

文章编号:1000-0615(2007)06-0726-05

## 鳊皮肤黏液 IgM 样蛋白的纯化

罗霞<sup>1,2</sup>, 潘厚军<sup>1</sup>, 巩华<sup>1</sup>, 石存斌<sup>1</sup>, 刘瑞明<sup>1</sup>, 吴淑勤<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380;

2. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524088)

**摘要:**对经嗜水气单胞菌全菌疫苗浸泡免疫后的鳊皮肤黏液中的免疫球蛋白采用盐析法、重组蛋白 A (HiTrap rProteinA Sepharose) 亲和层析法及鼠抗鳊血清 IgM 单克隆抗体偶联的 Sepharose 4B 亲和层析法分离纯化, 并通过 SDS-PAGE 及 Western-blot 技术对纯化蛋白的部分特性进行分析比较。结果表明:50% 硫酸铵溶液可以沉淀黏液中大部分蛋白, 条带仍较多, 约十几条, 其中含有 72 ku 和 29 ku 的条带, 因此仅可作为免疫球蛋白粗提的方法; Sepharose 4B 亲和层析法所提取鳊黏液 Ig 经 SDS-PAGE 检测, 只含有 72 ku 和 29 ku 2 个条带(初步认为鳊黏液 Ig 的重链和轻链), 与鳊血清 IgM 的重、轻链分子量相同; rProteinA 亲和层析法所提蛋白除具有上述重链(72 ku)和轻链(29 ku)外, 还含有 43 ku 的蛋白带(可能为鳊黏液 Ig 另外一种形式的重链)。Western-blot 显示, 兔抗鳊 Ig 多克隆抗体可与 72 ku 及 43 ku 条带发生反应。两种亲和法所提蛋白纯度较高, 但含量较低, 条带较淡, 仅可作为实验室小量提纯鳊黏液 Ig 的有效方法。

**关键词:**鳊; 皮肤黏液免疫球蛋白; 盐析; 亲和层析

**中图分类号:**S 917

**文献标识码:**A

## Purification of skin mucus IgM-like proteins in *Siniperca chuatsi*

LUO Xia<sup>1,2</sup>, PAN Hou-jun<sup>1</sup>, GONG Hua<sup>1</sup>, SHI Cun-bin<sup>1</sup>, LIU Rui-ming<sup>1</sup>, WU Shu-qin<sup>1</sup>

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

**Abstract:** Skin mucus immunoglobulin was purified by the methods of ammonium sulfate precipitation, HiTrap rProteinA Sepharose affinity chromatography and Sepharose 4B linked with mouse monoclonal antibody against serum IgM affinity chromatography from *Siniperca chuatsi* immersed with inactivated *Aeromonas hydrophila* (Ah) strain GYK1. And partial characteristics of purified proteins were analyzed and compared by SDS-PAGE and Western-blot. The results revealed that most proteins in mucus were precipitated by 50% ammonium sulfate solution, so it can only be a crude method. Determined by SDS-PAGE, *Siniperca chuatsi* skin mucus immunoglobulin purified by Sepharose 4B affinity chromatography has only two bands of 72 ku and 29 ku, the same two bands as those in serum. Besides the heavy chain (72 ku) and the light chain (29 ku) mentioned above, the immunoglobulin purified by HiTrap rProteinA, has a 43

收稿日期:2007-01-15

资助项目:国家科技支撑计划(2006BAD03B05); 广东省科技计划(2004B20301003); 广东省自然科学基金(04001503)

作者简介:罗霞(1982-), 女, 山东济宁人, 硕士研究生, 从事水产经济动物免疫学及病害研究。Tel:020-81617592, E-mail: lxwenhao@163.com

通讯作者:吴淑勤, Tel:020-81616813, E-mail: wushuqin001@21.cn.com

ku protein band, which may be another kind of heavy chain. Western-blot analysis showed that the rabbit polyclonal antibody can recognize bands of 72 ku and 43 ku. The experiment also proved that both the methods of HiTrap rProtein A and Sepharose 4B affinity chromatography were effective to purify proteins in small quantity, whereas the contents were relatively low.

