

军曹鱼 MHC-II β 基因全长 cDNA 的克隆与组织表达分析

茅莉娜^{①②} 冯娟^{①*} 李玉谷^{②*} 侯月娥^① 郭志勋^① 许海东^①

(① 中国水产科学研究院南海水产研究所 广州 510300; ② 华南农业大学兽医学院 广州 510642)

摘要: 采用同源克隆和末端快速扩增 (RACE) 的方法, 得到 1 161 bp 的军曹鱼 (*Rachycentron canadum*) MHC-II β 全长 cDNA 片段。该序列包括 20 bp 的 5' 末端非编码区 (UTR) 394 bp 的 3' UTR 及 747 bp 的开放阅读框 (ORF), 编码 248 个氨基酸, 预测其蛋白质分子量约为 27.99 ku, 等电点为 6.21。通过构建 MHC-II β 氨基酸序列的系统进化树, 并进行氨基酸相似性比对, 结果表明, 军曹鱼和已知鱼类、鼠 (*Mus musculus*)、鸡 (*Gallus gallus*) 及人类 (*Homo sapiens*) MHC-II β 氨基酸的同源性在 28.5% ~ 77.5% 之间。所推测的蛋白序列具有一些重要的特征, 包括: 前导肽、 β 1、 β 2 和 CP/TM/CYT 区, 保守的半胱氨酸等。Real-time PCR 检测结果显示, MHC-II β 基因在正常军曹鱼组织中均表达, 但表达量在各个组织中不同, 其中, 头肾表达较强, 鳃、脾、肠表达程度中等, 在心、脑、肌肉中表达较弱。

关键词: 军曹鱼; MHC-II β ; 全长 cDNA; 组织特异性表达

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2010)04-118-11

Full Length cDNA Cloning and Tissue Expression of Major Histocompatibility Complex (MHC) -II β in Cobia (*Rachycentron canadum*)

MAO Li-Na^{①②} FENG Juan^{①*} LI Yu-Gu^{②*} HOU Yue-E^①

GUO Zhi-Xun^① XU Hai-Dong^①

(① The South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Guangzhou 510300;

② South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The homology cloning and RACE PCR were employed to clone the MHC-II β gene from cobia (*Rachycentron canadum*). The full length cDNA of MHC-II β comprises 1 161 bp with a 20 bp 5' untranslated region (UTR), a 394 bp 3' UTR and a 747 bp open reading frame (ORF) encoding a polypeptide of 248 amino acid residues with a predicted molecular weight of 27.99 ku and theoretical isoelectric point of 6.21. The putative protein showed homology varying from 28.5% to 77.5% when compared with other fishes, mouse (*Mus musculus*), chicken (*Gallus gallus*) and human (*Homo sapiens*). The protein sequence showed all the important features including leader peptide, β 1, β 2, CP/TM/CYT regions and conserved cysteines. The MHC-II β expression was detected in all tested tissues with different expression levels. The high expression was detected in head kidney, moderate expression was detected in gill, spleen and intestine, while low expression was

基金项目 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目 (No. 2007ZD10);

* 通讯作者, E-mail: juanf@21cn.com; liyugu@scau.edu.cn;

第一作者介绍 茅莉娜, 女, 硕士研究生; 研究方向: 鱼类分子免疫; E-mail: maolina2003@163.com。

收稿日期: 2010-01-08, 修回日期: 2010-05-20

detected in heart , brain and muscle.

Key words: Cobia (*Rachycentron canadum*); MHC-II β ; Full length cDNA; mRNA expression

MHC (major histocompatibility complex) 即主要组织相容性复合体,是指染色体上由一系列紧密连锁的基因位点所组成的具有高度多态性的复合遗传系统或区域。MHC 广泛参与免疫应答的诱导与调节,激发机体特异性免疫反应,在免疫学上具有极为重要的意义。MHC 分子又称 MHC 抗原,是由 MHC 基因编码的一类细胞表面转膜蛋白,在体内主要起到抗原提呈的作用。由于 MHC 具有多态性、与疾病的相关性以及连锁不平衡性的特点,因此,了解鱼类 MHC 基因的结构与功能,寻找与疾病相关联的易感基因或疾病抵抗基因,对预防疾病具有很高的价值。此外,由于 MHC 的高度多态性,故可用于种群遗传学研究,并作为种群分子进化的标记之一。对 MHC 本质的探究是从 1950 年 George Snell^[1]进行小鼠的移植排斥反应研究时发现 MHC 开始的,此后相继发现人 (*Homo sapiens*) (HLA)、鼠 (*Mus musculus*) (H-2) 和鸡 (*Gallus gallus*) (B) 等许多动物的 MHC。哺乳动物具有 MHC 基因是较为普遍的现象,随着研究的不断深入,近年来已确定几乎所有的脊椎动物都存在 MHC 基因。鱼类 MHC 基因的研究起步较晚,直到 1990 年,Hashimoto 等^[2]通过比较人、鼠、鸡的 I 类 $\alpha 3$ 结构域和 II 类 β 结构域氨基酸序列,并以这些区域形成链内二硫键 2 个半胱氨酸残基侧翼的保守序列为模板,设计高度简并性引物,扩增出鲤 (*Cyprinus carpio*) 的部分 MHC 基因序列,才揭开了鱼类 MHC 研究的序幕。迄今为止,已经在超过 30 种鱼类中进行了全长或部分序列的克隆及测序,验证了它们的多态性及基因拷贝数的变化,已经获得包括斑马鱼 (*Danio rerio*)^[3]、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[4]、大西洋鲑 (*Salmo salar*)^[5]、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)^[6]、真鲷 (*Chrysophrys major*)^[7] 等鱼类 MHC-II β 的全长序列。但对军曹鱼 (*Rachycentron canadum*) 的 MHC 基因序列尚未有报道。

