

草鱼 MHC I 区基因的表达特征

吴凡 郭稳杰 詹柒凤 张锋 胡晓坤 梁旭方 刘红

华中农业大学水产学院/农业部淡水生物繁育重点实验室/淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心, 武汉 430070

摘要 为全面了解草鱼 MHC I 区基因及其表达特征, 利用已知斑马鱼 MHC I 区基因序列, 通过本地 Blast 得到草鱼 MHC I 区的部分基因序列。采用 RT-PCR 技术, 检测 MHC I 区 *BRD2*、*KNSL2*、*RXR*B、*TAPBP*、*FABGL*、*MHC Ia*、*PSMB9* 以及 *TAP2* 等 8 个基因在健康草鱼各组织的表达水平。结果表明, 除 *FABGL* 在肾脏表达量最高外, 其他基因都在血液中的表达量最高。通过实时荧光定量 PCR 检测草鱼在嗜水气单胞菌感染后 4、12、24、48 及 96 h, MHC I 区免疫相关基因在脾脏和肾脏中的表达情况。结果发现, *BRD2* 表达量分别在 12 h 和 24 h 在肾脏和脾脏中达到最高; *MHC Ia* 表达量在脾脏和肾脏中都先上升后下降, 并都在 24 h 达最大值; *PSMB9* 表达量在脾脏先上升后下降, 在 12 h 达最大值, 在肾脏中则先下降后上升, 在 24 h 达最大值; *TAP2* 在脾脏和肾脏中整体呈先下降后上升的趋势, 在 24 h 都达最大值, 并最后都回调至正常范围。*BRD2*、*MHC Ia*、*PSMB9*、*TAP2* 的表达量在攻毒后都有显著性变化, 表明这 4 个基因在草鱼免疫方面具有重要的作用。

关键词 MHC I 区基因; 半定量 PCR; 组织表达; 实时荧光定量 PCR; 草鱼

中图分类号 Q 959.46⁺8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)05-0060-07

主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 是一个包含许多免疫反应相关基因并相互连锁的基因组区域。在 MHC 区中除了 MHC 类基因还有许多其他基因, 其中一些直接与 MHC I 类和 MHC II 类基因协调作用, 但另外一些基因在脊椎动物免疫系统中的作用还有待研究^[1]。MHC I 类分子主要是呈递内源性抗原多肽, 与处理后的多肽结合形成复合体, 并激活细胞毒性 T 细胞 (CD8⁺), 使 T 细胞进行细胞免疫^[2]。目前研究表明, MHC I 区部分基因编码的蛋白与 MHC I 类分子有相互作用, 尚未发现另外一些基因编码的蛋白与 MHC I 类分子间是否有作用。其中蛋白酶体亚单位 (proteasome subunit beta type, PSMB)、抗原相关转运体 (transporters associated with antigen processing, TAP) 以及 TAP 相关蛋白 (TAP-associated protein, TAPBP) 在 MHC I 类抗原呈递途径中发挥着对内源性抗原处理、加工和转运的作用^[3-5]。在硬骨鱼类, 如斑马鱼 (*Danio rerio*)^[6]、日本河豚 (*Fugu rubripes*)^[7]、大西洋鲑 (*Salmo salar*)^[8]、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[9]

以及青鳉 (*Oryzias latipes*)^[10] 等中已对 MHC I 区基因进行了研究, 但大多数都集中在 MHC Ia 类基因本身及其与抗病性之间的关系, 而对 MHC I 区其他基因却鲜有报道。

草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*), 属鲤形目、鲤科、雅罗鱼亚科, 是我国淡水养殖的重要经济鱼类, 2013 年我国草鱼年产量达 507 万 t, 占淡水养殖总产量的 18%。但近年来, 鱼类养殖模式逐渐转变为集约化养殖, 养殖水环境日益恶化, 导致草鱼各种细菌性疾病的暴发。其中嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 为弧菌科气单胞菌属, 是引发草鱼细菌性败血症的主要病原, 对我国草鱼养殖造成了严重的危害。笔者利用已知斑马鱼 MHC I 区基因序列, 通过本地 Blast 得到草鱼 MHC I 区的 8 个基因序列; 利用 RT-PCR 技术检测这 8 个基因在健康草鱼不同组织中的表达水平; 并通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术检测了 *BRD2*、*PSMB9*、*TAP2* 以及 *MHC Ia* 等免疫相关基因在草鱼感染嗜水气单胞菌后不同时间点表达的变化情况, 旨在为草鱼细菌性败血症的预防和治疗提供参考

