

文章编号 :1000 - 0615(2006)04 - 0531 - 07

中华鲟、史氏鲟及达氏鳇血清免疫球蛋白的纯化及部分特性分析

刘红柏^{1, 2}, 张 颖¹, 杨雨辉¹, 叶继丹¹, 孙大江¹

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070 ;

2. 东北农业大学博士后科研流动站, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要 采用饱和硫酸铵分步沉淀和 Sephadex G-200 凝胶层析的方法,首次分别纯化制备了健康非免疫状态下中华鲟(*Acipenser sinensis*)、史氏鲟(*Acipenser schrenckii*)和达氏鳇(*Huso dauricus*)的血清免疫球蛋白(Ig),并采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、蛋白免疫印迹(Western blotting)及免疫琼扩实验等方法对其Ig及Ig亚单位的分子量和部分特性进行了分析。PAGE及SDS-PAGE的结果显示:史氏鲟、中华鲟和达氏鳇IgM的相对分子量分别为867 kD、896 kD和924 kD,3种鲟鱼Ig的重链分子量均为88 kD,都具有29 kD的轻链,其中达氏鳇还另有一分子量约为26 kD的轻链蛋白。分子量的测定及计算结果显示鲟鱼的Ig为四聚体。Western blotting的检测结果表明,3种鲟鱼Ig的重链与其Ig具有同样的抗原性,在硝酸纤维素膜上可被兔抗鲟Ig多克隆抗体所识别,而轻链的Western blotting检测结果则呈阴性。免疫沉淀反应的结果显示,3种鲟鱼的血清及其Ig与相互之间的兔抗Ig血清有免疫沉淀反应,但与兔抗鲤Ig血清无免疫沉淀反应,这表明3种鲟科鱼类的Ig在结构和序列上是较为相似的,而与鲤鱼等高等硬骨鱼类的Ig存在较大的差别。

关键词 史氏鲟;达氏鳇;中华鲟;免疫球蛋白

中图分类号 S 917 文献标识码 A

Purification and partial characterization of serum immunoglobulin in *Acipenser sinensis*, *Acipenser schrenckii* and *Huso dauricus*

LIU Hong-bai^{1, 2}, ZHANG Ying¹, YANG Yu-hui¹, YE Ji-dan¹, SUN Da-jiang¹

(1. Heilongjiang River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China ;

2. Postdoctoral Research Station of Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China)

Abstract : Serum immunoglobulin (Ig) of Amur sturgeon *Acipenser schrenckii*, Chinese sturgeon *Acipenser sinensis* and Huso sturgeon *Huso dauricus* which were healthy and unimmunized, was first time respectively purified by using saturation ammonium sulfate precipitation followed by Sephadex G - 200 gel column chromatography. Molecular weight and partial characterization of Ig and heavy chain and light chain of Ig were measured by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS - PAGE), Western blotting and Ouchterlony method. The results show that Ig molecular weight of Amur sturgeon, Chinese sturgeon and Huso sturgeon is 867 kD, 896 kD and 924 kD respectively. Heavy chain molecular weight of Ig in the three sturgeons' serum is all 88 kD and light chain of Amur sturgeon and Chinese sturgeon is 29 kD, but there is an extra light chain of 26 kD in Huso sturgeon serum. The results of measurements and calculation show that Ig of sturgeon is tetramer. In Western blotting, Ig and Ig heavy chain of the sturgeons have the same antigenicity and can be detected by antibody of rabbit anti the sturgeon Ig respectively in colloxylin membrane while light chain cannot be detected. Serum and Ig in serum of the three sturgeons can react with serum of rabbit anti each of the three sturgeons' Ig, but cannot react with serum of rabbit anti Ig of carp *Cyprinus*

收稿日期 2005-09-02

资助项目 科技部“十五”攻关计划(2001BA505B506)、黑龙江省自然科学基金(C0322)

作者简介 刘红柏(1970-),女,黑龙江阿城人,副研究员,博士,主要从事鱼病及鱼类免疫学研究。Tel:0451-84861322, E-mail:

liulhb@hotmail.com

通讯作者 孙大江, Tel:0451-84861322; E-mail: Sundajiang0451@sohu.com

carpio. The Ouchterlony results show that Ig of sturgeons are immune homologous in structure and sequence, but have little immune homologous characters compared with Ig of high-classification Osteichthyes such as carp.

