

五龙鹅 *MHC Class I* 基因克隆及同源建模研究

贾晓晖¹, 王宝维¹, 王雷¹, 李桢¹, 张名爱¹, 吴晓平¹,
刘光磊², 杨志刚¹, 龙芳羽¹, 张旭晖¹

(1. 莱阳农学院优质水禽研究所, 青岛 266109; 2. 中国农业科学院畜牧研究所, 北京 100094)

摘要: 主要组织相容性复合体(MHC)与动物机体对外源性抗原的免疫应答之间存在关联。从 GenBank/DDBJ/EMBL 基因库中读取鸡、其他鸟类、爬行类和哺乳类的 *MHC Class I* 基因进行序列分析设计引物, 使用 LA-PCR 法从五龙鹅的基因组中克隆了 *MHC Class I* 基因序列(DNA 序列和 mRNA 序列 GenBank 登录号分别为: AM114925 和 AM114924), 并分析其基因组结构。运用生物信息技术对测序结果进行分析显示: 基因组 DNA 由 8 个外显子和 7 个内含子组成, 与鸡基因序列同源率为 60.8%~64.1%, 与人的同源率为 42.9%。分子进化树进一步揭示了五龙鹅与鸡、其他鸟类、爬行类、哺乳类以及人类的进化关系, 同源建模分析发现该基因由氨基末端结构域和羧基末端结构域构成。

关键词: *MHC Class I*; 五龙鹅; 基因组; 分子进化树; 氨基酸同源率; 同源建模

中图分类号: Q953

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2006)09-1087-06

Molecular Cloning and Homologous Modeling of Wulong Goose *MHC Class I* Gene

JIA Xiao-Hui¹, WANG Bao-Wei¹, WANG Lei¹, LI Zhen¹, ZHANG Ming-Ai¹, WU Xiao-Ping¹,
LIU Guang-Lei², YANG Zhi-Gang¹, LONG Fang-Yu¹, ZHANG Xu-Hui¹

(1. Institute of High Quality Waterfowl, Laiyang Agricultural University, Qingdao 266109, China;

2. Institute of Animal Husbandry, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

Abstract: Major histocompatibility complex (*MHC*) was correlated with immune response for extra-antigen. *MHC* sequences of chicken, other birds, crawl species and mammalian were derived from GenBank/DDBJ/EMBL and analyzed by alignment, and then primers were designed. By means of LA-PCR method, *MHC Class I* gene was cloned from Wulong goose genomic DNA and total RNA, and the structure of *MHC Class I* genomic DNA was analyzed using bioinformation methods. The results showed that the genomic DNA, which consisted of 8 exons and 7 introns, had 64.1% amino acids homologous to chicken and 42.9% amino acids to human. The molecular phylogenetic tree further revealed evolutionary relationship between Wulong goose and other animals such as chicken, other birds, crawl species, mammalian and human. The results of homologous modeling showed that Wulong Goose *MHC Class I* gene was formed by amidocyanogen (N) terminal structure region and carboxyl (C) terminal structure region.

Key words: *MHC Class I*; Wulong goose; genome; molecular phylogenetic tree; amino acids homologous rate; homologous modeling

收稿日期: 2006-02-21; 修回日期: 2006-04-20

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(编号: 2004BA514A09-3)资助[National Key Technologies R&D Program (No.2004BA514A09-3)]

作者简介: 贾晓晖(1980—), 男, 山东莱阳人, 硕士研究生, 专业方向: 预防兽医学

通讯作者: 王宝维(1959—), 男, 山东荣成人, 教授, 研究方向: 禽类科学。Tel: 0532-88030449; E-mail: wangbw@lyac.edu.cn

五龙鹅属中国白色鹅种的小型品种,以繁殖性能高而闻名,主要分布于中国山东省胶东半岛,经过 20 多年的品种资源调查、收集,运用家系选育、闭锁选育、BLUP 育种技术及分子遗传标记等手段,使五龙鹅体型外貌、生产性能及均匀度整齐一致,具有明显的豁眼特征的白色小型品种,其繁殖性能达到国际领先水平^[1]。

