

黄鳍棘鲷血清 IgM 的纯化及兔抗血清的制备

刘振兴^{1,2}, 张殿昌¹, 苏天凤¹, 姜巨峰¹, 龚世园², 江世贵¹

(1. 中国水产科学研究院 南海水产研究所, 广东 广州 510300; 2. 华中农业大学 水产学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 分别采用 Sepharose-6B 凝胶过滤层析、Phenyl Sepharose FF 疏水作用层析和 rProtein A Sepharose 亲和层析技术纯化黄鳍棘鲷 (*Acanthopagrus latus*) 血清 IgM, 并将这 3 种层析纯化方法进行了比较。纯化产物进行 SDS-PAGE, 电泳结果扫描后经 Band Scan5.0 软件分析显示, 单独使用 Sepharose-6B 凝胶过滤层析或 Phenyl Sepharose FF 疏水作用层析得到的 IgM 纯度只有 56% 左右; 二者联合使用纯度可以达到 69%, 而 rProtein A Sepharose 亲和层析一步就可以达到 89% 的纯度; 纯化得到的黄鳍棘鲷血清 IgM 的重链和轻链分子量分别为 73.6 kD 和 26.5 kD。本研究还以 rProtein A Sepharose 亲和层析纯化的黄鳍棘鲷血清 IgM 为抗原, 制备其兔抗血清, 采用 Western Blot 和双向琼脂扩散检测抗血清免疫学活性, 并用间接 ELISA 检测其效价达到 1:25 600, 为进一步开展黄鳍棘鲷免疫学方面的研究奠定了基础。[中国水产科学, 2008, 15(1): 129-135]

关键词: 黄鳍棘鲷; 免疫球蛋白; 纯化; 兔抗血清; ELISA

中图分类号: Q959.483

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)01-0129-07

免疫球蛋白 (Immunoglobulin) 是脊椎动物体液免疫应答中的重要分子, 在哺乳动物中根据重链不同将其分为 5 类: IgG (γ 链)、IgM (μ 链)、IgA (α 链)、IgD (δ 链) 和 IgE (ϵ 链); 作为低等脊椎动物的硬骨鱼类同样具有免疫球蛋白分子, 在鱼类中最早发现的免疫球蛋白是 IgM。近年来, 在斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)^[1]、大西洋鲑 (*Salmo salar*)^[2]、大西洋鳕 (*Gadus morhua*)^[3]、褐牙鲈 (*Paralichthys olivaceus*)^[4] 和红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*)^[5] 中陆续发现了一种新型的免疫球蛋白 IgD。但是, 在大西洋鲑^[2]、大西洋鳕^[3]、红鳍东方鲀^[5] 中仅发现了膜结合形式的 δ 链。尽管斑点叉尾鲷血清中发现了分泌型的 δ 链, 但是该链却没有包含有效的 V 区^[6]。2005 年, Danilova 等^[7] 在斑马鱼 (*Danio rerio*) 中发现了含有 1 种新型免疫球蛋白重链基因 (ζ 链) 的免疫球蛋白 IgZ, 随后又在虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[8] 中发现了免疫球蛋白 IgT, 它含有新型重链 τ 链。Savan 等^[9] 在鲤 (*Cyprinus carpio*) 中发现了 1 种新的免疫球蛋白, 其重链基因为 IgM-IgZ 的嵌合体; 在红鳍东方鲀^[10] 中还发现了一种仅包含两个恒定区的重链。不过, 目前在绝大

多数硬骨鱼中仅发现血清 IgM, 并且该分子是 1 个四聚体, 其中的每个单体包含 2 条重链和 2 条轻链。

高纯度的鱼类血清 IgM 在鱼类免疫学中有广泛用途, 如制备单克隆、多克隆抗体, 检测鱼类病原体及鱼类免疫应答水平; 探索 IgM 的产生、分布, 还可用于研究免疫系统的进化。而以上这些研究都离不开高纯度血清 IgM 的制备和纯化。鱼类血清 IgM 的纯化方法主要有凝胶过滤层析、离子交换层析和亲和层析, 它们是分别利用该分子在大小、电荷和生物识别方面的差异发展起来的; 而疏水作用层析是利用分子疏水性质差异进行分离的一项技术, 目前国内尚未见利用该方法分离鱼类血清 IgM 的报道。黄鳍棘鲷 (*Acanthopagrus latus*) 隶属鲈形目 (Perciformes)、鲷科 (Sparidae)、棘海鲷属, 是中国南方沿海重要的海水养殖对象, 但是对其基础免疫方面的研究尚未深入开展。本研究采用 Sepharose-6B 凝胶过滤层析、Phenyl Sepharose FF 疏水作用层析和 rProtein A Sepharose 亲和层析技术分别纯化黄鳍棘鲷血清 IgM, 并将这几种层析纯化方法进行了比较; 在此基础上以纯化的黄鳍棘鲷血清 IgM 为抗原, 制备其兔抗血清, 为进一步进

