

## 大鳍鲩免疫球蛋白 M 重链基因的克隆及表达分析

李春涛<sup>1</sup>, 张其中<sup>2\*</sup>, 杨莹莹<sup>1</sup>, 朱成科<sup>1</sup>, 李超<sup>1</sup>, 陈霞<sup>1</sup>

(1. 西南大学生命科学学院, 水产科学重庆市市级重点实验室, 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 淡水生物生殖与发育教育部重点实验室, 重庆 400715;  
2. 暨南大学水生生物研究所, 广东 广州 510632)

**摘要:** 用 RACE-PCR 和 RT-PCR 方法获得大鳍鲩分泌型免疫球蛋白 M(sIgM) 重链基因的全长 cDNA 序列。大鳍鲩 sIgM 的 cDNA 全长为 1 992 bp, 包含 5' 非编码区 53 bp, 3' 非编码区 226 bp, 开放阅读框 1 713, 编码 570 个氨基酸。推测的大鳍鲩 sIgM 蛋白质序列可变区含有 4 个骨架区(FR)和 3 个互补决定区(CDR), 恒定区(CH)含有 CH1、CH2、CH3 和 CH4 4 个部分。与其它 6 种硬骨鱼类 IgM 氨基酸序列比对分析表明, 大鳍鲩 sIgM 存在半胱氨酸和色氨酸保守位点; 其氨基酸序列与斑点叉尾鲷 IgM 的相似性最高, 为 54.3%; 与石斑鱼的相似性最低, 为 24.6%。进化树分析表明, 大鳍鲩 sIgM 与斑点叉尾鲷聚为一支。RT-PCR 显示, 大鳍鲩 IgM 基因主要在血细胞、脾脏、头肾和中肾中转录表达; 注射嗜水气单胞菌后, 血细胞、脾脏和头肾 IgM 重链基因转录表达量在 1~10 d 内有显著上升。

**关键词:** 大鳍鲩; IgM 重链基因 cDNA; 克隆; 实时荧光定量 PCR; 组织分布

**中图分类号:** Q 785; S 917.4

**文献标志码:** A

免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)是介导体液免疫的重要效应分子,是 B 细胞接受抗原刺激后增殖分化为浆细胞所产生的糖蛋白,通过与相应抗原特异性结合,发挥体液免疫功能。结构上,免疫球蛋白由重链和轻链通过链内和链间二硫键连接组成。根据重链(heavy chain, H)恒定区的差异,哺乳动物免疫球蛋白被划分为 5 种类型,即 IgM、IgG、IgA、IgE 和 IgD<sup>[1]</sup>。在硬骨鱼类中,已经报道的免疫球蛋白包括 IgM<sup>[2-3]</sup>、IgD<sup>[4-6]</sup>、IgZ 或 IgT<sup>[7-8]</sup> 和 IgM-IgZ<sup>[9]</sup>。

IgM 是一类存在于所有有颌类脊椎动物中的抗体,其重链代表了从软骨鱼类到哺乳类的一个连续进化的过程<sup>[10]</sup>,一直是鱼类免疫学研究的热点。到目前,除模式鱼类斑马鱼(*Danio rerio*)外,多种重要经济性鱼类 IgM 重链基因被克隆鉴定,如斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)<sup>[11]</sup>、大西洋鲑(*Salmo salar*)<sup>[12]</sup>、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[13]</sup>、

鲤(*Cyprinus carpio*)<sup>[14]</sup>、鳊(*Siniperca chuatsi*)<sup>[15]</sup>、石斑鱼(*Epinephelus coioides*)<sup>[16]</sup>、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)<sup>[17]</sup>、鳗鲡(*Anguilla anguilla*)<sup>[18]</sup>和南方鲇(*Silurus meridionalis*)<sup>[19]</sup>等。大鳍鲩(*Mystus macropterus*, 异域名 *Hemibagrus macropterus*)属于鲇形目(Siluriformes), 鲿科(Bagridae), 在我国嘉陵江中下游水域有广泛的分布和一定的养殖规模。大鳍鲩、斑点叉尾鲷和南方鲇都有重要的经济价值。本研究克隆了大鳍鲩 IgM 重链基因 cDNA 全长,应用实时荧光定量 PCR 分析了该基因在不同组织中的表达,以及注射嗜水气单胞菌后血细胞、脾脏和头肾 IgM 转录变化,以期揭示大鳍鲩免疫抗感染机制奠定基础。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 实验材料

实验鱼与细菌 实验用鱼体质量为(80 ±

收稿日期:2011-06-03 修回日期:2011-07-10

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2011AA10A216);重庆市科技攻关计划项目(CSTC.1010AC1116);三峡库区生态环境教育部重点实验室基金资助项目

通讯作者:张其中, E-mail: zhangqzdr@126.com

7.3) g,均来自重庆市北碚,饲养在室内水族箱中,每天投喂一定水蚯蚓饵料,并通气换水,水温控制在 $(18 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, Ah)来自本实验室 $-80 ^\circ\text{C}$ 低温保存菌种,培养和浓度测定参考文献[20]中记载的草鱼出血病混合感染的嗜水气单胞菌的分离、鉴定与理化特性。嗜水气单胞菌用0.65%生理盐水稀释,调整浓度到 $1 \times 10^5$  CFU/mL,4 $^\circ\text{C}$ 临时保存备用。感受态大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ 由本实验室低温保存。

**样品采集** 所有实验用鱼室内适应喂养1周。

(1) 选3尾健康的大鳍鱩,每尾鱼腹腔注射0.2 mL, $1 \times 10^5$  CFU/mL嗜水气单胞菌0.65%生理盐水。一周后,第二次注射相同浓度的嗜水气单胞菌。24 h后,取其头肾,液氮冻存,用于基因cDNA克隆;