主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC),是由紧密连锁的高度多态的基因座所组成的染色体上的一个遗传区域,是一个与免疫应答和抗病性密切相关的多基因家族。其编码产物是免疫系统中极为复杂且具多态性的一类细胞表面转膜蛋白,称为 MHC 抗原,该抗原主要分布在各种细胞的表面。MHC 广泛存在于脊椎动物中,决定着动物的免疫排斥反应,在机体免疫系统中发挥着非常重要的抗原递呈作用,同时也与动物的抗病性和易感性密切相关;目前已证实 MHC 与畜禽的多种疾病之间存在着强相关,因此,近年来成为畜禽抗病育种技术中的重要部分。

MHC 分子主要包括 MHC I 和 MHC II 两种抗原,在羊中还发现 MHC III 类抗原,在鸡 MHC 中发现 Rfp-Y 区域。MHC I 类抗原由两条多肽链组成:重链(α 链)和轻链(β 链),它们以非共价键形式结合,其中重链由 MHC I 类基因编码,轻链由位于另一条染色体上的 MHC I 类基因编码。 α 链在远胞膜区构成了 1 个抗原结合槽,2 条 β 螺旋组成槽的侧壁,1 个 β 片层构成底部。禽类 MHC 的研究主要集中在鸡上,随着生物技术的发展,鸡的 MHC B-F、B-L、B-G 分别被克隆,其中的 B-F、B-L 部分被测序^[2-4]。关于 MHC 与抗体之间的关系,Dunnington D A 等^[5]证明 MHC 与抗体的产生有关;Loudovaris T 等^[6]和 Yang N 等^[7]报道鸡对 SRBC 和沙门氏菌的抗体效价与鸡的 MHC 有关;Pinard M H 等^[8]报道抗体对于 SRBC 的长期应答与鸡 MHC 等位基因的改变具有相关性。目前关于鹅的 MHC 研究的报道较少,本文用五龙鹅作为实验材料研究其 MHC 的分子和基因组结构,以便为更好地探索鹅 MHC 与疾病和生产性能之间的关系提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

转化态受体菌株为 DH5 α 由本实验室保存,克

隆载体为 pMD-18T,购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 实验动物

10 周龄五龙鹅 10 只由莱阳农学院优质水禽研究所育种基地提供。

1.1.3 引物设计

登录 GenBank/DDBJ/EMBL 数据库,根据登录的鸡(No. XM_424372),鸭(No. AY294417),鼠(No. AY064389),斑马鱼(No. BC066745)的 MHC Class I 基因序列设计一对引物:

P1: 5'-CCACTCCCTGCGCTATTT-3';

P2: 5'-GAAGCAGAGCGGTTAGACACT-3'。

以上引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.1.4 工具酶及试剂

RNA 提取试剂盒、dNTP、LA-Taq 酶、AMV 反转录酶、DNA Maker DL2000、质粒纯化试剂盒购自 TaKaRa 生物公司;琼脂糖、RNasin、氨苄青霉素、X-gal、IPTG 购自华美生物工程公司;T4 连接酶购自 TOYOBO 生物公司;胰蛋白酶、酵母提取物均为 OXID 产品。

1.2 五龙鹅 MHC Class I 基因克隆与鉴定

1.2.1 五龙鹅组织 DNA 的提取

将五龙鹅经心脏采血处死无菌取脾脏,利用酚抽提法提取脾脏组织的 DNA。

1.2.2 脾淋巴细胞的诱导培养及其总 RNA 的提取

将 10 周龄的五龙鹅经心脏采血处死,无菌取其脾脏,在冷 Hanks 液中剪碎,尼龙网过滤,用淋巴细胞分离液分离细胞。洗涤后调整细胞终浓度为 8.0×10^6 个/ml/L,置于含 $10 \mu\text{g/ml}$ ConA 的无血清 RPMI1640 培养液,在 40°C , $5\% \text{CO}_2$ 条件下孵育 16 h 后收集细胞用 Trizol 试剂盒提取细胞总 RNA。

1.2.3 五龙鹅 MHC Class I 基因 RT-PCR 的扩增

将提取的总 RNA 置于 42°C 水浴中反转录 1 h,合成 cDNA 第一链,并以此为模板,用 PCR 扩增此片段,PCR 产物于 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.4 重组质粒的构建转化及其鉴定

