

陈继楚,陈成勋,王晓梅,等. 草鱼免疫基因研究进展[J]. 江苏农业科学,2020,48(2):46-51.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.02.008

草鱼免疫基因研究进展

陈继楚¹, 陈成勋¹, 王晓梅¹, 樊振中², 刘春玲², 任光岷², 孙少起³, 王满江⁴

(1. 天津农学院水产学院/天津市水产生态与养殖实验室, 天津 300384; 2. 天津市西青区水产技术推广站, 天津 300380;

3. 天津市凯润淡水养殖有限公司, 天津 300385; 4. 天津市益利来养殖有限公司, 天津 300384)

摘要:鱼类疾病抵抗力与健康养殖及可持续发展密切相关,而免疫系统在鱼类的疾病防御及其免疫调控中发挥着重要作用。大量研究表明,通过各类免疫因子及其相关通路来调节免疫系统,可以达到有效对抗各类外源性微生物的目的。本文从基因表达变化角度对草鱼部分免疫相关因子及相关调控因子,对草鱼免疫基因研究进展进行概述。

关键词:草鱼;免疫因子;Toll 样受体;免疫系统;疾病病害;健康养殖;可持续发展

中图分类号: S965.112;S917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)02-0046-06

鱼类免疫系统包括特异性免疫和非特异性免疫,在系统发育上,特异性免疫比非特异性免疫形成晚,在自身对病原微生物抵抗的过程中,非特异性免疫系统发挥了更大的作用^[1]。非特异性免疫与生俱来,在面对入侵性外源微生物时反应迅速,如免疫细胞保护机体的过程中,凝集素、调理素、溶菌酶和补体等可以辅助其进行识别、黏附及共价结合,细胞膜上的 Toll 样受体等通过识别病原微生物相应的膜蛋白和脂多糖等,向下游的相关蛋白及蛋白激酶等传递信号,最终使细胞产生白细胞介素、干扰素、肿瘤坏死因子、转生长因子等非特异性免疫因子,进行稳定且迅速地排斥异己、清除和杀灭病原微生物^[2]。在特异免疫反应中,外源微生物入侵后,部分未被非特异性免疫系统处理的胞外抗原、各种抗原呈递细胞处理后的产物,机体通过激活特异性免疫系统,由此产生对应的免疫球蛋白来

进行特异性清除^[3-4]。

鱼类免疫系统的正常运行都依赖各类免疫基因的表达、转录及各种相关通路的调控,通过研究不同条件下机体各组织差异基因的时序表达,可进一步验证免疫基因及其表达的信号因子与各类疾病的相关性,从而为鱼类疾病防治及免疫方向的研究奠定基础^[5-6]。

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)是我国传统养殖的四大家鱼之一,一直以来作为国内淡水养殖的主要品种,具有生长快、饲料成本低、蛋白利用率高等优点^[1],但草鱼的抗病力较差、成活率低、养殖过程中易患草鱼出血病、烂鳃病、赤皮病和肠炎病等,疾病频发在一定程度上不仅对生产养殖造成了较为严重的损失,也制约了草鱼的健康养殖和可持续发展。在对疾病防治进行探索的过程中,除加强日常管理与提高养殖技术外,还可通过研究鱼体免疫系统,了解机体自身的免疫功能,增强抗病防御能力^[2]。疾病病害已经长期制约了草鱼的健康养殖,使得免疫防治及疾病方向的研究也逐渐受到各方学者重视,因此针对免疫相关因子的研究也具有重要的现实意义。迄今为止,有关草鱼抗病防御机制的研究已有诸多报道,部分免疫相关基因的序列被

收稿日期:2018-10-13

基金项目:天津市科技计划(编号:16ZXZYNC00090)。

作者简介:陈继楚(1993—),女,湖北武汉人,硕士研究生,主要从事水产增养殖研究。E-mail:865616952@qq.com。

通信作者:陈成勋,研究员,主要从事水产增养殖研究。E-mail:ccxnxy@163.com。

制研究——基于参与主体之间的博弈分析[J]. 上海经济研究, 2014(5):66-74.

[7]李磊,周昇昇. 中国食品安全信息交流平台的建立现状分析[J]. 食品工业,2011(12):78-82.

[8]刘任重. 食品安全规制的重复博弈分析[J]. 中国软科学,2011(9):167-171.

[9]靳明,郑少锋. 我国绿色农产品市场中的博弈行为分析[J].

财贸经济,2006(6):38-41.

[10]韩正清. 农产品绿色营销的博弈模型分析[J]. 生态经济,2005(7):46-49.

