

## GCRV弱毒疫苗免疫草鱼母本的免疫因子 代间传递与表达特性

肖调义<sup>1,2\*</sup>, 周智愚<sup>1</sup>, 王荣华<sup>1</sup>, 李耀国<sup>1,2</sup>,  
金生振<sup>1</sup>, 李伟<sup>1</sup>, 王红权<sup>1,2\*</sup>

(1. 湖南农业大学, 湖南省特色水产资源利用工程技术中心, 湖南长沙 410128;

2. 水产高效健康生产湖南省协同创新中心, 湖南常德 415000)

**摘要:** 为探究GCRV弱毒疫苗母源性免疫的草鱼母本及其子代免疫因子(IgM、C3、LSZ)表达特性及代间传递效应, 采用ELISA、Rt-qPCR等方法检测了草鱼母本产前40 d接种疫苗后, 母本血液、子代早期发育阶段及2月龄幼鱼3种免疫因子的蛋白活性及基因表达水平。结果显示, 经GCRV弱毒疫苗免疫的草鱼母本血液、早期胚胎及幼鱼阶段IgM蛋白活性均显著高于对照组样品。子代各阶段中, 28日龄的夏花样品IgM蛋白活性水平最高, 而5日龄水花样品中蛋白活性最低; 从受精卵发育至3日龄水花阶段, 实验组样品免疫因子C3和LSZ的蛋白活性均显著高于对照组; 2组鱼中IgM、C3和LSZ蛋白的活性水平随着发育进行, 总体上呈先下降后升高的趋势, 从卵细胞至3日龄水花阶段实验组样品C3和LSZ蛋白活性水平均显著高于对照组。实验组和对照组受精卵IgM基因的表达水平差异最大, 实验组表达量为对照组的3.4倍。从24 h器官形成期至3日龄水花样品中, 实验组C3基因的表达水平显著高于对照组。从卵细胞至3 h囊胚期阶段, 实验组LSZ基因表达水平显著高于对照组。实验组2月龄草鱼体肾、头肾、脾脏组织中IgM基因表达量均显著高于对照组; 感染GCRV病毒后, 实验组死亡尾数(2尾)低于对照组死亡尾数(5尾)。研究表明母源性免疫可在草鱼进行代间传递, 并对子代起到一定程度的免疫保护作用。

**关键词:** 草鱼; GCRV; 母源性免疫; 早期发育; 免疫因子

**中图分类号:** S 941.41

**文献标志码:** A

母源性免疫是指由母体内形成并传递给子代的免疫能力<sup>[1]</sup>。高等脊椎动物中母源性免疫研究已相当深入, 如哺乳类母源性抗体可经胎盘和乳汁传递给胚胎和初生子代, 并发挥免疫保护作用<sup>[2]</sup>; 鸟类母源性抗体可由血液循环转移至卵黄囊<sup>[3-4]</sup>。硬骨鱼类也存在母源性免疫因子, 如免疫球蛋白M(immunoglobulin M, IgM)<sup>[5]</sup>、补体分子(complement, C)<sup>[6-7]</sup>、溶菌酶(lysozyme, LSZ)<sup>[8]</sup>和凝集素(lectin)<sup>[9]</sup>。通过疫苗免疫产前性成熟的雌鱼, 如大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)<sup>[10]</sup>、

南亚黑鲮(*Labeo rohita*)<sup>[11]</sup>、罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)<sup>[12]</sup>、金头鲷(*Sparus aurata*)<sup>[13]</sup>等, 能显著提高母源性免疫因子的表达水平并传递给后代。开展鱼类母源性免疫研究以提高子代早期抗病能力是重要的育种手段之一。

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)是我国大宗淡水鱼类养殖品种, 病害频发, 其中以草鱼呼肠孤病毒(grass carp reovirus, GCRV)感染导致的出血病最为突出<sup>[14]</sup>。当年夏花至2龄鱼种均可发病, 严重制约了草鱼养殖产业的发展<sup>[15]</sup>。针对草鱼抗

收稿日期: 2016-12-19 修回日期: 2017-04-18

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46-42)

通信作者: 肖调义, E-mail: tyxiao1128@163.com; 王红权, E-mail: whq@hunau.net

GCRV相关研究报道发现,利用GCRV灭活疫苗或其亚单位疫苗免疫草鱼后,免疫组织中IgM、C3基因的表达和LSZ、C3活性水平显著高于对照组,说明这些体液免疫因子参与了应对GCRV感染的免疫反应<sup>[16-18]</sup>。生产中常由于操作工序、制作成本和安全性等多重原因,大规模GCRV疫苗的使用受到限制,这一现状亦促使科研工作者开展草鱼母源性免疫研究工作。目前,仅见陈昌福等<sup>[19]</sup>以灭活柱状嗜纤维菌(*Cytophaga columnaris*)对草鱼的母源性免疫研究,证实了凝集抗体的代间传递。但针对草鱼GCRV疫苗的母源性免疫研究尚未见报道。

基于上述体液免疫因子参与草鱼抗GCRV免疫反应和鱼类母源性免疫研究基础,该研究拟通过GCRV弱毒疫苗免疫产前40 d的草鱼母本,并检测草鱼母本血液及其子代早期发育阶段中3种免疫因子的蛋白活性和基因表达水平。目的在于通过实验组与对照组的表达差异来探究GCRV弱毒疫苗作为抗原进行草鱼母源性免疫的可行性。研究结果将为草鱼免疫因子的跨代传递规律和免疫时效提供资料,并为草鱼及其他鱼类基于母源性免疫的抗病育种研究提供思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用草鱼亲本为从湖南湘阴巨丰渔业公司选购的长江原种,平均体质量为(9.0±1.0) kg。草鱼出血病弱毒疫苗购自中国水产科学研究院珠江水产研究所。小鼠抗草鱼IgM  $\mu$ 链单克隆抗体由中国科学院水生生物研究所聂品研究员惠赠;GCRV 106毒株由中国水产科学研究院长江水产研究所曾令兵研究员提供。