将扩增的 PCR 产物回收,与 pMD-18T 载体构建重组质粒, 16°C 连接 2 h,转化利用 CaCl_2 法制备的感受态细胞大肠杆菌 DH5 α ,在 Amp/X-gal/IPTG 选择性 LB 固体培养基中筛选蓝白斑,选取白斑在液体 LB 培养基中摇菌 12 h,利用碱裂解法提取质粒,并

做 PCR 鉴定。

1.2.5 测序

将新鲜菌液送 TaKaRa 生物公司测序, ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle sequence Ready Reaction 试剂盒和 ABI PRISM™ 377XL 测序仪, 测通全序列。

1.2.6 测序结果分析

序列的同源性分析采用动态规划的方法, 选用 Clustal W 软件分析, 序列的电荷分布, 疏水性, 重复结构及周期性分析选用 SAPS(Statistical Analysis of Protein Sequences) 统计分析软件, 局部序列的等电点采用 ComputepI/MW 程序计算。

1.3 三维结构分析及蛋白的同源建模

搜索自瑞士生物信息研究所(Swiss Institute of Bioinformatics)提供的 swiss pro Modeling 建模服务器, 通过所提交的序列信息在蛋白质结构库中搜寻模板, 在 swiss-pdb viewer 中通过人工方法对局部结构进行调整, 采用蛋白质三维图像软件 Swiss-Pdb Viewer 根据距离平方和最小的叠合方法(Least squares superposition), 将蛋白质分子的结构进行叠合。

2 结果与分析

2.1 五龙鹅 RT-PCR 的 *MHC Class I* 扩增

根据鸡、鸭、鼠、斑马鱼等动物的 *MHC Class I* 设计的引物对五龙鹅脾脏组织中的 DNA 和脾淋巴细胞总 RNA 进行 RT-PCR 反应, 扩增出分别为 2 500 bp 和 1 100 bp 的片段, 结果如图所示:

2.2 五龙鹅 *MHC Class I* 序列分析

利用基于神经网络的 Grail II 程序对启动子、蛋白质编码区和 poly(A) 进行分析, 发现其基因组 DNA 由 8 个外显子和 7 个内含子组成, 其外显子数目与鸡、猪的相同。其中外显子 1~8 分别为 60 bp, 264 bp,

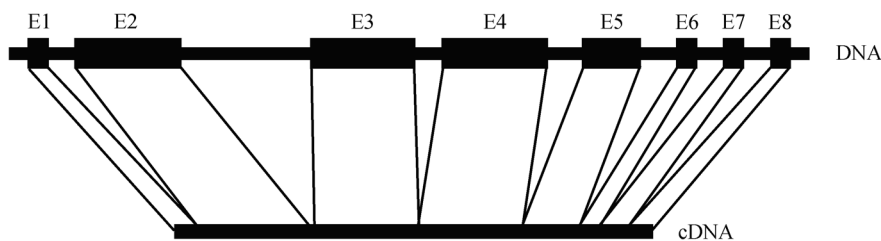


图 3 五龙鹅 *MHC Class I* gene 外显子和内含子结构

Fig. 3 Exon and intron organization of Wulong goose *MHC Class I* gene

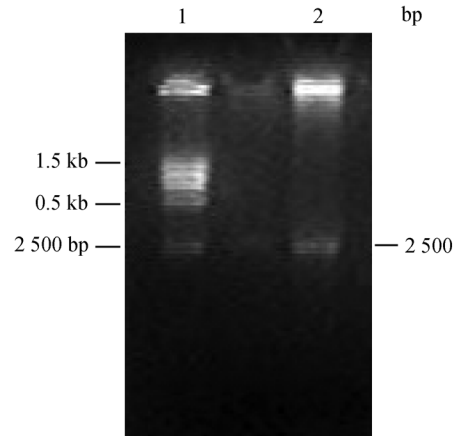


图 1 总 DNA 的 PCR 扩增

1: DL 15000 marker; 2: 总 DNA 的 PCR 产物。

Fig. 1 PCR amplification of total DNA

1: DL 15000 marker; 2: PCR product of total DNA.

