13]。国内尚没有无菌斑马鱼培育的研究报道,无菌斑马鱼也没有作为实验动物模型在科学研究中应用。本研究对无菌斑马鱼胚胎的培育流程进行了简化,并作了详细描述;对无菌斑马鱼胚胎的生活环境进行了无菌检验;并以常规饲养的斑马鱼作为对照,分析了其先天免疫系统标志分子TLRs的表达水平。*mpl*和*plcB*为单增李斯特菌两个重要毒力因子基因,分别编码金属蛋白酶Mpl和磷脂酶PlcB,在单增李斯特菌逃逸细胞吞噬小泡过程中发挥作用^[14-15]。利用无菌斑马鱼胚胎模型,初步分析了单增李斯特菌毒力因子*mpl*及*plcB*基因缺失株与野生株之间的毒力差异及毒力因子的功能。研究结果可以为无菌斑马鱼胚胎在感染生物学研究中的应用提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及菌株:野生型AB品系斑马鱼及巨噬细胞绿色荧光标记、中性粒细胞红色荧光标记转基因鱼Tg(*corola*: dsred; *lyz*: gfp)^[16]由浙江大学发育生物学实验室提供。成年斑马鱼饲养于过滤水循环系统,饲养标准均参照《Zebra fish Book》^[17],鱼房光照/黑暗时间比为14/10,空调控制室内温度为28℃。单增李斯特菌强毒参考菌株EGDe由本实验室保存。*mpl*及*plcB*基因缺失株由本实验室构建并保存。

1.1.2 培养基:脑心浸液培养基(Brain heart infusion, BHI)购自北京陆桥技术有限公司,37 g BHI

粉末,溶于1000 mL蒸馏水中,调pH至7.4,每管5 mL分装至试管中,120℃高压灭菌20 min。胰蛋白胨大豆肉汤(Trypticase soy broth, TSB)培养基购自青岛海博生物技术有限公司,30 g TSB粉末,溶于1000 mL蒸馏水中,调pH至7.4,每管5 mL分装至试管中,120℃高压灭菌20 min。血琼脂平板:蛋白胨100 g,牛肉膏30 g,NaCl 50 g,琼脂15 g,溶于1000 mL蒸馏水中,调pH至7.4,120℃高压灭菌20 min,待冷却至50℃左右时加入100 mL脱纤维绵羊血,摇匀倒平板。

1.1.3 仪器:无菌培养隔离系统购自苏州市冯氏实验动物设备有限公司;普通恒温培养箱购自宁波赛福实验仪器有限公司;斑马鱼水循环系统购自北京爱生科技发展有限公司。荧光定量PCR仪为BIO-RAD iCycler iQ5,购自美国伯乐生物仪器公司。

1.1.4 培养液:斑马鱼胚胎培养液(egg water)参照《Zebrafish Book》^[17]标准:137.00 mmol/L NaCl、5.40 mmol/L KCl、0.25 mmol/L Na₂HPO₄、0.44 mmol/L K₂HPO₄、1.30 mmol/L CaCl₂、1.00 mmol/L MgSO₄、4.20 mmol/L NaHCO₃,每1 L培养液加入1-2滴亚甲基蓝溶液。无菌斑马鱼胚胎培养液:普通斑马鱼胚胎培养液(不加入亚甲基蓝溶液),加两性霉素B(终浓度为250 ng/mL)、卡那霉素(终浓度为5 μg/mL)和氨苄青霉素(终浓度为100 μg/mL),0.22 μm滤膜过滤除菌,4℃保存。

1.2 无菌培养流程

无菌斑马鱼胚胎培养流程如图1所示。取成年斑马鱼1-2对放入交配缸,加入0.22 μm滤膜过滤后的循环系统新鲜水,用透明隔板隔离公鱼与母鱼。次日换新交配缸及新鲜过滤水,抽掉隔板,进行自然产卵。受精后立即用一次性灭菌吸管将受精卵转移至无菌培养皿中,用无菌培养液清洗鱼卵3次,最后加入适量无菌培养液,放入无菌培养隔离器,每12 h换1次无菌培养液。受精后8 h,

