欧洲鳗皮肤黏膜免疫球蛋白纯化及其结构组成分析

林娟娟^{1,2},杨金先¹,陈强¹,刘晓东¹,俞伏松¹,林天龙¹ (1.福建省农业科学院生物技术研究所、福建福州350003;2.莆田学院环境与生命科学系、福建莆田351100)

摘要:应用亲和层析技术提纯欧洲鳗(Anguilla anguilla)黏膜免疫球蛋白(Ig),并在结构和抗原性上进行分析。柱层析结 果表明,欧洲鳗黏膜Ig经亲和层析分离后出现1个锐形的蛋白峰,蛋白主要分布于收集物的第2-6管,蛋白峰和抗原活性峰 重叠。凝胶电泳结果显示,在变性还原条件下,欧洲鳗黏膜Ig重、轻链分子量分别为68 kD和26 kD,还有1条分子量约为 18 kD的蛋白带;在非变性非还原条件下,黏膜Ig只有1条蛋白带,分子量约为350 kD,略呈扩散拖带现象,这一结果提示自 然条件下欧洲鳗黏膜Ig可能以二聚体形式存在;在变性非还原条件下,黏膜Ig有3条蛋白带,分子量约为350 kD、138 kD和 135 kD,表明欧洲鳗黏膜Ig在SDS作用下可发生不同程度的解聚。Western-blotting试验证实,免抗血清能识别欧洲鳗黏膜 Ig的二聚体、解聚体、重链和81 kD、84 kD处的蛋白带,显示出黏膜Ig的抗原特异性。欧洲鳗黏膜Ig与血清Ig在结构和抗原 性上的差异,为进一步探讨欧洲鳗是否存在相对独立的黏膜免疫系统奠定了基础。[中国水产科学,2009,16(3):404-410]

关键词:欧洲鳗;免疫球蛋白;亲和层析;结构组成分析;抗原性中图分类号:S965.223文献标识码:A

近年来,越来越多的学者将鱼类免疫学研究重点 从中枢和外周免疫系统转向黏膜免疫系统方面的研 究^[1-2]。鱼类生活在富含病原的"多菌"水环境中,其 大面积的黏膜包括表皮、肠和鳃的黏膜构成了抵御病 原微生物侵入的第一道防线,在免疫应答与免疫保护 过程中起着极其重要的作用^[3]。因此,对黏膜免疫的 深入研究将有利于了解鱼类病原侵入、致病和康复的 规律。鱼类的表皮中有很多黏液细胞,可分泌黏液, 黏液中除含有非特异性免疫成分外,还含有特异性 的免疫球蛋白(Ig)。早在1969年, Fletcher等^[4]证实鲽 鱼(Pleuronectes platessa)的黏膜Ig类型为Ig M。随后, 从羊头鲷(Archosargus probatocephalus)^[5]、沟鲶(Ictalurus punctatus)^[6]、香鱼(Plecoglossus altivelis)^[7]、鲤(Cyprinius carpio L.)^[8]、大西洋鳕(Gadus morhus L.)^[9]、鲫(Carassius auratus)^[10]等多种鱼类的皮肤黏液中都发现有 Ig的存 在。但迄今未见有欧洲鳗(Anguilla anguilla)皮肤黏膜 文章编号:1005-8737-(2009)03-0404-07

Ig的相关报道。本研究以欧洲鳗为模型,利用黏膜Ig 能与鼠抗鳗血清Ig单克隆抗体的交叉反应特性,制备 亲和层析柱,纯化欧洲鳗黏膜Ig,并在蛋白结构和抗原 性上与血清Ig进行比较,为进一步阐明欧洲鳗黏膜Ig 的发生与来源、局部体液免疫应答的规律及其介导免 疫保护的机理提供必要的证据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

欧洲鳗体质量250~300g,100尾,购自福建长 乐鳗鲡养殖场;8株鼠抗鳗血清Ig单克隆抗体(表1)、 兔抗鳗血清Ig多克隆抗体、亲和层析纯化的欧洲鳗 血清Ig,均由本实验室制备、保存。

1.2 亲和纯化欧洲鳗黏膜Ig

1.2.1 饱和硫酸铵盐析纯化 用海绵轻柔刮擦欧 洲鳗体表,收集大量黏液。黏液用纱布过滤后,加入

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471336).