(2) 选3尾健康的大鳍鱩,分别取其血细胞、肝脏、脾脏、肠、肾、头肾、鳃、皮肤、肌肉、脑和心脏,液氮冻存,用于组织分布实验;

(3) 选10尾健康的大鳍鱩,腹腔注射0.2 mL, $1 \times 10^5$  CFU/mL嗜水气单胞菌0.65%生理盐水。在24 h、48 h、5 d、10 d、15 d、20 d和30 d时间点取大鳍鱩血细胞、头肾、脾脏,每组取5个样品,液氮冻存,用于研究其IgM基因在这3个组织中的转录表达变化。

## 1.2 实验方法

**总RNA提取和第一链cDNA的合成** 按Trizol (Invitrogen)说明书提取总RNA,电泳检测完整性,核酸定量仪检测浓度和纯度。以总RNA(约2  $\mu\text{g}$ )为模板,按照逆转录M-MLV (promega)说明书合成cDNA第1链。

**中间片段的获得** 根据从GenBank数据库中下载的部分硬骨鱼类IgM cDNA保守区设计简并引物IgM F422和IgM R1435(表1),以第一链cDNA为模板,进行RT-PCR。目的产物经电泳检测纯化后克隆到pMD-19T (TaKaRa)载体上,转化入大肠杆菌,PCR检测为阳性克隆后送华大公司测序。

表1 大鳍鱩IgM重链基因cDNA全长扩增及实时定量PCR所用的引物  
Tab.1 Primers used for cloning IgM heavy chain gene of *M. macropterus* and its real-time PCR quantification

引物名称 primer	引物序列(5'-3') sequence	用途 usage
IgM F422	GACTACTGGGGAAAGGGAACC	扩增中间片段
IgM R1435	TCTAACATAGCAAGTCAGGGTCA	扩增中间片段
IgM-3F1	ACAGGCTCATCTACTCCAGTTAGGTGCG	3'RACE
IgM-3F2	ACTTGCTCCCTCCACCAGAGATTTTCAG	3'RACE
IgM-5R1	CCGCATTGCCAAAGTGGAACAGG	5'RACE
CDS III	ATTCTAGAGGCCGAGCGCCGACATG-D(T)30N-1N	3'RACE
SMART IV	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCGGG	5'RACE
Up	CTAATACGACTCACTATAGGGC	5'RACE
Nup	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	5'RACE
UTR-F	TGTGTTTATTTACAGCGGCAGG	全长cDNA
UTR-R	AGACATATTCAGAAAACAAGG	全长cDNA
IgM F1464	GGAAAATGTGAACGGCTATGTGC	real-time PCR
IgM R1678	TAAGATGCGTTATGGTGGGCG	real-time PCR
$\beta$ -actin F	GAGCACCCAGTCTCTTAC	内参基因引物
$\beta$ -actin R	TGCCCATCTCCTGCTCAAAGT	内参基因引物

**5'端和3'端片段的获得** 根据已获的中间片段设计5'和3'RACE引物(表1)。在进行5'和3'RACE逆转录时,在5'加SMART IV Oligonucleotide接头和3'加CDS III接头。Up及Nup和IgM-5R1引物用于扩增5'端;CDS III引物和IgM-3F1及IgM-3F2引物用于扩增3'端片段。目的片段纯化后同样连接到pMD-19T载体中,转化到大肠杆菌送华大公司测序。

**全长cDNA的扩增** 根据已获得的全部cDNA片段,在5'和3'非编码区区域(UTR)分别设计UTR-F和UTR-R引物,以第一链cDNA为模板,扩增全长cDNA。

### 1.3 序列分析

在NCBI网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>),进行相似性搜索,下载其它硬骨鱼类IgM cDNA和蛋白质序列。通过DNA Star软件找到大鳍鲮IgM cDNA开放阅读框,并推导出其氨基酸序列,然后应用DNA Tool 6.0进行序列分析。再利用Clustal X 1.83和BOXSHADE 3.21软件进行比对和系统进化分析。

### 1.4 Real-time PCR分析

**标准曲线绘制** 从样品采集获得的组织中,提取各组织总RNA。RNA样品用gDNA Erasers试剂,42℃,2 min除去基因组DNA。分别计算RNA样品的浓度和纯度。取1 μg RNA,用Prime Script RT Kit试剂盒(TaKaRa)进行反转录,20 μL反转录体系,条件37℃ 15 min,85℃ 5 s,4℃。根据大鳍鲮IgM cDNA保守序列设计正向F1464和反向R1678引物(表1),内参基因β-actin引物为β-actin F和β-actin R(表1)。分别用这2对引物进行PCR扩增。PCR产物连接到pMD-19T载体中,并通过测序来检验cDNA的正确性。提取含有插入目的片段的质粒,测定其浓度,计算相应的拷贝数。构建的质粒DNA按1/10倍数梯度稀释,绘制标准曲线。

**荧光定量PCR和数据分析** 荧光定量PCR用SYBR Premix Ex Taq II试剂盒(TaKaRa),在Chromo4 Real-Time Detection System(MJ Research)上进行。两步法扩增,条件为95℃ 30 s;95℃ 5 s;60℃ 30 s;40个循环。PCR结束后对扩增产物进行溶解曲线分析,以确保特异性扩增。根据标准曲线计算样品中IgM