Key words: *Acipenser schrenckii*; *Huso dauricus*; *Acipenser sinensis*; Ig

鲟鱼泛指鲟形目(Acipenseriformes)鱼类,在鱼类乃至脊椎动物的系统进化上占据着重要的地位。它们是一群古老的鱼类,有着“活化石”之称,同时鲟鱼还具有重要的经济价值,其鱼子酱被称为“黑色黄金”。野生的鲟鱼更是被列入世界濒危保护动物的行列。在我国,野生中华鲟(*Acipenser sinensis*)属一级保护动物,而史氏鲟(*Acipenser schrenckii*)和达氏鳇(*Huso dauricus*)则是重要的经济鱼类,其野生种也受到保护,并且都具有养殖前景。我国的鲟鱼养殖业正在兴起,养殖的成功及健康发展同控制病害密切相关,对鱼类的Ig(主要是IgM)及其特性进行了解,在鱼体的免疫防御、鱼病的治疗和疫苗的使用等方面的研究中都具有重要意义。

在国外,有关鲟鱼免疫球蛋白的研究也进行得较少,只对白鲟(*Acipenser transmontanus*)和西伯利亚鲟(*Acipenser baeri*)等少数鲟鱼进行了这方面的研究^[1,2],其中Lundqvist等在对西伯利亚鲟亚单位结构序列进行分析时发现其轻链的保守序列与软骨鱼相近,而可变区与真骨鱼有类似之处^[3],这一研究说明了鲟鱼所处的特殊分类地位——由软骨鱼类向高等硬骨鱼类进化的过渡种类——同免疫球蛋白演化之间的联系。因此对鲟鱼的免疫球蛋白进行研究不但可以完善对鲟鱼免疫系统的认识,而且对研究鱼类的进化也具有一定的意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物及血清的制备

实验用鲟鱼采自中国水产科学研究院鲟鱼繁育技术工程中心。史氏鲟为2⁺龄,体重0.5~1.0 kg;达氏鳇为3龄,体重2.0~2.5 kg;中华鲟为3⁺龄,体重2.0~2.5 kg。随机采集健康的非免疫史氏鲟15尾、中华鲟及达氏鳇各18尾的尾动(静)脉血,其中史氏鲟采血致死,中华鲟及达氏鳇每尾采集10 mL左右血液后放回鱼池。收集血液,置20℃室温下30 min,然后于4℃冰箱中过夜。待血清充分析出后,3 500 r·min⁻¹离心20 min,收集上清。血清于-20℃保存、备用。

健康新西兰大白兔购自哈尔滨医科大学实验动物中心。

1.2 饱和硫酸铵分步盐析

取鲟鱼血清,加等体积0.01 mol·L⁻¹ pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液混匀,滴加饱和硫酸铵使其达总体积的20%,4℃冰箱静置20 min,以3 000 r·min⁻¹ 4℃离心15 min,弃沉淀(纤维蛋白)。取上清液,加入与上清液体积相等的饱和硫酸铵溶液,4℃冰箱静置20 min,以3 000 r·min⁻¹ 4℃离心15 min,弃上清液(清蛋白),沉淀为球蛋白。将沉淀溶解于磷酸盐缓冲液,加饱和硫酸铵,使其饱和度为33%,4℃冰箱静置20 min,以3 000 r·min⁻¹ 4℃离心15 min,除去上清,沉淀即为γ-球蛋白。收集沉淀,溶于0.02 mol·L⁻¹ pH 8.0 Tris-HCl缓冲液,4℃透析24 h,中间换缓冲液。

1.3 Sephadex G-25 凝胶过滤除盐

采用pH 7.0的磷酸缓冲液(PBS)溶胀Sephadex G-25(Pharmacia)。平衡好柱(1.5 cm×20 cm)体积后,加样,洗脱,流速0.5 mL·min⁻¹,自动器收集蛋白峰,紫外检测仪检测。收集的蛋白液放入透析袋中浓缩。

1.4 Sephadex G-200 柱层析纯化、制备血清 Ig

取10 g Sephadex G-200(Pharmacia, Sweden)于600 mL 0.1 mol·L⁻¹ pH 8.0 Tris-HCl缓冲液中溶胀72 h,装柱(规格为2.5 cm×60 cm)。洗脱液为0.1 mol·L⁻¹ pH 8.0 Tris-HCl(含0.15 mol·L⁻¹ NaCl和0.01%的叠氮钠缓冲液),流速为0.3 mL·min⁻¹,紫外检测记录仪监测,收集第一峰,即IgM。层析工作站记录分离曲线,收集的蛋白液用20%聚乙二醇浓缩后,冷冻冻干机冻干,-20℃保存。

