

斜带石斑鱼 IgM、IgZ 和 IgD 重链基因的克隆

黄 贝^{1,2}, 陈善楠^{1,2}, 徐 镇¹, 聂 品^{1*}

(1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430072;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 应用 RACE 方法获得斜带石斑鱼膜结合型免疫球蛋白 M(membrane-bound immunoglobulin M, mIgM), 膜结合型免疫球蛋白 D(mIgD), 分泌型免疫球蛋白 Z(secretory immunoglobulin Z, sIgZ)的重链基因。斜带石斑鱼膜结合型 IgM 重链恒定区包含 3 个恒定区结构域($\mu 1$, $\mu 2$, $\mu 3$)以及两个跨膜外显子(TM1, TM2), TM1 外显子与 $\mu 3$ 结构域末端相连接。氨基酸序列相似性分析结果显示,斜带石斑鱼 mIgM 各恒定区与牙鲆 mIgM 恒定区相似性最高,为 53%~78%。mIgD 的 cDNA 全长为 3 375 bp, 开放阅读框包含 3 006 bp, 其恒定区由 1 个 $\mu 1$ 外显子, 7 个 δ 外显子以及跨膜区组成。斜带石斑鱼 IgD 恒定区与鳊 IgD 各恒定区氨基酸序列相似性最高, $\delta 1$ ~ $\delta 7$ 的相似性分别为 75.5%、75.8%、65.4%、76.6%、88.1%、90.6%、82.8%, TM 结构域为 82.7%。sIgZ 的基因结构与其他硬骨鱼类 sIgZ 的结构相似, 包括 4 个外显子和 3 个内含子, 内含子长度分别为 222、129 和 458 bp。利用半定量 PCR 分别检测了这 3 种基因在斜带石斑鱼各器官/组织中的表达, 发现 mIgM 在头肾、肾脏、脑、脾脏、肠、鳃、心脏和胸腺中均有表达; mIgD 的 mRNA 在头肾、肾脏以及胸腺中有较高的表达, 在肠中表达量较低; sIgZ mRNA 主要分布于淋巴组织如头肾、肾及脾脏中, 而在鳃、心脏和胸腺中的丰度较低。

关键词: 斜带石斑鱼; 免疫球蛋白; 膜结合型免疫球蛋白 M; 膜结合型免疫球蛋白 D; 分泌型免疫球蛋白 Z

中图分类号: Q 785;S 917.4

文献标志码: A

免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)是免疫系统中的重要组成部分,目前,在硬骨鱼类中已发现了 IgM、IgD、IgZ(亦称 IgT)、IgH 和 IgM-IgZ^[1-3]。硬骨鱼类免疫球蛋白转录过程与哺乳动物相似,即由基因座 5'上游区域一个高变区(variable segment, V), 一个多变区(diversity segment, D) 和一个连接区区段(joining segment, J)融合在一起编码 Ig 可变区,再与位于基因座 3'末端的免疫球蛋白恒定区区段(constant segment, C)结合在一起共同编码免疫球蛋白重链^[2-3]。免疫球蛋白具有分泌型和膜结合型两种形式,前者存在于血清和体液中,介

导体液免疫应答;后者作为 B 细胞表面受体执行抗原识别的功能^[4]。

硬骨鱼类 IgM 有分泌型和膜结合型两种形式,其重链基因分别包含 4 个和 3 个恒定区^[3, 5]。IgD 重链(δ)的基因结构在不同鱼类中存在差异。如斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)免疫球蛋白重链基因座中包含有 3 个 IgD 基因,分别命名为 IGHD1, IGHD2 和 IGHD3。其中 IGHD1 有 14 个外显子,其基因结构为 C $\delta 1$ -(C $\delta 2$ -C $\delta 3$ -C $\delta 4$)₃-C $\delta 5$ -C $\delta 6$ -C $\delta 7$ -TM。IGDH2 基因只有 3 个外显子,由完整的 C $\delta 1$ 和 C $\delta 2$ 以及一个不完整的 C $\delta 3$ 外显子组成。C $\delta 3$

收稿日期: 2012-02-09

修回日期: 2012-03-13

资助项目: 国家自然科学基金委与广东省联系基金(U0631010); 国家“九七三”重点基础研究发展计划(2009CB118703)

通讯作者: 聂 品, E-mail: pinnie@ihb.ac.cn

外显子有两个核苷酸的缺失而造成移码, 翻译终止。由于未能扩增到 IGDH2 基因的转录本, 所以 IGDH2 是否是一个假基因目前还没有定论。IGDH3 与 IGDH1 同源性很高, 其区别在于 IGDH3 最后一个外显子是编码 IgD 的分泌片, 而 IGDH1 的最后一个外显子则编码的是跨膜区^[6]。红鳍东方鲀(河豚) (*Fugu rubripes*)膜结合型 IgD 基因的 C δ 1-C δ 2-C δ 3-C δ 4-C δ 5-C δ 6 有两个重复, 其基因结构为 VDJ-C μ 1-(C δ 1-C δ 2-C δ 3-C δ 4-C δ 5-C δ 6)₂-C δ 7-TM^[7]。三棘刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)基因组中有 3 个免疫球蛋白基因座, 每个基因座上的 IgD 都没有外显子的重复, 且 3 个基因座上的 IgD 氨基酸序列的相似性高达 90%。虽然在三棘刺鱼中有 3 个 IgD, 但目前没有证据证明这 3 个 IgD 在功能上有区别^[8]。Danilova 等^[9]和 Hansen 等^[10]分别报道了斑马鱼 (*Danio rerio*)和虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)中的一种新型的免疫球蛋白, 分别命名为 IgZ 和 IgT, 它们实际上是同一种类型的免疫球蛋白^[3]。IgZ/T 重链恒定区基因位于 IgM 恒定区基因的上游, 有其特有的 D 区和 J 区, 即 V 区基因区段位于两个连锁的 D-J-C 簇的上游, 通过 V 区段与(DJC) μ 或者(DJC) ζ 基因重组形成 IgM 或 IgZ。硬骨鱼类 IgZ/T 重链恒定区由 4 个外显子组成, 也存在膜结合型和分泌型两种形式。其中膜结合型的产生方式与哺乳动物 IgM 膜结合型产生方式类似, 即由膜外显子 TM1 与在 μ 4 中的一个隐蔽性位点剪切连接而成。此后在草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 中也报道了这种新型的免疫球蛋白^[11]。此外, 研究人员在红鳍东方鲀中发现了一种仅有两个恒定区构成的新型免疫球蛋白重链基因, 并命名为 IgH^[12]。在鲤 (*Cyprinus carpio*)中还报道了一种 IgM-IgZ 嵌合体, 该基因由 V 区和两个恒定区组成^[13]。三棘刺鱼中有 4 个 IgT 基因座, 且三棘刺鱼 IgT 基因只有 3 个恒定区^[8]。可见, 不同鱼类 Ig 组成类型可能存在差异, 甚至在 Ig 重链基因座方面也存在一定的差异。

石斑鱼是我国重要的海水养殖对象, 但随着其养殖规模的扩大, 病害问题已严重困扰着石斑鱼养殖业的发展。近年来, 石斑鱼免疫系统的研究已得到学术界的关注, 但目前关于石斑鱼免疫球蛋白的相关报道却很少^[14]。本实验报道了斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*) 3 种类型的免疫球蛋白, 即膜结合型 IgM、分泌型 IgZ、膜结合型 IgD 的免

