



Xenopus tropicalis 免疫球蛋白轻链重组多样性的研究*

秦 彤¹⁾ 任立明²⁾ 孟庆勇^{2)**}

(¹⁾ 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193; ²⁾ 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100194)

摘要 热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*)是两栖类动物免疫球蛋白研究中常用的模式生物之一, 其免疫球蛋白轻链的类型和基因结构已经研究清楚, 3种轻链类型分别为: ρ 、 σ 和 type III。通过克隆测序, 并对3种轻链重组 cDNA 克隆的 VJ 基因片段的连接方式进行了分析, 发现在表达的3种轻链中, 仅有少量的 N 和 P 核苷酸的插入。 σ 轻链基因的体细胞 VJ 重组主要依靠微同源重组。而在 ρ 和 type III 轻链中这种方式不是主要的, ρ 和 type III 轻链或是通过 VJ 基因片段的直接连接或是部分删除后连接。研究结果为研究免疫球蛋白轻链多样性产生的机制提供了重要的线索。

关键词 热带爪蟾, 免疫球蛋白, 轻链, 重组, 多样性

学科分类号 Q75

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00232

免疫球蛋白轻链由可变区(variable region, V 区)、连接区(joining region, J 区)和恒定区(constant region, C 区)组成。轻链通过与重链的随机配对大大增加了抗体的多样性^[1]。不同脊椎动物轻链的类型及基因结构各不相同。哺乳动物有两类典型的轻链, λ 和 κ 。 λ 基因座包含多个 V 基因片段, 其下游基因以 J_k-C_k 成对排列, 而 κ 链基因座则只有一个 C 基因片段, 其上游有少量的 J 基因片段和多个 V 基因片段^[2]。不同物种中两种轻链的表达比率不同^[3]。轻链通过不精确的 VJ 重组以及体细胞超突变产生了多样性(somatic hypermutation, SHM)。鸟类只有一种轻链类型 λ 链^[4], 与其他物种不同, 其多样性主要通过基因转换来实现, 即利用上游的假基因作为供体修饰唯一有功能的 V 基因, 从而产生多样的有功能的 V 基因^[4-5]。

胚系中大量的 V、J 基因片段组合和连接的多样性是轻链多样性产生的重要机制。有颌类脊椎动物轻链(IgL)基因的 VJ 重排均是位点特异的。胚系基因的 V、J 片段由重组信号序列(recombination signal sequence, RSS)所分隔, RSS 是一段由“七聚体-间隔序列-九聚体”组成的核苷酸序列, 其中间隔序列为 12 或 23 碱基对。基因重排时, 重组

酶 RAG1、RAG2 能特异识别并切除 V、J 片段间的 RSS, 将处于分隔状态的基因片段连接成一个完整的 Ig 功能基因^[6]。编码区和重组信号序列末端 DNA 双链发生断裂时, 重组信号序列末端的连接一般较准确, 但编码序列末端的连接准确性较差, 编码区末端的连接通过随机删除或添加核苷酸的非同源末端连接的方式产生, 根据产生的方式不同, 添加的核苷酸被分为 P-核苷酸(P-nucleotides)和 N-核苷酸(N-nucleotides), P-核苷酸是指保留在 V 基因片段中的回文序列, N-核苷酸是通过 TdT 添加的。编码区末端不精确性的连接增加了 VJ 连接的多样性^[7]。然而, 有些情况, 再连接过程是通过两个编码末端共用的短的同源序列进行的, 从而使 P、N 核苷酸缺失, 这种连接方式称为微同源重组^[8-10]。

* 国家杰出青年科学基金(30725029)和国家自然科学基金(30671497)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-62734181, E-mail: victor.qy.meng@gmail.com

收稿日期: 2010-04-30, 接受日期: 2010-06-08

以前的研究中, 作者已经对两栖类动物 *X. tropicalis* 的 3 种轻链结构、功能以及与其他物种的关系进行了全面分析^[1]. 基因结构、染色体的同线性关系以及系统进化分析都证明了两栖类动物的 ρ 轻链属于哺乳动物的 κ 基因家族, 而 type III 轻链则与哺乳动物的 λ 基因相似. 许多脊椎动物轻链的类型及其重组的多样性已被分析, 在两栖类动物中仅有关于 *X. laevis* 轻链重组多样性的报道, 随着 *X. tropicalis* 基因组信息的出现以及结构和进化关系的清晰, 本研究旨在阐明 *X. tropicalis* 3 种轻链重组的多样性及其产生的机制.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂. TRIzol 总 RNA 提取试剂购自天根生化科技有限公司; PCR 及反转录常规试剂购

自天根生化科技有限公司; 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 由本实验室保存; OMEGA 胶回收试剂盒购自 BIO-TEK 公司; pMD19-T 载体购自 Takara 公司; X-gal、IPTG、氨苄青霉素(Amp) 购自华美公司; PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成; 基因片段的测序由北京华大基因和北京奥科生物技术有限责任公司完成.

1.1.2 试验材料. *X. tropicalis* 组织样品由美国 Dr. John Butler 惠赠.

1.2 方法

1.2.1 引物设计. 用 MegAlign (DNASTar) 对 *X. tropicalis* 已知的 3 种轻链胚系基因片段进行序列比对, 根据可变区(V 区)和恒定区(C 区)的同源序列分别设计正向和反向引物. 引物序列及位置见表 1.

