

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.18374

高盐胁迫下大弹涂鱼 *MHC Ia* 基因对病毒拟似物 poly(I:C)的免疫反应

刘桓君¹, 孟繁星², 黎明², 王日昕², 石戈¹

1. 浙江海洋大学海洋科学与技术学院, 浙江 舟山 316022;

2. 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211

摘要: 主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)是一类编码细胞表面糖蛋白的基因, 在所有硬骨鱼的适应性免疫系统中起着至关重要的作用, 而关于 MHC 基因的研究一直是鱼类分子免疫学和鱼类抗病辅助育种的研究热点之一。本研究首次分析了大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*) *MHC Ia* 基因的 cDNA 序列特征, 构建了系统发生树, 评估了大弹涂鱼 *MHC Ia* 基因 mRNA 在健康个体不同组织中的表达差异, 研究了注射病毒拟似物 poly(I:C)后 *MHC Ia* 基因在机体主要免疫器官肝和脾的表达情况。结果显示, 大弹涂鱼 *MHC Ia* 基因具有由 1101 个碱基组成的开放阅读框(ORF), 共编码 366 个氨基酸残基, 具有 3 个蛋白激酶 C-磷酸化位点、1 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点和 1 个 N-糖基化位点。系统发育分析显示与大弹涂鱼 *MHC Ia* 基因亲缘关系最密切的是河川沙塘鳢(*Odontobutis potamophila*)。RT-PCR 分析显示, *MHC Ia* 基因 mRNA 在不同组织中均有表达, 其中肾和脾组织中表达量最高, 鳃和肠组织中表达次之。大弹涂鱼在腹腔注射 poly(I:C)后, 肝和脾组织中 mRNA 表达量明显上升, 在 12 h 时, *MHC Ia* 基因 mRNA 表达量在肝和脾中均达到峰值。本研究结果表明, *MHC Ia* 基因参与了大弹涂鱼在高盐胁迫下的免疫应答。

关键词: 大弹涂鱼; *MHC Ia* 基因; 高盐胁迫; poly(I:C); 组织表达

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2019)04-0729-09

大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)属虾虎鱼目(Gobiiformes)、虾虎鱼科(Gobiidae)、弹涂鱼属(*Boleophthalmus*), 是一种暖水、广温和广盐性的滩涂养殖经济鱼类, 具有广阔市场前景^[1]。之前的研究表明, 作为一种近岸穴居鱼类, 大弹涂鱼虽然栖息在环境复杂的潮间带泥滩, 但却具有很强的抗病能力^[2]。因此, 其能适应不同环境刺激的免疫系统具有非常重要的研究价值。

主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)是染色体上的一组编码免疫球蛋白受体的基因遗传区域, 这个区域由许多紧密连锁并高度多态的基因群构成^[3-4]。根据 MHC

基因编码的产物结构与功能的不同, *MHC* 基因可分为 I 类和 II 类, 它们的主要功能是参与适应性免疫, 通过特异性识别内源性和外源性抗原并提呈给 T 细胞, 从而发挥免疫作用^[5-7]。目前已在多种鱼类上分离和鉴定到了 *MHC* I 类基因, 如斑马鱼(*Danio rerio*)^[8]、中华鲟(*Acipenser sinensis*)^[9]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[10]和大西洋鲑(*Salmo salar*)^[11]等。随着研究的不断深入, 近年来已确定 *MHC* I 类基因几乎能在所有现存的有颌脊椎动物中找到, 即使在最古老的类群中也能找到这类基因^[12], 这表明在物种进化的过程中, *MHC* I 类基因一直发挥着不可替代的作用。目前, 关于大弹

收稿日期: 2018-11-15; 修订日期: 2019-01-21.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31872222); 宁波市自然科学基金项目(2016A610083).

作者简介: 刘桓君(1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向为鱼类免疫基因的克隆及分子进化. E-mail: 773379362@qq.com

通信作者: 石戈, 硕士生导师, 教授, 研究方向为海洋生物化学与分子生物学. E-mail: sg2610105@126.com

涂鱼 *MHC I* 类基因的研究还未有报道。

盐度是能够影响水生动物生存的重要环境因子,尤其是在鱼类的呼吸代谢和生长发育等方面具有显著影响^[13-15]。例如在低盐度环境下处理银鲳(*Pampus argenteus*),其肾中谷胱甘肽 S-转移酶活性显著上升^[16];研究发现水体盐度变化可以影响虹鳟糖及氨基酸等营养物质在肠内的运输,并在脂肪代谢过程中对脂肪酶活性起重要的调节作用^[17]。目前,关于盐度胁迫对鱼类免疫基因的影响则鲜有报道。为研究高盐胁迫下病毒感染对大弹涂鱼免疫基因的影响,本研究旨在分析大弹涂鱼 *MHC Ia* 基因的序列特征,评估大弹涂鱼与其他已鉴定鱼类 *MHC Ia* 基因的进化关系,分析其 mRNA 在不同组织中的表达以及在高盐刺激下注射 poly(I:C) (polyinosinic : polycytidylic acid, 是一种免疫兴奋剂,它以钠盐的形式被用来模拟病毒感染)后的表达情况,为进一步研究大弹涂鱼的免疫机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

