

大鳍鲩免疫球蛋白轻链 3 型基因 cDNA 的克隆及表达

蒋自立^{1,2}, 李春涛², 张其中^{3*}, 陈霞², 李超², 杨莹莹²

(1. 遵义师范学院, 贵州 遵义 563000; 2. 西南大学生命科学学院, 淡水生物生殖与发育教育部重点实验室, 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715; 3. 暨南大学水生生物研究所, 广东 广州 510632)

摘要: 应用同源克隆和 RACE-PCR 方法获得大鳍鲩免疫球蛋白轻链 3 型(IgL3)基因的全长 cDNA 序列, 并分析了该基因在组织中的表达。大鳍鲩 IgL3 的 cDNA 全长为 947 bp, 包含 5'非编码区 58 bp, 3'非编码区 184 bp, 开放阅读框 705 bp, 编码 234 个氨基酸。推测的蛋白质序列分为可变区(VL)和恒定区(CL)。VL 被进一步划分为 4 个骨架区(FR)和 3 个互补决定区(CDR)。大鳍鲩与其它 6 种硬骨鱼类免疫球蛋白轻链 L3 氨基酸序列比对分析表明, 大鳍鲩氨基酸序列与斑点叉尾鲩 IgL3 型(F 型)的相似性最高, 为 68.8%, 与南极鱼 IgL3 型的相似性最低, 为 47.2%。进化树分析表明, 大鳍鲩 IgL 与斑点叉尾鲩 IgL3 型(F 型)聚为一支并与其它硬骨鱼类 IgL3 型聚为一簇, 明显与 L1 和 L2 进化支不同。实时荧光定量 PCR 显示, 大鳍鲩 IgL3 基因主要在头肾、脾脏和血细胞中转录表达; 注射嗜水气单胞菌后, 头肾、脾脏和血细胞 IgL3 基因转录表达量有显著上升。研究表明, 头肾、脾脏和血液是大鳍鲩 IgL3 型基因主要的表达器官, 在免疫反应中起重要作用。

关键词: 大鳍鲩; 免疫球蛋白轻链 3 型基因; 克隆; 实时荧光定量 PCR; 表达

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(IgH)和轻链(IgL)通过链内和链间二硫键连接组成^[1]。哺乳类有 κ 和 λ 两种轻链类型^[2], 爬行类有 ρ 、 σ 和 τ , 两栖类有 κ 、 λ 和 σ ^[3] 3 种轻链类型, 鸟类仅仅一种轻链类型^[4], 而在硬骨鱼类, 发现有 L1、L2 和 L3 等 3 种轻链类型^[5]。由于脊椎动物免疫球蛋白轻链存在明显差异, 研究人员一直在努力寻找脊椎动物免疫球蛋白轻链亚型之间的联系, 但至今无统一的分类标准。

目前, 已有许多硬骨鱼类的轻链基因被鉴定和识别, 但所有的硬骨鱼类是否含有相同的轻链类型仍不清楚^[5]。另一方面, 免疫球蛋白轻链的主要功能通常是在免疫应答中提供抗原结合位点^[6], 但

证据仍然有限。

为了更加深入地了解免疫球蛋白分子结构和脊椎动物之间的进化关系, 目前已开展很多脊椎动物免疫球蛋白轻链基因序列测定及其表达研究, 除模式鱼类斑马鱼(*Danio rerio*)^[7]外, 多种重要经济性鱼类 IgL3 型轻链基因被克隆鉴定, 如花狼鱼(*Anarhicas minor*)^[8]、斑点叉尾鲩(*Ictalurus punctatus*)^[9]、大西洋鲑(*Salmo salar*)^[10]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[11]、鲤(*Cyprinus carpio*)^[12]和南极鱼(*Trematomus bernacchii*)^[5]等。

大鳍鲩(*Mystus macropterus* Bleeker)属于鲇形目(Siluriformes), 鲿科(Bagruidae), 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。大鳍鲩味道鲜美, 无肌间刺, 有重要的经济价值。本研究克隆了大鳍鲩免疫球蛋白轻链 L3 基因 cDNA 全长, 应用实时荧光定量 PCR 分析了该基

收稿日期: 2011-12-13 修回日期: 2012-03-07
资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划(2011AA10A216)
通讯作者: 张其中, E-mail: qizhong676@163.com

