

军曹鱼 MHC- I α 基因全长 cDNA 的克隆及其组织表达分析

张鹤^{1,2}, 茅莉娜², 冯娟², 管越强¹, 许海东², 苏友禄²

(1. 河北大学生命科学学院, 河北 保定 071002; 2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300)

摘要: 采用同源克隆和末端快速扩增 (RACE) 方法, 得到 1 330 bp 的军曹鱼 (*Rachycentron canadum*) MHC- I α 全长 cDNA 片段。该序列包括 76 bp 的 5' 末端非编码区 (UTR), 189 bp 的 3' UTR 及 1 065 bp 的开放阅读框 (ORF), 编码 354 个氨基酸, 预测其蛋白质分子量约 40.10 kDa, 等电点 5.70。构建 MHC- I α 氨基酸序列的系统进化树并进行氨基酸相似性比对, 结果表明, 军曹鱼和已知鱼类及人类 (*Homo sapiens*) MHC- I α 氨基酸的同源性在 27.9% ~ 67.1% 之间。所推测的蛋白序列具有一些重要特征, 包括前导肽、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 区、CP/TM/CYT 区和保守的半胱氨酸等。Real-time PCR 检测结果显示, MHC- I α 基因在各个正常军曹鱼组织中均表达, 但表达量各有不同, 其中较强的表达于头肾; 中等程度表达于鳃、脾和肠; 在心、脑和肌肉中表达较弱。

关键词: 军曹鱼; MHC- I α ; 全长 cDNA; 组织特异性表达

中图分类号: S 943

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2011)01-0008-10

Full-length cDNA cloning and tissue expression of major histocompatibility complex (MHC) - I α from cobia (*Rachycentron canadum*)

ZHANG He^{1,2}, MAO Lina², FENG Juan², GUAN Yueqiang¹, XU Haidong², SU Youlu²

(1. College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China;

2. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: We cloned the MHC- I α gene from cobia (*Rachycentron canadum*) by homology cloning and RACE PCR. The full-length cDNA of MHC- I α comprises 1 330 bp with a 76 bp 5' untranslated region (UTR), a 189 bp 3' UTR and a 1 065 bp open reading frame (ORF), encoding a polypeptide of 354 amino acid residues with a predicted molecular weight of 40.10 kDa and a theoretical isoelectric point of 5.70. According to the phylogenetic tree and amino acid similarity comparison, the homology of MHC- I α amino acids between cobia and some known fishes and human (*Homo sapiens*) varies from 27.9% to 67.1%. The putative protein sequence shows some important features including leader peptide, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, CP/TM/CYT regions and conserved cysteines, etc. Real-time PCR result indicates that MHC- I α expresses in all detected tissues at different expression levels. High expression is detected in head kidney; moderate expression is detected in gill, spleen and intestine; while low expression is detected in heart, brain and muscle.

Key words: cobia (*Rachycentron canadum*); MHC- I α ; full-length cDNA; tissue-specific expression

主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 是指染色体上由一系列紧密

连锁的基因位点所组成的具有高度多态性的复合遗传系统或区域, 其表达产物分布于各种细胞的表

面, 称为 MHC 分子^[1]。MHC 分子可与经加工后的抗原肽结合形成 MHC 抗原肽复合物, 供 T 细胞受体 (TCR) 识别, 在体内起抗原提呈作用, 广泛参与免疫调节和免疫应答, 激发机体特异性免疫反应, 是免疫细胞间沟通信息、相互协作的基础, 在免疫学上具有极为重要的意义。

1950 年, SNELL 在小鼠体内发现了 MHC^[2], 从此揭开了 MHC 研究的序幕。随着研究的深入, 陆续在许多动物中发现了 MHC。直到 1990 年 HASHIMOTO 等^[3]扩增出鲤 (*Cyprinus carpio*) 的部分 MHC 基因序列后, 鱼类 MHC 研究才逐渐开展。根据化学结构和功能的不同, 鱼类 MHC 分子可以分为 MHC I 类分子和 MHC II 类分子。MHC I 类分子同哺乳动物的一样分为重链 MHC- I α 和轻链 β_2 微球蛋白 (β_2 -microgolubin, β_2m), 其中 MHC- I α 由 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 区、跨膜区和胞内区组成, 与轻链 β_2m 非共价结合形成 MHC I 类分子。MHC- I α 基因是 MHC 家族的重要成员。自 1993 年 GRIMHOLT 等^[4]获得大西洋鲑 (*Salmo salar*) MHC- I α 链 cDNA 的全序列后, 在虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[5]、鲤^[6]、大眼鲷鲈 (*Stizostedion vitreum*)^[7]、草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)^[8]等鱼类中也获得了 MHC- I α 链 cDNA 基因序列。但对军曹鱼的 MHC- I α 基因序列尚未有报道。

军曹鱼隶属鲈形目 (Perciformes)、鲈亚目 (Percoidei)、军曹鱼科 (Rachycentridae)、军曹鱼属 (*Rachycentron*), 俗称海鲡、鲸龙鱼, 分布于大西洋、印度洋和太平洋沿岸海域及港湾^[9]。具有生长速度快和营养价值高等优点, 是中国近几年来养殖规模迅速发展的重要海水经济鱼类, 已成为海水网箱养殖的重要品种^[10]。随着养殖密度的增大和养殖生态环境的恶化, 加上管理不善导致鱼体受伤、抵抗力下降等原因, 军曹鱼病害日趋严重, 已成为制约军曹鱼健康养殖发展的关键因素之一^[11-13]。笔者根据其他鱼类 MHC- I α 基因的保守序列设计兼并引物, 运用同源克隆和末端快速扩增方法扩增到军曹鱼 MHC- I α 基因的全长 cDNA 序列, 并对 cDNA 和推测的氨基酸序列进行分析, 比较它和其他物种的 MHC- I α 氨基酸序列的差异, 分析了军曹鱼 MHC- I α 基因的组织分布, 为进一步研究 MHC I 类分子的作用及其调控机制奠

