



青海湖裸鲤与花斑裸鲤 *MHC* II 基因克隆、组织表达及多态性

张海琛^{1,2}, 许保可^{1,2}, 阿琳林^{1,2}, 马清花^{1,2}, 高强¹,
田文根³, 俞录贤³, 梁健^{1*}

(1. 青海大学, 省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室, 青海 西宁 810016;

2. 青海大学生态环境工程学院, 青海 西宁 810016;

3. 青海湖裸鲤救护中心, 青海 西宁 810016)

摘要: 为探究青海湖裸鲤中主要组织相容性复合体 (MHC) 基因在免疫功能调节过程中可能发挥的作用, 实验利用 cDNA 末端快速扩增技术 (RACE 技术) 克隆获得了青海湖裸鲤 *MHC* II α/β 基因和伴侣基因 *Ii* 全长 cDNA 序列以及花斑裸鲤 *MHC* II α/β 和 *Ii* 基因的编码区序列。将获得的基因序列进行对比分析, 结果显示, 两种鱼中该基因的序列特性基本一致。系统发生树结果显示, 两种鱼的 *MHC* II 与鲤科鱼类在进化地位上更接近, 聚为一支。两种鱼中 *MHC* II α/β 氨基酸序列均包括信号肽、两个功能区、跨膜区和胞质区, 且均在跨膜区发现 1 个在不同物种中的保守结构。实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 结果显示, 青海湖裸鲤 *MHC* II 主要在肾脏、脑、鳃、肝脏、臀皮中表达较高, 而花斑裸鲤主要在脑、肌肉、眼、鳃中高表达。对比正常状态和感染水霉后青海湖裸鲤鳃、肾脏、肝脏、肠组织中 *MHC* II 基因的表达变化, 发现 *MHC* II 3 个基因在肾脏组织中的表达水平显著下调, 而 *MHC* II α/β 基因在鳃、肝脏、肠组织中均显著上调。对青海湖裸鲤进行不同盐碱胁迫处理后, 检测到鳃、肾脏组织中 *MHC* II 基因的 mRNA 水平均显著降低。对两种鱼中 *MHC* II α/β 基因的多态性进行分析, 分别获得青海湖裸鲤和花斑裸鲤 *MHC* II α 8 种、12 种等位基因型, 分别编码 23 和 24 种氨基酸序列, 且这种序列多态性主要集中在 $\alpha 1$ 功能区; *MHC* II β 分别获得 12、14 种等位基因型, 编码 22、23 种氨基酸序列。青海湖裸鲤 *MHC* II α/β 的多态性均低于花斑裸鲤, 暗示其与青海湖裸鲤的盐碱耐受过程联系不紧密。遗传多样性分析结果表明群体多样性在两个物种中均较高, 其单倍型多样性接近 1, 且核苷酸多样性之间的差异较小。花斑裸鲤 *MHC* II 基因的单倍型多样性和核苷酸多样性均略高于青海湖裸鲤, 反映了青海湖裸鲤种群稳定性略低于花斑裸鲤。研究表明, *MHC* II 分子不仅在青海湖裸鲤和花斑裸鲤的免疫防御应答中发挥着重要作用, 还可能参与了青海湖裸鲤的盐碱耐受过程, 而基因多态性与盐碱耐受的关联度不高。

关键词: 青海湖裸鲤; 花斑裸鲤; 主要组织相容性复合体; 组织表达; 多态性

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

收稿日期: 2022-04-03 修回日期: 2022-04-28

资助项目: 国家自然科学基金 (31960741, 31660745); 青海省科技项目 (2016-ZJ-940Q)

第一作者: 张海琛 (照片), 从事动物生态学研究, E-mail: orange9605@163.com

通信作者: 梁健, 从事生物化学与分子生物学研究, E-mail: liangjianws@126.com



主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC), 是与免疫应答紧密联系的一种高度多态的基因连锁群^[1], 参与了有机生物体中抗原的呈递, 并在机体的适应性免疫中发挥重要作用。通常 MHC 基因分为三类: I 类 MHC 分子主要呈递机体的内源性抗原, II 类 MHC 分子主要负责加工、呈递外源性抗原^[2], III 类分子主要参与部分补体的组成成分以及受体的编码。而由于 III 类分子通常不参与机体的免疫应答过程, 故目前针对其的研究较少。

当前, MHC 的研究主要集中在如小鼠 (*Mus musculus*)、鸡 (*Gallus gallus domesticus*)、羊 (*Ovis*)、牛 (*Bos*) 等高等脊椎动物中, 又以人类和 (*Homo sapiens*) 小鼠中的研究居多且深入。哺乳动物中 MHC I 类分子由一条重链 (α 链) 和一条轻链 (β 链)、跨膜区、胞质区四部分组成, 其中 α 链分为 3 个结构域 ($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$), 抗原结合肽区主要由 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 构成。同样, 哺乳动物 II 类分子也由 α 链、 β 链、跨膜区和胞质区组成, α/β 链均由 4 个不同的功能结构域构成, 分别为 $\alpha 1/\beta 1$ 功能域、 $\alpha 2/\beta 2$ 功能域、跨膜区和胞质区。其中, $\alpha 1$ 和 $\beta 1$ 结构域构成了 II 类分子的抗原结合凹槽, 以 β 片层结构作为结合凹槽底部, α 螺旋则构成了凹槽的两边, 从而形成一个开放结构。抗原结合凹槽与进入机体的外源性抗原多肽结合后, 被呈递到抗原呈递细胞 (APC) 表面从而供 $CD4^+$ T 细胞识别^[3], 进而发挥机体的免疫防御功能。MHC II 类分子的 α 链和 β 链首先在内质网中形成异源二聚体, 再与 II 类抗原的分子伴侣—恒定链 (invariant chain, Ii) Ii 链 (自身形成同源三聚体) 以非共价的形式构成异源九聚体复合物 ($\alpha_3\beta_3Ii_3$), 然后九聚体中的 Ii 链被逐步水解并暴露出抗原多肽^[4], 最终使得外源性抗原肽和凹槽形成的复合物被运输到细胞表面并被 T 淋巴细胞识别。鱼类 MHC I 和 MHC II 基因与哺乳动物类似, 而关于鱼类 MHC 基因的研究较其他哺乳动物略晚, 目前主要包括草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)^[5]、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[6]、半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*)^[7]、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)^[8]、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)^[9] 等多种鱼类中。但关于青海湖裸鲤 (*Gymnocypris przewalskii*) 和花斑裸鲤 (*G. eckloni*) MHC 基因的研究未见报道。

青海湖裸鲤隶属裂腹鱼亚科 (Schizothoracinae) 裸鲤属 (*Gymnocypris*), 是一种主要栖息于

青海湖及其周边水系的裂腹鱼, 在青海湖“鱼鸟共生”生态系统中处于核心地位^[10-11]。因青海湖具有盐碱度含量高的水文环境特点, 使得生活在其中的青海湖裸鲤较其他鱼类表现出明显的盐碱适应性和耐受性, 而较高的盐碱度也会使得青海湖裸鲤的免疫功能出现相应的变化。花斑裸鲤与青海湖裸鲤同属于裂腹鱼亚科裸鲤属, 主要分布于黄河水系中, 其与青海湖裸鲤为近缘种^[12]。淡水水域中的花斑裸鲤可作为高盐碱环境中生存的青海湖裸鲤的对照。作为鱼类主要的免疫防御因子, MHC 广泛参与机体内的免疫应答调控, 其基因多态性常与疾病的抗病性及病毒易感性联系紧密, 通常作为鱼类抗病性、易感性研究的主要筛选标记分子。本研究克隆获得了青海湖裸鲤 MHC II 基因的 cDNA 全长序列, 分析了基因结构与多态性、感染水霉状态下以及不同盐碱胁迫处理的组织表达差异, 并与克隆获得的花斑裸鲤序列进行了比较, 以期探究 MHC II 在青海湖裸鲤中发挥的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

青海湖裸鲤由青海湖裸鲤救护中心协助采自野外, 花斑裸鲤为本实验室养殖。实验开始前, 将青海湖裸鲤 (3~4 龄, 体长 150~200 mm, 体重约 90~120 g) 和花斑裸鲤 (3~4 龄, 体长 200~250 mm, 体重约 100~130 g) 在实验室驯养 2 周, 期间保持每天换水, 持续通氧, 驯养前 96 h 不喂食, 其后每日喂食 1 次。驯养结束后, 分别随机各选取 3 尾健康且发育正常成鱼采取鳃、肾脏、脑、肌肉、肝脏、眼、臀皮等组织, 相同组织合并为一个样品, 迅速放入液氮中速冻, 后转入 -80°C 冰箱, 待后续实验备用。实验过程中操作人员严格遵守动物伦理规范, 并按照实验动物福利及伦理各项规章制度执行。

1.2 青海湖裸鲤和花斑裸鲤总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

称取青海湖裸鲤及花斑裸鲤各组织并使用 TRIzol 法提取组织总 RNA。使用 NanoPhotometer-NP80 (Implen, 德国) 对 RNA 的浓度和纯度进行检测, 1% 琼脂糖凝胶电泳用于测量 RNA 的完整性。参照 PrimeScriptTM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, Japan) 试剂盒操作说明, 将上述提取组

织的总 RNA 反转成 cDNA, 置于-20 °C 冰箱备用。

1.3 青海湖裸鲤 *MHC* II 基因 cDNA 全长的获得

根据本课题组获得的青海湖裸鲤转录组数据, 利用在线网站 Primer Express 3.0 软件设计该基因中间片段引物, 克隆获得中间片段。扩增程序为 94 °C, 5 min; 94 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 30 s, 72 °C 10 min, 进行 30 个循环。同样利用 Primer Express 3.0 软件在线网站根据克隆所得中间片段分别设计 3'RACE 和 5'RACE 特异性引物用于末端扩增。引物具体信息见表 1。将上述组织 RNA 根据 SMART Scribe™ Reverse Transcriptase 试剂盒按说明反转录为 RACE 模板 cDNA。扩增程序为 94 °C, 30 s; 72 °C, 3 min, 5 个循环; 94 °C, 30 s; 70 °C 30 s; 72 °C 3 min, 5 个循环; 94 °C, 30 s; 58 °C, 30 s; 72 °C, 3 min; 25 个循环。将扩增所得条带切胶回收, 连接, 克隆至 DH5 α 感受态细胞中, 挑取阳性克隆进行 PCR 检

测, 后将阳性克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.4 花斑裸鲤 *MHC* II 基因 CDS 编码区的获得

根据表 1 所列引物 *MHC* II α -F1/*MHC* II α -R1 和 *MHC* II β -F1/*MHC* II β -R1 分别扩增花斑裸鲤 *MHC* II 基因 CDS 编码区序列, 扩增程序同“青海湖裸鲤 *MHC* II 基因 cDNA 全长的获得”。

1.5 基因序列的生物信息学分析

将测序获得的序列通过 DNAMAN 软件进行拼接、确认, 最终获得青海湖裸鲤 *MHC* II 基因的 cDNA 全长, 以及花斑裸鲤 *MHC* II 基因 CDS 编码区, 同时确定开放阅读框(ORF)并翻译为氨基酸序列。在线网站 Motif Scan 用于活性位点的预测, Bioedit 软件用于氨基酸多重序列的比对, MEGA 6 软件用于构建进化系统树(Neighbor-Joining, NJ)。

