

草鱼 MHC class I 等位基因克隆及其多态性分析*

夏 春^{1,2**} 徐广贤^{1**} 林常有¹ 胡团军¹ 阎若潜¹ 高 福³

1. 中国农业大学动物医学院, 北京 100094; 2. 农业部预防兽医学重点实验室, 北京 100094;

3. Department of Clinical Medicines, Oxford University, UK

摘要 为了阐明草鱼 MHC class I 等位基因的结构与多态性, 进一步研究其与疾病的关系, 从草鱼 cDNA 文库中克隆了 MHC class I 基因 (Ctid-MHC I); 并通过对 12 个个体 Ctid-MHC I 的克隆, 分析了其等位基因的多态性与三级结构. 结果显示 Ctid-MHC I 等位基因在 $\alpha 1$ 与 $\alpha 2$ 区域变异幅度大, 可分为 6 类 (Ctid-MHC I-UA ~ -UF), 9 型 (A~I); 但是其三级结构和抗原多肽结合的关键性氨基酸十分保守. 结果阐明了草鱼 MHC class I 分子在 8 个区域 (A-H) 置换率高, 存在插入或缺失以及长度变异, 使等位基因呈现高度多态性. 动物 MHC class I 分子系统树也提示了我国大陆架上鱼类、两栖类、鸟类、哺乳动物和人的遗传距离与分歧年代.

关键词 草鱼 MHC class I 等位基因 多态性 三级结构 分子系统树

主要组织相容性抗原复合体 (MHC) 指集中于哺乳动物某一染色体、编码与免疫应答直接相关的一类细胞膜糖蛋白基因群^[1]. MHC 分为 MHC class I 和 MHC class II; MHC class I 由 $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ 链, 跨膜区 (TM) 和胞质区 (CY) 组成, 分子质量约 44 ku^[1,2]. 其中, $\alpha 1$ 链与 $\alpha 2$ 链形成多肽结合区 (PBD), 与抗原多肽、T 细胞受体 (TCR) 形成三分子复合物 (TCR-pMHC), 由此诱导机体产生特异性细胞免疫应答^[3]. 目前, 人类 MHC class I 等位基因的结构与数目及其与疾病的关系已研究得十分清楚; 而畜禽及鱼类 MHC class I 结构与功能的研究尚处于发展阶段. 1990 年, Hashimoto 等率先克隆了低等脊椎动物——鲤鱼 MHC class I 基因^[4]. 随后, 鸡^[5]、蛙^[6]以及多种鱼类 MHC class I 基因被分别克隆报道^[7~12]. 1996 以来, 我们也报道过人、中华鳖、虹鳟 MHC 序列^[3,13~16]. 近年来, 随着 MHC 与疾病的关系 (结构不同的 MHC 递呈不一样的抗原多肽导致动物抗病性差异) 被逐步阐明, 我们认为有必要在我国开展经济动物 MHC 的研究.

草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 是我国内陆水域主养的优质鱼类, 具草食性、生长快的特点. 然而, 草鱼存在多种疾病, 年存活率仅为 15% ~ 30%, 是养殖鱼类中因病死亡率最高的鱼种. 为了阐明草鱼 MHC class I 等位基因的结构与多态性, 进一步研究 MHC 与疾病的关系, 本研究从草鱼 cDNA 文库中克隆了 MHC class I 基因 (Ctid-MHC I), 并对其多态性与三级结构进行了分析. 结果显示 Ctid-MHC I 等位基因呈现高度多态性; 其 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 区域变异幅度大, 可分为 6 类 (Ctid-MHC I-UA ~ -UF), 9 型 (A~I); 而其三级结构相对保守. MHC class I 分子系统树也提示了软骨鱼和硬骨鱼, 鱼类与两栖类、鸟类、哺乳动物的遗传距离.

1 材料与方法

1.1 RNA 提取与 cDNA 合成

本研究共使用了 15 尾草鱼. 首先用 Trizol 试剂 (GibcoRBL) 从草鱼肾脏提取总 RNA. 以总 RNA

2003-06-24 收稿, 2003-08-22 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目 (批准号: 30070596)

** 同等贡献者, E-mail: xiachun@cau.edu.cn

为模板, 用 pd(N)6 随机引物、First-Strand cDNA Synthesis 试剂盒 (Pharmacia Biotech) 反转录合成第一链 cDNA (fcDNA)。另外, 再以肾总 RNA 为模板, 用 pd(N)6 随机引物、Time Saver 试剂盒 (Pharmacia) 反转录合成双链 cDNA。

