

文章编号: 1674-5566(2025)01-0094-17

DOI: 10.12024/jsou.20241004653

草鱼抗原加工相关转运蛋白TAP的系统进化及其响应细菌和病毒感染的转录表达分析

雷文晶, 徐 兢, 贾 钊, 柳轶帆, 郭 旭, 王俊亚, 邹 钧

(上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 克隆了草鱼(*Ctenopharyngodon idella*) *TAP1*、*TAP2a*、*TAP2t* 基因, 分析了其在系统进化中的地位, 发现草鱼 *TAP* 基因结构非常保守, 与鲤科鱼类亲缘关系最近。通过对 *TAP* 蛋白的结构预测发现草鱼 *TAP* 蛋白含有多个跨膜区, 并具有 ATP 结合盒式蛋白(ATP-binding cassette transporter, ABC)超家族的典型结构特征。草鱼 *TAP* 基因在脾脏和头肾组织中表达量较高; 感染嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) 72 h 后, *TAP1*、*TAP2a*、*TAP2t* 表达显著上调。植物血凝素(Phytohemagglutinin, PHA)和聚肌苷酸-聚胞苷酸(Polyinosinic-polycytidylic acid)均可诱导草鱼 *TAP1*、*TAP2a*、*TAP2t* 的表达。此外, 分析了细胞因子对 *TAP* 基因表达的影响, 结果显示, 伽马干扰素(IFN- γ)和白介素 1beta(IL-1 β)上调 *TAP1* 和 *TAP2t* 的表达。EPC 细胞在感染鲤春病毒血症病毒(Spring viraemia of carp virus, SVCV) 12、24 和 36 h 后 *TAP1* 的表达量显著升高, *TAP2t* 表达在 12 h 得到上调, 提示 *TAP1* 和 *TAP2t* 参与宿主应答 SVCV 的免疫反应。研究结果为阐明鱼类 MHC I 的抗原呈递机制奠定基础。

关键词: 抗原加工相关转运蛋白 *TAP*; MHC I; 草鱼; 转录表达分析; 细菌; 病毒

中图分类号: S 917 文献标志码: A

MHC (Major histocompatibility complex) I 抗原呈递系统是适应性细胞免疫的重要组成部分, 其通过结合内源性抗原激活 CD8⁺ T 细胞介导的免疫反应, 抗原加工相关转运体 (Transporter associated with antigen processing, TAP) 负责 MHC I 抗原呈递通路的抗原加工, 以 ATP 依赖的方式协助胞质肽装配至 MHC I 分子上呈递给 CD8⁺ T 细胞^[1-2]。TAP 蛋白包含 *TAP1* 和 *TAP2*, 它们为 ABC (ATP-binding cassette transporter) 转运蛋白家族成员。人 TAP 蛋白复合体由 *TAP1* 和 *TAP2* 以非共价键结合的方式形成, *TAP1* 和 *TAP2* 蛋白的跨膜结构域共同组成跨膜通道促使胞质肽选择性进入内质网中^[3]。TAP 蛋白未与被呈递肽结合时两个 ATP 镁分子与其核苷酸结合结构域 (Nucleotide-binding domain, NBD) 结合, 其跨膜结构域 (Transmembrane domain, TMD) 以面向内部的封闭形式存在; 与被呈递肽结合后, 构象

朝外的 TAP 蛋白的多个残基与 β -发夹样构象的被呈递肽结合, 随后 NBD 结构域发生二聚化。当被呈递肽被释放后, ATP 水解, ADP 与 ATP 进行交换, 导致 TAP 构象重置参与下一个短肽的转运^[2]。

TAP 基因的表达受到多种因子的调控。研究表明, 伽马干扰素 (IFN- γ)、poly(I:C)、病毒感染靶向 NLRC5 启动 *TAP* 基因的表达^[4], 此过程需要 *TAP1* 启动区域的 SXY 基序与转录因子 RFX5 结合, 因此, 在 RFX5 未表达的情况下, *TAP* 表达量非常低^[5]。此外, STAT 1 可以与 *TAP1* 启动子区域的伽马干扰素激活位点 (GAS) 结合, 从而完成 IFN- γ 对 *TAP1* 基因的诱导表达, *TAP1* 基因启动子还含有干扰素调节因子 (IRF1) 结合位点, 该位点对于诱导 *TAP1* 的表达具有重要作用^[6]。*TAP2* 启动子的 IRF1/IRF2 结合位点是其唯一的与其他基因共有的调节元件, 该位点对于 IFN- γ 上调

收稿日期: 2024-10-08 修回日期: 2024-11-10

基金项目: 国家自然科学基金(32030112)

作者简介: 雷文晶(2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向为鱼类免疫与病害防控。E-mail: 2512868932@qq.com

通信作者: 邹 钧, E-mail: jzou@shou.edu.cn

版权所有 © 《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

TAP2 的表达具有重要作用^[7]。此外,介于 TAP 在 MHC I 介导的抗原呈递过程中发挥重要的作用,很多病毒会通过靶向 TAP 因子来逃避 CD8⁺ T 细胞的识别。例如,牛痘病毒 CPXV12 通过抑制 TAP 呈递短肽的易位来阻止 MHC I 类/肽复合物的形成从而达到逃避的目的^[8]。

有关鱼类 TAP 基因的研究较少。PINTO 等^[9]从分子、结构和系统发育 3 个方面对鲈鱼 TAP1 和 TAP2 基因进行了分析,发现其基本结构在进化上较为保守。草鱼是我国的四大家鱼之一,年产量 590 万 t。近年来,病害频发给草鱼养殖业造成巨大经济损失,疾病防控面临严峻挑战。在草鱼中, TAP2 基因部分序列被克隆,研究发现 TAP2 基因在草鱼的血液中高量表达^[10]。本研究在草鱼中鉴定了 3 个 TAP 基因,即 TAP1、TAP2a、TAP2t 基因;分析了其在系统进化上的关系;明确了草鱼在感染嗜水气单胞菌(*Aeromonus hydrophila*)和鲤春病毒血症病毒(Spring viraemia of carp virus, SVCV)后 TAP 基因转录表达水平的变化,评估了细胞因子对 TAP 基因表达的影响。本研究结果将有助于阐明 TAP 在抗原呈递及 T 细胞介导的适应性免疫中的作用,为高效疫苗的研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 动物

草鱼(15±2 g)饲养在上海海洋大学听涛河网箱中,在进行感染实验之前转移至室内循环水系统中饲养至少 2 周,水温控制在(28±1) °C,在实验开始前使用 0.1% 的 MS-222(100 mg/L, Sigma-Aldrich, 美国)对草鱼进行麻醉。草鱼实验获得了上海海洋大学实验动物伦理委员会的批准(SHOU-DW-2021-027)。

1.2 基因克隆

通过本地 BLAST 分析,从 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中获得草鱼 TAP1、TAP2a、TAP2t 的部分 cDNA 序列,根据获得的序列设计基因特异性引物,通过 PCR 扩增和测序验证基因顺序;随后使用 HifairTM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (gDNA digester plus)试剂盒(翌圣,中国)进行 cDNA 末端快速扩增(Rapid Amplification of cDNA Ends, RACE PCR),获得 cDNA 5' 端和 3' 端 PCR 产物。将获得的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳回收产物后将其连接到 pMD-19 T 载体

(TaKaRa, 中国)上,随后转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中,阳检后送公司(金唯智,中国,测序仪为 ABI 3730XL)测序获得 5' 和 3' cDNA 序列。最后用 1 对位于 5' 和 3' 非翻译区(UTR)的引物进行 PCR 扩增,获得 TAP 基因全长顺序。

1.3 生物信息学分析

TAP1、TAP2a、TAP2t 基因核苷酸序列从 NCBI 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的 GenBank 数据库中获得。核苷酸和氨基酸序列比对以及蛋白质理化性质分析通过 ExPasy 网站(SIB Swiss Institute of Bioinformatics ExPasy)进行。使用 SMART 网站[SMART: Main page (embl.de)]预测氨基酸结构。通过 NetNGlyc 1.0 server (NetNGlyc 1.0-DTU Health Tech-Bioinformatic Services)和 NetPhos 3.1 server (NetPhos 3.1-DTU Health Tech-Bioinformatic Services)分别进行 N-糖基化位点和磷酸化位点的预测。通过 NCBI 网站检索得到人、鼠、鸡、热带爪蟾、大西洋鲑、青鳉、欧洲海鲈、斑马鱼氨基酸序列,再运用 MEGA X 程序进行多序列比对分析,最后通过 ESPript 3.0 网站[ESPrpt 3 (ibcp.fr)]绘制序列对比图。从 Ensembl(<http://www.ensembl.org/index.html>)数据库中获得基因共线性及基因组结构的数据。利用 MEGA X 程序采用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树,进化树分析重复 1 万次 bootstrap 分值。

1.4 组织表达

取 5 条健康草鱼[(15±2)g]的组织,分别为大脑、头肾、胸腺、后肠、肝、鳃、皮肤、肌肉、脾脏。用 1 mL 的 TRIzol 试剂(Thermo Fisher Scientific)匀浆,提取总 RNA,根据 2×HifairTM II SuperMix plus[翌圣生物科技(上海)股份有限公司]的说明书进行反转录获得 cDNA,通过 qRT-PCR (Quantitative real time PCR)检测 TAP1、TAP2a、TAP2t、MHC I 基因的转录表达。

1.5 嗜水气单胞菌感染草鱼实验

利用嗜水气单胞菌对草鱼进行腹腔注射感染实验。首先使用无抗 LB 培养基(生工,中国)培养嗜水气单胞菌 OD₆₀₀ 的值为 0.6 时^[11],离心弃培养基,将浓度调至 1×10⁷ CFU/mL, PBS 悬浮菌液用于后续注射感染实验。实验组和对照组各 15 尾,实验组每条草鱼腹腔注射 15 μL 嗜水气单胞菌,对照组注射等体积的 PBS。24、48、72 h 后采集 5 条鱼的头肾和脾脏组织,用 1 mL 的 TRIzol

试剂匀浆,提取总 RNA,根据 2×Hifair™ II 通过 qRT-PCR 检测 *TAP1*、*TAP2a*、*TAP2t*、*MHC I* SuperMix plus 的说明书进行反转录获得 cDNA, 基因的转录表达。

表 1 *TAP* 基因全长克隆引物信息
Tab. 1 Primers used for cloning of full-length *TAP* genes

引物名称 Primer name	序列信息 (5' to 3') Sequence information (5' to 3')	应用 Appliance
GcTAP1-3F1	CGAGTTTGTGTGTGACCTCATCTAC	3' RACE
GcTAP1-3F2	TCCATGATGCTGCTCCTCAGAC	3' RACE
GcTAP1-5R1	TCAGCAGTGGCTCGTCGTCGAATAA	5' RACE
GcTAP1-5R2	TGAGGTCACACACAACTCGCACAC	5' RACE
GcTAP1-F	CGGCGACACTAAAACACGTC	验证全长
GcTAP1-R	CGTCTGATTTGTGCTGGCAT	验证全长
GcTAP2a-3F1	GTGGGAATGTCAGGTGGGGGAAGA	3' RACE
GcTAP2a-3F2	AGAGTTATGGAGCAAGGGACGCAC	3' RACE
GcTAP2a-5R1	ACACCAGCCACGAACCAGAGATGAG	5' RACE
GcTAP2a-5R2	TGAACTCCATCCCGTTTGTTTATTT	5' RACE
GcTAP2a-F	TGGGCTATAGCTCGTCTTCG	验证全长
GcTAP2a-R	AACGGTTAGCCAACAAAAAGCA	验证全长
GcTAP2t-3F1	GCAGACTCAACAAGAGAATACGACA	3' RACE
GcTAP2t-3F2	TCCAGGTTTTGAGGCGTAAAGGCAT	3' RACE
GcTAP2t-5R1	TTACAGTCCTGAAGCTCTTTTGATG	5' RACE
GcTAP2t-5R2	GACTAAAGCCTCTCAGGTCCCTGG	5' RACE
GcTAP2t-F	CCTCCGACAAAATGCAACGAG	验证全长
GcTAP2t-R	TGTGTGTCCCATACATCGCC	验证全长
APT	CCAGACTCGTGGCTGATGCA(T) ₁₆	3' RACE 通用引物
APG	CCAGACTCGTGGCTGATGCA(G) ₁₆	5' RACE 通用引物
AP	CCAGACTCGTGGCTGATGCA	RACE 通用引物

