

香鱼 *LECT2* 基因的克隆及其组织表达差异

杨红艳 陈炯* 史雨红 李凌云

(宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室, 宁波 315211)

摘要 *LECT2* (leukocyte cell-derived chemotaxin 2)是一个多功能的蛋白质, 其与细胞生长、分化、损伤修复及免疫等过程相关。本研究通过设计简并引物, 从香鱼肝脏 cDNA 文库中筛选 *LECT2* 基因, 该基因 cDNA 序列全长 547 个核苷酸, 3' 末端具有 polyA 尾, 单一大开读框编码一个由 156 个氨基酸组成的分子量为 17 kDa 的蛋白质。序列分析及系统进化树分析均表明, 香鱼 *LECT2* 与虹鳟 *LECT2* 最相似, 且各物种 *LECT2* 的进化关系与目前接受的物种分类关系基本一致。香鱼 *LECT2* 基因在香鱼许多组织中均有表达, 而肝脏中的表达量最高, 肾脏和脑中的表达量也较高。

关键词 *LECT2*; 克隆; 序列分析; mRNA 表达谱

LECT2 (leukocyte cell-derived chemotaxin 2)最早分离自人 T 细胞 SKW-3 株培养液, 它具有嗜中性粒细胞趋化活性^[1]。人 *LECT2* 分子量为 16 kDa, 含三个分子二硫键, 在人肝脏中特异表达并分泌到血液中^[2]。新近的研究揭示, *LECT2* 可能是一个多功能的蛋白, 其与细胞生长、分化、损伤修复及免疫等过程相关^[3-6]。近年来, 采用同源克隆和 EST 等分子生物学技术, 人们已克隆并测定了牛(*Bos taurus*)^[2]、小鼠(*Mus musculus*)^[7]、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)^[8]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[9]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[5]和大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)^[6]等物种的 *LECT2* 基因。

香鱼(*Plecoglossus altivelis*)是东亚地区如中国、日本和朝鲜等国特有的一种中小型名贵鱼类, 虽然其养殖面积逐年扩大, 但高密度的人工养殖导致病害频发, 这些病害已成为制约香鱼养殖产业发展的瓶颈。因此, 对香鱼免疫相关基因的研究日益受到重视^[10,11]。研究表明, 杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)急性侵染试验中, 染病斑马鱼的肝脏中 *LECT2* mRNA 水平上升高达 1 000 倍^[5]; 溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)侵染的大黄鱼肝脾中 *LECT2* mRNA 表达水平也有显著增加^[6], 这些结果提示 *LECT2* 在鱼类免疫过程中可能起着重要作用。因此, 本文拟克隆香鱼 *LECT2* (*aLECT2*)基因 cDNA 序列, 并检测其组织表达差异性, 从而为进一步研究鱼类 *LECT2* 的结构、功能和作用机制打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康香鱼 5 尾, 个体体重 20~25 g, 购自宁波水产大世界。

1.1.2 菌株、载体和质粒 大肠杆菌 TG1 菌株和载体 pBluescript SKII (+)由本实验室保存。

1.1.3 主要试剂及耗材 T_4 DNA 连接酶、RNAiso 试剂、Oligotex-dT30 <super> mRNA Purification Kit、限制性内切酶、ExTaq DNA 聚合酶和 cDNA Library Construction Kit 等均购自 TaKaRa 公司; Gel Extraction Kit 购自 Omega 公司。

1.1.4 引物合成及序列测定 引物合成及序列测定由上海英骏生物工程公司完成。

1.2 方法

1.2.1 香鱼 *LECT2* 基因 cDNA 序列的获得 用 RNAiso 试剂提取香鱼肝脏总 RNA, 用 Oligotex-dT30 <super> 纯化 mRNA, 以其为模板, 采用 cDNA Library Construction Kit 构建香鱼肝 cDNA 文库, 方法参照厂家说明。根据已报道的动物 *LECT2* 保守序列设计简并引物 dL (+): 5'-GTXTAYGCXCCXTTYGAYGT-3', 其中 X=A, T, C, G; Y=T, C。随机挑选 287 个克隆, 用 dL (+)和文库载体质粒 pBluescript SKII (+)引物 T7 配对做 PCR 检测, 阳性克隆测序并经 BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)分析。

