

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.00399

“粉玉”体色瓯江彩鲤 MHC class II B 基因多态性及其与鱼体抗病力的关系

赵雪锦¹, 刘至治¹, 李雪松¹, 王宇¹, 王成辉²

1. 上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学 农业部水产种质资源与利用重点开放实验室, 上海 201306

摘要: 利用 1 对特异性引物 DABF 和 DABR, 分别从 30 尾感病和 13 尾抗病“粉玉”体色瓯江彩鲤(*Cyprinus carpio* var. *color*)的 cDNA 中扩增出长度为 624 bp 的 MHC class B 基因片段。对 210 个有效克隆进行测序, 获得 84 个不同的编码序列, 分属 13 个不同的等位基因, 其中 *Cyca-DAB3*17* 和 *Cyca-DAB3*18* 为新发现的 2 个等位基因。核苷酸、氨基酸变异位点总数为 267、130, 变异率较高(42.79%、62.50%)。MHC B 基因片段包括第 1–4 个外显子, 分别编码信号肽、 $\beta 1$ 和 $\beta 2$ 结构域及跨膜区。 $\beta 1$ 结构域的变异明显大于 $\beta 2$ 结构域, 表现为在长度为 276 bp 的 $\beta 1$ 结构域中, 核苷酸、氨基酸变异位点分别为 150 个 (54.35%)和 72 个 (78.26%); 而长度为 282 bp 的 $\beta 2$ 结构域的核苷酸、氨基酸变异位点较少, 分别为 105 个 (37.23%)和 54 个 (57.45%)。在 $\beta 1$ 结构域的 24 个抗原结合位点(PBR)上, 有 22 个发生了变异。 $\beta 1$ 结构域的 PBR、非抗原结合位点(non-PBR)及 $\beta 2$ 结构域的非同义碱基替换率(d_N)与同义碱基替换率(d_S)的比值 ω 分别为 1.366、0.992、0.792, 表明“粉玉”体色瓯江彩鲤 MHC class B 基因的 $\beta 1$ 结构域在进化过程中受到正向选择作用。基因 *Cyca-DAB3*09* 在抗病群体中出现的频率(7.81%)显著高于感病群体(1.37%, $P < 0.05$), 新等位基因 *Cyca-DAB3*18* (频率为 3.13%)只出现在抗病群体中, 基因 *Cyca-DAB1*08*、*Cyca-DAB3*08* 和 *Cyca-DAB3*17* 为感病群体所特有。研究结果为抗病“粉玉”体色瓯江彩鲤的选育奠定了基础。

关键词: “粉玉”体色瓯江彩鲤; 主要组织相容性复合体; 多态性; 抗病力

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2012)03–0399–09

主要组织相容性复合体(Major histocompatibility complex, MHC)是目前已知存在于所有脊椎动物体内、参与机体免疫应答的高度多态性基因群^[1], 其表达产物分布于各种细胞表面, 在免疫学上具有极为重要的意义^[2]。自 1990 年至今, 国内外学者已对 50 多种海、淡水鱼类的 MHC 基因进行了研究, 如鲤(*Cyprinus carpio*)^[3]、斑马鱼(*Brachydanio rerio*)^[4]、大西洋鲑(*Salmo salar*)^[5]、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)^[6]、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[7]、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)^[8]

和圆斑星鲈(*Verasper variegatus*)^[9]等。早期的研究多侧重于揭示鱼类 MHC 分子结构及其在物种进化等方面的应用。而近 10 年来, MHC 基因的多态性与鱼体抗病力方面的研究, 越来越得到国内外学者的关注, 成为研究的热点^[2,10–12]。分析鱼类 MHC 基因多态性与抗病力之间的关系, 对于阐明鱼类抗病力的遗传基础具有重要意义^[2]。

瓯江彩鲤(*Cyprinus carpio* var. *color*)是分布于浙江省瓯江流域的一种地方性养殖种类, 已经有 1 200 余年的养殖历史。它有“全红”、“大花”、

收稿日期: 2011–09–01; 修订日期: 2011–11–10.

基金项目: 农业部公益性行业科研专项(200903045); 上海市教育委员会科研创新基金(11YZ152); 上海市水生生物学重点学科建设项目(S30701).

作者简介: 赵雪锦(1987–), 女, 硕士研究生, 研究方向为鱼类分子进化与免疫遗传学. E-mail: xuejin5258@163.com

通信作者: 刘至治, 博士, 副教授. E-mail: zzliu@shou.edu.cn; 王成辉, 博士, 教授. E-mail: wangch@shou.edu.cn

“麻花”、“粉玉”和“粉花”等 5 种基本体色^[2], 具有很高的观赏价值。自 1999 年以来, 已对瓯江彩鲤的种质资源与开发利用进行了多角度的持续研究^[13-15], 目前瓯江彩鲤的良种选育已至第 6 代 (F_5), 在体色纯度、生长速度等方面均已取得了明显的选育效果, 但抗病力等方面的研究才刚刚起步。2011 年, 李雪松等^[2]报道, “全红”体色瓯江彩鲤的 MHC class B 基因中, 有 5 个等位基因与鱼体对嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)的抗性/易感性显著相关($P < 0.05$)。而前期的研究表明, “全红”、“粉玉”两种体色瓯江彩鲤, 在遗传、生长性能等方面显示出明显差异^[14-15]。那么, “粉玉”体色瓯江彩鲤是否存在与“全红”体色相同或相异的抗性 MHC class B 基因, 是我们迫切想了解的问题。本研究以“粉玉”体色瓯江彩鲤为对象, 人工感染嗜水气单胞菌, 分析其 MHC class B 基因序列多态性与抗病力之间的关系, 以期瓯江彩鲤抗病基因的筛选提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

