

鲈血清免疫球蛋白分离纯化及部分特性分析*

张福森^① 杨桂文^① 李国田^① 曹善东^② 安利国^{①**}

(^① 山东师范大学生命科学学院 济南 250014; ^② 临沂师范学院生命科学学院 临沂 276005)

摘要: 采用硫酸铵盐析、透析和 Sephadex G-200 凝胶过滤的方法纯化出鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 血清免疫球蛋白, 利用高效液相色谱 (HPLC) 结合 SDS-PAGE 的方法分析其性质。HPLC 结果表明: 纯化得到的 IgM 在经巯基乙醇处理后解离形成轻链和重链两个亚单位, SDS-PAGE 确定其分子量分别为 72 ku 和 28 ku。实验说明, HPLC 的检测方法具有广阔的应用前景; 而对鲈 IgM 的分析为鱼类免疫球蛋白的比较研究提供了基础资料。

关键词: 鲈; 免疫球蛋白; HPLC

中图分类号: Q956 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2004)05-09-04

Isolation, Purification and Partial Characterization of Serum Immunoglobulin in Sea Bass (*Lateolabrax japonicus*)

ZHANG Fu-Miao^① YANG Gui-Wen^① LI Guo-Tian^① CAO Shan-Dong^② AN Li-Guo^①

(^① College of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan 250014;

^② College of Life Sciences, Linyi Teacher's University, Linyi 276005, China)

Abstract: Immunoglobulin was purified from the serum of the sea bass *Lateolabrax japonicus* using ammonium sulfate precipitation, dialysis and Sephadex G-200 gel filtration, and was partially characterized on High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels (SDS-PAGE) under reducing conditions. The IgM treated with mercaptoethanol was dissociated into two subunits, the H and L chains. The relative molecular mass of the H and L chain was 72 ku and 28 ku, respectively, as determined by SDS-PAGE. The present results indicate that HPLC may have the great potential application to analyzing the immunoglobulin, and that the analysis of fish IgM may offer the basic information for further comparative studies.

Key words: *Lateolabrax japonicus*; IgM; HPLC

鱼类是低等的脊椎动物,能够产生特异性的体液免疫反应。在特异性体液免疫过程中,免疫球蛋白发挥着最重要的作用。对鱼类免疫球蛋白的研究有助于人们加深对鱼类特异性体液免疫机制的认识,从而为研制鱼类疫苗以及防治鱼病发生提供可靠的理论依据。目前,国外的研究多见于一些海水鱼类,如欧洲海鲈和海鲷^[1]、鳎^[2]、红鳍笛鲷^[3]、鳗^[4]、鲑^[5]等等;近几年来,对我国的几种淡水鱼类免疫球蛋白的

研究也有了相关报道,如鲤^[6]、鳊^[7]、鲫^[8]、黄颡鱼^[9]等等,但是,对我国重要的海产经济鱼类鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 的免疫球蛋白的研究尚未见报道。

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30070586);

** 通讯作者, E-mail: anlg@sdu.edu.cn;

第一作者介绍 张福森,女,25岁,硕士;主要从事鱼类免疫学研究; E-mail: zhufumiao@hotmail.com.

收稿日期: 2004-04-20, 修回日期: 2004-07-12

鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 是洄游性鱼类, 早春在淡水与海水交汇的出海口产卵, 适盐性广, 随季节变化移动于淡水、近海及至深海区。近年来, 鲈鱼的淡水和海水养殖都得到了较快发展, 但是, 各种病毒、细菌、真菌和寄生虫类疾病的蔓延给鲈鱼的养殖造成了很大的威胁。因而, 对鲈鱼特异性体液免疫的研究具有重要的意义。本文通过硫酸铵盐析、透析和 Sephadex G-200 凝胶过滤层析的方法首次分离纯化出鲈血清免疫球蛋白, 并利用高效液相色谱 (HPLC) 对经巯基乙醇处理后的 IgM 进行分析, 结合 SDS-PAGE 确定了 IgM 亚单位分子量。

