

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00299

圆斑星鲽 *MHC IIB* 基因结构、多态性及组织表达分析

李宏俊¹, 王娟^{1,2}, 高祥刚¹, 苏浩¹, 刑坤³, 傅立元^{1,2}, 赫崇波¹

1. 辽宁省海洋水产科学研究院, 辽宁省海洋水产分子生物学重点实验室, 辽宁 大连 116023;
2. 辽宁师范大学 生命科学学院, 辽宁 大连, 116029;
3. 大连海洋大学 海洋工程学院, 辽宁 大连 116023

摘要: 通过表达序列标签法和 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术, 分离和克隆了圆斑星鲽 (*Verasper variegatus*) 主要组织相容性复合体(MHC) IIB 的全长 cDNA 序列, 该 cDNA 全长为 1 144 bp, 5'UTR (untranslated region)为 7 bp, 3'UTR 为 450 bp, 开放阅读框(ORF)长度为 687 bp, 可编码 228 个氨基酸, 包含信号肽、抗原结合域(β 1)、IGC 区(β 2)、跨膜区和胞质区 5 个结构域。同源分析表明, 圆斑星鲽 MHC IIB 氨基酸序列与其他硬骨鱼具有 49%~79%的同源性, 与鼠、人、红原鸡和护士鲨的相似性较低, 分别为 34%、33%、31%和 30%。圆斑星鲽 *MHC IIB* 基因含有 5 个内含子, 与其他硬骨鱼不同, 其 β 2 结构域编码区内存在 1 个 109 bp 的内含子。根据获得的 *MHC IIB* 基因组序列设计特异性引物, 在 10 尾野生圆斑星鲽中扩增了包括完整内含子 1 和外显子 2 的长度约 388 bp 的 DNA 片段, PCR 产物直接测序后发现在 270 bp 的抗原结合域中共有 23 个位点发生变异, 密码子第 1 位和第 2 位的变异明显高于第 3 位。利用荧光定量 PCR 分析组织表达发现, *MHC IIB* 基因在健康圆斑星鲽 9 种组织中均有表达, 但表达量存在差异, 肾的表达量最高, 肌肉的表达量最低, 肾、心、脾脏和鳃的表达量显著高于肝、皮肤、脑、血和肌肉。本研究旨在为 *MHC* 基因家族的遗传进化分析、结构与功能的解析提供基础, 同时为圆斑星鲽的分子免疫学和标记辅助育种研究提供参考依据。[中国水产科学, 2011, 18(2): 299-307]

关键词: 圆斑星鲽; MHC IIB; cDNA; 基因结构; 多态性; 组织特性表达

中图分类号: Q959

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)02-0299-09

主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)是在脊椎动物体内发现的参与机体免疫的高度多态基因群, 其表达产物分布于各种细胞的表面, 直接参与抵抗病原体入侵、免疫应答和保持自身稳定的过程^[1]。MHC II 类基因的主要功能是编码识别各种外来抗原的细胞表面转膜蛋白, 并将其呈递给 CD4⁺辅助 T 细胞, 激发针对病原生物特异的免疫反应^[2]。MHC 基因最为突出的特点是高多态性, 在群体内存在大量具有一定频率的等位基因, 而且等位基因之间具有高度的核苷酸多样性^[3]。不同个体间 MHC 遗传背

景的差异将导致个体对疾病的抗性和易感性的差异, 因此, MHC 作为抗病的候选基因被广泛应用于动物的遗传育种研究中^[4-6]。鱼类 MHC 基因的研究开始于 1990 年, Hashimoto 等^[7]通过同源克隆的方法扩增出鲤鱼 MHC I 的部分序列, 目前已有斑马鱼(*Danio rerio*)^[8]、条纹鲈(*Morone saxatilis*)^[9]、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[10]、真鲷(*Pagrus major*)^[11]和半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)^[2]等 30 多种鱼类 MHC 的报道, 鱼类 MHC 结构和功能的研究已取得重要进展。

圆斑星鲽 (*Verasper variegatus*) 隶属于鲽形

收稿日期: 2010-04-04; 修订日期: 2010-04-27.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30972246); 国家鲆鲽类产业技术体系计划项目(nycytx-50-S08); 国家海洋经济规划实施的科技推进平台与运行项目(2008-2009).

