

文章编号: 1674-5566(2017)05-0651-07

DOI:10.12024/j.sou.20170402026

CyHV-3 感染镜鲤选育世代免疫基因表达及抗病能力比较

白姗姗^{1,2}, 贾智英¹, 郎延贺¹, 石连玉¹

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070; 2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 对镜鲤抗锦鲤疱疹病毒 (CyHV-3) 新品种的选育工作, 目前已经进行到 F₃、F₂、F₃ 成活率相近且显著高于 F₁。本研究利用实时荧光定量 PCR 技术比较选育世代间免疫基因 *IL-1β*、*TRAF6*、*MyD88a*、*I-IFN* 和 *TLR7a* 的表达及 CyHV-3 病毒载量情况, 从而在免疫基因表达水平及病毒载量两个方面结合抗病成活率综合评估选育世代的抗病能力。结果显示: (1) CyHV-3 病毒载量在 F₁、F₂、F₃ 中呈下降趋势, 且 F₃ 显著低于 F₁、F₂ ($P < 0.05$); (2) 夏花组未感染 CyHV-3, 仅 *TRAF6* 基因在 F₃ 的表达显著高于 F₁、F₂ ($P < 0.05$); (3) 感染组 F₃ 脾中 *IL-1β*、*MyD88a* 基因显著高于 F₁、F₂ ($P < 0.05$)、*TRAF6* 显著高于 F₁ ($P < 0.05$), F₃ 肾中 *IL-1β*、*TRAF6* 基因显著高于 F₁、F₂ ($P < 0.05$), F₁ 与 F₂ 间均差异不显著 ($P > 0.05$)。以上结果说明在选育世代间除 *TRAF6* 基因表达较高外, 其他基因未受选育影响, 且 F₃ 抗病能力显著高于 F₁、F₂。基于 F₂、F₃ 成活率相近且显著高于 F₁, 说明 F₂ 抗病力不稳定, 而 F₃ 抗病力已趋于稳定, 也说明从免疫基因表达或病毒载量方法进行抗病能力评估是可行的。

关键词: 镜鲤; 锦鲤疱疹病毒 3 型; 免疫基因; 病毒载量; 抗病力评估

中图分类号: S 917

文献标志码: A

机体受病原刺激后, 将启动免疫应答防御病原入侵, 减轻病原对机体的损伤, 免疫应答的激活、维持及效应机制均离不开各类免疫相关功能基因的表达及调控^[1]。一般情况下, 免疫基因在机体中的表达处于较低水平, 当病原刺激时免疫基因的表达将发生显著变化, CyHV-3 病毒入侵显著上调鲤白细胞介素 *IL-1β* 基因的表达^[2], I 型干扰素 (*I-IFN*) 通过诱导 GIG-1 蛋白、泛素样蛋白 (ISG15) 的表达, 在脾脏中发挥抑制病毒复制的作用^[3]。髓样细胞分化蛋白 (*MyD88*)、白细胞介素 (*IL-1β*)、肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (*TRAF-6*)、*TLR-7* 等被证明可能与 CyHV-3 的病毒免疫有关^[4-5]。研究发现, 免疫基因的表达能从分子水平更直观地反映机体在病原入侵时的免疫应答水平, 免疫基因表达水平越高, 机体启动的免疫应答水平越高, 对病原的抑制能力越

强, 说明机体抗病能力越强^[6], 例如中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 的 *TLR* 基因表达被抑制时抗病毒能力有所下降^[7]。目前, 从免疫基因表达水平研究水产动物抗病能力的报道较多^[8-9], 因此, 从免疫基因表达水平对抗病选育世代进行抗病能力评估具有一定可行性。

锦鲤疱疹病毒病 (Koi herpesvirus disease, KHVD) 由鲤疱疹病毒 3 型 (Cyprinid herpesvirus 3, CyHV-3) 引起^[10], 锦鲤^[11]、镜鲤^[12] 等鲤及其变种对其易感。该病已经在全球大部分地区发现并导致巨大经济损失, 锦鲤及其他鲤产品全球性贸易流动是该病广泛爆发的重要原因之一。2002 年, 我国首次在进口的锦鲤中检出该病, 至今已在东北^[13]、海南^[14] 等地区发现。研究发现, 鲤感染 CyHV-3 后在全身多个器官组织中均能检测到该病毒, 但主要是在鳃、脾、肾组织中^[15]。而