[11]武永春,文启湘. 绿色营销的博弈分析[J]. 经济管理,2004(5):79-82.

[12]魏明侠. 绿色营销的真实性选择:企业和消费者间的博弈[J]. 中国地质大学学报(社会科学版),2002,2(2):40-43.

克隆,不同条件下基因表达谱及相关免疫调控产物等均进行了部分研究^[7-8],本文对草鱼部分免疫因子的基因表达研究进行概述,旨在为草鱼的疾病防治提供参考。

1 Toll 样受体 TLRs

Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)是一类重要的参与机体非特异性免疫的相关非催化性蛋白。它可以识别来源于微生物的具有保守结构的分子,部分未被识别的外源微生物及激活机体产生免疫应答反应;Toll 样受体也是连接非特异性免疫和特异性免疫的桥梁^[9]。至今在硬骨鱼类中已经发现了 17 种 TLR 基因(T1、2、3、4、5、7、8、9、13、14、18、19、20、21、22、23、27),其中 TLR(13、14、19、20、21、22、23)为鱼类所特有^[10-11]。哺乳类的 TLR4 可识别 LPS,但鱼类的 TLR4 不具有识别 LPS 的功能且目前仅在部分鲤科鱼类中被鉴定到^[10]。

目前,已研究的草鱼 TLR 基因相关报道中,杨春荣等发现健康草鱼的 TLR9 基因在血、脑、眼、鳃、脾、肌肉、皮肤、肝胰脏、头肾、中肾、鳃、肠和心脏组织均有所表达,在鳃组织中表达量最高,血和头肾表达量次之^[12]。黄吉文应用嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)感染草鱼后,转录组分析发现 20 种 TLR 基因,即 TLR(1、2、3、4、2.4、3、4.4、5a、5b、7、8a、8b、9、13、18、20.1、20.2、21、22、25、27);脾脏转录组分析显示感染后 72 h 内,14 个基因表达无差异,有 6 个 TLR 基因显著上调,即 TLR(5a、5b、20.2、21、22、27),其中 TLR(5a、5b)和 TLR20.2 在感染 48 h 上调最为显著且呈现先升后降的趋势,TLR21 在感染 72 h 上调最为显著,TLR(22、27)在感染 12 h 上调最为显著;TLR27 基因为草鱼中首次发现,其目前仍未被明确按结构域归类确定其所属 TLR 亚家族。通过体外诱导刺激草鱼 CIK 细胞系,经鼠伤寒沙门菌的鞭毛蛋白(FLA-ST, flagellin from *Salmonella typhimurium*)、脂多糖 LPS, (lipopolysaccharide) 及聚肌苷酸 [Poly(I:C), polyinosine-polycytidylic acid] 诱导后发现 TLR18 基因表达量均呈现先升高后降低的趋势;经 LPS 及 Poly(I:C) 诱导后 TLR20.2 基因表达量呈现先升后降趋势,经 FLA-ST 诱导后呈现先降后升再恢复正常的趋势;TLR21 基因表达量经 LPS 及 FLA-ST 诱导后显著先升后降趋势^[13]。草鱼感染柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare*)后发现,7 d 内 TLR3、

TLR7、TLR 22 3 种基因的表达量均呈现不同程度的显著上调变化^[14]。

杨春荣等使用草鱼出血病呼肠孤病毒 GCRV (reovirus of grass carp)感染草鱼后 120 h,发现 24 h 时肝胰脏中 TLR3 基因表达量显著高于正常水平,48 h 时恢复至正常水平^[15-16]。李青梅使用 GCRV 攻毒草鱼后 72 h,其中肾组织中 TLR3 基因表达量 6~72 h 内持续显著上调;TLR7 基因的表达量在 12~72 h 内持续显著上调;TLR22 基因表达量在 72 h 内持续显著上调^[17]。王文静研究了经 GCRV 诱导后 1~7 d 的草鱼发现,其肝胰脏中 TLR18 基因在 4 h 显著上调,脾脏中 3 d 内表达水平显著上调后 7 d 显著下降,TLR20 基因在肝胰脏中显著下调,在脾脏中显著下调 4 h 后上调至高表达水平,在鳃和肾脏中表达水平较高,TLR21 基因在肝胰脏和脾脏中的表达量显著下调;经嗜水气单胞菌诱导后 1~7 d,TLR18 在肝胰脏中表达水平呈现抑制,在脾脏中诱导 4 h 和 7 d 2 个时间点呈现抑制状态,TLR20 基因在肝胰脏中 4 h 内迅速上升后开始下降,在脾脏中 3 d 内逐渐上升后至 7 d 显著被抑制,而在肾脏和鳃中表达水平相对较高,TLR21 基因在肝胰脏和脾脏中的表达量显著上调^[18]。草鱼感染 GCRV 后,发现其脾脏和头肾组织中的 TLR8 基因呈现先抑制再上调后恢复正常水平的趋势,陈晓慧对比斑马鱼(*Barchydanio rerio* var.)及虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)相关基因序列,成功检测并克隆到草鱼的 TLR8 序列,之后分析鱼体感染嗜水气单胞菌 72 h 内不同时间点 TLR8 基因的情况,发现脾脏中 TLR8 基因呈现 6 h 内先下调后 12~24 h 上升至顶峰,72 h 恢复正常的趋势^[14]。

