

文章编号:1000-0615(2009)06-0996-07

哲罗鱼免疫球蛋白轻链可变区序列及其多样性

魏巍^{1,2}, 刘红柏¹, 王荻¹, 卢彤岩¹, 尹家胜¹

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070;

2. 东北农业大学动物科技学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:采用 RT-PCR 技术从哲罗鱼主要免疫器官——脾脏总 RNA 中获得免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig) 轻链可变区 cDNA 克隆, 随机挑取 51 个阳性克隆菌落进行测序, 得到 46 条完整的不重复序列, 用以确定哲罗鱼 IgL 的家族种类, 为哲罗鱼病毒性疾病的疫苗研制提供理论依据。经过 BLUST 网络对比, 结果显示: 其与 GenBank 报导的虹鳟 (序列号为 X68517.1 和 X68519.1) 序列的相似性均达 90% 以上, 46 条序列的核苷酸相同率分别为最低 86.1% (P4 与 P43) 至最高的 99.8% (P21 与 P38) 之间不等; 经 DNAstar 5.0 软件包 MegAlign 中 Jotun Hein 方法对所得序列进行氨基酸同源性比较, 得到两个不同的家族; 通过可变性参数计算方法可知哲罗鱼 IgL 的可变性主要集中在 CDRs 区, 可变性最高的区域为 CDR3 区; 对可变区中 CDR3 序列进行分析后, 得出哲罗鱼 Ig 轻链可变区的重排方式是 J_{κ} 基因片段位于 V_{κ} 基因片段的 3' 端的结论, 这种重排方式增加了核苷酸不同的连接方式, 使哲罗鱼抗体具有更多的可变性空间; 对照其亲水性分布图可知: 可变区的亲水性氨基酸主要分布于 LP 前端, FR1 末端, 完整的 FR2, FR3 两端, 以及 CDR1, CDR2 和 CDR3 前端。

关键词:哲罗鱼; 免疫球蛋白; 轻链; 可变区

中图分类号:Q 343; S 917

文献标识码:A

鱼类的免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig) 一直是鱼类免疫学和鱼类分子免疫学研究的热点和难点^[1]。鱼类免疫球蛋白基因的研究, 对于人们认识鱼类免疫球蛋白的个体发生, 特别是利用特异性体液免疫进行免疫防御具有重要意义^[2-3], 如某些疫苗的成功应用正是基于鱼类具有抗体反应这一点^[4-5]。

对于鱼类免疫球蛋白重链基因的研究较多也较系统, 相对来说对于轻链基因的研究则较少, 但轻链研究的重要性不容忽视, 比如临幊上通过检测重链/轻链比值和 κ/λ 轻链比值来进行某些疾病的诊断^[6]。Shambrott 等^[3] 确定免疫球蛋白轻链除可变区外只有一个恒定区, 其基因结构也比重链简单。板鳃亚纲鱼类和真骨鱼类的轻链基因座都是以 (VL-JL-CL) 多簇的形式组织的, 与哺乳动物的易位子排列不同, 但其基因簇的数目比重

链的少^[3]。Ghaffari 等^[7] 利用 PCR 方法得到鮰鱼 IgM 分子的轻链全长 cDNA, 指出硬骨鱼类的轻链基因有两种类型。

Widholm 等^[2] 对来源于 4 个代表动物 (狼鰨、大西洋鲑、非洲爪蟾、小鼠) 的免疫球蛋白轻链可变区进行比较时, 发现其轻链可变区某些特异性, 包括 CDR 区的变异性和长度与进化地位之间有某种相关性。Bentén 等^[8] 的研究表明, 斑点叉尾鮰免疫球蛋白轻链具有两种类型, F 型和 G 型, 都是由 VL-JL-CL 多簇编码的; 而 Ishikawa 等^[9] 对鲤研究时发现它的免疫球蛋白有三种轻链的同种型, 相似性很高, 可变区基因序列分为两个家族。河豚的轻链基因也分属于两个家族, 但是它只有一种轻链类型。Saha 等^[10] 对鱼类轻链基因的研究也可以揭示物种的演化, Lundqvist 等^[11] 在对西伯利亚鲟轻链的分析中就发现, 其轻

