

草鱼的两种新型免疫球蛋白基因 IgZ-2 和 IgM-IgZ

肖凡书, 许巧情, 王欣欣, 聂 品*

(中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430072)

摘要: 在草鱼中新发现的两种免疫球蛋白重链的 cDNA 和基因组序列, 其中的一种 IgZ 命名为 IgZ-2, 以区别于已报道的 IgZ, 另一种只有两个恒定区, 一个恒定区与 IgM 相似而另一个与 IgZ 相似, 这一特征与已报道的鲤的 IgM-IgZ 相似, 故同样称为 IgM-IgZ。分泌型 IgZ-2 的 cDNA 序列包含 1 889 bp, 编码 539 个氨基酸, 其 3' 编码区包含 267 bp, 但缺乏 5' 非编码区及部分可变区序列。分泌型 IgM-IgZ 的 cDNA 全长为 1 316 bp, 编码 361 个氨基酸, 其 5' 非编码区包含 3 bp, 3' 非编码区包含 227 bp。膜结合型 IgM-IgZ 由两个膜外显子与 CH2 中的一个剪切位点剪切而成。氨基酸序列比对结果显示 IgZ-2 和 IgM-IgZ 的恒定区存在保守的半胱氨酸。系统进化树分析显示, 草鱼 IgZ-2 以较高的支持率与斑马鱼 IgZ 聚为一枝, 再与草鱼 IgZ、草鱼 IgM-IgZ 和鲤 IgM-IgZ 这一枝聚为一类。用半定量 RT-PCR 检测 IgZ-2 和 IgM-IgZ 在 4 条草鱼的器官/组织中的表达, 发现分泌型 IgZ-2、分泌型 IgM-IgZ 和膜结合型 IgM-IgZ 在 4 条鱼中的表达存在个体差异, 但主要都在免疫器官中表达。

关键词: 草鱼; 免疫球蛋白; IgZ-2; IgM-IgZ; RT-PCR

中图分类号: S 917; Q 512⁺.2

文献标识码: A

免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig) 是指具有抗体活性或化学结构与抗体分子相似的球蛋白, Ig 的基本单位是由两条重链 (heavy chain, H 链) 和两条轻链 (light chain, L 链) 组成, 根据 Ig 重链恒定区 (constant region, C 区) 肽链抗原特异性的不同, 免疫球蛋白被划分为多种类型^[1-2]。哺乳动物主要具有 5 种免疫球蛋白类型, 即 IgM、IgD、IgG、IgE 和 IgA, 其对应的重链分别为 μ 、 δ 、 γ 、 ϵ 和 α , 最近在比较古老的哺乳动物鸭嘴兽 (*Ornithorhynchus anatinus*) 中发现了一种新的免疫球蛋白 IgO, 其重链基因为 o^[3]。

鱼类是在进化史上最早具有 Ig 的脊椎动物, 但鱼类 Ig 的研究起步较晚。随着研究的不断深入, 目前硬骨鱼类中已报道了多种免疫球蛋白, 即 IgM、IgD、IgZ/IgT、IgM-IgZ 以及从红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*) 中报道的新型 IgH^[4]。IgM 和 IgD 是最早从鱼类中报道的两种免疫球蛋白, 已

经从多种鱼类中克隆获得^[5-7], 其他几种免疫球蛋白是自 2005 年才相继报道的。目前已从斑马鱼 (*Danio rerio*)^[8]、草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)^[9] 中克隆了 IgZ, 从虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[10]、三棘刺鱼 (*Gasterosteus aculeatus*)^[11] 和大西洋鲑 (*Salmo salar*)^[12] 中报道了 IgT。IgZ 和 IgT 都由 4 个恒定区组成, 并且在序列上存在较高的相似性。另外在红鳍东方鲀中报道了一种新型 IgH^[4], 只包含 2 个恒定区, 其 CH1 与 IgZ、IgT 的 CH1 存在较高的相似性, 其 CH2 与 IgZ、IgT 的 CH4 存在较高的相似性^[4]。IgZ、IgT 和新型 IgH 的重链基因在基因组上都位于 μ 基因的上游, 且相应的恒定区序列存在较高的相似性, 因此被认为是同一种免疫球蛋白^[13]。鲤 (*Cyprinus carpio*) 中报道了一种 IgM-IgZ 嵌合体^[14], 其 cDNA 序列包括 2 个恒定区, 第一个恒定区与 IgM 的 CH1 非常相似, 第二个恒定区与斑马鱼

收稿日期:2010-08-12 修回日期:2010-10-01

资助项目:国家重点基础研究发展计划资助(2009CB118703)

通讯作者:聂 品, Tel:027-68780736, Fax:027-68780123, E-mail:pinnie@ihb.ac.cn

IgZ 的 CH4 有很高的相似性,但没有编码 IgM-IgZ 重链基因的基因组序列,因此推测这种 Ig 是在转录的过程中由 IgM 和 IgZ 嵌合而成^[14]。

草鱼是我国淡水养殖的主要养殖对象之一,但草鱼的抗病力差、成活率低,易患出血病、烂鳃病、赤皮病和肠炎病等,这些疾病在一定程度上阻碍了草鱼养殖业的健康发展。要解决这些问题,除了加强管理,提高养殖技术外,还必须认识其免疫系统,了解机体自身的免疫功能,以期通过免疫手段增强鱼体的防御能力。目前,关于其适应性免疫系统中免疫球蛋白的研究,已经报道了 IgM、IgZ 和 IgD 的存在^[9,15],本研究克隆了草鱼的其他两种免疫球蛋白重链基因,即 IgZ-2 和 IgM-IgZ,并进行了器官或组织水平的表达分析及系统进化分析。

1 材料与方法

1.1 总 RNA 和基因组 DNA 的提取

实验用草鱼(90~120 g)来自中国科学院水生生物研究所关桥实验基地。取头肾约 0.1 g,按 Trizol 试剂盒(Invitrogen)说明书提取总 RNA。取脾脏约 0.2 g,参照 Wizard Genomic DNA 纯化试剂盒(Promega)提取基因组 DNA。