### 1.2 草鱼母本免疫实验

选取10尾健康且性腺成熟的雌性草鱼,其中5尾为母源性免疫实验组,5尾为对照组。催产前40 d,实验组草鱼母本按0.5 mL/kg剂量于胸腔注射草鱼出血病弱毒疫苗(冻干粉末以0.65%生理盐水稀释);对照组草鱼母本注射等剂量生理盐水。2组鱼均注射可扫码标记芯片,同池饲养,按照体质量2%投喂黑麦草(*Lolium perenne*)和草鱼亲本配合饲料(湘中饲料,湖南)。

### 1.3 亲本催产及子代培育

草鱼亲本于催产前1周停食,实验组和对照

组均各有4尾鱼符合催产条件。利用普通草鱼作为父本,通过干法人工授精获得受精卵。实验组和对照组受精卵分池孵化,对3~15日龄鱼苗投喂熟鸡蛋黄和豆浆,15日龄后则投喂鱼苗营养粉(大北农饲料,北京)。2月龄草鱼于室内循环水养殖系统暂养4周,水温控制在(28±1) °C,按体质量2%比例投喂普通草鱼饲料。

### 1.4 母本血液、子代早期胚胎及幼鱼样品采集

使用5 mL规格一次性注射器采集实验组和对照组中产卵后母本草鱼的尾静脉血液,每尾采集4 mL。用于荧光定量基因表达检测的血液样品于液氮保存;用于生理生化指标测定的血液样品于-80 °C冰箱保存。采集实验组和对照组的卵细胞、受精卵、3 h(囊胚期)、6 h(原肠胚期)、12 h(神经胚期)、24 h(器官形成期)、36 h(脱膜孵化期)、3 d(水花)、5 d(卵黄囊消失期水花)、14 d(乌仔)和28 d(夏花)样品。每组随机选取5个胚胎或鱼苗,每个阶段或时间点均作3次生物学重复取样。由于个别样品体积较大,为了方便后续匀浆实验,将吸水后的受精卵、6 h、12 h、24 h胚胎样品和14 d、28 d仔鱼分为5个无核酸酶匀浆管(Bertin,法国)单独存放,其他时期样品5个或5尾放入1个灭菌匀浆管中,均放入液氮中保存。

### 1.5 免疫因子活性检测

**IgM活性检测** 取上述胚胎、幼鱼阶段样品,每管加入1% DEPC处理的3~5粒陶瓷研磨珠,按照50 mg : 500  $\mu$ L比例加入1×PBS,使用均质仪(Bertin,法国)4000 r/min,10 s/次匀浆3次。匀浆液在4 °C下10 000×g离心10 min,收集上清液,单独样品匀浆后5份混合为1份。采用酶联免疫双抗体夹心法检测实验组和对照组母本血清、各胚胎阶段样品、幼鱼样品上清液IgM蛋白的含量。按1 : 4000比例稀释IgM一抗工作液,以100  $\mu$ L/孔包被于酶标板(康宁,美国),4 °C孵育过夜。经洗涤操作后加50  $\mu$ L待测样品,37 °C孵育30 min,按50  $\mu$ L/孔加入辣根过氧化氢酶标记的山羊抗小鼠IgM二抗,37 °C孵育30 min。再次洗涤操作后加50  $\mu$ L TMB显色剂(博士德,武汉),避光显色15 min,加50  $\mu$ L 2 mol/L的H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应。使用酶标仪(Thermo,美国)于450 nm波长下测量各样品孔OD值。

**C3活性检测** 利用补体C3检测试剂盒(伊

利康, 浙江), 基于免疫比浊法测定上述样品中C3的活性。将250  $\mu\text{L}$ 相应抗体与2.5  $\mu\text{L}$ 待测样品混合, 37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育10 min, 冰水浴终止反应, 酶标仪340 nm下检测吸光值; 以2.5  $\mu\text{L}$ 蒸馏水(Mili-Q级)代替样品作为空白对照。根据标准品吸光度值绘制标准曲线并计算样品C3含量。

**LSZ活性检测** 使用溶菌酶试剂盒(南京建成)测定样品的LSZ活性。将200  $\mu\text{L}$ 应用菌液和20  $\mu\text{L}$ 待测样品混合, 37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育15 min, 冰水浴3 min后于530 nm处测定吸光度值。分别用蒸馏水和2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶菌酶标准品代替样品作为空白对照和标准品孔, 并计算样品孔和标准品孔透光光度值。

## 1.6 免疫基因表达分析

**RNA提取与cDNA第一链合成** 分别向研磨管内草鱼母本血液、胚胎、幼鱼阶段样品中加入1% DEPC处理的3~5粒陶瓷研磨珠和600  $\mu\text{L}$  Buffer RL裂解液(TaKaRa, 大连), 使用均质仪匀浆, 4500 r/min, 10 s/次匀浆3次。2月龄草鱼随机选取3尾后用丁香酚麻醉并各取脾脏、体肾、头肾约100 mg, 平行取3份样, 处理方法同母本血液等样品。按照Mini BEST Universal RNA抽提试剂盒(TaKaRa, 大连)操作要求提取总RNA, 并用Recombinant Dnase I去除基因组DNA。前期单独提取的胚胎和仔鱼RNA样品以5个/尾进行混合, 使用核酸蛋白仪(Eppendorf, 德国)和1% 琼脂糖凝胶电泳检测RNA的浓度与完整性。利用RevertAid<sup>TM</sup> First Strand cDNA合成试剂盒(Thermo, 美国)生成第一链cDNA。

**荧光定量PCR分析** 根据GenBank中草鱼IgM、C3和LSZ基因序列, 采用Primer 6.0软件设计荧光定量引物(表1)。使用CFX96 Touch<sup>TM</sup> Real-time PCR仪(Bio-Rad, 美国)进行实时荧光定量PCR。反应体系: SYBR Green I荧光染料(TaKaRa, 大连)10  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 引物各0.4  $\mu\text{L}$ , 稀释20倍后的cDNA模板9.2  $\mu\text{L}$ 。反应条件: 95.0  $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s; 95  $^{\circ}\text{C}$  5 s、60  $^{\circ}\text{C}$  40 s, 共40个循环。数据收集和分析均使用CFX manager software 3.1(Bio-Rad, 美国), 基因的相对表达量通过 $2^{-\Delta\Delta\text{C}_T}$ 方法计算, 采用 $\beta$ -actin作为参考基因。