Table 1 Primers for PCR amplification

Name	Primer sequence (5'~3')	Site in V _L or C _L	Annealing temperature/°C
XT-Vrho1	GGTTCCTATGGGCAGATTGTG	1~21	55
XT-Vrho2	GCTGACTCAGTCCCCAGATTATG	20~42	55
XT-Vrho3	AATCAGGGCAGGCACCAAAG	127~146	55
XT-Crho1	GCCAGTTGTTGCGTTTTGTG	268~287	
XT-V sigma1	GGGAGAAAGGGCAACATTCAC	53~73	56
XT-V sigma2	TCACCATTCACTCACCTCTCC	158~178	56
XT-C sigma1	GATACGAAGGCAGAAGAACC	280~299	
XT-type3V1	TGGCTCAATCTCTGGTGGA	221~240 (VIII12)	57
XT-type3V2	CAGCAAGGGTAAGGGAGAAGG	179~199 (VIII17)	57
XT-type3V3	GGGCACAGTGAACTGACTTG	83~103 (VIII1)	57
XT-type3V4	GGTGTCTGAATCAGTGAAGC	17~36 (VIII4)	55
XT-type3V5	GATTCAGCCACCCTCTGTATC	20~40 (VIII10)	55
XT-type3C1	GAGCCATTCATCGGAGGTCAG	220~240	

Primers begin at the first nucleotide of FR1 region, not including the leader peptide sequence.

1.2.2 PCR 扩增及克隆测序. 提取 *X. tropicalis* 脾脏或肠组织的 RNA, 反转录获得 cDNA, 以 cDNA 作为模板, PCR 扩增轻链 VJ 重组区的序列. PCR 反应程序为: 94°C 预变性 5 min, 94°C 30 s, 55~57°C 30 s, 72°C 1 min, 共计 35 个循环; 最后 72°C 延伸 7 min. 1%琼脂糖凝胶电泳检测结果. 我们将正向引物与反向引物随机配对组合进行扩增. 由于引物位置不同, PCR 产物大小约为 400~700 bp. 将扩增得到的 PCR 产物回收纯化, 并与 pMD-19 T 载体 16°C 连接过夜, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态

细胞, 挑选白斑, 通过菌体 PCR 筛选阳性克隆, 进行克隆测序, 每条轻链挑选 200 个左右克隆测序.

1.2.3 轻链 VJ 重组多样性的分析. 将测序得到的克隆去除载体序列, 去除相同的序列, 进一步去除重组方式相同的克隆, 最终得到重组方式独特的克隆并进行分析. 将这些 cDNA 克隆与胚系中 V、J 基因片段进行比对, 判断每个 cDNA 克隆的 V、J 和 C 区, 根据相同的 J 基因片段对所有的 cDNA 克隆归类, 统计胚系中 VJ 基因片段的使用频率.

分析每个 cDNA 克隆 CDR3 区中 N、P 核苷酸的数目(轻链 CDR3 区是指氨基酸序列从 V 基因片段中保守的“YYC”结构开始到 J 基因片段中保守的“GNG”结构为止)以及 CDR3 区的平均长度(图 1), 比较 3 种轻链重组方式的特点及差异.

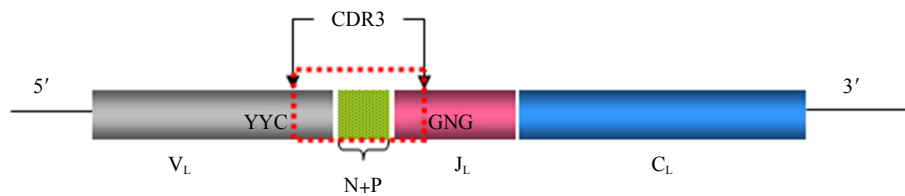


Fig. 1 The CDR3 length in the light chain

2 结 果

2.1 ρ 轻链 VJ 重组的分析

经过克隆测序, 共获得 234 个 ρ 轻链 cDNA 克隆, 去除相同序列后得到 115 个序列不同的克隆. 与胚系 VJ 片段比对结果发现, 51 个克隆(45%)重组时 J 基因片段 5' 端部分删除, 因而很难区分为 J4、J5 或 J6(J4、J5、J6 基因片段的 3' 端序列完全相同). 各种 J 基因片段的使用频率(图 2a), 其中 J3、J4 使用较多, 这与 EST 数据库中分析的结果一致.

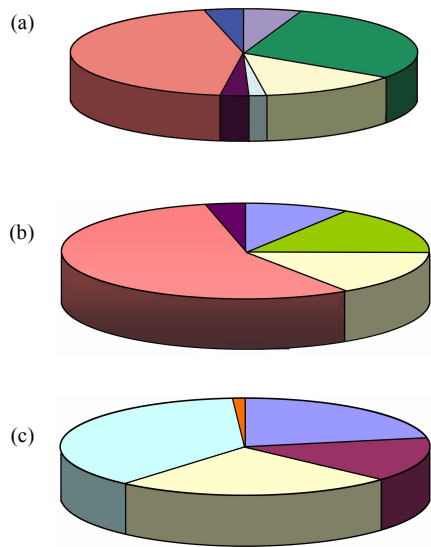


Fig. 2 J usage frequency of ρ, σ and type III light chain in *X. tropicalis*

(a) ρ light chain. ■: J1; ■: J3; ■: J4; ■: J5; ■: J6; ■: J4/J5/J6; ■: ?.
(b) σ light chain. ■: J1; ■: J2; ■: J3; ■: J4; ■: J4; ■: ?. (c) type III light chain.
■: J3; ■: J2; ■: J1.1/Jx1; ■: J III x2/J III 1.2/J III 1.3; ■: ?.

