

赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*) MHC IIB 基因的克隆与表达多态性分析

尹雄¹, 张之文¹, 杜佳莹¹, 王军¹, 曾华嵩¹, 王颖¹, 陈晓峰²

(1 厦门大学海洋与环境学院, 福建 厦门 361005; 2 国家海洋局第三海洋研究所, 福建 厦门 361005)

摘要: 主要组织相容性复合体(Major histocompatibility complex, MHC)是脊椎动物体内重要的非特异性免疫基因之一。为了研究赤点石斑鱼的 MHC 基因的结构与表达特性, 本研究运用 RACE, Realtime PCR 及 SSCP 等技术, 首次成功克隆获得赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*) 非特异性免疫因子 MHC IIB 基因的 4 个 cDNA 全序列, 序列全长为 1 195~ 1 355 bp, 含有 3' UTR、启动子、多肽结合区(β 1)、IGC 区(β 2)、跨膜区、胞质区和 5' UTR 区, 编码区大小为 750 bp。氨基酸序列分析发现赤点石斑鱼 MHC IIB 分子具有经典 MHC 蛋白分子的空间结构, 在多肽结合区存在极其丰富的变异, β 1 区由 1 个 α 螺旋与 4 个反向平行的 β 折叠构成多肽结合区, β 2 区由多个 β 折叠构成 2 个反向平行的三明治结构。利用 SSCP 技术研究了赤点石斑鱼 MHC IIB 的表达多态性, 发现其在头肾、心、肝等 12 个组织器官中均能有效表达, 表达多态性也异常丰富。此外, 根据 MHC IIB 分子中相对保守的 IGC 区氨基酸序列构建了脊椎动物的系统进化树, 也表明了该分子的 IGC 区氨基酸序列可以作为研究鱼类物种间进化关系的良好标记。

关键词: 赤点石斑鱼; MHC IIB 基因; 多态性

中图分类号: S965 334

文献标识码: A

文章编号: 0253-4193(2009)02-0129-10

1 引言

主要组织相容性复合体(Major histocompatibility complex, MHC)是广泛存在于脊椎动物体内与免疫功能密切相关并编码免疫球蛋白样受体的高度多态基因群, 其编码产物是免疫系统中极为复杂且最具多态性的一类细胞表面转膜蛋白, 统称为 MHC 分子^[1-2]。各种动物 MHC 分子的作用基本相似, 许多与免疫有关的重要基因都在 MHC 位点上, 这使得 MHC 可以通过识别以及清除外源和内在抗原来参与调控动物机体免疫应答^[3-5], 在免疫学上具有极为重要的意义。

赤点石斑鱼 *Epinephelus akaara* (Temminck and Valenciennes, 1842), 俗称“红斑”, 属鲈形目

Perciformes, 鲷科 Serranidae, 石斑鱼亚科 Epinephelinae, 石斑鱼属 *Epinephelus* (Nelson et al., 2006), 主要分布在日本、韩国和南海及东海, 为暖水性底层鱼类。赤点石斑鱼是我国南方名贵的岛礁性经济鱼类, 其肉味鲜美, 营养丰富, 市场价格高, 养殖前景看好。与其他养殖品种一样, 赤点石斑鱼养殖业同样受到病害的严重威胁, 已有的报道表明, 弧菌、变形菌及石斑鱼神经坏死病毒(NNV)是目前赤点石斑鱼的主要病原^[6-8], 但相关研究仍主要停留在初步的病原病理学方面, 在生产实践中也主要以抗菌药物作为病害的主要防治措施, 不仅效率低下, 而且对生态环境造成极大的破坏。因此, 开展赤点石斑鱼 MHC 基因抗病机理及其多态性及抗病力的相关性研究, 将可为其

收稿日期: 2008-08-07; 修订日期: 2009-01-21。

基金项目: 福建省自然科学基金(2060203); 福建省新世纪人才资助计划。

作者简介: 尹少雄(1973—), 男, 福建省泉州市人, 博士, 副教授, 主要从事鱼类分子生物学研究。E-mail: sxding@xmu.edu.cn

抗病育种奠定理论基础,有利于从根本上提高鱼体自身的免疫力和抗病力,促进赤点石斑鱼养殖业的健康发展。目前对于鱼类 MHC 蛋白分子的结构和功能性研究,在国内外主要集中在模式鱼(如斑马鱼)和冷水性洄游性鱼类(如虹鳟、鲑鱼等)^[9-12],而对于暖水性定居性鱼类的报道仍不多见,特别是对具有重要经济价值又具广泛养殖前景的石斑鱼类,至今未见报道。

2 材料和方法

2.1 材料来源

用于本研究的赤点石斑鱼均于 2006 年在福建厦门渔市场采集,体重 200~400 g,根据联合国粮农组织(FAO)物种目录之《Groupers of the World》^[13]、《中国鱼类系统检索》^[14]和《鱼类分类学》^[15]鉴定为赤点石斑鱼。鲜活样品在暂养 1 周

后,将其组织(脑、肝、脾、肠、头肾、心、肌肉、血液、鳃、胃、性腺、胸腺)取出,放入 1.5 ml Eppendorf 离心管中,置入液氮中保存备用。

2.2 引物设计

下载 NCBI 上鲈形总目鱼类的 MHC IIB 的 DNA 序列,用 Clustalx 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 Oligo 6.0 和 Primer Premier 5.0 软件设计 1 对简并引物 MHC DABF、MHC DABR,进行 MHC IIB cDNA 部分序列的扩增和测序。

根据已获得的 MHC IIB cDNA 中间序列,分别设计用于扩增 3' 端和 5' 端的上游巢式引物 IIBF37, IIBF213 和 IIBR236, IIBR48,其下游引物均为与 Oligo dT-RA 互补的引物 RA。由于 3' 端和 5' 端分别存在多态性,根据所得序列另设计 1 对引物 MHC IIBF 和 MHC IIBR 扩增 MHC IIB 编码基因全序列(表 1)。

