



初探母源免疫处理草鱼母本及其子代 5 种 免疫因子含量的周年变化规律

刘 益¹, 丁春华¹, 吕 钊¹, 余建波¹, 王红权¹, 张学文¹,
石存斌², 任 燕², 王 庆², 吕丽刚¹, 刘科均¹,
李东放¹, 肖调义^{1*}, 刘巧林^{1*}

(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. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东省水产动物免疫技术重点实验室, 农业农村部
渔用药物创制重点实验室, 广东广州 510380)

摘要: 为探究草鱼母源免疫因子传递特性, 实验借助酶联免疫吸附实验 (ELISA) 和实时荧光定量 PCR (qPCR) 技术分别检测分析了草鱼呼肠孤病毒 (grass carp reovirus, GCRV) 弱毒疫苗免疫草鱼母本及其子代 (即母源免疫子代) 早期胚胎阶段至 1 龄期间 5 种免疫因子 (IgM、C3、LZM、MBL 和 Bf) 蛋白活性和基因表达水平的周年变化规律。结果显示, 草鱼母本经 GCRV 弱毒疫苗免疫后, 血液中 5 种免疫因子蛋白活性及基因表达水平在产卵期均显著高于对照组 1.5 倍以上, 至免疫后第 11 个月与对照组无显著差异。母源免疫子代发育至水花 (4 d) 时, IgM、C3、MBL 和 Bf 的基因表达水平均高于对照组; 发育至乌仔 (15 d) 时, IgM、C3 和 Bf 的蛋白活性水平均略高于对照组; 发育至 5~11 月龄时, 5 种免疫因子在肝脏、脾脏、肾脏和头肾等免疫器官中仍存在高表达。研究表明, GCRV 弱毒疫苗促使母源免疫因子在亲本和子代体内富集表达具有一定的时效性, 最长可维持至 11 个月, 为实际生产中草鱼母本疫苗免疫程序的制定提供参考依据。

关键词: 草鱼; 草鱼呼肠孤病毒; 母源免疫因子; 早期发育; 时效性; 保护效果

中图分类号: S 942.5

文献标志码: A

大多数动物在胚胎及幼体时, 免疫系统尚未发育完全, 为应对外界病原的威胁, 它们主要从母体中获取母源性免疫因子以起到保护自身的作用, 动物这种通过母-子垂直传递免疫物质的自身保护机制即称为母源免疫 (maternal immunity)^[1-2]。研究表明, 脊椎动物如哺乳动物^[3]、鸟类^[4]、爬行动物^[5] 及鱼类^[6] 等通过胎盘、母乳或卵黄等途径向子代传递母源性抗体的现象很普遍, 无脊椎动

物如斑节对虾 (*Penaeus monodon*)^[7] 及白氏文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri*)^[8] 中也存在特定的母源免疫传递机制。因此, 母源免疫作为宿主抵御病原体感染的一种机制, 广泛存在于动物界, 其不仅可以提高子代的成活率, 还可以保证种群的生殖繁衍^[9-10]。

高等脊椎动物哺乳类和鸟类中关于母源免疫的研究已有 120 余年^[11], 母源免疫因子的传递机

收稿日期: 2021-04-02 修回日期: 2021-05-17

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-45-48); 湖南省教育厅科学研究重点项目 (20A243)

第一作者: 刘益 (照片), 从事水产遗传育种与繁殖研究, E-mail: yiliu1223@163.com;

丁春华, 从事水产遗传育种与繁殖研究, E-mail: 1160412785@qq.com

通信作者: 肖调义, 从事水产遗传育种与繁殖研究, E-mail: tiaoyixiao@hunau.edu.cn;

刘巧林, 从事水产遗传育种与繁殖研究, E-mail: qiaolinliu2017@hunau.edu.cn



理和作用机制已相对明晰。人类血清中的母源性抗体 IgG 可通过胎盘 Fc 受体选择性地转移至胎儿循环系统^[12]; 仔猪可通过母乳获得母源抗体, 从而抵抗病原感染^[13]; 在鸟类卵子的卵黄和卵清中发现了母源免疫因子 IgY 的存在^[14]。相比于哺乳类和鸟类, 鱼类母源免疫因子的鉴定研究起步较晚。国内外学者已经在大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*)^[15]、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[16]、黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*)^[17] 和尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[18] 等多种硬骨鱼类中证实, 免疫处理后母本可以将母源免疫因子如免疫球蛋白 M (immunoglobulin M, IgM)、补体 (complement, C)、溶菌酶 (lysozyme, LZM) 和凝集素 (lectin) 传递给子代, 在早期胚胎中发挥免疫保护作用, 提高鱼苗存活率。在虹鳟的早期胚胎和斑马鱼 (*Danio rerio*) 的受精卵中均检测到了母源性补体因子 B (complement factor B, Bf)^[19-20]。斑马鱼中的甘露糖结合凝集素 (mannose-binding lectin, MBL) 在早期胚胎中发挥免疫保护作用, 以保护发育中的胚胎不受微生物病原的感染^[21]。基于母源免疫的理论, 目前已经在草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、斑马鱼和大菱鲂等养殖鱼类中发现, 灭活病毒、细菌疫苗免疫母本的方法能使得母源免疫因子在母本体内富集表达并向子代进行有效传递, 且在子代中维持较长时间^[20, 22-23], 已成为增强鱼苗抗病力的关键技术手段。

草鱼是我国产量最高的大宗淡水鱼类养殖品种, 2019 年产量为 553.3 万 t^[24]。长久以来, 因草鱼呼肠孤病毒 (grass carp reovirus, GCRV) 引起的草鱼出血病严重制约草鱼养殖业的健康发展, 该病主要危害 1 龄以内草鱼鱼种。为培育抗 GCRV 能力显著增强的子代新材料群体, 本团队自 2014 年针对母源免疫草鱼做了基础研究, 结果显示, GCRV 弱毒疫苗免疫草鱼母本能提高其成熟卵及早期胚胎中 IgM 和 LZM 的免疫活性, 并在一定程度上影响 6 月龄鱼种 IgM、干扰素 (interferon, IFN)、白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和 Toll 样受体 (toll-like receptor, TLR)3 的基因表达水平^[25]; 采用 GCRV 弱毒疫苗 (0.5 mL/kg) 免疫和黄芪多糖 (0.2%) 免疫处理草鱼可增强免疫因子 IgM、C3、LZM 在草鱼亲子代间的传递及子代对 GCRV 的抗感染能力^[22, 26]。然而, 草鱼母源免疫程序尚未确立, 通过分析总结草鱼母源免疫因子在母本及其子代受精卵至 1 龄鱼苗时期中的含量变化和传递

规律, 有利于亲鱼免疫程序的进一步优化, 提高免疫因子的传递水平, 减慢免疫因子的消耗, 进而延长免疫因子保护时期, 以提高子代抵御病原危害的能力。

基于上述研究基础, 本实验通过 GCRV 弱毒疫苗免疫草鱼母本, 采集草鱼母本血液、子代不同发育时间段的胚胎及幼鱼组织样品, 通过酶联免疫吸附实验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 和实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qPCR) 技术分别检测分析草鱼母本及其子代 5 种免疫因子 (IgM、C3、LZM、MBL 和 Bf) 的蛋白活性和基因表达水平的周年变化规律, 以期探寻 GCRV 疫苗免疫的合适时间点以及日后通过母源免疫提高草鱼抗病力方法的建立、基于母源免疫的抗病育种研究提供重要依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用草鱼亲本选自石首老河长江四大家鱼原种场, 暂养于华容田家湖渔场, 平均体质量为 (9.0 \pm 1.0) kg, 每尾注射可扫码的标记芯片并做好相应记录; GCRV 弱毒疫苗 (II 型毒株) 购自中国水产科学研究院珠江水产研究所。1 龄草鱼于室内循环水养殖系统暂养 4 周, 水温控制在 (28 \pm 1) $^{\circ}$ C, 按体质量 2% 比例投喂普通草鱼饲料。