收稿日期: 2016-10-30

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项 (2662015PY041; 2015PY134)

吴凡, 硕士研究生, 研究方向: 鱼类遗传育种. E-mail: 494332599@qq.com

通信作者: 刘红, 博士, 教授, 研究方向: 鱼类遗传育种. E-mail: liuhong59@mail.hzau.edu.cn

资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用草鱼均采自湖北省武汉市江夏区金水闸水产养殖基地,平均体质量 100~150 g,带回实验室暂养 1 个月,水温维持在 28 ℃。采集 3 尾健康草鱼的肝脏、脾脏、肾脏、肠、鳃、心脏、肌肉、血液等 8 个组织用于基因组织分布半定量 RT-PCR 试验。对试验鱼进行腹腔注射感染嗜水气单胞菌,浓度 1.0×10^7 cfu/mL,每尾鱼注射 0.1 mL,对照组注射等量的 0.8% 无菌生理盐水。注射后 0、4、12、24、48、96 h,采集脾脏和肾脏,每个时间点每组分别采 9 尾鱼,每 3 尾鱼混合作为一个生物学重复。采集的样品立刻放于液氮中闪冻,之后放置在 -80 ℃ 冰箱保存备用。

1.2 总 mRNA 的提取和 cDNA 的合成

采集的组织样品用研钵在液氮中充分研磨,取 100 mg 左右的研磨干粉,按照试剂盒 Trizol (Invitrogen) 的方法提取总 RNA,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,用紫外分光光度法检测纯度和浓度。取 1 μ g 总 RNA 严格按照 TaKaRa 公司反转录试剂盒的说明进行反转录,得到的 cDNA 用于后续 RT-PCR 及 qRT-PCR。

1.3 MHC I 区基因序列的获得及引物设计

利用已知斑马鱼 MHC I 区基因序列和草鱼基因组序列,通过本地 Blast 得到草鱼 MHC I 区的 *BRD2*、*KNSL2*、*RXR B*、*TAPBP*、*FABGL*、*MHC Ia*、*PSMB9* 以及 *TAP2* 等 8 个基因 cDNA 序列。用 Primer premier 5.0 设计草鱼各基因的 RT-PCR 和 qRT-PCR 引物(表 1),由武汉擎科创新生物科技有限公司合成。

表 1 本研究 RT-PCR 和 qRT-PCR 所用引物

Table 1 Primers used for RT-PCR and qRT-PCR in this study

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	扩增目的 Purpose of amplification
BRD2-F	TGTAGGTAGCATGGGTCTCGG	RT-PCR/
BRD2-R	GCACTGGCTGATGTTGGTTCT	qRT-PCR
FABGL-F	TCGCTTTATCCCATTCA	RT-PCR
FABGL -R	GGTCAGCCACTACAACAG	
KNSL2-F	GCGGAAGGTGGAATAGA	RT-PCR
KNSL2-R	TGGGCTTTGGTTATGGAC	
RXR B-F	TCTGACGCTCCTCCTGAAC	RT-PCR
RXR B-R	TGGGTTCCTTGCCCTC	
TAPBP-F	AAGCGAAGACTGAAACAAC	RT-PCR
TAPBP-R	GCTGGACTCGGGTAAACT	
MHC Ia-F	TTCCAGACGACGAGCACCAT	RT-PCR/
MHC Ia-R	ACACCACATACCCAGCGACA	qRT-PCR
PSMB9-F	CAATAGTGACGAGGTAAGCC	RT-PCR/
PSMB9-R	TGGCTCTGGAAGTTTCTACAT	qRT-PCR
TAP2-1F	CTGCTGGTAAGGTGTTTGAGT	
TAP2-1R	CTGGGATACGAGAAGGTGAGAT	qRT-PCR
TAP2-2F	GACATGCTAAACTCTGTGGGTG	RT-PCR
TAP2-2R	CCTTGAGGGCTGGCTGAT	
β -actin-F	CCTTCTTGGGTATGGAATCTTG	
β -actin-R	AGAGTATTTACGCTCAGGTGGG	RT-PCR
18S-rRNA-F	GGAATGAGCGTATCCTAAACCC	qRT-PCR
18S-rRNA-R	CTCCCAGATCCAACACTACAAGC	

1.4 MHC I 区基因在健康草鱼各组织中的半定量 RT-PCR 分析

采用 RT-PCR 方法检测各基因在健康草鱼肝脏、脾脏、肾脏、肠、鳃、心脏、肌肉、血液等 8 个组织中的表达情况,以 β -actin 作为内参基因,反应体系: 7 μ L ddH₂O, 1 μ L 10 \times Buffer, 0.4 μ L dNTP, 0.4 μ L 引物(F/R), 0.2 μ L Taq 聚合酶, 0.6 μ L 模板。反应程序: 94 ℃ 预变性 3 min, 94 ℃ 变性 30 s,