疫球蛋白序列, 并对它们的表达模式进行了初步研究, 为进一步研究石斑鱼免疫球蛋白在免疫反应中的作用, 及石斑鱼的养殖和病害防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 提取总 RNA 及合成第一链 cDNA

斜带石斑鱼(体质量约 400 g)于 2009 年 6 月购自广东海洋大学实验场, 暂养 2 周后, 取其头肾、肾脏、脾脏、脑、肠、鳃和胸腺。按 Trizol(Invitrogen)说明书提取总 RNA。在进行逆转录之前, 进行 DNase I 处理, 去除基因组污染。将经 DNase 处理的总 RNA 分别利用反转录试剂盒 SMART cDNA Synthesis Kit (Clontech)进行反转录合成 cDNA 第一链。

1.2 扩增免疫球蛋白基因序列

根据已知斜带石斑鱼 IgM, IgZ 序列设计特异性引物 MF/MR 和 ZF/ZR, 以及已报道的三棘刺鱼、河豚 IgD 恒定区序列保守位置设计特异性引物 DF 和 DR, 扩增得到恒定区中间片段后, 分别设计巢式引物, 经两轮 PCR 反应扩增其 3'和 5'端片段。反应条件为 94 °C 预变性 5 min 后; 94 °C 变性 30 s, 66 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 运行 7 个循环; 94 °C 30 s, 64 °C 30 s, 72 °C 1 min, 运行 18 个循环; 72 °C 延伸 10 min。从第一轮 PCR 扩增产物中取 1 μ L 作为第二轮 PCR 反应的模板, 反应条件同上, PCR 反应运行 35 个循环。根据所获得的 IgZ cDNA 序列设计特异引物扩增斜带石斑鱼 IgZ 基因组全长(表 1)。目的产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳后, 用凝胶 DNA 回收试剂盒(Omega)纯化并连接到 pMD-18T(TaKaRa)载体上, 热转化到大肠杆菌 *Escherichia coli* M15 感受态中, 经 PCR 检测阳性克隆后测序验证。

1.3 序列分析

将所获得的序列用 BLAST X 程序在 GenBank 数据库中进行序列比对; 使用 EXPASY 网站的在线翻译程序(<http://web.expasy.org/translate/>)进行氨基酸序列的推断; 通过 NetNGlyc1.0 在线分析软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)进行 N-糖基化位点的预测; 使用 Clustal W 2.0 程序进行氨基酸序列的多重比对; 采用 MEGA 4.0 中的邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统进化树。

1.4 RT-PCR 分析斜带石斑鱼 IgZ、IgM、IgD 的表达模式

RT-PCR 以反转录产物为模板, β -actin 作为内参基因进行扩增。取等量 PCR 产物进行电泳, 根据电泳结果中条带的强弱来调整各组织模板浓度至最终在各组织中扩增的 β -actin 基因的条带亮度基本一致。分别以 EZF 和 EZR(IgZ), EMF/EMR

(IgM), EDF/EDR(IgD)进行扩增。PCR 反应的条件为 94 °C 预变性 4 min 后; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 用于扩增 IgM 和 IgD 的 PCR 为 30 个循环; 用于扩增 IgZ 的 PCR 为 45 个循环; 用于扩增 β -actin 的 PCR 为 25 个循环; 所用引物见表 1。

表 1 实验中所用引物序列
Tab. 1 Primers used in the study

引物 primer	引物序列(5'-3') sequence	用途 usage
MF	TGAGCAAACAGGACTGGGACG	
MR	TGAGTTTGCTTCCTCGTCATCG	
ZF	CAAAAGCCTCCTCCACCTCCTA	克隆中间片段
ZR	GTATCTTCTCTCCAGGCGATGTAGT	cloning for the internal fragments
DF	GCTTCACACCCTCCTCACTGACCTAC	
DR	TCATTGCTGCGACTCACTGGTGGCTCC	
M3Fout	GGGAAATGTA AAAATGTCAAGTCAAGA	
M3Fin	ACCGTGACCCTGACTTGCTATGT	
M5Rout	ACATCTGCTTCCACGCATCCT	
M5Rin	GCCCTCATCAGAGCAGGTCAT	
Z3Fout	CGAGGTGACGAACCAAGGAACAA	
Z3Fin	CTGACCCAATCAAGTCCCAAAGA	
Z5Rout	TTTGCTGGTTGTTGCTGAA	克隆基因末端序列
Z5Rin	CCTTAGGAGGTGGAGGAGGCTT	cloning for the 5' and 3' ends
D5R1out	TTGTCCCGCTTCCACTCCACAC	
D5R1in	AGGGTGCAGACAAGTCTGACTG	
D3F1out	GGTCTTCTGAGTCTCAGCAAAG	
D3F1in	GGGTGCAGATGGGCGTGTGA	
D3F2out	GTACTGGGAGGAGAATGACCAG	
D3F2in	CCCTTCAACTCGCTACACCAACAG	
Z_IntronF1	CCTACGGTTATGAAAGACAACAAAT	
Z_IntronR1	GGCAGTCAGTGAAGCCAGTAACA	克隆内含子序列
Z_IntronF23	GGTGACGAACCAAGGAACAACATA	cloning for the intronic sequences
Z_IntronR23	TTGTCCAGTATCTTCTCTCCAGGC	
EMF	GGACGATTGAATTATGGAATGC	
EMR	TGGTGAACAGCAGAGTGATAAGG	
EZF	CACCAGTTATTCAGGAACTGACC	
EZR	CTCTCCAGGCGATGTAGTAATCC	组织表达分析
EDF	GTGTGGAGTGGAAGCGGGACA	expression analysis
EDR	CTGCCAGGTCAACTTGCGTC	
Actin F	GAGAGGGAAATCGTGCGTGA	
Actin R	CATACCGAGGAAGGAAGGCTG	

2 结果

2.1 斜带石斑鱼膜结合型 IgM

斜带石斑鱼 mIgM(GenBank 登录号: JQ743909) 重链恒定区由 3 个恒定区结构域以及两个 TM 结构域组成, 其结构与斑点叉尾鲷 mIgM 相似, TM1 外显子与 $\mu 3$ 结构域末端相连接, 在其 $\mu 2$ 结构域中有两个糖基化位点(NGT, NSS)。氨基酸序列相似性分析的结果显示, 斜带石斑鱼 mIgM 各恒定区与牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) mIgM 恒定区相似性最高 (53%~78%)。序列比对结果表明, 硬骨鱼类 mIgM

各恒定区都有两个位置十分保守的半胱氨酸(图 1)。此外在 $\mu 1$ 结构域的 5' 端还有一个用于连接重链和轻链的半胱氨酸。与其他硬骨鱼类 mIgM 类似, 斜带石斑鱼 mIgM 的跨膜区存在一个 CART 基序。该基序富含苏氨酸, 苯丙氨酸和亮氨酸。系统进化分析结果显示, 硬骨鱼类 mIgM 聚为一类, 而 IgZ 则与嵌合型 IgM-Z 聚为一类(图 2)。系统进化树的拓扑结构表明, 在这 3 种类型的免疫球蛋白中, 从进化的角度上看, 嵌合型 IgM-Z 与 IgZ 具有更密切的联系。