1.2 草鱼母本免疫

从草鱼亲本培育池里选取 10 尾已达性成熟的健康状况良好的雌性草鱼, 其中 5 尾为 GCRV 疫苗免疫组, 5 尾为对照组。2018 年 4 月即催产前 40 天, 向实验组即疫苗免疫组草鱼母本胸腔注射剂量为 0.5 mL/kg 的 GCRV 弱毒疫苗 (使用前将 0.2 g 弱毒疫苗冻干粉用 100 mL 0.65% 生理盐水稀释); 对照组草鱼母本注射同等剂量的生理盐水。

1.3 母本血液、子代早期胚胎及幼鱼样品采集

实验分别于 2018 年 2、5、11 月及 2019 年 3 月 4 个时间点采集实验组和对照组草鱼母本血液, 其中 2018 年 5 月的草鱼母本血液于其产卵后采集。采集过程: 使用 10 mL 一次性注射器采集草鱼母本血液约 6 mL/尾, 取 2 mL 血液离心获得血细胞, 分装至 2 管无酶冻存管中至液氮保存, 用于基因 mRNA 表达水平测定; 剩余血液装入含有 400 μ L 抗凝剂的 15 mL EP 管中, 轻轻晃动混匀, 4 $^{\circ}$ C

静置过夜于 1 000×g 离心 20 min, 取上清液并分装至 1.5 mL EP 管中, 于-80 °C 保存, 用于蛋白活性水平测定。

2018 年 5 月进行繁殖实验, 经催产后草鱼母本诱发排卵, 取同一父本通过干法人工授精获得受精卵。采集实验组(母源免疫处理子代)和对照组(未母源免疫处理子代)鱼的受精卵、原肠胚期(6 h)、器官形成期(24 h)、脱膜孵化期(36 h)、水花(4 d)、乌仔(15 d)、秋片(5 月龄)、冬片(8 月龄)和春片(11 月龄)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、原肠胚期、器官形成期胚胎样品和乌仔分为 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。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 μ L 比例加入 1×PBS, 使用均质仪(Bertin, 法国) 4 000 r/min, 每次匀浆 10 s, 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。

1.4 免疫因子蛋白活性水平检测

使用鱼类 IgM/C3/LZM/MBL/Bf ELISA 检测试剂盒(上海苗彩生物科技有限公司)对草鱼亲本血液、子代早期胚胎及幼鱼阶段中这 5 个免疫因子的蛋白活性水平进行检测, 除标准品原液的浓度不同以外, 其余试剂及实验步骤均相同。设置标准品孔、样本孔和空白孔, 每一标准品、检测样本和空白对照均设置 3 个重复孔, 标准品孔各加入不同浓度的标准品 50 μ L(各免疫因子标准品浓度梯度、检测范围及单位见表 1), 样本孔中加入待测样本 50 μ L, 空白孔不加; 除空白孔外, 标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记抗体 100 μ L, 37 °C 温育 60 min; 经洗涤操作后每孔加入显色剂 A、B 各 50 μ L, 37 °C 避光孵育 15 min; 每孔加入终止液 50 μ L, 使用酶标仪(Thermo, 美国)测定各孔的 OD 值(波长为 450 nm)。

表 1 各免疫因子标准品浓度梯度、检测范围及单位

Tab. 1 Standard concentration gradient, detection range and unit of each immune factor

免疫因子名称 name of immune factors	标准品浓度梯度 standard concentration gradient	检测范围 detection range	单位 unit
IgM	1.25, 2.50, 5.00, 10.00, 20.00, 40.00	1.25~40.00	μ g/mL
C3	5, 10, 20, 40, 80, 160	5~160	μ g/mL
LZM	6.25, 12.50, 25.00, 50.00, 100.00, 200.00	6.25~200.00	ng/mL
MBL	12.5, 25.0, 50.0, 100.0, 200.0, 400.0	12.5~400.0	ng/mL
Bf	0.625, 1.250, 2.500, 5.000, 10.000, 20.000	0.625~20.000	μ g/mL

1.5 免疫因子基因 mRNA 表达水平检测

RNA 提取及 cDNA 第一链合成 取适量草鱼母本血细胞、胚胎及幼鱼阶段样品中加入到装有 1 mL RNA-Solv Reagent (Omega, 美国) 和 2 颗无菌钢珠的匀浆管中, 使用冷冻混合球磨仪进行研磨, 均质速度 55 Hz 1 650 r/s, 根据 E.Z.N.A.® Total RNA Kit II (Omega, 美国) 说明书提取组织总 RNA。RNA 的质量和浓度采用核酸蛋白检测仪进行检测, A_{260}/A_{280} 比值为 1.8~2.0; RNA 的完整性使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。根据 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo, 美国) 说明书合成 cDNA 第一链, 完成后将反应产物于-20 °C 保存备用。

qPCR 检测 选用 18S rRNA 和 β -actin 作为

参考基因^[27], 使用 Oligo 7.0 软件设计特异性荧光定量引物(表 2)。qPCR 反应体系: ChamQ™ Universal SYBR® qPCR Master Mix (Vazyme, 南京) 5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.4 μ L, cDNA 模板(稀释 5 倍) 1 μ L, ddH₂O 3.2 μ L。qPCR 反应程序: 95 °C 10 min; 95 °C 10 s, 60 °C 10 s, 72 °C 15 s, 35 个循环, 熔解曲线: 65 °C 升至 95 °C, 每 5 s 增加 0.5 °C, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分别计算每个参考基因与目的基因的相对表达量, 取二者几何平均数作为双参考基因标准化结果, 该结果使用 Bio-Rad CFX Manager 3.1 软件进行计算。

1.6 数据分析

ELISA 和 qPCR 测定免疫因子蛋白和 mRNA 表达量的结果均使用 Excel 2016 软件进行数据整

表 2 qPCR 所用引物

引物 primers	引物序列 5'-3' primer sequences 5'-3'
<i>IgM</i> -F	TGGTCATCAGGTGGCAAAT
<i>IgM</i> -R	GCGGCTGTCTTCCATTCTT
<i>C3</i> -F	GATTTTCTCTCTGACGCCAA
<i>C3</i> -R	TGATGAAACTGTGATGCCTT
<i>LZM</i> -F	ACTTGCCTTGTTTCAGATTTGC
<i>LZM</i> -R	CATGATTTTCAGTCTCCGGTT
<i>MBL</i> -F	CATTTAGTGCTGATCGCCAGA
<i>MBL</i> -R	CAGCACAGACTCCATTAGCAG
<i>Bf</i> -F	GCACCAATCTGTATAAAGCC
<i>Bf</i> -R	TTGCGATGATTATGACGTTT
β -actin-F	GCTATGTGGCTCTTGACTTCG
β -actin-R	GGGCACCTGAACCTCTCATT
18S <i>rRNA</i> -F	ATTTCCGACACGGAGAGG
18S <i>rRNA</i> -R	CATGGGTTTAGGATACGCTC

理, 采用 SPSS Statistics 25.0 统计软件进行 t 检验显著性分析, 数据表示方法为平均值 \pm 标准误差 (mean \pm SE), 显著性水平表示方法为“*” $P < 0.05$ 、“**” $P < 0.01$ 和“***” $P < 0.001$, 并用 GraphPad Prism 6.0 软件作图。

