

## 镜鲤抗疱疹病毒(CyHV-3) $F_4$ 抗病品系病毒表达量评估

孙佳鑫, 石连玉, 姜晓娜, 李池陶, 葛彦龙, 胡雪松, 张晓峰, 贾智英

## Research on expression of virus in Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3) $F_4$ disease resistant strains

SUN Jiaxin, SHI Lianyu, JIANG Xiaona, LI Chitao, GE Yanlong, HU Xuesong, ZHANG Xiaofeng, JIA Zhiying

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20200302949>

### 您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

#### CyHV-3感染镜鲤选育世代免疫基因表达及抗病能力比较

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

上海海洋大学学报. 2017, 26(5): 651 <https://doi.org/10.12024/jsou.20170402026>

#### 鲤疱疹病毒3型ORF148 DNA疫苗对建鲤鱼苗的免疫保护

Immunization of *Cyprinus carpio* var. *jian* with Cyprinid herpesvirus 3 ORF148 DNA vaccine against koi herpesvirus disease

中国水产科学. 2020, 27(4): 454 <https://doi.org/10.3724/SP.J.1118.2020.19212>

#### 鲤疱疹病毒3型ORF136基因编码蛋白多克隆抗体的制备与鉴定

Identification and development of a polyclonal antibody against proteins encoded by the ORF136 gene in Cyprinid herpesvirus 3

中国水产科学. 2018, 25(1): 204 <https://doi.org/10.3724/SP.J.1118.2018.17050>

#### 鲤疱疹病毒2型武汉株的分离与鉴定

Isolation and characterization of Cyprinid herpesvirus 2 WH strain

中国水产科学. 2013, 20(6): 1303 <https://doi.org/10.3724/SP.J.1118.2013.01303>

#### 鲤疱疹病毒II型对异育银鲫背鳍细胞的显微形态与免疫基因表达水平的影响

The expression analysis of immune genes and microscopic morphology of CCF cells in response to Cyprinid herpesvirus 2 infection

水产学报. 2016, 40(12): 1915 <https://doi.org/10.11964/jfc.20160110240>

#### 鲤疱疹病毒II型TaqMan real-time PCR检测方法的建立及应用

Establishment of a TaqMan real-time PCR assay for detecting the Cyprinid herpesvirus II

水产学报. 2013, 37(4): 607 <https://doi.org/10.3724/SP.J.1231.2013.38441>

文章编号: 1674-5566(2021)02-0258-08

DOI:10.12024/jsou.20200302949

## 镜鲤抗疱疹病毒(CyHV-3) F<sub>4</sub> 抗病品系病毒表达量评估

孙佳鑫<sup>1,2,3</sup>, 石连玉<sup>2</sup>, 姜晓娜<sup>2</sup>, 李池陶<sup>2</sup>, 葛彦龙<sup>2</sup>, 胡雪松<sup>2</sup>, 张晓峰<sup>2</sup>, 贾智英<sup>2</sup>

(1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所 农业农村部水产基因组学重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070; 3. 上海海洋大学 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心, 上海 201306)

**摘要:** 以镜鲤抗疱疹病毒新品种 F<sub>4</sub> 为实验材料, 利用实时荧光定量 PCR 技术以 TK(thymidine kinase) 和 ORF72 基因为病毒标志基因, 分析镜鲤抗疱疹病毒(CyHV-3) 选育抗病品系 F<sub>4</sub> 在病毒感染不同阶段中的表达量。结果显示: 2 个基因不同感染阶段脾、肾组织表达量趋势一致, 24 ~ 144 h 呈上升趋势, 144 ~ 288 h 呈下降趋势, 且在 144 h 时脾、肾组织的病毒表达量均达到最高。脾组织 2 个基因表达量均低于肾组织。选育组 2 个基因在 120 h 均达到差异极显著, 未选育组 2 个基因均在 96 ~ 144 h 差异极显著。选育组 2 个基因表达量低于未选育组。脾、肾组织 TK 基因均在 96 ~ 168 h 差异极显著; 脾、肾组织 ORF72 基因均在 96 ~ 192 h 差异极显著, 其中脾组织 216 h 也差异极显著。以上结果说明选育组抗病性能强于未选育组, 其中肾组织抗病性能强于脾组织, 且经选育肾组织抗病免疫性能得到提高。目前, 未见其他鱼类的选育种在抗病性状上达到一个稳定阶段, 对于病毒表达量的研究可为其他鱼类的研究提供重要的参考作用。

**关键词:** 镜鲤; 鲤科疱疹病毒 3 型; 免疫基因; 病毒表达量

**中图分类号:** S 917      **文献标志码:** A

镜鲤疱疹病毒 III 型(Cyprinid herpesvirus 3, CyHV-3) 是由锦鲤疱疹病毒(Koi Herpesvirus, KHV) 引起的鲤和锦鲤(*Cyprinus carpio*) 传染并致死性病毒, 是一种在鲤和锦鲤中常见的致命疾病的病原。CyHV-3 的基因组是 295 kb 的线性双链 DNA 分子, 编码 156 个潜在的蛋白质开放阅读框(ORF), 包含其中 8 个末端重复 ORF, 是基因组最大的疱疹病毒<sup>[1]</sup>。CyHV-3 主要感染锦鲤和普通鲤及其变种, 死亡率高达 75% ~ 95%<sup>[2]</sup>, 严重地威胁了鲤和锦鲤养殖业的发展。

