

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00048

军曹鱼 Ig κ 轻链 cDNA 克隆及组织表达分析

侯月娥^{1,2}, 冯娟¹, 宁章勇², 茅莉娜^{1,2}, 郭志勋¹, 许海东¹, 孔小明²

1. 中国水产科学研究院 南海水产研究所, 广东 广州 510300;

2. 华南农业大学, 广东 广州 510642

摘要: 应用同源克隆和RACE技术克隆了军曹鱼(*Rachycentron canadum* Linnaeus)Ig κ 轻链的cDNA全序列, 并分析其在组织中的表达。军曹鱼Ig κ 的cDNA全长 969 bp, 3'端的非编码区(UTR)为 188 bp, 5'UTR为 52 bp, 开放阅读框为 729 bp, 编码 242 个氨基酸, 分子量约为 26.255 kD, 理论等电点 7.52。推测的军曹鱼Ig κ 恒定区氨基酸序列同鲷(*Seriola quinqueradiata*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)的Ig轻链同源性最高, 达 77%以上, 可变区氨基酸序列与鲷的相应序列同源性最高, 达 87%。通过构建系统进化树可以看出, 军曹鱼Ig κ 恒定区氨基酸序列同鲷、大西洋鲑的L3、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)的G等鱼的轻链均为 κ 型的聚为一支, 同大西洋鲑的L2、斑马鱼(*Danio rerio*)的L2、鲤(*Cyprinus carpio*)的L2 等均为 λ 型的明显不同, 由此可推断此序列属于Ig κ 型。利用半定量PCR技术, 发现在健康鱼体中 κ 链基因在肝脏和鳃中的表达量较高, 在肠和脑组织中几乎没有表达。经鲨鱼弧菌(*Vibrio carchariae*)JT2 刺激 192 h后, κ 链基因在采样的各个组织中均有表达, 尤其在头肾、肠、鳃和脾中的表达量较正常水平明显升高, 而肝的表达量有所下降, 脑组织有 κ 链基因的少量表达。说明经刺激后头肾、脾脏、肠、鳃是免疫球蛋白的主要表达场所, 在抵御病原感染过程中发挥着重要作用。[中国水产科学, 2011, 18(1): 48–58]

关键词: 军曹鱼; 免疫球蛋白轻链 κ ; cDNA 序列全长; mRNA 表达

中图分类号: S941

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)01-0048-11

军曹鱼(*Rachycentron canadum* Linnaeus)隶属鲈形目(Perciformes)、鲈亚目(Percoidei)、军曹鱼科(Rachycentridae), 俗称海鲷、鲸龙鱼, 分布于大西洋、印度洋和太平洋沿岸海域及港湾。具有生长速度快、病害少、营养价值高等优点, 是国内近几年来养殖规模迅速发展的重要海水经济鱼类, 已成为海水网箱养殖的重要品种, 给养殖业创造了良好的经济效益。随着军曹鱼人工养殖规模的迅速发展, 海水网箱养殖密度过高, 常有不明原因的暴发性疾病发生, 给军曹鱼养殖业及养殖户带来极大的损失。因此探索军曹鱼的免疫防御机制是当前较为迫切的研究课题。

免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)是由淋巴细

胞产生的一类能与相应抗原特异性结合的具有免疫功能的蛋白, 通过特异性结合抗原或通过重链C区来介导一系列生物学效应, 包括中和毒素、亲和细胞而导致吞噬调理、胞外杀伤及免疫炎症、介导抗体依赖性细胞介导的细胞毒(ADCC)、激活补体途径等^[1-3]。Ig单体包括 2 条相同的分子量较大的重链和 2 条相同的分子量较小的轻链。免疫球蛋白轻链(immunoglobulin light chain, IgL)由可变区(V)恒定区(C)和连接区(J)组成, 其中V区位于J区的上游, C区位于J区的下游。到目前为止IgL主要分为 κ 、 λ 和 σ 3 种类型, 在哺乳动物中有 κ 、 λ 2 种类型^[4-7], 鸟类中仅发现 1 种IgL(λ 型)^[8], 但在大多数脊椎动物中发现 2 到 3 种不同类型的IgL,

收稿日期: 2009-12-16; 修订日期: 2010-04-27.

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2007ZD10).

作者简介: 侯月娥(1983-), 女, 硕士研究生, 主要从事分子生物学方面的研究.

通讯作者: 冯娟, 副研究员, 主要从事鱼类细菌病及免疫防治技术研究. E-mail: jannyfeng@163.com

包括非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)的κ、λ和σ^[9-11]。

对于软骨鱼而言, 研究较多的有东太虎鲨(*Heterodontus francisci*)(板鳃类)的I、II和III型^[12-14] 3 种类型的轻链, 类型 I(或 σ 链)仅存在于软骨鱼^[15-16], 类型II被认为是λ链, 类型III是κ链^[17-18]。对于硬骨鱼来说, 基于 2 条链之间的系统进化分析和CL区氨基酸的相似性不低于 40%, 硬骨鱼IgL在很大程度上可以分为 4 种类型: L1/G 以虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的L1^[19]和斑点叉尾鲷的G^[20]为代表; L2 以虹鳟^[21]和斑马鱼^[22]的L2 为代表; L3/F以斑马鱼的L3^[23]和斑点叉尾鲷^[24] 为代表; 还有大西洋鳕(*Gadus morhua*)的L2 (GenBank 登录号 AJ293807)。然而Edholm等^[25]于 2009 年通过对代表序列的系统进化分析将L1、L2 以及L3 又重新归于κ、λ和σ的分类系列。其中L1 和L3 都属于Igκ^[16], L2 与Igσ是同源序列的不同类型, 大西洋鳕的L2 属于Igλ。硬骨鱼的Igκ和Igσ基因都是由“VL-JL-CL”的基因簇组成的, 至于Igκ、Vκ基因与Jκ和Cκ基因的转录方向相反, 但是Vσ、Jσ和Cσ基因却有相同的转录方向。特别是Vκ的反转录方向暗示重排的发生是由于基因倒置而非缺失。硬骨鱼Igκ和Igσ的另一个区别是Igσ的基因簇数明显少于Igκ, 这已经在不同的硬骨鱼中得到验证, 例如在虹鳟中Igκ基因座估计含有 20 个基因簇^[26], Igσ基因座估计含有至少 10 个基因簇^[27]。本实验以军曹鱼为研究对象, 克隆其主要的免疫球蛋白轻链基因, 通过对该基因同其他已知动物基因的相似性、系统进化树分析以及该基因在鲨鱼弧菌(*Vibrio car chariae*)刺激下在各组织中表达的差异性进行分析, 并结合已知鱼类基因的特性对克隆获得的基因进行分类分析。

1 材料与方法

1.1 总 RNA 的提取

取健康的军曹鱼(体质量约 1 000 g)在养殖桶中暂养 3 日, 腹腔注射 0.1 mL活的鲨鱼弧菌(*V. carchariae*)菌株JT2^[28], 浓度为 10⁷个/mL。192 h 后, 解剖鱼体取出头肾, 迅速放入液氮 24 h, 再放入-80℃冰箱保存。取保存的头肾, 剪碎加入 Trizol(Invitrogen)进行匀浆, 按照试剂说明提取总

RNA。

1.2 cDNA 第一条链的合成

取军曹鱼总 RNA 10 μL 与加了接头的 Oligo-dT(上海英骏公司合成, 表 1)2 μL(10 pmol/L)混合, 65℃加热 5 min 后, 立即放置冰上静置 2 min, 然后加入缓冲液 5×buffer 4 μL, 10 mmol/LdNTP 混合液 2 μL, Ribonuclease Inhibitor 1 μL, M-MLV 反转录酶 1 μL, 反应体系为 20 μL。反应程序为 37℃, 60 min。合成的 cDNA 第一链放入-80℃保存。

表 1 军曹鱼 Ig κ 链 cDNA 全长扩增所用到的引物
Tab. 1 Oligonucleotide primers used in this experiment

引物名称 primer	核酸序列(5'-3') nucleotide sequence(5'-3')
Oligo-dT adaptor	GGCCACGCGACTAGTAC(T) ₁₆
KF	CGAAATCAACAGTCAGAGG
KR	GAGTCCCAGTGAGTCAGGT
R3Kf	GGGAAGGACGGCCTCTAC
R5Kr	GGACGGGTATCACTTCCAATATCC
Adaptor	GGCCACGCGACTAGTAC
Oligo-dG	GGGGGGGGGGGGGGGGG
β-actinF	AGGGAAATTGTGCGTGAC
β-actinR	AGGCAGCTCGTAGCTCTT
KDf	ATCAAACCTCCGACTTCACTC
KDr	GACGGGTATCACTTCCAAT

1.3 κ 链基因 cDNA 片段的克隆

使用构建的 Smart cDNA 文库扩增 Ig κ cDNA 片段, 用设计的中间片段引物 KF 和 KR 进行 PCR 扩增, 反应参数为: 94℃, 3 min; 94℃, 35 s; 56℃, 45 s; 72℃, 1 min, 共 35 个循环, 最后终延伸 72℃, 10 min, 4℃保温。PCR 产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 送上海英骏生物技术有限公司进行双向测序。

1.4 κ 链 cDNA 全序列的克隆及分析

根据已得到的 cDNA 片段序列设计特异性的引物 R3Kf、R5Kr(表 1)。利用 cDNA 末端快速扩增技术(Rapid Amplification of cDNA End, RACE)对目的基因的 3'和 5'末端进行 PCR 扩增。

在 3'RACE 中, 利用降落 PCR(touchdown PCR)方法, 用接头引物 adaptor 和 R3Kf 进行 PCR 扩增, 反应系数为: 94℃, 3 min; 94℃ 50 s; 69℃

50 s, 72℃ 1.5 min, 共 10 个循环, 每个循环退火温度下降 1℃; 94℃ 50 s; 60℃ 50 s, 72℃ 1.5 min, 共 30 个循环; 最终延伸 72℃, 10 min。

5'RACE参照邱丽华等^[29]的方法, 利用末端转移酶和dCTP在cDNA末端加上poly(C)尾巴, 以加尾后的cDNA作为模板, 利用特异性引物R5Kr和OligodG进行PCR扩增, 反应系数为: 94℃, 3 min; 94℃ 50 s; 71℃ 50 s; 72℃ 1.5 min, 共 10 个循环, 每个循环退火温度下降 1℃; 94℃, 50 s; 64℃ 50 s, 72℃ 1.5 min, 共 30 个循环; 最终延伸 72℃, 10 min。

所得到的 PCR 产物经纯化、克隆、转化后, 送上海英骏生物技术有限公司测序。测序所得序列再与中间片段序列利用 SeqMan 软件进行拼接。拼接如图 1 所示。

1.5 κ 链 cDNA 的同源性分析

对全序列用 DNASTAR 软件找出开放阅读框并翻译为相应的氨基酸, 用 Smart 软件将其氨基酸序列分为不同的区。测序结果用 BLAST 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 在 GenBank 数据库中进行同源性检索, 并对 κ 链 cDNA 的恒定区和可变区的氨基酸序列进行同源性分析。多序列比较采用软件 Clustal X 1.83 和 PHYLIP 进行比对, 并构建系统进化树。

1.6 κ 链基因在鱼体各组织的表达

为检测 κ 链基因在鱼体内的表达情况, 对 4 尾军曹鱼腹腔注射 0.1 mL 活的浓度为 10^7 个/mL

和 192 h 2 个时间点的头肾、脾脏、肝脏等器官各约 100 mg, 按照 1.1 和 1.2 的方法提取总 RNA, 并合成 cDNA 第一链, 作为半定量 PCR 检测的模板。根据已克隆到的军曹鱼 κ 链基因的表达序列设计 1 对特异性引物 KDf 和 KDr (表 1), 对目的基因的 cDNA 进行扩增。 β -actin 基因作为内参, 扩增的引物分别为 β -actin F 和 β -actin R (表 1), 扩增 150 bp 左右的片段。反应参数为: 94℃, 3min; 94℃ 30s; 57℃ 30s; 72℃ 1min, 共 40 个循环, 最后终延伸为 72℃, 10 min。PCR 的产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

2 结果与分析

2.1 κ 链基因的序列特征

军曹鱼 κ 链的全长 cDNA 由 969 个碱基组成, 其编码区 729 bp, 编码 242 个氨基酸, 分子量约为 26.255 kD, 理论等电点为 7.52。在第一个起始密码子 ATG 的上游有 52 bp 的非编码区, 在终止密码子下游有 188 bp 的非编码区, 序列包含 poly (A) 结构, 在 poly(A) 尾上游 13 bp 处可见 poly(A) 加尾信号 AATAA。经 Smart 软件 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析后发现, 在军曹鱼 κ 链的序列中存在 21 个氨基酸的信号肽 (MTLNSVLIW TLLCCCFTESRG), 同时在军曹鱼的 κ 链还存在 1 个非稳定区段 (Disordered Regions, DR), 无跨膜区。军曹鱼 κ 链编码区由前导肽 (信号肽)、可变区 (V κ)、连接区 (J κ) 和恒定区 (C κ) 组成 (图 2), 分别编码 21、100、12、109 个氨基酸。其中可变区根据同其他鱼种 Ig 轻链的比较, 可划分为 3 个骨架区 (Framework Region, FR) 和 3 个互补决定区 (Complementarity Determining Region, CDR) (图 3)。序列中含有用于构建链内二硫键的半胱氨酸残基 4 个, 其中可变区 2 个 (v22、v100), 恒定区 2 个 (c26、c87); 用于构建链间二硫键的半胱氨酸残基 1 个, 位于恒定区下游 (c106)。

2.2 κ 链基因的相似性

军曹鱼 κ 链的恒定区与鲈、大西洋鲑、斑点叉尾鲷等鱼的轻链恒定区氨基酸序列的相似率从

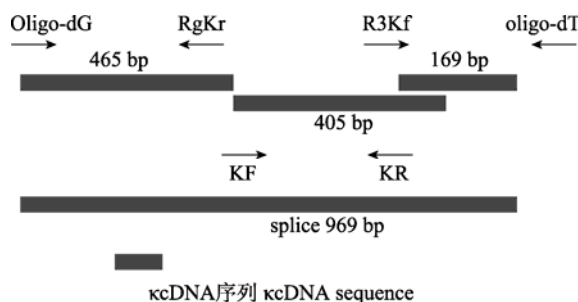


图 1 军曹鱼 κ 链 cDNA 全序列扩增中所用的引物位点及扩增片段示意图

Fig. 1 Position of primers used to amplify κ cDNA of cobia and the products obtained

的 JT2, 另取 3 尾健康的军曹鱼作为对照。取 0 h

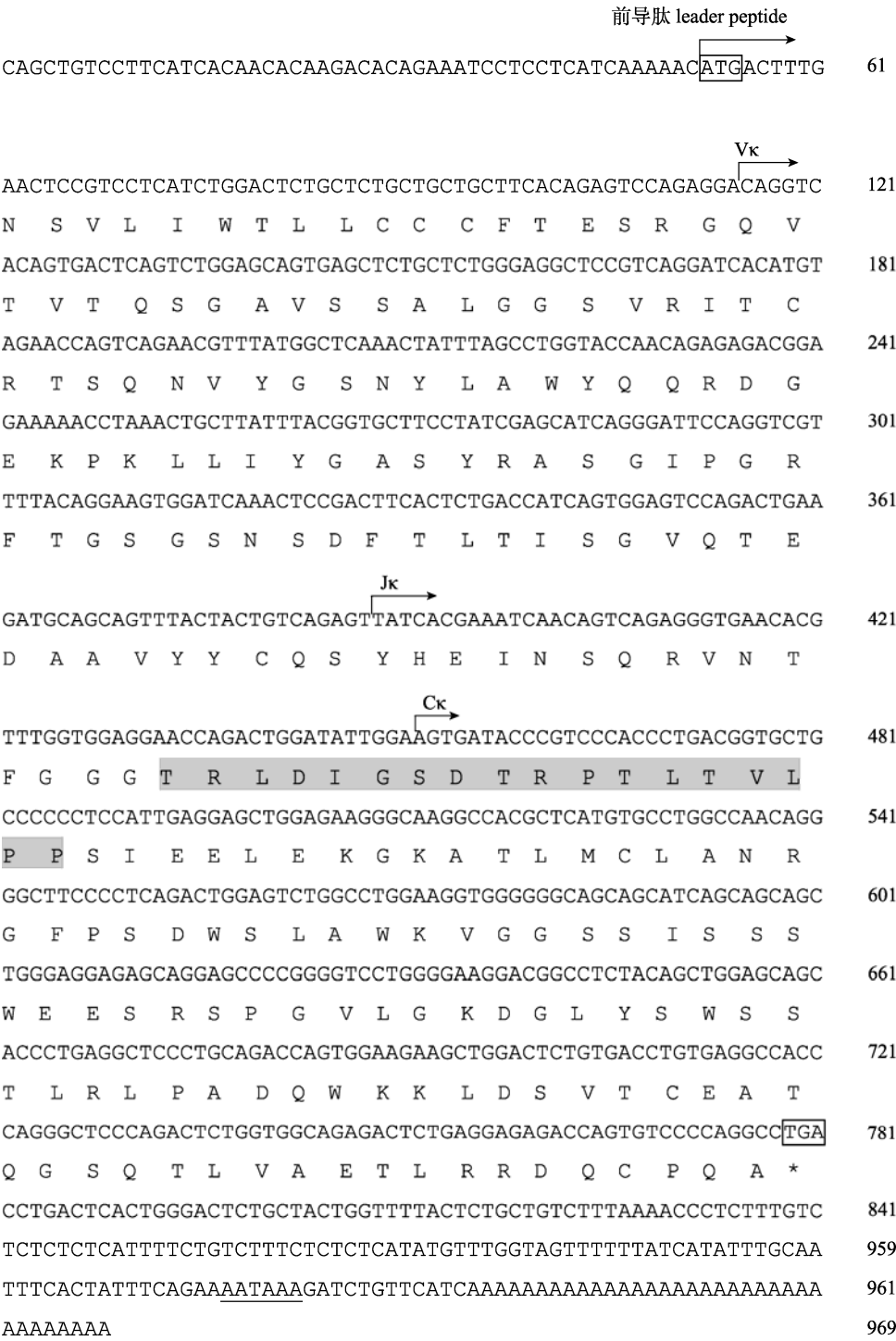


图2 军曹鱼κ链的cDNA序列和推断的氨基酸序列

起始密码子ATG和终止密码子TAG以黑框表示; 加尾信号以下划线标出; 不稳定区用灰色标记。Vk: 可变区; Jk: 连接区; Ck: 恒定区。

Fig. 2 cDNA and deduced amino acid sequences of cobia κ gene

Start and stop codons of the open reading frame are highlighted in bold. Putative polyadenylation signal(AATAAA) in 3'UTR is underlined. Disorder region is colored with green. Vk: variable region; Jk: junctional region; Ck: constant region.

高到低为: 鲢(86%)、大西洋鲑(77%)、斑点叉尾
鲷(60%)(表 2)。军曹鱼κ链的可变区与其他动物轻

链氨基酸相似率同恒定区又有很大的不同, 其相似
率从高到低依次为: 鲢(87%)、大西洋鲑(64%)、猴

子(*Macaca mulatta*)(63%)、斑马鱼L3(60%)(表 3)。利用Clustal X 1.83 软件进行军曹鱼、大西洋鲑、鳊、伯氏肩孔南极鱼(*Trematomus bernacchii*)、金头鲷(*Sparus aurata*)等鱼轻链恒定区的比对,发现半胱氨酸和色氨酸等保守位点在军曹鱼的κ链中同样存在(图 4)。

2.3 系统树的构建

根据军曹鱼 κ 链基因全长、恒定区、可变区的氨基酸同其他鱼类的氨基酸序列的比对结果,利用 Clustal X 1.83 和 Phylip 软件构建邻接树。根

据全长系统进化树的结果显示,军曹鱼κ、鳊(1,2,3)、斑点叉尾鲷的 G、鲤的 L1A、L1B 以及斑马鱼的 L1 聚为一支(图 5a),可以判断此轻链属于 κ 型。恒定区结果显示,军曹鱼κ同鳊(1,2,3)、大西洋鲑的 L3,斑点叉尾鲷的 G,鲤的 L1A、L1B,斑马鱼的 L1 以及大西洋鲑的 L1 均为 κ 型,聚为一支,大西洋鲑的 L2、斑马鱼的 L2、鲤的 L2 均为 λ 型聚为一支(图 5b);可变区的结果显示:军曹鱼 κ、鳊(1,2,3)、斑点叉尾鲷F 聚为一支,斑马鱼 L1、斑马鱼 L2 以及鳊(1,2)聚为一支(图 5c)。

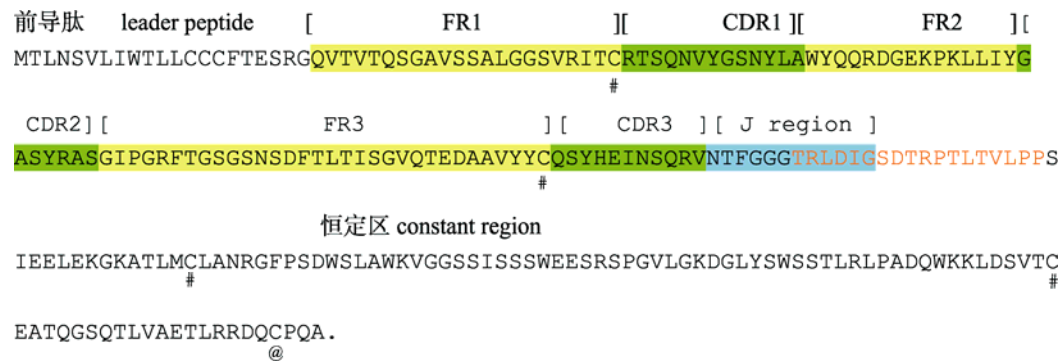


图3 军曹鱼κ链氨基酸可变区序列划分区域

FR: 框架区; CDR: 互补决定区; 链内二硫键和链间二硫键分别由#和@表示。

Fig. 3 Domain of variable regions of deduced cobia κ chain

FR: framework region. CDR: complementarity determining region. The cysteine residues involved in intra- and inter-domain interactions are indicated by # and @, respectively.

表 2 军曹鱼 κ 链恒定区与其他已知动物轻链恒定区氨基酸相似率

Tab. 2 Amino acid similarity of cobia κ constant region with those known in other animals

物种 species	相似性/% similarity	E 值 E value	注册号 access. no.
鳊(2) <i>Seriola quinqueradiata</i> (2)	86	1e-29	AB062650
鳊(3) <i>Seriola quinqueradiata</i> (3)	81	4e-26	AB062653
大西洋鲑L3 <i>Salmo salar</i> L3	77	3e-31	AF406956
鳊(1) <i>Seriola quinqueradiata</i> (1)	64	1e-25	AB062647
大西洋鲑L1 <i>Salmo salar</i> L1	64	1e-25	AF273017
斑点叉尾鲷 G <i>Ictalurus punctatus</i> G	60	8e-18	L25531
斑马鱼 L1 <i>Danio rerios</i> L1	58	1e-17	AF246185
鲤 L1A <i>Cyprinus carpio</i> L1A	58	2e-21	AB073328
鲤 L1B <i>Cyprinus carpio</i> L1B	52	2e-11	AB073331
小鼠 <i>Mus musculus</i>	37	7e-14,	BC091750
鳊 2 <i>Raja erinacea</i> 2	35	4e-08	L25566
牛 <i>Bos taurus</i>	35	1e-12	BC151500
鳊 1 <i>Raja erinacea</i> 1	33	1e-06	L25568
斑点叉尾鲷 F <i>Ictalurus punctatus</i> F	32	1e-06	U25705
猴子 <i>Macaca mulatta</i>	32	2e-06	FJ795855
斑马鱼 L2 <i>Danio rerios</i> L2	30	8e-08	AF246162
鲤 L2 <i>Cyprinus carpio</i> L2	30	1e-07	AB091119
斑马鱼 L3 <i>Danio rerios</i> L3	29	1e-07	AF246193
大西洋鲑L2 <i>Salmo salar</i> L2	27	4e-06	AF297518
鲤 L3 <i>Cyprinus carpio</i> L3	28	2e-07	AB035730

表 3 军曹鱼 κ 链可变区与其他已知动物轻链可变区氨基酸的相似率

Tab. 3 Amino acids similarity of cobia κ variable region with those known in other animals

物种 species	相似性/% simiarity	E 值 E value	注册号 access. no.
鳊(C) <i>Seriola quinqueradiata</i> (C)	87	5e-36	AB062667
大西洋鲑L3 <i>Salmo salar</i> L3	64	3e-23	AF406956
猴子 <i>Macaca mulatta</i>	63	3e-26	FJ795855
大西洋鲑L1 <i>Salmo salar</i> L1	61	3e-22	AF273017
斑马鱼 L3 <i>Danio rerios</i> L3	60	3e-23	AF246193
鳊(B) <i>Seriola quinqueradiata</i> (B)	60	1e-23	AB062653
斑点叉尾鲷 F <i>Ictalurus punctatus</i> F	59	4e-24	U25705
小鼠 <i>Mus musculus</i>	56	1e-22	BC091750
斑马鱼 L1 <i>Danio rerios</i> L1	55	8e-22	AF246185
牛 <i>Bos taurus</i>	53	3e-23	BC151500
鳎 2 <i>Raja erinacea</i> 2	49	2e-18	L25566
鳊(A) <i>Seriola quinqueradiata</i> (A)	44	1e-15	AB062664
鳎 1 <i>Raja erinacea</i> 1	41	1e-13	L25568
斑马鱼 L2 <i>Danio rerios</i> L2	33	9e-06	AF246162

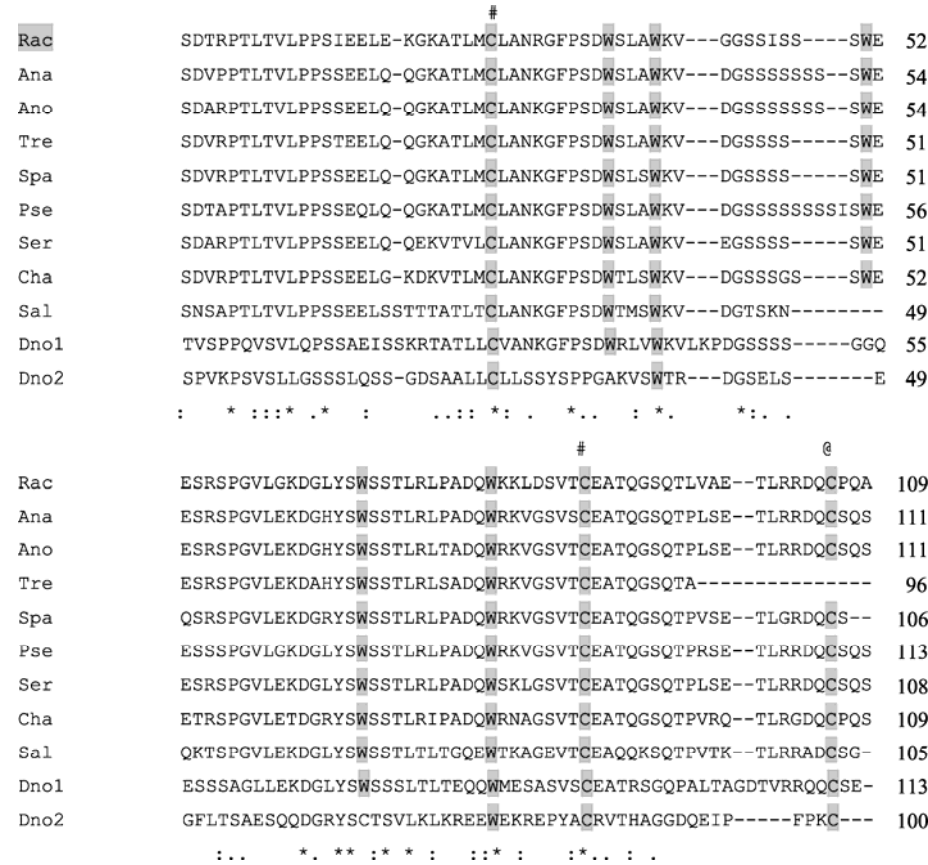


图4 军曹鱼κ链与其他鱼种κ链恒定区氨基酸序列比较

链内二硫键和链间二硫键分别由#和@表示。相同氨基酸用*表示，相似的氨基酸用·表示，点数越多，保守性越强。保守位点的半胱氨酸和色氨酸用阴影标出。Ano: 花狼鱼(AF137397), Tre: 伯氏肩孔南极鱼(EF421439), Ana: 银鳕(BT083068), Pse: 大黄鱼(DQ862131), Ser: 鳊(AB062649), Rac: 军曹鱼, Spa: 金头鲷, Cha: 乌鳢(EU822511), sal: 大西洋鲑(AF273019), Dan2: 斑马鱼 2 (AF246193), Dan1: 斑马鱼1 (AF246185), Onc: 虹鳟 (OMU69987).

Fig. 4 Alignment of κ chain amino acids between cobia and other fish species Cysteine residues involved in intra- and inter-domain interactions are indicated by # and @, respectively. Identical amino acids are indicated with asterisk. Similar amino acids are indicated with dots, and more dots mean higher similarity. The conserved cysteines and tryptophan are shaded. Ano: *Anarhichas mino* (AF137397), Tre: *Trematomus bernacchii* (EF421439), Ana: *Anoplopoma fimbria* (BT083068), Pse: *Pseudosciaena crocea*(DQ862131), Ser: *Seriola quinqueradiata* (AB062649), Rac: *Rachycentron canadum*, Spa: *Sparus aurata* (EF555070), Cha: *Channa argu* (EU822511), sal: *Salmo salar* (AF273019), Dan2: *Danio rerio* 2(AF246193), Dan1: *Danio rerio* 1(AF246185), Onc: *Oncorhynchus mykiss*(OMU69987).

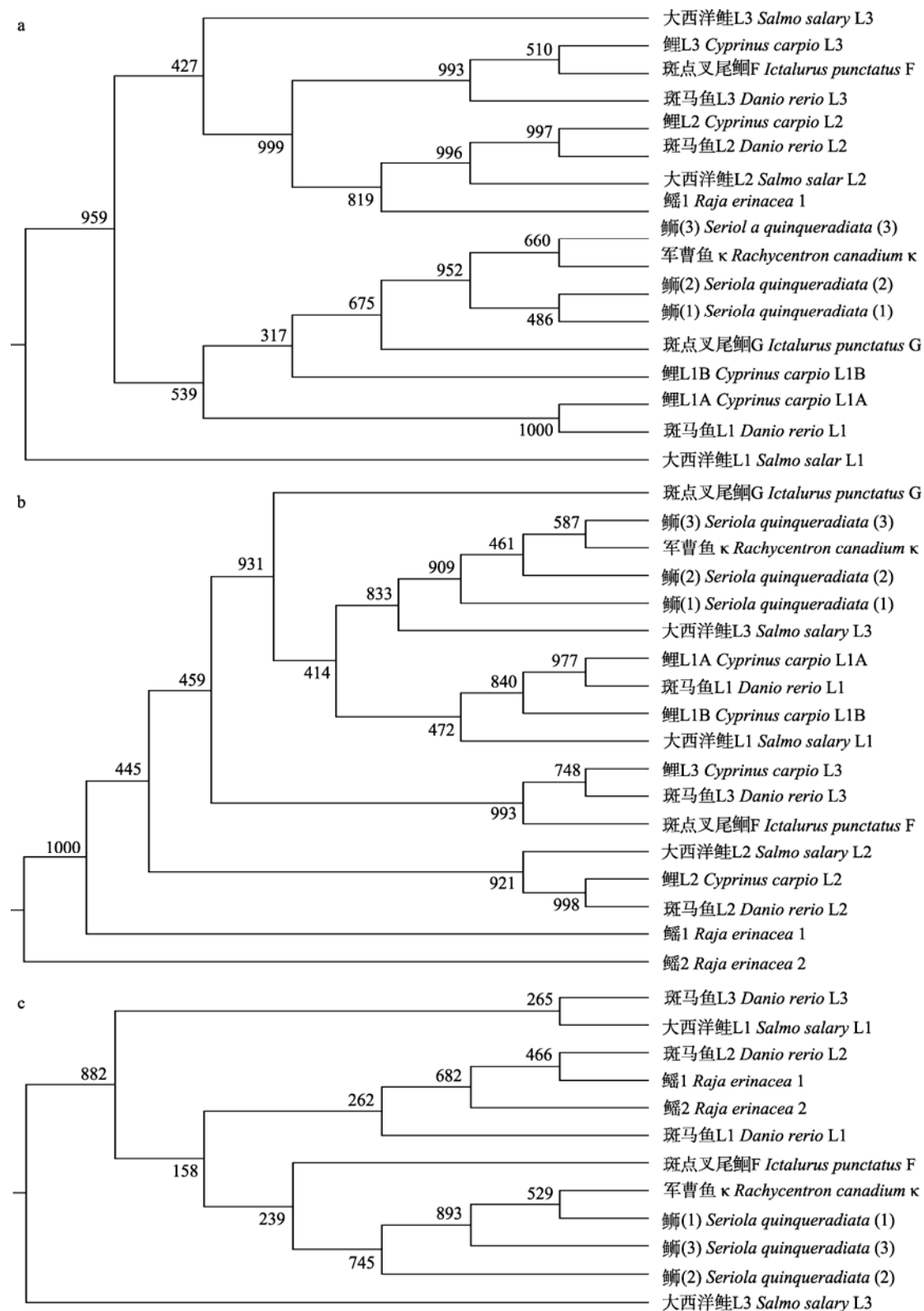


图5 鱼类免疫球蛋白κ轻链氨基酸序列的系统进化树

a: 全基因氨基酸序列; b: 恒定区氨基酸序列; c: 可变区氨基酸序列。节点处数字表示1 000次重复检测的bootstrap值。

Fig. 5 Phylogenetic analysis of Ig κ chain amino acid sequences in teleost

a: amino acid sequences of full length Igκ chain; b: amino acid sequences of immunoglobulin light chain constant region; c: amino acid sequences of immunoglobulin light chain's variable region. Figures on the nodes are bootstrap values of 1 000 repeats.

2.4 κ 链基因在体内各组织中的表达情况

以 K_{Df} 和 K_{Dr} 为引物, 利用 RT-PCR 方法检测免疫球蛋白 κ 链基因, 在正常鱼体和 JT2 刺激 192 h 后相对于 β -actin 基因的表达情况(图 6)。军曹鱼 κ 链基因在头肾、肝脏、肠、鳃、脾脏以及脑等不同组织中都有不同程度的表达, 在未受刺

激的健康鱼中, κ 链基因在肝脏和鳃中的表达量较高, 而在肠和脑组织中几乎没有表达。经 JT2 刺激 192 h 后, 在采样的各个组织中均有表达, 尤其以头肾、肠、鳃和脾中的表达量较正常水平明显升高, 反而肝的表达量有所下降, 脑组织有 κ 链基因的少量表达。

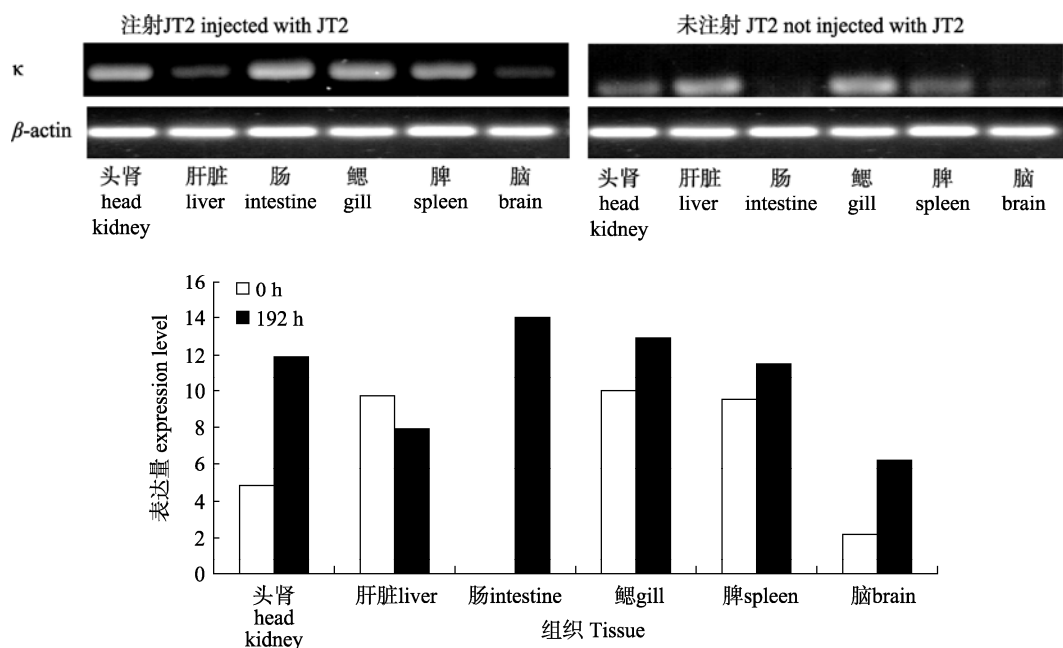


图 6 军曹鱼 κ 链基因在不同组织中的表达情况

Fig. 6 Cobia Ig κ gene expression in different tissues of fish head-kidney

3 讨论

鱼类免疫系统尤其是体液免疫系统承担着抵御外来病原生物侵害, 维持机体正常功能及自身内环境稳定的功能^[30], 其中免疫球蛋白, 又是鱼类特异性体液免疫应答中最主要的介质, 因此成为鱼类免疫学研究的重点和热点^[31]。Ig 轻链(IgL)是 Ig 分子的重要组成部分之一, 同 Ig 重链(IgH)的 V-C1 共同组成了 Ig 分子的 Fab 抗原结合位点, 尽管不同的 IgL 的类型的功能尚不明确, 但近年来的研究提出 IgL 的类型直接影响了抗体分子的不同结构特征^[32]。鱼类的 IgL 具有很高的多样性, 而且鱼类种类间遗传距离远近相差较大, 所以尽管发现了不少鱼种的不同 IgL 类型, 人们对鱼 IgL 的分型及分布的认识仍不很明确。

3.1 军曹鱼 Ig κ 的 cDNA 序列特征

通过同源克隆和 RACE 技术得到了军曹鱼 Ig κ 的 cDNA 全序列, 经过同已报道的鱼种的 IgL 的序列进行对比, 军曹鱼的 Ig κ 具有典型的 IgL 的特征: 包括 V 区、C 区和 J 区, J 区有典型的甘氨酸凸位点——FGxG, V 区的 CDR1 比 CDR2 长, 二者之比为 13: 7。根据军曹鱼 IgL 同其他鱼种不同类型 IgL 的比较结果, 以及 Edholm 等^[25]对鱼类 IgL 的分类原则, 将克隆得到的军曹鱼 IgL 归为 Ig κ 。同其他鱼类一样, 军曹鱼 κ 链的 V 区存在 2 个半胱氨酸残基, 用于构成链内二硫键。C 区存在 3 个半胱氨酸残基, 其中 c26、c87 用于形成结构域的链内二硫键, c106 用于形成连接重链和轻链的链间二硫键^[33]。基本上所有鱼的 IgL 的 V 区和 C 区的半胱氨酸残基位置很相似, 而且数量一致, 说明 IgL 在不同鱼种

之间的结构是基本一致的。同样大多数鱼类在恒定区中还存在 5 个色氨酸的保守位点,色氨酸残基对免疫球蛋白空间结构的形成和功能起着决定性作用,由半胱氨酸所形成的二硫键以及色氨酸残基的保守位点在免疫球蛋白的分子进化中具有普遍重要意义。J区的序列有 9~13 个氨基酸,在近 2 年的文章中较受重视,Edholm等^[25]和Coscia等^[34]对不同鱼的J区的氨基酸序列进行了比对,发现同类型的轻链其J区的相似性较V区和C区更高,这个结果揭示J区在今后的分类和进化分析中可能有着更重要的作用。军曹鱼IgL的J区有 11 个氨基酸,同 κ 链的序列相似度最高,也说明了J区序列的保守性。

3.2 Ig κ 氨基酸的相似性和系统进化关系

到目前为止已报道了很多鱼类的多种IgL,不同的作者建立了不同的进化关系,随着IgL类型的增多,氨基酸序列的相似性和进化关系越来越复杂。由于军曹鱼是鲈形目下军曹鱼科的唯一鱼种,从分类学角度讲,军曹鱼Ig κ 恒定区和可变区氨基酸的同源性都与同是鲈形目的鳊最高,而且在其他鱼种中也有类似的关联,说明Ig的相似性同鱼类的分类地位有一定的相关性。从构建的系统进化树上可以看出,鱼的IgL的种类以及鱼的种类越多,构建的树的数值就越低,这种情况在Edholm等^[25]的研究中也明显存在,说明随着鱼种不同,鱼类IgL表现出了较高的多样性,现有资料相对鱼的种类而言依然非常缺乏。随着鱼类IgL资料信息的逐渐增多,在IgL的系统进化关系研究上会有更明确的思路和线条。

3.3 军曹鱼 Ig κ 的组织表达情况

本研究利用半定量RT-PCR方法研究了军曹鱼 κ 链基因在受到鲨鱼弧菌刺激前后在头肾、肝脏、肠、鳃、脾脏以及脑等不同组织中的表达。在未受刺激的健康鱼中,除了头肾、脾外其中肝脏、鳃也表达了一定量的Ig κ ,经鲨鱼弧菌刺激 192 h后,Ig κ 在多个组织中均有表达,以头肾、肠、鳃和脾中的表达量较正常水平明显升高,反而肝的表达量有所下降。由于在正常的鱼体中存在着一定量的天然抗体用于机体的自我防御,受到特

异的抗原刺激后,表达量较高的特异性抗体会用于清除体内的抗原。所以推测在正常鱼体中头肾、脾、肝脏和鳃可能是天然抗体的主要表达场所,而头肾、脾脏、鳃、肠是特异性抗体的主要表达场所,随着特异性抗体表达的增高,肝脏中天然抗体的表达受到了一定程度的抑制。肝脏是体内抗原加工呈递的主要场所,也是非特异性免疫酶类产生的主要场所,所以以天然抗体的存在为主,且其表达可能受到特异性抗体的负调控。鳃是黏膜免疫组织,鱼类的黏膜免疫系统有独立产生抗体的能力^[35],在鳃的天然抗体受到抑制的同时,特异性抗体表达增高,导致鳃上Ig κ 的表达没有明显变化。

参考文献:

- [1] Sarker N, Tsudzuki M, Nishibori M, et al. Cell-Mediated and humoral immunity an phagocytic ability in chicken lines divergently selected for serum immunoglobulin M and G levels[J]. Poultry Sci, 2000, 78: 1705-1709.
- [2] Johansson J, Aveskogh M, Munday B, et al. Heavy chain V region diversity the duck billed platypus(*Ornithorhynchus anatinus*): long and highly variable complementarity-determining region compensates for limited gennline diversity[J]. J Immunol, 2002, 168: 5155-5162.
- [3] Magor B G, Magor K E. Evolution of effectors and receptors of innate immunity[J]. Dev Comp Immunol, 2005, 25(8-9): 651-682.
- [4] Zachau H G. Immunoglobulin light-chain genes of the-type in man and mouse[M]//Honjo T, Alt F W, Rabbitts T H. Immunoglobulin genes. London: Academic Press, 1989: 91-109.
- [5] Bauser T R Jr, Blomberg B. The human-L chain Ig locus. Characterization of JCl6 and identification of functional JCl7[J]. J Immunol, 1991, 146: 2813-2820.
- [6] Home W A, Ford J E, Gibson D M. L chain isotype regulation in horse[J]. J Immunol, 1992, 149: 3927-3936.
- [7] Kirschbaum T, Jaenichen R, Zachau H G. The mouse immunoglobulin-locus contains about 140 variable gene segments[J]. Eur J Immunol, 1996, 26: 1613-1620.
- [8] Raynaud C A, Dahan A, Weill J C. Complete sequence of a chicken-light chain immunoglobulin derived from the nucleotide sequence of its mRNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1983, 80: 4099-4103.
- [9] 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]. J Immunol,