1.2.2 序列分析 信号肽序列预测采用 SignalP 3.0^[12], 多重序列比对采用 ClustalW 程序([http://](http://www.ebi.ac.uk/Tools/ClustalW/)

收稿日期: 2008-11-05 接受日期: 2009-02-25

国家 973 前期研究专项(No.2008CB117015)、长江学者和创新团队发展计划(No.IRT0734)和宁波市科技局项目(No.2007C10081)资助

* 通讯作者。Tel: 0574-87609571, Fax: 0574-87600167, E-mail: jchen1975@163.com

clustalw.ddbj.nig.ac.jp/), 系统进化树分析采用 MEGA 4.0 [13]。

1.2.3 RT-PCR 方法分析 *LECT2* 基因在各组织中的表达差异

香鱼肝、脾、肾、脑、心、鳃、肌肉和肠等各组织总 RNA 提取和第一链 cDNA 合成如前所述。根据获得的香鱼 *LECT2* 全长基因序列设计特异引物, aLect2 test (+): 5'-CAGTCTGGTCC-TTGCAGAGC-3' 和 aLect2 test (-): 5'-ACTTGGTG-GGGTCAGACTTG-3', 预期扩增片段长度为 440 bp; 根据 GenBank 中香鱼 β -肌动蛋白看家基因序列 (AB020884) 设计特异引物, pActin2 (+): 5'-TCG-TGCGTGACATCAAGGAG-3' 和 pActin2 (-): 5'-CGCACTTCATGATGCTG TTG-3', 预期扩增片段长度为 231 bp。应用上述引物, 以香鱼各组织第一链 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, UVP 凝胶成像系统采集图像。

2 结果

2.1 香鱼 *LECT2* 基因 cDNA 序列分析

287 个随机挑选的克隆, 经 dL (+)/T7 引物对扩增检测, 共筛选到 8 个阳性克隆, 经部分序列测定, 这些序列彼此间同源性 >99%, BLASTP 搜索表明, 与已报道的鱼类 *LECT2* 相似性最高。随即测通了最长插入片段的一个克隆 pBS-aLECT2-5, 获得了香鱼 *LECT2* 基因 cDNA 序列 (EMBL 登录号 FM253748)。序列长 547 个核苷酸, 3' 末端具有 polyA 尾。计算机分析表明, 该序列含一个大的开读框, 起始于第 34~36 位的一个 ATG 起始密码子, 终止于第 502~504 位的一个 TGA 终止密码子, 编码一个由 156 个氨基酸组成、分子量为 17 kDa 的蛋白质, N 端 21 个氨基酸为信号肽序列 (图 1)。

cDNA 序列的 3' 端非编码区长 43 个核苷酸, 短于虹鳟^[9] (210 个核苷酸) 和大黄鱼^[6] (112 个核苷酸) 相应序列, 多腺苷酸化信号序列 “AATAAA” 位于第 529~534 位。氨基酸序列比较表明, aLECT2 与虹鳟 *LECT2* 同源性最高, 达 77.6%, 与青黑斑河豚 (*Tetraodon nigroviridis*)、大黄鱼、鲤鱼和斑马鱼 *LECT2* 的同源性分别为 70.9%、69.5%、59.6% 和 55.8%。系统进化树分析表明, 哺乳动物和鱼类 *LECT2* 分别成簇, aLECT2 与虹鳟 *LECT2* 进化相关性最高 (图 2), 各物种 *LECT2* 的进化关系与目前接受的物种分类关系基本一致, 揭示了 *LECT2* 在动物进化过程中的保守性 (图 2)。

2.2 香鱼 *LECT2* 基因在各组织中的表达

在所有检测的香鱼组织中, 引物 aLect2 test (+)/aLect2 test (-) 均成功扩增到特异性的 440 bp 片段, 表明香鱼 *LECT2* 基因的转录在鱼类组织中广泛存在, 而肝脏中表达量最高, 肾脏和脑中也有较高水平的表达 (图 3)。

