

星斑川鲷MHC II恒定链Ii基因的克隆和表达特性

郑风荣¹, 郭湘云^{1,2}, 刘洪展³, 李青^{1,3}, 王波^{1*}

(1. 国家海洋局第一海洋研究所, 山东 青岛 266061;

2. 大连海洋大学, 辽宁 大连 116023;

3. 山东大学海洋学院, 山东 威海 264209)

摘要: 为了研究星斑川鲷MHC II类分子的作用及调控机制, 实验通过SMART-RACE技术克隆得到了星斑川鲷MHC II恒定链(MHC II Ii)的全长cDNA序列, 其长度为1766 bp, 包含135 bp的5'非编码区、837 bp的开放阅读框和794 bp的3'非编码区。该基因共编码279个氨基酸。理论分子量为30.848 ku, 等电点为6.89。与已知物种MHC II Ii进行同源性比对, 结果与狼鲈、紫红笛鲷和鳊关系较近, 同源性均为79%。利用quantitative real-time PCR (qRT-PCR)技术检测了MHC II Ii在星斑川鲷不同组织中的表达, 以及爱德华氏菌感染前后对该基因在不同组织中表达水平的影响, 结果显示: 在脾脏、头肾、肝脏、后肠、性腺、心脏、血液、鳃和肌肉组织中, MHC II Ii mRNA均有表达, 但在表达量上有明显差异, 脾脏和头肾组织相对表达水平较高, 鳃、血液、肌肉、心脏和性腺中的表达水平较低。病原感染后, 免疫相关组织脾脏和头肾的表达水平升高最明显, 肝脏和后肠的表达水平也略有升高, 但变化不明显。本研究可为星斑川鲷MHC II类分子的作用机理提供理论依据, 同时为海水养殖鱼类的抗病遗传育种工作提供研究基础。

关键词: 星斑川鲷; MHC II Ii; cDNA克隆; 序列分析; 表达特性

中图分类号: Q 785; S 965

文献标志码: A

主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)是染色体上一系列紧密连锁的基因位点所组成的具有高度多态性的复合遗传系统或区域^[1-2], 是一个与免疫功能密切相关的基因家族^[3]。MHC II类分子主要是递呈外源性抗原, 其多态结合区约可容纳10~30个氨基酸残基的肽段^[4]。外源性抗原在溶酶体中与MHC II类分子结合, 然后递呈给辅助T淋巴细胞(Th, CD⁴⁺), 触发免疫反应, 从而保护机体免受病原菌侵害。不同于 α 、 β 链的多态性, γ 链呈非多态性, 故称为恒定链(invariant chain, Ii)^[5]。恒定链Ii是一种非多态性II型跨膜糖蛋白, 存在于T、B细胞、巨噬细胞、树突状细胞和肿瘤细胞表面, 是MHC II生物合成及结合外源性抗原肽的重要分子伴侣^[6], 细胞中缺乏Ii会导致

MHC II α 链和 β 链不能正确折叠, 从而被较长时间滞留于内质网中^[7-8]。恒定链Ii通过抑制蛋白酶来增强抗原递呈, 确保新合成的MHC II分子的胞内转运^[9-10], 并且在B细胞成熟过程中起重要作用^[11]。迄今为止, 恒定链跨膜区的功能研究多集中在哺乳动物, 有关鱼类的研究还鲜有报道, 海水养殖鱼类仅有赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)的MHC II invariant china-like proteins (ICLP)全长cDNA克隆的研究报道^[12], 未见星斑川鲷(*Platichthys stellatus*)MHC II Ii基因的相关研究。

星斑川鲷隶属于鲷形目(Pleuronectiformes), 鲷科(Pleuronectidae), 川鲷属(*Platichthys*), 是一种经济价值很高的冷温性鲷类。星斑川鲷因肉质口感独特、味道鲜美、含有丰富的胶原蛋白

收稿日期: 2015-05-29 修回日期: 2015-10-09

资助项目: 国家“八六三”高新技术研究发展计划(2012AA10413, 2012AA10408);国家海洋公益性行业科研专项(201405010)

通信作者: 王波, E-mail: ousun@fio.org.cn

且耐贮藏而受到越来越多的重视。目前,在我国北方地区,星斑川鲷人工繁殖已经成功,并发展成为北方沿海地区的一项新兴养殖产业。目前关于星斑川鲷的研究多集中在生物学特性、分类学、形态发育、遗传特性上。本实验运用同源克隆和末端快速扩增方法克隆了星斑川鲷MHC II Ii基因的cDNA序列全长,并对cDNA和推测的氨基酸序列进行了生物信息学分析,比较了和其他物种的MHC II Ii氨基酸序列的差异。qRT-PCR方法分析了MHC II Ii基因在不同组织中的表达情况以及在爱德华氏菌感染后表达水平的变化,可为进一步研究MHC II类分子的调控机制提供理论基础,可推动鱼类MHC免疫进化机制的研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用星斑川鲷取自日照海洋水产资源增殖站的健康养殖鱼,鱼体质量(200 ± 10) g,体长(20 ± 2) cm,随机选取10尾鱼,在试验室暂养1周后,解剖,取脾脏、心脏、鳃、肝脏、性腺、后肠、血液、肌肉和头肾等组织立即存放于液氮中,备用。

1.2 实验方法

取正常健康的星斑川鲷脾脏和头肾组织,采用TRIzol总RNA提取试剂(康为世纪)提取总RNA,使用RNase Free DNase I (TaKaRa)对总RNA进行处理,除去DNA污染,最终定容于无RNase水中。用核酸蛋白测定仪检测纯度并计算浓度,同时进行琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。纯化后的总RNA溶液保存于-80 °C。

MHC II Ii cDNA的5'-RACE和3'-RACE扩增根据本实验室构建的星斑川鲷脾脏组织的转录组库中的MHC II Ii部分序列^[13],利用Primers 5.0设计引物GSP1、GSP2(表1)扩增目的片段,按照SMARTer™ RACE cDNA Amplification试剂盒(Clontech)说明书进行反转录、3'RACE和5'RACE扩增。3'RACE程序为95 °C 4 min; 95 °C 45 s, 63 °C 45 s, 72 °C 2 min共30个循环; 72 °C延伸10 min。5'RACE程序为95 °C 4 min; 95 °C 45 s, 65 °C 45 s, 72 °C 1 min共30个循环; 72 °C 10 min。取5 μL PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,采用琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(生工生物工程(上海)有限公司)切胶回收3'RACE产物及5'RACE产物,将PCR产物纯化后连接到PTZ57R/T(Thermo)载体上,转化到感受态细胞

