

剑尾鱼 *IgZ* 基因的克隆及疫苗免疫对其在组织中表达的影响

王片片^{1,2}, 刘 春², 李凯彬², 石存斌², 吴淑勤^{2*}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业部渔用药物创制重点实验室,
广东省水产动物免疫技术重点实验室, 广东 广州 510380)

摘要: 为研究剑尾鱼 *IgZ* 基因序列及其在疫苗免疫后的表达规律, 本实验根据已知的 EST 库设计引物, 利用 RT-PCR 等方法, 获得剑尾鱼 *IgZ* 基因 cDNA 全长序列, 并进行生物信息学分析和疫苗免疫后组织表达分析。结果显示, 剑尾鱼 *IgZ* 基因全长序列为 5 420 bp, 包含 4 个外显子和 3 个内含子; cDNA 序列全长 1 527 bp, 包含一个 1 299 bp 的完整 ORF 框, 该基因编码 432 个氨基酸, 预测其编码蛋白的分子量大小为 47.48 ku, 并具有 *IgZ* 的基本结构, 与其他硬骨鱼类 *IgZ* 氨基酸序列一致性为 28%~54%。荧光定量 PCR 分析结果显示, *IgZ* 基因主要在剑尾鱼的头肾、脾脏和肠中分布, 且疫苗免疫后 11 天内, *IgZ* 基因在头肾、脾脏和肠组织中均表现为先上升后下降的趋势。头肾中 *IgZ* 基因的表达量在第 4 天时最高, 为对照组的 2.12 倍; 脾脏中 *IgZ* 基因在第 4 天时呈现最高峰, 为对照组的 4.65 倍; 肠组织中 *IgZ* 基因的表达量在 12 h 时有一个小高峰, 第 2 天时最高, 为对照组的 11.41 倍。本研究获得了剑尾鱼 *IgZ* 基因 cDNA 全长序列, 并对其表达规律进行了初步研究, 发现 *IgZ* 在肠道黏膜免疫中具有重要作用, 这将为进一步验证其在黏膜免疫中的作用以及剑尾鱼作为疾病研究模式动物和疫苗免疫评价模型奠定基础。

关键词: 剑尾鱼; 免疫球蛋白 Z; 基因克隆; 免疫

中图分类号: Q 785; S 965

文献标志码: A

免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig) 是体液免疫应答中发挥免疫功能的具有抗体活性的蛋白质, 在鱼体的免疫防御中起着十分重要的作用。Ig 的基本单位由两条重链 (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]。哺乳动物中主要有 5 种免疫球蛋白类型, 即 IgM、IgD、IgG、IgE 和 IgA^[3]。相比于哺乳动物, 鱼类的免疫球蛋白研究起步较晚, 在硬骨鱼类中已经发现的免疫球蛋白主要有 IgM、IgD、IgZ、IgT 及 IgM-Z 等^[4]。目前, *IgZ* 仅在鱼类中发现, 其重链恒定区基因位于 *IgM* 恒定区基因的上游, 一般由 4 个恒定区组成。2005 年 Danilova 等^[5] 在斑马鱼

(*Danio rerio*) 中首次发现 *IgZ*, 同年 Hansen 等^[6] 在虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 体内发现该蛋白, 将其命名为 *IgT*, 进一步研究发现这两种免疫球蛋白结构高度相似, 均含 4 个恒定区, 属于同一类免疫球蛋白^[7]。随后 *IgZ* 在草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)^[8-9]、三刺鱼 (*Gasterosteus aculeatus*)^[10-11]、大西洋鲑 (*Salmo salar*)^[12-13]、鳊 (*Siniperca chuatsi*)^[14]、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)^[15]、鲤 (*Cyprinus carpio*)^[16-17] 和红鳍东方鲀 (*Fugu rubripes*)^[18] 中均被发现。*IgZ* 基因结构研究表明同种鱼存在不同类型的 *IgZ*, 但其重链基因的基本结构均比较保守。目前, 鱼类 *IgZ* 基因功能的研究表明其在黏膜免疫特别是肠道黏膜免疫中发挥重要作

收稿日期: 2014-10-20 修回日期: 2015-01-06

资助项目: 科技部公益项目 (2004DIB1J029); 广东普通高校重点实验室开放基金 (J201309)

通信作者: 吴淑勤, E-mail: wushuqin001@21cn.com

用^[6,19],如该基因在肠道寄生虫等免疫刺激条件下,其表达量显著上调^[16,20]。

剑尾鱼 (*Xiphophorus hellri*) 属 鲮 形 目 (Cyprinodontiformes)、花 鲮 科 (Poeciliidae), 是 中 国 首 个 通 过 审 定 的 鱼 类 实 验 动 物, 广 泛 应 用 于 动 物 疾 病 检 验 模 型、水 环 境 监 测 等 不 同 领 域^[21]。剑尾鱼作为实验动物,在应用中具有良好的反应一致性和可重复性,从而保证实验结果的准确性、可靠性和可比性。然而,作为鱼类免疫过程中的重要免疫因子之一,*IgZ* 基因有许多生物学功能尚未揭示,尤其是作为模式动物的剑尾鱼,尚无 *IgZ* 基因相关的研究报道。因此,通过研究 *IgZ* 基因在剑尾鱼体内的组织表达情况及疫苗免疫刺激后的表达变化规律,进一步揭示剑尾鱼 *IgZ* 的功能,为深入研究鱼类免疫应答的分子机制以及建立标准化的剑尾鱼水生动物免疫评价模型奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

