

# 鸡 Ig $\lambda$ 轻链基因克隆、序列分析及其在 COS7 细胞膜上的定位表达

张红<sup>1,2,3</sup>, 王健<sup>3</sup>, 王丽<sup>2</sup>, 席俊<sup>2</sup>, 易明林<sup>2</sup>, 张改平<sup>2\*</sup>, 章金刚<sup>1</sup>

(1. 军事医学科学院, 北京 100850; 2. 河南省农业科学院 农业部动物免疫学重点开放实验室  
河南省动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450002; 3. 河南教育学院, 河南 郑州 450003)

**摘要:** 为了研究鸡 B 细胞膜免疫球蛋白 (mIg) 的功能, 深入了解鸡免疫系统抗体基因的特点, 从鸡法氏囊 B 细胞 cDNA 中扩增出 Ig $\lambda$  轻链基因, 对其核苷酸序列和氨基酸序列进行了分析和比较。该基因 cDNA 全长 873bp, 编码含 226 个氨基酸的 Ig $\lambda$  轻链, N-端 21 个氨基酸构成轻链信号肽, 随后是 2 个 Ig 样结构域。运用融合 PCR 的方法将该基因与牛 IgG Fc 受体  $\gamma$ RII 跨膜区序列嵌合形成重组跨膜分子, 构建真核表达载体 pcDNA- $\lambda$ R2T, 转染 COS7 细胞, 荧光抗体染色及流式细胞术检测到重组鸡 Ig $\lambda$  轻链在细胞膜上的表达。所扩增的鸡 Ig $\lambda$  轻链基因以及构建表达于细胞膜上的重组鸡 Ig $\lambda$  轻链跨膜分子, 为研究鸡免疫系统中的抗体轻链基因, 探索 Ig $\lambda$  轻链和 B 细胞膜免疫球蛋白的功能奠定技术基础。

**关键词:** 鸡 Ig $\lambda$  轻链; 重组跨膜分子; COS7 细胞; 膜定位表达; 牛 IgG Fc 受体  $\gamma$ RII

**中图分类号:** Q78    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1004-3268(2009)08-0132-05

## Cloning and Expression of the Chicken Ig $\lambda$ Light Chain on COS7 Plasma Membrane

ZHANG Hong<sup>1,2,3</sup>, WANG Jian<sup>3</sup>, WANG Li<sup>2</sup>, XI Jun<sup>2</sup>,

YI Ming-lin<sup>2</sup>, ZHANG Gai-ping<sup>2\*</sup>, ZHANG Jin-gang<sup>1</sup>

(1. Academy of Military Medical Sciences Beijing 100850 China; 2. Key Laboratory of Animal Immunology of the Ministry of Agriculture, Henan Provincial Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002 China; 3. Henan Educational Institute, Zhengzhou 450003 China)

**Abstract:** To study the functions of chicken antibody genes, a chicken Ig $\lambda$  light chain gene was amplified from chicken bursa B lymphocyte cDNA pool. The gene spans 873bp of DNA which encodes a chicken Ig $\lambda$  light chain with 226 amino acids. The light chain consists of a signal peptide with 21aa at N-terminus and two antibody-like domains. Using fuse PCR technique, the recombinant transmembrane molecule was formed by generating a chimeric protein incorporating transmembrane region of bovine IgG Fc receptor  $\gamma$ RII (bFc $\gamma$ RII) and chicken Ig $\lambda$  light chain. Mamalian expression vector pcDNA- $\lambda$ R2T was successfully constructed and transiently transfected into COS7 cells via lipofectamin. Flow cytometric analysis showed that the expression of the chimeric Ig $\lambda$  light chain was located principally on the plasma membrane on COS7 cells. The gene cloning and membrane-located expression of the chicken Ig $\lambda$  light chain provide a basis for further

收稿日期: 2009-04-10

基金项目: 国家“863”计划项目 (2006AA10Z446); 国家自然科学基金项目 (30571388); 河南省高校创新人才支持计划 (2009HASTIT035); 河南省基础与前沿项目 (072300430110)

作者简介: 张红 (1967-), 女, 河南光山人, 教授, 博士, 主要从事分子生物学及免疫学研究。

通讯作者: 张改平 (1960-), 男, 河南内黄人, 研究员, 博士, 博士生导师, 主要从事分子生物学及免疫学研究。

study of chicken antibodies and B cell membrane immunoglobulin.

