

# 团头鲂 hepcidin 基因单核苷酸多态性及与抗病性状的相关性

孙千惠 田万平 罗航 王卫民 刘红

华中农业大学水产学院/农业农村部淡水生物繁育重点实验室, 武汉 430070

**摘要** 为了解 hepcidin(铁调素)基因的多态性及其与抗病性状的相关性,以团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)为研究对象,从公共数据库中获得 hepcidin 基因序列,对团头鲂进行嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)人工感染来区分易感和抗病个体,采用 PCR 扩增及测序技术筛选 hepcidin 基因序列中的 SNP(单核苷酸多态, single nucleotide polymorphisms)位点,对 SNP 位点运用高分辨率溶解曲线法(high-resolution melting, HRM)进行分型,分析其多态性及与抗病性状之间的关系。结果在 hepcidin 基因上共筛选出 2 个 SNP 位点,其中 1 个位点位于内含子部分,1 个位于 3' 非编码区。经过统计分析发现,位于 3 371 bp(A/G)的这一 SNP 位点的基因型频率和等位基因频率在易感和抗病组间差异极显著,位于 217 bp(A/G)位点的基因型频率和等位基因频率在易感组和抗病组间差异显著。据此推测 hepcidin 的这 2 个 SNP 位点多态性与团头鲂抗病性状相关。

**关键词** 团头鲂; 铁调素基因; SNPs; 抗病; 嗜水气单胞菌

**中图分类号** S 917: Q 959.46<sup>+</sup>8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)02-0038-07

团头鲂(*Megalobrama amblycephala* Yih),又名武昌鱼,属硬骨鱼纲(Osteichthyes)、鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae)、鲂亚科(Cultrinae)、鲂属(*Megalobrama*),在长江中下游湖泊中广泛分布<sup>[1]</sup>,20 世纪 50 年代,易伯鲁将其命名为团头鲂<sup>[2]</sup>。团头鲂在我国华中地区养殖较多,因其肉质鲜嫩,营养物质丰富,具有很高的经济价值,作为一种名优淡水鱼<sup>[3]</sup>,被推广至全国养殖,2017 年的年产量约 83 万 t<sup>[4]</sup>。在多年大规模养殖的过程中,细菌性败血症是对团头鲂危害最大的疾病之一<sup>[5]</sup>,其发病率高,暴发性强,流行性广,致病周期长,殃及鱼类品种较多,死亡率高<sup>[6]</sup>。在如今国家不断推广生态养殖的大背景下,只有不断深入分析鱼类免疫应答机制,研究相关基因与抗病的相关性,选育抗病品种,才能改善养殖环境,促进水产养殖健康发展。

近年来,动物育种研究者们着力从动物的基因序列上来研究抗病相关性,繁殖培育抗病能力强的动物品种,以不断增强动物抵抗疾病的能力。SNP(单核苷酸多态, single nucleotide polymorphisms)是单个核苷酸突变导致该位点的 DNA 序列出现多

态性,是研究基因与抗病相关性的一个重要方法<sup>[7]</sup>,在许多对生物表现型、生物抗药性的研究中,具有重要的意义。高分辨率溶解曲线技术(high resolution melting, HRM)是一种新的 SNP 分析方法,广泛应用于基因突变和基因分型等研究中<sup>[8]</sup>。抗菌肽(antimicrobial peptides)参与的非特异性免疫在鱼类抵御外界刺激的过程中发挥着重要作用<sup>[9]</sup>。Hepcidin(铁调素)是一种由肝脏合成的富含半胱氨酸小分子抗菌多肽,在机体铁代谢调节中起重要作用<sup>[10]</sup>。已有研究表明,在感染嗜水气单胞菌后,团头鲂肝脏、脾、脑和鳃 4 个不同组织中,hepcidin mRNA 表达水平不同程度地上调,有助于抵御病原菌侵袭<sup>[11]</sup>。当鱼体内 hepcidin 表达升高,肠道对铁的吸收以及网状内皮系统对铁离子的释放受到抑制,血清铁、铁蛋白和转铁蛋白的饱和度降低,从而限制细菌对铁的利用<sup>[12]</sup>。真鲷(*Pagrus major*)、黑鲷(*Spargus macrocephalus*)<sup>[13]</sup>、中华鲟(*Acipenser sinensis*)<sup>[14]</sup>体外重组抗菌肽 hepcidin 对大肠杆菌 *Escherichia coli*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 等细菌都有抑菌作用。因此,笔者

