

文章编号: 1674-5566(2019)05-0772-10

DOI:10.12024/jsou.20190402623

两种弧菌感染大黄鱼免疫相关基因的 SNP 位点分析

孙明洁¹, 张娜¹, 徐善良², 鲍宝龙¹, 龚小玲¹

(1. 上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 2. 宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 为了探究大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 免疫相关基因的 SNP 与弧菌抗性关系, 分别利用鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 和副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 人工感染大黄鱼。对感染前后抗感群体的转录组进行高通量测序、筛选并分析其抗病差异: (1) 筛选氨基酸的非同义突变 SNP 位点在抗鳃弧菌组有 17 个, 而抗副溶血弧菌组的有 28 个; (2) 一代测序验证结果发现, 染色体 NW_011323507.1 上白细胞介素 6 受体基因 (*IL-6R*) 第 91 196 位碱基 G 突变为 C, 导致缬氨酸突变为亮氨酸, 该位点 G/C 在抗鳃弧菌组、对照组样本之间突变基因型 CC 频率分别为 12.5% 和 0, 呈显著性差异 ($P < 0.05$); (3) 补体 C1q/ 肿瘤坏死因子相关蛋白 9 (CTRP9) 基因在染色体 NW_011323975.1 上的 35 665 位碱基突变 (A-G), 在副溶血弧菌抗感易感群体中突变位点基因型 GG 频率分别为 37.5% 和 0, 呈极显著性差异 ($P < 0.01$)。结果表明, *IL-6R*-91196-G/C 位点突变与大黄鱼抗鳃弧菌有关联, *CTRP9*-35665-A/G 位点突变与大黄鱼抗副溶血弧菌有关联, 这为大黄鱼抗弧菌群体的选育提供了理论依据。

关键词: 鳃弧菌; 副溶血弧菌; 大黄鱼; 转录组; 免疫基因; SNP

中图分类号: S 917.4 **文献标志码:** A

大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 属硬骨鱼纲鲈形目 (Perciformes) 石首鱼科 (Sciaenidae) 黄鱼属 (*Larimichthys*), 是我国近海主要养殖经济鱼类^[1-2]。近些年, 养殖环境恶化、养殖规模扩大、养殖密度过高等原因导致其病害频发, 尤其是鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 和副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 感染引起的弧菌病, 对大黄鱼生长危害极大。弧菌病发病时间短、死亡快、传染性极强, 严重威胁着渔业经济发展和人们的健康^[3]。因此, 培育大黄鱼抗病品系是预防弧菌病的重要途径之一。

单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 是一种理想的遗传标记, 在遗传的多样性分析、关联分析、品种鉴定、高密度遗传连锁图谱的构建以及辅助育种等方面有广泛的应用^[4-6]。

水产品免疫基因 SNP 与抗病关联的研究在

鱼类和贝类中已有报道^[7-17]。与大黄鱼生长、繁殖性状、耐高温、溶氧等相关基因 SNP 标记也有一定的筛选^[18-22], 这将提升大黄鱼遗传育种的效率。有关大黄鱼免疫相关基因 SNP 的报道不多, 李婵等^[23]从白细胞介素 8 (*IL-8*) 基因 cDNA 中筛选出 5 个同义突变 SNPs, 这些 SNP 可能被用作抗病大黄鱼的分子标记。

为了确定免疫基因中 SNP 是否与抗弧菌相关联, 运用鳃弧菌和副溶血弧菌感染大黄鱼, 观察大黄鱼感染后的病理特征, 从转录组中筛选免疫相关基因的 SNP 位点并加以验证, 寻找抗弧菌病的突变位点, 为大黄鱼抗弧菌的分子选育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 大黄鱼暂养、驯化

出膜 40 余天、1~2 cm 左右的大黄鱼苗取自

收稿日期: 2019-04-29 修回日期: 2019-08-31

基金项目: 国家自然科学基金(31872546)

作者简介: 孙明洁(1990—), 女, 硕士生, 研究方向为鱼类生物学。E-mail: 1061878779@qq.com

通信作者: 龚小玲, E-mail: xlgong@shou.edu.cn

象山港水产引种育种有限公司,在水温 26 ℃、水深 1 m、1.0 m (内径) × 1.2 m (高) 的养殖桶里暂养 3~4 d,每天投饵 2 次(早上 7:00、下午 6:30),换水 2 次,每次换水 90%,清理底部食物残渣及粪便。为了防止大黄鱼患白点病,换水时加入少量甲醛并维持水体中甲醛浓度为 0.005‰。待鱼苗适应环境、进食稳定后,将暂养的大黄鱼苗移入实验缸中进行实验。

1.2 弧菌对大黄鱼的感染

鳃弧菌为本实验室从双斑河鲀中分离保存的菌种^[24-25],副溶血弧菌(ATCC17802)由中国工业微生物菌种保藏管理中心提供。鳃弧菌和副溶血弧菌分别在含盐 1.5‰ 和高盐 30‰ 的 LB 培养基,28 ℃ 培养。

实验水体为海水 70 L,加入到长 80 cm、宽 45 cm 的玻璃缸,每缸放苗 500 尾,水温控制在 26 ℃,待鱼苗稳定后进行实验;设置鳃弧菌 1.5×10^8 CFU/mL 和副溶血弧菌 1.5×10^7 CFU/mL 浓度感染实验组和对照组,每组设置 3 个平行。各缸每隔 24 h 投喂 1 次饵料,清理掉食物残渣和粪便,换水 1/3,并补充感染菌以维持其恒定的浓度。每天清理、记录各缸中死苗数,RNA 保护液保存死亡样本用于后续 PCR 验证。

1.3 转录组分析

实验第 7 天取对照组、鳃弧菌感染无症状(抗鳃弧菌组)、副溶血弧菌感染无症状(抗副溶血弧菌组)活鱼样本各 3 尾,Trizol 法提取整鱼总 RNA,各组样本总 RNA 混合后质检、建库,用

