

斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) MHC II α 基因的克隆及表达分析^①

蔡佳^②* * * * * 李楠 * * * * * 蒋一男 *** 张念之 *** 鲁义善 * * * * *

吴灶和 * * * * 夏春^③ *** 简纪常^③ * * * * *

(* 广东海洋大学水产学院 湛江 524088)

(** 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室 湛江 524088)

(*** 广东省教育厅水产经济动物病害控制重点实验室 湛江 524088)

(**** 中国农业大学动物医学院 北京 100094)

摘要 利用 RACE PCR 克隆了斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 主要组织相容性复合体 II α (MHC II α) 基因，并通过荧光定量 PCR 分析了该基因在健康鱼体中的组织分布以及在溶藻弧菌 (*Vibro alginolyticus*) 感染后在不同组织中的表达变化。斜带石斑鱼 MHC II α cDNA 全长为 2127bp，其中 5' 非翻译区为 834bp，开放阅读框为 714bp，3' 非翻译区为 579bp，编码 237 个氨基酸，其推导的氨基酸序列包含信号肽、 α 1 及 α 2 功能区、跨膜区、连接肽和胞浆区。荧光定量 PCR 结果表明，斜带石斑鱼 MHC II α 基因在鳃、头肾、肝、体肾、脑、脾和肠中表达量较高，在心脏、皮肤和肌肉中的表达量较低，并且溶藻弧菌 (*Vibro alginolyticus*) 感染后在脾、肠、头肾、和体肾中的表达显著上调，分别为对照组的 9.5 倍、4.3 倍、3.4 倍及 1.9 倍。上述结果表明斜带石斑鱼 MHC II α 在抗溶藻弧菌感染的免疫反应中可能发挥重要作用，这对进一步了解石斑鱼抗菌免疫反应具有参考意义。

关键词 斜带石斑鱼，溶藻弧菌，MHC II α ，克隆，表达分析

0 引言

主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 是脊椎动物中编码免疫应答直接相关的高度多态的基因群，在脊椎动物免疫系统中发挥着重要的抗原呈递作用^[1,2]。根据编码蛋白的不同，哺乳动物 MHC 分子可分为 MHC I 类、MHC II 类和 MHC III 类。MHC II 类分子是异源二聚体，可进一步分为两个亚类 (A 类和 B 类，分别编码一个 α 与 β 链)^[3]，主要参与外源性抗原的递呈，病原菌感染后，哺乳动物 MHC II 分子 α 1 和 β 1 链相互作用聚合而成的肽结合区 (peptide binding region, PBR)

能结合免疫细胞吞噬病原菌后产生的蛋白质抗原，形成 MHC II-抗原肽复合物并呈递给辅助 T 细胞，从而触发宿主的免疫反应^[4]。目前 MHC 分子已在多种鱼类中被鉴定及报道^[5,6]，鱼类 MHC 分子也具有丰富的多态性，与其他脊椎动物的 MHC 分子不同，硬骨鱼类经典的 MHC I 类与 II 类分子属于不同的连锁群^[5]。其中鱼类 MHC II 类分子主要分布在免疫细胞中，如 B 细胞、单核细胞/巨噬细胞和树突状细胞、激活的 T 细胞和其他抗原呈递细胞。此外，MHC II 类抗原也能在含有内皮细胞以及上皮细胞的一些组织中表达。MHC II 类分子通过将外源肽呈递到辅助 (CD4 $^+$) T 细胞后启动免疫应答，使机

① 国家自然科学基金 (U0631009, 31402335, 41406172), 广东省教育厅科技创新重点项目 (2012CXZD0026) 和广东海洋大学创新强校工程 (GDOU2013050231) 资助项目。

② 男, 1982 年生, 博士; 研究方向: 水产动物病害防治。

③ 通讯作者, E-mail: xiachun@cau.edu.cn; jianjc@gmail.com
(收稿日期: 2014-09-16)

体能抵御病原的侵染^[7];该类分子高度的多态性也被广泛应用于遗传进化及系谱划分、遗传多样性评估与种群生存力、种群遗传结构分析、抗病相关性及抗病辅助育种的研究中^[8]。最近的研究表明 MHC II β 的表达还在硬骨鱼类胸腺细胞的分化中发挥着关键的作用^[9]。

斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)俗称“青斑”,隶属于鲈形目(*Perciformes*)鮨科(*Serranidae*)、石斑鱼亚科(*Epinephelinae*)、石斑鱼属(*Epinephelus*),由于味道鲜美、营养丰富,已成为广东以及东南沿海重要的海水养殖品种。然而,由于缺乏科学的养殖及防病技术,随着养殖规模的扩大,斜带石斑鱼养殖中的病害问题日益突出,其中弧菌病是一种主要的细菌性疾病,对石斑鱼养殖业造成了极大的影响^[10]。目前关于斜带石斑鱼抗菌免疫的研究还相对较少^[11-15]。斜带石斑鱼 MHC II α 作为一种关键的适应性免疫相关基因,在弧菌感染过程中的作用还未见报道。本实验通过 cDNA 末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE) PCR 克隆了斜带石斑鱼 MHC II α (Ec-MHC II α)基因,并通过荧光定量聚合酶链反应(PCR)分析了该基因的组织分布情况及其在溶藻弧菌感染前后的表达变化,研究结果为进一步了解 MHC II α 在斜带石斑鱼抗菌免疫反应中的作用提供了重要信息。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用斜带石斑鱼(约 100g/尾)购于广东省湛江市南三岛某鱼排。实验室暂养一周后开始实验,分别取其头肾、脾、肝、体肾、肠、心脏、鳃、脑、肌肉和皮肤,迅速放入液氮中冻存,然后转移到 -80℃ 冰箱保存备用。

1.2 溶藻弧菌人工感染

溶藻弧菌(*Vibro alginolyticus*)由本实验室保存,复苏后于 TBST 培养基中 28℃ 条件下培养至对数生长期,离心收集菌体,经 0.65% 无菌生理盐水洗涤并配制成细菌悬液。经预实验后调整菌液浓度为 5.0 $\times 10^8$ CFU(colony forming unit, 菌落形成单位)/ml。

随机选取 40 尾健康斜带石斑鱼,采用腹腔注射法进行人工感染,每尾注射剂量为 0.1ml,对照组注射相同体积的无菌生理盐水。分别在人工感染 24h 后随机选取 3 尾个体,分别取其脾、体肾、头肾、肠以及鳃,液氮冻存。

1.3 实验方法

1.3.1 cDNA 模板的制备

参照试剂说明书,采用 Trizol (Invitrogen) 法提取头肾总 RNA。提取后通过 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,利用分光光度计测定 RNA 浓度及 OD 值,随后用 PolyATtract® mRNA Isolation Systems III 试剂盒(Promega)纯化 mRNA,按照说明书提供的方法进行操作。纯化得到的 mRNA 利用 M-MLV Reverse Transcriptase(Takara) 试剂盒与 5'-Full RACE 试剂盒(Clontech) 分别合成 cDNA 一链及 5' RACE 模板。

1.3.2 MHC II α cDNA 的扩增

根据本实验构建的斜带石斑鱼头肾 SMART cDNA 文库中已知的 MHC II α cDNA 片段 3' 端序列设计一对 5' RACE PCR 所需的引物。其中 MHC II α 5' RACE outer 引物(M2a54)序列为 5'-GTGACATCATCA GCCCGACCAA-3', MHC II α 5' RACE inner 引物(M2a52)序列为 5'-ACG TTCTT-GTTGTTCTCGTCCA-3'。参照说明书,直接取 1.3.1 的反转录产物 2 μ l 作为模板,利用试剂盒提供的 5' RACE Outer Primer 与基因特异性引物 M2a54 进行 Outer PCR 反应,反应体系为:1 \times cDNA Dilution Buffer II 8 μ l, 10 \times LA PCR Buffer II (Mg^{2+} Free) 5 μ l, $MgCl_2$ (25mM) 3 μ l, TaKaRa LA Taq (5 U/ μ L) 0.25 μ l, M2a54(10 μ M) 2 μ l, 5' RACE Outer Primer(10 μ M) 2 μ l, cDNA 2 μ l, 用去离子水补充体积至 50 μ l。反应条件为:95℃ 预变性 3min; 95℃ 30s, 65℃ 30s, 72℃ 4min, 20 个循环; 72℃ 10min, 4℃ 保存。随后取 1 μ l Outer PCR 反应产物为模板,利用 M2a52 与 5' RACE Outer Primer 进行 Inner PCR 反应,反应体系为:10 \times LA PCR Buffer II (Mg^{2+} Free) 5 μ l, $MgCl_2$ (25mM) 3 μ l, TaKaRa LA Taq(5 U/ μ L) 0.25 μ l, M2a52(10 μ M) 2 μ l, 5' RACE Outer Primer(10 μ M) 2 μ l, cDNA 2 μ l, 用去离子水补

充体积至 50 μl。反应条件为: 95℃ 预变性 3 min; 95℃ 30 s, 65℃ 30 s, 72℃ 4 min, 30 个循环; 72℃ 10 min, 4℃ 保存。反应结束后, 取 5 μl 反应液进行琼脂糖凝胶电泳检测。通过切胶回收目的片段, 连接 PMD-18T 载体 (Takara) 后转化至感受态 *E. coli* DH5α, 挑阳性克隆到北京华大基因测序。

1.3.3 序列分析

通过 DNAMAN5.2 将 1.3.2 得到的测序结果与已知的片段序列进行拼接, 拼接后的序列在 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 上进行序列同源性比对和相似性分析; 运用 Genetyx 7.0 软件预测开放阅读框 (ORF) 的确定以及氨基酸序列; TagIdent tool (<http://expasy.org/tools/tagident.html>) 确定开放阅读框、预测所推测蛋白的分子质量和等电点; SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) 和 NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 在线分析序列的保守结构域、功能基序和 N 糖基化位点; 应用 Clustal X 软件进行序列的多重比对; 通过 MEGA4 软件以 Neighbor-joining

