

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15300

金钱鱼 MHC II β 基因结构、多态性与组织表达分析

王晓冰, 刘至治, 李强, 张璐菲, 张俊彬

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

摘要: 为探究金钱鱼(*Scatophagus argus*) MHC II β 基因的结构和特性, 采用同源克隆和 RACE 等技术, 在获得 cDNA 全序列的基础上, 分析其内含子序列、基因多态性和组织表达情况。结果表明, 金钱鱼 MHC II β 基因 cDNA 序列全长 1172 bp, 其中 5'UTR 长 34 bp, 3'UTR 长 388 bp, 开放阅读框(ORF)长 750 bp, 编码 249 个氨基酸, 包含信号肽、 β 1 结构域、 β 2 结构域、连接肽(CP)、跨膜区(TM)和胞质区(CYT); MHC II β 基因由 6 个外显子和 5 个内含子组成, 其中内含子 3 将 β 2 结构域分开。从 43 尾金钱鱼的 209 个有效克隆中, 获得 209 条不同的核苷酸序列, 可归为 48 个等位基因主型, 分别命名为 Scar-DXB*0101~Scar-DXB*4801, 揭示金钱鱼 MHC II β 基因的多态性很丰富。RT-PCR 检测发现, 金钱鱼 MHC II β 基因在所检测的 11 种组织中均有表达, 其中在脾、鳃、肠和皮肤中表达量较高, 在肾、胃、心脏表达量中等, 而在眼、脑、肝、肌肉中表达量较低。对健康金钱鱼人工感染嗜水气单胞菌后, 发现其 MHC II β 基因在肝、脾、鳃、肾等组织中的表达量均发生了不同程度的变化, 证明该基因在金钱鱼免疫反应中有重要作用。在 NJ 法构建的系统树中, 金钱鱼与舌齿鲈、大西洋鲑等硬骨鱼类的亲缘关系相对较近, 而与鲛口鲨、原鸡、小鼠、人等的亲缘关系则依次渐远。

关键词: 金钱鱼; MHC II β 基因; 基因结构; 多态性; 组织表达

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)01-0021-13

主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)由紧密连锁的高度多态基因位点组成, 存在于多数脊椎动物体内, 且在机体的适应性免疫中发挥非常重要的作用, 因此一直受到国内外研究者的关注。自 Hashimoto 等^[1]于 1990 年首次报道了鲤(*Cyprinus carpio*)的部分 MHC 基因序列以来, 在此后的 20 多年里, 国内外学者已对斑马鱼(*Brachydanio rerio*)^[2]、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)^[3]、大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)^[4]和尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[5]等许多海、淡水鱼类的 MHC II 类基因进行了研究, 这些研究成果为了解 MHC II 类基因家族在鱼类天然免疫体系中的作用积累了重要的基础资料。

金钱鱼(*Scatophagus argus*)为广温、广盐性鱼类,

广泛分布于太平洋地区的盐碱地和海水中^[6-7]。因其环境耐受力强, 已成为近年来在中国南部深受欢迎的优质海水经济鱼类。然而, 目前有关金钱鱼的研究主要集中于人工养殖^[8]、生物学特征^[9]、性腺发育^[10]和繁殖特性^[11]及渗透压调节与性腺发育相关基因^[12]等方面, 却鲜见有关金钱鱼机体免疫系统机能方面的基础性研究。近年来的养殖实践表明, 金钱鱼易受到不同病原体如嗜水气单胞菌、海水小瓜虫等的侵染而患病, 从而造成严重的经济损失。鉴于此, 本研究通过 RACE 和同源克隆技术, 在获得金钱鱼 MHC II β 基因 cDNA 全序列的基础上, 分析其基因结构与多态性, 以及感染细菌前后的组织表达情况, 为金钱鱼抗病基因的筛选及抗病育种提供依据。

收稿日期: 2015-07-29; 修订日期: 2015-09-18.

基金项目: 国家自然科学基金项目(41176109).

作者简介: 王晓冰(1990-), 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: bbwang66@126.com

通信作者: 刘至治, 博士, 副教授, E-mail: zzliu@shou.edu.cn; 张俊彬, 博士, 教授, E-mail: jb-zhang@shou.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料

健康金钱鱼 63 尾, 重 20~30 g/尾, 采自广东省湛江市雷州湾。运回实验室后暂养于直径为 1.5 m 的圆形水缸中, 充气并将水温控制在 $(25\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 。实验时, 随机选取 12 尾健康鱼作为实验组, 腹腔注射 0.1 mL 浓度为 1.25×10^6 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)进行人工感染。对照组鱼 8 尾, 每尾注射相应量的磷酸生理盐水。10 h 后实验组鱼开始出现感病症状, 而对照组鱼在整个实验过程中正常生长, 无任何生病或死亡症状。接着, 分别在 12 h、24 h、48 h 和 72 h 4 个时间点, 随机取感病金钱鱼的肠、肝、脾、鳃、皮、肾等组织, 保存于 -80°C 超低温冰箱备用。然后, 对剩余 43 尾样本, 取肝、脾、肾、肠、心脏、肌肉、胃、脑、鳃、眼和皮肤共 11 个组织, 保存于 -80°C 超低温冰箱, 用于基因结构或多态性分析, 同时剪取每尾鱼的尾鳍, 保存于 75%酒精中备用。

1.2 DNA、mRNA 的提取以及 cDNA 的合成

采用“酚-氯仿”法从尾鳍抽提基因组 DNA。采用 TRIZOL 法(Invitrogen), 从各组织提取总 RNA, 先经 1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性, 再用分光光度计测定其浓度及 OD 值(A_{260}/A_{280})。以总 RNA 为模板, 利用反转录试剂盒 Prime Script 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)合成 cDNA, -20°C 冰箱保存备用。

1.3 引物设计、PCR 扩增和克隆

依据 NCBI 上其他硬骨鱼类如舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)(GenBank 登录号: CAJ34348.1)、鳊(*Miichthys miui*)(AGJ70375.1)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)(AH02000.1)等的 MHC II β 基因核苷酸序列的保守区, 设计 1 对兼并引物 MHC II β -F/R, 用于扩增金钱鱼 MHC II β 基因的 cDNA 部分中间片段。然后, 根据中间片段, 设计 5'-RACE 的下游引物 MHC II β -GSP5'和 3'-RACE 的上游引物 MHC II β -GSP3', 而以反转录试剂盒 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech)中提供

的通用引物 UPM 作为 5'-RACE 的上游引物, 以试剂盒 3'-Full RACE Core Set Ver.2.0 (TaKaRa)中的 Outer P 和 Inner P 作为 3'-RACE 的下游引物, 扩增 MHC II β 基因的 5'端和 3'端以得到 MHC II β 基因 cDNA 序列全长。接着, 根据所得 cDNA 全长序列, 参照其他硬骨鱼类 MHC II β 基因各外显子的位置, 分别设计 4 对引物(MHC II β -1F/R~MHC II β -4F/R), 用于扩增金钱鱼 MHC II β 基因的内含子, 以得到 MHC II β 基因的完整结构。最后, 根据得到的 cDNA 序列, 在 5'-UTR 和 3'-UTR 区, 设计引物 MHC II β -UAF 和 MHC II β -UAR, 用来扩增金钱鱼 MHC II β 基因的编码序列, 包括完整的信号肽(SP)、2 个结构域($\beta 1$ 、 $\beta 2$)、连接肽(CP)、跨膜区(TM)和胞质区(CYT), 以了解金钱鱼 MHC II β 基因的多态性。设计引物 MHC II β -RT-F/R, 以分析金钱鱼各组织在感染细菌前后的表达情况。上述所有引物对的序列具体见表 1。

