

文章编号: 1674-5566(2010)03-0296-06

## 草鱼 CC趋化因子基因 CCL24及其可变剪接

杨琳琳, 谢彩霞, 龚小玲, 鲍宝龙

(上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

**摘要:** CC趋化因子是一类能够促进动物体内炎症部位的各种白细胞的补充、激活和黏附的趋化性细胞因子家族, 是鱼类天然免疫系统的重要组成部分。分析了从草鱼肠道 cDNA文库中筛选到的 CC趋化因子基因 CCL24, 并克隆了阅读框区域内的基因组序列。序列分析表明, CCL24基因由 4个外显子和 3个内含子组成; 外显子拼接的序列与 CCL24 cDNA序列完全一致, 编码 95个氨基酸, 有 2个相邻的半胱氨酸(CC), 为典型的 CC趋化因子亚家族成员。此外, 还发现草鱼 CCL24基因存在可变剪接现象, 第 1内含子没有被剪切掉的非正常转录本翻译后可能产生没有 CC趋化因子活性的 24个氨基酸的短肽, 而且这种转录本在精巢、头肾、皮肤、肝胰脏、肠道、肌肉、肾脏等组织均检测到; 而正常剪接的 CCL24转录本, 仅在肾脏和肠道中检测到, 且其表达量要明显低于非正常剪接的转录本。

**关键词:** 草鱼; CC趋化因子; RNA可变剪接; CCL24基因

**中图分类号:** S 917 **文献标识码:** A

### Cloning and alternative splicing expression of chemokine gene CCL24 in *Ctenopharyngodon idellus*

YANG Lin-lin, XIE Cai-xia, GONG Xiao-ling, BAO Bao-long

(Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** CC chemokines are a superfamily of chemotactic cytokines involved in recruitment, activation and adhesion of a variety of leukocyte types to inflammatory foci. And they are the important component of the innate immune system. In this research, we have analyzed the CC chemokine gene of CCL24 identified from cDNA library of intestine of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). The CCL24 gene is composed of four exons and three introns, encoding 95 amino acids with typical arrangement of the first two cysteines together. In addition to this transcript, an alternative spliced variant of CCL24 in intestine was identified from the RT-PCR result of CCL24. This splice variant encodes a truncated CCL24 that may not have the same function as the normal CCL24. The unspliced mRNA was also detected in the testis, head kidney, kidney, hepatopancreas, intestine, muscle and skin using RT-PCR. Moreover, the normal spliced CCL24 isoform was only detected in the kidney and intestine, and its expression level was lower than that of abnormal spliced CCL24 mRNA in same tissues.

**Key words:** *Ctenopharyngodon idellus*; CC chemokines; RNA alternative splicing; CCL24 gene

收稿日期: 2009-12-22

基金项目: 教育部科学技术重点研究项目(207037); 上海市教委重点学科建设项目(J50701和 S30701)

