

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.01368

败血症鲢肝与肾 cDNA 文库构建及 MHC class I 的克隆与分析

汪登强^{1,2} 罗晓松² 陈大庆²

1. 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 武汉 430223

摘要: 采用 CloneMiner™ cDNA 文库构建试剂盒构建了患败血症的鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)肝和肾的 cDNA 文库。经检验, 文库的滴度为 1.34×10^7 cfu/mL, 总库容为 2.68×10^7 cfu, 阳性克隆率为 97.5%, 平均插入片段大于 1.2 kb。对 80 个随机挑选的克隆进行两端测序, 结果显示有 74 个测序成功。经在 GenBank 上 BLAST 比对, 其中 57 个为已知功能基因, 属于 45 个不同基因, 另外 17 个没有明显的同源序列。在已知功能的 57 个克隆中, 含有全长编码区序列的克隆共有 49 个, 全长 cDNA 比率为 61.25%。采用 PCR 法对文库进行筛选, 获得一个含 MHC class I 完整编码区的序列, 该序列具有典型的脊椎动物 MHC class I 的序列特征。本研究完成鲢肝和肾较高质量的 cDNA 文库的构建, 旨在为今后开展鲢功能基因研究奠定基础。

关键词: 鲢; cDNA 文库; MHC; 肝; 肾

中图分类号: Q959

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)06-1368-09

鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)是中国“四大家鱼”之一, 因适应能力强、生长速度快、易于饲养, 为中国大陆最重要的淡水养殖品种之一。除了用作养殖对象外, 鲢因其滤食浮游藻类而且食量大, 也常被放养于湖泊等水体, 用于控制藻类繁殖, 起到生物治污作用^[1]。近 40 年来, 人们对鲢的种质和养殖进行了许多^[1-4], 对重要功能基因的研究还很少。通过构建 cDNA 文库来筛选功能基因是功能基因研究的基本手段之一, 构建鲢 cDNA 文库, 开展鲢的功能基因的研究是十分必要性的, 但目前尚未见到任何鲢 cDNA 文库构建的报道。

主要组织相容性复合体(MHC)编码细胞表面糖蛋白, 识别和结合抗原, 并将抗原呈递给 T 淋巴细胞, 激发脊椎动物产生适应性免疫反应。MHC 主要有两类: class I 和 class II, 其中 class I 主要呈递细胞内抗原, 有 3 个胞外功能结构域,

即 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$ 区, 表达于所有的有核细胞。迄今, 已经有不少脊椎动物的 class I 被克隆和分析, 并应用于群体遗传学、生态学、免疫学、适应性免疫系统进化等各个方面^[5]。Chen 等^[7]研究表明, 草鱼 class I 能够结合草鱼出血病病毒, 受干扰素调控^[6]。鲢的 class I 的基因片段已经被克隆, 但还没有得到全部编码序列。

近年来鲢养殖过程中出现经常暴发性败血症, 主要表现为鳍基、眼眶、鳃盖及两侧等充血, 肛门红肿, 腹部膨大, 鳃丝苍白。解剖鱼体后可见, 肝、脾、肾器官肿大, 肠壁充血。该病病原主要是嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*), 可能由其他细菌或多种病原引起, 具有频繁发生、发病急、死亡率高、具有传染性的特点, 是危害鲢养殖的主要疾病^[8]。本研究拟构建患暴发性败血病的鲢肝和肾组织 cDNA 文库, 并克隆鲢 class I 基因, 以期为进一步研究鲢的功能基因, 特别是免

收稿日期: 2010-10-18; 修订日期: 2011-04-03.

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(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心)

作者简介: 汪登强(1973-), 男, 副研究员, 主要从事鱼类遗传学研究. E-mail: wdq@yfi.ac.cn

通信作者: 陈大庆. E-mail: chdq@yfi.ac.cn

疫相关基因的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

鲢 1 尾, 2009 年 7 月份取于湖北荆门市西湖水库。鱼体鳍条、周身及眼睛出血, 游泳缓慢, 为典型的暴发性败血症症状。现场解剖鱼体, 取肝、肾组织各约 50 mg 放入预先加 4 mL Trizol(大连宝生物工程有限公司)的玻璃匀浆器, 迅速匀浆后分装到 2 mL 离心管, 冰上保存带回实验室。同时将鱼带回实验室分离和鉴定病原。病原鉴定的结果显示, 主要病原为嗜水气单胞菌, 正是暴发性败血症的主要病原体。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及 mRNA 分离 总 RNA 提取参照 RNAiso Reagent (大连宝生物工程有限公司)说明书操作。取 2 μ L 总 RNA 溶液在 1.2% 琼脂糖甲醛变性凝胶电泳检测质量, 紫外分光光度计测量浓度。根据浓度, 等量混合肝脏和肾脏总 RNA, 并采用 FastTrack[®] 2.0 Kit (Invitrogen)试剂盒并按操作手册从总 RNA 并抽提 mRNA, 电泳检测并定量。

1.2.2 cDNA 文库构建 文库使用 CloneMiner[™] cDNA Library Construction Kit (Invitrogen)来构建, 实验按试剂盒推荐的步骤进行。

1.2.3 文库的鉴定 文库总克隆数估算: 取转化后细菌原液 1 μ L 稀释 1 000 倍后, 从中取出 50 μ L 涂布 LB 平板(含卡那霉素), 第 2 天计数, 共统计 3 个平板, 总克隆数(cfu) = 平板上的克隆数 $\times$ 1 000 倍 $\times$ 2 $\times$ 10。随机挑选 160 个克隆, 采用通用引物 M13 (M13F: 5'-TGTAACGACGCGCCAGT-3'; M13R: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3')对其中 80 个克隆进行菌液 PCR 反应以鉴定文库重组率及平均插入片段大小, 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min, 共 30 个循环; 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。对其余 80 个克隆进行两端测序以估计文库全长 cDNA 比例。

