

## 牙鲆血清免疫球蛋白的分离纯化及部分特性分析

刘云<sup>1</sup>, 孙峰<sup>1,2</sup>, 姜国良<sup>1</sup>

(1. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003; 2. 大连自然历史博物馆, 辽宁 大连 116023)

**摘要:**运用 Sephacryl S-200 凝胶层析和 HiTrap rProtein A Sepharose 亲和层析 2 种方法对牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 血清免疫球蛋白进行分离纯化, 结果表明, 牙鲆免疫球蛋白分布于 33%~50% 的硫酸铵饱和溶液中, 其中 45% 的分离效果最好。凝胶层析和亲和层析样品均出现 2 个蛋白峰, 用还原 SDS-PAGE 检测确定牙鲆免疫球蛋白存在于第 2 个蛋白峰中。牙鲆免疫球蛋白重链分子量约为 75.4 kD, 轻链分子量约为 29.9 kD 和 28.2 kD, 推测牙鲆血清免疫球蛋白的分子量为 836 kD。制备了兔抗牙鲆免疫球蛋白多克隆抗体, 免疫双扩散法检测多克隆抗体效价为 1:32, 免疫斑点法检测多克隆抗体效价至少为 1:1 600。运用免疫印迹法 (Western-blotting) 检测了兔抗牙鲆免疫球蛋白多克隆抗体的特异性, 实验证明该抗体与牙鲆全血清中免疫球蛋白重链、轻链反应均成阳性。[中国水产科学, 2007, 14 (4): 547-553]

**关键词:**牙鲆; 免疫球蛋白; 凝胶层析; 亲和层析; 免疫印迹

**中图分类号:** Q959.486 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2007)04-0547-07

同其他脊椎动物一样, 鱼类的免疫系统包括细胞免疫和体液免疫。近年来对其研究表明, 硬骨鱼抗体主要有 IgM<sup>[1]</sup>, 随着研究的逐步深入, 陆续发现了 IgD<sup>[2-4]</sup>、IgZ<sup>[5]</sup> 和 IgT<sup>[6]</sup>。对硬骨鱼 IgM 的研究多以淡水鱼为主, 如对斑 ( *Ictalurus punctatus* )<sup>[7]</sup>、鳊 ( *Siniperca chuatsi* )<sup>[8]</sup>、鲤 ( *Cyprinus carpio* )<sup>[9-10]</sup>、欧洲鳗 ( *Anguilla anguilla* )<sup>[11]</sup>、草鱼 ( *Ctenopharyngodon idellus* )<sup>[12]</sup>、黄颡鱼 ( *Pseudobagrus fulvidraco* )<sup>[13]</sup> 以及胡鲇 ( *Clarias batrachus* L. )<sup>[14]</sup> 的研究发现, IgM 通常是由 2 条重链 (H 链) 和 2 条轻链 (L 链) 组成的 1 个单体, 或单体间通过连接链“J”链连接成四聚体, 分子量为 600~900 kD。而对海水鱼的研究较晚, 现已有 Bernard 等<sup>[15]</sup> 对黑鲈 ( *Dicentrarchus labrax* ), Bang 等<sup>[16]</sup>、曲凌云等<sup>[17]</sup> 对牙鲆 ( *Paralichthys olivaceus* ), 鄢庆彬等<sup>[18]</sup> 对大黄鱼 ( *Pseudosciaena crocea* ) 以及冯娟等<sup>[19]</sup> 对 4 种海水鱼类的血清免疫球蛋白分离纯化部分性质进行了探讨。

由于牙鲆 ( *Paralichthys olivaceus* ) 是中国北方海水养殖的重要品种, 具有较高的经济价值, 研究其免疫系统的发育和功能, 有着重要的理论意义和应用前景。利用抗体标记技术, 可以对免疫系统的发

生和制约条件进行研究。制备出针对免疫球蛋白的多克隆或单克隆抗体, 作为研究工具日益显现出其重要作用, 其关键技术就是分离纯化出尽可能多的纯度较高的免疫球蛋白。本研究利用与其他研究者不同的分离方法, 探索了提纯牙鲆免疫球蛋白的技术, 测定了牙鲆免疫球蛋白的分子量, 并制备了特异性较强的兔抗牙鲆 Ig 的多克隆抗体, 这些都为今后的研究提供了技术手段。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

牙鲆体质量 450~550 g, 购于青岛南山水产品市场。新西兰大白兔体质量 2 000~2 500 g, 购于青岛市实验动物中心, 为标准的实验动物 (合格证: 200002004)。HiTrap rProtein A Sepharose 亲和层析预装柱和 Sephacryl S-200 均为 Amersham 产品。

#### 1.2 牙鲆血清 IgM 的制备与纯化

**1.2.1 牙鲆血清制备** 将牙鲆捞出放在干净的磁盘中, 75% 乙醇消毒, 用剪刀断尾取血, 滴入灭菌的 5 mL 的离心管中, 静置 4 ℃ 冰箱过夜, 使血清充分析出, 4 ℃ 600 g 离心 15 min, 用微量移液器吸取上

收稿日期: 2006-03-22; 修订日期: 2006-08-14.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30000129).