1.2 草鱼 IgZ-2 和 IgM-IgZ 的 cDNA 序列扩增

按照 SMART cDNA 合成试剂盒(Clontech)操作手册,将提取的草鱼头肾总 RNA 反转录为 cDNA 第一链。根据已知的斑马鱼和草鱼 IgZ 基因的保守序列,设计草鱼 IgZ-2 基因的正、反向简并引物(表 1),以 SMART cDNA 为模板,扩增草鱼 IgZ-2 的 cDNA 片段,以获得的草鱼 IgZ-2 片段设计 5' 和 3' RACE 引物(表 1),与 UPM 扩增 IgZ-2 cDNA 的 5' 和 3' 端。根据已获得的草鱼 IgZ 和 IgZ-2 cDNA 序列设计引物(表 1),用引物 ZF1 与 UPM 扩增 IgM-IgZ 的 3' 端,用特异性引物扩增 IgM-IgZ 的 5' 端序列以及膜结合型 IgM-IgZ 的 3' 端序列。PCR 反应条件为 94 ℃ 变性 5 min; 94 ℃ 30 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 90 s, 30 个循环; 72 ℃ 延伸 7 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后,用 Omega 公司的胶回收试剂盒进行回收,将回收产物与 TaKaRa 公司的 pMD18-T 载体于 16 ℃ 连接过夜后,转化入大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 株,通过 PCR 检测阳性克隆,并将阳性克隆交华大公司进行测序。

1.3 IgZ-2 和 IgM-IgZ DNA 序列的扩增

根据已获得的 IgZ-2 和 IgM-IgZ 的 cDNA 序列设计特异性引物(表 1),以草鱼 DNA 为模板进行扩增。PCR 反应条件为 94 ℃ 变性 5 min; 94 ℃ 30 s, 60 ℃ 120 s, 72 ℃ 90 s, 30 个循环; 72 ℃ 延伸 7 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后,用 Omega 公司的胶回收试剂盒进行回收,将回收产物与 TaKaRa 公司的 pMD18-T 载体于 16 ℃ 连接过夜后,转化入大肠杆菌 DH5 α 株,通过 PCR 检测阳性克隆,并将阳性克隆交华大公司进行测序。

1.4 序列分析及系统进化树的构建

用 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)的 BLASTN 和 BLASTX 软件进行同源基因的搜索;氨基酸序列的推断通过 ExPASy 网站(<http://au.expasy.org/>)的翻译程序完成;氨基酸序列同源性比较由 ClustalX^[16] 和 BOXSHADE 3.21(http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)程序完成;并使用 ProtParam 软件分析编码蛋白的理化性质;使用 MatGAT 2.02^[17] 软件计算序列的相似性和同一性。采用 PAUP^[18] 最大简约法(maximum parsimony, MP)构建最简约树,并采用重复抽样分析 1 000 次检验分子系统树各分枝的置信度,选用斑马鱼的 CD4 基因作为外类群。

1.5 Ig 在草鱼组织中转录水平上的表达分析

实验用 4 尾草鱼(体重 90~120 g)同样来自中国科学院水生生物研究所关桥实验基地,驯养两周后分别取其头肾、脾脏、肠、肌肉、肝脏、中肾和鳃 7 种器官/组织,按 Trizol 试剂盒说明书提取各组织总 RNA,随后用脱氧核糖核酸酶 I(Deoxyribonuclease I, DNase I)对所提取的 RNA 进行处理。分别测量 RNA 样品在 260 nm 和 280 nm 波长下的吸光度值,计算 RNA 样品的浓度和纯度。取 2 μ g 经过上述处理的 RNA 样品在 20 μ L 反应体系中用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas)进行反转录。以合成的 cDNA 模板,使用 β -actin F 和 β -actin R 引物进行扩增,取等量 PCR 产物电泳,根据各个组织电泳条带的强弱调节各个组织 PCR 扩增的模板量,直至以同一尾草鱼 7 个器官/组织为模板扩增的 β -actin 基因的条带亮度基本一致。根据 IgZ-2 和 IgM-IgZ 的 cDNA 序列设计特异性引物(表 1),以各组织的 cDNA 为模板进行扩增,总体

积为 50 μ L 的反应体系的程序如下:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后,分别接 25、30、35、40 及 45 个循环(94 $^{\circ}$ C 30 s,59 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 40 s),72 $^{\circ}$ C 延伸 6 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测各循环的扩增产物,最后展示的是第 35 个循环的扩增结果。

表 1 扩增草鱼 IgZ-2 和 IgM-IgZ 及半定量 RT-PCR 所用的引物

Tab. 1 Primers used for cloning IgZ-2 and IgM-IgZ genes of grass carp and for semi-quantitative RT-PCR

名称 name	序列(5'-3') sequence(5'-3')	用途 application
Z2F1	GACACTGC(GA)GTGTATTACTGTGC	扩增 IgZ-2 的中间片段的引物
Z2R1	T(TC)T(TC)TCAC(AC)(AC)T(TC)GGTGG(GA)TTCAG	扩增 IgZ-2 的中间片段的引物
Z2F2	ATGTGTGTTATTGAGAATTC	扩增 IgZ-2 cDNA 3'末端
Z2R2	TGGTTCTGCCCTCTATGTAAG	扩增 IgZ-2 cDNA 5'末端
ZF1	CGATGTCTATATCATGTGGAA	扩增 sIgM-IgZ cDNA3'末端
UF	GGATACTGTAGAGGAGAATCAATCA	扩增 IgM-IgZ cDNA 5'末端
UR	ACAAAAGCATCACACTCACACAGGT	扩增 IgM-IgZ cDNA 5'末端
CF2	CTCAACCATCTCCGCCGAAGTC	扩增 mIgM-IgZ cDNA3'末端
CR1	ACTTTATTGATGAGTGTGAACATTGAG	扩增 mIgM-IgZ cDNA3'末端
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGC	cDNA 5', 3'RACE 通用引物
Z2Df	TCTTCCTCGGATTTCTATTTA	扩增 IgZ-2 DNA 序列
Z2Dr	GCACTGGTTCTGCCCTCTATG	扩增 IgZ-2 DNA 序列
MZDF	CTGAACCATCTGCGCCGAAGT	扩增 IgM-IgZ DNA 序列
MZDR	ACTTTATTGATGAGTGTGAACA	扩增 IgM-IgZ DNA 序列
EMZF1	AGTCAATCTTCGCCCTGTCTC	扩增 sIgM-IgZ RT-PCR 引物
EMZR1	CAACAGGGAGCATAAGCATT	扩增 sIgM-IgZ RT-PCR 引物
EMZF2	ATATCATGTGGAAGGTGGGCAATG	扩增 mIgM-IgZ RT-PCR 引物
EMZR2	ACTTTATTGATGAGTGTGAACATTGAG	扩增 mIgM-IgZ RT-PCR 引物
EZF	GAAGGTCTTTTCACAGCACACAGT	扩增 sIgZ-2 RT-PCR 引物
EZR	ATAATCAACTGGACATTCTGCCTG	扩增 sIgZ-2 RT-PCR 引物
β -actin F	CCTTCTTGGGTATGGAGTCTT	扩增 β -actin RT-PCR 引物
β -actin R	AGAGTATTTACGCTCAGGTGG	扩增 β -actin RT-PCR 引物