表 1 赤点石斑鱼 MHC IIB 基因克隆引物序列

引物名称	引物序列
MHC DABF	5' - GCAGCGTCTWY GACTTCTWCCCC- 3'
MHC DABR	5' - TGTAGTAGATGAATCCAGCCAGAGA- 3'
IIBF37	5' - TCACCTCTGATGTCACCTCCACTG- 3'
IIBF213	5' - AGAAACAAGATTGCCATCGGAGCC- 3'
IIBR236	5' - GGCTCCGATGGCAATCTTGTTTCT- 3'
IIBR48	5' - CATCAGAGGTGACTTCCTTCCGT- 3'
Oligo-dT-RA	5' - AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGAC(T) ₂₅ VN- 3'
RA	5' - AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT- 3'
actinF	5' - AAGCCAACAGGGAGAAGATGAC- 3'
actinR	5' - AAGCCAACAGGGAGAAGATGAC- 3'
actinR	5' - GCCAGGTCTTCACCGCCGTCATGGT- 3'
MHC IIBF	5' - ATGGCTTCATCCTTTCTCAGCT- 3'
MHC IIBR	5' - ACTGGGACCAGAATCCGTCT- 3'
SSCP IIBF	5' - TCTCAGCTTCTCCCTCCTCTTCA- 3'
SSCP IIBR	5' - TGGGTAGAAAGCCTCAACGTGGTT C- 3'

注:引物中出现的部分简并引物代码表示:Y = C/T, W = A/T。

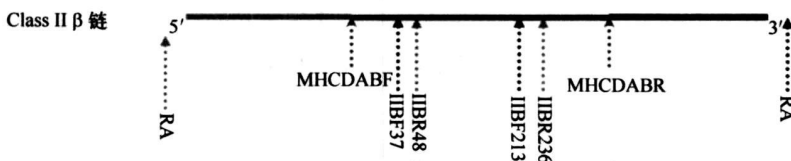


图 1 赤点石斑鱼 MHC IIB 的 RACE 扩增引物位置图

2.3 实验方法

2.3.1 总 RNA 的提取

取新鲜组织约 50 mg 于冰置钵体中, 加液氮迅速研磨成粉末, 后转移到 1.5 ml Eppendorf 离心管中, 加 1 ml Trizol(Invitrogen 公司) 充分混匀, 按试剂盒说明书提取组织总 RNA。所提取赤点石斑鱼各组织的总 RNA 经分光光度计测定, OD_{260}/OD_{280} 比值均在 1.9~2.0 之间, 经琼脂糖电泳检测, 可观察到 18S 和 28S rRNA 两条明亮的带(图 2)。

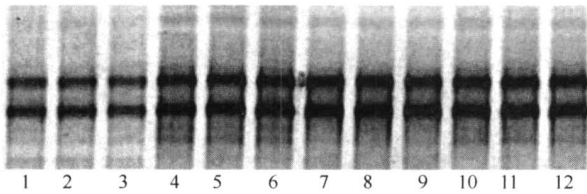


图 2 赤点石斑鱼 12 个组织的总 RNA 电泳分析

1. 脑; 2. 肝; 3. 肠; 4. 胸腺; 5. 肌肉; 6. 脾; 7. 血; 8. 性腺
9. 头肾; 10. 心脏; 11. 鳃; 12. 胃

2.3.2 cDNA 模板的制备

根据所测 RNA 浓度, 每个样品各取 2 μg 于 Rnase-free 离心管中, 分别加 1 μl Oligo dT-RA, 加入经 DEPC 处理的无菌重蒸水补齐至 7 μl 。70 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 放入冰中骤冷, 冰浴 2 min, 依次加: 5 \times Reaction Buffer 4 μl , dNTP(2.5 mmol) 8 μl , M-MLV(200 U/ μl)(TAKARA) 1 μl , 补足 20 μl 。42 $^{\circ}\text{C}$ 1 h, 99 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min 以灭活反转录酶。获得 cDNA 模板, 用于 MHC II B 基因中间序列、3' 端 RACE 扩增。

参照分子克隆手册^[16]进行 5' 端模板制备, 取上述样品中脑的 cDNA 10 μl , 加 RNAHase(TAKARA) 1 μl , Buffer 2 μl , 加 DEPC 水补足至 20 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h, 用于降解 cDNA 中的 RNA, 加 2 倍体积乙醇置入 -20 $^{\circ}\text{C}$, 30 min, 12 000 g 离心 10 min, 溶于 10 μl DEPC 水中, 加 dATP 2.5 mmol, TDT Buffer 2 μl , TDT 核酸末端转移酶(TAKARA) 1 μl , 加水补足至 20 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h, 获得 5' 端模板。

2.3.3 MHC II B 序列全长的获得

利用 MHC DABF、MHC DABR 为引物, 进行中间片段的扩增, 反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min(94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min) \times 30 cycles -72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min; 以 IIBF37、IIBF213 与 RA 为引物, 以脑的 cDNA 为模板进行 3' 端 RACE; 以 IIBR236、

IIBR48、Oligo dT-RA 和 RA 为引物, 以加尾的脑的 cDNA 为模板, 参照分子克隆手册进行 5' 端的 RACE PCR 扩增。

2.3.4 PCR 产物的纯化、克隆及测序

50 μl 的 PCR 产物, 经 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 切下目的片段, 用 QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN) 回收试剂盒, 按说明书提供的方法进行纯化。将回收产物与 pMD18-T(Takara) 载体 16 $^{\circ}\text{C}$ 进行连接反应, 连接产物转化入大肠杆菌 DH5 α , PCR 检测阳性菌落, 送 Invitrogen 公司测序。