收稿日期: 2018-10-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(31572613); 中央高校基本科研业务费专项(2662015PY134)

孙千惠, 硕士研究生, 研究方向: 鱼类遗传育种, E-mail: 2504337931@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

拟筛选团头鲂 hepcidin 基因的 SNP 位点,对团头鲂进行嗜水气单胞菌人工感染来区分易感和抗病个体,分析 hepcidin 基因多态性与团头鲂抗病性状之间的相关性,以期对团头鲂抗病育种工作积累资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验所用团头鲂购自湖北百容水产良种有限公司的 1 龄 F3 代,经暂养待实验鱼逐渐适应新的环境后,人工感染嗜水气单胞菌以获得团头鲂抗病和易感群体,具体方法参照文献[15],即用浓度为  $1 \times 10^7$  cfu/mL 的嗜水气单胞菌对实验鱼进行腹腔注射,水温 27~29 °C。观察 12 h 内死亡的鱼是否具有全身或部分部位充血、腹腔积水、内脏溃烂等发病症状,采集 120 条具有明显发病症状的鱼的鳍条样本,作为易感组;采集 5 d 后仍然存活且无任何病症的 120 尾鱼的鳍条样本,作为抗病组。将采集的所有鳍条样本分别放在无水乙醇中 -20 °C 保存。

### 1.2 DNA 提取(酚-氯仿法)

DNA 的提取参照柴欣等<sup>[16]</sup>的方法,取 0.2 g 鳍条用消过毒的剪刀剪碎,放到 2 mL 的洁净离心管中,加入 600  $\mu$ L 细胞裂解液和 6  $\mu$ L 质量浓度为 20 mg/ $\mu$ L 蛋白酶 K,60 °C 水浴消化 2~4 h 直至溶液澄清。将消化好的样品冷却后,加入 600  $\mu$ L 的 Tris 饱和酚(pH=8.0),混匀后放置 10 min,4 °C 冷冻离心机离心 10 min,吸取上清液加入等体积(600  $\mu$ L) 酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),12 000 r/min 离心 10 min,取上清液至新的 1.5 mL 离心管,加入 600  $\mu$ L 氯仿与异丙醇(24:1)冰上混匀后,12 000 r/min 离心 10 min。取上清液,加入 60  $\mu$ L 的 NaAc (pH=5.2),混匀后缓慢加入 2 倍体积的提前预冷的无水乙醇,将离心管于 -20 °C 冰箱静置 30 min。4 °C 冷冻离心机 12 000 r/min 离心 20 min,轻柔弃掉上清液。向沉淀中加入 70% 乙醇,12 000 r/min 离心 10 min,重复此步骤 1 次。将沉淀晾干后,向其中加入 50~100  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O,置 4 °C 充分溶解后于 -20 °C 保存。

### 1.3 hepcidin 基因 SNP 位点筛选

从 GenBank 中查找到 hepcidin 基因 mRNA 序列(GenBank:JQ308841.1),从团头鲂全基因组序列<sup>[17]</sup>中查找获得 hepcidin 基因的 DNA 全序列。用 Primer premier 5.0 软件设计引物 (hepcidin-s1、

hepcidin-s2 和 hepcidin-s3)(引物序列详细信息见表 1),从易感和抗病组中各随机选择 5 尾鱼的 DNA 为模板,扩增 hepcidin 基因。PCR 反应体系共 25  $\mu$ L:DNA 模板 0.5  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 10.5  $\mu$ L,PrimeSTAR Max DNA polymerase 12.5  $\mu$ L,上下游引物各 0.75  $\mu$ L。使用 Veriti 梯度 PCR 仪(德国 Eppendorf 公司)进行扩增:95 °C 变性 10 s,58 °C 退火 5 s,72 °C 延伸 5 s,循环 35 次。琼脂糖凝胶电泳后与 DNA Marker 的条带对比,挑选明亮、单一、清晰条带的扩增产物送武汉擎科公司进行测序。采用 DNASTar 软件进行序列比对和峰图分析,筛选出 SNP 位点。同时,对团头鲂 hepcidin 基因 DNA 序列和 mRNA 序列进行比对分析,绘制团头鲂 hepcidin 基因结构图。