2 结果

2.1 IgZ-2 的序列分析

通过 PCR 扩增从草鱼中获得了一种新的 IgH 序列,与已报道的草鱼 IgZ 恒定区氨基酸序列相似性为 59.8%,命名为 IgZ-2,分泌型 IgZ-2 (secretory IgZ-2, sIgZ-2) 的 cDNA 序列共 1 889 bp,GenBank 登录号为 GQ201419,编码 539 个氨基酸,其 3'非编码区包含 267 bp,但缺乏 5'非编码区及部分可变区序列,IgZ-2 的恒定区序列中存在 6 个糖基化位点(图 1)。IgZ-2 重链基因的基因组结构为 CH1(273 bp)-IVS1(94 bp)-CH2(291 bp)-IVS2(168 bp)-CH3(327 bp)-IVS3(215 bp)-CH4(338 bp),所有的外显子与内含子的界限都遵循 GT-AG 法则,GenBank 登录号为 GQ429175。

2.2 IgM-IgZ 的序列分析

分泌型 IgM-IgZ(secretory IgM-IgZ, sIgM-IgZ) 的 cDNA 序列含 1 316 bp, GenBank 登录号为 GQ201420,包含 3 bp 的 5' UTR,1 086 bp 的开放阅读框,编码 361 个氨基酸,3' UTR 具有 227 bp,3' UTR 中含有一个多聚腺苷酸加尾信号(AATAAA),并且包含 poly(A)(图 2-A)。推断分子式为 C₁₇₆₉H₂₇₆₂N₄₇₀O₅₅₃S₁₉,预测分子量为 40.07 ku,理论等电点 8.42。膜结合型 IgM-IgZ(membrane IgM-IgZ, mIgM-IgZ) 的 GenBank 登录号为 EU243241, mIgM-IgZ 由两个膜外显子(TM1 和 TM2)与 sIgM-IgZ 中最后一个恒定区中的隐蔽性剪切位点(AA ↓ GTAAA)剪接而成(图 2-B)。IgM-IgZ 的重链基因的基因组结构为 CH1(327 bp)-IVS1(628 bp)-CH2(356 bp)-IVS2(958 bp)-TM1(155 bp)-IVS3(143 bp)-TM2(12 bp),GenBank 登录号为 EF101890。

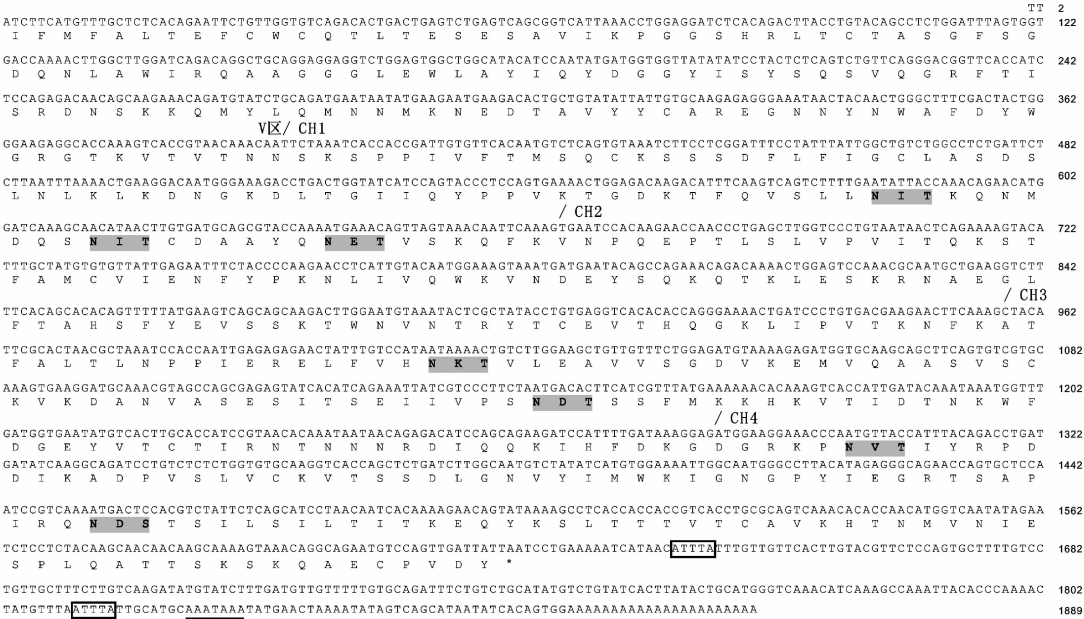


图 1 草鱼 sIgZ-2 cDNA 序列及由此推断的氨基酸序列

推断的 N-糖基化位点用阴影标出,终止密码子用星号表示,多聚腺苷酸加尾信号用下划线表示,不稳定信号用方框表示,sIgZ-2 的 GenBank 登录号 GQ201419。

Fig.1 Nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of sIgZ-2 in grass carp

Potential sites for N-glycosylation and the stop codons are indicated by shade and asterisks, respectively. The putative polyadenylation signal sequence is underlined. The sequences of inflammatory motifs are indicated with boxes. The GenBank accession number for sIgZ-2 is GQ201419.

