

## 鲤鱼 6 个群体间 MHC II B 基因第 3 外显子的多态性分析

闵霞<sup>1,2</sup>, 贾智英<sup>1</sup>, 李池陶<sup>1</sup>, 李飞<sup>1,2</sup>, 石连玉<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 哈尔滨 150070; 2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

**摘要:** 根据已克隆的鲤鱼 MHC II B 基因序列, 设计 1 对特异性引物, 采用 PCR-SSCP 方法对 6 个鲤鱼群体 MHC II B 基因第 3 外显子 108 bp 扩增片段进行多态性分析, 结果共获得 7 种基因型 (A-G), 其中基因型为 B 型的个体数占有所有群体总个体数的 47.45%, 且分布于所有群体, 其它 6 种基因型出现频率范围为 1.1%~17.15%。回收不同基因型的片段并测序, 经比对共发现 4 个碱基多态位点和 3 个氨基酸多态位点。易捕鲤和大头鲤两群体中各发现 4 个突变位点 (占 3.7%); 松荷鲤、松浦鲤和德国镜鲤群体各发现 3 个突变位点 (占 2.7%); 松浦镜鲤群体仅发现 2 个突变位点 (占 1.8%)。用 Popgene 软件计算每个群体不同位点的杂合度和多态信息含量 (PIC), 6 个鲤鱼群体的观测杂合度 ( $H_o$ ) 最大值为 0.746 4, 最小值为 0.103 7; 多态信息含量为 0.062 3~0.360 9。该研究将为今后深入研究鲤鱼 MHC 基因多态性及与鲤鱼抗病新品种的选育提供理论依据。

**关键词:** MHC; 鲤鱼; 多态性; 多态核苷酸位点; 连锁不平衡

中图分类号: S965.116

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2012)02-0195-06

### Polymorphisms of exon 3 of MHC class II B gene in six populations of common carp (*Cyprinus carpio*)

MIN Xia<sup>1,2</sup>, JIA Zhi-ying<sup>1</sup>, LI Chi-tao<sup>1</sup>, LI Fei<sup>1,2</sup>, SHI Lian-yu<sup>1</sup>

(1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070;

2. College of Fishery and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract:** In this study, a pair of specific primers, designed according to the cloned common carp MHC II B gene sequences, was used to analyze the uniform fragment of 108 bp of exon 3 of MHC II B gene by PCR-SSCP (polymerase-chain-reaction-single-strand-conformation polymorphism) in six common carp populations. The result showed that seven genotypes (A-G) were acquired in the populations. The most common genotype was of genotype B that presented in all populations and accounted for 47.45%. The ratio of other genotypes varied from 1.1% to 17.15%. Four variable nucleotide positions and three variable amino acid positions were detected after fragments of different genotypes were recycled and sequenced. The populations of Yibu common carp and Big-head common carp had four (3.7%) variable nucleotide positions. Three (2.7%) variable nucleotide positions were found in the populations of Songhe common carp, Songpu common carp and German mirror common carp. The population of Songpu mirror common carp had only two (1.8%) variable nucleotide positions. Observed heterozygosity ( $H_o$ ), expected heterozygosity ( $H_e$ ) and polymorphism information contents (PIC) were determined. The observed heterozygosity value ( $H_o$ ) was from 0.103 7 to 0.746 4; the expected heterozygosity value ( $H_e$ ) was from 0.065 2 to 0.482 5 and the PIC value was from 0.062 3 to 0.360 9, respectively. The data may be of great help in the study of MHC gene polymorphisms and the selected breeding of disease resistance in common carp.

**Key words:** MHC; common carp; polymorphic; variable nucleotide site; linkage disequilibrium

收稿日期: 2011-01-18

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-46-02), 黑龙江省自然科学基金 (C201044), 公益性行业 (农业) 科研专项 (200903045), 黑龙江水产研究所基本科研业务费专项资金 (201005) 和国家高技术研究发展计划 (2011AA100402) 共同资助。

