

“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

李雪松¹, 刘至治^{1*}, 赵雪锦¹, 马晓茜¹, 冯维¹, 王成辉^{2*}

(1. 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;

2. 上海海洋大学农业部水产种质资源与利用重点开放实验室, 上海 201306)

摘要: 利用一对特异性引物 DABF 和 DABR, 分别从 21 尾感病和 16 尾抗病“全红”体色瓯江彩鲤的 cDNA 中, 扩增出长度为 624 bp 的 MHC-DAB 基因片段。共测序 185 个有效克隆, 获得 76 个不同的核苷酸序列。MHC-DAB 基因片段包括第 1~4 外显子, 分别编码信号肽、 $\beta 1$ 和 $\beta 2$ 结构域及跨膜区。长度为 276 bp 的 $\beta 1$ 结构域有 144 个核苷酸变异位点 (52.17%) 和 70 个氨基酸变异位点 (76.07%), 而长度为 282 bp 的 $\beta 2$ 结构域只有 98 个核苷酸变异位点 (34.75%) 和 50 个氨基酸变异位点 (53.19%), 显示 $\beta 1$ 结构域的变异要明显大于 $\beta 2$ 结构域。在 $\beta 1$ 结构域的 24 个抗原结合位点 (PBR) 上, 有 23 个发生了变异。 $\beta 1$ 结构域的 PBR、非抗原结合位点 (non-PBR) 及 $\beta 2$ 结构域的 ω 值 ($\omega = d_N/d_S$) 分别为 1.367、0.886 和 0.754, 表明“全红”体色瓯江彩鲤 MHC-DAB 基因 (特别是 $\beta 1$ 结构域) 在进化过程中受到正向选择作用。在所得的 20 个不同的等位基因中, 基因 DAB3 * 15 在抗病群体中出现的频率 (13.75%) 显著高于感病群体中出现的频率 (3.81%) ($P < 0.05$); 基因 DAB3 * 09 和 DAB3 * 10 的出现频率都为 3.75% ($P < 0.05$), 仅存在于抗病群体中; 而基因 DAB3 * 02 和 DAB3 * 14 的出现频率分别为 7.62% ($P < 0.05$) 和 8.57% ($P < 0.01$), 仅存在于感病群体中。

关键词: 瓯江彩鲤; 主要组织相容性复合体; 多态性; 抗病力

中图分类号: S 917

文献标志码: A

主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 是存在于脊椎动物体内与免疫功能密切相关的高度多态性基因群, 其编码的细胞表面糖蛋白广泛参与免疫应答的诱导和调节, 激发机体特异性免疫反应, 在免疫学上具有极为重要的意义^[1]。自 1990 年 HASHIMOTO 等^[2]首先在鲤 (*Cyprinus carpio*) 中报道 MHC 基因以来, 国内外学者已经对几十种鱼类的 MHC 进行了研究, 如大西洋鲑 (*Salmo salar*)^[3]、斑马鱼 (*Danio rerio*)^[4]、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)^[5]、团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*)^[6]、半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*)^[7] 和虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[8]

等。MHC 被认为不仅是最具多态性的基因^[9], 而且是一个与抗病相关的重要基因家族, 在许多物种中都发现其多态性与机体抗病力密切相关, 如鱼类中的虹鳟^[8]、大西洋鲑^[3]、牙鲆^[5]等。分析鱼类 MHC 基因多态性与抗病力之间的关系, 对于阐明鱼类抗病力的遗传基础具有重要意义。

瓯江彩鲤 (*Cyprinus carpio* var. *color*) 是分布于浙江省瓯江流域的一种地方性鲤科鱼类, 已有 1 200 余年的养殖历史。它不仅食用性能突出, 而且体色绚丽、鲜艳而丰富, 有“全红” (即全身体表均为红色)、“大花” (即红色体表镶嵌大块黑色斑纹)、“麻花” (即红色体表散布小块黑色斑点)、“粉玉” (即全身体表为粉玉色)、“粉花” (即粉白

收稿日期: 2011-04-18 修回日期: 2011-05-27

资助项目: 上海市教育委员会科研创新基金 (11YZ152); 国家公益性行业科研专项 (200903045); 上海市水生生物学重点学科建设项目 (S070301)

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

色体表镶嵌大块黑色斑纹)5种基本体色。自1999年以来,国内有关学者对瓯江彩鲤的种质资源与开发利用进行了持续研究^[10-13]。至2009年,5种体色瓯江彩鲤已完成第五代(F_5)的选育工作,其体色纯度和生长速度、形态性状等均已取得了明显的选育效果。在此基础上,筛选抗病相关基因标记、培育抗病优良品种,是研究者和生产者极为关心的问题。本研究以“全红”体色瓯江彩鲤为对象,通过人工感染嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)后,分析MHC II类B基因多态性与其抗病力之间的关系,以期为瓯江彩鲤抗病基因的筛选及抗病育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

“全红”体色瓯江彩鲤样本采自浙江龙泉省级瓯江彩鲤良种场,每尾鱼体质量为35~45 g,带回实验室暂养4周,水温维持在25℃。瓯江彩鲤抗病群体和感病群体获得的具体方法参照文献[14],即:实验组鱼50尾,每尾腹腔注射0.1 mL浓度为 3×10^8 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);对照组鱼10尾,每尾注射0.1 mL的无菌水。11 h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。经嗜水气单胞菌感染96 h后不出现发病症状的个体为抗病群体,而96 h内出现腹部充血、肛门红肿、游动迟缓等症状直至临死的个体为感病群体。本研究共得到了16尾抗病个体和21尾感病个体。分别取其肝脏,迅速放入液氮中冻存,转至-80℃冰箱保存备用。

