

草鱼 RAGs 的克隆及不同发育阶段的表达分析

张琼宇^{1,2} 范嗣刚^{1,2} 罗琛²

(1. 湖南师范大学生命科学学院, 长沙 410081; 2. 浙江大学生命科学院, 杭州 310058)

摘要: 草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 在 1~2 龄阶段的抗病能力很差, 但到 3 龄阶段后又具有了很强的抗病能力, 提示草鱼的免疫系统可能要到 3 龄发育阶段才会完善。重组激活基因 (Recombination activating genes, RAGs) 编码的蛋白质专一性介导淋巴细胞抗原识别受体基因的 V(D)J 重组, 在脊椎动物淋巴细胞正常发育成熟过程中起关键作用。为了进一步研究草鱼免疫系统建立和完善的发育遗传学因素, 通过 PCR 方法克隆了草鱼重组激活基因 *rag1* 和 *rag2*, 分析了它们在不同发育阶段的表达。草鱼 *rag1* 基因从起始密码到终止密码总长 4188 bp, 由三个外显子和两个内含子组成, 其开放阅读框长 3192 bp, 编码 1063 个氨基酸。草鱼 *rag2* 基因从起始密码到终止密码总长 1593 bp, 没有内含子, 编码 530 个氨基酸。氨基酸序列比对分析表明, 预测的草鱼 RAG1 和 RAG2 蛋白的功能区域与其他脊椎动物的相应功能区具有很高的同源性。从受精后第 4 天开始, RT-PCR 即可检测到 *rag1* 基因的表达, 在随后的幼鱼阶段 *rag1* 基因维持了高水平的表达。在 1 龄草鱼的头肾中仍可以检测到 *rag1* 基因的表达, 但在 3 龄草鱼头肾中没有检测到 *rag1* 基因的表达。这些结果表明草鱼从胚胎的孵化期开始到 1 龄幼鱼阶段是免疫球蛋白 (Ig) 和 T 细胞受体 (TCR) V(D)J 重组的活跃时期, 在 3 龄发育阶段其淋巴细胞系中 V(D)J 重组活动已经很少, 免疫系统中 Ig 和 TCR 库的多样化过程趋于完成, 其免疫系统已经比较完善。

关键词: 草鱼; 免疫系统; 重组激活基因; 发育遗传学

中图分类号: Q781 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2009)05-0795-09

草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 是我国主要的淡水养殖经济鱼类。草鱼高密度人工养殖中经常遇到严重的传染性病毒和细菌的危害, 但这种病毒性、细菌性传染病危害主要发生在 1 龄和 2 龄阶段, 3 龄以上的草鱼很少发病, 具有很强的抗病能力^[1]。在对草鱼 1 龄和 3 龄肾脏蛋白质组进行的研究中我们发现: 一些与个体免疫机制相关的蛋白, 如新类免疫型受体 2 蛋白和主要组织相容性复合物 II 类分子等, 在 1 龄草鱼中表达量不高, 而在 3 龄草鱼中的表达明显上调。这些结果说明草鱼的免疫系统可能要到 3 龄阶段才可以完善^[2]。

重组激活基因 (Recombination activating genes, RAGs) 包括一对在染色体上位置非常邻近的两个基因 *rag1* 和 *rag2*。它们被一起转录, 编码产物一起组成重组酶, 特异性识别免疫球蛋白 Ig 和 T 细胞表面

受体 TCR 的 V、DH、J 基因片段两侧的重组信号序列 (Recombination signal sequence, RSS), 引起 V(D)J 重排, 在淋巴细胞的发育成熟过程中起关键性的作用^[3-4]。V(D)J 基因重排使 TCR 和 Ig 分子产生巨大的特异性抗原受体谱, 这是脊椎动物免疫系统具有惊人的适应能力的基础^[5-6]。此外, 由于 RAGs 在脊椎动物中普遍存在, 在进化过程中非常保守, 不同物种之间其碱基组成变化很少, 因此它还被广泛运用于脊椎动物进化分析和亲缘关系分析^[7-10]。

目前虹鳟鱼、河豚、斑马鱼、鲢鱼、鲫鱼和鲤鱼等多种鱼类的 RAGs 已经被克隆, 研究表明鱼类 RAGs 主要在胸腺、头肾和肾脏等免疫器官中表达, 这些结果为追踪鱼类淋巴细胞发育以及研究免疫系统进化提供了重要基础^[11-18]。通过克隆和测定草鱼 RAGs 序列, 与其他脊椎动物进行比较分析并检测

收稿日期: 2008-12-04; 修订日期: 2009-06-09

基金项目: 国家“973”项目 (课题编号: 2004CB117401); 国家自然科学基金项目 (批准号: 30271034); 浙江省重大科技攻关项目 (2006C12005) 资助

作者简介: 张琼宇 (1982—), 男, 汉族, 湖南永州人; 博士研究生; 主要从事发育的基因表达调控方面的研究。E-mail: fancyboy_ren@126.com

通讯作者: 罗琛, E-mail: luo@zju.edu.cn

rag 1 基因在草鱼胚胎不同发育时期以及在不同发育阶段草鱼头肾中的表达情况, 是深入研究草鱼免疫系统建立和完善的基因控制机制的基础, 并可能为新的草鱼疾病防控策略的制定提供有价值的参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料 受精后 22℃发育 1—14d 的草鱼胚胎、1龄和 3龄草鱼均由湖南湘阴东湖渔场提供。不同发育阶段的草鱼胚胎以及取自 1龄和 3龄的草鱼头肾分别用液氮速冻后, - 80℃保存, 用于 DNA 和 RNA 提取。

