

团头鲂 *MHC II α* 基因的 SNP 位点开发、 鉴定及与抗病性状关联分析

柴欣^{1,2} 胡晓坤^{1,2} 马徐发¹ 张家波¹ 刘红^{1,2}

1. 华中农业大学水产学院/农业部淡水生物繁育重点实验室, 武汉 430070;

2. 淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心, 武汉 430070

摘要 用嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)感染团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)区分抗病和易感组,通过PCR扩增及测序在*MHC II α*基因上筛选单核苷酸多态位点(single nucleotide polymorphisms, SNP),利用高分辨率熔解曲线法和限制性内切酶酶切法对SNP进行分型,分析其多态性及与抗病性状之间的关系。在*MHC II α*基因上共筛选出35个候选SNP位点,占*MHC II α*基因总碱基的1.45%,包含30个转换位点、5个颠换位点。其中外显子部分有16个,内含子部分7个,5'非编码区有1个,3'非编码区有11个。有13个SNP位点位于编码区,占总氨基酸位点的5.56%,位于839 bp的T/A颠换和1 663 bp的A/G转换是无义突变,其余11个SNP位点为有义突变。 $\alpha 1$ 结构域的SNP位点分别占总碱基和总氨基酸位点的4.88%和10.98%,明显高于 $\alpha 2$ 结构域的1.08%和3.22%。*MHC II α*基因的21个抗原结合位点(peptide binding region, PBR)中,有4个位点变异,变异率为19.05%;而non-PBR的变异率仅为8.20%(5/61)。用SPSS软件对分型成功的5个SNP位点在易感和抗病组各100尾中的基因型频率和等位基因频率进行了统计。通过卡方检验分析发现位于1 395 bp(T/A)位点的基因型频率和等位基因频率在易感和抗病组中差异极显著,位于221 bp(G/T)和1 859 bp(G/T)位点的基因型频率和等位基因频率在易感组和抗病组中差异显著。本研究结果表明团头鲂*MHC II α*基因的多态性和抗细菌性败血症性状显著关联。

关键词 *MHC* 基因; 抗病性状; 嗜水气单胞菌; SNP 分型; 关联分析

中图分类号 Q 959.46⁺8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)04-0076-07

主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)是与免疫应答相关的基因群,其多态性极为丰富^[1],各种细胞表面都存在它的表达产物,对机体免疫调控有非常重要的意义^[2],它编码的糖蛋白广泛参与调控动物机体免疫应答^[3-4]。*MHC*多态性比较高,*MHC II*类基因是其中多态性最高的,也是大家公认的抗病育种标记基因。研究鱼类*MHC*基因多态性,将其与抗病性状进行关联,对于了解鱼类抗病基因的表达和调控规律具有重要意义^[2]。研究鱼类*MHC*基因多态性,寻找抗病相关SNP位点,是分子标记辅助抗病育种的重要方法^[5]。Sheila等^[6]于1956年发现*MHC*的存在,Hashimoto等^[7]于1990年首次分离出鲤(*Cyprinus carpio*)的部分*MHC*序列,此后的20多年,国内外学者对斑马鱼(*Danio rerio*)^[8]等几十种鱼类

的*MHC*基因进行了研究。早期研究比较偏重于鱼类*MHC*基因基本分子结构和表达调控等方面,而近期,*MHC*基因的多态性和鱼体抗病性状关联分析方面的研究越来越多,*MHC*在鱼类抗病分子育种中的研究也在国内外开展起来^[9]。

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)是我国非常重要的养殖品种^[10],其在养殖过程中受细菌性败血症危害比较严重^[11]。该病是危害重、殃及鱼类品种多、死亡率非常高的爆发性流行病,主要由嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)引起,给我国的水产养殖业造成了十分严重的经济损失,目前尚无有效的治疗方法。培育鱼类抗病新品种,可望从根本上解决病害问题。本研究以团头鲂为对象,人工感染嗜水气单胞菌区分抗病和易感群体,利用高分辨率熔解曲线法和限制性内切酶酶切法对团头鲂

收稿日期: 2016-09-20

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2012BAD26B00); 中央高校基本科研业务费专项(2014PY042; 2015PY134)

柴欣,硕士研究生,研究方向: 鱼类遗传育种. E-mail: 1347929608@qq.com

通信作者: 刘红,博士,教授,研究方向: 鱼类遗传育种. E-mail: liuhong59@mail.hzau.edu.cn

MHC II α 基因抗病相关的 SNP 位点进行分型, 将该基因的多态性与抗病性状进行关联分析, 以期为团头鲂抗病分子育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

