

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200802001

http://www.yykxjz.cn/

童正飞, 葛玲瑞, 胡亚洲, 杨涛, 涂开发, 王佩, 周先文, 王晓清, 熊钢. 中华鳖 *MHC II α* 基因 cDNA 的克隆及组织表达分析. 渔业科学进展, 2021, 42(6): 102-108
TONG Z F, GE L R, HU Y Z, YANG T, TU K F, WANG P, ZHOU X W, WANG X Q, XIONG G. Cloning and expression analysis of *MHC II α* cDNA in *Pelodiscus sinensis*. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(6): 102-108

中华鳖 *MHC II α* 基因 cDNA 的克隆及组织表达分析*

童正飞¹ 葛玲瑞^{1,2,3①} 胡亚洲^{1,3} 杨涛¹ 涂开发¹
王佩¹ 周先文¹ 王晓清^{1,3①} 熊钢^{2,3}

(1. 湖南农业大学动物科学技术学院 湖南 长沙 410128; 2. 湖南生物机电职业技术学院 湖南 长沙 410127;
3. 湖南省水产产业技术体系 湖南 长沙 410128)

摘要 为了探究中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)的结构和功能,本研究利用 RACE 技术成功克隆获得中华鳖 *MHC II α* 基因的 cDNA 全长序列,其长度为 1296 bp,开放阅读框(ORF)为 807 bp,共编码 268 个氨基酸,分为信号肽序列、II 类组织相容性抗原 α 结构域、IGc1 结构域及跨膜结构域 4 个功能结构域。通过 NJ 法构建的系统进化树分析显示,中华鳖与西部锦龟(*Chrysemys picta bellii*)亲缘较近,而与哺乳类、鸟类及鱼类亲缘关系较远。荧光定量 PCR 结果显示, *MHC II α* mRNA 在中华鳖 8 个组织中均有表达,在脾、心、肝及肠组织中表达水平较高,在肌肉组织中表达量最低。感染嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) 12 h 后,中华鳖 *MHC II α* mRNA 在肝和肠组织中的表达显著上调;感染 1 d 时,在脾组织中的表达显著上调;感染 1 d 及 5 d 时,在肾组织中的表达显著上调。研究表明,中华鳖 *MHC II α* 基因参与了中华鳖免疫反应。

关键词 中华鳖; *MHC II α* ; 序列分析; 基因表达

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)06-0102-07

主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)是编码主要组织相容性抗原的基因群的统称,在脊椎动物抵抗疾病和免疫应答过程中发挥重要作用(冯美惠等, 2017)。MHC 类分子主要分为 MHC I 和 MHC II,是由 MHC 基因编码的一类细胞

表面转膜蛋白,主要参与抗原呈递(于文博等, 2017; 童正飞等, 2020; 徐田军等, 2008)。Hashimoto 等(1990)成功扩增鲤鱼(*Cyprinus carpio*)的部分 *MHC* 基因序列。目前,关于水产动物 MHC 研究主要集中在鱼类,对中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)MHC 的研究还较少。

*国家重点研究开发项目-蓝色粮仓(2018YFD0900200)、湖南省自然科学基金青年基金项目(2018JJ3265)、国家自然科学基金(31672640)和湖南省教育厅资助科研项目(18C0170)共同资助 [This work was funded by Key National and Special Project of Blue Granary Science and Technology Innovation (2018YFD0900200), Youth Fund Project of Natural Science Foundation of Hunan Province (2018JJ3265), National Natural Science Foundation of China (31672640), and Scientific Research Fund of Hunan Provincial Education Department (18C0170)]. 童正飞, E-mail: 1101142532@qq.com

