

北京鸭含有 *VH δ* 基因的 *TCR δ* 位点结构、表达及其进化特点

于迪¹ 张铭暄² 王喜凤^{1,3*}

(1. 中国农业大学 生物学院/农业生物技术国家重点实验室,北京 100194;

2. 北京市第一零一中学,北京 100091;

3. 中国科学院 动物研究所,北京 100101)

摘要 为分析北京鸭含有 *VH δ* 基因的 *TCR δ* 位点的结构、表达及进化特点,本研究通过筛选北京鸭基因组 DNA 的细菌人工染色体(Bacterial artificial chromosome,BAC)文库,并对筛选到的 BAC 克隆进行全长测序,获得包含北京鸭第二个 *TCR δ* 位点的约 136 Kb 的基因组序列;深入分析北京鸭第二个 *TCR δ* 位点基因序列,发现北京鸭第二个 *TCR δ* 位点上的 *VH δ* 、*D δ* 和 *J δ* 之间没有内含子序列,已在基因组水平已经完成了 VDJ 的重组;同线性分析显示该基因位点结构为 *SPPL2A-VH δ -D δ -J δ -C δ -OR-OR*,与鸡的第二个 *TCR δ* 位点 5' 端具有同线性关系;通过 Q-PCR 得到了北京鸭二个 *TCR* 位点上基因的组织特异表达特点;全面分析鸟类第二个 *TCR δ* 位点上各基因的进化关系,结果显示所有鸟类的祖先中已出现了第二个 *TCR δ* 位点;但在进化过程中不同鸟类 *C δ* 基因经历了基因的丢失或者基因的复制。

关键词 北京鸭; *VH δ* 基因; *TCR δ* 位点; 进化

中图分类号 Q352

文章编号 1007-4333(2019)10-0070-11

文献标志码 A

Comprehensive analysis of the additional *TCR δ* locus in Peking duck

YU Di¹, ZHANG Mingxuan², WANG Xifeng^{1,3*}

(1. College of Biological Sciences/State Key Laboratory of Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. Beijing 101 Middle School, Beijing 100191, China;

3. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract To investigate genomic organization, expression and phylogeny of the *TCR δ* , which including *VH δ* gene in Peking duck, a Peking duck BAC genomic library was screened and a BAC clone containing the second *TCR δ* locus was sequenced in this study. The total length of the BAC insert is about 136 Kb. A detailed analysis of the BAC sequence showed there were no introns among *VH δ* , *D δ* and *J δ* genes, which suggested that they have recombined on the genomic level. Then a complete genomic structure of the second *TCR δ* locus in the Peking duck was identified, which is organized in an unusual pattern, *SPPL2A-VH δ -D δ -J δ -C δ -OR-OR*. Syntenic analysis suggested the second *TCR δ* locus of Peking duck syntenic with chicken's second *TCR δ* locus. And the mRNA levels in different tissues are measured by Q-PCR. Phylogenetic analysis shows that all *C δ* and *VH δ* genes from birds are clustered together, indicating that all *C δ* genes of birds are derived from a common ancestral gene. The gene is either duplicated or lost in different birds during evolution. In summary, this study would provide insight into the evolution of the second *TCR δ* in birds and improve our understanding of the duck immune system and the evolution of *TCR δ* genes in birds.

Keywords Peking duck; *VH δ* gene; *TCR δ* locus; evolution

收稿日期: 2019-04-04

基金项目: 国家自然科学基金资助(31472085)

第一作者: 于迪, 博士研究生, E-mail: yudishero@163.com

通讯作者: 王喜凤, 助理研究员, 主要从事比较免疫学研究, E-mail: wangxifeng@ioz.ac.cn

鸭是重要的农业经济禽类。作为重要的水禽动物之一,其免疫分子机制具有不同于鸡的特点。例如:对鸡致死率为 100% 的高致病禽流感病毒 H5N1,虽然也能引起鸭的死亡,但是对鸭的致病致死率却很低;另外,研究发现包括鸭在内的一些水禽是 A 型流感病毒(包括感染人类的禽流感病毒)的天然宿主^[1-3],鸭中存在天然抗流感基因 *RIG-I* (Retinoic acid-inducible gene 1, *RIG-I*),该基因能够引发先天性免疫反应,诱导机体产生 β 干扰素,由此引发的干扰素反应能够消除流感病毒感染,但在鸡中未发现 *RIG-I* 基因,这在一定程度上解释了鸡与鸭之间抗流感能力的差异^[4]。

T 细胞受体(T cell receptor, TCR)是表达于 T 细胞表面的特异性受体,主要负责识别由主要组织相容性复合体(Major histocompatibility complex, MHC)递呈的抗原^[5]。TCR 由固定在细胞膜上的异源二聚体组成,分为 2 种类型:由 α 链和 β 链组成的二聚体被称为 $\alpha\beta$ TCR,表达于 $\alpha\beta$ T 细胞表面;以及由 γ 链和 δ 链组成的二聚体称为 $\gamma\delta$ TCR,表达于 $\gamma\delta$ T 细胞表面^[6]。目前已知除了有鳞目以外的所有有颌类脊椎动物都有 4 种 TCR 基因^[7],即: *TCR α* 、*TCR β* 、*TCR γ* 和 *TCR δ* ^[6]。与免疫球蛋白基因座的结构类似,编码 4 种 TCR 的基因也是由多个 V(Variable)基因片段、少数 D(Diversity)基因片段、数量不等的 J(Joining)基因片段和一个或几个高度同源的 C(Constant)基因片段组成的。且这 4 种 TCR 基因位于不同的基因位点上,其中 *TCR β* 和 *TCR γ* 具有单独的基因位点,*TCR δ* 基因位于 *TCR α* 位点内部^[8]。

最近在负鼠和鸭嘴兽中发现了第五个 TCR 基因,被称为 *TCR μ* ^[9-10]。*TCR μ* 位点的结构是由若干个串联的 *V μ 1-nD-J-V μ 2-J-C μ* 基因簇组成^[9]。有趣的是^[9-10]:*TCR μ* 位点上的 *V μ* 基因与 *TCR δ* 位点的 *V δ* 基因同源性很低,而与免疫球蛋白重链的 *V* 基因(*IgHV*)同源性更高,因此认为 *V μ* 基因来源于免疫球蛋白重链的 *V* 基因;而 *TCR μ* 位点上的 *C μ* 基因与 *TCR δ* 位点的 *C δ* 基因具有很高的同源性;此外,*TCR μ* 链的表达也与传统的 *TCR δ* 链不同,是由 2 个 *V μ* 基因和 1 个 *C* 基因组成的具有 3 个结构域分子;不仅如此,研究发现 *TCR μ* 的第二个 *V μ* 基因,也就是与 *C* 区相邻的 *V μ* 基因多样性不高。除了负鼠和鸭嘴兽中发现了 *TCR μ* 位点外,其他有颌类脊椎动物中没有发现同源的基因位点。但是也

