

## 红笛鲷主要组织相容性复合物 I $\alpha$ 抗原基因的克隆与表达分析

张新中<sup>1,2</sup>, 鲁义善<sup>1,2</sup>, 吴灶和<sup>1,2,3\*</sup>, 简纪常<sup>1,2</sup>

(1. 广东海洋大学广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室, 广东 湛江 524025;

2. 广东海洋大学广东省教育厅水产经济动物病害控制重点实验室, 广东 湛江 524025;

3. 仲恺农业工程学院, 广东 广州 510225)

**摘要:** 为研究红笛鲷免疫防御相关基因的作用机理和调控机制, 实验应用 cDNA 末端快速扩增技术 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 成功克隆了红笛鲷组织相容性复合物 I  $\alpha$  (*MHC I  $\alpha$* ) 抗原基因的全长 cDNA 序列, *MHC I  $\alpha$*  的全长序列为 1 369 bp, 编码 354 个氨基酸残基。BLAST 分析显示, 红笛鲷 *MHC I  $\alpha$*  与其他已知物种 *MHC I  $\alpha$*  基因的最高同源性为 84%。构建的系统进化树显示, 红笛鲷 *MHC I  $\alpha$*  与石斑鱼等 *MHC I  $\alpha$*  亲缘关系较近。Real-time PCR 分析表明, *MHC I  $\alpha$*  在头肾中的最大表达量出现在哈氏弧菌 ZJ0706 诱导后 6 ~ 15 h 内; 构建的重组表达质粒 pET32a-*MHC I  $\alpha$*  经 IPTG 诱导后在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中获得了正确表达。将纯化后的重组蛋白与佐剂混合后免疫新西兰纯种大白兔制备多克隆抗体。ELISA 检测显示, 所获得的兔抗血清效价约为 1:40 000。Western blot 检测发现, 本实验制备的抗血清能特异性地与重组蛋白发生抗原抗体反应。

**关键词:** 红笛鲷; 主要组织相容性复合物 I  $\alpha$  (*MHC I  $\alpha$* ); 原核表达; 克隆; cDNA 末端快速扩增技术 (RACE)

**中图分类号:** Q 786; S 917.4

**文献标志码:** A

主要组织相容性复合物 (major histocompatibility complex, MHC) 是广泛存在于脊椎动物体内的与免疫功能密切相关并编码免疫球蛋白样受体的高度多态性的基因群<sup>[1]</sup>。根据其编码产物的结构和功能, 目前 MHC 家族主要被分为 3 类: I 类基因区—内含经典 A、B、C 基因座和新近确定的非经典基因座 E、F、G、H 等; II 类基因区—包括 DP、DQ、DR、DN、DO 和 DM 6 个亚区; III 类基因区—位于 II 类与 I 类基因区之间, 内含众多编码补体成分和其它血清蛋白基因, 主要产物为 C4、CZ、B 因子、TNF $\alpha$ 、TNF $\beta$  和热激蛋白 70 等。鱼类 *MHC* 基因也是由 I 类区、II 类区和 III 类区组成, 目前, 对 *MHC* I 类和 II 类研究较多。

*MHC I* 是一个非共价结合的异源二聚体, 它由一个约 45 ku 的  $\alpha$  链和约 12 ku 的  $\beta_2$ -微球蛋白组成<sup>[2]</sup>。*MHC I  $\alpha$*  能在有核细胞中进行表达并递呈内源性抗原到细胞毒性 T 淋巴细胞。重链 *MHC I  $\alpha$*  是由先导肽、胞外结构域 ( $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$  和  $\alpha 3$ )、跨膜结构域和胞质区组成。然而, 有研究结果认为, 可溶性 *MHC I  $\alpha$*  类蛋白无跨膜区的存在<sup>[3]</sup>。基因组研究表明, 硬骨鱼基因组的拷贝数 (从 3 至 17) 是可变的, 就像 A1 和 A2 间的肽结合区 (PBR) 的多态性<sup>[4-6]</sup>。在基因层面, *MHC I* 的表达 (无论是 *MHC I  $\alpha$*  链或  $\beta_2$ -微球蛋白) 可能会受到物理因素 (如温度)、微粒抗原 (病毒、细菌等) 或内源可溶性蛋白 (细胞因子, 生长因子等) 的影响<sup>[2,7-11]</sup>。

收稿日期: 2011-12-09 修回日期: 2012-02-22

资助项目: 国家自然科学基金项目 (40906073); 广东省科技厅国际合作项目 (2009B050700040)

通讯作者: 吴灶和, E-mail: wuzh@gdou.edu.cn

红笛鲷 (*Lutjanus sanguineus*), 又名红鱼, 是中国南方沿海的重要经济鱼类之一。近年来, 海南、湛江等地养殖水域的红笛鲷频繁爆发由哈氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 引发的烈性传染疾病, 给养殖户带来巨大经济损失。然而, 有关红笛鲷免疫防御机制, 特别是分子免疫防御机制和免疫相关功能基因的研究只有零星报道<sup>[12-16]</sup>。本研究在红笛鲷头肾消减 cDNA 文库的基础上成功克隆了 *MHC I  $\alpha$*  基因的全长 cDNA 序列并进行了 real-time PCR 分析及多克隆抗体的制备, 这对探讨红笛鲷免疫防御相关基因的作用机理和调控机制具有重要意义, 为进一步改善红笛鲷的抗病力和免疫防御能力的研究打下坚实基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 红笛鲷的暂养

实验用红笛鲷采集自湛江港某鱼排, 质量 20 g 左右, 健康、有活力。充氧运至实验室后暂养于含 80 ~ 100 L 沙滤海水的水族箱中, 每箱 8 尾, 水温 (25  $\pm$  1)  $^{\circ}\text{C}$ 。每日投喂小杂鱼肉糜 2 次, 日换水量为 30 L 左右。暂养 7 d 后用于实验研究。

### 1.2 哈氏弧菌培养及感染

哈氏弧菌 ZJ0706 菌株 ( $\text{LD}_{50}$  为  $7.2 \times 10^5$  CFU/g) 于 TSB (2% NaCl) 培养基中 28  $^{\circ}\text{C}$  振荡 (120 r/min) 培养 18 h 后离心收集菌体。根据平板涂布测定的细菌浓度, 将细菌用无菌 PBS 稀释为  $1 \times 10^7$  /mL。感染实验采用腹腔注射法, 实验组红笛鲷每尾注射 0.1 mL 上述浓度哈氏弧菌菌液, 对照组每尾注射 0.1 mL 无菌 PBS。注射后放回原箱正常投喂养殖。

