

太平洋鳕 *RAG1* 和 *IgM* 基因荧光定量 PCR 方法的建立及初步应用

李 幸, 温施慧, 毛明光, 姜志强*, 蒋洁兰

(大连海洋大学农业部北方海水增养殖重点实验室, 辽宁 大连 116023)

摘要: 为研究太平洋鳕发育早期特异免疫系统形成的机制, 通过 *RAG1* 和 *IgM* 基因的转录水平衡量特异免疫系统的发育特点。根据 GenBank 中 *RAG1* 和 *IgM* 的序列信息, 分别设计 1 对特异引物, 从太平洋鳕头肾中扩增得到 *RAG1* 和 *IgM* 的基因片段。将所获基因片段分别插入到克隆载体 pMD18-T 中, 从而构建太平洋鳕 *RAG1* 和 *IgM* 基因的质粒标准品。建立并优化太平洋鳕 *RAG1* 和 *IgM* 基因绝对荧光定量 PCR 方法。为进一步验证该方法的可靠性, 分别利用绝对定量和相对定量检验目的基因在太平洋鳕早期发育过程不同组织内的表达差异。以优化后的绝对荧光定量 PCR 方法检测不同发育时期太平洋鳕 *RAG1* 和 *IgM* 的表达情况。结果显示, *RAG1* 的回归方程为 $y = -3.266x + 33.77$, 回归系数 $R^2 = 0.996$; *IgM* 的回归方程为 $y = -3.119x + 27.61$, 回归系数 $R^2 = 0.998$ 。绝对定量和相对定量结果在基因转录趋势上显现出一致性, 即 *RAG1* 基因在胸腺和头肾中表达, 且在胸腺中的表达量显著高于头肾中的表达量, 在肝脏和脾脏中无表达; *IgM* 基因在胸腺、头肾、肝脏和脾脏中均有表达, 其中脾脏中表达量最高, 其次是头肾。*RAG1* 基因在太平洋鳕发育早期的表达水平很低, 到 61 日龄 (days post-hatching, dph) 至 95 dph 表达量显著提高; *IgM* 基因在早期表达水平同样很低, 到 33 dph 至 61 dph 才有明显表达, 在 95 dph 时表达量显著提高。研究表明, 本实验方法可靠, 特异性较强, 可成功对目标基因转录水平进行检测。

关键词: 太平洋鳕; *RAG1*; *IgM*; 绝对荧光定量 PCR

中图分类号: Q 784; S 965

文献标志码: A

在脊椎动物中, 特异性免疫反应通过 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞表面的抗原特异受体来发挥作用, 而这些多样的抗原特异受体是由多个 V (variable) 基因片段、J (joining) 基因片段和 D (diversity) 基因片段通过基因重组 [V(D)J 重组] 而产生的^[1-5]。重组激活基因 (recombination-activating gene, *RAG*), 分为两个亚型 (*RAG1* 和 *RAG2*), 其编码蛋白构成的重组酶能特异地识别免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig) 和 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR) 的 V、D 和 J 基因片段两侧的重组信号序列 (recombination signal sequence, RSS), 催化 DNA 双链断裂, 引起

V(D)J 重排, 从而改变抗体基因, 产生新的特异性抗原受体^[3-5]。因此, *RAG* 基因所主导的免疫基因重组是 Ig 和 TCR 库多样性产生的主要原因, 在淋巴细胞发育成熟过程中起着关键性作用。免疫球蛋白是免疫系统中的重要组成部分, 是重组激活基因影响对象之一, 目前在硬骨鱼类中已经发现了 *IgM*、*IgD*、*IgZ* 和 *IgH* 等多种类型, 其中 *IgM* 是 B 细胞表面的抗原识别受体^[5-6]。*RAG1* 和 *IgM* 被认为是免疫系统发育的重要标记基因^[7-10]。

太平洋鳕 (*Gadus macrocephalus*), 又称大头鳕, 具有较高的经济价值。近几年来, 由于捕捞量

收稿日期: 2014-10-07 修回日期: 2015-01-22

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2012AA10A413); 国家自然科学基金 (31302202); 辽宁省教育厅专项 (L2013276)

通信作者: 姜志强, E-mail: zhqjiang@dlou.edu.cn

剧增,导致其野生资源不断下降,积极开展太平洋鳕的人工育苗与养殖已迫在眉睫。太平洋鳕人工繁育技术不断取得突破,但在早期会出现大量死亡现象,严重影响其人工繁育研究的进程^[11-13],这可能是由于其早期免疫系统尚不完善,对病毒等外界致病因子抵抗力弱。目前,鲜有关于太平洋鳕免疫系统研究的报道,本实验为研究太平洋鳕发育早期特异免疫系统形成的机制,通过太平洋鳕 *RAG1* 和 *IgM* 基因的转录水平来衡量特异免疫系统的发育特点,分别建立了相应的荧光定量 PCR 方法,以期为太平洋鳕免疫系统的深入研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

采用本实验室人工养殖的 305 dph 太平洋鳕,解剖取胸腺、头肾、肝脏和脾脏用于 *RAG1* 和 *IgM* 基因在不同组织中表达差异的研究;采用 2013 年冬季人工繁育的不同发育时期(1、9、21、33、61 和 95 dph)的仔稚鱼进行 *RAG1* 和 *IgM* 基因在早期发育阶段中表达特点的研究。样品置于 1.5 mL 离心管中,每管中组织量约 20 mg,样品用液氮迅速冷冻后转移至 -80 °C 超低温冰箱中保存备用。

1.2 主要试剂和仪器

动物组织总 RNA 提取试剂盒(天根,北京); DNA 酶 RQ1 RNase-Free DNase (Promega, 北京);反转录试剂盒 PrimeScript RT reagent Kit(宝生物,大连); PCR 反应液 2 × EasyTaq PCR SuperMix(全式金,北京); SanPrep 柱式 DNA 胶