“粉玉”体色瓯江彩鲤采自浙江龙泉省级瓯江彩鲤良种场, 每尾鱼体质量为 35~45 g, 带回实验室暂养 4 周, 水温维持在 25℃。瓯江彩鲤抗病群体和感病群体获得的具体方法参照文献^[16], 即实验组鱼 50 尾, 每尾腹腔注射 0.1 mL 浓度为 3×10^8 CFU/mL 的嗜水气单胞菌(由上海海洋大学国家水生动物病原库提供); 对照组鱼 10 尾, 每尾注射 0.1 mL 的无菌水。11 h 后实验组鱼开始死亡, 而对照组鱼在整个实验过程中生长正常, 无任何生病或死亡症状。经嗜水气单胞菌感染 96 h 后不出现发病症状的个体为抗病群体, 而 96 h 内出现腹部充血、肛门红肿、游动迟缓等症状直至临死的个体为感病群体。本研究共得到了 13 尾抗病个体和 30 尾感病个体, 另外 7 尾鱼虽出现感病症状却在 96 h 后仍然存活, 不属于抗病或感病群体。分别取 43 尾鱼的肾脏, 迅速放入液氮中冻存, 转至 -80℃ 冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取和 fcDNA 的合成 按照 TRIZOL(Invitrogen)的方法, 从肾脏组织中提取总 RNA。电泳检测总 RNA 的质量并测定其 OD 值。利用反转录试剂盒 PrimeScript First Strand cDNA Synthesis Kit (Takara)合成 fcDNA。

1.2.2 引物设计和 RT-PCR 扩增 根据 van Erp 等^[17]已获得的鲤 MHC class II B 基因序列(GenBank 登录号为 X95431), 用在线引物设计软件 Primer3^[18]在外显子 1 和外显子 4 上设计 1 对特异性引物: DABF (5'-TGA TGC TGT CTG CTT TCA CTG G-3')和 DABR(5'-CGA TGG CGA TTT TAT TCC TCT C-3') (由上海生工生物工程技术服务有限公司合成), 用于扩增“粉玉”体色瓯江彩鲤 MHC class II B 基因的片段, 包括完整的 $\beta 1$ 和 $\beta 2$ 结构域、部分信号肽和跨膜区。

PCR 反应总体积为 25 μ L, 包括 100 ng fcDNA, 200 μ mol/L dNTPs, 引物各 0.2 μ mol/L, 1 U *Taq* DNA 聚合酶(Tiagen)。反应条件为: 94℃预变性 3 min; 然后 94℃变性 1 min, 55℃退火 1 min, 72℃延伸 2 min, 35 个循环; 72℃延伸 10 min。所有 PCR 反应均在 Mastercycler ep gradient S (Eppendorf)型 PCR 仪上进行。

1.2.3 PCR 产物的纯化、克隆及测序 取 25 μ L 的 PCR 产物, 经 1%的琼脂糖凝胶电泳, 切下目的片段, 用 Biospin Gel Extraction Kit (Bioflux)胶回收试剂盒纯化。将纯化产物与 pMD19-T(Takara)载体进行连接。取 10 μ L 连接液转化于 TOP10 (Tiagen)感受态细胞。根据蓝白斑原理, 挑选白色菌落, 用 M13+/-引物做菌落 PCR, 鉴定阳性克隆, 每尾鱼随机测序 5 个克隆(由上海美吉生物医药科技有限公司的 ABI3730 测序仪测序)。

1.2.4 数据分析 将获得的 MHC class B 的序列通过 NCBI 中 BLAST 进行同源检索。用 Clustal X 软件^[19]对蛋白序列进行多序列比对。利用 MEGA4.0 软件^[20]分析核苷酸序列和氨基酸序列的变异位点, 确定等位基因, 计算核苷酸的错义和同义替换率、氨基酸的组成比例; 利用 DnaSP5.0

软件^[21]进行第二外显子和第三外显子序列的多态性分析;利用 DAMBE 软件^[22]计算变异位点的转换和颠换数;用卡方检验(Chi-square test)检测各个基因型在抗病群体和感病群体中的分布频率。

参照人类 HLA 类分子的晶体三维结构^[23],对本研究所获得的“粉玉”体色瓯江彩鲤 MHC class B 序列的 $\beta 1$ 结构域中抗原结合位点(PBR)进行了界定。用 MEGA4.0 软件^[20]中的 Nei-Gojobori (Jukes-Cantor)方法,计算非同义碱基替换(d_N)和同义碱基替换(d_S)的比值 ω ($\omega = d_N/d_S$)。

1.2.5 MHC class B 基因的命名 已知鲤的 MHC class B 基因有 MHC-DAB1 和 MHC-DAB3 两种类型^[2,17]。因此,本研究采用在哺乳动物以及其他脊椎动物中广泛采用的命名规则^[24-25],对“粉玉”体色瓯江彩鲤的 MHC class II B 基因进行命名:以 MHC 基因同源序列所编码氨基酸间的错义替换超过或等于 5 个残基作为一个等位基因主型,少于 5 个残基的变异作为主型中的一个亚型,如等位基因 *Cyca-DAB1*0801*, *Cyca* 代表彩鲤拉丁名的属名和种名这两个单词的前两个字母

