

牙鲆血清中免疫球蛋白M的分离及其测定

王先磊, 张培军, 李军, 徐永立

(中国科学院海洋研究所 实验海洋生物学开放研究实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 通过提取健康养殖牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 血清中的免疫球蛋白(Ig), 并测定其相对分子质量, 其中重链(H链)的相对分子质量为74.2 ku, 轻链(L链)的相对分子质量为23.8 ku。用纯化的牙鲆血清中的Ig作抗原, 制备多克隆抗体, 确立牙鲆血清中免疫球蛋白的最佳测定方法。

关键词: 牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*); 免疫球蛋白M(IgM); 兔多抗; 鼠多抗; ELISA
中图分类号: Q 511; Q956 **文献标识码:** B **文章编号:** 1000-3096(2004)04-0008-05

近年来, 牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 作为名贵的海水养殖鱼类, 在中国海水养殖业中的重要性日益显著, 但是在高密度养殖的条件下, 牙鲆流行病时有发生。为了解决这一难题, 就需要对牙鲆本身的免疫系统的作用机制进行基础性研究。

同高等脊椎动物一样, 鱼类也通过免疫系统来抵御外来病原微生物的侵害, 即通过特异性和非特异性的免疫防御机制来维持机体的正常功能及自身内环境的稳定。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。哺乳动物根据其重链稳定区的分子结构和抗原特异性的不同, 可分为5类, 即IgG, IgA, IgM, IgD及IgE。在过去的几十年里, 在高等脊椎动物体内发现有正常的血清免疫系统, 而对鱼类免疫学的研究还不深入, 也不系统。近年来, 鱼类Ig的研究已经受到免疫学家的广泛关注。目前大多数认为在真骨鱼类血清中只存在1种Ig, 类似于哺乳动物的IgM, 他由2条重链(H链)和2条轻链(L链)所组成的单体通过连接链“J”链将4个单体联接成一个四聚体^[1]。在沟鲶、大菱鲆、鲤和羊头鲷、鳊^[2]血清中皆发现血清IgM是四聚体。相对分子质量700~800 ku, H链的相对分子质量约为70 ku, L链的相对分子质量约为19 ku。对于鱼类整个免疫系统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^[3]。日本已经有关于牙鲆血清中IgM的提取纯化方法, 日本学者用SDS-PAGE不连续电泳测得牙鲆的相对分子质量为750 ku, H链和L链的相对分子质量分别为75 ku,

23 ku^[4]。国内也有从患病的牙鲆中提取抗特异外来抗原免疫球蛋白提取方法的报道^[5,6]。但是迄今关于鱼类IgM测定方法的报道还较少。

该实验通过总结前人的研究方法^[7], 提取纯化健康牙鲆血清的IgM, 并确立其在牙鲆血清中的最佳测定方法, 从而为进一步研究牙鲆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, 实现牙鲆的健康养殖, 提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 牙鲆IgM的提取纯化

1.1.1 材料

20尾人工养殖健康牙鲆(平均体质量500 g)饲养于中国科学院海洋研究所水族楼的水泥池内, 每天投喂充足的玉筋鱼, 换水, 并连续充气。

1.1.2 方法

1.1.2.1 取血^[8]

用无菌注射器从健康牙鲆的尾静脉抽取血液, 室温下静置1 h, 放4℃冰箱过夜, 次日4 000 r/min离心10 min, 取上清, 加入同样体积的饱和硫酸铵沉淀, 过夜, 10 000 r/min离心30 min, 取沉淀,

收稿日期: 2003-03-25; 修回日期: 2003-05-15

基金项目: 国家973课题(G1999012006)

作者简介: 王先磊(1976-), 女, 山东胶南人, 在读博士生, 目前主要参与国家973计划课题, E-mail: wxllcy@163.com

用少量 0.015 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液溶解后, 再用相同的缓冲液透析, 至检测不到 SO_4^{2-} 为止。然后将透析后的样品液上 DEAE-52 离子交换柱。

