

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00103

花鲈免疫球蛋白的分离纯化及部分特性分析

许娜娜^{1,2}, 钱冬², 赵海泉¹

1. 安徽农业大学 生命科学学院, 安徽 合肥 230001;

2. 浙江省淡水水产研究所 鱼病室, 浙江 湖州 313001

摘要: 分离纯化了花鲈(*Lateolabrax japonicus*)血清免疫球蛋白(Ig), 并对其特性进行初步研究与分析。采用山羊-IgG(Goat-IgG)免疫花鲈并制备血清, 分别采用硫酸铵分级沉淀法、A蛋白亲和层析法及Goat-IgG偶联亲和层析法提取花鲈Ig, 对提取组份进行了蛋白浓度测定、间接ELISA 效价测定、SDS-PAGE和Western-blotting分析。结果表明, 采用硫酸铵分级沉淀法提取的花鲈Ig主要集中在硫酸铵饱和度为 30%~50%的区间, 其中 45%饱和度硫酸铵富集的的抗体比活最高, ELISA效价为 2×10^4 /mg蛋白, 比血清ELISA效价提高 2.2 倍; A蛋白柱亲和层析可得单一蛋白峰, 洗脱峰集中在洗脱体积 0.8~1.6 mL处, 占洗脱蛋白总量的 76.2%, 峰值的ELISA效价为 1.37×10^5 /mg蛋白, 抗体得率为 2.57%; Goat-IgG 偶联Sephrose 4B亲和柱层析也可得单一蛋白峰, 洗脱峰集中在洗脱体积 1.4~2.8 mL处, 占洗脱蛋白总量的 72.4%, 峰值的ELISA效价为 1.39×10^5 /mg蛋白, 抗体得率为 2.63%。以上 3 种提取方法均可得到 79 kD的重链和 29 kD轻链, 表明可得到纯化的免疫球蛋白; 采用鼠抗花鲈Ig 血清和单抗AA5 经Western-blotting证实提取成份为花鲈Ig。本研究表明, A蛋白柱和Goat-IgG偶联柱亲和层析均可用于花鲈Ig的提取, 其中A蛋白柱法获得的洗脱峰值更为集中, 抗体效价高, 且提取过程不需要Goat-IgG免疫鱼体, 是一种更为有效的免疫球蛋白提取方法。[中国水产科学, 2011, 18(1): 103–109]

关键词: 花鲈; 免疫球蛋白; 纯化; 亲和层析

中图分类号: S942

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)01-0103-07

花鲈(*Lateolabrax japonicus*)俗称鲈鱼、七星鲈, 分类上属鲈形目(Perciformes)鲈亚目(Percoidae)真鲈科(Percichthyidae)花鲈属, 是中国海水养殖高品质的品种。近年来花鲈海水网箱集约式养殖迅速发展, 高度集约化养殖、近海环境污染、种质退化、养殖场地老化等原因, 造成鲈各种传染性疾病流行^[1]。国内外先后报道了鲈寄生虫、淋巴囊肿病(lymphocystis)^[2]等病毒病以及哈维氏弧菌^[3-4]、诺卡氏菌^[5]等细菌性疾病, 给花鲈养殖业带来了极大的经济损失。近年来中国养殖花鲈平均发病率为 6%~10%^[6]。以抗生素为主的药物防治是目

前鱼病控制的主要方法, 但长期使用可诱导耐药菌、破坏养殖水体微生态环境, 同时抗菌药物残留是影响水产品质量的重要因素。因此采用疫苗预防疾病是鱼病控制的必然趋势。

目前国内外对花鲈疫苗报道较少, 中国学者研究了鳃弧菌的浸泡、注射和口服疫苗^[7-8], 但对于疫苗的免疫效果, 通常采用传统的免疫保护力和血清凝集抗体效价进行评估, 未见血清抗体产生规律等系统研究。为了研究花鲈体液免疫应答机制, 为疫苗研制和免疫效果评估提供技术手段, 作者开展了花鲈血清免疫球蛋白(Ig)提取和亲和

收稿日期: 2010-04-29; 修订日期: 2010-05-25.

基金项目: 宁波市重大科研项目(2007C10037).