## 1.7 GCRV感染2月龄草鱼的免疫基因表达分析

以上述实验组、对照组的2月龄子代草鱼为材料。实验组和对照组分别养殖120尾鱼, 每尾注射0.2 mL GCRV病毒液。每组随机选取30尾用

表1 本研究所用的引物序列

Tab. 1 Primers used in this study

引物 primer name	引物序列 5'~3' primer sequence 5'-3'
IgM-F	TGGTCATCAGGTGGCAAAT
IgM-R	GCGGCTGTCTTCCATTCTT
lysozyme-F	TTCGACAGCAAAACAGGACAAC
lysozyme-R	GATATGATGGCAGCAATCACAGC
C3-F	AATACGCCATTCTCTGAGGTTTCC
C3-R	CTTCCACCATTTCAGTCCACTT
Actin-F	GCTATGTGGCTCTTGACTTCG
Actin-R	GGGCACCTGAACCTCTCATT

于子代免疫保护实验, 持续2周观察发病和死亡情况。每组中剩余的90尾鱼用于荧光定量分析: 分别采集实验组和对照组注射GCRV后0、6、12、24、48、72和96 h的脾脏与头肾组织约100 mg(每个时间点随机选取3尾样品混合), 平行取3次。按前述方法提取总RNA, 合成cDNA第一链并用荧光定量PCR检测IgM、C3、LSZ基因的表达水平。

## 1.8 数据分析

利用SPSS Statistics 19.0软件进行组间数据的单因素方差(One-Way ANOVA)分析, 并利用Graph-Pad Prism 6软件对数据分析结果作图。

## 2 结果

### 2.1 草鱼母本血液免疫因子蛋白活性与基因表达水平

对经草鱼出血病弱毒疫苗免疫的实验组草鱼母本及注射等剂量生理盐水的对照组草鱼母本血液样品中IgM、C3和LSZ蛋白活性及基因表达水平进行了检测及分析。草鱼出血病弱毒疫苗免疫草鱼母本后, 血液中IgM、C3和LSZ的蛋白活性显著高于对照组样品中对应蛋白的活性( $P < 0.05$ ), 分别提高了2.5、1.9和3.0倍(图1-a)。实验组血液样品中IgM、C3和LSZ的基因表达水平亦显著高于对照组( $P < 0.05$ ), 基因表达水平分别升高2.5、2.2和3.0倍(图1-b)。

### 2.2 胚胎与幼鱼期IgM、C3和LSZ蛋白活性

实验组草鱼早期胚胎与幼鱼期各阶段IgM蛋白的表达水平均显著高于对照组对应样品的蛋

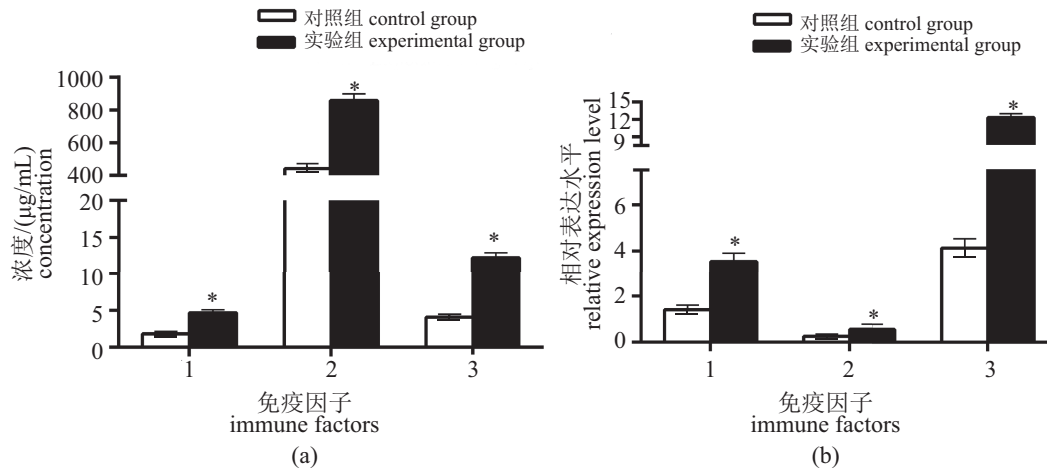


图 1 草鱼母本血液3种免疫因子蛋白活性和基因表达水平

(a)蛋白活性: 1. IgM、2. C3、3. LSZ; (b)基因表达: 1. *IgM*、2. C3、3. LSZ; \*. 显著性差异( $P<0.05$ ); mean±SD, 下同

Fig. 1 The protein activity and gene expression level of three immune factors in the maternal blood of *C. idella*

(a) protein activity: 1. *IgM*, 2. C3, 3. LSZ; (b) gene expression: 1. *IgM*, 2. C3, 3. LSZ; \*. significant differences ( $P<0.05$ ); mean±SD, the same below

白水平( $P<0.05$ )。2组中各阶段样品IgM蛋白的表达水平呈先下降后上升的趋势。对照组和实验组中均以28日龄(夏花)样品IgM蛋白的表达水平最高, 而均在5日龄(卵黄囊消失期水花)样品中表达水平最低。至28日龄(夏花), 经出血病弱毒疫苗免疫的实验组草鱼子代IgM蛋白水平为对照组的2.7倍。免疫因子C3和LSZ在实验组和对照组早期胚胎与幼鱼期的活性变化总体上均呈先下

降后上升的趋势。从卵细胞至3日龄(水花)实验组样品C3和LSZ蛋白活性水平均显著高于对照组( $P<0.05$ )(表2)。

### 2.3 胚胎与幼鱼期IgM、C3和LSZ基因表达水平

实验组和对照组中IgM基因表达水平随着发育时间的变化, 总体上呈先下降后上升的趋势。卵细胞至早期发育6 h(原肠胚期)各阶段样品IgM

表 2 草鱼早期胚胎与幼鱼期IgM、C3和LSZ蛋白活性

Tab. 2 The IgM, C3 and LSZ protein activity in early embryo stages and larvae fish of *C. idella*