作者简介: 刘云 (1969-), 女, 副教授, 博士, 主要从事鱼类免疫学研究. Tel: 0532-82032913; E-mail: liuyun@mail.ouc.edu.cn

清液,分装到1.5 mL离心管中,在冰箱中-20 ℃保存备用。

**1.2.2 饱和硫酸铵分级盐析** 牙鲆血清与生理盐水按1:1体积比稀释,加入pH 7.2的饱和硫酸铵(28%氨水调pH),边加边搅拌,使最终质量分数为50%。4 ℃静置过夜后,4 ℃下750 g离心15 min,倒掉上清液。取沉淀用0.05 mol/L Tris-HCl pH 7.8溶解沉淀。继续加入饱和硫酸铵至终质量分数为33%,出现较少的絮状沉淀,4 ℃下750 g离心15 min后,因沉淀量过少无法分离。继续加饱和硫酸铵至终质量分数为45%,出现较多的絮状沉淀,4 ℃下750 g离心15 min,倒上清液于另1只离心管中,重悬沉淀,以Tris-HCl透析除盐,用萘氏试剂检查,-20 ℃保存备用。上清液继续加饱和硫酸铵至终质量分数为50%,出现较少的絮状沉淀,4 ℃下750 g离心15 min后,因沉淀量过少无法分离。

**1.2.3 Sephacryl-S200 凝胶过滤层析** 柱长70 cm,直径1.6 cm。洗脱液为Tris-HCl 0.05 mol/L pH 7.8,流速1 mL/min,每管收集2 mL,记录管号,收集280 nm下的蛋白质吸收峰。分别收集层析所得的2个蛋白峰所在的管号中的液体于透析袋中,在4 ℃下外加聚乙二醇(分子量20 000),将液体浓缩后,依以上步骤再次过层析柱,并收集2个蛋白峰所在管号的液体。

**1.2.4 HiTrap rProtein A Sepharose 亲和层析** 血清Ig的分离提纯采用HiTrap rProtein A Sepharose亲和层析,参照Amersham产品手册方法进行。0.5 mL血清用0.5 mL PBS(0.1 mol/L, pH 7.4)平衡液稀释,经0.22 μm孔径的无菌滤膜过滤后,上样,并在柱床上4 ℃孵育6 h,以提高样品同rProtein A的结合率。先用PBS洗脱未结合蛋白,冲洗柱床至流出液OD<sub>280 nm</sub>=0。再用甘氨酸-盐酸缓冲液(0.05 mol/L, pH 2.5)洗脱结合的蛋白,以1 mL为单位分步收集结合蛋白于含50 μL 1.0 mol/L Tris(pH 10.5)的中和液中,以达到pH为8.0。洗脱下来的蛋白浓缩后置于-20 ℃保存。

### 1.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

采用还原不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳来检测蛋白纯度。标准蛋白分子量为14.4~97.4 kD。待测样品20 μL与等量样品缓冲液混合,沸水浴5 min,降至室温,稍离心后上样。凝胶配置液为浓缩胶3%,分离胶15%。每孔内加样品、蛋白分子量标准各20 μL。稳流条件下,先用低电流30~40 mA,约

30 min后,加大电流(50~70 mA),电泳2 h。用考马斯亮蓝G-250染色,脱色至条带清晰,Kodak凝胶成像系统进行拍照。

## 1.4 兔抗牙鲆IgM多克隆抗体的制备

**1.4.1 免疫方案** 利用凝胶过滤层析法纯化的牙鲆血清抗体2 mL和等量福氏完全佐剂(FCA, Gibco)混合后在兔双后足垫皮下各注射0.5 mL进行首次免疫。15日后加强免疫,0.5 mL牙鲆血清抗体与等量福氏完全佐剂混合并加少量Tween-80乳化,背部3点,双后肢窝淋巴结内注射。20日后加强免疫,0.5 mL牙鲆血清抗体与等量福氏不完全佐剂混合并加少量Tween-80乳化,背部3点注射。30日后1 mL牙鲆血清抗体耳缘静脉注射,1周内注射3次,1周后测效价。