### 1.3 红笛鲷头肾及各组织样品的总 RNA 提取

在哈氏弧菌 ZJ0706 感染 3、6、9、15、24、36 及 48 h 时用浓度为 40 mg/L 的丁香酚将红笛鲷麻醉后采集头肾组织, 感染 15 h 时采集胸腺、肝脏、脾脏、肌肉、脑、肠和心脏 7 组织, 每个时间点采集 5 尾红笛鲷。组织采集量每尾约 100 mg, 按照 Trizol 试剂盒 (Invitroge, USA) 提供的方法提取总 RNA, 用 DNase I (TaKaRa, Japan) 对提取的总 RNA 进行消化处理以消除基因组 DNA 的残留, 最后 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。合并每一个时间点提取的同组相同组织的 5 管总 RNA 作为一个样本用于实时荧光定量 PCR 分析。

### 1.4 *MHC I $\alpha$* 基因全长 cDNA 序列克隆

使用 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation 试剂盒 (Roche, Germany) 进行 *MHC I  $\alpha$*  基因 5' 和 3' cDNA 末端的快速克隆。

**3' RACE** 根据 cDNA 文库信息设计一条特异性引物 F1, 序列为 5'-GCTGAAGAA-GTATGTGCAG TAT-3'。按照试剂盒操作手册, 用引物 oligo-dT 将头肾总 RNA 反转录为 cDNA 第一链后以 F1 为上游引物, 以试剂盒自带的锚定引物为下游引物进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1.0 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。目标条带回收纯化后与 pMD18-T 载体 (TaKaRa, Japan) 4  $^{\circ}\text{C}$  连接过夜, 转化到感受态大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ , 利用 M13 引物进行 PCR 检测后将阳性克隆送至上海生工生物有限公司测序。

**5' RACE** 根据已知的 *MHC I  $\alpha$*  基因 3' 端片段设计 3 条特异性引物 R1、R2、R3 用于 5' 端 RACE。利用引物 R1 (5'-GCATTCAGGACTCT-GGATTCAGTT-3') 将总 RNA 反转录为 cDNA 第一链, 纯化并 Poly A 加尾后用于 5' 端的扩增。首轮 PCR 以 oligo-dT 为上游引物, 以 R2 (5'-CTTCGTTG GTCCTGATCTCTGCT-3') 为下游引物进行扩增。PCR 反应条件为 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 52  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min。次轮 PCR 以 20 倍稀释后的首轮 PCR 产物为模板, 以 oligo-dT 锚定引物为上游引物, 以 R3 (5'-TCTCCA TCTTTCCTCCAGAACAG-3') 为下游引物进行扩增。PCR 反应条件为: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 56  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min。切胶回收目的产物, 克隆转化后送至上海生工生物有限公司测序。

### 1.5 生物信息学分析

应用 BLAST 程序进行序列同源性比对和相似性分析; 用 DNAMAN 5.2.2 软件进行序列拼接; 开放阅读框 (ORF) 的确定以及氨基酸序列的翻译采用 Genetyx 7 软件; 信号肽序列及跨膜结构域的预测分别使用 SignalP 3.0 Server 和 TMHMM Server v. 2.0。在线软件 PredictProtein 查询各功能位点。应用 Clustal-Raindy 软件进行序列的多重比对; 使用 MEGA 4 软件, 以邻接法

(Neighbor-Joining, NJ)构建系统进化树。在线软件 PSORT II Prediction 预测蛋白的亚细胞定位。

### 1.6 *MHC I α* 基因表达的实时荧光定量 PCR 分析

按 SYBR Premix Ex Taq™ (TaKaRa, Japan) 试剂盒说明书应用 ABI7300 real-time PCR System (Applied Biosystems, USA) 完成荧光定量 PCR 分析,每一样本做 3 平行对照。

使用 PrimeScript Reverse Transcriptase 试剂盒 (TaKaRa, Japan) 将总 RNA 反转录为一链 cDNA, 1:5 ~ 1:20 倍稀释后用于荧光定量 PCR 分析。实验使用的内参基因  $\beta$ -actin 序列由广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室提供,序列分别为  $\beta$ F1 (5'-GTCATGTGG-ATCAGCAAGC AGGA-3') 和  $\beta$ R1 (5'-CGCCCG-AGTGTGTATG AGAAATG-3'),产物大小为 116 bp; *MHC I α* 基因特异性引物序列分别为 F5 (5'-GGACCATCACTAGCGAACTCATT-3') 和 R5 (5'-A GGCTGAGAG CAACTTGG TCTG-3'),产物大小为 106 bp。50  $\mu$ L 反应体系中包含 25  $\mu$ L 2 × SYBR Premix Ex Taq, 上下游引物各 1  $\mu$ L (10 mmol/L), 22  $\mu$ L 稀释后的模板, 1  $\mu$ L 50 × ROX Reference Dye (TaKaRa, Japan)。PCR 反应条件为 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 20 s, 58 °C 20 s, 72 °C 20 s, 40 个循环。

### 1.7 数据统计与分析

应用荧光定量 PCR 仪自带软件 7 300 System SDS Software, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法自动进行目标基因表达效率分析, 根据每一样本表达效率的计算结果, 取 3 个平行对照结果的平均值绘制树形图; 应用 SPSS 11.0 for Windows 软件对获得的实验数据进行 ANOVA 单因素方差分析和 Tukey HSD 多重比较, 检验不同组间目标基因的表达差异, 以  $P < 0.05$  作为显著性差异。

### 1.8 重组质粒 pET32a-*MHC I α* 的构建

设计一对在 5' 端和 3' 分别加入 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切位点的引物 (IF 和 IR) 扩增 *MHC I α* 的开放阅读框。IF 和 IR 序列分别为 5'-CGC GGATCCATGGCTTCGTGTTTAAAGTT-3' (*Bam*H I) 和 5'-ACGCGTCGACTTATGGTAGT GAGAGAGC-3' (*Sal* I)。PCR 反应条件为 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 45 s, 60 °C 45 s, 72 °C 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 7 min。切胶回收目的

产物, 克隆转化后送至上海生工生物有限公司测序。构建的重组质粒命名为 pMD18-*MHC I α*。

pET32a(+) 表达载体质粒及重组质粒 pMD18-*MHC I α* 分别接种于 Amp<sup>+</sup>/LB 液体培养基中扩大培养。离心回收菌体后利用 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒 (上海生工生物有限公司) 提取表达质粒及重组质粒。提取的 pET32a(+) 质粒及 pMD18-*MHC I α* 重组质粒经琼脂糖凝胶电泳检测后使用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sal* I (NEB, USA) 进行双酶切 6 h, 切胶回收目的条带。利用 T<sub>4</sub> 连接酶 (NEB, USA) 将双酶切后的质粒 pET32a(+) 与双酶切后的 PCR 产物于 16 °C 连接过夜。最后将连接产物转化 DH5 $\alpha$ , 将阳性克隆接种于 Amp<sup>+</sup>/LB 液体培养基中扩大培养并进行重组质粒提取, 将获得的重组质粒转化至感受态 BL21 (DE3), PCR 确认的阳性克隆进行测序并提取重组质粒双酶切以进一步确认重组质粒的正确性。构建的表达重组质粒命名为 pET32a-*MHC I α*。