法构建系统进化树。

1.3.4 MHC IIα 的组织分布

通过荧光定量 PCR 检测斜带石斑鱼 MHC IIα 在健康鱼体中头肾、脾、肝、体肾、肠、心脏、鳃、脑、肌肉和皮肤中的分布情况。根据 Ec-MHC IIα 的保守序列设计引物 Fm2a, Bm2a(表 1), 以 β-actin 作为内参基因, 引物为 Fba, Bba。25 μl 反应体系为: 2 μl cDNA, 12.5 μl SYBR Premix Ex Taq(TaKaRa), 上下游引物各 0.5 μl 和 9.5 μl 去离子水。PCR 反应条件是: 95℃ 变性 10 s 后, 95℃ 5 s, 58℃ 15 s, 72℃ 20 s, 40 个循环。通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法确定 Ec-MHC IIα 基因 mRNA 在不同组织中的相对表达量。

1.3.5 溶藻弧菌感染后斜带石斑鱼 MHC IIα 的表达分析

使用荧光定量 PCR 技术检测溶藻弧菌感染前后斜带石斑鱼 MHC IIα 在脾、体肾、头肾、肠以及鳃中的表达差异, 所用引物, 反应体系与 PCR 条件同 1.3.4。实验利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算基因的相对表达量, 应用 SPSS 11.0 软件对实验数据进行统计学分析。

表 1 实验所用引物序列

引物名称	引物序列	用途
M2a52	ACGTTCTGTTGTTCTTCGTCCA	RACE PCR 扩增
M2a54	GTGACATCATCAGCCCCGACCAA	
Fm2a	GGACATCAGACCCTGGACCAAC	荧光定量 PCR
Bm2a	CACACCGAGCAGACCGACACT	
Fba	GAAATGCCGCACTGGTTGTTG	
Bba	CACCATCACTCCCTGATGCCT	

2 结果

2.1 斜带石斑鱼 MHC IIα cDNA 的克隆及序列分析

斜带石斑鱼 MHC IIα 基因的 cDNA 全长为 2127 bp(登录号:FJ598317)。其中 5' UTR、3' UTR 分别为 834 bp、579 bp, 开放阅读框包含 714 bp, 将该基因命名为 Ec-MHC IIα。该基因编码开放阅读框编码 237 个氨基酸, 蛋白质预测的分子量约为 26 kD, 等电点为 4.53, 其推导的氨基酸序列分为信号肽、α1 及 α2 功能区、跨膜区、连接肽和胞浆区, 具有 4 个半胱氨酸残基(第 30, 84, 126, 182 位), 可形成两个链内二硫键(图 1)。此外, 还包含 1 个糖基

化位点、4 个酪蛋白激酶 II 磷酰化位点、1 个免疫球蛋白和主要组织相容性复合体蛋白信号和 5 个酰化位点(图 1)。在 3' UTR 区含有多聚腺苷酸加尾信号 AATAAA 和 mRNA 不稳定基序 ATTAA(图 1)。

氨基酸比对显示 Ec-MHC IIα 和海鲈 (*Dicentrarchus labrax*) MHC IIα 序列同源性最高, 为 78.0%, 与真鲷 (*Pagrus major*)、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)、斑马鱼 (*Danio rerio*) MHC IIα 序列同源性分别为 71%、69% 和 53%, 与爪蟾 (*Xenopus laevis*)、鸡 (*Gallus gallus*)、小鼠 (*Mus musculus*) 及人类 (*Homo sapiens*) MHC IIα 序列的同源性较低, 分别为 31%、30%、27% 和 33%(表 2)。