用于本实验的大弹涂鱼购于浙江省宁波慈溪市山下村的滩涂围养户,体重(21±0.5) g,于宁波大学高等技术研究院鱼类健康与进化研究室控温暂养一周(室温 20℃,水体盐度为 15,用海水晶配制),每天换水一次。

病毒感染模拟物 poly(I:C)购于西格玛奥德里奇贸易有限公司(上海,中国),用于 RNA 提取的 TaKaRa RNAiso Plus 试剂购于大连宝生物工程有限公司(大连,中国),分子量标记物 GeneRuler™ 1kb DNA Marker 购于生工生物工程股份有限公

司(上海,中国),用于反转录和荧光定量分析的 TransScript® All-in-one First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR 试剂盒购于全式金生物技术有限公司(北京,中国)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验设计 在暂养一周后,将 180 尾体质健康、活力旺盛的大弹涂鱼,随机分为两组,对照组和实验组(水体盐度均为 30),每组设 3 个重复,在 6 个 50 L 的水族箱内进行实验,24 h 泵气保证氧气充足。根据预实验结果,将大弹涂鱼用 MS 222 (TMS, tricaine methanesulfonate)麻醉后,实验组腹腔注射 0.2 mL 0.15 μg/μL poly(I:C),对照组腹腔注射等体积的 0.9% NaCl 生理盐水。在注射后 0 h、6 h、12 h、24 h、36 h、48 h、72 h 时间点将大弹涂鱼组织(肝、脾、肠、头肾、皮肤、鳃、脑和肌肉)取出,迅速放入液氮中,然后转移到-80℃冰箱保存。

1.2.2 RNA 提取与序列扩增 采用 RNAiso Plus 试剂,根据制造商要求,提取大弹涂鱼各组织总 RNA,并采用 TransGen 试剂盒进行反转,得到可以用于实时荧光定量的 cDNA 模板。根据实验室已获得的大弹涂鱼 cDNA 文库,筛选出 *MHC Ia* 基因并验证。在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ncbisearch>)公共数据库中检索获得近缘物种的相关序列,在 *MHC Ia* 基因编码序列两端的保守区,利用软件 Primer Premier 6.0 设计特异性引物,所有引物均由生工生物工程股份有限公司(上海,中国)合成并验证(表 1)。PCR 反应体系为(10 μL): 0.4 μL 正向引物、0.4 μL 反向引物、1 μL cDNA 模板(0.1 μg/μL)、5 μL 的 Taq 酶和 3.2 μL 无菌水,反应程序如下: 95℃ 5 min; 95℃ 15 s, 60℃ 15 s, 72℃ 1 min, 循环 30 次; 72℃ 5 min。

表 1 本研究中用到的引物
Tab. 1 The primers used for this study

引物名称 primer	序列(5'-3') sequence	片段长度/bp fragment length
MHC IaCF1	TATTATGACAGTAACACAAAGA	981
MHC IaCR1	TCCATCTTTAGTCCAGAACA	
MHC IaQF1	GCAGACCTACAAAGCCAAC	126
MHC IaQR1	GGTCTCACTGTTCCATTAC	
β-actinQF1	GAGCGTGGCTACTCTTTCA	148
β-actinQR1	GGAGGCAGCAGTGTTTCAT	

1.2.3 实时荧光定量实验 为了研究大弹涂鱼 *MHC 1α* 基因在健康鱼体和病毒感染后的表达情况,进行了荧光定量实验(real-time quantitative PCR),将 *MHC 1α* 基因和 β -actin 基因的 cDNA 模板以 5 为单位进行 6 个梯度的稀释,用于制作目的基因和内参基因的标准曲线。实时荧光定量 PCR 反应体系为 20 μ L,其中包括 0.4 μ L 正向引物、0.4 μ L 反向引物、0.4 μ L cDNA 模板(0.1 μ g/ μ L)、10 μ L TransStart TipGreen qPCR SuperMix、8.8 μ L 无菌水。热循环系统反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 40 个循环; 60 $^{\circ}$ C 25 s, 72 $^{\circ}$ C 25 s, 3 次重复实验。

1.3 数据分析

该实验所得数据用平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示, 利用 SPSS 22.0 统计软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)以及独立样本 t 检验来检测数据均值差异的显著性, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异, $P < 0.01$ 表示极显著差异。利用 OriginPro 8 图表软件进行柱状图绘制。

1.4 生物信息学分析

其他物种序列由在线程序 NCBI 获得; 序列同源性比对和相似性搜索用在线程序 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行; 采用 DNAMAN 软件预测氨基酸序列以及开放阅读框; 利用在线程序 PHDsec (<https://prabi.ibcp.fr/html/site/web/home>) 和 SOPMA (<https://prabi.ibcp.fr/html/site/web/home>) 预测氨基酸二级结构; 采用在线程序 SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽序列; 利用在线程序 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测蛋白质结构; 利用 DNASTar 软件预测蛋白质的分子量和等电点; 采用 MEGA5.0 软件构建系统发生树^[18]。

2 结果与分析

2.1 *MHC Ia* 基因序列特征

大弹涂鱼 *MHC Ia* 基因 cDNA 序列共有 1445 个核苷酸, 包括一个由 1101 个核苷酸组成的完整开放阅读框(ORF), 编码一个由 366 个氨基酸组成的蛋白(图 1), 包括 5 个结构域: 前导肽、 $\alpha 1$ 结构域、 $\alpha 2$ 结构域、 $\alpha 3$ 结构域和跨膜区。其分子质

