

军曹鱼 Ig μ 重链的全长克隆及在各组织中的定量分析

侯月娥^{1,2}, 冯 娟^{1*}, 郭志勋¹, 郭吉余², 徐力文¹, 苏友禄¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300;

2. 广东海大集团股份有限公司畜牧水产研究中心, 广东 广州 511400)

摘要: 采用同源克隆和 RACE 技术, 克隆了军曹鱼 Ig μ 重链的 cDNA 全序列, 并通过荧光定量技术分析其在组织中的表达。军曹鱼 Ig μ 的 cDNA 全长 1 933 bp, 3'的非编码区(UTR)为 164 bp, 5'UTR 为 26 bp, 开放阅读框为 1 743 bp, 编码 580 个氨基酸, 分子量为 64.831 ku, 理论等电点 6.6。推测的军曹鱼 Ig μ 全长氨基酸序列与已报道的鱼类的相似性最高为 60%, 最低为 30%, 同两栖类的相似度在 30%~33%, 同其他高等的动物相似度不足 30%。较保守的 CH4 区和鱼类相似性在 64%~71%, 同其他生物的相似度仅为 31%~33%, 具有较强的物种特异性。军曹鱼 Ig μ 中存在半胱氨酸和色氨酸的保守位点以及 FR2 骨架区的 GKGLEW 和在 FR3 的 YYCAR 保守序列。Ig μ 链基因在健康鱼体中除了肾以外在其它各组织中均有表达, 在肠中的表达量最高。经鲨鱼弧菌刺激 48、96、192 h 后, 在采样的各个组织中均有表达, 心脏、鳃、肠道在刺激后 48 h 表达量明显增加, 脾脏、胃和脑 0 h 时的表达量较高, 肝脏、头肾以及肾脏 192 h 后表达较显著。从时间上看, 黏膜免疫屏障最先抵御外来抗原, 其后, 依次是肝脏、肾、头肾产生免疫应答, 说明系统免疫在长时间的抵御外来抗原时发挥着重要作用。

关键词: 军曹鱼; 免疫球蛋白; IgM; cDNA 全长; 荧光定量 PCR

中图分类号: S 942.1

文献标志码: A

硬骨鱼类中的 IgM 和 IgD 基因已被克隆并经过了特征鉴定^[1-5], IgZ、IgT 和 IgH 都是在 2005 年先后发现的, 并且 IgZ^[6]、IgT^[7]和 IgH^[8]的基因座出现在可变区基因座(V)_H和 C μ 区基因座之间, 有分泌型和膜型两种表达形式, 与哺乳动物的 IgA 基因组的组成形式相似^[9-11], 通过蛋白膜型比较河豚的免疫球蛋白 A 的铰链区与人的 IgA 类似^[8]。有关鱼类 IgG 和 IgE 的研究很少有报道。

IgM 重链(μ 链)基因座的组织形式与两栖动物和哺乳动物的一样, 即数百个可变区基因区段(variable segment, VH)位于多变区基因区段聚簇(cluster of diversity segment, D)的上游, 紧接着是连接区基因区段(joining segment, JH), 而在 3'端是

4 个恒定区基因区段(constant segment, C μ 1-4)和 2 个跨膜基因区段(transmembrane segment, TM1-2)。一个 VH、一个 D 和一个 JH 区段融合在一起编码 C μ 链可变区, 再与编码恒定区的区段结合在一起共同编码 μ 链。其中 VH 区段为 Ig VH 功能区的 FR1-3/framework region, FR)和 CDR1-2(complementarity determining region, CDR)编码, D 区段编码 CDR3 区 N 端大部分, JH 区段编码 CDR3 区端剩余部分和整个 FR4 区^[12], 已报道有重要经济意义的鱼类如:斜带石斑鱼^[13](*Epinephelus coioides*)、鳊^[14](*Siniperca chuatsi*)、牙鲆^[15](*Paralichthys olivaceus*)、海鲢^[15](*Elops saurus*)、大西洋鳕^[16](*Gadus morrhua*)、大西洋鲑^[17](*Salmo salar*)、虹

收稿日期: 2011-11-04

修回日期: 2011-12-21

资助项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2007ZD10)

通讯作者: 冯娟, E-mail: annyfeng@163.com

鱒^[18](*Oncorhynchus mykiss*)、鲤(*Cyprinus carpio*)和斑点叉尾鲷^[19](*Ictalurus punctatus*)等种类, 以及重要的模式生物, 如斑马鱼^[20](*Danio rerio*)的 IgM 基因的研究中显示了不同鱼类的 IgM 重链存在基因数目差异和序列特异性, 因此 IgM 的表达也存在差异。

IgM 是唯一一个被报道在鱼类体液免疫中发挥重要作用的免疫球蛋白, 在很多重要的经济鱼类, 如蓝鳍金枪鱼^[21](*Thunnus maccoyii*), 黑鲈^[22](*Dicentrarchus labrax*), 鲤^[23], 大西洋庸鲽^[24](*Hippoglossus hippoglossus*), 尼罗罗非鱼^[25] *Oreochromis niloticus*), 欧洲鳗鲡^[26](*Anguilla anguilla*)中的 IgM 已被分离鉴定。硬骨鱼类中 IgM 通过连接链将 4 个单体连接而成一个四聚体, 在大菱鲆^[27](*Scophthalmus maximus*)、鲤^[28]和羊头鲷^[29](*Archosargus probatocephalus*)血清中皆有发现, 分子量 700~800 ku。

IgM 是真骨鱼中的一类重要免疫球蛋白。存在于血液和其它体液中介导体液免疫的称为分泌型(sIg), 作为抗原受体结合于 B 淋巴细胞膜上的, 称为膜结合型(mIg)。前者作为体液免疫应答的重要部分, 在研究鱼病防治和鱼类疫苗学方面都具有十分重要的意义。军曹鱼(*Rachycentron canadum*)是一个优良的高效海水养殖品种, 具有很高的经济价值, 本实验研究了军曹鱼经灭活的鲨鱼弧菌全菌疫苗腹腔注射免疫后, IgM 基因 mRNA 在鳃、皮肤、脾脏和头肾中转录水平的变化从而检测免疫应答的效果, 为探索鱼类的免疫防御机制, 有针对性的解决一些问题提供一定的理论基础和科学数据以及为后续免疫球蛋白的应用性研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 总 RNA 的提取

取健康的军曹鱼(体质量约 1 000 g)在养殖桶中暂养 3 日, 腹腔注射 0.1 mL 活的鲨鱼弧菌(*V. carchariae*)菌株 JT2^[30], 浓度为 10⁷/mL。192 h 后, 解剖鱼体取出头肾, 迅速放入液氮 24 h, 再放入 -80 °C 冰箱保存。取保存的头肾, 剪碎加入 Trizol(Invitrogen)进行匀浆, 按照试剂说明提取总 RNA。

1.2 cDNA 第一条链的合成

取军曹鱼总 RNA 10 μ L 与加了接头的 Oligo-dT(上海英骏公司合成, 表 1)2 μ L(10 pmol/L)混合, 65 °C 加热 5 min 后, 立即放置冰上静置 2 min, 然后加入缓冲液 5 \times buffer 4 μ L, 10 mmol/L dNTP 混合液 2 μ L, Ribonuclease Inhibitor 1 μ L, M-MLV 反转录酶 1 μ L, 反应体系为 20 μ L。反应程序为 37 °C, 60 min。合成的 cDNA 第一链放入 -80 °C 保存。

