

猪 FcRn 基因及其剪接变体序列的克隆与序列分析

李海霞,陈丽颖,刘涛,范沛,乔新安,张志强,王月影,王艳玲

(河南农业大学牧医工程学院,郑州 450002)

摘要:克隆并分析猪 FcRn 基因;十二指肠组织提取总 RNA,利用设计的引物进行 RT-PCR,PCR 产物与 pMD-19T 载体连接后转化 JM109 感受态细胞,筛选阳性克隆并测序;FcRn 阳性克隆两条序列在 NCBI 上比较,显示序列同猪 FcRn(AY740682.1)同源性都为 99%。克隆了猪 FcRn 基因的序列和其剪接变体序列,其剪接变体序列已在 GenBank 上注册(Accession.EU852582)

关键词:猪;FcRn;剪接变体;克隆;序列分析

中图分类号:S852.23 文献标识码:A

Molecular Cloning and Sequence Analysis of Swine FcRn and its Alternatively Spliced Variant

Li Haixia, Chen Liying, Liu Tao, Fan Pei, Qian Xin'an, Zhang Zhiqiang,

Wang Yueying, Wang Yanling

(Lab of Animal Physiology & Biochemistry, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002)

Abstract: To clone and analysis the FcRn gene of pig. Total RNA was extracted from mucosal tissue of duodenum and mRNA sequence of gene were amplified by RT-PCR using two designed primers. The PCR products were ligated into the pMD-19T vector, and then transformed into competent cells of JM109. The sequence was analyzed to identify the recombinant plasmid. Identity analysis showed that the two FcRn nucleotide sequence shared 99%. The porcine alternatively spliced variant of FcRn gene was successfully cloned in the present study and the sequence of spliced variant has been submitted to GenBank (Accession. EU852582).

Key words: Pig, FcRn, Alternatively spliced variant Molecular Cloning, Sequence Analysis.

哺乳动物刚刚出生后其免疫系统功能尚未完善,因此被动获得抗体非常重要,而哺乳动物新生儿获得母体特异性体液免疫依赖于母源 IgG 和或 IgA 分子从母体到胎儿或婴儿的转运^[1]。IgG 是初乳中含量最丰富的免疫球蛋白成分,母源 IgG 向乳汁中分泌和被新生儿摄取均需要通过胞转作用(transcytosis)穿越上皮细胞屏障,这个过程需要一种具有转运功能的受体即新生儿 Fc 受体(neonatal Fc receptor, FcRn)的参与。

免疫球蛋白 Fc 受体(FcR)是识别免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig) Fc 段的受体。根据其功能, FcRs 可分为 2 类。一类存在于效应细胞表面,与抗原抗体复合物结合后激发不同的生物学反应,它们包括识别 IgG 的 Fc γ 受体(Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII 和牛 Fc γ 2R),识别 IgE 的 Fc γ RI 和 Fc γ RII,以及识别 IgA 的 Fc γ RI。另一类负责上皮细胞对免疫球蛋白分子的主动转运,包括转运 IgA、IgM 的多体 IgA 受体(poly-IgA receptor, pI-

基金项目:国家自然科学基金资助项目“FcRn 在仔猪肠道的表达规律及其与母乳 IgG 转运的关系”(30671531)

第一作者简介:李海霞,女,1983 年出生,硕士研究生,研究方向:泌乳生物学。通信地址:450002 郑州河南农业大学牧医工程学院动物生理生化实验室,Email:lhx5162003@yahoo.com.cn。

通讯作者:王艳玲,女,1962 年出生,博士,教授,博导,研究方向:泌乳生物学。通信地址:450002 河南农业大学牧医工程学院, Tel: 0371-63558888, Email: wangyanling1@yahoo.com。

收稿日期:2008-07-28,修回日期:2008-08-11。

gR)和转运 IgG 的 FcRn。

截止目前, FcRn 是已发现的转运 IgG 的唯一特异受体, 对其功能以及在动物体内表达规律和在人类医学及动物医学中可能的应用等方面的研究近年来日益受到重视, 已成为生命科学领域的研究热点之一。实验利用 RT-PCR 技术克隆了猪 FcRn 基因的序列和其剪接体序列, 为今后更好地研究 FcRn 提供一定的理论基础。