收稿日期: 2017-04-17 修回日期: 2017-05-11

基金项目: 国家大宗淡水鱼类产业技术体系北方鲤种质资源与品种改良项目 (CARS-45-06); 农业部财政专项物种资源保护 (2130135); 黑龙江所基本业务费 (HSY201401)

作者简介: 白姗姗 (1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为鱼类遗传育种。E-mail: bss140101017@163.com

通信作者: 石连玉, E-mail: sly2552@aliyun.com

脾、肾组织是鲤重要的免疫器官,因此本实验主要研究了脾、肾组织中 CyHV-3 病毒载量及免疫基因表达情况,以期更准确有效地反映鲤的抗病毒免疫水平。

近几年,在北方地区镜鲤(*Cyprinus carpio* L. mirror)养殖中由于爆发锦鲤疱疹病毒病导致大规模死亡,损失严重。研究发现镜鲤感染该病的死亡个体和成活个体在基因水平及遗传物质上存在差异^[12],为此黑龙江水产所通过筛选抗病毒相关分子标记的辅助育种手段,开展了镜鲤抗疱疹病毒(CyHV-3)新品种的选育工作,目前已经选育到 F₃,且选育世代间抗病成活率存在显著差异。本研究拟在免疫基因表达水平及病毒载量两个方面结合抗病成活率结果综合全面评估 3 个选育世代的抗病能力,从而科学指导下一代选育,并丰富鱼类抗性育种理论。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

实验鱼为黑龙江水产所通过筛选抗病毒相关分子标记的辅助育种手段选育的镜鲤抗疱疹病毒(CyHV-3)选育世代 F₁、F₂、F₃。2016 年度抗病选育世代 F₁、F₂、F₃ 的抗病成活率分别为 61.1%、88.6%、92.5% (养殖密度为 60 尾/m³,于发病后统计)。

1.2 实验设计

攻毒实验方法借鉴了 ØDEGÅRD 等^[16]将健康鱼与患病鱼混养方式进行攻毒试验的方法。辽宁丹东某镜鲤养殖场中锦鲤疱疹病毒病存在连续多年固定爆发的情况,因此选择该养殖场进行本次研究。采集夏花规格的 F₁、F₂、F₃ 为夏花组,检测夏花组是否感染 CyHV-3。并在该养殖场暴发锦鲤疱疹病毒病时采集 F₁、F₂、F₃ 为感染组,比较 F₁、F₂、F₃ 间免疫基因表达及 CyHV-3 病毒载量情况。

1.3 实验样品采集

夏花组采样:分别采集 F₁、F₂、F₃ 的全鱼样本,规格:2~3 cm 左右,每个选育世代均随机采集 3 尾,且每个选育世代设两组平行,受夏花鱼规格限制无法区分脾和肾,因此仅在夏花鱼同一部位采集样品用于总 RNA 和基因组 DNA 提取。

感染组采样:分别采集无发病症状的 F₁、F₂、F₃,规格:8~12 cm,每个选育世代均随机采集 3 尾,且每个选育世代设两组平行,每尾分别采集脾和肾。所有样本均液氮保存后转移至实验室 -80 °C 超低温冰箱中保存备用。

1.4 实验方法

1.4.1 夏花组感染 CyHV-3 检测

利用 MagPureTissue DNA KF Kit 提取基因组 DNA,用 OIE 推荐的 TK 引物和 sph 引物^[17]检测夏花组是否感染 CyHV-3。PCR 体系 20 μL: DNA 模板 1 μL, 2 × Es Taq Master Mix 酶 10 μL,上、下游引物各 0.5 μL,最终体积由灭菌超纯水补足,PCR 程序:预变性 95 °C 5 min;94 °C 变性 30 s,56 °C/63 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,30~35 个循环;72 °C 后延伸 5 min,4 °C 终止反应。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4.2 CyHV-3 病毒载量及免疫基因表达

将 F₁ 设为对照组, CyHV-3 的衣壳蛋白 ORF72 (Capsid triplex protein ORF72)^[18]、胸腺嘧啶核苷激酶 TK (Thymidine kinase)^[19] 和免疫基因^[20] TLR7a、TRAF6、MyD88a、IL-1β 及 I-IFN 为目的基因,比较 3 个选育世代的 CyHV-3 病毒载量及免疫基因表达情况。