收稿日期: 2007-03-19; 修订日期: 2007-07-13.

基金项目: 国家科技基础平台项目资助 (2005DKA30470).

作者简介: 刘振兴 (1981-), 男, 硕士研究生. 从事鱼类免疫学研究. E-mail: liuzhenxing81@yahoo.com.cn

通讯作者: 江世贵. E-mail: Jiangsg@21cn.com

行黄鳍棘鲷免疫学研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康的黄鳍棘鲷 10 尾, 体质量 400~450 g, 购自广州市荟萃菜市场; 普通级雄性新西兰大白兔, 购自中山医科大学实验动物中心。

1.2 黄鳍棘鲷血清 IgM 的纯化及检测

1.2.1 黄鳍棘鲷血清的制备 从尾动脉取血, 室温放置 1 h 后 4 °C 静置过夜使血清充分析出。次日 4 °C 15 000 g 离心 15 min, 取上清, 用 0.45 μm 滤器过滤后分装于 2 mL EP 管, -80 °C 保存备用。

1.2.2 饱和硫酸铵二次盐析 将黄鳍棘鲷血清用等体积 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 稀释后, 加入 pH 7.4 的饱和硫酸铵, 使其终质量分数为 33%, 4 °C 静置过夜; 次日, 4 °C 15 000 g 离心 15 min, 收集上清, 再加入 pH 7.4 的饱和硫酸铵 (SAS) 至终浓度为 50%, 4 °C 静置过夜; 次日, 4 °C 15 000 g 离心 15 min, 弃上清, 用 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 重悬沉淀; 4 °C 下用 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 透析除盐 48 h, 每 6 h 换 1 次透析液。透析产物分装后 -80 °C 保存备用。

1.2.3 Sepharose-6B 凝胶过滤层析纯化 IgM Sepharose-6B 填料购自 Pharmacia 公司, 装填后柱床长 55 cm, 直径 1.6 cm, 饱和硫酸铵 2 次盐析产物上柱后用 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 洗脱, 流速 0.6 mL/min, BSZ-100 自动部分收集器, 每管 3 min, 收集洗脱峰。

1.2.4 Phenyl Sepharose FF 疏水作用层析纯化 IgM Phenyl Sepharose FF 填料购自北京韦氏博慧色谱科技有限公司, 装填后柱床长 6 cm, 直径 1.6 cm, 血清沉淀方法参照 1.2.2, 将第二次沉淀物重悬于 1 mol/L 硫酸铵 (0.05 mol/L PBS, pH 7.4), 上柱后以 1 mol/L, 0.8 mol/L, 0.65 mol/L pH 7.4 的硫酸铵 (Ammonium sulfate, AS) 以及 ddH₂O 进行阶段洗脱, 流速 1.5 mL/min, 手工收集洗脱峰。

1.2.5 凝胶过滤和疏水作用层析联合使用纯化 IgM 合并凝胶过滤层析的第二峰, 用 PEG (20000) 包埋浓缩, 浓缩产物与 2 mol/L 的硫酸铵 (pH 7.4) 1:1 混合后进行疏水作用层析, 方法同 1.2.4。

1.2.6 rProtein A Sepharose 亲和层析纯化 IgM 1 mL rProtein A Sepharose 亲和层析预装柱购自北京韦氏博慧色谱科技有限公司, 层析过程参照鄢庆枇等^[11]的方法进行, 上柱前血清与 0.02 mol/L