表1 实验中克隆和表达用到的引物及其序列

Tab. 1 The primers and sequences of clone and expression used in this experiments

引物 primer	序列 sequence	用途 usage
3'CDS	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T) ₃₀ VN	3' cDNA 反转录
5'CDS	(T) ₂₅ VN(N = A、C、G or T; V = A、G or C)	5' cDNA 反转录
UPM(Long)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAG TGGTATCAACGCAGAGT	3'&5'扩增
UPM	short CTAATACGACTCACTATAGGGC	3'&5'扩增
SMARTer II A Oligo	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACXXXXX 5' cDNA	反转录
NUP	AAGCAGTGGTATCAA	5'端扩增
GSP1	GCCAGGTGTGACGAGAGCG	3'端扩增
GSP2	TGTGGGGCTGACGGGTTGAC	5'端扩增
MHC	II li F TCTGAGGAACCTGCTCACTG	验证全长
MHC	II li R AGATGTTATTTTTGGGTTA	验证全长
Q-MHC	II li F AGCAAAGTCCGACGAAAG Realtime	PCR引物
Q-MHC	II li R AGAAGCAGAGGAAACCCAGAGA Realtime	PCR引物
β-actin	F CAACTGGGATGACATGGAGAAG	内参引物
β-actin	R TTGGCTTTGGGGTTCAGG	内参引物

表 2 星斑川鲷MHC II Ii的氨基酸组成

Tab. 2 Amino acid composition of MHC II Ii in *P. stellatus*

氨基酸 amino acid	数目 number	百分比/% percent	氨基酸 amino acid	数目 number	百分比/% percent
Ala (A)	23	8.2	Pro (P)	20	7.2
Arg (R)	15	5.4	Ser (S)	22	7.9
Asn (N)	9	3.2	Thr (T)	18	6.5
Asp (D)	19	6.8	Trp (W)	4	1.4
Gln (Q)	21	7.5	Tyr (Y)	3	1.1
Glu (E)	11	3.9	Val (V)	10	3.6
Gly (G)	17	6.1	Met (M)	14	5.0
His (H)	4	1.4	Lys (K)	15	5.4
Ile (I)	9	3.2	Leu (L)	29	10.4
Cys (C)	7	2.5	Phe (F)	9	3.2

E. Coli DH5 α 中, 涂平板、挑菌, 经PCR检测阳性克隆后进行扩培, 提取质粒DNA, 送上海桑尼公司进行序列测定, 将3'RACE和5'RACE获得的基因片段连接为MHC II Ii cDNA全长, 用引物MHC II Ii F和MHC II Ii R进行全长PCR扩增验证(表1), 并与GenBank中已知序列进行比对。

生物信息学分析与系统进化树的构建 利用DNASTAR软件进行序列拼接。用GENSCAN软件确定正确的开放阅读框, 并翻译成氨基酸序列。用ProtParam预测理化性质, 用PredictProtein预测其二级结构, 利用SOPMA软件进行蛋白质二级结构预测, 利用I-TASSER软件进行蛋白质三级结构预测, 用获得的星斑川鲷MHC II Ii氨基酸序列与其他物种MHC II Ii氨基酸序列进行Clustal W比对, 然后用MEGA 5.0软件Neighbor-Joining法(bootstrap values为1000)进行分子进化分析。

MHC II Ii基因的组织表达及病原感染对其表达的影响 取日照市海洋水产资源增殖站的健康星斑川鲷50尾, 运回实验室驯养5 d, 实验期间海水温度保持在(18 \pm 2) $^{\circ}$ C左右, 每天换水, 充氧。共设置3个处理组, 每处理组3组重复, 每组重复5尾星斑川鲷。处理组1为不同组织MHC II Ii基因的表达水平的检测实验, 处理组2和3为病原菌感染对MHC II Ii基因表达水平的影响实验。采用qRT-PCR法检测MHC II Ii mRNA在肝脏、脾脏、肠、头肾、血液、鳃、肌肉、心脏和性腺组织中的相对表达量和在病原感染时肝脏、脾脏、后肠和头肾组织中的表达水平变化。病原菌爱德华氏菌于28 $^{\circ}$ C、LB培养

基中震荡培养24 h后, 4 $^{\circ}$ C离心后收集菌体, 灭菌海水悬浮菌体, 调整细菌浓度为10⁸ CFU/mL, 处理组3每尾腹腔注射1 mL 爱德华氏菌, 在感染前和感染后第3天时, 处理组2和处理组3随机抽取5尾取其肝脏、脾脏、后肠、头肾组织, 使用Prime ScriptTM II 1st strand cDNA synthesis Kit试剂盒(TaKaRa)进行反转录得到cDNA。

根据得到的星斑川鲷MHC II Ii cDNA全序列, 设计特异性引物Q-MHC II Ii F和Q-MHC II Ii R, 以 β -actin作为内参引物(表1)。以感染前和感染后的脾脏、头肾、肝脏和后肠组织RNA为模板, 采用Fast Start Universal SYBR Green Master(ROX)(Roche)进行qRT-PCR, 程序为95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 共40个循环。采用2^{- $\Delta\Delta$ CT}方法分析基因表达水平的变化。目的基因的CT值与内参基因的CT值之间的差称为 Δ CT, 处理组 Δ CT与未处理组 Δ CT之间的差为 $-\Delta\Delta$ CT, 2^{- $\Delta\Delta$ CT}值即为样品的该基因的相对表达水平。利用SPSS 16.0软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), 设定差异显著水平P为0.05, 当P < 0.05时即差异显著, 当P < 0.01时即差异极显著。