表 1 实验所用引物

Tab. 1 Primers used in the study

引物名称 primer name	序列(5'-3') sequence (5'-3')	用途 function
<i>MHC</i> II α -F1	ATGGCGATGTATGATGTCCTGCTTA	中间片段克隆
<i>MHC</i> II α -R1	TCAGTTGCAGTTGTTTCCTTTAATG	中间片段克隆
<i>MHC</i> II α -5'	ACAGTTCCTCTCCATCAAATCCAGACAA	5'RACE
<i>MHC</i> II α -3'	GCCTGTCAATGTCTCCTGGACTAAAAAC	3'RACE
q <i>MHC</i> II α -F	TGCTCTGGATTGTATGGAGAGG	荧光定量PCR
q <i>MHC</i> II α -R	CCAGCTCCACATCATCTTTTG	荧光定量PCR
<i>MHC</i> II β -F1	AGTTGGGATAGTCACAGTGAGAGAA	中间片段克隆
<i>MHC</i> II β -R1	CTCCCTGTTGATTCTTCTTGTAGT	中间片段克隆
<i>MHC</i> II β -5'	CGATAGCGCTCTGTCTGATTTTCAGCATT	5'RACE
<i>MHC</i> II β -3'	TACCAGATCCACTCCACCTGGAATACA	3'RACE
q <i>MHC</i> II β -F	ACTATTCTCGCTGGGCTAGATG	荧光定量PCR
q <i>MHC</i> II β -R	GTATCGTGTGTCCATGCTTGTG	荧光定量PCR
<i>Ii</i> -F1	GAGACATAAGCACAGACACAGACAC	中间片段克隆
<i>Ii</i> -R1	GTCTTTATCCACACACCAGCAGTAT	中间片段克隆
<i>Ii</i> -5'	GAGGACTCGTCAGAGAATTCCTTCAGCA	5'RACE
<i>Ii</i> -3'	GCAAGAAGAGCAGCGTTCTCTCACTAA	3'RACE
q <i>Ii</i> -F	AGAAAGATGTCCGCTCTCCTC	荧光定量PCR
q <i>Ii</i> -R	GCCCTCTCTATGGTTTGTAAGAA	荧光定量PCR
<i>EF1</i> α -F	GTATTACCATTGACATTGC	荧光定量PCR
<i>EF1</i> α -R	CTGAGAAGTACCAGTGAT	荧光定量PCR
<i>MHC</i> II α -F2	TCTACTCACCTCTGAATGAACA	多态性分析
<i>MHC</i> II α -R2	CCAAAAGGGTTTAATTTACAGA	多态性分析
<i>MHC</i> II β -F2	GGGGATAGTCACAGTGAGAGAGAA	多态性分析
<i>MHC</i> II β -R2	TCAGTCGTACCATTATTAGGIT	多态性分析

1.6 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 检测组织表达和青海湖裸鲤盐碱耐受过程中 *MHC II* 的表达变化

将“总 RNA 的提取和 cDNA 的合成”中提取所得青海湖裸鲤和花斑裸鲤组织 RNA 使用 Prime Script™ RT Master Mix (Perfect real time) 试剂盒依说明反转录为荧光定量 cDNA。选取 *EF-1 α* 作为内参基因, 根据克隆所得基因序列设计实时荧光定量引物(表 1)。根据 TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 说明配置 20 μ L 反应体系进行 qRT-PCR 实验。反应程序为 95 °C 30 s; 95 °C 5 s; 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环, 每个样品设置 3 个重复。最后使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [13] 方法计算基因的相对表达量。

选择对照组养殖过程中感染水霉病的青海湖裸鲤 3 尾, 分别采取鳃、肾脏、肝脏、肠组织, 提取组织 RNA 后反转录为荧光定量 cDNA, 根据设计的 *MHC II* 基因荧光定量引物, 以 *EF-1 α* 为内参基因, 检测正常状态和感染水霉状态下, 以上 4 个组织的表达情况。

慢性盐碱胁迫实验以海水晶处理后的自来水为对照组, 使用 Na_2CO_3 以及 NaHCO_3 按比例配置成相应的碱度调节曝气后的自来水(配置方法参考衣晓飞等 [14])。绝大部分盐碱水域其总碱度由 HCO_3^- 和 CO_3^{2-} 构成, 即碳酸盐碱度 [15], 本实验中的碱度为碳酸盐碱度。实验期间, 胁迫浓度按梯度由 5% 依次递增至 100%。分别在盐碱胁迫浓度为 50%(盐度 8, 碱度 16 mmol/L)、100%(盐度 16, 碱度 32 mmol/L) 时随机选取 3 尾实验鱼并采取鳃、肾脏组织, 相同组织合并为一个样品, 放入液氮速冻后储存于 -80 °C 冰箱。使用 TRIzol 法提取上述鳃、肾脏组织 RNA, 根据说明反转录为荧光定量 cDNA 后, 以 *EF-1 α* 作为内参基因, 根据克隆所得 *MHC II* 基因全长序列设计的实时荧光定量引物, 分别以不同盐碱胁迫处理下的青海湖裸鲤鳃、肾组织 cDNA 样品为模板, 以海水晶处理后的青海湖裸鲤鳃、肾脏组织为 cDNA 为参照, 进行 qRT-PCR 检测。

1.7 *MHC II* α/β 基因多态性分析

使用 TRIzol 法分别随机选择提取青海湖裸鲤和花斑裸鲤各 6 尾鱼的鳃、肾脏组织 RNA, 以其反转录获得的 cDNA 作为多态性扩增的模板。根

据获得的序列, 在起始密码子之前、终止密码子之后分别设计上下游引物扩增 *MHC II* α/β 基因的 ORF(表 1)。用 1% 琼脂糖凝胶电泳将 PCR 产物检测后进行纯化、连接及转化, 每个片段挑取 11 个阳性克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序(下同)。所得序列用于 *MHC II* α/β 基因多态性的分析。根据命名原则, 以 *MHC* 基因同源序列所编码的氨基酸序列间的错义替换大于或等于 5 个残基作为一个等位基因型, 小于 5 则作为该等位基因的一个亚型。

1.8 *MHC II* α/β 遗传多样性分析

将“*MHC II* α/β 基因多态性分析”中测序所得的 *MHC II* α/β 多态性序列用于分析 *MHC II* 的遗传多样性。使用 DnaSP 5.10 软件分析 *MHC II* 基因的单倍型数目、单倍型多样性、核苷酸多样性等遗传多样性。

2 结果

2.1 *MHC II* 基因全长 cDNA 的获得及序列分析

青海湖裸鲤 *MHC II* α 基因全长序列为 1 012 bp (GenBank 登录号: OM066738), 其中包括 5'非编码区 160 bp, 3'非编码区 141 bp, 开放阅读框 711 bp, 共编码 236 个氨基酸。*MHC II* β 基因全长序列为 1 574 bp (GenBank 登录号: OM066739), 5'非编码区 149 bp, 3'非编码区 666 bp, 开放阅读框 759 bp, 共编码 252 个氨基酸。*Ii* 基因全长序列为 1 556 bp (GenBank 登录号: OM066740), 5'非编码区 496 bp, 3'非编码区 358 bp, 开放阅读框 702 bp, 共编码 233 个氨基酸(图 1)。花斑裸鲤克隆获得 *MHC II* α 编码区 711 bp (GenBank 登录号: OM802507), 编码 236 个氨基酸。*MHC II* β 基因编码区 759 bp (GenBank 登录号: OM802508), 编码 252 个氨基酸(图 2)。*Ii* 基因编码区 702 bp (GenBank 登录号: ON037478), 编码 233 个氨基酸(图 2)。

分析二级结构, 青海湖裸鲤 *MHC II* α 的 135 位发现了 1 个 N-糖基化位点, 1 个蛋白激酶 C-磷酸化位点, 8 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点以及 6 个 N-豆蔻酰化位点。*MHC II* β 有 1 个 N-糖基化位点, 4 个蛋白激酶 C-磷酸化位点, 6 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点以及 3 个 N-豆蔻酰化位点。*Ii* 包

```

1  GATTCACCTCCAGTAAGGATTGTTTGGATATGGTGTGGTCTACTCACCTCTGAATGAACA
21  ATGGCGATGTATGGTGGCTGCTTATGCTCACTGTATTGTAGTATTGAGACTCAAGT
61  MAAWVYGVGSPFVLMLELQV
121  GTGCACAGGGATGTGATGTTTACTGGGTGTTCTGATACAGAGAAGAGGATTTGTCTGG
21  VHRDVMFDTGCSDETKEDLSG
181  TTTGATGGAGAGGAAGTGTATTCAGACTTCAATAGAAAAGAAGGAGTGGTGCAGCTG
41  FDEGEEELYHSDFNREKEGVVFL
241  CTTGACTTTGCAGATCCCATCAGCTTCTGGATTTTATGAGACTGGTGTCTAATGTA
61  PDFAADPISTFPGFYETGVSLNV
301  GAGGCCGCAAAACAAAGCTTAGCCTTAGACATTAAGTCTACAAGTCCCTGATGAGCAA
81  ACCKQSLALADIKVYKSPDEO
361  CTGGACCCCGAGATGTTTCCATGTATCAAAAAGATGATGGAGCTGGGTGCTGAGAAC
41  TTTGATGGAGAGGAAGTGTATTCAGACTTCAATAGAAAAGAAGGAGTGGTGCAGCTG
421  ACTCTCATCTGTCTATGACTGGACTTCCCTCCGCTGTCAATGTCTCTGGACTAAA
121  TLLICHVVTGLFPPPPVNVVSLD
481  AACAAATCAGATTGTGACCGAGGGCATGAGTCTAAGCCAGTACCGCAGAAATAATGCGGC
141  NNQIVTNEGMSLSQYRRRNNDG
541  ACCTTCAACATCTTCCGCTCTGAAGATCAGCCTCAGAGGAAGACATTTACAGCTGC
161  TFNIFSAALKITPAIEDEIYSC
601  ACTGTGTTCCAAAAGCTTAGCCAGCCGTTTGAACGAAAACATGGGAGTGGACAT
181  TVFHKAALASRFEIKTWED
661  GCGGTGCCCGCGTTGGTCCAGCTGTGTTTGGAGTGGGTCTGTCTGGGGCTGCTG
301  AVFPGLVPLAVMELGGLL
721  GGATCCGAGCTGGAAACATTTCTCCTAATAAGAAAACACTGCAACTGACCCGCTGTG
221  GVVAAAGTAAAFFLIKGNNCN*
781  TTTAAAAGTCAACATATCTTGTGTTTGTAAATCAGATTCTTGTACTCTTATTAACAT
841  CTCTCTAGTCAAAATCTGTAATTAACCCITTTGGTACTAAAAA
901  AAAAAAAAAA