目前, 人们对于该病毒的研究, 在基因水平上主要以 TK(thymidine kinase) 和 ORF72 为标志基因。TK<sup>[3]</sup> 是参与核苷酸合成的重要病毒产物, 是一种参与 DNA 合成所必需的核苷酸代谢的

酶, 由大多数疱疹病毒和其他 DNA 病毒编码, 包括非洲猪瘟病毒(ASFV)、牛痘病毒(VACV) 和几种痘病毒<sup>[4-5]</sup>。ORF72 基因属于 GIY-YIG 核酸内切酶家族, 有研究<sup>[6]</sup> 报道推测其与病毒 DNA 的复制有关。TU 等<sup>[7]</sup>、ZHANG 等<sup>[8]</sup>、OUYANG 等<sup>[9]</sup> 和柯浩等<sup>[10]</sup> 对 CyHV-3 病毒进行了广泛的研究, 其中对 CyHV-3 的衣壳蛋白进行了详细阐述, 研究表明, ORF72 单克隆抗体可以作为免疫组织临床样本检测中 CyHV-3 的诊断工具<sup>[11]</sup>。因此本研究选择 CyHV-3 的胸腺嘧啶核苷激酶 TK、衣壳蛋白 ORF72 为目的基因, 研究病毒感染后在鱼体内病毒的表达情况。

2001 年, 鲤疱疹病毒在我国首次暴发后, 次年入侵台湾以及广东地区, 造成了大量鲤、锦鲤

收稿日期: 2020-03-07      修回日期: 2020-03-17

**基金项目:** 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2018HY-ZD0205, 2020TD31); 国家大宗淡水鱼类产业技术体系鲤种质资源与品种改良项目(CARS-45-06); 黑龙江省应用技术与开发计划项目(GA18B202); 国家重点研究计划(2018YFD0900302-6)

**作者简介:** 孙佳鑫(1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为遗传育种与生物技术。E-mail: sjxyzu@163.com

**通信作者:** 贾智英, E-mail: Zyjia2010@163.com

死亡<sup>[12]</sup>,死亡率高达 80%~100%<sup>[13-14]</sup>。2008 年我国将锦鲤疱疹病毒病(KHVD)列为必须报告的疾病<sup>[15]</sup>。对此,国内外开展了不同疾病的抗病新品种选育的研究,白珊珊等<sup>[16]</sup>进行了 CyHV-3 感染镜鲤选育世代免疫基因表达及抗病能力比较的研究,表明 F<sub>3</sub> 的病毒载量显著高于 F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub> ( $P < 0.05$ ),而 F<sub>2</sub> 高于 F<sub>1</sub> 但两者间无显著性差异 ( $P > 0.05$ ),说明 F<sub>3</sub> 抗病性状已经处于一个稳定的状态<sup>[16]</sup>。在 F<sub>3</sub> 的基础上,目前已经选育到了 F<sub>4</sub>,通过病毒感染实验表明 F<sub>4</sub> 抗病性能已达到稳定,但目前对于病毒感染后,在机体内病毒的表达模式及选育对病毒表达的作用并不清楚,且未见选育种在抗病性状上选育达到一个稳定阶段的相关研究,所以本研究应用镜鲤 F<sub>4</sub> 抗病品系作为实验对象,利用 *TK* 和 *ORF72* 这 2 个病毒基因进行抗病品系 F<sub>4</sub> 在不同感染阶段病毒表达量的研究,并分析其抗病选育效果及病毒表达模式,以期为其他鱼类抗病毒选育提供理论指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本研究所用实验鱼为德国镜鲤抗病选育品系 F<sub>4</sub> 和未选育德国镜鲤,均来自中国水产科学研究院黑龙江水产研究所宽甸水产试验站。

### 1.2 实验设计

攻毒分为选育组和未选育组,所用实验鱼体长为 10~15 cm,体质量为 (72.13 ± 10.30) g,在大小为 1.6 m × 1.2 m × 0.6 m 的水箱中各投放 300 尾鱼,水温保持在 25 °C,并每天以 3% 体质量喂食。

### 1.3 实验样品采集

待实验鱼进入水箱稳定后,攻毒实验按照

ADAMEK 等<sup>[17]</sup>的方法,将养殖场中所采集的携带病毒个体的内脏组织,进行液氮研磨后平均投放至 2 组实验鱼中,进行攻毒感染实验。攻毒实验开始后每 24 h 进行脾、肾组织的样品采集,直至鱼停止死亡,其中选育组与未选育组均在 144 h 达到死亡高峰,选育组成活率 87.3%、未选育组成活率 62.3%。分别采集选育组、未选育组中实验鱼的脾脏和肾脏,各采集 3 尾,且每组设 2 个平行,采集样品用于 RNA 提取。所有采集样本的内脏组织均立即储存在 RNAlater 中,在 4 °C 下 12 h 之后储存在 -20 °C 冰箱,之后转移至实验室 -80 °C 超低温冰箱中保存备用。