作者简介: 杨琳琳(1983-), 女, 硕士研究生, 专业方向为分子生物学和鱼类分子免疫学。E-mail: llyang@stmail.shou.edu.cn

通讯作者: 鲍宝龙, E-mail: bilbao@shou.edu.cn

鱼类在进化图谱上代表着仅具有天然免疫系统的动物和主要依赖获得性免疫动物的中间类群<sup>[1]</sup>,相对于高等脊椎动物,鱼类获得性免疫系统并不完善。因此,鱼类抗感染过程中更为依赖于反应较快的先天免疫系统。CC趋化因子(CC Chemokine)是趋化因子家族中的最大一个基因家族,能够刺激受感染或损伤部位免疫细胞的补充、激活和黏附<sup>[2]</sup>,在鱼类先天免疫反应中起重要的作用。人类CC亚家族成员多数基因定位于第17对染色体,主要对单核细胞、嗜酸性粒细胞、树突状细胞、自然杀伤细胞(NK cell)、T淋巴细胞和B淋巴细胞等具有强大趋化活性<sup>[3]</sup>,哺乳动物中已发现28个CC趋化因子(CCL1-CCL28)<sup>[4-5]</sup>。近年来,在鲤(*Cyprinus carpio*)<sup>[11]</sup>、条纹狗鱼(*Triakis scyllia*)<sup>[2]</sup>、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)<sup>[6]</sup>、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[7]</sup>、斑点叉尾 (*Ictalurus punctatus*)<sup>[8]</sup>和蓝叉尾 (*Ictalurus furcatus*)<sup>[9-11]</sup>等中相继分离到CC趋化因子基因,利用生物信息学手段在大唇朴丽鱼(*Paralabidochromis chilotes*)、金拟丽鱼(*Melanochromis auratus*)和猫鲨(*Scyliorhinus canicula*)中也鉴定出CC趋化因子基因<sup>[2]</sup>。本研究克隆和分析了草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)CC趋化因子基因CCL24,并发现该基因存在可变剪接现象。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品来源和核酸抽提

草鱼购于上海市临港新城古棕路菜市场,活体运回实验室,经检查无明显病症。分别取6尾草鱼的精巢、头肾、皮肤、肝胰脏、肠道、肌肉、肾脏等组织,采用Trizol试剂(Invitrogen)抽提上述各组织的总RNA,具体方法参考杨琳琳等<sup>[12]</sup>。采用酚-氯仿抽提法用草鱼包埋于肌肉内的鳍条组织抽提草鱼基因组DNA,博大泰克基因组DNA快速纯化回收试剂盒纯化。

### 1.2 cDNA序列分析和蛋白质预测分析

在本实验室构建的草鱼肠道cDNA文库中大规模测序所得的EST(表达标签序列)中,通过BLAST分析初步鉴定出一种CC趋化因子,进一步通过反向引物测序,得到了覆盖整个读码框的cDNA序列。利用MEGA4.0对编码氨基酸序列

与GenBank比对结果中同源性较高的5个基因编码的氨基酸序列进行系统进化分析<sup>[6]</sup>,利用AntheProt 5.0软件预测蛋白的等电点和分子量<sup>[13]</sup>,用DNASar的Protean进行亲疏水性分析<sup>[13]</sup>,用signalP进行信号肽分析<sup>[14]</sup>,用TMPred进行跨膜结构分析<sup>[14]</sup>,用SOPMA软件预测蛋白的二级结构<sup>[13]</sup>。

### 1.3 基因组序列的克隆

在阅读框两端设计一对引物用于扩增该CC趋化因子的基因组序列,CCL24上游引物为5'-TCAGAAGTTTCTCTGTGTGGATTAC-3',CCL24下游引物为5'-GCGTTCCTAGATGGAATTCTCAG-3'。以纯化的DNA为模板,25 μL PCR反应体系为:2.5 μL 10×PCR Buffer 1.5 μL MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L),0.5 μL dNTP (10 mmol/L),上下游引物各1 μL DNA模板1 μL (0.1 μg/μL),Taq酶0.5 μL H<sub>2</sub>O 17 μL。PCR反应条件为:94℃预变性5 min,然后94℃ 30 s 52℃ 30 s 72℃ 90 s 32个循环,最后72℃延伸10 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳,胶回收,将胶回收产物克隆至T载体(Promega公司)中,转化入TOP10感受态细胞,挑取阳性克隆送至上海鼎安生物技术有限公司测序。

### 1.4 RT-PCR

取1 μg来自以上各种草鱼组织抽提的总RNA,按M-MLV反转录系统(Promega公司)说明书要求,逆转录为单链的cDNA。然后取2 μL单链的cDNA作模板,以如上的一对CCL24引物或用来调查组织特异性的RNA可变剪辑的一对引物CCL24b(上游引物为:5'-TCAGAAGTTTCTCTGTGTGGATTAC-3';下游引物为:5'-CACAGCGTC TGGGGTATTTAG-3')进行PCR扩增。25 μL PCR反应体系为:2.5 μL 10×PCR Buffer 1.5 μL MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L),0.5 μL dNTP (10 mmol/L),上下游引物各1 μL cDNA模板2 μL, Taq酶0.5 μL H<sub>2</sub>O 16 μL。PCR反应条件为:94℃预变性5 min,然后94℃ 30 s 52℃ 30 s 72℃ 30 s 32个循环,最后72℃延伸10 min。RT-PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳,拍照。