1 材料与与方法

1.1 材料 鲈 5 尾, 体重 500 ~ 600 g, 正常无损伤, 取自济南市海鲜批发市场。

1.2 IgM 分离纯化

1.2.1 血清制备 将鲈断尾取血, 收集血液, 置室温下 1 h, 后放入 4℃ 冰箱静置过夜, 待血清充分析出, 3 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液 (血清约 11 ml)。

1.2.2 IgM 的分离纯化 将收集的上清液用生理盐水稀释后加入饱和硫酸铵至终浓度 45%, 放入 4℃ 冰箱静置过夜, 次日, 低温 4℃ 10 000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀, 用 2 ml 0.05 mol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液将沉淀复溶, 0.05 mol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液透析 24 h, Sephadex G-200 凝胶过滤层析, 洗脱液为 0.05 mol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液, 洗脱速度为 16 ml/h, 收集速度为每只试管 10 min, 紫外分光光度计 A_{280} 下检测, 收集第一峰, 即为 IgM, 冻干备用。

1.2.3 人免疫球蛋白工作标准液层析 将含有 IgM (900 ku)、IgA (390 ku)、IgG (150 ku) 的人免疫球蛋白工作标准液在与上述相同的试验条件下进行 Sephadex G-200 层析。

1.3 高效液相色谱 (HPLC) 分析

1.3.1 不解离 IgM 的 HPLC 分析 将收集到的鲈 IgM 在 Agilent 1100 LC 高效液相色谱分析仪上进行 HPLC 分析, Agilent Eclipse XDB-C18 柱,

工作温度 25℃, 紫外检测波长 254 nm, 流动相为 10 mmol/L PBS (pH 7.0), 流动相流速 0.9 ml/min, 进样量 10 μ l。

1.3.2 解离 IgM 的 HPLC 分析 将收集到的鲈 IgM 参照《实验免疫学》^[10] 方法用巯基乙醇处理使 IgM 解离, 然后在同样条件下进行 HPLC 分析。

1.4 SDS-PAGE 测定 IgM 亚单位分子量 采用 Mini-Protein II Cell (BioRad) 进行变性不连续垂直凝胶电泳, 浓缩胶浓度为 3.9%, 分离胶浓度为 12.5%, 取收集样品 10 ~ 20 μ l 与等体积的样品缓冲液混合, 沸水浴 4 min, 各孔分别按标准上样, 恒定电流 70 mA, 110 min, 电泳后的凝胶用考马斯亮蓝染色, 待脱色至背景清晰照相。所用标准分子量为 14.4、20.1、31.0、43.0、66.2、97.4 ku (Sagon)。

2 结果

2.1 Sephadex G-200 凝胶过滤层析纯化鲈血清 IgM 从 Sephadex G-200 的层析图 (图 1) 中可以看出, 鲈血清 IgM 呈单一峰, 计算人免疫球蛋白标准工作液中 IgM、IgA、IgG 的洗脱体积, 分别为 147、184、216 ml, 鲈血清免疫球蛋白洗脱体积为 152 ml, 已知人免疫球蛋白 IgM 分子量 900 ku, 推测鲈血清 IgM 在自然状态下分子量略小于 900 ku。

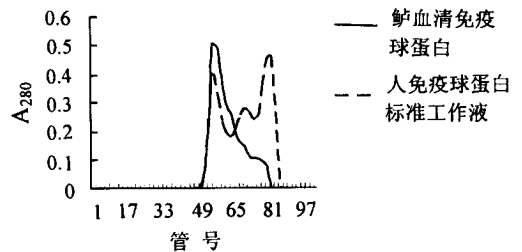


图 1 鲈血清 IgM 及人免疫球蛋白工作标准液 Sephadex G-200 凝胶层析图

— 鲈血清 IgM; - - - 人免疫球蛋白工作标准液 (IgM 900 ku, IgA 390 ku, IgG 150 ku)

2.2 高效液相色谱 (HPLC) 分析 IgM 解离性质 高效液相色谱 (HPLC) 图谱 (图 2、3) 表明, 纯化的鲈 IgM 在处理以前呈单一对称吸收峰,