将上述 115 个克隆与胚系 V 基因片段进行比对, 根据同源性大于 85% 判断主要使用了 vr1, vr4, vr6, vr7, vr8, vr9, vr11 这 7 个 V_ρ 基因片段. 分析这些克隆的 VJ 重组方式, 我们得到了 22 种不同的 VJ 连接方式(图 3). 在这些 VJ 连接的克隆中, 很少有 P、N 核苷酸的插入. 仅有一个克隆既包含 P 核苷酸又包含 N 核苷酸(vr9: r37), 一个克隆仅包含 P 核苷酸(vr7: re17), 4 个克隆仅包含 N 核苷酸(vr11: r64; vr9: r29, r91, rb36), 剩下的 16 个克隆(73%)均是通过 VJ 片段的直接连接或部分删除后相连的.

N 核苷酸和 P 核苷酸插入的平均数目为: (0.95 ± 1.89) bp/ 克隆; 大多数克隆(18/22)的 CDR3 区由 9 个密码子组成, 这与已经报道的 *X. laevis* ρ 轻链基因以及其他物种 κ 链基因 CDR3 区长度是一致的^[2]. CDR3 平均长度为: 9.18 ± 0.66 .

2.2 *X. tropicalis* σ 轻链 VJ 重组主要依靠微同源重组

在获得的 198 个 σ 轻链 cDNA 克隆中, 有 54 个序列不同的克隆. J 基因片段的使用情况见图 2b, J4 使用频率最高(56%). 去除相同重组方式的克隆后, 共得到 25 个不同的 VJ 连接方式(图 4). 令人惊奇的是, 在这些重组方式中, 很少有 N、P 核苷酸的插入, 仅有 4 个克隆有 N 核苷酸的插入(Vs4: sc24; Vs5: S38; vs7: L27, L21), 有一个克隆通过 V 片段、J 编码区部分删除后连接的, 然而, 剩下的 19 个克隆(76%)都是通过微同源重组的方式连接的, 这些微同源重组似乎都有一个限定的模式, 一个碱基 T 被 V、J 基因片段所共用, 这一分析结果表明, *X. tropicalis* σ 轻链与 ρ 轻链不同, 其主要通过微同源重组进行 VJ 连接.

	CDR3	J	N+P	CDR3 Length
	Q Q Y W D P P L			
v1	TGGAAGCAGAAGATGCAGCAGATTATTACTGCGAGCAGTATTGGATCCCCCACTC			
rb25	G..C.....T...T.TC...ACAG.T.....	<u>ACACTTTTGGTGGAGAACCAAGGTTGAAATCAAA</u> J3	0	9
	Q Q G Y D T P L			
vr4	TGGAAGCAGAAGATGCAGCAGATTATTACTGCGAGCAGGTTATGATCCCACTC			
r55	T.....	<u>GCTACTTTGGTGGAGAACCAAGGTTGAAATCAAA</u> J1	0	9
r94	T.....	<u>GTACACTTTTGGTGGAGAACCAAGGTTGAAATCAAA</u> J3	0	9
rb6	T.....A.....	<u>TACACTTTTGGTGGAGAACCAAGGTTGAAATCAAA</u> J3	0	9
	M Q Y G Y S P			
Vr6	TGGAAGCAGAAGATGCAGCAGATTATTACTGTATGAGTACGTTATTCCTCT			
rc16	CCA.....T.....	<u>CACCTTTTGGTGGAGAACCAAGGTTGAAATCAAA</u> J3	0	9
rd29	C.....CCA.....	<u>CACCTTTTGGTGGAGAACCAAGGTTAGATTAAAC</u> J6	0	8
	Q Q G Y S N P L			
vr7	TGGAAGCAGAAGATGCAGCAGATTATTACTGCGAGCAGGTTACAGCAACCACTC			
re5	T...T.TCA.....T.C...	<u>GTACACTTTTGGTGGAGAACCAAGGTTGAAATCAAA</u> J3	0	9
re4	C.....T.TCA.....CTTC...	<u>GTACACTTTTGGTGGAGAACCAAGGTTAGATTAAAC</u> J4	0	9
re17	T.....AG...TGG...	<u>GAACCTTCACTTTTGGTGGAGAACCAAGGTTAGATTAAAC</u> J4	4	11
l3	C.....TA.C.G..AG.....	<u>CACCTTTTGGTGGAGAACCAAGGTTGAAATCAAA</u> J3	0	9
	Q Q G Y S S H			
vr8	TGGAAGCAGAAGATGCAGCAGATTATTACTGTATGAGTATGCTTGGACCCACT			
re29		<u>GTACTTTTGGTGGAGAACCAAGGTTGAAATCAAA</u> J1	0	9
rc3		<u>TTATCTTTTGGTGGAGAACCAAGGTTAGATTAAAC</u> J6	0	9
	C Q Q G Y S S N			
vr9	TGGAAGCAGAAGATGCAGCAGATTATTACTGCGAGCAGGTTACAGTCCCACTC			
r60	T...T.TCA.....C.....C	<u>GTACACTTTTGGTGGAGAACCAAGGTTAGATTAAAC</u> J4	0	9
r29	G.....T.....AG...C.GG. CACT	<u>CACCTTTTGGTGGAGAACCAAGGTTGAAATCAAA</u> J3	4	9
r37	G.....T.....C.AG...C.GG. CAC	<u>GAACCTTCACTTTTGGTGGAGAACCAAGGTTAGATTAAAC</u> J4	7	11
r91	G.....T.....TGA.G... CAC	<u>TCACTTTTGGTGGAGAACCAAGGTTAGATTAAAC</u> J4	3	9
r34	T.....TA.GCTCAG.T..C	<u>GTACACTTTTGGTGGAGAACCAAGGTTGAAATCAAA</u> J3	0	9
	C Q Q G Y S S N			
Vr9	TGGAAGCAGAAGATGCAGCAGATTATTACTGCGAGCAGGTTA-CAGTCCCACTC			
rb35	T.A..CT...A..... T	<u>ACCTTTTGGTGGAGAACCAAGGTTAGATTGAAAC</u> J4	1	9
rb3	G.....TG.TAC...	<u>GTTCACCTTTTGGTGGAGAACCAAGGTTAGATTAAAC</u> J4	0	9
rb6	G.....T.....TA.TAC...	<u>TACACTTTTGGTGGAGAACCAAGGTTGAAATCAAA</u> J3	0	9
			0.95±1.89	9.18±0.66