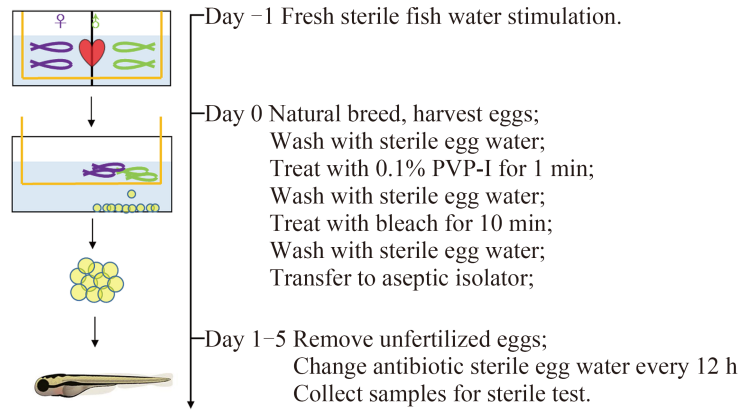


图 1. 无菌斑马鱼胚胎培养流程

Figure 1. Procedure for generation of germ-free zebrafish embryos.

去除未受精鱼卵，将受精的鱼卵放入0.1%乙炔吡咯烷酮碘消毒液(PVP-I)中浸泡1 min，用无菌培养液清洗鱼卵3次，将鱼卵放入0.5%次氯酸钙消毒液(现配现用，60%有效氯含量的次氯酸钙)中浸泡10 min，用无菌培养液清洗鱼卵3次，每次3 min。孵化过程中(受精后1-2 d)，及时移除卵壳，更换无菌培养液。

1.3 无菌培养系统

无菌培养系统包括隔离器、传递窗、恒温加热装置、照明灯、紫外杀菌灯和空气过滤装置(图2)。进行无菌培养前，隔离器内部使用紫外灯光杀菌及2%过氧乙酸喷雾消毒，隔离器手套安装好后将手套外翻开启风机检查是否漏气。经传递窗传送的物品先经高压灭菌或过滤除菌，再用2%过氧乙酸喷雾消毒。消毒后通风24 h，隔离器内过氧乙酸全部排出后待用。经0.1% PVP-I及次氯酸钙溶液消毒后的鱼卵放入隔离器后，28 °C恒温培养，保持光照14 h、黑暗10 h的光照周期。

1.4 无菌检验

用灭菌生理盐水蘸湿的棉拭子采集普通培养箱，无菌隔离器出风口、传递窗和操作台等样本，另用一次性灭菌吸管采集斑马鱼体及胚胎培养液样本，根据国标GB/T 14926.41-2001《无菌

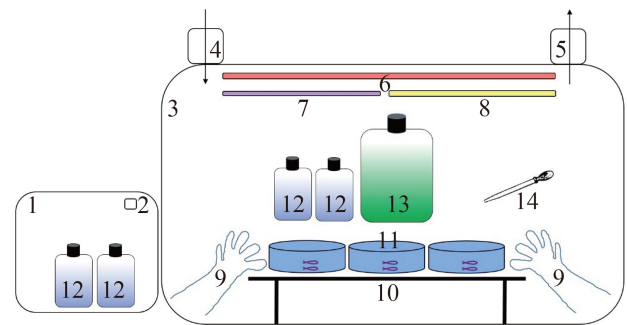


图 2. 无菌斑马鱼胚胎培养系统装置示意图

Figure 2. Schematic diagram of the isolator equipped for germ-free zebrafish embryos. 1: Delivery window; 2: Disinfectant spray hole; 3: Aseptic isolator; 4: Air inlet; 5: Air outlet; 6: Digital temperature measuring & controlling apparatus; 7: UV Sterilizer; 8: Light; 9: Gloves; 10: Operation area; 11: Petri dishes; 12: sterile egg water; 13: Disposal bottle; 14: Disposable sterile pipette.