2 结果

2.1 母源免疫处理草鱼母本 5 种免疫因子的含量变化

母源免疫处理草鱼母本 5 种免疫因子蛋白活性水平 通过 ELISA 检测了母源免疫处理草鱼母本 5 种免疫因子 (*IgM*、*C3*、*LZM*、*MBL* 和 *Bf*) 的蛋白活性水平。结果显示, 与对照组相比, 经 GCRV 弱毒疫苗免疫后, 草鱼母本血液中 5 种免疫因子的蛋白活性均呈现先上调后下降的趋势, 且均在草鱼母本产卵后 (2018 年 5 月) 达到峰值。草鱼母本在产前 40 天进行疫苗免疫处理后, 草鱼母本产卵后血液中疫苗免疫组 *IgM*、*C3*、*LZM*、*MBL* 和 *Bf* 的蛋白活性水平均显著高于对照组, 分别是对照组的 2.67 倍 ($P < 0.01$)、2.81 倍 ($P < 0.001$)、2.64 倍 ($P < 0.01$)、1.57 倍 ($P < 0.01$) 和 2.14 倍 ($P < 0.001$)。疫苗免疫处理草鱼母本 11 个月 (2019 年 3 月), 疫苗免疫组 5 种免疫因子的蛋白活性水平回落至与对照组保持同一水平 (图 1)。

母源免疫处理草鱼母本 5 种免疫因子基因表达水平 通过 qPCR 检测母源免疫处理草鱼

母本 5 种免疫因子的基因表达水平发现, 经 GCRV 弱毒疫苗免疫后, 草鱼母本血液中 5 种免疫因子的基因表达较对照组均显著上调, 但表达趋势略有不同, *IgM*、*MBL*、*Bf* 总体呈现先上升后下降的趋势 (图 2-a, d, e), *C3* 和 *LZM* (图 2-b, c) 总体呈现先上调后下调再上调的趋势。GCRV 疫苗免疫处理后, 草鱼母本产卵后血液中疫苗免疫组 *IgM*、*C3*、*LZM*、*MBL* 和 *Bf* 的基因表达水平分别是对照组的 2.35 倍 ($P < 0.001$)、2.27 倍 ($P < 0.01$)、1.88 倍 ($P < 0.01$)、2.34 倍 ($P < 0.001$) 和 1.90 倍 ($P < 0.001$)。疫苗免疫处理草鱼母本 11 个月后 (2019 年 3 月), 疫苗免疫组 5 种免疫因子的基因表达水平与对照组无显著差异 ($P > 0.05$, 图 2)。

2.2 母源免疫处理草鱼子代 5 种免疫因子的含量变化

草鱼子代受精卵至春片 5 种免疫因子蛋白活性水平 草鱼子代受精卵至春片, 5 种免疫因子的蛋白活性水平随鱼体发育时间而变化, 总体呈先下降后上升的趋势。受精卵至水花各阶段疫苗免疫组 *IgM*、*LZM*、*MBL* 和 *Bf* 的蛋白活性水平均显著低于对照组 ($P < 0.05$, 图 3-a, c~e)。当鱼体发育至乌仔时, 疫苗免疫组 5 种免疫因子的蛋白活性水平与对照组的差异减小, 其中疫苗免疫组 *IgM*、*C3* 和 *Bf* 3 种免疫因子的蛋白活性水平均略高于对照组 ($P > 0.05$, 图 3-a, b, e)。鱼体发育至冬片时, 疫苗免疫组 *C3* 和 *LZM* 的蛋白活性水平均极显著高于对照组 ($P < 0.01$, 图 4-b, c)。除 *Bf* 外, 其余 4 种免疫因子在鱼体发育至春片时疫苗免疫组的蛋白活性水平均略高于对照组 ($P > 0.05$, 图 4)。

草鱼子代受精卵至春片 5 种免疫因子基因表达水平 草鱼子代受精卵至春片, 5 种免疫因子基因表达水平与蛋白活性水平表达趋势略有不同。疫苗免疫组与对照组中免疫因子 *IgM*、*C3* 和 *Bf* 的基因表达水平总体呈先上升后下降的趋势 (图 5-a, b, e); *MBL* 总体呈现上升趋势 (图 5-d); 而 *LZM* 则与其余因子表达趋势相反, 总体呈现先下降后上升的趋势 (图 5-c)。其中, 疫苗免疫组 *IgM*、*MBL*、*Bf* 在胚胎发育早期的基因表达水平较对照组低, 但发育至水花时均显著高于对照组 ($P < 0.05$, 图 5-a, d, e); *C3* 和 *LZM* 在受精卵至乌仔各发育阶段的疫苗免疫组与对照组基本无显著差异 ($P > 0.05$, 图 5-b, c)。疫苗免疫组 1 龄草鱼各

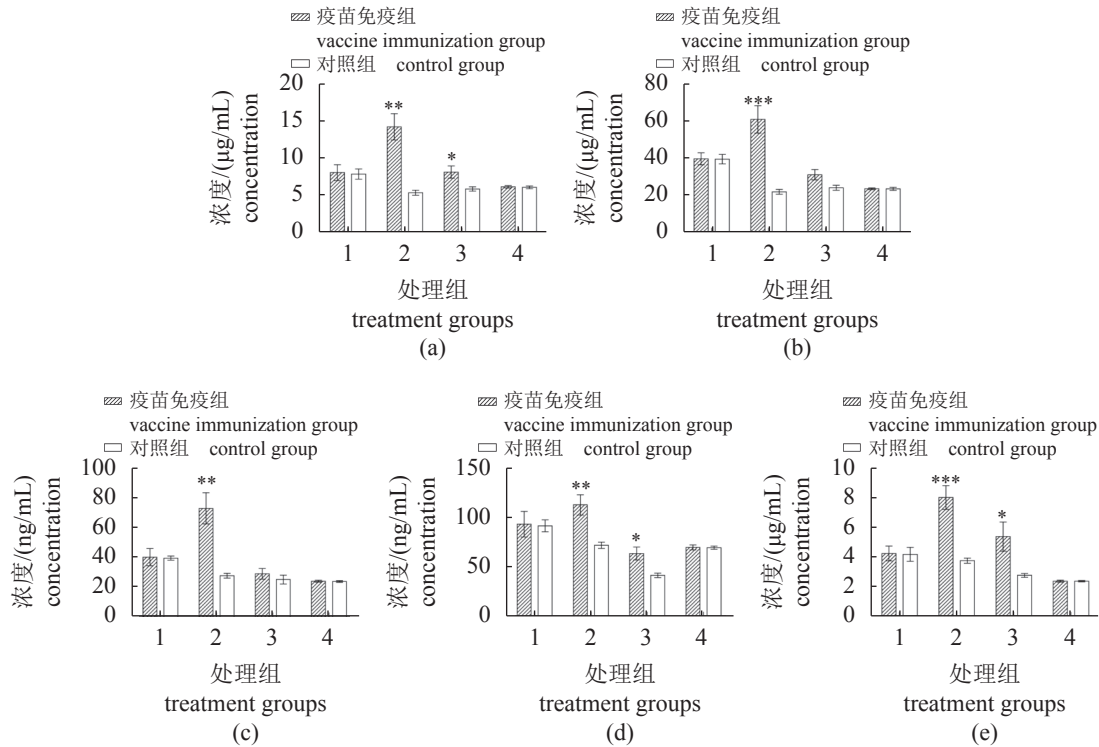


图1 母源免疫处理草鱼免疫因子蛋白活性水平

(a)~(e) 分别为 IgM、C3、LZM、MBL 和 Bf 蛋白活性水平；1~4 分别表示 2018 年 2 月、5 月、11 月及 2019 年 3 月；“*”表示显著性差异 ($P < 0.05$)，“**”表示极显著性差异 ($P < 0.01$)，“***”表示极其显著性差异 ($P < 0.001$)；误差线表示标准误差 ($n=5$)；下同

Fig. 1 Protein concentration of immune factor in *C. idella* treated with maternal immunity

(a)~(e) represent the protein concentration of IgM, C3, LZM, MBL and Bf, respectively; 1-4 represent 2018.02, 2018.05, 2018.11 and 2019.03, respectively; “*”, “**” and “***” mean significant differences ($P < 0.05$) and extremely significant differences ($P < 0.01$ and $P < 0.001$), respectively; error bar was shown as the standard error ($n=5$); the same below

