

史氏鲟免疫球蛋白重链可变区序列及多样性*

刘红柏^{1,3**} 王 荻^{1,2}

1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 哈尔滨 150070

2. 东北林业大学野生动物资源学院, 哈尔滨 150040

3. 东北农业大学动物科技学院, 哈尔滨 150030

摘要 为了研究史氏鲟免疫球蛋白重链可变区基因的组织结构和多样性, 采用 RT-PCR 技术从史氏鲟 (*Acipenser schrenckii*) 脾脏总 RNA 中获得了免疫球蛋白重链可变区 cDNA 克隆, 随机挑取 31 个阳性克隆进行测序。结果表明: 所有序列相同率高于 75%, 前导肽相同率高于 90%, 应属于同 1 个 VH 家族。其变异主要存在于互补性决定区, 特别是 CDR3 区。在 D 片段序列中发现大量保守的基因序列 (motif)。并发现多个 VH 基因片段可以共用一个 J 片段的现像。在基因组 DNA 重排过程中, VH 片段可以与任意的 D 和 J 片段结合。此外, 史氏鲟免疫球蛋白重链可变区的 VH, D 和 J 片段的随机重排外, 外切核酸酶作用, 以及在重排位点大量 N, P 片段的插入现象, 都大大增加了鲟鱼免疫球蛋白的多样性 [动物学报 52 (3): 557-563, 2006]。

关键词 史氏鲟 免疫球蛋白 重链 可变区 多样性

Ig heavy chain of Amur sturgeon *Acipenser schrenckii*: cDNA sequence and diversity*

LIU Hong-Bai^{1,3**}, WANG Di^{1,2}

1. Heilongjiang River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Harbin 150070, China

2. Wildlife Resource College, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

3. College of Animal Science and Technology, Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China

Abstract To investigate the VH gene organization and diversity of the Amur sturgeon IgH gene locus, total RNA was extracted from the spleen, and the cDNA of the immunoglobulin heavy chain variable regions were obtained by RT-PCR with a pair of specific primers. 31 clones were isolated and completely sequenced in double-strand sequenced over the variable regions. The erythrocyte DNA was cut with restriction endonuclease for Southern blotting to define the distribution in the sturgeon genome and whether they belong to the same family. Except for the leader, D and JH segments translation sequence, the aa sequence comparison results of the variable domain showed that the identity of all the clones was higher than 75%, subsequently those clones were separated into two clusters. The identity of the leader peptides was over 90%. According to the result of Southern blotting, we suspected that the 31 clones belong to the same IgH variable region family. The complementary determining regions (CDRs), especially the CDR3, have a number of variations. But the range of sturgeon CDR3 was shorter than other vertebrates. This indicates that the sturgeon is lower in the development of immune system. Some conservative motifs were found in the diversity segments. During the rearrangement, more than one VH gene segments could share the same JH segment. In another word, the variable segments can be associated with any of the D or JH segments in the rearrangement. Amur sturgeon, in addition to the random rearrangement of VH, D, and JH segments, has exonuclease activity and an introduction of N and probably P nucleotides at the site of rearrangement all of which could enhance the diversity of Amur sturgeon IgH variable region [Acta Zoologica Sinica 52 (3): 557-563, 2006].

Key words Amur sturgeon, *Acipenser schrenckii*, Immunoglobulin, Heavy chain, Variable region, Diversity

2005-12-08 收稿, 2006-02-14 接受

* 科技部“十五”攻关计划 (No.2001BA505B506), 黑龙江省自然科学基金 (No.C0322) [This research was funded by the grants from the Ministry of Science & Technology Tackle Key problems program (No.2001BA505B506) and the Heilongjiang Province Natural Science Foundation (No.C0322)]

** 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: liulhb@hotmail.com

© 2006 动物学报 Acta Zoologica Sinica

鱼类是最早产生免疫球蛋白 (Immunoglobulin, Ig) 的生物, 所产生的 *IgM*, 是系统发生及个体发育中最早出现的 Ig。鲟鱼隶属于辐鳍鱼纲的软骨硬鳞亚纲 (Nelson, 1994), 被认为是最古老的辐鳍亚纲的鱼类之一, 与硬骨鱼类相比, 它更接近于板鳃类, 是研究 Ig 基因组织形式和多样性机制的一个十分有意义的物种 (Takeshi et al., 1990)。