1.6 原代头肾白细胞刺激实验

嗜水气单胞菌灭活实验如下:用 PBS 洗涤离心后的嗜水气单胞菌 3 次,用 PBS 进行悬浮并将浓度调整为 1×10^7 CFU/mL,将细菌置于 100°C 水浴中保温 30 min,取 100 μL 的灭活菌液涂板于 LB 琼脂板,置于 28°C 培养箱培养 46~72 h,确保嗜水气单胞菌全部被灭活。

将制备得到的草鱼原代头肾白细胞 (HKL) 转移至 6 孔板 (5×10^6 个细胞/孔) 中。培养基为: 10% FBS、1% Pen、44.5% RPMI 1640、44.5% DEME。细胞在 28°C 、5% CO_2 条件下培养 6 h 后,与灭活的嗜水气单胞菌 (1×10^7 CFU/mL)、poly (I: C) (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、PHA (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)^[12] 孵育 6、12、24 h,对照组细胞与 PBS 孵育。收集贴壁细胞和悬浮液细胞进行基因分析表达。

将 HKL 接种于 6 孔板 (5×10^6 个细胞/孔) 中,在 28°C 、5% CO_2 条件下培养 6 h,用本实验室制

备的草鱼 IL-10 (0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)^[13]、IL-1 β (0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)^[11]、IFN- γ (0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)^[14] 重组蛋白孵育 24 h,对照组细胞用同体积的蛋白缓冲液孵育,收集贴壁细胞和悬浮液细胞进行基因分析表达。

1.7 SVCV 病毒感染

将 EPC 细胞转移至 12 孔细胞培养板中,待细胞生长至 90% 覆盖度时,加入 SVCV 病毒 (3.16×10^6 TCID₅₀/mL) 进行感染,对照组加入同体积 PBS。将对照组和实验组细胞在含 2% FBS、1% 双抗的 DMEM 培养基培养,置于 28°C 、5% CO_2 培养箱中,在 12、24、36 h 收集细胞进行基因表达分析。

1.8 实时荧光定量 PCR

使用 TRIzol 试剂提取总 RNA,使用 PrimeScript™ II 第一链 cDNA 合成试剂盒 (TaKaRa, 日本) 反转录获得 cDNA。qRT-PCR 引物信息见表 2。qRT-PCR 在 Light Cycler® 480 real-time PCR 系统 (Roche, 瑞士) 上运行, qRT-

PCR (10 μL) 反应体系: 5 μL Hieff UNICON® qPCR SYBR Green Master Mix [翌圣生物科技(上海)股份有限公司], 1 μL cDNA 模板, 0.2 μL 正向及反向引物 (20 μmol/L), 3.6 μL 蒸馏水。qRT-PCR 程序: 1 个循环 95 °C 30 s; 40 个循环 95 °C 5 s, 62 °C 30 s, 72 °C 10 s; 1 个循环 95 °C

10 s, 65 °C 60 s, 97 °C 1 s。草鱼组织及细胞的内参管家基因为 *EF1α*, EPC 细胞的内参管家基因为 *β-actin*。通过比较目的基因和管家基因的表达水平, 计算出目的基因的相对表达值。通过比较实验组与相应对照组基因的相对表达量的平均值, 计算表达的差异倍数 (Fold changes)。

表 2 qRT-PCR 基因引物信息
Tab. 2 Information of qRT-PCR primers

引物名称 Primer name	序列信息 (5' to 3') Sequence information (5' to 3')	应用 Appliance
TAP1-qF	ACAGGAGCCAGTTCTGTTCG	qPCR
TAP1-qR	TGCTTCTGACCTCCGAAAC	qPCR
TAP2t-qF	CGTAAAGCCAACGCACACAA	qPCR
TAP2t-qR	CCAGCACTGTCTGATCCGTT	qPCR
GcTAP2a-qF	CTGTCCTGGAAACTCACGCT	qPCR
GcTAP2a-qR	AGACGGCCCTCACTGTATCT	qPCR
EPCTAP2a-qF	TGCTAAACTCTGTGGGAGCG	qPCR
EPCTAP2a-qR	TCATCTGACCCGGCTTCAAC	qPCR
EF-1α-F	CAGCACAAACATGGGCTGGTTC	qPCR
EF-1α-R	ACGGGTACAGTTCCAATACCTCCA	qPCR
β-actin-F	CTCCATTGAACTGCTGAAAGATG	qPCR
β-actin-R	CAAATAACTGTCTTCATTTCGCTCAT	qPCR

1.9 统计学分析

采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 对 qRT-PCR 数据进行分析, 并在 SPSS 软件包 20.0 中进行最小显著差异 (Least significant difference, LSD) *T* 检验。**P*<0.05 或 ***P*<0.01 表示具有显著性差异。

2 结果

2.1 草鱼 TAP 基因序列分析

本研究获得了 *TAP1*, *TAP2a*, *TAP2t* 基因的 cDNA 全长序列。*TAP1* 基因 cDNA 序列全长为 2 802 bp (图 1a), 其中 5' 和 3' 非编码区 (UTR) 为 192 bp 和 417 bp, 编码区 (CDS) 为 2 193 bp, 编码 730 个氨基酸, NCBI 登录号为 PQ306473, NetNGlyc 1.0 server 网站预测该蛋白链含有 1 个 N-糖基化位点, 用 ExPasy 网站工具预测的分子量大小为 81 354.84 u, 等电点 (pI) 为 6.02, *TAP1* 为疏水性蛋白, 平均疏水性为 0.065; *TAP2a* 基因 cDNA 全长为 2 795 bp (图 1b), 5' 和 3' UTR 为 108 bp 和 506 bp, CDS 区为 2 181 bp, 编码 726 个氨基酸, NCBI 登录号为 PQ306474, 含有 5 个 N-糖基化位点, 分子量大小为 81 705.92 u, pI 为

8.94, *TAP2a* 为亲水性蛋白, 平均亲水性为 -0.040; *TAP2t* 基因 cDNA 全长为 2 702 bp (图 1c), 5' 和 3' UTR 分别为 56 bp 和 465 bp, CDS 区为 2 181 bp, 编码 726 个氨基酸, NCBI 登录号为 PQ306475, 含有 1 个 N-糖基化位点, 分子量大小为 81 659.29 u, 等电点为 8.90, *TAP2t* 是疏水性蛋白, 平均疏水性为 0.064。

2.2 草鱼 TAP 基因结构域及同源性分析

通过 SMART 网站 [SMART: Main page (embl.de)] 对 TAP 蛋白结构进行预测, 发现 *TAP1*、*TAP2a*、*TAP2t* 均含有由 6 个跨膜螺旋组成的 ABC 转运蛋白跨膜区 (ABC transporter transmembrane region, ABC_membrane) 和 AAA 结构域, 其中 *TAP1* 和 *TAP2t* 蛋白含有 4 个跨膜区。*TAP1* 蛋白的 4 个跨膜区在 7 aa 至 122 aa 的区域, ABC 转运蛋白跨膜区为 160 aa 至 431 aa, 在 503 aa 至 697 aa 是 AAA 结构域 (图 2a), 该结构域参与膜融合、蛋白水解和 DNA 复制的细胞过程^[15]。*TAP2a* 在 35 aa 至 57 aa 的区段含有 1 个跨膜区, 159 aa 至 426 aa 的区段为 ABC 转运蛋白跨膜区, 502 aa 至 687 aa 区段为 AAA 结构域 (图 2b)。*TAP2t* 蛋白在 12 aa 至 129 aa 区段含有 4 个

跨膜区, 165 aa至436 aa区段为ABC转运蛋白跨膜区, 508 aa至693 aa区段为AAA结构域(图2c)。序列比对分析显示, 草鱼TAP1蛋白与人、鼠、鸡、热带爪蟾、大西洋鲑、青鳉、斑马鱼、欧洲海鲈TAP1蛋白的平均相似性为70.91%(图3a), TAP2a为73.58%(图3b), TAP2t为72.89%(图3b), 草鱼TAP2a蛋白与TAP2b蛋白的平均相似性为82.79%。TAP蛋白的ABC转运蛋白跨膜区保守性较高, 与人、鼠、鸡、热带爪蟾、大西洋鲑、青鳉、欧洲海鲈、斑马鱼相比较, TAP1的ABC转运蛋白跨膜区平均相似性为78.10%, TAP2a平均相似性为73.00%, TAP2t平均相似性为77.12%。

本研究通过比对基因组和cDNA顺序明确了TAP基因的外显子和内含子组成。外显子长度比较分析发现, 草鱼TAP1基因第1个和第2个外显子长度之和与人TAP2基因、鼠TAP基因及草鱼TAP2基因的第1个外显子长度大致相当; 草鱼TAP1基因第3个外显子至第11个外显子长度与人、鼠、草鱼TAP2基因第2个外显子至第10个对应的外显子长度完全一致(图4)。基因共线性分析结果显示, 人和鼠TAP1和TAP2基因处于同一染色体位点上, 分别位于6号(人)和17号(鼠)染色体上。而草鱼和斑马鱼TAP1、TAP2和TAP2t基因位于不同染色体上, 分别位于16号(TAP1)、19号(TAP2)和12号(TAP2t)染色体上, 草鱼和斑马鱼TAP2与人及鼠TAP1/TAP2的基因共线性保守度高, 人和鼠TAP1/TAP2基因组位点的PSMB8、PSMB9和BRD2基因在草鱼和斑马鱼中同样与TAP2连锁。

为了探究TAP的系统进化, 本研究采用Neighbor-Joining法构建了TAP蛋白质的进化树。如图5所示, TAP1和TAP2各自聚为独立的分支, 在TAP2分支中, 硬骨鱼类TAP2a和TAP2t进一步分为独立的两个分支, 提示TAP2a和TAP2t由同一祖先进化而来。

2.3 TAP基因在草鱼各组织中的表达分析

因为TAP因子在MHC I通路中位于MHC I因子的上游, 所以在后续的研究中, 分析了TAP和MHC I基因的转录表达, 从而探究TAP与MHC I之间的调控关系。本研究通过qRT-PCR分析了TAP1、TAP2a、TAP2t、MHC I基因在健康草鱼9个组织中的表达情况(图6)。结果显示, TAP1、TAP2a、TAP2t和MHC I基因在大脑、鳃、

头肾、后肠、肝脏、肌肉、皮肤、脾脏、胸腺均有表达。与3个TAP基因相比, MHC I在各组织中的表达量最高, 而TAP1和TAP2t在各组织中的表达量高于TAP2a, 此外, TAP1在大脑、鳃、头肾、后肠、皮肤、脾脏、胸腺组织中表达量高于TAP2t; 在免疫组织头肾和脾中TAP1、TAP2a、TAP2t的表达量较高, 因此, 这两个组织被选为后续研究。