### 1.9 融合蛋白的诱导表达

接种阳性克隆菌液于 Amp<sup>+</sup>/LB 液体培养基中, 37 °C, 200 r/min 培养过夜, 次日按 1:100 的比例接种到新鲜的 Amp<sup>+</sup>/LB 液体培养基中, 于 37 °C 200 r/min 培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.4 ~ 0.6 时, 添加 IPTG 至终浓度为 0.7 mmol/L, 于 37 °C 继续震荡培养, 6 h 后取 1 mL 菌液 10 000 r/min 离心 1 min 收集沉淀。菌体 PBS 重悬后超声破碎并 SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白。

### 1.10 Western blot

使用蛋白转印装置将 SDS-PAGE 分离的重组蛋白转移至硝酸纤维素膜上。以 6-His · Tag 单克隆抗体为一抗, HRP-标记的羊抗鼠 IgG 为二抗进行 Western blot 分析, DAB 显色, ddH<sub>2</sub>O 终止反应, 拍照。其中, 以导入重组质粒的 BL21 为实验组, 以未导入重组质粒的 BL21 为对照组。

### 1.11 *MHC I α* 基因在大肠杆菌中表达条件的优化

在 IPTG 浓度为 0.1、0.4、0.7 和 1.0 mmol/L 条件下于 37 °C 诱导 6 h, 分别离心收集菌体并超声破碎进行 SDS-PAGE 分析。

在 16、28 和 37 °C 条件下 (IPTG 浓度为 0.7 mmol/L) 诱导 6 h, 分别离心收集菌体并超声破碎进行 SDS-PAGE 分析。

IPTG 浓度为 0.7 mmol/L 时,37 °C 条件下诱导 2、4、6、8、10 及 12 h 分别离心收集菌体并超声破碎进行 SDS-PAGE 分析。

### 1.12 重组蛋白的纯化及浓度测定

将重组质粒培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.4 ~ 0.6, 按照优化的诱导条件诱导后离心收集菌体, 菌体超声破碎后提取重组蛋白。利用 His Trap HP column (GE health, USA) 进行重组蛋白的纯化。其中咪唑的洗脱浓度分别为 30、60、90、120、150、200、250 和 300 mmol/L。最后将收集到的蛋白进行 SDS-PAGE 分析。

蛋白质浓度按照 K4000 Bradford 蛋白质定量测定试剂盒(博彩,上海)说明书进行测定。

### 1.13 多克隆抗体的制备及效价检测

利用新西兰纯种大白兔制备多克隆抗体。4 只实验兔分为两组采用皮下多点注射法进行免疫, 每点注射约 0.2 ~ 0.4 mL。一组采用佐剂乳化抗原免疫, 每只兔子每次免疫约 500  $\mu$ g 重组蛋白; 另一组为对照组, 采用同样方法注射无菌 PBS。实验组首次免疫使用重组蛋白与弗氏完全佐剂 (Sigma, USA) 的乳化剂, 首次免疫 12 d 后用重组蛋白与弗氏不完全佐剂的乳化剂进行 5 次加强免疫, 免疫间隔期为 7 d。6 次免疫后第 5 天停止喂食(只喂水), 12 h 后通过颈动脉采血。将装有血液的瓶子室温放置 2 h 待其凝固后置 4 °C 过夜让血块收缩; 次日 4 °C 4 500 r/min 离心 10 min, 无菌操作吸出血清, 分装后置 -80 °C 保存备用。

采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定血清效价。一抗为本实验制备的兔抗血清, 二抗为 HRP 标记的羊抗兔 IgG (博士德, 武汉)。终止显色后在酶标仪上读出  $\lambda = 450$  nm 处的 OD 值, 用 Student's *t*-test 统计显著性差异。抗体滴度根据 P/N 值来确定。P/N = (待检血清的 OD<sub>450</sub> - 空白对照的 OD<sub>450</sub>) / (阴性血清的 OD<sub>450</sub> - 空白对照的 OD<sub>450</sub>)。当 P/N > 2.1 时抗血清的最高稀释倍数为其最终抗体滴度。数据以平均数  $\pm$  标准差表示。

### 1.14 抗血清免疫反应性检测

基于纯化的重组蛋白利用 Western blot 技术检测本实验制备的抗血清的免疫反应性。将实验组和对照组抗血清分别用 0.01 mol/L 无菌 PBS

(pH = 7.4) 稀释 1 000、2 000 和 3 000 倍后作为一抗, 以 HRP 标记的羊抗兔 IgG 作为二抗进行 Western blot 分析。最后加入 DAB 显色至有清晰的目标蛋白带出现, 用 ddH<sub>2</sub>O 终止反应, 拍照。

## 2 结果

### 2.1 MHC I $\alpha$ 基因全长 cDNA 序列的克隆

利用引物 F1 进行 3' RACE 获得了 701 bp 的 MHC I $\alpha$  抗原基因 3' 端 cDNA 序列。利用引物 R1、R2 和 R3 进行 5' RACE 获得了 826 bp 的 MHC I $\alpha$  基因 5' 端 cDNA 序列; DNAMAN 5.2.2 软件对 3' 和 5' 端序列进行拼接得到 1 369 bp 的 MHC I $\alpha$  基因全长 cDNA 序列。GenBank 数据库登录号为 ADX01349.1。

### 2.2 MHC I $\alpha$ 抗原基因序列特征分析

MHC I $\alpha$  基因 cDNA 序列全长为 1 369 bp, 包含一个能编码 354 个氨基酸的 1 062 bp 的开发阅读框。软件预测其编码的氨基酸分子量为 39.9 ku, 理论等电点为 5.25。另外, MHC I $\alpha$  的 5' 非编码区 (UTR) 为 114 bp, 3' UTR 为 190 bp; 软件预测的 N-糖基化位点 (NQTG)、酪氨酸激酶磷酸化位点 (RATEDRADY) 和酰胺化位点 (DGKK) 分别位于位点 105 ~ 108、70 ~ 78 和 270 ~ 272 处。此外, 还有 4 个蛋白激酶 C 磷酸化位点、2 个 N-肉豆蔻酰化位点和 2 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点存在于氨基酸序列中。整体上看 MHC I $\alpha$  变异较大, 特别是在 C 端 (图 1)。