试验所用团头鲂采自湖北百容水产良种有限公司团头鲂良种场, 采用 1 龄鱼进行试验, 全长 (15.0 ± 1.3) cm, 体质量 (71.7 ± 19.2) g, 嗜水气单胞菌由华中农业大学水产学院疾病组提供。团头鲂抗病和易感群体获得的具体方法参照文献[12], 对 1 482 尾试验鱼进行腹腔注射感染嗜水气单胞菌 $(1.0 \times 10^7$ cfu/mL), 每尾注射 0.1 mL。注射 6 h 之后试验鱼出现死亡个体, 注射 48 h 内死亡个体数不断上升, 48 h 后逐渐趋于稳定, 5 d 后共死亡 924 尾, 死亡率达 62.3%。将 12 h 内死亡并有充血、腹腔积水、内脏溃烂等明显病症的个体作为易感组, 5 d 后仍存活的个体作为抗病组。对于易感个体, 根据死亡先后顺序编号; 对于抗病个体, 依次编号。分别采集易感组和抗病组个体的鳍条(各 100 尾), 放入无水乙醇中保存, 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

试验所用的 PCR 引物由武汉擎科创新生物科技有限公司提供; 试验用酶及相关试剂由大连宝生物工程有限公司生产提供; PCR 仪为 applied bio-

systems ProFlex 型。

1.2 基因组 DNA 提取

参照 Paabo 等^[13]的方法, 使用酚-氯仿法提取鳍条样品基因组 DNA。用 1% 琼脂糖凝胶电泳 $(1 \times \text{TBE } 5\text{V}/\text{cm})$ 检测提取的 DNA, 用分光光度计检测 DNA 的浓度。把全部样品质量浓度稀释至 30 ng/ μL 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 *MHC II a* 基因 SNP 位点的获得

在易感和抗病组中各随机选择 5 尾鱼的 DNA 为模板, 在团头鲂基因组序列(未发表数据)中查找获得 *MHC II* 基因序列, 用 Primer premier 5.0 软件设计引物(*MHC II a* Sense 3 和 *MHC II a* Anti-Sense 3)(见表 1), 对 10 个模板的 *MHC II a* 基因进行扩增。扩增体系: 10.5 μL PCR-Grade Water, 正反引物各 0.75 μL , 12.5 μL Max DNA polymerase, 0.5 μL DNA 模板, 共 25 μL 。反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 5 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 s, 35 个循环。把扩增产物送武汉擎科创新生物科技有限公司纯化测序。用 Clustalw2 在线软件(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)对测序结果进行比对, 筛选出等位基因频率大于 20% 的位点作为候选 SNP 位点。对得到的团头鲂 *MHC II a* 基因 DNA 序列和 mRNA 序列进行比对分析, 绘制团头鲂 *MHC II a* 基因结构图。

表 1 *MHC II α* 基因扩增和分型所用引物

Table 1 Primers used for *MHC II a* gene amplification and genotyping

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	扩增目的 Purpose of amplification	产物大小/bp Product size
<i>MHC II a</i> Sense 3 <i>MHC II a</i> Anti-Sense 3	TGTTCCCTATACTAAAGTGGTACCG AGCCAACTGCTAGCCATC	特异性基因片段扩增 Specific gene amplification	2 409
<i>MHC II a</i> Sense m 1 <i>MHC II a</i> Anti-Sense m 1	GATGGAGAGGAAGTGTGGCA CAGCCCCAGAGACAGACCC	用于 974 bp(A/C)位点酶切分型 Genotyping of SNP 974 bp (A/C) by restriction enzyme digestion	876
<i>MHC II a</i> Sense m 2 <i>MHC II a</i> Anti-Sense m 2	GGAGTGGGTCTGTCTCTGGG GCAAAGTCGTGGGTTCG	用于 1 859 bp(G/T)位点和 2 074 bp(G/T)位点酶切分型 Genotyping of SNP 1 859 bp (G/T) and 2 074 bp(G/T) by restriction enzyme digestion	1 010
<i>MHC II a</i> Sense a-5 <i>MHC II a</i> Anti-Sense a-5	TGATTGGTTGAGGGGATTATGA CAAATCTTTTCAAGCCACAGTCA	用于 221 bp(A/G)位点 HRM 分型 Genotyping of SNP 221 bp (A/G) by HRM	306
<i>MHC II a</i> Sense b-3 <i>MHC II a</i> Anti-Sense b-3	GTGGAGGGAGACATTTTCAGC ACACTGGGCACAGCAACATC	用于 1 395 bp(T/A)位点 HRM 分型 Genotyping of SNP 1 395 bp (T/A) by HRM	269