1.1.2.2 DEAE-纤维素-52 离子交换柱层析

DEAE-52 上样后, 用盐浓度分别为 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.40 mol/L 的 NaCl 洗脱液 (0.015 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液配制, pH 8.0) 洗脱, 得到 5 个洗脱峰, 收集 0.10 mol/L NaCl 的洗脱峰, 加入同样体积的饱和硫酸铵沉淀, 过夜, 10 000 r/min 离心 30 min, 取沉淀, 用少量 0.02 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0, 含 2% 的 NaCl, 0.02% 的 NaN_3) 溶解后, 再用相同的缓冲液透析, 至检测不到 SO_4^{2-} 为止。然后将

透析后的样品液上 Sepharose 6B 凝胶柱。

1.1.2.3 Sepharose 6B 凝胶柱层析

Sepharose 6B 用 0.02 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0, 含 2% 的 NaCl, 0.02% 的 NaN_3) 平衡后上样, 上样后用同一缓冲液洗脱, 得到 3 个洗脱峰, 收集第 2 个洗脱峰, 即为所要提取的 IgM, 将收集的洗脱液超滤浓缩后, 置 -20°C 冷冻保存。

1.2 兔多抗, 鼠多抗的制备

1.2.1 兔多抗的制备

免疫兔处理: 用提取的牙鲆 IgM 免疫荷兰兔 (青岛市药检所提供), 2 只免疫, 1 只对照, 平均体质量 3 kg, 免疫过程见表 1。

表 1 新西兰兔的免疫过程

Tab.1 Procedure of immunizing the New Zealand rabbits

次数	时间 (d)	剂量 (mL)	浓度 (g/L)	成分	部位
1	1	0.5	1	抗原-弗氏佐剂	背部皮下
2	14	0.5	1	抗原-弗氏佐剂	背部皮下
3	21	0.1	1	抗原	耳静脉
4	23	0.3	1	抗原	耳静脉
5	25	0.3	1	抗原	耳静脉

对照兔处理: 对照兔, 不进行注射, 同免疫兔在相同条件下饲养。

5 次免疫 1 周后耳静脉取免疫兔和对照兔的全血, 用间接 ELISA 法测免疫效价^[9], 见表 2。

阳性结果判断采用“比率”表示法: 用测定

表 2 兔抗牙鲆血清 IgM 效价测定

Tab.2 The rabbit polyclonal titer anti the serum IgM of flounder

样品	A_{490nm} 值		血清稀释倍数	
	阴性对照	空白对照*	样品	阴性对照
0.362	0.059	0.054	1:320	1:320
0.384	0.058	0.054	1:640	1:640
0.396	0.057	0.054	1:1 280	1:1 280
0.335	0.056	0.054	1:2 560	1:2 560
0.338	0.054	0.054	1:5 120	1:5 120
0.222	0.060	0.054	1:10 240	1:10 240
0.143	0.051	0.054	1:20 480	1:20 480
0.116	0.054	0.054	1:40 960	1:40 960
0.088	0.049	0.054	1:81 920	1:81 920
0.087	0.054	0.054	1:163 840	1:163 840

* 空白对照差别很小, 都可以用 0.054 这一光吸收值作为空白对照。

样品孔的吸收值 (P) 与一组阴性对照孔平均吸收值 (N) 的比值 (P/N) 表示, 当 P/N 大于 2 时判断为阳性^[9]。

根据以上的判断依据, 由表 2 可以看出, 兔多抗的效价为 1:40 960, 效价较高, 可以取血。心脏取血, 每只兔取血约 50 mL, 将所得的血清室温静置 1 h, 放置 4°C 冰箱过夜, 待血清析出后取血清, 分装, 置 -20°C 保存备用。

1.2.2 鼠多抗的制备

免疫大鼠处理: 用提取的牙鲆 IgM 免疫 8 只 Wistar 大鼠 (青岛市药检所提供), 平均体质量为 300 g, 免疫过程见表 3。

对照大鼠处理: 取 4 只大鼠做对照, 不进行注射, 同免疫大鼠在相同条件下饲养。第 5 次免疫 1 周后尾静脉取血用间接 ELISA 法测效价, 见表 4^[9]。

大鼠免疫后用间接 ELISA 法测定的实验数据见表 4。根据阳性结果判定方法^[9], 由表 4 可以看出, 兔多抗的效价为 1:163 840, 效价较高, 可以取血。心脏取血, 每只取血约 5 mL, 将所得的血清室温静置 1 h, 然后置 4°C 过夜, 待血清析出后取血清, 分装, 置 -20°C 保存备用。