作者简介: 许娜娜(1986-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产病害防治. E-mail: xunana77@yahoo.com.cn

通讯作者: 钱冬, 研究员. E-mail: qdomonas@163.com; 赵海泉. E-mail: swjs12@ahau.edu.cn

纯化方法研究,并研究了纯化花鲈免疫球蛋白的部分特性。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验用花鲈由浙江省宁波市象山港湾水产苗种有限公司提供,体质量(500±20) g,实验前于海水网箱暂养 1 周,选取活力好、体表无损伤的鱼用于注射;实验用 BALB/c 小鼠购于浙江省实验动物中心。

1.2 仪器与试剂

蛋白质测定用 Varian Cary 50 紫外分光光度仪;效价测定用 Bio-Rad model 550 酶标仪,蛋白质电泳分析用 BioRad 垂直电泳仪,免疫转印用 BioRad 半干胶转印仪。

山羊 IgG(Goat-IgG)、弗氏完全佐剂和不完全佐剂为 Sigma 产品;CNBr 活化 Sepharose 4B 为 Amersham-Pharmacia 产品;HiTrap Protein A HP 为 GE 产品;邻苯二胺(OPD)购自上海华美公司;驴抗鼠 IgG-HRP 购自武汉三鹰生物技术有限公司;其他药品均为国产分析纯;Tris-HCl、PBS 等常用试剂等按文献[9]配制。

1.3 实验方法

1.3.1 花鲈抗 Goat-IgG 血清的制备 Goat-IgG 用 pH 7.4 PBS 溶解后加等体积弗氏完全佐剂充分乳化,腹腔注射免疫花鲈,剂量为 200 μg/尾;以后每隔 3 周以弗氏不完全佐剂乳化 Goat-IgG,同上注射花鲈,共加强免疫 3 次,剂量分别为 300 μg/尾、450 μg/尾、650 μg/尾。实验鱼饲养于宁波市象山港湾水产苗种有限公司养殖场,海水网箱规格为 3 m×3 m×3 m,实验期间平均水温(20±5)℃。末次免疫后 21 d 于尾静脉处抽血,收集血液,4℃ 10 000 r/min 离心 10 min,吸取上层血清;同法采集未免疫花鲈血清为对照。免疫组共注射鱼 10 尾,共得血清 30 mL;对照组 5 尾,得血清 13 mL。血清于-20℃保存备用。

1.3.2 花鲈 Ig 的硫酸铵提取 Goat-IgG 免疫花鲈血清用生理盐水稀释后加入过饱和硫酸铵至 30%饱和度,4℃静置 1 h,10 000 r/min 离心 10 min,

沉淀以 30%饱和度硫酸铵洗涤 1 次,以 500 μL 0.02 mol/L pH7.4 的 PBS 复溶;去沉淀后上清加入饱和硫酸铵至 35%饱和度,4℃静置 1 h,同上离心,沉淀以 35%饱和度硫酸铵洗涤 1 次,以 500 μL 0.02 mol/L pH7.4 的 PBS 复溶;按上述方法,依次分别获得饱和度为 30%、35%、40%、45%、50% 和 55%的硫酸铵提取物,同时用间接 ELISA 法测定各管抗体活性,PBS 4℃透析脱盐,紫外分光法测定蛋白质含量。按下式计算蛋白质浓度:

$$\text{蛋白质浓度(mg/mL)} = 1.45 \times \text{OD}_{280} - 0.74 \times \text{OD}_{260}$$

1.3.3 花鲈Ig的A蛋白柱提取 Goat-IgG免疫花鲈血清 1.0 mL,与HiTrap Protein A HP柱 4℃结合 3~4 h;用 0.02 mol/L pH7.4 PBS以 1.0~1.5 mL/min 流速洗脱未结合蛋白至 $\text{OD}_{280} < 0.01$;用 0.1 mol/L pH3.0 柠檬酸以 1.0~1.5 mL/min流速洗脱结合蛋白,以 200 μL/管收集洗脱峰,测定各管蛋白浓度,同时用间接ELISA法测定各管抗体活性;合并洗脱峰,用 0.02 mol/L pH7.4 PBS 4℃透析过夜,-20℃保存备用。

1.3.4 花鲈Ig的亲亲和层析提取 取CNBr活化 Sepharose 4B凝胶,按偶联蛋白:凝胶 = 0.12:1 (W/V)偶联凝胶,制备Sepharose 4B-Goat IgG偶联亲和层析柱,具体条件参阅Amersham-Pharmacia 产品说明书 18-1113-55。取Goat-IgG免疫花鲈血清 1.0 mL上样,4℃结合过夜,用 0.02 mol/L pH7.4 PBS以 1.0~1.5 mL/min流速洗脱未结合蛋白至 $\text{OD}_{280} < 0.01$;用 0.1 mol/L pH2.7 Gly-HCl洗脱,以 200 μL/管收集洗脱峰,测定各管蛋白浓度,同时用间接ELISA法测定抗体活性;合并洗脱峰,用 0.02 mol/L pH7.4 PBS 4℃透析过夜,-20℃保存。

