

大黄鱼血清 IgM 纯化及其兔抗血清的制备

鄢庆枇¹, 韩一凡^{1,2}, 高天翔², 庄峙厦³, 王小如³

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003; 3. 厦门大学化学化工学院, 福建 厦门 361005)

摘要:分别用饱和硫酸铵二次盐析法和蛋白 A 亲和层析法对健康大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 血清中的免疫球蛋白 (IgM) 进行分离纯化, 所得产物用 SDS-PAGE 进行检测。结果表明, 蛋白 A 亲和层析法可以较好地分离到高纯度的大黄鱼血清 IgM, 产物的电泳胶中只有重链和轻链 2 个条带; 饱和硫酸铵二次盐析法除了有这 2 个条带, 还有很多杂带, 而且蛋白 A 亲和层析法更为简便、快速, 因此用蛋白 A 亲和层析法分离纯化 IgM 优于饱和硫酸铵二次盐析法; 大黄鱼免疫球蛋白重链的分子量在 76 kD 左右, 轻链分子量在 28 kD 左右。用纯化的大黄鱼 IgM 免疫实验兔, 获得效价高达 1:40 960 的兔抗鱼 IgM 血清。本实验所建立的蛋白 A 亲和层析法提取大黄鱼血清 IgM 可以方便、快捷地获得高纯度的产物, 适合在实验室中纯化鱼类 IgM。本研究所制备的兔抗大黄鱼 IgM 血清可为今后的相关研究工作打下基础。[中国水产科学, 2006, 13(3): 475-479]

关键词:大黄鱼; 蛋白 A 亲和层析法; 免疫球蛋白; 兔抗鱼 IgM 血清; 酶联免疫吸附分析

中图分类号:Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)03-0475-05

大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 是中国福建、广东、浙江、江苏、山东沿海重要的养殖经济鱼类。近年来, 由于大规模高密度网箱养殖, 使得弧菌病成为大黄鱼的主要病害之一, 给大黄鱼养殖业造成了很大损失, 严重制约了其发展。而传统的化学方法已经无法满足防治病害的要求^[1]。利用疫苗进行免疫预防治疗是一种高效持久的方法。

对大黄鱼免疫机制的研究是进行疫苗研究的基础。近年研究表明, 同高等脊椎动物相比, 大多数真骨鱼类血清中只存在一种免疫球蛋白即 IgM, 为四聚体结构, 其重链分子量在 70 kD 左右, 轻链的分子量在 30 kD 左右^[2-9]。鱼类 IgM 提取方法如今已经较为成熟, 但多为几种方法结合使用, 如王先磊等^[4]依次用盐析、离子交换层析和凝胶柱层析 3 种方法结合纯化牙鲆血清 IgM, 林天龙等^[5]用盐析、二次凝胶柱层析和一次离子交换层析纯化了欧洲鳗血清 IgM, 这些方法还要进行透析除盐, 步骤繁琐。本研究利用蛋白 A 亲和层析法探索分离纯化大黄鱼 IgM 的最佳条件, 并用纯化的大黄鱼 IgM 免疫实验兔制备抗血清, 以期为进一步研究大黄鱼免疫系统和免疫机理及相关免疫检测研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

22 尾健康大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 购自厦门刘五店大黄鱼养殖场, 体质量 300~500 g。

1.2 大黄鱼血清制备

从大黄鱼尾动脉取血, 常温放置 1 h 后, 放入 4℃ 冰箱过夜使血清充分析出。次日于 4℃ 10 000 g 离心 10 min, 取上清液过滤除菌后分装于 2 mL 血清瓶, 保存于 -80℃ 超低温冰箱备用^[2]。

1.3 大黄鱼免疫球蛋白的分离纯化

1.3.1 二次盐析 往血清中加入饱和硫酸铵至终质量分数为 33%, 放置 4℃ 冰箱过夜; 次日, 4℃ 10 000 g 离心 10 min, 取上清加入饱和硫酸铵至终质量分数为 50%, 放置 4℃ 冰箱过夜; 次日, 4℃ 10 000 g 离心 10 min, 取沉淀用 PBS 重溶, 4℃ 下对 PBS 进行透析除盐 2 d, 每天换液 2 次。尔后分装保存于 -20℃ 冰箱。

1.3.2 蛋白 A 亲和层析

(1) 蛋白溶液浓度测定

用紫外分光光度法测定蛋白质浓度。在 280 nm

收稿日期: 2005-04-29; 修订日期: 2005-11-14.