2.3.5 Real time PCR 检测与单链构象多态性(SSCP)分析

MHC II B 基因中 PBR(肽结合位点) 区为变异区, 具有高度多态性。通过所设计的特异引物(SSCPIIBF 与 SSCPIIBR) 扩增 MHC II B 基因 PBR 区。实时定量 PCR 参照 SYBR Green real time PCR Master mix-plus(Toyobo Japan) 试剂盒说明书, 在 Rotor-Gene RG3000 上进行。以 SSCPIIBF 与 SSCPIIBR 为特异引物, 对赤点石斑鱼的 12 个不同器官组织(脑、肠、脾、胃、血、胸腺、性腺、头肾、心、鳃、肝脏与肌肉) 中 MHC II B 基因的表达进行检测, 以 actinF 与 actinR 为内参 actin 的引物。Real time PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min(94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s) \times 40 cycles, 反应过程中进行实时监控, 利用 Rotor-Gene 6171 软件确定 CT 值进行, 根据反应标准曲线计算 ETA 值, 以 β -actin 为参照, 计算出 MHC II B 基因相对表达情况 β -action。每个样品进行 3 次重复试验。

以赤点石斑鱼脑、头肾、肝脏等 12 个组织的 cDNA 为模板, 进行 RT-PCR, 反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min(94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min) \times 30 cycles -72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。先以 2% 琼脂糖电泳检测各组织的表达, 在 SSCP 检测之前, 取 2 μl 产物, 与等体积变性缓冲液(95% 甲酰胺, 0.1% 溴酚蓝, 0.1% 二甲苯青 FF, 1 mol/dm³ EDTA 和 10 mol/dm³ NaOH) 混合, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min 后冰浴 2 min, 在 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶 8 V/cm 下电泳 5 h, 银染显色。

2.3.6 序列拼接及 cDNA 全序列分析

用 ClustalX 和 Genetyx 软件进行序列比对、排列后, 测序结果用 ContigExpress 软件进行拼接, 再经测序峰图结果分析软件 Chroma 仔细校正后, 得到赤点石斑鱼 MHC II B 基因的 cDNA 全序列。用

DNASTAR、Genetyx 等软件统计序列总长、各碱基百分比、GC 含量等信息。登陆 NCBI 用 BLAST 对测序结果进行同源性检索。用 DNASTAR 分析所得到的基因序列, 确定其开放阅读框, 并采用 DNASTAR Protein 软件中 Chou 等提出的预测方案和 Garnier 法推测其蛋白质二级结构 (Chou et al., 1978) (定义蛋白质二级结构的规则为: α 型蛋白为 α 螺旋结构比例多于 45%, β 片层少于 5%; β 型蛋白为 β 片层结构比例多于 45%, α 螺旋少于 5%; α + β 型蛋白为 α 螺旋多于 30%, β 片层多于 20%; 其他为混合型蛋白)。空间结构预测采用 Swiss-model 软件^[17]。利用 <http://www.cbs.dtu.dk/services/> 寻找 MHC II B 信号肽、糖基化位点与跨膜结构, 利用 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> 的 IGC 区域。

3 结果

3.1 MHC II B 基因全长 cDNA 的克隆和序列分析
通过设计的简并引物 MHC DABF 和 MHC D-ABR, 以赤点石斑鱼的脑组织 cDNA 为模板扩增得到

200 bp 左右的 cDNA 片段, 克隆测序后所得序列经 BLAST 分析, 同源性最高的序列为大眼狮鲈 (*Stizostedion vitreum*) MHC II B 基因 (同源性达 95%), 基本确认为赤点石斑鱼 MHC II B 基因序列。根据所得的片段序列分别设计引物 IIbF37、IIbF213 和 IIbR236、IIbR48 进行 MHC II B 3' 端和 5' 端的 RACE 扩增。3' RACE 和 5' RACE 的扩增分别得到 500–750 bp 和 600 bp 左右的特异带; 产物经 T 载体连接克隆, 分别挑取 10 个阳性菌落测序, 经测序发现 3' 端和 5' 端序列均存在序列多态性, 为此, 根据所得序列重新设计 1 对 MHC II B 编码区扩增引物 MHC IIBF 和 MHC IIBR, 经 PCR 扩增及克隆测序, 共获得 4 个序列不同的编码基因, 经 BLAST 验证, 确认均为赤点石斑鱼 MHC II B 编码基因序列, 将之与前面所获 3' 端及 5' 端序列分别进行拼接, 获得 4 个含有 3' UTR 区域、蛋白质编码区及 5' UTR 区域的赤点石斑鱼 MHC II B 全长 cDNA 序列。根据 Klein 等 (1990) 的命名规则, 这 4 条序列分别命名为: Epak-DAB × 0101, Epak-DAB × 0201, Epak-DAB × 0301 和 Epak-DAB × 0401 (Genebank accession number: EU 399183~ EU 399186)。

表 2 MHC II B 基因 cDNA 组成

名称	5' UTR 区域	编码区				3' UTR 区域	编码氨基酸
		起始密码子	终止密码子	编码区域	长度		
Epak-DAB × 0101	27 bp	ATG	TGA	28~ 777	750 bp	575 bp	249
Epak-DAB × 0201	30 bp	ATG	TGA	31~ 780	750 bp	575 bp	249
Epak-DAB × 0301	30 bp	ATG	TGA	31~ 780	750 bp	575 bp	249
Epak-DAB × 0401	27 bp	ATG	TGA	28~ 777	750 bp	418 bp	249