表 1 SNP 位点筛选所用引物

Table 1 The primers used for SNPs screening

引物名称 Name of primer	引物序列(5'-3') Sequence of primer (5'-3')	DNA 熔解 温度/°C Melting temperature
hepcidin-s1-F	GACAGGAAGAGTCAAGCAGGT	56
hepcidin-s1-R	AACGATTATGTTTCCCTTTTG	
hepcidin-s2-F	CAAAAGGGAAAACATAATCG	52
hepcidin-s2-R	TGAAATCAATACCGAGGAGAAT	
hepcidin-s3-F	CGCAACAAAGGCTGTGGATA	56
hepcidin-s3-R	ATGCAGCAATCTAAAGACGGTT	

### 1.4 hepcidin 基因 SNP 位点分型

SNP 位点分型参照文献<sup>[16]</sup>,在筛选出的 hepcidin 基因 2 个 SNP 位点附近,用 Primer premier 5.0 软件设计分型引物(表 2),采用 HRM 方法在 Roche LightCycler<sup>®</sup> 480 荧光定量 PCR 仪上进行 SNP 分型,用 LightCycler480 软件中的 Genescanning 程序对结果进行分析。HRM 反应设置阴性和阳性 2 个对照,每个样品均分型 3 次,之后选取每种类型各 2 个产物送武汉擎科公司进行测序,以确定产物的具体基因型。SNP 分型体系参照文献<sup>[18]</sup>为:ddH<sub>2</sub>O 13.1  $\mu$ L,Es Taq 0.2  $\mu$ L,Es buffer 2.5  $\mu$ L,Eva Green 1.0  $\mu$ L,上下游引物各 0.4  $\mu$ L,dNTPs(10 mmol/L) 0.4  $\mu$ L,30 ng/ $\mu$ L DNA 模板 2.0  $\mu$ L,共 20  $\mu$ L。SNP 分型程序:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 1 min,58 °C 退火 10 s,72 °C 延伸 15 s,重复此循环 45 次。HRM 曲线采集程序:95 °C 1 min;40 °C 1 min;65 °C 1 s;自 65 °C 起按 25 次/°C 变化率连续搜集荧光值,按 0.02 °C/s 的温度变化率采集熔解曲线,至 95 °C 结束。

表 2 实验用 SNP 分型引物

Table 2 The primers used for SNPs genotyping in this study

引物名称 Name of primer	引物序列(5'-3') Sequence of primer(5'-3')	产物大小/bp Product length
hepcidin-217-F	AGTTGAAGTGCCATAAAATCTGCT	165
hepcidin-217-R	TCGTAAGCCATTCCTCCCAFT	
hepcidin-3371-F	CATTGTGATTTGTTCTGGTGATTGG	197
hepcidin-3371-R	TAATAATGCAGCAATCTAAAGACGG	

## 1.5 hepcidin 基因 SNP 位点与抗病性状的关联分析

对团头鲂 hepcidin 基因每一个核苷酸多态性的基因型和等位基因型进行统计,然后利用 SPSS19.0 软件,对 SNP 位点在抗病组和敏感组基因型的分型进行统计和差异显著性分析,从而分析 SNP 位点与抗嗜水气单胞菌感染性状的关联性。

## 2 结果与分析

### 2.1 hepcidin 基因的结构

对 10 尾易感与抗病团头鲂个体 DNA 模板进行 PCR 扩增,产物送往公司测序,利用 DNASTAR 软件对测序结果进行比对分析。测序所得的 hepcidin 基因的基因组 DNA 片段长度为 4 500 bp,NCBI 上查找到的 hepcidin 基因 mRNA 序列(GenBank: JQ308841.1)为 799 bp,编码 93 个氨基酸,通过对测