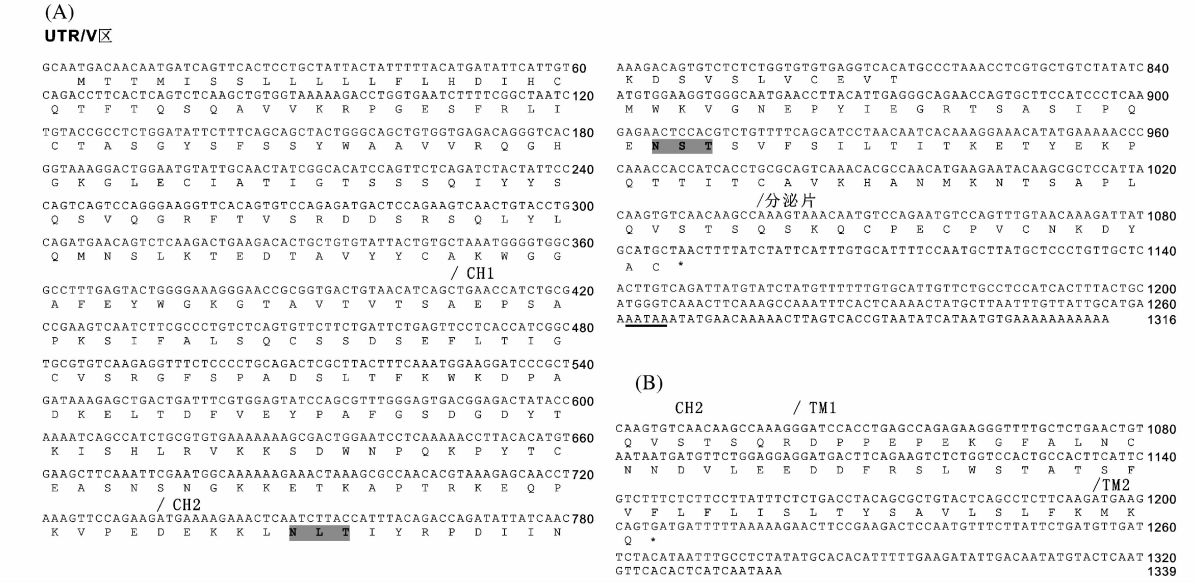


图 2 草鱼 IgM-IgZ cDNA 序列及由此推断的氨基酸序列

(A) sIgM-IgZ 序列;(B)部分 mIgM-IgZ 序列。推断的 N-糖基化位点用阴影标出,终止密码子用星号表示,多聚腺苷酸加尾信号用下划线表示,隐蔽性剪切位点 AA ↓ GTAAA 以斜体标示。sIgM-IgZ 和 mIgM-IgZ 的 GenBank 登录号分别为 GQ201420 和 EU243241。

Fig.2 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of IgM-IgZ from grass carp

(A) sIgM-IgZ; (B) Partial mIgM-IgZ. Potential sites for N-glycosylation and the stop codons are indicated by shade and asterisks, respectively. The putative polyadenylation signal sequences are underlined. The cryptic donor splice site(AA ↓ GTAAA) of grass carp IgM-IgZ is shown in italics. The GenBank accession numbers for sIgM-IgZ and mIgM-IgZ are GQ201420 and EU243241, respectively.

2.3 氨基酸序列比对分析

氨基酸序列的相似性分析结果(表2)表明,草鱼 IgZ-2 的全部恒定区氨基酸序列与斑马鱼 IgZ、草鱼 IgZ、虹鳟 IgT、草鱼 IgM 的全部恒定区氨基酸序列的相似性较高,依次为 66.7%、59.8%、52.6%、47.8%,将草鱼 IgZ-2 的各个恒

定区与表3中的 IgH 的对应恒定区进行比对,草鱼 IgZ-2 的 CH1、CH2、CH3 的氨基酸序列与斑马鱼 IgZ 对应的恒定区相似性最高,分别为60.9%、67.0%、68.8%,草鱼 IgZ-2 的 CH4 与斑马鱼 IgZ CH4 以及鲤 IgM-IgZ CH3 的氨基酸相似性都高达 75.0%(表2)。

表2 草鱼 IgZ-2 恒定区与草鱼 IgM、IgZ、IgM-IgZ、其他鱼类 Ig 恒定区氨基酸序列相似性
Tab.2 Percent amino acid similarity between constant regions of grass carp IgZ-2 and other Igs as follows: IgM, IgZ, IgM-IgZ from grass carp and Igs in other teleosts

物种 species	恒定区 constant regions				
	CH1-4(%)	CH1(%)	CH2(%)	CH3(%)	CH4(%)
草鱼 IgM	47.8	55.0	45.7	41.3	46.0
草鱼 IgM-IgZ	37.7	52.8	/	/	72.9
草鱼 IgZ	59.8	56.4	43.1	65.1	70.6
斑马鱼 IgZ	66.7	60.9	67.0	68.8	75.0
虹鳟 IgT	52.6	48.0	54.5	48.6	57.5
红鳍东方鲀 IgH	27.1	49.0	/	/	38.4
鲤 IgM-IgZ	35.9	53.6	/	/	75.0

草鱼 IgM-IgZ 的全部恒定区氨基酸序列与鲤 IgM-IgZ 的全部恒定区氨基酸序列的相似性最高,达 74.0%,其次是与红鳍东方鲀中新的 IgH 存在较高的相似性,相似性为 47.1%。其中, IgM-IgZ 的 CH1 与草鱼 IgM 的 CH1 相似性最高,达 85.1%,CH2 与草鱼 IgZ 的 CH4 相似性最高达 77.3%(表3)。

表3 草鱼 IgM-IgZ 恒定区与草鱼 IgM、IgZ、IgZ-2、其他鱼类 Ig 恒定区氨基酸序列的相似性
Tab.3 Percent amino acid similarity between constant regions of grass carp IgM-IgZ and other Igs including IgM, IgZ, IgZ-2 from grass carp and Igs in other teleosts

物种 species	恒定区 constant regions		
	全部 CH(%)	第一个 CH(%)	最后一个 CH(%)
草鱼 IgM	35.2	84.3	41.1
草鱼 IgZ-2	37.7	52.8	72.9
草鱼 IgZ	43.2	80.6	77.3
斑马鱼 IgZ	35.6	43.5	67.8
虹鳟 IgT	31.1	55.6	50.8
红鳍东方鲀新型 IgH	47.1	50.0	40.7
鲤 IgM-IgZ	74.0	77.3	72.9

氨基酸序列比较分析结果(图3)表明,草鱼 IgZ-2 和 IgM-IgZ 在 CH1 含有 3 个保守的半胱氨酸,第一个是起连接重链和轻链作用的半胱氨酸,另外两个半胱氨酸用于形成链内二硫键。草鱼 IgZ-2 和 IgM-IgZ 中其他的恒定区也都具有两个

保守的用于形成链内二硫键的半胱氨酸。此外,在草鱼 IgZ-2 和 IgM-IgZ 的各个恒定区存在一个或两个保守的色氨酸。

2.4 系统发育分析

利用 Ig 的重链恒定区氨基酸序列进行多序列对位排列并构建系统进化树,显示草鱼 IgZ-2 与斑马鱼 IgZ 聚为一枝,再依次与草鱼 IgZ、草鱼 IgM-IgZ 和鲤 IgM-IgZ 聚在一起;三棘刺鱼 IgT 与鳊(*Siniperca chuatsi*) IgT、红鳍东方鲀中新型 IgH、虹鳟 IgT 先分别聚在一起,再与草鱼 IgZ-2 等聚在一起,这一大类最后与硬骨鱼类 IgM 聚为一大枝(图4)。此外,系统发育分析结果表明,两栖类、爬行类、鸟类和哺乳动物 IgM 聚为一大类,硬骨鱼类 IgM 单独聚为一大类,而软骨鱼类的 IgM 则在这两大类之外,与 IgW、NAR 聚成一大类,但支持率低于 50%。