PBS (pH 8.0) 按体积比 2:3 混合稀释, 1 mL 稀释后血清上柱后孵育 2.5 h; 用 10 倍柱床体积的 PBS 平衡液洗涤未结合的蛋白, 流速为 1 mL/min; 再用甘氨酸-盐酸缓冲液洗脱结合的蛋白, 流速为 1 mL/min, 每份 1 mL 收集洗脱液, 每份再加入 50 μL Tris-Cl 中和液中, 将 pH 值调到 8.0。

1.2.7 黄鳍棘鲷血清 IgM 纯化效果的检测 采用 Mini-Protein II cell 系统 (BioRad) 按照汪家政等^[12]的方法进行 SDS-PAGE 电泳, 样品与等体积上样缓冲液混合后沸水浴 5 min, 短暂离心后上样, 分离胶浓度 15%, 浓缩胶浓度 5%, 恒压 100V 电泳 20 min 后改用 150 V 电泳 70 min, 电泳后用考马斯亮蓝进行染色, 脱色后拍照, 采用 Band Scan 5.0 软件扫描分析, 得出样品的纯度。

1.2.8 纯化的黄鳍棘鲷血清 IgM 浓度的测定 rProtein A Sepharose 亲和层析纯化的黄鳍棘鲷血清 IgM 使用 Amicon Ultra-15 型 (5K) 超滤管浓缩, 再用 Bradford 法测定蛋白质浓度, 参照汪家政等^[12]的方法进行。

1.3 兔抗黄鳍棘鲷 IgM 血清的制备及检测

1.3.1 兔抗血清的制备 免疫前实验用新西兰大白兔暂养 10 d, 免疫过程参照鄢庆枇等^[11]的方法进行, 以 rProtein A Sepharose 亲和层析纯化的黄鳍棘鲷血清 IgM 为抗原, 共免疫注射 5 次, 每次间隔 1 周。第 1 次和第 2 次分别将 IgM 与弗氏完全佐剂 (FCA) 和弗氏不完全佐剂 (FIA) 混合乳化, 对兔背部皮下多点注射, 后 3 次不添加佐剂, 直接在耳缘静脉注射 IgM 进行免疫。除第 3 次免疫用 0.2 mg IgM 外, 其余每次免疫均用 0.3 mg。

1.3.2 兔抗血清效价的测定 最后 1 次免疫注射 1 周后, 从耳缘静脉采血, 采用间接 ELISA 检测抗血清效价。用 pH 9.6, 0.05 mol/L 的碳酸盐缓冲液将纯化的黄鳍棘鲷血清 IgM 稀释为 1 μg/mL, 包被酶标板, 每孔 100 μL, 4 °C 包被过夜。次日加入 5% 的脱脂奶粉, 每孔 100 μL, 37 °C 封闭 1 h, 再用 pH 7.4 的 PBST 洗涤 3 次。加入 200~51 200 倍稀释的兔抗血清, 阴性对照为 1:50 倍稀释的免疫前血清, 空白对照为兔抗血清稀释液 (PBS), 每份样品均做 2 个平行, 每孔 100 μL, 37 °C 孵育 1 h 后同上洗涤 3 次。加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG, 每孔 100 μL, 37 °C 孵育 1 h 后同上洗涤 3 次。加入 TMB 显色液, 每孔 100 μL, 37 °C 避光反应 20 min 后每孔再加入 50 μL 2 mol/L 硫酸终止液, 在酶标仪上测 450 nm

下的 OD 值。效价检测合格后从颈动脉采血, 收集血清, 分装后 -80°C 保存备用。

1.3.3 兔抗血清的 Western Blot 检测 参照 Deane 等^[13] 的方法进行, 略作修改, 具体过程如下: 黄鳍棘鲷血清 $2\ \mu\text{L}$ 上样后进行 SDS-PAGE 电泳。再用 Mini-Protein II cell 系统 (BioRad) 将样品转移到 $0.45\ \mu\text{m}$ 的硝酸纤维素滤膜上, 转膜电流 $300\ \text{mA}$, 时间 $60\ \text{min}$ 。转膜后剪下 Marker 用丽春红 S 染色, 剩余硝酸纤维素滤膜用 5% 的脱脂奶粉封闭 $1\ \text{h}$, 加 $1:500$ 稀释的兔抗血清, 室温孵育 $1\ \text{h}$ 后用 $\text{pH}\ 7.4$ 的 PBST 洗涤 3 次。加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG, 室温孵育 $1\ \text{h}$ 后同上洗涤 3 次, DAB 显色。

