

研究简报

黄颡鱼血清免疫球蛋白的纯化及分子量的初步测定

黄艳青^{1,2} 王桂堂^{1*} 孙 军¹ 陈孝煊²

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070)

PURIFICATION AND MOLECULAR WEIGHT DETERMINATION OF SERUM IMMUNOGLOBULIN FROM *PSEUDOBAGRUS FULVIDRACO*

HUANG YarrQing^{1,2}, WANG GuirTang, SUN Jun¹ and CHEN Xiao Xuan²

(1. Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072; 2. College of Fisheries,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

关键词: 黄颡鱼; 免疫球蛋白; 纯化; 分子量

Key words: Bullhead catfish (*Pseudobagrus fulvidraco*), Immunoglobulin, Purification, Molecular weight

中图分类号: Q512 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2003)06-0654-03

免疫球蛋白(Immunoglobulin, 简称 Ig)在脊椎动物体液免疫中起着十分重要的作用。已经证实, 鱼类在受到微生物、寄生虫等病原体感染或接受人工免疫后, 都能产生由 Ig 介导的特异性体液免疫反应^[1,2]。早在 20 世纪 60 年代, 鱼类 Ig 就引起了一些学者的关注^[3]。迄今为止, 在大多数硬骨鱼类中只发现一种 Ig, 它类似哺乳动物的 IgM, 但其结构为 8 条重链和 8 条轻链组成的四聚体。随着人们在鱼类免疫学方面研究的逐步深入, 对一些重要经济鱼类如日本鳗鲡^[4]、大西洋鲑^[5]、大菱鲆^[6]、虹鳟^[7]、罗非鱼^[8]等血清 IgM 的结构、部分理化性质和免疫学特性已有所了解。我国有关鱼类 Ig 的研究起步较晚, 到目前为止只见于陈昌福等^[9]对草鱼体表和黏液中 Ig 的初步分析, 杨桂文等^[10,11]对鲤鱼胆汁、肠黏液和血清中 Ig 的比较, 林天龙等^[12,13]对欧洲鳗鲡血清中 Ig 及其单克隆抗体的初步研究, 张永安等^[14]对鳊鱼血清 Ig 的分离纯化及分子量的测定和张永安^[15]对鳊鱼 Ig 基因的克隆与表达研究。但对我国重要经济鱼类—黄颡鱼 Ig 的研究, 至今尚未见报道。

本文通过饱和硫酸铵(SAS)盐析沉淀, 甘露糖结合蛋白(Mannan binding protein, 简称 MBP)亲和层析柱对黄颡鱼的血清 Ig 进行分离纯化, 并通过 SDS PAGE 确定其纯度和分子量, 旨在为黄颡鱼 Ig 基本结构的阐明打下基础, 并为不同鱼类

Ig 的比较研究提供资料。

1 材料和方法

1.1 血清制备 黄颡鱼取自湖北省梁子湖。用无菌注射器从尾静脉采血, 室温静置 1h, 4℃ 过夜。次日 4000r/min 离心 15min, 吸取上清液, -20℃ 冻存备用。

1.2 Ig 的分离纯化 Ig 用饱和硫酸铵(SAS)盐析沉淀法进行分离。血清中加入 SAS(pH7.0)直至终浓度为 50% (V/V), 静置 2h 以上(冰浴中进行)。15,000r/min 离心 20min, 沉淀用两倍体积的 0.01mol/L PBS(pH7.4)重悬。重悬液在透析袋中用 PBS 透析 24—48h, 每天换液 5—8 次。透析好的溶液以 15,000r/min 离心 20min, -70℃ 冻存备用。

