

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.00465

日本七鳃鳗(*Lampetra japonica*)VLRB 的克隆表达及单克隆抗体制备

吴芬芳^{1,2}, 马宁^{1,2}, 陈立勇^{1,2}, 苏鹏^{1,2}, 李庆伟^{1,2}

1. 辽宁师范大学生命科学学院, 大连 116029;
2. 辽宁师范大学海洋生物功能基因及蛋白质组学研究所, 大连 116029

摘要: 七鳃鳗(*Lampetra japonica*)和盲鳗(*Hyperotreti*)作为现存的无颌类脊椎动物的代表, 其适应性免疫系统中的受体分子与哺乳动物的抗原受体分子不同, 这种独特的受体分子称为可变淋巴细胞受体VLRs(Variable lymphocyte receptors)。目前VLRs分为3类, 分别是VLRA、VLRB、VLRC, 而VLRB由七鳃鳗类B淋巴细胞产生, 是其体液免疫中主要成分, 与IgM结构和功能类似。文章对日本七鳃鳗VLRB基因保守的C末端进行克隆、原核表达和重组蛋白纯化后, 免疫Balb/c小鼠, 通过细胞融合及间接酶联免疫吸附实验(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)筛选技术得到针对VLRB保守区的单克隆抗体细胞株。将杂交瘤细胞接种小鼠腹腔得到大量的单抗腹水, 经Protein G亲和纯化后的单抗进行ELISA与Western blotting检测。经ELISA检测抗体效价为1:40000。Western blotting结果显示该单克隆抗体能够特异的检测重组VLRB蛋白及七鳃鳗血清中分泌型VLRB。流式细胞实验证明该单抗能特异识别七鳃鳗类淋巴细胞表面表达的膜型VLRB。VLRB单克隆抗体的成功制备和建株, 为研究日本七鳃鳗基于VLR的适应性免疫系统提供了重要的工具。

关键词: 七鳃鳗; 可变淋巴细胞受体(VLR); VLRB; 单克隆抗体

Cloning and expression of VLRB of *Lampetra japonica* and generation of the corresponding monoclonal antibodies

WU Fen-Fang^{1,2}, MA Ning^{1,2}, CHEN Li-Yong^{1,2}, SU Peng^{1,2}, LI Qing-Wei^{1,2}

1. College of Life science, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China;
2. Institute of Marine Genomics & Proteomics, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China

Abstract: The agnathans (lampreys and hagfishes) are representatives of the jawless vertebrates. The receptor molecules of adaptive immune system in lampreys are different from the antigen receptors in mammal vertebrates. The unique receptor molecules of lampreys are known as variable lymphocyte receptors (VLR). There are three types of VLRs in lampreys,

收稿日期: 2011-12-29; 修回日期: 2012-01-20

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(编号: 30971567, 31071991, 31170353)资助

作者简介: 吴芬芳, 博士, 专业方向: 免疫进化。Tel: 13840886846; E-mail: wufenfang19@126.com

马宁, 硕士, 专业方向: 免疫进化。Tel: 15942809465; E-mail: maningbaotou@126.com

吴芬芳和马宁同为第一作者。

通讯作者: 李庆伟, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 七鳃鳗功能基因及蛋白质组学。E-mail: liqw@263.net

网络出版时间: 2012-3-16 14:50:48

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20120316.1450.008.html>

VLRA, VLRB, and VLRC. Multimeric antigen-specific VLRB antibodies are secreted by VLRB⁺ lymphocytes and constitute the major components of the humoral arm of the lamprey adaptive immune system. Oligomeric VLRB antibodies are composed of four or five disulfide-linked dimeric subunits, which are similar to IgM antibodies in structure and function. In this study, the conservative c-terminal of *Lampetra japonica* VLRB was cloned and expressed in BL21 *E. coli*. The recombinant VLRB protein was purified by Ni²⁺ affinity chromatography column. After Balb/c mice immunity, cell fusion, the positive clones were screened by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Finally, the hybridoma cells that produced specific anti-VLRB monoclonal antibodies were obtained. In order to get a large number of antibodies against VLRB, the hybridoma cells were injected into the abdominal cavity of Balb/c mice and the antibodies were purified by protein G sepharose. The results of ELISA indicated that the valence of anti-VLRB antibodies was 1:40000. Western blotting assay showed that the antibodies were able to detect both recombinant VLRB and secreted VLRB in lamprey sera. Flow cytometry analysis also revealed the existence of VLRB on the surface of lymphocytes. In summary, the anti-VLRB monoclonal antibodies provided a major tool for studying lamprey adaptive immune system.