定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验用鱼

军曹鱼 (约 200 g) 购于海南陵水, 暂养 7 d 后, 采集其组织, 放于液氮冷冻 1 d 后, 至 -80 ℃ 冰箱保存。

1.2 总 RNA 提取

称取 0.3 g 军曹鱼的头肾, 采用 Trizol 法 (TaKaRa) 提取总 RNA, 并通过琼脂糖凝胶电泳和微量紫外分光光度计检测 RNA 的完整性和浓度。

1.3 cDNA 第一链的合成

取总 RNA 10 μ g 与反转录引物 (oligo-dT 接头引物, 表 1) 2 μ L (10 pmol \cdot L⁻¹) 混合, 经 RT-PCR 合成 cDNA 第一链。

1.4 MHC- I α 基因的同源扩增

根据大菱鲆 (*Psetta maxima*)、大眼鲷鲈、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)、金鲷 (*Sparus aurata*) MHC- I α 的核酸序列, 使用 CLUSTAL W 2.0 程序进行比对, 确定保守区域。在保守区设计简并引物 RCMC1AF、RCMC1AR (由上海英潍捷基生物技术有限公司合成, 序列见表 1), 扩增军曹鱼 MHC- I α 的中间片段。PCR 产物经过电泳检测、回收、连接和转化后, 取阳性菌液于上海英潍捷基生物技术有限公司测序。

1.5 MHC- I α 基因全序列的克隆

根据中间片段序列设计特异性引物 RCMC32AOUT、RCMC32AIN、RCMC52AOUT、RCMC52AIN, 序列见表 1。利用半巢式 (semi-nested) PCR 方法, 用 cDNA 末端快速扩增技术 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 对目的基因的 3' 和 5' 末端进行 PCR 扩增。PCR 产物经回收、连接和转化后, 取阳性菌液于上海英潍捷基生物技术有限公司测序。两端的序列与中间片段用 DNAsstar (V 5.01) 软件拼接。

1.6 MHC- I α 基因序列分析

登录 NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 用 BLAST 对测序结果进行同源性检索, 用 DNAsstar 分析所得军曹鱼 MHC- I α cDNA 序列及开放阅读框, 蛋白质二级结构用 PHDsec program 软件进行预测分析, 用在线 CLUSTAL W 2.0 进行多序列比较, 用 MEGA 4.1 构建进化树。

表1 试验中所用到的引物序列
Tab. 1 Primer sequences used in tests

引物名称 primer	核酸序列 (5'~3') nucleotide sequence	应用范围 scope of application
RCMC1AF	GGATGAAGGGACAAATGA	同源克隆
RCMC1AR	GATAGAAACCTGTAGCGTG	同源克隆
oligo-dT 接头引物	AAGCAGTGGTATCAACGGCAGAGTACT (30) VN	反转录
SMART 3a	CAGAGTACTTTTTTTTTTTTT	3'RACE
RCMC32AOUT	TRACAGAGGTTKGAACACACAG	3'RACE
RCMC32AIN	AACTCTCCCTCCTCTTCAGTCAGC	3'RACE
RCMC52AOUT	GCTGACTGAACAGGAGGGAGAC	5'RACE
RCMC52AIN	GRWKTGTSYTGASTGGGTGAAG	5'RACE
olido-dG	GGGGGGGGGGGGGGGG (A/T/C)	5'RACE
β-ActinF	TGCTGTCCCTGTATGCC	RT-PCR 内参
β-ActinR	TGATGCTGTTGTAGGTGGTC	RT-PCR 内参
J1AF	GCTGACTGAAGAGGGAGGG	RT-PCR
J1AR	TGAATGGGATGAAGGGAC	RT-PCR

1.7 MHC-I α 基因在各组织中 Real-time PCR 分析

为了检测军曹鱼体内 MHC-I α 的表达情况, 取 3 条健康的军曹鱼 (约 200 g) 的脾、头肾、肠、鳃、脑、肌肉和心, 分别提取 RNA 做反转录。根据已获得的片段设计 QPCR (Real-time quantitative PCR) 的特异性引物, 用引物 β-ActinF 和 β-ActinR 扩增得到的 PCR 产物作为内参, 与目的基因在同一体系中扩增。用 SYBR Green I 法在 Mastercycler ep realplex 荧光定量 PCR 仪 (德国艾本德股份公司出品) 上进行扩增和数据分析。每个样品做 4 个平行, 荧光吸收值及扩增曲线通过 Mastercycler ep realplex System 软件分析, 利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算相对表达量。

2 结果

2.1 MHC-I α 基因核酸序列分析

经过同源克隆及 3'RACE 和 5'RACE, 分别获得 314、642 和 751 bp 的片段。通过序列拼接之后, 经 DNAstar 分析, 得到军曹鱼 MHC-I α 基因 cDNA 的全序列 1 330 bp (图 1), 分析可知其由 76 bp 的 5'UTR、189 bp 的 3'UTR 及 1 065 bp 的编码区组成。