1.2.4 MHC class 基因筛选 用于筛选 class 基因的引物是 IaF: 5'-CARHNGATGTAYGGTGT

和 IaR: 5'-YTTNARCCAYTCNATRCA-3'^[7]。随机挑取克隆到 384 孔板, 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养过夜。参照徐军望等的方法^[9]采用 PCR 法进行筛选 class 基因。筛选到的阳性克隆进行测序。

1.3 序列分析

对随机挑选克隆序列的分析, 采用核苷酸和推算出可能的氨基酸序列在 GenBank 中做 BLAST 比较, 确定其所代表的基因。利用在线工具 AmiGO(<http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/go.cgi>)已知基因编码的蛋白进行 GO 分类。通过与 GenBank 上的全长序列比较序列的长度、是否存在起始密码子(ATG)以及 3' 是否存在 poly(A), 以确定克隆是否是全长 cDNA。

对 MHC class I 序列, 比较鲢与 GenBank 中代表物种的序列, 分析各个结构域和特征位点。采用 MEGA 4.0^[10]构建鲢与代表物种全长的和 α 3 区氨基酸的邻接(Neighbor-joining, NJ)树。

2 结果与分析

2.1 文库质量

3 个平板克隆数分别是 525 个、703 个和 776 个, 共 2004 个, 由此推出文库的滴度为 1.34×10^7 cfu/mL, 2 mL 文库的库容就是 2.68×10^7 cfu。对随机挑选的 80 个克隆 PCR 结果显示, 有 78 个得到扩增产物(图 1), 表明文库的重组率为 97.5%。这 78 个 PCR 产物的片段大小为 0.8~3.5 kb。对 80 个克隆进行两端测序, 其中 74 个获得有效的序列。通过 BLAST 比对发现已知功能基因的有 57 个克隆, 其余 17 个未知功能。已知功能基因的 57 个克隆共鉴定出 45 个不同的基因, 这些基因及部分 GenBank 登录号列于表 1。对这 45 个基因的蛋白质进行分类, 其中 16 个属于细胞组分(cellular component), 占 35.6%; 具有分子功能(molecular function)的有 20 个, 占 44.4%; 6 个处于生物学过程(biological process), 占 13.3%; 另外 3 个归属不明(表 1)。通过对比 GenBank 上的同源序列以及推导出的氨基酸序列, 发现含有全长编码区序列的 cDNA 克隆共有 49 个, 全长 cDNA 比率为 61.25%(52/80)。

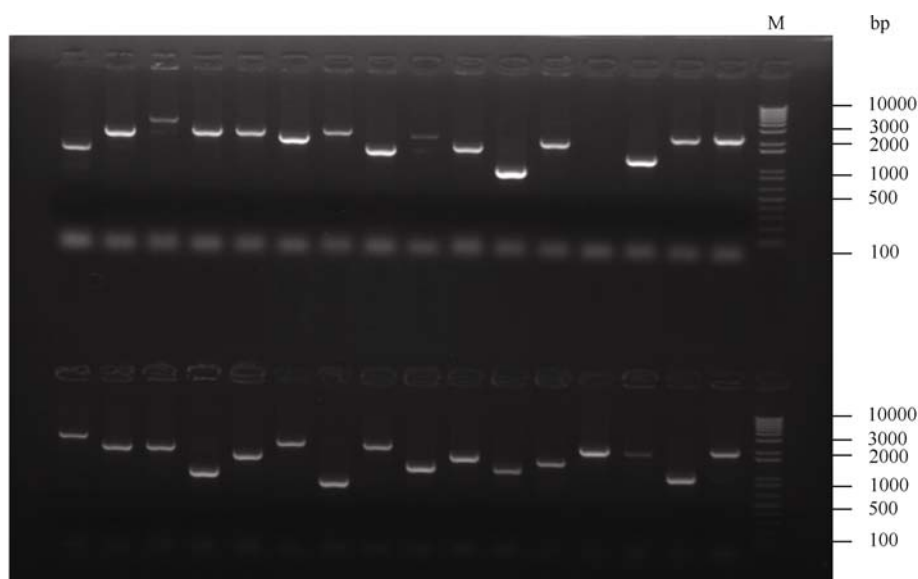


图 1 鲢 cDNA 文库插入片段的 PCR 鉴定

M: DNA 分子标记

Fig.1 PCR product of recombinant clones in cDNA library of silver carp
M: DNA marker

2.2 MHC class 的克隆与序列分析

采用 MHC 引物对克隆进行 PCR 筛选, 结果得到一个阳性克隆。将阳性克隆测序, 并经 BLAST 比对, 确认克隆的 cDNA 为 MHC class 序列。得到的鲢 MHC class I cDNA 序列全长为 1 645 bp, 根据 Klein 等命名规则^[11]命名为 Hymo_UA, 包括 5'UTR(非翻译区)37 bp、编码区 1026 bp、3'UTR 及 poly(A) 582 bp(图 2)。编码区编码 341 个氨基酸(aa), 包括信号肽 16 aa、 $\alpha 1$ 区 88 aa、 $\alpha 2$ 区 90 aa、 $\alpha 3$ 区 87 aa、跨膜及胞质区 60 aa。3'UTR 于 poly(A)前第 23 个碱基位置存在 poly(A)加尾信号 AATAAA, 而于第 100 个碱基位置起存在一段(TC)₂₂(AC)₁₂的微卫星序列(图 2)。