免疫球蛋白的重链 (*IgH*) 基因座包含可变区基因区段 (Variable segment, *VH*), 连接区基因区段 (Joining segment, *JH*), 多样性基因区段 (Diversity segment, *D*) 以及紧接其后的恒定区基因区段 (Constant segment, $C\mu 1-4$), 各区段的不同结构决定了 *IgH* 分子的多样性。所有的有颌脊椎动物都具有 Ig 分子 (Lundqvist, 1998)。伴随着软骨鱼类与辐鳍鱼类分歧的同时, *IgM μ* 链基因组织及其调节也发生了显著的变化, 导致辐鳍鱼类和四足类的谱系其 μ 链基因经历了单个基因区段的前后串连复制, 而软骨鱼类 *IgM μ* 链基因则经历了整个遗传单位 (基因簇) 的复制 (Amemiya and Litman, 1990a)。软骨鱼的 *IgM* 为四聚体, 其重链 (μ 链) 基因座的组织形式与两栖动物 (爪蟾属) (Schwager et al., 1998a) 和哺乳动物 (Honjo and Matsuda, 1995) 的一样, 即数百个可变区基因区段 (*VH*) 位于多变区基因区段聚簇 (Cluster of diversity segment, *D*) 的上游, 紧接着是连接区基因区段 (*JH*), 而在 3' 端是 4 个恒定区基因区段 ($C\mu 1-4$) 和 2 个跨膜区基因区段 (Transmembrane segment, *TM1-2*)。总的来说, *VH*、*D* 和 *JH* 区段的拷贝数多于 $C\mu$ 区段。这种基因组织形式称为“易位子 (Translocon)”排列 (Amemiya and Litman, 1990b; Bengtén et al., 1991; Ghaffari and Lobb, 1989; Wilson et al., 1990; Ventura-Holman et al., 1994; Hordvik et al., 1997)。基因组织形式的不同将会影响特异性抗体的多样性机制 (Lundqvist, 1998)。多样性机制包括 *VH-D-JH* 片断的随机重排, 核苷酸的核酸外切酶切除作用, 以及重排位点 P 和 N 核苷酸的插入 (Lieber, 1992)。

关于鲟鱼免疫球蛋白分子生物学方面的报道仅见于西伯利亚鲟的轻链和重链 (Lundqvist and Pilstrom, 1999; Lundqvist, 1998; Lundqvist et al., 1996), 目前还没有关于史氏鲟此方面的研究。软骨硬鳞鱼类 (鲟和匙吻鲟) 能通过提高二次应答中

特异性抗体的浓度来达到较好的免疫反应 (Lundqvist and Pilstrom, 1999), 因此对鲟鱼 Ig 的研究, 是抗病防病、研制疫苗的基础, 并对了解脊椎动物免疫系统的组成与进化具有重要意义。关于硬骨鱼抗体基因的知识, 能够帮助我们根除一些对现代水产养殖业有害的传染性疾病 (Takeshi et al., 1990)。

1 材料与方法

1.1 材料

1 龄史氏鲟 (150 - 200 g), 采自中国水产科学研究院鲟鱼繁育技术工程中心, 系野生鲟鱼人工孵化的第一代养殖品种。

1.2 方法

1.2.1 *IgH* 链 cDNA 的克隆 采用 Trizol (Germany Invitrogen Life Technologies) 试剂盒分别提取 6 条史氏鲟脾脏 (鱼类产生淋巴细胞的主要器官) 组织总 RNA。取总 RNA 悬液 8 μ l 加入 oligo (dT) 引物 40 pmol/L 混匀后, 70 $^{\circ}$ C 水浴 5 min, 立即冰浴 5 min, 用以消除 RNA 二级结构并使单链模板 RNA 与引物充分复性结合。然后补入 5 \times Buffer 4 μ l, dNTP 0.5 μ l (10 mmol/ μ l), M-MuLV (莫洛尼氏鼠白血病毒) 反转录酶 1 U, 抑制剂 5 U, 加水补至总体积 20 μ l。37 $^{\circ}$ C 反转录 1 h 后, 得到反转录合成的单链 cDNA 产物。根据已克隆的西伯利亚鲟重链 cDNA 序列 (GenBank 序列号为 Y13253), 应用 Oligo6.0 生物软件设计合成一对引物, 序列如下:

V1: 5'-CACAATACTGCAGTACAATGGG-3'

V2: 5'-GTTTGATCCGTCCAAGAGAAGG-3'