2.5 Ig 在草鱼的器官/组织中转录水平的表达

采用半定量 RT-PCR 检测 sIgZ-2、sIgM-IgZ 和 mIgM-IgZ 在 4 条草鱼中的表达(图5),发现 sIgM-IgZ、mIgM-IgZ 和 sIgZ-2 在 4 条草鱼中的表达并不完全一致。在第一、二条鱼中,sIgM-IgZ 和 mIgM-IgZ 只在头肾中有明显表达,而在第三、四条鱼中,sIgM-IgZ 和 mIgM-IgZ 在头肾,中肾,鳃,肠和脾脏中均可见表达。sIgZ-2 在第一、二条鱼的头肾、中肾中有较强的表达,在第三条鱼的头肾中有较弱的表达,而在第四条鱼的组织中无明显表达。

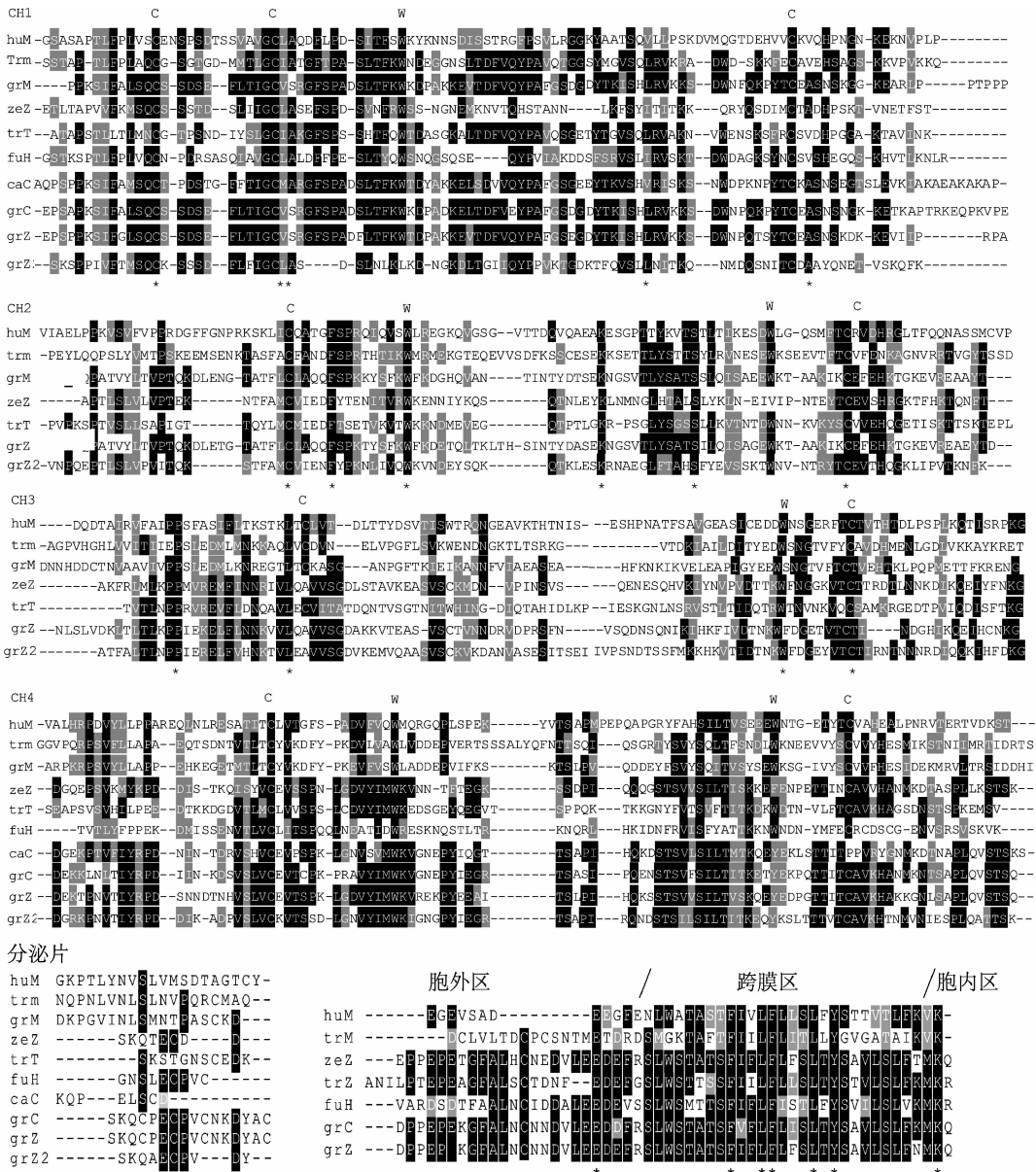


图3 IgM、IgZ、IgT、IgH 和 IgM-IgZ 重链恒定区氨基酸序列的排列

同样的氨基酸用星号(＊)表示,类似的氨基酸用阴影表示,缺失的氨基酸用横线表示。保守的半胱氨酸(C)和色氨酸(W)在保守氨基酸的上方分别用“C”或“W”表示。所用序列的 GenBank 登录号及对应的缩写如下:人 IgM(huM,分泌型,CAB37838,膜结合型,EAW81938);虹鳟 IgM(trM,分泌型,AAW66972,膜结合型,AAA56662);草鱼 IgM(grM,分泌型,ABD76396);斑马鱼 IgZ(zeZ,分泌型,AAT67446,膜结合型,AAT67444);虹鳟 IgT(trT,分泌型,AAW66978,膜结合型,AAW66980);红鳍东方鲀新型 IgH(fuH,分泌型,BAD89297,膜结合型,BAD89298);鲤 IgM-IgZ(caC,分泌型,BAD69715);草鱼 IgZ(grZ,分泌型,GQ201421,膜结合型,EU243240);草鱼 IgZ-2(grZ2,分泌型,GQ201419);草鱼 IgM-IgZ(grC,分泌型,GQ201420,膜结合型,EU243241)。

Fig.3 Amino acid alignment based on heavy chain constant regions of the IgM,IgZ,IgT,IgH and IgM-IgZ

