

合作小型猪 T 细胞受体 α 链的基因结构及其多样性

高建平^{1,2}, 李玩生¹, 曾爽¹, 房永祥¹, 冯海燕¹, 杨孝朴², 景志忠^{1,2}

(1. 中国农业科学院兰州兽医研究所, 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 农业部兽医公共卫生重点实验室, 兰州 730046; 2. 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070)

【摘要】 目的 探讨猪 TCR 基因分子结构的复杂性及其与人类的相似性。方法 以公开的猪 TCR α 链基因为参考序列设计两对特异性引物, 用 RT-PCR 法从合作小型猪外周血、淋巴结和脾脏的淋巴细胞中克隆了 93 个猪 TCR α 基因(简称 STA)。结果 测序分析表明, 克隆的猪 TCR α 链的基因均含有可变的信号肽区和 V 区、高变的 J 区和恒定的 C 区的基因片段, 但基因间的核苷酸序列组成都不完全相同, 且具有十分复杂的多态性和多样性, 基因间的同源性在 68.4% ~ 98.7%, 这与 TCR α 链的基本基因结构特征相一致。依据 TCR α 基因的同源性对其分子结构、遗传演化关系和归类分析发现, 在其信号肽区、FR1 区和 CDR1 区、FR2 区和 CDR2 区以及 FR3 区和 CDR3 区都存在一些变异集中点和变异热点区。用 IMGT/V-QUEST 分析方法可将合作小型猪 TCR α V 区(STAV)、J 区(STAJ) 基因片段与人类的进行比较分析, 发现合作小型猪 TCR α 与人类的遗传演化关系较近, 每个序列都能找到与人类对应的 TRAV、TRAJ 基因片段, 甚至 V 区的相似性可达 92% 以上。结论 近交培育的合作小型猪在正常状态具有应对外界复杂微生物等环境的 TCR 遗传多样性分子基础, 且适合作为人类免疫学及疾病研究的动物模型。

【关键词】 合作小型猪; TCR α 基因; 生物信息学; 多样性

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 06-0001-08

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2014.06.001

Genetic structure and diversity of T cell receptor alpha chain genes in Hezuo minipig

GAO Jian-ping^{1,2}, LI Wan-sheng¹, ZENG Shuang¹, FANG Yong-xiang¹, FENG Hai-yan¹, YANG Xiao-pu², JING Zhi-zhong^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology/Key Laboratory of Veterinary Public Health of Ministry of Agriculture/Lanzhou Veterinary Research Institute, CAAS, Lanzhou 730046, China.

2. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070)

【Abstract】 **Objective** To analyze the complexity of molecular structure in porcine T cell receptor gene and its similarity compared to humans. **Method** Based on the gene of porcine T cell receptor alpha chain (TCR α) from the GenBank database, 93 swine T cell receptor alpha chain genes (STA) were cloned by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) from porcine peripheral blood lymphocytes, lymph nodes and spleen. **Result** Sequence analysis showed that STA genes all contain a domain of variable signal peptide and V, hypervariable J and conservative C. However, nucleotide sequence of STA was not completely identical with only 68.4% to 98.7% homology among genes, and had extremely sophisticated polymorphism and diversity. This was accord with the genetic structure of TCR α chain. Molecular structure, genetic evolution and classification of these genes were carried out according to the homology of TCR α gene, which all have several sites and zones of mutation on the domain of signal peptide, FR1 and CDR1, FR2 and CDR2, FR3 and CDR3. Analysis of similarity and classification of TCR α V domain(STAV) and J domain (STAJ) of Hezuo minipig using IMGT/V-QUEST tools compared with those of humans found the genetic evolution relationship that was closer, and each of TRAV and TRAJ also found to have a corresponding fragment of humans, ever in 92% of similarity of TRAV be-

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31372423); 甘肃省技术与开发专项(1207TCYA025)。

[作者简介] 高建平(1985-), 硕士研究生, 主要从事生物技术产品研究与生产工作。

[通讯作者] 景志忠, 博士生导师, 研究员, 主要从事人兽共患病及病原与宿主分子生物学和免疫学研究。Tel: 0931-8341979; E-mail: zhizhongj@163.com

tween swine and humans. **Conclusion** Our results indicate that inbred Hezuo minipig possesses genetic diversity against complicated environment of microbes in healthy status, and Hezuo minipig is suitable as an animal model for research on human immunology and diseases.

【Key words】 Hezuo minipig; Gene of TCR α chain; Bioinformatics; Diversity; Genetics

由于猪的解剖学和生理学与人极为相似,除用于兽医学研究之外,已广泛用于人类的生理学、生物学及特有疾病的研究。但由于普通猪的体型过大,并不利于其微生物控制和实验操作,所以小型猪的培育及应用成为国内外研究的方向^[1]。合作猪是我国青藏高原地区珍贵的地方品种种质资源,与目前已开发的各种实验用小型猪相比具有诸多独特的生物学特性^[2]。我们实验室经过 10 多年对合作猪的近交培育,初步获得了 3 个家系的小型猪用于疫病病原致病机制研究。由于小型猪的遗传特性特别是免疫遗传学特征与抗病性关系密切,故开展了其免疫相关关键分子如 T 细胞受体(TCR)、主要组织相容性复合物(MHC)以及细胞因子家族等分子的基因结构研究,拟为其基础和应用研究提供依据。