**1.4.2 抗血清效价测定** 耳缘静脉取血1 mL。将血液置入离心管中,4 ℃过夜,待血块收缩后,吸出血清,按1/100体积比加2%的NaN<sub>3</sub>。用2种方法测量抗血清的效价,即免疫双扩散法和免疫斑点法。免疫双扩散法测定采用Kunkel等<sup>[12]</sup>的方法进行。免疫斑点法检测血清效价的过程如下:将牙鲆血清免疫球蛋白点于每格的中央,每点2 μL,晾干后用0.1 mol/L PBST(0.1 mol/L PBS, pH 7.2~7.4,含0.05% Tween20)洗3次,每次5 min。将膜浸入2% BAS中,4 ℃封闭过夜,取出后以0.1 mol/L PBST洗3次,每次5 min。将膜充分晾干即得包被好的NC膜,封闭冷冻保存。取不同稀释度(1:200、1:400、1:800、1:1 600、1:3 200)的抗血清于反应孔内,每孔加入包被好的NC膜1片,4 ℃过夜,取出后以0.1 mol/L PBST洗3次。将膜放入1:400 HRP-山羊抗兔IgG,37 ℃湿盒孵育40 min,0.1 mol/L PBST洗3次。加DAB(0.1 mol/L PBST,含0.05% DAB,0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)室温反应5~15 min,用蒸馏水冲洗终止反应,晾干后拍照。

**1.4.3 抗血清制备及保存** 经检验效价合格后颈动脉放血,收集血液,测定抗血清效价,方法同1.4.2。抗血清-20 ℃保存备用。

## 1.5 免疫印迹实验

抗血清的特异性检测使用免疫印迹法。SDS-PAGE蛋白质凝胶电泳后,进行电转移。卸下凝胶板,切下蛋白分子量标准,进行固定、染色、脱色,其余部分做好标记准备转膜。电转移前将凝胶、硝酸纤维素膜(Pall Gekman Lab, USA)、滤纸等置于4 ℃

电转移缓冲液中浸泡 30~60 min。按照“夹心法”装好电转移装置,4 ℃ 条件下,30 V 转移过夜。电转移结束后,取出硝酸纤维素膜在丽春红 S 液中染色 5~10 min。漂洗数次。剪下分子量标准的参考蛋白位置,并标记。

把硝酸纤维素膜放入 Western Blotting 检测试剂盒(产品编号:SA2022,武汉博士德生物工程有限公司产品)中,加封闭液摇动 30 min 至 1 h。PBST 轻洗 3 次。将一抗——兔抗牙鲆 Ig 免疫血清用抗体稀释液稀释至适当浓度后(1:100)加入容器中,在 20~35 ℃ 轻摇 2 h。倒掉一抗溶液,用 0.1 mol/L PBST 洗膜 2 次,每次 5 min。然后将 HRP-羊抗兔 IgG 用抗体稀释液稀释至适当浓度后(1:400)加入