2 结果

2.1 星斑川鲷MHC II Ii基因cDNA的全长克隆与序列分析

星斑川鲷MHC II Ii基因的核苷酸及推导的氨基酸序列(GenBank登录号:KR996719)见图1。利用在线工具GENSCAN(<http://genes.mit.edu/GEN>)

```

-135                               CCC CAG AAG GGG CTC
-120  CAA CAG CCA CCT TTC TGA GGA ACC TGT CCA CTG CTC CTT CCT CAT TTT ACA GAC CAT TTA
-60   TTA GTC TGA CCA GTT GAA CTT TCT CCA GTT TGT TGC TGT GAA GAA GCT TCA GAG ATC ACG
1    ATG GACCAG GCT GAC AGA GAAAACCT TCCCAG GACGTA AGG AGT CTG GCA GGC AGC GAT
1    M D Q A D R E N P S Q D V R S L A G S D
61   GTA GGC CTT TTA AAC CCT GCC CCC AGA AGG GGC TCC AAC AGC CGG GCC TTT AAG ATC GCC
21   V G L L N P A P R R G S N S R A F K I A
121  GGC CTG ACC ACG CTG GCG TGT CTG CTG CTG GCC AGC CAG GTC TTC ACT GCC TAC ATG GTG
41   G L T T L A C L L L A S Q V F T A Y M V → MHC 结合区
181  TTC GGC CAG AAG CAG CAG ATC AAC TCT CTG GAG AGG GAC TCC GAG AAA ATG GCC AAG CAG
61   F G Q K Q Q I N S L E R D S E K M A K Q
241  CTG ACC CGC TCC TCC CAA GCT GTG GGC TCA ATG AGG ATG CCC ATC AAG AAC ATG CCT CTG
81   L T R S S Q A V G S M Q M P I K N M P L
301  ATG ATG GAT CTG ACT CTG GAT GCC GAC GAC GAC ACA GCA GCG AAG ACG CCC TTG ACC AAA
101  M M D L T L D A D D D T A A K T P L T K
361  CTT CAG GAC ACG ACC ATT GTC AGT TTG GAG AAG CAG CTG ACG GAT CTC CTG CAG GAT CCC
121  L Q D T T I V S L E K Q L T D L L Q D P
421  CAC CTG CCA CAG TTC AAT GAC ACC TTC GGG CCC AAC CTG CAG AGC CTG AAG GAG CAG ATG
141  H L P Q F N D T F G P N L Q S L K E Q M
481  GAG GAC AGC GAG TGG CAG GGC TTT GAG TCC TGG ATG CGT CAC CGG CTC ATC TTC CAG TTG
161  E D S E W Q G F E S W M R H R L I F Q L → MHCassoc_trimer
541  GCC CAG CAG ATG CCT GCA GCC CCC ACC TCT CTG CCA GCT TCT AAG ACC AAG AGC AAA TGC
181  A Q Q M P A A P T S L P A S K T K S K C
601  CAG ATG GAG GCG ACA CAC GGG AAG ATC GGG GCC TAC AAG CCC AGG TGT GAC GAG AGC GGC
201  Q M E A T H G K I G A Y K P R C D E S G
661  CGC TAC CTG CCC ATG CAG TGC TGG TCC TCC ATT GGC TTC TGC TGG TGT GTG GAT GTC AAT
221  R Y L P M Q C W S S I G F C W C V D V N → TY区域
721  GGC GTC CCC ATT CCT GGC ACC AAC GTC CGC GGA CAC CCC GAC TGC CCA ACT GCT CTT CGC
241  G V P I P G T N V R G H P D C P T A L R
781  AGT AGG AAG TTC GCT CCC ATG CTG ATT CCT GAG GCC CTC GGC ACT GAT GGT CAG TGA
261  S R K F A P M L I P E A L G T D G Q End
841  ATC CAA TGA AGC AAA GTC CGC AGC AAA GGG TTT CTT CTC CTC AAG CAA TCA TAACAG ACA
901  CGA CGG CTC GGC CGC TGG ATC TGG CTC TGC TAC GGA CAG CAA TGG TTT AAC CAC CTG ATC
961  GCT TCT CCT TCC ATG TAA TCT CTG GGT TTC CTC TGC TTC TCC TTC TGC TTG AAA TTA AAC
1021 CAA AGG CCT GTT GCT GTG TCA GGA TGT GAA ACT TAG TTG ATT TTC TCT GAT TTA TTT GGG
1081 GGG TTT CTC ATT GAC AAT TTA ACT TAG ATA TTC ATA TAA TCT GTA GCA AAT TAA AGT AGA
1141 TGT GTT TTG AAA AAT GTT TAA ATA GTT TGA TGA CTC GGA TAA CCC AAA AAA TAA CAT CTT
1201 CTC TCA ATG TCC AAT ACC ATT GTC CAG TCA TTG AGG TTA CTC TGG TAA AAG ATG TCT GCC
1261 TCT CAC CAC CTA CAT AAT GTG TTT GTT TAA AGG AGC TTA CAG TAA TAA AAA TTC ACA TTA
1321 AAG AAA AAA GAC TCA ATG TCC CAT GTA ACT GTG ATT ATC TGT AGA CCT CAC ATG TGA AAG
1381 TTG TCA CTG GCA CCG ATT CCA ATT AAA GTA GTT TCA ATA AAA CTG GTT GTA ATT GCA TGA
1441 TCC AAC CTG TTT AAT GAT GTT CAC ATC AGA GTG TGG ATA CCT GAC CCG ACG GGA CGG ATG
1501 GAG TAG ATT GAT ATT TAT GTT TGG ACA GAA AGG AAA CTG AAA GCC TTT CGG GTA GTG CAC
1561 ATA TGA GAC AGT GAC CTT TAT ATG AAG ATG TTT GTG TTA AGA ATG ATG AAT AAA GTT CTC
1621 CGA AAC ATAAA

```

图 1 星斑川鲈MHC II li的cDNA全长及推导的氨基酸序列

Fig. 1 The cDNA sequence and its deduced amino acid sequence of MHC II li from *P. stellatus*

SCAN.html)分析得知: 该cDNA全长1766 bp, 5'UTP含有135 bp, 3'UTP含有794 bp, 开放阅读框有837 bp, 共编码279个氨基酸。在3'端有明显的加尾信号序列AATAAA, 这表明获得的该cDNA全长序列3'末端序列完整。

氨基酸序列包括胞外结构域、跨膜区和胞质区, 其中1~36位于胞质区, 37~61位于跨膜区, 62~279则位于胞外区。结构具有保守的半胱氨酸残基、多肽结合区和N-糖基化位点等。在17~103位点为MHC II结合区, 130~192位为MHC结合三聚体(MHCassoc_trimer)区, 200~255位为甲状腺球蛋白(TY)区。在三聚体区第147位和153位分别含有N-糖基化位点(N-[P][ST][P])(图1)。

利用在线工具ProtParam(<http://web.expasy.org>)分析编码的氨基酸, 结果显示其理论分子量为30848.3 u, 分子式为 $C_{1338}H_{2143}N_{381}O_{413}S_{21}$, 总共有4296个原子组成, 预测的等电点(Theoretical pI)为6.89, 理论推测半衰期(estimated half-life)在哺乳动物网状细胞中为30h, 不稳定系数为