军曹鱼隶属鲈形目 (Perciformes) 鲈亚目 (Percoidei) 军曹鱼科 (Rachycentridae) 军曹鱼属,俗称海鲷、鲸龙鱼,分布于大西洋、印度洋和太平洋沿岸海域及港湾^[8]。军曹鱼具有生长速度快、营养价值高等优点,是国内近几年来养殖规模迅速发展的重要海水经济鱼类,已成为海水网箱养殖的重要品种^[9]。随着养殖密度的增大和养殖生态环境的恶化,加上管理不善,导致鱼体受伤、抵抗力下降等原因,军曹鱼病害日趋严重,已成为制约军曹鱼健康养殖发展的关键因素之一^[10-12]。本文根据其他鱼类 MHC-II β 基因的保守序列设计简并引物,采用同源克隆和末端快速扩增方法扩增军曹鱼 MHC-II β 基因的全长 cDNA 序列,对 cDNA 和推测的氨基酸序列进行分析,比较它与其他鱼类以及鸡、鼠和人类的 MHC-II β 氨基酸序列差异,并分析了军曹鱼 MHC-II β 基因的组织特异性表达。通过对 4 尾军曹鱼 MHC-II β 氨基酸的比对,研究了其多态性,为进一步研究 MHC-II 类分子的作用机理以及 MHC-II 类基因多态性与鱼体抗病力的关系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料 军曹鱼购于海南陵水网箱,于陵水试验站暂养一周。取样时将心、脾、鳃、头肾、皮肤、心和脑等组织取出,放于液氮冷冻 1 d 后,转移至 -80°C 冰箱保存。

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 第一链的合成 称取 0.1 g 军曹鱼的脾,采用 Trizol 法 (Invitrogen) 提取总 RNA,通过琼脂糖凝胶电泳和微量紫外分光光度计检测 RNA 的完整性和浓度后,保存于 -80°C 冰箱。取总 RNA 5 μg 与反转录引物 (oligo-dT 接头引物,表 1) 1 μl (10 pmol/L) 混合,经 RT-PCR 合成 cDNA 第一链,放入 -80°C 保存备用。

1.3 同源扩增 根据其他鱼类 MHC-II β 的核酸序列,利用 CLUSTAL W2 程序进行比对,确定

其保守区域。在保守区设计简并引物(由上海英骏生物技术有限公司合成)(RCMC2BF、RCMC2BR,序列见表1),扩增军曹鱼 MHC-II β 的中间片段。PCR 产物经过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后回收,连接 pMD18-T 载体,转化 TOP10 感受态细胞。阳性菌液于上海英骏生物技术有限公司测序。

1.4 cDNA 全序列的克隆 根据中间片段序列设计特异性引物 RCMC32BOUT、RCMC32BIN、RCMC52BOUT、RCMC52BIN,序列见表1。利用半巢式(semi-nested)PCR方法,用cDNA末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA ends,RACE)对目的基因的3'和5'末端进行PCR扩增。所得到的PCR产物经1%的琼脂糖凝胶电泳检测、纯化后,连接pMD18-T载体,转化TOP10感受态细胞。阳性菌液于上海英骏生物技术有限公司测序。所得序列与中间片段用DNASTAR软件进行拼接。

1.5 序列分析 登录NCBI用BLAST对测序结果进行同源性检索,用DNASTAR分析所得军曹鱼MHC-II β cDNA序列以及开放阅读框,蛋白质二级结构用PHDsec program软件进行预测分析,用在线CLUSTAL W2进行多序列比

较,用MEGA4.1方法构建进化树。

1.6 多态性研究 在5'UTR和3'UTR区域设计一对引物(M5和M3),序列见表1,扩增4尾军曹鱼的MHC-II β 的ORF序列,通过氨基酸比对来确定基因的多态性。

1.7 MHC-II β 基因在不同组织中的 Real-time PCR 分析 取3尾健康军曹鱼(200 g)的心、脾、鳃、头肾、肌肉、肠和脑组织,分别将这3尾军曹鱼的不同组织分装,相同组织混合均匀。在已获得的序列上(靠近3'端)设计qPCR特异性引物(引物序列见表1,预计扩增约106 bp的目的片段),以反转录的cDNA为模板进行普通PCR,并进行PCR反应条件优化,将PCR产物送测序以确保其为预期的目的基因片段。引物 β -ActinF和 β -ActinR扩增得到的PCR产物作为内参与目的基因在同一体系中扩增。采用SYBR Green I法在Mastercycler ep realplex荧光定量PCR仪(Eppendorf AG,Hamburg,Germany)上进行扩增和数据分析。每个样品做4个平行,荧光吸收值及扩增曲线通过Mastercycler ep realplex System软件分析。利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算相对表达量。

表1 实验中所用到的引物序列

Table 1 Oligonucleotide primers used in this experiment

引物名称 Prime	核苷酸序列 Nucleotide sequence (5'-3')	应用范围 Applied range
RCMC2BF	AGCAGCACTGTGGGGAAGT	同源克隆
RCMC2BR	ACTCAGGCATGGACGGATC	同源克隆
oligo-dT 接头引物	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT(30)VN	反转录
SMART 3a	CAGAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT	3'RACE
RCMC32BOUT	GAACGCTGGAACAAAGGTC	3'RACE
RCMC32BIN	CCGAGATGGACAGGAAGTG	3'RACE
Olido-dG	GGGGGGGGGGGGGGG(A/T/C)	5'RACE
RCMC52BOUT	TACCAGTCGCCGTCAGCC	5'RACE
RCMC52BIN	TTGTTCACCGTTCTGCGTT	5'RACE
M5	AGAGCTCTCAACTCACCATC	多态性研究
M3	GGACCAGACTGAGGTGTTT	多态性研究
β -ActinF	TGAGACCACCTACAACAGC	RT-PCR 内参
β -ActinR	CTGCATCCTGTCAGCGAT	RT-PCR 内参
J2BF	ACCTCTGGTTATTGACTGGG	RT-PCR
J2BR	TCCAGCCAGAGATAAGATCAGAC	RT-PCR

2 结果

2.1 核酸序列分析 经同源克隆获得 460 bp 的片段,通过 3'RACE PCR 和 5'RACE PCR 分别得到 704 bp 和 325 bp 的 MHC-II β 两端(图 1),将获得的三段序列经 DNASTAR 分析去除重叠序列和接头序列后,得到 1 161 bp 军曹鱼