cgccggatccccactactgtatcgtcaggatggaaaagtgcgtccctcagactgagacacagactcagacaggte
 caggctcacagagactcagacaggccaggctcacagagagactcagacaggccaggctcacagaggctcaggc
 ggtaggtctcacagagagaatcagacaggccaggctcacagagagactcagacaggccaggctcacagaga
 actcagacaggccaggctcacagagagaatcagacaggccaggctcacagagagactcagacaggccaggc
 acagagagactcggacaggccaggctcacagagactcagacaggccaggctcacagagagactcagacaggc
 tccaggctcacagagagactcagacaggccaggctcacagactcagacaggccaggctcacagagagactcagac
 ggtctcacagagactcagacaggccaggctcacagagactcagacaggccaggctcacagagagactcagac
 ttttaggtctcacagagagactcagacaggccaggctcacagagactcagacaggccaggctcacagagactc
 gacaggccaggctcacagagagactcagacaggccaggctcacagactcagacaggccaggctcacagag
 ctgagacaggccaggctcacagagactcagacaggccaggctcacagagagactcagacaggccaggctcac
 gagactcagacaggccaggctcacagagactcagacaggccaggctcacagagagactcagacaggccaggc
 ATGATGAAGATGATGGTGGCTCTGGTCAGCTCATGAGCTACGGTCTACATGAGGACTTT
 M M K M M V V L V L S C V L C V S A D G L H E D F
 CGCATCGCTGGCTGTTCAGACTCTGATGGAGAGGAGATGACGCTCTGGATGGTAGGGAGATGGTACGCAGAC
 R I A G C S D S D G E E M Y A L D G E E M W Y A D
 TTCATCAACAAGAAGGGGGTGAGCCTCAGCCCAGCTTCATTGATCATATCAGCTATGTGAAAGGAACCTATGAG
 F I N K K G V E P Q P S F I D H I S Y V E G T Y E
 AGTGCTGAGGCTAACACAGACCTGCAGACAGAACCTGAAATTGAGTGCCAAAGCCATGAAGGACCTCCACTG
 S A E A N Q Q T C R Q N L K L S A K A M K D L P L
 GAATTGATCCTCCGTCAGTCCCACATCGTCACTCCAGAGACGACGACGAGCTGGAGCTGGAGAGAACACATCCTCATC
 E F D P P S S P I V Y S R D D V E L G E N N I L I
 TGTCATGTGACTGGTTCTATCCTGCTCCTGTAACGTTACTGGACGAAGAACACAAGTCAGTGAAGGA
 C H V T G F Y P A P V T F Y W T K N N K N V T E G
 ACCAGCGTCAACGTTCCCTCCCCAACAGGACGGCTCTCAACCAGTTCTCAGACTGGAGTTCTGGAGAC
 T S V N V P F P N K D G S F N Q F S R L E F V P Q
 CTGGGAGACATCTACAGCTGTCAGTGGACATCAGACCCCTGGACCAACCAGACTGGAGTTCTGGAGAC
 L G D I Y S C S V G H Q T L D Q P L T R I W D V E
 AAGACTCAGCCCAGTGTGGACCTGCAGTTCTGTGGAGTGGGCTGACTGTGGCTGCTCGGTGTGGCTGCT
 K T Q P S V G P A V F C G V G L T V G L L G V A A
 GGAACCTTCTCCTCATCAAAGGGAACGAGTGCAGCTGA
 G T F F L I K G N E C S *

ttggcgccgtatgtatcaccagaggcccgttctgtgaggatcaggtaactgagttatgggtcacttgcc
 tgagtccacacctggaatcacatcacacctaaacatgtgttggaaatccctgggttgttctcagacaactg
 tccagataactgtgtcggtcgattgttggtcaggctcagagacagtgcagccacattcagctcactca
 gtgaacgtgttcatagcagcaggccctgggttcaacatgtttctgtgttgcagactgatcat
 aactgaatgagtggcacataactttgattaagtaagtgcagttctccctgtttctgtcagagactgc
 attgtttactgtcaactgtacaatgatgtttatgatcaggatgggttcacccatgaaataatctt
 aatgttctgtttcacatctgtgggtaaaaacagctttatgtcacacatgtcagagaaaactctgtat
 aatgaatgatttatgatgatcaggactcagactctttg

小写字母示5'和3'UTR,方框示ATTAA基序;阴影表示N连接的糖基化位点;____表示蛋白激酶C-磷酸化位点;……表示酪蛋白激酶II磷酸化位点;N-豆蔻酰化位点用____表示;_____表示免疫球蛋白和主要组织相容性复合体蛋白信号