PCR 反应体系为反转录产物 1 μ l, 10 \times Buffer 2.5 μ l, Dntp 0.2 mmol/L, 上下游引物各 0.5 μ mol/L, *Taq* DNA 聚合酶 1 U, 然后加水至 25 μ l。PCR 反应条件为: 预变性 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s 共 30 个循环; 最后延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min。采用切胶回收试剂盒 (MagExtractorR-PCR & Gel clean up-ToYoBo) 回收 PCR 产物, 并取纯化回收后样品与 PMD18T 载体 (TaKaRa) 16 $^{\circ}$ C 连接 3 h, 转化到大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中。提取质粒, 经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切和 PCR 鉴定后, 随机挑取 31 个重组阳性克隆进行序列测定。

1.2.2 序列分析 ABI 3730XL 自动测序仪 (北京三博远志生物公司) 进行序列测定, 并通过

BLAST-N (Altschul et al., 1997) 程序在 GenBank 数据库中进行相似性检索。采用 ExPASy (Expert Protein Analysis System) 将其翻译成对应的氨基酸序列, 并应用 CLUSTAL W1.8 (Thompson et al., 1994) 程序或 Jotun Hein 方法完成多重对准。氨基酸序列相同率和亲水性分布分别由 DNA Star 软件包的 MegAlign 和 Protean 程序进行分析。根据 Kabat et al. (1991) 研究报道并结合其他物种相似区域的比较分析, 将 VH 区分为前导肽 (Leader peptide, LP), 骨架区 (Framework regions, FRs1-3) 以及互补决定区 (Complementary determining regions, CDRs1-2) 以及由 D 和 J 片段编码的 CDR3 和 FR4, 共 8 个基因区段进行分析研究。

1.2.3 Sothern blot 分析 提取红细胞总 DNA, 用 *Hind* III, *Bam*HI, 和 *Eco*R I 单独及分别排列组合酶切。酶切产物在 1% 的琼脂糖凝胶中 1.5 V/cm 电泳 20 h 充分分离, 并借由 3 MM 滤纸和 20×SSC 虹吸作用转移到尼龙膜 (MAGNA Nylon transfer membrane 0.45 Micron) 上; 360 nM 紫外光照射下交联 30 s, 预杂交 1 h 后, 加入 10 μl 地高辛标记过的探针, 50℃ 杂交 16-20 h; 将膜用含有 0.1% SDS 的 2×SSC 室温漂洗两次, 每次 15 min, 再用含 0.1% SDS 的 0.1×SSC 65℃ 漂洗两次, 每次 15 min; 然后加入含 1 μl Anti-Dig-Ap (Germany) 的 10 ml buffer (1×buffer:bolcking = 9:1) 振荡 1 h; 最后将 400 μl 含有 4 μl CDP-STAR (Germany) 的 Buffer III, 滴加在膜上, 铺匀, 黑暗中显色 5 min, 压入增感屏, X 光片曝光 30 min

并显影。

2 结果

2.1 史氏鲟 *IgH* 链可变区 cDNA 序列分析

采用引物 V1 和 V2 进行 RT-PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测到预期大小 (约 560 bp 处) 的产物条带, 切胶纯化回收, 并克隆到 PMD18T 载体上, 转化后经阳性克隆检测, 随机挑取重组阳性克隆并依次编号为 v1-v31 进行测序。序列已递交到 GenBank 数据库中, 录入编号分别为 DQ257638 到 DQ257668。所有测得的序列均包括 *IgH* 链 LP, VH, DH, JH 的完整功能区序列。通过网络对比, 与已报道的西伯利亚鲟 H 链可变区具有相同的结构域组成。将克隆 v1-v31 的 VH 区段 (FR1 至 FR3) 以及完全 cDNA 序列进行比较时, 核苷酸的同构率分别为 82.2% (v2 与 v26) 至 98.8% (v11 与 v17) 之间不等。而网络对比结果显示, 所有序列均与西伯利亚鲟免疫球蛋白重链可变区 VI 家族有极高的同构率, 可达 90% 左右。

2.2 史氏鲟 *IgH* 可变区氨基酸序列分析

2.2.1 可变区 V 片段序列分析 除去 LP 以及 CDR3 和 FR4 区 (他们是由 D 和 JH 片段编码的) 的可变区 V 片段的氨基酸序列, 采用 Jotun Hein 方法比较结果显示, 克隆 v1-v31 的 VH 区段自动聚类为两个相对独立的亚单元 (见图 1)。其第一部分的氨基酸序列同构率在 80.6% (v7 与 v17) -95% (v17 与 v25) 之间, 第二部分氨基酸序列同构率为 77.8% (v3 与 v16, v16 与 v24) -99%