Keywords: lamprey; variable lymphocyte receptor; VLRB; monoclonal antibody

作为现存的圆口纲无颌类脊椎动物的代表, 七鳃鳗(*Lampetra japonica*)出现于距今 5 亿年前的寒武纪, 并以其独特的进化地位和独有的适应性免疫系统获得了免疫学家的关注, 成为研究脊椎动物适应性免疫系统起源和进化的新型模式生物^[1~7]。

无颌类脊椎动物七鳃鳗体内存在明显的适应性免疫反应, 但没有发现与有颌类脊椎动物相似的抗原受体。2004 年, Pancer 等^[8]发现在海七鳃鳗(*Petromyzon marius*)体内存在新型的可变淋巴细胞受体(Variable lymphocyte receptors, VLRs)。迄今为止, 已经发现了 3 种 VLR, 即 VLRA、VLRB 和 VLRC^[9~16], 其中对于 VLRA 和 VLRB 的研究较为深入。可变淋巴细胞受体基因含有大量的亮氨酸富集序列(Leucine-rich repeats, LRR), 在 VLRs 的重排过程中, 这些 LRR 模体会随机插入到 VLR 中, 伴随着 LRR 模体插入数量和顺序的不同, 成熟的 VLR 基因具有显著的多样性^[17~21]。VLR 结构包括: N 端 LRRNT、LRR1、可变 LRR 区域(LRRVe)、连接肽(CP)、C 端 LRRCT 和序列保守的 C 末端。在转录水平上, VLR 主要分布于血液、肾脏和肠壁纵褶类淋巴细胞中, 而在肝脏、红细胞和鱼尾中不表达^[8]。2008 年, Herrin 等^[17]发现, 抗原特异性 VLR 与炭疽杆菌孢子衣壳蛋白具有高度亲和力。Alder 等^[13]研究发现, VLRB 可识别具有重复序列的蛋白质或糖类抗原, 却不能与不具有重复序列的可溶性蛋白发生反应。VLRA 和 VLRB 两者均可表达为膜型的淋巴

细胞表面受体。当机体受到抗原刺激时, VLRB 阳性淋巴细胞会迅速增殖并分泌 VLRB, 从而对外来病原体进行免疫应答, 相对而言, VLRA 的表达水平则不会发生变化^[10~15]。但到目前为止, 还有一系列问题没有解决。如: 哪些细胞分子参与了膜型 VLRB 对抗原进行识别? 识别抗原后 VLRB 又如何将识别信号转导到细胞内? 分泌型 VLRB 怎样处理抗原, 血清中有哪些免疫因子参与了这一过程? 本研究通过对 VLRB 保守的 C 末端区进行克隆、原核表达, 并制备出抗 VLRB 单克隆抗体, 经 ELISA、Western blotting、流式细胞术验证该抗体具有高效性和特异性。本研究对进一步探究七鳃鳗体内 VLRB 所介导的适应性免疫反应有着重要的应用意义。

1 材料和方法

1.1 材料

日本七鳃鳗捕于中国黑龙江省同江地区, SPF 雌性 Balb/c 小鼠购自大连医科大学实验动物中心, 小鼠骨髓瘤细胞系 SP2/0、原核表达载体 pET-32a、大肠杆菌克隆菌株 *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α 、表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)均由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的 PCR 扩增

