

doi: 10.7541/2014.36

兴国红鲤 MHC 类 α 基因多态性、表达及其与鱼体抗病力关系的分析

刘俊¹ 刘至治¹ 王成辉² 项松平³ 王剑³

(1. 上海海洋大学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淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306; 3. 浙江龙泉省级瓯江彩鲤良种场, 龙泉 323700)

摘要: 对 41 尾感病和 22 尾抗病兴国红鲤的 308 个有效克隆进行测序, 获得 171 条不同的 MHC 类 α 基因编码序列, 分属 26 个不同的等位基因, 其中 Cyca-DXA24—Cyca-DXA36 为新发现的 13 个等位基因。MHC 类 α 基因片段的长度为 624 bp, 包括第 1—4 个外显子, 分别编码信号肽、 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域及连接肽/跨膜区。 $\alpha 1$ 结构域的变异明显大于 $\alpha 2$ 结构域, 表现在 $\alpha 1$ 结构域中核苷酸和氨基酸变异位点比例(55.16%和 79.76%)明显高于 $\alpha 2$ 结构域的变异位点比例(45.96%和 68.42%)。 $\alpha 1$ 结构域的 PBR 区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 ($\omega = d_N/d_S$)为 5.742, 远远高于非抗原结合位点(non-PBR)及 $\alpha 2$ 结构域的 0.755、0.592, 揭示兴国红鲤 MHC 类 α 基因的 $\alpha 1$ 结构域在进化过程中受到正向选择作用。等位基因 Cyca-DXA24 ($P < 0.01$)与兴国红鲤对嗜水气单胞菌的抗性相关, 等位基因 Cyca-DXA3 ($P < 0.05$)、Cyca-DXA4 ($P < 0.01$)、Cyca-DXA6 ($P < 0.05$)、Cyca-DXA33 ($P < 0.05$)与兴国红鲤对嗜水气单胞菌的易感性相关。荧光定量 PCR 结果表明, MHC 类 α 基因在健康兴国红鲤的肾、肝、鳃等 10 个组织均能普遍表达。人工感染嗜水气单胞菌后, 肾、肝、脾 3 个组织中的 MHC 类 α 基因的表达量均发生了不同程度的变化, 表明 MHC 类 α 分子在兴国红鲤的免疫反应中起到重要作用。

关键词: 兴国红鲤; MHC; 多态性; 表达; 抗病力

中图分类号: Q346^{+.5} 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2014)02-0241-08

兴国红鲤(*Cyprinus carpio* var. *singguoensis*)为“江西三红”之一, 其分布于江西省兴国县, 已有1300余年的养殖历史^[1]。据报道, 从1972—1984年, 相关单位已对其进行了6代定向选育, 培育出性状稳定的品种^[2], 目前已选育至20代。兴国红鲤是重要的杂交亲本, 在我国鱼类杂交育种中具有重要作用。

在淡水养殖中, 嗜水气单胞菌为主要病原菌之一, 目前没有针对该菌的有效疫苗^[3, 4]。因此, 有必要从绿色水产的角度出发, 努力寻找一种安全的新方法, 增加鱼体对嗜水气单胞菌等病原菌的抵抗力。研究证明, 主要组织相容性复合体(Major

histocompatibility complex, MHC)在鱼类机体的免疫中发挥着极为重要的作用, 与许多疾病的抗性、易感性、免疫应答都密切相关, 已成为抗病力相关研究的重要候选基因^[5-8]。本研究以兴国红鲤为对象, 人工感染嗜水气单胞菌后, 分析MHC类 α 基因序列多态性与抗病力之间的关系, 同时采用荧光定量PCR技术, 检测健康鱼体不同组织中MHC类 α 基因mRNA表达水平上的差异性, 并分析鱼体感染嗜水气单胞菌后, MHC类 α 基因在肾、肝、脾等组织中mRNA水平的变化。研究结果将为兴国红鲤抗病基因的筛选及抗病育种提供依据。

收稿日期: 2013-08-09; 修订日期: 2013-11-02

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); 上海高校水产一流学科建设项目资助

作者简介: 刘俊(1987—), 女, 河南信阳人; 硕士研究生; 研究方向为鱼类分子进化与免疫遗传学。E-mail: liujunhnsd@126.com

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

1 材料与方法

1.1 材料

2010年10月从江西省兴国红鲤良种场引入2龄兴国红鲤,养殖于浙江省龙泉省级瓯江彩鲤良种场。2011年8月,随机选取健康鱼(体重约601 g),腹腔注射嗜水气单胞菌(由上海海洋大学国家水生动物病原库提供)进行人工感染。具体方法:实验组鱼63尾,每尾每100 g体重注射0.1 mL浓度为 1.5×10^9 cfu/mL的嗜水气单胞菌;对照组鱼15尾,每尾则注射相应量的磷酸生理盐水。13h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。这里,感染96h后不出现发病症状的个体为抗病个体,而96h内出现口鳃出血、体表出血、皮肤溃疡、游动迟缓等症状且直至临死的个体为感病个体。最终,共得到41尾感病和22尾抗病个体。在感染过程中,随着感病个体的死亡,及时取肾、肝、脾等组织,迅速放入液氮中冻存,转至 -80°C 冰箱备用;而抗病个体的相关组织,则在感染完毕后采集。