Fig. 3 VJ junctions of the expressed ρ genes

Red letters indicate P nucleotides, whereas blue letters denote N nucleotides. The CDR3 length is shown as codon numbers. All germline J sequences are underlined.

	CDR3	J	N+P	CDR3 Length
	Y Y C V K W F S S I S A			
Vs3	TATTACTGTGTAAGATGGTTTGCAGCATTTCAGCATC			
L25	C...G...	<u>GGGTTTTCAGTGCAAGGAGCAAACTCATTTGTTACA</u> Jsigma3	0	11
sb18	A.....A.....C...G...	<u>TTGTCTTCAGTCAAGGAGCAAACTCATTTGTTACA</u> Jsigma4	0	11
sb10	A.....	<u>GGGTTTTCAGTCAAGGAGCAAACTCATTTGTTACA</u> Jsigma3	0	11
sb15		<u>GGGTTTTCAGTCAAGGAGCAAACTCATTTGTTACA</u> Jsigma3	0	11
sb1	T.....	<u>TTGTCTTCAGTCAAGGAGCAAACTCATTTGTTACA</u> Jsigma4	0	11
sb60	T.....	<u>TTGTCTTCAGTCAAGGAGCAAACTCATTTGTTACA</u> Jsigma4	0	11
sc14	A.....T.....C...G...	<u>TTGTCTTCAGTCAAGGAGCAAACTCATTTGTTACA</u> Jsigma4	0	11
sc18		<u>TTGTCTTCAGTCAAGGAGCAAACTCATTTGTTACA</u> Jsigma2	0	11
	Y Y C V K W F D S I S A			
Vs4	TATTACTGTGTAAGATGGTTTGCAGCATTTCAGCATC			
S47	C...G...	<u>ATGTCCTTCAGCCAAAGTACCAAACTGATTGTTACAG</u> Jsigma2	0	11
S20	C...G...	<u>ATGTCCTTCAGCCAAAGTACCAAACTGATTGTTACAG</u> Jsigma2	0	11
S43	C...G...	<u>ATGTCCTTCAGCCAAAGTACCAAACTGATTGTTACAG</u> Jsigma2	0	11
L14		<u>TTGTCTTCAGTCAAGGAGCAAACTCATTTGTTACAG</u> Jsigma4	0	11
sb9	C.....	<u>GGGTTTTCAGTCAAGGAGCAAACTCATTTGTTACAG</u> Jsigma3	0	11
sb53	C.....	<u>TTGTCTTCAGTCAAGGAGCAAACTCATTTGTTACAG</u> Jsigma1	0	11
sc24	C.....	<u>TTTTTCAGTCAAGGAGCAAACTCATTTGTTACAG</u> Jsigma3	3	11
sc1	C.....	<u>GGGTTTTCAGTCAAGGAGCAAACTCATTTGTTACAG</u> Jsigma3	0	11
L11	G.....GC.....AGT...	<u>GGGTTTTCAGTCAAGGAGCAAACTCATTTGTTACAG</u> Jsigma3	0	11
	Y Y C M K W F D S I T A			
Vs5	TATTACTGTGTAAGATGGTTTGCAGCATTTCAGCATC			
S38	G.....G...G...	<u>GTCTTCAGTCAAGGAGCAAACTCATTTGTTACAG</u> Jsigma4	2	11
S1	G.A...T.T.....	<u>TTGTCTTCAGTCAAGGAGCAAACTCATTTGTTACAG</u> Jsigma1	0	11
	Y Y C A K W F N S I S G			
Vs6	TATTACTGTGTAAGATGGTTTGCAGCATTTCAGCATC			
L6		<u>TGGGTTTTCAGTCAAGGAGCAAACTCATTTGTTACAG</u> Jsigma3	0	11
	Y Y C V K W F G S I S E			
Vs7	TATTACTGTGTAAGATGGTTTGCAGCATTTCAGCATC			
L27	A...G...C...	<u>ATGTCCTTCAGCCAAAGTACCAAACTGATTGTTACAG</u> Jsigma2	0	11
L21		<u>GTCTTCAGCCAAAGTACCAAACTGATTGTTACAG</u> J?	1	11
S53	A...G...C...	<u>GTCTTCAGTCAAGGAGCAAACTCATTTGTTACAG</u> Jsigma4	1	11
Sa9	A.....	<u>TTGTCTTCAGTCAAGGAGCAAACTCATTTGTTACAG</u> Jsigma4	0	11
Sc20	C...AG...CC...	<u>TTGTCTTCAGTCAAGGAGCAAACTCATTTGTTACAG</u> J1??	0	11
			0.28±0.74	11.0±0.0

Fig. 4 VJ junctions of the expressed σ genes

Blue letters denote N nucleotides. The CDR3 length is shown as codon numbers. All germline J sequences are underlined.