作者简介: 李宏俊(1982-), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事水产动物分子遗传学研究. E-mail: oceanlhj@163.com

通讯作者: 赫崇波, 博士, 研究员. Tel: 0411-84697003; E-mail: hechongbo@hotmail.com

目、鲷科、星鲷属, 俗称花斑宝、花瓶鱼等, 属于冷温性大型底栖鱼类。其肉质细嫩鲜美, 富含多种维生素、微量元素, 营养丰富^[12], 主要分布于中国的黄海、渤海、东海, 日本中部以南和韩国西南部的沿海海域, 是非常适合中国北方沿海养殖的珍贵海水鱼类。目前, 国内学者已经开展了圆斑星鲷的生物学^[13]、养殖技术^[14-15]和线粒体基因组^[16]等方面的研究, 但是关于圆斑星鲷抗病机制的研究未见报道。本研究通过大规模 EST 测序结合 RACE 技术获得了圆斑星鲷 MHC IIB 的全长 cDNA 序列, 并且通过特异性 PCR 扩增获得了内含子序列, 以期为 MHC 基因家族的遗传进化分析、结构与功能的解析提供基础, 同时为圆斑星鲷的分子免疫学和标记辅助育种研究提供重要参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用圆斑星鲷采自辽宁省海洋水产科学研究院旅顺养殖基地, 在实验室暂养 1 周后, 选取 10 尾活体解剖后固定肌肉和脾脏组织-80°C 保存。分别取肌肉和脾脏组织, 迅速转移至液氮预冷的研钵中, 使用 Takara 公司的 Trizol 试剂提取总 RNA。取肌肉组织 50~100 mg, 按照常规酚-氯仿方法抽提基因组 DNA^[17]。

1.2 方法

1.2.1 cDNA 文库构建 参照 Clontech 公司的 SMART cDNA Library Construction Kit 操作手册, 构建圆斑星鲷肌肉和脾脏组织的 cDNA 文库, 随机挑选 1 058 个克隆进行测序。对所得序列经过去除载体和拼接后, 利用 NCBI 的 tblastx 程序将单一序列 (singleton) 和拼接序列 (contig) 与 GenBank 中的蛋白数据库进行比对。

1.2.2 MHC IIB 全长 cDNA 和基因组序列的克隆

经过序列比对后发现, 圆斑星鲷脾脏 EST 数据库中 1 条 singleton 与牙鲆的 MHC IIB 具有很高的同源性, 根据这段序列, 利用软件 primer premier 5.0 设计引物 MHCII B3'(表 1), 以 MHCII B3' 和 T7 为引物, cDNA 文库菌液为模板扩增圆斑星

鲷 MHC IIB 基因的 3'端。PCR 反应条件: 94 变性 5 min; 94 变性 30 s, 57 退火 1 min, 72 延伸 1 min, 运行 35 个循环; 72 保温 10 min。为了获得圆斑星鲷 MHC IIB 的基因组序列, 参考近缘物种 MHC IIB 外显子和内含子的结构特征, 研究设计了 2 对引物(表 1)扩增 MHC IIB 基因的内含子。PCR 反应条件: 94 5 min; 94 30 s, 退火 30 s, 72 1 min, 共 35 个循环; 72 10min。所得 PCR 产物克隆到 pMD18-T simple 载体, 转化 *E. coli* Top10 感受态细胞, 送 Takara 公司进行双向测序, 并与原始 EST 序列拼接获得圆斑星鲷 MHC IIB 的基因组序列。

表 1 PCR 扩增引物序列
Tab. 1 Sequences of primers used in this study

引物 primer	引物序列(5'-3') sequence(5'-3')
RACE PCR	
MHCII B3'	GGATTCATCTACTACAAGAGGAAGG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
Intron PCR	
MHCII B-intron1F	ACATGGCTTCATTCTTCTCAG
MHCII B-intron1R	TTTACTCAGGCTGGCGTGTTT
MHCII B-intron2F	AACACGCCAGCCTGAGTAAAC
MHCII B-intron2R	TTTACTCAGGCTGGCGTGTTT
polymorphism	
MHCII BPF	TCCCTCTTCTTCATCACTGTCTGC
MHCII BPR	ACCTGACTTCGTCAGAGCATTTC
realtime PCR	
MHCII B-RTF	GCTGCTTCAACCTGCTTTCTGT
MHCII B-RTR	GTCGGGATCAGACCAGCACAG
β -actinF	AGCCACACTGTCCCATCTAC
β -actinR	CTCGGTGAGGATCTTCATCAG