用于克隆的 PCR 反应条件如下: 94°C 3 min; 35 个循环: 94°C 1 min, 退火温度(T_m , $^{\circ}\text{C}$)1 min, 72°C 2 min; 72°C 10 min。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 目的基因片段用 Gel Extraction Kit (Aidlab)纯化, 连接于 pMD-19T 载体(TaKaRa), 再转化到 TOP10 细胞(Tiagen), 并通过 M13F/R 引物(表 1)进行 PCR 来筛选阳性克隆, 然后随机挑选 5 个阳性克隆, 由上海美吉生物医药科技有限公司的 ABI3730 测序仪测序。

1.4 等位基因命名

根据 Klein 等^[13]的方法对得到的等位基因进行命名。例如, Scar-DXB*0101 等位基因, Scar 代表金钱鱼拉丁名中的属名和种本名的前两个字母, DXB 代表 MHC II 类 β 基因, “0101”代表不同的等位基因。分析中, 为防止因 PCR 错配、测序等人为因素而导致的假多态性, 用于基因多态性分析的序列均经同一个体或不同个体 2 次独立的 PCR 验证所得, 并将那些与同源序列的非同义碱基替换位点不超过全长 1.5% 的序列认定为假性等位基因^[14]。

1.5 序列分析

测序所得序列, 通过 NCBI 中 BLAST

表 1 本研究所用引物
Tab.1 Primers used in this study

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	退火温度/℃ T _m	扩增目标 amplification target
MHC II β -F	CTGAACCTGGACTGATGTAT	54	中间片段扩增
MHC II β -R	AGATCTTCTCTCCAGACTTG		
UPM (long)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAA GCAGTGGTATCAACGCAGAGT		
UPM (short)	CTAATACGACTCACTATAGGGC		
Outer Primer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATT	59	3'RACE
Inner Primer	CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG		
MHC II β -GSP5'	ACTTCCTGTCCGTCTGTGAG		
MHC II β -GSP3'	GTCAAAATCTGCGATGCCCT		
MHC II β -1F	CATCAGCTTCTCCCTCCT	52	内含子 1 intron 1
MHC II β -1R	TAGCCAACAAAATTCCCC		
MHC II β -2F	CTGAACCTGGACTGATGTAT	53	内含子 2 intron 2
MHC II β -2R	CATCAGTGGAAGTGACATC		
MHC II β -3F	ACATGTGGCCATGTTGGT	55	内含子 3 intron 3
MHC II β -3R	TCAGTCCTGAGGCTCCGA		
MHC II β -4F	TACTACAAGACGAAAGCC	46	内含子 4 intron 4
MHC II β -4R	GAACAACCAACAGGACCA		
MHC II β -UAF	TGGTGGTCCTCGTCCTCT	54	ORF
MHC II β -UAR	ATGTTGTGGTGACGTTTCG		
MHC II β -RT-F	AGCGTCCCTCAGTGTCTC	60℃	qPCR
MHC II β -RT-R	GCTCCTCTCCATCTTTCC		
β -actin-F	GTGCTATGTTGCCCTGGACT	59℃	qPCR
β -actin-R	TGCTGTTGTAGGTGGTCTCG		
M13-F	GAGCGGATAACAATTTACACAGG	55℃	菌液验证 microbial validation
M13-R	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC		

注: GSP 为基因特异性引物; UPM 为通用引物; F 为正向引物; R 为反向引物。
Notes: GSP is gene specific primer; UPM is Universal Primer Mix; F is forward primer; R is reverse primer.

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行同源检测, 以判定目的基因片段的准确性, 然后用 Bioedit 软件^[15]整理和编辑, 并辅以人工校准。接着用 Clustal X 软件^[16]进行对比和排序, 以 ContigExpress (<http://www.contigexpress.com/>)进行拼接后, 获得 cDNA 全序列, 再以 BLAST 对全长 cDNA 序列进行核苷酸与蛋白质的同源检索。继而, 用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>)寻找开放阅读框(ORF), 用在线软件 SignalP 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分析预测蛋白信号肽^[17]及信号肽剪切位点, 用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)^[18]进行跨膜区预测, 用 Pfam(<http://pfam.sanger.ac.uk/>)来推测蛋白质的保守区; 用 ProtParam

(<http://web.expasy.org/protparam/>)来剖析蛋白质的氨基酸构成、分子相对质量及等电点等; 用 PredictProtein (<http://www.predictprotein.org/>)工具, 分析预测蛋白质的一级、二级结构及很多功能位点等。最后用软件 DnaSP 5.0^[19]分析金钱鱼 MHC II β 基因外显子序列的多态性, 以 Mega 5.0^[20]分析突变位点, 计算核苷酸的错义、同义替换率及氨基酸的构成比例, 通过 Mega 5.0 软件的 NJ 法 (Neighbor-Joining)构建系统进化树, 分支置信度 Bootstraps 重复 1000 次采样。

1.6 组织表达分析

分别提取健康金钱鱼的肝、脾、肾、胃、脑、肌肉、眼、肠、皮肤、鳃和心脏共 11 个组织和感染后的各时间段(12 h、24 h、48 h、72 h)的金钱

鱼组织的 RNA, 分别反转录成 cDNA 后, 用 ABI7500 荧光定量 PCR 仪进行 RT-PCR 反应, 以了解 MHC II β 基因在各正常组织中的表达情况以及感染后不同时间段组织表达量的变化趋势。PCR 反应总体系 20 μ L, 包括: 2 μ L cDNA 模板, 10 μ L SYBR Green Real-time PCR master mix (TaKaRa), 0.4 μ L ROX II, 0.8 μ L 引物和 6.8 μ L ddH₂O。特异引物和内参引物分别为 MHC II β -RT-F/R、 β -actin-F/R(表 1)。每个反应 3 个平行对照, 另外, 以未添加模板的反应体系作为空白对照。

2 结果与分析

2.1 金钱鱼 MHC II β 基因结构序列

利用简并引物 MHC II β -F/R(表 1), 扩增得到长度为 464 bp 的中间片段, 然后通过 5'RACE 和 3' RACE, 扩增得到全长为 1172 bp 的金钱鱼 MHC II β 基因 cDNA 序列(KT176142), 命名为 Scar-DXB*01(图 1A)。该基因包括 6 个外显子, 外显子 1 包括 34 bp 的 5'UTR 和 55 bp 的信号肽, 外显子 2 编码 β 1 结构域, 外显子 3 和 4 编码 β 2 结构域, 外显子 5 和 6 编码连接肽、跨膜区、胞质区以及 3'UTR。

接着, 利用 4 对内含子引物 MHC II β -1F/R~MHC II β -4F/R(表 1), 扩增得到 5 个内含子(图 1B): 内含子 1 长度为 216 bp, 它把外显子 1 和外显子 2 分开; 内含子 2 紧跟着外显子 2, 长度为 1010 bp; 内含子 3 把 β 2 结构域分开, 长度为 85 bp; 内含子 4 和 5 长度分别为 258 bp 和 94 bp。所有内含子与外显子的匹配位点均为 GT/AG。

2.2 氨基酸序列分析

金钱鱼 MHC II β 蛋白质与其他硬骨鱼类结构域类似, 由信号肽(SP)、两个结构域(β 1、 β 2)、连接肽、跨膜区及胞质区等结构域组成。它的 ORF 共编码 249 个氨基酸, 分子组成为 C₂₂₃₉H₃₇₃₀N₇₅₀O₉₃₄S₁₉₈, 分子量 62.45 kD, 等电点为 5.09。经 Predict Protein 预测, 金钱鱼 MHC II β 蛋白质的主要功能位点如下(图 1A): 在 β 1 区发现了 1 个 N-糖基化位点(NSTE), 在 β 1 区、 β 2 区和 CP/TM/CYT 区均发现 N-豆蔻酰基化位点(GNFVGY、GLMYAE、