### 1.4 实验方法

利用实时荧光定量 PCR 技术,以 18S RNA 为内参基因,用 OIE 推荐的 CyHV-3 的衣壳蛋白 *ORF72* (Capsid triplex protein *ORF72*)<sup>[18]</sup> 和胸腺嘧啶核苷激酶 *TK* (Thymidine kinase)<sup>[3]</sup> 为目的基因,比较选育组与未选组鱼 CyHV-3 病毒感染后不同阶段表达量的变化趋势。

使用 Applied Biosystems 7300 仪器 (Applied Biosystems, USA) 和 Fast Start Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche Diagnostics GmbH, Germany) 进行 PCR 反应。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 (highROX) 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 RNA 1 μL/cDNA 0.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足 25 μL。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。

表 1 荧光定量 PCR 引物

Tab. 1 Primers used in quantitative real-time PCR

引物 Primers	引物序列(5'-3') Sequences (5'-3')	退火 T <sub>m</sub> /°C
CyHV-3 thymidine kinase ( <i>TK</i> )	qF: CCCTTCACCGTCAGAATCTCTC qR: AGCTCGTACTGGGCCATCC	60
CyHV-3 capsid triplex protein <i>ORF72</i> ( <i>ORF72</i> )	F: CGAGAAGCAGGGTATGGTC R: GGCCTGTAGGGCACAAAG	60
18S RNA	F: TCTGCCCTAACTTTTCGATGGTA R: AATTTGGCGCCTGCTGCCTTCTTT	60

## 1.5 数据分析

使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法<sup>[19]</sup> 处理荧光定量实验数据计算出相对表达量。使用 SPSS 17.0 软件单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 进行显著性差异分析。

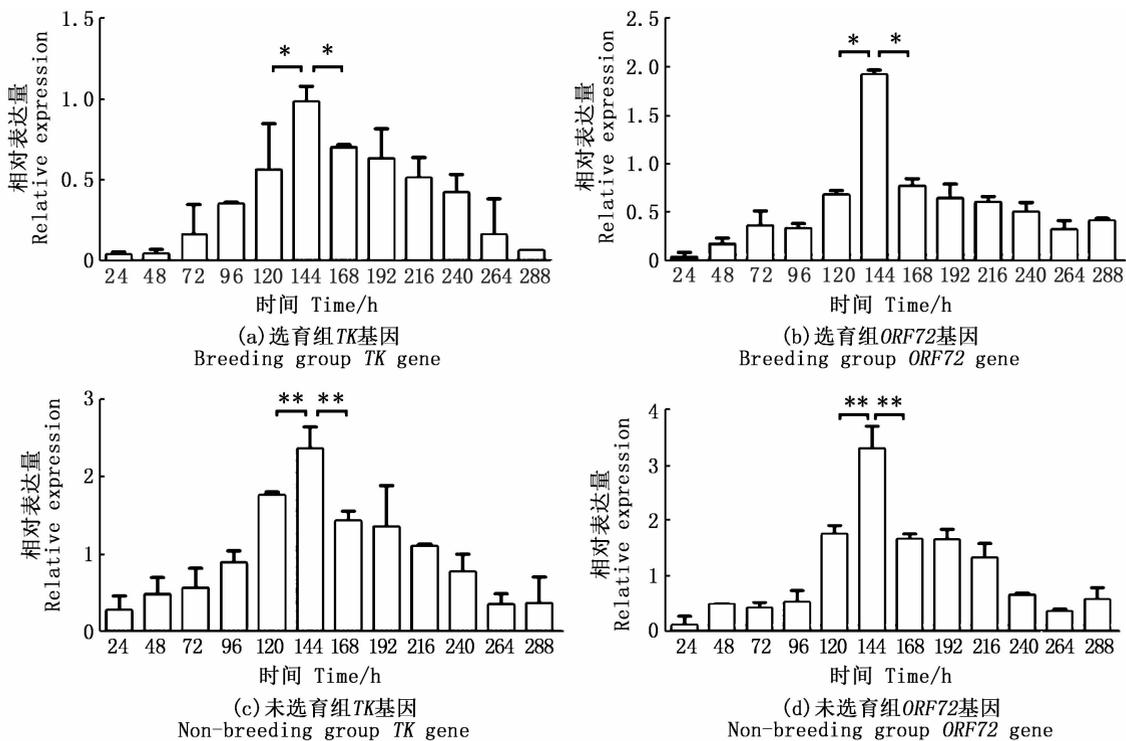
## 2 结果

### 2.1 不同感染阶段病毒表达情况

在人工攻毒感染实验采集的样品中,脾、肾组织中均检测到了病毒基因的表达。在脾、肾组

织中,选育组 *TK* 基因和 *ORF72* 基因的表达量在 24 ~ 144 h 均呈现上升趋势,144 ~ 288 h 呈现下降趋势。

在脾组织中,选育组 *TK* 基因和 *ORF72* 基因在 144 h 与 120、168 h 相比,病毒的表达量达到了显著性差异水平 ( $P < 0.05$ ),见图 1a 和 b;未选育组 *TK* 基因和 *ORF72* 基因在 144 h 与 120、168 h 相比,病毒的表达量达到了极显著差异 ( $P < 0.01$ ),见图 1c 和 d。



标记 \* 不同表示组内存在显著性差异 (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ )。

Marked \* indicates significant differences within groups (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ).