1.4.3 实时荧光定量 PCR

所有引物均由生工生物工程(上海)有限公司提供,引物信息见表 1,实时荧光定量 PCR 反应体系为 25 μL, 2 × Ultra SYBR Mixture (high ROX) 12.5 μL,上游引物(10 μmol/L)0.5 μL,下游引物(10 μmol/L) 0.5 μL,基因组 DNA 1 μL/cDNA 0.5 μL, ddH₂O 补足 25 μL。上机程序(1)循环数 1,预变性,95 °C 1 min;(2)循环数 40,变性:95 °C 30 s,退火:58~60 °C 1 min,溶解曲线:95 °C 1 min,55 °C 30 s,95 °C 1 min。所有样本均进行了 3 次重复,每个样品的 Ct 值为 3 次重复的均值,病毒载量研究中以 ddH₂O 为空白对照,去除假阳性可能。

1.5 数据分析

使用 2^{-ΔΔCt}法^[21]处理荧光定量实验数据计算出相对表达量。使用 SPSS 17.0 软件单因子方差分析(one-way ANOVA)进行显著性差异分析,P < 0.05 为存在显著性差异。Excel 2010 作图。

表 1 荧光定量 PCR 引物
Tab. 1 Primers used in quantitative real-time PCR

引物名 Primers	引物序列(5'-3') Sequences (5'-3')	退火/°C T _m
<i>CyHV-3</i> thymidine kinase (<i>TK</i>)	F: GGGTTACCTGTACGAG R: CACCCAGTAGATTATGC	56
<i>CyHV-3</i> polymerase (<i>sph</i>)	F: GGGTYACCTGTACGAG R: GACACATGTACAATGCTCCG	63
<i>CyHV-3</i> thymidine kinase (<i>TK</i>)	qF: CCCTTCACCGTCAGAATCTCTC qR: AGCTCGTACTGGCCATCC	60
<i>CyHV-3</i> capsid triplex protein <i>ORF 72</i> (<i>ORF 72</i>)	F: CGAGAAGCAGGGTATGGTC R: GGCCTGTAGGGCACAAAG	60
<i>18S RNA</i>	F: TCTGCCCTAACTTTCGATGGTA R: AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCTTT	60
<i>IL-1β</i>	F: CTGTGACGCTGAGTGTGGAGCAATG R: TTCGGGTGCTTGGCATCTGGTT	60
<i>MyD88a</i>	F: TGACTTCCAGTTTGTGCATGAG R: ATGTCCACTATGTAGAATGGCT	60
<i>TLR7a</i>	F: GCACCTTTTCCATGCGTTCC R: CGGTTGGATGCTCTTCTGCT	60
<i>I-IFN</i>	F: AAGATGAACCAAACCTCAAATGTGGAC R: CTGATGAACATTTACAAACAAATCATG	58
<i>TRAF6</i>	F: AGATCCGGGAGCTGTGCATCC R: GCCTCTGGAATGCCTGCAAGTC	60

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA、总 RNA 提取、cDNA 合成

微量分光光度计检测提取总 RNA 的 A_{260}/A_{280} 在 1.8 ~ 2.0 之间,组织 DNA 的 A_{260}/A_{280} 约为 1.8。提取总 RNA、组织 DNA 及反转的 cDNA 经琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 1。符合进行实时荧光定量 PCR、常规 PCR 的条件。

2.2 夏花组 CyHV-3 检测结果

本研究夏花组 F_1 、 F_2 、 F_3 利用 *TK* 基因和 *sph* 基因进行常规 PCR 检查,在 1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示:阳性模板均出现目的条带,空白对照及夏花组 F_1 、 F_2 、 F_3 均无目的条带,这一结果说明夏花组 F_1 、 F_2 、 F_3 未感染 CyHV-3(图 2)。

2.3 感染组 F_1 、 F_2 、 F_3 中 CyHV-3 病毒载量情况比较

如图 3 所示,*TK* 和 *ORF72* 基因扩增结果一致,表明本实验通过实时荧光定量 PCR 对 F_1 、 F_2 、

F_3 中 CyHV-3 病毒载量进行相对定量的研究方法具有可行性。CyHV-3 病毒载量在 3 个选育世代中呈下降趋势,在脾、肾组织变化趋势一致, F_3 脾、肾中 CyHV-3 病毒载量显著低于 F_1 、 F_2 ($P < 0.05$), F_2 脾、肾的 CyHV-3 病毒载量高于 F_1 但二者间无显著性差异 ($P > 0.05$),说明 3 个选育世代抑制 CyHV-3 增殖能力逐代增强。