**Key words:** Chicken Ig $\lambda$  light chain; Chimeric transmembrane molecule; COS7 cells; Membrane-located expression; bFc $\gamma$ R II

鸡免疫系统中, B 淋巴细胞系的分化与成熟依赖独有的淋巴器官——法氏囊, 并且经历从淋巴干细胞到祖 B 细胞、前 B 细胞、幼龄 B 细胞和成熟 B 细胞的发育过程。在 B 细胞分化成熟过程中, 抗体胚系基因完成了基因重排, B 细胞产生膜免疫球蛋白(mIg)等一系列的细胞表面标志, 具有标志的 B 细胞系可以被方便地区分并加以分离, 为免疫系统发育、细胞识别、基因重排的关键因子等研究提供了最佳的细胞模型<sup>[1]</sup>。鸡免疫球蛋白轻链主要为 $\lambda$ 型, 与 mIg 和 B 细胞抗原受体(BCR)的构成、抗体产生及 B 细胞增殖分化密切相关<sup>[2~4]</sup>。本试验从鸡法氏囊 B 细胞 cDNA 中扩增出 Ig $\lambda$  轻链基因, 对其核苷酸序列和氨基酸序列进行分析和比较, 还将鸡 $\lambda$ 轻链与牛 IgG Fc 受体 $\gamma$ RII的跨膜区嵌合, 构建在 COS7 细胞膜表达的真核重组载体 pcDNA- $\lambda$ R2T, 实现其在 COS7 细胞膜上的定位表达, 为进一步研究 Ig $\lambda$  的免疫学及其他生物学功能奠定基础。

# 1 材料和方法

## 1.1 组织标本

无菌分离 3 周龄 SPF 雏鸡法氏囊组织, 剪碎后充分研磨, 用于总 RNA 提取。

## 1.2 细胞、质粒和试剂

真核表达载体 pcDNA3 (Invitrogen 公司)、COS7 细胞株(中科院上海细胞生物所)、脂质体 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 (Invitrogen 公司)、质粒提取试剂盒 (Qiagen 公司)、限制酶、T4 连接酶、DNA 聚合酶(购自 Takara 公司)。EZ Spin column total RNA isolation kit 和 First strand cDNA synthesis kit 购自 BBI 公司。

## 1.3 鸡 Ig $\lambda$ 轻链基因的扩增

鸡 B 细胞总 RNA 提取依照 EZ Spin column total RNA isolation kit 说明进行, 测定 RNA 浓度和检测 RNA 完整性后用 First strand cDNA synthesis kit 合成 cDNA 第 1 链。该反转录产物作为 PCR 模板, 用于扩增的引物为: 上游引物: 5'-CAGAAGCTTACAGCT-GCTGGGATTC-3', 下游引物: 5'-CATCTCGAGCT-TAGCACTCGGACCT-3'。

50 $\mu$ L 反应体系中加入模板 2 $\mu$ L、10 $\times$ Pyrobest<sup>TM</sup> 聚合酶 Buffer 5 $\mu$ L、dNTPs 4 $\mu$ L、上、下游引物各 1 $\mu$ L、Pyrobest<sup>TM</sup> DNA polymerase 0 5 $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 36 5 $\mu$ L, 扩

增鸡 Ig $\lambda$  轻链基因。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C, 预变性 1min; 94 $^{\circ}$ C 50s, 58 $^{\circ}$ C 50s, 72 $^{\circ}$ C 90s, 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。1%琼脂糖凝胶电泳分析 RT-PCR 扩增产物。

## 1.4 鸡 Ig $\lambda$ 轻链基因克隆与鉴定

PCR 产物纯化后连接于 pGEM-T easy 载体, 再将连接产物转化感受态细胞 JM109, 转移至含有 X-gal、IPTG 和氨苄青霉素的 LB 固体平板上培养, 16h 后挑取白色单菌落接种于 LB 液体培养基(Amp<sup>+</sup>)中振荡培养, 小量提取质粒进行 PCR 鉴定和酶切鉴定, 阳性重组质粒送宝生物工程(大连)有限公司测序。