TruSeq PE Cluster Kit 在 cBot 中进行 cluster generation,然后在 Illumina HiSeq™ 2500 中进行双向测序。测序原始数据去除低质量和错误碱基后得到 clean reads,以模式生物斑马鱼转录组和大黄鱼基因组数据为参考序列进行比对,对测序数据的 KEGG 通路、差异表达基因和 SNP 进行分析。从转录组中筛选免疫相关的 KEGG 通路,根据通路中的免疫基因从差异表达基因中筛选差异倍数较大的免疫基因,并筛选出免疫基因对应的非同义突变位点。

1.4 PCR 扩增及测序

选取鳃弧菌和副溶血弧菌感染第 4 天死亡(易感)、第 7 天存活(抗感)和对照第 7 天存活的实验鱼各 20、共 100 尾,分别提取全鱼的总 RNA。以 RNA 为模版用 TaKaRa 公司的 PrimeScript™ II 1st 和 cDNA Synthesis Kit 反转录成 cDNA, -20℃ 保存备用。根据大黄鱼转录组和基因组序列设计免疫基因相关引物进行 PCR 扩增(表 1),PCR 反应体系为 25 μL:12.5 μL 2 × Taq Plus Master Mix (Dye Plus) (诺唯赞公司),Primer F (10 μmol/L) 和 Primer R (10 μmol/L) 各 1 μL, cDNA 模板 1 μL, 无菌水 9.5 μL。扩增反应器为 Eppendorf PCR 仪(德国)。PCR 反应程序:95 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 30 s,64 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s(45 个循环),72 ℃ 延伸 10 min。经琼脂糖凝胶检测、目的条带清晰无杂带的 PCR 产物送上海生工生物工程股份有限公司进行测序。

表 1 免疫基因非同义突变 SNP 引物设计

Tab.1 Primer design of immune gene non-synonymous mutation SNP

引物名称 Primer Name	Gene ID	片段大小 Size/bp	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer
1 <i>CTRP9</i>	104937181	431	AGCCTAACCTTCCTGTTCTTCTATACTATCATT	GGTGGTGTGGCCATCGGGACCTT
2 <i>Complent</i>	104938942	242	ATCAGGACGCCGTCTGTTGAGAAA	ATGGTGGCGCCCTTCAGGCTTGTG
3 <i>IL-6R</i>	104934469	104	TTTATGTCTAAGCTCCAGAGTTTGAGTG	GTCACCAGAGCCTGCCCTTC
3-2 <i>IL-6R</i>	104934469	156	ACCTTTGGCCGTCGCGCTTAC	GCCTGGTCATCACTACTGTGGG
4 <i>galectin4</i>	104934301	419	GAGAAGGCAAATCTGGAGTCTAACAAA	CCGTCCGCATAGTAAAGCAACG
5 <i>NF</i>	104929101	254	TCGACCCTCCGACACCAGTACACTT	ATACGCCAGAGCCCGTCTACCTT
5-2 <i>NF</i>	104929101	258	GAAATGTTCAATTATGAGGGTTTAACTGCG	AAGTTCAACAGCTCCACGTTTGC
6 <i>glutathione</i>	104929615	269	TTCGCCAAAGGGAGTGCTGC	GGGTAAACTTCATCCAGGTATTCACAGG
7 <i>Tyrosine</i>	104929020	135	AGGTGATCGTTGTGCCATCTFTGC	GCACTTCTGTTGGTTCGGCTTTGAT
8 <i>Interferon</i>	104927797	304	CTGAAGCGGACGCACGGGATGC	TCTGAGTCACTAGGCTTGGAGGGATGCC

1.5 基因型的判断及数据分析

根据测序结果用 BioEdit 软件观察测序峰型

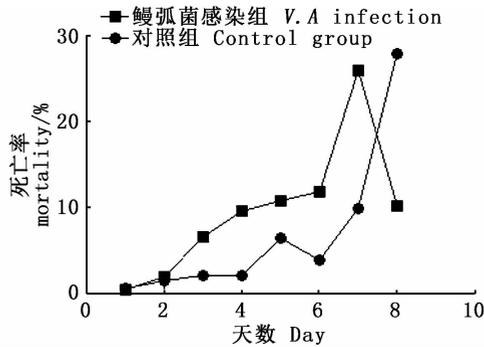
图,进而确定 SNP 位点的基因型,单峰为纯合子基因型,双峰为杂合子基因型。用 SPSS 18.0 软

件统计数据进行单因素方差分析($P < 0.05$; 显著性差异; $P < 0.01$: 极显著差异)。

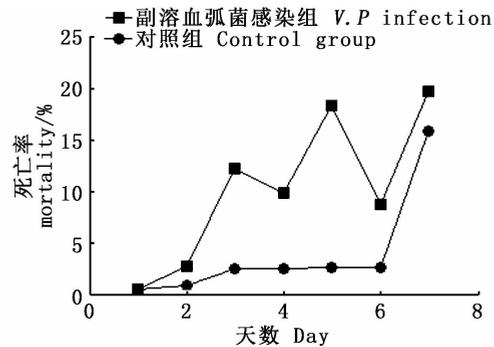
2 结果

2.1 感染实验结果

记录实验鱼每天各缸的死亡数, 计算其死亡率, 并绘制鳗弧菌和副溶血弧菌感染死亡趋势图



(图1): 对照组和鳗弧菌实验组死亡率在实验第1, 2天差别不大, 从第3天开始感染组死亡率急剧增加, 到第7天对照组死亡率达到最高。副溶血弧菌感染组死亡率趋势明显高于对照组(图1)。感染组、对照组样本死亡率在实验第7天后均急剧上升。



V. A 和 V. P 分别表示 *V. anguillarum* 和 *V. parahaemolyticus* 的简称
V. A is short for *V. anguillarum*, V. P is short for *V. parahaemolyticus*

