

野生抗病牙鲆 *MHC II B* 内含子 1 和外显子 2 序列多态性

徐建勇^{1,2}, 陈松林², 毕金贞²

(1. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003; 2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 通过对牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) *MHC II B* 基因内含子 1 和外显子 2 直接测序的方法, 从 83 个抗病牙鲆个体中共得到了 85 个等位基因, 其中 76 个为新发现的等位基因。在扩增得到的 263 bp 的外显子 2 中, 共发现了 60 个多态性位点, 其中 33 个是新发现的。不同的等位基因均以较低的频率出现, 基因频率范围从 0.006 到 0.069, 基因型频率范围从 0.012 到 0.169。通过序列分析, 共发现了 6 种内含子 1, 其中 4 种是新发现的。内含子 1 中均包含了一个 12 bp 的重复单元, 其 3' 端含有一个富含 CT/GT 的区域。牙鲆 *MHC II B* 基因的高多态性和低频率揭示了牙鲆群体 *MHC* 基因资源的丰富性, 为选择育种提供了可能。[中国水产科学, 2008, 15(4): 593-599]

关键词: 牙鲆; 主要组织相容性复合体; 多态性

中图分类号: Q959 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2008)04-0593-07

主要组织相容性复合体 (Major Histocompatibility Complex, MHC) 在机体免疫和自身免疫耐受的形成中都起着举足轻重的作用^[1]。MHC 与抗原结合后可被 T 细胞受体识别, 从而激发机体免疫反应。主要组织相容性复合体可分为 3 大类—MHC I、MHC II 和 MHC III, 其中 MHC I 又由经典 MHC I (MHC Ia) 和非经典 MHC I (MHC Ib) 组成。非经典 MHC I 主要呈递保守的微生物抗原给 T 细胞, 例如脂类、糖类及疏水类蛋白, 具有较低的多态性。MHC III 是由多种基因编码的区域, 其中部分基因参与机体免疫, 部分参与其他机体活动, 也不具有较高的多态性。而 *MHC Ia* 和 *MHC II* 都具有较高的多态性, 参与机体免疫活动, 并与机体的抗病能力相关^[1-2]。

根据对斑马鱼 (*Danio rerio*)、青鳉 (*Oryzias latipes*)、虹鳉 (*Oncorhynchus mykiss*) 和河鲀 (*Fugu orthologues*) 的研究, 在鱼类中仅存在一个包含有编码 *MHC Ia* 的 *MHC* 基因区域, *MHC II A* 基因和 *MHC II B* 基因共同位于另一连锁群^[3-4]。*MHC II* 被认为是在进化过程中从 *MHC I* 区域分离出去的^[3], 其不连锁性可导致 *MHC I* 和 *MHC II* 分别以更高的速率演化。部分研究者甚至认为鱼类 MHC 更应该命名为 MH (Major Histocompatibility)^[5]。

MHC II 基因具有极高的多态性, 其中包括多座位以及多等位基因^[6]。多态性不仅位于编码区, 还发生在启动子区域^[7]。关于牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) *MHC II B* 基因的多态性, 张玉喜和陈松林^[8]已经对其进行了一定程度的研究, 并讨论了其不同等位基因与牙鲆抗病力的相关性^[9]。其中, 所有等位基因均以较低的频率出现 (最高等位基因频率为 26.19%), 这就为发现更多的等位基因以及其他与抗病相关的等位基因提供了可能性。因此, 在以前研究基础上, 本研究扩大了对 *MHC* 基因的研究范围, 期望发现更多的多态性位点和等位基因, 为牙鲆 *MHC* 分型的精细化和发现更多的抗病相关等位基因提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

牙鲆个体 83 尾取自于本课题组养殖的抗病牙鲆实验群体, 该群体为自然群体, 通过自然选择和人工选择获得^[8]。剪取少许鳍组织, 置于乙醇中, 保存备用。

1.2 引物设计

根据本实验室克隆的牙鲆 *MHC II B* 基因的全长序列^[10] (GenBank Accession No.: AY848955), 设计了

收稿日期: 2007-08-10; 修订日期: 2007-09-24.