重链基因的拷贝数。每个样品设3个重复,以未加模板的PCR反应样品作为阴性对照。PCR结果用Opticon Monitor Software 2.03 Version (MJResearch)进行分析。每个组织中IgM基因mRNA的精确拷贝数由每个阈值和标准曲线计算获得。

## 2 结果

### 2.1 大鳍鲮IgM重链基因cDNA序列

大鳍鲮IgM重链基因全长cDNA(GenBank登录号:JF909893)由1992 bp组成,其编码区有1713 bp,编码570个氨基酸。在起始密码子ATG的上游有53 bp非编码区,终止密码子ATT下游有包含poly A在内的226 bp非编码区序列。Poly A上游18 bp处是PolyA终止信号AATAAA(图1)。

### 2.2 大鳍鲮IgM氨基酸序列分析

大鳍鲮IgM重链570个氨基酸,由前导链(Leader)、可变区(VH)、恒定区(CH)和C末端(C-terminus)组成。其中可变区由4个骨架区(FR)和3个互补决定区(CDR)组成;恒定区分别由CH1、CH2、CH3和CH4组成。CH2与CH3之间为铰链区(Hinge)。在骨架区和恒定区内,共出现10个半胱氨酸和8个色氨酸保守位点(图2)。通过DNA Star中Megalalign软件分析,大鳍鲮IgM氨基酸序列与斑点叉尾鲮、草鱼、虹鳟、大西洋鲑、鳊和石斑鱼的相似率依次为53.4%、35.5%、30.2%、30.0%、27.2%和24.6%。根据大鳍鲮IgM和其他硬骨鱼类免疫球蛋白重链氨基酸序列构建的系统进化树显示(图3):大鳍鲮与斑点叉尾鲮聚为一支,表明在系统进化树所示鱼类之中,大鳍鲮与斑点叉尾鲮亲缘关系最近。

### 2.3 大鳍鲮IgM基因的组织表达

以梯度稀释含有大鳍鲮β-actin和目基因的质粒建立标准曲线,其线性相关系数分别为0.986和0.996。由于大鳍鲮IgM基因在心脏中的表达量在比较的组织中处于中游位置,所以选择它为参照并设定为1,再根据各组织相对表达量作柱形图。从图中可以看出,IgM基因在头肾中的表达量最高;其次为肾、血细胞、脾脏、鳃、肠、胃、肝脏。而在皮肤、肌肉和脑表达量很少(图4)。

```

GACCAGCAGTTGTGTTTATTACAGCGGCAGGAATCATTTTAATCTTTGAGATGGGACTAGACAGTGTTTTG 74
M F I Q Y S C 7
AGTTACTTTACTCTAGCAATGTTTATTCAATATTCCTGCAGTCAGACACTGATCCAGTCTGATCCAGTGCATC 149
S Y F T L A M F I Q Y S C S Q T L I Q S D P V I I 32
AAACCTGATCAGTCTCATAAACTGACCTGCACAGCCTCTGGATTAGACATGAGTGGCTATTACATGGCTTGGATC 224
K P D Q S H K L T C T A S G L D M S G Y Y M A W I 57
AGACAGGCGCCGGAAAAGGACTGGAATGGGTTGCAAGCATGCACAGTACAGTACATATATTACTCCAGCACT 299
R Q A P G K G L E W V A S M H S S S Y I Y Y S S T 82
GTTAAGGCGCTTACCATCTCCAGAGACGACAGTAAGAAGCAGGTATCTGCAGATGAACAGCATGAGGACA 374
V K G R F T I S R D D S K K Q V Y L Q M N S M R T 107
GAAGACTGCAGTTTATTACTGCGCTCGTGAACGTTCTGGGAACGATGCTTTTGACTACTGGGAAAAGGGACT 449
E D T A V Y Y C A R E R S G N D A F D Y W G K G T 132
TCAGTGACCGTACTTACGCTGTGCAAGGCCACCGCAGTCCCTGTTTCCACTTTGGCAATGCGGCGCTCGGAC 524
S V T V T S A V Q G P P Q S L F P L W Q C G A S D 157
GGTTTTGCTACTCTCGGCTGCATCACTCGGATTTGGCTCCGCGGACGACTGACCTTACGCTGGGCGGATGGG 599
G F V T L G C I T R D L A S A D G L T F S W A D G 182
AGCGGAAAAGCGTACTGACGTCGTGCAATACCCGGCGGTGCAGGCGAACGGAGTTATACCTCGGTGAGCCAT 674
S G K A L T D V V Q Y P A V Q A N G G Y T S V S H 207
CGCGCATCGCGCTACCGAATGGGACAAGAAAACAGTACAGTGCAGGAGTCCAAAACAGCGCAGGAAAAG 749