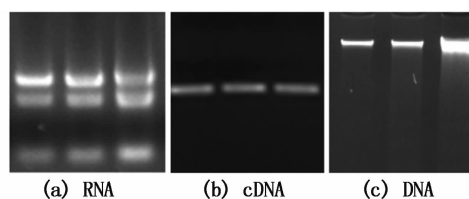


图 1 RNA、cDNA 及 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测结果
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis detection result of RNA, cDNA and DNA

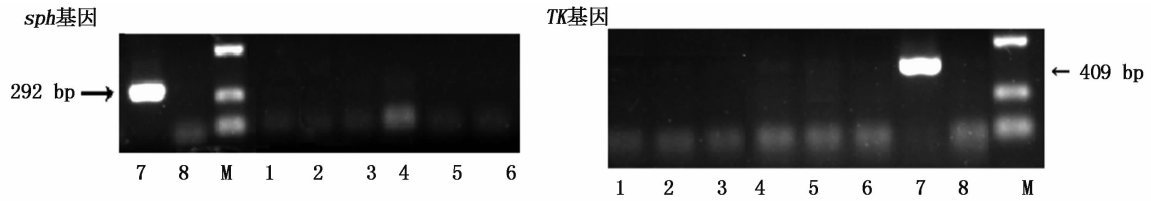


图2 夏花组 CyHV-3 检测结果

Fig.2 CyHV-3 test results of summerlings groups

1,2 为 F₁ 样品; 3,4 为 F₂ 样品; 5,6 为 F₃ 样品; 7 为阳性对照; 8 为空白对照

1 and 2 : the F₁ samples; 3 and 4: the F₂ samples; 5 and 6 : the F₃ samples; 7: the positive; 8:the negative control

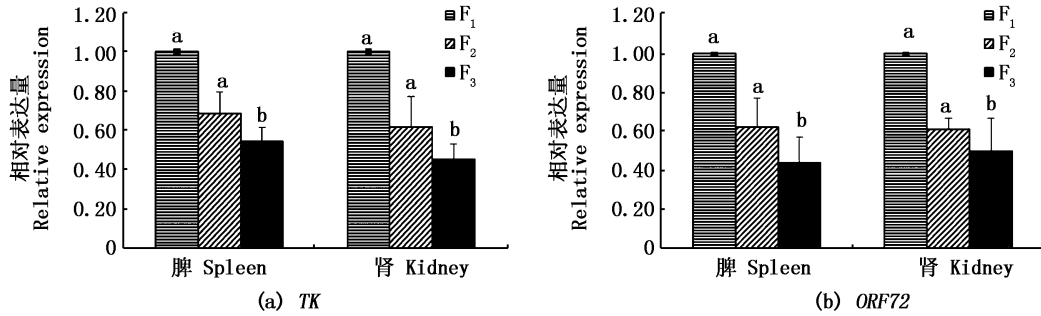


图3 F₁、F₂、F₃ 中 CyHV-3 病毒增殖情况

Fig.3 CyHV-3 virus proliferation in the three breeding generations F₁, F₂, F₃

标记字母不同表示组内存在显著性差异 ($P < 0.05$), 图4,5 同此

Different letters indicate the presence of significant difference within the two groups ($P < 0.05$), the same in fig. 4-5

2.4 夏花组 F₁、F₂、F₃ 中免疫基因的表达

如图4所示,在夏花组 F₁、F₂、F₃ 中,*I-IFN* 的相对表达量呈现下降趋势, *TRAF6*、*TLR7a*、*MyD88a* 及 *IL-1β* 的相对表达量呈现上升趋势,仅 *TRAF6* 基因在 F₃ 的表达显著高于 F₁、F₂ ($P < 0.05$),其余均差异不显著 ($P > 0.05$),结果说明在选育世代间,除 *TRAF6* 基因表达较高外,其他基因未受选育影响。