```

(a)

```

1  IGGGGATAGTCACAGTGAGAGAGAAATGGCACTGCAGAAGGTCTTGTGTTTCATCTTATA
13  LMLCAFLTGAADGYYSHTWST
121  TGCATCCACAGCTCCCGTGAACCTCAGTGACATGGTGTACATCGATAACTATATCTCAAT
33  CIHSSRELSDMVYIDNYSIFN
181  AAGAATGTGGTGTACAGTTCAACAGCACTGTGGGGAGTATGTGGGTACACTGAACT
53  DKPVDVFCDFNSD
241  GGAGTAAAGAGCGCACAGTATGGAACCGCATCCACATCTGACGAAGAGAGACT
73  GAVKSAQSNSDPNILOQERAA
301  GAGGTGGAGAGATTTGCAAACTAATGCTAACTCCTTCAGAGCACTATCGCTGATAAA
93  EVERFCKPNAKLLQSILADK
361  ACAGTTGCACCAAGGTTAAGCTCAGTTCAGTGACGACGGCCGGTGGCAGACATCAGCT
113  TVAAPKVTKLSVTVQAGGRHPA
421  GTGCTGATGTGCAAGTCTACCGCTTACCCACACCGGATCAAGTGACCTGGATGAGA
133  VALMCSAYRFFYPHRIGQVVTWMR
481  GACGATAAACCTGTGAAGTCTGATGTGACCTCAACTGAGGAGTGGCTAACGGAGACTGG
153  DDKPVDVFCDFNSD
541  TACTACCAGATCCACTCCACCTGGAATACACTCCCAATCTGGAGAGAAGATCTCTGT
173  SYQIHSHELYTPKSYGEKIS
601  ATGGTGGATCAGCTGGCTTAACTAAACCCATCATTGTAGTCTGGGAACCGTCTCTCCCG
193  MVDHAGLTKPIIVVWEPSELV
661  GAGCTGAGAGGAATAAAATGCTATCAGTGGCTGGTCTGGTCTGGGATCATCATC
213  SESRNKIASASGLVLLGLI
721  GACGTGCTGGAATCTTACTACAAGAAGAAATCAACAGGGAGGACCTGGTACCACCT
233  AAGA GI IYK K K S TGR T L V P A T
781  TAAATGGTACGACTGACTGGAATGACTCATTGATGGACAACCTACTTATCATTTATG
253  *
841  TTTTACTCTTAAACAATTAACCTATTTTAAAAATGGAACAATAACAACAATCTAATA
901  AATGTGTTGGTATTGTAACCTTTTATTAATTCAGTGTATGATATAATGAATGTAAA
961  TATAGAGATTATATAGAAGCATATAAATACCATCTCGTGGCTTTTTTCCAGTACT
1021  TATATGCATAGAATAAGATGTCGTAATATTAGAACGGAATCTTGAAGTGTATGTCTA
1081  AATAATGATATCTATCAGGCTCTGGGTCTGAGGAAGGGTACTCTGAGACTTTTTTTGA
1141  AGACTATTTTTCTTCTTTATTGTAAGAAAGTATATTAGAAGCAAAATTTGTGCAGCTT
1201  ACATGTAATGTGTTTGGATAGAAAAAATTTAAAAAATATTACTGCACAAATAAGACTAT
1261  CAACAATTTTCATTTTTCTTAGCATTTATTTCTGACAATGATTTCTGCATGATTTAAG
1321  GACATCAAAATATCCTCAACATGATTTGTTCTTCAGAAACACCATCTGAAACATTTAT
1381  GATCTGTGCTGTCTTTAAGCTCTAAATAAATGTCTTGCAAAAA
1441  AAAAAAAAA

```

(b)

```

1  IGGACTCTCCGCCAAAGACGTCCTGAAAAGCGAGTTCAGAGGGCGCATAAAACCTTTGGAG
61  TTAACAGAGAGTGCATTTAGTGTAGAGACATAAAGCACAGACACAGACACGCCGATG
121  GATGAGCATCATAATGAGGCGCTGATTCAGCGGTGCCAAGCCAGGAGACCGTCTGTAAC
2  DEHHHNELALIQRVVPNSQETVVVN
181  CGCGGAGGGAGCCCAATGGAAAGGCGCTGAAGGTGACCGGACTGACGGTCTGGCTTGT
22  RGLSPNGKALKVTGLTVLAC
241  CTCTGCTGGCGGGACAGGGGCTGACCGCATACCTCGTCTGGGGTCAAGAGGAACACATC
42  LLLLAGQGLTAVLVWQKELHI
301  AGTGTCTTGACACCGGTGAGGAGAAGCTGAAGACGGAGCTCACCAGAAAGATGTCCGCT
62  SAFTKLSKLSMSE
361  TCTCTCCAAAGCGATGAATCTTCCATGAACACCTTCCGCTGCTGAAAGGGATTTCT
82  STPPKAAAMNLPMPNLSPLCLTKKGF
421  GACGAGTCTCGGACCAAGCTCCAGCAAGAAGAGCAGCGTCTCTCACTAACTCGAG
102  DESSDQTSSSKKSSVPLTKLQ
481  CCAATTTTCAAAACCATAGAGAGGGCAGCGGACACCAAGGATGCTGCCAGAATGATGCC
122  PIFTNHREGSQHQAARMMMP
541  AAGAGGATGCAGTGCACGCGAGGAGCATGCCACTGCTGTTGAACATGGATGAGGATG
142  KRMQLPARNMPLLLNMDIEEAG
601  AAGAGCTCTCTGAATCAGATGTCAAGGTTCAGAGTAAAGTGCAGCTGGATCTGAGAGG
162  KSPHSDVQSKCQLDSEK
661  CAGGTGAAGCCGGTACTTCAAGCTGAGTGTGATGAGCAGGGCAACTATCTGCCATG
182  QVKKPGYFKPECDENYLP
721  CAGTGTGGCACAGCAGCGGATGCTGGTGTGGATAAAGACGGCAACGAGGTCCCA
202  QCWHSYCWCVDKDGNV
781  GAGACGCAACAGCGGCGAACGCCCCAGTGCAGCTAAGATGCTGATTTCTCGAGTGA
222  ETRTRGE R P Q C S *
841  ATTTTTCATCCAGCTATAAAGAGAATAACTCCAGTCTTACTACCTGTCATTAGTTTCAG
901  CTCCTGGCGATCGATCGATATAGGCAATATAGTAACTTCCTACTGAAGATTTT
961  TTTTGGATCTGTGTCAGAATAGATAAACAATATTAGCGCTACATGGTTTAACTTAT
1021  TTAATAATCTACAGTAAGTCTCTGTGTGACACCAATTTCTTTTAAATTTGAAC
1081  ACAGCATGTTGTTAGAAAGCATGAATATCACAGTGATGATAACTGTAATAAACACATGC
1141  TGTTCACAAAAA

```

(c)

图 1 青海湖裸鲤 MHC II cDNA 序列及其所编码的氨基酸

(a) MHC II α, (b) MHC II β, (c) li; 红色字体表示起始密码子和终止密码子, 蓝色字体表示开放阅读框, 双下划线表示 N-糖基化位点, 阴影部分表示酪蛋白激酶 II 磷酸化位点, 方框部分表示 N-豆蔻酰化位点; 下同。

Fig. 1 MHC II cDNA sequence and its encoded amino acids of G. przewalskii

(a) MHC II α, (b) MHC II β, (c) li; the start codon and the stop codon are shown in red, the ORFs are shown in blue, N-glycosylation sites use double-underlined, the casein kinase II phosphorylation sites are marked with shaded part, N-myristoylation sites are marked with box; the same below.

```

1 ATGGCGATGTATGGTGTCTTGTCTTATGCTCACTGTTATTGTCAGTATTGAGACTCAAGTT
I M A M Y G V L L M L I V I V S I E I Q V
61 GTGCACAGGGATTTGGGTTTGGTGGTCTGATACAGAGAAAGAGGATTTGTATGGA
21 V H R D F G F V G C S D T K E D L Y G
121 TTTGATGGAGAGGAAATGTATCATTAGACTTCATTAGAAAAGAAGGAGTGGTGACACTG
41 F D G E M Y H S D F I R K F V V T L
181 CCTGACTTTGCAGATCCTGTCGGCTTTCCTGGATTTTATGAGGGTGGTGTTCCTAATCTA
61 P D F A D P V G F P G F Y E G G V S N L
241 GAGGTCGCAAAACGAAACTTAGCCTTAGACATTACAGTTTTCAAGTCCCAGATGAGCAA
81 E V C K R N L A L D I T V F K S P D E Q
301 CTGGACCCCCAGATGTTCCATGTATTCAAAAGATGATGTGGTGTGGTGTGGTGTGGTGTG
101 L D P P D V S M Y S K D D V V L G D E N
361 ACTCTCATCTGTCATGTGACTGGACTCTCCCTCCACCTGTCAATGTCTCCTGGACTAAA
121 T L I C H V T G L I F P P P V N V S W T K
421 AACAAATCAGATTGTGACCGAGGGCATGAGCTAAGCCAGTATCGCAGAAATAATGACGGC
141 N N Q I V T E G M S L S Q Y R R N N D G
481 ACCTTCAACATCTTCTCCGCTCTGAAGATCACGCCCTGCAGAGGAAGACATTTACAGCTGC
161 T F N I F S A L K I T P A E E D I Y S C
541 ACTGTGTTCCACAAAGCTCTAGCCAGCCGTTTGAAGCAGAAACATGGGAAGTGGACGTT
181 T V F H K A L A S R F E T K T I W E V D T
601 GCTGTGCCCGTGTGGTCCAGCTGTGTTCTGTGGAGTGGGTCGTCTCTGGGCTGCTG
201 A V P G V G P A V F C G V G L S I G L L
661 GGAGTCGCTGCTGGAACGTTCTTCTCATTAAAGGAAACAACCTGCAACTGA
221 G V A A G T F F L I K G N N C N *

```

(a)

```

1 ATGGCACTGCCGAAGGTCCTTGTGTTTTCACTCTCATACTGATGCTGTCTGCTTTCCTGGA
I M A L P K V L C F H I L I L M L S A F I G
61 GCAGCTLGGATACTACAATCTCGATTAGATGCTTCCACAGCTCCCCTGATCTC
21 A A D G Y Y N S R W I R C F H S S R D L
121 AGTGATATCGTGTTCATCGATAAATACTTCAATAAAGATGTGTATATACAGTCAAC
41 S D I V F I D N Y I F N K D V Y I Q F N
181 AGCACTGTGGGGAGTATGTGGGTACACTTGGAGTACATAACGCACAGTATGTG
61 S T V G E Y V G Y I E L G V H N A Q L W
241 AACAAAGATCCCAACCTTCTGCAGCAAAATGAGAGCTCAGGCGGAGACAGTCTGCAAACT
81 N K D P N L L Q Q M R A Q A E T V C K P
301 AATGCTGAACCTTTCAGAGCGCTATCTGATAAAACAGTTCACCAAAAGGTTAAGCTC
101 N A E L F Q S A I S D K T V A P K V K L L
361 AGTTCAGTGACGGCGGCCGGTGGCAGACATCCAGCTGTGTGATGTGACAGTACC
121 S S V T A A G G R H P A V L M C S A Y R
421 TTCTACCCACACCGGATCCAAGTGACCTGGATGAGAGACGATAAACCTGTGAAAGTCTGAT
141 F Y P H R I Q V I W M R D D K P V K S D
481 GTGACCTCACTGAGGAGGTTGCCTAACGGAGACTGGTACTACCAGGTCCACTCCCCTG
161 V T S T E E L P N G D W Y Y Q V H S H L A
541 GAATACACTCCCAAATCTGGAGAGAAGATCTCCTGTATGGTGGATCACGCTGGCTTAACT
181 E Y T P K S G E K I S C M V D H A G L T I
601 AAACCCATCATTGTAGTCTGGGATCCGTCTCTCCCTGAGTCTGAGAGGAATAAAATCGCC
201 K P I I V V W D P S L P E S E R N K I A
661 ATCGGTGCTGTGGTCTGGTCTGGGATCATCATCGCAGCTGCTGGAATCATTACTAC
221 I G A S G L V L G I I I A A A G I I Y Y
721 AAGAAGAAATCAACAGGGGAGGACCTGGTACCAACCTAA
241 K K K S T G R T L V P T *