因在不同组织中的表达, 以期为大鳍鲩免疫球蛋白的结构和功能以及免疫抗感染机制的研究奠定分子基础, 同时为硬骨鱼类轻链的研究提供更多的数据和资料。

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±7.3) g, 均来自重庆市北碚, 饲养在室内水族箱中, 每天投喂水蚯蚓饵料, 并通气换水, 水温控制在 (18±1) °C。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, Ah)来自本实验室-80 °C低温保存菌种, 培养和浓度测定参考文献[13]的方法。嗜水气单胞菌用 0.65%生理盐水稀释, 调整浓度到 1×10⁵ CFU/mL, 4 °C临时保存备用。感受态大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5a 由本实验室低温保存。

样品采集 实验鱼室内适应喂养 1 周。

(1) 选 3 尾健康的大鳍鲩, 每尾鱼腹腔注射 0.2 mL, 1×10⁵ 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 (二次细菌刺激处理, 可以有效提高免疫球蛋白基因转录丰度)。

(2) 选 3 尾健康的大鳍鲩, 分别取其头肾、脾脏、血细胞、肠、鳃、肝脏、皮肤、肌肉、脑和心脏, 液氮冻存, 用于组织分布试验。

(3) 选数 10 尾健康的大鳍鲩, 每尾鱼腹腔注射 0.2 mL, 1×10⁵ CFU/mL 嗜水气单胞菌+0.65%生理盐水。在注射时、注射后 5、10、15、20 和 30 d 共 6 个时间点取大鳍鲩头肾、脾脏和血细胞。每组取 5 个样品, 液氮冻存, 用于研究其 IgL3 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 从上述采集的样品中按 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 μg) 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 IgL3 cDNA 保守区设计简并引物 IgL3-F214 和 IgL3-R552 (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。

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 CDSIII 接头。Up 及 Nup 和 IgL3-R87 引物用于扩增 5'端; CDSIII 引物和 IgL3-F171 及 IgL3-F143 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

表 1 本研究中使用的引物
Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 primer	引物序列(5'-3') primer sequence	用途 usage
IgL3-F214	TGGCGAAGCTCCTAAACTCCT	扩增中间片段
IgL3-R552	TCGTCTACTGTCCAGCTCACC	扩增中间片段
IgL3-F171	CTTTCGGTGGAGGAACAAACTCATC	3'RACE
IgL3-F143	TGTCAGCAGAGTGAGAGCCTTCCGTT	3'RACE
IgL3-R87	GTACCAGATCCACTGCCACTGAAAC	5'RACE
CDS III	ATTCTAGAGGCCGAGGCCGACATG-D(T)30N-1N	3'RACE
SMART IV	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCGGG	5'RACE
Up	CTAATACGACTCACTATAGGGC	5'RACE
Nup	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	5'RACE
UTR-F	GCTCAGCAACTTCAACCCACAGC	全长 cDNA
UTR-R	AAGACTGAGCCGCTTACAC	全长 cDNA
IgL3-F628	CAGCAGAGTGAGAGCCTTCCG	real-time PCR
IgL3-R813	TTGTAGATGGATGTGTAAGCGGC	real-time PCR
β -actin F	GAGCACCCAGTCCTTCTTAC	内参基因引物
β -actin R	TGCCCATCTCCTGCTCAAAGT	内参基因引物

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 IgL cDNA 和蛋白质序列。通过 DNASTar 软件找到大鳍鱠 IgL3 cDNA 开放阅读框, 并推导出其氨基酸序列, 然后应用 DNATool 6.0 进行序列分析。再利用 ClustalX 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 提取各组织总 RNA, RNA 样品用 gDNA Erasers 试剂, 42 °C, 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 PrimeScript RT Kit 试剂盒(TaKaRa)进行反转录, 20 µL 反转录体系, 条件为 37 °C 15 min, 85 °C 5 s, 4 °C。根据大鳍鱠 IgL3 cDNA 保守序列设计正向 F628 和反向 R813 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 °C 30 s; 95 °C 5 s 60 °C 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 IgL3 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 (MJ Research) 进行分析。每个组织中 IgL3 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 大鳍鱠 IgL3 基因 cDNA 序列

