

鳊免疫球蛋白 D 重链基因的克隆与表达分析

王改玲^{1,2}, 骆彦萍^{1,2}, 孙宝剑¹, 徐镇¹, 许巧情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: 用 RACE-PCR 和 RT-PCR 方法获得鳊(*Siniperca chuatsi*)膜结合型免疫球蛋白 D (Membrane-bounded IgD, mIgD)重链基因的全长 cDNA 序列。鳊 mIgD 的 cDNA 全长为 3 358 bp, 其 5' 非编码区包含 30 bp, 3' 非编码区包含 337 bp; 开放阅读框包含 2 991 bp, 编码 996 个氨基酸, 基因结构为 VDJ- μ 1- δ 1- δ 2- δ 3- δ 4- δ 5- δ 6- δ 7-TM。鱼类 IgD 恒定区氨基酸序列比对结果显示, 鳊 mIgD 存在半胱氨酸和色氨酸保守位点, 与其他鱼类 IgD 的相似性在 37% ~ 72% 之间。用邻接法 (Neighbor Joining) 构建的鱼类免疫球蛋白基因的系统发育树表明, 鱼类 IgD 形成独立的一支, 鳊 mIgD 与牙鲆和庸鲽 IgD 聚为一支。荧光定量 PCR 结果显示, 鳊 mIgD 的 mRNA 主要分布于外周血白细胞、胸腺、头肾、中肾和脾脏中。[中国水产科学, 2010, 17 (1): 11-20]

关键词: 鳊; 免疫球蛋白 D; 克隆; 表达; 荧光定量 PCR

中图分类号: S91

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)01-0011-10

免疫球蛋白 (Immunoglobulin, Ig) 作为脊椎动物体液免疫系统的效应分子, 其单体由 2 条重链 (Heavy chain, H 链) 和 2 条轻链 (Light chain, L 链) 组成。重链依据其恒定区化学结构的不同, 分为 μ 、 γ 、 α 、 ϵ 和 δ 型, 由此将相应的免疫球蛋白划分为 5 种类型, 即 IgM、IgG、IgA、IgE 和 IgD。哺乳动物具有这 5 类结构和功能不同的免疫球蛋白。而对于鱼类免疫球蛋白的研究起步比较晚, 长久以来人们一直认为鱼类只有 1 种免疫球蛋白, 即 IgM^[1], 随着研究的不断深入和研究方法的进步, 近年来又发现 IgD、IgT^[2] 和 IgZ 这 3 种鱼类免疫球蛋白^[3]。

IgD 作为继 IgM 后在硬骨鱼类中发现的第 2 类免疫球蛋白分子, 已经在多种鱼类中报道, 包括斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)^[4]、大西洋鲑 (*Salmon salar*)^[5]、大西洋鳕 (*Gadus morhua*)^[6]、庸鲽 (*Hippoglossus hippoglossus*)^[7]、牙鲆 (*Paralichthys*

olivaceus)^[8] 和红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*)^[9]。与哺乳动物相比, 鱼类的 IgD 基因存在许多不同之处: 鱼类的 IgD 是 1 个嵌合体结构, 在基因组上的位置紧位于 IgM 下游, 与 IgM 共用 μ 1 恒定区^[4,8-10], 没有铰链区, 而且 δ 恒定区的数目较多。鱼类 IgD 基因的结构存在多样性, 源于其恒定区的多种复制方式, 如斑点叉尾鲷和大西洋鲑 δ 2、 δ 3 和 δ 4 存在串联复制; 大西洋鳕缺失 δ 3- δ 6 4 个恒定区, δ 1 和 δ 2 存在串联复制, 且 2 个复制子之间通过 δ y 相连; 红鳍东方鲀的 δ 1- δ 6 存在串联复制, 因而恒定区的数目在各个物种之间差别较大。尽管哺乳动物的 IgD 早在 1965 年就已经从一名骨髓瘤患者的血清中分离出来^[11], 但它的功能一直未被阐释清楚, 目前普遍接受的观点是 IgD 在 B 细胞分化过程中起免疫调节的作用^[12]。对于鱼类 IgD 的研究, 主要集中在基因的克隆和表达模式方面^[8-9,13-14]。

收稿日期: 2009-06-12; 修订日期: 2009-08-22.

基金项目: 国家自然科学基金和广东省人民政府联合基金项目 (U0631010); 国家自然科学基金项目 (30130150).

作者简介: 王改玲 (1976-), 女, 博士研究生, 主要从事鱼类免疫学研究. E-mail: wgl939@126.com

通讯作者: 聂品. Tel: 027-68780736; E-mail: pinnie@ihb.ac.cn

硬骨鱼类是鱼类中一个大的类群,其中包含许多重要的经济鱼类,对其 IgD 的研究,将有助于全面认识鱼类 IgD 的结构和功能。鳊(*Siniperca chuatsi*)是中国重要的淡水养殖硬骨鱼类,近年来已经从免疫细胞^[13]、免疫球蛋白^[15-16]和一些非特异性免疫因子^[17-19]等方面对其免疫系统进行了研究。本研究测定了鳊膜结合型 IgD (mIgD)重链全长 cDNA,并与其他鱼类 IgD 的基因结构进行了比较;此外,通过荧光定量 PCR 分析了 mIgD 在鳊各个器官和组织中的表达。

1 材料与方法

1.1 总 RNA 提取

实验用鱼(体质量为 400 ~ 500 g)均来自武汉市江夏区牛山湖渔场,驯养 1 周后,注射溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*) 3 周后取其头肾,按 Trizol

(Invitrogen)说明书提取总 RNA,用于反转录合成 cDNA 第 1 链。

1.2 扩增鳊 mIgD 全长 cDNA 扩增

根据已知鱼类 IgD 的序列设计简并引物,按照 SMART cDNA Synthesis Kit (Clontech)操作手册,将提取的鳊头肾总 RNA 反转录为 cDNA 第 1 链。根据已获得的 IgD 基因片段设计 5' 和 3' RACE 引物(表 1),与 UPM 扩增鳊 mIgD cDNA 的 5' 和 3' 端。PCR 反应条件为: 94 ℃变性 5 min; 94 ℃ 30 s, 66 ℃ 30 s, 72 ℃ 45 s, 5 个循环; 94 ℃ 30 s, 62 ℃ 30 s, 72 ℃ 45 s, 20 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后,用凝胶纯化试剂盒(Omega)纯化后与 pMD-18T 载体(TaKaRa)连接,转化到大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α 株,PCR 检测阳性克隆后测序。

表 1 鳊 mIgD cDNA 全长扩增及荧光定量 PCR 所用的引物
Tab. 1 Primers used for cloning mIgD gene of *Siniperca chuatsi* and its real-time PCR quantification

引物名称 Primer	引物序列(5'-3') Sequence (5'-3')	用途 Purpose
IgDF	GTGA (CT)CTG (A)TCA (T)CCTGTCTTCTGG (C)TC	正向简并引物扩增 cDNA
IgDR	CCAAG (A)TAATGTTAATGGATG(AG)CAGGGCT	反向简并引物扩增 cDNA
51	GAGAATATTTGATTCCACCTACTTTCC	cDNA 5' RACE
52	CCTCTGATGTAGACAGCTCAGAGGCA	
53	ACACTCTGCAGCTTCCTTTGGATTTGC	
54	GATGTAATGTGATGTTTGGTGAGTCA	
31	TGCCTCTGAGCTGTCTACATCAGA	cDNA 3' RACE
32	ACCTTCAGCCACCTTGCTCCAGGGC	
33	TCCAAAGCCACCTCCGTCTGTCCCAAGT	
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGC	扩增 5' 和 3' 末端的通用引物
qIgD F	CATCCAAAAGTGAAGGACAAGC	IgD real-time PCR 上游引物
qIgD R	AAGCCAAAGACCAGGCACAC	IgD real-time PCR 下游引物
Actin F	GAGAGGGAAATCGTCCGTGA	Actin real-time PCR 上游引物
Actin R	CATACCGAGGAAGGAAGGCTG	Actin real-time PCR 下游引物

