

# 黄鳝主要组织相容性复合体 $I\alpha$ 基因的克隆及多态性分析

李伟, 江翱, 吴辉

(长江大学生命科学学院, 湖北 荆州 434025)

**摘要:** 通过同源克隆, 结合 RACE 技术, 从黄鳝肝脏 cDNA 中分离得到了 *MHC I $\alpha$*  基因的全长 cDNA 序列。结果表明: 黄鳝 *MHC I $\alpha$*  基因 cDNA 全长 1 731 bp, 5'UTR 长 78 bp, 3'UTR 长 600 bp, 编码 1 条 350 个氨基酸的多肽; 与其他鱼类不同, 黄鳝 *I $\alpha$*  基因只具有 4 个外显子和 3 个内含子。二级结构分析结果表明, 该基因具有 *MHC I $\alpha$*  基因的典型特征和保守区域。实时荧光定量 PCR 检测结果表明: 黄鳝 *MHC I $\alpha$*  基因在不同组织中表达量的差别较大; 嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophilia*)感染可显著影响黄鳝肝脏、肾脏和脾脏 *MHC I $\alpha$*  基因的表达。对 42 个个体的 *MHC I $\alpha$*  基因外显子 3 序列的测定结果表明, 42 个个体共分离到 50 个等位基因, 每个个体包含 1~6 个等位基因, 推测黄鳝具有至少 3 个 *I $\alpha$*  基因座位; 等位基因 PBR 位点和非 PBR 位点的  $d_N$  值均显著大于  $d_S$  ( $P < 0.05$ ), 提示黄鳝 *I $\alpha$*  基因曾经历过强烈的正选择作用。

**关键词:** 黄鳝; 主要组织相容性复合体; 克隆; 多态性

中图分类号: Q959.482; S966.4

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2015)04-0396-05

## Molecular clone and polymorphism analysis on exon 3 of *MHC Class I $\alpha$* gene in swamp eel, *Monopterus albus*

Li Wei, Jiang Ao, Wu Hui

(College of Life Science, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025, China)

**Abstract:** The cloning process of full-length cDNA of *MHC class I $\alpha$*  gene from swamp eel (*Monopterus albus*) was reported in the paper. The full length of cDNA, encoded with 350 amino acids, was 1 731 bp, including a 5 untranslated region (UTR) with 78 bp-long, and 3' UTR with a 600 bp-long. The genomic sequence was identified to be different from that of in other teleosts, which contained of four exons and three introns. Real-time quantitative PCR demonstrated that the *MHC class I $\alpha$*  gene ubiquitously expressed in ten healthy tissues. Great changes in liver, spleen and kidney were observed after they infected by *Aeromonas hydrophilia*, a pathogenic bacteria. Fifty distinct alleles were isolated from forty-two individuals, and each of them had one to six alleles. The presence of six alleles in one individual suggested that there were at least three *MHC I $\alpha$*  loci in the genome. Both at the protein-binding region (PBR) and at the non-PBR region,  $d_N$  were significantly greater than  $d_S$  ( $P < 0.05$ ), which implied that the gene undergone a strong positive selection in swamp eel sequences.

**Keywords:** swamp eel (*Monopterus albus*); major histocompatibility complex (MHC); cloning; polymorphism

主要组织相容性复合体(MHC)在机体获得性免疫中具有重要作用<sup>[1]</sup>。MHC I类和II类分子分别负责内、外源性抗原的加工和呈递<sup>[2]</sup>。MHC I类分子是由 $\alpha$ 链和 $\beta$ 链(由 $\beta 2$ 微球蛋白编码)组成的异二聚体。经典的*MHC I $\alpha$* 分子包含连接肽、跨膜区、胞质区和胞外区等结构域。MHC分子不仅在群体

内存在着大量等位基因,而且等位基因间也存在较多变异<sup>[3]</sup>。II类分子的多态性主要集中于外显子2,而I类分子的多态性主要集中于外显子2和外显子3<sup>[4]</sup>。这些区域包含众多抗原结合位点(PBR)。PBR位点的氨基酸发生变异会极大地影响MHC识别病原并呈递给T细胞受体的能力<sup>[5]</sup>。MHC分子的多态