图1 两种弧菌感染大黄鱼死亡趋势

Fig. 1 The death trends of two *Vibrio* infected large yellow croaker

两感染组中, 第4天死亡和第7天存活部分样本出现了感染后症状。如图版-1 对照组, 可以看出鱼体整体剔透, 外部无明显症状; 图版-2 鳗弧菌感染组中患病样本, 部分鱼苗出现鳃部、腹部内淤血、脊椎下充血和烂尾症状, 大多数鱼苗表现为头部内出血症状; 图版-3 副溶血弧菌感染组患病鱼苗部分出现鳃部、腹部内出血的症状。

2.2 转录组中免疫基因的 SNP 统计

根据转录组测序结果, 与免疫相关的信号通路主要有 Toll-like receptor signaling pathway、Arginine and proline metabolism、TGF-beta signaling pathway、PI3K-Akt signaling pathway、MyD88-dependent pathway、NF- κ B signaling pathway、MAPK signaling pathway、JAK-STAT signaling pathway 等。根据信号通路筛选免疫差异基因 ($P < 0.01$), 从抗鳗弧菌组与对照组中共筛选出 101 个, 其中上调基因 39 个、下调基因 62 个; 39 个上调基因中筛选出的 14 个基因编码区存在 64 个 SNP 位点, 其中氨基酸非同义突变位点有 17 个(表 2)。从抗副溶血弧菌组与对照组中筛选出 127 个, 其中有 53 个免疫上调基因、73 个下调基因; 53 个免疫上调基因中共发现 29 个基因的编码区存在 146 个 SNP 位点, 其中非同义突变位点

有 28 个(表 3)。

2.3 免疫基因 SNP 验证

选择对照组、鳗弧菌易感组(第4天死亡)、抗鳗弧菌组(第7天存活)、副溶血弧菌易感组、抗副溶血弧菌组样本各 10 尾, 共 50 尾样本的 cDNA 对表 2 和表 3 中部分 SNP 进行一代测序验证。

数据统计分析结果(表 4)显示: tyrosine-protein kinase STYK1-like、glutathione S-transferase omega 1、NF-kappa-B inhibitor zeta-like、complement C1q and tumor necrosis factor-related protein 9A-like、APOBEC1 complementation factor 基因分别在其染色体上的第 261 746、1 060 606、286 278、35 665 和 35 767、6 206 位上的 SNP 位点无显著性差异。补体 C1q/ 肿瘤坏死因子相关蛋白 9(complement C1q and tumor necrosis factor-related protein 9A-like, *CTRP9*) 所在染色体上的 35 767 位在抗副溶血弧菌组与对照组间存在显著性差异($P < 0.05$), 但抗副溶血弧菌组与对照组样本却不存在显著性差异($P < 0.05$); interleukin-6 receptor (*IL-6R*) 基因所在染色体的 91 196 位的突变在鳗弧菌实验组样本中存在极显著性差异($P < 0.01$)。

表 2 对照组与抗鳃弧菌组差异表达的免疫基因非同义突变 SNP
**Tab. 2 Non-synonymous mutation SNP of differentially expressed immune genes
 in control group and *V. anguillarum* resistance group**

Gene id	基因名称 Gene Name	log ₂ . Fold_change	染色体 Chromosome	位置 Position	密码子 Codon	氨基酸 Amino acid
104929101	<i>NF-kappa-B inhibitor zeta-like</i>	-3.898	NW_011322972.1	284103 286278	ATG/ATA AAC/CAC	Met/Ile Asn/His
104934301	<i>galectin-4</i>	-2.879	NW_011323488.1	161460	CAT/CGT	His/Arg
104929615	<i>glutathione S-transferase omega 1</i>	-2.011	NW_011322447.1	1060606	AAT/CAT	Asn/His
104929020	<i>tyrosine-protein kinase STYK1-like</i>	-1.838	NW_011322966.1	261746	ACC/GCC	Thr/Arg
104927422	<i>microsomal glutathione S-transferase 3-like</i>	-1.592	NW_011322860.1	181410	CAT/TAT	His/Tyr
104939356	<i>MHC class II antigen alpha chain</i>	-1.374	NW_011324685.1	9725 9821 10168 398810	TAT/TTT TTC/TAC GGG/AGG CCC/GCC	Tyr/Phe Phe/Tyr Gly/Arg Pro/Ala
104924427	<i>nuclear factor, erythroid 2</i>	-1.361	NW_011322691.1	398895 400201 400678	CTA/CCA GAG/GAC GAT/GAA	Leu/Pro Glu/Asp Asp/Glu
104929209	<i>DELTA-stichotoxin-Hmg2b-like</i>	-1.185	NW_011322979.1	507945 507959 508014	TGC/TCC GTC/ATC GCG/GTG	Cys/Ser Val/Ile Ala/Val
104920970	<i>gamma-interferon- inducible-lysosomal thiol reductase</i>	-1.148	NW_011322565.1	1212654	CAG/CGG	Gln/Arg
104918236	<i>lonf2</i>	-1.037	NW_011322493.1	652532	GCG/GTG	Ala/Val

注: Gene id 表示大黄鱼基因组中基因编号, log₂. Fold_change: log₂(对照组/鳃弧菌感染未患病), 染色体为大黄鱼基因组染色体, 位置为该 SNP 在大黄鱼基因组染色体上的位置

Notes: Gene id indicates the gene number in the large yellow croaker genome, log₂. Fold_change: log₂(control group/*V. anguillarum* resistance group), and the chromosome is the large yellow croaker genome, position is the SNP on the chromosome of the large yellow croaker genome

表 3 对照组和抗副溶血弧菌组差异表达的免疫基因非同义突变 SNP
**Tab. 3 Non-synonymous mutation SNP of differentially expressed immune genes
 in control group and *V. parahaemolyticus* resistance group**