1.2 种间交叉 PCR

如图 1(a) 所示, 从 DDBJ/EMBL/GenBank 基因库中读取人^[17]、鼠^[18]、鸡^[5]、蛙^[6]和斑马鱼^[9]的 MHC class I 基因序列, 在形成二硫键两半胱氨酸的保守区分别设计引物。正引物 (S96) 序列为 5'-CAR HNG ATG TAY GGN TGT-3', 反引物 (AS164) 序列为 5'-YTT NAR CCA YTC NAT RCA-3'。其中 N 代表 A, T, G 或 C; Y 代表 T 或 C; R 代表 G 或 A。以 fcDNA 为模板, 用 S96 / AS164 引物, 参照 TaKaRa ExTaq PCR 试剂盒 (TaKaRa) 进行 PCR 扩增。PCR 反应总体积为 50 μ L, 模板添加量为 0.5 μ g。PCR 程序是首先 98 $^{\circ}$ C 热变性 8 min, 加入 ExTaq 酶; 再 94 $^{\circ}$ C 热变性 1 min, 然后 55 $^{\circ}$ C 退火 1 min、72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min。PCR 反应在 HYBAID 公司的 PCRExpress 仪上进行 30 个循环。反应产物经 2% 琼脂糖电泳, 用 GENECLAN 试剂盒 (BIO101) 回收 230 bp DNA 片段后, 与 T-Easy 载体 (Promaga) 连接, 转化 JM109 感受态细胞; 再用 QIAEX II 试剂盒 (QIAGEN) 纯化重组质粒, 用 ABI PRISM Big Dye Primer Cycle Sequencing Ready Reaction 试剂盒和 ABI 377 型 DNA 自动测序仪 (Perkin Elmer 公司) 从 T7 引物端测定 12 个阳性克隆序列。

1.3 构建 cDNA 文库

取 5 μ g RNA 为模板, 以 5'-ATCTAGAGGTAC-CGGATCC-(T)15 为反转录引物并采用 Time Saver 试剂盒 (Pharmacia) 按其操作手册合成 cDNA。再用 TaKaRa cDNA PCR Library 试剂盒 (TaKaRa) 按其标准操作构建草鱼 cDNA 文库。

1.4 CtId-MHC I 基因克隆

CtId-MHC I 基因克隆分 3 步进行。第一步, 采用 3'-Rapid Amplification of cDNA Ends (3' RACE) PCR 试剂盒扩增 MHC class I α 2 区至 Poly A 尾段; 第二步采用 5'-Rapid Amplification of cDNA Ends

(5' RACE) PCR 试剂盒扩增 MHC class I α 2 区域至 5'-非编码部分 (5'-UT); 第三步采用 RT-PCR 扩增 5'-UT 至 3'-非编码部分 (3'-UT) 的 CtId-MHC I 全基因。即首先根据种间交叉 PCR 结果 (图 1(b)), 在 MHC class I α 2 区域中设计一正引物 (GF1: 5'-GATGGAGAGGACTTCCTCGCCCTGG-3'), 参照 TaKaRa 3'-Full RACE Core Set 试剂盒 (TaKaRa) 进行 3' RACE PCR 扩增。回收 1.45 kb 的 PCR 产物, 进行全序列测定。随后, 再根据 3' RACE PCR 克隆的测序结果 (图 2) 在 MHC I α 3 区域设计一反引物 (CSA2: 5'-TGGTGCCATCATCCAGCTCAC-3'), 进行 5' RACE PCR 扩增 (PCR 条件同前)。回收 900 bp 的 PCR 产物与 T 载体连接, 测定全序列。最后, 根据 5' RACE PCR 和 3' RACE PCR 结果 (图 2) 设计一对引物, 上游引物 (P1) 序列为 5'-CATCAGTC-TATCACCAGACATCTG-3', 下游引物 (P2) 序列为 5'-CATCTTGTCTCATCTTTGTGCTTTAGGATC-3'。PCR 反应总体积为 50 μ L, 模板 cDNA 文库添加量为 0.1 μ g。再经 PCR 后将获得产物测序。

1.5 CtId-MHC I 等位基因多态性

在 CtId-MHC I 信号肽区域设计一正引物 (FGP1), 序列为 5'-AAGGATGCGATCTGTAGT-GCTTTTGCTC-3', 采用 CSA2 为反引物。用 High-Plus RT-PCR 试剂盒 (TOYOBO, Co., Ltd.) 进行 RT-PCR 扩增。回收扩增产物测定全序列。

1.6 CtId-MHC I 序列分析

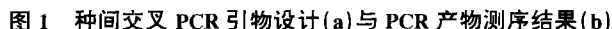
采用 SAKURA 系统, 将 12 个 CtId-MHC I 核酸序列连续登录入 DDBJ/EMBL/GenBank, 序列号为 AB109779~AB109790。CtId-MHC I 类型划分, 同源性比较, 以及分子系统树 (Unweighted pair grouping, UPG) 构建等均采用 GENETYX 9.0 软件进行 (Software Development Co., Ltd)。将 CtId-MHC I 输入 NCBI 蛋白结构库进行三级结构分析, 并根据人 MHC class I (HLA-A2) 结构绘制 CtId-MHC I 三级结构。

2 结果与讨论

2.1 种间交叉 PCR

种间交叉 PCR 共获得 12 个阳性克隆, 测序结果仅 2 个序列一致并具备 MHC class I α 2 基因序列

1 (b)所示, 克隆片段长 220 bp, 暂命名为 CtId-MHC I α 2CC.