A R I A A T E W D K K N T Y T C E V Q N S A G K K 232
TATGCGGCTTTCGAAAAGCCAGAAGTGGCCGAGTTCGATGCATCTCTGCTTCTAACAGCTCCAACCCAAACAGAC 824
Y A V L R K P E V A E F D A S L L L T A P T Q T D 257
ATAGACAATGGAACAGCTATCTTCATCTGCTTAGCTGAAAACCTTTTCGCTAAAACACACACATTTAAGTGGAGA 899
I D N G T A I F I C L A E N F S P K T H T F K W R 282
CAAGTCTGAAGGACTTGAATGGAAATGTCAAAGCCAACATTAAGCAAGGATAAATAATTACTGCTGTA 974
Q G L K D L N G N V K A N I L S K D K Y N Y T A V 307
AGTGTGTTGAAAATACCAGCAGTGAATGGACAGGCTCATCTACTCCAGTTAGGTGCGAATCAAGCAGAAGACA 1049
S V L E I P S S E W T G S S T P V R C E F K Q K T 332
AAGACTACGGTTAAAGAGGCGCTTATGTGTGTGATAATGTCAACAGCCAAATATACGCATCATCTCACCTCC 1124
K T T V K E A L Y V C D N V Q Q P N I R I I S P S 357
CCCAGGAAAATGCTGATCAAAAAGAGTGGTATCTTGTGTGCAGAGGTGATGGAGAGCCAGGCTTCAAGGAAAT 1199
P R E M L I K R S G D L V C R G D G E P G F K E I 382
AAATGGTTTAGTACAATAGAGAGTTGGCATCAGTAAAGAATATACAAACGAATACCACAGTCAAAGCCTCTCTC 1274
K W F S D N R E L A S V K N I Q T N T T V K A S L 407
AGAATCAATTACTGAATGGACCAGTGGCTCCACATACCTGTGAGGTGTCCCATCAATCATCCCCCAACTG 1349
I N Y T E W T S G S T Y T C Q V S H Q S F P Q L 432
TTAAAGAGGTTGAATATAAAAGAGAAAATGGCAACAAGGCTGCCCCAAGGTTACTTGCTCCCTCCACCAGAG 1424
F K E V E Y K R E N G N K V C P K V Y L L P P P E 457
ATTCAGATGAATCGGTGACCCTGACTTGCTATGTAAGACTTCCACCCTAAGGAGGTGGCTGTGTCTTGGCT 1499
I S D E S V T L T C Y V K D F H P K E V A V S W L 482
GTTGACGATGCACCAGTGGAAAATGTGAACGGCTATGTGCAGGCCACCACTAACGTTATTGAGGAAAACAACCTC 1574
V D D A P V E N V N G Y V Q A T T N V I E E N N L 507
TTTTCAACATACAGCCAGCTTACTCTCAAAGCTGCAGATTGGGAAAAAGGCGCTGTTTTTACCTGCAGGGTTAT 1649
F S T Y S Q L T L K A A D W E K G A V F T C R V Y 532
CATGAGTCTATCGAGGAATCTGTACTCCTCATATCCAGATCCATCACTAGCAATTCAAACCCGCCACCATAACG 1724
H E S I E E S V L L I S R S I T S N S N P P T I T 557
CATCTTAGTCTGAATGTTCCCTCAGTCTGCAACAAGAAGTAAATAGAAATGTCTTGTCTGCTATTAATGCTTGT 1799
H L S L N V P S V C N K K * 570
TTATTTTTTTTTGCTCGTCTTCTATGCTTTTTCTTTCTTAATTAATGCAATGTCATTGCTTGAAGTCTGT 1874
CTGATGCTGTGTCTTGTGTTTCTGGAATATGTCTGATGCAATATTACTGAAACAATGACAAATAAAAAA 1949
TCCTTCAGCATGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1992