1.2 mRNA的提取和fcDNA的合成

取少量肝脏组织,采用TRIZOL法(Invitrogen)提取总RNA,电泳检测总RNA的质量并测定其OD值。利用反转录试剂盒PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit(Takara)合成fcDNA。

1.3 引物设计和RT-PCR扩增

根据VAN ERP等^[15]已获得的鲤MHC II B基因序列(GenBank登录号为X95431),用Primer Premier 5.0软件在外显子1和外显子4上设计一对特异性引物:DABF(5'-TGATGCTGCT-GCTTTCCTGG-3')和DABR(5'-CGATGG-CGATTTTATTCCTCTC-3')(由上海生工生物工

程服务有限公司合成),用于扩增“全红”体色瓯江彩鲤MHC-DAB基因的片段,包括完整的 $\beta 1$ 和 $\beta 2$ 结构域、部分的信号肽和跨膜区。

PCR反应总体积为25 μ L,包括100 ng fcDNA,200 μ mol/L dNTPs,引物各0.2 μ mol/L,1 U *Taq* DNA聚合酶(Tiagen)。反应条件为94℃预变性3 min,然后94℃变性1 min,55℃退火1 min,72℃延伸2 min,35个循环后,72℃延伸10 min。所有PCR反应均在Mastercycler ep gradient S(Eppendorf)型PCR仪上进行。

1.4 PCR产物的纯化、克隆及测序

取25 μ L的PCR产物,经1%的琼脂糖凝胶电泳,切下目的片段,用Biospin Gel Extraction Kit(Bioflux)胶回收试剂盒纯化目的片段。将纯化产物连接到pMD19-T(TaKaRa)载体上,然后转化入TOP10(Tiagen)感受态细胞。根据蓝白斑原理,挑选白色菌落,用M13 +/-引物做菌落PCR筛选鉴定阳性克隆,每个个体挑选5个阳性克隆进行测序。

1.5 数据分析

获得的序列通过NCBI中BLAST同源检索,确认所得的基因片段。用Clustal X软件^[16]进行序列排序、比对并辅以人工校正。利用MEGA 4.0软件^[17]分析DNA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;利用DnaSP 5.0软件^[18]进行第二外显子和第三外显子序列的多态性分析;利用DAMBE软件^[19]计算变异位点的转换和颠换数;用卡方(Chi-square Test)检验各个基因型在抗病群体和感病群体中的分布频率。

2 结果

2.1 序列测定

从“全红”体色瓯江彩鲤的16尾抗病个体和21尾感病个体中,共测序185个有效克隆。获得的序列经NCBI中BLAST软件同源性比对后,确认为瓯江彩鲤的MHC-DAB基因片段。该核苷酸序列总长624 bp,包括24 bp的外显子1、276 bp的外显子2、282 bp的外显子3以及42 bp的外显子4;分别编码8个氨基酸的部分信号肽、92个氨基酸的完整 $\beta 1$ 结构域、94个氨基酸的完整 $\beta 2$ 结构域及14个氨基酸的部分跨膜区,共208个氨基酸。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。

2.2 MHC-DAB 等位基因的命名

采用在哺乳动物以及其他脊椎动物中广泛采用的命名规则^[20],并参照已有鲤 MHC 序列的命名习惯^[15],对“全红”体色瓯江彩鲤的 MHC-DAB 等位基因进行命名:以 MHC 基因同源序列所编码氨基酸间的错义替换超过或等于 5 个残基作为一个等位基因型,少于 5 个残基的变异作为该等位基因的一个亚型,如等位基因 Cyca-DAB1 * 0701。这里,Cyca 代表瓯江彩鲤拉丁名前两个单词前两个字母,DAB1(或 DAB3)表示 MHC II 类 B 基因,07 两位数字是用来指定不同的等位基

因,01 两位数字是用来区别编码变异的等位基因亚型。

核苷酸序列及所推断的氨基酸序经过比对后,从 185 条序列中共检出 76 条不同的编码序列,划分为两组,分别归属于 20 个不同的等位基因(图 1),并命名为 Cyca-DAB1 * 0701 ~ Cyca-DAB1 * 1113 及 Cyca-DAB3 * 0201 ~ Cyca-DAB3 * 1603 (GenBank 登录号: JF742674-JF742749),图 1 中 Cyca-DAB1 * 01 和 Cyca-DAB3 * 01 为已有鲤的 MHC 序列,GenBank 登录号分别为 Z49064 和 X95431。