组合, DAB1(或 DAB3)表示 MHC 的类 B 基因, 08 是用来指定不同的等位基因, 01 是用来区别编码变异的等位基因亚型(图 1)。

2 结果与分析

2.1 MHC class B 基因序列测定与分析

本研究共对 43 尾“粉玉”体色瓯江彩鲤的 210 个有效克隆进行了测序与分析。所得序列经 NCBI 中 BLAST 同源比对,确认为 MHC class B 基因片段。该核苷酸序列长度为 624 bp, 包括 24 bp 的外显子 1、276 bp 的外显子 2、282 bp 的外显子 3 和 42 bp 的外显子 4, 分别编码 8 个氨基酸的部分信号肽、92 个氨基酸的完整 $\beta 1$ 结构域、94 个氨基酸的完整 $\beta 2$ 结构域和 14 个氨基酸的部分跨膜区,共 208 个氨基酸。推断的氨基酸序列经比对后,共检出 84 条不同的编码序列,可划分为两组,分属 13 个不同的等位基因(图 1),其中 11 条编码序列与“全红”体色瓯江彩鲤的 MHC-DAB 基因型一致^[2], 剩余 73 条编码序列分属不同的 MHC class B 基因亚型(GenBank 登录号为

SP	$\beta 1$ domain										
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
Cyca-DAB3*01	MLSAFTGT	AHGYEYMTFCVYSASDYSMDVYLLSYSPNQGLDAQFNSSVGKFGVYTERGMKDAEYWNPNPAELQQRRAEVDTCRHNAQILDSSVRDKT									
Cyca-DAB3*0201		D...IANE...	F...E.H...	VV.L...	Y...	V.VIY.KN..	IM..KK.S..	RF...	V...	S	
Cyca-DAB3*0401		D...TMNE...	F...E.H...	VVYL...	Y...	Q.V.Y..	NA.K.Q.RM..	AK.A..	H.P..	V..A...	
Cyca-DAB3*0501		D...MH...	F...E...	KVVYL...	Y...	V.V.Y..	NA.K.Q.RM..	AK...	RF...	W..A...	
Cyca-DAB3*0802		D...T...VM...	F...E...	VV.I.Y...		E.V.F..	NP.K.Q.YM..	QK.Q..	F...	A...	
Cyca-DAB3*0901		D...T...TMVE...	F.V.L...	VV.V.Y..	T...	Q.V.I..	NP.KDQ.T..	AK...	F..P..	SA..A...	
Cyca-DAB3*1401		D...TS...	EL...	KVV.V.Y..	H...	E.V.Y..	N.KDQ.LM..	KK...	RF...	LW..AI...	
Cyca-DAB3*1604		D...VMNE...	T...	N...	KVV.V.Y..	Y...	E.V.Y..	NP.KD..	IM..QK.A..	RF...	NH.T..A
Cyca-DAB3*1701	K	D...T...	F...E.H...	KVV.L...	Y...	V.V.Y..	NA.K.Q.RM..	AK.A..	F..P.V.AD.T..	L..S	
Cyca-DAB3*1801		D...Q.TSVER...	T...	V.L...	VV.V...	Q.V.H..	NP.KDQ.L..	QK...	RF...	V...	
Cyca-DAB1*01		A...N...HSRWTK.IH.SR.F...	IDN.I..	KDVYI...	T.EY...	AL.VYN..	RF.KD.NI..	E..Q.ER..	K..ELYQ.AI...		
Cyca-DAB1*0701		A...N...YSRWAK.FHGSR.F...	FVDN.I..	KDVYI...	T.EY...	AL.VYN..	S..KD.NI..	M..Q..SF.K...	NRQ.AIA...		
Cyca-DAB1*0801		A...N...YSRWAK.FHGSR.F...	FVDN.I..	KDVYI...	T.EY...	AL.VHN..	RF.KD.NL..	M..Q..SF.K...	ELYQ.AIA...		
Cyca-DAB1*0901		A...N...NSRWTK.FHGSR.F...	VDN.I..	KDVFI...	T.EY...	AL.VHN..	S..KD.NR..	M..Q..S..KY..	E.RQ.AIA...		
Cyca-DAB1*1101		A...N...YSRWAK.FHGSR.F...	MVDN.I..	KDVHI...	T..E...	AL.VYN..	LY.KD.NI..	E...	ERV.K..	ENRQ.AIA...	
		* * * * * * * * * * * *									
	$\beta 2$ domain										TM
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	
Cyca-DAB3*01	VKPKITLRSARQAGGSRPAVLVCSAYDFYPPKKIKVSWLRDGEKMTSDVTSTMEMADGDFYQIHSELEYTPKSGEKISCNVEHASFSPKMITDW										DPSLPEGERNKIAI
Cyca-DAB3*0201		M...D.R...	M...E...				Y...				
Cyca-DAB3*0401		M...D...	M...E...					H...			F...
Cyca-DAB3*0501		M...D...	M...E...								F...
Cyca-DAB3*0802	Q...A...		M...E...					H...			F...
Cyca-DAB3*0901	Q...		M...E...				N.N...	H...			F...
Cyca-DAB3*1401			E...				V...				
Cyca-DAB3*1604			M...E...					H...			Y...
Cyca-DAB3*1701			G...M...E...				V...				
Cyca-DAB3*1801	Q...	V...	M...E...					H...			F...
Cyca-DAB1*01	P..VK.S.VKP...	RH...	M...R..HG...	M.N.EVVKT...	E..PN..Y...			A.D..GLT..I..I...			S...
Cyca-DAB1*0701	P..VK.S.VKP...	RH...	M...R..HW...	M.N.EVVKT...	E..PN..Y...			A.D..GLT..I..I...			S...
Cyca-DAB1*0801	P..VK.S.VT...	RH...	M...R..HG...	M.N.EVVKT...	E..PN..Y...			A.D..GLT..I..I...			S...
Cyca-DAB1*0901	P..VK.S.VTP...	RH...	M...R..HG...	M.N.EVVKT...	E..PN..Y...			A.D..GLT..I..I...			S...
Cyca-DAB1*1101	P..VK.S.VNP...	RH...	M...R..HW...	M.N.EVVKT...	E..PN..Y...			A.D..GLT..I..I...			S...