1.2 主要试剂 AMV、RNase inhibitor PrimeStart™ HS 高保真 *Taq* 酶、*ExTaq* 酶、dNTPs、DNA Marker、PrimeScript RT reagent Kit 逆转录试剂盒、5'-Full RACE Kit 试剂盒和 pMD18-T 克隆载体试剂盒均购自 TaKaRa 公司; 胶回收试剂盒和 E. Z. N. A.™ Tissue RNA Kit 购自 OMEGA 公司; 其他化学试剂均为国产分析纯; PCR 引物合成以及 DNA 序列的测定均由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

1.3 实验方法

1.3.1 基因组 DNA 和 Total RNA 的提取以及 cDNA 第一条链的获得 受精后 14d 草鱼胚胎基因组 DNA 用酚氯仿法抽提^[19]; 草鱼头肾以及 1—14d 草鱼胚胎 Total RNA 的提取按照 E. Z. N. A.™ Tissue RNA Kit (OMEGA) 试剂盒实验操作指南进行。以提取的 Total RNA 为模板, 利用 PrimeScript RT reagent Kit 合成 cDNA 的第一条链, 具体操作按照试

剂盒说明书进行。

1.3.2 RAGs cDNA 和 DNA 序列的获得以及基因结构的确定 利用鲤科鱼类的同源性, 根据斑马鱼和鲤鱼 RAGs 编码区的保守区域分别设计引物 *rag1*-1S、*rag1*-1A 以及 *rag2*-1S、*rag2*-1A (表 1)。以受精后 14d 草鱼胚胎 RNA 逆转录而来的 cDNA 为模板扩增目的片段, 进行亚克隆和序列测定。再利用 NCBI 网站中 BlastN 比对所得序列, 确定扩增片段是否为 RAGs cDNA 目的片段。进一步根据已得序列和其他保守区序列再设计其他引物, 并以上述方法获得更多草鱼 RAGs 编码区 cDNA 序列 (表 1 和图 1)。

我们在已获得的部分草鱼 RAGs 编码区序列设计上游特异性嵌套式引物, 利用进行 RACE 方法扩增草鱼 RAGs 的 5' 和 3' 末端编码区序列 (表 1 和图 1)。5' RACE 按照 5'-Full RACE Kit 试剂盒说明书进行。3' RACE 按照以下方法进行: 以受精后 14d 草鱼胚胎 RNA 为模板, 利用 oligo dT-3sites Adaptor Primer 引物 (5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'), 逆转录合成 cDNA 的第一条链; 再以设计的 RAGs 特异嵌套式引物为正向引物和 3sites Adaptor Primer 引物 (5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATCC-3') 为反向引物, 利用 Primers start 高保真 *Taq* 酶进行两轮嵌套式 PCR 反应, 从而扩增 *rag1* 和 *rag2* 基因的 3' 端 cDNA 序列。所用循环条件均为: 95℃, 240s; 94℃, 30s; 53℃, 30s; 72℃, 60s; 30 个循环; 72℃, 420s。所得目的片段经胶回收后, 亚克隆测序。将所有扩增的测序结果分别拼接, 得到草鱼 RAGs 全长 cDNA 序列。

表 1 用于草鱼 RAGs cDNA 克隆的引物

Tab. 1 Primers used in cloning the cDNA s of grass carp *rag1* and *rag2*

<i>rag1</i> 基因 cDNA 扩增引物 Primers for amplifying <i>rag1</i> cDNA		<i>rag2</i> 基因 cDNA 扩增引物 Primers for amplifying <i>rag2</i> cDNA	
引物编号 Primer NO.	引物序列 (5'-3') Primer Sequence	引物编号 Primer NO.	引物序列 (5'-3') Primer Sequence
<i>rag1</i> -1S*	ATGGAGAAA GGGAGGTGGAG	<i>rag2</i> -1S	TGTCCGCCTCAA GTCTACCT
<i>rag1</i> -1A*	CTGCTACCA CAGGTCCCAAG	<i>rag2</i> -1A	TCCTCCTCATCTTCCTCGTTAT
<i>rag1</i> -2S	CCAGACGAT TCCGCTACGAT	<i>rag2</i> -2S	CAGCGAAA TAAGCCACAGCC
<i>rag1</i> -2A	GCCAAA GCTTTG TGGAGGTAG	<i>rag2</i> -2A	ACAGGAGCCTT GCGGTGGGT
<i>rag1</i> -5' RACE1	ATGCGACGGA CCTTTAGCC	<i>rag2</i> -3S	GCAGAAA GATGTCCCTA GAGCC
<i>rag1</i> -5' RACE2	TCCTTACTCTCCCTCAAAA CAG	<i>rag2</i> -3A	AAACGAGG TGGTGGGCAAT
<i>rag1</i> -3' RACE1	ACACTCTG CGACTCAACCCG	<i>rag2</i> -5' RACE1	ACGCTGAG GGGTATGACCGTATC
<i>rag1</i> -3' RACE2	TGAGATCGGCGAAGTCTACCAG	<i>rag2</i> -5' RACE2	CAGTTCGTTG TTGGGTGTTCC
		<i>rag2</i> -3' RACE1	CCACCA GACGCCTA CCATT
		<i>rag2</i> -3' RACE2	CAACACCTGGGAG CCCTACT