1.3.4 兔抗血清的双向琼脂扩散检测 用 1.5% 琼脂糖 (含 $0.1\% \text{NaN}_3$) 铺板, 平板厚度约 $3\ \text{mm}$ 。琼脂凝固后打孔, 孔径 $4\ \text{mm}$, 孔距 $5\ \text{mm}$, 中心孔为黄鳍棘鲷血清, 四周的六孔为兔抗血清和对照。将兔抗血清用 PBST ($\text{pH}\ 7.4$) 稀释成 $1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32$ 的不同浓度, 按顺序加样, 并以 PBST 做空白对照。将玻片放湿盒内, 37°C 孵育 $24\ \text{h}$ 。观察沉淀线。

2 结果与分析

2.1 黄鳍棘鲷血清 IgM 的纯化及检测结果

2.1.1 黄鳍棘鲷血清 IgM 纯化的结果 黄鳍棘鲷血清的 33%~50% 沉淀物经 Sepharose-6B 凝胶过滤层析后出现 2 个主要的洗脱峰 (图 1), 经过 Phenyl Sepharose FF 疏水作用层析后也出现 2 个主要的洗脱峰 (图 2), 将 Sepharose-6B 凝胶过滤层析得到的第 2 峰浓缩后进行 Phenyl Sepharose FF 疏水作用层析, 得到的峰形图与单独进行 Phenyl Sepharose FF 疏水作用层析类似 (图 3)。

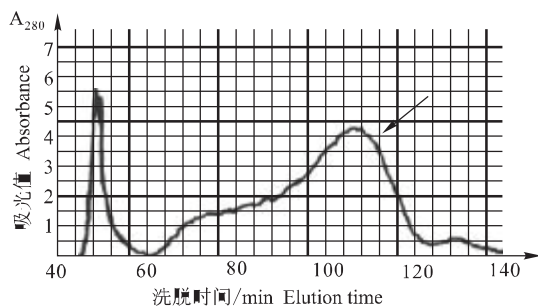


图1 黄鳍棘鲷血清 33%~50% 饱和硫酸铵提取物 Sepharose-6B 的层析图

Fig.1 Sepharose-6B chromatogram of 33%~50% ammonium sulfate purified *Acanthopagrus latus* serum

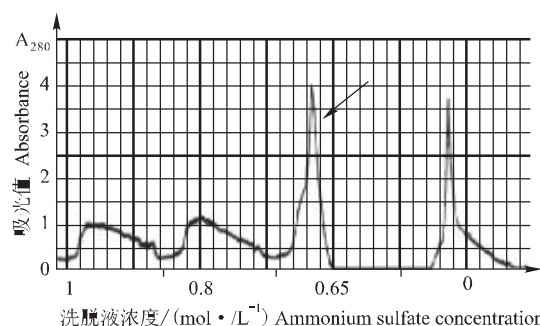


图2 黄鳍棘鲷血清 33%~50% 饱和硫酸铵提取物 Phenyl Sepharose FF 的层析图

Fig.2 Phenyl Sepharose FF chromatogram of the 33%~50% ammonium sulfate purified *Acanthopagrus latus* serum

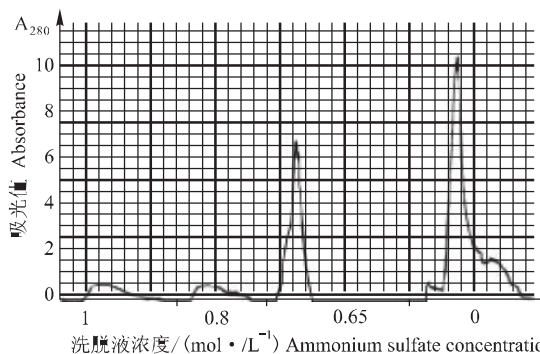


图3 对 Sepharose-6B 第 2 峰用 Phenyl Sepharose FF 疏水作用层析图

Fig.3 Phenyl Sepharose FF chromatogram of peak 2 from Sepharose-6B chromatography

