

文章编号: 1674-7054(2018)04-0370-07

卵形鲳鲹 IgM 蛋白的纯化和抗血清的制备

张胜楠 吴莹 孙云 曹贞洁 周永灿

(海南大学海洋学院/海南省热带水生生物技术重点实验室/
海南省南海海洋资源利用国家重点实验室,海口 570228)

摘要: 为了获得卵形鲳鲹血清免疫球蛋白(IgM) 笔者首先采用硫酸铵二次盐析法对 IgM 进行粗提,然后利用蛋白 A 亲和层析法进行纯化,并以纯化后的 IgM 蛋白为抗原,制备该蛋白的多克隆抗体,最后利用酶联免疫吸附(ELISA)方法和 Western blot 技术检测所获抗血清的效价及效果。结果表明:用饱和硫酸铵二次盐析法提取的蛋白除了重链和轻链 2 条电泳带外,杂蛋白较多;利用蛋白 A 亲和层析法可获得纯度较高的 IgM 重链和轻链。用纯化的卵形鲳鲹 IgM 免疫小鼠,ELISA 方法检测获得的多抗血清效价高达 1:25 600。Western blot 结果显示,本实验制备的鼠抗卵形鲳鲹 IgM 血清可结合显示出目标条带,说明卵形鲳鲹 IgM 多克隆抗血清制备成功,为卵形鲳鲹的后续研究工作奠定了基础。

关键词: 卵形鲳鲹;蛋白 A 亲和层析法;免疫球蛋白 IgM;多克隆抗体

中图分类号: Q 78; S 917.4 **文献标志码:** A **DOI:** 10.15886/j.cnki.rdsxb.2018.04.002

卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*) 俗名金鲳,含有丰富的蛋白质和维生素,是华南地区重要的深海网箱养殖鱼类^[1]。近年来,随着市场需求和养殖规模的不断扩大,卵形鲳鲹病害问题频发,已成为制约卵形鲳鲹养殖业可持续发展的主要因素之一^[2]。为了防控疾病,抗生素类化学药物被广泛使用,虽可以快速、有效地抑制疾病,但是不能从根本上解决问题,而且易造成渔药残留、水环境污染等问题^[3]。目前,利用免疫学方法研制疫苗被认为是一种更有效、持久,而且是生态友好的途径。为了制备能有效抗多种病原体的疫苗,需要对卵形鲳鲹的免疫应答机制进行研究。免疫球蛋白(Immunoglobulin, Ig)是有颌脊椎动物中主要的体液免疫因子。免疫球蛋白分子的基本组成大多数为呈“Y”字型对称的 1 个四肽链结构,由 2 条重链和 2 条轻链组成,4 条肽链之间通过二硫键相连成为 1 个四聚体^[4]。每条肽链都包括可变区和恒定区,可变区是免疫球蛋白近氨基端的第 1 个结构域,在不同种类的免疫球蛋白中,这个结构域的氨基酸序列存在很大差别,也是抗原特异性结合的部位;恒定区是肽链上除可变区以外的较保守序列^[5]。在硬骨鱼类中,目前发现存在 4 种 Ig 类: IgM、IgD、IgT 和 IgZ^[6]。其中, IgM 是硬骨鱼类适应性免疫应答中最关键的免疫因子,存在于所有有颌脊椎动物中,也是有颌类脊椎动物进化过程中最先出现的免疫球蛋白,且非特异性的 IgM 还是机体天然免疫系统的有效屏障^[7]。目前,多种鱼类的 IgM 已经成功从其血清中分离纯化出来了,如大菱鲆^[8]、大黄鱼^[9]、鲫鱼^[10]、罗非鱼^[11]、草鱼^[12]、大西洋鲑^[13]、鲤^[14]、鲢^[15]、鳙^[16]、肺鱼^[17]等。目前纯化 IgM 的方法主要有:分步盐析法、葡萄糖凝胶过滤层析法、亲和层析法和离子交换层析法^[18]。其中亲和层析法又分为:蛋白 A 亲和层析法、免疫亲和层析法、甘露糖结合蛋白亲和层析法等。本研究主要使用蛋白 A 亲和层析的方法从卵形鲳鲹的血清中提取及纯化 IgM,利用纯化所得的 IgM 免疫小鼠以获得多克隆抗体,旨在为探索卵形鲳鲹 IgM 结构与理化特性提供材料支持,为了解卵形鲳鲹 IgM 在免疫应答中的作用奠定物质基础,为卵形鲳鲹的免疫系统及免疫防治的进一步研究提供材料。