阶段的 IgM 在 8 个组织 (肝脏、脾脏、肾脏、头肾、肠、鳃、肌肉和皮肤) 中均有表达, 其中在脾脏和肾脏中有较高表达; LZM 主要在肾脏和头肾中表达, 在其余组织中的表达水平极低; C3、MBL、Bf 在肝脏中表达水平最高 (表 3)。5 种免疫因子在草鱼子代秋片至春片各阶段的大部分组织中, 疫苗免疫组的基因表达水平均高于对照组, 其中仅 IgM、MBL 和 Bf 在疫苗免疫组部分组织中的表达显著高于对照组 ($P < 0.05$, 表 3)。

3 讨论

鱼类胚胎或早期发育阶段的免疫系统仍处于发育阶段, 合成免疫因子的能力十分有限, 不具备完整的抗病免疫能力^[6]。大多数养殖鱼类均属于卵生, 卵子为母源免疫因子的直接载体, 因此通过灭活的病毒、细菌疫苗免疫鱼类亲本后, 母源免疫因子如 IgM、补体各组分、LZM 和卵黄蛋白原 (vitellogenin, Vg) 等可以在亲鱼体内富集表达

并向子代进行有效传递, 使其在子代中的表达水平显著升高并能维持较长时间, 从而增强子代对该病原的抵抗能力^[20, 22-23, 28-29]。在发育起始阶段, 胚胎发育受母源提供的 RNA 和蛋白质影响^[30]。随着胚胎发育的进行, 发育由母源因子影响转为合子基因产物调控, 该过程包括母源 RNA 降解和合子基因组启动^[31]。目前, 已有研究表明在斑马鱼受精卵至早期胚胎发育过程中, 母源因子 mRNA 含量显著下降, 表现为明显的母源降解模式^[32-33]。本研究发现, 疫苗免疫组和对照组草鱼子代的 5 种免疫因子在受精卵至早期胚胎发育阶段, mRNA 表达均呈现不同程度的下降趋势, 同样表现为母源降解模式, 推测 5 种免疫因子可从草鱼母本传递至子代, 从而保护草鱼子代并提高其成活率。

特异性免疫因子 IgM 是硬骨鱼应对抗原刺激后机体初次免疫应答所产生的抗体, 也是新生子代最先合成的免疫球蛋白, 能够中和病毒与细菌、介导细胞免疫应答及参与补体经典或替代途径激活^[34-36]。补体系统各组分、LZM 是生物体内重要

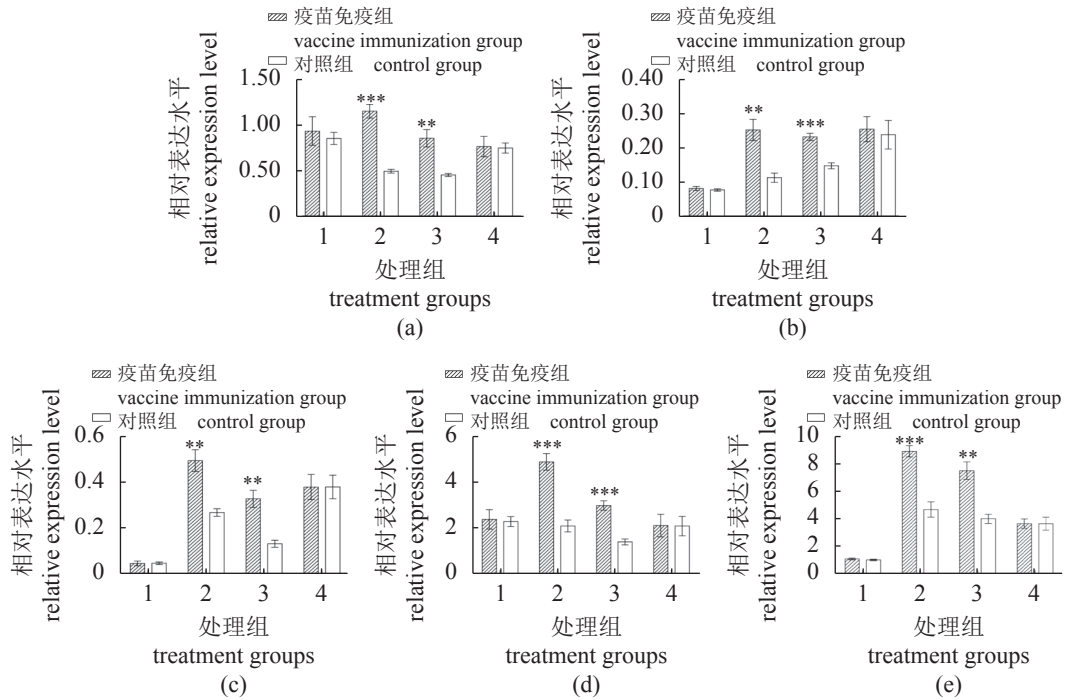


图 2 母源免疫处理草鱼免疫因子基因表达水平

(a)-(e) 分别为 *IgM*、*C3*、*LZM*、*MBL* 和 *Bf* 基因表达水平

Fig. 2 Relative expression level of immune factor in *C. idella* treated with maternal immunity

(a)-(e) represent the relative expression level of *IgM*, *C3*, *LZM*, *MBL* and *Bf*, respectively

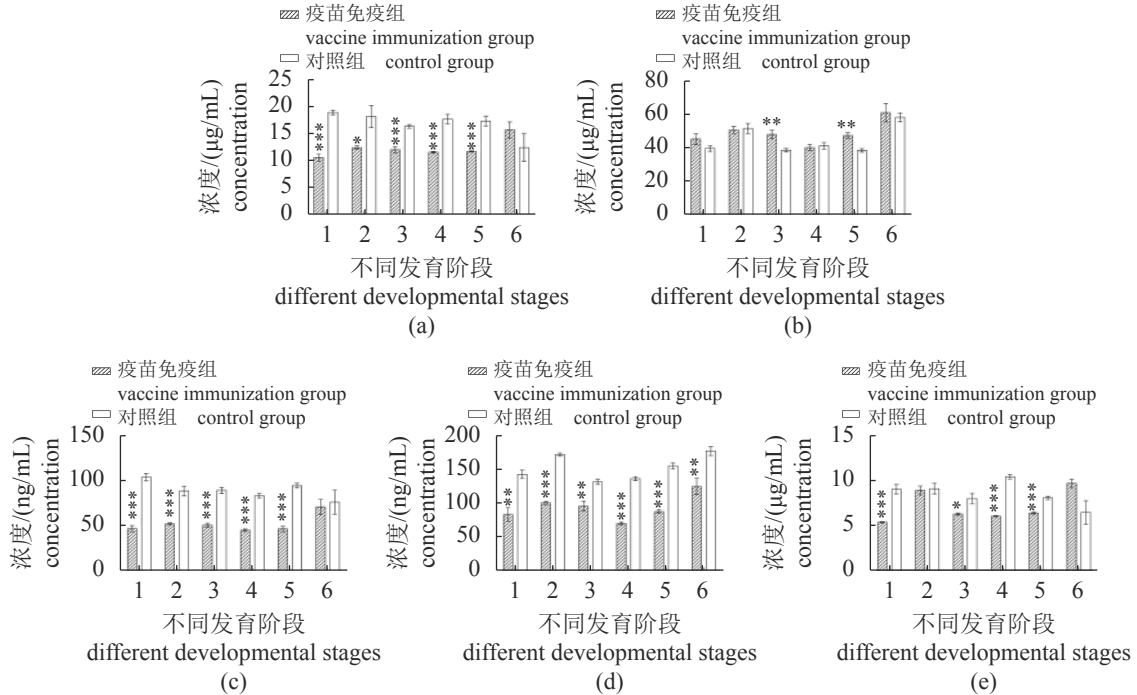


图 3 草鱼早期胚胎免疫因子蛋白活性水平

(a)-(e) 分别为 *IgM*、*C3*、*LZM*、*MBL* 和 *Bf* 蛋白活性水平; 1-6 分别表示受精卵、原肠胚期 (6 h)、器官形成期 (24 h)、脱膜孵化期 (36 h)、水花 (4 d)、乌仔 (15 d)