### 2.3 MHC I $\alpha$ 基因的生物信息学分析

BLAST 分析显示, 红笛鲷 MHC I $\alpha$  与其他硬骨鱼的 MHC I $\alpha$  具有较高的同源性。MHC I $\alpha$  的核苷酸序列及氨基酸序列与已公布的其他物种 MHC I $\alpha$  的最高同源性为分别为 84% 和 69%。多重比较证实, MHC I $\alpha$  变异较大 (图 1), 特别在 C 端区域。软件预测显示, 红笛鲷的 MHC I $\alpha$  不仅具有信号肽序列, 还具有跨膜结构域。根据不同物种 MHC I $\alpha$  氨基酸序列构建的系统进化树显示 (图 2), 红笛鲷 MHC I $\alpha$  与鼓眼鱼 (*Sander vitreus*) 及石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 的 MHC I 亲缘关系较近。另外, MHC I $\alpha$  在细胞上不同位置分布的几率分别为内质网 (44.4%), 高尔基体 (33.3%), 质膜 (22.2%)。

	* * * * *	
<i>L. Sanguineus</i>	.... MKILMFLFLG... IDLHGATAVIHSLKYFYTGSSQ. VPMFPEFVVVGLVDEVQMVHFDSTKKTTEP	63
<i>E. coioides</i>	...mrqltMkawiylgllflsLHGAsAmthSLKYFYTaSSQ. VPMFPEFVVVGLVDEVVHVHDSNTSraEP	68
<i>S. vitreus</i>	...mktlvvavllLG...lmvqdAsAVtHSMKYFYTaSSg. VPMFPEFVgVGLVDdVeMVHDSNTKrTEP	64
<i>R. norvegicus</i>	mgrkglqwglmmFLpfltwflakqshtrtHSLrYFrLaiSdpgPgVPEFisVGyWDshpittyDSvTrqkEP	73
<i>H. sapiens</i>	mg.....elmaFLLplliivlmvkhdsrthSLrYFrLgVsdpihgVPEFisVGyWDshpittyDSvTrqkEP	67
	* * * * *	
<i>L. Sanguineus</i>	KQDWMSRATEDRADYWEYQTQVLVGEHQSFQKGNIDILKPRFNQGTGGVHIVQRMVGCCEWDDTKEIKGFSQYGY	136
<i>E. coioides</i>	KQDWMSRvTEDvpqYWqreTesflGdqQifKaNIetaKqRFNQTGGVHIaQvMfGCEWdNtGnInGFnQqGY	141
<i>S. vitreus</i>	KQDWMSRvTEDdpqYWErnTgnfVGSqQvFKagIeILKPRFNQGTGGVHIVQRMVGCCEWDDTgEvmGFSQwGY	137
<i>R. norvegicus</i>	rapWMAen..lapDhWEryTQlLrGwqrTfQtelrhLqrhyNhsG. lHtyQRMiGCElled. gSttGF1QYaY	142
<i>H. sapiens</i>	rapWMAen..lapDhWEryTQlLrGwqMFKvelkrLqrhyNhsG. sHtyQRMiGCElled. gSttGF1QYaY	136
	* * * * *	
<i>L. Sanguineus</i>	DGEDFISFDLKTETTYIAPNQQAIVITKHKWDNNEAGIAYIKQYLtQICPDWLKKYVDYGRSSLMRTELPSVSLl	209
<i>E. coioides</i>	DGEDFISlDLKTETwIAPkpQAVITKHKWDNdkArIAqwKhdLTqhCPaWLKKYmDYGRSSLlRkdLPSVSLl	214
<i>S. vitreus</i>	DGEDFISFDLKTESYvAPkQQAIVITKHKWDNdkAeIsqrKhYLTQeCPeWvKKYlnYGRSSLlRTdrPSVSLl	210
<i>R. norvegicus</i>	DGqDFIvFDkdTlswlAmdnvAhITKraWeaNlhelqYqKwLeeeCiaWLKrfleYGsdaLeRTEhFvVrTt	215
<i>H. sapiens</i>	DGqDFliFnkdTlswlAvdnvAhtiKqaWeaNqhellYqKwLeeeCiaWLKrfleYGkdTLqRTEpFlVrvn	209
	* * * * *	
<i>L. Sanguineus</i>	QK...TSSSPVSHASGFYPDRASLFWRKDGEEHHEGVDQGEILPNHDGTFQMSVDLDLSS..AEDGKKFECV	277
<i>E. coioides</i>	QK...spSSPVSrHAtGFYPnRAmIFWRKDGEElyEnVDhGEILPNHDGsFQMSsDLnvSSvppEDweryECV	284
<i>S. vitreus</i>	QK...spSSPVSCHAtGFYPDRAnnFWRKDGEEHHEdVDvGEdtLPnDGSFQMSVDLDLSSvpAEDwrrydCV	280
<i>R. norvegicus</i>	rKetfpgittlfcraAhGFYPpeiSmiWkKnGEEivqeVDyGgvLPsgDGTyQmWVsvDLdp...qtkdiysCh	285
<i>H. sapiens</i>	rKetfpgvtalfCkAhGFYPpeiymtWmKnGEEivqeidyGdILPsgDGTyQawasieLdp...qsnlyysCh	279
	* * * * *	
<i>L. Sanguineus</i>	FQLSGAK. DIVTKLDKAEIRTNEVNPVPVPA. VIAAVVWLTLVLIAVIGFVLVYKKKKAACPPSPDTGSELSE	348
<i>E. coioides</i>	FQLSGvKeDIVTKL..AvIRTNrekPtdVtvpIIAAVVWLapiLTAVIGyViYKnrK. AeCskpqDnnpELsv	354
<i>S. vitreus</i>	FQLSGmKdDIVTKLDKAKIRTNrekPtdmttPIAAVVWLALVLAVIGvVlVYrKKK. AKCP. pstdsSEvne	351
<i>R. norvegicus</i>	vehcGlq.....mvleapqesgntllvantisgtiliivlAgvGaliwrrrs. repkevmyqptqvnE	348
<i>H. sapiens</i>	vehcGvh.....mvlqvpqesetiplvmkavsgsivlvivlAgvGvlwrrrp. reqngaiylptpdr.	341
	* * * * *	
<i>L. Sanguineus</i>	KLNPEs...	354
<i>E. coioides</i>	KLNPEgnmpr	364
<i>S. vitreus</i>	KLNqEt...	357
<i>R. norvegicus</i>	gssPs.....	353
<i>H. sapiens</i>	.....	341

图1 红笛鲷 MHC I  $\alpha$  氨基酸序列与其它已知 MHC I 氨基酸序列多重比对

物种名称及 GenBank 登录号分别为斜带石斑鱼, ACZ97571. 1; 鼓眼鱼, AAL11412. 1; 智人, NP\_001522. 1; 大鼠, EDM09513. 1。 “\*” 指示相同的氨基酸残基。

Fig. 1 Multiple alignments of the deduced amino acid sequences of humphead snapper MHC I  $\alpha$  with MHC I of other species

The GenBank accession numbers of the MHC I s are as follows: *Epinephelus coioides*, ACZ97571. 1; *Sander vitreus*, AAL11412. 1; *Homo sapiens*, NP\_001522. 1; *Rattus norvegicus*, EDM09513. 1; Identical residues are marked with “\* ”.