2.4 感染嗜水气单胞菌后TAP基因的表达变化

嗜水气单胞菌导致草鱼败血症的发生, 本研究对草鱼进行腹腔注射嗜水气单胞菌, 分析了嗜水气单胞菌感染对TAP1、TAP2a和TAP2t转录表达的影响。在草鱼脾脏组织中, TAP1和TAP2a表达水平在注射嗜水气单胞菌24和72 h后显著上调, TAP2t和MHC I的表达水平在24、48和72 h时也有显著上调(图7)。在草鱼头肾组织中, TAP2a表达水平在注射嗜水气单胞菌48、72 h时显著升高, TAP1、TAP2t和MHC I的表达水平在24、48和72 h时均显著升高(图7)。

用灭活嗜水气单胞菌(1×10^7 CFU/mL)刺激草鱼原代头肾细胞6、12、24 h, 对TAP1、TAP2a、TAP2t、MHC I的表达进行定量分析(图8)。灭活嗜水气单胞菌能够显著诱导TAP1(12和24 h)、TAP2a(12 h)、TAP2t(24 h)、MHC I(6 h)的表达。

2.5 poly(I:C)、PHA刺激草鱼原代头肾细胞TAP基因的表达变化

poly(I:C)和PHA为常用病原相关分子模式(PAMP)。本研究用80 μ g/mL的poly(I:C)和20 μ g/mL的PHA分别刺激草鱼原代头肾细胞, 分析了刺激6、12、24 h后TAP1、TAP2t、TAP2a、MHC I的转录表达水平。结果发现(图9), poly(I:C)在24 h时显著上调TAP1的表达, 但在6和12 h对TAP1的表达没有影响; TAP2a在6 h时被显著上调, 随后下降, 在24 h时被显著抑制; 与之相比, TAP2t在poly(I:C)刺激24 h后显著升高, 在6和12 h时被下调; MHC I的表达在poly(I:C)刺激6和12 h时没有变化, 在24 h时显著升高。PHA对TAP1和TAP2t基因的上调效果显著(图9), 在12 h时上调TAP2a表达, 而在24 h时下调TAP2a表达; MHC I的表达在PHA处理后无显著变化。

```

1 actttcgggttcagatttaaaccttataatggaggttcaactcaacagattctcatcgctc 397
61 ttgtttagttactgattttaaactataacatataaataatgtggcgccgacacataaaa 1441
121 caectgcatcttgacatttcaaacagtttcaagtagtactctcaagtagtttggttg 417
181 gcagtcgcaagaaATGAAAGTAAGATGGCTGTCTCTGTTCGCCCTGTGGCATTTGGC 1501
M K D K M A V P L F A L L A L C
241 GTGGAGCGTGTTCAGATGATGTTTCATCGGTCCATCCAGCTGTCCCTCATCAGTAACGCC 1561
17 V D V F A V M F I G A I Q L S L I S N A 1567
301 TTCATCATGCTGGGGTGGACTGGTCCGAATCATCTCTCTCTCGTTCCTCCTC 1571
37 F I M L W A G G L V R I I L L L F V S F 1577
361 GCCTACTCCGCGAGCCCGGGTGGATGAGAGGATTCGAGGGGTGCAGACGGCTGATG 1581
57 A Y S G S P A W M R G F E G V Q T A V A 1597
421 CACGGTCTCTCTATCCGGGTATATCTCTCTCTCTGGGCTTGGCAAGCTACTGTG 1741
77 H G L L Y P V Y I S F L W A C G K S T Y 1757
481 GAGCTGGTGTGGGGTGGCAACCTGGCAAGGGCTCTGCAAGGGTATTTGGTGTGGCT 1801
97 E L V W G W H T W Q G L L Q G Y L V L A 1807
541 ATGTCTGTGGTGGGAAAGCCATATACCCACTATCCTCCGACGCCAAAAGCAG 1861
117 M S L L V W K R H I P T I L P T A K K Q 1867
601 AAAACAGAGCAGAAGGGCAAGGCTTCCGTCGAAGGGCTGGGATACATGAAGCAATC 1921
137 K T E Q K G K A S L Q R R L L G Y M K P F 1927
661 AGTGAGCGCTTTCAGCGCTTCTCTCTTGTGGTATATCTCTCTAGTGAATGGGG 1981
157 S G R F A A V F F F V V I S S L L G E M A 1987
721 ATTCTCATACACTGTAATAACGACAGCTGGATCATGAATGAAGTGAACCTGAGGCC 1997
177 I P H Y T G K M I D W I M N E D E P E A 2041
781 TTTAACCTGCTATCAGTGTATGACCTGATGACCATATGAGCGCGTGTGGAGTTT 2101
197 F N H A I T V M T L M T I M S A V C E F 2107
841 GTGTGTGACCTCATTCGAACATCACCATGAGCGCAATACACAGTCCATCCAAGCGCTC 2161
217 V C D L I Y N I T M S R I H T S I Q A L 2167
901 GTCITTCAGTGTGGTGAACAGCACATTTGGTTCGTGATAATCTCCACAGCGCAC 2221
237 V F Q S V L K Q D I A F F D K S S T G D 2227
961 ATGATATTCGGTACACCCAGCAACCAACCATGAGTCTCTGAGTGAAGAGTGG 2281
257 I V S R I T I D T N T M S E S L S E K L 2287
1021 AGCCTGCTATGGTACTCATCGCGTCTCTCTCTGCTGGCTCATGATGCTGCTC 2341
277 S L L M W Y F M R V I F L F G S M M L L 2347
1081 TCCCTCAGACTGTCATCTTCCCGACTCGGCTCCCATCTGGATCATCCAGAG 2377
297 S L R L S I F T A L G L P I I W I I P E 2383
1141 TTTTCGCGCGTTCACCGAAACTTTCTGTGCAAGTCAAGAACTCTGCGCAAGGCC 2401
317 F S G R F Y Q K L S V Q V Q E S L A K A 2407
1201 AATGATGTGCAACGGAAAGCTTCTCTTCCATGAAGACAGTCCGAGCTTGTCAACGAG 2411
337 N D V A T E T F S S M K T V R S F A N E 2417
1261 GACGGAGAAACCGAGAGTACAAGAGTCTAGAGGGCAGTACGCCCTGAACAAAGTG 2461
357 D G E T E R Y K K C L E G T V A L N K V 2467
1321 GAAGCGTGTCTACCGTCCCTCAACCTGGACCAATAGTATGTCAGTCTGGCTTGA 2521
377 E A V A T A A S T W T N S M S S L A L K 2527
1481 GTCAGTACTATACATGGAGGACGGCTGTGACAGGAAGTATGTCAGTACGGCTGAT

```

(a)

```

1 aggaaatgcaatttgaagaaacctaccatgggctatagctcgtcttcgataaagacac 405
61 aatctctcttcttatttagctatttgtgctagaataaacaacagcATGAGTTCAAA 1381
M E F K
121 ATGCATCATGTAAGCGCTGTCTGGTACCTGGCGATAAGCTGTGCTACATTACAGC 1441
5 M H H A K I L D M L V D L A I S C V L H Y S 1447
181 ACAAGTACATGTTAAGAATAACAGCAGTGTATTTCTCTGTCTCATCTCTGGTTCGTG 1501
25 T S T L L K K S S V F L L S H L W F V 1507
241 GCTGATGTGAAGTGGTAACTCAGGTGTTTCTGTAAGCAGTGGAAAGATGTGGCC 1561
45 A G V K W V S L R C F L L S S W K D V S 1567
301 GTGCGCGTGTGTGGCGGTGACATGCTGTGATGTGCGGTTTATGAAGCGTACTGTGG 1621
65 V R R C V A V T C L M C P V T E S V L S 1627
361 CTCTCTTGAACACTAGCCGGAGTACTGGAGCGGCTTGTGCTTGGCCCTGGAAACT 1681
85 L L L N Y T Q P E V W S G L S C P G K T 1687
421 ATTACTCTACAGTCAACACTATAGCGGTTTGTCTGGGAAGTAACTTTCCCGAC 1741
105 I T S T A A L I A C L F W E V S F P D 1747
481 ACAAAAAGGAAAGCGAAAGTTCAGAATGGGGAGGACGAAACAGTGAAGAAACCGGCGCT 1801
125 T K R K A E S S E C A E T K Q R N R A L 1807
541 TTCATGCGAGTGGTCCGTTATTCGAAGCCGACGCCCTTACTGAGTGGAGCTTTTGG 1861
145 F M R V V R Y S K P D A P L L S G A F V 1867
601 TTTCTTCACTGCTCATATGTGACATGTGCATCCATATTACCGGAAAGGTCATA 1921
165 F L S L A V I C D M C I P Y Y T G K V I 1927
661 GACATCTGGGAGAACATTAACCAACCAACAGCTTCACTGACCAATCTTCTCATGGGT 1981
185 D I L G E H Y Q P N S F M S A I F L M G 1987
721 CTCTCTCACTGGCAGCTCTTGTCTCTGGTTCGGTGGAGGTCTCTCATGTCAGCT 2041
205 L L S L G S L S G L R G G L F M C T 2047
781 CTGTCCAGACTGAACAGAGAGTTCGTCTTATGCTCTTAACTTCTTGGTCAATCAGGAG 2101
225 L S R L N K R V R L M L F N S L V N Q E 2107
841 ATAGGATTTTGGAGTAAAAGCAGGGACTTGACATCAGCTGTCTGTGCGACCC 2161
245 I G F F E D K K T G D L S R L S V D T 2167
901 AAGCTAATGAGCAATCAGTGGCAATGAACGTGAACCTCTCCCGCAGCTTAATCAAG 2221
265 K L M S Q S V A M N V I L L R S L I K 2227
961 AGTGTGGCGTCTGTATCTGATGGTCAAGCTGTCTGGAACTCAGCTGTCTCTCTT 2281
285 S V G V L Y L M V R L S W K L T L V T F 2287
1021 ATCGAAGTCTCTGATTCGCACTCACTCAAAAGTCTACAACACACTATGAGCAATTA 2341
305 I E A P L I A I T Q K I Y N T H Y E Q L 2347
1081 TCAAAAAGATTTCAAGACTCGGTAGCCAGAGCCAATGAGACAGCAGGAGAACCGTCC 2401
325 S K E V Q D S V A R A E T A G E A V A 2407
1141 GGGGTGAGGACTGTACCGAGTTCCGCAATGAATCTAGTGAAGCTGTGTTATGAGCAG 2461
345 G R T V R S F R M E S E A C R Y D 2467
1201 CGTTTGAAGACTCACAACCTGAAGACTGGAAGAGATACAGTGAAGCGCTCACTA 2521
365 R T D H N L K T R R D T V R A V Y L 2527
1261 TTAGTGGCAGCGCTGATGCTGTAGGAATCAAGTCTGATGATGATTAATGGTGTGAG 2581
385 L V R R L M S L G I Q V L M M Y Y G R Q 2587
1321 CTCATCAATTAGCTGATGATGAGGCAACCTGTGCTCTCATCTCAGGCTGAT

```

(b)