1.5 血清 Ig 轻、重链的制备

取20 mg 鲟鱼血清 Ig,溶解于10 mL 0.5 mol·L⁻¹ pH 8.0的 Tris-HCl缓冲液(含4.0 mol·L⁻¹ 尿素)中,逐滴加入2-巯基乙醇(Amresco)至终浓度0.75 mol·L⁻¹,于室温下真空作用3 h。冰水冷却后,加入等体积预冷的0.75 mol·L⁻¹ 碘乙酰胺溶液,用5.0 mol·L⁻¹ NaOH溶液小心调pH至8.0,并保持约1 h。还原烷化的血清 Ig 对2

000 mL $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 透析过夜。将蛋白液浓缩至质量浓度约为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右。 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻、保存备用。

1.6 电泳

非变性连续聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)测定 Ig 纯度及其相对分子量。采用 Bio Rad 垂直电泳系统,配置 3.5% 聚丙烯酰胺凝胶(含 0.6% 琼脂糖),蛋白标准品(Pharmacia, 分子量为 158~975 kD)和鲟鱼 Ig 的浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 样品缓冲液为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 6.8 Tris-HCl(含甘油及溴酚兰),加样电泳,当染料到达分离胶底部时,停止电泳。取出凝胶,室温摇床考马斯亮蓝 R-250 染色 4 h 后、脱色,记录结果,拍照,计算分子量。

SDS-PAGE(3%~10%)测定 Ig 轻、重链的相对分子量。聚丙烯酰胺分离胶为 10%,浓缩胶 3%。蛋白 Marker 为 14~215 kD(Sigma),标准及样品浓度与 PAGE 相同,缓冲液为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 6.8 Tris-HCl(含 1% SDS,0.05% 溴酚兰及 10% 甘油),加样后调节电流至 10 mA,染料进入分离胶后,加大电流至 15 mA。染料到达分离胶底部时停止电泳。以下同 PAGE 的测定。

1.7 兔抗三种鲟鱼血清 Ig 多克隆抗体的制备

兔抗鲟鱼多克隆血清的制备。采用纯化的 Ig 用生理盐水溶液配成 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Ig 溶液,加等量的弗氏完全佐剂(Sigma),调制均匀的乳剂,对新西兰大白兔四足垫皮下注射。两周后二免,取 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Ig 溶液加等量弗氏不完全佐剂(Sigma),膈淋巴结及颈部皮下多点注射。二免 1 周后,耳缘采血测定抗血清效价,达 1:32 后再在耳缘静脉注射 1 mg 的 Ig。若达不到 1:32 稀释度,重复二免步骤,一周后心脏采血制备兔抗血清, $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

兔抗鲟血清 IgG 的纯化。采用 Sephadex G-150(Pharmacia, Sweden),层析柱规格 $2.5 \text{ cm} \times 60 \text{ cm}$,缓冲液为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 8.0 Tris-HCl(含 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 和 0.01% 的叠氮钠)。兔抗鲟血清滴加饱和硫酸铵分步沉淀(方法见 1.2)后,加样洗脱,流速为 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。收集蛋白,20% 聚乙二醇浓缩,冻干, $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

鲤(*Carpio cyprinus*)血清 Ig 的提纯及兔抗鲤血清 Ig 多克隆抗体的制备方法与鲟鱼相同。

1.8 凝胶平板双向免疫扩散实验

制备琼脂凝胶(生理盐水配制的 1% 琼脂)板,打孔,点样,中间孔为兔抗鲟 Ig 血清,四周孔分别为鱼类血清及其 Ig 溶液($2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。将点好样的琼脂板放入湿盒,置 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 温箱中扩散 24~48 h。观察沉淀线的产生。

1.9 免疫印迹(Western-blotting)试验

鲟鱼血清 Ig 的免疫印迹鉴定。当 3 种鲟鱼血清 Ig 非变性连续 PAGE 即将结束时,采用 BioRad 半干转印系统将凝胶上的蛋白条带转移至硝酸纤维素膜上,按 $0.65 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ 接通电源,电转移 2 h。完全转移后将硝酸纤维素膜浸于封闭液($0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.4 PBS-T,内含 BSA $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)中 2 h,封闭膜上可能结合的非相关蛋白的位点,然后按 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的量加入兔抗鲟 IgG, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜,用 PBS-T 缓冲液洗涤 3 次,每次 5 min。将膜转移至含有辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(上海鼎国)溶液中, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 平动 2 h,用 PBS-T 缓冲液洗涤 3 次,每次 5 min。按 $0.1 \text{ mL} \cdot \text{cm}^{-2}$ 加底物溶液,当膜上出现深蓝色条带时,蒸馏水洗终止反应,吸去水分,晾干。结果判定:硝酸纤维素杂交膜上有特异性显色带为阳性,否则为阴性。

