

戴薇, 汤井雪, 陈俊红, 等. 草鱼 MHC I  $\alpha$  基因克隆及其多态性特征分析 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (7): 6-14.

DAI W, TANG J X, CHEN J H, et al. Grass carp MHC I  $\alpha$  gene cloning and its polymorphic characteristics [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (7): 6-14.

## 草鱼 MHC I $\alpha$ 基因克隆及其多态性特征分析

戴薇, 汤井雪, 陈俊红, 朱瑾雯, 戴鼎震\*

(金陵科技学院动物科学与食品工程学院, 南京市动物生物技术创新实验室, 江苏 南京 210038)

**摘要:** 主要组织相容性复合体 (MHC) 是存在于脊椎动物染色体上、呈高度多态性的基因群, 与机体的抗病性密切关系。MHC I 类分子由  $\alpha$  链和  $\beta_{2m}$  微球蛋白组成,  $\alpha$  链呈高度多态性。为探究草鱼 MHC I  $\alpha$  基因的多态性特征, 本研究对 3 个草鱼个体的 MHC I  $\alpha$  基因进行克隆和测序, 并使用生物信息学方法分析比较草鱼与小鼠、牛和鸡的 MHC I  $\alpha$  基因多态性特征。结果: 共获得了 5 条草鱼 MHC I  $\alpha$  基因型序列, 其基因编码 332 个氨基酸, 包括信号肽、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$  和 TM/CY 区域。草鱼 MHC I  $\alpha$  基因的氨基酸变异位点主要分布在  $\alpha 1$  和  $\alpha 2$  区域, 与小鼠、牛和鸡 MHC I  $\alpha$  基因肽结合区 (PBR) 空间结构相似, 多态性位点分布在抗原递呈的关键部位  $\alpha$  螺旋或  $\beta$  折叠上。草鱼 MHC I  $\alpha$  基因的进化受自然环境的负向选择作用, 而其他 3 个物种的进化方式均为正向选择。此外, 草鱼 MHC I  $\alpha$  基因与其他脊椎动物亲缘关系较远, 单独构成进化树上一大分支, 且个体间继续分化为不同的亚支。本研究从基因层面阐述了草鱼 MHC I  $\alpha$  基因多态性特征和分子进化规律, 为进一步探究低等脊椎动物 MHC I  $\alpha$  基因的生物学特征奠定基础。

**关键词:** 草鱼; MHC I  $\alpha$  基因; 多态性;  $\alpha 1$  和  $\alpha 2$  区域; 肽结合区

**中图分类号:** S852.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2024)07-0006-09

## Grass carp MHC I $\alpha$ gene cloning and its polymorphic characteristics

DAI Wei, TANG Jingxue, CHEN Junhong, ZHU Jinwen, DAI Dingzhen\*

(Animal Biotechnology Innovation Laboratory of Nanjing, School of Animal Science and Food Engineering, Jinling Institute of Technology, Nanjing 210038, China)

**Abstract:** Major histocompatibility complexes (MHC) are highly polymorphic gene groups on the chromosomes of vertebrates, which are closely related to the differences in disease resistance. MHC class I molecules are composed by the  $\alpha$  chain and  $\beta_{2m}$  microglobulin, and the  $\alpha$  chain shows high polymorphism. To explore the polymorphic characteristics of grass carp MHC I  $\alpha$  genes, the MHC I  $\alpha$  genes from three individuals of grass carp were cloned and sequenced in this study. The polymorphic characteristics of the grass carp MHC I  $\alpha$  genes were analyzed with bioinformatics and were compared with the genes of mice, cattle, and chickens. As a result, five grass carp MHC I  $\alpha$  genotype sequences were obtained. The sequence analysis showed that the grass carp MHC I  $\alpha$  gene encoded 332 amino acids, including the signal peptide region, the  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  and TM/CY domains; and the most polymorphic amino acid residues were concentrated in the  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  domains. The spatial structures of the peptide binding region (PBR) of the four species' MHC I  $\alpha$  genes were similar; the polymorphic sites mainly distributed in the key position of antigen-presentation  $\alpha$  helices or  $\beta$  sheets. The evolution process of the grass carp MHC I  $\alpha$  gene was influenced by negative selection of natural environment, while that of the other vertebrates was positively selected. In addition, the grass carp MHC I  $\alpha$  gene shared distant genetic relationship with the other vertebrates, and constituted a large branch of its own, and the individuals continue to differentiate into different subclades, with no obvious individual differences. Our results clarified the polymorphic characteristics and gene evolution of the grass carp MHC I  $\alpha$  gene, which laid a foundation for further exploration of the biological features of MHC I genes in lower vertebrates.

**Keywords:** grass carp; MHC class I  $\alpha$  gene; polymorphism;  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  domains; peptide binding region

收稿日期: 2023-07-23; 修回日期: 2024-04-30

基金项目: 江苏省自然科学基金青年基金项目 (BK20210005); 金陵科技学院高层次人才科研启动项目 (jit-b-202105); 金陵科技学院 2022 年“科教融合”项目 (2022KJRH38)

第一作者: 戴薇, 女, 博士, 讲师

\* 通信作者: 戴鼎震, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为畜禽微生物与免疫, E-mail: daimingrui@jit.edu.cn.

主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 是抗原递呈过程中的关键分子, 具有重要的免疫学功能<sup>[1]</sup>。MHC 是一种多基因家族, 群体中复等位基因的存在和共显性遗传导致个体具有高度多态性, 基因的多态性引起结构和功能各异, 从而决定机体抵御病原体感染能力的大小<sup>[2]</sup>。MHC I 类分子以 MHC/肽复合物的形式活化 CD8<sup>+</sup>T 细胞, 引起抗病毒/抗肿瘤的特异性细胞免疫应答, 在 MHC/肽复合物中, 内源性抗原肽被包裹在 MHC I 类分子的抗原肽结合区 (PBR) 凹槽中<sup>[3]</sup>。MHC I 类分子 PBR 由  $\alpha 1$  和  $\alpha 2$  结构域组成, 该区域正是 MHC I 类分子与抗原肽相互作用的关键部位<sup>[4]</sup>。MHC I 类分子由  $\alpha$  链和  $\beta_{2m}$  微球蛋白组成,  $\alpha$  链呈现出高度多态性。最近研究证实, 脊椎动物体内 MHC I 类分子的多态性远比预测的更为复杂<sup>[5]</sup>。因此, 研究 MHC I 类分子  $\alpha$  链的多态性特征有助于揭示分子进化规律和免疫防御机制。