剑尾鱼 5~6 月龄,体长 5~8 cm,体质量 3.5~4.8 g,由中国水产科学研究院珠江水产研究所培育,暂养 2 周后实验,水温控制在 28 °C 左右。嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 疫苗由珠江水产研究所疫苗工程中心提供,嗜水气单胞菌株 (GYK1) 由本实验室保存。DNA 提取试剂盒 Tissue DNA Kit II、总 RNA 提取试剂盒 Total RNA Kit II 和胶回收试剂盒 Gel Extraction Kit 购自 OMEGA 公司, M-MLV Reverse Transcriptase 购自 Promega 公司, pMD-18T vector、PrimeScript™ RT Reagent Kit (Perfect Real Time) 和荧光定量试剂盒 SYBR® Premix EX Tap™ II (Tli RNaseH plus)、DNA 消化酶 DNase I 均购自 TaKaRa 公司,大肠杆菌感受态细胞 DH5α (*E. coli* DH5a) 由本实验室保存,PCR 引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 实验方法

总 DNA, RNA 的提取 选取 6 尾健康剑尾鱼,腹腔注射嗜水气单胞菌 GYK1 60~80 μL (菌悬液浓度 10⁴ cfu/mL), 2 d 后取脾脏,按照试剂盒说明书分别提取 DNA 和 RNA,用于 *IgZ* 基因 DNA 及 cDNA 的克隆。RNA 提取过程中进行 DNA 消化,提取后取 5 μL 总 RNA 样品通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量和完整性,用核酸蛋

白测定仪测定 RNA 样品的浓度和纯度。提取的总 RNA 按照逆转录 M-MLV 说明书合成 cDNA 第一链。

***IgZ* 基因 DNA 及 cDNA 克隆** 参照本实验室建立的剑尾鱼 EST 库的基因序列和已知鱼类 *IgZ* 基因序列,设计 DNA 扩增引物(表 1),以剑尾鱼 DNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后,切下目的条带用 DNA 凝胶回收试剂盒纯化,纯化产物连接到 pMD18-T 载体后转化进大肠杆菌感受态细胞 DH5α, 37 °C 倒置培养过夜,挑取阳性克隆测序。获得拼接的全长 DNA 序列,分析、预测其 cDNA 序列。根据预测序列设计引物(表 1),以 cDNA 第一链为模板,进行 PCR 扩增,PCR 产物经过克隆、测序,然后对所测的序列进行拼接,获得其全长 cDNA 序列。

表 1 剑尾鱼 *IgZ* 基因扩增和定量检测所用引物
Tab. 1 The primers used for PCR amplification and quantitative detection of the *IgZ* gene of *X. hellri*

引物名称 primer name	序列(5'-3') sequence(5'-3')	用途 usage
ZF1	CTCCTTCAGCGTGCTTGTT	DNA 扩增
ZR1	ACTGGTGTGTGGCGTTTT	
ZF2	GTGAAAAAGCCCGAGAAGC	DNA 扩增
ZR2	AGGAGCGACAGAGAGAGCAA	
ZF3	ATCTGACCTGGTGGTTTTTG	DNA 扩增
ZR3	CTGGCGGCTGAATACGAGT	
ZF4	TATTCAGCCGCCAGCGTCTT	DNA 扩增
ZR4	CCTCCGCTCCACTTGTCTTGT	
ZF5	CGCCACCAACAAGGACAAG	DNA 扩增
ZR5	TGCTGGTTCTCTCCATACA	
CZF1	ACACGGCAAAAGACAGGGAG	cDNA 扩增
CZR1	TCCTCAATGACGCACACAAG	
CZF2	AACTCGGAGACTCGTATTCAG	cDNA 扩增
CZR2	ACACTCAGTAGCGTTACCCAT	
EZF	CTTATCTGTGCTTTGAGCGACTA	IgZ 荧光定量 引物
EZR	TTGTCTGGAGTAATCTCGGTG	
β-actinF	TGCTATGTTGCACTGGACTTTGAG	β-actinR 荧光 定量引物
β-actinR	CCTCTCGTTCCGATGGTGATGAC	

生物信息学分析 利用 DNASTAR 分析软件对获得的测序片段进行全长拼接。用 DNAMAN 5.1 分析剑尾鱼 *IgZ* 基因 DNA 序列以及开放阅读框 (open reading frame, ORF), 通过与其他种类的核苷酸和氨基酸序列比对, 最终确定 ORF。ExPASy-Tools (<http://www.expasy.ch/tools/>) 对

IgZ 蛋白的生化特性和蛋白质功能位点进行预测和分析;用 NCBI 中的 Blast 程序进行同源序列查找及结构组成分析;应用 Clustalx 进行多序列比对,根据氨基酸序列,用 MEGA 4.0 中的临近法 (neighbor joining, NJ) 构建进化树。

剑尾鱼 IgZ 基因组织表达分析 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术检测 IgZ 基因在 9 个组织中相对表达量。根据已知剑尾鱼 β -actin 序列 (登录号: DQ060278) 和获得的 IgZ 基因 cDNA 序列分别设计内参引物 β -actinF、 β -actinR 和检测引物 EZF、EZR (表 1)。选取 3 尾健康的剑尾鱼,分别取其鳃、脑、心脏、肝、脾、头肾、肠、肌肉和皮肤等组织,按照试剂盒说明书提取 RNA,提取过程中进行 DNA 消化,提取后 RNA 样品同上进行电泳检测及浓度测定。RNA 用 SYBR PrimeScript RT-PCR Kit 进行反转录,合成 cDNA 第一链。以合成的 cDNA 第一链为模板,按照荧光定量试剂盒步骤在 ABI 7500 (Applied Biosystems) 实时荧光定量 PCR 仪上进行荧光定量 PCR 检测,反应体系: SYBR[®] Premix ExTaq[™] II (2 ×) 10 μ L, ROX Reference Dye II (50 ×) 0.4 μ L, 10 μ mol/L 的上下游引物各 0.4 μ L, cDNA 2 μ L, 加双蒸水补足至反应总体积为 20 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 然后 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 扩增 40 个循环, 60 $^{\circ}$ C 延伸时采集荧光信号, 反应结束后对扩增产物进行溶解曲线分析, 以确保特异性扩增。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算样品中 IgZ 基因 mRNA 的相对表达量。