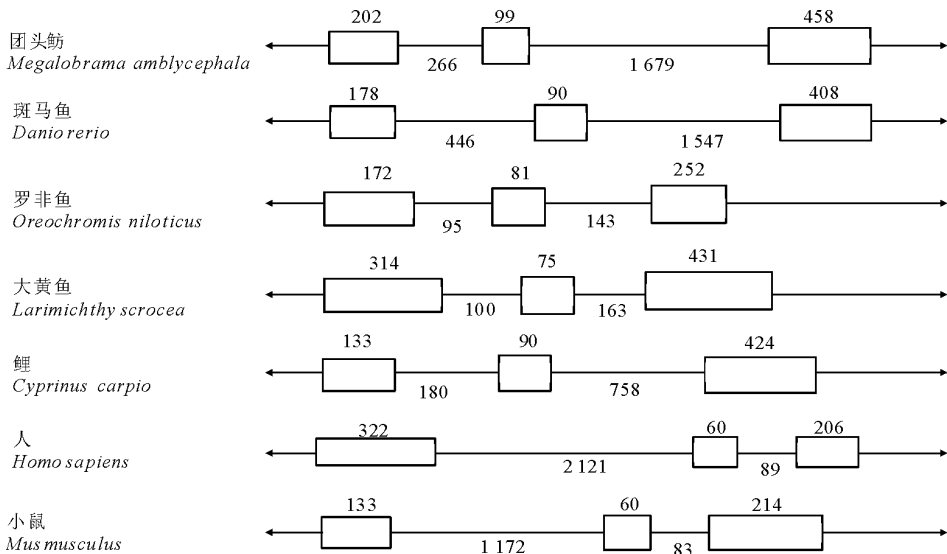
序所得的 hepcidin 基因的基因组 DNA 与 hepcidin 基因 mRNA 序列在 NCBI 数据库中进行 blast 比对,并结合外显子-内含子边界处的保守序列遵守 GT-AG 法则<sup>[18]</sup>,即内含子 5' 序列末端是 GT 开始,3' 端则是 AG 结束,得到 hepcidin 基因的结构图(图 1)。与斑马鱼、人和小鼠等其他脊椎动物类似,团头鲂 hepcidin 基因包括 3 个外显子和 2 个内含子,外显子长度分别为 99、202 和 458 bp,内含子长度分别为 266 bp 和 1 679 bp。

### 2.2 hepcidin 基因 SNP 位点筛选

通过 PCR 扩增序列、核苷酸比对和测序峰图分析,筛选得到团头鲂 hepcidin 基因的 SNP 位点 2 个,具体见图 2。其中 1 个 SNP 位点在内含子部分,1 个 SNP 位于非编码序列,以转录起始位点为 +1,这 2 个位点分别为 hepcidin-217-A/G(第一内含子)、hepcidin-3371-A/G(3' 非编码区)。

### 2.3 hepcidin 基因 SNP 位点分型及与抗病性状的关联分析

hepcidin-217-A/G、hepcidin-3371-A/G 的分型采取 HRM 法,如图 3 所示,3 种曲线中蓝色的为 AA 基因型,绿色的为 AG 基因型,红色的为 GG 基因型,hepcidin-217-A/G 位点图中从上往下依次为 AA、GG、AG 基因型,hepcidin-3371-A/G 图中从上往下依次为 AA、AG、GG 基因型。



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、斑马鱼、罗非鱼<sup>[19]</sup>、大黄鱼、鲤<sup>[20]</sup>、人和小鼠 hepcidin 基因结构图Fig.1 Hepcidin gene structure of *M. amblycephala*, *Danio rerio*, *Oreochromis niloticus*, *Larimichthys scrocea*, *Cyprinus carpio*, *Homo sapiens* and *Mus musculus*