根据本实验室建立的日本七鳃鳗 EST 序列库, 筛选出 VLR 序列, 通过 ClustalX 2.0 软件进行序列比

对找出保守的C末端区,设计上下游特异性引物。F: 5' -CGGGATCCCCAGGCTACGTTGCTACGAC-3' (下划线处为 *Bam*H 酶切位点); R: 5' -CCGCTCGAG TTAACGTTTCTTGCAGAGGG-3' (下划线处为 *Xho* 酶切位点)。用 *Catrimox-14*^R RNA Isolation Kit Ver. 2.11 试剂盒(购自 TaKaRa 公司)提取七鳃鳗淋巴细胞的总RNA,操作过程按说明书进行, mRNA经逆转录后得到淋巴细胞cDNA(逆转录酶购自 Promega 公司),以此cDNA为模板进行PCR反应: 94 预变性 3 min 后; 94 40 s, 55 40 s, 72 30 s, 30 个循环; 最后再 72 延伸 10 min。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测并切胶回收。

1.2.2 原核表达质粒的构建

回收后的 *VLRB* 基因片段与载体 pET-32a 分别用 *Bam*H 和 *Xho* 双酶切处理(限制性内切酶购自 TaKaRa 公司),酶切产物进行连接后转入克隆菌 *E.coli* DH5 α , 并进行菌落 PCR 筛选阳性克隆,随后提质粒进行双酶切鉴定及测序。

1.2.3 目的基因的原核表达与鉴定

将测序正确的质粒转入表达菌 BL21(DE3),挑菌落接种于 LB 培养基中, 37 、180 r/min 振荡培养至对数期($OD_{600}=0.5$)。处于对数期的菌液中加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG, 25 诱导 4 h。离心收集菌体,进行 SDS-PAGE 电泳,检测蛋白表达情况。将同样条件诱导的菌体进行超声处理,得到破菌上清与破菌沉淀,进行 SDS-PAGE 电泳,检测蛋白可溶情况。

1.2.4 目的蛋白的提取与纯化

含有目的基因 *VLRB* 的表达菌进行大量诱导表达。得到的菌体进行超声破菌,上清经滤膜过滤, Ni^{2+} 柱亲和纯化后收集蛋白峰。纯化后蛋白用 Bradford 法测定蛋白浓度。

1.2.5 动物免疫

纯化后 *VLRB* 蛋白与等量的弗氏完全佐剂(购自 Sigma 公司)充分乳化,皮下多点注射 Balb/c 鼠。每只 100 μ g, 二免抗原剂量为 50 μ g, 加等量弗氏不完全佐剂。加强免疫不加佐剂,进行腹部注射。

每次免疫后,用 *VLRB* 蛋白包板,间接 ELISA 方法进行效价检测,当效价达到 1:40000 以上时,最后加强免疫(静脉注射),准备融合。

1.2.6 细胞融合及单抗筛选

免疫小鼠的脾淋巴细胞与 SP2/0 细胞以 5:1 比例融合。用 PEG1450(购自 Sigma 公司)做融合剂, HAT 选择培养基培养,培养过程在 96 孔细胞培养板中进行。10 d 后,换 HT 选择培养基,14 d 后换含 20% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养基(购自 Invitrogen 公司)。当杂交瘤细胞长至孔底面积 1/5 以上时,同时用重组表达的 Trx-VLRB 抗原和我们先前表达的 Trx-HE4 抗原包被 ELISA 板,取融合细胞上清,通过间接 ELISA 的方法正向和反向筛选出能与 *VLRB* 蛋白反应而不与 Trx-HE4 反应的杂交瘤细胞。采用有限稀释法并连续亚克隆得到单克隆细胞,直至单克隆细胞阳性孔率为 100%。

1.2.7 腹水制备与纯化

将杂交瘤细胞悬液($5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$)腹腔注射于弗氏不完全佐剂致敏一周后 Balb/c 小鼠, 7~10 d 后采集小鼠腹水。用二氧化硅吸附法对腹水进行预处理,采用 Protein G 纯化柱(购自 GE 公司)进行进一步纯化。纯化的抗体经 PBS 透析过夜后用 Bradford 法测定抗体浓度,然后加入 50% 甘油混匀后分装, -20 保存备用。