高等脊椎动物中 MHC I 类分子的典型特征是具有敏感的移植排斥现象, 而在软骨鱼类和无颌鱼类等低等脊椎动物中, 这种移植排斥现象较弱或较缓慢<sup>[6]</sup>。通过对低等脊椎动物鱼类 MHC I 类分子的研究, 有助于揭示其起源和进化, 找出低等脊椎动物和高等脊椎动物免疫防御的关联。目前, 人和小鼠等哺乳动物的 MHC 分子研究较为深入<sup>[7]</sup>。作为最低等脊椎动物鱼类, MHC 基因研究却相对滞后, 直到 1990 年, Hashimoto 等<sup>[8]</sup>才率先克隆了鲤鱼 MHC I 基因, 从此揭开了鱼类 MHC 基因的研究序幕。草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*, Ctid) 属于鱼类分类学上的硬骨鱼类 (Osteichthyes) 鲤科 (Cyprinidae) 草鱼属 (*Ctenopharyngodon*) 成员, 是我国淡水资源中特有的鱼类品种, 也是我国内陆水域中主要养殖的优质鱼类品种<sup>[9]</sup>。然而草鱼疾病种类繁多, 养殖成活率不高。因此, 对草鱼 MHC 基因的研究有助于抗病育种工作的顺利进行, 也对渔业发展具有深远意义。

鉴于 MHC I 类分子  $\alpha$  链的多态性特点, 本研究选取草鱼 MHC I  $\alpha$  基因作为研究对象, 通过 RT-PCR 直接克隆测序手段, 阐明草鱼 MHC I  $\alpha$  基因结构特征, 随后对其多态性规律进行探究, 并与脊椎动物中的小鼠、牛和鸡 MHC I  $\alpha$  基因多态性进行比较, 从而为深入了解低等脊椎动物草鱼 MHC I 类分子的遗传特征和进化规律, 从遗传学角度揭示脊椎动物 MHC I 类分子的生物学特征奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物和牛 cDNA 样品

草鱼 3 尾, 购自合肥市蜀山区铜锣湾市场; 6~8 周龄 SPF 级 C57BL/6 雌性小鼠 3 只, 购自安徽医科大学实验动物中心; 文昌鸡 3 只, 购自合肥市肥西农牧集团育种中心, 遗传背景和养殖纪录均能够获得。3 份牛血清 cDNA 样品由安徽农业大学安徽省人兽共患病重点实验室构建及保存。

### 1.2 主要试剂

总 RNA 抽提试剂 TRIzol、反转录试剂盒 Prime-Script RT Master Mix、预混型热启动 PCR 高保真酶 PrimeSTAR HS、DNA 分子量标准 DL2000 DNA Marker 和 PCR 产物 TA 载体克隆试剂盒 pMD18-T 载体均购自北京宝日医生物技术有限公司; DNA 胶回收试剂盒购自杭州爱思进生物工程有限公司; DH5 $\alpha$  感受态细胞购自北京天根公司; 引物和测序均由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

### 1.3 引物设计与合成

参照 GenBank 上已发表的草鱼 (登录号: AB540144)、小鼠 (登录号: NM001001892)、牛 (登录号: DQ121190) 和鸡 (登录号: KF274026) MHC I  $\alpha$  基因 cDNA 序列, 针对其 ORF 两端高度保守区域, 应用 Primer Premier 5.0 软件设计 4 对特异性引物 (表 1)。

表 1 MHC I  $\alpha$  基因引物序列

物种	引物名称	引物序列 (5'→3')	扩增长度/bp
草鱼	grass carp-I- $\alpha$ F	CCCGAATTCACATGCGATCTGTAGTGC	1 009
	grass carp-I- $\alpha$ R	GCGTCGACACAACAGGTTTAAAGCCT	
小鼠	mouse I- $\alpha$ F	ATGGCTCCGGCAGCGTCTGCTCCTG	1 080
	mouse I- $\alpha$ R	TCACGCTTACAATCTCGGAGAGACA	
牛	cattle-I- $\alpha$ F	CAGACTCAGAGGATGTGAGTTATGGG	1 138
	cattle-I- $\alpha$ R	TGAAGCATCACTCAGTCCCCCAAG	
鸡	chicken-I- $\alpha$ F	ATGGGGCCGTGCGGAGCGC	1 035
	chicken-I- $\alpha$ R	TCAGATGGCAGGGTTGCTCCCT	

## 1.4 RNA 抽提与 cDNA 合成

使用 TRIzol 从草鱼、小鼠和鸡血液中抽提总 RNA。以提取的 RNA 为模板，反转录合成 cDNA 第一链，反应体系为：2×PrimeScript RT Master Mix 5 μL，RNA 500 ng，加 H<sub>2</sub>O 补足至 10 μL；将反应体系轻柔混匀后进行反转录，反应条件为：37 °C 反转录反应 15 min，85 °C 反转录酶失活反应 5 s。

## 1.5 MHC I α 基因克隆与测序

以 cDNA 为模板，分别使用 grass carp-I-α F/R、mouse I-α F/R、cattle-I-α F/R 和 chicken-I-α F/R 引物进行草鱼、小鼠、牛和鸡 MHC I α 基因 PCR 扩增。PCR 反应体系为：PrimeSTAR HS 25 μL、cDNA 2 μL、上下游引物各 1 μL (10 μmol/L)，加 H<sub>2</sub>O 补足至 50 μL。反应体系混匀后进行 PCR 扩增，反应条件为：98 °C 变性 10 s，58 °C 退火 15 s，72 °C 延伸 1.5 min，共 35 个循环；72 °C 终延伸 8 min，4 °C 保存。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测，切下 1 100 bp 左右目的条带，使用 DNA 胶回收试剂盒回收，插入 pMD18-T 载体，转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞。使用 PCR 方法从草鱼、小鼠、牛和鸡每个个体中筛选 20 个阳性克隆并送深圳华大基因科技有限公司测序。

## 1.6 核苷酸序列比对分析

使用 DNASTAR Lasergene 7.1 软件和 Clustal X 1.8 软件包对测序结果进行多序列比对分析。从 GenBank 数据库中下载人（登录号：L19923）、鸭（登录号：AY294416）、猪（登录号：NM001246242）和武昌鱼（登录号：JF921106）的 MHC I α 基因序列，基于 MEGA 5.0 软件中的邻接法（neighbor-joining, NJ）构建系统发育进化树<sup>[10]</sup>。