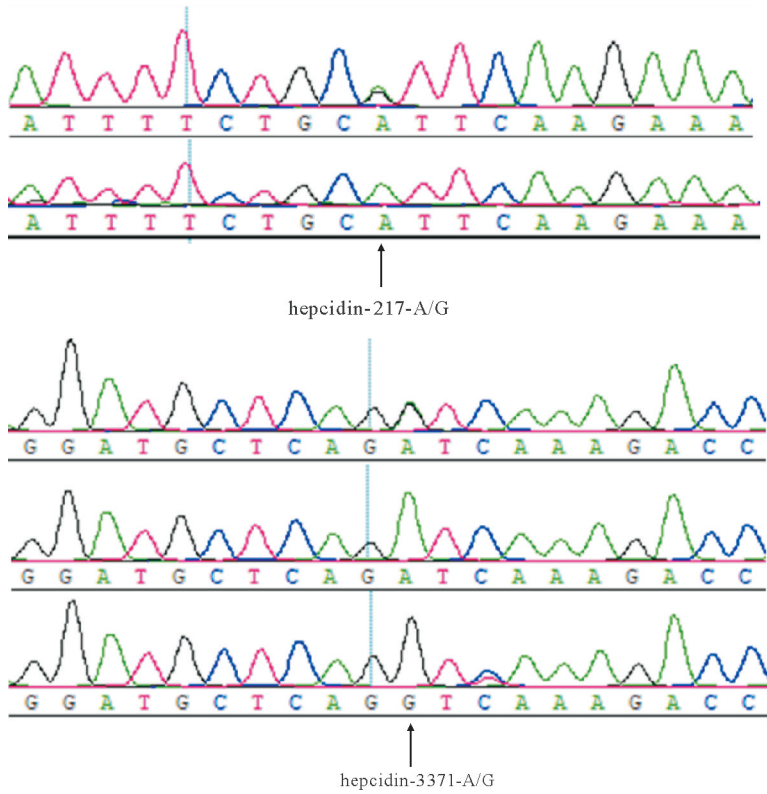


图 2 hepcidin 基因测序峰图序列分析 (箭头示 hepcidin-217-A/G、hepcidin-3371-A/G 突变位点)

Fig.2 Sequencing chromatogram of hepcidin (arrow refers to hepcidin-217-A/G and hepcidin-3371-A/G)

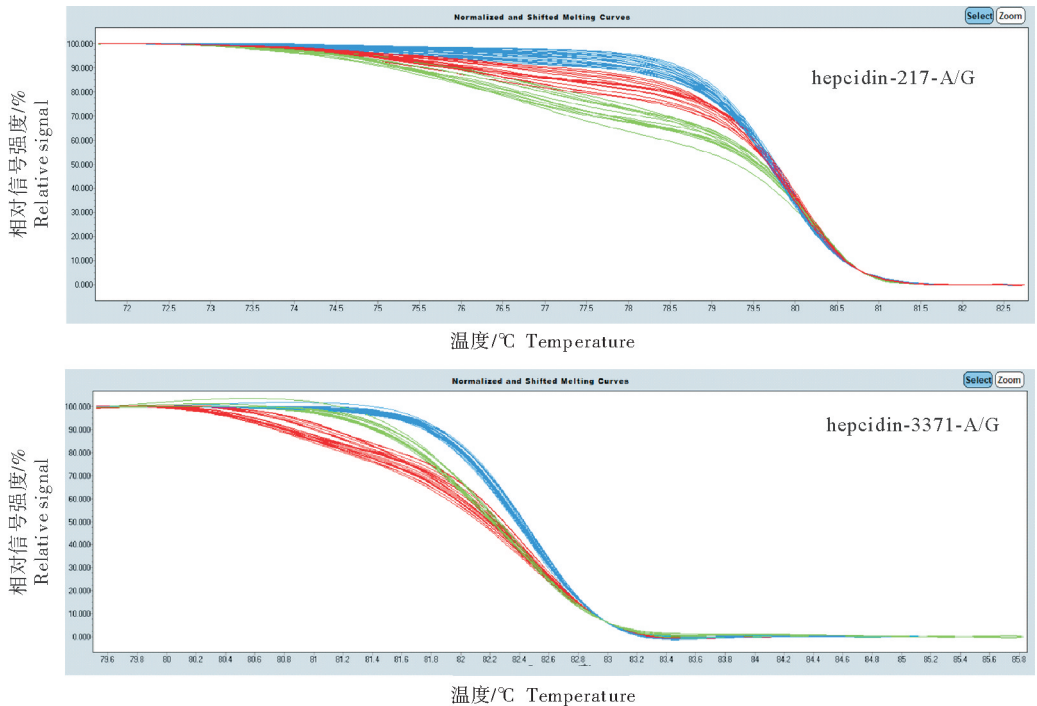


图 3 hepcidin-217-A/G、hepcidin-3371-A/G 位点 HRM 曲线图

Fig.3 Identification of the SNPs genotypes by HRM analysis of hepcidin-217-A/G and hepcidin-3371-A/G

通过设计引物在抗病和易感组中成功地对团头鲂 hepcidin 基因 2 个 SNP 位点 hepcidin-217-A/G 和 hepcidin-3371-A/G 进行了分型。数据选用 SPSS19.0 软件进行统计,统计内容包括易感组和抗病组中的基因型频率、等位基因的频率,结果如

