

尼罗罗非鱼 MHC II A 基因的克隆、表达及多态性分析

周芬娜, 董忠典, 李同明, 傅咏, 王慧*

(山东农业大学动物科技学院, 山东 泰安 271018)

摘要: 为进一步了解鱼类 MHC II A 基因的特点及其在免疫反应中的功能,采用同源克隆、RACE-PCR、巢式 PCR 等技术,从健康的尼罗罗非鱼体获得 1 205 bp 的 MHC II A 基因 cDNA 全序列(Orni-DBA-0101, Genebank 登录号: JF719813)及 1 388 bp 的基因组序列。序列分析发现,尼罗罗非鱼 MHC II A 基因含 4 个外显子和 3 个内含子,开放阅读框长 720 bp,编码 239 个氨基酸。从 4 尾尼罗罗非鱼中共得到 8 条不同的 cDNA 序列,分别编码不同的氨基酸序列。氨基酸序列比对后发现,序列间存在丰富的多态性,且主要集中在 α -1 区,多态性位点数远远高于半滑舌鲷 MHC II A 基因。生物信息学分析表明,尼罗罗非鱼 MHC II A 编码的蛋白质分子包含 1 个信号肽、2 个胞外结构域、1 个跨膜区和 1 个胞质区,存在 4 个保守的半胱氨酸残基以及丰富的磷酸化位点,与其他物种的相似性为 23%~65%。RT-PCR 结果表明,MHC II A 基因在脾、肾、肠、鳃、性腺、肝、心脏表达量很高,在鳃和肌肉中表达量最低。人工感染嗜水气单胞菌后,肝、脾、肾、鳃、肠 5 个组织中 MHC II A 基因的 mRNA 水平均发生了不同程度的变化,提示 MHC II A 分子作为一种重要的免疫因子,在清除病原的免疫反应中起着重要作用。

关键词: 尼罗罗非鱼; 表达; 多态性; 基因; 克隆; MHC

中图分类号: Q785; S917.4

文献标志码: A

主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)是与免疫功能密切相关的一组紧密连锁的基因群,定位于动物或人某对染色体的特定区域,被认为是一组重要的免疫应答基因。其编码的分子表达于不同细胞表面,参与抗原递呈,制约细胞间相互识别及诱导免疫应答^[1]。大量研究表明,MHC 与许多疾病的易感性密切相关,分析鉴定并克隆出 MHC 基因,对从遗传上控制疾病、促进抗病转基因动物研究有重要意义。

尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)俗称非洲鲫,属于鲈形目(Perciformes)、丽鱼科(Cichlidae)、罗非鱼属(*Tilapia*),原产于非洲约旦的坦噶尼喀湖,具有适应性强、生长快、产量高、肉质细嫩、营养价值高、抗病力强等优点^[2]。自 1978 年引入我

国以来,尼罗罗非鱼养殖业在我国迅速兴起,目前已成为主要的养殖和出口罗非鱼品种之一^[3]。近几年来,由于片面强调经济效益,养殖规模迅速增长,养殖密度也不断提高,导致病害种类、发病频率及危害性逐年增加,其中暴发性细菌性败血症作为主要病害之一,严重制约着罗非鱼养殖业的健康发展。嗜水气单胞菌作为主要病原菌之一,可引起罗非鱼体表和内脏器官溃烂并引发严重出血的急性败血症^[4]。

本研究以尼罗罗非鱼为研究对象,采用同源克隆、RACE 等技术获得了 MHC II A 基因的 cDNA 全长及基因组序列,生物信息学分析其核苷酸及氨基酸序列,并预测了蛋白质的结构和功能,同时应用 RT-PCR 技术分析了健康鱼体 12 个组织中

收稿日期: 2011-12-25

修回日期: 2012-03-08

资助项目: 中国博士后创新基金项目(20100481295); 山东省自然科学基金(ZR2009DQ021, Y2008D32); 山东省博士后创新基金项目(200703044); 国家重大专项科技计划项目(2001BA804A29)

通讯作者: 王慧, E-mail: wanghui2328@sdau.edu.cn

MHC II A 基因 mRNA 表达水平的差异性及其人工感染嗜水气单胞菌后肝、脾、肾、鳃、肠 5 个组织中 mRNA 水平的变化, 以期为进一步研究 MHC 的生物学活性、功能和表达调控以及揭示罗非鱼免疫抗感染机制奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

尼罗罗非鱼 60 尾, 由泰安市岱岳区乔沟温泉水产养殖试验场提供, 体质量(350±50) g。实验室暂养 1 周, 确定健康无病后开始试验。分别取试验鱼血液、心脏、肌肉、肝、脾、肾、鳍、脑、胃、肠、鳃及性腺组织, 放入 1.5 mL 的 RNase-free 离心管中, 置于液氮保存备用。

1.2 病原菌分离及人工感染

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)由本实验室分离, 进一步鉴定后, 于 LB 培养基中 28 °C 条件下培养至对数生长期, 离心收集菌体, 经 0.65% 无菌生理盐水洗涤并配制成细菌悬液。经预试验后调整菌液浓度为 9×10^7 CFU/mL。随机选取 40 尾健康的尼罗罗非鱼, 采用腹腔注射法进行人工感染, 每尾注射剂量为 0.2 mL。分别在人工感染后 5、24、48、72 及 96 h 随机选取 3 尾个体, 分别取其肝、脾、肾、鳃、肠组织, 液氮冻存。

1.3 实验方法

DNA 分离及总 RNA 的提取 参照天根 DP319 试剂盒说明书提取尼罗罗非鱼血液基因组, 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。Trizol 法提取总 RNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 分光光度计测定 RNA 浓度及 OD260/OD280 比值, 要求 RNA 样品 OD260/OD280 比值在 1.8~2.0 方可使用, 否则重新提取。DNA 及 RNA 样品均置于 -70 °C 保存。

cDNA 模板的制备 根据所测 RNA 浓度, 稀释到 1 μg/μL, 每个样品取 2 μg 于 RNase-free 离心管中, 加 1 μL Oligo dT-RA, 加入经 DEPC 处理的无菌水至 11 μL, 70 °C 温育 5 min 后立即冰浴 2 min, 然后依次加入: 5×Reaction Buffer 4 μL, dNTP(10 mmol/L) 2 μL, M-MLV(Fermentas 公司, 200 U/μL) 1 μL, DEPC 水补足 20 μL, 42 °C 加热 1 h, 之后 95 °C 变性 5 min 以灭活反转录酶, 获得的产物即为 cDNA 第一链, -20 °C 保存用于 MHC II A

基因中间序列及 3'端 RACE 扩增。

5'端模板制备采用 TDT 法, 取上述样品中肝脏组织的 cDNA 9 μL, 加入 TDT Buffer 2.5 μL, dCTP 0.5 μL, 98 °C 加热 1 min 后冰上骤冷, 加入 0.5 μL TDT(Fermentas 公司), 37 °C 温育 10 min, 之后 70 °C 加热 10 min 使 TDT 失活, 加水至 100 μL, -20 °C 保存备用。