基金项目: 国家“863”计划项目 (2002AA639600); 福建省自然科学基金 (B0410022); 福建省青年创新基金 (2002J037).

作者简介: 鄢庆枇 (1971-), 男, 博士, 副教授, 主要从事水产疾病学研究. E-mail: ywngp@jmu.edu.cn

下测定溶液 OD 值,参照公式:蛋白质质量浓度(mg/mL) = $1.2 \times OD_{280\text{nm}}$,求得溶液中蛋白质质量浓度^[10]。

(2) 蛋白 A 亲和层析分离纯化 IgM 条件优化

取 0.5 mL 血清用等量的 PBS 稀释后上样于 1.2 mL 柱床,在 10 ℃ 下于柱床上温育 150 min^[12-13],然后用 10 倍柱体积的 PBS(pH 8.0)通过蠕动泵以 1 mL/min 的速度洗脱未结合蛋白,以 1 mL 为单位分步收集洗脱液;再用 10 倍柱体积的甘氨酸-盐酸缓冲液(pH 2.5)洗脱结合蛋白,以 1 mL 为单位分步收集洗脱液于含 50 μ L Tris-Cl(pH 10.5)中和液中,使 pH 值调到 8.0 左右。用紫外分光光度法测定所收集洗脱液的蛋白质质量浓度。

(3) 大黄鱼 IgM 的纯化

取 6 mL 血清用等量的 PBS 稀释,经 0.22 μ m 无菌滤膜过滤后上样,每次 1 mL。样品柱于 10 ℃ 温育 150 min,然后用 10 倍柱体积的 PBS(pH 8.0)

洗脱未结合蛋白,再用 2 倍柱体积的甘氨酸-盐酸缓冲液(pH 2.5)洗脱 IgM,收集洗脱液于 4 ℃ 下以蔗糖粉包埋过夜,浓缩至浓度为 2 mg/mL 后分装,于 -20 ℃ 保存。

1.4 大黄鱼 IgM 纯化效果的检测

采用 Mini-Protein II cell 系统(BioRad),按照 Laemmli 系统进行变性不连续 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)来检测蛋白质分离纯化的效果。样品与等体积样品缓冲液混合后,于 90 ℃ 水浴 5 min,经 1~2 s 短暂离心后上样。分离胶浓度为 12%,压缩胶电流 10 mA,分离胶电流 18 mA,电泳时间为 160 min,电泳后用考马斯亮蓝进行染色^[11]。稍后对凝胶进行拍照。

1.5 兔抗血清的制备

实验用新西兰大白兔购自上海,暂养 1 周后用大黄鱼 IgM 进行免疫,免疫过程如表 1^[4]所示。

表 1 新西兰大白兔免疫过程
Tab.1 Procedure of immunization for New Zealand rabbits

次数 Time	注射时间/d Injection time	注射剂量/mL Injection dose	注射浓度 (mg·mL ⁻¹) Injection concentration	抗原 Antigen	注射部位 Injection position
1	1	0.3	1	抗原+福氏完全佐剂 Antigen + FCA	背部皮下多点注射 Dorsal multi-hyodermic
2	14	0.3	1	抗原+福氏不完全佐剂 Antigen + FIA	背部皮下多点注射 Dorsal multi-hyodermic
3	21	0.1	2	抗原 Antigen	耳缘静脉 Aural vein
4	28	0.3	1	抗原+PBS Antigen + PBS	耳缘静脉 Aural vein
5	35	0.3	1	抗原+PBS Antigen + PBS	耳缘静脉 Aural vein

1.6 兔抗大黄鱼 IgM 血清效价测定

最后一次免疫 1 周后,从耳静脉取血试血,用间接 ELISA 法检测效价。具体步骤如下:用包被液(pH 9.6, 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液)将大黄鱼 IgM 稀释至 20 μ g/mL,分别于酶标板各孔加入 100 μ L,置于 4 ℃ 冰箱过夜包被。然后用 5% 的牛血清白蛋白于 37 ℃ 封闭 1 h,封闭结束后用含 0.05% Tween20 的 0.01 mol/mL PBST(pH 7.4)洗涤液滴孔洗涤 3 次,每次 3 min。各孔依次加入稀释 320~163 840 倍的兔抗大黄鱼 IgM 血清 100 μ L,阴性对照孔加 PBS,37 ℃ 温育 1 h,同上洗涤 3 次。每孔加