表 3 团头鲂 hepcidin SNP 位点基因型分布

Table 3 Distribution of *M. amblycephala* hepcidin 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	卡方值 (P 值) Chi-squar (P value)	位点 Site	等位基因 Allelic gene	易感个体 Susceptible individuals	抗病个体 Disease resistant individuals	卡方值 (P 值) Chi-squar (P value)
+217 A/G	AA	52(48.6%)	41(39.4%)	6.173 7 ( $P=0.045 6^*$ )	+217 A/G	A	133(62.1%)	127(61.1%)	0.053 2 ( $P=0.817 6$ )
	AG	29(27.1%)	45(43.3%)			G	81(37.9%)	81(38.9%)	
	GG	26(24.3%)	18(17.3%)						
+3371 A/G	AA	56(49.6%)	67(58.3%)	6.235 2 ( $P=0.044 3^*$ )	+3371 A/G	A	130(57.5%)	159(69.1%)	6.618 0 ( $P=0.010 0^{**}$ )
	AG	18(15.9%)	25(21.7%)			G	96(42.5%)	71(30.9%)	
	GG	39(34.5%)	23(20.0%)						

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.

### 3 讨论

团头鲂是我国特有的大宗淡水经济鱼类,近年来养殖产量维持在 80 万 t/a<sup>[4]</sup>。但是,由于在养殖中,多代近亲繁殖导致一些性状有所退化<sup>[3]</sup>,抵抗疾病的免疫能力有所降低,同时由于养殖环境恶化等原因造成病害频频发生,所造成的经济损失相当严重。而团头鲂养殖过程中危害较大的一种疾病就是细菌性败血症,此病一旦暴发,就会造成鱼体大量死亡,目前还没有有效的治疗方法。

已有较多研究表明抗病相关基因的 SNP 多态性与鱼类抗病性状是相关联的。例如牙鲆(*Paralichthy solivaceus*)对鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)的抗性与其组织相容性复合体 II  $\alpha$ (MHC II  $\alpha$ )基因多态性有相关性<sup>[21]</sup>。含有不同 MHC 等位基因的大西洋鲑个体对杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)的抵抗能力不同<sup>[22]</sup>。鲤肿瘤坏死因子(TNF2)基因中的 1 个 SNP 位点碱基的变异导致脯氨酸(Pro)变成丝氨酸(Ser),易感鲤缺乏 TNF2ser,而抗病鲤具有 TNF2pro 和 TNF2ser<sup>[23]</sup>。草鱼 TLR3 和 TLR22 基因多态性与草鱼出血病抗性显著相关<sup>[24]</sup>,草鱼 RIG-I 基因多态性与草鱼呼肠孤病毒感染之间存在显著相关性<sup>[25]</sup>,草鱼 Mx2 和 MDA5 基因的多态性与草鱼出血病抗性之间也存在相关联系<sup>[26]</sup>。在 B 淋巴细胞白血病转录因子

表 3。通过卡方检验分析发现 hepcidin-217-A/G 等位基因 A/G 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( $P < 0.05$ ),hepcidin-3371-A/G 等位基因 A/G 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极显著( $P < 0.01$ )。

(PBX1) 基因 3' 端下游区域测序发现 SNP rs3185695,对发现的该 SNP 进行等位基因分型发现,系统性红斑狼疮患者含有优势等位基因 G<sup>[27]</sup>,基因的 5' 端上游区域和 3' 端下游区域 SNP 位点在基因调控中发挥重要作用。

嗜水气单胞菌感染过程中团头鲂多数铁代谢通路相关基因表达升高,血清铁、肝脏铁水平也有显著变化,表明铁代谢通路参与了机体抵抗嗜水气单胞菌感染引起的免疫应答。hepcidin 基因是铁代谢通路中主要的功能基因,在维持铁稳态和先天性免疫系统都发挥着重要作用。hepcidin mRNA 在肝脏中特异高表达,心脏、脊髓、肺等组织器官中也有少量表达<sup>[28]</sup>。鱼的 hepcidin 类抗菌肽是在杂交条鲈中首次被发现并定义<sup>[29]</sup>,后来陆续在鲢(*Silurus asotus*)<sup>[30]</sup>、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)<sup>[31]</sup>、澳洲肺鱼(*Barramundi latescalcarifer*)<sup>[32]</sup>等体内发现 hepcidin 广泛表达,在肝脏中表达量较高,且具有抗菌能力。

类似地,研究也发现 hepcidin 在团头鲂肝脏中高表达,且在嗜水气单胞菌感染后被显著诱导<sup>[11]</sup>。因此,本试验以探究团头鲂 hepcidin 基因多态性及其与抗病性状的相关性为目的,在人工感染嗜水气单胞菌后,分别从易感组和抗病组中各选取 120 尾团头鲂提取 DNA,通过扩增、测序和比对得到了团头鲂 hepcidin 基因的 2 个可以设计 HRM 分型引物