Fig. 3 Protein concentration of immune factors in early embryo stages of *C. idella*

(a)-(e) represent the protein concentration of *IgM*, *C3*, *LZM*, *MBL* and *Bf*, respectively; 1-6 represent fertilized ovum, gastrula stage (6 h), organogenesis stage (24 h), stripping and hatching stage (36 h), larval stage (4 d), and juvenile stage (15 d), respectively

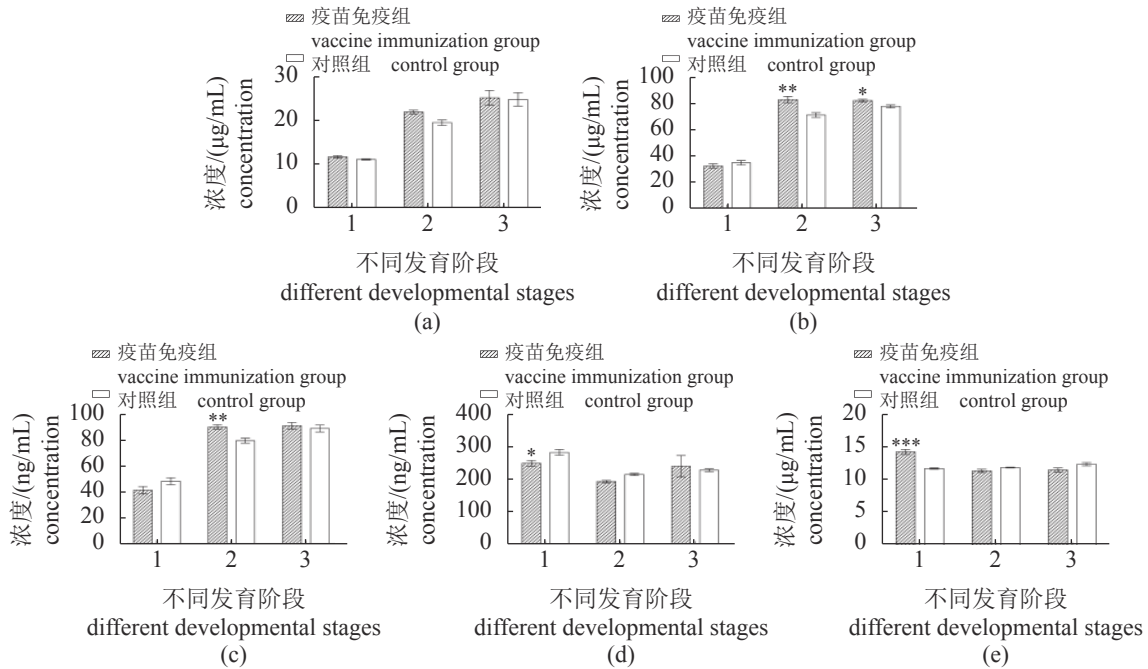


图 4 草鱼子代秋片至春片期免疫因子蛋白活性水平

(a)~(e) 分别为 IgM、C3、LZM、MBL 和 Bf 蛋白活性水平；1~3 分别表示秋片 (5 月龄)、冬片 (8 月龄) 和春片 (11 月龄)

Fig. 4 Protein concentration of immune factors in larvae fish of *C. idella*

(a)~(e) represent the protein concentration of IgM, C3, LZM, MBL and Bf, respectively; 1~3 represent young stage (5-month-old), young stage (8-month-old) and young stage (11-month-old), respectively

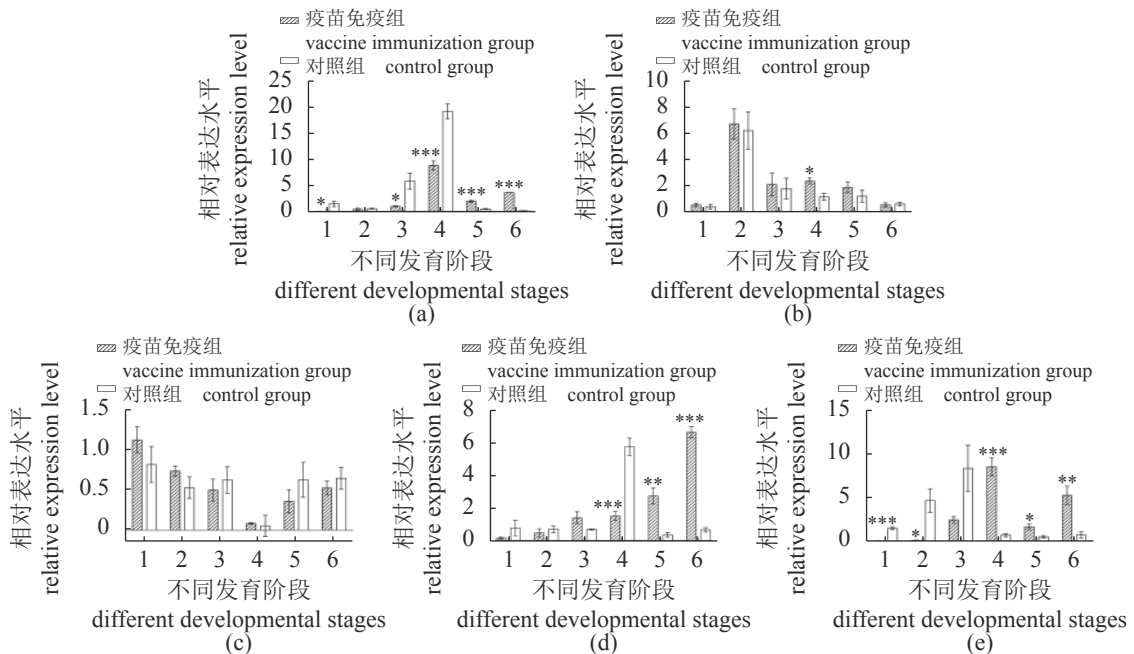


图 5 草鱼早期胚胎免疫因子基因表达水平

(a)~(e) 分别为 IgM、C3、LZM、MBL 和 Bf 基因表达水平；1~6 分别表示受精卵、原肠胚期 (6 h)、器官形成期 (24 h)、脱膜孵化期 (36 h)、水花 (4 d)、乌仔 (15 d)

Fig. 5 Relative expression level of immune factors in early embryo stages of *C. idella*

(a)~(e) represent the relative expression level of IgM, C3, LZM, MBL and Bf, respectively; 1-6 represent fertilized ovum, gastrula stage (6 h), organogenesis stage (24 h), stripping and hatching stage (36 h), larval stage (4 d), and juvenile stage (15 d), respectively

表 3 5 种免疫因子在草鱼秋片至春片时期不同组织中的基因表达水平

Tab. 3 mRNA expression levels of five immune factors in different tissues of larvae *C. idella*

