



通过CRISPR/Cas9技术探索草鱼TLR8a在抗病育种中的应用潜力

陈冠宇^{1,2}, 王鹏旭¹, 吕毛琳¹, 苏建国^{1,2*}

1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070

2. 青岛海洋科技中心海洋生物学与生物技术功能实验室, 青岛 266237

* 联系人, E-mail: sujianguo@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2025-04-01; 接受日期: 2025-04-23; 网络版发表日期: 2025-09-29

农业生物育种国家科技重大专项(批准号: 2023ZD04065)资助

摘要 草鱼出血病严重制约淡水养殖业的可持续发展, 基于CRISPR/Cas9基因编辑技术筛选免疫负调控基因并培育抗病品系, 已成为当前病害防控的重要策略. 草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)TLR8a是抗病毒免疫反应中的负调控因子, 为确定该靶点在抗病育种中的应用潜力, 本研究构建F0代*tlr8a*基因缺失的杂合体草鱼模型, 并探究其在抗病毒感染中的免疫调控机制. 结果表明, 敲除草鱼*tlr8a*可减缓出血病的临床症状与肝胰腺、肠道的病变程度, 并提高抗病毒关键基因(*ifn1*, *mx2*)与炎症基因(*nf- κ b2*, *il-6*)的表达, 降低II型草鱼呼肠孤病毒(type II grass carp reovirus, GCRV-II)感染后病毒外衣壳蛋白VP56的mRNA表达量. 此外, 敲除*tlr8a*后草鱼的外周血白细胞展现出更强的趋化活性, 并且活性氧的产生能力和酸性磷酸酶活性显著增强. 这暗示TLR8a可能通过调控干扰素通路 with 细胞因子来参与抗病毒先天免疫, 并介导过度的炎症激活. 本研究不但为解析鱼类TLR信号通路的免疫平衡机制提供新视角, 也为抗病鱼类的分子选育提供潜在靶点.

关键词 基因编辑, 草鱼, 抗病育种, TLR8a, 草鱼呼肠孤病毒, 外周血白细胞

CRISPR/Cas9技术凭借高效的靶向编辑特性及精准的双链断裂修复机制, 在基因功能研究、可持续的遗传改良、疾病控制与抗病育种方面发挥着重要作用^[1,2]. 抗病是水产养殖中的一个重要性状, 已有部分研究在个体水平对免疫基因进行基因编辑, 从而探索宿主与病原间的相互作用机制^[3,4]. 张杰等人^[5]对草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)的*pi4kb*基因进行敲除, 发现敲除*pi4kb*后的第F0代草鱼生长速度快、并对GCRV-II感染具有抗性, 证明该基因对GCRV-II所引起的草鱼

出血病具有保护作用. 赵心愉等人^[6]构建的团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)*socs1a*和*socs1b*突变杂合体生长性能增强, 同时在感染嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)后炎症因子*tnf- α* , *il-6*的表达量显著增加. 上述研究进展均强调负调控基因在抗病毒/细菌免疫中的重要性.

Toll样受体(Toll-like receptors)是研究最广泛最深入的模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)家族, 在抵抗感染、免疫稳态和免疫监视中发挥重要

引用格式: 陈冠宇, 王鹏旭, 吕毛琳, 等. 通过CRISPR/Cas9技术探索草鱼TLR8a在抗病育种中的应用潜力. 中国科学: 生命科学

Chen G Y, Wang P X, Lv M L, et al. Investigating the application potential of TLR8a in disease-resistant breeding of *Ctenopharyngodon idella* via CRISPR/Cas9 (in Chinese). Sci Sin Vitae, doi: [10.1360/SSV-2025-0090](https://doi.org/10.1360/SSV-2025-0090)

作用,是启动先天性免疫和调控获得性免疫的关键元件^[7]。草鱼TLR8分为两个成员,包括TLR8a(原TLR8)与TLR8b^[8],前期的研究发现草鱼TLR8a的功能与抗病毒先天免疫密不可分,其能够作为抗病毒免疫反应中的负调控因子,当使用siRNA干扰CIK细胞TLR8a的表达后能够增强细胞对GCRV-II的抗性^[9,10]。

草鱼在2024年全国淡水养殖的产量为616.49万吨,高居淡水鱼类养殖之首^[11]。由草鱼呼肠孤病毒引发的草鱼出血病因其高传染性和高致死率(流行期死亡率可达80%以上)严重制约产业发展^[12]。本研究基于CRISPR/Cas9技术成功构建 $tlr8a$ 敲除($TLR8a^{+/-}$)的草鱼F0代突变体,并系统评估该模型在GCRV-II感染下的病毒动态载量、组织病理变化及关键免疫基因(抗病毒/炎症通路相关)的表达谱变化,并通过原代外周血白细胞(peripheral blood leukocytes, PBLs)探究基因编辑对免疫细胞功能活性的影响,为抗病育种中F0代基因编辑个体的早期评价体系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 敲除靶点设计与草鱼胚胎敲除

通过美国国家生物信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)获得草鱼 $tlr8a$ 的基因序列,基因登录号为: HQ638214。使用CRISPRscan(<https://www.crisprscan.org/>)设计靶位点,使用MEGA-script™ T7转录试剂盒体外合成特异性gRNA并保存在 -80°C 。以pT3TS-nCas9n质粒为模板,使用mMES-SAGE mMACHINE™ T3转录试剂盒进行体外转录,合成Cas9 mRNA并保存在 -80°C 。

实验所用亲本草鱼来自于中国科学院水生生物研究所武汉现代生态渔业研究基地,雌雄分开。显微注射前一晚准备好繁殖缸,人工授精后收集受精卵,向胚胎中注射1.8 nL Cas9 mRNA和gRNA混合液到一细胞期的受精卵内,室温孵化。待幼鱼生长至约3 cm时剪取草鱼幼鱼部分尾鳍进行DNA提取,使用TLR8a检测引物TLR8a-testF/R(表1)扩增目的片段并测序,筛选敲除成功的F0代 $TLR8a^{+/-}$ 草鱼。

1.2 浸泡感染与感染期间草鱼的表现症状观察

草鱼呼肠孤病毒 II 型(GCRV-II)毒株由中国科学院水生生物研究所汪亚平研究员惠赠,使用荧光定量

方法检测病毒滴度^[13],浸泡感染实验方法按先前报道的方法进行^[14],保证水体氧含量大于6 mg/L,水温控制在 $(28\pm 0.2)^{\circ}\text{C}$ 。提前将敲除组草鱼的上尾鳍作剪鳍处理,与野生型草鱼相区别。每1 L水体加入 1.25 mL 病毒液($1.42\times 10^9\text{ copies}/\mu\text{L}$),混匀后浸泡感染30 min,随后将全部草鱼转移至养殖缸中养殖21天,每日早晚各投喂1次商业饲料。在第1, 3, 5, 7天随机对感染后的WT及 $TLR8a^{+/-}$ 组草鱼个体进行取样,使用150 mg/L MS-222麻醉草鱼并拍照记录感染后表现症状。本研究涉及的实验草鱼均通过华中农业大学实验动物中心动物实验伦理审查(伦理编号: HZAUF1-2025-0026)。