## 1.7 MHC I α 基因多态性特征分析

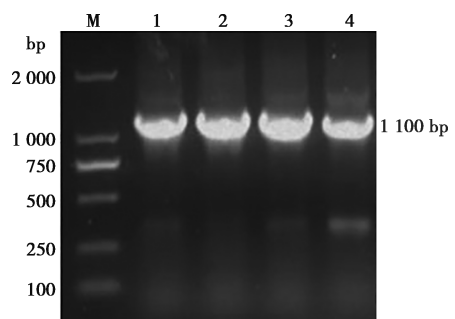
使用 Signal P 3.0 在线工具 (<http://genome.cbs.dtu/services/SignalP3.0>) 预测信号肽和跨膜结构域。使用 DnaSP 5.0 基因多态性分析软件计算等位基因多态性 (Hd)、核苷酸差异数量 (K)、平均核苷酸多样性 (Pi) 和遗传距离 (d)，并进行基于 Tajima's D 和 Fuand Li's 的中性检验<sup>[11]</sup>。利用 MEGA 5.0 软件中改进的 Nei 和 Gojobori 方法计算氨基酸错义替换率 (dN) 和同义替换率 (dS) 比率 (R)，定义：R>1 为正向选择，R=1 为平衡选择，R<1 为负向选择<sup>[12]</sup>。利用 Protein Variability Server 在线软件中的 Wu-Kabat 算法统计氨基酸变异率 (<http://imed.med.ucm.es/PVS/>)，定义：Wu-Kabat 分值=1 表示无氨基酸突变；1<Wu-Kabat 分值<4 表示氨基酸变异程度

低；Wu-Kabat 分值≥4 表示氨基酸变异程度高，其位点为多态性位点；Wu-Kabat 分值≥8 为高度可变氨基酸位点 (HVS)<sup>[13]</sup>。使用 SWISS-MODEL 蛋白质模拟系统 (<http://swissmodel.expasy.org/>) 分析蛋白质三维 (3D) 模型结构<sup>[14]</sup>，并使用 SWISS-Pdb viewer 4.01 软件绘制 3D 结构图<sup>[15]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 草鱼 MHC I α 基因克隆与序列比对分析

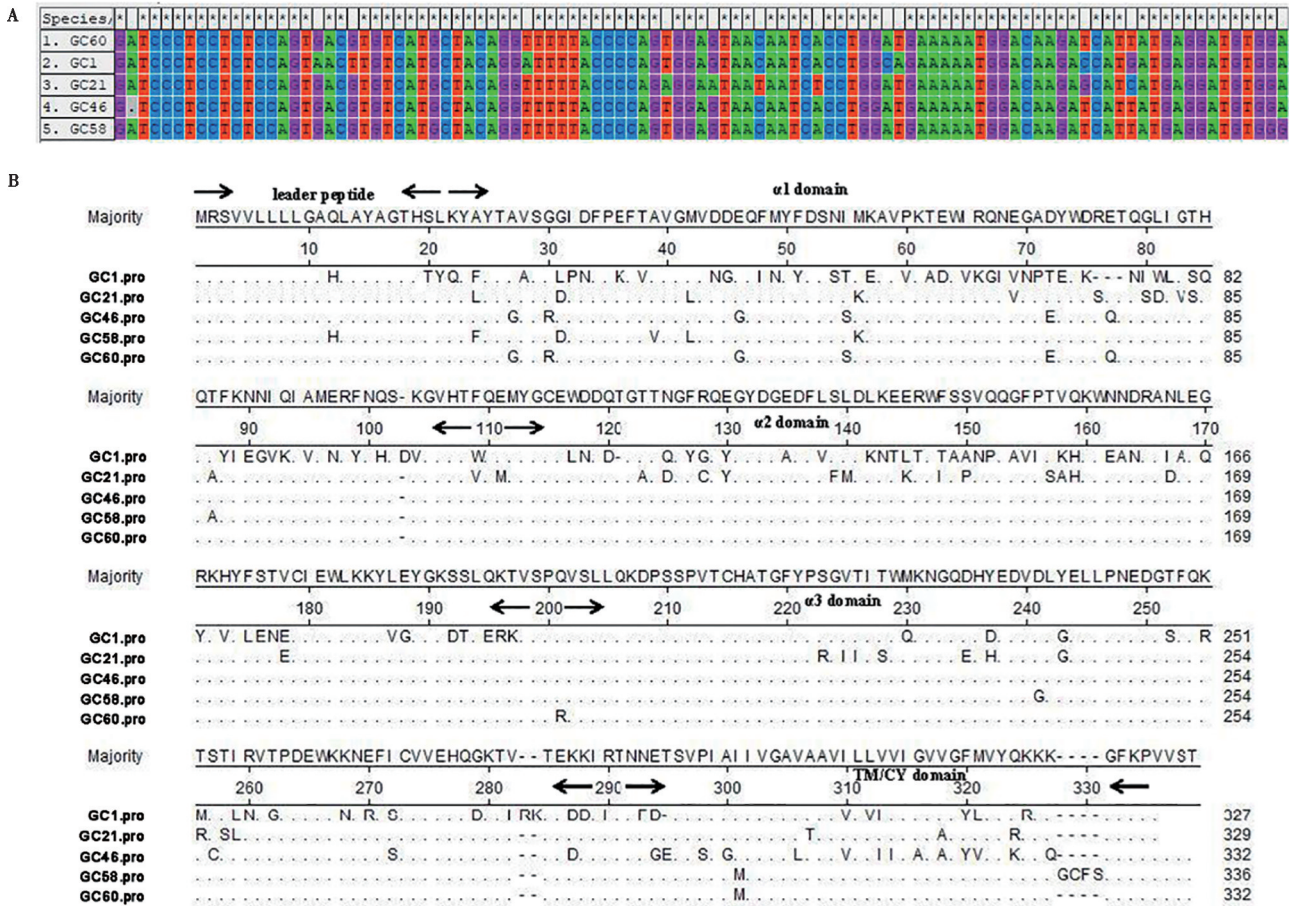
使用表 1 中 4 对引物对草鱼、小鼠、牛和鸡 MHC I α 基因进行 PCR 扩增，扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。结果显示，条带清晰明亮，无引物二聚体，条带长度约为 1 100 bp，与预期目的条带大小一致 (图 1)。