回收试剂盒(生工,上海);克隆载体试剂盒 pMDTM18-T Vector Cloning Kit(宝生物,大连); DH5 α 感受态细胞(全式金,北京);质粒提取试剂盒 EasyPureTM Plasmid MiniPrep Kit(全式金,北京);荧光定量 PCR 反应液 TransStart Top Green qPCR SuperMix(全式金,北京)。

超净工作台(苏净,北京);高速冷冻离心机(日立,日本);全自动数码凝胶图像分析系统(天能,上海);NV3000 微量分光光度计(VASTECH INC,北京);PCR 仪(Eppendorf,德国);ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪(ABI,美国)。

1.3 总 RNA 提取及 cDNA 合成

根据动物组织总 RNA 提取试剂盒说明,提取太平洋鳕各组织及早期各发育阶段样品总 RNA。取 4 μ L 总 RNA 用于 1% (W/V) 琼脂糖凝胶电泳,检测总 RNA 的质量。取 2 μ L 总 RNA 用于微量分光光度计测定 RNA 的浓度。根据 Promega RQ1 RNase-Free DNase 说明,对提取的总 RNA 进行 DNase 处理。按照反转录试剂盒说明,以 20 μ L 体系对 1 μ g RNA 进行反转录反应。反应结束后将产物置于 -20 °C 保存备用。

1.4 基因的克隆与荧光定量 PCR 方法的建立

根据 NCBI 中已报道鱼类 *RAG1* 和 *IgM* 基因序列对比结果,在高同源性的核心区各设计 1 对引物 (*RAG1c-F*, *RAG1c-R*; *IgM2-F*, *IgM2-R*) (表 1),用于目的基因部分序列的扩增和标准品模板的制作。再根据扩增得到的片段序列分别设计特异性引物 (*qRAG1b-F*, *qRAG1b-R*; *qIgM3-F*, *qIgM3-R*) 用于目的基因的绝对定量 PCR 反应(表 1)。

表 1 实验中用到的引物
Tab.1 Primers used in this experiment

引物名称 primers' name	引物序列(5'-3') primer sequence	引物用途 usage
<i>RAG1c-F</i>	CAAGGCGGACGAACTGGA	目的基因部分序列的扩增
<i>RAG1c-R</i>	GCGGCTTACAGGACAGCT	
<i>IgM2-F</i>	CATCCGCTGTCAGGTCTC	
<i>IgM2-R</i>	ATTCCTTTGCTCCATTCATC	
<i>qRAG1b-F</i>	GCGGTGCGTTTCTCCTCA	荧光定量 PCR 目的基因特异性引物
<i>qRAG1b-R</i>	AGTTGGGCTTCGGCTCCTG	
<i>qIgM3-F</i>	ATCTTGCCAATCTCACTT	
<i>qIgM3-R</i>	TCCTTTGCTCCATTCATC	
<i>β-actin-F</i>	CCAAAGCAACAGGGAGA	相对定量 PCR 内参基因引物
<i>β-actin-R</i>	GCAGTGTTGGTGAAGGAGTAG	

以头肾组织 cDNA 为模板,根据 2 × EasyTaq PCR SuperMix 说明配制 50 μL 反应体系进行 PCR 反应扩增目的基因部分序列。反应条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,38 个循环;72 °C 延伸 5 min。反应结束后进行 1.2% (W/V) 琼脂糖凝胶电泳,并利用 DNA 凝胶回收纯化试剂盒将目的片段回收纯化。根据 pMD18-T 载体试剂盒说明将回收纯化的目的基因片段连接到载体上,并以热击法转化到 DH5α 大肠杆菌感受态细胞中,经测序验证后,利用质粒提取试剂盒提取重组质粒。用微量分光光度计测定质粒浓度,并计算拷贝数^[14-15]。拷贝数计算公式如下:

$$N_c = (6.02 \times 10^{14} \times C_p) / (Ln + 2692) \times 660$$

式中, N_c 为目的基因的拷贝数,单位为 copies/ng total RNA; C_p 为质粒浓度,单位 ng/μL; Ln 为插入载体的基因的长度,单位 bp。

根据得到的标准质粒拷贝数,将标准质粒以 10 倍系列稀释成 5 个梯度并以稀释后的质粒为模板。根据 TransStart Top Green qPCR SuperMix (TransGen) 说明配制 20 μL 反应体系,每个目标基因分别配制加引物 (10 μmol/L, 包括上、下游引物) 量为 0.4 和 0.8 μL 的两组反应体系,模板为 2 μL,并制作标准曲线。反应设 3 个重复。扩增条件为 94 °C、4 min;94 °C、25 s,58 °C、25 s,72 °C、30 s,40 个循环。反应结束后对扩增曲线和熔解曲线进行分析,制作标准曲线,得出回归方程,根据斜率 (s) 与扩增效率 E 的关系 [$E = 10^{(-1/s)} - 1$], 分析得到合适的体系,即得到体系中引物的添加量。

1.5 绝对定量 PCR 检测 *RAG1* 和 *IgM* 基因在不同组织和发育阶段的表达差异

以 10 倍系列稀释成 5 个梯度的标准质粒为标准模板,以太平洋鳕胸腺、头肾、脾脏和肝脏的 cDNA 为目标基因组织差异表达的未知样品模板,以 1、9、21、33、61 及 95 dph 的 cDNA 为早期发育目标基因表达差异的未知样品模板,配制优化确定的反应体系,每个样品设 3 个重复,以水为模板作为空白对照。反应结束后对 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪自动生成的扩增曲线和熔解曲线进行分析,制作标准曲线,根据标准曲线计算得到每个组织及发育阶段中 *RAG1* 和 *IgM* 基因的精确拷贝数。拷贝数用平均值 ± 标准差 (means ±