48.51, 可推断为不稳定蛋白, 总带正电残基(Arg + Lys)为30, 总带负电残基(Asp + Glu)为30, 总平均亲水性(grand average of hydropathicity)为-0.437, 脂肪系数(aliphatic index)为71.76。

2.2 星斑川鲷MHC II Ii的空间结构模拟

通过SOPMA软件进行蛋白质结构分析显示, 在MHC II Ii蛋白质的二级结构中, α -螺旋占43.37%, β -转角占7.53%, 无规则卷曲占39.43%, 延伸链占9.68%。利用I-TASSER软件, 对星斑川鲷MHC II Ii蛋白分子的空间结构进行了预测, 并与人抗原MHC II Ii进行比较(图2)。

2.3 星斑川鲷MHC II Ii与其他物种MHC II Ii的多重比对及系统进化树分析

星斑川鲷MHC II Ii与其他物种MHC II Ii的多重比对 利用Clustal W软件, 将推导的星斑川鲷MHC II Ii氨基酸序列与其他物种在NCBI上进行同源性比较, 结果表明: 星斑川鲷与狼鲈

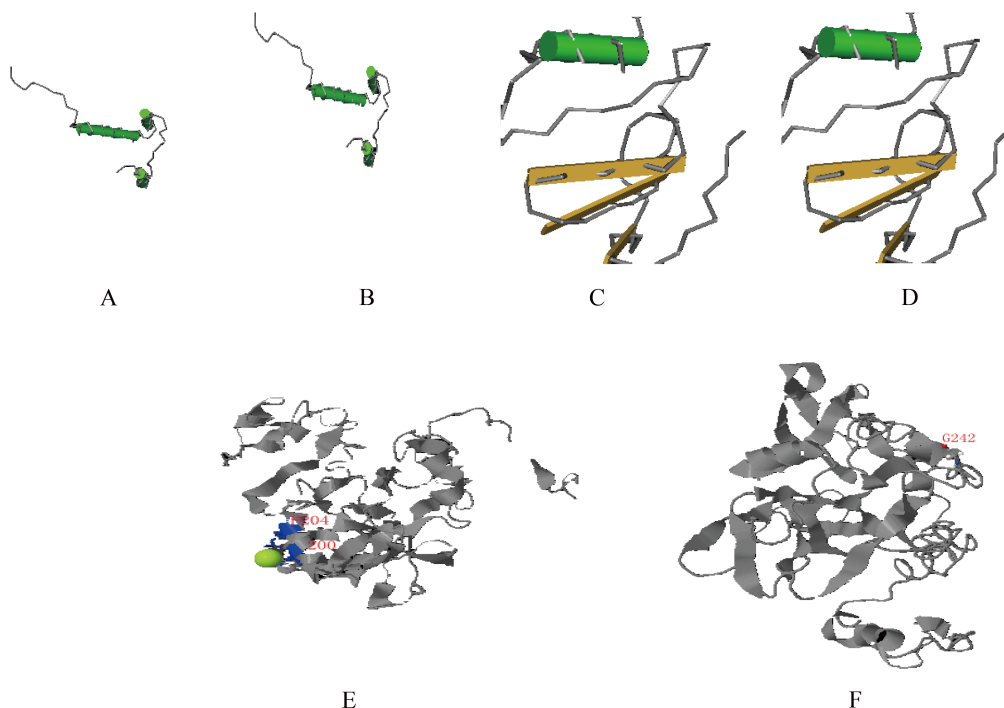


图2 星斑川鲷 MHCII Ii 的空间结构

A. 星斑川鲷 MHCII Ii三聚体区空间结构; B. 人抗原相关的MHCII Ii空间结构; C. 星斑川鲷MHCII Ii的TY空间结构; D. 人类MHC associated p4I II空间结构; E. 星斑川鲷MHCII Ii配体结合位点; F. 星斑川鲷MHCII Ii酶活性位点

Fig. 2 The tertiary of MHCII Ii from *P. stellatus*

A. The tertiary of MHCassoc—trimer of MHCII Ii from *P.stellatus*; B. The tertiary of HLA-DR antigens associated invariant chain; C. The tertiary of TY of MHCII Ii from of MHC class II associated *P.stellatus*; D. The tertiary of MHC class II associated P4I II; E. Ligand binding sites of MHCII Ii from *P.stellatus*; F. Enzyme commission numbers and active sites of MHCII Ii from *P.stellatus*

(*Dicentrarchus labrax*)、紫红笛鲷(*Lutjanus argentimaculatus*)、鳊(*Siniperca chuatsi*)和赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)的同源性依次为79%、79%、79%、77%，并且不同物种的MHC II Ii链含有相同的结构域，存在着数目不等的保守性氨基酸，可进一步说明MHC II Ii基因进化相对保守(图3)。

星斑川鲷MHC II Ii系统进化树分析 利用MEGA 5.0软件，以邻接法构建16种生物MHC II Ii的氨基酸序列的系统发育树(图4)。图中结果显示16种生物的进化树系统上分为两大分支，其中硬骨鱼类为一支，其他灵长目、鸟类等则为另一分支。在硬骨鱼类所在分支中，星斑川鲷独自为一支，与紫红笛鲷、狼鲈和鳊关系较近。

2.4 星斑川鲷MHC II Ii mRNA的组织分布分析

qRT-PCR方法检测MHC II Ii mRNA在星斑川鲷不同组织的表达，结果表明：在后肠、头肾、心脏、肝、肌肉、血液、鳃、性腺和脾脏组织均有表达，但表达水平存在差异。在脾脏表达水平最高，显著高于其他组织($P < 0.01$)，肝脏、后肠和头肾等免疫相关组织中表达水平次之，在鳃、血液、肌肉、心脏和性腺中表达量较少(图5)。

2.5 病原感染对星斑川鲷MHC II Ii mRNA表达水平影响的分析

病原感染星斑川鲷后，MHC II Ii在不同组织的表达情况表明，病原感染导致头肾和脾脏组织中的MHC II Ii mRNA表达水平显著升高，后肠和肝脏中的表达水平则变化不显著。