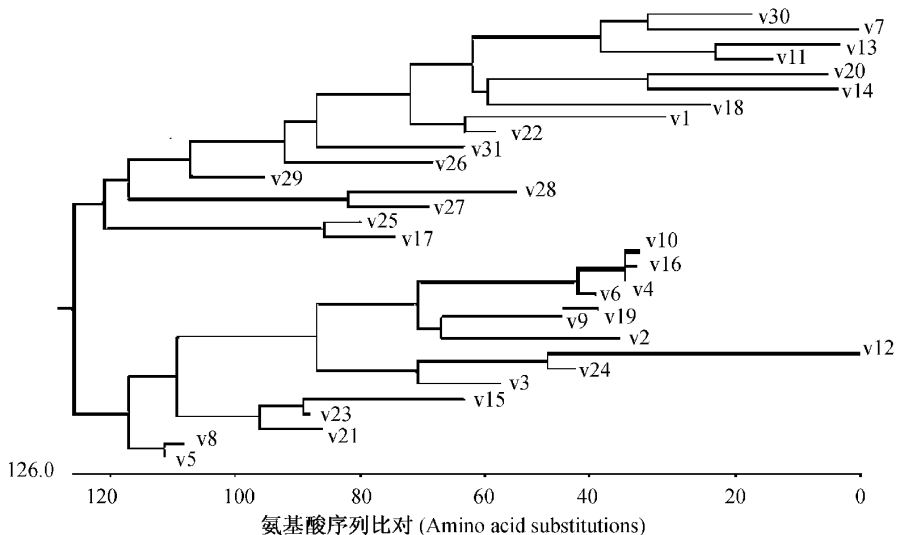


图 1 史氏鲟 VH 区氨基酸序列比对聚类结果

Fig.1 The clustering result of Amur sturgeon VH region aa sequences

(v5 与 v8, v9 与 v19)。但是总体相同率高于 75%。而且有报道指出前导肽 (LP) 序列是具有家族特异性的 (Lundqvist, 1998), 而本实验获得的全部序列的前导肽 (LP) 的氨基酸序列都具有极高的相似性, 在 90% 以上, 所以我们推测这些 VH 基因片段应该来源于同 1 个 VH 基因家族。

2.2.2 可变区 D 片段序列分析 通过与其他物种进行网络对比, 并结合 Lundqvist (1998) 的方法, 将 FR3 区域内保守的半胱氨酸 (Cys) 后的第 3 个氨基酸作为 D 片段的起始点。而把 FR4 中保守的色氨酸 (Trp) 前的第 3 个氨基酸作为 J 片段的起始点。研究获得的数据表明, D 片段的长度从 7 到 35 个碱基的长度不等, 并且无论在核苷酸, 还是在氨基酸序列上都有很大的不同。对史氏鲟 D 片段的比较分析见图 2。

2.2.3 可变区 J 片段序列分析 通过对 J 片段的分析, 我们发现尽管核苷酸序列有些许不同, 但是编号为 4, 7, 9, 10, 15, 16, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 30, 31 的这 15 个序列的 J 片段具有相同的氨基酸序列, 而 6, 8, 11 的 J 片段的氨基酸序列也是相同的 2, 3, 13, 14 也同样共用了另一个

J 片段。曾有研究发现, 有一个 JH 片段在西伯利亚鲟的三个 VH 家族中都出现了 (Lundqvist, 1998), 这就表明, 在形成免疫球蛋白的基因重组过程中, 同一 VH 家族的不同成员或者不同 VH 基因家族的成员可以使用相同的 JH 片段。根据本试验的数据分析, 我们共分离到 12 种不同氨基酸序列的 JH 片段。

2.2.4 FRs 和 CDRs 各区段变异性分析 按照可变性参数计算方法 (Kabat, 1976) 绘制的图 3 中可以看出, 史氏鲟免疫球蛋白重链可变区的互补决定区 (CDRs) 具有较大的可变性。CDR1 区共包括 5 个氨基酸残基。CDR2 区相对较长。而由 D 及部分 J 片段编码的 CDR3 区在氨基酸位置和长度上都表现出更大的可变性。

通过与其他物种 (包括西伯利亚鲟, 虹鳟, 蛙, 鼠, 鳕, 兔, 人和牛等) 的 CDR3 比较发现, 鲟鱼的 CDR3 的长度变化范围比哺乳动物窄的多, 而史氏鲟的 4-11 个氨基酸的变化范围比西伯利亚鲟还要小一些 (Lundqvist, 1998; Jorgen et al., 2000)。