通讯作者: 林天龙. E-mail: Lint05@163.com

收稿日期:2008-04-11.修订日期:2009-01-09.

作者简介:林娟娟(1974-)女,硕士,讲师,主要从事鱼类免疫学方面的研究.Tel:0591-87817514; E-mail: ljjcmj@sina.com

等体积PBS(磷酸盐缓冲液,0.01 mol/L, pH7.4),磁力 搅拌条件下缓慢加入pH 7.0饱和硫酸铵至20%饱 和度,4℃静置过夜,10 000 r/min离心30 min,收集 上清,加饱和硫酸铵至50%饱和度,4℃静置过夜, 10 000 r/min离心30 min,弃上清,沉淀用PBS重悬并 透析除盐,测定蛋白浓度,分装,-20℃保存备用。

1.2.2 亲和层析柱制备 先进行亲和层析柱配体的选择,方法简述如下:将50%饱和硫酸铵粗提纯化的欧洲鳗黏膜Ig用PBS以体积比1:10稀释开始,按2倍比稀释后包被酶标板,4℃过夜,弃包被液,2%BSA-PBST封闭,室温反应1h,PBST洗3次,滴加8株鼠抗鳗血清Ig单抗(工作体积比为1:500),室温1h,洗涤后加入羊抗鼠IgG辣根过氧化物酶标记物(Sigma,体积比为1:500),室温1h,洗涤后加底物OPD显色30min,2mol/LH₂SO₄终止反应。酶联仪读取OD₄₉₀值(OD₄₉₀>0.2为阳性),试验设PBS为空白对照。选择合适的单抗用于制备亲和层析柱。取10mL所选单抗腹水,饱和硫酸铵盐析纯化步骤同上,沉淀物重悬于PBS,于500mLNaHCO₃缓冲液(0.1mol/L,pH8.3)4℃透析48h除盐,其间换液3次,测定蛋白含量,4℃备用。接着按先前的方法制备亲和层析柱^[11]。

1.2.3 亲和层析纯化欧洲鳗黏膜Ig 上样前先用 甘氨酸(0.1 mol/L, pH 2.6)和二乙胺(0.05 mol/L, pH 11.0)洗柱各1次,洗脱结合不牢的单抗残基。将硫 酸铵盐析粗提的欧洲鳗黏膜Ig加入亲和层析柱,收 集未结合蛋白,用PBS(含0.15 mol/L NaCl)洗至OD₅₉₅ < 0.02,然后用甘氨酸洗脱,收集洗脱液,每管1 mL, 立即加入333 μ L K₂HPO₄(0.5 mol/L, pH 8.0)调节 pH 值至7.0,测定收集物的OD₅₉₅值和抗原活性, -20 ℃ 保存备用。亲和层析柱经保存液(PBS含0.01%NaN₃ 和5%BSA)平衡后,4℃保存,重复使用。

1.3 欧洲鳗血清Ig单抗和兔抗血清分别对黏膜Ig的 灵敏度测定

亲和纯化的欧洲鳗黏膜Ig从 2 μg/mL开始。作 系列2倍比稀释后包被96孔酶标板,4℃过夜,封闭 洗涤后,一抗分别为8株血清Ig腹水单抗(体积比 为1:1000)和兔抗血清(体积比为1:2000),二抗分 别为羊抗鼠IgG辣根过氧化物酶标记物(Sigma,体积 比为1:5000)和羊抗兔IgG辣根过氧化物酶标记物 (Sigma,体积比为1:2000),显色终止后,读取OD₄₉₀值。