2.2 MHC-I α 基因氨基酸序列分析

军曹鱼 MHC-I α cDNA 完整的开放阅读框编码 354 个氨基酸 (图 1), 预测蛋白质的分子量约

40.10 kDa, 等电点 5.70。由前导肽 (leader peptide)、 α 1、 α 2、 α 3 区和连接肽/跨膜区/胞浆区 (CP/TM/CYT) 组成, 分别为 17、89、93、103 和 52 个氨基酸。在二级结构上, 在 α 1 区的第 103 位氨基酸上含有 1 个 N-糖基化位点 (NQTG), 在 CP/TM/CYTQ 区上含有 1 个磷酸腺苷蛋白激酶磷酸化位点 (330 位 KKKS), α 1、 α 2、 α 3 区和 CP/TM/CYT 区上含有 6 个蛋白激酶 C-磷酸化位点 (21 位 SMK、56 位 TKR、171 位 TQR、265 位 SVK、300 位 SEK 和 333 位 SDK), 在 α 3 和 CP/TM/CYT 区上含有 3 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 (289 位 TKLD、298 位 TNSE 和 342 位 SNPE), 在 α 1 和 α 3 区含有 2 个酪氨酸激酶磷酸化位点 (68 位 KVVADDPQY 和 267 位 KPEDWRRY), 在前导肽和 α 1 区含有 2 个 N-豆蔻酰化位点 (11 位 GMQGAL 和 82 位 GISLSN)。

用 DNAstar 分析序列的同源性, 军曹鱼 MHC-I α 基因与大菱鲆、金鲷、赤点石斑鱼等鱼类及人类 (*Homo sapiens*) 的同源性由高到低为大菱鲆 (67.1%)、金鲷 (63.5%)、赤点石斑鱼 (60.9%)、人类 (27.9%) (表 2)。

将军曹鱼 MHC-I α 获得的氨基酸序列与其他鱼类、鼠 (*Mus musculus*) 和人类的 MHC-I α 氨基酸序列利用在线软件 Clustal W 2.0 进行比对 (图 2)。根据 α 3 区域的氨基酸序列比对情况, 用

图1 军曹鱼 MHC-I α cDNA 序列及推导的氨基酸序列

起始密码子 (ATG) 和终止密码子 (TGA) 用阴影标出, 不同区域起始氨基酸用下划线标出; 小写字母表示核酸序列, 大写字母表示氨基酸序列; “<” 表示区域的起始位置, “>” 表示区域的终止位置, 这些区域包括前导肽、3 个胞外区 (α_1 、 α_2 和 α_3)、跨膜区、连接肽和胞浆区

Fig. 1 cDNA sequence of MHC-I α from cobia and deduced amino acid sequence

The start and stop codons are shown in shadow; the start amino acid of different region is underlined. Lowercase letters indicate nucleotide sequence; capital letters indicate amino acid sequence; "<" indicates the initial position of the region; ">" indicates the final position of the region; these regions include the leader peptide, $\alpha 1$, $\alpha 2$ and $\alpha 3$ regions as well as CP/TM/CYT region (connecting peptide, transmembrane and cytoplasm)

MEGA 4.1 构建了系统进化树 (图 3)，结果显示军曹鱼和金鲷的关系最近，与人、铰口鲨和皱唇鲨较远。

2.3 MHC-I α 基因在不同组织中的表达分析

以正常的军曹鱼组织为材料, 以反转录合成的第一链 cDNA 为模板, 以 β -actin 为内参基因, 用特异性引物 (J1AF 和 J1AR) 进行 Real-time PCR 反应, 检测 MHC-I α 基因在不同组织中的表达情况。结果表明, 在正常军曹鱼组织中 MHC-I α 基因较强的表达于头肾; 中等程度表达于鳃、脾和肠; 在心、脑和肌肉中表达较弱 (图 4)。

3 讨论

分子免疫是鱼类抵抗微生物感染、确保种群延续的基础。MHC 分子在免疫系统中起着重要作用，研究鱼类 MHC-I α 分子的结构与功能，可以更好 地探寻与疾病相关联的易感基因和疾病抵抗基因，对于疾病的预防和治疗很有意义。MHC I 类分子

组成型表达在所有的有核细胞及血小板表面，呈递的抗原多是细胞内源性多肽（如肿瘤抗原和病毒抗原）。MHC I α 链的肽结合槽结合肽段，折叠成一定的空间构型，再结合 $\alpha 2$ 区微球蛋白，形成稳定的肽 MHC I 类分子复合体，继而表达在细胞膜上，被 CD8⁺ T 细胞 TCR 识别，刺激产生 TCR 免疫，杀伤和溶解靶细胞。

一个典型的 MHC-I 类基因包括前导肽、3 个胞外区 ($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$)、跨膜区、连接肽和胞浆区。该研究利用同源克隆和 RACE PCR 技术得到军曹鱼 MHC-I α 全长序列 1 330 bp，包括 76 bp 的 5'UTR、189 bp 的 3'UTR 及 1 065 bp 的开放阅读框 (ORF)，编码 354 个氨基酸。蛋白水平上预测该序列前导肽、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 区和 CP/TM/CYT 分别为 17、89、93、103 和 52 个氨基酸。 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$ 区存在 4 个半胱氨酸残基。根据这些结构特征以及同其他鱼种 MHC-I 类基因的比较结果均表明，该研究所获的基因是 MHC 基因家族的一员。