1 材料与方 法

1.1 试验时间、地点

研究中试验样品的采集于 2008 年 2 月 -3 月年在河南农业大学动物基础科学实验室进行, RNA 提取及其他所有室内试验于 2008 年 4 月至 2008 年 6 月在河南农业大学农业生物技术重点实验室进行。

1.2 试验材料

1.2.1 待检组织样品 试验用健康仔猪 (大白和长白二元杂交后代) 由河南新大牧业有限公司提供, 为出生当天已吃初乳 (标记为 0dy)。仔猪经放血处死, 然后取十二指肠 (前、中、后段即十二指肠乙状弯曲部、十二指肠升段和十二指肠降段) 等组织, 放入液氮速冻后, 置 -80℃ 冰箱保存待测。

1.2.2 酶与试剂 动物组织 RNAout 试剂 (TaKaRa 宝生物工程 (大连) 有限公司); DEPC (Sigma, 美国); AMV 反转录酶、5×AMV Buffer、RNA 酶抑制剂 (RNase-Inhibitor)、通用引物 (Oligo (dT))、Taq DNA 聚合酶、dNTPs、MgCl₂、DNA Marker2000、pMD-19T 载体、琼脂糖切胶纯化试剂盒 (TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0)、大肠杆菌 (*E.coli* JM109) 感受态细胞等均购自 TaKaRa 宝生物工程 (大连) 有限公司; 琼脂糖 (Promega, 美国); 氯仿、异丙醇、乙醇等, 均为分析纯试剂。

1.2.3 仪器 Sigma3k30 高速冷冻离心机 (Sigma); 梯度 PCR 仪 (Biometra); DYY-III 型稳压稳流电泳仪 (北京六一仪器厂); Tanon Gis-1000 凝胶成像分析系统 (上海天能科技生物公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 引物设计与合成 根据 GenBank 中公布的猪的 FcRn 的 cDNA 序列, 利用 Primer 5.0 引物设计软件设计一对 PCR 引物。上游引物 (F): 5' -CTCCTGTAC-CACCTCACGG-3'; 下游引物 (R): 5' -GCCCAAG-GCTTATACCATTTA-3', 扩增长度 1 290 bp。TaKaRa 宝生物工程 (大连) 有限公司合成。

1.3.2 仔猪 (0d) 十二指肠组织总 RNA 的提取 核酸提取过程中所用试剂均使用 0.1% DEPC 水浸泡过夜, 并高压灭菌。在锡箔纸上用手术刀切约 50-100 mg 的仔

猪十二指肠组织, 放入 2 ml 离心管中, 加 1000 μl RNAout, 立即用解剖剪剪碎, 至出现粘丝为止, 室温放置 5min; 加入 1/5 体积氯仿, 剧烈混匀, 室温放置 2-3min; 4℃ 10000×g (离心 5-8min, 用微量加样器将上清转至新离心管中, 加等体积异丙醇于 -80℃ 放置 20min, 12000×g 离心 10min; 弃去管内液体, 留沉淀, 加 1000 μl 75% 的乙醇 (用无 RNA 酶水配制), 4℃ 10000×g 离心 5min; 弃去管内液体, 加 1000 μl 无水乙醇, 4℃ 10000×g 离心 5min; 倒置风干, 用适量的无 RNA 酶水溶解待测。

1.3.3 RT-PCR 扩增 以猪十二指肠组织总 RNA 为模板, 利用 FcRn 基因的上下游引物, 进行 RT-PCR 扩增。反转录体系为: DEPC-H₂O 6.5 μl、dNTP Mix (2.5mM) 4 μl、5×AMV Buffer 4 μl、oligo d (T) 18 (50pmol/l) 1 μl、AMV (5U/μl) 2 μl、Ribonuclease Inhibitor (40U/μl) 0.5 μl、总 RNA 2 μl。反应程序: 42℃ 60 min, 72℃ 15min, 后冰浴 2min, 得到 cDNA, 置冰箱 4℃ 备用, 以此为模板进行 PCR 扩增目的基因。