MHC II A 中间片段的获得 从 NCBI 上下载鲈形总目鱼类的 MHC II A 氨基酸全序列(Genebank 登录号: AAB67859.1、AAF65681.1、AAW21980.1), 用 Clustal X 软件进行比对, 找出无间隙氨基酸序列保守区段, 遵循引物设计原则, 用 Primer 5.0 和 DNAMAN 软件设计一对简并引物 F1 和 R1(表 1), 以肝脏 cDNA 为模板进行 MHC II A 基因中间片段的 PCR 扩增。反应条件为: 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。

cDNA 全长及基因组序列扩增 根据已获得的 cDNA 中间序列, 分别设计用于扩增 3'端和 5'端的巢式引物 GSP3、NGSP3 和 GSP5、NGSP5。以肝脏 cDNA 为模板, 用正向引物 GSP3、NGSP3 及接头引物 Oligo dT-AP 和 RA, 进行 3'-RACE 扩增。利用反向引物 GSP5、NGSP5 及引物 AAP 和 AUAP, 以加尾的肝脏 cDNA 为模板, 进行 5'-RACE 扩增。一次 PCR 产物稀释 50 倍后作模板进行二次 PCR, 同时采用降落 PCR 以提高反应的特异性。PCR 反应条件为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 50 s, 72 °C 50 s, 72 °C 1 min, 5 个循环; 94 °C 50 s, 70 °C 50 s, 72 °C 1 min, 5 个循环; 94 °C 50 s, 68 °C 50 s, 72 °C 1 min, 5 个循环; 94 °C 50 s, 66 °C 50 s, 72 °C 1 min, 20 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。将中间片段、3'-RACE、5'-RACE 序列片段进行拼接, 根据拼接后的序列设计编码区引物 ORF-F、ORF-R, 进行 cDNA 及 DNA 编码区扩增。

分别以 4 尾健康尼罗罗非鱼的肝脏 cDNA 为模板, 以 ORF-F、ORF-R 为引物, 进行 MHC II A 基因编码区全长扩增及多态性分析。反应条件为 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 62 °C 30 s, 72 °C 1 min, 38 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 保存。得到的 cDNA 编码区序列与 5'-UTR 及 3'-UTR 序列拼接得到 cDNA 全长。以血液基因组为模板, 利用引物 ORF-F、ORF-R 进行基因组序列扩增, 反应

表 1 本研究所用的主要引物
Tab. 1 Primers used in the study

引物名称 primer	引物序列 (5'-3') primer sequence	扩增目标 amplification target
F1	5'-GATCTGTCA YGTGACTGGTTTC-3'	cDNA 片段扩增
R1	5'-AATCAKCTGCACTCGTTYCYTTTG-3'	amplification of cDNA fragment
GSP3	5'-CCAGCACCAGCGTTCCTATCCCA-3'	3'-RACE
NGSP3	5'-TGGGTCTGACTCTCGGTCTGTTCCGGTG-3'	3'-RACE
Oligo dT-AP	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T) ₃₀ VN-3'	3'-RACE
AP	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'	3'-RACE
GSP5	5'-CAACAGCCACACCGAACAGACCGA-3'	5'-RACE
NGSP5	5'-AGCCTGAGCAGACGCCTCCACCTT-3'	5'-RACE
AAP	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACG(G) ₁₄ -3'	5'-RACE
AUAP	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACG-3'	5'-RACE
ORF-F	5'-ATGAAAGATGAAGGAGCTGCTC-3'	编码区全长扩增
ORF-R	5'-GCTGCACTCGTTTCCTTTGA-3'	amplification of complete ORF
F2	5'-TGTATGGACTGGATG-3'	半定量 RT-PCR
R2	5'-GACCTGTTGATTAGC-3'	semi-quantitative RT-PCR
<i>β-actin</i> -F	5'-CCATTGAGCACGGTATTG-3'	<i>β-actin</i> 扩增
<i>β-actin</i> -R	5'-CTGTGGTGGTGAAGGAGTAG-3'	amplification of <i>β-actin</i>

注: 引物序列中 Y 代表 C 或 T, K 代表 G 或 T。

Notes: Y represents C or T, K for G or T in the primer sequence.

条件为 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 50 s, 62 °C 50 s, 72 °C 2 min 30 s, 38 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。

PCR 产物的纯化、克隆及测序 取 PCR 产物 50 μL, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 用 E.Z.N.A.™ Gel Extraction Kit(OMEGA)回收试剂盒回收目的片段, 并按说明书进行纯化。将回收产物连接至载体 PJET (Fermentas), 22 °C 连接 5 min, 转化到大肠杆菌 DH5α (Tiangen), 37 °C 培养 12 h, 用特异引物进行菌落 PCR 验证后, 每个个体至少选取 8 个阳性菌落送交上海生物工程技术有限公司测序。

生物信息学分析 登陆 NCBI 用 BLAST 程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对测序结果进行同源性检索。DNASTAR 等软件统计序列总长、各碱基百分比、GC 含量等信息, 确定其开放阅读框进而预测氨基酸序列。使用在线软件 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对氨基酸序列进行结构和功能域分析, 用 SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行信号肽的预测。蛋白质的二级结构经 predictprotein (<https://www.predictprotein.org/>)进行在线预测, 3-D

结构利用 Swiss-model (<http://swissmodel.expasy.org/>)服务器^[5]进行预测。使用 Clustal W 软件将尼罗罗非鱼及其它物种 MHC II A 基因的氨基酸序列进行多重比对^[6], 然后用 MEGA 4.1 软件构建 NJ 系统发育树^[7]。应用 NCBI 上的 Spidey 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Ostell/Spidey/>)进行基因组及 cDNA 序列对比分析基因组结构。

组织表达特异性分析 依据获得的序列设计特异性引物 F2 和 R2, 随机选取 3 尾试验鱼, 采用 RNA 混池法分别以各组织(心、肌肉、肝、脾、肾、鳍、脑、胃、肠、鳃及性腺)cDNA 为模板, 进行半定量 PCR。另外根据尼罗罗非鱼 *β-actin* 序列(Genebank 登陆号: AY116536)设计一对引物 *β-actin*-F 和 *β-actin*-R 作内参(表 1)。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 缓冲体系为 0.5×TBE, 电压 120 V, 凝胶成像系统观察并拍照。