1 GTTTCGTCGCTCTCTTGAGAGTTGTCGCTTCAATGCTCCGGTCAGTTGGTCTCTGTG
61 GTCCGTCATCATCGGAGACTTGTGGGCCACAGTTCCACATGAAGCTCTGCGTGAGTCTG
1 (M) R R L V G P Q F T M K L C V S L
121 GTTGTTTTGGGAATGTTCTACACGGCGTCTCTCAATGACACACTCCCTGAAGTATTTC
18 V V L G M F L H G V S S M T H S L K Y F
181 TACACGGCATCGTCTGAAGTCCCAACTTCCCAGAGTTGTGCTGTGGTTTGGTTGAC
38 Y T A S S E V P N F P E F V A V G L L V D
241 GATGTTCCAGATGTTTATTATGACAGTAACACAAAGAGAGCAGTGCCTCAACAGCAGTGG
58 D V Q M V Y Y D S N T K R A V P K Q D W
301 ATGGACAAAGTGTCAGAAAGGAGACCTCTAGTACTGGGAGGAGAGACTCAGGGGTTATTG
78 M D K V S E G D P Q Y W E G E T Q G L L
361 GGTTCCCGACAGACTCAAAAGGCAAACTTGAAATCGCAAAAGCAGCGCATGACCAAACT
98 G S C Q Q T Y K G N I E I A K Q R M N Q T
421 GGAGGGACACACATTATCAGAACATGTACGGCTGTGAATGGAACAGTGAGACCGGTGAA
118 G G T H I Y Q N M Y G C E W N S E T G E
481 GTGAAAGGATATGACGAGTATGGATTGTATGGAGAAGATTTCATTGCGCTGACATGGAG
138 V K G Y E Q Y G F D G E D F I A L D M E
541 ACACAAACATATTTCTCAAGACAGACGGCTTTCATCACCACAACTCAAGTGGGACAGT
158 T Q T Y I A P R Q E A F I T K L K W D S
601 GATGAAGCTGGCAAGCCTATTGGCAAAATACCTACCCAGGAGTGCTCTGATGGATA
178 D E A G K A Y W Q N Y L T Q E C P E W I
661 AAGAGTACGTAGTATGGGAAGGACACTCTGATGAGAAGACTCTCCCTCTATCTCC
198 K K Y V A S Y G K D T L M R T V L P S I S
721 CTCTCGYAGAGTCTTCTCGTCCCGGTACCTGCCACGCCACAGTTTCTACCCCGAC
218 L L Q K S S S P V T C H A T G F Y P D
781 GGAGCCATGCTGTTCTGGACTAAAGATGGAGTCGAGCTTCATGACGGTGTGGACCCCGG
238 G A M L F W T K D G V E L H D G V D P G
841 GAGATCTGCCAACACGACGGGAACCTTCCAGATGAGTGTGGAGCTGGACGTGTCTTCT
258 E I L P N H D G T F Q M S V E L D V S S
901 ATCCAGCTGGAGAATGGCAAGTACAAGTGTGTGTTTCAGCTCTCTGGAGTCAAGAG
278 I P A G E W H K Y N C V F L S G V K E
961 GACATCATCACCACCTGGACAAAGCTGTGATCTGACCAATGAGAAGTCGACACTTCT
298 D I I T Q L D K A V I L T N E K S D T S
1021 CTGATCATCACTGTTGTGGCGTCAATTGTCTGTGTTGTGTGGTGGCTGCTCTGGGTTCT
318 L . I . I . T . V . V . A . V . I . V . C . V . V . V . V . A . L . G . F .
1081 CTCTTGTCACAAAGAGGAGCAAGCAAGCGCCCTCCATCTCTCGGAATGACCCAGAC
338 L . L . L . Y . K K R T A N C K A R P P S P A N D P D
1141 TACAGGAGGAGCTTAATCAAAATCTGTAATCTGTCGAGGAGGAGCGGGCTATTCCAG
358 V Q E E L N P K S *
1201 TTGGAAGCACTGTTATTCTTAGCTGTCATAAACTTTTACAAATTTGATTGATGCTTTAG
1261 GCTCTTTAAATGATGACTTATTTTCACTATGCAATTACAAATGCAGAACTCAGCTTTCAA
1321 ATCAGGCTCAGTTACTCAAAACATAATTACAATGTATGTTGAACTTGTTTTGTCTATA
1381 GCATCATCTATTATTCAGTTGCTCTTAATTCATTGTCTGTCAATTACTAACCGCATACA
1441 CATA

图1 大弹涂鱼 *MHC Iα* 基因 cDNA 序列和
推导的氨基酸预测

起始密码子用圆圈表示, 终止密码子用星号(*)表示, N 连接糖基化位点用方框表示, 蛋白激酶 C 磷酸化位点以直下划线表示, 酪蛋白激酶 II 磷酸化位点用双直线表示, 前导肽显示为阴影, 跨膜区域用虚线表示.

Fig. 1 cDNA and deduced amino acid sequence of *MHC Ia* gene of *Boleophthalmus pectinirostris*

The start codon is circled and the stop codon is indicated by an asterisk (*); N-linked glycosylation sites are represented with a box; protein kinase C phosphorylation sites are underlined; casein kinase II phosphorylation sites is underlined with a double straight line; leader peptide is shown in shadow; the transmembrane region is underlined with a dashed line.