赤点石斑鱼 MHC II B cDNA 的编码区长度为 750 bp, 分别编码 250 个氨基酸。此外还有 27–30 bp 的 5' UTR 区和 418–575 bp 的 3' UTR 区, 其中 3' UTR 区含有脊椎动物典型的加尾信号 AATAAA 和 70 bp 的 Poly A 尾巴 (表 2), 而在 3' UTR 区 Epak-DAB × 0401 存在一段长度为 157 bp 的片段缺失。比较所得的 4 个 MHC II B cDNA 序列, 在 750 个核苷酸编码序列中, 没有缺失位点, 变异位点 87 个, 占总核苷酸数的 11.6%, 其中有 50 个位点存在两碱基替换, 简约信息位点 31 个, 占核苷酸数的 4.13%, 有 6 个位点存在三碱基替换。在其编码的氨基酸, 存在 45 个变异位点, 占氨基酸总长的 18.1%, 变异区域主要存在于 MHC II B

多肽结合区 (β 2-1 区)。

3.2 MHC II B 基因的氨基酸序列分析和蛋白质二级结构和三级结构预测

与鱼类的经典 MHC II B 分子一样^[11-20], 赤点石斑鱼的 MHC II B 同样包含前导肽、2 个胞外结构域、跨膜区和胞质区, 在结构上具有保守的半胱氨酸残基、多肽结合区、N-糖基化位点等。2 个胞外结构域由 2 个半胱氨酸形成链内二硫键相连, 环绕这些残基的区域趋于保守。以 Epak-DAB × 0101 为例, 其开放阅读框编码 249 个氨基酸, 蛋白质预测的分子量约为 28.35 KD, 等电点为 7.28。其二级结构经过 DNASTAR 软件预测, 结果表明该氨基酸序列前 19 位为信号肽区, 20~103 位为 β 2-1 区, 116~204 位为 β 2-2

区(IGC区), 214~235位为跨膜区, 之后为胞质区(图2)。在 $\beta\alpha-1$ 上的第58位上含有N-糖基化位点(A-X-S/T/N); 在 $\beta\alpha-1$ 的第59位, $\beta\alpha-2$ 的第104、136位和跨膜区的第221、222位上共含有5个O-糖基化位点; 在信号肽上第14位, $\beta\alpha-1$ 上的第33位, $\beta\alpha-2$ 上第118、122、133、155、159、194位和跨膜区的第206位上共含有9个丝氨酸磷酸化位点; 在 $\beta\alpha-2$ 的第158、179位上含有2个苏氨酸磷酸化位点; 在 $\beta\alpha-1$ 的第46、65、102位和 $\beta\alpha-2$ 的第169位上共有4个酪氨酸磷酸化位点; 在信号肽上第2位上有1个N乙酰化位点; 在 $\beta\alpha-1$ 上第29、

94位和 $\beta\alpha-2$ 的132、188位上有4个半胱氨酸残基。

采用DNASTAR软件的Garnier-Robson和Chou-Fasman法分别进行赤点石斑鱼MHC II B蛋白分子的二级结构预测, 结果表明: 赤点石斑鱼MHC II B分子属于 $\alpha+\beta$ 型蛋白, 其中 α 螺旋占30%, β 片层占44.4%, Turn(转角)占15.6%, Coil(无规则卷曲)占11.2%。采用空间结构预测软件SWISS-MODEL, 对赤点石斑鱼MHC II B蛋白分子的空间结构进行预测, 得到其三维空间构象(图4a), 结构与人类的相似(图4b)。

	signal peptide 1	beta-1 2	beta-2 3	transmembrane region 4	cytoplasmic tail			
Epak-DAB*0101	MASSFLSFL LFISLYTAE	FRCYSLFRCD FNSTDLKDIE	YIYSEVYNKL EIARFSSSUG	KYUGYTEFGU	KQAEINWVKDS SELARRSAEK			
Epak-DAB*0201ME.UTTS.U	.F.R.V.F.	.FT.....	.H.....Y..N..F..S.P.F..QMR...			
Epak-DAB*0301LNFUTA..UP.....	L...V.....	.VT.....F.....VF.N.P.I..QWRGD..			
Epak-DAB*0401			
Epak-DAB*0101	ERFCLNNIEA FYPNLTKPA	EPYURLHSUT	PSSGKHSAML	UCSUFNFYPK	KIKUSWLRDG KEUTSDUTST	DELADGDWVY QIHSHELYTP		
Epak-DAB*0201	..V.U..GI D.QAA..S.		
Epak-DAB*0301	..U.U..UGN D.R.AU..S.	K...I..S.TS		
Epak-DAB*0401		
Epak-DAB*0101	RSGEKISCUU	EHASLREPLU	TDWDP	PSMPES	ERNKIAIGAS	GLILGLULSL	AGFIYVYKKA	RGRILUPSN
Epak-DAB*0201
Epak-DAB*0301
Epak-DAB*0401

图3 4种MHC II B基因编码区的氨基酸序列比较

1 信号肽序列; 2 $\beta\alpha-1$ 区; 3 $\beta\alpha-2$ 区; 4 跨膜区

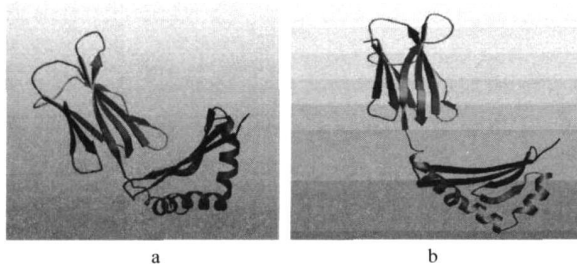


图4 赤点石斑鱼(a)和人类(b)MHC II B蛋白分子的三级结构分析

3.3 赤点石斑鱼MHC II B基因的组织表达多态性与表达量分析

在MHC II B蛋白中, 多肽结合区($\beta\alpha-1$ 区)是整条蛋白链变异最大的区域, 为研究赤点石斑鱼不同组织MHC II B表达的多态性, 设计了1对引物(SSCPIIBF和SSCPIIBR), 通过实时定量PCR技术和SSCP分析技术对源于赤点石斑鱼12个组织的MHC II B表达丰度和多态性进行了检测, 结果表