大鳍鱠 IgL3 基因 全长 cDNA (GenBank 登录号: JQ082336) 由 947 bp 组成, 其编码区有 705 bp, 编码 234 个氨基酸。在起始密码子 ATG 的上游有 58 bp 非编码区, 终止密码子 ATT 下游有包含 poly A 在内的 184 bp 非编码区序列。Poly A 上游 11 bp 处是 PolyA 终止信号 AATAAA(图 1)。

2.2 大鳍鱠 IgL3 氨基酸序列分析

大鳍鱠 IgL3 蛋白质序列含有 234 个氨基酸, 由前导链(Leader)、可变区(VL)、恒定区(CL)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; 在骨架区和恒定区内, 共出现 3 个半光氨酸保守位点(图 2)。通

```

GGCCATTACGGCCGGGGGACTGAGAGCTGCTGCTCAGCAACTTCACCCACAGCAACCAATGACTTTGATCAGC 73
                                                                M T L I S
GTCTTCATCTGCACACTGGCCCTCTGGACTCAAGGATCCAGAGGTCAGGTGACTGTGACTCAGACTCCTTCAGTG 148
V F I C T T L A L W T Q G S R G Q V T V T Q T P S V 30
CAAACATTGCTCCAGGAACACCGTCACCATCACTGTAGAACCCAGTACCAGAGTGTATGGTGGTAATATCTA 223
Q T I A P G N T V T I N C R T S T R V Y G G N Y L 55
CACTGGTACCCGCAGAAACCCGGAGAAGTTCCTAAACTCCTGATCTACTATGCTACTAAGTACAGTCAGGGACT 298
H W Y P Q K P G E V P K L L I Y Y A T N L Q S G T 80
CCAGCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACACAGTTTAACTTAAATAATCTCTGGATTTCAGGCTGAAGATGCA 373
P A R F S G S G S G T Q F S L K I S G F Q A E D A 105
GGAGATTACTGTGAGCAGAGTGAGAGCCTTCCGTTGACTTTCGGTGGAGGAACCAAATCATCATCACCAGT 448
G D Y Y C Q Q S E S L P L T F G G G T K L I I T G 130
CCCAGGTGAAGCCCTCCGTGCTCTGCTCCCTCCCTCTCTGACGCTGTCTGAGGGATCGGCCTCGCTGCTC 523
P T V K P S V S L L P P S S L Q L S E G S A S L L 155
TGCCTGCTGCTGCTACTCTCCACAGGGGGCGCTGGTACGCTGGACGGTGGACGGCTCGGTGTAAGGACGGC 598
C L L S A Y S P Q G A L V S W T V D G S V V K D G 180
GTCGTGACCCAGCGCGGAAGAACAAGAGGACGGTTACACGTGCAGCAGCACTCTGACCCCTCAGCAAAGCACTC 673
V V T S A E E Q K K D G Y T C S S T L T L S K A L 205
TGGGAACAGGGGGAGGAGTTTGCCTGTAGGGTCTCCACGGGGCGTGGATCATCCGGTACAGTTCAGAGAGAGC 748
W E Q G E E F A C R V S H G G V D H P V T F R E S 230
CAGTGTGATGCTTAAACAGCTCCAAGATAGAATTGAAGACTGAGCCGCTTACACATCCATCAATAAGAGTTTCA 823
Q C D V *
ATICTACACAAGCGTIGACATTTCTGTCTTTACTCTCTTCACTGTCTGTTGCTCTCTCTGTTAGTTTCTGCTGCT 898
GAATAAAAGCTTCATTGGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 947

```

图 1 大鳍鱠 IgL3 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 IgL3 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.

过 DNASTar 中 Megalign 软件分析, 大鳍鲩 IgL3 氨基酸序列与斑点叉尾鲷、鲤、斑马鱼、虹鳟、南极鱼、大西洋鲑相似率依次为 68.8%、62.7%、59.2%、56.2%、49.2%和 47.2%。根据大鳍鲩 IgL3 和其他硬骨鱼类免疫球蛋白轻链氨基酸序列构建的系统发育树显示(图 3), 大鳍鲩与斑点叉尾鲷聚为一支。