**Key words:** *Siniperca chuatsi*; skin mucus immunoglobulin; ammonium sulfate precipitation; affinity chromatography

覆盖在鱼体皮肤、鳃和胃肠道等器官的黏膜样淋巴组织 (mucosa-associated lymphoid tissue, MALT) 及其分泌的黏液, 构成了鱼类的黏膜免疫系统, 鱼类生活在富含病原的水环境中, 黏膜与外界环境直接接触, 构成机体抵抗病原入侵的第一道防线<sup>[1-3]</sup>。目前已经从多种鱼类体液中分离到免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig) 并对其理化性质进行了较为详尽的阐述, 除血清外, 由 B 淋巴细胞产生的免疫球蛋白也在皮肤黏液、肠黏液、胆汁和鱼卵中发现<sup>[4]</sup>。到目前为止, 已报道的硬骨鱼类免疫球蛋白主要有 IgM、IgD 以及近年在虹鳟 (*Dncorhynchus mykiss*) 体内发现的 IgT 和在斑马鱼 (*Danio rerio*)、鲤 (*Cyprinus carpio*) 体内发现的 IgZ, 但在已发现的这 4 种免疫球蛋白中只有 IgM 被证明具有免疫应答作用<sup>[5-7]</sup>。

国外早在上世纪八九十年代就已经从羊头鲷 (*Archosargus probatocephalus*)、香鱼 (*Plecoglossus altivelis*)、虹鳟及鲑 (*Parasilurus asorus*) 等鱼类皮肤黏液中发现了免疫球蛋白 IgM, 国内对鱼类黏膜免疫的研究起步较晚, 近几年才对草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、鲤、鲫 (*Carassius auratus*) 等皮肤黏液中的免疫球蛋白及斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 等的皮肤、眼角膜、鳃、肠道等黏膜免疫组织结构进行研究<sup>[8-11]</sup>。

到目前为止, 对作为我国传统的名贵商品鱼和出口创汇重要养殖品种之一的鳊 (*Siniperca chuatsi*) 的研究还主要集中在系统免疫方面<sup>[12-13]</sup>, 对其黏膜免疫的研究尚未见报道, 本文主要利用亲和层析的方法对经嗜水气单胞菌全菌灭活疫苗浸泡免疫的鳊皮肤黏液中的免疫球蛋白进行提取纯化, 并通过 SDS-PAGE 及 Western-blot 技术对纯化蛋白的部分特性进行分析比较。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

鳊, 购自广东省南海市某一养殖场, 体重

( $325.3 \pm 15.0$ ) g, 体长 ( $25.2 \pm 2.5$ ) cm。挑选健康无疾病的鳊 20 尾, 于水泥池中暂养 7 d, 水温  $28 \sim 29$  °C, 期间投喂活的鲢鱼苗作为饵料。嗜水气单胞菌 GYK1 株 (*Aeromonas hydrophila*, Ah), 由本实验室自行分离、鉴定<sup>[14]</sup>。

鼠抗鳊血清 IgM 单抗: 7F12-F6 株, 福建省农业科学院畜牧兽医研究所和本研究所合作制备<sup>[15]</sup>; HRP-羊抗鼠 IgG: 美国 Jackson 公司产品; 溴化氰 (CNBr) 活化的 Sepharose 4B: Pharmacia 产品; HiTrap rProteinA Sepharose 1 mL 预装柱: 北京韦氏博慧色谱科技有限公司产品; 蛋白质分子量 Marker: 中国科学院上海生物化学研究所产品; 考马斯亮兰蛋白测定试剂盒: 南京建成生物工程研究所产品; 0.45  $\mu\text{m}$  硝酸纤维素膜: 美国 Osmonics 产品。

### 1.2 嗜水气单胞菌菌苗的制备

将保藏的嗜水气单胞菌接种于营养琼脂平板上,  $28$  °C 培养 24 h, 划线转接, 挑取单菌落接种于营养肉汤培养基中,  $28$  °C 培养 24 h, 0.3% 的甲醛室温灭活 3 d。取 200  $\mu\text{L}$  上述灭活的菌液 100 倍稀释, 经营养琼脂平板检测无活菌存在后, 8 000 g 离心 20 min, 菌体重悬于 0.65% 生理盐水中, 比浊法调整菌浓度为  $10^9$   $\text{mL}^{-1}$ ,  $4$  °C 保存备用。

### 1.3 浸泡免疫

实验鱼于水泥池中暂养 7 d, 于 80 L 终浓度为  $10^7$   $\text{mL}^{-1}$  菌苗中浸泡免疫 30 min。为刺激鳊皮肤黏膜产生更多的免疫球蛋白, 7 d 后同样方法加强免疫一次。

### 1.4 样品收集与处理

于加强免疫后第 7 d, 取 5 尾经上述方法免疫的鳊, 用洁净的玻璃片轻轻刮取鱼体表面皮肤, 将所取黏液混合, 加入等量生理盐水, 10 000 g,  $4$  °C 离心 30 min, 取上清,  $-70$  °C 冻存备用。