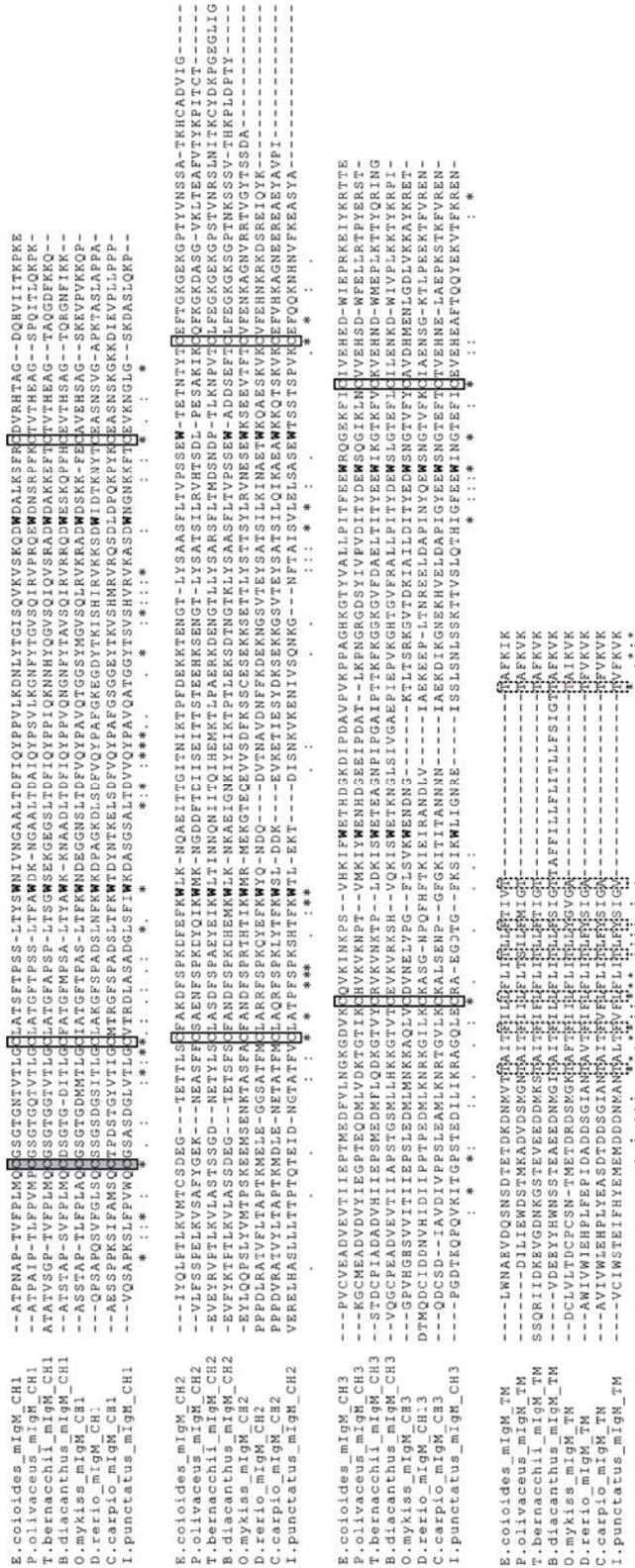


图 1 斜带石斑鱼 mIgM 与其他硬骨鱼类 mIgM 恒定区氨基酸序列比较

相同的氨基酸用 * 表示, 相似的氨基酸用 . 和 : 表示。灰色方框内的氨基酸表示用于连接轻链的半胱氨酸, 实框内的氨基酸表示用以形成链内二硫键的半胱氨酸, 加粗字体的氨基酸表示保守的色氨酸, 虚线框中的氨基酸表示保守的 CART 基序。所用序列的 GenBank 登录号及对应缩写如下: 斜带石斑鱼 JQ743909; 牙鲆 BAC99314.1; 伯氏肩孔南极鱼 ABY22508.1; 双棘牛鱼 ABX52073.3; 虹鳟 AAA56662.1; 斑马鱼 AAT67445.1; 鲤 BAA34719.1; 斑点叉尾鮰 PIR: S78042。

Fig. 1 Multiple alignment of deduced amino acid sequences of mIgM heavy chain CH domains in orange-spotted grouper in comparison with those in other teleost fish

Identical residues are indicated with asterisks (*), and similar amino acids are indicated with dots and colons. Cysteine residues predicted to form a disulphide bond between heavy and light Ig chains are highlighted in gray. The conserved cysteine residues predicted important for disulphide linkage are boxed. Tryptophan residues required for the formation and stabilization of the tertiary structure of immunoglobulin are indicated in bold letters. The conserved amino acids in the CART-motif are boxed with dash line. GenBank accession numbers are as follows: orange-spotted grouper *E. coioides* JQ743909; olive flounder *P. olivaceus* BAC99314.1; emerald rockcod *T. bernacchii* ABY22508.1; klipfish *B. diacanthus* ABX52073.3; rainbow trout *O. mykiss* AAA56662.1; zebrafish *D. rerio* AAT67445.1; common carp *C. carpio* BAA34719.1; channel catfish *I. punctatus* PIR: S78042.

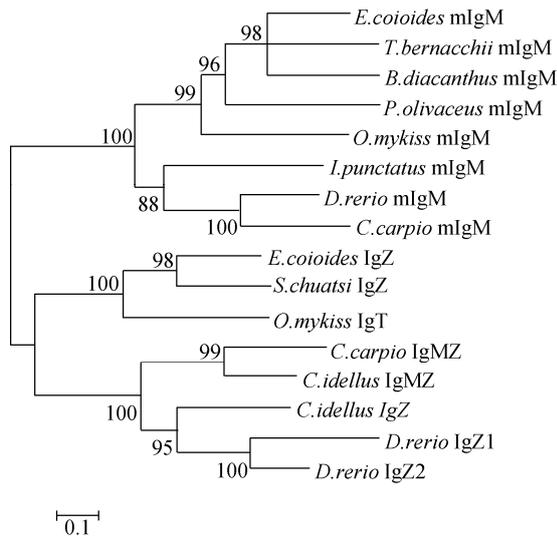


图 2 硬骨鱼类 IgM、IgZ 和嵌合体 IgM-Z 的系统发育树

节点上的数字表示为 bootstrap 的置信度。所用序列的 GenBank 登录号: mIgM. 斜带石斑鱼 JQ743909; 伯氏肩孔南极鱼 mIgM ABV22508; 牙鲆 mIgM BAC99314; 双棘牛鱼 mIgM ABX52073; 虹鳟 mIgM AAA56662; 斑点叉尾鲷 mIgM PIR.S78042; 斑马鱼 mIgM CAI11476; 鲤 mIgM BAA34719; 斜带石斑鱼 IgZ ACZ54909; 鳊 IgZ AAY42141; 虹鳟 IgZ AAW66978; 斑马鱼 IgZ1 CAI20891; 斑马鱼 IgZ2 ACH92959; 草鱼 IgZ ABF19723; 鲤 IgM-Z BAJ41038; 草鱼 IgM-Z ABV32163。

Fig. 2 Phylogenetic analysis of mIgM, IgZ and chimera IgM-Z in teleost fish

Bootstrap values are indicated at nodes. GenBank accession numbers are as follows: mIgM. *E. coioides* JQ743909; *T. bernacchii* ABV22508; *P. olivaceus* BAC99314; *B. diacanthus* ABX52073; *O. mykiss* AAA56662; *I. punctatus* S78042; *D. rerio* CAI11476; *C. carpio* BAA34719; IgZ: *E. coioides* ACZ54909; *S. chuatsi* AAY42141; *O. mykiss* AAW66978; *D. rerio* IgZ1 CAI20891; *D. rerio* IgZ2 ACH92959; *C. idellus* ABF19723; chimera IgM-Z: *C. carpio* BAJ41038; *C. idellus* ABV32163.