作者简介: 闵霞, 女, 硕士研究生。E-mail: minxia\_999@yahoo.com.cn

\* 通讯作者: 石连玉, 男, 研究员。E-mail: sly2552@yahoo.com.cn

主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 由内源性 (MHC I 类分子) 和外源性 (MHC II 类分子) 肽组成, 通过与 T 细胞的相互作用, 诱导并调节机体的免疫应答, 激发机体特异性免疫反应, 是脊椎动物直接与免疫应答相关的一个高度多态的基因群<sup>[1]</sup>。鱼类 MHC 基因的结构和功能与其它脊椎动物如人类<sup>[2]</sup>、小鼠<sup>[3]</sup>、牛<sup>[4]</sup>、羊<sup>[5]</sup>等相似, 而且同样存在丰富的多态性<sup>[6-9]</sup>。MHC 基因的高度多态性与物种遗传进化和抗病性、易感性密切相关, 这已在硬骨鱼类中得到了证实<sup>[10-16]</sup>。目前, 鲤鱼中 MHC 基因已经得到克隆<sup>[17-18]</sup>, 而关于鲤鱼 MHC 基因的研究相对较少。张玉喜等<sup>[19]</sup>近年来开展了牙鲈 MHC II B 基因多态性及其与鱼体抗病力关系的研究, 研究结果发现了 13 个不同的 MHC Class II B 等位基因, 32 个核苷酸多态位点及 13 个氨基酸多态位点。贾智英<sup>[20]</sup>等报道了德国镜鲤 MHC Class I 和 Class II B 部分片段的多态性, 结果

显示研究的样本群体外显子序列中存在 5 到 6 个核苷酸多态位点及 2 到 6 个氨基酸多态位点。鲤鱼是我国重要养殖品种, 它具有丰富的地理群体和养殖品种, 作者利用 PCR-SSCP 和直接测序的方法对松浦镜鲤、松荷鲤、松浦鲤、德国镜鲤、易捕鲤和大头鲤 6 个群体 MHC class II B 基因第 3 外显子部分序列遗传多态性进行研究, 以期研究鲤鱼 MHC 基因多态性及鲤鱼抗病新品种的选育提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

松浦镜鲤、松荷鲤、松浦鲤、易捕鲤和大头鲤采自黑龙江水产研究所松浦实验站, 德国镜鲤采自辽宁省丹东市英波渔场。剪取鳍条迅速放于 75% 酒精中, 带回实验室 - 20℃ 保存待用。

表 1 样本信息

Table 1 Information of samples

群体 Population	松浦镜鲤 Songpu mirror common carp	松荷鲤 Songhe common carp	松浦鲤 Songpu common carp	易捕鲤 Yibu common carp	德国镜鲤 German mirror common carp	大头鲤 Big-head common carp
时间 Date	2009-05	2009-05	2009-05	2010-06	2008-10	2009-05
数量 Number	47	59	45	48	30	45

### 1.2 DNA 提取、引物设计及 PCR 反应条件

DNA 提取方法采用传统酚/氯仿抽提的方法, 具体操作方法参照文献<sup>[21]</sup>。

根据参考文献<sup>[18]</sup>已报道的鲤鱼 MHC Class II 的 *Cyca-DAB\*01* 序列, 利用 oligo6.0 软件, 结合该基因序列的特异性设计并筛选出引物 *HLJ-II3*, 上游引物: AG TGC[T/a]TA[C/t]CGCTTCTACC, 下游引物: CCAGTC[T/c]CCATTAG[G/c]CATC, 扩增片段长度为 108 bp。由上海生工生物工程技术有限公司合成。

PCR 反应均在德国 Biometra 公司的 TGRADIENT 型 PCR 仪上完成。反应体系: 10×PCR buffer 1.5 μL, 10 mmol·L<sup>-1</sup> dNTP 0.3 μL, 10 μmol·L<sup>-1</sup> 的引物, 上下游各 0.5 μL, 5 U·μL<sup>-1</sup> 的 *Taq* DNA 聚合酶 0.075 μL, 50 ng·μL<sup>-1</sup> DNA 模板 1 μL, 超纯水补足总体积 15 μL。PCR 反应程序: 94℃ 3 min, (94℃ 30 s, 53.2℃ 30 s, 72℃ 30 s) 26 个循环, 最后 72℃ 延伸 5 min。

### 1.3 PCR-SSCP 反应条件

取 PCR 扩增产物 5 μL 加入等体积的载样缓冲液 (98% 去离子甲酰胺, 10 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 2.5 g·L<sup>-1</sup>

溴酚蓝, 2.5 g·L<sup>-1</sup> 二甲苯氰) 混匀, 98℃ 变性 10 min, 立即取出冰浴 10 min。在浓度为 10%, 交联度为 29:1 的非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳。确保外界温度 6~8℃ 条件下, 120 V 电泳 12 h 后银染显色并扫描拍照。