1.2.3 序列分析 将获得的圆斑星鲷 MHC IIB 的全长 cDNA 序列与 GenBank 核酸数据库及蛋白数据库作 tblast 分析, 同时利用软件 DNAMAN 软件将 cDNA 序列翻译成氨基酸序列, 确定正确的开放阅读框, 利用 SMART 进行蛋白结构域预测, 蛋白质二级结构用软件 PHDsec program 预测分析。利用 Clustalx 1.83 软件对蛋白序列进行多序列比对, 用 MEGA 4.0 中的邻位相联(neighbor-joining, NJ)方法构建进化树。

1.2.4 圆斑星鲈 MHC IIB 多态性分析 根据获得的 *MHC IIB* 基因组序列设计特异性引物 MHC IIBPF 和 MHC IIBPR(表 1), 以 10 尾野生圆斑星鲈基因组 DNA 为模板, 扩增包括完整内含子 1 和外显子 2 的 DNA 片段, 对 *MHC IIB* 基因进行多态性分析。PCR 体系为 25 μ L, 包括 2.5 μ L 10 \times PCR buffer, 2.0 μ L dNTP(2.5 mmol/L), 正反引物(10 μ mol/L)各 1.0 μ L, 模板 1 μ L, 0.4 μ L Pfu DNA polymerase(2.5 U/ μ L, 北京天根)和 17.1 μ L 灭菌水。PCR 产物送 Takara 公司直接进行双向测序。

1.2.5 MHC IIB 组织特异性表达 利用荧光定量 PCR 技术分析圆斑星鲈 MHC IIB 在血、肾、脾脏、心、皮肤、肌肉、肝、鳃和脑 9 种组织中的分布。使用 RNAfast200 试剂盒(上海飞捷)提取总 RNA, M-MLV 反转录酶(Takara)合成 cDNA, 然后以此为模板进行 Realtime PCR。PCR 体系为 25 μ L, 其中包括 2 \times SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Takara) 12.5 μ L, ROX II 0.5 μ L, 引物(表 1)各 1.0 μ L, 模板 2 μ L 和灭菌水 8 μ L。反应程序为: 第一步 95 30 s; 第二步 95 5 s, 60 50 s, 共 40 个循环; 反应结束后进行溶解曲线分析。对于任意一个样品, 目标基因(*MHC IIB*)和內参基因(*β -actin*)扩增时加入等量的模板, 分别对其计算 Δ CT 值, 这些值取平均后再进行 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算^[18], 所得数据采用 SPSS 12.0 软件进行 *t*-test 统计分析。

2 结果与分析

2.1 圆斑星鲈 *MHC IIB* 基因组序列的结构特征

利用构建 cDNA 文库和大规模 EST 测序获得了 1 条长度为 917 bp 的序列, 经 tblastx 分析确认为圆斑星鲈 *MHC IIB* 基因片段。根据这段序列设计正向引物 MHC IIB3' 扩增 3' 末端, 所得片段经测序和拼接后得到 1 144 bp 的 *MHC IIB* 全长 cDNA (GenBank accession No. GU253881)。该全长 cDNA 含有 7 bp 的 5'UTR, 450 bp 的 3'UTR, 3'UTR 区含有多聚腺苷酸加尾信号 AATAAA 和 Poly A 尾巴; 开放阅读框架长度为 687 bp, 可以编码 228 个氨基酸。根据所得全长 cDNA 序列, 参考硬骨鱼 *MHC IIB* 的基因组结构, 设计了 2 对基因特异

性引物扩增内含子, PCR 产物经克隆、测序后, 获得包含 6 个外显子和 5 个内含子的 *MHC IIB* 基因组序列(图 1)。第一外显子包括 7 bp 的 5'UTR 和信号肽, 第二外显子编码 $\beta 1$ 结构域, 第三和第四外显子编码 $\beta 2$ 结构域, 第五和第六外显子编码连接肽、跨膜结构域和胞质结构域。圆斑星鲈 *MHC IIB* 基因 5 个内含子的长度在 85~356 bp, 第 2 内含子存在 1 个(GT)_n(CTGT)_n 微卫星位点; 与其他硬骨鱼不同, 圆斑星鲈 *MHC IIB* 的 $\beta 2$ 结构域编码区内存在 1 个 109 bp 的内含子(图 2)。