	R		F	D
5	CGA	CAGGTAT GGGGT AGCGG GTAC	TTT	GAC
6	---	GACTTCAGT AGCT ACAGT GGG	---	--T
8	---	CAGGTAT GGGGT AGCGG GTAC	---	---
10	-AG	CTGGGGT GCCCGAATGCT	--C	---
15	---	GCCT GGGGT AGCGGG TGGGGT GCT	--C	---
22	---	GCT GGGGT GGAG AGCT ATGGTTAC	--C	---
33	--G	TGGGGT GGCGGTGC	---	---
4	---	GACTACTACTACGGTGCT	--C	---
9	---	GCTAG TGGGTGGAGTGGCTACGGC	--C	---
12	---	GAGAGAGACTACTATAGCCCTACGGC	--C	---
19	TCG	GTCTACGGGGTAGC AGCT ACAACCGC	---	---
21	AAG	GGGT GGCC CTACGGTGTT	--C	---
26	G-C	AGTAC GGGGACTACTGGGGAAAGGCACAATGAT	CAC	CGT
27	--G	CGCTATAGCCCTACGATGCT	--C	---
31	---	TACG GTAGCTAC AGTGGCTACGGTGC	---	CGA
5	---	CAGGTAT GGGGT AGCGG GTAC	---	---
8	---	CAGGTAT GGGGT AGCGG GTAC	---	---
15	---	GCCT GGGGT AGCGGG TGGGGT GCT	--C	---
19	---	GTCTACGGGGTAGC AGCT ACAACCGC	---	---
16	---	TACAGCGGT AGCT GG GTACA AATGCT	--C	---
20	G--	GGAGGGGACAATGCT	---	--G

图 2 D 片段核酸序列比较

重复出现基因序列用黑体标出; 回文序列用□标出。

Fig.2 The comparison result of D segment nucleotide sequence

The last aa of the V segment and the first aa of the J segment are indicated at the top. Identified motifs are indicated in bold and palindrome sequences are written in frame and gray.

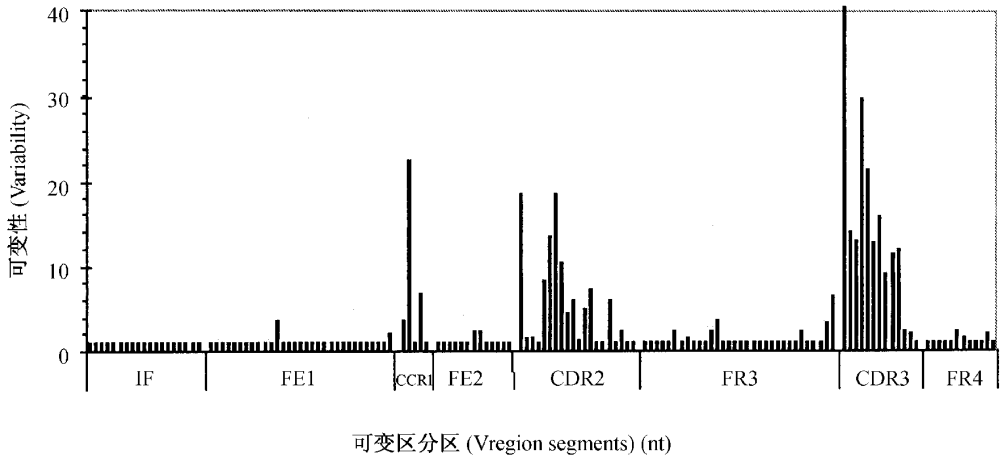


图 3 克隆序列分区可变性比较条形图

可变性 = 位点上不同氨基酸的数目 / 该位点最常见氨基酸出现的频率 (引自 Kabat et al., 1991: Structural concepts in immunology and immunochemistry)。

Fig.3 Variability of the sequenced clones

Variabilities have been calculated according to Kabat et al. (1991). Variability = Number of different amino acids at a given position / Frequency of the most common amino acid at that position.

2.3 Southern blotting 分析

采用自制的史氏鲟 *VH* 家族特异性探针与不同限制性内酶切组合的红细胞基因组 DNA 酶切产物杂交后得到了大量的杂交谱带, 分析 Southern blotting 结果, 可以确定该家族成员众多, 并广泛分布于史氏鲟基因组中。而取不同聚类的 2 个克隆为代表制备的探针杂交结果一致 (图片未附), 结合可变区及前导肽的高度相同性, 我们认为, 本实验所取得的数据应都属于同一个免疫球蛋白可变区家族。