1.3 序列分析

用 ABI PRISM 377 自动测序仪完成 cDNA 序列测定,通过 BLAST-N 程序在 GenBank 数据库中进行相似性搜索;氨基酸序列的推断通过 EXPASY 网站(<http://au.expasy.org>)的 Translate 程序完成;氨基酸序列的多重比对采用 CLUSTAL W 2.0 程序完成;

系统发育树由 Clustal X 和 MEGA 4.0 程序中的邻接法(Neighbor Joining, NJ)构建。

1.4 Real-time PCR 分析

1.4.1 组织总 RNA 的抽提和反转录合成 cDNA 为检测 mIgD 在不同组织和器官中的表达水平,取 3 尾健康鳊(体质量 400 ~ 500 g),驯养 1 周后分别取

其胸腺、鳃、头肾、中肾、脾脏、肝脏、肌肉、肠、心脏、脑和血液。用不连续密度梯度的 Percoll(Pharmacia) (51%/34%) 分离血液得到外周血白细胞(Peripheral blood leucocytes, PBLs)。按 Trizol 试剂盒说明书提取各组织和外周血白细胞总 RNA, 经 DNase I RNase-free (Fermentas) 处理后, 分别测量 RNA 样品在 260 nm 和 280 nm 波长下的吸光度值, 计算 RNA 样品的浓度和纯度。取 2 μg 经过上述处理的 RNA 样品在 20 μL 反应体系中用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) 进行反转录。

1.4.2 标准曲线绘制 根据鳊 *mIgD* 基因保守序列设计引物 IgD F 和 IgD R, 内参基因 β -actin 的引物为 Actin F 和 Actin R (表 1), 分别用这 2 对引物进行 PCR 扩增。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后, 用 DNA 凝胶回收试剂盒(BioDev) 对目的片段进行纯化, 纯化产物连接到 pMD-18T 载体(TaKaRa) 中, 并通过测序来检验 cDNA 的正确性。提取含有插入目的片段的质粒, 用分光光度计测定其浓度, 根据公式 $1 \mu\text{g DNA} (1\ 000\ \text{bp}) = 9.1 \times 10^{11}$ 计算相应的拷贝数。构建的质粒 DNA 按 $10^9 \sim 10^3$ 梯度稀释, 绘制标准曲线。

1.4.3 荧光定量 PCR 和数据分析 荧光定量 PCR 用 SYBR Green Realtime PCR Master Mix 试剂盒 (TOYOBO) 在 Chromo4 Real-Time Detection System (MJ Research) 上进行, 扩增条件为: 94 ℃ 预变性 2 min; 94 ℃ 15 s, 60 ℃ 20 s, 72 ℃ 30 s, 42 个循环;

72 ℃ 延伸 5 min。PCR 结束后对扩增产物进行溶解曲线分析, 以确保特异性扩增。根据标准曲线计算样品中 *mIgD* 基因的拷贝数, 每个样品设 3 个重复, 以未加模板的 PCR 反应样品作为阴性对照。PCR 结果用 Opticon Monitor Software 2.03 Version (MJ Research) 进行分析。每个组织中 *mIgD* 基因 mRNA 的精确拷贝数由每个阈值和标准曲线计算获得。

2 结果与分析

2.1 鳊 *mIgD* cDNA 序列

利用简并引物扩增到鳊 *mIgD* 基因片段, 通过 RACE PCR 的方法获得其 cDNA 全长 (GenBank 登录号为 FJ876151), 共包含 3 358 bp, 其编码区有 2 991 bp, 编码 996 个氨基酸, 由可变区和恒定区组成, 其恒定区氨基酸的排列顺序为 $\mu 1$ 、 $\delta 1$ – $\delta 7$ 和跨膜区 (图 1)。

2.2 氨基酸序列分析

鳊 *mIgD* 与红鳍东方鲀、牙鲆、斑点叉尾鲟、大西洋鲑、大西洋鳕和庸鲽的 IgD 恒定区氨基酸序列相似性比对发现, 所有恒定区内有 2 个氨基酸位点是非常保守的, 其一是形成二硫键的半胱氨酸, 其二是形成和稳定三级结构的色氨酸 (图 2)。将鳊 *mIgD* 与其他物种 IgD 的 7 个恒定区氨基酸序列进行相似率比较, 相似性较高的为庸鲽 (52% ~ 79%); 其次为红鳍东方鲀 (57% ~ 73%)、牙鲆 (52% ~ 76%); 最低的为斑点叉尾鲟 (32% ~ 47%) (表 2)。第 7 个恒定区在各

表 2 鳊与其他鱼类 IgD 恒定区的氨基酸序列相似性
Tab. 2 Amino acid sequence similarity of IgD constant regions in *Siniperca chuatsi* with those in other fish species %

物种 Species	IgD 恒定区 IgD constant region							
	δ1~δ7	δ1	δ2	δ3	δ4	δ5	δ6	δ7
庸鲽 <i>Hippoglossus hippoglossus</i>	72.2	64.1	52.5	77.8	76.8	76.1	79.2	75.0
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	65.9	69.8	61.6	57.6	63.1	66.0	68.8	73.9
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	65.3	59.0	52.5	71.1	68.4	75.2	76.4	67.7
大西洋鲑 <i>Salmon salar</i>	54.8	49.5	42.5	68.5	53.0	61.4	56.0	57.2
斑点叉尾鲟 <i>Ictalurus punctatus</i>	36.8	32.7	34.3	43.2	39.3	47.7	39.6	41.6

GTTTCACAGCAGCTCAGTTTTCAACATCAACC[ATG]TTTTCTGTAGCTCTGCTGCTGCTGTTG
 M F S V A L L L L L
 10

VH
 GCAGCTGGATGTGTGAAGTGTGAACAGCTGACTCAGCCAGCCTCTGTGACTGTGCAGCCA
 A A G C V K C E Q L T Q P A S V T V Q P
 30
 GGTCAACGCTCTGACCATCACCTGTCAAGTCTCTTATTCTGTTAGCAGCTATCGCAGAGCT
 G Q R L T I T C Q V S Y S V S S Y R T A
 50
 TGGATCAGACAGCCTGCAGGGAAAGGACTGGAGTGGATTGGAATTAGACGTGTTGGATAC
 W I R Q P A G K G L E W I G I R R V G Y
 70
 ACAACATATTACAAAGATTCACTAAAGAACAAGTTTCAAGTATCGACTTAGACTCTTCCAGC
 T T Y Y K D S L K N K F S I D L D S S S
 90
 AACACAGTGACTCTAAACGGACAGAATGTGCAGCCTGAAGACACTGCTGTGTATTACTGT
 N T V T L N G Q N V Q P E D T A V Y Y C
 110