1.2 方法

总RNA的提取和cDNA的合成 Trizol法提取实验鱼肾中的总RNA,1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性,分光光度计测定RNA浓度及OD值,要求在1.8—2.0。以总RNA为模板,利用反转录试剂盒PrimeScript First Strand cDNA Synthesis Kit (Takara)合成cDNA。

引物设计,PCR扩增,产物的纯化、克隆及测序 根据van Erp^[9]已获得的鲤MHC类 α 基因(GenBank登录号为X95432),设计一对特异性引物:DXAF (5'-TGCTTATGCTCGCTCTTATTGTC-3')和DXAR (5'-ACCCACTCCACAAAACACAGCTG-3') (由上海生工生物工程服务有限公司合成),用于扩增荷包红鲤MHC类 α 基因的片段。PCR反应总体积为25 μL ,包括:1.0 μL cDNA (100 ng),1.0 μL 上、下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$),2.0 μL dNTP Mixture (2.5 mmol/mL),2.5 μL 10 $\times$ Buffer,0.6 μL Taq DNA聚合酶 (Tiangen, 5 U/ μL),16.9 μL 去离子水。PCR程序如下:94 $^\circ\text{C}$ 预变性3min;94 $^\circ\text{C}$ 1min,54 $^\circ\text{C}$ 1min,72 $^\circ\text{C}$ 2min,35个循环;72 $^\circ\text{C}$ 延伸10min。所有PCR反应均在Mastercycler ep gradient S (Eppendorf)型PCR仪上进行。

参照文献[10]的方法,进行PCR产物的纯化、目的片断的连接和转化、阳性克隆的鉴定等操作。

每尾个体随机挑选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。

实时荧光定量PCR 分别在人工感染后12、24、48、72和96h随机选取3尾兴国红鲤,取其肾、肝和脾组织,以及对照组鱼的10个组织(脑、眼、鳃、心脏、肠、肾、肝、肌肉、脾和胃)。提取各组织RNA,选取高质量且等量的RNA,根据Prime ScriptTM RT Master Mix (Perfect Real Time) (TaKaRa)试剂盒附带的说明书,进行反转录实验制备cDNA模板。PCR反应体系:5 $\times$ PrimeScript RT Master Mix 2 μL 、500 ng RNA最后加RNase Free dH₂O至10 μL 。反应条件:37 $^\circ\text{C}$ 15min,85 $^\circ\text{C}$ 5s,4 $^\circ\text{C}$ 保存。

实时荧光定量PCR使用SYBR Premix Ex TaqTM (Perfect Real Time) (TaKaRa)试剂盒,反应扩增引物为DXA-ex-F (5'-AGGTGATGTGGTGCTGGGTG-3')和DXA-ex-R (5'-AGCGAGGAGAAGATGTTGAAGG-3'),产物长度为171 bp。20 μL PCR反应体系为:2 μL cDNA、10 μL SYBR Premix Ex TaqTM、0.4 μL ROX、0.8 μL 上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)和6.0 μL ddH₂O。PCR扩增条件为:95 $^\circ\text{C}$ 预变性30s;95 $^\circ\text{C}$ 5s,60 $^\circ\text{C}$ 34s,40个循环;60—95 $^\circ\text{C}$ 15min进行溶解曲线检测。每个样本3个重复,空白对照采用ddH₂O作为模板。目的基因的标准曲线以肾组织的cDNA 10倍系列(1.0×10^{-1} 、 1.0×10^{-2} 、 1.0×10^{-3} 、 1.0×10^{-4} 、 1.0×10^{-5} 倍)稀释为模板得到,通过标准曲线来检测实时荧光定量PCR引物的特异性和试验的可靠性。反应在7500实时荧光定量PCR仪(Applied Biosystems)上进行。每个目的基因的相对表达以内参 β -actin为参考基因,引物序列: β -actin-ex-F (5'-TGCTATGTGGCTCTTGA-CTT-3')和 β -actin-ex-R (5'-CTGGGCACCTGAACCT-CT-3'),产物长度为127 bp。数据由7500PCR仪自带的软件分析得到,数据处理采用 2^{-C_t} 法^[11]。

MHC类 α 基因的命名与数据分析 已知鲤MHC α 有MHC-DXA一种基因型,故兴国红鲤MHC类 α 基因的命名参照文献[10]中的方法进行。

登录NCBI,用BLAST对所获得的序列进行同源检索,确定所得的基因片段。用Clustal X^[12]对蛋白质序列进行多序列比对。利用MEGA 4.0^[13]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;参照人类HLA类分子的晶体三维结构^[14],