2.2 斜带石斑鱼膜结合型 IgD

斜带石斑鱼 mIgD (GenBank 登录号: JQ743910) cDNA 序列全长 3 375 bp, 其 5' 和 3' 非编码区分别包含 30、339 bp。开放阅读框的长度为 3 006 bp, 编码 1 002 个氨基酸。同源性比对分析结果显示, 斜带石斑鱼 mIgD 的重链恒定区与大多数硬骨鱼相似, 在 IgD 转录时剪切 IgM 的 $\mu 1$ 连接 IgD 的 $\delta 1$ 而形成嵌合结构。各结构域的排列顺序为 Leader-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4- $\mu 1$ - $\delta 1$ - $\delta 2$ - $\delta 3$ - $\delta 4$ - $\delta 5$ - $\delta 6$ - $\delta 7$ -TM。氨基酸序列比对结果显示, 斜带石斑鱼 IgD 恒定区与鳊 IgD 的相对应的恒定区氨基酸序列相似性最高, $\delta 1$ ~ $\delta 7$ 的相似性分别为 75.5%、75.8%、65.4%、76.6%、88.1%、

90.6%、82.8%, TM 结构域为 82.7%。在各恒定区中, 用于形成链内二硫键的半胱氨酸的位置都较为保守(图 3)。 $\delta 1$ 、 $\delta 2$ 、 $\delta 4$ 和 $\delta 5$ 的 3' 末端包含有一个额外的半胱氨酸。此外在 $\delta 1$ 、 $\delta 2$ 、 $\delta 4$ 、 $\delta 5$ 中存在两个位置保守的色氨酸。而在 $\delta 6$ 中, 第二个色氨酸被谷氨酸所替代; $\delta 7$ 中第二个色氨酸被精氨酸替代; 在 $\delta 3$ 的两个相应位置都没有色氨酸。利用 IgD 各恒定区氨基酸序列构建系统进化树, 表明硬骨鱼类 IgD 的各恒定区分别聚在一起, 且 $\delta 3$ 与 $\delta 6$ 聚为一支, $\delta 2$ 与 $\delta 5$ 聚为一支, $\delta 4$ 与 $\delta 7$ 聚在一支。所有硬骨鱼类的 $\delta 1$ 恒定区聚在一起(图 4)。

2.3 斜带石斑鱼分泌型 IgZ

根据斜带石斑鱼 sIgZ 序列(GenBank 登录号: ACZ54909.1), 设计特异引物扩增得到其重链恒定区基因组序列。经比对分析发现, 其基因结构与其他硬骨鱼类 sIgZ 的结构相似, 包括 4 个恒定区外显子、3 个内含子(分别为 Intron 1: 222 bp; Intron 2: 129 bp; Intron 3: 458 bp), 所有的外显子与内含子的界限都遵循 GT-AG 法则。序列分析结果显示, 斜带石斑鱼 sIgZ 重链恒定区中具有 4 个潜在的糖基化位点: $\zeta 3$ 结构域中的 NVTD 位点, 以及 $\zeta 4$ 结构域 3 个位点(NMTP、NTTK 和 NKSM)。将斜带石斑鱼 sIgZ 与鳊 IgZ、虹鳟 IgZ、草鱼 sIgZ、斑马鱼 sIgZ1 和斑马鱼 sIgZ2 恒定区氨基酸序列进行比对, 发现所有恒定区都有两个位置十分保守的半胱氨酸, 推测这两个半胱氨酸用于形成链内二硫键(图 5)。此外, 在所比对的硬骨鱼类 sIgZ 的 $\zeta 1$ 恒定区的 5' 端, 还有一个额外的半胱氨酸, 用以与轻链结合。所有恒定区中还有用于形成和稳定蛋白质三级结构的色氨酸, 其位点也十分保守。比较斜带石斑鱼 sIgZ 的恒定区与其他硬骨鱼类 sIgZ 恒定区氨基酸序列发现, 斜带石斑鱼 sIgZ 与鳊 sIgZ 的恒定区氨基酸相似性较高(57%~61%), 而与其他物种的相似性仅为 22%~45%。