2.2 圆斑星鲈 *MHC IIB* 编码氨基酸的序列特征

圆斑星鲈 *MHC IIB* 基因编码 228 个氨基酸, 预测的蛋白质分子量为 27.97 kD, 理论等电点为 7.00, 为中性蛋白。利用软件 SMART 对其进行结构域预测, 结果表明, 该预测蛋白属于跨膜糖蛋白, 是典型的 MHC II 类家族成员, 含有前导肽、多肽结合域($\beta 1$)、IGC(Immuno Globulin C-Type)区($\beta 2$)、连接肽、跨膜区和胞质区 5 个结构域。利用软件 PHDsec program 分析 *MHC IIB* 蛋白二级结构, 在 $\beta 1$ 的第 32 位上含有 1 个 N-糖基化位点(N-X-S/T), 在 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 和连接肽上含有 4 个蛋白激酶 C-磷酸化位点(S/T-X-R/K), $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 和连接肽存在 7 个酪氨酸激酶 II 磷酸化位点(S/T-X-X-D/E), 在 $\beta 2$ 和胞质区存在 2 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)。

使用软件 Clustalx 将得到的圆斑星鲈 *MHC IIB* 氨基酸序列与其他鱼类、鼠和人进行多重序列比对, 结果显示圆斑星鲈 *MHC IIB* 氨基酸序列具有较高的保守性, 圆斑星鲈与其他物种的同源性在 30%~79%(表 2), 其中圆斑星鲈与牙鲆的相似度最高为 79%, 与条纹鲈、大黄鱼、真鲷、半滑舌鲷、大西洋鲑、鲤鱼和斑马鱼的相似度分别为 75%、70%、69%、67%、57%、55%和 51%, 与鼠、人、红原鸡和护士鲨的相似性最低, 分别为 34%、33%、31%和 30%。利用 MEGA 软件, 以邻位相接法, 构建了 *MHC IIB* 的系统进化树(图 3), 结果表明, 所有硬骨鱼类的 *MHC IIB* 氨基酸序列聚为一簇, 其中鲈形目的圆斑星鲈与牙鲆聚为 1 个分支, 鲈形目的条纹鲈和真鲷为 1 个分支,

表 2 圆斑星鲈 *MHC IIB* 与其他鱼类和高等脊椎动物的氨基酸相似度
 Tab.2 Identity of spotted halibut *MHC IIB* amino acid sequence with those of other fishes and high vertebrates

物种 species	GenBank 注册号 GenBank accession no.	圆斑星鲈相似度/% identity with spotted halibut
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	AY848955	79
条纹鲈 <i>Morone saxatilis</i>	AAA49379	75
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	ABV48908	70
真鲷 <i>Pagrus major</i>	AAX63386	69
半滑舌鳎 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	ACI88826	67
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	CAA49726	57
鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>	CAA64706	55
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	CAD87794	51
鼠 <i>Mus musculus</i>	P18469	34
人 <i>Homo sapiens</i>	M11161	33
红原鸡 <i>Gallus gallus</i>	AAS00716	31
护士鲨 <i>Ginglymostoma cirratum</i>	AAF82681	30

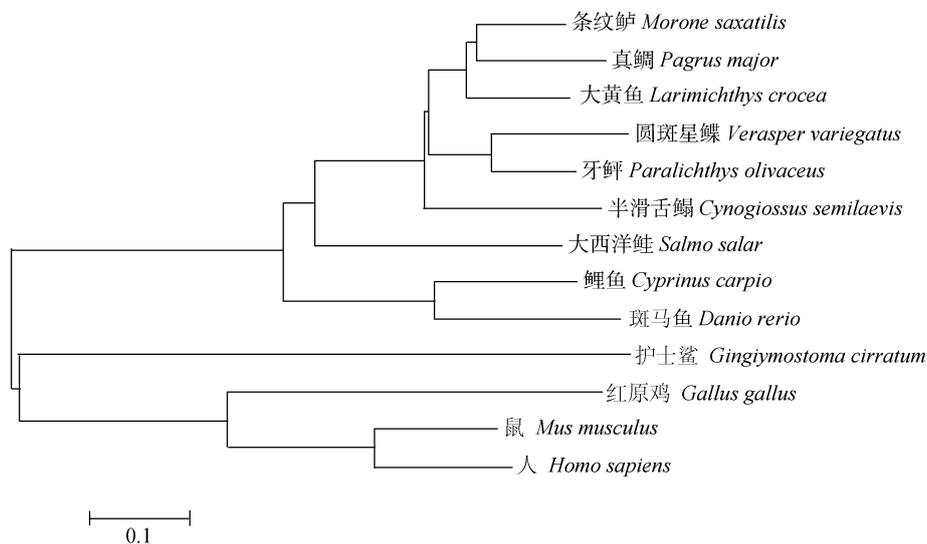


图 3 根据 *MHC IIB* 氨基酸序列使用邻接法构建的系统进化树

Fig.3 Neighbor-joining phylogenetic tree constructed with the amino acid sequences of *MHC IIB*

