

欧洲鳗鲡免疫球蛋白轻链基因的克隆及表达分析

冯建军 郭松林 林 鹏

集美大学水产学院/鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心/农业部东海海水健康养殖重点实验室, 厦门 361021

摘要 通过 RT-PCR 技术克隆欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*) Ig 轻链基因 cDNA 全长序列, 命名为 *AaIgL*, 其全长为 1 016 bp, 开放阅读框为 714 bp, 编码 238 个氨基酸。将该基因片段与 pET-his 载体连接构建原核表达载体, 在大肠杆菌 BL21 中诱导表达, 其表达产物经 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析, 结果表明新增的 27 ku 蛋白条带与预期值相符, 且与兔抗欧洲鳗鲡 IgM 血清发生特异性显色反应, 证实了 *AaIgL* 基因能够在大肠杆菌中以包涵体形式高效表达; 实时荧光定量 PCR 检测结果发现: *AaIgL* 在欧洲鳗鲡各组织中均有表达, 其中脾脏的表达量最高, 肾脏和心脏中也有较高的表达水平, 而肝脏、肌肉、鳃以及肠中的表达量较低; 欧洲鳗鲡经山羊 IgG 肌肉注射后脾脏和肾脏的 *AaIgL* 表达水平明显上升, 其峰值分别为第 7 天和第 14 天, *AaIgL* 在脾脏的表达量显著高于肾脏, 但是第 21 天后均恢复至正常水平。以上结果表明, *AaIgL* 在欧洲鳗鲡机体免疫防御中发挥重要作用, 脾脏是 *AaIgL* 基因的主要表达器官。

关键词 欧洲鳗鲡; 免疫球蛋白轻链; 原核表达; 荧光定量 PCR
中图分类号 S 965.223 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)05-0081-09

鱼类虽为低等的脊椎动物, 但也能产生由免疫球蛋白(immunoglobulins, Igs)介导的特异性体液免疫反应^[1]。Ig 基本结构由 4 条多肽链, 即相同的 2 条重链分子和 2 条轻链分子借链间的二硫键连接而成, 其蛋白功能域由恒定区和可变区两部分组成, 在抵御外源微生物侵害的免疫应答反应中发挥重要作用^[2]。

免疫球蛋白轻链 (immunoglobulin light chain, IgL) 分为可变区(V)、恒定区(C)和连接区(J), 通过 V 区、J 区以及 C 区的顺序进行排列, 形成 VL-JL-CL 聚簇结构^[3]。哺乳动物中有 κ 、 λ 2 种 IgL^[4], 鸟类中仅发现 1 种 λ 型 IgL^[5], 两栖类则发现 κ 、 λ 和 σ 3 类^[6]。虽然鱼类是低等的脊椎动物, 但却有多种类型的免疫球蛋白轻链存在。大西洋鲑 (*Salmo salar*)^[7]、伯氏豚鲷虎鱼 (*Trematomus bernacchii*)^[8]、鲤 (*Cyprinus carpio*)^[9] 以及大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*)^[10] 中发现 L1、L2 和 L3 3 种 Ig 轻链同种型, 其中 L1 型在鲤鱼和伯氏豚鲷虎鱼存在 L1A 和 L1B 2 个亚型。最近在斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 中发现有 4 种免疫球蛋白

轻链同种型存在^[11], 推测重链可以与不同的轻链同种型构成多种不同功能的 Ig 结构, 在机体免疫防御中发挥作用^[12]。此外, 在模式生物斑马鱼 (*Danio rerio*)^[13] 以及大鳍鲮 (*Mystus macropterus*)^[14]、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)^[15]、鳊 (*Siniperca chuatsi*)^[16] 等经济鱼类也有 IgL 基因克隆与表达的研究报道。

鳗鲡(*Anguilla*)是我国重要的经济养殖种类, 在亚洲各国也有广泛养殖^[17], 但近年来由于高密度养殖造成鳗鲡病害时常发生, 严重影响鳗鲡养殖的健康发展^[18]。因此, 对于鳗鲡免疫防御机制的研究显得尤为重要。笔者将利用 RACE-PCR 技术克隆欧洲鳗鲡免疫球蛋白 *AaIgL* 基因全长, 并对山羊 IgG 免疫欧洲鳗鲡后不同组织器官的轻链基因表达水平变化进行检测分析, 以期对鳗鲡体液免疫应答分子机制的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验动物

欧洲鳗鲡 (*Anguilla anguilla*), 购自厦门同安

收稿日期: 2014-12-09
基金项目: 国家自然科学基金项目 (31272685); 福建省教育厅项目 (JA11150); 福建省海洋与渔业厅项目 (201212140006); 集美大学科研基金项目 (C60819)
冯建军, 博士, 副教授。研究方向: 鱼类免疫学。E-mail: fengjj@jmu.edu.cn

养鳊场,平均体质量约为 200 g。随机选取欧洲鳊 5 尾,经丁香酚麻醉后获得各组织器官样品,液氮冷冻后 -80 ℃ 保存备用;另取 25 尾欧洲鳊暂养 1 周,日换水约 1/3,控制温度约 28 ℃,充足曝气。取山羊 IgG 0.5 mg 与 0.5 mL 完全弗氏佐剂混匀后于背部肌肉注射欧洲鳊,在第 0、7、14、21、28 天随机取 5 尾欧洲鳊,获得肾脏和脾脏样品,液氮冷冻后 -80 ℃ 保存备用。