## 1.5 融合 PCR 构建嵌合跨膜分子

采用融合 PCR 技术将牛 IgG Fc 受体 $\gamma$ RII膜区(R2T)与鸡 Ig $\lambda$  轻链序列(cIg $\lambda$ )连接形成嵌合跨膜分子 $\lambda$ 2T, 利用鸡 Ig $\lambda$  轻链的信号肽引导和牛 IgG Fc 受体 $\gamma$ RII膜区的锚定功能实现嵌合跨膜分子在细胞膜的定位表达。

设计引物分别扩增出 cIg $\lambda$  和 R2T, R2T 以河南省动物免疫学重点实验室保存的牛 IgG Fc 受体 $\gamma$ RII 质粒为模板进行扩增。

cIg $\lambda$  引物: P1 5'-CAGAAGCTTACAGCTGCTGG-GATTC-3'; P2 5'-AGCTGTCATCGAGCACTCGGAC-CTCTT-3'

R2T 引物: P3 5'-GTCCGAGTGCTCGATGA-CAGCTGTGGCT-3'; P4 5'-TCTCTCGAGAAG-GCGTTTCTGGTAATC-3'

融合 PCR 方法分 2 步进行, 先在 100 $\mu$ L PCR 反应体系中加入 Premix Ex Taq<sup>TM</sup> 50 $\mu$ L、cIg $\lambda$  2 $\mu$ L、R2T 2 $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 46 $\mu$ L, 94 $^{\circ}$ C 1min, 58 $^{\circ}$ C 2min。10 个循环后再加入引物 P1 和 P4, 进行第 2 步 PCR, 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 50s, 58 $^{\circ}$ C 50s, 72 $^{\circ}$ C 90s, 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 产物纯化后连接于 pGEM-T easy 载体, 转化感受态细胞 JM109, 转移至含有氨苄青霉素的 LB 固体平板上培养, 挑单菌落 PCR 鉴定和测序验证。

## 1.6 构建重组表达载体 pcDNA- $\lambda$ R2T

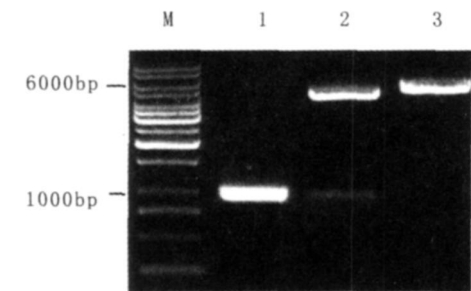
Hind II和 Xhd 酶切 $\lambda$ R2T cDNA 和 pcDNA3 质粒, 将 $\lambda$ R2T cDNA 定向克隆于表达载体 pcDNA3。经连接、转化和培养后挑取阳性菌落小量提取质粒,



R10全序列 20051130.aa.txt	1	THSCWDSAMAWAPLLLAHLAHTSGSLVQAALTQPASVSANLGETVKITCSGSSGYGYNWY	60
chicken lambda ig 849bp paper aa.txt	1	-----SGSLVQAALTQPASVSANLGETVKITCSGSSG-SYGWY	37
R10全序列 20051130.aa.txt	61	QKSPGSPAPVTVIYDNTNRPSPDIPSRFSGFTSGSTGLTITIGVQADEAVYFCGSRDSSY	120
chicken lambda ig 849bp paper aa.txt	38	QKSPGSPAPVTVIYNDKRPSPDIPSRFSGSKSGSTATLTITIGVQADEAVYFCGSYDS-Y	96
R10全序列 20051130.aa.txt	121	VNTGFGAGTTLTVLGQPKNAPTITLPPPSKEELNEATKATLVCLINDFYPSFVTVDWVID	180
chicken lambda ig 849bp paper aa.txt	97	VGI-FGAGTTLTVLGQPKVAPTITLPPPSKEELNEATKATLVCLINDFYPSFVTVDWVID	155
R10全序列 20051130.aa.txt	181	GSTRSGETTAPQSQNSQYMASSYLSLSASDWSSSHETTCRVTHNGTSITKTLKRSEC	238
chicken lambda ig 849bp paper aa.txt	156	GSTRSGETTAPQSQNSQYMASSYLSLSASDWSSSHETTCRVTHDGTSTKTLKRSEC	213

图3 扩增产物编码的氨基酸序列(R10)与鸡 Igλ 轻链序列比较

载体 pcDNA3, 经连接、转化和培养后挑取阳性菌落小量提取质粒, PCR 扩增以及用 *Hind*II 和 *Xhd* 双酶切鉴定, 均产生约 1 000bp 的条带(图 4), 鉴定正确的阳性克隆送往大连 Takara 公司, 测序确定读码框正确。