有研究显示鲨鱼中存在一种与 *TCR μ* 表达特点一致的 *TCR* 基因,即 *NAR-TCR*^[11]; *NAR-TCR* 分子也是由 2 个 V 区结构域和 1 个 C 区结构域组成的,且编码 *NAR-TCR* 的 V 区基因也不与 *TCRV* 相似,而是与鲨鱼中特有的一种免疫球蛋白基因 *IgNAR* 的 V 基因更相似;但是,进化分析的结果显示鲨鱼的 *NAR-TCR* 与负鼠和鸭嘴兽的 *TCR μ* 并非直系同源的关系^[11]。那么,*TCR μ* 位点是如何产生的? 这一问题直到在鸭嘴兽的 *TCR α/δ* 位点内发现了一个 *VH δ* 基因才得以解决:鸭嘴兽的 *TCR α/δ* 位点中有一个与免疫球蛋白重链 V 区序列相似性更高,而与 TCR 的 *V δ* 基因相似性不高的 V 基因,称之为 *VH δ* 基因,进化分析显示鸭嘴兽的 *VH δ* 基因与 *V μ* 基因具有高度同源性,因此认为,免疫球蛋白重链的 V 基因易位并插入到 *TCR α/δ* 位点,然后分化出来产生了 *TCR μ* 位点^[12]。

目前在其他物种中没有发现 *TCR μ* 位点的存在,*VH δ* 基因在爪蟾、扬子鳄、鸡、火鸡、鸭及斑胸草雀中却都有发现^[13-14]。鸡和火鸡属于鸡形目鸟类,它们的 *VH δ* 基因位于第二个 *TCR δ* 位点上,且第二个 *TCR δ* 位点结构非常相似,都是由 *VH δ* 、*D δ* 、*J δ* 和 *C δ* 基因组成^[14]。鸟类的第二个 *TCR δ* 位点与在哺乳动物中发现的 *TCR μ* 位点相似,都含有与免疫球蛋白同源性更高的 V 基因和 *C δ* 基因。不同的是,鸡和火鸡第二个位点上 *TCR δ* 基因的转录本有且只有一个 *VH δ* 基因^[14]。但是雀形目的斑胸草雀却没有第二个 *TCR δ* 位点,其仅有的一个 *VH δ* 基因位于 *TCR α/δ* 位点内^[14]。可见不同的鸟类中 *VH δ* 基因所在的位点不同。

鸭的 EST 表达序列标签中也同样检测到 *VH δ* 基因的存在^[14],然而,尚无关于鸭的 *VH δ* 基因位点的详细研究。因此,本研究拟通过筛选本实验室保存的北京鸭基因组 BAC 文库,通过测序,获得含有 *VH δ* 基因的第二个 *TCR δ* 位点的全长基因组序列,利用在线软件分析第二个 *TCR δ* 位点的基因组结构,利用检测表达分析检测含有 *VH δ* 的 *TCR δ* 链在不同日龄大小的北京鸭中表现出组织特异性表达特点,并通过进化分析得到鸟类含有 *VH δ* 基因的第二个 *TCR δ* 位点的进化特点,以期通过本研究对北京鸭的第二个 *TCR δ* 进行全面分析,为理解鸭的免疫功能及 *TCR δ* 基因在鸟类中的进化提供了一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

北京鸭样品购自北京金星鸭业有限公司,分别选取 21 和 120 日龄的北京鸭各 3 只。北京鸭的基因组 DNA BAC 文库由上海美吉生物医药科技有限公司构建,覆盖率为 5 倍北京鸭的基因组。BAC 文库由 16 个超级池、384 个行池、256 个列池和 16 个 384 孔板组成。该文库由中国农业大学生物学院农业生物技术国家重点实验室保存。

1.2 BAC 文库筛选

根据北京鸭 GenBank 数据库非典型的 TCR δ 表达序列 (GenBank AF415216) 设计特异引物

VH δ -F1 和 VH δ -R1 (表 1)。以建库鸭的基因组 DNA 为模板,使用筛库引物进行扩增;对扩增后的片段进行测序从而验证筛库引物的特异性。BAC 文库筛选采用基于 PCR 扩增的两步-3D 筛选方法。两步指筛选时必须经过对超级池和二级池的混合 DNA 进行 PCR 扩增,通过对 16 个超级池 DNA 样品的第一步 PCR 检测,确定阳性克隆所在的超级池号,然后针对阳性超级池所对应的二级池的 48 个板池、行池、列池 DNA 样品进行第二步 PCR 扩增,从阳性结果确定所有阳性克隆的位置。3D 指在阳性超级池中,必须经过三维(板、行和列)的 PCR 鉴定才能确定阳性克隆的具体所在位置。

表 1 引物列表

Table 1 List of the primers

引物 Primer	用途 Purpose	引物序列(5'→3') Sequence (5'→3')
VH δ -F1	筛选基因组 BAC 文库	GACACAGCCACCTACTTC
VH δ -R1	Screening genomic DNA BAC of Peking duck	CCCCTCCGATGTGATAAG
Q-TCR δ -F1	Q-PCR	CTTATCACATCGGAGGGGA
Q-TCR δ -R1	Real-time fluorescence quantification PCR	GCAAACCTTTCACGTCCACCA

1.3 BAC 提取、鉴定及测序

阳性 BAC 克隆质粒使用 QIAGEN Large-Construct 试剂盒(QIAGEN, 中国)按说明书提取,然后通过脉冲场电泳鉴定 BAC 插入片段的大小。首先使用 *Not* I 酶(Takara, 中国),37 °C 水浴酶切 1 μ g BAC 过夜;配制 1% 琼脂糖凝胶,将 *Not* I 酶切好的 BAC 点入胶孔;固体 DNA 大分子量 MidRange PFG Marker I(NEB, 美国)嵌入已凝固的琼脂糖凝胶梳孔中并用琼脂糖封闭;进行电泳,电泳条件:6 v/cm,120°角,12 °C,0.1~40.0 s,12~14 h;电泳结束后,取出胶用 EB 染色 10 min,水中浸泡 30 min,凝胶成像系统观察,计算 BAC DNA 大小。然后将 BAC 质粒送至北京百迈客生物科技有限公司采用 PacBio 技术进行测序。

1.4 RNA 提取、RT-PCR 及 Q-PCR

RNA 提取参照 QIAGEN RNeasy Mini 试剂盒(QIAGEN, 中国)说明书操作方法,采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。RT-PCR 使用 M-MLV 反转录酶 (Promega, 美国)、RNA 酶抑制剂

(Promega, 美国)及 Oligo (dT) (Promega, 美国)进行反转录,程序为:70 °C 5 min;42 °C 1 h;75 °C 10 min。使用 SYBR Premix Ex *Taq* 试剂盒 (Takara, 中国)进行实时荧光定量反转录聚合酶链式反应(Realtime fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, Q-PCR)。利用 Primer Premier 5.0 软件设计特异扩增 TCR δ 的跨内含子的定量引物 Q-TCR δ -F1 和 Q-TCR δ -R1 (表 1),进行 PCR 扩增。Q-PCR 的反应程序为:94 °C 5 min;94 °C 30 sec;55 °C 10 sec;72 °C 10 sec,共进行 40 个循环;72 °C 2 min。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算含有 VH δ 基因的 TCR δ 在不同组织的相对表达量。