表2 军曹鱼 MHC- I α 氨基酸与其他已报道动物氨基酸同源性分析Tab. 2 Homology analysis of amino acids of MHC- I α from cobia and other reported animals

物种 species	同源性/% homology	注册号 accession No.	参考文献 references
大菱鲆 (<i>Psetta maxima</i>)	67.1	ABM92962	WANG 等 (2008) ^[14]
大眼鲷鲈 (<i>Stizostedion vitreum</i>)	65.0	AAL11412	
牙鲆 (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	64.6	BAD13368	SRISAPOOME 等 (2004) ^[15]
金鲷 (<i>Sparus aurata</i>)	63.5	DQ211540	
孔雀鱼 (<i>Poecilia reticulata</i>)	61.3	CAA90791	
青鳉 (<i>Oryzias latipes</i>)	61.2	BAB83849	MATSUO 等 (2002) ^[16]
赤点石斑鱼 (<i>Epinephelus akaara</i>)	60.9	ABX80521	
红鳃慈鲷 (<i>Aulonocara hansbaenschi</i>)	56.8	AAD37812	SATO 等 (1997) ^[17]
红鳍东方鲀 (<i>Takifugu rubripes</i>)	55.6	AAC41238	TIMON 等 (1998) ^[18]
虹鳟 (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	53.4	AAG25199	AOYAGI 等 (2002) ^[19]
细鳞大麻哈鱼 (<i>O. gorbuscha</i>)	51.9	BAA09553	
大西洋鳕 (<i>Gadus morhua</i>)	51.8	AAL14532	MILLER 等 (2002) ^[20]
大西洋鲑 (<i>Salmo salar</i>)	48.5	AAN75116	GRIMHOLT 等 (2002) ^[21]
鲤 (<i>Cyprinus carpio</i>)	43.1	CAA62497	
草鱼 (<i>Ctenopharyngodon idellus</i>)	43.0	AAS76087	
间鲃 (<i>Barbus intermedius</i>)	43.0	CAD44955	KRUISWIJK 等 (2004) ^[22]
斑点叉尾鮰 (<i>Ictalurus Punetaus</i>)	40.6	AAG29241	ANTAO 等 (2001) ^[23]
人类 (<i>Homo sapiens</i>)	27.9	CAC15502	
铰口鲨 (<i>Ginglymostoma cirratum</i>)	32.2	AAC60347	BARTL 等 (1997) ^[24]
皱唇鲨 (<i>Triakis scyllium</i>)	36.0	AAB97322	OKAMURA 等 (1997) ^[25]

氨基酸比对结果显示 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 区序列变化较大, 拥有较少的保守氨基酸 (仅 19 个保守的氨基酸), 而 $\alpha 3$ 区较保守, 说明 MHC- I $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 编码的区域是主要的功能性区域即肽结合域, 而 $\alpha 3$ 编码的区域主要是结构性区域即骨架区。 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 区的多态性表明 MHC I α 是一类多态性极高的基因。

经氨基酸比对结果显示, 军曹鱼 $\alpha 1$ 区第 103 位氨基酸含有的 N-糖基化位点 (NQTG) 与其他鱼类的此位点相似性高, 而军曹鱼上的其他位点包括 CP/TM/CYTQ 区上含有的磷酸腺苷蛋白激酶磷酸化位点 (330 位 KKKS), $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 区和 CP/TM/CYT 区上含有的蛋白激酶 C-磷酸化位点 (21 位 SMK、56 位 TKR、171 位 TQR、265 位

SVK、300 位 SEK 和 333 位 SDK), $\alpha 3$ 区和 CP/TM/CYT 区上含有的酪蛋白激酶 II 磷酸化位 (289 位 TKLD、298 位 TNSE 和 342 位 SNPE), $\alpha 1$ 和 $\alpha 3$ 区上含有的酪氨酸激酶磷酸化位点 (68 位 KVVADDPQY 和 267 位 KPEDWRRY) 以及前导肽和 $\alpha 1$ 区上含有的 N-豆蔻酰化位点 (11 位 GMQGAL 和 82 位 GISLSN), 和其他鱼类存在很大差异。差异原因尚不明确。

推测的军曹鱼 MHC- I α 氨基酸序列和已报道鱼类及人类 MHC- I α 的同源性在 27.9% ~ 67.1% 之间, 以军曹鱼和大菱鲆同源性最高, 同已知硬骨鱼的同源性在 40.6% ~ 67.1%, 而同软骨鱼的铰口鲨和皱唇鲨仅有 32.2% ~ 36%, 同哺乳动物的人相差更远, 仅有 27.95% 相似。