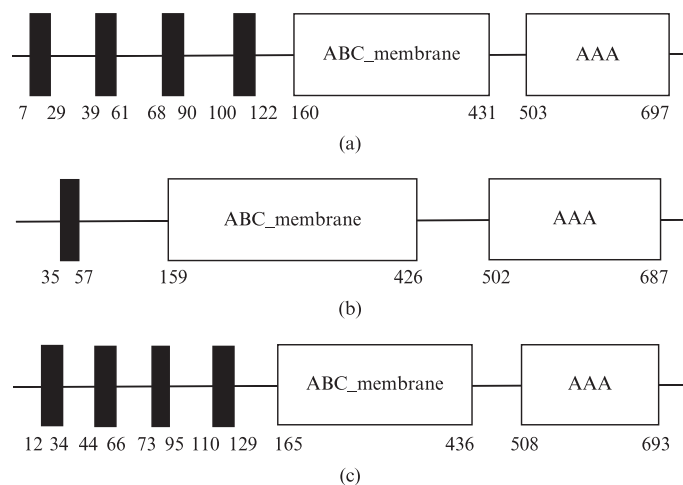
```

1      ttgaaaceaaaacttatactccgacaaaatgcaacgagaaacaaatgttttaaATGATC 1323
63     TCAAAGGGTACCCCATACCCAGAGCTGCAGCAGAACATTCTGTGTGTGTGCTGTGAT 423
1383  S K A Y P I P R A A A E H F C V L C C D
443   CTGTGATCTGGGCTCTGTGGATAGACTGTGGCTGGATGGAGGGCAGCTCG
1443  L V I W A S V W I A L L W L D G E G S L
463   GATCTATGGTCCCTGGGCTCTCAGGATCATCAGCTGATTTGCTTATTAGTAATC
1503  D L W C L W A L R I I S C I V L Y S V I
483   ACACTTGTCTGCACAGCAGCATCAACCCCTCTGAAGGATGGGTAGCCCTACTGTGC
1563  T L V S D S S I Q P L L K R W V A L L C
543   TTCTTACCTCAGTGTGTGACAGCATCAGACATTGTGCCAGGGACGTGAGAGGCTTT
1623  F L P P V F D S I Q T L L P G V R G F
563   AGTCTGTCTCCTGATCTGGCATGGTGTCTGAGCACTGCTACTCTCATATAT
1683  S P V P D P G M V I L S T A T S T L I Y
583   ATGGTGGGAGTGGCTTCCACACGGTGGATCATCAAGGTTCCAGAAACAGAGAAA
1743  M V W E L A F P H G G S S K G S R N Q K
603   AAAGATGAAGAGCTAGAGCACTCTAATGAGGCTACCGCTACTCCAGGCCAGACTAT
1803  K D E E A R L L M R V I R Y S R P D Y
623   CTTTCATAGGGCTGCTTCTCTCTCAGCCTGGGGGCTTTTGGAGCATTCATC
1863  L H L G A A F L F L S L A A L F E T F I
643   CCATACGATGGGAAAGTATTGACTTACTGAGTGAAGTACCAGAGAACACTTTC
1923  P Y C I G K V I D L L S G K Q Q Q N F
663   TTATGGCCATGGACTATGGGCTGTGTTCACTTGAAGTCTGTGTTCACTGGTCTG
203   L W A I G L M A L C S L G S S V F T G L
723   CGCGTGGGATGTTGATGTAGCTCAGCAGACTCAACAGAGAAATACGACATGTTG
223  R G G M F M C S L S R L N K R I R H M L
783   TTCCAGAACCTCATGAAGCAGAGATAAGCTTCTTGAAGAAAATAAACAGGTAGTCTC
243  F Q N L M K Q E I S F F E E N K P G S L
843   ACATCAGTTTGTATCTGCACCTGATAAAATGGGACGTTCTGTGGCCATGAATGTGAAC
263  S S R L I S D T D K M G R S V A M N V N
903   GTGTTACTGGGAGGCTGGTGAAGACATGGCGCATGCTGTTCTCATGCTGGCGCTGCC
283  V L L R S L V K T C G M L F F M L R L S
963   TGGCAGTTAACCTCCTCACCTGCATGAAATGCCGCTTCTTGTCTTATCAGAATCA
303  W Q L L L L C I E M P L L A F I Q N S
1023  TACAACAACATCTCCAGAAAACATCAAAAGAGCTTCAGGACTGTAATGGGAGACTACA
323  Y N I S Q K I S K E L Q D C N A E I I
1083  GAGTGGCATCTCAGTCATTGGGTGATTAAGACTGTGGCAGTTTAAAGCAGAGCGA
343  E L A S S V I G S I K I V R S F K A E R
1143  CAGGAACAGCAGCATGAACAGACTCTCAACAGGAAGCTCCAGGTTTGGAGCGTAAA
363  Q E Q Q R E Q Q L N R K L Q V L R R K
1203  GGCATCTACAGTCAATCTCTTAATACGAGGTTCAATTAGAGTGGGCTGAAAGTA
383  G I S A I H L L I R R F I V G L K V
1263  GCAATGCTTCCAAGCGAAATCTCATCTGTGGCCAGCTTAGCAGTGGCAGCCTT
403  A M L F Q G R N L I S S G Q L S S G S L

```

(a)图为 *TAP1* 基因序列;(b)图为 *TAP2a* 基因序列;(c)图为 *TAP2t* 基因序列。矩形表示起始翻译密码子和终止密码子,椭圆形表示预测的磷酸化位点,菱形表示预测的N-糖基化位点。
 Figure a shows the sequence of *TAP1* gene; Figure b shows the sequence of *TAP2a* gene; and Figure c shows the sequence of *TAP2t* gene. Rectangles indicate translation initiation and stop codons; ovals and diamonds indicate predicted phosphorylation sites and N-glycosylation sites, respectively.

图1 草鱼 *TAP1*、*TAP2a*、*TAP2t* 核苷酸和氨基酸顺序
 Fig. 1 Nucleotide and amino acid sequences of *TAP1*、*TAP2a*、*TAP2t* cDNA



(a)图为 *TAP1* 蛋白;(b)图为 *TAP2a* 蛋白;(c)图为 *TAP2t* 蛋白。黑色矩形为跨膜区,数字为氨基酸序列位置,白框为结构域,其名称在框中用文字标出。
 Figure a shows the *TAP1* protein; Figure b shows the *TAP2a* protein and Figure c shows the *TAP2t* protein. The black rectangles represent transmembrane regions, the numbers indicate the positions of amino acid sequence, and white boxes represent structural domains which are indicated with abbreviations in the boxes.

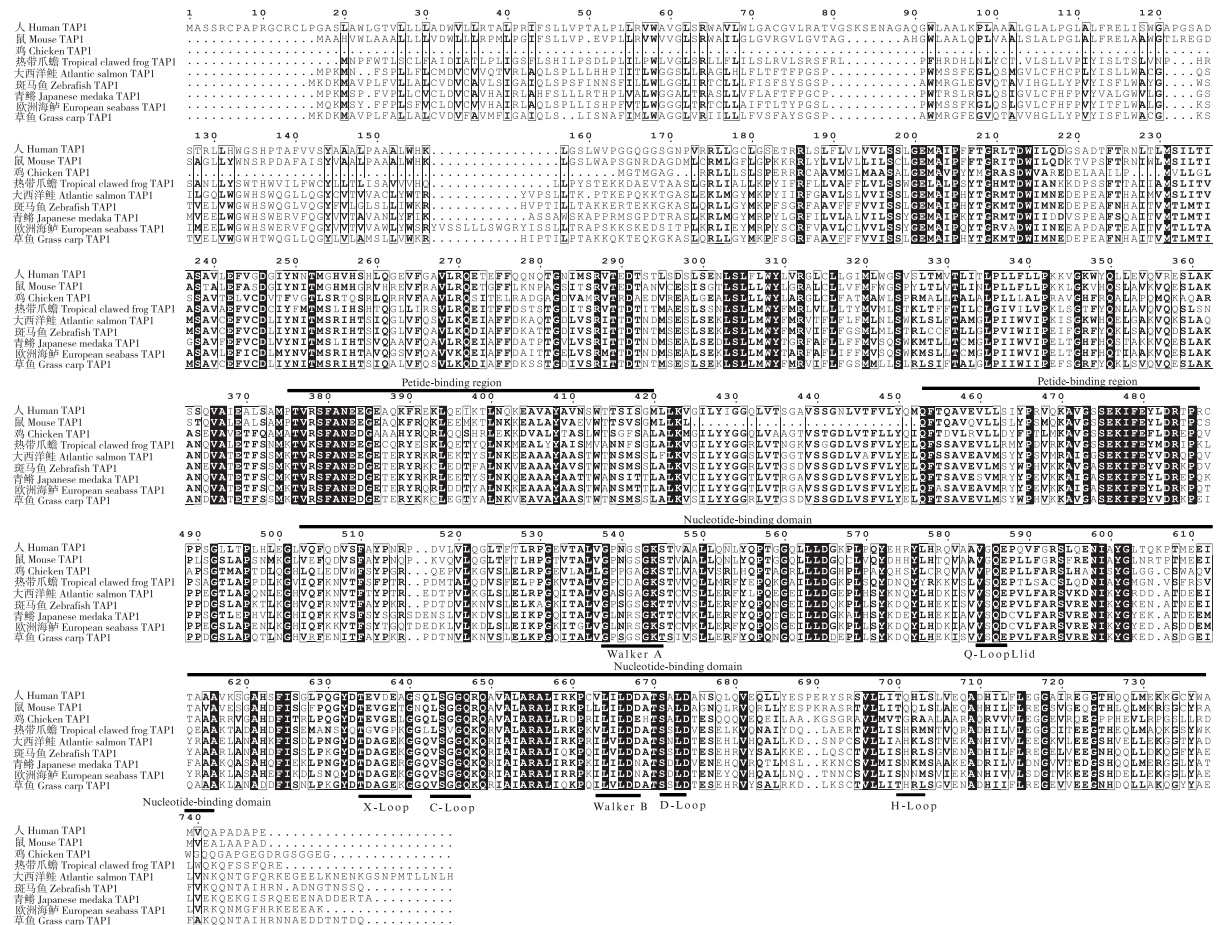
图2 TAP 蛋白结构预测
 Fig. 2 Domain prediction of TAP proteins

