

doi: 10.7541/2016.8

草鱼*Noxa*基因克隆及其应答GCRV入侵的表达响应

卢肖男^{1,2} 黄容¹ 廖兰杰¹ 朱作言¹ 汪亚平¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 研究通过获得草鱼*Noxa*基因(*Cinoxa*)全长cDNA, 进行序列分析和进化树构建, 使用定量PCR (qPCR)的方法研究其在GCRV刺激下的表达模式。研究发现, 草鱼*Noxa*基因的蛋白序列与斑马鱼*Noxa*基因具有高度相似性。通过分析草鱼和斑马鱼的*Noxa*基因的蛋白三维结构(3D)模型, 研究发现两者具有高度一致的蛋白三维结构模式, 该模型与高等哺乳类中的Bcl-2家族蛋白中C端结构域同源。对*Cinoxa*在GCRV刺激下的表达模式的研究表明, *Cinoxa*在GCRV感染后中肾、脾脏和头肾中表达发生显著性变化, 攻毒后24h和120h出现显著上调表达。研究表明草鱼*Noxa*为斑马鱼*Noxa*的同源基因, 并且参与了草鱼对GCRV入侵的应答反应, 为深入研究鱼类*Noxa*应答病毒入侵的功能和转录调控机制奠定了基础。

关键词: 草鱼; *Cinoxa*; GCRV刺激; 基因表达; 应答反应

中图分类号: S942.9

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2016)01-0058-05

先天性免疫是抵御病毒入侵的第一道防线, 由于鱼类的获得性免疫系统远不如高等脊椎动物完善, 因此, 先天性免疫对于鱼类抵抗病毒入侵起到至关重要的作用。一旦病毒入侵细胞, 病毒的各个组成部分会通过不同的信号传导途径激活一系列的细胞免疫反应, 如干扰素(Interferon, IFN)途径和炎症反应途径等。当IFN途径激活后细胞内会产生并分泌I型IFN, 分泌的I型IFN会通过自分泌和旁分泌的方式作用于自身和周围细胞, 通过JAK-STAT信号通路激活一系列抗病毒蛋白的表达, 这些蛋白通过直接阻碍病毒复制与组装从而起到抗病毒的作用^[1]。细胞除了通过IFN通路抑制病毒的复制外, 还会通过多条途径诱导细胞凋亡阻止病毒的进一步传播。

细胞凋亡, 又称为细胞程序性死亡, 是细胞在应对内外环境刺激时采取的主动有序的细胞自发性死亡。细胞凋亡不同于细胞死亡, 后者因细胞损伤会引起细胞破碎使细胞内物质释放到胞外继而引发炎症反应, 而细胞凋亡的发生是在复杂的基因调控下有序的进行细胞自我解体, 细胞内物质以出

泡的方式分解不会引发机体炎症反应^[2]。通常细胞凋亡的主要途径分为外源性途径和内源性途径。外源性途径通常又称为死亡受体途径, 这种途径主要是通过细胞外配体与细胞质膜上的死亡配体结合后募集相应接头蛋白形成死亡诱导信号复合体(Death inducing signaling complex, DISC), 随后DISC激活起始因子Caspase-8, Caspase-8活化后依据细胞类型引发不同细胞应答反应, 在某些细胞中活化的Caspase-8直接激活效应分子Caspase-3Caspase-7, 最终引发细胞凋亡^[1]。内源性途径通常又称为线粒体途径, 这种途径是通过调控线粒体膜通透性的改变, 引发线粒体膜腔内促凋亡因子释放从而诱导细胞凋亡。B淋巴细胞瘤-2家族基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)是线粒体凋亡途径的关键调控因子, 目前已发现的Bcl-2家族蛋白有25种, 通过对细胞凋亡促进和抑制效应不同分为促凋亡因子和抗凋亡因子, 其中抗凋亡因子有Bcl-2、Bcl-x、Bcl-XL、Bcl-XS、Bcl-w、BAG; 促凋亡因子有Bcl-10、Bax、Bak、Bid、Bad、Bim、Bik、Blk、Puma、Noxa^[3]。

收稿日期: 2015-02-09; 修订日期: 2015-12-16

基金项目: 国家自然科学基金(31130055, 31123001); 863项目(2011AA100403)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31130055, 31123001); the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (2011 AA100403)]