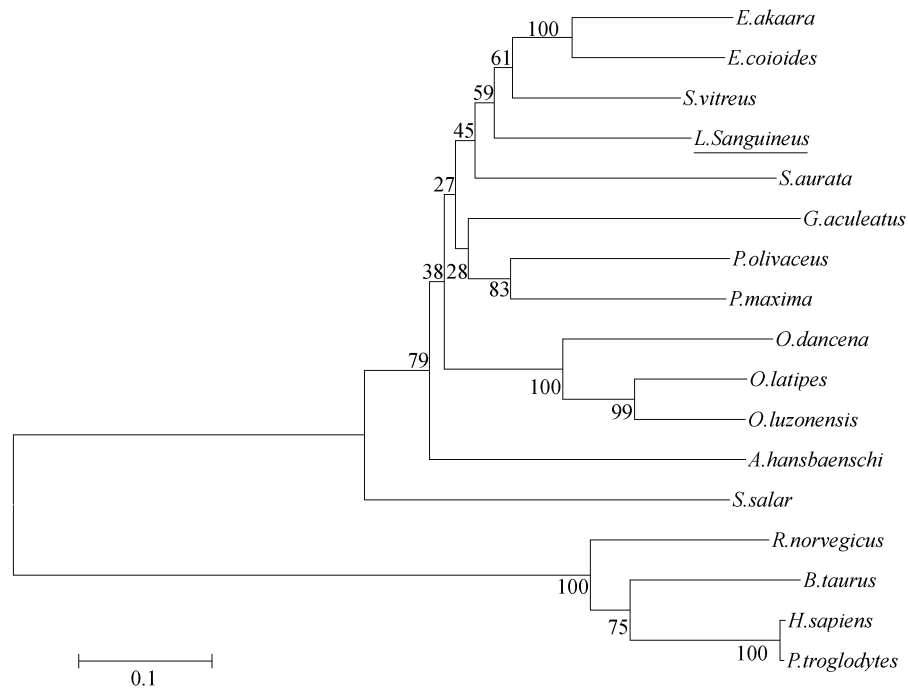


图2 以NJ法构建的MHC I家族成员核苷酸序列系统进化树

物种名称及 GenBank 登录号分别为:鼓眼鱼, AAL11412.1;青鲮, BAJ07293.1;赤点石斑鱼 ABX80523.1;金头鲷, ABB04087.1;斜带石斑鱼, ACZ97571.1;吕宋青鲮, ACN49174.1;恒河青鲮, ACN53464.1;牙鲆, BAD13 368.1;大菱鲆, ABM92962.1;汉斯孔雀鲷, AAD37812.1;三棘刺鱼, ABN14358.1;大西洋鲑, AAN75113.1;智人, NP\_001522.1;黑猩猩, CAC34274.1;大鼠, EDM09513.1;黄牛, NP\_001177227.1。

Fig. 2 A phylogenetic tree of MHC I family members constructed with the Neighbour-Joining method

The species names and the GenBank accession numbers are as follows: *S. vitreus*, AAL11412.1; *O. latipes*, BAJ07293.1; *E. akaara*, ABX80523.1; *S. aurata*, ABB04087.1; *E. coioides*, ACZ97571.1; *O. luzonensis*, ACN49174.1; *O. dancena*, ACN53464.1; *P. olivaceus*, BAD13 368.1; *P. maxima*, ABM92962.1; *A. hansbaenschii*, AAD37812.1; *G. aculeatus*, ABN14358.1; *S. salar*, AAN75113.1; *H. sapiens*, NP\_001522.1; *P. troglodytes*, CAC34274.1; *R. norvegicus*, EDM09513.1; *B. taurus*, NP\_001177227.1.

#### 2.4 MHC I $\alpha$ 基因的表达分析

实时荧光定量 PCR 分析结果显示,在实验组和对照组中都能检测到 MHC I  $\alpha$  mRNA 的表达。在头肾中, MHC I  $\alpha$  的表达上调开始发生在哈氏弧菌 ZJ0706 感染后的 3~6 h 内,在感染后 9 h 左右达到最大值,接着开始下调(图 3)。SPSS 分析显示, MHC I  $\alpha$  在感染后 15~48 h 内的表达水平与对照组的表达水平差异显著( $P < 0.05$ ),在 6 h 和 9 h 时达到差异极显著水平( $P < 0.01$ )。不同组织中 MHC I  $\alpha$  mRNA 表达情况分析显示,在感染后 15 h, MHC I  $\alpha$  在脾脏中的表达量最大,其次为头肾;在脑组织中表达量最小(图 4)。

#### 2.5 MHC I $\alpha$ 双酶切及表达载体的构建

重组质粒 pMD18-MHC I  $\alpha$  和 pET32a-MHC I  $\alpha$  双酶切产物大小相符(图 5),且双向测序未发现 MHC I  $\alpha$  有错配、易位或突变,这表明重组表达质粒 pET32a-MHC I  $\alpha$  构建成功。

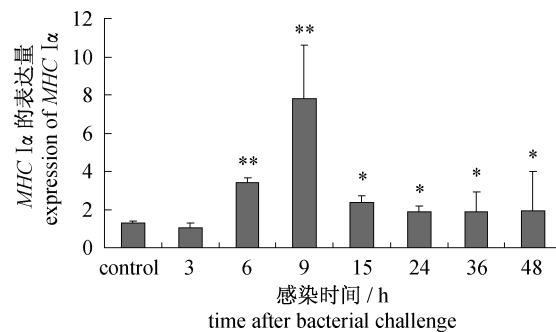


图3 哈氏弧菌 ZJ0706 感染不同时间红笛鲷头肾中 MHC I  $\alpha$  mRNA 的表达变化

\* 表示在 0.05 水平上差异性显著( $P < 0.05$ ); \*\* 表示在 0.01 水平上差异性显著( $P < 0.01$ )。

Fig. 3 The mRNA expression level of MHC I  $\alpha$  in head kidney at different time points after *V. harveyi* ZJ0706 challenge

\* means significant differences at 0.05 level( $P < 0.05$ ); \*\* means significant differences at 0.01 level( $P < 0.01$ ).

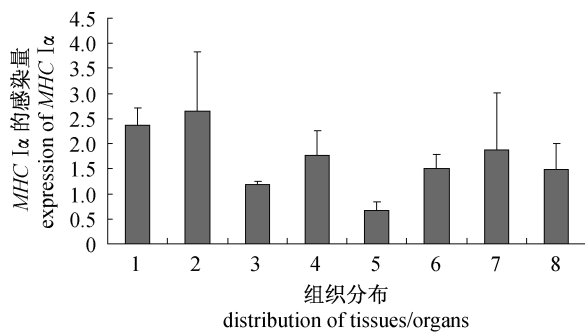


图4 哈氏弧菌 ZJ0706 感染 15 h 后各组织中  $MHC I \alpha$  mRNA 的表达差异

1. 头肾, 2. 脾, 3. 胸腺, 4. 肝脏, 5. 脑, 6. 肠, 7. 肌肉, 8. 心脏。

Fig. 4 The expression level of  $MHC I \alpha$  mRNA in different tissues at the time point of 15 h after *V. harveyi* ZJ0706 challenge

1. head kidney, 2. spleen, 3. thymus, 4. liver, 5. brain, 6. intestine, 7. muscle, 8. heart.