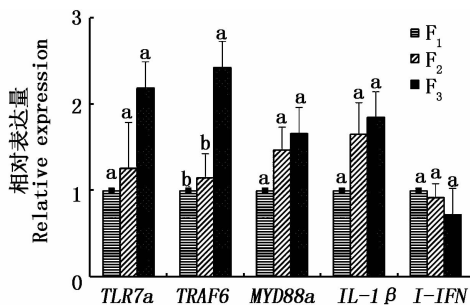


图4 夏花组 F₁、F₂、F₃ 中免疫基因的表达

Fig.4 Expression of immune genes in Summerlings F₁, F₂, F₃

2.5 感染组 F₁、F₂、F₃ 中免疫基因的表达

如图5所示,在脾中, F₃ 的 *TLR7a*、*TRAF6*、

MyD88a、*IL-1β* 及 *I-IFN* 的相对表达量均最高,其中, *TRAF6* 基因在 F₃ 的表达显著高于 F₁ ($P < 0.05$), *MyD88a*、*IL-1β* 基因在 F₃ 的表达显著高于 F₁ 和 F₂ ($P < 0.05$), 在 F₂ 中, *TLR7a*、*TRAF6*、*MyD88a* 基因的相对表达量高于 F₁, *IL-1β* 及 *I-IFN* 基因的相对表达量低于 F₁, 但 F₂ 与 F₁ 间免疫基因表达均差异不显著 ($P > 0.05$)。在肾中, F₃ 的 *TLR7a*、*TRAF6*、*MyD88a*、*IL-1β* 及 *I-IFN* 的相对表达量均为最高值,其中, *TRAF6*、*IL-1β* 基因在 F₃ 中的表达显著高于在 F₁、F₂ ($P < 0.05$) 中, *TLR7a*、*MyD88a*、*IL-1β* 在 F₂ 中的相对表达量低于 F₁, *TRAF6*、*I-IFN* 在 F₂ 中的相对表达量高于 F₁, 但 F₂ 与 F₁ 之间差异均不显著 ($P > 0.05$)。以上结果说明感染组 F₃ 与 F₁、F₂ 间免疫基因表达水平存在显著差异, F₂ 与 F₁ 间无显著差异,其中 F₂ 的免疫基因表达水平与其表现出的抗病成活率水平不一致,但与 CyHV-3 病毒载量研究结果一致。

3 讨论

3.1 夏花组 CyHV-3 检测

目前,通过常规 PCR 检测 CyHV-3 时, PCR

产物一般通过 1% 琼脂糖凝胶电泳方法检测,本研究利用 OIE 推荐检测引物 *TK* 和 *sph* 引物进行常规 PCR 检测,结果显示:待检样品在 1% 琼脂

糖凝胶电泳中未出现目的条带,说明本研究中夏花组 F_1 、 F_2 、 F_3 均未感染 CyHV-3。

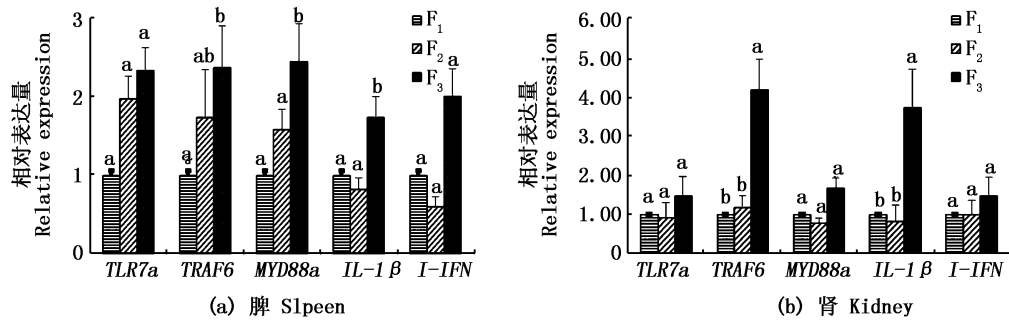


图5 感染组 F_1 、 F_2 、 F_3 中免疫基因在脾、肾中的表达

Fig. 5 The expression of immune genes in spleen and kidney of the infection groups F_1 , F_2 , F_3