图1 根据“粉玉”体色瓯江彩鲤 MHC class II B 等位基因推断的氨基酸序列

“.”表示与 Cyca-DAB3*01 残基一致;“*”表示抗原结合位点(PBR)。

Fig.1 Putative amino acids of MHC class II B alleles in “Whole white” color pattern of *Cyprinus carpio* var. *color*
“.”Indicates identical amino acid; “*” Indicates the PBR sites.

JN618000 ~ JN618072)。 *Cyca-DAB3*17* 和 *Cyca-DAB3*18* 为新发现的 2 个等位基因。图 1 中 *Cyca-DAB1*01* 和 *Cyca-DAB3*01* 为已有鲤的 MHC 序列, 其 GenBank 登录号分别为 Z49064 和 X95431。

2.2 MHC class B 基因的多态性

2.2.1 等位基因的分布 分析显示, 13 个不同的等位基因明显分为两组, 即 DAB1 型和 DAB3 型(图 1)。 DAB1 型和 DAB3 型分别含有 4 和 9 个等位基因; 但 DAB1 基因频率却高达 76.19%, 而 DAB3 的基因频率却只有 23.81%。在所检测的 43 尾个体中, 只含 DAB1 或 DAB3 等位基因的个体数分别为 18 尾和 1 尾, 而在剩余的 24 尾个体中两种等位基因则都能检测到。DAB 等位基因的亚型分布不均衡, 等位基因 *Cyca-DAB1*07*、*Cyca-DAB1*11* 分别含有 15、31 个亚型, 两者的等位基因频率之和高达 65.72%(图 2), 另外有 3 个等位基因仅含有 1 种亚型。亚型中, *Cyca-DAB1*1101* 出现的频率最高(29.52%), 其次是 *Cyca-DAB1*0701* (14.29%), 其余大多数等位基因亚型仅出现 1 次, 频率为 0.48%。值得注意的是, 分析发现单一个体中最多存在 4 个等位基因, 表明“粉玉”体色瓯江彩鲤个体中至少存在 2 个 DAB 座位。

2.2.2 多态位点的变异 在检测到的 267 个核苷酸变异位点中, 简约信息位点 196 个。核苷酸、氨基酸变异位点比例分别为 42.79%、62.50% (表 1)。序列间的碱基变异范围为 0~25.6%, 平均 10.1%; 氨基酸变异范围为 0~43.3%, 平均 17.5%。 $\beta 1$ 结构域的核苷酸变异位点和氨基酸变异位点分别高达 54.35%和 78.26%, 明显高于 $\beta 2$ 结构域的 37.23%和 57.45%(表 1), 这与 $\beta 1$ 结构域存在高

度多态的抗原多肽结合区(PBR)相关。信号肽和跨膜区变异都不大, 属于保守序列。对全部序列的分析表明, “粉玉”体色瓯江彩鲤 MHC class B 基因的单倍型多样性(H_D)、核苷酸多样性(P_1) 及平均核苷酸差异数目(k)都比较高, 分别为 0.921 0、0.101 3 和 63.184。

2.2.3 碱基组成及核苷酸的替换 分析发现, 4 种碱基 A、G、C、T 的含量差异不大, 分别为 28.2%、25.2%、22.9%、23.7%。而 4 种碱基在密码子的分布上存在差异, GC 碱基在密码子第三位上占到 56.4%, 高于其他两位密码子, 也明显高于其在密码子第一、二位上的比例(分别为 48%和 40%); 单个碱基 A、G、C 分别在密码子第三、二、一位上的含量相对较少, 而 T 碱基则较均衡。MHC class B 基因在密码子 3 个位置上发生的平均转换/颠换比(R)分别为 1.5、0.798、1.198, 表明密码子在第 1 位和第 3 位的变异要明显高于第 2 位密码子的变异。