## 2 结果

### 2.1 草鱼CCL24基因的分析

在草鱼肠道cDNA文库中,得到该序列长为

1 059 bp 含有完整的读码框,有完整的 PolyA 及 PolyA 加尾信号 AATAA。该基因编码由 95 个氨基酸残基组成的蛋白质(图 1)。预测的氨基酸序列在其氨基端存在 2 个相邻的半胱氨酸,为典型的 CC 亚家族的趋化因子, GenBank 比对显示其与斑马鱼 CCL24 有 76% 相似性,此序列已提交至 GenBank(接受号为 FK939143)。进一步利用该序列编码的氨基酸序列进行系统进化分析,确定

该序列为草鱼的 CCL24 基因(图 2)。

CCL24 其编码蛋白分子量为 10 370.399 u, 等电点为 8.39;氨基端有较多的疏水性残基,羧基端有较多的亲水性残基,具有很强的抗原性;具信号肽和跨膜结构域,二级结构以  $\alpha$  螺旋和随机卷曲为主,间或有  $\beta$  转角,与已报道的 CC 趋化因子结构特点相一致。

```

CAACTGTCTCACACCTGCTCAGTGGCATAACAACCCATCCACTCTACCTGAGGAATTTCAA    60
GGGGGAGTAAACAAATTCCAAAGGTGGGGGAAACCCATATCAAGGGCTTATAAAGAGTG    120
ATCTCAGTCAAGTCCAACAAAAGCTCTTCAGAAGTTTCTCTGTGTGGATTACCGCTCTCT    180
TAAACAATACTTAAACCCCTTCATGAGATACTGGACAACCTCCAAAGTTCGAAGATGTAAT    240
                                     M V I
AAAAATATGTATTTTGGCCTTGGTTACTACTCCTTTTTCAGGTGGAGACAGACGCAGT    300
  K I C I L A L V T L L L F Q V E T D A V
GGCCTGCTGCGTTAGTTACTACTAAATACCCAGACGCTGTGGAGTTTAAAAGGCTATGA    360
  A C C V S Y T K Y P R R C G V L K G Y D
TATCCAGGGTATAACTGGCGGCTGTGATCTTGACGCTATTATCTTCCACACCGAAAAGG    420
  I Q G I T G G C D L A A I I F H T E K G
AAGATCAGTCTGTGCTGACCCAGCACAACTTGACACAAAAAAGAGTCGAGTGCCTAAA    480
  R S V C A D P A Q T W T Q K R V E C L K
GATGAAAGCAGCAAAAATCGGCTCTGAGAATTCATCTAAAGAACGCAAAAATTAATTCTG    540
  M K A A K I G S E N S I *
AAGAGATATAGATATATATATAAAAATGTATATCTTTATTGGCATTACTTAGTTGCACT    600
TTCTTCTACAGATTATTTATAGAGGGCAAATTACAAGCTACTAAATAAATTTGCTATGTA    660
TTTTATAACTTTTTTACAAAGCAAAAATACTTTTTGTATTGATAACTATTCAATTCAGTGT    720
TGTTTTTTTTTACTAATCTAATAACCATTAACATGTTTTCTATAAAGACATTATATATT    780
TAAAGGAATTATATATTGATACCTGTAATATTTCATAAATGGTCTCCTGAACCTGTAT    840
TTAATCATTTATTTTGTGGAATGGTGCCTTTGGTTACTCAGTGTGCCCTCTTCTGTTC    900
AGTCATGCCAGTATAACAAAGTAGGAATTTTTTTCCCTCTATATAAACTCTATATAAAA    960
TTAAATAAACATTGTATGCAATTGTATATTTCTATTATATATTTTCACTTTTTTTTTTT    1020
TACTGTATTTTTTTTTAAATAAAGGTCCTTAATTTCAAAA    1058