1.2.8 纯化后抗体的效价与特异性检测

ELISA 方法检测:将纯化的 *VLRB* 蛋白作为抗原包被酶标板,将纯化后的小鼠单克隆抗体进行倍比稀释,应用间接 ELISA 方法检测单抗效价。

Western blotting 检测:1 μ L 七鳃鳗血清(含蛋白量 23.12 μ g)上样进行 SDS-PAGE,后进行 Western blotting 的正常操作,一抗为纯化单克隆抗体,稀释倍数 1:1000,二抗为 HRP 标记羊抗鼠 IgG(购自北京中杉金桥生物技术有限公司),稀释倍数 1:5000,最终结果由 FluorChem Q 多色荧光、化学发光成像分析系统采集。流式细胞分析:用淋巴细胞分离液收集七鳃鳗类淋巴细胞,室温条件下用 3% 牛血清白蛋白封闭 30 min,经 0.01 mol/L PBS 洗 3 次,先后与 anti-VLRB 单克隆抗体和 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 孵

育。细胞荧光染色用 BD 流式细胞分析仪进行分析。

2 结果与分析

2.1 VLRB 氨基酸序列 C 末端的保守性分析

通过 ClustalX 2.0 软件分析本实验室先前构建的白细胞 cDNA 文库中 3 条日本七鳃鳗 VLRB 氨基酸序列, 发现其信号肽和 C 末端氨基酸序列具有高度保守性(图 1)。因信号肽序列在 VLRB 基因翻译成成熟定位后将切割掉, 其保守的 C 末端是制备广谱抗 VLRB 抗体的理想抗原序列。

2.2 VLRB 基因 C 末端的克隆及其表达载体的构建与鉴定

本研究根据七鳃鳗 VLRB 基因保守 C 末端设计并合成引物, 通过 PCR 扩增 VLRB 基因, 经琼脂糖凝胶电泳检测, 在 250 bp 左右得到 VLRB 基因保守 C 末端的条带(图 2A)。与 pET-32a 载体连接后, 经过 BamH 和 Xho 的双酶切鉴定, 得到两条特异带, 位置与 pET-32a 和目的条带的大小一致(图 2B)。这些都证明表达载体构建成功。

2.3 重组 VLRB 的原核表达及 VLRB 蛋白的纯化

将表达载体 pET-32a-VLRB 在 BL21 表达菌中经 IPTG 诱导表达后进行 SDS-PAGE(图 3), 在 29.6 kDa 附近有特异的蛋白条带, 与预期的目的蛋白大小一致, 且此目的蛋白主要为可溶表达。

经 Ni²⁺ 纯化柱的纯化后, 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳(图 4)。可以看出, 杂蛋白明显减少, 剩下纯度较高的融合蛋白。

2.4 动物免疫、血清及抗 VLRB 单克隆抗体的效价

检测

纯化后目的蛋白免疫 3 只 Balb/c 小鼠, 第 4 次免疫后取小鼠血清进行 ELISA 检测, 其中 2 号小鼠血清效价较高, 达 1 : 80000(此稀释倍数下平均 OD 值 > 1.0, 而阴性对照平均 OD 值 < 0.1)(图 5), 可以进行融合。

用 2 号小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行融合, 经过 3 次亚克隆, 利用间接 ELISA 的方法, 筛选出一株只针对 VLRB 的杂交瘤细胞株 5G12。用该细胞株对 Balb/C 小鼠进行腹腔注射制备大量单抗腹水, 将单抗腹水进行纯化, 得到纯度较高的单克隆抗体(图 6A)。Bradford 法测定抗体浓度为 0.45 mg/mL。间接 ELISA 检测结果表明该单克隆抗体的效价为 1 : 40000(此稀释倍数下平均 OD 值 > 1.0, 而阴性对照平均 OD 值 < 0.1)(图 6B)。

2.5 抗 VLRB 单克隆抗体特异性检测

2.5.1 七鳃鳗血清中 VLRB 的 Western blotting 检测

对原核表达的重组 VLRB 蛋白及七鳃鳗血清进行 Western blotting 检测, 都可以得到针对 VLRB 的特异性条带, 其分子量大小分别与重组原核蛋白及 VLRB 天然蛋白分子量大小相符(图 7)。在对抗原量梯度摸索实验中, VLRB 抗体能检测到 0.1 μg 的抗原。说明该抗体灵敏度达到能检测 ng 级蛋白(图 7A)。将抗体从 1 : 500 到 1 : 4000 进行梯度稀释, 均能检测到七鳃鳗血清中 VLRB(图 7B)。