GQEVTS、GLILGL), 在 β 2 区、CP/TM/CYT 区发现了蛋白激酶 C-磷酸化位点(TPR、SLK、SER), 在 β 2 区和 CP/TM/CYT 区共有 5 个酪氨酸激酶 II-磷酸化位点[ST].[2][DE], 在 β 1 区存在 1 个酪氨酸激酶磷酸化位点 KVEDVGY。金钱鱼 MHC II β 基因的氨基酸序列, 与 NCBI 上已报道过的大眼狮鲈(*Stizostedion vitreum*)等十几个物种的 MHC II β 基因的氨基酸序列比对见图 2。

2.3 分子多态性

为分析金钱鱼 MHC II β 分子多态性, 从 43 尾健康鱼的 209 个阳性克隆中, 获得 209 条不同编码的核苷酸序列, 编码的氨基酸序列都包含完整的信号肽、 β 1 和 β 2 结构域、连接肽(CP)、跨膜区(TM)和胞质区(CYT), 分别编码 179 条不同的氨基酸序列。根据等位基因命名规则, 可将它们归为 48 个等位基因主型及 96 个等位基因亚型, 分别命名为 Scar-DXB*0101~Scar-DXB*4801 (GenBank 登录号: KT176142~KT176189)。

分析得知, 金钱鱼 MHC II β 基因的核苷酸序列中有 183 个变异位点, 变异率达 25.74%, 其中简约信息位点有 139 个; 而氨基酸序列中有 83 个变异位点, 变异率达 35.02% (表 2), 其中简约信息位点有 62 个。另外, 金钱鱼 MHC II β 基因的单倍型多样性(H_D)、平均核苷酸差异数目(K)和核苷酸多样性(P₁)分别为 1.000、57.480 和 0.081。

2.4 系统进化分析

基于 NJ 法构建的系统发生树显示(图 3): 金钱鱼与尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*, 鲈形目)、牙鲈(*Paralichthys olivaceus*, 鲈形目)、三刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*, 三刺目)等 11 种鱼类先聚为一大支, 接着与大西洋鲑(*Salmo salar*, 鲑形目)聚类, 再与鲤(*Cyprinus carpio*)、斑马鱼等鲤形目鱼类相聚, 位于系统发生树的上部, 表明金钱鱼与海水硬骨鱼类的亲缘关系较近; 而铰口鲨(软骨鱼纲)、原鸡(鸟纲)、小鼠与人(哺乳纲)则聚为一支, 在系统进化树的下部, 显示这些物种与金钱鱼的关系依次渐远。

2.5 组织表达分析

RT-PCR 分析表明(图 4), MHC II β 基因在健康金

钱鱼的肝、脾、肾、胃、脑、肌肉、眼、肠、鳃、皮肤和心脏共 11 个正常组织中都表达, 其中在皮肤、鳃、脾和肠的表达量较高, 中等程度表达于肾、胃和心脏等组织, 而在肝、脑、眼和肌肉中的表达量较低。

人工感染嗜水气单胞菌后, MHC II β 基因在不同实验时间段内, 于肝、肾、鳃、脾等组织中的表达量均发生不同程度的变化(图 5): 鳃和脾组织的表达量, 在 12~48 h 均低于对照组的表达量,

A	ACATGGGGAGTGTGTGTGAAGTGAACACAGGGAC	34
	← 5'-UTR	
(ATG)GCTTCAGCCTTCATCAGCTTCTCCCTCTCTTCATCAGCCTGTGGACGGCAG	gtacgatcaatacgcctctgatcaatacactgat	124
M A S A F I S F S L L F I S L W T A		18
Caatacgcctctgatcaatacgcctctgatcaatacactgatcaatacactgatcaacaacacactctgatcaatacgcctctgatcat		214
Tatgctctgatcaacactgattgtctgatcaatacctctgatcatactgtagtttcatgctgatgttcaaacgtgtttgtttctgttcttca		304
gATGGATTCTGGAATATTCTTTCAGCCGCTGTGTGTTAACTCCACTGAGCTGAAGGACATCGAGTACATCGTGTCTTACTACTTCAAC		394
D G F L E Y S F S R C V F N S T E L K D I E Y I V S Y Y F L		48
AAAGTGGAGGACGCTCGGTACAGCAGCAGTTTGGGAATTTGTTGGCTACACTGAACCTGGACTGATGTATGCAGAGAGCTGGAACAAC		484
N K V E D V G Y S S S G N F V G Y T E P G L M Y A E S W N N		78
GATCCTTCACAACTGGCTCAGATGAGAGGTGAGAAGGAGAGGTACTGCCACCACAACATTGGGATCGACTACCATGCTGCTGTGCTCAAAA		574
D P S Q L A Q M R G E K E R Y C H H N I G I D Y H A A L S K		108
TCTGgtgagtttgtgttctgtcacatccaacagcatctgatcatcacgttattgattaactgactgattcattaactctctgaccaatc		664
S		109
aacgtgaactattgaatcagctttcaatattaatattgatctaaaacagtttatggtttcatttcacctaaagtcaactaactatttggtta		754
gttactgatcatttaatattttatatatcattttaaatgtttacatacatgtcttctttattttatttcaaacgtgtgttcaatgaaact		844
Acatcaatttgtttccagttatttccaaatgtatttgttccaaataacagtcacatcaaacacacaatcattattaaagaaaatataaaa		934
Ataaaatcacacttttagaaaagggaatcaatattttattttatttttttggtgtgttacactgttaaagtcacaaaagaaactatttca		1024
Caaaactagagtttcttttccactctctgtgtgcatgtatgaagtgtttgttgacagcataaattgtgtgatttggatgaatatttact		1114
Gtcaacattaatgttccagttatttgcactcaggaaacattttgttccactcagttactttcacttttctttacagcaacacactcacaca		1204
Ctgaagcctgaacaacaaaatgtcatgttaggaatgatgactgtgagcaggtaaaataaagacgactttgagagccctggaatattc		1294
Tacaataaattattgtctatgaacatcaggcagacttgaaaatcctaacttttgtcactgtctgtctgtccctgtccactcattttcata		1384
Acgactgatcctccaaaggccagaagtgaaccatcaaaacctgcaggaacttaactgaaagtcagggtgtcggctctgtctgtttgaatgc		1474
Tgacattaaaggagaagtttttaatgcaggcagcctcagacgtccagaacaaacacacttctgtctgtaaacacactttgttaattaaa		1564
acgacaacataacttgtgttccagCGATGCCCTACCTCAGGCTCGGGTCTGTGACACCCCTGGTGGTAAACATGTGGCCATGTTGGTCT		1654
A M P Y L R L R S V T P P G G K H V A M L V		131
GCAGCGTCTTCGACTTCTACCCGAACACATCAAAGTGTCTGGCTCACAGACGACAGGAAGTCACCTCTGATGTCACTTCCACTGATG		1744
C S V F D F Y P E H I K V F W L T D G Q E V T S D V T S T D		161
AGCTGGCAGACGCTGATTGGTATTACCAGATCCACTCTCACCTGGAGTACAGCCAGgtgagtcagctgcaggctcctgtgctgttc		1834
E L A D A D W Y Y Q I H S H L E Y T P		180
aggtcagttctgcgtgacagaccctctgatgtgttggttgtgtgaagcagGTCTGGAGAGAAGATCTCCTGTGTGGTGGACACGCC		1924
R S G E K I S C V V E H		192
AGCCTGAAGCAACCTCTGGTGACTGACTGGGgtaataacctgtctgtctgtcaccgcgtctatctgtctgtctgtctgtctgtcactg		2014
A S L K Q P L V T D W		203
tctatctgactgttcacctgtctgtcttctgtctgtctgtcctcagATCCGTCCATGCCCGAGTCAGAGAGGAACAAGATTGCCATCGG		2104
D P S M P E S E R N K I A I		217
AGCCTCAGGACTGATCCTGGGTCTGATCTTATCTCTGGCTGGATTATCTACTACAAGACGAAAGCCCGAGgtcagaccagtacacacag		2194
G A S S L I L G I I L S L A G F I Y Y K T K A R		241
Tctgaaaccagttcagaccagtacacacagctctgaaaccagttcagaccagtacacacagctctgaaaccagttcagaccagtctgagacc		2284
Agttcagaccagtctggtctcctctgtttttatttagtgtttcatttagaatgggttcagttgttgattgttttcagaccacttcagttct		2374
Cactgcaggttcaggtatttttcaaacagttttcaggtcattttcagaccagttttgttcagttctcagaagacaggttttaagtctt		2464
catctgaggttgacctgtctcctctcttctgtcttcaagGTGCGATTCTGGTCCCACTAAC(GAT)CCTGGTCTGGTCCCGGTCTCT		2554
G R I L V P T N *	3'-UTR →	249
GATCCTGGTCTGATCCTGGTCTGTATCCTGTGTTCTCTGATCCTGAGCTGGTCTTAAACCCTGATCCAGGACTCTCACTGTCCTGTTGG		2644
TTGTTCCACATGTCTGTGACAGTCTGGATCAGGTTGTGGTCTGGGCTGTGGATCTGGACTCTGCTTCTGCTGCTTTACTGTGTGGAT		2734
CAACGTGTTGGAGGCTCTCAGTAACCTGCTGTTAAATCAGATAGAATCCAGAGGTTTGGATCATGTGGGCTCGCAGCTTGTCTGATT		2824
GTTCAATTTCTGTGTTTTACTGCACTGAAACGTTTTCTAACCAATAAAACCCAGAGAAAACCTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA		2914
AAAAAA		2920