张小平通过在养殖水体中投放枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)及施氏假单胞菌(*Pseudomonas*)的复合菌微生态制剂,发现 15 d 后草鱼肝胰脏中 TLR3、TLR7 基因表达量显著提升;肠黏膜中 TLR3 基因表达量升高,TLR7 基因表达量降低^[19]。徐晓雁使用嗜水气单胞菌感染草鱼后经发现 0~7 d 内,TLR4 基因的表达量在脾脏中持续上升,在肾脏中表达量则无显著性差异;TLR5 基因的表达量在脾脏和肾脏中均呈现先降低后升高的趋势^[11]。李雪吟使用不同浓度赖氨酸饲料饲喂草鱼 56 d 后,使用 LPS 处理草鱼肠道上皮细胞,经研究发现 TLR3、TLR4 的表达水平均显著上调^[20]。

2 髓样分化因子

髓样分化因子(myeloid differentiation factor 88, MyD88)是依赖于 *MyD88* 的 TLR 信号通路中的关键接头分子,在传递上游信息中具有重要的作用^[21]。鱼类相关研究中,最初在斑马鱼中鉴定到 *MyD88* 并克隆,其与人、小鼠、非洲爪蟾具有较高的同源性^[22]。在多种组织器官中均有表达,在肠、脾及肝胰脏中表达量为相对较高^[23]。目前,已有不少学者对草鱼的该基因做过相关研究,董捷发现,GCRV 感染草鱼后 120 h,其肌肉、皮肤、肝胰脏、头肾、中肾、鳃、肠、脾脏和心脏等组织中 *MyD88* 基因表达量均有不同比例上调,其中肝胰脏中 *MyD88* 基因表达量呈现先升,至 72 h 后降,120 h 再升高趋势,脾脏中表达量在 24 h 时升到最高值后开始下降,72 h 下降至正常水平,120 h 时再次上调^[24]。陈晓慧使用 GCRV 刺激草鱼后,发现脾组织和中肾组织中 *MyD88* 基因的表达量在 24 h 内显著上调^[14]。李青梅使用 GCRV 攻毒草鱼后 72 h 内,发现中肾中 *MyD88* 基因表达量在 0~6 h 内先降低后升高,12 h 达到最大表达量后开始降低,72 h 恢复正常水平无显著差异^[17]。李雪吟使用不同浓度赖氨酸饲料饲喂草鱼 56 d,再 LPS 处理草鱼肠道上皮细胞后,经研究发现 *MyD88* 表达水平显著上调^[20]。

3 肿瘤坏死因子和白细胞介素

Toll 样受体介导的信号通路下游常见免疫相关因子中,通过 NF- κ B 经典信号通路进行活化后信号传递,所产生的肿瘤坏死因子及白细胞介素,是两大类重要的促炎症因子及免疫调节相关分子。

肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)是一种可以由多种免疫细胞产生的小分子蛋白质,具有杀伤肿瘤细胞、进行免疫调节和诱导白细胞迁移、分化、增殖及凋亡等功能,主要通过其基因表达形成受体及一系列相关因子发挥功能^[25]。使用 LPS 体外刺激处理草鱼 120 h 内,12 h 时脾脏组织中 *TNF- α* 基因表达水平出现明显的上调^[26-27]。吴宗凡使用不同浓度的对羟基苯乙酰胺(4-hydroxybenzeneacetamide)和环(甘氨酸-脯氨酸)二肽刺激草鱼 CIK 肾细胞,分析后发现 24 h 内 *TNF- α* 基因表达量显著上调^[28]。吴春燕等在草鱼的高脂饲料中添加不同浓度的景天科中草药植物垂盆草(*Sedum sarmentosum*)水提取物,连续投喂饲