2.4 斜带石斑鱼免疫球蛋白基因的表达

半定量 PCR 检测了斜带石斑鱼 IgZ、IgM 和 IgD 的组织表达, 发现斜带石斑鱼 IgM 在所检测的组织中都有表达。IgD 则主要在头肾、肾脏、脾脏和胸腺中表达。IgZ 在头肾、肾脏、脾脏中大量表达, 在鳃和心脏组织中也可见表达(图 6)。

```

E.colioides_Igd_CH1
S.chuatsi_Igd_CH1
O.mykiss_Igd_CH1
C.idellus_Igd_CH1
D.rerio_Igd_CH1

E.colioides_Igd_CH2
S.chuatsi_Igd_CH2
O.mykiss_Igd_CH2
C.idellus_Igd_CH2
D.rerio_Igd_CH2

E.colioides_Igd_CH3
S.chuatsi_Igd_CH3
O.mykiss_Igd_CH3
C.idellus_Igd_CH3
D.rerio_Igd_CH3

E.colioides_Igd_CH4
S.chuatsi_Igd_CH4
O.mykiss_Igd_CH4
C.idellus_Igd_CH4
D.rerio_Igd_CH4

E.colioides_Igd_CH5
S.chuatsi_Igd_CH5
O.mykiss_Igd_CH5
C.idellus_Igd_CH5
D.rerio_Igd_CH5

E.colioides_Igd_CH6
S.chuatsi_Igd_CH6
O.mykiss_Igd_CH6
C.idellus_Igd_CH6
D.rerio_Igd_CH6

E.colioides_Igd_CH7
S.chuatsi_Igd_CH7
O.mykiss_Igd_CH7
C.idellus_Igd_CH7
D.rerio_Igd_CH7

E.colioides_Igd_TM
S.chuatsi_Igd_TM
O.mykiss_Igd_TM
C.idellus_Igd_TM
D.rerio_Igd_TM

-ERVVPPNTHLHPVMDNVGVGSSVRLVLTLSGYDFDELVSVEKRRDNLOPAKSPKLOSGADGTGKFTSLTSEIEPKTEWERSNFTKSTHKDOE-----YKKTISICO
SORDVSPNTHLHPVMDNVGVGSSVRLVLTLSGYDFDELVSVEKRRDNLOPAKSPKLOSGADGTGKFTSLTSEIEPKTEWERSNFTKSTHKDOE-----YKKTISICO
LORVPPNTHLHPVMDNVGVGSSVRLVLTLSGYDFDELVSVEKRRDNLOPAKSPKLOSGADGTGKFTSLTSEIEPKTEWERSNFTKSTHKDOE-----YKKTISICO
LKEVSVETWALLS-KEE--GD-CIVLEKOLKDYVEEYFVWMLSDNHOPL-ANYKXKLVONIGKVKRYKYSIQIIGL--YEGKRYTKAKHESKT-----FTQEYNSCT
---TKPRIALLS-RED--GD-RIMELKDYVEEYFVWMLSDNHOPL-ANYKXKLVONIGKVKRYKYSIQIIGL--YEGKRYTKAKHESKT-----FTQEYNSCT
* * * * *
-HSSPPSIHWEIISFKTVNMGAGSTVKAATVRSDFDAKLTWQINGEQA-ERDOVTKNTVIFST-VTVSSNWKKILITKAEHOCFSATETVNVVA
IHSRAAPSIHWEIISFKTVNMGAGSTVKAATVRSDFDAKLTWQINGEQA-ERDOVTKNTVIFST-VTVSSNWKKILITKAEHOCFSATETVNVVA
APRSTPSIHLETFTFTVMTQ--TEVTAQVHVSADVSVMWLLDQKPTSTVNOASSTTOSISNTIPSSQWMLTNTIIRAEHCFNSRTEKTSNVK
SKVSPKIKYKRYRLESEIFKG--GNVLSKIVKAPHTIVSMLANDVQSH--VGIISH-EGPNLIVN-ITISKNEKSLMNTIIRAKHCFEFEKVELPFA-
-HCFIKPQIKNTPLADIIT--GNVLSKIVKAPHTIVSMLANDVQSH--VGIISH-EGPNLIVN-ITISKNEKSLMNTIIRAKHCFEFEKVELPFA-
* * * * *
-PAVT--TPVVTIRSLNELLNGOS-AVLESDQVTLGSSLDLVTFOAGTSDISEKLVLDLPEAPGLHSITRSFVPEHLLKDKKSTK-----
RPAVT--APSVIIRSLPDLKNGS-AVLESDQVTLGSSLDLVTFOAGTSDISEKLVLDLPEAPGLHSITRSFVPEHLLKDKKSTK-----
GPAVSTTVIIRSLPELLKNGS-AVLESDQVTLGSSLDLVTFOAGTSDISEKLVLDLPEAPGLHSITRSFVPEHLLKDKKSTK-----
--DMKKVPVVIIRRFKKS-AGSDGALLVWKSSEVILKFCANADISDFICTDCASENIIWLIPIFFIFIDQKKKDKITLTVIYGFPSRNMKSEFYGIYF
--DVKKDPEVEIRRFKMSAPVSDAVLQVVDGSLPSEVICITVANNVSDIOLDCVDFASFNWSLIIKFIIPSNQIITENNFTIKVHRAPF-KEWITSRPIGHIF
* * * * *
TISLIDCFENLADPSMKLLLAPSEES---GSQTLVRSRGENFQIOWSSSESQORASTNDISMGADGRVTVTSCFOIIPKMSSTGKVTQVSDK-SLGNIRKDISLCS-----
-----VPPSVLELLVFSKES---GFQRLVSSNGDFPQIKWFSQQRSTNDISMGADGRVAVTSLHIPTQEMTKGKFTKVSDDK-SLNNIVEKISLCS-----
-----GELSMELLVFSSESQGTQKLMSSNGFNPKIKWLSSEQKSAADREIMGDEGHVAVTSHITQOEWNEKDFIHEVDDK-DLQKTVRKSLSCT-----
-----GDPTVELVAVFSVQSSSETQLLDSGSDGPKIKWLSSEKVEKHTAFDTMMENGRVRYSEIIVPQOEWNGVYTIQIADGSGTPTQNKDISLCGVQHAIS
-----NASSELVGVKVVQSSSEYQKLLASATGFYPIQIOWLPSQWKAENS-TVTLMOQDGHVKVYSEIILVPODEWKNKVNYTLVTDG-TNKETVEKNTSICS-----
* * * * *
-TPASSQVVYVQVQPPQERQYKGVVTVLVLGSPNDFSVTWKVDGKYSQNVHREPPVRSNTEETMRSTLSVSAQWHAHKRVSBEAKHRCNMGYEDHRSKST
VTPASSQVVYVQVQPPQERQYKGVVTVLVLGSPNDFSVTWKVDGKYSQNVHREPPVRSNTEETMRSTLSVSAQWHAHKRVSBEAKHRCNMGYEDHRSKST
VIAPSSLKAAYLLGPPSNHVRSGAALNLTGFIITGFDFSDLSVWKLNGKLFKLNKNGA--NSGVIQNPIDHANGTQKESILKVFDDMNAHAFTEVKKLCSKDTQOHNSIKTR
-IAPSSQOADVLLGPPSLFVASS--DLNLTGFIQVQVVEYFQWKNVGN--NSGVIQNPIDHANGTQKESILKVFDDMNAHAFTEVKKLCSKDTQOHNSIKTR
* * * * *
-LHPFAVKIIEPAAASDLSTSNFLTLILVSGFFFSNIIVWENGGRLSTRYNSFAWKYTGSTYSMSSSLNASKTEDEKQSTYSVWVHRESS--FESTIKDQV
DLYPFTVKIIQPTASELSTSDVTLILVSGFFFSNIIVWENGGRLSTRYNSFAWKYTGSTYSMSSSLNASKTEDEKQSTYSVWVHRESS--FESTIKDQV
DKQPIVILRPSDLSLQNTSLTDFITGFFSDLSVWKLNGKLFKLNKNGA--NSGVIQNPIDHANGTQKESILKVFDDMNAHAFTEVKKLCSKDTQOHNSIKTR
-PKQPTVILRPSDLSLQNTSLTDFITGFFSDLSVWKLNGKLFKLNKNGA--NSGVIQNPIDHANGTQKESILKVFDDMNAHAFTEVKKLCSKDTQOHNSIKTR
* * * * *
-SVTHSKESVLLQGSDELVLVGFESASINIMWF-DDTKELLDYNTSEPRHGPKFKFIQSHLRLSKASRFIGAVFTQVTHANTLIINTLFLVSNP-
ATEPSEFATLLOGSDELVLVGFESASINIMWF-DDTKELLDYNTSEPRHGPKFKFIQSHLRLSKASRFIGAVFTQVTHANTLIINTLFLVSNP-
GVTSEFATLLOGSDELVLVGFESASINIMWF-DDTKELLDYNTSEPRHGPKFKFIQSHLRLSKASRFIGAVFTQVTHANTLIINTLFLVSNP-
ASVTHSKESVLLQGSDELVLVGFESASINIMWF-DDTKELLDYNTSEPRHGPKFKFIQSHLRLSKASRFIGAVFTQVTHANTLIINTLFLVSNP-
-SLHHSARFASBELLQAGDGLMLVSGFFFSNIIVWENGGRLSTRYNSFAWKYTGSTYSMSSSLNASKTEDEKQSTYSVWVHRESS--FESTIKDQV
* * * * *
-ILEDCELDIIRHIDVNHSGVDSMYAFALFLFLIILYGLVATVIKTK--
DILEDCELDIIRHIDVNHSGVDSMYAFALFLFLIILYGLVATVIKTK--
LLEVEGFEDENRSEPLADTAENNNACIFLFLIILYGLVATVIKTK--
AMFEAIFMNNRSEPLADTAENNNACIFLFLIILYGLVATVIKTK--
-ISEEAIFMNEIKPEFIPQDTVGEVWNNACAFLLFLIILYGLVATVIKTK--
* * * * *

```

图3 斜带石斑鱼 Igd 与其他鱼类 Igd 恒定区及跨膜区氨基酸序列比较

相同的氨基酸用*表示,相似的氨基酸用.和.表示.实框内的氨基酸表示用以形成链内二硫键的半胱氨酸,加粗字体的氨基酸表示保守的色氨酸。所用序列的 GenBank 登录号及对应缩写如下:斜带石斑鱼 JQ743910; 鳙 FJ876151.1; 虹鳟 AAW66976.1; 草鱼 GQ429174.1; 斑马鱼 BX510355.6。

Fig.3 Multiple alignment of deduced amino acid sequences of Igd δ domains in orange-spotted grouper in comparison with those in other teleost fish

Identical residues are indicated with asterisks (*), and similar amino acids are indicated with dots and colons. The conserved cysteine residues predicted important for disulphide linkage are boxed. Tryptophan residues required for the formation and stabilization of the tertiary structure of immunoglobulin are indicated by bold letters. GenBank accession numbers are as follows: *E. coioides* JQ743910; *S. chuatsi* FJ876151.1; *O. mykiss* AAW66976.1; *C. idellus* GQ429174.1; *D. rerio* BX510355.6.

