

乌鳢免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链的克隆与特征分析

贾伟章^{1,2} 周秀霞²

1. 广东药学院生命科学院, 广州 510006; 2. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072

摘要 应用 RACE-PCR 方法克隆并鉴定了乌鳢免疫球蛋白 M (immunoglobulin M, IgM) 重链 (H) 和免疫球蛋白轻链 (L) 全长 cDNA。乌鳢 IgH cDNA 全长 1 912 个核苷酸 (nt), 包含 1 797 nt 的开放阅读框, 编码 598 个氨基酸 (aa)。IgH 恒定区 (CH) 均包含 1 对保守的半胱氨酸残基形成链内二硫键, 其中 CH1 区氨基末端存在保守的半胱氨酸残基与轻链形成链间二硫键, 4 个推测的 N-糖基化位点 (NXT 和 NXS) 则分别位于 CH1、CH2 和 CH4。序列比对发现乌鳢 IgH CH1 与 CH2 交界处氨基酸序列的插入使铰链区肽段较其他硬骨鱼 IgH 长, 此外 IgH CH4 区羧基末端参与单体间聚合的半胱氨酸被赖氨酸替换, 这反映乌鳢 IgH 分子结构的特异性。序列相似性比较显示乌鳢 IgH 与点带石斑鱼、黑鳍冰鱼、牙鲆、虹鳟的相似性依次为 55%、50%、45% 和 36%, 与斑马鱼类的相似性较低 (为 28%)。乌鳢 IgL cDNA 全长 941 nt, 包含 729 nt 的开放阅读框, 编码 242 个 aa。轻链可变区 (VL) 和恒定区 (CL) 均包含保守的半胱氨酸, 形成链内和链间二硫键。序列比对分析表明乌鳢 IgL 与五条鲷和花狼 IgL 的相似性为 78% 和 77%, 而与斑点叉尾鲷和虹鳟的相似性仅为 32% 和 31%。根据 IgH 和 IgL 恒定区氨基酸序列构建系统进化树, 鱼类 IgH 形成硬骨鱼和软骨鱼两大分支, 其中乌鳢 IgH 与河豚 IgH 的亲缘关系较近; 硬骨鱼 IgL 系统树显示 3 个主要的分支: L1、L2 和 L3, 乌鳢 IgL 位于 L1 分支的 L1A 亚类。

关键词 免疫球蛋白 M; 重链; 轻链; 克隆; 乌鳢

中图分类号 S 917.4; Q 959.481 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)01-0079-06

鱼类是具备体液免疫反应的低等脊椎动物, 在免疫记忆、亲和力成熟、免疫球蛋白类别转换以及抗体不均一性等方面均不同于哺乳动物^[1]。硬骨鱼 IgM 由重链 (IgH) (70 ~ 81 ku) 和轻链 (IgL) (22 ~ 32 ku) 通过二硫键连接在一起形成单体, 主要以四聚体形式存在, 但是也存在单体和二聚体形式^[2-3]。硬骨鱼分泌型 IgH 基因由 8 个外显子构成, 分别编码导肽 (LH)、可变区 (VH)、多样区 (DH)、铰链区 (JH)、4 个恒定区 (CH1-4); 膜型 IgH 基因出现跨膜区而缺少 CH4 区^[4]。根据重链所带电荷、分子质量以及与单克隆抗体的免疫反应推测硬骨鱼存在不同类型 IgH 分子以弥补抗体类型的差异在硬骨鱼特异性免疫反应上的缺陷^[5]。IgL 基因由 VL 和 JL 以及紧接其后的 CL 基因片段构成 (VL-JL-CL)^[6]。鱼类与哺乳动物轻链恒定区氨基酸顺序的比对结果

表明硬骨鱼类 IgL 分子不能简单定义为 μ 和 λ 型^[7]。

最近研究显示脊椎动物 IgL 分为 4 类: sigma (σ)、sigma-cart (σ -cart)、kappa (κ) 和 lambda (λ) 型, 而硬骨鱼 IgL 系统进化树主要分为 3 个分支, 分别属于 μ 和 λ 型^[8-9]。目前, 多种重要经济性鱼类 IgM 重链和轻链基因被克隆鉴定, 其中包括虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[10-11]、鳊 (*Siniperca chuatsi*)^[12-13] 等。乌鳢 (*Channa argus*) 是我国重要的淡水养殖鱼类之一, 然而疾病的频繁发生给乌鳢养殖业带来严重的经济损失^[14]。本研究在获得 cDNA 片段的基础上进行乌鳢 IgH 和 IgL 的克隆和序列分析, 鉴定乌鳢免疫球蛋白的分子特征, 以期为乌鳢疾病以及抗感染机制的研究奠定基础。