量约为 41.1 kD, 等电点为 4.83。其二级结构经 PHDsec 进行预测, 结果表明, α -螺旋(α -helix)占

37.16%, β -转角(β -turn)占 7.65%, 延伸链(extended strand)占 21.31%, 无规则卷曲(random coil)占 33.88%, 具有 1 个由 29 个氨基酸组成的前导肽(leader peptide); 3 个蛋白激酶 C-磷酸化位点(S/T-X-R/K); 1 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(S/T-X-X-D); 1 个 N-糖基化位点(N-X-S/T); 和 1 个由 23 个氨基酸构成的跨膜区(transmembrane region)(图 2)。

2.2 MHC Ia 基因系统发育分析

为了研究大弹涂鱼和其他已鉴定鱼类 MHC Ia 基因的进化关系, 采用 MEGA5.0 软件中的邻近法(NJ 法, 可靠性由 1000 次自展分枝检验)构建系统发生树(图 3), 所用到的物种及其 MHC Ia 基因登录号见表 2。如图 3 所示, 不同的物种聚成几枝, 大弹涂鱼与河川沙塘鳢(*Odontobutis potamophila*)最先聚成独立分枝, 然后与鲑科鱼[包括虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)和大西洋鲑(*Salmo salar*)]形成第一枝, 再与剩下的鲈形目鱼类聚在一起, 最后与由丽鱼科[尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)和朴丽鱼(*Pundamilia nyererei*)]和怪颌鲂科[茉莉花鲂(*Poecilia latipinna*)和青鲂(*Oryzias latipes*)]组成的另一枝聚在一起。

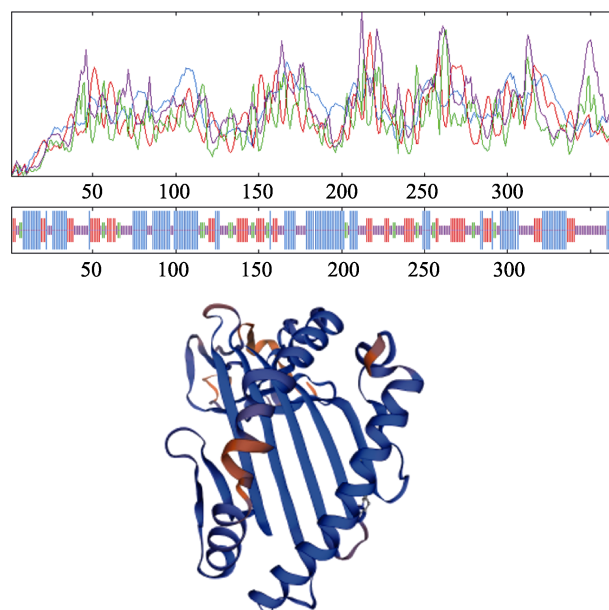


图 2 大弹涂鱼 MHC Ia 蛋白二级结构预测和三级结构模式图

蓝色线条表示 α -螺旋(α -helix), 绿色线条表示 β -转角(β -turn), 红色线条表示延伸链(extended strand), 无规则卷曲(random coil)则用紫色线条表示。

Fig. 2 The predicted protein secondary and tertiary structure ideographs of MHC Ia gene of *Boleophthalmus pectinirostris*. The blue line represents α -helix; the green line represents β -turn; the red line represents extended strand; and the random coil is represented by purple line.

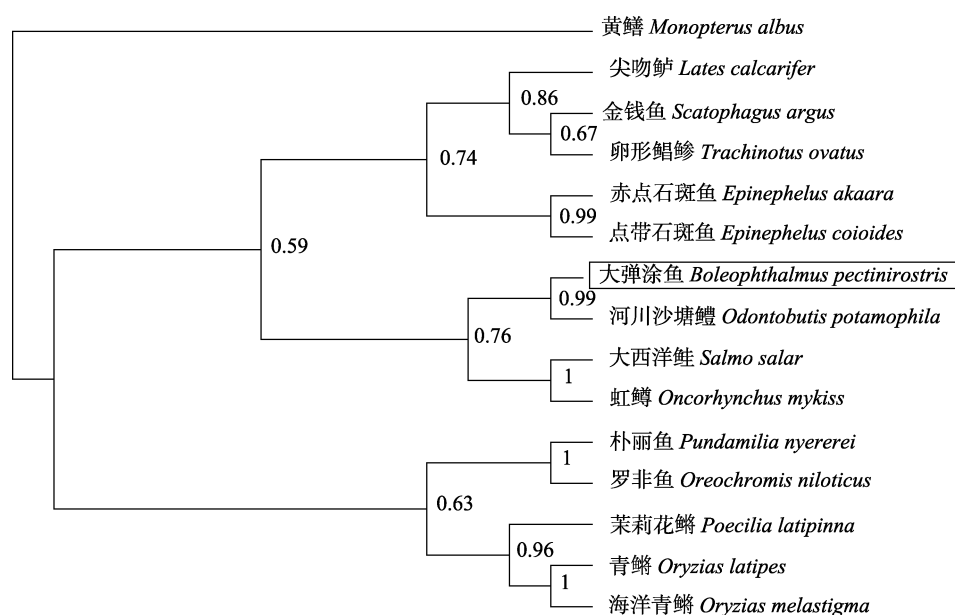


图 3 大弹涂鱼 MHC Ia 基因和其他鱼类的系统发生树
节点上的数字表示后验概率。大弹涂鱼用方框标出。

Fig. 3 Phylogenetic tree of MHC Ia of *Boleophthalmus pectinirostris* and other fish
The numbers on the nodes represent the posterior probability. The great blue-spotted mudskipper is indicated by box.