	IgM/(µg/mL)		C3/(g/L)		LSZ/(µg/mL)	
	对照组 control group	实验组 experimental group	对照组 control group	实验组 experimental group	对照组 control group	实验组 experimental group
EC	0.60±0.17	1.38±0.13*	0.24±0.02	0.53±0.02*	1.52±0.15	2.95±0.22*
FE	0.54±0.16	1.14±0.10*	0.23±0.01	0.47±0.03*	1.50±0.04	2.86±0.21*
3 h	0.53±0.13	1.03±0.10*	0.23±0.02	0.43±0.02*	1.49±0.13	2.77±0.13*
6 h	0.47±0.08	1.02±0.09*	0.22±0.01	0.42±0.03*	1.38±0.10	2.69±0.19*
12 h	0.44±0.05	0.95±0.09*	0.21±0.02	0.39±0.02*	1.36±0.09	2.59±0.19*
24 h	0.34±0.09	0.86±0.09*	0.20±0.01	0.38±0.03*	1.22±0.12	2.39±0.11*
36 h	0.26±0.04	0.75±0.08*	0.18±0.01	0.36±0.06*	1.18±0.12	1.99±0.07*
3 d	0.17±0.05	0.45±0.08*	0.17±0.02	0.28±0.02*	0.64±0.16	1.24±0.07*
5 d	0.16±0.05	0.37±0.08*	0.16±0.01	0.21±0.02	0.86±0.13	1.26±0.23
14 d	0.60±0.06	1.58±0.10*	0.25±0.01	0.29±0.02	1.65±0.15	2.08±0.13
28 d	0.83±0.07	2.24±0.12*	0.35±0.04	0.42±0.03	2.01±0.11	2.21±0.14

注: 各免疫因子同一行数据上标\*表示组间差异显著( $P<0.05$ ), mean±SD. EC. 卵细胞; FE. 受精卵; 下同

Notes: the superscript in the same row \* means significant differences ( $P<0.05$ ), mean±SD. EC. egg cell; FE. fertilized egg; the same below



基因的表达量均显著高于对照组( $P<0.05$ )。在12 h(神经胚期)至5日龄(卵黄囊消失期水花)样品中未检测到*IgM*基因的表达;而在14日龄(乌仔)和28日龄(夏花)样品中开始重新检测到*IgM*的基因表达,且随发育进行呈上升趋势。实验组和对照组样品中以受精卵阶段*IgM*基因的表达水平差异最大,实验组*IgM*基因的表达量为对照组的3.4倍。对*C3*和*LSZ*基因的表达检测结果显示,实验组和对照组的卵细胞至12 h(神经胚期)阶段未检测到*C3*基因的表达;24 h(器官形成期)才开始检测到表达。从24 h(器官形成期)至5日龄(水花)样品中,实验组*C3*基因的表达水平显著高于对照组中该基因的表达( $P<0.05$ )。但随着发育的继续进行,此后2组鱼各阶段样品中*C3*基因的表达水平差异不显著。从卵细胞至3 h(囊胚期)实验组*LSZ*表达水平显著高于对照组( $P<0.05$ )(表3)。

## 2.4 2月龄草鱼*IgM*、*C3*和*LSZ*基因组织分布特征

实验组2月龄草鱼的体肾、头肾和脾脏组织中*IgM*基因表达量均显著高于对照组( $P<0.05$ );其中2组间头肾组织*IgM*基因表达水平差异最大,实验组表达量为对照组的4.3倍。*C3*基因在体肾和头肾组织中的表达水平极低,但在脾脏中有较高表达。*LSZ*基因在3种免疫组织中均有表达,其中在体肾中表达水平最高;2组鱼各组织*LSZ*基因表达量均无显著差异( $P>0.05$ )(表4)。

## 2.5 GCRV攻毒2月龄草鱼免疫基因的组织表达

随着感染GCRV时间的延长,实验组和对照组2月龄草鱼脾脏样品中*IgM*基因表达水平总体上呈先上升后下降的趋势。从染病12 h开始至96 h,*IgM*基因在实验组中的表达水平均显著高于对照

表3 草鱼胚胎发育与幼鱼期中*IgM*、*C3*和*LSZ*基因表达水平

Tab. 3 *IgM*, *C3* and *LSZ* gene expression levels in the early embryo stages and larvae of *C. idella*

	<i>IgM</i> 相对表达水平		<i>C3</i> 相对表达水平		<i>LSZ</i> 相对表达水平	
	<i>IgM</i> relative expression level		<i>C3</i> relative expression level		<i>LSZ</i> relative expression level	
	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组
	control group	experimental group	control group	experimental group	control group	experimental group
EC	0.51±0.13	1.32±0.12*	0.00±0.00	0.00±0.00	7.53±0.19	12.38±0.57*
FE	0.14±0.00	0.48±0.03*	0.00±0.00	0.00±0.00	5.32±0.32	10.51±0.33*
3 h	0.11±0.02	0.20±0.05*	0.00±0.00	0.00±0.00	3.23±0.06	6.06±0.26*
6 h	0.02±0.01	0.10±0.03*	0.00±0.00	0.00±0.00	1.86±0.10	1.92±0.13
12 h	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.36±0.01	0.32±0.01
24 h	0.00±0.00	0.00±0.00	0.39±0.06	1.38±0.14*	0.13±0.01	0.13±0.00
36 h	0.00±0.00	0.00±0.00	0.32±0.09	0.75±0.20*	0.10±0.01	0.10±0.00
3 d	0.00±0.00	0.00±0.00	0.31±0.02	0.44±0.17*	0.14±0.01	0.16±0.01
5 d	0.00±0.00	0.00±0.00	1.31±0.35	1.74±0.46	0.19±0.00	0.22±0.01
14 d	0.62±0.02	0.70±0.05	9.41±0.16	10.82±0.70	1.63±0.03	1.84±0.11
28 d	1.30±0.10	1.49±0.07	7.64±0.51	8.89±0.55	1.91±0.09	2.19±0.10