SD) 表示。采用 SPSS 19.0 软件对数据进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 应用 Tukey 法进行多重比较, $P < 0.05$ 为结果差异显著。

1.6 相对定量 PCR 检测 *RAG1* 和 *IgM* 基因在不同组织中表达差异

以太平洋鳕胸腺、头肾、脾脏和肝脏的 cDNA 为未知样品模板,以 β -actin 为内参基因,根据 ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪自动生成的 C_T 值,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算基因的相对表达量^[16],即根据 $\Delta C_T = \text{目的基因 } C_T \text{ 值} - \text{内参基因 } C_T \text{ 值}$ 进行标准化,用不同样品与标志样品 (作图中被考虑为 1 倍的样品) ΔC_T 的差值进行比较,即 $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T1} - \Delta C_{T2}$; 最后转化为转录水平实际变化倍数 (Y), $Y(\%) = 2^{-\Delta\Delta C_T} \times 100$ 。基因表达水平以平均值 ± 标准差 (means ± SD) 表示,用 SPSS 19.0 对数据进行方差分析,应用 Tukey 法进行多重比较分析, $P < 0.05$ 为结果差异显著。

2 结果

2.1 标准品模板的制备和定量引物的 PCR 检验

用克隆引物进行 PCR 反应,分别得到长度为 1 242 bp 和 1 132 bp 的片段 (图 1-a), 经测序确认分别为太平洋鳕 *RAG1* 和 *IgM* 基因的 cDNA 片段序列, GenBank 登录号分别为 KM408434 和 KM408433, 通过构建图片说明序列与引物的位置 (图 2)。以所获片段建立的重组质粒为模板检验特异性定量引物与重组质粒的正确性与可用性, 实验分别得到 112 bp 和 192 bp 的片段, 均与预计片段大小相符, 且电泳条带单一清晰 (图 1-b), 说明引物特异性强, 重组质粒可作为标准模板构建标准曲线。

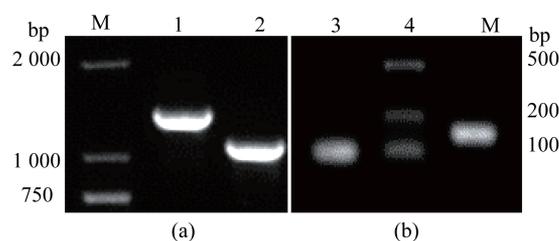


图 1 PCR 产物电泳

(a) *RAG1* (1) 和 *IgM* (2) 部分序列扩增电泳图; (b) *qRAG1b* (3) 和 *qIgM3* (4) 定量引物的 PCR 检验

Fig. 1 Gel electrophoresis of PCR product

(a) gel electrophoresis of *RAG1* (1) and *IgM* (2) partial sequences; (b) quantification primers checking of *qRAG1b* (3) and *IgM3* (4)

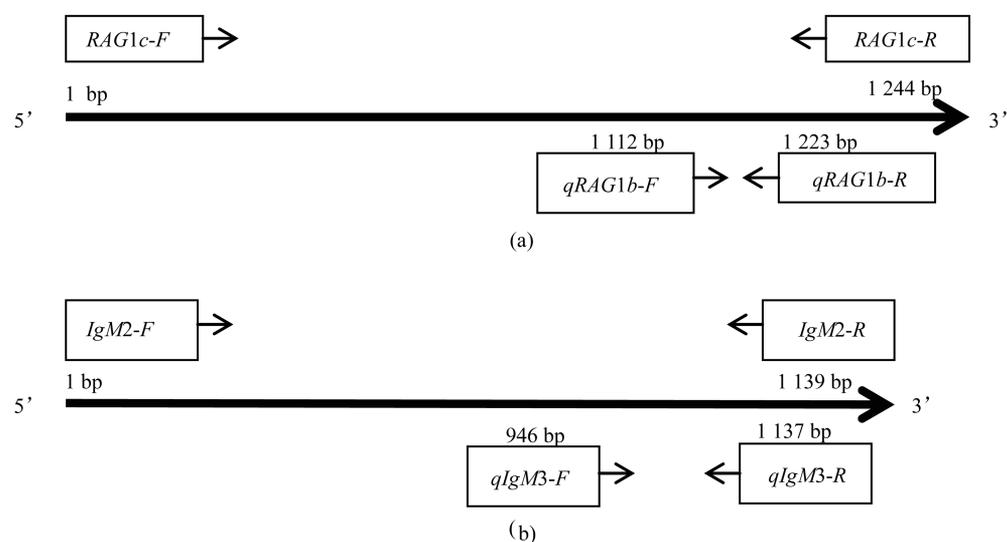


图2 *RAG1* (a) 和 *IgM* (b) 基因部分序列及引物设计示意图

Fig.2 General view of the sequences of *RAG1* (a) and *IgM* (b) and primers' position

2.2 绝对定量 PCR 反应体系的优化

以5个拷贝数梯度的标准质粒为模板,通过实时定量PCR扩增,系统自动生成的熔解曲线均为单特异峰,*RAG1*和*IgM*熔解温度分别为87.05℃(图3-a)和81.38℃(图3-b),说明无引物二聚体及非特异性扩增产物,可用于相应的定量反应。体系优化结果显示,*RAG1*体系中添加0.4和0.8 μL引物所得到的标准曲线回归方程分别为 $y = -2.896x + 37.50$ (图4-a)和 $y = -3.251x + 39.57$ (图4-b),*IgM*体系中添加0.4 μL和0.8 μL引物所得到的标准曲线回归方程分别为

$y = -2.767x + 40.02$ (图4-c)和 $y = -3.037x + 34.62$ (图4-d),cDNA模板量相同的体系中引物的添加量与所得标准曲线回归方程的斜率成反比(图4)。为使扩增效率E更接近于1,本实验中,*RAG1*和*IgM*均选择引物添加量为0.8 μL。