1.3 μ 链基因 cDNA 片段的克隆

使用构建的 Smart cDNA 文库扩增 cDNA 片段, 用设计的中间片段引物 UF1、UR1 以及 UF2、UR2 进行 PCR 扩增, 反应参数分别为 94 °C, 3 min; 94 °C, 35 s; 59 °C, 45 s; 72 °C, 1 min, 共 35 个循环, 最后终延伸 72 °C, 10 min, 4 °C 保温; 94 °C, 3 min; 94 °C, 35 s; 50 °C, 45 s; 72 °C, 1 min, 共 35 个循环, 最后终延伸 72 °C, 10 min, 4 °C 保温。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 送上海英骏生物技术有限公司进行双向测序。

1.4 κ 链 cDNA 全序列的克隆及分析

根据已得到的 cDNA 片段序列设计特异性的引物 UF1、UR1 以及 UF2、UR2(表 1)。利用 cDNA 末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA

表 1 军曹鱼 μ 链 cDNA 全长扩增所用引物

Tab. 1 The primers of μ chain cDNA amplification of *R. canadum*

引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequence
Oligo-dT Adaptor	GGCCACGCGACTAGTAC(T) ₁₆
UF1	GGAAAGGAACAATGGTTACAG
UR1	ATCACCGTTGCTCGTTTT
UF2	TGTTCCAGGTGAAATAGG
UR2	CATAGCATGTCAGGGTC
CUF	CACTTGACATCACATATGACG
CU5'R	GGTGGCAAGACAGCCGAG
Oligo-dG Adaptor	GGCCACGCGACTAGTAC
β -actin-F	GGGGGGGGGGGGGGGG
β -actin-R	AGGGAAATTGTGCGTGAC
DUF	AGGCAGCTCGTAGCTCTT
DUR	CAGGAGACAGGACTGGGACG

end, RACE)对目的基因的 3'和 5'末端进行 PCR 扩增。

在 3'RACE 中^[31], 利用降落 PCR(touchdown PCR)方法, 用接头引物 Adaptor 和 CUF 进行 PCR 扩增, 反应体系为 94 °C, 3 min; 94 °C, 50 s; 64 °C, 50 s, 72 °C, 1.5 min, 共 10 个循环, 每个循环退火温度下降 1 °C; 94 °C, 50 s; 54 °C, 50 s, 72 °C, 1.5 min, 共 30 个循环; 最终延伸 72 °C, 10 min。

在 5'RACE 中^[32], 利用末端转移酶和 dCTP 在 cDNA 末端加上 poly(C)尾巴, 以加尾后的 cDNA 作为模板, 利用特异性引物 R5Kr 和 OligodG 进行 PCR 扩增, 反应体系为 94 °C, 3 min; 94 °C, 50 s; 68 °C, 50 s; 72 °C, 1.5 min, 共 10 个循环, 每个循环退火温度下降 1 °C; 94 °C, 50 s; 58 °C, 50 s, 72 °C, 1.5 min, 共 30 个循环; 最终延伸 72 °C, 10 min。

所得到的 PCR 产物经纯化、克隆、转化后, 送上海英骏生物技术有限公司测序。测序所得序列再与中间片段序列利用 SeqMan 软件进行拼接(图 1)。

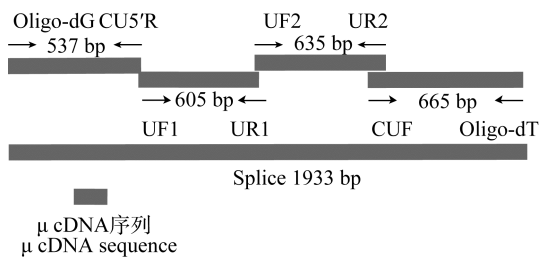


图 1 军曹鱼 μ 链 cDNA 全序列中的所用引物位点和扩增片段示意图

Fig. 1 Position of primers used in amplifying μ cDNA of *R. canadum* and the products obtained

1.5 μ 链 cDNA 的同源性分析

运用 DNAMAN 软件, 将克隆所得的 Ig μ 4 段 cDNA 序列进行比对拼接为一完整的 cDNA 序列, 即军曹鱼的免疫球蛋白 Ig μ cDNA 序列(图 1)。对全序列用 DNASTar 软件找出开放阅读框并翻译为相应的氨基酸, 用 Smart 软件将其氨基酸序列分为不同的区。测序结果用 BLAST 软件(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)在 GenBank 数据库中进行同源性检索, 并对 μ 链 cDNA 的恒定区和可变区的氨基酸序列进行同源性分析。多序列比较采用软件 ClustalX 1.83 和 PHYLIP 进行比对, 并构建系统进化树。

1.6 μ 链基因在鱼体各组织的表达

为检测 μ 链基因在鱼体内的表达情况, 腹腔

注射 0.1 mL 灭活的 JT2 浓度为 10^7 /mL 军曹鱼 10 条(每尾体质量 180~230 g), 购自海南省陵水县的网箱养殖场。驯养在盛有海水的养殖桶中 5 d, 水温大约为 22~32 °C, 另取 3 条健康的军曹鱼作为对照。取 0、48、96、192 h 4 个时间点的脾脏、头肾、肾脏、鳃以及肝脏等器官各约 100 mg, 按照“1.1”和“1.2”的方法提取总 RNA, 并合成 cDNA 第一链, 作为实时荧光定量 PCR 检测的模板。根据已克隆到的军曹鱼 μ 链基因的表达序列设计一对特异性引物 DUF 和 DUR(表 1), 对目的基因的 cDNA 进行扩增。 β -actin 基因作为内参, 扩增的引物分别为 β -actin-F 和 β -actin-R(表 1), 扩增 110 bp 左右的片段。反应体系为 95 °C, 30 s; 95 °C, 5 s; 55 °C, 3 s; 95 °C, 15 s; 共 40 个循环, 溶解曲线温度为 65 °C, 1 min; 95 °C, 15 min。

1.7 统计分析

用 Excel 中的 STDEV 函数计算标准差, 用 SPSS13.0 统计分析软件进行分析配对样品 *T*-test, 腹腔注射前后 μ 链的相对表达量差异是否显著 ($0.01 < P < 0.05$ 判定为差异显著)。