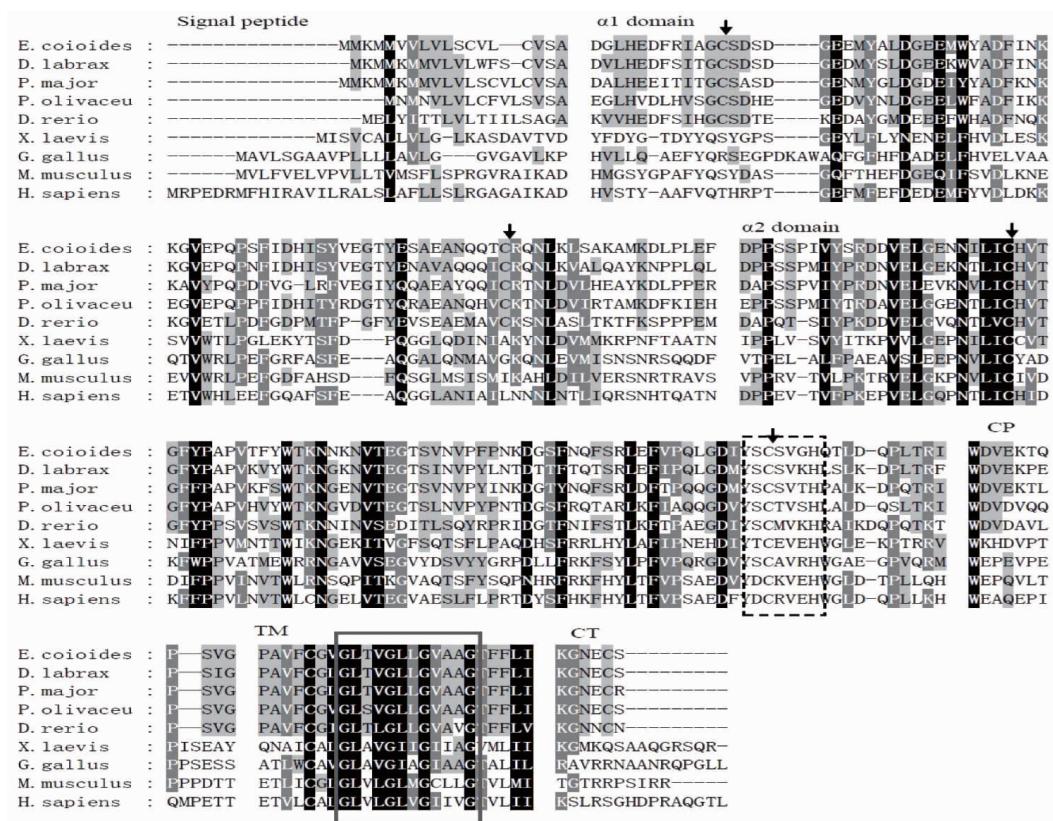
图1 斜带石斑鱼MHC II α 基因cDNA序列及推导的氨基酸序列

Ec-MHC II α 氨基酸序列包含信号肽、 α 1区、 α 2区、肽结合区和胞浆区。其中 α 1区和 α 2区具有保守的4个半胱氨酸,MHC II α 基因极保守的免疫球蛋白和主要组织相容性复合体蛋白信号(F/Y-X-C-X-V/A-X-H),在跨膜区还具有

GXXGXXXGXXXXXXG基序(图2)。进化分析结果表明鱼类MHC II α 单独聚为一支,爪蟾、鸡、小鼠和人类MHC II α 聚为一支。斜带石斑鱼MHC II α 与海鲈MHC II α 进化关系最近,其次是真鲷和牙鲆(图3)。

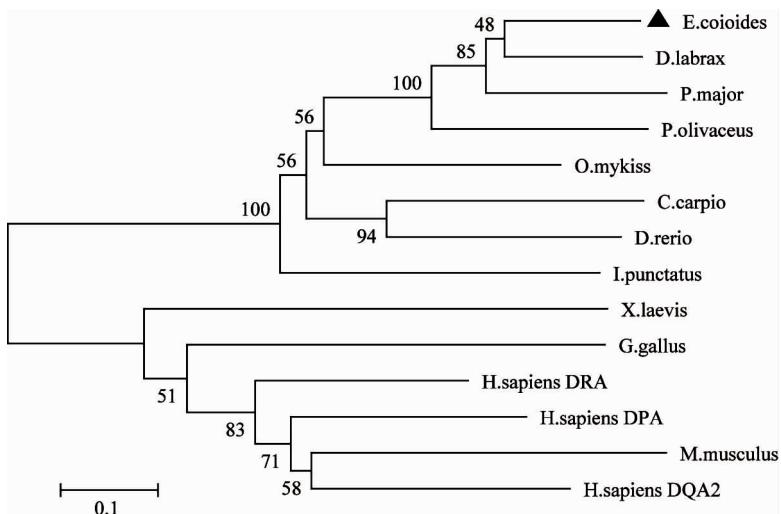
表 2 斜带石斑鱼 MHC II α 氨基酸序列与其他物种该序列的相似度

物种	登录号	相似性(%)
<i>Epinephelus coioides</i> (斜带石斑鱼)	FJ598317	100
<i>Mus musculus</i> (小鼠)	AAB46387	27
<i>Pagrus major</i> (真鲷)	AAW21980	71
<i>Homo sapiens</i> (人类)DRA	P01903	35
<i>Homo sapiens</i> (人类)DQA2	P01906	33
<i>Homo sapiens</i> (人类)DPA	P20036	33
<i>Gallus gallus</i> (鸡)	ABU88980	30
<i>Xenopus laevis</i> (爪蟾)	NP_001079971	31
<i>Dicentrarchus labrax</i> (海鲈)	CBK52292	78
<i>Cyprinus carpio</i> (鲤鱼)	CAA64707	49
<i>Paralichthys olivaceus</i> (牙鲆)	BAD13364	69
<i>Ictalurus punctatus</i> (斑点叉尾鮰)	AAD39866	46
<i>Danio rerio</i> (斑马鱼)	CAD60677	53
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (虹鳟)	CAB96451	57