明: MHC II B基因在12个组织中均有表达, 但不同组织表达的强弱存在明显差异(图5)。其中, 表达量最为丰富的组织为头肾和心脏, 表达量最小的组织为肝脏。此外, MHC II B基因在各组织的表达都体现出丰富的多态性, 表达多态性最丰富的组织为肝脏, 共有13个等位基因, 而多态性最低的组织为心脏, 也有8个等位基因(见图6)。

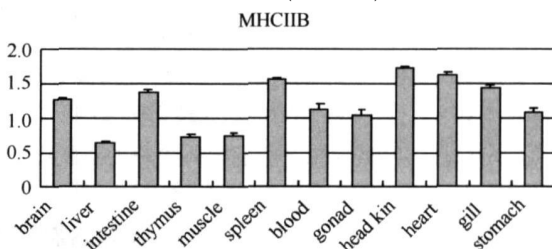


图5 实时定量PCR检测赤点石斑鱼不同器官组织的MHC II B表达丰度

通过对PAGE胶上的不同条带的纯化、扩增、克隆和测序, 共获得20种不同的MHC II B核苷酸

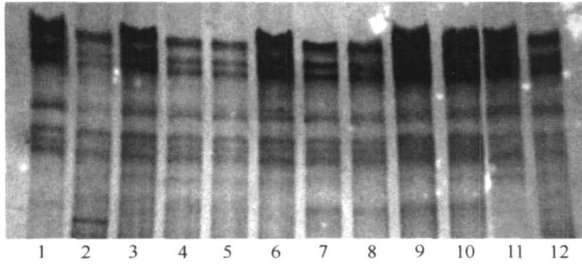


图6 SSCP方法检测赤点石斑鱼在12个正常组织中的表达多态性

1. 脑; 2. 肝脏; 3. 肠; 4. 胸腺; 5. 肌肉; 6. 脾; 7. 血;
8. 性腺; 9. 头肾; 10. 心脏; 11. 鳃; 12. 胃

序列(Genebank accession numbers: EU399189 ~ EU399208), 分别编码19种不同的MHC IIB氨基酸序列, 经序列比较分析, 该序列涵盖了MHC IIB整个多肽结合区(peptide-binding region PBR)。

4 讨论

4.1 赤点石斑鱼MHC IIB基因的序列特征分析

本实验通过RACE扩增, 成功获得4个完整赤点石斑鱼MHC IIB的cDNA序列。分析所得的4

个MHC IIB氨基酸序列, 在 $\beta\alpha-1$ 和 $\beta\alpha-2$ 均含有4个保守的半胱氨酸残基(分别在 $\beta\alpha-1$ 的第29位, 94位和 $\beta\alpha-2$ 的第132, 188位上), 这4个半胱氨酸残基在大西洋鲑鱼(*Salmo salar*)、虹鳟(*Salmo gairdneri*)等物种的相同位点上也存在, 并两两组成2对二硫键^[10-11]。Ren^[20]认为鱼类跨膜区极度保守, 通过CLUSTAL比对发现, 赤点石斑鱼MHC IIB基因的跨膜区序列也相当保守, 在这一区域赤点石斑鱼和其他鱼类及哺乳类一样均含有GXXGXXXGXXXXXXG框, Cosson等^[19]推测此框与MHC IIB基因形成 $\alpha\beta$ 异二聚体有关。以人类MHC IIB(HLA-DPB)的氨基酸序号(AAH15000)和功能性氨基酸位置为参照, 比较所得的赤点石斑鱼与鱼类、爪蟾、人等的MHC IIB氨基酸序列, 在24个与抗原多肽结合的关键性氨基酸位点中, 59位上的酪氨酸(Y)特别保守, 推测该氨基酸残基在生物体中对与MHC IIB基因的功能的维持有重要意义, 而多态性异常丰富的多肽结合区则是MHC IIB结合多种外源性多肽的分子基础。

表3 不同组织MHC IIB基因表达多态性与强弱的分析表格

组织	脑	肝	肠	胸腺	肌肉	脾	血	性腺	头肾	心	鳃	胃
表达强度	+++	+	+++	+	+	+++	++	++	+++	+++	+++	++
位点数	11	13	10	10	10	11	11	11	10	8	10	11

4.2 赤点石斑鱼MHC IIB分子的空间结构分析

MHC II复合物由 α 链和 β 链以非共价键相连接, 组成异二聚体。经典的MHC IIB由2个胞外结构域(多肽结合区 β_1 、免疫球蛋白样区 β_2)、1个跨膜区和胞质区组成, β_1 区多态性异常丰富, 而跨膜区极度保守, 2个胞外结构域分别由2个半胱氨酸形成的链内二硫键相连^[21]。预测的赤点石斑鱼MHC IIB分子空间结构同样具备了经典MHC IIB的空间结构特点, 在N端由1个 α 螺旋与4个反向平行的 β 折叠构成多肽结合区, C端则由多个 β 折叠构成两个反向平行的三明治结构。而4个序列在同样的位置都存在4个半胱氨酸并两两形成二硫键(29-94, 132-188)。

