

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00164

草鱼血清 IgM 蛋白的纯化及抗血清的制备

丁炜东 曹丽萍 曹哲明

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业部水生动物遗传育种和养殖生物学重点开放实验室, 无锡 214081)

摘要: 采用盐析法、重组蛋白 A(HiTrap rProteinA Sepharose)亲和层析法分离纯化草鱼血清中的 IgM, 并通过 SDS-PAGE 及 Western-blot 技术对纯化蛋白的部分特性进行分析比较并制备兔抗 IgM 抗血清。结果表明: 33% 硫酸铵溶液可以沉淀血清中大部分蛋白, 但电泳条带仍较多, 其中含有 78 kD 和 28 kD 的条带, 因此仅可作为免疫球蛋白粗提的方法; 而 rProteinA 亲和层析法所提蛋白则仅有上述重链(78 kD)和轻链(28 kD)。Western-blot 显示, 鼠抗人 Ig 抗体可与 78 kD 及 28 kD 条带发生反应。rProteinA 亲和法提纯蛋白的纯度较高, 但含量较低, 条带较淡, 仅可作为实验室小量提纯草鱼 IgM 的有效方法。将提纯的蛋白免疫实验兔后可制得效价高达 1: 25600 的兔抗鱼 IgM 血清, 并测得血清蛋白总量和 IgM 含量分别为 25.87 mg 和 4.5 mg, IgM 占血清蛋白总量的 17.39%。本实验所采用的蛋白 A 亲和层析法提取草鱼血清 IgM 可以方便、快捷地获得高纯度的产物, 适合在实验室中纯化鱼类 IgM。同时本研究所制备的兔抗草鱼 IgM 血清也为今后的相关研究工作打下基础。

关键词: 草鱼; 蛋白 A 亲和层析法; 免疫球蛋白; 兔抗鱼 IgM 血清; 酶联免疫吸附分析

中图分类号: Q816 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2010)01-0164-06

抗体是在宿主对抗原刺激的免疫应答过程中, 由淋巴细胞产生的一类能特异性识别并中和相应抗原的具有免疫功能的球蛋白。作为体液免疫系统中重要的免疫效应分子, 免疫球蛋白是有颌类脊椎动物所特有的^[1]。免疫球蛋白由重链和轻链组成, 根据重链(Heavy chain, H 链)恒定区化学结构的不同, 相应的免疫球蛋白被划分为多种类型, 分别为免疫球蛋白 M(IgM)、免疫球蛋白 D(IgD)、免疫球蛋白 A(IgA)、免疫球蛋白 E(IgE)和免疫球蛋白 G(IgG)。而目前硬骨鱼类中已经分离到的免疫球蛋白包括 IgM、IgD、IgZ 和 IgT^[2]。IgM 是一类存在于所有有颌类脊椎动物中的抗体, 其重链从软骨鱼类到哺乳类中都具有较高的保守性^[3]。近年来国内外对鱼类 IgM 进行了广泛研究, 如斑点叉尾鲷^[4]、海鲢^[5]、大西洋鳕^[6]、大西洋鲑^[7]、虹鳟^[8]、鲤^[9]、鳊^[10]、牙鲆

和石斑鱼^[11]、斑马鱼^[12]等。

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)是我国内陆水域主养的优质鱼类, 20 世纪 60 年代以来其产量占我国淡水鱼产量的 20%。近年来, 亲鱼选择的盲目性及人工近亲繁殖已导致主要经济性状退化、生长速度减慢、性成熟个体变小、抗逆力下降等^[13]问题, 环境污染致使其天然种群数量明显下降和种质资源破坏。对淡水草鱼, 国内学者^[14-16]曾研究过它的免疫应答, 推断草鱼免疫应答中可能有一种含有较多二硫键的类似于 IgM 某些特性的大分子蛋白质, 但没有对其性质作进一步的研究。本文主要利用蛋白 A 亲和层析的方法对草鱼血液中免疫球蛋白进行提取纯化, 并通过 SDS-PAGE 及 Western-blot 技术对纯化蛋白的部分特性进行分析比较, 并用纯化的草鱼 IgM 免疫实验兔制备抗血清, 测定了总血清蛋白中