收稿日期: 2008-12-22; 修回日期: 2009-03-28

* 国家自然科学基金项目 (30371091) 资助

贾伟章, 男, 1978 年生, 博士, 研究方向: 水生动物遗传与免疫学. E-mail: jiawzh@gmail.com

材料与方法

试验鱼

乌鳢购自湖北省某水产市场,体重约 250 g,试验水槽中控温(25)暂养 1 周。取材后的组织样品保存于液氮中备用。

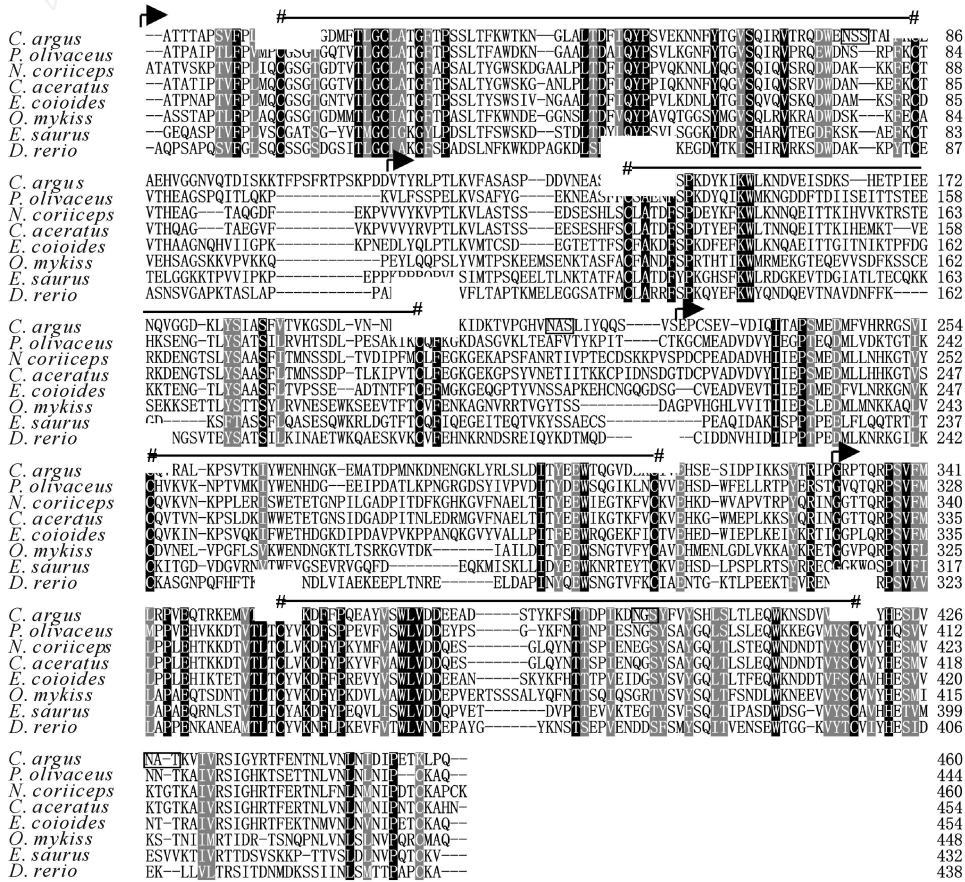
同源 片段

通过抑制差减杂交的方法构建乌鳢头肾差减 cDNA 文库,将 cDNA 片段连接到 pMD-18T 载体 (TaKaRa),转化大肠杆菌 DH-5。经筛选和测序分别获得长度为 621 个核苷酸(nt)和 328 nt 的 cDNA 片段,序列比对结果显示与硬骨鱼 IgH 和 IgL