1.4 序列分析

使用 NCBI 网站中的 Blast 功能对团头鲂 *MHC II a* 基因蛋白质及核苷酸序列的同源性进行检索, 把团头鲂与其他物种 *MHC II a* 基因的蛋白质序列进行比对分析。用 DNAMAN 软件分析团头鲂 *MHC II a* 基因 DNA 序列, 寻找开放阅读框,

预测蛋白质序列。用 TMHMM Server v.2.0 软件预测蛋白质的跨膜区域。蛋白质氨基酸组成、分子质量及等电点用 Prot Param 软件分析获得。用 SMART 软件从结构和功能域方面对预测的蛋白质序列进行分析。核苷酸和蛋白质序列的多态位点用 DNA SP4.0 软件分析获得。

1.5 SNP 位点分型

通过限制性内切酶法对 *MHC II a* 基因 974 bp (A/C)、1 859 bp(G/T)和 2 074 bp(G/T)3 个 SNP 位点进行分型,选用的限制性内切酶分别为 *Eco*321/*Hinc* II、*Vsp* I。酶切体系为:7.5 μ L 纯水,1.0 μ L 10 $\times$ PCR buffer,1.0 μ L Restriction endonuclease,0.5 μ L 模板。酶切时间均为 16 h。

采用高分辨率熔解曲线(high-resolution melting,HRM)的方法对 *MHC II a* 基因 221 bp(A/G)和 1 395 bp (T/A) 2 个 SNP 位点进行分型。SNP 分型体系为:13.1 μ L 纯水,2.5 μ L Ex buffer,1.0 μ L EvaGreen,正反引物各 0.4 μ L,0.4 μ L dNTPs (10 mmol/L),0.2 μ L Ex *Taq*,2.0 μ L DNA (30 ng/ μ L),共 20 μ L。SNP 分型程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 1 min,60 $^{\circ}$ C 退火 10 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s(搜集荧光值),共 45 个循环。高分辨率熔解曲线:95 $^{\circ}$ C,1 min;40 $^{\circ}$ C,1 min;65 $^{\circ}$ C,1 s;95 $^{\circ}$ C 连续搜集荧光值,25 次/ $^{\circ}$ C,温度变化率 0.02 $^{\circ}$ C/s。

1.6 SNP 多态性与抗细菌性败血症的关联性分析

用 SPSS 软件对分型成功的 5 个 SNP 位点各在 100 尾易感群体和 100 尾抗病群体中的基因型频率和等位基因的频率进行统计,利用卡方检验进行差异显著性分析,筛选团头鲂抗病相关基因标记,寻找抗病相关位点,筛选出与抗细菌性败血症性状显著关联的 SNP 位点。

2 结果与分析

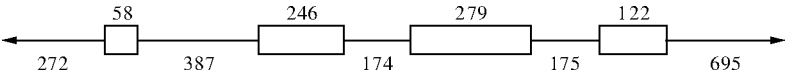
2.1 团头鲂 *MHC II a* 基因序列的测定与分析

设计基因特异引物对易感和抗病组各 5 尾鱼进行 PCR 扩增并测序,通过 NCBI 上 Blast 的功能对获得的序列进行比对分析,确认所得序列是团头鲂 *MHC II a* 基因片段。通过对测序所得的 *MHC II a* 基因的基因组 DNA 与 NCBI 上查找到的 *MHC II a* 基因 cDNA 序列 (GenBank: KF193864.1)进行比对,再结合外显子-内含子连接处的 GT-AG 法则,得出了 *MHC II a* 基因的结构