动物生活环境及粪便标本的检测方法》，将无菌胚胎、无菌培养液和棉拭子样本分别接种于BHI和TSB液体培养基，37 °C恒温培养14 d，取少量培养液进行涂片及革兰氏染色，观察微生物生长情况；并在7 d及14 d时取少量培养液涂血平板，37 °C培养48 h，观察菌落形成情况。

1.5 *mpl*及*plcB*基因缺失株构建

以EGDe为模板分别扩增*mpl*及*plcB*基因上下

游同源臂, 并用SOE-PCR法获得上下游同源臂融合片段, 所使用引物见表1。将融合片段连接至温敏型穿梭质粒pksv7^[18]上, 并将重组质粒电转化导入亲本株EGDe感受态, 利用同源重组方法^[19]构建*mpl*及*plcB*基因缺失株, 分别命名为 Δmpl 和 $\Delta plcB$, 由本实验室保存。

1.6 斑马鱼感染试验

浸泡感染: 用一次性吸管吸取5 dpf (days post fertilization) 斑马鱼, 每组各10条, 放入96孔板, 每孔1条, 吸去多余培养液, 分别用含 10^8 CFU/mL细菌的胚胎培养液及无菌胚胎培养液进行培养, 24 h后弃去培养液, 用新鲜无菌胚胎培养液冲洗数次后进行免疫基因检测或共聚焦显微镜观察。

静脉注射感染: 取26 hpf (hours post fertilization) 尚未孵化的鱼卵, 用1 mL注射器针头小心剥去卵壳, 取出胚胎, 经0.02%三卡因(MS-222)麻醉后, 在泄殖腔附近未成形血管处显微注射李斯特菌突变株 Δmpl 和 $\Delta plcB$ 及其亲本菌株EGDe (10^8 CFU/mL菌液), 控制显微注射液滴大小使注射体积为1 nL (即每个鱼胚100 CFU), 注射成功后酚红

指示剂会延回心血流充满血管, 感染后每12 h观察1次, 记录存活鱼数量, 绘制Kaplan-meier存活率曲线。

1.7 qPCR试验

分别取无菌培养斑马鱼胚胎、常规培养的斑马鱼胚胎及单增李斯特菌浸泡感染的无菌斑马鱼胚胎各10条, 研磨后抽取总RNA。RNA样品经DNA酶处理去除基因组DNA后, 体外反转录为cDNA, 荧光定量检测 Toll 样受体分子TLR1、TLR2、TLR3、TLR4b及TLR5b的转录水平, 以此来监测无菌斑马鱼胚胎先天免疫系统激活情况。荧光定量引物用Vector NTI软件设计, 由深圳华大基因科技有限公司合成, 序列如表2所示。荧光定量体系为SYBR Green I 10 μ L, 上下游引物(10 μ mol/L)各0.5 μ L, cDNA模板2 μ L, 灭菌蒸馏水7 μ L, 总体积为20 μ L。荧光定量程序为95 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 55 $^{\circ}$ C 10 s, 72 $^{\circ}$ C 15 s, 同时在延伸时收集荧光信号, 共进行40个循环。选择 β -actin为内参基因, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对样本中的目的基因表达差异进行相对定量分析。

表1. 缺失株构建使用引物序列*

Table 1. Primer sequences for deletion strain construction

Primers	Sequence (5'→3')	Length/bp
<i>mpl</i> -1	GCG <u>T</u> CGACTTACGCTAAAGAATGCACTGGTTTA	459
<i>mpl</i> -2	TTAAGCCACCTACAACCTAATCTGAC	
<i>mpl</i> -3	GTCAGATTAGTTGTAGGTGGCTTAATAATTCTC CAAGTGATATTCTTAAA	470
<i>mpl</i> -4	CGGGGTACCTTCTTTCAACATTGCTATTAGGTCT	
<i>plcB</i> -1	GCG <u>T</u> CGACCCTGTAAAGACCGCACCAAAGCTAG	382
<i>plcB</i> -2	CCTAAAGAGAACACGCCAATAGCT	
<i>plcB</i> -3	AGCTATTGGCGTGTCTCTTTAGGATATTTAGGA ATACATTCTTATCCA	507
<i>plcB</i> -4	CGGGGTACCATTC AAGACTACCTAACAACCGCA	

*: the underline shows restriction enzyme sites in primer sequences.