表4 *IgM*、*C3*、*LSZ*基因在2月龄草鱼组织中的表达水平

Tab. 4 The expression levels of *IgM*, *C3* and *LSZ* genes in tissues of two-month old *C. idella*

		<i>IgM</i> 相对表达水平		<i>C3</i> 相对表达水平		<i>LSZ</i> 相对表达水平	
		<i>IgM</i> relative expression level		<i>C3</i> relative expression level		<i>LSZ</i> relative expression level	
		对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组
		control group	experimental group	control group	experimental group	control group	experimental group
体肾	trunk kidney	0.40±0.02	0.65±0.03*	0.03±0.00	0.04±0.00	0.69±0.09	0.61±0.02
头肾	head kidney	0.26±0.02	1.11±0.12*	0.02±0.00	0.01±0.00	0.23±0.02	0.21±0.01
脾脏	spleen	0.12±0.01	0.35±0.02*	2.10±0.04	2.37±0.14	0.42±0.02	0.47±0.04

组( $P<0.05$ ); 其中在72 h实验组中IgM基因表达水平达到最高值, 为对照组的2.8倍(图2-a)。头肾组织中, IgM基因的表达水平在2组鱼感染0~24 h阶段均呈下降趋势。从感染24 h后IgM表达水平开始上升, 且实验组中表达水平显著高于对照组( $P<0.05$ )。2组鱼感染后72 h样品中IgM基因表达量均达到峰值(图2-b)。C3基因在2组鱼脾脏和

头肾中表达水平总体上呈先升高后下降的趋势, 感染GCRV后, 实验组C3基因表达水平在2组织各时间点均高于对照组, 但无显著差异。LSZ基因的表达水平在实验组和对照组样品脾脏中无明显规律; 2组样品头肾中LSZ基因表达水平均呈先下降后上升的趋势, 但2组样品间基因表达水平无显著差异。

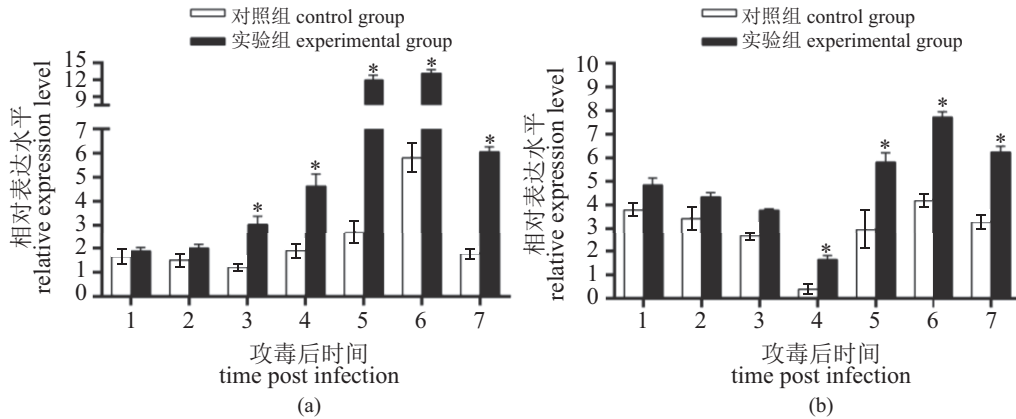


图 2 GCRV攻毒后2月龄草鱼IgM基因表达

(a)脾脏中IgM的表达; (b)头肾中IgM的表达; 横坐标1~7分别为攻毒后0、6、12、24、48、72和96 h

Fig. 2 The IgM gene expression of two-month old *C. idella* after GCRV infection

(a)expression of IgM in spleen; (b) expression of IgM in head kidney; the numbers 1~7 in the horizontal axis represents 0, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 h after being infected by GCRV

人工感染GCRV后, 对实验组和对照组2月龄草鱼染病症状和死亡尾数进行观察及统计, 并取病鱼样品进行检测。对照组草鱼于第3天出现早期GCRV感染症状(体色发黑, 尾鳍边缘褪色, 鳃盖和鳍条有充血现象); 从第3至第7天共有10尾鱼出现症状, 其中死亡5尾。实验组从第4天开始出现早期GCRV感染症状; 从第3至第7天总共5尾草鱼出现症状, 其中死亡2尾(图版)。

### 3 讨论

硬骨鱼类母本可经细菌、病毒和免疫添加剂等刺激引发母源性免疫因子的表达。母源性免疫因子可以富集并垂直传递给子代, 在胚胎和仔鱼抵御水体病原微生物入侵时发挥免疫保护作用<sup>[20]</sup>。本研究中, 母源性免疫草鱼母本血液中3种免疫因子的蛋白活性与基因表达水平均显著高于未进行免疫的对照组( $P<0.05$ ), 说明GCRV弱毒疫苗刺激后能诱导草鱼母本产生免疫应答并上调免疫因子的表达, 证实了母源性免疫的母本免疫效果。

免疫因子IgM是由B淋巴细胞分化产生参与病原活性抑制和抗原呈递过程调节的特异性免疫因子<sup>[21]</sup>。雷雪彬等<sup>[22]</sup>研究发现, 草鱼自主IgM阳性细胞最早出现于孵化后17日龄的仔鱼头肾。本研究结果显示从卵细胞至5日龄草鱼仔鱼阶段IgM抗体活性及基因表达水平不断下降, 其原因可能为该阶段的IgM主要源于母本的代间传递, 且随着母源性抗体IgM的不断消耗而下降。对照组和实验组在5日龄卵黄囊消失期水花苗中IgM抗体表达水平均降至最低值, 但母源性免疫子代仍维持显著高于对照组水平的IgM抗体表达。该结果与大菱鲆母源性免疫胚胎中IgM的传递趋势相似, 但保护时效不同<sup>[10]</sup>, 免疫保护时效的差异可能与母源性免疫的疫苗选择及免疫时间不同有关。在5~28日龄草鱼仔鱼发育过程中IgM抗体活性与基因表达量均迅速上升; 其原因可能是子代个体IgM阳性细胞的出现促进了IgM表达水平的升高。在5~28日龄草鱼仔鱼中抗体IgM表达上调, 且母源性免疫实验组中IgM的表达水平仍显著高于对照组。其变化规律与母