1.3 组织收集与病理学切片

在第0, 6, 12, 24, 48, 60, 72, 120, 168 h麻醉草鱼后无菌取草鱼肝胰腺、脾脏、头肾、鳃和肠道(每个时间点各组取3尾草鱼)置于2 mL无菌无酶研磨管中,并加入1 mL TRIpure Reagent (Aidlab Biotechnologies, China)研磨后按照说明书进行RNA提取,使用Hiscrypt III Reverse Transcriptase试剂盒(Vazyme, China)合成cDNA,将模板浓度稀释至100 ng/ μL 后置于 -80°C 冰箱保存。将24, 72, 120和168 h的肝胰腺和肠道置于含1 mL 4%组织固定液的1.5 mL离心管中固定24 h。将样品送至皮诺飞生物科技公司进行HE染色。最后将玻片置于高分辨数字切片扫描系统中扫描切片,使用TEKSQRAY数字病理阅片软件分析病理损伤。

1.4 实时荧光定量RT-PCR与蛋白质免疫印迹

使用NCBI的Primer-BLAST工具设计待测基因与内参基因的特异性引物。检测野生型与 $TLR8a^{+/-}$ 草鱼的 $tlr8a$ 相对含量,测定不同时间点各组织中病毒外衣壳蛋白vp56 mRNA及免疫相关基因 $ifn1$, $mx2$, $nf-\kappa b2$, $il-6$ 的相对表达量,并使用18S rRNA作为内参基因,所使用的引物序列见表1。将稀释过的cDNA模板与定量引物在384孔板中按BrightCycle Universal SYBR Green qPCR Mix (Abclonal Biotechnology, China)说明书配制10 μL 反应体系。使用水平转子将384孔板瞬时离心,消除壁上液体与气泡后将孔板置于CFX opus 384 (Bio-Rad, United States)中并按说明书设置反应程序(第一次进行qRT-PCR反应时需检测不同引物的熔解曲线),使用比较CT值法($2^{-\Delta\Delta C_t}$)分析数据。

使用全蛋白提取试剂盒(南京建成生物工程研究

表 1 实验所需引物
Table 1 Primers for experiments

引物名称	引物序列(5'→3')	用途
TLR8aTarget-F	TAATACGACTCACTATAGGGGTGGTGTTCCTCTCGAGGTTTTAGAGCTAGAA	gRNA模板扩增
Scaffold	GATCCGCACCGACTCGGTGCCACTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTT-TAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAAC	gRNA模板扩增
TLR8a-testF	CCGCTCGAGAGAAACACCACCTC	靶点序列扩增
TLR8a-testR	CCCCTCGAGCTCCAGCGTACGCA	靶点序列扩增
18sF	ATTTCGACACGGAGAGG	qRT-PCR
18sR	CATGGGTTTAGGATACGCTC	qRT-PCR
CiTLR8a-qPF	TAACTCGAGTGCCAGAGGA	qRT-PCR
CiTLR8a-qPR	AGCTCGCGGATGGATTTCAA	qRT-PCR
CiIL6-rtF	CTGGAACACATCGAGAAGG	qRT-PCR
CiIL6-rtR	GGAGATGTTGAGTTCAGGTG	qRT-PCR
IFN1F	AAGCAACGAGTCTTTGAGCCT	qRT-PCR
IFN1R	GCGTCCTGGAAATGACACCT	qRT-PCR
NF-κB2F	AGGCACTTCTCAGCACTACGAT	qRT-PCR
NF-κB2R	AAAACCTCTCCCATTCACC	qRT-PCR
MF428	ACATTGACATCGCCACCACT	qRT-PCR
MR429	TTCTGACCACCGTCTCTCTCC	qRT-PCR
VP56F	AGCAGGCTATTCATCACCAGT	qRT-PCR
VP56R	GTTCTAACGCTCACCCTCTTTTC	qRT-PCR

所, 中国)提取各组草鱼脾脏中的蛋白, 随后将提取得到的蛋白进行SDS-PAGE与Western blot. 使用VP56多克隆兔抗^[15]与β-actin Rabbit mAb (ABclonal Biotechnology)作为一抗、HRP-conjugated Goat anti-Rabbit IgG (ABclonal Biotechnology)作为二抗, 检测脾脏中的VP56和β-actin (内参蛋白)的含量.

1.5 草鱼外周血白细胞提取

攻毒实验结束后将存活草鱼转移至养殖室中继续饲养, 按照密度梯度离心法进行草鱼外周血白细胞(peripheral blood leukocytes, PBLs)的提取, 实验方法如下. 配制100%的Percoll, 使用1× PBS稀释成61%的Percoll后置于冰盒中备用. 使用PBS配制终浓度为1 mg/mL的肝素钠(Solarbio, China), 置于冰盒中备用. 各取3尾F0代TLR8^{+/-}草鱼与野生型草鱼尾静脉采血, 加入2倍血液体积的肝素钠混匀并置于冰盒中. 向2 mL离心管中加入900 μL 61%的Percoll, 倾斜管壁小心加入400 μL血液, 此时出现明显分层. 在高速冷冻离心机(Multifuge X1R, Thermo Fisher Scientific, United States)中4℃ 600×g离心10 min后小心取出离心管, 吸出中间灰白色细胞置于新的2 mL离心管. 使用1× PBS

清洗细胞后向管中加入800 μL红细胞裂解液(Solarbio), 移液器轻轻吹打混匀后置于冰上静置孵育5 min, 最后使用PBS清洗细胞沉淀3次, 使用细胞计数板在倒置显微镜下计数后使用.

1.6 基因编辑*tlr8a*对草鱼外周血白细胞功能的影响

趋化活性检测: 使用1×PBS将PBLs重悬至5×10⁶ cells/mL, 使用PBS将LPS梯度稀释(1, 10, 25, 50, 100 μg/mL), 将灭活后的病毒液稀释2, 4, 8, 16和32倍, 使用PBS作为阴性对照. 取24孔趋化板(Corning Transwell, Merck, United States), 将100 μL稀释后的PBLs小心滴加到上室(孔径3 μm)中, 将600 μL不同浓度的LPS或灭活病毒稀释液与对照组加入到下室中. 将上室放回孔中, 室温孵育1 h. 孵育结束后取下上室, 并使用倒置显微镜观察记录从上室趋化到下室的细胞数目. 为方便比较, 将阴性对照组所诱导的野生型草鱼PBLs趋化结果设置为1.

