

大菱鲆家系选育二代 7 种免疫因子的分析

田岳强^{1,2}, 郭建丽¹, 黄智慧^{1,3}, 马爱军^{1,3}, 王新安^{1,3}, 杨志⁴, 曲江波⁴

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 山东 青岛 266071; 2. 上海海洋大学, 上海 201306; 3. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋生物学与生物技术功能实验室, 山东 青岛 266071; 4. 烟台开发区天源水产有限公司, 山东 烟台 264003)

摘要: 为选育高成活率的大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)抗鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)群体, 对 30 个大菱鲆选育二代家系(F₂)和 1 个普通养殖群体进行鳃弧菌攻毒实验(周期为 14 d), 统计分析死亡率。选取死亡率不同的 6 个选育家系和普通养殖群体构成 7 个实验组, 采用半定量-聚合酶链反应(semi-quantitative polymerase Chain reaction, RT-PCR) 技术对它们肝脏、脾脏、头肾的相关免疫因子——溶菌酶(Lysozyme)、抗菌肽(Hepcidin)、热激蛋白 70(HSP70)、热激蛋白 90(HSP90)、免疫球蛋白(IgM)、C-型凝集素(C-type lectin)、Lily-型凝集素(Lily-type lectin) 的表达量开展研究, 并应用 SPSS 16.0 软件对攻毒前后各免疫因子的表达量与攻毒后存活率之间的相关性进行分析。研究结果表明: 攻毒前后选育家系幼鱼肝脏、脾脏、头肾中 7 个免疫因子的表达量普遍高于普通养殖幼鱼, 且在 7 个实验组中, 攻毒后的表达量相较攻毒前均呈现下降趋势; 攻毒前, 肝脏中 lysozyme、IgM 的表达量与存活率为极显著性正相关($P < 0.01$), HSP70、HSP90、C-type lectin、Lily-type lectin 的表达量与存活率为显著性正相关($P < 0.05$); 脾脏中, Hepcidin、HSP70 和 HSP90 的表达量与存活率为极显著性正相关($P < 0.01$); 头肾中, HSP70 的表达量与存活率为显著正相关($P < 0.05$)。综上, 可以推断选育家系相对于普通养殖群体大菱鲆抗鳃弧菌性能更强, 且 7 种免疫因子在鳃弧菌感染鱼体的过程中发挥重要的抗感染作用; 从 F₂ 中获得一个抗鳃弧菌性能较强的家系(23 号), 可用于今后大菱鲆抗鳃弧菌品系的选育指导工作, 为大菱鲆高成活率群体的选育提供参考资料和理论依据。

关键词: 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*); 鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*); 选育家系; 免疫因子; RT-PCR

中图分类号: S941 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2016)09-0009-09

doi: 10.11759/hyxx20150305002

大菱鲆(*Scophthalmus maximus*), 隶属于鲽形目(Pleuronectiformes)、菱鲆科(Bothidae)、菱鲆属(*Scophthalmus*), 为原产于北欧的底栖冷水性鱼类^[1]。1992 年中国水产科学院黄海水产研究所率先将其引进中国, 目前大菱鲆养殖已发展为年产量超过 60 000t 的海水养殖支柱产业^[2]。但是中国进口大菱鲆群体种质较单一, 加之累代养殖和近亲交配, 其种质退化日趋明显, 并且伴随着大菱鲆养殖业的迅猛发展和集约化程度的不断提高, 病害问题日渐突出^[3-5], 严重制约了大菱鲆养殖产业的可持续发展。

自“十一五”开始, 中国陆续立项支持大菱鲆良种选育的相关研究, 旨在选育出生长快、抗逆性强的新品种^[2]。从 2007 年起, 本课题组采用电子标记辅助的大规模家系选育技术和分子辅助育种技术, 开始了大菱鲆的良种选育工作^[6-10]。目前已成功选育出

生长快、成活率高的新品种“多宝一号”以及耐高温^[9-10]的新品系。然而, 大菱鲆高成活率品系的选育及相关抗病的详细机制国内鲜有报道, 为了指导本课题组高成活率品系的选育, 开展此研究。众所周知, 溶菌酶、抗菌肽、热激蛋白、免疫球蛋白和凝集素等均是鱼类重要的免疫因子, 国内外许多专家对它

收稿日期: 2015-03-05; 修回日期: 2015-05-07

基金项目: 国家 863 计划项目(2012AA10A408-8); 现代农业产业技术体系建设专项基金共同资助(CARS-50-G01); 中国博士后科学基金项目(2015M572096); 山东省自然科学基金项目(ZR2014CP001)

[Foundation: National 863 Program (2012AA10A408-8); Modern Agro-Industry Technology Research System (CARS-50-G01); China Postdoctoral Science Foundation(2015M572096); the Shandong Provincial Natural Science Foundation (ZR2014CP001)]

作者简介: 田岳强(1988-), 男, 山东省泰安人, 硕士, 主要从事鱼类遗传育种研究, 电话: 15865385685, E-mail: tyqiang1988@163.com; 马爱军, 通信作者, 电话: 0532-85835103, E-mail: maaj@ysfri.ac.cn

们在抵抗感染性致病菌的防御机制中起到的作用进行研究。如周丽等^[11]对引起牙鲆体表溃烂的病原纤毛虫——指状拟舟虫(*Paralembus digitiformis*)诱导牙鲆免疫反应产生的免疫球蛋白进行分析,发现病原纤毛虫免疫注射牙鲆,可诱导牙鲆发生特异性免疫反应,产生抗体;Shike等^[12-13]报道抗菌肽 mRNA 表达量变化受外界病原微生物的正调控;林天势等^[14]用病原菌感染大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*),感染 48 h 后,各组织 HSP90 表达量明显上升等。

本研究对以高成活率为选育目标的大菱鲆家系选育二代和普通养殖群体幼鱼进行鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)攻毒实验,检验选育家系抗鳃弧菌性能,并分析了肝脏、脾脏和肾脏中的多种免疫因子的表达水平及其与存活率的关系,为大菱鲆高成活率性状选育提供参考资料和理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 实验用鱼