对获得的兴国红鲤 MHC Ⅱ类基因序列的 $\alpha 1$ 结构域的抗原结合位点(PBR)进行界定, 然后用 MEGA 4.0 软件中改进的 Nei-Gojobori (Jukes-Cantor)方法, 计算非同义碱基替换率(d_N)和同义碱基替换率(d_S)的比值 ω ($\omega=d_N/d_S$)。利用 DnaSP 5.0^[15]进行第二外显子和第三外显子序列的多态性分析。

2 结果

2.1 兴国红鲤 MHC Ⅱ类 α 基因序列测定

本研究对 63 尾兴国红鲤的 308 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 Ⅱ类 α 基因片段。序列经对位排列和变异检测后, 没有发现任何插入、缺失或异常的密码子。该核苷酸序列长度为 624 bp, 编码 11 个氨基酸的部分信号肽、84 个氨基酸的完整 $\alpha 1$ 结构域、95 个氨基酸的完整 $\alpha 2$ 结构域和 18 个氨基酸的完整连接肽及部分跨膜区, 共 208 个氨基酸。推断的氨基酸序列经比对后, 分属 26 个不同的等位基因, 其中有 13 个等位基因为新发现的等位基因, 命名为 Cyca-DXA24*01—Cyca-DAB36*01 (GenBank 登陆号为 KF154087-KF154099)。

2.2 兴国红鲤 MHC Ⅱ类 α 基因多态性

分析表明, 兴国红鲤 MHC Ⅱ类 α 的 26 个等位基因所包含的亚型数量多少不均。如等位基因 Cyca-DXA24 含有 47 个亚型, 频率高达 40.58%; 而 Cyca-DXA19 的亚型仅有 1 个, 频率为 0.32%。此外, 各亚型的出现频率高低不一。在总共 171 个亚型中, Cyca-DXA24*01 出现的频率最高, 为 24.03%, 其次是 Cyca-DXA4*01 (4.87%), 其余大多数亚型仅出现一次(0.32%)。值得注意的是, 我们发现单一个体中最多存在 5 个等位基因, 表明兴国红鲤个体中至少存在 3 个 DXA 基因座。

在所得的 MHC Ⅱ类 α 基因核苷酸序列中, 分别检测到 297 个核苷酸变异位点和 197 个简约信息位点。MHC Ⅱ类 α 基因的核苷酸变异位点比例为 47.60%(297/624), 而氨基酸相对应的值则高达 69.23% (144/208) (表 1)。MHC Ⅱ类 α 序列间的碱基及氨基酸变异范围分别为 0—9.6%和 0—16.8%, 平均值为 5.3%和 9.5%。此外, $\alpha 1$ 结构域的核苷酸/氨基酸位点变异率为 55.16%/79.76%, 明显大于 $\alpha 2$ 结构域的 45.96%/68.42% (表 1)。MHC Ⅱ类 α 的信号肽、CP 及 TM 变异都不大, 属于保守序列。对全部序列的分析表明, 兴国红鲤 MHC Ⅱ类 α 基因的单倍型多样性 (H_d)、核苷酸多样性 (P_i) 及平均核苷酸差异数目 (k) 分别是 0.9831、0.05332、33.275。

分析表明(表 2), 在含有 21 个氨基酸位点的 PBR 区中, 变异位点数高达 20 个(95.24%), 而在 non-PBR 区的 63 个位点中, 变异位点数却只有 46 个(73.01%), PBR 区的变异率明显高于 non-PBR。计算表明, $\alpha 1$ 结构域的 PBR 区的 ω 值为 5.742 远大于 1, 而它们的 non-PBR 区(0.755)和 $\alpha 2$ 结构域(0.592)的 ω 值却都小于 1, 表明兴国红鲤 MHC Ⅱ类 α 基因(尤其是 $\alpha 1$ 结构域)在进化过程中受到正向选择 (Positive selection) 作用。

2.3 兴国红鲤 MHC Ⅱ类 α 基因与抗病力的关系

在所得的 26 个不同的 MHC Ⅱ类 α 基因中(图 1), 其中有 11 个等位基因在感病群体和抗病群体中都出现, 剩余的 Cyca-DXA3、Cyca-DXA5、Cyca-DXA8、Cyca-DXA10、Cyca-DXA17、Cyca-DXA19、Cyca-DXA20、Cyca-DXA22、Cyca-DXA30—Cyca-DXA36 等 15 个等位基因则为感病群体所特有, 没有发现只存在于抗病群体的等位基因。等位基因 Cyca-DXA3、Cyca-DXA33 的频率为 9.00%和 5.00%, 显著存在于感病群体中($P<0.05$); 等位基因 Cyca-