2.4 史氏鲟 *IgH* 可变区亲水性, 抗原指数和表面可能性分析

史氏鲟 *IgH* 可变区的亲水性分析如图 4 所示, 图 4: A 为史氏鲟 *IgH* 可变区的亲水性分布图, 可变区的亲水性氨基酸主要分布于 FR1 中部、FR2 前部、FR3 两端和 FR4 前端, 以及整个的 CDR1 和 CDR3, 而 CDR2 亲水性较低。同时, 对照抗原性指数图 (图 4: B) 和表面可能性图 (图 4: C), 亲水性越强的区域, 越倾向于暴露在分子表面, 更易于形成抗原决定簇。

3 讨论

抗体分子中 H, L 链 V 区是抗原的结合部位, 其中主要是以相对恒定的 FR 区氨基酸序列作为骨架, 与高度变异的 CDRs 区结合在一起构成与抗原表面三维结构互补的结构空间。

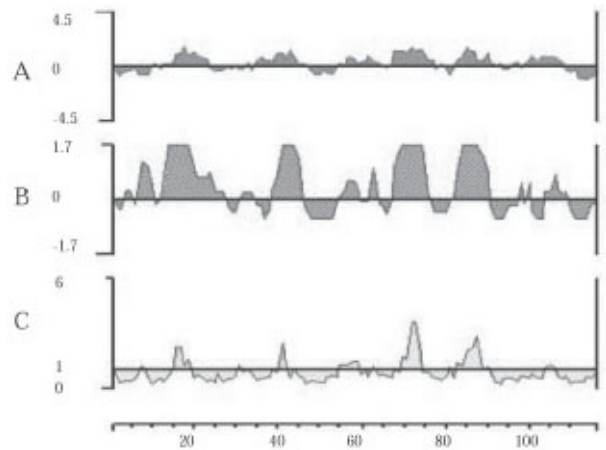


图 4 史氏鲟 *IgH* 可变区亲水性分布图

亲水性尺度分别为: A. Kyte-Doolittle 亲水性; B. Jameson-Wolf 抗原指数; C. Emini 表面可能性。

Fig.4 The data of amur sturgeon hydrophilic, antigen index and surface probability

A. Hydrophilic blot Kyte-Doolittle. B. Antigen index-Jameson-Wolf. C. Surface probability plot-Emini.

通过对史氏鲟可变区氨基酸序列比对结果的分析, 我们认为本实验所得到序列均属于同一个 *VH* 家族, 但是又聚类为相对独立的两个不同的亚单位。由 Southern blotting 结果可以看出, 该史氏鲟 *VH* 家族是由很多成员组成的, 他们都将成为鲟鱼免疫球蛋白多样性的储备单元, 但是由于假基因的

存在, 我们无法推测出该 *VH* 家族成员的确切数目。同时, 我们还发现, 不同可变区片段可以与同一个 *J* 片段发生重组, 这也意味着在史氏鲟同一条染色体上, 编码 *VH* 家族的基因在编码 *D* 和 *J* 片段的基因的上游, 史氏鲟免疫球蛋白重链可变区是采取易位子重排模式的。由于受基因组 *VH-D-JH* 之间的距离和抗原插入位点的影响, *VH* 基因片段各克隆之间出现的频率没有必然的联系。

经比较可知, 我们获得的 *D* 片段无论是长度或是序列都有较大的变化。并且 *D* 片段的数目巨大, 也无法做出合理的估算。通过对其核苷酸序列的比较 (见图 2), 我们发现有一些相同的基因序列在不同的克隆序列中重复出现多次。而且有的基因序列在同一个克隆里出现多次 (如克隆 $\nu 15$ 中的基因序列 TGGGGT), 也有一些克隆内出现了多个基因序列 (如克隆 $\nu 5$ 中的基因序列 TGGGGT 和 GGGTAG)。还有报道指出, 在虹鳟, 鸡, 老鼠和人类的序列比较中也发现了 CTACGG, GGGTAG 等一些基因序列 (Roman et al., 1995)。而 *D* 片段中, 大量回文基因片段的出现证明有 *P* 片段插入 (*P*-region additions)。在 *D* 片段 3' 和 5' 两端 GC 核苷酸富集说明有 *N* 片段插入 (*N*-region additions)。 *P* 片段和 *N* 片段的插入将有利于免疫球蛋白可变区多样性的形成。

而史氏鲟 *IgH* 可变区的骨架区 (FRs) 与其他物种一样, 较为保守, 变化很小。本实验数据显示 (见图 3), FR2 和 FR3 区相对恒定, 变化极少。而在 FR1 区的第 12 个氨基酸残基和 FR4 的第 8 个氨基酸残基处出现的高可变性, 均是由于一个腺嘌呤 (A) 碱基突变为鸟嘌呤 (G) 造成的缬氨酸 (Val) 取代了原有的异亮氨酸 (Ile)。