料 42 d 后发现,1 200 mg/kg 剂量组肝胰脏中 *TNF- α* 基因表达量显著低于同期的高脂组^[23]。

白细胞介素(interleukin, IL)是一类由淋巴细胞、单核细胞等免疫细胞产生的重要细胞因子,其在维持机体免疫功能和炎症反应过程中发挥极其重要的作用。系统发育分析已经证明,IL-1 家族的有限几种成员和受体在硬骨鱼类中存在直系同源物。IL-1 是早期促炎症反应细胞因子中枢性的一个并诱导级联效应,通过上调或下调其他细胞因子来间接地介导,最终导致炎症反应^[29]。目前,学者们已经在 13 种硬骨鱼类中发现并鉴定了 IL-1 β 因子的基因表达,它通过刺激 T 细胞来调节免疫,类似于哺乳动物中 IL-1 β 的作用。而硬骨鱼类的 IL-1 β 又区别于蛙类、鸟类及哺乳动物的 IL-1 β ^[30]。使用嗜水气单胞菌感染草鱼后发现,其肠道中的 7 个白细胞介素相关基因(*IL-10*、*IL-10R α* 、*IL-10R β* 、*IL-2RG*、*IL-17R*、*IL-22*、*IL-23*)在致炎 1 d 后表达量上调至最高水平;*IL-12p40*、*IL-12R β 2* 基因在 3 d 上调至最高;*IL-23R*、*IL-6* 基因则在致炎后 3 d 显著上调,而 IL-21 在致炎后 3 d 显著下调^[31]。徐炳森研究表明,伴刀豆球蛋白(concanavalin, Con A)可诱导草鱼的头肾淋巴细胞白细胞介素 *IL-2* 基因的表达^[32]。王尚念使用嗜水气单胞菌攻毒草鱼 72 h 后发现,*IL-1 β* 基因在肾脏、脾脏和头肾组织中表达较高^[33]。张小平通过在养殖水体中投放枯草芽孢杆菌及施氏假单胞菌的复合菌微生态制剂发现,15 d 内草鱼肝胰脏中 *IL-8* 基因表达量显著升高,IL-1 β 显著降低肠黏膜中 *IL-8* 基因表达量显著降低^[19]。李雪吟使用不同浓度赖氨酸饲料饲喂草鱼 56 d,再使用 LPS 处理草鱼肠道上皮细胞后发现,*IL-1*、*IL-8* 基因表达量显著上升^[20]。

4 干扰素及其调节因子

干扰素(interferon, IFN)是一类重要的细胞功能糖蛋白,具有抗病毒、抗肿瘤和调节免疫系统等功能,其转录调控因子为干扰素调节因子(interferon regulatory factors, IRF),其中常见的有 IRF1、IRF3、IRF5、IRF7。干扰素及其相关调节因子是鱼类抵御病毒入侵的重要组成部分之一^[34-37]。

草鱼干扰素最初是由邵健忠等开始探究^[38-41],通过 GCRV 病毒诱生后分离纯化得到草鱼血清中一种高效价的抗病毒活性物质,鉴定为干扰素^[39],

进一步研究免疫调节功能,发现草鱼的干扰素是由头肾、脾、肾、外周血和胸腺组织的 T 淋巴细胞产生的,可以经病毒体外诱导产生 α/β 干扰素^[40-41]。Zhang 等通过体外细胞培养草鱼肾细胞系 CIK,并从中鉴定出抗病毒的干扰素基因^[42-43]。李青梅使用 GCRV 攻毒草鱼后发现,72 h 内中肾中 *IFN-1* 的表达量在 6~72 h 内呈现持续上调趋势^[17]。许巧情等研究发现,经柱状黄杆菌诱导后 *IRF-5* 基因表达量在受精卵中呈现先升后降的趋势,推测未受精卵中存在 *IRF-5* 母源 mRNA 表达,随着胚胎发育,其免疫防御机制逐渐完善^[44]。仔鱼出膜后,*IRF-5* 的表达量又开始上调且维持在一定数量,推测母源性该基因在早起胚胎发育以及抵抗外源病毒和细菌的侵染方面发挥重要作用,通过母源基因的保护,草鱼胚胎免疫系统逐渐发育至完全^[45]。王伟等还曾根据前人的研究,克隆出 IFN 上游的一种起调节诱导的抗病毒基因 *Mx* (myxovirus resistance) 并将其在草鱼肝胰脏中进行了表达^[46]。

5 补体

补体 (complement) 主要由肝细胞和巨噬细胞产生,常以无活性形式存在于正常血清和体液中的一组蛋白质,共有 20 多种,由特定的补体基因编码而成^[47]。补体本身没有特异性,不能和游离的抗原或抗体结合,只能与抗原抗体复合物进行结合,主要作用是在一定条件下进行一系列酶促级联反应,在机体抵抗细菌侵染的免疫应答过程中,通过补体激活,活化淋巴细胞,对鱼类健康生长发育起重要作用^[48-55]。