注: * S 上游正向引物; A: 下游反向引物
Note: * S Sense primer A Anti-sense primer

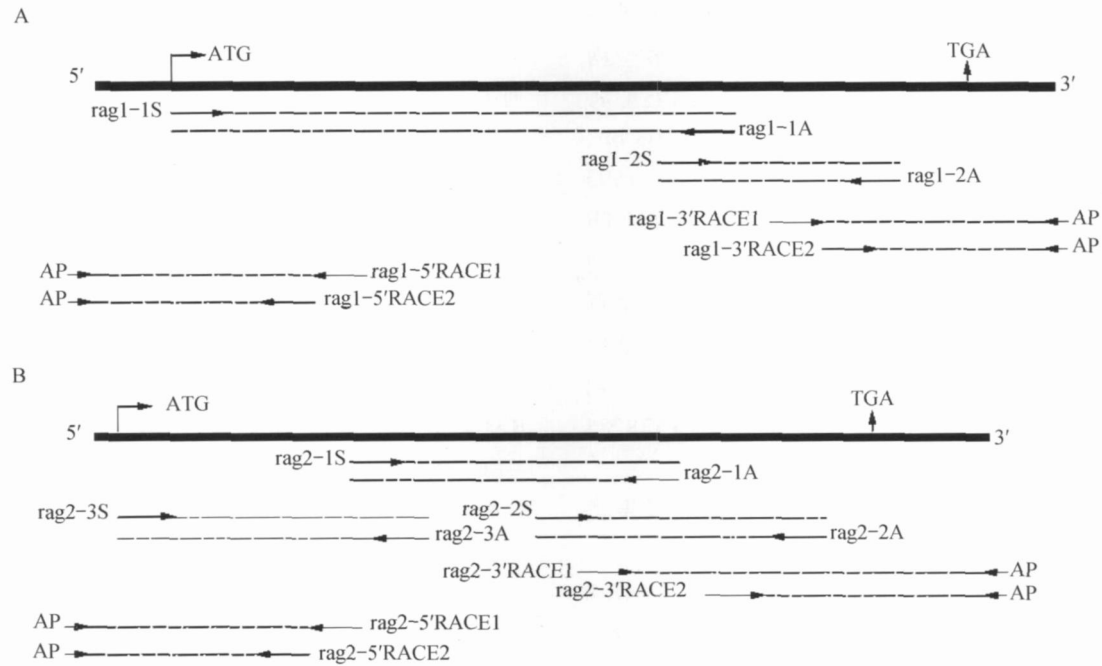


图 1 草鱼 RAGs cDNA 序列扩增引物的 PCR 扩增范围

Fig 1 Positions of PCR primers used in cloning full length grass carp RAGs cDNA

A: *rag1*基因 cDNA 扩增步骤及所用引物; B: *rag2*基因 cDNA 扩增步骤及所用引物; AP: Adaptor Primer

A: Positions of primers used in *rag1* cDNA amplification; B: Positions of primers used in *rag2* cDNA amplification. AP: Adaptor primer

已有研究表明鲤科和鲴科鱼类 *rag1* 基因具有两个内含子, *rag2* 基因在任何物种中都没有发现内含子^[13-15]。用 *rag1* 基因 cDNA 的扩增引物, 以草鱼基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 获得草鱼 *rag1* 的相应基因组序列, 测序拼接后与 cDNA 序列进行比对, 确定 *rag1* 内含子的位置和序列。用 *rag2* 基因 cDNA 的扩增引物, 以草鱼基因组 DNA 为模板扩增得到 *rag2* 基因组序列, 通过电泳比较 cDNA 序列和基因组序列长度的差异, 判断草鱼 *rag2* 基因组序列中是否具有内含子。由于二者长度一致, 没有进行进一步的测序分析。

1.3.3 草鱼 *rag1* 和 *rag2* 基因编码氨基酸序列预测及系统进化分析 用 MEGA 4.1 和 Jellyfish 软件预测草鱼 RAGs 编码的蛋白质序列, 将它们与其他物种分别进行同源性分析并构建系统进化树。根据人的 RAGs 蛋白结构以及预测的草鱼 RAGs 氨基酸序列的同源性推测草鱼 RAGs 蛋白质的结构。

1.3.4 RAGs 在草鱼不同发育阶段的表达 RT-PCR 检测 分别取各种 TotalRNA 样品 2 μg AMV 逆转录合成第一条 cDNA 链为模板, 并利用草鱼 *rag1* 基因的特异性引物进行 PCR 扩增。所用 *rag1* 基因特异性引物为: *rag1*RTS: 5'-TTGACGCTCTTG-

CTTCTGGG-3', *rag1*RTA: 5'-TCGTCCTCACCTCAACTCG-3'; 扩增产物跨 *rag1* 基因第二内含子; 反应条件为: 94℃ 210s, 94℃ 30s, 56℃ 30s, 72℃ 40s, 30个循环; 72℃ 420s。RT-PCR 内参对照用普遍存在的 β -actin 基因转录本。 β -actin 基因引物为 β -actinS: 5'-TCACACCTTCTACAACGAGCTGCG-3', β -actinA: 5'-GAAGCTGTAGCCTCTCTCGGTCAG-3', 反应条件为: 94℃ 210s, 94℃ 30s, 53℃ 30s, 72℃ 30s, 30个循环; 72℃ 420s。

2 结果

2.1 草鱼 RAGs 的结构及预测的氨基酸序列

将草鱼 *rag1* 和 *rag2* 基因所有 PCR 扩增中所得 cDNA 片段测序结果进行拼接后, 分别得到 3730 bp 的 *rag1* 基因和 1963 bp 的 *rag2* 基因全长 cDNA 序列。*rag1* 基因的开放阅读框 (ORF) 长 3192 bp 编码 1063 个氨基酸, 其 5'UTR 长 102 bp, 3'UTR 长 436 bp。通过比对 *rag1*-1S 和 *rag1*-1A 引物所扩增的逆转录 cDNA 序列和基因组 DNA 序列, 在草鱼 *rag1* 基因组 DNA 序列中发现两个内含子, 分别位于 *rag1* 基因组 DNA 序列 ATG 下游的 +309~+425 区域, 以及 +1562~+2398 区域。其两侧的剪接位点附近的序列分别为 AATCTTCTCAAG₁和 agAAGCCT-

GTGTC, 以及 TATGATGCAAG_{gt} 和 agGCAGGG-GATTT, 其剪接位点都符合 GT-AG 规则。第一内含子和第二内含子分别长 117 bp 和 837 bp 它们将 *rag1* 基因编码区分隔成 3 个外显子, 分别长 308 bp、1136 bp 和 2184 bp。草鱼 *rag2* 基因 ORF 长 1593 bp 编码 530 个氨基酸, 其 5'UTR 长 132 bp、3'UTR 238 bp。由于用 *rag2* 引物所扩增的草鱼 cDNA 序列和基因组 DNA 序列片段长度一致, 因此可以确定草鱼 *rag2* 基因没有内含子, 只有单一的外显子。草鱼 RAGs 结构 (图 2)。所得草鱼 *rag1* 和 *rag2* 基因序列均已递交至 GenBank, 序列号分别为 EF178284 和 EF514220。