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 (973) 项目 (2004CB117403); 国家自然科学基金项目资助 (30413240).

作者简介: 徐建勇 (1982-), 男, 在读硕士研究生, 主要从事鱼类功能基因组研究. E-mail: xujianyong820915@163.com

通讯作者: 陈松林. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

一对基因特异引物 fMPN (5'-CTCCCTCTTCTTCAT-CACGGT-3') 和 fMPC (5'-ACACACTCACCT-GACTTCGT-3'),用以扩增完整的内含子 1 和外显子 2。

1.3 DNA提取和PCR扩增

利用高盐法提取牙鲈鳍条 DNA^[11-12]。剪取保存的鳍条组织约 1cm²,放入 1.5 mL 离心管中。用裂解液 (10 mmol/L Tris-HCl,400 mmol/L NaCl and 2 mmol/L Na₂EDTA, pH 8.2) 洗涤 1 遍,以除去残余的乙醇。然后向每管中加入 0.9 mL 裂解液,0.1 mL 10%SDS 和 100 μg 蛋白酶 K, 55 ℃ 水浴过夜。消化完全后,向每管中加入 270 μL 饱和 NaCl,混匀,12 000 r/min 离心 30 min。将上清转移到新的离心管中,加入两倍体积无水乙醇沉淀 DNA, 75% 乙醇洗涤一遍,溶于 TE 备用。

PCR 按照普通程序进行,25 μL 体系中包含引物各 10 pmol, DNA 40 ng。PCR 反应条件: 94 ℃ 5 min, 94 ℃ 30 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 共 35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min。所有 PCR 反应均在 PTC-200 型 PCR 仪上进行。

1.4 PCR产物的克隆与测序

100 μL PCR 产物,经 1% 琼脂糖凝胶电泳纯化后,用 QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN) 凝胶回收试剂盒回收。将回收的产物按照摩尔比 3 : 1 的比例与 PBS-T (天为时代) 载体连接,并将连接产物转化感受态细胞 DH5α。利用载体测序引物进行菌液 PCR,筛选阳性单克隆。每个个体随机选取 6 个阳性克隆送上海联合基因公司用 ABI 3730 测序仪测序。

1.5 序列分析

用 DNAMAN 软件 (版本 5.2.2) 对序列进行分析,剪除载体序列。按照单碱基突变 (SNP) 的定义,将出现频率低于 1% 的序列剔除,即:在某一位点,某一碱基出现的频率若低于 1%,则忽略该突变^[13]。基因型命名规则: Paol 为牙鲈拉丁文 *Paralichthys olivaceus* 缩写,字母 D 代表 MHC II 类基因,字母 A 代表未分类群体,字母 B 代表 β 链基因。星号前的数字代表内含子 1 类型 (1 代表 A 型; 2 代表 B 型; 3 代表 C 型; 4 代表 D 型; 5 代表 E 型; 6 代表 F 型),星号后数字代表等位基因。

2 结果与分析

2.1 MHC II B基因外显子2的多态性

从 83 个抗病个体共得到可用序列 460 条,按

照 1% 频率忽略单碱基突变位点,共剔除序列 112 条,剩余的 348 条序列可归为 85 个等位基因。其中 45 个等位基因的出现频数仅为 1,另外 40 个等位基因的出现频率如表 1 所示。

表 1 野生抗病牙鲈 MHC II B 基因
不同等位基因的分布频率
Tab.1 Frequency of alleles of MHC II B
gene in wild *Polivaceus*