将粗提的 Ig 通过 MBP 亲和层析柱进行纯化。室温下用 5mL 免疫纯 MBP 预备缓冲液洗涤柱子。4℃ 下用 20mL 结合缓冲液以 1mL/min 的流速平衡柱子。血清在 4℃ TBS(20mmol/L Tris, 1.25mol/L NaCl, 0.020% NaN₃, pH7.4)中透析过夜, 以去除磷酸根离子。透析后血清以 1:1 与结合缓冲液稀释, 取 1mL 稀释血清上样进柱, 4℃ 孵育 30min。孵育后, 4℃ 下柱子用 42mL 结合缓冲液洗涤, 除去未结合的蛋白。柱子及免疫纯 R IgM 洗脱缓冲液恢复至室温, 加入 3mL 免疫纯 R IgM 洗脱缓冲液, 室温下孵育 1h 以上。室温下柱子用 45mL 洗脱缓

收稿日期: 2002-07-05; 修订日期: 2002-07-22

基金项目: 中国科学院知识创新工程领域前沿项目资助

作者简介: 黄艳青(1977—), 女, 湖北宜昌人; 华中农业大学水产学院硕士研究生; 现在中国科学院水生生物研究所做硕士论文

通讯作者: 王桂堂, Email: gwang@ihb.ac.cn

冲液洗脱。每 3mL 收集一管。收集的组分的蛋白含量于 280nm 条件下测出, 吸收值大于 0.02 的组分集中在一起。-70℃ 保存备用。具体操作参见说明书 (ImmunoPure R IgM Purification Kit, Pierce Chemical, Rockford, IL, USA)。纯化样品在-70℃ 保存备用。

1.3 Ig 的纯度及分子量测定 采用 Mini-Protein II Cell (BioRad) 按 Laemmli 系统^[6] 进行不连续 SDS-PAGE 垂直电泳, 检测样品中 IgM 的纯度和分子量。分离胶浓度为 12.5%, 浓缩胶浓度为 4%。样品置沸水浴中加热变性 3—10min, 冷却, 稍作离心后上样。在 25mA 电流下电泳 20min 后, 调电流至 35mA 继续电泳。所用标准分子量为 14.4kD、20.1kD、31kD、43kD、66.2kD、97.4kD (Sangon)。电泳后的凝胶用考马斯亮蓝进行染色, 待脱色至背景清晰后进行扫描。

2 结果与讨论

Ig 会被 2-巯基乙醇 (2ME) 还原降解为重链(H 链) 和轻链(L 链) 两个亚单位。从 SDS-PAGE 凝胶电泳图谱上可以看到两条清晰的蛋白带(图 1)。由于 MBP 亲和层析柱只对 IgM 类免疫球蛋白具有结合力^[17], 所以这两条蛋白带代表黄鲇鱼 Ig 的重链和轻链。尽管在高浓度 IgM 的电泳带中, 除了有 2 条主要的蛋白带外, 还有少量杂蛋白带; 但是在低浓度 IgM 的电泳带中却观察不到此现象。说明 MBP 亲和层析柱分离出的黄鲇鱼血清 Ig 纯度比较高。计算和分析结果表明, 黄鲇鱼血清 IgM 重链和轻链的分子量分别为 72.4kD 和 29.9kD。如果黄鲇鱼血清 IgM 在自然状态也与其他硬骨鱼类一样也为四聚体, 那么其总分子量的理论值应为 818.4kD。

鱼类血清 IgM 的纯化方法很多, 通常采用的有凝胶过滤层析和离子交换层析二者结合的方法^[8], 也有人采用 Protein

A 亲和层析技术来纯化鱼类血清 IgM^[17], 但通过这些方法获得的 IgM 的活性、纯度都有限, 而且操作步骤较为繁琐。因此目前使用较多且最为有效的方法是免疫亲和层析法, 它可以得到高纯度的鱼类 IgM^[5], 但在用这种方法纯化鱼类血清 IgM 之前, 必须有一个免疫鱼的过程, 比较费时费力。本研究采用的 MBP 亲和层析技术, 是一种常用于纯化哺乳动物血清 IgM 的有效方法, 近来的研究也证明 MBP 对多种鱼类的血清 IgM 也有不同程度的结合力^[17]。本研究结果也表明, 使用 MBP 亲和层析技术不仅能得到高纯度的黄鲇鱼血清 IgM, 而且具有操作简便、耗时少、对其他实验条件要求较低的特点, 是一种理想的、适用于实验室小量纯化鱼类 IgM 的有效方法。