表 2 本研究中所涉及的物种名称及登录号
Tab. 2 The species and Chinese names and accession numbers of *MHC Ia* sequences used in this study

物种 species	登录号 accession number
黄鳝 <i>Monopterus albus</i>	KP690079.1
尖吻鲈 <i>Lates calcarifer</i>	XM018674100.1
金钱鱼 <i>Scatophagus argus</i>	KJ868828.1
卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	KX181492.1
赤点石斑鱼 <i>Epinephelus akaara</i>	EU221232.1
点带石斑鱼 <i>Epinephelus coioides</i>	FJ896112.3
河川沙塘鳢 <i>Odontobutis potamophila</i>	KP973945.1
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	AF504019.1
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	AY278452.1
朴丽鱼 <i>Pundamilia nyererei</i>	XM005751381.2

2.3 *MHC Ia* 基因 mRNA 在健康组织的表达

以健康、未进行注射感染实验的大弹涂鱼组织(肝、脾、肾、鳃、脑、肠、肌肉和皮肤)为材料,以反转录合成的第一链 cDNA 为模版,以 *MHC Ia*QF1 和 *MHC Ia*QR1 为引物,应用 qPCR 技术检测 *MHC Ia* 基因在大弹涂鱼健康组织中的表达。结果表明(图 4),*MHC Ia* 基因 mRNA 在不同组织中均有表达,其中肾和脾组织中表达量最高,在鳃和肠组织中表达次之。

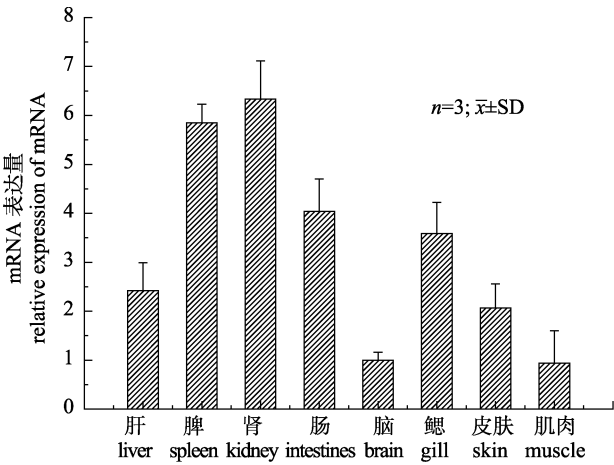


图 4 大弹涂鱼 *MHC Ia* 基因在健康组织中的表达情况
各组织的表达情况通过 RT-PCR 检测, β -actin 用作内参, 为了便于比较, 将大脑中的表达水平设为 1。
Fig. 4 Tissue distribution of *MHC Ia* gene of *Boleophthalmus pectinirostris* under normal physiological condition
Expression levels of *MHC Ia* in various tissues were measured by RT-PCR. β -actin was used as the internal control to calibrate the cDNA templates. For the convenience of comparison, the expression level in brain was set as 1.

2.4 *MHC Ia* 基因 mRNA 在 poly(I:C)胁迫下的表达

RT-PCR 分析腹腔注射 poly(I:C)后的大弹涂鱼 *MHC Ia* 基因 mRNA 表达变化, 结果显示(图 5), 在肝组织中, 对照组 *MHC Ia* 基因 mRNA 表达量在所有时间点内均没有显著变化($P>0.05$); 而实验组的表达量具有显著变化, 在 6 h 时, *MHC Ia* 基因 mRNA 表达量开始上升(1.63 倍); 在 12 h 时表达量显著上升, 达到最大值($P<0.01$, 为 5.30 倍); 在 24 h 时, 表达量有所下降, 但仍然显著高于对照组的表达量($P<0.05$, 为 2.98 倍); 在 36 h 时, 表达量又一次升高, 仍然显著高于对照组($P<0.01$, 为 4.68 倍); 以后, 表达量逐渐下降到 48 h 时的 2.22 倍和 72 h 的 1.46 倍。在脾组织中, 对照组 *MHC Ia* 基因 mRNA 表达量在所有时间点内同样没有显著变化($P>0.05$); 而实验组的表达量具有显著变化, 但峰值的出现时间早于肝组织, 即在 6 h 时, 实验组 *MHC Ia* 基因 mRNA 表达量显著上升 ($P<0.01$, 为 6.25 倍); 在 12 h 时, 实验组的表达量更是显著上升达到最大值($P<0.01$), 为 9.71 倍在 24 h 时, 表达量也有下降, 但仍然高于对照组($P<0.05$, 为 3.25 倍); 在 36 h 时, 表达量又一次升高, 且显著高于对照组($P<0.01$, 为 5.81 倍); 其表达量在 48 h 和 72 h 逐渐恢复到正常水平(分别为 1.21 倍和 1.38 倍)。

