



研究简报

鳊血清免疫球蛋白的分离纯化 及其亚单位分子量的测定*

张永安 聂 品

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

ISOLATION, PURIFICATION AND MOLECULAR WEIGHT DETERMINATION OF SERUM IMMUNOGLOBULIN FROM MANDARIN FISH (*SINIPERCA CHUATSI*)^{*}

Zhang Yong'an and Nie Pin

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

关键词 免疫球蛋白, 纯化, 分子量, 鳊

Key words Immunoglobulin, Purification, Molecular weight, Mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)

免疫球蛋白 (Immunoglobulin, Ig) 在脊椎动物体液免疫中起着十分重要的作用。近年来, 鱼类 Ig 的研究已受到免疫学家的广泛关注。大多数硬骨鱼类只发现有一种 Ig, 类似于哺乳动物的 IgM, 但不是五聚体, 而是由 8 条重链 (H 链) 和 8 条轻链 (L 链) 组成的四聚体。然而, IgM 的结构在不同鱼类甚至同一种鱼的不同部位 (如血液、粘液和胆汁等) 有所差异^[1]。

对于鱼类整个免疫系统以及免疫应答规律等的基础研究, 都有赖于高纯度 Ig 的制备^[2]。然而许多年来鱼类 Ig 的分离纯化, 还主要是采用饱和硫酸铵沉淀、凝胶过滤和离子交换层析等技术^[3-5]。通过这些方法获得的 Ig, 其活性、纯度以及数量都是有限的, 而且操作步骤较为烦琐。本文报道了通过特异性配体亲和层析技术分离鳊 [*Siniperca chuatsi* (Basilewsky)] 血清 Ig, 并对其 H、L 链分子量进行测定。

近年来, 鳊作为名贵鱼类, 在我国淡水渔业中的重要性日益显著, 但是在高密度养殖的条件下, 鳊流行病时有发生。因此, 利用亲和纯化的鳊血清 Ig, 可以对其进行结构分析或作为抗原制备高特异性的抗体, 进而研究鳊的整个免疫系统及其免疫反应, 建立针对各种病原的免疫诊断方法, 实现鳊的健康养殖。

1 材料与方 法

1.1 材料鱼饲养 六尾鳊 (平均体重 400g, 购自武汉市江夏区一渔场) 饲养于两个 250L 的水族箱内, 每天投喂充足的活泥鳅 (2% 食盐水溶液体表消毒)。免疫前驯化 10d。驯化及免疫期间水温保持在 26 ± 1℃。

1.2 血清制备 基础免疫和 14d 后第一次加强免疫抗原剂量及免疫途径相同, 即每尾鱼腹腔注射

* 本工作得到中国科学院、武汉市科学技术委员会“晨光计划”和淡水生态及生物技术国家重点实验室的资助。
1997-10-17收到。

0.8mg 山羊 IgG(Sigma 公司, 溶于 0.8ml 0.6%NaCl 中并用 0.8ml Sigma 公司福氏完全佐剂乳化)。第 29d, 进一步加强免疫, 每尾鱼腹腔注射 0.8mg 山羊 IgG(溶于 0.8ml 0.6%NaCl 中, 不加佐剂)。7d 后, 从尾静脉采血, 室温下静置 1h, 待其凝固后置 4℃ 冰箱中过夜。次日以 4000rpm 离心 10min, 收集上层血清, -70℃ 保存备用。