源性免疫黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)<sup>[23]</sup>的实验结果类似。据此推测GCRV弱毒疫苗免疫草鱼母本后,可以提高抗体IgM的表达水平并且具有一定的作用时效。本实验胚胎阶段IgM基因表达规律与舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)<sup>[24]</sup>一致,而免疫因子作用时效与黄颡鱼<sup>[23]</sup>不同。黄颡鱼在3日龄仔鱼中仍能检测到IgM基因表达,这可能与鱼的种类、IgM转移机制和卵子内母源性IgM基因含量有关。研究报道显示在胚胎阶段鱼类IgM基因的表达可通过2种方式进行:一是IgM mRNA在卵母细胞内由卵巢因子激活转录,当成熟卵细胞排出卵巢后,转录停止;二是卵细胞中含有基因转录物,可以将少量母源性IgM mRNA翻译成蛋白质储存于卵内,延长母源性IgM蛋白作用时间<sup>[24]</sup>。本研究结果提示通过弱毒疫苗母源性免疫后,草鱼子代所提高的IgM mRNA可能参与转录合成IgM蛋白,参与机体早期免疫保护。

先天性免疫因子补体C3和LSZ在抑制病毒及溶菌活性中发挥重要的免疫作用<sup>[21]</sup>。斑马鱼(*Danio rerio*)<sup>[25]</sup>和狼鲈(*Anarhichas minor*)<sup>[26]</sup>卵细胞和早期胚胎存在母源性补体C3的蛋白活性。本研究通过疫苗母源性免疫实验,可使母本C3活性富集并向胚胎和幼鱼垂直传递。但随着仔鱼卵黄囊的吸收,由母本所提供的C3逐渐被消耗,活性水平逐步降低。基因表达结果分析显示在草鱼卵细胞至12 h胚胎中未检测到C3基因表达,这与鲤(*Cyprinus carpio*)<sup>[27]</sup>、大西洋鲑(*Salmo salar*)<sup>[28]</sup>的研究结果相似。此外,早期胚胎阶段存在C3蛋白活性而未出现C3基因表达的现象,可能原因是母本血液中C3基因经卵巢因子转录合成蛋白并经卵细胞传递给后代,但早期胚胎发育阶段C3基因尚未被引发表达。随着自身免疫器官的发育完善,在24 h(器官形成期)才开始检测到自身C3基因的表达。本研究中,草鱼早期胚胎和幼鱼阶段均检测到LSZ活性。经疫苗免疫草鱼亲本后,实验组胚胎和早期幼鱼可获得由母本垂直传递的LSZ活性,提高子代的LSZ活性及免疫能力。研究结果与斑马鱼<sup>[29]</sup>、银鲑(*Oncorhynchus kisutch*)<sup>[30]</sup>和罗非鱼<sup>[31]</sup>中相关报道相似,其中罗非鱼的研究证实了胚胎中检测到的溶菌酶来自卵巢外组织和母本血液系统。刘小宁等<sup>[32]</sup>研究结果也证实,斑马鱼卵子中存在LSZ基因表达,通过疫苗免疫亲本后,可使母本LSZ向子代垂直传递。对2月龄草鱼免疫实验结果表明,IgM基因

在3种免疫器官均有表达,母源性免疫后对子代的免疫力可持续到2月龄。人工感染GCRV后,脾脏和头肾只在IgM基因有显著差异,暗示了特异性免疫在子代发育后期发挥重要作用。攻毒实验结果表明,对照组出现草鱼出血病症状早于实验组,且死亡数目高于实验组,说明经GCRV弱毒疫苗免疫的实验组子代在一定程度上提高了抵抗GCRV感染的能力。

本研究验证了以GCRV弱毒疫苗作为抗原进行草鱼母源性免疫的可行性,揭示了草鱼免疫因子IgM、C3和LSZ蛋白活性和基因表达的代间垂直传递效应。草鱼母源性免疫可在子代应对GCRV感染过程中发挥一定的免疫保护作用。

#### 参考文献:

- [1] 王志平,张士瑾. 鱼类免疫因子的母体传递及其对子代的保护作用[J]. 水生生物学报, 2010, 34(2): 426-430. Wang Z P, Zhang S C. Maternal transfer and protective roles of immune relevant factors in fish[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(2): 426-430(in Chinese).
- [2] Simister N E. Placental transport of immunoglobulin G[J]. Vaccine, 2003, 21(24): 3365-3369.
- [3] Barua A, Yoshimura Y, Tamura T. Effects of ageing and oestrogen on the localization of immunoglobulin-containing cells in the chicken ovary[J]. Journal of Reproduction & Fertility Supplement, 1998, 114(1): 11-16.
- [4] Tressler R L, Roth T F. IgG receptors on the embryonic chick yolk sac[J]. Journal of Biological Chemistry, 1987, 262(32): 15406-15412.
- [5] Suzuki Y, Orito M, Furukawa K, et al. Existence of low molecular weight immunoglobulin M in carp eggs[J]. Fisheries Science, 1994, 60(2): 159-162.
- [6] Ellingsen T, Strand C, Monsen E, et al. The ontogeny of complement component C3 in the spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2005, 18(5): 351-358.
- [7] Gasque P. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals[J]. Molecular Immunology, 2004, 41(11): 1089-1098.
- [8] An Y, Albright L, Evelyn T. *In vitro* evidence for the antibacterial role of lysozyme in salmonid eggs[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1994, 19(1): 15-19.
- [9] Tateno H, Yamaguchi T, Ogawa T, et al. Immunohistoche-