58 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 20 s, 经 30 个循环后, 72 ℃ 延伸 5 min。

1.5 BRD2、MHC Ia、PSMB9 以及 TAP2 基因的 qRT-PCR 分析

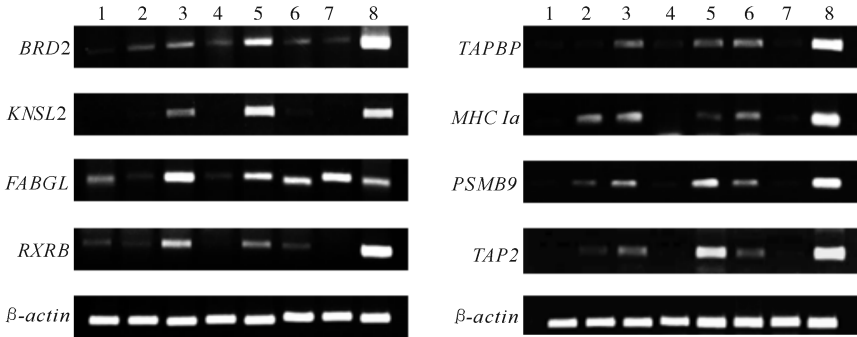
采用 qRT-PCR 技术检测草鱼在感染嗜水气单胞菌 4、12、24、48 和 96 h 后 MHC I 区 *BRD2*、*MHC Ia*、*PSMB9* 以及 *TAP2* 等基因表达情况,以 18S-rRNA 作为内参基因。使用的荧光定量 PCR

仪为罗氏 (Roche) LightCycler[®] 480, 反应体系为 10 μL SYBGreen, 7.4 μL ddH₂O, 0.8 μL 引物 (F/R), 1 μL 模板, 共 20 μL 。qRT-PCR 程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s, 共 40 个循环。数据导入 GraphPad Prism 5 软件, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值比较法分析, $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值越大, 表示目的基因相对表达量越高, 结果用平均数 \pm 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 MHC I 区基因在健康草鱼各组织中的表达

以健康草鱼 8 个组织的 cDNA 为模板, $\beta\text{-actin}$ 基因作为参照, 用 RT-PCR 方法检测 MHC I 区 *BRD2*、*KNL2*、*RXR*B、*TAPBP*、*FABGL*、*MHC Ia*、*PSMB9* 以及 *TAP2* 基因的表达情况。结果如



1. 肝脏 Liver; 2. 脾脏 Spleen; 3. 肾脏 Kidney; 4. 肠 Intestines; 5. 鳃 Gill; 6. 心脏 Heart; 7. 肌肉 Muscle; 8. 血液 Blood.

图 1 草鱼 MHC I 区各基因组织表达的 RT-PCR 检测结果

Fig.1 The RT-PCR results of MHC class I genes in different tissues of grass carp

2.2 草鱼 *BRD2* 基因在感染嗜水气单胞菌后的表达

BRD2 基因在草鱼感染嗜水气单胞菌后 4、12、24、48 以及 96 h 时在脾脏和肾脏中表达量的变化见图 2, 在脾脏中, *BRD2* 基因的表达量在感染后先下降后上升, 24 h 时达最大值, 为对照组的 2.8 倍, 随后下降。在肾脏中, 表达量在感染后 4 h 时先下降后显著上升, 在 12 h 增至最大值, 为对照组 3.4 倍, 随后又显著下降, 96 h 时回调至正常的范围。