收稿日期: 2018-09-10

修回日期: 2018-10-18

基金项目: 海南省重大项目(ZDKJ2016011); 海南省博士后科学基金(BSH-RST-2018001); 国家自然科学基金项目(31702379, 31560725)

作者简介: 张胜楠(1992-) 女,海南大学海洋学院 2016 级硕士研究生, E-mail: 940378713@qq.com

通信作者: 曹贞洁(1991-) 女,博士后,研究方向:水生生物病害防治及免疫, E-mail: 1057319886@qq.com;

周永灿(1968-) 男,教授,博导,研究方向:水生生物病害防治及免疫, E-mail: zychnu@163.com

1 材料与方法

1.1 材料 卵形鲳鲈 5 尾 购自海南省海口市 体质量约(450 ± 10) g 鱼体暂养于实验室循环系统中, 每日投喂饲料 2 次 水温恒定为 26 °C, 1 周后观察鱼体健康无病再开始试验。雌性 SPF 级小鼠 2 只, 体质量约(30 ± 2) g 购自广东医学实验动物中心。96 孔酶标板、蛋白 Marker (Page Ruler™ Unstained Protein Ladder) 美国 Thermo 公司生产; TMB 单组分显色液、考马斯亮兰、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 购自北京索莱宝科技有限公司; Western 及 IP 细胞裂解试剂盒(碧云天)、HRP 标记山羊抗兔 IgG 购自北京艾德莱科技有限公司; 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂 购自 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 卵形鲳鲈血清制备 为了获得更多的免疫球蛋白 将迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*) 扩大培养 30 °C 培养 16 h 加甲醛(终质量分数为 0.5%) 灭活 72 h 取 100 μL 灭活菌液接种于平板 经检测无菌落生长后 4 000 g 离心 15 min 收集灭活菌体 用 PBS 调整菌液浓度为 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 。初次免疫时 取灭活的迟缓爱德华氏菌与弗氏完全佐剂等体积混合并完全乳化后 卵形鲳鲈肌肉注射 500 μL; 初次免疫后第 14 天和第 21 天进行加强免疫 加强免疫时与弗氏不完全佐剂等体积混合并完全乳化 注射方式和剂量同初次免疫; 对照组为注射 PBS 加佐剂的免疫组。第 3 次免疫 1 周后 从卵形鲳鲈尾静脉取血 分装于 1.5 mL 离心管内。室温放置 1 h 后 置于 4 °C 冰箱过夜。次日取出 4 °C 800 g 离心 15 min 吸取上清 然后分装于 -80 °C 超低温冰箱中备用。

1.3 免疫球蛋白的提取纯化

1.3.1 饱和硫酸铵粗提 将卵形鲳鲈血清与等体积的 PBS(pH7.4) 混合后 加入饱和硫酸铵(pH7.0) 溶液, 使其终浓度为 33% 4 °C 过夜。次日取出 4 °C 15 000 g 离心 15 min 取上清加入饱和硫酸铵 使硫酸铵终浓度为 50% 4 °C 过夜。次日取出 4 °C 15 000 g 离心 15 min 弃上清 PBS(pH7.4) 重悬沉淀 4 °C 条件下透析除盐 2 d, 每天更换 2 次透析液。最后检测溶液中没有硫酸根离子和铵根离子则透析完成。透析产物分装后置于 -80 °C 超低温冰箱中保存备用。

1.3.2 蛋白 A 亲和层析纯化 用 5~10 倍柱体积的平衡缓冲液(20 mmol · L⁻¹ PBS 0.15 mol · L⁻¹ KCl, pH7.0) 平衡层析柱 取卵形鲳鲈血清与等体积的 PBS 混合稀释后上样 10 °C 柱上孵育 2.5 h。用 10 倍柱体积的平衡缓冲液洗脱未结合的蛋白 再用 10 倍柱体积的洗脱缓冲液(0.1 mol · L⁻¹ 甘氨酸 pH3.0) 洗脱已结合的蛋白 流速为 1 mL · min⁻¹, 以 1 mL 为单位收集结合蛋白于含 50 μL 碱性缓冲液(1 mol · L⁻¹ Tris-HCl) 的收集管中 使 pH 调至 8.0。洗脱蛋白 -80 °C 保存备用。