目前,硬骨鱼类中补体 C(1、2、3、4、5、6、7、8、9) 的成分及其性质和功能等大多都已明确,而草鱼中目前主要所研究的补体有 C2、C3、C4、C6、C7 和 C9^[49]。补体 C3 基因在感染大中华鲮 (*Sinergasilus major*) 的病鱼肝胰脏、脾脏中检测到大量的表达,鳃组织中检测到少量的表达^[50]。经灭活后的柱状黄杆菌诱导发现,草鱼 C9 基因在 1、7 d 时在肝胰脏和脾脏中呈现显著上调^[51-52]。通过研究不同条件下的肝脏原代细胞中草鱼 C2 基因^[53],发现其过表达能引起除部分补体因子外的各种下游组分表达量上调;而经过刺激过表达后的肝脏细胞中,其炎症因子等的表达量显著提高,被敲减 C2 基因的细胞则与之结果相反,表明 C2 基因在激活补体下游各项组分中起到重要的免疫作用,在各个组织中均呈

现时间依赖性的表达模式。使用福尔马林灭活的嗜水气单胞菌诱导后,发现草鱼补体基因 *BF/C2A*、*BF/C2B*、*C6* 在血、脑、肌、中肾、肝胰脏、头肾、皮、脾、心、鳃、肠、鳍 12 个组织中均呈现表达量显著上调;C7 基因仅在头肾、中肾、皮、脾、心脏和肠中进行了表达并显著上调;后续检测不同发育时期的补体基因 mRNA 表达量,发现补体 C6 在孵化 1 d 开始显著上升 10 d 后呈现下降趋势,表明补体 C6 在草鱼发育早期起着一定的免疫与机体保护功能^[54]。卢明森等在饲料中添加不同浓度的果寡糖,连续投喂草鱼 56 d 后发现 2 g/kg 剂量组的鱼体血清中补体 C3 和 C4 的活性显著高于对照组^[56]。张涛在饲料中添加不同浓度的添加剂,连续投喂 49 d 后发现 0.22% 浓度酵母多糖组的鱼体血清中补体 C3 的活性与对照组相比均呈现出显著升高的趋势^[57]。

6 主要组织相容性复合体及其相关因子

主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 是一组高度多态的蛋白复合体,主要功能为递呈抗原,被 T 细胞所识别,从而激活机体的体液免疫和细胞免疫^[58-59]。

草鱼 MHC 和哺乳动物 MHC 一样,分为参与内源性抗原呈递的 I 型和参与外源性抗原呈递的 II 型^[60]。通常 MHC - I 型类分子与 CD8⁺ 细胞 (cluster of differentiation 8⁺ cell) 相互作用,只呈递内源蛋白;而 MHC - II 类分子与 CD4⁺ 细胞相互作用,只呈递外源蛋白^[61]。

徐在言通过分析草鱼 MHC 类的多种相关多肽发现,其中一种不可溶性蛋白 SIMP 并通过研究其基因结构,确定草鱼 *SIMP* 基因不像人类 *SIMP* 基因具有组织表达的均一性,只在草鱼的脑组织中高表达,在脾脏中则低丰度表达^[62]。苏建明等克隆了草鱼 *MHC II α* 基因,并检测到该基因主要在草鱼的脾脏、头肾、鳃、肠道等组织表达^[63]。使用草鱼出血病疫苗处理幼龄草鱼后,在免疫后 14 d 内发现其中肾、肠道、脾脏中的 *MHC I* 相对表达量均有所提高,推测可能是 MHC 因子参与了下游各类相关模式识别受体并进行了信号传递,引起了与对应信号通路免疫相关因子的转录^[64-66]。