收稿日期: 2008-04-16, 修订日期: 2009-02-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(30471343); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心)项目(2007JBFC07, 2009JBFC01); 中国水产科学研究院热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室开放课题(2008-Y-004)资助

作者简介: 丁炜东(1977—), 男, 江苏如东人; 硕士; 主要从事鱼类遗传育种研究。E-mail: dingwd@126.com

通讯作者: 曹哲明, Tel: 0510-88296778; E-mail: caozm@ffrc.cn

IgM 的含量, 以期为进一步研究草鱼免疫系统和免疫机理及相关免疫检测研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

二龄草鱼 30 尾, 采自江苏邗江国家级四大家鱼原种场于 2003 年 5 月从长江下游围网捕获的鱼苗养殖至二龄的草鱼。体重 0.52—0.89 kg, 体长 34.7—43.2 cm。尾静脉采血, 4℃静置。

HiTrap rProteinA Sepharose 1 mL 预装柱: 北京韦氏博慧色谱科技有限公司产品; 溴化氰(CNBr)活化的 Sepharose 4B: Pharmacia 产品; SDS、透析袋、蛋白质分子量 Marker、鼠抗人 Ig 抗体购自上海生物工程公司; 考马斯亮兰蛋白测定试剂盒: 南京建成生物工程研究所产品; 0.45 μm 硝酸纤维素膜: 美国 Osmonics 产品。饱和硫酸铵液, 配制后用 28%氨水将硫酸铵溶液调 pH 至 7.0—7.2, 0.01 mol/L PBS, pH 为 7.4。

1.2 免疫球蛋白(IgM)的提取纯化

硫酸铵粗提: 吸取 10 mL 血清于小烧杯中缓慢加入 pH 7.0 的饱和硫酸铵溶液, 使其终浓度达 33%, 4℃过夜, 10000 r/min, 20min 离心后将上清加入终浓度为 33%的饱和硫酸铵, 4℃过夜, 同前离心取沉淀。沉淀溶于相同体积 0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 中, PBS 透析 48h, 期间更换透析液, 聚乙二醇(PEG-20000)浓缩, 获抗体粗提物, -70℃保存。

HiTrap rProteinA Sepharose 亲和柱提纯草鱼 IgM: 5 倍柱体积平衡缓冲液 PBS 平衡柱子后上样(样品为上述粗提物), 为使免疫球蛋白与 rProteinA 充分结合, 将样品在柱床上 4℃孵育 5h, 然后再用平衡缓冲液 PBS 洗脱未结合蛋白至 A=0, 甘氨酸洗脱液洗脱目的蛋白, 1 mL 分管收集, 为防止蛋白变性立刻用中和液中和, PEG-20000 浓缩, -70℃冻存备用。

1.3 蛋白浓度的测定

蛋白浓度的测定参照南京建成生物工程研究所生产的考马斯亮兰蛋白测定试剂盒说明书。样品中蛋白含量计算公式如下:

$$\text{蛋白含量}(\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{测定管OD值} - \text{空白管OD值}}{\text{测定管OD值} - \text{空白管OD值}} \times \text{标准管浓度}$$

其中标准管浓度为 0.615 μg/mL。

1.4 SDS-PAGE 电泳分析

采用 Mini-Protein cell III 系统(BioRad), 按文献[17]的方法进行不连续垂直凝胶电泳, 5%浓缩胶, 12%分离胶。样品与上样缓冲液(60 mmol/L 的 Tris-HCl, pH 6.8, 25%甘油, 0.1%溴酚蓝, 2%SDS, 13-巯基乙醇 14.4 mmol/L) 4:1 混合后, 沸水中煮 3min, 每孔上样量 15 μL。样品在浓缩胶时调电压 100 V, 分离胶时加大到 120 V, 电泳约 1.5h, 考马斯亮兰 R-250 染色。