性和哺乳动物、家禽及鱼类的抗病性密切相关<sup>[6-8]</sup>。MHC 作为用分子标记辅助育种的重要候选基因倍受重视。近年来有多种经济鱼类的 MHC 分子被陆续克隆<sup>[9-15]</sup>，鱼类 *MHC Ia* 基因的多态性研究已较为深入<sup>[16-18]</sup>。黄鳝 *MHC IIB* 基因具有较丰富的多态性<sup>[4]</sup>，但关于其 *MHC Ia* 基因的研究尚少。

黄鳝是一种重要的淡水养殖鱼类，具有很高的食用和药用价值。克隆和发掘具有重要开发潜力的抗病基因，并应用于分子标记辅助育种对黄鳝的健康养殖具有重要意义。笔者克隆黄鳝 *MHC Ia* 基因的全长 cDNA 序列，探究其基因结构，分析该基因的组织表达特异性和病原菌感染对基因表达的影响，探讨黄鳝 *MHC Ia* 基因的多态性，以期探明 MHC I 类分子多态性与鱼体抗病力的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验用鱼及病原菌感染

健康鳝鱼约 200 条，每条质量 60~70 g，均购买于市场。室温条件下，于水箱中暂养 1 周后提取总 RNA 和进行病原菌感染试验。取心脏、肝脏、脾脏、胃、肾脏、血细胞、皮肤、肠、肌肉和脑等 10 种组织，在液氮中速冻后提取总 RNA。

细菌感染试验按文献<sup>[4]</sup>报道的方法进行。病原细菌 *Aeromonas hydrophila* 在液体 LB 中 28 °C 培养到对数生长期后，4 500 r/min 离心收集，用灭菌生理盐水(0.9%)将菌液稀释至约  $2.2 \times 10^7$  CFU/mL。随机取 45 尾鱼用 MS222 处理麻醉后进行腹腔注射。每条鱼注射 20  $\mu$ L。对照鱼注射生理盐水。分别在感染后 4、12、24、48、72 h 随机选 3 个个体，取其肝脏、脾脏和肾脏 3 种组织液氮速冻后提取总 RNA。

### 1.2 DNA 的提取和 cDNA 的合成

黄鳝肝脏 DNA 提取按照 DNA 分离试剂盒说明书进行。各组织总 RNA 提取按照 Trizol 试剂说明书进行。cDNA 合成按照 PrimeScript RT reagent 试剂盒说明书进行。

### 1.3 黄鳝 *MHC Ia* 基因的克隆

根据已报道的鱼类 *MHC Ia* 基因序列，设计了一对简并引物 de-IA-F(5'-CAAACCTTYCCAGAGT TTGT-3')和 de-IA-FR(5'-CCAGAGAGCTGRAAC ACACA-3')，用来扩增黄鳝 *MHC Ia* 基因的 cDNA 片段。根据上述 cDNA 片段设计基因特异性引物 IA-GSP5(5'-TGGACACCTCCACTTTGGTTGAAG

CGC-3')和 IA-GSP3(5'-CCCAACAACGATGGGAC CTTCCAG-3')，分别用于 5'和 3'RACE 扩增。RACE 扩增按照 Smart RACE cDNA 扩增试剂盒说明书进行。Touchdown 扩增反应程序：94 °C 预变性 3 min；94 °C 变性 1 min，70 °C 退火 45 s，72 °C 延伸 2 min，5 个循环；94 °C 预变性 1 min，65 °C 退火 50 s，72 °C 延伸 1 min，30 个循环；延伸 10 min。

PCR 产物回收、纯化后，连接至 pMD-19T 载体，克隆至 Top10 感受态细胞，挑取阳性克隆进行序列测定。根据 cDNA 全长设计特异性引物，分离黄鳝 *MHC Ia* 基因的内含子，将各序列拼接后得到 gDNA 结构。

### 1.4 序列分析

利用网站 <https://www.predictprotein.org/>对黄鳝 *MHC Ia* 基因推断的氨基酸序列进行二级结构预测。保守结构利用在线网站 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure> 进行分析。