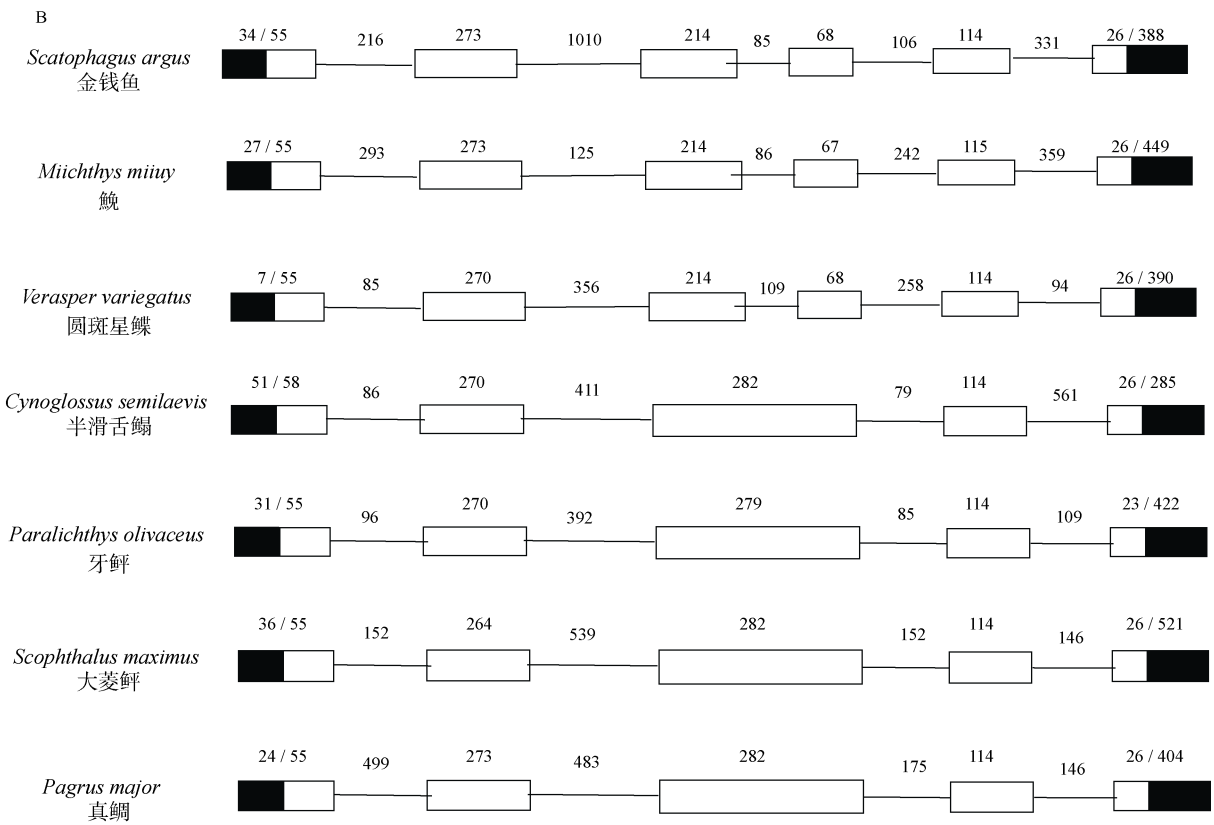


图 1 金钱鱼 MHC II β 基因的基因序列(A)和基因结构示意图(B)^[21-22]

A. 大写字母表示外显子，小写字母表示内含子；数字表示该行末尾的核苷酸位点数；加粗数字表示该行末尾的氨基酸位点数；点虚线代表信号肽区域；下划线代表蛋白激酶 C 磷酸化位点；横虚线表示 N 糖基化位点，圆角框表示酪蛋白激酶 II 磷酸化位点；波浪线表示酪氨酸激酶磷酸化位点；灰色方框表示 N-豆蔻酰基化位点；直角方框表示加尾信号和 Poly A 尾巴；阴影部分表示内含子与外显子的匹配位点；椭圆表示起始和终止密码子。B. 方框代表外显子；横线代表内含子；白色方框代表编码区；黑色方框代表非编码区，数字代表内含子或者外显子的碱基长度。

Fig.1 Genomic sequence (A) and schematic illustration (B) of *Scatophagus argus* MHC II β gene^[21-22]

A. Exons are shown in uppercase and introns are shown in lowercase letters; Numbers are representative of the end of nucleotide sequence (non-bold) and deduced amino acid sequence (in bold); Dot-dashed line stands for signal peptide; Underline indicates protein kinase C phosphorylation site; Horizontal dotted line indicates N-glycosylation site; Rounded rectangle indicates casein kinase II phosphorylation site; Wavy line shows tyrosine kinase phosphorylation site; Grey box indicates N-nutmeg acetoxylation site. Rectangular boxes are representative of the polyadenylation signal and the polyA tail; Dash area indicates introns and exons matching sites; Ellipse indicates the start codon and stop codon. B. Boxes stand for exons; Lines indicate introns; White boxes stand for CDS; Black boxes stand for UTR; Numbers stand for the length (bp) of exons and introns.