疫苗免疫对剑尾鱼 IgZ 基因表达的影响 选取 120 尾健康的剑尾鱼,分为 3 个平行实验组和 1 个对照组,每组 30 尾,水温保持在 28 $^{\circ}$ C 左右。实验组每尾剑尾鱼按说明书腹腔注射嗜水气单胞菌疫苗进行免疫,对照组注射等量 0.65% 的生理盐水。免疫后每组分别在 6 h, 12 h, 1 d, 2 d, 4 d, 7 d 和 11 d 取 3 尾剑尾鱼的头肾、脾和肠 3 个组织,采用 qRT-PCR 检测各组织不同时间点 IgZ 基因 mRNA 的相对表达量。提取及检测方法同上。

2 结果

2.1 剑尾鱼 IgZ 基因扩增结果及序列分析

通过 PCR 方法扩增得到 5 条 DNA 片段,片段序列用 DNAstar 拼接后获得剑尾鱼 IgZ 基因 DNA 序列为 5 420 bp。剑尾鱼 IgZ 基因全长

DNA 序列由 4 个外显子和 3 个内含子组成,内含子大小分别为 146、96 和 432 bp。通过 RT-PCR 扩增得到 720 和 860 bp 的 cDNA 片段,拼接获得 1 527 bp 的全长 cDNA 序列,该序列 ORF 为 1 299 bp (图 1),编码 432 个氨基酸。预测其编码蛋白质分子量为 47.48 ku,等电点 pI 为 5.55。保守结构功能域分析结果显示,该蛋白具有 Ig 的基本结构特征 (图 2),与其他硬骨鱼类的 IgZ 基因氨基酸序列结构相似,包含 CH1, CH2, CH3 和 CH4 4 个恒定区。在线分析工具预测显示该蛋白具有 7 个 O-糖基化位点,2 个 N-糖基化位点,33 个磷酸化位点。

2.2 剑尾鱼与不同鱼类 IgZ 基因进化关系

将剑尾鱼与其他鱼类 IgZ 基因 ORF 框核苷酸序列及其编码的氨基酸序列进行一致性比较,结果显示剑尾鱼核苷酸序列与鳊的一致性最高,为 70%,与东方金枪鱼 (*Thunnus orientalis*) 为 69%,与斜带石斑鱼为 68%,与草鱼、团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*)、斑马鱼和虹鳟的一致性分别为 48%、50%、51% 和 56%;氨基酸序列比对结果显示,剑尾鱼与东方金枪鱼一致性最高,为 54%,与鳊为 53%,与斜带石斑鱼的为 49%,与草鱼、斑马鱼、团头鲂和虹鳟的一致性分别为 28%、29%、30% 和 42%,剑尾鱼与其他鱼类 IgZ 氨基酸多重序列比对结果还显示,剑尾鱼与其他鱼类 IgZ 恒定区均存在位点十分保守的半胱氨酸与色氨酸 (图 2)。根据已经发表的其他鱼类 IgZ 氨基酸序列,通过 MEGA 4.0 软件邻近法构建系统发育树 (图 3),在该系统发育树中剑尾鱼首先与东方金枪鱼、鳊和斜带石斑鱼聚为一支,然后再与虹鳟聚为一大支,与团头鲂、草鱼和斑马鱼亲缘关系较远,分属两支。

2.3 剑尾鱼 IgZ 基因组织表达分析

应用荧光定量 RT-PCR 技术,以 β -actin 为内参基因,用设计的荧光定量引物 (表 1) 检测剑尾鱼心、肝、脾、头肾、脑、鳃、肠、皮肤、肌肉 9 个组织中 IgZ 基因的组织表达分布特征 (图 4)。结果表明,剑尾鱼 IgZ 基因在头肾、肠和脾中的表达量较高,其次是肌肉、肝、鳃、心和皮肤,脑中 IgZ 基因表达量最低。

2.4 疫苗免疫后 IgZ 基因的表达规律

荧光定量 PCR 检测嗜水气单胞菌疫苗免疫

剑尾鱼 6 h, 12 h, 1 d, 2 d, 4 d, 7 d 和 11 d 后 *IgZ* 基因在其脾脏、头肾和肠中的表达变化。结果显示剑尾鱼头肾、脾脏和肠中的 *IgZ* 基因表达量均发生明显变化(图 5)。

头肾中的相对表达量在免疫后 6 和 12 h 均上升, 12 h 的表达量显著高于对照组, 随后有下降趋势, 然后上调, 第 4 天出现最高峰, 为对照组的 2.12 倍, 第 7 天时逐渐恢复到正常水平; 脾脏中