DJ
 GCCAGA|GAGATATTATACTGGGCTTTTTGACTACTGGGGAAAAGGCACTACGGTCACCGTC
 A R E I L Y W A F D Y W G K G T T V T V
 130

μ1
 ACCTCA|GCCACTTCAACTGGACCGACTGTGTTTCTCTGATGCAATGTGGTTCTGGGACT
 T S A T S T G P T V F P L M Q C G S G T
 150
 GGAGACACGGTCACTCTTGGCTGCCTTGGCACC GGCTTCACACCTTCTCTACTGACCTTC
 G D T V T L G C L A T G F T P S S L T F
 170
 ACATGGAGCAAAAACGGGGCGGCCTTGACGGACTTCATTCAAGTACCTCCAGTACAGAAA
 T W S K N G A A L T D F I Q Y P P V Q K
 190
 GGCAGCGTTTATACGGGAATCAGTCAAAATCCATGTGAGGAGACAGGACTGGGACGCCAGG
 G D V Y T G I S Q I H V R R Q D W D A R
 210
 GAGTCTTTTCCAATGTGCCGTGACACATCCAGCAGGAAAATGTACAGACTAATTTTCATAAAA
 E S F Q C A V T H P A G N V Q T N F I K
 230

δ1
 CCA|AGCCAGCGGGTTGACTCACCAAACATCACATTACATCTGTATGGGAAGGTGAATTCT
 P S Q R V D S P N I T L H P V W E G E F
 250
 GGAGCCTCACCAGTCAGACTCATCTGCACCCTAAGTGGCTTCTTTCCAGACAAAACCTGAAT
 G A S P V R L I C T L S G F F P D K L N
 270
 GTGACGTGGCAACGGGACAACAGAGCTCTAGACGGGCAAATCCAAAGGAAGCTGCAGAGT
 V T W Q R D N R A L D G Q I Q R K L Q S
 290
 GTGGAGGGAGTGGAGAAAACCTTCAGTCTAAGCAGTGAGATTGAGCCAAATATGACAGAG
 V E G V E K T F S L S S E I E P N M T E
 310
 TGGGCAGATGGCTCAAGTTTTTACATGCATGTCCATTACACAACAACAGTGAATTTAGAAAA
 W A D G S S F T C M S I H N N S E F R K
 330

δ2
 ACAATAAGTATTTGTCAA|ATCCATTCAAGAGCCGCTCCTTCCATTATGTGGAGATTCCC
 T I S I C Q I H S R A A P S I H V E I P
 350
 AGCTTCAAGACAGTAATGATGTGCAGCGTCTGAGGTGAAGGCAACATGTTCCCTCCGCACC
 S F K T V M M S A S E V K A T C S L R T
 370
 GTGTTTGACGCCAAGGTGACCTGGCTGATGGATGGGAAACTTCCATCCAGAGACCAAGTG
 V F D A K V T W L M D G K L P S R D Q V
 390
 AACAAGGTACAAAACACAACCTCATTTAATAAGCACTCTGACGGTTTCTTGAATCAGTGG
 N K V T N T T H L I S T L T V S L N Q W
 410
 AAACAACCTGAAGCTTCTTAAACTGTAAAGCTGAACATCGCTGCTTCTCATCCGCTGAGGAG
 K Q L K L L N C K A E H R C F S S A E E
 430

δ3
 ACAACAAATGTGTCA|AGGCCTGCAGTTACAGCTCCATCAGTGGAGATCAGGAGATCGCTC
 T T N V S R P A V T A P S V E I R R S L
 450
 CCAGATTTTGCTGAAGGGAACAGTGCTGTGCTGGAGTGTGACATCACACAACCTCTCTCC
 P D L L K G N S A V L E C D I T Q L S S
 470
 AGTGACCTCTACGTACCTTTTCAGGCCAACAGTGTGTGATATTTCTGACAAACAGTATGTT
 S D L Y V T F Q A N S V D I S D K Q Y V
 490
 GATCTCCCTGAAGACCCAGGCCTCCATTCGGTCAGTAGACGCTTCACTGTCCCTCCAAGT
 D L P E D P G L H S V S R R F T V P P S
 510
 CACTGGAAGAAAGACACAAGTTTACCTGCAAAGTGAATCAAGGCTTCTCCAGCAACTTT
 H W K K D T S F T C K V N Q G F S S N F
 530

δ4
 GAGTCAAACCTCCACTGGCAAAATCTTT|GTGGACCCATCAGTGGAGCTCCTTCTGGTCCCC
 E S N S T G K I F V D P S V E L L L V P
 550
 AGTAAAGAGTCTCAGGACCACAGAGGCTCGTTTGTCTCTGGATGGGGCTTCGACCCCTCAAAT
 S K E S G P Q R L V C S A G W G F D P Q I
 570
 AAATGGTTTTTCTGAGTCTCAGCAAAAGATCTCCATCAACTAATGACATCAGCATGGGTGCA
 1800

K W F S E S Q Q R S P S T N D I S M G A	590
GATGGACGTGTGGCAGTAACCAAGTCAACTTCATATCCCCCAAACAGAGTGGAAAAACAGGG	1860
D G R V A V T S Q L H I P Q T E W K T G	610
AAGGGCTTCACCTTGCAAAGTGTCTGACAAGTCTCTGAACAAAATTGTTGAAAAGGAAATC	1920
K G F T C K V S D K S L N K I V E K E I	630
δ5	
AGCCTCTGTTCAGTAAGTCCAGCATCATCTCAGATAGTTGGCGTTTACGTTTCAGGGACCA	1980
S L C S V T P A S S Q I V G V Y V Q G P	650
CCACTCCAGGAGCTTCAGAGCCAGGGACAGGTGACTGTACCTGTCTTCTGGTCGGCCCT	2040
P L Q E L Q S Q G Q V T V T C L L V G P	670
TCTCTTAATGATTTCTCCATCACCTGGAAGTAGGTGGAATCAAATATTCTCTCAATGTC	2100
S L N D F S I T W K V G G I K Y S L N V	690
CACACGGAGCCACCAGTGAGTCACAGCAATGGGACAGAGTCTTTGCGGAGCTTCCTCAAT	2160
H T E P P V S H S N G T E S L R S F L N	710
GTGTCTCAGCGGAGGACTGGCATGCATATAAACAAAGTGTCTTGTGAGGGAAAGCACCGATGT	2220
V S A E D W H A Y K Q V S C E G K H R C	730
δ6	
TCCAACCAGGGCTACGAGGACCATATAAGCAAAAGCAGAGGACTGTACCCACCAACAGTG	2280
S N Q G Y E D H I S K S R D L Y P P T V	750
AAAATAATACAACCAACTGCCTCTGAGCTGTCTACATCAGACGTCCTCACACTTATTTGC	2340
K I I Q P T A S E L S T S D V L T L I C	770
CTAGTTTCTGGATTTTTTCCATCTAACATCATAGTGTACTGGGAGGAGAATGGCCAGAGA	2400
L V S G F F P S N I I V Y W E E N G Q R	790
CTCCCTTCAACTCGCTACACCAACAGTCCTGCCTGGAATACACAGGGAGCAGCACTTAT	2460
L P S T R Y T N S P A W K Y T G S S T Y	810
TCAATGAGCAGCAGACTAAATGCATCCAAAAGTGAAGCAGTCTACGTATTCTTGT	2520
S M S S R L N A S K T E D K Q S T Y S C	830
GTTGTCTCAGACATGAGTCATCTGAAACGCTGCTTGAAAGCACTATAAAGGATGTGTTTGGC	2580
V V R H E S S E T L L E S T I K D V F A	850
ACAGAGCCCTACAGTGAACCTTCAGCCACCTTGCTCCAGGGCTCTGGTGAACCTTGTGTGC	2640
T E P Y S E P S A T L L Q G S G E L V C	870
δ7	
CTGGTCTTTGGCTTCAGCCCTGCATCCATTAACATTACTTGGTTTTGATGACACCAAGGAA	2700
L V F G F S P A S I N I T W F D D T K E	890
CTGTTGGACTACAACACTAGTGAACCCACAGAGGCCCAAACGGAAAGTTCAGCATCCAA	2760
L L D Y N T S E P H R G P N G K F S I Q	910
AGCCACCTCCGTCTGTCCCAAGTCAACTGGTTACCTGGGGCAGTCTCACCTGCAGGGTG	2820
S H L R L S Q V N W L P G A V L T C R V	930
TM	
ACACATGCAAACACCACCCAATCCCTGAAAATAGCTAAACCAAGATATCTTGGAGGACTGT	2880
T H A N T T Q S L K I A K P D I L E D C	950
CTTTTCTTAGATGACATCATGCTGATGTGAGCCAAGACATCGATGTGGAAGCTGG	2940
L F L D D I M H A D V S Q D I D V E S W	970
TATATGGCCTGCATCTTCCTCCTTTTTTCTCATCTCCATCATCTATGGTGTCTTGGCT	3000
Y M A C I F L L F F L I S I I Y G V L A	990
ACCGTGATTAAGACTAAATGAGCCCCAGGACAGATCCCATTTTATGATCCAAATGTGGACT	3060
T V I K T K *	996
GTTGAGGATTTTTGATGACATATGGCCTTACTGGTTTTAAAGTGTAATTGATGCATTTTC	3120
TTTATTTTTTTTTTAAATTTCTATTATTCTATTCTATAGAATTGGTTTGTACTATATTCCA	3180
TTGTTTTTATATGTCAGTTAGATATTTGGTGTGGCAGGTATGTAATGCATGTGTGTAAGA	3240
GGAAATTAGACTTTGAGATTCAAATACCAATGTAATGTAACAAATATTCTGTCACTGGCC	3300
TCATTCTTGCATTTAGAAAAATAAAGATTCAAATATGGAAAAA	3358