4.3 赤点石斑鱼MHC IIB基因的表达多态性分析

有学者认为MHC IIB基因的表达局限在一定

的组织 and 细胞型上, Juul-Madsen等^[10]检测到虹鳟的头肾和脾中MHC IIB基因的表达, 但在心和肝中未检测到此基因表达。Ono等^[22]在鲤鱼肝胰腺和肠中检测到MHC IIB基因转录物, 但在心、卵巢、脑和骨骼肌中未检测到转录产物。Rodrigues等^[23]研究表明MHC IIB基因在鲤鱼胸腺、外周血、后肠中表达, 但在骨骼肌和红细胞中未检测到表达产物。也有学者认为MHC IIB基因表达的组织特异性与鱼体自身的免疫水平相关, Koppang等^[11]应用RT-PCR技术分析免疫与非免疫大西洋鲑MHC IIB β 基因表达水平, 发现非免疫鱼MHC IIB基因仅在前肠、脾、后肠和鳃表达, 在心、肝、头肾等组织均未检测到表达产物, 而免疫鱼在心、肝、前肠、头肾、脾、后肠和鳃均检测到表达产物。本实验通过SSCP和实时定量PCR技术对赤点石

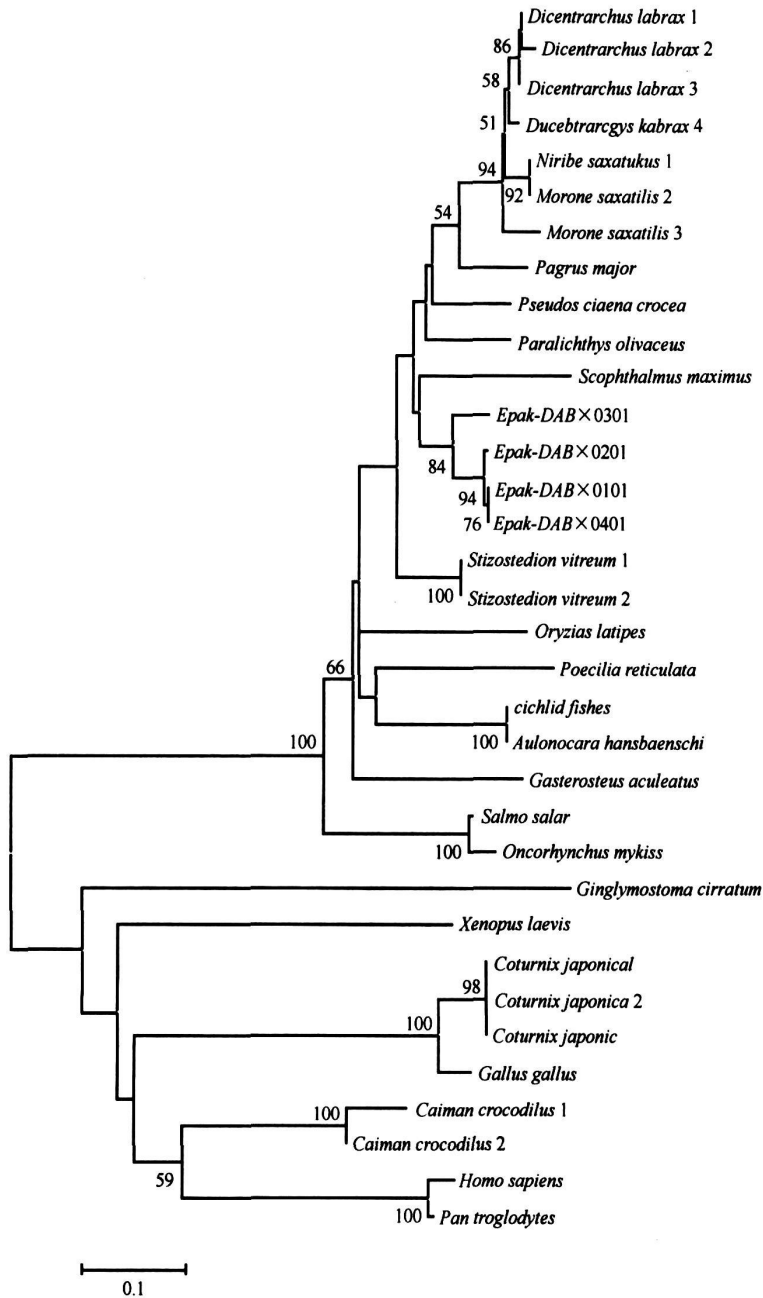


图 7 基于 MHC II B 基因 IGC 区氨基酸序列构建脊椎动物系统进化树(NJ 树)

Dicentrarchus labrax 1 DQ821112, *Dicentrarchus labrax* 2 AM113471, *Dicentrarchus labrax* 3 DQ821113, *Dicentrarchus labrax* 4 DQ821110——狼鲈; *cichlid_fishes* 1918357A 丽鱼; *Morone saxatilis* 1 L33965, *Morone saxatilis* 2 L33967, *Morone saxatilis* 3 L33966——条纹石斑; *Pagrus major* AY190711——真鲷; *Pseudosciaena crocea* 大黄鱼(本实验室工作); *Paralichthys olivaceus* AY848955——牙鲆; *Scophthalmus maximus* DQ001730——进口大菱鲆; *Stizostedion vitreum* 1 AY158838, *Stizostedion vitreum* 2 AY158837——大眼鲷; *Oryzias latipes* AB033212——青鳉; *Poecilia reticulata* Z54077——孔雀鱼; *Aulonocara hansbaenschi* L13223——马拉维慈鲷; *Gasterosteus aculeatus* (L.) AY713945——刺鱼; *Salmo Salar* X70166——大西洋鲑; *Oncorhynchus mykiss* AF115529——硬头鲑; *Xenopus laevis* D13688——非洲爪蟾; *Ginglymostoma cirratum* AAF82681——护士鲨; *Coturnix japonical* AB110472, *Coturnix japonica* 2 AB110470, *Coturnix japonica* 3 AB078884——日本鹌鹑; *Gallus gallus* AY510090——红原鸡; *Caiman crocodilus* 1 AF256652, *Caiman crocodilus* 2 AF256651——中美凯门鳄; *Homo sapiens* CH878642——智人; *Pan troglodytes* XM_001165717——黑猩猩。