箭头所示 4 个保守的半胱氨酸残基, 实线方框表示 GXXXGXXGXXXG 框, 虚线方框表示免疫球蛋白和主要组织相容性复合体蛋白信号序; CP, connecting peptide (连接肽); TM, transmembrane region (跨膜区); CT, cytoplasmic domain (胞浆区); 所用序列的 GenBank 登录号在表 2 中列出。图中简写代表物种:E. coioides:斜带石斑鱼;M. musculus:小鼠;P. major:真鲷;H. sapiens:人类;G. gallus:鸡;X. laevis:爪蟾;D. labrax:海鲈;P. olivaceus:牙鲆;D. rerio:斑马鱼。

图 2 斜带石斑鱼 MHC II α 基因氨基酸序列的比对分析



(所用序列的 GenBank 登录号在表 2 中列出)图中简写代表物种:E. coioides:斜带石斑鱼;M. musculus:小鼠;P. major:真鲷;H. sapiens:人类;G. gallus:鸡;X. laevis:爪蟾;D. labrax:海鲈;C. carpio:鲤鱼;P. olivaceus:牙鲆;I. punctatus:斑点叉尾鮰;D. rerio:斑马鱼;O. mykiss:虹鳟。

图 3 斜带石斑鱼 MHC II α 基因的系统进化分析

2.2 Ec-MHC II α 基因在健康鱼体组织中的表达分析

荧光定量结果表明,Ec-MHC II α 在健康斜带石斑鱼的头肾、脾、肝、体肾、肠、心脏、鳃、脑、肌肉和皮肤中均有表达,但表达水平的高低有所差别,如图 4 所示,Ec-MHC II α 基因在鳃、头肾、肝和体肾中的表达量高于在其它组织中的表达量。

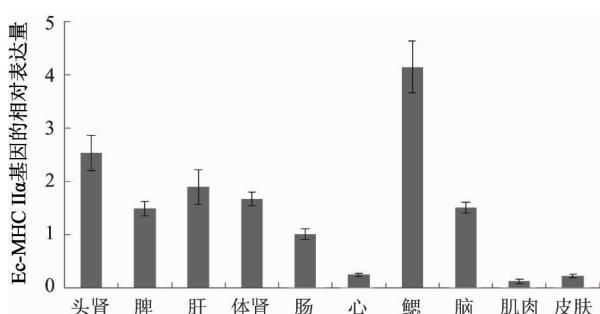
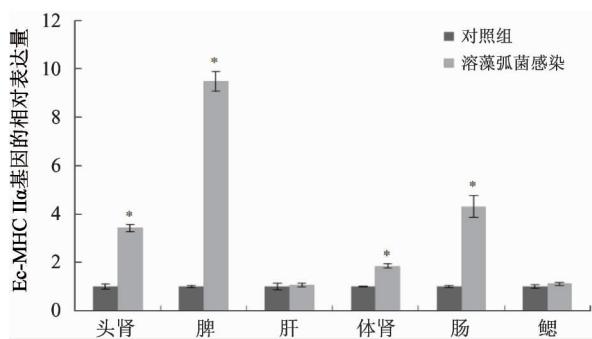


图 4 斜带石斑鱼 MHC II α 基因在健康石斑鱼各组织的表达情况

2.3 Ec-MHC II α 基因在溶藻弧菌感染后的表达变化

为了研究 Ec-MHCII α 是否参与了石斑鱼抗菌免疫反应,我们利用荧光定量 PCR 检测了溶藻弧菌感染后斜带石斑鱼脾、鳃、体肾、头肾、肠中 Ec-MHC II α mRNA 表达量的变化。结果如图 5 所示:溶藻

弧菌刺激后,Ec-MHCII α 在脾、肠、头肾和体肾中的表达水平显著上调,分别为对照组的 9.5 倍、4.3 倍、3.4 倍及 1.9 倍。



* 代表斜带石斑鱼 MHC II α 基因在感染前后表达差异显著 ($P < 0.05$)

图 5 斜带石斑鱼 MHC II α 基因在溶藻弧菌感染后的表达差异

3 讨论

本实验通过 RACE PCR,成功获得斜带石斑鱼 MHCII α 基因 cDNA 序列(Ec-MHC II α)。该基因推导的氨基酸序列含有信号肽、 α 1 区、 α 2 区、肽结合区和胞浆区。在 Ec-MHCII α 的 α 1 区和 α 2 区具有保守的 4 个半胱氨酸及糖基化位点,其中糖基化位点能影响 MHC II 异二聚体的形成及 MHC 分子与 T

细胞的相互作用^[16,17]。另外,α2 区上 MHC II α 基因极保守的免疫球蛋白和主要组织相容性复合体蛋白信号(F/Y-X-C-X-V/A-X-H)是 T 细胞 CD4 受体特异性结合的氨基酸基序,在抗原递呈并引起特异性免疫反应的过程中发挥着重要的作用^[18]。在跨膜区,斜带石斑鱼 MHC II α 含有 GXXGXXXGXXXXXG 基序(X 指疏水氨基酸残基),其他鱼类如舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)、圆斑星鲽(*Verasper variegatus*)和罗非鱼(*Tilapia nilotica*)^[19-21]也具有类似的基序。该基序的 G 残基在 MHC II α 与 MHC II β 形成异二聚体的过程中具有重要作用^[22]。氨基酸序列进化分析结果表明,斜带石斑鱼和海鲈同源性最高,可能因为斜带石斑鱼和海鲈同属在分类学上隶属于鲈形目,亲缘关系较近,而与真鲷、牙鲆、虹鳟的亲缘关系次之。