图 1 不同感染阶段脾组织中 *TK* 基因和 *ORF72* 基因相对表达情况

Fig. 1 Relative expression of *TK* gene and *ORF72* gene in spleen tissue at different infection stages

在肾组织中,选育组和未选育组的 *TK* 基因在 144 h 与 120、168 h 相比病毒的表达量达到了显著性差异的水平 ( $P < 0.05$ ),见图 2a 和 c;选育组和未选育组的 *ORF72* 基因在 144 h 与 120、168 h 相比,病毒的表达量达到了极显著差异 ( $P < 0.01$ ),见图 2b 和 d。

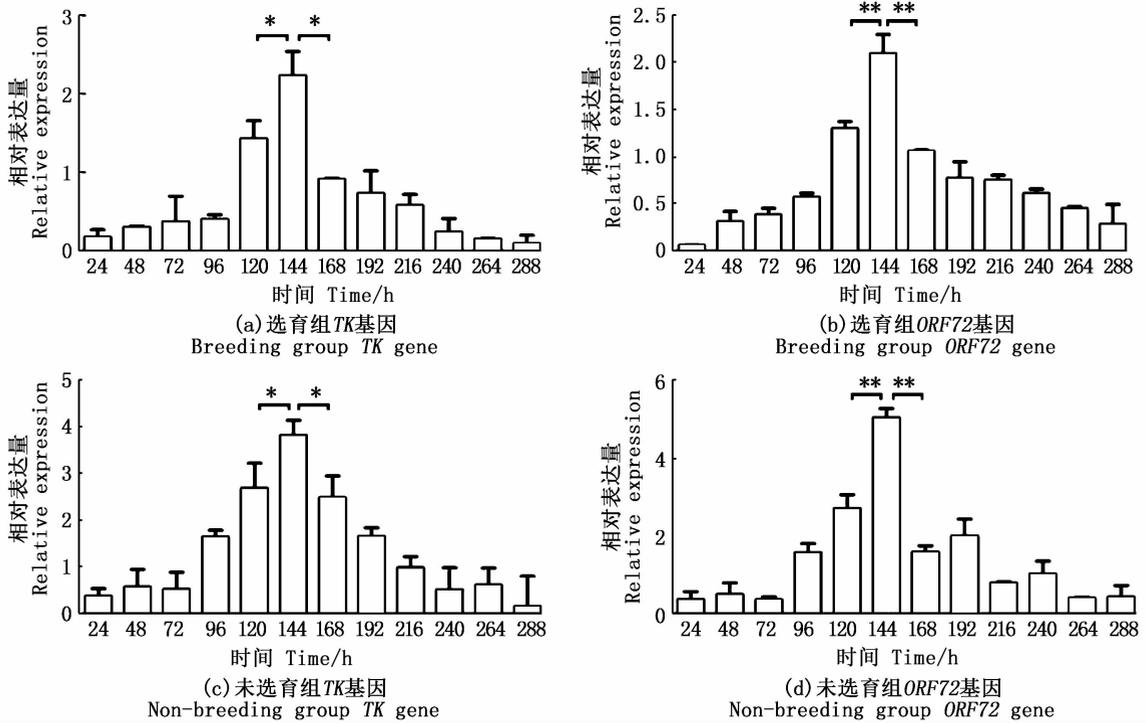
### 2.2 脾、肾组织病毒表达量比较

将 *TK* 基因和 *ORF72* 基因脾、肾组织病毒的表达量进行对比,2 个基因的脾组织的病毒表达量总体趋势较肾组织低,且均在 96、120、144 h 具

有显著性差异。

在选育组中,*TK* 基因的表达量在 96 h 脾组织显著低于肾组织 ( $P < 0.05$ ),在 120、144 h 差异达到极显著水平 ( $P < 0.01$ ),见图 3a;*ORF72* 基因的表达量在 96、144 h 这 2 个感染时期,脾组织显著低于肾组织 ( $P < 0.05$ ),其中在 120 h 达到差异极显著 ( $P < 0.01$ ),见图 3b。