表 1 兴国红鲤核苷酸和氨基酸的变异位点
Tab. 1 Variable sites of nucleotide and amino acid in *Cyprinus carpio* var. *singguoensis*

	核苷酸 Nucleotide			氨基酸 Amino acid		
	变异位点 Variable sites	位点数 No. of sites	百分比 Percentage (%)	变异位点 Variable sites	位点数 No. of sites	百分比 Percentage (%)
信号肽 Signal peptide	6	33	18.18	3	11	27.27
$\alpha 1$ 结构域 $\alpha 1$ -domain	139	252	55.16	67	84	79.76
$\alpha 2$ 结构域 $\alpha 2$ -domain	131	285	45.96	65	95	68.42
连接肽/跨膜区 CP/TM	21	54	38.89	9	18	50.00
总共 Total	297	624	47.60	144	208	69.23

表 2 兴国红鲤 MHC II 类基因 $\alpha 1$ 结构域的 PBR、non-PBR 及 $\alpha 2$ 结构域的 d_S 和 d_N 值
Tab. 2 d_S , d_N of PBR, non-PBR of MHC II $\alpha 1$ and $\alpha 2$ domains in *Cyprinus carpio* var. *singguoensis*

结构域 Domain	位点 Sites	非同义替换率 d_N (SE)	同义替换率 d_S (SE)	比值 d_N/d_S	密码子数目 No. of codons
$\alpha 1$	抗原结合区 PBR	0.356±0.095	0.062±0.029	5.742	21
	非抗原结合区 Non-PBR	0.037±0.015	0.049±0.013	0.755	63
	总计 Total	0.106±0.020	0.045±0.013	2.356	84
$\alpha 2$		0.029±0.007	0.049±0.012	0.592	95

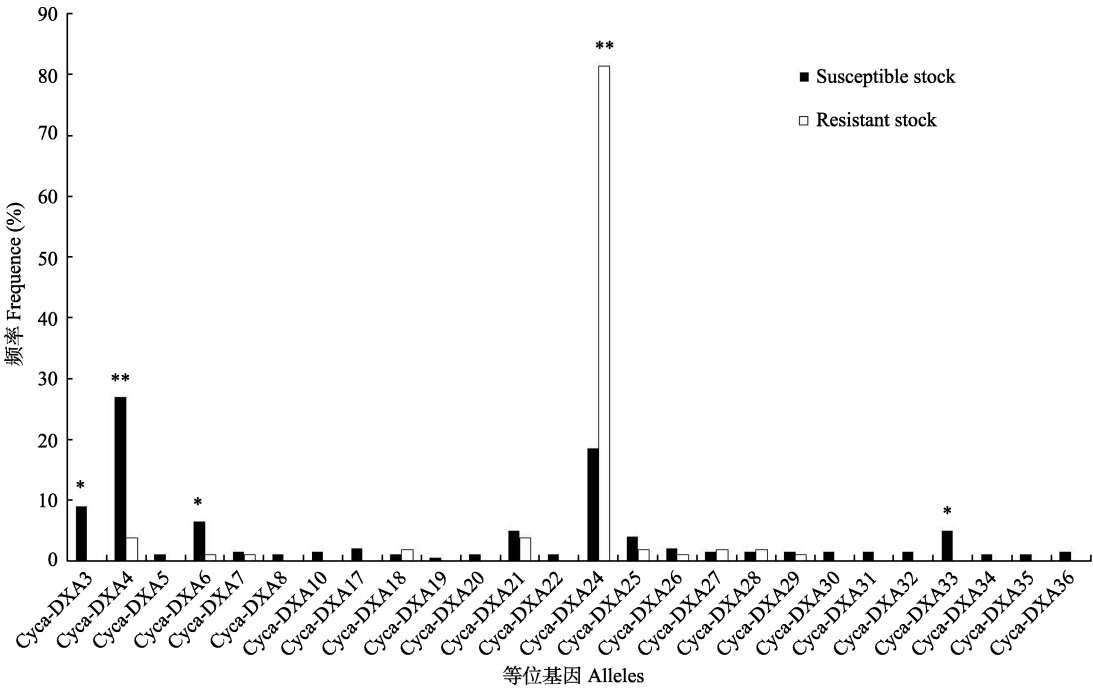


图 1 不同等位基因在抗病群体与感病群体的分布频率(%)

Fig. 1 Distribution of MHC class IIa alleles in resistant and susceptible *Cyprinus carpio* var. *singguoensis* stock
** $P < 0.01$; * $P < 0.05$

DXA4、Cyca-DXA6 在感病群体中出现的频率 (27.00%、6.50%), 分别极显著 ($P<0.01$) 和显著 ($P<0.05$) 地高于抗病群体中出现的频率 (3.70%、0.93%); 等位基因 Cyca-DXA24 在抗病群体中出现的频率 (81.48%) 极显著 ($P<0.01$) 高于感病群体中出现的频率 (18.50%)。