表2. 荧光定量引物序列
Table 2. Primer sequences for real time quantitative PCR

Primers	Sequence (5'→3')	Length/bp
TLR1-F	AATCAAGGCAGGTGTTTCTGGCCT	126
TLR1-R	TCGGTTGTGCCGAAGGTTTAGGA	
TLR2-F	GGTGAAGGAAGGTGGCACTAAGAGC	134
TLR2-R	CAACAAATTGTATATCTTCAAGTCCAATAAAAGAC	
TLR3-F	TGAAGAAGCTTGCTGACACAGCCTTG	154
TLR3-R	GGCACCATCTACAATCTTTGAAATTCTG	
TLR4b-F	GAGGATTTGAAGGACTTGATTCGCTTG	180
TLR4b-R	GAACATTAAGACTGCTGAGTCCAAGAAAGC	
TLR5b-F	TCTTGACAAACTTGAGGTGCTCGATT	146
TLR5b-R	TTGGTAAGGCAGCAAATGTATGGACTG	
β-actin-F	GTGCCCATCTATGAGGGTTACGCT	147
β-actin-R	GTCACGGACAATTTCTTTTCGGC	

2 结果和分析

2.1 无菌检验

无菌斑马鱼(Germ-free, GF)和普通斑马鱼(Conventionally raised, CR)生活环境及鱼体无菌情况测定结果见表3。根据国标GB/T 14926.41-2001《无菌动物生活环境及粪便标本的检测方法》，所取的无菌斑马鱼胚胎及其生活环境棉拭子的样

表3. 无菌斑马鱼胚胎的微生物检验

Table 3. Sterility testing of germ-free zebrafish embryos

Samples	BHI		TSB		Blood agar	
	GF	CR	GF	CR	GF	CR
Constant temperature incubator	-	+	-	+	-	+
Air inlet	-	/	-	/	-	/
Delivery window	-	/	-	/	-	/
Operation area	-	/	-	/	-	/
Embryos	-	+	-	+	-	+
Egg water	-	+	-	+	-	+

+: positive; -: negative; /: not detected.

本，在BHI、TSB液体培养基及血平板中进行培养，结果均为阴性；普通培养的斑马鱼胚胎及其生活环境的样本，在上述相应的培养基中均有细菌或真菌生长。

2.2 先天免疫相关基因检测

选择β-actin为内参基因，用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对无菌斑马鱼胚和常规培养的斑马鱼胚样本的先天免疫相关基因进行表达差异的相对定量分析，经3次独立试验重复。在无菌斑马鱼胚胎(GF)样本中，TLR分子表达量均很低， C_t 值接近40，接近检测下限；在常规培养的斑马鱼胚胎(CR)样本中，TLR分子表达水平均较高，以TLR2分子的激活最为显著(图3)，说明先天免疫系统已被微生物的模式识别分子激活；在将单增李斯特菌强毒株EGDe作为特定病原浸泡感染无菌斑马鱼胚胎，TLR1、TLR2、TLR4均有显著上调。

2.3 无菌斑马鱼胚胎模型的应用

分别用单增李斯特菌标准株EGDe，缺失株Δmpl和ΔplcB经静脉显微注射感染26 hpf的无菌斑

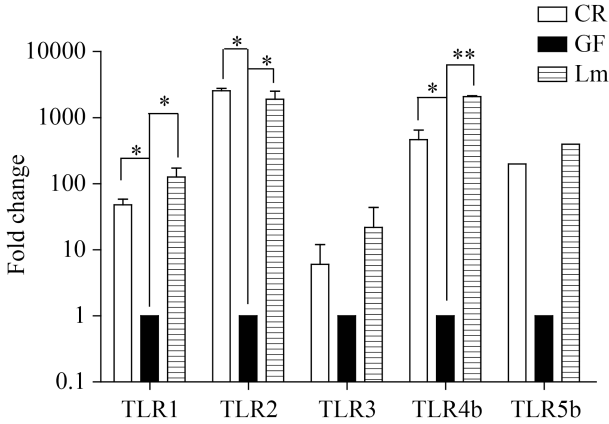


图 3. 无菌斑马鱼胚、常规斑马鱼胚及浸泡感染单增李斯特菌的无菌斑马鱼胚 *tlr1-tlr5* 分子表达水平比较

Figure 3. Compariosn of transcriptional level of *tlr1-tlr5* of germ-free, conventionally raised, and *Listeria monocytogene* infected germ-free zebrafish embryos. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

马鱼胚胎, 在注射后10 d内观察斑马鱼存活情况。图4结果显示, 野生株感染后, 斑马鱼胚胎在1周内全部死亡, Δmpl 有30%的鱼能够存活, $\Delta plcB$ 有60%的鱼能够存活, 缺失株的毒力相对于野生株均有不同程度的下降。