1.3.5 SDS-PAGE分析 按Laemmli方法^[10]制备 0.75 mm不连续SDS-PAGE胶,浓缩胶浓度 4%,分离胶浓度 12%,取 10~20 μL收集样品与等体积样品缓冲液混合后,于沸水浴 5 min后,浓缩胶电压 80 V,分离胶电压 150 V,电泳时间 2 h,考马斯亮蓝染色。

1.4 鼠抗花鲈 Ig 制备

取亲和纯化的花鲈 Ig,加等体积弗氏完全佐

剂充分乳化后,以 30 μg/只进行腹腔、皮下多点注射免疫 BALB/c 小鼠;以后每隔 2 周以弗氏不完全佐剂乳化,同上注射小鼠,免疫剂量分别为 50 μg/只、100 μg/只、200 μg/只。末次免疫后 2 周取血得小鼠抗花鲈 Ig 血清,同时取小鼠脾脏与小鼠骨髓瘤细胞系 sp2/0 融合制备单克隆抗体 AA5(另文发表)。

1.5 酶联免疫吸附实验(ELISA)

花鲈抗Goat-IgG活性采用间接ELISA法^[11]测定,方法简述如下:1) 纯化Goat-IgG以 5 mg/L 4℃包板过夜,用含Tween20 0.05%(V/V)pH7.4 PBS(PBST)洗涤 3~4 次;2) 每孔加 300 μL 0.8%~1% 明胶 37℃ 封闭 3 h,同上PBST洗涤;3) 加待测的花鲈Ig 100 μL,37℃孵育 1 h,同上洗涤;4) 加鼠抗花鲈Ig单抗(工作浓度 1:1 000),37℃孵育 1 h,同上洗涤;5) 加 100 μL 驴抗鼠IgG-HRP(1:10 000),37℃孵育 1 h,同上洗涤;6) 邻苯二胺(OPD)显色 10~15 min,2 mol/L硫酸中止反应,测定 OD₄₉₀,以阳性孔与阴性孔OD值之比P/N > 2.1 者为阳性。

1.6 免疫印迹试验(western-blot analysis)

花鲈Ig SDS-PAGE电泳后,12 V 4℃过夜半干转印至硝酸纤维膜上,10%脱脂奶粉 37℃封闭 1 h,分别加入 1:1 000 鼠抗花鲈Ig和 1:1 000 单克隆抗体AA5,37℃孵育 1 h,用含Tween20 0.05%(V/V) pH7.5 TBS(TBST)洗涤后加羊抗鼠IgG-AP,37℃ 1 h,NBT/BCIP避光显色,PBS终止反应^[12]。

2 结果与分析

2.1 硫酸铵法提取花鲈血清 Ig

用饱和硫酸铵对花鲈血清作分级沉淀,收集

30%、35%、40%、45%、50%和 55%饱和度的沉淀物,测定各组份的蛋白浓度及抗体ELISA效价,结果表明,硫酸铵沉淀免疫球蛋白的主要活性成份集中在饱和度为 30%~50%的区间,其中以 45%饱和度的抗体比活最高,ELISA效价为 2 × 10⁴/mg 蛋白,比血清的ELISA效价提高了 2.2 倍;35%饱和度沉淀蛋白量最高,但抗体比活略低于 45%饱和度沉淀组份;45%饱和度沉淀后,上清液中的抗体浓度和活力均下降(表 1)。对各组份进行 SDS-PAGE分析,除抗体的重链和轻链外,还存在较多的杂蛋白带(图 1),表明硫酸铵沉淀可有效浓缩抗体,但不能有效去除杂蛋白。

2.2 A 蛋白柱提取花鲈血清 Ig

将Goat-IgG免疫花鲈血清经HiTrap Protein A HP过柱,充分洗脱未结合蛋白,用柠檬酸缓冲液洗脱结合蛋白,200 μL/管收集洗脱峰。测定各收集管蛋白质浓度和抗Goat-IgG效价(间接ELISA法),结果如图 2 所示。由图可见,花鲈血清经充分洗脱未结合蛋白后,用柠檬酸缓冲液解离洗脱,可得单一蛋白峰,洗脱峰集中在第 4~8 管,即洗脱体积 0.8~1.6 mL处,峰值总蛋白量达 1.079 mg,占全部洗脱蛋白的 76.2%。抗Goat-IgG间接ELISA测定表明蛋白峰与抗体效价峰完全重叠,其中最高浓度管的ELISA效价达 1.37 × 10⁵/mg蛋白。从 35 支收集管中共得到蛋白质 1.415 mg,根据花鲈血清蛋白含量 55 mg/mL,计算出中A蛋白柱提取抗体得率为 2.57%。