表 2 金钱鱼 MHC II β 基因的核苷酸及氨基酸变异位点

Tab.2 Variable sites of nucleotide and amino acid in the MHC II β gene of *Scatophagus argus*

序列 sequence	核苷酸 nucleotide			氨基酸 amino acid		
	变异位点 variable site	总位点 total site	百分比/% percentage	变异位点 variable site	总位点 total site	百分比/% percentage
信号肽 signal peptide	11	60	18.33	5	20	25.00
β 1 结构域 β 1 domain	129	255	50.59	55	85	64.71
β 2 结构域 β 2 domain	36	282	12.77	18	94	19.15
跨膜区 transmembrane	7	114	6.14	5	38	13.16
总共 total	183	711	25.74	83	237	35.02

金钱鱼 <i>Scatophagus argus</i>	HNNIGIDYHAALSKSAMPYRLRLRS-VTPPGKGHVAMILVCSVFDFPEHIVKVFMLTDGQEVTSDDVTSDELADADNYQYQIHSHLEYTPRSGEKISCVWEHASKQP	104
大眼狮鲈 <i>Stizostedion vitreum</i>	KY.VD.R.QN.T...E.V.S-TAS...S...Y...KQ.R.S.TR...G...M...RE	104
点带石斑鱼 <i>Epinephelus coioides</i>	VN.V.L.L.QN.T...E.VV.S.VTPS...S...KK...S.R.K...V...RE	104
鳊 <i>Miichthys miui</i>	Q...E...QT.D...E.V.H...H.P.S...K...S.R...E	104
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	LN.VQA.QS.D...K.V.H...H.P.S...Q...S.I.R...E	104
三刺鱼 <i>Gasterosteus aculeatus</i>	LNHPVYV.SN.T...E.V.H.E...GPLS...Y...KK.I.R.TR.RPE.TG...G...T...I...SK	104
真鲷 <i>Pagrus major</i>	KT.V.NE.AY.TQ.K.V.Q.VTPS-A.QS.S...F.KL...S.FR...G.F...E	104
半滑舌鲷 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	V.V.L.RTG.AA...E.V.H.E...A...PS...Y...KQ.S.S.RR...ST...G.F...E	104
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	FR.V.VFTES.T...K.VS.N...A.A...PS...KR...S.QR...G...M.K...SK	103
尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	Q...W.SNP...VK.V.H-TA.LSSH.P...R.Y...SK...S.R...E.M.G...T...DK	104
舌齿鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	LTH.N...Q.V.D.VK.VV.S-A.A...PS...Y.F.K.R.S.R...F...RE	104
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	K.ADLH.R.I.D.TVE.HV.S-A.S.R.P...M.AY...KP.R.T.R.R.K...E.NG...M.I...TE	104
圆斑星鲈 <i>Verasper variegatus</i>	FP...ATEN.T.VK.SVT.H-A.A...P...Y.F.K.R.R.S.QR...H...G.F...SK	104
鲢 <i>Cyprinus carpio</i>	E...PVM.ES...ARQVE.KVT.I.TXRGHLSXPS.I.I.AYV...AK.S.T.K.NL.S.DOADVTVEL.SNG...T.VRQY.Q.E.VY.D.YT.H...S.TS	104
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	R.AQ.LDSSVRD.TVK.KIT...-ARQA.SRP.V...AYG...K...S.R.K.M...M.M.G.F...E...K...M...FSK	104
斑马鱼 <i>Brachydanio rerio</i>	R.AQ.SDS.VRD.AVL.EVTIK...RQAE...P.V.L.AYE...KK.MS...R.K...M.M.G...K...Q.L...T...	104
原鸡 <i>Gallus gallus</i>	R.Y.VGESFTVQR.VE.KV.VSAXAERDQXETDR.A.Y.TG...PE.E.K.FLN.R.E.E.V...VMQNG...T.VL.VV...TV.XR.DSYV.R...R...	105
小鼠 <i>Mus musculus</i>	R.YE.FDMFLVPRRVE.TVTYVYXQN.AAXX.HNL...S...GN.E.R.FRN.K.EKGIV...VMQNG...TF.TL.VM...TV.Q...VYT.Q...P.TD	105
人 <i>Homo sapiens</i>	R.Y.VGESFTVQRVE.TVTYVYXQN.AAXX.HNL...SG...GS.E.R.FRN.K.EKGIV...GLIQNG...TF.TL.VM...TV.Q...VYT.Q...P.VTS	105

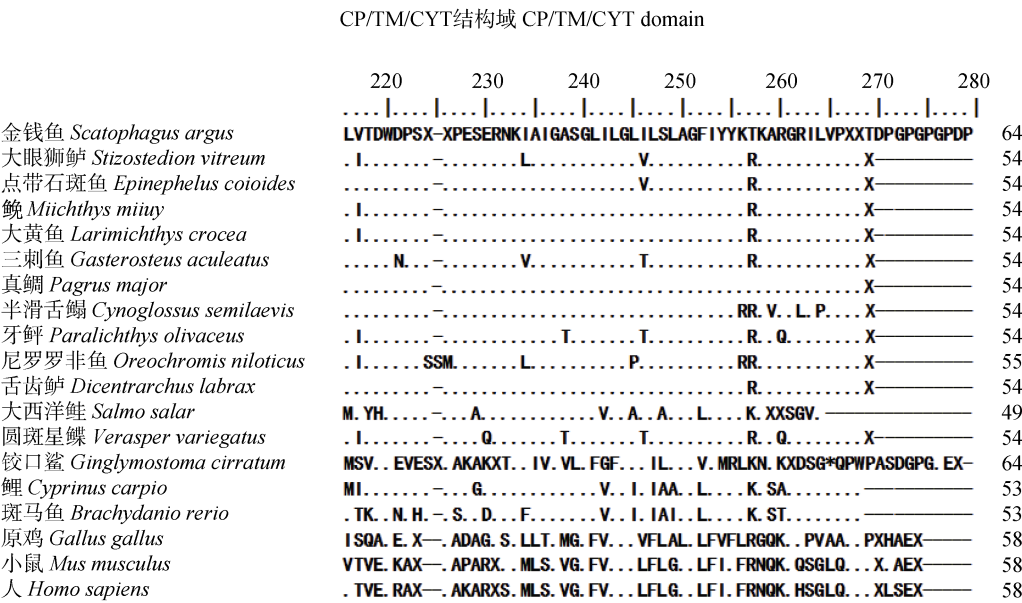


图 2 金钱鱼 MHC II β 基因编码的氨基酸序列与其他物种的比对

包括信号肽、β1 结构域、β2 结构域、连接肽(CP)、跨膜区(TM)和胞质区(CYT), 序列上面的数字代表序列的位置, 序列末尾的数字代表氨基酸总数, “.”表示一致的氨基酸序列, “-”表示缺失, 比对中所用到的鱼类氨基酸序列登录号与图 3 中的一致.

Fig. 2 The comparison of amino acid sequences of MHC II β gene in the *Scatophagus argus* with other species
The sequence includes signal peptide, β1 domain, β2 domain, connecting peptide (CP), transmembrane region (TM) and cytoplasmic tail (CYT); Numbers above the sequences refer to positions found in the sequences; Numbers at the end of the sequences represent for the total number of amino acids; “.” shows consistent amino acid sequence; “-” represents for deficiency. Sequence accession numbers are the same with those in Fig.3.