由此看出, 草鱼 *BRD2* 基因表达量在感染细菌后, 在肾脏和脾脏中都先下降后上升, 但在肾脏中的变化比在脾脏中稍快一些。

2.3 草鱼 *MHC Ia* 基因在感染嗜水气单胞菌后的表达

由图 3 中可以看出, *MHC Ia* 基因在脾脏和肾脏中的表达变化趋势一致, 均在感染后 24 h 达到最

大值, 分别为对照组的 2.3 倍和 2.5 倍, 在其他时间点和对照无显著差异。

图 1 所示, 除了 *FABGL* 基因在肾脏表达量最高外, 其他基因都在血液中的表达量最高。此外, *BRD2* 基因在鳃中表达较强, 在其他组织相对表达较弱; *KNL2* 基因在鳃中表达较强, 肾脏相对表达较弱, 在其他组织中几乎无表达; *FABGL* 基因在鳃、心脏、肌肉中有较强表达, 在血液中等表达, 肝脏、脾脏、肠中表达较弱; *RXR*B 基因在肾脏中表达较强, 肝脏、脾脏、鳃以及心脏中表达较弱, 肠和肌肉中几乎无表达; *TAPBP* 基因在肾脏、鳃以及心脏中表达较强, 在肝脏、脾脏、肠以及肌肉中相对表达较弱或几乎无表达; *MHC Ia* 和 *PSMB9* 基因都在脾脏、肾脏、鳃以及心脏中有较强表达, 在肝脏、肠和肌肉中有较弱表达或几乎无表达。 *TAP2* 基因在鳃中有较强表达, 在脾脏、肾脏及心脏中等表达, 在肝脏、肠和肌肉中则相对表达较弱。

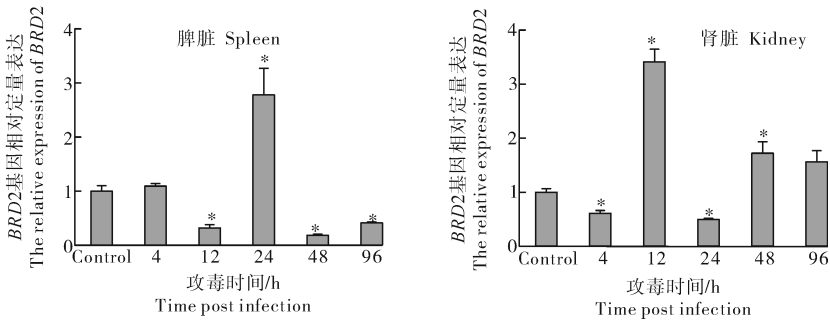
大值, 分别为对照组的 2.3 倍和 2.5 倍, 在其他时间点和对照无显著差异。

2.4 草鱼 *PSMB9* 基因在感染嗜水气单胞菌后的表达

由图 4 可以看出, 在脾脏中, *PSMB9* 基因的表达量在感染后 12 h 和 24 h 时显著高于对照, 12 h 时上升至最大值, 为对照组的 2.3 倍, 24 h 后呈持续的下降趋势, 在 96 h 时开始回落至正常值。在肾脏中, 其表达量在感染后 12 h 时下降之后显著上升, 在 24 h 达最大值, 为对照组的 2.0 倍, 随后呈缓慢下降趋势。

2.5 草鱼 *TAP2* 基因在感染嗜水气单胞菌后的表达

由图 5 可以看出, 在脾脏中, *TAP2* 基因的表达量在感染后显著下降, 随后开始上升并在 24 h 达到最大值, 为对照组的 2.2 倍, 随后又下降, 在 96 h 时



差异显著 ($P < 0.05$) 和差异极显著 ($P < 0.01$) 分别用 “*” 和 “**” 表示。下同。Statistically significant up-regulation or down-regulation in expression of genes are denoted with “*” and “**” ($P < 0.05$ and $P < 0.01$), respectively. The same as following.

图 2 草鱼 BRD2 基因在感染嗜水气单胞菌后在脾脏和肾脏中相对表达量变化

Fig.2 The relative expression of BRD2 transcript in the spleen and kidney after infection with *A. hydrophila* in grass carp

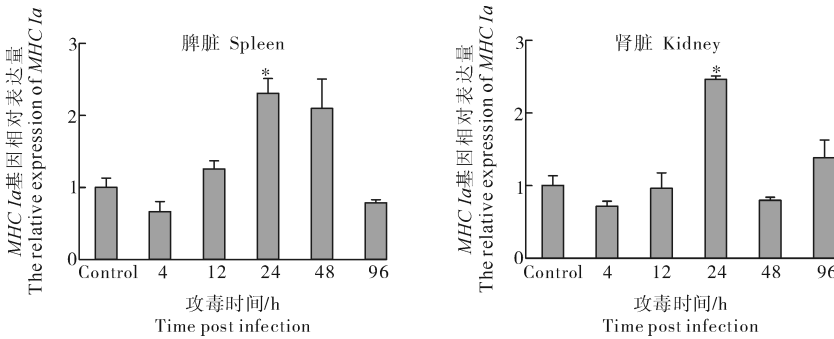


图 3 草鱼 MHC Ia 基因在感染嗜水气单胞菌后在脾脏和肾脏中相对表达量变化

Fig.3 The relative expression of MHC Ia transcript in the spleen and kidney after infection with *A. hydrophila* in grass carp