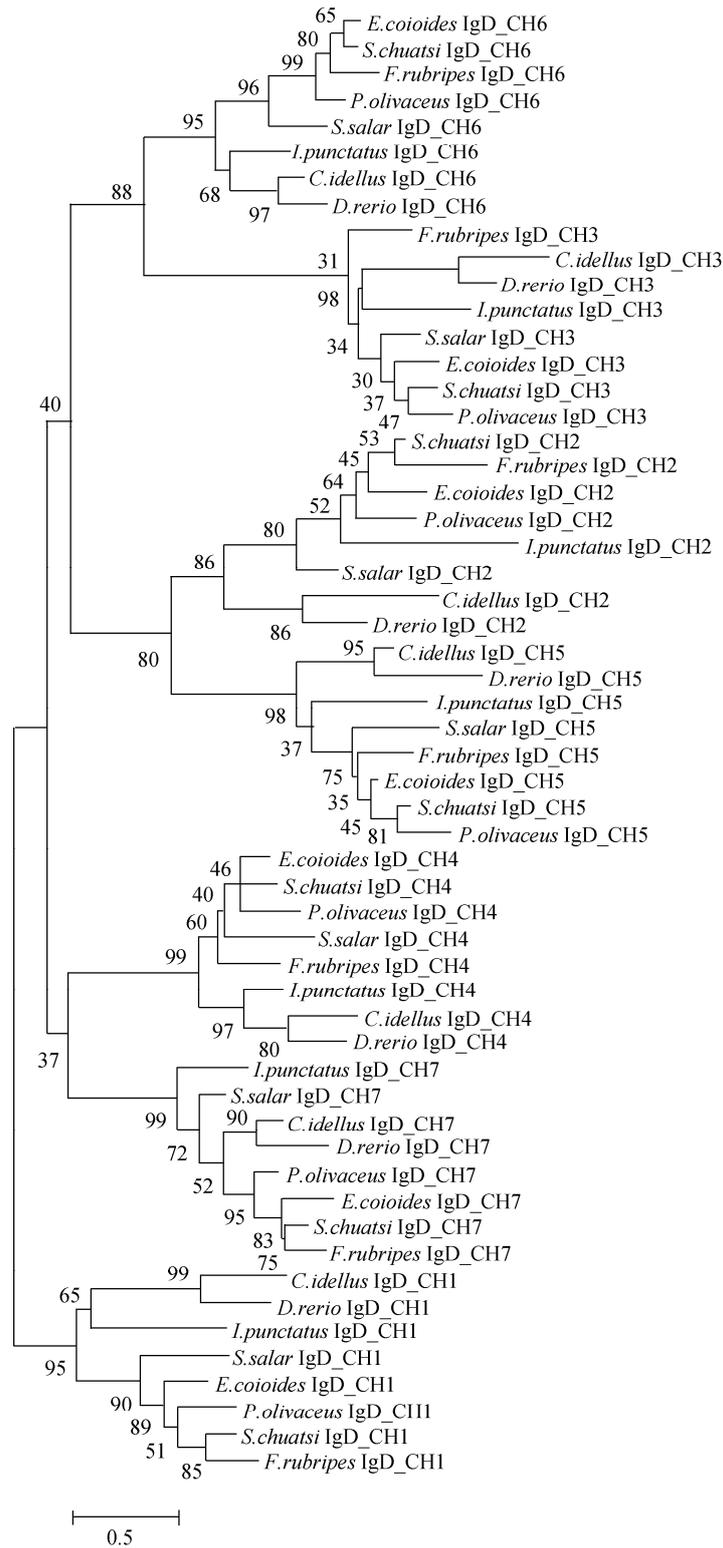


图 4 硬骨鱼类 IgD 恒定区氨基酸序列构建的系统发育树

节点上的数字表示为 bootstrap 的置信度。所用序列的 GenBank 登录号: 斜带石斑鱼 IgD JQ743910; 鳊 IgD ACO88906.1; 草鱼 IgD ADK66818.1; 河豚 IgD BAD34541; 大西洋鲑 IgD AAD43526.1; 牙鲆 IgD BAB41204.1; 斑点叉尾鲷 IgD AAC60133.1; 斑马鱼 IgD CAI11477.1。

Fig. 4 Phylogenetic analysis of IgD CH domains in teleost by using Neighbor-Joining method

Bootstrap values are indicated at nodes. GenBank accession numbers are as follows: *E. coioides* JQ743910; *S. chuatsi* ACO88906.1; *C. idellus* ADK66818.1; *F. rubripes* BAD34541; *S. salar* AAD43526.1; *P. olivaceus* BAB41204.1; *I. punctatus* AAC60133.1; *D.rerio* CAI11477.1.

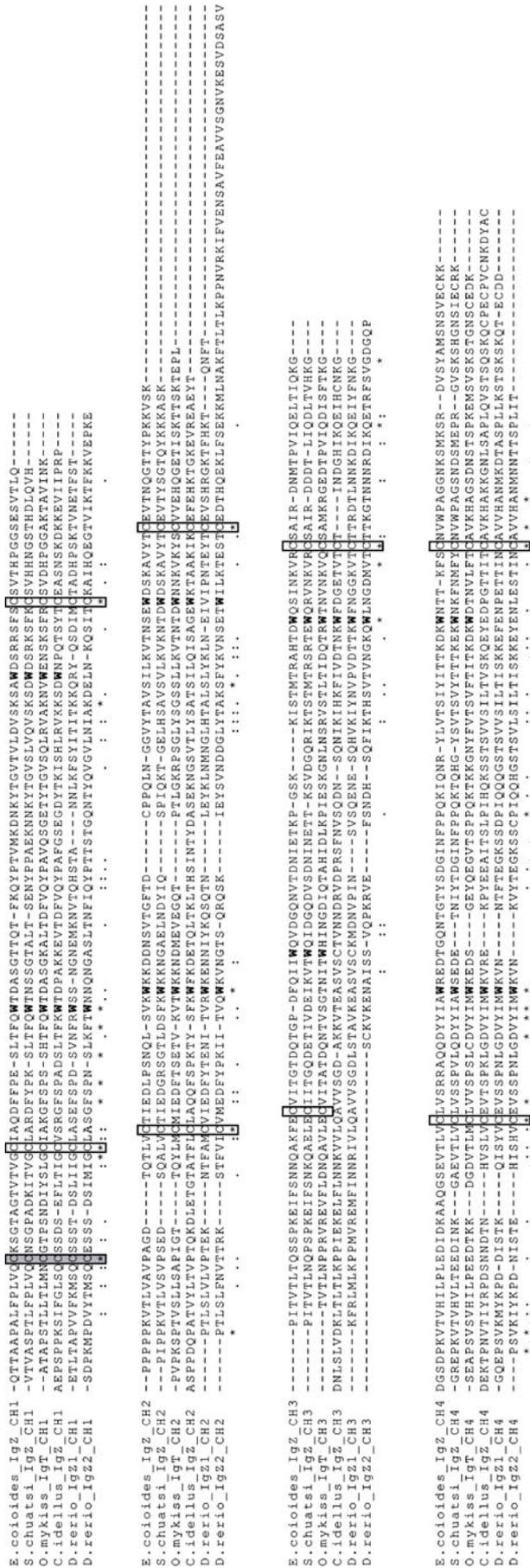


图 5 斜带石斑鱼 IgZ 与其他鱼类 IgZ 恒定区氨基酸序列比较

相同的氨基酸用*表示, 相似的氨基酸用. 和; 表示, 灰色方框内的氨基酸表示用于连接轻链的半胱氨酸, 实框内的氨基酸表示用以形成链内二硫键的半胱氨酸, 加粗字体的氨基酸表示保守的色氨酸。所用序列的 GenBank 登录号及对应缩写如下: 斜带石斑鱼 ACZ54909; 鳕 AAY42141; 虹鳟 AAW66978; 草鱼 ABF19723; 斑马鱼 IgZ1 CAI20891; 斑马鱼 IgZ2 ACH92959。