保留时间为 2.471 min。在经巯基乙醇处理以后,在不同于原保留时间的位置新出现了两个明显的对称吸收峰,保留时间分别是 3.707 min 和 4.806 min,峰面积分别为 1 921.76 和 5 853.22,说明 IgM 解离成轻链和重链两种亚单位。

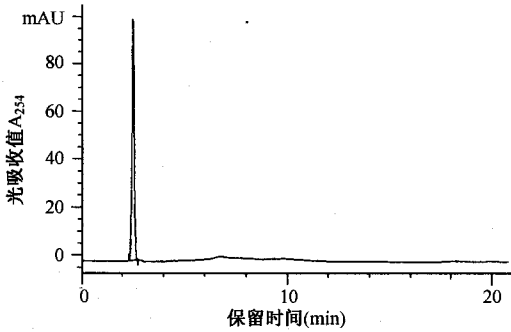


图 2 纯化的鲈血清 IgM 高效液相色谱 (HPLC) 图

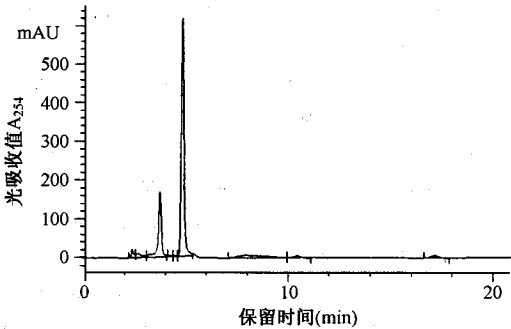


图 3 经巯基乙醇处理后的鲈血清 IgM 高效液相色谱 (HPLC) 图

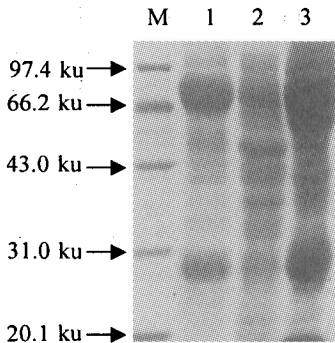


图 4 鲈血清 IgM 的 SDS-PAGE(12.5%) 图谱
M: 蛋白分子量标准; 1. 鲈血清 IgM; 2. 硫酸铵粗提物;
3. 全血清

图 4 可以看出,纯化后鲈血清 IgM 呈现两条清晰的蛋白条带,与鲈全血清及硫酸铵粗提物样品相比,杂蛋白带显著减少,这是 β -巯基乙醇的还原作用将 IgM 降解成重链(H 链)和轻链(L 链)。对电泳结果进行计算分析,可以确定鲈血清 IgM 重链和轻链分子量分别是 72 ku 和 28 ku。

3 讨论

本文通过硫酸铵盐析及凝胶过滤的方法首次从鲈血清中纯化出免疫球蛋白。HPLC 检测可以证明:纯化的天然鲈血清免疫球蛋白呈单一对称峰,而经巯基乙醇处理后,在不同于原保留时间处出现两个新的对称峰,说明鲈免疫球蛋白解离形成了两个亚单位,分别为轻链和重链。

硬骨鱼类 IgM 大多以四聚体形式存在,总分子量范围一般为 700 ~ 850 ku,重链的分子量范围一般为 60 ~ 81 ku,轻链的分子量范围一般为 20 ~ 30 ku^[11]。但是,随着物种的不同,鱼类 IgM 分子量也会表现出一定差异。我国重要的淡水经济鱼类鳊鱼 (*Siniperca chuatsi*),与鲈鱼同属鲈形目鲈科,其血清 IgM 亚单位分子量分别是 72 ku 和 29 ku^[7];而 Oswaldo 等测定的黑鲈 (*Dicentrarchus labrax*) IgM 重链和轻链的分子量分别是 78 ku 和 27.5 ku^[1]。本实验 Sephadex G-200 层析结果显示,未免疫鲈血清 IgM 的分子量略小于人 IgM(900 ku),SDS-PAGE 测定解离后重轻链亚单位分子量分别是 72 ku 和 28 ku。因此,鲈血清 IgM 也是以四聚体的形式存在的。