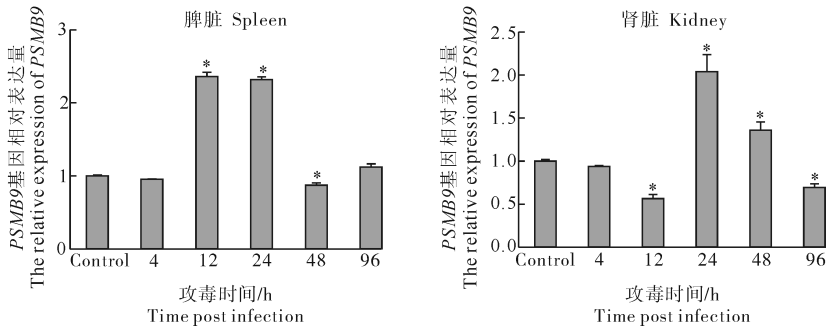


图 4 草鱼 PSMB9 基因在感染嗜水气单胞菌后在脾脏和肾脏中相对表达量变化

Fig.4 The relative expression of PSMB9 transcript in the spleen and kidney after infection with *A. hydrophila* in grass carp

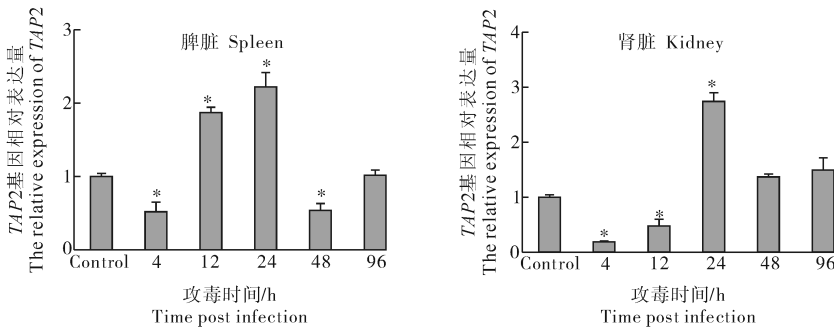


图 5 草鱼 TAP2 基因在感染嗜水气单胞菌后在脾脏和肾脏中相对表达量变化

Fig.5 The relative expression of TAP2 transcript in the spleen and kidney after infection with *A. hydrophila* in grass carp

与对照差异不显著。其在肾脏中的表达量先骤降至最低值后显著上升,并在 24 h 时达到最大值,为对照组的 2.7 倍,随后开始下降至正常值。

3 讨论

主要组织相容性复合体 MHC 是一个包含许多 MHC 基因和非 MHC 基因的基因群。在人类基因组中,MHC 区域超过几百万个碱基,包含 100 多个基因^[11]。目前对各个物种的 MHC I 类基因的研究较多,而对这个区域的非 MHC 类基因的功能知之甚少。在本研究中,所检测的草鱼 MHC I 区 8 个基因,除 *FABGL* 基因外,其他基因都在血液中表达量最高,而且在肾脏和鳃中都有较高的表达。参与 MHC I 类途径的 *TAPBP*、*MHC Ia*、*PSMB9* 以及 *TAP2* 基因的表达情况基本一致,且在感染细菌后,*MHC Ia*、*PSMB9* 以及 *TAP2* 基因的表达量都有显著上调。

驱动蛋白样 DNA 结合蛋白 2 (kinesin-like DNA binding protein, *KNSL2*) 是 KID 中的一员。Tekki-kessarar 等^[12] 通过 Northern blot 技术检测 *KNSL2* 基因在小鼠各组织中的表达水平,其中在头肾、肌肉和心脏有较强表达,在其他组织表达相对较弱。而本试验中,*KNSL2* 基因在草鱼血液和鳃中表达较强,肾脏、心脏、肝脏和脾脏表达较弱,肠和肌肉中几乎无表达。可以看出,*KNSL2* 在小鼠和草鱼之间的主要表达组织不同,说明其在不同物种中所发挥的主要功能可能不同,还需对其进行更多深入研究。