入 100 μ L 羊抗兔 IgG-HRP,37 ℃ 温育 1 h,同上洗涤 3 次。每孔加入 100 μ L 新鲜配置的 OPD-H₂O₂ 底物溶液,于避光处反应 30 min,然后每孔加入 50 μ L 2 mol/L 硫酸溶液中止反应,于 492 nm 下检测每孔 OD 值。试血后 2 d 从颈动脉采血,制备抗血清,同样用间接 ELISA 法检测效价。将所制备的抗血清过滤除菌后分装, -20 ℃ 保存。

2 结果

2.1 蛋白 A 亲和层析法提纯大黄鱼 IgM 的结果

将亲和层析 2 次洗脱液以 1 mL 为单位分步收

集后,于 280 nm 下测紫外吸光度,结果如图 1 所示。用亲和层析分离大黄鱼血清得到 2 个蛋白峰,第一个峰是用 PBS 洗脱的未结合杂蛋白的吸收峰,第二个峰是用甘氨酸-盐酸缓冲液洗脱下来的结合到柱床上的大黄鱼 IgM。从图 1 可以看出,未结合杂蛋白用 3 倍体积 PBS 就基本洗脱干净了,而结合的 IgM 不能被 10 倍体积 PBS 洗脱,为了保证最大限度地洗脱杂蛋白,本研究在纯化 IgM 时还是使用 10 倍体积 PBS 洗脱。加入甘氨酸-盐酸缓冲液后,结合在蛋白 A 上的 IgM 很快就被洗脱,用 2 mL 的甘氨酸-盐酸缓冲液就已经将结合的 IgM 基本上洗脱干净。为了得到较高浓度的 IgM 溶液,本实验在纯化 IgM 时使用 2 倍体积甘氨酸-盐酸缓冲液洗脱。本实验用蛋白 A 亲和层析最终从 6 mL 鱼血清中得到浓度为 0.306 mg/mL 的蛋白溶液 20 mL,浓缩至 3 mL 的 2 mg/mL 蛋白溶液,最终得到 6 mg 纯化的 IgM。

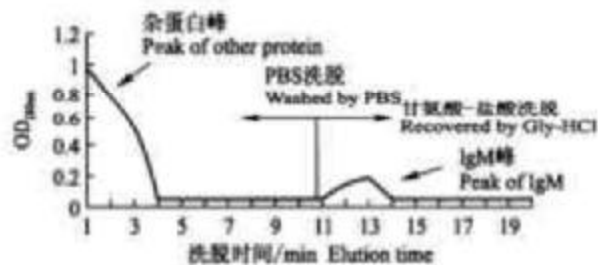


图1 蛋白 A 亲和层析法提纯抗体蛋白洗脱曲线

Fig.1 Curve of protein eluted from protein A-sepharose affinity chromatography

2.2 两种提取方法的 SDS-PAGE 检测结果

将二次盐析和蛋白 A 亲和层析提取的产物,对照大黄鱼全血清进行 SDS-PAGE 检测(图 2)。由图 2 可见大黄鱼全血清的电泳条带最多,说明其中含有多样的蛋白质;大黄鱼血清经二次盐析后其电泳条带大为减少,颜色也淡了许多,表明二次盐析能够去除大量的杂蛋白,但是大黄鱼血清经二次盐析后仍有多个条带,表明二次盐析法不能完全去除杂蛋白;大黄鱼血清经蛋白 A 亲和层析纯化后,在电泳胶上只有轻链和重链 2 个条带,表明蛋白 A 亲和层析法能够有效去除大黄鱼血清中的杂蛋白,达到纯化 IgM 的目的。

由图 2 可以看出,大黄鱼血清 IgM 的重链分子量在 76 kD 左右,轻链分子量在 28 kD 左右。冯娟

等^[2]测得尖吻鲈(*Lates calcarifer*)、紫红笛鲷(*Lutianus argentimaculatus*)、青石斑鱼(*Epinephelus a-tocara*)和牙鲆 4 种海水养殖鱼类的重链分子量在 81.8 kD~73.5 kD,轻链分子量在 31.0 kD~15.0 kD。Scapigliati 等^[3]测得鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*)血清 IgM 重链和轻链的分子量分别为 74 kD 和 27 kD。王先磊等^[4]测得牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)血清 IgM 的重链为 74.2 kD,轻链为 23.8 kD。林天龙等^[5]测得欧洲鳗(*Anguilla anguilla*)血清 IgM 重链分子量为 68 kD,轻链为 26 kD。这些都与本实验所得到的大黄鱼血清 IgM 重链和轻链的分子量在同一水平。