Identical residues are indicated with asterisk(＊) and similar amino acids are shaded. The missing amino acids are marked by dashes. The cysteines and tryptophans in conserved location are indicated with “C” and “W”, alternatively. GenBank accession numbers of sequences used are as the followings;human IgM(huM,secreted form,CAB37838,membrane form,EAW81938); rainbow trout IgM(trM,secreted form,AAW66972,membrane form,AAA56662); grass carp IgM(grM,secreted form,ABD76396); zebrafish IgZ(zeZ,secreted form,AAT67446,membrane form,AAT67444); rainbow trout IgT(trT,secreted form,AAW66978,membrane form,AAW66980); fugu IgH(fuH,secreted form,BAD89297,membrane form,BAD89298); carp chimera IgM-IgZ(caC,secreted form,BAD69715); grass carp IgZ(grZ,secreted form,GQ201421,membrane form,EU243240); grass carp IgZ-2(grZ2,secreted form,GQ201419); grass carp IgM-IgZ(grC,secreted form,GQ201420,membrane form,EU243241)。

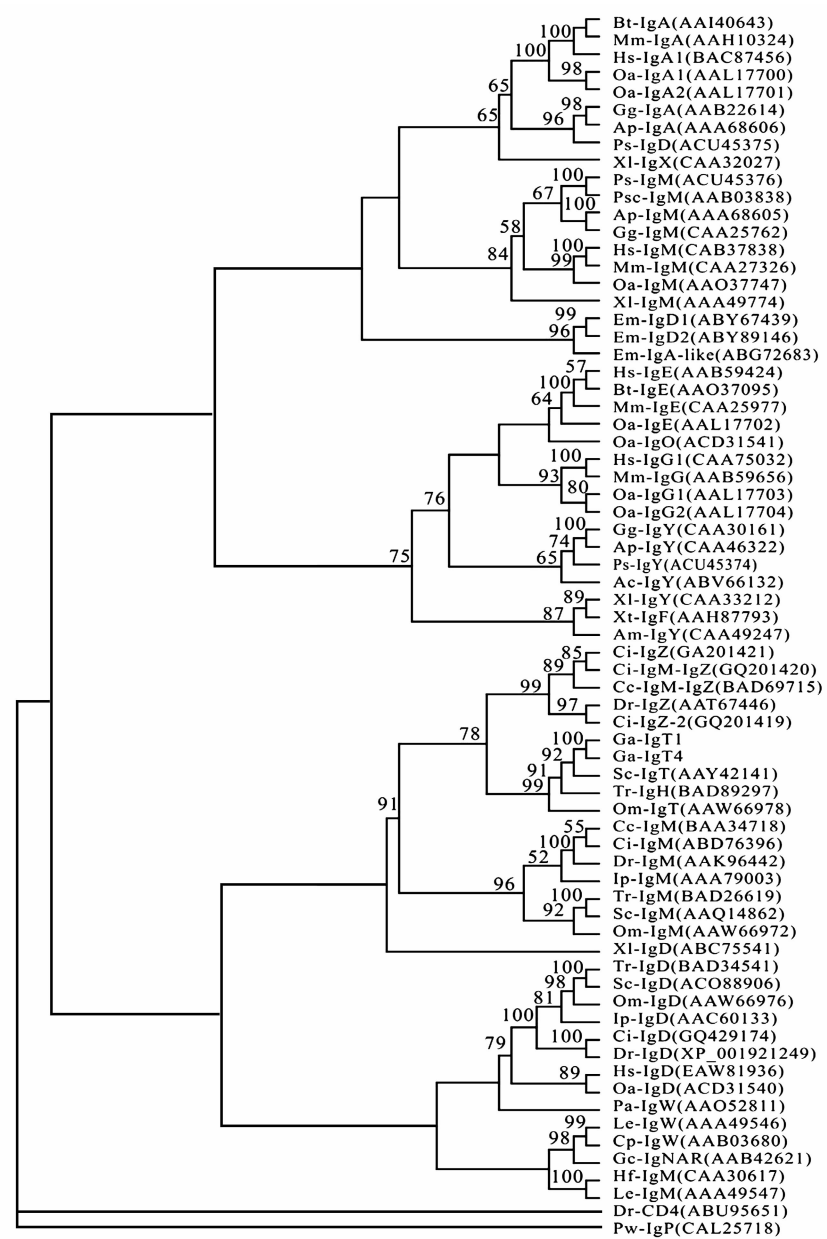


图 4 基于脊椎动物免疫球蛋白重链基因构建的系统发育树

采用 MP 法构建系统进化树,以斑马鱼的 CD4 为外类群,枝上数字为 1 000 次 bootstrap 的置信度值(只显示在 50% 以上的值)。建树所用序列为重链基因的全部恒定区氨基酸序列(鱼类 IgD 基因去除了 μ 1 的序列),除三棘刺鱼的 IgT1、IgT4 的序列来自所发表论文的正文外^[11],其余序列均来自 GenBank,序列的登录号见系统发育树中的括号内。Hs. 人; Mm. 小鼠; Bt. 牛; Oa. 鸭嘴兽; Gg. 鸡; Ap. 绿头鸭; Ps. 中华鳖; Ac. 安乐蜥; Xl. 非洲爪蟾; Xt. 热带爪蟾; Am. 美西螈; Pw. 欧非肋突螈; Em. 豹纹壁虎; Psc. 红耳龟; Hf. 角鲨; Le. 鳐; Ga. 三棘刺鱼; Sc. 鳊; Tr. 红鳍东方鲀; Om. 虹鳉; Cc. 鲤; Dr. 斑马鱼; Ci. 草鱼; Ip. 斑点叉尾鮰; Pa. 肺鱼; Gc. 护士鲨; Cp. 沙洲鲨。

Fig. 4 Phylogenetic relationship of immunoglobulin heavy chain genes in vertebrates

The tree was inferred by maximum parsimony (MP) with zebrafish CD4 used as the outgroup. Bootstrap support values from the MP (>50%) are shown at branch nodes. The tree was constructed by using complete constant region amino acid sequences, except that μ 1 was not used in fish IgD. Except for the three-spined stickleback fish IgT1 and IgT4 which were obtained directly from the publication^[11], all other sequences used in the phylogenetic analysis were taken from the GenBank database, with their accession numbers shown in parentheses. Hs. *Homo sapiens*; Mm. *Mus musculus*; Bt. *Bos taurus*; Oa. *Ornithorhynchus anatinus*; Gg. *Gallus gallus*; Ap. *Anas platyrhynchos*; Ps. *Pelodiscus sinensis*; Ac. *Anolis carolinensis*; Xl. *Xenopus laevis*; Xt. *Xenopus tropicalis*; Am. *Ambystoma mexicanum*; Pw. *Pleurodeles waltl*; Em. *Eublepharis macularius*; Psc. *Pseudemys scripta*; Hf. *Heterodontus Francisci*; Le. *Leucoraja erinacea*; Ga. *Gasterosteus aculeatus*; Sc. *Siniperca chuatsi*; Tr. *Takifugu rubripes*; Om. *Oncorhynchus mykiss*; Cc. *Cyprinus carpio*; Dr. *Danio rerio*; Ci. *Ctenopharyngodon idellus*; Ip. *Ictalurus punctatus*; Pa. *Protopterus aethiopicus*; Gc. *Ginglymostoma cirratum*; Cp. *Carcharhinus plumbeus*.