Gene id	基因名称 Gene Name	log ₂ . Fold_change	染色体 Chromosome	位置 Position	密码子 Codon	氨基酸 Amino acid
104937181	<i>complement C1q and tumor necrosis factor-related protein 9A-like</i>	-4.508	NW_011323975.1	35665 35767	ATC/GTC TGG/GGG	Ile/Val Trp/Gly
104938942	<i>APOBEC1 complementation factor</i>	-4.45	NW_011324475.1	6206	TGG/CGG	Trp/Arg
104934301	<i>galectin-4</i>	-2.879	NW_011323488.1	161460	CAT/CGT	His/Arg
104934469	<i>interleukin-6 receptor</i>	-2.125	NW_011323507.1	91170 91196	AGC/ACC GTG/CTG	Ser/Thr Val/Leu
104921364	<i>C-type lectin domain family 4 member G-like</i>	-1.972	NW_011322575.1	915562 915573 916876	GAC/GGC TAC/CAC ACT/TCT	Asp/Gly Tyr/His Thr/Ser
104928642	<i>antigen peptide transporter 1-like</i>	-1.585	NW_011322939.1	60083	AAA/GAA	Lys/Glu
104919865	<i>lysosomal associated membrane protein 2</i>	-1.462	NW_011322536.1	172239	CCA/TCA	Pro/Ser
104927797	<i>interferon regulatory factor 2-binding protein 1-like</i>	-1.318	NW_011322885.1	298431	GGA/GCA	Gly/Ala
104934750	<i>E3 ubiquitin/ISG15 ligase TRIM25-like</i>	-1.298	NW_011323543.1	122510 127509 128926	TTT/CTT TAC/TGG TGC/GGC	Phe/Leu Tyr/Trp Cys/Gly
104927548	<i>ubiquitin associated protein 2</i>	-1.138	NW_011322870.1	243107	GGT/AGT	Gly/Ser

注: log₂. Fold_change: log₂(对照组/抗副溶血弧菌组)

Notes: log₂. Fold_change: log₂(control group/*V. parahaemolyticus* resistance group)

表 4 免疫基因 SNP 位点卡方值统计

Tab. 4 Chi-square value statistics of immune gene SNP locus

基因名称 Gene Name	氨基酸 Amino acid	对照组 Vs 抗鳃弧菌 CP Vs <i>V. A resistance</i>	鳃弧菌易感 Vs 抗感 <i>V. A</i> susceptibility/ resistance group	对照组 Vs 抗副溶血弧菌 CP Vs <i>V. P</i> resistance	副溶血弧菌 易感 Vs 抗感 <i>V. P susceptibility/</i> resistance group
<i>NF-kappa-B inhibitor zeta-like</i>	Asn/His	0.034	0	0.505	0.505
<i>glutathione S-transferase omega 1</i>	Asn/His	3.086	5.914	0.843	1.810
<i>galectin-4</i>	His/Arg	0	0	0	0
<i>tyrosine-protein kinase STYK1-like</i>	Thr/Arg	0	0	0	0
<i>complement C1q and tumor necrosis</i>	Ile/Val	1.938	3.903	4.55	2.59
<i>factor-related protein 9A-like</i>	Trp/Gly	4.951	4.300	6.964 *	0.917
<i>APOBEC1 complementation factor</i>	Trp/Arg	0.643	1.778	0.227	0.085
<i>interleukin-6 receptor</i>	Val/Leu	10.08 **	4.425	2	2
<i>interferon regulatory factor</i>	Gly/Ala	2.50	2.5	0	0
<i>2-binding protein 1-like</i>					

注:表中 * 代表差异显著 ($P < 0.05$); ** 代表差异极显著 ($P < 0.01$)

Notes: * in the table shows significant difference ($P < 0.05$); ** shows extremely significant difference ($P < 0.01$)

2.3.1 *IL-6R* 基因 SNP 位点扩大样本检测

扩大样本对照组 (19 尾)、鳃弧菌易感组 (19 尾)、抗鳃弧菌组 (16 尾) 进行 *IL-6R* 基因 SNP 的显著性差异验证。

数据分析显示 SNP 位点 *IL-6R-91196-G/C* 在抗鳃弧菌群体中 CC 基因型频率为 12.5%, 而在对照组和易感群体中 CC 基因型频率均为 0, 存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

表 5 *IL-6R* 基因在鳃弧菌实验组 SNP 位点统计Tab. 5 Statistics of *IL-6R* gene in SNP sites of *V. anguillarum* experiment group

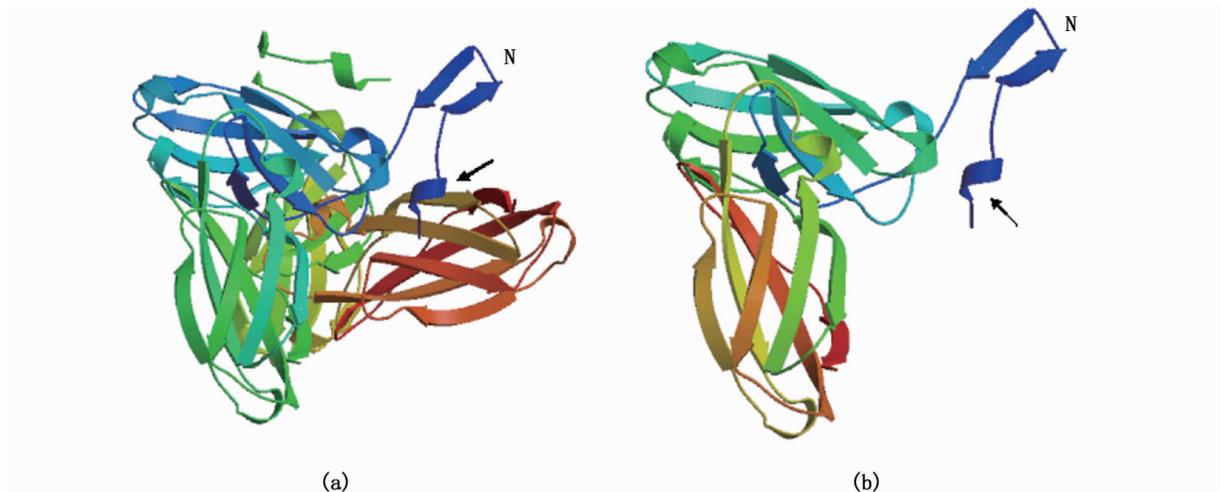
实验样本 Experimental sample	个数 Number	SNP			基因型频率 Genotype frequency			卡方值 X^2	
		GG	GC	CC	GG	GC	CC	易感 susceptible	抗感 resistant
对照组 control group	19	11	8	0	0.579	0.421	0.000	3.199	6.838 *
易感 susceptible	19	16	3	0	0.843	0.158	0.000	-	15.322 **
抗感 resistant	16	3	11	2	0.188	0.688	0.125	-	-