① 通讯作者: 葛玲瑞, 副教授, E-mail: 84805349@qq.com; 王晓清, 教授, E-mail: wangxiao8258@126.com

收稿日期: 2020-08-02, 收修改稿日期: 2020-08-16

中华鳖是我国重要的名特优养殖品种之一,具有较高的营养价值及药用价值,近年来创造了巨大的经济效益(彭娜等, 2018; 陈贞年等, 2020)。目前,高度集约化养殖、种质退化及抗生素滥用等导致中华鳖疾病频发,治疗仍主要是通过化学药物,易导致水产品药物残留及产生抗药性(尹梦雅, 2018)。但关于中华鳖免疫基因的遗传分析和抗病性研究却相对较少。本研究利用 RACE 技术克隆中华鳖 *MHC II α* 基因 cDNA 全长,并以嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)为刺激物,分析中华鳖 *MHC II α* 基因在组织中的表达特征,旨在了解中华鳖免疫基因及免疫应答,为中华鳖病害免疫防治和培育抗病新品系等提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验中华鳖购自湖南河洲甲鱼养殖基地,选取同批次、体重为 100 g 左右的健康中华鳖幼鳖 60 只,随机分为 2 组,每组设 3 个平行,每个平行 10 只,分别饲养于水温为(26±1)℃的容器中。暂养稳定后,实验组腹腔注射 0.1 mL 浓度为 10⁸ CFU/mL 的嗜水气单胞菌,对照组注射 0.1 mL 生理盐水。分别取注射后 6 h、12 h、1 d、3 d 和 5 d 中华鳖的肝脏、脾脏、肾脏及肠道 4 种组织于加有 RNA 保护液的 1.5 mL EP 管中,置于-20℃保存备用。同时,选取健康中华鳖幼鳖 3 只,不做处理,分别取其肝脏、脾脏、肾脏、肠道、心脏、肌肉、脑及胃组织于 1.5 mL EP 管,液氮冷冻后,-80℃保存。

1.2 主要药品与试剂

RNA 提取试剂盒和凝胶回收试剂盒购于 Omega, SMARTer RACE 5'/3' Kit、TA 克隆相关试剂和 TB Green Premix Ex Taq II 购自大连宝生物工程(TaKaRa)公司, 2×TransTaq-T PCR superMix (+dye)(北京全式金生物)和 cDNA 合成试剂盒购自 Thermo Scientific 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 引物合成 根据本课题组获得的中华鳖转录组数据,利用 Primer 6.0 软件设计特异性引物(MHCHX-F, MHCHX-R),克隆获得核心序列,并根据核心序列设计特异性引物(MHC II -F, MHC II -R),进行后续基因全长的扩增,荧光定量 PCR 以 GAPDH 为内参基因,扩增引物为 GAPDH-F 和 GAPDH-R。引物(表 1)由上海铂尚生物科技有限公司合成。

表 1 本研究所用引物
Tab.1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	目的 Purpose
MHCHX-F	CACCAAGTTCGCCAG GGAGTTC	核心序列 Core sequence
MHCHX-R	GCAGGAAGGGCAGGT AGGAGAA	核心序列 Core sequence
MHC II -F	AGCGTGACGTGGCTG AGGAA	cDNA-3' terminal, qPCR
MHC II -R	GGTAGGAGAACTTGC GGAAGGC	cDNA-5' terminal, qPCR
GAPDH-F	CCCATTTCATTGGCCTC AACTAC	内参引物 Reference gene
GAPDH-R	CCCCTTGTGTGTTAG CAGGAT	内参引物 Reference gene

1.3.2 RNA 提取及 cDNA 的合成(qPCR) 采用 RNA 提取试剂盒(Omega)提取各组织 RNA,实验操作按照试剂盒说明书进行,得到各组织 RNA 后进行琼脂糖凝胶电泳并使用 BioSpectrometer Basic 核酸蛋白仪(Eppendorf)检测其完整度、浓度及相关比值,选择 OD_{260 nm/280 nm} 值在 1.8~2.0 之间且条带完整性良好的 RNA 用于后续 cDNA 的合成。

1.3.3 中华鳖 *MHC II α* 基因 cDNA 全长克隆 根据 SMARTer RACE cDNA amplification kit(TaKaRa)说明书合成 5'和 3'末端 cDNA 模板,并按照要求进行稀释。按照说明书分别进行 *MHC II α* 基因的 5'或 3'端序列的扩增。PCR 体系:5'或 3'端 cDNA 模板 2 μL, 10×UPM 引物 5 μL, 5'或 3'端扩增引物 1 μL, ddH₂O 17 μL, 2×TransTaq-T PCR SuperMix (+dye) 25 μL。反应均为 25 个循环:94℃ 30 s, 68℃ 30 s, 72℃ 3 min。扩增所得目的 PCR 条带用凝胶回收试剂盒回收,连接 pMD18-T Vector 载体后测序。

1.3.4 生物信息学分析及系统进化树构建 使用 Chromas 软件将测序结果中的载体序列去除,利用 DNAMAN 6.0 软件将克隆片段拼接,得到中华鳖 *MHC II α* 基因全长序列,通过 NCBI 数据库进行对比分析。利用 ExPASy translate 在线工具预测编码的氨基酸序列,利用 ProtParam 在线软件预测蛋白质理化性质,利用 SMART 及 SignalP 5.0 等在线软件预测蛋白质结构,使用 SWISS-MODEL 在线软件预测蛋白质三级结构。运用 MEGA-X 软件,采用邻位相接法(NJ 法)构建氨基酸系统发育树,并设置 Bootstrap 重复 1000 次,计算各分支的置信度。