作者简介: 卢肖男(1988—), 男, 山东济宁人; 硕士研究生; 研究方向为遗传。E-mail: luxiaonan365@163.com

通信作者: 汪亚平, E-mail: wangyp.ihb@gmail.com

草鱼呼肠孤病毒(Grass carp reovirus, GCRV)是水生呼肠孤病毒中的一种, 该病毒具有很强的致病性, 严重影响我国草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)养殖业^[4]。GCRV是一个由11条dsRNA片段和两层衣壳蛋白组成的无囊膜dsRNA病毒。该病毒的粒子呈20面体, 直径65—72 nm^[5]。研究表明, GCRV感染草鱼后会引起肾脏、肝脏等多器官组织病变, 尤其以肾脏组织病变最为严重, 感染后出现组织坏死^[6]。对GCRV感染的细胞学研究发现, GCRV能够引起草鱼肾脏细胞系(CIK)细胞的凋亡^[7]。根据本实验室对GCRV感染草鱼后各组织表达谱数据分析(数据未显示), 推测GCRV引起细胞凋亡很可能是通过内源性凋亡途径引发的。于是本研究集中在Bcl-2家族成员中BH3-only成员*Noxa*基因。目前, 鱼类中*Noxa*只有斑马鱼(*Danio rerio*)序列被克隆, 对斑马鱼*Noxa*的研究主要集中在其胚胎期凋亡调控作用^[8, 9]。此外, 有研究表明斑马鱼*Noxa*在成体斑马鱼肝脏中介导了纳米银粒子诱导的细胞凋亡^[10]。本研究通过RACE-PCR的方法克隆了*Cinoxa*全长cDNA, 并通过荧光定量PCR的方法初步探讨鱼类*Noxa*在病毒诱导细胞凋亡中的作用, 从而有助于进一步对鱼类抗病毒免疫机制的研究。

1 材料与方法

1.1 全长cDNA克隆

根据斑马鱼*Noxa*基因CDS区序列设计PCR引物CDS 01F和CDS 01R(表 1), 以草鱼肾脏cDNA为模板进行PCR扩增, PCR产物经PCR Clean-up Kit

(Axygen)试剂盒纯化回收, 然后将回收产物克隆入pMD18-T(TaKaRa)载体, 转化DH5 α 感受态大肠杆菌, 挑克隆测序, 利用BLAST验证序列正确性。

根据获得CDS区序列设计嵌套引物(表 1), 通过RACE的方法克隆基因5'和3'末端, RACE实验选用SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech)试剂盒。

1.2 序列分析

通过NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)的BLASTN和BLASTX对核酸和蛋白质序列进行相似性分析检索, 利用clustalx软件对多物种蛋白序列进行多重比对, 使用MEGA 6构建分子系统进化树。利用Phyre 2(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/servers/phyre2>)预测蛋白质3级结构, 并用3D Molecule Viewer软件显示图像。

1.3 草鱼与攻毒处理

本实验用草鱼均取自实验室养殖基地, 选取体长10 cm左右的1龄健康草鱼50尾, 室内适应养殖1周, 水温维持恒定28℃, 每天换水1次, 投喂2次。

实验分为攻毒组和对照组, 每组25尾, 攻毒采取草鱼腹腔注射的方法。攻毒组草鱼每尾注射200 μL GCRV病毒液, 对照组注射200 μL PBS。攻毒后每天换水1次, 早晚各投喂两次, 水温保持恒定28℃。分别在攻毒后0、24h、48h、72h、96h和120h的时间点取材, 每次取材随机选取3条草鱼。

1.4 组织RNA提取和反转录

选取草鱼中肾、脾脏、后肠和头肾组织用TRIZOL (Invitrogen)法提取总RNA。反转录前用RQ1 RNase-

表 1 实验所用引物

Tab. 1 Primers used for all experiments

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	引物用途 Primer usage
CDS01F	GAAATGGCGAAGAAAGAGAA	CDS clone
CDS01R	CGTTGGTTTCAGATTCCCTTC	CDS clone
5RACE01R	TTTCCCGTCCGTCTGC	5' RACE
5RACE02R	GAGATCTCCAATTGTGCGCA	5' RACE
5RACE03R	TCGACAAACAGCGGTTTCTC	5' RACE
3RACE01F	GCGAACAGTTGCGCACAATTGGAG	3' RACE
3RACE02F	ATAATCGCGCTCCAGAAAGCGCAGA	3' RACE
βactinF	GGATGATGAAATTGCCGCAGTGG	qPCR internal control
βactinR	ACCGACCATGACGCCCTGATGT	qPCR internal control
RTPCR01F	ACAGCAGTCAGACGCCTTAA	qPCR for CiNoxa
RTPCR01R	GCTTCTGGAGCGCGATT	qPCR for CiNoxa