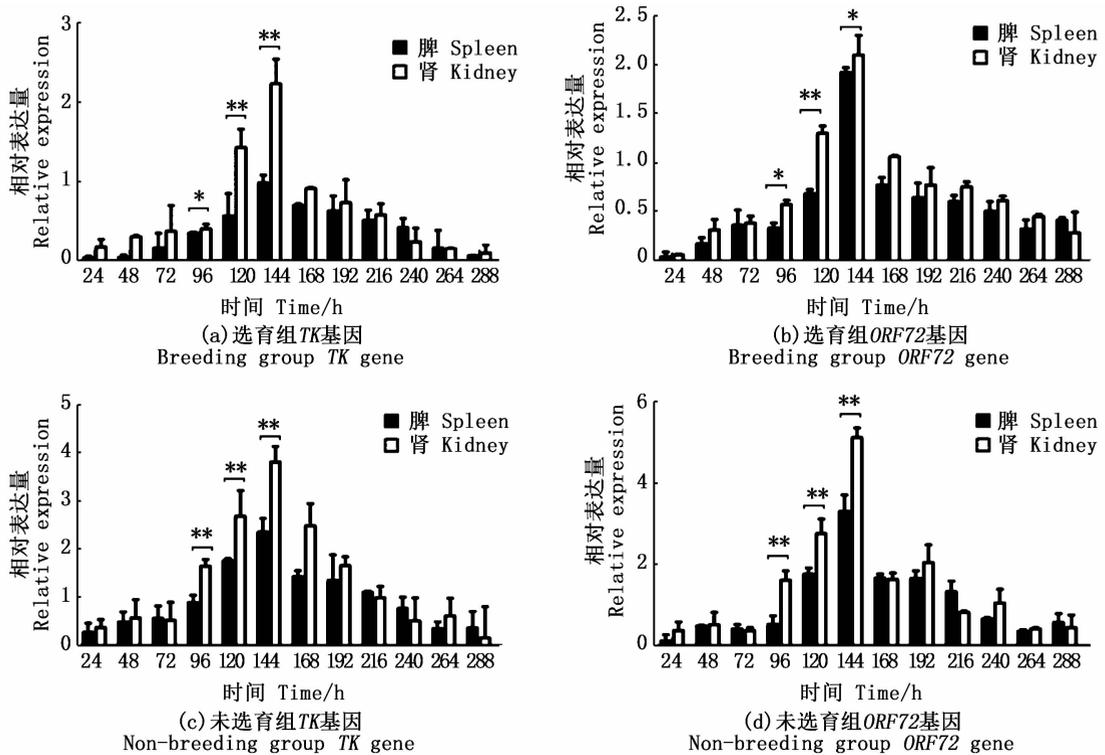
在未选育组中,*TK* 基因和 *ORF72* 基因的表达量均在 96、120、144 h 这 3 个感染时期,脾组织极显著低于肾组织 ( $P < 0.01$ ),见图 3c 和 d。



标记 \* 不同表示组内存在显著性差异 (\* P < 0.05, \*\* P < 0.01)。  
 Marked \* indicates significant differences within groups (\* P < 0.05, \*\* P < 0.01).

图 2 不同感染阶段肾组织中 TK 基因和 ORF72 基因相对表达情况

Fig. 2 Relative expression of TK gene and ORF72 gene in kidney tissue at different infection stages



标记 \* 不同表示组内存在显著性差异 (\* P < 0.05, \*\* P < 0.01)。  
 Marked \* indicates significant differences within groups (\* P < 0.05, \*\* P < 0.01).

图 3 对比不同感染阶段不同组别脾、肾组织中 TK 基因和 ORF72 基因相对表达情况

Fig. 3 Comparison of relative expression of TK gene and ORF72 gene in spleen and kidney tissue at different infection stages