PCR 扩增体系: ddH₂O 15.3 μl, 10×Buffer (Mg²⁺) 2.5 μl, dNTP Mix (2.5mM) 3 μl, 25mM MgCl₂ 1.8 μl, 上、下游引物 (20pmol/l) 各 0.5 μl, cDNA 1 μl, rTaq (5u/μl) 0.4 μl, 总体积 25 μl。

PCR 反应程序: 95℃ 预变性 5min; 95℃ 变性 30s, 53℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 40s, 共 35 个循环; 最后于 72℃ 延伸 10min。PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0 进行纯化。

1.3.4 DNA 序列测定 将 PCR 扩增产物纯化后连接到 pMD-19T 载体上, 转化到大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 筛选阳性克隆。序列测定由 TaKaRa 宝生物 (大连) 有限公司完成。

1.3.5 序列分析 在线运行 Blast、Smart 及 BioXM 2.6 软件分析。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取结果

经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下可见清晰的、无拖尾的两个条带, 即为 18S rRNA 和 28S rRNA, 表明 RNA 纯度和完整性良好。

2.2 FcRn 基因片段克隆

经 RT-PCR 扩增, 并经琼脂糖凝胶电泳检测, 结果表明, 从猪十二指肠组织总 RNA 中得到了 2 条相应的目的基因片段, 长度分别为 1290bp 和 1015bp (图 1)。将此 PCR 扩增产物进行回收纯化后, 与 pMD-19T 载体连接, 构建克隆载体。经 CaCl₂ 法转化到 JM109 感受