由微同源重组介导的 VJ 连接明显使抗体连接的多样性受到限制, N、P 核苷酸的平均数目为: (0.28 ± 0.74) bp, 由于微同源重组方式的限制以及很少量的 N、P 核苷酸的插入, σ 轻链 VJ 连接处的 CDR3 长度变化不明显, 几乎全部 CDR3 都编码 11 个氨基酸。

2.3 type III 轻链具有复杂的重组多样性

克隆测序共获得 233 个 cDNA 克隆, 去除相

同序列后得到 82 个不同的克隆。J 基因片段的使用频率见图 2c。大多数克隆中, J 基因片段与他们各自的 C 基因片段共同表达, 个别的克隆 C 基因片段有碱基的突变, 可能是 PCR 错误造成的。

与 ρ 轻链、 σ 轻链相比, type III 轻链重组的多样性较为复杂(图 5)。44 个不同重组方式的克隆中, 一个克隆(VIII4: Ta31)有 N、P 核苷酸的插入, 一个克隆(VIII14: B25)有 P 核苷酸, 11 个克隆有 N

	CDR3	J	N+P	CDR3 Length
VIII1 LT9	S G A Q A G D E A D Y Y C Q V W D S D S K A CTCTG GAG CCC AAGC AGGG GAT GAG GCT GATTA TTA CTG <u>TCAG GTG TGG GATA GCG TAGC AAG GCT</u>	TAT ATT TTGGAGGT GGAACCCAGC TGAC TGT CCT TA J II 1x1/J III 1.1	0	10
VIII2 T6	S G A Q A G D E A D Y Y C Q V W D S D CTCTG GAG CCC AAGC AGGG GAT GAG GCT GATTA TTA CTG <u>TCAG GTG TGG GATA GCG TAGC AAG GCT</u>	TATA TCT TTG GAG TGG AACCCAGCT GACTGT CCT TA J II 1x2/J III 1.2/J III 1.3	0	9
Ta66	G.....G.....G.....	GTAT ATTTT GGA GGT GGA ACC CC AGCT GACT GT CCT TA J II 1x1/J III 1.1	0	8
Ta55	C.....T.....	GT AT ATTTT GGA GGT TGG AAC CC AGCT GACT GT CCT TA J II 1x1/J III 1.1	1	9
VIII3 Ta38	AAGCAG GGG AT GAG GCT GAT TATTACT GTC AGGTGT GGGAT GGC AGTAG CAG TGT CT ..A.....G.....C.....A.....G.....	TATA TCT TTG GAG GTG GAG ACC CAGCT GACTGT CCT TA J II 1x2/J III 1.2/J III 1.3	0	11
Ta25	A.....	TTTG GAG GT GGA ACC CA GCT GACT GT CCT TA ?	0	8
Ta22	A.....AAG.....	TATA TCT TTG GAG GTG GAG ACC CAGCT GACTGT CCT TA J II 1x2/J III 1.2/J III 1.3	0	11
Ta41	C.....G.....	TATTT TGG AG GTG GAA CC CA GCT GACT GT CCT TA J III 1x1/J III 1.1	0	10
VIII4 T2	S G A Q A G D E A D Y Y C Q V W D G S S K A CTCTG GAG CCC AAGC AGGG GAT GAG GCT GATTA TTA CTG <u>TCAG GTG TGG GATA GCG TAGC AAG GCT</u>	AT CTTT GGA GGT GGA ACC CAGCT GACT GTCT CCT TA J II 1x2/J III 1.2/J III 1.3	0	10
T10	G.....	TAT CTTT TGG AGGT GGA ACC CAGCT GACTGT CCT TA J II 1x2/J III 1.2/J III 1.3	2	11
Ta9	T.....C.....	TTTT GGA GGT GGA ACC CAGCT GACT GTCT CCT TA J II 1x1/J III 1.1	0	8
Ta70	G.....	CTTA ? ? ?	0	NF
Ta52	T.....	GCA TATTTT GGA GGT GGA ACC CAGCT GACT GTCT CCT TA J II 1x1/J III 1.1	3	11
Ta83	T.....	GCAT <u>CTTTT GGA GGT GGA ACC CAGCT GACT GTCT CCT TA</u> J II 1x2	4	11
Ta31	T.....C.....A.....C.....	GTGG ATT TTT GGA GAG GAG AAC CA CACT CAG TCCT G J II 13	2	12
VIII6 LA2	R G A L L E D D A D Y Y C A I W H S P S S S A GAG GAG CCTT ACTAGAA GAT GATG CAGA TTA TTA CTG <u>GCTATATGGCATCTCCATCCAGCTCGTCT</u>	A TAT CTTT TGG AGGT GGA ACC CAGCT GACT GTCT CCT TA J II 1x2/J III 1.2/J III 1.3	0	11
LA10	T.....G.....	ATACTTTT GGA GGT TGG AAC CCAGCT GACTGT CCT TA J II 1x2/J III 1.2/J III 1.3	0	11
LA4	T.....G.....	A TAT CTTT TGG AGGT GGA ACC CAGCT GACT GTCT CCT TA J II 1x2/J III 1.2/J III 1.3	0	11
LA9	AT.....C.....G.....	ATA TTTG GTGG TGG AAC CCAGCT GACTGT CCT TA J II 12	1	11
VIII7 LA5	R G A L L E D D A D Y Y C A I W H P P S N T A GAG GAG CCTT ACTAGAA GAT GATG CAGA TTA TTA CTG <u>GCTATATGGCATCTCCATCCAGCTCGTCT</u>	T TAT ATT GGT GGT GGA ACC CCAGCT GACT GTCT CCT TA J II 12	0	11