2.6 细胞因子对原代头肾细胞 TAP 表达的影响

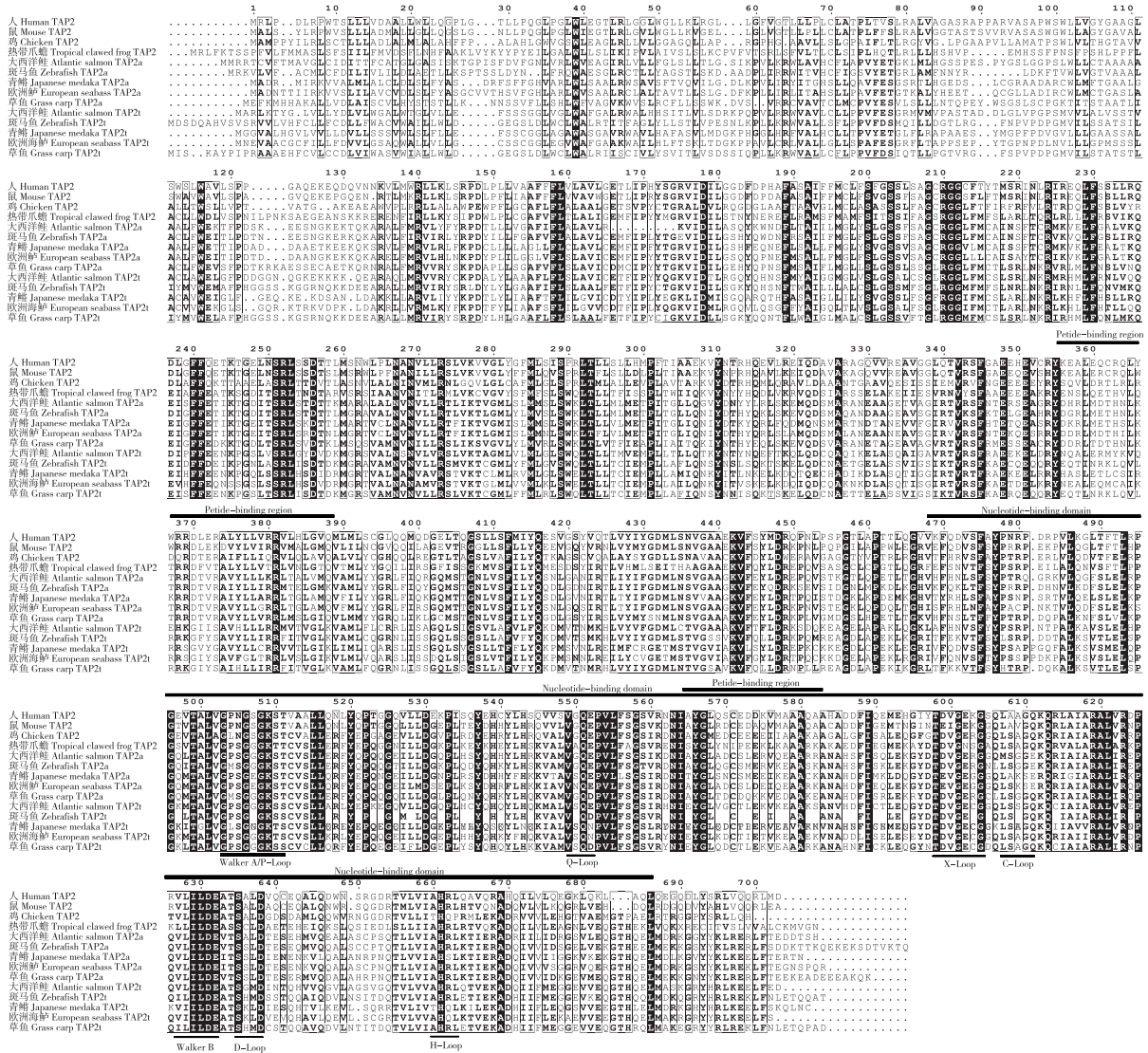
本研究分析了抑炎症细胞因子(IL-10)、促炎症细胞因子(IL-1β)和干扰素(IFN-γ)对 TAP 表达的影响(图 10)。用细胞因子 IL-10、IL-1β、IFN-γ 分别刺激草鱼原代头肾细胞 24 h, IL-10 上调 TAP1 和 MHC I 的转录表达,但对 TAP2a、TAP2t 没有影响;IL-1β 可显著诱导 TAP1、TAP2t、TAP2a、MHC I 的转录表达; IFN-γ 则上调 TAP1、TAP2t、MHC I 的表达,但不影响 TAP2a 的表达。

2.7 鲤春病毒血症病毒对 TAP 的表达分析

SVCV 是鲤春病毒血症的病原,致病力强,感染宿主广泛,对鲤科养殖鱼类危害大。本研究用 SVCV (3.16 × 10⁶ TCID₅₀/mL) 感染 EPC 细胞,在 12、24 和 36 h 时检测了 TAP1、TAP2a、TAP2t、MHC I 的表达。结果显示(图 11),SVCV 显著诱导 TAP1 和 MHC I 的表达,而 TAP2t 表达在 12 h 时显著升高,在 24 和 36 h 受到抑制,TAP2a 在 EPC 细胞中的表达量极低,刺激前后均无法被检测到。



(a)

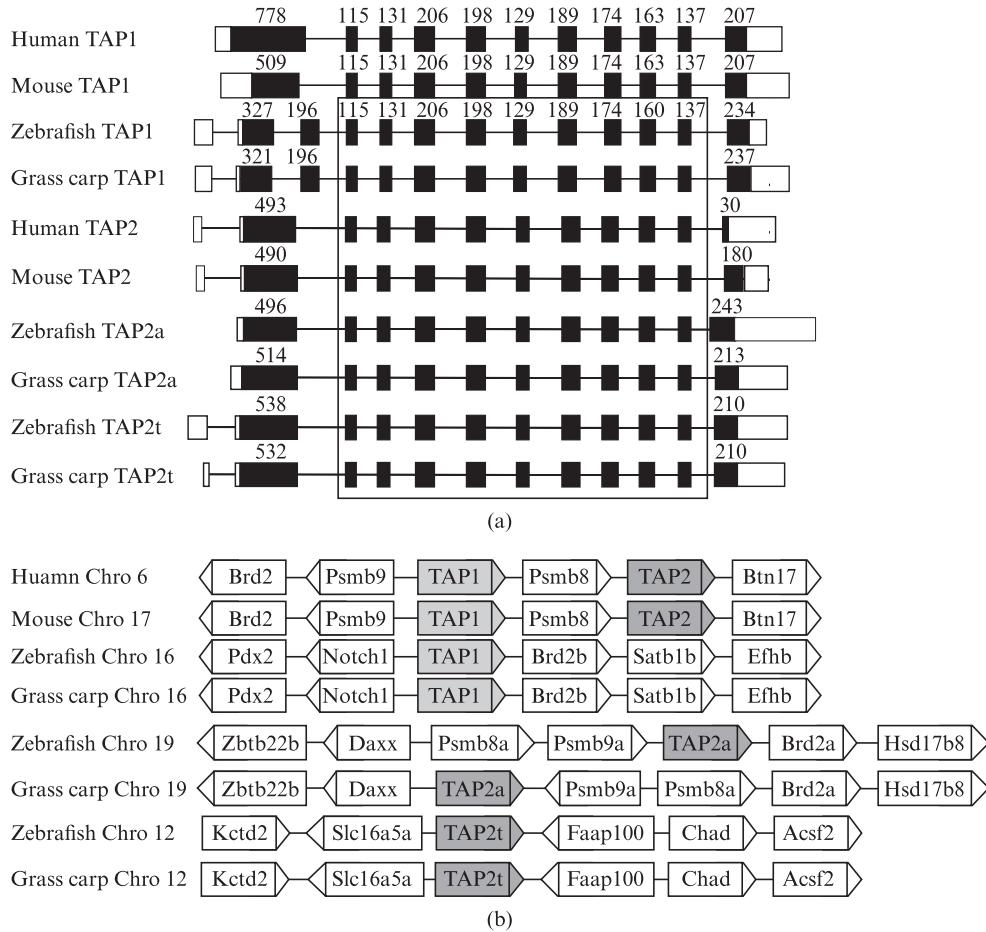


(a)图为草鱼TAP1蛋白序列与人、鼠、鸡、热带爪蟾、大西洋鲑、青鳉、斑马鱼、欧洲海鲈的对比;(b)图为草鱼TAP2a和TAP2t蛋白序列与人、鼠、鸡、热带爪蟾、大西洋鲑、青鳉、斑马鱼、欧洲海鲈的对比。大于70%同源性的多肽用阴影标记,NBD结构域、Peptide binding region、Q-loop、X-loop、C-loop、D-loop、H-loop、Walker A和B基序用横线标出。

Figure a shows the sequence comparison of grass carp TAP1 protein with homologs from humans, mice, chicken, tropical clawed frog, Atlantic salmon, medaka, zebrafish, and European seabass; and Figure b shows the sequence comparison of grass carp TAP2a and TAP2t proteins with homologs from humans, mice, chicken, tropical clawed frog, Atlantic salmon, medaka, zebrafish, and European seabass. Peptides with more than 70% homology are shaded; NBD peptide binding region, Q-loop, X-loop, C-loop, D-loop, H-loop, Walker A and B motifs are indicated by horizontal lines.

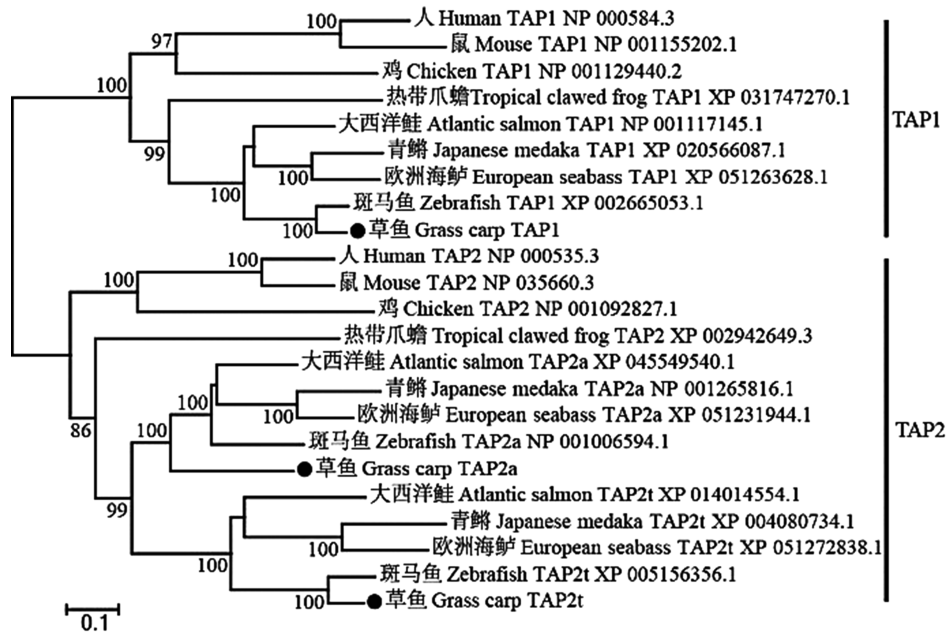
图3 TAP氨基酸多序列比对

Fig. 3 Multiple sequence alignment of amino acids of TAP proteins



(a)图为草鱼、人、鼠、斑马鱼 TAP 基因结构;黑框代表 CDS 区外显子,白框代表非编码区外显子,横线代表内含子,矩形区域对应外显子长度一致,数字为外显子长度(bp);(b)图为草鱼、人、鼠、斑马鱼 TAP 基因共线性,箭头指示转录方向。
 Figure a shows the structure of TAP genes from grass carp, humans, mice and zebrafish; Black boxes represent exons in the CDS region, white boxes represent exons in the non-coding region, horizontal lines represent introns, rectangular regions correspond to the same length of exons, and the numbers are the length of exons (bp); Figure b shows the synteny of TAP genes from grass carp, humans, mice and zebrafish. Arrows indicate the direction of transcription.