态细胞后, 进行蓝白斑筛选, 随后用通用引物 (BcaBesT Primer M13-47 和 BcaBesT Primer RV-P) 进

行 PCR 扩增, 再经过电泳检查判定含有插入片段的重组子 (图 2)。

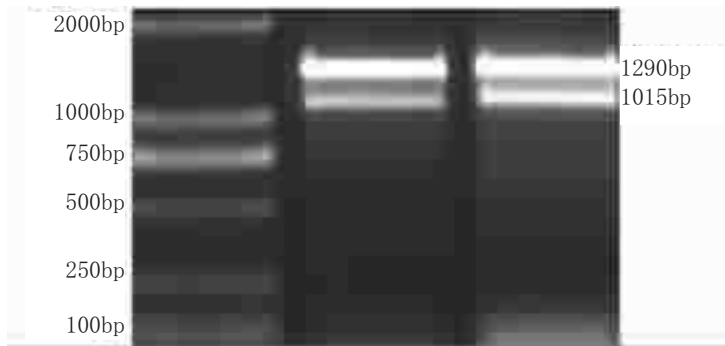


图 1 0d 仔猪十二指肠组织中 FcRn mRNA 的 RT-PCR 产物电泳结果

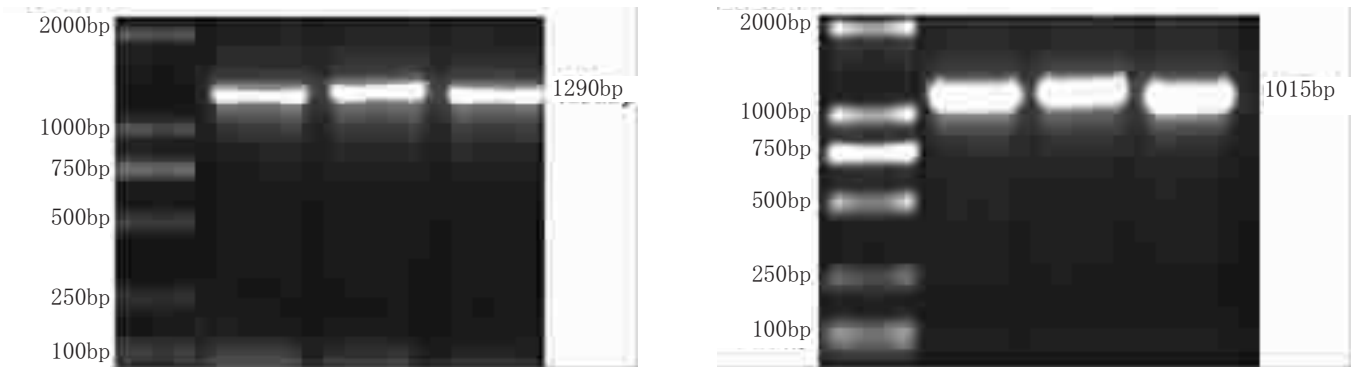


图 2 两个 FcRn mRNA 片段的大肠杆菌菌液电泳图

2.3 序列测定及分析

通过通用引物的鉴定, 各挑选出 3 管阳性菌液送上海生工生物工程公司进行 DNA 序列测定, FcRn 阳性克隆序列 1015bp 和 1290bp 在 NCBI 上比较, 显示序列同猪 FcRn 序列 (AY740682.1) 同源性都为 99%, 表明所扩增 PCR 产物为预期 FcRn 目的片断。通过氨

基酸序列分析显示, FcRn 的阳性克隆序列 1015bp 翻译的氨基酸序列 (序列 1) 比 1290bp 翻译的氨基酸序列 (序列 2) 和 NCBI 上公布的猪 FcRn 序列 (AY740682.1) 翻译的氨基酸序列 (序列 0) 缺失 92 个氨基酸如图 3 (图 3 中带下划线部分)。

```

序列_0      LLYHLTAVSAPTPGAPAFWVSGWLGPPQYLSYNNLRAQAEPYGAWVWE SQVSWYWEKETA
序列_1      LLYHLTAVSAPTPGAPAFWVSGWLGPPQYLSYNNLRAQAEPYGAWVWE SQVSWYWEKETA
序列_2      LLYHLTAVSAPTPGAPAFWVSGWLGPPQYLSYNNLRAQAEPYGAWVWE SQVSWYWEKETA
*****

序列_0      DLRNKQKLFLEALK TLEEG GPF TLQGLLGCEL GPDNVSVP VATFALNGEEF MKFDTKLGT
序列_1      DLRNKQKLFLEALK TLEEG -----
序列_2      DLRNKQKLFLEALK TLEEG GPSPCR AFWAANWAPTMSRCLX-- PRSPMARRLS STPSWAP
*****

序列_0      WDGEWPEAR TIG SKWMQEP DAVNKEKT FLL YSCPHRLLGHLERGRGNLEWKEPPSMRMKA
序列_1      -----EPPSMRMKA
序列_2      GMGS GPRPGPLAPS GCRSR TRS TRRRP SCS TP VPTGCWGI WRG AGATW SGXEPSPSMRMKA
*****

序列_0      RPGTAPGFS VLT CI AFSFY PPELQL RFLRNGLAAG SGE SD IGPNGDGSFHAW S LT VKSG
序列_1      RPGTAPGFS VLT CI AFSFY PPELQL RFLRNGLAAG SGE SD IGPNGDGSFHAW S LT VKSG
序列_2      RPGTAPGFS VLT CI AFSFY PPELQL RFLRNGLAAG SGE SD IGPNGDGSFHAW S LT VKSG
*****
    
```

序列_0	DEHHYCVVQHAGLAQPLT VELESP AKSSMPV VGI MVGFLLLL IVAGG GALLWRRMRKGL
序列_1	DEHHYCVVQHAGLAQPLT VELESP AKSSMPV VGI MVGFLLLL IVAGG GALLWRRMRKGL
序列_2	DEHHYCVVQHAGLAQPPHRRAGIP TKSSMPV VGI MVGFLLLL IVAGG GALLWRRMRKRL ***** . * :*****
序列_0	PAPWISFHGDDV GALLP TDLAKDAESDMN AFPAT ACWSP ILAATSYC SQVLFMLDLLES
序列_1	PAPWISFHGDDV GALLP TDLAKDAESDMN AFPAT ACWSP ILAATSYC SQVLFMLDLLES
序列_2	PAPWISFHGDDV GALLP TDLAKDAESDMN AFPAT ACWSP ILAATSYC SQVLFMLDLLES ***** :*
序列_0	WYFASGRSRMSSLWISPPV VCL SSPSY TWL YSTSTYITRV WALFVFSLFHLLRQSWGELN
序列_1	WYFASRRSRMSSLWISPPV VCL SSPSY TWL YSTSTYITRV WALFVFSLFHLLRQSWGELN
序列_2	WYFASGRSRMSSLWISPPV VCL SSPSY TWL YSTSTYITRV WALFVFSLFHLLRQSWGELN *****
序列_0	G ISL GX
序列_1	G ISL GX
序列_2	G ISL GX