链的恒定区序列与软骨鱼类相似而可变区更倾向于真骨鱼类的基因结构。

哲罗鱼(*Hucho taimen* Pallas)属鲑形目、鲑科、鲑亚科、哲罗鱼属,曾用名哲罗鲑,太门哲罗鱼,是我国高寒地区山溪河流的特产鱼类之一,肉质鲜美,属名贵珍稀鱼类。对于鲑科鱼类,病毒性疾病是一种严重的养殖危害,目前世界上有效的预防手段就是采用疫苗,我国哲罗鱼的人工养殖刚刚起步,相关的免疫学研究尚属空白,抗体的研究可以为这一预防手段的采用提供依据。本文对哲罗鱼免疫球蛋白的轻链序列进行了报道,有助于我们对鱼类免疫球蛋白基因更深入广泛的了解,可以为哲罗鱼等鲑科鱼类人工养殖的疾病预防和基因免疫提供基础数据,有利于这一产业的健康发展。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用哲罗鱼采自中国水产科学研究院黑龙江水产研究所渤海冷水性鱼类实验站,为人工孵化驯养的第一代。选择体质健康、非免疫状态下的1⁺龄哲罗鱼为实验对象。

特异性引物和 oligo dT₍₁₈₎引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。Trizol(Germany Invitrogen Life Technologies)试剂盒购自伊事达生物技术公司;rTaq DNA聚合酶,dNTP,pMD18-T载体,购自日本TaKaRa生物试剂公司;M-MuLV(莫洛尼氏鼠白血病毒)反转录酶,切胶回收试剂盒(MagExtractorR-PCR & Gel Clean up-ToYoBo)及限制性内切酶EcoR I和Hind III均购自日本东洋纺ToYoBo生物试剂公司。

1.2 试验方法

采用Trizol试剂盒提取哲罗鱼脾脏组织总RNA。取总RNA悬液5 μL加入(20 pmol/L)oligo dT₍₁₈₎引物1 μL吹打混匀后,70 ℃水浴5 min,立即冰浴5 min,用以消除RNA的发夹结构并使单链RNA与oligo dT₍₁₈₎引物充分复性结合。然后加入5×Buffer 5 μL,2 mmol/L dNTP 2.5 μL,M-MuLV反转录酶1 U,抑制剂5 U,用水补足至20 μL。42 ℃反转录1 h,得到反转录合成的单链cDNA。根据GenBank已报到的虹鳟(序列号为X68517.1)免疫球蛋白轻链序列,应用引物

设计软件Oligo 6.0设计一对特异性引物,序列为:

F:13 bp处5'-CTACATACAAGAATCCAGA
G-3'

R:870 bp处5'-AAAGCAACATTCTACA
-3'

PCR反应体系为:RT产物2 μL,10×Buffer 2.5 μL,2 mmol/L dNTP 2 μL,上下游引物(20 pmol/L)各1 μL,rTaq聚合酶5 U,加水补足至25 μL。PCR反应条件为:预变性95 ℃5 min;95 ℃1 min;54 ℃1 min;72 ℃1 min共30个循环;最后延伸72 ℃10 min。取PCR扩增产物于1.2%琼脂糖凝胶电泳,切取1 000 bp左右处目的片段,回收纯化目的DNA,溶于50 μL 0.1×TE缓冲液中。经紫外分光光度计测定DNA溶液在A₂₆₀的吸光度后,确定DNA溶液浓度。取纯化DNA产物4.5 μL与pMD18-T载体16 ℃循环水浴连接3 h。将连接产物转化到用CaCl₂法制备的大肠杆菌*E. coli* DH5α感受态细胞中,摇菌涂板后挑取质粒,经PCR阳性克隆快速鉴定和EcoR I和Hind III双酶切鉴定后,随机挑取51个重组阳性克隆进行序列测定。

1.3 序列分析

采用DNAMAN序列比对分析软件对所得的哲罗鱼46条免疫球蛋白轻链(IgL)可变区序列进行了分析,通过BLAST-N程序在GenBank数据库中进行相似性检索,经DNAstar 5.0软件包MegAlign中的Jotun Hein方法对序列进行比较。