M. DL2000 DNA Marker; 1~4. 草鱼、小鼠、牛、鸡 MHC I α 基因片段。

图 1 4 个物种 MHC I α 基因的 PCR 扩增

分别从草鱼、小鼠、牛和鸡 3 个个体样本中筛选 20 个阳性克隆，每个物种共计 60 个阳性克隆进行测序，分别编号为 GC1~GC60 (草鱼)、MO1~MO60 (小鼠)、CA1~CA60 (牛)、CH1~CH60 (鸡)。测序结果表明，草鱼、小鼠、牛和鸡分别获得了 56、54、59 和 58 条正确的 MHC I α 基因序列。草鱼 MHC I α 基因存在 3 种基因型，每种基因型又包括 1~3 种亚型，从中筛选出 5 个特异的 MHC I α 基因型序列，草鱼编号为 GC1、GC21、GC46、GC58 和 GC60 (图 2A)。序列分析显示，草鱼 MHC I α 基因编码区序列 (coding DNA sequence, CDS) 全长 996 bp，编码 332 个氨基酸 (aa)，由 8 个外显子组成，分别对应 21 个 aa 的信号肽 (外显子 1)，88 个 aa 的 α1 区域 (外显子 2)，90 个 aa 的 α2 区域 (外显子 3)，91 个 aa 的 α3 区域 (外显子 4) 和 42 个 aa 的 TM/CY 区域 (外显子 5、6、7、8) (图 2B)。



A. 5个草鱼 MHC I  $\alpha$  基因型部分序列; B. 草鱼 MHC I  $\alpha$  基因氨基酸序列比对分析; “.”表示一致的氨基酸,“-”表示缺失的氨基酸。

图2 草鱼 MHC I  $\alpha$  基因序列分析

### 2.2 草鱼 MHC I $\alpha$ 基因多态性特征分析

使用 DnaSP 5.0 软件对草鱼、小鼠、牛和鸡 MHC I  $\alpha$  基因进行多态性分析。如表 2 所示,草鱼、小鼠、牛和鸡 MHC I  $\alpha$  基因均拥有丰富的多态性, Hd 分别为 0.984、0.928、0.998 和 0.995。草鱼 MHC I  $\alpha$  基因遗传多样性最丰富,其基因 K 值和 Pi 值最高,分别为 153.305 和 0.199 98,小鼠、牛和鸡

MHC I  $\alpha$  基因 K 值分别为 16.523、64.141 和 48.005, Pi 值分别为 0.027 96、0.068 49 和 0.054 93。此外, Tajima's D 和 Fuand Li's 负值统计结果显示,草鱼 MHC I  $\alpha$  基因进化受到自然环境的负向选择,且有一些单倍型分化,有利于物种进化,而小鼠、牛和鸡 MHC I  $\alpha$  基因的进化方式均为正向选择(表 2)。

表 2 4 个物种 MHC I  $\alpha$  基因遗传多样性和群体间的遗传分化

物种	n	Hd	K	Pi	d	D	D*	P
草鱼	3	0.984	153.305	0.199 98	0.024	-1.707 38	-0.931 59	>0.10
小鼠	3	0.928	16.523	0.027 96	0.052	0.218 92	0.322 34	>0.10
牛	3	0.998	64.141	0.068 49	0.012	0.060 02	0.396 82	>0.10
鸡	3	0.995	48.005	0.054 93	0.018	1.004 65	0.249 30	>0.10

注: n 表示基因个数, Hd 表示等位基因多态性, K 表示核苷酸差异数量, Pi 表示核苷酸差异, d 表示遗传距离, D 表示 Tajima's D 统计值, D\* 表示 Fuand Li's 数字。

草鱼 MHC I  $\alpha$  基因的进化规律分析显示,与基因全长相比较,草鱼 MHC I  $\alpha$  基因  $\alpha 1$  和  $\alpha 2$  区域的

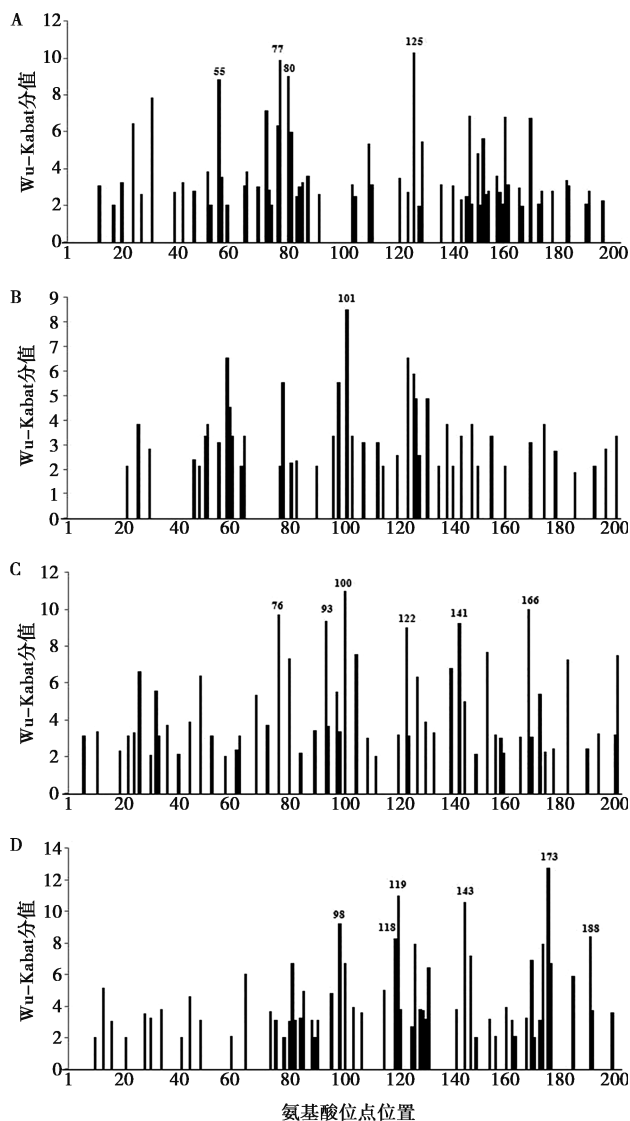
dN 和 dS 均显著高于前者 ( $P>0.01$ ), 提示由  $\alpha 1$  和  $\alpha 2$  构成的 PBR 是其 MHC I  $\alpha$  基因活跃的变异区。此外, 草鱼 MHC I  $\alpha$  基因全长、 $\alpha 1$  和  $\alpha 2$  区域的 R 值均小于 1, 表明其基因进化受到自然环境的负向选择作用, 而其他 3 个物种 MHC I  $\alpha$  基因进化方式均为正向 ( $R>1$ ) (表 3)。

表 3 4 个物种 MHC I  $\alpha$  不同区域错义替换率 (dN) 与同义替换率 (dS) 分析

物种	区域	dN	dS	R
草鱼	全长	0.124 3	0.186 1	0.667 9
	$\alpha 1$	0.170 2	0.353 1	0.482 0
	$\alpha 2$	0.159 0	0.266 7	0.596 2
小鼠	全长	0.052 3	0.038 2	1.369 1
	$\alpha 1$	0.053 7	0.047 6	1.128 2
	$\alpha 2$	0.084 0	0.047 9	1.753 7
牛	全长	0.069 5	0.059 3	1.172 0
	$\alpha 1$	0.115 2	0.081 9	1.406 6
	$\alpha 2$	0.088 7	0.066 6	1.331 3
鸡	全长	0.053 3	0.041 8	1.275 1
	$\alpha 1$	0.078 2	0.049 4	1.583 0
	$\alpha 2$	0.077 4	0.048 2	1.605 8