的 SNP 位点,其中 hepcidin-217-A/G 位点位于内含子部分,hepcidin-3371-A/G 位点则位于 3'端下游区域。用 HRM 法对 SNP 位点进行了基因分型,经过统计分析,发现 hepcidin-217-A/G、hepcidin-3371-A/G 位点突变在易感组和抗病组之间具有显著差异( $P < 0.05$ ),从而推测 hepcidin 的 SNP 位点多态性与抗病性状相关。在 hepcidin-217-A/G、hepcidin-3371-A/G 位点易感组和抗病组中均有 AA、AG 和 GG 基因型个体,拥有 AA 和 GG 基因型个体明显比拥有 AG 基因型个体抗病,猜测可能由于近亲繁殖或者不同品系之间的杂交使得杂合型的团头鲂个体抗病能力下降。hepcidin-217-A、hepcidin-3371-A 基因型在抗病群体中占优势。在实际生产中,应注意避免近亲繁殖,保持品种的优良性状。综上所述,本研究结果表明团头鲂 hepcidin 基因的多态性与抗细菌性败血症性状相关,纯合个体对嗜水气单胞菌引起的细菌性败血症抗性更高,结果为团头鲂抗病基因以及分子遗传标记筛选奠定了一定的理论基础,今后在进行团头鲂抗病育种工作时,本试验结果可为亲本的选择提供一定参考。

## 参 考 文 献

- [1] 陈宜瑜. 中国动物志,硬骨鱼纲,鲤形目(中卷)[M].北京:科学出版社,1998:113.
- [2] 柯鸿文.中国团头鲂的养殖[J].水产科技情报,1986(5):1-4.
- [3] 王卫民.团头鲂养殖产业现状[J].科学养鱼,2009(4):49-50.
- [4] 农业部渔业局. 中国渔业统计年鉴[M].北京:中国农业出版社,2018:45.
- [5] 姚伦,王玉兰,涂彭文.团头鲂爆发性败血症病原分离鉴定及免疫防治[J].江西水产科技,2008(4):16-19.
- [6] 王春瑞.嗜水气单胞菌的分子流行病学调查及其两种分型方法的研究[D].宁波:宁波大学,2011.
- [7] 杜玮南,孙红霞,方福德.单核苷酸多态性的研究进展[J].中国医学科学院学报,2000,22(4):392-394.
- [8] 潘登.高分辨率溶解曲线分析技术(HRM)系统的建立及其在基因多态性和突变检测方面的应用[D].上海:复旦大学,2013.
- [9] 王卫卫,吴璟琦,孙修勤,等.硬骨鱼免疫系统的组成与免疫应答机制研究进展[J].海洋科学进展,2010,28(2):257-265.
- [10] 常彦忠,段相林,钱忠明. Hpcidin 和铁稳态[J].中华内分泌代谢杂志,2003,19(6):501-504.
- [11] LIANG T,JI W,ZHANG G R,et al. Molecular cloning and expression analysis of liver-expressed antimicrobial peptide 1 (LEAP-1) and LEAP-2 genes in the blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. Fish Shellfish Immunol,2013,35(2):553-563.
- [12] BECK V B S,SCHULER M A,JOLLIE D R,et al. Synthesis, bacterial expression, and mutagenesis of the gene coding for mammalian cytochrome b5[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1986,83(24):9443-9447.
- [13] 杨明. 养殖真鲷、黑鯛抗菌肽 hepcidin 的基因克隆、表达特性及其抗菌活性研究[D]. 厦门:厦门大学,2006.
- [14] 高宇,陈昌福,李大鹏,等. 中华鲟抗菌肽 Hpcidin 的克隆、表达及其抗菌活性分析[J]. 水生生物学报,2012,36(4):798-803.
- [15] 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.
- [16] 柴欣,胡晓坤,马徐发,等. 团头鲂 MHC II  $\alpha$  基因的 SNP 位点开发、鉴定及与抗病性状关联分析[J]. 华中农业大学学报,2017,36(4):76-82.
- [17] LIU H,CHEN C,GAO Z,et al. The draft genome of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) reveals the development of intermuscular bone and adaptation to herbivorous diet[J]. Giga science,2017,6(7):1-13.
- [18] 柴欣. 团头鲂 MHC II  $\alpha$  基因的 SNP 位点开发、鉴定及与抗病性状关联分析[D]. 武汉:华中农业大学,2017.
- [19] 黄文树,李少菁,蔡灵,等. 尼罗罗非鱼 Hpcidin 基因结构与序列分析[J]. 厦门大学学报(自然科学版),2007,46(3):390-395.
- [20] 李华. 鲤鱼抗菌肽 hepcidin 的基因克隆、表达及其功能的研究[D]. 济南:山东师范大学,2010.
- [21] XU T J,CHEN S L,ZHANG Y X. MHC class II  $\alpha$  gene polymorphism and its association with resistance/susceptibility to *Vibrio anguillarum* in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Dev Comp Immunol,2010,34(10):1042-1050.
- [22] LOHM J,GRAHN M,LANGEFORS A,et al. Experimental evidence for major histocompatibility complex-allele-specific resistance to a bacterial infection[J].Proc R Soc B,2002,269(1504):2029-2033.
- [23] SAEIJ J P,STET R J,DE VRIES B J,et al. Molecular and functional characterization of carp TNF: a link between TNF polymorphism and trypanotolerance[J]. Dev Comp Immunol,2003,27(1):29-41.
- [24] 衡建福.草鱼 TLR3 和 TLR22 基因多态性与草鱼出血病抗性之间的关联分析[D].杨凌:西北农林科技大学,2011.
- [25] 万全元.草鱼 RIG-I 基因核苷酸多态性与草鱼呼肠孤病毒感染的关联研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2014.
- [26] 王兰.草鱼 Mx2 和 MDA5 基因多态性与草鱼出血病抗性的关联研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2012.
- [27] 黄新芳,沈南,梁栋,等. PBX1 基因 3'末端基因多态性 rs3185695 与系统性红斑狼疮发病相关研究[J].中华风湿病学杂志,2006,10(3):129-132.
- [28] KULAKSIZ H,THEILIG F,BACHMANN S,et al. The iron-regulatory peptide hormone hepcidin: expression and cellular localization in the mammalian kidney[J]. J Endocrinol,2005,184(2):361-370.