基因同源。

克隆 和 全长

全长 cDNA 的合成按 BD SMAR™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) 操作手册进行。IgH 5 末端扩增,使用接头通用引物(5'-CTAAT-ACGACTCACTATAAGGC-3')与基因专一性引物 IgH-R1 (5'-TCTGTTCTACTGGACGCA GCA-3')和 IgH-R2 (5'-ATGTCCTGGACGGTCTTATC-3'),第 1 轮 PCR:94 预变性 2 min,10 个循环:94 30 s,65 30 s(每个循环降低 1),72 1.5 min;25 个循环:94 30 s,55 30 s,72 1.5 min;1 个循环:72 6 min。第 2 轮巢式 PCR 以



链内二硫键以黑线连接,形成链内和链间二硫键的半胱氨酸残基以“#”显示,N糖基化位点加边框。比对序列号:乌鳢(EU822510),牙鲈(AF226284),鲮鱼(AF437738),黑鳍冰鱼(AF437736),点带石斑鱼(A Y885700),虹鲟(A Y870258),海鲢(A34891)和斑马鱼(AF406819)。Cysteine residues are shown with “#”,inner-chain disulfide bonds are linked by lines,N-glycosylation sites (NXT,NXS) are boxed. IgH GenBank accession nos: *Channa argus* (EU822510), *Paralichthys olivaceus* (AF226284), *Notothenia coriiceps* (AF437738), *Chaenocephalus aceratus* (AF437736), *Epinephelus coioides* (A Y885700), *Oncorhynchus mykiss* (A Y870258), *Elops saurus* (A34891) and *Danio rerio* (AF406819).

图1 乌鳢 IgH 与其它鱼类 IgH 恒定区序列比较

Fig. 1 Alignment of IgH constant region between snakehead and other fish species

1 μL 第 1 轮反应产物为模板:94 预变性 2 min,30 个循环:94 30 s,57 30 s,72 1.5 min;1 个循环:72 6 min;-20 保存。使用接头通用引物与基因专一性引物 IgH-F1 (5-GCCAACT-CAGCGTCCCTCA-3) 和 IgH-F2 (5-TGCT-GCGTCCA GTA GAACA GA-3) 72 延伸 1 min 扩增 IgH 基因 3 末端。使用接头通用引物与基因专一性引物 IgL-R (5-TCA GGGT GCT GCTC-CAGCT-3) 和 IgL-F (5-A GCT GGA GCA GCAC-CCTGA-3) 分别扩增 IgL cDNA 5 和 3 末端。

克隆、测序和序列分析

扩增产物与 pMD-18T (Takara) 载体连接,转化 DH-5 感受态细胞,经检查为阳性克隆测序。氨基酸序列的推断通过 ExPASy 网站的程序翻译,同源性比较由 Cluatal W 1.8 程序完成,采用 MEGA 3.1 软件以邻位相联法构建进化树。

结果与分析

和 序列

根据乌鳢 IgH 和 IgL 恒定区设计引物,通过接头通用引物和基因专一性引物分别进行 5 RACE 和 3 RACE 获得 IgH 和 IgL 全长 cDNA 序列(IgH 和 IgL GenBank 登录号:EU822510 和 EU822511)。乌鳢 IgH cDNA 全长 1 912 nt,包含 1 797 nt 的开放阅读框,编码 598 个 aa。5 非编码区 5 nt,起始编码区包含 2 个起始密码子和完整的前导肽序列。乌鳢 IgL cDNA 全长 941 nt,包含 729 nt 的开放阅读框,编码 242 个 aa,5 非编码区 56 nt,3 非编码区