3 讨论

在本研究中, 我们测定了香鱼 *LECT2* 基因的 cDNA 序列, 预测的香鱼 *LECT2* 由 156 个氨基酸组成, N 端为 21 个氨基酸的信号肽。香鱼 *LECT2* 与其他已报道的鱼类 *LECT2* 高度相似, 与虹鳟 *LECT2* 同源性最高, 达 77.6%, 成熟 *LECT2* 除 N 末端序列相对可变外, 其余区域高度保守。并且在一定程度上, 不同动物 *LECT2* 的关系与物种进化吻合, *LECT2* 在不同动物中的广泛分布以及序列的高度相似性揭示, 该蛋白质可能在动物的生命活动中有重要的作用。

LECT2 最初被鉴定为趋化因子, 但越来越多的研究表明, *LECT2* 更类似于细胞因子, 是一个多功能的

	ATCTGTACCCAGAGTACTGCTACCACTTCATC	33
	ATGAAAGCAGCTGTTTATCTGTTTCAGTCTGGTCTTGCAGAGCTGCTGTTGGGAGGAGAGCGAGTAACGTTTGGCCAGTTC	114
	M K A A V Y L F S L V L A E L L L G G E A V T F G Q F	27
	TGCAGTGAACACCAACAACAGGAAGAGGACTTCTGACAAATGGGACAAGGAAGCTACGGAGCAAGCCGAGGTGACAGA	195
	C S G N T N N R K R T S D K W G Q G S Y G A S R G D R	54
	GACCACCTCGGCTGGACGTAGTTTGCAGGACGGGGCTGTGTCTACGCTCCCTTTGACGTCAAGCTGAACGGCAAAGTT	276
	D H L G L D V V C Q D G A V V Y A P F D V K L N G K V	81
	GTCGTTTACACCGACCCCAAGAAGGCCGCCATTAACAACGGCATCAACCTCAGCGGGGAAGGTTTGTGCTTCAAAGTTC	357
	V V Y T D P K K A A I N N G I N L S G E G L C F K L F	108
	TACGTGAAGCCAGACAAGTACTCTGGAGAAGTAAAGAAGGGCAGCAGGTTGGGCACCATGTTGCCATGCAATCTGTCTAC	438
	Y V K P D K Y S G E V K K G D R L G T M L P M Q S V Y	135
	CCCGGCATCACCTCACATCCATGTGCAGATGTGGCACAAGTCTGACCCCAAGTACTTCTGATGACCTTTGACCCCTG	519
	P G I T S H I H V Q M C D K S D P T K Y F *	156
	TGTCAGCTT <u>AATAAA</u> CGGATGTGCATCAAAAAAAAAAAAAAAAAA	565

Fig.1 Nucleotide sequences of ayu *LECT2* cDNA and deduced amino acid sequences

Shaded box showed the signal peptide, and underlined sequence was the typical polyadenylation signal.

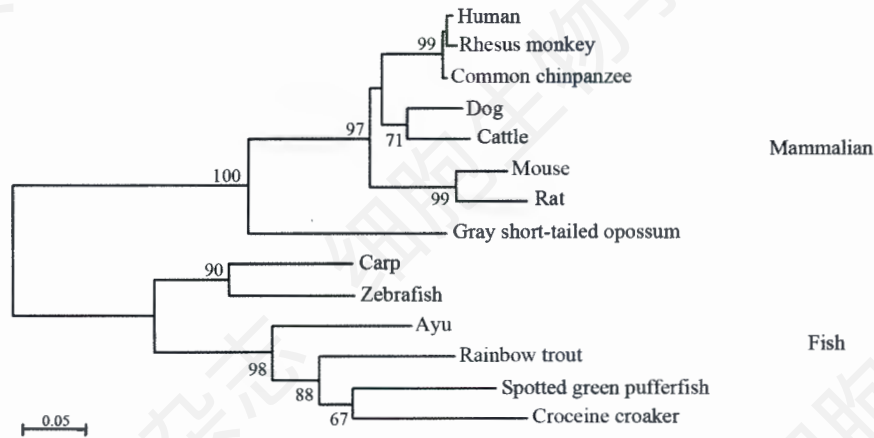


Fig.2 Phylogenetic analysis on the amino acid sequences of animal *LECT2* using Neighbor-Joining method

The values at the forks indicate the percentage of trees in which this grouping occurred after bootstrapping the data (1 000 replicates; shown only when >70%). The scale bar shows the number of substitutions per base. Accession numbers of sequences used are ayu, FM253748; croceine croaker, AM709638; spotted green pufferfish, CAAE01014623; rainbow trout, AF271114; carp, AB027192; zebrafish, NM_001048055; mouse, NM_010702; rhesus monkey, XM_001111039; human, NM_002302; common chimpanzee, XM_517944; dog, XM_531913; cattle, NM_174380; rat, XM_341486; gray short-tailed opossum, XM_001366934.