1.4 聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分析 配制 $w = 5\%$ 的浓缩胶 $\mu = 12\%$ 的分离胶。蛋白样品与蛋白上样缓冲液按 4:1 的比例混合后 沸水煮 10 min 冷却后上样。样品在浓缩胶时电压为 80 V, 当样品到达分离胶时 将电压升为 120 V。当溴酚蓝指示剂迁移至距前沿 1~2 cm 处时 停止电泳。电泳后 将凝胶置于 0.25% 考马斯亮蓝染液中 在水平摇床上染色 2~4 h。之后弃去染色液 加入脱色液脱色。

1.5 蛋白质量浓度测定 根据 BCA 蛋白质量浓度测定试剂盒说明书进行: 将 Cu 试剂与 BCA 试剂以 1:50 的比例混合 配制成需要的 BCA 工作液 将 10 μL 的 BCA 标准品用 PBS 进行稀释至终体积为 100 μL。混合均匀后 在 96 孔板中分别加入 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16 和 20 μL 的 BCA 标准品(各 3 个平行) 后加入 PBS 补足至终体积为 20 μL。分别取稀释 4 倍、6 倍和 8 倍的样品 20 μL 加入到 96 孔板中(各 3 个平行) 然后向标准品和样品的孔内均加入 200 μL 工作液。37 °C 下放置 30 min 用酶标仪测定 OD₄₅₀ 制作标准曲线 并计算 IgM 的蛋白质量浓度。

1.6 多克隆抗体的制备 实验鼠为 SPF 级小鼠 暂养 1 周 实验开始前先取少量小鼠血清 作为后续阴性对照组使用; 然后用纯化的卵形鲳鲈 IgM 蛋白免疫小鼠 注射剂量为 50 μg(表 1); 3 次免疫结束 1 周后 对小鼠眼球取血 以收集小鼠血清; 血清收集并分装后于 -80 °C 保存备用。

表1 卵形鲳鲹 IgM 多克隆抗体的制备
Tab.1 Preparation of the IgM polyclonal antibody in *Trachinotus ovatus*

免疫次数 Frequency	注射时间/d Injection time	注射剂量/ μg Injection dose	抗原 Antigen	注射部位 Injection site
1	1	50	抗原 + 弗氏完全佐剂 Antigen + Freund complete adjuvant	背部皮下多点注射 Multipoint subcutaneous injection on the back
2	14	50	抗原 + 弗氏不完全佐剂 Antigen + Freund incomplete adjuvant	背部皮下多点注射 Multipoint subcutaneous injection on the back
3	21	50	抗原 + 弗氏不完全佐剂 Antigen + Freund incomplete adjuvant	背部皮下多点注射 Multipoint subcutaneous injection on the back

1.7 酶联免疫吸附反应(ELISA)检测抗体效价 将纯化蛋白用包被液稀释至质量浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 加入到 96 酶标板内, 在 4°C 放置过夜, 弃掉包被液, 向每个孔内加入 $200 \mu\text{L}$ 洗涤液 PBST, 洗涤 3 次。然后向每个孔内加入 $100 \mu\text{L}$ 封闭液(含 5% 脱脂奶粉的 PBST), 37°C 封闭 1 h。将封闭液倒出, 加入 PBST 洗涤 3 次, 轻晃 5 min 后将洗涤液倒出, 将残余液体拍干。将制备的鼠抗血清进行梯度稀释(1:100, 1:400, 1:1600, 1:6400, 1:25600, 1:102400) 作为一抗, 每个梯度取 $100 \mu\text{L}$ (3 个平行) 加入到 96 孔板内, 37°C 孵育 3 h。阴性对照血清按同样方法操作, 空白对照为每孔加入 $100 \mu\text{L}$ PBS。孵育完成后洗涤方法同上, 二抗为 1:5000 稀释的辣根过氧化物酶(HRP) 标记的羊抗鼠 IgG, 37°C 孵育 3 h, 孵育完成后再次洗涤。最后加入 $100 \mu\text{L}$ 可溶性单组分 TMB 底物溶液显色, 37°C 孵育。当溶液显现蓝色时, 吸取 $50 \mu\text{L}$ 的 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2SO_4 加入到孔板内, 以终止颜色反应。用酶标仪测定 450 nm 处的吸光值。结果判定公式为: 抗体效价 = (免疫血清吸光值 - 空白对照吸光值) / (阴性对照管吸光值 - 空白对照吸光值), 比值大于 2.1 即判定为阳性, 否则为阴性。