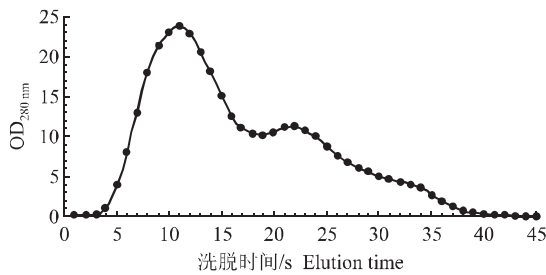


图1 牙鲆血清 Sephacryl-S200 2次层析图

Fig.1 Re-chromatogram of flounder serum on Sephacryl-S200 column

## 2.2 还原不连续电泳 SDS-PAGE 结果

免疫球蛋白分子被 2-巯基乙醇还原,降解为重链(H链)和轻链(L链)亚单位,在此基础上进行 SDS-PAGE,电泳结果如图 3 和图 4 所示。从图 3 中可以看出, Sephacryl-S200 柱层析纯化的蛋白峰 F<sub>1</sub>的电泳图谱主要有 4 个蛋白带;蛋白峰 F<sub>2</sub>主要有 3 条蛋白带。第 1 条为 66.2~97.4 kD,第 2、3 条为 20.1~31.0 kD;而全血清的蛋白带数至少在 20 条以上。图 4 表明,亲和层析后第 1 蛋白峰内蛋白条带较多,而第 2 峰内仅可以看到 3 个主要的条带,条带比较浅,即免疫球蛋白重链和轻链,杂蛋白条带几乎没有。从亲和层析的 SDS-PAGE 电泳图谱上看,亲和层析的分离效果与 Sephacryl-S200 层析第 2 峰的分离效果相近。测出标准蛋白的迁移率(Rf),做标准曲线,得到蛋白峰 F<sub>2</sub>的 3 条蛋白带分子量分别为 75.4 kD、29.9 kD 和 28.2 kD;如果牙鲆和多数鱼类一样,血清免疫球蛋白也是四聚体(H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>)<sub>4</sub>,那么

容器中 20~35 ℃ 轻摇 45 min。PBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入 DAB 显色剂反应 5~30 min,观察显色情况。用双蒸水洗膜 3 次,每次 10 min,终止显色。室温晾干膜后,避光密封保存。

## 2 结果与分析

### 2.1 牙鲆血清 Ig 的纯化

牙鲆血清经 45% 饱和硫酸铵提取物经 2 次 Sephacryl-S200 凝胶过滤层析后,出现 2 个部分重叠的蛋白吸收峰,即 F<sub>1</sub> 和 F<sub>2</sub>(图 1)。HiTrap rProtein A Sepharose 亲和层析后,出现 2 个完全分开的蛋白吸收峰(图 2)。从峰面积上可以看出,血清中能与 HiTrap rProtein A 结合的蛋白质的含量比较少。

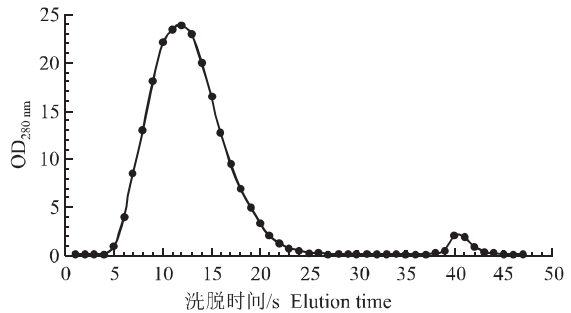


图2 牙鲆血清 HiTrap rProtein A Sepharose 亲和层析图

Fig.2 Affinity chromatogram of flounder serum on Hi-Trap rProtein A Sepharose column

推测其分子量应为  $(75.4 \times 2 + 29.9 + 28.2) \times 4 = 836$  kD。

### 2.3 兔抗牙鲆 IgM 多克隆抗体效价测定

免疫新西兰大白兔后制得抗血清。按照免疫双扩散法检测抗血清效价,结果如图 5 所示。中央孔为 5 μL 纯化的牙鲆 IgM,周围 1~6 孔(顺时针排列)为 5 μL 梯度稀释的抗血清,即 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64。由孔与中央孔之间的沉淀线可知,抗血清的效价为 1:32。按照免疫斑点法检测抗血清效价,结果如图 6 所示。依次为系列稀释的抗血清温育后的硝酸纤维素膜,1:200、1:400、1:800、1:1 600、1:3 200,从实验结果可知,1:3 200 稀释的抗血清用免疫斑点法也可观察到阳性反应,说明免疫斑点法测得的抗血清效价至少为 1:1 600 以上。两种方法测定结果的比较表明,免疫斑点法的灵敏度大大高于双扩散法。

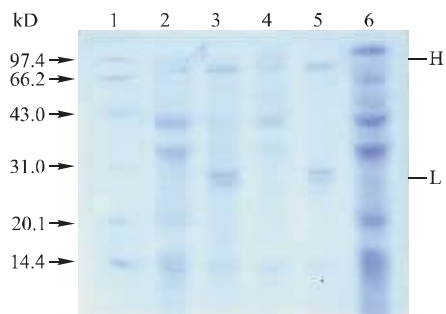


图3 Sephacryl-S200 2次纯化牙鲆血清 Ig 的 SDS-PAGE 图谱

1: 蛋白质分子量标准; 2: 第1次层析第1峰 (F<sub>1</sub>) 结果; 3: 第1次层析第2峰 (F<sub>2</sub>) 结果; 4: 第2次层析第1峰 (F<sub>1</sub>) 结果; 5: 第2次层析第2峰 (F<sub>2</sub>) 结果; 6: 45% 硫酸铵沉淀的血清; H 为重链; L 为轻链位置。

Fig.3 SDS-PAGE analysis of proteins purified by Sephacryl-S200 chromatography

1: Molecular weight standard; 2: Proteins extracted from the first peak (F<sub>1</sub>) for the first chromatography; 3: Proteins extracted from the second peak (F<sub>2</sub>) for the first chromatography; 4: Proteins extracted from the first peak (F<sub>1</sub>) for the second chromatography; 5: Proteins extracted from the second peak (F<sub>2</sub>) for the second chromatography; 6: Whole flounder serum obtained by ammonium sulfate precipitation at 45% concentration. H indicates heavy chain and L indicates light chain in lanes 3 and 5.