1.5 克隆测序

使用胶回收试剂盒 (Sigma, 美国)切胶回收的 PCR 产物,并与 pMD-19T 载体 (Takara, 中国)连接后转染至 DH5 α 细胞中,涂板 37 °C 培养 12 h,挑选阳性克隆用 PCR 法鉴定重组质粒,随后将鉴定过的阳性质粒送往北京华大基因研究中心测序。

1.6 系统进化树构建

从 NCBI 公布的数据中选择需要构建系统发育树所需的全部氨基酸序列或者核苷酸序列, 然后使用软件 ClustalX 2.1 进行序列比对。然后利用 MEGA 6.06 软件使用 Neighbor-joining 的算法构建系统发育树, 根据系统进化树的拓扑结构分析鸟类 *TCR δ* 基因进化的特点。

1.7 生物信息学分析

图片处理软件: Adobe Photoshop CS6, Adobe Illustrator CS5, Microsoft PowerPoint 2013; PCR 引物设计及评估软件: Primer Premier 5, DNAMAN; 序列分析比对软件: Chromas, DNASTar Lasergene7.1, GENEDOC, ClustalX2.1; 序列模式分析: FUZZNUC (<http://embossgui.sourceforge.net/demo/fuzznuc>); 基因功能注释网站: InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/scan.html>); 基因比对网站: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; 基因预测网站: <http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>, <http://linux1.softberry.com/berry.phtml>。

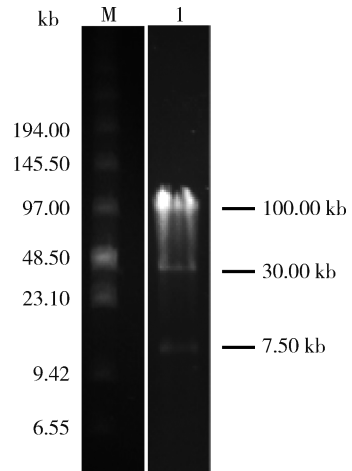
2 结果与分析

2.1 北京鸭含有 *VH δ* 基因的 *TCR δ* 位点基因组结构

根据 Genbank 序列号为 AF415216 的核苷酸序列设计扩增 V 区特异的引物(表 1), 筛选本实验室保存的北京鸭基因组 BAC 文库, 得到阳性 BAC 克隆 DHS1604G02。筛选得到的阳性 BAC 质粒提取后经脉冲检测显示 BAC 大小约为 130 Kb 左右(图 1), 将 BAC 质粒送至北京百迈客生物科技有限公司, 利用三代测序 PacBio 技术进行测序并组装。

测序结果显示, 含有第二个 *TCR δ* 位点的 BAC 大小为 136 835 bp。利用在线软件 FUZZNUC, 以 23 bp-RSS(Recombination signal sequence, 重组信号序列)(CACAGTG-23 bp 间隔序列-ACAAAACC)

搜索 BAC 序列, 在 79 970~80 008 的位置搜索到了 1 个序列相对保守的 23 bp-RSS, 为: CACCATA-23 bp-ACAAAAGT。随后分析了位于 23 bp-RSS 5' 端的序列, 得到一个 V 基因。接下来用 12 bp-RSS (GGTTTTTGT-12 bp 间隔序列-CACAGTG) 搜索 BAC 序列, 并没有得到任何相似的 RSS 序列。

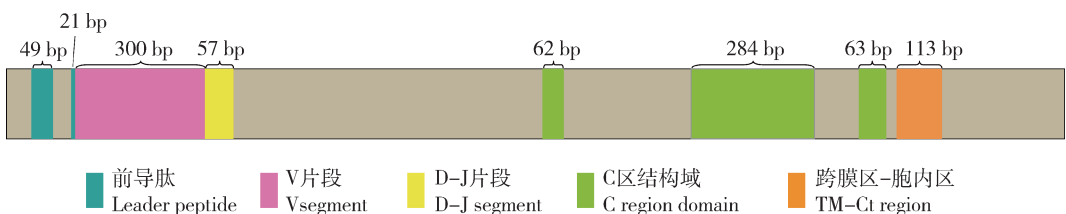


M, MidRange PFG Marker; 1, BAC 克隆 DHS1604G02 BAC clone DHS1604G02。

图 1 脉冲场凝胶电泳检测阳性 BAC 克隆 DNA 大小

Fig. 1 Size identification of inserts in BAC DHS1604G02 by PFGE

进一步利用 NCBI 上第二个位点上 *TCR δ* 表达的序列分析 V 基因 3' 端的序列。结果显示, V 基因下游紧跟着 *D-J* 基因(图 2)。因此, 北京鸭的第二个 *TCR δ* 位点上仅有的 1 个 V 基因在基因组上完成了 *V-D-J* 的重组。随后用北京鸭的 *C δ* 基因比对 BAC 序列, 得到了位于北京鸭第二个 *TCR δ* 位点上的 C 基因, 由 3 个结构域组成, 位于 BAC 序列的 90 033~93 107 bp 处(图 2)。综上所述, 北京鸭第二个 *TCR δ* 位点上有 1 个完成 *VDJ* 重组的 *VH δ* 基因和 1 个 C 基因。



各外显子的大小在图的上方标记。

Sizes of exons are labeled on the top.

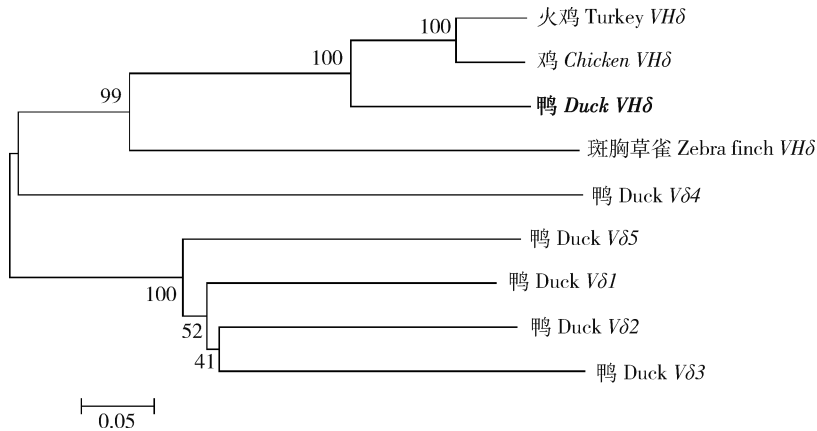
图 2 北京鸭第二个 *TCR δ* 位点上 *TCR δ* 基因的结构示意图

Fig. 2 Schematic diagram of the structure of *TCR δ* gene on the second *TCR δ* locus of Peking duck