T 细胞是一类介导细胞免疫和调节免疫应答的关键活性细胞,其细胞表面有多种不同的标志,其中 TCR 作为一种细胞表面受体在获得性免疫功能中发挥着非常重要的作用^[3]。多数 TCR 是由 α 、 β 肽链组成的异二聚体即 TCR $\alpha\beta$ 。在病原抗原识别上,TCR $\alpha\beta$ 可特异地识别由抗原递呈细胞(APC)表面 MHC I 类或 MHC II 类分子呈递的抗原肽,从而启动获得性免疫反应。TCR 基因具有大量的 V 区和一些 D 区以及 J 区,在重排的过程中,不同的组合以及结合过程中核苷酸的随机插入(N 区)等可以构成大量的识别不同抗原的 TCR 库^[3-5]。

20 世纪 80 年代以来,TCR 的研究大多集中在小鼠和人类,猪的研究很少^[5-8]。随着对免疫学研究的不断深入,研究人员发现家畜如猪、牛和羊与小鼠和人类的免疫细胞在种类和组成比例上有明显的差异^[9-10],TCR 作为 T 细胞的关键识别分子是否相同还不完全清楚。鉴于此,本研究开展了猪淋巴细胞的 TCR α 链基因(简称 STA 基因)克隆和生物学信息学分析工作,以明确合作猪 TCR α 链的基因结构和多样性特征,为猪病防控以及作为人类生命科学研究的动物模型提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

JM109 菌种、ThermoScript TM RT-PCR kit、Trizol

reagent 等均购自 Invitrogen 公司; pGEM-Teasy 载体、T4 ligase 等购自 Promega 公司; rTaq 酶、EcoR I 酶、DNA 片段凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒等均购自宝生物工程(大连)有限公司; DNA marker DL2000 购自广州东盛生物技术有限公司;淋巴细胞分离液购自上海生工生物工程有限公司。

试验猪:本实验室【SYXK(甘)2010-0001】。近交培育的合作小型猪(F8),3 月龄 1 公 1 母。

1.2 方法

1.2.1 淋巴细胞的分离与培养

无菌采集小型猪新鲜外周血、肠系膜淋巴结和脾脏,淋巴细胞的分离、计数和培养见文献 4。

1.2.2 总 RNA 的提取

取上述分离的细胞,用 Invitrogen 公司的 Trizol reagent 提取试剂盒提取总 RNA,操作方法严格按试剂盒使用说明书进行,提取的总 RNA 置 -70°C 备用。

1.2.3 引物设计与合成

参照 NCBI/GenBank 上公开的猪 T 细胞受体 α 链基因序列(STA1:AB087988;STA2:AB087990),用 Oligo6.0 软件在其阅读框两端设计两对特异性引物。引物序列合成如下:STA1 参考序列上游引物 T1:5'-TGCTTCCTGCCACTCACTCAGT-3',下游引物 T2:5'-GCGGCTGTGGTCCAGCTGA-3';STA2 参考序列上游引物:T3:5'-ATGAAGCCCACCCTCATCTCA-3',下游引物:T4:5'-TCAGCTGGACCACAGCCG-3'。

1.2.4 RT-PCR 反应

在 0.5 mL PCR 反应管中加入如下试剂进行反转录:RNA 悬液 2 μL , Oligo(dT)20 (50 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , 10 mmol/LdNTPMix 2 μL , DEPC 水 7 μL ,混匀后 70°C 预变性 5 min,瞬时离心后迅速置于冰上;然后加入 5 \times cDNA 合成缓冲液 4 μL , 0.1 mol/L DTT 1 μL , ThermoScriptTMRT (15 U/ μL) 1 μL , RNase-OUTTM (40 U/ μL) 1 μL , DEPC 水 1 μL ,置微量离心机离心混匀后, 55°C 水浴反应 45 min, 85°C 灭活 5 min;然后加入 RNase-H (2 U/ μL) 1 μL , 37°C 20 min,反转录产物置于 -20°C 保存备用。

1.2.5 PCR 反应

在 25 μL 反应体系中加入反转录产物 0.3 μL , 10 \times buffer I 2.5 μL , 2.5 mmol/L dNTP mixture 4 μL , T_1/T_3 上游引物和 T_2/T_4 下游引物 (50 pmol/ μL) 各 0.25 μL , 灭菌去离子水 17.45 μL , rTaqDNA 聚合酶 0.25 μL 。扩增参数为: 94 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^\circ\text{C}$ 1 min, 65 ~ 67 $^\circ\text{C}$ 50 s, 72 $^\circ\text{C}$ 90 s, 35 个循环后 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。

1.2.6 克隆与鉴定

PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 回收目的 DNA 片段, 与 pGEM-T easy 载体相连接, 转化 JM109 感受态细胞, 然后涂布含氨苄青霉素 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的平板, 挑取单个菌落, 接种 LB 中 37 $^\circ\text{C}$ 振荡培养过夜, 提取的质粒经凝胶电泳及 *EcoR I* 酶切鉴定后, 送上海生物工程有限公司测序。

1.2.7 生物信息学分析

利用 SignalP 3.0 Server-prediction、DNASar、SMART、IMGT/V-QUEST 等生物软件, 应用生物信息学方法对克隆分子的遗传演化关系和序列结构进行预测分析。