VIII12 B5	N R A Q A E D D G V Y Y C V L W I S S A AACAGAGCC CAGG CAGA GGA TGA TGCT GTAT ATT ACT <u>GCTCTGTGGATTAGTAGTGCCT</u>	G TGG ATTTT TGG AGG AGG AAC CAG CCA CAG TCCT CG J II 13	0	9
B70	C.....	GATTTT TGG AGG AGG AAC CAG CCA CAG CTCG C J II 13	1	10
B6		G TAT ATCT TGG AGG TGG AAC CAG CCA CAG TCCT TA J II 1x2/J III 1.2/J III 1.3	0	9
B80		G TTTA TAT TGG TGG AAC CAG CCA CAG CTCG CCT CA J II 12	0	9
VIII13 B100	N R A Q A E D D G V Y Y C A L W I G S A AACAGAGCC CAGG CAGA GGA TGA TGCT GTAT ATT ACT <u>GCTCTGTGGATTAGTAGTGCCT</u>	G GAT TTT TGG AGG GAG AAC CC AACT CACA GTCC TCG J II 13	0	9
B64	C.....	GGA TTTT TGG AGG AGG AAC CAG CCA CAG CTCG C J II 13	0	9
B45	C.....	GGA TTTT TGG AGG AGG AAC CAG CCA CAG CTCG C J II 13	0	9
B11		G TGA TTTT TGG AGG AGG AAC CAG CCA CAG CTCG C J II 13	0	9
B39		<u>GATTTT TGG AGG AGG AAC CAG CCA CAG CTCG C</u> J II 13	0	8
VIII13 B51	N R A Q A E D D G V Y Y C A L W I G S A AACAGAGCC CAGG CAGA GGA TGA TGCT GTAT ATT ACT <u>GCTCTGTGGATTAGTAGTGCCT</u>	TATCTTTT GGA GGT TGG AAC CCAGCT GACTGT CCT TA J II 1x2/J III 1.2/J III 1.3	1	9
B18	G.....	<u>GTA TATCTTTT GGA GGT TGG AAC CCAGCT GACTGT CCT TA</u> J II 1x2/J III 1.2/J III 1.3	0	9
B34	G.....	A TTC GGT GGT GGA ACC CAG CCA CAG CTCG C J II 12	1	8
B59	T.....	TAT TTT GGT GGT TGG AAC CAG CCA CAG CTCG C J II 12	0	8
B49	AT.....	GT TTA TAT TTT GGT TGG AAC CAG CCA CAG CTCG C J II 12 ?	0	9
VIII14 B46	N R A Q A E D D G V Y Y C A L W I S S A AACAGAGCC CAGG CAGA GGA TGA TGCT GTAT ATT ACT <u>GCTCTGTGGATTAGTAGTGCCT</u>	G TGA TTTT TGG AGG AGG AAC CAG CCA CAG CTCG C J II 13	0	9
B8	A.....	GGA TTTT TGG AGG AGG AAC CAG CCA CAG CTCG C J II 13	0	8
B25		<u>CG TGA TTTT TGG AGG AGG AAC CAG CCA CAG CTCG C</u> J II 13	1	10
B94		<u>G TTTA TAT TTT GGT TGG AAC CAG CCA CAG CTCG C</u> J II 12	0	9
VIII16 B14	N R A Q A E D D G V Y Y C A L W I S S A AACAGAGCC CAGG CAGA GGA TGA TGCT GTAT ATT ACT <u>GCTCTGTGGATTAGTAGTGCCT</u>	G TATA TCTTTT GGA GGT TGG AAC CCAGCT GACTGT CCT TA J II 1x2/J III 1.2/J III 1.3	0	9
B23	CC.....	<u>TAT TCTTTT GGA GGT TGG AAC CCAGCT GACTGT CCT TA</u> J II 1x2/J III 1.2/J III 1.3	2	9
B95	CCGG.....	TAT TCTTTT GGA GGT TGG AAC CCAGCT GACTGT CCT TA J II 12	4	9
B55	CC.....	<u>TAT TCTTTT GGA GGT TGG AAC CCAGCT GACTGT CCT TA</u> J II 12	2	9
B81		G TTTA TAT TTT GGT TGG AAC CCAGCT GACTGT CCT TA J II 12	0	9
B15		G TGA TTTT TGG AGG AGG AAC CAG CCA CAG CTCG C J II 13	0	9
			0.57±1.07	9.49±1.10

Fig. 5 VJ junctions of the expressed type III genes

Red letters indicate P nucleotides, whereas blue letters denote N nucleotides. The CDR3 length is shown as codon numbers. All germline J sequences are underlined. NF: non-functional clones.

核苷酸的插入(VIII 2: Ta55; VIII 4: T10, Ta52, Ta83; VIII 6: LA9; VIII 12: B70; VIII 13: B51, B34; VIII 16: B23, B95, B55), N、P 核苷酸插入的平均数目为: (0.57 ± 1.07) bp. 与另外两种轻链不同的是, type III 轻链 VJ 连接大多由连接位点处 VJ 编码区的部分删除后连接而来. 另外, 在我们获得的 type III 轻链 cDNA 克隆中, 9 个克隆 VJ 连接时 1~2 个碱基由 VJ 基因片段共用, 共用的碱基分别为: G、T、A、GT、TA, 由 VIII 6, VIII 7 形成的基因家族中, GT 是主要的微同源重组方式(图 5).