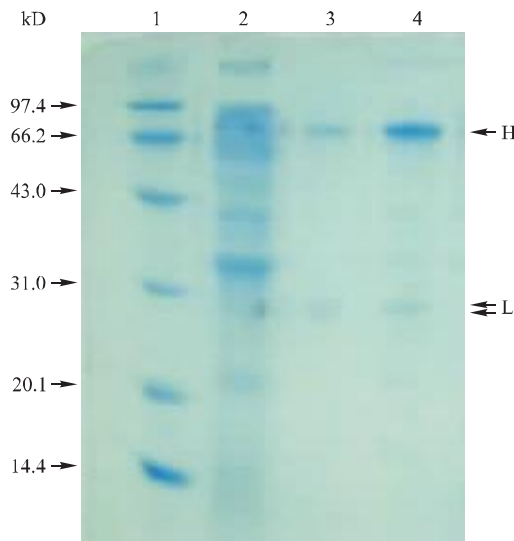


图4 HiTrap rProtein A Sepharose 亲和层析纯化牙鲆血清 Ig 的 SDS-PAGE 图谱

1: 蛋白质分子量标准; 2: 亲和层析第1峰结果; 3: 亲和层析第2峰结果; 4: Sephacryl-S200 2次层析第2峰结果。

Fig.4 SDS-PAGE analysis of purified flounder serum Ig using rProtein A Sepharose affinity chromatography

1: Molecular weight standards; 2: Proteins in the first peak (F<sub>1</sub>); 3: Purified flounder immunoglobulin in the second peak (F<sub>2</sub>); 4: Purified flounder immunoglobulin extracted from the second peak (F<sub>2</sub>) for the second chromatography by Sephacryl-S200 column.

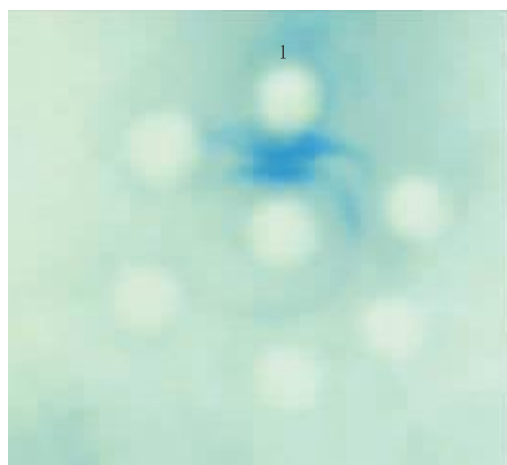


图5 免疫双扩散法测定抗血清效价  
中央孔为纯化牙鲆 Ig, 从1(顺时针)梯度稀释的抗血清稀释比例依次为 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64.

Fig.5 Rabbit antiserum titre by double immunodiffusion  
Flounder Ig in the center. The antiserum diluted from 1 clockwise was: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 and 1:64.

## 2.4 抗体特异性检测

按照 Western-blotting 方法检测抗血清特异性, 结果如图7所示。纯化的 IgM 在相应的重链和轻链位置上均有条带。

## 3 讨论

多数硬骨鱼具有类似哺乳类 IgM 的免疫球蛋白, 一般为四聚体<sup>[20]</sup>, 每个单体由 2 条重链和 2 条轻链组成, 其分子量随物种不同而有差异, 一般在 600~900 kD 之间。在某些鱼类血清, 体液或卵中也发现了一些分子量较小的免疫球蛋白<sup>[1]</sup>。

本研究对牙鲆免疫球蛋白的提取主要采用了 2 种方法, 即 Sephacryl-S200 柱层析和 HiTrap rProtein A Sepharose 亲和层析法。Sephacryl-S200 柱层析之前常先采用盐析法沉淀出大量的免疫球蛋白, 从而使免疫球蛋白得到浓缩, 但是此法得到的免疫球蛋白往往混杂很多的杂蛋白, 仅可以作为粗提的方法。经实验发现, 牙鲆血清经 33%、45%、50%