### 1.5 黄鳝 *MHC Ia* 基因的表达分析

采用荧光定量 PCR 技术，检测 *MHC Ia* 组织表达特异性和病原菌感染对该基因表达的影响。以不添加模板的反应作为空白对照，以  $\beta$ -actin 的表达作为内参。设计的 actin 引物为 sense(5'-GCTGTGCT GTCCCTGTA-3')和 antisense(5'-GAGTAGCCACG CTCTGTC-3')。设计的基因特异性引物为 RT-F(5'-CAGATGTGATGGAGATTGTGTG-3')和 RT-R(5'-CACCTACATTTGCTCCACTAC-3')。荧光定量 PCR 在 7 500 RT-PCR 系统(ABI)上进行。20  $\mu$ L 反应体系中包含 1  $\mu$ L 模板，10  $\mu$ L SYBR Premix Ex Taq，0.4  $\mu$ L 引物，7.8  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。反应程序：95 °C 预变性 30 s；95 °C 变性 30 s，54 °C 退火 25 s，72 °C 延伸 1 min，40 个循环。

### 1.6 黄鳝 *MHC Ia* 基因外显子 3 的多态性分析

利用引物 IA-e3-F(5'-CTCAGGTGTCCACDT TTTACAG-3')和 IA-e3-R(5'-CATACTGTTCTCA GCAGAGAGCT-3')进行外显子 3 多态性分析。42 个个体被用来检测多态性。每个个体测定其 5~7 个阳性克隆的序列。等位基因按照文献<sup>[19]</sup>的规则进行命名；PBR 位点的确定根据文献<sup>[20]</sup>的规则进行。利用 MEGA 4.0 软件分析变异位点，运用 Poisson-corrected 算法计算等位基因氨基酸间的遗传距离。同义替代率( $d_S$ )和非同义替代率( $d_N$ )按照 MEGA4.0 中的 Nei-Gojobori 算法进行，用 Jukes-Cantor 算法



脏和胃中的表达量中等，而皮肤、脑、肌肉、肾脏和小肠中的表达量较低(图 2)。病原细菌感染会显著影响肝脏、脾脏和肾脏中  $MHC I\alpha$  基因的表达。感染后 4 h 内肝脏、脾脏和肾脏中  $MHC I\alpha$  基因的表达量基本保持不变。4 h 后肾脏中的基因表达量急剧上升，24 h 达到峰值，然后逐渐下降(图 3)；肝脏中的表达在感染 4 h 后呈下降趋势，72 h 后有所恢复(图 4)。感染 4 h 后脾脏中  $MHC I\alpha$  基因的表达量先下降，24 h 恢复至正常水平后又下降，呈波动趋势(图 5)。

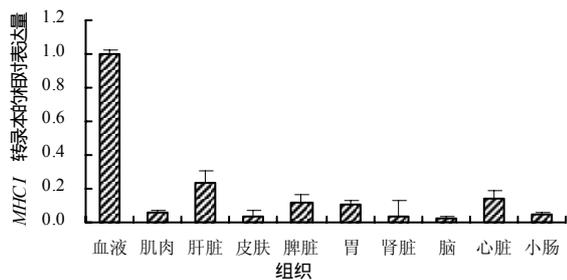


图 2 黄鳝  $MHC I\alpha$  基因在不同组织中的相对表达量  
Fig.2 Relative expression analysis of swamp eel  $MHC I\alpha$  gene in different tissues

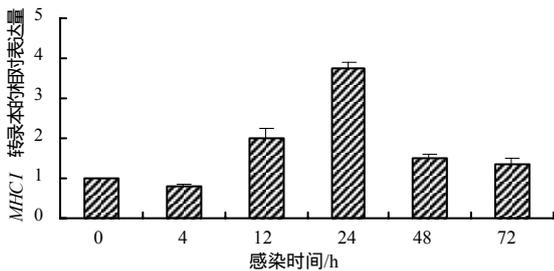


图 3 病原菌感染后肾脏  $MHC I\alpha$  基因的相对表达量  
Fig.3 Relative expression analysis of  $MHC I\alpha$  gene in kidney after infection with *A. hydrophilia*

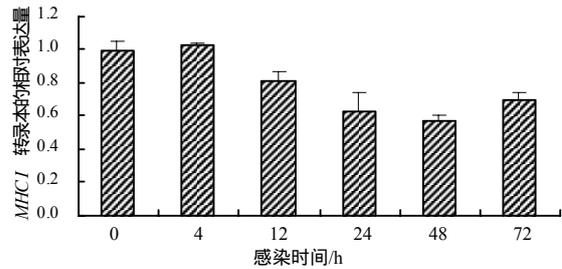


图 4 病原菌感染后肝脏  $MHC I\alpha$  基因的相对表达量  
Fig.4 Relative expression analysis of  $MHC I\alpha$  gene in liver after infection with *A. hydrophilia*

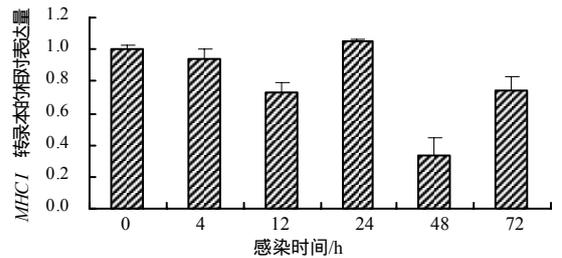


图 5 病原菌感染后脾脏  $MHC I\alpha$  基因的相对表达量  
Fig.5 Relative expression analysis of  $MHC I\alpha$  gene in spleen after infection with *A. hydrophilia*

### 2.3 黄鳝 $MHC I\alpha$ 基因的多态性

42 个健康个体共得到有效等位基因 50 个，每个个体包含 1~6 个等位基因。据此推测，黄鳝基因组上可能至少含有 3 个  $MHC I\alpha$  基因座位。分析等位基因 PBR 位点和非 PBR 位点的遗传变异后发现：PBR 位点氨基酸水平的平均遗传距离为 0.393；非 PBR 位点氨基酸水平的平均遗传距离为 0.178。各等位基因的 PBR 位点和非 PBR 的同义替代率( $d_S$ )和非同义替代率( $d_N$ )计算结果表明：无论是 PBR 位点还是非 PBR 位点，其  $d_N/d_S$  均大于 1。采用单尾的 Z 检验进行正选择( $d_N > d_S$ ) 检验， $P$  值  $< 0.05$ ，说明黄鳝  $MHC I\alpha$  基因在进化过程中受到正向选择的影响(表 1)。

表 1 等位基因间的遗传距离及同义替代率与非同义替代率在外显子 3 的分布

Table 1 Pairwise genetic distance and condon-based evolutionary divergence in all sites and PBR

位点	氨基酸水平的平均遗传距离	非同义替代率( $d_N$ )	同义替代率( $d_S$ )	$d_N/d_S$	$P$
所有位点	0.275±0.027	0.194±0.028	0.120±0.029	1.617	0.011
抗原结合位点	0.393±0.052	0.400±0.007	0.290±0.088	1.379	0.000
非抗原结合位点	0.178±0.031	0.188±0.032	0.110±0.028	1.709	0.011

### 3 结论与讨论

通过同源克隆，结合 RACE 技术，克隆了黄鳝  $MHC I\alpha$  基因。经序列分析，发现黄鳝  $MHC I\alpha$  基因是“4 外显子-3 内含子”结构。这与其他物种的  $MHC I\alpha$  基因结构不同<sup>[15, 21-24]</sup>。黄鳝的  $MHC I\alpha$  基因在 10 种被检测组织里的表达量存在着显著差异；

病原细菌 *A. hydrophilia* 感染可以显著影响肝脏、脾脏和小肠等组织里  $MHC I\alpha$  基因的表达水平，这与许多鱼类 MHC 分子的研究报道<sup>[4, 10-11, 14-15, 25]</sup> 相似。黄鳝  $MHC I\alpha$  基因具有丰富的多态性，50 个不同的等位基因间非同义替代率( $d_N$ )与同义替代率( $d_S$ )的比值大于 1，差异达到了显著水平( $P < 0.05$ )，说明