活性氧含量与酸性磷酸酶活性检测: 使用氯化硝基四氮唑蓝(NBT)测定基因编辑*tlr8a*对PBLs产生活性氧的影响. 使用终浓度为25 μg/mL的LPS刺激F0代

TLR8^{+/−}草鱼的PBLs与野生型草鱼的PBLs (4×10^6 cells), 将上述混合液置于旋转摇床上室温孵育1或2 h. 在不同时间点取上述混合液100 μ L于96孔板中, 每孔加入100 μ L NBT (1 mg/mL, 内含1 μ g/mL的PMA), 室温静置孵育1 h后加入100 μ L甲醇终止反应. 将96孔板置于水平转子中400 $\times$ g离心10 min后弃除上清, 再使用200 μ L 70%甲醇清洗3次, 最后每孔加入120 μ L的2 mol L^{−1} KOH与140 μ L的DMSO, 显色后置于A₆₃₀测定吸光度. 使用碧云天酸性磷酸酶活性检测试剂盒检测各组PBLs的酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)活性, 细胞同样使用25 μ g/mL的LPS刺激. 为便于比较, 将各时间点野生型草鱼的PBLs细胞活性设置为1.

2 结果与分析

2.1 TLR8a敲除靶位点分析

F0代草鱼*tlr8a*基因突变体的靶位点位于第2外显子上, 序列为CCGCTCGAGAGAAACACCACCTC (图1A). 随后使用检测引物扩增目的序列并测序, 野生型(WT)草鱼的序列正常, 而第F0代敲除组草鱼(TLR8a^{+/−})的目标序列被成功敲除(图1B). 使用荧光定量引物检测野生型与TLR8a^{+/−}草鱼5种组织中的*tlr8a*相对表达量后发现, 敲除组草鱼肝胰腺、脾脏、头肾、鳃和肠道中的*tlr8a*含量均显著低于野生型草鱼(图1C).

2.2 浸泡感染后草鱼死亡率统计与组织载毒量检测

在GCRV-II浸泡感染后的21天内统计各组存活率, 未进行浸泡感染的野生型草鱼存活率为100%, 感染后的野生型草鱼和F0代TLR8^{+/−}草鱼的存活率分别为1.81%和10.91%, 与野生型草鱼相比基因编辑后的第F0代草鱼存活率提升9.1%(图2A). 对*vp56* mRNA相对表达量的检测结果表明, 在肝胰腺感染后的第72和120 h, 脾脏感染后的第48, 60, 120和168 h, 头肾感染后的第60, 72和168 h, 鳃感染后的第12和72 h, 肠道感染后的第24, 72和168 h, TLR8^{+/−}草鱼的*vp56*相对表达量显著低于野生型草鱼(图2B~F). 对脾脏中VP56蛋白的检测表明, 在第0天两组草鱼均未检测到VP56. 而在感染后第1, 5, 7天, TLR8^{+/−}草鱼脾脏中的VP56含量明显低于WT草鱼, 这与定量结果显示的趋势基本一致. 并且*vp56*在各组织中的相对表达量呈现为先上升后下

降趋势, 上述结果表明对*tlr8a*的基因编辑能够减少GCRV-II病毒的组织载毒量.

2.3 感染后的草鱼临床症状与组织病理学观察

收集浸泡感染后7天内的野生型与TLR8^{+/−}草鱼个体, 如图3A所示, 两组草鱼随着感染时间的推移感染症状均持续加重. 在第3天野生型草鱼便出现出血症状, 第5天野生型草鱼腹部体表也出现出血症状, 第7天草鱼的鳍条、下颌、体表均出现出血. 而TLR8^{+/−}草鱼在第5天与第7天也出现鳍条出血的症状. 对肠道的HE染色结果表明各组草鱼的肠道随着时间推移杯状细胞增多, 出现较严重的组织水肿, 但野生型草鱼的病变程度较严重(图3B). 对肝胰腺的染色结果表明两组草鱼的肝胰腺随着感染时间的推移均出现细胞核固缩现象(图3C). 这些结果表明, 浸泡感染GCRV-II后在体表、肝组织和肠道中能够引起显著的病理变化, 并且TLR8^{+/−}草鱼的组织病变情况较WT草鱼相比有所减轻.

2.4 病毒刺激后草鱼的免疫基因表达情况

为了检测对草鱼*tlr8a*的基因编辑是否对免疫基因的表达产生影响, 本文使用IFN1, Mx2, NF- κ B2和IL-6的定量引物检测相对应的mRNA相对表达量. 结果表明TLR8^{+/−}草鱼的*ifn1* mRNA相对表达量在感染后第24, 60和72 h的肝胰腺; 第0, 6, 12, 72和120 h的脾脏; 第60和168 h的头肾; 第0, 6, 60, 72, 120和168 h的鳃; 第12, 48, 60和72 h的肠道中显著高于野生型草鱼(图4A). 但在第0 h的肠道中*ifn1*表达量低于野生型草鱼(图4A). 对*mx2* mRNA相对表达量的检测结果显示在感染后0, 6, 12, 24, 72和120 h的肝胰腺; 12 h的脾脏; 0, 72和168 h的头肾; 48, 72~168 h的鳃和48和72 h的肠道中的*mx2*的相对表达量显著高于野生型草鱼(图4B). 上述研究结果表明, *tlr8a*可能通过调控*ifn1*与*mx2*的表达从而介导抗病毒免疫反应. 随后对炎症相关基因的表达量进行检测, 与野生型草鱼相比, 第F0代TLR8^{+/−}草鱼的*nf- κ b2*和*il-6*的mRNA表达量在感染后的不同时间点也有不同程度的升高. 在第24, 60, 120, 168 h的肝胰腺中F0代TLR8^{+/−}草鱼*nf- κ b2*的表达量是野生型草鱼的1.46~2.39倍; 第0~24, 72~168 h的脾脏中是野生型草鱼的1.33~5.35倍; 第0~48, 72, 120 h的头肾中是野生型草鱼的1.32~2.66倍; 在鳃中的表达量是野生型草鱼的