1.8 卵形鲳鲹脾脏组织全蛋白提取 摘取健康卵形鲳鲹的脾脏, 用于提取组织中的全蛋白。提取方法参考 Western 及 IP 细胞裂解液说明书(碧云天): 准确称量脾脏质量, 在每 20 mg 组织中加入 $200 \mu\text{L}$ 裂解液, 然后用玻璃匀浆器匀浆, 直至组织充分裂解。 $12\,000 \text{ g}$ 4°C 离心 5 min, 吸取上清进行 SDS-PAGE 检测。

1.9 Western blot 检测 取上述所提卵形鲳鲹脾脏组织全蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 然后裁剪与蛋白胶大小一致的滤纸、硝酸纤维素膜(NC 膜)。提前将滤纸、NC 膜、海绵和蛋白胶放入预冷的转膜液中浸泡 10 min。打开转膜夹, 自上而下依次放上海绵、2 层滤纸、NC 膜、蛋白胶、2 层滤纸和海绵。合上转膜夹, 在低温环境 80 V 电压下转膜 3 h。转膜结束后, 取出 NC 膜, 用 PBST 由上至下冲洗 5 遍, 每次 1 min 左右。在平板内盛放 20 mL 的封闭液(含有 $w = 5\%$ 的脱脂奶粉 PBST), 37°C 静置封闭 2 h。封闭结束后, 洗涤方式同上。将上述制备的鼠抗血清用抗体稀释液(含有 $w = 2\%$ 的脱脂奶粉的 PBST 稀释 1000 倍) 作为一抗, 将 NC 膜放入盛有一抗的培养皿中, 37°C 下孵育 1 h, 洗涤方式同上。二抗为 1:5000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG, 37°C 下孵育 1 h。洗涤方式同上, 最后用 DAB 显色。

2 结果与分析

2.1 饱和硫酸铵法粗提卵形鲳鲹 IgM 使用饱和硫酸铵法粗提卵形鲳鲹 IgM, 结果见图 1。结果显示, 经硫酸铵沉淀可去除卵形鲳鲹血清中大部分的蛋白, 但除了预期大小的重链相对分子质量为 $(75 \sim 80) \times 10^3$ 和轻链相对分子质量为 $(25 \sim 30) \times 10^3$ 外, 仍有较明显的杂蛋白存在。

2.2 蛋白 A 亲和层析法纯化 IgM 经过蛋白 A 亲和层析法纯化 IgM, 结果见图 2。从图 2 中仅能看到重链和轻链 2 个条带, 表明蛋白 A 亲和层析的方法能有效地纯化卵形鲳鲹血清中的 IgM, 将血清中其他的杂蛋白去除, 达到纯化 IgM 的目的。

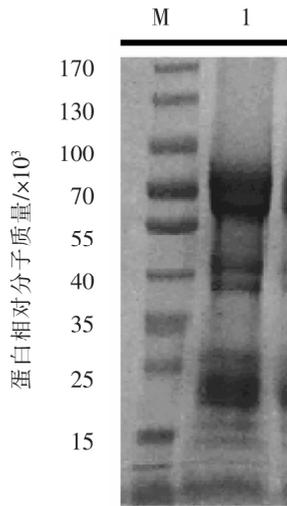


图1 卵形鲳鲆血清 IgM 粗提产物 SDS-PAGE 电泳

M: 蛋白相对分子质量标准 Marker; 1: 硫酸铵沉淀法粗提得到的 IgM

Fig.1 Detection of the crude IgM product extracted from the serum of *Trachinotus ovatus* by SDS-PAGE

Line M: Protein molecular weight marker; Line 1: The crude IgM product extracted by ammonium sulfate fractionation