Ig 轻、重链的免疫印迹鉴定。当 3 种鲟鱼血清 Ig 轻、重链的 SDS-PAGE 即将结束时,进行电转移。其余步骤同上。

2 结果

2.1 史氏鲟、达氏鲤及中华鲟血清免疫球蛋白的柱层析结果

中华鲟、达氏鲤及史氏鲟血清经饱和硫酸铵分步沉淀后葡聚糖凝胶层析,所出现的蛋白洗脱峰及其洗脱时间(图 1~3)。

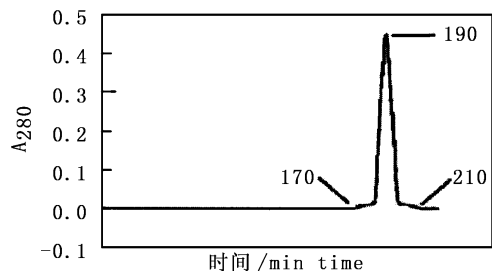


图 1 中华鲟血清免疫球蛋白 Sephadex G-200 层析图

Fig.1 Sephadex G-200 gel chromatography of Ig in sera of *Acipenser sinensis*

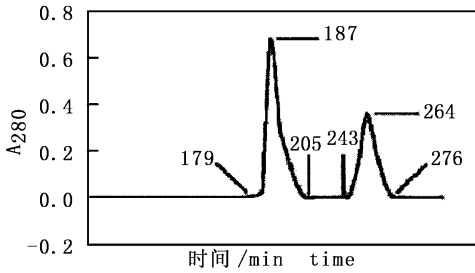


图2 达氏鲟血清免疫球蛋白 Sephadex G-200 层析图
Fig.2 Sephadex G-200 gel chromatography of Ig in sera of *Huso dauricus*

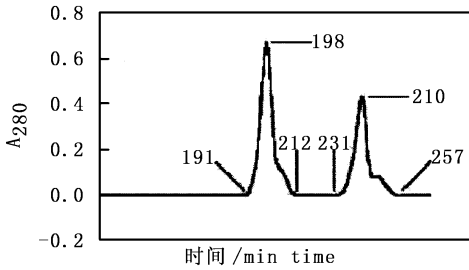


图3 史氏鲟血清免疫球蛋白 Sephadex G-200 层析图
Fig.3 Sephadex G-200 gel chromatography of Ig in sera of *Acipenser schrenckii*

中华鲟的层析图上只有一个峰,根据鱼类免疫球蛋白的类型来判断,此即 IgM 的洗脱峰,而史氏鲟及达氏鲟分别都有两个洗脱时间和吸光值不同的蛋白峰,其中第一峰的洗脱时间与人和鲤的 IgM 相近^[4],即为鲟鱼的 IgM。

2.2 史氏鲟、达氏鲟及中华鲟免疫球蛋白及其重链、轻链的分子量

3 种鲟鱼 PAGE 及 SDS-PAGE 的结果见图 4、5,史氏鲟、中华鲟及达氏鲟 IgM 的分子量分别为 867 kD、896 kD 及 924 kD,略小于牛血清 IgM 的分子量(975 kD)。同样测定所收集的史氏鲟第 2 蛋白峰物质的分子量为 456 kD,达氏鲟第 2 峰物质分子量为 468 kD。

这 3 种鲟鱼的 IgM 均可被 2-巯基乙醇降解,在 SDS-PAGE 图上均出现 1 条分子量为 88 kD 的重链条带和 1 条分子量为 29 kD 的轻链条带,达氏鲟除此外还另有 1 条分子量为 26 kD 的轻链条带(计算结果见表 1)。

通过重链及轻链的分子量对 IgM 的分子量进行了计算,其结果见表 1。

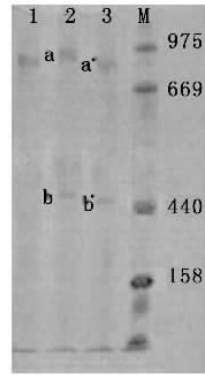


图4 中华鲟、达氏鲟及史氏鲟的 PAGE 图谱
Fig.4 PAGE analysis of molecular weight of Ig in serum of the three sturgeons

1. 中华鲟血清 IgM 2. 达氏鲟血清 IgM a-IgM b-达氏鲟第二峰蛋白 .3. 史氏鲟血清 IgM a'-IgM , b'-史氏鲟第二峰蛋白.
1. IgM in *Acipenser sinensis* serum ; 2. IgM in *Huso dauricus* serum ; 3. IgM in *Acipenser schrenckii* serum