3 讨论

本研究通过SMART-RACE技术在星斑川鲷脾脏和头肾组织中扩增出MHC II Ii的cDNA全长序列，其预测的蛋白质二级结构中， α -螺旋和无规则卷曲分别占43.37%和39.43%，所占比例较高。 α -螺旋构象是相当稳定的、最普遍的二级结构形式，无规则卷曲往往与蛋白质分子功能实施和构象相关，对外界的理化因子极为敏感。这表明恒定链Ii基因翻译合成结构稳定、具有特异性功能的蛋白质。星斑川鲷MHC II Ii氨基酸包括胞外结构域、跨膜区和胞质区，其中1~36位

于胞质区，37~61位于跨膜区，62~279则位于胞外区(图1)。2012年，叶显峰等^[14]克隆得到鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)MHC II Ii，研究发现该Ii分子由胞浆区(第1~29位氨基酸)、跨膜区(第30~58位氨基酸)和内质网腔区(第59~232位氨基酸)组成。跨膜区是MHC II Ii在进化中最保守的部分，并且是MHC II Ii复合体形成所必需的。Ann等^[15]利用氨基酸定点突变试验发现，跨膜区Gln47和Thr50 2个氨基酸是Ii链结合成同源三聚体和MHC II分子组装成 $(\alpha\beta Ii)_3$ 九聚体中是必不可缺少的。许发芝等^[16]确定了鸡MHC II Ii分子跨膜区2个氨基酸(Gln)和(Thr)残基在形成MHC II-Ii复合物中起不可替代的重要作用。Kazuhiro等^[17]对虹鳟(*Salmo salar*)、鸡、鼠和人等的ICLP1和ICLP2研究表明，不同物种间ICLP的跨膜区和三聚体区具有很高的同源性，该区域的保守性体现了其对维持ICLP蛋白功能具有重要意义。但研究同时表明，ICLP分子在一定区域如MHC II结合区也存在一定程度的变异，这和ICLP分子与不同MHC II分子相结合的功能是相适应的。

本研究通过MHC II Ii氨基酸序列构建了包括星斑川鲷在内的16种脊椎动物的进化树，所构建的进化树不仅显示了硬骨鱼类的单系起源，而且在硬骨鱼类所在分支中，星斑川鲷独自为一支，与紫红笛鲷、狼鲈和鳊关系较近，因为硬骨鱼类MHC II Ii的研究较少，与星斑川鲷进化关系较近的物种也较少。

采用qRT-PCR方法检测了MHC II Ii基因在星斑川鲷不同组织的分布情况。结果表明：MHC II Ii mRNA在后肠、头肾、心脏、肝、肌肉、脑、鳃、性腺和脾脏组织均有表达，但在表达量上存在一些差异。在脾脏、后肠、肝脏和头肾免疫相关组织中表达水平较高，其次是鳃和血液，在肌肉、心脏和性腺中表达量较少，该特征与王颖等^[12]在赤点石斑鱼中的研究结果相同。可见，恒定链Ii基因在生物体的多种组织中存在，但主要集中在具有防御功能的部位。恒定链Ii作为MHC II的抗原呈递伴侣分子，通常与MHC II分子共表达于抗原呈递细胞^[2,18]，行使抗原呈递能力，引起免疫保护应答^[19]。