### 2.3 草鱼 MHC I $\alpha$ 基因 PBR 区多态性位点分析

基于 Wu-Kabat 分值对草鱼和小鼠、鸡、牛 PBR 区域氨基酸的变异频率进行分析比较, 结果显示, 与小鼠、鸡和牛 MHC I  $\alpha$  基因相比, 草鱼 MHC I  $\alpha$  基因 PBR 区域的氨基酸多态性位点 (Wu-Kabat 分值  $\geq 4$ ) 较丰富并且分布较为均衡,  $\alpha 1$  和  $\alpha 2$  区域各存在 9 个和 7 个多态性位点, 4 个峰值较高的多态性位点 (Wu-Kabat 分值  $\geq 8$ ) 分别位于第 55、77、80 和 125 位氨基酸残基 (图 3A)。小鼠 MHC I  $\alpha$  基因  $\alpha 1$  和  $\alpha 2$  区域各存在 5 个和 4 个多态性位点, 仅 1 个峰值较高的多态性位点位于第 101 位氨基酸残基 (图 3B)。牛 MHC I  $\alpha$  基因  $\alpha 1$  和  $\alpha 2$  区域各存在 10 个多态性位点, 6 个峰值较高的多态性位点分别位于第 76、93、100、122、141 和 166 位氨基酸残基 (图 3C)。鸡 MHC I  $\alpha$  基因  $\alpha 1$  和  $\alpha 2$  区域各存在 8 个和 12 个多态性位点, 6 个峰值较高的多态性位点分别位于第 98、118、119、143、173 和 188 位氨基酸残基 (图 3D)。与其他 3 个物种相比, 尽管草鱼 MHC I  $\alpha$  基因的高频氨基酸变异位点不是最多, 并且在 PBR 内的具体位置不同, 但其整体分布较为均衡; 作为构成 MHC 分子与抗原肽结合的 PBR, 由于病原体抗原的多样化, 使其相应区域内的氨基酸在进化过程中也发生高度变化。



A. 草鱼; B. 小鼠; C. 牛; D. 鸡。

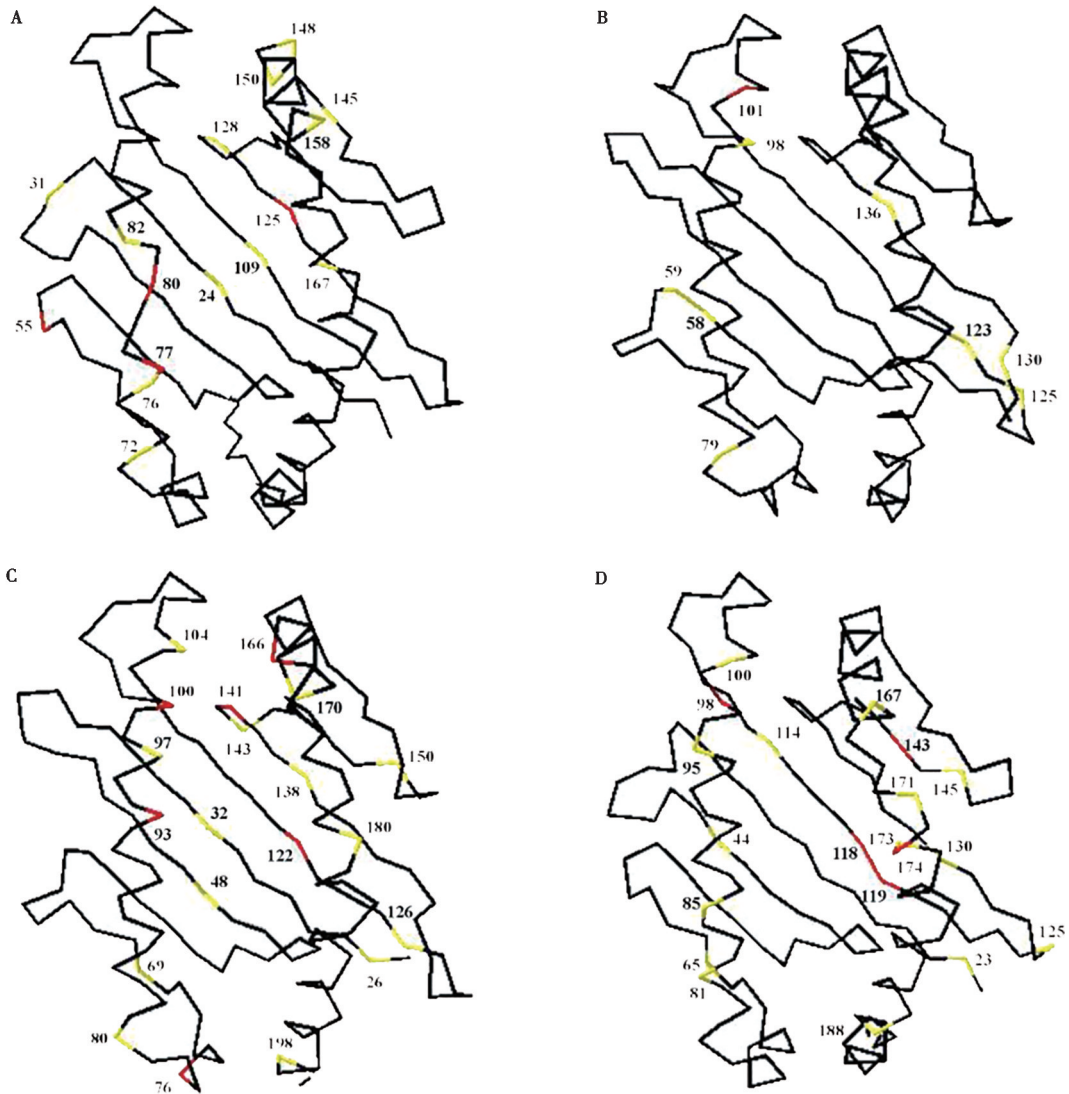
图 3 4 个物种 MHC I  $\alpha$  基因  $\alpha 1$  和  $\alpha 2$  区域氨基酸变异率 Wu-Kabat 分析