7 免疫球蛋白

免疫球蛋白 (immunoglobulins) 是鱼类主要的免疫因子之一,主要是 IgM,有些鱼类中也存在 IgI、

IgZ、IgT、IgH 等其他免疫球蛋白。目前草鱼中已经克隆 IgM、IgZ 和 IgD 3 种免疫球蛋白基因,并且制备出了相对应的抗体。邵建忠等经研究得出草鱼的体表黏液和肠道黏液中免疫球蛋白与血清中的免疫球蛋白种类相同^[67]。江育林等通过研究推断,草鱼的免疫应答中可能具有一种含有较多二硫键的类似于 IgM 某些特性的大分子蛋白质,其在分离纯化过程中能分离成分子量近似于人 IgG 的较小分子,但当时没有获得明确的结果^[68]。李亚南使用嗜水气单胞菌感染草鱼 14 d 后,定性分析血清中蛋白结构并对比凝聚后的聚合体进而推断,草鱼血液中的免疫球蛋白主要应该是 IgM^[69]。肖凡书等通过克隆草鱼含有 IgM、IgZ 和 IgD 重链 ζ 、 δ 、 μ 基因的基因座,发现了草鱼 IgZ、IgZ-2 和 IgM-IgZ 3 种不同的免疫球蛋白^[70]。李青梅等使用 GCRV 攻毒草鱼后发现,72 h 内中肾中 IgM 基因表达量在 48~72 h 内呈上调趋势^[17]。张鹏英等使用 GCRV 疫苗腹腔注射健康草鱼,发现 14 d 内头肾、中肾、肠和脾脏中的 IgM 的相对表达量显著高于对照组^[64]。

草鱼作为我国重要的四大家鱼之一,从 20 世纪 50 年代起,各种细菌病、病毒病已逐渐成为草鱼养殖业的“瓶颈”。至今为止,在病原检测、流行情况、诊断及防治方法上已经取得了一定的进展,但草鱼免疫因子及相关免疫应答分子机制方面的研究由于起步相对较晚,仍旧有大量的免疫相关因子未被了解,部分已经被研究的内容也仍旧须要进一步加强探究。从而根据各项疾病的症状及病理变化,结合生理生化指标、基因时空表达变化等试验数据,进一步确定草鱼免疫应答的关键基因,从而调动、开发草鱼自身的防御潜力,是有效防止病害发生、开展健康养殖、实现养殖业持续发展的重要战略之一。

参考文献:

- [1] 马贵华,陈道印,刘六英,等. 草鱼出血病的免疫学研究进展[J]. 渔业现代化,2008,35(1):45-49.
- [2] 王红权,唐德约,赵玉蓉,等. 牛膝多糖对草鱼免疫和抗氧化功能的影响[J]. 水生生物学报,2013,37(2):351-357.
- [3] 李莉,李春梅. 鱼类非特异性免疫研究进展[J]. 河南农业科学,2012,41(2):26-32.
- [4] 许宝红. 感染草鱼脾脏的比较转录组分析[D]. 长沙:湖南农业大学,2012.
- [5] 王俊相,李玉萍,孔令富,等. 鱼类免疫系统研究进展[J]. 四川畜牧兽医,2010,37(7):29-31.
- [6] 左然涛,麦康森,徐玮,等. 脂肪酸对鱼类免疫系统的影响及调控机制研究进展[J]. 水产学报,2015,39(7):1079-1088.
- [7] 张艳秋,詹勇,许梓荣. 鱼类免疫机制及其影响因子[J]. 水产养殖,2005(3):1-5.
- [8] 唐政,马广智,徐军. 鱼类免疫学研究进展[J]. 免疫学杂志,2002(增刊1):112-116,127.
- [9] 范泽军,邹鹏飞,姚翠鸾. 鱼类 Toll 样受体及其信号传导的研究进展[J]. 水生生物学报,2015,39(1):173-184.
- [10] 裴永艳,黄容,李勇明,等. 鱼类和哺乳类 *TLR4* 基因结构和功能的保守与进化[J]. 水生生物学报,2015,39(3):590-597.
- [11] 徐晓雁. 草鱼感染嗜水气单胞菌 miRNA 筛选及其功能分析[D]. 上海:上海海洋大学,2015.
- [12] 杨春荣,苏建国,彭丽敏,等. 草鱼 *TTLR9* 基因全长 cDNA 的克隆及特征分析[J]. 水产学报,2011,35(5):641-649.
- [13] 黄文吉. 草鱼 *TLR* 基因鉴定及三个 *TLR* 基因免疫功能初步研究[D]. 上海:上海海洋大学,2017.
- [14] 陈晓慧. 草鱼 *TLR8* 基因的克隆及其功能表达的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2014.
- [15] 杨春荣,苏建国,张荣芳,等. 草鱼 BAC 文库中 *TLR3* 基因的筛选及表达特征的研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2010,38(6):83-87.
- [16] 李立森,李家乐. 草鱼 *TLR20* 基因的 cDNA 全长克隆及表达分析[C]//中国水产学会学术年会论文摘要集. 杭州:中国水产学会,2015:1.
- [17] 李青梅. 多个免疫相关基因在草鱼中肾的表达[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2013.
- [18] 王文静. 草鱼 3 个 Toll 样受体基因克隆和表达及与细菌性败血症关联分析[D]. 上海:上海海洋大学,2014.
- [19] 张小平. 枯草芽孢杆菌 SC02 和施氏假单胞菌 F1M 对草鱼养殖水体水质的影响及机理研究[D]. 杭州:浙江大学,2014.
- [20] 李雪吟. 赖氨酸对草鱼肠道免疫和结构屏障作用及其机制研究[D]. 雅安:四川农业大学,2017.
- [21] 郑琳琳,张圣强,安利国. 鱼类髓样分化因子 88 (MyD88) 的研究进展[J]. 科技信息,2009(34):480-481.
- [22] Jault C, Pichon L, Chluba J, et al. Toll-like receptor gene family and TIR-domain adain adapters in *Dnaio rerio* [J]. Molecular Immunology, 2004, 40(11):771.
- [23] Takano T, Kondo H, Hirano I, et al. Identification and characterization of a myeloid differentiation factor 88 (MyD88) cDNA and gene in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2006, 30(9):807-816.
- [24] 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.
- [25] 蔡中华,宋林生,高春萍,等. 真鲷肿瘤坏死因子 α (TNF α) cDNA 的克隆与表达[J]. 生物化学与生物物理学报,2003(12):1111-1116.
- [26] Wang H, Shen X B, Xu D, et al. Lipopolysaccharide-induced TNF- α factor in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): evidence for its involvement in antiviral innate immunity[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(2):538-545.