饱和硫酸铵沉淀后均有沉淀产生,其中 33% 的饱和硫酸铵提取物为絮状沉淀。经 4 ℃ 静置 24 h 后离

心也未能将其分离,45% 的饱和硫酸铵沉淀产生较多也容易分离。

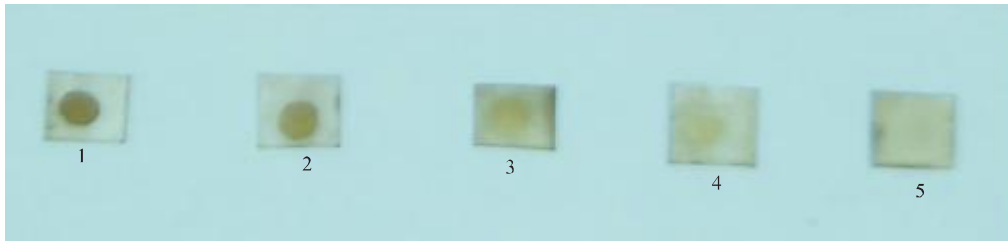


图6 免疫斑点法测定抗血清效价

1:1 /200:2:1 /400:3:1 /800:4:1 /1 600:5:1 /3 200.

Fig.6 Flounder serum titre by immunodotting

1:1 /200:2:1 /400:3:1 /800:4:1 /1 600:5:1 /3 200.

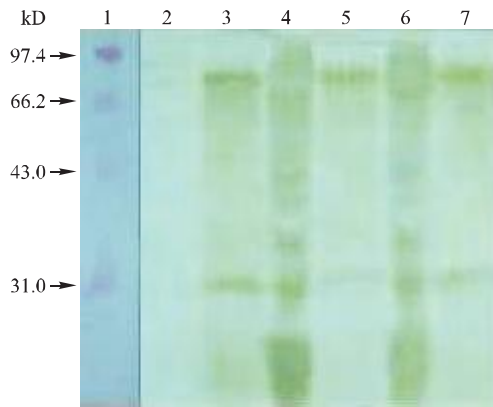


图7 牙鲈血清、纯化 Ig 的免疫印迹图

1: 蛋白质分子量标准 (丽春红 S 染色); 2: 对照组, 一抗使用正常兔血清; 3、5、7: 纯化的牙鲈 Ig; 4、6: 牙鲈全血清。

Fig.7 Western blotting analysis of reduced purified immunoglobulin and total flounder serum proteins

1: Molecular weight standards (stained by Ponceau S); 2: The primary antibody was normal rabbit serum; 3, 5, 7: Purified flounder IgM; 4, 6: Whole serum of flounder.

与 Sephacryl - S200 柱层析相比, HiTrap rProtein A Sepharose 亲和层析步骤简单。即只需 1 次过柱就能得到较纯的产物。设计实验时, 考虑了重组葡萄球菌 Protein A 较葡萄球菌 Protein A 更能特异地与免疫球蛋白 Fc 片段结合, 并且减少对白蛋白的吸附, 因而会得到更好的结果。但实验结果并不理想。虽然蛋白较纯, 但经高度浓缩后才有较浅的条带, 表明产率偏低。原因可能有 2 方面: (1) 牙鲈等冷水性鱼类的免疫球蛋白与重组葡萄球菌蛋白 A 结合较差所致, 这个结果与冯娟等<sup>[19]</sup>的研究结果一致; (2) 与牙鲈血清内 Ig 含量较低有关。有报道证

实牙鲈血清中 Ig 含量仅占血清总蛋白的 4%<sup>[16]</sup>, 曲凌云等<sup>[17]</sup>和周丽等<sup>[22]</sup>提取牙鲈抗淋巴囊肿病毒 IgM 和抗指状拟舟虫 IgM 的得率均较低; 冯娟等<sup>[19]</sup>研究也证实, 热带鱼类如紫红笛鲷 (*Lutjanus argentimaculatus*) 等 Ig 含量远远高于冷水鱼类。

因此, 比较这 2 种分离提取方法, 通过 45% 的饱和硫酸铵沉淀再经 2 次 Sephacryl - S200 柱层析后可以达到较纯的结果, 并可以处理大量样品, 是值得推荐的纯化牙鲈免疫球蛋白方法。