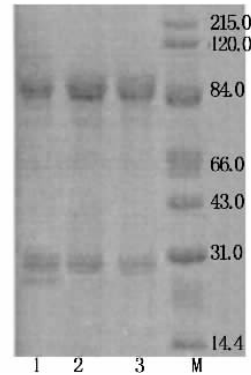


图5 史氏鲟、中华鲟及达氏鲟 Ig 重链及轻链 SDS-PAGE 图谱

Fig.5 SDS-PAGE analysis of heavy chain and light chain of the three sturgeons

1. 达氏鲟 ; 2. 史氏鲟 ; 3. 中华鲟 a-重链 b-轻链
1. *Huso dauricus* ; 2. *Acipenser schrenckii* ; 3. *Acipenser sinensis* a. high chain. b : light chain

2.3 史氏鲟、达氏鲟和中华鲟血清 IgM 及其亚单位的 Western-blotting 分析结果

3 种实验鱼的 Western-blotting 分析结果见图 6 显色结束后在硝酸纤维素杂交膜上可明显的观察到血清 IgM 特异性条带中华鲟 896 kD、史氏鲟 867 kD、达氏鲟 924 kD,而所收集的第 2 峰物质则呈阴性,说明此物质与 IgM 的抗原性不同。对这 3 种鲟的重链和轻链进行的 Western-blotting 分析表明,它们的重链(88 kD 条带)均可在硝酸纤维素杂交膜上被各自的兔抗血清 IgM 抗体所

识别,而其轻链的 Western-blotting 检测结果则呈阴性(图 7)。这表明它们各自的重链都具有和其 Ig 相同的抗原性,而轻链的抗原性因较弱或没有而无法被血清 IgM 的兔抗所识别。

表 1 3 种鲟科鱼类血清免疫球蛋白及其重链、轻链的相对分子量

Tab.1 Ig molecular weight , heavy chain m. w. and light chain m. w. of three sturgeons kD

	IgM 分子量 Ig m. w.	H 链分子量 H chain m. w.	L 链分子量 L chain m. w.	IgM 分子量计算值 calculation
中华鲟 <i>Acipenser sinensis</i>	896	88	29	936
史氏鲟 <i>Acipenser schrenckii</i>	867	88	29	936
达氏鳇 <i>Huso dauricus</i>	924	88	26 及 29	936 或 912

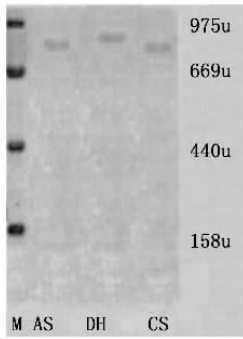


图 6 史氏鲟、达氏鳇及中华鲟血清 IgM 的免疫印迹结果

Fig.6 Western - blotting analysis of IgM in serum of *Acipenser schrenckii* , *Acipenser sinensis* and *Huso dauricus* M - 蛋白标准 ; AS - 史氏鲟 ; DH - 达氏鳇 ; CS - 中华鲟
M - protein marker ; AS - *Acipenser schrenckii* ;
DH - *Huso dauricus* ;CS - *Acipenser sinensis*

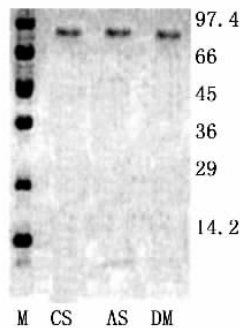


图 7 史氏鲟、达氏鳇及中华鲟血清 IgM 的重链及轻链免疫印迹结果

Fig.7 Western-blotting analysis of H chain and L chain of n serum of *Acipenser schrenckii* , *Acipenser sinensis* and *Huso dauricus* M - 蛋白标准 ; AS - 史氏鲟 ; DH - 达氏鳇 ; CS - 中华鲟
M - protein marker ; AS - *Acipenser schrenckii* ;
DH - *Huso dauricus* ;CS - *Acipenser sinensis*