MHC-II β 基因 cDNA 的全序列(图 2)。军曹鱼 MHC-II β cDNA 由 747 bp 编码区、20 bp 的 5'UTR 区和 394 bp 的 3'UTR 区组成,并且具有脊椎动物典型的加尾信号 AATAAA 和 16 bp 的 Poly A 尾巴。在 3'UTR 区发现了一个 RNA 不稳定模体 ATTTA (RNA instability motifs)。

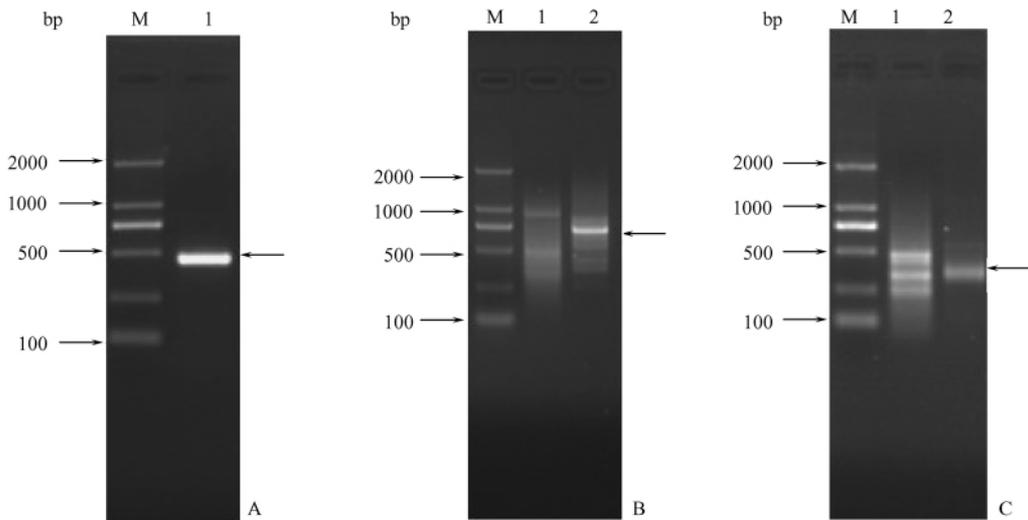


图 1 同源克隆及 RACE PCR 电泳图

Fig. 1 Electrophoresis pictures of homology cloning and RACE PCR

A. 同源克隆:1. 同源克隆 PCR 产物; B. 3'RACE 产物:1. 一扩产物 2. 二扩产物; C. 5'RACE 产物:1. 一扩产物;2. 二扩产物。M. DL 2000 DNA 分子量标准。

A. Product of homology cloning, 1. Homology cloning product; B. 3'RACE PCR product, 1. The first round PCR product; 2. The second round PCR product; C. 5'RACE PCR product, 1. The first round PCR product; 2. The second round PCR product. M. DL 2000 DNA ladder.

2.2 MHC-II β 氨基酸序列分析 军曹鱼 MHC-II β cDNA 的开放阅读框编码 248 个氨基酸(图 2),用 DNASTAR 预测蛋白质的分子量约为 27.99 ku,等电点为 6.21。由前导肽(leader peptide)、 β 1 区、 β 2 区、连接肽、跨膜区和胞浆区(CP/TM/CYT)组成,分别为 17 个、92 个、94 个、45 个氨基酸。其二级结构,在 β 1 的第 32 氨基酸上含有一个 N-糖基化位点(NSSD),在 β 2、连接肽上含有 4 个蛋白激酶 C-磷酸化位点(112 位 SVR、178 位 TPR、193 位 SLK 以及 209 位 SER)和 5 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(132 位 SVYD、157 位 SSTE、173 位 SHLE、193 位 SLKE 以及 205 位 SMPE),另外在 β 1、 β 2 和跨膜区上共含有 4

个 N-豆蔻酰化位点(69 位 GVKNAE、98 位 GLDYTA、149 位 GQEVAS 以及 220 位 GLILGL),在 CP/TM/CYT 区具有在鱼类及哺乳动物中保守的 GXXGXXXGXXXXXXXXG 框。

利用在线软件 CLUSTAL W2 进行军曹鱼 MHC-II β 推测的氨基酸序列与其他鱼类、鼠和人的 MHC-II β 氨基酸序列比对(图 3)。根据 β 2 区的氨基酸序列比对情况,用 MEGA4.1 构建了系统进化树(图 4),结果发现鸡、鼠和人形成一个独立的分支,军曹鱼与其他鱼类形成另一个独立分支,军曹鱼和驼背犬齿罗非鱼(*Cyphotilapia frontosa*)的关系最近,与人、鼠、鸡较远。用 DNA star 分析序列的同源性,其中军

```

agagctctcaactcaccatcatatggcttcatcctctgctctgacctgctcttcatcg      60
< Leader peptide
      M A S S F V C L C L V F I      13
ctgcctacacagcagatggattcatgaatttcgcggtgggtgctgtgactttaactcct      120
>< β1 domain
  A A Y T A D G F M N F A V G R C D F N S      33
ctgatacctaaagacatcgagtacattcagtccttattattacaacgaactggagttcatca      180
  S D P K D I E Y I Q S Y Y Y N E L E F I      53
ggttcagcagcagtggtgggaagttgttgatcacagagcttgagtgagaagacgcag      240
  R F S S S V G K F V G Y T E L G V K N A      73
aacctggaacaaaggctccagagtggttcagatgaagggtgagaaggacagatactgtg      300
  E R W N K G P E L V Q M K G E K D R Y C      93
tcaggaccgtgggactagactacacagctattctgactaagtcagtcgaaccctcggtca      360
>< β2 domain
  V R T V G L D Y T A I L T K S V E P S V      113
ggctgcaactcgaccacgccccctatgggcaaacaccggccatgctggtctgcagcgtet      420
  R L H S T T P P M G K H P A M L V C S V      133
acgacttctaccctcaatacatcagggtgagttggtcagagatggacaggaagtggcct      480
  Y D F Y P K Y I R V S W C R D G Q E V A      153
ctgatgtcagctccactgaggagctggctgacggcgactggtactaccagatccactctc      540
  S D V S S T E E L A D G D W Y Y Q I H S      173
acctggagtacacgccaggtctggagagaagatctctgtgtggtggagcagccagccg      600
  H L E Y T P R S G E K I S C V V E H A S      193
tgaagaacctctggttattgactgggatccgtccatgcctgagtcagagagaaacaaaa      660
>< CP/TM/CYT region
  L K E P L V I D W D P S M P E S E R N K      213
ttgccattggagctcaggactgactcgggtctgatcttatctctgctggattcatct      720
  I A I G A S G L I L G L I L S L A G F I      233
actacaagaggaagcccgaggaaggatcctggttcccaactgagccaggtcctgta      780
  Y Y K R K A R G R I L V P T N *      248
tgctggacctggacctggacctgcttctcagatggaagaaatcagctgctgct      840
  ttaaactgcttctgtttctcagtgctgccactgttgaccagctgaacacctcagctet      900
ggtccaggactggrtctgacagctcctgggtctaaacctggtycatgaggtcacaggagt      960
cttgatgggactctgacagctcctggaccaggttaatgtggactcacgtgtatcagctg      1020
gatctggactctgctcttactgtgtgaatcaaaaccagatcagggtctgtgtgcaaa      1080
tcttcatgatcagatgtttctacgctgcatgtatttacaataaaaaccaccagaaa      1140
ctctgaaaaaaaaaaaaaaaaa      1161