2.4 兴国红鲤 MHC 类 α 基因 mRNA 在组织中的表达

以兴国红鲤的肾 cDNA 为模板, 将模板做 10 倍梯度稀释, 通过引物 β -actin-ex-F、 β -actin-ex-R 和 DXA-ex-F、DXA-ex-R 进行实时荧光定量 PCR, 制作内参基因和目的基因的标准曲线。经优化, β -actin 和 MHC 类 α 基因的扩增效率分别为 95.15% 和 96.18%, 标准曲线的相关系数都为 1, 斜率分别为 -3.444 和 -3.417, 表明可以用 2^{-Ct} 法进行相对定量分析。溶解曲线中没有杂峰出现, 未出

现非特异性扩增, 试验条件达到实验要求, 可靠性较高。

通过实时荧光定量 PCR 技术的分析结果表明, 兴国红鲤的 10 个组织中均扩增出 MHC 类 α 基因目的片段, 但表达量有所不同, 其中较强表达于肾、肝、鳃、肠、脾, 中等强度表达于心脏、胃、脑, 而在眼和肌肉中表达较弱 (图 2A)。

人工感染嗜水气单胞菌后的不同时期, 兴国红鲤肾、肝、脾这三个组织中的 MHC 类 α 基因表达水平均发生了不同程度的变化 (图 2B)。在肾组织中, MHC 类 α 基因表达水平在 12h 表达水平最高, 接着发生下降, 在 72h 表达量最低, 呈先上升后下降的变化趋势。在肝和脾组织中, MHC 类 α 基因表达水平都是先下降后上升的趋势, 96h 之后恢复到原来的水平, 只是肝、脾组织中最低表达水平分别在感染后 48h 和 24h。

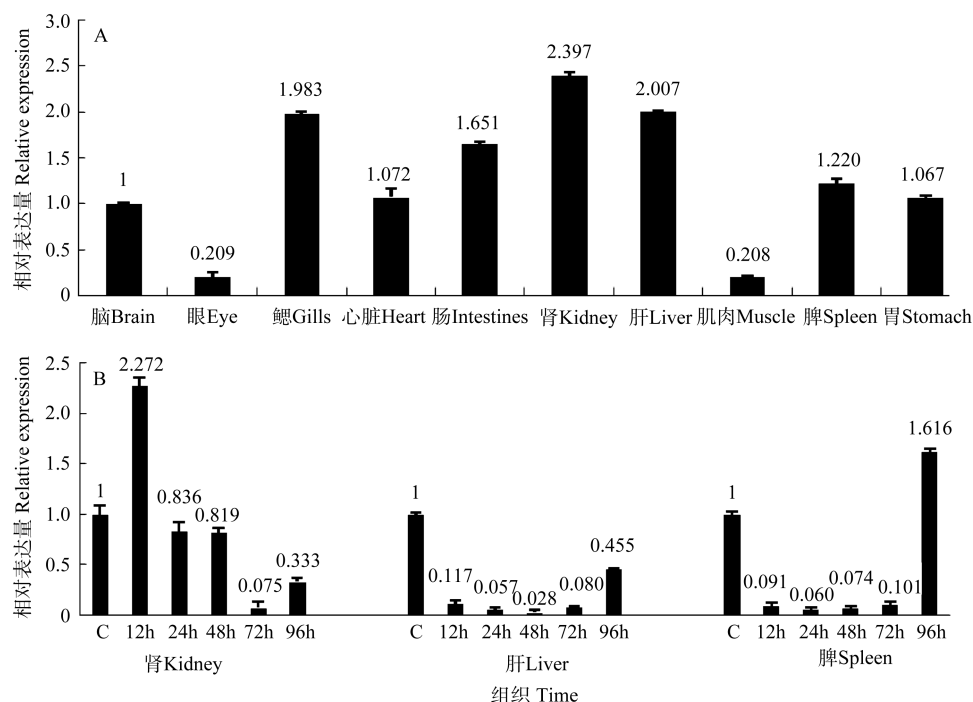


图 2 MHC 类 α 基因在健康(A)和感染(B)后兴国红鲤的各组织中的相对表达量

Fig. 2 Expression of MHC class II α gene in tissues of (A) uninfected and (B) challenged *Cyprinus carpio* var. *singguensis*