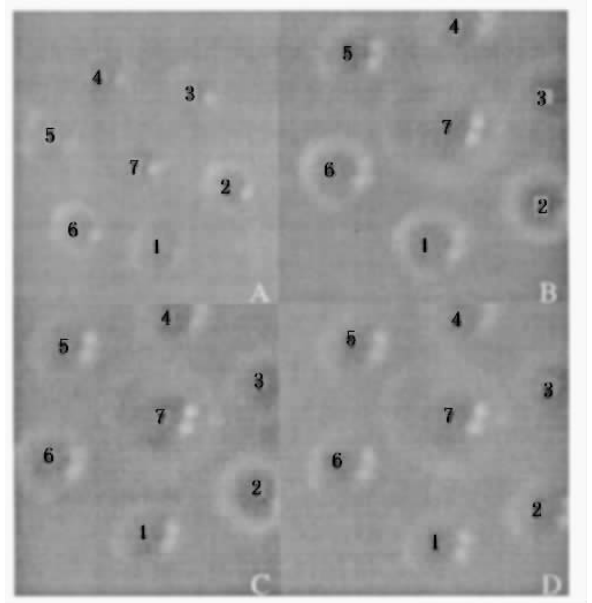


图 8 史氏鲟、达氏鳇、中华鳇、鲤及其兔抗血清凝胶平板免疫扩散试验结果

Fig.8 Ouchterlony analysis of serum Ig of *Cyprinus carpio* , *Acipenser schrenckii* , *Acipenser sinensis* and *Huso dauricus* and their rabbit anti serum

A. 兔抗鲤血清 Ig 免疫琼扩 ; B. 兔抗中华鲟血清 Ig 免疫琼扩 ;
C. 兔抗史氏鲟血清 Ig 免疫琼扩 ; D. 兔抗达氏鳇血清 Ig 免疫琼扩
1 - 达氏鳇血清 ; 2 - 史氏鲟血清 ; 3 - 中华鲟血清 ; 4 - 达氏鳇血清 ; 5 - 史氏鲟 Ig ; 6 - 中华鲟 Ig ; 7 - 兔抗鱼血清 Ig 血清
A. Ouchterlony analysis of rabbit serum anti *Cyprinus carpio* serum Ig ; B. Ouchterlony analysis of rabbit serum anti *Acipenser sinensis* serum Ig ; C. Ouchterlony analysis of rabbit serum anti *Acipenser schrenckii* serum Ig ; D. Ouchterlony analysis of rabbit serum anti *Huso dauricus* serum Ig 1. serum of *Huso dauricus* ; 2. serum of *Acipenser schrenckii* ; 3. serum of *Acipenser sinensis* ; 4. Ig of *Huso dauricus* ; 5. Ig of *Acipenser schrenckii* ; 6. Ig of *Acipenser sinensis* ; 7. rabbit serum anti Ig in fish serum

2.4 史氏鲟、达氏鳇及中华鲟 IgM 免疫扩散实验结果

如图 8—B、C、D 所示,兔抗中华鲟 Ig 的血清、兔抗史氏鲟 Ig 的血清及兔抗达氏鳇 Ig 的血清与 3 种鲟鱼的血清及其血清 IgM 都有沉淀反应,沉淀线之间相互融合,不出现交叉或部分交叉现象;兔抗鲤血清不与鲟鱼血清及其血清 Ig 发生免疫沉淀反应(图 8—A)。

3 讨论

3.1 鲟鱼免疫球蛋白的特点

采用传统的饱和硫酸铵分步沉淀和凝胶层析的方法对 3 种鲟鱼类:中华鲟、史氏鲟和达氏鳇的血清免疫球蛋白进行了纯化。虽然现在分离蛋白的方法很多,但传统的饱和硫酸铵沉淀加凝胶层析的方法由于设备简单、操作方便、不需要有机溶剂、对高分子物质有很好的分离效果,所以在教学和实验中被广泛应用,无论从分离效果上还是操作技术上都有一定的保证。因此在进行新的研究上使用这些常规的方法是较为科学的选择。

从凝胶层析图中可以看出,中华鲟只有 1 个蛋白洗脱峰,而史氏鲟及达氏鳇分别有两个完全分离的蛋白洗脱峰,按照我们的洗脱条件的选择以及洗脱蛋白的保留时间和吸光值(与浓度成正比),可以判定所得到的第 1 峰蛋白为研究对象的主要 Ig,对于硬骨鱼类来讲,即是 IgM。PAGE 所测定出的该蛋白峰的分子量,以及通过亚单位分子量所换算出的该蛋白的分子量也都表明了这一点。Partula 等发现西伯利亚鲟血清中的优球蛋白类似于 IgM 分子,可以形成 $(H_2L_2)_n$ 形式的高分子量的多聚体,也可以形成单聚体或二聚体^[2],Adkison 等也发现白鲟血清中有单聚体分子量的 Ig(170 kD)^[1]。我们在史氏鲟及达氏鳇层析图中也发现了分子量类似于 IgM 二聚体的第 2 洗脱峰蛋白(分子量在 400~500 kD 之间),由于其 Western-blotting 的检测结果则呈阴性,因此它应该不是 IgM 的降解产物。关于鲟鱼 Ig 的种类,Partula 等认为 IgM 是鲟鱼唯一的免疫球蛋白^[2]。

