

草鱼免疫球蛋白 IgM 四聚体的分析鉴定

陈丛琳^{1,2} 罗绍祥^{1,2} 张晓华¹ 戴和平¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

ANALYSIS AND CHARACTERIZATION OF SERUM IMMUNOGLOBULIN IGM TETRAMER FROM GRASS CARP (*CTENOPHARYNGODON IDELLUS*)

CHEN Cong-Lin^{1,2}, LUO Shao-Xiang^{1,2}, ZHANG Xiao-Hua¹ and DAI He-Ping¹

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;

2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

关键词: 草鱼; IgM; 四聚体

Key words: Grass carp; IgM; Tetramer

中图分类号: Q939.91 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2012)01-0173-04

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)是我国重要的淡水经济鱼类之一。为了制备有效的抗各种病原体的疫苗, 必须对草鱼的免疫应答分子进行分析。IgM 是大多数真骨鱼类血清中都存在的一种免疫球蛋白, 是主要的介导体液免疫应答的分子, 也是有颌类脊椎动物进化过程中最先出现的免疫球蛋白^[1]。

1965 年 Hodgins 发现真骨鱼类鲑鱼体内的抗体为四聚体构型^[2]。近些年研究表明, 硬骨鱼的 IgM 和哺乳动物类似, 由两条重链和两条轻链形成一个 IgM 单体, 通过二硫键连接。通常硬骨鱼 IgM 以四聚体存在, 但是也有其他的多聚体形式, 这可能是硬骨鱼产生抗体多样性的一种机制^[3]。在哺乳动物中, 5 个 IgM 单体由二硫键相互连接, 并通过二硫键与连接链连接形成五聚体^[4]。而硬骨鱼 IgM 缺乏连接链^[1,5], 单体常常通过非共价键结合成四聚体^[3,6], 空间结构可能为四面体结构^[7]。不同鱼类, 它们的单体间二硫键的形成也是不确定的^[7-10]。

虽然有关草鱼 IgM 的分离纯化和生化性质鉴定方面的研究已有论文发表^[11-14], 但结果分析表明, 这些论文对草鱼 IgM 的分析并不完整, 如没有准确的草鱼 IgM 多聚体的分子量数据, 也没有准确的草鱼 IgM 多聚体分子数的分析数据, 仅处于推测的阶段。为了补充上述有关草

鱼 IgM 的数据, 本文通过改善的分离纯化方法, 获得了纯化的草鱼 IgM, 利用还原性和非还原性 SDS-PAGE 分析方法, 明确了草鱼 IgM 多聚体的分子数, 并对多聚体的连接方式进行了推测, 进一步完善了对草鱼 IgM 的认识。

1 材料与方法

1.1 材料

草鱼血样来源于水产市场草鱼的尾动脉采血取样。

10 mL 预装柱购自 Bio-Rad 公司; Protein A-Sepharose 4B Fast Flow (P-9424)为 Sigma 公司产品; 宽范围分子量蛋白质 marker(2—212 kD)购自 New England Biolabs 公司; 高分子量蛋白质 marker 购自 GE Healthcare 公司; 低分子量标准蛋白质 marker 为中国科学院上海生命科学研究院研制; β -巯基乙醇购自 sigma 公司; 甘氨酸、Tris 碱、SDS 购自飞羿科技公司; 硫酸铵等其他常规生化试剂均为国药集团化学试剂有限公司生产。

1.2 草鱼 IgM 的分离纯化

将草鱼血样于 4℃ 静置过夜, 然后 4℃ 离心、4000 r/min, 15min。收集血清 100 mL, 置冰水中, 边搅拌边少量多次缓慢加入硫酸铵粉末, 达到 30%饱和度后, 于 4℃ 静置 1h, 在 4℃ 离心, 9700 r/min, 10min, 取上清。继续缓

收稿日期: 2010-09-29; 修订日期: 2011-05-15

基金项目: 国家 973 项目(2009CB118704)资助

作者简介: 陈丛琳(1985—), 女, 湖北省武汉市人; 硕士; 研究方向为分子生物学。E-mail: philomelchen@163.com

通讯作者: 戴和平, Tel: 027-68780716, E-mail: hpdai@ihb.ac.cn

慢加入硫酸铵粉末, 达到 50%饱和度, 于 4℃静置 1h, 然后在 4℃离心, 9700 r/min, 10min。弃上清, 沉淀溶于 6 mL 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)溶液中。对 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)透析, 中间换几次透析液, 36h 后奈氏试剂^[15]测透析外液无黄色。