目前常用的鱼类血清 IgM 提取纯化技术有凝胶过滤技术、离子交换层析技术和亲和层析技术。离子交换层析法制备的样品纯度较低,可以在二次纯化分离中使用;亲和层析技术制备的样品纯度很高,但样品制备量较少,很难满足后续实验的需要;而凝胶过滤技术,不仅具有较高的分离纯度,并且还可用于大量样品量的制备,是很多实验室经常采用的方法。从本实验的结果看,Sephadex G-200 凝胶过滤能够较好的保持免疫球蛋白的天然存在状态而不发生降

解变性,峰值样品经 HPLC 检测具有较高的纯度。

在对鱼类血清 IgM 的分析鉴定中,SDS-PAGE 作为经典的方法被广泛采用。但是,在 SDS-PAGE 实验中,剧烈的处理常常会造成部分 IgM 降解和不规则聚合而在重链附近出现弥散性杂带^[8]。本文在实验过程中将高效液相色谱(HPLC)与 SDS-PAGE 相结合,可以发现 HPLC 具有检测迅速准确、灵敏度高的优势,并且待检样品的用量极少,从而能够很好的为后续实验保留更多样品。不仅如此,HPLC 的应用为进一步进行氨基酸组成分析^[12] 及以结合力为参数的抗原抗体反应监测^[13] 奠定了良好的基础。本实验通过凝胶过滤纯化的免疫球蛋白在 HPLC 图谱中呈现出单一的对称峰,经巯基乙醇处理后新出现的两个峰,图谱清晰、峰形对称,说明在 HPLC 检测的过程中既没有造成断链,也没有造成重轻链亚单位的不规则聚合,克服了在 SDS-PAGE 实验中经常出现的问题。利用 HPLC 快速检测鱼类 IgM 为鱼类体液免疫研究和水产免疫防护提供了一种实用的技术。

参 考 文 献

- [1] Oswaldo P, Ariadna S B, Pilar A P. Isolation and partial characterization of serum immunoglobulins from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 1996, **6**: 81 ~ 94.
- [2] Sigrun L, Bjarnheidur K G, Bergljot M. Humoral immune parameters of cultured Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 2001, **11**: 523 ~ 535.
- [3] Morrison R N, Nowak B F. Affinity purification and partial characterization of systemic immunoglobulin of the snapper (*Pagrus auratus*). *Aquaculture*, 2001, **201**: 1 ~ 17.
- [4] Uchida D, Hirose H, Chang P K, *et al.* Characterization of Japanese eel (*Anguilla japonica*) immunoglobulin M and its level in serum. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 2000, **127**: 525 ~ 532.
- [5] Magnadottir B, Gudmundsdottir B K, Gudmundsdottir S. The carbohydrate moiety of IgM from Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Comp Biochem Physiol*, 1997, **116B**(4): 423 ~ 430.
- [6] 杨桂文,安利国,王长法等. 鲤肠粘液与血清中免疫球蛋白的比较研究. *中国水产科学*, 1999, **6**(4): 109 ~ 110.
- [7] 张永安,聂品. 鳃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.
- [8] 陈焱,王石泉,韩晓冬等. 鲫鱼血清和皮肤粘液 IgM 的分离纯化及部分性质的鉴定. *动物学研究*, 2003, **24**(2): 111 ~ 115.
- [9] 黄艳青,王桂堂,孙军等. 黄颡鱼血清免疫球蛋白的纯化及分子量的初步测定. *水生生物学报*, 2003, **27**(6): 654 ~ 656.
- [10] 北京医学院微生物学教研室编. *实验免疫学*. 北京:人民卫生出版社, 1980, 337 ~ 339.
- [11] Biagio P, Maria R C, Umberto O. Characterization of serum immunoglobulin M of the Antarctic Teleost (*Trematomus bernacchii*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 2003, **135**: 349 ~ 357.
- [12] Anne C Lines. High-performance liquid chromatographic mapping of the oligosaccharides released from the humanized immunoglobulin, CAMPATHTM 1H. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, 1996, **14**: 601 ~ 608.
- [13] Charles G Sanny, Joseph A Price. Analysis of antibody-antigen interaction in mixtures containing reactive and nonreactive components using size-exclusion high-performance (pressure) liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 2001, **295**: 57 ~ 65.