实验家系用鱼来源于本课题组于 2010 年 5 月在烟台天源水产国家级良种场所构建的同批次选育家系^[8]。于 2011 年 5 月开展攻毒实验,即从 30 个家系中分别挑取 40 尾幼鱼,从购自日照养殖场的普通群体中挑取 40 尾幼鱼,同时从选育家系与普通养殖群体中共挑选 40 尾组成 1 个混合组,共计 32 组,分别养殖于 32 个直径 110 cm、高 68 cm 的圆柱形玻璃钢桶内。养殖海水为过滤深井海水,循环流水,桶内海水高度控制在 50 cm,水温为(13±1)℃,氧气泵连续通氧,DO 7.3 mg/L,盐度为 28‰,早晚各喂 1 次,暂养 14 d。为保证后续攻毒实验用菌量在各组之间无显著差异,挑选的所有用鱼规格均匀[体长均值为(17.79±2.8) cm,体质量均值为(275.98±21.36)g,均值±标准差]。后期免疫分析所用的 6 个家系是根据攻毒后死亡率的高低,从 30 个家系中挑选获得。

1.1.2 鳃弧菌

攻毒实验所用的鳃弧菌为本实验室保存并经过鉴定的鳃弧菌菌株。菌株接种于灭菌的 TSB 培养基(TSB 30g, NaCl 15g, 蒸馏水 1 000 mL 溶解), 28℃, 200 r/min 培养约 24 h,测定 OD₆₀₀ 值,并用 0.9%生理盐水稀释至已测定的半致死浓度 10⁶ cfu/mL。

1.2 实验方法

1.2.1 攻毒实验

暂养结束后,参照文献^[15-16]的方法,对选育

家系及普通养殖群体幼鱼腹腔注射 1 μL/g^[17]经过稀释的鳃弧菌菌液,同时对混合组腹腔注射 1 μL/g 0.9%生理盐水作为对照。感染期间水温控制在(14±1)℃,实验持续 14 d,统计死亡情况并及时捞出死鱼。对每组死鱼随机抽取 3 尾进行涂片镜检,均发现鳃弧菌。

1.2.2 样品采集

在注射前和注射后第 15 天分别从各组随机取 5 尾大菱鲆幼鱼,剪取幼鱼肝脏、脾脏、头肾,置于加入组织保护液的无 RNA 酶离心管中,即为肝脏、脾脏、头肾的样品。样品放入液氮中保存备用。

1.2.3 免疫因子的测定和分析

1.2.3.1 RNA 提取

利用 TIANGEN 动物组织总 RNA 提取试剂盒提取肝脏、脾脏和头肾样品的 RNA。将 5 个样本按照等同的 RNA 含量进行混合,分装并用封口膜封存,-80℃ 储存。

1.2.3.2 RNA 反转录成 cDNA

在 RNase-free 离心管中加入 1 μg 混匀后的 RNA 以及 1 μL random hexamer primer(随机引物),加入 RNase-free ddH₂O 至 12 μL,65℃ 反应 5 min。向上述反应体系中加入 4 μL 5 × Reaction Buffer、1 μL (20 U/μL)RiboLock RNase Inhibitor、2 μL 10 mmol/L dNTP Mix 以及 1 μL(200 U/μL)RevertAid M-MuLV R 反转录酶,反应体系总体积为 20 μL。PCR 扩增,反应条件为:25℃ 5min,42℃ 60min,75℃ 5min。

1.2.3.3 免疫因子的 PCR 扩增与分析

对 7 种免疫因子的特异引物(表 1),在 Taq polymerase 的作用下进行特异性扩增,并用 β-actin 作为内参对 RT-PCR 产物进行分析。PCR 反应体系 20 μL: cDNA 1 μL, 10 × buffer 1.5 μL, 上、下游引物各 0.5 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 1.3 μL, Taq DNA 聚合酶 0.2 μL, 无 RNA 水 15 μL。PCR 反应条件:94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 按表 1 设置循环数; 72℃ 延伸 5 min, 反应结束。利用 1.7%琼脂糖凝胶电泳系统对 PCR 产物进行检测,利用凝胶成像软件(UV-systems)对条带强度进行分析。每个样品的凝胶电泳进行 3 次重复,灰度值以[均值±标准差]表示。

1.3 数据处理

采用 SPSS16.0 统计软件进行单因素方差分析,用 Duncan 法进行多重比较,*P*<0.05 为差异显著。

进行皮尔逊检验(Pearson correlation),对攻毒前各免疫因子的相对表达量与大菱鲆攻毒后的死亡率

表 1 PCR 反应中特异性引物的核苷酸序列
Tab. 1 Oligonucleotide sequences used in PCR

基因	序列(5' to 3')	退火温度 (°C)	循环数	GeneBank 登录号
β肌动蛋白(β-Actin)	F: ATCGTGGGGCGCCCCAGGCACC R: CTCCTTAATGTCACGCACGATTC	55	30	AY008305
免疫球蛋白 M(IgM)	F: CAGTGTTCCCAGTC R: CTCAGCGTCATCATAAGC	51	35	DQ848956
溶菌酶(Lysozyme)	F: AGCCTGGCCGACTGGGTTTG R: CGCAGCGACACACAGTAAAAGTAAAG	58	35	AJ250732
抗菌肽(Hepcidin)	F: CACATAATGAAGGCATTGAGCA R: TTATCCTCAGAACTTGACAGCA	51	35	AY994074
热激蛋白 70(HSP70)	F: CTGTCCCTGGGTATTGAGAC R: GAACACCACGAGGAGCA	53	35	ABU50777.1
热激蛋白 90(HSP90)	F: CCGCCTACCTCGTTGC R: GTAGCCGATGAACTGCGAGT	54	35	ABD61721.1
Lily-型凝集素(Lily-type lectin)	F: TCTTCCAGGATGACGGCAACT R: CGCGCTTGTCGTACATAACCAG	55	35	实验室自主设计
C-型凝集素(C-type lectin)	F: GGTCGACGCTCAGAAAAAC R: GCACCATCAATCCAGAAGAAA	51	35	GU385827.1

进行相关性分析。Pearson 相关系数公式为:

$$r_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

2 结果

2.1 攻毒后大菱鲆的累积死亡情况

注射生理盐水的混合组在实验期间未出现死亡,可排除养殖环境和注射对实验的干扰。攻毒后,30 个家系的累积死亡率在(23.34±4.72)%~(75.00±2.36)%,普通养殖群体的累积死亡率为(81.67±2.35)%,各家系的死亡率均低于普通养殖群体(编号 31)(图 1);Duncan 多重比较结果表明,30 个家系中有 27 个的累积死亡率显著低于普通养殖群体($P < 0.05$)。选取死亡率由低到高具有代表性的 6 个家系作为家系组,分别命名为家系组 1~6,死亡率平均值分别为 25.00%、33.33%、41.65%、56.66%、66.66%、75.00%,对应家系号为 23 号、6 号、8 号、7 号、15 号、5 号,普通选育群体命名为普通组,共 7 个实验组用于免疫因子分析。