2.2 CtId-MHC I 等位基因

2.3 CtId-MHC I 多态性

对 10 尾草鱼进行 RT-PCR 扩增后测序的结果. 从中可以发现: (1) Ctid-MHC I 变异大, 在 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 区域均存在缺失/插入以及长度变异. (2) Ctid-MHC I 基因群中保留了人 HLA-A2 与抗原多肽结合的 8 个关键性氨基酸. (3) Ctid-MHC I 序列中氨基酸置换率高, 同源率跨度大, 如 Ctid-MHC I-UD01, Ctid-MHC I-UF01 的 $\alpha 2$ 区域与人的同源率分别为 47.9% 和 46.4%; 而与 Ctid-MHC I-UC01 和 Ctid-MHC I-UD02 的同源率仅为 47.4% 和 39.5%. (4) Ctid-MHC I 等位基因之间, 以及 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 序列之间差异大, 相互间同源率高的可达 99%, 低的仅为 36%~40%. (5) Ctid-MHC I 等位基因与已报道的鲤鱼、斑马鱼、虹鳟、大西洋鲑、鲨鱼同源性低^[8-12], 除 Ctid-MHC I-UA01, -UA02, -UA03, -UD01, -UD02, -UF01 的 $\alpha 2$ 区域与鲤鱼同源性在 70.8%~79.2% 外, 鱼类 $\alpha 1$ 区域同源性仅在 30.2%~51.2% 之间. 结果揭示了草鱼 MHC class I 的进化一方面受 $\beta 2m$, TCR 和 CD8⁺ 约束; 另一方面, 在一些区域却发生了氨基酸大量的置换, 使种群 MHC class I 呈现高度多样性. 这种进化策略有利于种群的延续.

-137 5' UT 区域

Ctid-MHC I-UA01: CATCAGTA TATCACCAGA CATCTGAAAC GTCTAGAACA
 Ctid-MHC class I 5: GAGACTATCT AGGCGTTCTC TCAGAAACAT TT-----

信号肽
 -1 M R S V V L

Ctid-MHC I-UA01: AATATTTCAT TTAATTTCTC TAGAACGATT TTTACTGACA AAAACTGTTT CTCAGACAAC AGCAAGG ATG CGA TCT GTA GTG CTT
 Ctid-MHC class I 5: -----A-----G-----

$\alpha 1$ 区域

Ctid-MHC I-UA01: L L L G A H L A Y A G T H S L R Y F Y T S G D I D
 TTG CTC CTC GGA GCT CAT CTT GCC TAT GCT GGA ACA CAC TCT CTG AGA TAC TTC TAT ACT TCT GGA GAC ATT GAC
 Ctid-MHC class I 5: -----

Ctid-MHC I-UA01: F P E F T A V G L V D D G Q F M Y F D S N I M K A
 TTC CCA GAG TTC ACA GCG GTT GGT CTG GTG GAT GAT GGG CAG TTT ATG TAC TTT GAC AGC AAC ATA ATG AAA GCT
 Ctid-MHC class I 5: -----

Ctid-MHC I-UA01: V P K T E W M R Q D V G A D Y W D I Q N Q N P I G
 GTG CCG AAG ACA GAG TGG ATG AGA CAG AAT GTG GGA GCA GAT TAC TGG GAC ATA CAG AAT CAG AAT CTG ATT GGA
 Ctid-MHC class I 5: -----G-----C-----

$\alpha 2$ 区域

Ctid-MHC I-UA01: A H Q V F K D N I Q I A K E R F N Q S K G V H S L
 GCC CAT CAG GTC TTC AAA GAC AAC ATC CAG ATT GCA AAG GAA CCG TTT AAC CAG TCA AAG GGT GTT CAC TCG CTC
 Ctid-MHC class I 5: -----

Ctid-MHC I-UA01: Q F M Y G C E L D D D G T K R G Y M Q Y G Y D G E
 CAG TTT ATG TAC GGG TGT GAG CTG GAT GAT GAT GGC ACC AAA CGA GGA TAC ATG CAG TAT GGC TAT GAT GGA GAG
 Ctid-MHC class I 5: -----GG-----

Ctid-MHC class I 3: -----

Ctid-MHC I-UA01: D F L A L D K S T L T W T A A V P Q A T I T K K K
 GAC TTC CTC GCC CTG GAT AAG AGC ACC CTC ACC TGG ACT GCT GCT GTT CCT CAA GCT ACG ATT ACC AAG AAA AAA
 Ctid-MHC class I 5: -----