3 讨论

MHC 是基因组中多态性最丰富的区域之一, 这主要表现为多基因座及每个基因座含有相当数量的等位基因^[10]。本研究发现每尾鱼体中存在1—5个等位基因, 表明兴国红鲤MHC 类 α 基因至少含有3个基因座。这一结果与条纹鲈(*Morone saxatilis*)^[16]、大菱鲈(*Scophthalmus maximus*)^[17]、牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)^[18]等的研究结果不同, 这些鱼类的个体中含有MHC 类等位基因的数量最多不超过4个, 推测至少含有2个基因座。而对于同是鲤的全红体色瓯江彩鲤(*C. c. var. color*), 李雪松等^[8]的报道推测单个个体中也是至少含有2个基因座。可见, 鱼类物种间含有MHC等位基因座的数量, 仅靠测序还无法确定, 需要设计核酸探针进行原位杂交来验证。关于鱼类MHC 类 α 基因多态性的研究已有不少报道。Stet, *et al.*^[19]从84尾大西洋鲑个体中检测到7个等位基因; 徐田军和陈松林^[20]从45尾牙鲈个体得到129条序列, 共编码30个等位基因; Pang, *et al.*^[21]从6尾尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)个体检测到10个等位基因。本实验从63尾兴国红鲤中共得到26个不同的等位基因, 虽较牙鲈、尼罗罗非鱼的多态性低, 却远远高于大西洋鲑。不同鱼类MHC 类 α 基因

的多态性高与低, 可能是该物种的固有特征, 或者是跟它们的生长进化史有关, 如奠基者效应、基因漂流、基因选择等。

兴国红鲤MHC 类 α 基因的 $\alpha 1$ 结构域的变异明显高于 $\alpha 2$ 结构域的现象在大西洋鲑^[19]、金头鲷(*Sparus aurata*)^[22]、间鲃(*Barbus intermedius*)^[23]、鲢鱼(*Miiichthys miiuy*)^[24]等不同鱼类中也出现过。这一现象与 $\alpha 1$ 结构域存在高度多态的抗原肽结合区(PBR)相关。目前解释MHC基因高度多态性的机制主要有杂种优势、超显性选择以及正向(平衡)选择^[25]。许多研究都表明, MHC基因的多态性是平衡选择的结果^[10, 17, 18]。一般认为, 非同义碱基替换和同义碱基替换的比值 ω ($\omega=d_N/d_S$)大于1是由正向选择作用产生的。在本研究中, 兴国红鲤 $\alpha 1$ 结构域的PBR的 ω 值大于1, 而non-PBR区和 $\alpha 2$ 结构域的 ω 值都小于1(表2), 因此可以认为, 在兴国红鲤进化过程中MHC 类 α 基因主要受到正向选择的影响。

MHC是一个与抗病相关的基因家族, 不同的等位基因可能具有不同的抗病能力。作为抗病相关的分子标记候选基因, MHC已经被国内外学者越来越多地应用于各种海、淡水鱼类的抗病辅助育种的研究中。有关于MHC 类 α 基因与鱼体抗病力之间关系的研究, 多集中于牙鲈^[18]与大西洋鲑^[26, 27]。Xu, *et*

al.^[18]在研究牙鲈MHC Ⅱ类 α 基因与鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)抗病力的关系时,发现 Paol-DAA*1301、Paol-DAA*1401、Paol-DAA*2201与抗病性相关,Paol-DAA*1001、Paol-DAA*1501与感病性相关;Kjøglum, *et al.*^[26]研究MHC Ⅱ类和MHC Ⅲ类联合基因型与大西洋鲑疳病(Furunculosis)的抗病性的关系,发现含有 DAA*0301 的鱼抵抗力显著强于 DAA*0201 的鱼;Wynne, *et al.*^[27]发现,含有 Sasa-DAA-3'UTR中单倍型239/259和259/259的大西洋鲑,对阿米巴鳃病的感染度明显低于其他不含有该单倍型的个体。本研究在探讨兴国红鲤MHC Ⅱ类 α 基因与嗜水气单胞菌抗性的相关性时,获得了5个与鱼体抗病力相关的等位基因,其中 Cyca-DXA3、Cyca-DXA4、Cyca-DXA6、Cyca-DXA33与兴国红鲤对嗜水气单胞菌的易感性相关,而Cyca-DXA24则与抗病性相关。虽然不能排除会有另外的连锁基因可能导致本研究的结果,但它们为筛选抗病相关MHC Ⅱ类 α 基因标记提供了重要的参考依据。

许多研究表明,不同鱼类的MHC Ⅱ类 α 基因的mRNA表达水平存在组织特异性。Srisapoom, *et al.*^[28]检测牙鲈的MHC Ⅱ类 α 基因在鳃、脾、肾、肠、胃中表达较高,在肌肉和眼中表达较低;Li, *et al.*^[29]的研究显示,在健康的圆斑星鲃(*Verasper variegatus*)的肾、鳃、脾中表达量最高,在肝、心脏和皮肤中度表达,在肌肉和脑中表达量最低。在本研究中,兴国红鲤MHC Ⅱ类 α 基因的表达特异性,与上述研究结果基本相符。肾和脾是最重要的免疫器官,肝和黏膜上皮组织等也是重要的免疫防线,而肌肉组织的免疫功能则是较低的。可见,鱼类MHC Ⅱ类 α 基因在不同组织中表达量的高低与其免疫细胞的分布有关,揭示肾、肝、鳃、脾、肠等在鱼类免疫过程中起重要作用。