### 1.5 鳊黏液免疫球蛋白 (Ig) 的提取纯化

硫酸铵粗提 取上述 1.4 中制备的黏液样品, 缓慢加入 pH 7.0 的饱和硫酸铵溶液, 使其终

浓度达 50%, 4 °C 过夜, 10 000 g、20 min 离心弃上清, 沉淀溶于相同体积 0.01 mol·L<sup>-1</sup> pH 7.4 的 PBS 中, PBS 透析 48 h, 期间更换透析液, 聚乙二醇(PEG-20000) 浓缩, 获黏膜抗体粗提物, -70 °C 保存。

Sepharose 4B 亲和柱提纯鳃黏液 Ig 称取 CNBr 活化的 Sepharose 4B 1.5 g, 1 mmol·L<sup>-1</sup> HCl 中浸泡、膨化 15 min, 偶联缓冲液(0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub> pH 8.3, 含 0.5 mol·L<sup>-1</sup> NaCl) 洗胶, 快速加入经 NaHCO<sub>3</sub> 透析平衡的鼠抗鳃血清 IgM 单克隆抗体 7F12-F6 腹水, 室温轻摇 2 h, 1 mol·L<sup>-1</sup> 乙醇胺(pH 8.0) 封闭多余位点, 将洗涤好的 Sepharose 4B 灌制亲和柱(10 cm × 1 cm), 平衡缓冲液(0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS, pH 7.4) 平衡后上样(样品为 1.4 中保存的黏液, 经 0.45 μm 滤膜过滤), PBS 充分洗涤未结合蛋白, 洗脱液(0.1 mol·L<sup>-1</sup> 甘氨酸缓冲液, pH 2.4) 洗脱结合蛋白, 快速用 Tris 缓冲液中和洗脱蛋白至中性, PEG-20000 浓缩, -70 °C 冻存备用。

HiTrap rProteinA Sepharose 亲和柱提纯鳃黏液 Ig 5 倍柱体积平衡缓冲液 PBS 平衡柱子后上样(样品同上), 为使鳃黏液免疫球蛋白与 rProteinA 充分结合, 将样品在柱床上 4 °C 孵育 5 h, 然后再用平衡缓冲液 PBS 洗脱未结合蛋白至 OD<sub>280</sub> = 0, 甘氨酸洗脱液洗脱目的蛋白, 1 mL 分管收集, 为防止蛋白变性立刻用中和液中和, PEG-20000 浓缩, -70 °C 冻存备用。

### 1.6 蛋白浓度的测定

蛋白浓度的测定参照南京建成生物工程研究所生产的考马斯亮兰蛋白测定试剂盒说明书。

样品中蛋白含量计算公式如下:

$$\text{蛋白含量}(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}) =$$

$$\frac{\text{测定管 OD 值} - \text{空白管 OD 值}}{\text{标准管 OD 值} - \text{空白管 OD 值}} \times \text{标准管浓度}$$

其中标准管浓度为 0.615 μg·mL<sup>-1</sup>。

### 1.7 SDS-PAGE 电泳分析

采用 Mini-Protein cell III 系统(BioRad), 按文献[16]的方法进行不连续垂直凝胶电泳, 5% 浓缩胶, 12% 分离胶。样品与上样缓冲液(60 mmol·L<sup>-1</sup> 的 Tris-HCl, pH 6.8, 25% 甘油, 0.1% 溴酚蓝, 2% SDS, β-巯基乙醇 14.4 mmol·L<sup>-1</sup>) 4:1 混合后, 沸水中煮 3 min, 每孔上样量 15 μL。样品在浓缩胶时调电压 100 V, 分离胶时加大到 120

V, 电泳约 1.5 h, 考马斯亮兰 R-250 染色。

### 1.8 兔抗鳃 Ig 血清多克隆抗体的制备

实验用新西兰大白兔购自广东省医学实验动物中心。暂养 7 d 后用经硫酸铵粗提的 Ig 进行免疫, 免疫过程参照文献[1]的方法进行。

### 1.9 蛋白质免疫印迹(Western-blot) 试验

鳃黏液免疫球蛋白经 SDS-PAGE 后, Mini Trans-Blot Transfer Cell (Bio-Rad) 转移至 0.45 μm 的硝酸纤维素膜上(恒流 200 mA 转移 3 h), 5% 脱脂奶粉封闭过夜, 一抗为 1:500 稀释的兔抗鳃 Ig 多克隆抗体, 二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG, 1:2000 稀释, DAB 显色。