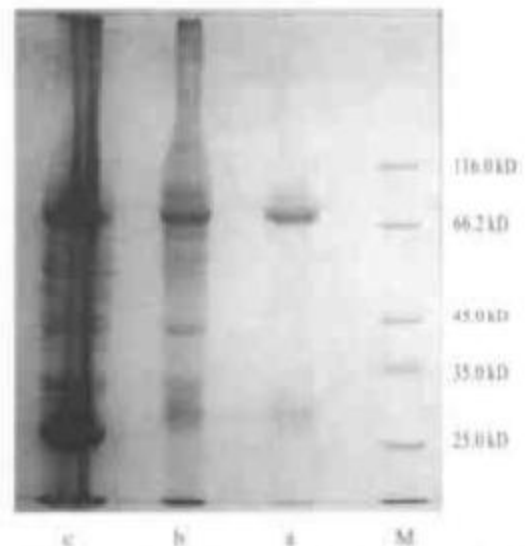


图2 大黄鱼血清及其分离产物 SDS-PAGE 电泳结果

M: Marker; a: 蛋白 A 亲和层析分离产物; b: 二次盐析分离产物; c: 大黄鱼血清

Fig.2 Result of SDS-PAGE of *Pseudosciaenops crocea* serum and its separated production

M: marker; a: products of protein A; b: products of twice salt out-ing; c: crude sera of *P. crocea*

2.3 兔抗大黄鱼 IgM 血清效价 ELISA 检测结果

用间接 ELISA 测定了所制备的兔抗大黄鱼 IgM 血清的效价,结果表明本实验所制备的兔抗大黄鱼 IgM 血清的效价高达 1:40 960(表 2),可以满足免疫检测的要求。

3 讨论

蛋白 A 为金黄色葡萄球菌的细胞壁组分,可以和 IgG 及一些 IgM 的 Fc 段特异性的结合。已知大多数真骨鱼类血清中只含有一种免疫球蛋白

(IgM),是以四聚体的形式存在,而蛋白A与IgM的亲合力较弱,故在上样之后,应使样品在4~10℃下于柱床上温育2~3h,以提高样品与蛋白A的结合率。本实验采用10℃温育150min,可以使大黄鱼IgM较好地结合到蛋白A上,用10倍体积的PBS不能将结合的IgM洗脱。蛋白A与IgM的非共价结合是可逆的,在酸性条件下,蛋白A与IgM的亲合力降低,可以用酸性洗脱液将蛋白A与IgM分开。因此,可以用蛋白A亲和层析法来进行真骨鱼IgM的分离纯化。

表2 兔抗大黄鱼IgM血清效价
Tab.2 Titer of rabbit polyclonal sera
anti-IgM of *Pseudosciaena crocea*

血清稀释倍数 Serume dilution times	OD _{492nm}	+/-
320	3.214	+
640	3.523	+
1280	3.302	+
2560	3.435	+
5120	3.152	+
10240	2.499	+
20480	1.716	+
40960	1.318	+
81920	1.138	-
163840	0.717	-
阴性对照(PBS)	0.606	-
空白管	0.055	-

注:(样品孔吸光值-空白管吸光值)/(阴性对照管吸光值-空白管吸光值)大于2则判定为“+”,否则为“-”。

Note: When $(OD_{492} \text{ of sample hole} - \text{blank } OD_{492}) / (OD_{492} \text{ of negative control} - \text{blank } OD_{492}) > 2$, it's a positive.

蛋白A亲和层析法纯化大黄鱼血清IgM可以得到高纯度的产物,在电泳胶上只有轻链和重链2个条带;而二次盐析的条带却很杂。亲和层析法所得产物无需透析,可直接过滤除菌后-20℃保存,制备周期短,有利于保持蛋白质的生物活性;二次盐析法需要进行长达几天的透析除盐,很容易造成污染和蛋白质变性沉淀。同时,就操作而言,亲和层析法只需要进行加样、洗脱、收集这几个简便的步骤;而二次盐析法则需要进行离心、透析等操作,较亲和层析法要麻烦很多。因此,蛋白A亲和层析法无论在IgM纯度、IgM活性、实验操作、工作周期等方面,都要优于二次盐析法,是一种较为理想的提取大黄鱼血清IgM的方法。本实验采用1.2mL蛋白A