CP/TM/CYT		
Raca	FQMSVDLQLSSVKPEDWRRYDCVFQLSGVKEDIITKLDKAVIRTNS-----	EKSSP-----MIAIIIAAVAILALIIAGVGF 326
Gici	YQIRKWIWFD---PEDQAEYSCYMEHIGLEAK--VIYDPKSHSQVPVT-----	LGIVFGVIGIAIAAVAVGAV 311
Trsc	YQMEKQTDDE---PSDPAFKSCEVDHAGLSQKLVVFYEPKADSMPLV-----	IGIVIAVLVVALAVVG--V 310
Bain	FQRTSTIRVSPDELKK-NEFSCVVEHQGKTIREFIILRD-----DSLPIG-----	IIVGVVVAVVLLAVIGVVVF 314
Ctid	FQRTSTLNVPDEWKN-NRFSCVVEHQDKTIRKTEDDIITNL---DSVPIA-----	IIVGAVAABVLVI-VIGVGY 317
Cyca	FQRASLTNVKPEEWKN-NKFSCVVEHQGKTIREFIILTEDKIKTNY-APFPIG-----	IIIGIVVAVVLLI-VIGVAGY 319
Icpu	FQKRSILTVSAEDLQK-HTYTCVQHSSLEKEIVLNQEVIRILNPGGVPIG-----	IIVG-VVALLLVL-VVVVAGI 329
Orla	FQMSVHLQPP--SGEDMQRYECVQFQLSGVKEDVITKLEKAKIRTNAG-----	SSQMLIIIGVLAAMAVVAVSAF 321
Pore	FQMSVELTLS---ASEDWTKYDCVFQLSGVDKDLVPLDKANIKTNAG-----	NSLALILITIVAVVVLITSAVIVI 306
Auha	FQMSVLDLDFSSVTSEDWKRKYDCVFQLSGLNEDIVTKLDKNAIKTNWKGKPSIR---SDGSSS-----DSTGTIIGVVVVMILLIIGLGI 325	
Spau	FQMSVLDLKLSSVTPEDWTRYDCVFQLSGVNEDIITKLDKAVITNTK-----	GKTGIRSVDEKLNTTAAIIIAAVVVSAVFLL-AGV 335
Stvi	FQMSVLDLSSVPAEDWRRYDCVFQLSGMKDIVTKLDKAKIRTNR-----	EKPTD-----MTTPIIA-AVVVLALVLLAVIGV 330
Taru	FQMSVLDLNNSVSPPEDWSSYKCVFQLSGAK-EITTLTDKQTIRLNTWKGPGVRGDGAEDPSN-----TAVIAAV-AVVVLALVLIAVVGF 339	
Epak	FQMSSDLVQSLPPEDWKEYECVQFQSGVKEDIITKLDKAVIRTNR-----	EKPTD-----VTVPTIIA-AVVVLALVLIAVIG- 326
Paol	FQMSADLQVSSIPPEDWTRYDCVFQLSGVKEDIVKRLDKDSVESNR-----	EKPTD-----VTTIIIV-AAVVALAVLAVIGF 326
Psma	FQMSTDLKVSAPGDWKGKYQCVFQLSGVTEDIVRVLKDVKIRTNR-----	EKPTD-----MTTIIIVIVAVAVLALAAIAIGV 326
Gamo	FQVSVDLNLKAVPQEDWGRYECVQQLRGIE-DISTPLDPALIRTNGGR-----	TRLR-----VAFTIPIIIIGFVVLPPAAAAVVGV 331
Ongo	FQKSSHLTVTPEDRKN-NKYQCVVQVKGIKDDFIRVLPD-----QDAAN-----	IVPIIIVGVVALLLSIVAVVVG 321
Onmy	FQKSSHLTVTPEDRKK-NKYQCVVQVKGIKDEFIKVLPD-----PDAAN-----	VVPIIIVGVVALLLIVAVVVG 319
Sasa	FQKSSHLTVTPEEWKN-NKYQCVVQVTGLQEDFIKVLTESEIKTNWNDPN-----	IVLIIIGVVVALLVVAVVVG 324
Hosa	FQKWAAVVVP--SGEEQRYTCHVQHEGLP-----IVGIVAGLAVLAVVIGAVVATKPLTLRWEPSQSTIP-----	329
	*	.
Raca	FVYKK-----KSDKRPPSPVNPEVMEQLNPSA-----	354 军曹鱼(<i>R.cadamus</i>)
Gici	IIYKKKGQ-----VKSNSPTDTSDTEFSDSPAVS-----	342 铰口鲨(<i>G.cirratum</i>)AAC60347
Trsc	VLYRKKAG-----QKTGYNPAKTSKDAESENSNSATA-----	342 皱唇鲨(<i>T.scyllium</i>)AAB97322
Bain	KVLQKKKK-----PDFKPVNA-----	330 间鮀(<i>B.intermedius</i>)CAD44955
Ctid	LVYQRKK-----GFKPVSASDDGSNSART-----	342 草鱼(<i>C.idella</i>)AAS76087
Cyca	KVYQKKK-----GFKPVNGSDDGSNSAHTDPKA-----	348 鲤(<i>C.carpio</i>)CAA62497
Icpu	VVWKKNS-----GFKPVPPPKPSEEDSLSSTSSLESNSYSTNS	367 斑点叉尾鮰(<i>I.punctatus</i>)AAG29241
Orla	IFYKK-----KNAKRPPSPVNDN--KEIQEMLQOPENPSA---	353 青鱈(<i>O.latipes</i>)BAB83849
Pore	VLVKR-----KRAKRPPSPVEN--AEVQROMIAK-----	333 孔雀鱼(<i>P.reticulata</i>)CAA90791
Auha	FFWKRR-----TNGQDKGGLNVPTLRLHLHQLKIQTLRKRAVKRSRR	368 红鰓慈鲷(<i>A.hansbaenschi</i>)AAD37812
Spau	VAYKRREACTSSSDNKSQNSEQSEPEQKKTLLPNA-----	374 金鲷(<i>S.aurata</i>)DQ211540
Stvi	LVYRK-----KKAICPPSTDSS-EVNEKLNQET-----	357 大眼鲷(<i>S.vitreum</i>)AAL11412
Taru	LLYRK-----KKGKCTKTEGHSE-VKVP1KPNP-----	367 红鳍东方鲀(<i>T.rubripes</i>)AAC41238
Epak	YVYKN-----RKAECSPKPQDNNP-ELTRLNHEGNNPR-----	357 赤点石斑鱼(<i>E.akaara</i>)ABX80521
Paol	IVYRK-----RNAECPPSPGNDPNVLPKLPNQ-----	353 牙鲆(<i>P.olivaceus</i>)BAD13368
Psma	FIYRR-----SNAKRPPSPVNNAGVMEQLNPK-----	353 大菱鲆(<i>P.maxima</i>)ABM92962
Gamo	LLYKK-----RKPSDQRHKPVATSDTSSEDA-----	357 大西洋鳕(<i>G.morhua</i>)AAL14532
Ongo	SLEEE-----EQERLCQSGQHFRH-----	339 细鳞大麻哈鱼(<i>O.gorbuscha</i>)BAA09553
Onmy	VIWRKR-----SKKGFPVASTSDTSDNSGRAPQI-----	350 虹鳟(<i>O.mykiss</i>)AAG25199
Sasa	VIWKKK-----SKKGFPVASTSDTSDNSGRAAQMT-----	355 大西洋鲑(<i>S.salar</i>)AAN75116
Hosa	VMCRRKSS-----GGKGGSYSQAASSDSAQGCDVSLTA-----	362 人类(<i>H.sapiens</i>)CAC15502