图1 鳊 mIgD cDNA 序列和推断的氨基酸序列(GenBank 登录号 FJ876151)

起始密码子 ATG 和终止密码子 TGA 以黑框表示; poly (A) 加尾信号(AATAAA)与 mRNA 不稳定性相关的信号 ATTTA 以下划线表示; 氨基酸分区用箭头表示。

Fig. 1 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of mIgD in *Siniperca chuatsi* (GenBank accession no. FJ876151)

The start and stop codons of open reading frame are highlighted in blank boxes. The polyadenylation signal and RNA instability motifs are underlined. The subregions of amino acid sequences are marked with arrows.

81	Sc	SQRVDSPNITLHPVWEGEGASPVRLICTLSGFFPDKNVTWQRDNRLD-GQIQRLQSQVEGVEKTFSLSSEIEPNMTEWADGSSFTMSIHNN-----SEFRKTIS-ICQ
	Tr	EQRVVPPNITLQPVWDGELGASPVRLICTLSGFFPEKLSVKWQRDNQTLIDPQSQRLQSQVEKTEKTFSLSSEIQPDMQWEDGSNFIQNTSHNN-----MEFIKSTN-VQ
	Po	KSRVVSPIITLYPVWEGEGFVSPVRLICTLSGFFPDQLQVWHDNDHLLHIPTITKLQSMQGEETKTFSLISDIEAVN-WKSNSTFTCKAQHNN-----DKKFTKTIVNFVQICS
	Ip	AQRVTEPNITM-----STNTMDNNVNLICWLDGFSPPKISVWYKGTNLTKTKTMTKIFESLNNGEKTFGALSQLSINAEQWNEGTEFTCKATHIS-----KIFSQTWS-KCK
	Gm	VERVISPNITLYPVWGTQSWASELSVCTLSGFPYDPKVSVEWLLDGRVPETSPVQNKLSQVAEVGKTFTLNSKTIQLKIEEWKGPVNVQCKSKYGH-----GKEATRNIS-ICA
	Ss	VQRVIPPNITLYPLWEELEGGSVGLLCTLSEFYPDKLSVEWLLDDKTVTITYPQRLQSQVEGEEKTFSLNSQLELDQSQWITQGESEVTKAIHNAAQGPHPGTTVSRITIS-ICS
82	Hh	-VQVFEPNITLHPVWEGEGASPVRLICTLSGFTPNLKVWQKDNIPLTITQETKLQPLQGVKTFSSQSSNIEPAKKEWESGTFSCAKQHNN-----REFTKTVN-ICQ
		. * ****: . : * * * * . * . : . * * . . : : . * * * * * . : . * . . . * : : . . . *
	Sc	IHSRAAPSIHVEIPSFVKTMMSASEVKATCSLRTVFDKAVTWLMDGKLP-SRDQVNVKNTNTHLI-STLTVSLNQWKLKLNCAEHRQFSSAEETT---
	Tr	IHGSFVPSIHVEIPSFVKVMSEEVAKCSVRTVFNKAVTWLMDGK-P-SIAKASQSKNTHLI-SSLKISLSEWEKLLKQKALHRCFSSTEKTVRIS
	Po	---SAAPSIDVEIPSFRTV-MTESAVTAKCSVNNRFAGKVTWMDGKAE-SKYIVTSNANQTHTI-SEVAVPPSQWKLKSIITCKADHQC-STQRTVNV
	Ip	AEPSTKPLIRLEKPLMSV-LTDSVTASCVVETVHNTKVSFWDGKE-KTRDVLTKLTDGRTV-SNLTISTNDWKNQTIKCTAAHLFCGTVEKTNIL
83	Gm	IY-SYPPSVHLTTPSFKTVIEAGSDVTAAQVHTAFDNNVTHLDGKALTTPNHVTKVEGALTR-SNLTSSSSQWKLKNSITCRAEH-CFTTVEKNMTVA
	Ss	AFPSSTPSLHLTPRFRVT-MTQVETATCVHSAYDAKVSWHLDGKPTSRTPVNAQSSSTQSISSNLTLPSSQWKLKNTITCRAEHRFPNPTQRTSNVN
	Hh	VYSSAAASIDVEIPSFRTV-MTESAVTATCSVHTLFNAKLWLMDDGDA-PSNTVTQKSNTHII-RDLSVPSSQWKLKAITCKADHKLSSSTQRTVNV
		. : : * : * . : * * * : . . . : : * : * * . . . : : : : * : * * * : : : . . .
	Sc	RPAVT-APSVIEIRRLPDLKGNASVLECDITQLSSDLYVTFQANSVDISKQYVDLPEDPGLHSVSRRTVPPSHWKDTSFTCKVQGFSSNFESNSTGKIF
	Tr	ESEAA-APQVEIRRLDLFNGNSAVLECVTPSSSDLCITFQADGVDISGKNFVDFSKASGISLIRTFAPVSTHWKKDATFSETVNGFGSSVNSTSTGRLF
84	Po	GPAVT-NASVEIKRSPDLLKGGQSAVLECDITKLSSDLYVTFQANDKIDSEKQYVLPAPDPQSITRRFSIPSSYWKDITTFSCKHQGFSPVSKSTGNIF
	Ip	EPYQK-TPTVIRRLADILKGGSAVLECAARDLPSGELSVILQANGIRVFEPQYVDLPK-GVDTLARFTVSTTRQNKQRFTQIQQSSKQWGSNSENIF
	Ss	GPAVSTPTVLIRRLPDLKGGSAVLECAITQLSSDLYVTFQANGVDFPEKQYVDLPASKDPHSLTRRFSIPTSHWKENTFTCKVNGQYNSWVSNSTGTFL
	Hh	GPAVT-VPSVEIKRSLDLLKGGQSAVLECDITNLSSDLYVTFQANDEISDRQFVDLPVAPGLHSITRHSIPPSHWKDTNFTCKVHGFSSNPFKSESTGNIF
		. . * * . : * : * * : * * * * . * . : : * : . . : : * : . . : : * : . . : : * : . . : : * : . . : : * : . . : : *
	Sc	VDPSVELLVPSKE-SGPQRLVSGWGFDPQIKWFSEQQRPST-NDISMGADGRVAVTSQLHPQTWEKTKGKFTCKVSDKSLNKIWEKEISLCS
85	Tr	VDPSLDLLVHSED-SGTQKLLCTGGGFNPQIQWFFPHGALN-AT-YDISMGADGRVAVTSHLHPQNEWTKGKPYTCQVSDMSLNSSVNGSISFCS
	Po	VDPSVELLVFPNEL-SGPQRLCSGRGFNPQIQWLSVSNKLP-SN-NDVTMGADGRVAVTSQQLIPQTWEKTKGVYCEVSDTSLSKTVSKNISLCS