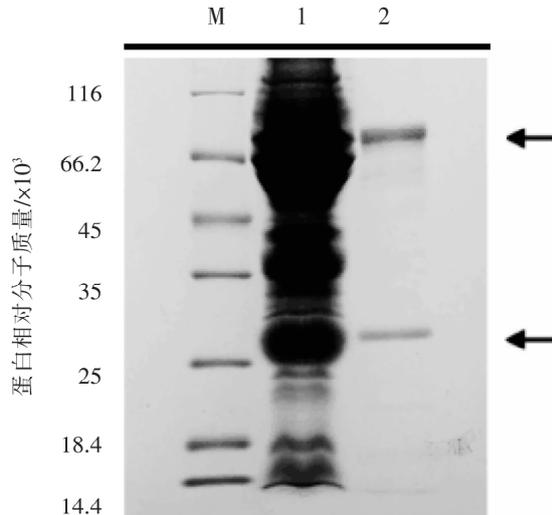


图2 卵形鲳鲆血清 IgM 纯化产物 SDS-PAGE 电泳

M: 蛋白相对分子质量标准 Marker; 1: 卵形鲳鲆全血清; 2: 蛋白 A 亲和层析分离得到的 IgM

Fig.2 Detection of the purified IgM products from the serum of *Trachinotus ovatus* by SDS-PAGE

Line M: Protein molecular weight marker; Line 1: The serum of *T. ovatus*; Line 2: The IgM product purified by Protein A-sepharose affinity chromatography

2.3 蛋白质量浓度测定 利用 BCA 法对纯化的卵形鲳鲆血清 IgM 浓度进行测定。结果显示 利用标准品建立的标准曲线方程为 $y = 0.688 2x + 0.103 9$ ($R^2 = 0.998 9$) (图3)。经计算 卵形鲳鲆血清 IgM 的蛋白质量浓度为 $1.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.4 鼠抗卵形鲳鲆血清 IgM 抗体效价检测 本研究制备的鼠抗卵形鲳鲆血清 IgM 抗体的效价检测结果见表2。结果表明 鼠抗卵形鲳鲆血清 IgM 抗体的效价可达 1: 25 600 效价较高, 可以满足免疫检测要求。

2.5 Western blot 检测 从图4可知 鼠抗卵形鲳鲆血清 IgM 抗体的重链和轻链均能显现出特异的条带, 这说明本研究的多克隆抗体制备成功, 且特异性强。

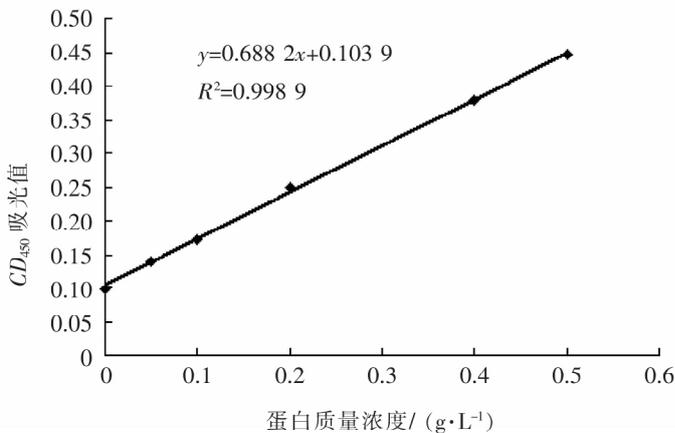


图3 BCA 法测定卵形鲳鲆血清 IgM 浓度标准曲线图

Fig.3 Standard curve of the IgM concentrations in the serum of *Trachinotus ovatus* detected by BCA

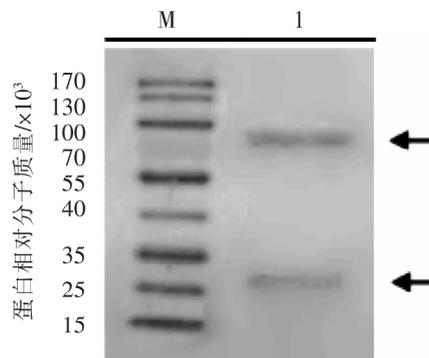


图4 Western Blot 检测多克隆抗体 IgM M: 预染 Marker; 1: 以卵形鲳鲆脾脏组织全蛋白为指示

Fig.4 Detection of the polyclonal antibody IgM by the Western blot

Line M: Prestained protein molecular weight marker; Line 1: The holoprotein of the spleen of *Trachinotus ovatus* used as an indicator