1.3 免疫球蛋白纯化 亲和层析过程使用 Pharmacia 公司的 FPLC(快速蛋白液相色谱)系统。4ml 山羊 IgG-琼脂糖悬液(Sigma 公司)装入层析柱(10×0.5cm, BioRad 公司)中, 重力作用下逐步填充, 形成床体积 2ml; 80ml 0.01mol/L PBS(pH7.2, 含 0.5mol/L NaCl)预洗, 流速 1.0ml/min; 2ml 鳃免疫血清与 2ml PBS 混匀, 0.45μm 无菌针头滤器(Gelman 公司)过滤, 滤液上柱; 80ml PBS 洗涤; 用 10ml 洗脱液(0.1mol/L 甘氨酸-NaOH, pH11.0, 含 0.15mol/L NaCl)将鳃抗山羊 IgG 的抗体从层析柱上洗脱下来并作为单一分部收集(层析柱用 80ml PBS 平衡备用); 立即用 1.2ml 0.1mol/L Tris-HCl(pH7.2)中和, 置 0.01mol/L PB(pH7.2, 不含 NaCl)中 4℃ 透析 24h, 其间多次更换透析液^[2]; 低温下样品于透析袋中吹风浓缩; -70℃ 保存。

1.4 分子量及纯度测定 用 Mini-Protein™ II Cell(BioRad 公司)进行不连续 SDS-PAGE, 检测制备样品中 Ig 的纯度及其 H、L 链的分子量。电泳按 Laemmli 系统^[6]进行。浓缩胶浓度 4%, 分离胶 12.5%。待测样品与样品缓冲液(0.0625mol/L 的 Tris-HCl, pH6.8, 含 2% SDS, 10% 甘油, 0.05% 溴酚蓝)1:1 混合; 加入 2.5%(终浓度)2-巯基乙醇; 沸水浴中 5min, 冷却至室温后上样; 200V 恒压电泳 40min; 0.25% 考马斯亮蓝 R-250 溶液(40% 甲醇 - 10% 乙酸配成)固定并染色; 7.5% 乙酸溶液(含 5% 甲醇)脱色。用于 SDS-PAGE 的分子量标准蛋白(BioRad 公司)为磷酸化酶 b(97.4kD)、牛血清白蛋白(66.2kD)、卵清蛋白(45.0kD)、碳酸酐酶(31.0kD)、大豆胰蛋白酶抑制剂(21.5kD)和溶菌酶(14.4kD)。

2 结果与讨论

2.1 免疫球蛋白的分离纯化

免疫亲和层析技术用于鱼类 Ig 的分离纯化国外仅有几例报道^[2, 7, 8]。此技术是运用抗原-抗体结合

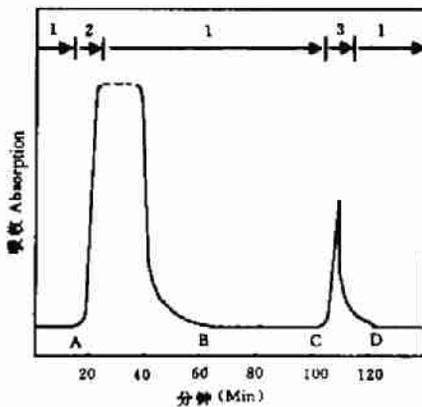


图1 鳃免疫血清的 FPLC 图谱

流动相: 1. PBS, 2. 免疫血清 + PBS, 3. 甘氨酸-NaOH 检测波长: 280nm 流速: 1.0ml/min
柱: Econo-Column

Fig.1 FPLC chromatograph of mandarin fish immune serum

mobile phase: 1. PBS, 2. Serum + PBS,
3. Glycine-NaOH λ : 280nm

flow rate: 1.0ml/min column: Econo-Column

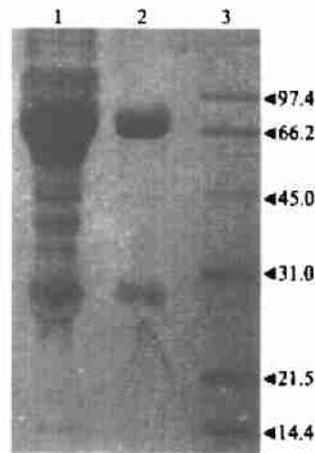


图2 鳃免疫血清及纯化免疫球蛋白的 SDS-PAGE(12.5%) 图谱

1. 血清, 2. 免疫球蛋白, 3. 分子量标准蛋白(kD)