- mical localization of rhamnose-binding lectins in the steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2002, 26(26): 543-550.
- [10] 丁福红, 雷霖霖, 韩明明, 等. 母源免疫对大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)子代抗体IgM水平的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2013, 44(5): 1301-1305.  
Ding F H, Lei J L, Han M M, *et al.* Effect of maternal immunity on the antibody igm level in turbot *Scophthalmus maximus* offspring[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(5): 1301-1305(in Chinese).
- [11] Swain P, Dash S, Bal J, *et al.* Passive transfer of maternal antibodies and their existence in eggs, larvae and fry of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 20(4): 519-527.
- [12] Mor A, Avtalion R R. Transfer of antibody activity from immunised mother to embryos in *tilapias*[J]. *Journal of Fish Biology*, 1990, 37(2): 249-255.
- [13] Hanif A, Bakopoulos V, Dimitriadis G J. Maternal transfer of humoral specific and non-specific immune parameters to sea bream (*Sparus aurata*) larvae[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2004, 17(5): 411-435.
- [14] 李兵, 周勇, 曾令兵, 等. 化学合成小干扰RNA分子高效抑制草鱼呼肠孤病毒复制[J]. *病毒学报*, 2009(5): 388-394.  
Li B, Zhou Y, Zeng L B, *et al.* Highly efficient inhibition on replication of grass carp reovirus mediated by chemically synthesized small interfering RNAs[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2009(5): 388-394(in Chinese).
- [15] 褚鹏飞, 朱作言, 汪亚平, 等. 一种新型草鱼呼肠孤病毒人工感染方法[J]. *水生生物学报*, 2016, 40(6): 1166-1171.  
Chu P F, Zhu Z Y, Wang Y P, *et al.* Preliminary study on a new method of GCRV artificial infection[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, 40(6): 1166-1171(in Chinese).
- [16] 王杭军, 叶星, 田园园, 等. 草鱼呼肠孤病毒GCRV-GD108株VP5蛋白功能及免疫原性分析[J]. *水产学报*, 2013, 37(1): 109-116.  
Wang H J, Ye X, Tian Y Y, *et al.* Analysis of function and immunogenicity of GCRV-GD108 VP5[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(1): 109-116(in Chinese).
- [17] Zhu B, Liu G L, Gong Y X, *et al.* Protective immunity of grass carp immunized with DNA vaccine encoding the vp7 gene of grass carp reovirus using carbon nanotubes as a carrier molecule[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 42(2): 325-334.
- [18] 奕志娟, 郝贵杰, 袁雪梅, 等. 草鱼出血病灭活疫苗上调草鱼脾细胞主要免疫分子的表达[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2015, 31(2): 177-181.  
Yi Z J, Hao G J, Yuan X M, *et al.* Inactivated vaccine for hemorrhage of grass carp regulates the expressions of major immune related genes in spleen of grass carp[J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2015, 31(2): 177-181(in Chinese).
- [19] 陈昌福, 李静, 楠田理一. 草鱼母源免疫的初步研究[J]. *华中农业大学学报*, 1996, 15(1): 73-78.  
Chen C F, Li J, Riichi K. Preliminary study on maternal immunity of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 1996, 15(1): 73-78(in Chinese).
- [20] Zhang S, Wang Z, Wang H. Maternal immunity in fish[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2013, 39(1-2): 72-78.
- [21] 张永安, 聂品. 鱼类体液免疫因子研究进展[J]. *水产学报*, 2000, 24(4): 376-381.  
Zhang Y A, Nie P. Humoral immune factors of fish: a review[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2000, 24(4): 376-381(in Chinese).
- [22] 雷雪彬, 常藕琴, 石存斌, 等. 草鱼头肾发生组织学与免疫组织化学观察[J]. *水产学报*, 2013, 37(6): 840-850.  
Lei X B, Chang O Q, Shi C B, *et al.* Histological and immunohistochemical observations on the early development of head kidney in *Ctenopharyngodon idella*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(6): 840-850(in Chinese).
- [23] 李春涛, 曾伯平, 张其中. 黄颡鱼IgM基因的个体发生和抗体的代间传递[J]. *水产学报*, 2014, 38(5): 638-643.  
Li C T, Zeng B P, Zhang Q Z. The ontogenesis and transfer of IgM between generations in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(5): 638-643(in Chinese).
- [24] Picchiotti S, Taddei A R, Scapigliati G, *et al.* Immunoglobulin protein and gene transcripts in ovarian follicles throughout oogenesis in the teleost *Dicentrarchus labrax*[J]. *Cell and Tissue Research*, 2004, 315(2): 259-270.



- [25] Wang Z, Zhang S, Tong Z, *et al.* Maternal transfer and protective role of the alternative complement components in zebrafish *Danio rerio*[J]. PLoS one, 2009, 4(2): 4498.
- [26] Ellingsen T, Strand C, Monsen E, *et al.* The ontogeny of complement component C3 in the spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2005, 18(5): 351-358.
- [27] Huttenhuis H B, Grou C P, Taverne-Thiele A J, *et al.* Carp (*Cyprinus carpio* L.) innate immune factors are present before hatching[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 20(4): 586-596.
- [28] Løvoll M, Johnsen H, Boshra H, *et al.* The ontogeny and extrahepatic expression of complement factor C3 in Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 23(3): 542-552.
- [29] Wang Z, Zhang S. The role of lysozyme and complement in the antibacterial activity of zebrafish (*Danio rerio*) egg cytosol[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 29(5): 773-777.
- [30] Yousif A N, Albright L J, Evelyn T P T. *In vitro* evidence for the antibacterial role of lysozyme in salmonid eggs[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1994, 19(1): 15-19.
- [31] Takemura A, Takano K. Lysozyme in the ovary of tilapia (*Oreochromis mossambicus*): its purification and some biological properties[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 1995, 14(5): 415-421.
- [32] 刘小宁, 李正龙, 王志平, 等. 母体免疫对斑马鱼胚胎中溶菌酶基因表达的影响[J]. 水产科学, 2014, 33(8): 525-528.
- Liu X N, Li Z L, Wang Z P, *et al.* Influence of maternal immunization on expression of lysozyme genes in zebrafish embryos[J]. Fisheries Science, 2014, 33(8): 525-528(in Chinese).