2.2 不同物种的 RAGs 氨基酸序列比较以及聚类分析

预测的草鱼 RAG1 蛋白氨基酸序列经 Jellyfish 软件分析显示它与 GenBank 中斑马鱼、鲑鱼、爪蟾、

鸡和人的 RAG1 蛋白序列的相似性分别为 91.7%、74.5%、55.9%、57% 和 58%; 并且其保守氨基酸序列主要集中在蛋白 C 端。预测的草鱼 RAG2 蛋白氨基酸序列与 GenBank 中斑马鱼、鲑鱼、爪蟾、鸡和人的 RAG2 蛋白序列的相似性分别为 90.3%、73.3%、50.2%、52.7% 和 52.9%; 与 RAG1 所不同的是, RAG2 蛋白中保守氨基酸序列的位置是分散的。表 2 显示了预测的草鱼 RAG1 蛋白和 RAG2 蛋白氨基酸序列分别与其他几种脊椎动物 RAG1、RAG2 蛋白氨基酸序列之间的同源性。根据对 RAG1、RAG2 氨基酸序列同源性分析, 我们在 MEGA4.1 软件中用 Neighbor-joining 方法构建了不同物种的系统进化树 (图 3)。基于 RAG1 和 RAG2 氨基酸序列的同源性分别构建的系统进化树是完全一致的, 都是草鱼与鲤鱼、斑马鱼等理科鱼类首先聚类, 具有最近亲缘关系。

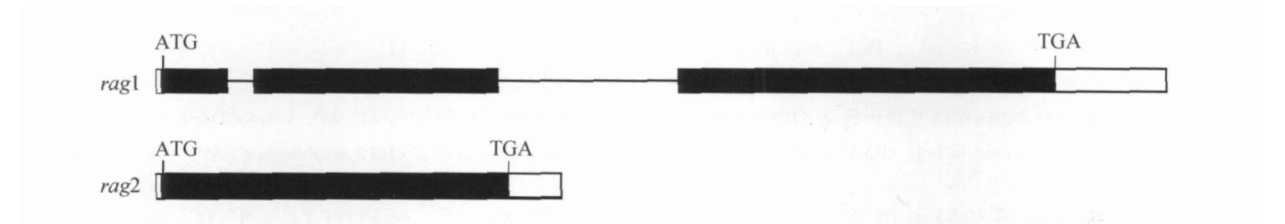


图 2 草鱼 RAGs 结构示意图
Fig. 2 The structure of grass carp *rag1* and *rag2* genes
其中白色框示非翻译区; 黑色框示外显子; 直线示内含子
White boxes, black boxes and lines indicate untranslated regions, exons and introns, respectively

表 2 草鱼与其他几种脊椎动物 RAG1、RAG2 蛋白质氨基酸序列同源性比较
Tab. 2 Percent identity of putative amino acid sequences of RAG1 and RAG2 between grass carp and several other vertebrates

	<i>Ctenopha ryngodon</i>	<i>Cyprinus idellus carpio</i>	<i>Danio rerio</i>	<i>Oncorhyn- chus mykiss</i>	<i>Cardharth inus leucas</i>	<i>Xenopus laevis</i>	<i>Gallus gallus</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Homo sapiens</i>	
<i>Ctenopha ryngodon idellus</i>	100	92	91	74		52	54	54	54	RAG2
<i>Cyprinus carpio</i>	91(96)	100	90	73		52	54	53	52	
<i>Danio rerio</i>	91(96)	90(96)	100	73		51	54	53	52	
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	77(88)	76(88)	76 (88)	100		52	53	52	52	
<i>Cardharth inus leucas</i>	57(78)	57(77)	58(78)	56(75)	100					
<i>Xenopus laevis</i>	58(76)	58(76)	58(76)	58(75)	61(75)	100	61	62	62	
<i>Gallus gallus</i>	60(78)	59(78)	60(78)	59(76)	62(79)	71(87)	100	71	72	
<i>Mus musculus</i>	59(78)	59(77)	59(78)	59(77)	63(80)	71(88)	75(88)	100	88	
<i>Homo sapiens</i>	59(79)	59(78)	60(78)	60(78)	64(81)	72(88)	76(89)	90(96)	100	
RAG1										

注: 括号中的数值表示 RAG1 蛋白核心序列之间同源性
Note: Numbers in parentheses are percent identities of the *rag1* core region, residues 409 to 1034 of the grass carp RAG1 sequence