1.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳

1.4.1 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 采用Mini-Protein cell系统(BioRad) 进行变性还原条件下的凝胶电泳^[12],分离胶的浓度 为12%,积层胶的浓度为4%。待测样品20μL加入5 倍浓缩的样品缓冲液5μL,煮沸5min,瞬时离心后上 样。恒压70 V,10min,调电压至100 V,电泳至前沿 指示剂达到终点。按双胺银染色法进行蛋白染色。 预染标准蛋白(Biolabs,17~175 kD)

1.4.2 非变性非还原条件下的凝胶电泳 分离胶的浓度为6%,积层胶的浓度为4%,凝胶中不含SDS,电泳样品中不含SDS和2-ME。直接上样。恒压70V, 30 min后调电压至100V,约2h。考马斯亮蓝染色。 大分子标准蛋白(Amersham,669~67kD)

1.4.3 变性非还原条件下的SDS-PAGE 分离胶的浓度为6%,积层胶的浓度为4%,电泳样品中含SDS 但不含2-ME。电泳条件和大分子标准蛋白同**1.4.2**。预染标准蛋白同**1.4.1**。

1.5 Western-blotting

样品经凝胶电泳后,将分离开的蛋白带电转移至 硝酸纤维素膜上(Amersham,孔径0.45 μm),100 V恒 压电转移60 min。将膜置于3%BSA-PBST中封闭1h, 洗涤后加兔抗血清(体积比为1:1000),摇床振荡, 室温1h, PBST洗3次,加入羊抗兔IgG碱性磷酸酶标 记物(Sigma,体积比为1:15000),摇床振荡,室温1h, PBST洗3次,蒸馏水冲洗1次,加底物BCIP/NBT(华美 生物工程公司)显色30 min,水洗终止反应,晾干。

1.6 蛋白质分子量的计算

根据标准蛋白质的相对迁移率(*R_t*)作分子量标 准曲线。*R_t*=蛋白质样品距加样端迁移距离(cm)/溴 酚蓝区带中心距加样端距离(cm)。以各蛋白的*R_t*值 为横坐标,各蛋白的分子量对数为纵坐标,在坐标轴 上作标准曲线。参照标准曲线及*R_t*便可得出相应蛋 白质的分子量。

1.7 蛋白浓度测定

按Bradford法测定蛋白浓度,用DU Series 7000 分光光度计(Beckman)在波长595 nm处测定吸收 值,参照标准曲线测出蛋白的浓度。

2 结果与分析

2.1 亲和层析柱配体的选择

用ELISA法筛选与欧洲鳗黏膜Ig有交叉反应的 单抗时,IgG类型的单抗以单体形式存在,捕捉效率 高,抗体性质稳定,并能避免细胞悬浮反应中细胞团 的出现^[13]。故常作为首选对象。鉴于曾用单抗4B7 亲和纯化血清 Ig且其与黏膜 Ig反应效价达1:80(表 1),本实验选用单抗4B7作为配体制备亲和层析柱。

2.2 单抗亲和层析纯化欧洲鳗黏膜Ig

硫酸铵盐析粗提的欧洲鳗黏膜Ig经Sepharose-4B柱亲和层析分离后出现1个锐形的蛋白峰,蛋白 主要分布于收集物的第2-6管,蛋白峰和抗原活性峰 重叠(图1);峰值蛋白浓度为180.9 μg/mL, ELISA效 价为1:128。

表1 黏膜 Ig 与8株血清 Ig 单克隆抗体反应的效价比较 Tab. 1 ELISA titers of eight different monoclonal antibodies (McAbs) to the mucus Ig of European eel

血清 Ig 单抗 (McAb of serum Ig)	8H1	4B7	7E2	9D7	3D11	9B11	9D12	12G8
单抗亚级份(McAb's isotype)	$\mathrm{IgG}_{\mathrm{2a}}$	IgG _{2b}	IgM	IgM	IgG _{2a}	IgG_1	IgG_1	IgG_{2b}
黏膜Ig效价(Mucus Ig titer)	1:40	1:80	1:160	1:80	1:160	1:40	1:40	0