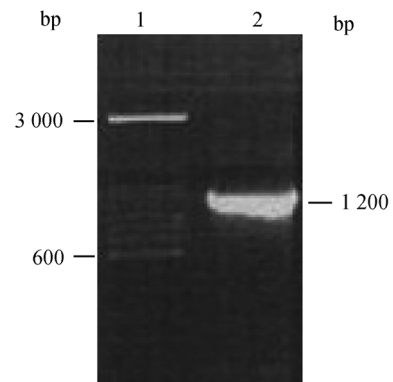


图 2 RNA 的 RT-PCR 扩增

1: DL 3000 marker; 2: RT-PCR 产物。

Fig. 2 RT-PCR amplification of RNA

1: DL 3000 marker; 2: RT-PCR product of RNA.

276 bp, 273 bp, 102 bp, 33 bp, 33 bp 和 21 bp。内含子 1~7 分别为 121 bp, 672 bp, 94 bp, 84 bp, 144 bp, 166 bp, 200 bp, 结构如图 3。

2.3 同源性分析

利用 CLASTALW 软件对测得的序列与人、鸡、

鼠, 斑马鱼等动物的 *MHC Class I* 基因进行比较, Wulong goose *MHC I* 与人有 42.9% 的同源性, 与鸡有 64.1%, 与鼠 43.5%~44.4% 的同源性, 结果如图 4 所示; 利用 PHYLIP 程序绘制的进化树如图 5 所示, 进化树结果表明五龙鹅 *MHC I* 的进化关系与鸡最近, 鱼类、两栖类与鸟类、哺乳动物进化形成两大群。

2.4 五龙鹅 *MHC Class I* 蛋白同源建模

通过距离平方和最小的叠合方法进行预测, 得

到 Wulong goose *MHC I* 的空间结构, 发现分子结构具有两个结构域: 氨基末端结构域和羧基末端结构域。分子中心由两个长的亲水性 α -螺旋构成。氨基末端结构域由 3 个 β -折叠构成, 羧基末端结构域由 3 个 β -折叠和一个 α -螺旋构成(图 6)。

3 讨论

Miller M M 等 [9] 最先通过 DNA 杂交方法 (RLFP) 报道了鸡具有 4 个 *Class I* 基因座位 (B-FI~FIV), 其

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		
1	■	42.3	42.5	39.3	41.8	42.6	41.1	64.1	19.5	44.4	22.7	42.0	42.4	43.3	42.9	43.5	16.2	1	五龙鹅 Wulong goose
2	100.0	■	91.6	37.9	40.6	42.6	35.0	40.6	14.7	36.3	14.7	37.0	39.4	39.2	36.4	37.3	11.8	2	非洲爪蛙 African clawed frog
3	100.0	100.0	■	37.4	40.4	41.5	34.5	39.8	15.8	36.4	17.2	36.5	38.9	39.0	35.9	37.2	14.7	3	乌干达爪蛙 Uganda clawed frog
4	100.0	100.0	100.0	■	59.7	54.2	34.0	36.2	18.9	35.9	14.7	33.0	32.9	35.9	34.0	34.4	16.2	4	斑马鱼 Zebrafish
5	100.0	100.0	100.0	57.1	■	54.5	36.4	36.0	17.4	36.1	14.1	38.3	39.8	40.8	37.3	38.9	13.2	5	草鱼 Grass carp
6	100.0	100.0	100.0	69.3	68.5	■	31.6	41.1	12.9	35.6	12.5	32.8	34.9	36.8	33.3	33.9	13.2	6	大西洋三文鱼 Atlantic salmon
7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	■	39.2	19.1	77.9	14.9	62.9	67.6	64.3	61.8	65.8	16.4	7	中国苍鼠 Chinese hamster
8	48.6	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	■	17.5	40.4	14.8	35.5	37.7	37.0	38.7	39.0	13.2	8	鸡 Chicken
9	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	■	18.1	48.3	17.6	14.5	15.4	16.0	17.0	75.7	9	黑眉苇莺 Great reed warbler
10	96.3	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	26.3	100.0	100.0	■	16.8	62.1	65.5	62.0	63.2	64.7	16.4	10	挪威鼠 Norway rat
11	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	84.5	100.0	■	13.7	14.3	13.7	13.7	13.7	51.2	11	原鸡 Red jungle fowl
12	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	50.8	100.0	100.0	52.4	100.0	■	72.5	70.9	85.5	86.3	16.4	12	猕猴 Rhesus monkey
13	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	42.4	100.0	100.0	46.1	100.0	34.3	■	77.6	71.6	75.6	16.9	13	绵羊 Sheep
14	99.9	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	48.1	100.0	100.0	52.5	100.0	36.8	26.2	■	72.3	74.0	19.4	14	猪 Pig
15	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	53.0	100.0	100.0	50.2	100.0	16.1	35.6	34.6	■	93.2	17.6	15	人 Human
16	99.2	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	45.5	100.0	100.0	47.6	100.0	15.1	29.5	32.0	7.2	■	19.4	16	黑猩猩 Chimpanzee
17	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	29.4	100.0	76.8	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	■	17	大山雀 Parus major