鱼类 IgM 重链和轻链的分子量以及总分子量随着鱼种类的不同而存在差异, 其总分子量的变动范围估计在 700—850kD 之间^[18]。有时即使是同一种鱼, 由于所采用的纯化方法不一样, 得出的分子量结果也有不同^[19,20]。本研究测出的黄鲇鱼血清 IgM 的分子量符合有关文献所报道的硬骨鱼血清中 IgM 的分子量范围, 但它与鲇形目的斑点叉尾 (Ictalurus punctatus) IgM 的分子量有一定差别, 后者重、轻链分子量及总分子量分别为 70kD、23kD 和 744kD^[21]; 而与用 MBP 亲和层析柱分离出的白条双锯鱼 (Amphiprion frenatus) 血清 IgM 的分子量(重、轻链分子量及总分子量分别为 70kD、32kD、816kD) 较接近^[22], 与鲈形目的鳊鱼 (Siniperca chuatsi) 血清 IgM 的分子量(重、轻链分子量及总分子量分别为 72kD、29kD、808kD) 则更为接近^[14]。这到底是由于纯化方法造成的, 还是由于这些鱼类 IgM 本身的特性造成的, 还有待于进一步实验的证实。另外, 有关黄鲇鱼血清 IgM 的活性测定、IgM 四聚体结构的证实以及 IgM 基因的克隆等都还有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Nie P, Hoole D. Antibody response of carp, *Cyprinus carpio* to the cestode *Bothriocephalus acheilognathi* Yamaguti, 1934[J]. *J Parasitol*, 1999, **118**: 635—639

[2] Wang G T, Kim J H, Sameshima M, et al. Detection of antibody against the monogenean *Meterobothrium okamotoi* in tiger puffer by ELISA [J]. *Fish Pathol*, 1997, **32**: 179—180

[3] Filer J E. Immunoglobulin synthesis in neonatal nurse sharks (*Ginglymostoma cirratum*) [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1969, **31**: 365—371

[4] Hung H W, Lo C F, Tseng C C, et al. Humoral immune response of Japanese ell, *Anguilla japonica* Temminck & Schlegel, to *Pleistophora anguillarum* Hoshina, 1951(Microspora) [J]. *J Fish Dis*, 1996, **19**: 243—250

[5] Lund T. Genetic variation in immune parameters and association to survival in Atlantic salmon [J]. *J Fish Biol*, 1995, **46**: 748—758

[6] Estevez J, Leiro J, Sanmartin M L, et al. Isolation and Partial Characterization of Turbot (*Scophthalmus maximus*) Immunoglobulins [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1993, **105A**(2): 275—281

[7] Sanchez C, Babin M, Tomillo J, et al. Quantification of low level of rainbow trout immunoglobulin by enzyme immunoassay using two monoclonal antibodies [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1993, **36**: 65—74

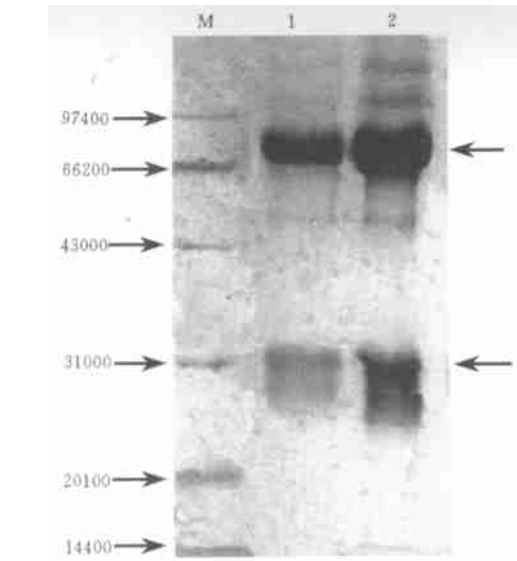


图1 黄鲇鱼血清纯化 IgM 的 SDS-PAGE (12.5%) 图谱
M. 分子量标准蛋白(kD); 1. 低浓度 IgM; 2. 高浓度 IgM
Fig.1 SDS-PAGE(12.5%) of purified serum IgM from the bullhead catfish Lane M, Molecular weight markers (kD); Lane 1, IgM of low concentration; Lane 2, IgM of high concentration