2.2 肝脏攻毒前后各免疫因子的表达分析

应用 7 种免疫因子的特异性引物对肝脏 cDNA

进行 PCR 扩增,PCR 产物利用 1.7%琼脂糖凝胶电泳系统进行检测,利用凝胶成像软件(UV-systems)分析条带强度,由此得出攻毒实验对大菱鲆肝脏 7 种免疫因子表达水平的影响,如图 2。应用 SPSS16.0 分别对各实验组肝脏之间免疫因子的表达量进行方差分析及多重比较,并用 t 检验分析 7 种免疫因子攻毒前后的差异性,结果见表 2。肝脏中各免疫因子的表达量在攻毒后普遍呈现下降趋势;攻毒前,6 个家系组的各免疫因子表达量全部高于普通组($P < 0.05$),7 个实验组的免疫因子表达量的高低与其存活率呈一定的正相关关系;攻毒后,大多数家系组的免疫因子表达量高于普通组($P < 0.05$)。

2.3 脾脏攻毒前后各免疫因子的表达分析

应用 7 种免疫因子的特异性引物对脾脏 cDNA 进行 PCR 扩增,结果见图 3。应用 SPSS16.0 分别对各实验组脾脏之间免疫因子的表达量进行方差分析及多重比较,并用 t 检验分析免疫因子攻毒前后的差异性,结果见表 3。脾脏中各免疫因子的表达量在攻毒后普遍呈现下降趋势;无论攻毒前后,6 个家系组的各免疫因子表达量普遍高于普通组($P < 0.05$);攻毒前,7 个实验组的免疫因子表达量的高低与其存活率呈一定的正相关关系。

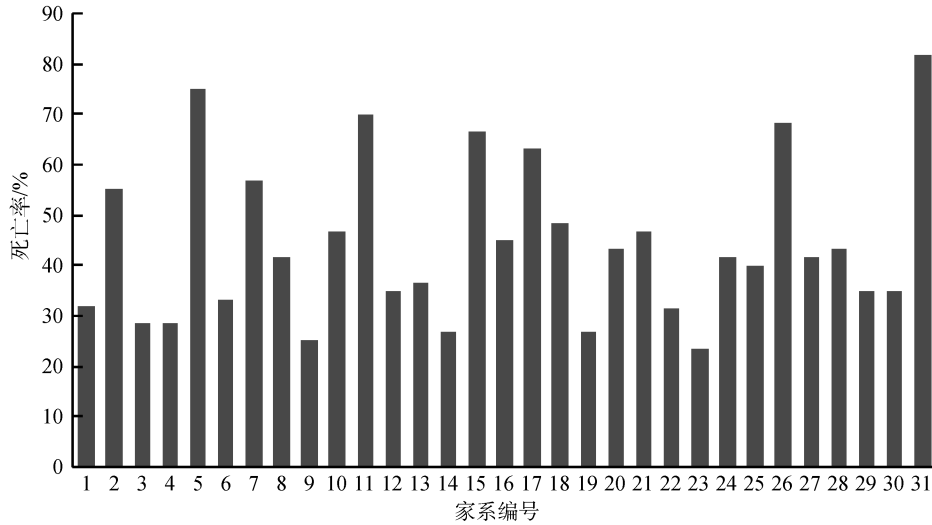


图 1 感染鳃弧菌后 31 个组的死亡率统计(图中 31 为对照组)

Fig. 1 Mortality of 31 groups after infection with *V. anguillarum* (31 served as the control group)

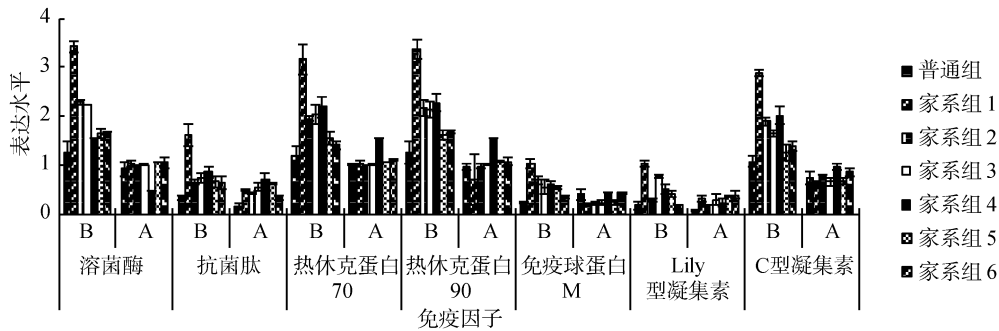


图 2 攻毒实验对大菱鲆肝脏 7 种免疫因子表达水平的影响

Fig. 2 The effects of infection experiment on the expression levels of seven immune-related genes in turbot livers

B. 攻毒前; A. 攻毒后(图 3、图 4 同)

B. before the challenge; A. after the challenge (same as in Fig. 3 and Fig. 4)

表 2 大菱鲆肝脏 7 种免疫因子灰度值测定结果

Tab. 2 Gray value measurement results of seven immune-related genes in turbot livers