图 4 TAP 基因结构和共线性
 Fig. 4 Genomic structures and synteny of TAP genes

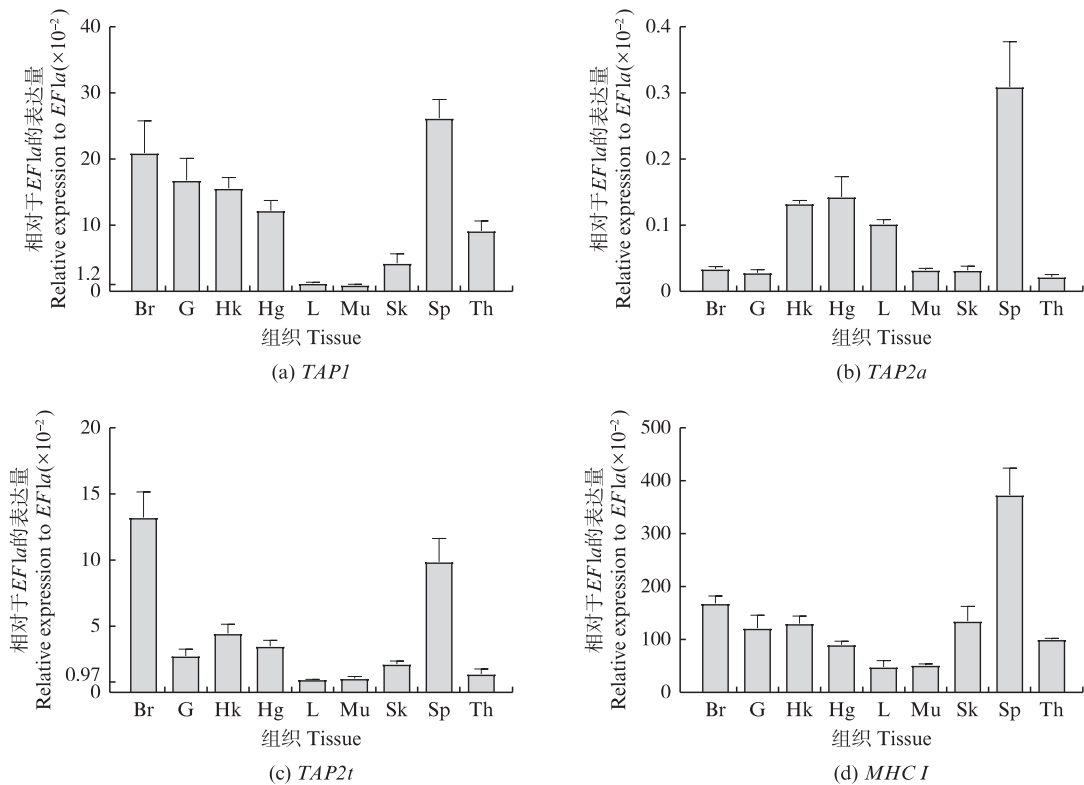


黑色圆点标注的为本次基因克隆获得的草鱼 TAP1, TAP2a 和 TAP2t 蛋白质序列, 进化树采用 MEGA X 程序中的 Neighbor-Joining 方法构建, 并重复 1 万次获得 bootstrap 百分值, 节点数值为 bootstrap 百分值。

The black dots indicate grass carp TAP1, TAP2a and TAP2t. The phylogenetic tree were constructed using the Neighbor-Joining method in the MEGA X program and repeated 10 000 times to obtain the bootstrap percentage scores.

图 5 TAP 系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of TAP proteins



Br. 脑; G. 鳃; Hk. 头肾; Hg. 后肠; L. 肝; Mu. 肌肉; Sk. 皮肤; Sp. 脾脏; Th. 胸腺。TAP1、TAP2t、TAP2a、MHC I 基因表达水平归一化, 与 EF1a 基因表达水平一致。数据显示 Mean+ SEM (n=3)。

Br. brain; G. gills; Hk. head kidney; Hg. hindgut; L. liver; Mu. muscle; Sk. skin; Sp. spleen; Th. thymus. The gene expression levels of TAP1, TAP2t, TAP2a, and MHC I are normalized to that of EF1a gene. Data are shown as Mean + SEM (n=3).

图 6 TAP 和 MHC I 基因在健康草鱼组织中的表达分析

Fig. 6 Expression analysis of TAP and MHC I genes in tissues of healthy grass carp

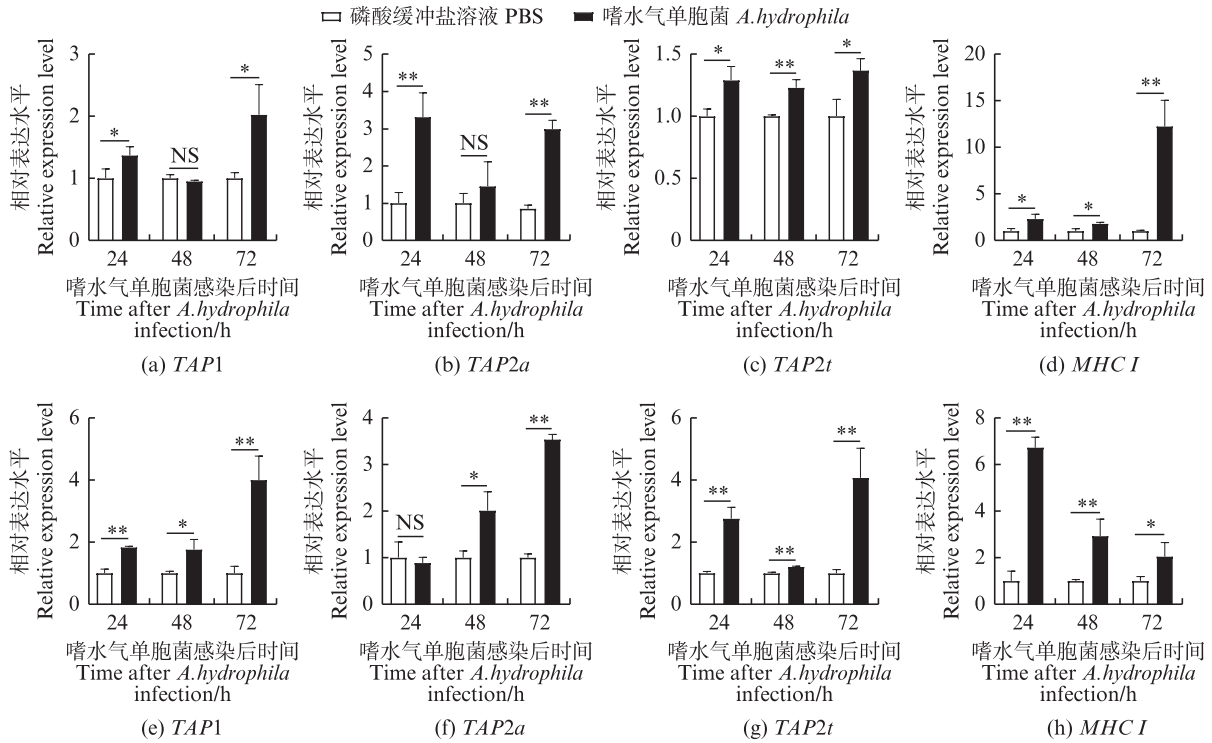
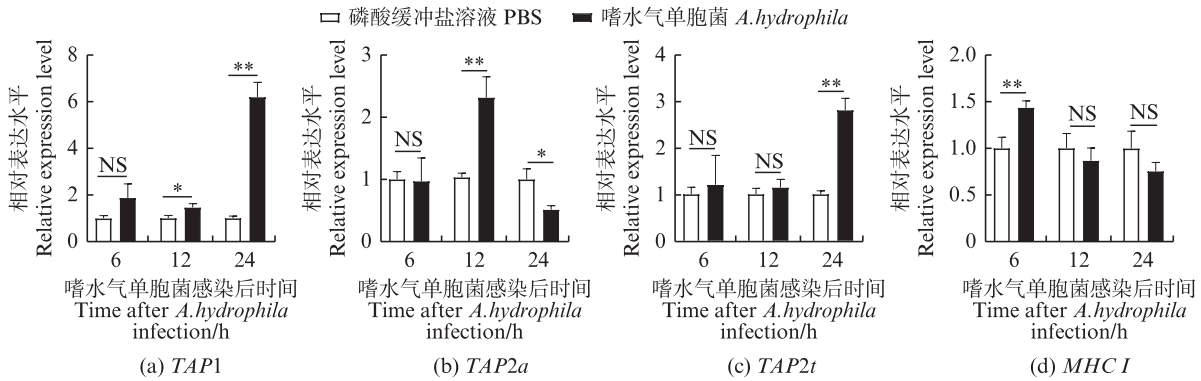


图 a-d 为草鱼的脾脏组织,图 e-h 为草鱼的头肾组织。腹腔注射 1×10^7 CFU/mL 的嗜水气单胞菌感染草鱼 24、48、72 h, 计算 *TAP1*、*TAP2t*、*TAP2a*、*MHC I* 相对于 *EF1 α* 的表达水平。数据以 Mean + SEM ($n = 3$) 表示。* $P < 0.05$ 和 ** $P < 0.01$ 认为显著, NS 为不显著。
Figure a-d shows the spleen tissue of grass carp and Figure e-h shows the head kidney tissue of grass carp. Grass carp were infected with *A. hydrophila* by intraperitoneal injection of 1×10^7 CFU/mL. The expression levels of *TAP1*, *TAP2t*, *TAP2a*, and *MHC I* relative to *EF1 α* were calculated. Data are expressed as Mean + SEM ($n = 3$). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ indicate significant difference, NS indicate no significant difference.

图 7 嗜水气单胞菌感染草鱼 *TAP* 和 *MHC I* 基因在脾脏和头肾组织中的表达

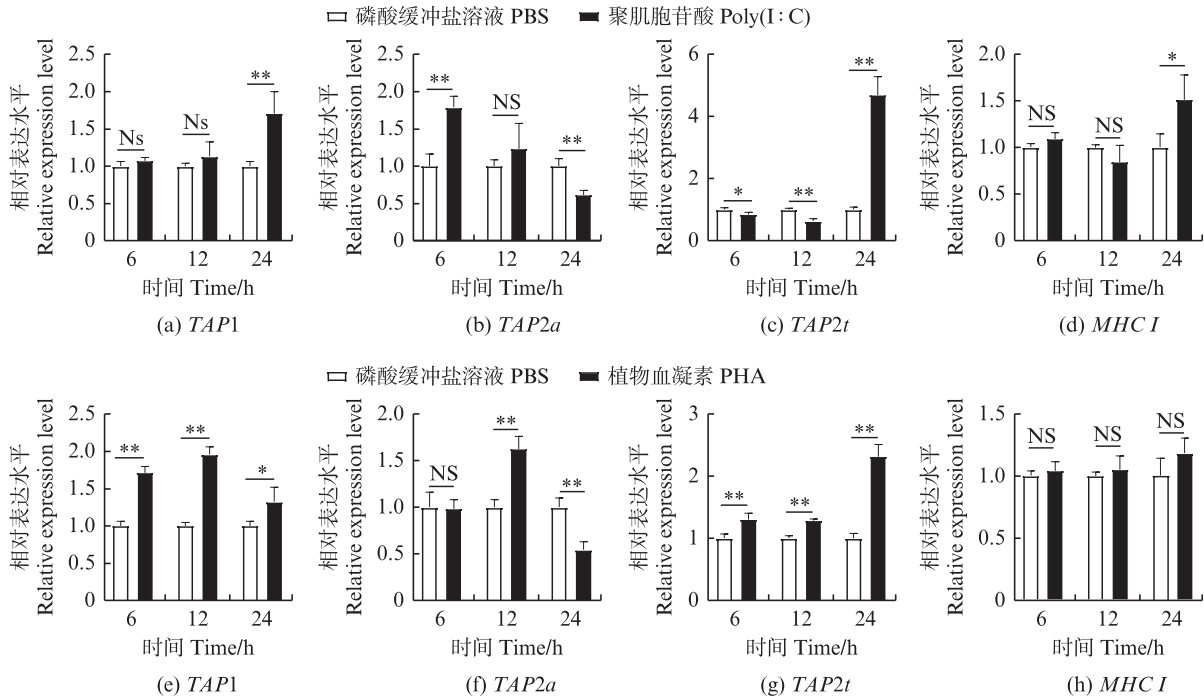
Fig. 7 Expression of *TAP* and *MHC I* genes in spleen and head kidney tissues after *A. hydrophila* infection in grass carp



用灭活嗜水气单胞菌 (1×10^7 CFU/mL) 刺激草鱼原代头肾细胞 6、12、24 h, 检测 *TAP1* (a)、*TAP2a* (b)、*TAP2t* (c)、*MHC I* (d) 的表达。数据以 Mean + SEM ($n = 3$) 表示。* $P < 0.05$ 和 ** $P < 0.01$ 表示显著差异, NS 为不显著。
The primary head kidney leukocytes were stimulated with inactivated *A. hydrophila* (1×10^7 CFU/mL) for 6 h, 12 h, and 24 h, and the expression of *TAP1* (a), *TAP2a* (b), *TAP2t* (c), and *MHC I* (d) was examined. Data are expressed as Mean + SEM ($n = 3$). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ are indicate significant difference, NS indicates no significant difference.