分别用单增李斯特菌标准株EGDe, 缺失株 Δmpl 和 $\Delta plcB$ 浸泡感染5 dpf的无菌斑马鱼胚胎, 共聚焦显微镜观察转基因鱼Tg (*corola: dsred*; *lyz: gfp*)中巨噬细胞及中性粒细胞的分布情况。图5结

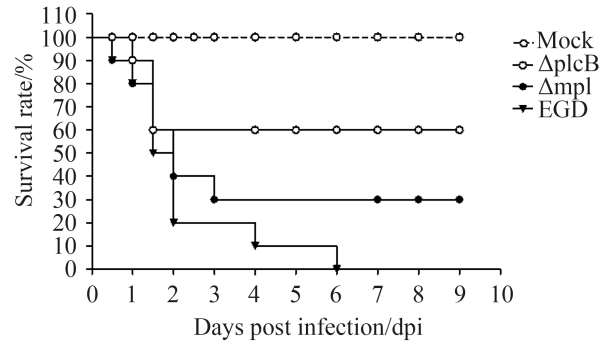


图 4. 无菌斑马鱼胚胎静脉注射感染单增李斯特菌EGDe, Δmpl 和 $\Delta plcB$ 后的生存率曲线

Figure 4. Kaplan-meier curve of germ-free zebrafish embryos after *Listeria monocytogenes* EGDe, Δmpl and $\Delta plcB$ intravenous infection.

果显示, 野生株感染后, 斑马鱼胚胎巨噬细胞及中性粒细胞迅速迁移至肠道附近, 高倍镜下可见巨噬细胞内有被吞噬的细菌(图5红色方框处)。 Δmpl 及 $\Delta plcB$ 均能引起中性粒细胞在肠道周围聚集但巨噬细胞较少。对照组鱼中, 巨噬细胞几乎不聚集, 中性粒细胞分布也较为分散。

3 讨论

斑马鱼作为重要的模式脊椎动物之一, 具有繁殖能力强、体外受精和发育、性成熟周期短、胚胎透明和易于遗传操作等诸多优点。斑马鱼具

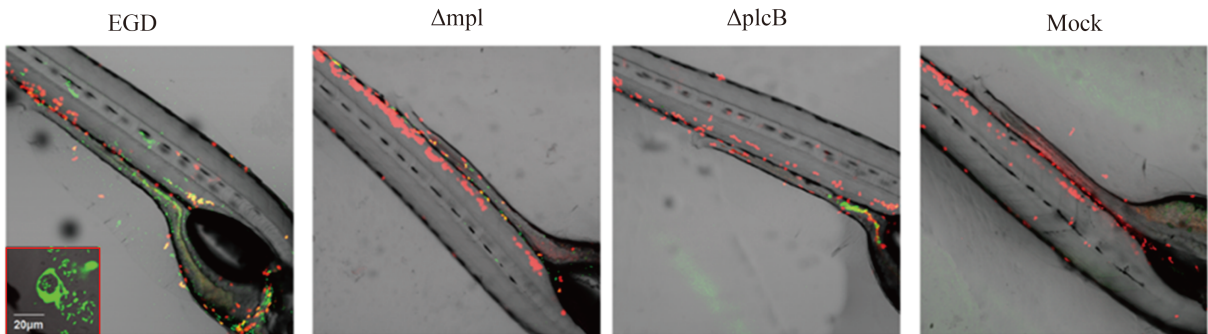


图 5. 共聚焦观察浸泡感染单增李斯特菌EGDe、 Δmpl 和 $\Delta plcB$ 后的无菌斑马鱼胚胎中巨噬细胞及中性粒细胞分布情况

Figure 5. Confocal imaging of macrophages and neutrophils in germ-free zebrafish embryos after *Listeria monocytogenes* EGDe, Δmpl and $\Delta plcB$ immersion infection.