```

图1 大鳍鱠 IgM cDNA 序列和推测的氨基酸序列

起始密码子(ATG)、终止密码子(TAA)和 polyA 信号序列(AATAAA)用黑框标明。

Fig.1 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of IgM in *M. macropterus*

The start codon(ATG)and stop codon(TAA)of open reading frame and the polyadenylation signal(AATAAA)are highlighted in blank boxes.

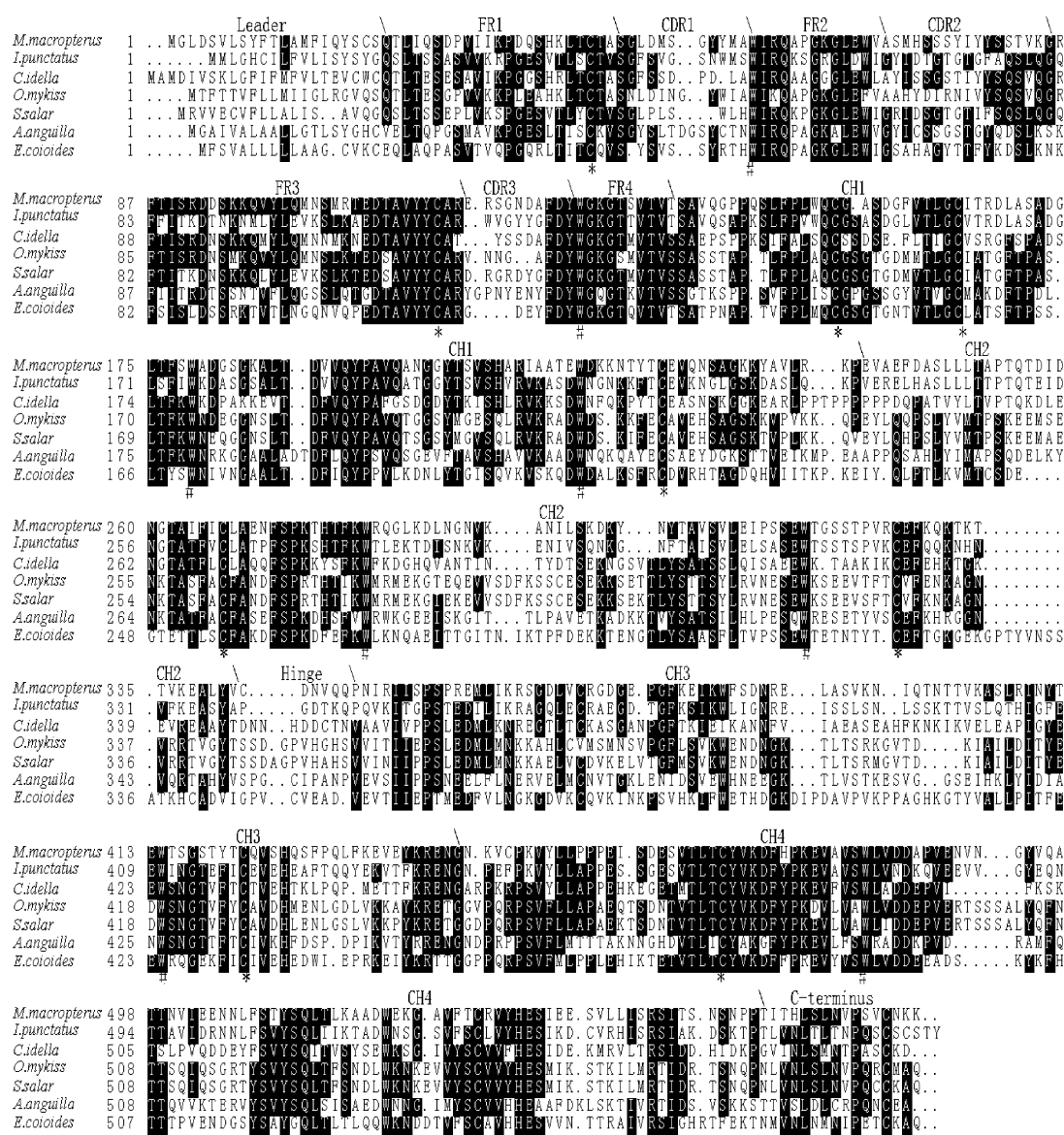


图2 大鳍鲮与其他鱼类 IgM 氨基酸序列比较

用于比较的 IgM 在 GenBank 中登录号分别为,大鳍鲮(*M. macropterus*), JF909893; 斑点叉尾鲩(*I. punctatus*), M27230; 草鱼(*C. idellus*), DQ417927; 虹鳟(*O. mykiss*), AY870257; 大西洋鲑(*S. salar*), Y12456; 鳊鱼(*A. anguilla*), EF062515; 石斑鱼(*E. coioides*), AY885701。保守的半胱氨酸(C)和色氨酸(W)分布用“\*”和“#”注明,前导链(Leader)、骨架区(FR)、互补决定区(CDR)、恒定区(CH)和 C 末端用“\”隔开。

Fig.2 Alignment of IgM amino acids between *M. macropterus* and other fish species

The GenBank accession numbers of the sequences are as follows; *M. macropterus*, JF909893; *I. punctatus*, M27230; *C. idellus*, QQ417927; *O. mykiss*, AY870257; *S. salar*, Y12456; *A. anguilla*, EF062515; *E. coioides*, AY885701. Conserved cysteines and tryptophans are marked with ‘\*’ and ‘#’. Leader, frame region (FR), complementary determining region (CDR), constant region (CH), Hinge and C-terminus are bordered with ‘\’.

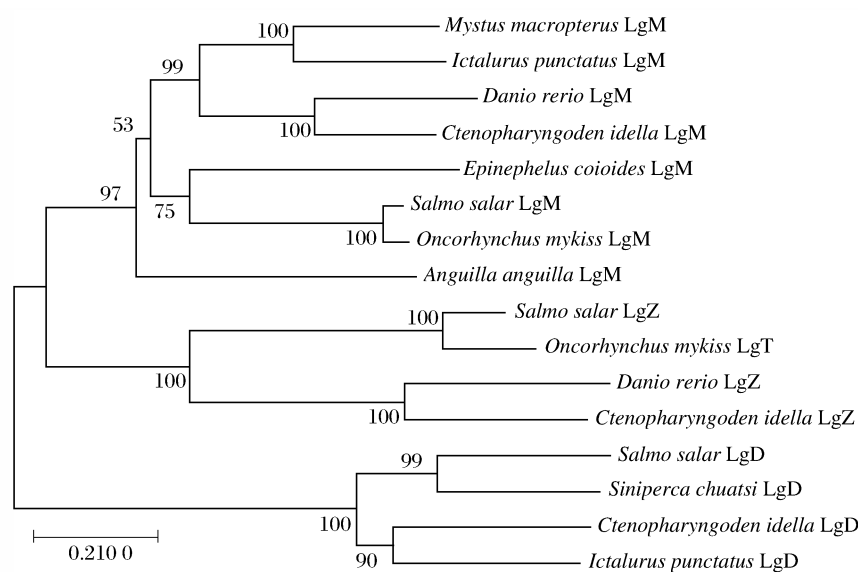


图3 硬骨鱼类免疫球蛋白系统进化树

系统进化树中各序列在 GenBank 中的登录号分别为 IgM 大鳍鱠 (*M. macropterus*), JF909893; 斑点叉尾鮰 (*I. punctatus*), M27230; 斑马鱼 (*D. rerio*), AAT67447; 草鱼 (*C. idellus*), DQ417927; 石斑鱼 (*E. coioides*), AY885701; 大西洋鲑 (*S. salar*), Y12456; 虹鳟 (*O. mykiss*), AY870257; 鳗鲡 (*A. anguilla*), EF062515; IgZ/IgT 大西洋鲑 (*S. salar*), ADD59859; 虹鳟 (*O. mykiss*), AY870264; 斑马鱼 (*D. rerio*), AY643752; 草鱼 (*C. idellus*), DQ478943; IgD 大西洋鲑 (*S. salar*), AAD43527; 鳊 (*S. chuatsi*), FJ876151; 草鱼 (*C. idellus*), GQ429174; 斑点叉尾鮰 (*I. punctatus*), T18537。进化树上的数字为步展值,是 1 000 次重复计算的结果,代表进化枝的可信度。