斑鱼 12 个组织进行检测,所有组织均能检测到 MHC IIB 基因不同程度的表达产物。张玉喜等^[24]在所检测大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*) 各组织中也均检测到 MHC IIB 基因不同程度的表达,说明 MHC IIB 基因的表达可能并不存在所谓的组织局限性,而是在表达程度上存在组织特异性。Vladimir 等^[25]指出 MHC IIB 基因多态性被限制在明显的功能性位点上,其主要集中在多肽结合区(即 PBR 区)。MHC IIB 多样性水平的降低可导致种群内个体对突发性的外界传染性病原体的易感性增高,导致种群抗病能力单一,生存力下降^[26]。Kristen 等^[27]在研究大麻哈鱼 (*Oncorhynchus tshawytscha*) 对不同病原体的抗性中已发现 MHC IIB 位点杂合个体的存活率要明显高于纯合体。SSCP 技术可以用来分离具有不同核苷酸序列的 DNA 片段,其具有操作方便快捷,灵敏度高(分辨率可以达到分离单碱基差异的 DNA 片段)等优点。因此其虽然主要应用于检测基因的点突变,但同样可以用来检测具有核苷酸多态性的多拷贝基因的表达^[28]。通过 SSCP 检测,我们发现赤点石斑鱼 MHC IIB 在各组织表达的多态性相当的丰富,即使是在表达等位基因数最少的心脏,仍然有 8 个等位基因的表达。通过比较发现, MHC IIB 基因除了在头肾和脾等免疫器官的表达量及多态性均较为显著外,在鳃和肠等与外界病原接触机会较多的组织均有显著表达,这与 MHC IIB 基因递呈外源性抗原,引导机体进行非特异性免疫的功能是相适应的。

4.4 赤点石斑鱼 MHC IIB 基因的同源性和系统发生分析

MHC IIB 的 β 结构域存在丰富多态性,为了避免氨基酸变异速率过快带来的不必要的进化“噪音”,我们选择了较为保守的 IGC 序列作为构建进化树的参考序列。通过 Clustal X 将所得赤点石斑鱼 4 个 MHC IIB IGC 区的氨基酸序列与部分鱼类及其他高等脊椎动物的同源氨基酸序

列进行比对,用 MEGA 3.0 构建 NJ 系统树(见图 7),其由 2 个主要分支组成,所有硬骨鱼类聚为一簇,支持了硬骨鱼类的单系起源,在硬骨鱼类内部,所有鲈形目鱼类聚合为 1 个分支,鲑鳟鱼类为 1 个分支,位于硬骨鱼类的基部,二者都具有单系性,在鲈形目中可以发现鮠科与鲈科鱼类有较近的亲缘关系,而狼鲈科与石首鱼科的亲缘关系更近,赤点石斑鱼 4 个氨基酸序列的平均遗传距离为 11.9%,与大眼狮鲈 (*Stizostedion vitreum*) 的亲缘关系最近。软骨鱼类与硬骨鱼类外的其他高等脊椎动物聚合为另 1 个分支,并位于该分支的基部,表明了 MHC IIB 基因的分化可能早于软骨鱼类与硬骨鱼类及其他高等脊椎动物的分化。而软骨鱼类在 MHC 基因上与其他高等脊椎动物更为近似的特点同样体现在其他方面,如 Sato 等^[29]指出,硬骨鱼类的 I 类和 II 类基因都应该分属不同的连锁群,而 Yuko 等^[30]的研究则表明在软骨鱼中 I 类和 II 类基因与其他高等脊椎动物一样,是连锁在一起的。Simona 等^[31]对软骨鱼类的 MHC II 分子研究表明,尽管在序列上存在 13 个氨基酸的差异,但是在空间结构上却与高等的哺乳动物存在着很高的相似性,这说明了软骨鱼类的 MHC II 分子的免疫功能应该与高等哺乳动物更为相似。造成这种现象推测有 2 种可能,一个是鱼类为单系起源,但 MHC 基因的进化在软骨鱼类和其他高等脊椎动物呈现趋同,另一可能原因为鱼类并系甚至多系起源。本研究所构建的进化树还显示出几乎所有物种内的不同等位基因均先聚合再与其他物种聚合,这种源于同一物种不同座位的 MHC IIB 分子均先聚合的结果,表明了多数 MHC IIB 位点的分化,也即其通过基因重复,歧化等形成多基因座位的过程,是在物种形成之后进行的,由于其形成时间短,因此可以成为研究种内群体分化及良种选育的良好指标。

参考文献:

- [1] 王重庆. 分子免疫学基础 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1997: 139—140
- [2] PAUL W E. Fundamental Immunology. Fourth Edition [M]. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1999: 297—298
- [3] APANIUS V, PENN D, SLEV P R, et al. The nature of selection on the major histocompatibility complex [J]. Rev Immunol, 1999, 17 (2): 179—224
- [4] EDWARD S V, HEDRICK P W. Evolution and ecology of MHC molecules: from genomics to sexual selection [J]. Trends in Ecology and Evolution, 1998, 13: 305—311