有与哺乳动物相似类型的免疫细胞^[20-21]，且先天免疫系统在胚胎时期独立于后天免疫而存在^[22-23]。以斑马鱼为模式动物建立病原微生物感染模型，对于病原的致病机制、宿主的先天免疫功能和病原与宿主之间互作关系的研究具有重要意义。然而普通斑马鱼饲养环境及其肠道内的微生物可能会影响特定病原感染的研究，由于固有菌群和生活环境中的微生物存在，普通饲养的斑马鱼与无菌培养的斑马鱼在抵御病原感染中的免疫应答模式有显著区别^[24]，因此无菌斑马鱼胚胎模型更适用于感染生物学中对宿主免疫应答的研究。

自20世纪80年代起，国内外利用无菌动物进行的研究工作已渗入到生物学和医学多个领域，无菌动物的培育技术及其无菌生活环境的检测方法也逐步完善。各国对无菌检验方法都有详尽的描述，但目前尚无统一的标准。本研究采用国标GB/T 14926.41-2001《无菌动物生活环境及粪便标本的检测方法》，对无菌斑马鱼胚胎模型及其生活环境进行检测。该方法仅检测无菌动物体及其环境有无细菌或真菌污染，由于检测技术繁杂、污染频率较低，对于病毒和寄生虫的未予检测。因此，单凭该方法检测的结果来判别标本是否无菌并不能确保无菌动物的无菌质量，只能定义为“相对无菌”^[25]。本研究在国标无菌检验基础上又检测了先天免疫基因Toll样受体分子的转录水平。表达在巨噬细胞、树突状细胞和上皮细胞表面的Toll样受体分子可识别多种类型的病原体相关分子模式(PAMPs)或损伤相关分子模式(DAMPs)，其介导的信号转导可导致先天免疫细胞活化，表达和分泌多种促炎症细胞因子和可诱导共刺激分子(co-stimulatory molecule)表达，并启动特异性免疫应答产生^[26-27]。为使无菌斑马鱼胚胎模型可被应用于先天免疫系统功能研究，本研究选择了TLR1、TLR2、TLR3、TLR4b和TLR5b这5个先天免疫中具有代表性的Toll样受体分子，

对无菌斑马鱼胚胎先天免疫系统是否被激活进行了检测。在哺乳动物中，TLR1识别细菌中的脂蛋白和三酰脂质肽^[28-29]，TLR2主要识别脂蛋白，脂多肽，脂壁酸(LTA)，阿拉伯甘聚糖(LAM)及酵母多糖^[30]，TLR3可识别病毒复制的中间产物ds-RNA^[31]，TLR4主要识别革兰氏阴性菌脂多糖(LPS)^[32]，还可识别宿主坏死细胞释放的热休克蛋白(heat-shock proteins, HSP)^[33]，但斑马鱼的TLR4功能可能有别于哺乳动物，不能识别LPS^[34]。TLR5可识别细菌鞭毛蛋白^[35]。

本研究结果中，无菌斑马鱼胚胎样本及其生存环境样本中根据国标均未检出微生物，且无菌斑马鱼胚胎TLR分子表达水平均显著低于常规饲养的鱼胚，甚至不表达，可认为我们所建立的斑马鱼胚胎生长环境中不存在细菌、真菌和病毒等可能会引起先天免疫系统激活的微生物，“相对无菌”的斑马鱼胚胎培育是成功的。本研究利用简易无菌培养系统获得的斑马鱼胚胎作为实验动物模型，代替了对单增李斯特菌不易感的小鼠模型^[1]，探索了单增李斯特菌标准株EGDe，缺失株 Δmpl 和 $\Delta plcB$ 在斑马鱼上的毒力，并利用免疫细胞荧光标记的转基因斑马鱼^[16]初步研究了 mpl 及 $plcB$ 这2个毒力因子的功能，认为其在细菌感染中可能参与招募巨噬细胞的过程，具体机制尚待进一步研究。

综上，本报道的无菌斑马鱼胚胎培育系统，利用其后天免疫尚未发育的特殊发育时期^[22-23]，及胚胎可吸收卵黄获取营养、无需饲喂灭菌饲料的特点，可通过简易操作获得无菌胚胎，用于接种特定病原，对病原致病机制及宿主的先天免疫系统功能进行深入探索。

参考文献

- [1] Lecuit M, Dramsi S, Gottardi C, Fedor-Chaiken M, Gumbiner B, Cossart P. A single amino acid in E-cadherin responsible for