与其他几种脊椎动物, 包括草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*, Ctld_UA, AY391782)、斑马鱼(*Danio rerio*, Dare_UA, Z46777)、鲤(*Cyprinus carpio*, Cyca_UA, X91015)、大西洋鳕(*Gadus morhua*, Gamr_UA, AJ132511)、大西洋鲑(*Salmo salar*, Sasa_UA, AF504019)、中华鲟(*Acipenser Sinensis*, Acsi_UA, GQ485572)、匙吻鲟(*Polyodon spathala*, Posp_UA, GQ485566)、人(*Homo sapiens*, HLA-A2, K02883)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*,

Xela_UBA, L20733)、美洲鬣蜥(*Iguana iguana*, Igig_UB, EU604317)、护士鲨(*Ginglymostoma cirratum*, Gici_11, AF028557)、虎鲨(*Heterodontus francisci*, Hefr-20, AF028559)的 MHC class I aa 比较(图 3), 鲢与草鱼的相似性最高, 为 72.3%, 其次是斑马鱼(71.0%), 与人、爪蟾、蜥蜴、鲨鱼等相似性较低, 仅为 31.9%~36.1%。尽管不同物种间序列差异比较大, 但存在一些对引导 MHC class I 行使功能有重要作用的保守位点, 如 8 个保守的肽结合位点 YYRTKWYY、构成 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$ 区盐桥的半胱氨酸(C)、糖基化位点(NQT 或 NQS)等^[12]。鲢 MHC class I 序列同样存在这些保守序列, 只是在第一个保守肽结合位点 Y 的位置有一个位点偏差, 斑马鱼的序列也有相同情况(图 3)。

基于 MHC class I 全长氨基酸序列构建的 NJ 系统树上, 鲢与斑马鱼具有最近的系统关系, 而基于相对保守的 $\alpha 3$ 和跨膜及胞质区序列构建的 NJ 树上, 鲢与草鱼的系统关系最近。

3 讨论

文库的滴度、总容量、重组率、平均插入片段长度等是评价一个 cDNA 文库的质量主要指标,

表 1 鲢 cDNA 文库部分序列
Tab. 1 Partial sequences in cDNA library of silver carp

GO 分类 gene ontology	同源基因 homologous gene	GenBank 登录号 GenBank accession No.	全长 cDNA complete cDNA	克隆 clones
cellular component	蛋白酶体成熟蛋白 proteasome maturation protein	HM124737	是	1
	核糖体 L35a 蛋白 ribosomal protein L35a		是	1
	核糖体 P0 蛋白 ribosomal protein, large, P0	HM124745	是	1
	核糖体 L7a 蛋白 ribosomal protein L7a	HM124746	是	1
	核糖体 S3B 蛋白 ribosomal protein S3B	HM124752	是	1
	40S 核糖体 S15 蛋白 40S ribosomal protein S15	HM124759	是	1
	核糖体 S11 蛋白 ribosomal protein S11	HM124760	是	1
	P3 蛋白 P3 protein	HM124761	是	1
	核糖体 L30 蛋白 ribosomal protein L30	HM124762	是	1
	小核的核糖核蛋白多肽 A small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A	HM124765	是	1
molecular function	纤维蛋白原 α 多肽 fibrinogen, α polypeptide		是	1
	纤维蛋白原 β 多肽 fibrinogen, β polypeptide	HM124747	是	3
	纤维蛋白原 γ 多肽 fibrinogen, γ polypeptide		是	5
	微管蛋白 β 1 Tubulin β 1	HM124750	是	1
	Sec61 α 链 1 蛋白 Sec61 α 1	HM124753	是	1
	蛋白酶体亚单位 β 型 4 proteasome subunit β type-4	HM124771	是	1
	果糖二磷酸醛缩酶 C Aldolase C	HM124740	是	1
	GDP 解离抑制蛋白 2 GDP dissociation inhibitor 2	HM124748	是	1
	载脂蛋白 A-I Apolipoprotein A-I	HM124749	是	3
	载脂蛋白 E-2 Apolipoprotein E-2		是	1
	14 kD 载脂蛋白 14 kD apolipoprotein	HM124766	是	1
	D 型结合蛋白 1 D-type binding-protein 1		是	1
	I 型 cAMP 依赖的蛋白激酶 α 链 protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, α	HM124754	是	1
	Rho GDP 解离抑制蛋白 γ 链 Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) γ chain	HM124755	是	1
	G 蛋白 β 多肽 1 G protein, β polypeptide 1	HM124756	是	1
	TINP1 蛋白 TGF- β -inducible nuclear protein 1	HM124757	是	1
	C1 抑制物 C1 inhibitor	HM124763	否	1
	性激素结合球蛋白 hormone binding globulin		否	1
	结合珠蛋白 haptoglobin		是	2
	血红蛋白 β 链 hemoglobin β chain	HM124768	是	1
	泛醌细胞色素 C 还原酶核心蛋白 2 ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 2 (uqcrc2)	HM124764	是	1
	基质金属蛋白酶 9 matrix metalloproteinase 9	HM124770	否	1
	补体 C1 complement C1		否	1
	补体 C3 complement C3		是	2
	补体 C7 complement C7		否	1
	α -1 微球蛋白 α -1-microglobulin		是	1
biological process	富含脯氨酸核受体辅活化子 2 Proline-rich nuclear receptor coactivator 2	HM124738	否	1
	基质类细胞驱动因子蛋白 2 stromal cell-derived factor 2-like 1	HM124739	是	1
	多腺嘌呤结合蛋白 poly A binding protein	HM124769	是	1
	翻译起始因子 3 亚单位 translation initiation factor 3 subunit	HM124758	否	1
	DNA 修复蛋白 RAD51 同源蛋白 4 DNA repair protein RAD51 homolog 4	HM124772	否	1
	转铁蛋白 transferrin	HM124773	是	3
	photomorphogenic 同源亚基 5 photomorphogenic homolog subunit 5	HM124767	是	1
	透明带黏附素 zonadhesin	HM124742	是	1
	含缬氨酸蛋白 valosin-containing protein	HM124743	是	1
	未知功能 unknown			17
unknown				