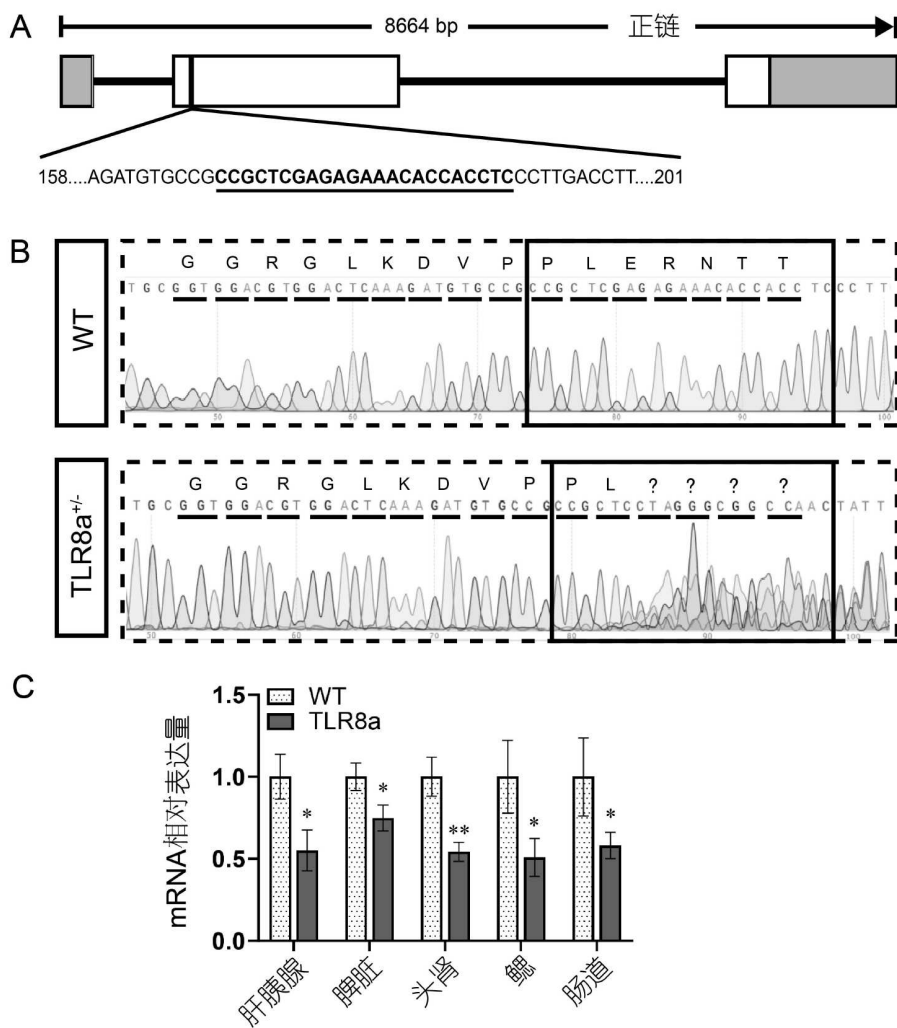


图 1 草鱼*tlr8a*基因敲除的靶位点分析。A: 外显子和内含子分别用矩形方框和黑色线条表示, 方框内的灰色和白色区域分别代表非翻译区和开放阅读框。带下划线的加粗字体代表目标序列; B: 测序验证*tlr8a*基因被成功敲除; C: 使用qRT-PCR检测敲除后草鱼的*tlr8a*相对含量。平均值±平均值的标准差表示三个独立分析的平均值。*, $P<0.05$; **, $P<0.01$

Figure 1 Analysis of the target site for *tlr8a* knockout in grass carp. A: Exons and introns are represented by rectangular boxes and black lines, respectively. The gray and white areas within the box represent the untranslated region (UTR) and open reading frame (ORF). The underlined bold font represents the target sequence; B: the *tlr8a* was knocked successfully through sequencing; C: the relative *tlr8a* content of knockout grass carp was detected by qRT-PCR. The means±SD denotes the means of three independent assays. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$

1.05~6.64倍; 第12, 48~168 h的肠道中是野生型草鱼的1.18~2.78倍(图4C)。对早期炎症因子IL-6的检测表明在感染后的第6 h和48 h, F0代TLR8^{+/-}草鱼的肝胰腺中*il-6* mRNA含量较高, 是野生型草鱼的3.62倍和3.86倍; 在第12和24 h的脾脏中含量是野生型草鱼的5.05和3.46倍; 在第48~72 h的头肾中含量分别是野生型草鱼的2.12, 2.25和2.94倍; 在第60~120 h的鳃中含量分别是野生型草鱼的4.68, 10.39和5.13倍; 在48~120 h的肠道中含量分别是野生型草鱼的13.94, 3.48, 2.63和2.20

倍(图4D)。以上结果表明敲除*tlr8a*后能够影响*nf- κ b2*和*il-6*的表达, 从而保护宿主免受病毒感染。

2.5 基因编辑TLR8a对草鱼外周血白细胞激活的影响

实验结果表明敲除*tlr8a*后的原代PBLs在刺激2 h时能产生更多的活性氧(图5A)。对酸性磷酸酶活性的分析显示在所选取的时间点内, F0代TLR8^{+/-}草鱼原代PBLs的酸性磷酸酶活性均高于野生型草鱼(图5B)。