[8] Takemura A. Changes in an immunoglobulin M (IgM)-like protein during larval stages in tilapia, *Oreochromis mossambicus* [J]. *Aquaculture*, 1993, **115**: 233—241

[9] Chen C F, Ji G L, Luo Y L, *et al.* A preliminary analysis on immunoglobulin in the cutaneous mucus and intestine mucus [C]. *Transactions of Researches on Fish Diseases (II)*, Beijing: China ocean press, 1995: 21—25. [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), 北京: 海洋出版社, 1995, 21—25]

[10] Yang G W, An L G, Wang C F, *et al.* Comparative studies on the immunoglobulin in skin mucus and serum of Carp [J]. *Zoological Research*, 1998, **19**(6): 489—492. [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. 动物学研究, 1998, **19**(6): 489—492]

[11] Yang G W, An L G, Wen W J, *et al.* Comparative studies on the immunoglobulin in bile and serum of *Cyprinus carpio* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1998, **22**(3): 199—203. [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. 水产学报, 1998, **22**(3): 199—203]

[12] Lin T L, Chen Q, Yu F S, *et al.* Purification and partial characterization of serum immunoglobulin in *Anguilla anguilla* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2001, **25**(1): 52—57. [林天龙, 陈强, 俞伏松, 等. 欧洲鳗鲡血清免疫球蛋白纯化及部分特性分析. 水产学报, 2001, **25**(1): 52—57]

[13] Lin T L, Chen Q, Gong H, *et al.* Production and characterization of monoclonal antibodies against *Anguilla anguilla* IgM [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2001, **25**(6): 532—537. [林天龙, 陈强, 龚晖, 等. 欧洲鳗鲡免疫球蛋白单克隆抗体的制备与特性. 水产学报, 2001, **25**(6): 532—537]

[14] Zhang Y A, Nie P. Isolation, purification and molecular weight determination of serum immunoglobulin from mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1998, **22**(2): 192—194. [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. 水生生物学报, 1998, **22**(2): 192—194]

[15] Zhang Y A. Cloning and expression of the genes encoding the immunoglobulin of mandarin fish, *Siniperca chuatsi* [D]. Institute of hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Doctoral dissertation, 2001. [张永安, 鳊免疫球蛋白基因的克隆与表达研究. 中国科学院水生生物研究所博士学位论文, 2001]

[16] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄ [J]. *Nature*, 1970, **227**: 680—685

[17] Nevens J R. Affinity chromatographic purification of immunoglobulin M antibodies utilizing immobilized mannan binding protein [J]. *J Chrom*, 1992, **597**: 247—256

[18] Wilson M R, Warr G W. Fish immunoglobulins and the genes that encode them [J]. *Ann Rev Fish Dis*, 1992, **2**: 201—221

[19] Pilstrom L, Bengten E. Immunoglobulin in fish genes, express and structure [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1996, **6**: 243—262

[20] Lobb C J, Clem L W. Immunoglobulin light chain classes in a teleost fish [J]. *J Immunol*, 1984, **132**: 1917—1923

[21] Lobb C J, Clem L W. Distinctive subpopulations of catfish serum antibody and immunoglobulin [J]. *Mol Immunol*, 1983, **20**: 811—818

[22] Cobb C S. Acquired immunity to amyloodiniosis is associated with an antibody response [J]. *Dis Aquat Org*, 1998, **34**: 125—133