	-20	1	20	40	60
	信号肽	$\alpha 1$ 区	*		*
Hymo_UA	---MQSII--LLVVT-LHIASG	AIHSWKAYITGTTG-LSEPFPEFVALN	IDDLMGYFDSN--TNRFSQFKWMEDNL	-GKDYD---	EQETNTLQ
Ctid_UA	---R.VV--..LLG-AQL.YA	GT..L.YF..AVS.-DID..	TVVG.V..EQFM....	IMKAVPKTE..RQ.E--..A..W---	DR..QG.I
Cyca_UA	---..R.VLA--FLLIG-I.LT.A	.T..TLQYF..A.S.-IEN..	MTAGVV.G.QID.Y..I--	IRKAVQKAE..ISGAV--DP..W---	NRN.QIYA
Dare-UBA	---..L..GL...C..QY...T.....	..T.....	..K--.....	Q.....	E..Q..I.L
Gamr_UB	---..KALTG-..LLVFG.GV.S	VL..LHYF..ASS.-.TT.....	VGMV.GVQ.LHY..V--	SK.AVAKQD..RYAREDR..L---	QQ.GG..
Sasa_UBA	---..KGF.LLV.GIGL..T..A	VT.AL.YF..ASSE-VPN....	VVGVV.GVQ.VHY..	SQ.AVPKQD.VNKAA--DPQ.W---	RN.GIFK
Acsi_UBA*01	---MLRAVV--..AILCCV.A..	GT..LRYF..VSE-GT....	TIVG.V..VQMHYN.V--	KKVRPTQD..RSE--..PE.W---	KR..L.AV
Posp_UBA*01	---MLRAVV--..AILCCF.A..A	GS..LRYF...S.-VT.....	IVGMV..VQISHC..K--	SKQTPVKQ..K..V--EPG.W---	RN.QICL
HLA_A2	MAVMAPRTLVL..SGALA.TQTWA	GS..MRYFF.SVSRPGRGE.R.I	VGYY..TQFVR..DAASQ.MEPAP.I	---QE..PE.WD---	G..RKVK
Xela_UBA	---MDLRIVP.LLT--LWISAVYS	GS..LRY..AVSDRAFL..STVGIV..	TQIERYS.D--..G.DEPATQ..KQ--	KE..PE.WE---	R..QKSK
Igig_UB	---MGLPWGS.LL.AASFLAGLGH	SS..LHYFT.AVSEPGQ.V.Q	FSVGIV..QFVS.Y.T.--	R.RLPTVP.IKKVDEDDPQ.WE---	RNSQRV..
Gici_11	---M.GL.VLGLCGEL..A..T..	VRYFH..MSS-VPLG...IVGYV.GVQFVMY..	D--RKVLIPREQ..V.TE--	AQF---	WKRKLSLA..
Hefr_20	-----M.GLTVF.LLCCGV.A..S	WRYF..SVS.-V.D..Q...VGYL..	KELN.Y..W--KKEMEPHIV..	LAA--DAEFSDESERTW.QR.L	
	80	100	120	140	160
	* cho	$\alpha 2$ 区	#	*	**
Hymo_UA	GHTATFKDSVRIVMDRYNQ-T-QG	VHTWQLMYGCELND--GTTQGYHQ	FGYDGADEFVSLDKSTLTWTAANPQ	AVITKHKE--ATTYAAK--EKGYLENTCIE	
Ctid_UA	..THQA..NNIQ.A.E.F..S-K..	..F.E.....D.-.N.R.Y.Y..M..I..	R..P.....	..GAE.NYW.....	
Cyca_UA	..NEPS..ENIN..KS.F...-G..	..SV.Q.....H..-..KG..M.Y...E..L...	S.....V..D-S.RAET.S.TN...	I...	
Dare-UBA	..YPEV..NNIKV..E.F...-..	..F.F.....MD.-.NK.VHW.I...E..I...K...	S..MT..V..D-S.GAE.NYW.....E..		
Gamr_UB	..QQQ...ANIG.AKQ.F...-G..	A.MF.W....WD..DDS.D..E...E..L...LEH...	V.PVR..FA..R..D-EDKAILQYK.N.HIKE.VD		
Sasa_UBA	..SQQ...ANID.AKQ.F...S-G..	..VN.W....WD.EA.V.E.FE.W...E..IAF.LK.KS.I.PT..S...	L..D-SD.AQNEHD.H..TQ...		
Acsi_UBA*01	..EQQN..VNIG.A.Q.F...-G..	..V.R.....D.-.KR.FK.D...K..I.F.TD....	PVM.....D--NRARNQQQ.A..TE...		
Posp_UBA*01	..NQOI..VA.IDLPK.F...-E..	..V.R.V....D.-.KR.FE.H...E.YIMF..D.....	SQRGFT..V..D-PL.ASNQR.A..G...		
HLA_A2	A.SQ.HRVDLGLTILRGY..SEA.	S..V.R...DVGVS.WRFLR...YA...K.YIA.KEDLRS...	DMA.QT.....AHV.EQ-LRA..G..V.		
Xela_UBA	..IE...HN.KVA..F..S-T..T.MV.W....G..G-SIR..E.HV...	RE.FA..TEEWVYVPSVRE.QL.TQ..NSPEVN.PERN.N..Q.I...			
Igig_UB	..TEE..QVNLITALKY..S-G..L...	W....RN.G-SKG.HM..A..K.YI...E.....DVP.QN..R..D-PDSARNQRA.A..EE..D			
Gici_11	..EMEDH..GY.P.F.S.T...-L..I.Y.MVV..D.RN.-.AVE.FN..W..Q.LI.F..DHMV.VTPM.W.ESI.NR..N-QHVANKQEW.YF..EE.VQ				