都位于硬骨鱼类分支的基部; 软骨鱼类与其他高等脊椎动物聚合为另一簇。圆斑星鲈 *MHC IIB* 分子进化地位与其生物学分类地位基本一致。

2.3 圆斑星鲈 *MHC IIB* 基因内含子 1 和外显子 2 的序列多态性

利用引物 *MHC IIBPF* 和 *MHC IIBPR* 对 *MHC II* 基因的内含子 1 和外显子 2 序列多态性进行分析, PCR 产物直接双向测序和序列比对后发现, 设计的引物扩增长度为 388 bp, 其中内含子 1 长 85 bp, 外显子 2 长 270 bp, 编码 90 个氨基酸残

基。内含子 1 未发现单核苷酸变异位点; 在外显子 2 中共发现 23 个单核苷酸变异位点(表 3), 其中密码子第 1 位、第 2 位和第 3 位的变异位点分别为 10, 9 和 4, 密码子第 1 位和第 2 位的突变率明显高于第 3 位。

2.4 圆斑星鲈 *MHC IIB* 在不同组织中的表达分析

提取 3 条圆斑星鲈成鱼的血、肾、脾脏、心、皮肤、肌肉、肝、鳃和脑 9 种组织的 RNA, 反转录为 cDNA 后, 以此 cDNA 为模板进行 Realtime PCR, 结果显示, 在 9 种组织中 *MHC IIB* 基因均

有表达(图 4), 但是表达量存在差异, 其中肾的表达量最高, 肌肉的表达量最低, 肾、心、脾脏和鳃的表达量显著高于肝、皮肤、脑、血和肌肉($P < 0.05$)。

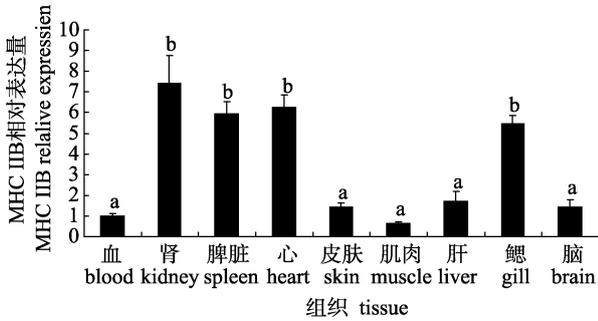


图 4 圆斑星鲈 MHC IIB 组织表达 Realtime PCR 分析柱上不同字母表示各组织间的表达量存在显著差异($P < 0.05$)。

Fig.4 Tissue distribution of spotted halibut MHC IIB transcript measured by Realtime PCR
Different letters on columns mean significant difference ($P < 0.05$) among different tissues.

3 讨论

主要组织相容性复合体(MHC)是脊椎动物适应性免疫的重要成员, 它编码细胞表面糖蛋白, 激发机体的免疫应答, 一直是鱼类免疫学和遗传育种学研究的热点。MHC 基因遗传特性中最为突出的特点是高多态性, 不同等位基因的 MHC 分子可以结合和呈递特异性多肽, 不同 MHC 分子的单倍型导致个体对某些病原体反应的不同, 已有的研究发现, MHC 基因的多态性可以导致人^[19]、鸡^[20]、鸟^[21]、鼠^[22]和鱼类^[3,23-24]不同个体抗病力的差异。本研究采用表达序列标签法, 结合 cDNA 末端快速克隆法, 获得了圆斑星鲈 MHC IIB 全长 cDNA 序列, 该 cDNA 编码前导肽、抗原结合域($\beta 1$)、IGC($\beta 2$)、连接肽、跨膜区和胞质区 5 个结构域, $\beta 1$ 和 $\beta 2$ 结构域含有 4 个保守的半胱氨酸残基, 这 4 个氨基酸残基在其他硬骨鱼类 MHC IIB 氨基酸序列的相同位置也存在, 并两两组成二硫

表 3 圆斑星鲈 MHC IIB 外显子 2 的序列多态性
Tab.3 Distribution of SNP sites within exon2 of spotted halibut MHC IIB sequences