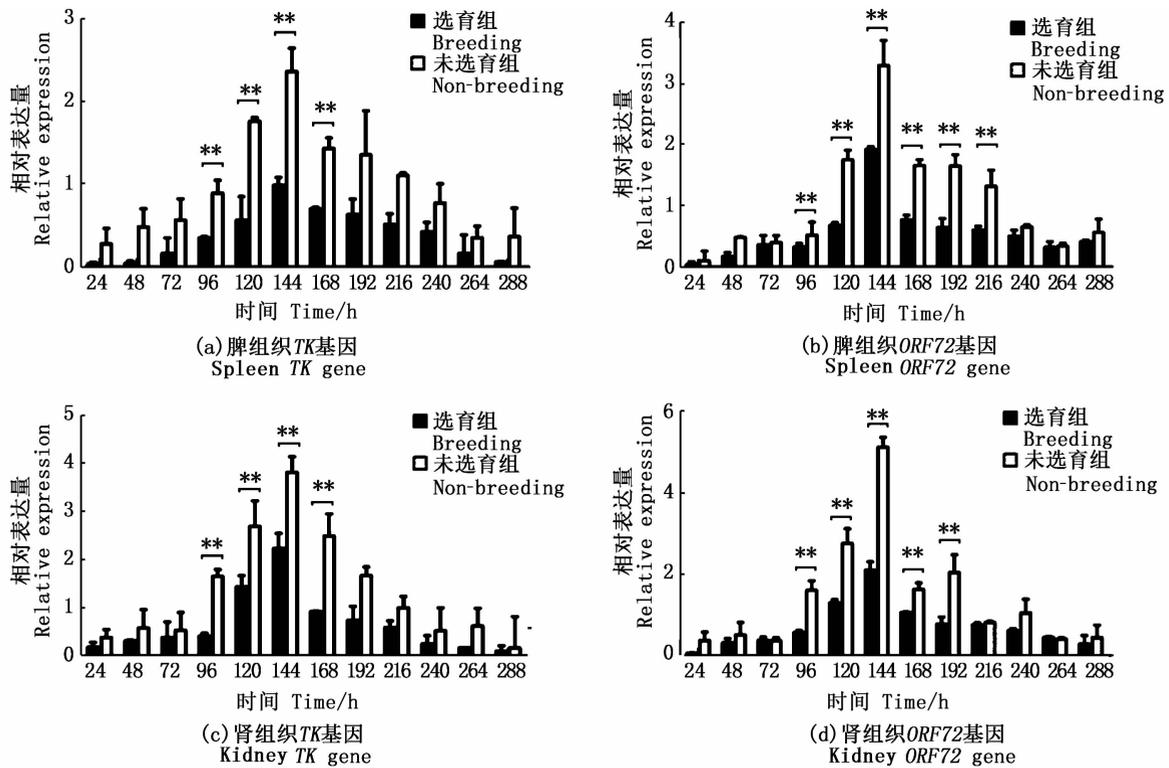
### 2.3 选育组与未选育组病毒表达量比较

将 *TK* 基因和 *ORF72* 基因选育组和未选育组比较,在脾、肾组织中 2 个基因在选育组的病毒表达量均低于未选育组。

在脾组织中, *TK* 基因在 96、120、144、168 h 选育组表达量相比未选育组,差异极显著 ( $P < 0.01$ ),见图 4a; *ORF72* 基因在 96、120、144、168、

192、216 h 选育组表达量极显著低于未选育组 ( $P < 0.01$ ),见图 4b。

在肾组织中, *TK* 基因在 96、120、144、168 h 选育组表达量相比未选育组,差异极显著 ( $P < 0.01$ ),见图 4c; *ORF72* 基因在 96、120、144、168、192 h 选育组表达量相比未选育组,差异极显著 ( $P < 0.01$ ),见图 4d。



标记 \* 不同表示组内存在显著性差异 (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ )。

Marked different \* indicates significant differences within groups (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ).

图 4 对比不同感染阶段脾、肾组织中 *TK* 基因和 *ORF72* 基因在两组中相对表达情况  
Fig. 4 Comparison of relative expression of *TK* gene and *ORF72* gene in spleen and kidney tissues at different infection stages in two kinds of fish

## 3 讨论

### 3.1 *TK* 基因和 *ORF72* 基因病毒表达量比较

目前 *TK* 基因和 *ORF72* 基因都是对病毒进行研究的标志基因。SANFORD 等<sup>[4]</sup>用 *TK* 基因研究得出, *TK* 基因缺失的突变体通常具有复制缺陷性,并且不会因体内神经元组织的潜伏期而重新激活, *TK* 基因通过影响原发性、急性感染以及潜伏感染的建立和再激活期间的病毒特性,因此 *TK* 基因可以随着病毒表达量升高而升高。 *ORF72* 基因属于 GIY-YIG 核酸内切酶家族,有研究<sup>[6]</sup>推测其与病毒 DNA 的复制有关。王世会

等<sup>[18]</sup>通过克隆锦鲤疱疹病毒衣壳蛋白基因 *ORF72*,分析其蛋白结构与功能,成功获得 *ORF72* 基因开放阅读框共 1 113 bp,主要由  $\alpha$  螺旋、 $\beta$  折叠、无规则卷曲 3 种二级结构组成。锦鲤疱疹病毒衣壳蛋白是病毒的重要组成部分<sup>[7-10]</sup>。

本研究发现, *TK* 基因和 *ORF72* 基因的选育组和未选育组的相对表达量趋势相同,都是从 24 ~ 144 h 呈现上升趋势,144 ~ 288 h 呈现下降趋势,其中 144 h 与 120、168 h 相比,病毒的表达量达到了显著性差异水平 ( $P < 0.05$ )。2 组都在 144 h 时病毒的表达量达到最高值,且选育组和

未选育组趋势相同,说明病毒在体内增殖和表达的过程当中,机体对病毒产生了抗病免疫反应并逐渐增强,而在 144 h 之后,机体内脾、肾组织抗病毒的免疫性能达到最高程度,开始抑制病毒的表达,机体逐渐不再发病和出现死亡情况。比较 *TK* 基因和 *ORF72* 基因在不同感染阶段病毒的表达量时,在肾组织中 *TK* 基因在 144 h 时相较其他感染时期具有显著差异 ( $P < 0.05$ ), *ORF72* 基因在 144 h 时相较其他感染时期具有极显著差异 ( $P < 0.01$ ), *TK* 基因和 *ORF72* 基因表达量趋势相同,但是显著性水平不同,推测 2 个基因执行不同的功能。*ORF72* 基因比 *TK* 基因显著性差异更大,说明应用 *ORF72* 基因研究病毒表达检测敏感性更高。

### 3.2 脾、肾组织中 CyHV-3 病毒表达量比较

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<sup>[20]</sup>,主要是在鲤的鳃、脾、肾中<sup>[21-22]</sup>,而脾、肾组织是鲤疱疹病毒感染的 2 个主要免疫组织<sup>[23]</sup>,因此本研究比较了脾、肾中病毒表达量情况。

结果显示,比较脾、肾组织在选育组与未选育组的表达量时,选育组与未选育组脾组织的表达量均低于肾组织,说明脾组织对疱疹病毒抗病性能强于肾组织。比较选育组与未选育组,未选育组在 2 个基因 96、120、144 h 时均达到了极显著水平,而在选育组中 *TK* 基因在 96 h、*ORF72* 基因在 96 h 和 144 h 均为显著性水平,说明经选育脾、肾 2 个组织对病毒免疫抗病性存在显著差异,其中肾组织选育效果更强,抗病免疫能力更高,因而下一步研究应以肾组织为主要研究对象,探讨鲤在疱疹病毒感染中免疫抗病机制,从而为其他鲤抗疱疹病毒新品种选育奠定重要基础。