视黄素 X 受体 β (retinoid X receptor beta, *RXR β*) 是组成视黄素受体的一种亚型。黄锐等^[13] 对 *RXR β* 基因在两种猪的表达分析中发现,在雌性东北民猪心脏、肝脏及子宫等组织中不表达而在肾脏中相对表达量较高,雄性心脏、肾脏中不表达;在雌性长白山野猪脾脏中不表达,雄性心脏中不表达而在肝脏中表达量最高。Tallafuss 等^[14] 研究斑马鱼 *RXR β* 基因在胚胎时期的表达水平时发现,*RXR β* 基因主要表达于间脑。在本试验中通过 RT-PCR 技术研究发现,*RXR β* 基因在草鱼肾脏有较强表达,心脏、脾脏及肝脏中表达较少。上述研究结果表明在不同物种、不同品种、不同时期以及雌雄之间 *RXR β* 基因的表达情况都不尽相同,由于对 *RXR β* 基因的研究还太少,猜测 *RXR β* 在不同情况下发挥的作用不同。需要对更多不同鱼类 *RXR β*

基因的研究来验证其在鱼类中发挥的功能。

Landis 等^[15] 利用 Northern blot 技术检测 *TAPBP* 基因在虹鳟各组织中的表达水平,其在肾脏和脾脏中表达较强,肠和心脏中中等表达,肝脏和肌肉中表达较弱。Jørgensen 等^[16] 利用 qRT-PCR 技术研究大西洋鲑组织表达,发现 *TAPBP* 基因在心脏、脾脏、肾脏及肠中有较强表达,在肝脏中表达较弱。而在本试验草鱼各个组织中,*TAPBP* 基因在心脏、肾脏和鳃中都有一定程度的表达,而在肌肉、肝脏、脾脏及肠中的表达量则较弱。可以看出,虽然在鱼类不同物种中 *TAPBP* 基因表达情况不同,但都在免疫组织肾脏中有较强的表达,这说明 *TAPBP* 基因编码的蛋白参与鱼体免疫防御。

溴结构域包含蛋白 (bromodomain-containing proteins, BRD) 不仅涉入各种疾病反应中,而且在生物的生长发育和代谢调控中也发挥着重要作用。BRD 包含 BRD2、BRD3、BRD4 以及 BRDT。在本研究中 *BRD2* 基因在草鱼各个组织中都有一定表达,其中血液中表达最强,在脾脏和肾脏中也有较强表达,这与小鼠中 *BRD2* 基因在各组织的表达情况基本相同^[17]。Belkina 等^[18] 在研究中发现用脂多糖 (LPS) 处理小鼠的 B 细胞 24 h 后,*BRD2* 基因表达量显著增加。Choi 等^[19] 在小鼠星形胶质细胞研究中也得到相同的结果。在本研究中,*BRD2* 基因的表达量在受细菌感染后也有较大变化趋势。这些结果显示,*BRD2* 基因在重要免疫器官中有较强表达,并在病原刺激后表达量都有较大变化,说明 *BRD2* 基因与鱼类免疫也有一定的联系。

在鱼类中,Hansen 等^[20] 利用 Northern blot 技术检测虹鳟 MHC I 类相关基因在各组织的表达水平,发现 *PSMB9* 基因在肠、脾脏、肾脏有较强表达,在心脏中等表达,而在肌肉及肝脏等组织中表达量极少;*TAP* 基因在心脏、肠、脾脏、肾脏中表达较强,而在其他组织表达相对较弱。Jørgensen 等^[21] 通过病原感染大西洋鲑后,其肾脏中 *TAP2* 和 *PSMB9* 基因表达量先持续下降后在 24 h 开始上调,3 d 时达最大值,随后又持续下降。上述鱼类的研究结果与本试验中草鱼 *PSMB9* 基因在各个组织的表达情况,及其在感染后 *TAP2* 和 *PSMB9* 基因表达量变化的趋势基本相同。这一结果进一步表明,*PSMB9* 和 *TAP2* 基因在鱼类免疫防御中起着重要作用。

本研究中,草鱼 *MHC Ia* 基因在血液中表达量最高,脾脏、肾脏、鳃和心中表达较强,在肝脏、肠和

肌肉中表达较弱,这一结果与杨天耀^[22]的研究结果一致。在虹鳟^[23]、团头鲂^[24]、大西洋鲑^[25]、军曹鱼^[26]以及赤点石斑鱼^[27]中,*MHC Ia*基因分别在脾脏、肾脏以及鳃等重要免疫相关组织中有较高表达,说明*MHC Ia*基因在鱼类中具有重要的免疫功能。黎建平等^[28]研究尼罗罗非鱼人工感染无乳链球菌后,发现*MHC Ia*基因在脾脏中0 h~3 d表达量的变化趋势为先下降后上升,并在3 d时达到最大值,这与本试验中草鱼感染嗜水气单胞菌后*MHC Ia*基因在脾脏中的表达量变化趋势一致。另外,红笛鲷和虹鳟在感染后,*MHC Ia*基因的表达量都有显著上调^[29-30]。上述研究表明,鱼类在受到病原入侵后,*MHC Ia*基因在鱼体脾脏、肾脏以及头肾等主要免疫器官中的表达量都有显著上调的情况,说明*MHC Ia*基因在鱼类免疫应答的过程中起着重要作用。