SP	β 1 domain																								
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100															
Cyca-DAB3*01	MLSAFTGT	AHGYYEYMTFDCVYSASDYS	DMVYLLSYSPNQGLDAQFNSS	VGKFGVYTERGMDAEYWNHNP	AELQQRRAEVDIYCRHNAQILDSS	VDRDKT																			
Cyca-DAB3*0201	D	IANE	E H	VV L	Y	V VIY	KN	KD	IM	KK S	RF	V	S												
Cyca-DAB3*0301	D	MH	T	F E	KVVYL	Y	V V Y	NA	K Q	RM	AK	A	H	P	V	A	S								
Cyca-DAB3*0401	D	TMNE	T	F E	H	VVYL	Y	Q	V Y	NA	K Q	RM	AK	A	H	P	V	A	S						
Cyca-DAB3*0501	D	MH	T	F E	H	KVVYL	Y	V	V Y	NA	K Q	RM	AK	RF	Y	W	A	S							
Cyca-DAB3*0601	D	MH	T	F E	H	KVVYL	Y	V	V Y	NA	K Q	RM	AK	RF	Y	W	A	S							
Cyca-DAB3*0701	D	MH	A	T	F E	H	KVVYL	Y	V	V Y	NA	K Q	RM	AK	RF	Y	W	A	S						
Cyca-DAB3*0801	D	T	VW		Q		VV I	Y		E	V	F	NF	K	Q	YM	QK	Q	F	A	S				
Cyca-DAB3*0901	D	T	TMVE		F	V	L	VV	V	Y	T	Q	V	I	NF	KD	Q	T	AK	F	P	SA	A	S	
Cyca-DAB3*1001	Q	TMH	T		N		VV	L		Y	Q	V	F	NF	KD	F	QK	RF	Y	W	A	S			
Cyca-DAB3*1101	TSS	T		EL		KVV	V		Y	E	V	Y	N	KD	L	KK	RF	P	F	Q	S	A	S		
Cyca-DAB3*1201	TSY	T		EL		KVV	V		Y	E	V	Y	NF	KD	IM	AK	S	F	W	A	S	A	S		
Cyca-DAB3*1301	TSY	T		EL		KVV	V		Y	E	V	Y	NF	KD	IM	AK	S	F	W	A	S	A	S		
Cyca-DAB3*1401	D	TS	T		EL		KVV	V	Y	H	E	V	Y	N	KDQ	LM	KY	RF	W	A	S	A	S		
Cyca-DAB3*1501	Q	TMEE	T		L	V	L	KVV	V	Y	Q	V	H	NF	KD	FM	VK	RF	V	Q	S	A	S		
Cyca-DAB3*1601	Q	VMNE	T		N		KVV	V	Y	Y	E	V	Y	NF	KD	IM	QK	A	RF	NH	T	A	S		
Cyca-DAB1*01	A	N	HSWWTK	IH	SR	F	IDN	I	KDVI	T	EY	AL	VYN	RF	KD	NI	E	Q	ER	K	ELYQ	AI	A	S	
Cyca-DAB1*0701	A	N	YSRWAK	FHGSR	F	FVDN	I	KDVI	T	EY	AH	VYN	S	KD	NI	M	Q	SP	K	NRQ	ATA	A	S		
Cyca-DAB1*0801	A	N	YSFWSR	IH	SR	L	VDM	I	KDV	I	T	EY	AL	VHN	RF	KD	NL	M	Q	SP	K	ELYQ	ATA	A	S
Cyca-DAB1*0901	A	N	NSRWTK	FHGSR	F	FVDN	I	KDVI	T	EY	AL	VHN	S	KD	NR	M	Q	S	KY	E	RQ	ATA	A	S	
Cyca-DAB1*1001	A	N	YSRWAK	IH	SR	F	MVDN	I	KDVI	T	EY	AH	VYN	L	KDNL	E	ERV	KY	E	RQ	TIA	A	S		
Cyca-DAB1*1101	A	N	YSRWAK	FHGSR	F	FVDN	I	KDVI	T	EY	AH	VYN	LY	KD	NI	E	ERV	K	KNRQ	ATA	A	S			

β 2 domain																						
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200												
Cyca-DAB3*01	VKPKITLRSARAGGSRPAVLVCSAYDFYPKIKVSWLRDGGKEMTSVDTSTMEMADGDWFIQIHSELYTPESGEKISCMVEHASFSKPMITDW									DPSLPEGERNKIAI												
Cyca-DAB3*0201	M	D	R	M	E		Y															
Cyca-DAB3*0301	M	D	M	E	V																	
Cyca-DAB3*0401	M	D	M	E			H			F												
Cyca-DAB3*0501	M	D	M	E	V					F												
Cyca-DAB3*0601	M	D	M	E		L	N	N	H	R												
Cyca-DAB3*0701	M	P		E		N			G													
Cyca-DAB3*0801	Q	A		M	E		N	N														
Cyca-DAB3*0901	Q			M	E		N	N	H													
Cyca-DAB3*1001	EQ			E		N				F												
Cyca-DAB3*1101	H			E		N	N	H														
Cyca-DAB3*1201	L	G		E	V					F												
Cyca-DAB3*1301	L	E		E		L	N	N	H													
Cyca-DAB3*1401				E	V																	
Cyca-DAB3*1501						Y	H			A												
Cyca-DAB3*1601				M	E		Y	H		A												
Cyca-DAB1*01	P	VK	S	VK	RH	M	R	HG	M	N	EVVKT	E	PN	Y	H		A	D	GLT	I	I	S
Cyca-DAB1*0701	P	VK	S	VK	RH	M	R	HG	M	N	EVVKT	E	PN	Y	H		A	D	GLT	I	I	S
Cyca-DAB1*0801	P	VK	S	VT	RH	M	R	HG	M	N	EVVKT	E	PN	Y	H		A	D	GLT	I	I	S
Cyca-DAB1*0901	P	VK	S	VTF	RH	M	R	HG	M	N	EVVKT	E	PN	Y	H		A	D	GLT	I	I	S
Cyca-DAB1*1001	P	VK	S	VK	RH	M	R	HG	M	N	EVVKT	E	PN	Y	H		A	D	GLT	I	I	S
Cyca-DAB1*1101	P	VK	S	VNF	RH	M	R	HG	M	N	EVVKT	E	PN	Y	H		A	D	GLT	I	I	S