3 讨 论

2008 年, 我们对两栖类动物 *X. tropicalis* 的 3 种轻链类型: ρ 、 σ 、type III 的基因结构和进化进行了分析, 证明了两栖类动物的 ρ 基因与哺乳动物的 κ 基因家族相似, 而 type III 基因属于 λ 基因家族. 2010 年 Wu 等^[13]在对绿安蜥轻链的结构和表达进行全面分析后, 绘制了完整的有颌类脊椎动物免疫球蛋白轻链类型进化的示意图, 使我们能够更清楚地认识免疫球蛋白轻链进化的历程. 到目前为止, 免疫球蛋白轻链基因类型及重组的多样性已在哺乳类、两栖类、爬行类、鱼类等多种脊椎动物中进行了深入研究^[14-16].

X. tropicalis 的 3 种轻链都有多个结构上有功能的 V 基因片段, 通过分析轻链重组 cDNA 克隆, 我们发现, 3 种轻链都使用了多个胚系 V 基因片段, 说明体细胞 VJ 重组大大增加了抗体的多样性. *X. tropicalis* 轻链重组的多样性与爬行类是相似的, 但与鸟类是不同的, 在鸡中, 仅有一个有功能的 V 基因片段用于体细胞 VJ 重组, 重链轻链有功能的 V 片段上游有多个假基因片段, 通过假基因的基因转换产生了抗体的多样性.

X. tropicalis σ 轻链主要通过短的同源末端序列来进行 VJ 重组, 这种通过短的同源序列进行的重组以前曾在新生幼鼠^[17-19]和缺少某些重要末端连接因子(Ku80, Rag 1、Rag 2, TdT 和 XRCC4)的动物中发现^[20-22]. 目前, 究竟哪些因子在微同源重组过程中发挥作用仍不清楚. 与 σ 轻链相比, ρ 和 type III 轻链微同源重组的情况较少, *X. tropicalis* ρ 轻链 VJ 重组后 CDR3 长度限制在 9 个氨基酸, 这与 *X. laevis* 以及鼠类是相似的, 3 种轻链都有很少的 N、P 核苷酸, 极少量的 N 核苷酸或许是由于 TdT 酶的低表达所致(因为 TdT 酶可增加 VJ 连接处的

非模板编码序列). 在 V(D)J 重组过程中, RAG 蛋白识别并切割 RSS 序列, 在编码端形成发夹结构^[21], 由于 TdT 酶表达受限, VJ 片段存在两种主要的连接方式, 如果在黏性 VJ 末端存在短的同源序列, 这个连接的过程将由微同源重组介导, 否则, 黏性末端碱基删除产生钝性末端, 然后 VJ 直接相连.

脊椎动物能够利用不同的轻链与重链配对. ρ 轻链是 *Xenopus* 中最主要的一种轻链类型, 它与哺乳动物的 κ 链相似. 虽然 *Xenopus* 的 3 种轻链都能与 μ 重链结合, 然而, 轻重链的结合有很强的偏好性, ρ 链几乎完全与单体型 IgY 结合^[23-24], *Xenopus* 中 IgY 为 IgG 的等价物, 在抗体反应过程中, IgY 紧随 IgM 产生, 重链体细胞超突变中, 90%发生在 ν 链^[25-26]. *Xenopus* type III 轻链无疑是分子水平上最多多样性的轻链类型, 但在 IgY 抗体中含量很少, σ 轻链在 IgY 抗体中尚未发现, 如果血清 IgY 含量反应了动物的免疫史, 那么, ρ 轻链(κ 轻链的同源物)是受体结合中最重要的轻链类型. 其他两种轻链的使用, 尤其是 σ 链, 是值得进一步研究的. 因为不同的轻链类型对抗体多样性的产生是至关重要的.

致谢 感谢美国 Dr. John Butler 惠赠 *Xenopus tropicalis* 的组织样品.

参 考 文 献

- [1] Nemazee D. Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nat Rev Immunol*, 2006, **6**(10): 728-740
- [2] Bengten E, Wilson M, Miller N, *et al.* Immunoglobulin isotypes: structure, function, and genetics. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2000, **248**: 189-219
- [3] Lundqvist M L, Middleton D L, Radford C, *et al.* Immunoglobulins of the non-galliform birds: antibody expression and repertoire in the duck. *Dev Comp Immunol*, 2006, **30**(1-2): 93-100
- [4] Reynaud C A, Anquez V, Dahan A, *et al.* A single rearrangement event generates most of the chicken immunoglobulin light chain diversity. *Cell*, 1985, **40**(2): 283-291
- [5] Reynaud C A, Anquez V, Grimal H, *et al.* A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire. *Cell*, 1987, **48**(3): 379-388
- [6] McBlane J F, van Gent D C, Ramsden D A, *et al.* Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell*, 1995, **83**(3): 387-395
- [7] Bassing C H, Swat W, Alt F W. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell*, 2002, **109**(Suppl): S45-