- [27] Zhang A Y, Chen D Y, Wei H, et al. Functional characterization of TNF- α in grass carp head kidney leukocytes: induction and involvement in the regulation of NF- κ B signaling[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 33(5): 1123-1132.
- [28] 吴宗凡. 厌氧芽孢杆菌代谢产物对草鱼免疫相关基因表达的影响[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2012.
- [29] 邱丽华, 张汉华, 吴进锋. 鱼类肿瘤坏死因子基因和受体的研究进展[J]. 中国水产科学, 2004(5): 482-487.
- [30] Mathew J A, Guo X Y, Goh K P, et al. Characterisation of a monoclonal antibody to carp IL-1 β and the development of a sensitive capture ELISA[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2002, 13(2): 85-95.
- [31] 宋学宏. 嗜水气单胞菌诱导的草鱼肠道炎症机制研究[D]. 苏州:苏州大学, 2015.
- [32] 徐炳森. 草鱼白细胞介素-2 基因克隆、序列分析及其在原核细胞中表达的研究[D]. 杭州:浙江大学, 2001.
- [33] 王尚念. 草鱼 IRAK-4 介导 IL-1 β 细胞信号转导研究[D]. 成都:电子科技大学, 2015.
- [34] 余新建, 李东明, 马梅生, 等. 重组干扰素上调草鱼干扰素系统基因的表达[J]. 水生生物学报, 2013, 37(6): 1184-1188.
- [35] 贾方钧, 王铁辉, 张义兵, 等. 干扰素防治草鱼出血病的效果初探[J]. 水产科学, 2000(4): 1-4.
- [36] 张林. 斑马鱼 *TBK1L* 功能研究与草鱼 *P47PHOX/P40PHOX* 基因克隆[D]. 武汉:华中农业大学, 2016.
- [37] Altmann S M, Mellon M T, Distel D L, et al. Molecular and functional analysis of an interferon gene from the zebrafish, *Danio rerio*[J]. Journal of Virology, 2003, 77(3): 1992-2002.
- [38] 邵健忠. 鱼类非特异性免疫因子——干扰素的探索与研究[D]. 杭州:浙江大学, 1998.
- [39] 邵健忠, 项黎新. 草鱼干扰素的体外诱生及其组织细胞的来源[J]. 动物学报, 2001, 47(6): 677-683.
- [40] 邵健忠, 钱凯先, 项黎新, 等. 病毒诱导草鱼产生干扰素活性因子的研究[J]. 病毒学报, 1998, 14(4): 62-67.
- [41] 邵健忠, 项黎新, 李亚南. 草鱼干扰素诱生条件的研究[J]. 水产学报, 1999, 23(2): 122-127.
- [42] Zhang Y B, Gui J F. Cloning, identification and characterization of interferon system genes in crucian carp (*Carassius auratus* L.) [J]. Journal of the Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, 2004, 21(3): 418-427.
- [43] 张义兵, 张奇亚, 徐德全, 等. 从灭活病毒诱导的培养细胞中鉴定鱼类抗病毒相关基因[J]. 科学通报, 2003, 48(5): 457-463.
- [44] 许巧情, 昌鸣先, 肖凡书, 等. 草鱼干扰素调节因子 5 的表达研究[J]. 水生生物学报, 2010, 34(6): 1206-1210.
- [45] 许巧情. 草鱼干扰素调节因子 IRF-5 和 IRF-10 以及趋化因子受体 *CXCR5* 克隆与表达[D]. 武汉:华中农业大学, 2009.
- [46] 王伟, 白俊杰, 劳海华, 等. 草鱼 *Mx* 蛋白基因的克隆与原核表达[J]. 中国水产科学, 2003, 10(5): 365-369.