3 讨论

MHC I 分子在脊椎动物免疫系统中起重要作用, 它主要识别细胞内抗原, 结合细胞内源肽并呈递到 $CD8^+$ T 细胞, 从而引发适应性免疫^[6, 12]。迄今为止, 许多研究报道了不同鱼类的 *MHC Ia* 基因的鉴定和表达^[8-9, 11], 然而大弹涂鱼 *MHC Ia* 基因的表达仍不清楚。本研究首次分析了大弹涂鱼 *MHC Ia* 基因的氨基酸序列, 发现只有 1 个 N-糖基化位点, 一些鱼类被预测有一个单一的糖基化位点, 如牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[19]、卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)^[20]、舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[21], 而刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)有 3 个糖基化位点^[22], 条纹斑竹鲨(*Chiloscyllium plagiosum*)则无糖基化位点^[23]。蛋白质二级结构分析

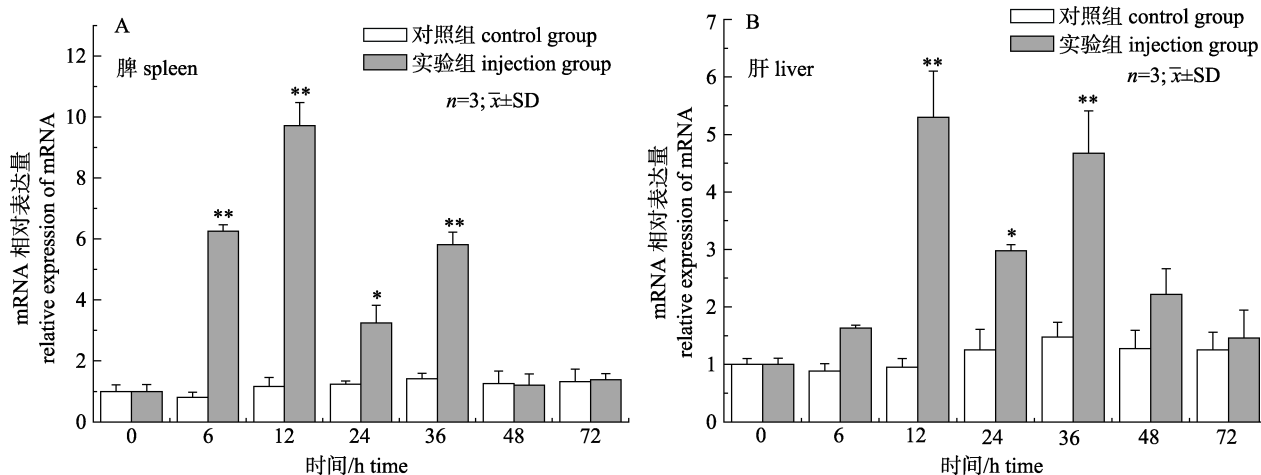


图 5 大弹涂鱼肝和脾中 *MHC Ia* 基因在 poly(I:C)刺激下的表达

β -actin 用作内参。*表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$ 。

Fig. 5 The hepatic and splenic responses of *Boleophthalmus pectinirostris* *MHC Ia* under poly(I:C) challenge β -actin was used as the internal control. *means $P<0.05$; ** means $P<0.01$.

表明,大弹涂鱼 *MHC Ia* 分子的 α 螺旋、 β 折叠结构规则,形态固定,处于蛋白质内部,而 β 转角和无规则卷曲处于蛋白质的表面,结构突出,有利于与抗体结合,因此可能作为抗原结合部位。

在现存物种的漫长进化过程中, *MHC* 基因家族大约出现在 5 亿年前的低等脊椎动物中,并在那时开始分化^[4]。本研究构建了系统发生树分析大弹涂鱼和其他已鉴定鱼类 *MHC Ia* 基因的进化关系,由进化树可以看出,大弹涂鱼与河川沙塘鳢(*Odontobutis potamophila*)的 *MHC Ia* 基因分子进化距离最近,亲缘关系最密切,这与两者同属虾虎鱼亚目(Gobioidei)的传统分类学相符。

MHC 基因的组织特异性表达已在许多硬骨鱼中报道,并广泛分布于许多鱼类的各种组织中^[8-11],本研究评估了大弹涂鱼 *MHC Ia* 基因 mRNA 在不同组织中的表达情况,结果表明, *MHC Ia* 基因 mRNA 在肾和脾组织中表达量最高,鳃和肠组织中表达次之,在肝、脑、皮肤和肌肉中表达量较低。这个结果与虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)中 *MHC Ia* 基因表达结果相似,在肠、肾、胸腺和脾表达量较高,脑、肝中表达量较低^[10],在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)中, *MHC Ia* 基因在鳃、脑、肾、肠、脾中的表达量也较高,在肌肉、卵巢和皮肤中表达较低^[19]。众所周知,脾和肾是鱼类的主要免疫器官^[12, 20],而肠道和鳃由于经常暴露在