图 1 “全红”体色瓯江彩鲤 MHC-DAB 等位基因推断的氨基酸序列

“·”表示与 Cyca-DAB3 * 01 残基一致;“*”表示抗原结合位点(PBR)。

Fig. 1 Putative amino acids of MHC-DAB alleles in “whole red” color pattern of *C. carpio* var. *color*

“·”Indicates identical amino acid; “*” Indicates the PBR sites.

2.3 “全红”体色瓯江彩鲤 MHC-DAB 基因多态性

等位基因的分布 分析显示,20 个不同的等位基因明显分为两组,即 DAB1 型和 DAB3 型。DAB1 型和 DAB3 型分别含有 5 和 15 个等位基因,但 DAB1 基因频率却高达 61.08%,而 DAB3 的基因频率却只有 38.92%。在所检测的 37 尾个体中,只含 DAB1 或 DAB3 等位基因的样本数

分别为 13 和 7,而在剩余的 17 个个体中两种等位基因则都能检测到。DAB 等位基因的亚型分布不均衡。等位基因 DAB1 * 07、DAB1 * 11 分别含有 15 个、13 个亚型,两者的等位基因频率之和高达 51.35%,另外有 7 个等位基因仅含有一种亚型。亚型中,DAB1 * 0701 出现的频率最高(25.41%),其次是 DAB1 * 1101(11.89%),其余大多数等位基因亚型仅出现一次,频率为 0.54%。

值得注意的是,分析发现单一个体中最多存在 4 个等位基因,表明“全红”体色瓯江彩鲤个体中至少存在两个 DAB 基因座。

多态位点的变异 本实验共检测到 252 个核苷酸变异位点(表 1),包括 203 个简约信息位点,核苷酸变异位点的比例为 40.38% (252/624),而氨基酸变异位点的比例则高达 59.62% (124/208)。序列间的碱基变异范围为 0% ~ 24.50%,平均 12.60%;氨基酸变异范围为 0% ~ 43.30%,平均 21.60%。从 $\beta 1$ 和 $\beta 2$ 结构域来

看, $\beta 1$ 结构域的核苷酸变异位点和氨基酸变异位点分别高达 52.17% 和 76.09%,明显高于 $\beta 2$ 结构域的 34.75% 和 53.19% (表 1),这与 $\beta 1$ 结构域存在高度多态的抗原多肽结合区(PBR)相关。信号肽和跨膜区变异都不大,属于保守序列。对全部序列的分析表明,“全红”体色瓯江彩鲤 DAB 基因座的单倍型多样性($H_d = 0.939 0$)以及核苷酸多样性($P_i = 0.125 8$)都比较高,平均核苷酸差异数目($K = 78.519$)也很大。

表 1 “全红”体色瓯江彩鲤核苷酸和氨基酸的变异位点

Tab.1 Variable sites of nucleotide and amino acid in “whole red” color pattern of *C. carpio* var. *color*

	核苷酸 nucleotide			氨基酸 amino acid		
	变异位点 variable sites	总位点 total number of sites	百分比/% percentage	变异位点 variable sites	总位点 total number of sites	百分比/% percentage
信号肽 signal peptide	1	24	4.17	1	8	12.50
$\beta 1$ 结构域 $\beta 1$ -domain	144	276	52.17	70	92	76.09
$\beta 2$ 结构域 $\beta 2$ -domain	98	282	34.75	50	94	53.19
跨膜区 transmembrane	9	42	21.43	3	14	21.43
总共 total	252	624	40.38	124	208	59.62

碱基组成以及核苷酸的替换 碱基含量分析发现 4 种碱基 A、G、C、T 的含量没有非常大的偏差,分别为 28.30%、25.30%、23.00%、23.60%。而 4 种碱基在密码子的分布存在差异,GC 碱基在密码子第三位上占到 57.1%,明显高于其它两位密码子;单个碱基 A、G、C 分别在密码子第三、二、一位上含量相对较少,而 T 碱基则较均衡。DAB 基因在密码子 3 个位置上发生的平均转换颠换比(R)分别为 1.282、0.756、1.223,表明密码子在第 1 位和第 3 位的变异要高于第 2 位密码子的变异。

选择压力检测 参照人类 HLA II 类分子的晶体三维结构^[21],对本文所获得的“全红”体色瓯江彩鲤 DAB 序列 $\beta 1$ 结构域的抗原结合位点(PBR)进行了界定(图 1),发现其 PBR 区 24 个氨基酸位点中的 23 个存在变异,变异率高达 95.83%;而非抗原结合位点(non-PBR)的变异率较小,为 69.12% (47/68)。从表 2 可知, $\beta 1$ 结构域 PBR 的 ω 值(d_N/d_S)大于 1,而 non-PBR 和 $\beta 2$ 的 ω 值都小于 1,说明“全红”体色瓯江彩鲤 MHC-DAB 基因(特别是 $\beta 1$ 结构域)在进化过程中受到正向选择(positive selection)作用。