Fig.2 SDS-PAGE(12.5%) of immune serum and purified immunoglobulin from mandarin fish

1. Serum, 2. Immunoglobulin,
3. Standard protein (kD)

的特性从免疫鱼血清中选择性地分离抗原的特异性抗体。以山羊 IgG-琼脂糖(特异性配体山羊 IgG 与基质琼脂糖通过共价键结合)为固相载体装入层析柱中。将鳊(抗山羊 IgG)的免疫血清通过该柱。这时样品中对配体有亲和力的 Ig 以次级键吸附到固相载体上,而其它无亲和力的物质则穿过基质流出层析柱并形成第一个层析峰。用起始缓冲液充分洗涤(直到紫外检测吸光值为零)以确保杂质完全去除。然后用碱性洗脱液将 Ig 从固相载体上洗脱下来并形成第二个层析峰。亲和层析洗脱曲线如图 1 所示。图中第一个层析峰 A—B 既宽又高,第二个层析峰 C—D 则较为细小,二者没有重叠,表明样品液中杂蛋白与 Ig 已完全分开,预示后者在其分部收集液中具有较高的纯度。收集含 Ig 的分部并用中和液平衡,这样可消除碱性洗脱液对 Ig 变性的潜在影响。在 PB 中充分透析脱盐并使纯化的 Ig 回复正常的生理状态。

2.2 分子量及纯度鉴定

在 2-巯基乙醇作用下,鳊血清 Ig 分子中共价二硫键被还原,多聚体的 Ig 被拆解为 H、L 链亚单位。在此条件下通过 SDS-PAGE,电泳图谱如图 2 所示。图上仅见分子量约为 72kD 和 29kD 的两条蛋白带,分别代表 Ig 的 H 链和 L 链。表明通过此法获得的鳊血清 Ig 纯度较高。这代表了国内首次分离得到纯度较高的鱼类血清抗体及其 H、L 链分子量的测定值。如果鳊 Ig 也象大多数硬骨鱼类 IgM 那样在自然状态下为四聚体,则其分子量理论值应为 808kD。这与文献 [1] 报道的硬骨鱼 IgM 的分子量范围(H 链 60—81kD, L 链 20—30kD,完整分子 610—900kD)一致。但尚需进一步研究以证实鳊血清中的 Ig 为四聚体的 IgM。

鳊免疫血清电泳图谱(图 2)上,与经过亲和层析纯化的血清 Ig 的 H、L 链对应部分蛋白带较宽。表明该免疫血清蛋白中抗体的含量较高,也证明作者采用的刺激鳊产生抗体的方法是成功的,其抗体产生的规律有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Wilson M R, Warr G W. Fish immunoglobulins and the genes that encode them. *Annual Review of Fish Diseases*, 1992, 2:201—221
- [2] Smith S A. Affinity purification of serum immunoglobulin from fish, *Techniques in Fish Immunology*, eds. Stolen et al, 125—130. New Jersey: SOS Publications, 1992
- [3] 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: 321—326
- [4] 陈昌福等. 草鱼体表和肠粘液中 Ig 的初步分析, 鱼病学研究论文集(第二辑), 北京: 海洋出版社, 1995, 21—25
- [5] Estévez J, Leiro J, Sanmartín M L, Ubeira F M. Isolation and partial characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) immunoglobulins. *Comparative Biochemistry Physiology*, 1993, 105A:275—281
- [6] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 1970, 227:680—685
- [7] Smith S A, et al. Isolation, purification, and molecular-weight determination of serum immunoglobulin from *Oreochromis aureus*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1993, 5:23—35
- [8] Hung H W, Lo C F, Tseng C C, Kou G H. Humoral immune response of Japanese eel, *Anguilla japonica* Temminck & Schlegel, to *Pleistophora anguillarum* Hoshina, 1951 (Microspora). *Journal of Fish Diseases*, 1996, 19:243—250