### 2.4 草鱼 MHC I $\alpha$ 基因 PBR 区多态性位点空间结构

模拟草鱼和小鼠、鸡、牛 MHC I  $\alpha$  基因 PBR 区域的三维空间结构。结果显示, 4 个物种 MHC I  $\alpha$  基因 PBR 区的 3D 结构相似,  $\alpha 1$  和  $\alpha 2$  构成 PBR 区域中与抗原肽相结合的分子凹槽, 2 个  $\alpha$  螺旋构成凹槽的两侧, 8 个  $\beta$  折叠构成凹槽的底部。与小鼠、鸡、牛 MHC I  $\alpha$  基因 PBR 区域中多态性位点空间结构相比, 草鱼 MHC I  $\alpha$  基因多态性位点在 PBR 区域中分布较均衡, 10 个多态性位点平均分布在  $\alpha 1$  和  $\alpha 2$  区域。其中,  $\alpha 1$  区域内的 4 个多态性位点 (第 72、76、77 和 82 位) 位于  $\alpha$  螺旋上, 1 个多态性位点 (第 109 位) 位于  $\beta$  折叠上;  $\alpha 2$  区域内的 2 个多态性

位点（第158和167位）位于 $\alpha$ 螺旋上，3个多态性位点（第125、128和145位）位于 $\beta$ 折叠上（图4A）。小鼠MHC I  $\alpha$ 基因氨基酸多态性位点在PBR区域中分布较分散， $\alpha 1$ 区域内的3个多态性位点（第79、98和101位）位于 $\alpha$ 螺旋上，2个多态性位点（第58和59位）位于 $\beta$ 折叠上； $\alpha 2$ 区域内的4个多态性位点（第123、125、130和136位）均位于 $\beta$ 折叠上（图4B）。牛MHC I  $\alpha$ 基因的多态性位点最多，且在PBR区域中分布较紧凑，除了第76、80和143位的3个氨基酸多态性位点外， $\alpha 1$ 区域内的4个多态性位点（第93、97、100和104位）位于 $\alpha$ 螺旋上，4个多态性位点（第26、32、48和69位）位于 $\beta$ 折叠上； $\alpha 2$ 区域内的4个多态性位点（第166、170、180和198位）位于 $\alpha$ 螺旋上，5个多态

性位点（第122、126、138、141和150位）位于 $\beta$ 折叠上（图4C）。鸡MHC I  $\alpha$ 基因PBR区域中除31、55、80、148和150位的5个氨基酸多态性位点外， $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 区域内其余多态性氨基酸残基均位于 $\alpha$ 螺旋或 $\beta$ 折叠上， $\alpha 1$ 区域内的4个多态性位点（第72、76、77和80位）位于 $\alpha$ 螺旋上，2个多态性位点（第24和109位）位于 $\beta$ 折叠上； $\alpha 2$ 区域内的2个多态性位点（第158和167位）位于 $\alpha$ 螺旋上，3个多态性位点（第125、128和145位）位于 $\beta$ 折叠上（图4D）。草鱼和其他3个物种MHC I  $\alpha$ 基因PBR区域的空间结构极其相似，参与抗原递呈的关键性氨基酸残基主要分布在 $\alpha$ 螺旋或 $\beta$ 折叠上，但草鱼MHC I  $\alpha$ 基因的多态性位点在PBR区域中的分布较其他物种更加均衡。



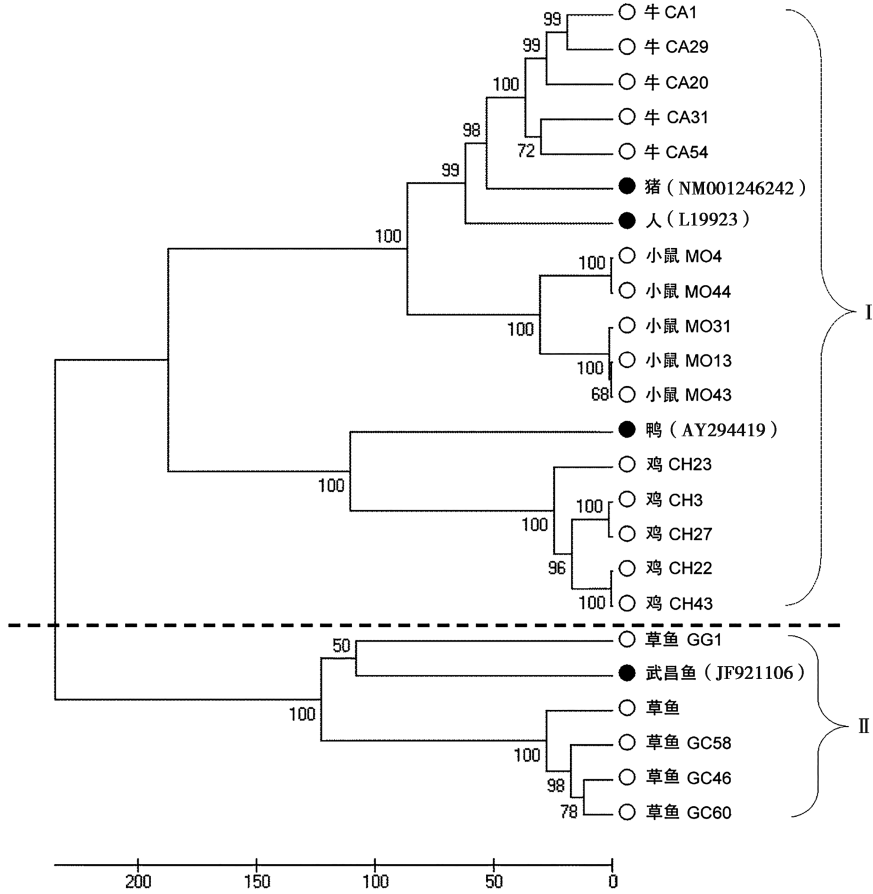
注：黄色线段表示 Wu-Kabat 分值 $\geq 4$ 的多态性位点，红色线段表示 Wu-Kabat 分值 $\geq 8$ 的多态性位点。

图4 草鱼(A)、小鼠(B)、牛(C)和鸡(D) MHC I  $\alpha$ 基因  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 区域的空间结构

### 2.5 不同物种 MHC I α 基因系统进化分析

为了解草鱼 MHC I α 基因在遗传学方面与禽类、哺乳类动物的关系，将本研究获得的草鱼、小鼠、牛和鸡各 5 个 MHC I α 基因序列与已经发表的人 (L19923)、鸭 (AY294416)、猪 (NM001246242) 和武昌鱼 (JF921106) 的 MHC I α 基因序列构建系统发育进化树。结果显示，上述 8 个物种 MHC I α 基因序列可明显分为两大分支。人、小鼠、牛、猪、