2.1.2 SDS-PAGE 电泳分析的结果 由图 4 的 SDS-PAGE 电泳可知, 黄鳍棘鲷 IgM 在凝胶过滤层析中出现在第 2 峰中 (图 1 箭头所示), 在疏水层析中出现在 $0.65\ \text{mol/L}$ AS 洗脱液的洗脱峰中 (图 2 箭头所示)。二次盐析后除去了个别杂带, 再经 Sepharose-6B 凝胶过滤层析或 Phenyl Sepharose FF 疏水层析后有效地除去了很多杂带 (图 4), 但是纯化效果不及 rProtein A Sepharose 亲和层析, 亲和层析几乎去除了重链和轻链条带以外的杂带。单独使用 Sepharose-6B 凝胶过滤层析和 Phenyl Sepharose FF 疏水层析得到的 IgM (重链加轻链) 纯度分别为 56.03% 和 57.57% , 这两种层析联合使用得到的 IgM 纯度为 69.43% , 而 rProtein A Sepharose 亲和层析一步纯化得到的 IgM 纯度就达 88.83% 。经过分析计算, 黄鳍棘鲷 IgM 的重链分子量为 $73.6\ \text{kD}$ 轻

链分子量为 26.5 kD。

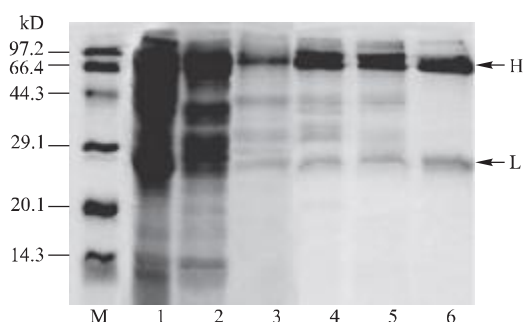


图4 黄鳍棘鲷血清、33%~50% 饱和硫酸铵提取物和纯化 IgM 的 SDS-PAGE 电泳图

M: marker; 1: 黄鳍棘鲷全血清; 2: 33%~50% 饱和硫酸铵提取物; 3: Sepharose-6B 层析纯化的 IgM; 4: Phenyl Sepharose FF 纯化的 IgM; 5: Sepharose-6B 层析产物再经 Phenyl Sepharose FF 层析后纯化的 IgM; 6: rProtein A Sepharose 亲和层析纯化的 IgM; H: 重链; L: 轻链。

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of *Acanthopagrus latus* serum, precipitation from 33% to 50% ammonium sulfate and purified IgM

M: protein marker; 1: serum of *Acanthopagrus latus*; 2: precipitation from 33% to 50% ammonium sulfate; 3: IgM purified by Sepharose-6B gel filtration chromatography; 4: IgM purified by Phenyl Sepharose FF hydrophobic interaction chromatography; 5: IgM purified by the combination of Sepharose-6B gel filtration chromatography and Phenyl Sepharose FF hydrophobic interaction chromatography; 6: IgM purified by rProtein A Sepharose affinity chromatography; H: heavy chain; L: light chain

2.1.3 黄鳍棘鲷血清 IgM 浓度 经测定, 浓缩后的 rProtein A Sepharose 亲和层析纯化的黄鳍棘鲷血清 IgM 浓度为 0.8 mg/mL。

2.2 兔抗黄鳍棘鲷 IgM 血清效价

兔抗黄鳍棘鲷 IgM 的血清进行间接 ELISA 检测时, (样品吸光值-空白吸光值)/(阴性吸光值-空白吸光值) >2.1 即认为是阳性, 经计算, 本研究制备的兔抗血清效价为 1:25 600 (表 1)。

2.3 兔抗血清的 Western Blot 检测

Western Blot 显示, 在分子量 70 kD 附近出现 1 条反应条带 (图 5), 该条带对应黄鳍棘鲷血清 IgM 的重链。

2.4 兔抗血清的双向琼脂扩散

经过双向琼脂扩散, 在黄鳍棘鲷血清与兔抗血清之间形成 1 条沉淀线 (图 6)。

表 1 ELISA 检测结果

Tab.1 Results of ELISA

免疫血清 稀释倍数 Dilution ratio	免疫血清 OD ₄₅₀	阴性对照 血清 OD ₄₅₀	空白对照 OD ₄₅₀	P/N
1:200	3.522	1.148	0.239	+
1:400	3.654	1.148	0.239	+
1:800	3.604	1.148	0.239	+
1:1 600	3.419	1.148	0.239	+
1:3 200	3.405	1.148	0.239	+
1:6 400	3.375	1.148	0.239	+
1:12 800	3.107	1.148	0.239	+
1:25 600	2.677	1.148	0.239	+
1:51 200	2.087	1.148	0.239	-