- 1996, 157: 1544–1550.
- [10] Schwager J, Burckert N, Schwager M, et al. Evolution of immunoglobulin light chain genes: analysis of *Xenopus laevis* IgL isotypes and their contribution to antibody diversity[J]. EMBO J, 1991, 10: 505–511.
- [11] Zezza D J, Stewart S E, Steiner L A. Genes encoding *Xenopus laevis* Ig L chains. Implications for the evolution of k and l chains[J]. J Immunol, 1992, 149: 3968–3977.
- [12] Shambloott M J, Litman G W. Complete nucleotide sequence of primitive vertebrate immunoglobulin light chain genes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86: 4684–4688.
- [13] Shambloott M J, Litman G W. Genomic organization and sequences of immunoglobulin light chain genes in a primitive vertebrate suggest coevolution of immunoglobulin gene organization[J]. EMBO J, 1989, 8: 3733–3739.
- [14] Rast J P, Anderson M K, Ota T, et al. Immunoglobulin light chain class multiplicity and alternative organizational forms in early vertebrate phylogeny[J]. Immunogenetics, 1994, 40: 83–99.
- [15] Fleurant M, Changchien L, Chen C T, et al. Shark Ig light chain junctions are as diverse as in heavy chains[J]. J Immunol, 2004, 173: 5574–5582.
- [16] Criscitiello M F, Flajnik M F. Four primordial immunoglobulin light chain isotypes, including lambda and kappa, identified in the most primitive living jawed vertebrates[J]. Eur J Immunol, 2007, 37: 2683–2694.
- [17] Hohman V S, Schluter S F, Marchalonis J J. Complete sequence of a cDNA clone specifying sandbar shark immunoglobulin light chain: gene organisation and implications for the evolution of light chains[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 276–280.
- [18] Rast J P, Anderson M K, Ota T, et al. Immunoglobulin light chain class multiplicity and alternative organizational forms in early vertebrate phylogeny[J]. Immunogenetics, 1994, 40: 83–99.
- [19] Ghaffari S, Lobb C J. Structure and genomic organization of immunoglobulin light chain in the channel catfish. An unusual genomic organizational pattern of segmental genes[J]. J Immunol, 1993, 151: 6900–6912.
- [20] Partula S, Schwager J, Timmusk S, et al. A second immunoglobulin light chain isotype in the rainbow trout[J]. Immunogenetics, 1996, 45: 44–51.
- [21] Ghaffari S, 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.
- [22] Espelid S, Halse M, Solem S T, et al. Immunoglobulin genes and antibody responses in the spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2001, 11: 399–413.
- [23] Haire R N, Rast J P, Litman R T, et al. Characterization of three isotypes of immunoglobulin light chains and T-cell antigen receptor alpha in zebrafish[J]. Immunogenetics, 2000, 51: 915–923.
- [24] Ghaffari S, 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.
- [25] 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: 353–370.
- [26] Daggfeldt A, Bengtén E, Pilström L. A cluster type organization of the loci of the immunoglobulin light chain in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) indicated by nucleotide sequences of cDNA and hybridization analysis[J]. Immunogenetics, 1993, 38: 199–209.
- [27] Timmusk S, Partula S, Pilström L. Different genomic organization and expression of immunoglobulin light-chain isotypes in the rainbow trout[J]. Immunogenetics, 2000, 51: 905–914.
- [28] 郭明元, 刘广锋, 冯娟. 1 株军曹鱼病原弧菌的鉴定及其系统发育树分析[J]. 中国水产科学, 2006, 13(5): 823–828.
- [29] 邱丽华, 冯娟, 江世贵, 等. 军曹鱼白细胞介素 1 β 基因的克隆、分析及表达[J]. 中国水产科学, 2005, 12(2): 119–125.
- [30] Shintani S, Terzic J, Sato A. Do lampreys have lymphocytes? The Spi evidence[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(13): 7417–7422.
- [31] 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.
- [32] Stanfield R L, Zemla A, Wilson L A, et al. Antibody elbow angles are influenced by their light chain class[J]. J Mol Biol, 2006, 357: 1566–1574.
- [33] Wiersma E J, Shulman M J. Assembly of IgM: Role of disulfide bonding and noncovalent interaction[J]. J Immunol, 1995, 154: 5265–5272.
- [34] Coscia M R, Giacomelli S, Santi C D, et al. Immunoglobulin light isotypes in the teleost *Trematomus bernacchii*[J]. Mol Immunol, 2008, 45: 3096–3106.
- [35] 苏友禄, 郭志勋, 徐力文, 等. 军曹鱼黏膜免疫组织发育的形态学研究[J]. 中国水产科学, 2008, 15: 644–649.

Molecular cloning and tissue expression analysis of immunoglobulin light κ chain cDNA from cobia *Rachycentron canadum* Linnaeus

HOU Yue^{1,2}, FENG Juan¹, NING Zhangyong², MAO Lina^{1,2}, GUO Zhixun¹, XU Haidong¹, KONG Xiaoming²

1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

2. South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China

Abstract: The technique of homologous cloning and Rapid Amplification of cDNA Ends(RACE) was used to amplify full length cDNA gene of immunoglobulin light chain(κ chain) from cobia (*Rachycentron canadum* Linnaeus). The full length cDNA of κ in cobia is 969 bp, containing a 3' untranslated region (UTR) of 188 bp, a 5' UTR of 52 bp, and an open reading frame (ORF) of 729 bp, encoding 242 amine acids. The estimated molecular weight of Ig κ is 26.255 kD, and the theoretical isoelectric point is 7.52. The deduced Ig κ amino acid sequences of cobia were compared with those of other teleost species. For the constant region of Ig κ , higher percentage similarity was obtained from comparisons between *R. canadum* and *Seriola quinqueradiata* and between *R. canadum* and *Salmo salar*, which was higher than 77%. For the variable region, higher percentage similarity was obtained from comparisons between *R. canadum* and *S. quinqueradiata*, which reached 87%. By the phylogenetic tree of immunoglobulin light chain constant region, Ig κ amino acid sequences of cobia were clustered with *S. quinqueradiata* (1,2,3) and *Ictalurus punctatus* G chain which belong to the type of κ chain, so IgL of cobia was supposed to type of κ . *Salmo salar* L2 chain, *Danio rerios* L2 chain, *Cyprinus carpio* L2 chain that belong to the type of λ chain were clustered together. The expression of Ig κ gene in healthy cobia was initially measured by semi-quantitative RT-PCR. It was found that the expression of the Ig κ existed more obviously in liver and gill than in other tissues, but they were hardly expressed in intestine and brain. The expression of the target gene in head kidney, spleen, intestine and gill increased obviously after cobia was immunized by intraperitoneal injection with *Vibrio carchariae* strain JT2, while the expression in liver decreased. The result indicated that head kidney, spleen, intestine and gill are main organs for Ig κ production after stimulation, and play a critical role in host-pathogen interaction. [Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(1): 48–58]

Key words: *Rachycentron canadum*; immunoglobulin light kappa; cDNA full length; mRNA expression

Corresponding author: FENG Juan. E-mail: jannyfeng@163.com