```

图 2 军曹鱼 MHC-II β cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig. 2 cDNA sequence of cobia MHC-II β and deduced amino acid sequence

起始密码子 (atg)、终止密码子 (tga)、加尾信号 aataaa 用黑体标出;RNA 不稳定模体 (atta) 用方框标出;不同区域起始氨基酸用下划线标出。小写字母示核酸序列,大写字母示氨基酸序列;“<”表示区域的起始位置,“>”表示区域的终止位置,这些区域包括前导肽、β1 区、β2 区、连接肽、跨膜区和胞浆区。

The start and stop codons or the putative polyadenylation signal (aataaa) are shown in bold print. RNA instability motif (atta) in the 3'UTR is represented by box. The start amino acid of different region is underlined. Lowercase letters show nucleotide sequence, capital letters show amino acid sequence; "<" indicates the starting position of the region, ">" indicates the termination position of the region, these regions include the leader peptide, β1 region, β2 region, CP/TM/CYT region (connecting peptide, transmembrane and cytoplasm).

曹鱼与赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*) 的同源性最高,同源性为 77.5%,与欧洲鲈 (*Dicentrarchus labrax*)、条纹鲈 (*Morone saxatilis*)、大眼狮鲈 (*Stizostedion vitreum*)、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)、真鲷、三刺鱼 (*Gasterosteus aculeatus*)、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 和驼背

犬齿罗非鱼的同源性次之,同源性分别为 77.1%、77.1%、75.5%、75.1%、73.5%、70.3%、69.9%、69.9% 和 68.7%,与大西洋鲑、虹鳟、斑点叉尾鲷和斑马鱼的同源性较低,分别为 63.1%、61.4%、51.8% 和 51.8%。与人、鼠和鸡的 MHC-II β 氨基酸的同源性仅为 28.5%、33.7% 和 30.1%。

2.3 多态性分析 通过建立对军曹鱼 MCH-IIβ ORF 扩增的 PCR 方法,我们获得了共 4 尾军曹鱼的 MHC-IIβ 氨基酸序列(图 5),经过比对,总

共有 25 个不同的氨基酸位点,其中有 22 个位于 β1 区,占 β1 区的 23.9%,而 β1 区氨基酸的相似度只有 81.5%,说明 β1 的多态性极高。