在哺乳动物中,MHC II 分子主要在树突状细胞,B 细胞以及巨噬细胞中表达^[23]。在本研究中,斜带石斑鱼 MHC II α 基因在所有检测的组织中均有表达,但在各个组织中表达水平存在差异,其中在鳃、头肾、肝、体肾中表达量较高,这与团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)^[24]的报道相似。在其他鱼类中,如牙鲆^[6]、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)^[25]、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[26]的 MHC II α 基因在鳃、脾、体肾中均具有较高的表达量。头肾、脾、体肾是鱼类主要的免疫器官,含有包括抗原呈递细胞在内的大量淋巴细胞,而鱼类的鳃是水体中病原菌感染鱼类时最先接触的部位,其中也含有淋巴细胞、巨噬细胞、粒细胞等免疫细胞。因此,MHC II α 在上述组织的高表达暗示 MHC II α 可能参与了鱼类抵御病原侵染的免疫反应。

通过荧光定量 PCR,我们对斜带石斑鱼 MHC II α 基因在溶藻弧菌免疫前后不同组织(肝、头肾、鳃、脾、体肾、肠)中的表达差异进行了分析。结果发现,Ec-MHC II α 基因在免疫后的脾、肠、头肾和体肾中表达量显著升高,表明 Ec-MHC II α 可能在斜带石斑鱼抗菌免疫反应过程中发挥了重要作用。其他鱼类 MHC II α 的研究也有类似发现,如罗非鱼 MHC II α 在肠、鳃、脾以及肾中的表达量在链球菌感染第二天时显著上调^[21];鳗弧菌感染舌鳎后,其肠中的

MHC II α 基因也具有类似的表达模式^[20];在嗜水气单胞菌感染的不同时期,团头鲂脾、肝、鳃、肠、肾中 MHC II α 基因的表达也显著上调^[24]。在本研究中,除了脾、肠、头肾和体肾,Ec-MHC II α 的表达量在其余检测组织(鳃与肝)中均无明显变化,与上述其他鱼类的相关报道存在区别,这可能是由于不同的物种、不同菌株以及不同的采样时间造成的。在病原菌侵染的早期,MHC II 类分子能将外源性抗原递呈给 T 细胞并激活免疫反应,使机体免受病原菌的侵害。本研究中 Ec-MHC II α 在感染发生的早期表达显著上调,表明鱼体在这个时期可能通过调节 Ec-MHC II α 的表达来增强抗原呈递的功能,从而提高鱼体对病原菌感染的抵抗能力,其具体的作用机理还需要进一步的研究与验证。

4 结 论

本研究首次克隆到斜带石斑鱼 MHC II α 基因 cDNA 序列。氨基酸序列比对及进化分析显示斜带石斑鱼 MHC II α 基因与鱼类 MHC II α 的亲缘关系较近。荧光定量分析结果表明,斜带石斑鱼 MHC II α 基因在鳃、头肾、肝、体肾、脑、脾和肠中具有较高的表达水平,而在心脏、皮肤和肌肉中的表达量较低。溶藻弧菌感染后,斜带石斑鱼 MHC II α 基因在脾、肠、头肾、和体肾中的表达显著上调。本研究为进一步探索该基因在斜带石斑鱼抗菌免疫反应中的作用奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Klein J, Satta Y, O'hUigin C, et al. The molecular descent of the major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol*, 1993, 11: 269-295
- [2] Mona S, Crestanello B, Bankhead-Dronnet S, et al. Disentangling the effects of recombination, selection, and demography on the genetic variation at a major histocompatibility complex class II gene in the alpine chamois. *Mol Ecol*, 2008, 17: 4053-4067
- [3] Klein J, Figueroa F. Evolution of the major histocompatibility complex. *Crit Rev Immunol*, 1986, 6: 295-386
- [4] Apanius V, Penn D, Slev P R, et al. The nature of se-