2.3 大鳍鲩 IgL3 基因的组织表达

以梯度稀释含有大鳍鲩 β -actin 和目基因的质粒建立标准曲线。把大鳍鲩 IgL3 基因在肝脏中的表达量设定为 1, 其他组织表达量与之进行比较作柱形图。从图 4 可以看出, IgL3 基因在头肾中的表达量最高, 其次脾脏、血细胞、鳃、肠; 然后为肝脏, 而在心脏、皮肤、肌肉和脑表达量很少(图 4)。

2.4 注射嗜水气单胞菌后 IgL3 基因的表达变化

用实时荧光定量 PCR 研究大鳍鲩注射嗜水气单胞菌后 IgL3 基因的表达变化。结果表明, 头肾、脾脏和血细胞 IgL3 基因表达量都随时间而增加(图 5), 但具体表现有显著的不同。头肾 IgL3 基因表达量在注射处理后 5 d 内剧烈上升, 达到刺激前的 15.4 倍; 20 d 达到最高峰, 30 d 时出现轻微的下降。脾脏 IgL3 基因表达量 15 d 内呈线性上升, 上升明

显, 增加到刺激前的 22.9 倍; 15~30 d 表达量有下降的趋势, 但不显著, 仍维持到刺激前 15 倍左右的较高水平。血细胞 IgL3 表达量在 30 d 内一直表现为上升, 到第 30 天达到刺激前的 18.6 倍。

3 讨论

免疫球蛋白重链和轻链都是由 N-端的可变区(V 区)和 C-端的恒定区(C 区)组成, 两者的 V 区都可以进一步划分为 3 个互补决定区(CDR)和 4 个骨架区(FR)。通常, 轻链 C 区只有一个结构域, 而免疫球蛋白 M 重链 C 区有 4 个结构域^[1]。大鳍鲩 IgL3 氨基酸序列中含有 3 个半胱氨酸保守位点, 其中 N-端的两个半胱氨酸形成轻链内二硫键, C-端的半胱氨酸与重链 CH1 的半胱氨酸形成链间二硫键, 对免疫球蛋白二、三级结构域的形成起重要作用^[14]。在大鳍鲩等 7 种硬骨鱼类 Ig L3 和 IgM 重链^[15]的 FR3 区域都发现了 ED-YYCA 保守基序, 推测该区域同样与免疫球蛋白结构域的稳定有关。

到目前为止, 许多硬骨鱼类免疫球蛋白轻链氨基酸序列和 cDNA 序列被发现和认识, 但是有关它们的分类仍然没有完全统一。对硬骨鱼类轻链研究的早期, 学者们往往把它们与哺乳类免疫球

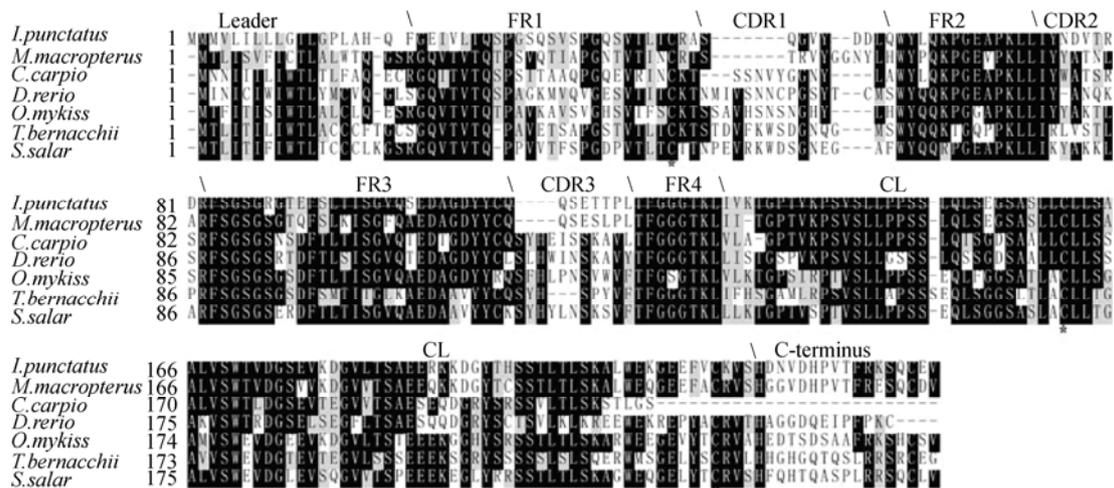


图 2 大鳍鲩与其它硬骨鱼类 IgL3 氨基酸序列比较

用于比较的 IgL3 在 GenBank 中序列号分别为大鳍鲩(*M.macropterus*), JQ082336; 斑点叉尾鲷(*I.punctatus*), AAA82596; 鲤 (*C.carpio*), BAB91007; 斑马鱼(*D.erio*), AAH9329; 虹鳟(*O.mykiss*), ACS94421; 南极鱼(*T.bernacchii*), ABH09119; 大西洋鲑(*S.salar*), ACM09379。保守的半胱氨酸(C)用“*”注明。前导链(Leader)、骨架区(FR)、互补决定区(CDR)、恒定区(CL)和 C 末端用“\”隔开, 根据硬骨鱼类 IgL3 及 IgM 重链氨基酸序列相互比较划分。

Fig. 2 Alignment of IgL3 amino acids between *M. macropterus* and other teleost

The GenBank accession numbers of the sequences are as follows: *M.macropterus*, JQ082336; *I. punctatus*, AAA82596; *C. carpio*, BAB91007; *D.erio*, AAH9329; *O. mykiss*, ACS94421; *T.bernacchii*, ABH09119; *S. salar*, ACM09379. Conserved cysteines are marked with “*”. Leader, frame region(FR), complementary determining region(CDR), constant region(CL) and C-terminus are bordered with “\”. Boundaries between each domain are shown beyond the sequence estimated by analogy of amino acids sequences in IgL3 and IgM heavy chain in teleost.

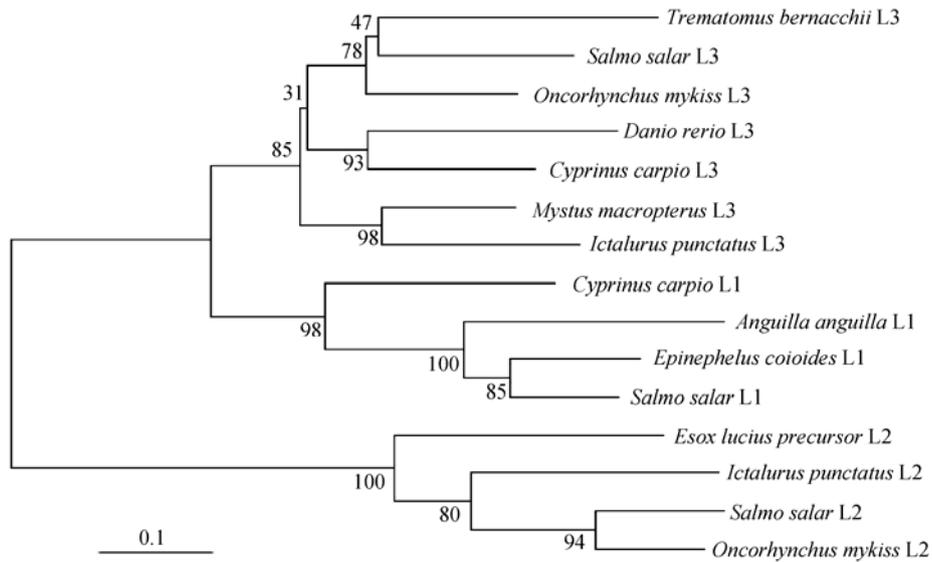


图 3 硬骨鱼类免疫球蛋白轻链系统进化树

系统进化树中各序列在 GenBank 中的登录号分别为 IgL3 大鳍鱬(*M.macropterus*), JQ082336; 斑点叉尾鲷(*I.punctatus*), AAA82596; 斑马鱼(*D.rerio*), AAH9329; 鲤(*C.carpio*), BAB91007; 虹鳟(*O.mykiss*), ACS94421; 南极鱼(*T.bernacchii*), ABH09119; 大西洋鲑(*S.salar*), ACM09379; IgL1 鲤(*C.carpio*), BAB90996; 鳗鲡(*A.anguilla*), ABM74383; 大西洋鲑(*S.salar*), AAG18368; 石斑鱼(*E.coioides*), AAS55942; IgL2 白斑狗鱼(*E.lucius*), ACO14109; 斑点叉尾鲷(*I.punctatus*), ACG70844; 大西洋鲑(*S.salar*), ACI67577; 虹鳟(*O.mykiss*), AAB41313。进化树上的数字为步展值, 是 1000 次重复计算的结果, 代表进化支的可信度。