图 8 灭活嗜水气单胞菌刺激草鱼原代头肾细胞对 *TAP* 和 *MHC I* 基因的表达影响

Fig. 8 Effects of inactivated *A. hydrophila* on the expression of *TAP* and *MHC I* genes in the primary head kidney leukocytes of grass carp

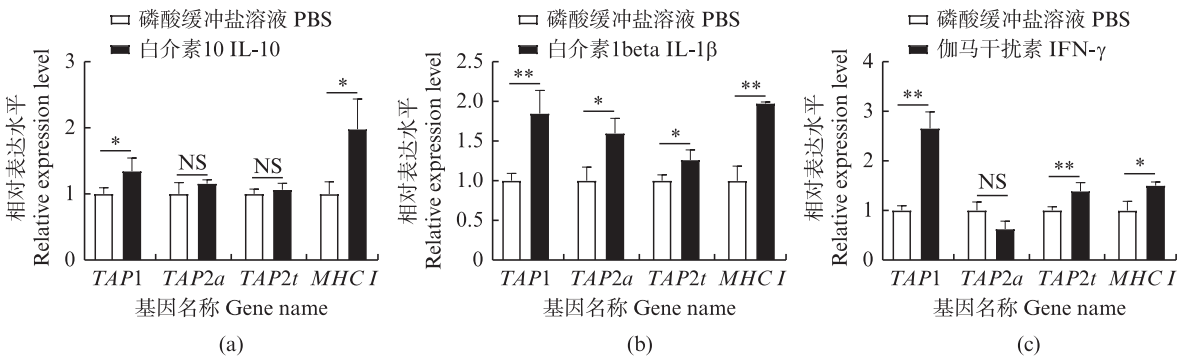


用 poly(I:C) (80 μg/mL) (a-d)或 PHA (20 μg/mL) (e-h) 分别孵育草鱼原代头肾细胞 6、12、24 h, 数据以 Mean + SEM (n = 3) 表示。*P<0.05 和 **P<0.01 表示显著, NS 为不显著。

The primary head kidney leukocytes were stimulated with poly(I:C) (80 μg/mL) (a-d) or PHA (20 μg/mL) (e-h) for 6 h, 12 h, and 24 h. Data are expressed as Mean + SEM (n = 3). *P<0.05 and **P<0.01 indicate significant difference, NS indicates no significant difference.

图9 草鱼原代头肾细胞中 poly(I:C) 和 PHA 刺激对 TAP 和 MHC I 基因的表达影响

Fig. 9 Effects of poly(I:C) and PHA stimulation on the expression of TAP and MHC I genes in grass carp primary head kidney cells

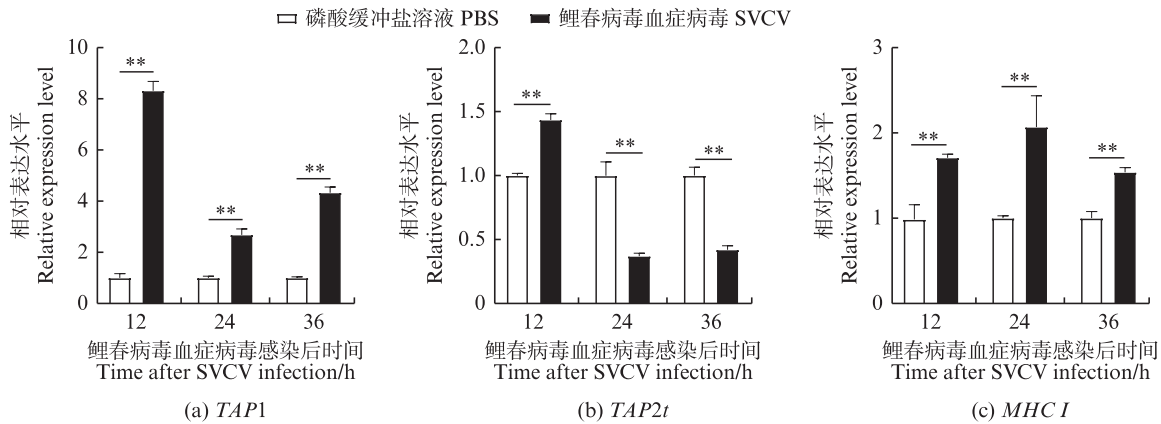


用 IL-10(200 ng/mL)(a)、IL-1β(200 ng/mL)(b)或 IFN-γ (200 ng/mL)(c) 刺激草鱼原代头肾细胞 24 h。数据以 Mean + SEM (n = 3) 表示。*P<0.05 和 **P<0.01 表示显著, NS 为不显著。

The primary head kidney leukocytes were stimulated with IL-10 (200 ng/mL)(a)、IL-1β (200 ng/mL)(b) or IFN-γ (200 ng/mL) (c) for 24 h. Data are expressed as Mean + SEM (n = 3). *P<0.05 and **P<0.01 indicate significant difference, NS indicates no significant difference.

图10 细胞因子对草鱼原代头肾细胞的 TAP 和 MHC I 表达调控

Fig. 10 Effects of cytokines on the expression of TAP and MHC I genes in the primary head kidney leukocytes



用SVCV(3.16×10^6 TCID₅₀/mL)感染EPC细胞12、24、36 h,检测TAP1(a)、TAP2t(b)、MHC I(c)的表达。数据以Mean + SEM (n = 3)表示。*P<0.05和**P<0.01表示显著,NS为不显著。
EPC cells were infected with SVCV (3.16×10^6 TCID₅₀/mL) for 12 h, 24 h, and 36 h, and the expression of TAP1 (a), TAP2t (b), and MHC I (c) was detected. Data are expressed as Mean + SEM (n = 3). *P<0.05 and **P<0.01 indicate significant difference, NS indicates no significant difference.

图 11 EPC 细胞感染 SVCV 后 TAP 和 MHC I 基因的表达分析

Fig. 11 Analysis of the expression of TAP and MHC I genes in the EPC cells after infection with SVCV

3 讨论

MHC I 通路是脊椎动物适应性免疫的重要环节^[16]。MHC I 类分子由重链和 β2 微球蛋白组成,存在于有核细胞,呈递细胞内源抗原^[17],激活 CD8⁺T 细胞,杀死清除感染或异常细胞。TAP 分子作为 MHC I 通路中的关键抗原呈递蛋白,由 TAP1(ABCB2)蛋白和 TAP2(ABCB3)蛋白组成,它们具有跨膜结构域和核苷酸结合域(NBD),N 端结构域与 Tapasin 的招募密切相关^[18],TAP1 的 C 末端具有调节功能^[16]。与高等哺乳动物不同,硬骨鱼类 TAP2 基因分化为 TAP2a 和 TAP2t,它们位于 2 个不同的染色体上,其中 TAP2a 基因共线性与人和鼠 TAP2 基因高度保守,TAP2t 则不保守,提示鱼类 TAP2a 是高等动物 TAP2 的对等同源基因(Ortholog),TAP2t 可能从 TAP2a 复制而来。一般认为,硬骨鱼类经历了第 3 轮全基因组重组,我们推测该事件可能导致了 TAP2t 的出现。

DURGEAU 等^[19]在 2011 年对 TAP 基因的不同表达水平进行了研究,发现 TAP 基因表达缺陷时,会导致癌细胞抗原性的降低,而 TAP 基因表达上调则会增加 CTL 对癌细胞抗原的识别。本研究对草鱼 TAP 基因表达的分析将有助于对草鱼疾病的深入研究。吴凡等^[10]在 2017 年对草鱼 MHC I 通路上的数个基因进行了组织表达分析,发现 TAP2 基因在鳃中有较强表达,在脾脏、肾脏也有表达。条纹斑竹鲨中的研究表明,MHC Ia

在鳃中的表达量最高,在头肾,肝脏,脾脏中也有相对较高的表达量^[20]。本研究发现,健康草鱼 TAP1、TAP2a、TAP2t 和 MHC I 在大脑、鳃、头肾、后肠、肝脏、肌肉、皮肤、脾脏、胸腺中也均有组成性表达。在脾脏和头肾中表达量较高,说明 TAP 和 MHC I 在免疫组织中表达量高。

嗜水气单胞菌为革兰氏阴性菌,诱发草鱼细菌性败血症,典型症状是体表出血,肛门红肿,最终导致病鱼的死亡。YANG 等^[21]通过转录组分析研究了嗜水气单胞菌感染草鱼幼鱼的基因表达情况,发现 MHC I 基因被上调。研究发现,铜绿假单胞菌可以导致 TAP1 的泛素化和蛋白酶体降解,但对 TAP2 没有影响,从而导致细胞质膜上含有抗原的 MHC I 类分子减少^[22]。在日本鳗鲡中,嗜水气单胞菌感染会导致 MHC I 基因在肾组织中的表达显著上调,在脾脏中,MHC I 的表达在 6 和 48 h 时出现下调^[23]。本研究通过对草鱼腹腔注射嗜水气单胞菌发现 72 h 时对 TAP 基因和 MHC I 基因的表达在脾脏和头肾组织中显著上调,这与其他鱼类的研究结果相吻合。由此,我们推测草鱼 TAP 基因的表达调控机制可能与其他鱼类类似。通过灭活的嗜水气单胞菌对草鱼头肾原代细胞刺激的体外实验进一步佐证发现,灭活嗜水气单胞菌能够显著诱导 TAP1(24 h)、TAP2a(12 h)、TAP2t(24 h)、MHC I(6 h)的显著表达,证明 MHC I 通路在宿主抵抗细菌感染中发挥重要作用。

poly(I:C)和PHA是重要病原相关分子模式。poly(I:C)可以诱导干扰素的表达^[24]。已有研究表明,poly(I:C)能够上调鲈鱼头肾白细胞MHC I复合物的可溶性 β 2-微球蛋白(β 2M)的表达^[25],用poly(I:C)体外刺激日本鳗鲡导致MHC I基因表达升高^[23]。本研究发现poly(I:C)刺激草鱼头肾原代细胞在24 h时显著上调TAP1、TAP2t、MHC I的表达。植物血凝素PHA可以激活免疫细胞,诱导干扰素的生成,增强毒性T细胞对病毒感染细胞的杀伤作用^[26]。本研究发现PHA对TAP1和TAP2t基因的上调效果显著,提示MHC I抗原呈递过程受到病原相关分子模式的调控。

本研究进一步分析了干扰素和炎症细胞因子对草鱼TAP1、TAP2a、TAP2t、MHC I表达的影响。IFN- γ 为II型干扰素,主要由CD4辅助性T细胞(Th)细胞、CD8毒性T细胞和自然杀伤(NK)细胞产生^[27]。IFN- γ 孵育可增加细胞表面的MHC I^[28]和胞内TAP1分子数量^[29]。与上述研究结果类似,本研究发现IFN- γ 刺激草鱼头肾原代细胞24 h可上调TAP1、TAP2t、MHC I的表达。IFN- γ 可以有效诱导IL-1 β 的表达^[30],而IL-1 β 的刺激引起TAP1、TAP2a、TAP2t、MHC I的转录表达显著升高,这表明IFN- γ 也可以通过诱导IL-1 β 表达促进MHC I的抗原呈递。大西洋鲑中的研究发现,I型干扰素(IFN α 2)亦可以上调MHC I基因的表达^[30]。这些研究表明,MHC I介导的抗原呈递受到细胞因子的精细调控。