IgZ 基因相对表达量随时间增加而呈上升趋势, 在第 4 天时表达量最高, 为对照组 4.65 倍, 第 11 天恢复到正常水平; 肠组织中 *IgZ* 基因的表达水平上调较快, 在疫苗免疫 12 h 后出现一个小高峰, 为对照组的 3.15 倍, 第 2 天时出现最高峰, 为对照组的 11.41 倍。第 7 天时表达量仍显著高于对照组, 第 11 天时才恢复到正常水平。

```

                                     /CH1
M R W Q H C D A L D Y W G E G T R V T V T S E P P V P P V L
1  ATGAGATGGCAGCACTGTGATGCCTTAGATTACTGGGGTGAAGGGACCAGAGTCACAGTGACTTCAGAACCACCTGTACCTCCGGTTC
V P M V W F S P A S G D K V T L S C L A L D F Y P Q S L S F
91  GTCCCGATGGTTTGGTTCAGTCTGCATCTGGAGATAAAGTACCCTCAGCTGCCCTGGCTCTTGACTTCTACCCACAGAGTCTTTCTTTT
E W S D A S G A P L D S V R Y P A V E T N N R F T E V S L V
181  GAGTGGAGCGATGCGAGTGGAGCACCACCTGGATTCTGTACGTTATCCTGCAGTAGAAACAACAGATTACAGAAGTCAGTTTGGTT
                                     /CH2
Q M S R S E A N L K S Y R C S V T H P G G T K T V D A K W A
271  CAAAATGCCAGATCTGAAGCAAATCTAAAGTCTTATCGATGTTGAGTACTCATCTGGTGGCACCAGACTGTGGATGCAAAATGGGCC
S C T P K L T V L S V T T G D G Q T L V C V I E D F S S E N
361  TCCTGTACCCAAAAGTACTGTACTCTCGGTGACAACTGGAGACGGTCAGACACTTGTGTGCGTCATTGAGGATTTTCTTCTGAAAAT
L L I K W K R N S N E V S G H N E W P P K K L G D S Y S A A
451  CTTTTAATCAAATGGAAAAGGAATAGCAAAGTGTCTGGACACAATGAATGGCCCTCCCAAAAAGTGGAGACTCGTATTGAGCCGCC
S V L K L K S S D W D S E A V Y S C E V T H L G K T Y T K K
541  AGCGTCTAAAATGAAGAGCTCTGACTGGGACAGTGAAGCTGTTTACTCATGTGAAGTACTCACCTTGGAAAAGTACACAAAGAAA
                                     /CH3
A S K A P I T V T L K P L S P K K M F S N N Q A E L E C V V
631  GCTTCAAAGCTCCTATCACAGTGACACTGAAACCTCTGAGTCTCAAAAAAATGTTGAGCAACAACAGGCAGAGTTGGAGTGTGTGCTG
S G Q D N D I V S G T E I T W E I N G E L M R S K I K E A T
721  TCTGGACAGGACAATGACATTGTGTGAGGACTGAAATCACTGGGAGATTAAAGGAGAACTTATGAGAAGTAAGATTAAAGGAAGCAACA
M F E G S K H S I I T F N S S D W R T V S K V R C S A V A E
811  ATGTTTGAAGGCAGTAAACACAGCATCATCACTTTTAATTCTCCGACTGGAGACAGTGAAGCAAAAGTGAAGTGTCTGCTGTAGCAGAA
                                     /CH4
D V G P V I Q D L T V N K G D G T E P K V T V H V L P E K D
901  GACGTGGACCAAGTATTCAAGACCTGACTGTCAACAAGGAGACGGGCACAGGCCAAAAGTAAACAGTCCCGTCTTCCAGAGAAAGAT
I G Q E A S A Q V T L V C L V S S D V L Q D Y Y I A W T E D
991  ATTGGCCAAGAAGCATCAGCTCAGGTCACCTGGTGTGTTTGGTTTCCAGTACGCTCTCAGGATTACTATAATTGCCTGGACTGAAGAT
V G Q S S S V Y Y D G I D F P P R K T K N G Y S V V S V Y A
1081  GTTGGACAAAAGTAGCTCAGTGTATTATGATGGCATCGACTTTCACCAAGAAAGACCAAAAATGGCTACTCAGTTGTAAGTGTITACGCC
T N K E K W S G G Y V F Y C N V W P A G R G N R M K P S G V
1171  ACCAACAAGGAGAAGTGGAGCGGAGGCTACGCTTCTATTGCAACGTGTGGCCTGCCGGCCGTGGGAATCGCATGAAAACCAAGTGGAGTG
R A M G N A T E C D V *
1261  TCTCGGGCCATGGGTAACGCTACTGAGTGTGATGTCTAG

```

图 1 剑尾鱼 *IgZ* 基因 ORF 框序列及推导的氨基酸序列

起始密码子(ATG)和终止密码子(TAG)用下划线标出, CH1~CH4 表示 4 个恒定区, “*”表示终止密码子不翻译氨基酸

Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *IgZ*' ORF from *X. hellri*

The start codon(ATG) and the stop codons(TAG) of open reading frame are underlined, CH1-CH4 represents the 4 constant regions of *IgZ*, “*” represents no translation amino acid