Free Dnase (Promega)处理, cDNA合成采用GoScript™ Reverse Transcription System(Promega)试剂盒。

1.5 荧光定量PCR

利用Primer Premier 6.0设计qPCR引物(表 1),引物“合成”由武汉擎科科技有限公司“合成”。荧光定量PCR在Bio-rad CFX96荧光定量PCR仪上进行。每个样本设3个重复, 荧光定量PCR试剂采用Bio-rad的iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix, 反应条件为: 95℃预变性2min, 95℃ 15s, 59℃ 15s, 72℃ 45s, 40个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算基因的相对表达量。

2 结果

2.1 草鱼Noxa基因全长cDNA序列特征

通过5'RACE和3'RACE获得了草鱼Noxa基因全长cDNA序列并把其命名为*Cinoxa*。*Cinoxa*的cDNA全长795 bp, 包含一个138 bp的开放阅读框(ORF), 编码45个氨基酸多肽。5'UTR长107 bp, 3'UTR包含550 bp的核苷酸(Genbank号: KT3463 64)。利用BLASTX对*Cinoxa*蛋白序列进行相似性检索分析发现, *Cinoxa*蛋白序列与斑马鱼Noxa蛋白序列具有最高的一致性(Identity)和相似度(Similarity), 分别为78%和89%。

2.2 *Cinoxa*基因蛋白序列分析

将通过对NCBI数据库搜索获得的11个物种Noxa蛋白质序列和本研究克隆获得的*Cinoxa*的蛋白质序列进行多重序列比对, 结果表明所选12个物种的Noxa蛋白质都具有一个保守性很高的C端结构域。然而, 不同物种间Noxa的N端区域却存在一定差异。斑马鱼(*Danio rerio*)与草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)Noxa具有最高的相似性, 然而却缺失其他哺乳类Noxa的N端结构域。哺乳动物中小鼠(*Mus musculus*)与大鼠(*Rattus norvegicus*)的Noxa的N端具有一个类似BH3结构域, 而其他哺乳类Noxa的N端不具有该结构域。

通过MEGA 6软件将草鱼Noxa氨基酸序列与NCBI中收录的11中脊椎动物的Noxa氨基酸序列构建NJ系统进化树(图 1), 进化树显示了两类亲缘关系最近的分支, 其中斑马鱼(*Danio rerio*)与草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)聚为一类, 而小鼠(*Mus musculus*)与大鼠(*Rattus norvegicus*)聚为一支, 其余物种Noxa与这两类分支之间具有较大的进化距离。

通过对人、斑马鱼和草鱼Noxa的蛋白质序列同源建模预测蛋白质三级结构, 结果显示斑马鱼与草鱼Noxa蛋白质三级结构具有极高的相似性, 蛋白整体形成一个α螺旋结构, 该结构与人类Noxa蛋白

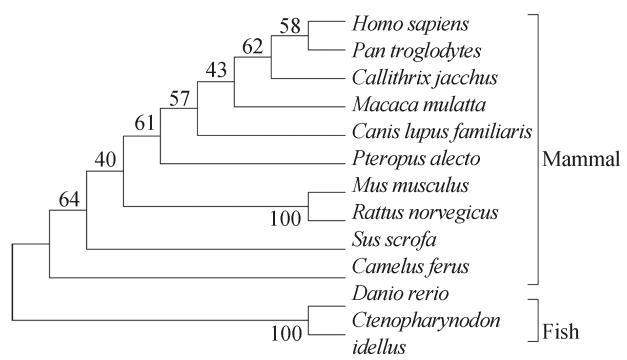


图 1 *Noxa*家族N-J系统发育树

Fig. 1 N-J Phylogenetic tree of Noxa protein family

构建进化树以自展法(bootstrap)进行验证, bootstrap值为1000, 图中节点值为百分比

The reliability of the phylogenetic tree was evaluated by bootstrap value representing as percentage

C端结构域高度相似。

2.3 *Cinoxa*基因应答GCRV组织表达变化

为了研究GCRV入侵草鱼后诱导*Cinoxa*基因的表达响应, 选取人工GCRV感染后草鱼的中肾、脾脏、后肠和头肾组织, 提取组织总RNA, 利用荧光定量PCR方法检测*Cinoxa*基因在GCRV感染后24h、48h、72h、96h和120h的表达变化(图 2)。