2 结果

2.1 Ig轻链可变区cDNA序列分析

采用特异性引物R和F进行PCR扩增,1%琼脂糖凝胶电泳检测到预期大小(1 000 bp)的目的条带,切胶回收后,将纯化产物连接到pMD18-T载体上进行转化,并进行阳性克隆检测,同时划板存菌,挑取阳性重组菌株测序。除去测序不完全的5个序列,共得到目的序列46条,分别编号为P1~P46。

试验获得的哲罗鱼46条Ig轻链核苷酸序列均包括前导肽(leader peptide,LP)、可变区片段(variable region,VL)、连接片段(joining region,JL)、骨架区(framework region,FR)和恒定区(constant region,CL)5个完整的功能区片段。经

与 GenBank 已报导的虹鳟免疫球蛋白轻链 (GenBank 编号为 X68517.1) 进行 BLAST-N 比较,与其具有相同的结构域组成。网络对比结果显示,所得序列均与虹鳟免疫球蛋白轻链 (GenBank 编号为 X68517.1) 序列有极高的相似性,可达 90% 以上。将哲罗鱼克隆体 P1~P46 的轻链可变区 (VL) 以及 cDNA 全序列进行比较,核苷酸的相同率分别为最低 86.1% (P4 与 P43) 至最高的 99.8% (P21 与 P38) 不等。

2.2 哲罗鱼 IgL 可变区氨基酸序列分析

除去 LP 以及由 JL 片段编码的 FR4 区的可变性氨基酸序列,经 DNAstar 5.0 软件包 MegAlign 中的 Jotun Hein 方法对序列进行比较,哲罗鱼 IgL 可变区氨基酸聚类结果见图 1。

按照 Kabat 等制定的可变性参数计算方法:可变性 = 位点上不同氨基酸的种类/该位点最常见氨基酸出现的频率,即可变性为某一位点的不同氨基酸的数目除以该位点最常见氨基酸的出现频率所得的商^[12]。哲罗鱼 IgL 可变区氨基酸可变性比较见图 2。经 DNAstar 5.0 软件包中 Proteam 分析哲罗鱼 IgL 可变区理化性质见图 3 (图中 a 为亲水性,亲水性强的氨基酸在水平线以上;b 为抗原性指数,抗原性强的氨基酸与亲水性强的氨基酸有相同的走向,在水平线以上;c 为表面可能性指数,氨基酸走向与 a 和 b 相似,可能性越大的氨基酸值越大)。

3 讨论

免疫球蛋白超家族 (immunoglobulin superfamily, IgSF) 是指细胞膜分子和某些游离蛋白分子其多肽链折叠方式与免疫球蛋白相似,其结构域同 Ig 的可变区 (V 区) 或恒定区 (C 区) 有一定的同源性^[13]。同源性要求在 DNA 水平上有 80% 是相同的;在蛋白质水平上,同一家族的基因翻译产物中有 75% 相同,不同基因家族少于 70%。在图 1 中其上面部分的氨基酸序列相似率在 77.4% (P36 与 P41) ~ 99.7% (P1 与 P31, P4 与 P31, P9 与 P21, P21 与 P31) 之间,下面部分氨基酸序列相似率在 94.3% (P13 与 P25) ~ 99.7% (P14 与 P26, P10 与 P14 等)。在两个单元的分界序列 P15 与 P32 氨基酸相似率为 40.9%。因此,本实验所得数据来源于两个不同的家族。