亲和层析柱,一次能上样1mL,1d可以处理6mL血清样品,可以满足实验室研究需要。

Scapigliati等^[3]从5mL鲈鱼血清中分离纯化出8mg的IgM,取得率为2.6%。本实验从6mL大黄鱼血清中分离纯化出6mg的IgM,取得率为1.6%。本实验纯化得到的IgM较少,其主要原因可能是由于大黄鱼血清中IgM含量本身就比较低,因为本实验中所采用的健康大黄鱼没有经人工免疫提高其血清中免疫球蛋白的浓度。同时也可能是蛋白A对大黄鱼IgM亲合力较低所致,在10℃温育150min后有可能还有小部分IgM没有结合到蛋白A上。有报道表明,蛋白A和牙鲆血清IgM亲合力也比较低,用蛋白A柱来分离纯化南极鱼种*Trematomus newnesi*时效果很不理想^[2]。

本实验用纯化的大黄鱼IgM通过多次注射免疫实验兔,结果得到效价高达1:40960的兔抗大黄鱼IgM血清,可以用来进一步研究大黄鱼免疫机制及免疫指标和一些相关工作。

参考文献:

- [1] 李清禄,陈强.海水网箱养殖大黄鱼细菌性病原鉴定与感染治疗研究[J].应用与环境生物学报,2001,7(5):489-493.
- [2] 冯娟,胡超群.四种海水养殖鱼类血清免疫球蛋白的分离纯化及分子量测定[J].热带海洋学报,2002,21(4):8-13.
- [3] Scapigliati G, Romano N, Picchiotti S. Monoclonal antibodies against sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) immunoglobulins: immunolocalisation of immunoglobulin-bearing cells and applicability in immunosays[J]. Fish Shell Immunol, 1996, 6: 383-401.
- [4] 王先磊,张培军,李军,等.牙鲆血清中免疫球蛋白M的分离及其测定[J].海洋科学,2004,28(4):8-12.
- [5] 林天龙,陈强,俞伏松,等.欧洲鳎血清免疫球蛋白纯化及部分特性分析[J].水产学报,2001,25(1):53-57.
- [6] 陈怀青,陆承平.从比较免疫学看鱼类的免疫特性[J].动物学杂志,1994,29(4):56-60.
- [7] 曲凌云,孙修勤,战文斌,等.牙鲆抗淋巴瘤病毒免疫球蛋白的纯化[J].高技术通讯,2000,10(9):14-18.
- [8] 林天龙,陈强,费晖,等.欧洲鳎免疫球蛋白单克隆抗体的制备与特性[J].水产学报,2001,25(6):532-537.
- [9] 张永安,葛品.鳎血清免疫球蛋白的分离纯化及其亚单位分子量的测定[J].水生生物学报,1998,22(2):192-194.
- [10] 哈洛E,莱恩D.抗体技术实验指南[M].北京:科学出版社,2002:9.
- [11] 马歇尔D R,门永J T.蛋白质纯化与鉴定实验指南[M].北京:科学出版社,2000:5.

Purification of serum IgM from large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) and preparation of rabbit sera anti-IgM

YAN Qing-pi¹, HAN Yi-lan^{1,2}, GAO Tian-xiang², ZHUANG Zhi-xia³, WANG Xiao-rui³

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 3. College of Chemistry & Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The serum IgM of healthy large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) was purified by twice salt out of saturated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and protein A-sepharose affinity chromatography. The products were examined by SDS-PAGE electrophoresis. The results showed that the product of protein A-sepharose affinity chromatography had only two bands (heavy chain and light chain) in SDS-PAGE, while the product of twice salt out of saturated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ had several other bands; moreover, using protein A-sepharose affinity chromatography to purify IgM was more simple, convenient and fast, so protein A-sepharose affinity chromatography was better than twice salt out of saturated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in terms of the purification of IgM; the molecular weight of heavy chain and light chain of *Pseudosciaena crocea* IgM were 76 kD and 28 kD respectively. Sera anti-IgM of *Pseudosciaena crocea* had been prepared by repeatedly immunized New Zealand rabbits with purified IgM, and the titers of anti-sera obtained up to 1:40 960 examined by indirect ELISA. The results indicated that protein A-sepharose affinity chromatography was feasible in purification of IgM of *Pseudosciaena crocea*. The anti-sera obtained could be used in correlative studies in future. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(3): 475–479]

Key words: *Pseudosciaena crocea*; protein A-sepharose affinity chromatography; immunoglobulin M (IgM); rabbit sera anti-IgM; ELISA