从纵向水平看, 草鱼感染GCRV后24h *Cinoxa*基因在中肾、脾脏和头肾中表达量上调, 而在后肠中表达下降。其中上调组中头肾中*Cinoxa*基因上调最大, 相比与对照组上调2.3倍, 其次为中肾中上调1.7倍和脾脏中上调1.5倍。感染后48h, 在头肾和脾脏中*Cinoxa*表达下调, 而肾脏和肠中保持不变。感染后72h, 4个组织中*Cinoxa*表达均下调。感染后96h, 4个组织中*Cinoxa*表达均上调。感染120h, *Cinoxa*基因在脾脏、头肾和后肠中表达继续上调,

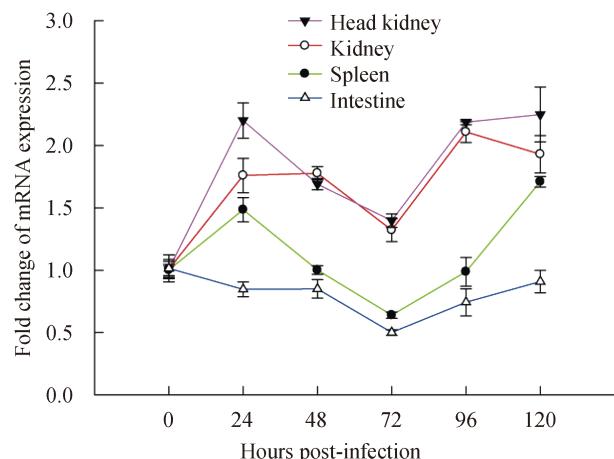


图 2 草鱼感染GCRV后4个组织*Cinoxa*的表达变化

Fig. 2 change of *Cinoxa* expression in four tissues of grass carp post GCRV infection

而在中肾中表达相对96h略微下降。

从横向水平看, *Cinoxa*基因在头肾和中肾中表达量从感染后24h到120h均高于对照组水平。在脾脏中24h和120h表达量高于对照组, 48h和96h与对照组持平, 而72h低于对照组。在肠中*Cinoxa*基因的表达量均低于对照组。

从表达模式上看, *Cinoxa*基因在草鱼感染GCRV后的中肾、脾脏和头肾组织中的表达模式基本一致, 攻毒后24h表达升高, 随后48h表达下降, 至72h到达最低点, 从72h后表达呈上调趋势, 至120h回复至各自24h水平。然而, *Cinoxa*在草鱼肝脏组织中表达0—72h表达下调, 随后表达上升, 至120h恢复24h水平。

3 讨论

本研究克隆了草鱼*Cinoxa*基因的全长cDNA序列, 对其氨基酸序列的分析发现草鱼Noxa与斑马Noxa蛋白序列具有极高的相似性, 这表明草鱼Noxa和斑马鱼Noxa为直系同源基因。随后, 通过*Noxa*基因家族蛋白序列多重比对分析证明, 草鱼和斑马鱼Noxa与哺乳类Noxa蛋白质C端保守区同源, 该区域在哺乳类Noxa中形成线粒体识别结构域和BH3结构域, 然而, 草鱼和斑马鱼Noxa却缺少哺乳类Noxa中的N端保守区。为了进一步研究草鱼、斑马鱼和哺乳类Noxa的同源区域是否具有相同的三级结构, 我们通过同源建模的方法分别构建了草鱼和斑马鱼Noxa以及人Noxa蛋白C端结构域3级结构模型, 结果表明斑马鱼与草鱼Noxa具有完全一致的蛋白质三级结构, 整个蛋白质多肽链构成一个 α 螺旋, 该结构与高等哺乳类人Noxa蛋白中C端结构域3级结构高度相似。对高等哺乳类Noxa的研究表明, 高等哺乳动物中Noxa通过自身的BH3结构域与MCL-1结合^[11], 从而置换出MCL-1/Bim复合体中的Bim, Bim进而激活Bax/Bak的活性, Bax/Bak嵌入到线粒体膜上使其通透性改变, 使线粒体内Cytochrome *c*释放到细胞基质中引起线粒体-Cytochrome *c*的凋亡途径^[12]。分析表明, 鱼类Noxa很可能与哺乳类Noxa采用相同的机制实现调控功能, 即通过自身形成BH3结构域与MCL-1相互作用从而调控线粒体膜通透性引发细胞凋亡。然而, 鱼类Noxa不具有高等哺乳类Noxa蛋白的N端结构域, 这表明鱼类Noxa发挥功能不需要哺乳类Noxa蛋白N端类似的结构域。而且有研究表明, 小鼠Noxa仅仅需要C端的BH3结构域就能够起到抑制MCL-1活性的作用^[13], 而C端的线粒体识别结构域则会影响MCL-1的定位和稳定性^[14]。这很可能预示着Noxa基因C端结构域是其调控凋亡的功能结构域, N端结构