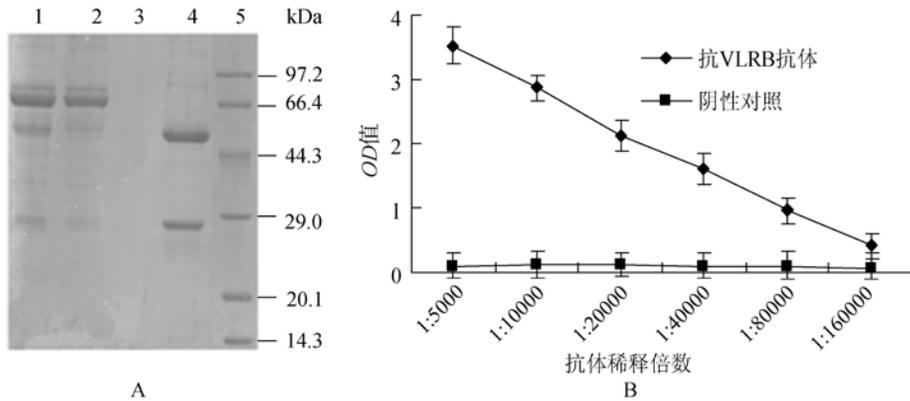


图 6 Balb/c 鼠的腹水纯化结果及纯化后 VLRB 单克隆抗体 ELISA 检测

A : 纯化结果。1 : 上样; 2 : 流穿; 3 : 平衡; 4 : 洗脱; 5 : 蛋白 marker。B : ELISA 检测。每个稀释倍数下样品做 3 个平行孔, 以免疫前小鼠血清作阴性对照。

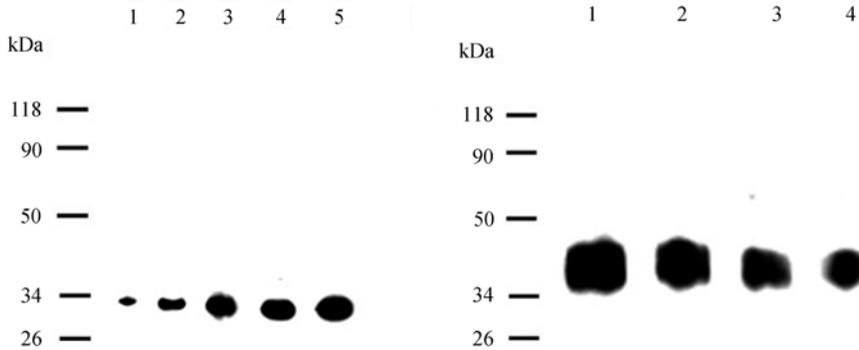


图 7 Western blotting 鉴定 VLRB 蛋白

A : 原核表达 Trx-VLRB 重组蛋白。1~5 : 上样量分别为 0.1 μ g、0.4 μ g、0.6 μ g、0.8 μ g、1 μ g。抗 VLRB 抗体稀释倍数 1:1000。HRP 标记二抗稀释倍数 1 : 5000。B : 正常七鳃鳗血清。上样量 1 μ L (含蛋白量 23.12 μ g)。1 ~ 4 : 抗 VLRB 抗体稀释倍数分别为 1:500、1:1000、1:2000、1:4000。HRP 标记二抗稀释倍数 1 : 5000。