等位基因 Allele	基因频率 (n=348) Gene frequency	基因型频率 (n=83) Genotype frequency
Paol-DAB1*01	0.023	0.048
Paol-DAB1*02	0.011	0.036
Paol-DAB1*03	0.052	0.096
Paol-DAB2*01	0.023	0.036
Paol-DAB2*02	0.037	0.072
Paol-DAB2*03	0.006	0.024
Paol-DAB2*04	0.017	0.036
Paol-DAB2*05	0.029	0.048
Paol-DAB2*06	0.009	0.024
Paol-DAB2*07	0.006	0.012
Paol-DAB3*01	0.009	0.024
Paol-DAB4*01	0.034	0.084
Paol-DAB4*02	0.006	0.012
Paol-DAB4*03	0.006	0.012
Paol-DAB4*04	0.006	0.012
Paol-DAB4*05	0.017	0.036
Paol-DAB4*06	0.014	0.036
Paol-DAB4*07	0.037	0.060
Paol-DAB4*08	0.011	0.036
Paol-DAB4*09	0.034	0.060
Paol-DAB4*10	0.014	0.024
Paol-DAB4*11	0.011	0.024
Paol-DAB4*12	0.069	0.120
Paol-DAB4*13	0.011	0.036
Paol-DAB4*14	0.014	0.024
Paol-DAB4*15	0.040	0.084
Paol-DAB5*01	0.029	0.060
Paol-DAB5*02	0.032	0.048
Paol-DAB5*03	0.011	0.048
Paol-DAB5*04	0.023	0.024
Paol-DAB5*05	0.006	0.012
Paol-DAB5*06	0.009	0.036
Paol-DAB5*07	0.020	0.036
Paol-DAB5*08	0.066	0.169
Paol-DAB5*09	0.011	0.036
Paol-DAB5*10	0.046	0.084
Paol-DAB5*11	0.009	0.012
Paol-DAB5*12	0.006	0.012
Paol-DAB6*01	0.014	0.012
Paol-DAB6*02	0.040	0.060

从表 1 可以看出,不同等位基因的分布频率都较低,基因频率范围从 0.006 到 0.069,基因型频率范围从 0.012 到 0.169。通过与已知序列的比对,其中 9 种与张玉喜等^[8-9]发现的 13 种等位基因中的 9 种相同:等位基因 *Paol-DAB2*07* 与 b 相同, *Paol-DAB5*03* 与 c 相同, *Paol-DAB5*10* 与 f 相同, *Paol-DAB4*14* 与 k 相同, *Paol-DAB1*03* 与 d 相同, *Paol-DAB4*05* 与 e 相同, *Paol-DAB6*02* 与 l 相同, *Paol-DAB2*01* 与 h 相同, *Paol-DAB2*05* 与 g 拥有共同的外显子。其余 76 种为新发现的等位基因。在表 1 列出的 40 个等位基因中, *Paol-DAB5*04* 和 *Paol-DAB2*02* 具有相同的外显子, *Paol-DAB1*01* 和 *Paol-DAB4*01* 具有相同外显子。其中,具有较高频率的等位基因 *Paol-DAB4*12* 和 *Paol-DAB5*08* 均为首次发现。其较高的频率,为开发牙鲈抗病相关的新等位基因提供了可能。

由于此次测序的序列长度较张玉喜等^[8]测得序列长,分别为 396/408 与 268/280。所以在

268/280 范围内相同的序列,在 396/408 范围内则可能归为 2 类不同的等位基因(图 1),即随着序列长度和多态位点的增加,等位基因的归类会更加详尽具体。在图 1 中,Allele-f 为张玉喜等^[8]发现的一种等位基因,测序长度增加后,两个等位基因 *Paol-DAB5*10* 和 *Paol-DAB5*13* 在前 280 bp 是与其相同的,但在 280 bp 后出现了多个多态位点,从而被归为了 2 个等位基因。所以从理论和应用角度出发,增加测序长度来进行 *MHC II B* 基因型分型是必要的。

通过序列分析,总共发现了 60 个多态性位点(表 2),在扩增得到的 263 bp 的外显子 2 中,比例高达 22.8%。其中位置从 65 到 185 的 27 个位点与张玉喜等^[8]发现的多态性相同;从 193 到 311 的 33 个位点是新发现的。这些多态性位点包含了颠换、置换,有 2 个碱基之间的替换,也有 3 个或 4 个碱基之间的替换。