Ctid-MHC class I 3: -----

Ctid-MHC I-UA01: L D S T G A E A N S D N N Y L D N I C I E W L K
 TTG GAT TCC ACT GGA GCA GAG GCA AAC AGT GAT AAT AAT TAT CTG GAC AAC ATA TGC ATC GAG TGC CTG AAA
 Ctid-MHC class I 5: -----C-----T-----

Ctid-MHC class I 3: -----C-----T-----

$\alpha 3$ 区域

Ctid-MHC I-UA01: K Y V D Y G K D T L M R K V S P Q V S L L Q K D P
 AAA TAT GTT GAT TAT GGC AAG GAC ACT CTG ATG AGA AAA GTC TCT CCT CAG GTG TCT CTG TTG CAG AAG GAT CCC
 Ctid-MHC class I 5: -----

Ctid-MHC class I 3: -----

Ctid-MHC I-UA01: S S P V T C H A T G F Y P S G V T I T W Q R N G H
 TCC TCT CCA GTG ACG TAT CAC GCT ACA GGT TTT TAC CCC AGT GCA GTA ACA ATC TCC TGG CAG AGA AAT GGA CAT
 Ctid-MHC class I 5: -----

Ctid-MHC class I 3: -----T-----G-----T-----G-----A-----

Ctid-MHC I-UA01: D H H E D V D L G E L L P N G D G T F Q K S S T I
 GAC CAT CAT GAG GAT GTG GAT CTT GGT GAA CTT CTT CCC AAT GAG GAC GGA ACC TTC CAG AAG AGC AGC ACC ATC
 Ctid-MHC class I 5: -----

Ctid-MHC class I 3: -----G-----

Ctid-MHC I-UA01: R V T P D E R K K N E F S C V V E H Q G K T I T E
 AGA GTT ACA CCT GAT GAG AGG AAG AAC AAT GAG TAC AGC TGT GTG CTG GAA CAT CAG GGC AAA ACC ATC ACA GAG
 Ctid-MHC class I 3: -----G-----T-----

TM/CY 区域

Ctid-MHC I-UA01: I L K D D S F P I G I I V G V V A V L L V V S G
 ATA CTG AAA GAT GAT TCA TTT CAC ATT GGC ATC ATT GTT GGA GTT GTT GCT GTC CTG TTG GTT GTC AGT GGT
 Ctid-MHC class I 3: -----C-----

Ctid-MHC I-UA01: V V V F V V Y R K K K G F K P V P Q S Q S S D N S
 GTG GTT ATG TTT GTG GTG TAT CAG AAA AAG AAA GGC TTT AAA CCT GTT CCA CAG AAC CAA TCT TCT GAT GAT GGT
 Ctid-MHC class I 3: -----G-----G-----G-----A-----A-----

3' UT 区域

Ctid-MHC I-UA01: S N G S * AGCACAAGA TGAGACAAGA
 TCA AAT GGA TCC TAA
 Ctid-MHC class I 3: TGAGTGTGAG AGATGAAGTT GAAGAAATGA TTCTTATCCT GCTGTCCATC
 Ctid-MHC class I 3: (720bp) AAAAAAAAAA AAAA (多聚 A)

图2 RT-PCR, 5' RACE-PCR, 3' RACE 扩增产物测序结果

Ctid-MHC I-UA01 (AB109779) (RT-PCR); Ctid-MHC I 5 (AB109782) (5' RACE-PCR);

Ctid-MHC I 3 (AB109781), (3' RACE PCR); —表示与上相同

根据 Ctid-MHC I $\alpha 1$, $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$ 相互间的遗传距离和同源性, 将 Ctid-MHC I $\alpha 1$, $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$ 分别分为 6 类、5 类和 5 类(表 1). 再根据 $\alpha 1$, $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$ 的类别组合, 将 Ctid-MHC I 等位基因聚类为 9 个

型(A~I). 这一结果为进一步研究草鱼 MHC class I 与抗原多肽结合谱、种群标志, 以及与疾病的关系打下了基础.

表1 Ctid-MHC I 等位基因聚类分析

名称	GenBank 登录号	Ctid-MHC I ^{a)}			聚类
		$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	
Ctid-MHC I-UA01	AB109779	I (<0.0368)	I (<0.0079)	I (<0.0289)	A
Ctid-MHC I-UA02	AB109780	I	I	I	A
Ctid-MHC I-UA03	AB109782	I	I	I	A
Ctid-MHC I-UB01	AB109787	I	IV (<0.0740)	II (<0.0390)	B
Ctid-MHC I-UB02	AB109786	II (<0.0694)	IV	V (<0.0495)	C
Ctid-MHC I-UC01	AB109788	IV (<0.0923)	III (<0.0267)	V	D
Ctid-MHC I-UC02	AB109790	II	III	IV (<0.0495)	E
Ctid-MHC I-UD01	AB109784	III (<0.0237)	II (<0.1283)	III (<0.0390)	F
Ctid-MHC I-UD02	AB109789	III	II	II	G
Ctid-MHC I-UE01	AB109783	V (<0.1495)	V (<0.2733)	IV	H
Ctid-MHC I-UF01	AB109785	VI (<0.5783)	II	III	I

a) 括号内为遗传距离

2.4 Ctid-MHC I 的三级结构

Ctid-MHC I 的三级结构如图4所示。Ctid-MHC I 与人 HLA-A2 晶体结构比较, 在 A, B, C, D, E, F, G, H 区有缺失或插入变异。在 β 折叠区和 2 个 α 螺旋区相对保守。这一结果揭示了 MHC I 的进化过程保留了与抗原多肽结合的关键性氨基