1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

总 RNA 提取方法按照 Trizol(Invitrogen)使用说明进行。取 1.5 μL 总 RNA 样品进行琼脂糖凝胶 (1.5%) 电泳检测。取 3 μg 脾脏 RNA 进行 5' RACE 和 3' RACE cDNA 模板制备,方法参考 Clontech 公司的 SMARTer™ RACE cDNA Ampli-

fication Kit 使用说明进行。

1.3 Aalgl 基因全长的克隆

以 3' RACE cDNA 为模板,通过简并引物 IgL-F 和 IgL-R(表 1)对 Aalgl 基因片段进行扩增。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分析后,将目的条带进行胶回收,然后与 pMD19-T(TaKaRa)载体连接,转化 JM109 感受态细胞,经 LB/Amp 平板培养基筛选后,通过菌落 PCR 检测阳性克隆并测序。测序结果经 BLAST 比对后,确定为轻链基因片段。利用 Primer 5.0 所设计的 RACE 引物 IgL3-Outer、IgL3-inner、IgL5-Outer 以及 IgL5-inner(表 1)PCR 扩增该基因的全长 cDNA 序列,并用引物 IgL-ORF5 和 IgL-ORF3(表 1)验证其开放阅读框(open reading frame, ORF)的正确性。

表 1 试验中用到的引物及其序列¹⁾
Table 1 Oligonucleotide primers used in the experiments

引物名称 Primer name	引物序列(5' → 3') Primer sequence
IgL-F	GGAGTYCAGGCTGAAGATGC
IgL-R	GTCCAGTCTGAGGGGAAGCC
IgL3-Outer	CCCAGTCTCCGTCAGCTCAATCTGTTC
IgL3-inner	CCCTTAATGTCCTGTCCCCCTCGAA
IgL5-Outer	TTGCCCTGCCCGTCCACCTTC
IgL5-inner	GTAGTAATCTCCTGCATCTTCAGCC
IgL-ORF5	ATGATGATGTCAAACATTTTACTGCTGGTG
IgL-ORF3	CTACTCGGTGCAGTCGGCTTTCCG
real-IgL-F	GGAGCAGCACTTTGACCCTC
real-IgL-R	TCGGTGCAGTCGGCTTTC
β-actin-F	AATCCACGAGACCACCTTCAA
β-actin-R	GTTGGCGTACAGGTCCTTACG
5'IgL-BamH I	CGCGGATCCGATGTAGTTTTGACCCAGTCTCCGTCAG
3'IgL-EcoR I	CCGGAATTCTCGGTGCAGTCGGCTTTCCGA

1) * N=A,C,G,或 T; V=A,G,或 C * N represents A,C,G,or T; V represents A,G,or C.

1.4 Aalgl 的生物信息学分析

欧洲鳊轻链基因的全长 cDNA 序列通过 NCBI Blast 和 ORF Finder 进行分析,欧洲鳊轻链等电点及分子质量通过 ExPASy (http://cn.expasy.org/tools/pi_tool.html)进行预测,信号肽序列由 SingalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SingalP>)进行预测,糖基化位点采用 NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)进行预测,蛋白结构域通过 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)进行

预测,蛋白三级结构的构建由 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>)进行,蛋白序列多重比对采用 BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/>)软件进行分析,并用 MEGA 4.0 软件中邻位相接法构建系统进化树。

1.5 Aalgl 基因不同组织表达水平检测

提取健康欧洲鳊不同组织 RNA 样品,逆转录合成的 cDNA 模板,方法参照 Promage 逆转录酶说明书。实时荧光定量 PCR 反应体系如下:cDNA 模板 9 μL,real-IgL-F 和 real-IgL-R 各 0.5 μL,浓度

为 $10\ \mu\text{mol/L}$, $10\ \mu\text{L}$ SYBR Green Real time PCR Master Mix (TOYOBO), 混合均匀后进行 $95\ ^\circ\text{C}$ 1 min, 40 个循环 ($95\ ^\circ\text{C}$ 15 s, $60\ ^\circ\text{C}$ 1 min) 荧光定量 PCR 扩增, 同时设定 $\beta\text{-actin}$ 为内参基因, 引物 $\beta\text{-actin-F}$ 和 $\beta\text{-actin-R}$ 见表 1。通过溶解曲线、扩增曲线以及 PCR 产物测序分析, 确定是否为欧洲鳗鲡轻链基因和 $\beta\text{-actin}$ 基因特异产物。仪器软件分析得出各个样品的 RQ 值即 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 。

1.6 欧洲鳗鲡脾脏和肾脏 AaIgL 基因表达谱变化

提取山羊 IgG 免疫注射后第 0、7、14、21、28 天欧洲鳗鲡脾脏和肾脏总 RNA, 逆转录合成的 cDNA, 进行实时荧光定量 PCR 检测分析, 方法同材料与方法“1.5”。

1.7 AaIgL 基因的原核表达与 SDS-PAGE 电泳分析

根据获得的欧洲鳗鲡 AaIgL 开放阅读框序列设计蛋白表达上游引物 5' IgL-BamH I 和下游 3' IgL-EcoR I, 以欧洲鳗鲡脾脏 cDNA 为模板, PCR 扩增带有酶切位点的欧洲鳗鲡 AaIgL 开放阅读框序列, 与 pMD19-simple-T (TaKaRa) 链接后获得 pMD19-simple-T-AaIgL 重组质粒。将该重组质粒与表达载体 pET-His 进行 BamH I 和 EcoR I 双酶切后构建 pET-His-AaIgL 表达载体, 进而转化大肠杆菌 BL21 菌株的感受态细胞, 经 Amp/LB 平板培养基筛选后获得阳性克隆菌株进行扩大培养, $D_{600\text{ nm}}$ 约为 0.6 时进行 IPTG 诱导 5 h 后收集菌体。同时设置空载体 pET-His 宿主菌 BL21 为空白对照。用 1 mL 的 PBS 重悬菌体沉淀, $10\ 000\ \text{r/min}$ 、 $4\ ^\circ\text{C}$ 离心 2 min, 重复 3 次。将沉淀用 $300\ \mu\text{L}$ PBS 重悬, 于冰上进行超声波破碎。通过浓缩胶 4%, 分离胶 12.5% 的不连续 SDS-PAGE 凝胶电泳分析表达产物, 并用考马斯亮蓝 R-250 进行蛋白染色。