Fig. 3 Phylogenetic tree of teleostean immunoglobulin

GenBank accession numbers: IgL3 *M.macropterus*, JQ082336; *I.punctatus*, AAA82596; *D.rerio*, AAH9329; *C.carpio*, BAB91007; *O.mykiss*, ACS94421; *T.bernacchii*, ABH09119; *S.salar*, ACM09379; IgL1 *C.carpio*, BAB90996; *A.anguilla*, ABM74383; *S.salar*, AAG18368; *E.coioides*, AAS55942; IgL2 *E.lucius*, ACO14109; *I.punctatus*, ACG70844; *S.salar*, ACI67577; *O.mykiss*, AAB41313; 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 1000 trials, indicating the credibility of each branch.

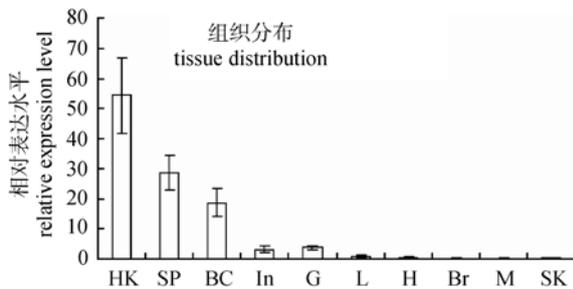


图 4 大鳍鱬 IgL3 基因在各组织中的转录表达比较 比较的组织分别是头肾(HK)、脾脏(SP)、血细胞(BC)、肠(In)、鳃(G)、肝脏(L)、心脏(H)、脑(Br)、皮肤(SK)和肌肉(M)。

Fig. 4 The expression of IgL3 gene in different tissues The compared tissues are as follows: head kidney (HK), spleen (SP), blood cells (BC), intestine (In), gill (G), liver (L), heart (H), brain (Br), skin (SK) and muscle (M).

蛋白轻链的 κ 和 λ 型进行比较, 后来发现无论硬骨鱼类的轻链都不能明确划归为 κ 和 λ 型, 而在 κ 和 λ 之外形成单独的分支^[10]。Ghaffari 等^[16]把在斑点叉尾鲷发现的两种免疫球蛋白轻链命名为 F 和 G 型。随着硬骨鱼类免疫球蛋白轻链基因和氨基酸序列数据的不断积累, 它们可以被划分为 3 个类型, 即 L1、L2 和 L3, L1 可以进一步分为 a 和 b 型^[5]。

这种划分得到了很多鱼类免疫学工作者的认可。本研究获得的大鳍鱬免疫球蛋白轻链, 根据该鱼与其他几种硬骨鱼类轻链氨基酸序列比对以及其他硬骨鱼类免疫球蛋白轻链系统进化树表明, 属于 Ig L3 型。

最近研究认为, 有颌类脊椎动物 IgL 可分为 4 个家族, 即 σ 、 σ -cart、 κ 和 λ 型^[17-18], 软骨鱼类具有全部 4 种类型 IgL, 硬骨鱼类的 IgL1、IgL2 和 IgL3 分别属于 σ (L2)和 κ (L1 和 L3)。这种脊椎动物免疫球蛋白分类方式的主要依据是 J 链的相似程度, 但是这种分类方法还需要更多的证据支持。

通常认为免疫球蛋白轻链的功能是提供抗原结合位点^[6]。本研究对几种硬骨鱼类轻链的比较也发现 V 区的 CDR 氨基酸变化很大, 这与重链 CDR 氨基酸变化程度相似。两条链上的 CDR 氨基酸的变化是形成抗体多样性的重要原因之一。轻链的另外一个功能是有助于 B 细胞受体和抗体的表达。研究表明, 如果轻链基因座重排失败, 重链也无法形成。所以轻链基因座重排是形成抗原结合位点多