Paol-DAB5*10	CTC CCT CTT CTT CAT CAC GGT CTG CAC AGC AGG TAG GAT CAG AAC	[45]
Paol-DAB5*13	...	[45]
allele-f	...	[45]
Paol-DAB5*10	ACT GAT CAC TGA TCA ATA CAC TGA TCA ATA CAC TGA TCA ATA CAT	[90]
Paol-DAB5*13	...	[90]
allele-f	...	[90]
Paol-DAB5*10	GGA TCA TTC TCT GAC TCG TTT TCT TGT CTG CTC TTC AGA TGG ATT	[135]
Paol-DAB5*13	...	[135]
allele-f	...	[135]
Paol-DAB5*10	TCG GCA TTA TGT GGT GAA CAA CTG TGA GTT TAA CTC CTC GAA GCT	[180]
Paol-DAB5*13	...	[180]
allele-f	...	[180]
Paol-DAB5*10	GAA CGA CAT CGA GTA CAC ACT GTC TTA CTA TTA CAA CAA ACT GGA	[225]
Paol-DAB5*13	...	[225]
allele-f	...	[225]
Paol-DAB5*10	GAT CAT CAG GTT CAG CAG CAG TGT GGG GAA GTT CGT TGG ATA CAC	[270]
Paol-DAB5*13	...	[270]
allele-f	...	[270]
Paol-DAB5*10	TGA GCA TGG AAT CAA GAA CGC TGA GAA GTG GAA CAA TGG TCA AGA	[315]
Paol-DAB5*13	...	[315]
allele-f	...	[315]
Paol-DAB5*10	GGT GAT CAC TAG AAG AGG TTT TAA GGA GAG GTA CTG CTT TCA CAA	[360]
Paol-DAB5*13	...	[360]
allele-f	...	[360]
Paol-DAB5*10	CGT TGG AGT CTT CAC AGA ATC TGC TCT GAC GAA GTC AGG TGA GTG	[405]
Paol-DAB5*13	... AA GA AGT A	[405]
allele-f	---	[405]
Paol-DAB5*10	TGT	[408]
Paol-DAB5*13	...	[408]
allele-f	---	[408]

图 1 序列长度对 *MHC II B* 基因型的影响

“...”表示相同碱基;“---”表示空位;“□”表示不同的碱基。

Fig.1 Influence of sequence length on *MHC II B* genotyping

“...” means the same nucleotides; “---” means gaps; “□” means different nucleotides.

表 2 野生抗病牙鲈 *MHC II B* 多态性位点
Tab.2 *MHC II B* polymorphism sites of wild disease-resistance *Polivaceus*

位置 Position	替换碱基 Substituted nucleotide	位置 Position	替换碱基 Substituted nucleotide	位置 Position	替换碱基 Substituted nucleotide	位置 Position	替换碱基 Substituted nucleotide
65	TG	126	AC	227	TG	284	ACG
67	CT	127	CTG	228	TG	287	AG
68	AT	128	AT	239	AC	295	AG
69	TC	129	GTC	250	ATG	296	ATC
73	AG	133	CT	251	AC	298	ATCG
74	TC	134	AT	255	AT	299	AT
79	AG	151	GA	260	CG	300	AC
80	CGA	154	AT	261	CT	301	AG
81	AC	155	AT	262	GCAT	302	TC
82	GA	157	AG	263	ACT	304	AG
83	AG	185	AT	264	GT	307	GT
84	CG	193	AT	273	CG	311	AC
106	CT	202	TCG	274	TG		
117	CA	203	AT	275	AT		
122	AT	224	AT	282	GT		
125	CT	225	GT	283	ACT		

注：位置编号以启动子 ATG 的 A 定为 1。
Note: Position number means the position from start codon ATG as the “A” numbered 1.