图 3 FcRn 阳性克隆序列 1015bp(序列 1)和 1290bp(序列 2)在 NCBI 上同猪 FcRn(AY740682.1)(序列 0)比较图

3 讨论

新生动物免疫球蛋白 Fc 受体(*neonatal Fc receptor*, FcRn), 又称新生儿 Fc 受体。已经证明, FcRn 具有如下独特的重要功能: 保持血液中 IgG 水平稳定; 通过肠上皮转运母体 IgG 分子; FcRn 通过胎盘转运母体 IgG 分子^[23]。最新研究表明, FcRn 还与机体的免疫应答密切相关, 如 FcRn 不仅通过转运母源 IgG 而直接关系到幼龄动物被动免疫的获得, 成年动物肠道 FcRn 还参与 IgG 介导的免疫监视^[4], 而嗜中性粒细胞颗粒中的 FcRn 在 IgG 抗体介导的胞吞过程中也具有重要作用^[9]。

FcRn 最初是从哺乳大鼠肠上皮细胞顶端表面发现的。随后的试验证实, FcRn 在人和多种哺乳动物如灵长类、啮齿类、反刍动物等肠道、胎盘、乳腺、肝、肺等多种组织和器官中均有表达。研究表明 FcRn 也可以在成年动物的血管内皮、肝脏、肾脏等组织中表达, 主要是调节血清中 IgG 浓度。

最早被克隆出来的是牛 FcRn, 它在乳腺、肺部等多种组织中有表达, 提示其与 IgG 胞转作用有关。Laegreid 等^[6]发现, 牛 FcRn 基因的不同单元型(*haplotype*)与新生牛血清 IgG 水平相关, 这进一步证实了 FcRn 在转运初乳 IgG 中的重要性。Mayer 等^[7]用免疫组化方法检测绵羊乳腺腺泡和导管上皮细胞中新生羊十二指肠隐窝细胞顶端 FcRn 表达。Schnulle & Hurley^[8]以猪的乳腺组织为材料, 证实了 cDNA 在乳腺组织中的存在。Zhao & Kacs Kovics 等^[9]人用 PCR-SSCP 方法对六个猪种共 25 头的 FcRn 链的细

胞浆区进行克隆测序, 并与猪、羊 FcRn a 链的编码区进行了比较。Stirling 等^[10]检测到猪体外培养细胞中有 FcRn 表达, 4 周龄猪空肠肾脏肝脏和脾脏以及成年猪肠上皮细胞中也有该受体表达。

上述学者分别克隆了猪 FcRn 基因, 但其报道的基因序列不尽一致, 尤其是一些编码重要氨基酸基序的核苷酸位点存在差异。

实验以仔猪十二指肠组织总 RNA 为模板, 利用 FcRn 基因的上下游引物, 采用 RT-PCR 的方法克隆得到了长度分别为 1290bp 全长 pFcRn cDNA (pFcRn-L) 和 1015bp 小片段 cDNA (pFcRn-S) 的 FcRn 目的片段, 根据序列分析显示二者的差异仅在于 pFcRn-S 比 pFcRn-L 缺失 276 个碱基推导出其编码 92 个氨基酸, 因此推测小片段 cDNA (pFcRn-S) 可能是全长 pFcRn cDNA (pFcRn-L) 的剪接变体, 这与 Ye 等的报道基本一致^[11]。Ye 等克隆了两条 pFcRn cDNA 片段(1.071 and 0.795kb), 并证明完整蛋白 pFcRn-L 在上皮细胞固有层有表达, 且能在 pH6.0 结合 IgG; 但未检测到 pFcRn-s 在猪组织和细胞系中的表达, 而在转染细胞中 pFcRn-s 虽有表达但不结合 IgG。由此推测 FcRn 结构完整性对于其正常的胞内转运和功能发挥十分重要。