2.3 绝对和相对定量对比检测太平洋鳕 *RAG1* 和 *IgM* 基因在不同组织中的表达

太平洋鳕 *RAG1* 和 *IgM* 绝对定量标准曲线回归方程和回归系数分别为 $y = -3.266x + 33.77$, $R^2 = 0.996$ (图5-a); $y = -3.119x + 27.61$, $R^2 = 0.998$ (图5-b)。

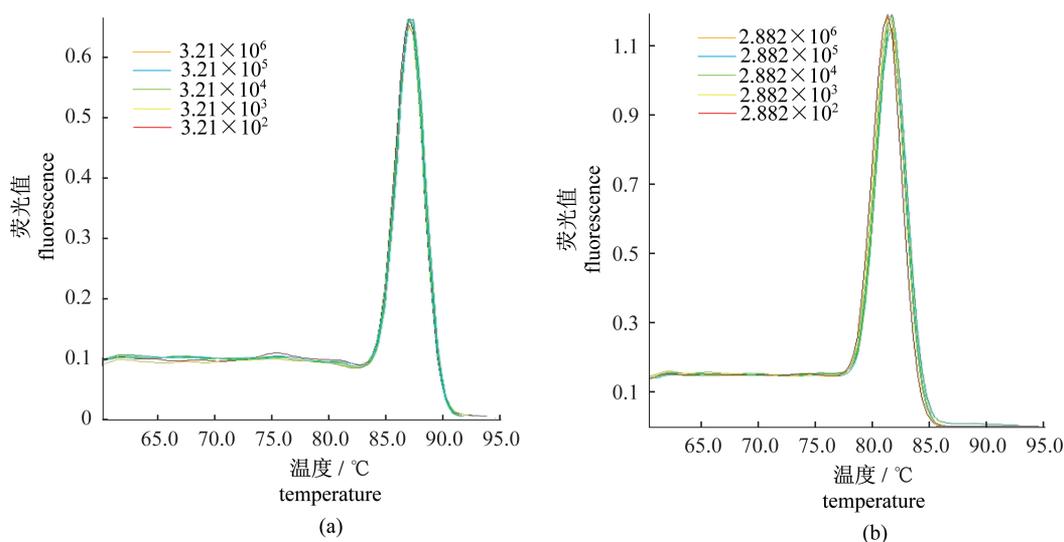


图3 *RAG1* (a) 和 *IgM* (b) 基因熔解曲线

Fig.3 Melt curve of *RAG1* (a) and *IgM* (b)

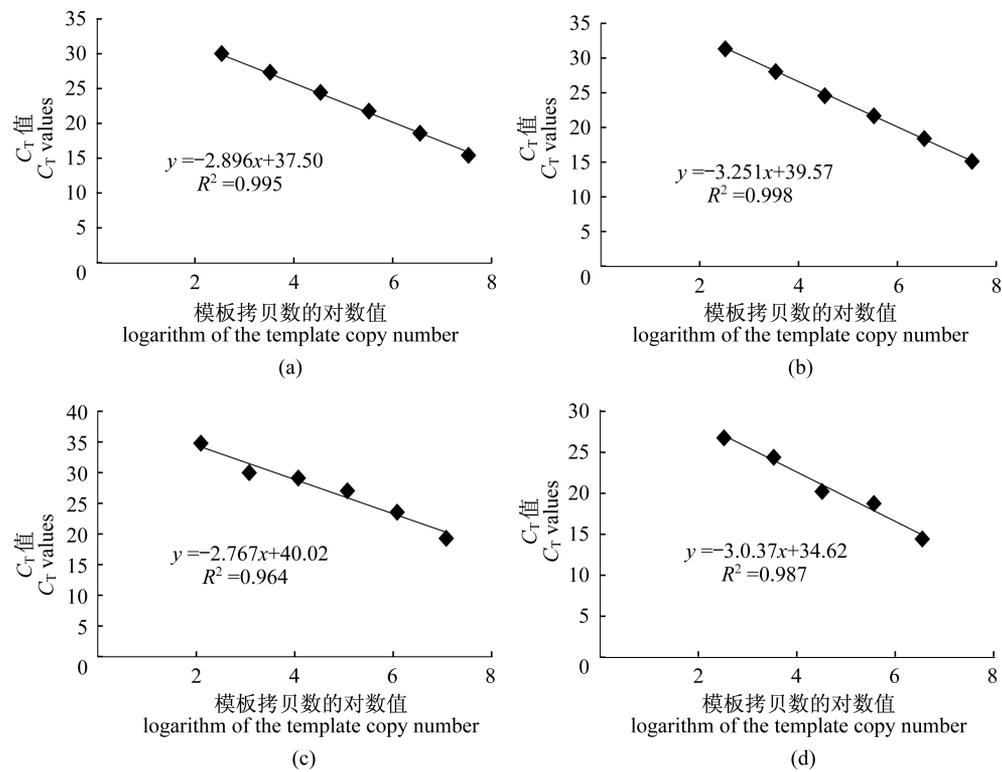
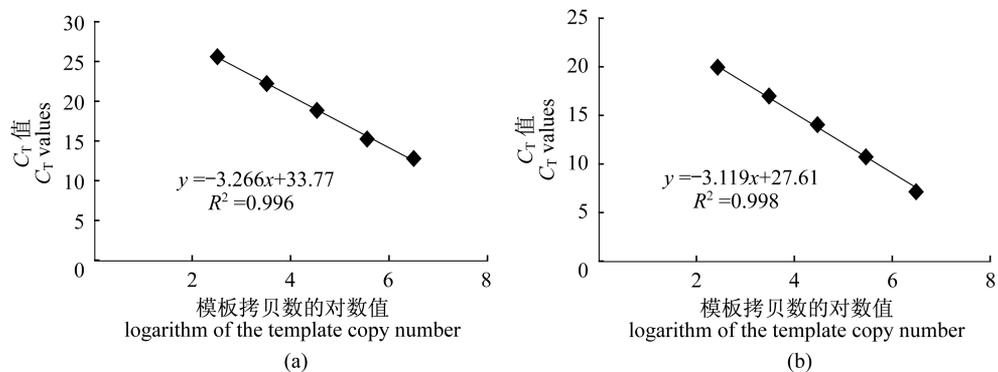