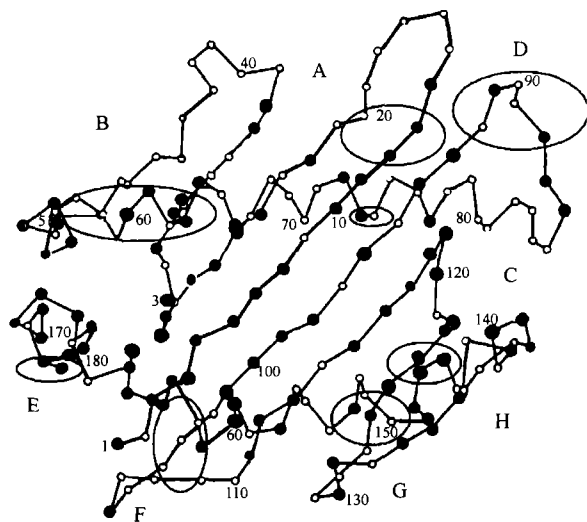


图4 Ctid-MHC I 抗原结合区(PBD)三级结构

○ 为人 MHC I (HLA-A2); ● 为草鱼种群 MHC I 与 HLA-A2 一致的氨基酸。A~H 为与 HLA-A2 比较, Ctid-MHC I 中有缺失或插入的部位

酸以及功能性的立体结构。其变异结果可能受正淘汰筛选。

2.5 MHC I 序列与分子结构的比较

图5为 Ctid-MHC I-UA01 (AB109779) 和 Ctid-MHC I-UA02 (AB109780) 与脊椎动物 MHC class I 序列比较结果。参照人 HLA-A2 氨基酸序号, Ctid-MHC I 与鲤鱼 (Carp, X91015)、斑马鱼 (Zebrafish, Z46779)、虹鳟 (Onmy-UCA-32, U55380; Onmy-UBA1, AB012064)、赤鲮 (Pink Salmon, D58386)、大西洋鲑 (Atlantic Salmon, L07606)、鲨鱼 (Shark, AF034316)、鸡 (Chicken, AY234768)、蛙 (Frog, L20733)、鼠 (Mouse, M58156)、人 (Human HLA-A2, K02883) MHC class I 序列比较, 8 个与抗原多肽结合的关键性氨基酸, 即 7 位、59 位、84 位、159 位、171 位的酪氨酸 (Y), 143 位苏氨酸 (T), 146 位赖氨酸 (K), 147 位色氨酸 (W) 在动物不同种属间基本保守 (84 位 Y 仅在 Ctid-MHC I-UF01 中保守; 146 位 K 在 Ctid-MHC I-UB, -UC, -UD 中保守)。在 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 区域与抗原多肽结合的相关性氨基酸 (P) 部分保守。其中, 在 $\alpha 1$ 区中形成的 α 螺旋区域 (第 58~85 位氨基酸) 变异较大 (图3)。而与 $\beta 2m$ 结合的氨基酸 (b) 相对保守, 并且, 86~88 位的糖基化位点在所有动物和人 MHC class I 中都存在。

2.6 MHC I 分子系统树

根据已报道的软骨鱼、硬骨鱼、两栖类、鸟类、哺乳动物和人 MHC class I 氨基酸序列^[4~18], 采用 UPG 法绘制分子系统树, 结果如图6所示。如果按照目前发现的鱼类化石所推算的鱼类最早存在的年代 (3.5 亿年) 计算, MHC class I 分子系统树进一步提示了鱼类与两栖类、鸟类、哺乳动物和人大约在 2.8 亿年前就开始了分枝; 而软骨鱼和硬骨鱼是在 1.8 亿年前分枝; 草鱼和鲤鱼大约在 1.2 亿年前分枝。

综上所述, 本研究首先克隆了我国大陆架低等脊椎动物——草鱼的 MHC class I 基因, 对其等位基因多态性、三级结构进行了量化分析。这些结果为进一步进行草鱼抗病育种奠定了基础。