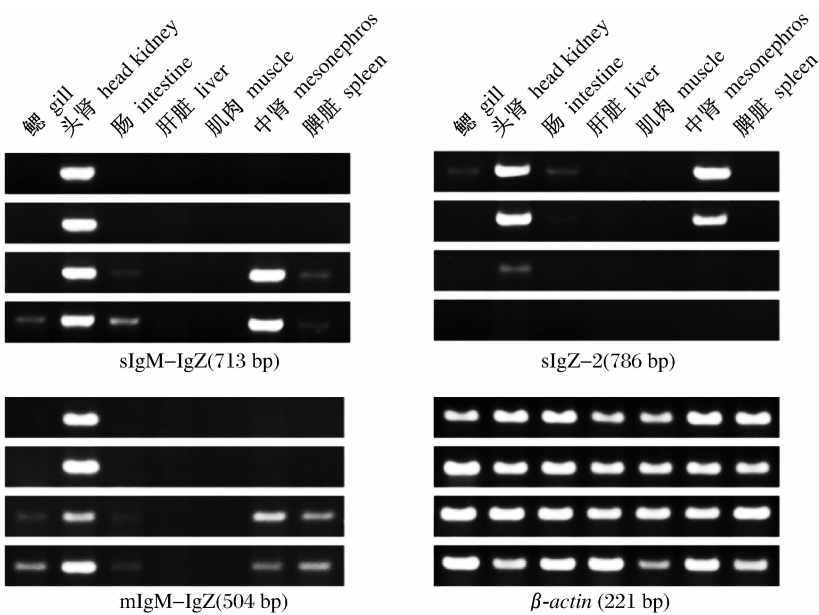


图 5 草鱼 IgZ-2 和 IgM-IgZ 的组织表达分析

Fig. 5 Expression of grass carp IgZ-2 and IgM-IgZ in different organs as detected by RT-PCR

3 讨论

本研究分别克隆了编码草鱼 IgZ-2 和 IgM-IgZ 恒定区基因的 cDNA 序列。将草鱼 IgZ-2 的全部恒定区及每个恒定区分别与已报道的鱼类 IgZ/IgT 进行氨基酸相似性分析,发现草鱼 IgZ-2 的恒定区与斑马鱼 IgZ 的恒定区的氨基酸序列相似性最高,系统进化树分析显示草鱼 IgZ-2 以极高的支持率最先与斑马鱼 IgZ 聚为一枝,表明草鱼 IgZ-2 也应与斑马鱼 IgZ 同为一类免疫球蛋白,也表明草鱼中存在两种类型的 IgZ。在目前已经阐述的草鱼 IgH 基因座中,IgZ 的重链基因位于 IgM 的重链基因的上游^[9],而 IgZ-2 的重链基因在基因座中的位置尚有待进一步研究。研究显示,在斑马鱼和虹鳟中都存在另外一个 IgZ/IgT 基因,在斑马鱼中被命名为 IgZ-2^[19],而在虹鳟中则可能存在两个 IgD 和两个 IgT 基因^[10]。最近的研究显示,大麻哈鱼则可能具有两个免疫球蛋白重链的基因座,这可能与大麻哈鱼是四倍体的原因有关^[12]。但是,在斑马鱼和虹鳟中是否存在两个免疫球蛋白重链基因座是一个有待回答的问题,有关草鱼这方面的研究也只有等待草鱼基因组的不断解密。

草鱼的 IgM-IgZ 具有两个恒定区,其 CH1 与草鱼 IgM 的 CH1 相似性最高,而 CH2 与草鱼 IgZ

的 CH4 相似性最高,这一特征与鲤中 IgM-IgZ 的特征类似^[14],但鲤 IgM-IgZ 只具有 cDNA 序列,缺乏对应的基因组序列,而草鱼 IgM-IgZ 的重链基因则具有对应的基因组序列,其基因组序列包含两个恒定区外显子及两个膜外显子,这一结果表明,草鱼 IgM-IgZ 并非是由 IgM 和 IgZ 在转录水平嵌合而成,而可能是在基因重排时嵌合而成。

草鱼 IgM-IgZ 具有分泌型和膜结合型两种形式。膜结合型的产生方式是由膜外显子与 CH4 中的剪切位点连接,与哺乳动物、鸟类、两栖类和爬行类中的 IgM 膜结合型的剪切方式一样。四足动物膜结合型 IgM 的剪切位点的保守序列是 AG ↓ GTAAG^[20],而草鱼 mIgM-IgZ 中的剪切位点是 AA ↓ GTAAA,与四足动物 IgM 剪切位点的保守序列(AG ↓ GTAAG)存在差异,但膜结合型的 IgM-IgZ 确实存在,并且同样的剪切位点序列也存在于斑马鱼和草鱼 IgZ 中。此外,红鳍东方鲀 mIgH 和虹鳟 mIgT 的 CH4 中也存在剪切位点,剪切位点的序列均为 GG ↓ GTAAC,也与四足动物 IgM 剪切位点的保守序列不同,这表明鱼类 IgZ、IgT、IgH 和 IgM-IgZ 的膜结合型剪切位点序列偏离了四足动物 IgM 剪切位点的保守序列,但仍能被识别,并产生膜结合型免疫球蛋白。