注:表中 * 代表差异显著 ($P < 0.05$); ** 代表差异极显著 ($P < 0.01$)

Notes: * in the table shows significant difference ($P < 0.05$); ** shows extremely significant difference ($P < 0.01$)

大黄鱼 *IL-6R* 基因 cDNA 全长共 1 026 bp, 编码 401 个氨基酸。生物信息学的预测分析: 第 341 位氨基酸缬氨酸 Val (GUG) 突变为亮氨酸 Leu (CUG), 会导致蛋白质结构发生明显变化, 由缬氨酸 Val 变为亮氨酸 Leu 时, 蛋白质折叠由近

似球状变为椭球状; 为缬氨酸时 N 端距离 *IL-6R* 基因的蛋白分子较近, 而为亮氨酸 Leu 时, N 端远离分子, 蛋白质三级结构的变化, 可能影响该基因的功能 (图 2)。



图(a,b)分别表示 *IL-6R* 基因 341 位氨基酸是缬氨酸(Val)和亮氨酸(Leu)时的蛋白质三级结构

Figures (a, b) show the tertiary structure of the protein when the amino acid at position 341 of the *IL-6R* gene is valine (Val) and leucine (Leu) respectively

图 2 Swiss model 预测 *IL-6R* 蛋白质三级结构

Fig. 2 Predicting *IL-6R* protein tertiary structure using Swiss model

2.3.2 *CTRP9* 基因 SNP 位点扩大样本检测

为了更准确验证 *CTRP9* 基因 SNP 位点在副溶血弧菌感染组样本中的基因型,扩大样本进行分析:对照组、副溶血弧菌易感组和抗副溶血弧菌组样本分别为 20、18、16 尾。数据分析发现 SNP 位点 *CTRP9*-35665-A/GAA 22.2%、AG 77.8%、GG 0,在抗副溶血弧菌组中 AA 37.5%、AG 25%、GG 37.5%。*CTRP9* 基因的 Ile 突变为 Val 位点,副溶血弧菌易感组与抗副溶血弧菌组间存在极显著性差异($P < 0.01$),但抗副溶血弧菌组与对照组之间却不存在显著性差异($P > 0.01$) (表 6)。

CTRP9 基因 cDNA 全长 1 368 bp,编码 455 个氨基酸,异亮氨酸(Ile)突变为缬氨酸(Val)发生在氨基酸序列的第 383 位,用 Swiss model 预测 *CTRP9* 蛋白质三级结构(图 3)。*CTRP9* 氨基酸序列第 383 位为 Ile 和 Val 时蛋白质三级结构整体折叠层次都近似球体状,但稍有差异,为 Ile 时 C 端尾巴折叠靠近蛋白质大分子,为 Val 时 C 端尾巴则远离蛋白质大分子。位点突变导致其蛋白质三级结构改变,该 SNP 位点可能与大黄鱼抗副溶血弧菌有关。

表 6 *CTRP9* 基因两个 SNP 位点在副溶血弧菌实验组样本中卡方值统计

Tab. 6 Chi-square value statistics of two SNP loci of *CTRP9* gene in *V. parahaemolyticus* experimental group samples

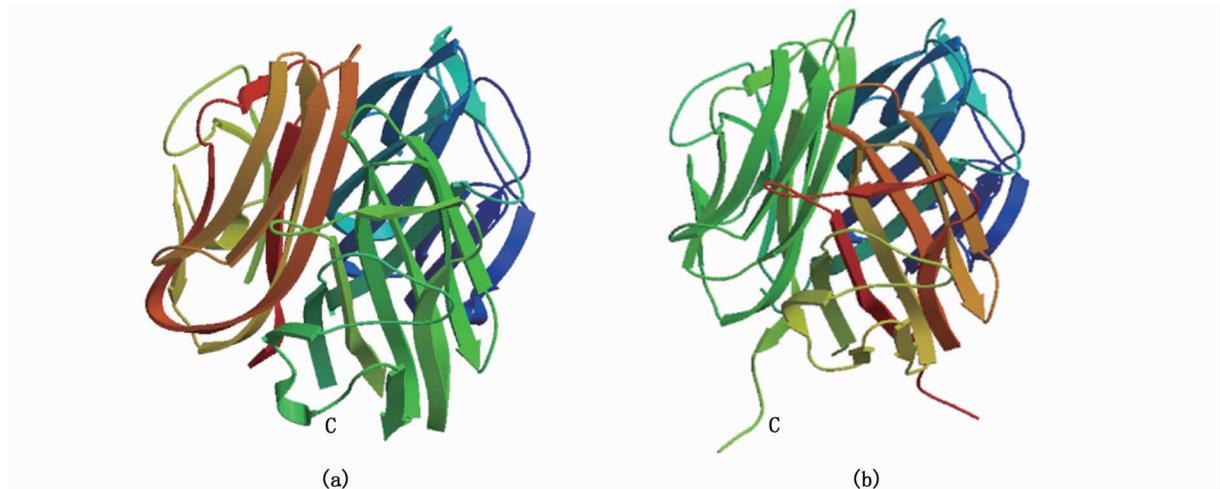
<i>CTRP9</i> SNP	对照组 Vs 抗副溶血弧菌组 CP Vs V. P resistance group	副溶血弧菌易感组 Vs 抗感组 V. P susceptibility/ resistance group
Ile-Val	2.301	11.879 **
Trp-Gly	3.633	5.621

注:表中 ** 代表差异极显著($P < 0.01$)

Notes: ** in the table shows extremely significant difference ($P < 0.01$)