Fig. 5 Multiple alignment of deduced amino acid sequences of IgZ constant regions in orange-spotted grouper in comparison with those in other teleost fish

Identical residues are indicated with asterisks (*), and similar amino acids are indicated with dots and colons. Cysteine residues predicted to form a disulphide bond between heavy and light Ig chains are highlighted in gray. The conserved cysteine residues predicted important for disulphide linkage are boxed. Tryptophan residues required for the formation and stabilization of the tertiary structure of immunoglobulin are indicated by bold letters. GenBank accession numbers are as follows: *E. coioides* ACZ54909; *S. chuatsi* AAY42141; *O. mykiss* AAW66978; *C. idellus* ABF19723; *D. rerio* IgZ1 CAI20891; *D. rerio* IgZ2 ACH92959.

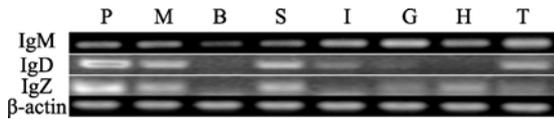


图 6 半定量 PCR 分析斜带石斑鱼 IgM、IgD、IgZ 基因的表达

内参基因为 β -actin; P. 头肾; M. 肾脏; B. 脑; S. 脾脏; I. 肠; G. 鳃; H. 心脏; T. 胸腺。

Fig. 6 Expression of IgM, IgD, IgZ genes in *E. coioides* as detected by RT-PCR

β -actin served as control of the amount and quality of cDNA. P, M, B, S, I, G, H, T indicating pronephros, kidney, brain, spleen, intestine, gill, heart and thymus.

3 讨论

在硬骨鱼类中已经报道的免疫球蛋白, 主要包括 IgM、IgD、IgZ/T。通过筛选 cDNA 文库, Cheng 等^[14]首次报道了斜带石斑鱼分泌型 IgM。本研究中则报道了斜带石斑鱼的膜结合型 IgM、分泌型 IgZ、膜结合型 IgD, 并对它们的表达进行了初步研究。

哺乳动物、鸟类、两栖类和爬行类的 mIgM 的产生方式为跨膜区外显子与 $\mu 4$ 中的剪切位点连接。大部分硬骨鱼类, 包括斜带石斑鱼 IgM 的 $\mu 4$ 中缺乏剪切位点, 其 mIgM 主要由 TM1 直接剪切到 $\mu 3$ 外显子的末端, 从而剪除整个 $\mu 4$ 区, 使得其 mIgM 只含有 3 个恒定区。相似的结构在大西洋鲑、斑点叉尾鲷、大西洋鲑、虹鳟中都有报道^[15-19]。在有些硬骨鱼类的 mIgM 结构存在多样性, 如在较为古老的弓鳍鱼以及长吻雀鳢中, mIgM 的产生方式有两种: (1)按照非典型的硬骨鱼类剪切方式。TM1 外显子与 $\mu 3$ 恒定区中间位置的一个隐蔽剪切位点相连; (2)按照典型的四足动物剪切方式, TM1 与 $\mu 4$ 中的一个隐蔽剪切位点相连^[20-21]。

斜带石斑鱼 mIgD 与其他硬骨鱼类 mIgD 的结构类似, 结构为嵌合形式, IgD 的 $\delta 1$ 前端连接有 IgM 的 $\mu 1$, 然后才与 VDJ 区相连。由于 IgD 的 $\delta 1$ 恒定区缺乏与轻链连接的半胱氨酸, 故利用 IgM 的 $\mu 1$ 中的半胱氨酸与轻链相连。硬骨鱼类 IgD 的每个恒定区构建的系统进化树表明, $\delta 2$ 、 $\delta 3$ 、 $\delta 4$ 分别与 $\delta 5$ 、 $\delta 6$ 、 $\delta 7$ 有较近的亲缘关系, 推测来源于同一个祖先。除了这种由 7 个恒定区组成的 IgD, 实验还扩增到了斜带石斑鱼的另外一些 IgD 的 cDNA 序列。这些转录本包含有 $\delta 2$ - $\delta 3$ - $\delta 4$ 的 3 个恒定区的多次重复, 此外, 还扩增得到了 $\mu 1$ - $\delta 1$ 形式

的基因结构。由于缺乏斜带石斑鱼的基因组数据, 目前尚不能全面认识其 IgD 基因的多样性, 其 IgD 重链基因座也许存在一定的独特性, 但这些都有待于其基因组数据的公布。

斜带石斑鱼 sIgZ 的结构类似于其他已报道的硬骨鱼类 sIgZ。在恒定区中都包含有两个位置十分保守的半胱氨酸和色氨酸。已有的研究表明, 恒定区中的两个半胱氨酸用来形成链内二硫桥, 色氨酸则有助于稳定蛋白质的三级结构。此外, 在第一个恒定区中还存在一个额外的半胱氨酸 (Cys-151), 该位点的半胱氨酸用来连接轻链。类似的结构在斑马鱼和虹鳟的 sIgZ 中都有报道^[9-10]。类似于哺乳动物的 IgA, 斜带石斑鱼、虹鳟以及斑马鱼 IgZ 的 $\zeta 4$ 恒定区末端存在一个额外的半胱氨酸以及糖基化位点, 这种结构对于哺乳动物 IgA 的多聚化至关重要^[22], 推测硬骨鱼类 IgZ 有可能以多聚体形式发挥作用。对虹鳟 IgT 的研究表明, 它在血清中以单体形式存在, 而在脏器中以多聚体形式存在^[23]。

斜带石斑鱼 mIgM 以 $\mu 3$ -TM 剪切形式产生, 基因呈组成型表达, 在各组织中都能检测到。在西伯利亚鲟中, $\mu 4$ -TM 剪切形式的 mIgM 优势表达, $\mu 3$ -TM 和 $\mu 1$ -TM 在头肾和脾脏中的表达量较低^[21]。斜带石斑鱼中是否存在 $\mu 1$ -TM 或 $\mu 4$ -TM 剪切形式的 mIgM 还有待进一步研究, 但 $\mu 3$ -TM 剪切形式的这种组成型表达模式表明该剪切形式的 mIgM 在斜带石斑鱼抵抗抗原入侵的过程中发挥着重要的作用。IgZ 基因主要在淋巴组织如头肾、脾脏中表达, 且在粘膜组织如肠和鳃中都能检测到该基因的表达。Zhang 等^[23]推测 IgZ/T 可能类似于哺乳动物中的 IgA, 参与粘膜免疫。斜带石斑鱼 IgZ 的功能则是有待进一步的研究。