关于 IgZ 和 IgM-IgZ 的转录表达,已经在多种鱼类中开展了研究,如斑马鱼、红鳍东方鲀、鳊、

鲤、草鱼等,在不同鱼类中,Ig 表达的器官或组织并不完全相同,但一般在免疫器官如胸腺、头肾和脾脏中均有表达^[13]。本研究中,半定量 RT-PCR 分析显示 sIgM-IgZ、mIgM-IgZ 和 sIgZ-2 在 4 条草鱼的器官/组织中存在明显的表达差异。当表达量低时,sIgM-IgZ、mIgM-IgZ 和 sIgZ-2 只在淋巴器官中表达,这与在其他鱼类的器官/组织中的表达结果是一致的。当表达量较高时,mIgM-IgZ 和 IgZ-2 不仅在头肾、脾脏等淋巴器官中表达,也在鳃、肠等器官/组织中有表达。这种情况有可能是个体差异引起的,但也可能与这 3 种基因的表达时序相关。另外一个比较特殊的现象是,在第一、二条鱼中,sIgM-IgZ、mIgM-IgZ 的表达较弱,sIgZ-2 的表达较强,而在第三、四条鱼中 sIgZ-2 的表达较弱,sIgM-IgZ、mIgM-IgZ 的表达较强。IgM-IgZ 和 IgZ-2 这种器官/组织表达的特点是否与它们的功能有联系,或者处在不同的免疫状态的个体它们的 Ig 的表达规律如何都是有待进一步研究的问题。

参考文献:

- [1] 周光炎. 免疫学原理[M]. 2 版. 上海:上海科学技术出版社,2007.
- [2] Flajnik M F. Comparative analyses of immunoglobulin genes: surprises and portents [J]. Nature Reviews Immunology, 2002, 2(9): 688–698.
- [3] Zhao Y, Cui H, Whittington C M, et al. *Ornithorhynchus anatinus* (Platypus) links the evolution of immunoglobulin genes in eutherian mammals and nonmammalian tetrapods [J]. Journal of Immunology, 2009, 183(5): 3285–3293.
- [4] Savan R, Aman A, Sato K, et al. Discovery of a new class of immunoglobulin heavy chain from fugu [J]. European Journal of Immunology, 2005, 35(11): 3320–3331.
- [5] Solem S T, Stenvik J. Antibody repertoire development in teleosts—a review with emphasis on salmonids and *Gadus morhua* L [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2006, 30(1–2): 57–76.
- [6] 王改玲, 骆彦萍, 孙宝剑, 等. 鳊免疫球蛋白 D 重链基因的克隆与表达分析 [J]. 中国水产科学, 2010, 17(1): 11–20.
- [7] Saha N R, Suetake H, Kikuchi K, et al. Fugu immunoglobulin D: a highly unusual gene with unprecedented duplications in its constant region [J]. Immunogenetics, 2004, 56(6): 438–447.
- [8] Danilova N, Bussmann J, Jekosch K, et al. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z [J]. Nature Immunology, 2005, 6(3): 295–302.
- [9] Xiao F S, Wang Y P, Yan W, et al. Ig heavy chain genes and their locus in grass carp *Ctenopharyngodon idella* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 29(4): 594–599.
- [10] Hansen J D, Landis E D, Phillips R B. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(19): 6919–6924.
- [11] Gambón-Deza F, Sánchez-Espinel C, Magadán-Mompó S. Presence of an unique IgT on the IGH locus in three-spined stickleback fish (*Gasterosteus aculeatus*) and the very recent generation of a repertoire of VH genes [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2010, 34(2): 114–122.
- [12] Tadiso T M, Lie K K, Hordvik I. Molecular cloning of IgT from Atlantic salmon, and analysis of the relative expression of τ , μ and δ in different tissues [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, doi:10.1016/j.vetimm.2010.07.024.
- [13] 肖凡书, 裴品. 鱼类免疫球蛋白重链基因与基因座的研究进展 [J]. 水产学报, 2010, 34(10): 1617–1628.
- [14] Savan R, Aman A, Nakao M, et al. Discovery of a novel immunoglobulin heavy chain gene chimera from common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Immunogenetics, 2005, 57(6): 458–463.
- [15] 王欣欣, 孙宝剑, 昌鸣先, 等. 草鱼免疫球蛋白 M 重链基因的克隆及表达 [J]. 水产学报, 2008, 32(1): 13–20.
- [16] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876–4882.
- [17] Campanella J J, Bitincka L, Smalley J. MatGAT: an application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences [J]. BMC Bioinformatics, 2003, 4(1): 29.
- [18] Swofford D L. PAUP *: Phylogenetic analysis using

- parsimony (* and other methods), Version 4.0 [M]. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2002.
- [19] Hu Y L, Xiang L X, Shao J Z. Identification and characterization of a novel immunoglobulin Z isotype in zebrafish; implications for a distinct B cell receptor in lower vertebrates [J]. Molecular Immunology, 2009, 47(4): 738–746.
- [20] Peterson M L, Perry R P. The regulated production of μ_m and μ_s mRNA is dependent on the relative efficiencies of μ_s poly(A) site usage and the C μ 4-to-M1 splice [J]. Molecular and Cellular Biology, 1989, 9(2): 726–738.

Novel immunoglobulin heavy chain genes, IgZ-2 and IgM-IgZ in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)

XIAO Fan-shu, XU Qiao-qing, WANG Xin-xin, NIE Pin*

(State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology,
Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: The cDNA and genomic sequences of IgZ-2 and IgM-IgZ were characterized in grass carp *Ctenopharyngodon idellus* in the present study. The secretory IgZ-2 (sIgZ-2) cDNA sequence of grass carp is 1 889 bp, encoding 539 amino acids, and it contains a 267 bp 3' untranslated region (UTR), but lacking 5' UTR and partial variable region (V). The secretory IgM-IgZ (sIgM-IgZ) cDNA sequence of grass carp is 1 316 bp, encoding 361 amino acids, and contains a 3 bp 5' UTR and a 227 bp 3' UTR. The cDNA sequence of membrane-bound form IgM-IgZ (mIgM-IgZ) possesses two transmembrane exons, which are also spliced to a site within the CH2 exon. Amino acid alignment based on heavy chain constant regions of Igs showed that IgZ-2 and IgM-IgZ contain conserved cysteines. Phylogenetic analysis indicates that the grass carp IgZ-2 was clustered closely with the reported zebrafish IgZ, and then with IgZ in grass carp, which then was clustered well with grass carp IgM-IgZ and chimeric IgM-IgZ in common carp. There was apparent discrepancy in mRNA expression of sIgM-IgZ, mIgM-IgZ and sIgZ-2 in the four fish. In general, IgM-IgZ and IgZ-2 were expressed mainly in lymphoid organs.

Key words: grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) immunoglobulin; IgZ-2; IgM-IgZ; RT-PCR

Corresponding author: NIE Pin. Tel: 027-68780736, Fax: 027-68780123, E-mail: pinnie@ihb.ac.cn