表2 ELISA 检测卵形鲳鲹血清 IgM 多克隆抗体

Tab.2 ELISA assay of mice against the serum IgM antibody of *Trachinotus ovatus*

项 目	抗体稀释度					
	1:100	1:400	1:1 600	1:6 400	1:25 600	1:1 024 000
免疫血清 OD 值 Immune serum OD	3.315	3.231	3.097	2.978	2.7	1.373
阴性血清 OD 值 Negative serum OD	1.298	1.362	1.265	1.075	0.998	0.975
结果判定 Result	+	+	+	+	+	-

注: 空白对照值平均为 0.046, “+”表示结果有效,“-”表示结果无效

Note: The mean value of the blank control was 0.046 “+” represents effective “-” represents invalid

3 讨 论

免疫球蛋白在动物免疫系统中起重要作用,是由 B 淋巴细胞表达的能够特异地结合特定抗原的一类免疫分子。作为硬骨鱼类血液中含有最高的 Ig 类, IgM 在免疫应答中起着抑制、黏附和溶解病原体的重要作用。Pucci 等^[19]研究表明,硬骨鱼类 IgM 大多以四聚体形式存在,总相对分子质量范围一般为 $(700 \sim 850) \times 10^3$,重链的相对分子质量范围一般为 $(60 \sim 81) \times 10^3$,轻链的相对分子质量范围一般为 $(20 \sim 30) \times 10^3$ 。冯娟等^[6]测得尖吻鲈、紫红笛鲷和青石斑鱼,这 3 种海水养殖鱼类的重链相对分子质量在 $(73.5 \sim 81.8) \times 10^3$ 范围内,轻链相对分子质量在 $(15 \sim 31) \times 10^3$ 范围内。Scapigliati 等^[21]测得鲈鱼血清 IgM 重链和轻链的相对分子质量分别为 $(74 \times 10^2$ 和 27×10^3 。鄢庆彬等^[9]纯化的大黄鱼血清 IgM 重链相对分子质量为 76×10^3 ,轻链为 28×10^3 。本研究纯化到的卵形鲳鲹血清 IgM 重链的相对分子质量为 $(75 \sim 80) \times 10^3$,轻链的相对分子质量为 $(25 \sim 30) \times 10^3$,与其他鲈形目鱼类 IgM 处在同一水平,表明本研究成功纯化得到了卵形鲳鲹血清 IgM,该纯化方法有效。

蛋白质会在高浓度的盐溶液中溶解度降低从而析出形成沉淀,称为盐析。盐析是一种被广泛使用的粗提蛋白质的方法。由于硫酸铵溶液经济适用,免疫球蛋白的盐析多使用硫酸铵。在鱼类 IgM 的纯化实验中多使用饱和硫酸铵盐析作为纯化的第 1 步。在 IgM 的纯化研究中,国内外学者所选择的盐析沉淀范围略有不同,一般来说两步盐析时饱和硫酸铵的浓度上限为 45%、50% 或 55%;下限多为 30%、33% 或 35%^[17],也有仅用一步盐析来粗提 IgM 的。本实验以 33% 为饱和硫酸铵浓度下限,50% 作为上限。33% 的饱和硫酸铵与血清混合后离心,将血清中的大部分的纤维球蛋白分离到沉淀中,之后利用 55% 的饱和硫酸铵将免疫球蛋白从上清液中粗提出来,粗提效果较好。然而产物混有大量杂蛋白,因此需要更有效的纯化方法。亲和层析是一种利用蛋白质某些特殊的结构特征特异地吸附层析蛋白质的方法,能够提纯到高浓度的 IgM。目前在鱼类 IgM 的纯化实验中,蛋白 A 亲和层析是一种常用的亲和层析的方法。与离子交换层析和凝胶过滤层析相比,蛋白 A 亲和层析能更快地得到产物^[20-24]。但是由于鱼类 IgM 和 protein A 的结合能力并不强,所以应在上样之后采用温育的方法来提高样品与 protein A 的结合数量。本实验采用上样之后在 10℃ 下放置 2.5 h 的方式,获得了较好的实验结果。将含有其他杂蛋白的粗提产物在柱床上上样温育之后,此时柱床上既存在特异结合的 IgM 又有未结合的其他蛋白质,利用缓冲液可以将这些杂蛋白洗脱下来,之后利用降低 pH 的方法可以破坏 IgM 与蛋白 A 的结合,进而将其洗脱下来,从而达到获得高纯度的 IgM 的目的。在本研究中,为了保证最大限度地洗脱杂蛋白,在纯化 IgM 时使用 10 倍体积平衡缓冲液洗脱,之后再使用 10 倍柱体积的洗脱缓冲液 $(0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘氨酸, $\text{pH} = 3.0$) 洗脱已结合的蛋白,最终得到纯度较高的 IgM。