本实验提取病原爱德华氏菌感染不同时间后的星斑川鲷肝脏、脾脏、头肾和后肠组织的

RNA, 应用qRT-PCR对MHC II Ii mRNA表达水平变化进行测定。结果表明: 病原感染导致脾脏、头肾、肝脏和后肠组织中的MHC II Ii

mRNA表达量升高, 升高最多的为脾脏, 其次为头肾, 这可能与星斑川鲮免疫相关组织的抗原提呈及防御反应相关。

	Cytoplasmic domain	TM domain
<i>Cyprinus carpio</i>	-MDEH---QDQALFQRVPSQETIVN----	-GGTGGSNKGKALKVAGLTVLACL LLAGQAL
<i>Danio rerio</i>	MEPDH---QNESLIQRVPSAETILG----	-GDARNSNTKALKITGLTVLACL LLAGQAL
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	-MDEH---QNESLIQRVPSSEETVLS----	-GPTRNSNGKALKVTVLTVLACL LLAGQAL
<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	-MDEH---QNESLIQRVPSSEETVLS----	-GPTRNSNGKALKVTVLTVLACL LLAGQAL
<i>Salmo salar</i>	--MEGQQQHHDDALLERTGSQDVILP----	MTATRGASNSRPLKIAGLITTLACL LLASQVF
<i>Esox lucius</i>	-MEEQQQIHNEALLERTASDEAILP----	SVR-RRTSNSRAFKVAGFTLLACL LLAGQQL
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	-MADQGEDAPLARGSVAGSEEGILL----	RARPAGGSNSHALKVAGLTTVLCL LLSQVF
<i>Pltichthys stellatus</i>	MDQADRENPSQDVRSLAGSDVGLLN----	PAAPRRGNSNSRAFKIAGLITTLACL LLASQVF
<i>Epinephelus akaara</i>	-MAEPAEGAPLAAGSLASSEEDLLP----	LTAQRGGSNSRALKIVGLTTLACL LLASQVF
<i>Siniperca chuatsi</i>	-MADSAEDAPMARGSLAGSDEAILL----	PAGPTGGNSRALKIVAGLTTLACL LLASQVF
<i>Dicentrarchus labrax</i>	--MAHSEDAPLATGSLAGSEELVVL----	SGRPTGGNSRALKIVAGLTTLACL LLASQVF
<i>Lutjanus argentimaculatus</i>	-MASSPEDAPLARGSLAGSEELVVL----	PGRPGGNSRALKIVAGLTTLACL LLASQVF
		CLIP domain
<i>Cyprinus carpio</i>		TAYLVWGQKEHISALTTGQEKLKTE-----
<i>Danio rerio</i>		LTRKMSGAPPKAMHLPKMSMPL LKDFSDDS
<i>Ctenopharyngodon idella</i>		TAYMVWGQKHINALTSGQEKLKAE-----
<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>		LTRKMSAGAPKAMSLPMNSMPL LKDYSDPT
<i>Salmo salar</i>		TAYLVWGQKEHISALTTSSQEKMKTE-----
<i>Esox lucius</i>		LTRKMSAGPPKAMHLPKMSMPL LKDFSDPT
<i>Tetraodon nigroviridis</i>		TAYLVWGQKEHISALTSQEKLKTE-----
<i>Platichthys stellatus</i>		LTRKVSAGPPKAMHLPKMSMPL LKDFSDPT
<i>Epinephelus akaara</i>		TAYMVFNQRGQIHDMEKSNNDNRKQ-----
<i>Siniperca chuatsi</i>		LRNRPPAVAPVQMHMPMLNMPRL I DFTDED
<i>Dicentrarchus labrax</i>		TAYLVFNQRGQINDMQKNNNDNRKQ-----
<i>Lutjanus argentimaculatus</i>		LRNRPP-VAPVQMHMPMLNMPRL I DFSEED
		TAYMVFGQRQIQRELQGNKRISNQ-----
		LTRSSQA--PVRMQVPMRSLPMMRAFDPDT
		TAYMVFGQRQIINSLERDSEKMAKQ-----
		LTRSSQAVGSMR--MPIKNMPLMDLTLDA
		TAYMVFDQKQIHSLQRNSDKLGRQ-----
		LTRSSQAVAPVRMHMPMNSLPL LMDFDADA
		TAYMVFGQKEQIHTLQKNSERM SKQ-----
		LTRSSQAVAPMKMHMPMNSLPL LMDFTPNE
		TAYMVFGQKEQIHTLQKNSERM SKQ-----
		LTRSSQAVAPVRMHMPMNSLPL LMDFTDED
		TAYMVFGQRQIHTLQRNSEKMGQR-----
		LTRSSQAVAPMRMHMPMNSLPL LDRFSSDD
		Tg domain
<i>Cyprinus carpio</i>		SDQTSK-KSSVPLTKLQPIFT---NQKEGSGQLD---
<i>Danio rerio</i>		ASRLMPK-----Q
<i>Ctenopharyngodon idella</i>		SDQTAVKSKSVPLTKLRPIYS---NQREGSGQVD---
<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>		GSRLMPK-----M
<i>Salmo salar</i>		SDQTSKDKKSSPLVKLHPVFT---NQREGSGQLD---
<i>Esox lucius</i>		GVRMPK-----T
<i>Tetraodon nigroviridis</i>		SDQTSKDKKSGSLVKLHPVFT---NQREGSGQLD---
<i>Platichthys stellatus</i>		GARM-----
<i>Epinephelus akaara</i>		-KK-----TPMTKLEA--TAIVSLEKQVKD LL---
<i>Siniperca chuatsi</i>		QNPQLPQFNETFLANLQSLKRQ
<i>Dicentrarchus labrax</i>		-SQTT---KNSPMTKLENTAVAIQSLEKQVKD LL---
<i>Lutjanus argentimaculatus</i>		QNPQLPQFNETFLANLQGLKKQ
		DT-----PIMPAAVQE--T-VVSVETQVKD LL---
		QNFTLPANSTFASNLLALKSQ
		DDDTA---AKTPLTKLQD--TTIVSLEKQLTD LL---
		QDPHLPQFNDFGNLQSLKEQ
		--NTPK---KKTPLTKLQE--A-VVSVEAQLKELLQ---
		EDSQLPQFNETFLANLQGMKQ
		-D-----SKTPLTKLQD--TAVVSVEKQLKD LM---
		QDSQLPQFNETFLANLQGLKQQ
		-S-KA---TKTPLTKLQD--T-VVSVEKQVKD LI---
		QDSQLPQFNETFMANLQSLKQH
		-D-----SKTPLTKLQD--T-VVSVEKQVKD LV---
		QDSQLPQFNETFLANMRSLKHQ
<i>Cyprinus carpio</i>		-----MQLPMRSLPL LMDT--DDVKSTPESAVEVQSKCQL ESQK--
<i>Danio rerio</i>		QMKRGFYKPKQ
<i>Ctenopharyngodon idella</i>		-----MHLPMRSMPL LVNA--DEDVKSSPESVVELETKCKLESER--
		EVRPGFFKPA
		-----MHLPMRSMPL LVDA--DEEVKSSPESAVEVETKCKLESEK--
		QVRPGFYKPKQ

<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	-----MHLPMKSMPLLVDA--DEEVKSSPESAVEVETKCKLESEK--QVRPGFFRPQ
<i>Salmo salar</i>	MEEAEWKGFQAWTRNWLIFQMAQEKPP-ATTPQPAAGLQTKCNL-EAS-KGRKLGAYLPQ
<i>Esox lucius</i>	MESNEWKDFETWTRNWLIFQMAQEKTAVSATPKPSTGLQTKCSEVKDS-LKHMGLGTYVPQ
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	MDQTTWQKLESWMQSWLIFQMAQEKPP-TITATPAP-VMTKCQKEAAS-VKHLGLGTRKPKQ
<i>Platichthys stellatus</i>	MEDSEWQGFESWMRHRLIFQLAQQMPA-APTSLPASKTKSKCQMEATH-G--KIGAYKPR
<i>Epinephelus akaara</i>	HVNETDWKSFESWRYWLIHQIAQRTPA-PPTAEPTTAPLTKCQQAAP-GPSKIGSYKPKQ
<i>Siniperca chuatsi</i>	MNESEWKSFEWRYWLIHQMAQQKPV-PPTADPASLIKTKCQMESAP-GVSKIGSYKPKQ
<i>Dicentrarchus labrax</i>	INESEWQSFESWRYWLIHQMAQKTPV-PPTADPASLIKTKCQMEAAP-GPSKIGSYKPKQ
<i>Lutjanus argentimaculatus</i>	LNETEWSQFETWRYWLIHQMAQQQPP-PPTAQPASLIKTKCQMEAAP-GPSKIGSYKPKQ
<i>Cyprinus carpio</i>	CDEQGNLYLPMQCWHRPGYCWCVDKKGNEIPGTSVRGRRPDCS-----
<i>Danio rerio</i>	CDEEGNYLPMQCWHSSTGYCWCVTGTEIEGTRIRGR-PQC-----
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	CDEEGNYLPIQCWHSTGYCWCVDKGHEIPDTRIRGR-PQCGSE-----
<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	CDEQGNLYLPMQCWHSSTGYCWCVDKGNEIPDTRTRGR-PKCDSE-----
<i>Salmo salar</i>	CDEQGNLYLPMQCWHATGFCWCVDKDGKPIEGTSIRGR-ATCDRFP---SRMAAFPRMMQL
<i>Esox lucius</i>	CDEQGNLYLPMQCWHATGFCWCVDKGTIPGTAVRGR-ASCNQGF---RRVAAPPMMMQV
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	CDELGQYTFIQCWPAVGMWCVDSSGTAVPGTAVRGR-PNCPRAS--PRHMMLAPLREMA
<i>Platichthys stellatus</i>	CDESGRYLPMQCWSSIGFCWCVDVNGVPIPGTNRVGR-PDCPTAL---RSRKFAPLIPE
<i>Epinephelus akaara</i>	CDEQGGRYKPMQCWHATGFCWCVDVFNVEGTRMRGR-PDCQRASLYPRRVMLAPRLMQK
<i>Siniperca chuatsi</i>	CDEQGGRYKPMQCWHATGFCWCVDVETGAVIEGTTMRGR-PDCQRRALAPRRMAFAPSLMQK
<i>Dicentrarchus labrax</i>	CDEQGGRYKPMQCWHATGFCWCVDVETGTAIEGTTMRGR-PDCQRGS-MPRRVMLAPRLMQK
<i>Lutjanus argentimaculatus</i>	CDEQGGRYKPMQCWHATGFCWCVDVETGTTIEGTTMRGR-PDCQRGT-FPRRMMAPRLMQK