	Leader peptide	β 1	
<i>Raca</i>	-----	MASSFVCLCLVFIA-AYTADGFMFVAVGRCDFNSSDPKDIEYIQSYYY	47
<i>Dare</i>	-----	MYLLKPFLVILMLSTFTGTADGYDYIKQQCFYSTSDYSDVMVLYASYSF	49
<i>Icpu</i>	-----	MSKLLKILLIVLPAVLH-TAHGNFLSPQDWCIWSKEDLSDMEYIKPLII	48
<i>Paol</i>	-----	MASFILSFSLFFIT-VCTADGFLHYTVTDFEFNSSKLNLDIEYIQSYYY	47
<i>Scma</i>	-----	MASSFLSFALLFIT-VYTADGFYEFVESSCFVFNSTKLDLDDIEFIKSYYY	47
<i>Dila</i>	-----	MASSFLSFLLFIISLYTADGFLNFITTRCDFNSTDLKLDIEYINSYFF	48
<i>Mosa</i>	-----	MASSFLSFLLFITSLYTADGFRYFWDTRCFVFNSTDPNRIEYINSYFF	48
<i>Chma</i>	-----	MASSFLSFLLFIS-LCSADGFYFATQRCDFNSELKDMIEYIESYFF	47
<i>Lacr</i>	-----	MASSFISFLLFIS-LCTADGFMEFRLARCFVFNSTDLKNIEYIDSYFF	47
<i>Epak</i>	-----	MASSFLSFLLFIS-LYTADGFMEYVTTSCVFNSTDLKLDIEFIRSYFF	47
<i>Stvi</i>	-----	MASSFVSLFFIS-LYTADGFMEYNLARCFFNSSLKLDIEFIYSMY	47
<i>Gaac</i>	-----	MAPSFISVSLFFIG-LHAADGFMMFTKTRCFVFNSTELKLDIEFIRSYFF	47
<i>Cyfr</i>	-----	-----MNYMVSRCDFNSTELKLDIEFIRSYFF	26
<i>Onmy</i>	-----	-----MKSIRFYICLAVALSTLYETDGYASDVVTRCLYSSIDMHGAEFIQSYTF	50
<i>Sasa</i>	-----	-----MSMSI-FCVSLTLVLSIFSGTDGYFEQVVRQCRYSSKDLQGLIEFIDSYFF	49
<i>Homo</i>	-----	-----MGSGWVPWVVALVNLTRLDSMTQGTDSPEDFVIQAKADCYFTN-GTEKVFVVRIF	58
<i>Mumu</i>	-----	-----MVWLPVPCVAIVALLLTVLSPVALVRDSRPWFLEYCKSECHFYN-GTQRVRLLERYFY	59
<i>Gaga</i>	-----	-----MGSGRVPAAGAVLVALLGALGARPAAAGTRPSAFFFHGVIAECHYLN-GTERARFLARHIY	58
		* : .	
<i>Raca</i>		NELEFIRFSSSVGKFGVGYTELGVKNAER--WNGKPE-LVQMKGEKDRYCVRTVGLDYTAI	104
<i>Dare</i>		NKVVDTFQFNSSVGKFGVGYTEQGLIFAEN--FNKDQAYLHLKAQVDTFCRHNQIWDASV	107
<i>Icpu</i>		NKIKLEYNSTVGKVVGYTELGIKNADR--FNKDPAFMQGLKAEKLDVCKNVNGYSGI	106
<i>Paol</i>		NKLEIVRFSSSVGKYGVEYFEGIKNAER--WNGKPE-VISRRGEKESYCFHNVGIFTESA	104
<i>Scma</i>		NKLEYTRFSSSVGKYGVEYFEGVNRNAEQRHWRWG--CNESSEGDVLSQ--RKYHEAA	102
<i>Dila</i>		NKMKYLRPSSSVGEYVGYTELGVKNAER--LNKDPSELARRRGEKERYCLTNVNADYQGA	106
<i>Mosa</i>		NKLEYARFSSSEGEFVGYTELGVKNAER--FNKDPSYLAQRRAEKERYCLTNINIDYQNA	106
<i>Chma</i>		NKVEFARFSSSVGEFVGYTELGLKQAQG--WNKDKSILAVKRAEKERYCKTNVNGEYAYA	105
<i>Lacr</i>		NKMEYSRFSSSVGKYGVEYFEGVKNABEY--WNNNPSLLARERGEKERYCLNNVQADYQSA	105
<i>Epak</i>		NKLEFTRFSSSVGKHVGYTEYGVKNAEF--WNSDPSFLAQMRAEKERYCVNNIGIDYQAA	105
<i>Stvi</i>		NKLEFIRFSSSLGKYGVEYFEGVKNABEY--LNNDPSELARRKADKERYCKHNIDIRYHAA	105
<i>Gaac</i>		NKLEFTRFSSSVGKYGVEYFEGVKNABEY--WNKDASFLSAMKAQKEVYCLNHVQSKYDNV	105
<i>Cyfr</i>		NMMEVVRFDSSVGEYVGYTDFGVKQAKY--FNSQPANLAAMRAQKGYCQHNIQIDYYSNI	84
<i>Onmy</i>		NKVEHLRFNSTVGEFVGYTELGLKNAKR--LNRGQE-VVQMRGELERLCKPNADIHRYAI	107
<i>Sasa</i>		NKAEYVRFNSTVGKYGVEYTELGVKNAEA--WNGKPE-LAVELGELERFCKHANADLHYRAI	106
<i>Homo</i>		NLEEYVRFSDVGMFVALTKLGPDAEQ--WNSRLDLLERSRQAVDGVCRHNYRLGAPPT	116
<i>Mumu</i>		NLEENLRFSDVGEFRAVTELGRPDAEN--WNSQPEFLEQKRAEVDTVCRHNYEISDKFL	117
<i>Gaga</i>		NRQQYAHFSDVGVYVADTPLGEPQAEY--WNSNAELLENLMNTVDGPCRHNHYGILESFT	116
		* : . * * . * * * .	
		β 2	
<i>Raca</i>		LTKSVPEPSVRLHSTTPPMGKHPAMLVCSVYDFYPKYIRVSWCRDGGQEVASDVSSTEELAD	164
<i>Dare</i>		RDKAIVLPEVTIKSVRQAEGRHPAVLLCSAYEFYPKKIKMSWLRDGEVTSDDVTSTEMAD	167
<i>Icpu</i>		LSKTVEPQVKVLVKSDDGTHPATLMCSAYSFYPPAISVTLWRNGKEIKGGVTSSTEMAD	166
<i>Paol</i>		LTKSAKPYVRLNSVAPPAGKH-AMLVCSVDFYPKRIKVSWRDGGQEVTSDDVTSTDELAD	163
<i>Scma</i>		LTKSVKPYVRLHSEEHGGKHPTVLVCSVDFYPKRIKVSQIDEKEVTSDDVTSTDELAD	162
<i>Dila</i>		LDKSVKPYVRLHSVAPPAGKHPSMLVCSVYGFYPKHIRVSWLRDGGQEVTSDDVTSTDELAD	166
<i>Mosa</i>		LDKSVKPSVRLHSVAPPAGKHPSMLVCSVYDFYPKHIRVSWLRDGGQEVTSDDVTSTDELAD	166
<i>Chma</i>		LTQSAKPYVRLQSVTPSAGKHQSMVCSVDFDFPKLIRVSWFRDGGQEVTSDDVTSTDELAD	165
<i>Lacr</i>		LDKSAKPYVRLHSVTPPGGHPHPSMLVCSVDFYPKHIRVSWLRDGGQEVTSDDVTSTDELAD	165
<i>Epak</i>		LTKSAEPYVRLHSVTPSGGKHSAMLVCSVFNFPKIKVSWLRDGEVTSDDVTSTDELAD	165
<i>Stvi</i>		LTKSAEPYVRLSSTASPGGKHSAMLVCSVYDFYPKQIRVSWTRDGGQEVTSDDVTSTDELAD	165
<i>Gaac</i>		LTKSAEPYVRLHSETPPGGGLSMLVCSVYDFYPKKIVRWTRDGRPETTGTVTSDELAD	165
<i>Cyfr</i>		LSKSAEPYVRLHSSTPPSGNHQAMLVCSVYDFYPKYIRVSWLRDGEKVSADVTSTEMAD	144
<i>Onmy</i>		LDKTVEPHVRLSSVTPPSGRHPAMLCSAYDFYPKPIRVTWLRDGEVKSDDVTSTEMAN	167
<i>Sasa</i>		LDKTVEPHVRLSSVAPPSPGRHPAMLCSAYDFYPKPIRVTWLRDGEVKSDDVTSTEMAN	166
<i>Homo</i>		VGRKVPQEVTVYPTKQPLEHNLVCSVDFYPGNIEVWFRNGKEEKTGLVSTGLVRN	176
<i>Mumu</i>		VRRRVEPTVYPTKQPLEHNLVCSVDFYPGNIEVWFRNGKEEKTGLVSTGLVRN	177
<i>Gaga</i>		VQRSVEPKVVRVALQSGLPETDRLACYVTGFYFPEIEVKWFQNGREETERVSDTVMQN	176
		: . * * * : * . * * * : * : . : * * : :	