1.3.5 荧光定量 PCR 1.3.2 中合成的 cDNA 稀释 5 倍后,取 1 μL 作为荧光定量 PCR 模板,设置 3 个

重复。GAPDH 为内参基因,内参基因引物采用表 1 中的 GAPDH-F 和 GAPDH-R,荧光定量引物使用 MHC II-F 和 MHC II-R。运用 CFX96 荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad)进行荧光定量 PCR: TB Green Premix Ex Taq II (TaKaRa) 5 μ L, 上、下游引物各 0.4 μ L, cDNA 模板 1 μ L 以及 3.2 μ L ddH₂O。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 40 个循环的 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 20 s。采用 CFX manager 3.1 (Bio-Rad)软件收集和分析基因表达量数据,并采用 GraphPad Prism 7 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 中华鳖 *MHC II α* 基因 cDNA 全长序列分析

通过 RACE 技术扩增获得了中华鳖 *MHC II α* 基因 cDNA 全长序列(图 1), 全长为 1296 bp (GenBank 登录号: MT834970), 其开放阅读框为 807 bp, 共编码 268 个氨基酸, 利用 SMART 软件预测蛋白结构域, 发现 MHC II α 氨基酸序列包括信号肽(1~37)、II 类组

织相容性抗原 α 结构域(44~125)、IGc1 结构域(143~214)及跨膜结构域(230~252) 4 个功能结构域(图 2)。ProtParam tool 预测 MHC II α 蛋白分子式为 C₁₃₄₅H₂₀₈₁N₃₆₃O₃₈₅S₈, 分子量为 29.75 kDa, 等电点为 5.67, 总平均亲水性(GRAVY)为-0.220。

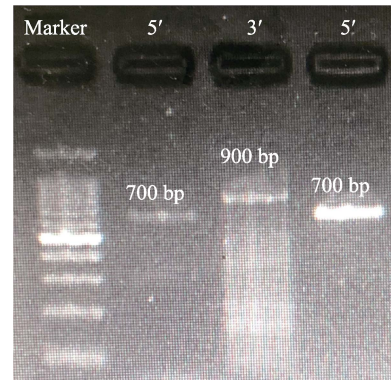


图 1 *MHC II α* 基因 5'/3'RACE 电泳
Fig.1 5'/3'RACE product of *MHC II α*

```

1   CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGGACACCCAGCCAGGTGCCGGGAGAGGAGATGGGCGCGGGACGGGGCGGCCCC
1   M G T P S Q V P G E E M G A G R G G P
106 CCATGGCCCAGCTGGCCCTGCTCACCTTGCTGCGCCCTGCCGGGCACAGGGCAGTGAAGTGGAGCACACGCAGCTCCAGGCGGATTTCTACCTGCGCATGGAGC
20  P M A Q L A L L T L L A L P G T R A V K V E H T H V Q A D F Y L R M E
211 GGGCCAGCATGAGTCGGGGCAGGTCATGTTGAGTTCGACAGGACGAGATCCTGCACGTGGACCTGGATGGGAAGGAGGCGCTCTGGCGCCTGCCCAATTCA
55  R P Q H E S G Q V M F E F D Q D E I L H V D L D G K E A V W R L P Q F
316 CCAAGTTCGCCAGCTTCGAGGCACAGGGAGCCCTGGGTGCCATCGGCACAGACAAACACAACCTGGATAACCTGATCAAGAGATCCAACACACAGGGCCCGAGA
90  T K F A S F E A Q G A L G A I A T D K H N L D N L I K R S N Y T R A Q
421 ACGTGCCCGGAGGTGACCGTGTCCCGAGGACCCGTGGAGCTGGGGAGCCCAACGCTGATCTGCTTTGCCGACAAGTCTCCCAACCCGCGCTCAGGG
125 N V P P E V T V F P E D P V E L G E P N V L I C F A D K F S P P A L S
526 TGACGTGGCTGAGGAACGGGCAGGAGTGGCCGAGGACGTCTACGAGACCGACTCTACCCCGCCCGGACACGCCTTCCGCAAGTCTCTCTACCTGCCCTTCC
160 V T W L R N G Q E V A E D V Y E T D F Y P R P D H A F R K F S Y L P F
631 TGCCCCGGGCGGGGACGTCTACACTGCCGGTGCAGCACGTGACGCTGCCAGCCCTTGAAGTGCCTGGGAGGCGCAGTGGGACTGCCAGGAGCAAGA
195 L P R A G D V Y T C R V Q H V S L P S P L E V R W E A Q S D S A R S K
736 TGCTGACGGCGCTCGGGGCTCGTGTGGGGTGTCTTCTGTTGCCGGACTGCTGCTACCTGAGGAACAAGAAAGGGCGCCCTGTTCCCAAGCCCGCAG
230 M L T G V G G F V L G L I F L V P G L V V Y L R N K K G R P V P Q P A
841 GGCTCTGAGCTAGACCCAGGCTCCGACCCCTCCAGCAGGAGCGTCCGACCGTCTGTCCAGCACCCGCGCCAGCCTGGAGAACACAGAACCGGGACCCGCT
265 G L L S *
946 CTTCTGTGCGCATCTGCTCCACCTCCTTTGCCCGAGTCTTCCCTCTGGGACCCGTCCTGCCCGCTCCAGCAAGCCCTGATAGTCCCTGTGCATCC
1051 GTTGACGTGTGACCCCGCTCCCGGGCGCTACCCGCCAGCCAGACAGTCCCGCGCGCCGCGCCCTACCCCTGTGATCCGCGCTCCCTGCCAGACGTC
1156 CCAGCCATGGACTGGAAGCAGCGCCGACCCGCCAGCCCTCGTATTTCCCGCCAGACAGCACCTGTGGCCAGCCCATATACCCCACTAAAGAGCTGTA
1261 CCCAGACAAAAA