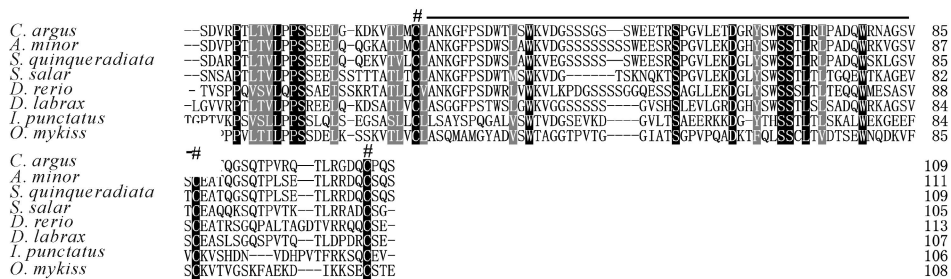
156 nt。

和 氨基酸序列分析

根据 Kabat 等^[15]的方法,将乌鳢 IgH 氨基酸序列划分为前导链、可变区和恒定区,其中可变区包括 4 个骨架区和 3 个高变区,恒定区由 4 个结构域构成。与其他硬骨鱼和脊椎动物 IgH 相比,乌鳢 IgH 可变区包含保守的半胱氨酸残基,其氨基酸组成和疏水氨基酸侧链与脊椎动物 IgH 具有显著的一致性。乌鳢 IgH 恒定区与斜带石斑鱼等鲈形目鱼类的同源性较高,而与虹鳟和斑马鱼等鲑形目和鲤形目鱼类的同源性较低(图 1)。

分别比较硬骨鱼 IgH 4 个恒定区氨基酸序列,结果显示 CH4 同源性最高,其次为 CH3、CH2 和 CH1。IgH 恒定区保守的氨基酸残基包括半胱氨酸和色氨酸,半胱氨酸参与形成链内和链间二硫键,值得注意的是 CH4 末端参与单体聚集形成多聚体的半胱氨酸被赖氨酸替换。在 IgH CH1 与 CH2 交界处氨基酸序列的插入使乌鳢 CH1-CH2 较链区肽段较其他硬骨鱼 IgH 长。乌鳢 IgH 恒定区存在 4 个推测糖基化位点,2 个糖基化位点分别位于 CH1 和 CH2 区,2 个位于 CH4 区,而通常存在于硬骨鱼 CH3 区末端的糖基化位点在乌鳢 CH3 区缺失。

乌鳢 IgL 可变区多个位点存在高度保守的氨基酸残基,其中 Cys-43 和 Cys-107 形成链内二硫键维持 IgL 的空间结构。IgL 恒定区由 109 个氨基酸构成,包含 3 个高度保守的半胱氨酸残基,Cys-26 和 Cys-87 形成轻链恒定区链内二硫键,Cys-106 可能与 IgH 形成链间二硫键(图 2)。序列比对分析表明



链内二硫键以黑线连接,形成链内和链间二硫键的半胱氨酸残基以“#”显示。比对的序列号:乌鳢(EU822511);花狼(AF137397);五条鲈(AB062619);大西洋鲑(AF273019);斑马鱼(AF246185);狼鲈(AJ400216);斑点叉尾鮰(U25705);虹鳟(U69987)。Cysteine residues are shown with “#”,inner-chain disulfide bonds was linked by line. IgL GenBank accession nos: *Channa argus* (EU822511), *Anarhichas minor* (AF137397), *Seriola quinqueradiata* (AB062619), *Salmo salar* (AF273019), *Danio rerio* (AF246185), *Dicentrarchus labrax* (AJ400216), *Ictalurus punctatus* (U25705) and *Oncorhynchus mykiss* (U69987).