1.8 免疫印迹分析

样品经 SDS-PAGE 分离后, 用 Western blotting 分析: 重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转移至硝酸纤维素膜, 用 pH 7.4 的 $0.01\ \text{mol/L}$ PBS 配制 5% 脱脂奶粉封闭液, 硝酸纤维素膜室温封闭 1 h, 加入稀释倍数为 1:1 000 的兔抗欧洲鳗鲡 IgM 抗血清, 室温下放置 1 h, 再加入稀释倍数为 1:1 000 的羊抗兔 IgG 的 HRP 酶标抗体, 室温下放置 1 h, 最后进行 DAB 显色反应。

1.9 统计学分析

采用 RQ 平均值 $\pm$ 标准误差的平均值 (mean $\pm$

mean of standard error, $M \pm \text{SEM}$) 来表示欧洲鳗鲡轻链基因表达水平, 通过 t -检验对数据进行统计学分析, $P < 0.05$ 为显著性差异。

2 结果与分析

2.1 AaIgL 基因序列分析

AaIgL 的 cDNA 全长 1 016 bp (GenBank 登录号: EF031085), 开放阅读框 ORF 为 714 bp, 编码 238 个氨基酸, 预测蛋白质分子质量为 25.66 ku, 等电点为 5.18, 蛋白结构分为信号肽、轻链可变区以及轻链恒定区, 具有 1 个潜在的 N-糖基化位点; 5' 非编码区 (untranslated region, UTR) 和 3' UTR 分别为 59 bp 和 243 bp, 终止信号 AATAAA 位于 Poly A 上游 18 bp 处 (图 1)。

2.2 AaIgL 空间结构模拟

AaIgL 空间结构通过 SWISS-MODEL 软件构建, 以 PDB code: 4jo1L (crystal structure of a rabbit IgL) 为模板所构建的 AaIgL 蛋白三维空间结构见图 2。结果表明, AaIgL 蛋白三维空间结构图与兔 IgL 三维空间结构图十分相似, 均由轻链可变区和恒定区 2 个结构域组成, α 螺旋和 β 折叠的数量分别为 1 个和 18 个。

2.3 AaIgL 与其他物种 IgL 的多重比对及系统进化树分析

将推导的 AaIgL 氨基酸序列与其他物种的 IgL 蛋白进行多序列比对, 结果 (图 3) 显示, AaIgL 可变区由 4 个骨架区 (FR) 和 3 个互补决定区 (CDR) 组成; 在骨架区中和恒定区中分别有 2 个和 3 个保守的 Cys 位点。N-J 系统发育树表明: 欧洲鳗鲡轻链与虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 和大西洋鲑轻链 L1 型群聚为一支, 属于 L1 型。哺乳动物 CL 基因分别聚为单系的 κ 型和 λ 型类群, 与软骨鱼和硬骨鱼轻链类型明显不同。两栖类光滑爪蟾 L1 型 CL 基因以独立的分支与哺乳动物 κ 型 CL 类群聚在一起。

除了东太虎鲨 (*Heterodontus francisci*) 轻链同种型 III 与人轻链 κ 型聚为一类外, 其他软骨鱼 CL 基因都聚在一起形成一个独立于 κ 型、 λ 型以及硬骨鱼轻链的过渡类型分支。硬骨鱼不同的轻链同种型形成 3 类不同的分支, 显示不同的同种型的序列之间差异较大。

/ Leader

1 ATGACTTTTATCTAACAGCTATTACCAGTCCTTTACAGACACTGACACAATCAGCAT**Tatgatgatgtcaaacattttactgetgtgatgtgggact** 100
1 M M M S N I L L L V M L G L 14

/ VL

101 ctttgetcaggaatcaatggcagatgtagttttgaaccagttctcgtcagctcaatctgttcagcaggaaccattgtctctatcagctgtacagccagt 200
15 F A Q E S M A D V V L T Q S P S A Q S V Q Q E T I V S I S **C** T A S 47
201 cagagtggtcacaatgacagcaatggcgaactggctccactggtaacctgcagaaacctggtcaggtctcctgaactctgtgacccaatcgcc 300
48 Q S V H N D S N G N W L H W Y L Q K P G Q A P E L L T Y R A T N R Q 81
301 agtctgggattcctaatcgtttcagtgaggatggtctgggactcagtttacactgaaaactcagggtccaggtcgaagatgcaggagattactactg 400
82 S G I P N R F S G S G S G T Q F T L K I T G V Q A E D A G D Y Y **C** 114