## 2 结果

### 2.1 蛋白浓度测定结果

鳃皮肤黏液蛋白经 50% 硫酸铵粗提后所得蛋白浓度为 0.618 μg·mL<sup>-1</sup>, 经 rProteinA 层析后为 0.421 μg·mL<sup>-1</sup>, 经 Sepharose 4B 层析后为 0.385 μg·mL<sup>-1</sup>。

从结果可以看出, 50% 硫酸铵粗提法特异性不强, 混有其它杂蛋白, 因此浓度较高; 另外两种方法特异性较强, 但蛋白损失较大。

### 2.2 鳃黏液免疫球蛋白电泳图谱

50% 硫酸铵可以沉淀黏液中大部分蛋白, 含有约十几条电泳条带, 包括 72 ku 和 29 ku 两条蛋白带, 与鳃皮肤黏液相比, 仅去除了少数几条蛋白带, 因此该法仅适于对蛋白进行粗提; 鳃黏液分别过 Sepharose 4B 亲和柱和 rProteinA Sepharose 亲和柱后所提蛋白较纯, 前者仅含有 72 ku 和 29 ku 两条蛋白条带, 可能分别代表鳃黏液 Ig 的重链和轻链; 后者除上述重链和轻链外, 还含有 43 ku 的蛋白带。两种亲和法所提蛋白浓度均较低, 条带较淡(图 1)。

### 2.3 Western-blot 检测

由图 2 可知, 兔抗鳃 Ig 多克隆抗体可与鳃黏液 Ig 重链(72 ku 条带) 发生反应, 而在轻链(29 ku 条带) 无反应发生。此外, 在 43 ku 条带处, 也可发生较弱的反应。

## 3 讨论

免疫球蛋白在鱼类体液免疫应答中起着十分重要的作用, 并且可以作为鱼类免疫机理和鱼病免疫诊断研究的有力工具, 现已受到众多学者的

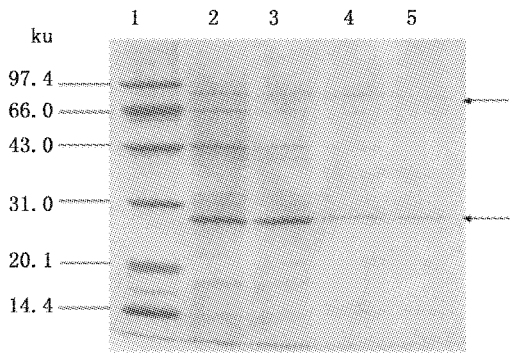


图1 鳊皮肤黏液蛋白 SDS-PAGE 图谱

Fig. 1 SDS-PAGE profiles of immunoglobulin extracted from skin mucus of *Siniperca chuatsi*

1. 蛋白质标准; 2. 免疫鳊皮肤黏液; 3. 50% 硫酸铵沉淀提取鳊黏液 Ig; 4. rProteinA Sepharose 亲和柱提取鳊黏液 Ig; 5. Sepharose 4B 亲和柱提取鳊黏液 Ig

1. marker ; 2. skin mucus of immunized *Siniperca chuatsi*; 3. skin mucus Ig of *Siniperca chuatsi* purified by SAS ; 4. skin mucus Ig of *Siniperca chuatsi* purified by rProteinA; 5. skin mucus Ig of *Siniperca chuatsi* purified by Sepharose 4B

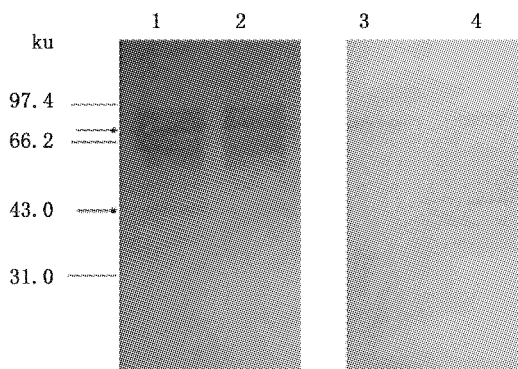


图2 鳊皮肤黏液免疫球蛋白 Western-blot 图谱

Fig. 2 Western-blot analysis of skin mucus immunoglobulin of *Siniperca chuatsi*

1. 免疫鳊皮肤黏液; 2. 50% 硫酸铵沉淀提取鳊黏液 Ig; 3. Sepharose 4B 亲和柱提取鳊黏液 Ig; 4. rProteinA Sepharose 亲和柱提取鳊黏液 Ig