轻链 CDR1 和 CDR2 由相应的 V_κ 或 V_λ 基

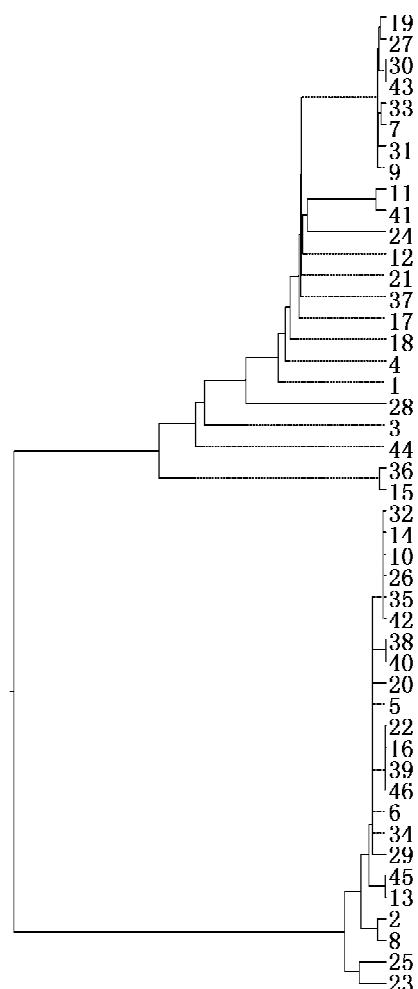


图 1 哲罗鱼 VL 区氨基酸序列对比聚类结果

Fig. 1 The *Hucho taimen*
VL region aa sequences

因片段编码,轻链 V 区中 CDR3 是由 V_κ-J_κ 或 V_λ-J_λ 两种基因片段组合的产物。CDR3 可能有 N 区的插入,其变化明显多于 CDR1 和 CDR2,加之 CDR3 编码区域体细胞高变率也明显高于 CDR1 和 CDR2,因此,在大多数情况下,重链和轻链 CDR3 在 Ig 结合抗原的特异性中起着主要的作用。由图 2 可以看出,哲罗鱼免疫球蛋白轻链可变区的互补决定簇 (CDRs) CDR1 (3.29 ~ 16.1)、CDR2 (5.52 ~ 16.1) 和 CDR3 (6.57 ~ 25.88) 均具有较大的可变性;骨架区 FR1 (6 ~ 13.4)、FR2 (10.45 ~ 19.17)、FR3 (4.68 ~ 16.1) 和 FR4 (10.45 ~ 18.4) 变化相对较少,比较稳定。

在哺乳动物和冷血动物个体发育早期,它们都均有较短的 CDR3 区域^[14~18]。而 CDR3 的长度将会影响可变区的多样性。哲罗鱼轻链可变区

的前导肽由 9 个氨基酸编码;FR1 区由 14 个氨基酸编码;CDR1 区由 13 个氨基酸编码;FR2 区由 12 个氨基酸编码,CDR2 区由 12 个氨基酸编码,FR3 区较长,由 27 个氨基酸编码,CDR3 区由 12 个氨基酸编码,FR4 由 7 个氨基酸编码。因此,它的 CDR3 长度限制了自身抗体的多样性,使得自身免疫反应比其他哺乳动物和高等脊椎动物差。

研究表明,Ig 胚系基因中轻链 V 和 J 基因片段是通过基因片段的重排(rearrangement)而形成 V 基因的。轻链基因的 V、J 片段可实现直接的连接,这也表明,J 基因片段可以分布在 V 基因片段的两端,即 J_k 基因片段位于 V_k 基因的 3' 端,和

位于 V_k 基因的 5' 端,与 C_k 成对排列。因此,对其他的个体或在其他条件下养殖的个体进行分析可能会得到不同的结果。在与抗原结合的过程中,CDRs 氨基酸的数量和位置起了很大的作用。在哲罗鱼中,CDR1 由 13 个氨基酸组成,CDR2 由 12 个氨基酸组成。之前的研究已经证实,由部分 V 片段和 J 片段或由 J 片段和 C 片段编码的 CDR3 区存在突变的热点(hotspot),在结合抗原的过程中起到至关重要的作用^[19]。哲罗鱼免疫球蛋白 CDR3 由 4~12 个氨基酸构成,当与其他物种相比时,我们发现哲罗鱼的 CDR3 的长度变化比哺乳动物窄的多(图 4)。