<i>X.hellri</i>MRWCHCD.....	7
<i>T.orientalis</i>	MMDYRTVLLLTICWAGVDGQT.LTESEPAVK.KPGESHKLTCTTSGLSFSS.YGMAWIRQAPGKGLWLIATYSG.GSKYYSQSVQGRF	86
<i>E.coioides</i>	MENTVIWSLLFFVVTIHGVWSEIKLDQSSSEVK.RPGETVRMSCIIISGFDMD.YNIHWIRQRPGNALWIGWMMTGNSASYSSTQSRF	88
<i>S.chuatsi</i>	MENTVIWSLLFFVVTIHGVWSEIKLDQSSSEVK.RPGETVRMSCIIISGYSMTS.YSIHWIRQRPGRALWIGWMMTGNSASYSSTQSRF	88
<i>O.mykiss</i>	..MFPASLLMLAAVSCVHCQVVTCAEQSVQGT.PAGSLKLTACSGFTLSS.TNMHWIRQAPGKGLWLIYYYSYD.SYKSNACVQVQGRF	86
<i>M.amblycephala</i>	MVSSSLWLFLLLAAVSRVHCVELTQDFVLLR..EGQLLTLCKRISYSVTDSYCTGFIQCAAGKALEWVGIMCGD..GSTYSQSVQGRF	86
<i>X.hellri</i>ANDYWGEGRTVTVTSEFPVPP.VLVPMVWFSPASGDKVTLGCLALDMEQC.S	57
<i>T.orientalis</i>	TISRDNRSREQLYLQMNSLKTEESAVYYCAR.....DVPEDYWGEGRTVTVTSEFPVPP.TLYPLLQCDSDTGKNTVGCCLARDPEEK.S	168
<i>E.coioides</i>	IMTEDVPSSTQYLEVKSLTAEDSAVYFCAR...SAGFADYWGEGRTAVVYSQTAAE.ALFPLVQCCKSGTAGTVTVGCCLARDPEEK.S	172
<i>S.chuatsi</i>	IMTEDVPSSTQYLEVKSLTAEDSAVYFCARYMG.SDGLYFDYWGEGRTVTVTSEFPVPP.TLYPLLQCDSDTGKNTVGCCLARDPEEK.S	175
<i>O.mykiss</i>	TASKD..SSNLYLHMSQLKPEESAVYYCARDSSRRRPEAGDYWGEGRTVTVTSEFPVPP.TLLTLMNCGTSPNDIYSLGCLARDPEEK.S	172
<i>M.amblycephala</i>	TVSRDSSSQLYLQMNSLKTEESAVYYCAS..ELAGAARDYWGEGRTAVVYSQTAAE.ALFPLVQCCKSGTAGTVTVGCCLARDPEEK.S	174
<i>X.hellri</i>	LSFENSDASGAPLD.SVRFDAVETNNRTEVSLVQMSRSE.ANLSFYKCSVTHPGGTKTVDAKWA SCTP.KLTVLSVTT.....GDTQ	137
<i>T.orientalis</i>	IDFCNDARGTRVD.SACQLSG.QNNKRYDGVSVQVRSR..DIKSSYKCSVDHLGRIMAVTVKLESEF..RVTLISVFN.....GDTQ	245
<i>E.coioides</i>	LSFENSDASGTTQT.FKQCFIVMKDNKYIGVSVLVDKSAWDSRSEFSCSVTHPGGSESVTLQKPEPPP.KVTLVAVPA.....GDTQ	253
<i>S.chuatsi</i>	LTFQNDSSGTALT.SENYPPAEKNNRYIGVSLVQVSKSDWDSRSEFSCSVHNGSTHDLQVHKEIPP..KVTLVSVPS.....EDSQ	255
<i>O.mykiss</i>	HTFCNDASGKALTDVFCVPAVCSGETYIGVSLRVKANKVWNSKSFPCSVDPHGGAKTAVINKFVPSFTVLSLAPI.....GTQ	255
<i>M.amblycephala</i>	LTFQNDSSANKGLTDFVHFAFSGDPDYIKIHLVKKSEWRPQTSYTC.EASNSIGTVRDTITREVPFPLPATVYLTVPTRKELENGRA	264
	IgC domain	
<i>X.hellri</i>	TLVCFVIEDFSSENL.IKWRKNSNEVSGHNWPPKLG...SYSAAVLRKLSHDSSEAVVYCEVTHLQKTYTRKASK.APITVTEK	221
<i>T.orientalis</i>	VLVCFVIEEFLPETLS.VKWRKNDYSDFTDWPVRCIGD...VYSAVSVLRVKNALWESKAVVYCEVTHRKGTYERKASK.APITVTEK	329
<i>E.coioides</i>	TLVCFVIEDLPSNQLS.VKWRKDDNSVGTDFDCPPQLNGG...VYTAVSDRVKNSLWDSKAVVYCEVTHRKGTYERKASK.APITVTEK	337
<i>S.chuatsi</i>	ALVCFVIEDRSGTLDSEFKKNGAELNDYIQSPIQKTGE...LHSAVSVLRVKNALWESKAVVYCEVTHRKGTYERKASK.APITVTEK	340
<i>O.mykiss</i>	YLMCFVIEDFTSETVK.VKWRKNDMEVEGQTFPLGRRPSG...LYSGSSLRVKNALWESKAVVYCEVTHRKGTYERKASK.APITVTEK	340
<i>M.amblycephala</i>	TEFLAQEFSPKTY.S.FKRFKDNQVTAINTYDASKKNGSETFYSATSILQISAEFRKTKAKIKCFEDHKMGRQEREAEYTAKLDTTEK	353
<i>X.hellri</i>	PLSPKKEISNNQAELECFVSGCENDIVSGTETIWEINGELMRSKIKREATMFE...GSKHSHITFNSSPRTVSKVRCESAV.AEDVGFVI	306
<i>T.orientalis</i>	PLSPKKEISNNQAELECFVEGQENIIVSETEMITQINGKMNAGMGLLKTAG...SQYKRNITLRSLEPLQVNTVRCESAK.RRDVT.VT	415
<i>E.coioides</i>	QSSPKKEISNNQAKRECFVITGTCITGP.DFQLIQCVDGQNVVDNIETKPGSK...KISIMTRAHTDQDSINKVRCESAI.RDNMTFVI	419
<i>S.chuatsi</i>	QSPKKEISNNQAELECFITGQETIIVDEIKVTCIDGQVDSNINNETTKSVD.GQRKTSMTSRSTKRVNKRRCESAI.RDDDT.LI	427
<i>O.mykiss</i>	PPRPREVLDNQAVLECFVITATQNTVSGTNTIWHINGDIQTAHIDLKPIESKGNLNSRVSTLIDQTRVNVNKRRCESAMRGETFPVI	430
<i>M.amblycephala</i>	PPIESEVFNNTVVLQAVVSG.FERKVRKASVLCVVRNNEVTLGPGSVSFSQDISQYIRIHRIVDTNKRPNGETVTCITIS...DRNIK	438
<i>X.hellri</i>	QDLTVNCGDTEPKTVHVLPERDIG.QEASACVTVLQVNSDVLQVYVYFPEDEDVQSSSVYDGDIDFFERKTKNG.YSVSVYATNFE	394
<i>T.orientalis</i>	KDLTFHGEDRKTITVHILSEEEIR..KNSDVLQVNSDVLQVYVYFPEDEDVQSSSVYDGDIDFFERKTKNG.YSVSVYATNFE	501
<i>E.coioides</i>	QELTIQCGDSDPEKTVHILPELIDIDRAAGQSEVILVQVSSRAQCYVYFPEDEDVQSSSVYDGDIDFFERKTKNG.YSVSVYATNFE	508
<i>S.chuatsi</i>	QDLTVNCGDTEPKTVHVLTEEDIN..KGAEVVLQVNSDVLQVYVYFPEDEDVQSSSVYDGDIDFFERKTKNG.YSVSVYATNFE	510
<i>O.mykiss</i>	QDISFTKES.EAPSQSVHILPEEDTK...KDGVLVLCVNSDVLQVYVYFPEDEDVQSSSVYDGDIDFFERKTKNG.YSVSVYATNFE	512
<i>M.amblycephala</i>	QEIHCGDEKTEPNITVYRPSNKT...DQVSPVQVNSDVLQVYVYFPEDEDVQSSSVYDGDIDFFERKTKNG.YSVSVYATNFE	518
<i>X.hellri</i>	FNISGGY.VFYCNWPAGRGRNRMKFS..GVSRAMGNATGCDV..	432
<i>T.orientalis</i>	FNISGGY.VFYCNWPAGRGRNRMKFS..GVSRAMGNATGCDV..	541
<i>E.coioides</i>	FNISGGY.VFYCNWPAGRGRNRMKFS..GVSRAMGNATGCDV..	545
<i>S.chuatsi</i>	FNISGGY.VFYCNWPAGRGRNRMKFS..GVSRAMGNATGCDV..	548
<i>O.mykiss</i>	FNISGGY.VFYCNWPAGRGRNRMKFS..GVSRAMGNATGCDV..	551
<i>M.amblycephala</i>	FNISGGY.VFYCNWPAGRGRNRMKFS..GVSRAMGNATGCDV..	561