2 结果

2.1 μ 链基因的序列特征分析

军曹鱼 IgM 链的全长 cDNA 由 1 933 个碱基组成, 其编码区有 1 743 bp, 编码 580 个氨基酸, 分子量大约为 64.831 ku, 理论等电点为 6.6。在第一个起始密码子 ATG 的上游有 26 bp 的非编码区, 在终止密码子下游有 164 bp 的非编码区, 序列包含 poly(A)结构, 在 poly(A)尾上游 51 bp 处可见 poly(A)加尾信号 AATAA。编码区由前导链、可变区和恒定区组成, 同时可变区又可以分为骨架区 (framework region, FR)和互补决定区 (complementarity determining region, CDR)。经 Smart 软件 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)分析后发现, 军曹鱼的 IgM 链无跨膜区, 所以为分泌型的蛋白。军曹鱼 VH 基因的结构与其它硬骨鱼的在实质上是相同的(图 2), 在前导肽的后面有 4 个骨架区 (FRs)和 3 个互补决定区 (CDRs)位于 4 个骨架区之间, 以及在 FR2 骨架区的 GKGLEW 和在 FR3 的 YYCAR 保守序列^[33], 在其它的硬骨鱼也有发现, 然而位于 YYCAR 的精氨酸却被色氨酸取代, 但是在军曹鱼 VH 基因仍然包括在大多数鱼类和两栖类都保守的氨基酸残基。军曹鱼 IgM 恒定区与其它物种

```

AGCTCATCAGTTTGACCATAAACATGTTTTCTGTAGCTCTGCTGCTGCTGTTGGCAGCT 62
      [
      Signal peptide
      M F S V A L L L L L A A
GGATCCTGTGTGAAGTGTCAACAGTTGACACAGCCAGCCTCTGTGACTGTGCAGCCAGGT 122
      ] [
      FR1
  G S C V K C Q Q L T Q P A S V T V Q P G
CAACGCTGTGACCATCACCTGTCAAGTCTTTTATTCTGTTAGCAGCTACGCAACAGCTTGG 182
      ] [
      CDR1
  Q R L T I T C Q V F Y S V S S Y A T A W
ATCAGACAGCCTGCAGGAAAAGACTGGAGTGGATTGGAATTGCACGTGTTGGATACACC 242
      FR2
  I R Q P A G K R L E W I G I A R V G Y T
TCATACTACAAAAGATTCAGTGAAGCACAAGTTCAGTATCGACTTAGACTCTTCCAACAAC 302
      ] [
      CDR2
  S Y Y K D S L K H K F S I D L D S S N N
AGAGTAACTCTAAATGGACAGAACATGCAGCCTGAAGACTCTGCTGTGATTATTGTGCC 362
      FR3
  R V T L N G Q N M Q P E D S A V Y Y C A
AGCCGGATGGTAGGGGATGCTTTTGACTACTGGGGGAAAGGAACAATGGTTACAGTTACA 422
      ] [
      CDR3
  S R M V G D A F D Y W G K G T M V T V T
TCAGCCACTGCAAAAGGACCAACTCTCTTCTCTGATAACAATGTGCATCTGGGAGCGG 482
      ] [
      CH1
  S A T A K G P T L F P L I Q C A S G S A
AGCGAGGTCCTCTCGGCTGTCTGCCACCGACTTCACACCCCTCCTCACTGACATTCACA 542
  S E V T L G C L A T D F T P S S L T F T
TGGAAAAGGACCAAACTGACTTGACGGACTTCATTAGTACCCTTCAGTACAGAAAAGGC 602
  W K K D Q T D L T D F I Q Y P S V Q K G
GCCATGTACACAGGAGTCAGTCAAATTCGTGTCAGGAGACAGGACTGGGACGACGGGCG 662
  A M Y T G V S Q I R V R R Q D W D A G Q
AGTTTCCATTGCATTGCAACACATGTTGGAGGAAATGACAACGTTACCATCGCAAAGCCA 722
      ] [
  S F H C I A T H V G G N D N V T I A K P
CTGGAATTTGCTCTGTTGCCAAGTTCGAGCGTTGGTCTCTCTGATGATGCGAACGAA 782
  L E F F V L L P T L R A L V S S D D A N E
GCTACTTCTCTGCTTTGCTAAAGATTTTCCACCAAGATCATGAGATCAAATGGCTG 842
  A T F S C F A K D F S P K D H E I K W L
AAACACGGAATGGAATCAGTCTCAACATACGATCCAAACGTTTACCGGGGAAAAGAGG 902
  K H G M E I S P Q H T I Q T F T G E R R
TTGGAGAACGGAAGTACTGTACAGTGCAGCAAATTTCTCTCATTGAAAACCAATGAA 962
  L E N G T V L Y S A A N F L S L K T N E
TTGACTGAAAACACAGAGTTAACAATGCCTGTTAAGTTGAAAACGAGCAACGGTGATG 1022
  L T E N T E L T C L F K L K T S N G D M
TTCACTAATTCATCTGTGACTTACAACCTCAAATGTGTTCCAGGTGAAATAGGATGCATT 1082
      CH2
      CH3
  F T N S S V T Y N S K C V P G E I G C I
GTACCAGATGTGAACATAGACTTTGAAGGCCAACACTGAAGGATATATTTTCAAAGAAA 1142
  V P D V N I D F E E G P T L K D I F S K K
AAGGGAATATAAAATGTCACGTCAACAATAACAAGCCATCCGTTGACAAAGTTTTTTGG 1202
  K G T I K C H V T I N K P S V D K V F W
GAGGACAGTGGGAAATGAATGTCTTACACTGTAGACTCCAGTAAATGGAAAAAAGTG 1262
  E D Q W G N E L S Y T V D S S N G K K V
ATCGTTTCACTGTGACATCACATATGACGAATGGAGCAAGGGGATAAAGCGCTTCTGTGTA 1322
  I V S L D I T Y D E W S K G I K R F C V
GTTGAACATTCAAATTTCCCTGAACCAATAAAGAAAATCTATGAAAGGCATTCTGGAGAA 1382
      ] [
  V E H S N F P E P I K K I Y E R H S G E
CACACTGTGCGTCTTCAGTGTATGCTGCCACCAGTAGAACACACTAAGACAAACACA 1442
      CH4
  H T V R P S V F M L P P V E H T K T N T
GTGACCTGACATGCTATGTGAAAGACTTCTCCCTGAGGAGGTTTACGTGTCTTGGCTT 1502
  V T L T C Y V K D F F P E E V Y V S W L
GTTGATGATGAGGCGGACACTCAAGATACAAATTCAGTACCACAACCCCTGTGAGACAA 1562
  V D D E A A D S R Y K F S T T N P V R Q
AATGGATCTTATTCTGCTTATGGCCAGCTATCACTCGACGCTGATGAGTGGAAAAACAAT 1622
  N G S Y S A Y G Q L S L D A D E W K N N
AAGATGGTTTATAGCTGTGTAGTTTACCACGAATCTGTGGTTAACAGTTGTAATGCCATT 1682
  K M V Y S C V V Y H E S V V N S C N A I
ATCAGATCCATTGGCCAGAGAACATTTGAAAGCACAACCTGGTCAATCTCAATATGAAC 1742
  I R S I G Q R T F E S T N L V N L N M N
ATCCCTGAAACGTGCAAGGCCAGTAGATGCTACAGGCTACTTTGTGCTGCTGTGCTC 1802
      ]
  I P E T C K A Q *
CGCTGTTTGTGTTAATGTTTGTGCTTGTGATATGACATTGTGTTTGTCTTTTTAATG 1862
CAGATCAAAATCAAAATAAAAAAAGCACTTTGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1922
AAAAAAAAA 1933

```

图 2 军曹鱼 μ 链的 cDNA 序列和推断的氨基酸序列

起始密码子 ATG 和终止密码子 TAG 以黑框表示, 加尾信号以下划线标出, μ 链氨基酸前导链、可变区和保守区的序列划分区域有阴影部分标出。

Fig. 2 cDNA and deduced amino acids sequences of *R. canadium* μ chain

The start and stop codons of the open reading frame are highlighted in bold, the putative polyadenylation signal(AATAA) in the 3'UTR are underlined, the domains of μ leader, variable and conservative regions were in shade.