1. skin mucus of immunized *Siniperca chuatsi*; 2. skin mucus Ig of *Siniperca chuatsi* purified by SAS; 3. skin mucus Ig of *Siniperca chuatsi* purified by Sepharose 4B; 4. skin mucus Ig of *Siniperca chuatsi* purified by rProteinA

广泛关注。目前提取纯化鱼类免疫球蛋白的方法已经较为成熟,主要有盐析法、柱层析、离子交换层析、疏水层析及亲和层析等方法<sup>[9-10,15-19]</sup>,但在众多方法中,亲和层析是依靠生物高分子所特有的生物活性进行分离提纯的特异性吸附层析,具有高效、快速、纯化效果好的优点,是提取 IgM 的最佳方法。

盐析法是利用抗体与杂质之间对盐浓度敏感

程度的差异性进行的,是实验室最常用的提取免疫球蛋白的方法,该法不易引起蛋白变性,价格便宜,废液不污染环境,可以一步沉淀出大量的免疫球蛋白,从而使 Ig 得到浓缩。本实验中由于鳊皮肤黏液中的蛋白种类及含量均较少,因此选取了较高饱和度——50% 的饱和硫酸铵溶液对鳊皮肤黏液中的蛋白进行沉淀,但此法得到的 Ig 混有较多杂蛋白,仅适于粗提之用。

大量研究证明,IgM 是鱼类重要的免疫球蛋白,其重链分子量为 70 ku 左右,轻链分子量为 30 ku 左右<sup>[11-12,17-19]</sup>。张永安等<sup>[12]</sup>利用山羊 IgG-琼脂糖凝胶亲和层析柱对鳊血清免疫球蛋白提取纯化后得到 72 ku 和 29 ku 两条蛋白带。黄艳青等<sup>[20]</sup>用甘露糖结合蛋白亲和层析纯化黄颡鱼 (*Pseudobagrus fulvidraco*) 血清免疫球蛋白,得到高纯度的 Ig,其重轻链分别为 72.4 ku 和 29.9 ku,操作简便、耗时少。本实验尝试利用鼠抗鳊血清 IgM 单克隆抗体偶联的 Sepharose 4B 亲和柱及重组蛋白 A 琼脂糖凝胶 (HiTrap rProteinA Sepharose) 亲和柱两种亲和层析法对鳊皮肤黏液中的免疫球蛋白进行提取纯化。实验中经鼠抗鳊血清 IgM 单克隆抗体偶联的 Sepharose 4B 亲和柱提取纯化后的蛋白在上样缓冲液中  $\beta$ -巯基乙醇的解离作用下,经 SDS-PAGE 检测,并通过电泳迁移率计算得到的两条带分别为 72 ku 和 29 ku,与上述张永安等<sup>[12]</sup>所提鳊血清免疫球蛋白重、轻链分子量大小相同,因此,鳊皮肤黏液和血清中可能存在相同的免疫球蛋白单体,但其多聚体形式是否相同仍需进一步的实验验证。

Protein A 是金黄色葡萄球菌的细胞壁组分,可以特异地结合 IgG 和部分 IgM 的 Fc 部分,并且对不同的 Ig 有不同的亲和力。国内外有很多利用该法对鱼类血清 IgM 进行纯化的报道<sup>[17-21]</sup>,特别是商品化的偶联了 Protein A 介质的出现使得这一技术更加方便快捷<sup>[16]</sup>。实验中利用该法所提蛋白经 SDS-PAGE 检测,发现除具有与 Sepharose 4B 亲和柱所提蛋白相同的两条带 (72 ku 和 29 ku) 外,还含有 43 ku 的蛋白条带。Cain 等<sup>[22]</sup>在对虹鳟的研究中也发现其黏液 Ig 除具有与血清 Ig 重链 (72 ku) 和轻链 (28 ku) 相同的蛋白条带外,还具有 68 ku 和 43 ku 的条带。Western-blot 检测显示,兔抗鳊 Ig 多克隆抗体除可与重链反应外,还可与 43 ku 条带发生较弱的

反应,与张永安等<sup>[13]</sup>对鳊血清免疫球蛋白的研究所得结论相似,他们发现当把兔抗血清稀释到1:16384时,仍可与43 ku条带发生反应,因此他们推断该条带可能代表另一种类型的免疫球蛋白重链。