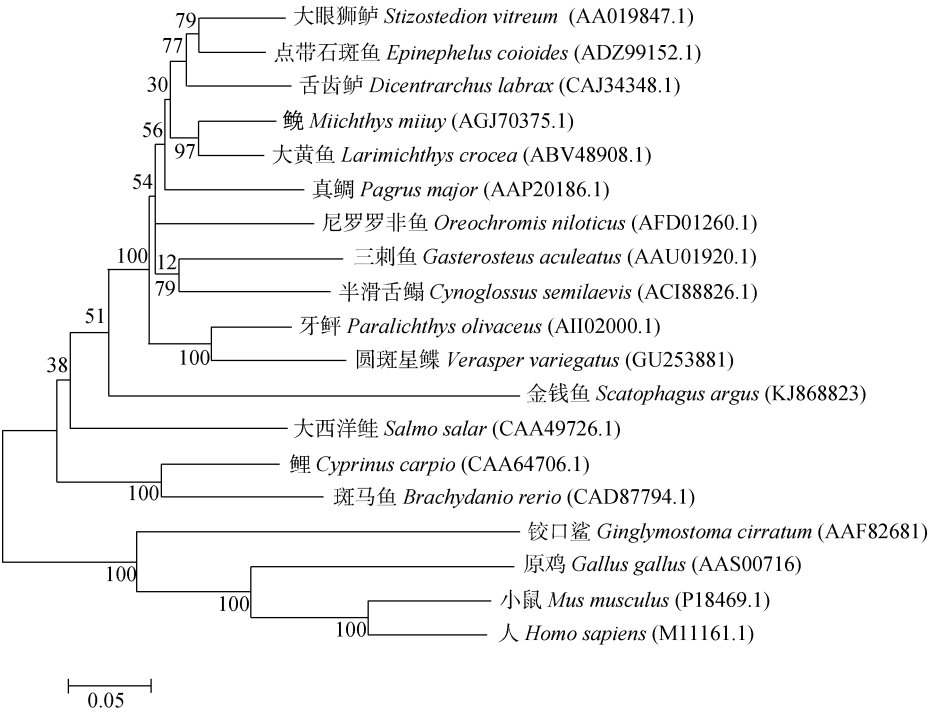


图 3 NJ 法构建的金钱鱼 MHC II β 基因编码的氨基酸序列与其他物种的系统进化树

分支上的数字表示 bootstrap 验证中该分支的可信度, 物种名后为各序列 GenBank 登录号.

Fig. 3 Phylogenetic tree of MHC II β gene based on amino acid sequences of the *Scatophagus argus* and other vertebrates by NJ method
Numbers on the nodes show the confidence level from bootstrap analysis. The GenBank accession numbers of the sequences are behind the species name.

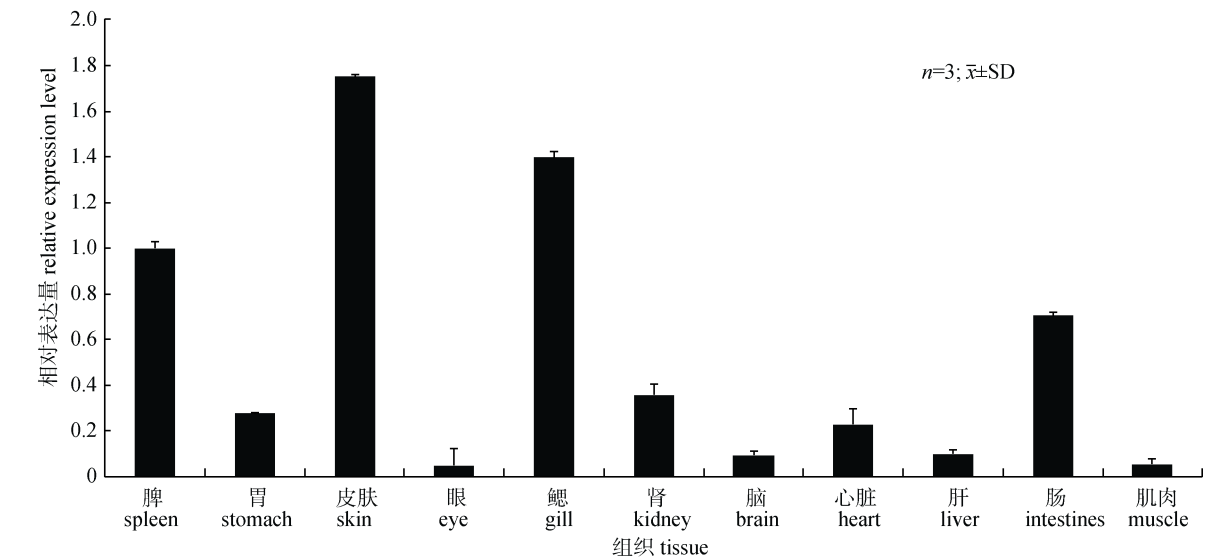


图 4 MHC II β 基因在金钱鱼各正常组织中的表达情况
Fig.4 Tissues expression of MHC II β gene from the *Scatophagus argus*

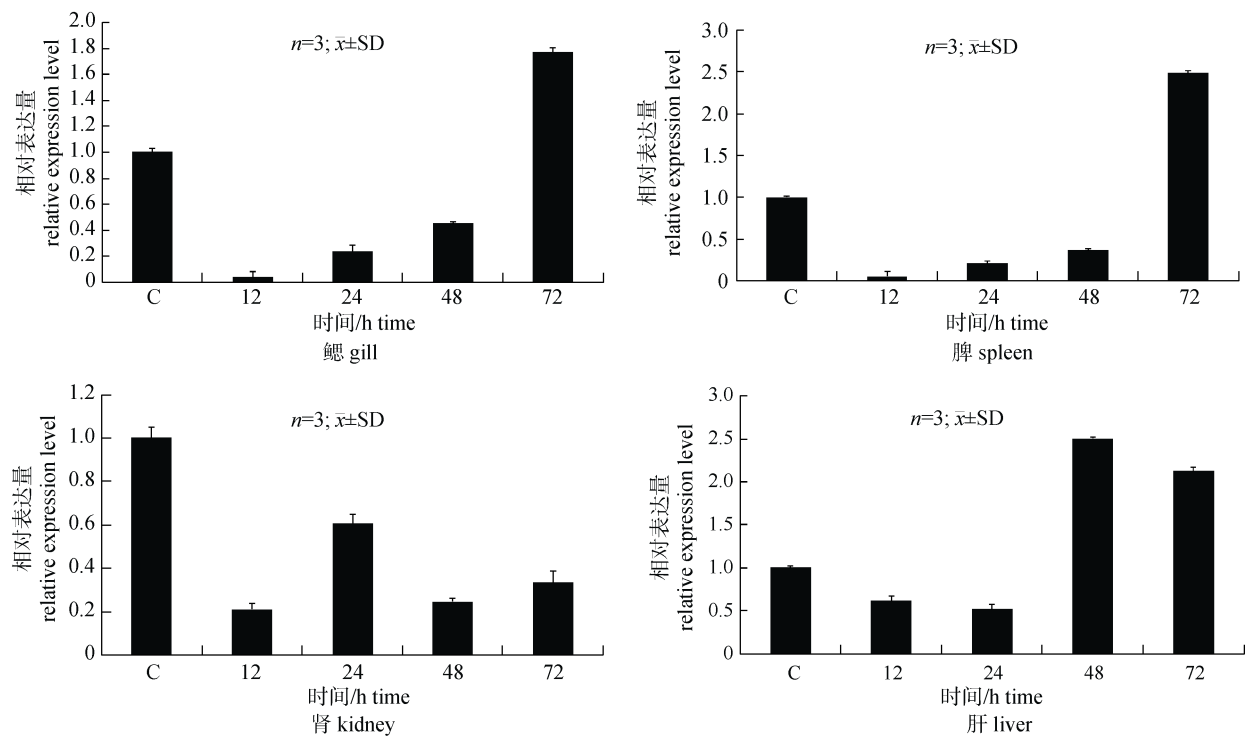


图 5 感染嗜水气单胞菌后金钱鱼 MHC II β 基因在鳃、脾、肾和肝中的表达情况
C 为注射生理盐水的对照组.

Fig.5 Expression tendency of MHC II β mRNA in gill, spleen, kidney and liver of *Scatophagus argus* after injection with *Aeromonas hydrophila*
C is the control group injected with saline.