表3 大鼠免疫过程

Tab.3 Procedure of immunizing the Wistar rats

次数	日期(d)	剂量(mL)	浓度(g/L)	成分	部位
1	1	0.5	0.6	抗原-弗氏佐剂	背部皮下
2	14	0.5	0.4	抗原-弗氏佐剂	背部皮下
3	21	0.15	0.235	抗原	尾静脉
4	23	0.25	0.235	抗原	尾静脉
5	25	0.25	0.235	抗原	尾静脉

表4 鼠抗牙鲆血清 IgM 效价测定

Tab.4 The rat polyclonal Titer anti serum IgM of flounder

样品	A_{490nm} 值		血清稀释倍数	
	阴性对照	空白对照**	样品	阴性对照
4-*	0.964	0.060	1:10	1:10
4-*	0.843	0.060	1:40	1:40
4-*	0.906	0.060	1:160	1:160
4-*	0.635	0.060	1:640	1:640
4-*	0.191	0.060	1:2 560	1:2 560
3.802	0.123 5	0.060	1:10 240	1:10 240
2.621	0.1	0.060	1:40 960	1:40 960
1.377	0.077	0.060	1:163 840	1:163 840
0.453	0.073	0.060	1:640 000	1:640 000
0.207	0.064 5	0.060	1:2 560 000	1:2 560 000

*酶标仪的最大读数为4, 这些数值都大于4; ** 空白对照差别很小, 都可以用0.060这一光吸收值作为空白对照。

1.3 间接 ELISA 法制作 IgM 含量-A 值标准曲线

1.3.1 方法一: 兔多抗作一抗制作 IgM 含量-A 值标准曲线

根据用 BSA 标注溶液做的蛋白浓度-光吸收值标准曲线, 将 1.1 中提取的 IgM 在用 Folin-酚法紫外分光光度计上 500 nm 测定其光吸收, 可得到提取纯化的 IgM 的浓度。然后将提取纯化的 IgM 用制成系列稀释的标准溶液, 用间接 ELISA 法测定其光吸收值与 IgM 含量的变化, 方法如下: IgM 在 37 °C 烘箱包被 4 h, 用 3% BSA 封闭 40 min, 稀释度为 1:640 的兔多抗作一抗 37 °C 放置 50 min, 加羊抗兔(HRP 标记)二抗(华美生物工程公司) 37 °C 放置 50 min, 加底物 OPD-H₂O₂ 37 °C 避光保存 10 min, 加终止液(2 mol/L H₂SO₄) 终止反应, 于 20 min 内在酶标仪上 490 nm 波长检测实验结果。IgM 的加样浓度为 1.95, 3.9, 7.8, 15.625, 62.5, 125, 250, 500, 1 000 μg/L, 每

个数量级做 3 个平行。

1.3.2 方法二: 鼠多抗作一抗制作 IgM 含量-A 值标准曲线

实验方法同 1.2.3.1, 只是一抗用稀释度为 1:640 的鼠多抗, 用羊抗大鼠(HRP 标记)二抗(进口, 北京鼎国分装)。

1.4 双夹心 ELISA 法制作 IgM 含量-A 值标准曲线

1.4.1 方法一

先加兔多抗(1:640), 再依次加 BSA, 鼠多抗(1:640), 羊抗大鼠(HRP 标记)二抗, 底物, 终止液, 490 nm 检测。

1.4.2 方法二

先加鼠多抗(1:640), 再依次加 BSA, 兔多抗(1:640), 羊抗兔(HRP 标记)二抗, 底物, 终止液, 490 nm 检测。

2 结果与讨论

2.1 IgM 的提取纯化结果

将过离子交换柱, 凝胶柱后提取的 IgM 做 SDS-PAGE 电泳(如图 1), 电泳图谱在 VDS(凝胶成像扫描仪)凝胶成像系统上进行分析, 测定两条蛋白带的相对分子质量分别为 74.2 ku, 23.8 ku, 分别代表 IgM 的 H 链和 L 链, 测四聚体的相对分子质量为 779 ku。日本学者测出的相对分子质量为 75 ku, 23 ku, 四聚体的相对分子质量为 750 ku^[4], 国内提取纯化的 IgM 的 H 链和 L 链的相对分子质量也分别为 71, 23^[5]和 74, 22 ku^[6]。该实验提取的 IgM 的 H, L 链的相对分子质量与已发表的文献结果相似, 而且由图 1 可以看出提取纯化的 IgM 经 SDS-PAGE 电泳后只有 H, L 两条带, 没有杂带出现, 可以说提出纯化的结果较好, 可用于免疫兔, 免疫大鼠, 制备兔多抗, 鼠多抗。