3.2 免疫基因差异表达

研究发现, CyHV-3 与细菌^[22] 均能上调 *IL-1 β* 基因的表达, 感染 CyHV-3 的鱼对由真菌、细菌、寄生虫等引发疾病更易感, 从而导致该病更高的死亡率。 *IL-1 β* 基因表达量的增加能增强鱼类抗病能力^[23]。本研究中, *IL-1 β* 基因在夏花组和感染组的 F_3 中高表达, 说明 F_3 抗病毒、病菌及抗感染的能力强于 F_1 、 F_2 , 这可能是 F_3 具有显著高成活率的重要原因之一。

Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 能直接与 *MyD88* 配体结合, 并结合 *IL-1* 受体相关激酶 (IRAKs) 向下激活下游接头分子 *TRAF6*, 而 *TRAF6* 可以激活下游因子 IKKs 从而分别诱导 *NF- κ B*、*IRF7* 和其他炎性因子的表达^[24-25]。本研究感染组中 *TRAF6*、*MyD88a* 及 *IL-1 β* 基因的表达量在具有高成活率的 F_3 中显著高表达, 由以上推测, 镜鲤可能通过上述 TLRs 信号通路诱导 *IL-1 β* 基因的表达。 *TRAF6*、*MyD88* 作为 TLRs 信号通路的关键因子, 在 F_3 中的显著高表达情况推测可能是因为在 CyHV-3 感染后, 机体启动多种 *TRAF6*、*MyD88* 参与的 TLRs 信号通路发挥抗病毒作用, 但这一推测还有待进一步研究。

3.3 抗病力评估

随抗病成活率的增加, 在感染组 F_1 、 F_2 、 F_3 中, CyHV-3 病毒载量呈下降趋势, F_3 显著高于 F_1 、 F_2 ($P < 0.05$), 而 F_2 高于 F_1 但二者间无显著性差异 ($P > 0.05$), 机体抑制病毒增殖能力能反映其抗病毒能力, 推断 F_3 抗病能力显著高于 F_1 、 F_2 。

不同选育世代间免疫基因的显著差异表达可以反映选育评估效果。夏花组未感染 CyHV-3, 3 个选育世代中仅 *TRAF6* 基因在 F_3 的表达量显著高于 F_1 、 F_2 ($P < 0.05$), 说明在选育世代间, 除 *TRAF6* 基因表达较高外, 其他基因未受选育影响。在感染组的脾中, F_3 的 *IL-1 β* 、*MyD88a* 基因表达显著高于 F_1 、 F_2 ($P < 0.05$)、*TRAF6* 基因表达显著高于 F_1 ($P < 0.05$), 而肾中 F_3 的 *IL-1 β* 、*TRAF6* 基因表达显著高于 F_1 、 F_2 ($P < 0.05$), 从 3 个选育世代免疫基因表达的显著性差异来看, F_1 与 F_2 间均差异不显著, 而 F_3 与 F_1 、 F_2 均存在显著差异表达的基因, 由此说明 F_3 抗病能力显著高于 F_1 、 F_2 , 而 F_2 的抗病力与 F_1 无显著差异。

病毒载量及免疫基因表达的结果均表明 F_3 抗病能力显著高于 F_1 、 F_2 , F_3 的成活率也显著高于 F_1 , 由此推断, F_3 的抗病力高且趋于稳定。 F_2 的成活率显著高于 F_1 , F_2 抑制 CyHV-3 能力高于 F_1 , 但免疫基因表达水平无显著差异, 推测 F_2 的抗病力还不稳定。总之, 通过病毒载量、免疫基因表达及抗病成活率 3 个方面综合评估抗病选育世代的抗病力比单纯由抗病成活率情况反映的评估结果更完善更准确, 也说明本研究的评估方法是进行鱼类抗病新品种选育世代评估的行之有效的办法。

参考文献:

- [1] SECOMBES C J, HARDIE L J, DANIELS G. Cytokines in fish: an update[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1996, 6 (4): 291-304.