收集透析后的血清, 量取总体积, 加入 1/10 体积的 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)混匀, 过 0.22 μm 滤膜。每次取 1 mL 过滤后的血清上样于柱床体积为 1.4 mL 的 Protein A 亲和层析柱, 6℃过夜。依次用 10 倍柱体积的 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)和 10 倍柱体积的 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)清洗未结合蛋白, 5 倍柱体积的 50 mmol/L 甘氨酸 (pH 3.0)洗脱结合蛋白。分管收集, 立即用 1 mol/L Tris-HCl (pH 10.5)中和。最后以 10 倍柱体积的 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)平衡柱子。收集的洗脱液用 Bradford 染色法测蛋白量, 合并浓度较高的收集管。

1.3 还原性 SDS-PAGE

还原性 SDS-PAGE 使用常规样品缓冲液(含 β-巯基乙醇), 其成分为: 100 mmol/L Tris-HCl(pH 6.8)、20%甘油、0.2%溴酚蓝、4%SDS、200 mmol/L β-巯基乙醇^[16]。蛋白样品与还原性样品缓冲液等体积混合, 沸水浴中 5min。SDS-PAGE 为 4%的浓缩胶, 10%的分离胶。

1.4 非还原性 SDS-PAGE

非还原性 SDS-PAGE 使用不含 β-巯基乙醇的样品缓冲液, 其成分为: 100 mmol/L Tris-HCl(pH 6.8)、20%甘油、0.2%溴酚蓝、4%SDS。按文献[10, 17]配制, 分离胶含 3%的丙烯酰胺和 0.5%的琼脂糖, 浓缩胶含 3%丙烯酰胺。蛋白样品与非还原样品缓冲液等体积混合, 沸水浴 5min^[18]。

1.5 SDS-PAGE 梯度胶检测

按文献[19]配置 1%—15%浓度梯度的聚丙烯酰胺分离胶, 浓缩胶含 3%丙烯酰胺。Protein A 纯化的 IgM 与非还原性样品缓冲液或还原性样品缓冲液等体积混合, 沸水浴 5min。

2 结果

2.1 草鱼 IgM 的纯化和还原性和非还原性 SDS-PAGE 分析

图 1a 显示, 采用 30%—50%饱和度的硫酸铵溶液能去掉血清中大部分杂蛋白, 沉淀下来大部分分子量为 75.8 kD 和 28.2 kD 的蛋白条带, 这与已经报道的草鱼 IgM 的重链和轻链的分子量基本符合^[12]。经过 protein A 亲和层析后, 这两条蛋白带得到大大地纯化。lane 3 的蛋白上样量是 lane 4 的两倍, 可以清晰地看到在 75.8 kD 和 28.2 kD 之间看到一条 58.5 kD 的蛋白条带, 其分子量与已报道的草鱼 IgZ 重链(登录号 GQ480796.1, 427aa)理论分子量相似。图 1b 显示了用不含 β-巯基乙醇的非还原性样品缓冲液处理样品的 SDS-PAGE 分析结果, 得到纯化的完整草鱼免疫球蛋白多聚体的分子量约为 832 kD, 是重链与轻链分子量之和的 8 倍。这说明草鱼免疫球蛋白 IgM 应是四聚体。

2.2 1%—15% 浓度梯度 SDS-PAGE

将纯化的草鱼 IgM 用还原性和非还原性样品缓冲液处理后, 在同一个 SDS-PAGE 浓度梯度胶进行电泳分析, 结果(图 2)。非还原草鱼 IgM 在大约 800 kD 处有一条主要蛋白条带, 与图 1b 非还原性 SDS-PAGE 结果相同, 应