相比对有很高的相似性, 推理出来的氨基酸可以分为 CH1、CH2、CH3 和 CH4 4 个区。这 4 个区共包括 12 个半胱氨酸残基和 8 个色氨酸残基。

2.2 军曹鱼 Ig μ 氨基酸序列的相似性分析

军曹鱼 Ig μ 链基因全长的氨基酸同其它鱼类的氨基酸比对发现, 同硬骨鱼如斑点狼鱼、日本牙鲆、虹鳟、斑马鱼、鲤、大西洋鳕、草鱼和海鲢的相似性为 36%~60%, 同软骨鱼如小型鳐(*Leucoraja erinacea*)、沙洲鲨(*Carchrocles megalodon*)、铰口鲨(*Carcharhinus plumbeus*)的相似性为 25%~28%, 同两栖类如非洲爪蟾和热带爪蟾的相似性为 30%~33%, 同禽类如鸡的相似性为 26%, 同哺乳类如家鼠和兔的为 26%~27%(表 2)。而军曹鱼 Ig μ 链的 CH4 片段的氨基酸序列同硬骨鱼的斑点叉尾鲷、与日本牙鲆、南极鱼的相似性为 64%~1%, 同两栖类的非洲爪蟾的为 33%, 同禽类的鸡的为 32%, 同哺乳类的兔子和家鼠的为 29%~1%。由此看出 CH4 片段较之序列全长更具有种属特异性。

利用 ClustalX 1.83 软件对军曹鱼、大西洋鳕、斑点狼鱼、肩孔南极鱼(*Trematomus bernacchii*) 等鱼重链可变区进行比对, 发现半胱氨酸和色氨酸等保守位点在军曹鱼的 Ig μ 链中同样存在(图 3)。

2.3 系统树的构建

许多鱼类的 IgM 的一级结构已被阐明, 且具

有高度的保守性, 但 IgM 基因各区段的保守性有很大差别, 不同鱼类的 CH 区的氨基酸相似性很低, 有近期的研究知, 原因有可能归咎于 CH2 和 CH3 区的多变性。因此, 根据军曹鱼 μ 链基因全长、CH4 区的氨基酸同其它鱼类的氨基酸, 利用 ClustalX 1.83 和 PHYLIP 软件构建邻接树。根据全长系统进化树的结果显示, 军曹鱼、牙鲆、斑点狼鱼以及头带冰鱼聚为一支(图 4)同属于 IgM 的同源序列, 并且同属于鲈形目。CH4 区结果显示, 军曹鱼、花狼鱼、头带冰鱼以及虹鳟聚为一支(图 5), 具有较高的种属特异性。

2.4 μ 链基因在体内各组织中的表达情况

按照荧光定量反应条件检测军曹鱼 Ig μ 基因在不同组织中的表达情况发现, Ig μ 基因 0 h 时在肾脏中没有荧光信号在其它各组织中均有表达。且表达水平不同, 表明军曹鱼 Ig μ 基因具有组织特异性。在肠中的表达量最高, 其次是脾脏, 而在心脏、脑、鳃以及头肾中的相对表达量相近(图 6)。经 JT2 腹腔注射后, Ig μ 基因在心脏(图 7-a)、鳃(图 7-d)中的表达量从 0 h 至 48 h 是增加的, 而从 48~192 h 时表达量是减少的。在肝脏(图 7-b)、头肾(图 7-f)以及肾脏(图 7-g)从 0~192 h 表达量明显增加。在脾脏(图 7-c)、胃(图 7-e)、肠(图 7-h)以及脑(图 7-i)中的表达量从 0~192 h 是降低的。

表 2 曹鱼 μ 链全长与其他动物 μ 链全长氨基酸的相似率

Tab. 2 The μ chain full-length amino acids similarity between *R. canadum* and other animals

物种 species	相似性 similarity	E	GenBank 登录号 accession number
鸡 <i>Gallus gallus</i>	26%	2e-09	CAA25762
小鼠 <i>Mus musculus</i>	27%	4e-06	AF052835
欧洲兔 <i>Oryctolagus cuniculus</i>	26%	1e-12	J00666
小型鲸 <i>Leucoraja erinacea</i>	28%	4e-12	AAA49547
灰真鲨 <i>Carcharhinus plumbeus</i>	25%	1e-08	U40560
铰口鲨 <i>Ginglymostoma cirratum</i>	26%	2e-06	U40560
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	33%	3e-06	AAH72253
热带爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i>	30%	1e-11	AAH89670
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	58%	1e-17	BAB60868
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	40%	3e-23	AAB27359
猾鳐 <i>Raja erinacea</i>	39%	2e-18	L25566
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	30%	8e-08	BAA34719
大西洋鳕 <i>Gadus morhua</i>	40%	1e-13	A46538
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>	36%	5e-06	DQ417927
海鲢 <i>Elops saurus</i>	36%	3e-12	M26182
花狼鱼 <i>Anarhichas minor</i>	60%	0.0	AAD37510

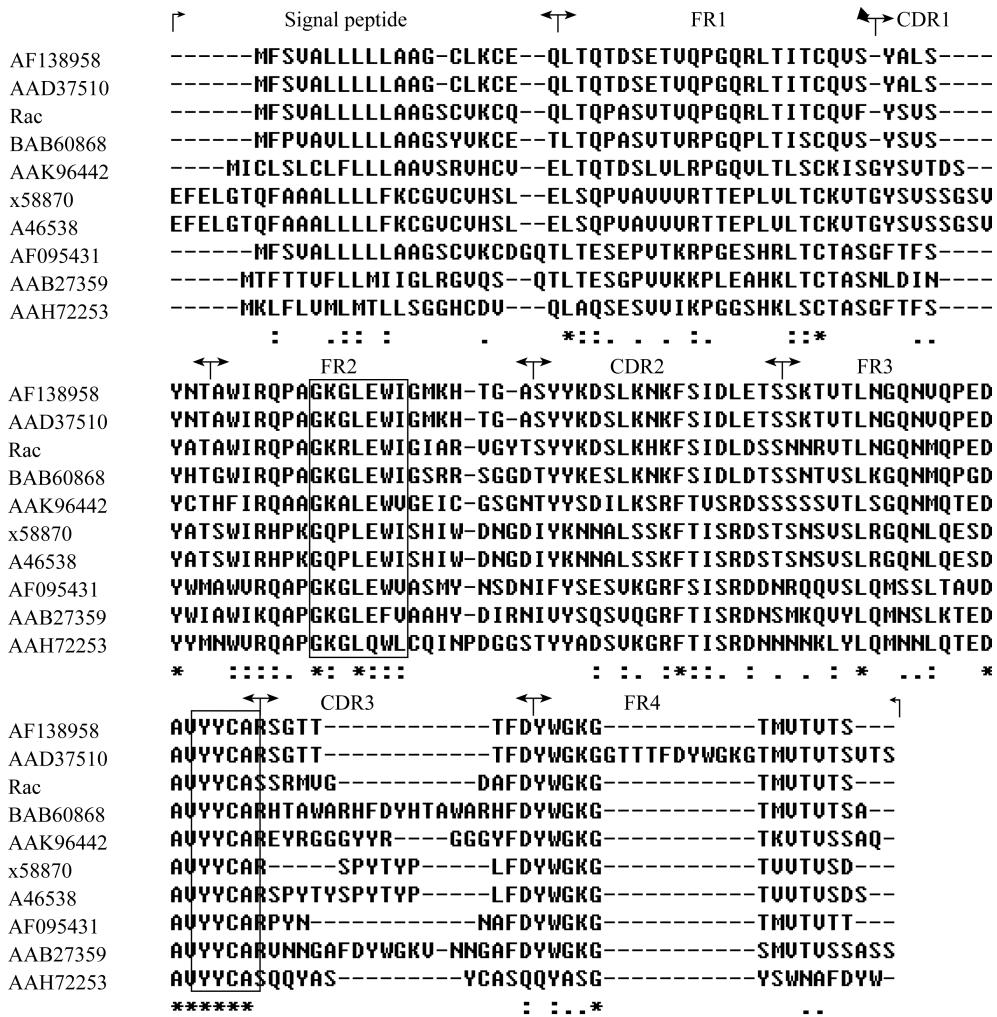


图3 军曹鱼 μ 链与其他鱼中 μ 链可变区氨基酸序列比较

相同氨基酸用*表示, 相似的氨基酸用·表示。两个保守区域用黑框框出, 前导肽、骨架区、和互补决定区也相应的标出。GenBank 登录号: 军曹鱼 *R.canadium* (JX025102), 花狼鱼 *A. minor* (AF138958), 牙鲆 *P. olivaceus* (BAB60868), 斑马鱼 *D. rerio* (AAK96442), 大西洋鳕 *G. morhua* (A46538), 花狼鱼 *A. minor* (AAD37510), 非洲爪蟾 *X. laevis* (AAH72253), 肩孔南极鱼 *Trematomus bernacchii* (AF094531), 大西洋鲑 *S. salar* (X58870), 虹鳟 *O. mykiss* (AAB27359)