图(图 1)。19 个氨基酸的部分信号肽由外显子 1 编码,82 个氨基酸完整的 α 1 结构域由外显子 2 编码,93 个氨基酸完整的 α 2 结构域由外显子 3 编码,40 个氨基酸的跨膜区由外显子 4 编码,以上总共 234 个氨基酸(图 2)。预测蛋白质分子质量为 26.10 ku,预测蛋白质等电点为 4.62,编码区含有 1 个 N-糖基化位点。检索团头鲂与其他物种 *MHC II a* 基因的蛋白质序列同源性,结果表明团头鲂和草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 的相似性最高 (63.4%),与斑马鱼和鲤的相似性较高 (分别为 60.1%和 57.9%),与赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*)、胡瓜鱼 (*Osmerus eperlanus dentex Steindachner*)、大西洋鲑 (*Salmo salar*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、斑点叉尾鲴 (*Ictalurus punctatus*)及长吻鮠 (*Leiocassis longirostris*)相似性则较小(分别为 51.2%,50.9%、48.7%、45.6%、35.0%、34.7%),与人类 (*Homo sapiens*) 的相似性最小 (32.6%)。对碱基组成及核苷酸的替换结果分析表明,在 *MHC II a* 基因序列上,A、T 碱基含量较高,分别是 33.04%和 33.96%;C、G 碱基含量较低,分别是 15.82%和 17.19%。此外 *MHC II a* 基因编码的 235 个氨基酸密码子的 4 种碱基的分布也存在显著差异,密码子第 2 位上的 A 和 T 碱基比例达 62.13%,明显比 G 和 C 碱基的 37.87%要高,也比其在密码子第 1 位和第 3 位上的占比高(47.66%和 59.57%);对单个碱基进行对比分析发现,密码子 3 个位置上的 A 碱基分布比较均衡,而 T、C、G 3 个碱基的分布都不太均衡。密码子第 1 位的平均转换/颠换比(R)是 5.0,第 2 位和第 3 位上的是 5.0 和 4.0,表明团头鲂 *MHC II a* 基因密码子第 3 位上的变异率比第 1 位和第 2 位上的变异率低。

2.2 *MHC II a* 基因的 SNP 位点筛选结果分析

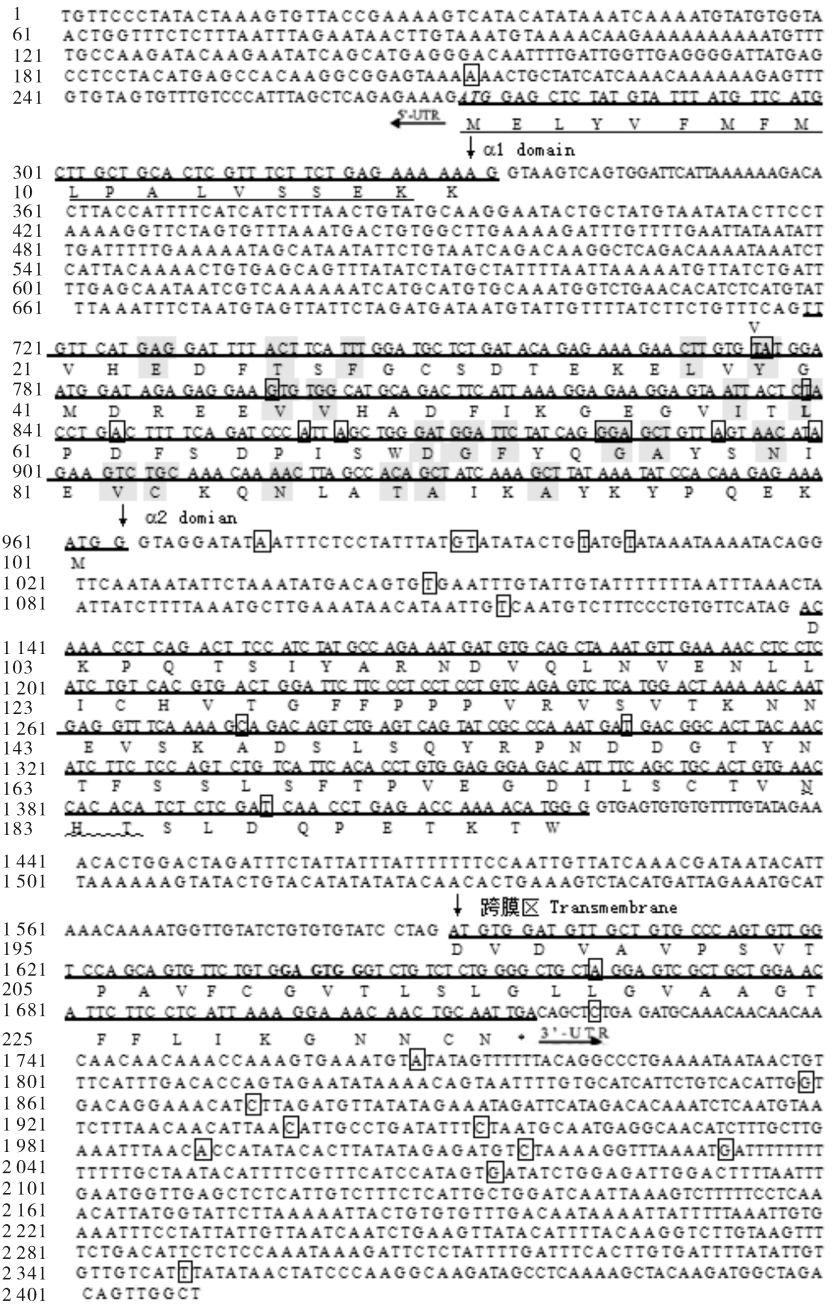
在长度为 2 409 bp 的团头鲂 *MHC II a* 基因上共筛选出 35 个候选 SNP 位点,占 *MHC II a* 基因总碱基的 1.45%;有 13 个 SNP 位点位于编码区,占总氨基酸位点的 5.56%,13 个 SNP 位点中位于