鸡和鸭 MHC I α 基因构成进化树上第一分支 (I)，草鱼和武昌鱼 MHC I α 基因单独构成另一分支 (II)。草鱼不同个体的 MHC I α 基因继续分化为不同的亚支，而同一个体的 MHC I α 基因差异不明显。鱼类 (草鱼、武昌鱼) MHC I α 基因与禽类 (鸡、鸭) 和哺乳动物 (人、小鼠、牛、猪) 的亲缘关系较远，基因沿着不同的方向进化 (图 5)。



注：●表示从 GenBank 上下载的 MHC I α 基因序列，○表示本研究所获得的 MHC I α 基因序列。

图 5 不同物种 MHC I α 基因进化树分析

### 3 讨论

MHC 分子在现有物种形成前就已经存在。在物种长期的进化过程中，MHC 基因在物种间及种群个体间产生了显著差异。亲缘关系较近的物种间 MHC 基因结构相似，同种动物个体间 MHC 等位基因呈现出高度多态性。本研究从草鱼 3 个个体中获得了 5 种 MHC I α 基因型序列，胡丹丹等<sup>[16]</sup>在虹鳟中发现了 12 个 MHC I 等位基因，季芳等<sup>[17]</sup>在中国恒河猴中检出了 23 个 MHC I 等位基因，Grimholt 等<sup>[18]</sup>分别在大西洋蛙和金头鲷中发现了 12 个和 2 个 MHC I 等位基因。序列分析显示，草鱼 MHC I α 基因 CDS 区基

因结构与哺乳动物相似，由信号肽、胞外段结构域 (α1、α2、α3)、跨膜区和胞质区组成。其中，α2 和 α3 区域中有 4 个保守的半胱氨酸残基，α1 与 α2 区域形成一个由 2 个 α 螺旋和 8 个 β 折叠组成的 PBR。随后模拟了草鱼 MHC I α 基因 PBR 的空间结构，结果发现，PBR 形成与抗原肽结合的分子凹槽，2 个 α 螺旋构成凹槽的两侧，8 个 β 折叠构成凹槽的底部。该区域主要由保守的氨基酸残基组成，螺旋的两端非常保守，螺旋的中部较为多态<sup>[19]</sup>。在抗原呈递过程中，内源性抗原肽占据 MHC I 类分子的 PBR，而 MHC I 类分子的多态性主要体现在 PBR，多态性对 PBR 结合特异性抗原肽的亲合力发挥重要作用<sup>[20]</sup>。

基于 Wu-Kabat 分析发现, 草鱼 MHC I  $\alpha$  基因 PBR 区域内多态性氨基酸残基主要位于  $\alpha$  螺旋或  $\beta$  折叠上。4 个高频氨基酸多态性变异位点的主要作用是结合抗原多肽。夏春等<sup>[21]</sup> 研究发现草鱼 MHC I 类分子  $\alpha 1$  和  $\alpha 2$  区域存在大量的插入/缺失突变, 是多态性富集区。Phillips 等<sup>[22]</sup> 也证实了虹鳟 UBA 基因第二外显子存在高度多态性, 且变异主要发生在 PBR。

MHC 分子最主要的功能是递呈抗原肽, 多态性决定了其识别和递呈抗原肽的能力, 由此决定了不同个体对特定抗原肽能否产生免疫应答及应答反应的强度<sup>[23]</sup>。在 MHC I  $\alpha$  基因中, 非 PBR 部位相对保守, 承担着维持分子结构稳定的作用, 从而保证 PBR 形成袋状凹槽结构, 有利于同抗原肽结合, 维持免疫活性。MHC 表面的氨基酸残基可能参与 T 细胞受体 (TCR) 的识别, 肽结合槽中部的氨基酸残基侧链分别伸向结合槽的内部和  $\alpha$  螺旋的上方, 参与抗原肽和 TCR 的结合<sup>[24]</sup>。作为构成 MHC I 类分子与抗原肽结合的 PBR, 由于病原体抗原的多样化, 使其在进化过程中相应区域的氨基酸也发生高度变化。该区域多态性越丰富, 基因序列变异越大, 越有利于同结构各异的抗原肽结合。这些特征说明 MHC I 类分子  $\alpha$  链 PBR 内的氨基酸残基各自行使独特的功能, 同时为了更好地识别种类繁多的抗原肽, 又参与内部各位点的相互协作, 也证实了 MHC I 类分子的系统进化方向是氨基酸残基协同进化的结果。此外, 本研究发现, 草鱼和小鼠、牛、鸡 MHC I  $\alpha$  基因均存在丰富的多态性, 尽管多态性氨基酸残基的具体位置在不同物种间存在差异, 但整体的分布是相似的, 主要集中在  $\alpha 1$  和  $\alpha 2$  区域构成的 PBR, 并且在空间结构上处于抗原肽结合的关键部位  $\alpha$  螺旋或  $\beta$  折叠上。

众所周知, 同一物种的不同个体由于生活环境差异, 可能受到不同病原体的影响, 致使同物种个体间 MHC 基因呈现出高度多态性。在环境作用下, 源于共同祖先的不同物种 MHC 基因有着不同的演化趋势<sup>[25]</sup>。草鱼不同个体尽管在养殖过程中, 外形特征、生产性能等方面存在差异, 但基于相同的自然环境, 其 MHC I  $\alpha$  基因仍保留着共同祖先的遗传特征, 个体间差异并不明显<sup>[26]</sup>。禽类与哺乳动物生活环境相似、亲缘关系较近, 而鱼类有着截然不同的水生环境, 并且鱼类与禽类和哺乳动物在系统发育树上处于不同的分支, 这就造成了草鱼和小鼠、牛、鸡 MHC I  $\alpha$  基因多态性存在一定差异。草鱼 MHC I  $\alpha$  基因的  $P_i$  和  $K$  值均大于其他脊椎动物, 并且 Tajima's  $D$  和 Fuand Li's 负值统计结果表明, 该基因的进化过程中未遵循中性进化模型, 不是平衡选择的结果, 其基因的遗传变异不是群体进行随机“遗传漂变”的结

果, 而是受到自然环境的负向选择, 而其他脊椎动物均为正向选择。此外, 草鱼 MHC I  $\alpha$  基因全长、 $\alpha 1$  和  $\alpha 2$  区域的  $R$  值均小于 1, 再次证实其受到自然环境的负向选择作用, 而其他脊椎动物的  $R$  值大于 1, 为正向选择<sup>[12]</sup>。Kita 等<sup>[27]</sup> 分析了食蟹猴的 MHC 等位基因, 发现造成群体遗传结构差异的因素主要是不同的环境选择压力。环境中的病原体种类繁多、形态各异, 物种要在复杂的自然环境中生存并延续下来, 就不得不面对各种病原体的侵害。因此, 免疫系统就必须具有特异识别、处理种类繁多的病原体并引起机体特异性免疫应答的能力。环境中的病原压力促使草鱼 MHC I  $\alpha$  基因向多型性基因方向进化, 优势的基因经过长期的自然选择得以在群体中保留并延续下去。这种遗传学特点对其抗病性起着关键作用, 草鱼个体 MHC I  $\alpha$  基因的差异决定了机体抵御病原体感染能力的大小。