表 2 “全红”体色瓯江彩鲤 MHC-DAB $\beta 1$ 的抗原结合位点(PBR)、非抗原结合位点(non-PBR)及 $\beta 2$ 的同义替换率(d_S)和非同义替换率(d_N)

Tab.2 d_S, d_N of PBR, non-PBR of MHC-DAB $\beta 1$ and $\beta 2$ domains in “whole red” color pattern of *C. carpio* var. *color*

结构域 domain	位点 sites	非同义替代率 d_N (SE)	同义替代率 d_S (SE)	比值 d_N/d_S	密码子数目 number of codons
$\beta 1$	抗原结合区 PBR	0.428 ± 0.092	0.313 ± 0.142	1.367	24
	非抗原结合区 non-PBR	0.155 ± 0.025	0.175 ± 0.053	0.886	68
	总计 total	0.214 ± 0.027	0.206 ± 0.051	1.039	92
$\beta 2$		0.104 ± 0.017	0.138 ± 0.037	0.754	94

2.4 MHC-DAB 等位基因与抗病力的关系
在“全红”体色瓯江彩鲤 20 个 MHC-DAB 等

位基因中,有 5 个等位基因(DAB3 * 06、DAB3 * 07、DAB3 * 09、DAB3 * 10、DAB3 * 16)是抗病群

体所特有的,同时有 7 个等位基因(DAB1 * 08、DAB1 * 10、DAB3 * 02、DAB3 * 03、DAB3 * 08、DAB3 * 12、DAB3 * 14)是感病群体所特有的(图 2)。经检验,等位基因 DAB3 * 15 在抗病群体中出现的频率(13.75%)显著高于感病群体中出现的频率(3.81%),而 DAB3 * 09 和 DAB3 * 10 只出现在抗病群体中(频率都为 3.75%),DAB3 * 02 和 DAB3 * 14 只出现在感病群体中(频率分别为 7.62% 和 8.75%),其中 DAB3 * 14 达到了极

显著水平($P < 0.01$)。

“全红”体色瓯江彩鲤 MHC-DAB 等位基因数在抗病群体和感病群体中的分布如表 3 所示,每尾鱼中存在 1~4 个等位基因。在感病群体中,含 1~2 个基因的个体数占到 80.96%,明显高于抗病群体的 56.25%;相反,43.75% 抗病群体的个体含 3~4 个不同的基因,而在感病群体中却只有 19.04% 的个体。说明对于每尾鱼而言,MHC 等位基因数量的多少与对疾病的抵抗力有着明显的关系。

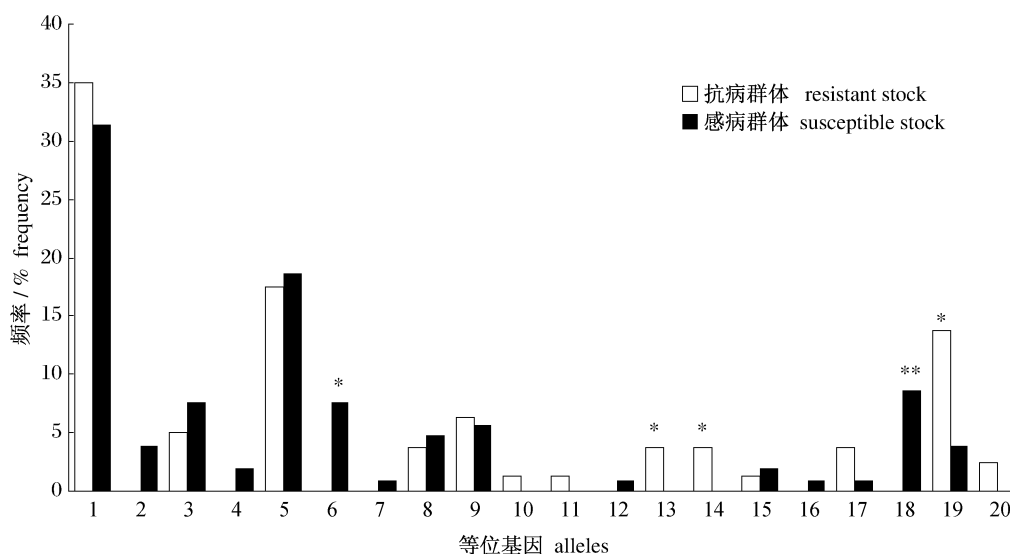


图 2 不同等位基因在抗病群体与感病群体的分布频率(%)及卡方检验结果

Fig. 2 Percentages of the alleles in resistant stock and susceptible stock of “whole red” color pattern of *C. carpio* var. *color* and its Chi-square test results

1. Cyca-DAB1 * 07, 2. Cyca-DAB1 * 08, 3. Cyca-DAB1 * 09, 4. Cyca-DAB1 * 10, 5. Cyca-DAB1 * 11, 6. Cyca-DAB3 * 02, 7. Cyca-DAB3 * 03, 8. Cyca-DAB3 * 04, 9. Cyca-DAB3 * 05, 10. Cyca-DAB3 * 06, 11. Cyca-DAB3 * 07, 12. Cyca-DAB3 * 08, 13. Cyca-DAB3 * 09, 14. Cyca-DAB3 * 10, 15. Cyca-DAB3 * 11, 16. Cyca-DAB3 * 12, 17. Cyca-DAB3 * 13, 18. Cyca-DAB3 * 14, 19. Cyca-DAB3 * 15, 20. Cyca-DAB3 * 16.