域并非其调控所必须的结构。

哺乳类Noxa基因的研究表明, 哺乳类Noxa参与了呼肠孤病毒入侵诱导的细胞凋亡调控^[15]。对斑马鱼的研究证实, 斑马鱼Noxa基因对细胞凋亡的调控发挥着重要作用^[10, 16]。为了研究草鱼*Cinoxa*基因是否在GCRV入侵诱导细胞凋亡的过程中发挥作用, 进一步对草鱼感染GCRV后的*Cinoxa*基因表达模式进行了分析。结果表明*Cinoxa*在病毒感染后的中肾、头肾和脾脏中表达量明显上调, 感染后24h出现上调高峰, 随后下调表达至72h到达低谷后表达量从新上调, 至120h表达量上调至24h相近水平。然而, *Cinoxa*在感染GCRV的后肠中表达量略微下调, 表达变化差异不显著。在4个组织中*Cinoxa*表达上调最大是头肾, 其次是中肾。这表明草鱼中肾和头肾组织中的*Cinoxa*基因表达对GCRV入侵刺激相比与脾脏和后肠更为敏感, 这表明GCRV诱导*Cinoxa*表达具有组织特异性。有研究发现, 草鱼肾脏组织在GCRV入侵后发生的组织坏死最为严重, 其次为脾脏和肠, 而且在组织中发现大量病毒粒子^[5, 6]。对GCRV诱导CIK细胞凋亡研究表明攻毒后12h细胞内检测到Caspase激酶活性, 至24h和48h活性到达最高^[17], 这与*Cinoxa*对GCRV应答的模式一致。因此, 基于以上分析本研究推测草鱼*Cinoxa*基因很可能参与了GCRV诱导的细胞凋亡的调控。

令人注意的是, 对草鱼*Cinoxa*基因应答GCRV的表达模式研究发现, *Cinoxa*基因在GCRV感染后草鱼中肾、脾脏和头肾中的表达模式有着很高的致一致性, 于是推测GCRV入侵诱导草鱼*Cinoxa*基因表达很可能受到某种细胞因子的调控。在哺乳类病毒诱导细胞凋亡的研究中, 内质网压力反应在能引发细胞病理性症状的病毒诱导细胞凋亡中起到重要作用, 而Noxa在调控内质网压力和dsRNA诱导的细胞凋亡中发挥着至关重要的作用^[18]。有研究表明, 细胞因子MDA-7/IL-24能够通过引发内质网压力反应上调Noxa的表达从而诱导细胞凋亡^[19]。也有研究表明, 草鱼CIK细胞感染GCRV 48h后 IL-1 β 表达量显著升高, 至96h到达最高值^[17]。因此, 本研究推测白细胞介素在GCRV诱导Noxa表达中起到重要的调控作用。

参考文献:

- [1] Barber G N. Host defense, viruses and apoptosis [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2001, 8(2): 113—126
- [2] Kerr J F, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics [J]. *British Journal of Cancer*, 1972, 26(4): 239—257