```

图 1 CCL24 基因 cDNA 序列与氨基酸序列

Fig 1 cDNA and deduced amino acid sequences of CCL24 gene

方框表示起始密码子和终止密码子,双下划线表示加尾信号,单下划线表示 PolyA 尾,\* 表示翻译终止。

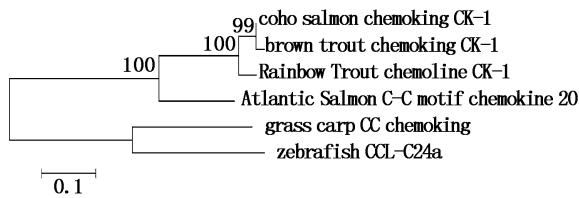


图 2 CCL24 氨基酸的系统进化树

Fig 2 The phylogenetic analysis of the fish CCL24  
Mega 4.0 软件中的 NJ 法建树,500 次重复计算 bootstrap 值;  
比例尺 =0.1,表示进化距离。

## 2.2 可变剪接和 CCL24 基因组序列

RT-PCR 扩增覆盖草鱼 CCL24 阅读框区域的 cDNA 序列,在肠道组织中扩增到一个 524 bp 的

长片段和一个 379 bp 的短片段(如图 3),将二者测序结果比较发现,长片段仅比短片段多出一段 145 bp 的序列,其余碱基组成均一致,而且多出的这段序列碱基序列为:GT-AG,为典型的内含子序列,判断此片段可能存在可变剪接。通过进一步克隆测序分析覆盖读码框的基因组序列,得到 1 161 bp 的 DNA 序列。将上述 2 个片段的 cDNA 序列与克隆得到的基因组序列比较分析发现,379 bp 的短片段是基因组序列剪切掉 3 个长度分别为 145 bp,529 bp 和 105 bp 的 3 个内含子片段而得,524 bp 的长片段则只剪切掉了 529 bp 和 105 bp 的 2 个内含子序列,这 3 个内含子的基因序列都是 5'(GT)-(TG)<sup>3</sup>这样典型的内含子

序列。克隆的这段阅读框内有 3 个内含子、4 个外显子, CCL24 基因的可变剪接模式见图 4。

通过分析草鱼 CCL24 趋化因子 CCL24 两个转录本, 翻译出其两段不同的氨基酸序列, 长片段由于在正常剪切阅读框的第 68 位碱基处多出一段 145 bp 的序列, 而导致终止密码子 (TGA) 提前, 翻译出一段没有 CCL24 趋化因子活性的 24 个氨基酸的短肽, 见图 4 和图 5。生物信息学分析显示, 无 CCL24 趋化因子活性的短肽分子量为 2 634.266 u, 等电点为 3.805, 具疏水性, 无抗原性; 具跨膜结构域, 信号肽剪切位点位于其 23 位氨基酸残基处。

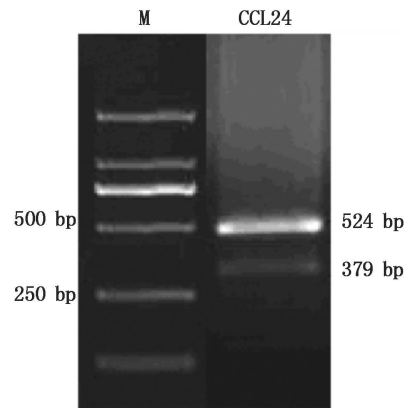


图 3 CCL24 基因在肠道组织中的表达  
Fig 3 Different expression of CCL24 alternative isoforms in the intestine tissue of the grass carp