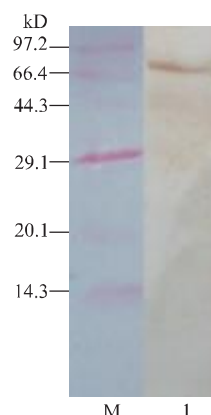


图5 黄鳍棘鲷血清的 Western Blot 图谱

M: marker; 1: 黄鳍棘鲷血清。

Fig. 5 Western Blot of serum from *Acanthopagrus latus*

M: marker; 1: serum of *Acanthopagrus latus*.

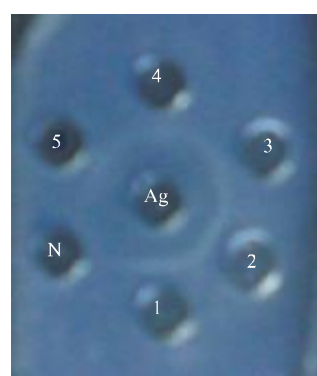


图6 双向琼脂扩散结果

Ag: 黄鳍棘鲷血清; 1 5 孔分别为 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 倍比稀释的兔抗血清; N: PBST.

Fig. 6 Result of double-direction agar diffusion

Ag: serum of *Acanthopagrus latus*; 1 5 wells represent 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 and 1:32 diluted rabbit sera anti-IgM, respectively; N: PBST.

3 讨论

本研究纯化到的黄鳍棘鲷血清 IgM 重链和轻链的分子量分别为 73.6 kD 和 26.5 kD, 与其他鱼类 IgM 的重链和轻链处在同一水平。考虑到 Band Scan 软件进行分子量测定及纯度分析时存在误差, 我们分别计算分析了 3 次凝胶电泳的结果, 得到 IgM 分子量和纯度的平均值。

盐析是一种广泛使用的蛋白质粗提手段, 免疫球蛋白的盐析多选择硫酸铵。在已经进行的研究中选择的盐析沉淀范围略有不同, 一般来说两步盐析时饱和硫酸铵的浓度下限多为 30%、33% 或 35%, 上限为 45%、50% 或 55%, 也有仅用一步盐析产物进行层析的。本实验收集了 33% ~ 50% 范围内的沉淀物, 这些盐析都得了较为满意的粗提效果。但是有必要进一步探索更狭窄的盐析范围, 以最大限度的提高粗提样品中血清 IgM 的含量; 另外不同鱼类以及同一种鱼类的免疫与未免疫血清 IgM 是否具有相同的最佳盐析范围都需要进一步研究。

凝胶过滤层析是按照分子大小进行分离的一种最为温和的大分子纯化技术, 纯化效果受填料的影响较大, 以葡聚糖为基础的 Sephadex 和琼脂糖为基础的 Sepharose 成为全世界实验室广泛使用的大分子纯化填料。在纯化鱼血清 IgM 方面, 国内早期应用较多的是 SephadexG-200 填料, 先后纯化了草鱼血清中抗草鱼出血病的 IgM^[14], 鲫鱼血清 IgM^[15], 鲤血清和皮肤黏液的 IgM^[16], 鲈的血清免疫球蛋白^[17] 等等, 不过 SephadexG-200 填料正在被逐步取代。林天龙等^[18] 将 Sepharose-4B 凝胶过滤层析和 DEAE-52 离子交换层析联合使用纯化了欧洲鳗血清免疫球蛋白和伊光辉等^[19] 用相同的方法纯化了斑点叉尾鲷血清免疫球蛋白。王先磊^[20] 和曲凌云^[21] 分别用 DEAE-52 离子交换和 Sepharose-6B 凝胶过滤两步层析纯化了健康牙鲈的血清和淋巴囊肿病毒免疫的牙鲈血清中的 IgM。从产品性能上说, Sepharose-6B 填料的选择性要优于 Sepharose-4B, 本研究采用 Sepharose-6B 纯化得到的黄鳍棘鲷血清 IgM 纯度为 56.03%, 随着新一代选择性较好的凝胶填料的应用, 这种传统的分离技术将在鱼类免疫球蛋白纯化中发挥更重要的作用。