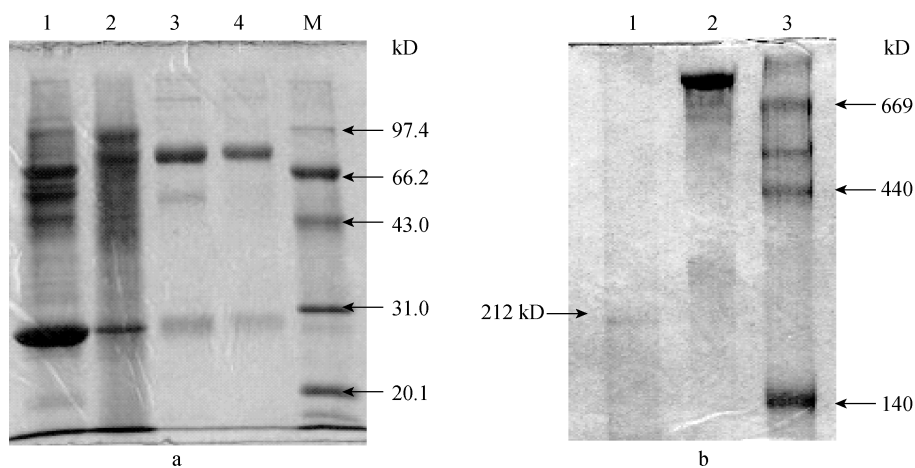


图 1 草鱼血清 IgM 的还原性 SDS-PAGE(a)和非还原性 SDS-PAGE(b)图谱

Fig. 1 Reducing (a) and non-reducing (b) SDS-PAGE of the purified grass carp serum IgM

a: 1. 草鱼血清; 2. 30%—50%饱和硫酸铵溶液沉淀的血清; 3 和 4. protein A 柱纯化的 IgM; M. 蛋白质 marker; b: 1. 低分子量 marker; 2. protein A 柱纯化的 IgM; 3. 高分子量蛋白质 marker

a: Lane 1, grass carp serum; Lane 2, Component of serum precipitated by 30%—50% ammonium sulfate saturated solution; Lane 3 and 4, IgM purified by protein A affinity chromatography; Lane M, protein marker; b: Lane 1, low molecular weight protein marker; Lane 2, IgM purified by protein A affinity chromatography; Lane 3, high molecular weight protein marker

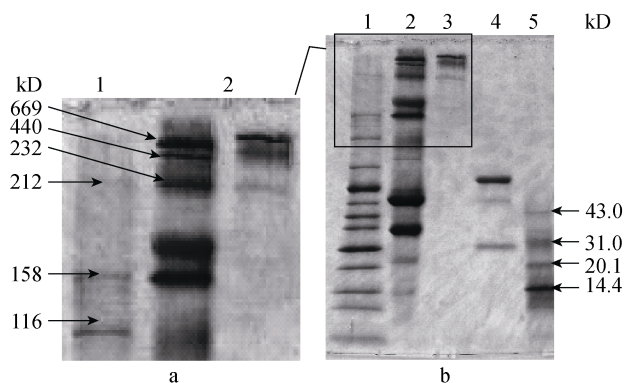


图2 草鱼血清 IgM 的 1%—15% SDS-PAGE 浓度梯度胶(a 是 b 中黑框部分的放大图)

Fig. 2 1%—15% SDS-PAGE gradient gel of the purified grass carp serum IgM(a magnifies the black rectangle region of b)

1. 宽范围分子量蛋白质 marker(2—212kD); 2. 高分子量蛋白质 marker; 3. 未还原 IgM; 4. 还原 IgM; 5. 低分子量蛋白质 marker
Lane 1, broad range protein marker(2—212kD); Lane 2, high molecular weight protein marker; Lane 3, non-reducing IgM; Lane 4, reducing IgM; Lane 5, low molecular weight protein marker

是 IgM 的四聚体。

另外, 在 212 kD 处及 440 和 669 kD 之间有较弱的蛋白条带, 推测是大约 800 kD 的四聚体在样品处理时解离产生的单体(208 kD)、二聚体(416 kD)、三聚体(624 kD)等次多聚体, 这与文献[10]对六种硬骨鱼的免疫球蛋白分析结果相似, 说明草鱼 IgM 四聚体的聚合常常通过非共价键, 单体间也存在二硫键。在同一个梯度胶上, 可以看见, 当纯化的草鱼 IgM 用还原性样品液处理后, 800 多 kD 的蛋白条带消失了, 出现了分子量 75.8 kD 和 28.2 kD 的这两个主要蛋白条带, 进一步证明草鱼 IgM 单体由两条重链(75.8 kD)和两条轻链(28.2 kD)组成, 四个单体聚合成四聚体。58.5 kD 蛋白条带有可能是 IgZ。