```

图 2 *MHC II α* 基因 cDNA 全长序列及推导的氨基酸序列

Fig.2 Full-length cDNA and deduced amino acid sequences of *MHC II α*

起始密码子(ATC)和终止密码子(TAG)用方框标示; 信号肽用下划线标示; II 类组织相容性抗原 α 结构域用虚下划线标示; IGc1 结构域用波浪线标示; 跨膜结构域用点式下划线标示

The start codon (ATG) and the stop codon (TAG) are indicated in box; the signal peptide is underlined; MHC II alpha domain is indicated by dashed underline; IGc1 domain is indicated by wave line; Transmembrane region is indicated by dot underline

2.2 中华鳖 *MHC II α* 系统进化树的构建

在 NCBI 网站中选取人(*Homo sapiens*, CAA25142.1)、黑猩猩(*Pan troglodytes*, XP_003950844.1)、西部锦龟(*Chrysemys picta bellii*, XP_005315098.1)、澳洲棕蛇(*Pseudonaja textilis*, XP_026577346.1)、鸚鸚鵡(*Strigops habroptila*, XP_030366648.1)、鹌鹑(*Coturnix japonica*, XP_032297688.1)、白梭吻鲈(*Sander lucioperca*, XP_031149428.1)及红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*, XP_029695924.1)共 8 种动物的已知或预测 *MHC II α* 氨基酸序列, 利用 MEGA-X 软件构建 NJ 系统进化树, 发现中华鳖与西部锦龟属于同一分支(图 3), 亲缘关系较近。

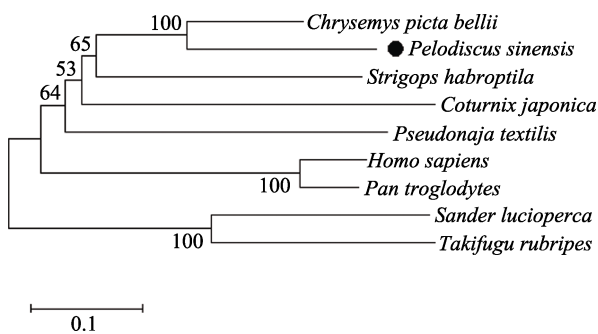


图 3 *MHC II α* 的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of *MHC II α*

2.3 中华鳖 *MHC II α* 的蛋白质三级结构

使用 SWISS-MODEL 在线软件预测 *MHC II α* 的蛋白质三级结构(图 4)。SWISS-MODEL 预测结果显示, 匹配的模板与 *MHC II α* 氨基酸序列一致度为 60.67%, GMQE 值为 0.59, QMEAN 值为 -2.08, 说明 *MHC II α* 的蛋白质三级结构预测结果可信。