2.3 Goat-IgG 偶联亲和柱提取花鲈血清 Ig

将 Goat-IgG 免疫花鲈血清经 Goat-IgG 偶联的 Sephrose 4B 亲和柱结合,充分洗脱未结合蛋

表 1 花鲈血清 Ig 硫酸铵分级沉淀及抗体效价
Tab. 1 *Lateolabrax labrax* Ig eluted with ammonium sulfate fractionation and its antibody titer

项目 item	硫酸铵饱和度/% (NH ₄) ₂ SO ₄ saturation						血清 serum
	30%	35%	40%	45%	50%	55%	
所得蛋白量/mL total protein volume	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0
蛋白浓度/(mg·mL ⁻¹) protein concentration	0.68	14.31	8.49	7.00	3.16	1.97	55
ELISA效价/(mg ⁻¹ pro) ELISA titer	1 × 10 ³	2 × 10 ³	1 × 10 ⁴	2 × 10 ⁴	1 × 10 ³	1 × 10 ³	9 × 10 ³

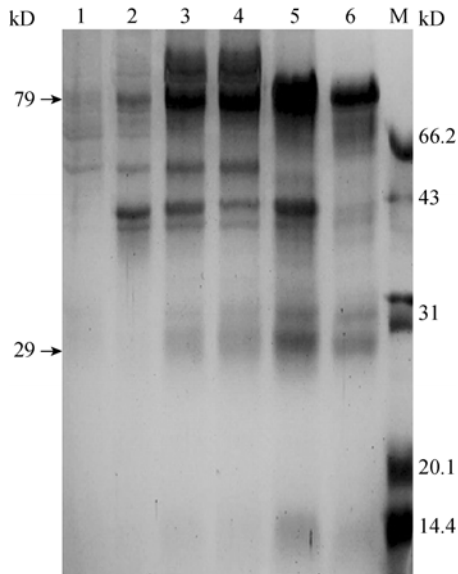


图 1 硫酸铵分级沉淀花鲈血清 Ig 的 SDS-PAGE 电泳
1-6: 硫酸铵饱和度分别为 1.55%、2.50%、3.45%、4.40%、5.35%、6.30%。

Fig. 1 SDS-PAGE of *Lateolabrax labrax* Ig eluted with ammonium sulfate fractionation
1-6: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation is 1.55%, 2.50%, 3.45%, 4.40%, 5.35%, 6.30%, respectively.

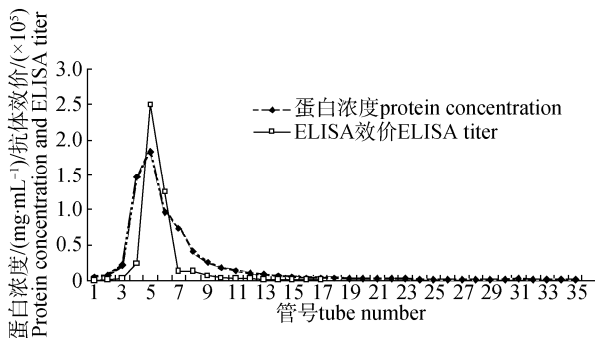


图 2 蛋白 A 柱提取花鲈 Ig 洗脱蛋白浓度和抗体效价

Fig. 2 Protein concentration and antibody titer of *Lateolabrax labrax* Ig eluted with protein A affinity column

白。Gly-HCl缓冲液洗脱结合蛋白,以 200 μL /管收集洗脱峰,测定各收集管蛋白质浓度和抗 Goat-IgG 效价(间接 ELISA 法),结果如图 3 所示。洗脱峰为单一蛋白峰;洗脱峰集中在第 7-14 管,即洗脱体积 1.4~2.8 mL 处,峰值总蛋白量达 1.046 mg,占全部洗脱蛋白的 72.4%。抗 Goat-IgG 间接 ELISA 测定表明蛋白峰与抗体效价峰完全重叠,其中最高浓度管的 ELISA 效价达 $1.39 \times 10^5/\text{mg}$ 蛋白。从 36 支收集管中共得蛋白 1.44 mg,根据花鲈血清蛋白含量为 55 mg/mL,计算出中 Goat-IgG 偶联柱提取抗体得率为 2.63%。