1: PCR 扩增产物; 2: pcDNA-λR2T *Hind*III 和 *Xho*I 双酶切; 3: pcDNA-λR2T 质粒; M: DNA 分子量标准

图4 表达载体 pcDNA-λR2T 的酶切鉴定

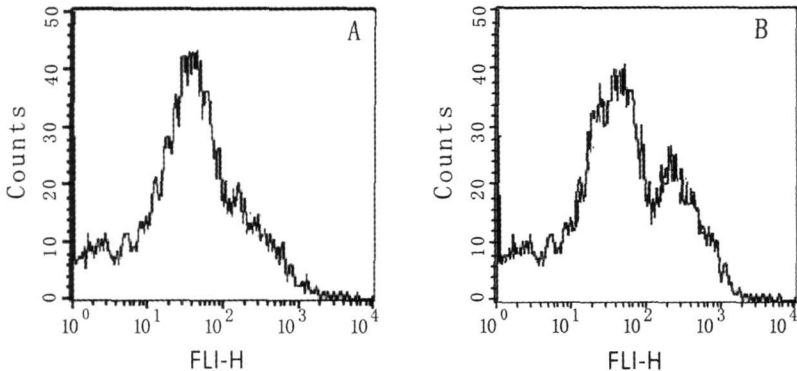
2.4 重组分子在 COS7 细胞膜的定位表达

COS7 细胞培养达到 80%融合时, 用脂质体 Lipofectamine™2000 将表达载体 pcDNA-λR2T 和空质粒 pcDNA3 转染 COS7 细胞, 72h 后用抗鸡 Igλ 单抗进行间接细胞免疫荧光染色, 流式细胞术检测结果见图 5。pcDNA-λR2T 重组质粒转染的 COS7 细胞平均荧光强度大于对照组用空质粒 pcDNA3 转

染 COS7 细胞的平均荧光强度。显示细胞膜上有重组蛋白 Igλ 表达。

3 讨论

禽类 B 淋巴细胞的发育依赖独有的淋巴器官——法氏囊, 在法氏囊中, 囊胚细胞经历了抗体基因重排并形成带有特定表面免疫球蛋白标志的 B 细胞克隆<sup>[9]</sup>。哺乳动物及啮齿动物通常先进行重链重排, 随后再进行轻链基因重排, 小前 B 细胞轻链 V-J 重排后并无轻链在膜上表达, B 细胞受体由 μ 链与替代轻链 V pre-B/λ5 构成<sup>[9]</sup>。与哺乳动物有所不同, 禽类抗体基因重链和轻链几乎在同一时期完成重排, 重排后的轻链与重链以功能性 mIg 的形式呈现于 B 细胞表面, mIg<sup>+</sup> B 细胞在囊滤泡中快速增殖, 在此阶段进行的基因转变是细胞分化的内在动力<sup>[7]</sup>。特定编码形成的 mIg 分子对 B 细胞的进一步分化发育尤为关键, 作为 B 细胞表面受体, mIg 与配体分子的结合为 B 细胞发育提供了必不可少的选择信号<sup>[8,9]</sup>。为了研究 B 细胞表面重要标志 mIg 分子的生物学功能, 充分认识其在禽免疫系统中所处地位以及发挥的重要作用, 本试验先从鸡 Igλ



A: pcDNA-λR2T 转染 COS7 细胞后的细胞荧光强度  
B: pcDNA 转染 COS7 细胞后的细胞荧光强度

图5 流式细胞术检测重组跨膜分子 λR2T 在 COS7 细胞膜的表达

入手, RT-PCR 扩增出鸡 Igλ 轻链基因, 与 Gen Bank 中鸡 Igλ 轻链序列(K00678)进行比较分析, 氨基酸序列同源性为 92%。N-端有 21 个氨基酸组成的信号肽序列, 有 2 个 Ig 样结构域(A22—S118、Y120—C238)。起始密码子 ATG 之前 24 个核苷酸构成 5'UTR 序列, 2 个连续的终止密码子之后共 153 个核苷酸构成 3'UTR 序列, 序列比较 5'UTR 和 3'UTR 以及信号肽序列与鸡 Igλ 轻链序列完全一致, 与轻链稳定区的核苷酸序列和氨基酸序列基本一致, 与轻链可变区的序列差异较大。