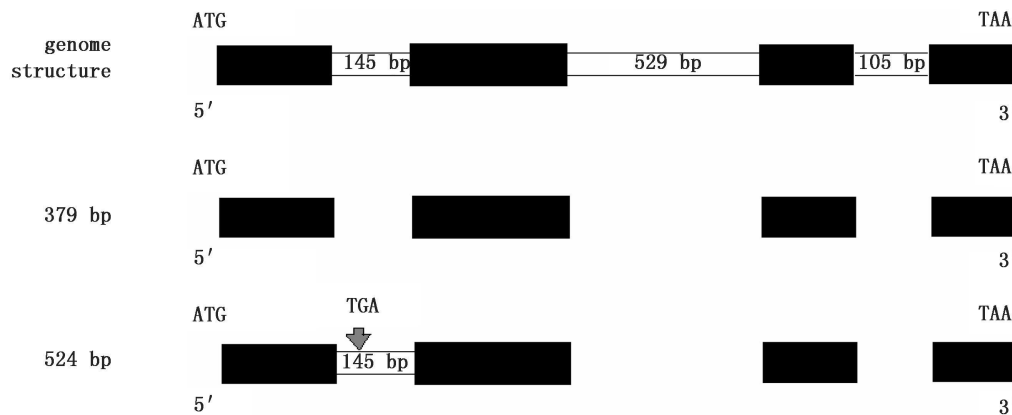


图 4 CCL24 基因的可变剪接模式

Fig 4 The gene structure and the alternative splicing of CCL24  
黑色表示外显子, 白色表示内含子。

```

ATGGTAATAAAAAATATGTATTTGGCCTTGGTTACACTACTC 42
M V I K I C I L A L V T L L
CTTTTTCAGGTGGAGACAGACGCAGGTGAGTGACTGCTTTTA 84
L F Q V E T D A G E *
AAGAATATGCAACAGAGCTTTTAAAACGCTGTTGAATGCGTT 126
AATAATCCGCCAGCATGCTGAAAAATGTGCCGCTGAAATGTT 168
GAGCAATTGCTTTTAAACATAACTCTTTCCTTTTGTTCACA 210
GTGGCCTGCTGCGTTAGTTACACTAAATACCCAGACGCTGT 252
GGAGTTTTTAAAAGGCTATGATATCCAGGTATAACTGGCGGC 294
TGTGATCTTGCAGCTATTATCTTCCACACGAAAAAGGAAGA 336
TCAGTCTGTGCTGACCCAGCACAACTTGGACACAAAAAGA 378
GTCGAGTGCCTAAAGATGAAAGCAGCAAAAATCGGCTCTGAG 420
AATTCCATCTAA 432

```

图 5 CCL24 基因可变剪接的序列分析

Fig 5 The sequence of alternative splicing of CCL24 gene  
起始密码子用下划线表示, 终止密码子用方框表示, 阴影部分为内含子序列。

### 2.3 CCL24基因可变剪接的组织特异性

用跨越长为 145 bp的内含子的 1对引物,对草鱼精巢、头肾、皮肤、肝胰脏、肠道、肌肉和肾脏组织的 CCL24基因的表达进行了检测。如图 6所示,在精巢、头肾、皮肤、肝胰脏和肌肉中得到了没有剪切内含子的长为 339 bp的片段,而在肠道和肾脏中扩增同时得到 339 bp的长片段和剪切掉内含子的长为 194 bp的片段,可见, CCL24的可变剪接存在组织性差异。此外,内含子没有被剪切的 339 bp的转录本的表达强度,明显要高于内含子被正常剪切的 194 bp的转录本的表达强度。

## 3 讨论

趋化因子是对白细胞具有趋化作用的一类家族,根据其氨基酸序列结构基序的不同分为几个亚家族。本研究克隆和分析的是一种 CC趋化因子,氨基端存在 2个相邻的半胱氨酸,为典型的 CC亚家族的趋化因子。基于与序列同源相似