综上,本研究通过RT-PCR技术检测了MHC I区8个基因在健康草鱼各个组织中的基本表达特征,可为更全面研究草鱼MHC I区基因的功能及预测其作用机制提供理论依据。检测免疫相关基因*BRD2*、*MHC Ia*、*PSMB9*以及*TAP2*基因在细菌感染后表达变化,有利于研究这些基因与鱼类疾病之间的关系,也可为草鱼细菌性败血症防治奠定理论基础。

参 考 文 献

- [1] KULSKI J K, SHIINA T, ANZAI T, et al. Comparative genomic analysis of the MHC: the evolution of class I duplication blocks, diversity and complexity from shark to man[J]. Immunol Rev, 2002, 190: 95-122.
- [2] JARATLERDSIRI W, DEAKIN J, GODINEZ R M, et al. Comparative genome analyses reveal distinct structure in the saltwater crocodile MHC[J]. PLoS ONE, 2014, 9(2): e114631.
- [3] NEEFJES J, JONGSMA M L, PAUL P, et al. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation[J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11(12): 823-836.
- [4] TROWSDALE J, HANSON I, MOCKRIDG I, et al. Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters, 1990[J]. J Immunol, 2008, 180(5): 2733-2736.
- [5] GRANDEA G, GOLOVINA T, HAMILTON S E, et al. Impaired assembly yet normal trafficking of MHC class I molecules in tapasin mutant mice[J]. Immunity, 2000, 13(2): 213-222.
- [6] MICHALOVA V, MURRAY B W, SULTMANN H, et al. A contig map of the MHC class I genomic region in the zebrafish reveals ancient synteny[J]. Journal of immunology, 2000, 164(10): 5296-5305.
- [7] CLARK M S, SHAW L, KELLY A, et al. Characterization of the MHC class I region of the Japanese pufferfish (*Fugu rubripes*) [J]. Immunogenetics, 2001, 52(3/4): 174-185.
- [8] LUKACS M F, HARSTAD H, BAKKE H G, et al. Comprehensive analysis of MHC class I genes from the U-, S-, and Z-lineages in Atlantic salmon[J]. BMC Genomics, 2010, 11: 154.
- [9] SHIINA T, DIJKSTRA J M, SHIMIZU S, et al. Interchromosomal duplication of major histocompatibility complex class I regions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), a species with a presumably recent tetraploid ancestry[J]. Immunogenetics, 2005, 56(12): 878-893.
- [10] TSUKAMOTO K, HAYASHI S, MATSUO M Y, et al. Unprecedented intraspecific diversity of the MHC class I region of a teleost medaka, *Oryzias latipes*[J]. Immunogenetics, 2005, 57(6): 420-431.
- [11] The MHC Sequencing Consortium. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex[J]. Nature, 1999, 401(6756): 921-923.
- [12] TEKKESSARIS N, BONVENTRE J V, BOULTER C A. Characterization of the mouse *Kid1* gene and identification of a highly related gene, *Kid2*[J]. Gene, 1999, 240(1): 13-22.
- [13] 黄锐, 秦宁, 张英英, 等. 长白山野猪和东北民猪 *RXRβ* 基因 mRNA 组织表达特性分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2014, 21(11): 5-8.
- [14] TALLAFUSS A, HALE L A, YAN Y L, et al. Characterization of retinoid-X receptor genes *rxra*, *rxrb*, *rxrbb* and *rxrg* during zebrafish development[J]. Gene expression patterns, 2006, 6(5): 556-565.
- [15] LANDIS E D, PALTU Y, DEKONING J, et al. Identification and regulatory analysis of rainbow trout tapasin and tapasin-related genes[J]. Immunogenetics, 2006, 58(1): 56-59.
- [16] JØGRENSEN S M, GRIMHOLT U, GJØEN T. Cloning and expression analysis of an Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) tapasin gene[J]. Dev Comp Immunol, 2007, 31(7): 708-719.
- [17] SUN R, WU Y, WANG Y, et al. DNA methylation regulates bromodomain-containing protein 2 expression during adipocyte differentiation[J]. Mol Cell Biochem, 2015, 402(1/2): 23-31.
- [18] BELKINA A C, BLANTON W P, NIKOLAJCZYK B S, et al. The double bromodomain protein Brd2 promotes B cell expansion and mitogenesis[J]. J Leukoc Biol, 2014, 95(3): 451-460.
- [19] CHOI C S, HONG S H, SIM S, et al. The epigenetic reader BRD2 as a specific modulator of PAI-1 expression in lipopolysaccharide-stimulated mouse primary astrocytes[J]. Neurochem Res, 2015, 40(11): 2211-2219.
- [20] HANSEN J D, STRASSBURGER P, THORGAARD G H, et al.