图1 欧洲鳗黏膜Ig亲和层析及Ig抗原活性曲线

Fig. 1 Affinity chromatography and antigenic activity curve of European eel mucus Ig

2.3 欧洲鳗血清Ig单抗和兔抗血清分别对黏膜Ig的 灵敏度检测

ELISA结果表明: 当欧洲鳗血清 Ig单抗工作体 积比为1:1000时,对黏膜 Ig的检测灵敏度最高只有 500 ng/mL; 而兔抗血清工作体积比为1:2000时,对 黏膜 Ig的灵敏度可达250 ng/mL。因此,选用兔抗血 清作为Western-blotting的免疫探针,可提高反应的 灵敏度。

2.4 变性还原条件下凝胶电泳和Western-blotting

亲和层析纯化的欧洲鳗黏膜Ig条带较复杂,其 中重链分子量约为68 kD,轻链分子量为26 kD,但轻 链处蛋白在银染过程中脱落形成空泡负染,而且在 其附近呈现严重的扩散现象,这可能与不同蛋白质 对染色方法的敏感度不同有关;也可能由于染色时 间太长,导致背景色过深影响效果。在重链上方有1 条分子量为81 kD的蛋白带,而在轻链下方还有1条 18 kD的蛋白带(图2第4条带)。



图2 欧洲鳗黏膜Ig重轻链的SDS-PAGE银染图谱分析 1. 预染标准蛋白; 2. 硫酸铵粗提的黏膜Ig; 3. 过柱后未结合黏 膜蛋白; 4. 亲和纯化的黏膜Ig; 5. 纯化的血清Ig

 Fig. 2 SDS-PAGE analysis of heavy and light chains of European eel mucus Ig stained with silver
1.Prestained protein standard; 2.Ammonium sulfate precipitated mucus Ig;

3. Unabsorbed run through mucus Ig; 4. Eluted mucus Ig; 5. Eluted serum Ig

Western-blotting分析结果表明,由于分辨率的提高,蛋白反应条带更加清晰。兔抗鳗Ig血清不仅能识别黏膜Ig的重链及其上方81kD和84kD的蛋白带(图3第3条带),而且,在黏膜Ig重链下方也能见到若干条信号较弱的蛋白带。但是,却无法识别图2第4条带中18kD处的蛋白带。



图 3 欧洲鳗黏膜 Ig结构和抗原性的 Western-blotting 分析 1. 硫酸铵粗提的黏膜 Ig; 2. 过柱后未结合的黏膜蛋白; 3. 亲和纯化的 黏膜 Ig; 4. 预染蛋白标准; 5. 纯化的血清 Ig

Fig.3 Western-blotting analysis of the structure and the antigenicity of European eel mucus Ig

1. Ammonium sulfate precipitated mucus Ig; 2. Unabsorbed run through mucus Ig; 3. Eluted mucus Ig; 4. Prestained protein standard; 5. Eluted serum Ig

2.5 非变性非还原条件下凝胶电泳和Western-blotting

亲和层析纯化的欧洲鳗黏膜Ig在非变性非还原 条件下凝胶电泳中出现1条蛋白带,呈拖带状(图4 第1条带),其分子量约为350 kD。在Western-blotting 中兔抗血清能识别这条蛋白带(图4第4条带),根据 其蛋白的分子量大小推测它可能为欧洲鳗黏膜Ig的 二聚体。



图4 欧洲鳗黏膜Ig的非变性非还原PAGE和 Western-blotting分析图谱

1. 亲和纯化的黏膜 Ig; 2. 纯化的血清 Ig; 3. 大分子标准蛋白; 4 亲和纯 化黏膜 Ig的免疫印迹图谱; 5. 纯化血清 Ig的免疫印迹图谱

Fig.4 Analysis of European eel mucus Ig by non-denatured and non-reduced PAGE and Western-blotting

1. Eluted mucus Ig; 2.Eluted serum Ig; 3.High molecular protein stand; 4. Eluted mucus Ig by Western-blotting; 5. Eluted serum Ig by Western-blotting