1.5 蛋白质免疫印迹(Western-blot)试验

免疫球蛋白经 SDS-PAGE 后, MiniTran-Blot Transfer Cell(Bio-Rad)转移至 0.45 μm 的硝酸纤维素膜上(恒流 200 mA 转移 3h), 5%脱脂奶粉封闭过夜, 一抗为 1: 500 稀释的鼠抗人 Ig 多克隆抗体, 二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG, 1:2000 稀释, DAB 显色。

1.6 兔抗血清的制备

实验用新西兰大白兔购自浙江大学实验动物中心, 暂养 1 周后用草鱼 IgM 进行免疫, 免疫过程如表 1 所示, 同时以生理盐水免疫 1 只实验兔为空白对照。最后大量取血制备抗血清。

1.7 兔抗草鱼 IgM 血清效价测定

在每次加强免疫前耳静脉取血检测抗血清效价。具体步骤如下: 用包被液(pH 9.6, 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液)将草鱼 IgM 稀释至 20 μg/mL, 每孔加入 100 μL, 4℃冰箱过夜包被。然后用 5%的牛血

表 1 免疫程序
Tab. 1 Procedure of immunization for New Zealand rabbits

次数 Time	注射时间 Injection time	注射剂量 Injection dose	注射浓度 Injection concentration	抗原 Antigen	注射部位 Injection position
1	1	0.5	1	抗原+福氏完全佐剂	背部皮下多点注射
2	14	0.5	1	抗原+福氏不完全佐剂	背部皮下多点注射
3	21	0.25	1	抗原+福氏不完全佐剂	背部皮下多点注射
4	28	0.25	1	抗原+福氏不完全佐剂	耳静脉
5	35	1	1	抗原+福氏不完全佐剂	背静脉

清白蛋白于 37℃ 封闭 1h, 封闭结束后用含 0.05% Tween80 的 0.01 mol/mL PBST (pH 7.4) 洗涤液洗涤 3 次, 每次 5min。各孔依次加入稀释的兔抗草鱼 IgM 血清 100 μ L, 阴性对照孔加 PBS, 37℃ 温育 1h, 同上洗涤 3 次。每孔加入 100 μ L 羊抗兔 IgG-HRP, 37℃ 温育 1h, 同上洗涤 3 次。每孔加入 100 μ L 新鲜配置的 OPD-H₂O₂ 底物溶液, 于避光处反应 30min, 然后每孔加入 50 μ L 2mol/L 硫酸溶液中止反应, 于 492 nm 下检测每孔 OD 值。最后一次采血 2d 后从颈动脉采血, 制备抗血清, 同样用间接 ELISA 法检测效价。将所制备的抗血清过滤除菌后分装, -20℃ 保存。

1.8 血清总蛋白和血清 IgM 含量测定

根据 Bradford 及 BioRad 蛋白测定法^[18], 用考马斯亮蓝 G-250 染色, 在 595 nm 波长下, 在酶标仪上读取蛋白样品的光密度值。以标准 BSA (Sigma 公司) 系列稀释液作为蛋白质浓度标准, 计算血清总蛋白含量。采用夹心双抗 ELISA 测定正常草鱼血清中 IgM 的含量。具体过程参照文献[19]。

1.9 数据统计

采用生物统计软件 SPSS11.0 进行数据分析, 差异显著性分析采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 蛋白浓度测定结果

草鱼血清蛋白经 33% 硫酸铵粗提后所得蛋白浓度为 0.798 g/mL, 经 rProteinA 层析后为 0.556 g/mL。从结果可以看出, 33% 硫酸铵粗提法特异性不强, 混有其他杂蛋白, 因此浓度较高; 亲和层析的方法特异性较强, 但蛋白损失较大。

2.2 免疫球蛋白电泳图谱

33% 硫酸铵可以沉淀血清中大部分蛋白, 含有约十几条电泳条带, 包括 78 kD 和 28 kD 两条蛋白带, 与血清相比, 仅去除了少数几条蛋白带, 因此该法仅适于对蛋白进行粗提; 粗提物过 rProteinA Sepharose 亲和柱后所提蛋白较纯, 仅含有 78kD 和 28kD 两条蛋白条带, 亲和法所提蛋白浓度均较低, 条带较淡(图 1)。