虽然鲟鱼在某些形态及生理特征上与软骨鱼类有近似之处,而且其轻链恒定区也与软骨鱼相似而与真骨鱼不同,但在本实验中对 3 种鲟鱼

IgM 及其重链、轻链分子量的测定结果却表明鲟鱼的 IgM 同其它硬骨鱼类一样为四聚体,而同鲨鱼等类似于哺乳动物 IgM 的五聚体不同^[5,6]。Adkison 等^[1]对白鲟血清 Ig 及亚单位分子量的测定结果也表明它的 Ig 为四聚体。

在双向琼扩免疫反应中可以看出,尽管 3 种鲟鱼的分类地位稍有不同,但兔抗中华鲟 IgM 的血清,抗史氏鲟 IgM 的血清及抗达氏鳇 IgM 的血清同这 3 种鱼的血清及相应的 IgM 均有免疫沉淀反应,其抗体的免疫原性相同,说明它们的抗体在在结构和序列上具有高度的同源性。但兔抗鲤血清 IgM 的血清却同这 3 种鲟鱼血清及其血清 IgM 之间无免疫反应,表明鲟鱼这种较为低等的软骨硬磷鱼类同高等硬骨鱼鲤之间在抗体结构或者是序列上还是存在着明显的差异的。这同 Adkison 等的试验结果类似,他们发现鼠抗白鲟血清可以与绿鲟(*A. medirostis*),大西洋鲟(*A. oxyrinchus*)等多种鲟鱼发生免疫反应,而与真骨鱼类中的斑点叉尾鲟(*Ictalurus punctatus*)虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)等不产生免疫沉淀反应^[1]。

3.2 鲟鱼 IgM 重链及轻链的特点

3 种鲟鱼的免疫球蛋白均可被二巯基乙醇还原,还原后 3 种鲟鱼 IgM 重链的测定值均为 88 kD,而轻链则不同,史氏鲟及中华鲟都只有一种分子量的轻链为 29 kD,而达氏鳇除 29 kD 的轻链外,还存在有一种分子量为 26 kD 的轻链。鱼类重链的分子量在 80 kD 左右,轻链的分子量在 30 kD 左右^[7],我们测定的结果也在这个范畴。国外有对其它鲟鱼重链及轻链分子量测定的报道:Adkison 等测得白鲟重链的分子量为 73 kD,轻链的分子量则在 27~30 kD 间^[1];Partula 等对西伯利亚鲟的研究也测得一个分子量的重链(70 kD),轻链的分子量则在 26~30 kD 之间^[2]。史氏鲟、达氏鳇及中华鲟的轻链分子量与西伯利亚鲟及白鲟非常接近,而重链分子量则较高于后两种鱼。Lobb 等^[8]和 Palenzuela 等^[9]认为有些硬骨鱼的免疫球蛋白经还原 SDS-PAGE 可呈现出多条相对分子量为 22~29 kD 的轻链蛋白带。Lobb 等^[8]在对斑点叉尾鲟(*Ictalurus punctatus*)的重链和轻链分子量进行测定时发现只有一个分子量的重链,却有三种分子量的轻链,他同时指出,鱼类中存在着显著的轻链种类的演化。但

Hordvik 等对大西洋鲑 (*Salmo salar*) 免疫球蛋白的研究指出它有两种形式的重链^[10], 黑线鳕 (*Melanogrammus aeglefinus*) 也有两种形式的重链^[11], 而南方金枪鱼 (*Thunnus maccoyii*) 和牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 有两种分子量的重链和两种分子量的轻链^[12,13], 这表明鱼类轻、重链的种类较为复杂, 分型上的差别很大。另外, 拥有两种分子量的轻链是否是达氏鳇作为鳇属鱼类与鲟属鱼类不同的一个特征还需要进一步查明。