图 4 五龙鹅 *MHC Class I* 与其他动物氨基酸同源性比较

Fig. 4 Homologous comparison of amino acids sequences of Wulong goose and other species

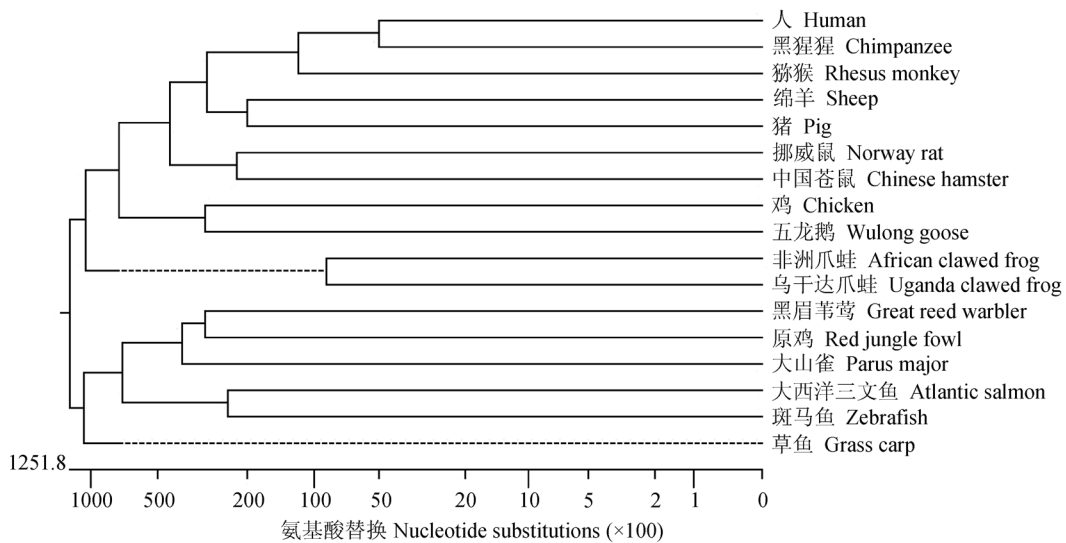


图 5 五龙鹅 *MHC Class I* 氨基酸序列与其他物种进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of Wulong goose and other species