3 讨论

鳗弧菌和副溶血弧菌感染大黄鱼,激活相应组织上的 TLR 受体^[26],与受体结合后激活细胞内相关免疫通路。从相关免疫通路中,筛选出有差异表达的免疫基因及相关的非同义突变的 SNP,推测 45 个 SNPs 可能与抗弧菌有关。首次对免疫相关基因的 SNP 进行一代测序验证,证明白细胞介素受体 *IL-6R*-383 位 SNP 与抗鳗弧菌有关;补体 C1q/ 肿瘤坏死因子相关蛋白 *CTRP9*-341 位 SNP 与抗副溶血弧菌有关。



图(a,b)分别表示 *CTRP9* 基因 383 位氨基酸是异亮氨酸(Ile)和缬氨酸(Val)时的蛋白质三级结构

Figures (a, b) show the tertiary structure of the protein when the amino acid at position 383 of the *CTRP9* gene is isoleucine (Ile) and proline (Val) respectively

图3 Swiss model 预测 *CTRP9* 蛋白质三级结构

Fig. 3 Predicting *CTRP9* protein tertiary structure using Swiss model

白细胞介素受体是参与免疫反应的重要基因,在启动和调节免疫反应中起中心调节作用。*IL-6R* 主要有 α 链和 β 链,当病原菌感染机体时,*IL-6* 首先与 B 淋巴细胞、T 淋巴和吞噬细胞等细胞表面的 *IL-6R* 的 α 链结合,后与 β 链上的信号转导蛋白 gp130 结合,形成高亲和复合体,激活 JAK-STAT 信号通路,发挥免疫功能^[27]。*IL-6R* 基因的 SNP 在人、牛等生物中有相关报道。溶藻弧菌感染大黄鱼后,*IL-6R* 基因在大黄鱼所有组织中表达量都上调,在头肾中最高^[28]。本实验中两种弧菌感染大黄鱼部分出现腹腔内出血症状,推测大黄鱼的血管内皮细胞和炎性细胞中 *IL-6R* 被激活、上调,从而发挥免疫学功能和抗菌活性。因此,研究大黄鱼 *IL-6R* 基因多态性与抗弧菌关联,不仅为大黄鱼抗菌机制研究提供新思路,也是分子育种的迫切需要。

CTRP9 基因是脂肪因子超家族中与脂联素结构最相近的分子,可与脂联素形成异源多聚复合物参与炎症等诸多生理和病理过程^[29]。*CTRP9* 基因还通过脂联素受体 1/AMPK/Akt/内皮型一氧化氮合酶依赖的通路,增加人静脉内皮细胞一氧化氮,发挥舒张血管的作用^[30]。*CTRP9* 基因在鱼类中的研究主要有石斑鱼和罗非鱼。点带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 中,*CTRP9* 的结构和蛋白功能在硬骨鱼代谢和食物摄入起重要的调节作用^[31]。杨国坤等^[32] 在尼罗罗非鱼中证

明了 *CTRP9* 对硬骨鱼类繁殖的调节作用。梁丽丽等^[33] 首次对 *CTRP9* 基因多态性与冠心病的相关性进行研究,本文对 *CTRP9* 基因的 SNP 与抗副溶血弧菌的关系进行研究,这为 *CTRP9* 基因多态性与疾病关联研究奠定基础。

陈小明等^[22] 在研究大黄鱼耐高温性状全基因组关联分析时,在 38 个 SNPs 附近共找到 26 个已知的功能基因,部分基因与免疫功能相关。本研究首次对筛选到的大黄鱼免疫基因 SNPs 进行验证,确定具体抗弧菌的基因型频率。SNP 位点 *IL-6R*-91196-CC 和 *CTRP9*-35665-GG 基因型 *CTRP9*-35665-GG 基因型可以作为大黄鱼抗弧菌病的候选基因,用于指导大黄鱼的分子标记辅助选择育种。另外,HAO 等^[34] 发现三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) C 型凝集素中的 SNP E4-205C/T 与抗溶藻弧菌有关联,基因型 TT 可增加梭子蟹对溶藻弧菌抗性;GUO 等^[35] 克隆出了血蓝蛋白 Ig 样结构域基因存在 11 个 SNP,通过测序验证了 5 个 SNP 位于基因组 DNA 和 cDNA 中,可能与环境压力或致病性相关。免疫相关基因的 SNPs 在水产育种中的应用,将大大提升水产品的质量 and 育种速率。

综上所述,本研究首次对大黄鱼免疫相关基因非同义突变 SNP 进行筛选与验证,SNP 的标记不仅可以评估大黄鱼遗传多样性,而且为大黄鱼的抗病选育等工作提供研发基础。同时,本研究

检测到了大黄鱼 *IL 6R*、*CTRP9* 基因与弧菌抗性相关的 SNP,为大黄鱼的选育工作提供新思路,有利于推进大黄鱼的遗传育种进程。

参考文献:

- [1] 郭进杰,陈国平,黄振玉,等. 循环水系统中淡化养殖大黄鱼生长及卵巢发育的初步研究[J]. 上海海洋大学学报, 2016,25(6):847-852.
GUO J J, CHEN G P, HUANG Z Y, et al. Studies on growth and gonadal development of *Pseudosciaena crocea* in low salinity indoor circulating culture system [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2016,25(6):847-852.
- [2] 林美金,黄伟卿,陈庆荣,等. 闽-粤东族网箱养殖大黄鱼的生长模型研究[J]. 宁德师范学院学报(自然科学版), 2017,29(1):61-65.
LIN M J, HUANG W Q, CHEN Q R; et al. Growth model of Min-Yuedong tribe cultured *Larimichthys crocea* [J]. Journal of Ningde Normal University (Natural Science), 2017, 29(1):61-65.
- [3] 卫玮. 大黄鱼对鳃弧菌减毒活疫苗免疫应答差异表达基因的筛选与鉴定[D]. 上海:华东理工大学,2010.
WEI W. Screening and identification of differentially expressed genes in large yellow croaker immunologically responded to attenuated live *Vibrio anguillarum* [D]. Shanghai:East China University of Science and Technology, 2010.
- [4] 唐立群,肖层林,王伟平. SNP 分子标记的研究及其应用进展[J]. 中国农学通报,2012,28(12):154-158.
TANG L Q, XIAO C L, WANG W P. Research and application progress of SNP markers[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin,2012,28(12):154-158.
- [5] 程方圆,陶紫玉,李晨虹. 应用单核苷酸多态性(SNP)标记鉴定短颌鲷、湖鲷和刀鲷[J]. 上海海洋大学学报, 2019,28(1):13-22.
CHENG F Y, TAO Z Y, LI C H. Species identification of *Coilia brachygnathus*, *C. nasus* and *C. nasus taihuensis* with SNP markers [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2019,28(1):13-22.
- [6] 王冉,刘红. 凡纳滨对虾繁殖性状的 SNP 分子标记筛选的初步研究[J]. 上海海洋大学学报,2018,27(6):24-31.
WANG R, LIU H. Preliminary study of SNP marker on spawning traits in *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Shanghai Ocean University,2018,27(6):24-31.
- [7] BAO Y, LI L, ZHANG G. Polymorphism of the superoxide dismutase gene family in the bay scallop (*Argopecten irradians*) and its association with resistance/susceptibility to *Vibrio anguillarum* [J]. Developmental & Comparative Immunology,2010,34(5):553-561.
- [8] BJELLAND A M, FAUSKE A K, NGUYEN A, et al. Expression of *Vibrio salmonicida* virulence genes and immune response parameters in experimentally challenged Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) [J]. Frontiers in Microbiology, 2013, 4: 401.
- [9] GUI H F, ZHI Y B, XIA J H, et al. Characterization of the *LECT2* gene and its associations with resistance to the big belly disease in Asian seabass [J]. Fish Shellfish Immunol, 2014,37(1):131-138.
- [10] HONG F G, YI W Z, JUN HONG X, et al. The *MCP-8* gene and its possible association with resistance to *Streptococcus agalactiae* in tilapia [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 40(1):331-336.
- [11] PALTI Y, NICHOLS K M, WALLER K I, 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, 2001,194(3):283-289.
- [12] SAEIJ J P J, STET R J M, VRIES B J D, et al. Molecular and functional characterization of carp *TNF*: a link between *TNF* polymorphism and trypanotolerance [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2003, 27(1):29-41.
- [13] SHEN Y, FU G H, LIU F, et al. Characterization of the duodenase-1 gene and its associations with resistance to *Streptococcus agalactiae* in hybrid tilapia (*Oreochromis spp.*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2015,45(2):717-724.
- [14] SHEN Y, ZHANG J, XU X, et al. A new haplotype variability in complement *C6* is marginally associated with resistance to *Aeromonas hydrophila* in grass carp [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013,34(5):1360-1365.
- [15] SOMMER S. The importance of immune gene variability (*MHC*) in evolutionary ecology and conservation [J]. Frontiers in Zoology, 2005, 2(1):16.
- [16] XU T J, CHEN S L, ZHANG Y X. *MHC class II α* gene polymorphism and its association with resistance/susceptibility to *Vibrio anguillarum* in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2010, 34(10):1042-1050.
- [17] YU H, HE Y, WANG X, et al. Polymorphism in a serine protease inhibitor gene and its association with disease resistance in the eastern oyster (*Crassostrea virginica* Gmelin) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011,30(3):757-762.
- [18] DONG L S, HAN Z F, FANG M, et al. Genome-wide association study identifies loci for body shape in the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [M]. Aquaculture and Fisheries, 2019.
- [19] GAO Y X, DONG L S, XU S B, et al. Genome-wide association study using single marker analysis and Bayesian methods for the gonadosomatic index in the large yellow croaker [J]. Aquaculture, 2018,486:26-30.
- [20] NI J, YOU F, XU J, et al. Single nucleotide polymorphisms in intron 1 and intron 2 of *Larimichthys crocea* growth hormone gene are correlated with growth traits. [J]. Chinese Journal of Oceanic and Limnology, 2012, 30(2):279-285.
- [21] YANG B, XUE L Y, XIU-LI Y E, et al. Genetic polymorphism

- analysis of exon II in MSTN gene from large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* [J]. Marine Science Bulletin, 2010, 29 (5): 554-559.
- [22] 陈小明, 李佳凯, 王志勇, 等. 基于简化基因组测序的大黄鱼耐高温性状全基因组关联分析[J]. 水生生物学报, 2017, 41 (4): 735-740.
CHEN X M, LI J K, WANG Z Y, et al. Genome-wide association analysis of high temperature traits in large yellow croaker based on simplified genome sequencing [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2017, 41 (4): 735-740.
- [23] LI C, YAO C L. Molecular and expression characterizations of *interleukin-8* gene in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34: 799-809.
- [24] 韦芬. 细菌河鲀毒素合成的前体及相关基因的筛选[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.
WEI F. Screening TTX biosynthesis precursor and related genes in bacteria [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University
- [25] 张娜, 韦芬, 鲍宝龙. 星点东方鲀及共生细菌河鲀毒素的提取与检测[J]. 上海海洋大学学报, 2017, 26 (6): 801-807.
ZHANG N, WEI F, BAO B L. Extraction and detection of tetrodotoxin in *Takifugu niphobles* and its symbiotic bacteria [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2017, 26 (6): 801-807.
- [26] CUI J, GAO Y, CHU Q, et al. *miRNA-8159* is involved in TLR signaling pathway regulation after pathogen infection by direct targeting *TLRI3* in *miuy croaker* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 66: 531-539.
- [27] BIFFL W L, MOORE E E, MOORE F A, et al. *Interleukin-6* in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation [J]. Annals of Surgery, 1996, 224 (5): 647-664.
- [28] WU J, SHI Y H, ZHANG X H, et al. Molecular characterization of an *IL-1 β* gene from the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and its effect on fish defense against *Vibrio alginolyticus* infection [J]. Zoological Research, 2015, 36 (1): 131-141.
- [29] 雷虹, 张洁, 王瑾瑜, 等. 补体 C1q/肿瘤坏死因子相关蛋白家族研究进展[J]. 生理科学进展, 2015, 1: 43-48.
LEI H, ZHANG J, WANG J Y, et al. Advances in research on complement C1q/tumor necrosis factor-related protein family [J]. Progress in Physiological Science, 2015, 1: 43-48.
- [30] ZHENG Q, YUAN Y, YI W, et al. C1q/TNF-related proteins, a family of novel adipokines, induce vascular relaxation through the adiponectin receptor-1/AMPK/eNOS/nitric oxide signaling pathway [J]. Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology, 2011, 31 (11): 2616-2623.
- [31] YANG G, QIN C, WANG B, et al. Molecular identification and functional analysis of *Ctrp9* in *Epinephelus coioides* [J]. Journal of Molecular Endocrinology, 2017, 58 (4): 179.
- [32] YANG G K, SONG Q Q, SUN C Y, et al. *Ctrp9* and adiponectin receptors in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Molecular cloning, tissue distribution and effects on reproductive genes [J]. General and Comparative Endocrinology, 2018, 265: 160-173.
- [33] 梁丽丽, 蔡梦云, 周萌媛, 等. *CTRP9* 基因多态性与冠心病的相关性[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37 (1): 67-70.
LIANG L L, CAI M Y, ZHOU M Y, et al. Correlation between *CTRP9* gene polymorphism and coronary heart disease [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2017, 37 (1): 67-70.
- [34] HAO G J, LIN F, MU C K, et al. SNP E4-205 C/T in *C-type lectin* of *Portunus trituberculatus* is association with susceptibility/resistance to *Vibrio alginolyticus* challenge [J]. Aquaculture, 2015, 442: 125-131.
- [35] GUO L L, ZHAO X L, ZHANG Y L, et al. Evidences of SNPs in the variable region of hemocyanin Ig-like domain in shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35: 1532-1538.