2 结果与分析

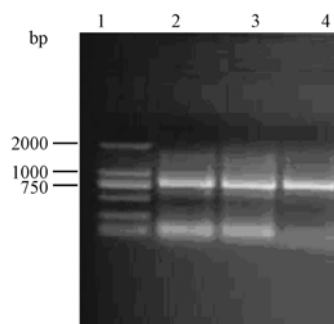
2.1 STA 基因的扩增与序列分析

将 STA1 和 STA2 参考序列的特异性引物扩增的产物进行电泳分析, 结果均可见在 750 ~ 1000 bp 之间出现一条特异性扩增条带 (图 1、图 2)。将克隆片段的阳性质粒测序, 所得的基因序列通过与参考序列的比对以及 BLAST 的同源性搜索后确定, 克隆的 93 个基因序列为猪 T 细胞受体 α 链基因, 统一命名为 STA1-STA93, 其中基因克隆 STA1-STA68 来自猪外周血淋巴细胞, STA69-STA78 来自猪肠系膜淋巴结, STA79-STA93 来自脾脏淋巴细胞。

将 93 个基因序列整体分析发现, 其中 79 个序列含有较大的完整的开放阅读框, 14 个序列只含一个较小的开放阅读框, 这些阅读框较小的序列主要扩增自猪外周血和脾脏的淋巴细胞。

2.2 STA 基因的同源性比较

利用 DNASar 和 MEGA 等软件进行同源性分析发现, STA1 ~ 93 基因间核苷酸的同源性在 68.4% ~ 98.7% 之间 (见 STA1 ~ 16 分析表 1, 其他略)。根据核苷酸同源性比对结果, 将 STA1 ~ 5、STA11、STA13 ~ 18、STA20、STA23 ~ 25、STA27 ~ 28、STA46 ~ 68、STA91 ~ STA93 归为一亚类, 将其余的 49 个基因序列再归为一亚类, 分别命名为 STAI 和

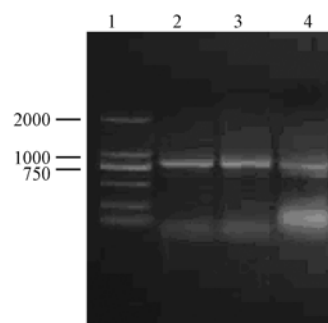


注: 1. DNA 分子质量标准; 2. 猪外周血 STA1 PCR 产物; 3. 猪淋巴结 STA1 PCR 产物; 4. 猪脾脏 STA1 PCR 产物。

图 1 猪 STA1 基因扩增产物电泳分析

Note. 1. DNA marker DL2000; 2. PCR products of STA1 from peripheral blood; 3. PCR products of STA1 from lymph node; 4. PCR products of STA1 from spleen.

Fig. 1 Electrophoresis of PCR products of STA1



注: 1. DNA 分子质量标准; 2. 猪外周血 STA2 PCR 产物; 3. 猪淋巴结 STA2 PCR 产物; 4. 猪脾脏 STA2 PCR 产物。

图 2 猪 STA2 基因扩增产物电泳分析

Note. 1. DNA marker DL2000; 2. PCR products of STA1 from peripheral blood; 3. PCR products of STA2 from lymph node; 4. PCR products of STA2 from spleen.

Fig. 2 Electrophoresis of PCR product of STA2

STA II (图略), 这与所用的 STA1 和 STA2 特异性引物扩增无关。

2.3 STA 基因的基本结构与多样性分析

对分类的 STA I 和 STA II 基因的全长通过对比分析发现, STA I 类基因除 STA43 和 STA85 基因之外 (以下均不包括这两个基因), 基因序列在第 1 ~ 320 位差异比较小, 这一位置主要包括基因的信号肽、FR1 区、CDR1 区、FR2 区、CDR2 区和 FR3 区前部分, 为 TCR α 链的 V 区的绝大部分序列。基因间序列的主要差异集中在第 320 ~ 400 位, 这一位置包括 FR3 区后部分和 CDR3 区, 主要为 TCR α 链的 V 区的小部分序列和整个 J 区。第 401 位以后相对比较保守, 为 TCR α 链的 C 区。