左箭头表示 5'非编码区,方框表示外显子,直线表示内含子,右箭头表示 3'非编码区,数字表示相应区域的长度(bp)。The 5'-untranslated region is marked with a left arrow,the 3'-untranslated region is marked with a right arrow,the boxes represent the exon whereas the line represents intron,the number represents the length.

图 1 团头鲂 *MHC II a* 基因结构图

Fig.1 The structure of blunt snout bream *MHC II a* gene



起始密码子和终止密码子分别用斜体和 * 标出, 5'非编码区用左箭头标出, 3'非编码区用右箭头标出, 信号肽区域用下划线标出, N-糖基化位点用波浪线标出, 外显子和编码的蛋白质用粗黑下划线标出, 单核苷酸多态位点用方框标出, α1 区、α2 区以及跨膜区的起始位置均用下箭头标出, 抗原结合位点(PBR)用阴影标出。The start codon is marked with an italic and the stop codon is marked with an asterisk (*), the 5'-untranslated region is marked with a left arrow, the 3'-untranslated region is marked with a right arrow, the signal peptide region is marked with an underline, the potential N-linked glycosylation site is underlined with a wavy line. Exons and proteins are marked with thick black underline, single nucleotide polymorphisms are marked with boxes, the starting position of α1 domain, α2 domain and transmembrane domain are marked with a down arrow, the shaded areas indicate the PBR sites.

图 2 团头鲂 *MHC II α* DNA 序列以及推测出来的氨基酸序列

Fig.2 The DNA and deduced amino acid sequence of *MHC II α* gene in *Megalobrama amblycephala*

839 bp 处的 T/A 颠换和位于 1 663 bp 处的 A/G 30 个转换位点、5 个颠换位点。α1 结构域的 SNP 转换并没有导致氨基酸改变, 为无义突变, 另外 11 位点分别占总碱基和总氨基酸位点的 4.88% 和 10.98%, 明显高于 α2 结构域的 1.08% 和 3.22%。个 SNP 位点是有义突变。35 个 SNP 位点中存在

信号肽和跨膜区域中的 SNP 位点分别占总碱基的 0%和0.81%,序列上的变异并不大,属于保守序列(表 2)。对照人类 *HLA*Ⅱ类 α 基因中的 PBR 位点,检测团头鲂 *MHC*Ⅱ α 基因上存在 21 个 PBR 位点(图 2),21 个位点当中,有 4 个位点变异,变异率为 19.05%;而 non-PBR 的变异率仅为 8.20%(5/61)。

表 2 *MHC*Ⅱ α 基因的核苷酸序列和编码区的 SNP 位点

Table 2 SNP of nucleotide and coding region sequences of *MHC*Ⅱ α gene

序列组分 Component of sequence	核苷酸 Nucleotide			氨基酸编码区 Coding region		
	变异位点	总位点	百分占比/%	变异位点	总位点	百分占比/%
	Variable site	Number of site	Percentage	Variable site	Number of site	Percentage
信号肽 Signal peptide	0	57	0	0	19	0
α_1 结构域 α_1 -Domain	12	246	4.88	9	82	10.98
α_2 结构域 α_2 -Domain	3	279	1.08	3	93	3.22
跨膜区 Transmembrane	1	123	0.81	1	40	2.50
5'非阅读区 5'-Untranslated region	1	273	0.37	—	—	—
3'非阅读区 3'-Untranslated region	11	695	1.58	—	—	—
内含子 Intron	7	736	0.95	—	—	—
共计 Total	35	2 409	1.45	13	234	5.56