### 3.3 选育组与未选育组病毒表达量比较

白珊珊等<sup>[16]</sup>利用荧光定量 PCR 技术比较了  $F_1$ 、 $F_2$ 、 $F_3$  世代选育免疫基因表达以及鲤疱疹病毒的病毒表达量。其结果表明,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  $F_1$ 、 $F_2$  ( $P < 0.05$ ),说明随着选育的进行和抗病性能的提高,病毒载量逐渐降低,  $F_3$  的抗病力高且已经达到稳定阶段。

本研究以  $F_4$  为研究对象,其抗病力更高,抗病性状更加稳定。研究结果显示,在脾、肾组织

中 *ORF72* 和 *TK* 2 个基因在选育组的病毒表达量均低于未选育组,由此可见选育组对病毒基因表达起到了显著免疫抗病作用,机体抑制病毒表达量能力能反映其抗病毒能力,说明选育对镜鲤抗疱疹病毒取得了显著的效果,选育组的抗病能力强于未选育组。比较选育组及未选育组在 2 个组织不同采样点的表达量,96 ~ 216 h, 2 个基因表达量达到了极显著的差异,说明在此感染阶段中,选育组镜鲤抗疱疹病毒性能得到了显著提高,216 h 后,选育组与未选育组无显著差异,并逐渐达到稳定。对 *TK* 基因,选育组与未选育组脾、肾组织均在 96 ~ 168 h 极显著差异表达,而 *ORF72* 基因脾组织在 96 ~ 216 h、肾组织在 96 ~ 192 h 差异表达,不同基因显著差异表达与病毒基因功能有关,也进一步说明 *ORF72* 基因检测敏感性高于 *TK* 基因。以上研究结果说明,选育组免疫抗病性能较未选育组得到了极显著提高,说明  $F_4$  抗病品系具有较高的抗病性能。

### 参考文献:

- [1] AOKI T, HIRONO I, KUROKAWA K, et al. Genome sequences of three koi Herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide[J]. *Journal of Virology*, 2007, 81(10): 5058-5065.
- [2] PERELBERG A, SMIRNOV M, HUTORAN M, et al. Epidemiological description of a new viral disease afflicting cultured *Cyprinus carpio* in Israel[J]. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 2003, 55(1): 5-12.
- [3] 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.
- [4] ZHANG Y, MENG Q F, QIAN A D, et al. Establishment of a Fluorogenic quantitative polymerase chain reaction assay for detection of Kio Hepesvirus[J]. *Jilin Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2010, 31(4): 11-14.
- [5] SANFORD B, HOLINKA L G, O' DONNELL V, et al. Deletion of the thymidine kinase gene induces complete attenuation of the Georgia isolate of African swine fever virus [J]. *Virus Research*, 2016, 213: 165-171.
- [6] GOMES NOLL J C, JOSHI L R, DO NASCIMENTO G M, et al. Deletion of the thymidine kinase gene attenuates Caprine alphaherpesvirus 1 in goats [J]. *Veterinary Microbiology*, 2019, 237: 108370.
- [6] 李娜, 李恩杰, 王青华, 等. 美国白蛾核型多角体病毒 *ORF72* 原核表达载体的构建、表达及纯化[J]. *林业科学研究*, 2018, 31(5): 57-63.
- [6] LI N, LI E J, WANG Q H, et al. Construction, expression