Fig. 3 Alignment of μ chain variable region amino acids between *R. canadum* and other fishes

The identical amino acids are indicated with asterisk. The similar amino acids are indicated with dot. The conversed GKRLEW and YYCAS of the variable region frame were highlighted in bold. The positions of the leader peptide, framework regions (FR), and complementarity determining regions (CDR) were determined of the cobia and other teleosts.

3 讨论

3.1 军曹鱼 μ 链的 cDNA 序列

军曹鱼重链 μ 链基因的一级结构同其它鱼类的很是相似, 并且基因测序的总长为 1 933 个碱基。Ig μ 基因很早以前就在哺乳动物和其它很多鱼类中被描述, 有 4 个恒定区结构, 如: 河豚^[34] (*Spheroides rubripes*), 牙鲆^[35], 大西洋鳕^[36], 弓鳍鱼^[37] (*Amia calva*) 等。Cμ 区包含 CH1-CH4 4 个恒定区, 而每个恒定区都是有特定的外显子编码^[38]。膜型和分泌型两种不同的 IgM 类型, 起初的原始转录本是一样, 不同仅仅是因为羧基端序列的不同^[39]。与哺乳

动物不同的是, 鱼类的分泌型 IgM 在 CH4 下游缺乏额外的分泌功能区, 因此, 在鱼类中 CH4 与 CH1-CH3 4 个区都被认为是分泌功能区^[40]。

3.2 军曹鱼 μ 链基因保守位点及保守区域

军曹鱼重链 μ 链基因也和大多数鱼类和两栖类一样含有其特定的残基。对该基因的分析显示 CH1 区含有 3 个半胱氨酸, CH2 区含有 2 个, CH3 区含有 4 个, CH4 区含有 3 个, 4 个区含有 12 个半胱氨酸残基, 这些半胱氨酸残基出现在相应的位置, 有的是用于形成链间的二硫键, 有的是用于形成链内的二硫键^[15], 这可能表明由半胱氨酸所形

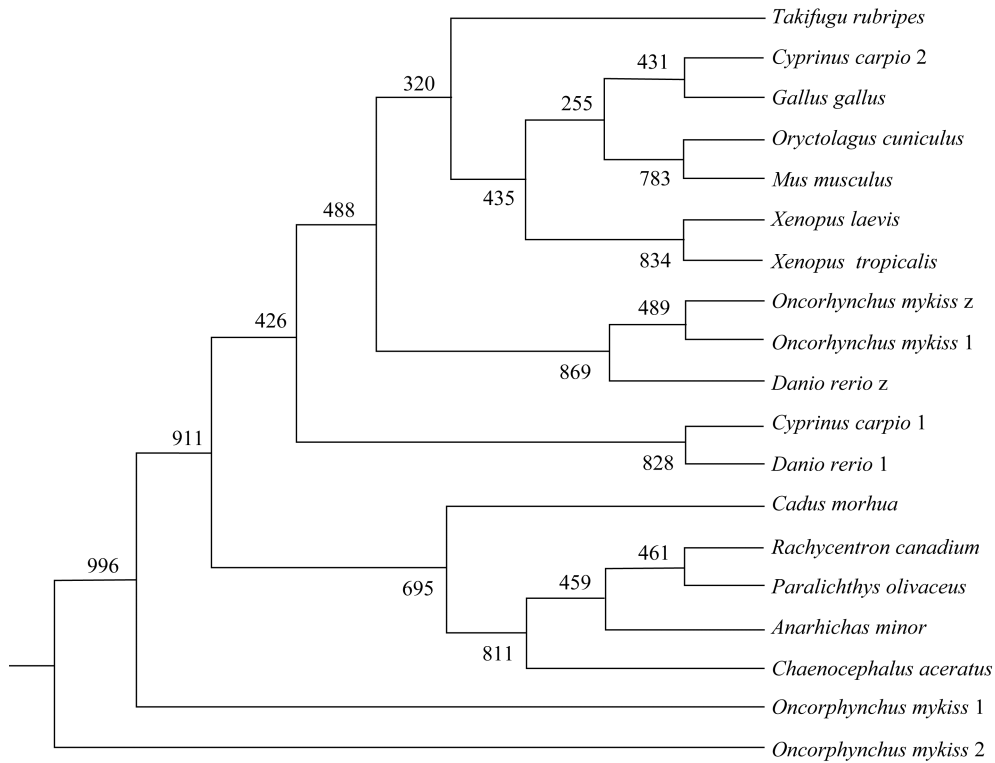


图 4 免疫球蛋白 μ 链全长氨基酸的系统进化树

红鳍东方鲀. AB201354; 鲤 1. BAA34719; 鲤 2. AB015902; 鸡. CAA25762; 欧洲兔. J00666; 小鼠. AF052835; 虹鳟 t. AY870265; 虹鳟 z. AY773715; 斑马鱼 1. AAK96442; 大西洋鲑. A46538; 军曹鱼. JX025102; 牙鲆. BAB60868; 斑点狼鱼. AAD37510; 非洲爪蟾. AAH72253; 热带爪蟾. AAH89670; 头带冰鱼. AAL99930; 虹鳟 1. AAA56662; 虹鳟 2. AAB27359; 斑马鱼 z. AY643750

Fig. 4 Phylogenetic tree showing the relationship between the cobia immunoglobulin μ heavy chain genes full-length amino acid sequences from other vertebrates

Takifugu rubripes. AB201354; Cyprinus carpio 1. BAA34719; Cyprinus carpio 2. AB015902; Gallus gallus. CAA25762; Oryctolagus cuniculus. J00666; Mus musculus. AF052835; Oncorhynchus mykiss t. AY870265; Oncorhynchus mykiss z. AY773715; Danio rerio 1. AAK96442; Gadus morhua. A46538; Rachycentron canadum. JX025102; Paralichthys olivaceus. BAB60868; Anarhichas minor. AAD37510; Xenopus laevis. AAH72253; Xenopus tropicalis. AAH89670; Chaenocephalus aceratus. AAL99930; Oncorhynchus mykiss 1. AAA56662; Oncorhynchus mykiss 2. AAB27359; Danio rerio z. AY643750.