表 1 STA1 ~ 16 基因核苷酸序列同源性比较

Tab. 1 Comparison of the homology of STA1 - 16 gene nucleotide sequences

基因	STA1	STA2	STA3	STA4	STA5	STA6	STA7	STA8	STA9	STA10	STA11	STA12	STA13	STA14	STA15	STA16
STA1		95.7	94.9	94.8	95.1	70.9	73.3	71.9	71.9	71.3	95.1	72.6	93.6	94.6	94.7	94.7
STA2	3.3		95.1	94.9	94.8	71.5	73.4	72.4	72.2	72.6	95.8	72.6	94.5	95.0	95.0	94.9
STA3	4.2	3.5		94.5	94.4	71.6	73.0	72.9	72.0	72.6	94.2	75.6	94.5	94.6	94.8	94.5
STA4	4.2	3.5	4.1		95.8	72.2	72.1	73.2	72.9	72.2	94.3	72.1	94.3	95.4	94.4	94.7
STA5	3.9	3.4	4.5	3.2		71.7	72.1	71.8	72.6	71.7	95.1	72.1	94.4	95.3	94.2	95.1
STA6	26.1	26.0	25.2	24.4	25.6		92.8	93.7	95.5	91.2	70.7	92.1	70.9	71.6	71.0	71.1
STA7	24.4	23.5	23.4	24.7	25.3	5.3		92.6	92.9	92.4	72.8	94.8	72.0	72.2	72.7	73.0
STA8	25.4	24.9	24.1	24.0	25.6	4.6	5.3		93.6	93.0	72.1	93.2	71.5	72.4	72.1	72.2
STA9	25.2	24.8	24.1	23.9	24.9	3.1	5.0	5.7		90.4	71.5	93.9	71.4	72.1	71.5	71.6
STA10	27.0	24.0	24.6	24.7	25.7	5.5	5.1	4.6	5.5		72.9	93.6	71.9	72.2	72.8	73.2
STA11	4.3	2.5	4.1	4.0	3.9	26.9	24.3	25.6	25.8	25.4		72.5	94.0	94.3	95.3	94.8
STA12	24.8	23.4	20.9	24.3	25.4	5.0	3.6	4.3	2.9	4.2	24.2		72.4	72.7	72.7	72.6
STA13	5.0	4.1	4.1	4.0	4.7	26.1	24.9	26.0	25.0	27.1	4.9	24.5		94.7	94.9	94.1
STA14	4.4	3.6	4.0	3.9	4.2	25.5	24.9	24.5	24.7	25.9	4.8	24.1	4.1		94.4	95.7
STA15	4.2	2.8	3.8	3.8	4.7	26.8	24.2	26.0	25.9	24.9	3.4	24.2	3.8	4.3		94.5
STA16	4.1	3.8	4.3	4.0	4.1	26.6	25.0	25.6	25.7	25.3	4.0	24.5	4.8	3.4	4.4	

对于 STA I 类基因,在信号肽区(约 1 ~ 57 位)发现有两个主要变异位点。在 FR1 区和 CDR1 区(约第 58 ~ 150 位),发现有 11 个变异位点,这一区域主要变异热点在 STA3、17、20、27、91 等基因序列。FR2 区和 CDR2 区(约第 151 ~ 250 位)发现 8 个变异位点。FR3 区和 CDR3 区(约第 251 ~ 400 位)序列的差异很大,后面将作详细分析。C 区(第 401 ~ 825 位)相对比较保守,有 21 个变异位点。

STA II 基因结构分区与 STA I 类基因基本相似。将这 49 个基因的核苷酸序列比较发现,STA22 和 STA74 与其他 47 个基因的核苷酸序列不同,在其第 45 ~ 59 位间多了 14 bp 的碱基(ATCTTCTTTTCTA)。对除这两个基因之外的 47 个基因的分析发现:在信号肽区(约第 1 ~ 57 位)主要有 5 个变异位点。在 FR1 区和 CDR1 区(约第 58 ~ 150 位),发现主要有 6 个变异位点。这一组基因的 FR2 区和 CDR2 区(约第 151 ~ 250 位)变异点比较集中,主要分布在第 166 位,另外有 17 个基因在 169 ~ 170 位多了 AT 两个碱基。同样 FR3 区和 CDR3 区(约第 251 ~ 420 位)序列的差异很大,后面将作详细分析。这类基因的 C 区(第 401 ~ 825 位)也比较保守,有 16 个变异位点。

2.4 STAV 序列与人类 TRAV 的相似性比较

在核苷酸水平,对 STA1 ~ 93 基因 V 区(STAV)用 IMGT/V-QUEST 软件与其数据库中的人类 TRAV 基因序列进行同源性分析,发现 STAV1、2、3 等 39 个基因与人类 TRAV16 * 01 的相似性最高,均在 80% 以上。STAV6、7、10 等 34 个基因与人类

TRAV18 * 01 的相似性较高,在 75% 以下。STAV8 等 13 个基因与 TRAV8-4 * 07 相似性较低,均在 65% 以下。

在氨基酸水平,将克隆的 93 个 STAV 推导编码的氨基酸序列与 IMGT 中的人类 TRAV 的进行相似性比对,发现与人类相似性最高的序列为 TRAV16 * 01、TRAV18 * 01、TRAV8-4 * 01(表 2)。选择代表性的 STAV1、STAV6、STAV21 分别作相似性分析发现,STAV1 与 TRAV16 * 01 相似性为 84.67%,STAV6 与 TRAV18 * 01 相似性为 73.3%,STAV21 与 TRAV8-4 * 01 相似性为 60.22%(图 3 ~ 5)。

2.5 STAJ 序列与人类 TRAJ 的相似性比较

同样将 88 个含有猪 STA 基因 JUNCTION 区(即连接区,简称 STAJ)的序列与人类的 TRAJ 进行同源性比较,发现与人类 TRAJ 序列同源性达 85% 以上的 STAJ 序列有 23 个,其中最高可达 92.54%。88 个 STAJ 序列按相似度对应人类 TRAJ 的有 43 个,一种人类 TRAJ 如 TRAJ10 * 01、24 * 02、36 * 01 和 48 * 01 对应的 STAJ 序列最多为 5 个,并且对应同一 TRAJ 序列如 TRAJ10 * 01 的 STAJ 间的相似度很高,但并不完全相同。对照 STAV 序列的相似度分析发现,与 STAV 序列对比结果不同的是 STAJ 序列分散度很大,两者并无相关性,这可能与人类 V 区和 J 区的分子结构组成机制不同有关(表 2,3)。

在氨基酸水平上,对 88 个 STAJ 序列进一步分析发现,这些序列的 J 区绝大部分能形成正常阅读框(in-frame),一般由 9 ~ 18 氨基酸组成。序列除前两个氨基酸均为半胱氨酸和丙氨酸,最后一个氨基