2.2 北京鸭含有 *VH δ* 基因的 *TCR δ* 位点基因分析

将北京鸭第二个 *TCR δ* 位点上的 *C δ 2* 基因与哺乳类、鸟类和鱼类的 *C δ 1*、*C δ 2* 及其负鼠和鸭嘴兽的 *C μ* 基因用 Cluster W 进行氨基酸序列的比较,结果见图 3。结果显示与其他有颌类脊椎动物类似,北京鸭的 *C δ 2* 基因也由 4 个外显子组成:第一外显子编码免疫球蛋白结构域;第二外显子编码连接区的第一部分;第三外显子编码连接区的第二部分和

跨膜区;第四外显子编码胞内区。不仅如此,北京鸭的 *C δ 2* 具有维持免疫球蛋白结构域所必须的半胱氨酸和色氨酸的保守位点。北京鸭 *C δ 2* 与其他有颌类脊椎动物 *C δ* 同源基因的序列相似性为 13.9%~72.8%;北京鸭 *C δ 2* 与护士鲨 *C δ* 序列的相似性最少,仅为 13.9%;与鸡的 *C δ 2* 相似性最高,达到为 72.8%;然而北京鸭 *C δ 2* 与其 *C δ 1* 的氨基酸序列相似性为 42.2%。



比例尺代表遗传距离;每个节点位置标注了可信度;来自北京鸭的 *VH δ* 基因加粗标记。

Scale bar shows the genetic distance. The credibility value is shown beside each node. The *VH δ* gene of Peking duck is in bold.

图 3 北京鸭 *VH δ* 基因的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic analysis of the Peking ducks *VH δ* gene

将北京鸭的 *VH δ* 基因与鸡、火鸡和斑胸草雀的 *VH δ* 进行氨基酸序列比对,并通过 NCBI 网站的 IgBLAST 功能进行分析,可以清楚的划分出骨架区(Frame region,FR)和互补决定区(Complementary decision region,CDR),并且这些 *VH δ* 基因包含 3 个保守的 *Cys*²³、*Trp*⁴¹ 和 *Cys*¹⁰⁴ 位点,分别位于 FR1、FR2 和 FR3 区,说明它们都具有可以发挥免疫功能的 IgV 结构。进一步将北京鸭的 *VH δ* 基因与鸡、火鸡和斑胸草雀的 *VH δ* 以及北京鸭的 *V δ* 基因进行氨基酸序列,结果显示北京鸭的 *VH δ* 基因与鸡和火鸡的 *VH δ* 基因序列相似性最高,分别达到 76.2%和 75.2%;与斑胸草雀的 *VH δ* 序列相似性为 43.8%;而北京鸭的 *VH δ* 基因与来自北京鸭 5 个家族的 *V δ* 基因的相似性都很低,仅为 25.5%~30.6%。进化分析也显示北京鸭的 *VH δ* 基因与来自鸡、火鸡和斑胸草雀的 *VH δ* 基因聚在同一分支上,表明其具有同源性(图 3)。通过以上分析表明北京鸭第二个 *TCR δ* 位点上的 *V* 基因的确与自身 *V δ* 基因同源性较低,而与其他鸟类的 *VH δ* 基因同源性较高。

2.3 北京鸭含有 *VH δ* 基因的 *TCR δ* 位点与其他鸟类含有 *VH δ* 基因的 *TCR δ* 位点的染色体同线性关系

利用在线预测软件(<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html> 和 <http://linux1.softberry.com/berry.phtml>)对包含北京鸭第二个 *TCR δ* 位点的 BAC 阳性克隆的其他序列进行基因预测,并将预测到的结果在 NCBI 上进行 BLAST 比对确定基因。结果显示,该 BAC 序列上还有其他 3 个完整的基因,分别为位于 *TCR δ* 5' 端的 *SPPL2A* (Signal peptide peptidase-like 2A) 基因和 2 个位于 *TCR δ* 3' 端的 *OR* (Olfactory receptor) 基因(表 2)。其中 *SPPL2A* 在基因组上的位置为 32 362~57 653,由 15 个外显子构成,编码 439 个氨基酸。2 个 *OR* 基因都只由 1 个大小为 939 bp 的外显子组成,编码 313 个氨基酸。该位点上游有 1 个 *SPPL2A* 基因,下游有 2 个 *OR* 基因。

鸭、鸡及火鸡都存在第二个 *TCR δ* 位点,而斑胸草雀仅有一个 *TCR α/δ* ,斑胸草雀的 *VH δ* 位于该 *TCR α/δ* 位点上。比较鸭的第二个 *TCR δ* 位点与

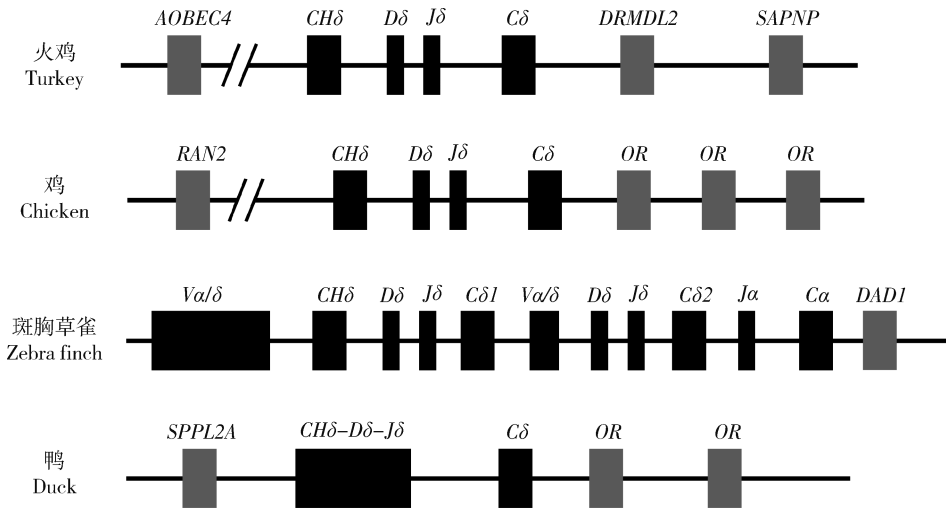
表 2 BAC 序列预测的基因

Table 2 Prediction genes on the BAC sequence

编号 No.	基因名 Gene name	BAC 上的位置 Location	方向 Direction	基因组 DNA 大小/bp Genomic DNA size
1	<i>SPPL2A</i>	32 362~57 653	—	25 291
2	<i>TCRδ</i>	79 377~93 107	+	13 730
3	<i>OR</i>	97 892~100 202	+	2 310
4	<i>OR</i>	112 085~113 023	+	939

鸡、火鸡的第二个 *TCR δ* 位点以及斑胸草雀的 *TCR α/δ* 位点的同线性关系(图 4)。结果显示,鸡和鸭的第二个 *TCR δ* 位点的 5' 端都有 *OR* 基因,在染色体上具有同线性关系;而鸭第二个 *TCR δ* 位点的

3' 端为 *SPPL2A*, 鸡的第二个 *TCR δ* 位点的 3' 端 *RAN2* 基因, 火鸡第二个 *TCR δ* 位点的 3' 端为 *AOBEC4* 基因, 因此鸡、鸭和火鸡的第二个 *TCR δ* 位点的 3' 端在染色体上不具有同线性的关系。



图中黑色的矩形表示 *TCR δ* 基因; *TCR δ* 位点两侧的其他基因用灰色矩形表示; 双斜线表示空缺序列。

TCR δ genes are marked by black rectangles, other genes flanking the locus are marked by grey rectangles; gaps are indicated with double slash.