图 2 乌鳢 Ig 与其它鱼类 IgL 恒定区序列比较

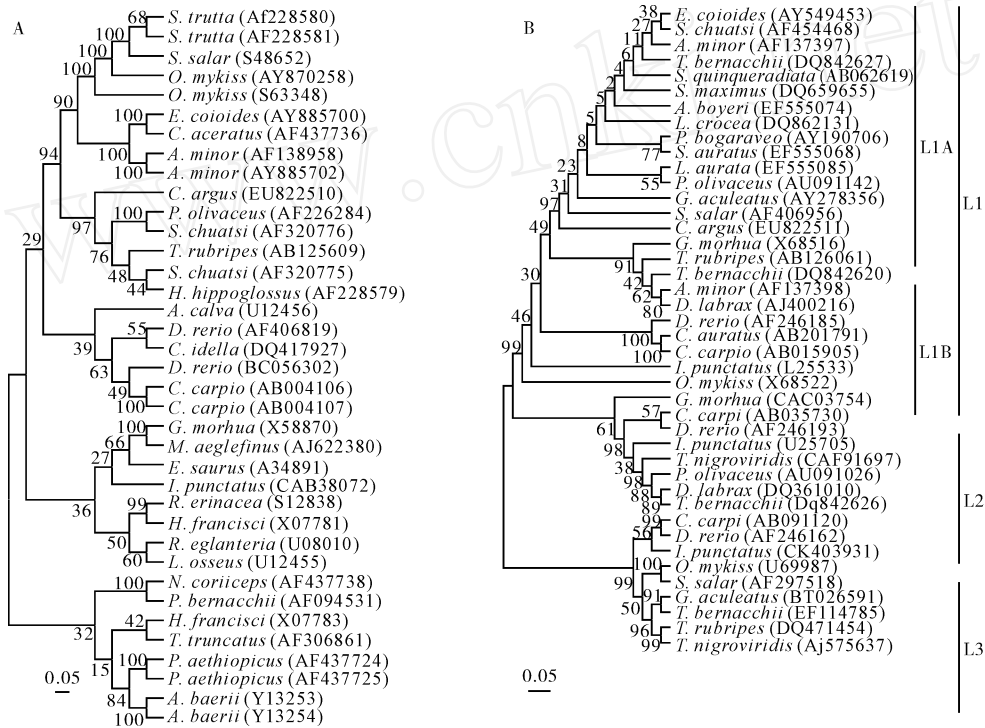
Fig. 2 Alignment of IgL constant region between snakehead and other fish species

乌鳢 IgL 与五条鲷和花狼的相似性为 78 % 和 77 % , 而与斑点叉尾鮰和虹鳟的相似性只有 32 % 和 31 % 。

和 恒定区进化树分析

IgH 系统树显示硬骨鱼和软骨鱼形成 2 个主要分支。乌鳢 IgH 和河豚 (*fugu rubripes*) IgH 的亲缘关系最近,与牙鲆、大西洋庸鲽 (*Hippoglossus*

hippoglossus)、鲑 (*Salmo salar*) 和斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 位于同一个分支上 (图 3A)。根据 CL 区构建的系统发育树显示硬骨鱼 IgL 形成 3 个主要分支,乌鳢 IgL 位于 L1 分支的 L1A 亚类,与金头鲷 (*Sparus aurata*) IgL 的关系最为密切 (图 3B)。



通过 Clustal W 进行序列比对,MEGA3.1 构建 N-J 树。A. IgH 恒定区系统进化树;B. IgL 恒定区系统进化树。Neighbor-joining trees were constructed based on analysis of protein sequences by Clustal W and MEGA3.1. A. Phylogenetic tree of IgH constant region; B. Phylogenetic tree of IgL constant region.

图 3 IgH (A) 和 IgL (B) 恒定区的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic trees of IgH (A) and IgL (B) constant region

讨论

根据头肾差减文库中筛选到的 cDNA 片段,通过 RACE-PCR 克隆并鉴定了乌鳢免疫球蛋白 M 重链和免疫球蛋白轻链全长 cDNA。乌鳢 IgH 和 IgL 均由前导肽、可变区和恒定区构成,氨基酸序列分析显示与其它硬骨鱼类 IgH 和 IgL 具有较高的同源性。IgH 和 IgL 可变区存在一系列保守氨基酸残基用于折叠形成抗原连接位点,其中 1 对保守半胱氨酸形成可变区链内二硫键。此外,在 IgH 和 IgL FR2 区存在 GKGLEW 和 FR3 区 DX₃YYC 两处肽段,可能是 IgM 可变区折叠所必需的氨基酸序列。IgH 包含 4 个恒定区 (CH1-4),每个恒定区包含 2 个以上的半胱氨酸形成链内和链间二硫键。比较硬

骨鱼 CH 区氨基酸序列认为 CH1 区 Cys14 参与了 IgM 重链和轻链之间二硫键的形成;CH2 和 CH3 交界处存在一个较保守的半胱氨酸,参与了 IgH 链间二硫键的形成^[16]。值得注意的是乌鳢 CH4 区羧基末端参与单体间聚合的半胱氨酸被赖氨酸替换。已知硬骨鱼 IgM 主要以四聚体形式存在,但是也存在单体和二聚体形式^[2-3]。比较 GenBank 中鱼类 IgH 氨基酸序列发现 CH4 羧基末端高度保守的 Cys 仅仅在乌鳢和肺鱼 (*Protopterus aethiopicus*) 中缺失或替换,能否说明鱼类也存在 IgM 单体形式尚需要进一步的试验证实。乌鳢 IgH 存在 7 个保守的色氨酸残基参与维持免疫球蛋白三级结构的稳定^[17]。此外,乌鳢 IgH 有 4 个 N-糖基化位点,寡糖链能够维持免疫球蛋白的空间结构,与免疫球蛋白