Hefr_20	..WEQIG.VNIQTALS.T..S-A..I..V.T.....R.-.S.R.FY.D.W..K.YINF..ENMV.VTPVSWGE...N..D-QDKAYNQW....G...				
	180	200	220	240	260
	*	$\alpha 3$ 区	#		#
Hymo_UA	WLKKYVVYKDKTLERK	VSPQVSLQKNPS--SPVSCATGFYP	SGVKISWQRNGQE-HYEDVDL	GELLPNEDGTGFTSTLRVGPDEWKNN-KFSCVV	
Ctid_UA	...D..A.....	...T.....	...D..D..G.....	...N.....R....	
Cyca_UA	...Q..R.....	...D.L.....	...T..T.....	...D..D.....II.....A..N.K.E.....	
Dare-UBA	..VQ..G.....	...SS.....	...V..V.....L...R..D..D..E...I.....Y...N.K.E..KD...		
Gamr_UB	...LA..S..Q.T.DR.R...	...RS.....	...V.....DR.VVF.RRD...-LH.Q..P..V..HN...	VSVD.NLKAVPQEDWGRYE...	
Sasa_UBA	...LD..S..M.T.P.S...	...T.....	...T.....MV...D..D..H..EY..T.Q.D...KS.H.T.T.E.....YQ...		
Acsi_UBA*01	...Q..Q..RE...R.P.A.T..RKARGSADTE.L.V..F.RA.EVT.VRD.RDQLE.G.QS..V..DQ...	LRKI.T.SSE.QRGH-SY..Q.			
Posp_UBA*01	...Q..Q..RE...R.P.E.T..RKARGSADME.L.V..F.RA.EVT.VRD..DQLE.G.QN..V.L.Q..Y.LRKI.T.S.E.QGRH-RY..Q.				
HLA_A2	..RR.LEN..E..Q.T.DA.KTHMTHAV.DH-EATLR.W.LS...AEITLT..RD.ED-QTQ.TE.V.TR.AG...KWAAVV.PSGQE-Q--RYT.H.				
Xela_UBA	G..R.LS..QAE..R.H.H.RISDHQSAD--ATELR.Q.Y...REIDVK.V...GD-DVHSEAAK.I..P..SY.LRV.AEIT.N.GD--SYA.H.				
Igig_UB	..RR.LG..E..L.R.NP.E.KVTL.ADDDN-METLI.R.D...KEID...T.D.KN-WMQ.TFH.L.S..S..YTTWWSIKID.KDRE--RYK.R.				
Gici_11	..R..LD..QRE.R-V..A.T..FTHLGD--NQL..LV...QAIEVTLWRD.VV-ID.TLST.-I..H.R.Y.IRKWIEFD.ED--QAEY..YM				
Hefr_20	...LKL.ERE.R-P..A.S..PTRRGD--NRL..VT....QAIEVTLWRD.VS-LD.SHFD.-I..H...Y.THKWTDID.AD--QA...E.				
	280	300	320	340	360
	跨膜及胞质区				
Hymo_UA	EHQ--EKNIR-K	TEDDIITN--PDSVPIAII	VGAVAAVVLIVIGVGVLYVQRK--	KGFKPV--NASDD--GSNSSART--	
Ctid_UA	...-D.T..-	...-L.....	...-S.....	...-S.....	
Cyca_UA	...-G.T..EIL	...K.K..-YAPF..G..I.I.V..L.L..A..K..K..-	...G.....	...G.....H.DPKA-	
Dare-UBA	...-S.T.NSIL	...E.R..-NPTALLG..I.I.V.A..LVA.A.A.FV..R.H--	...PQ.T..G--	...DN.S..-	
Gamr_UB	QLKG-IED.STPL	DPAL.R..GGKSGHT.P..I.-LLVLL.AAAAA..V.L.KKRNASD.RH..DGSdT.SENTE.Q.PAPEAQLTKV			
Sasa_UBA	QVTGVKEDFIKVL	..SE.K..-WNEPN.VL.IVV.V.LL.LV.AV..VVIWK.SK--	..V.A--ST..T--D.DN.G.AAQM-		
Acsi_UBA*01	D.AS-F.ERQNYI	WDPNMRSS--DGGP..G..A..IVG..ALIAAI.VIWKQRQ--GAQ.SDYSK.PSK--E.DT.SD.AP--			
Posp_UBA*01	D.IS-F.EKQIYI	WDPNMRSS--DGGP..G..A..IVG..LL.AA.I.VIWK.RQ--GAQ.SDYSK.PSK--E.DT.SD.AP--			
HLA_A2	Q.BG-LPKPLTLR	W.-PSSQP-TIP--IVG..A.L.LFGAVITGAV.AAVMWRKSSDRKG.SYSQAASSDSA-Q..DV.LTACKV--			
Xela_UBA	..SS-LNEKLIW	WPGPNKDG-QMGI..A.V..LLI.AAVAG--FAI.KKRAGKPDAGYTAA.RDSP-PS.IV..-			
Igig_UB	..DG-LEKPLDLA	W.-ESVSA-SN.GLI..CV...LL.AVM.AG--TAVYIKK.QDGYKAASDQGSNNSG-K..ADAIQQA--			
Gici_11	..IG-LEAK--VI	YDPKSHSQ--..VTLGIVFGVIGIIA.AVA.GAVII.KK.GQVKSNS.Y.TDTSDETE--F.D.P.VS--			
Hefr_20	D.SG-L.EKMVFV	Y.RKSDSL--L..IVG.LV-V..L.I.AVI.G-WI.KK.AGEKT.YN.AKTSDRGE--S.SN.SANA--			