2.2.4 选择压力 在 $\beta 1$ 结构域 PBR 区的 24 个氨基酸位点中(图 1), 有 22 个存在变异, 变异率高达 91.67%; 而非抗原结合区(non-PBR)的氨基酸变异率较小, 为 73.53% (50/68)。从表 2 可知, $\beta 1$ 结构域 PBR 的 ω 值(d_N/d_S)大于 1, 而其 non-PBR 和 $\beta 2$ 的 ω 值都小于 1, 表明“粉玉”体色瓯江彩鲤 MHC class B 基因的 $\beta 1$ 结构域在进化过程中受到正向选择(positive selection)作用。

2.3 MHC class B 等位基因与抗病力的关系

在“粉玉”体色瓯江彩鲤 13 个 MHC class B 等位基因中(图 2), 新等位基因 *Cyca-DAB3*18* 是抗病群体所特有的(频率为 3.13%), 且达到显著

表 1 核苷酸和氨基酸的变异位点
Tab.1 Variable sites of nucleotide and amino acid sequences

序列组分 component of sequence	核苷酸 nucleotide			氨基酸 amino acid		
	变异位点 variable site	总位点 total number of site	百分比/% percentage	变异位点 variable site	总位点 total number of site	百分比/% percentage
信号肽 signal peptide	3	24	12.50	1	8	12.50
$\beta 1$ 结构域 $\beta 1$ -domain	150	276	54.35	72	92	78.26
$\beta 2$ 结构域 $\beta 2$ -domain	105	282	37.23	54	94	57.45
跨膜区 transmembrane	9	42	21.43	3	14	21.43
共计 total	267	624	42.79	130	208	62.50

水平($P<0.05$); 虽然基因 *Cyca-DAB1*08*、*Cyca-DAB3*08* 和 *Cyca-DAB3*17* 为感病群体所特有, 但它们的出现频率均未达到显著水平; 等位基因 *Cyca-DAB3*09* 在抗病群体中出现的频率(7.81%) 显著高于感病群体中出现的频率(1.37%, $P<0.05$)。

在“粉玉”体色瓯江彩鲤的每尾个体中, 存在 1~4 个 MHC class B 等位基因(表 3)。其中, 66.67%的感病群体只含有 1~2 个等位基因, 远高于抗病群体的 46.16%; 相反, 53.84%抗病群体的个体却含 3~4 个不同的等位基因, 而 33.33%的感

表 2 “粉玉” 体色瓯江彩鲤 MHC class II B 基因 $\beta 1$ 结构域的抗原结合位点(PBR)、非抗原结合位点(non-PBR)及 $\beta 2$ 结构域的同义替换率(d_s)和非同义替换率(d_N)

Tab.2 The d_s , d_N values in PBR and non-PBR of MHC class B $\beta 1$ and $\beta 2$ domain in “whole white” color pattern of *Cyprinus carpio* var. color

$\bar{x} \pm SE$					
结构域 domain	位点 site	非同义替换率 d_N	同义替换率 d_s	比值 d_N/d_s	密码子数目 no. of codons
$\beta 1$	抗原结合区 PBR	0.377±0.086	0.276±0.116	1.366	24
	非抗原结合区 non-PBR	0.127±0.038	0.128±0.020	0.992	68
	总计 total	0.179±0.023	0.162±0.039	1.105	92
$\beta 2$		0.080±0.014	0.101±0.028	0.792	94

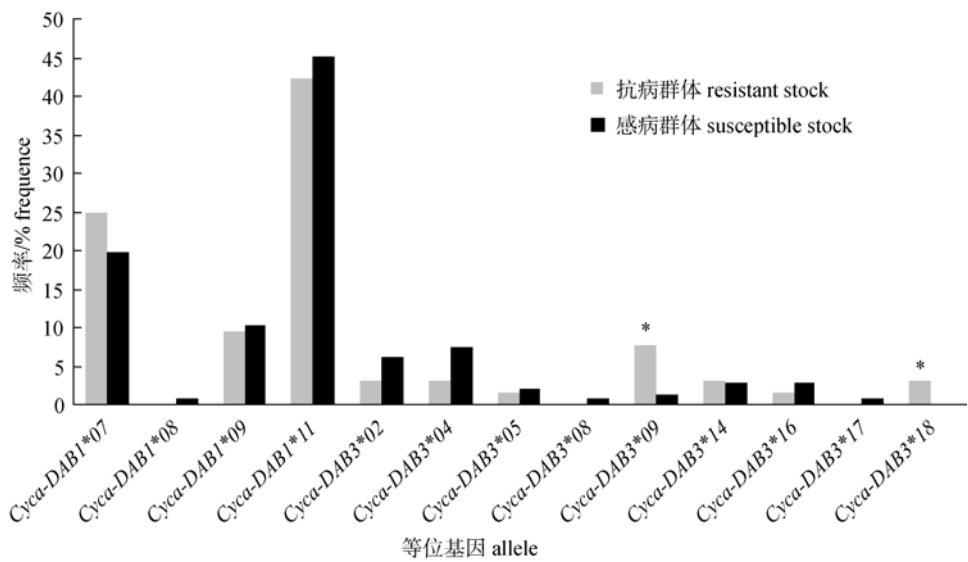


图 2 不同等位基因在抗病群体与感病群体的分布频率及卡方检验结果

*表示基因在抗病群体和感病群体中的分布具有显著差异($P<0.05$).

Fig.2 Percentages of the alleles in resistant and susceptible individuals of “Whole white” color pattern of *Cyprinus carpio* var. color and its Chi-square test result

* donates significant difference between resistant and susceptible individuals($P<0.05$).