### 1.4 目的片段回收及测序

从非变性聚丙烯酰胺凝胶上回收、二次扩增目的片段, PCR 产物经 2% 琼脂糖胶检测后由上海生工生物工程技术有限公司进行正反测序。

### 1.5 数据统计分析

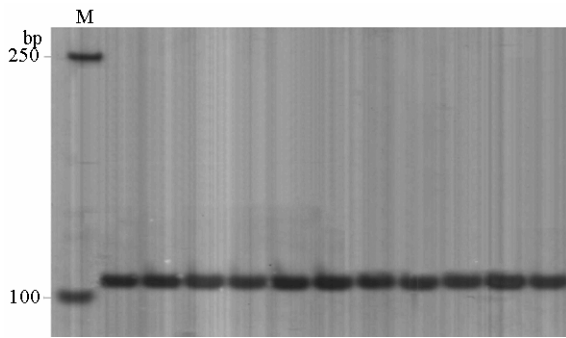
利用 Mutation Surveyor (SoftGenetics, State College, PA) 软件分析测序后得到的碱基序列。Chromas2.33 软件编辑序列, 在 MEGE4 中进行比对。用 Popgene32 分析、计算碱基多态位点的观测杂合度 ( $H_o$ )、期望杂合度 ( $H_e$ ) 和多态信息含量 ( $PI_C$ ) 和连锁不平衡参数。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 产物扩增结果

引物 *HLJ-II3* 扩增的 PCR 产物大小为 108 bp, 结果如图 1 所示。从图片上可以看出扩增产物片段

大小与设计的产物片段大小相符, 而且目的条带清晰, 无杂带, 符合 SSCP 分析的要求。



M: DNA marker DL2000

图 1 引物 *HLJ-II3* PCR 产物电泳图谱

Figure 1 Electrophoresis of PCR product amplification of *HLJ-II3*

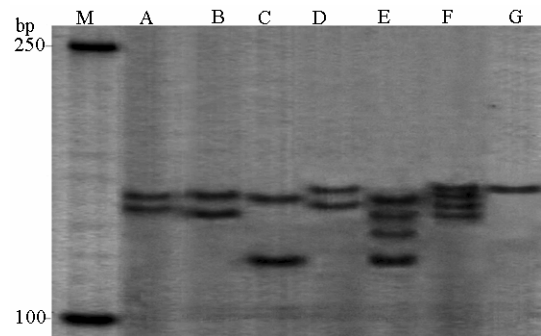
## 2.2 SSCP 电泳结果

对引物 *HLJ-II3* 在鲤鱼各个群体中扩增的 PCR 产物进行 SSCP 分析, 结果在 274 个个体中共检测到 7 种基因型 (A-G, 见图 2)。基因型为 B 型的个体数占有所有群体总个体数的 47.45%, 且分布于所有群体; 除了易捕鲤群体, 基因型 A 分布于其它 5 个群体, 占有所有群体总个体数的 14.23%; 基因型 C 分布于松浦镜鲤、松荷鲤、易捕鲤和德国镜鲤群体中, 占有所有群体总个体数的 12.41%; 基因型 D 分布于易捕鲤、德国镜鲤、大头鲤群体中, 占有所有群体总个体数的 17.15%; 基因型为 E、F、G 型的个体在整个群体中占的比例较小, 分别为 4.01%、3.65% 和 1.09%。7 种基因型在每个群体中的分布见表 2。

## 2.3 引物 *HLJ-II3* 经 PCR-SSCP 不同基因型片段的测序结果及多态性

经过 SSCP 分析, *HLJ-II3* 在 6 个鲤鱼群体中呈现不同程度的多态性, 回收 6 个群体中所有不同基因型的片段, 共计回收 78 个目的条带, 测序。结果 *HLJ-II3* 扩增的片段中存在 4 个变异位点, 分别位于外显子 3 第 93 bp (G→T)、第 104 bp (A→G)、第