- [29] 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]. *Dev Comp Immunol*, 2004, 28(7): 747-754.
- [30] BAO B, PEATMAN E, LI P, et al. Catfish hepcidin gene is expressed in a wide range of tissues and exhibits tissue-specific upregulation after bacterial infection [J]. *Dev Comp Immunol*, 2005, 29(11): 939-950.
- [31] CHEN S L, LI W, MENG L, et al. Molecular cloning and expression analysis of a hepcidin antimicrobial peptide gene from turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 22(3): 172-181.
- [32] BARNES A C, TREWIN B, SNAPE N, et al. Two hepcidin-like antimicrobial peptides in *Barramundi latescalcarifer* exhibit differing tissue tropism and are induced in response to lipopolysaccharide [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2011, 31(2): 350-357.

## Single nucleotide polymorphisms and its association with disease resistant trait of hepcidin gene in *Megalobrama amblycephala*

SUN Qianhui TIAN Wanping LUO Hang WANG Weimin LIU Hong

*College of Fisheries, Huazhong Agricultural University/*

*Key Lab of Freshwater Animal Breeding,*

*Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wuhan 430070, China*

**Abstract** The genomic sequences of hepcidin in *Megalobrama amblycephala* were obtained from public database to study the association between the hepcidin gene polymorphism and disease resistance trait. *Aeromonas hydrophila* challenge experiment was used to distinguish susceptible and disease resistant *M. amblycephala* individuals. The single nucleotide polymorphisms (SNP) of the hepcidin gene in *M. amblycephala* were screened with PCR and DNA sequencing. High-resolution melting (HRM) were used for SNP genotyping. Two SNPs of the hepcidin gene were screened, one of which was located in the intron region and the other was located in the 3'-untranslated region. The results of statistical analyses showed that the genotype and allele frequencies of SNP (A/G) located at 3 371 bp was extremely significant different ( $P < 0.01$ ) and SNP (A/G) located at 217 bp was significant different ( $P < 0.05$ ) between the susceptible and resistant group. It is indicated that the polymorphism of hepcidin gene was significantly associated with bacterial septicemia resistance.

**Keywords** *Megalobrama amblycephala*; hepcidin gene; SNPs; disease resistance; *Aeromonas hydrophila*

(责任编辑:边书京)