3 讨论

本文通过改进后的硫酸铵盐析法, 采用 30%—50% 饱和度的硫酸铵溶液沉淀草鱼 IgM, 发现虽然 30% 饱和度的硫酸铵溶液会沉淀一部分 IgM, 但大部分 IgM 仍留在上清中, 却可以去除大量的杂蛋白。当加入硫酸铵至 50% 饱和度后离心, IgM 全部在沉淀里, 上清几乎没有(数据未显示)。

根据已报道的用 Protein A 纯化硬骨鱼 IgM 的方法^[10], 本文在经硫酸铵盐析法初步纯化草鱼 IgM 后, 再用 Protein A 亲和层析法, 纯化获得了高纯度的草鱼 IgM。通过对纯化的草鱼 IgM 的还原性和非还原性 SDS-PAGE 分析, 获得的关于草鱼 IgM 的重链(75.8 kD)和轻链(28.2 kD)的分子量与已报道的文献^[12]基本符合, 且证明草鱼 IgM 是四聚体。

最近, 有报道发现草鱼血清中还有 IgZ 和 IgD^[20],

并测出重链序列, IgZ 理论分子量为 47.4 kD(登录号 GQ480796.1, 427aa, 以下称为 IgZ-1)或 63.4 kD(登录号 GQ201421.1, 571aa, 以下称为 IgZ-2)。前者小于 58.5 kD, 推测本文图 1a 中出现的 58 kD 条带可能是 IgZ 重链, 但尚需进一步研究予以证实。在哺乳动物中, protein A 特异性识别 IgG Fc 段的主要位点在 C_γH₂ 和 C_γH₃ 之间, 另外, V_HIII 骨架区也是其识别人 IgM 的一个位点^[10]。或许硬骨鱼 Ig 中存在相似的结合位点。序列比对发现草鱼 IgM (DQ417927.1)和 IgZ-2 恰好在这两个区域有相同氨基酸序列, IgZ-1 只在 CH₂ 和 CH₃ 之间有, 这为 protein A 纯化 IgM 的同时也可能纯化出部分 IgZ 提供了依据。草鱼 IgZ 的 CH1、CH2、CH3 和 CH4 与草鱼 IgM 相应区域的核苷酸有 91.9%、92%、48.1% 和 49.7% 的相同。而 IgD (GQ429174.1)与 IgM 的相似性很低。

有文献^[14]报道, 草鱼经嗜水产气单胞菌疫苗免疫, 将免疫血清与正常血清一起电泳, 发现前者多于后者的一条带, 将其切下, 透析后直接电泳大小有 309 kD, 变性电泳得到重链 52 kD, 轻链 26 kD。根据 309 kD 约是 52 和 26 kD 之和的 4 倍, 即下结论 309 kD 蛋白是草鱼四聚体 IgM。这一结论表示 IgM 单体只由一条重链和一条轻链组成, 这显然与正常鱼类 IgM 结构相悖, 也不符合草鱼 IgM 重链的测序结果。

本实验结果证明, 草鱼 IgM 的单体应是由两条重链(75.8 kD)和两条轻链(28.2 kD)组成, 完整免疫球蛋白分子量约为 832 kD, 是 4 个单体的总和。这与硬骨鱼 IgM 的分子量范围(重链 70—81 kD、轻链 22—32 kD、完整分子 610—900 kD)^[11]一致。在非还原性 SDS-PAGE 和浓度梯度胶实验中, 所用的非还原性与还原性样品缓冲液相比, 缺少 β-巯基乙醇。β-巯基乙醇破坏二硫键, 而变性剂 SDS 可破坏部分非共价键, 所以一部分四聚体 IgM 解离为单体、二聚体或三聚体。推断构成四聚体的 IgM 单体间也拥有不同程度的二硫键交联, 导致氧化还原亚单位的不同组合。

本研究首次以实验数据证明了完整的草鱼 IgM 是四聚体构型, 为鱼类 IgM 结构的研究提供了准确的实验证据, 为研究草鱼对病原体的免疫应答、疫苗效价测定和鱼病防治方面的研究提供了准确的数据基础。

参考文献:

- [1] Wilson M R, Warr G W. Fish immunoglobulins and the genes that encode them [J]. *Annual Review of Fish Diseases*, 1992, 2: 201—221
- [2] Douglas P. Anderson [M]. *Fish Immunology*. 1974, 85—87
- [3] Kaattari S L, Evans D A. Varied redox forms of teleost IgM: An alternative to isotypic diversity [J]. *Immunological Reviews*, 1998, 166: 133—142
- [4] Chen W F, Jin B Q. *Medical Immunology* (edit 4) [M]. Bei-