图 3 鲢与其他几种脊椎动物 MHC class I 氨基酸序列比对

Hymo_UA: 鲢; Ctid_UA: 草鱼; Cyca_UA: 鲤; Dare-UBA: 斑马鱼; Gamr: 大西洋鳕; Sasa_UBA: 大西洋鲑; Acsi_UBA: 中华鲟; Posp_UBA: 匙吻鲟; HLA-A2: 人; Xela_UBA: 非洲爪蟾; Igig_UB: 美洲鬣蜥; Gici_11: 护士鲨; Hefr-20: 虎鲨

“...”: 与 Hymo_UA 序列一致位点; “—”: 间隔; “*”: 保守肽结合位点; “#”: 保守的半胱氨酸; cho: 糖基化位点。

Fig.3 Amino acid alignment of MHC class I of silver carp with other vertebrate

Hymo_UA: silver carp; Ctid_UA: grass carp; Cyca_UA: common carp; Dare-UBA: zebrafish; Gamr: Atlantic cod; Sasa_UBA: Atlantic salmon; Acsi_UBA: Chinese sturgeon; Posp_UBA: paddlefish; HLA-A2: human; Xela_UBA: clawed frog; Igig_UB: green iguana; Gici_11: nurse shark; Hefr-20: tiger shark. “...”: identity to the Hymo_UA sequence; “—”: gaps; “*”: conserved sites for peptide binding; “#”: conserved cysteine residues; cho: glycosylation site.

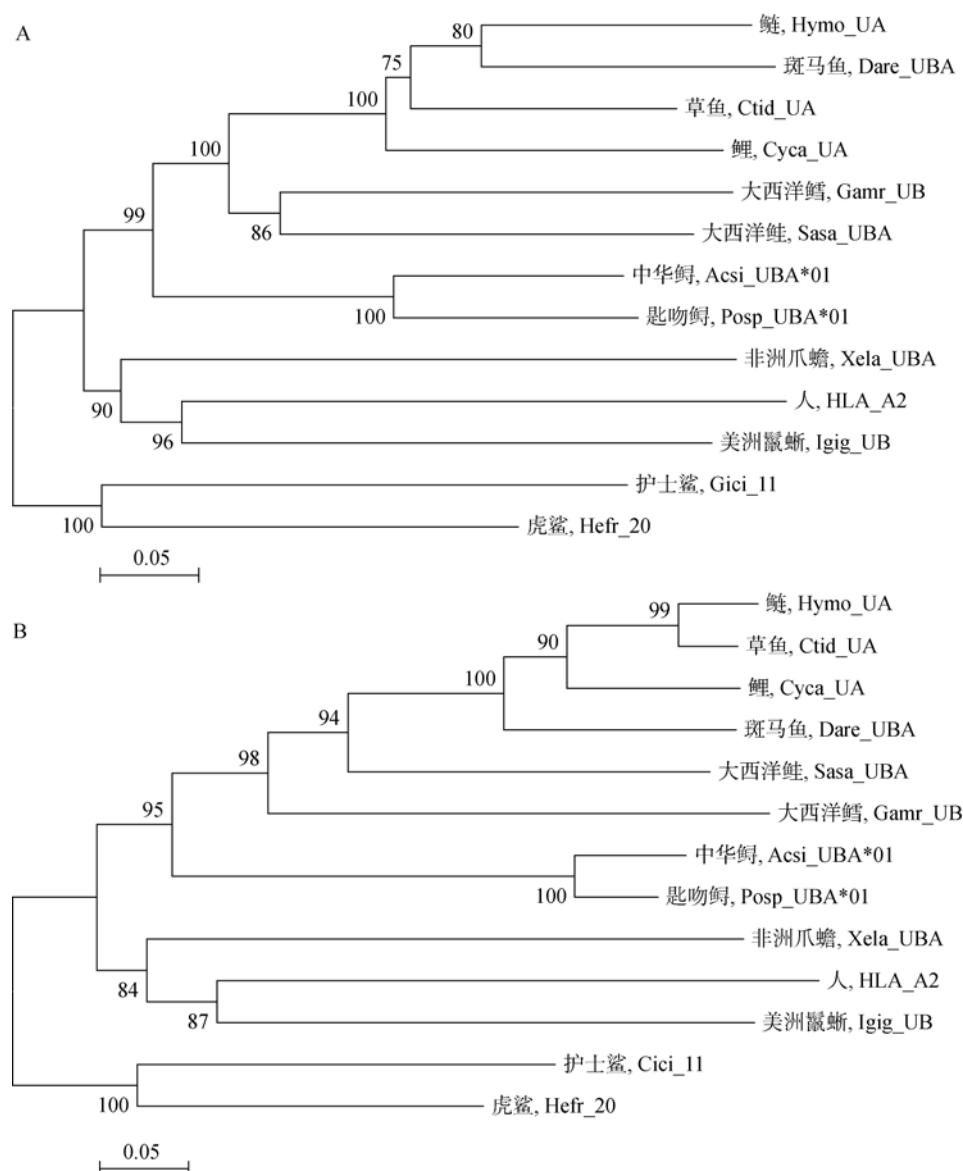


图 4 基于鲢与几种脊椎动物 MHC class I 氨基酸序列构建的 NJ 系统树

A: 全序列; B: $\alpha 3$ 和跨膜及胞内区序列。分枝上的数值为 500 次重复抽样的自展值, 鲨鱼序列(Cici_11, Hefr_20)作外群。