外界环境中,可以接触到许多病原体^[24], *MHC Ia* 基因在这些组织中的高表达,可能表明这些组织都参与了大弹涂鱼的免疫应答。

鱼类养殖环境受到许多自然因素和人为因素的影响,自然养殖水域的盐度经常会发生变化,而盐度的变化会导致鱼类代谢加速、耗氧率升高、能量需求增加,严重时会造成生理机能的失常^[13]。有学者认为,在盐度胁迫条件下,鱼类会通过提升免疫功能来做出相应的防御机制,例如, IgM (immunoglobulin M) 是由 B 淋巴细胞产生的一类能特异识别并中和相应抗原的、具有免疫作用的球蛋白,将尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)从淡水转移至 24‰ 盐度养殖一段时间后, IgM 含量显著上升^[25];补体系统是先天免疫的重要组分,研究发现分别在盐度 6、12 和 38 的水体下养殖金头鲷(*Sparus aurata*) 3 个月,盐度 38 组的补体旁路活性最高,并与盐度 6 组的形成显著差异^[26]。poly(I:C)是 dsRNA 的人工模拟物,本研究以在高盐度水体下腹腔注射 poly(I:C)的形式模拟高盐胁迫后大弹涂鱼被病毒感染后的情况,结果表明,大弹涂鱼腹腔注射 poly(I:C)后,肝和脾组织中 *MHC Ia* 基因 mRNA 表达显著上升,在 12 h 时, mRNA 表达量达到最大值,且脾组织的峰值出现时间早于并大于肝组织,这与鲢(*Müichthys müy*)、大黄鱼(*Pseudosciana crocea*)等硬骨鱼类在病毒感

染后的表达相一致^[27-28]。这可能证明在高盐胁迫下, *MHC Ia* 基因仍然参与了大弹涂鱼关于病毒感染的免疫应答, 且脾组织的免疫应答速度比肝组织更迅猛, 这也为研究高盐水体环境下病毒感染对大弹涂鱼免疫应答机制的影响提供理论借鉴。

4 结论

本研究首次分析了大弹涂鱼 *MHC Ia* 基因的序列特征和与其他已鉴定鱼类 *MHC Ia* 基因的进化关系, 初步评估了大弹涂鱼 *MHC Ia* 基因 mRNA 在不同组织中的表达情况以及在高盐胁迫下注射 poly(I:C)后对其表达的影响, 为进一步了解环境刺激对虾虎鱼类和其他硬骨鱼类免疫应答机制的影响奠定基础。

参考文献:

- [1] Chen S X, Hong W S, Zhang Q Y, et al. Rate of oxygen consumption and tolerance of hypoxia and desiccation in mudskipper (*Boleophthalmus pectinirostris*) and Chinese black sleeper (*Bostrichthys sinensis*) embryos[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2006, 25(4): 91-98.
- [2] Chen S X, Hong W S, Su Y Q, et al. Microhabitat selection in the early juvenile mudskipper *Boleophthalmus pectinirostris* (L.)[J]. Journal of Fish Biology, 2008, 72(3): 585-593.
- [3] Bernatchez L, Landry C. MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years?[J]. Journal of Evolutionary Biology, 2003, 16(3): 363-377.
- [4] Rodgers J R, Cook R G. MHC class Ib molecules bridge innate and acquired immunity[J]. Nature Reviews Immunology, 2005, 5(6): 459-471.
- [5] Hughes A L, Yeager M. Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates[J]. Annual Review of Genetics, 1998, 32(1): 415-435.
- [6] König R, Huang L Y, Germain R N. MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8[J]. Nature, 1992, 356(6372): 796-798.
- [7] Ohta Y, Okamura K, McKinney E C, et al. Primitive synteny of vertebrate major histocompatibility complex class I and class II genes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(9): 4712-4717.
- [8] Bingulac-Popovic 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(2): 129-134.
- [9] Wang D Q, Zhong L, Wei Q W, 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.
- [10] Hansen J D, La Patra S. Induction of the rainbow trout MHC class I pathway during acute IHNV infection[J]. Immunogenetics, 2002, 54(9): 654-661.
- [11] Grimholt U, Olsaker I, de Vries Lindstrøm C, et al. A study of variability in the MHC class II $\beta 1$ and class I $\alpha 2$ domain exons of Atlantic salmon, *Salmo salar* L.[J]. Animal Genetics, 1994, 25(3): 147-153.
- [12] Terado T, Okamura K, Ohta Y, et al. Molecular cloning of C4 gene and identification of the class III complement region in the shark MHC[J]. The Journal of Immunology, 2003, 171(5): 2461-2466.
- [13] Livingstone D R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms[J]. Marine Pollution Bulletin, 2001, 42(8): 656-666.
- [14] Brown J A, Moore W M, Quabius E S. Physiological effects of saline waters on zander[J]. Journal of Fish Biology, 2001, 59(6): 1544-1555.
- [15] Nolan D T, Op't Veld R L J M, Balm P H M, et al. Ambient salinity modulates the response of the tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters), to net confinement[J]. Aquaculture, 1999, 177(1-4): 297-309.
- [16] Yin F, Peng S M, Sun P, et al. Effects of low salinity on antioxidant enzymes activities in kidney and muscle of juvenile silver pomfret *Pampus argenteus*[J]. Acta Ecologica Sinica, 2011, 31(1): 55-60.
- [17] Rubino J G, Zimmer A M, Wood C M. Intestinal ammonia transport in freshwater and seawater acclimated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): evidence for a Na^+ coupled uptake mechanism[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2015, 183: 45-56.
- [18] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood,

- evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [19] Srisapoom P, Ohira T, Hirono 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]. *Fisheries Science*, 2004, 70(2): 264-276.
- [20] Zhang X H, Dai Z X, Zhang G H, et al. Molecular characterization, balancing selection, and genomic organization of the tree shrew (*Tupaia belangeri*) MHC class I gene[J]. *Gene*, 2013, 522(2): 147-155.
- [21] Pinto R D, Randelli E, Buonocore F, et al. Molecular cloning and characterization of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) MHC class I heavy chain and β 2-microglobulin[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2013, 39(3): 234-254.
- [22] Scharsack J P, Kalbe M, Schaschl H. Characterization of antisera raised against stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) MHC class I and class II molecules[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23(5): 991-1002.
- [23] Shen T, Lei M L, Wang J R, et al. Molecular cloning, organization, expression and 3D structural analysis of the MHC class Ia gene in the whitespotted bamboo shark (*Chiloscyllium plagiosum*)[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2014, 157(1-2): 111-118.
- [24] Pang J C, Gao F Y, Lu M X, et al. Major histocompatibility complex class IIA and IIB genes of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: Genomic structure, molecular polymorphism and expression patterns[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(2): 486-496.
- [25] Dominguez M, Takemura A, Tsuchiya M, et al. Impact of different environmental factors on the circulating immunoglobulin levels in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. *Aquaculture*, 2004, 241(1-4): 491-500.
- [26] Cuesta A, Laiz-Carrión R, del Río M P M, et al. Salinity influences the humoral immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2005, 18(3): 255-261.
- [27] Liu G Z, Zheng W B, Chen X H. Molecular cloning of proteasome activator PA28- β subunit of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) and its coordinated up-regulation with MHC class I α -chain and β 2-microglobulin in poly I:C-treated fish[J]. *Molecular Immunology*, 2007, 44(6): 1190-1197.
- [28] Xu T J, Sun Y N, Cheng Y Z, et al. Genomic sequences comparison and differential expression of miiuy croaker MHC class I gene, after infection by *Vibrio anguillarum*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(4): 483-489.

Immune response of the *MHC 1 α* gene of *Boleophthalmus pectinirostris* to the viral mimetic poly(I:C) under high salinity stress

LIU Huanjun¹, MENG Fanxing², LI Ming², WANG Rixin², SHI Ge¹

1. College of Marine Science, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;

2. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China

Abstract: The major histocompatibility complex (MHC) is a large group of genes that encode cell surface glycoproteins and play a crucial role in the acquired immune systems of all teleosts. The study of the MHC is a major focus in the field of fish molecular immunology, and for the auxiliary breeding of disease resistant fish. The great blue-spotted mudskipper (*Boleophthalmus pectinirostris*) is special for its unique behavioral, physiological, and biochemical characteristics suitable for amphibian life. This study firstly analyzed the sequence characteristics of the *Boleophthalmus pectinirostris MHC 1 α* gene, then reconstructed the phylogenetic tree and explored the possible molecular evolution. Finally, the mRNA spatial expression pattern of the *MHC 1 α* gene was assessed in healthy tissues, and hepatic and splenic expression patterns were examined after viral mimetic poly(I:C) injection. The results showed that the open reading frame (ORF) was 1,101 bases in length, encoding 366 amino acid residues, with a molecular mass of 41.1 kD and theoretical isoelectric point (pI) of 4.83. The gene included five domains: the leader peptide, $\alpha 1$ domain, $\alpha 2$ domain, $\alpha 3$ domain, and the transmembrane domain. The following secondary protein structure was predicted: α helix accounted for 37.16%, β -turn for 7.65%, extended strand for 21.31%, and random coils for 33.88%. There were three protein kinase C phosphorylation sites, one casein kinase II phosphorylation site, and one N-glycosylation site. Phylogenetic analysis showed that the *MHC 1 α* gene of *Boleophthalmus pectinirostris* was most closely related to the *MHC 1 α* gene of *Odontobutis potamophila*. The spatial expression analysis showed that *MHC 1 α* was expressed in all tissues examined, particularly in the kidneys and spleen, followed by the gills and intestines. At 0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, and 72 h after stimulation there were no significant changes ($P>0.05$) in expression levels in the control group. During poly(I:C) challenges which were intraperitoneally injected into the liver, *MHC 1 α* mRNA expression level was increased at 6 h (1.63-fold) and the expression increased significantly and was at its maximum at 12 h ($P<0.01$, 5.30-fold). Then, the expression level decreased at 24 h, but was still significantly higher than the control group ($P<0.05$, 2.98-fold). At 36 h, expression level increased again, and was still significantly higher than the control group ($P<0.01$, 4.68-fold). Expression gradually decreased to 2.22-fold and 1.46-fold the control values at 48 h and 72 h, respectively. In spleen tissues, the expression level of *MHC 1 α* mRNA in the experimental group was significantly increased at 6 h ($P<0.01$, 6.25-fold), and the expression level of the experimental group increased significantly to its maximum ($P<0.01$, 9.71-fold) at 12 h. The maximum value expression level was reached earlier than in liver tissue. At 24 h, the expression level also decreased, but was still higher than the control group ($P<0.05$, 3.25-fold). At 36 h, the expression level increased again and was significantly higher than that in the control group ($P<0.01$, 5.81-fold), expression levels gradually returned to normal levels at 48 h and 72 h (1.21-fold and 1.38-fold, respectively). The results suggested that *MHC 1 α* plays a crucial role in the immune response of *Boleophthalmus pectinirostris* against poly(I:C) challenges.

Key words: *Boleophthalmus pectinirostris*; *MHC 1 α* ; high salinity stress; poly(I:C); tissue expression

Corresponding author: SHI Ge. E-mail: sg2610105@126.com