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

表 3 MHC-DAB 等位基因数在抗病和感病群体中的分布频率

Tab. 3 The distribution frequency and its corresponding individual number of MHC-DAB alleles in resistant and susceptible stocks

个体中 DAB 等位基因数 allele number per individual	感病群体 susceptible stock				抗病群体 resistant stock			
	1	2	3	4	1	2	3	4
个体数 individuals number	3	14	2	2	3	6	5	2
百分比/% percentage	14.29	66.67	9.52	9.52	18.75	37.50	31.25	12.50
总计 total	80.96		19.04		56.25		43.75	

3 讨论

3.1 “全红”体色瓯江彩鲤 MHC-DAB 基因的多态性分析

关于鱼类 MHC 基因多态性的研究,已在 40

多种物种中开展,其中以重要经济鱼类大西洋鲑和虹鳟的 II 类基因多态研究最为深入^[3,8]。在瓯江彩鲤中,仅有蔡完其等^[22]对 MHC I 基因的多态性进行过初步的分析,发现其 $\alpha 2$ 链的基因多态性较为丰富,多态位点百分率达 45.3%。本研

究从 37 尾“全红”瓯江彩鲤抗病和感病个体中,共检出 76 条不同的编码序列,归于 20 个不同的等位基因;而张玉喜等^[5]从 84 个牙鲆个体中,仅获得 13 个 MHC II B 基因。比较而言,“全红”体色瓯江彩鲤 MHC-DAB 基因的多态性更高。我们所得的等位基因分属于 DAB1 和 DAB3 型,与已报道的鲤 Cyca-DAB1 * 01/Cyca-DAB2 * 01 和 Cyca-DAB3 * 01/Cyca-DAB4 * 01 两组相对独立的 MHC II B 等位基因型相一致^[15]。本研究中,35.10% (13 尾)和 18.90% (7 尾)的个体中,只能检测到 DAB1 或 DAB3 等位基因型,而在剩余的 45.90% (17 尾)个体中却能检测到两种基因型。此外,每个等位基因又包括不同数量的亚型,其中等位基因亚型 DAB1 * 0701 和 DAB1 * 1101 占有明显优势(基因频率分别达到了 25.41% 和 11.89%),而其余大多数亚型仅仅出现了一次(基因频率仅为 0.54%)。“全红”体色瓯江彩鲤 MHC-DAB 基因具有的高多态性和低分布频率的现象,显示了其 MHC-DAB 基因资源较为丰富,为从中筛选出抗病家系提供了可能。这与张玉喜等^[5]报道的牙鲆 MHC II 的研究结果相类似。

分析表明,“全红”体色瓯江彩鲤 MHC-DAB 基因 $\beta 1$ 结构域的核苷酸变异位点和氨基酸变异位点分别高达 52.17% 和 76.09%,比 $\beta 2$ 结构域的相应值高出 50.12% 和 43.05%。MHC II 基因 $\beta 1$ 结构域的变异明显高于 $\beta 2$ 结构域的现象,其他物种也存在。如牙鲆^[5]MHC II B 基因的第 2 外显子变异高度丰富,而第 3 外显子的变异则相对有限;张燕等^[23]对长江草鱼群体 MHC II B 基因的研究表明:第 2 外显子有 78% 的核苷酸变异位点和 88% 氨基酸变异位点,而第 3 外显子的相应值则分别为 45% 和 56%, $\beta 1$ 变异要比 $\beta 2$ 区高出 57.13% ~ 73.33%。GRASER 等^[24]指出,MHC 的多态性主要集中在抗原结合区(PBR),这在我们的研究中再次得到了证实。本研究发现, $\beta 1$ 抗原结合区氨基酸变异位点的比例高达 95.83%,比 non-PBR 区域的变异值高出 38.64%。正是由于 MHC 基因的高度多态性,它已越来越被用于调查种群遗传结构、区分紧密相关物种间的亲缘关系及历史进化关系等多种领域的研究^[25]。

目前认为,MHC 基因高度多态性的维持机制

主要有杂种优势、超显性选择以及正向(平衡)选择^[9]。本研究中,PBR 区非同义替换率(d_N)与同义替换率(d_S)的比值(ω)大于 1(1.367),而非 PBR 和 $\beta 2$ 的 d_N/d_S 都小于 1(表 2),表明氨基酸替换集中出现在抗原结合区附近。一般认为非同义替换高于同义替换是由正向选择作用产生的^[26],因此可以认为,“全红”体色瓯江彩鲤 MHC 基因的多态性是由正向选择机制维持的。