免疫因子	普通组	家系组 1	家系组 2	家系组 3	家系组 4	家系组 5	家系组 6
溶菌酶	B 1.249±0.245 ^a A 0.915±0.155 ^b	3.421±0.111 ^d 1.033±0.060 ^{b*}	2.280±0.059 ^c 1.000±0.007 ^{b*}	2.226±0.006 ^c 1.003±0.007 ^b	1.543±0.013 ^b 0.461±0.005 ^{a*}	1.647±0.101 ^b 1.057±0.014 ^{b*}	1.679±0.009 ^b 1.041±0.120 ^{b*}
抗菌肽	B 0.331±0.058 ^a A 0.155±0.050 ^a	1.605±0.231 ^c 0.485±0.011 ^c	0.650±0.053 ^b 0.422±0.013 ^{bc*}	0.729±0.100 ^b 0.548±0.072 ^{cd}	0.851±0.105 ^b 0.689±0.152 ^c	0.657±0.121 ^b 0.624±0.019 ^{de*}	0.634±0.139 ^b 0.331±0.048 ^b
热激蛋白 70	B 1.189±0.190 ^a A 1.000±0.009 ^a	3.157±0.301 ^d 1.033±0.065 ^{ab}	1.946±0.054 ^c 1.000±0.001 ^a	2.021±0.192 ^c 1.003±0.009 ^{a*}	2.180±0.199 ^c 1.534±0.004 ^{d*}	1.555±0.135 ^b 1.064±0.006 ^{b*}	1.403±0.073 ^{ab} 1.112±0.009 ^c
热激蛋白 90	B 1.249±0.220 ^a A 0.970±0.060 ^{a*}	3.365±0.190 ^d 0.700±0.521 ^a	2.161±0.172 ^c 0.975±0.052 ^a	2.129±0.172 ^c 1.003±0.009 ^{a*}	2.273±0.183 ^c 1.543±0.014 ^b	1.606±0.098 ^b 1.068±0.012 ^a	1.662±0.032 ^b 1.073±0.066 ^a
免疫球蛋白 M	B 0.221±0.015 ^a A 0.392±0.120 ^{b*}	1.020±0.092 ^d 0.178±0.020 ^a	0.694±0.080 ^c 0.202±0.0355 ^a	0.547±0.142 ^b 0.215±0.051 ^a	0.601±0.059 ^{bc} 0.437±0.014 ^b	0.528±0.034 ^b 0.234±0.049 ^a	0.333±0.027 ^a 0.437±0.018 ^b
Lily-型凝集素	B 0.163±0.071 ^a A 0.060±0.009 ^a	1.024±0.071 ^f 0.304±0.070 ^{cd}	0.287±0.028 ^b 0.174±0.011 ^b	0.773±0.039 ^e 0.280±0.111 ^{bcd}	0.505±0.090 ^d 0.226±0.089 ^{bc}	0.399±0.068 ^c 0.350±0.017 ^{d*}	0.178±0.011 ^a 0.386±0.078 ^d
C-型凝集素	B 1.072±0.121 ^a A 0.731±0.120 ^{abc}	2.887±0.061 ^e 0.623±0.059 ^a	1.892±0.091 ^d 0.805±0.008 ^{bc}	1.638±0.073 ^c 0.651±0.081 ^a	2.015±0.182 ^d 0.963±0.061 ^d	1.257±0.170 ^{ab} 0.670±0.071 ^{ab}	1.376±0.088 ^b 0.855±0.078 ^{cd}

注: B. 攻毒前, A. 攻毒后。同行中, 标有不同小写字母者表示同种免疫因子相同实验阶段下不同组间差异显著($P<0.05$), 标有相同小写字母者表示组间差异不显著($P>0.05$); 标有“*”者表示该组在不同实验阶段下差异显著($P<0.05$), 没标“*”者表示该组在不同实验阶段下差异不显著($P>0.05$)(表 3, 表 4 同)

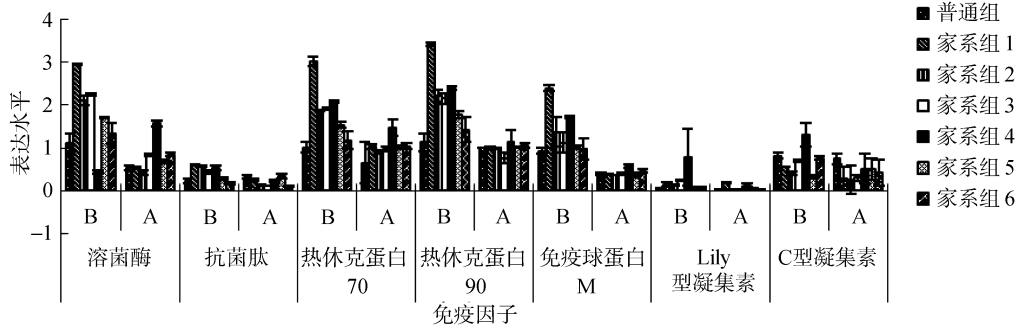


图 3 攻毒实验对大菱鲆脾脏 7 种免疫因子表达水平的影响

Fig. 3 The effects of infection experiment on the expression levels of seven immune-related genes in turbot spleens

表 3 大菱鲆幼鱼脾脏 7 种免疫因子灰度值测定结果

Tab. 3 Gray value measurement results of seven immune-related genes in turbot spleens

免疫因子		普通组	家系组 1	家系组 2	家系组 3	家系组 4	家系组 5	家系组 6
溶菌酶	B	1.124±0.218 ^b	2.957±0.025 ^c	2.107±0.115 ^d	2.251±0.039 ^d	0.431±0.029 ^a	1.715±0.017 ^c	1.328±0.252 ^b
	A	0.528±0.058 ^{b*}	0.530±0.017 ^b	0.417±0.067 ^a	0.831±0.028 ^d	1.572±0.059 ^e	0.679±0.051 ^c	0.846±0.030 ^{d*}
抗菌肽	B	0.230±0.049 ^b	0.587±0.012 ^c	0.575±0.015 ^{de}	0.429±0.039 ^c	0.517±0.055 ^d	0.284±0.036 ^b	0.164±0.019 ^a
	A	0.316±0.035 ^c	0.247±0.034 ^b	0.133±0.017 ^a	0.110±0.009 ^{a*}	0.232±0.033 ^b	0.337±0.047 ^c	0.101±0.018 ^a
热激蛋白 70	B	1.009±0.130 ^a	3.028±0.105 ^e	1.883±0.018 ^c	1.923±0.029 ^{cd}	2.084±0.018 ^d	1.545±0.073 ^b	1.175±0.214 ^a
	A	0.654±0.492 ^{a*}	1.026±0.057 ^a	0.898±0.050 ^a	0.972±0.058 ^a	1.463±0.190 ^{b*}	1.022±0.041 ^a	1.041±0.061 ^a
热激蛋白 90	B	1.130±0.213 ^a	3.439±0.041 ^e	2.220±0.130 ^d	2.155±0.125 ^d	2.402±0.041 ^d	1.780±0.077 ^c	1.431±0.299 ^b
	A	1.000±0.004 ^{b*}	0.982±0.033 ^b	0.987±0.008 ^b	0.761±0.120 ^a	1.144±0.278 ^{b*}	1.019±0.008 ^b	1.054±0.059 ^b
免疫球蛋白 M	B	0.923±0.069 ^a	2.405±0.075 ^d	1.377±0.356 ^b	1.118±0.233 ^{ab}	1.715±0.021 ^c	1.022±0.039 ^a	0.981±0.251 ^a
	A	0.393±0.038 ^a	0.378±0.005 ^{a*}	0.367±0.007 ^a	0.386±0.021 ^{a*}	0.574±0.039 ^c	0.363±0.047 ^a	0.452±0.037 ^{b*}
Lily-型凝集素	B	0.055±0.009 ^a	0.137±0.049 ^a	0.126±0.025 ^a	0.238±0.026 ^a	0.782±0.657 ^a	0.064±0.017 ^a	0.079±0.017 ^a
	A	0.021±0.004 ^a	0.186±0.010 ^{c*}	0.022±0.006 ^a	0.021±0.006 ^{a*}	0.126±0.033 ^{b*}	0.039±0.016 ^a	0.026±0.011 ^a
C-型凝集素	B	0.816±0.069 ^d	0.554±0.009 ^{bc}	0.406±0.049 ^{ab}	0.695±0.019 ^{cd}	1.305±0.267 ^e	0.330±0.037 ^a	0.763±0.051 ^d
	A	0.744±0.130 ^a	0.286±0.266 ^a	0.255±0.341 ^{a*}	0.294±0.071 ^a	0.511±0.346 ^{a*}	0.500±0.261 ^a	0.426±0.311 ^a