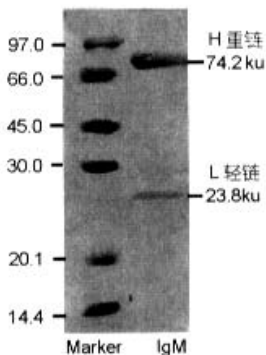


图1 IgM的提取结果

Fig.1 SDS-PAGE of IgM and Mark

2.2 兔多抗和大鼠多抗效价的测定

测定兔多抗和鼠多抗的效价分别为 1:40 000, 1:160 000; 效价较高。

比较间接法和双夹心法测定 IgM 含量的灵敏度。4 种方法在 IgM 浓度, 所加一抗稀释倍数, 显色, 作用时间都相同的情况下, 将测定的实验结果, 以牙鲆 IgM 浓度数量级为横坐标, A 值为纵坐标作柱形图 (如图 2)。

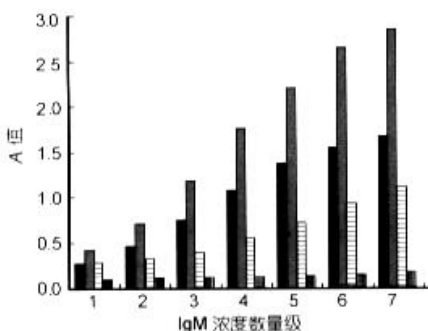


图2 4种方法测定牙鲆 IgM 的灵敏度比较

Fig.2 The sensitivity of four method in measuring the concentration of the serum IgM

■ 间接法一; ■ 间接法二; □ 双夹心法一; □ 双夹心法二

由表 1、图 2 可以看出, 在 IgM 浓度, 所加一抗稀释倍数, 显色, 作用时间都相同的条件下, 把用间接法和双夹心法测定的实验结果进行比较,

可以看出用两种间接法测定的实验结果都比两种双夹心法测定的 A 值高, 这可以得出结论, 在 IgM 含量相同的条件下, 间接法的灵敏度高于双夹心法。该实验结果的重复操作性较好。

比较间接法和双夹心法测定 IgM 含量的灵敏度, 以测定的 IgM 浓度为横坐标, A 值为纵坐标做标准曲线, 如图 3。

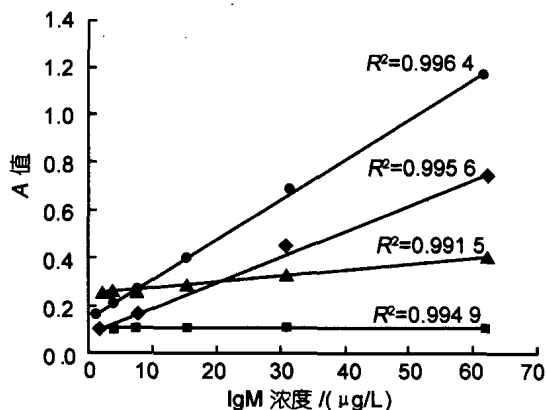


图3 4种方法测定牙鲆 IgM 的准确性比较

Fig.3 The exactness of four methods in measuring the concentration of the serum IgM

◆ 间接法一; ● 间接法二; ▲ 双夹心法一; ■ 双夹心法二

由图3可以看出实验结果4种方法的相关系数的平方值 (R^2)^[10]

$$R^2 = \frac{\sum (X - \bar{X})(Y - \bar{Y})}{\sum (X - \bar{X})^2 \sum (Y - \bar{Y})^2}$$