3.2 “全红”体色瓯江彩鲤 MHC-DAB 等位基因的抗病力分析

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、免疫应答以及生产性能密切相关,已成为疾病抗性和易感性等一般抗病力最为重要的候选基因^[27]。2001 年,PALTI 等^[8]利用 SSCP 技术,发现虹鳟 MHC II 类基因多态性与对传染性造血组织坏死病(infectious hematopoietic necrosis, IHN)病毒的抗性密切相关。接着,LOHM 等^[28]、KJØGLUM 等^[3]、GLOVER 等^[29]、WYNNE 等^[30]和 GHARBI 等^[31]分别报道了细菌性或寄生虫病与大西洋鲑 MHC 基因多态性的关系,并从中成功地筛选出了有效的抗病基因型或基因型组合。国内学者张玉喜等^[5]、XU 等^[32]分别报道了牙鲆 MHC 等位基因与鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)引起的疾病之间的关系,发现某些等位基因在易感群体、抗病群体的出现频率显著不同,且有些等位基因只在易感或抗病群体出现。对于鲤的相关性研究也有报道,如 RAKUS 等^[33]发现鲤的 MHC II B 基因与鲤疱疹病毒-3 型(CyHV-3)的抗病力有关,拥有基因型 Cyca-DAB1 * 05 的鱼对 CyHV-3 抵抗力较高,而拥有基因型 Cyca-DAB1 * 02 和 Cyca-DAB1 * 06 的鱼对 CyHV-3 更易感。本研究初步筛选到 3 个与“全红”体色瓯江彩鲤抗病密切相关的基因型,即:主要出现在抗病群体中的等位基因 DAB3 * 15、只出现在抗病群体中的等位基因 DAB3 * 09 和 DAB3 * 10;同时,还发现了 2 个只出现在感病群体中的等位基因 DAB3 * 14 和 DAB3 * 02,其中 DAB3 * 14 频率为 8.57%,达到了极显著水平($P < 0.01$)。WEGNER 等^[34]研究三刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)的 MHC 基因型与寄生虫的关系时发现,在同一三刺鱼家族内,含有 MHC II 类 B 基因变异序列较多的个体存活率较高且同时鱼体所含寄生虫较少;本研究对“全红”

体色瓯江彩鲤 DAB 等位基因数统计分析表明,80.96% 感病群体的个体,只含 1~2 个等位基因,明显高于抗病群体的 56.25%;相反,43.75% 抗病群体的个体含 3~4 个不同的等位基因,而在感病群体中却只有 19.04%,表明含有 DAB 等位基因数较多的个体,对由嗜水气单胞菌引起的疾病有较强的抵抗力。我们的研究结果与 WEGNER 等^[34]的相类似。上述结果,为进一步筛选“全红”体色瓯江彩鲤抗病相关基因标记及利用抗病基因型进行抗病瓯江彩鲤的选育奠定了良好基础。

在实验过程中,水产与生命学院翁志毅高级工程师、何为副教授、胡鲲博士及 2008 级水族科学专业的李昶同学提供了很多方便,研究生杨新鑫、马玉清、何安元等多次协助采样,肖丹同学也给予了诸多帮助,在此表示由衷的感谢。

参考文献:

- [1] PAUL W E. Fundamental immunology [M]. 4th Eds. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1999:297-298.
- [2] HASHIMOTO K, NAKANISHI T, KUROSAWA Y. Isolation of carp genes encoding major histocompatibility complex antigens[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, 87(17):6863-6867.
- [3] KJØGLUM S, LARSEN S, BAKKE H G, et al. How specific MHC class I and class II combinations affect disease resistance against infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 21(4):431-441.
- [4] SULTMANN H, MAYER W E, FIGUEROA F, et al. Zebrafish Mhc class II α chain-encoding genes: polymorphism, expression, and function [J]. Immunogenetics, 1993, 38(6):408-420.
- [5] 张玉喜, 陈松林. 牙鲈 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.
- [6] 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.
- [7] XU T J, CHEN S L, JI X S, et al. Molecular cloning, genomic structure, polymorphism and expression analysis of major histocompatibility complex class II A and II B genes of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(2):192-201.
- [8] PALTU Y, NICHOLS K M, WALLER K I, et al. Association between DNA polymorphisms tightly linked to MHC class II genes and IHN virus resistance in backcrosses of rainbow and cutthroat trout [J]. Aquaculture, 2001, 194(3-4):283-289.
- [9] PARHAM P, OHTA T. Population biology of antigen presentation by MHC class I molecules [J]. Science, 1996, 272(5258):67-74.
- [10] 王成辉, 李思发, 赵金良. 我国 4 种红鲤群体的生化遗传差异 [J]. 上海水产大学学报, 2004, 13(1):1-4.
- [11] 吕耀平, 王成辉, 胡则辉, 等. “全红”瓯江彩鲤不同世代间的遗传结构及遗传分化初步分析 [J]. 水生生物学报, 2010, 34(1):65-71.
- [12] WANG C H, LI S F. Phylogenetic relationships of ornamental (koi) carp, Oujiang color carp and Longfin carp revealed by mitochondrial DNA CO II gene sequences and RAPD analysis [J]. Aquaculture, 2004, 231(1-4):83-91.
- [13] WANG C H, LI S F, XIANG S P, et al. Genetic parameter estimates for growth-related traits in Oujiang color common carp (*Cyprinus carpio* var. color) [J]. Aquaculture, 2006, 259(1-4):103-107.
- [14] RAKUS K L, WIEGERTJES G F, ADAMEK M, et al. Application of PCR-RF-SSCP to study major histocompatibility class II B polymorphism in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 24(6):734-744.
- [15] 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.
- [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]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24):4876-4882.
- [17] 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(8):1596-1599.
- [18] LIBRADO P, ROZAS J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. Bioinformatics, 2009, 25(11):1451-1452.
- [19] XIA X, XIE Z. DAMBE: software package for data