成的二硫键在 IgM 的分子进化中具有普遍重要的意义。军曹鱼 IgM 基因 CH3 区交界处还存在两个额外的半胱氨酸残基。尽管在哺乳动物的 IgM 基因中不存在，但与斑点狼鱼、头带冰鱼和牙鲆报道的结果相似。推测这个 CH2 和 CH3 区交界处其中的一个半胱氨酸残基可能与重链间的双桥连接相关^[41]，另外一个半胱氨酸的作用仍未有报道。在一些鱼类中，CH4 区有一额外的半胱氨酸残基，用于形成 A 和 B 链 β 折叠的闭合环路^[42]，这个残基被认为是参加形成四聚体分子结构或是两重链间二聚作用的残基，在军曹鱼中，未发现这样一个半胱氨酸残基，但是军曹鱼的 IgM 仍然是四聚体，同河豚^[39] IgM 的 CH4 区类似，因此可以认为，此半胱氨酸残基或许在形成四聚体时并没有那么重要的作用。

在其他鱼类中，色氨酸残基对免疫球蛋白空间结构的形成和功能起决定性作用^[43]，IgM 恒定区内 7 个色氨酸残基出现的位置也与其它鱼类完全一致，在鱼类中也是相当保守，所以，由半胱氨酸所形成的二硫键以及色氨酸残基的保守位点在免疫球蛋白的分子进化中具有重要意义。军曹鱼属于典型的无鳞硬骨鱼类，同其他的鱼类一样有着保守的 GKGLEW 和 YYCAR 两个保守区域，然而在 YYCAR 保守区的精氨酸代替了丝氨酸，所以，这样就和两栖类有着相同的 YXCAS 保守区。

3.3 军曹鱼 μ 链氨基酸的相似性和系统进化关系

军曹鱼是鲈形目军曹鱼科的惟一鱼种，在分类学上，军曹鱼 μ 链全长氨基酸的同源性都跟同是鲈形目的斑点狼鱼的最高，而且在其它鱼种中也有类似的关联，说明 Ig 的相似性同鱼类的分类地

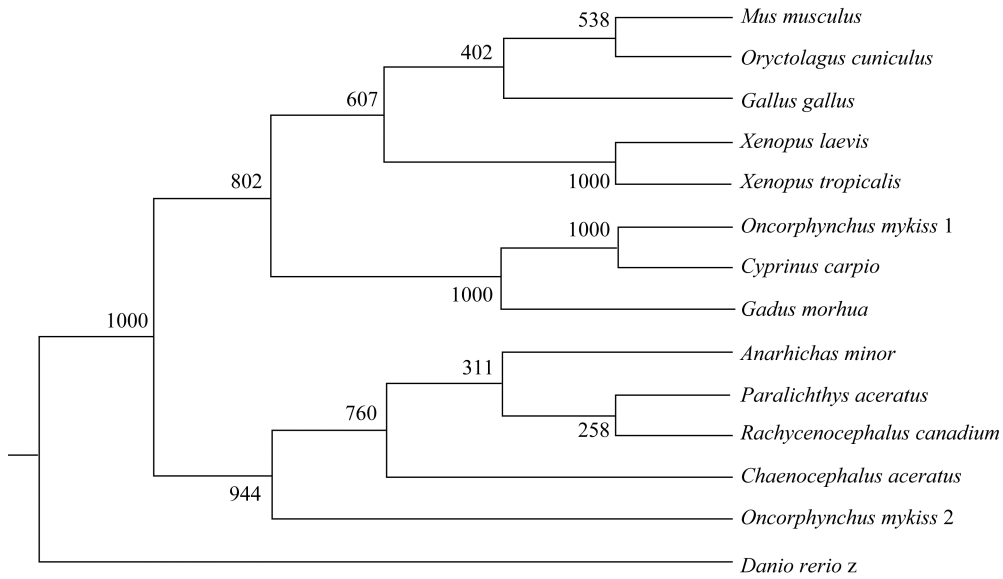


图 5 免疫球蛋白 μ 重链 CH4 氨基酸的系统进化树

鸡. CAA25762; 欧洲兔. J00666; 小鼠. AF052835; 头带冰鱼. AAL99930; 非洲爪蟾. AAH72253; 热带爪蟾. AAH89670; 大西洋鳕. A46538; 军曹鱼. 补充登录号; 牙鲆. BAB60868; 虹鳟 2. AAB27359; 斑点狼鱼. AAD37510; 斑马鱼 z. AAK96442; 鲤 1. BAA34719; 虹鳟 1. AAA56662.

Fig. 5 Phylogenetic tree of immunoglobulin heavy chain piece phylogenetic tree tree was constructed with amino acid sequences of immunoglobulin CH4 domains of the teleosts and other animals μ chain

Gallus gallus. CAA25762; *Oryctolagus cuniculus*. J00666; *Mus musculus*. AF052835; *Chaenocephalus aceratus*. AAL99930; *Xenopus laevis*. AAH72253; *Xenopus tropicalis*. AAH89670; *Gadus morhua*. A46538; *Rachycentron canadum*. 补充登录号, *Paralichthys olivaceus*. BAB60868; *Oncorhynchus mykiss* 2. AAB27359; *Anarhichas minor*. AAD37510; *Danio rerio*. AAK96442; *Cyprinus carpio*. BAA34719; *Oncorhynchus mykiss* 1. AAA56662.

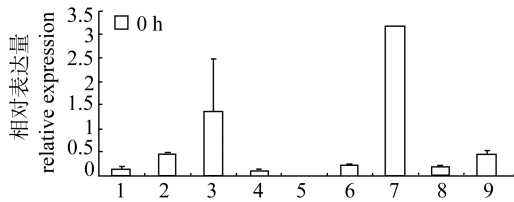


图 6 军曹鱼不同组织中 IgM 基因的组织特异性表达
1. 心; 2. 肝; 3. 脾; 4. 鳃; 5. 肾; 6. 头肾; 7. 肠; 8. 脑; 9. 胃。

Fig. 6 Tissue-specific expression of IgM in different tissues

1. heart; 2. liver; 3. spleen; 4. gill; 5. kidney; 6. headkidney; 7. intestines; 8. brain; 9. stomach.

位具有相关性。根据军曹鱼 IgM 链基因全长和 CH4 片段的氨基酸同其它脊椎动物的氨基酸, 利用 ClustalX 1.83 和 PHYLIP 软件构建系统进化树。从系统进化树的结果可以看出, 军曹鱼、斑点狼鱼、头带冰鱼都属于鲈形目, 因此全长氨基酸聚为一支, 而同时与日本牙鲆的 IgM 也聚为一支, 其相似性可能说明这两者发育关系非常近^[44]。从推论的结果分析, 在很大程度上这与脊椎动物的进化观点一致, 同属于 IgM 的同源序列。

3.4 军曹鱼 μ 链的表达

本研究利用荧光定量 PCR 方法, 以 β -actin 为参照, 研究了军曹鱼 μ 链基因在受到 JT2 的刺激前后, 在头肾、肝脏、肠、鳃、脾脏、心脏、胃、鳃以及脑等不同组织中的表达。 μ 链在 0 h 健康的军曹鱼的大部分组织均有一定量的表达, 而在肾脏中却未检测到荧光信号。这个结果显示了各个器官在军曹鱼未受刺激时扮演的功能角色, 其中, 脾脏和肠表达明显, 所以, 在军曹鱼在未受外来病原刺激的情况下, 脾脏和肠是产生天然抗体的主要场所, 在其它硬骨鱼如红旗东方鲀(*Takifugu rubripes*)^[39], 牙鲆^[3], 河豚^[8]以及鲤^[8]也出现了相同的现象。