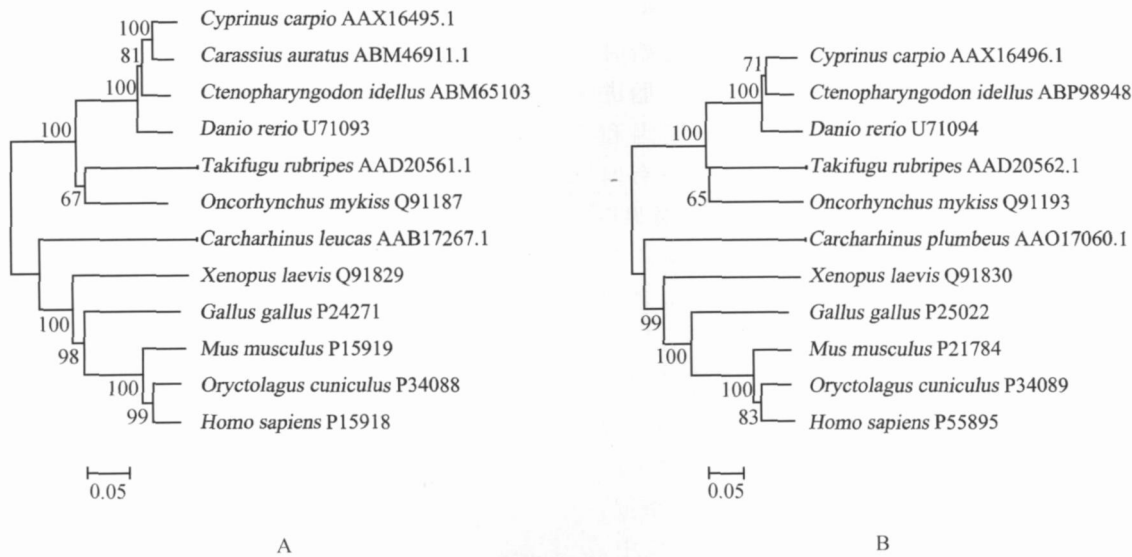


图 3 根据 RAG1和 RAG2蛋白氨基酸序列所构建的一些脊椎动物无根系统进化树
Fig 3 Unrooted phylogenetic trees of some vertebrates based on RAG1 and RAG2 amino acid sequences

A. 根据 RAG1氨基酸序列构建的系统进化树; B. 根据 RAG2氨基酸序列构建的系统进化树
A. Unrooted phylogenetic trees based on RAG1 amino acid sequences B. Unrooted phylogenetic trees based on RAG2 amino acid sequences

2.3 草鱼 RAGs蛋白中功能区和结构域的预测

将预测的草鱼 RAG s蛋白与哺乳类的 RAG s蛋白进行序列比对,发现很多保守的氨基酸序列。根据人的 RAG s蛋白结构以及草鱼这些保守的氨基酸序列与人 RAG s蛋白功能区域的同源性,我们推测出草鱼 RAG s蛋白中所具有的功能区和结构域。位于草鱼 RAG1蛋白 C端第 409位到 1034位的那些非常保守的氨基酸序列是其核心区域,它具有重组核酸酶活性^[20]。而在 RAG1蛋白 N端第 136到第 141位、第 213到第 221位、第 253到第 266位、第 300到 342位和第 367到 388位氨基

酸,分别对应于人的 RAG1蛋白同源的 BI BIIa BIIb区域以及 R N G Finger motif和 Zinc Finger A 结构域 (ZFA)^[21-22],但没有找到明显与 BIII区域同源的区域 (图 4A)。预测的草鱼 RAG2蛋白活性核心区域对应于其 N端的第 1到 381位氨基酸^[23-24];在预测 RAG2蛋白的 C端还有 Hinge结构域和球状的 Zinc Finger结构域 (ZF),分别对应于第 349到 413位氨基酸和第 414到 530位氨基酸 (图 4B)。RAGs蛋白中构成 Zinc Finger结构域所需的半胱氨酸和组氨酸序列在各物种中都是一致的。

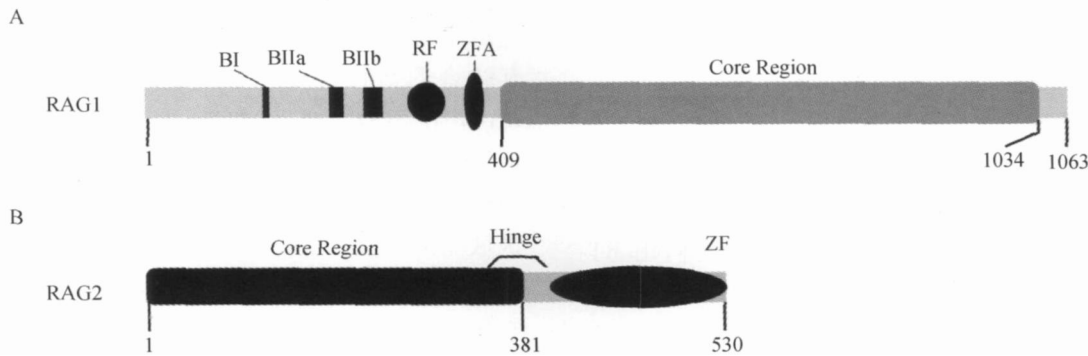


图 4 草鱼 RAGs蛋白结构示意图
Fig 4 The putative structure of RAG protein in grass carp
A: 推测的草鱼 RAG1蛋白结构; B: 推测的 RAG2蛋白结构
A: Putative structure of RAG1 protein; B: Putative structure of RAG2 protein

2.4 rag1基因在草鱼胚胎不同发育时期的表达

为了检测 RAGs在草鱼中胚胎的表达起始时间,我们利用 RT-PCR 对不同发育时期草鱼胚胎进行半定量分析。由于大部分情况下 *rag1* 基因和 *rag2* 基因一起转录^[13 15],并且 *rag2* 基因中没有内含子。为了避免 RNA 样品中的基因组 DNA 对 RT-PCR 实验结果的干扰,我们只用扩增产物跨 *rag1* 基因组序列第二内含子的一对引物进行了 *rag1* 基因表达的 RT-PCR 检测,而没有对 *rag2* 基因的表达进行相应的检测。当模板为 cDNA 时,扩增的目的条带为 623 bp 而当模板为基因组 DNA 时扩增的目的条带为 1460 bp。在受精后第 4 天及以后发育阶段的草鱼胚胎样品中都能扩增得到约 600 bp 的条带,并且条带亮度逐步增强(图 5)。这说明在草鱼中, *rag1* 基因从受精后第 4 天开始具有明显表达,并且其表达水平随着发育的进行逐步增加,而在受精后 10 天的幼鱼阶段已经具有高水平的 *rag1* 基因表达。