- jing: People's Sanitation Press. 2005, 37—38 [陈慰峰, 金伯泉. 医学免疫学(第四版). 北京: 人民卫生出版社. 2005, 37—38]
- [5] Kobayashi K, Hara A, Takano K. Studies on subunit components of immunoglobulin from a bony fish, the chum salmon (*Oncorhynchus keta*) [J]. *Molecular Immunology*, 1982, **19**: 95—103
- [6] Lobb C J. Covalent structure and affinity of channel catfish anti-dinitrophenyl antibodies [J]. *Molecular Immunology*, 1985, **22**: 993—999
- [7] Sanchez C, Dominguez J. Trout immunoglobulin populations differing in light-chains revealed by monoclonal-antibodies [J]. *Molecular Immunology*, 1991, **28**: 1271—1277
- [8] Lobb C J, Olson MOJ, Clem L W. Immunoglobulin light chain classes in a teleost fish [J]. *Immunology*, 1984, **132**: 1917—1923
- [9] Sanchez C, Dominguez J, Coll J. Immunoglobulin heterogeneity in the rainbow-trout, *Salmo gairdneri* Richardson [J]. *Fish Diseases*, 1989, **12**: 459—465
- [10] Erin S. Bromage, Jianmin Ye, *et al.* Use of staphylococcal protein A in the analysis of teleost immunoglobulin structural diversity [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2004, **28**: 803—814
- [11] Huang Y D. Purifying immunoglobulin M of grass carp in serum [J]. *Journal of Nanjing Agricultural Academy*, 1995, **23**: 26—29 [黄永东. 从草鱼血清中提取抗草鱼出血病的 IgM. 南京农专学报, 1995, **23**: 26—29]
- [12] Ding W D, Cao L P, Cao Z M. Purification of serum IgM from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and preparation of rabbit sera anti-IgM [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(1): 164—169 [丁炜东, 曹丽萍, 曹哲明. 草鱼血清 IgM 蛋白的纯化及抗血清的制备. 水生生物学报, 2010, **34**(1): 164—169]
- [13] Shen J Y, Thompson K D, Adams A, *et al.* Production and characterization of monoclonal antibodies against *Carassius auratus gibelio* IgM [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2006, **30**(3): 421—424 [沈锦玉, Thompson K D, Adams A, 等. 银鲫 IgM 的纯化及其单克隆抗体的制备. 水产学报, 2006, **30**(3): 421—424]
- [14] Li Y N. Analysis on immunoglobulin induced by inoculation of *Aeromonas hydrophila* in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus* cuvier et valencinnes) [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2001, **47**(2): 132—138 [李亚南. 嗜水产气单胞菌诱导的草鱼免疫球蛋白分析. 动物学报, 2001, **47**(2): 132—138]
- [15] Shi Y Z, Xiong X X, Chen X X. The chromogenic reaction of ammonium ion with Nessler's reagent and the nitrogen determination by the photometric analysis [J]. *Journal of Wuhan Yeyin University of Science and Technology*, 1998, **21**(1): 40—43 [史雅珍, 熊新向, 谌翔希. 奈氏试剂与铵离子的显色反应及光度法定氮. 武汉冶金科技大学学报, 1998, **21**(1): 40—43]
- [16] Joseph Sambrook, David W Russell. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.) [M]. Beijing: Science Press. 2002, 1583
- [17] P P Suresh Babu, K M Shankar, B R Honnananda, *et al.* Isolation and characterization of immunoglobulin of the Indian major carp, rohu [*Labeo rohita* (Ham.)] [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, **24**: 779—783
- [18] Zhang Y A. Cloning and expression of the genes encoding the immunoglobulin of mandarin fish, *Siniperca chuatsi* [D]. Thesis for Doctor of Science. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan. 2001 [张永安. 鳊免疫球蛋白基因的克隆与表达研究. 博士学位论文. 中国科学院水生生物研究所, 武汉. 2001]
- [19] Frederick M A, Roger B, Robert E K, *et al.* *Current Protocols in Molecular Biology* [M]. John Wiley & Sons Inc. 1995, 3507—3512
- [20] Xiao F S, Wang Y P, Yan W, *et al.* Ig heavy chain genes and their locus in grass carp *Ctenopharyngodon idella* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, **29**(4): 594—599