分别为 0.995 6, 0.996 4, 0.991 5, 0.664 9 (见图 3), 即在低浓度范围内 (1.95~62.5 ng) 间接法的线形结果较好, 而间接法方法二的实验结果最好。

在实验设计过程中, 理论上认为由于抗原抗体之间的特异性吸附, 用双夹心法测定的实验结果线形应该比较好。但实验结果并非如此。产生这种结果的原因可能是用双夹心法在测定 IgM 含量的过程中, 实验操作步骤过多, 测定时间过长, 使抗原抗体之间的特异性吸附率降低所造成的。

由以上的实验结果得出, 在测定牙鲆血清中 IgM 的含量时, 用间接法, 用鼠多抗实验结果比较好。测定牙鲆血清中的 IgM 的含量时, 将其稀释一定倍数后, 用间接法测定其在 490 nm 的光吸收值, 根据公式可以求出血清中 IgM 的含量。

在 IgM 浓度, 所加一抗稀释倍数, 显色, 作



用时间都相同的条件下,把用间接法和双夹心法测定的实验结果进行比较,由图2可以看出用间接法测定的实验结果都比双夹心法测定的实验结果高,即在IgM含量相同的条件下,间接法的灵敏度高于双夹心法。该实验结果的重复操作性较好。在实验设计过程中,理论上认为由于抗原抗体之间的特异性吸附,测定的实验线形结果应该比较好。但4种方法的相关系数的平方值(R^2)分别为0.9956, 0.9964, 0.9915, 0.6649即在低浓度范围内(1.95~62.5ng)间接法的线形结果较好,而间接法方法二的实验结果最好。产生这种结果的原因可能是用双夹心法测定IgM含量的过程中,实验操作步骤过多,使抗原抗体之间的特异性吸附率降低所造成的。由以上的实验结果得出,在测定牙鲆血清中IgM的含量时,最好用间接法,用鼠多抗测定牙鲆血清中IgM。

参考文献:

- [1] Jurd R D. Specialisation in the teleost and anuran immune response[A]. Manning M J, Tatner M F. A comparative critique in fish immunology[C]. London: Academic Press, INC, 1985. 9-28.
- [2] 张永安, 聂品. 鳕血清免疫球蛋白的分离纯化及其亚单位分子量的测定[J]. 水生生物学报, 1998, 22: 192-194.
- [3] Smith S A. Isolation, purification, and molecular-weight determination of serum immunoglobulin from *Oreochromis aureus*[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1993(5):23-35.
- [4] Nishida H, Enokida T, Hiramatsu N, et al. Purification of immunoglobulin M (IgM) in serum of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Bulletin of the Faculty of Fisheries*. 1998, 49(3):157-164.
- [5] 周丽, 战文斌, 宋微波, 等. 指状拟舟虫诱导牙鲆抗血清免疫球蛋白分析[J]. 中国水产科学, 2000. 7(2): 28-31.
- [6] 曲凌云, 孙修勤, 战文斌, 等. 牙鲆抗淋巴囊肿瘤病毒免疫球蛋白的纯化[J]. 高技术通讯, 2000(9):14-18.
- [7] Hirotohi F, Kiyoshi S S, Fumio Y, et al. Serum immunoglobulin M (IgM) during early development of masu salmon (*Oncorhynchus masou*) [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1991, 99A(4): 637-643.
- [8] 苗明三. 实验动物和动物实验技术[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1997. 171-175.
- [9] 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000. 352-358.
- [10] 杜荣蓉. 生物统计学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999. 210.

Isolation and detection of Japanese flounder immunoglobulin M

WANG Xian-lei, ZHANG Pei-jun, LI Jun¹, XU Yong-li

(Experimental Marine Biology Laboratory, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Mar., 25, 2003

Key words: Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*); immunoglobulin M (IgM); rabbit polyclonal antibodies; rat polyclonal antibodies; ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Abstract: The serum IgM of healthy cultured flounder was purified and the molecule of the IgM was measured. The height chain (H chain) molecule weight and the light chain (L chain) molecule weight of the purified serum IgM were 74.2 ku and 23.8 ku. The polyclonal antibodies anti-serum IgM of flounder can be obtained by injecting the animals with the purified IgM. This study provided a reliable method of measuring the concentration of the serum IgM in fish.

(本文编辑: 刘珊珊)