据有关文献报道, mRNA 前体(pre-mRNA)包含基因的内含子序列, 通过 RNA 剪接机制将内含子序列剪除, 使外显子序列转录的 RNA 片段连接在一起, 形成成熟的 RNA, 即 mRNA。mRNA 前体还可通过替代剪接(*alternative splicing*)机制改变剪接点的对接顺序, 产生少量序列结构略有不同的变体^[12]。mRNA 序列的改

变是否导致了相应蛋白质结构和功能的变化, 替代剪接机制尚不清楚, 所以 pFcRn-L 和 pFcRn-S 具体结构和功能差异还有待进一步研究。

4 结论

实验以仔猪十二指肠组织总 RNA 为模板, 利用 FcRn 基因的上下游引物, 采用 RT-PCR 的方法克隆得到了长度分别为 1290bp 全长 pFcRn cDNA (pFcRn-L) 和 1015bp 小片段 cDNA (pFcRn-S) 的 FcRn 目的片段, 其中根据序列分析显示二者的差异仅在于 pFcRn-S 比 pFcRn-L 缺失 276 个碱基推导出其编码 92 个氨基酸。

参考文献

- [1] Raghavan and Bjorkman. Fc receptors and their interactions with immunoglobulins [J]. Annual Review of Cell Developmental Biogyl. 1996, 12:181-220
- [2] 出生至断奶仔猪胃肠道组织中 FcRn 的表达规律初探. 陈丽颖, 胡广超, 王艳玲, 杨国宇, 韩立强. 中国农学通报. 2008, 24(2):8-11.
- [3] 新生儿 Fc 受体及其研究进展. 陈丽颖, 王艳玲, 杨国宇, 胡广超. 河南农业大学学报, 2007, 41(4):469-474
- [4] Yoshida M, Kobayashi K, Kuo TT, et al. 2006. Neonatal Fc receptor for IgG regulates mucosal immune responses to luminal bacteria. The Journal of clinical investigation 116(8):2142-2151.
- [5] Vidarsson G, Stemerding AM, Stapleton NM, Spliethoff SE, et al. 2006. FcRn: an IgG receptor on phagocytes with a novel role in phagocytosis. Blood 108(10):3573-3579.
- [6] Laegreid WW, Heaton MP, Keen JE, et al. Association of bovine neonatal Fc receptor alpha-chain gene (FCGRT) haplotypes with serum IgG concentration in newborn calves[J]. Mammalian Genome. 2002, 13(12):704-710
- [7] Mayer B, Zolnai A, Frenyo LV, et al. Redistribution of the sheep neonatal Fc receptor in the mammary gland around the time of parturition in ewes and its localization in the small intestine of neonatal lambs[J]. Immunology. 2002, 107:288-296
- [8] Schnulle PM, Hurley WL. Sequence and expression of the FcRn in the porcine mammary gland [J]. Veterinary immunology and immunopathology, 2003, 91:227-231
- [9] Zhao Y, Kacsokovics I, Zhao Z, et al. Presence of the di-leucine motif in the cytoplasmic tail of the pig FcRn alpha chain[J]. Veterinary immunology and immunopathology, 2003, 96:229-233
- [10] Stirling CMA, Charleston B, Takamatsu H, et al. 2005. Characterization of the porcine neonatal Fc receptor_potential use for trans-epithelial protein delivery. Immunology 114:542-553.
- [11] Ye L, Tuo W, Liu X, et al 2008. Identification and characterization of an alternatively spliced variant of the MHC class I-related porcine neonatal Fc receptor for IgG. Developmental and comparative immunology 32(8):966-979.
- [12] Zhi — Hong Jiang, Jane Y. Wu. Alternative splicing and programmed cell death. Proc Soc Exp Biol Med 1999Feb, 220(2):64-72.