的稳定性以及其生物学功能相关^[18]。乌鳢 IgL 恒定区包含 3 个保守的半胱氨酸, Cys26 和 Cys87 形成链内二硫键, Cys106 参与轻链和重链之间二硫键的形成。对乌鳢和其它硬骨鱼类 IgH 和 IgL 恒定区序列比对发现参与蛋白质高级结构形成的半胱氨酸、色氨酸及其侧翼序列高度保守, 表明在 Ig 结构或功能中扮演重要角色的氨基酸进化较为稳定。

氨基酸序列比对显示乌鳢 IgH 和 IgL 与鲈形目鱼类相似性较高。根据 IgH 恒定区构建的系统进化树形成硬骨鱼和软骨鱼 2 个主要分支, 其中乌鳢 IgH 和河豚 IgH 的亲缘关系最近。一般认为脊椎动物 IgL 分为不同类型, 已知两栖类动物具有 和 型 IgL, 哺乳动物具有 和 型 IgL, 而鸟类仅具有 型 IgL^[19]。与哺乳动物 IgL 分为 C 和 C 不同, 硬骨鱼 IgL 不能明确地分成 和 型, 而在 和 类群之外形成一个单独的分支^[13], 推测低等脊椎动物 IgL 基因可能来源于共同祖先基因。最近研究结果发现有颌类脊椎动物 IgL 分为 4 个家族(、-cart、和 型)^[8], 软骨鱼类具有全部 4 种类型 IgL, 而硬骨鱼 IgL 分为 3 类: IgL1、IgL2 和 IgL3, 分别属于 (L2) 和 (L1 和 L3) 2 种类型^[8,9]。利用 44 种硬骨鱼类 IgL 恒定区构建系统树显示乌鳢 IgL 属于 L1 分支的 L1A 亚类。