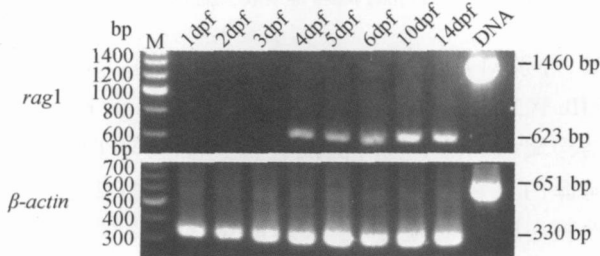


图 5 RT-PCR 检测不同发育阶段草鱼胚胎中 *rag1* 基因的表达

Fig. 5 The *rag1* expression of grass carp embryos detected with RT-PCR at different developmental stages

M: DNA 分子标准; dpf 受精后的天数; DNA: 模板为草鱼 DNA 的阳性对照

M: the DNA marker dpf days post fertilization DNA: the positive control with grass carp DNA template

2.5 RAGs在 1 龄和 3 龄草鱼头肾中的表达存在明显差异

鱼类头肾是一种重要的免疫器官,它是各类粒细胞和抗体生产细胞发生的主要器官^[1 25]。由于草鱼的抗病能力在一龄和二龄阶段没有明显差异,而在一龄和三龄阶段存在明显差异,我们用 RT-PCR 方法检测了一龄和三龄草鱼头肾中 *rag1* 基因的表达。结果表明在 1 龄草鱼的头肾中检测到 *rag1* 基因表达,而在 3 龄草鱼中没有检测到 *rag1* 基因的表达(图 6)。这说明草鱼头肾中 *rag1* 基因的表达在 1 龄和 3 龄阶段存在明显差异,在 3 龄草鱼头肾中的表达水平很低。

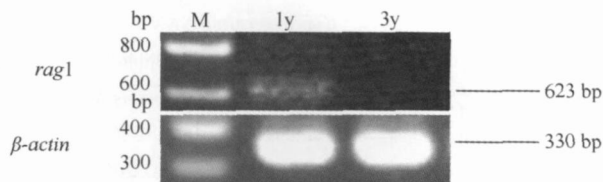


图 6 RT-PCR 检测 *rag1* 基因在 1 龄和 3 龄草鱼头肾中的表达

Fig. 6 The *rag1* expression in head kidney of grass carp detected with RT-PCR at 1 and 3-year old stage
y 年 y years

3 讨论

3.1 草鱼 RAG 结构和预测蛋白结构特点

我们克隆了草鱼 *rag1* 和 *rag2* 基因 DNA 序列。草鱼 *rag1* 基因从起始密码到终止密码总长 4188bp,由三个外显子和两个内含子组成,其开放阅读框长 3192bp 编码 1063 个氨基酸。草鱼 *rag2* 基因从起始密码到终止密码总长 1593bp,没有内含子,编码 530 个氨基酸。目前在已克隆 *rag1* 基因的物种中发现鲤科和鲴科鱼类中具有两个内含子,在沟鲈和虹鳟鱼中只有一个内含子^[11 16],而在其他物种中 *rag1* 与 *rag2* 一样都没有内含子^[13]。草鱼 *rag1* 基因的结构与目前已知的一些鲤科鱼类及河豚中 *rag1* 基因结构相同^[13 15 18]。

不同物种 RAGs 蛋白的氨基酸序列比对分析表明,草鱼中没有发现与人类 RAG1 BIII 结构域同源的区域,这与其他鱼类一致。除此之外,草鱼 RAGs 蛋白与其他物种的 RAGs 蛋白具有相似的功能区,功能区域内的氨基酸序列从软骨鱼到哺乳类都非常保守。普遍认为 RAG1 蛋白 C 端和 RAG2 蛋白 N 端的核心区域具有重组核酸酶的所有活性,如识别重组序列信号序列 RSS 活性,重组酶活性以及相互结合的活性等^[21 26]。但体内实验证明完整的 RAG1 和 RAG2 蛋白能行使更多的生物学功能^[27 28]:如 RAG1 蛋白 N 端的 4 个碱性区域 BI BIIa BIIIa BIII 是核转运蛋白 SRP1 的靶点^[29], BIIa 区域能提高 RAG1 蛋白的活性^[21]; RAG1 蛋白 N 端序列有一组非常保守的半胱氨酸和组氨酸残基^[30],它们所形成的两个 Zinc finger 结构域 C3HC4 C2H2 (ZFA) 参与了 RAG1 蛋白的二聚体的形成^[31]。在 RAG2 蛋白 C 端氨基酸序列中具有与 PHD (Plant Homeodomain) 结构域同源的序列,可以形成一个含有 7 个半胱氨酸和 1 个组氨酸残基 (C4HC3) 的球状 Zinc finger 结构域^[22],该结构对免疫球蛋白重链

(IgH)位点的第二轮有效重排是必需的^[32];此外,RAG2蛋白的C端区域还包含降解信号以及核定位信号^[33-34]。可见,完整RAG1和RAG2蛋白不仅仅承担重组核酸酶的活性,而且对V(D)J重组正确控制也具有重要作用^[6-35]。近来发现RAG1蛋白N端的C3HC4结构域也属于RING finger motif具有泛素连接酶活性,在泛素化途径中起重要作用^[36],因此,可以推测RAGs蛋白对其他的生命活动也可能具有某些重要调控作用^[37]。