```

(b)

```

1 ATGGATGAGCATCATAATGAGGCGCTGATTACAGCGCTGCCAAGCCAGGAGACCGTCTGTG
I M D E H N E A L I Q R V P S Q E T V V
AAACCGCGGAGGGAGCCCAATGGAAAGGCGCTGAAGGTGACCGGACTGACGGTTCTGGCT
21 N R G G S P N G K A L K V T G L T V L A
TGTCTTCTGCTGGCGGACAGGGCTGACCCGATAACCTCGTCTGGGTCAGAAGGAACAC
41 C L L L A G Q G L T A Y L V W G Q K E H
ATCAGTGCTCTGACCACCGGTGAGGAGCTGAAGACGGAGCTCACCAGAAAGATGTCC
61 I S A L T T G Q E K L K T E L T R K M S
GCTTCTCTCCAAAGGCGATGAATCTTCCCATGAACAGCCTTCCGCTGCTGAAGGGATTCT
81 A S P P K A M N L P M N S L P L L K G F
TCTGACGAGTCTCGGACCAGACCTCCAGCAAGAAGAGCAGCTTCTCTCACTAAACTG
101 S D E S S D Q T S S K K S S V P L T K L
CAGCCAAATTTTACAAACCATAGAGAGGGCAGCGGACACCAGGATGCTGCCAGAATGATG
121 Q P I F T N H R E G S G H Q D A A R M M
CCGAAGAGGATGCAGCTGCCAGCGAGGAGCATGCCACTGTTTTTGAACATGGATGAGGAG
141 P K R M Q L P A R S M P L F L N M D E E
ATGAAGAGCTCTCCTGAATCAGTGTCCGAGGTTTCAAGTAAAGTGTGAGTGGATTTCTCAG
161 M K S S P E S A V E V Q S K C Q L D S Q
AGGCAGGTGAAGCCCGGTACTTCAAGCTGAGTGTGATGAGCAGGGCAACTATCTGCC
181 R Q V K P G Y F K P E C D E Q G N Y L P
ATGCAGTGTGGCAGACAGCCGATACTGCTGTTGTTGGATAAAGACGGCAACAGGAGT
201 M Q C W H S T G Y C W C V D K D G N E V
CCAGAGACACGCACACGGCGAACGCCCCAGTGAACCTAA
221 P E T R T R G E R P Q C N *

```

(c)

图2 花斑裸鲤 MHC II cDNA 序列及其所编码的氨基酸

蛋白激酶 C-磷酸化用黄色字体表示蛋白激酶 C-磷酸化用黄色字体表示。

Fig. 2 MHC II cDNA sequence and its encoded amino acids of *G. eckloni*

The protein kinase C phosphorylation sites are shown in yellow.

含 3 个蛋白激酶 C-磷酸化位点, 3 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点及 2 个 N-豆蔻酰化位点。花斑裸鲤 MHC II α 各活性位点分别有 1、1、7、6 个; MHC II β 各活性位点分别有 1、5、5、3 个, Ii 中蛋白激酶 C-磷酸化、酪蛋白激酶 II 磷酸化、N-豆蔻酰化位点分别包括 3、4、2 个。

在线网站 SMART 对 MHC II α 氨基酸序列进行结构功能域的分析, 结果显示, 青海湖裸鲤 MHC II α 具有 MHC II 典型结构, 包括 1 个信号肽 (signal peptide), 1 个 $\alpha 1$ 功能区 (Alpha-1 domain), $\alpha 2$ 功能区 (Alpha-2 domain), 1 个跨膜区 (transmembrane region, TM) 和 1 个胞质区 (cytoplasmic domain, CT)。Signal P 5.0 预测表明, 该蛋白存在 1 个由 18 个氨基酸组成的信号肽 (MAMY-GVLLMLTVIVSIET), 第 18、19 位氨基酸为该蛋白的信号肽分割位点 (IET-QV), 表明 MHC II α 蛋白为一种分泌型蛋白。此外, 发现 MHC II α 跨膜区存在一个所有物种中均保守的 GxxxGxxGxxxG 结构。推导出的 MHC II β 同样具有信号肽 (SP)、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 功能区、跨膜区 (TM) 及胞质区 (CT) 等结构域。预测结果表明, 其信号肽为 1~24 位氨基酸, 21 和 22 位之间为信号肽切割位点 (TGA-AD)。并且同样也在跨膜区发现了 GxxGxxxGxxxxxxG 基序。Ii 包括内质网腔区、跨膜区 (TM)、胞质区 (CT) 和甲状蛋白 (TY), 其中 1~32 位于胞质区, 33~55 位于跨膜区, 174~232 位为甲状蛋白区。同样, 花斑裸鲤 MHC II α/β 基因结构包括信号肽分割位点以及 4 个结构功能区的划分以及 Ii 的结构划分均与青海湖裸鲤相同, 且花斑裸鲤 MHC II α/β 的跨膜区均存在保守的 GxxxGxxGxxxG (MHC II α) 和 GxxGxxxGxxxxxxG 基序 (MHC II β)。

2.2 MHC II 系统进化树的构建

使用 MEGA 6.0 软件中的邻接法构建 10 种生物 MHC II 氨基酸序列的系统发生树, 模型采用 Poisson model, 同时用 Bootstrap 法进行 1 000 次评估。结果显示, 青海湖裸鲤 MHC II 主要与花斑裸鲤、鲤 (*Cyprinus carpio*)、滇池金线鲃 (*Sinocyclocheilus grahami*) 和鲫 (*Carassius auratus*) 等鲤科 (Cyprinidae) 鱼类聚为同一支, 表明青海湖裸鲤与花斑裸鲤等鲤科鱼类的亲缘关系较近, 而与人以及小鼠等的亲缘关系较远 (图 3)。

2.3 MHC II 基因组织表达分析

qRT-PCR 结果显示, MHC II α 基因在青海湖裸鲤肾脏组织中表达量最高, 其次为脑、鳃和肌

肉, 在肝脏中表达量最低 (图 4)。花斑裸鲤中, 该基因主要在脑、眼、肌中高表达, 鳃和肝脏中表达较低 (图 5)。MHC II β 基因在青海湖裸鲤的脑、肝脏、臀皮、肾脏中有较高表达量, 鳃、肌肉中的表达量次之, 眼中表达量最低 (图 4), 在花斑裸鲤的肌、臀皮、脑中高表达, 肝脏和脏肾中低表达 (图 5)。Ii 在青海湖裸鲤的脑、鳃高表达, 肾脏、臀皮、肌肉中等表达量, 眼和肝脏中弱表达 (图 4), 花斑裸鲤中在肌肉中表达最高, 脑、鳃、肾脏表达次之, 在肝脏和臀皮中表达最弱 (图 5)。

检测青海湖裸鲤 MHC II 基因在正常状态和感染水霉情况下的鳃、肾脏、肝脏、肠 4 个组织表达变化情况, 发现感染水霉后 MHC II α/β /Ii 在肾脏组织中的表达显著下降, MHC II α/β 在鳃、肝脏和肠 3 个组织中的表达均上调, 而 Ii 在感染水霉后的 4 个组织中表达均下降 (图 6)。

对青海湖裸鲤进行盐碱胁迫实验后检测 MHC II 基因的表达变化, 结果显示, 与对照组相比, MHC II 基因在肾脏组织和鳃组织中的表达量均呈现出随着盐碱度的增加而降低的趋势, 不同盐碱度下 MHC II α 在肾脏组织中的表达量较鳃组织更低, 而 MHC II β 在鳃组织中的表达量较肾脏组织更低 (图 7)。

2.4 MHC II α/β 基因多态性分析

分别用青海湖裸鲤鳃组织 cDNA 和花斑裸鲤肾脏组织 cDNA, 各随机挑选 6 尾实验鱼, 对 MHC II 基因的多态性进行分析。每尾鱼的 PCR 扩增产物经后续连接转化实验后, 分别选择 11 个阳性克隆菌液送至公司测序。测序结果比对后, 最终得到青海湖裸鲤 MHC II α 共计 49 条有效序列, 为 8 种基因型, 23 种基因亚型, 分别编码 23 种 MHC II α 氨基酸序列。依命名原则, 并分别命名为 Gypr-DAA*0101- Gypr-DAA*0803。使用同样的方法, MHC II β cDNA 序列共获得有效克隆 42 个, 可分为 12 种基因型, 22 种基因亚型, 分别编码 22 种 MHC II β 氨基酸序列, 依次命名为 Gypr-DAB*0101- Gypr-DAB*1204。花斑裸鲤 MHC II α 共获得 46 条有效序列, 分析得 12 种基因型包括 24 种基因亚型, 分别编码 24 种 MHC II α 氨基酸序列, 以 Gyec-DAA*0101- Gyec-DAA*1204 名称命名。同样 MHC II β cDNA 序列共获得有效克隆 45 个, 可分为含 23 种基因亚型的 14 种基因