病毒侵入细胞会通过被感染细胞的细胞器来进行病毒自身蛋白的复制,其产生的肽会被MHC I通路呈递给T细胞识别引发机体的免疫反应。大西洋鲑在受到传染性鲑鱼贫血病毒(ISAV)感染时MHC I通路基因在脾脏和头肾的淋巴组织以及心脏中的表达快速上调^[31]。虹鳟感染传染性造血组织坏死病病毒(IHNV)后,MHC I α 基因在肾脏、肝脏、脾脏中被诱导表达^[32]。病毒侵染宿主会通过上调IL-10的表达来避免宿主免疫清除^[33],鲤科疱疹病毒3型(CyHV-3)编码的白细胞介素10同系物蛋白可以抑制MHC I的表达^[34]。牛痘病毒蛋白CPXV203能够阻断MHC I的运输,从而阻断CD8⁺T细胞的识别,而CPXV12通过抑制TAP蛋白的肽易位干扰MHC I类/肽复合物的形成,当CPXV203和

CPXV12蛋白缺失时,MHC I通路恢复正常识别^[8]。马立克氏病病毒(MDV)的MDV012基因会通过阻断TAP蛋白来逃避免疫识别^[35]。本研究发现SVCV病毒在感染草鱼后,TAP1和MHC I的表达被显著诱导,表明鱼类MHC I通路在呈递病毒抗原时发挥重要作用。

综上所述,本研究在草鱼中克隆了3个TAP基因(TAP1、TAP2a和TAP2t),生信分析显示TAP基因在进化过程中的保守性较高;根据基因共线性结果推测,硬骨鱼类经历的第3轮全基因组重组事件,TAP2进行了复制和分化,导致TAP2a和TAP2t的出现。基因表达分析结果表明,草鱼在细菌感染72 h和病毒感染12 h后TAP基因表达量显著上调,提示TAP基因参与宿主应答细菌和病毒感染的免疫反应。此外,poly(I:C)、PHA、细胞因子(IL-1 β 和IFN- γ)均能上调TAP的表达,说明TAP基因能够响应PAMP刺激且受到细胞因子的调控。本研究结果为阐明草鱼MHC I的抗原呈递机制和高效疫苗研发奠定理论基础。

作者声明本文无利益冲突

参考文献:

- [1] ROCK K L, FARFÁN-ARRIBAS D J, SHEN L J. Proteases in MHC class I presentation and cross-presentation[J]. The Journal of Immunology, 2010, 184(1): 9-15.
- [2] MANTEL I, SADIQ B A, BLANDER J M. Spotlight on TAP and its vital role in antigen presentation and cross-presentation [J]. Molecular Immunology, 2022, 142: 105-119.
- [3] 杨杰,董宋鹏,李子彬,等. 抗原处理相关转运体蛋白的研究进展[J]. 生命科学, 2014, 26(10): 1018-1025. YANG J, DONG S P, LI Z B, et al. Progress on transporter associated with antigen processing protein[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2014, 26(10): 1018-1025.
- [4] BENKO S, MAGALHAES J G, PHILPOTT D J, et al. NLRC5 limits the activation of inflammatory pathways [J]. The Journal of Immunology, 2010, 185(3): 1681-1691.
- [5] LUDIGS K, SEGUÍN-ESTÉVEZ Q, LEMEILLE S, et al. NLRC5 exclusively transactivates MHC class I and related genes through a distinctive SXY module[J]. PLoS Genetics, 2015, 11(3): e1005088.
- [6] BRUCET M, MARQUÉS L, SEBASTIÁN C, et al. Regulation of murine Tap1 and Lmp2 genes in

- macrophages by interferon gamma is mediated by STAT1 and IRF-1[J]. *Genes & Immunity*, 2004, 5(1): 26-35.
- [7] ARONS E, KUNIN V, SCHECHTER C, et al. Organization and functional analysis of the mouse transporter associated with antigen processing 2 promoter [J]. *The Journal of Immunology*, 2001, 166(6): 3942-3951.
- [8] ALZHANOVA D, EDWARDS D M, HAMMARLUND E, et al. Cowpox virus inhibits the transporter associated with antigen processing to evade T cell recognition [J]. *Cell Host & Microbe*, 2009, 6(5): 433-445.
- [9] PINTO R D, PEREIRA P J B, DOS SANTOS N M S. Transporters associated with antigen processing (TAP) in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.): molecular cloning and characterization of TAP1 and TAP2 [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(11): 1173-1181.
- [10] 吴凡. 草鱼 MHC I 区基因生物信息学及表达分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.
WU F. Bioinformatics and expression analysis of MHC I region in grass carp[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017.
- [11] FENG J H, JIA Z, YUAN G L, et al. Expression and functional characterization of three β -defensins in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2023, 140: 104616.
- [12] LIU Y F, SONG Y J, CHENG X X, et al. A cytokine-like factor 1 homolog acts as a macrophage chemoattractant in grass carp [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2024, 151: 109722.
- [13] 刘琴, 贾钊, 陈康勇, 等. 草鱼 IL-10 单克隆抗体的制备与鉴定[J]. *水生生物学报*, 2022, 46(12): 1867-1875.
LIU Q, JIA Z, CHEN K Y, et al. Production and characterisation of IL-10 monoclonal antibodies in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2022, 46(12): 1867-1875.
- [14] ZHU X Z, WANG J Y, JIA Z, et al. Novel dimeric architecture of an IFN- γ -related cytokine provides insights into subfunctionalization of type II IFNs in teleost fish [J]. *The Journal of Immunology*, 2022, 209(11): 2203-2214.
- [15] SNIDER J, THIBAUT G, HOURY W A. The AAA+ superfamily of functionally diverse proteins [J]. *Genome Biology*, 2008, 9(4): 216.
- [16] PLEWNIA G, SCHULZE K, HUNTE C, et al. Modulation of the antigenic peptide transporter TAP by recombinant antibodies binding to the last five residues of TAP1 [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 369(1): 95-107.
- [17] MADDEN D R. The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes [J]. *Annual Review of Immunology*, 1995, 13: 587-622.
- [18] KOCH J, GUNTRUM R, HEINTKE S, et al. Functional dissection of the transmembrane domains of the transporter associated with antigen processing (TAP) [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(11): 10142-10147.
- [19] DURGEAU A, EL HAGE F, VERGNON I, et al. Different expression levels of the TAP peptide transporter lead to recognition of different antigenic peptides by tumor-specific CTL [J]. *The Journal of Immunology*, 2011, 187(11): 5532-5539.
- [20] SHEN T, LEI M L, WANG J R, et al. Molecular cloning, organization, expression and 3D structural analysis of the MHC class Ia gene in the whitespotted bamboo shark (*Chiloscyllium plagiosum*) [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2014, 157(1/2): 111-118.
- [21] YANG Y, YU H, LI H, et al. Transcriptome profiling of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) infected with *Aeromonas hydrophila* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 51: 329-336.
- [22] BOMBERGER J M, ELY K H, BANGIA N, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Cif protein enhances the ubiquitination and proteasomal degradation of the transporter associated with antigen processing (TAP) and reduces major histocompatibility complex (MHC) class I antigen presentation [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(1): 152-162.
- [23] FENG J J, PENG X W, LIN P, et al. Molecular characterization, expression patterns, and subcellular localization of a classical and a novel nonclassical MHC class I α molecules from Japanese eel *Anguilla japonica* [J]. *Aquaculture and Fisheries*, 2023, 8(2): 108-123.
- [24] ZOU J, CARRINGTON A, COLLET B, et al. Identification and bioactivities of IFN- γ in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: the first Th1-type cytokine characterized functionally in fish [J]. *The Journal of Immunology*, 2005, 175(4): 2484-2494.
- [25] PINTO R D, RANDELLI E, BUONOCORE F, et al. Molecular cloning and characterization of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) MHC class I heavy chain and β 2-microglobulin [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2013, 39(3): 234-254.
- [26] 王佩佩. 植物血凝素 PHA-L 活性成分及重组植物血凝素 PHA-L 的体内外抗肿瘤作用及机制研究[D]. 成都: 四川大学, 2021.
WANG P P. Anti-tumour effect and underlying mechanisms of functional component isolated from PHA-L and recombinant PHA-L in vitro and in vivo [D]. Chengdu: Sichuan University, 2021.
- [27] SAVAN R, RAVICHANDRAN S, COLLINS J R, et al.

- Structural conservation of interferon gamma among vertebrates [J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2009, 20(2): 115-124.
- [28] BURR M L, SPARBIER C E, CHAN K L, et al. An evolutionarily conserved function of polycomb silences the MHC class I antigen presentation pathway and enables immune evasion in cancer [J]. *Cancer Cell*, 2019, 36(4): 385-401. e8.
- [29] ZHU B H, OUDA R, AN N, et al. The balance between nuclear import and export of NLRC5 regulates MHC class I transactivation [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2024, 300(5): 107205.
- [30] ZOU J, SECOMBES C J. Teleost fish interferons and their role in immunity [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(12): 1376-1387.
- [31] JØRGENSEN S M, HETLAND D L, PRESS C M, et al. Effect of early infectious salmon anaemia virus (ISAV) infection on expression of MHC pathway genes and type I and II interferon in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) tissues [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23(3): 576-588.
- [32] LANDIS E D, PURCELL M K, THORGAARD G H, et al. Transcriptional profiling of MHC class I genes in rainbow trout infected with infectious hematopoietic necrosis virus [J]. *Molecular Immunology*, 2008, 45(6): 1646-1657.
- [33] BRADY M T, MACDONALD A J, ROWAN A G, et al. Hepatitis C virus non-structural protein 4 suppresses Th1 responses by stimulating IL-10 production from monocytes [J]. *European Journal of Immunology*, 2003, 33(12): 3448-3457.
- [34] OUYANG P, YANG R X, YIN L Z, et al. Molecular characterization of Cyprinid herpesvirus 3 encoded viral interleukin10 [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 89: 149-157.
- [35] HEARN C, PREEYANON L, HUNT H D, et al. An MHC class I immune evasion gene of Marek 's disease virus [J]. *Virology*, 2015, 475: 88-95.

Phylogeny of grass carp *TAP* genes and their expression kinetics in response to bacterial and viral infection

LEI Wenjing, XU Jing, JIA Zhao, LIU Yifan, GUO Xu, WANG Junya, ZOU Jun

(College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In this study, we cloned the *TAP1*, *TAP2a*, and *TAP2t* genes from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), and analyzed their phylogeny. It was found that grass carp *TAP* genes are conserved. Structural prediction of *TAP* proteins revealed that grass carp *TAP* proteins possess multiple transmembrane regions and have typical structural features of the ATP-binding cassette transporter (ABC) superfamily. Grass carp *TAP1*, *TAP2a*, and *TAP2t* genes were highly expressed in the spleen and kidney, and significantly up-regulated at 72h after infection with *Aeromonas hydrophila*. In the primary head kidney leukocytes, stimulation with phytohemagglutinin (PHA) and polyinosinic-polycytidylic acid [poly (I: C)] up-regulated all *TAP* genes, and that with interferon gamma (IFN- γ) and interleukin 1 beta (IL-1 β) induced the expression of *TAP1* and *TAP2t* but not *TAP2a*. In the EPC cells, infection with Spring viraemia of carp virus (SVCV) elevated the expression levels of *TAP1* at 12 h, 24 h, and 36 h and *TAP2t* at 12 h, suggesting they are involved in immune response to SVCV infection. The findings provide valuable information for further investigation on MHC I antigen presentation pathway in fish.

Key words: transporter associated with antigen processing *TAP*; MHC I; grass carp; transcriptional expression analysis; bacteria; virus