3.2 草鱼 RAGs在不同发育阶段的表达差异

草鱼 *rag1* 基因在胚胎发育第4天开始具有明显的表达,这与斑马鱼和鲤鱼中 *rag1* 基因表达的时间相似,可能对应于鲤科鱼类胸腺的形成时间^[13-17]。*rag1* 基因在幼鱼和1龄草鱼头肾中表达,提示在幼龄阶段的草鱼头肾中发生了抗体基因活跃的V(D)J重排,是淋巴细胞多样性形成的阶段。在3龄草鱼头肾中 *rag1* 基因表达水平很低,说明在草鱼3龄发育阶段头肾中新抗原识别特异性表面受体重组活动已经较少,在该发育阶段草鱼的Ig和TCR库多样化过程的已趋于完成,比较完善的免疫系统已经建立。3龄以上草鱼具有较强抗病能力与这种现象吻合。草鱼RAGs表达的这种发育变化过程与鲤鱼随年龄增长头肾中RAGs表达的变化过程类似^[17]。但在鲤鱼中 *rag1* 基因的表达在1龄时表达水平就已经很低^[17],而草鱼中其表达时间可能持续两年以上,说明草鱼Ig和TCR库多样化过程以及建立完善免疫系统比鲤鱼需要更长的时间,直至3龄发育阶段才能完成。这种差异提示低等脊椎动物物种特异性免疫系统发育完善的时间可能与其发育成熟年龄有关。

我们在之前进行的蛋白质组学的研究中曾检测到类似RAG1的蛋白质在3龄草鱼中表达上调的现象^[2]。由于MALD-TOF质谱鉴定蛋白时只能得到该蛋白的肽指纹图谱而非蛋白的序列,蛋白鉴定时质谱仪所得肽指纹图谱需要已知的准确蛋白质数据进行匹配和参照,而草鱼不是模式动物从而缺少蛋白序列的数据库,因此,蛋白质组分析所检测到的上调蛋白质点可能不是RAG1蛋白,而可能是与RAG1蛋白质有一定同源性序列的蛋白。

参考文献:

- [1] Ni D S, Wang J G. Biology and Diseases of Grass Carp [M]. Beijing: Academic Press, 1999. 38—41, 329—330 [倪达书, 汪建国. 草鱼生物学与疾病. 北京: 科学出版社, 1999. 38—41, 329—330]
- [2] Zhang Q Y, Xie J Y, Zhao R R, et al. Preliminary proteomic difference analysis on the kidney of grass carp *Ctenopharyngodon idellus*, in various developmental stages [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30**(4): 425—431 [张琼宇, 谢锦云, 赵如榕, 等. 不同发育阶段草鱼肾脏蛋白质组差异的初步分析. 水生生物学报, 2006, **30**(4): 425—431]
- [3] Van G D, Melchior J F, Ransden D A, et al. Initiation of V(D)J recombination in a cell-free system [J]. *Cell*, 1995, **81**: 925—934
- [4] Mark E, Papavasiliou F N. V(D)J recombination and the evolution of the adaptive immune system [J]. *PLoS Biology*, 2003, **1**(1): e16
- [5] Litman G W, Anderson M K, Rast J P. Evolution of antigen binding receptors [J]. *Annual Review of Immunology*, 1999, **17**(1): 109—147
- [6] Brandt V L, Roth D B. A recombinase diversified new functions of the RAG proteins [J]. *Current Opinion in Immunology*, 2002, **14**(2): 224—229
- [7] Groth J G, Bamawole G F. Basal divergences in birds and the phylogenetic utility of the nuclear RAG-1 gene [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1999, **12**(2): 115—123
- [8] Lovejoy N R, Collette B B. Phylogenetic relationships of new world needlefishes (Teleostei: Belontiidae) and the biogeography of transitions between marine and freshwater habitats [J]. *Copeia*, 2001, **2001**(2): 324—338
- [9] Sullivan J P, Lundberg J G, Hardman M. A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using *rag1* and *rag2* nuclear gene sequences [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2006, **41**(3): 636—662
- [10] Wang X, Li J, He S. Molecular evidence for the monophyly of East Asian groups of Cyprinidae (Teleostei: Cypriniformes) derived from the nuclear recombination activating gene 2 sequences [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2007, **42**(1): 157—170
- [11] Hansen J D, Kaattari S L. The recombination activating gene 1 (RAG1) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): cloning, expression, and phylogenetic analysis [J]. *Immunogenetics*, 1995, **42**(3): 188—195
- [12] Hansen J, Kaattari S. The recombination activating gene 2 (RAG2) of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Immunogenetics*, 1996, **44**(3): 203—211
- [13] Willett C E, Chen Y J, Steiner L A. Characterization and expression of the recombination activating genes (*rag1* and *rag2*) of zebrafish [J]. *Immunogenetics*, 1997, **45**(6): 394—404
- [14] Willett C E, Zapata A G, Hopkins N, et al. Expression of zebrafish RAG genes during early development identifies the thymus [J]. *Developmental Biology*, 1997, **182**(2): 331—341
- [15] Pekoto B R, Mikawa Y, Brenner S. Characterization of the recombinase activating gene-1 and 2 locus in the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes* [J]. *Gene*, 2000, **246**(1—2): 275—283
- [16] Gong Y W, Zhang Y, Huang Q, et al. Cloning and identification