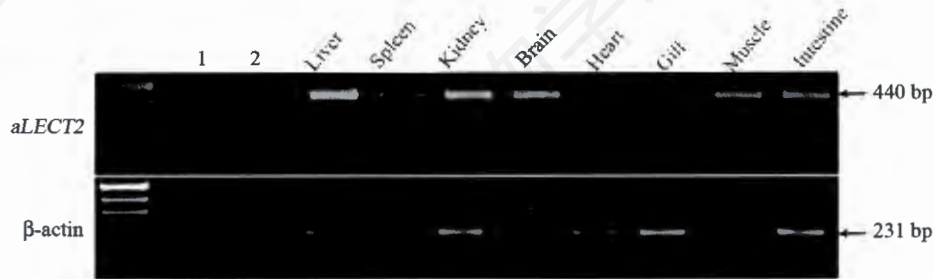


Fig.3 RT-PCR analysis of *aLECT2* mRNA expression in various tissues of healthy ayu

1: ayu genomic DNA as template; 2: negative control. The size of the products is shown on the right. pUC19 DNA/*Msp*I marker was used, and the size of band (up to below) means 501 (489), 404, 331, 242, 190, 147 and 111 (110) bp respectively.

蛋白质, 例如, *LECT2* 能以 WNT 信号通路抑制物的方式起作用^[14], 而已知 WNT 信号通路调节细胞生长、迁移和分化, 在肿瘤发生中有重要意义, *LECT2* 还能直接抑制类风湿性关节炎(collagen antibody-induced arthritis, CAIA)的发展^[15]、触发肝再生的早期事件^[16,17]、影响夏科氏利什曼原虫(*Leishmania chagasi*)的感染^[18]等。然而, *LECT2* 的功能及其作用机制仍不明确, 特别是在鱼类等低等动物中研究更少, 最近的研究表明, *LECT2* 在鱼类对病原菌感染的免疫应答过程中有重要作用^[5,6]。在本研究中我们发现香鱼 *LECT2* 基因在香鱼许多组织中均有表达, 而人和牛的 *LECT2* 基因只在肝脏中表达^[2], 提示低等生物 *LECT2* 的作用可能更加广泛。香鱼 *LECT2* 序列的测定以及其组织表达差异的研究, 为我们进一步研究鱼类 *LECT2* 的结构、功能和作用机制打下基础。

参考文献(References)

- [1] Yamagoe S, Yamakawa Y, Matsuo Y, *et al.* Purification and primary amino acid sequence of a novel neutrophil chemotactic factor *LECT2*, *Immunol Lett*, 1996, 52(1): 9-13
- [2] Yamagoe S, Mizuno S, Suzuki K. Molecular cloning of human and bovine *LECT2* having a neutrophil chemotactic activity and its specific expression in the liver, *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1396(1): 105-113
- [3] Hiraki Y, Inoue H, Kondo J, *et al.* A novel growth-promoting factor derived from fetal bovine cartilage, chondromodulin II. Purification and amino acid sequence, *J Biol Chem*, 1996, 271(37): 22657-22662
- [4] Saito T, Okumura A, Watanabe H, *et al.* Increase in hepatic NKT cells in leukocyte cell-derived chemotaxin 2-deficient mice contributes to severe concanavalin A-induced hepatitis, *J Immunol*, 2004, 173(1): 579-585
- [5] Lin B, Chen S, Cao Z, *et al.* Acute phase response in zebrafish upon *Aeromonas salmonicida* and *Staphylococcus aureus* infection: striking similarities and obvious differences with