细胞膜磷脂双层的环境决定了跨膜区必须有强疏水的氨基酸组成。氨基酸序列比对结果显示, 硬骨鱼类 mIgD 的 TM 区富含疏水性氨基酸。mIgD 是 B 细胞表面受体的重要组成部分, 在 B 细胞分化和成熟的过程中扮演着十分重要的角色^[24]。斜带石斑鱼 mIgD 主要表达于免疫器官, 如肾脏、脾脏以及胸腺。其他硬骨鱼类中, 如河豚、斑点叉尾鲷以及牙鲆, 其 IgD 也存在类似的表达模式^[7, 25]。这种表达的特点表明, 肾脏和脾脏这类淋巴组织是硬骨鱼类产生 IgD⁺ B 细胞的主要场所。尽管鱼类的

IgM、IgD 和 IgZ/T 已在多种模式动物和经济鱼类中报道, 但它们在机体抵抗病原入侵时的抗体水平变化以及功能则需要更进一步的阐明。

参考文献:

- [1] Kobayashi K, Tomonaga S. The second immunoglobulin class is commonly present in cartilaginous fish belonging to the order Rajiformes[J]. *Molecular Immunology*, 1988, 25(2): 115–120.
- [2] 张永安, 聂品, 朱作言. 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.
- [3] 肖凡书, 聂品. 鱼类免疫球蛋白重链基因与基因座的研究进展[J]. *水产学报*, 2010, 34(10): 1617–1682.
- [4] Janeway C A, Travers P, Walport M, *et al.* *Immunobiology: the immune system in health and disease*[M]. New York: Current Biology Publications/Garland Publishers, 2001.
- [5] Wilson M R, Ross D A, Miller N W, *et al.* Alternate pre-mRNA processing pathways in the production of membrane IgM heavy chains in holostean fish[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 1995, 19(2): 165–177.
- [6] Bengten E, Quiniou S M, Stuge T B, *et al.* The IgH locus of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*, contains multiple constant region gene sequences: different genes encode heavy chains of membrane and secreted IgD [J]. *Journal of Immunology*, 2002, 169(5): 2488–2497.
- [7] 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.
- [8] Gambon-Deza F, Sanchez-Espinel C, Magadan-Mompo S. Presence of an unique IgT on the IGH locus in three-spined stickleback fish (*Gasterosteus aculeatus*) and the very recent generation of a repertoire of VH genes[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2010, 34(2): 114–122.
- [9] Danilova N, Bussmann J, Jekosch K, *et al.* The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z[J]. *Nature Immunology*, 2005, 6(3): 295–302.
- [10] 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.
- [11] Xiao F S, Wang Y P, Yan W, *et al.* Ig heavy chain genes and their locus in grass carp *Ctenopharyngodon idella*[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, 29(4): 594–599.
- [12] 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.
- [13] Savan R, Aman A, Nakao M, *et al.* Discovery of a novel immunoglobulin heavy chain gene chimera from common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Immunogenetics*, 2005, 57(6): 458–463.
- [14] Cheng C A, John J A, 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(3-4): 255–265.
- [15] Bengten E, Leanderson T, Pilstrom L. 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(12): 3027–3033.
- [16] Hordvik I, Voie A M, Glette J, *et al.* Cloning and sequence analysis of two isotypic IgM heavy chain genes from Atlantic salmon, *Salmo salar* L.[J]. *European Journal of Immunology*, 1992, 22(11): 2957–2962.
- [17] Wilson M R, Marcuz A, Van Ginkel F, *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.
- [18] Ledford B E, Magor B G, Middleton D L, *et al.* Expression of a mouse-channel catfish chimeric IgM molecule in a mouse myeloma cell[J]. *Molecular Immunology*, 1993, 30(16): 1405–1417.
- [19] Lee M A, Bengten E, Daggfeldt A, *et al.* Characterisation of rainbow trout cDNAs encoding a secreted and membrane-bound Ig heavy chain and the genomic intron upstream of the first constant exon[J]. *Molecular Immunology*, 1993, 30(7): 641–648.
- [20] Ross D A, Wilson M R, Miller N W, *et al.* Evolutionary variation of immunoglobulin μ heavy chain RNA processing pathways: origins, effects, and implications[J]. *Immunological Reviews*, 1998, 166(1): 143–151.
- [21] Lundqvist M, Stromberg S, Bouchenot C, *et al.* Diverse splicing pathways of the membrane IgHM pre-mRNA in a Chondrosteian, the Siberian sturgeon[J]. *Developmental and Comparative Immunology* 2009, 33(4): 507–515.
- [22] Yoo E M, Coloma M J, Trinh K R, *et al.* Structural requirements for polymeric immunoglobulin assembly and association with J chain[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(47): 33771–33777.
- [23] Zhang Y A, Salinas I, Li J, *et al.* IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity[J]. *Nature Immunology*, 2010, 11(9): 827–835.
- [24] Edholm E S, Bengten E, Stafford J L, *et al.* Identification of two IgD⁺ B cell populations in channel catfish,

Ictalurus punctatus[J]. *Journal of Immunology*, 2010, 185(7): 4082–4094.
[25] Hirono I, Nam B H, Enomoto J, *et al.* Cloning and

characterisation of a cDNA encoding Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* IgD[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2003, 15 (1) : 63–70.

Molecular characterization of IgM, IgZ and IgD heavy chain genes in orange-spotted grouper(*Epinephelus coioides*)

HUANG Bei^{1,2}, CHEN Shan-nan^{1,2}, XU Zhen¹, NIE Pin^{1*}

(1. *State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;*

2. *Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China*)

Abstract: In the present study, the membrane-bound immunoglobulin M (mIgM), mIgD and secretory IgZ (sIgZ) have been identified by using RACE-PCR from the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. The mIgM and sIgZ are comparable with their counterparts in other teleost in terms of their heavy chain cDNA sequences and gene structures. The constant region of the mIgM had three CH domains, i.e., CH1, CH2, CH3, and two transmembrane domains, TM1 and TM2. The TM1 exon is spliced into the regular donor site at the 3' terminus of the CH3 domain. When comparing the amino acid sequence of mIgM with those in teleost fish, it is found that the grouper mIgM CH region shares highest identity with that in the oliver flounder (*Paralichthys olivaceus*), with CH1, CH2, CH3 having 53% – 78% identity with those in the flounder, respectively. The complete transcript of the grouper mIgD contains 3 375 bp, including a 3 006 bp open reading frame, and the constant region of the mIgD consists serially of a μ 1 domain, seven δ domains (δ 1 to δ 7), and a TM region. The degree of amino acid sequence identity, in domain-by-domain comparison with other teleost fishes, reveals an overall higher identity between the IgD in the grouper and that in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*), with δ 1 to δ 7 having 75.5%, 75.8%, 65.4%, 76.6%, 88.1%, 90.6%, 82.8% identity, and the transmembrane domain having 82.7% identity, respectively. The sIgZ has a four exon structure in genome, with the introns being 222, 129, and 458 bp in length, respectively. The semi-quantitative RT-PCR was performed to examine the expressions of IgZ, IgM, and IgD in various organs / tissues of the grouper. Transcripts encoding the mIgM were detected in all examined samples. IgD was mainly detected in pronephros, kidney, spleen and thymus, with weak expression in intestine. IgZ was expressed in lymphoid tissues such as pronephros, kidney and spleen, with relatively low expression detected in gills, thymus and heart.

Key words: *Epinephelus coioides*; immunoglobulin; IgM; IgD; IgZ

Corresponding author: NIE Pin. E-mail: pinnie@ihb.ac.cn