但在 72 h 的表达量却明显高于对照组; 肾组织的表达量在不同时间点呈现波动情况, 且均低于对
照组; 肝组织在 12~24 h 中的表达量低于对照组, 但在 48~72 h 的表达量却明显高于对照组。

3 讨论

3.1 金钱鱼 MHC II β 基因的结构特征与多态性

MHC 基因是普遍存在于脊椎动物中的一个大的基因家族。越来越多的证据表明, MHC 的变异影响机体很多重要的生物学特点, 包括免疫识别、感染和自身免疫的感受性、个体气味、交配偏爱、亲属识别、合作等^[23]。本研究运用 RACE 技术, 首次获得金钱鱼 MHC II β 基因 cDNA 序列, 并进一步分析了其结构、多态性和感染细菌前后的组织表达情况, 不仅发现它具有典型的脊椎动物 MHC II 类分子的分子特征, 而且呈现出种的特异性。

MHC II β 基因的内含子和外显子首次在本文报道。MHC II β 基因全长 2920 bp, 由 6 个外显子和 5 个内含子组成, 与鲢^[21]、圆斑星鲈(*Verasper variegatus*)^[22]等鱼类的 MHC II 基因结构相同, 却与含有 5 个外显子和 4 个内含子的半滑舌鲷^[3]、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[24]以及牙鲆^[25]等鱼类的 MHC II β 基因结构不同, 揭示鱼类的 MHC II β 基因结构并不保守。

比较发现, 不仅金钱鱼 MHC II β 基因氨基酸序列的结构与其他硬骨鱼类的类似, 且其 MHC II β 基因存在的 N-糖基化位点(NSTE)、N-豆蔻酰基化位点、蛋白激酶 C-磷酸化位点、酪氨酸激酶 II-磷酸化位点以及酪氨酸激酶磷酸化位点的数目也与鲤^[26]、大黄鱼^[4]、鲢^[21]、小鼠(*Mus musculus*)^[27]、人(*Homo sapiens*)^[28]等的类似, 揭示物种间 MHC 基因的功能位点具有一定的保守性。

在物种长期的进化过程中, 随着鱼类对外部生存环境的不断适应, 为了抵御外界病原的侵入, 保护机体内部环境的稳态, 鱼类的免疫基因家族形成了极其丰富的多态性^[29]。先前的许多研究表明, MHC 是基因组中多态性最丰富的区域之一, 不仅含有多个基因座且每个基因座拥有相当数量的等位基因^[3, 25, 30-31]。本研究从 43 尾金钱鱼中, 首次获得了 48 个新等位基因, 揭示金钱鱼 MHC II β 基因具有较高的多态性。比较而言, 研究者们从 3 尾牙鲆^[25]、6 尾尼罗罗非鱼^[5]和 5 尾圆斑星鲈^[22]

中分别克隆得到 12、10 和 12 个 MHC II β 的等位基因, 可见不同鱼类 MHC II β 基因的等位基因的多态性高低有别, 也许是不同物种的固有特征, 或者与它们生长进化过程中受到的奠基者效应、基因漂流、基因选择等诸因素的影响有关^[32]。

3.2 金钱鱼 MHC II β 基因的表达特性

分析表明, 金钱鱼 MHC II β 基因在肝、脾、肾等 11 个正常组织中均有不同程度的表达, 其中在皮肤、脾和鳃的表达量较高, 而在肝、脑、眼中的表达量较低。这与半滑舌鲷^[3]、大菱鲆^[24]和圆斑星鲈^[33]等鱼类组织中的表达情况基本一致。金钱鱼 MHC II β 基因在皮肤、脾和鳃等组织的高表达量, 暗示鱼类的免疫反应是通过这些组织起始和发生的。

人工感染嗜水气单胞菌后, 不同时间段(12~72 h)内金钱鱼 MHC II β mRNA 在肝、肾、鳃和脾等组织中的表达量均发生一定程度的变化: 在脾中, 呈先下降又持续上升的趋势, 在 72 h 达到最大表达量; 在肝中, 呈先下降后上升又下降的趋势, 在 48 h 达到最大表达量。这与在半滑舌鲷中^[3]的表达情况略有不同: Xu 等^[3]的研究显示, 半滑舌鲷感染鳃弧菌后, 其脾的表达量呈持续下降又上升的趋势, 在 72 h 达到最小表达量, 而肝的表达量呈先上升后持续下降又上升的趋势, 在 72 h 达最小表达量。不同组织表达情况的变化, 说明病原菌的入侵启动了机体特异性免疫反应, 而不同组织在不同时间点分别达到自身的最大表达量, 表明各组织对免疫反应的调节作用不尽相同。总之, 本研究表明, MHC II β 基因在金钱鱼免疫反应中占有重要地位。

参考文献:

- [1] Hashimoto K, Nakanishi T, Kurosawa Y. Isolation of carp genes encoding major histocompatibility complex antigens[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(17): 6863-6867.
- [2] Sultmann H, Mayer W E, Figueroa F, et al. Organization of MHC class IIB genes in the zebrafish (*Brachydanio rerio*)[J]. Genomics, 1994, 23(1): 1-14.
- [3] 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.
- [4] Yu S H, Ao J Q, Chen X H. Molecular characterization and expression analysis of MHC class II alpha and beta genes in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)[J]. Mol Biol Reports, 2010, 37(3): 1295–1307.
- [5] 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 Immunol, 2013, 34(2): 486–496.
- [6] Bardach J E, Ryther J H, Mc Larney, et al. The farming and husbandry of freshwater and marine organisms[J]. Aquaculture, 1974, 3(2): 208–209.
- [7] Barry T, Fast A. Biology of the spotted scat (*Scatophagus argus*) in the Philippines[J]. Fish Sci, 1992, 5(3): 163–179.
- [8] Zhang B J, Liang R J, Mao D N, et al. The growth characteristic of spotted scat (*Scatophagus argus*) with salt water pond domestication[J]. Modern Fisheries Information, 1999, 14(10): 8–15.[张邦杰, 梁仁杰, 毛大宁, 等. 金钱鱼的生长特性与咸水池塘驯养[J]. 现代渔业信息, 1999, 14(10): 8–15.]
- [9] Wu B, Zhang M Z, Deng S P, et al. Morphological variance analysis of spotted scat (*Scatophagus argus*) male and female individuals[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2014, 23(1): 64–69.[吴波, 张敏智, 邓思平, 等. 金钱鱼雌雄个体的形态差异分析[J]. 上海海洋大学学报, 2014, 23(1): 64–69.]
- [10] Liu H F, Mu X J, Gui L, et al. Characterization and gonadal expression of FOXL2 relative to Cyp19a2 genes in spotted scat *Scatophagus argus*[J]. Gene, 2014, 561(1): 6–14.
- [11] Cai Z P, Wang Y, Hu J W, et al. Breeding biology and induced spawning test of spotted scat (*Scatophagus argus*)[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2010, 29(5): 180–185.[蔡泽平, 王毅, 胡佳伟, 等. 金钱鱼繁殖生物学及诱导产卵试验[J]. 热带海洋学报, 2010, 29(5): 180–185.]
- [12] Mu X, Su M, Gui L, et al. Comparative renal gene expression in response to abrupt hypoosmotic shock in spotted scat (*Scatophagus argus*)[J]. Gen Comp Endocrinol, 2014, 215(1): 25–35.
- [13] Klein J, Bontrop B E, Dawkins R L, et al. Nomenclature for the major histocompatibility complexes of different species: a proposal[J]. Immunogenetics, 1990, 31(4): 217–219.
- [14] Anmarkrud J A, Johnsen A. Ancestral polymorphism in exon 2 of blue throat (*Luscinia svecica*) MHC class II B genes[J]. J Evol Biol, 2010, 23(6): 1206–1217.
- [15] Hall T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. Nucl Acids Symp Ser, 1999, 41: 95–98.
- [16] 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.
- [17] Petersen T N, Brunak S, von Heijne G, et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions[J]. Nature Methods, 2011, 8(10): 785–786.
- [18] Chen Y J, Yu P, Luo J C, et al. Secreted protein prediction system combining CJ-SPHM M, TMHMM, and PSORT[J]. Mamm Genome, 2003, 14(12): 859–865.
- [19] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. Bioinformatics, 2009, 25(11): 1451–1452.
- [20] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Mol Biol Evol, 2007, 24(8): 1596–1599.
- [21] Xu T J, Sun Y N, Shi G, et al. Characterization of the major histocompatibility complex class II genes in *miuiy croaker*[J]. PLoS ONE, 2011, 6(8): e23823.
- [22] Li H J, Jiang L X, Han J B, et al. Major histocompatibility complex class IIA and IIB genes of the spotted halibut *Verasper variegatus*: genomic structure, molecular polymorphism, and expression analysis[J]. Fish Physiol Biochem, 2011, 37: 767–780.
- [23] Sommer S. The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation[J]. Front Zool, 2005, 2(1): 16–34.
- [24] Zhang Y X, Chen S L. Molecular identification, polymorphism, and expression analysis of major histocompatibility complex class IIA and B genes of turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Mar Biotechnol, 2006, 8(6): 611–623.
- [25] Srisapoome P, Ohira T, Hirono I, et al. Cloning, characterization and expression of cDNA containing major histocompatibility complex class I, IIA and IIB genes of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Fish Sci, 2004, 70(2): 264–276.
- [26] Saeij J P, Wiegertjes G F, Stet R J. Identification and characterization of a fish natural resistance-associated macrophage protein (NRAMP) cDNA[J]. Immunogenetics, 1999, 50(1–2): 60–66.
- [27] Grunheid S, Cellier M, Vidal S, et al. Identification and characterization of a second mouse Nramp gene[J]. Genomics, 1995, 25(2): 514–525.
- [28] Kishi F, Tabuchi M. Complete nucleotide sequence of hu-