2.3 Western-blot 检测

由图 1 B 可知, 鼠抗人 Ig 抗体可与草鱼 Ig 重链(78 kD 条带)及轻链(28 kD)发生反应, 因此这两条条带均为纯化的血清 IgM。

2.4 兔抗草鱼 IgM 血清效价 ELISA 检测结果

初免 2 周后, 免疫组实验兔的血清中就能检测

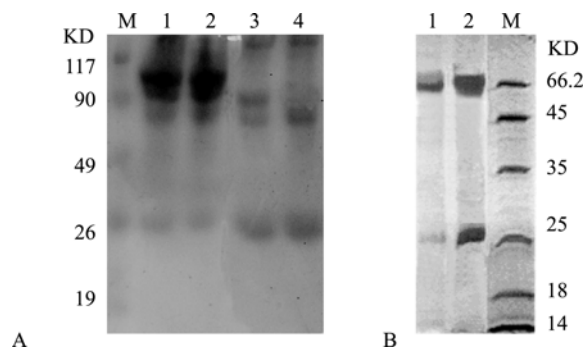


图 1 草鱼血清 IgM SDS-PAGE 图谱(A)和 Western-blot 图谱(B)
Fig. 1 Grass carp serum IgM was analyzed by SDS-PAGE (A) and Western-blot (B)

图 A 中, 1、2 为草鱼血清, 3 为硫酸铵沉淀提取 Ig, 4 为 r-Protein A 提取 Ig, M 为分子量; 图 B 中, 1 为 r-Protein A 提取 Ig, 2 为硫酸铵沉淀提取 Ig, M 为分子量

A: 1, 2 grass carp serum; 3. serum Ig of grass carp purified by SAS; 4. serum Ig of grass carp purified by r-Protein A; M: protein marker; B: 1. serum Ig of grass carp purified by r-Protein; 2. serum Ig of grass carp purified by SAS; M: protein marker

到 IgM 诱导产生的特异抗体, 在加强免疫后第 21、28、35 天将采集的血清稀释后测定抗血清效价。在第 35 天时达到最高效价(图 2), 而空白对照组不产生特异抗体, 且免疫组与空白组抗体效价值差异显著($P < 0.05$)。大量采血制备抗体后按 1:50 开始倍比稀释后, 测定效价的滴度高达 1:25600, 可以满足免疫检测的要求。

2.5 草鱼血清中总蛋白和 IgM 含量的测定

通过 Bradford 法及夹心双抗 ELISA 法对正常草鱼血清中血清总蛋白和 IgM 含量分别进行了测定(图 2)。测定时先对标准蛋白浓度进行测定并建立了回归方程为: $y = 0.132 + 1.450x$ 和 $y = 0.016 + 0.023x$, 从而测定血清总蛋白和 IgM 含量分别为 25.87 mg/mL 和 4.5 mg/mL, 正常草鱼血清中 IgM 占血清总蛋白的比例为 17.39%。

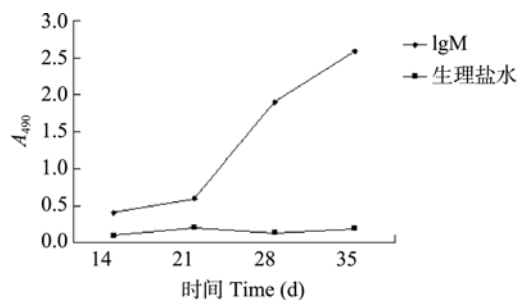


图 2 实验兔免疫 IgM 和生理盐水后的抗体滴度分布

Fig. 2 The titers of rabbit serum immunized with IgM protein and saline

3 讨 论

3.1 草鱼血清 IgM 蛋白的分离与纯化

鱼类具有比较原始的免疫系统, 包括免疫组织、免疫细胞和体液免疫因子三大类。大量的文献证明鱼类能够进行体液和细胞免疫应答, 其中免疫球蛋白是鱼类特异性体液免疫应答中最主要的介质, 因此对鱼类免疫球蛋白的研究理所当然地成为鱼类免疫学研究的重点和热点^[20,21]。