	Ip	GDPSVELLVISSVDKSASATQKLIACAATGLNPNIKWLPESVVNALNGLSKVTVDSDGRVKVSSEISVPQQQWNNRVTFTRVSDQDPLKPEKSTSDIA
	Ss	GELSMELLVPNEEMSGSTQKLMCSGRGFNPQIRWLSGSKQRSAD-NERGMREDGHVAVTSHITVTQQEWNEGKDFICEVIDKDLQKTVRKSTSLCT
	Hh	VDPSVEPLLVPSKE-SGPQRLVSGWGFNPQIQWLSSEKQRS-SN-NDVTMGADGRVAVTSRNPQTWEKTKGVFTCKVSDTSLNKTVHNKVSLS
		* : * : . . * : * : * : . . * : * : * : . . * : * : * : . . * : * : * : . . * : * : * : . . * : * : * : . . * : * : *
86	Sc	VTPASSQIVGVYVQGPPLQELQSQGVTVTCLLVGSLNDFSITWKVGGIKYSLNVHTEPPVSHSNGTESLRSFLNVSAEDWHAYKQVSGEGKHCSSQGYEDHISKSR
	Tr	VTPASSQQRVSYYIQGPPIRGFEANGPVTISCLLVGSSLDFSITWKVVGKETSVPSPTEPPVKHNGTQTQLQSLNVSSDWFHGHVVSCEGKHCSDQGYENHVSXSK
	Po	VTPASSQIVGVYVQGPPLPEEFKKEQVTITCLLVGSLNDFSITWKVAGKSSLNFKKEPPVSHSNGTESLMSVSPSAEDWHAAKQVSGEAKHLCSQGYEGHTSKSR
	Ip	VTPDFASQIVGVYVQGPPLNAPSISDMRAN-HVSVTCLLRHRLNDFSITWKVIGKDNSTSGVVTQPLRVHSNGRESVRLKVPARKWKAYTTSCEVTHLSTTKMEHTISKTR
	Ss	VTPISSQKAVAVYLGPTLQELRTDGGVPVTCCLLVGSLGDFSVSQWVDGFVASQGGVTRAPKDHSGTGTQEQIMFNVSARDWHAAKLVSEGVKHCSSQAQVEHITKCR
	Hh	VTPASSQIVGVYVQGPPLPEEFQNKQVTITCLLVGSLNDFSITWKVVDGDKSSL-FHKEPPVSHSNGTETLRSVFNVAEDWHAAKQVSGGAKHLCSQGYEGHTSKSR
87		*** : * . * : . : . . * : * * : * * : * . . . * * * : : . : . . * * * . * * * : * .
	Sc	DLYPTTVKI IQPTASELSTSDVLTLQLVSGFFPSNIIYVWEENGRLPSTRYTNSPAWKYTGSSYSSMSRLNASKTE-DKQSTYSVVRHESSETLLESTIKDVF
	Tr	APSPPAVQIMQSPAPQLSTQVLPLTCLVSGFFPSNILLFWKENDQRPVSSRYTNSDPWKYPGSSYSSMSLLNTSKTE-DKSTYSVVRHESSEKNPFIITVVDVF
	Po	VLHQPTVKI IQPTASELSAPDDLPLICLVSGFYPNPVIVYWEQSGQRLPSTRYTNSDVWITYTGNSTYSMSRLNISKTE-DKSTYSVVRHESSEKPFKNTIKNVF
	Ip	DRKSPTVRI LSPSDDL SGVRNTNLLCLVDGFRPADISVHWEINDRLDASKFINSVGNASALGDYSMHVILPASK-RENTFSVVRHESSEKPIRNSINNVF
	Ss	DPKPSIKIVRPSVDLWGSNATLLCLVSGFFPSDVIWNWEKAGSLRPLFPFSRYSIPSVLYAGSSTYSMSRLIIPRSEWDHNSNYSVVRHESSEKPIITSTIENVF
88	Hh	VFHQPTVKI IQPTASELSASDDLPLICLVSGFYPNPVIVYWEQSGQRLPSTRYTNSAEWITYTGSSTYSMSRLNISKTE-DKSTYSVVRHESSETPFKNTIKNVF
		* : . : *
	Sc	ATEPYSEPSATLLQGSGELVCLVFGFSPASINITWFL-DDTKELLDYNTSEPHRGPNKGKFSIQSHLRLSQVNWLPAGAVTICRVTHANTTQSLKIAKP
	Tr	AAATYSEPSATLLQSSDELVCLVFGYSPSINISWFLDSSKELIDFHTHEYRGPNKGKFSIQSHLLSKVTWLPAGAVTICRVTHSNTSLSLNISKP
	Po	ATVHTKPSATLLQSSDELVCLVFGFSPASINITWFLDESTQLLDYNTSKPHKSGFVSRSHLRLPKGNWLPAGATVTCRVSHATNLSLNLNLSN
	Ip	ASVTENRPSVLLQGNKLVCLVYGYSPPASINITWLLNSVSVQHDNTKSSAKRPDKGKFSIKSHLKVQASEWAPGDTYTCQVKHITGIVTRDISKK
	Gm	GSLSHSQSALLQGNELVCLVYGFSPPASINITWLLDGTQLRSYNTSEPHRGPNKGKFSIQSRPLSPHEWLPQGMYTICRVNHCNGNIALNMSKP
89	Ss	GSVTPSAPTATLLQGNELVCLVYGFSPPASINITWLLDNVTELWNNNTSTTYRPGGKFGIRSHLSLAHQDWTPGAVYTICRVTHITTTATLNLNSKP
	Hh	ATVTLSEPSATLLQGNELVCLVFGFSPASINITWFLDESVPLLDYNTSEPHESQNGKFSVQSHLRPPKGNWLPAGAVTICRVSHANTTSLNLSKP
		. : . . * : . * * . . : * * * . * : * : * : * : . . . * . * * * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
	Sc	DILE-DCLFLDDIMHADVSQDIDVESWYMACIFLLFLISIIYGVLATVIKTK---
	Tr	EISE-NRHLNFSNDDEGIGITIESWYMALTFLLFLAAVIYGVSVTIIKIK---
	Po	DNLE-HCTFFDELLNADVNQDIGVESWYMALTFLLFLISVIFGVATMIKTK---
90	Ip	EFTE-ETIYFDENTSETSLDQAEETWMACAFIILFVISLGYCSVTLVKVIA
	Gm	EILE-ESVLFDENKQVVF-QDMGEDNMMTITFLLFFVSLFYGLTVIKTK---
	Ss	VLLGVEGVFFDENRSDPILADTAENWMMACIFLVLLFLISLYSITVTLVKTK---
	Hh	DNLE-RCTFFNEIFNADVNQDIGVESWYMALTFMLLFISVIFGVLAIMIKTK---
		. : . . * : . * * . . : * * * . * : * : * : * : . . . * . * * * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
	Sc	DILE-DCLFLDDIMHADVSQDIDVESWYMACIFLLFLISIIYGVLATVIKTK---