Fig. 3 Phylogenetic tree of teleostean immunoglobulin

GenBank accession numbers: IgM *M. macropterus*, JF909893; *I. punctatus*, M27230; *D. rerio*, AAT67447; *C. idellus*, DQ417927; *E. coioides*, AY885701; *S. salar*, Y12456; *O. mykiss*, AY870257; *A. anguilla*, EF062515; IgZ/IgT *S. salar*, ADD59859; *O. mykiss*, AY870264; *D. rerio*, AY643752; *C. idellus*, DQ478943; IgD *S. salar*, AAD43527; *S. chuatsi*, FJ876151; *C. idellus*, GQ429174; *I. punctatus*, T18537; The degree of confidence for each branch point was determined by bootstrape analysis (1 000 repetitions). Values on the tree represent bootstrap scores out of 1 000 trials, indicating the credibility of each branch.

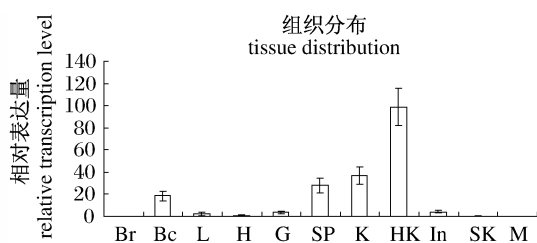


图4 大鳍鱠 IgM 基因在各组织中的转录表达比较  
比较的组织分别是脑 (Br)、血细胞 (Bc)、肝脏 (L)、心脏 (H)、鳃 (G)、脾脏 (SP)、肾 (K)、头肾 (HK)、肠 (In)、皮肤 (SK) 和肌肉 (M)。

Fig. 4 The mRNA expression of sIgM gene in different tissues

The compared tissues are as follows: brain (Br), blood cells (Bc), liver (L), heart (H), gill (G), spleen (SP), kidney (K), head kidney (Hk), intestine (In), skin (SK) and muscle (M).

#### 2.4 注射嗜水气单胞菌后 IgM 的表达变化 用实时荧光定量 PCR 研究大鳍鱠注射嗜水

气单胞菌后 IgM 的表达变化。结果表明,血细胞、脾脏和头肾 IgM 表达量都随时间发生变化(图 5)。血细胞 IgM 表达量在注射处理后 1 ~ 10 d 上升较快,增长了 7.5 倍;10 ~ 30 d 有缓慢上升。第 30 天的表达量与第 10 天比较,上升不到 1.4 倍。脾脏 IgM 表达量 1 ~ 15 d 内呈线性上升,上升明显,增加了 16.2 倍;第 20 天时达到最高峰。15 ~ 30 d 内表达量有下降的趋势,但不明显,所以仍然维持在一个较高的水平。在检测的 7 个时间点中,第 15 天是 IgM 表达量从上升期到平台期的拐点。头肾 IgM 表达量 1 ~ 15 d 增长迅速,增加了 24.5 倍。15 ~ 30 d 增长缓慢,表达量仅仅增加了 1.2 倍。到第 30 天为止,检测的血细胞、脾脏和头肾 3 个组织 IgM 表达量上调程度均在 10 倍以上,血细胞 IgM 表达量增加较低,为 10.6 倍,头肾增加最高,增加了 27.0 倍。

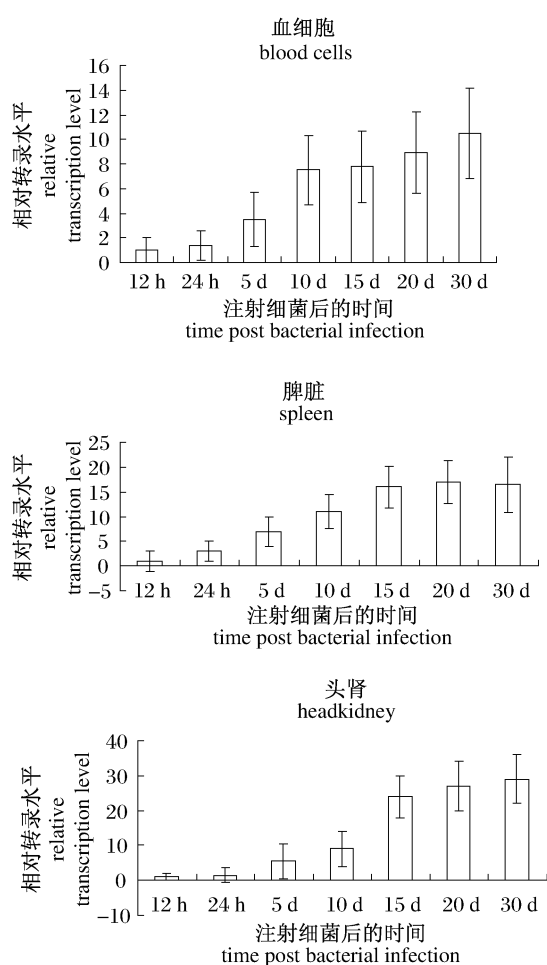


图5 注射细菌后大鳍鲮血细胞、脾脏和头肾 IgM 平均转录表达量变化 ( $n = 5$ )

Fig. 5 Mean fold changes of IgM mRNA expression in blood cells, spleen and head kidney of the *M. macropterus* at different time points after injection of *A. hydrophila* values are expressed as means standard error (SE) ( $n = 5$ )