序号 number	位置 position	核苷酸 nucleotide	等位基因数($n=20$) allele nos. ($n=20$)	序号 number	位置 position	核苷酸 nucleotide	等位基因数($n=20$) allele nos.
1	159	T	16	13	280	C	13
		C	2			T	7
		G	2			A	18
2	162	T	17	14	321	G	2
		A	3			A	17
3	165	G	13	15	322	C	3
		A	7			A	16
4	167	T	14	16	324	G	4
		G	6			G	17
5	168	A	11	17	325	C	3
		T	9			G	10
6	170	C	15	18	327	C	7
		A	5			T	3
7	171	T	14	19	328	G	10
		G	6			C	6
8	172	C	4	20	376	T	4
		T	16			A	11
9	214	A	14	21	387	C	9
		T	6			A	13
10	219	G	12	22	400	G	7
		C	8			G	12
11	277	A	16	23	401	T	8
		T	4			A	8
12	278	C	16			T	8
		G	4			C	4

键^[2,11]。圆斑星鲽 *MHC IIB* 基因的 $\beta 1$ 结构域存在 1 个 N-X-S/T 糖基化位点, 在大西洋鲑、牙鲆和半滑舌鲷的相同位点也存在, 张玉喜等^[10]认为该糖基化位点用于指导 MHC II 分子 $\alpha\beta$ 二聚体形成分子伴侣。通常认为鱼类 MHC II 类基因的跨膜域高度保守, 本研究发现圆斑星鲽在这一区域和其他鱼类及哺乳动物一样均含有 GXXGXXXGXXX XXXG 框(X 指疏水氨基酸残基), Cosson 等^[25]推测此框与 *MHC IIB* 基因形成 $\alpha\beta$ 异二聚体有关。

本研究利用特异 PCR 方法获得了圆斑星鲽 *MHC IIB* 基因的全长序列共 2 047 bp, 其中包含 6 个外显子和 5 个内含子, 内含子两侧都具有 RNA 正确剪接所必须的识别位点(GT/AG), 符合外显子和内含子连接区域的 GT-AG 剪切原则。与其他已报道的硬骨鱼 *MHC IIB* 基因结构^[2]不同, 圆斑星鲽 $\beta 2$ 结构域编码区(外显子 3)存在 1 个 109 bp 的内含子, 其余编码区的长度与牙鲆和半滑舌鲷几乎完全一致。Figueroa 等^[26]发现鲷鱼和其他鲈形目以及刺鲈鱼 *MHC IIB* 基因的 $\beta 2$ 结构域编码区也具有 1 个额外的内含子, 该内含子不仅可以作为系统发生的标记, 而且证明鱼类 MHC 基因在进化过程中经历过多轮复制。相比外显子, 圆斑星鲽内含子的长度与其他鱼类相比变异较大, 这是由于内含子承担的进化压力小, 内含子序列的相似度更低。这些结果表明在进化过程中不同物种同一基因的编码序列是高度保守的, 内含子虽然在一定程度上反应物种之间的亲缘关系, 其数目和长度是可变的, 同源性较低。

在人类及其他高等动物中, MHC 是基因组中遗传多样性最丰富的区域之一, 鱼类 MHC 分子的抗原结合域决定了外源肽结合的亲和力和 T 细胞识别的特异性, 为多态位点集中的区域。在 II 类分子中, 多肽结合域由 α 和 β 片段组成, 分别对应 II 类 A 和 B 基因的第 2 外显子。本研究利用 PCR 产物直接测序的方法, 探讨了圆斑星鲽 *MHC IIB* 基因第 2 外显子的序列多态性, 在 270 bp 的多肽结合域中共发现 23 个单核苷酸变异, 证明 *MHC* 基因的多态性极为丰富, 这与前人的研究结

果基本一致。张玉喜等^[27]在牙鲆 *MHC IIB* 编码的 61 个氨基酸位点中发现 13 个位点是多态的, 其中有 6 个位点发生在多肽结合位点上; 徐建勇等^[28]通过对野生抗病牙鲆 *MHC IIB* 内含子 1 和外显子 2 直接测序的方法, 在 263 bp 的外显子 2 中, 共发现 60 个多态性位点。本研究揭示了圆斑星鲽 *MHC IIB* 基因丰富的遗传多样性, 为下一步筛选抗病基因标记和分子育种奠定了良好的基础。