图2 鳊 mIgD 与其他鱼类 IgD 恒定区氨基酸序列比较

Clustal W 进行序列比较时相同的氨基酸用“*”表示,相似的氨基酸用“-”和“:”表示,方框内的氨基酸表示保守的半胱氨酸,阴影表示保守的色氨酸.用于比较的 IgD 在 GenBank 中序列号分别为:鳊(Sc) FJ876151;红鳍东方鲀(Tr) BAD34541;牙鲆(Po) BAD27405;斑点叉尾鲟(Ip) T18537;大西洋鲱(Gm) AAF72568;大西洋鲑(Ss) AF141605;庸鲈(Hh) AY077848.

Fig. 2 Alignment of the deduced amino acid sequences of mIgD heavy chain δ domains in *Siniperca chuatsi* with those of other fish species. Asterisks indicate identical amino acid residues, whereas dots and colons indicate similar amino acid residues. Cysteine residues which are involved in interdomain and intradomain disulfide bridges are boxed. Conserved tryptophan residues are shaded. The GenBank accession numbers of the sequences are as follows: *Siniperca chuatsi* (Sc), FJ876151; *Takifugu rubripes* (Tr), BAD34541; *Paralichthys olivaceus* (Po), BAD27405; *Ictalurus punctatus* (Ip), T18537; *Gadus morhua* (Gm), AAF72568; *Salmon salar* (Ss), AF141605; *Hippoglossus hippoglossus* (Hh), AY077848.

个物种之间相似性最高(图2)。硬骨鱼类 *IgD* 基因的恒定区结构示意图如图3所示, 鳊与牙鲈 *IgD* 基因的排列方式相同, 不存在串联复制形式。应用 Clustal

X 和 MEGA 软件建立的硬骨鱼类免疫球蛋白重链恒定区系统进化树显示, *IgM*、*IgD* 和 *IgZ/IgT* 各形成独立的分支, 鳊 *mIgD* 与牙鲈和庸鲽 *IgD* 聚为一支(图4)。

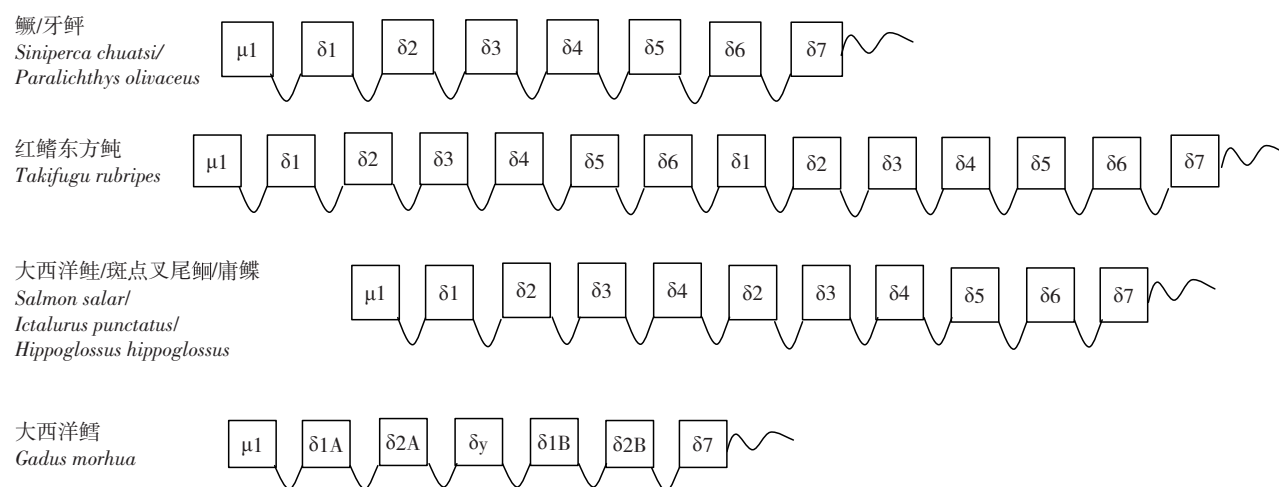


图3 硬骨鱼类 *IgD* 恒定区的基因结构示意图

Fig. 3 Schematic representation of *IgD* constant region of teleosts

2.3 *mIgD* 基因的表达

以梯度稀释的含有鳊 β -actin 和目的基因的质粒建立标准曲线, 其线性相关系数分别为 0.999 和 0.996。设定鳊 *mIgD* 在肌肉中的表达量为 1, 根据 *mIgD* 在各个组织中的相对表达量作柱形图。从图中可以看出, *mIgD* 在外周血白细胞和头肾中的表达量较高; 其次为胸腺、脾脏和中肾; 心脏、肠、鳃、肝脏和脑中几乎没有检测到表达(图5)。

3 讨论

鳊的 *mIgD* 重链恒定区与其他鱼类的 *IgD* 存在相似的结构模式, 即由 *VH*、*DJ* 区、 $\mu 1$ 区和几个 δ 恒定区组成。恒定区的数目和重复串联方式在不同物种之间是不同的, 鳊和牙鲈的 *IgD* 恒定区没有串联重复, 由 $\delta 1$ – $\delta 7$ 组成。通过比较鱼类 *IgD* 恒定区氨基酸相似性, 发现在进化关系上较近的鳊与庸鲽 *IgD* 恒定区的氨基酸序列相似性较高, 但是两者恒定区却存在不同的串联复制模式, 说明基因片段的串联重复方式在各个物种之间是不同的。此外, 鱼类与哺乳动物 *IgD* 恒定区基因结构的不同之处在