在与抗原结合过程中, CDRs 的大小和氨基酸所在的位置起了很大的作用, 而 CDR3 区的变化最大。在史氏鲟 *IgH* 可变区序列中, CDR1 由 5 个氨基酸残基组成, 而 CDR2 的长度从 15 到 19 个氨基酸不等。史氏鲟免疫球蛋白 CDR3 的长度为 4 到 11 个氨基酸残基不等 (见图 2), 而其在氨基酸组成上也有较大的变化 (见图 3)。当与其他物种相比较时, 我们发现鲟鱼的 CDR3 的长度变化范围要比哺乳动物窄的多。而在所比较的物种中, 免疫反应最差的虹鳟的 CDR3 变化最小 (5 到 11 个氨基酸残基)。有报道指出, 在哺乳动物和冷血脊椎动物个体发生早期, 他们的 CDR3 区也较短 (Desravines and Hsu, 1994; Golub et al., 1997;

Lee et al., 1993; Raaphorst et al., 1992; Schroeder et al., 1995)。而 CDR3 的长度可以影响可变区的多样性。因此, 较短的 CDR3 会限制冷血的低等脊椎动物抗体多样性的发生。Roman et al. (1995) 曾报道 CDR3 有在越高等的脊椎动物中就越长的进化趋势。由此可见, 鲟鱼虽然具有较完备的免疫系统, 但是仍处于免疫系统发育的早期阶段。

史氏鲟 *IgH* 的 CDR3 相对较短, 而 Wu et al. (1993) 年曾报道: CDR3 的结构受其长度的影响: 较短的 CDR3 区域易形成凹型, 而较长的 CDR3 区域会突出到分子外面。依照这种说法, 史氏鲟 *Ig* 可能拥有较平坦的表面或者仅有小的突起。但是, 平的抗原结合表面由于为抗原抗体结合提供了大量的相互接触最佳空间位点, 有时会具有多聚特异性 (Multi-specific) (Schroeder et al., 1995)。针对小的半抗原和碳水化合物的鼠抗体 CDR3 长度也受到限制, 特异性抗体的 CDR3 长度一般都在 5 到 12 之间。而针对蛋白质和 DNA 的抗体则有更宽更随机的 CDR3 长度分布 (Johnson and Wu, 1998)。据此, 我们推测, 与大西洋鳕 (*Gadus morhua* L.) 一样 (Jorgen et al., 2000), 史氏鲟有限的 CDR3 长度分布是对其结合特殊抗原类型 (如菌多糖) 的一种适应方式, 同时会产生部分的粘性回复。

在史氏鲟免疫球蛋白重链可变区序列与其他物种的多序列对准比较中, 我们发现参与三维结构形成的半胱氨酸 (Cys) 和色氨酸 (Trp) 残基在所比较的物种 *IgH* 链中出现的位置显示出了进化上的高度保守性, 这也确保了史氏鲟 *Ig* 分子具有正确折叠及与特异性抗原相结合的能力。

由此我们得出结论: 史氏鲟免疫球蛋白重链可变区是采取易位子重排模式的, 其 *VH* 家族有多个成员, 同时拥有大量的 *D* 和 *J* 片段, 导致史氏鲟免疫球蛋白拥有大量的 *V-D-J* 重组多样性。并且由于核酸外切酶的作用, 以及 *N* 和 *P* 片段的插入, 使史氏鲟抗体有更多的可变性空间。

致 谢 感谢黑龙江水产研究所的马波同志、孙效文研究员及佟广香, 李绍戌硕士在本文的实验研究工作中给予的帮助和支持。

参考文献 (References)