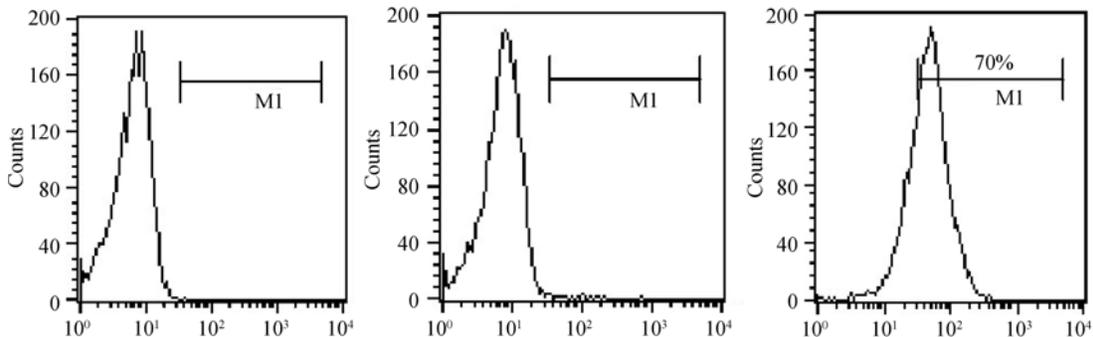


图 8 七鳃鳗类淋巴细胞表面 VLR 流式结果

A : 裸细胞空白对照; B : 二抗对照(二抗 : FITC 标记羊抗鼠 IgG 1:100 稀释); C : 类淋巴细胞表面 VLR 检测(一抗 : 抗 VLRB 单抗 1:500 稀释; 二抗 : FITC 标记羊抗鼠 IgG 1:100 稀释)。

的, 是构成七鳃鳗适应性免疫系统的分子基础。Herrin等^[4]在 VLR与 IgG结合抗原亲和力比较实验中发现, 同样浓度下其对特异性抗原的亲和力是 Ig G

类抗体的 1000 倍, 显现出其有更好的抗原识别灵敏性及更高的亲和力。另外, VLR分子具有良好的稳定性, 在室温放置一个月或 56 $^{\circ}$ C 放置 36 h仍保持活性,

其稳定性优于抗体分子,使其更容易保存。并且VLR与抗原结合后,与抗体不同的是,其不能被高盐或强酸缓冲液洗脱,只有在强碱性条件下(pH>11)才能被洗脱,且在极端条件下不能改变VLR结构及与抗原的亲合力,如此稳定的理化性质将赋予其更广泛的用途。但是,VLRB作为抗原特异性受体,在适应性免疫中是如何行使功能,在识别抗原、触发细胞内信号转导、激活类淋巴细胞增殖、引起细胞免疫应答等一系列免疫反应中扮演何种角色,目前还知之甚少。为了深入研究七鳃鳗这一独特的基于VLR的适应性免疫系统,抗VLRB的单克隆抗体是必不可少的研究工具。

由于VLRB基因具有高度可变性,针对VLRB分子的单克隆抗体必须针对其保守的C末端。因此,我们首先对七鳃鳗VLRB保守的C末端进行基因克隆、原核表达、重组蛋白纯化、细胞融合、杂交瘤细胞建株及单抗腹水制备,然后将得到的抗体进行纯化及鉴定。ELISA结果显示,VLRB单克隆抗体对抗原的识别具有高度敏感性,效价达到1:40000。用Western blotting方法,该抗体在七鳃鳗血清中可检测到特异性单一条带,分子量大小与预测的VLRB单体大小相符,说明VLRB单克隆抗体能特异识别七鳃鳗血清中存在的VLRB蛋白。通过流式细胞术,也证实了本研究所制备的抗VLRB单克隆抗体能够识别七鳃鳗类淋巴细胞表面表达的模型VLRB。

综上所述,本研究得到效价高、特异性好的抗VLRB单克隆抗体,为以后的VLRB功能研究及七鳃鳗免疫系统研究提供了重要工具。

参考文献(References):