信号肽区域

Ctid-MHC I UA01 (AB109779): MRSVVLJLJG*QALAYA
 Ctid-MHC I UA02 (AB109780): -----*H-----
 Carp (X91015): --VLAFT---L*H-TS-
 Zebrafish (Z46779): -Q-LIG--V*VC-Q--SG
 Onmy-UCA-C32 (U55380): -KGFI--V--IGL-HT-SA
 Onmy-UBA1 (AB012064): -KGFI--V--IGL-HT-SA
 Pink Salmon (D58386): -KGFI--V-LGIG-LHTASA
 Atlantic Salmon (L07606): -KGFI--V--IGL-HT-SA
 Shark (AF034316): -*LRFF**I--*LTL-YGVVSA
 Chicken (AY234768): -GPCGA-G-LLLA-VCGAAA
 Frog (J20733): -DLRLVPI--*LTLWIS-VYS
 Mouse (M58156): -APCT---LA-A--PTQTTRA
 Human (K02883, HLA-A2): -AVMAPRI-VJLISGALALFQTWA

α1 区域

Ctid-MHC I UA01 : GHSLSRYFYT*AVSGDIDPEFTAVGLVDGQFMFYDS**NIMKAVPKIFWWRQVVCADYWDIQNQLICAHQVFKYNIQIAKERFVQSK
 Ctid-MHC I UA02 : -----V-----**-----D-----
 Carp : A--T-Q---*I--IEN---MIA-V--(Q-ID-Y---**I-R--Q-A--ISGA-DP---NRNT-IYA-NHPS--I--N-V-S---IG
 Zebrafish : A---WKAY---*GFI-LTE---V-LN-I--QLMG---**KTNRFSQFQ--ED-L-KG-DEQ-TN)-L-YPE---N-KVVM---IQ
 Onmy-UCA-C32 : V---K---ASSI*VPN---VVV-M--GV-MVHY--NSQR-VPRQDWMKAAETLPQ--ES-IG-CK-QQ-T--A--D-VNQ---G
 Onmy-UBA1 : V---K---ASSE*VPN---VVV-M--GA-MVHY--NSQR-VPRQDWMKAAETLPQ--ES-IG-CK-QQ-T--A--D-VNQ---G
 Pink Salmon : V--K--F--ISSE*VPN---VVV-M--GV-MVHY--NSQRAVPKQDWMKAAETLPQ--ERETGICK-TQ-T--A--D-L-Q---G
 Atlantic Salmon : V-A-K---ASSE*VPN---VVV-V--GV-MVHY--NSQRAVPKQDWMKAAETLPQ--ERNIGIFK-SQ-T--A--D-Q---G
 Shark : -S-----H-SMTPIS*GI--VIV-Y--ELE-VHY---**DMK-I-RQR--AESE-P--ERNI-KAR-WE-WG-V--P-LS--T--G
 Chicken : E-L-T---IR-AMTDPCPGL-WYVDV-Y--GLL-VHYN-TARRVVPRTETW**AAKADQQ---G-T-IGQ-NE-IDRE-LG-LQR-Y--TG
 Frog : -S-----Y-AVSDRAF*GI--SVV-Y--T-IRYS--**DIGRDE-A-Q--K-KE-PF--ERET-KSK-LEAT--H-VKV-MD---I
 Mouse : -P-----E-AVSRUG*GI--RYTSV-Y--NTE-VR--DAENPRFE-RVR--MEQE-PF--ERET-RAK-QE-S-RYDLRLTLGVY---ES
 Human : -S-M---F-SVSRPGR*GI--R-I-V-Y--T-VR--DAASQRME-RAP--IFQE-PE---GETRKVKALIS-THRVDLGLRGY---LA 90
 bbb b b b b b b

α2 区域

Ctid-MHC I UA01 : GVHSLSRYFYT*AVSGDIDPEFTAVGLVDGQFMFYDS**NIMKAVPKIFWWRQVVCADYWDIQNQLICAHQVFKYNIQIAKERFVQSK
 Ctid-MHC I UA02 : -----V-----**-----D-----
 Carp : A--T-Q---*I--IEN---MIA-V--(Q-ID-Y---**I-R--Q-A--ISGA-DP---NRNT-IYA-NHPS--I--N-V-S---IG
 Zebrafish : A---WKAY---*GFI-LTE---V-LN-I--QLMG---**KTNRFSQFQ--ED-L-KG-DEQ-TN)-L-YPE---N-KVVM---IQ
 Onmy-UCA-C32 : V---K---ASSI*VPN---VVV-M--GV-MVHY--NSQR-VPRQDWMKAAETLPQ--ES-IG-CK-QQ-T--A--D-VNQ---G
 Onmy-UBA1 : V---K---ASSE*VPN---VVV-M--GA-MVHY--NSQR-VPRQDWMKAAETLPQ--ES-IG-CK-QQ-T--A--D-VNQ---G
 Pink Salmon : V--K--F--ISSE*VPN---VVV-M--GV-MVHY--NSQRAVPKQDWMKAAETLPQ--ERETGICK-TQ-T--A--D-L-Q---G
 Atlantic Salmon : V-A-K---ASSE*VPN---VVV-V--GV-MVHY--NSQRAVPKQDWMKAAETLPQ--ERNIGIFK-SQ-T--A--D-Q---G
 Shark : -S-----H-SMTPIS*GI--VIV-Y--ELE-VHY---**DMK-I-RQR--AESE-P--ERNI-KAR-WE-WG-V--P-LS--T--G
 Chicken : E-L-T---IR-AMTDPCPGL-WYVDV-Y--GLL-VHYN-TARRVVPRTETW**AAKADQQ---G-T-IGQ-NE-IDRE-LG-LQR-Y--TG
 Frog : -S-----Y-AVSDRAF*GI--SVV-Y--T-IRYS--**DIGRDE-A-Q--K-KE-PF--ERET-KSK-LEAT--H-VKV-MD---I
 Mouse : -P-----E-AVSRUG*GI--RYTSV-Y--NTE-VR--DAENPRFE-RVR--MEQE-PF--ERET-RAK-QE-S-RYDLRLTLGVY---ES
 Human : -S-M---F-SVSRPGR*GI--R-I-V-Y--T-VR--DAASQRME-RAP--IFQE-PE---GETRKVKALIS-THRVDLGLRGY---LA 90
 b b bbb bbb bbb