Amemiya CT, Litman GW, 1990b. Complete nucleotide sequence of

- an immunoglobulin heavy-chain gene and analysis of immunoglobulin gene organization in a primitive teleost species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 811–815.
- Amemiya CT, Litman GW, 1990a. Early evolution of immunoglobulin genes. *Nucl. Acids Res.* 18: 1 015–1 020.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ, 1997. Gapped BLAST and PSI. BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25: 3 389–3 402.
- Bengtén E, Leanderson T, Pilström L, 1991. Immunoglobulin heavy chain cDNA from the teleost Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): nucleotide sequences of secretory and membrane form show an unusual splicing pattern. *Eur. J. Immunol.* 21: 3 027–3 033.
- Desravines A, Hsu E, 1994. Measuring CDR3 length variability in individuals during ontogeny. *J. Immunol. Methods* 168: 219–225.
- Ghaffari SH, Lobb CJ, 1989. Nucleotide sequence of channel catfish heavy chain cDNA and genomic blot analysis. *J. Immunol.* 143: 2 730–2 739.
- Golub R, Fellah JS, Charlemagne J, 1997. Structure and diversity of the heavy chain VDJ junctions in the developing Mexican axotl. *Immunogenetics* 46: 402–409.
- Honjo T, Matsuda F, 1995. Immunoglobulin heavy chain loci of mouse and human. In: Honjo T, Alt FW ed. *Immunoglobulin Genes* (2nd edn). London: Academic Press, 145–171.
- Hordvik I, Lindstrom CDV, Voie AM, Lilybert A, Jaclb J, Endresen C, 1997. Structure and organization of the immunoglobulin M heavy chain genes in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Mol. Immunol.* 34: 631–639.
- Johnson G, Wu TT, 1998. Preferred CDRH2 lengths for antibodies with defined specificities. *Int. Immunol.* 10: 1 801–1 805.
- Jorgen Stenvik, Ann-Sofie Lundback, Trond Q, Jorgensen, Lars Pilström, 2000. Variable region diversity of the Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) immunoglobulin heavy chain. *Immunogenetics* 51: 670–680.
- Kabat EA, 1976. *Structural Concepts in Immunology and Immunochimistry*. 2nd edn. New York: Departments of Microbiology, Human Genetics and Development, and Neurology, Columbia University and Neurological Institute, Presbyterian Hospital.
- Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C, 1991. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. Bethesda: U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institute of Health.
- Lee A, Desravines S, Hsu E, 1993. *IgH* diversity in an individual with only one million B lymphocytes. *Dev. Immunol.* 3: 211–222.
- Lieber MR, 1992. The mechanism of V (D) J recombination: a balance of diversity, specificity, and stability (a mini-review). *Cell* 70: 873–876.
- Lundqvist ML, 1998. Siv Stromberg. Lars Pilstrom. Ig heavy chain of the sturgeon *Acipenser baeri*: cDNA sequence and diversity. *Immunogenetics* 48: 372–382.
- Lundqvist M, Bengtén E, Strömberg S, Pilström L, 1996. Ig light chain gene in the Siberian sturgeon *Acipenser baeri*: implications for the evolution of the immune system. *J. Immunol.* 157: 2 031–2 038.
- Lundqvist ML, Pilstrom L, 1999. Variability of the immunoglobulin light chain in the Siberian sturgeon *Acipenser baeri*. *Dev. Comp. Immunol.* 23 (7–8): 607–615.
- Nelson JS, 1994. *Fishes of the World*. 3rd edn. New York: John Wiley and Sons.
- Raaphorst FM, Timmers E, Kenter MJ, Van Tol MJ, Vossen JM, Schuurman RK, 1992. Restricted utilization of germ-line *VH3* genes and short diverse third complementarity-determining regions (*CDR3*) in human fetal B lymphocyte immunoglobulin heavy chain rearrangements. *Eur. J. Immunol.* 22: 247–251.
- Roman T, De Guerra A, Charlemagne J, 1995. Evolution of specific antigen recognition: size reduction and restricted length distribution of the CDRH3 regions in the rainbow trout. *Eur. J. Immunol.* 25: 269–273.
- Schroeder HW, Mortari F, Shiokawa S, Kirkham PM, Elgavish RA, Bertrand FE, 1995. Developmental regulation of the human antibody repertoire. *Ann. NY. Acad. Sci.* 764: 242–260.
- Schwager J, Grossberger D, Du Pasquier L, 1998a. Organization and rearrangement of immunoglobulin M genes in the amphibian *Xenopus*. *EMBO J.* 7: 2 409–2 415.
- Takeshi M, Thomas C, Vuokko T, 1990. Characterization of a complete immunoglobulin heavy-chain variable region germ-line gene of rainbow trout. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 7 767–7 771.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22: 4 673–4 680.
- Ventura-Holman T, Jones JC, Ghaffari SH, Lobb CJ, 1994. Structure and genomic organization of *VH* gene families are interspersed and closely linked. *Mol. Immunol.* 31: 823–832.
- Wilson MR, Marcuz A, van Ginkel F, Miller NW, Clem LW, Middleton D, Warr GW, 1990. 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. *Nucleic Acids Res.* 18: 5 227–5 233.
- Wu TT, Johnson G, Kabat EA, 1993. Length distribution of CDRH3 in antibodies. *Proteins* 16: 1–7.