分步盐析法是蛋白质技术中最为经典的分离浓缩法。在高浓度的盐溶液中, 蛋白质会凝集并析出沉淀, 即盐析^[22]。人们通常采用经济适用的硫酸铵溶液作为盐析的盐溶液, 鱼类血清 IgM 纯化中通常采用饱和硫酸铵(SAS)盐析作为纯化蛋白的第一步。离子交换层析是依据离子交换的原理将蛋白质从大量缓冲液中分离出来, 适用于蛋白质粗提物的初始纯化, 蛋白质的等电点是进行离子交换层析的重要依据^[17]。在本实验中, 首先通过饱和硫酸铵作为纯化蛋白的第一步, 从电泳图谱可看出, 两次粗提后, 仍混有较多杂蛋白, 仅能作为粗提之用。目前纯化免疫球蛋白的方法除了常规的饱和硫酸铵(SAS)盐析外, 还有柱层析、离子交换层析、疏水层析及亲和层析等方法^[23], 在这些方法中, 亲和层析是依靠生物高分子所特有的生物活性进行分离提纯的特异性吸附层析, 具有高效、快速、纯化效果好的优点, 是提取 IgM 的最佳方法。细菌胞壁蛋白主要是指从金黄色化脓性葡萄球菌和 G 组链球菌中分离纯化出的 Protein A 和 Protein G, 它们能特异结合到 Ig 的 Fc 部分, 对不同的 Ig 有不同的亲和力, 因此可以提供快速简捷, 特异且高效的抗体纯化方法。在鱼类血清 IgM 纯化中, 一般采用 Protein A。这种方法比离子交换层析、凝胶过滤层析要快多了^[24-26], 商品化偶联了 Protein A 或 Protein G 的介质的出现使得这一技术的使用更加方便可行^[17]。但在采用 Protein A 柱纯化前应事先考虑柱对鱼类 IgM 的结合能力, 这种结合能力因鱼而异。据报道, 大菱鲆可结合 25%, 而鲤鱼仅能结合 13%^[35]。Scapigliati, et al.^[27]从 5 mL 鲈鱼血清中分离纯化出 8 mg 的 IgM, 取得率为 2.6%。鄢庆彬等^[28]从 6 mL 大黄鱼血清中分离纯化出 6 mg 的 IgM, 取得率为 1.6%。在本实验中我们从草鱼 10 mL 血清中纯化得到 13 mg 的 IgM, 其量也不是很多, 其主要原因可能是由于草鱼血清中 IgM 含量本身就比较低, 此外也可能是由于本实

验中所采用的是健康草鱼, 没有经人工免疫提高其血清中免疫球蛋白的浓度。同时也可能是蛋白 A 对草鱼 IgM 亲和力较低所致, 在 4℃ 温育 5h 后有可能还有小部分 IgM 没有结合到蛋白 A 上。有报道表明, 蛋白 A 和牙鲈血清 IgM 亲和力也比较低, 用蛋白 A 柱来分离纯化南极鱼种 *Trematomus newnesi* 时效果也很不理想。这种结合能力差异的原因, 目前仍没有统一的认识, 但鱼类免疫学家们推测可能与 Ig 分子中 Fab 片段系统发育有关。但亲和层析是根据抗原抗体特异性结合的原理, 所提蛋白纯度较高, 基本无其他杂蛋白, 特别是 HiTrap rProteinA Sepharose 亲和法操作简单, 周期短, 可以作为实验室小量提取免疫球蛋白的有效方法。