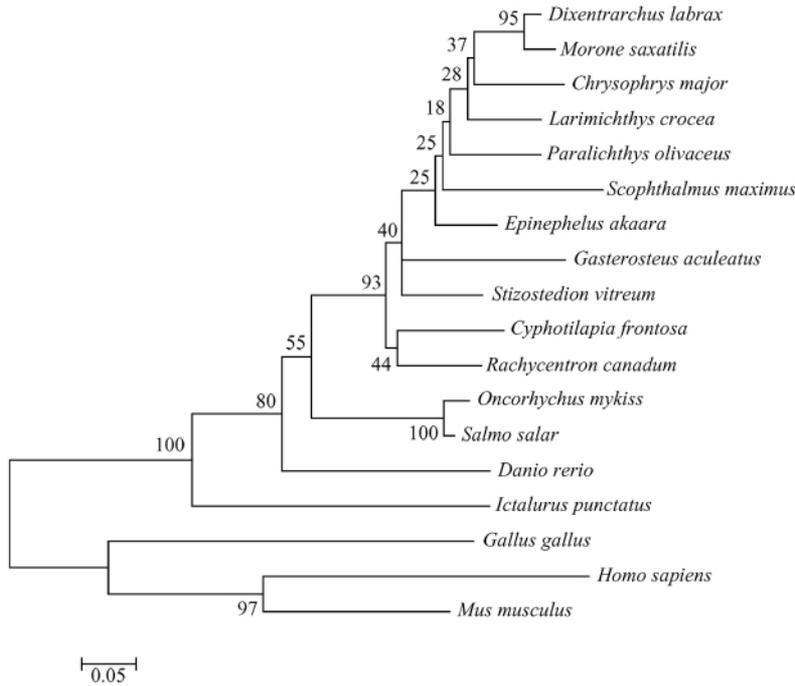


图 4 利用 Clustal W2 和 MEGA4.1 软件构建的 MHC-II β 基因 ($\beta 2$ 区) 氨基酸序列的系统树

Fig. 4 Phylogenetic tree of MHC-II β gene ($\beta 2$ region) amino acids sequences in different groups with program Clustal W2 and MEGA 4.1 using neighbor-join method

节点处的数字为 1 000 次 bootstrap 检验的支持率。

The numbers were the percentages of bootstrap values supporting each node from 1 000 replicas.

Rachycentron canadum: 军曹鱼; *Danio rerio*: 斑马鱼; *Ictalurus punctatus*: 斑点叉尾鲶; *Paralichthys olivaceus*: 牙鲆; *Scophthalmus maximus*: 大菱鲆; *Dicentrarchus labrax*: 欧洲鲈; *Morone saxatilis*: 条纹鲈; *Chrysophrys major*: 真鲷; *Larimichthys crocea*: 大黄鱼; *Epinephelus akaara*: 赤点石斑鱼; *Stizostedion vitreum*: 大眼狮鲈; *Gasterosteus aculeatus*: 三刺鱼; *Cyphotilapia frontosa*: 驼背犬齿罗非鱼; *Oncorhynchus mykiss*: 虹鳟; *Salmo salar*: 大西洋鲑; *Homo sapiens*: 人类; *Mus musculus*: 鼠; *Gallus gallus*: 鸡。

2.4 MHC-II β 基因在不同组织中的表达分析 以正常的军曹鱼组织为材料,以反转录合成的第一链 cDNA 为模板,以 β -actin 为内参基因,用特异性引物 (J2BF, J2BR) 进行 Real-time PCR 反应,检测 MHC-II β 基因在不同组织中的表达情况。结果表明,在正常军曹鱼组织中, MHC-II β 基因较强地表达于头肾 (61.70 ± 1.92),中等程度表达于鳃 (18.80 ± 1.38)、脾 (9.28 ± 0.10)、肠 (7.62 ± 0.05),在心 (3.89 ± 0.34)、脑 (5.67 ± 0.16)、肌肉 (1.03 ± 0.15) 中表达较弱。

3 讨论

根据化学结构和功能的不同, MHC 可分为

MHC-I 类分子和 MHC-II 类分子,在哺乳动物中还存在 MHC-III 类分子。其中, II 类 MHC 分子呈递的抗原多是细胞外源性多肽,它在内质网内由 α 、 β 和辅助分子 γ 链组装成完整三聚体,蛋白酶水解 γ 链,抗原多肽与 II 类 MHC 分子结合,形成稳定的 II 类 MHC-多肽复合体,再运至细胞表面,外源性抗原在线粒体或溶酶体中与 MHC-II 类分子结合后呈递给协助 T 淋巴细胞 ($Th, CD4^+$),从而触发免疫反应。

虽然鱼类 MHC 基因和哺乳动物的 MHC 基因相似度不高,但它们的结构组成基本上是一致的,只是鱼类的跨膜区极度保守^[13]。一个典型的 MHC-II 类基因包括前导肽、两个胞外区 ($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 和 $\beta 1$ 、 $\beta 2$)、连接肽、跨膜区和胞浆