关于牙鲈免疫球蛋白的提取方法, 已有一些报道<sup>[16-17, 21-22]</sup>, 但是由于提纯的方法不同, 研究结果也不相同。经过测定标准蛋白的迁移率 (Rf), 做标准曲线, 测得牙鲈免疫球蛋白重链和轻链分子量分别约为 75.4 kD 及 29.9、28.2 kD, 这个结果与 Bang 等<sup>[16]</sup>的研究类似, 而与其他研究者的研究结果不尽相同。Bang 等<sup>[16]</sup>报道了用 Sephacryl-S300 分子筛层析分离纯化得到的牙鲈血清 Ig 的分子量, 其高分子量 Ig 重链为 68 kD、轻链为 22 kD 和 24 kD, 其低分子量 Ig 重链为 69 kD、轻链为 22 kD 和 26 kD。冯娟等<sup>[19]</sup>分离纯化的牙鲈血清 Ig 重链为 73.5 kD、轻链为 15.0 kD。Nishida 等<sup>[21]</sup>报道牙鲈的 IgM 重链为 75 kD, 轻链为 23 kD。曲凌云等<sup>[17]</sup>利用 DEAE-52 纤维素离子交换柱和 Sepharose6B 凝胶过滤提取的牙鲈抗淋巴囊肿病毒 IgM 重链和轻链分别是 74 kD 和 22 kD。本实验所提取的牙鲈血清 IgM 的重链分子量和其他研究者的研究结果相似, 但在轻链位置上却发现 2 条电泳条带。在有些硬骨鱼类免疫球蛋白经还原 SDS-PAGE 分析呈现多条轻链蛋白质带, 如斑鳊免疫球蛋白有 3 条轻链, 金

枪鱼等中有2类轻链,这可能反映了硬骨鱼类轻链具有不同种型<sup>[23-24]</sup>。

运用免疫印迹法检测了兔抗牙鲈免疫球蛋白多克隆抗体的特异性。实验证明,与牙鲈全血清中免疫球蛋白重链、轻链反应均成阳性。在进行 **Western blotting** 时发现电转移时维持低电流较长时间比高电流较短时间,会在硝酸纤维素膜上富集更多的蛋白质。同等条件下可以节约比较贵重的样品。

本研究探索了提纯牙鲈免疫球蛋白的技术,测定了牙鲈免疫球蛋白的分子量,并首次制备了特异性较强的兔抗牙鲈 **Ig** 的多克隆抗体,以此为基础,可以为进一步研究 **Ig** 生成细胞的发育和成熟过程、探讨环境因子对牙鲈免疫器官发育和功能完善的影响机制奠定良好的基础。