免疫因子基因 immune factors genes	组织 tissues	秋片 young stage (5-month-old)		冬片 young stage (8-month-old)		春片 young stage (11-month-old)	
		疫苗免疫组 vaccine immunization group	对照组 control group	疫苗免疫组 vaccine immunization group	对照组 control group	疫苗免疫组 vaccine immunization group	对照组 control group
<i>IgM</i>	鳃 gill	0.42±0.10*	0.10±0.02	0.41±0.12	0.32±0.05	0.13±0.03*	0.04±0.01
	肝脏 liver	0.10±0.00	0.19±0.10	0.34±0.10	0.28±0.10	0.09±0.01***	0.02±0.00
	脾脏 spleen	1.05±0.28	2.20±0.65	1.65±0.55	1.71±0.13	0.73±0.04**	0.34±0.07
	肾脏 kidney	1.31±0.38	0.77±0.15	0.73±0.10	0.91±0.26	0.28±0.05	0.17±0.04
	头肾 head kidney	0.25±0.03	0.28±0.10	0.76±0.20	0.77±0.24	0.88±0.27	0.29±0.11
	肠 intestines	0.10±0.04	0.14±0.07	0.33±0.06	0.47±0.13	0.09±0.02*	0.02±0.01
	肌肉 muscle	0.03±0.02	0.06±0.03	0.22±0.10	0.12±0.03	0.03±0.02	0.01±0.00
	皮肤 skin	0.05±0.00	0.04±0.01	0.84±0.59	0.15±0.02	0.11±0.02*	0.03±0.01
<i>C3</i>	鳃 gill	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.01±0.01	0.05±0.02	0.02±0.01
	肝脏 liver	2.02±0.94	1.00±0.40	2.35±0.88	4.61±0.29	2.96±0.50	3.32±0.29
	脾脏 spleen	0.09±0.01	0.04±0.02	0.02±0.01	0.92±0.56	0.08±0.02	0.05±0.01
	肾脏 kidney	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.03±0.00	0.01±0.00
	头肾 head kidney	0.00±0.00	0.01±0.00	0.00±0.00	0.01±0.00	0.05±0.01	0.02±0.00
	肠 intestines	0.01±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.01±0.00	0.04±0.02	0.02±0.01
	肌肉 muscle	0.00±0.00	0.00±0.00	0.01±0.01	0.19±0.18	0.01±0.00	0.01±0.00
	皮肤 skin	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.03±0.01	0.04±0.01	0.05±0.01
<i>LZM</i>	鳃 gill	0.00±0.00	0.00±0.00	0.01±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	肝脏 liver	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.01±0.00	0.00±0.00	0.01±0.00
	脾脏 spleen	0.00±0.28	0.00±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.00±0.00	0.02±0.02
	肾脏 kidney	1.62±0.40	1.33±0.55	1.12±0.13	1.16±0.16	1.12±0.25	0.96±0.31
	头肾 head kidney	0.84±0.07	0.51±0.13	0.58±0.33	0.99±0.18	1.52±0.15	0.93±0.25
	肠 intestines	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	肌肉 muscle	0.00±0.00	0.00±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	皮肤 skin	0.00±0.00	0.01±0.01	0.06±0.05	0.00±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
<i>MBL</i>	鳃 gill	0.04±0.01	0.03±0.01	0.02±0.01	0.04±0.01	0.01±0.01	0.01±0.00
	肝脏 liver	4.51±0.32***	1.17±0.41	4.54±0.88	4.42±0.92	2.79±0.63	4.19±0.40
	脾脏 spleen	3.64±1.37*	0.11±0.04	2.94±0.78*	0.28±0.11	0.20±0.13	0.09±0.03
	肾脏 kidney	0.05±0.01	0.04±0.04	0.01±0.00	0.19±0.17	0.00±0.00	0.02±0.00
	头肾 head kidney	0.25±0.09	0.07±0.03	5.56±1.21**	0.09±0.03	0.14±0.04	0.06±0.01
	肠 intestines	0.09±0.04	0.00±0.00	0.04±0.00*	0.25±0.06	0.01±0.00	0.02±0.01
	肌肉 muscle	0.00±0.00	0.00±0.00	0.10±0.08	0.08±0.01	0.00±0.00	0.01±0.00
	皮肤 skin	0.05±0.04	0.03±0.01	0.18±0.08	0.06±0.01	0.01±0.00	0.05±0.00
<i>Bf</i>	鳃 gill	0.00±0.00	0.01±0.00	0.01±0.01	0.09±0.01	0.04±0.02	0.01±0.01
	肝脏 liver	3.53±0.63**	0.85±0.28	4.22±1.01	2.99±0.63	5.19±1.08	2.51±0.63
	脾脏 spleen	0.51±0.15*	0.08±0.04	0.45±0.11	0.89±0.60	0.30±0.13	0.09±0.01
	肾脏 kidney	0.01±0.00	0.01±0.01	0.29±0.09	0.23±0.18	0.00±0.00	0.01±0.00
	头肾 head kidney	0.02±0.01	0.02±0.01	4.71±0.48***	0.05±0.01	0.23±0.11	0.54±0.14
	肠 intestines	0.04±0.02	0.00±0.00	0.03±0.01	0.20±0.07	0.01±0.00	0.02±0.01
	肌肉 muscle	0.00±0.00	0.00±0.00	0.01±0.00	0.89±0.39	0.00±0.00	0.01±0.00
	皮肤 skin	0.01±0.01	0.01±0.00	0.25±0.05	0.39±0.19	0.02±0.00**	0.06±0.01

注: 结果表示为平均值±标准误差($n=5$); “*”表示差异显著 ($P < 0.05$), “**”表示差异极显著 ($P < 0.01$), “***”表示差异极其显著 ($P < 0.001$)

Notes: results were expressed as mean±SE ($n=5$); “*”, “**” and “***” mean significant differences ($P < 0.05$) and extremely significant differences ($P < 0.01$ and $P < 0.001$), respectively

的非特异性免疫因子,补体系统可介导免疫调节、吞噬和炎症反应,对病毒感染的细胞具有一定的溶解作用,阻止病毒对宿主细胞的吸附和穿入^[37-39],LZM也可在外来病原菌入侵和病毒感染时发挥免疫保护作用^[40-41]。大菱鲆亲鱼在产卵前3个月进行初次免疫,在首免5周后特异性抗体IgM水平显著升高,而产卵后的亲鱼血清抗体效价依然保持在同一水平^[23]。通过重组病毒结构蛋白(viral structural protein, VP) 7并将重组质粒作为疫苗免疫25~30 g草鱼,在免疫28 d后发现IgM和C3表达量显著上调^[42]。采用GCRV疫苗免疫质量为20~50 g的草鱼,IgM蛋白活性在14~90 d时显著高于对照组,C3和LZM蛋白活性在7~14 d显著高于对照组^[43]。本研究发现,草鱼母本在产卵前经GCRV弱毒疫苗免疫约6周后,5种免疫因子的蛋白活性和基因表达水平显著升高,但随着时间的推移,免疫后草鱼母本血液中5种免疫因子的表达量回落至与对照组同一水平,说明GCRV弱毒疫苗能够诱导草鱼母本产生免疫应答,促使母源免疫因子在产卵期亲本体内的富集表达,暗示母源免疫可以提高免疫因子从母本向子代的传递水平,从而增强子代的抗感染能力^[44]。

已有大量实验表明母源免疫因子可由亲鱼传递给子代,且母源免疫因子在不同鱼类中表达趋势均有不同。免疫处理大菱鲆亲鱼后,其子代在孵化40 d前,IgM蛋白含量呈现逐渐升高的趋势,并在孵化55 d时有所下降;C3蛋白含量在40 d前相对稳定,在40~55 d时显著升高;免疫子代LZM蛋白含量在孵化初期显著高于对照组,后期则相反^[15]。采用山羊IgG对红笛鲷(*Lutjanus sanguineus*)亲鱼进行免疫,发现红笛鲷母源抗体在子代中的表达可维持7 d^[45]。在本研究中,母源免疫子代发育至水花(4 d)时,IgM、C3、MBL和Bf的基因表达水平平均高于对照组;发育至乌仔(15 d)时,IgM、C3和Bf的蛋白活性水平平均略高于对照组;暗示通过GCRV弱毒疫苗免疫可提高草鱼子代体内免疫因子的表达,从而增强子代的免疫保护能力。鱼类早期胚胎的免疫因子自身尚未合成,主要从母本传递获取,直至幼鱼自身免疫系统开始发育,才可通过自身的免疫系统合成免疫因子^[46]。母源免疫草鱼子代在秋片(5月龄)阶段中,5种免疫因子的蛋白活性水平较乌仔(15 d)低,即子代通过母本传递获取的免疫因子逐渐被消耗,说明草鱼早期胚胎免疫系统尚未发育完全,合成