- of the *rag1* gene in channel catfish [J]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2004 **26**(8): 700— 703 [公衍文, 张云, 黄庆, 等. Channel catfish重组激活基因克隆与鉴定. 第三军医大学学报, 2004 **26**(8): 700— 703]
- [17] Huttenhuis H B, Huising M O, Van M T, *et al*. Rag expression identifies B and T cell lymphopoietic tissues during the development of common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2005 **29**(12): 1033— 1047
- [18] Fan S G, Zhang Q Y, Luo C. Sequence cloning and expression analysis of *Rag* genes in goldfish *carassius auratus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, **33**(4): 603— 612 [范嗣刚, 张琼宇, 罗琛. 鲫鱼 Rag基因的克隆及表达分析. 水生生物学报, 2009, **33**(4): 603— 612]
- [19] Chen J H, Huang M M, Zheng K, *et al*. RAPD analysis on genomic DNA of two artificial gynogenetic groups of grass carp *Ctenopharyngodon idellus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(5): 471— 477 [陈金辉, 黄明敏, 郑康, 等. 两个不同的人工雌核发育草鱼群体基因组 DNA 的 RAPD 分析. 水生生物学报, 2004 **28**(5): 471— 477]
- [20] Sadofsky M J, Hesse J E, Mchale J F, *et al*. Expression and V (D) J recombination activity of mutated RAG-1 proteins [J]. *Nucl Acids Res*, 1993 **21**(24): 5644— 5650
- [21] Monahan C J, Difilippantonio M J, Rao N, *et al*. A basic motif in the N-terminal region of RAG1 enhances V (D) J recombination activity [J]. *Mol Cell Biol*, 1997, **17**(8): 4544— 4552
- [22] Adkins V, Dias D C, Gomez C A, *et al*. Definition of minimal domains of interaction within the recombination-activating genes 1 and 2 recombinase complex [J]. *J Immunol*, 2000, **164**(11): 5826— 5832
- [23] Sadofsky M J, Hesse J E, Gellert M. Definition of a core region of RAG-2 that is functional in V (D) J recombination [J]. *Nucl Acids Res*, 1994 **22**(10): 1805— 1809
- [24] Cuomo C A, Oettinger M A. Analysis of regions of RAG-2 important for V (D) J recombination [J]. *Nucl Acids Res*, 1994 **22**(10): 1810— 1814
- [25] Bigaj J, Dukak J, Plytycz B. Lymphoid organs of *Gasterosteus aculeatus* [J]. *Journal of Fish Biology*, 1987, **31**(supplement A): 233— 234
- [26] Notarangelo L D, Villa A, Schwarz K. RAG and RAG defects [J]. *Current Opinion in Immunology*, 1999, **11**(4): 435— 442
- [27] Noordzij J G, Verkak N S, Hartwig N G, *et al*. N-terminal truncated human RAG1 proteins can direct T-cell receptor but not immunoglobulin gene rearrangements [J]. *Blood*, 2000 **96**(1): 203— 209
- [28] Steen S B, Han J, Mundy C, *et al*. Roles of the “dispensable” portions of RAG-1 and RAG-2 in V (D) J recombination [J]. *Mol Cell Biol*, 1999 **19**(4): 3010— 3017
- [29] Cortes P, Ye Z S, Balkin O D. RAG-1 interacts with the repeated amino acid motif of the human homologue of the yeast protein SRP1 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994 **91**(16): 7633— 7637
- [30] Schatz D G, Oettinger M A, B D. The V (D) J recombination activating gene RAG-1 [J]. *Cell*, 1989 **59**(6): 1035— 1048
- [31] Rodgers K K, Bu Z, Fleming K G, *et al*. A zinc-binding domain involved in the dimerization of RAG1 [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1996 **260**(1): 70— 84
- [32] Kirch S A, Rathbun G A, Oettinger M A. Dual role of RAG2 in V (D) J recombination: catalysis and regulation of ordered Ig gene assembly [J]. *EMBO Journal*, 1998 **17**(16): 4881— 4886
- [33] Barbara C A. A short peptide at the C terminus is responsible for the nuclear localization of RAG2 [J]. *European Journal of Immunology*, 2002 **32**(7): 2068— 2073
- [34] Ross A E, Vuica M, Desiderio S. Overlapping signals for protein degradation and nuclear localization define a role for intrinsic RAG-2 nuclear uptake in dividing cells [J]. *Mol Cell Biol*, 2003 **23**(15): 5308— 5319
- [35] Sadofsky M J. The RAG proteins in V (D) J recombination: more than just a nuclease [J]. *Nucl Acids Res*, 2001 **29**(7): 1399— 1409
- [36] Yurchenko V, Xue Z, Sadofsky M. The RAG1 N-terminal domain is an E3 ubiquitin ligase [J]. *Genes & Development*, 2003, **17**(5): 581— 585
- [37] Sadofsky M J. Recombination-activating gene proteins: more regulation, please [J]. *Immunological Reviews*, 2004 **200**(1): 83— 89

SEQUENCE CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF RECOMBINATION ACTIVATING GENE 1 AND 2 (*rag1* AND *rag2*) IN GRASS CARP, *CTENOPHARYNGODON IDELLUS*

ZHANG Qiong-Yu^{1,2}, FAN Si-Gang^{1,2} and LUO Chen²

(1. College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081; 2. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058)

Abstract It is well known that the infectious diseases caused by the virus and bacterium frequently occur in the one-year and two-year old grass carp but rarely in the three-year old grass carp, suggesting that perfect immune system might be established in three-year old grass carp. By mediating V(D)J recombination of the lymphocyte surface receptor gene exclusively, recombination activating genes (RAGs) are the key genes playing pivotal role in regulating the development of specific immune system in vertebrate. To understand the developmental genetics of immune system in grass carp, we have cloned grass carp *rag1* and *rag2* genes with polymerase chain reaction (PCR) method and then examined their expression in various developmental stages with method of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The total length of the genomic sequence of the grass carp *rag1* gene from the initiation codon to the stop codon is 4188bp, which composed of three exons and two introns. The length of entire open reading frame (ORF) is 3192bp, encoding a protein containing 1063 amino acids. The grass carp *rag2* gene has no intron and the length of open reading frame is 1593bp, encoding a protein containing 530 amino acids. A ligament of RAGs amino acids among various vertebrate species has shown that the putative sequences in predictive function regions of grass carp shared high identity with other vertebrates. The expression of *rag1* in grass carp embryos has been detected at 4 days post-fertilization (dpf), and higher expression level has been detected maintaining during the subsequent larva stage. *rag1* expression has been detected in head kidney of one-year old grass carp but not in the three-year old grass carp. These results suggest that the V(D)J recombination of the immunoglobulin (Ig) and T-cell receptor (TCR) genes and the concomitant differentiation of lymphocyte start at hatching stage and are maintained in larva and one-year old grass carp, but in three-year old grass carp, the activation of V(D)J recombination is greatly reduced meaning the libraries of diversified Ig and TCR and relative perfect immune system are established at this stage.

Key words Grass carp; Immune system; Recombination activating genes; Developmental genetics