- mammals, *Mol Immunol*, 2007, 44(4): 295-301
- [6] Li MY, Chen J, Shi YH. Molecular cloning of leucocyte cell-derived chemotaxin-2 gene in croceine croaker (*Pseudosciaena crocea*), *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 24(2): 252-256
- [7] Yamagoe S, Watanabe T, Mizuno S, et al. The mouse LECT2 gene: cloning of cDNA and genomic DNA, structural characterization and chromosomal localization, *Gene*, 1998, 216(1): 171-178
- [8] Fujiki K, Shin DH, Nakao M, et al. Molecular cloning of carp (*Cyprinus carpio*) leucocyte cell-derived chemotaxin 2, glia maturation factor β , CD45 and lysozyme C by use of suppression subtractive hybridization, *Fish Shellfish Immunol*, 2000, 10(7): 643-650
- [9] Kokkinos PA, Kazantzi A, Sfyroera G, et al. Molecular cloning of leucocyte cell-derived chemotaxin 2 in rainbow trout, *Fish Shellfish Immunol*, 2005, 18(5): 371-380
- [10] Chen J, Shi YH, Li MY, et al. Molecular cloning of liver angiotensinogen gene in ayu (*Plecoglossus altivelis*) and mRNA expression changes upon *Aeromonas hydrophila* infection, *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 24(5): 659-662
- [11] Uenobe M, Kohchi C, Yoshioka N, et al. Cloning and characterization of a TNF-like protein of *Plecoglossus altivelis* (ayu fish), *Mol Immunol*, 2007, 44(6): 1115-1122
- [12] Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, et al. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0, *J Mol Biol*, 2004, 340(4): 783-795
- [13] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0, *Mol Biol Evol*, 2007, 24(8): 1596-1599
- [14] Pheffe TJ, Parry L, Reed KR, et al. Deficiency of Mbd2 attenuates Wnt signaling, *Mol Cell Biol*, 2008, 28(19): 6094-6103
- [15] Okumura A, Saito T, Otani I, et al. Suppressive role of leucocyte cell-derived chemotaxin 2 in mouse anti-type II collagen antibody-induced arthritis, *Arthritis Rheum*, 2008, 58(2): 413-421
- [16] Sato Y, Watanabe H, Kameyama H, et al. Changes in serum LECT2 levels during the early period of liver regeneration after adult living related donor liver transplantation, *Transplant Proc*, 2004, 36(8): 2357-2358
- [17] Ohtomi M, Nagai H, Ohtake H, et al. Dynamic change in expression of LECT2 during liver regeneration after partial hepatectomy in mice, *Biomed Res*, 2007, 28(5): 247-253
- [18] Jeronimo SM, Holst AK, Jamieson SE, et al. Genes at human chromosome 5q31.1 regulate delayed type hypersensitivity responses associated with *Leishmania chagasi* infection, *Genes Immun*, 2007, 8(7): 539-551

Molecular Cloning and mRNA Expression Profiles of Leukocyte Cell-derived Chemotaxin 2 Gene (*LECT2*) in Ayu (*Plecoglossus altivelis*)

Hong-Yan Yang, Jiong Chen*, Yu-Hong Shi, Ming-Yun Li

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract Leukocyte cell-derived chemotaxin 2, also known as *LECT2*, is a protein related with multifunctional roles in cell growth, differentiation, damage/repair process and carcinogenesis to autoimmune diseases. A full-length cDNA clone of the *LECT2* gene, 547 bp in size, 3'-end with a polyA tail, encoding a protein of 156 amino acids with a molecular weight of 17 kDa, was isolated from the fish ayu (*Plecoglossus altivelis*). Sequence comparison and phylogenetic analysis shows that ayu *LECT2* (*aLECT2*) is most similar to rainbow trout *LECT2*, and the relationships of the different *LECT2* coincided well with the evolutionary relationships of their organisms. The mRNA level of *aLECT2* was highest in liver and moderately high in kidney and brain.

Key words *LECT2*; clone; sequence analysis; mRNA expression profiles

Received: November 5, 2008 Accepted: February 25, 2009

This work was supported by the National Basic Special Pre-research (973 Program) of China (No.2008CB117015), the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (No.IRT0734) and the S&T Program of Ningbo Sci-Tech Bureau (No. 2007C10081)

*Corresponding author. Tel: 86-574-87609571, Fax: 86-574-87600167, E-mail: jchen1975@163.com