#### 参考文献:

- [1] Warr G W. The immunoglobulin genes of fish[J]. *Dev Comp Immunol*, 1995, 19: 1-12.
- [2] Wilson M, Bengtén E, Miller N W, et al. A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to Ig D[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94 (9): 4 593-4 597.
- [3] Hordvik I. Identification of a novel immunoglobulin  $\delta$  transcript and comparative analysis of the genes encoding IgD in Atlantic salmon and Atlantic halibut[J]. *Mol Immunol*, 2002, 39 (1-2): 85-91.
- [4] Hirano I, Nam B H, Enomoto J, et al. Cloning and characterization of a cDNA encoding Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* Ig D[J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 2003, 15 (1): 63-70.
- [5] Danilova N, Bussmann J, Jekoschek, et al. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown istype, immunoglobulin Z [J]. *Nat Immunol*, 2005, 6 (3): 295-302.
- [6] Hansen J D, Landis E D, Phillips R B. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (Ig T) in rainbow trout: implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102 (9): 6 919-6 924.
- [7] Ourth D D. Purification and quantitation of Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) Immunoglobulin M [J]. *J Appl Ichthyol*, 1986, 3: 140-143.
- [8] 张永安, 裴品. 鳊鱼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.
- [9] 杨桂文, 安利国, 温武军, 等. 鲤胆汁与血清中免疫球蛋白的比较研究[J]. *水产学报*, 1998, 22 (3): 199-203.
- [10] 杨桂文, 安利国, 王长法, 等. 鲤鱼皮肤粘膜与血清中免疫球蛋白的比较研究[J]. *动物学研究*, 1998, 19 (6): 489-492.
- [11] 林天龙, 陈强, 俞伏松, 等. 欧洲鳗血清 IgM 纯化及部分特性分析[J]. *水产学报*, 2001, 25 (1): 52-57.
- [12] 李亚南. 嗜水产气单胞菌诱导的草鱼免疫球蛋白分析[J]. *动物学报*, 2001, 47 (2): 132-138.
- [13] 黄艳青, 王桂堂, 孙军, 等. 黄颡鱼血清免疫球蛋白的纯化及分子量的初步测定[J]. *水生生物学报*, 2003, 27 (6): 654-656.
- [14] Swain T, Mohanty J, Sahu A K. One step purification and partial characterization of serum immunoglobulin from Asiatic catfish (*Clarias batrachus* L.) [J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 2004, 17: 397-401.
- [15] Bernard R, Bournaud Ch A-F, Georges B. Isolation and partial characterization of IgM-like sea bass (*Dicentrarchus labrax* L. 1758) immunoglobulins[J]. *Aquaculture*, 1995, 132 (1-2): 53-58.
- [16] Bang J D, Kim J W, Lee S D, et al. Humoral immune response of flounder to *Edwardsiella tarda*: the presence of various sizes of immunoglobulins in flounder[J]. *Dis Aquatic Org*, 1996, 26: 197-203.
- [17] 曲凌云, 孙修勤, 战文斌, 等. 牙鲈抗淋巴囊肿瘤免疫球蛋白的纯化[J]. *高技术通讯*, 2000, 10 (9): 14-18.
- [18] 鄢庆彬, 韩一凡, 高天翔, 等. 大黄鱼血清 IgM 纯化及其兔抗血清的制备[J]. *中国水产科学*, 2006, 13 (13): 475-479.
- [19] 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.
- [20] Pilstrom L, Bengten E. Immunoglobulin in fish-genes, expression and structure [J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 1996, 6: 243-262.
- [21] Nishida H, Enokida T, Hiramatsu N, et al. Purification of Immunoglobulin M (IgM) in serum of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Bull Fac Fish Hokkaido Univ*, 1998, 49 (3): 157-164.
- [22] 周丽, 战文斌, 宋微波, 等. 指状拟舟虫诱导牙鲈抗血清免疫球蛋白分析[J]. *中国水产科学*, 2000, 7 (2): 28-31.
- [23] Sánchez C, Dominguez J. Trout immunoglobulin population differing in light chains revealed by monoclonal antibodies[J]. *Mol Immunol*, 1991, 28: 1 271-1 277.
- [24] Watts M, Munday B L, Burke C M. Isolation and partial characterisation of immunoglobulin from southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii* Castelnau[J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 2001, 11 (6): 491-503.

## Purification and partial characterization of serum immunoglobulins from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)

LIU Yun<sup>1</sup>, SUN Feng<sup>1,2</sup>, JIANG Guo-liang<sup>1</sup>

(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Dalian Natural History Museum, Dalian 116023, China)

**Abstract:** Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, a species with high commercial value in north costal China, has been attacked by many diseases nowadays. Since it has an importance value both in theory and in practice usage, the immune system has been widely studied. In the last decade, it was well established that the teleost predominant immunoglobulins (Ig) have been shown to belong to a single class (IgM), and the studies on the teleost immune system have been benefited greatly from the production of polyclonal or monoclonal antibodies that have been used as specific markers. In this work, the purified Ig were isolated from serum of healthy flounder, and then used to produce polyclonal rabbit anti-flounder Ig antibody. The serum immunoglobulins of flounder were purified by means of Sephacryl-200 gel column chromatography and Hi-Trap rProtein A Sepharose affinity chromatography. The results showed that the immunoglobulins were precipitated in ammonium sulfate with saturation from 33% to 50%, with best effect in the 45% ammonium sulfate saturation. Both chromatography methods showed that there were two protein peaks and the immunoglobulins existed at the second peak that was detected by the dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under reducing condition. Further analysis of the immunoglobulins showed that the molecular weight of flounder Ig was approximately 836 kD, composing of one heavy chain weighing about 75.4 kD, and two light chains weighing about 29.9 kD and 28.2 kD, respectively. A polyclonal rabbit against flounder antibody Ig was produced. The antiserum titer was evaluated in double immunodiffusion as 1:32 and in immunodotting assay as 1:1 600. Western blotting illuminated that the antibody had immunological activity by reaction with the heavy chain and light chains of flounder serum Ig and no cross-reaction with that of human. Western blotting proved the antiserum immunological specific activity and could be used in the further study on the immunolocalisation of Ig-positive cells in lymphoid tissue of the flounder. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (4): 547 – 553]

**Key words:** Japanese flounder; *Paralichthys olivaceus*; immunoglobulin; gel column chromatography; sepharose affinity chromatography; western blotting

**Corresponding author:** LIU Yun. E-mail: liuyun@ouc.edu.cn