2.4 *MHC II α* mRNA 组织表达分析

通过检测 *MHC II α* mRNA 在健康中华鳖不同组织中的相对表达量, 分析其组织表达差异。结果显示, *MHC II α* mRNA 在中华鳖的脾、心、肝及肠组织中表达水平较高, 显著高于肾、肌肉、脑及胃组织($P < 0.05$), 在肌肉组织中表达量最低(图 5)。

2.5 *MHC II α* mRNA 的时空表达

腹腔注射嗜水气单胞菌后, 分析中华鳖的肝、脾、肠及肾组织在不同时间点(6 h、12 h、1 d、3 d 及 5 d)的 *MHC II α* mRNA 相对表达水平(图 6)。*MHC II α* mRNA 在肝、脾、肠及肾组织中均出现显著上调表达。各组织 *MHC II α* mRNA 相对表达量均在 1 d 时最高。但在脾、肠及肾 3 个组织的相对表达结果中有下调表

达的时期, 在脾的表达量在 12 h 及 3 d 时呈下调表达, 在肠的表达量在 3 d 时呈下调表达, 在肾的表达量在 12 h 内呈下调趋势以及 3 d 时呈下调表达。

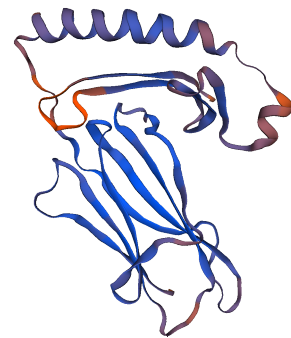


图 4 *MHC II α* 的 3D 结构预测

Fig.4 Predicted 3D structure of *MHC II α*

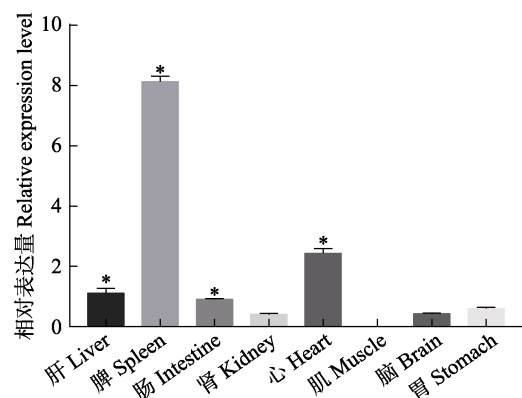


图 5 *MHC II α* mRNA 在不同组织中的表达分布

Fig.5 Expression of *MHC II α* gene in different tissues

*: 组织间差异显著($n=3$, $P < 0.05$)

*: Significant difference between groups ($n=3$, $P < 0.05$)

3 讨论

MHC 基因在脊椎动物中广泛存在, 且大多数位于同一条染色体上, 具有高多态性, 在免疫抗病及遗传育种等研究中备受青睐。根据表达产物类型, *MHC* 基因目前分为 *MHC-I*、*MHC-II* 和 *MHC-III*, 都由多基因座组成, 但在表达组织类型、结构组成、刺激的 T 细胞类群及多态性演化上均有差异(庞纪彩等, 2012; 林友福等, 2018; Lindqvist *et al*, 2005)。*MHC-II* 类基因被命名为 *MHC-D*, 并划分为 *MHC-DR*、*MHC-DQ*、*MHC-DP* 等亚区(亢孝珍等, 2014)。目前, 水产动物 *MHC-II* 基因研究已较为广泛, 大多数研究主要集中在鱼类, 现已得到草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、斑马鱼(*Brachydanio rerio var*)、军曹鱼(*Rachycentron canadum*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、大菱鲆

(*Scophthalmus maximus*)等的 *MHC-II* 类基因 cDNA 全长(van Erp *et al*, 1996; Hideki *et al*, 1992; 茅莉娜等, 2010; Prapansak *et al*, 2004; Zhang *et al*, 2006), 而关于龟鳖类水产动物 *MHC-II* 基因的研究较少, 且中华鳖 *MHC* 基因家族尚未有相关报道。本研究通过 RACE 技术成功获得中华鳖 *MHC II α* 基因 cDNA 全

长 1296 bp, 编码 268 个氨基酸, 通过预测蛋白结构域, 发现 *MHC II α* 存在明显的信号肽序列、II 类组织相容性抗原 α 结构域、IGc1 结构域及跨膜结构域。通过建立氨基酸系统进化树分析发现, 中华鳖 *MHC II α* 基因与西部锦龟亲缘关系更近, 而与其他爬行类、哺乳类、鸟类及鱼类亲缘关系较远。