## The expression and transmission of immune factors between generations in maternal *Ctenopharyngodon idella* after immunization with GCRV attenuated vaccine

XIAO Tiaoyi<sup>1,2\*</sup>, ZHOU Zhiyu<sup>1</sup>, WANG Ronghua<sup>1</sup>, LI Yaoguo<sup>1,2</sup>,  
JIN Shengzhen<sup>1</sup>, LI Wei<sup>1</sup>, WANG Hongquan<sup>1,2\*</sup>

(1. Hunan Engineering Technology Research Center of Featured Aquatic Resources Utilization,  
Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2. Collaborative Innovation Center for Efficient and Health Production of  
Fisheries in Hunan Province, Changde 415000, China)

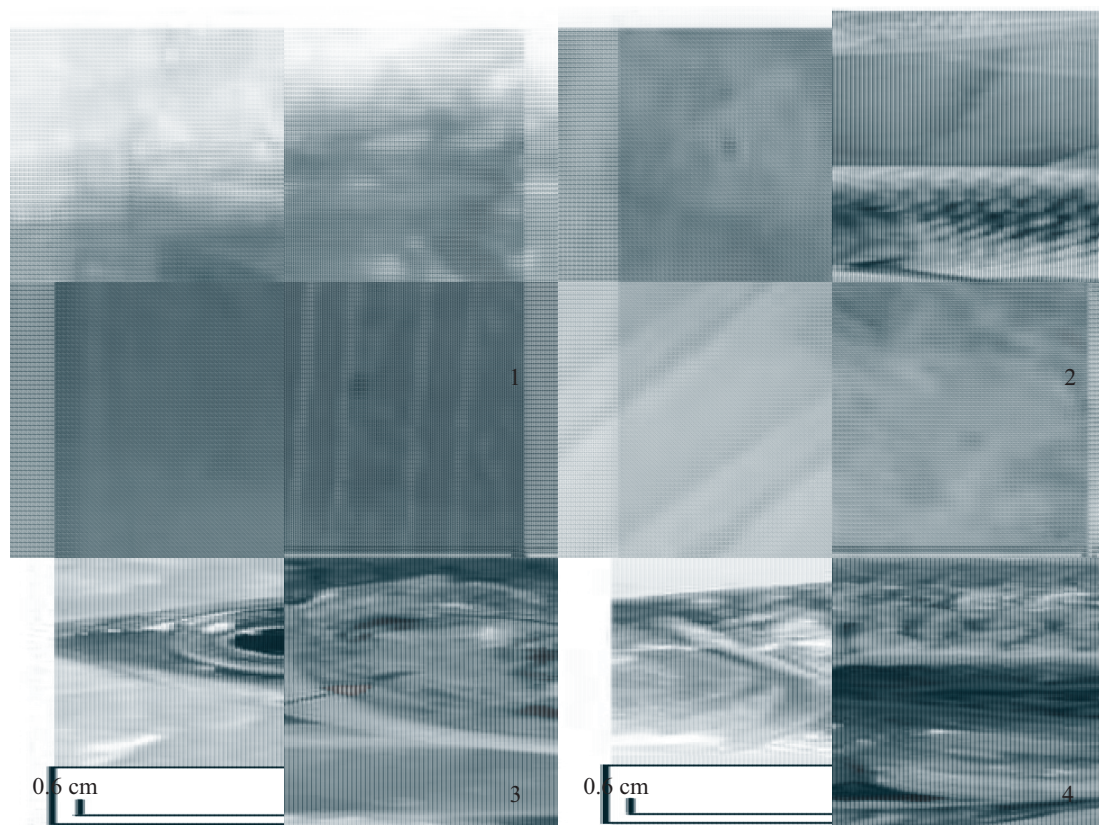
**Abstract:** In order to investigate the expression characteristics and transmission effects of immune factors between the female parent and the progeny of *Ctenopharyngodon idella*, after being vaccinated with GCRV attenuated vaccine to female grass carp (40 days old). the protein activity and gene expression levels of IgM, C3 and LSZ were detected in the blood of female parent during the early development embryos of progeny and juvenile fish. The activities of IgM protein in the blood, early embryos and juvenile stage of grass carp were significantly higher than those in the control group by GCRV attenuated vaccine. In each stage of progeny, the expression level of IgM protein was the highest on d 28, while the protein activity was the lowest on d 5. From the fertilized egg to the 3 d water stage, the protein activity of C3 and LSZ were significantly higher in the experimental group than those in the control group. The activity levels of IgM, C3 and LSZ proteins in both groups showed a trend from decline to rise. The activity levels of C3 and LSZ protein in the experimental group were significantly higher than those in the control group from the stages of egg cell to 3 d. The expression level of IgM gene had a big difference between the experimental group and control group, the expression level of the experimental group was 3.4 times that of the control group. From the period of organogenesis (24 h) to the stage of 3 d, the mRNA expression of C3 was significantly higher than that in the control group. From the egg cell to the blastula stage, the mRNA expression of LSZ was significantly higher than that in the control group. After being immunized by attenuated vaccine of GCRV, the mRNA expressions of *IgM* were significantly higher than those in the control group in the tissues of body kidney, head kidney and spleen of 2-month-old progeny. The number of death fish caused by the GCRV infection in the experimental group (2 fish died) was lower than that in the control group (5 fish died). The results showed that maternal immunization can transmit between generations, and it played an important role in the immune protection of progeny.

**Key words:** *Ctenopharyngodon idella*; GCRV; maternal immunity; early development; immune factor

**Corresponding author:** XIAO Tiaoyi. E-mail: tyxiao1128@163.com;

WANG Hongquan. E-mail: whq@hunau.net

**Funding projects:** Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-46-42)



图版 GCRV攻毒后2月龄草鱼染病症状及组织特征

黑色细箭头表示体色发黑和游边；黑色粗箭头表示鳍条充血；红色细箭头表示鳃盖出血；红色粗箭头表示肌肉出血

**Plate The symptoms and tissue characteristics of two-month old *C. idella* after GCRV infection**

Thin black arrow means body color black and swim to the side; bold black arrow means fin congestion; thin red arrow means gill cover bleeding; bold red arrow means muscle bleeding