图 4 鸡、火鸡、斑胸草雀及北京鸭第二个 *TCR δ* 位点同线性分析Fig. 4 Syntenic analyses of the second *TCR* loci of turkey, chicken, zebra finch and Peking duck

2.4 北京鸭含有 *VH δ* 基因的 *TCR δ* 位点上基因表达特点

检测北京鸭不同组织中第二个 *TCR δ* 位点上的 *VH δ* 基因在转录水平上的表达情况。结果显示, 21 日龄北京鸭 *TCR δ* 第二个位点的 *VH δ* 基因主要在肺脏、小肠和法氏囊中高表达; 而在脾脏和胸腺中显示出中等表达; 在心脏、肝脏、肾脏和大肠组织中低表达。而 120 日龄北京鸭第二个位点 *TCR δ* 的 *VH δ* 基因呈现出不同的组织特异表达情况: 在大肠、胸腺中表达量最高; 其次为心脏和肺脏; 而在法氏囊等其他组织中的表达量都很低(图 5)

2.5 鸟类含有 *VH δ* 基因的 *TCR δ* 位点基因的起源与进化分析

为了研究鸟类第二个 *TCR δ* 位点上基因的起源与演化, 本研究将哺乳类、鸟类、爬行类、两栖类、硬骨鱼和软骨鱼相关基因的 *C μ* 和 *C δ* 基因的氨基酸序列进行比对, 构建系统进化树(图 6)。所选择的基因及其在 NCBI 的序列号如下: 人(Human *C δ* : AAA61033.1)、小鼠(Mouse *C δ* : B26945)、负鼠(Opossum *C δ* : XP_001379771、Opossum *C μ* : XP_001369282) 和鸭嘴兽(Platypus *C δ* : XM_001516959、Platypus *C μ* : XP_001516799); 鸟类中

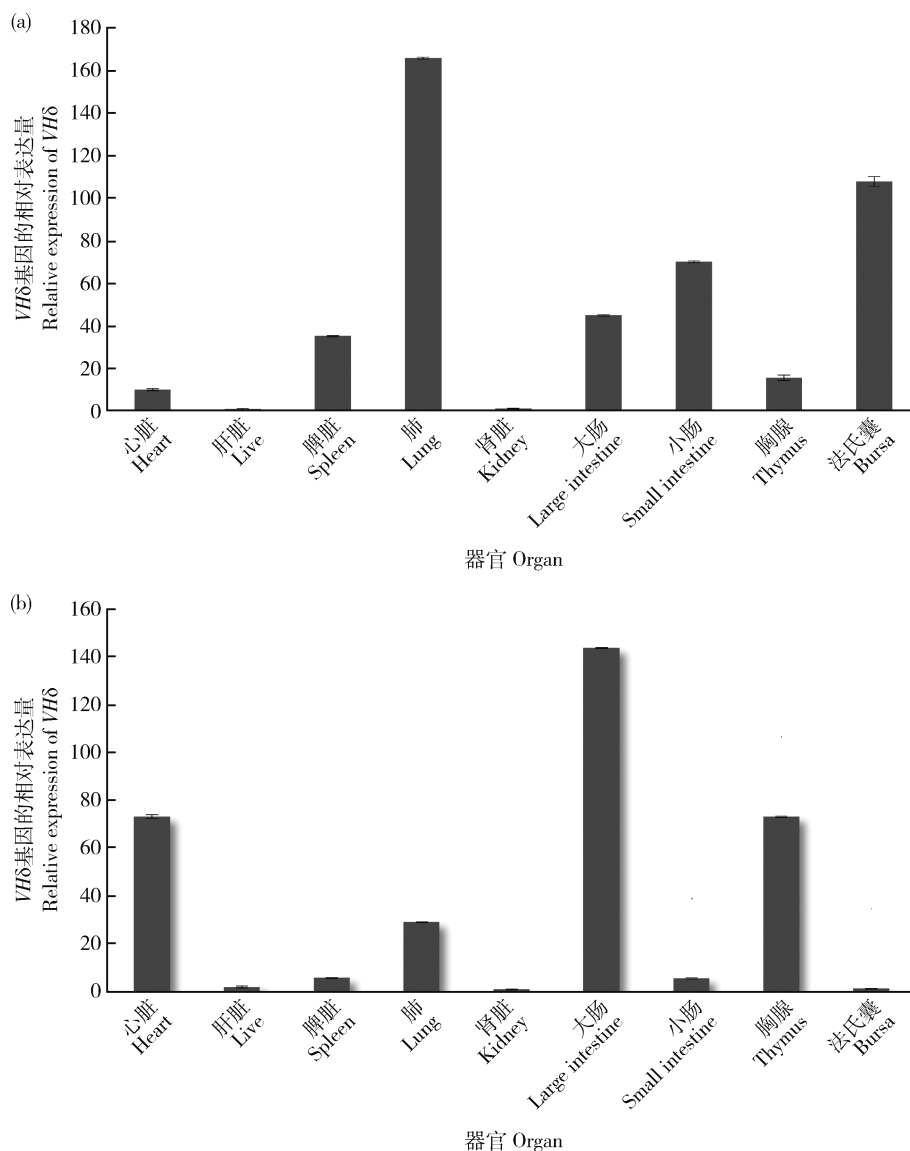


图5 北京鸭第二个 $TCR\delta$ 位点上 $VH\delta$ 基因基因在 21 日龄 (a) 和 120 日龄 (b) 在各组织中的相对表达定量 PCR 检测结果

Fig. 5 Q-PCR expression of *TCRδ* gene on the second *TCRδ* locus of Peking ducks in different tissues