疏水作用层析是利用蛋白质表面的疏水基团

与填料之间疏水作用的强弱不同来分离大分子的技术。国内尚无利用疏水作用层析纯化鱼的 IgM 的报道。本实验中我们首先利用梯度混合器 (TH-500 型) 产生硫酸铵浓度下降 (由 1 mol/L 至 0 mol/L) 的直线梯度摸索 IgM 的洗脱浓度, 再改用分离效果较好的阶段洗脱, 得到的血清 IgM 纯度为 57.57%。SDS-PAGE 分析显示, 凝胶过滤层析或是疏水作用层析可以去除不同的杂带, 于是尝试将两种方法联合使用。由于疏水作用层析产物中含有硫酸铵, 如果再进行凝胶过滤层析则需要进一步透析, 较为繁琐, 而疏水作用层析本身又具有浓缩样品的优势, 所以本实验将凝胶过滤层析的第二峰浓缩后上疏水作用层析得到较为理想的纯化结果, IgM 纯度接近 70%。

Protein A 是金黄色葡萄球菌的细胞壁成分, 可以特异性的结合多种 IgG 分子和部分 IgM 分子的 Fc 段, 冯娟等^[22] 利用该方法纯化了紫红笛鲷、青石斑鱼、尖吻鲈和牙鲈的血清 IgM, 并分析认为, 牙鲈等冷水鱼类与 Protein A 的结合能力较差。另外鄢庆枇^[11] 也用该方法成功纯化了大黄鱼血清的 IgM。在本研究中总计从 8 mL 黄鳍棘鲷血清中纯化了 4 mg 左右的 IgM, 并且得到的黄鳍棘鲷血清 IgM 纯度最高, 接近 90%。由于受所购买的亲和层析预装柱结构所限, 无法连接蠕动泵和紫外监测仪, 需要手工操作。亲和层析纯化鱼的 IgM 作为一项新的技术成为近年得到广泛应用, 除 Protein A 外也有其他几种填料应用于鱼类 IgM 的纯化, 例如黄艳青^[23] 采用 MBP 亲和层析分离了黄颡鱼血清免疫球蛋白, 但是孙军等^[24] 利用 MBP 亲和层析纯化鲢血清 IgM 时得到的结果很不理想, 此外孙军等还比较了此种方法与 TG 亲和层析以及免疫亲和层析对鲢血清 IgM 的纯化效果。

总体来看, 单独使用 Sepharose-6B 凝胶过滤层析或是 Phenyl Sepharose FF 疏水作用层析对黄鳍棘鲷血清 IgM 的纯化程度有限, 但是两者联合使用还是可以达到较为满意的效果, 而且这些填料的寿命较长, 重复性好, 适用于大规模纯化。而亲和层析技术除了免疫亲和层析需要在纯化前经过一个鱼的免疫过程而较为复杂外, 血清上柱前不需要进行盐析等处理, 并且得到的免疫球蛋白纯度较高。但是 rProtein A 等亲和层析填料价格较高, 使用寿命较短, 对不同鱼类血清 IgM 的结合能力存在差异, 比较适合实验室小规模纯化。

本研究利用 rProtein A Sepharose 亲和层析纯化的黄鳍棘鲷血清 IgM 制备了兔抗血清,经 ELISA 检测,抗血清效价达到 1:25600。Western Blot 检测显示,制备的抗血清具有明显的抗体活性,实验中没有检测到轻链对应的反应条带,这可能是由于轻链的免疫原性较弱,或是作为检测样品的黄鳍棘鲷血清在 -80℃ 保存过久,轻链降解较多所致。双向琼脂扩散表明制备的兔抗血清纯度较高。本研究成功制备了效价较高、特异性较强的兔抗血清,可以用其检测黄鳍棘鲷免疫应答水平,为进一步开展黄鳍棘鲷免疫学方面的研究打下良好的基础。

参考文献:

- [1] 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: 4 593-4 597.
- [2] 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.
- [3] Stenvik J, Schröder M B, Olsen 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 (4): 291-302.
- [4] Hirano I, Nam B H, Enomoto J, et al. Cloning and characterization of a cDNA encoding Japanese flounder *Paralichthys solivaceus* IgD[J]. Fish Shellfish Immunol, 2003, 15: 63-70.
- [5] 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.
- [6] Bengtén 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]. Immunology, 2002, 169: 2 488-2 497.
- [7] 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 (3): 295-302.
- [8] 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 (19): 6 919-6 924.
- [9] 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.
- [10] Savan R, Aman A, Sato K, et al. Discovery of a new class of immunoglobulin heavy chain from fugu[J]. Eur J Immunol. 2005, 35 (11): 3 320-3 331.
- [11] 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 (3): 475-479.
- [12] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 8.
- [13] Deane E E, Woo N Y. Molecular cloning of growth hormone from silver seabream: Effects of abiotic and biotic stress on transcriptional and translational expression [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 342 (4): 1 077-1 082.
- [14] 黄永东. 从草鱼血清中提取抗草鱼出血病的 IgM [J]. 南京农专学报, 1995, 1: 26-29.
- [15] 陈垚, 王石泉, 韩晓东, 等. 鲫鱼血清和皮肤粘液 IgM 的分离纯化及部分性质的鉴定 [J]. 动物学研究, 2003, 24 (2): 111-115.
- [16] 杨桂文, 安利国, 王长法, 等. 鲤鱼皮肤粘液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.
- [17] 张福森, 杨桂文, 李国田, 等. 鲈血清免疫球蛋白分离纯化及部分特性分析 [J]. 动物学杂志, 2004, 39 (5): 9-12.
- [18] 林天龙, 陈强, 俞伏松, 等. 欧洲鳗血清免疫球蛋白纯化及部分特性分析 [J]. 水产学报, 2001, 25 (1): 52-57.
- [19] 伊光辉, 林天龙, 熊邦喜, 等. 斑点叉尾鮰血清免疫球蛋白纯化及其结构分析 [J]. 福建农业学报, 2005, 20 (2): 91-96.
- [20] 王先磊, 张培军, 李军, 等. 牙鲆血清中免疫球蛋白 M 的分离及测定 [J]. 海洋科学, 2004, 28 (4): 8-12.
- [21] 曲凌云, 孙修勤, 战文斌, 等. 牙鲆抗淋巴腺肿瘤病毒免疫球蛋白的纯化 [J]. 高技术通讯, 2000, 10 (9): 14-18.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] 孙军, 高谦, 聂品. 四种方法对鲢血清免疫球蛋白的纯化及分子量测定 [J]. 浙江大学学报, 2005, 31 (4): 487-492.

Purification of serum IgM in *Acanthopagrus latus* and preparation of rabbit sera anti-IgM

LIU Zhen-xing^{1,2}, ZHANG Dian-chang¹, SU Tian-feng¹, GONG Shi-yuan², JIANG Shi-gui¹

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2. Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: The serum IgM of *Acanthopagrus latus* was purified by using Sepharose-6B gel filtration chromatography, Phenyl Sepharose FF hydrophobic interaction chromatography and rProtein A Sepharose affinity chromatography. The purified IgM obtained through the three methods was then compared. By the methods of Sepharose-6B gel filtration chromatography and Phenyl Sepharose FF hydrophobic interaction chromatography the IgM was obtained at the purity of only 56%. While through combination of Sepharose-6B gel filtration chromatography and Phenyl Sepharose FF hydrophobic interaction chromatography, we obtained a bit higher purity at about 69%. The purity reached approximately 89% when using rProtein A Sepharose affinity chromatography. However, the rProtein A Sepharose affinity chromatography suffered relatively high cost. Sepharose-6B gel filtration chromatography and Phenyl Sepharose FF hydrophobic interaction chromatography could be good choices for the purification of the IgM in terms of cost and performance. It was revealed that molecular weights of the heavy- and light- chains of IgM were 73.6 and 26.5kD, respectively. The IgM purified by rProtein A Sepharose affinity, chromatography was used to prepare rabbit anti-IgM sera. The antibody activity of anti-sera was tested by Western Blot and double agar diffusion. Indirect ELISA revealed that the anti-serum titer reached 1 : 25 600. It is considered that the purified IgM and developed anti-sera provide a foundation for further studies in relation to fish immune response. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (1): 129–135]

Key words: *Acanthopagrus latus*; immunoglobulin; purification; rabbit sera anti-IgM; ELISA

Corresponding author: JIANG Shi-gui. E-mail: jiangsg@21cn.com