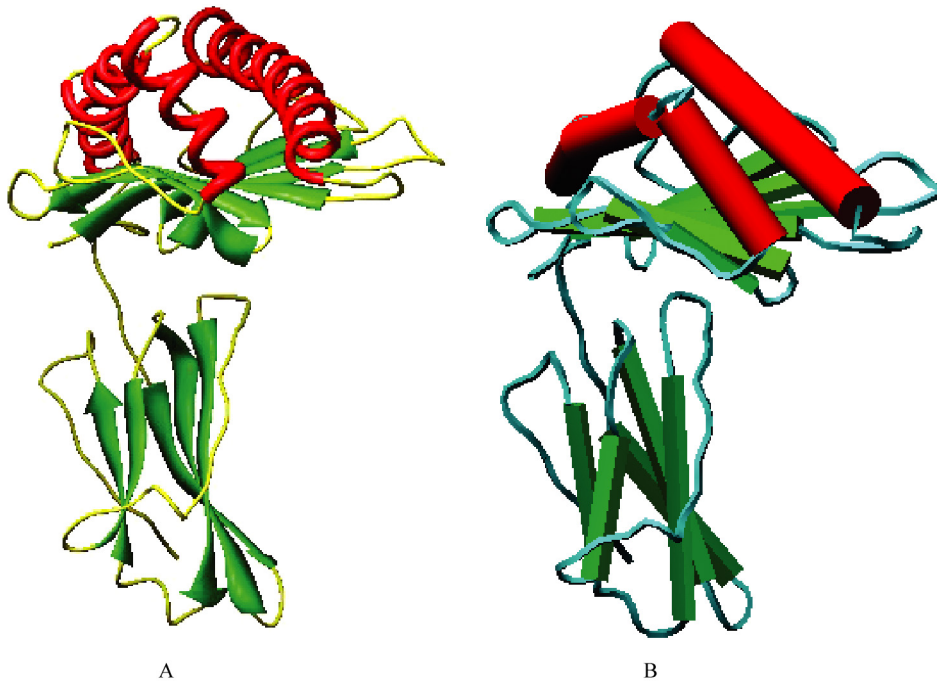


图 6 五龙鹅 *MHC Class I* 分子骨架结构

A: 分子骨架二级结构; B: 主链从氨基末端到羧基末端的空间趋向。

Fig. 6 Backbone structure of Wulong goose *MHC Class I*

A: Secondary structure of backbone; B: Spacial tendency of the main chain form amino-terminal to carboxyl-terminal.

中只有一个基因位座(B-FIV)表达。Kaufman J等^[10]发现基因组中存在相应的酶切位点,这4个基因位座实际上是两个位座(后来命名为B-FI和B-FIV)。因此看来,传统的RFLP方法可以通过产生不同条带为单倍型进行MHC分型,但要获得准确的基因座数往往需要基因组DNA的克隆为其提供理论依据。Kaufman J等^[10]发现鸡的*MHC Class I* DNA内含子5长度为558 bp,是其他内含子的2~7倍,对于形成多态区具有重要意义。在五龙鹅*MHC Class I*基因组DNA中发现了一较大的内含子,即内含子2,其长度为670 bp,是其他几个Class I DNA内含子的3~8倍,这说明禽类的*MHC*在进化过程中对保留一较大内含子呈正筛选。*MHC I*分子进化树分析进一步揭示了同类群在*MHC I*进化中的关系。鸡与鹅同源关系比其他脊椎动物的更近,这说明它们与鸡的进化出现了分化,预示着鸡、鹅和其他脊椎动物之间的免疫系统作用机理存在着差异^[11,12]。

*MHC I*类分子作为免疫递呈的重要分子,主要递呈外源性抗原,它结合TAP加工过的抗原表达于细胞表面,被CD8+T细胞识别,从而启动机体的免

疫反应^[13-15]。因此,*MHC I*类分子/抗原肽/TCR三者之间的关系在免疫反应中具有重要的意义。人的HLA-A2和HLA-AW68分子的三维结构中,与经典I类分子不同功能相关的结构和位点被定位^[16,17]。参照这种模型我们将五龙鹅的推导氨基酸进行 α -螺旋和 β -折叠分区,及功能性位点进行比较。结果显示鹅多态性位点主要分布于 α -螺旋和 β -折叠区,在鹅不同等位基因之间,与抗原多肽结合的37个多态性位点中,有20个无变异,呈单态性。由此推测可能与鹅自身疾病少有关,在较少的疾病选择压力下,有些位点的变异保持了沉默。

4 小 结

分析和测定了五龙鹅*MHC I*基因,并登录到GenBank中,*MHC Class I*的DNA序列和mRNA序列登录号分别为:AM114925和AM114924。运用生物信息学技术对测序结果进行分析显示:基因组DNA由8个外显子和7个内含子组成,与鸡基因序列同源率为60.8%~64.1%,与人的同源率为42.9%。

参 考 文 献 (References):