136 bp (C→A)、第 147 bp (T→G)。因碱基变异, 由第 93 bp、第 136 bp 和第 147 bp 位点碱基编码的氨基酸也发生了变化。这 3 个位点很有可能与鲤鱼免疫抗病机能有关。在易捕鲤、大头鲤群体中发现的突变位点最多 (第 93 bp、第 104 bp、第 136 bp、第 147 bp 处), 多态位点百分率为 3.7%; 松荷鲤、松浦鲤和德国镜鲤群体发现 3 个突变位点 (第 104 bp、第 136 bp、第 147 bp 处), 多态位点百分率为 2.7%; 松浦镜鲤群体仅发现 2 个突变位点 (第 104 bp、第 136 bp), 多态位点百分率为 1.8%。



M: DNA marker DL2000

图 2 引物 *HLJ-II3* 在 6 个鲤鱼群体扩增的 PCR 产物 SSCP 带型图 (A-G)

Figure 2 The SSCP band patterns of the products of *HLJ-II3* in six populations of common carp population and named A-G

从表 3 可知, 6 个群体在每个位点的  $H_o$ 、 $H_e$  和  $PIC$  值。松浦镜鲤和德国镜鲤群体的平均观测杂合度分别为 0.563 8、0.377 8,  $PIC$  值都在 0.25~0.5 之间, 说明这 2 个群体在这几个位点属于中度多态水平。松荷鲤群体平均观测杂合度为 0.248 6, 位点多态性较低。松浦鲤群体的平均观测杂合度最低, 仅有 0.103 7, 3 个位点的多态性也较低。易捕鲤群体的平均观测杂合度为 0.746 4, 第 93 bp、第 104 bp 和第 147 bp 位点都表现为中等多态。大头鲤群体的平均观测杂合度为 0.233 3, 仅有第 104 bp 位点属于中度多态。

表 2 6 个鲤鱼群体 MHC II B 基因第 3 外显子的基因型频率

Table 2 Frequency of MHC II B exon 3 genotypes in six populations of common carp

群体 Population	基因型 Genotype						
	A	B	C	D	E	F	G
松浦镜鲤 Songpu mirror common carp	0.34	0.21	0.45				
松荷鲤 Songhe common carp	0.10	0.63	0.08		0.14	0.05	
松浦鲤 Songpu common carp	0.09	0.84			0.07		
易捕鲤 Yibu common carp		0.25	0.06	0.63		0.06	
德国镜鲤 German mirror common carp	0.20	0.38	0.11	0.24		0.07	
大头鲤 Big-head common carp	0.13	0.53		0.20		0.03	0.10

2.4 Hardy-Weinberg 平衡与连锁不平衡分析

6 个群体 Hardy-Weinberg 平衡情况请见表 3, 松浦鲤和大头鲤在所有位点处都表现为平衡状态。松浦镜鲤在第 104 bp、松荷鲤和德国镜鲤在第 136 bp 均不同程度的偏离 Hardy-Weinberg 平衡。易捕鲤群体在 4 个位点均严重偏离 Hardy-Weinberg 平衡。

表 4 显示了 6 个群体的变异位点中有关联关系的位点及两两之间连锁不平衡参数 *P* 值。结果表明松浦镜鲤有 1 对连锁不平衡位点, 松荷鲤、松浦鲤、易捕鲤、德国镜鲤和大头鲤分别有 3 对连锁不平衡位点。

表 3 6 个鲤鱼群体核苷酸变异位点的遗传多态性指数  
Table 3 Genetic diversity indices of variable nucleotide positions in six populations of common carp

群体 Population	碱基位置/bp Position of base	变异模式 Variation pattern	观测杂合度 <i>H<sub>o</sub></i>	期望杂合度 <i>H<sub>e</sub></i>	多态信息 含量 <i>PIC</i>	Hardy-Weinberg 平衡 卡方检验 <i>P</i> 值
松浦镜鲤 Songpu mirror common carp	104	A/G	0.787 2	0.482 5	0.356 6	0.000 01**
	136	C/A	0.340 4	0.477 7	0.360 9	0.046 2*
松荷鲤 Songhe common carp	104	A/G	0.372 9	0.306 0	0.257 3	0.086 5
	136	C/A	0.101 7	0.236 4	0.206 9	0.000 01**
	147	T/G	0.271 2	0.236 4	0.207 0	0.245 1
松浦鲤 Songpu common carp	104	A/G	0.155 6	0.145 1	0.133 2	0.602 3
	136	C/A	0.088 9	0.085 9	0.081 3	0.788 1
	147	T/G	0.066 7	0.065 2	0.062 3	0.851 0
易捕鲤 Yibu common carp	93	G/T	0.617 0	0.431 3	0.335 6	0.002 7**
	104	A/G	0.744 7	0.472 4	0.358 2	0.000 06**
	136	C/A	0.879 2	0.120 8	0.112 3	0.000 01**
	147	T/G	0.744 7	0.472 4	0.358 2	0.000 06**
德国镜鲤 German mirror common carp	104	A/G	0.511 1	0.469 7	0.356 6	0.548 7
	136	C/A	0.200 0	0.336 8	0.277 6	0.005 3**
	147	T/G	0.422 2	0.336 8	0.277 6	0.081 9
大头鲤 Big-head common carp	93	G/T	0.200 0	0.183 1	0.163 8	0.581 4
	104	A/G	0.366 7	0.304 5	0.254 6	0.244 2
	136	C/A	0.133 3	0.126 6	0.116 8	0.736 8
	147	T/G	0.233 3	0.209 6	0.184 9	0.506 2