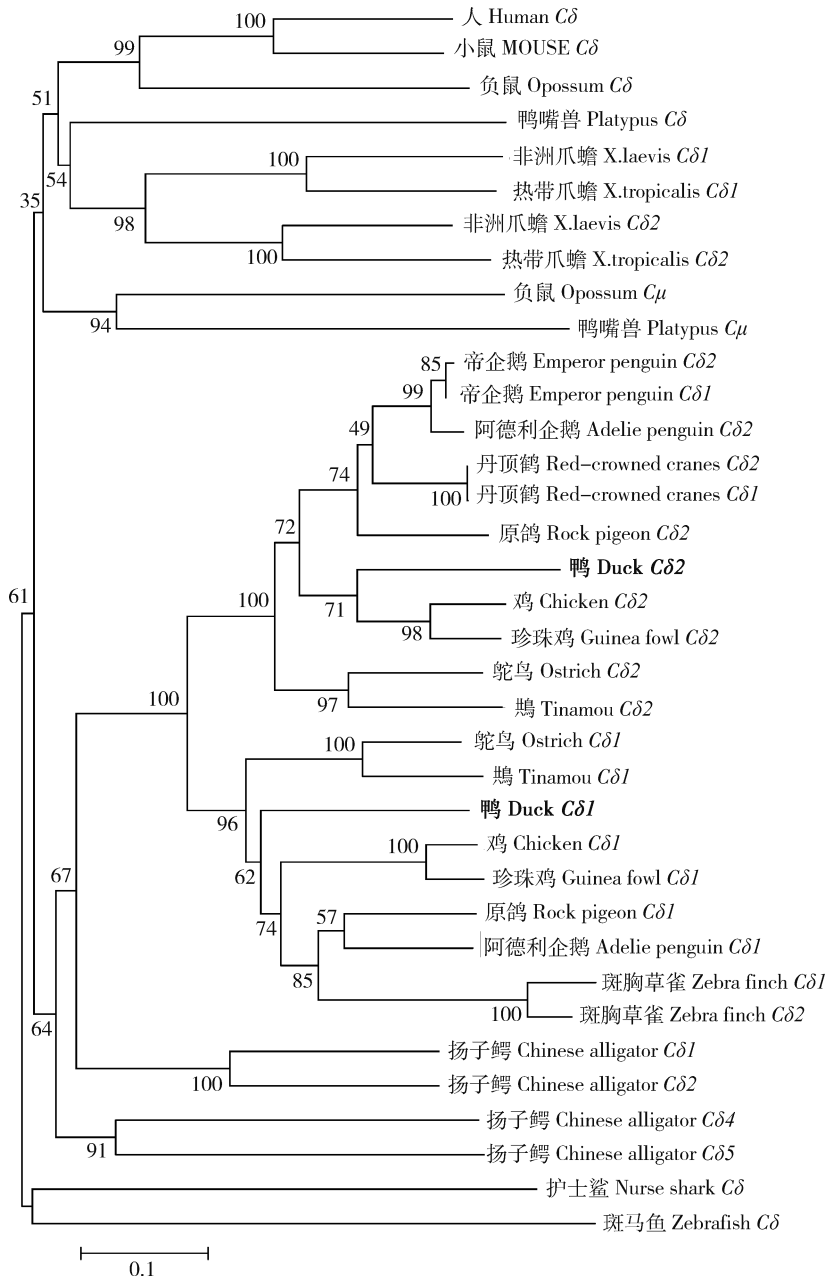
鸡形目的鸡 (Chicken *Cδ1*: AAD51740. 1, Chicken *Cδ2*: XP_021239081. 1)、和珍珠鸡 (Guinea fowl *Cδ1*: XP_021238579. 1, Guinea fowl *Cδ2*: XP_021239081. 1)、雁形目的鸭 (Duck *Cδ1*: EOA97320, Duck *Cδ2*: NP_001297331), 雀形目的斑胸草雀 (Zebra finch *Cδ1*: Chr 27: 3021481, Zebra finch *Cδ2*: Chr 27: 3039847), 鹤形目的丹顶鹤 (Red-crowned cranes *Cδ1*: XP_010306726. 1, Red-crowned cranes *Cδ2*: XP_010143810. 1), 企鹅总目的帝企鹅 (Emperor penguin *Cδ1*: XP_019326224. 1, Emperor penguin *Cδ2*: KFM03985. 1) 和阿德利企

鹅 (Adelie penguin *Cδ1*: KFW68195. 1, Adelie penguin *Cδ2*: XP_009332819. 1), 鸽形目的原鸽 (Rock pigeon *Cδ1*: XP_021147365. 1, Rock pigeon *Cδ2*: XP_021156318. 1), 鸵鸟目的鸵鸟 (Ostrich *Cδ1*: XR_694179, Ostrich *Cδ2*: XM_009690365) 以及鸚形目的鸚 (Tinamou *Cδ1*: NW_010587243: 3126, Tinamou *Cδ2*: XM_010222746); 爬行类的扬子鳄 (Chinese alligator *Cδ1*: NW_005843295. 1, Chinese alligator *Cδ2*: NW_005843295. 1, Chinese alligator *Cδ4*: NW_005842791. 1, Chinese alligator *Cδ5*: NW_005842791. 1); 两栖类的非洲爪蟾 (X.

tropicalis C δ 1: OCA50706、*X. tropicalis C δ 2*: OCA50696) 和热带爪蟾 (*X. laevis C δ 1*: OCU01513、*X. laevis C δ 2*: OCU01483); 硬骨鱼类的斑马鱼 (Zebra fish *C δ* : Chr 2:36172205); 及软骨鱼类的护士鲨 (Nurse shark *C δ* : FJ513799)。

系统进化树结果显示(图 6), 所有鸟类的 *C δ* 基因与爬行动物扬子鳄的 *C δ* 聚在同一支上, 说明鸟类

的确是与爬行动物亲缘关系更近的物种。不仅如此, 大部分鸟类都有 2 个 *C δ* 基因, 但是不同鸟类的 2 个 *C δ* 基因来源不同。包括鸡、鸭、鸽子、鸵鸟及鸚等鸟类, 他们的 *C δ 1* 基因聚在一起, 同样 *C δ 2* 基因聚在另外一支, 表明这些鸟类的 2 个 *C δ* 基因在其祖先中存在。而帝企鹅、丹顶鹤和斑胸草雀的 2 个 *C δ* 基因, 它们自身基因的相似性要高于与其他物种 *C δ* 基因的相似性。