2 结果

2.1 MHC II A 基因全长 cDNA 的获得

以尼罗罗非鱼肝脏 cDNA 为模板, 采用简并引物 F1 和 R1, PCR 扩增得到一条 350 bp 左右的条

带,符合预期大小。3'-RACE 及 5'-RACE 分别得到 500 bp、670 bp 左右的条带。产物经克隆测序后发现,3'和 5'端的序列均存在多态性,根据所得序列重新设计 1 对引物 ORF-F 和 ORF-R 扩增 MHC II A 编码区。PCR 扩增及克隆测序后得到编码区全长序列,经 BLAST 比对后,确认为尼罗罗非鱼 MHC II A 基因序列,与所得到的 3'和 5'序列拼接后获得 1 205 bp 的 cDNA 全序列(图 1),根据国际命名规则将其编码的氨基酸序列命名为 Orni-DBA*0101。等位基因的命名基于氨基酸序列进行,其中 Orni 表示种名,DBA 表示 MHC II A 基因,后面有 4 位阿拉伯数字,前两位表示主型,后面两位表示亚型,

氨基酸变异数小于 5 的被认为是一种亚型^[8-9]。同时,每个等位基因要从两个不同的个体或者同一个体的两次 PCR 得到至少 3 次才可以确定^[10]。

经 DNASTAR 分析发现,尼罗罗非鱼 MHC II A cDNA 全序列含 50 bp 的 5'UTR、720 bp 的 CDS(包括终止密码子)和 435 bp 的 3'UTR 区,3'UTR 区具有真核生物共有的加尾信号 AATAAA 和 30 bp 的 PolyA 尾巴。

2.2 MHC II A 基因组序列的获得

以尼罗罗非鱼血液基因组为模板,采用引物 ORF-F 和 ORF-R 进行 PCR,结果得到一条 1 388 bp 的目的片段。克隆测序后进行 Blast 验证,确定为

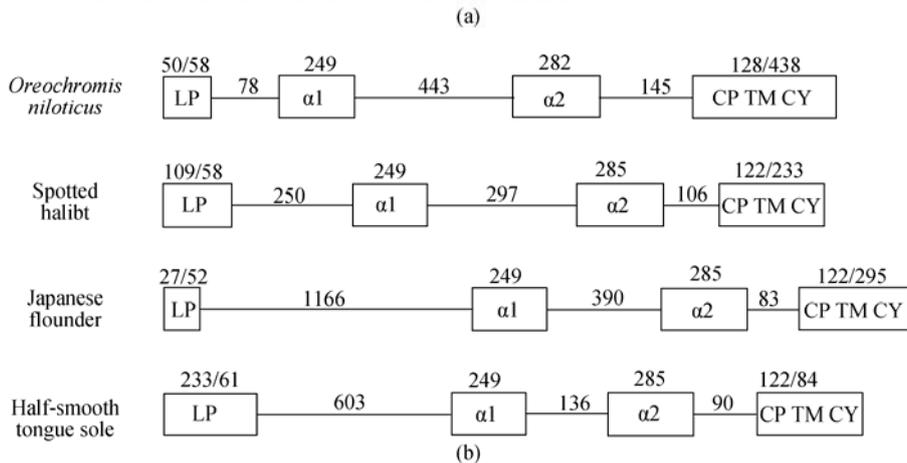


图 1 尼罗罗非鱼 MHC II A 基因 cDNA 与基因组序列(a)及基因组结构(b)

大写字母表示外显子序列,小写字母表示内含子序列,*表示终止密码子,黑色的框表示 poly(A)及加尾信号。---表示 N-糖基化位点,___表示酪蛋白激酶 II 磷酸化位点,无色的方框表示蛋白激酶 C-磷酸化位点,浅灰色阴影表示酪氨酸激酶磷酸化位点,___表示豆蔻酰化位点,===表示免疫球蛋白和主要组织相容性复合体蛋白信号。

Fig. 1 cDNA and genomic sequence (a) and the schematic illustration (b) of *O. niloticus* MHC II A gene

Exons are in uppercase and introns are in lowercase. The stop codon is indicated by an asterisk. The canonical polyadenylation signal and the poly(A) are in the dark shadow. N-linked glycosylation site is underlined with ---, casein kinase II phosphorylation sites are underlined with ___, Protein kinase C phosphorylation sites are in the normal frame, tyrosine kinase phosphorylation site is in the light shadow, N-myristoylation sites are underlined with ____, immunoglobulin and major histocompatibility complex protein signature is

underlined with==.

尼罗罗非鱼 MHC II A 基因组序列。将得到的基因组 DNA 序列与 cDNA 序列 Orni-DBA*0101 比对后, 得知该基因是由 4 个外显子和 3 个内含子组成(图 1)。外显子的拼接位点非常保守, 所有拼接位点都遵守 GT-AG 规则。

2.3 氨基酸序列分析

序列分析发现, Orni-DBA*0101 中开放阅读框长 720 bp, 编码 239 个氨基酸, 蛋白质分子量为 26.15 ku, 理论等电点 $pI=4.71$ 。氨基酸组成中, 正电荷残基(Arg+Lys)20 个, 负电荷残基(Asp+Glu)31 个, 整个蛋白质带负电荷。二级结构分析发现, 尼罗罗非鱼 MHC II A 与经典 MHC II A 分子一样, 包含 1 个信号肽、2 个胞外结构域、以及 1 个跨膜区和 1 个胞质区, 在结构上具有保守的半胱氨酸残基、丰富的磷酸化位点等。

使用在线软件 SMART 对氨基酸序列进行结构功能域分析, 结果显示其中 22~102 位为 α -1 功能区, 121~191 位为 α -2 功能区(IGC 区), 211~233 位为蛋白质的跨膜区。Signal P 3.0 预测结果显示, 蛋白质存在 1 个由 18 个氨基酸组成的信号肽(MKMKELLLFLSCVLCVSA), 信号肽和 α -1 区的分界点在第 18 和 19 位氨基之间(VSA-DV)。

二级结构经 predictprotein 在线预测, 结果表明, 在 α -2 上的第 137 位上含有 1 个 N-糖基化位点(N-X-S/T); 第 148 位上存在一个 O-糖基化位点; 在第 162、166、201 位上共有 3 个蛋白激酶 C-磷酸化位点(S/T-X-R/K); 在第 31、67、112、167 位上共存在 4 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(S/T-X-X-D/E); 在 α -1 的第 66 位上含有 1 个酪氨酸激酶磷酸化位点(R/K-X-X-D/E-X-X); 在 29、149、207、215、224 位上共含有 5 个 N-豆蔻酰化位点(G-E/D/R/K/H/P/F/Y/W-X-X-S/T/A/G/C/N-G/I/T); 在 α -2 功能区的 179 位上含有免疫球蛋白和主要组织相容性复合体蛋白信号(F/Y-X-C-X-V/A-X-H)。另外, 在 α -1 区的 30、84 位和 α -2 区的 126、181 位发现 4 个保守的半胱氨酸残基。二级结构预测结果还表明, 尼罗罗非鱼 MHC II A 蛋白分子含有 α 螺旋(Alpha helix, 42 个 AA)17.57%, β 折叠(Extended strand, 86 个 AA)35.98%, β 转角(Beta turn, 13 个 AA)5.44%, 无规则卷曲(Random coil, 98 个 AA)41.00%, 说明尼罗罗非鱼 MHC II A 编码的蛋白质为混合