酸主要为苯丙氨酸外,其他氨基酸均有非常复杂的 一致(表 2)。
多态性变化,这一分析结果与人类 TRAJ 的结果相

表 2 STA1 ~ 50 基因 V 区、J 区推导氨基酸序列及与人类的分子结构特征比较

Tab.2 Similarity comparison of J and V domains of STA1-50 with those of humans

猪 TCR α	V 基因与等位基因 V-GENE and allele	V 区的一致性/% (nt) V-Region identity	J 基因与等位基因 J-Gene and allele	J 区氨基酸组成 AA junction	J 区阅读框 Junction frame
STA1	Homsap TRAV16 * 01	84,67 (221/261 nt)	Homsap TRAJ10 * 01	CALSVDSWRGGNKFTF	in-frame
STA2	Homsap TRAV16 * 01	84,67 (221/261 nt)	Homsap TRAJ17 * 01	CALRISAGNKLTF	in-frame
STA3	Homsap TRAV16 * 01	82,38 (215/261 nt)	Homsap TRAJ20 * 01	CAIRGTTSS#F	out-of-frame
STA4	Homsap TRAV16 * 01	84,67(221/261 nt)	Homsap TRAJ29 * 01	CAPTGSGSRQLVF	in-frame
STA5	Homsap TRAV16 * 01	85,06 (222/261 nt)	Homsap TRAJ11 * 01	CALSARNSGYKLTFF	in-frame
STA11	Homsap TRAV16 * 01	84,67(221/261 nt)	Homsap TRAJ39 * 01	CALSDRSHAGKAFTF	in-frame
STA13	Homsap TRAV16 * 01	85,06(222/261 nt)	Homsap TRAJ35 * 01	CALSPTNSGGVLHF	in-frame
STA14	Homsap TRAV16 * 01	84,67 (221/261 nt)	Homsap TRAJ34 * 01	CALTAPFSSYDKLIF	in-frame
STA15	Homsap TRAV16 * 01	84,67 (221/261 nt)	Homsap TRAJ26 * 01	CALSDAMPRV * P#	out-of-frame
STA16	Homsap TRAV16 * 01	83,91(219/261 nt)	Homsap TRAJ50 * 01	CALSDDSSYNKLMF	in-frame
STA17	Homsap TRAV16 * 01	83,52 (218/261 nt)	Homsap TRAJ15 * 01	CALPDRL * A##F	out-of-frame
STA20	Homsap TRAV16 * 01	83,14 (217/261 nt)	Homsap TRAJ40 * 01	CALRRRGSFYKIF	in-frame
STA23	Homsap TRAV16 * 01	84,67 (221/261 nt)	Homsap TRAJ36 * 01	CALSGPGTGANRLVF	in-frame
STA24	Homsap TRAV16 * 01	84,67 (221/261 nt)	Homsap TRAJ2 * 01	CALNPGATTGKFIF	in-frame
STA25	Homsap TRAV16 * 01	84,67 (221/261 nt)	Homsap TRAJ20 * 01	CALSNDYKFTF	in-frame
STA27	Homsap TRAV16 * 01	83,14 (217/261 nt)	Homsap TRAJ30 * 01	CALSDLRESANKIVF	in-frame
STA28	Homsap TRAV16 * 01	85,06 (222/261 nt)	Homsap TRAJ28 * 01	CALSRGVGSSQLTF	in-frame
STA46	Homsap TRAV16 * 01	84,67 (221/261 nt)	Homsap TRAJ43 * 01	CALDNNNDRLF	in-frame
STA47	Homsap TRAV16 * 01	84,67 (221/261 nt)	Homsap TRAJ56 * 01	CALSPSVLGTSAADDKLIF	in-frame
STA48	Homsap TRAV16 * 01	84,29 (220/261 nt)	Homsap TRAJ12 * 01	CALRDRRRFGGGYKWF	in-frame
STA49	Homsap TRAV16 * 01	84,67(221/261 nt)	Homsap TRAJ40 * 01	CALTPSGSFYKIF	in-frame
STA50	Homsap TRAV16 * 01	84,67 (221/261 nt)	Homsap TRAJ40 * 01	CALSYSGSFYKIF	in-frame
STA6	Homsap TRAV18 * 01	73,03 (195/267 nt)	Homsap TRAJ13 * 02	CAVLGGYQKLVF	in-frame
STA7	Homsap TRAV18 * 01	71,54(191/267 nt)	Homsap TRAJ48 * 01	CAMTDNYGGNMLTF	in-frame
STA8	Homsap TRAV18 * 01	55,68 (147/264 nt)	Homsap TRAJ9 * 01	CAVTAGGFKVVF	in-frame
STA9	Homsap TRAV18 * 01	56,82 (150/264 nt)	Homsap TRAJ8 * 01	CALRAGYQKLVF	in-frame
STA10	Homsap TRAV18 * 01	72,28 (193/267 nt)	Homsap TRAJ23 * 01	CAMSDLQYNQGGKLIFF	in-frame
STA12	Homsap TRAV18 * 01	72,28 (193/267 nt)	Homsap TRAJ20 * 01	CAYDDYKFTF	in-frame
STA19	Homsap TRAV18 * 01	71,91 (192/267 nt)	Homsap TRAJ33 * 01	-	-
STA26	Homsap TRAV18 * 01	56,82 (150/264 nt)	Homsap TRAJ56 * 01	CAIEGKLIF	in-frame
STA29	Homsap TRAV18 * 01	71,54(191/267 nt)	Homsap TRAJ48 * 01	CAMTDNYGGNMLTF	in-frame
STA30	Homsap TRAV18 * 01	71,16(190/267 nt)	Homsap TRAJ8 * 01	CAMTGYQKLVF	in-frame
STA31	Homsap TRAV18 * 01	73,03 (195/267 nt)	Homsap TRAJ3 * 01	CAVGSSGNKLNFF	in-frame
STA32	Homsap TRAV18 * 01	73,03 (195/267 nt)	Homsap TRAJ48 * 01	CAMTDNYGGNMLTF	in-frame
STA33	Homsap TRAV18 * 01	71,54 (191/267 nt)	Homsap TRAJ27 * 01	CAVSDGTRTDKLTFF	in-frame
STA34	Homsap TRAV18 * 01	71,91 (192/267 nt)	Homsap TRAJ53 * 01	CAVYGGSNYKLTFF	in-frame
STA35	Homsap TRAV18 * 01	70,79 (189/267 nt)	Homsap TRAJ10 * 01	CAVRDLWRGGIKFTFF	in-frame
STA36	Homsap TRAV18 * 01	72,28 (193/267 nt)	Homsap TRAJ20 * 01	CAGQV * * LQVH#F	out-of-frame
STA37	Homsap TRAV18 * 01	71,54 (191/267 nt)	Homsap TRAJ43 * 01	CAVSDPNNNDRLF	in-frame
STA38	Homsap TRAV18 * 01	71,91 (192/267 nt)	Homsap TRAJ35 * 01	CAMSDRNTGGVLHFF	in-frame
STA39	Homsap TRAV18 * 01	71,16 (190/267 nt)	Homsap TRAJ42 * 01	CAMTPNFGGSQKLTFF	in-frame
STA40	Homsap TRAV18 * 01	55,68 (147/264 nt)	Homsap TRAJ24 * 02	CAVSDGPPGDWGWKLNFF	in-frame
STA41	Homsap TRAV18 * 01	70,79 (189/267 nt)	Homsap TRAJ36 * 01	CAVSETTGANRLVFF	in-frame
STA42	Homsap TRAV18 * 01	71,54 (191/267 nt)	Homsap TRAJ43 * 01	CAVRGTDLRF	in-frame
STA44	Homsap TRAV18 * 01	70,79 (189/267 nt)	Homsap TRAJ53 * 01	CAVSEVWR * QL * #LTF	out-of-frame
STA45	Homsap TRAV18 * 01	71,54 (191/267 nt)	Homsap TRAJ42 * 01	CAVSENFSGSQKLTFF	in-frame
STA43	Homsap TRAV2 * 01	82,83 (164/198 nt)	Homsap TRAJ37 * 02	CAMGSSNTGKLVFF	in-frame
STA21	Homsap TRAV8-4 * 07	63,44 (118/186 nt)	Homsap TRAJ42 * 01	CALSLGGSQKLTLL	in-frame
STA22	Homsap TRAV8-4 * 07	60,75 (113/186 nt)	Homsap TRAJ47 * 02	CAVSDWNYGNKVIF	in-frame
STA18	No results	-	-	-	-