比例尺代表遗传距离; 每个节点位置标注了可信度; 来自北京鸭的 *C δ* 基因加粗标记。

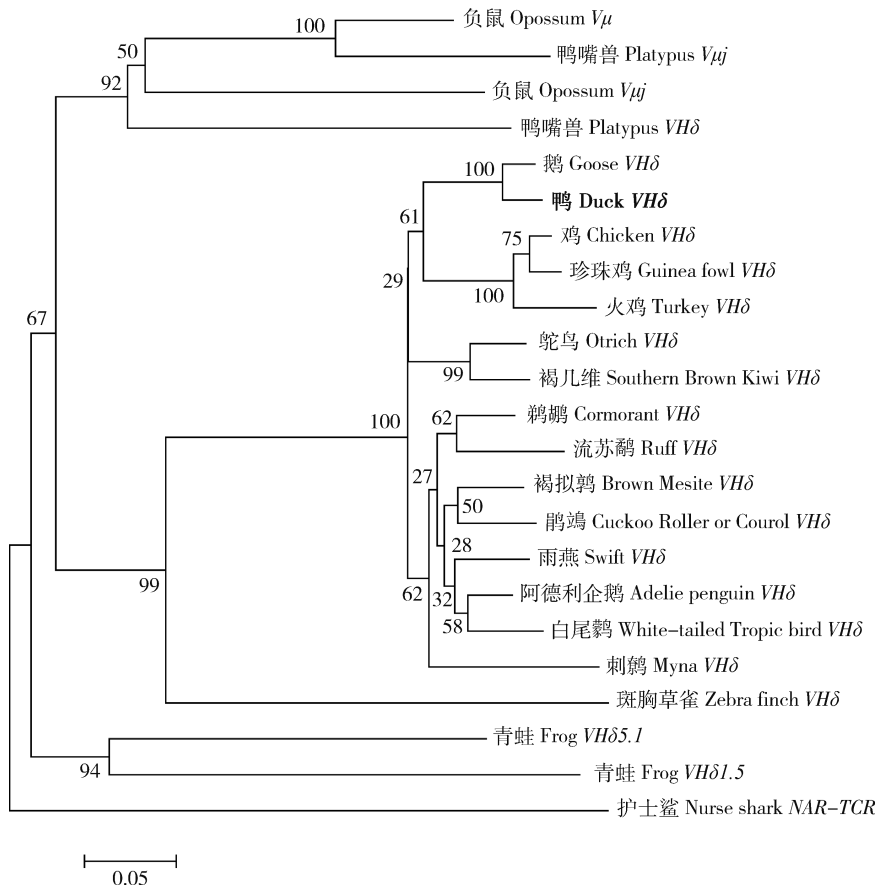
Scale bar shows the genetic distance. The credibility value is shown beside each node. The Peking ducks *C δ* gene is in bold.

图 6 有颌类脊椎动物 *C δ* 基因的系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic analysis of the *C δ* gene in different jawed vertebrates

为了探究鸟类 $VH\delta$ 基因的起源与演化,本研究从哺乳动物、鸟类、两栖类及软骨鱼中选择相关基因的核苷酸序列进行比对,构建系统进化树(图7)。所选择的基因及其在 NCBI 的序列号如下:哺乳动物负鼠的 $V\mu$ 基因和 $V\mu j$ 基因(Opossum $V\mu$: GU475142.1、Opossum $V\mu j$: GU264000.1)、鸭嘴兽的 $V\mu$ 基因和 $VH\delta$ 基因(Platypus $V\mu$: GU458342、Platypus $VH\delta$: XM_007664070.1);鸟类的 $VH\delta$ 基因:鸡形目的火鸡(Turkey $VH\delta$: XM_021383406.1)、鸡(Chicken $VH\delta$: JF936901.1)和珍珠鸡(Guinea fowl $VH\delta$: XM_021383406.1)、雁形目的鸭(Duck $VH\delta$: XM_021277202.2)和鹅(Goose $VH\delta$: XM_013192840.1)、雀形目的刺鸫(Myna $VH\delta$: XM_009084311.1)和斑胸草雀(Zebra finch $VH\delta$:

JF936921.1)、鸮鸵目的褐几维(Southern Brown Kiwi $VH\delta$: LK391157.1)、鸨形目的流苏鸨(Ruff $VH\delta$: XM_014962011.1)、雨燕目的雨燕(Swift $VH\delta$: XM_010004398.1)、佛法僧目的鹊鸚(Cuckoo Roller or Courol $VH\delta$: XM_009953166.1)、鸨形目的褐拟鸨(Brown Mesite $VH\delta$: XM_010183661.1)、鸨形目的白尾鸨(White-tailed Tropic bird $VH\delta$: XM_010296248.1)和鸬鹚(Cormorant $VH\delta$: XM_009510487.1)、企鹅总目的阿德利企鹅(Adelie penguin $VH\delta$: XM_009334544.1)、鸵形目的鸵鸟(Struthio $VH\delta$: XM_009690365.1)、两栖类爪蟾的 $VH\delta$ 基因(Frog $VH\delta 1.5$: EL677058、Frog $VH\delta 5.1$: GQ262028),软骨鱼类的护士鲨的 $NAR-TCRV$ 基因(Nurse shark $NAR-TCRV$: DQ022688)。



比例尺代表遗传距离;每个节点位置标注了可信度;来自北京鸭的 $VH\delta$ 基因加粗标记。

Scale bar shows the genetic distance. The credibility value is shown beside each node. The Peking duck's $VH\delta$ gene is in bold.

图7 有颌类脊椎动物 $VH\delta$ 基因的系统进化树

Fig. 7 Phylogenetic analysis of the $VH\delta$ gene in different jawed vertebrates

从系统进化树中可以看出(图7),所有鸟类的 $VH\delta$ 基因共同聚在一起,表明鸟类的祖先中具有

$VH\delta$ 基因的共同祖先基因。进一步分析系统发育树可见同为雁形目鹅的 $VH\delta$ 基因与鸭的 $VH\delta$ 聚

在同一分支上;同为鸡形目的鸡、火鸡和珍珠鸡的 *VH δ* 基因聚在同一分支;平胸总目的鸵形目(鸵鸟)和鹬鸵目(褐几维)的 *VH δ* 基因也聚在同一分支;相反,雀形目斑胸草雀的 *VH δ* 和刺鹬的 *VH δ* 不在同一进化分支上。

3 讨 论

已有研究表明四足动物中除了在有鳞目中没有发现 *TCR γ* 和 *TCR δ* 基因,其他动物都有 *TCR α* 、*TCR β* 、*TCR γ* 和 *TCR δ* 4 个基因^[6-7]。在有袋类的负鼠和单孔目的鸭嘴兽中发现了第五个 TCR 位点,将其命名为 *TCR μ* 位点^[9-10]。鸡和火鸡也存在第二个 *TCR δ* 位点^[14]。由于免疫球蛋白的 V 区可以直接识别抗原,而 TCR 的 V 区识别的抗原需要经过 MHC 加工,具有一定的局限性。那么含有 *VH δ* /*V μ* 基因的 *TCR δ* 很可能在不存在 MHC 的限制情况下,能够更好地识别抗原^[5]。鸭作为雁形目最重要的水禽动物,其免疫分子具有很多不同于鸡的特点^[1-4]。研究显示鸭的表达序列标签中有 *VH δ* 基因和 *C δ* 基因的共同表达产物^[14],但是目前对于含有 *VH δ* 的第二个位点还没有详细的研究。