- host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *The EMBO Journal*, 1999, 18(14): 3956–3963.
- [2] Tobin DM, May RC, Wheeler RT. Zebrafish: a see-through host and a fluorescent toolbox to probe host–pathogen interaction. *PLoS Pathogens*, 2012, 8(1): e1002349.
- [3] Meijer AH, Spaik HP. Host–pathogen interactions made transparent with the zebrafish model. *Current Drug Targets*, 2011, 12(7): 1000–1017.
- [4] Menudier A, Rougier FP, Bosgiraud C. Comparative virulence between different strains of *Listeria* in zebrafish (*Brachydanio rerio*) and mice. *Pathologie–Biologie*, 1996, 44(9): 783–789.
- [5] Levraud JP, Disson O, Kissa K, Bonne I, Cossart P, Herbomel P, Lecuit M. Real-time observation of *Listeria monocytogenes*–phagocyte interactions in living zebrafish larvae. *Infection and Immunity*, 2009, 77(9): 3651–3660.
- [6] Corbo CP, Gaylets CE, Molesan AJ, Rivera WA. *Listeria monocytogenes* infects the zebrafish central nervous system; a useful model to analyze the neuroimmune response. *Microscopy and Microanalysis*, 2014, 20(S3): 1324–1325.
- [7] Nuttall GHF, Thierfelder H. Thierisches leben ohne bakterien im verdauungskanal. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 1896, 21(2/3): 109–121.
- [8] Gordon HA. The germ-free animal-its use in the study of "physiologic" effects of the normal microbial flora on the animal host. *The American Journal of Digestive Diseases*, 1960, 5(10): 841–867.
- [9] Baker JA, Ferguson MS, TenBroeck C. Growth of platyfish (*Platypoecilus maculatus*) free from bacteria and other micro'organisms. *Experimental Biology and Medicine*, 1942, 51(1): 116–119.
- [10] Pham LN, Kanther M, Semova I, Rawls JF. Methods for generating and colonizing gnotobiotic zebrafish. *Nature Protocols*, 2008, 3(12): 1862–1875.
- [11] Kanwal Z, Zakrzewska A, den Hertog J, Spaik HP, Schaaf MJM, Meijer AH. Deficiency in hematopoietic phosphatase ptpn6/Shp1 hyperactivates the innate immune system and impairs control of bacterial infections in zebrafish embryos. *The Journal of Immunology*, 2013, 190(4): 1631–1645.
- [12] Rekecki A, Dierckens K, Laureau S, Boon N, Bossier P, Van den Broeck W. Effect of germ-free rearing environment on gut development of larval sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*, 2009, 293(1/2): 8–15.
- [13] Kanther M, Sun XL, Mühlbauer M, Mackey LC, Flynn III EJ, Bagnat M, Jobin C, Rawls JF. Microbial colonization induces dynamic temporal and spatial patterns of NF- κ B activation in the zebrafish digestive tract. *Gastroenterology*, 2011, 141(1): 197–207.
- [14] Dussurget O, Pizarro-Cerda J, Cossart P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annual Review of Microbiology*, 2004, 58(1): 587–610.
- [15] Cossart P. Illuminating the landscape of host-pathogen interactions with the bacterium *Listeria monocytogenes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(49): 19484–19491.
- [16] Li L, Yan B, Shi YQ, Zhang WQ, Wen ZL. Live imaging reveals differing roles of macrophages and neutrophils during zebrafish tail fin regeneration. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(30): 25353–25360.
- [17] Westerfield M. The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). Oregon: University of Oregon Press, 2000.
- [18] Smith K, Youngman P. Use of a new integrational vector to investigate compartment-specific expression of the *Bacillus subtilis* *spoII*M gene. *Biochimie*, 1992, 74(7/8): 705–711.
- [19] Cheng CY, Chen JS, Shan Y, Fang C, Liu Y, Xia Y, Song HH, Fang WH. *Listeria monocytogenes* ArcA contributes to acid tolerance. *Journal of Medical Microbiology*, 2013, 62(6): 813–821.
- [20] Meeker ND, Trede NS. Immunology and zebrafish: spawning new models of human disease. *Developmental & Comparative Immunology*, 2008, 32(7): 745–757.
- [21] Carradice D, Lieschke GJ. Zebrafish in hematology: sushi or science. *Blood*, 2008, 111(7): 3331–3342.
- [22] Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 1995, 203(3): 253–310.
- [23] Trede NS, Langenau DM, Traver D, Look AT, Zon LI. The use of zebrafish to understand immunity. *Immunity*, 2004, 20(4): 367–379.
- [24] Shan Y, Fang C, Cheng CY, Wang Y, Peng JR, Fang WH. Immersion infection of germ-free zebrafish with *Listeria monocytogenes* induces transient expression of innate immune