2.3 SNP 多态性与抗菌性败血症的关联性分析

用 SPSS 软件对分型成功的 5 个 SNP 位点各在 100 尾易感群体和 100 尾抗病群体中的基因型频率和等位基因的频率进行统计,结果如表 3 所示。通过卡方检验分析发现位于 1 395 bp (T/A)位点的基因型频率和等位基因频率在易感组和抗病组中均为差异显著($P<0.05$)。进一步分析表明,纯合个体对嗜水气

表 3 *MHC*Ⅱ α 核苷酸多态性位点基因型分布

Table 3 Distribution of the *MHC*Ⅱ α SNPs in susceptible and resistant groups

位点 Site	基因型 Genotype	易感个体/% Susceptible individuals	抗病个体/% Disease resistant individuals	卡方检验 (<i>P</i> 值) Chi-squar (<i>P</i> value)	等位基因 Allelic gene	易感个体/% Susceptible individuals	抗病个体/% Disease resistant individuals	卡方检验 (<i>P</i> 值) Chi-squar (<i>P</i> value)
221 bp G/T	AA	34(34.0)	31(31.0)	7.26(0.02*)	A	105(52.55)	85(42.5)	4.01(0.04*)
	AG	37(37.0)	23(23.0)		G	95(47.5)	115(57.5)	
	GG	29(29.0)	46(46.0)					
974 bp C/A	CC	34(34.0)	38(38.0)	1.04(0.59)	C	86(43.0)	89(44.5)	0.09(0.76)
	CA	18(18.0)	13(13.0)		A	114(57.0)	111(55.5)	
	AA	48(48.0)	49(49.0)					
1 395 bp T/A	TT	35(35.0)	28(28.0)	10.78(0.00**)	T	106(53.0)	77(38.5)	8.47(0.00**)
	AT	36(36.0)	21(21.0)		A	94(47.0)	123(61.5)	
	AA	29(29.0)	51(51.0)					
1 859 bp G/T	GG	42(42.0)	23(23.0)	8.23(0.01*)	G	107(53.5)	76(38.0)	9.68(0.00*)
	GT	23(23.0)	30(30.0)		T	93(46.5)	124(62.0)	
	TT	35(35.0)	47(47.0)					
2 074 bp G/T	GG	78(78.0)	75(75.0)	0.25(0.62)	G	178(89.0)	175(87.5)	0.22(0.64)
	GT	22(22.0)	25(25.0)		T	22(11.0)	25(12.5)	

注: * 表示差异显著($P<0.05$), ** 表示差异极显著($P<0.01$)。Note: * * and * * * showed distributions of corresponding SNPs between susceptible and resistant groups were significant different at the 0.05 level and 0.01 level, respectively.

单胞菌引起的细菌性败血病抗性更高。

3 讨 论

主要组织相容性复合体 *MHC* 基因,是机体内与免疫应答紧密相关的基因群,是由染色体上许多高度多态、紧密相连的基因位点组成的。*MHC* 基因具有丰富的多态性,也正是由于这种多态性,导致

单个个体与抗原多肽的结合能力不尽相同,进而导致不同 *MHC* 等位基因的机体对于病菌和自身免疫性疾病的抵抗力不同,使它成为动物疾病分子标记研究的热点^[14]。

本研究发现团头鲂 *MHC*Ⅱ α 基因上的 SNP 位点(35 个)占基因组碱基(2 409 bp)比例为 1.45%,编码区中的 SNP 位点(13 个)占总氨基酸位

点(234个)比例为5.56%,编码区13个SNP位点中的有义突变占比高达84.6%。以上结果证实团头鲂 *MHC II α* 基因含有丰富的多态位点且具有极高的特异性。 $\alpha 1$ 结构域的SNP位点分别占总碱基和总氨基酸位点的4.88%和10.98%,明显高于 $\alpha 2$ 结构域的1.08%和3.22%。*MHC II α* 基因 $\alpha 1$ 结构域比 $\alpha 2$ 结构域变异率高的现象在大西洋鲑^[15]、金头鲷(*Sparus aurata*)^[16]、间鲃(*Barbus intermedius*)^[17]等鱼类中都有所表现。这是由于 $\alpha 1$ 结构域存在的抗原肽结合区(PBR)具有高度的多态性,再次证实PBR位点存在于 $\alpha 1$ 结构域。信号肽和跨膜区域中核苷酸的SNP位点百分比分别是0和0.81,序列上的变异并不大,属于保守序列。团头鲂 *MHC II α* 基因的21个PBR位点中有4个位点变异,变异率为19.05%;而non-PBR的变异率却仅为8.20%(5/61),表明抗原结合位点区域的多态性高于非抗原结合位点的多态性,同时也表明氨基酸的替代、替换集中出现在多肽结合位点上。