图 4 反应体系中引物添加量的选择

(a) *qRAG1* 0.4 μL ; (b) *qRAG1* 0.8 μL ; (c) *qIgM* 0.4 μL ; (d) *qIgM* 0.8 μL

Fig. 4 Optimization of primer concentration in the reaction system

(a) *qRAG1* 0.4 μL ; (b) *qRAG1* 0.8 μL ; (c) *qIgM* 0.4 μL ; (d) *qIgM* 0.8 μL 图 5 太平洋鳕 *RAG1* (a) 和 *IgM* (b) 基因绝对荧光定量 PCR 标准曲线Fig. 5 Standard curve of the absolute qPCR of *RAG1* (a) and *IgM* (b)

绝对和相对定量检测 *RAG1* 基因在不同组织中的表达结果显示,绝对定量检测到 *RAG1* 在胸腺及头肾中有表达,胸腺中每 100 ng RNA 中拷贝数为 $(41\ 908.35 \pm 11\ 290.84)$,头肾中每 100 ng RNA 中拷贝数为 $(1\ 419.29 \pm 384.31)$ 。在胸腺中的表达量显著高于头肾中的表达量 ($P < 0.05$),但未检测到肝脏和脾脏的表达(图 6-a)。

相对定量时胸腺在图中作为 1 倍的标志样品,检测到胸腺的表达量是头肾的 3.83 倍。胸腺的表达量显著高于头肾中的表达量 ($P < 0.05$),但仍未检测到肝脏和脾脏的表达(图 6-b)。绝对定量得到的 *RAG1* 在胸腺中的表达量是在头肾中表达量的 29.53 倍,高于相对定量的 3.83 倍。

绝对和相对定量检测 *IgM* 基因在不同组织中

的表达结果显示,绝对定量检测到 *IgM* 在胸腺、头肾、肝脏和脾脏中均有表达,且脾脏中的表达量最高,显著高于其余组织 ($P < 0.05$),其次是头肾。每 100 ng RNA 组织中脾脏拷贝数为 $(37\ 397.98 \pm 7\ 482.38)$,头肾拷贝数为 $(22\ 105.61 \pm 11\ 222.01)$,胸腺与肝脏表达量相对较低,拷贝数分别为 $(3\ 362.58 \pm 59.72)$ 和 $(3\ 648.25 \pm 32.56)$ (图 7-a);

相对定量也均检测到 *IgM* 在胸腺、头肾、肝脏和脾脏有表达,头肾、肝脏和脾脏表达量依次是胸腺表达量的 3.15、0.60 及 5.06 倍,但各组织之间的表达无显著性差异 ($P > 0.05$) (图 7-b)。绝对定量测得的脾脏、头肾和肝脏之间有显著性差异 ($P < 0.05$)。

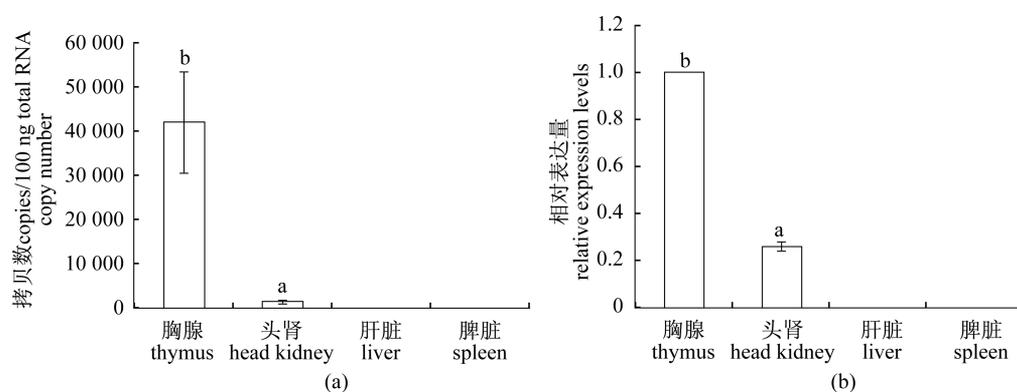


图 6 绝对 (a) 与相对 (b) 定量检测 *RAG1* 在太平洋鲷不同组织中的表达

竖线表示标准差,不同上标字母表示存在差异显著 ($P < 0.05$),下同

Fig. 6 Expression of *RAG1* in different tissues of Pacific cod using absolute (a) and relative (b) qPCR

Bars indicate SD. The difference letters mean significant differences ($P < 0.05$). The same as the following

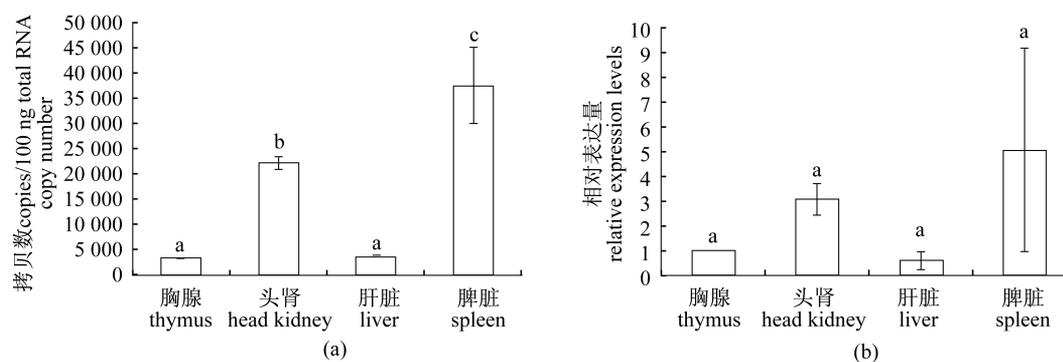


图 7 绝对 (a) 与相对 (b) 定量检测 *IgM* 在太平洋鲷不同组织中的表达

Fig. 7 Expression of *IgM* in different tissues of Pacific cod using absolute (a) and relative (b) qPCR