- [5] HEDRICK P W, KIM T J. Genetics of complex polymorphism: parasites and maintenance of MHC variation[M] // SINGH R S, KRIMBAS C K. Evolutionary Genetics From Molecules to Morphology. New York: Cambridge University Press, 1999
- [6] 陈信忠, 苏亚玲, 龚艳清. 闽南地区养殖石斑鱼病毒性神经坏死病初步研究[J]. 福建水产, 2003, 9: 11—14
- [7] 吴后波, 吴灶和, 潘金培. 海水网箱养殖赤点石斑鱼溃疡病致病菌研究[D] // 热带海洋研究(五). 北京: 科学出版社, 1997: 91—95
- [8] 杨霞, 吴信忠. 赤点石斑鱼的普通变形菌病原学研究[J]. 水产科学, 2005, (24): 5—7
- [9] BINGULAC P J, FIGUEROA F, SATO A, et al. Mapping of MHC class I and class II regions to different linkage groups in the zebrafish, *Danio rerio* [J]. Immunogenetics, 1997, 46: 129—144
- [10] JUUL-MADSEN H R, GLUMANN J, MADSEN H O, et al. MHC class II beta-chain expression in the rainbow trout [J]. Scan J of Immunol, 1992, 35: 687—694
- [11] KOPPANG E O, LUNDIN M, PRESS C M, et al. Differing levels of Mhc class II beta chain expression in a range of tissues from vaccinated and non-vaccinated Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1998, 8: 183—196
- [12] KOPPANG E O, PRESS C M, RONNINGEN K, et al. Expression of Mhc class I mRNA in tissues from vaccinated and nonvaccinated Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1998, 8: 577—587
- [13] HEEMSTRA P C, RANDALL J E. Groupers of the World[M]. Rome: FAO Species Catalogue, 1993
- [14] 成庆泰, 郑葆珊. 中国鱼类系统检索(上册)[M]. 北京: 科学出版社, 1987
- [15] 孟庆闻, 苏锦祥, 缪学祖. 鱼类分类学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995
- [16] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [17] COSSON P, BONIFACINO J S. Role of transmembrane domain interactions in the assembly of class II MHC molecules[J]. Science, 1992, 258: 659—662
- [18] RODRIGUES P N S. Expression of Major histocompatibility complex genes in carp (*Cyprinus carpio* L.) [D]. Dutch: Elsevier Science Ltd and Academic Press Ltd, 1996: 1—27
- [19] 周光炎. 免疫学原理[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2000: 63—121
- [20] REN É J M. Inference of structure and function of fish major histocompatibility complex (MHC), molecules from expressed genes [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1996, 6: 305—318
- [21] 金伯泉. 细胞和分子免疫学[M]. 西安: 世界图书出版公司, 1998: 213—258
- [22] ONO H, O' HUIGIN C, VINCEK V, et al. New beta chain encoding MHC class II genes in the carp [J]. Immunogenetics, 1993, 38: 146—149
- [23] RODRIGUES P N S, HERMSEN T T, TOMBOU T J H, et al. Detection of MHC class II transcripts in lymphoid tissues of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Dev Comp Immunol, 1995, 19: 483—495
- [24] 张玉喜, 陈松林. 大菱鲆 MHC II B 基因全长 cDNA 的克隆与组织表达分析[J]. 高技术通讯, 2006, 16(8): 859—863
- [25] VLADIMIR V, DAGMAR K, GRASER R T, et al. Molecular cloning of major histocompatibility complex class II B gene cDNA from the Bengalee finch *Lonchura striata* [J]. Immunogenetics, 1995, 42(4): 262—267
- [26] Ó BRIEN S J. Comparative genome organization of the major histocompatibility complex: lessons from the Felidae [J]. Immunological Reviews, 1994, 167: 133—144
- [27] KRISTEN D A, GIESE A R, HOLLY L M, et al. Resistance to three pathogens in the endangered winter-run chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*): effects of inbreeding and major histocompatibility complex genotypes [J]. Can J Fish Aquat Sci, 2002, 59(6): 966—975
- [28] KRZYSZTOF L R, GEERT F W, MIKOLAJ A, et al. Application of PCR-RF-SSCP to study major histocompatibility class II B polymorphism in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 24: 734—744
- [29] SATO A, FIGUEROA F, MURRAY B W, et al. Nonlinkage of major histocompatibility complex class I and class II loci in bony fishes [J]. Immunogenetics, 2000, 51: 108—116
- [30] YUKO O, KAZUHIKO O, MCKINNEY E. Primitive synteny of vertebrate major histocompatibility complex class I and class II genes [J]. PNAS, 2000, 97: 4712—4717
- [31] SIMONA B, DAVID B, IRVING L W. Molecular Evolution of the Vertebrate Immune System [J]. PNAS, 1994, 91(23): 10769—10770

The cloning and polymorphism of MHC class IIB gene from *Epinephelus akaara*

DING Shao-xiong¹, ZHANG Zh-wen¹, DU Jia-ying¹, WANG Jun¹, ZENG Hua-song¹,
WANG Ying¹, CHEN Xiao-feng²

(1 Department of Oceanography and Institute of Subtropical Oceanography, Xiamen University, Xiamen 361005, China;
2 Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

Abstract: Major histocompatibility complex is one of crucial innate immune factors in vertebrates. In this study, RACE, Realtime PCR and SSCP techniques had been used to study the structure and expression characterization of MHC gene from *Epinephelus akaara*, 4 complete cDNA sequences of MHC class II β chain from *E. akaara* was obtained, the sequences have the length of 1195~1355 bp, and contain a 3' UTR, promoters, a peptide-binding region(β 1), an immunoglobulin-like region(β 2), a transmembrane region, a cytoplasmic region, and 5' UTR. The size of their coding region is 750 bp, exhibits a classic MHC 3D molecular structure and abundant polymorphisms in the peptide-binding region. Within the peptide-binding region, β 1 included an α -helical region and a beta sheet of four strands in antiparallel orientation, while β 2 forms a sandwich-like structure made of two antiparallel sheets, with each containing several strands. Using SSCP technique, we observed high levels of expression of polymorphism in 12 tissue such as head-kidney, heart and liver. We also constructed phylogenetic tree based on Neighbour-Joining methods with IGC region of the MHC IIB gene. These results showed that the amino acid sequence of the IGC region of MHC IIB is informative for phylogenetic studies in fishes.

Key words: *Epinephelus akaara*; MHC class II gene; polymorphism