- response genes. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 373.
- [25] Dai FW, Zhou SS, Ke XF, Xu Z, Sa XY. Present situation and the analysis of germ-free animals. *Laboratory Animal and Comparative Medicine*, 2006, 26(4): 261–264. (in Chinese)
戴方伟, 周莎桑, 柯贤福, 徐智, 萨晓婴. 国内无菌动物无菌检查的现状与分析. *实验动物与比较医学*, 2006, 26(4): 261–264.
- [26] Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, 2004, 4(7): 499–511.
- [27] Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 2011, 34(5): 637–650.
- [28] Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong ZY, Modlin RL, Akira S. Cutting edge: role of toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *The Journal of Immunology*, 2002, 169(1): 10–14.
- [29] Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R, Golenbock D. Cutting edge: recognition of gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via toll-like receptor 2. *The Journal of Immunology*, 1999, 163(1): 1–5.
- [30] Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(25): 17406–17409.
- [31] Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by toll-like receptor 3. *Nature*, 2001, 413(6857): 732–738.
- [32] Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Cutting edge: toll-like receptor 4(TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the *Lps* gene product. *The Journal of Immunology*, 1999, 162(7): 3749–3752.
- [33] Ohashi K, Burkart V, Flohé S, Kolb H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *The Journal of Immunology*, 2000, 164(2): 558–561.
- [34] Sepulcre MP, Alcaraz-pérez F, López-muñoz A, Roca FJ, Meseguer J, Cayuela ML, Mulero V. Evolution of lipopolysaccharide (LPS) recognition and signaling: fish TLR4 does not recognize LPS and negatively regulates NF- κ B activation. *The Journal of Immunology*, 2009, 182(4): 1836–1845.
- [35] Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by toll-like receptor 5. *Nature*, 2001, 410(6832): 1099–1103.

A simplified system for generation of germ-free zebrafish embryos and its application in *Listeria monocytogenes* infection

Ying Shan, Yikai Zhang, Changyong Cheng, Chun Fang, Jinrong Peng, Weihuan Fang*

Institute of Preventive Veterinary Medicine, College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang Province, China

Abstract: [Objective] Under conventional cultivation conditions zebrafish harbors numerous microbes from the environment, leading to activation of its innate immune systems and interfering the results of relevant studies. We aimed to establish a germ-free zebrafish embryo model suitable for studies of host immune responses to infections. [Methods] A germ-free cultivation process including simple disinfection of the fertilized eggs and growth in a positive-pressured thermostatic isolator. Sterility testing of germ-free zebrafish embryos and water samples was done according to the national standards. The transcriptional level of TLRs, the mark genes indicating activation of the innate immune system, was detected by qPCR. *Listeria monocytogenes* was used as an infection model. [Results] The cultivation system and disinfection process could ensure germ-free status as shown by absence of microbes in zebrafish embryos and egg water. TLRs were barely detectable in zebrafish raised in the germ-free system, but highly induced in conventionally raised zebrafish or in germ-free zebrafish immersion-infected with pathogenic *Listeria monocytogenes*. The germ-free fish was sensitive to infection by *L. monocytogene* EGDe at a 100-CFU dose with 100% mortality in one week, while its isogenic mutants Δ mpl and Δ plcB exhibited reduced death (70% and 40%, respectively). Macrophages were recruited around the intestine in EGDe immersion infected fish, but not in Δ mpl and Δ plcB infected fish. [Conclusion] Zebrafish embryos produced by this simple process were free of microbes and could be used to study the innate immune responses and the pathogenesis of microbial pathogens.

Keywords: germ-free zebrafish embryos, innate immunity, *Listeria monocytogenes*

(本文责编: 李磊)

Supported by the Special Fund for Agro-Scientific Research in the Public Interest (201303041)

*Corresponding author. Tel: +86-571-88982242; E-mail: whfang@zju.edu.cn

Received: 11 March 2016; Revised: 21 June 2016; Published online: 1 July 2016