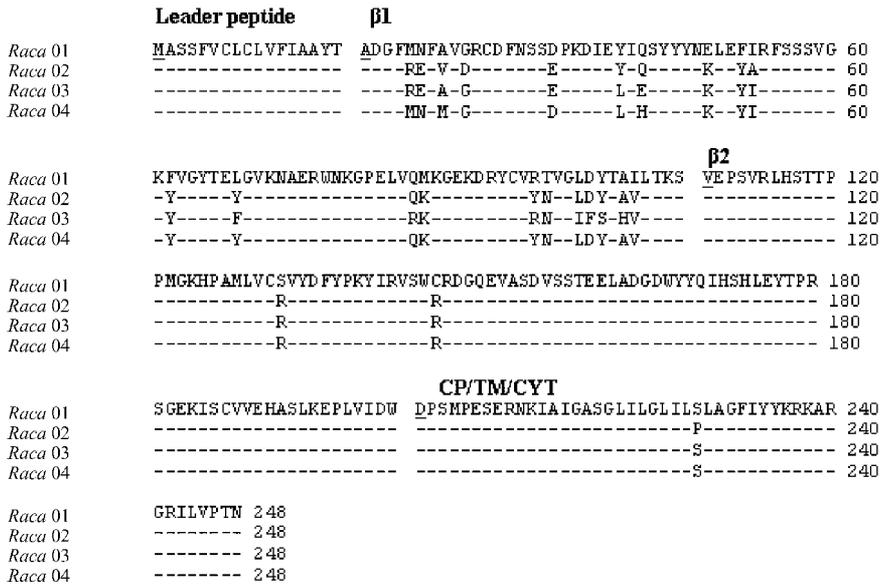


图 5 不同军曹鱼个体之间的氨基酸比对图

Fig. 5 Alignment of amino acid sequences among different Cobias

上述序列比对对应不同的区域:前导肽、β1 区、β2 区、CP/TM/CYT 区。相同氨基酸用“-”表示。

Regions corresponding to the putative leader peptide, β1 domain, β2 domain, connecting peptide, transmembrane region and cytoplasmic tail are shown above the sequences. The same amino acids is represented by “-”.

区。本实验克隆得到军曹鱼 MHC-II β 的全长序列 1 161 bp, 包括 20 bp 的 5'UTR, 394 bp 的 3'UTR 及 747 bp 的开放阅读框(ORF), 编码 248 个氨基酸, 在 3'UTR 区发现了一个 RNA 不稳定模体 ATTTA (RNA instability motifs), 此序列与 mRNA 的稳定性直接相关^[14-15]。蛋白水平上预测该序列前导肽为 17 个氨基酸, β1 区含有 92 个氨基酸, β2 区含有 94 个氨基酸, CP/TM/CYT 为 45 个氨基酸。β1、β2 区域含有 4 个半胱氨酸, 构成 2 个二硫键桥以此连接两个胞外区。在第 32~35 位氨基酸上含有一个 N-糖基化位点(NSSD), 这一位点在其他鱼类及哺乳动物中也存在, 只是确切的氨基酸位置有所区别。如相同位点存在于牙鲆^[16]、大菱鲆^[17]、真鲷^[18]、欧洲鲈^[19]等, 而在虹鳟^[4]、大西洋鲑^[5]、斑马鱼^[20]中这一位点的位置发生了变化。以上这些特征都说明所获得的基因是 MHC 基因家族的一员。

氨基酸比对结果显示该序列 β1 区的变化最大, 拥有较少的保守氨基酸, 而 β2 区相对保守, 特别是在近膜端。这一区域中的 94 个氨基

酸中有 33 个保守氨基酸。在 β1、β2 区域出现的 4 个半胱氨酸残基在所有的鱼类及哺乳动物中均保守, 2 个胞外结构域由 2 个半胱氨酸形成的链内二硫键相连, 环绕这些残基的区域经常被用来设计引物进行基因 MHC 序列的 PCR 扩增。跨膜区极度保守, 在跨膜区的 GXXGXXXGXXXXXXG 框在所有生物中均保守, Cosson 等^[21]推测此框与其和 MHC-II α 基因形成 αβ 异二聚体有关。在哺乳动物中, 推测的 MHC-II β 与 MHC-II α 作用位点包括 3 个氨基酸残基: 两个组氨酸、一个谷氨酸^[22], 第一个组氨酸在鱼类中均保守, 除了在三刺鱼中缺失这一氨基酸^[23]。谷氨酸在所有鱼类中均保守。在鱼类中第二个组氨酸经常被其他氨基酸所替代, 在军曹鱼中为脯氨酸(125 位组氨酸、126 位脯氨酸及 176 位谷氨酸)。在人类中, 推测的 MHC-II 类分子与 CD4 作用位点包括 3 个氨基酸残基: 缬氨酸、苏氨酸以及丝氨酸^[22]。这 3 个氨基酸残基在其他鱼类中均保守, 但是在军曹鱼中的苏氨酸被丝氨酸所替代(156 位缬氨酸、157 位丝氨酸和 158 位丝氨酸)。

多序列氨基酸比对显示 $\beta 1$ 区的变化最大,只有 7 个保守氨基酸。不同军曹鱼氨基酸之间的比对,说明 MHC 基因不仅在种间存在多态性,而且种内不同个体之间也存在相当丰富的多态性,且多态性都集中在 $\beta 1$ 区中,提示功能性 PBR 的存在。

由于 $\beta 2$ 的保守性,因此利用 MEGA4.1 对此区域的序列构建系统进化树,结果显示鸡、鼠和人形成一个独立的分支,军曹鱼与其他鱼类形成另一个独立分支,这说明鱼类与其他脊椎动物在分化上的不同,鱼类可能来自同一祖先,而人类、哺乳动物及家禽类源自于另一始祖。推测的军曹鱼 MHC-II β 和已知鱼类、鼠、鸡及人类 MHC-II β 氨基酸^[24-28]的同源性在 28.5% ~ 77.5% 之间,其中与赤点石斑鱼的同源性最高,可能是因为他们同属于鲈形目。

本实验利用 Real-time PCR 检测发现 MHC-II β 在正常军曹鱼组织中均有所表达,其中在头肾中表达最强,中等程度表达于鳃、脾、肠中,在心、脑、肌肉中表达较弱。这一结果与虹鳟^[29]、大西洋鲑^[30]及大菱鲆^[31]的表达情况基本相似,而鲤鱼^[32]在心、脑中未检测到基因转录物。这说明 MHC-II β 基因主要在免疫相关组织中表达,可能与 II 类 MHC 分子抗原选择性分布在具有免疫功能的细胞有密切的关系。