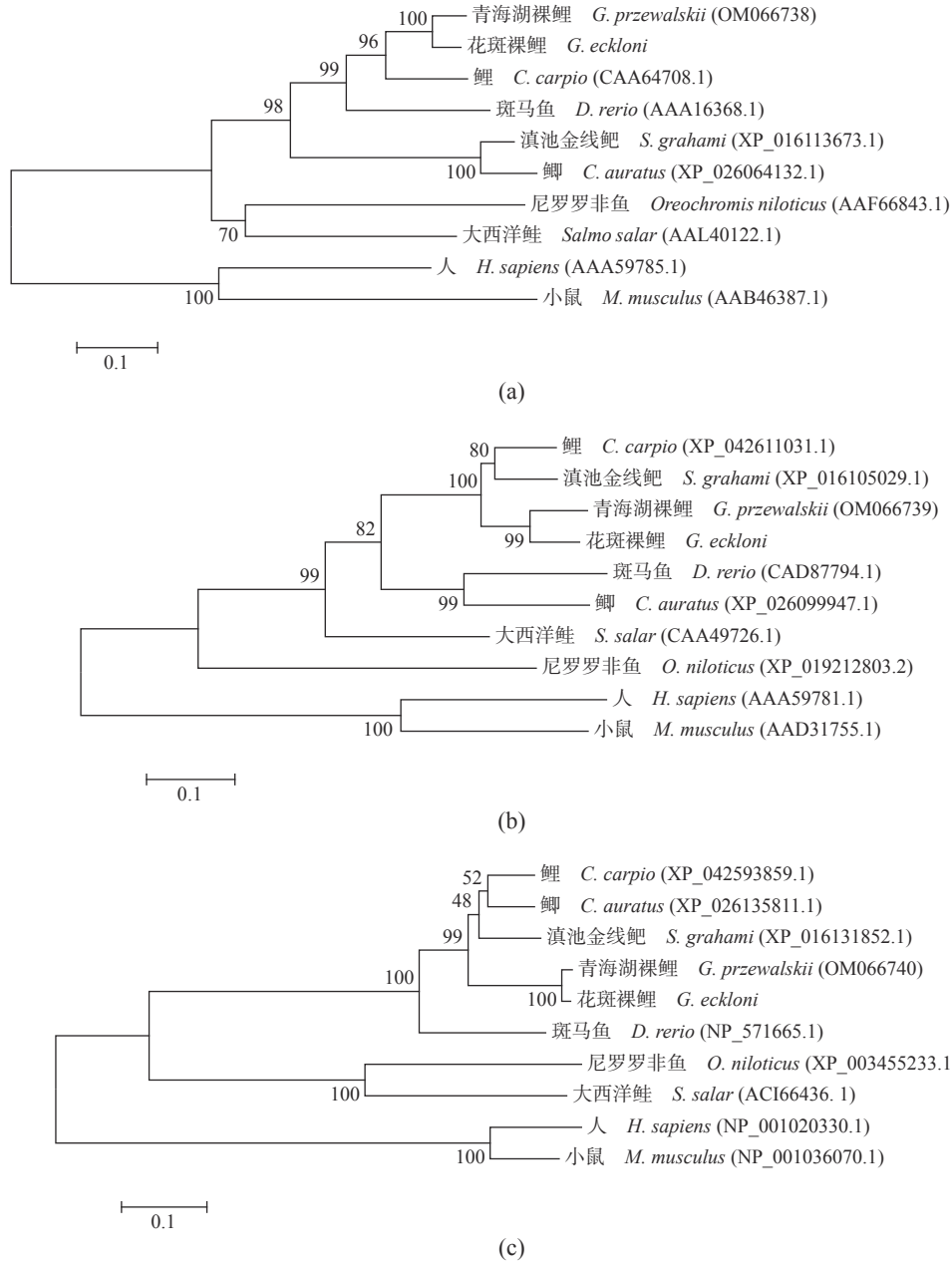


图 3 基于 MHC II 氨基酸序列的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of MHC II among species

(a) MHC II α ; (b) MHC II β ; (c) Ii.

型, 编码 23 种不同的 MHC II β 氨基酸序列, 命名为 Gyec-DAB*0101-Gyec-DAB*1401。

2.5 MHC II α/β 遗传多样性分析

青海湖裸鲤 MHC II α 共获得 49 条有效核苷酸序列, 分析得到 23 种氨基酸序列。使用 DnaSP 5.10 软件分析结果发现共有 102 个多态位点, 其中包括单一多态位点 28 个, 简约多态位点 74 个。有 23 个单倍型, 单倍型多样性为 1.000 ± 0.013 , 核苷酸多样性为 0.042。MHC II β 共获得 42 条有

效核苷酸序列, 共得到 22 种氨基酸序列。分析得 MHC II β 基因共有 134 个多态位点, 包括 24 个单一多态性位点和 110 个简约多态性位点。其单倍型多样性为 0.996 ± 0.015 , 核苷酸多样性为 0.061。花斑裸鲤 MHC II α/β 经实验分别获得共计 46、45 条有效序列, 分别得到 24、23 种氨基酸序列 (表 2)。软件分析结果显示, MHC II α/β 多态性位点为 120 和 148 个, 其中 MHC II α 单一多态位点 48 个, 简约多态位点 72 个。而 MHC II β 则包括 28 个单一多态性位点和 120 个简约多态性位点。

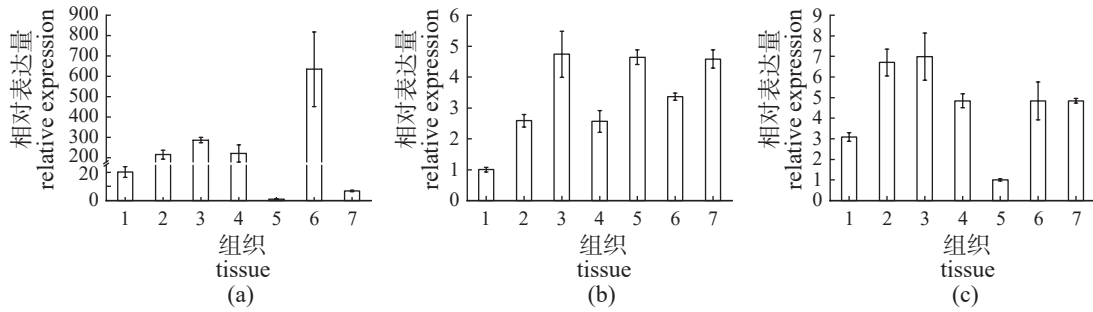


图 4 不同组织中青海湖裸鲤 *MHC II* 基因的表达情况

(a) *MHC II* α , (b) *MHC II* β , (c) *Ii*; 1. 眼, 2. 鳃, 3. 脑, 4. 肌肉, 5. 肝脏, 6. 肾脏, 7. 臀皮; 下同。

Fig. 4 Relative expression of *MHC II* gene in different tissues from *G. przewalskii*

(a) *MHC II* α , (b) *MHC II* β , (c) *Ii*; 1. eyes, 2. gill, 3. brain, 4. muscle, 5. liver, 6. kidney, 7. skin tissue around the anal fin; the same below.

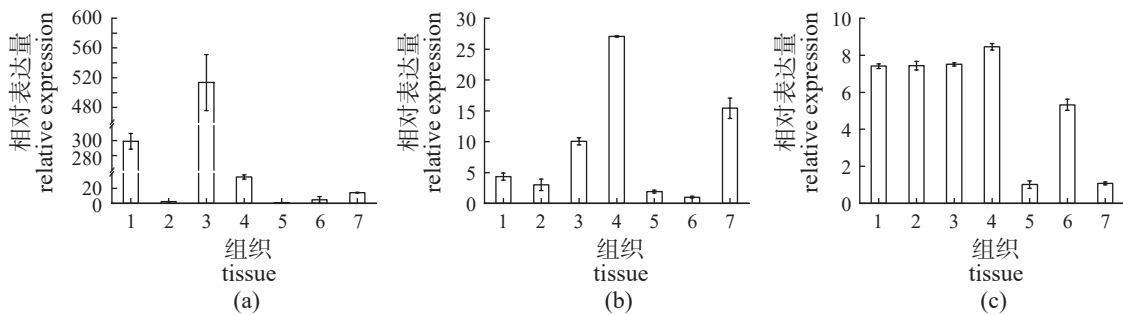


图 5 不同组织中花斑裸鲤 *MHC II* 基因的表达情况

Fig. 5 Relative expression of *MHC II* gene in different tissues from *G. eckloni*

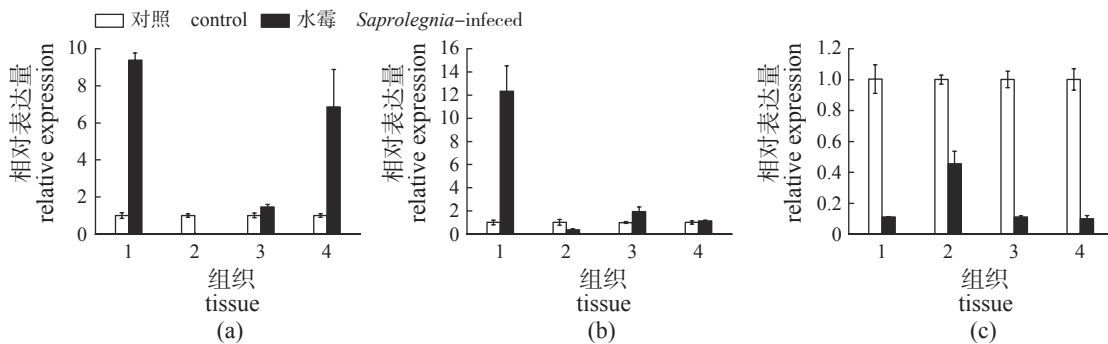


图 6 正常状态和感染水霉状态下青海湖裸鲤 *MHC II* 基因在 4 种组织中的表达情况

1. 鳃; 2. 肾; 3. 肝; 4. 肠。

Fig. 6 Expression of *MHC II* gene of *G. przewalskii* in normal and *Saprolegnia*-infected conditions in four tissues

1. gill; 2. kidney; 3. liver; 4. intestines.

单倍型多样性分别为 1.000 ± 0.012 、 1.000 ± 0.013 ，核苷酸多样性为 0.044 和 0.062。

两物种的单倍型多样性均基本接近于 1，表明群体多样性高。而核苷酸多样性值为 0.0420~0.062，差异不大。将两种鱼类作为一个整体进行分析，*MHC II* α 的单倍型多样性为 1.000 ± 0.004 而核苷酸多样性为 0.044。*MHC II* β 的单倍型多样性 0.999 ± 0.005 ，核苷酸多样性为 0.064。

3 讨论

3.1 *MHC II* 基因序列信息分析

MHC II 基因编码的蛋白产物属细胞表面转膜蛋白，在与外源性蛋白质多肽结合后同时将其呈递至 $CD4^+$ T 细胞表面^[16-17]，为随后生物体体内免疫防御功能的激活做准备。本研究通过 PCR 和 RACE 技术克隆获得青海湖裸鲤 *MHC II* 基因的全

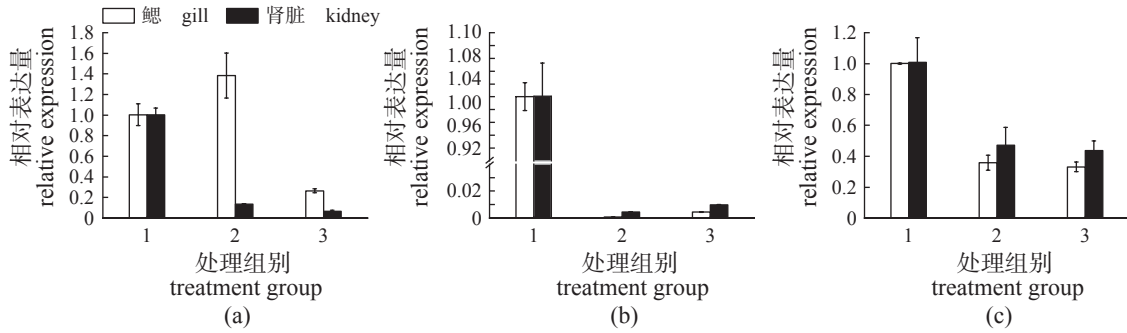


图 7 青海湖裸鲤 MHC II 基因在不同盐碱胁迫处理下的鳃、肾脏组织中的表达情况

1. 对照组, 2. 盐度 8, 碱度 16 mmol/L 浓度处理组, 3. 盐度 16, 碱度 32 mmol/L 处理组。

Fig. 7 Expression of MHC II gene in gill and kidney of *G. przewalskii* under different salt-alkali stress

1. control group, 2. salinity 8, alkalinity 16 mmol/L treatment group, 3. salinity 16, alkalinity 32 mmol/L treatment group.