免疫因子的能力较弱。在5~11月龄草鱼仔鱼发育过程中,5种免疫因子蛋白活性水平平均逐步上升并趋于稳定,mRNA主要在肝脏、脾脏、肾脏和头肾等免疫器官表达,说明5月龄草鱼的免疫系统开始发育,可通过自身免疫系统合成免疫因子,推测免疫因子在子代中的高表达可维持5~11个月。另外,本研究结果发现,免疫因子的基因表达水平和蛋白活性水平并不完全一致,可能是母源免疫促进效应使免疫因子的mRNA在免疫子代中大量积累,此过程大量积累的mRNA对因子蛋白表达造成了一定影响,而在翻译过程中mRNA的修饰或降解最终也会影响免疫因子蛋白的产生^[47]。

本研究发现,通过GCRV弱毒疫苗提高母源性免疫因子在亲本及子代体内的富集表达具有一定的时效性,即草鱼母本经GCRV弱毒疫苗免疫后,免疫因子在亲本及子代中的高表达可维持5~11个月,最长可达11个月。因此,根据本研究结果推测,在实际生产过程中,次年需再次对草鱼雌性亲鱼进行免疫处理,以加强亲本及子代母源免疫因子的积累表达,但对于草鱼母源免疫的传递效率和机制需进行深入解析,对合适免疫时间也需进一步确定,并开展有关免疫因子生成、降解、代谢的分子调控研究,以减缓免疫因子的消耗,从而确保GCRV弱毒疫苗的最佳效果。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Grindstaff J L, Brodie E D, Ketterson E D. Immune function across generations: integrating mechanism and evolutionary process in maternal antibody transmission[J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2003, 270(1531): 2309-2319.
- [2] Magnadottir B, Lange S, Gudmundsdottir S, et al. Ontogeny of humoral immune parameters in fish[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2005, 19(5): 429-439.
- [3] Darby M G, Chetty A, Mrjden D, et al. Pre-conception maternal helminth infection transfers via nursing long-lasting cellular immunity against helminths to offspring[J]. *Science Advances*, 2019, 5(5): eaav3058.
- [4] Bar-Shira E, Cohen I, Elad O, et al. Role of goblet cells and mucin layer in protecting maternal IgA in precocious birds[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 44(1): 186-194.

- [5] Perrault J R, Bauman K D, Greenan T M, *et al.* Maternal transfer and sublethal immune system effects of brevetoxin exposure in nesting loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) from western Florida[J]. *Aquatic Toxicology*, 2016, 180: 131-140.
- [6] Zhang S C, Wang Z P, Wang H M. Maternal immunity in fish[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2013, 39(1-2): 72-78.
- [7] Huang C C, Song Y L. Maternal transmission of immunity to white spot syndrome associated virus (WSSV) in shrimp (*Penaeus monodon*)[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 1999, 23(7-8): 545-552.
- [8] Pathirana A, Diao M Y, Huang S B, *et al.* Alpha 2 macroglobulin is a maternally-derived immune factor in amphioxus embryos: new evidence for defense roles of maternal immune components in invertebrate chordate[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 50: 21-26.
- [9] 姚敬明, 孟帆, 吴忻, 等. 猪繁殖与呼吸综合征母源抗体和免疫抗体的消长规律研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2010, 37(4): 205-209.
- Yao J M, Meng F, Wu X, *et al.* Porcine reproductive and respiratory syndrome virus maternal antibodies and immune antibody by ELISA detection[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2010, 37(4): 205-209 (in Chinese).
- [10] Cazan A M, Klerks P L. Effects on life history variables and population dynamics following maternal metal exposure in the live-bearing fish *Gambusia affinis*[J]. *Ecotoxicology*, 2015, 24(3): 626-635.
- [11] Ehrlich P. Ueber immunität durch vererbung und säugung[J]. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*, 1892, 12(1): 183-203.
- [12] Leach L, Eaton B M, Firth J A, *et al.* Uptake and intracellular routing of peroxidase-conjugated immunoglobulin-G by the perfused human placenta[J]. *Cell and Tissue Research*, 1990, 261(2): 383-388.
- [13] 卢炳州. 仔猪 A 型口蹄疫母源抗体及细胞因子消长规律 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2017.
- Lu B Z. Change rules of piglet A type foot-and-mouth disease maternal antibody and cytokines[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [14] Hamal K R, Burgess S C, Pevzner I Y, *et al.* Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens[J]. *Poultry Science*, 2006, 85(8): 1364-1372.
- [15] Han M M, Ding F H, Meng Z, *et al.* The effect of vaccinating turbot broodstocks on the maternal immunity transfer to offspring immunity[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 39(1): 118-124.
- [16] Akbary P, Mirvaghefi A R, Akhlaghi M, *et al.* Influence of maternal and larval immunisation against *Lactococcus garviae* infection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walaum) lysozyme activity and IgM level[J]. *Open Journal of Animal Sciences*, 2015, 5(3): 258-269.
- [17] 李春涛, 张其中, 曾伯平. 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, Zhang Q Z, Zeng B P. 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).
- [18] Nurani F S, Sukenda S, Nuryati S. Maternal immunity of tilapia broodstock vaccinated with polyvalent vaccine and resistance of their offspring against *Streptococcus agalactiae*[J]. *Aquaculture Research*, 2020, 51(4): 1513-1522.
- [19] Løvoll M, Kilvik T, Boshra H, *et al.* Maternal transfer of complement components C3-1, C3-3, C3-4, C4, C5, C7, Bf, and Df to offspring in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Immunogenetics*, 2006, 58(2-3): 168-179.
- [20] 王志平. 斑马鱼 (*Danio rerio*) 母源性补体因子的传递和免疫功能以及补体系统的个体发育 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.
- Wang Z P. The passive transfer and immune function of maternal complement components and the ontogeny of complement system in zebrafish (*Danio rerio*)[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2008 (in Chinese).
- [21] Yang L L, Bu L Z, Sun W W, *et al.* Functional characterization of mannose-binding lectin in zebrafish: implication for a lectin-dependent complement system in early embryos[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 46(2): 314-322.
- [22] 肖调义, 周智愚, 王荣华, 等. 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[J]. *水产学报*, 2017, 41(8): 1308-1318.
- Xiao T Y, Zhou Z Y, Wang R H, *et al.* The expression and transmission of immune factors between genera-