IgM 具有双重性,既能够作为抗体与体内的细菌、真菌等抗原特异性结合,又能作为抗原刺激机体免疫细胞产生抗体。因此,将血清中提纯得到的 IgM 注射到小鼠体内,能得到含有抗体的小鼠血清。使用佐剂与 IgM 混合,能够延长 IgM 在小鼠体内滞留的时间,增强小鼠的免疫反应。本实验第 1 次使用弗

氏完全佐剂混合注射,第2次和第3次使用弗氏不完全佐剂混合注射的方式,既能够增强小鼠的免疫反应,又能避免卡介苗对小鼠的刺激。2次免疫与1次免疫相比,小鼠产生抗体的速度明显提高,且能产生较多的抗体,抗体在体内的存留时间也大大加长。因此,本研究采用3次免疫的方法以保证小鼠能产生较强的免疫应答。而本研究获得的鼠抗卵形鲳鲹 IgM 多抗血清经 ELISA 检测效价高达 1:25 600,可以为卵形鲳鲹免疫系统及免疫防治的进一步研究提供材料,为卵形鲳鲹的血清学检测技术奠定基础,血清学检测利用抗原抗体特异结合的基本原理,可找出发病源,是一项重要的人类以及动物病害诊断技术^[27]。

参考文献:

- [1] 陈秀荔,肖群平,陈晓汉,等. 卵形鲳鲹微卫星分子标记的筛选[J]. 武汉大学学报(理学版) 2010, 56(5): 564-569.
- [2] 余庆,李菲,覃仙玲,等. 广西卵形鲳鲹小脑来源细胞系的建立及特征分析[J]. 广西科学, 2018, 25(1): 74-79.
- [3] POMLERD CHANRATCHAKOOL. 沿海水产养殖中的疾病预防措施——来自泰国农场的疾病预防和控制经验[J]. 中国水产, 2006(2): 86-87.
- [4] 黄浩正. 抗体的分子结构及体液分布[J]. 宁夏医学杂志, 1983(3): 46-48.
- [5] 韩滨岳. 鸟类免疫球蛋白重链基因的进化分析[D]. 北京: 中国农业大学, 2017.
- [6] 冯娟,胡超群. 四种海水养殖鱼类血清免疫球蛋白的分离纯化及分子量测定[J]. 热带海洋学报, 2002, 21(4): 8-13.
- [7] 叶剑敏,王玉红,丁明媚,等. 硬骨鱼 IgM 结构和功能及其体液免疫应答[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2015, 47(5): 1-8.
- [8] LI Y Q, SUN L, LI J. Internalization of large particles by turbot (*Scophthalmus maximus*) IgM⁺ B cells mainly depends on macropinocytosis[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2018, 82(2): 31-38.
- [9] 鄢庆彬,韩一凡,高天翔,等. 大黄鱼血清 IgM 纯化及其免疫血清的制备[J]. 中国水产科学, 2006, 13(3): 475-479.
- [10] 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[J]. 动物学研究, 2003, 24(2): 111-115.
- [11] AIHARBI A H, TRUAX R, THUNE R L. Production and characterization of monoclonal antibodies against tilapia *Oreochromis niloticus* immunoglobulin[J]. Aquaculture, 2000, 188(3/4): 219-227.
- [12] 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[J]. 水生生物学报, 2010, 34(1): 164-169.
- [13] HORDVIK I, LINDSTRØM C D V, VOIE A M, et al. Structure and organization of the immunoglobulin M heavy chain genes in Atlantic salmon, *Salmo salar*[J]. Molecular Immunology, 1997, 34(8/9): 631.
- [14] 杨桂文,安利国,王长法. 鲤肠粘液与血清中免疫球蛋白的比较研究[J]. 中国水产科学, 1999, 6(4): 109-110.
- [15] 孙军,高谦,聂品. 四种方法对鲢血清免疫球蛋白的纯化及分子量测定[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2005, 31(4): 487-492.
- [16] 张福森,杨桂文,李国田,等. 鲈血清免疫球蛋白分离纯化及部分特性分析[J]. 动物学杂志, 2004, 39(5): 9-12.
- [17] BILAL S, KAI L, KARISEN O A, et al. Characterization of IgM in Norwegian cleaner fish (lumpfish and wrasses) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 59: 9-17.
- [18] 林娟娟,杨金先,陈强,等. 欧洲鳗皮肤黏膜免疫球蛋白纯化及其结构组成分析[J]. 中国水产科学, 2009, 16(3): 404-410.
- [19] PUCCI B, COSCIA M R, ORESTE U. Characterization of serum immunoglobulin M of the Antarctic teleost *Trematomus bernacchii*[J]. Comparative Biochemistry & Physiology Part B Biochemistry & Molecular Biology, 2003, 135(2): 349-357.
- [20] LI Q, ZHAN W, XING J, et al. Production, characterisation and applicability of monoclonal antibodies to immunoglobulin of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 23(5): 982-990.
- [21] SCAPIGLIATI G, ROMANO N, PICCHIETTI S, et al. Monoclonal antibodies against sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) immunoglobulins: immunolocalisation of immunoglobulin-bearing cells and applicability in immunoassays[J]. Fish & Shellfish Immunology, 1996, 6(5): 383-401.
- [22] HIROTOSHI F, KIYOSHI S, FUMIO Y, et al. Serum immunoglobulin M (IgM) during early development of masu salmon