- al. Expression, linkage, and polymorphism of MHC-related genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. J Immunol, 1999, 163(2): 774-786.
- [21] JØGRENSEN S M, SYVERTSEN B L, LUKACS M, et al. Expression of MHC class I pathway genes in response to infectious salmon anaemia virus in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) cells[J]. Fish Shellfish Immunol, 2006, 21(5): 548-560.
- [22] 杨天耀. 草鱼 β_2m 基因的分子克隆与 MHC class I 多态性分析及其重组蛋白的鉴定[D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- [23] HANSEN J D, STASSBURGER P, DUPASQUIER L. Conservation of an alpha 2 domain within the teleostean world, MHC class I from the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. Dev Comp Immunol, 1996, 20(6): 417-425.
- [24] 马晓茜, 刘至治, 李思发, 等. 团头鲂主要组织相容性复合体 I 类基因全长 cDNA 的克隆及组织表达分析[J]. 上海海洋大学学报, 2011, 20(1): 34-43.
- [25] KOPPANG E O, PRESS C M, RONNINGEN K, et al. MHC class II alpha suggests a role for granulocytes as antigen-presenting cells[J]. Molecular immunology, 2006, 43(8): 1275-1285.
- [26] 张鹤, 茅莉娜, 冯娟, 等. 军曹鱼 MHC Ia 基因全长 cDNA 的克隆及其组织表达分析[J]. 南方水产科学, 2011, 7(1): 8-17.
- [27] 沈铭辉, 郑乐云, 杜佳莹, 等. 赤点石斑鱼 MHC Ia 基因的克隆与表达多态性分析[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2013, 52(1): 103-108.
- [28] 黎建平, 高风英, 卢迈新, 等. 尼罗罗非鱼 MHC Ia 全长 cDNA 克隆、多态性及组织表达特征[J]. 中国水产科学, 2014, 21(6): 1134-1145.
- [29] 张新中, 鲁义善, 吴灶和, 等. 红笛鲷主要组织相容性复合体 Ia 抗原基因的克隆与表达分析[J]. 水产学报, 2012, 36(10): 1482-1492.
- [30] HANSEN J D, PATRA S L. Induction of the rainbow trout MHC class I pathway during acute IHNV infection[J]. Immunogenetics, 2002, 54(9): 654-661.

Expression patterns of MHC I region in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*

WU Fan GUO Wenjie ZHAN Qifeng ZHANG Feng HU Xiaokun LIANG Xufang LIU Hong
College of Fisheries/Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture,
Huazhong Agricultural University/Freshwater Aquaculture Collaboration
Innovation Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China

Abstract The partial cDNA sequences of MHC I genes were obtained from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) genome sequence based on local Blast against zebrafish's MHC I region. Gene expression levels of *BRD2*, *KNSL2*, *RXRB*, *TAPBP*, *FABGL*, *MHC Ia*, *PSMB9* and *TAP2* in various tissues were detected by semi-quantitative RT-PCR. The results showed that expression of 7 genes above were highest in the blood but that of *FABGL* was highest in the kidney. After *Aeromonas hydrophila* infection at 4, 12, 24, 48 and 96 h, expression level of immune-related MHC I genes was detected in the spleen and kidney with quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The expression level of *BRD2* gene reached the peak at 12 h in the kidney but at 24 h in the spleen. The expression level of *MHC Ia* gene increased first and then decreased both in the spleen and kidney, reaching the maximum at 24 h. In the spleen, the expression of *PSMB9* increased significantly and reached the peak at 12 h, and then decreased significantly at 48 h, following by a recovery to normal level at 96 h; in the kidney, the expression peaked at 24 h, and then continued to decline. The expression levels of *TAP2* gene were first down regulated and then up regulated in the spleen and kidney, and backed to normal level at last. It is indicated that MHC I genes are related to the immune of grass carp, laying a foundation for further studying fish diseases and breeding resistance cultivars.

Keywords MHC I region gene; RT-PCR; tissue expression; quantitative real-time PCR; grass carp