- [1] WANG Bao-Wei, PAN Qing-Jie, ZHU Xin-Chan, ZHANG Ting-Rong, GE Wen-Hua, LIAN Ai-Ling. Breeding selection and research development of Wulong goose. *Chinese Poultry Science*, 2002, 24(18): 28~32.
王宝维, 潘庆杰, 朱新产, 张廷荣, 葛文华, 廉爱玲. 五龙鹅品种选育与研究进展. *中国家禽*, 2002, 24(18): 28~32.
- [2] Kaufman J, Avila D, Engberg J, Lambris J, Salomonsen J, Welinder K, Skjodt K. Different features of the MHC Class I heterodimer have evolved at different rates. *J Immunol*, 1992, 148(5): 1532~1546.
- [3] Fulton J E, Bacon L D, Hunt H D. Functional analysis of avian class I (BFIV) glycoproteins by epitope tagging and mutagenesis in vitro. *Eur J Immunol*, 1995, 25: 2069~2076.
- [4] Hunt H D, Fulton J E. Analysis of polymorphisms in the major expressed class I locus (B-FIV) of the chicken. *Immunogenetics*, 1998, 47(6): 456~467. [\[DOI\]](#)
- [5] Dunnington D A, Yang N, Siegel P B. Kinetics of antibody responses in hens from chicken lines divergently selected for response to sheep red blood cells. *Poult Sci*, 1999, 78(8): 1081~1084.
- [6] Loudovaris T, Brandon M R, Fahey K J. The major histocompatibility complex and genetic control of antibody response to synthetic antigens in chickens. *Avian Path*, 1990, 19(2): 101~117.
- [7] Yang N, Dunnington D A, Siegel P B. Heterosis following long-term bidirectional selection for mating frequency in male Japanese Quail. *Poult Sci*, 1999, 78(1): 1252~1256.
- [8] Pinard M H, Arendonk J A M, Nieuwland M G B. Divergent selection for immune responsiveness in chickens: estimation of realized heritability with an animal model. *J Anim Sci*, 1992, 70(5): 2986~2993.
- [9] Miller M M, Goto R M, Taylor R L Jr, Zoorob R, Auffray C, Briles R W, Briles W E, Bloom S E. Assignment of Rfp-Y to the chicken major histocompatibility complex/NOR microchromosome and evidence for high-frequency recombination associated with the nucleolar organizer region. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(9): 3958~3962. [\[DOI\]](#)
- [10] Kaufman J, Miller M M, Riegert P, Salomonsen. The chicken class II A gene is located outside of the B complex. *Immunology research*, 1995, 3: 119~127.
- [11] Guillemot F, Pourquie O, Behar G, Chausse A, Zoorob R, Kreibich G, Auffray C. A molecular map of the chicken major histocompatibility complex: the class II b genes are closely linked to the class I genes and the nucleolar organizer. *EMBO J*, 1988, 7(9): 2775~2785.
- [12] HOU Zhuo-Cheng, YANG Ning. 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.
- [13] Kober M, Reith W, Herrero-Sanchez C, Mach B. Two DNA-binding proteins discriminate between the promoters of different members of the major histocompatibility complex class II multigene family. *Mol Cell Biol*, 1990, 10(3): 965~971.
- [14] Lamphear J G, Mollick J A, Reda K B. Residues near the amino and carboxyl termini of staphylococcal enterotoxin E independently mediate TCR V beta-specific interactions. *J Immunol*, 1996, 156(6): 2178~2185.
- [15] Nakamura T, Donovan D M, Hamada K, Sax C M, Norman B, Flanagan J R, Ozato K, Westphal H, Piatigorsky J. Regulation of the mouse A-crystallin gene: isolation of a cDNA encoding a protein that binds to a cis sequence motif shared with the major histocompatibility complex class I gene and other genes. *Mol Cell Biol*, 1990, 10(7): 3700~3708.
- [16] Fulton J E, Thacker E L, Bacon L D, Hunt H D. Functional analysis of avian class I (BFIV) glycoproteins by epitope tagging and mutagenesis in vitro. *Eur J Immunol*, 1995, 25(7): 2069~2076.
- [17] Trowsdale J, Mockridge I, Beck S, Townsend A, Kelly A. Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the ABC superfamily of transporters. *Nature*, 1990, 348(12): 741~744. [\[DOI\]](#)