综上, 本研究通过 RT-PCR 直接克隆测序的方法获得了 5 个草鱼 MHC I  $\alpha$  基因型序列, 发现了其基因拥有丰富的多态性, 且受到自然环境的负向选择; 证实了草鱼与小鼠、牛和鸡 MHC I  $\alpha$  基因多态性特征相似, 多态性氨基酸主要位于  $\alpha$  螺旋或  $\beta$  折叠上, 处于抗原递呈的关键部位。本研究结果为进一步探究低等脊椎动物 MHC I  $\alpha$  基因的生物特征及从遗传学角度揭示其基因的多态性特点和分子进化规律奠定了理论基础。

## 参考文献:

- [1] DERSH D, HOLLÝ J, YEWEDELL J W. A few good peptides: MHC class I-based cancer immunosurveillance and immunoevasion [J]. *Nat Rev Immunol*, 2021, 21: 116-128.
- [2] ANTONIOU A N, POWIS S J. Pathogen evasion strategies for the major histocompatibility complex class I assembly pathway [J]. *Immunology*, 2008, 124: 1-12.
- [3] CHEN Z, ZHANG N, QI J, et al. The structure of the MHC class I molecule of bony fishes provides insights into the conserved nature of the antigen-presenting system [J]. *J Immunol*, 2017, 199: 3668-3678.
- [4] SAINI S K, OSTERMEIR K, RAMNARAYAN V R, et al. Dipeptides promote folding and peptide binding of MHC class I molecules [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110: 15383-15388.
- [5] BOEHM T, ZUFALL F. MHC peptides and the sensory evaluation of genotype [J]. *Trends Neurosci*, 2006, 29: 100-107.
- [6] BOEHM T, IWANAMI N, HESS I. Evolution of the immune system in the lower vertebrates [J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2012, 13: 127-149.
- [7] WINCHESTER R, FITZGERALD O. MHC class I associations beyond HLA-B27: the peptide binding hypothesis of psoriatic arthritis and its implications for disease pathogenesis [J]. *Curr Opin Rheu-*

- matol, 2020, 32: 330–336.
- [ 8 ] HASHIMOTO K, NAKANISHI T, KUROSAWA Y. Isolation of carp genes encoding major histocompatibility complex antigens [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990, 87: 6863–6867.
- [ 9 ] WANG Y, LU Y, ZHANG Y, et al. The draft genome of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) provides insights into its evolution and vegetarian adaptation [J]. Nat Genet, 2015, 47: 625–631.
- [ 10 ] EVANS J, SHENEMAN L, FOSTER J. Relaxed neighbor joining: a fast distance-based phylogenetic tree construction method [J]. J Mol Evol, 2006, 62: 785–792.
- [ 11 ] ROZAS J. DNA sequence polymorphism analysis using DnaSP [J]. Methods Mol Biol, 2009, 537: 337–350.
- [ 12 ] WOLF J B W, KUNSTNER A, NAM K, et al. Nonlinear dynamics of nonsynonymous (dN) and synonymous (dS) substitution rates affects inference of selection [J]. Genome Biol Evol, 2009, 1: 308–319.
- [ 13 ] GARCIA-BORONAT M, DIEZ-RIVERO C M, REINHERZ E L, et al. PVS: a web server for protein sequence variability analysis tuned to facilitate conserved epitope discovery [J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36: W35–W41.
- [ 14 ] SCHWEDE T, KOPP J, GUEX N, et al. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server [J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31: 3381–3385.
- [ 15 ] MADDEN D R. The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes [J]. Annu Rev Immunol, 1995, 13: 587–622.
- [ 16 ] 胡丹丹, 刘哲, 邵淑娟, 等. 虹鳟 MHC-UBA 基因遗传多样性分析 [J]. 生物技术通报, 2013 (7): 99–106.
- [ 17 ] 季芳, 张艳春, 李学家, 等. 中国恒河猴 MHC I 型部分等位基因的分析 [J]. 实验动物科学, 2011, 28: 6.
- [ 18 ] GRIMHOLT U, HORDVIK I, FOSSE V M, et al. Molecular cloning of major histocompatibility complex class I cDNAs from Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. Immunogenetics, 1993, 37: 469–473.
- [ 19 ] KAUFMAN J. From chickens to humans; the importance of peptide repertoires for MHC class I alleles [J]. Front Immunol, 2020, 11: 601089.
- [ 20 ] WANG D, ZHONG L, WEI Q, et al. Evolution of MHC class I genes in two ancient fish, paddlefish (*Polyodon spathula*) and Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) [J]. FEBS Lett, 2010, 584: 3331–3339.
- [ 21 ] 夏春, 徐广贤, 林常有, 等. 草鱼 MHC class I 等位基因克隆及其多态性分析 [J]. 自然科学进展, 2004, 14 (1): 51–58.
- [ 22 ] PHILLIPS R B, ZIMMERMAN A, NOAKES M A, et al. Physical and genetic mapping of the rainbow trout major histocompatibility regions: evidence for duplication of the class I region [J]. Immunogenetics, 2003, 55: 561–569.
- [ 23 ] SARI G, ROCK K L. Tumor immune evasion through loss of MHC class -I antigen presentation [J]. Curr Opin Immunol, 2023, 83: 102329.
- [ 24 ] MIGALSKA M, SEBASTIAN A, RADWAN J J. Major histocompatibility complex class I diversity limits the repertoire of T cell receptors [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116: 5021–5026.
- [ 25 ] XIA J H, LIU F, ZHU Z Y, et al. A consensus linkage map of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) based on microsatellites and SNPs [J]. BMC Genomics, 2010, 11: 135.
- [ 26 ] XU T J, SUN Y N, CHEN S L. Allelic variation, balancing selection and positive selected sites detected from MHC class I  $\alpha$  gene of olive flounder [J]. Genetica, 2010, 138: 1251–1259.
- [ 27 ] KITA Y F, HOSOMICHI K, KOHARA S, et al. MHC class I A loci polymorphism and diversity in three Southeast Asian populations of cynomolgus macaque [J]. Immunogenetics, 2009, 61: 635–648.