### 3 讨论

本研究克隆的大鳍鲮 IgM 重链基因 cDNA 开放阅读框为 1 713 bp, 推测的蛋白质 570 个氨基酸, 有 4 个恒定区, 根据文献[21]规定, 该蛋白质属于分泌型 IgM (sIgM)。sIgM 和 mIgM (膜型 IgM) 重链有着共同的基因结构, 其 H 链分为 C 端的 4 个恒定区和 N 端的一个可变区。由于不同的剪接方式, 两种分子在 mRNA 和蛋白质结构上发生了变化。sIgM 保留了 4 个完整的恒定区 (CH), 而绝大多数是 mIgM 没有 CH4 区域, 短而疏水的跨膜区 (TM) 和胞内区直接连接到 CH3 区域

上<sup>[22]</sup>。最近在斑马鱼发现了一种新型 mIgM 分子<sup>[23]</sup>, 被命名为 mIgM-2。该分子重链缺失了 CH2、CH3 和 CH4, 恒定区只保留了 CH1。跨膜区直接连接到了 CH1 区域。IgM 的 sIgM 和 mIgM 以及 mIgM-2 的发现, 说明 IgM 的表现形式是多样的。

比较大鳍鲮、斑点叉尾鲮、草鱼、虹鳟、大西洋鲑、鳊和石斑鱼 IgM 重链氨基酸序列, 它们都在 FR2 含有 GKGLEW 和在 FR3 含有 YYCAR 保守序列; GKGLEW 是一段疏水区域, 是免疫球蛋白二级结构折叠不可缺少的<sup>[24]</sup>。在 FR4, 含有一段较长的相对保守序列 FDY-WGKGT-VTV-S。这些可变区保守序列是抗原结合表位实现功能的重要结构<sup>[25]</sup>。尽管哺乳类 IgG 和 IgA 铰链区存在于 CH1 和 CH2 结构域的连接处, 鱼类和其他脊椎动物 IgM 铰链区存在于 CH2 和 CH3 结构域之间。含脯氨酸 (P) 是 IgM 铰链区的特点。铰链区含脯氨酸及其一定长度使得抗原结合片段灵活地适应不同表位方向<sup>[26]</sup>。铰链区含脯氨酸的现象, 在大鳍鲮等 7 种硬骨鱼类中都存在 (图 2)。在比较的 7 种硬骨鱼类中, 鲇形目的大鳍鲮和斑点叉尾鲮铰链区最短, 发现它们除了有脯氨酸外, 还有谷氨酰胺残基 (Q)。可能谷氨酰胺残基的存在弥补了铰链区长度的不足以适应结合抗原的不同方向表位。

本研究使用了实时定量 PCR 技术对注射嗜水气单胞菌后的大鳍鲮血细胞、脾脏和头肾 IgM 转录表达进行了分析。结果显示, 3 种组织 IgM 转录表达量在 1 ~ 10 d 之内都有显著增加; 15 d 后表达量变化趋于缓和 (图 5)。这个结果与 ZILBERG 等<sup>[27]</sup>对斑点叉尾鲮注射爱德华氏菌 (*Edwardsiella ictaluri*) 的 IgM 表达研究大体一致。在 ZILBERG 的研究中, 对斑点叉尾鲮注射细菌后血细胞、脾脏和头肾 IgM 表达量在 1 ~ 13 d 有显著增加。而 RAIDIA 等<sup>[28]</sup>对虹鳟注射鲁氏耶尔森氏菌 (*Yersinia ruckeri*) 的研究显示, IgM 表达量在 21 d 内都有增加。这些结果都显示抗原刺激后在 3 周内, 鱼类脾脏和头肾 IgM 表达量达到一个重要水平。这表明鱼类 IgM 分子在 3 周内可以识别细菌抗原<sup>[29]</sup>。CUI 等<sup>[30]</sup>用溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 注射石斑鱼研究了其 IgM 在血细胞中的表达变化, 结果发现血细胞 IgM 表达量在 5 周内均有显著上升。这与本研究中血细

胞 IgM 表达量变化有一定差异。本研究中 IgM 表达量上升在 15 d 后趋缓。这可能表明影响血液 IgM 表达量变化因素较多,不同物种之间差异存在明显不同。

#### 参考文献:

- [1] 金伯泉,于永利,司传平,等. 医学免疫学[M]. 北京:人民卫生出版社,2008:34-46.
- [2] LOBB C J, OLSON M O. Immunoglobulin heavy H chain isotypes in a teleost fish [J]. Immunology, 1988,141(4):1236-1245.
- [3] WARR G W. The immunoglobulin genes of fish [J]. Developmental & Comparative Immunology, 1995,19:1-12.
- [4] WILSON M, BENGTEÉN E, MILLER N W, et al. A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997,94:4593-4597.
- [5] HORDVIK I, THEVARAJAN J, SAMDAL I, et al. Molecular cloning and phylogenetic analysis of the Atlantic salmon immunoglobulin D gene [J]. Scandinavian Journal of Immunology, 1999, 50: 202-210.
- [6] HIRONO I, NAM B H, ENOMOTO J, et al. Cloning and characterization of a cDNA encoding Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* IgD [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2003,15:63-70.
- [7] 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, 2005,6:295-302.
- [8] 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, 2005,102:6919-692.
- [9] 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, 2005,57:458-463.
- [10] WILSON M R, WART G W. Fish immunoglobulins and the genes that encode them[J]. Annual Review of Fish Diseases, 1992,2:201-221.
- [11] WILSON M R, MARCUZ A, VAN GINKEL, et al. The immunoglobulin M heavy chain constant region gene of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*: an unusual mRNA splice pattern produces the membrane form of the molecule [J]. Nucleic Acids Research, 1990,18(17):5227-5233.
- [12] HORDVIK I, LINDTROM C D V, VOIE A M, et al. Structure and organization of the immunoglobulin M heavy chain genes in atlantic salmon, *Salmo salar* [J]. Molecular Immunology, 1997,34:631-639.
- [13] 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]. Molecular Immunology, 1994,31:499-501.
- [14] NAKAO M, MORITOMO T, TOMANA M, et al. Isolation of cDNA encoding the constant region of the immunoglobulin heavy chain from common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1998,8:425-434.
- [15] 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 Immunology, 2003,14:477-480.
- [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]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2006,109:255-265.
- [17] 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):13-19.
- [18] FENG J J, GUAN R Z, LIN P, et al. Molecular cloning and characterization analysis of immunoglobulin M heavy chain gene in European eel (*Anguilla anguilla*) [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2009,127:144-147.
- [19] 冯汉如. 南方鲇 IgM 重链基因 cDNA 克隆及该基因在小瓜虫感染下的表达特征分析 [D]. 重庆:西南大学, 2010.
- [20] 邓国成,江小燕,叶星,等. 草鱼出血病混合感染的嗜水气单胞菌的分离、鉴定与理化特性 [J]. 微生物学通报, 2009,36(8):1170-1177.
- [21] KABAT E A, WU T T, PERRY H M, et al. Sequences of proteins of immunological interest [M]. 5th ed. Bethesda: U. S. Department of Health and Human Service, 1991:1250-1441.
- [22] LEE M, BENGTEÉN E, DAGGFELDT A.