- [1] Herrin BR, Cooper MD. Alternative adaptive immunity in jawless vertebrates. *J Immunol*, 2010, 185(3): 1367–1374. DOI
- [2] Kasahara M, Kasamatsu J, Sutoh Y. Two types of antigen receptor systems in vertebrates. *Zool Sci*, 2008, 25(10): 969–975. DOI
- [3] Amemiya CT, Saha NR, Zapata A. Evolution and development of immunological structures in the lamprey. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19(5): 535–541. DOI
- [4] Cooper MD, Alder MN. The evolution of adaptive immune systems. *Cell*, 2006, 124(4): 815–822. DOI
- [5] 刘岑杰, 黄惠芳, 马飞, 刘欣, 李庆伟. 无颌类脊椎动物适应性免疫系统的进化. *遗传*, 2008, 30(1): 13–19. DOI
- [6] 梁佼, 刘欣, 吴芬芳, 李庆伟. 无颌类脊椎动物适应性免疫系统研究进展. *遗传*, 2009, 31(10): 969–976. DOI
- [7] Shintani S, Terzic J, Sato A, Saraga-Babic M, O'hUigin C, Tichy H, Klein J. Do lampreys have lymphocytes? The Spi evidence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(13): 7417–7422. DOI
- [8] Pancer Z, Amemiya CT, Ehrhardt GRA, Ceitlin J, Gartland GL, Cooper MD. Somatic diversification of variable lymphocyte receptors in the agnathan sea lamprey. *Nature*, 2004, 430(6996): 174–180. DOI
- [9] Kasamatsu J, Sutoh Y, Fugo K, Otsuka N, Iwabuchi K, Kasahara M. Identification of a third variable lymphocyte receptor in the lamprey. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(32): 14304–14308. DOI
- [10] Kishishita N, Matsuno T, Takahashi Y, Takaba H, Nishizumi H, Nagawa F. Regulation of antigen-receptor gene assembly in hagfish. *EMBO Rep*, 2010, 11(2): 126–132. DOI
- [11] Guo P, Hirano M, Herrin BR, Li JX, Yu CL, Sadlonova A, Cooper MD. Dual nature of the adaptive immune system in lampreys. *Nature*, 2009, 459(7248): 796–801. DOI
- [12] Tasumi S, Velikovsky CA, Xu G, Gai SA, Witttrup KD, Flajnik MF, Mariuzza RA, Pancer Z. High-affinity lamprey VLRA and VLRB monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(31): 12891–12896. DOI
- [13] Alder MN, Herrin BR, Sadlonova A, Stockard CR, Grizzle WE, Gartland LA, Gartland GL, Boydston JA, Turnbough CL Jr, Cooper MD. Antibody responses of variable lymphocyte receptors in the lamprey. *Nat Immunol*, 2008, 9(3): 319–327. DOI
- [14] Han BW, Herrin BR, Cooper MD, Wilson IA. Antigen recognition by variable lymphocyte receptors. *Science*, 2008, 321(5897): 1834–1837. DOI
- [15] Kasamatsu J, Suzuki T, Ishijima J, Matsuda Y, Kasahara M. Two variable lymphocyte receptor genes of the inshore hagfish are located far apart on the same chromosome. *Immunogenetics*, 2007, 59(4): 329–331. DOI
- [16] Rogozin IB, Iyer LM, Liang LZ, Glazko GV, Liston VG, Pavlov YI, Aravind L, Pancer Z. Evolution and diversification of lamprey antigen receptors: evidence for involvement of an AID-APOBEC family cytosine deaminase. *Nat Immunol*, 2007, 8(6): 647–656. DOI
- [17] Herrin BR, Alder MN, Roux KH, Sina C, Ehrhardt GRA,

- Boydston JA, Turnbough CL Jr, Cooper MD. Structure and specificity of lamprey monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(6): 2040–2045. [DOI](#)
- [18] Nagawa F, Kishishita N, Shimizu K, Hirose S, Miyoshi M, Nezu J, Nishimura T, Nishizumi H, Takahashi Y, Hashimoto S, Takeuchi M, Miyajima A, Takemori T, Otsuka AJ, Sakano H. Antigen-receptor genes of the agnathan lamprey are assembled by a process involving copy choice. *Nat Immunol*, 2007, 8(2): 206–213. [DOI](#)
- [19] Pancer Z, Saha NR, Kasamatsu J, Suzuki T, Amemiya CT, Kasahara M, Cooper MD. Variable lymphocyte receptors in hagfish. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(26): 9224–9229. [DOI](#)
- [20] Alder MN, Rogozin IB, Iyer LM, Glazko GV, Cooper MD, Pancer Z. Diversity and function of adaptive immune receptors in a jawless vertebrate. *Science*, 2005, 310(5756): 1970–1973. [DOI](#)
- [21] Kim HM, Oh SC, Lim KJ, Kasamatsu J, Heo JY, Park BS, Lee H, Yoo OJ, Kasahara M, Lee JO. Structural diversity of the hagfish variable lymphocyte receptors. *J Biol Chem*, 2007, 282(9): 6726–6732. [DOI](#)