在人工感染嗜水气单胞菌后,兴国红鲤肾、肝、脾中MHC Ⅱ类 α 基因在不同组织不同感染时间的表达量有差异。首先,MHC Ⅱ类 α 基因在肝、脾中的转录水平在96h感染过程中是先下降后上升,这一趋势与大菱鲆^[17]的表达情况一致。Zhang and Chen^[17]发现,大菱鲆感染鳃弧菌后,其肝、脾组织中MHC Ⅱ类 α 基因的表达量在感染后72h内出现最低值,呈现出先下降后上升的趋势。可见,当鱼体在受到外来病原侵袭时,有一个免疫应答的过程,肝、脾等组织中MHC Ⅱ类 α 基因的表达水平会随之发生相应的

变化,以保护机体免受伤害。其次,MHC Ⅱ类 α 基因在兴国红鲤肾组织中呈先上升后下降的趋势,这与鲢鱼^[24]的研究相类似。Xu, *et al.*^[24]对鲢鱼人工感染鳃弧菌,发现肾中的MHC Ⅱ类 α 基因的相对表达量在6—36h内都呈先上升后下降,并在24h时表达量最高。可见,在感染发生的早期,作为鱼类重要免疫器官的肾脏(特别是头肾)先行发挥着抵抗病原菌的作用,从而使得MHC Ⅱ类分子的表达模式呈现出组织特异性。

致谢:

在感染实验及样品采集过程中,本院研究生毕祥、李雪松、赵雪锦、朱丽艳、胡建尊等同学提供了很多帮助,在此表示衷心感谢。

参考文献:

- [1] Wang C H, Li S F, Zou S M. RAPD analysis of genetic diversity of red common carp in China [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, 27(3): 329—331 [王成辉, 李思发, 邹曙明. 中国红鲤遗传多样性的 RAPD 分析. 水生生物学报, 2003, 27(3): 329—331]
- [2] Lou Y D, Sun J C. Progress on studies of origin and genetic diversity of three breeds of red carp in Jiangxi Province [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2001, 25(6): 570—575 [楼允东, 孙景春. 江西三种红鲤起源与遗传多样性研究进展. 水产学报, 2001, 25(6): 570—575]
- [3] Poobalan S, Thompson K D, Diab A, *et al.* Protein expression by *Aeromonas hydrophila* during growth in vitro and in vivo [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2008, 45(1): 60—69
- [4] Zhang X J, Yang W M, Li T T, *et al.* The genetic diversity and virulence characteristics of *Aeromonas hydrophila* isolated from fishponds with disease outbreaks in Hubei province [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(3): 458—466 [张旭杰, 杨五名, 李彤彤, 等. 湖北地区暴发病池塘中嗜水气单胞菌的遗传多样性和毒力特征研究. 水生生物学报, 2013, 37(3): 458—466]
- [5] Zhao H J, Li H, Yu H, *et al.* Advance of MHC class II genes associated with immunity and disease resistance in fish [J]. *Journal of Hydroecology*, 2010, 3(5): 111—115 [赵红娟, 李华, 于辉, 等. 鱼类 MHC Ⅱ类基因与免疫抗性的研究进展. 水生态学杂志, 2010, 3(5): 111—115]
- [6] Juul-madsen H R, Glumann J, Madsen H O, *et al.* MHC class II beta-chain expression in the rainbow trout [J]. *Scandinavian Journal of Immunology*, 1992, 35(6): 687—694
- [7] Hetland D L, Jørgensen S M, Skjødt K, *et al.* In situ localization of major histocompatibility complex class I and class II and CD8 positive cells in infectious salmon anaemia virus (ISAV)-infected Atlantic salmon [J]. *Fish and Shellfish*