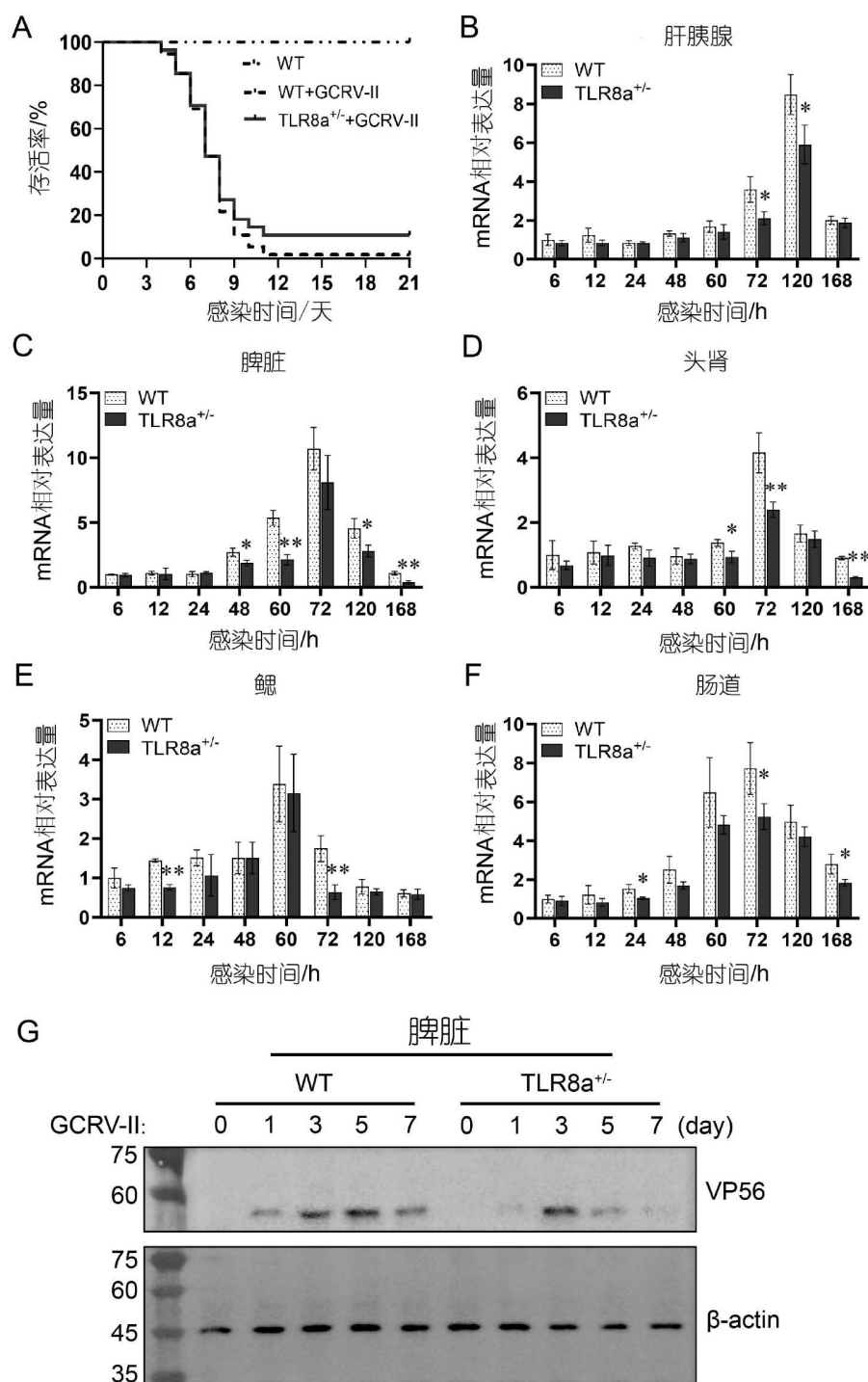


图 2 浸泡感染后草鱼存活率与不同时间点5种组织中病毒载量统计. A: 使用 II 型 GCRV 浸泡感染草鱼, 统计 21 天内草鱼存活率; B~F: 浸泡感染后的草鱼肝胰腺、脾脏、头肾、鳃和肠道中的 *vp56* 相对表达量检测, *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; G: II 型 GCRV 感染后不同时间点脾脏内的 VP56 与 β -actin 检测

Figure 2 Survival rates of grass carp after immersion and relative viral load in five tissues at different time points. A: Grass carp were soaked with GCRV-II, and the survival rates of grass carp were measured within 21 d; B~F: detection of *vp56* relative mRNA content in hepatopancreas, spleen, head kidney, gill, and intestine of grass carp after immersion infection, *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; G: detection of VP56 and β -actin in the spleen at different time points after type II GCRV infection

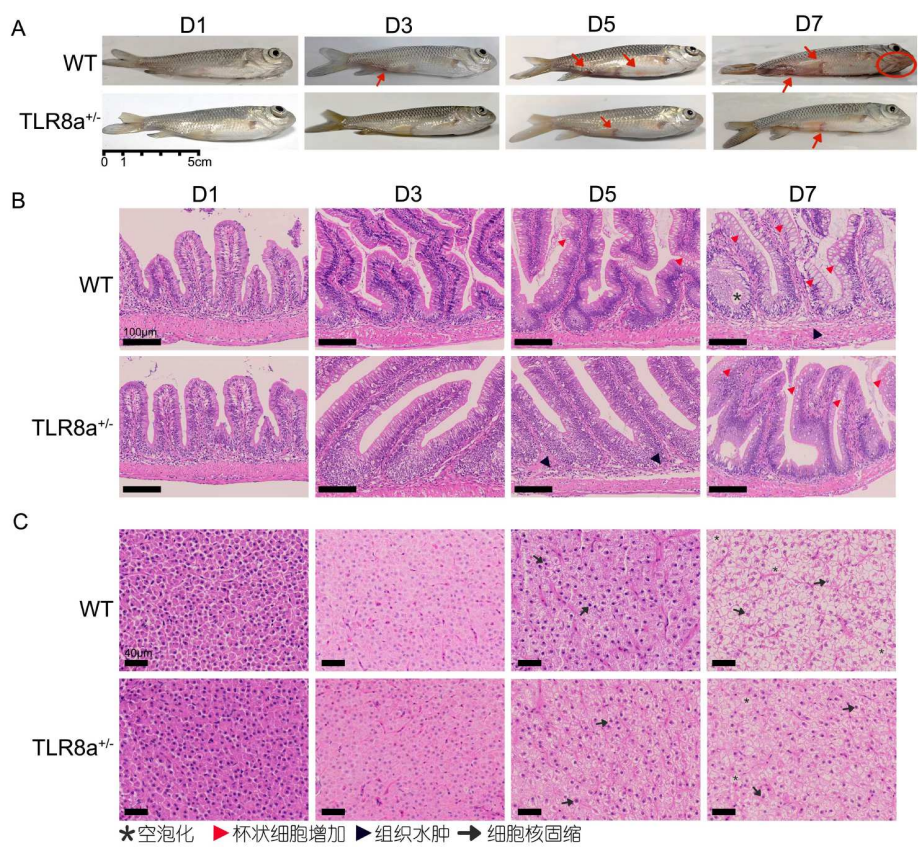


图 3 野生型与敲除组草鱼在感染期间的临床表征与病理切片. A: 野生型草鱼与 $tlr8a$ 敲除草鱼在感染期间的表观症状. 红色箭头代表体表局部出血, 红色圆圈代表下颌出血. 使用D1~D7代表感染天数. 标尺大小为5 cm; B: 野生型草鱼与 $tlr8a$ 敲除草鱼在感染期间的肠道切片. 标尺大小为100 μm ; C: 野生型草鱼与 $tlr8a$ 敲除草鱼在感染期间的肝胰腺切片. 标尺大小为40 μm . 黑色星号代表空泡化, 红色三角代表杯状细胞增加, 黑色三角代表组织水肿, 黑色箭头代表细胞核固缩