\*: *P*<0.05, \*\*: *P*<0.01.

表 4 6 个群体的不同位点两两间连锁不平衡检测  
Table 4 Linkage disequilibrium test among any two loci in six populations of common carp

群体 Population	位点/bp Position	<i>P</i> value	群体 Population	位点/bp Position	<i>P</i> value
松浦镜鲤 Songpu mirror common carp	136-104	0.004 7**	易捕鲤 Yibu common carp	147-104	0.000 6**
				147-93	0.010 8*
				104-93	0.010 8*
松荷鲤 Songhe common carp	136-147	0.004 8**	德国镜鲤 German mirror common carp	136-104	0.010 9*
	136-104	0.025 8*		136-147	0.015 3*
	147-104	0.002 4**		147-104	0.018 8*
松浦鲤 Songpu common carp	136-147	0.004 1**	大头鲤 Big-head common carp	136-52	0.031 7*
	136-104	0.014 6*		147-104	0.047 1*
	147-104	0.036 7*		147-93	0.013 1*

\*: *P*<0.05; \*\*: *P*<0.01.

3 讨论

研究鱼类 MHC 基因的多态性有许多种方法,

如: 直接测序法、变性梯度凝胶电泳(DGGE)、限制性片段长度多态性(RFLP)、单链构象多态性(SSCP)、变性高效液相色谱法(DHPLC)等。Hoshim

等<sup>[22]</sup>建立了聚合酶链式反应-单链构象多态性技术(PCR-SSCP), 因操作简单、灵敏性高、经济适用等优点使得该项技术被广泛应用于检测核苷酸多态性(SNP)<sup>[23]</sup>。PCR-SSCP 技术能够检测 DNA 片段上不同位点的多态性或单个碱基的突变、缺失、插入或置换等细微变化, 在基因序列未知条件下, 也同样适用。其不足之处就是目的片段大小会影响 PCR-SSCP 技术的灵敏性, Hayashi<sup>[24]</sup>经实验证明小于 300 bp 的目的片段, 单个碱基突变检出率能达到 99%。本试验研究的目的片段为 108 bp, 符合 PCR-SSCP 技术分析条件。此外 PCR-SSCP 分析结果受多种因素影响如: 电泳温度、凝胶浓度、交联剂亚甲基双丙烯酰胺的浓度等。本试验经过多次预实验, 最后证实在浓度为 10%, 交联度为 29:1 的非变性聚丙烯酰胺凝胶, 120V 电压电泳 12 h, 外界温度为 6~8℃条件下, 能获得较好的结果。