性比对及系统进化分析,发现该草鱼 CC趋化因子为斑马鱼 CCL24的同源基因。通过对此草鱼 CCL24编码蛋白的生物信息学特征分析,表明其氨基端是疏水性结构,而羧基端具亲水性,有明显的表面抗原结构,具信号肽和跨膜结构域,其二级结构以  $\alpha$ 螺旋和随机卷曲为主,间或有  $\beta$ 转角。CC趋化因子羧基端的亲水结构有利于其趋化性,对 CC趋化因子的功能发挥有重要的作用。而大部分的趋化因子都产生有信号肽的前体蛋白,经剪切加工后,成熟的蛋白分子分泌外细胞,起趋化作用。大多的 CC趋化因子都具有跨膜结构域,以利于其在细胞内外穿梭行使免疫因子的功能。已报道的鱼类 CC趋化因子基因的二级结构多以  $\alpha$ 螺旋和随机卷曲为主,与预测的 CCL24的二级结构一致。本研究通过生物信息学方法对草鱼 CC趋化因子基因 CCL24编码蛋白分析,了解了其氨基酸组成、各类结构域以及其二级结构,对了解 CC趋化因子的结构和功能有重要帮助,也为研究其免疫调控机制和 CC趋化因子与受体的作用奠定了基础。

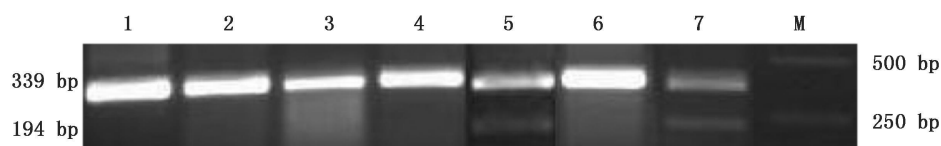


图 6 CCL24在草鱼各组织中的可变剪接分析

Fig 6 Difference expressions of CCL24 in the tissues of *Ctenopharyngodon idellus*  
1-7分别为精巢、头肾、皮肤、肝胰脏、肠道、肌肉、肾脏, M为 DL2000。

鱼类中报道较多的 CC趋化因子是斑点叉尾 CC趋化因子家族,鉴定其绝大多数 CC趋化因子的基因结构是由 3个外显子和 2个内含子组成,或由 4个外显子和 3个内含子组成<sup>[15]</sup>。本实验对草鱼 CC趋化因子基因 CCL24编码框区域分析结果显示,其编码框区域由 4个外显子和 3个内含子组成。

本研究发现草鱼 CCL24基因存在 RNA可变剪接现象。可变剪接指 RNA剪接过程中外显子或内含子有目的地被去除,从而产生各种成熟的 mRNA,是基因表达调控的重要途径之一。40%~60%的人类基因发现有可变剪接现象,可变剪接已成为实现人类基因组功能复杂性的主要途径之一<sup>[16]</sup>。在人趋化因子 CCL14中,也发现存在可变剪接现象<sup>[17]</sup>。在人类精巢组织中,至少检

测到趋化因子超家族成员 CKLFSF1基因的 23种可变剪接产物<sup>[18]</sup>。在斑点叉尾 CC趋化因子家族也发现可变剪接现象,在斑点叉尾脾脏和肝脏组织中检测到 SCYA126基因的 2种可变剪接产物<sup>[19]</sup>。本研究中,由于一个 145 bp的内含子没有被剪切掉,而此内含子中的 TGA刚好成为终止密码子,提前终止了完整 CCL24基因的翻译,结果导致其翻译产物仅为 24个氨基酸的短肽,失去了 CCL24蛋白的正常功能。

这种可变剪接在不同的组织中表现不同,内含子没有被剪切掉的转录本,在草鱼各种组织中都有表达,而正常剪切的转录本,只有在部分组织中表达,而且内含子没有被剪切掉的转录本的表达强度要明显高于正常剪切的转录本。仅根据本研究的结果,还不能很好地解释这种现象。