3.2 草鱼血清 IgM 含量分析

不同种类鱼类血清 IgM 浓度相差很大, 大多在 3.5—7 mg/mL, IgM 含量占血清总蛋白浓度的 7.5%—18%。本实验中, 草鱼血清中 IgM 和血清总蛋白含量分别为 1.16 mg/mL 和 17.57 mg/mL, IgM 占血清总蛋白的比例为 6.60%, 这跟鲤科鱼类 IgM 占血清总蛋白的比例相似。通过对草鱼 IgM 重链基因的分析可以发现草鱼 IgM 全部恒定区与鲤具有较高的同源性^[29], 这与本试验的结果具有一定的相似性。准确定量血清 IgM 水平, 对研究鱼类疾病控制, 特别是在说明感染后抗体产生以及调查疫苗免疫后抗体生成方面是很重要的^[24]。总血清 IgM 的含量也是评价鱼体健康的一个有价值的指示因子, 鱼类免疫学家在研究 IgM 时, 把 IgM 与血清总蛋白的含量分别测定出来, 并计算出二者的比值^[30]来评价鱼类的免疫状况。最初一些研究者采用兔抗血清做抗体的 SKID 的方法来定量 IgM 的水平^[33]。在这种方法中, 各位研究者所采用的纯化鱼类 IgM 的方法不同, 得到的鱼类 IgM 的纯度以及制备的兔抗鱼类 IgM 的纯度也各不相同, 而且 SKID 在灵敏度上有较高的限制, 对低浓度的 IgM 水平无法检测。因此, ELISA 以其独特的优势被更多的研究者选为定量血清 IgM 水平的方法, 它是一种非常灵敏的检测、定量方法。ELISA 测血清黏液 IgM 水平可达 0.1 μg/mL, 且仅需 2h^[29,31]。

本实验用纯化的草鱼 IgM 通过多次注射免疫实验兔, 结果得到效价高达 1:25600 的兔抗草鱼 IgM 血清, 并对血清中 IgM 含量进行了测定, 为进一步研究草鱼免疫机制及免疫指标和一些相关工作打下了基础。

参考文献:

- [1] Warr G W. The immunoglobulin genes of fish [J]. *Dev Comp Immunol*, 1995, **19**: 1—12
- [2] 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**: 6919—6924
- [3] Wilson M R, Wart G W. Fish immunoglobulin and the genes that encode them [J]. *Ann Rev Fish Dis*, 1992, **2**: 201—221
- [4] Ghaffari S H, Lobb C J. Cloning and sequence analysis of channel catfish heavy chain cDNA indicate phylogenetic diversity within the IgM immunoglobulin family [J]. *J Immunol*, 1989, **142**: 1356—1365
- [5] Amemiya C T, Litman G W. Complete nucleotide sequence of an immunoglobulin heavy-chain gene and analysis of immunoglobulin gene organization in a primitive teleost species [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 811—815
- [6] Bengten E, Leanderson T, Pilstrom L. Immunoglobulin heavy chain cDNA from the teleost Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): nucleotide sequences of secretory and membrane form show an unusual splicing pattern [J]. *Eur J Immunol*, 1991, **21**: 3027—3033
- [7] Hordvik I, Lindstrom C D V, Voie A M, *et al.* Structure and organization of the immunoglobulin M heavy chain genes in Atlantic salmon, *Salmo salar* [J]. *Mol Immunol*, 1997, **34**: 631—639
- [8] Hnansen J, Leong J A, Kaattari S. Complete nucleotide sequence of a rainbow trout cDNA encoding a membrane bound form of immunoglobulin heavy chain [J]. *Mol Immunol*, 1994, **31**: 499—501
- [9] Nakao M, Moritomo T, Tomana M, *et al.* Isolation of cDNA encoding the constant region of the immunoglobulin heavy-chain from common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 1998, **8**: 425—434
- [10] Zhang Y A, Nie P, Wang Y P, *et al.* cDNA sequence encoding immunoglobulin M heavy chain of the mandarin fish *Siniperca chuatsi* [J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 2003, **14**: 477—480
- [11] Cheng C A, John J A C, Wu M S, *et al.* Characterization of serum immunoglobulin M of grouper and cDNA cloning of its heavy chain [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2006, **109**: 255—265
- [12] Danilova N, Hohman V S, Kim E H, *et al.* Immunoglobulin variable-region diversity in the zebrafish [J]. *Immunogenetics*, 2000, **52**: 81—91
- [13] Liao Y M, Liu J L, Tang X L. The reason of commercial traits degeneration of four fish and advice for protection germplasm [J]. *Fishery Technology Message*, 1994, **21**(2): 62—63 [廖亚明, 刘金炉, 汤学林. 浅析“四大家鱼”性状退化的原因及重视种质保护的建议. 水产科技情报, 1994, **21**(2): 62—63]
- [14] Jiang Y L, Li Y, Yu P. Primary analysis on immune response of *Ctenopharygodon Idellus*. [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1991, **15**(4): 321—326 [江育林, 李燕, 于平. 草鱼免疫应答的初步研究. 水生生物学报, 1991, **15**(4): 321—326]
- [15] Cheng C F, Ji G L, Luo Y L, *et al.* Analysis of body and plasma Ig in *Ctenopharygodon Idellus*. Fish virology thesis (II) [C]. Beijing: Ocean Publish. 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]
- [16] Yang X L, Zuo W G. Relationship between water temperature and the immune response of grass carp, *Ctenopharygodon Idellus* C. ET V [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1997, **43**(1): 42—48 [杨先乐, 左文功. 水温与草鱼应答关系的研究. 动物学报, 1997, **43**(1): 42—48]
- [17] Wang J Z, Fang M. Protein technology manual [M]. Beijing: Science Press. 2002 [汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社. 2002]
- [18] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analyt Biochem*, 1976, **72**: 248—254
- [19] Davis C R, Many G D, Adkison M A, *et al.* Association of plasma IgM with body size, histopathologic changes, and plasma chemistries in adult Pacific herring *Clupea pallasii* [J]. *Dis Aquat Org*, 1999, **38**: 125—133
- [20] Scapigliati G, Romano N, Abeli L. Monoclonal antibodies in fish immunology: Identification, ontogeny and activity of T-and B-lymphocytes [J]. *Aqua*, 1999, **172**: 3—28
- [21] 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. 鳊鱼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]
- [22] Zhao Y F. Biochemical technology and apply (edit 2) [M]. Wuhan: Wuhan University Published. 1994 [赵永芳. 生物化学技术原理及应用(第二版). 武汉: 武汉大学出版社. 1994]
- [23] Cheng Y, Wang S Q, Han X D, *et al.* Purification and partial characterization of Immunoglobulin M from *Carassius auratus* Serum and skin mucus [J]. *Zoological Research*, 2003, **24**(2): 111—115 [陈鑫, 王石泉, 韩晓冬, 等. 鲫鱼血清和皮肤黏液 IgM 的分离纯化及部分性质的鉴定. 动物学研究, 2003, **24**(2): 111—115]
- [24] Fuda H, *et al.* Serum IgM during early development of masu salmon [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1991, **99A**(4): 637—643
- [25] Kobayashi K, *et al.* Ontogenic studies on the appearance of two classes of immunoglobulinulin forming cells in the spleen of the skate, *Bathyraja*, aleutica, a cartilaginous fish [J]. *Eur J Immunol*, 1985, **15**: 952—956
- [26] Zikan J. Binding of non-mammalian immunoglobulin to staphylococcal protein A [J]. *Fol Biol (Praha)*, 1980, **26**: 261—266
- [27] Scapigliati G, Romano N, Piechietti S. Monoclonal antibodies against sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) immunoglobu-