- [2] ADANEK M, STEINHAGEN D, IRNAZAROW I, et al. Biology and host response to Cyprinid herpesvirus 3 infection in common carp [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 43(2): 151-159.
- [3] RAKUS K Ł, IRNAZAROW I, ADAMEK M, et al. Gene expression analysis of common carp (*Cyprinus carpio* L.) lines during Cyprinid herpesvirus 3 infection yields insights into differential immune responses [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2012, 37(1): 65-76.
- [4] KONGCHUM P, PALTU Y, HALLERMAN E M, et al. SNP discovery and development of genetic markers for mapping innate immune response genes in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(2): 356-361.
- [5] KONGCHUM P, HALLERMAN E M, HULATA G, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of *TLR9*, *MyD88* and *TRAF6* genes in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(1): 361-371.
- [6] 杨华, 杨永林. 基于主成分分析法建立绵羊一般抗病力的评估模型[J]. *中国草食动物科学*, 2015, 35(3): 1-5.
- YANG H, YANG Y L. Assessment model of general disease resistance with principal component analysis in sheeps [J]. *China Herbivore Science*, 2015, 35(3): 1-5.
- [7] 梁忠秀, 李健, 谭志军, 等. 塔玛亚历山大藻对中国明对虾肝胰腺和鳃 SOD、GST 和 MDA 的影响[J]. *水产学报*, 2013, 37(8): 1192-1197.
- LIANG Z X, LI J, TAN Z J, et al. Effects of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* on MDA, SOD and GST in hepatopancreas and gill of *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(8): 1192-1197.
- [8] SHIN G W, WHITE S L, DAHMS H U, et al. Disease resistance and immune-relevant gene expression in golden mandarin fish, *Siniperca scherzeri* Steindachner, infected with infectious spleen and kidney necrosis virus-like agent [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2014, 37(12): 1041-1054.
- [9] AHMADI P Y, FARAHMAND H, MIANDARE H K, et al. The effects of dietary Immunogen® on innate immune response, immune related genes expression and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 37(2): 209-214.
- [10] 李俊超, 马杰, 曾令兵, 等. 抗锦鲤疱疹病毒的植物药物筛选及其效果比较[J]. *淡水渔业*, 2014, 44(3): 62-67.
- LI J C, MA J, ZENG L B, et al. Studies on the screening and efficacy evaluation of herbal drugs in inhibiting Koi herpesvirus replication in vitro [J]. *Freshwater Fisheries*, 2014, 44(3): 62-67.
- [11] 袁海延, 于慧, 王好, 等. 锦鲤疱疹病毒病的研究进展[J]. *中国兽药杂志*, 2015, 49(5): 62-65.
- YUAN H Y, YU H, WANG H, et al. Research progress of koi herpesvirus disease [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2015, 49(5): 62-65.
- [12] 贾智英, 池喜峰, 李池陶, 等. 德国镜鲤养殖群体中抗病与死亡个体遗传结构比较研究[J]. *上海海洋大学学报*, 2010, 19(1): 7-11.
- JIA Z Y, CHI X F, LI C T, et al. Analysis of genetic structure between the death and survival individuals of German mirror carp in cultivated stocks [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2010, 19(1): 7-11.
- [13] 朱霞, 李新伟, 王好, 等. 一株锦鲤疱疹病毒的分离与鉴定[J]. *中国预防兽医学报*, 2011, 33(5): 340-343.
- ZHU X, LI X W, WANG H, et al. Isolation and identification of Koi herpesvirus [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2011, 33(5): 340-343.
- [14] 周永灿, 袁军法, 任武泽, 等. 锦鲤疱疹病毒的检测与人工感染试验[J]. *武汉大学学报(理学版)*, 2005, 51(s2): 249-252.
- ZHOU Y C, YUAN J F, REN W Z, et al. Detection and experimental infection of Koi herpesvirus [J]. *Journal of Wuhan University (Natural Science Edition)*, 2005, 51(s2): 249-252.
- [15] 包卫空, 沈锦玉. 锦鲤疱疹病毒的鉴定及预防[J]. *水产养殖*, 2015, 36(4): 45-48.
- BAO W K, SHEN J Y. Identification and prevention of Koi herpes virus disease [J]. *Journal of Aquaculture*, 2015, 36(4): 45-48.
- [16] ØDEGÅRD J, OLESEN I, DIXON P, et al. Genetic analysis of common carp (*Cyprinus carpio*) strains. II: Resistance to koi herpesvirus and *Aeromonas hydrophila* and their relationship with pond survival [J]. *Aquaculture*, 2010, 304(1/4): 7-13.
- [17] 张圆圆, 王先科, 贾滔. 锦鲤疱疹病毒 (KHV) 的检测技术概述[J]. *河南水产*, 2016(4): 1-2, 6.
- ZHANG Y Y, WANG X K, JIA T. Overview of detection methods of koi herpesvirus (KHV) [J]. *Henan Shuichan*, 2016(4): 1-2, 6.
- [18] ADAMEK M, SYAKURI H, HARRIS S, et al. Cyprinid herpesvirus 3 infection disrupts the skin barrier of common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 162(2/4): 456-470.
- [19] 张艳, 孟庆峰, 钱爱东, 等. 锦鲤疱疹病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. *吉林畜牧兽医*, 2010, 31(4): 11-14.
- ZHANG Y, MENG Q F, QIAN A D, et al. Establishment of a fluorescent quantitative polymerase chain reaction assay for detection of Koi herpesvirus [J]. *Jilin Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2010, 31(4): 11-14.
- [20] 葛会争. 德国镜鲤与黑龙江野鲤杂交组合的亲缘鉴定及鲤鱼免疫功能基因 SNP 位点研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.
- GE H Z. Parentage identification of Heilongjiang wild carp and the German mirror carp cross combinations on microsatellite DNA markers and carp immune function gene SNP research [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University,