2.4 头肾攻毒前后各免疫因子的表达分析

应用 7 种免疫因子的特异性引物对头肾 cDNA 进行 PCR 扩增, 结果见图 4。应用 SPSS16.0 分别对各实验组头肾免疫因子攻毒前后的表达量进行方差分析及多重比较, 并用 *t* 检验分析免疫因子攻毒前后

的差异性, 结果见表 4。头肾中各免疫因子的表达量在攻毒后普遍呈现下降趋势; 无论攻毒前后, 6 个家系组的免疫因子表达量普遍高于普通组($P < 0.05$); 攻毒前, 7 个实验组免疫因子的表达量与其存活率相关关系不如肝脏与脾脏中明显。

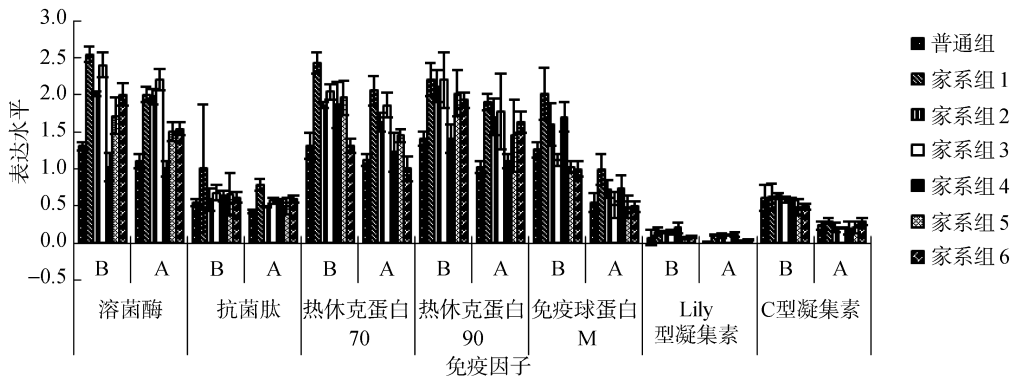


图 4 攻毒实验对大菱鲆头肾 7 种免疫因子表达水平的影响

Fig. 4 The effects of infection experiment on the expression levels of seven immune-related genes in turbot head kidneys

表 4 大菱鲃幼鱼头肾 7 种免疫因子灰度值测定结果

Tab. 4 Gray value measurement results of seven immune-related genes in turbot head kidneys

免疫因子	普通组	家系组 1	家系组 2	家系组 3	家系组 4	家系组 5	家系组 6	
溶菌酶	B	1.305±0.053 ^b	2.542±0.103 ^e	2.018±0.031 ^d	2.401±0.163 ^e	1.021±0.192 ^a	1.715±0.249 ^c	2.002±0.158 ^d
	A	1.108±0.096 ^{a*}	2.001±0.098 ^{c*}	1.972±0.098 ^c	2.200±0.145 ^d	1.001±0.103 ^a	1.498±0.132 ^b	1.536±0.089 ^{b*}
抗菌肽	B	0.543±0.053 ^a	1.002±0.865 ^b	0.583±0.144 ^a	0.677±0.103 ^a	0.631±0.073 ^a	0.654±0.292 ^a	0.610±0.0751 ^a
	A	0.423±0.021 ^{a*}	0.785±0.078 ^{c*}	0.488±0.012 ^{ab}	0.571±0.037 ^b	0.567±0.031 ^b	0.496±0.111 ^{ab}	0.592±0.043 ^b
热激蛋白 70	B	1.308±0.178 ^a	2.427±0.140 ^c	1.857±0.041 ^b	2.035±0.096 ^b	1.860±0.312 ^b	1.956±0.230 ^b	1.310±0.098 ^a
	A	1.112±0.080 ^a	2.056±0.200 ^e	1.623±0.128 ^{cd*}	1.857±0.166 ^{de}	1.225±0.267 ^{ab}	1.446±0.092 ^{bc*}	1.001±0.165 ^{a*}
热激蛋白 90	B	1.401±0.095 ^a	2.203±0.228 ^b	2.109±0.214 ^b	2.197±0.371 ^b	1.399±0.190 ^a	2.012±0.311 ^b	1.924±0.097 ^b
	A	1.020±0.082 ^{a*}	1.899±0.117 ^c	1.697±0.246 ^c	1.770±0.505 ^c	1.105±0.099 ^{ab}	1.444±0.482 ^{abc}	1.632±0.1445 ^{bc}
免疫球蛋白 M	B	1.257±0.107 ^{ab}	2.011±0.356 ^d	1.600±0.286 ^{bc}	1.117±0.086 ^a	1.699±0.194 ^c	1.023±0.081 ^{ad}	0.997±0.111 ^a
	A	0.543±0.127 ^{a*}	0.996±0.208 ^{c*}	0.725±0.126 ^{ac*}	0.511±0.177 ^{a*}	0.736±0.177 ^{ac*}	0.485±0.152 ^{a*}	0.488±0.074 ^{a*}
Lily-型凝集素	B	0.066±0.104 ^a	0.147±0.055 ^{bc}	0.137±0.017 ^{bc}	0.145±0.028 ^{bc}	0.200±0.066 ^c	0.065±0.017 ^a	0.080±0.010 ^{ab}
	A	0.019±0.005 ^{a*}	0.105±0.009 ^b	0.095±0.032 ^b	0.102±0.009 ^b	0.113±0.038 ^b	0.028±0.009 ^{a*}	0.043±0.011 ^{a*}
C-型凝集素	B	0.605±0.170 ^a	0.621±0.181 ^a	0.632±0.037 ^a	0.584±0.042 ^a	0.590±0.017 ^a	0.478±0.105 ^a	0.489±0.039 ^a
	A	0.232±0.051 ^{a*}	0.288±0.040 ^{a*}	0.215±0.064 ^{a*}	0.203±0.011 ^{a*}	0.199±0.095 ^{a*}	0.208±0.080 ^{a*}	0.290±0.046 ^{a*}