- [47] 张颖, 刘洪柏, 卢彤岩, 等. 鱼类补体系统的研究进展[J]. 水产学报, 2005(6): 842-848.
- [48] 王志平, 张士璿, 王光锋. 鱼类补体系统成分及补体特异性和功能的研究进展[J]. 水生生物学报, 2008(5): 760-769.
- [49] 刘峰, 李家乐. 草鱼免疫因子研究进展[J]. 上海海洋大学学报, 2009, 18(4): 502-507.
- [50] 昌鸣先, 聂品. 草鱼补体 C3 基因的克隆及在感染大中华鳊草鱼个体的表达分析[J]. 自然科学进展, 2004, 14(8): 870-881.
- [51] 李莉. 草鱼补体 C9 和穿孔素基因的克隆与表达研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2007.
- [52] Li L, Chang M X, Nie P. Molecular cloning, promoter analysis and induced expression of the complement component C9 gene in the grass carp *Ctenopharyngodon idella*[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2007, 118(3/4): 270-282.
- [53] 党云飞. 草鱼抗菌免疫基因筛选及补体凝集素途径基因功能研究[D]. 上海:上海海洋大学, 2017.
- [54] 沈玉帮. 草鱼 4 个补体基因克隆表达和连锁及与细菌性败血症的关联分析[D]. 上海:上海海洋大学, 2013.
- [55] 王红权. 基于 GCRV 抗性提高的草鱼免疫特性分析[D]. 长沙:湖南农业大学, 2014.
- [56] 卢明森, 陈孝煊, 吴志新, 等. 果寡糖对草鱼非特异性免疫功能的影响[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(2): 213-216.
- [57] 张涛. 酵母多糖、壳聚糖、甘草酸对草鱼非特异性免疫功能的影响[J]. 河北渔业, 2017(9): 9-12.
- [58] 吴康, 黄晓声, 金洁南, 等. 饲喂蚕豆对草鱼抗氧化能力及免疫机能的影响[J]. 水生生物学报, 2015, 39(2): 250-258.
- [59] 张燕. 长江草鱼群体 *MHC Class II B* 基因的克隆、表达及多态性分析[D]. 武汉:华中农业大学, 2010.
- [60] 夏春, 徐广贤, 林常有, 等. 草鱼 *MHC class I* 等位基因克隆及其多态性分析[J]. 自然科学进展, 2004(1): 53-60.
- [61] 贾卫. 一种新的白细胞分化抗原 CD226 (PTA1) 分子结构和功能关系的研究[D]. 西安:第四军医大学, 2001.
- [62] 徐在言. 草鱼 *MHC* 相关多肽与肿瘤坏死因子受体相关因子的克隆及其表达分析[D]. 武汉:中国科学院水生生物研究所, 2007.
- [63] 苏建明, 肖调义, 张学文, 等. 草鱼 *MHC II α* 基因 cDNA 的克隆与组织表达分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2008, 34(6): 673-679.
- [64] 张鹏英. 两种不同规格的三月龄草鱼免疫组织结构及其相关因子的比较研究[D]. 上海:上海海洋大学, 2016.
- [65] 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.
- [66] 杨玲, 孟庆磊, 张龙岗, 等. 草鱼 *MHC class I* 基因多态性及其与鱼体抗柱形病能力关系分析[J]. 长江大学学报(自科版石油/农学中旬刊), 2013, 10(6): 42-47, 50.
- [67] 胡瑜兰. 硬骨鱼类补体关键因子 C1q 及免疫球蛋白分子克隆、进化和功能的初步研究[D]. 杭州:浙江大学, 2009.
- [68] 江育林, 李燕, 于平. 草鱼免疫应答的初步研究[J]. 水生生物学报, 1991(4): 321-326.
- [69] 李亚南. 嗜水产气单胞菌诱导的草鱼免疫球蛋白分析[J]. 动物学报, 2001, 47(2): 132-138.
- [70] 肖凡书, 许巧情, 王欣欣, 等. 草鱼的两种新型免疫球蛋白基因 *IgZ-2* 和 *IgM-IgZ* [J]. 水产学报, 2010, 34(12): 1891-1900.