- [3] Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death [J]. *Toxicologic Pathology*, 2007, **35**(4): 495—516
- [4] Zhang F, Li Z Q, Yan L M, et al. Isolation of SCFV antibodies against GCRV using phage display technology [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, **38**(3): 430—437 [张凤, 李周全, 闫利明, 等. 利用噬菌体展示技术淘选草鱼呼肠孤病毒的单链抗体. 水生生物学报, 2014, **38**(3): 430—437]
- [5] Chen Y Y, Jiang Y L. The research of grass carp hemorrhage virus morphology and physical and chemical characteristics [J]. *Chinese Science Bulletin*, 1983, **28**(18): 1138—114 [陈燕燊, 江育林. 草鱼出血病病毒形态结构及其理化特性的研究. 科学通报, 1983, **28**(18): 1138—1140]
- [6] Lu Y J, Yan Q G, Li H, et al. The pathological changes of reovirus-effected kidney of grass carp [J]. *Journal of Foshan University (Natural Science Edition)*, 2011, **29**(2): 41—44 [陆英杰, 颜其贵, 李华, 等. 呼肠孤病毒草鱼肾脏的病理变化观察. 佛山科学技术学院学报(自然科学版), 2011, **29**(2): 41—44]
- [7] Qu S P, Zhang X R, Zheng C Y, et al. Apoptosis of the cell line from grass carp (cik) induced by fish reovirus [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, **24**(6): 616—621 [屈三甫, 张小榕, 郑从义, 等. 鱼呼肠孤病毒诱导草鱼肾细胞凋亡. 水生生物学报, 2000, **24**(6): 616—621]
- [8] Zhong J X, Zhou L, Li Z, et al. Zebrafish noxa promotes mitosis in early embryonic development and regulates apoptosis in subsequent embryogenesis [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2014, **21**(6): 1013—1024
- [9] Kratz E, Eimon P M, Mukhyala K, et al. Functional characterization of the bcl-2 gene family in the zebrafish [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2006, **13**(10): 1631—1640
- [10] Christen V, Capelle M, Fent K. Silver nanoparticles induce endoplasmatic reticulum stress response in zebrafish [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2013, **272**(2): 519—528
- [11] Chen L, Willis S N, Wei A, et al. Differential targeting of prosurvival bcl-2 proteins by their bh3-only ligands allows complementary apoptotic function [J]. *Molecular Cell*, 2005, **17**(3): 393—403
- [12] Gomez-Bougie P, Wuilleme-Toumi S, Menoret E, et al. Noxa up-regulation and mcl-1 cleavage are associated to apoptosis induction by bortezomib in multiple myeloma [J]. *Cancer Research*, 2007, **67**(11): 5418—5424
- [13] Weber A, Auslander D, Hacker G. Mouse noxa uses only the c-terminal bh3-domain to inactivate mcl-1 [J]. *Apoptosis*, 2013, **18**(9): 1093—1105
- [14] Nakajima W, Hicks M. Pendent and enhanced by ifn regulatory factor 3- and nf-kappab-dependent expression of noxa [J]. *Journal of Virology*, 2012, **86**(3): 1650—1660
- [15] Chen M H, Hsu L C, Wu J L, et al. Exposure to benzidine caused apoptosis and malformation of telencephalon region in zebrafish [J]. *Environmental Toxicology*, 2013, doi: 10.1002/tox.21873
- [16] Jia R, Cao L P, Du J L, et al. Grass carp reovirus induces apoptosis and oxidative stress in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) kidney cell line [J]. *Virus Research*, 2014, **185**: 77—81
- [17] Rosebeck S, Sudini K, Chen T, et al. Involvement of noxa in mediating cellular er stress responses to lytic virus infection [J]. *Virology*, 2011, **417**(2): 293—303
- [18] Rahmani M, Mayo M, Dash R, et al. Melanoma differentiation associated gene-7/interleukin-24 potently induces apoptosis in human myeloid leukemia cells through a process regulated by endoplasmic reticulum stress [J]. *Molecular Pharmacology*, 2010, **78**(6): 1096—1104

CLONING OF GRASS CARP NOXA AND ITS EXPRESSION PROFILES IN RESPONSE TO GCRV INFECTION

LU Xiao-Nan^{1,2}, HUANG Rong¹, LIAO Lan-Jie¹, ZHU Zuo-Yan¹ and WANG Ya-Ping¹

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: In this study, we obtained the full-length cDNA of grass carp Noxa (*Cinoxa*) and performed the sequence analysis and phylogenetic tree construction. Next we used quantitative PCR (qPCR) to explore the expression pattern of Noxa mRNA in response to GCRV infection. The results suggested that there was high similarity in the protein sequences between grass carp Noxa and zebrafish Noxa. The 3-demisional (3D) model analysis also revealed that their protein 3D models were identical, and the models were homologous with C-terminus of BCL-2 family in mammals. In response to GCRV infection, the expression of grass carp Noxa upregulated significantly in the kidney, spleen and head kidney and reached to the peak at 24h and 120h after infection. Our data indicated that the CiNoxa was ortholog of zNoxa in grass carp and was involved in the immune response to GCRV. This could provide fundamental information for the future study on functions of grass carp Noxa, and help understanding the mechanisms that regulate the transcription during GCRV infection.

Key words: Grass carp; *Cinoxa* GCRV; Gene expression; Response