图2 剑尾鱼 IgZ 与其他鱼类 IgZ 氨基酸序列比对

相同氨基酸为黑色背景,相似氨基酸为灰色背景,框内氨基酸为恒定区保守位点的半胱氨酸与色氨酸; IgC 区域表示免疫球蛋白的恒定结构域

Fig. 2 IgZ amino acid sequences comparison of *X. hellri* with other fishes

Identical residues are indicated with black background, and the similar amino acids are indicated with gray background; the conserved cysteine residues and tryptophan residues are boxed; the IgC domain represents the immunoglobulin constant domain

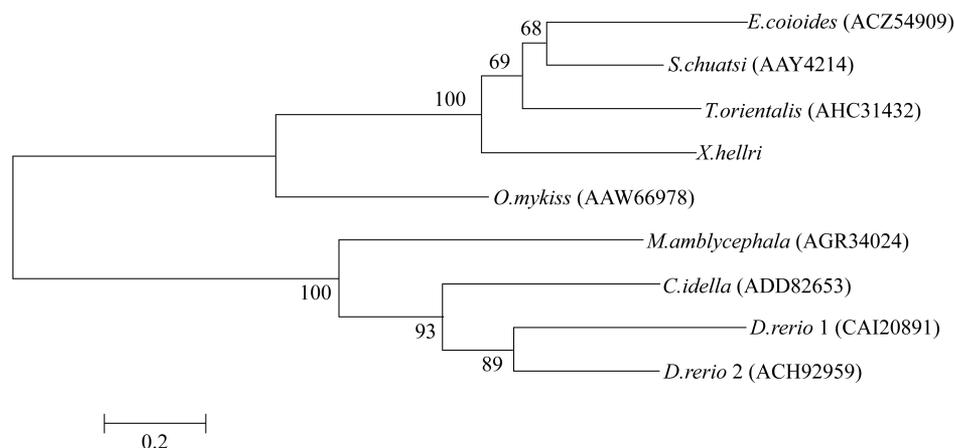


图3 剑尾鱼与其他鱼类 IgZ 基因氨基酸序列构建进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of IgZ gene from *X. hellri* and other species of fishes

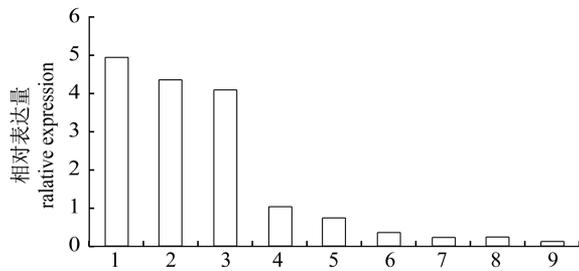


图4 剑尾鱼不同组织中 *IgZ* 基因的组织特异性表达

1. 头肾, 2. 肠, 3. 脾, 4. 肌肉, 5. 肝, 6. 鳃, 7. 心, 8. 皮肤, 9. 脑

Fig. 4 Tissue-specific expression of *IgZ* gene in different tissues of *X. hellri*

1. head kidney, 2. intestines, 3. spleen, 4. muscle, 5. liver, 6. gill, 7. heart, 8. skin, 9. brain

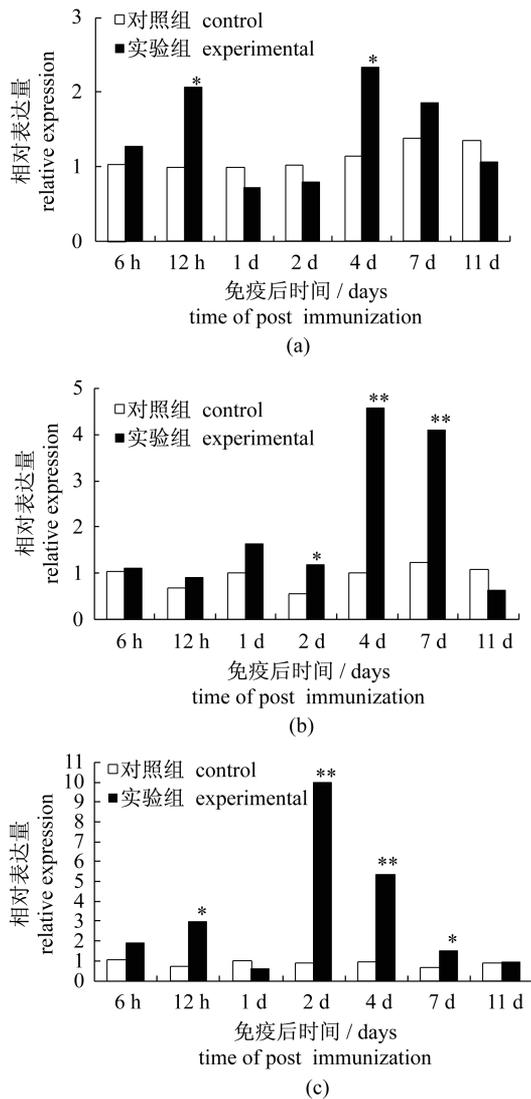


图5 嗜水气单胞菌疫苗免疫后 *IgZ* 在各器官中的表达变化 (a)头肾; (b)脾; (c)肠; $n=3$; “*”、“**”分别表示与相应对照组比有显著或极显著差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)