表 3 MHC class II B 等位基因数在感病和抗病群体中的分布频率

Tab.3 The distribution frequency and its corresponding individual number of MHC class II B alleles in susceptible and resistant individuals

项目 item	感病群体 susceptible individuals				抗病群体 resistant individuals			
	1	2	3	4	1	2	3	4
个体中等位基因数 allele number per individual	1	2	3	4	1	2	3	4
个体数 individual number	5	15	10	0	3	3	6	1
百分比/% percentage	16.67	50	33.33	0	23.08	23.08	46.15	7.69
总计 total	66.67		33.33		46.16		53.84	

病群体个体只含有 3 个基因。值得注意的是, 在 30 个感病群体个体中, 没有检测到含有 4 个等位基因的样本。显然, “粉玉”体色瓯江彩鲤 MHC 等位基因数量的多少与其对疾病的抵抗力有着明显的关系。

3 讨论

3.1 “粉玉”体色瓯江彩鲤 MHC class B 基因的多态性

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, 激发机体特异性免疫反应, 在动物机体的免疫系统中发挥着重要作用^[6,26]。许多研究表明, 高度多态性是鱼类 MHC 基因最为显著的特点之一, 主要表现为多基因座及每个基因座含有数量众多的等位基因^[7-8,16,26]。这一点在瓯江彩鲤的研究中也得到证实^[2]。早在 2003 年, 研究者便发现瓯江彩鲤的 MHC I 基因的 $\alpha 2$ 结构域片段的多态性很丰富, 多态位点比例达 45.3%^[27]。最近, 我们的研究表明, 45.9%的“全红”瓯江彩鲤个体含有 MHC-DAB1 或 MHC-DAB3 两种基因型, 且每个基因型又包括不同数量的亚型(1~15 个)^[2]。本研究从 43 个“粉玉”体色瓯江彩鲤中, 共得到 84 条不同的编码序列, 归为 13 个等位基因, 其中 11 个与已报道的鲤等位基因型一致^[2,17], 而 *Cyca-DAB3*17* 和 *Cyca-DAB3*18* 为新发现的等位基因。这一结果与“全红”体色瓯江彩鲤的 MHC class B 基因的多态性相当, 却明显高于牙鲆的多态性^[2,11,28]。此外, 本研究同样证实了 MHC class II B 基因的高多态性和低分布频率的特点, 表现在多达 41.86% 的个体(18)含 DAB1 基因型, 仅 1 个个体(占 2.33%)含 DAB3 基因型, 而超过 50%(24/43)的个体含有前面的两种基因型; 此外, 每个等位基因包含不同数量的亚型(1~31 个), 其中 *Cyca-DAB1*1101* 和 *Cyca-DAB1*0701* 两个亚型占有明显优势(基因频率高达 29.52%和 14.29%), 而其余大部分亚型仅出现了 1 次(基因频率很低, 为 0.48%)。显然, “粉玉”体色瓯江彩鲤同“全红”体色瓯江彩鲤一样, 具有丰富的 MHC class B 基因资源, 为从中筛

选出抗病家系提供了可能。

鱼类 MHC class B 基因 $\beta 1$ 结构域的变异明显高于 $\beta 2$ 结构域的现象, 在牙鲆^[11]、半滑舌鳎^[8]、圆斑星鲽^[9]、“全红”体色瓯江彩鲤^[2]等不同物种中都存在。本研究发现, “粉玉”体色瓯江彩鲤 MHC class B 基因的 $\beta 1$ 结构域的核苷酸、氨基酸变异位点百分率分别为 54.35%、78.26%, 要比 $\beta 2$ 结构域的相应值高出 45.98%和 36.22%。本研究结果与其他研究者的结论一致。一般认为, 非同义碱基替换(d_N)和同义碱基替换(d_S)比值 $\omega > 1$, 显示 MHC 基因的多态性是由正向选择机制维持的^[2,8,29]。本研究中, $\beta 1$ 结构域 PBR 区的 ω 值(1.366)大于 1, 而其 non-PBR 和 $\beta 2$ 结构域的 ω 值(0.992、0.792)都小于 1, 表明氨基酸替换集中出现在抗原结合区, 正向选择起到了增加其多态性的作用。

3.2 “粉玉”体色瓯江彩鲤 MHC class B 基因与抗病力的关系

研究表明, 鱼类个体间 MHC 遗传背景的差异, 导致对疾病的抗性和易感性的不同。因此, 作为抗病相关的候选基因, MHC 已被越来越多地应用于大西洋鲑^[5,30]、牙鲆^[11]、鲤^[31]等海、淡水鱼类的抗病辅助育种的研究中。这些报道证实, 无论是病毒还是细菌引起的疾病, 含有不同的 MHC class B 基因型的个体, 对疾病的抵抗力存在明显的差异。本研究从 30 尾感病和 13 尾抗病“粉玉”体色瓯江彩鲤中, 获得了 13 个 MHC class