型蛋白。

用 DNASTAR 软件的子程序 Protean 预测尼罗罗非鱼 MHC II A 蛋白的亲水性、柔韧性、抗原性和表面可能性, 结果显示, Kyte-Doolittle 方案预测的亲水性区域集中在 32-59、93-104、139-164 和 200-207 区域, 亲水性氨基酸残基所占比例大于疏水性残基, 推测该蛋白为亲水性的; Jameson-Wolf 方案预测抗原性显示, 该蛋白具有较多的 B 细胞抗原结合位点, 且主要集中于 29-57、82-105、140-162、174-179、196-210 区域, 抗原表位区域与通过 Karplus-Schulz 方案预测的柔韧性区域以及通过 Emini 方案预测的表面可能区域存在大量的重叠。

利用 SWISS-MODEL 对空间结构进行预测, 获得其三维空间构像(图 2)。发现尼罗罗非鱼 MHC II A 基因具有经典的 MHC 空间结构: N 端由 1 个 α 螺旋与 4 个反相平行的 β 折叠构成多肽结合区, C 端由 2 个反向平行的三明治结构组成。

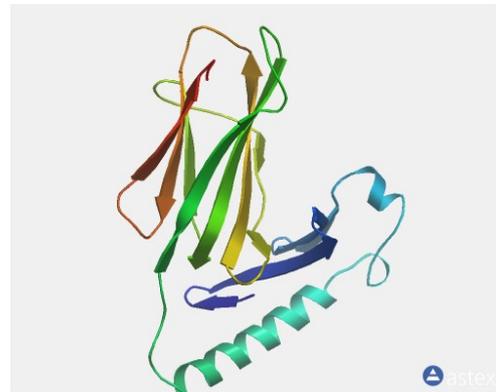


图 2 尼罗罗非鱼 MHC II A 蛋白分子的空间结构预测图

Fig. 2 Prediction of schematic dimensional structure of *O. niloticus* MHC II A gene

2.4 多态性分析

分别以 4 尾健康尼罗罗非鱼的肝脏 cDNA 为模板, 以 ORF-F、ORF-R 为引物进行 PCR 扩增以及克隆测序, 共得到 32 条有效序列。其中, 4 个个体分别得到 4、1、3、1 条不同的 cDNA 序列。分析发现, 共得到 8 条不同的 cDNA 序列, 编码 8 条不同的氨基酸序列, 氨基酸残基数为 239~240 个, 根据命名法分别命名为 Orni-DBA*0101-0701。8 条氨基酸序列间对比(图 3)发现, 240 个氨基酸残基

中共有 101 个变异位点, 简约性信息位点 59 个。 其中 53 个变异发生在 α -1 结构域, 约占变异位点

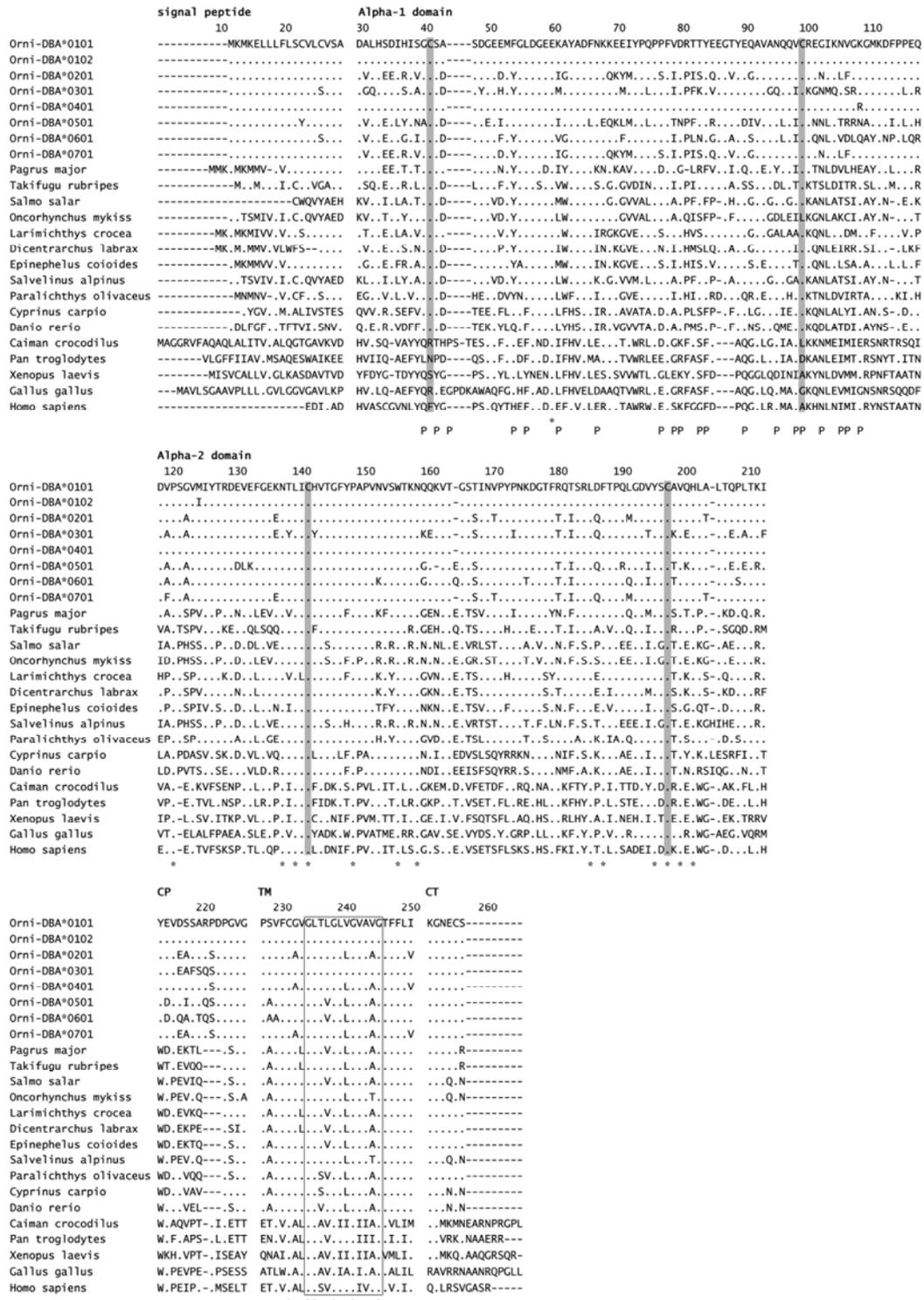


图 3 尼罗罗非鱼 MHC II A 基因与其物种氨基酸序列的多重对比

••表示相同的氨基酸, ---表示氨基酸的缺失, *表示保守的氨基酸, P 表示多肽结合位点, 阴影表示 4 个保守的半胱氨酸残基, 方框表示 GXXXGXXGXXXG 框, 所用序列的 GenBank 登录号在表 2 中列出。

Fig. 3 Alignment of the deduced amino acid sequences of *O. niloticus* MHC II A with other species

Identity is indicated by dots(**), and gaps used to maximize the alignment are shown by dashes(---). Conserved cysteine residue are indicated in shadow, conserved amino acid residues are indicated with an asterisk. P indicates the correlative amino acid that combines the peptide, the box designates the motifs of GXXXGXXGXXXG. The accession numbers of these

sequences are the same with the table 2.