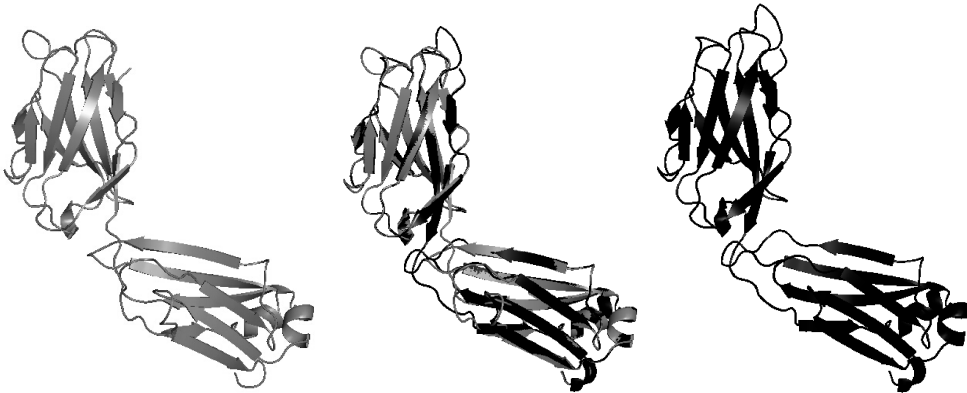
/ CL

401 tcagcaatactatgagattccatacacttttggcggttagtactggatgttggaagtaacacccgccaccccttaattgtcctgtcccccctgaac 500
115 Q Q Y Y E I P Y T F G G G T R L D V G S N T R P A L N V L S P S N 147
501 gggagctgaccagcaaggggacggcgactctgattgcataccaacaggggcttcctctcagactggacgtgagctggaaggtgacggcgaggca 600
148 A E L T S K G T A T L I **C** I A N R G F P S D W T L S W K V D G Q G K 18
601 agacctccgccccggcagaggagtcagtgagaaggacggtctgtacagctggagcagcactttgacctcactgctgacgagtgggccaaggcgcgctc 700
182 T S A P G R G V M E K D G L Y S W S S T L T L T A D E W A K A A S 214
701 gctcacctgcgaggcctccagggtctcgaatctccggtcactcagacgcttcggaaagccgactgcaccagtagACCAAGTGCCAAGCGCCGATCGC 800
215 L T **C** E A S Q G S Q S P V T Q T L R K A D **C** T E * 238
801 TGATTTTTTCTACTGCTCTACAGCATATGCAGCTTCTCTCCATAATAACGATCGATCACAATGGCTTTGCTCGTCGTATGCAGGTATCGTTGCAACCACT 900
901 AATGTGCACAGCTTTAGTTCCTGTTAGATATGTATGTGTGATTGATGGCTTATAATTATAACA**AATAAAC**AAATATGTGAATCGCACAAAAA 1000
1001 AAAAAAAAAAAAAA 1016

5'和 3'非编码区序列用大写字母标示,编码区序列用小写字母标示;核苷酸序列在上面,对应的氨基酸编码序列在下面;起始密码子(ATG)、终止密码子(TGA)、终止信号(AATAAA)字体加粗;Leader 表示信号肽,VL 表示轻链可变区,CL 表示轻链恒定区,保守的半胱氨酸用阴影表示,N-糖基化位点以下划线标识。5' and 3' untranslated regions are represented with capital letters separately. The coding sequence is represented with lowercase letters, and the coded amino sequences are below. The initiation codon (ATG), the stop codon (TGA) and the polyadenylation are represented in bold. Leader: signal peptide. VL: Immunoglobulin light chain variable region. CL: Immunoglobulin light chain constant region. Cysteins are shaded. N-Glycosylation sites are underlined.

图 1 欧洲鳗鲡 *Aalgl* 基因 cDNA 及其编码氨基酸序列

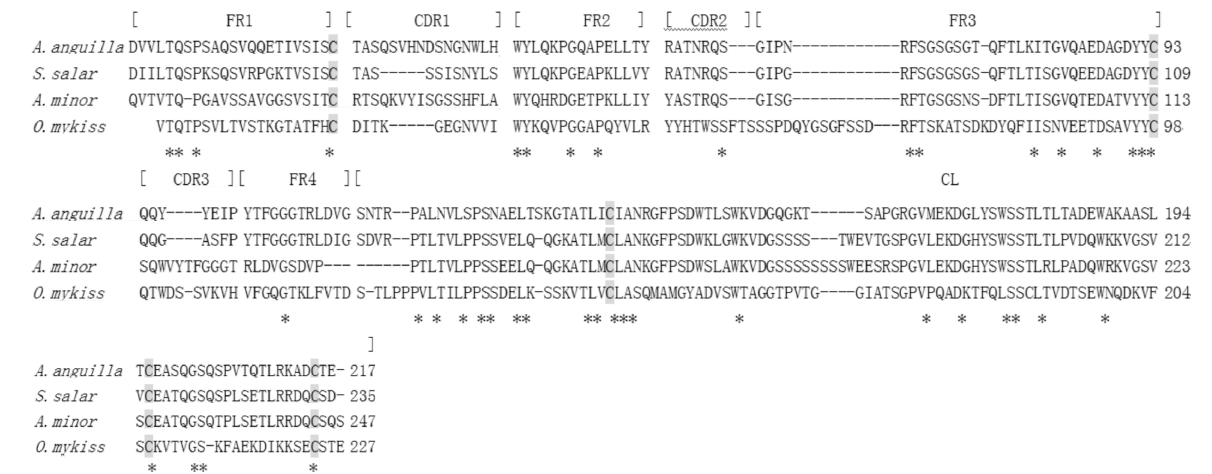
Fig.1 The cDNA and coded amino acid sequence of *Aalgl* gene from European eel



(左)欧洲鳗鲡 IgL 空间结构模拟;(中)欧洲鳗鲡与兔 IgL 叠合空间结构模拟;(右)兔 IgL 空间结构模拟。The left is predicted three-dimensional structure of *Aalgl*; the middle predicted three-dimensional structure of *Aalgl* overlapped with rabbit IgL; the right is three-dimensional structure of a rabbit IgL.