参 考 文 献

- [1] WATTS M, MUNDA Y B L, BURKE C M. Immune responses of teleost fish [J]. Aust Vet J, 2001, 79: 570-574.
- [2] BANG J D, KIM J W, LEE S D, et al. Humoral immune response of flounder to *Edwardsiella tarda*: the presence of various sizes of immunoglobulins in flounder [J]. Dis Aquat Org, 1996, 26: 197-203.
- [3] 冯建军, 关瑞章, 郭松林. 欧洲鳗鲡免疫球蛋白阳性细胞的组织化学定位与分布特点[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(4): 500-505.
- [4] LITMAN G W, ANDERSON M K, RAST J P. Evolution of antigen binding receptors [J]. Annu Rev Immunol, 1999, 17: 109-147.
- [5] HORDVIK I, BERVEN F S, SOLEM S T, et al. Analysis of two IgM isotypes in Atlantic salmon and brown trout [J]. Mol Immunol, 2002, 39: 313-321.
- [6] TIMMUSK S, PARTULA S, PILSTR M L. Different genomic organization and expression of immunoglobulin light-chain isotypes in the rainbow trout [J]. Immunogenetics, 2000, 51: 905-914.
- [7] OKAMOTO K, IKEMURA H, SAVAN R, et al. Cloning, sequence and variability analysis of expressed immunoglobulin light chain genes from yellowtail *Seriola quinqueradiata* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2003, 14: 55-70.
- [8] CRISCITIELLO M F, FLAJNIK M F. Four primordial immunoglobulin light chain isotypes, including and , identified in the most primitive living jawed vertebrates [J]. Eur J Immunol, 2007, 37: 2683-2694.
- [9] COSCIA M R, GIACOMELLI S, DE SANTI C, et al. Immunoglobulin light chain isotypes in the teleost *Trematomus bernacchii* [J]. Mol Immunol, 2008, 45: 3096-3106.
- [10] HANSEN J, LEONG J A, KAATTARI S. Complete nucleotide sequence of a rainbow trout cDNA encoding a membrane-bound form of immunoglobulin heavy chain [J]. Mol Immunol, 1994, 31: 499-501.
- [11] PARTULA S, SCHWAGER J, TIMMUSK S, et al. A second immunoglobulin light chain isotype in the rainbow trout [J]. Immunogenetics, 1996, 45: 44-51.
- [12] ZHANG Y A, NIE P, WANG Y P, et al. cDNA sequence encoding immunoglobulin M heavy chain of the mandarin fish *Siniperca chuatsi* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2003, 14: 477-480.
- [13] ZHANG, Y A, NIE P, LUO H Y, et al. Characterization of cDNA encoding immunoglobulin light chain of the mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) [J]. Vet Immuno Immunopathol, 2003, 95: 81-90.
- [14] GUO Q L, JIA W Z, HAN X P, et al. Rickettsia-like organism infection in a freshwater cultured fish *Ophiocephalus argus* C. in China [J]. Prog Nat Sci, 2004, 14: 417-422.
- [15] KABAT E A, WU T T, PERRY H M, et al. Sequences of proteins of immunological interest [M]. fifth ed. Washington, DC: US Department of Health and Human Services, 1991.
- [16] CHENG C A, JOHN J A C, WU M S, et al. Characterization of serum immunoglobulin M of grouper and cDNA cloning of its heavy chain [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2006, 109: 255-265.
- [17] WILLIAMS A F, BARCLAY A N. The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition [J]. Annu Rev Immunol, 1988, 6: 381-405.
- [18] TAO M H, MORRISON S L. Study of a glycosylated chimeric mouse-human IgG role of carbohydrate in the structure and effector functions mediated by the human IgG constant region [J]. J Immunol, 1989, 143: 2595-2601.
- [19] BENGT N E, WILSON M, MILLER N, et al. Immunoglobulin isotypes: structure, function, and genetics [J]. Curr Topics Microbiol Immunol, 2000, 248: 189-219.

Molecular Cloning and Characterization of IgM Heavy Chain and Ig Light Chain from Snakehead (*Channa argus*)

JIA Wei-zhang^{1,2} ZHOU Xi-xia²

1. School of Life Sciences, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

2. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China

Abstract By RACE-PCR, immunoglobulin M heavy chain (H) and immunoglobulin light (L) chain cDNAs have been cloned and characterized from snakehead *Channa argus*. The IgH cDNA was found to be 1 912 nucleotides (nt) and contains an open reading frame (ORF) of 1 797 nt that is translated into a putative peptide of 598 amino acids (aa). The constant region (CH1-4) of IgH each contain a pair conserved Cys residues which may be responsible for the formation of intra-domain disulfide bridge. The Cys of CH1 may be concerned with inter-chain disulfide bridge, four N-linked glycosylation sites are located in CH1, CH2 and CH4 respectively. The multiple sequence alignment reveal the presence of a remarkable insertion at the CH1-CH2 boundary, result in a CH1, CH2 hinge peptide longer than other teleost IgH, respectively. Noteworthy, the Cys in CH4 is substituted by Lys in snakehead fish, that not find in other teleost IgH. Protein sequence of snakehead IgH has 55%, 50%, 45%, 36% and 28% identical to orange-spotted grouper, blackfin icefish, bastard halibut, rainbow trout and zebrafish IgH, respectively. The IgL cDNA was found to be 941 nt and contains an ORF of 729 nt that translates into a putative peptide of 242 aa. The cysteine residues involved in the formation of disulfide bonds are completely conserved among fish IgL. Snakehead IgL exhibits 78%, 77%, 32% and 31% overall identity to Japanese amberjack, spotted wolfish, channel catfish and rainbow trout IgL, respectively. The phylogenetic tree of fish IgH conserved region contains two major branches of teleost and elasmobranch, and snakehead IgH is most closely related to pufferfish. The phylogenetic tree of IgL conserved region shows three major branches, and snakehead IgL locate as a branch of IgL1A.

Key words immunoglobulin M; heavy chain; light chain; clone; snakehead (*Channa argus*)

(责任编辑:边书京)