对鱼类 MHC 基因的克隆表达进行分析以及与抗病力之间的关系探讨,对于阐明鱼类抗病力的遗传基础具有重要意义。Zhang 等^[33]克隆了牙鲆的 MHC-II β 基因,分析了牙鲆 42 个抗病个体和 42 个不抗病个体 MHC-II β 基因的分子多态性,并初步筛选出两个与牙鲆抗病相关的 MHC 等位基因。本实验已获得军曹鱼 MHC-II β 基因的全长 cDNA 序列,并初步研究了其多态性,对其多态性与抗病力之间的关系的研究以及筛选出抗病基因都值得我们今后进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Klein J. George Snell's first foray into the unexplored territory of the major histocompatibility complex. *Genetics*, 2001, 159(2): 435 - 439.
- [2] Hashimoto K, Nakanishi T, Kurosaw Y. Isolation of carp genes encoding major histocompatibility complex antigens. *PNAS*, 1990, 87(17): 6863 - 6867.
- [3] Ono H, Klein D, Vincek V, et al. Major histocompatibility complex class II genes of zebrafish. *PNAS*, 1992, 89: 11886 - 11890.
- [4] Glamann J. Complete coding sequence of rainbow trout Mhc II beta chain. *Scand J Immunol*, 1995, 41(4): 365 - 372.
- [5] Hordvik I, Grimholt U, Fosse V M, et al. Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding the MHC class II β chain in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Immunogenetics*, 1993, 37: 437 - 441.
- [6] Godwin U B, Antao A, Wilson M R, et al. MHC class II B genes in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev Comp Immunol*, 1997, 21: 13 - 23.
- [7] Chen S L, Zhang Y X, Xu M Y, et al. Molecular polymorphism and expression analysis of MHC class II B gene from red seabream (*Chrysophrys major*). *Dev Comp Immunol*, 2006, 30(4): 407 - 418.
- [8] 孟庆闻. 鱼类学. 上海:上海科学技术出版社, 1987, 261 - 263.
- [9] 勾效伟, 区又君, 廖锐. 我国军曹鱼研究现状. *海洋渔业* 2007, 29(1): 84 - 89.
- [10] 简纪常, 吴灶和, 陈刚, 等. 海水网箱养殖军曹鱼弧菌病原的分离及其特性. *中国兽医学报*, 2003, 23(4): 329 - 330.
- [11] 郭明元, 刘广锋, 冯娟. 1 株军曹鱼病原弧菌的鉴定及其系统发育树分析. *中国水产科学* 2006, 13(5): 823 - 828.
- [12] 常藕琴, 石存斌, 马红, 等. 军曹鱼淋巴囊肿的病理学研究. *中国水产科学* 2006, 13(6): 973 - 977.
- [13] Rene J M. Inference of structure and function of fish major histocompatibility complex (MHC) molecules from expressed genes. *Fish & Shellfish Immunology*, 1996, 6: 305 - 318.
- [14] Bakheet T, Frevel M, Williams B R G, et al. ARED: human AU-rich element-containing mRNA database reveals an unexpectedly diverse functional repertoire of encoded proteins. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(1): 246 - 254.
- [15] Shaw G, Kamen R. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell*, 1986, 46(5): 659 - 667.
- [16] Prapansak S, Tsuyoshi O, Ikuo H, et al. Cloning, characterization and expression of cDNA containing major

[1] Klein J. George Snell's first foray into the unexplored

- histocompatibility complex class I, II α , and II β genes of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science*, 2004, 70(2): 264–276.
- [17] Zhang Y X, Chen S L. Molecular Identification, Polymorphism, and expression analysis of major histocompatibility complex class II A and B genes of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Marine Biotechnology*, 2006, 8(6): 611–623.
- [18] Chen S L, Xu M Y, Hu S N, et al. Analysis of immunorelevant genes expressed in red seabream (*Chrysophrys major*) spleen. *Aquaculture*, 2004, 240: 115–130.
- [19] Buonocore F, Randelli E, Casani D, et al. Molecular cloning, differential expression and 3D structural analysis of the MHC class-II β chain from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23(4): 853–866.
- [20] Sultmarm H, Mayer W E, Figueroa F, et al. Organization of Mhc class II B genes in the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Genomics*, 1994, 23(1): 1–14.
- [21] Cosson P, Bonifacino J S. Role of transmembrane domain interactions in the assembly of class II MHC molecules. *Science*, 1992, 258: 659–662.
- [22] Brown J H, Jardetzky T S, Gorga J C, et al. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature*, 1993, 364: 33–39.
- [23] Scharsack J P, Kalbe M, Schaschl H. Characterization of antisera raised against stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) MHC class I and class II molecules. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23: 991–1002.
- [24] Walker R B, Mc Connell T J, Walker R A. Variability in an MHC class II beta chain encoding gene in striped bass (*Morone saxatilis*). *Dev Comp Immunol*, 1994, 18(4): 325–342.
- [25] Ono H, O'Huigin C, Vincek V, et al. Exon-intron organization of fish major histocompatibility complex class II B genes. *Immunogenetics*, 1993, 38: 223–234.
- [26] Beck S, Kelly A, Radley E, et al. DNA sequence analysis of 66 kb of the human MHC class II region encoding a cluster of genes for antigen processing. *J Mol Biol*, 1992, 228(2): 433–441.
- [27] Acha-Orbea H, Scarpellino L. Nonobese diabetic and nonobese nondiabetic mice have unique MHC class II haplotypes. *Immunogenetics*, 1991, 34: 57–59.
- [28] Hosomichi K, Miller M M, Goto R M, et al. Contribution of mutation, recombination, and gene conversion to chicken MHC-B haplotype diversity. *J Immunol*, 2008, 181(5): 3393–3399.
- [29] Juul-Madsen H R, Glumunio J, Madsen H O, et al. MHC class II beta-chain expression in the rainbow trout. *Scand J Immunol*, 1992, 35: 687–694.
- [30] Koppang E O, Lundin M, Press C M, et al. Differing levels of Mhc class II B chain expression in a range of tissues from vaccinated and non-vaccinated Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 1998, 8: 183–196.
- [31] 张玉喜, 陈松伶. 大菱鲆 MHC II B 基因全长 cDNA 的克隆与组织表达分析. *高技术通讯*, 2006, 16(8): 859–863.
- [32] Ono H, O'Huigin C, Vincek V, et al. New beta chain-encoding Mhc class II genes in the carp. *Immunogenetics*, 1993, 38: 146–149.
- [33] Zhang Y X, Chen S L, Liu Y G, et al. Major histocompatibility complex class II B allele polymorphism and its association with resistance/susceptibility to *Vibrio Anguillarum* in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Mar Biotech*, 2006, 8(6): 600–610.