于, 后者具有铰链区, 而且恒定区的数目比较少, 例如人类 *IgD* 基因含有 2 个铰链区和 3 个 δ 恒定区 ($C\delta 1$ – $H1$ – $H2$ – $C\delta 2$ – $C\delta 3$)^[20], 鼠 *IgD* 基因含有 1 个铰链区和 2 个 δ 恒定区 ($C\delta 1$ – H – $C\delta 3$)^[21]。鱼类 *IgD* 基因是 1 个嵌合体的结构, $C\mu 1$ 被剪切到 δ 链上, 然后与 L 链相连, 因为 $\delta 1$ 区缺乏合适的半胱氨酸与 L 链结合, 表明它是通过 $\mu 1$ 来实现与 L 链的结合^[4]。在部分偶蹄类中 $\delta 1$ 区被 $\mu 1$ 区的复制所代替, 这似乎是偶蹄类中出现的偶然事件, 但却与硬骨鱼类 δ 链的嵌合性相似^[22]。两栖纲和爬行类动物不存在嵌合和串联重复的现象, 而且恒定区的数目差别比较大, 如非洲爪蟾 (*Xenopus tropicalis*) 有 8 个恒定区^[23], 壁虎 (*Eublepharis manularius*) 有 11 个恒定区^[24], 蜥蜴 (*Anolis carolinensis*) 有 4 个恒定区^[25], 中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 有 6 个恒定区^[26]。总之, 不同物种 *IgD* 重链恒定区的结构模式存在很大差异。

到目前为止, 只有少数几种鱼类 *IgD* 基因表达的报道, Saha 等^[9] 利用 RT-PCR 技术检测红鳍东方鲀 *IgD* 基因主要在脾脏、头肾和中肾中表达, Tian 等^[13] 和 Stenvik 等^[14] 分别利用原位杂交技术检测

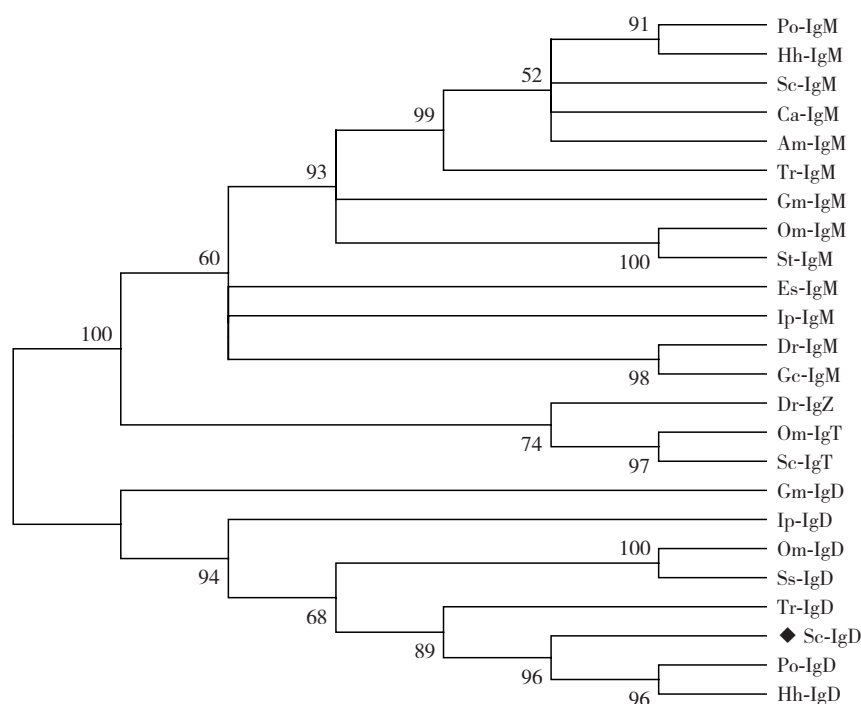


图4 基于硬骨鱼类免疫球蛋白恒定区序列构建的系统进化树

系统进化树中各序列在GenBank中的登录号分别为: IgM: Po 牙鲆 BAB60868; Hh 庸鲽 AAF69489; Ca 南极鱼 AAL99929; Am 花狼鲷 AAD37510; Sc 鳊 AAQ14862; Tr 红鳍东方鲀 BAD26619; Gm 大西洋鲑 CAA41680; Om 虹鳟 AAW66974; St 欧鲢 AAF69489; Es 海鲢 M26182; Ip 斑点叉尾鲷 A45804; Dr 斑马鱼 AAT67447; Gc 草鱼 DQ417927; IgZ/IgT: Dr 斑马鱼 AY643752; Om 虹鳟 AY870265; Sc 鳊 DQ016660; IgD: Gm 大西洋鲑 AAF72568; Om 虹鳟 AAW66976; Ss 大西洋鲑 AAD43527; Ip 斑点叉尾鲷 T18537; Hh 庸鲽 AY077848; Tr 红鳍东方鲀 BAD34541; Po 牙鲆 BAD27405; Sc 鳊 FJ876151. 节点上的数字表示分支可信度的百分比 (1 000 bootstraps).

Fig. 4 Phylogenetic tree of teleostean immunoglobulin

GenBank accession numbers: IgM: Po (*Paralichthys olivaceus*), BAB60868; Hh (*Hippoglossus hippoglossus*), AAF69489; Ca (*Chaenocephalus aceratus*), AAL99929; Am (*Anarhichas minor*), AAD37510; Sc (*Siniperca chuatsi*), AAQ14862; Tr (*Takifugu rubripes*), BAD26619; Gm (*Gadus morhua*), CAA41680; Om (*Oncorhynchus mykiss*), AAW66974; St (*Salmo trutta*), AAF69489; Es (*Elops saurus*), M26182; Ip (*Ictalurus punctatus*), A45804; Dr (*Danio rerio*), AAT67447; Gc (*Ctenopharyngodon idellus*), DQ417927; IgZ/IgT: Dr (*Danio rerio*), AY643752; Om (*Oncorhynchus mykiss*), AY870265; Sc (*Siniperca chuatsi*), DQ016660; IgD: Gm (*Gadus morhua*), AAF72568; Om (*Oncorhynchus mykiss*), AAW66976; Ss (*Salmon salar*), AAD43527; Ip (*Ictalurus punctatus*), T18537; Hh (*Hippoglossus hippoglossus*), AY077848; Tr (*Takifugu rubripes*), BAD34541; Po (*Paralichthys olivaceus*), BAD27405; Sc (*Siniperca chuatsi*), FJ876151. The degree of confidence for each branch point was determined by bootstrap analysis (1 000 repetitions).