表 2 两个物种内 MHC II 基因序列多态信息

Tab. 2 Polymorphic information of MHC II in two species

基因 gene	物种 species	多态位点数(S) no. of polymorphic sites	单倍型数目(h) no. of haplotypes	突变总数(Eta) total no. of mutations	单一多态性位点(SP) singleton variable sites	简约多态性位点(PIP) parsimony informative sites	单倍型多样性(Hd) haplotype diversity	核苷酸多样性(π) nucleotide diversity
MHC II α	青海湖裸鲤 <i>G. przewalskii</i>	102	23	113	28	74	1.000±0.013	0.042
	花斑裸鲤 <i>G. eckloni</i>	120	24	133	48	72	1.000±0.012	0.044
	总计 total	156	47	178	—	—	1.000±0.004	0.044
MHC II β	青海湖裸鲤 <i>G. przewalskii</i>	134	21	151	24	110	0.996±0.015	0.061
	花斑裸鲤 <i>G. eckloni</i>	148	23	166	28	120	1.000±0.013	0.062
	总计 total	180	44	205	—	—	0.999±0.005	0.064

长序列和花斑裸鲤的 CDS 编码区序列。所获得的青海湖裸鲤和花斑裸鲤 MHC II α 基因编码的蛋白均由 4 个功能区构成, 空间结构预测分析表明, MHC II α 分子头部为多肽结合区结构, 尾部由反向平行的三明治结构组成, 与 MHC II 的典型蛋白结构相符。同时发现, 均仅在 135 位存在一个 N-糖基化位点, 这与李正杰^[18] 对齐口裂腹鱼 (*Schizothorax prenanti*) 的研究结果一致。并且还发现其他保守位点如蛋白激酶 C-磷酸化位点、酪蛋白激酶 II 磷酸化位点以及 N-豆蔻酰化位点在序列中存在重叠现象, 这可能与它们都共有的磷酸化功能有关。此外, 青海湖裸鲤和花斑裸鲤 MHC II α 跨膜区存在保守的 GxxxGxxGxxxG 结构, 在大菱鲂^[9]、尼罗罗非鱼^[19]、达氏鲟 (*Acipenser dabryanus*)^[20] 等鱼类中也发现了相同的现象。该保守结构中的 G 残基可能对 MHC II 基因 α-β 异源二聚体的形成产生举足轻重的作用^[21]。

分析青海湖裸鲤和花斑裸鲤的 MHC II β 蛋白

序列发现, 与 MHC II α 相同, MHC II β 的跨膜区也存在保守的 GxxGxxxGxxxxxxG 基序, 而达氏鲟^[20]、泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*)^[22]、尼罗罗非鱼^[23] 等中也在跨膜区发现了保守的 GxxGxxxGxxxxxxG 结构, 这表明该结构对 MHC II 分子结构的正确形成以及功能的正常发挥方面至关重要。在对长吻鮠 (*Leiocassis longirostris*)^[21]、黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*)^[24]、中华鲟 (*A. sinensis*)^[25] 等的研究中发现只有 MHC II β 中存在 N-糖基化位点。而本研究中, 与尼罗罗非鱼^[19]、泥鳅^[22]、圆斑星鲈 (*Verasper variegatus*)^[26]、团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*)^[27] 中的结果一致, 两种鱼 MHC II α/β 均存在 N-糖基化位点, 这表明在 MHC II 分子与内质网和高尔基体有关的修饰转运过程中, MHC II α/β 均发挥着关键的作用^[28]。尼罗罗非鱼^[19]、黄颡鱼^[24]、金钱鱼 (*Scatophagus argus*)^[29] 中 MHC II α 酪蛋白激酶 II 磷酸化位点分别为 5、3、4 个, MHC II β 酪蛋白激酶 II 磷酸化

位点均为 5 个, 本研究中预测得到的青海湖裸鲤 $MHC\ II\ \alpha/\beta$ 酪蛋白激酶 II 磷酸化位点数量分别为 8 个和 6 个, 花斑裸鲤 $MHC\ II\ \alpha/\beta$ 酪蛋白激酶 II 磷酸化位点数量分别为 7、5 个, 多于已报道的上述几种鱼类中的数量, 反映了高原裂腹鱼类的独特性。

由于 $MHC\ II\ \alpha/\beta$ 具有丰富的多态性, 使得两种鱼中的氨基酸序列存在较大区别。而 Ii 不具有多态性, 故在两种鱼中该基因高度保守, 均编码 233 个氨基酸, 且仅有 5 个氨基酸不同。结构上, 两种鱼中该基因结构均主要由胞外结构域、跨膜区 (TM)、胞质区 (CT) 和甲状蛋白 (TY) 构成, 其中跨膜区是 Ii 在进化上较为保守的区域, 是 Ii 三聚体形成中的关键区域。许发芝等^[30] 使用突变技术发现鸡 Ii 分子跨膜区的 2 个氨基酸 (Gln) 和 (Thr) 残基在形成 Ii 同源三聚体中的作用不可或缺。并且在比对不同物种的 Ii 后, 发现本研究中这两个残基在物种间也是高度保守的。 $MHC\ II$ 的系统发育进化树聚类分析也表明, 青海湖裸鲤不仅在同源性上高于鲤科鱼类, 且在进化地位中与其也聚为一支, 说明它们在进化地位上最接近, 这与它们都同属鲤科鱼类的地位相符。青海湖裸鲤与金线鲃属亲缘关系更近, 本研究中系统进化树结果表明 $MHC\ II\ \beta/Ii$ 遵循了这种规律, 而 $MHC\ II\ \alpha$ 并没有遵循该规律, $MHC\ II\ \alpha$ 与鲤和斑马鱼的亲缘关系更近, 表明可能在进化过程中 $MHC\ II\ \alpha$ 较为保守, 且遗传多样性分析也表明 $MHC\ II\ \beta$ 较 $MHC\ II\ \alpha$ 积累了更多的突变。

3.2 $MHC\ II$ 组织表达分析

作为鱼类中的一类与细胞免疫应答有关的基因, 并且 $MHC\ II$ 分子结构上是由 $\alpha/\beta/Ii$ 构成的九聚体复合物, 故其在各组织中的表达量会随着细胞量的变化而有所差异, 即其表达在不同鱼类中存在组织特异性。有研究对尼罗罗非鱼^[23]、金钱鱼^[29]、星斑川鲮 (*Platichthys stellatus*)^[31]、斑马鱼^[32]、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)^[33]、卵形鲳鲹 (*Trachinotus ovatus*)^[34]、草鱼^[35]、赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*)^[36] 等鱼类的研究中, $MHC\ II$ 在不同组织中均能正常表达, 但在不同组织中各基因表达水平存在差异。本研究中, 花斑裸鲤和青海湖裸鲤的共同点是, $MHC\ II$ 3 个基因均在脑组织中具有相当高的表达量。其中, 青海湖裸鲤 $MHC\ II\ \alpha$ 主要在肾脏、脑、鳃组织中高表达, 这与尼罗罗非鱼^[23]、斑马鱼^[32]、大黄鱼^[33] 等的组织表达基本

类似, 但尼罗罗非鱼中 $MHC\ II\ \alpha$ 还在胃组织中高表达; 斑马鱼 $MHC\ II\ \alpha$ 还在肝脏中高表达。两种鱼的 $MHC\ II\ \beta$ 组织表达与其他鱼类有较大差异, 如金钱鱼^[29] 中 $MHC\ II\ \beta$ 在脾脏、鳃、肠和皮肤中表达量较高, 大黄鱼^[33] 中 $MHC\ II\ \beta$ 在肾脏、脾脏和鳃中高表达, 卵形鲳鲹^[34] 中则在脾脏、肾脏、肠道、鳃中的表达量较高; 而青海湖裸鲤主要是在脑、肝脏、臀皮和肾脏, 花斑裸鲤中主要是在肌肉、臀皮和脑中高表达。星斑川鲮^[31]、草鱼^[35]、赤点石斑鱼^[36] 中 Ii 的组织表达类似, 均在头肾、脾中高度表达, 青海湖裸鲤则在脑、鳃、肾脏中表达量较高, 花斑裸鲤中与青海湖裸鲤类似, 还在肌肉中有较高表达量。三个基因均在花斑裸鲤肌肉中表达量比较高, 这是花斑裸鲤的不同之处。

比较青海湖裸鲤正常状态和感染水霉状态下 $MHC\ II$ 基因在鳃、肾脏、肝脏、肠组织中的表达差异时发现, $MHC\ II$ 在感染水霉后的鳃、肝脏、肠组织中均表达上调。这与大弹涂鱼 (*Boleophthalmus pectinirostris*) MHC 基因对病毒拟似物 poly(I:C) 和鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 的免疫反应中的结果类似^[37]。病原菌的感染使得机体内的免疫系统激活, 导致免疫细胞的吞噬率增加从而使 MHC 的表达上调。而感染水霉后的肾脏组织中该基因的表达显著下降, 推测可能是因为肾脏中 MHC 的表达受到抑制, 也可能是因为青海湖裸鲤肾脏中该基因表达的模式与其他组织不相同。同时, 结果还表明 $MHC\ II\ \alpha/\beta$ 在感染水霉后的 4 个组织中表达趋势相同, 而 Ii 的表达趋势与这 2 个基因相反, 这可能是由于 $MHC\ II\ \alpha/\beta$ 主要先以异源二聚体的形式结合后再与 Ii 结合, 故这 2 个基因的表达趋势较一致。

特殊之处在于, 青海湖裸鲤生活在高海拔、低氧、盐碱度高 (碱度 26~32 mmol/L, 盐度 11.9~13.94 g/L) 的青海湖中且表现出了极强的盐碱耐受性。组织表达结果表明, $MHC\ II$ 与青海湖裸鲤免疫预防相关, 同时也发现该基因在盐碱耐受过程中发挥主导作用的鳃、肾组织中均有较高表达, 推测该基因可能与青海湖裸鲤的盐碱耐受相关。故本研究使用不同盐碱胁迫处理青海湖裸鲤后检测 $MHC\ II$ 基因在鳃、肾脏组织中的差异表达量。结果发现, 胁迫处理过后的 $MHC\ II$ 在鳃、肾脏组织中均表达下调。不同盐胁迫处理后鱼类该基因的表达模式并不相同, 盐胁迫后有基因表达上调的, 如尼罗罗非鱼在 6、16、20 三种