在人类中,通过比较分析人类基因组序列和各种组织的 EST序列,发现 RNA可变剪接存在明显的组织特异性<sup>[16]</sup>,不同组织进行不同的可变剪接是有一定的生物学意义的。

### 参考文献:

- [1] 赫崇波,木云雷,王志松,等. 鱼类 CC趋化因子基因及其系统进化分析 [J]. 中国水产科学, 2006, 13(1): 119—127.
- [2] 赫崇波,王强,刘卫东. 鱼类趋化因子基因的研究 [J]. 水产科学, 2006, 25(7): 367—370.
- [3] 张金洲,陈新华. 鱼类趋化因子的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2006, (增刊): 129—132.
- [4] 郑红. 趋化因子及其受体的功能 [J]. 免疫学杂志, 2004, 20(1): 1—9.
- [5] 刘祝公,陈慰峰. 趋化因子超家族研究进展 [J]. 生命科学, 1996, 8(3): 1—7.
- [6] Peatman E, Liu Z J. CC chemokines in zebrafish: Evidence for extensive intrachromosomal gene duplications [J]. *Genomics* 2006, 88(3): 381—385.
- [7] Laing K J, Secambes C J. Trout C C chemokines: comparison of their sequences and expression patterns [J]. *Mol Immunol* 2004, 41(8): 793—808.
- [8] Peatman E, Bao B L, Xu P, et al. Catfish CC chemokines: genomic clustering, duplications and expression after bacterial infection with *Edwardsiella ictaluri* [J]. *Mol Genet Genomics* 2005, 275(3): 1—13.
- [9] Peatman E, Bao B L, Baoprasertkul P, et al. In silico identification and expression analysis of 12 novel CC chemokines in catfish [J]. *Immunogenetics* 2005, 57(6): 409—419.
- [10] 鲍宝龙,李建忠,李家乐,等. 鱼 SCYA107序列的比较分析 [J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(4): 385—389.
- [11] He C, Peatman E, Baoprasertkul P, et al. Multiple CC chemokines in channel catfish and blue catfish as revealed by analysis of expressed sequence tags [J]. *Immunogenetics* 2004, 56(5): 379—387.
- [12] 杨琳琳,蒋燕,杨桂梅,等. 银鲟皮肤和肌肉组织的基因表达谱分析 [J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(4): 390—395.
- [13] 赵建朋,顾立军,胡文革,等. *Bacillus* sp. XJ1205菌株 GbsA基因的克隆及其生物信息学分析 [J]. 石河子大学学报 [J], 2008, 26(2): 220—223.
- [14] 罗艳,王瑛. 茄子 SmU2AF65基因的可变剪接 [J]. 遗传, 2008, 30(11): 1499—1505.
- [15] Bao B L, Peatman E, Xu P, et al. Characterization of 23 CC chemokine genes and analysis of their expression in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Developmental and Comparative Immunology* 2006, 30(9): 783—796.
- [16] Yeo G, Holste D, Kreiman G, et al. Variation in alternative splicing across human tissues [J]. *Genome Biology* 2004, 5(10): R74.
- [17] Hiller M, Huse K, Platzer M, et al. Creation and disruption of protein features by alternative splicing: a novel mechanism to modulate function [J]. *Genome Biology* 2005, 6(7): 581—588.
- [18] Wang L, Wu C, Zheng Y, et al. Molecular cloning and characterization of chemokine-like factor super family member 1 (CKLFSF1), a novel human gene with at least 23 alternative splicing isoforms in testis tissue [J]. *Int J Biochem Cell Biol* 2004, 36(8): 1492—1501.
- [19] 鲍宝龙,李家乐,汪桂玲,等. 斑点叉尾 趋化因子 SCYA126基因及其可变剪接 [J]. 中国水产科学, 2007, 14(1): 1—7.