2.4 绝对定量 PCR 检测 *RAG1* 和 *IgM* 在太平洋鲷早期发育阶段的表达

RAG1 和 *IgM* 基因在早期发育阶段的表达结果显示,两者的表达量均很低,随着鱼体的发育,表达量略有增加,*RAG1* 在 61 dph 至 95 dph 表达量较之前各时期有显著提高 ($P < 0.05$) (图 8-a); 而 *IgM* 在 1 dph 至 61 dph 表达量略有提高,在 95 dph 时表达量显著高于之前各时期 ($P < 0.05$) (图 8-b)。

3 讨论

迄今为止,在分子生物学研究中,实时定量 PCR 方法主要分为绝对定量和相对定量。在相对定量方法中,管家基因通常被用作参考基因定量目标基因表达的相对丰度,因为该基因被假定在不同的组织或发育时期可以平稳地表达^[17];同时由于管家基因的加入,在体系中要同时考虑到管家基因和目标基因两者的扩增效率相接近时才可靠,但在实际上也难以达到^[18],为此进行的大量引物筛选也造成了实验的繁琐。

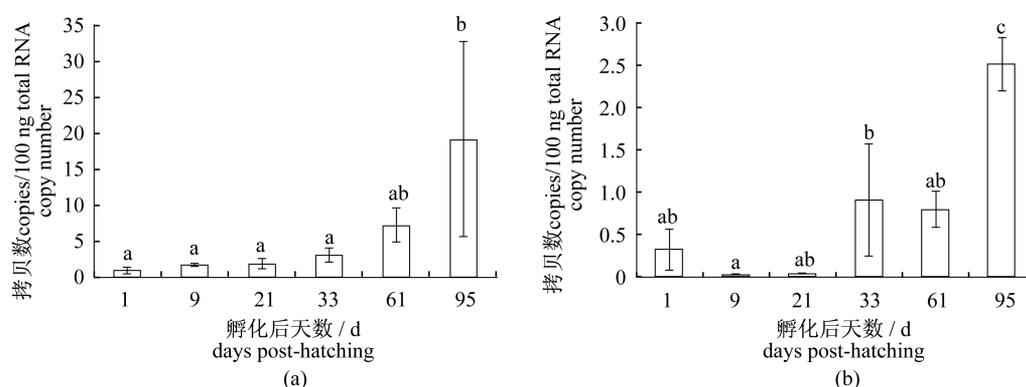


图 8 绝对定量检测 *RAG1* (a) 和 *IgM* (b) 在太平洋鳕早期发育阶段的表达

Fig. 8 *RAG1* (a) and *IgM* (b) expression during early developmental stages of Pacific cod using absolute qPCR

为阐明目标基因的表达情况,本实验建立了绝对定量方法以更精确地探索目标基因的表达情况。该方法无需管家基因的加入,而是用含有目标基因片段的重组质粒为标准品制作标准曲线;标准质粒和待测样品在相同体系、相同条件下同时进行反应,因此待测样品和标准曲线之间不会产生扩增效率的差异;另外,实验中为统一不同待测样品的量,以各样品 100 ng RNA 反转录获得的 cDNA 为模板;参照标准曲线回归方程,根据具有正常熔解曲线待测样品的 C_T 值计算出目标基因的精确表达量,即每 100 ng RNA 中基因的拷贝数^[19-20]。在本实验中,为了使结果更加精准,在体系建立与优化中尽量使体系获得的标准曲线的斜率接近 -3.322,即扩增效率接近 1^[21]。

为验证所建立的绝对定量方法,以及目标基因 *RAG1* 和 *IgM* 在太平洋鳕不同组织中的表达情况,分别采用了相对定量法和绝对定量法进行比较。*RAG1* 组织差异表达结果表明,无论绝对定量还是相对定量方法均显示该基因在胸腺和头肾 2 种组织中表达,且在胸腺中的表达量要显著高于在头肾中的表达量 ($P < 0.05$);这与运用相对定量方法得到的赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*) *RAG1* 组织差异表达的结果相一致^[22];而运用相对定量方法对红鲷 (*Pagrosomus major*) *RAG1* 的研究显示,*RAG1* 除在红鲷的胸腺和头肾中表达外,在其他组织中也发现有少量的表达^[23]。*IgM* 组织差异表达结果表明,两种定量方法均显示该基因在胸腺、头肾、肝脏和脾脏中有表达,在脾脏中的表达量最高;这一结果与运用相对定量方法得到的赤点石斑鱼 *IgM* 组织差异表达结果相一致^[22];而利用相对定量方法得到的草鱼

(*Ctenopharyngodon idellus*) *IgM* 在头肾中表达量最高,其次是脾脏^[24]。本研究在对比绝对和相对定量 2 种方法获得的结果时发现,绝对定量得到的 *RAG1* 在胸腺中与头肾表达量比值高于相对定量;同样,比较 2 种方法得到的 *IgM* 组织差异表达结果也明显可见类似的规律;并且相对定量得到的 *IgM* 在各组织中的表达量差异不显著 ($P > 0.05$),但绝对定量测得的头肾和脾脏之间有显著性差异 ($P < 0.05$)。因此,相对定量作为一种检验目标基因在不同样品中表达量的方法,不能有效获得准确的结果。由于绝对定量方法以目标基因片段本身作为标准品,通过计算将定量结果精确为拷贝数,因此,其结果更加准确、可信,更有助于相关目的基因的深入研究。