不同的盐度下进行胁迫处理后, 在盐度 20 时肾脏组织中观察到 *MHC* 基因表达显著上调^[38]; 慢性盐胁迫下 (盐度 3、7、11) 奥尼罗非鱼 (*O. aureus*) 的肝脏、脾脏组织转录组与对照组 (盐度 0) 相比, *MHC* II 的表达上调^[39]。Boutet 等^[40] 发现, 舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*) 从海水到淡水适应的过程中, 鳃组织 *MHC* II 类表达上调, 也就是说, 从淡水到海水过程中, 该基因表达是下调的; 在比较淡水和海水驯养的舌齿鲈的蛋白表达差异时, 发现淡水中 *MHC* II 的表达是海水中的 2 倍^[41]。以上结果表明, *MHC* II 基因在胁迫处理后不同鱼类中的表达有所差异, 这种差异可能与鱼的种类有关, 也可能是由于单纯的盐胁迫处理和淡水、海水的胁迫处理后基因的表达模式不相同, 青海湖裸鲤的盐碱胁迫也是人工模拟的淡水和盐碱水体; 还可能由于随着胁迫浓度的升高, 环境中的病原微生物数量变少而使得肾脏等免疫防御器官无需发挥更多的免疫功能。*MHC* II 对青海湖裸鲤盐碱耐受的分子机理需进一步探究。

3.3 *MHC* II 基因的多态性分析与比较

MHC II α/β 基因具有高度多态性, 与脊椎动物的抗病性/易感性密切相关。目前已有研究表明 *MHC* II 基因的多态性可导致人类^[42]、鲤^[43]、牙鲈^[44] 和其他物种的抗病性产生差异, 故 *MHC* 的克隆和特性分析可作为抗病相关基因标记的筛选依据。本研究中, 从 6 尾青海湖裸鲤中共获得 *MHC* II α 的 8 种等位基因型, 每个个体的等位基因数从 2 到 8 不等, 共编码 23 种不同的氨基酸序列, *MHC* II β 共获得 12 种等位基因型, 每个个体的等位基因数从 1 到 4 不等, 共编码 22 种不同的氨基酸序列。6 尾花斑裸鲤中获得 *MHC* II α 的 12 种等位基因型, 每个个体的等位基因数从 1 到 5 不等, 共编码 24 种不同的氨基酸序列, *MHC* II β 共获得 14 种等位基因型, 每个个体的等位基因数从 1 到 4 不等, 共编码 23 种不同的氨基酸序列。以上结果均揭示了 *MHC* II α/β 具有较高的基因多态性。并且氨基酸序列分析发现, *MHC* II α 基因 $\alpha 1$ 功能区的变异程度要明显高于 $\alpha 2$ 功能区, 相同现象也在兴国红鲤 (*C. carpio* var. *singguoensis*)^[45]、金头鲷 (*Sparus aurata*)^[46]、间鲃 (*Barbus intermedius*)^[47] 等不同种类的鱼中发现。这可能是由于 $\alpha 1$ 功能区构成了抗原肽结合区 (PBR)^[45], 而该区域高度可变且与抗原决定簇多肽接触后并能将其呈

递至细胞表面。近年来, 已对 *MHC* II α/β 基因的多态性分别进行过一定研究, 在大菱鲆^[9]、黄颡鱼^[24]、圆斑星鲃^[26]、尼罗罗非鱼^[48] 等中均发现了类似的结果, 以上结果表明不同种类鱼中该基因的多态性存在区别, 这可能是由于不同物种中该基因在进化过程出现了适应性改变, 或者是不同鱼在其生长进化过程中受到奠基者效应、基因选择等因素的影响所导致的^[45]。本研究中, 青海湖裸鲤与花斑裸鲤中 *MHC* II 的基因序列多态性存在一定的区别且花斑裸鲤中该基因的多态性高于青海湖裸鲤。易感群体和抗病群体使得 *MHC* 存在高度活跃的多态性^[49]。花斑裸鲤作为一种主要分布于黄河水域上游水段淡水湖泊中的杂食性鱼类, 该物种中 *MHC* II 基因的高度多态性可能是由于其生存的淡水环境中微生物数量众多, 从而诱发了机体内的免疫防御功能, 使得抗原结合区高度活跃从而使其具有较高的多态性。Ottova 等^[50] 认为 *MHC* 的多样性降低会造成生物体由于无法适应外部环境而使得其生命力减弱, 而能够对外部环境的变化及时地做出适应性反应则可以赋予水生生物 *MHC* II 分子高度活跃的多态性。而青海湖裸鲤生活在高盐、高碱的青海湖中, 可能长期处于一种应激状态使得机体的免疫防御机能下降^[51], 同时容易受水环境中病原体的感染, 进而具有较高的多态性。总体来看, 青海湖裸鲤 *MHC* II α/β 的多态性数值小于花斑裸鲤 *MHC* II α/β 的多态性, 而青海湖裸鲤较花斑裸鲤有较强的盐碱耐受能力, 因此推测 *MHC* II 分子的高度多态性可能与盐碱耐受能力关联性不强。

3.4 *MHC* II 遗传多样性分析

根据 Grant 等^[52] 提出的标准得知, 单倍型多样性和核苷酸多样性分别以 0.5 和 0.005 为判断临界值, 两个值越大, 则表明其遗传多样性越高, 种群更稳定。本研究中, 分析得青海湖裸鲤和花斑裸鲤均呈现出 *MHC* II α 高单倍型多样性 ($H_d > 0.5$), 低核苷酸多样性 ($P_i < 0.005$) 而 *MHC* II β 两物种均高单倍型多样性 ($H_d > 0.5$) 和高核苷酸多样性 ($P_i > 0.005$) 的遗传多样性特征。高的单倍型和核苷酸多样性说明在两物种的进化过程中, *MHC* II β 基因积累了较多的突变, 且更适应所处环境。并且花斑裸鲤该基因不管是单倍型多样性还是核苷酸多样性, 均略高于青海湖裸鲤。这与韩永^[53] 的研究一致, 其在对比了花斑裸鲤和裂腹鱼亚科其

他物种的遗传多样性后发现, 几种物种间的单倍型多样性差距不大而核苷酸多样性花斑裸鲤高于包括青海湖裸鲤在内的其他物种。这表明花斑裸鲤种群较青海湖裸鲤种群稳定。此外, 研究表明种群遗传多样性还与水域中放流个体比例呈反比^[54]。自 20 世纪 60 年代以来, 青海湖裸鲤生物资源数量急剧下降后, 青海省政府在采取“封湖育鱼”政策的同时还采取增殖放流技术以保护青海湖裸鲤的种质资源, 使得目前青海湖中青海湖裸鲤的放流群体占比较大, 所以这可能是导致青海湖裸鲤单倍型及核苷酸多样性较花斑裸鲤低的原因。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Chang J. MHC multimer: a molecular toolbox for immunologists[J]. *Molecules and Cells*, 2021, 44(5): 328-334.
- [2] Yamaguchi T, Dijkstra J M. Major histocompatibility complex (MHC) genes and disease resistance in fish[J]. *Cells*, 2019, 8(4): 378.
- [3] Wiczorek M, Abualrous E T, Sticht J, et al. Major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II proteins: conformational plasticity in antigen presentation[J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 292.
- [4] 周永. 草鱼 MHC I 类和 II 类分子的肽结合区结合恒定链特征的研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2018.
Zhou Y. Binding of peptide binding region of grass carp MHC class I and II molecule to invariant chain[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [5] Yu H, Tan S W, Zhao H J, et al. MH-DAB gene polymorphism and disease resistance to *Flavobacterium columnare* in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Gene*, 2013, 526(2): 217-222.
- [6] Monzón-Argüello C, De Leaniz C G, Gajardo G, et al. Eco-immunology of fish invasions: the role of MHC variation[J]. *Immunogenetics*, 2014, 66(6): 393-402.
- [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] Srisapoom 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*[J]. *Fisheries Science*, 2004, 70(2): 264-276.
- [9] Zhang Y X, Chen S L. Molecular identification, polymorphism, and expression analysis of major histocompatibility complex class II A and B genes of turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. *Marine Biotechnology*, 2006, 8(6): 611-623.
- [10] 梁健, 陈雪妍, 卫唯, 等. 青海湖裸鲤 TOB1 和 TOB2 基因的克隆与表达分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2020, 48(5): 31-41.
Liang J, Chen X Y, Wei W, et al. Cloning and expression analysis of TOB1 and TOB2 genes in naked carp (*Gymnocypris przewalskii*) in Qinghai Lake[J]. *Journal of Northwest A& F University (Natural Science Edition)*, 2020, 48(5): 31-41 (in Chinese).
- [11] 马清花, 陈雪妍, 卫唯, 等. 青海湖裸鲤 AP-1 基因的克隆与表达分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(7): 2964-2971.
Ma Q H, Chen X Y, Wei W, et al. Cloning and expression analysis of AP-1 gene in *Gymnocypris przewalskii*[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2020, 39(7): 2964-2971 (in Chinese).
- [12] 赵凯, 李俊兵, 杨公社, 等. 青海湖及其相邻水系特有裸鲤属鱼类的分子系统发育[J]. 科学通报, 2005, 50(13): 1348-1355.
Zhao K, Li J B, Yang G S, et al. Molecular phylogeny of endemic *Gymnocypris* in Qinghai lake and its adjacent water systems[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2005, 50(13): 1348-1355 (in Chinese).
- [13] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method[J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [14] 衣晓飞, 来琦芳, 史建全, 等. 高碱环境下青海湖裸鲤氮废物排泄及相关基因的表达规律[J]. 中国水产科学, 2017, 24(4): 681-689.
Yi X F, Lai Q F, Shi J Q, et al. Nitrogenous waste excretion and gene expression of nitrogen transporter in *Gymnocypris przewalskii* in high alkaline environment[J].

- Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(4): 681-689 (in Chinese).
- [15] 么宗利, 应成琦, 周凯, 等. 碳酸盐碱度胁迫下凡纳滨对虾基因的差异表达[J]. 中国水产科学, 2012, 19(1): 1-12.
- Yao Z L, Ying C Q, Zhou K, *et al.* Gene expression profiles of *Litopenaeus vannamei* in response to carbonate alkalinity stress[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(1): 1-12 (in Chinese).
- [16] Grimholt U. MHC and evolution in teleosts[J]. *Biology*, 2016, 5(1): 6.
- [17] 冯美惠, 陈沛, 雷文, 等. 黄颡鱼MHC class II 基因全长的克隆及饲料维生素D₃对其组织表达的影响[J]. *水生生物学报*, 2017, 41(5): 992-999.
- Feng M H, Chen P, Lei W, *et al.* Full-length cDNA cloning and the effect of dietary vitamin D₃ on tissue expression of major histocompatibility complex-II in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(5): 992-999 (in Chinese).
- [18] 李正杰. 齐口裂腹鱼 MHC II A 基因的克隆、组织分布及其在胚胎和仔鱼中表达的初步研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2015.
- Li Z J. Cloning and tissue distribution of MHC II A gene and the preliminary research on the expression in the embryo and larvae of *Schizothorax prenanti*[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [19] 庞纪彩. 尼罗罗非鱼 MHC II 类基因的克隆与表达特征及多态性研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.
- Pang J C. Cloning and expression patterns of MHC II gene and analysis of MHC IIB gene polymorphism in Nile tilapia[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013 (in Chinese).
- [20] Chen Y Y, Liu Y, Song M J, *et al.* Molecular polymorphism and expression of MHC I α , II α , II β and II invariant chain in the critically endangered dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*)[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2020, 103: 103494.
- [21] Shen T, Xu S X, Yang M, *et al.* Molecular cloning, expression pattern, and 3D structural analysis of the MHC class II B gene in the Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris*)[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2011, 141(1-2): 33-45.
- [22] Huang Z Y, Yu Y Y, Dong S, *et al.* Major histocompatibility complex class II A and II B genes of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*): molecular cloning and expression analysis in response to bacterial and parasitic challenge[J]. *Aquaculture*, 2019, 500: 359-369.
- [23] Pang J C, Gao F Y, Lu M X, *et al.* Major histocompatibility complex class II A and II B genes of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: genomic structure, molecular polymorphism and expression patterns[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(2): 486-496.
- [24] 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.
- Zhu F Z. Molecular characteristics, polymorphism and expression analysis of MHC II in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [25] Li X Y, Du H J, Liu L, *et al.* MHC class II alpha, beta and MHC class II-associated invariant chains from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) and their response to immune stimulation[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 70: 1-12.
- [26] Li H J, Jiang L X, Han J B, *et al.* Major histocompatibility complex class II A 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] Luo W, Zhang J, Wen J F, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of major histocompatibility complex class I, II A and II B genes of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 42(2): 169-173.
- [28] Anderson K S, Cresswell P. A role for calnexin (IP90) in the assembly of class II MHC molecules[J]. *The EMBO Journal*, 1994, 13(3): 675-682.
- [29] 王晓冰. 金钱鱼 MHC II 类基因结构、多态性与组织表达分析 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.
- Wang X B. Genomic structure, polymorphism and expression analysis of the spotted scat (*Scatophagus argus*) MHC II gene[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016 (in Chinese).
- [30] 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 -li复合物中的作用[J]. *畜牧中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries*

- 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).
- [31] 郑风荣, 郭湘云, 刘洪展, 等. 星斑川鲷MHC II恒定链Ii基因的克隆和表达特性[J]. *水产学报*, 2016, 40(2): 145-155.
- Zheng F R, Guo X Y, Liu H Z, *et al.* cDNA cloning and expression characteristics of MHC II invariant chain in *Platichthys stellatus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(2): 145-155 (in Chinese).
- [32] Sultmann 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.
- [33] Yu S H, Ao J Q, Chen X H. Molecular characterization and expression analysis of MHC class II α and β genes in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)[J]. *Molecular Biology Reports*, 2010, 37(3): 1295-1307.
- [34] 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).
- [35] 张大淦. 草鱼恒定链基因的克隆、分子特征及其与MHC分子关系的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2014.
- Zhang D G. Gene cloning and molecular characterization of invariant chain in grass carp and relationship with MHC[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [36] 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).
- [37] 刘桓君. 大弹涂鱼主要组织相容性复合体(MHC)基因的鉴定与免疫应答研究[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2019.
- Liu H J. The identification and immune response of MHC genes of *Boleophthalmus pectinirostris*[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2019 (in Chinese).
- [38] El-Leithy A A A, Hemeda S A, El Naby W S H A, *et al.* Optimum salinity for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth and mRNA transcripts of ion-regulation, inflammatory, stress-and immune-related genes[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2019, 45(4): 1217-1232.
- [39] Zhou K Q, Huang Y, Chen Z, *et al.* Liver and spleen transcriptome reveals that *Oreochromis aureus* under long-term salinity stress may cause excessive energy consumption and immune response[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 107: 469-479.
- [40] Boutet I, Ky C L L, Bonhomme F. A transcriptomic approach of salinity response in the euryhaline teleost, *Dicentrarchus labrax*[J]. *Gene*, 2006, 379: 40-50.
- [41] Ky C L, De Lorgeril J, Hirtz C, *et al.* The effect of environmental salinity on the proteome of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) [J]. *Animal Genetics*, 2007, 38(6): 601-608.
- [42] Trowsdale J, Knight J C. Major histocompatibility complex genomics and human disease[J]. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2013, 14(1): 301-323.
- [43] Rakus K Ł, Wiegertjes G F, Jurecka P, *et al.* Major histocompatibility (MH) class II *B* gene polymorphism influences disease resistance of common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Aquaculture*, 2009, 288(1-2): 44-50.
- [44] Zhang Y X, Chen S L, Liu Y G, *et al.* Major histocompatibility complex class II *B* allele polymorphism and its association with resistance/susceptibility to *Vibrio anguillarum* in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Marine Biotechnology*, 2006, 8(6): 600-610.
- [45] 刘俊, 刘至治, 王成辉, 等. 兴国红鲤MHC II类 α 基因多态性、表达及其与鱼体抗病力关系的分析[J]. *水生生物学报*, 2014, 38(2): 241-248.
- Liu J, Liu Z H, Wang C H, *et al.* The analysis of the polymorphism and expression of MHC class II α gene and its association with resistance/susceptibility to *Aeromonas hydrophila* in Xingguo red common carp[J].

- Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(2): 241-248 (in Chinese).
- [46] Cuesta A, Esteban M Á, Meseguer J. Cloning, distribution and up-regulation of the teleost fish MHC class II alpha suggests a role for granulocytes as antigen-presenting cell[J]. *Molecular Immunology*, 2001, 43(8): 1275-1285.
- [47] Kruijswijk C P, Hermsen T, Fujiki K, *et al.* Analysis of genomic and expressed major histocompatibility class Ia and class II genes in a hexaploid lake Tana African 'large' barb individual (*Barbus intermedius*)[J]. *Immunogenetics*, 2004, 55(11): 770-781.
- [48] 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[J]. *水产学报*, 2012, 36(8): 1167-1178.
Zhou F N, Dong Z D, Li T M, *et al.* Molecular cloning, expression and polymorphism analysis of major histocompatibility complex (MHC) class II A of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(8): 1167-1178 (in Chinese).
- [49] 何佳男, 罗文娜, 刘晓春, 等. 尼罗罗非鱼主要组织相容性复合体 II β (MHC II β)基因的克隆、表达和多态性[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2018, 57(1): 7-20.
He J N, Luo W N, Liu X C, *et al.* Molecular cloning, expression and polymorphism analysis of major histocompatibility complex class II β genes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2018, 57(1): 7-20 (in Chinese).
- [50] Ottová E, Šimková A, Martin J F, *et al.* Evolution and trans-species polymorphism of MHC class II β genes in cyprinid fish[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2005, 18(3): 199-222.
- [51] 张宇婷. 基于转录组技术的大鳞鲃盐碱胁迫免疫应激响应研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.
Zhang Y T. Study of immunological reaction of *Luciobarbus capito* under saline-alkali stress based on transcriptome sequencing technology[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020 (in Chinese).
- [52] Grant W A S, Bowen B W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation[J]. *Journal of Heredity*, 1998, 89(5): 415-426.
- [53] 韩永. 黄河上游花斑裸鲤 *Gymnocypris eckloni eckloni* 年龄、生长和种群遗传特性分析 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.
Han Y. Analysis on age, growth, population genetic characters and conservation of *Gymnocypris eckloni eckloni* in upper Yellow River[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016 (in Chinese).
- [54] 陈会娟. 长江中游四大家鱼放流亲本对早期资源和遗传多样性的影响研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2019.
Chen H J. Effects of broodstock enhancement on fish larval resources and genetic diversity of the four major Chinese carps in the middle reaches of the Yangtze River[D]. Chongqing: Southwest University, 2019 (in Chinese).

Cloning, tissue expression and polymorphism of *MHC* II gene of *Gymnocypris przewalskii* and *Gymnocypris eckloni*

ZHANG Haichen^{1,2}, XU Baoke^{1,2}, A Linlin^{1,2}, MA Qinghua^{1,2}, GAO Qiang¹,
TIAN wengen³, YU luxian³, LIANG Jian^{1*}

(1. State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Qinghai University, Xining 810016, China;

2. College of Eco-Environmental Engineering, Qinghai University, Xining 810016, China;

3. The Rescue and Rehabilitation center of Naked Carps of Qinghai Lake, Xining 810016, China)

Abstract: The major histocompatibility complex (MHC) is crucial in immune function regulation and is a primary factor in immune responses within organisms. To explore the characteristics and roles of this gene in *Gymnocypris przewalskii*, the full-length cDNA sequences of *MHC* II and chaperone gene *Ii* were obtained by cloning using rapid-amplification of cDNA ends (RACE) technique. Meanwhile, the sequences of the coding regions of *MHC* II and *Ii* in *G. eckloni* were also obtained and compared. Sequence alignment and analysis revealed that the characteristics of respective genes were largely identical in both species. The construction of phylogenetic tree indicated the closer evolutionary position of *MHC* II in both fish, clustered to one family, *Cyprinidae*. The amino acid sequences of *MHC* II α/β from two species both contained a signal peptide, two functional domains, a transmembrane domain, in which a conserved structure found in many different species located, and a cytoplasmic region. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) results showed that *MHC* II was highly expressed in the kidney, brain, gill, liver, and skin tissue around the anal fin of *G. przewalskii*, while the expression of which displayed a higher level in the brain, muscle, eye, and gill of *G. eckloni*. The expression of *MHC* II in gill, kidney, liver, and intestinal tissues was also compared between normal and *Saprolegnia* infected individuals of *G. przewalskii*, results demonstrated that the expression level of 3 genes in *MHC* II was significantly down-regulated in the kidney tissues, while α , β genes were significantly up-regulated in gill, liver and intestinal tissues. *MHC* II mRNA levels were significantly reduced in gill and kidney tissues after different saline stress treatments on *G. przewalskii*. Gene polymorphism analysis indicated that *MHC* II α has 8 and 12 allelic genotypes, encoding 23 and 24 amino acid sequences in two species, respectively, with sequence polymorphisms primarily in the $\alpha 1$ functional region. *MHC* II β had 12 and 14 allelic genotypes, encoding 22 and 23 amino acid sequences in two species, respectively. The lower polymorphisms in *MHC* II α/β of *G. przewalskii* suggested a weaker association with salinity tolerance compared to *G. eckloni*. Genetic diversity analysis showed high population diversity in both species, with haplotype diversity approaching 1 and minimal differences in nucleotide diversity. The slightly higher haplotype and nucleotide diversity of the *MHC* II in *G. eckloni* indicated a somewhat greater population stability compared to *G. przewalskii*. Our research verified that *MHC* II not only plays an important role in immunologic defence of two kinds of fish but also involved in the salinity tolerance process of *G. przewalskii*, while gene polymorphisms were not highly associated with salinity tolerance.

Key words: *Gymnocypris przewalskii*; *Gymnocypris eckloni*; major histocompatibility complex; tissue expression; polymorphism

Corresponding author: LIANG Jian. E-mail: Liangjianws@126.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31960741, 31660745); Science and Technology Project of Qinghai Province (2016-ZJ-940Q)