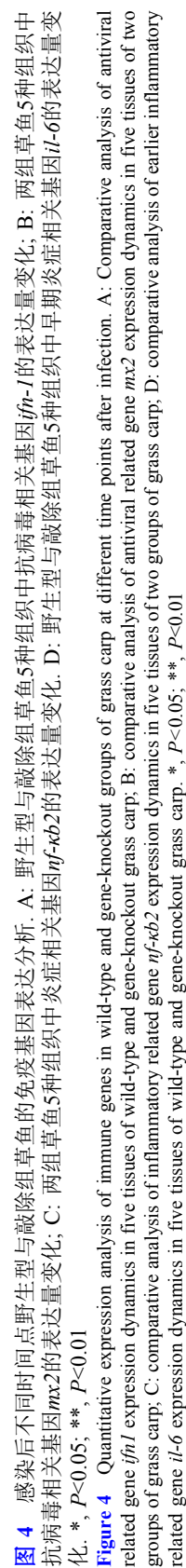
Figure 3 Clinical symptoms and histopathological observation of wild-type and gene-knockout group grass carp during infection. A: Clinical symptoms of wild-type and *tlr8a*-knockout grass carp during infection. The red arrow and red circle indicate the hemorrhagic symptoms on the body surface and lower jaw of the fish, respectively. The days post infection were represented by D1–D7. Bar size, 5 cm; B: the intestine histological section of wild-type and *tlr8a*-knockout grass carp during infection. Bar size, 100 μm ; C: the hepatopancreas section of wild-type and *tlr8a*-knockout grass carp during infection. Bar size, 40 μm . Black asterisks denote vacuolization; red triangles indicate an increase of goblet cells; black triangles represent tissue edema; and black arrows signify nuclear pyknosis

随后使用不同浓度的LPS诱导PBLs迁移, 并以未使用LPS诱导的PBLs为对照, 结果表明在未诱导条件下敲除组或野生型草鱼的PBLs均未发生显著迁移. 在受到LPS诱导后, 各组PBLs均发生迁移, 迁移程度与LPS浓度呈正相关, 当LPS浓度为1和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 敲除组草鱼的PBLs展现出比野生型更显著的趋化活性, 为野生型的1.79和1.33倍(图5C). 将灭活后的病毒液以不同的稀释倍数稀释后用于诱导PBLs迁移, 结果表明在未添加灭活病毒的条件下各组PBLs未发生显著迁移. 当受到灭活病毒刺激时, PBLs的趋化活性与病毒稀释倍数呈负相关, 当病毒稀释倍数为2, 4, 8, 16倍时, $TLR8^{+/-}$ 草鱼的PBLs比野生型的PBLs展现出更高的

趋化指数, 为野生型的1.39, 1.32, 1.55, 1.43倍(图5D). 以上结果表明敲除 $tlr8a$ 能够驱动细胞的炎症反应, 这种促炎作用可能导致溶酶体通透性增加, 从而向胞质中释放更多的ACP. 此外, 草鱼 $tlr8a$ 可能通过影响趋化因子的活性从而使PBLs发生趋化作用来响应细菌和病毒感染.

3 讨论

CRISPR-Cas基因组编辑技术彻底改变人们对鱼类疾病的研究方式, 在遗传修饰方面提供前所未有的精确度, 帮助研究者更好的探索疾病相关基因的鉴



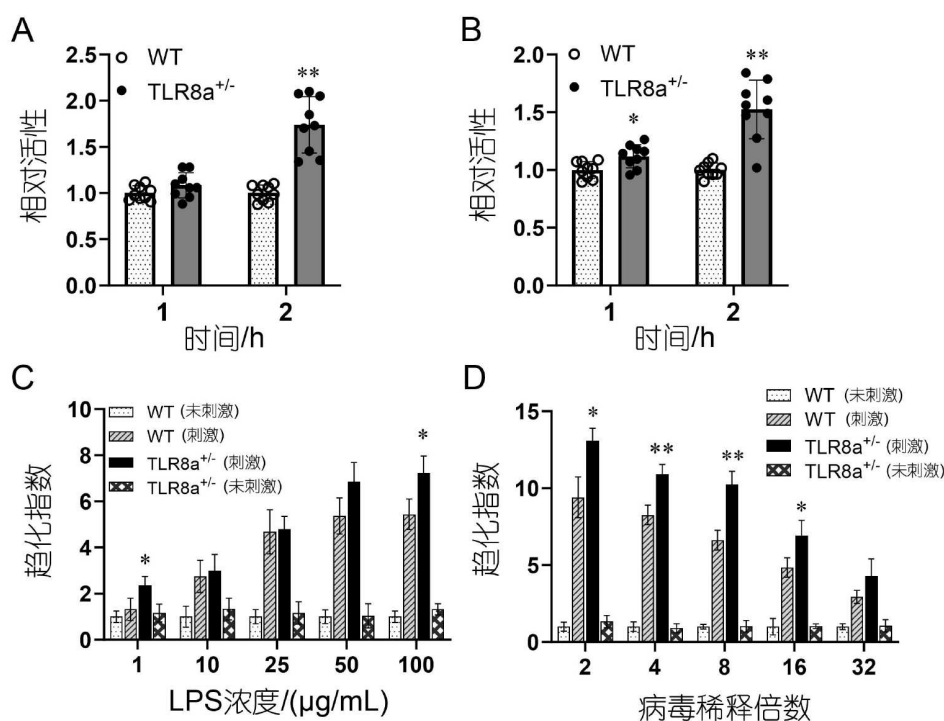


图 5 敲除 $tlr8a$ 对草鱼外周血白细胞活性的影响. A: 使用LPS刺激野生型与敲除组草鱼的PBLs, 随后检测其活性氧的产生能力; B: 使用LPS刺激野生型与敲除组草鱼的PBLs, 随后检测其酸性磷酸酶活性; C: 在使用LPS诱导或不诱导的条件下检测PBLs的趋化能力; D: 在使用灭活病毒诱导或不诱导的条件下检测PBLs的趋化能力. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$

Figure 5 Effect of *tlr8a* knockout on the activity of grass carp. A: The PBLs of wild-type and *tlr8a*-knockout grass carp were stimulated with LPS, and their reactive oxygen species production capacity was measured subsequently; B: the PBLs of wild-type and *tlr8a*-knockout grass carp were stimulated with LPS, and their acid phosphatase activity was measured subsequently; C: the chemotactic capacity of PBLs was detected with or without LPS stimulation; D: the chemotactic ability of PBLs was determined with or without inactivated virus stimulation. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$

定、疾病易感性/抗性的遗传基础、宿主与病原体间的相互作用以及抗病品种的培育^[16]. 近年来, 一些免疫负调控因子被发现, 并在细胞或个体水平通过CRISPR/Cas9技术靶向敲除这些基因, 从而提高宿主对不同疾病的抵抗力. 对草鱼CIK细胞中的JAM-A进行基因敲除会抑制细胞病变效应(CPE), 并减少I型GCRV (GCRV-JX0901)与III型GCRV (HGDRV)在细胞中的复制^[17]. 屈紫玲等人^[18]通过对斑马鱼(*Danio rerio*)*ftr42*基因(鲮特异性*ftrcal*的同源基因)进行编辑, 获得该基因的斑马鱼纯合突变体(*ftr42*^{lof/lof}), 并且该突变体能够有效抵抗鲤春病毒血症病毒(spring viraemia of carp virus, SVCV)感染. 蔡孝廉等人^[19]发现缺氧诱导因子抑制因子(FIH)能够通过破坏IKKε的功能从而负向调节I型干扰素信号, 并且*fih*敲除的纯合体斑马鱼显著增强对病毒的抵抗力. 通过对异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)的两种viperin (Cgviperin-A和Cgviperin-B)进行基因敲除并构建得到F2代纯合体, 从而探