## 2.6 $MHC I \alpha$ 基因的原核表达

pET32a- $MHC I \alpha$  重组质粒可以表达分子量约 60 ku 的融合蛋白, 其中  $MHC I \alpha$  的预计分子量为 39.9 ku, pET32a 表达的融合标签为 20.2 ku, 所以图6-a中显示的融合蛋白的分子量

为 60.1 ku; His · Tag 单克隆抗体进行 Western blot 检测也表明  $MHC I \alpha$  抗原基因成功表达(图6-b)。

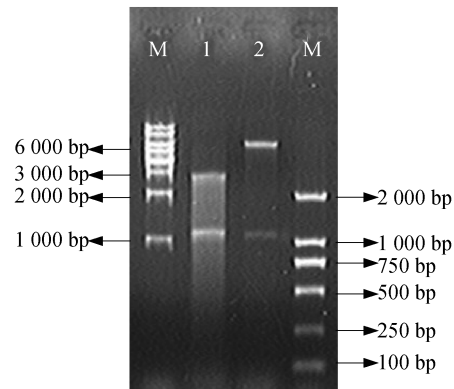


图5 重组质粒 pMD18- $MHC I \alpha$  和 pET32a- $MHC I \alpha$  双酶切鉴定结果

M. marker; 1. 重组质粒 pMD18- $MHC I \alpha$  双酶切鉴定结果; 2. 重组质粒 pET32a- $MHC I \alpha$  双酶切鉴定结果。

Fig. 5 The results of enzyme restriction of the recombinant plasmid pMD18- $MHC I \alpha$  and pET32a- $MHC I \alpha$  M. DNA marker; 1. the result of enzyme restriction of the recombinant plasmid pMD18- $MHC I \alpha$ ; 2. the result of enzyme restriction of the recombinant plasmid pET32a- $MHC I \alpha$ .

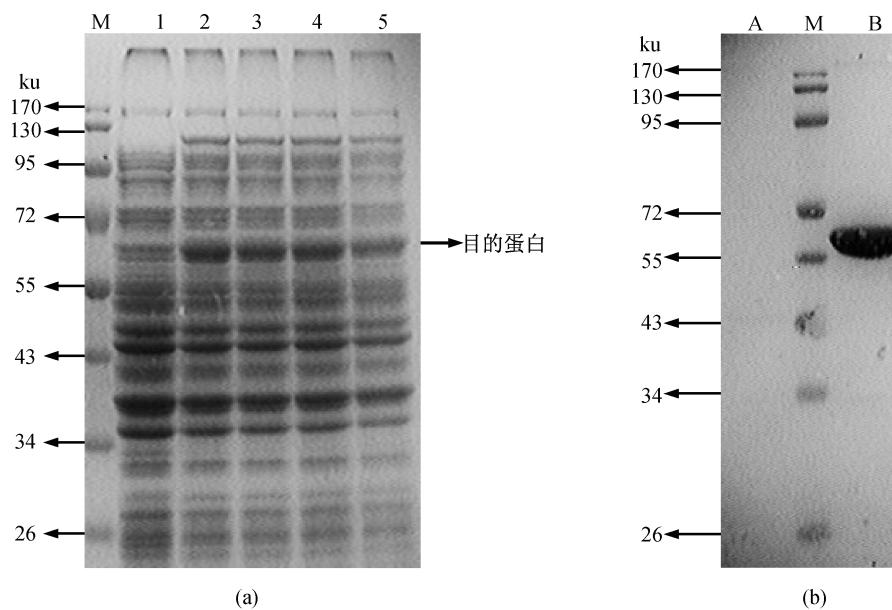


图6 pET32a- $MHC I \alpha$  在大肠杆菌中表达的 SDS-PAGE 分析 (a) 和用 His · Tag 单克隆抗体进行 Western blot 分析 (b)

(a) 1. pET32a- $MHC I \alpha$  未诱导; 2~5. pET32a- $MHC I \alpha$  的诱导表达; (b) A. 空白对照的 Western blot 结果; B. 融合蛋白的 Western blot 结果。M. 蛋白分子量标准。

Fig. 6 SDS-PAGE (a) and Western blot analysis (b) of pET32a- $MHC I \alpha$  expressed in *E. coli* BL21

(a) 1. pET32a- $MHC I \alpha$  without IPTG induction; 2~5. pET32a- $MHC I \alpha$  induced with IPTG; (b) A. western blot of control; B. Western blot of recombinant protein. M. prestained protein marker.

## 2.7 融合蛋白 *MHC I $\alpha$* 抗原基因在大肠杆菌中表达条件的优化

通过对诱导时间、温度、IPTG 浓度的优化,最终确定融合蛋白 pET32a-*MHC I  $\alpha$*  在大肠杆菌中最佳诱导表达条件为 0.1 mmol/L IPTG, 28  $^{\circ}$ C 条件下诱导 10 h, 且以包涵体的形式存在。

## 2.8 重组蛋白的纯化及定量

在优化的表达条件下诱导重组蛋白表达,采用亲和层析法纯化融合蛋白。用不同咪唑浓度的缓冲液洗脱,收集各步洗脱液电泳检测,电泳结果见图 7。图中可以看出 120 mmol/L 咪唑洗脱(第 4 泳道)纯化效果最佳。收集 120 mmol/L 咪唑洗脱液,用 K4000 Bradford 蛋白质定量试剂盒测定蛋白浓度,融合蛋白浓度约为 500  $\mu$ g/mL。

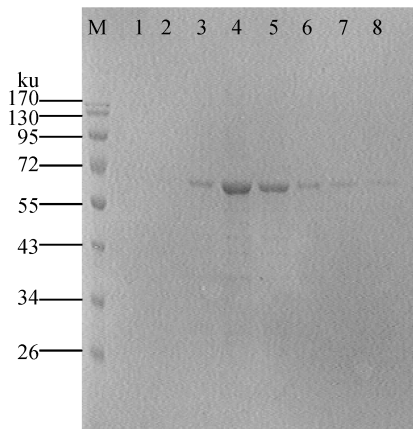


图 7 融合蛋白纯化产物的 SDS-PAGE 分析

1~8. 分别用咪唑浓度为 30、60、90、120、150、200、250 和 300 mmol/L 的洗脱液进行洗脱的效果。M. 蛋白分子量标准。

Fig. 7 Purification product of fusion protein analyzed by SDS-PAGE

1-8. The results of elution with the imidazole concentration of 30, 60, 90, 120, 150, 200, 250 and 300 mmol/L. M. prestained protein marker.