图 2 欧洲鳗鲡 IgL 与兔 IgL 空间结构的比较

Fig.2 IgL three-dimensional structure comparison between European eel and rabbit



用于比较的氨基酸序列分别为欧洲鳗鲡(*A.anguilla*)EF031085、大西洋鲑(*S.salar*)AF406956、花狼鲷(*A. minor*)AF137397、虹鳟(*O.mykiss*)X68521。空位经手工优化以“—”表示;相同氨基酸残基以“*”表示;不同的氨基酸序号用数字表示;保守的半胱氨酸用阴影标识、保守的氨基酸基序用阴影或方框标识;结构域根据氨基酸序列比对而划分。Multiple alignment of the amino acid sequences of IgL from *A. anguilla* (GenBank accession n.EF031085), *S. salar* (GenBank accession n.AF406956), *A. minor* (GenBank accession n. AF137397), *O.mykiss* (GenBank accession n.X68521).Gap positions were manually optimized and are indicated by hyphens.Amino acid residues found identical in all of the compared sequences are indicated by *.Different amino acid residues positions are indicated by numbers.Conserved cysteines are shadowed.Boundaries between each domain are shown beyond the sequences estimated by analogy to the other sequences.

图 3 *AaIgL* 和其他物种 *IgL* 氨基酸序列的多重比较

Fig.3 Multiple alignment of the *IgL* amino acid sequence between European eel and other species

在 CL 区的比较中,与欧洲鳗鲡同源性最高的是鲑形目的大西洋鲑(56.4%),其次是鲈形目的花狼鲷(*Anarhichas minor*)(54.8%)和鲑形目的虹鳟(53.1%),欧洲鳗鲡 CL 区与哺乳动物(人、马、兔、羊和鼠) κ 和 λ 型 *IgL* 同源性较低,范围在 23.7%~29.7%之间,与斑马鱼轻链 L3、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)轻链 F 型以及鲤轻链 L3 型仅为 17.3%~16.3%(图 4)。

2.4 *AaIgL* 在欧洲鳗鲡不同组织的表达

欧洲鳗鲡各组织器官均发现有 *AaIgL* 基因表达,其中脾脏的表达量最高,显著高于其他组织($P<0.05$),肾脏和心脏中的表达量也较高,但在肝脏、肌肉、鳃以及肠中的表达水平较低(图 5)。

2.5 *AaIgL* 在脾脏和肾脏的表达分析

欧洲鳗鲡经山羊 IgG 肌肉注射后,脾脏 *AaIgL* 基因表达量在第 7 天和第 14 天显著升高($P<0.01$),且在第 7 天达到峰值。而肾脏 *AaIgL* 基因

仅在 14 d 表达量有所提高($P<0.05$),表达量明显低于脾脏第 7 天和第 14 天的表达水平($P<0.05$)。第 21 天后,脾脏和肾脏的基因表达均恢复至正常水平(图 6)。

2.6 *AaIgL* 基因的原核表达及 Western blotting 分析

经 IPTG 诱导 4 h 后的克隆子 1 和克隆子 2 的 pET-His-*AaIgL* 重组表达菌体沉淀在大约 27 ku 处明显出现一条新增蛋白带,与预期融合蛋白分子质量相符,表明重组蛋白主要以包涵体的形式存在。该新增蛋白经 Western blotting 检测分析表明能够与兔抗欧洲鳗鲡 IgM 血清发生特异性的显色反应,而空白对照菌表达产物则无此显色条带,说明新增分子质量为 27 ku 表达产物具有天然欧洲鳗鲡免疫球蛋白轻链的抗原性,进一步证实重组蛋白为欧洲鳗鲡免疫球蛋白轻链基因表达产物(图 7)。