MHC 基因与抗病性状相关联,因而成为鱼类抗病分子育种的重要标记基因。目前,有关 *MHC* 基因与不同疾病抗性相关的研究已经有许多报道。Xu等^[18]在对牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)的研究中发现 *MHC II* 类A和B基因组合与弧菌(*Vibrio*)抗病性状相关;Palti等^[19]使用抗病关联分析发现虹鳟 *MHC II* 类B基因第2内含子等位基因的多态性与IHNV相关;李雪松等^[2]研究发现DAB的多态性与“全红”瓯江彩鲤(*Cyprinus carpio* var. *color*)对嗜水气单胞菌的抗性相关,且抗性与个体含DAB等位基因的数量正相关;逢锦菲^[20]利用高分辨率熔解曲线分析方法对中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)SNP基因型与抗白斑综合症病毒(WSSV)性状进行了关联分析,从132个SNP标记中筛选得到9个与抗白斑综合症病毒相关联的SNP标记;Kjøglum等^[21]将 *MHC* 基因作为抗病育种候选基因,成功筛选出大西洋鲑的抗病品系。本研究用SPSS软件对5个分型成功的SNP位点在易感群体和抗病群体中的基因型频率和等位基因的频率进行了统计。通过卡方检验分析发现位于1395 bp (T/A)位点的基因型频率和等位基因频率在易感组和抗性组中均为差异极显著($P < 0.01$),位于221 bp (G/T)位点和位于1859 bp (G/T)位点的基因型频率和等位基因频率在易感组和抗性组中均为差异显著($P < 0.05$)。本研究结果表明团头鲂 *MHC II α* 基因的多态性与抗细菌性败血症性状

相关,进一步分析表明,纯合个体对嗜水气单胞菌引起的细菌性败血症抗性更高。本试验初步分析获得的相关SNP标记及相应的优势、劣势基因型,能够在进行团头鲂抗病育种工作时为亲本的选择提供理论依据,也为分子遗传标记和团头鲂抗病基因筛选奠定理论基础。

参 考 文 献

- [1] EDWARDS S V, HEDRICK P W. Evolution and ecology of MHC molecules from genomics to sexual selection[J]. Trends Ecol Evol, 1998, 13(8): 305-311.
- [2] 李雪松, 刘至治, 赵雪锦, 等. “全红”体色瓯江彩鲤 *MHC-DAB* 基因多态性及其与鱼体抗病力关系的分析[J]. 水产学报, 2011, 35(9): 1293-1301.
- [3] AOYAGI K, DIJKSTRA J M, XIA C, et al. Classical MHC class I genes composed of highly divergent sequence lineages share a single locus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. J Immunol, 2002, 168(1): 260-273.
- [4] XU S X, REN W H, LI S Z, et al. Sequence polymorphism and evolution of three cetacean *MHC* genes[J]. J Mol Evol, 2009, 69(3): 260-275.
- [5] 庞纪彩, 高凤英, 卢迈新, 等. 广东养殖尼罗罗非鱼3个不同群体 *MHC II B* 基因序列多态性和遗传分化[J]. 基因组学与应用生物学, 2014, 33(2): 299-306.
- [6] SHEILA C, PRISCILLA S B A, ROLF B, et al. Strong and weak histocompatibility gene differences in mice and their role in the rejection of homografts of tumors and skin[J]. Bar Harb Maine, 1956, 144(2): 198-204.
- [7] HASHIMOTO K, NAKANISHI T, KUROSAWA Y. Isolation of carp genes encoding major histocompatibility complex antigens[J]. Proc Nat Acad Sci, 1990, 87: 6863-6867.
- [8] STRAUSBERG R L, FEINGOLD E A, GROUSE L H, et al. Generation and initial analysis of more than 15 000 full-length human and mouse cDNA sequences[J]. Proc Nat Acad Sci, 2002, 99(26): 16899-16903.
- [9] 陈松林. 海水养殖鱼类抗病分子育种研究进展及前景展望[J]. 科技导报, 2004(9): 10-13.
- [10] 扶晓琴, 丁祝进, 饶友亮, 等. 团头鲂白细胞介素6基因启动子报告载体的构建及活性分析[J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(1): 86-91.
- [11] 姚伦, 吴小平, 欧阳珊, 等. 团头鲂对嗜水气单胞菌的免疫应答[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(2): 416-417.
- [12] 周凤娟. 团头鲂 *NLR3-like* 基因的克隆、表达及其SNP的开发和鉴定[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.
- [13] PAABO S, WILSON A C. Polymerase chain reaction reveals cloning artifacts[J]. Nature, 1988, 334(6181): 387-388.
- [14] 胡丹丹, 刘哲. *MHC* 基因在鱼类遗传育种中德研究与应用[J]. 水产杂志, 2013, 26(3): 64-67.
- [15] STET R J M, VRIES B D, MUDDE K, et al. Unique haplotypes