黄鳝 *MHC Ia* 基因在进化过程中受到正向选择的影响<sup>[12,26]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] Klein J , Figueroa F . Evolution of the major histocompatibility complex[J] . Critical Reviews in Immunology , 1986 , 6 : 295–386 .
- [2] Rothbard J B , Gefters M L . Interactions between immunogenic peptides and MHC proteins[J] . Annual Review of Immunology , 1991 , 9 : 527–565 .
- [3] Kjoeglum S , Larsen S , Bakke H G . How specific MHC class I and class II combinations affect disease resistance against infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J] . Fish Shellfish Immunol , 2006 , 21 : 431–441 .
- [4] Li W , Sun W X , Hu J F , et al . Molecular characterization , polymorphism and expression analysis of swamp eel major histocompatibility complex class IIB gene , after infection by *Aeromonas hydrophilia*[J] . The Journal of Animal & Plant Sciences , 2014 , 24(2) : 481–491 .
- [5] Sommer S . The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation[J] . Front Zool , 2005 , 2 : 16–34 .
- [6] Zhang Y X , Chen S L , Liu Y G , et al . Major histocompatibility complex II B allele polymorphism and its association with resistance/susceptibility to *Vibrio anguillarum* in Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J] . Marine Biotechnology , 2006 , 8 , 600–610 .
- [7] Du M , Chen S L , Liu Y H , et al . MHC polymorphism and disease resistance to *Vibrio anguillarum* in 8 families of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J] . BMC Genetics , 2011 , 12 : 78 .
- [8] Tang J , Zhou C , Zhang Z J , et al . Association of polymorphisms in non-classic *MHC* genes with susceptibility to autoimmune hepatitis[J] . Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International , 2012 , 11 : 125–131 .
- [9] 苏建明, 肖调义, 张学文, 等 . 草鱼 *MHC IIA* 基因 cDNA 的克隆与组织表达分析[J] . 湖南农业大学学报: 自然科学版 , 2008 , 34(6) : 673–679 .
- [10] Pang J , Gao F , Lu M , 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 : 486–496 .
- [11] Zhou F , Dong Z , Fu Y , et al . Molecular cloning , genomic structure , polymorphism and expression analysis of major histocompatibility complex class II B gene of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J] . Aquaculture , 2013 , 372–375 : 149–157 .
- [12] 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 基因的克隆与多态分析[J] . 山东大学学报: 理学版 , 2013 , 48(11) : 14–22 .
- [13] 张新中, 鲁义善, 吴灶和, 等 . 红笛鲷主要组织相容性复合物 I A 抗原基因的克隆与表达分析[J] . 水产学报 , 2012 , 36 (10) : 1482–1492 .
- [14] 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 : 167–180 .
- [15] Xu T J , Chen S L . Molecular cloning , genomic structure and expression analysis of major histocompatibility complex class IA gene of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J] . Fish Physiol Biochem , 2011 , 37 : 85–90 .
- [16] Grimholt U , Drablos F , Jorgensen S M , et al . The major histocompatibility class I locus in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) : Polymorphism , linkage analysis and protein modeling[J] . Immunogenetics , 2002 , 54 : 570–581 .
- [17] 夏春, 徐广贤, 林常有, 等 . 草鱼 MHC class I 等位基因克隆及其多态性分析[J] . 自然科学进展 , 2004 , 14(1) : 51–58 .
- [18] Fujiki K , Booman M , Chin-Dixon E , et al . Cloning and characterization of cDNA clones encoding membrane-bound and potentially secreted major histocompatibility class IA receptors from walleye (*Stizostedion vitreum*)[J] . Immunogenetics , 2001 , 53(9) : 760–769 .
- [19] Klein J , Bontrop R E , Dawkins R L , et al . Nomenclature for the major histocompatibility complexes of different species , a proposal[J] . Immunogenetics , 1990 , 31 : 217–219 .
- [20] Brown J H , Jardetzky T S , Gorga J C , et al . Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLADR1[J] . Nature , 1993 , 364 : 33–39 .
- [21] Srisapoom 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 : 264–276 .
- [22] Lukacs M F , Harstad H , Grimholt U , et al . Genomic organization of duplicated major histocompatibility complex class I regions in Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J] . BMC Genomics , 2007 , 8 : 251 .
- [23] Antao A B , Wilson M , Wang J , et al . Genomic organization and differential expression of channel catfish MHC class I genes[J] . Dev Comp Immunol , 2001 , 25(7) : 579–595 .
- [24] Lunney J K , Ho C S , Wysocki M , et al . Molecular genetics of the swine major histocompatibility complex , the SLA complex[J] . Dev Comp Immunol , 2009 , 33 : 362–374 .
- [25] 马晓茜, 刘至治, 李思发, 等 . 团头鲂主要组织相容性复合体 I 类基因全长 cDNA 的克隆及组织表达分析[J] . 上海海洋大学学报 , 2011 , 20(1) : 34–43 .
- [26] Matsuo M Y , Aaskawa S , Shimizu N , et al . Nucleotide sequence of the MHC class I genomic region of a teleost , the medaka (*Oryzias latipes*)[J] . Immunogenetics , 2002 , 53 : 930–940 .

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 王 库