总数的 53%, 而信号肽区及跨膜区、胞质区的变异位点数则相对较少。

2.5 同源性及系统进化分析

将得到的 8 条氨基酸序列分别与 GenBank 中其他物种比较(图 3), 并通过软件 Clustal W 计算同源性。结果显示尼罗罗非鱼 MHC II A 基因与其他物种的相似性为 23%~65%(表 2), 其中与同为鲈形目的大黄鱼相似性最高为 65%, 而与非洲爪蟾、红原鸡相似性最低分别为 24%和 23%, 这与尼罗罗非鱼的分类地位是相符的。

选择以上物种的 MHC II A 蛋白质序列, 用 MEGA 4.1 软件, NJ 法重复 1 000 次构建 bootstrap 验证的系统发育树(图 4)。结果显示: 所有硬骨鱼类形成一个分支, 而两栖类、爬行类、鸟类与哺乳类聚在另外一支, 支持了硬骨鱼类单系起源的说法; 在硬骨鱼类内部, 鲤形目聚为一支并位于硬骨鱼类的基部, 所有鲈形目先聚为一支再与鲉形目、鲑形目聚为一支, 鲑形目聚为一支, 鲑形鱼类聚为另一支。另外, 尼

表 2 尼罗罗非鱼 MHC II A 基因氨基酸序列与其他物种相似性

Tab. 2 MHC II A amino acid identity of *O. niloticus* and other vertebrates

物种名 species name	GenBank 登录号 GenBank accession no.	相似性/% identity
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	ABV48906	65
狼鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	ABH09446	63
斜带石斑鱼 <i>Epinephelus coioides</i>	ACU46019	63
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	BAD13364	62
真鲷 <i>Pagrus major</i>	AAW21980	61
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	BAH30162	59
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	CAB96451	55
红点鲑 <i>Salvelinus alpinus</i>	ACI05079	54
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	CAD27723	54
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	AAA16369	49
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	CAA64708	48
黑猩猩 <i>Pan troglodytes</i>	ACL00578	30
人类 <i>Homo sapiens</i>	AAC41950	29
中美凯门鳄 <i>Caiman crocodilus</i>	AAF99282	27
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	NP_001079971	24
红原鸡 <i>Gallus gallus</i>	AAR14674	23

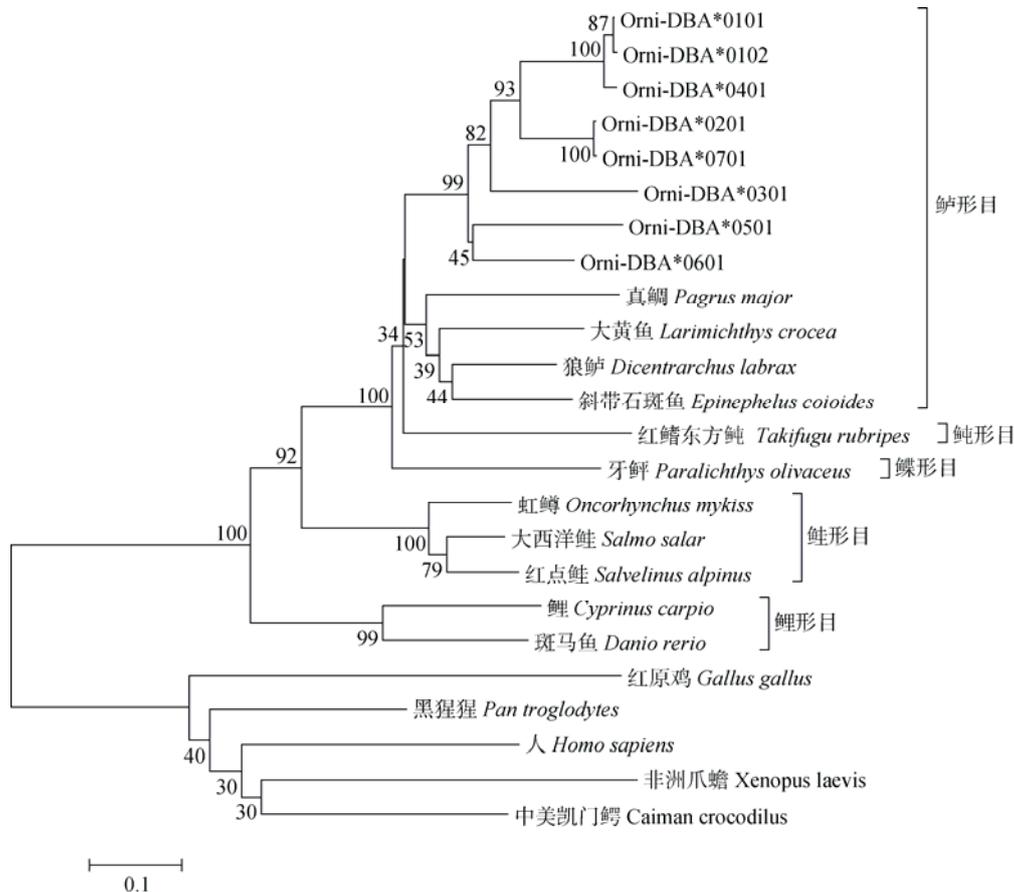


图 4 尼罗罗非鱼与其他物种 MHC II A 基因的系统进化树

分支上的数字表示 bootstrap 验证中该分支的可信度。

Fig. 4 Phylogenetic tree of MHC II A gene from *O. niloticus* and other vertebrates

Number of each note shows confidence level of bootstrap confirmation.