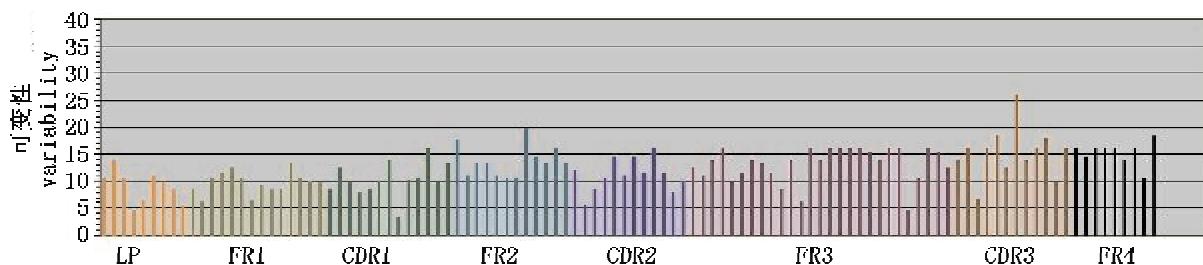


图 2 哲罗鱼 IgL 可变区氨基酸可变性比较柱形图
Fig. 2 Column diagram of Ig LV aa variability of *Hucho taimen*

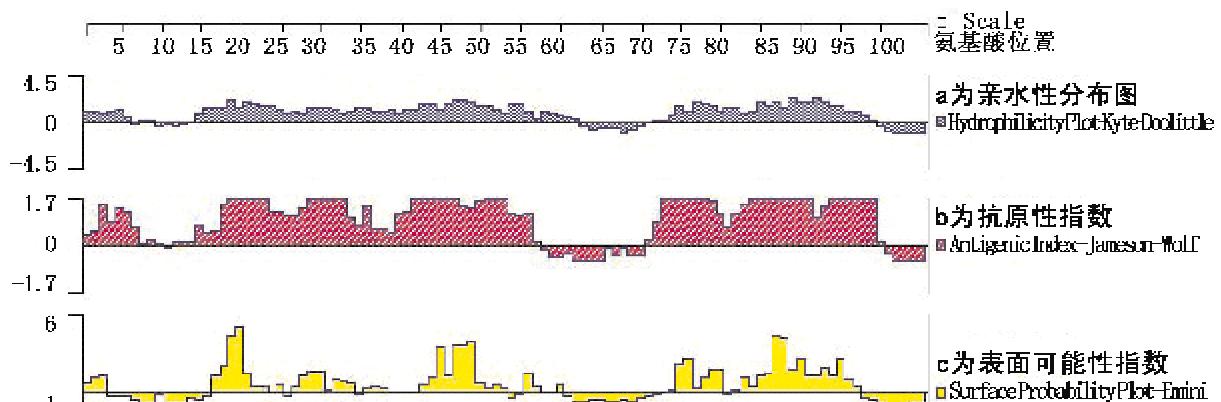


图 3 哲罗鱼 IgL 可变区理化性质分布图
Fig. 3 Chart of physical and chemical data of Ig LV of *Hucho taimen*

由哲罗鱼 IgL 可变区的理化性质分布图 3 可见,可变区由 105 个氨基酸构成,分子量为 11 054.92 u,等电点 Pi 为 12.44,为碱性蛋白质。可变区的亲水性氨基酸主要分布于 LP 前端,FR1 末端,完整的 FR2,FR3 两端,以及 CDR1,CDR2 和 CDR3 前端。同时对照抗原性指数图和表面可能性指数图,可以看出亲水性越强的区域,越易于暴露在分子表面,越容易形成抗原决定簇,越易于

与抗原结合。Stenvik 等^[20]的研究指出:CDR3 的结构受其长度的影响,即较短的 CDR3 区域容易形成凹形,较长的 CDR3 区域会突出到分子外面。由此,哲罗鱼 Ig 可变区可能拥有凹形或较平的表面。Schroeder 等^[21]认为,平的抗原结合表面能为抗原抗体结合提供大量的相互接触的最佳空间位点,还会具有多聚特异性。由此,可以认为,哲罗鱼与大西洋鳕(*Gadus morhua* L.)^[20]一样,其