- 2012.
- [21] LIVAL K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [22] XU Q Q, XU P, ZHOU J W, et al. Cloning and expression analysis of two pro-inflammatory cytokines, IL-1 β and its receptor, IL-1R2, in the Asian swamp eel *Monopterus albus* [J]. *Molecular Biology*, 2016, 50(5): 671-683.
- [23] 刘佳佳, 吴志新, 石焱, 等. 甘露寡糖对草鱼感染嗜水气单胞菌后细胞因子表达的调节 [J]. *淡水渔业*, 2013, 43(5): 31-36.
- LIU J J, WU Z X, SHI Y, et al. Regulation of MOS on cytokines gene expression in grass carp infected with *Aeromonas hydrophila* [J]. *Freshwater Fisheries*, 2013, 43(5): 31-36.
- [24] VEKSLER-LUBLINSKY I, SHEMER-AVNI Y, MEIRI E, et al. Finding quasi-modules of human and viral miRNAs; a case study of human cytomegalovirus (HCMV) [J]. *BMC Bioinformatics*, 2012, 13: 322.
- [25] JENKINS K A, MANSELL A. TIR-containing adaptors in Toll-like receptor signalling [J]. *Cytokine*, 2010, 49(3): 237-244.

Comparisons of the immune gene expression and disease resistance between mirror carp breeding generations after CyHV-3 infection

BAI Shanshan^{1,2}, JIA Zhiying¹, LANG Yanhe¹, SHI Lianyu¹

(1. Heilongjiang Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, Heilongjiang, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The mirror carp breeding of generations targeted at Koi herpes virus (CyHV-3) has been carried out to F₃ generation. F₂ and F₃ survival rates are similar and significantly higher than F₁. In this study, the CyHV-3 viral loads and the gene expression of *IL-1 β* , *TRAF6*, *MyD88a*, *I-IFN* and *TLR7a* are compared by real-time fluorescence quantitative PCR technique. Immune gene expression levels and viral loads in combination with disease resistance survival rates are used to evaluate the disease resistance of different generations. The results showed that: (1) CyHV-3 virus load decreased sequentially in F₁, F₂ and F₃, and F₃ was significantly lower than F₁ and F₂ ($P < 0.05$); (2) Summerlings group wasn't infected CyHV-3, only the expression of *TRAF6* gene in F₃ was significantly higher than that in F₁ and F₂ ($P < 0.05$). (3) In the infected group, the levels of *IL-1 β* and *MyD88a* in F₃ spleen were significantly higher than those in F₁ and F₂ ($P < 0.05$), and *TRAF6* was significantly higher than that of F₁ ($P < 0.05$). The expression of *IL-1 β* and *TRAF6* in F₃ kidney was significantly higher than that in F₁ and F₂ ($P < 0.05$). There was no significant difference between F₁ and F₂ ($P > 0.05$). The above results show that F₃ disease resistance is significantly higher than F₁, F₂, only the *TRAF6* gene was breeding. Based on the fact that F₂, F₃ survival rate was similar and significantly higher than F₁, it can be concluded that F₂ disease resistance is not stable and F₃ resistance has stabilized, and that using the immune gene expression or viral load method to evaluate the disease resistance is feasible.

Key words: mirror carp; koi herpes virus 3; immune gene; viral load; disease resistance assessment