图 3 星斑川鲮MHC II Ii和其他物种的氨基酸序列的多重比较

Fig. 3 Amino acid sequence alignment of MHC II Ii from *P. stellatus* with other fishes

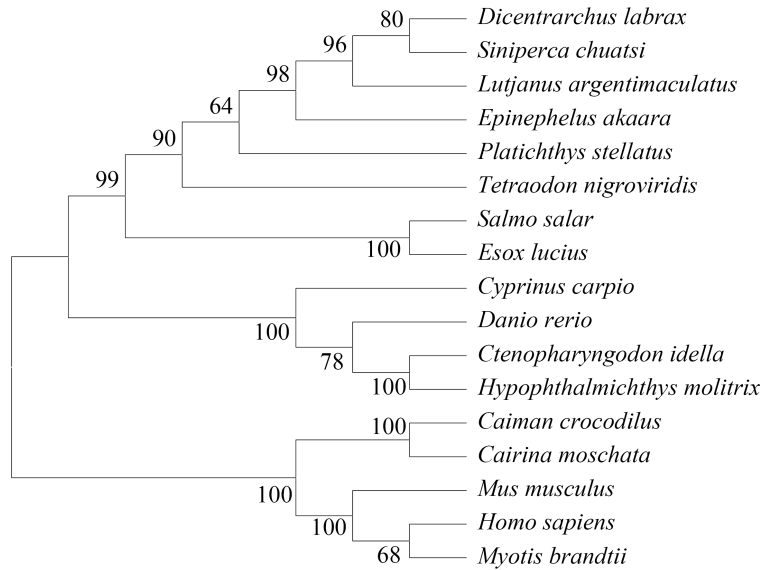


图 4 星斑川鲮MHC II Ii氨基酸与其他物种MHC II Ii系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of MHC II Ii showing the relationship between *P. stellatus* and other known vertebrates

The Species and GenBank Accession numbers of amino acid sequences are listed as follows: *Dicentrarchus labrax*: ABH09445, *Lutjanus argentimaculatus*: ACO82381, *Epinephelus akaara*: ACJ09264, *Tetraodon nigroviridis*: CAG06284, *Salmo salar*: ACI66436, *Esox lucius*: NP_001290671, *Cyprinus carpio*: BAC53767, *Ctenopharyngodon idella*: AIY53680, *Danio rerio*: AAD24542, *Caiman crocodiles*: ABB22797, *Cairina moschata*: AHB20201, *Homo sapiens*: NP_001020330, *Myotis brandtii*: EPQ10330, *Mus musculus*: NP_001036070, *Hypophthalmichthys molitrix*: AEZ67439, *Platichthys stellatus*: KR996719.

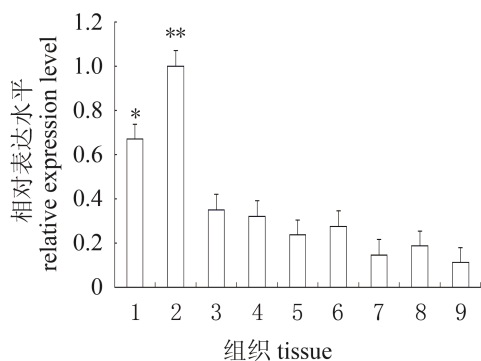


图5 MHCII Ii基因在星斑川鲷不同组织的表达情况

1. 肝脏, 2. 脾脏, 3. 后肠, 4. 头肾, 5. 血液, 6. 鳃, 7. 肌肉, 8. 心脏, 9. 性腺

Fig. 5 Distribution pattern of MHC II Ii in the different tissues of *P. stellatus*

1. liver, 2. spleen, 3. hind-gut, 4. head kidney, 5. blood, 6. gill, 7. muscle, 8. heart, 9. gonad

“***” The extremely significant differences of the tissue compared with other tissues are indicated by “***” ($P < 0.01$)

“*” The significant differences of the tissue compared with other tissues are indicated by “*” ($P < 0.05$)

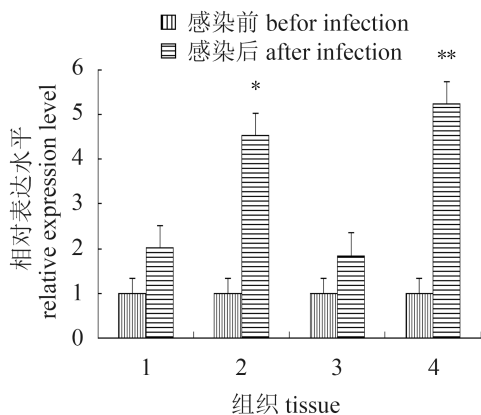


图6 病原感染星斑川鲷前后MHCII Ii基因在不同组织的表达情况

1. 肝脏, 2. 脾脏, 3. 后肠, 4. 头肾

Fig. 6 The expression level of MHC II Ii in different tissues of *P. stellatus* after infection

1. liver, 2. spleen, 3. hind-gut, 4. head kidney

** The extremely significant differences compared with control ($P < 0.01$)

* The significant differences compared with control ($P < 0.05$)

参考文献:

[1] 周光炎. 免疫学原理[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2000: 63-121.

Zhou G Y. Principles of Immunology [M]. Shanghai:

Shanghai Science and Technology Literature Press, 2000: 63-121 (in Chinese).