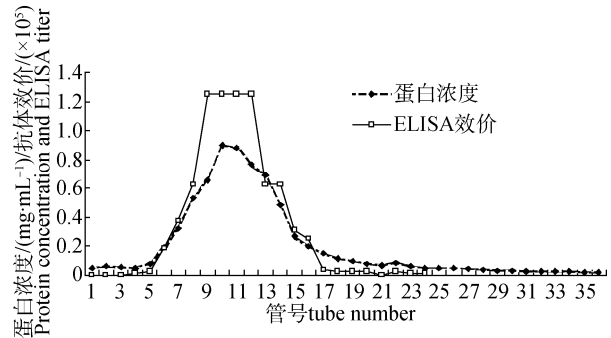


图 3 Goat-IgG 偶联亲和层析柱提纯花鲈 Ig
洗脱蛋白浓度和抗体效价

Fig. 3 Protein concentration and antibody titer of *Lateolabrax labrax* Ig eluted from goat IgG-immobilized agarose gel

2.4 花鲈血清 Ig 的 SDS-PAGE 分析

用 SDS-PAGE 电泳分析 A 蛋白柱、Goat-IgG 亲和层析柱及 45% 饱和硫酸铵(SAS)二次沉淀提取花鲈血清的抗体纯度,结果见图 4。花鲈血清经 A 蛋白柱(图 4, 第 3 泳道)和 Goat-IgG 偶联亲和层析柱提取(图 4, 第 4 泳道)后,电泳后显示 79 kD 和 29 kD 2 个条带,分别为花鲈免疫球蛋白的重链(H 链)和轻链(L 链),表明这 2 种方法可有效去除花鲈血清杂蛋白,达到快速纯化 IgM 的目的;而 45% 饱和硫酸铵提取成份(图 4, 第 1 泳道)与血

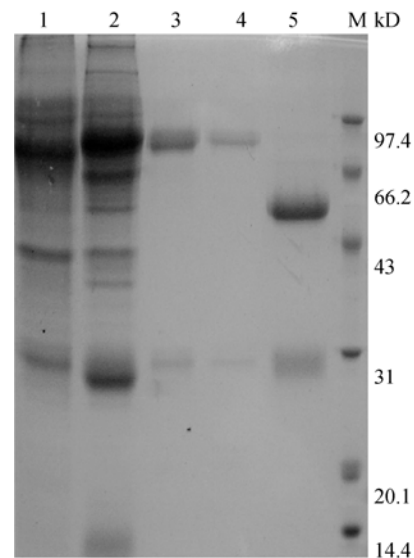


图 4 花鲈血清 Ig SDS-PAGE 电泳

1: 45% SAS 提取物; 2: 花鲈血清; 3: A 蛋白柱分离; 4:

Goat-IgG; 亲和柱分离; 5: Goat-IgG. M: marker.

Fig. 4 SDS-PAGE of *Lateolabrax labrax* serum and separated Ig
1: 45% SAS; 2: serum; 3: HiTrap Protein A HP; 4: goat-IgG immobilized agarose; 5: goat IgG. M: marker.

清直接电泳(图4,第2泳道)相比,杂蛋白条带已大大减少,重链和轻链较为明显,但杂蛋白条带仍较多,表明用硫酸铵二次沉淀法提取抗体,不能完全去除杂蛋白质。

2.5 花鲈血清 Ig 的 Western-blotting 分析结果

分别用鼠抗花鲈 Ig 血清及单抗对亲和层析 2 种方法提取花鲈的 Ig 进行免疫印迹(图5)。鼠抗花鲈 Ig 血清同时有抗花鲈 Ig H 链和 L 链抗体,而鼠单克隆抗体 AA5 仅识别花鲈 Ig 的 H 链;A 蛋白柱和 Goat-IgG 柱亲和层析均为单一的蛋白反应 79 kD 条带,为免疫球蛋白 H 链。由 Western-blotting 条带与 SDS-PAGE 条带的分子量对应性表明,通过 A 蛋白柱和 Goat-IgG 柱亲和层析提取的组分为纯化的花鲈免疫球蛋白。