Fig. 5 The expression of *IgZ* mRNA in different organs after vaccination with *A. hydrophila* vaccine

(a) head kidney; (b) spleen; (c) intestines; $n=3$; “*” $P < 0.05$, “**” $P < 0.01$ vs. control group at the same time

3 讨论

本研究克隆获得一段 5 420 bp 的 DNA 序列,其对应的 cDNA 全长为 1 527 bp, ORF 为 1 299 bp, 编码 432 个氨基酸的蛋白质序列, 该序列具有鱼类 *IgZ* 4 个典型的恒定区域, 其 ORF 与 GenBank 中登录的其他鱼类 *IgZ* 的 ORF 比对, 与鲈形目 (Perciformes) 鱼类鳊、东方金枪鱼和斜带石斑鱼的一致性较高, 为 68% ~ 70%, 与鲤形目 (Cypriniformes) 鱼类草鱼、斑马鱼和虹鳟一致性为 48% ~ 56%, 表明本实验成功克隆剑尾鱼 *IgZ* 基因全长 cDNA 序列。

鱼类 *IgZ* 基因结构较为保守, 一般由 4 个恒定区组成, 且恒定区都含有位置十分保守的半胱氨酸与色氨酸, 剑尾鱼 *IgZ* 恒定区在相同的保守位点也出现半胱氨酸和色氨酸。保守的半胱氨酸残基主要负责结构域间或链间二硫键的形成, 对形成与维持免疫球蛋白的空间结构起着决定性的作用, 恒定区色氨酸则有助于稳定蛋白质的三级结构, 对免疫球蛋白空间结构的形成及功能起着重要作用^[22]。半胱氨酸与色氨酸在鱼类 *IgZ* 中出现位置的相同, 显示了其在进化过程中的高度保守性, 这种保守性可确保 *IgZ* 分子的正确折叠以及维持与抗原结合的能力。

剑尾鱼 *IgZ* 基因主要在头肾、肠和脾中表达, 其次是肌肉, 肝, 鳃, 心脏和皮肤, 脑中有微量表达。头肾和脾脏是鱼类主要的免疫器官, 是免疫应答的主要场所, *IgZ* 在剑尾鱼头肾和脾脏中的大量分布表明其作为鱼类重要的免疫球蛋白在免疫应答过程中发挥重要作用, 这种头肾和脾脏中 *IgZ* 基因大量分布的现象在斑马鱼^[5, 23]、鳊^[14]和鲤^[16]中均有发现。肠道是生物体重要的消化器官, 而本研究中 *IgZ* 基因在肠道中表达量较高, 甚至超过脾脏中的表达量, 研究认为, 肠道黏膜不仅是消化吸收营养物质的主要场所, 也是一道重要的免疫防御屏障^[24]。鱼类在遭受病原体感染时, 黏膜是其最先接触的部位, 其不仅作为物理屏障发挥作用, 而且局部特异性免疫应答还对病原体的抵御起重要作用。大西洋鲑在疫苗免疫后, 其肠道出现大量的抗体分泌细胞, 产生黏膜免疫应答^[25], 虹鳟在肠道寄生虫感染后, 其肠道产生 *IgZ* 的 B 细胞大量聚集^[20]。 *IgZ* 是一种黏膜免疫抗体, 特别是在鱼类肠道黏膜抗感染免疫中, 其作用

甚至比 IgM 还要重要^[19-20],目前在草鱼^[8-9]、鲤^[17]和红鳍东方鲀^[18]等鱼类肠组织中也发现 IgZ 的高表达现象,剑尾鱼 IgZ 在肠道中的大量分布表明剑尾鱼肠道黏膜可能在鱼体免疫应答中具有重要作用,是黏膜免疫的主要场所。

剑尾鱼在疫苗注射免疫后,其脾脏、头肾 IgZ 基因的表达量都出现上调,与此相似,斑马鱼^[5]、鲤^[16]和虹鳟^[26]在外界抗原刺激后,IgZ 基因在肾和脾脏中表达水平也都表现出明显上调。这表明肾和脾脏中的 IgZ 在抵御外界病原时具有重要作用。剑尾鱼头肾中 IgZ 基因在免疫后第 4 天达到最高水平,为对照组的 2.12 倍,而脾脏中的 IgZ 基因同样在免疫后第 4 天时呈现最高峰,其表达水平为对照组的 4.65 倍,在免疫后第 7 天仍极显著高于对照组。与头肾相比,剑尾鱼脾脏中 IgZ 基因表达强度更大,持续时间更久,这可能是由于脾脏是外周免疫器官,是免疫反应的主要场所,淋巴细胞在头肾等中枢免疫器官中成熟后会被转运到外周免疫器官参与免疫反应,产生抗体,且脾脏中含有的相关巨噬细胞不仅能裂解红细胞,还可以以免疫复合体的形式长期储存抗原,能长时间内刺激抗体的产生。