- Characterization of rainbow trout cDNAs encoding a secreted and membrane-bound Ig heavy chain and the genomic intron upstream of the first constant exon [J]. *Molecular Immunology*, 1993, 30:641–648.
- [23] HU Y L, ZHU L Y, LI X X, *et al.* Discovery of an unusual alternative splicing pathway of the immunoglobulin heavy chain in a teleost fish, *Danio rerio* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2010, publish on line first.
- [24] COSCIAI M R, MOREA V, TRAMONTANO A, *et al.* Analysis of a cDNA sequence encoding the immunoglobulin heavy chain of the Antarctic teleost *Trematomus bernacchii* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2000, 10:343–357.
- [25] FRAZER J K, CAPRA J D. Immunoglobulin [M] // Paul W E. (Eds.), *Fundamental Immunology*. Philadelphia: Lippencott-Raven, 1999:37–74.
- [26] SAHA N R, SUETAKE H, SUZUKI Y. Analysis and characterization of the expression of the secretory and membrane forms of IgM heavy chains in the pufferfish, *Takifugu rubripes* [J]. *Molecular Immunology*, 2005, 42(1):113–124.
- [27] ZILBERG D, KLESIOUS P H. Quantification of immunoglobulin in the serum and mucus of channel catfish at different ages and following infection with *Edwardsiella ictaluri* [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1997, 58:171–180.
- [28] RAIDA M K, BUCHMANN K. Temperature-dependent expression of immune-relevant genes in rainbow trout following *Yersinia ruckeri* vaccination [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2007, 77:41–52.
- [29] TIAN J Y, SUN B J, LUO Y P, *et al.* Distribution of IgM, IgD and IgZ in mandarin fish, *Siniperca chuatsi* lymphoid tissues and their transcriptional changes after *Flavobacterium columnare* stimulation [J]. *Aquaculture*, 2009, 288:14–21.
- [30] CUI M, ZHANG Q Z, YAO Z J, *et al.* Immunoglobulin M gene expression analysis of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, following heat shock and *Vibrio alginolyticus* challenge [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29:1060–1065.

## Molecular cloning and expression analysis of the IgM heavy chain gene in largefin longbarbel catfish (*Mystus macropterus*)

LI Chun-tao<sup>1</sup>, ZHANG Qi-zhong<sup>2\*</sup>, YANG Ying-ying<sup>1</sup>, ZHU Cheng-ke<sup>1</sup>, LI Chao<sup>1</sup>, CHEN Xia<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Aquatic Science of Chongqing, Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir

Region (Ministry of Education), Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development

(Ministry of Education), School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Hydrobiology Institute of Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** Full cDNA sequence of a secretory IgM (sIgM) gene in largefin longbarbel catfish (*Mystus macropterus* Bleeker) was cloned using RACE-PCR and RT-PCR methods. It has 1 992 nucleotides, including 5' UTR of 53 nucleotides, 3' UTR of 226 nucleotides and an open reading frame with 1 713 nucleotides encoding a 570 amino acid peptide. The deduced amino acid sequence in *M. macropterus* contains 4 constant regions (CH) and a variable domain (VH) which consists of 4 frame regions (FRs) and 3 complementary determining regions (CDRs). The IgM comparison in seven teleost species showed that IgM in *M. macropterus* shared the highest identity (54.3%) with that in *Ictalurus punctatus*, and the lowest identity (24.6%) with that in *Epinephelus coioides*, and that the conserved cysteines and tryptophans existed in all fishes involved. Phylogenetic tree based on some teleost Ig heavy chain amino acids suggested IgM in *M. macropterus* was clustered closely with that of *I. punctatus*. Fluorescent real-time PCR showed that IgM mRNA expression of *M. macropterus* was mainly detected in blood cells, spleen, kidney and head kidney, and increased significantly in blood cells, spleen, head kidney between day 1 and day 10 after injection of *Aeromonas hydrophila*.

**Key words:** *Mystus macropterus*; cDNA of immunoglobulin M heavy-chain gene; clone; real-time PCR; tissue distribution

**Corresponding author:** ZHANG Qi-zhong. E-mail: zhangqzdr@126.com