- lection on the major histocompatibility complex. *Crit Rev Immunol*, 1997, 17(2): 179-224
- [5] 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 b2-microglobulin. *Dev Comp Immunol*, 2013, 39 (3): 234-254
- [6] 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*. *Fish Sci*, 2004, 70 (2): 264-276
- [7] Croisetiere S, Tarte P D, Bernatchez L, et al. Identification of MHC class IIb resistance/susceptibility alleles to *Aernmonas salmonicida* in brook charr (*Salvelinus fontinalis*). *Mol Immunol*, 2008, 45: 3107-3116
- [8] 庞纪彩,高风英,卢迈新等. 鱼类MHC II类基因及其研究进展. 广东农业科学, 2012,3;141-145
- [9] Picchietti S, Abelli L, Guerra L, et al. MHC II- β chain gene expression studies define the regional organization of the thymus in the developing bony fish *Dicentrarchus labrax* (L.). *Fish Shellfish Immunol*, 2015, 42(2):483-493
- [10] 林克冰,葛辉,林琪等. 斜带石斑鱼TLRSS基因结构及功能分析. 厦门大学学报:自然科学版,2013,1:109-115
- [11] 林超辉. 斜带石斑鱼的生物学特性及养殖技术. 水产科技情报,2007,34(5):206-207
- [12] 刘秀珍,李家炳. 海水网箱养殖石斑鱼病原菌研究. 热带海洋,1994,13 (1) :81-86
- [13] 罩映雪,池信才,苏永全等. 网箱养殖青石斑鱼的溃疡病病原. 水产学报, 2004,28(3):297-302
- [14] 吴后波,潘金培. 弧菌属细菌及其所致海水养殖动物疾病. 中国水产科学,2001,8 (1) :89-93
- [15] 朱传华,何建国,黄志坚. 网箱养殖石斑鱼暴发性溃疡病病原菌分离,鉴定及致病性研究. 中山大学学报:自然科学版,2009,39(S1):278-282
- [16] Wei B Y, Buerstedde J M, Bell M, et al. Functional effects of N-linked oligosaccharides located on the external domain of murine class II molecules. *J Immunol*, 1991, 146(7): 2358-2366
- [17] Nag B, Passmore D, Kendrick T, et al. N-linked oligosaccharides of murine major histocompatibility complex class II molecule. Role in antigenic peptide binding, T cell recognition, and clonal nonresponsiveness. *J Biol Chem*, 1992, 267(31): 22624-22629
- [18] 周芬娜,董忠典,李同明等. 尼罗罗非鱼MHC II A基因的克隆、表达及多态性分析. 水产学报,2012,36 (8):1167-1178
- [19] 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. *Fish Physiol Biochem*, 2011, 37: 167-180
- [20] 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*). *Fish Shellfish Immunol*, 2009, 27: 192-201
- [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. *Fish Shellfish Immunol*, 2013, 34(2): 486-496
- [22] Cosson P, Bonifacio J S. Role of transmembrane domain interactions in the assembly of class II MHC molecules. *Science*, 1992, 258: 659-662
- [23] Dixon B, van Erp S H, Rodrigues P N, et al. Fish major histocompatibility complex genes, an expansion. *Dev Comp Immunol*, 1995, 19: 109-133
- [24] Luo W, Zhang J, Wen J F, et al. Molecular cloning and expression analysis of major histocompatibility complex class I, IIA and IIB genes of blunt snout bream (*Megabrama amblycephala*). *Dev Comp Immunol*, 2014, 42 (2): 169-173
- [25] Yu S, Ao J, Chen X. Molecular characterization and expression analysis of MHC class II alpha and beta genes in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Mol Biol Rep*, 2010, 37(3), 1295-1307
- [26] 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*). *Mar Biotechnol (NY)*, 2006, 8 (6): 611-623

cDNA cloning and expression analysis of MHC II α from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)

Cai Jia * *** ***, Li Nan * ** ***, Jiang Yinan ****, Zhang Nianzhi ****, Lu Yishan * *** ***, Wu Zaohe ** ***, Xia Chun ****, Jian Jichang * *** ***

(* Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088)

(** Guangdong Provincial Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals, Zhanjiang 524088)

(*** Key Laboratory of Control for Diseases of Aquatic Economic Animals of Guangdong Higher Education Institutes, Zhanjiang 524088)

(**** College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract

In this study, the cDNA of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) MHC (major histocompatibility complex) II α gene (Ec-MHC II α) was cloned. And its distribution in healthy tissue and temporal expression after *Vibrio alginolyticus* infection were also investigated by quantitative real-time PCR. The Ec-MHC II α cDNA was 2127bp in length, including an 834 bp 5' UTR, a 714 bp open reading frame, and a 579 bp 3' UTR. The deduced amino acid sequence contained a signal peptide, alpha 1 and alpha 2 domains, transmembrane region, connecting peptide and cytoplasmic domain. The results of quantitative real-time PCR showed that the grouper MHC II α gene was highly expressed in gill, head kidney, liver, trunk kidney, brain, spleen and intestine, but weakly expressed in heart, skin and muscle. Moreover, Ec-MHC II α expressions were significantly up-regulated in spleen (9.5 fold), intestine (4.3 fold), head kidney (3.4 fold), kidney (1.9 fold) after *Vibrio alginolyticus* infection. These data indicates that Ec-MHC II α might play an important role in immune response to *Vibrio alginolyticus* infection. It is of referential significance to better understanding of the grouper's immunity against bacteria invasion.

Key words: *Epinephelus coioides*, *Vibrio alginolyticus*, MHC II α , cloning, expression analysis