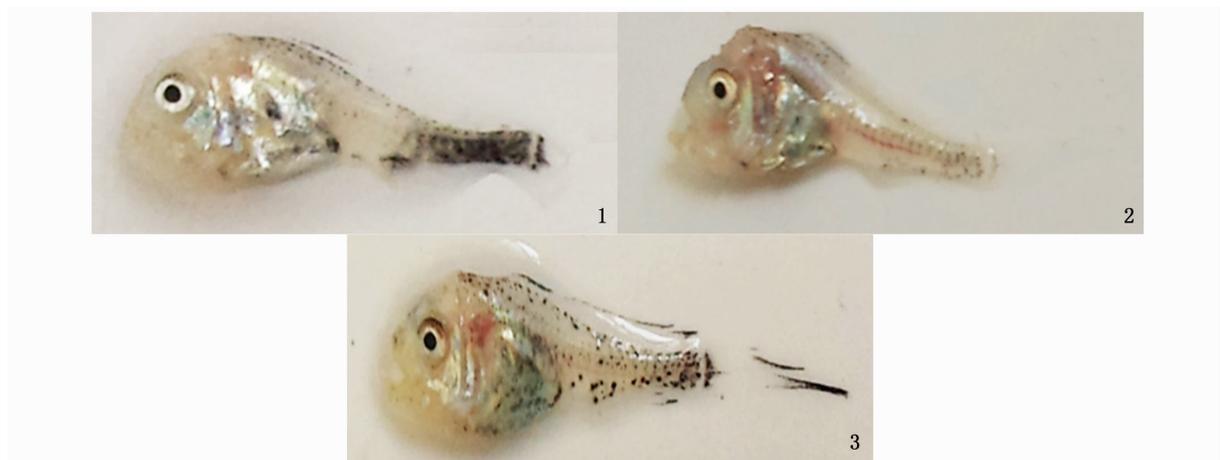
Analysis of SNP loci in immune-related genes of two species of *Vibrio* infecting large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)

SUN Mingjie¹, ZHANG Na¹, XU Shanliang², BAO Baolong¹, GONG Xiaoling¹

(1. The Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, Zhejiang, China)

Abstract: In order to investigate the relationship between SNP and *Vibrio* resistance in immune-related genes of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*), *Vibrio anguillarum* and *Vibrio parahaemolyticus* were used to artificially infect large yellow croaker. High-throughput sequencing, screening and analysis of disease-resistant groups before and after infection: (1) 17 non-synonymous mutation sites of amino acid were screened from *V. anguillarum* resistance group. A total of 28 SNPs were screened from the *V. parahaemolyticus* resistance group. (2) The first-generation sequencing confirmed that the SNP loci was located on the 91196th of chromosome NW_011323507. 1 that interleukin-6 receptor gene (*IL-6R*) was from G changed to C, the proline was mutated to leucine, and the genotype CC frequencies of this site in the *V. anguillarum* resistance and the control groups were 12.5% and 0, which showed significant difference ($P < 0.05$). (3) And the 35665 base mutation (A-G) of the complement C1q/TNF-related protein 9 (*CTRP9*) gene on chromosome NW_011323975. 1 showed a significant difference in the *V. parahaemolyticus* susceptibility/resistance groups ($P < 0.01$), the genotype GG frequencies were 37.5% and 0. The results showed that *IL-6R*-91196-G/C site mutation was associated with *V. anguillarum* resistance group, and *CTRP9*-35665-A/G site mutation was associated with large yellow croaker against *V. parahaemolyticus*. It provides theoretical support for the selection and breeding of large yellow croaker against *Vibrio* population.

Key words: *Vibrio anguillarum*; *Vibrio parahaemolyticus*; *Larimichthys crocea*; transcriptome; immune gene; SNP



1. 表示对照组样本; 2. 表示鳃弧菌感染患病样本; 3. 表示副溶血弧菌感染患病样本

1. represents the control sample; 2. represents the diseased sample of *V. anguillarum* infection; 3. represents the disease sample of *V. parahaemolyticus* infection

图版 弧菌感染大黄鱼后的症状

Plate Symptoms of large yellow croaker infected by *Vibrio*