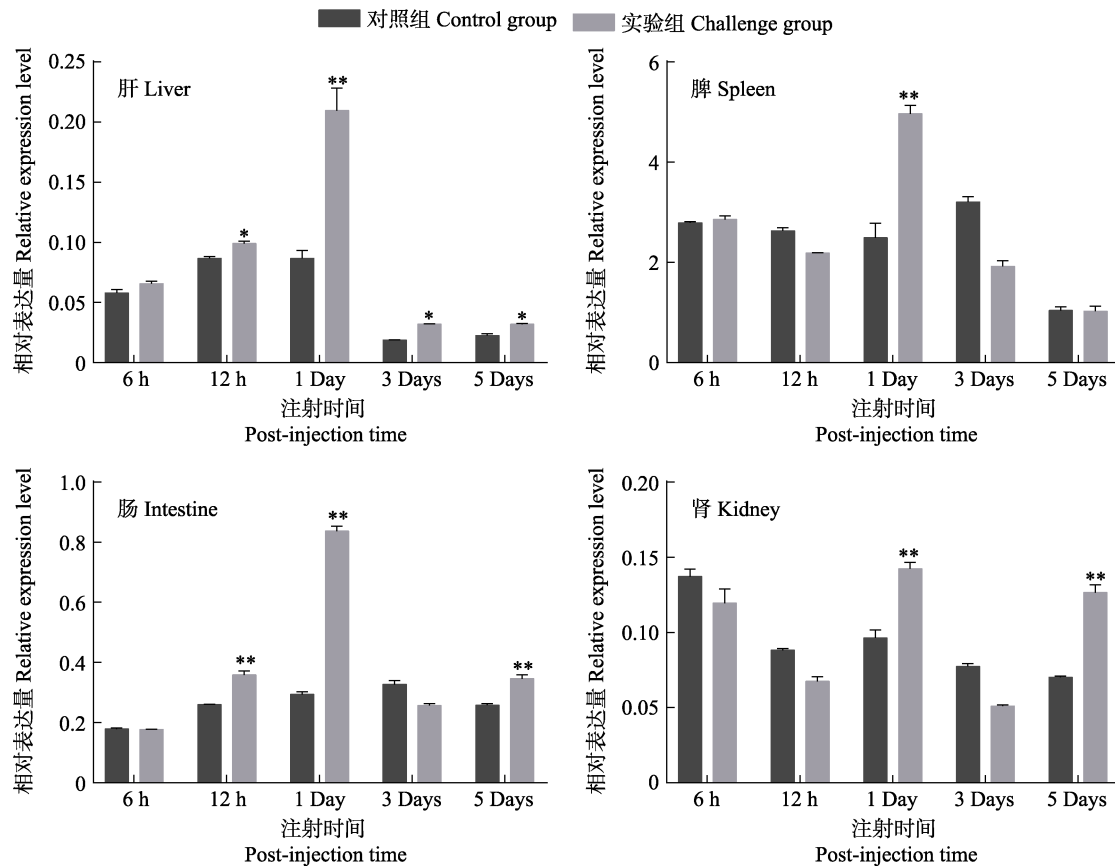


图 6 细菌刺激后中华鳖 *MHC II α* mRNA 在肝、脾、肠及肾的表达模式

Fig.6 Expression of *MHC II α* mRNA in liver, spleen, intestine and kidney of *P. sinensis* after bacterial challenge

*: 显著差异($P < 0.05$); **: 极显著性差异($P < 0.01$)

Significant difference between challenge group and control group was indicated with the asterisks (“*” $P < 0.05$; “**” $P < 0.01$)

MHC 与免疫系统有密切关系, 其编码产物分布于细胞膜上, 参与抗原呈递, 与水产动物、家禽及哺乳动物的遗传多样性、抗病性及生产性状等相关(Ruan *et al*, 2016; Johannes *et al*, 2013; Zhou *et al*, 2003; 侯卓成等, 2002; Katarzyna *et al*, 2012; Łopucki *et al*, 2016; Lindqvist *et al*, 2005)。*MHC-II* 类基因的组织表达具有差异性(Liu *et al*, 2002)。本研究荧光定量 PCR 结果显示, *MHC II α* 基因在健康中华鳖所检测的 8 个组织中均有表达。在中华鳖感染后, 实验组肝脏、脾脏、肠道及肾组织 *MHC II α* mRNA 的相对表达量均出现显著上调, 且均在 1 d 时达到最高。肝脏、脾脏、肠道及肾均与免疫密切相关, 据此推测, 中华鳖