图2 推导的军曹鱼 MHC- I α 氨基酸与其他已知物种 MHC- I α 氨基酸比对图

上述序列比对对应不同的区域：前导肽、 α 1区、 α 2区和CP/TM/CYT区。“*”表示所有序列中都一致的氨基酸；

“:”表示保守的氨基酸；“.”表示半保守的氨基酸；深色阴影部分为军曹鱼和其他鱼类差异不显著的位点；

浅色阴影部分为军曹鱼和其他鱼类差异显著的位点。

Fig. 2 Sequence alignment of predicted MHC- I α amino acid from cobia and MHC- I α amino acid from other known species

Regions corresponding to the putative leader peptide, α 1, α 2 and CP/TM/CYT regions are shown above the sequences.

“*” means that the residues or nucleotides in that column are identical in all sequences in the alignment.

“:” means that conserved substitutions have been observed. “.” means that semi-conserved substitutions are observed.

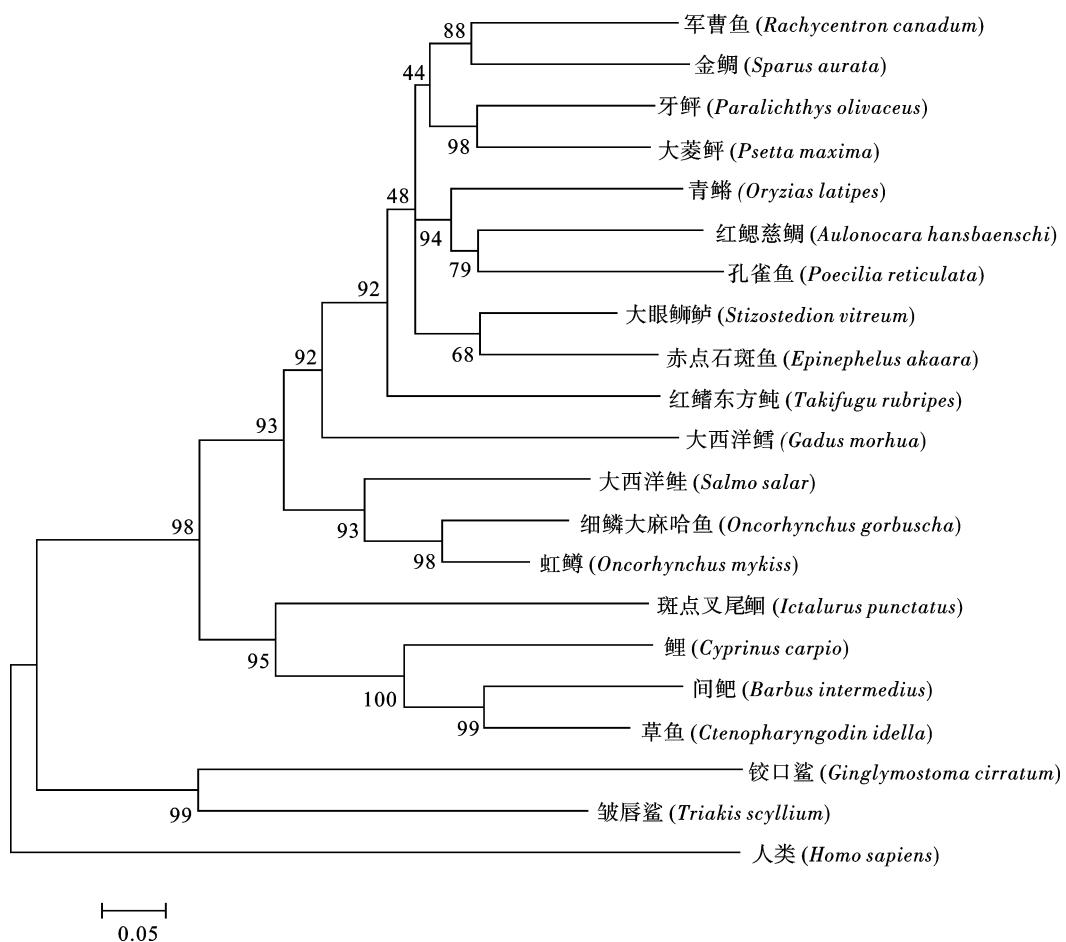
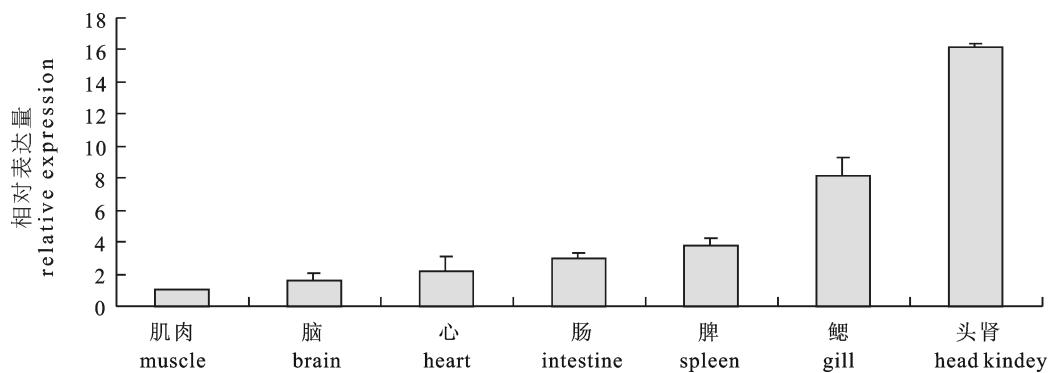
The dark shadow areas indicate no significant difference between cobia and other fish species; the light shadow