2.5 攻毒前 7 种免疫因子表达量与存活率的相关性分析

将各实验组肝脏、脾脏和头肾中 7 种免疫因子攻毒前的表达量与攻毒后的存活率(存活率=1-死亡率)进行相关性分析,如表 5 所示。肝脏中,溶菌酶(Lysozyme)、免疫球蛋白 M(IgM)的表达量与存活率为极显著性正相关($P < 0.01$),热休克蛋白 70(HSP70)、

热休克蛋白 90(HSP90)、C-型凝集素(C-type lectin)、Lily-型凝集素(Lily-type lectin)的表达量与其为显著性正相关($P < 0.05$);脾脏中,抗菌肽(Hepcidin)、热激蛋白 70(HSP70)和热激蛋白 90(HSP90)的表达量与存活率为极显著正相关($P < 0.01$);头肾中热休克蛋白 70(HSP90)的表达量与存活率为显著正相关($P < 0.05$)。

表 5 大菱鲃肝脏、脾脏和头肾的 7 种免疫因子攻毒前的表达量与存活率的相关性分析

Tab. 5 Correlation analysis between seven immune-related genes before infection in turbot liver, spleen, and head kidney with survival rates

	溶菌酶	抗菌肽	热激蛋白 70	热激蛋白 90	免疫球蛋白 M	Lily-型凝集素	C-型凝集素
(肝脏)Pearson 相关系数	0.885	0.730	0.862	0.870	0.911	0.758	0.843
(肝脏) P 值 Sig. (2-tailed)	0.008**	0.063	0.013*	0.011*	0.004**	0.048*	0.017*
(脾脏)Pearson 相关系数	0.732	0.906	0.880	0.884	0.735	0.115	-0.283
(脾脏) P 值 Sig. (2-tailed)	0.062	0.005**	0.009**	0.008**	0.060	0.806	0.539
(头肾)Pearson 相关系数	0.645	0.659	0.852	0.661	0.690	0.646	0.593
(头肾) P 值 Sig. (2-tailed)	0.118	0.108	0.015*	0.106	0.086	0.117	0.161

注: 显著相关($P < 0.05$); **, 极显著相关($P < 0.01$)

3 讨论与小结

非特异性免疫系统是动物抵御外界病原体侵染的重要防线,鱼类作为较低等的脊椎动物,相对于哺乳动物而言,其特异性免疫系统机制还处于较原始的状态,因此在抵抗入侵病原微生物生理反应中,鱼类的非特异性免疫防御系统所承担的角色显得更为关键^[18-19]。鱼类的肝脏、脾脏和头肾都是合成免

疫因子的重要器官,加之溶菌酶、抗菌肽、热激蛋白 70、热激蛋白 90、IgM、C-型凝集素、Lily-型凝集素 7 种重要的免疫因子在鱼体抵抗感染性致病菌的最前沿防御机制中起着至关重要的作用。因此,分析各重要免疫因子在肝脏、脾脏和头肾组织中的表达情况,可以在一定程度上对机体的抗病力进行判断。

本研究立足于前人经验,应用 Duncan 多重比较死亡率,选取 6 个 F_2 家系和 1 个普通群体,采用

RT-PCR 手段对它们肝脏、脾脏和头肾的 7 种免疫因子展开研究, 分析攻毒前肝脏、脾脏和头肾中相关免疫因子的表达量与攻毒后存活率之间的相关性, 分析结果讨论如下:

攻毒后, 各家系的死亡率均低于普通养殖群体, 30 个家系中有 27 个家系的累积死亡率显著低于非选育群体 ($P < 0.05$)。说明 F_2 选育家系在抗鳃弧菌方面优于普通养殖群体。

肝脏、脾脏与头肾中, 无论攻毒前后, 6 个家系组肝脏、脾脏、头肾中 7 个免疫因子的表达量普遍高于普通组, 见表 2、表 3、表 4。这表明, 免疫因子在家系组的重要免疫器官中的表达能力优于普通组, 初步判定选育家系 F_2 的抗鳃弧菌性能优于普通养殖群体。

在肝脏、脾脏和头肾中, 对比攻毒前后多组免疫因子的表达量出现了显著差异, 作者推测这些免疫因子在鳃弧菌感染鱼体的过程中, 发挥了重要的抗感染作用。然而, 各免疫因子在攻毒后, 表达量出现下降趋势, 与之前部分学者得出的上升趋势的结论不完全一致^[20-24]。如强俊等^[20]对“吉富”、“新吉富”、“埃及尼罗”3 种不同品系的尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 进行高密度胁迫发现, 应激 48 h 内, 吉富罗非鱼 (Jifu *Oreochromis niloticus*) 与新吉富罗非鱼 (New Jifu *Oreochromis niloticus*) 溶菌酶活力水平以及肝脏 HSP70 mRNA 水平呈先上升后下降的变化, 埃及尼罗罗非鱼 (Egypt *Oreochromis niloticus*) 血清溶菌酶活力与肝脏 HSP70 mRNA 水平在应激后 48 h 内始终高于应激前 ($P < 0.05$)。作者认为是由于取样时间不同造成的。之前的研究均在攻毒实验后的第 24、48 小时等时间点取样, 本实验目的是对各家系的抗性性能进行分析, 筛选出抗鳃弧菌性能较强的家系, 为今后的抗性选育工作提供理论依据, 因此在实验设计中, 模拟养殖环境, 避免取样后鱼缸中密度变化造成实验误差, 在实验结束即攻毒后第 15 天取样, 该时间点可能不在各免疫因子表达量增加的阶段, 而正好处于免疫因子表达下降阶段。

对比表 2、表 3、表 4, 肝脏、脾脏和头肾中, 相同实验组在攻毒前后, 表达量出现显著性差异的免疫因子并不一致。作者推测, 这 3 种不同的免疫器官, 在抗鳃弧菌时, 其免疫应答机理不同, 当外源病毒感染鱼体时, 3 个器官起免疫主导作用的免疫因子不同。