究viperin在鱼体内抗鲫疱疹病毒(*C. auratus herpesvirus*, CaHV)的功能^[20]. Michael Coogan等人^[21]通过对斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)*mstn*基因进行靶向敲除, 成功获得*mstn*敲除的F1代杂合子, F1代个体在生长速度增加的同时增强对鲷爱德华菌(*Edwardsiella ictaluri*)的抵抗力. 前期研究已证实草鱼TLR8a在抗GCRV感染中扮演负调控因子的角色^[9], 本文发现通过敲除 $tlr8a$ 能够在GCRV-II感染过程中减轻草鱼的病理损伤, 并显著上调抗病毒与炎症相关基因的表达.

全身性出血是草鱼出血病的重要病理特征, 是以肌肉出血、体表出血(口腔、下颌、鳃盖、鳍条基部明显充血)和肠道充血、出血为代表的临床症状及病变. 这3种症状在临床上可能单独出现, 也可混杂出现. 在本研究中, 野生型草鱼在感染第3天便出现出血症状, 并随着感染时间的增加出血症状加重, 这与先前的研究结果一致^[14]. 除表观症状外, GCRV感染能够引起草鱼组织的严重病变, 包括肝胰腺可能出现细胞空

泡化、核固缩、肝板排列紊乱、肝索溶解等现象^[15]; 肠道则可能出现杯状细胞增多、肠道绒毛的空泡化、肠黏膜层破损等现象^[14]; 本研究收集感染后不同时间点的草鱼肠道与肝胰腺, 发现在感染后第5天野生型与TLR8a^{+/-}草鱼的肠道便出现病变, 并在第7天加重, 表现为杯状细胞增多、黏液细胞增生、细胞空泡化与组织水肿。同样, 野生型草鱼的肝胰腺在感染后第7天出现空泡化、核固缩与核溶解。这些病理切片结果也为TLR8^{+/-}草鱼抵抗GCRV-II的感染提供有力证据。

本研究发现vp56的mRNA表达量在5种所检测组织中均呈现先上升后下降的趋势, 这可能是由于在攻毒后宿主先天免疫抗病毒基因被激活, 通过IFN通路抑制病毒的合成, 这与*tlr8a*敲除草鱼的*ifn1*相对表达量升高相吻合。作为干扰素介导的抗病毒先天免疫反应的效应分子, Mx蛋白可直接作用于病毒上的靶位点^[22], *mx2*的相对mRNA水平在感染后升高可能也与vp56 mRNA的表达降低有关。此外, vp56 mRNA在不同组织中的表达差异可能是病毒扩散至其他组织, 导致原取样部位的病毒载量下降。上述研究结果表明草鱼TLR8a可能通过影响干扰素通路调控抗病毒免疫。IL-6能够介导和调节固有免疫, 发挥抗病毒、抗细菌感染作用, NF-κB2(p100)主要通过非经典信号通路参与免疫调节, 在淋巴器官的发育、B细胞介导的体液免疫和自身免疫反应中发挥核心作用^[23]。本研究发现

在感染GCRV-II后, 敲除*tlr8a*会使炎症因子*il-6*、*nf-κb2*的表达量显著上升, 这暗示着TLR8a能够在草鱼的炎症反应中产生重要影响。

硬骨鱼类的白细胞具有更强大、更全面的免疫功能, 是鱼类抵御细菌和病毒感染的关键防线^[24]。细胞趋化作用能够在化学信号(趋化因子)的引导下定向迁移, 在免疫应答中至关重要^[25]。ROS也能发挥免疫防御作用, 并且还能激活NF-κB通路、驱动炎症反应, 这种促炎作用可能会导致溶酶体通透性增加, 释放ACP至胞质并加剧细胞损伤^[26]。本文发现敲除草鱼*tlr8a*能显著诱导外周血白细胞的趋化的同时增强ROS与ACP活性, 这预示着TLR8a不仅能够调控趋化因子的释放, 并且还能调控过度的炎症反应, 从而在先天免疫系统中发挥关键作用。

综上所述, 本研究通过浸泡感染实验, 系统评估F0代*tlr8a*基因敲除草鱼对GCRV-II的抵抗能力。实验结果表明, *tlr8a*基因敲除在一定程度上减缓GCRV-II感染导致的病理损伤。在分子机制层面, *tlr8a*基因敲除可显著上调抗病毒相关基因(*ifn1*, *mx2*)及炎症因子(*nf-κb2*, *il-6*)的表达水平, 并增强草鱼外周血白细胞的免疫活性, 这些调控作用可能与感染过程中病毒载量的降低相关。本研究不仅阐明*tlr8a*在草鱼抗病毒免疫中的负调控作用, 更为抗病育种中F0代基因编辑个体的早期评价体系提供理论依据和方法学参考。

参考文献

- 1 Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA—guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337: 816–821
- 2 Murovec J, Pirc Ž, Yang B. New variants of CRISPR RNA-guided genome editing enzymes. *Plant Biotechnol J*, 2017, 15: 917–926
- 3 Okoli A S, Blix T, Myhr A I, et al. Sustainable use of CRISPR/Cas in fish aquaculture: the biosafety perspective. *Transgenic Res*, 2022, 31: 1–21
- 4 Roy S, Kumar V, Behera B K, et al. CRISPR/Cas genome editing—can it become a game changer in future fisheries sector? *Front Mar Sci*, 2022, 9: 924475
- 5 Zhang J, Zhang L, Wu X, et al. CRISPR/Cas9 mutagenesis reveals an essential role of PI4KB in promoting growth and resisting hemorrhagic disease caused by GCRV-II infection in juvenile grass carp. *Water Biol Secur*, 2025, 4: 100323
- 6 Zhao X Y, Liu J, Zou S M. Knock-out analysis of duplicated *socs1* using CRISPR/Cas9 in *Megalobrama amblycephala* (in Chinese). *J Fish China*, 2020, 44: 1937–1947 [赵心愉, 刘娟, 邹曙明. 利用CRISPR/Cas9基因编辑技术敲除团头鲂*socs1*重复基因. *水产学报*, 2020, 44: 1937–1947]
- 7 Su J G. Toll-like receptor signaling in teleosts. *Sci China Life Sci*, 2025, 68: 1889–1911
- 8 Liao Z, Wan Q, Su H, et al. Pattern recognition receptors in grass carp *Ctenopharyngodon idella*: I. Organization and expression analysis of TLRs and RLRs. *Dev Comp Immunol*, 2017, 76: 93–104
- 9 Chen X, Wang Q, Yang C, et al. Identification, expression profiling of a grass carp TLR8 and its inhibition leading to the resistance to reovirus in