经 JT2 腹腔刺激后, 腹腔注射组 μ 链的表达量在肝脏、肾脏、头肾从 0 h 至 192 h 呈增加趋势; 在心脏和鳃中呈先增加后减少; 在脾脏、肠、脑以及胃中的表达量从 0 h 至 192 h 则是逐渐减少。经 JT2 腹腔刺激后 Ig μ 在肾、头肾以及肝脏中的表达量显著增加。从时间来看, 鳃、胃、肠中 Ig μ 的表达

较快并且表达量较高, 在 192 h 时又下降, 因此, 黏膜免疫屏障最先抵御外来抗原发挥作用, 其后, 依次是肝脏、脾脏、肾、头肾产生免疫应答, 说明系统免疫在长时间的抵御外来抗原时发挥着重要作用。

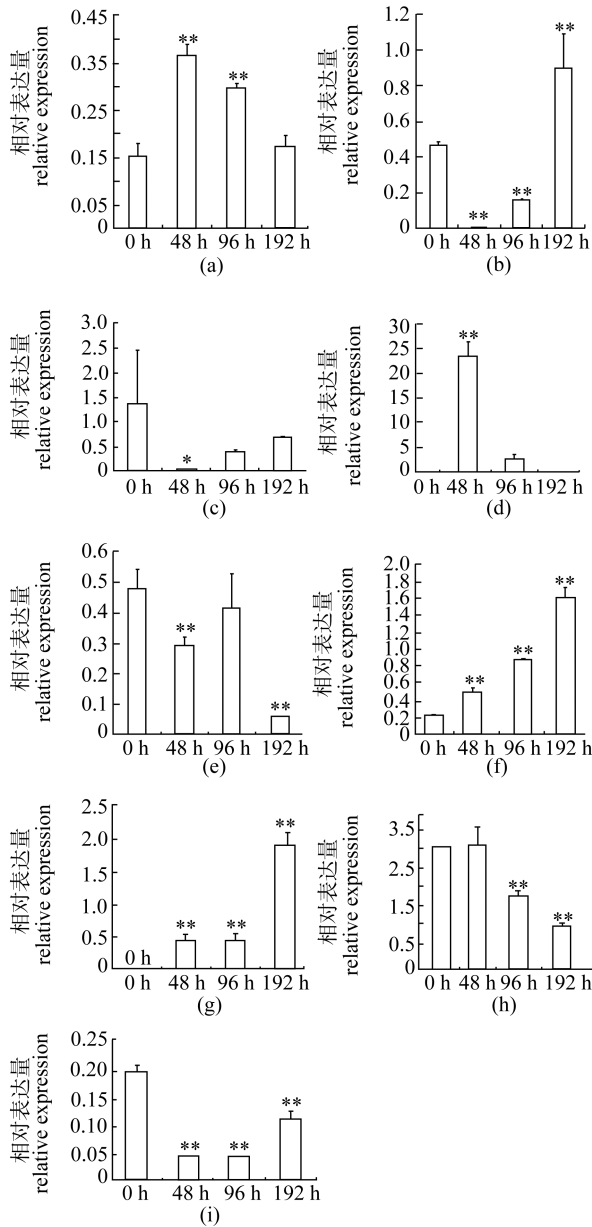


图 7 μ链在军曹鱼各组织中的表达 (a)心脏; (b)肝脏; (c)脾脏; (d)鳃; (e)胃; (f)头肾; (g)肾; (h)肠; (i)脑。* 与对照组相比差异显著(0.01<P<0.05); ** 与对照组相比差异极显著(P<0.01)。

Fig. 7 The expressions of μ chain gene in varieties of tissues of *R. canadum*

(a)heart; (b)liver; (c)spleen; (d)gill; (e)stomach; (f)head-kidney; (g)kidney; (h)intestine; (i)brain. * means significant difference (0.01<P<0.05); ** means highly significant difference(P<0.01).

参考文献:

- [1] Stenvik J, Jorgensen T O. Immunoglobulin D (IgD) of Atlantic cod has a unique structure[J]. Immunogenetics, 2000, 51(6): 452-461.
- [2] Hordvik I, Berven F S, Solem S T, et al. Analysis of two IgM isotypes in Atlantic salmon and brown trout[J]. Molecular Immunology, 2002, 39(5): 313-321.
- [3] Hirono I, Nam B H, Enomoto J, et al. Cloning and characterisation of a cDNA encoding Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* IgD[J]. Fish & Shellfish Immunol, 2003, 15(1): 63-70.
- [4] Saha N R, Suetake H, Kikuchi K, et al. Fugu immunoglobulin D: a highly unusual gene with unprecedented duplications in its constant region[J]. Immunogenetics, 2004, 56(6): 438-447.
- [5] Srisapoome P, Ohira T, Hirono I, et al. Genes of the constant regions of functional immunoglobulin heavy chain of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Immunogenetics, 2004, 56(4): 292-300.
- [6] Danilova N, Bussmann J, Jekosch K, et al. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulinZ[J]. Nature Immunology, 2005, 6 (3): 295-302.
- [7] Hansen J D, Landis E D, Phillips R B. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102 (19): 6919-6924.
- [8] Savan R, Aman A, Sato K, et al. Discovery of a new class of immunoglobulin heavy chain from fugu[J]. European Journal of Immunology, 2005, 35(11): 3320-3331.
- [9] Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity[J]. Nature, 1983, 302: 575-581.
- [10] Yancopoulos G D, Alt F W. Reconstruction of an immune system[J]. Science, 1988, 241: 1581-1583.
- [11] Matsuda F, Ishii K, Bourvagnet P, et al. The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus[J]. Journal of Experimental Medicine, 1998, 188(11): 2151-2162.
- [12] 张永安, 聂品, 朱作言, 等. 鱼类免疫球蛋白基因结构及抗体多样性的遗传机制[J]. 遗传, 2002, 24(5): 575-580.
- [13] Cheng C A, John J A C, Wu M S, et al. Characterization of serum immunoglobulin M of grouper and cDNA cloning of its heavy chain[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2006, 109(3): 255-265.
- [14] Zhang Y A, Nie P, Wang Y P, et al. cDNA sequence encoding immunoglobulin M heavy chain of the mandarin fish *Siniperca chuatsi*[J]. Fish & Shellfish Immunol