B 基因, 其中 4 个“*Cyca-DAB1*”、7 个“*Cyca-DAB3*”型基因与已报道的“全红”体色瓯江彩鲤的一致, 而 *Cyca-DAB3*17*、*Cyca-DAB3*18* 为“粉玉”体色瓯江彩鲤所特有的新基因。比较发现, 这些基因型在不同体色及抗病性群体中的分布存在相似或相异之处^[2]。首先, *Cyca-DAB1*07* 和 *Cyca-DAB1*11* 在两种体色的瓯江彩鲤中出现频率都超过 50%, 为主要的基因型, 只是亚型数量和出现频率在体色间存在差异; *Cyca-DAB1*08* 和 *Cyca-DAB3*08* 都为感病群体特有。其次, *Cyca-DAB3*02* 和 *Cyca-DAB3*14* 以较高的频率(7.62%和 8.75%)只出现在“全红”体色瓯江彩鲤的感病群体中; 而它们在“粉玉”体色瓯江彩鲤的感病、

抗病群体中都出现,只是出现的频率(约 2%~5%)在不同的抗病性群体间存在差异。与此相反的是, *Cyca-DAB3*09* 在“粉玉”体色瓯江彩鲤抗病群体中出现的频率(7.69%)显著高于在感病群体中的出现频率(1.33%),而该基因以 3.75%的频率只出现在抗病“全红”体色瓯江彩鲤中。第三, *Cyca-DAB3*15* 在“全红”体色瓯江彩鲤抗病群体中出现的频率(13.75%)显著高于感病群体中出现的频率(3.81%),而“粉玉”体色瓯江彩鲤则暂未检测到该基因。同样, *Cyca-DAB3*18* 则只存在于抗病“粉玉”体色瓯江彩鲤中(3.13%)。简言之,上述 MHC class B 基因在两种体色瓯江彩鲤分布中的共性与特异性,不仅再次证明了它们之间遗传背景的差异性^[14-15],而且为今后瓯江彩鲤的抗病育种工作奠定了基础。如能深入探明生长快个体、抗病个体间的基因关系问题,使亲鱼选择、人工选育的过程更加科学,那么从遗传上控制疾病,达到提高鱼体抗病力和生长速度的双重目的是能够实现的。

致谢: 在实验过程中,水产与生命学院翁志毅高级工程师、何为副教授、胡鲲博士及 2008 级水族科学专业的李昶同学提供了方便,马晓茜师姐在数据处理、冯维师兄在攻毒试验中给予了帮助,研究生杨新鑫、马玉清、何安元等多次协助采样,肖丹同学也给予了诸多指导,在此表示由衷的感谢。

参考文献:

- [1] Edwards S V, Hedrick P W. Evolution and ecology of MHC molecules: from genomics to sexual selection[J]. Trends Ecol Evol, 1998, 13(8): 305-311.
- [2] 李雪松, 刘至治, 赵雪锦, 等. “全红”体色瓯江彩鲤 MHC-DAB 基因多态性及其与鱼体抗病力关系的分析[J]. 水产学报, 2011, 35(9): 1293-1301.
- [3] Hashimoto K, Nakanishi T, Kurosawa Y. Isolation of carp genes encoding major histocompatibility complex antigens [J]. Immunology, 1990, 87(17): 6863-6867.
- [4] Sltmann H, Mayer W E, Figueroa F, et al. Organization of Mhc class II B genes in the zebrafish (*Brachydanio rerio*)[J]. Genomics, 1994, 23(1): 1-14.
- [5] Kjøglum S, Larsen S, Bakke H G, et al. How specific MHC class I and class II combinations affect disease resistance against infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. Fish Shellfish Immunol, 2006, 21(4): 431-441.
- [6] 马晓茜, 刘至治, 李思发, 等. 团头鲂主要组织相容性复合体 类基因全长 cDNA 的克隆及组织表达分析[J]. 上海海洋大学学报, 2011, 20(1): 34-43.
- [7] Srisapoom P, Ohira T, Hirano 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]. Fish Sci, 2004, 70(2): 264-276.
- [8] 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 Shellfish Immunol, 2009, 27(2): 192-201.
- [9] 李宏俊, 王娟, 高祥刚, 等. 圆斑星鲽 MHC B 基因结构、多态性及组织表达分析[J]. 中国水产科学, 2011, 18(2): 299-307.
- [10] 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 Immunol, 2007, 22(6): 707-717.
- [11] 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.
- [12] Van Muiswinkel W B, Wiegertjes G F, Stet R J M. The influence of environmental and genetic factors on the disease resistance of fish[J]. Aquaculture, 1999, 172(1-2): 103-110.
- [13] 吕耀平, 王成辉, 胡则辉, 等. “全红”瓯江彩鲤不同世代间的遗传结构及遗传分化初步分析[J]. 水生生物学报, 2010, 34(1): 65-71.
- [14] Wang C H, Li S F, Xiang S P, et al. Genetic parameter estimates for growth-related traits in Oujiang color common carp (*Cyprinus carpio* var. *color*)[J]. Aquaculture, 2006, 259(1-4): 103-107.
- [15] Wang C H, Li S F. Phylogenetic relationships of ornamental (koi) carp, Oujiang color carp and Long-fin carp revealed by mitochondrial DNA COII gene sequences and RAPD analysis [J]. Aquaculture, 2004, 231(1-4): 83-91.
- [16] Rakus K L, Wiegertjes G F, Adamek M, et al. Application of PCR-RF-SSCP to study major histocompatibility class IIB polymorphism in common carp (*Cyprinus carpio* L.)(J). Fish Shellfish Immunol, 2008, 24(6): 734-744.
- [17] van Erp S H M, Egberts E, Stet R J M. Characterization of