## 2.9 兔抗 *MHC I $\alpha$* 多克隆抗体效价测定

在第 6 次免疫后的第 5 天,通过颈动脉采血,每只兔获得血液约 70 mL,最后得到血清约为 40 mL。用 ELISA 检测效价发现,*MHC I  $\alpha$*  产生了高效价的抗体,效价约为 1:40 000。

## 2.10 融合蛋白的免疫反应性

Western blot 分析发现,*MHC I  $\alpha$*  兔抗血清能与诱导表达的 60 ku 的重组蛋白发生抗原抗体反应,在 60 ku 处有印迹带,对照组的抗血清不能与 60 ku 带发生反应(图 8)。

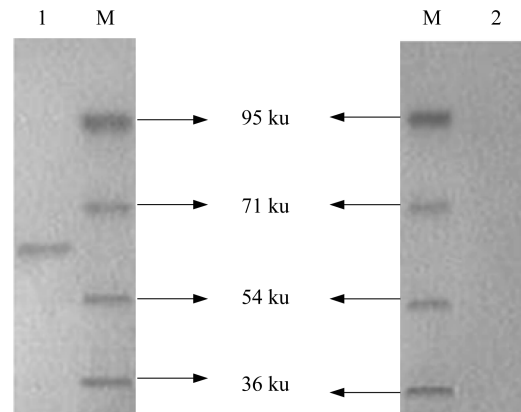


图 8 融合蛋白的免疫印迹

M. 蛋白分子量标准;1. 实验组抗血清与融合蛋白反应结果;2. 对照组抗血清与融合蛋白的反应结果。

Fig. 8 Western blot analysis of fusion protein

M. prestained protein marker; 1. Reaction results based on the antiserum of test group and the fusion protein; 2. Reaction results based on the antiserum of control group and the fusion protein.

## 3 讨论

自 20 世纪 90 年代以来,有大量的关于硬骨鱼 *MHC* 基因克隆、鉴定的报道,并对其在鱼体不同器官中的表达特征及相关功能也进行了广泛的研究<sup>[17]</sup>。本研究首次在红笛鲷头肾 SSH 文库<sup>[12]</sup>构建的基础上成功克隆了 *MHC I  $\alpha$*  基因的 cDNA 全长序列,并对其在病原菌诱导后表达模式进行了研究,同时我们还对重组蛋白 pET32a-*MHC I  $\alpha$*  进行了原核表达及多克隆抗体的制备。

推测的红笛鲷 *MHC I  $\alpha$*  氨基酸序列与 GenBank 数据库中硬骨鱼类 *MHC I* 的同源性最高为 69%;与人类 *MHC I* 氨基酸序列的同源性为 15.8%。构建的系统进化树分析表明,红笛鲷 *MHC I  $\alpha$*  抗原与鼓眼鱼及石斑鱼等的 *MHC I* 亲缘关系较近。*MHC I* 氨基酸序列比对发现编码 *MHC I* 的序列由三个胞外域、一个连接肽、一个跨膜结构域和胞浆域组成。红笛鲷 *MHC I  $\alpha$*  抗原的这些结构特征与半滑舌鲷<sup>[18]</sup> (*Cynoglossus semilaevis*) 的 *MHC I* 结构特征相似。另外,*MHC I  $\alpha$*  抗原具有的这些结构特征说明它能编码结合肽,能协同  $\beta$ 2 巨球蛋白及与 CD8 相互作用<sup>[19]</sup>。哺乳动物典型的 *MHC I* 分子的氨基酸序列的保守肽结合位点是 YYYITKWYY,但是在非哺乳动物 *MHC I* 中,保守肽结合位点的氨基酸组成会有轻微变化<sup>[20]</sup>。通过比较得知,本研究获得的



*MHC I*  $\alpha$  的保守肽绑定位点由 YYSFTKRY 组成,这种组成与半滑舌鳎<sup>[18]</sup>的保守结合定位点组成相似。

Antao 等<sup>[21]</sup>认为几乎所有的有核细胞的 *MHC I* 的表达模式都是差不多的。本研究中, *MHC I*  $\alpha$  的最高表达量出现在脾脏和头肾中,这与 Xu 等<sup>[22-23]</sup>的研究结果相似。这说明当病原菌入侵鱼体时,鱼体的免疫反应的发生可能是从脾脏和头肾开始,它们可能是 *MHC I*  $\alpha$  抗原功能的敏感器官。另外,RT-PCR 的结果显示,哈氏弧菌 ZJ0706 感染后红笛鲷头肾中 *MHC I*  $\alpha$  抗原 mRNA 的表达量随时间发生了巨大变化,且在 15 h 后出现持续下调的状态。但是,Jørgensen 等<sup>[11]</sup>报道认为 *MHC I*  $\alpha$  在受到病原刺激后在数天内会持续上调,与本研究的结果不同。分析认为这可能与毒株 ZJ0706 的毒力大小有关。本研究使用的哈氏弧菌 ZJ0706 为强毒株,攻毒 15 h 后可能已造成红笛鲷的头肾器官衰竭,从而导致 *MHC I*  $\alpha$  持续下调并在 48 h 内保持在较低水平。