Fig.4 NJ phylogenetic tree constructed by MHC class I amino acid sequences of silver carp with other vertebrate

A: complete sequences; B: sequences of $\alpha 3$, transmembrane and cytosolic domains. Bootstrap values from 1 000 replications were shown on nodes, and the sequences of sharks (Cici_11, Hefr_20) were used as outgroup.

白溶解、炎症、伤口愈合等^[19]中起重要作用, 我们推测因败血症病原导致鲢血管破裂出血, 鲢合成大量纤维蛋白原以促凝血和血管愈合, 是机体对抗败血症的一种适应性反应。此外, 我们注意到转铁蛋白基因也有一定的几率出现, 在 90 个随机测序的克隆中就有 3 个, 表明转铁蛋白基因也可能是一个鲢败血症中上调的基因。转铁蛋白是一种重要的 β 球蛋白, 是脊椎动物体内铁离子的运输者, 具有调节体内铁离子平衡的作用, 不仅

参与铁离子的运输和平衡, 与呼吸、细胞增殖和免疫系统调节也有着密切关系, 还具有抗菌及杀菌的功能。

通过对文库初步筛选, 我们获得一个含有鲢 MHC class I 基因全长 cDNA 的克隆。比较分析发现, 该基因序列仅比草鱼 Ctid_UA(AY391782)在 $\alpha 2$ 区上少一个氨基酸, 并且与其他脊椎动物 MHC class I 比较存在保守的氨基酸位点(图 3), 据此推测, 该基因产物具有呈递抗原多肽的功能,

属于 MHC class I U 系。对全序列和 $\alpha 3$ 与跨膜及胞质区构建的系统发育树产生不同拓扑结构(图 4), 原因在于 MHC class I 不同结构域受到不同选择压力的影响, 如 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 为抗原结合区, 常常受到正向自然选择作用^[20], 序列的过度变异掩盖了物种的系统发育关系, 而 $\alpha 3$ 与跨膜及胞质区相对比较保守, 可用于追溯基因的演化历程, 在其他物种也发现相似现象^[21-22]。MHC class I 是一个多座位基因家族, 其座位以“生-灭”模式演化^[23]。由于快速演化, 目前硬骨鱼类中难以区别 MHC class I 座位间是直系或并系同源关系, 即使在关系较近的物种也是如此^[24]。本研究中鲢、草鱼、鲤在系统关系上较为接近, 所用的 3 条序列的 3'UTR 上均存在相同的微卫星序列, 并且序列也有较高的相似性, 特别是微卫星序列之前的 3'UTR 相似性达到 85% 以上, 说明它们可能来源于同一个座位。另一方面, 作为抗原结合区, $\alpha 1$ 区通常在种间或种内序列的差异最大^[21], 但我们发现鲢的 $\alpha 1$ 区与斑马鱼 $\alpha 1$ 区相似性很高, 88 个氨基酸中仅有 19 个差异(图 3), 相似性达 78.4%, 远高于鲢 $\alpha 1$ 区与草鱼(40.9%)、鲤(34.1%)的相似性。但是鲢与斑马鱼 MHC class I 的 3'UTR 的序列特征差异很大, 说明它们并非源自相同座位。因此, 我们推测在鲤科鱼类演化过程, MHC class I 发生了座位间的基因重组。MHC class I 以整个第二外显子($\alpha 1$ 区)作“外显子洗牌”方式发生重组也存在于其它一些鱼类中, 如鲑^[25]、鲟^[21]等。重组事件会扭曲物种的系统关系, 但能够增加基因的遗传多样性^[26-27], 从而增加 MHC 应付病原的能力。鲤科鱼类 MHC class I 座位间重组还有待使用更多种类和序列来证实。

综上所述, 本研成功构建了败血症鲢肝脏和肾脏高质量的 cDNA 文库, 为进一步分离和研究鲢的功能基因, 特别是与败血症相关的基因提供坚实的基础。

参考文献:

- [1] 李思发, 吴力钊, 王强, 等. 长江、珠江、黑龙江鲢、鳙、草鱼种质资源研究[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1990.
- [2] 李思发, 吕国庆, 贝纳切兹·L. 长江中下游鲢鳙草青四大家鱼线粒体 DNA 多样性分析[J]. 动物学报, 1998, 44(1): 82-93.
- [3] 张四明, 邓怀, 汪登强, 等. 长江水系鲢和草鱼遗传结构及变异性的 RAPD 研究[J]. 水生生物学报, 2001, 25(4): 324-330.
- [4] 张四明, 汪登强, 邓怀, 等. 长江中游水系鲢和草鱼群体 mtDNA 遗传变异的研究[J]. 水生生物学报, 2002, 26(2): 142-147.
- [5] Sommer S. The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation [J]. Front Zool, 2005, 2: 16.
- [6] Chen W, Jia Z, Zhang T, et al. MHC Class I Presentation and Regulation by IFN in Bony Fish Determined by Molecular Analysis of the Class I Locus in Grass Carp [J]. J Immunol, 2010, 185: 2209-2221.
- [7] 夏春. 白鲢 MHC I $\alpha 2$ 基因克隆及序列分析[J]. 动物学报, 1999, 45(3): 345-349.
- [8] 战文斌. 水产动物病害学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004
- [9] 徐军望, 朱祯, 李旭刚. 快速 cDNA 文库筛选和淀粉合成酶基因的分离与鉴定[J]. 高技术通讯, 2001, 11(8): 1-6.
- [10] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Mol Biol Evol, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [11] 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: 217-219.
- [12] Kruiswijk C P, Hermesen T T, Westphal A H, et al. A novel functional class I lineage in zebrafish (*Danio rerio*), carp (*Cyprinus carpio*), and large barbus (*Barbus intermedius*) showing an unusual conservation of the peptide binding domains [J]. J Immunol, 2002, 169: 1936-1947.
- [13] Sakai D K. Osponization by fish antibody and complement in the immune phagocytosis by peritoneal exudates cells isolated from salmonid fishes [J]. J Fish Dis, 1984, 7: 29-38.
- [14] Bower S M, Evelyn T P. Acquired and innate resistance to the haemoflagellate *Cryptobia salmositica* in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) [J]. Dev Comp Immunol, 1988, 12: 749-760.
- [15] Dodds A, Smith S, Levine R, et al. Isolation and initial characterisation of complement components C3 and C4 of the nurse shark and the channel catfish [J]. Dev Comp Immunol, 1998, 22: 207-216.
- [16] 昌鸣先, 聂品. 草鱼补体 C3 基因的克隆及在感染大中华鲮草鱼个体的表达分析[J]. 自然科学进展, 2004, 14(8): 870-881.

- [17] Lange S, Dodds A W, Magnadóttir B. Isolation and characterization of complement component C3 from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2004, 16(2): 227–239.
- [18] 陈勇, 郭丽, 陈舒泛. 感染后暗纹东方鲀补体组分 C3、C4 表达分析[J]. 江苏农业科学, 2008 (2): 175–177, 240
- [19] Mosesson M W, Siebenlist K R, Meh D A. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin [J]. Ann NY Acad Sci, 2001, 936: 11–30.
- [20] Hughes A L, Yeager M. Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates [J]. Annu Rev Genet, 1998, 32: 415–435.
- [21] Wang D, Zhong L, Wei Q, et al. Evolution of MHC class I genes in two ancient fish, paddlefish (*Polyodon spathula*) and Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) [J]. FEBS Letters, 2010, 584(15): 3331–3339.
- [22] Holmes E C, Roberts A F, Staines K A, et al. Evolution of major histocompatibility complex class I genes in Cetartiodactyls [J]. Immunogenetics, 2003, 55(4): 193–202.
- [23] Nei M, Gu X, Sitnikova T. Evolution by the birth-and-death process in multigene families of the vertebrate immune system [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 799–7806.
- [24] Stet R J M, Kruiswijk C P, Dixon P. Major histocompatibility lineages and immune gene function in teleost fishes: the road not taken [J]. Crit Rev Immunol, 2003, 23(5-6): 441–471.
- [25] Shum B P, Guethlein L, Flodin L R, et al. Modes of salmonid MHC class I and II evolution differ from the primate paradigm [J]. J Immunol, 2001, 166(5): 3297–3308.
- [26] Bergström T F, Josefsson A, Erlich H A, et al. Recent origin of HLA-DRB1 alleles and implications for human evolution [J]. Nat Genet, 1998, 18: 204–206.
- [27] Consuegra S, Megens H J, Schaschl H, et al. Rapid evolution of the MH class I locus results in different allelic compositions in recently diverged populations of Atlantic salmon [J]. Mol Biol Evol, 2005, 22: 1095–1106.

Construction of a cDNA library and cloning of the MHC class I gene in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) infected with bacterial septicemia

WANG Dengqiang^{1,2}, LUO Xiaosong², CHEN Daqing²

1. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

2. Yangtze River Institute of Fisheries, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China

Abstract: Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) is one of the most commonly cultured freshwater species in China. However, the development of silver carp aquaculture is threatened by bacterial septicemia. To isolate and study genes relevant to the disease, we constructed a cDNA library from silver carp liver and kidney tissue using a CloneMiner™ cDNA kit. The primary cDNA library titer was 1.34×10^7 cfu/mL yielding 2.68×10^7 cfu recombinants with 97.5% positive clones. The exogenous inserts of the recombinants ranged in size from 0.8 to 3.5 kb. We attempted to sequence 80 positive clones from both terminals to test the completeness of the coding sequence. We successfully sequenced 74 clones, of which 49 contained the complete coding sequence. Among the clones successfully sequenced, 57 sequences were identified to 49 known genes in GenBank. The cDNA library was subsequently screened by PCR yielding a single clone containing the complete coding sequence for MHC class I. The *H. molitrix* MHC class I was 1 026 bp long and encoded a 341 amino acid (aa) protein that included a leader peptide, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, and transmembrane and cytosolic domains of 16, 88, 90, 87, and 60 aa, respectively. In addition, we identified sites that were highly conserved among vertebrate MHC class I. Phylogenetic comparison of the complete coding sequences and the $\alpha 3$ domain of *H. molitrix* MHC class I with other vertebrate species revealed different topology, suggesting a different evolutionary history for different domains of MHC class I and the occurrence of gene recombination among cyprinidae.

Key words: *Hypophthalmichthys molitrix*; cDNA library; MHC; liver; kidney

Corresponding author: CHEN Daqing. E-mail: chdq@yfi.ac.cn