MHC II α 基因参与了免疫调节。

本研究首次获得了中华鳖 *MHC II α* 基因的全长, 并对该基因序列及结构、所编码的氨基酸序列及结构特点进行分析, 构建相关系统发育树, 丰富了水产动物中龟鳖类 *MHC-II* 类基因库, 为进一步探索中华鳖 *MHC II α* 基因免疫调控机制提供了理论依据, 也有利于促进中华鳖疾病防控及抗病育种的发展。

参 考 文 献

CHEN Z N, WANG X Q, LUO L T, *et al*. High-throughput sequencing analysis of the effects of sanguinarine on *Trionyx*

- sinensis* intestinal microbiota. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(1): 177–185 [陈贞年, 王晓清, 罗来婷, 等. 高通量测序分析血根碱对中华鳖肠道菌群结构的影响. *渔业科学进展*, 2021, 42(1): 177–185]
- 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*). *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(5): 992–999 [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. *水生生物学报*, 2017, 41(5): 992–999]
- HASHIMOTO K, KUROSAWA N Y. Isolation of carp genes encoding major histocompatibility complex antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87(17): 6863–6867
- HIDEKI O, DAGMAR K, VLADIMIR V, *et al.* Major histocompatibility complex class II genes of zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(24): 11886–11890
- HOU Z C, YANG N. Advances in major histocompatibility complex research in poultry. *Hereditas (Beijing)*, 2002, 24(1): 72–76 [侯卓成, 杨宁. 家禽主要组织相容性复合体的研究进展. *遗传*, 2002, 24(1): 72–76]
- JOHANNES M D, UNNI G, JONG L, *et al.* Comprehensive analysis of MHC class II genes in teleost fish genomes reveals dispensability of the peptide-loading DM system in a large part of vertebrates. *BMC Evolutionary Biology*, 2013, 13: 260
- KANG X Z, ERDEMTU, JIANG J Q, *et al.* Research progress on major histocompatibility complex (MHC) gene. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2014, 41(5): 28–33 [亢孝珍, 额尔敦木图, 姜建强, 等. 主要组织相容性复合体(MHC)基因研究进展. *中国畜牧兽医*, 2014, 41(5): 28–33]
- KATARZYNA K, WIESŁAW B, KATARZYNA B, *et al.* Evolution of major histocompatibility complex class I and class II genes in the brown bear. *BMC Evolutionary Biology*, 2012, 12: 197
- LIN Y F, YU Y F, LI J J, *et al.* Progress of major histocompatibility complex (MHC) and relevant gene research in vertebrate. *Biology Teaching*, 2018, 43(8): 9–10 [林友福, 俞耀飞, 李金江, 等. 脊椎动物的主要组织相容性复合体基因研究进展. *生物学教学*, 2018, 43(8): 9–10]
- LINDQVIST A, COUR C D D L, STEGMARK A, *et al.* Overeating of palatable food is associated with blunted leptin and ghrelin responses. *Regulatory Peptides*, 2005, 130(3): 123–132
- LIU Y, KASSHARA M, RUMFELT L L, *et al.* Xenopus class II A genes: Studies of genetic, polymorphism, and expression. *Developmental and Comparative Immunology*, 2002, 26(8): 735–750
- ŁOPUCKI R, MRÓZ I. An assessment of non-volant terrestrial vertebrates response to wind farms—a study of small mammals. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2016, 188(2): 122
- MAO L N, FENG J, LI Y G, *et al.* Full length cDNA cloning and tissue expression of major histocompatibility complex (MHC)- II α from Cobia (*Rachycentron canadum*). *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2010, 37(10): 48–56 [茅莉娜, 冯娟, 李玉谷, 等. 军曹鱼 MHC- II α 基因全长 cDNA 的克隆及其组织表达分析. *中国畜牧兽医*, 2010, 37(10): 48–56]
- PENG N, ZENG D, WANG X Q, *et al.* SNP markers on IGF2 gene in *Pelodiscus sinensis* and its correlation analysis to growth traits. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2018, 44(1): 88–94 [彭娜, 曾丹, 王晓清, 等. 中华鳖 IGF2 基因 SNP 标记与生长性状的关联分析. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2018, 44(1): 88–94]
- PANG J C, GAO F Y, LU M X, *et al.* Progress of major histocompatibility complex (MHC) II gene and relevant gene research in fish. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2012, 39(3): 141–145 [庞纪彩, 高凤英, 卢迈新, 等. 鱼类 MHC II 类基因及其研究进展. *广东农业科学*, 2012, 39(3): 141–145]
- PRAPANSAK S, TSUYOSHI O, IKUO H, *et al.* Cloning, characterization and expression of cDNA containing major histocompatibility complex class I, II a and II b genes of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science*, 2004, 70(2): 264–276
- RUAN R, RUAN J, WAN X L, *et al.* Organization and characteristics of the major histocompatibility complex class II region in the Yangtze finless porpoise (*Neophocaena asiaeorientalis asiaeorientalis*). *Scientific Reports*, 2016, 6: 22471
- TONG Z F, HU Y Z, TAN J, *et al.* Transcriptome comparison and immune related gene analysis of spleen of Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis*. *Genomics and Applied Biology*, 2020, 39(12): 5449–5456 [童正飞, 胡亚洲, 谭进, 等. 中华鳖脾脏转录组比较及免疫相关基因分析. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(12): 5449–5456]
- VAN ERP S H M, EGBERTS E, STET R. Characterization of major histocompatibility complex class II A and B genes in gynogenetic carp clone. *Immunogenetics*, 1996, 44(3): 192–202
- XU T J, CHEN S L. Progress of major histocompatibility complex (MHC) and relevant gene research in fish. *Marine Fisheries Research*, 2008, 29(4): 116–126 [徐田军, 陈松林. 鱼类 MHC 及其基因研究进展. *海洋水产研究*, 2008, 29(4): 116–126]
- YIN M Y. The Study on the epidemiology investigation and pathogenicity, drug-resistance characteristics about fulminant death of *Pelodiscus sinensis*. Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2018 [尹梦雅. 中华鳖暴发性死亡症流行性调查及病原菌的致病性、耐药性研究. 华中农业大学硕士学位论文, 2018]
- YU W B, ZHU K C, GUO H Y, *et al.* Cloning and expression