of co-segregating major histocompatibility class II A and class II B alleles in Atlantic salmon (*Salmo salar*) give rise to diverse class II genotypes[J]. Immunogenetics, 2002, 54(5): 320-331.

[16] CUESTA A, ESTEBAN M A, MESEGUER J. Cloning distribution and up-regulation of the teleost fish MHC class II alpha suggests a role for granulocytes as antigen-presenting cells[J]. Mol Immunol, 2006, 43(8): 1275-1285.

[17] KRUISWIJK C P, HERMSEN T, FUJIKI K, et al. Analysis of genomic and expressed major histocompatibility class I a and class II genes in a hexaploid Lake Tana African ‘large’ barb individual (*Barbus intermedius*) [J]. Immunogenetics, 2004, 55(11): 770-781.

[18] XU T J, SUN Y N, SHI G, et al. Characterization of the major histocompatibility complex class II genes in Miiuy Croaker[J]. PLoS ONE, 2011, 6(8): e23823.

[19] PAITI Y K M, NICHOLS K, WALLER J E, et al. Association between DNA polymorphisms tightly linked to MHC class II genes and IHN virus resistance in backcrosses of rainbow and cutthroat trout[J]. Aquaculture, 2001, 94(3/4): 283-289.

[20] 逢锦菲. “黄海 2 号”中国对虾高通量 SNP 筛选及其与抗 WSSV 性状的关联分析[D]. 上海: 中国海洋大学, 2013.

[21] KJØGLUM S, LARSEN S, BAKKE H G, et al. How specific MHC class I and class II combinations affect disease resistance against infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2006, 21: 431-441.

SNP screening, identification and association with disease resistance of *MHC II a* gene in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)

CHAI Xin^{1,2} HU Xiaokun^{1,2} MA Xufa¹ ZHANG Jiabo¹ LIU Hong^{1,2}

1.College of Fisheries/Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture ,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China ;
2.Freshwater Aquaculture Collaboration Innovation Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China

Abstract Blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) were infected with *Aeromonas hydrophila* to distinguish susceptible and disease resistant individuals. PCR and DNA sequencing were used to screen single nucleotide polymorphisms (SNP) in the *MHC II a* gene of blunt snout bream. High-resolution melting and restriction enzyme digestion were used to analyze the relationship between gene polymorphism and disease resistance with SNP genotyping. A total of 35 SNP sites (1.45% of total nucleotide) out of the *MHC II a* gene were screened, including 30 transition sites and 5 transition sites. Among these 35 SNPs, 1 was found to be located in the 5'-untranslated region (UTR), 16 located in exon, 7 located in intron, and 11 located in 3' UTR. Coding sequence region contained 13 SNPs (5.56% of total amino acid). Among them, TA transversion located at 839 bp and AG transition located at 1 663 bp were nonsense mutations, and the other 11 SNPs were sense mutations. The percentage of SNPs of nucleotide and coding region in $\alpha 1$ domains were 4.88% and 10.98%, respectively, significantly higher than that in $\alpha 2$ domain (1.08% and 3.22%). There were 4 variable sites in the 21 peptide binding region (PBR), with the mutation rate of 19.05%. However, the mutation rate of non-PBR was just 8.20% (5/61). The genotype and allele frequencies of the 5 successfully genotyped SNP sites in the 100 bacterial septicemia susceptible and 100 resistant individuals were statistically different. Result of *Chi*-square tests showed that the differences of genotype and allele frequencies of SNP (T/A) located at 1 395 bp were extremely significant ($P < 0.01$), SNPs located in 221 bp (G/T) and 1 859 bp (G/T) were significant different between susceptible and resistant groups ($P < 0.05$). It is indicated that the *MHC II a* gene polymorphism is significant correlated with bacterial septicemia resistance.

Keywords *MHC* gene; disease resistance; *Aeromonas hydrophila*; SNP genotyping; association analysis

(责任编辑:边书京)