2.6 变性非还原条件下凝胶电泳和Western-blotting

在变性非还原条件下凝胶电泳中,亲和纯化的 欧洲鳗黏膜Ig出现3条蛋白带,分子量约为350 kD、 138 kD和135 kD(图5第7条带),说明欧洲鳗黏膜Ig 在SDS作用下发生不同程度的解聚;在印迹图谱中, 兔抗血清能识别这些蛋白带(图5第5条带)。

3 讨论

鱼类免疫球蛋白(Ig)作为鱼类免疫机理和鱼病 免疫诊断研究的有力工具,取得了一定的进展。但 是鱼类种类繁多,且Ig的结构、性质在不同种鱼类甚 至同一种鱼类的不同部位(如血液、黏液和胆汁等)



图5 欧洲鳗黏膜Ig的变性非还原PAGE和 Western-blotting分析图谱

1. 纯化的血清 Ig:2. 大分子标准蛋白;3. 预染标准蛋白;4. 亲和纯化的 黏膜 Ig;5. 亲和纯化黏膜 Ig的免疫印迹图谱;6. 纯化血清 Ig的免疫印 迹图谱

Fig.5 Analysis of European eel mucus Ig by denatured and nonreduced PAGE and Western-blotting

 Eluted serum Ig; 2. High molecular protein stand; 3. Prestained protein standard; 4. Eluted mucus Ig; 5.Eluted mucus Ig by Western-blotting; 6. Eluted serum Ig by Western-blotting

也可能存在一定的差异。因此,必须加强鱼类Ig特 别是血清Ig、黏膜Ig及其相互关系的研究。黏膜处 于皮肤的表层,它面临比血清更复杂的外界环境,因 此,在本实验中获得的欧洲鳗皮肤黏膜Ig的组成成 分要比血液多,但总蛋白含量却很低,只有743.6 μg。 这可能和黏膜Ig本身较稀少有关,也可能与亲和层 析的条件有关,需要对其条件进行优化,且多次浓缩 提纯。从SDS-PAGE中也可以看出,纯化后欧洲鳗黏 腹Ig的条带明显比血清Ig多,黏膜Ig和血清Ig重链 相同,但轻链处黏膜Ig比血清Ig少2条蛋白带。而且 黏膜Ig在18 kD处有1条特有蛋白带,它是共洗脱的 黏液杂蛋白(如蛋白酶、溶菌酶、糖类物质等),还是黏 腹Ig的固有成分或降解产物,需要再次验证。

纯化的Ig可表现出多种不同聚合体。完整的Ig 以四聚体或其他多聚体形式存在^[14]。较多学者认为, 鱼类黏膜Ig是IgM。Lobb等^[5]曾发现羊头鲷皮肤 黏膜Ig中除含有与血清相同的Ig外,还含有二聚体 IgA。而St Louis-Cormier等^[15]认为黏膜Ig是分泌型 IgS。在非变性非还原条件下,纯化的欧洲鳗黏膜Ig 只有1条蛋白带,分子量约为350 kD,略呈扩散拖带 现象。这一结果提示,自然条件下欧洲鳗黏膜Ig可 能以二聚体形式存在,与血清Ig以四聚体、二聚体2 种存在形式不同。至于实验获得的黏膜Ig是否与分 泌型IgA有关,还有待于深入研究。在变性非还原条 件下,纯化的欧洲鳗黏膜Ig有3条蛋白带,分子量约 为350 kD、138 kD和135 kD,表明欧洲鳗黏膜Ig部分 抗体单体间二硫键不健全,在SDS的作用下发生不 同程度的解聚,产生138 kD和135 kD 2条蛋白带;而 血清Ig则在SDS作用下由四聚体解聚成三聚体。鱼 类Ig这种特性的生物学功能尚未明了。