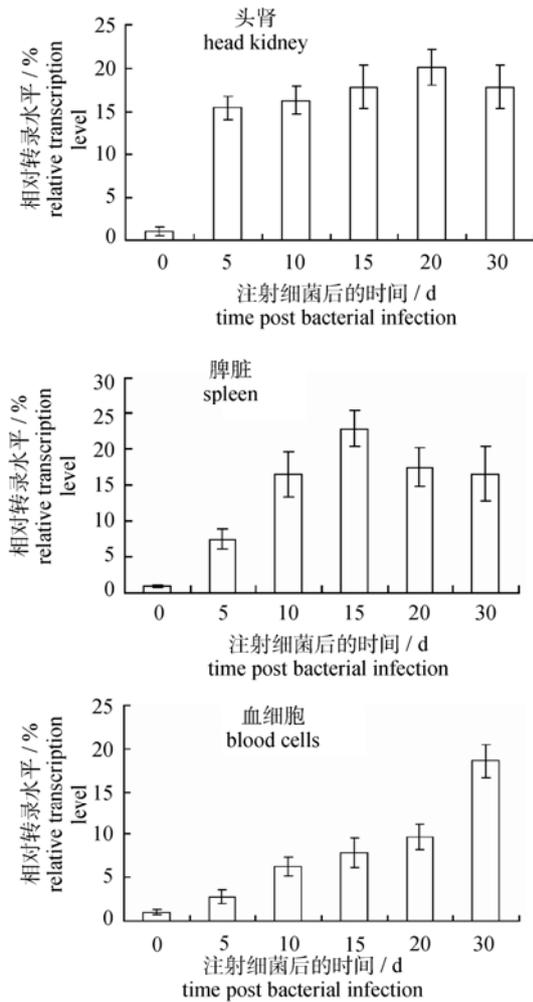


图 5 注射细菌后大鳍鲮头肾、脾脏和血细胞 IgL3 平均转录表达量变化($n=5$)

Fig. 5 Mean fold changes of IgL3 mRNA expression in head kidney, spleen and blood cells of *M. macropterus* at different time points after injection with *A. hydrophila*

样化的重要因素。

头肾和脾脏是鱼类的中枢免疫器官, 相当于哺乳类的骨髓和胸腺, 在适应性免疫中起主要作用^[19], 血液则是免疫的主要介质, 因此, 免疫球蛋白在这些组织中的表达研究有重要意义。本研究发 现 IgL3 基因在大鳍鲮头肾、脾脏和血细胞有很高的表达量。细菌刺激后, IgL3 基因转录水平在这 3 个组织中显著提高。这些结果与大鳍鲮分泌型 IgM(sIgM)重链基因转录表达情况相似^[15]。每个免疫球蛋白单体是由两条重链和轻链组成, 但是硬骨鱼类的重链不止 IgM 一种, 还有 IgD、IgZ、和 IgM/IgZ 嵌合体^[20], 而 IgM 也含有膜型和分泌型等形式。在大鳍鲮的组织中, 不仅有 sIgM 一种重链和 IgL3 一种轻链, 所以, 不能根据轻链的表达量

去推测重链的表达量, 但 IgM 重链是硬骨鱼类的主要表达形式^[20]。本研究中大鳍鲮重链和轻链基因转录表现出相似的情况, 表明大鳍鲮 IgL3 是 sIgM 的主要结合形式。

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] Home W A, Ford J E, Gibson D M. L chain isotype regulation in horse[J]. Journal of Immunology, 1992, 149(12): 3927–36.
- [3] Haire R N, Ota T, Rast J P, *et al.* A third Ig light chain gene isotype in *Xenopus laevis* consists of six distinct VL families and is related to mammalian lambda genes [J]. Journal of Immunology, 1996, 157(4): 1544–1550.
- [4] Bengtén E, Wilson M, Miller N, *et al.* Immunoglobulin isotypes: structure, function, and genetics[J]. Current Topics in Microbiology and Immunology, 2000, 248: 189–219.
- [5] Coscia M R, Stefano G, Concetta D S, *et al.* Immunoglobulin light chain isotypes in the teleost *Trematomus bernacchii*[J]. Molecular Immunology, 2008, 45(11): 3096–3106.
- [6] Pilström L. The mysterious immunoglobulin light chain [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2002, 26(2): 207–215.
- [7] Zimmerman A M, Yeo G, Howe K, *et al.* Immunoglobulin light chain (IgL) genes in zebra fish: genomic configurations and in versional rearrangements between (VL-JL-CL) gene clusters[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2008, 32(4): 421–434.
- [8] Espelid S, Nygaard G R. Immunoglobulin VH families and light chain isotypes in the spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2003, 15(4): 311–323.
- [9] Wilson M R, Marcuz A, Ginkel F V, *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.
- [10] Solem S T, Jorgensen T Ø. Characterization of immunoglobulin light chain cDNAs of the Atlantic salmon, *Salmo salar* L.; evidence for three IgL isotypes[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2002, 26(7): 635–647.
- [11] Timmusk S, Partula S, Pilström L. Different genomic organization and expression of immunoglobulin light-chain isotypes in the rainbow trout[J]. Immunogenetics, 2000, 51(11): 905–914.
- [12] Ishikawa J, Imai E, Moritomo T, *et al.* Characterisation of a fourth immunoglobulin light chain isotype in the