CDR3 有限的氨基酸长度分布是适应结合特殊抗原(如菌多糖)类型的一种方式,同时会产生部分

的粘性回复。

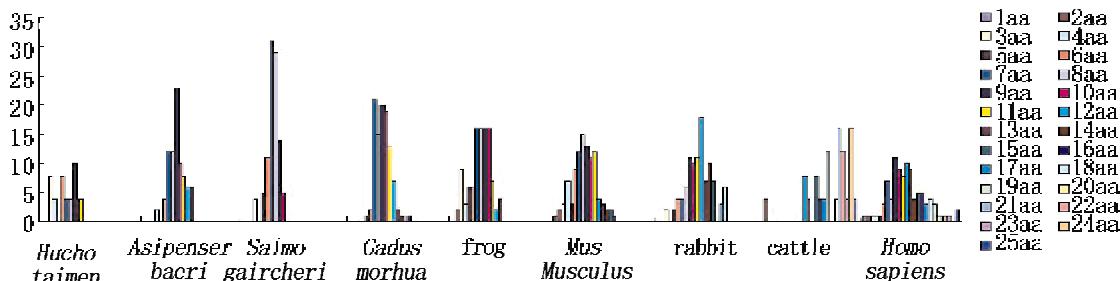


图 4 9 种动物 CDR3 长度分布图

西伯利亚鲟来自于 Lundqvist 等^[20],哲罗鱼来自于本文,其他数据来自于 Jorgen 等^[21]。

Fig.4 Profile of CDR3 length of nine animal species

The Siberian sturgeon figures from Lundqvist co-worker(1998)^[20], the *Hucho taimen* from articles, the trout, frog, mouse, cod, rabbit, human and cattle from Jorgen and co-workers(2000)^[21]

Homo sapiens: 灵长类动物; cattle: 牛; rabbit: 兔子; *Mus musculus*: 小鼠; frog: 蛙; *Gadus morhua*: 黑线鳕; *Salmo gaircheri*: 鲑科; *Asipenser baeri*: 西伯利亚鲟; *Hucho taimen*: 哲罗鱼

据此我们得出结论: 哲罗鱼免疫球蛋白轻链可变区是采用 J_{κ} 基因片段位于 V_{κ} 基因片段的 3'端的重排方式, 这样增加了核苷酸不同的连接方式, 使哲罗鱼抗体具有更多的可变性空间。

参考文献:

- [1] Scapigliati G, Romano N, Abelli L. Monoclonal antibodies in fish immunology: identification, ontogeny and activity of T-and B-lymphocytes [J]. Aquaculture, 1999, 172(3): 28.
- [2] Wildholm H, Lundback A-S, Daggfeldt A, et al. Light chain variable region diversity in Atlantic cod (*Gadus morhua*) [J]. Dev Comp Immunol, 1999, 23: 231–240.
- [3] Shamblott M J, Litman G W. Genomic organization and sequences of immunoglobulin lightchain genes in a primitive vertebrate suggest coevolution of immunoglobulin gene organization [J]. EMBO J, 1989, 8: 3733–3739.
- [4] 安利国, 傅荣恕, 邢维贤, 等. 鲤竖鳞病病原及其疫苗的研究 [J]. 水产学报, 1998, 22(2): 136–142.
- [5] 余俊红, 沈继红, 王祥红, 等. 鳗弧菌口服微囊疫苗的制备及其对鲈鱼的免疫效果 [J]. 中国水产科学, 2001, (2): 76–79.
- [6] 王兰兰, 李立新, 冯伟华, 等. 轻链比值和免疫球蛋白含量测定在诊断轻链病中的重要意义 [J]. 免疫学杂志, 1999, 15(1): 46–48.
- [7] Ghaffari S H, Lobb C J. Structure and genomic organization of a second class of immunoglobulin light chain genes in the channel catfish [J]. J Immunol, 1997, 159: 250–258.
- [8] Bengtén E, Clem L W, Miller N W, et al. Channel catfish immunoglobulins: repertoire and expression [J]. Dev Comp Immunol, 2006, 30(1–2): 77–92.
- [9] Ishikawa J, Imai E, Moritomo T, et al. Characterisation of a fourth immunoglobulin light chain isotype in the common carp [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2004, 16(3): 369–79.
- [10] Saha N R, Suetake H, Suzuki Y. Characterization and expression of the immunoglobulin light chain in the fugu: evidence of a solitaire type [J]. Immunogenetics, 2004, 56(1): 47–55.
- [11] Lundqvist M, Bengtén E, Strömberg S, et al. Ig light chain gene in the Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) [J]. J Immunol, 1996, 157(5): 2031–8.
- [12] Wu T T, Kabat E A. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity [J]. J Exp Med, 1970, 132: 211–250.
- [13] 刘飞, 金伯泉. 细胞和分子免疫学 [M]. 北京: 科学出版社, 2006: 5–7.
- [14] Desravines A, Hsu E. Measuring CDR3 length variability in individuals during ontogeny [J]. J