- lins: immunolocalisation of immunoglobulin-bearing cells and applicability in immunoassays [J]. *Fish Shell Immunol*, 1996, 6: 383—401
- [28] Yan Q P, Han Y F, Gao T X, *et al.* Purification of serum IgM from large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) and preparation of rabbit sera anti-IgM [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2006, 13(3): 475—479 [鄢庆枇, 韩一凡, 高天翔, 等. 大黄鱼血清 IgM 纯化及其兔抗血清的制备. 中国水产科学, 2006, 13(3): 475—479]
- [29] Wang X X, Sun B J, Chang M X, *et al.* The sequence and expression of the immunoglobulin M heavy chain cDNA of *Ctenopharyngodon idellus* [J]. *Jouranal of Fisheries of China*, 2008, 32(1): 13—20 [王欣欣, 孙宝剑, 昌鸣先, 等. 草鱼免疫球蛋白 M 重链基因的克隆及表达, 水产学报, 2008, 32(1): 13—20]
- [30] Magnadottir B, Gudmundsdottir B K. A comparison of total and specific immunoglobulin levels in healthy Atlantic salmon (*Salmon solar* L.) and in salmon naturally infected with *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1992, 32: 179—189
- [31] Estevez J, Leio J, Santamarina M T, *et al.* A sandwich immunoassay to quantify low levels of turbot (*Scophthalmus maximur*) immunoglobulin [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1995, 45: 165—174

PURIFICATION OF SERUM IGM FROM GRASS CARP (*CIENOYHARYNGODONI DELLUS*) AND PREPARATION OF RABBIT SERA ANTI-IGM

DING Wei-Dong, CAO Li-Ping and CAO Zhe-Ming

(Key Open Laboratory for Genetic Breeding of Aquatic Animals and Aquaculture Biology, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center of the Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081)

Abstract: Immunoglobulins are the primary humoral component of the acquired immune system. In order to know the ImmunoglobulinM (IgM) of grass carp (*Cienoyharyngodoni dellus*), two different isolating methods were applied to find the best way to purify serum IgM in the present study. The purity and molecular weight of the serum IgM were determined, and then the rabbit polyclonal antisera were prepared with the purified IgM. In this study, blood was collected with a syringe from the caudal sinus of 30 fish, and allowed to clot at 20°C for 20 min and at 4°C for 30 min. Serum was obtained by centrifugation at 500 g to remove cells and at 15000 g to remove particulate matter, and stored frozen at -80°C. Firstly, 33% ammonium sulfate precipitation was used to purify the serum, the result showed that most proteins in grass carp were precipitated and could not get high purity IgM, so it could only be a crude method. At the same time, HiTrap rProteinA Sepharose affinity was performed at 10°C to purify IgM. The partial characteristics of purified proteins were then analyzed and compared by SDS-PAGE and Western-blot. The results revealed that grass carp serum immunoglobulin purified by HiTrap rProtein A affinity chromatography had only two bands of 78 kD and 28 kD, the same two bands as those in serum. Western-blot analysis showed that the mouse anti-human Ig antibody can recognize bands of 78 kD and 28 kD. Sera anti-IgM of grass carp had been prepared by repeatedly immunized New Zealand rabbits with purified IgM. and the titers of anti-sera obtained up to 1:25600 examined by indirect ELISA. Total serum protein and the concentration of IgM of the normal sera of grass carp were determined by using the Coomassie blue dye binding method of Bradford and sandwich ELISA, the values being 25.87 mg/mL and 4.5 mg/mL, respectively. The percentage of IgM in the total serum protein was 17.39%. Measurements of IgM levels in serum from several fish species have been surveyed and the results point to a range between 0.25 and 23.5 mg/mL. The studies also pointed to considerable individual variations in serum IgM levels among fish, as occurs with other fish immune activities. These changes may be related to size and/or age, environmental conditions or disease status. It must be emphasized, therefore, that the serum IgM values obtained in the present work represent the mean of at least thirty healthy and non-immunized individuals of similar size kept under same conditions. In present work, the 13mg amount of purified IgM from 10 mL serum was not larger than other fish because the grass carp was not immunized with antigen such as BSA in the research. In conclude, the results indicated that protein A-sepharose affinity chromatography was feasible in purification of IgM of grass carp. The polyclonal antibody obtained could be used in correlative studies in future.

Key words: Grass carp; Protein A-sepharose affinity chromatography; Immunoglobulin M(IgM); Rabbit sera anti-IgM; ELISA