罗罗非鱼不同的等位基因先聚为一支，再与其他物种聚合，这也说明了多基因座的形成要早于物种形成，可以作为研究种内群体分化及良种选育的较好的指标，这与丁少雄等^[11]的研究也是相符的。

2.6 MHC II A 基因的组织表达分析

以普通反转录合成的第一链 cDNA 为模板，以 β -actin 为对照，应用 RT-PCR 法分析了 MHC II A 基因在健康尼罗罗非鱼体不同组织中的表达差

异(图 5-a)。结果表明 12 个组织中均扩增出 MHC II A 基因目的片段，但表达量有所不同，在脾、肾、肠、鳃、性腺、肝、心脏表达量高，脑、鳍、胃组织中表达程度中等，而在鳔和肌肉中表达量最低。

对人工感染嗜水气单胞菌后不同时期 MHC II A mRNA 的水平检测表明，肝、脾、肾、鳃、肠组织中的 MHC II A mRNA 水平均发生了不同程度的变化(图 5-b)：人工感染 5 h 后肝、脾、肾、

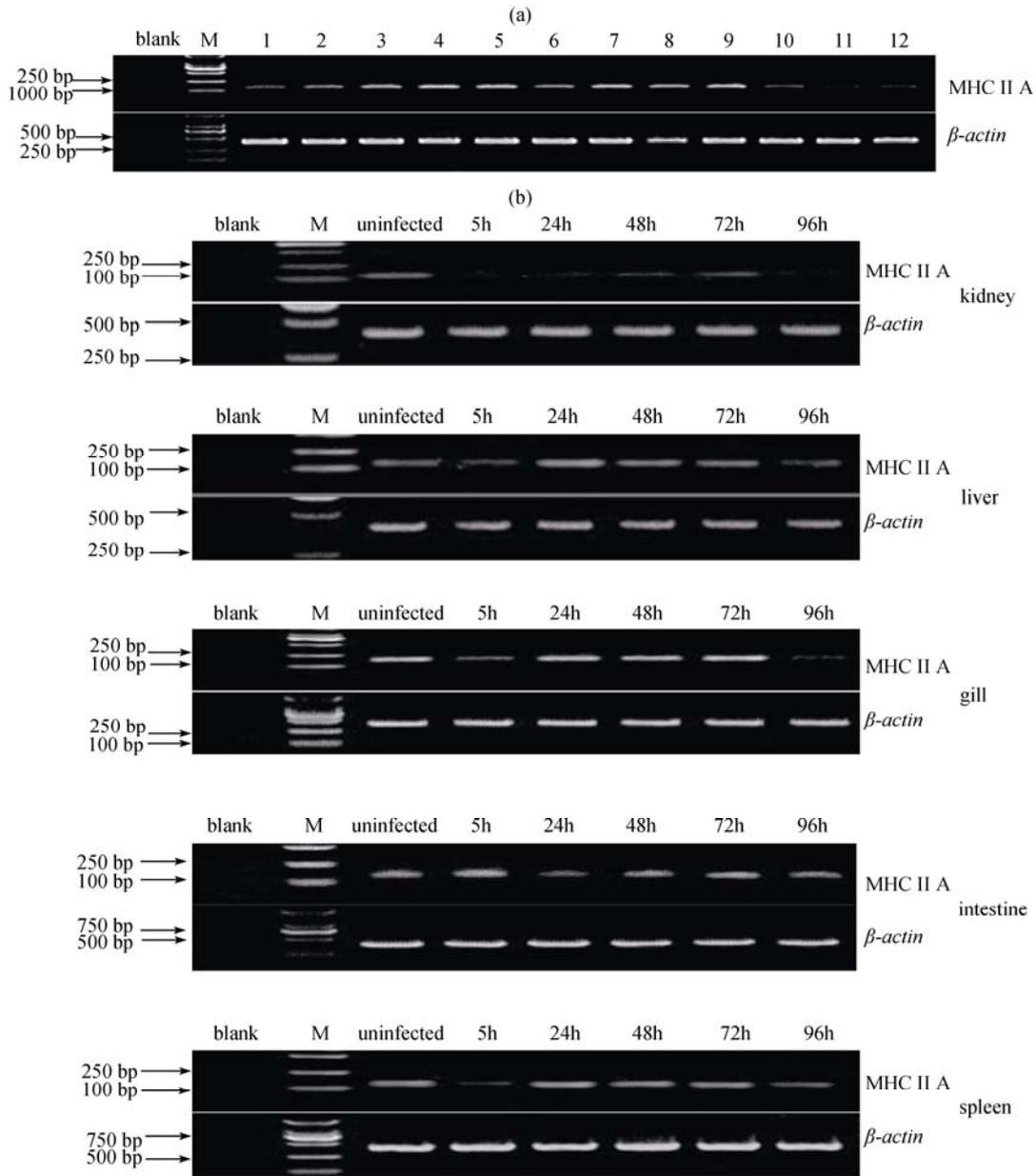


图 5 尼罗罗非鱼 MHC II A 基因的组织表达

(a)正常鱼体不同组织;(b)同一组织不同时期。M: DL2000 DNA Marker; 1: 脑; 2: 鳍; 3: 脾; 4: 肾; 5: 肠; 6: 性腺; 7: 肝; 8: 心; 9: 鳃; 10: 胃; 11: 肌肉; 12: 鳔。

Fig. 5 RT-PCR analysis of class II A gene expression in *O. niloticus*

(a) various tissues of normal *O. niloticus*; (b) challenged with *A. hydrophila* sampled at 5h, 24 h, 48 h, 72 h and 96 h after challenge. M: DL2000 DNA Marker. 1: brain; 2: fins; 3: spleen; 4: kidney; 5: intestine; 6: gonad; 7: liver; 8: heart; 9: gill; 10: stomach; 11: muscle; 12: swimbladder.

鳃中 mRNA 水平均发生明显的下降, 5~72 h 呈上升趋势, 72 h 以后又发生了轻微的下。而在肠组织中, 注射后 5~24 h 发生下降又回到初始水平, 48 h 之后的 mRNA 水平基本维持在同一水平。

3 讨论

3.1 尼罗罗非鱼 MHC II A 基因的氨基酸序列分析

将获得的尼罗罗非鱼 MHC II A 序列与其他物种进行序列比对发现, 几乎所有物种的 α -1 及 α -2 结构域都存在 4 个保守的半胱氨酸残基及 N-X-S/T 糖基化位点。有研究表明, 半胱氨酸残基的存在与分子内二硫键的形成有关, 而 N-X-S/T 糖基化位点的存在则会影响 MHC II 类分子 α - β 二聚体的形成以及 MHC 分子与 T 细胞的相互作用^[12-13]。序列对比还发现所有物种间的跨膜区都是相对保守的, 且均有 GXXGXXXGXXXXXXG 框的存在, Cosson 等^[14]和 Lemmon 等^[15]推测, 此框中的 G 残基对 α - β 二聚体的形成起重要作用。二级结构预测结果还表明, 尼罗罗非鱼 MHC II A 基因的 α -2 功能区存在 1 个组成免疫球蛋白和主要组织相容性复合体蛋白信号区(F/Y-X-C-X-V/A-X-H), 该信号区是 T 细胞表面 CD4⁺ 分子特异结合的部位, 对呈递抗原并引起特异性免疫反应起重要作用, 区域中的氨基酸呈现出较高的保守性, 属类免疫球蛋白超家族, 这对维持 MHC 的免疫功能是必需的^[16]。