parts indicate significant difference between cobia and other fish species.

由于 α 3区的相对保守性，利用 MEGA 4.1 对此区域的序列构建系统进化树结果显示，军曹鱼和金鲷的关系最近，可能由于其均属于鲈形亚目。人类与鱼类形成 2 个独立分支，鱼类又分为硬骨鱼和

软骨鱼 2 支，军曹鱼与其他硬骨鱼类聚为 1 支，说明硬骨鱼 MHC- I α 基因与软骨鱼的亲缘关系较远，与哺乳动物的亲缘关系更远。

该试验利用 Real-time PCR 检测发现 MHC-I α

图3 利用 Clustal W 2.0 和 MEGA 4.1 软件构建的 MHC- I α 基因 (α3 区) 氨基酸序列的系统树Fig. 3 Phylogenetic tree of amino acid sequences of full-length MHC- I α gene (α3 region) by Clustal W 2.0 and MEGA 4.1图4 正常军曹鱼组织的 MHC-I α 基因的组织表达Fig. 4 Tissue expression of MHC-I α gene from cobia

在正常军曹鱼组织中均有表达, 其中肌肉、脑和心中表达较弱; 肠、鳃和脾中的表达量中等; 头肾中的表达量最强。

鱼类 MHC-I α 的基因表达具有组织特异性。

在对大眼鲷的 MHC-I α 基因研究中发现, MHC-I α 基因在头肾中也有丰富的表达量, 在脑、肌肉中的表达量较少。此结果与该试验结果一致。用 Northern blotting 方法分析虹鳟的 MHC-I α 在各组

织的表达量,结果显示在肾中的杂交信号较强,说明与军曹鱼一样,MHC-I α 基因在肾脏中有较高的转录水平。van ERP等^[6]检测到鲤的脾和肌肉中均有MHC-I α 的表达。YANG等^[8]在草鱼的鳃、肠、脾、脑、肾和肝中也发现MHC-I α 基因的存在。

目前,研究发现MHC-I类分子呈递内源性抗原和MHC-II类分子呈递外源性抗原并非绝对。某些情况下,外源肽可进入胞质溶胶途径,被MHC-I类分子传递,内源肽也可以从细胞中释放出来,被MHC-II类分子传递^[26]。头肾是免疫器官,该试验中军曹鱼MHC-I α 基因在头肾中的大量表达,可能由于其具有呈递外源性抗原的作用,所以此类基因可在免疫器官中有较强水平的基因表达。

参考文献:

- [1] 周光炎. 免疫学原理 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2000: 63-121.
ZHOU Guangyan. Principles of immunology [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing Press, 2000: 63-121. (in Chinese)
- [2] 王重庆. 分子免疫学基础 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1997: 139-140.
WANG Chongqing. Molecular immunology [M]. Beijing: Peking University Press, 1997: 139-140. (in Chinese)
- [3] HASHIMOTO K, NAKANISHI T, KOROSAWA K. Isolation of carp genes encoding major histocompatibility complex antigens [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87 (17): 6863-6867.
- [4] GRIMHOLT U B, HORDVIK I, FOSSE V M, et al. Molecular cloning of major histocompatibility complex class I cDNAs from Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. Immunogenet, 1993, 37 (6): 469-473.
- [5] HANSEN J D, STRASSBURGER P, DU PASQUIER L. Conservation of an alpha 2 domain within the teleostean world, MHC class I from the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. Dev Comp Immunol, 1996, 20 (6): 417-425.
- [6] van ERP S H M, DIXON B, FIGUEROA F, et al. Identification and characterization of a new major histocompatibility complex class I gene in carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Immunogenet, 1996, 44 (1): 49-61.
- [7] FUJIKI K, BOOMAN M, DIXON E C, et al. Cloning and characterization of cDNA clones encoding membrane-bound and potentially secreted major histocompatibility class I receptors from walleye (*Stizostedion vitreum*) [J]. Immunogenet, 2001, 53 (9): 760-769.
- [8] YANG Tianyao, HAO Huifang, JIA Zhenhu, et al. Characterization of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) MHC class I domain lineages [J]. Fish Shellfish Immunol, 2006, 21 (5): 583-591.
- [9] 孟庆闻. 鱼类学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987: 261-263.
- MENG Qingwen. Ichthyology [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing Press, 1987: 261-263. (in Chinese)
- [10] 勾效伟, 区又君, 廖锐. 我国军曹鱼研究现状 [J]. 海洋渔业, 2007, 29 (1): 84-89.
- GOU Xiaowei, OU Youjun, LIAO Rui. Present status on studies of cobia *Rachycentron canadum* in China [J]. Mar Fish, 2007, 29 (1): 84-89. (in Chinese)
- [11] 简纪常, 吴灶和, 陈刚, 等. 海水网箱养殖军曹鱼弧菌病病原的分离及其特性 [J]. 中国兽医学报, 2003, 23 (4): 329-330.
- JIAN Jichang, WU Zaohe, CHEN Gang, et al. Isolation and characteristics of pathogen of vibriosis in cobia (*Rachycentron canadum*) maricultured in cage [J]. Chinese J Vet Sci, 2003, 23 (4): 329-330. (in Chinese)
- [12] 郭明元, 刘广锋, 冯娟. 1株军曹鱼病原弧菌的鉴定及其系统发育树分析 [J]. 中国水产科学, 2006, 13 (5): 823-828.
GUO Mingyuan, LIU Guangfeng, FENG Juan. Identification and phylogenetic analysis of a pathogenic *Vibrio* sp. isolated from *Rachycentron canadum* [J]. J Fish Sci China, 2006, 13 (5): 823-828. (in Chinese)
- [13] 常藕琴, 石存斌, 马红, 等. 军曹鱼淋巴囊肿的病理学研究 [J]. 中国水产科学, 2006, 13 (6): 973-977.
CHANG Ouqing, SHI Cunbin, MA Hong, et al. Histopathological study on lymphocystis disease of *Rachycentron canadum* [J]. J Fish Sci China, 2006, 13 (6): 973-977. (in Chinese)
- [14] WANG Chuanjuan, ZHANG Xiaohua, JIA Airong, et al. Identification of immune-related genes from kidney and spleen of turbot, *Psetta maxima* (L.), by suppression subtractive hybridization following challenge with *Vibrio harveyi* [J]. J Fish Dis, 2008, 31 (7): 505-514.
- [15] SRISAPOOME P, OHIRA T, HIRONO I. Cloning, characterization and expression of cDNA containing major histocompatibility complex class I, II alpha and II beta genes of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Fish Sci, 2004, 70 (2): 264-276.
- [16] MATSUO M Y, ASAOKAWA S, SHIMIZU N, et al. Nucleotide sequence of the MHC class I genomic region of a teleost, the medaka (*Oryzias latipes*) [J]. Immunogenet, 2002, 53 (10/11): 930-940.
- [17] SATO A, KLEIN D, SULTMANN H, FIGUEROA F, et al. Class I MHC genes of cichlid fishes: identification, expression, and polymorphism [J]. Immunogenet, 1997, 46 (1): 63-72.
- [18] TIMON M, ELGAR G, HABU S, et al. Molecular cloning of major histocompatibility complex class I cDNAs from the pufferfish *Fugu rubripes* [J]. Immunogenet, 1998, 47 (2): 170-173.
- [19] AOYAGI K, DIJKSTRA J M, XIA C, et al. Classical MHC class I genes composed of highly divergent sequence lineages share a single locus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. J Immunol,

- 2002, 168 (1): 260-273.
- [20] MILLER K M, KAUKINEN K H, SCHULZE A D. Expansion and contraction of major histocompatibility complex genes: a teleostean example [J]. *Immunogenet*, 2002, 53 (10/11): 941-963.
- [21] GRIMHOLT U, DRABLOS F, JORGENSEN S M, et al. The major histocompatibility class I locus in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): polymorphism, linkage analysis and protein modelling [J]. *Immunogenet*, 2002, 54 (8): 570-581.
- [22] KRUISWIJK C P, HERMSEN T, FUJIKI K, et al. Analysis of genomic and expressed major histocompatibility class I α and class II genes in a hexaploid Lake Tana African large barb individual (*Barbus intermedius*) [J]. *Immunogenet*, 2004, 55 (11): 770-781.
- [23] ANTAAO A B, WILSON M, WANG J, et al. Genomic organization and differential expression of channel catfish MHC class I genes [J]. *Dev Comp Immunol*, 2001, 25 (7): 579-595.
- [24] BARTL S, BAISH M A, FLAJNIK M F, et al. Identification of class I genes in cartilaginous fish, the most ancient group of vertebrates displaying an adaptive immune response [J]. *Immunol*, 1997, 159 (12): 6097-6104.
- [25] OKAMURA K, OTOTAKE M, NAKANISHI T, et al. The most primitive vertebrates with jaws possess highly polymorphic MHC class I genes comparable to those of humans [J]. *Immunity*, 1997, 7 (6): 777-790.
- [26] 金伯泉. 细胞和分子免疫学 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2001: 290-295.
- JING Boquan. Cellular and molecular immunology [M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2001: 290-295. (in Chinese)