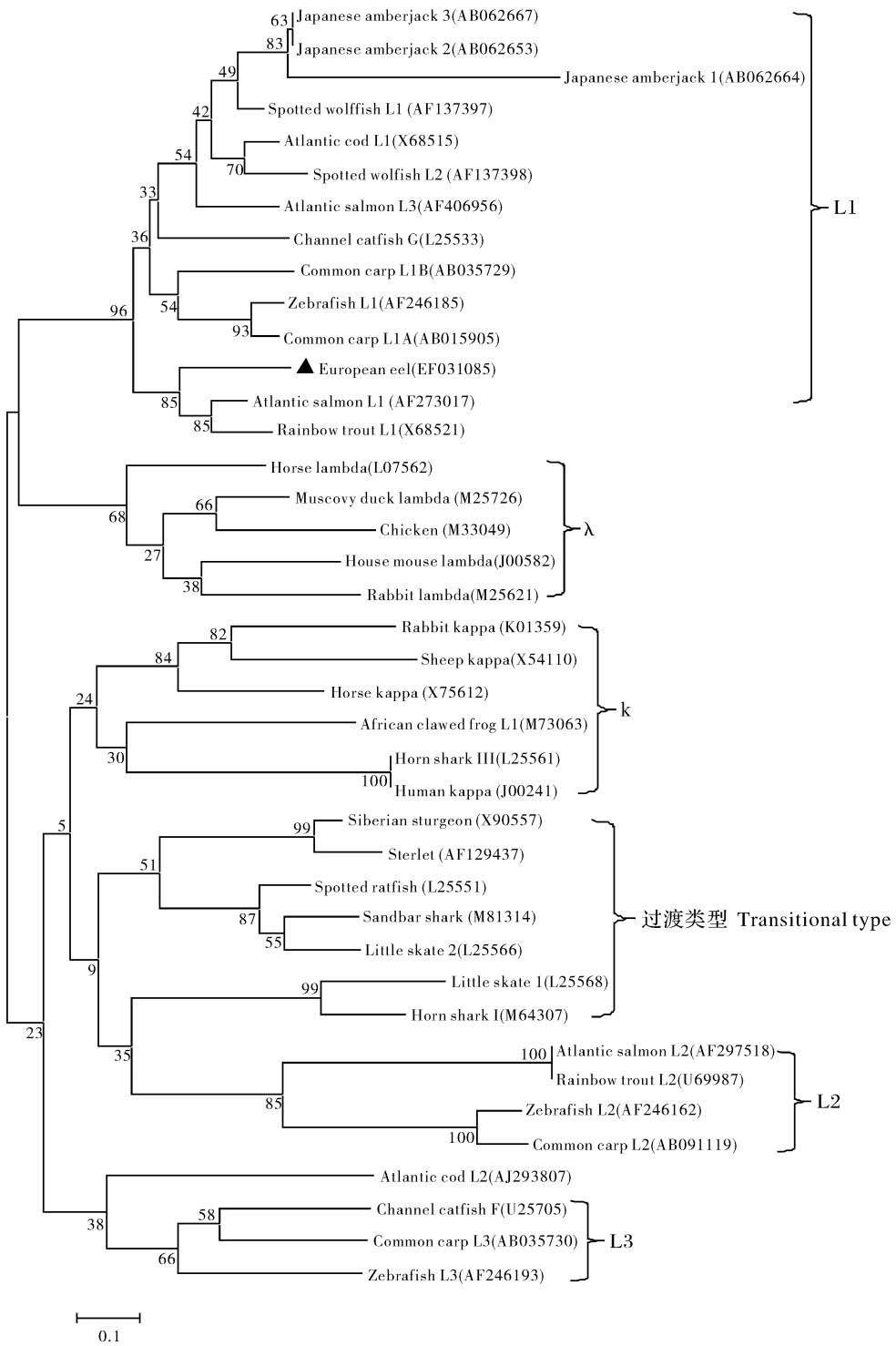
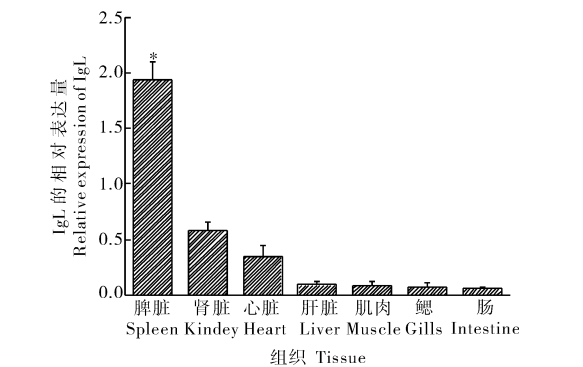


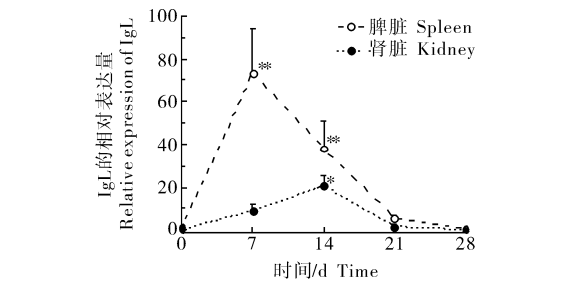
图 4 *Aal*gL 恒定区氨基酸序列系统发育树 (*Aal*gL 用▲标出)

Fig.4 Phylogenetic tree of the IgL constant region amino acid sequences of European eel
(The solid triangle marks the European eel IgL)



* 表示与其他组织中表达量存在显著性差异 ($P < 0.05$) The significant difference of expression level among the tissues was indicated by “*” ($P < 0.05$).

图 5 *AaIgL* 在欧洲鳗鲡各组织器官中表达图
Fig.5 Expression pattern of *AaIgL* in the different tissues of European eel



“*”表示 *AaIgL* 表达水平与第 0 天相比有显著性差异 ($P > 0.05$), “**”表示极显著差异 ($P < 0.01$). The significant difference of expression level was indicated by “*” ($P < 0.05$) when compared with the expression level at 0 d. The extremely significant difference was indicated by “**”.

图 6 肾脏、脾脏 *AaIgL* 基因表达水平变化
Fig.6 The time course changes of *AaIgL* gene expression in the spleen and kidney

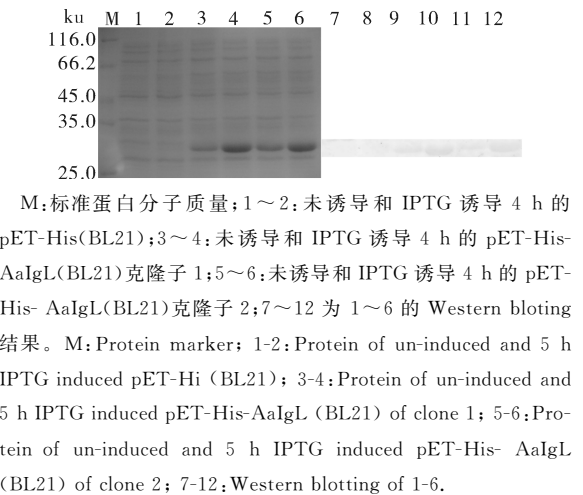


图 7 *AaIgL* 重组蛋白表达分析

Fig.7 Expression analysis of recombinant protein *AaIgL*

3 讨 论

本研究获得了欧洲鳗鲡 *AaIgL* cDNA 全长,多重比对显示其编码的氨基酸序列与大西洋鲑、花狼鲡以及虹鳟在 CL 区的同源性最高为 53%~57%。在所比较序列 VL 区中,CDR1 和 CDR3 区的序列结构及其长度都表现出多样性;CDR2 区中除了 *O. mykiss* 的 L2 有一处为 3aa 插入外,其余序列长度完全一致且相似性较高。涉及结构域内二硫键形成以及 H 和 L 链间二硫键连接的半胱氨酸残基^[19]在所比较的物种 L 链中都比较保守。欧洲鳗鲡 *AaIgL* 三维空间结构与兔 IgL 十分相似,表明 *AaIgL* 具备了免疫球蛋白轻链家族的功能性结构特征,另外参与 IgL 三维结构形成的色氨酸残基出现的位置高度一致,也反映出 IgL 系统发育中的保守性。