- 55
- [8] Gerstein R M, Lieber M R. Extent to which homology can constrain coding exon junctional diversity in V(D)J recombination. *Nature*, 1993, **363**(6430): 625–627
- [9] Gu H, Forster I, Rajewsky K. Sequence homologies, N sequence insertion and JH gene utilization in VHDJH joining: implications for the joining mechanism and the ontogenetic timing of Ly1 B cell and B-CLL progenitor generation. *EMBO J*, 1990, **9**(7): 2133–2140
- [10] Verkaik N S, Esveldt-van Lange R E, van Heemst D, *et al.* Different types of V(D)J recombination and end-joining defects in DNA double-strand break repair mutant mammalian cells. *Eur J Immunol*, 2002, **32**(3): 701–709
- [11] Qin T, Ren L, Hu X, *et al.* Genomic organization of the immunoglobulin light chain gene loci in *Xenopus tropicalis*: evolutionary implications. *Dev Comp Immunol*, 2008, **32**(2): 156–165
- [12] Ji Y, Desravines S, Hsu E. Junctional diversity in *Xenopus* immunoglobulin light chains. *Mol Immunol*, 1999, **36**(17): 1159–1168
- [13] Wu Q, Wei Z, Yang Z, *et al.* Phylogeny, genomic organization and expression of lambda and kappa immunoglobulin light chain genes in a reptile, *Anolis carolinensis*. *Dev Comp Immunol*, 2010, **34**(5): 579–589
- [14] Fleurant M, Changchien L, Chen C T, *et al.* Shark Ig light chain junctions are as diverse as in heavy chains. *J Immunol*, 2004, **173** (9): 5574–5582
- [15] Ji Y, Desravines S, Hsu E. Junctional diversity in *Xenopus* immunoglobulin light chains. *Mol Immunol*, 1999, **36** (17): 1159–1168
- [16] Bentolila L A, Olson S, Marshall A. Extensive junctional diversity in Ig light chain genes from early B cell progenitors of mu MT mice. *J Immunol*, 1999, **15**; **162**(4): 2123–2128
- [17] Gu H, Forster I, Rajewsky K. Sequence homologies, N sequence insertion and JH gene utilization in VHDJH joining: implications for the joining mechanism and the ontogenetic timing of Ly1 B cell and B-CLL progenitor generation. *Embo J*, 1990, **9**(7): 2133–2140
- [18] Feeney A J. Lack of N regions in fetal and neonatal mouse immunoglobulin V-D-J junctional sequences. *J Exp Med*, 1990, **172**(5): 1377–1390
- [19] Feeney A J. Predominance of VH-D-JH junctions occurring at sites of short sequence homology results in limited junctional diversity in neonatal antibodies. *J Immunol*, 1992, **149**(1): 222–229
- [20] Verkaik N S, Esveldt-van Lange R E, van Heemst D, *et al.* Different types of V(D) J recombination and end-joining defects in DNA double-strand break repair mutant mammalian cells. *Eur J Immunol*, 2002, **32**(3): 701–709
- [21] Roth D B. Restraining the V(D)J recombinase. *Nat Rev Immunol*, 2003, **3**(8): 656–666
- [22] Corneo B, Wendland R L, Deriano L, *et al.* Rag mutations reveal robust alternative end joining. *Nature*, 2007, **449**(7161): 483–486
- [23] Hadji-Azimi I. Structural studies of the *Xenopus* 19S immunoglobulin and 7S immunoglobulin and two immunoglobulin-like proteins. *Immunology*, 1975, **28**(3): 419–429
- [24] Hsu E, Lefkovits I, Flajnik M, *et al.* Light chain heterogeneity in the amphibian *Xenopus*. *Mol Immunol*, 1991, **28**(9): 985–994
- [25] Lykakis G. The production of two molecular classes of antibody in the toad, *Xenopus laevis*, homologous with mammalian gM(19S) and gG(7S) immunoglobulins. *Immunology*, 1969, **16**(1): 91–98
- [26] Marchalonis J J, Allen R B, Saarni E S. Immunoglobulin classes of the clawed toad, *Xenopus laevis*. *Comp Biochem Physiol*, 1970, **35**(1): 49–56

Junctional Diversity in *Xenopus tropicalis* Immunoglobulin Light Chains*

Qin Tong¹⁾, Ren Li-Ming²⁾, Meng Qing-Yong^{2)**}

¹⁾ Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;

²⁾ State Key Laboratory of Agrobiotechnology, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract *Xenopus tropicalis* is an important model animal in immunology. Based on the available genome data, the genomic organization of all three light chain gene (ρ , σ and type III) loci were recently characterized in *Xenopus tropicalis*. On the basis of similarity of protein sequences, genomic organization and chromosomal location of the light chain genes among frogs and mammals, the data strongly support the previous suggestions that the ρ genes belong to the κ gene lineage, whereas the type III genes share a common origin with the λ genes. About 200 cDNA fragments from each of ρ , σ and type III genes, were cloned and sequenced respectively generating 22, 25 and 44 clones that have unique VJ junctions (after removal of redundant clones). Recombined VJ junctions of cloned light chain cDNA were analyzed, which showed a paucity of N and P nucleotides in expressed ρ , σ and type III genes. They also show that somatic VJ rearrangements of the σ gene seemed to be dependent on short stretches of homologous nucleotides (microhomology). The microhomology-directed VJ recombination obviously results in very limited diversity. However, most expressed ρ and type III VJ junctions showed direct ligation or deletions of V and J coding ends. These results help researchers to understand the generation of Ig diversity in *X. tropicalis*.

Key words *Xenopus tropicalis*, immunoglobulin, light chain, recombination, diversity

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00232

*This work was supported by grants from National Science Fund for Distinguished Young Scholars (30725029) and The National Natural Science Foundation of China (30671497).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-62734181, E-mail: victor.qy.meng@gmail.com

Received: April 30, 2010 Accepted: June 8, 2010