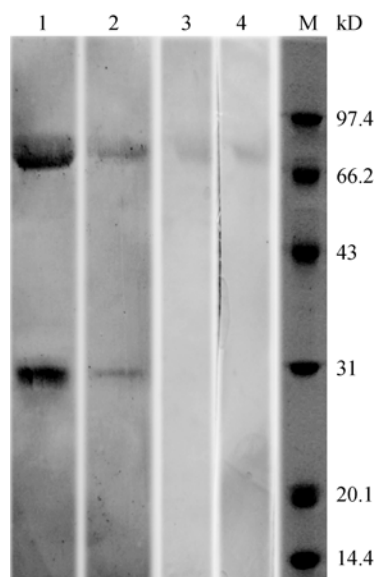


图5 纯化花鲈血清 Ig Western-blotting 分析

1. A 蛋白柱分离+多抗; 2. Goat-IgG 柱分离+多抗; 3. A 蛋白柱分离+AA5; 4. Goat-IgG 柱分离+AA5. M. marker

Fig. 5 Western-blotting of purified *Lateolabrax labrax* serum Ig
1. HiTrap Protein A fraction+pAb; 2. goat-IgG-gel fraction+pAb; 3. HiTrap Protein A fraction+AA5; 4. goat-IgG-gel+AA5. M. marker

3 讨论

本实验采用硫酸铵分级沉淀、A 蛋白柱亲和层析和 Goat-IgG 偶联 Sepharose 4B 亲和层析柱分离纯化花鲈血清 Ig, 通过比较提取物的 Ig 纯度及抗体活性, 表明采用 A 蛋白柱亲和层析或 Goat-IgG 偶联亲和柱层析均可 1 次得到单一纯化

的花鲈免疫球蛋白。其中 A 蛋白柱洗脱峰更集中、抗体效价高, 1 mL 血清洗脱后抗体集中在 0.8~1.2 mL 洗脱范围; 提纯抗体 ELISA 效价 $1.39 \times 10^5/\text{mg}$ 蛋白, 比血清的抗体比活提高 15 倍。Goat-IgG 偶联亲和柱层析也可 1 次得到纯化抗体, 收集的抗体比活与 A 蛋白柱提取的抗体无明显差异, 但洗脱峰较 A 蛋白柱亲和层析分散; 硫酸铵分级沉淀法可有效浓缩抗体, 但 SDS-PAGE 结果表明存在较多的杂蛋白带, 需要进一步纯化。Goat-IgG 偶联亲和层析法需用纯化的 Goat-IgG 免疫鱼, 获得抗血清再用于鱼体 Ig 的纯化, 提取效率受到鱼体免疫效价的影响, 而 A 蛋白柱亲和层析不需要 Goat-IgG 免疫鱼体, 缩短了实验周期, 是一种更为有效的免疫球蛋白提取方法。

A 蛋白即金黄色葡萄球菌 A 蛋白 (Staphylococcal Protein A, SPA), 是一种从金黄色葡萄球菌细胞壁分离的蛋白质, 分子量 12~15 kD, 具有与抗体的 Fc 段结合的作用, 目前已发现 A 蛋白能结合人、豚鼠、猪、小鼠、猴等的 IgG, 在免疫学上有广泛用途^[13]。A 蛋白偶联柱 (A 蛋白柱) 已应用于抗体的快速提取和纯化中^[14]。近年来发现 A 蛋白柱也可用于鱼类的抗体提取中, 其机理未见明确阐述。国内外已用 A 蛋白柱从黑岩鱼 (*Sebastes schlegeli* Higendorf)、大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*)、紫红笛鲷 (*Lutjanus argentimaculatus*)、青石斑鱼 (*Epinephelus awoara*)、尖吻鲈 (*Lates calcarifer*) 和牙鲆 (*Paralichthys olivace*)^[15-18] 等多种鱼中分离得到 IgM, 但 A 蛋白柱不能适用于所有鱼类和其他水生动物的免疫球蛋白提取纯化, 如无法有效分离纯化纽氏肩孔南极鱼 (*Trematomus newnesi*) 的免疫球蛋白^[19]。用山羊 IgG (Goat-IgG) 免疫鱼, 同时用 Goat-IgG 为配基制备 Sepharose 4B 亲和层析柱, 采用亲和层析法提取免疫后鱼血清抗体曾是国外实验室的标准方法, 用于提取鲤科鱼类、黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 和鲷 (*Sparus pagrus pagrus*) 等鱼类的 IgM^[20], 但这种方法相对较繁琐。本研究比较了 A 蛋白柱亲和层析和 Goat-IgG 偶联 Sepharose 4B 亲和层析提取花鲈血清免疫球蛋白