- tions in maternal *Ctenopharyngodon idella* after immunization with GCRV attenuated vaccine[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(8): 1308-1318 (in Chinese).
- [23] 丁福红, 雷霖霖, 韩明明, 等. 母源免疫对大菱鲂(*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).
- [24] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴-2020[M]. 北京: 中国农业出版社, 2020: 25.
- Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. *China Fishery statistical yearbook-2020*[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2020: 25 (in Chinese).
- [25] 李伟. 母源免疫草鱼子代 IgM、LZM 等免疫因子活性与表达特性研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2016.
- Li W. The activity and expression characteristic of maternal immune factors (IgM, LZM, etc) in offspring of grass carp[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [26] 周智愚, 王荣华, 金生振, 等. 黄芪多糖免疫草鱼母本对子代IgM、C3和LSZ表达特性研究[J]. *中国生物工程杂志*, 2017, 37(7): 34-41.
- Zhou Z Y, Wang R H, Jin S Z, *et al.* The expression characteristics of IgM, C3 and LSZ in the offspring from female *Ctenopharyngodon idella* immunized by astragalus polysaccharides[J]. *China Biotechnology*, 2017, 37(7): 34-41 (in Chinese).
- [27] 董捷. 草鱼四个候选内参基因稳定性比较及两个免疫相关基因的克隆与表达研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010.
- Dong J. Studies on the stability of four candidate internal reference genes molecular cloning and expression of two immunization-associated genes in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2010 (in Chinese).
- [28] Seppola M, Johnsen H, Mennen S, *et al.* Maternal transfer and transcriptional onset of immune genes during ontogenesis in Atlantic cod[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2009, 33(11): 1205-1211.
- [29] Zhang S C, Dong Y, Cui P F. Vitellogenin is an immunocompetent molecule for mother and offspring in fish[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 46(2): 710-715.
- [30] 胥鹏飞, 孟安明. 斑马鱼母源因子在胚胎发育中的作用[J]. *中国科学:生命科学*, 2014, 44(10): 954-964.
- Xu P F, Meng A M. Maternal factors regulate embryonic development in zebrafish[J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2014, 44(10): 954-964 (in Chinese).
- [31] Tadros W, Lipshitz H D. The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts[J]. *Development*, 2009, 136(18): 3033-3042.
- [32] Schier A F, Talbot W S. Molecular genetics of axis formation in zebrafish[J]. *Annual Review of Genetics*, 2005, 39: 561-613.
- [33] 杨明宇, 王厚鹏, 朱作言, 等. 斑马鱼*ca15b*的克隆及在原始生殖细胞中的特异表达[J]. *水生生物学报*, 2014, 38(1): 142-149.
- Yang M Y, Wang H P, Zhu Z Y, *et al.* Cloning, identification and expression analysis of *ca15b*, a novel gene specifically expressed in primordial germ cells of zebrafish[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(1): 142-149 (in Chinese).
- [34] 张梦兰, 卢志杰, 詹凡玢, 等. 草鱼*IgM*的表达及B淋巴细胞的抗菌活性[J]. *水产学报*, 2021, 45(1): 115-124.
- Zhang M L, Lu Z J, Zhan F B, *et al.* *IgM* expression and B lymphocyte antibacterial activity of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(1): 115-124 (in Chinese).
- [35] 吕翠, 安利国, 杨桂文. 硬骨鱼新型免疫球蛋白的研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*, 2011, 33(8): 905-913.
- Lü C, An L G, Yang G W. Progress in the study of novel immunoglobulin in teleost fish[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2011, 33(8): 905-913 (in Chinese).
- [36] Gong S Q, Ruprecht R M. Immunoglobulin M: an ancient antiviral weapon-rediscovered[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 1943.
- [37] Sinha A, Singh A K, Kadni T S, *et al.* Virus-encoded complement regulators: current status[J]. *Viruses*, 2021, 13(2): 208.
- [38] Dang Y F, Meng X Z, Wang S T, *et al.* Mannose-binding lectin and its roles in immune responses in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) against *Aeromonas hydrophila*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 72: 367-376.

- [39] 吴超, 陆承平. 二龄草鱼脾脏、肝脏组织高表达甘露糖结合凝集素 mRNA[J]. *动物学报*, 2004, 50(1): 137-140.
Wu C, Lu C P. The mannose-binding lectin mRNA is expressed at high level in spleen and liver in adult grass carp[J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2004, 50(1): 137-140 (in Chinese).
- [40] Hikima S, Hikima J I, Rojtinakorn J, *et al.* Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species[J]. *Gene*, 2003, 316: 187-195.
- [41] Simser J A, Macaluso K R, Mulenga A, *et al.* Immune-responsive lysozymes from hemocytes of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* and an embryonic cell line of the Rocky Mountain wood tick, *D. andersoni*[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 34(12): 1235-1246.
- [42] 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.
- [43] 张建强, 夏迎秋, 吴圣楠, 等. 注射草鱼出血病疫苗对草鱼 3 种血清蛋白指标的影响[J]. *江西农业大学学报*, 2014, 36(2): 390-394.
Zhang J Q, Xia Y Q, Wu S N, *et al.* Effect of injection with vaccine of hemorrhage disease in grass carp on indexes of three fish serum proteins[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2014, 36(2): 390-394 (in Chinese).
- [44] 刘小宁, 李争龙, 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).
- [45] 彭志东, 简纪常, 吴灶和, 等. 红笛鲷仔鱼体内特异性母源抗体降解动力学研究[J]. *水生生物学报*, 2009, 33(1): 34-38.
Peng Z D, Jian J C, Wu Z H, *et al.* Degradation kinetics of larval specific maternal antibody from crimson snapper (*Lutjanus erythropterus*)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, 33(1): 34-38 (in Chinese).
- [46] Mulero I, García-Ayala A, Meseguer J, *et al.* Maternal transfer of immunity and ontogeny of autologous immunocompetence of fish: a minireview[J]. *Aquaculture*, 2007, 268(1-4): 244-250.
- [47] Bushell M, Stoneley M, Sarnow P, *et al.* Translation inhibition during the induction of apoptosis: RNA or protein degradation?[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2004, 32(4): 606-610.

Preliminary study on the annual variation of five immune factors in female parent and offspring of *Ctenopharyngodon idella* with maternal immunization by grass carp reovirus (GCRV) attenuated vaccine

LIU Yi¹, DING Chunhua¹, LÜ Zhao¹, YU Jianbo¹, WANG Hongquan¹, ZHANG Xuewen¹,
SHI Cunbin², REN Yan², WANG Qing², LÜ Ligang¹, LIU Kejun¹,
LI Dongfang¹, XIAO Tiaoyi^{1*}, LIU Qiaolin^{1*}

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

2. Key Lab of Aquatic Animal Immune Technology of Guangdong Province, Key Lab of Fishery Drug Development of
Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of
Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: *Ctenopharyngodon idella* is the most productive cultured freshwater fish species in China, while the healthy development of grass carp industry has been restricted for a long time by grass carp hemorrhage disease caused by grass carp reovirus (GCRV) infection. The selective breeding of *C. idella* with high resistance is a research focus of industry and academia. Our previous research found that maternal immunization could significantly enhance the offspring resistance to GCRV. To investigate the expression characteristics of maternal immune factors in the female parent treated with GCRV attenuated vaccine and its offspring, the protein concentration and gene expression levels of five different immune factors (IgM, C3, LZM, MBL and Bf) were detected by ELISA and qPCR in the blood of female parent, the early development embryos and juvenile fish of offspring. The results showed that the protein concentration and gene expression level of five immune factors in female parent blood by GCRV attenuated vaccine (experimental group) were 1.5 times higher than those in the control group, but there was no significant difference between the two groups after 11 months of immunization. The gene expression level of *IgM*, *C3*, *MBL* and *Bf* in experimental group offspring were higher than those of the control group on day 4. The protein concentration level of *IgM*, *C3* and *Bf* in experimental group offspring were slightly higher than those of the control group on day 15. Five immune factors were still highly expressed in experimental group offspring immune organs such as liver, spleen, kidney and head kidney at the age of 5-11 months. The results indicated that the expression levels of immune factors in the female parent treated with GCRV attenuated vaccine and its offspring significantly increased after maternal immunization by GCRV attenuated vaccine, but it has a certain time-effectiveness. The high expression of immune factors in the female parents and offspring might last up to 11 months, which provides a reference for the maternal immune procedure in *C. idella* and molecular information for the breeding of *C. idella* with viral resistance.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; grass carp reovirus (GCRV); maternal immune factor; early development; time-effectiveness; preventive effect

Corresponding authors: XIAO Tiaoyi. E-mail: tiaoyixiao@hunau.edu.cn;

LIU Qiaolin. E-mail: qiaolinliu2017@hunau.edu.cn

Funding projects: China Agriculture Research System (CARS-45-48); Key Scientific Research Project of Education Department of Hunan Province (20A243)