- chass II A and B genes in a gynogenetic carp clone[J]. Immunogenetics, 1996, 44(3): 192–202.
- [18] Rozen S, Skaletsky H J. Primer3 on the WWW for generalusers and for biologist programmers[M]// Krawetz S, Misener S. Bioinformatics methods and protocols: Methods in molecular biology. New Jersey: Humana Press, 2000: 365–386.
- [19] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucl Acids Res, 1997, 25(24): 4876–4882.
- [20] 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.
- [21] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. Bioinformatics, 2009, 25(11): 1451–1452.
- [22] Xia X, Xie Z. DAMBE: Software package for data analysis in molecular biology and evolution[J]. J Hered, 2001, 92(4): 371–373.
- [23] Brown J H, Jardetzky T S, Gorga J C, et al. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1[J]. Nature, 1993, 364(6432): 33–39.
- [24] 徐田军, 陈松林, 田永胜. 日本牙鲈主要组织相容性复合体 DAB 等位基因的多态性[J]. 动物学报, 2008, 54(5): 909–917.
- [25] Davies C J, Andersson L, Ellis S A, et al. Nomenclature for factors of the BoLA system, 1996: Report of the ISAG BoLA nomenclature committee[J]. Anim Genet, 1997, 28(3): 159–168.
- [26] Aoyagi K, Dijkstra J M, Xia C, et al. Classical MHC class I genes composed of highly divergent sequence lineages share a single locus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Immunology, 2002, 168(1): 260–273.
- [27] 蔡完其, 轩兴荣, 王成辉, 等. 红鲤 4 群体间主要组织相容性复合体的差异[J]. 水产学报, 2003, 27(2): 113–118.
- [28] 徐建勇, 陈松林, 毕金贞. 野生抗病牙鲈 MHCII B 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] Miller K M, Withler R E, Beacham T D. Molecular evolution at Mhc genes in two populations of chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*[J]. Mol Ecol, 1997, 6(10): 937–954.
- [30] Glover K A, Gimholt U, Bakke H G, et al. Major histocompatibility complex (MHC) variation and susceptibility to the sea louse *lepeophtheirus salmonis* in the Atlantic salmon *Salmo salar*[J]. Dis Aquat Organ, 2007, 76(1): 57–65.
- [31] Rakus K L, Irnazarow I, Forlenza M, et al. Classical crosses of common carp (*Cyprinus carpio* L.) show co-segregation of antibody response with major histocompatibility class B genes[J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 26(3): 352–358.

Major histocompatibility complex class II B allele polymorphism and its association with resistance/susceptibility to *Aeromonas hydrophila* in the “whole white” color patterns of *Cyprinus carpio* var. *color*

ZHAO Xuejin¹, LIU Zhizhi¹, LI Xuesong¹, WANG Yu¹, WANG Chenghui²

1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources Certificated by Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Utilization Certificated by Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: We identified 84 different encoding sequences of the MHC gene within 210 clones from 13 resistant and 30 susceptible individuals for the “whole white” color pattern of *Cyprinus carpio* var. *color* using the specific primer pair DABF and DABR. The sequences were classified into 13 alleles and *Cyca-DAB3*17* and *Cyca-DAB3*18* represented novel genes for this species. We identified a total of 267 and 130 nucleotide and amino acid variable sites, respectively. They exhibited high variable percentages (42.79% and 62.50%). The 624 bp-long nucleotide fragment included a 24 bp exon1, 276 bp exon2, 282 bp exon3, and 42 bp exon4, which encoded partial signal peptide, $\beta 1$ domain, $\beta 2$ domain, and partial transmembrane, respectively. The $\beta 1$ domain possessed a greater number of variable sites than the $\beta 2$ domain. We identified 150 nucleotide (54.35%) and 72 amino acid (78.26%) variable sites in the 276 bp $\beta 1$ domain. In contrast, we only found 105 (37.23%) nucleotide and 54 (54.75%) amino acid variable sites in the 282 bp $\beta 2$ domain. We observed 22 variable sites within 24 peptide binding residues (PBR) of the $\beta 1$ domain. The ω values ($\omega = d_N/d_S$) were 1.366 for PBR, 0.992 for non-PBR in the $\beta 1$ domain, and 0.792 for the $\beta 2$ domain, implying that positive selection pressure was exerted on the $\beta 1$ domain of MHC class II B gene of the “Whole white” color pattern of *C. carpio* var. *color*. There was a higher percentage of *Cyca-DAB3*09* in the resistant individuals (7.81%) than in the susceptible individuals (1.37%, $P < 0.05$). *Cyca-DAB3*18* was only found in the resistant individuals (3.13% of all individuals). Conversely, *Cyca-DAB1*08*, *Cyca-DAB3*08*, and *Cyca-DAB3*17* were only observed in susceptible individuals. Our results may be used to guide anti-resistant breeding selection for the “Whole white” color pattern of *C. carpio* var. *color*.

Key words: “Whole white” color pattern of *Cyprinus carpio* var. *color*; major histocompatibility complex; polymorphism; disease resistance

Corresponding author: LIU Zhizhi. E-mail: zzliu@shou.edu.cn; WANG Chenghui. E-mail: wangch@shou.edu.cn