分析免疫因子攻毒前表达量与存活率之间的相关性发现, 肝脏中, Lysozyme、IgM 的表达量与存活率为极显著性正相关 ($P < 0.01$), HSP70、HSP90、C-type lectin、Lily-type lectin 的表达量与其为显著性

正相关 ($P < 0.05$); 脾脏中, Hspcidin、HSP70 和 HSP90 的表达量与存活率为极显著正相关 ($P < 0.01$); 头肾中 HSP70 的表达量与存活率为显著正相关 ($P < 0.05$)。作者将得出的与存活率成显著或者极显著正相关的免疫因子作为可靠的免疫指标, 对今后大菱鲆高成活率育种工作提供指导。以这些指标为依据, 作者对 6 个家系组攻毒前各免疫因子的表达量进行分析, 如表 2、表 3、表 4。攻毒前, 家系组 1 的肝脏、脾脏、头肾中, 与存活率显著相关的免疫因子表达量均最高, 其对应的存活率为 75.00%, 从而可以判断该家系组在抗鳃弧菌方面相对于其他选育家系有较强的优势, 其对应的家系号为 23。今后在抗鳃弧菌品种的选育过程中, 可以选取此家系为亲本继续构建, 也可取其存活个体进行抗鳃弧菌分子标记的筛选工作等。

通过本实验, 可以推测 F_2 相对于普通养殖群体大菱鲆, 在抗鳃弧菌方面具有一定的优势, 得到一个抗鳃弧菌性能较好的家系 23 号, 而且以上 7 种非特异免疫因子在鳃弧菌感染鱼体的过程中, 发挥重要的抗感染作用。得出了一些与存活率成显著或者极显著正相关的免疫因子, 可作为可靠的免疫指标, 指导大菱鲆高成活率育种工作。

参考文献:

- [1] Blanquer A, Alayse J P. Allozyme variation in turbot (*Psetta maxima*) and brill (*ScoPhthalmus rhombus*) (Osteichthyes, Pleuronectiformes, ScoPhthalmidae) throughout their range in Europe[J]. *Fish Biology*, 1992, 41(5): 725-736.
- [2] 雷霖霖, 刘新富, 关长涛. 中国大菱鲆养殖 20 年成就和展望——庆祝大菱鲆引进中国 20 周年[J]. *渔业科学进展*, 2012, 33(4): 123-130.
Lei Jilin, Liu Xinfu, Guan Changtao. Turbot culture in China for two decades: Achievements and prospect[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(4): 123-130.
- [3] 申雪艳, 宫庆礼, 雷霖霖, 等. 进口大菱鲆 *Scophthalmus maximus* L. 苗种的遗传结构分析[J]. *海洋与湖沼*, 2004, 35(4): 332-341.
Shen Xueyan, Gong Qingli, Lei Jilin, et al. Population genetic structure analysis of the imported turbot seedlings *scophthalmus maximus* L. using RAPD and microsatellite technique[J]. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2004, 35(4): 332-341.
- [4] 雷霖霖, 马爱军, 陈超, 等. 大菱鲆 (*Scophthalmus maximus* L.) 养殖现状与可持续发展[J]. *中国工程科学*, 2005, 7(5): 30-34.
Lei Jilin, Ma Aijun, Chen Chao, et al. The present status and sustainable development of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) culture in China[J]. *Engineering Science*,

- 2005, 7(5): 30-34.
- [5] 秦蕾, 王印庚, 阎斌伦. 大菱鲂微生物性疾病研究进展[J]. 水产科学, 2008, 27(11): 598-602.
Qin Lei, Wang Yingeng, Yan Binlun. Advances in research on diseases of turbot *Scophthalmus maximus* affected by microorganisms[J]. Fisheries Science, 2008, 27(11): 598-602.
- [6] 马爱军, 王新安, 雷霖霖. 大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)不同生长阶段体重的遗传参数和育种值估计[J]. 海洋与湖沼, 2010, 40(2): 187-194.
Ma Aijun, Wang Xin'an, Lei Jilin. Genetic parameterization for turbot *scophthalmus maximus*: implication to breeding strategy[J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2009, 40(2): 187-194.
- [7] 马爱军, 王新安, 薛宝贵, 等. 大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)选育家系的构建和培育技术研究[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(3): 301-306.
Ma Aijun, Wang Xin'an, Xue Baogui, et al. Investigation on family construction and rearing techniques for turbot (*scophthalmus maximus* L.) family selection[J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2010, 41(3): 301-306.
- [8] 马爱军, 王新安, 黄智慧, 等. 大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)家系选育 F₂ 早期选择反应和现实遗传力估计[J]. 海洋与湖沼, 2012, 43(1): 57-61.
Ma Aijun, Wang Xin'an, Huang Zhihui, et al. Response to selection and realized heritability for early growth in the second-generation bred line of turbot (*scophthalmus maximus* L.)[J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2012, 43(1): 57-61.
- [9] Liang X M, Ma A J, Wang X A, et al. Morphological comparison between a selected fast-growing strain and the common cultured strain of turbot *Scophthalmus maximus*[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2012, 30(4): 563-568.
- [10] 马爱军, 黄智慧, 王新安, 等. 大菱鲂耐高温品系选育及耐温性能评估[J]. 海洋与湖沼, 2012, 43(4): 797-804.
Ma Aijun, Huang Zhihui, Wang Xin'an, et al. The selective breeding of thermal tolerance family and appraisal of performance in turbot *scophthalmus maximus*[J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2012, 43(4): 797-804.
- [11] 周丽, 战文斌, 宋微波, 等. 指状拟舟虫诱导牙鲆抗血清免疫球蛋白分析[J]. 中国水产科学, 2000, 7(2): 28-31.
Zhou Li, Zhan Wenbin, Song Weibo, et al. Analysis of immunoglobulin M (IgM) in serum of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. Journal of Fisheryences of China, 2000, 7(2): 28-31.
- [12] Shike H, Lauth X, Westerman M E, et al. Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge[J]. European Journal of Biochemistry, 2002, 269(8): 2232-2237.
- [13] Shike H, Shimizu C, Lauth X, et al. Organization and expression analysis of the zebrafish hepcidin gene, an antimicrobial peptide gene conserved among vertebrates[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2004, 28(7-8): 747-754.
- [14] 林天势, 薛良义, 孙爱飞, 等. 温度和病原菌感染对大黄鱼热激蛋白 90 基因表达的影响[J]. 中国细胞生物学学报, 2012, 34(6): 555-564.
Lin Tianshi, Xue Liangyi, Sun Aifei, et al. Effect of temperature and pathogen on HSP90 expression in *Larimichthys crocea*[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2012, 34(6): 555-564.
- [15] 陈松林, 田永胜, 徐田军, 等. 牙鲆抗病群体和家系的建立及其生长和抗病性能初步测定[J]. 水产学报, 2008, 32(5): 665-673.
Chen Songlin, Tian Yongsheng, Xu Tianjun, et al. Development and characterization for growth rate and disease resistance of disease-resistance population and family in Japanese flounder(*Paralichthys olivaceus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(5): 665-673.
- [16] 莫照兰, 徐永立, 张培军. 养殖牙鲆鳃弧菌疫苗的研究[J]. 海洋科学, 2002, 26(4): 63-66.
Mo Zhaolan, Xu Yongli, Zhang Peijun. Vaccination against *vibrio anguillarum* on cultured flounder, *paralichthys olivaceus*[J]. Marine Sciences, 2002, 26(4): 63-66.
- [17] 马爱军, 郭建丽, 王新安, 等. 大菱鲂选育家系抗鳃弧菌性能[J]. 中国水产科学, 2014, 21(3): 484-493.
Ma Aijun, Guo Jianli, Wang Xin'an, et al. Family selection and estimation of disease resistance in turbot, *Scophthalmus maximus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(3): 484-493.
- [18] Bergljót M. Innate immunity of fish (overview)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 20(2): 137-151.
- [19] 佟雪红, 徐世宏, 刘清华, 等. 大菱鲂早期发育过程中免疫器官的发生[J]. 海洋科学, 2011, 35(6): 62-67.
Tong Xuehong, Xu Shihong, Liu Qinghua, et al. Ontogeny of immune organs during early developmental stages of turbot[J]. Marine Sciences, 2011, 35(6): 62-67.
- [20] 强俊, 杨弘, 何杰, 等. 3 种品系尼罗罗非鱼生长及高密度胁迫后生理响应变化的比较[J]. 中国水产科学, 2014, 21(1): 142-152.
Qiang Jun, Yang Hong, He Jie, et al. Comparison on growth performance in three different strains of *Nile tilapia* and physiological responses after short-term high stocking density stress[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(1): 142-152.
- [21] 万文菊, 王纪亭, 石存斌, 等. 溶藻弧菌感染对剑尾鱼 HSP70 基因表达的影响[J]. 大连水产学院学报, 2007, 22(5): 330-334.
Wan Wenju, Wang Jiting, Shi Cunbin, et al. Gene expression of HSP70 in green swordtail *Xiphophorus helleri* exposed to *Vibrio alginolyticus*[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2007, 22(5): 330-334.
- [22] 魏然, 张士瑾, 王长法, 等. 盐度多牙鲆非特异性免疫功能的影响[J]. 海洋科学进展, 2003, 21(2): 209-213.