制备高效价的抗体是开展 ELISA、免疫印迹和免疫组化等实验的前提,它能为研究目的蛋白的组织及细胞分布、定位和表达等提供有力的工具。单克隆抗体虽然具有特异性好,性质稳定和重复性好的优点,但是其存在制备复杂,费时费力的局限性,而多克隆抗体的制备具有简单、快速和效果好的优点<sup>[24]</sup>,所以我们制备了兔抗红笛鲷多克隆抗体。本研究以兔为实验对象,每次仅需 500  $\mu$ g 的蛋白注射量即可得到 40 mL 效价高达 1:40 000 的多克隆抗体血清。制备的兔抗血清具有较好的活性及特异性,为本研究拟开展的其他后续实验工作奠定了基础。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 王重庆. 分子免疫学基础[M]. 北京:北京大学出版社,1997:139 - 140.
- [ 2 ] Cuesta A, Meseguer J, Esteban M A. Cloning and regulation of the major histocompatibility class I alpha gene in the teleost fish gilthead seabream[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 22:718 - 726.
- [ 3 ] Fujiki K, Booman M, Chin-Dixon E, et al. Cloning and characterization of cDNA clones encoding membrane-bound and potentially secreted major histocompatibility class I receptors from walleye (*Stizostedion vitreum*) [J]. Immunogenetics, 2001, 53:760 - 769.
- [ 4 ] Grimholt Y, Lie O. The major histocompatibility complex in fish [J]. Revue Scientifique et Technique, 1998, 17:121 - 127.
- [ 5 ] Antao A B, Chinchar V G, McConnell T J, et al. MHC class I genes of the channel catfish: sequence analysis and expression [J]. Immunogenetics, 1999, 49:303 - 311.
- [ 6 ] Persson A C, Stet R J, Pilström L. Characterisation of MHC class I and beta-2-microglobulin sequences in Atlantic cod revealing an unusually high number of expressed class I genes [J]. Immunogenetics, 1999, 50:49 - 59.
- [ 7 ] Rodrigues P N, Dixon B, Roelofs J, et al. Expression and temperature-dependent regulation of the beta-2 microglobulin (Cyca-B2m) gene in a cold-blooded vertebrate, the common carp (*Cyprinus carpio* L) [J]. Development Immunology, 1998, 5:263 - 275.
- [ 8 ] Koppang E O, Dannevig B H, Lie Ø, et al. Expression of MHC class I and II mRNA in a macrophage-like cell line (SHK-1) derived from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., head kidney [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1999, 9:473 - 489.
- [ 9 ] Park K C, Osborne J A, Tsoi S C, et al. Expressed sequence tags analysis of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) liver, kidney and spleen tissues following vaccination against *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2005, 18:393 - 415.
- [ 10 ] 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, 23:576 - 588.
- [ 11 ] Jørgensen S M, Syvertsen B L, Lukacs M, et al. Expression of MHC class I pathway genes in response to infectious salmon anaemia virus in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) cells [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 21:548 - 560.
- [ 12 ] 张新中, 吴灶和, 简纪常, 等. 红笛鲷头肾消滅 cDNA 文库的构建与分析 [J]. 中国水产科学, 2011, 18(2):379 - 391.
- [ 13 ] Zhang X Z, Dai L P, Wu Z H, et al. Expression pattern of heat shock protein 90 gene of humphead snapper *Lutjanus sanguineus* during pathogenic *Vibrio harveyi* stress [J]. Journal of Fish Biology, 2011, 79(1):178 - 193.
- [ 14 ] Zhang X Z, Wu Z H, Yang S P, et al. Expression

- pattern of heat-shock cognate 70 gene of humphead snapper, *Lutjanus sanguineus*, infected by *Vibrio Harveyi*[J]. Journal of Fish Disease,2011,34(10): 719 – 729.
- [15] Zhang X Z, Pang H Y, Wu Z H, *et al.* Molecular characterization of heat shock protein 70 gene transcripts during *Vibrio harveyi* infection of humphead snapper, *Lutjanus sanguineus* [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2011, 37 ( 4 ): 897 – 910.
- [16] Zhang X Z, Dai L P, Wu Z H, *et al.* Molecular cloning, mRNA expression, and characterization of heat shock protein 10 gene from humphead snapper *Lutjanus sanguineus* [J]. Marine Genomics, 2011, 4 ( 3 ): 143 – 150.
- [17] 赵红娟,李华,于辉,等. 鱼类 MHC II 类基因与免疫抗性的研究进展[J]. 水生态学志,2010,3(5): 111 – 115.
- [18] Xu T J, Chen S L. Molecular cloning, genomic structure and expression analysis of major histocompatibility complex class Ia gene of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Fish Physiology and Biochemistry,2010,37:85 – 90.
- [19] Kaufman J, Salomonsen J, Flajnik M. Evolution conservation of MHC class I and class II molecules; different yet the same [J]. Seminars in Immunology,1994,6:411 – 424.
- [20] Kruiswijk C P, Hermsen T T, Westphal A H, *et al.* A novel functional class I lineage in zebrafish (*Danio rerio*), carp (*Cyprinus carpio*), and large barbus (*Barbus intermedius*) showing an unusual conservation of the peptide binding domains [J]. Journal of Immunology,2005,15:1936 – 1947
- [21] Antao A B, Wilson M, Wang J, *et al.* Genomic organization and differential expression of channel catfish MHC class I genes[J]. Developmental and Comparative Immunology,2001,25:579 – 595.
- [22] Xu T J, Sun Y N, Cheng Y Z, *et al.* Genomic sequences comparison and differential expression of Miiuy croaker MHC class I gene, after infection by *Vibrio anguillarum* [J]. Developmental and Comparative Immunology 2011,35:483 – 489.
- [23] Xu T, Sun Y, Shi G, *et al.* Characterization of the major histocompatibility complex class II genes in miiuy croaker[J]. PLoS One,2011,6(8):e23823
- [24] 盖永锋,张国广,陈元婷,等. 金鱼生长素 I 基因的原核表达及其多克隆抗体制备[J]. 厦门大学学报,2008,47(2):21 – 25.

## Cloning and expression analysis of histocompatibility complex I $\alpha$ antigen (*MHC I $\alpha$* ) from humphead snapper *Lutjanus sanguineus*

ZHANG Xin-zhong<sup>1,2</sup>, LU Yi-shan<sup>1,2</sup>, WU Zao-he<sup>1,2,3\*</sup>, JIAN Ji-chang<sup>1,2</sup>

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China;

2. Guangdong Key Laboratory of Control for Diseases of Aquatic Economic Animals, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China;

3. Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

**Abstract:** In the present study, full-length cDNA sequences of histocompatibility complex I  $\alpha$  antigen (*MHC I  $\alpha$* ) was cloned by rapid amplification of cDNA ends technique (RACE) from humphead snapper (*Lutjanus sanguineus*). Full-length cDNA sequence of *MHC I  $\alpha$*  is 1 369 bp, encoding 354 amino acids. BLAST analysis revealed that the amino acids sequence of *MHC I  $\alpha$*  shared high identity (84%) with other *MHC I*. Phylogenetic tree was constructed by the Neighbor-Joining method, and the results suggested that *MHC I  $\alpha$*  of humphead snapper shared the closest genetic relationship with the *MHC I* of *Epinephelus coioides*. The results of fluorescent real-time quantitative RT-PCR showed that the expression of *MHC I  $\alpha$*  mRNA could be detected in head kidney, and the maximum expression appeared in 6 – 15 h post infection. *MHC I  $\alpha$*  was subcloned into pET32a(+) to construct expression plasmids pET32-*MHC I  $\alpha$* . SDS-PAGE and Western blot analysis indicated that the recombinant proteins were successfully expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). Then the recombinant proteins were purified and the antiserum was obtained by immunizing rabbits with the purified recombinant proteins emulsified with adjuvant. ELISA analysis showed that the titer of the antiserum prepared in this study was 1:40 000. The results of the Western blot revealed that specific antigen-antibody reaction occurred between the antiserum and the recombinant proteins.

**Key words:** *Lutjanus sanguineus*; *MHC I  $\alpha$* ; prokaryotic expression; cloning; rapid amplification of cDNA ends (RACE)

**Corresponding author:** WU Zao-he. E-mail: wuzh@gdou.edu.cn