在 Western-blotting 的硝酸纤维素杂交膜上抗血清只识别了 3 种鲟鱼的重链, 在 88kD 处有清楚的条带, 而轻链蛋白则没有被抗血清识别。林天龙等采用 Western-blotting 分析欧洲鳇免疫球蛋白轻、重链时也发现免抗欧洲鳇血清 Ig 高免血清对欧洲鳇血清 Ig 的重链有较强的反应, 而对轻链区反应较弱, 并且分析其原因可能是血清 Ig 经过 SDS-PAGE 电泳后, 其轻链空间构象发生了改变, 而针对轻链的免抗血清则是构象依赖性抗体, 所以不能很好地识别构象改变了的轻链, 从而降低了反应强度, 或者是这种鱼 Ig 的轻链免疫原性弱, 不能有效激发新西兰白兔产生针对性的体液免疫应答^[14]。对于第一种分析, 鉴于 SDS 对蛋白质的变性作用, 这是有可能的, 但还需要更多的研究来证明; 后一种分析则可以从免疫球蛋白的结构组成中进行推论: 重链分子量相对较高, 其恒定区的氨基酸序列多, 结构复杂, 可提供多个抗原表位, 并且已报道的抗鱼 Ig 的单抗也是大部分只识别鱼 Ig 重链, 仅有少量可识别轻链^[1,8,15-17]。免疫球蛋白同种型的抗原决定簇主要存在于 Ig 的 C 区^[18], 所以重链在 Western-blotting 中易于被免抗鲟多克隆抗体所识别, 轻链蛋白结构相对简单, 抗原表位少, 分子量小, 会因其结合能力弱而在硝酸纤维素杂交膜上未被免抗鲟多克隆抗体所识别。

参考文献:

- [1] Adkison M A, Basurco B, Hedrick R P. Humoral immunoglobulins of the white sturgeon, *Acipenser transmontanus*: partial characterization of and recognition with monoclonal antibodies [J]. *Dev Comp Immunol*, 1996, 20(4): 285-298.
- [2] Partula S, Charlemagne J. Characterization of serum immunoglobulins in achondrostean fish, *Acipenser baeri* [J]. *Dev Comp Immunol*, 1993, 17(6): 515-524.
- [3] Lundqvist M, Bengten E, Stromberg S, et al. Ig light chain gene in the Siberian sturgeon *Acipenser baeri*. Implications for the evolution of the immune system [J]. *J Immunol*, 1996, 157(5): 2031-2038.
- [4] 杨桂文, 安利国, 温武军, 等. 鲤胆汁与血清中免疫球蛋白的比较研究 [J]. *水产学报*, 1998, 22(3): 199-203.
- [5] Clem L W, Small P A Jr. Phylogeny of immunoglobulin structure and function I. Immunoglobulins of the lemon shark [J]. *J Exp Med*, 1967, 125(5): 893-920.
- [6] Clem L W. Phylogeny of immunoglobulin structure and function IV. Immunoglobulins of the giant grouper, *Epinephelus itaira* [J]. *J Biol Chem*, 1971, 246(1): 9-15.
- [7] 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.
- [8] Lobb C J, Olson M O, Clem L W. Immunoglobulin light chain classes in a teleost fish [J]. *J Immunol*, 1984, 132(4): 1917-1923.
- [9] Palenzuela O, Sitja-Bobaadilla A, Alvarez P. Isolation and partial characterization of serum immunoglobulins from sea bass (*Dicentrarchus labras* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1996, 6: 81-94.
- [10] Hordvik I, Voie AM, Glette J, et al. Cloning and sequence analysis of two isotypic IgM heavy chain genes from Atlantic salmon, *Salmo salar* L [J]. *Eur J Immunol*, 1992, 22(11): 2957-2962.
- [11] Magnadóttir B. Comparison of immunoglobulin (IgM) from four fish species [J]. *ICEL AGR SCI*, 1998, 12: 47-59.
- [12] Watts M, Munday B L, Burke C M. Isolation and partial characterisation of immunoglobulin from southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii* Castelnau [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2001, 11(6): 491-503.
- [13] Jang H N, Woo J K, Cho Y H. Characterization of monoclonal antibodies against heavy and light chains of flounder (*Paralichthys olivaceus*) immunoglobulin [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2004, 37(3): 314-319.
- [14] 林天龙, 陈强, 俞伏松, 等. 欧洲鳇血清免疫球蛋白纯化及部分特性分析 [J]. *水产学报*, 2001, 25(1): 52-57.
- [15] 冯娟, 胡超群. 抗紫红笛鲷血清免疫球蛋白单克隆抗体的制备 [J]. *热带海洋学报*, 2002, 21(4): 14-20.
- [16] Estevez J, Leiro J, Antamarina M T, et al. Monoclonal antibodies to turbot (*Scophthalmus maximus*) immunoglobulins: characterization and applicability in immunoassays [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1994, 41: 353-366.
- [17] Israelsson O, Petersson A, Bengten E, et al. Immunoglobulin concentration in Atlantic cod *Gadus morhua* L. Serum and cross-reactivity between anti-cod antibodies and immunoglobulins from other species [J]. *J Fish Biol*, 1991, 39: 265-278.
- [18] 龚非力. 医学免疫学 [M]. 北京: 科学出版社, 2003. 17-42.