- CIK cells. *Dev Comp Immunol*, 2013, 41: 82–93
- 10 Su J, Su J, Shang X, et al. SNP detection of *TLR8* gene, association study with susceptibility/resistance to GCRV and regulation on mRNA expression in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. *Fish Shellfish Immunol*, 2015, 43: 1–12
 - 11 Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China Fishery Statistical Year Book (in Chinese). Beijing: China Agriculture Press, 2025 [农业部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2025]
 - 12 Su H, Su J. Cyprinid viral diseases and vaccine development. *Fish Shellfish Immunol*, 2018, 83: 84–95
 - 13 Zeng W W, Wang Y Y, Yin J Y, et al. Comparison and evaluation of the three different methods in quantitative detection of GCRV-II (in Chinese). *Freshw Fish*, 2019, 49: 63–69 [曾伟伟, 王英英, 尹纪元, 等. II型草鱼呼肠孤病毒三种定量检测方法的比较与评价. 淡水渔业, 2019, 49: 63–69]
 - 14 Wang H, Li Y, Wang Q, et al. Establishment of different artificial infection method models for grass carp reovirus. *Aquaculture*, 2025, 599: 742162
 - 15 Yang L, Su J G. Studies on pathological symptoms and virus distribution in natural and artificial injection infection *Ctenopharyngodon idella* with grass carp reovirus type II (in Chinese). *J Fish China*, 2022, 46: 205–260 [杨玲, 苏建国. 草鱼呼肠孤病毒II型自然发病与人工注射感染草鱼的病理症状和病毒分布研究. 水产学报, 2022, 46: 250–260]
 - 16 Marnis H, Syahputra K. Advancing fish disease research through CRISPR-Cas genome editing: recent developments and future perspectives. *Fish Shellfish Immunol*, 2025, 160: 110220
 - 17 Ma J, Fan Y, Zhou Y, et al. Efficient resistance to grass carp reovirus infection in JAM-A knockout cells using CRISPR/Cas9. *Fish Shellfish Immunol*, 2018, 76: 206–215
 - 18 Qu Z L, Gong X Y, An L, et al. Genome editing of FTR42 improves zebrafish survival against virus infection by enhancing IFN immunity. *iScience*, 2024, 27: 109497
 - 19 Cai X, Wang R, Zhu J, et al. Factor inhibiting HIF negatively regulates antiviral innate immunity via hydroxylation of IKK ϵ . *Cell Rep*, 2024, 43: 113606
 - 20 Mou C Y, Wang Y, Yu P, et al. Cooperative antiviral activities of two duplicated *viperin* homeologs confirmed by CRISPR/Cas9 editing in hexaploid gibel carp. *Aquaculture*, 2022, 548: 737609
 - 21 Coogan M, Alston V, Su B, et al. CRISPR/Cas-9 induced knockout of myostatin gene improves growth and disease resistance in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 2022, 557: 738290
 - 22 Fan C, Su H, Liao Z, et al. Teleost-specific MxG, a traitor in the Mx family, negatively regulates antiviral responses by targeting IPS-1 for proteasomal degradation and STING for lysosomal degradation. *J Immunol*, 2021, 207: 281–295
 - 23 Lin L, Yu H, Li L, et al. TRIM55 promotes noncanonical NF- κ B signaling and B cell-mediated immune responses by coordinating p100 ubiquitination and processing. *Sci Signal*, 2023, 16: eabn5410
 - 24 Zhu W, Lv M, Zhang J, et al. Target analyses by transcriptome sequencing in peripheral blood cells of grass carp: potent immune responses in leukocytes and thrombocytes against bacterial and viral infections. *Aquaculture*, 2024, 592: 741211
 - 25 Hu Y Z, Ma Z Y, Wu C S, et al. LECT2 is a novel antibacterial protein in vertebrates. *J Immunol*, 2022, 208: 2037–2053
 - 26 Gao F, Zhao Y, Shi X, et al. Signalling regulation of reactive oxygen species in fish inflammation. *Rev Aquacult*, 2024, 16: 1266–1285

Investigating the application potential of TLR8a in disease-resistant breeding of *Ctenopharyngodon idella* via CRISPR/Cas9

CHEN GuanYu^{1,2}, WANG PengXu¹, LV MaoLin¹ & SU JianGuo^{1,2*}

¹ College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

² Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao Marine Science and Technology Center, Qingdao 266237, China

* Corresponding author, E-mail: sujianguo@mail.hzau.edu.cn

The hemorrhagic disease of *Ctenopharyngodon idella* represents a significant constraint on the sustainable development of freshwater aquaculture. Utilizing CRISPR/Cas9 genome editing technology to screen immune negative regulatory genes and develop disease-resistant strains has emerged as a pivotal strategy in contemporary disease control. *C. idella* TLR8a, as a negative regulator of antiviral immunity, was targeted to assess its potential for breeding. In this study, we established F0 generation *tlr8a*-deficient heterozygous models to explore their immunoregulatory mechanisms in antiviral infections. The results revealed that *tlr8a*-knockout *C. idella* exhibited attenuated hemorrhagic disease symptoms, accompanied by reduced pathological lesions in both the hepatopancreas and intestine. Furthermore, there was a significant up-regulation in the expression of antiviral genes (*infl*, *mx2*) and pro-inflammatory factors (*nf- κ b2*, *il-6*). In addition, the transcription of the viral capsid protein VP56 was down-regulated following Type II grass carp reovirus infection. Additionally, peripheral blood leukocytes from *tlr8a*-knockout *C. idella* demonstrated enhanced chemotactic activity, along with increased reactive oxygen species production capacity and acid phosphatase activity. These findings suggest that TLR8a regulates antiviral innate immunity by modulating interferon signaling pathways and cytokine production, while also mediating excessive inflammatory activation. Our findings not only enhance the understanding of immunoregulatory homeostasis within TLR signaling in teleosts but also suggest a potential molecular target for developing disease-resistant fish.

gene editing, *Ctenopharyngodon idella*, disease-resistant breeding, TLR8a, grass carp reovirus, peripheral blood leucocyte

doi: [10.1360/SSV-2025-0090](https://doi.org/10.1360/SSV-2025-0090)