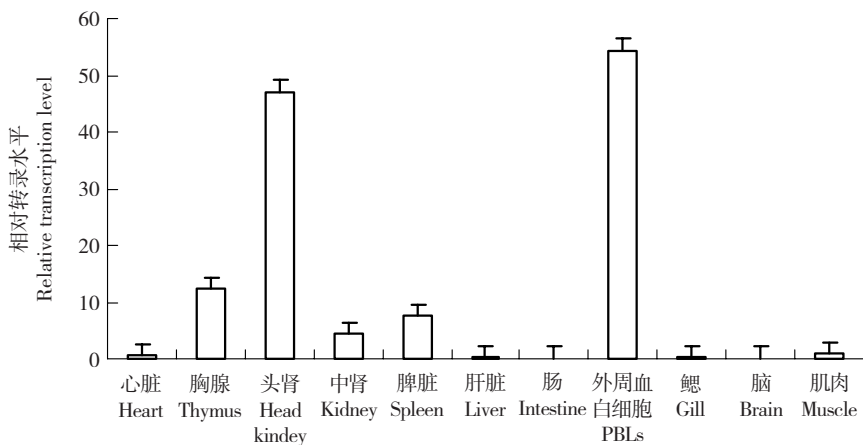


图5 鳊 *mIgD* 在各组织中的表达情况

Fig. 5 The expression of mandarin fish *mIgD* in different tissues

到 IgD 阳性细胞分布于鳎和大西洋鳕的头肾和脾脏。本研究应用荧光定量 PCR 检测到鳎 *IgD* 基因主要在外周血白细胞、头肾、胸腺、中肾和脾脏中表达,其中外周血白细胞中表达量最高,这一结果与牙鲆 *IgD* 基因表达一致^[8],可能是因为从血液中分离出的白细胞中提取的 RNA 纯度较高,而从组织中提取的 RNA 会因为其他细胞(如红细胞)或组织碎片 RNA 的干扰,而使目的基因扩增效率降低。以上研究揭示了 *IgD* 基因表达的主要场所是头肾和脾脏,正好与 IgM 阳性细胞产生的场所相一致^[13-14],提示头肾是 B 细胞分化为浆细胞的场所^[27],也是硬骨鱼类重要的抗体产生器官^[28],头肾和脾脏是产生 IgD 阳性细胞的主要场所。对于鱼类 IgD 功能的研究比较少,其主要功能可能是 B 细胞的受体,但是其表达量很低,在鱼类免疫应答中的作用还不清楚,此外, *IgD* 基因不同的剪切模式对其功能的影响还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Warr G W. The immunoglobulin genes of fish [J]. Dev Comp Immunol, 1995, 19: 1-12.
- [2] 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]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 6919-6924.
- [3] 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]. Nat Immunol, 2005, 6: 295-302.
- [4] Wilson M, Bengtén E, Miller N W, et al. A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 4593-4597.
- [5] Hordvik I, Thevarajan J, Samdal I, et al. Molecular cloning and phylogenetic analysis of the Atlantic salmon immunoglobulin D gene [J]. Scand J Immunol, 1999, 50: 202-210.
- [6] Stenvik J, Jørgensen T Ø. Immunoglobulin D (IgD) of Atlantic cod has a unique structure [J]. Immunogenetics, 2000, 51: 452-461.
- [7] Hordvik I. Identification of a novel immunoglobulin δ transcript and comparative analysis of the genes encoding IgD in Atlantic salmon and Atlantic halibut [J]. Mol Immunol, 2002, 39: 85-91.
- [8] Hirono I, Nam B H, Enomoto J, et al. Cloning and characterization of a cDNA encoding Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* IgD [J]. Fish Shellfish Immunol, 2003, 15: 63-70.
- [9] 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: 438-447.
- [10] Preud'homme J L, Petit I, Barra A, et al. Structural and functional properties of membrane and secreted IgD [J]. Mol Immunol, 2000, 37: 871-887.
- [11] Rowe D S, Fahey J L. A new class of human immunoglobulin [J]. J Exp Med, 1965, 121: 171-199.
- [12] Keer W G, Hendershot L M, Burrows P D. Regulation of IgM and IgD expression in human B-lineage cells [J]. J Immunol, 1991, 146: 3314-3321.
- [13] Tian J Y, Sun B J, Luo Y P, et al. Distribution of IgM, IgD and IgZ in mandarin fish, *Siniperca chuatsi* lymphoid tissues and their transcriptional changes after *Flavobacterium columnare* stimulation [J]. Aquaculture, 2009, 288: 14-21.
- [14] Stenvik J, Schrøder 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]. Dev Comp Immunol, 2001, 25: 291-302.
- [15] 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, 2003, 14: 477-480.
- [16] Zhang Y A, Nie P, Luo H Y, et al. Characterization of cDNA encoding immunoglobulin light chain of the mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2003, 95: 81-90.
- [17] Sun B J, Nie P. Molecular cloning of the viperin gene and its promoter region from the mandarin fish *Siniperca chuatsi* [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2004, 101: 161-170.
- [18] Sun B J, Wang G L, Xie H X, et al. Gene structure of goose-type lysozyme in the mandarin fish *Siniperca chuatsi* with analysis on the lytic activity of its recombinant in *Escherichia coli* [J]. Aquaculture, 2006, 252: 106-113.
- [19] Sun B J, Xie H X, Song Y, et al. Gene structure of an antimicrobial peptide from mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky), suggests that moronecidins and pleurocidins belong in one family: the piscidins [J]. J Fish Dis, 2007, 30: 335-343.
- [20] White M B, Shen A L, Word C J, et al. Human immunoglobulin D: genomic sequence of the delta heavy chain [J]. Science, 1985, 228: 733-737.

- [21] Liu C P, Tucker P W, Mushinski J, et al. Mapping of heavy chain genes for mouse immunoglobulin M and D [J]. *Science*, 1980, 209: 1348–1353.
- [22] Zhao Y, Kacsiovics I, Pan Q, et al. Artiodactyl IgD: the missing link [J]. *J Immunol*, 2002, 169 (8) : 4408–4416.
- [23] Ohta Y, Flajnik M F. IgD, like IgM, is a primordial immunoglobulin class perpetuated in most jawed vertebrates [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 10723–10728.
- [24] Deza F G, Espinel C S. IgD in the reptile leopard gecko [J]. *Mol Immunol*, 2008, 45: 3470–3476.
- [25] Deza F G, Espinel C S, Mompoto S M. The immunoglobulin heavy chain locus in the reptile *Anolis carolinensis* [J]. *Mol Immunol*, 2009, 46: 1679–1687.
- [26] Xu Z, Wang G L, Nie P. IgM, IgD and IgY genes and their expression pattern in the Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis* [J]. *Mol Immunol*, 2009, 46: 2124–2132.
- [27] Koumans-van Diepen J C E, Taverne-Thiele J J, van Rens B T T M, et al. Immunocytochemical and flow cytometric analysis of B cells and plasma cells in carp (*Cyprinus carpio* L.): an ontogenic study [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1994, 4: 19–28.
- [28] 张永安, 孙宝剑, 聂品. 鱼类免疫组织和细胞的研究概况 [J]. *水生生物学报*, 2000, 24: 648–654.

Cloning and expression of immunoglobulin D heavy chain in mandarin fish, *Siniperca chuatsi*

WANG Gailing^{1,2}, LUO Yanping^{1,2}, SUN Baojian¹, XU Zhen¹, XU Qiaoqing¹, NIE Pin¹

(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: Full cDNA sequence of membrane-bounded immunoglobulin D (mIgD) heavy chain in the mandarin fish, *Siniperca chuatsi* has been isolated and characterized using RACE-PCR and RT-PCR methods. The mandarin fish' *mIgD* gene consists of 3 358 nucleotides including 5' UTR of 30 nucleotides, 3' UTR of 337 nucleotides and an open reading frame with 2 991 nucleotides encoding 996 amino acid residues. The structure of mandarin fish' *mIgD* contained the VDJ region, the constant region of $\mu 1$ - $\delta 1$ - $\delta 2$ - $\delta 3$ - $\delta 4$ - $\delta 5$ - $\delta 6$ - $\delta 7$, and TM region. The amino acid sequence of the constant region of mandarin fish *mIgD* shared 37%–72% identity with those of previously reported teleost IgDs including conserved cysteines and tryptophans. Phylogenetic tree based on teleost IgD heavy chain constant regions generated by Neighbor Joining method suggests that all teleosts cluster together, and that the mandarin fish' *mIgD* is clustered closely with Japanese flounder's IgD and Atlantic halibut's IgD. Real-time PCR showed that the mandarin fish' *mIgD* transcription was mainly detected in peripheral blood leucocytes (PBLs), thymus, head kidney, kidney and spleen. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17 (1) : 11–20]

Key words: *Siniperca chuatsi*; IgD; clone; expression; real-time PCR

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