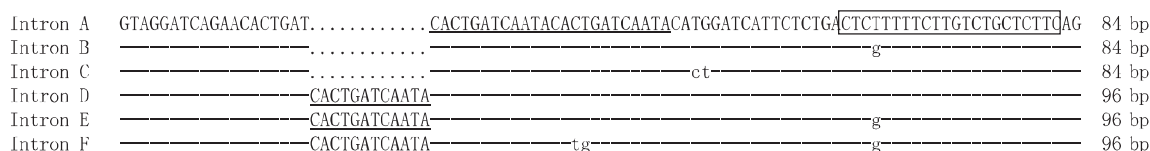
2.2 *MHC II B*基因内含子1的多态性

通过序列分析,共发现了 6 种内含子 (图 2),其中 A 型和 D 型分别与张玉喜等^[8]发现的 2 型和 1 型相同。这 6 种内含子除少数个别位置出现点突变外,大部分碱基是保守的。而且在这些内含子中发现了一个 12 bp 的重复单元 (CACTGAT-CAATA),这个重复单元在 A、B、C 这 3 种内含子中重复了 2 次,而在 D、E、F 这 3 种内含子中重复了 3 次。在内含子 1 的 3' 端有一个富含 CT/GT 的

区域,Godwin^[14]等认为此区域是重组酶 RecA 的潜在识别位点,从而可能诱导重组事件的发生。这种重组可以解释不同内含子中的重复单元,也可以解释不同基因座位的等位基因拥有共同的外显子。不同内含子的出现频率如表 3。其中 D 型和 E 型的分布频率较高,C 型的分布频率较低。不同类型内含子的出现频率与含有该内含子等位基因的数量成正比,即内含子出现的频率越高,含有该内含子等位基因的数目也越多(表 1)。

表 3 *MHC II B* 基因内含子 1 分布情况
Tab.3 Distribution of *MHC II B* intron 1

内含子类型 Intron type	基因频率 Gene frequency	基因型频率 Genotype frequency
A	0.101	0.193
B	0.152	0.241
C	0.009	0.024
D	0.374	0.590
E	0.310	0.506
F	0.055	0.072

图2 野生抗病牙鲈 *MHC II B* 基因 6 种不同内含子

“...”表示空位; “---”表示相同碱基; 小写字母表示不同碱基; 下划线表示重复单元; “[]”表示 CT/GT 区域。

Fig.2 Six different introns of *MHC II B* gene in wild disease-resistance *Polivaceus*

“...” means gap; “---” means the same nucleotide; lowercase means different nucleotides; underlined means repeat elements; “[]” means CT/GT rich region.

3 讨论

主要组织相容性复合体是参与脊椎动物机体免疫的一个重要基因家族,是基因组多态性最丰富的区域之一,主要表现为多座位基因及多等位基因。Robert 等^[15]指出, *MHC* 的多态性主要集中在多肽结合位点 (PBR)。 *MHC II B* 的多肽结合位点位于 $\beta 1$ 区域,对应的核苷酸序列是外显子 2。张玉喜等^[8]分析了外显子 2 前半部分的多态性,此次又对外显子 2 的后半部分进行了多态性分析。

从 83 个抗病个体共得到可用序列 460 条,按照 1% 频率忽略单碱基突变位点,共剔除序列 112 条,剩余的 348 条序列可归为 85 个等位基因。如果不对序列进行剔除处理,则有 197 个等位基因,足见牙鲈 *MHC II B* 多态性之高。此次仅发现了张玉喜等^[8]发现的 13 种等位基因中的 9 种,其余 76 种为新发现的等位基因。所有等位基因都以较低的频率出现,基因频率范围从 0.006 到 0.069,基因型频率范围从 0.012 到 0.169,不存在拥有明显优势的等位基因。该抗病牙鲈群体 *MHC II B* 等位基因具有高多态性和低分布频率的特点,揭示了其 *MHC II B* 基因资源较为丰富,为从中筛选出抗病家系提供了可能。

通过 *MHC II B* 基因长序列分型和短序列分型的比较,说明随着序列长度的增加,多态位点会相应增加,等位基因的归类会更加详尽具体。所以从理论和应用角度出发,增加测序长度来进行 *MHC II B* 基因型分型是必要的。但该结论仅限于 *MHC II B* 基因多态性高的区域。 *MHC II B* 基因的外显子 2 是多态性较高的区域,所以随着序列长度的增加,多态位点会增加,从而导致分型更加精细。但在外显子 2 之外的区域,基因多态性下降,测序长度增加不一定会起到相同的效果。因此,对于水产动物