- Immunol Methods, 1994, 168: 219–225.
- [15] Golub R, Fellah J S, Charlemagne J. Structure and diversity of the heavy chain VDJ junctions in the developing *Mexican axolotl* [J]. Immunogenetics, 1997, 46(5): 402–409.
- [16] Lee A, Desravines S, Hsu E. IgH diversity in an individual with only one million B lymphocytes [J]. Dev Immunol, 1993, 3(3): 211–222.
- [17] Raaphorst F M, Timmers E, Kenter M J, et al. Restricted utilization of germ-line VH3 genes and short diverse third complementarity-determining regions (CDR3) in human fetal B lymphocyte immunoglobulin heavy chain rearrangements [J]. Eur J Immunol, 1992, 22(1): 247–251.
- [18] Schroeder H W, Mortari F, Shiokawa S, et al. Developmental regulation of the human antibody repertoire[J]. Ann NY Acad Sci, 1995, 764: 242–260.
- [19] Lundqvist M L, Stromberg S, Pilstrom L. Ig heavy chain of the sturgeon *Acipenser baeri*: cDNA sequence and diversity[J]. Immunogenetics, 1998, 48(6): 372–382.
- [20] Stenvik J, Lundback A S, Trond Q, et al. Variable region diversity of the Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) immunoglobulin heavy chain [J]. Immunogenetics, 2000, 52: 670–680.
- [21] Schroeder H W, Mortari F, Shiokawa S, et al. Developmental regulation of the human antibody repertoire[J]. Ann NY Acad Sci, 1995, 764: 242–260.

Ig VL cDNA sequence and diversity analysis of *Hucho taimen* (Pallas)

WEI Wei^{1,2}, LIU Hong-bai¹, WANG Di¹, LU Tong-yan¹, YIN Jia-sheng¹

(Heilongjiang River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;

2. College of Animal Science and Technology, Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China)

Abstract: To provide data for immunoglobulin (Ig) phyletic evolution, isotypes classification and vaccine used in *Hucho taimen* (Pallas) cultivation, cDNA sequence, gene diversity and physico-chemical property on Ig VL (variable region of light chain) of *Hucho taimen* were studied. The cDNA clones of the immunoglobulin light chain variable regions were first time obtained by RT-PCR with a pair of specific primers after total RNA was extracted from the spleen of *Hucho taimen* (Pallas). 51 positive clones were isolated and double-strand sequenced over the variable regions. 46 complete sequences were obtained without duplicating to determine variety of Ig VL genes families. After comparing with other vertebrate Ig sequences in BLUST, the results show that the 46 sequences obtained are similar to the sequences of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, no. X68517. 1 and no. X68519. 1, reported in GenBank, with the similarity rate from the lowest 86. 1% (that of P4 and P43) to the highest 99. 8% (that of P21 and P38). Jotun Hein method from MegAlign of DNASTAR soft package was used to analyze amino acid homology of Ig VL and the VL genes were classified into two families. After computing method of variability parameters, it was found that CDRs (complementary determining regions) are the main variable regions, and hyper variability was showed in CDR3. By analysis of CDR3 sequences, a conclusion was drawn that character of rearrangement style of Ig VL of *Hucho taimen* is that J_{κ} genes are located at 3' side, and V_{κ} genes are followed. The rearranging way makes nucleotides link styles variable, and thus causes more diversity of the Ig. The hydropathic analysis showed that hydrophilic amino acids of VL are mainly distributed at forepart of LP, terminal of FR1, the whole FR2, amphi-sides of FR3 and foreparts of CDR1, CDR2 and CDR3.

Key words: *Hucho taimen* (Pallas); immunoglobulin; light chain; variable region