鸡和火鸡的第二个 *TCR δ* 位点上,*VH δ* 、*D δ* 和 *J δ* 之间含有内含子,且 *D δ* 和 *J δ* 两端有重组信号^[14],而北京鸭第二个 *TCR δ* 位点上的 *VH δ* 、*D δ* 和 *J δ* 之间没有内含子序列(图 2),它们在基因组水平已经完成了 VDJ 的重组,这表明该类受体多样性减少,可能更有利于识别专一的抗原类型。同线性分析表明北京鸭第二个 *TCR δ* 位点的 5'端与鸡的第二个 *TCR δ* 位点 5'端具有染色体同线性关系^[14],暗示这 2 个 *TCR δ* 位点产生的机制可能相似(图 4)。北京鸭第二个 *TCR δ* 位点基因在 21 日龄的北京鸭中主要表达在肺脏、小肠和法氏囊中,而 120 日龄的北京鸭主要表达在大肠和胸腺(图 5)。法氏囊是禽类的中枢免疫器官,其大小随年龄有显著变化,性成熟后逐渐消失。随着日龄的增加,北京鸭第二个 *TCR δ* 位点基因的表达量在法氏囊中降低;胸腺作为重要的免疫器官,是 T 细胞成熟和分化的场所,随着日龄的增加北京鸭第二个 *TCR δ* 位点基因的表达量在胸腺中增加。

对北京鸭第二个 *TCR δ* 位点上基因进化分析显示,所有鸟类的 *C δ* 基因聚在同一支上(图 6),所有鸟类的 *VH δ* 基因共同聚在一起(图 7),可见鸟类的祖先中已经有了第二个 *TCR δ* 位点的出现。但是在

进化过程有些鸟类的 *C δ 1* 基因聚在一起,*C δ 2* 基因聚在另外一支,表明这些鸟类的 2 个 *C δ* 基因在其祖先中存在。而有些鸟类的 2 个 *C δ* 基因,它们自身基因的相似性要高于与其他物种 *C δ* 基因的相似性,说明这种 *C δ* 的复制发生在较晚的时期,是在物种分化后又进行复制的;复制的同时他们丢失了祖先的另外一个 *C δ* 基因。因此,不同的鸟类在选择第二个 *TCR δ* 位点上的基因时,可能经历了不同的进化历程。

4 结 论

本研究利用北京鸭基因组 BAC 文库,筛选得到了含有北京鸭第二个 *TCR δ* 位点的阳性克隆。BAC 全长测序为 136 Kb,对 BAC 序列上的基因进行分析,与鸡和火鸡第二个 *TCR δ* 位点上的基因不同,北京鸭第二个 *TCR δ* 位点上的 *VH δ* 、*D δ* 和 *J δ* 之间没有内含子序列,他们在基因组水平已经完成了 VDJ 的重组;同线性分析表明北京鸭第二个 *TCR δ* 位点的 5'端与鸡的第二个 *TCR δ* 位点 5'端具有染色体同线性关系;组织特异性表达结果揭示了北京鸭第二个 *TCR δ* 位点上的基因在不同日龄个体中的表达特点;对北京鸭第二个 *TCR δ* 位点上基因进化的分析揭示了鸟类第二个 *TCR δ* 位点的进化过程。本研究通过对北京鸭第二个 *TCR δ* 位点的分析,一方面可以更好的理解鸟类第二个 *TCR δ* 位点的进化;另一方面也为了了解鸭免疫系统提供一定的理论基础。

参考文献 References

- [1] Hulse-Post D J, Sturm-Ramirez K M, Humberd J, Seiler P, Govorkova E A, Krauss S, Scholtissek C, Puthavathana P, Buranathai C, Nguyen T D, Long H T, Naipospos T S, Chen H, Ellis T M, Guan Y, Peiris J S, Webster R G. Role of domestic ducks in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H₅N₁ influenza viruses in Asia[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102 (30): 10682-10687
- [2] Sturm-Ramirez K M, Hulse-Post D J, Govorkova E A, Humberd J, Seiler P, Puthavathana P, Buranathai C, Nguyen T D, Chaisingh A, Long H T, Naipospos T S, Chen H, Ellis T M, Guan Y, Peiris J S, Webster R G. Are ducks contributing to the endemicity of highly pathogenic H₅N₁ influenza virus in Asia? [J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(17): 11269-11279

- [3] Hulse-Post D J, Franks J, Boyd K, Salomon R, Hoffmann E, Yen H L, Webby R J, Walker D, Nguyen T D, Webster R G. Molecular changes in the polymerase genes (PA and PB1) associated with high pathogenicity of H₅N₁ influenza virus in mallard ducks[J]. *Journal of Virology*, 2007, 81(16): 8515-8524
- [4] Barber M R W, Aldridge J R, Webster R G, Magor K E. Association of RIG-I with innate immunity of ducks to influenza[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(13): 5913-5918
- [5] Reddy S T. The patterns of T-cell target recognition [J]. *Nature*, 2017, 547(7661): 36-38
- [6] Rast J P, Anderson M K, Strong S J, Luer C, Litman R T, Litman G W. α , β , γ and δ T cell antigen receptor genes arose early in vertebrate phylogeny[J]. *Immunity*, 1997, 6(1): 1-11
- [7] Olivieri D N, von Haefen B, Sánchez-Espinel C, Faro J, Gambón-Deza F. Genomic V exons from whole genome shotgun data in reptiles[J]. *Immunogenetics*, 2014, 66(7-8): 479-492
- [8] Wang K, Klotz J L, Kiser G, Bristol G, Hays E, Lai E, Gese E, Kronenberg M, Hood L. Organization of the v gene segments in mouse T-cell antigen receptor α/δ locus[J]. *Genomics*, 1994, 20(3): 419-428
- [9] Parra Z E, Baker M L, Lopez A M, Trujillo J, Volpe J M, Miller R D. TCR μ recombination and transcription relative to the conventional TCR during postnatal development in opossums [J]. *The Journal of Immunology*, 2009, 182(1): 154-163
- [10] Wang X X, Parra Z E, Miller R D. Platypus TCR μ provides insight into the origins and evolution of a uniquely mammalian TCR locus[J]. *The Journal of Immunology*, 2011, 187(10): 5246-5254.
- [11] Criscitiello M F, Saltis M, Flajnik M F. An evolutionarily mobile antigen receptor variable region gene: Doubly rearranging NAR-TCR genes in sharks[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(13): 5036-5041
- [12] Parra Z E, Lillie M, Miller R D. A model for the evolution of the mammalian T-cell receptor α/δ and μ loci based on evidence from the duckbill platypus[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2012, 29(10): 3205-3214
- [13] Parra Z E, Ohta Y, Criscitiello M F, Flajnik M F, Miller R D. The dynamic TCR δ ; TCR δ chains in the amphibian *Xenopus tropicalis* utilize antibody-like v genes[J]. *European Journal of Immunology*, 2010, 40(8): 2319-2329
- [14] Parra Z E, Mitchell K, Dalloul R A, Miller R D. A second TCR δ locus in galliformes uses antibody-like v domains: Insight into the evolution of TCR δ and TCR μ genes in tetrapods [J]. *The Journal of Immunology*, 2012, 188(8): 3912-3919
- [15] Parra Z E, Baker M L, Schwarz R S, Deakin J E, Lindblad-Toh K, Miller R D. A unique T cell receptor discovered in marsupials [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(23): 9776-9781

责任编辑: 杨爱东