哺乳动物 CL 分别聚为单系的 κ 型和 λ 型类群,与软骨鱼和硬骨鱼轻链类型明显不同^[20]。两栖类光滑爪蟾 L1 型 CL 基因以独立的分支与哺乳动物 κ 型 CL 类群聚在一起。除了东太虎鲨轻链同种型 III 与人轻链 κ 型聚为一类外,其他软骨鱼 CL 基因都聚在一起形成一个独立于 κ 型、 λ 型以及硬骨鱼轻链的分支。硬骨鱼不同轻链同种型形成 3 类不同的分支^[21],表明不同的同种型序列之间差异较大。目前,随着更多的硬骨鱼类免疫球蛋白轻链基因被克隆与分析,其类型被分为 L1、L2 和 L3 3 个同种型^[8],本文克隆的欧洲鳗鲡 *AaIgL* 属于 L1 型。最近,有学者将硬骨鱼类 IgL 划分为即 σ 、 κ 和 λ 3 种类型^[11],与传统的分类有所不同,该种分类方法尚需进一步证实。

鱼类没有高等脊椎动物的淋巴结,但具有功能相似的淋巴髓质组织,其中脾脏是鱼类最重要的淋巴髓质组织^[22],与本试验欧洲鳗鲡脾脏 *AaIgL* 基因表达水平最高的结果相符。已有的研究表明鳃作为鱼类重要的粘膜免疫器官,含有多种淋巴细胞,可以分泌粘膜免疫球蛋白^[23]。杨金先等^[24]发现欧洲鳗鲡粘膜免疫球蛋白的结构和抗原性有别于血清 IgM,但其功能不是很清楚。本文在欧洲鳗鲡鳃中也检测到一定量的 *AaIgL* 基因表达,但鳃中是否存在其他类型的 *AaIgL* 基因尚需深入研究。此外,欧洲鳗鲡 *AaIgL* 在心脏、肝脏、肌肉等非淋巴组织中也有表达,这可能与血液循环中的淋巴细胞有关^[10]。

山羊 IgG 免疫欧洲鳗鲡后,其脾脏、肾脏 AaIgL 基因表达水平均有显著提高,与嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)感染大鳍鲃后引起其脾脏和头肾的 IgL 基因表达水平上调的结果一致,表明脾脏和肾脏参与欧洲鳗鲡免疫应答反应,而相关研究也表明嗜水气单胞菌感染欧洲鳗鲡后,在肾脏、脾脏有大量 Ig⁺ 细胞产生^[25]。

欧洲鳗鲡 AaIgL 基因表达水平在脾脏和肾脏的峰值分别在第 7 天和第 14 天,而欧洲鳗鲡脾脏和肾脏 IgH 基因表达水平分别在第 14 天和第 21 天达到峰值^[26],明显滞后于 AaIgL,这可能由于免疫球蛋白重链和轻链基因的转录调控机制不同所致。另外,脾脏 AaIgL 基因表达水平与变化幅度均高于肾脏,提示欧洲鳗鲡脾脏中抗体分泌细胞数量较多,这与脾脏是鱼类主要的造血器官有关^[22]。

AaIgL 蛋白在大肠杆菌中主要以包涵体的形式表达,这与张永安等^[16]在鳊中的研究结果相同。Western blotting 分析表明 AaIgL 重组蛋白能够与兔抗欧洲鳗鲡 Ig 血清发生特异性的显色反应,表明重组蛋白具有天然欧洲鳗鲡免疫球蛋白轻链的抗原性,系欧洲鳗鲡免疫球蛋白轻链基因表达产物,为该蛋白功能的研究奠定了分子基础。

总之,本研究成功获得了欧洲鳗鲡 AaIgL cDNA 全长序列,经山羊 IgG 免疫后 AaIgL 的表达量在脾脏和肾脏发生了明显变化,表明 AaIgL 参与了欧洲鳗鲡机体免疫应答反应,可为鳗鲡免疫防御分子机制的研究提供参考。