的 *MHC II B* 基因分型,从应用的角度出发,外显子 2 全长测序已经可以满足基本要求,既能较大程度进行准确分型,又能节约成本。

内含子 1 的多态性在鲈类^[16-17]、鲑类^[18]和草鱼^[19]中也有发现。不同类型的内含子代表了其在染色体的不同位置,所以根据内含子类型对等位基因进行归类 and 命名更具有说服力。本研究共发现了 6 种内含子,这 6 种内含子除少数个别位置出现点突变外,大部分碱基是保守的。而且在这些内含子中发现了一个 12 bp 的重复单元,该重复单元重复次数的差异,导致了两类不同内含子 1 的出现。在内含子 1 的 3' 端含有重组酶的识别位点—富含 CT/GT 的区域^[14]。含有不同内含子 1 的等位基因却拥有共同的外显子,以及内含子 1 中重复单元的出现,都可以证明重组事件很有可能发生过。

MHC 多态性的维持机制有频率依赖选择、性选择和病原菌驱动选择假说^[20-21]。其多态性的产生主要有点突变、高比率等位基因间的重组和较低频率的座位间的重组。这些重组大部分以微重组的形式出现,即不同等位基因间小片段的重组,这些重组更有利于产生新的等位基因^[20]。大量的实验证据表明这种微重组的存在^[20,22],本研究中,内含子 1 中重复单元及 3' 端富含 CT/GT 区域的存在 (图 2),多态位点的密集分布 (表 2),都说明了微重组的存在。

总之,通过分析抗病牙鲈群体的 *MHC II B* 多态性,发现该基因资源较为丰富,说明该抗病群体个体间不具备较高的血缘关系,可以用于下一步抗病家系的筛选,为筛选抗病家系提供了理论支持。

参考文献:

- [1] Nikolich-Zugich J, Fremont D H, Miley M J, et al. The role of

- mhc* polymorphism in anti-microbial resistance[J]. *Microbes Infect*, 2004, 6: 501-512.
- [2] Rothbard J B, Gefter M L. Interactions between immunogenetic peptides and Mhc proteins[J]. *Annu Rev Immunol*, 1991, 9: 527-565.
- [3] Sambrook J G, Russell R, Umrana Y, et al. *Fugu* orthologues of human major histocompatibility complex genes: a genome survey[J]. *Immunogenetics*, 2002, 54: 367-380.
- [4] Quiniou S M-A, Wilson M, Bengtén E, et al. MHC RFLP analyses in channel catfish full-sibling families: identification of the role of MHC molecules in spontaneous allogeneic cytotoxic response[J]. *Dev Com Immunol*, 2005, 29: 457-467.
- [5] Grimholt U, Larsen S, Nordmo R, et al. MHC polymorphism and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*); facing pathogens with single expressed major histocompatibility class I and class II loci[J]. *Immunogenetics*, 2003, 55: 210-219.
- [6] Hoelzel A R, Stephens J C, O'Brien S J. Molecular genetic diversity and evolution at the MHC DQB locus in four species of Pinnipeds[J]. *Mol Biol Evol*, 1999, 16(5): 611-618.
- [7] Mitchison N A, Muller B, Segal R M. Natural variation in immune responsiveness, with special reference to immunodeficiency and promotor polymorphism in class II MHC genes[J]. *Human Immunol*, 2000, 61: 177-181.
- [8] 张玉喜, 陈松林. 牙鲆 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.
- [9] 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*) [J]. *Mar Biotechnol*, 2006, 8(6): 600-610.
- [10] 张玉喜, 陈松林. 牙鲆 MHC II B 基因 cDNA 克隆及其组织表达特异性分析[J]. *高技术通讯*, 2004, 14(增刊): 309-315.
- [11] Miller S A, Dykes D D, Polesky H F. A simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16(3): 1-215.
- [12] Zilberman N, Reikhav S, Hulata G, et al. High-throughput genomic DNA extraction protocol from tilapia's fin tissue[J]. *Aquaculture*, 2006, 255: 597-599.
- [13] Brooks L D. SNP: Why Do We Care?[A]. *Single Nucleotide Polymorphisms Methods and Protocols*[M]. New Jersey: Humana Press, 2003.
- [14] Godwin U B, Flores M, Quiniou S, et al. MHC class II A genes in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Dev Comp Immunol*, 2000, 24: 609-622.
- [15] Robert G, O'hUigin C, Vladimir V, et al. Trans-species polymorphism of class II Mhc loci in danio fishes[J]. *Immunogenetics*, 1996, 44: 36-48.
- [16] Ono H, Klein D, Vincek V, et al. Major histocompatibility complex class II genes of zebrafish[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1992, 89: 11 886-11 890.
- [17] Graser R, O'hUigin C, Vincek V, et al. Trans-species polymorphism of class II Mhc loci in danio fishes[J]. *Immunogenetics*, 1996, 44: 36-48.
- [18] Grimholt U, Getahun A, Hermesen T, et al. The major histocompatibility class II alpha chain in salmonid fishes[J]. *Dev Comp Immunol*, 2000, 24: 751-763.
- [19] Erp S H M, Egberts E, Stet R J M. Characterization of major histocompatibility complex class II A and B genes in gynogenetic carp clone[J]. *Immunogenetics*, 1996, 44: 192-202.
- [20] Hedrick P W. Balancing selection and MHC[J]. *Genetica*, 1999, 104: 207-214.
- [21] Langefors Å, Lohm J, Grahn M, et al. Association between major histocompatibility complex class II B alleles and resistance to *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon[J]. *Proc R Soc Lond B*, 2000, 268: 479-485.
- [22] Ellis S. The cattle major histocompatibility complex: is it unique [J]. *Veterin Immunol Immunopathol*, 2004, 102: 1-8.

Polymorphism of *MHC II B* intron 1 and exon 2 in wild disease-resistance Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)

XU Jian-yong^{1,2}, CHEN Song-lin², BI Jin-zhen²

(1.College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2.Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources of the Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: *MHC II B* genes play a crucial role in immune responses and self-tolerance. MHC and antigen form peptide: MHC (pMHC) complex which could be bound by T-cell receptor (TCR) and initiates immune responses. MHC genes are characterized by their high level of polymorphism. The polymorphism occurs not only in coding region but also in promoter region. There are a lot of researches about the association between different *MHC II B* alleles and resistance or susceptibility to pathogens. As frequency of *MHC II B* alleles in Japanese flounder stock which we studied was low, more individuals were analyzed to find more alleles. Resistant stock was obtained by natural selection and pathogen injection. Fin was cut and stored in ethanol. DNA was extracted by salt-out method. PCR was performed with gene specific primer. The PCR fragment was purified, cloned and sequenced. The sequences were analyzed by DNAMAN and some of them were eliminated according to SNP definition. Eighty five alleles were obtained from 83 resistant individuals based on sequence of *MHC II B* intron 1 and exon 2 in Japanese flounder, among which there were 76 new alleles. Sixty polymorphic sites were discovered from 263 bp exon 2, of which 33 were first discovered. All alleles appeared as low frequency, with gene frequency ranging from 0.006 to 0.069 and genotype frequency ranging from 0.012 to 0.169. Six types of intron 1 were discovered with a 12 bp repeat element while four of them were first discovered. There was a CT/GT rich region at 3' end of intron 1. It is proved that *MHC II B* genes of Japanese flounder were high polymorphic and appeared as low frequency. So the flounders we studied have no close relationship with each other, and are suitable for family selection which could be resistant to pathogen. Micro-recombination exists in *MHC II B* genes of Japanese flounder which could produce polymorphism. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (4): 593-599]

Key words: *Paralichthys olivaceus*; major histocompatibility complex (MHC); polymorphism

Corresponding author: CHEN Song-lin. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn