



稀有鮡鲫 *MHC II β* 基因克隆及鲁氏耶尔森菌感染后的表达分析

郑宗林^{1*}, 张进¹, 徐靖琳¹, 刘伟¹, 于文博¹,
方媛林¹, 张景森¹, 段聪², 周朝伟¹

(1. 西南大学水产学院, 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 重庆 402460;

2. 重庆市珍稀特有鱼类国家级自然保护区管理处, 重庆 402260)

摘要: 为探究稀有鮡鲫 *MHC II β* 基因的分子特征及其表达特点, 采用 PCR 扩增技术获得了稀有鮡鲫 *MHC II β* cDNA 序列 810 bp, 包括开放阅读框 (ORF) 759 bp, 编码 252 个氨基酸。生物信息分析表明, *MHC II β* 氨基酸序列存在 4 个保守的半胱氨酸残基和 GXXGXXXGXXXXXXG 结构, 与其他亲缘鱼类的一致性为 51.78%~80.56%, 其编码的蛋白质分子包括 1 个信号肽、1 个 *MHC II β* (β -1) 结构域、1 个 *IGc1* (β -2) 结构域和 1 个跨膜螺旋区域。实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 结果显示, *MHC II β* 在脾脏表达量最高, 头肾、鳃、皮肤表达量较高。人工感染鲁氏耶尔森菌后, 6 h 时在头肾表达呈显著上调, 肝脏中在 12 h 开始出现极显著上调, 皮肤中在 24 h 和 48 h 表达极显著, 鳃中在 6~24 h 表达极显著, 脾脏中则是在 6 h 出现极显著下调, 于 96 h 接近对照组表达水平。初步研究表明, *MHC II β* 在鱼类抵御细菌感染的免疫反应中发挥着重要作用, 为进一步揭示稀有鮡鲫 *MHC* 家族的功能提供了参考依据。

关键词: 稀有鮡鲫; *MHC II β* ; 细菌感染; 基因表达

中图分类号: Q 786; S 941.42

文献标志码: A

主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, *MHC*) 是一个参与脊椎动物机体免疫的基因家族, 具有丰富的等位基因位点, 这种多态性可使每个个体结合并呈递相当数量的抗原多肽, 从而为易感性/抗感性基因的筛选与标记提供依据^[1]。*MHC* 基因编码形成细胞表面糖蛋白, 并与内源抗原或外源抗原结合, 将抗原呈递给 $CD8^+$ T 淋巴细胞或 $CD4^+$ T 淋巴细胞的 T 细胞受体识别, 从而引起适应性免疫反应^[2]。根据 *MHC* 基因结构和功能的差异, 可划分为 I 类、II 类和 III 类 3 个亚家族, 其中, *MHC II β* 基因编码的跨膜糖蛋白可构成 *MHC II* 类分子, 间接参与 *MHC*

II—抗原多肽复合物的形成, 使得 $CD4^+$ T 淋巴细胞结合主要来自寄生虫、细菌、病毒等外源性抗原多肽, 从而触发细胞外病原的免疫反应^[3]。相关研究结果表明, 在黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*)^[4]、西伯利亚鲟 (*Acipenser baeri*)^[5]、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)^[6] 等水产动物中, *MHC II β* 基因在应对细菌感染或病原菌刺激后的免疫应答方面发挥着十分重要的作用。

稀有鮡鲫 (*Gobiocypris rarus*), 隶属于鲤形目 (Cypriniformes) 鲤科 (Cyprinidae) 鮡鲫属 (*Gobiocypris*), 具有生活史周期短、环境适应能力强、对环境毒物敏感性较高的优点。现稀有鮡鲫已基

收稿日期: 2022-10-03 修回日期: 2022-12-20

资助项目: 西南大学博士基金 (SWU114025)

通信作者: 郑宗林 (照片), 从事水生动物疾病学研究, E-mail: 290499294@qq.com



本实现实验动物标准化, 是我国代表性的本土模式生物之一, 在遗传学、病理学、生理学、生态毒理学等学科领域有着广泛研究^[7]。然而与斑马鱼(*Danio rerio*)、青鳉(*Oryzias latipes*)、金鱼(*Carassius auratus auratus*)等模式鱼类相比, 稀有鮰鲫在免疫基因方面的研究数据相对较少^[8], 限制其在免疫防御研究领域的应用。本研究首先克隆了稀有鮰鲫 *MHC II β* 基因, 分析其基因结构、系统进化关系和功能结构域, 其次通过人工感染鲁氏耶尔森菌建立的感染模型, 分析稀有鮰鲫 *MHC II β* 类基因在免疫组织中的相对表达情况, 为揭示稀有鮰鲫的免疫应答、响应特征及适应机制提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

稀有鮰鲫, 由西南大学淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室惠赠。稀有鮰鲫亲本共 9 对, 按照雌雄各 1 尾配对放入独立的鱼缸中饲养, 水温 (24±1) °C, 溶解氧 ≥6.3 mg/L, 光周期为 14 L : 10 D, 每间隔 48 h 换水三分之一。为减少因饲养条件所导致的个体差异以及满足实验所需的动物数量, 采用干法授精方式进行人工繁殖, 子一代在 4 个月后达到性成熟, 随机捞取健康鱼 5 尾冰上麻醉, 将其解剖后分离脑、鳃、心脏、皮肤、头肾、肝脏、肠、眼、脾脏、卵巢共 10 个组织于液氮速冻。

1.2 建立人工感染模型

鲁氏耶尔森菌 (*Yersinia ruckeri*) 由西南大学水产学院水产动物病害防治研究室提供, 使用 LB 液体培养基活化菌株后, 采用麦氏比浊法和平板菌落计数法确定菌液浓度。通过预实验确定正式实验的半致死浓度为 3.16×10^5 CFU/mL。将 160 尾健康鱼 (子一代) 随机分为对照组、实验组, 每组 80 尾鱼, 实验组稀有鮰鲫采用腹腔注射的方式注射 10 μ L 鲁氏耶尔森菌, 对照组稀有鮰鲫注射同体积无菌生理盐水。实验组分别在 6 个时间点 (6、12、24、48、72 和 96 h), 随机选取 3 尾鱼分离脾脏、鳃、皮肤、肝脏和头肾组织并液氮速冻, 用于感染后 *MHC II β* 基因表达变化研究。

1.3 总 RNA 的提取及 cDNA 模板的制备

各组织总 RNA 提取方法参照 TaKaRa Min-

iBEST Universal RNA Extraction Kit (TaKaRa, 大连) 说明书, $w=1\%$ 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 通过 NanoDrop (ND-ONE-W, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比率, 1.90~2.05) 测定 RNA 质量。使用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa, 大连) 反转录合成第一条链 cDNA。

1.4 稀有鮰鲫 *MHC II β* 基因克隆

根据已知报道中与稀有鮰鲫亲缘性较高的鱼类^[9], 在 Nucleotide (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) 中下载其对应基因序列, 利用 DNAMAN 6.0.39 软件比对高度保守区并设计引物 (表 1), 以反转录合成的 cDNA 文库为模板, 扩增稀有鮰鲫 *MHC II β* 目的片段。PCR 反应产物用 1% 浓度琼脂糖凝胶电泳进行检测, 并切胶回收目的条带。回收条带先与 Ex Taq 连接酶反应, 再导入 PMD 19-T 载体, 最后转化到 TOP 10 感受态细胞中, 挑取阳性克隆菌株, 培养后送生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。

表 1 本研究所用的主要引物

Tab. 1 Primers used in the study

引物名称 primer names	引物序列 primer sequence
<i>MHC IIβ-F1</i>	GGACAGTCACAGTCAGAGAA
<i>MHC IIβ-R1</i>	CAGTTGAGGTCACATCAGTCT
<i>MHC IIβ-F2</i>	CAGTGCTTACCCTTCTACC
<i>MHC IIβ-R2</i>	TGAATCCTCTCCAGTCAGTCT
<i>β-action F</i>	CTATGTTGGTGACGAGGCTCA
<i>β-action R</i>	CCCAGTTGGTGACAATACCG
<i>MHC IIβ-RT-F</i>	CCTGGAGTACACCCCAAAT
<i>MHC IIβ-RT-R</i>	GATCCCAGCACCAGACCAG

1.5 基因序列分析和系统进化树的构建

测序结果运用 DNAMAN 6.0.39 进行拼接, 运用 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 查找开放阅读框、推导氨基酸序列。Signal IP 4.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-4.1>) 预测信号肽。使用 ExPASy 服务器的 NetNGlyc 1.0 server (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetNGlyc-1.0>) 和 NetPhos 3.1 server (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1>) 分别进行 N-糖基化位点和磷酸化位点的预测。使用 SMART 在线软件 (<https://smart.>

embl.de/) 预测蛋白结构域。在 GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 数据库中下载亲缘物种 *MHC II β* 的氨基酸序列。以 MEGA 7.0 的邻位相接法构建系统进化树, 并选择 Bootstrap method 重复为 1 000 次, 计算分支上的置信度。

1.6 组织表达特异性分析

根据已验证获得 *MHC II β* 的模板序列, 设计荧光定量特异性引物, 并结合实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 法检测脑、鳃、心脏、皮肤、头肾、肝脏、肠、眼、肌肉、卵巢等组织中基因表达情况, 以 β -actin 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达量。测定试剂为 SYBR Green (TaKaRa, 大连), 建立 20 μ L 反应体系: TB Green 10 μ L, 上下游引物、Rox II 各 0.4 μ L, cDNA 模板 2 μ L, 灭菌水 6.8 μ L, 每个样品均设置 3 个技术性重复。反应参数为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 45 个循环。

2 结果

2.1 稀有鮟鮓 *MHC II β* 基因的克隆及序列分析

通过设计的特异性引物, 以稀有鮟鮓肠道 cDNA 文库为模板扩增, 经克隆、测序拼接后, 得到 810 bp 的 *MHC II β* 片段, 使用 ORF Finder 查询到开放阅读框的长度为 759 bp, 共编码 252 个氨基酸 (图 1), 预测其编码的蛋白质的分子量大小为 28.13 ku, 等电点 (pI) 为 8.74。氨基酸序列中 1~24 为信号肽, 31~106 为 *MHC II β (β -1)* 结构域, 131~202 为 *IGc1(β -2)* 结构域, 219~240 为跨膜螺旋区域, N-糖基化位点位于第 60 位, 包含 26 个磷酸化位点。

2.2 *MHC II β* 氨基酸序列的系统进化分析

为进一步阐明稀有鮟鮓 *MHC II β* 基因的进化关系, 从 GenBank 下载其他物种的 *MHC II β* 氨基酸序列, 通过邻接法构建系统发育树, 结果显示, 稀有鮟鮓 *MHC II β* 基因与团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) *MHC II β* 基因亲缘程度最高, 与虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、长吻鮠 (*Leiocassis longirostris*) 的进化关系较近且在一个分支内, 而与哺乳类、两栖类、鸟类之间亲缘关系较远 (图 2)。

2.3 *MHC II β* 氨基酸序列的同源性分析

通过 NCBI 数据库下载不同物种 *MHC II β* 的氨基酸序列, 对稀有鮟鮓 *MHC II β* 氨基酸序列与不同物种的同源性差异进行了分析比较, 检索发现稀有鮟鮓 *MHC II β* 与团头鲂相似度最高, 为 80.56%, 斑马鱼次之为 64.57%, 与欧洲鲈为 51.78%, 而与小鼠一致性最低为 27.82% (图 3)。同源性结果分析表明, *MHC II β* 在不同动物中均具有保守性。

2.4 *MHC II β* 基因的组织表达分析

以反转录合成的第一条链 cDNA 为模板, 以 β -actin 为内参基因, 通过 qRT-PCR 分析了健康稀有鮟鮓各个组织 *MHC II β* 基因的表达差异, 将 *MHC II β* 基因在心脏组织的表达水平设为 1, 结果显示, 脾脏表达量最高, 头肾、鳃、皮肤表达量较高, 心脏表达水平较低, 肝脏、肠道、脑、眼、卵巢表达水平最低 (图 4)。

稀有鮟鮓被鲁氏耶尔森菌感染后, 不同免疫组织 (肝脏、皮肤、鳃、头肾、脾脏) 中 *MHC II β* mRNA 水平发生了不同程度的变化。从图 5 可知, 肝脏中 *MHC II β* 的表达量最高的时间点出现在感染后的 12 h ($P < 0.01$), 随后逐渐降低并低于正常水平, 但 96 h 高于正常水平; 皮肤中 *MHC II β* 的表达量在 6 h 开始升高, 在 24 h 达到峰值 ($P < 0.05$), 随后逐渐降低且 72 h 为最低值 ($P < 0.01$), 在 72~96 h 逐渐升高且低于正常水平; 脾脏 6 h 时表达水平极显著下降 ($P < 0.01$), 24 h 表达水平降到最低 ($P < 0.01$), 之后表达水平逐渐升高, 在 96 h 时接近正常水平 ($P < 0.05$)。鳃 *MHC II β* 的表达水平在 6~24 h 呈上升趋势, 24 h 达到峰值 ($P < 0.01$), 随后逐渐降低, 但 96 h 高于正常水平。头肾被感染 6 h 时表达水平最高 ($P < 0.05$), 随后逐渐降低至 24 h ($P < 0.05$), 48~96 h 表达量恢复到 0 h 时相当水平, 表明鲁氏耶尔森菌胁迫下 *MHC II β* 基因在不同组织的应答时间和表达水平存在差异。

3 讨论

3.1 *MHC II β* 基因生物信息学分析

通过氨基酸序列分析发现, 稀有鮟鮓 *MHC II β* 序列具有已知物种 β -1 和 *IGc1(β -2)* 结构域的 4 个保守半胱氨酸残基和 N-糖基化位点。半胱氨酸的存在有利于分子内二硫键的形成, 而 N-糖基化位点的存在会影响 *MHC II* 类分子 α - β 二聚体的

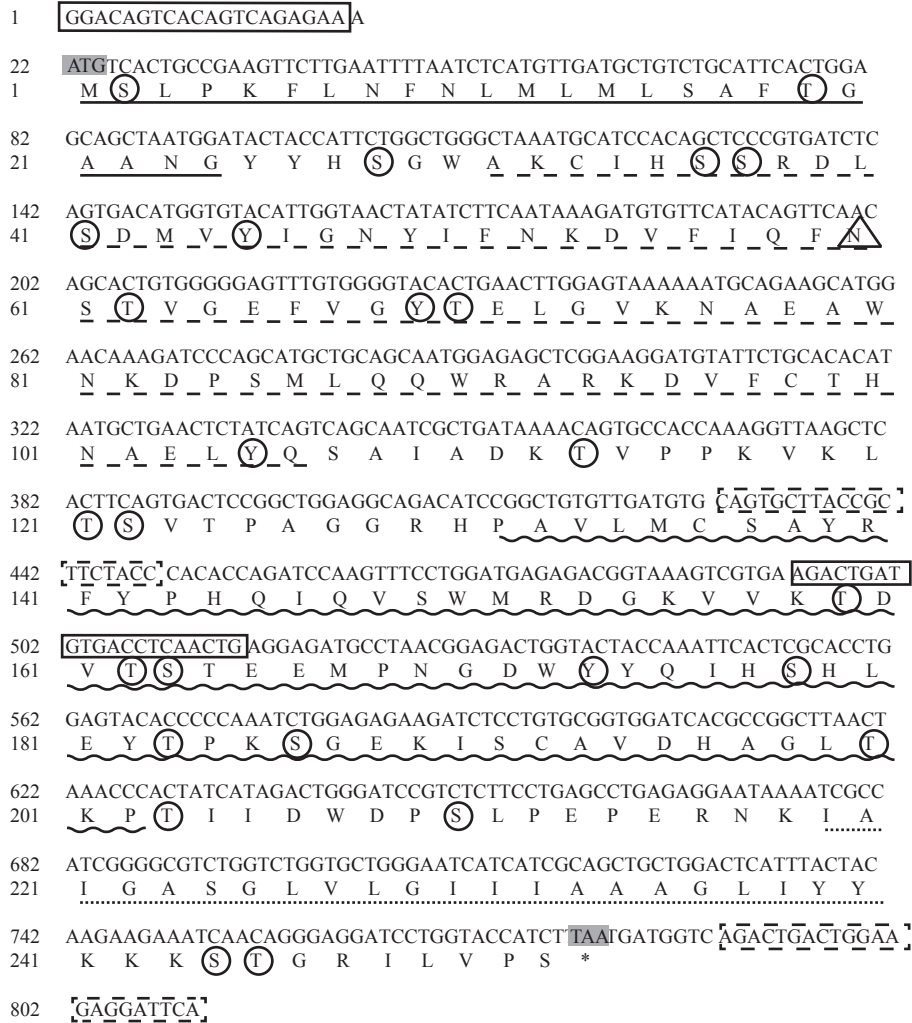


图 1 稀有鮟鲫 MHC II β 基因部分 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列

起始密码子 (ATG) 和终止密码子 (TAA) 分别用灰色底框表示; 三角形代表预测的 N-糖基化位点; 圆表示预测的磷酸化位点; 下划线部分为信号肽区域; MHC II β 结构域用虚下划线标示; IGc1 结构域用波浪线标示; 跨膜结构域用点式下划线标示; 实线方框表示 MHC II β-F1 和 MHC II β-R1 引物识别位点; 虚线方框表示 MHC II β-F2 和 MHC II β-R2 引物识别位点。

Fig. 1 Partial cDNA sequence of MHC II β and its encoded amino acid sequence of *G. rarus*

The initiation codon (ATG) and stop codon (TAA) are indicated by grey bottom boxes, respectively; the triangle indicates the putative site for N-linked glycosylation; the circle indicates the putative site for phosphorylation; the putative signal peptide is underlined; MHC II β domain is indicated by dashed underline; IGc1 domain is indicated by wave line; transmembrane region is indicated by dot underline; the solid line boxes indicate the MHC II β-F1 and MHC II β-R1 primer recognition sites; the dotted boxes indicate the MHC II β-F2 and MHC II β-R2 primer recognition sites.

形成以及 MHC 分子与 T 细胞的相互作用^[10]。根据氨基酸序列的多重序列比对结果, 稀有鮟鲫与鲤科鱼类具有较高的相似性, 与两栖类和哺乳类的氨基酸序列相似性较低, 说明稀有鮟鲫 MHC II β 基因的氨基酸序列与亲缘关系较近物种的氨基酸功能结构域具有高度的保守性, 其中的 β-1 和 IGc1(β-2) 亚基多位于抗原呈递细胞表面, 如 B 淋巴细胞、树突状细胞、T 淋巴细胞, 具有高度多态性, 发挥着外源性抗原识别与呈递的重要作用^[11]。序列对比还发现, 稀有鮟鲫 MHC II β 基因

氨基酸序列具有与其他鱼类相同特征的 GXXGXX XGXXXXXXG 序列结构, 这被认为是 MHC II 类分子中彼此正确相互作用的重要因素^[12], Cosson 等^[13]认为, 此结构中的 G 残基对 α-β 二聚体的形成起重要作用。从系统进化树的分支层次分析, 稀有鮟鲫与草鱼、斑马鱼和团头鲂的分支置信度较高且亲缘关系近, 与马和小鼠等哺乳动物的同源性较低且亲缘关系较远, 说明了脊椎动物之间的 MHC II β 同源性与其的亲缘关系一致, 同时 MHC II β 基因系统进化树基本反映了各脊椎

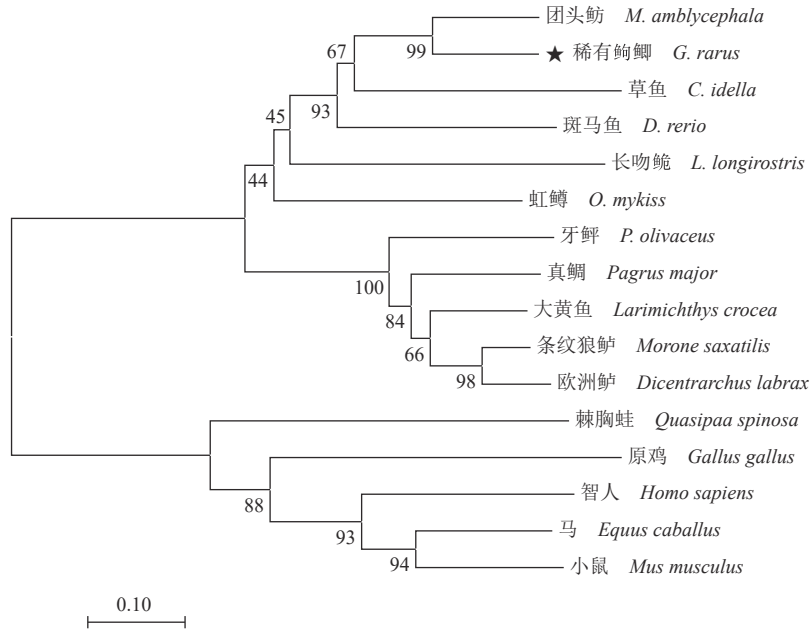


图 2 稀有鮕鲫 MHC II β 与其他物种 MHC II β 的系统进化树

稀有鮕鲫; 团头鲂 (AGV52144.1); 草鱼 (AEM75094.1); 斑马鱼 (NP_001007207.2); 长吻鲢 (ADK38668.1); 虹鳟 (AAD53026.1); 牙鲆 (AII02004.1); 真鲷 (A-AP20186); 大黄鱼 (ABV48909.1); 条纹狼鲈 (AAA49380.1); 欧洲鲈 (CAJ34344); 棘胸蛙 (AHN50435.1); 原鸡 (AAS00716.1); 智人 (AAA59777.1); 马 (AAA66940.1); 小鼠 (AAD31755.1)。

Fig. 2 Phylogenetic tree based on the sequence of *G. rarus* MHC II β and MHC II β from other species

G. rarus; *M. amblycephala* (AGV52144.1); *C. idella* (AEM75094.1); *D. rerio* (NP_001007207.2); *L. longirostris* (ADK38668.1); *O. mykiss* (AAD53026.1); *P. olivaceus* (AII02004.1); *Pagrus major* (A-AP20186); *Larimichthys crocea* (ABV48909.1); *Morone saxatilis* (AAA49380.1); *Dicentrarchus labrax* (CAJ34344); *Quasipaa spinosa* (AHN50435.1); *Gallus gallus* (AAS00716.1); *Homo sapiens* (AAA59777.1); *Equus caballus* (AAA66940.1); *M. musculus* (AAD31755.1).

动物在经典分类系统中的地位。

3.2 MHC II β 基因的组织表达

Kaastrup 等^[14]通过鲤 (*Cyprinus carpio*) 皮肤移植实验, 证实了鱼类具有类似于高等脊椎动物 MHC 的免疫调节系统。随后开展的多种鱼类研究表明, 脾脏、鳃和头肾等组织中 MHC II β 基因的表达量较其他组织具有显著差异性^[15-16]。Juul-Madsen 等^[17]在虹鳟的脾脏与头肾中检测到 MHC II β 基因的表达信号, 而在心脏和肝脏没有获得数据。Ono 等^[18]从鲤的胰腺、脾脏、头肾和肠道等已知有大量造血(淋巴)细胞的器官中检测到了 MHC II β 基因的表达, 从心脏、骨骼肌、大脑和卵巢未检测到该基因的表达。Koppang 等^[19]在研究大西洋鲑 (*Salmo salar*) 时, 发现头肾、脾脏、后肠和鳃均有较高水平表达, 心脏、肝脏和前肠呈中等水平表达, 而脑和肌肉的表达水平低或可忽略。本研究表明, 稀有鮕鲫 MHC II β 在各个组织中均检测到表达水平, 但具有一定的组织特异性: 脾脏表达量最高, 头肾、鳃、皮肤呈中等程

度表达, 心脏的表达量较低, 而肝脏、肠道、脑、眼和卵巢的表达量是极低的。脾脏和头肾均是鱼类淋巴系统组织发生中主要的免疫器官, 在适应性免疫和先天性免疫发挥着重要作用^[20], 头肾不依赖抗原刺激就可产生 B 淋巴细胞, 脾脏则是鱼类中性粒细胞、红细胞进行产生、贮存和成熟的主要场所, 本研究与 MHC II β 在团头鲂^[21]、卵形鲳鲹 (*Trachinotus ovatus*)^[22]、西伯利亚鲟^[5] 头肾和脾脏组织表达水平结果较相似。鳃、皮肤中包含淋巴细胞、巨噬细胞和各类粒细胞, 是黏膜免疫系统的组成部分, 表明两者具有识别、处理和呈递抗原的细胞基础^[23-24]。因此, MHC II β 在不同免疫器官中较高水平表达说明了 MHC II β 对参与免疫响应机制的重要性。

3.3 鲁氏耶尔森菌感染后 MHC II β 基因的表达模式

MHC II β 分子分布在淋巴细胞等抗原呈递细胞表面, 而在病毒、细菌等外源性抗原的刺激下, 会形成 MHC II β -抗原多肽复合物并呈递给 T 淋巴

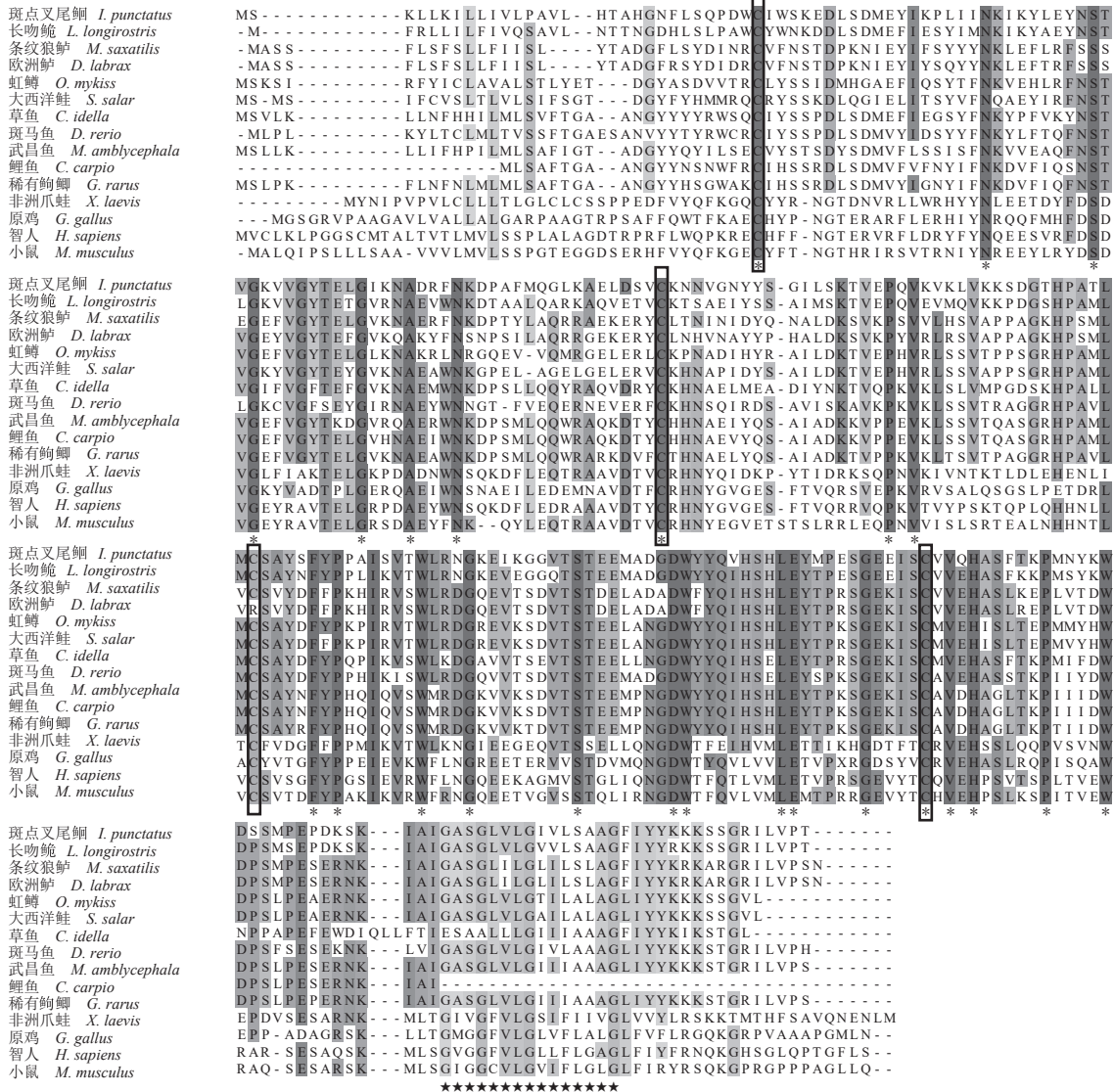


图3 MHC II β氨基酸序列多重比对

阴影部分表示列表中 70% 以上的多肽残基序列都是保守的; *表示氨基酸序列完全一致; 方框表示 4 个保守的半胱氨酸残基; --表示氨基酸的缺失; ★表示 GXXGXXXGXXXXXXG 框。

Fig. 3 Alignment of the amino acid sequences of MHC II β

Residues that are conserved in more than 70% of the listed peptides are shadowed; Identical amino acid is indicated by an asterisk; The Boxes indicate 4 conserved cysteine residues; Gaps used to maximize the alignment are shown by dashes; the black five pointed star designates the motifs of GXXGXXXGXXXXXXG.

细胞激活特异性免疫反应^[25]。Li 等^[26] 在圆斑星鲈 (*Verasper variegatus*) 被鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 感染后, 发现肝脏和血液分别在 4 和 16 h 出现显著上调。Zhang 等^[27] 对大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 用鳃弧菌攻毒后, 肝脏和头肾感染后 24~48 h 中 MHC IIβ mRNA 的表达显著降低, 随后上升, 脾脏在感染后 24~72 h 内 MHC IIβ mRNA 的表达显著下降。Xu 等^[12] 在鳊 (*Miichthys miiuy*) 用鳃弧菌感染过后, 脾脏、肝脏、肾脏中 MHC IIβ 变化

趋势相似, 在感染后的 6~36 h 内都呈先上升后下降的趋势, 并且在 12 h 时达到峰值, 36~72 h 又再次呈上升趋势。在尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 中, 嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 与无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 的感染都能够引起 MHC IIβ 基因的显著上调, 其中嗜水气单胞菌主要引起在肝脏、鳃和头肾中的表达上调, 而无乳链球菌能够引起在鳃、头肾、肠和脾脏中的上调^[28-29]。本研究显示, 稀有鮟鲫在感染鲁氏耶尔

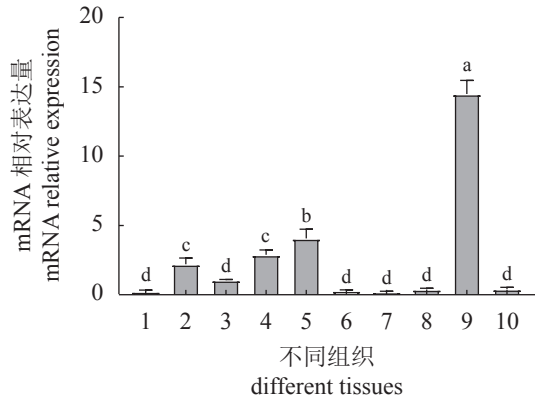


图4 稀有鮕鲫 MHC II β mRNA 的组织分布

1. 肝脏, 2. 头肾, 3. 心脏, 4. 鳃, 5. 皮肤, 6. 肠, 7. 脑, 8. 眼, 9. 脾脏, 10. 卵巢; 不同字母者表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 4 Tissue expression of MHC II β mRNA of *G. rarus*

1. liver, 2. head kidney, 3. heart, 4. gill, 5. skin, 6. intestine, 7. brain, 8. eye, 9. spleen, 10. ovary; different letters mean significantly difference ($P < 0.05$).

森菌后, MHC II β mRNA 水平发生了明显变化, 且在不同组织中有显著差异。在 6 h 时, 头肾 MHC II β 首先出现显著上调并达到峰值, 之后降低并在 24 h 为最低值 (为 0 h 的 0.12 倍), 随后在 96 h 接近正常水平。Zhang 等^[27] 发现用鳗弧菌感染后大菱鲆肝脏和头肾组织 MHC II β 表达在 24~48 h 显著降低, 96 h 后恢复正常水平, 认为半致死浓度的致病菌在早期就会发生对细胞功能的关键干扰, 也体现出肝脏和头肾是 MHC II β 功能的重要敏感组织。同时, 作为硬骨鱼类主要免疫器官的头肾对抗原刺激能够快速反应, 其存在的抗体产生细胞出现增殖促进了特异性免疫反应。在 12 h 时, 肝脏 MHC II β 表达水平极显著上调, 且出现最大表达量 (为 0 h 的 91 倍), 随后 24 h ($P < 0.01$) 至 48 h 逐渐降低, 96 h 仍有显著上调变化。周芬娜^[30] 发现在尼罗罗非鱼注射嗜水气单胞菌后, 肝脏组织在 24 h 内首先呈现明显的上升趋势, 24 h 到 48 h 间迅速下降, 48 h 后又开始缓慢

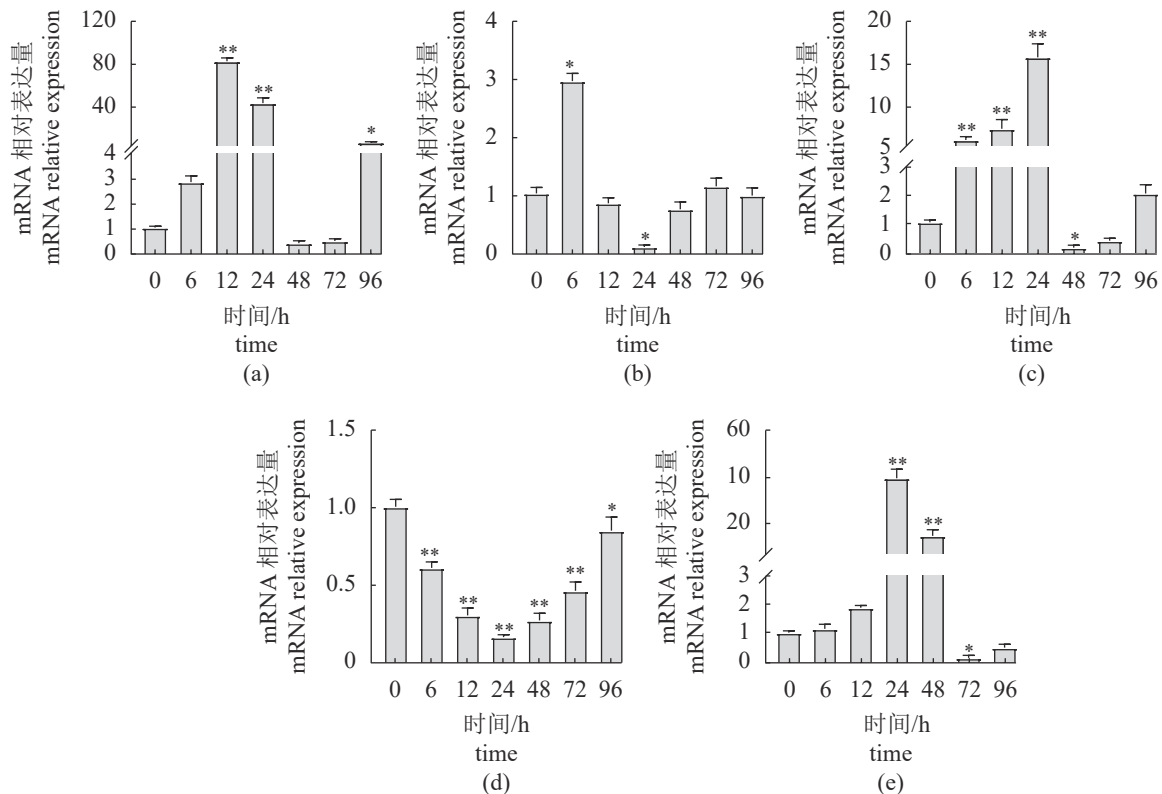


图5 注射鲁氏耶尔森菌后稀有鮕鲫 MHC II β 在肝脏 (a)、头肾 (b)、鳃 (c)、脾脏 (d)、皮肤 (e) 的表达量变化 *表示实验组与对照组的表达量有差异显著 ($P < 0.05$); **表示实验组与对照组的表达量有极差异显著 ($P < 0.01$)。

Fig. 5 Expression changes of MHC II β mRNA in liver (a), head kidney (b), gill (c), spleen (d) and skin (e) of *G. rarus* injected with *Y. ruckeri*

*means infection group expression level compared with control group has significant difference ($P < 0.05$); **means infection group expression level compared with control group has extremely significant difference ($P < 0.01$).

上升, 96 h 表达量高于正常水平, 认为肝脏 *MHC II β* 表达水平的变化体现了机体在对病原菌入侵的应答过程。在 24 h 内, 皮肤和鳃表达量逐渐升高, 且 24 h 时出现极显著上调, 到 96 h 时两者无显著变化及接近正常表达水平, 这表明作为黏膜相关淋巴组织的皮肤和鳃, 会产生溶菌酶、免疫球蛋白、蛋白酶等物质, 在清除细菌的非特异性免疫反应中也发挥着一定作用^[24]。在 96 h 内, 脾脏在感染后出现先降低后升高的趋势, 且变化显著, 96 h 接近正常表达水平, 说明 *MHC II β* 的表达水平在一段时间后逐渐被激活, 使得脾脏内特异性免疫调节机制开始发挥作用, Hansen 等^[31]发现虹鳟在感染传染性造血器官坏死病病毒 (infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV) 后, 头肾和脾脏中 *MHC II β* 的表达水平 72 h 内下调, 在 192 h 时部分恢复, 认为急性感染引起脾脏和头肾中生成 *MHC II β* 基因的细胞数量减少, 或者是由于病毒的诱导作用使得细胞迁移, 因此开始一段时间内表达量降低。值得注意的是, 头肾在 24 h 出现了与脾脏相似的显著下调和最低表达量, 这可能是由于大量繁殖的细菌对免疫器官产生了严重的破坏, 但具体作用机制仍需进一步研究。可见, *MHC II β* 表达水平的变化对机体免疫应答发挥着重要作用, 表明其在不断协助 B 淋巴细胞的增殖和细胞免疫因子的分泌, 这为稀有鮡鲫 *MHC* 家族在免疫防御研究领域的发展提供了参考依据。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 周欣, 高风英, 卢迈新. 鱼类抗病育种研究进展[J]. 大连海洋大学学报, 2021, 36(3): 510-523.
Zhou X, Gao F Y, Lu M X. Progress on breeding of disease resistant fishes: a review[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2021, 36(3): 510-523 (in Chinese).
- [2] Sommer S. The importance of immune gene variability (*MHC*) in evolutionary ecology and conservation[J]. *Frontiers in Zoology*, 2005, 2(1): 16.
- [3] Chen J S, Zhi T T, Xu X L, *et al.* Molecular characterization and dynamic expressions of three Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) complement genes after *Gyrodactylus cichlidarum* (Monogenea) infection[J]. *Aquaculture*, 2019, 502: 176-188.
- [4] 朱方正. 黄颡鱼 *MHC II* 的分子特征、多态性与表达分析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2020: 42-43.
Zhu F Z. Molecular characteristics, polymorphism and expression analysis of *MHC II* in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) *MHC* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020: 42-43 (in Chinese).
- [5] 田照辉, 徐绍刚, 胡红霞, 等. 西伯利亚鲟 *MHC II β* 基因克隆、组织分布及细菌感染后的表达变化[J]. 大连海洋大学学报, 2019, 34(1): 56-62.
Tian Z H, Xu S G, Hu H X, *et al.* Molecular cloning and expression of major histocompatibility complex class II β gene in tissues of Siberian sturgeon *Acipenser baerii*[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2019, 34(1): 56-62 (in Chinese).
- [6] 张玉喜, 陈松林. 牙鲆 *MHC class II B* 基因多态性及其与鱼体抗病力关系的分析[J]. 水产学报, 2006, 30(5): 633-639.
Zhang Y X, Chen S L. Major histocompatibility complex class IIB allel polymorphism and its association with resistance/susceptibility to *Vibrio anguillarum* in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2006, 30(5): 633-639 (in Chinese).
- [7] 王剑伟, 曹文宣. 中国本土鱼类模式生物稀有鮡鲫研究应用的历史与现状[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(2): 20-33.
Wang J W, Cao W X. *Gobiocypris rarus* as a Chinese native model organism: history and current situation[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2017, 12(2): 20-33 (in Chinese).
- [8] 吴晟旻, 张圣虎, 吉贵祥, 等. 稀有鮡鲫作为水生模式生物的研究及探讨[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(6): 38-46.
Wu S M, Zhang S H, Ji G X, *et al.* Research and discussion of rare minnow as an aquatic model organism[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2017, 12(6): 38-46 (in Chinese).
- [9] 饶海鸥, 查金苗, 王子健, 等. 稀有鮡鲫细胞凋亡相关基因的克隆及序列分析[J]. 生态毒理学报, 2013, 8(1): 105-110.
Rao H O, Zha J M, Wang Z J, *et al.* Cloning and sequence analysis of genes involved in cell apoptosis of rare minnow (*Gobiocypris rarus*)[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2013, 8(1): 105-110 (in Chinese).
- [10] Nag B, Passmore D, Kendrick T, *et al.* N-linked oligosaccharides in *Gobiocypris rarus* [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2003, 26(1): 1-10.
中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- gosaccharides of murine major histocompatibility complex class II molecule[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(31): 22624-22629.
- [11] 邓捷, 王启军, 姜维, 等. 大鲵MHC II B基因SNP位点筛选及与抗虹彩病毒性状关联分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(3): 1047-1053.
- Deng J, Wang Q J, Jiang W, *et al.* SNP screening and association with iridovirus resistance of MHC IIB gene in chinese giant salamander (*Andrias davidanus*)[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2020, 39(3): 1047-1053 (in Chinese).
- [12] Xu T J, Sun Y N, Shi G, *et al.* Characterization of the major histocompatibility complex class II genes in *miyu croaker*[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23823.
- [13] Cosson P, Bonifacino J S. Role of transmembrane domain interactions in the assembly of class II MHC molecules[J]. *Science*, 1992, 258(5082): 659-662.
- [14] Kaastrup P, Stet R J M, Tigchelaar A J, *et al.* A major histocompatibility locus in fish: serological identification and segregation of transplantation antigens in the common carp (*Cyprinus carpio L.*)[J]. *Immunogenetics*, 1989, 30(4): 284-290.
- [15] 于辉, 李波, 李华, 等. 鱼类主要组织相容性 II 类基因的研究进展[J]. *中国水产科学*, 2007, 14(2): 336-342.
- Yu H, Li B, Li H, *et al.* Progress on major histocompatibility class II genes in fish[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(2): 336-342 (in Chinese).
- [16] 董忠典, 周芬娜, 王慧. MHC基因的遗传变异及其与鱼类抗病性研究进展[J]. *水生态学杂志*, 2011, 32(2): 6-10.
- Dong Z D, Zhou F N, Wang H. Research advances of MHC genetic variation and disease resistance of fish[J]. *Journal of Hydroecology*, 2011, 32(2): 6-10 (in Chinese).
- [17] Juul-Madsen H R, Glamann 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.
- [18] Ono H, O'Huigin C, Vincek V, *et al.* New β chain-encoding Mhc class II genes in the carp[J]. *Immunogenetics*, 1993, 38(2): 146-149.
- [19] Koppang E O, Rnningen M, Press C M, *et al.* Differing levels of MHC class II β chain expression in a range of tissues from vaccinated and non-vaccinated Atlantic salmon (*Salmo salar L.*)[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 1998, 8(3): 183-196.
- [20] 孙德文, 詹勇, 许梓荣. 鱼类免疫系统研究进展[J]. *水利渔业*, 2002, 22(6): 17-19.
- Sun D W, Zhan Y, Xu Z R. Research progress in the immune system of fish[J]. *Journal of Hydroecology*, 2002, 22(6): 17-19 (in Chinese).
- [21] 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 (*Megalobrama amblycephala*)[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2014, 42(2): 169-173.
- [22] 张小其, 孙云, 周永灿, 等. 卵形鲳鲹MHC II α 及MHC II β 组织特异性表达分析[J]. *海南大学学报(自然科学版)*, 2018, 36(2): 101-109.
- Zhang X Q, Sun Y, Zhou Y C, *et al.* Expression analysis of MHC II α and MHC II β of golden pompano (*Trachinotus ovatus*)[J]. *Natural Science Journal of Hainan University*, 2018, 36(2): 101-109 (in Chinese).
- [23] Lazado C C, Caipang C M A. Mucosal immunity and probiotics in fish[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2014, 39(1): 78-89.
- [24] 罗晓春, 谢明权, 黄玮, 等. 鱼类粘膜免疫研究进展[J]. *水产学报*, 2005, 29(3): 411-416.
- Luo X C, Xie M Q, Huang W, *et al.* Review of fish mucosal immunity research[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(3): 411-416 (in Chinese).
- [25] Hoorn D V T, Paul P, Jongsma L M, *et al.* Routes to manipulate MHC class II antigen presentation[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2011, 23(1): 88-95.
- [26] 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 and Biochemistry*, 2011, 37(4): 767-780.
- [27] 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.
- [28] 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.

- [29] Zhou F N, Dong Z D, 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.
- [30] 周芬娜. 尼罗罗非鱼 *MHC* 基因的克隆、表达及多态性研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2012.
- Zhou F N. Molecular cloning, expression and polymorphism analysis of *MHC* gene of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2012 (in Chinese).
- [31] 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.

Cloning of the *MHC* II β gene in *Gobiocypris rarus* and expression analysis after *Yersinia ruckeri* infection

ZHENG Zonglin^{1*}, ZHANG Jin¹, XU Jinglin¹, LIU Wei¹, YU Wenbo¹,
FANG Yuanlin¹, ZHANG Jingsen¹, DUAN Cong², ZHOU Chaowei¹

(1. Key Laboratory Freshwater Fish Reproduction and Development, Ministry of Education, College of Fisheries, Southwest University, Chongqing 402460, China;

2. Chongqing National Nature Reserve Management Office of Rare and Endemic Fish, Chongqing 402260, China)

Abstract: In order to explore the molecular characteristics and expression characteristics of the rare minnow *MHC* II β gene, the 810 bp cDNA sequence of the rare minnow *Gobiocypris rarus* *MHC* II β was obtained by PCR amplification technology, including an open reading frame (ORF) of 759 bp, encoding 252 amino acids (aa). Bioinformatics analysis showed that there were four conserved cysteine residues and a GXXGXXXGXXXXXXG structure in the amino acid sequence of *MHC* II β , and the consistency with other relative fish was 51.78%-80.56%. The encoded protein molecules included a signal peptide, a *MHC* II β (β -1) domain, a *IGc1* (β -2) domain and a transmembrane helical region. Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) results showed that the expression of *MHC* II β gene was the highest in spleen, and higher in head kidney, gill and skin. After artificial infection with pathogenic bacteria, *Yersinia ruckeri*, the expression of head kidney was significantly up-regulated at 6 h, and liver was significantly up-regulated at 12 h, skin was significantly up-regulated at 24 h and 48 h, gill was significantly up-regulated at 6 to 24 h, and spleen was significantly down-regulated at 6 h, and approached the expression level of the control group at 96 h. The results show that *MHC* II β plays an important role in immune response, which provides reference for further revealing the regulatory mechanism of *MHC* family immune defense.

Key words: *Gobiocypris rarus*; *MHC* II β ; bacterial infections; gene expression

Corresponding author: ZHENG Zonglin. E-mail: 290499294@qq.com

Funding projects: The Doctoral Fund Project of Southwest University (SWU114025)