- Wei Ran, Zhang Shicui, Wang Changfa, et al. Effects of changes in salinity on nonspecific immune function of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. *Advances in Marine Science*, 2003, 21(2): 209-213.
- [23] 刘波, 王美垚, 谢骏, 等. 低温应激对吉富罗非鱼血清生化指标及肝脏 HSP70 基因表达的影响[J]. *生态学报*, 2011, 31(17): 4866-4873.
- Liu Bo, Wang Meiyao, Xie Jun, et al. Effects of acute cold stress on serum biochemical and immune parameters and liver HSP70 gene expression in GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(17): 4866-4873.
- [24] 刘洪展, 郑风荣, 孙修勤, 等. 氨氮胁迫对刺参几种免疫酶活性的影响[J]. *海洋科学*, 2012, 36(8): 47-52.
- Liu Hongzhan, Zheng Fengrong, Sun Xiuqin, et al. Effect of exposure to ammonia nitrogen stress on immune enzyme of holothurian *Apostichopus japonicus*[J]. *Marine Sciences*, 2012, 36(8): 47-52.

Analysis of seven immune-related genes in selective second filial families (F₂) of turbot (*Scophthalmus maximus*)

TIAN Yue-qiang^{1,2}, GUO Jian-li¹, HUANG Zhi-hui^{1,3}, MA Ai-jun^{1,3}, WANG Xin-an^{1,3}, YANG Zhi⁴, QU Jiang-bo⁴

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Qingdao 266071, China; 2. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China; 4. Yantai Tianyuan Aquatic Limited Corporation, Yantai 264003, China)

Received: Mar. 5, 2015

Key words: *Scophthalmus maximus*; *Vibrio anguillarum*; selective second filial families; immune-related gene; RT-PCR

Abstract: For breeding turbot group with high survival rates and resistance to *Vibrio anguillarum*, 30 selective second filial families (F₂) with a high survival rate and one common culture group of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) were infected with *V. anguillarum*. Six F₂ and one control groups were picked out as samples for detecting the following immune responses. Gene expressions of seven immune-related factors (lysozyme, HSP90, HSP70, IgM, hepcidin, C-type lectin, and lily-type lectin) were analyzed in turbot livers, spleens, and head kidneys using RT-PCR. Correlation analysis between the expression of these immune genes before infection and survival rate after challenge assays (period of 14 days) was carried out using SPSS 16.0 software. Results showed that regardless of samples infected with *V. anguillarum*, the expression of immune-related genes in the six F₂ populations was generally stronger than that in the control and the expression status of most immune genes was higher in the seven experimental groups without *Vibrio* stress than in the injected groups. The expression of the remaining six immune genes, except hepcidin, before *Vibrio* infection showed a significantly positive correlation with survival rate in livers ($P < 0.05$) and the gene expression of lysozyme and IgM exhibited a highly significant positive correlation ($P < 0.01$). Gene expressions of hepcidin, HSP70, and HSP90 showed a highly significant positive correlation with survival rate in spleens ($P < 0.01$); the expression of HSP70 exhibited a significant positive correlation with survival rate in head kidneys ($P < 0.05$). Therefore, F₂ selective families with a high survival rate could possess an outstanding resistance against *V. anguillarum* and the seven immune-related genes could play important roles in bacterial resistance of turbot. We obtained a selective family (No. 23) with a strong resistance against *V. anguillarum*, which could guide selection of turbot strains with disease-resistance trait in the future and provide a reference and theoretical basis for turbot breeding.

(本文编辑: 谭雪静)