剑尾鱼肠中 IgZ 基因在疫苗免疫后,其表达量也上调,这种现象在鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)免疫鲤^[16]后和脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激斑马鱼^[23]时均出现。剑尾鱼肠相对于脾脏和头肾,IgZ 基因的表达更早出现,其相对表达量在疫苗免疫后迅速上升,第 2 天时就达到最高值,为对照组的 11.41 倍,到第 7 天还维持较高的表达量,这可能主要是因为 IgZ 是鱼类黏膜免疫的主要抗体,肠道作为执行黏膜免疫功能的主要场所,肠黏膜表面与外界抗原直接接触,其局部的抗体比血清抗体出现的早,效价高且维持时间长;另外可能由于肠道表面的肠系膜在疫苗注射后能较早接触抗原,肠系膜中血管通过血液循环将抗原传递至肠道,因而更早产生黏膜免疫应答,使肠道中 IgZ 抗体上调更快,但这一方面的原因还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Zhou G Y. Principles of Immunology [M]. 2nd ed. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2007. [周光炎. 免疫学原理. 第二版. 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] Roitt I M, Brostoff I, Male D K. Immunology [M]. 5th ed. London: Mosby, 1998: 71 - 78.
- [4] Su B, Wang D, Liu H B. Research advances in immunoglobulin classification and diversity mechanism in fish [J]. Chinese Journal of Fisheries, 2013, 26(1): 60 - 64. [宿斌, 王荻, 刘红柏. 硬骨鱼类免疫球蛋白分类及多样性产生机制研究进展. 水产学杂志, 2013, 26(1): 60 - 64.]
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Xiao F S, Nie P. Immunoglobulin heavy chain genes and their loci in fish: Progress and perspectives [J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(10): 1617 - 1682. [肖凡书, 聂品. 鱼类免疫球蛋白重链基因与基因座的研究进展. 水产学报, 2010, 34(10): 1617 - 1682.]
- [8] 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.
- [9] Xiao F S, Xu Q Q, Wang X X. Novel immunoglobulin heavy chain genes, IgZ-2 and IgM-IgZ in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(12): 1891 - 1900. [肖凡书, 许巧情, 王欣欣, 等. 草鱼的新型免疫球蛋白基因 IgZ-2 和 IgM-IgZ. 水产学报, 2010, 34(12): 1891 - 1900.]
- [10] Gambon D F, Sanchez E C, Magadan M 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.
- [11] Bao Y, Wang T, Guo Y, et al. The immunoglobulin gene loci in the teleost *Gasterosteus aculeatus* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 28(1): 40 - 48.

- [12] Yasuike M, de Boer J, von Schalburg K R, *et al.* Evolution of duplicated IgH loci in Atlantic salmon, *Salmo salar* [J]. BMC Genomics, 2010, 11:486.
- [13] 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, 2011, 139(1):17-26.
- [14] 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(1-2):14-21.
- [15] Huang B, Cheng S N, Xu Z, *et al.* Molecular characterization of IgM, IgZ and IgD heavy chain genes in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(7):1000-1010. [黄贝, 陈善楠, 徐镇, 等. 斜带石斑鱼 IgM、IgZ 和 IgD 重链基因的克隆. 水产学报, 2012, 36(7):1000-1010.]
- [16] Ryo S, Wijdeven R H, Tyagi A, *et al.* Common carp have two subclasses of bonyfish specific antibody IgZ showing differential expression in response to infection. Developmental & Comparative Immunology, 2010, 34(11):1183-1190.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] Zhang Y A, Salinas I, Oriol S J. Recent findings on the structure and function of teleost IgT [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 31(5):627-634.
- [20] Zhang Y A, Salinas I, Li J, *et al.* IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity [J]. Nature Immunology, 2010, 11(9):827-835.
- [21] Wu S Q, Huang Z B, Shi C B, *et al.* Aquatic laboratory animals-swordtail fish [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2005:7-9, 93-108. [吴淑勤, 黄志斌, 石存斌, 等. 水生实验动物-剑尾鱼. 北京: 中国农业出版社, 2005:7-9, 93-108.]
- [22] Amemiya C T, Litman G W. Complete nucleotide sequence of an immunoglobulin heavy chain gene and analysis of immunoglobulin gene organization in a primitive teleost species [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 1990, 87(2):811-815.
- [23] 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, 2010, 47(4):738-746.
- [24] Tu Y F, Song D J. The structure and function adaptability of intestinal tissue of fish [J]. Jiangxi Feed, 2004(4):16-19. [涂永锋, 宋代军. 鱼类肠道组织结构及其功能适应性. 江西饲料, 2004(4):16-19.]
- [25] Vervarcke S, Ollevier F, Kinget R, *et al.* Mucosal response in African catfish after administration of *Vibrio anguillarum* O2 antigens via different routes [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2005, 18(2):125-133.
- [26] Raida M K, Buchmann K. Bath vaccination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) against *Yersinia ruckeri*; Effects of temperature on protection and gene expression. Vaccine 2008, 26(8):1050-1062.

Identification and expression analysis of *IgZ* gene in swordtail fish (*Xiphophorus hellri*) responses to vaccine challenges

WANG Pianpian^{1,2}, LIU Chun², LI Kaibin², SHI Cunbin², WU Shuqin^{2*}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology, Pearl River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: The full length DNA and cDNA of *IgZ* gene from swordtail fish *Xiphophorus hellri* were cloned. The obtained DNA of *IgZ* is 5 420 bp in length, which is composed of four exons and three introns. The length of cDNA is 1 527 bp, containing a 1 299 bp open reading frame (ORF) which encoded a protein of 432 amino acids with deduced protein molecular weight 47.48 ku. Alignment based on amino acid sequence indicates that swordtail fish *IgZ* shared similarities of 28% – 54% with other fishes. *IgZ* mRNA expression of swordtail fish was predominantly detected in head kidney, spleen and intestines. The expression levels of *IgZ* in the head kidney and spleen both demonstrated peaks at 4 days post immunization, increasing of approximately 2 fold and 4 fold in comparison with control group, respectively. Moreover, the expression level of *IgZ* in intestines varied more sensitively with increasing about 11 fold in comparison with control in the second day after immunization. The results further reveal the *IgZ* gene plays an important role in the intestinal mucosal immunity. Furthermore, this study also indicates that the swordtail fish could be utilized as a useful fish model for the research of fish diseases and vaccine evaluation.

Key words: *Xiphophorus hellri*; *IgZ*; gene cloning; immunization

Corresponding author: WU Shuqin. E-mail: wushuqin001@21cn.com