- Immunology*, 2010, **28**(1): 30—39
- [8] Jorgensen S M, Hetland D L, Press C M, *et al.* Effect of early infectious salmon anaemia virus (ISAV) infection on expression of MHC pathway genes and type I and II interferon in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) tissues [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2007, **23**(3): 576—588
- [9] van Erp S H M, Egberts E, Stet R J M. Characterization of class II A and B genes in a gynogenetic carp clone [J]. *Immunogenetics*, 1996, **44**(3): 192—202
- [10] Li X S, Liu Z Z, Zhao X J, *et al.* Major histocompatibility complex DAB allele polymorphism and its association with resistance/susceptibility to *Aeromonas hydrophila* in “whole red” color patterns of *Cyprinus carpio* var. *color* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, **35**(9): 1293—1301 [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. 水产学报, 2011, **35**(9): 1293—1301]
- [11] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-CT} method [J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402—408
- [12] Thompson J D, Dibson T J, Plesniak F, *et al.* The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, **25**(24): 4876—4882
- [13] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA 4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, **24**(28): 1596—1599
- [14] Brown J H, Jardetzky T S, Gorga J C, *et al.* Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR [J]. *Nature*, 1993, **364**(6432): 33—39
- [15] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. *Bioinformatics*, 2009, **25**(11): 1451—1452
- [16] Hardee J J, Godwin U, Benedetto R, *et al.* Major histocompatibility complex class II A gene polymorphism in the striped bass [J]. *Immunogenetics*, 1995, **41**(4): 229—238
- [17] 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]. *Marine Biotechnology*, 2006, **8**(6): 611—623
- [18] Xu T J, Chen S L, Zhang Y X. MHC class IIa gene polymorphism and its association with resistance/susceptibility to *Vibrio anguillarum* in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2010, **34**(10): 1042—1050
- [19] Stet R J M, Vries B D, Mudde K, *et al.* Unique haplotypes of co-segregating major histocompatibility class II A and class II B alleles in Atlantic salmon (*Salmo salar*) give rise to diverse class II genotypes [J]. *Immunogenetics*, 2002, **54**(5): 320—331
- [20] Xu T J, Cheng S L. Genomic structure of DAA gene and polymorphism within MHC-DAA alleles in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Hereditas*, 2009, **31**(10): 1020—1028 [徐田军, 陈松林. 牙鲆 MHC-DAA 结构及其等位基因多态性. 遗传, 2009, **31**(10): 1020—1028]
- [21] 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 and Shellfish Immunology*, 2013, **34**(2): 486—496
- [22] Cuesta A, Esteban M A, Meseguer J. Cloning, distribution and up-regulation of the teleost fish MHC class II alpha suggests a role for granulocytes as antigen-presenting cells [J]. *Molecular Immunology*, 2006, **43**(8): 1275—1285
- [23] Kruiswijk C P, Hermesen T, Fujiki K, *et al.* Analysis of genomic and expressed major histocompatibility class Ia and class II genes in a hexaploid Lake Tana African ‘large’ barb individual (*Barbus intermedius*) [J]. *Immunogenetics*, 2004, **55**(11): 770—781
- [24] Xu T J, Sun Y N, Shi G, *et al.* Characterization of the major histocompatibility complex class II genes in Miiuy Croaker [J]. *PLoS One*, 2011, **6**(8): e23823
- [25] Parham P, Ohta T. Population biology of antigen presentation by MHC class I molecules [J]. *Science*, 1996, **272**(5258): 67—74
- [26] Kjøglum S, Larsen S, Bakke H G, *et al.* The effect of specific MHC class I and class II combinations on resistance to furunculosis in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) [J]. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2008, **67**(2): 160—168
- [27] 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 and Shellfish Immunology*, 2007, **22**(6): 707—717
- [28] Srisapoome 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
- [29] 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 Physiology Biochemistry*, 2011, **37**(4): 767—780

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

LIU Jun¹, LIU Zhi-Zhi¹, WANG Cheng-Hui², XIANG Song-Ping³ and WANG Jian³

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China; 3. Oujiang Color Common Carp Provincial Farm, Longquan 323700, China)

Abstract: We cloned 171 sequences of MHC class II α gene were determined from 41 susceptible and 22 resistant individuals of *Cyprinus carpio* var. *singguoensis*. These sequences belonged to 26 alleles, thirteen of which were novel (Cyca-DXA24-Cyca-DXA36). The total length of the sequence was 624 bp, consisting of a 33 bp exon1, a 252 bp exon2, a 285 bp exon3, and a 54 bp exon4. These exons encoded a partial signal peptide, a α 1 domain, a α 2 domain and a connecting peptide (CP)/partial transmembrane (TM), respectively. The mutation-Prone positions of nucleotide or amino acid sites in α 1 domain (55.16%, 79.76%) significantly out number than those in α 2 domain (45.96%, 68.42%). The ω values ($\omega = d_N/d_S$) were 5.742 for peptide-binding region (PBR), 0.755 for non-PBR in the α 1 domain and 0.592 for the α 2 domain, implying that the positive selection pressure probably had occurred in the PBR region of the α 1 domain. Cyca-DXA24 ($P < 0.01$) was significantly correlated with the carp's resistance to *Aeromonas hydrophila*, while Cyca-DXA3 ($P < 0.05$), Cyca-DXA4 ($P < 0.01$), Cyca-DXA6 ($P < 0.05$) and Cyca-DXA33 ($P < 0.05$) alleles were significantly associated with the fish's susceptibility to the disease. Real-time quantitative PCR demonstrated that MHC II α genes were ubiquitously expressed in ten tissues. The expression was up-regulated in kidney, down-regulated in liver and spleen during infection. Our results indicated that the MHC class II α gene might play an important role in the immune reactions of *C. carpio* var. *singguoensis*.

Key words: *Cyprinus carpio* var. *singguoensis*; MHC; Polymorphism; Expression; Disease resistance