完整的跨膜分子通常由胞外区、跨膜区和胞内区构成, mIg 分子由重链跨膜区锚定在细胞膜上, 由于未能扩增出重链基因, 本试验采用融合 PCR 技术将牛 IgG Fc 受体 γR II 跨膜区(R2T)与鸡 Igλ 轻链序列(cIgλ)连接形成嵌合跨膜分子 λ2T, 利用鸡 Igλ 轻链的信号肽引导和牛 IgG Fc 受体 γR II 跨膜区的锚定功能实现嵌合跨膜分子在 COS7 细胞膜的定位表达。该细胞模型的建立为研究鸡 Igλ 轻链作为细胞表面分子在抗原识别、信号传递、配体与受体间的相互作用, 以及进一步认识 mIg 分子的免疫学功能奠定了技术基础。

参考文献:

[ 1 ] Sayegh C E, Drury G, Ratcliffe M J H. Efficient antibody diversification by gene conversion *in vivo* in the absence of selection for V(D)J-encoded determinants

[ J ] .EMBO J, 1999, 18(22): 6319—6328.  
[ 2 ] Conlon T M, Meyer K B. Cloning and functional characterisation of avian transcription factor E2A[ J ] . BMC Immunol, 2004, 14: 5—11.  
[ 3 ] Rosnet O, Blanco-Betancourt C, Grivel K, *et al.* Binding of free immunoglobulin light chains to VpreB3 inhibits their maturation and secretion in chicken B cells [ J ] . J Biol Chem, 2004, 279: 10228—10236  
[ 4 ] Fang T, Smith B P, Roman C A J. Coventional and surrogate light chains differentially regulate Ig<sup>μ</sup> and D<sup>μ</sup> heavy chain maturation and surface expression [ J ] . J Immuno, 2001, 167: 3846—3857  
[ 5 ] Reynaud C A, Imhof B A, Anquez V, *et al.* Emergency of committed B lymphoid progenitors in the developing chicken embryo[ J ] . EMBO J, 1992, 11: 4349—4358  
[ 6 ] Burrows P, LeJeune M, Kearney J F. Evidence that murine pre-B cells synthesise mu heavy chains but no light chains[ J ] . Nature, 1979, 280: 838—840  
[ 7 ] Houssaint E, Mansikka A, Vainio O. Early separation of B and T lymphocyte precursors in chicken embryo [ J ] . J Exp Med, 1991, 174: 397—406  
[ 8 ] Wienands J. The B-cell antigen receptor: formation of signaling complexes and the function of adaptor protein [ J ] . Curr Top Microbiol Immunol, 2000, 245: 53—76.  
[ 9 ] Aliahmad P, Pike K A, Ratcliffe M J H. Cell surface immunoglobulin related checkpoints in chicken B cell development[ J ] . Vet Immunol Immunopathol, 2005, 18: 3—9

# 2010 年《河南农业科学》征订启事

《河南农业科学》是河南省农业科学院主办的综合性农业科技期刊, 主要报道粮食作物、经济作物、土壤肥料、水资源高效利用、植物保护、果树蔬菜、畜牧兽医、特种种植及养殖等方面的研究成果和先进技术。多年来, 深受省内外农业科技人员, 农业院校师生, 基层干部和农民的喜悦, 曾多次得到有关部门的奖励, 连续被评为“全国中文核心期刊”、“全国优秀农业期刊”, 连续获“河南省优秀科技期刊一等奖”。2006 年又被评为“中国科技核心期刊”、“中国农业核心期刊”。2008 年被评为“河南省第一届自然科学二十佳期刊”、“河南省第一届自然科学期刊综合质量检测一级期刊”。为了进一步扩大信息量, 满足多层次读者的需求, 本刊将进一步突出创新性、学术性、指导性; 进一步加大对重大、重点项目以及基金项目、创新性成果的报道力度。同时, 继续加强对科技新动态、生产新动向、市场新需求的报道。

本刊为月刊, 国际标准 16 开本, 120 页, 彩色封面, 每期定价 8.00 元, 全年 96 元。各地邮局均可订阅, 邮发代号: 36—32。如错过订期, 可直接与本刊编辑部联系订阅。

地址: 郑州市农业路 1 号      邮编: 450002      E-mail: hnnykx @163.com  
电话: 0371—65739041      传真: 0371—65712747