- nology, 2003, 14(5): 477–480.
- [15] Amemiya C T, Litman G W. Complete nucleotide sequence of an immunoglobulin heavy-chain gene and analysis of immunoglobulin gene organization in a primitive teleost species[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, 87(2): 811–815.
- [16] Bengtén E, Leanderson T, Pilström L, *et al.* Immunoglobulin heavy chain cDNA from the teleost Atlantic cod (*Gadus morhua* L): nucleotide sequences of secretory and membrane form show an unusual splicing pattern[J]. European Journal of Immunology, 1991, 21 (3): 3027–3033.
- [17] Hordvik I, Lindstrom C D V, Voie A M, *et al.* Structure and organization of the immunoglobulin M heavy chain genes in Atlantic salmon, *Salmo salar*[J]. Molecular Immunology, 1997, 34(8): 631–639.
- [18] Hansen J, Leong J A, Kaattari S, *et al.* Complete nucleotide sequence of a rainbow trout cDNA encoding a membrane bound form of immunoglobulin heavy chain[J].Molecular Immunology, 1994, 31(6): 499–501.
- [19] Ghaffari S H, Lobb C J. Cloning and sequence analysis of channel catfish heavy chain cDNA indicate phylogenetic diversity within the IgM immunoglobulin family [J]. Journal of Immunology, 1989, 142(2): 1356–1365.
- [20] Danilova N, Hohman V S, Kim E H, *et al.* Immunoglobulin variable-region diversity in the zebrafish[J]. Immunogenetics, 2000, 52(1): 81–91.
- [21] Watts M, Munday B L, Burke C M. Isolation and partial characterisation of immunoglobulin from southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii* Castelnau[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2001, 11(6): 491–503.
- [22] Palenzuela O, Sitja-Bobadilla A, Alvarez-Pellitero P. Isolation and partial characterization of serum immunoglobulins from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 1996, 6(3): 81–94.
- [23] Suresh Babu P P, Shankar K M, Honnananda B R, *et al.* Isolation and characterization of immunoglobulin of the Indian major carp, rahu [*Labeo rohita* (Ham.)][J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 24(6): 779–783.
- [24] Grove S, Tryland M, Press C M, *et al.* Serum immunoglobulin M in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): characterisation of the molecule and its immunoreactivity[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 20(1): 97–112.
- [25] Al-Harbi A H, Truax R, Thune R L. Production and characterization of monoclonal antibodies against tilapia *Oreochromis niloticus* immunoglobulin[J]. Aquaculture, 2000, 188(3–4): 219–227.
- [26] Feng J, Guan R, Lin P, *et al.* Molecular cloning and characterization analysis of immunoglobulin M heavy chain gene in European eel (*Anguilla anguilla*)[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2009, 127(1–2): 144–147.
- [27] Estevez J, Leiro J, Sanmartin M L, *et al.* Isolation and partial characterization of turbot immunoglobulins [J].Comparative Biochemistry and Physiology: Part A:Physiology, 1993, 105(2): 275–281.
- [28] Rombout J, Taverne N, de Kamp M V, *et al.* Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp[J]. Developmental and Comparative Immunology, 1993, 17(4): 309–317.
- [29] Lobb C J, Olson M O. Immunoglobulin heavy chain isotypes in a teleost fish[J]. Journal of Immunology , 1988, 141(8): 1236–1245.
- [30] 郭明元, 刘广锋, 冯娟. 1 株军曹鱼病原弧菌的鉴定及其系统发育树分析[J]. 中国水产科学, 2006, 13(5): 823–828.
- [31] 侯月娥, 冯娟, 宁章勇, 等. 军曹鱼 Ig κ 轻链 cDNA 克隆及组织表达分析[J]. 中国水产科学, 2011, 18(1): 48–58.
- [32] 邱丽华, 冯娟, 江世贵, 等. 军曹鱼白细胞介素 1 β 基因的克隆、分析及表达[J]. 中国水产科学, 2005, 12(2): 119–125.
- [33] Saha N R, Suetake H, Suzuki Y. Analysis and characterization of the expression of the secretory and membrane forms of IgM heavy chains in the pufferfish, *Takifugu rubripes*[J]. Molecular Immunology, 2005, 42 (1), 113–124.
- [34] Toshiaki M, Maki O, Daisuke T, *et al.* Monoclonal antibodies recognising serum immunoglobulins and surface immunoglobulin-positive cells of puffer fish, torafugu (*Takifugu rubripes*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2004, 17(3): 211–222.
- [35] Mudjekeewis D, Santos A, Tatsuo S T B, *et al.* Characterization of polyclonal antibodies against Japanese flounder IgM derived from recombinant IgM constant region proteins[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(2): 334–337.
- [36] Stenvika J, Schröder M B, Olsena K, *et al.* Expression of immunoglobulin heavy chain transcripts (VH-families, IgM, and IgD) in head kidney and spleen of the Atlantic cod (*Gadus morhua* L.)[J]. Developmental and Comparative Immunology, 2001, 25(4): 291–302.
- [37] Melanie R W, Eric-van R, Norman W M, *et al.* cDNA sequences and organization of IgM heavy chain genes in two holostean fish[J]. Developmental and Comparative Immunology, 1995, 19(2): 153–164.
- [38] Miller F, Metzger H. Characterization of a human macroglobulin. I. The molecular weight of its subunit[J]. Journal of Biological Chemistry, 1965, 240: 3325–3333.
- [39] Rogers J, Early P, Carter C, *et al.* Two mRNAs with different 3' ends encode membrane-bound and secreted forms of immunoglobulin m chain[J]. Cell, 1980, 20: 303–312.
- [40] Nil R S, Hiroaki S. Yuzuru S. Analysis and characterization of the expression of the secretory and membrane forms of IgM heavy chains in the pufferfish, *Takifugu rubripes*[J]. Molecular Immunology, 2004, 42(1): 113–124.

- [41] Coscia M R, Morea V, Tramontano A, *et al.* Analysis of a cDNA sequence encoding the immunoglobulin heavy chain of the Antarctic teleost *Trematomus bernacchii*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2000, 10(4): 343–357.
- [42] Wilson M R, Marcuz A, van Ginkel, *et al.* The immunoglobulin M heavy chain constant region gene of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*: an unusual mRNA splice pattern produces the membrane form of the molecule[J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18 (17): 5227–5233.
- [43] Williams A F, Barclay A N. The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition[J]. *Annual Review of Immunology*, 1988, 6: 381–405.
- [44] Nelson J S. *Fishes of the World* [M]. 3rd edn. New York: John Wiley & Son Inc, 1994.

Full-length cDNA cloning of IgM heavy chain of cobia *Rachycentron canadum* and quantitative analysis in different tissues

HOU Yue-e^{1,2}, FENG Juan^{1*}, GUO Zhi-xun¹, GUO Ji-yu², XU Li-wen¹, SU You-lu¹

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

2. Animal Husbandry and Fisheries Research Center of Haid Group Co., Ltd, Guangzhou 511400, China)

Abstract: Full-length cDNA of IgM heavy chain of cobia (*Rachycentron canadum* Linnaeus) was amplified by the techniques of Rapid Amplification of cDNA ends (RACE) and PCR, and expression of target gene was analyzed by the method of real time RT-PCR in different tissues. The full-length cDNA of μ of cobia is 1 933 bp, with a 5' terminus untranslated region (UTR) of 26 bp and a 3' terminus UTR of 164 bp, carried an open reading frame (ORF) of 1 743 bp, encoding 580 amino acids with estimated molecular weight of 64.83 ku and the theoretical isoelectric point of 6.6. The similarity of the deduced Ig μ amino acid sequences of cobia was less than 30%, when compared with those of other animals. Moreover, similarities of the conservative CH4 region of cobia, to other fish were 64%–71%. But, to other living things, similarity was only 31%–33%, having a strong specificity. Clustal X analysis indicated that there existed conserved amino acid sites (cysteines, tryptophans) and two E-box motifs GKGLEW at framework region two and YYCAR at framework region three, respectively in the IgM heavy chain of cobia. Ig μ gene was expressed in all the tissues but kidney in healthy cobia and the expression with the highest quantity was present in intestine by real time RT-PCR. The target gene was respectively expressed in all tissues of cobia after stimulation by intraperitoneal injection with *Vibrio carchariae* for 48 h, 96 h and 192 h. The expression of Ig μ gene was significantly increased in heart, gill and intestine after 48 h. Increased expression of gene in spleen, stomach, brain was after 0 h and in liver, head kidney and kidney was after 192 h. Conclusion could be drawn that mucosal immune defended against foreign pathogens as the first barrier, followed by the liver, spleen, kidney, head kidney immune response, which indicated that immune system plays an important role in defense against foreign pathogens for a long time.

Key words: *Rachycentron canadum*; immunoglobulin; IgM; cDNA full-length; real time RT-PCR

Corresponding author: FENG Juan. E-mail: annyfeng@163.com