	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CD (56-104)
STAV1 AE000659 TRAV16*01	1 10 20	30	40 50	
	AQTVTQPEDHLSVFERSPVQVRCNYS YSG.....SFV LFWYVQYFKQHLQLLLK HI			
	AQRVTQPEKLLSVFKGAPVLEKCNYS YSG.....SFE LFWYVQYSRQLQLLLR HI			
	T	DHI ERS QV	V	PK H K
	R2-IMGT 56-65)	FR3-IMGT (66-104)		
	60	70	80 ABC	90 100
STAV1S RESIR.....GFTAHLDKKEASFHLKFPQAQEEDSAIYYC A			
AE000659 TRAV16*01S RESIK.....GFTADLNKGETSFHLKFPQAQEEDSAMYYC ALS			
	R	H D K A	S	I

图 3 STAV1 序列与人的 TRAV16 * 01 相似性分析

Fig. 3 Analysis of the homology of STAV1 amino sequences with TRAV16 * 01

	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CD (56-104)
STAV6 AE000660 TRAV18*01	1 10 20	30	40 50	
	GDSVNQTEVPVLPPEAPMTLNCYQ TTY.....SDY FFWYVQYLNKAPQLLLK GS			
	GDSVTQTEGPTLPERAALTLCYQ SSY.....STF LFWYVQYLNKEPELLLK SS			
	H V V E P M	IT	DY F	A Q G
	R2-IMGT 56-65)	FR3-IMGT (66-104)		
	60	70	80 ABC	90 100
STAV6S ANP RPKEQ.....GFQATLVKSDKTFHLKRSVQTSDSAVYY			
AE000660 TRAV18*01E NQ ETDSR.....GFQASPIKSDSSFHLEKPSVQLSDSAVYYC ALR			
	S A P RPKEQ	TLV KT	Q R T	