参 考 文 献

- [1] DRENNAN J D, LAPATRA S E, SWAN C M, et al. Characterization of serum and mucosal antibody responses in white sturgeon (*Acipenser transmontanus* Richardson) following immunization with WSIV and a protein hapten antigen [J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 23(3): 657-669.
- [2] 宿斌, 王获, 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 [J]. 水产学杂志, 2013, 26(1): 60-64.
- [3] HIKIMA J, JUNG T S, AOKI T. Immunoglobulin genes and their transcriptional control in teleosts [J]. Dev Comp Immunol, 2011, 35(9): 924-936.
- [4] HOME W A, FORD J E, GIBSON D M. L chain isotype regulation in horse. I. Characterization of Ig lambda genes [J]. J Immunol, 1992, 149(12): 3927-3936.
- [5] MAGOR K E. Immunoglobulin genetics and antibody responses to influenza in ducks [J]. Dev Comp Immunol, 2011, 35(9): 1008-1017.
- [6] 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(4): 1544-1550.
- [7] SOLEM S T, JØRGENSEN T Ø. Characterisation of immunoglobulin light chain cDNAs of the Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: evidence for three IgL isotypes [J]. Dev Comp Immunol, 2002, 26(7): 635-647.
- [8] COSCIA M R, GIACOMELLI S, DE SANTI C, et al. Immunoglobulin light chain isotypes in the teleost *Trematomus bernacchii* [J]. Mol Immunol, 2008, 45(11): 3096-3106.
- [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): 369-379.
- [10] TIAN C, DING Y, AO J, et al. Three isotypes of immunoglobulin light chains in large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*: molecular cloning, characterization, and expression analysis [J]. Fish Shellfish Immunol, 2011, 30(6): 1249-1256.
- [11] WU M S, CHENG C A, LIN C H, et al. Molecular characterization and expression analysis of four isotypes of immunoglobulin light chain genes in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* [J]. Dev Comp Immunol, 2013, 39(3): 169-179.
- [12] 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(10): 2683-2694.
- [13] ZIMMERMAN A M, YEO G, HOWE K, et al. Immunoglobulin light chain (IgL) genes in zebrafish: genomic configurations and inversional rearrangements between (VL-JL-CL) gene clusters [J]. Dev Comp Immunol, 2008, 32(4): 421-434.
- [14] 蒋自立, 李春涛, 张其中, 等. 大鳍鲃免疫球蛋白轻链 3 型基因 cDNA 的克隆及表达 [J]. 水产学报, 2012, 32(7): 1011-1018.
- [15] 王贤丽, 张玉喜, 孟亮, 等. 大菱鲆免疫球蛋白轻链 IgL 全长 cDNA 的分离、鉴定及表达分析 [J]. 中国海洋大学学报, 2010, 40(4): 31-37.
- [16] 张永安, 聂品. 鳊免疫球蛋白轻链基因在大肠杆菌中的表达 [J]. 自然科学进展, 2002, 12(9): 34-39.
- [17] LEE W C, CHEN Y H, LEE Y C, et al. The competitiveness of the eel aquaculture in Taiwan, Japan, and China [J]. Aquaculture, 2003, 221(1): 115-124.
- [18] GUO S L, WANG Y, GUAN R Z, et al. Immune effects of a bivalent expressed outer membrane protein to American eels (*Anguilla rostrata*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2013, 35(2): 213-220.
- [19] WIERSMA E J, SHULMAN M J. Assembly of IgM. Role of disulfide bonding and noncovalent interactions [J]. J Immunol, 1995, 154(10): 5265-5272.
- [20] EDHOLM E S, WILSON M, BENGTEN E. Immunoglobulin light (IgL) chains in ectothermic vertebrates [J]. Dev Comp Immunol, 2011, 35(9): 906-915.

[21] ZHANG Y A,NIE P,LUO H Y,et al.Characterization of cD-NA encoding immunoglobulin light chain of the mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)[J].Vet Immunol Immunopathol,2003,95(1/2):81-90.

[22] 张永安,孙宝剑,聂品.鱼类免疫组织和细胞的研究概况[J].水生生物学报,2000,24(6):648-654.

[23] SALINAS I,ZHANG Y A,SUNYER J O.Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish[J].Dev Comp Immunol,2011,35(12):1346-1365.

[24] 杨金先,陈强,林娟娟,等.欧洲鳗黏膜免疫球蛋白单克隆抗体的制备及其特性分析[J].中国水产科学,2008,15(3):511-515.

[25] 冯建军,关瑞章,郭松林.欧洲鳗免疫球蛋白阳性细胞的组织化学定位与分布特点[J].华中农业大学学报,2008,27(4):500-505.

[26] 冯建军,关瑞章,林鹏,等.欧洲鳗抗体生成规律的初步研究[J].集美大学学报,2009,14(4):333-338.

Molecular cloning and expression analysis of immunoglobulin light chain gene in *Anguilla anguilla*

FENG Jian-jun GUO Song-lin LIN Peng

Fisheries College,Jimei University/Engineering Research Centre of Eel Modern Technical Industry,Ministry of Education/Key Laboratory of Healthy Mariculture for East China Sea,Ministry of Agriculture,Xiamen 361021,China

Abstract The cDNA sequence of the immunoglobulin light chain gene, *AaIgL*, in European eel (*Anguilla anguilla*) was cloned using reverse transcription PCR (RT-PCR). The full-length cDNA sequence of *AaIgL* is 1 016 bp, with a 714 bp open reading frame encoding 238 amino acids. The amplified DNA fragments were ligated into pET-his vector, transformed into *E.coli* BL21 and then induced by IPTG. The size of the expressed protein was 27 ku as estimated by SDS-PAGE electrophoresis and the recombinant proteins were strongly recognized by the serum anti-IgM of European eel detected by Western blotting, demonstrating that the fusion protein is expressed stably in *E. coli* BL21 with the form of inclusion bodies. Quantitative real-time RT-PCR analysis revealed a broad expression of *AaIgL* in a wide range of tissues, with the highest expression in spleen, followed by kidney and heart, and lowest in liver, muscles, gills, and intestine. After injection with goat IgG, *AaIgL* were obviously up-regulated in the spleen and the kidney, peaking at 7 d and 14 d, respectively. The peak expression level of *AaIgL* was much higher in the spleen and the expression recovered to normal level at 21 d in both spleen and kidney. Our results suggested that *AaIgL* might play an important role in fish's immune defense system, and the spleen was the main organ for *AaIgL* expression after stimulation.

Key words *Anguilla anguilla*; immunoglobulin light chain (IgL); prokaryotic expression; real-time PCR

(责任编辑:边书京)