Western-blotting分析结果证明,兔抗欧洲鳗血清 可识别黏膜Ig和血清Ig的多聚体结构、重链及其共 纯化产物,但与轻链反应较弱,其原因可能是轻链的 免疫原性弱不能有效激发免疫应答。值得注意的是, 欧洲鳗黏膜Ig在81 kD和84 kD处各有1条血清Ig没 有的蛋白带,这可能是由于黏膜Ig上共价连接了其 他的蛋白质,它们有保护蛋白不被降解的作用^[10];也 可能是黏膜Ig发生了糖基化修饰。因为,林天龙等 也发现美洲叉尾鲷黏膜Ig的糖基化程度高于其血清 Ig(未发表研究数据),从而说明黏膜抗体的来源可能 有别于循环抗体。

目前,对于鱼类的黏膜Ig和血清Ig是否同源 仍是学者们争议的焦点。但是,大量的研究表明, 鱼类存在局部的黏膜免疫系统^[16],具有一定的细胞 基础^[1],能独立完成抗原摄取、呈递及抗体分泌^[17]。 Esteve-Gassent等^[18]认为,免疫后的欧洲鳗苗皮肤黏 膜和血清中产生的特异性抗体效价不同,黏膜抗体 出现比血清的快,而血清抗体效价比黏膜的高,且持 续时间长。表明分泌型抗体并非由血清抗体转化而 来,证实鱼类确实存在不同来源的Ig。本研究以亲和 层析方法纯化的欧洲鳗黏膜Ig和血清Ig,在结构和 抗原性上存在差异,说明欧洲鳗可能存在相对独立 的黏膜免疫系统,这将有利于黏膜免疫疫苗的研制 和实用化免疫接种技术的开发研究,为鱼类传染性 疾病的免疫预防提供新的途径。

参考文献:

- [1] 苏友禄,郭志勋,徐力文,等. 军曹鱼黏膜免疫组织发育的形态学研究[J]. 中国水产科学,2008,15(4):644-649.
- [2] 林旋,张伟妮,林树根,等. 欧洲鳗鲡皮肤、鳃及消化道粘液细胞的 分布与类型[J]. 福建农业学报,2008,23(1):39-43.
- [3] Cain K D, Jones D R, Raison R L. Characterisation of mucosal and systemic immune resposes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using surface plasmon resonance [J]. Fish Shellfish Immunol, 2000, 10: 651–666.
- [4] Flecher T C, P T Grant.Immunoglobulins in the serum and mucus of the plaice (*Pleuronectes platessa*) [J]. J Biochem, 1969, 18: 65.
- [5] Lobb C J, Clem L W. The meabolic relationships of the immunoglobulins in fish serum, cutaneous mucus and bile [J]. J Immunol, 1981a, 127 (4): 1 525–1 529.
- [6] Lobb C J.Secretory immunity induced in catfish, *Ictalurus punctatus*, following bath immunization [J]. Dev Comp Immunol, 1987, 11: 727–738.
- [7] Itami T, Takahashi Y, Okamoto T, et al. Purification and characterization of immunoglobulin in skin mucus and serum of ayu [J]. Nippon Suisan Gaakkaish, 1988, 54: 1 611–1 616.
- [8] Rombout J H W M, Taverne N, Kamp M, et al. Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp (*Cyprinius carpio* L)[J]. Dev Comp Immunol, 1993b, 17: 309–317.
- [9] Magnadottir B, Crispin M, Royle L, et al. The carbohydrate moiety of serum IgM from Atlantic cod (*Gadus morhus* L) [J]. Fish Shellfish Immunol,2002,12:209–227.

[10] 陈垚, 王石泉, 韩晓冬, 等. 鲫鱼血清和皮肤粘液 Ig M的分离纯化

及部分性质的鉴定[J]. 动物学研究, 2003, 24(2): 111-115.