图 4 STAV6 序列与人的 TRAV18 * 01 相似性分析

Fig. 4 Analysis of the homology of STAV6 amino sequences with TRAV18 * 01

	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CD (56-104)
STAV21 M17685 TRAV8-4*07	1 10 20	30	40 50	
	SVNQTIEV.PVLPPEEAPLTLRCTYQT TYL.....DSY LFWYVHYFNRAPQLLLK GS			
VE.....PY LFWYVQYFNQGLQLLLK YT			
	SVNQTIEV PVLPPEEAPLTLRCTYQT TYL	DS	H RAP	GS
	R2-IMGT 56-65)	FR3-IMGT (66-104)		
	60	70	80 ABC	90 100
STAV21T ANP RAEEQ.....GFQATLVKSDKTFHLKRSVQTSDSAVYY			
M17685 TRAV8-4*07TG...ATL VKGIN.....GFEAEFRKSETSFHLTKPSAHMTDPAEYFC AV			
	NP RAEEQ	Q TLV DKT	Q R VQTS S V Y	

图 5 STAV21 序列与人的 TRAV8-4 * 07 相似性分析

Fig. 5 Analysis of the homology of STAV21 amino sequences with TRAV8-4 * 07

3 讨论

3.1 猪 TCR α 链基因的基本结构与多样性

根据 GenBank 上登录的猪 T 细胞受体 α 链的基因序列设计引物,采用 RT-PCR 技术利用两对特异性引物从小型猪外周血、脾脏和淋巴结的淋巴细胞中成功扩增和克隆鉴定了猪 TCR α 链基因 STA1

~93,而且每个基因序列各不相同,绝大部分基因显示了丰富的多态性和多样性。除扩增的较小片段基因序列(缺失 V 区)外,全长 ORF 的基因序列都含有一个可变的 V 区、高变的 J 区和恒定的 C 区基因结构,并能形成与 pMHC 复合物结合的 CDR1、CDR2 和 CDR3 关键结构域,这符合 TCR 基因的谱系发育、基因重排和分子结构组成特征^[4,6,7]。

表 3 STAJ 序列与人类 TRAJ 的相似性比较

Tab. 3 Comparison of the similarity of STAJ groups with those of human TRAJ

STAJ	TRAJ	Similarity/%	STAJ	TRAJ	Similarity/%
STAJ1		67.19	STAJ34		86.15
STAJ35		70.97	STAJ44	53 * 01	90.91
STAJ52	10 * 01	68.25	STAJ87		92.19
STAJ69		68.75	STAJ24	2 * 01	76.92
STAJ77		72.58	STAJ85		72.73
STAJ23		74.58	STAJ22	47 * 02	78.95
STAJ41		74.58	STAJ74		78.95
STAJ51	36 * 01	74.58	STAJ17	15 * 01	78.57
STAJ57		74.58	STAJ93		71.67
STAJ92		76.27	STAJ73	21 * 01	82.35
STAJ7		79.66	STAJ78		83.64
STAJ29		79.66	STAJ10	23 * 01	88.89
STAJ32	48 * 01	79.66	STAJ84		78.57
STAJ66		76.19	STAJ28	28 * 01	82.26
STAJ89		76.19	STAJ67		82.26
STAJ3		91.84	STAJ42	37 * 02	86.67
STAJ12		91.49	STAJ72		87.10
STAJ25	20 * 01	90.30	STAJ19		92.54
STAJ36		82.46	STAJ80	33 * 01	89.47
STAJ40		77.78	STAJ86		91.23
STAJ58		76.19	STAJ26	56 * 01	81.13
STAJ64	24 * 02	77.42	STAJ47		80.65
STAJ82		76.19	STAJ2	17 * 01	81.36
STAJ91		79.03	STAJ4	29 * 01	87.50
STAJ20		76.27	STAJ5	11 * 01	88.33
STAJ49	40 * 01	85.25	STAJ6	13 * 02	72.41
STAJ50		84.48	STAJ8	9 * 01	84.21
STAJ56		85.25	STAJ11	39 * 01	71.43
STAJ9		73.33	STAJ14	34 * 01	81.03
STAJ30	8 * 01	78.43	STAJ15	26 * 01	73.21
STAJ88		78.95	STAJ16	50 * 01	75.00
STAJ48		83.33	STAJ27	30 * 01	71.93
STAJ71	12 * 01	82.76	STAJ31	3 * 01	72.58
STAJ90		84.91	STAJ33	27 * 01	83.05
STAJ13		79.66	STAJ53	41 * 01	80.36
STAJ38	35 * 01	74.58	STAJ54	60 * 01	77.19
STAJ83		77.97	STAJ55	31 * 01	83.93
STAJ21		80.65	STAJ62	25 * 01	90.00
STAJ39	42 * 01	84.85	STAJ63	7 * 01	79.66
STAJ45		84.62	STAJ70	38 * 01	91.53
STAJ37		85.19	STAJ75	46 * 01	87.50
STAJ42	43 * 01	80.00	STAJ76	57 * 01	77.78
STAJ46		90.74	STAJ79	54 * 01	76.67
STAJ65		85.11	STAJ81	32 * 02	81.67

同时,对全长 ORF 的 STA 基因的核苷酸序列的信号肽区、FR1 区、CDR1 区、FR2 区、CDR2 区、FR3 区和 CDR3 区进行分区比对发现,还存在非常复杂的多态性和多样性。其中大多数变异位点多集中于 CDR3 区和接近这一功能区的 FR3 区,其他区域相对较少,这与 Arden 等^[7]的分析结果一致。这些区域序列的变异位点大部分属于等位基因的多态性,

而 CDR3 区和接近这一功能区的 FR3 区的大量变异位点属于 TCR 多样性的具体体现,这与 TCR 基因重排或非模板的随机插入特性相关,由此也充分表明了猪 TCR α 链的多样性特征^[11-12]。