(Ig)效果,结果表明两者均可有效用于花鲈Ig的提取纯化,但A蛋白柱洗脱峰更集中,且免除了对鱼体的免疫过程,应用更为方便。通过将鱼血清与A蛋白柱 4℃ 孵育 3~4 h可充分保证鱼Ig与柱的结合,并获得理想的抗体提取率和抗体活性。

关于鱼类的免疫球蛋白,近年来已开展较多研究,一般认为硬骨鱼类的免疫球蛋白为IgM,通常鱼类的免疫球蛋白是由 4 个Ig分子组成的四聚体,每个Ig分子由 2 个重链(H链)和 2 个轻链(L链)组成,H链分子量一般为 60~81 kD, L链分子量 20~30 kD^[16-29]。不同鱼类的IgM分子存在一定差异。鲈形目鱼类中,鳊(*Siniperca chuatsi*)血清IgM的H链和L链分子量分别为 72 kD和 29 kD^[23];狼鲈(*Dicentrarchus labrax* L.)血清IgM的 H链和L链的分别为 78 kD和 27.5 kD^[19];尖吻鲈(*Lates calcarifer*)血清IgM的H链和L链分子量分别为 81.8 kD和 75.7 kD^[16]。关于花鲈血清Ig的分子量,作者采用亲和层析法纯化Ig 进行SDS-PAGE电泳,显示花鲈Ig的H链、L链分别为 79 kD和 29 kD。张福森等^[28]采用 Sephadex G-200 凝胶层析法测定了花鲈IgM分子量,显示花鲈Ig的H链、L链分别为 79 kD和 29 kD。本研究得到了与张福森相同的结果,采用鼠抗花鲈免疫球蛋白血清进行Western blotting,确认了 79 kD和 29 kD分别为H链和L链。

本研究采用 A 蛋白柱和 Goat-IgG 偶联 Sepharose 4B 亲和层析法开展了花鲈血清 Ig 的纯化,同时采用作者制备的花鲈 Ig 单抗对提取抗体进行了活性检测。采用 Goat-IgG 充分免疫的花鲈血清用于 Ig 提取纯化,保证了提取过程中检测体系的完整性,并揭示了花鲈 Ig 纯化过程中蛋白分布、抗体纯度和活性和等规律,为今后鱼类免疫球蛋白的提取和研究的提供了重要的方法借鉴。

参考文献:

- [1] 卓华龙,王国良.海水网箱养殖鲈鱼的主要病害及防治方法[J].海洋渔业,2000,2(7):67-75.
- [2] 薛良义,王国良,徐兴林,等.海水网箱养殖鲈鱼淋巴囊肿病的初步研究[J].海洋科学,1998(3):54-57.
- [3] 王国良,薛良义,金珊,等.海水网箱养殖鲈鱼皮肤溃疡病的流行病学研究[J].水生生物学报,2000,24(4):392-395.
- [4] 王保坤,余俊红,李筠,等.花鲈弧菌病原菌(哈维氏弧菌)的分离与鉴定[J].中国水产科学,2002,9(1):52-55.
- [5] Chen S C, Lee J L, Lai C C, et al. Nocardiosis in sea bass, *Lateolabrax japonicus*, in Taiwan[J]. J Fish Dis, 2001, 23(5): 299-307.
- [6] 陈爱平,朱泽闻,王立新,等.2006 年中国水产养殖病害监测报告(二)[J].科学养鱼,2007(8):48-49.
- [7] 肖慧,李军,王祥红,等.鲈鱼鳃弧菌疫苗的制备及免疫防治效果[J].青岛海洋大学学报,2003,33(2):226-232.
- [8] 余俊红,沈继红,王祥红,等.鳃弧菌口服微胶囊疫苗的制备及其对鲈鱼的免疫效果[J].中国水产科学,2001(2):765-779.
- [9] 奥斯伯 F,布伦特 R,金斯顿 R E,等.精编分子生物学实验指南[M].北京:科学出版社,1999:360-364.
- [10] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680-685.
- [11] 印莉萍,刘祥林.分子细胞生物学实验技术[M].北京:首都师范大学出版社,2000:224-227.
- [12] 哈洛 E,莱恩 D.抗体技术实验指南[M].北京:科学出版社,2002:177-185.
- [13] Hjelm H, Hjelm K, Sjöquist J. Protein A from *Staphylococcus aureus*: its isolation by affinity chromatography and its use as an immunosorbent for isolation of immunoglobulins[J]. FEBS Lett, 1972, 28(1): 73-76.
- [14] Grodzki A C, Berenstein E. Antibody purification: affinity chromatography-protein A and protein G sepharose[J]. Methods Mol Biol, 2010, 588: 33-41.
- [15] Shin G, Lee H, Palaksha K J, et al. Production of monoclonal antibodies against serum immunoglobulins of black rockfish(*Sebastes schlegelii* Higendorf)[J]. J Vet Sci, 2006, 7(3): 293-295.
- [16] 鄢庆彬,韩一凡,高天翔,等.大黄鱼血清 IgM 纯化及其免抗血清的制备[J].中国水产科学,2006,13(3):475-479.
- [17] 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.
- [18] Crosbie P B, Nowak B F. Production of polyclonal antisera against barramuodi(*Lates calcarifer* Bloch) serum immunoglobulin derived from affinity columns containing mannan-binding protein or staphylococcal protein A [J]. Aquaculture, 2002, 211: 49-63.
- [19] Scapigliati G, Chausson F, Cooper E L, et al. Qualitative and quantitative analysis of serum immunoglobulins of four Antarctic fish species[J]. Polar Biol, 1997, 18: 209-213.
- [20] Oswaldo P, Ariadna S B, Pilar A P. Isolation and partial characterization of serum immunoglobulins from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilthead sea bream(*Sparus aurata* L.) [J]. Fish Shellfish Immunol, 1996, 6: 81-94.