α3 区域

Ctid-MHC I UA01 : VSPQV**SSLLKQDPSPPVTCIATGFPYSGVITFWRQNGDHDIEDVDLCELLNMDGIFQKSSIRVTPDERKKNEFSCVVENQ**KFIIEILKD
 Ctid-MHC I UA02 : VSPQ***-----A-S-----E-----N-Y-A-----
 Carp : VSPQ***-----I-----K-Q-D-----I-E-----RA-LN-K-E-W-N-K-----**R--TEDKIKT
 Onmy-UCA-C32 : VRPS***-----I-----MVI-KD-QEQ-G--FH-I-Q-D-----THI-T--E-W-N-KYQ---QLA-IEDD-KV-IFSE-IQNFQGTNRGS
 Onmy-UBA1 : VRPS***-----I-----MVI-KD-QEQ-G--FH-I-Q-D-----THI-T--E-W-N-KYQ---QLA-IEDD-KV-IFSE-IQNFQGTNRGS
 Pink Salmon : VSPS***-----I-----D-MVS-KD-Q---EY-T--I-----HLT-T--ED-N-KYQ---QVK-IEDD-IRV-P
 Atlantic Salmon : VIPS***-----I-----MVS-KD-Q---EY-T-Q-D-----HLT-T--E-W-N-KYQ---QVT-VKEDFIVK-IESEIKTNW
 Shark : ***AAPT-FTRLCD-KKLS-V--QSTELK*HJRDQAADVPYSSGVK--H--Y-MEKQTDIE--**SDPAK--E-D-A-LSQKI VVFY
 Chicken : ERPE-R*VVGKEA-GILTLR-R-H---RPVVS-LKD-AVRQG-AHS-GIV---YHTWV--DAQ--*GCDKYQ-R---ASLPQGLYSW
 Frog : VHPH-R*LI-DH-SADATHLR-Q-Y--REIDVK-VK-G-DVHSEAAK-I--P--SY-LRV-AE-I--**NEGDSYA-H---SSLNEKILVW
 Mouse : DSPKAVTHIHPRSEDYVILR-W-L---ADI-L--L---LELTQ-ME-V-TR-A---*TFQKWAASV-V--RG-EQNYI-II-II-E-L*EPL-LRW
 Human : DAPKTHIMTHHAYS-HEATLR-W-L-S---ADL-L--L---D-F-QTQ-TI-V-TR-A---*TFQKWAASV-V--SGQEQRVY-I-I-Q-E-I-P-M-I-RW
 b b bbb bbb b b

TMCY 区域

Ctid-MHC I UA01 : ****DSE*PIGLVGVV**V*AVILVSVGVVGVV**RKKKGFKVPQSQSSNSVGS
 Ctid-MHC I UA02 : ****-H-----*-----M-----*Q-----N-D-G-NRS*
 Carp : N***YAPF---I-I--*AVI--I-I--AGYK--Q--***GFKPVNCSDDGSV-SAHIDPKA
 Zebrafish : ****NPTA-L--I-I--*A---ALA-AG---*RII---NT-DGG-D-S-RT
 Onmy-UCA-C32 : *****NDPNTIGLIGGVIA*LL-IIA*VVGVIWKKKKKGFVPAST-DTDSNSC*KGIQKI
 Onmy-UBA1 : ESEIQTFGKIRGNSNDPNTIGLIGGVIA*LL-IIA*VVGVIWKKKKKGFVPAST-DTDSNSC*KGIQKI
 Pink Salmon : *****QDAANIYPIIV*GVVALLISIVAVVGVVWKKK-KKGVIPAST-DTDSNSC*KGIQKI
 Atlantic Salmon : *****NPN*VILII--VVALLI--VAVVGVVWKKK-KKGVIPAST-DTDSNSC*KGIQKI
 Shark : EP**ADSMIPV-I-I--*AVLIV-ALA-GV-I--*A-Q-IGYNPAKTSRK*AE-SSNSATA
 Chicken : EPPQPNIV--VAG-A-ATVAI-IMV*GV*GFIYRIIAG--KGYNAPDRFG--SS-IGSNPAI
 Frog : PGPNKDGQNM---IATAVVAVI-I VAAVAG-AIYKRRAG-PDAGYIAAANRDSPP-SIVSA
 Mouse : EIPPA*FDSYVW-IALGVLC-LALFCAV-AFYKRRR-RNT-I-GGDY*LA*PG-Q-SDMSLPCKVMVDPHSLA
 Human : EPSSQPTI--VG-IAGLVLC--*ITGAV-AAVM*WR--SSDR-GGSY--AASDS-AQGSVSLTACKV