蛋白质的二级结构与其抗原表位分布有较大关系, 可被作为确定抗原表位的辅助手段。 α 螺旋与 β 折叠结构规则, 有氢键维持不易变形, 且常位于蛋白质的内部, 很难与抗体嵌合, 因此很少有机会成为抗原表位所在区域, 而 β 转角和无规则卷曲多处于蛋白质的表面, 结构突出, 较易与抗体结合, 因而成为抗原表位的可能性较大^[17]。本研究获得的尼罗罗非鱼 MHC II A 蛋白质中 β 转角和无规则卷曲结构在二级结构中所占比例分别达到 5.44%、41.00%, 这也为确定尼罗罗非鱼 MHC 的抗原表位提供了有力证据。

3.2 尼罗罗非鱼 MHC II A 基因的多态性分析

氨基酸序列比对发现, MHC II A 基因的变异度相当大, 这种变异不仅存在于种间, 即使在种内

也较大。以 Orni-DBA*0101 为例, 其与其他物种的相似性为 23%~65%, 与种内其他序列的相似性分别为 99.58%、82.85%、77.82%、97.49%、71.97%、74.90%和 82.43%。实验获得的 8 条氨基酸序列间, 存在 101/240 个(42.08%)多态性位点, 其中 53 个发生在 α -1 结构域, 占 α -1 区氨基酸总数的 60.23%。Xu 等^[18]得到的 9 条半滑舌鳎 MHC II A 序列中共有 32/239 个(13.39%)多态性位点, 其中 22 个发生在 α -1 区, 仅占 α -1 区氨基酸总数的 25%。可以发现, MHC II A 基因的多态性主要集中在 α -1 功能区, 且尼罗罗非鱼 MHC II A 基因的多态性远远高于半滑舌鳎。

Graser 等^[19]通过对 3 种鲤科鱼类 MHC II A 基因的克隆测序及多态性分析指出, MHC II A 基因的多态性被限制在明显的功能性位点上, 且主要集中在多肽结合区(α -1 区)。徐田军等^[20]利用克隆测序技术得到了 30 个牙鲈 MHC II A 等位基因, 发现各等位基因的保守区和变异区的分布相同。可以推测多肽结合区是 MHC II A 基因结合多种外源性抗原多肽的分子基础, 这是与多肽结合区与抗原结合的功能相适应的^[21]。本研究得到了尼罗罗非鱼 MHC II A 基因的多肽结合区序列, 可以为后续进行尼罗罗非鱼的相关抗病性研究及筛选 MHC 针对不同病原的特定序列提供重要依据。

MHC II 类分子的功能主要是在免疫应答的初始阶段将外源性抗原片段递呈给 T 细胞。其结合和递呈抗原的能力可以决定一个组织的免疫能力, 从而影响机体对病原微生物的抵抗力。脊椎动物中 MHC 基因的多态性程度与其免疫应答强度和呈正相关, 多态性高的个体往往具有高的抗病能力^[22-26]。在常见的养殖鱼类中, 尼罗罗非鱼普遍被认为是具有高抗病性的种类, MHC 这种高度的多态性正与其高抗病性的特点相适应。丰富的多态性会使其在面对多种病原侵袭时, 表现出较强的抵抗力。

3.3 尼罗罗非鱼 MHC II A 基因的组织表达分析

MHC II 类分子主要在免疫系统的细胞类型上表达, 如 B 细胞、巨噬细胞和其他抗原递呈细胞等, 参与外源性抗原的呈递, 在细胞介导免疫和体液

免疫中起着重要作用。本研究通过 RT-PCR 分析发现, 尼罗罗非鱼 MHC II A 基因的 mRNA 在 12 个组织中均表达, 但是表达水平存在组织特异性: 在脾、肾、肠等组织中表达量较高, 在鳃和肌肉中表达量较低。类似的研究也表明不同鱼类 MHC IIA 的 mRNA 表达水平均存在组织特异性: 斑马鱼 (*Danio rerio*) MHC II A 基因^[27]在脾脏、肝胰腺、小肠和肾脏中高度表达; 大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*) MHC II A^[28]在鳃、脾、头肾、心脏、小肠和皮肤中表达较强, 在肌肉和性腺中表达最弱; 苏建明等^[29]在草鱼的脾脏、肾及血液中检测到了 MHC II A 基因较强的表达, 而在肌肉中没有检测到; 半滑舌鳎 MHC II A 基因^[18]在脾脏、肾脏以及胃中有较强的表达水平, 在性腺、眼、血液等组织中表达较弱; 圆斑星鲈 (*Verasper variegatus*)^[30]脾脏、肾脏、皮肤以及鳃中 MHC II A 表达量较高, 而在血液、肌肉和脑中表达量最低。这些结果充分说明, 鱼类 MHC II A 分子普遍较强的表达于免疫器官和组织中, 而在肌肉组织中表达量较低或不表达。对于鱼类来说, 脾脏和头肾是最重要的免疫器官, 肝脏和粘膜上皮组织等也是其重要的免疫防线, 肌肉组织的免疫功能则是较低的。可见, 鱼类 MHC II A 基因在不同组织中表达量的高低与其免疫细胞的分布有关, 也说明了脾、肾、肠等组织在鱼类免疫过程中起了重要作用。

对实验鱼人工感染嗜水气单胞菌后, RT-PCR 检测了 MHC II A 在肝、脾、肾、鳃、肠组织中的 mRNA 表达水平变化, 发现其变化趋势比较一致, 整体呈现下降—上升—下降的变化。肝、脾、肾、鳃组织中, 在感染后 5 h 出现一个较低的转录水平, 之后上升, 至 72 h 左右又开始下降。在肠中较低的表达量出现在感染后 24 h, 随后同样出现上升后下降的趋势, 不同的是上升和下降的水平较轻微。Xu 等^[18]发现半滑舌鳎人工感染鳃弧菌后, 肝、脾、鳃组织中 MHC II A 的表达量在感染后 48 h 内达到高峰, 之后开始下降。Zhang 等^[28]对大菱鲂感染鳃弧菌后, 发现肝、肾、脾组织中 MHC II A 的表达量在感染后 72 h 内出现最低值, 表现为先下降后上升的趋势。这说明, 鱼体在受到外来病原侵袭时, 有一个免疫应答的过程, 肝、脾、肾、鳃等组织中 MHC II A 的表达水平会随之发生一系列的变化, 以保护机体免受伤害, MHC II A 基因的表

达量达到高峰, 正是机体在全力对抗病原入侵。同时也说明, MHC II A 分子作为一种重要的免疫因子, 在这些组织清除病原的免疫反应中起着重要作用, 可以考虑将其做为检测机体抗病力水平的一种指标。

参考文献:

- [1] Apanius V, Penn D, Slev P R, *et al.* The nature of selection on the major histocompatibility complex [J]. *Critical Reviews in Immunology*, 1997, 17(2): 179–224.
- [2] El-Sayed A F M. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis* spp [J]. *Aquaculture*, 1999, 179(1): 149–168.
- [3] 陈胜军, 李来好, 杨贤庆, 等. 我国罗非鱼产业现状分析及提高罗非鱼出口竞争力的措施[J]. *南方水产*, 2007, 3(1): 75–80.
- [4] 罗琳, 俞开康. 尼罗罗非鱼对嗜水气单胞菌的免疫反应[J]. *西南农业大学学报*, 1998, 20(1): 86–89.
- [5] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, *et al.* The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling [J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(2): 195–201.
- [6] Larkin M, Blackshields G, Brown N, *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0 [J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(21): 2947–2948.
- [7] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment [J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5(2): 150–163.
- [8] Davies C J, Andersson L, Mikko S, *et al.* Nomenclature for factors of the BoLA system, report of the ISAG BoLA nomenclature committee [J]. *Animal Genetics*, 1997, 28(3): 159–168.
- [9] Klein J, Bontrop R E, Dawkins R L, *et al.* Nomenclature for the major histocompatibility complexes of different species: a proposal [J]. *Immunogenetics*, 1990, 31(4): 217–219.
- [10] Kennedy L J, Ryvar R, Gaskell R M, *et al.* Sequence analysis of MHC DRB alleles in domestic cats from the United Kingdom [J]. *Immunogenetics*, 2002, 54(5): 348–352.
- [11] 丁少雄, 张之文, 杜佳莹, 等. 赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*) MHC II B 基因的克隆与表达多态性分析[J]. *海洋学报*, 2009, 31(2): 129–138.
- [12] Wei B Y, Buerstedde J M, Bell M, *et al.* Functional effects of N-linked oligosaccharides located on the external domain of murine class II molecules [J]. *The Journal of Immunology*, 1991, 146(7): 2358–2366.
- [13] Nag B, Passmore D, Kendrick T, *et al.* N-linked oligosaccharides of murine major histocompatibility complex class II molecule. Role in antigenic peptide

- binding, T cell recognition, and clonal nonresponsiveness [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(31): 22624–22629.
- [14] Cosson P, Bonifacino J S. Role of transmembrane domain interactions in the assembly of class II MHC molecules [J]. *Science*, 1992, 258(5082): 659–662.
- [15] Lemmon M A, Treutlein H R, Adams P D, *et al.* A dimerization motif for transmembrane α -helices [J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 1994, 1(3): 157–163.
- [16] Paterson S, Pemberton J M. No evidence for major histocompatibility complex-dependent mating patterns in a free-living ruminant population [J]. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 1997, 264(1389): 1813–1819.
- [17] Parham P, Ohta T. Population biology of antigen presentation by MHC class I molecules [J]. *Science*, 1996, 272(5258): 67–74.
- [18] Xu T J, Chen S L, Ji X S, *et al.* Molecular cloning, genomic structure, polymorphism and expression analysis of major histocompatibility complex class II A and II B genes of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 27(2): 192–201.
- [19] Graser R, O'huigin C, Vincek V, *et al.* Trans-species polymorphism of class II Mhc loci in danio fishes [J]. *Immunogenetics*, 1996, 44(1): 36–48.
- [20] 徐田军, 陈松林. 牙鲆 MHC-DAA 结构及其等位基因多态性[J]. *遗传*, 2009, 31(10): 1020–1028.
- [21] Srisapoome P, Ohira T, Hirono I, *et al.* Cloning, characterization and expression of cDNA containing major histocompatibility complex class I, II α and II β genes of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Fisheries Science*, 2004, 70(2): 264–276.
- [22] Bacon L. Influence of the major histocompatibility complex on disease resistance and productivity [J]. *Poultry Science*, 1987, 66(5): 802–811.
- [23] 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.
- [24] 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 Immunology*, 2007, 22(6): 707–717.
- [25] Croisetiere S, Tarte P, Berneteche L, *et al.* Identification of MHC class II β resistance/susceptibility alleles to *Aeromonas salmonicida* in brook charr (*Salvelinus fontinalis*) [J]. *Molecular Immunology*, 2008, 45(11): 3107–3116.
- [26] 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 & Comparative Immunology*, 2010, 34(10): 1042–1050.
- [27] Sülthmann H, Mayer W E, Figueroa F, *et al.* Zebrafish Mhc class II α chain-encoding genes: polymorphism, expression, and function [J]. *Immunogenetics*, 1993, 38(6): 408–420.
- [28] 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*) [J]. *Marine Biotechnology*, 2006, 8(6): 611–623.
- [29] 苏建明, 肖调义, 张学文, 等. 草鱼 MHC II α 基因 cDNA 的克隆与组织表达分析[J]. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 2009, 34(6): 673–679.
- [30] Li H, Jiang L, Han J, *et al.* Major histocompatibility complex class II A and II B genes of the spotted halibut *Verasper variegatus*: genomic structure, molecular polymorphism, and expression analysis [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2011, 37(4): 767–780.

Molecular cloning, expression and polymorphism analysis of major histocompatibility complex (MHC) class II A of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

ZHOU Fen-na, DONG Zhong-dian, LI Tong-ming, FU Yong, WANG Hui*

(College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: The major histocompatibility complex (MHC) class II A gene plays an important role in the immune response of teleost. In this study, the full length of MHC IIA cDNA and genomic sequences were obtained from healthy *Oreochromis niloticus* by homology cloning and rapid amplification of cDNA ends polymerase chain reaction (RACE-PCR). The full-length of cDNA sequence (Orni-DBA*0101, GenBank No: JF719813) comprises 1 205 bp with a 720 bp open reading frame (ORF) encoding a predicted protein with 239 amino acid residues. The genomic sequence was further identified to be 1 388 bp in length, which contains four exons and three introns. Eight class IIA alleles were identified from four healthy *O. niloticus* individuals. The variability that existed in the α -1 region was higher than that of half-smooth tongue sole. All the characteristic domains present in MHC IIA of other species could be found in *O. niloticus* MHC IIA sequence, including a leader peptide, two extracellular domains, a transmembrane region, and a cytoplasmic domain. In addition, there are four conserved cysteine residues and abundant phosphorylation sites. The deduced amino acid sequence shares 23% – 65% identity with those of other vertebrates. Semi-quantitative reverse transcriptase PCR (RT-PCR) demonstrated that *O. niloticus* MHC IIA mRNA was ubiquitously expressed in all tested tissues, which is highly expressed in spleen, kidney, gills, liver, heart, gonad and gut, however, lowly expressed in muscle and bladder. Challenge of *O. niloticus* with pathogenic bacteria, *Aeromonas hydrophila*, results in a significant change of the expression of MHC IIA in the liver, spleen, kidney, gills and intestine. The result implied that MHC IIA might play an important role in the immune system.

Key words: *Oreochromis niloticus*; expression; polymorphism; gene; cloning; major histocompatibility complex (MHC)

Corresponding author: WANG Hui. E-mail: wanghui2328@sdau.edu.cn