- [21] 陈昌福, 纪国良, 罗宇良, 等. 草鱼体表和肠黏液中 Ig 的初步分析鱼病学研究论文集(II)[M]. 北京: 海洋出版社, 1995: 21–25.
- [22] 杨桂文, 安利国, 王长法, 等. 鲤鱼皮肤黏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.
- [23] 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.
- [24] 张永安, 聂品. 鳊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.
- [25] 林天龙, 陈强, 俞伏松, 等. 欧洲鳊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.
- [26] 陈垚, 王石泉, 韩晓冬, 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.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] 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.

Purification and partial characterization of serum immunoglobulin in *Lateolabrax japonicus*

XU Nana^{1,2}, QIAN dong², ZHAO Haiquan¹

1. Faculty of Life Science, Anhui Agriculture University, Hefei 230001, China;

2. Laboratory of Fish Disease, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China

Abstract: The present study aims to establish antibody detection methods for further vaccine research and application. Healthy sea perches (*Lateolabrax japonicus*) were injected with commercial goat IgG emulsified with Freund's adjuvant four times in two months to develop good immune response. The sera of immunized sea perches were collected for immunoglobulin (Ig) isolation with saturated ammonium sulfate (SAS) precipitation, protein A-sepharose affinity chromatography and goat IgG-immobilized sepharose 4B affinity chromatography. It was shown that Ig mainly distributed in 30%–50% SAS precipitation, with the maximum ELISA titer per mg protein being 45% SAS, 2.2 times higher than that of original serum. Protein A column produced single elution peak with the elution volume of 0.8–1.6 mL, accounting for 76.2% of total collected protein, with the ELISA titer being 1.37×10^5 per mg protein, 15 times higher than that of original serum. Goat IgG-immobilized sepharose 4B affinity chromatography produced single elution peak with the elution volume of 1.4–2.8 mL, accounting for 72.4% of total collected protein, with the ELISA titer being 1.39×10^5 per mg protein. SDS-PAGE showed that Ig eluted by both protein A column and goat IgG-immobilized sepharose 4B affinity chromatography yielded two protein bands of 79 kD and 29 kD, which could be considered as H chain and L chain of sea perch Ig, while Ig precipitated with 45% SAS yielded more bands besides H and L chains. Protein bands of 79 kD and 29 kD were confirmed to be H and L chains by western-blotting with the antiserum and monoclonal antibody AA5. The Ig yield coefficients of protein A and goat-IgG methods was calculated as 2.57% and 2.63%, respectively. These results indicated that both protein A column and IgG-immobilized sepharose 4B affinity chromatography could successfully isolate Ig from sea perch serum with one step of absorption and elution. Protein A column method could be considered as a more effective and less time consuming method for sea perch Ig isolation, yielding narrower elution volume and higher antibody titer, without long period of vaccination with goat IgG to fish. The current research provide a useful technical tool for further studies on humoral immune response for vaccine development and vaccine effects assessments for sea perch, which would benefit the prevention and control of sea perch diseases.[Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(1): 103–109]

Key words: *Lateolabrax japonicus*; immunoglobulin; purification; affinity chromatography

Corresponding author: QIAN Dong. E-mail: qdomonas@163.com; ZHAO Haiquan. E-mail: swjs12@ahau.edu.cn