MHC 基因的多态性可以反映基因水平的多态性, 其广泛存在于脊椎动物体内, 而且是直接参与机体免疫应答的一个高度多态基因家族。同时 MHC 基因的多态性与物种在进化过程中受到的病原(细菌、病毒、原生动物及其它寄生虫和噬菌体)平衡选择有关, 对其进行深入研究将有利于寻找与鱼类抗病性/易感性相关的基因。徐建勇<sup>[25]</sup>等研究野生抗病牙鲆 MHC II B 基因一段长为 263 bp 的序列中发现 60 个多态位点, 多态位点百分率达 22.81%。HuiLiu<sup>[26]</sup>等对扬子鳄种群 MHC II B 基因外显子 3 的多态性进行了研究, 结果显示扩增片段的多态位点百分率达 32%。本试验以松浦镜鲤、松荷鲤、松浦鲤、德国镜鲤、易捕鲤和大头鲤 6 个鲤鱼群体为研究对象, 设计引物 HLJ-II3 扩增了 MHC II B 基因外显子 3 的一部分序列, 共发现 4 个突变位点, 易捕鲤和大头鲤群体的突变位点最多(第 93 bp、第 104 bp、第 136 bp、第 147 bp 处), 多态位点百分率为 3.7%。松荷鲤、松浦鲤和德国镜鲤群体发现 3 个突变位点(第 104 bp、第 136 bp、第 147 bp 处), 多态位点百分率为 2.7%。松浦镜鲤群体仅发现 2 个突变位点(第 104 bp、第 136 bp 处), 多态位点百分率为 1.8%。该结果与贾智英<sup>[20]</sup>等报道的德国镜鲤 MHC II B 基因多态位点百分率 2.89%的结论相近, 远低于野生抗病牙鲆和扬子鳄 MHC II B 基因的多态位点百分率。这可能与物种自身的起源和免疫机制有关。作者在研究鲤鱼 MHC II B 基因时发现 4 个核苷酸多态位点和 3 个氨基酸多态位点, 这对进一步研究鲤鱼遗传进化和免疫抗病育种等具有非常重要的意义。

连锁不平衡(linkage disequilibrium, LD)是指由于基因座的连锁关系或其它原因(选择、突变、群体混合与迁移等), 群体中的配子和基因型频率偏离随机组合的期望值。目前连锁不平衡分析是研究物种自然进化的重要方法之一。例如, 张林<sup>[27]</sup>等研究小尾寒羊微卫星座位 LSCV043 与 *FecB* 基因的连锁分析, 结果表明 LSCV043 微卫星座位 98 bp 等位基因与小尾寒羊 *FecB* 基因 B 等位基因之间存在一定的连锁不平衡关系, 是与小尾寒羊多羔主效基因紧密连锁的一个遗传标记。Palais<sup>[28]</sup>等对黄色和白色胚乳玉米品种的 Y1 位点的 DNA 序列作 LD 分析, 结果发现黄色等位基因比白色等位基因 y1 的多样性低 19 倍, 而且多态位点之间存在较强的连锁不平衡关系。通过连锁不平衡分析可知本研究中的 6 个群体都存在位点间连锁不平衡现象, 这可能是由于人工定向选育和自然选择共同作用的结果。松浦镜鲤只有 1 对位点存在不平衡的情况, 而其它群体存在 3 对位点不平衡情况, 松浦镜鲤、松荷鲤、松浦鲤、德国镜鲤和易捕鲤属于人工选育群体, 故人工选择造成的影响可能较大, 而大头鲤作为自然野生群体, 可能与自然选择的作用有关。该研究群体位点间的连锁不平衡结果将从分子水平上为寻找鲤鱼抗病和易感性基因及研究鲤鱼群体自然进化提供理论依据。

总之, 本试验通过分析松浦镜鲤、松荷鲤、松浦鲤、德国镜鲤、易捕鲤和大头鲤这 6 个群体 MHC II B 基因的多态性所获得的一个组织相容性复合体标记、核苷酸多态位点、氨基酸多态位点及单核苷酸多态位点信息对研究鱼类抗病、易感性、群体结构和演化是非常有意义的, 并期望为筛选鲤鱼抗病标记及选育鲤鱼抗病品种提供理论支持。

## 参考文献:

- [1] 徐志本, 余为一, 仲大莲, 等. 鸡 MHC II $\beta$  链基因的克隆和表达及其抗体制备[J]. 安徽农业大学学报, 2006, 33(11): 51-55.
- [2] 周光炎. 免疫学原理[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2000: 63-121.
- [3] Medina E, North R J. Resistance ranking of some common inbred mouse strains to *Mycobacterium tuberculosis* and relationship to major histocompatibility complex haplotype and Nrampl genotype [J]. Immunology, 1998, 93: 270-274.
- [4] 叶素成, 储明星, 陈国宏. 奶牛 MHC 基因多态性及其与经济性状关系的研究进展[J]. 遗传, 2003, 25(1): 89-92.
- [5] 李建平, 于燕, 刑凤, 等. 3 个绵羊种群 MHC 微卫星标记的遗传多样性[J]. 中国兽医学报, 2008, 28(1): 94-97.