MHC 基因主要表达于免疫系统的细胞, 如哺乳动物的树突状细胞、B 细胞、巨噬细胞和其他抗原呈递细胞^[29]。Koppang 等^[30]发现, *MHC IIB* 在大西洋鲑的前肠、脾、后肠和鳃中高表达, 在脑和肌肉组织中低表达或痕量表达; Xu 等^[2]在半滑舌鲷上利用 realtime PCR 研究了 *MHC IIA* 和 *MHC IIB* 在不同组织中的相对表达水平, 发现在所检测的 12 种组织中均有表达, 并且表达方式相似, 在鳃、肝、胃、后肾和脾中有较高的转录水平, 在眼、肠、脑和性腺中的转录水平较低。本研究发现, 在健康圆斑星鲽中, *MHC IIB* 较强表达于肾、心、脾脏和鳃, 在肝、皮肤、脑、血和肌肉中表达较弱, 与前人的研究结果基本相符。*MHC II* 类基因在硬骨鱼类所有组织中均有表达, 可能是由于血液的污染造成的, 因为血液中的白细胞表达该基因。圆斑星鲽 *MHC IIB* 在肾、心、脾脏和鳃中的高表达量与大菱鲆^[10]相似, 这暗示鱼类的免疫反应是通过这些器官起始和发生的, *MHC II* 基因的表达同这些组织含有的淋巴/骨髓细胞有关。

参考文献:

- [1] 徐田军, 陈松林. 鱼类 MHC 及其基因研究进展[J]. 海洋水产研究, 2008, 29(4): 116-126.
- [2] Xu T J, Chen S L, Ji X S, et al. Molecular cloning, genomic structure, polymorphism and expression analysis of major histocompatibility complex class IIA and IIB genes of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. Fish Shell Immunol, 2009, 27(2): 192-201.
- [3] 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(4): 210–219.
- [4] Hughes A L. MHC polymorphism and the design of captive breeding programs[J]. *Conserv Biol*, 1991, 5(2): 249–251.
- [5] Wedekind C, Walker M, Portmann J, et al. MHC-linked susceptibility to a bacterial infection, but no MHC-linked cryptic female choice in whitefish[J]. *J Evolut Biol*, 2004, 17(1): 11–18.
- [6] Traul D L, Li H, Dasgupta N, et al. Resistance to malignant catarrhal fever in American bison (*Bison bison*) is associated with MHC class IIa polymorphisms[J]. *Ani Gen*, 2007, 38(2): 141–146.
- [7] Hashimoto K, Nakanishi T, Kurosawa Y. Isolation of carp genes encoding major histocompatibility complex antigens [J]. *Proceeding of National Academy of Sciences of the USA*, 1990, 87(17): 6863–6867.
- [8] Sültmann H, Mayer W, Figueroa F, et al. Organization of Mhc class IIB genes in the zebrafish (*Brachydanio rerio*)[J]. *Genomics*, 1994, 23(1): 1–14.
- [9] Hardee J J, Godwin U, Benedetto R, et al. Major histocompatibility complex class IIA gene polymorphism in the striped bass [J]. *Immunogenetics*, 1995, 41(4): 229–238.
- [10] 张玉喜, 陈松林. 大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)MHC IIA 基因全长 cDNA 的克隆与组织表达分析[J]. *海洋与湖沼*, 2007, 38(3): 221–226.
- [11] Chen S L, Zhang Y X, Xu M Y, et al. Molecular polymorphism and expression analysis of MHC II B gene from red sea bream (*Chrysophrys major*)[J]. *Developm Comp Immunol*, 2006, 30(4): 407–418.
- [12] 王远红, 陈四清, 吕志华, 等. 圆斑星鲈的营养成分分析 [J]. *营养学报*, 2006, 28(3): 271–272.
- [13] 陈四清, 于东祥, 马爱军, 等. 圆斑星鲈 *Verasper variegates* (Temminck et Schegel)生物学特性研究[J]. *现代渔业信息*, 2002, 17(10): 25–27.
- [14] 苗淑彦, 张利民, 王际英, 等. 圆斑星鲈的生物学特性及养殖技术[J]. *水产科技情报*, 2009, 36(3): 137–139.
- [15] 宋广军, 木云雷. 野生圆斑星鲈的驯养试验[J]. *水产科学*, 2008, 27(7): 366–367.
- [16] 赫崇波, 高祥刚, 王效敏, 等. 圆斑星鲈线粒体基因组全序列结构及其进化[J]. *中国水产科学*, 2007, 14(4): 584–592.
- [17] 李宏俊, 刘晓, 杜雪地, 等. 海湾扇贝微卫星标记开发及其分离方式分析[J]. *海洋科学*, 2009, 33(12): 4–8.
- [18] Livak K, Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) [J]. *Method*, 2001, 25(4): 402–408.
- [19] Flores-Villanueva PO, Hendel H, Caillat-Zucman S, et al. Associations of MHC ancestral haplotypes with resistance/susceptibility to AIDS disease development[J]. *J Immunol*, 2003, 170(4): 1925–1929.
- [20] Briles W E, Briles R W, Taffs R E, et al. Resistance to a malignant lymphoma in chickens is mapped to subregion of major histocompatibility (B) complex[J]. *Science*, 1983, 219(4587): 977–979.
- [21] Medina E, North R J. Resistance ranking of some common inbred mouse strains to *Mycobacterium tuberculosis* and relationship to major histocompatibility complex haplotype and Nrampl genotype[J]. *Immunology*, 1998, 93(2): 270–274.
- [22] Kaufman J, Wallny H J. Chicken MHC molecules, disease resistance and the evolutionary origin of birds[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1996, 212(285): 129–141.
- [23] Xu T J, Chen S L, Ji X S, et al. MHC polymorphism and disease resistance to *Vibrio anguillarum* in 12 selective Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) families[J]. *Fish Shellf Immunol*, 2008, 25(3): 213–221.
- [24] Zhang Y X, Chen S L, Liu Y G, et al. Major histocompatibility complex class IIB allele polymorphism and its association with resistance/susceptibility to *Vibrio anguillarum* in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Mar Biotechnol*, 2006, 8(6): 600–610.
- [25] 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.
- [26] Figueroa F, Ono H, Tichy H, et al. Evidence for insertion of a new intron into an Mhc gene of perch-like fish[J]. *Proceedings: Biological Sciences*, 1995, 259(1356): 325–330.
- [27] 张玉喜, 陈松林. 牙鲈 MHC class 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.
- [28] 徐建勇, 陈松林, 毕金贞. 野生抗病牙鲈 MHC IIB 内含子 1 和外显子 2 序列多态性[J]. *中国水产科学*, 2008, 15(4): 593–599.
- [29] Dixon B, van Erp S H, Rodrigues P N, et al. Fish major histocompatibility complex genes: an expansion[J]. *Developm Compar Immunol*, 1995, 19(2): 109–133.
- [30] Koppang E O, Lundin M, Press C M, et al. Differing levels of Mhc class II β chain expression in a range of tissues from vaccinated and non-vaccinated Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. *Fish Shellf Immunol*, 1998, 8(3): 183–196.