- [11] 林娟娟,杨金先,陈强,等.欧洲鳗鲡血清免疫球蛋白纯化及其结构分析[J].水产学报,2006,30(6):806-811.
- [12] 汪家政,范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社,2000: 77-110.
- [13] Van Diepen J C E, Wagenaar G T M, Rombout J H W M. Immunocytochemical detectoin of membrane antigens of carp leucocytes using light and electron microscopy [J]. Fish Shellfish Immunol, 1991, 1: 47–57.
- [14] Bang J D, Kim J W, Le S D, et al. Humoral immune response of flounder to *Eduardsiella tarda*, presence of various sizes of immunoglobulins in flounder [J]. Dis Aquatic Org, 1996, 26: 197–203.
- [15] St louis-Cormier E A, Osterland C K, Anderson P D. Evidence for a cutaneous secretoru immune system in rainbow trout (Salmo gairdneri)[J].Dev Comp Immunol, 1984, 8: 71–80.
- [16] 李凌. 鱼类体液免疫研究进展[J]. 海洋科学, 2001, 25(11): 20-22.
- [17] Dos Santos N M S, Tacerne Thiele J J, Barnes A C, et al. The gill is a major organ for antibody secreting cell production following direct immersion of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) in a *Photobacterium damselae* spp. Piscicida bacterin ; an ontogenetic study [J]. Fish Shellfish Immunol, 2001, 11: 65–74.
- [18] Esteve-Gassent M D, Nielsen M E, Amaro C. The kinetics of antibidy production in mucus and serum of European eel (*Anguilla anguilla* L.) after vaccination against *Vibrio vulnificus*: development of a new method for antibidy quantification in skin mucus[J].Fish Shellfish Immunol, 2003, 15: 51–61.

Purification and structure analysis of skin mucus immunoglobulin in *Anguilla anguilla*

LIN Juan-juan^{1,2}, YANG Jin-xian¹, CHEN Qiang¹, LIU Xiao-dong¹, YU Fu-song¹, LIN Tian-long¹

(1. Bio-technology Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China; 2.Environment and Life Science Department, Putian College, Putian 351100, China)

Abstract: The purification of mucus immunoglobulin (Ig) of European eel (Anguilla anguilla) was carried out by affinity chromatography. The structure and the antigenicity of eel's mucus Ig were analyzed by electrophoresis and Western-blotting. The results showed that after separating by the affinity column, the amount of eluted protein of mucus Ig was showed by a sharp curve on plotting paper. They were distributed in the second to the sixth collected tubes. And the protein curve was highly correlated with the antigenic activity curve when analyzed by ELISA. The electrophoresis proved that under reduced and denatured conditions, the molecular weight of the heavy chain and the light chains of the mucus Ig were 68 kD and 26 kD. And there was a protein band of 18 kD; under non-reduced and non-denatured conditions, the mucus Ig appeared as a 350 kD protein band, the result indicated that the nature mucus Ig could be presented as a dimer; Under denatured and non-reduced conditions, the mucus Ig showed three protein bands, with the molecular weight 350 kD, 138 kD and 135 kD. The results demonstrated that the mucus Ig had come apart into smaller polymers under the reaction of the SDS. Western blotting revealed that the rabbit antiserum could recognize various polymers, heavy chain, 81 kD and 84 kD two protein bands of the mucus Ig, which showed the antigen specialty of mucus Ig. In combination with the above results, the difference indeed existed in the structures and antigenicity between eel's mucus Ig and serum Ig, which could lay a foundation for further research in to whether the mucosal immune system is independent of systematic immune system in European eel. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(3): 404-410]

Key words: *Anguilla anguilla*; immunoglobulin (Ig); affinity chromatography; structure analysis; antigenicity analysis **Corresponding author**: LIN Tian-long. E-mail: Lint05@163.com

免费阅读卡信息

免费维普资讯网阅读体验卡

为方便读者利用网络资源查阅和下载《中国水产科学》的文章,维普资讯网随本刊向读者免费赠送"维普阅读体验卡"一张,每卡面额10元。读者持本卡可随时登录维普资讯网(www.cqvip.com)了解《维普资讯阅读卡使用细则》,还可用于维普网站下载文章充值使用。

本刊编辑部