[2] Faure-André G, Vargas P, Yuseff M I, *et al.* Regulation of dendritic cell migration by CD74, the MHC class II-associated invariant chain [J]. *Science*, 2008, 322(5908): 1705-1710.

[3] 张鹤, 茅利娜, 冯娟. 军曹鱼MHC-I基因全长cDNA的克隆及其组织表达分析[J]. *南方水产科学*, 2011, 2(7): 8-17.

Zhang H, Mao L N, Feng J, *et al.* Full-length cDNA cloning and tissue expression of major histocompatibility complex (MHC)-I α from *Cobia (Rachycentron canadum)* [J]. *South China Fisheries Science*, 2011, 7(1): 8-17 (in Chinese).

[4] Cresswell P. Assembly, transport and function of MHC Class II Molecules [J]. *Annual Review of Immunology*, 1994, 12: 259-293.

[5] Ye H, Xu F Z, Yu W Y. The intracellular localization and oligomerization of chicken invariant chain with major histocompatibility complex class II subunits [J]. *Poultry Science*, 2009, 88(8): 1594-1600.

[6] Cresswell P. Invariant chain structure and MHC class II function [J]. *Cell*, 1996, 84(4): 505-507.

[7] Germain R N, Rinker A G. Peptide binding inhibits protein aggregation of invariant-chain free class II dimers and promotes surface expression of occupied molecules [J]. *Nature*, 1993, 363(6431): 725-728.

[8] Bonnerot C, Marks M S, Cosson P, *et al.* Association with BiP and aggregation of class II MHC molecules synthesized in the absence of invariant chain [J]. *The EMBO Journal*, 1994, 13(4): 934-944.

[9] Beswick E J, Reyes V E. CD74 in antigen presentation, inflammation, and cancers of the gastrointestinal tract [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2009, 15(23): 2855-2861.

[10] Landsverk O J B, Bakke O, Gregers T F. MHC II and the endocytic pathway: Regulation by invariant chain [J]. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2009, 70(3): 184-193.

[11] Matza D, Kerem A, Medvedovsky H, *et al.* Invariant chain-induced B cell differentiation requires intramembrane proteolytic release of the cytosolic domain [J]. *Immunity*, 2002, 17(5): 549-560.

[12] 王颖, 张之文, 丁少雄, 等. 赤点石斑鱼ICLP基因的克

- 隆和序列分析[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2009, 48(3): 428-434.
- Wang Y, Zhang Z W, Ding S X, *et al.* Cloning and sequence analysis of ICLP from *Epinephelus akaara* [J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2009, 48(3): 428-434 (in Chinese).
- [13] Tong Y L, Sun X Q, Wang B, *et al.* Transcriptome of intraperitoneal organs of starry flounder *platichthys stellatus* challenged by *Edwardsiella ictaluri* JCM1680 [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2015, 33(1): 20-27.
- [14] 叶显峰. 鲢鱼恒定链cDNA的克隆及其分子结构与功能的分析[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2012.
- Ye X F. cDNA cloning and analysis of molecular structure and function of *H. molitrix* invariant chain [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2012 (in Chinese).
- [15] Dixon A M, Stanley B J, Matthews E E, *et al.* Invariant chain transmembrane domain trimerization: A Step in MHC class II assembly [J]. Biochemistry, 2006, 45(16): 5228-5234.
- [16] 许发芝, 吴胜国, 刘雪兰, 等. 鸡恒定链分子跨膜区2个氨基酸残基在形成MHC II -Ii复合物中的作用[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(5): 721-728.
- Xu F Z, Wu S G, Liu X L, *et al.* The function of two amino acid residues located in chicken invariant chain transmembrane domain in assembly of MHC II -Ii Complex [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2011, 42(5): 721-728 (in Chinese).
- [17] Fujiki K, Smith C M, Liu L, *et al.* Alternate forms of MHC class II-associated invariant chain are not produced by alternative splicing in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) but are encoded by separate genes [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2003, 27(5): 377-391.
- [18] Stumptner-Cuvelette P, Benaroch P. Multiple roles of the invariant chain in MHC class II function [J]. Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research, 2002, 1542(1-3): 1-13.
- [19] 刘生杰. 鸳鸯鸭恒定链基因的克隆、分子特征及其组织表达特性[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2012.
- Liu S J. Gene cloning, molecular characterization and tissue-specific expression of invariant chain in muscovy Duck (*Cairina moschata*) [D]. Hefei: Anhui Agricultural University. 2012 (in Chinese).

cDNA cloning and expression characteristics of MHC II invariant chain in *Platichthys stellatus*

ZHENG Fengrong¹, GUO Xiangyun^{1,2}, LIU Hongzhan³, LI Qing^{1,3}, WANG Bo^{1*}

(1. First Institute of Oceanography, State Ocean Administration, Qingdao 266061, Shandong, China;

2. Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

3. Marine College of Shandong University, Weihai 264209, China)

Abstract: In the present study, full length cDNA sequence of the major histocompatibility complex II invariant chain (MHC II) Ii gene was cloned in *Platichthys stellatus* by using 3'RACE and 5'RACE technique, and the sequence and structural analysis of the MHC II Ii gene by using bioinformatics method. The results showed that the MHC II Ii cDNA sequence consisted of 1766 bp, including 135 bp at 5' region, 794 base pairs at 3'untranslated region and an open reading frame with 837 bp which could encode 279 amino acids. The theoretical molecular weight was 30.848 kDa, pI was 6.89. Comparison of the amino acid sequences and phylogenetic analysis showed that the *P. stellatus* MHC II Ii had the close relationship with *Dicentrarchus labrax*, *Lutjanus argentimaculatus* and *Siniperca chuatsi*. The results of different tissues indicated that the expression levels of MHC II Ii mRNA were higher in spleen and head kidney, lower in gill, blood, muscle, heart and gonads by Real-time Quantitative PCR technique. After pathogen infection, the expression levels of immune spleen and head kidney increased most significantly, and liver and intestinal expression levels increased slightly. This study can provide a theoretical basis for the function and regulation mechanism of *P. stellatus* MHC II Ii, and for basic research of marine fish disease resistance breeding.

Key words: *Platichthys stellatus*; major histocompatibility complex II invariant chain MHC II Ii; gene clone; sequence analysis; expression characteristics

Corresponding author: WANG Bo. E-mail: ousun@fio.org.cn

Funding projects: National Hightech Research and Development (863); Program of China (2012AA10413, 2012AA10408); Special Fund for Ocean-scientific Research in the Public Interest (201405010)