图5 草鱼 MHC class I(Ctid-MHC I-UA01, Ctid-MHC I-UA02)氨基酸序列与鱼类、蛙、鸟类、鼠和人 MHC class I比较结果

- 示人(HLA-A2)与抗原多肽结合的关键性氨基酸; p 示人(HLA-A2)与抗原多肽结合的相关性氨基酸;
- b 示人(HLA-A2)与βm 结合的氨基酸; * 示缺失; - 示与 Ctid-MHC I-UA01 一致的氨基酸序列

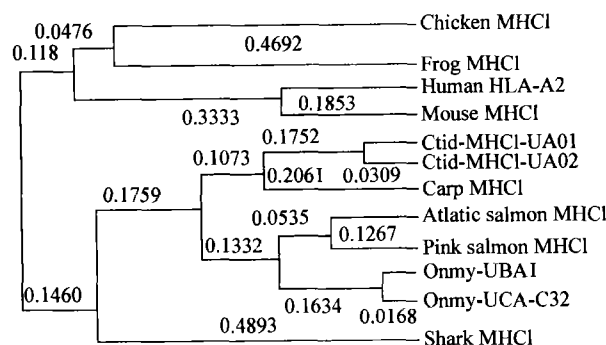


图6 MHC class I 分子进化系统树

参 考 文 献

- 1 Bjorkman P J, et al. Structure of the human class I histocompatibility antigen HLA-A2. *Nature*, 1987, 329: 506
- 2 Gao G F, et al. Molecular interactions of coreceptor CD8 and MHC class I. *Immunology Today*, 2000, 21(20): 630
- 3 Gao G F, et al. Crystal structure of the complex between human CD8 $\alpha\alpha$ and HLA-A2. *Nature*, 1997, 387, 630
- 4 Hashimoto K, et al. Isolation of carp genes encoding major histocompatibility complex antigens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 6863
- 5 Kaufman J, et al. The chicken B locus is a minimal essential major histocompatibility complex. *Nature*, 1999, 923
- 6 Flajnik M F, et al. Two ancient allelic lineages at the single classical class I locus in the xenopus MHC. *J Immunol*, 1999, 163, 3826
- 7 van Erp E S, et al. Identification and characterization of a novel class I gene in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Immunogenetics*, 1996, 44: 49
- 8 Hansen J D, et al. Conservation of an alpha 2 domain within the teleostean world, MHC class I from the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dev Comp Immunol*, 1996, 20 (6): 417
- 9 Takeuchi H, et al. Cloning and characterization of class I Mhc genes of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Immunogenetics*, 1995, 42: 77
- 10 Katagiri T, et al. Isolation of major histocompatibility complex class I cDNA from pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). *Dev Comp Immunol*, 1996, 20: 217
- 11 Grimholt U, et al. Molecular cloning of major histocompatibility complex class I cDNAs from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Immunogenetics*, 1993, 37 (6): 469
- 12 Okamura K, et al. The most primitive vertebrates with jaws possess highly polymorphic MHC class I genes comparable to those of humans. *Immunity*, 1997, 7 (6): 777
- 13 夏 春. 中华鳖 MHC I $\alpha 2$ 链基因克隆及序列分析. *中国免疫学杂志*, 1999, 15(2): 77
- 14 Xia C, et al. Differences in MHC class I between strains of Rainbow Trout. *Fish & Shellfish Immunology*, 2002, 12: 287
- 15 夏 春, 等. 一新 MHC I 类等位基因存在于低等脊椎动物: 虹鳟. *科学通报*, 2001, 46(2): 121
- 16 Aoyagi K, et al. Classical MHC class I genes composed of highly divergent sequence lineages share a single locus in Rainbow Trout. *J Immunology*, 2002, 168: 260
- 17 Koller B H, et al. Cloning and complete sequence of an HLA-A2 gene; Analysis of two HLA-A alleles at the nucleotide level. *J Immunol*, 1985, 134 (4): 2727
- 18 Horton R M, et al. Structural analysis of H-2Kf and H-2Kfm1 by using H-2K locus-specific sequences. *J Immunol*, 1990, 145 (6): 1782