Genomic structure of MHC IIB from spotted halibut *Verasper variegates*: genomic structure, polymorphism and tissue expression analysis

LI Hongjun¹, WANG Juan^{1,2}, GAO Xianggang¹, SU Hao¹, XING Kun³, FU Liyuan^{1,2}, HE Chongbo¹

1. Liaoning Ocean and Fishery Science Institute, Liaoning Key Laboratory of Marine Fishery Molecular Biology, Dalian 116023, China;

2. College of Life Sciences, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China;

3. College of Ocean Engineering, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China

Abstract: Major histocompatibility complex (MHC) plays an important role in the immune response of vertebrates. Its function is to present self and non-self peptide to T-cells receptor. In order to study the function and molecular polymorphism of class II genes in teleost, MHC IIB was identified from *Verasper variegates* by expressed sequence tags (ESTs) and rapid amplification of cDNA ends (RACE) approach. The full length cDNA was of 1 144 bp, consisting of 5' UTR of 7 bp, a 3' UTR of 450 bp with a poly (A) tail, and an open reading frame (ORF) of 687 bp encoding a polypeptide of 228 amino acids, which contained a signal peptide, a peptide-binding region (β 1), an immunoglobulin-like region (β 2), a transmembrane region and a cytoplasmic region. Phylogenetic analysis demonstrated that the putative *V. variegates* MHC IIB amino sequence showed 30%-79% identity with those of other teleosts and vertebrates. The genomic MHC IIB contained 6 exons and 5 introns. An important difference between *V. variegates* MHC IIB and other known class IIB genes was that β 2 domain-encoding exon was split by an intron of 109 bp in length. There were 23 single nucleotide variable sites in exon 2. Realtime PCR analysis demonstrated that MHC IIB was ubiquitously expressed in nine tested tissues, but the expression levels were different. The expression levels in kidney, heart, spleen and gill were significantly higher than those in liver, skin, brain, blood and muscle. [Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(2):299-307]

Key words: *Verasper variegates*; MHC IIB; cDNA; genomic structure; polymorphism; mRNA expression

Corresponding author: HE Chongbo. E-mail: hechongbo@hotmail.com