将建立的绝对荧光定量 PCR 方法应用于检测 *RAG1* 和 *IgM* 基因在太平洋鳕早期发育的不同阶段中的表达量。结果表明,太平洋鳕在早期发育阶段,其特异性免疫系统发育缓慢,无论是 *RAG1* 或是 *IgM* 基因,其表达量均在 33 dph 到 61 dph 时才有略微升高,到 61 dph 至 90 dph 表达量才显著提高 ($P < 0.05$),说明此时其特异性免疫系统可能处于快速发育期,并可以发挥一定免疫作用。这一结果较赤点石斑鱼^[18]和大鳍鲮 (*Mystus macropterus*)^[25]的特异免疫系统发育过程更慢。这可能是由于太平洋鳕为底层冷水性鱼类,长期处于低温环境,病毒或病菌暴发的可能较低,所以在长期进化过程中外部病原胁迫性最终导致其特异免疫系统发育较为缓慢。结合太平洋鳕人工繁育中早期仔稚鱼大量死亡的现象,推断其原因为鱼苗受到细菌或病毒的感染,同时免疫系统尚不健全导致病发死亡。据此可以初步判断

太平洋鳕 90 dph 以内为免疫力低下的易感和死亡危险时期。

RAG1 已在多种鱼类中被测序, 由于其功能的特异性, *RAG1* 可以作为研究鱼类免疫系统形成的重要分子标记^[26]。根据基因序列对比发现, 大部分鱼类的 *RAG1* 核心区域序列十分保守, 同源性极高, 因此, 本实验建立的 *RAG1* 绝对荧光定量 PCR 方法, 包括标准品质粒和引物有望应用到其他鱼类 *RAG1* 基因表达情况的检验, 对研究鱼类发育早期免疫系统的形成机制、幼鱼发育早期免疫力的高低具有重要的应用价值。免疫球蛋白在特异性免疫系统中发挥重要的作用, 而重组激活基因所编码的重组酶是免疫球蛋白基因片段重排所必需的。本实验建立一种精准可靠的荧光定量 PCR 方法, 以此检验 *RAG1* 和 *IgM* 基因在太平洋鳕中的表达情况, 结果可为太平洋鳕免疫系统的深入研究提供依据。

参考文献:

- [1] Gong Y W. Progress of recombination activating gene[J]. International Journal of Immunology, 2003, 26(5):236 - 239. [公衍文. 重组激活基因研究进展. 国外医学免疫学分册, 2003, 26 (5): 236 - 239.]
- [2] Catherine E, Willett J, Cherry A, et al. Characterization and expression of the recombination activating genes (*rag1* and *rag2*) of zebrafish [J]. Immunogenetics, 1997, 45(6):394 - 404.
- [3] Patricia G, Lisa A S. Recombination activating gene 1 (*Rag1*) in zebrafish and shark [J]. Immunogenetics, 1995, 41(1):54 - 55.
- [4] John D H, Stephen L K. The recombination activating gene 1 (*RAG1*) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Cloning, expression and phylogenetic analysis [J]. Immunogenetics, 1995, 42(3):188 - 195.
- [5] John D H, Stephen L K. The recombination activating gene 2 (*RAG2*) of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. Immunogenetics, 1996, 44(3):203 - 211.
- [6] 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.]
- [7] Lü A J, Hu X C, Zhang Y H, et al. Several new immunoglobulins in fish [J]. Fisheries Science, 2011, 30(7):425 - 428. [吕爱军, 胡秀彩, 张艳华, 等. 鱼类中新发现的免疫球蛋白. 水产科学, 2011, 30(7):425 - 428.]
- [8] Zhang L Y, Zhao M. Recent advances on immunoglobulin in fish [J]. Fisheries Science, 2009, 28(11):701 - 705. [张立颖, 赵萌. 鱼类免疫球蛋白的研究进展. 水产科学, 2009, 28 (11): 701 - 705.]
- [9] Yang G W, Xing W X, Wang C F, et al. Progress in molecular biology of fish immunoglobulins [J]. Journal of Shandong Normal University, 2000, 15(3):297 - 300. [杨桂文, 邢维贤, 王长法, 等. 鱼类免疫球蛋白的分子生物学研究进展. 山东师范大学学报, 2000, 15(3):297 - 300.]
- [10] Magadán-Mompó S, Sánchez-Espinel C, Gambón-Deza F. Immunoglobulin heavy chains in medaka (*Oryzias latipes*) [J]. BMC Evolutionary Biology, 2011, 11(10):165.
- [11] Jiang Z Q, Zhang Z M, Zhao C, et al. The gonad development and nutrition source of Pacific cod *Gadus macrocephalus* [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2012, 27(4):315 - 320. [姜志强, 张志明, 赵翀, 等. 太平洋鳕性腺发育及营养来源的初步研究. 大连海洋大学学报, 2012, 27 (4): 315 - 320.]
- [12] Wang W, Jiang Z Q, Meng F P, et al. The effects of sharply changes in temperature on survival and indices of physiology and biochemistry in pacific cod *Gadus macrocephalus* [J]. Fisheries Science, 2012, 31(8):463 - 466. [王伟, 姜志强, 孟凡平, 等. 急性温度胁迫对太平洋鳕仔稚鱼成活率、生理生化指标的影响. 水产科学, 2012, 31(8):463 - 466.]
- [13] Li Y Q, Jang Z Q, Sun Y, et al. Experimental starvation on *Gadus macrocephalus* and definition of the point of no return [J]. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(14):3873 - 3878. [李艳秋, 姜志强, 孙阳, 等. 太平洋鳕仔鱼饥饿实验及不可逆生长点的确定. 生态学报, 2014, 34(14):3873 - 3878.]
- [14] Li L, Zhao C P, Li H, et al. Establishment of the plasmid standard curve generation method for absolute quantification PCR [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2011, 19(6):1157 - 1162. [李丽, 赵成萍, 李宏, 等. 质粒制备绝对定量 PCR 标准曲线方法的建立. 农业生物技术学报, 2011, 19(6):1157 - 1162.]
- [15] Li H F, Li L, Zhang L J, et al. Standard curve