3.2 猪 TCR α 链分子与人类的遗传演化关系

STA1 ~ 93 基因 V 区分别与人类 TRAV 基因的同源性分析发现, STAV1、2、3 等 39 个基因与

TRAV16 * 01 相似性在 80% 以上, STAV43 和 STAV85 与 TRAV2 * 01 和 TRAV2 * 02 相似性在 80% 以上, STAV6、7、10 等 34 个基因与 TRAV18 * 01 相似性在 70% 以上, STAV8 等 13 个基因与 TRAV8-4 * 07 和 TRAV8-4 * 06 也有较大的相似性, 说明猪 TCR α 链 V 区与人类的遗传演化关系较近。因此, 可依据 Yamamoto 等^[8]的人类 TRA 的分类方法, 将克隆鉴定的 93 个 STA 基因归类。

T 细胞受体 α 链的 J 区是其变异程度最大的区域, 也是 CDR3 区形成的最关键的部位, STAJ 与人类 TRAJ 的相似性比较更能体现其遗传演化关系。STAJ 推导编码氨基酸的相似性比较发现, 虽然不同 STAJ 间序列差异性很大, 但在 88 个 STAJ 序列中按相似度对应人类 TRAJ 序列有 43 个, 其相似性均在 70% 以上, 甚至高达 92.54%。这说明 STAJ 序列虽然在物种内多样性丰富, 但在遗传上还与人类的 TRAJ 关系密切。

3.3 猪 TCR α 链分子的结构与生物学功能关系

TCR $\alpha\beta$ 作为 T 细胞识别和结合由抗原递呈细胞 (APC) 递呈的 MHC-抗原肽分子的重要表面受体, 主要由保守的框架区 (FRs) 和多态性的互补决定区 (CDRs) 组成。由 V 基因片段编码的 CDR1 和 CDR2 主要负责与 MHC 分子结合, 而由 V-(D)-J 编码的 CDR3 主要负责结合抗原肽。已证实人类 TCR α 链 V 基因成分由 44~46 个功能性的 TRAV 组成^[13], 绒猴 (*Callithrix jacchus*) 的 TCR α 链由 1 个恒定的 C、46 个 J 和 35 个 V 基因片段组成^[14]。Yamamoto 等^[8]首次报道扩增了 103 个完整的猪 TRA cDNA, 其中含 33 个不同的 TRAV 基因, 后根据人类 TRAV 基因将其归类为 20 个亚类, 其中 13 个亚类只含一个成员, 最多的亚类含 12 个成员。目前, 我们已克隆鉴定猪 TCR α 链基因 93 个, 而且每个基因各不相同, 但猪 TCR α 链究竟由多少个 V、J 和 C 基因片段组成, 还不能确定。但可以肯定是, 合作小型猪 TCR α 基因具有十分丰富的多态性和多样性, 能够适应外界复杂环境的免疫学反应需要。

参 考 文 献

- [1] 商海涛, 魏泓. 我国小型猪品系资源状况初浅分析 [J]. 中国实验动物学报, 2007, 15(1): 70-75.
- [2] 景志忠, 张永兴、高世杰, 等. 甘肃藏麻猪实验动物化利用前景 [J]. 实验动物科学与管理, 1997, 14(4): 64-65.
- [3] 何维. 医学免疫学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 第二版, 2010. 8.
- [4] 冯海燕, 莫斯科, 房永祥, 等. 猪 T 细胞受体 α 链基因的克隆、序列分析及其结构预测 [J]. 华北农学报, 2010, 25(1): 23-29.
- [5] Schatz DG, Ji YH. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination [J]. Nature Rev/Immunol, 2011, 11: 251-263.
- [6] Hedriek SM, Cohen DI, Nielsen EA, et al. Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins [J]. Nature, 1984, 308: 149.
- [7] Arden B, Clark SP, Kabelitz D, et al. Human T-cell receptor variable gene segment families [J]. Immunogenetics, 1995, 42(6): 455-500.
- [8] Yamamoto R, Uenishi H, Hatsuse H, et al. TRAV gene usage in pig T-cell receptor alpha cDNA [J]. Immunogenetics, 2005, 57: 219-225.
- [9] Gerner W, Kaser T, Saalmuller A. Porcine T lymphocytes and NK cells -an update [J]. Dev Comp Immunol, 2009, 33: 310-320.
- [10] Ishiguro N, Tanaka A, Shinagawa M. Sequence analysis of bovine T-cell receptor α chain [J]. Immunogenetics, 1990, 31: 57-60.
- [11] Walchli S, Løset GA, Kumari S. A Practical Approach to T-Cell Receptor cloning and expression [J]. PLoS ONE, 2011, 6(11): e27930.
- [12] Boudinot P, Marriotti-Ferrandiz ME, Du Pasquier L, et al. New perspectives for large-scale repertoire analysis of immune receptors [J]. Mol Immunol, 2008, 45: 2437-2445.
- [13] Scaviner D, Lefranc MP. The human T cell receptor alpha variable (TRAV) genes [J]. Exp Clin Immunogenet, 2000, 17(2): 83-96.
- [14] Fujii Y, Matsutani T, Kitaura K, et al. Comprehensive analysis and characterization of the TCR α chain sequences in the common marmoset [J]. Immunogenetics, 2010, 62: 383-395.

[收稿日期] 2014-01-16