- analysis of MHC II β gene in *Trachinotus ovatus*. South China Fisheries Science, 2017, 13(4): 69–79 [于文博, 朱克诚, 郭华阳, 等. 卵形鲳鲹 MHC II β 基因的克隆与表达分析. 南方水产科学, 2017, 13(4): 69–79]
- 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*). Marine Biotechnology, 2006, 8(6): 611–623
- ZHOU H J, LAMONT J. Chicken MHC class I and II gene effects on antibody response kinetics in adult chickens. Immunogenetics, 2003, 55(3): 133–140

(编辑 冯小花)

Cloning and Expression Analysis of *MHC II α* cDNA in *Pelodiscus sinensis*

TONG Zhengfei¹, GE Lingrui^{1,2,3 $\text{\textcircled{1}}$} , HU Yazhou^{1,3}, YANG Tao¹, TU Kaifa¹,
WANG Pei¹, ZHOU Xianwen¹, WANG Xiaoqing^{1,3 $\text{\textcircled{1}}$} , XIONG Gang^{2,3}

(1. College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China;

2. Hunan Biological and Electromechanical Polytechnic, Changsha, Hunan 410127, China;

3. Technology System of Aquatic Industry in Hunan Province, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract To study the structure and function of MHC (major histocompatibility complex) in *Pelodiscus sinensis*, we obtained the full-length cDNA of *MHC II α* using RACE-PCR (rapid amplification of cDNA ends PCR) technology. The resulting sequence was 1296 bp in length, including an ORF (open reading frame) region of 807 bp. The peptide-encoded *MHC II α* gene could be divided into four parts, including the signal peptide, MHC II α domain, IGc1 domain, and transmembrane region. A neighbor-joining tree showed that the *MHC II α* gene from *P. sinensis* and *Chrysemys picta bellii* cluster into one cluster. The *P. sinensis* gene had a close genetic-relationship with *C. picta bellii* and a farther genetic-relationship with mammals, aves, and fish. Using qRT-PCR in all 8 tissues, the highest expression of the *MHC II α* gene was observed in the spleen, heart, liver, and intestine, while the lowest level was found in muscle. Meanwhile, *MHC II α* mRNA expression levels were significantly up-regulated in the liver and intestine (after 12 h), the spleen (on the 1st day), and the kidney (on 1st and 5th day) after being infected with *Aeromonas hydrophila*. The liver, spleen, intestine, and kidney are closely related to immunity, which indicates that this gene has important effects on the immune response.

Key words *Pelodiscus sinensis*; *MHC II α* ; Sequence analysis; Gene expression

$\text{\textcircled{1}}$ Corresponding author: GE Lingrui, E-mail: 84805349@qq.com; WANG Xiaoqing, E-mail: wangxiao8258@126.com