- common carp[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2004, 16(3): 369–379.
- [13] 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.
- [14] Frazer J K, Capra J D. Immunoglobul-Structure, function[M]//Paul W E, Eds. *Fundamental Immunology*. Lippencott-Raven, Philadelphia, 1999: 37–74.
- [15] 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[J]. *水产学报*, 2011, 35(11): 1684–1690.
- [16] Ghaffari S H, Lobb C J. Structure and genomic organization of immunoglobulin light chain in the channel catfish. An unusual genomic organizational pattern of segmental genes[J]. *Journal of Immunology*, 1993, 151(12): 6900–6912.
- [17] Criscitiello M F, Flajnik M F. Four primordial immunoglobulin light chain isotypes, including κ and λ , identified in the most primitive living jawed vertebrates[J]. *European Journal of Immunology*, 2007, 37(10): 2683–2694.
- [18] Edholm E S, Wilson M, Sahoo M, *et al.* Identification of Ig σ and Ig λ in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, and Ig λ in Atlantic cod, *Gadus morhua*[J]. *Immunogenetics*, 2009, 61(5): 353–370.
- [19] 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
- [20] Wilson M R, Wart G W. Fish immunoglobulins and the genes that encode them[J]. *Annual Review of Fish Diseases*, 1992, 2: 201–221.

Molecular cloning and expression analysis of the immunoglobulin light chain (L3 isotype) gene cDNA in largefin longbarbel catfish (*Mystus macropterus* Bleeker)

JIANG Zi-li^{1,2}, LI Chun-tao², ZHANG Qi-zhong^{3*}, CHEN Xia², LI Chao², YANG Ying-ying²

(1. Zunyi Normal College, Zunyi 563000, China; 2. Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development of Ministry of Education, Key Laboratory Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region of Ministry of Education, School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China; 3. Hydrobiology Institute of Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: The technique of homologous cloning and Rapid Amplification of cDNA Ends(RACE) was used to amplify full length cDNA of immunoglobulin light chain 3 isotype (IgL3) gene from largefin longbarbel catfish (*Mystus macropterus* Bleeker). IgL3 in *M. macropterus* has 947 nucleotides, including 5'-UTR of 58 nucleotides, 3'-UTR of 184 nucleotides and an open reading frame with 705 nucleotides encoding a peptide of 234 amino acids. The deduced amino acid sequence contains a constant region(CL) and a variable domain(VL) consisting of 4 frame regions(FRs) and 3 complementary determining regions(CDRs). The IgL3 comparison in seven teleost species showed that IgL3 in *M. macropterus* shared the highest identity (68.8%) with that(F) in *Ictalurus punctatus*, and the lowest identity(47.2%) with that in *Salmo salar*. Phylogenetic tree based on some teleost IgL amino acids showed that IgL3 in *M. macropterus* was clustered closely with that (F) of *I. punctatus* and grouped with IgL3 in other teleost, and was far away from L1 and L2 of teleost. Real-time PCR showed that IgL3 mRNA expression of *M. macropterus* was mainly detected in head kidney, spleen and blood cells and increased significantly in these tissues after injection of *Aeromonas hydrophila*. The result indicated that head kidney, spleen and blood cell are main organs for IgL3 expression after stimulation, and play a critical role in immunity interaction in *M. macropterus*.

Key words: *Mystus macropterus*; immunoglobulin L3; cloning; real-time PCR; expression

Corresponding author: ZHANG Qi-zhong. E-mail: qizhong676@163.com