- [6] Klein D, Ono H, O'huigin C, et al. Extensive MHC variability in cichlid fishes on Lake Malwi [J]. *Nature*, 1993, 363: 330-334.
- [7] Grimholt U, Olaker I, Lindstrom D V, et al. A study of variability in the MHC class II  $\beta 1$  and I  $\alpha 2$  domain exons of Atlantic salmon *Salmo salar*[J]. *Anim Genet*, 1994, 25: 147-153.
- [8] Miller K M, Withler R E. Sequence analysis of a polymorphic Mhc class II gene in Pacific salmon [J]. *Immunogenetics*, 1996, 43: 337-351.
- [9] Sato A, Figueroa F, O'huign C, et al. Identification of a major histocompatibility complex genes in the guppy *Poecilia reticulata* [J]. *Immunogenetics*, 1995, 43: 48-49.
- [10] Morrison R N, Koppang E O, Hordvik I, et al. MHC class II B cells in the gills of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) affected by amoebic gill disease [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2006, 109: 297-303.
- [11] Wynne J W, Cook M T, Nowak B F, et al. Major histocompatibility polymorphism associated with resistance towards amoebic gill disease in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 22: 707-717.
- [12] Midtlyng P J, Storset A, Michel C, et al. Breeding for disease resistance in fish[J]. *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 2002, 22: 66-172.
- [13] Fjalestad K T, Gjerdem T, Gjerde B. Genetic improvement of disease resistance in fish: an overview[J]. *Aquaculture*, 1993, 111: 65-74.
- [14] Johnson N A, Vallejo R L, Silverstein J T, et al. Suggestive association of major histocompatibility resistance to bacterial cold water disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Mar Biotechnol*, 2008, 10: 429-437.
- [15] Rakus K, Wiegertjes G, Jurecka P, et al. Major histocompatibility (MH) class II B gene polymorphism influences disease resistance of common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Aquaculture*, 2009, 288: 44-50.
- [16] Dionne M, Miller KM, Dodson JJ, et al. Clinal variation in MHC diversity with temperature: evidence for the role of host-pathogen interaction on local adaptation in Atlantic salmon[J]. *Evolution*, 2007, 61(9): 2154-2164.
- [17] Van Erp S H M, Dixon B, Figueroa F. Identification and characterization of a new major histocompatibility complex class I gene in carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Immunogenetics*, 1996A, 44: 49-61.
- [18] Van Erp S H M, Egberts E, Stet R J M. Characterization of class II A and B genes in a gynogenetic carp clone[J]. *Immunogenetics*, 1996B, 44: 192-202.
- [19] 张玉喜, 陈松林. 牙鲈 MHC class II B 基因多态性及其与鱼体抗病力关系的分析[J]. *水产学报*, 2006, 30(5): 633-639.
- [20] Jia Z H, Chi X F, Li C T, et al. Development of MHC class I and II B primers in common carp and its molecular characterization[J]. *Biochem Genet*, 2010, 48:690-695.
- [21] 梁利群, 孙效文, 王鹏, 等. 利用鳍条提取样品总 DNA 初探[J]. *生物技术*, 1994, 4(1): 45-46.
- [22] Hoshino S, Kimara A S, et al. Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism analysis of polymorphism in DPAI and DPBI gene: a single economical and rapid method for histocompatibility[J]. *Hum Immunol*, 1992, 33: 98.
- [23] Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, et al. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction[J]. *Genomics*, 1989, 5:874-879.
- [24] Hayashi K. PCR-SSCP: A method for detection of mutations[J]. *Getet Anal Teeh Appl*, 1992, 9(3): 73-79.
- [25] 徐建勇, 陈松林, 毕金贞. 野生抗病牙鲈 MHC HB 内含子 1 和外显子 2 序列多态性[J]. *中国水产科学*, 2008, 15(4): 593-598.
- [26] Liu H, Wu X B, Yan P, et al. Polymorphism of exon 3 of MHC class II B gene in Chinese alligator (*Alligator sinensis*) [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2007, 349(10): 918-929.
- [27] 张林, 李春苗, 储明星, 等. 小尾寒羊微卫星座位 *LSCV043* 与 *FecB* 基因的连锁分析[J]. *农业生物技术学报*, 2009, 17(4): 621-628.
- [28] Palaisa K A, MorganteM, Williams M, et al. Contrasting effects of selection on sequence diversity and linkage disequilibrium at two phytoene synthase loci [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(8): 1795-1806.