- and purification of prokaryotic expression vector of Hyphantria cunea Nuclear Polyhedrosis virus ORF72 [J]. Forest Research, 2018, 31(5): 57-63.
- [7] TU C, LU Y P, HSIEH C Y, et al. Production of monoclonal antibody against ORF72 of Koi Herpesvirus Isolated in Taiwan[J]. Folia Microbiologica, 2014, 59(2): 159-165.
- [8] ZHANG Y N, WU S Q, WANG J C, et al. Expression and purification of the Nucleocapsid protein of Schmallenberg virus, and preparation and characterization of a monoclonal antibody against this protein [J]. Protein Expression and Purification, 2013, 92(1): 1-8.
- [9] OUYANG P, RAKUS K, BOUTIER M, et al. The IL-10 homologue encoded by cyprinid Herpesvirus 3 is essential neither for viral replication in vitro nor for virulence in vivo [J]. Veterinary Research, 2013, 44(1): 53.
- [10] 柯浩, 刘振兴, 林敏, 等. 锦鲤疱疹病毒囊膜蛋白 ORF59 的克隆、分析及其主要 B 细胞表位区的原核表达[J]. 南方水产, 2010, 6(4): 56-62.
- KE H, LIU Z X, LIN M, et al. Cloning, analysis of Koi herpesvirus envelope protein ORF59 and prokaryotic expression of major B cell epitope domain [J]. South China Fisheries Science, 2010, 6(4): 56-62.
- [11] KONG S Y, JIANG Y S, WANG Q, et al. Detection methods of cyprinid Herpesvirus 2 infection in silver Crucian Carp (*Carassius auratus gibelio*) via a pORF 72 monoclonal antibody [J]. Journal of Fish Diseases, 2017, 40(12): 1791-1798.
- [12] 李盈, 刘振兴, 马艳平, 等. 基于鲤疱疹病毒 3 型 ORF65 基因的 DNA 疫苗对建鲤鱼苗的免疫保护研究[J]. 南方水产科学, 2019, 15(4): 122-126.
- LI Y, LIU Z X, MA Y P, et al. Protection of Jian carp with immunization of CyHV-3 ORF65 DNA vaccine [J]. South China Fisheries Science, 2019, 15(4): 122-126.
- [13] 朱霞, 王好, 李新伟, 等. 锦鲤疱疹病毒病的研究进展 [J]. 中国兽医科学, 2011, 41(1): 106-110.
- ZHU X, WANG H, LI X W, et al. Advances in koi herpesvirus disease [J]. Veterinary Science in China, 2011, 41(1): 106-110.
- [14] 朱日同. 鲤鱼疱疹病毒病的防控技术 [J]. 河南水产, 2018(1): 14-15, 17.
- ZHU R T. Prevention and control techniques of carp herpesvirus disease [J]. Henan Fisheries, 2018(1): 14-15, 17.
- [15] TAYLOR N G H, DIXON P F, JEFFERY K R, et al. Koi Herpesvirus: distribution and prospects for control in England and Wales [J]. Journal of Fish Diseases, 2010, 33(3): 221-230.
- [16] 白姗姗, 贾智英, 郎延贺, 等. CyHV-3 感染镜鲤选育世代免疫基因表达及抗病能力比较 [J]. 上海海洋大学学报, 2017, 26(5): 651-657.
- BAI S S, JIA Z Y, LANG Y H, et al. Comparisons of the immune gene expression and disease resistance between mirror carp breeding generations after CyHV-3 infection [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2017, 26(5): 651-657.
- [17] 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.
- [18] 王世会, 贾智英, 李池陶, 等. 锦鲤疱疹病毒 ORF72 基因克隆及结构功能分析 [J]. 水产学杂志, 2016, 29(3): 9-15.
- WANG S H, JIA Z Y, LI C T, et al. Cloning and functional analysis of ORF72 gene in koi herpes virus [J]. Chinese Journal of Fisheries, 2016, 29(3): 9-15.
- [19] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [20] 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.
- [21] GILAD O, YUN S S, ANDREE K B, et al. Initial characteristics of koi Herpesvirus and development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in Koi, *Cyprinus carpio* koi [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2002, 48(2): 101-108.
- [22] 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.
- [23] 白姗姗. 镜鲤不同选育世代对疱疹病毒 (CyHV-3) 抗病力评估 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.
- BAI S S. Evaluation of the resistance of different mirror carp breeding generations to CyHV-3 [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017.

## Research on expression of virus in Cyprinid herpesvirus 3 ( CyHV-3) $F_4$ disease resistant strains

SUN Jiaxin<sup>1,2,3</sup>, SHI Lianyu<sup>2</sup>, JIANG Xiaona<sup>2</sup>, LI Chitao<sup>2</sup>, GE Yanlong<sup>2</sup>, HU Xuesong<sup>2</sup>, ZHANG Xiaofeng<sup>2</sup>, JIA Zhiying<sup>2</sup>

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Aquatic Genomics, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Harbin 150070, Heilongjiang, China; 3. Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** The new variety was bred to  $F_4$ , and the disease resistance traits have reached stability.  $F_4$  was used as the experimental material, and *TK* and *ORF72* were used as virus marker genes to analyze the expression of  $F_4$ , a resistant strain of Cyprinid herpesvirus (CyHV-3), in different stages of viral infection, to investigate the effect of  $F_4$  on disease resistance and its virus expression pattern from the perspective of virus expression. The results showed that: The expression trends of spleen and kidney tissues of the two genes at different infection stages were consistent, with an upward trend from 24 h to 144 h and a downward trend from 144 h to 288 h. The spleen and kidney of the unselected group and the kidney of the selected group were significantly different at 144 h compared with other periods. The expression of both genes in spleen tissue was lower than that in kidney tissue. The two genes in the breeding group and the non-breeding group were significantly different between 96 h and 144 h, and the two genes in the breeding group were significantly different at 96 h and 144 h in the *ORF72*, and the other periods were significantly different. The expression levels of two genes in the breeding group were lower than those in the non-breeding group. The two genes in spleen tissue were significantly different from 96 h to 168 h, and the *ORF72* was also significantly different at 192 h and 216 h; the two genes in kidney tissue were significantly different from 96 h to 168 h; *ORF72* was also significantly different at 192 h. The above results show that the disease resistance of the selective group is stronger than that of the non-selected group, in which the kidney tissue has better disease resistance than the spleen, and the immune resistance of the selected kidney tissue is greatly improved. At present, no selective breeding of other fisher has reached a stable stage in disease resistance. This study can provide important guidance for other fishes in the study of viral expression.

**Key words:** mirror carp; Cyprinid herpesvirus 3; immune gene; viral expression