- man Nramp2 cDNA[J]. Mol Immunol, 1997, 34(11-12): 839-842.
- [29] Li T M, Zhou F N, Cui Z F, et al. Cloning and polymorphism analysis of major histocompatibility complex class IA genes of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*)[J]. Journal of Shandong University (Natural Science), 2013, 48(11): 14-22.[李同明, 周芬娜, 崔志峰, 等. 尼罗罗非鱼主要组织相容性复合体 IA 基因克隆与多态分析[J]. 山东大学学报: 理学版, 2013, 48(11): 14-22.]
- [30] 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.
- [31] Li J P, Gao F Y, Lu M X, et al. cDNA isolation, polymorphism analysis, and tissue expression of MHC I α of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(6): 1134-1145.[黎建平, 高风英, 卢迈新, 等. 尼罗罗非鱼 MHC I α 全长 cDNA 的克隆、多态性及组织表达特征[J]. 中国水产科学, 2014, 21(6): 1134-1145.]
- [32] Liu J, Liu Z Z, Wang C H, et al. The analysis of the polymorphism and expression of MHC class II α gene and its association with resistance/susceptibility to *Aeromonas Hydrophila* in xingguo red common carp[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(2): 241-248.[刘俊, 刘至治, 王成辉, 等. 兴国红鲤 MHC II 类 α 基因多态性、表达及其与鱼体抗病力关系的分析[J]. 水生生物学报, 2014, 38(2): 241-248.]
- [33] Li H J, Wang J, Gao X G, et al. Genomic structure of MHC IIB from spotted halibut *Verasper variegates*: genomic structure, polymorphism and tissue expression analysis[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(2): 299-307.[李宏俊, 王娟, 高祥刚, 等. 圆斑星鲽 MHC IIB 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.]

Genomic structure, polymorphism, and expression analysis of the spotted scat (*Scatophagus argus*) MHC-II β gene

WANG Xiaobing, LIU Zhizhi, LI Qiang, ZHANG Lufei, ZHANG Junbin

Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: The major histocompatibility complex (MHC) is a gene family common to vertebrates and is encoded by a group of genes closely related to immunological functions. Many studies have indicated that MHC occurs on the surface of all karyocytes and that the MHC II genes of fish differ by species in structure, character, and polymorphisms. The spotted scat (*Scatophagus argus*) is eurythermic and euryhaline and is widely distributed in brackish water and marine habitats of the Indo-Pacific region. Spotted scat has become an economically important species in southern China in recent years owing to its strong tolerance to a variety of environmental conditions. However, most spotted scat studies in the last two decades have focused on artificial breeding, biological characteristics, gonadal development, reproductive characteristics, and genes related to osmotic adjustment and gonadal development, but not immune system function. Furthermore, farmers have recently found that spotted scat are susceptible to infections by parasites, bacteria, and viruses, which could cause serious economic losses. Thus, we determined the complete cDNA sequence of the spotted scat MHC-II β gene for the first time using homology-based cloning and rapid amplification of cDNA ends polymerase chain reaction (RACE-PCR) and analyzed the introns, gene polymorphisms, and tissue expression. As results, the cDNA sequence of the spotted scat MHC-II β gene was 1172 bp in length, including a 34 bp 5'-untranslated region (UTR), a 388 bp 3'-UTR, and a 750 bp open reading frame (ORF). The ORF contained the signal peptide, the β 1 domain, the β 2 domain, a connecting peptide, a transmembrane region, and a cytoplasmic tail. The total length of the gene was 2920 bp. The MHC-II β gene contained six exons and five introns (85–1010 bp), and the third intron separated the β 2 domain into two parts. This structure differs from some other teleosts and provides new evidence for the lack of conservation of MHC-II β gene structure. The molecular formula was $C_{2239}H_{3730}N_{750}O_{934}S_{198}$, and relative molecular mass was 62.45 kD. Some classic functional sites were found in the amino acid sequence, such as a protein kinase C phosphorylation site, an N-glycosylation site, a casein kinase II phosphorylation site, a tyrosine kinase phosphorylation site, and an N-nutmeg acetoxylation site. Interestingly, the number of protein functional sites in the spotted scat MHC-II β gene was very similar to that in other fish, such as common carp, yellow croaker, and Japanese flounder, indicating conservation of MHC in fish. We identified 48 alleles from 209 clones in 43 individuals to examine polymorphisms in the spotted scat MHC-II β gene. These alleles were named Scar-DXB*0101–Scar-DXB*4801, indicating high polymorphism of the MHC-II β gene in *S. argus*. However, allelic polymorphisms of the MHC-II β gene are quite different in fish, which may be an inherent characteristic of the species or it may be related to other factors, such as the founder effect, gene flow, or gene selection during evolution. The RT-PCR analysis showed that the MHC-II β gene was expressed in all 11 tissues examined, with the highest levels in spleen, gill, intestine and skin; moderate levels in kidney, stomach, and heart; and low levels in the eyes, brain, liver, and muscle. MHC-II β gene mRNA expression levels varied in liver, spleen, gill, and kidney after infection with *Aeromonas hydrophila*, indicating that the gene has important effects on the immune response. A neighbor-joining tree showed that the *S. argus* MHC-II β gene had a fairly close genetic relationship with those of *Paralichthys olivaceus*, *Dicentrarchus labrax*, and *Salmo salar* and more distant genetic relationships with *Ginglymostoma cirratum*, *Gallus gallus*, *Mus musculus*, and *Homo sapiens*. These results lay the foundation for screening resistance genes and breeding *S. argus* for disease resistance.

Key words: *Scatophagus argus*; MHC II β gene; genomic structure; polymorphism; tissue expression

Corresponding author: LIU Zhizhi. E-mail: zzliu@shou.edu.cn; ZHANG Junbin, E-mail: jb-zhang@shou.edu.cn