- analysis in molecular biology and evolution [J].
Journal of Heredity, 2001, 92(4) : 371.
- [20] 徐田军, 陈松林, 田永胜. 日本牙鲆主要组织相容性复合体 DAB 等位基因的多态性 [J]. *动物学报*, 2008, 54(5) : 909 – 917.
- [21] BROWN J H, JARDETZKY T S, GORGA J C, *et al.* Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1 [J]. *Nature*, 1993, 364 : 33 – 39.
- [22] 蔡完其, 轩兴荣, 王成辉, 等. 红鲤 4 群体间主要组织相容性复合体的差异 [J]. *水产学报*, 2003, 27(2) : 113 – 118.
- [23] 张燕, 姚延丹, 段辛斌, 等. 长江草鱼群体 MHC Class IIB 的多态性和进化分析 [J]. *淡水渔业*, 2010, 40(5) : 14 – 21.
- [24] GRASER R, O' HUGIN C, VINCEK V, *et al.* Trans-species polymorphism of class II Mhc loci in danio fishes [J]. *Immunogenetics*, 1996, 44 (1) : 36 – 48.
- [25] HEDRICK P W. Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation [J]. *Evolution*, 1999, 53(2) : 313 – 318.
- [26] MILLER K M, WITHLER R E, BEACHAM T D. Molecular evolution at Mhc genes in two populations of chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* [J]. *Molecular Ecology*, 1997, 6(10) : 937 – 954.
- [27] VAN MUISWINKEL W B, WIEGERTJES G F, STET R J M. The influence of environmental and genetic factors on the disease resistance of fish [J]. *Aquaculture*, 1999, 172(1 – 2) : 103 – 110.
- [28] LOHM J, GRAHN M, LANGEFORS Å, *et al.* Experimental evidence for major histocompatibility complex-allele-specific resistance to a bacterial infection [J]. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 2002, 269(1504) : 2029 – 2033.
- [29] GLOVER K A, GRIMHOLT U, BAKKE H G, *et al.* Major histocompatibility complex (MHC) variation and susceptibility to the sea louse *Lepeophtheirus salmonis* in Atlantic salmon *Salmo salar* [J]. *Diseases of aquatic organisms*, 2007, 76(1) : 57 – 65.
- [30] 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 & Shellfish Immunology*, 2007, 22(6) : 707 – 717.
- [31] GHARBI K, GLOVER K A, STONE L C, *et al.* Genetic dissection of MHC-associated susceptibility to *Lepeophtheirus salmonis* in Atlantic salmon [J]. *BMC genetics*, 2009, 10(1) : 20.
- [32] XU T J, CHEN S L, ZHANG Y. MHC class II α gene polymorphism and its association with resistance/susceptibility to *Vibrio anguillarum* in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2010, 34(10) : 1042 – 1050.
- [33] RAKUS K L, WIEGERTJES G F, ADAMEK M, *et al.* Resistance of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to cyprinid herpesvirus-3 is influenced by major histocompatibility (MH) class II B gene polymorphism [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 26(5) : 737 – 743.
- [34] WEGNER K M, KALBE M, MILINSKI M, *et al.* Mortality selection during the 2003 European heat wave in three-spined sticklebacks: effects of parasites and MHC genotype [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2008, 8(1) : 124.

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*

LI Xue-song¹, LIU Zhi-zhi^{1*}, ZHAO Xue-jin¹, MA Xiao-qian¹, FENG Wei¹, WANG Cheng-hui^{2*}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education,

Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Utilization, Ministry of Agriculture,

Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: A total of 76 different nucleotide acid sequences of MHC gene, which were classed as 20 alleles, were identified in 185 clones from 16 resistant and 21 susceptible “whole red” color patterns of *Cyprinus carpio* var. *color* individuals using the specific primer pair of DABF and DABR. The 624 bp-long nucleotide fragment consisted of the exon1, exon2, exon3 and exon4, encoding signal peptide, β 1 domain, β 2 domain and part transmembrane, respectively. There were 144 nucleotide (52.17%) and 70 amino acid (76.07%) variable sites in the 276 bp-long β 1 domain, whereas the nucleotide and amino acid variable sites were 98 (34.75%) and 50 (53.19%) in the 282 bp-long β 2 domain. It was obviously found that β 1 domain had more variable sites than β 2 domain. Meanwhile, 23 variable sites were observed in total 24 peptide binding residues (PBR) of β 1 domain. The ω values ($\omega = d_N/d_S$) were 1.367, 0.886, and 0.754 for PBR and non-PBR of the β 1 domain, and for β 2 domain, respectively, implying positive selection pressure conducted on the MHC-DAB gene (especially for β 1 domain) of *C. carpio* var. *color*. The percentage (13.75%) of Cyca-DAB3 * 15 was significantly higher in the resistant stock than that (3.81%) in the susceptible stock ($P < 0.05$). Interestingly, the Cyca-DAB3 * 09 and Cyca-DAB3 * 10 were only found in the resistant stock, with percentage of 3.75% ($P < 0.05$), whereas the Cyca-DAB3 * 02 and Cyca-DAB3 * 14 were only observed in the susceptible stock, with the percentage of 7.62% ($P < 0.05$) and 8.57% ($P < 0.01$), respectively. The present results would be useful to conduct the disease-resistant breeding program in the *C. carpio* var. *color*.

Key words: *Cyprinus carpio* var. *color*; major histocompatibility complex; polymorphism; disease resistance

Corresponding author: LIU Zhi-zhi. E-mail: zzliu@shou.edu.cn;

WANG Cheng-hui. E-mail: wangch@shou.edu.cn