- generation of Pep T1 gene for absolute quantification using real-time PCR [J]. Journal of Shanxi Agricultural University, 2010, 30(4) : 332 - 335. [李慧锋, 李丽, 张丽娟, 等. Pep T1 基因绝对荧光定量 PCR 标准曲线的建立. 山西农业大学学报, 2010, 30(4) : 332 - 335.]
- [16] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4) : 402 - 408.
- [17] Melony J S, Tony V, Lisa A L, et al. Real-time RT-PCR quantification of Kuruma shrimp transcripts: A comparison of relative and absolute quantification procedures [J]. Journal of Biotechnology, 2007, 129(3) : 391 - 399.
- [18] Greer S, Honeywell R, Geletu M, et al. Housekeeping genes; expression levels may change with density of cultured cells [J]. Journal of Immunological Methods, 2010, 355(1-2) : 76 - 79.
- [19] Wei M L, Liu C, Liang H L, et al. Establishment of real-time PCR for IgM mRNA in Crucian carp [J]. Guangdong Agricultural Science, 2010, 37(6) : 185 - 202. [韦木莲, 刘春, 梁慧丽, 等. 实时荧光定量 PCR 检测鲫鱼 IgM mRNA 方法的建立. 广东农业科学, 2010, (6) : 185 - 202.]
- [20] Zhang X M, Zhou B, He D N, et al. Establishment and application of the SYBR Green I real-time PCR assay for detection of porcine antiviral protein Mx1 gene [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2013, 36(1) : 92 - 96. [张小敏, 周斌, 何丹妮, 等. 实时荧光定量 PCR 检测猪源 Mx1 方法的建立及应用. 南京农业大学学报, 2013, 36(1) : 92 - 96.]
- [21] Xiang L, Jiang Y J, Liu W, et al. Real-time RT PCR with DNA subtraction for relative quantification of gene expression in *Staphylococcus aureus* [J]. Acta Microbiol Sin, 2008, 48(4) : 526 - 531. [相丽, 姜毓君, 刘伟, 等. 金黄色葡萄球菌基因表达的 DNA 扣除法 Real-time RT PCR 相对定量分析. 微生物学报, 2008, 48(4) : 526 - 531.]
- [22] Mao M G, Lei J L, Alex P M, et al. Characterization of RAG1 and IgM (mu chain) marking development of the immune system in red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 33(4) : 725 - 735.
- [23] Zhang X L, Lu Y S, Jian J C, et al. Cloning and expression analysis of recombination activating genes (RAG1/2) in red snapper (*Lutjanus sanguineus*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 32(4) : 534 - 543.
- [24] Wang X X, Sun B J, Chang M X, et al. The sequence and expression of the immunoglobulin M heavy chain cDNA of *Ctenopharyngodon idellus* [J]. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(1) : 13 - 19. [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. 水产学报, 2008, 32(1) : 13 - 19.]
- [25] Li C T, Zhang Q Z, Yang Y Y, et al. Molecular cloning and expression analysis of the IgM heavy chain gene in largefin longbarbel catfish (*Mystus macropterus*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(11) : 1684 - 1692. [李春涛, 张其中, 杨莹莹, 等. 大鳍鲮免疫球蛋白 M 重链基因的克隆及表达分析. 水产学报, 2011, 35(11) : 1684 - 1692.]
- [26] David G S. Transposition mediated by RAG1 and RAG2 and the evolution of the adaptive immune system [J]. Immunologic Research, 1999, 19(2-3) : 168 - 182.

***RAG1* and *IgM* detection in Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) using real-time PCR**

LI Xing, WEN Shihui, MAO Mingguang, JIANG Zhiqiang*, JIANG Jielan

(Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China's Sea,
Ministry of Agriculture, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

Abstract: To study the mechanisms of immune system formation at the early developmental stages of the Pacific cod, *Gadus macrocephalus*, transcriptional levels of *RAG1* and *IgM* were measured to characterize the immune system development. According to the sequences of *RAG1* and *IgM* in GenBank, pairs of specific primers were designed separately to amplify both genes from the head kidney of Pacific cod. Then the fragments of *RAG1* and *IgM* genes were inserted into pMD18-T cloning vector to construct the standard plasmids of *RAG1* and *IgM* genes. Both absolute (A-qPCR) and relative quantification PCR (R-qPCR) were established and optimized. The results showed that a linear regression equation of *RAG1* is $y = -3.2662x + 33.772$, and the regression coefficient (R^2) of the standard curve is 0.9961; a linear regression equation of *IgM* is $y = -3.1197x + 27.612$, and the regression coefficient (R^2) of the standard curve is 0.9981. The results of A-qPCR and R-qPCR revealed a consistent trend in gene transcription. The *RAG1* was only detected in the thymus and head kidney, and the expression level in thymus was higher than that in the head kidney. The *IgM* was detected in the thymus, kidney, liver and spleen, mainly in the spleen and head-kidney. The expression level of *RAG1* did not increase until 61 to 95 days post-hatching (dph), while the expression level of *IgM* started to increase from 33 to 65 dph and significantly increased on 95 dph. Further analysis showed that the method of A-qPCR is reliable and specific to analyze the expression of target genes.

Key words: *Gadus macrocephalus*; *RAG1*; *IgM*; absolute quantification PCR

Corresponding author: JIANG Zhiqiang. E-mail: zhqjiang@dlou.edu.cn