- (*Oncorhynchus masou*) [J]. *Comparative Biochemistry & Physiology A Comparative Physiology*, 1991, 99(4): 637–643.
- [23] KOBAYASHI K, TOMONAGA S, TESHIMA K, et al. Ontogenic studies on the appearance of two classes of immunoglobulin-forming cells in the spleen of the Aleutian skate, *Bathyraja aleutica*, a cartilaginous fish [J]. *European Journal of Immunology*, 2010, 15(9): 952–956.
- [24] ZIKAŇJ, SIMA P, PROKESOVÁ L, et al. Binding of non-mammalian immunoglobulins to staphylococcal protein A [J]. *Folia Biologica*, 1980, 26(4): 261–266.
- [25] 陈琼, 曹建萌, 卢迈新, 等. 尼罗罗非鱼 Ly75 基因的克隆、原核表达和多克隆抗体制备 [J]. *生物技术*, 2017, 27(3): 223–231.
- [26] 张朋, 刘荭, 陈孝煊, 等. 鲤春病毒血症病毒单克隆抗体的制备及其特性鉴定 [J]. *中国预防兽医学报*, 2011, 33(4): 305–308.
- [27] 林树柱, 李万波, 刘先菊, 等. 黄鳍 IgM 的分离纯化及兔抗黄鳍 IgM 抗血清的制备 [J]. *中国比较医学杂志*, 2007, 17(11): 644–647.

Purification of Serum IgM from *Trachinotus ovatus* and Preparation of Mouse Sera Anti-IgM

ZHANG Shengnan, WU Ying, SUN Yun, Cao Zhenjie, ZHOU Yongcan

(Ocean College, Hainan University/Hainan University Hainan Provincial Key Laboratory for Tropical Hydrobiology and Biotechnology/
State Key Laboratory of Marine Resource Utilization in South China Sea/ Haikou, Hainan 570228)

Abstract: Immunoglobulin M (IgM) was isolated from the serum of *Trachinotus ovatus* by using ammonium sulfate fractionation and then purified by using Protein A-sepharose affinity chromatography. Furthermore, the purified IgM product was used to prepare a polyclonal antibody. In addition, the titer and specificity of the polyclonal antibody were analyzed by the ELISA and the Western blot, respectively. The results showed that the ammonium sulfate fractionation precipitated most proteins from the sera of *T. ovatus*, but the IgM proteins with heavy and light chains were crude with some heteroproteins. Furthermore, the IgM product purified by the Protein A-sepharose affinity chromatography possessed two obvious bands (heavy chain and light chain). Moreover, the prepared anti-sera had a high titer of 1:25 600 when assayed by the ELISA. The Western blot analysis showed that the IgM polyclonal antibody of *T. ovatus* contained the target bands, indicating the IgM polyclonal antibody was prepared successfully and could be used in correlation analysis in the coming future.

Keywords: *Trachinotus ovatus*; protein A-sepharose affinity chromatography; immunoglobulin M (IgM); polyclonal antibody

(责任编辑: 钟云芳)