上述两种亲和层析法所提蛋白浓度均较低,PAGE图谱条带较淡,可能是由于黏液中所含蛋白浓度原本较低,再加上提取洗脱过程中蛋白的损失,并且ProteinA与鱼类IgM结合力较弱所致。有报道表明,蛋白A和大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)以及南极鱼(*Trematomus newnesi*)亲和力都相对较低<sup>[19]</sup>。但亲和层析是根据抗原抗体特异性结合的原理,所提蛋白纯度较高,基本无其它杂蛋白,特别是HiTrap rProteinA Sepharose亲和法操作简单,周期短,可以作为实验室小量提取免疫球蛋白的有效方法。Sepharose 4B亲和柱由于需要偶联合适的配体,配体制备过程一般都较为繁琐,因此可能会受到一定程度的限制。Western-blot显示兔抗鳊Ig多克隆抗体只与鳊黏液免疫球蛋白的重链发生反应,这与对鲫<sup>[10]</sup>以及欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)<sup>[17]</sup>等的研究结果相类似,可能是由于轻链免疫原性弱,因而产生的多克隆抗体只是针对Ig的重链。

#### 参考文献:

- [1] Angelies B M, Sarmon B M. Kinetics of adhesion of selection fish pathogenic *vibrio* strains to skin mucus of gilt head sea bream (*Sparus anrata* L.) [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(10): 3650-3654.
- [2] 巩华, 吴淑勤, 潘厚军. 硬骨鱼类黏液免疫机理研究概况[J]. 动物医学进展, 2006, 27(6): 24-28.
- [3] 罗晓春, 谢明权, 黄玮, 等. 鱼类黏液免疫研究进展[J]. 水产学报, 2005, 29(3): 411-416.
- [4] 王长法, 安利国, 杨桂文, 等. 鱼类免疫球蛋白研究进展[J]. 中国水产科学, 1999, 6(2): 105-107.
- [5] Hansen J D, Landis E D, Phillips R B. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish [J]. J Immunol, 2005, 102(19): 6919-6924.
- [6] Savan R, Aman A, Nakao M, et al. Discovery of a novel immunoglobulin heavy chain gene chimera from common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Immunogenetics, 2005, 57(6): 458-463.
- [7] Shin G, Lee H J, Palaksha K J, et al. Production of monoclonal antibodies against serum immunoglobulins of black rockfish (*Sebastes schlegeli* Higendorf) [J]. Veterinary Science, 2006, 7(3): 293-295.
- [8] 杨桂文, 安利国, 王长法, 等. 鲤鱼皮肤黏液与血清中免疫球蛋白的比较研究[J]. 动物学研究, 1998, 19(6): 489-492.
- [9] 陈昌福, 纪国良, 罗宇良, 等. 草鱼体表和肠黏液中Ig的初步分析[C]//鱼病学研究论文集(II). 北京: 海洋出版社, 1995: 21-25.
- [10] 陈焱, 王石泉, 韩晓冬, 等. 鲫鱼血清和皮肤黏液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] 罗晓春, 李安兴, 谢明权. 斜带石斑鱼黏膜免疫系统结构的研究[J]. 水生生物学报, 2005, 29(2): 193-198.
- [12] 张永安, 聂品. 鳊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(2): 192-194.
- [13] Zhang Y A, Nie P. Serum immunoglobulin of the Mandarin fish, *Siniperca chuatsi* with development of polyclonal antibody [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2002, 20(4): 332-337.
- [14] 潘厚军, 吴淑勤, 董传甫, 等. 鳊致病性嗜水气单胞菌 GYK1 株的鉴定、毒力及溶血性[J]. 上海水产大学学报, 2004, 13(1): 23-29.
- [15] 王凡, 林天龙, 潘厚军, 等. 鳊血清免疫球蛋白单克隆抗体的制备及其特性分析[J]. 水产学报, 2006, 30(2): 285-288.
- [16] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [17] 林天龙, 陈强, 俞伏松, 等. 欧洲鳗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.
- [18] 沈锦玉, Thompson K D, Adams A, 等. 银鲫IgM的纯化及其单克隆抗体的制备[J]. 水产学报, 2006, 30(3): 421-424.
- [19] 鄢庆彬, 韩一凡, 高天翔, 等. 大黄鱼血清IgM纯化及其兔抗血清的制备[J]. 中国水产科学, 2006, 13(3): 475-479.
- [20] 黄艳青, 王桂堂, 孙军, 等. 黄颡鱼免疫球蛋白的纯化及分子量的初步测定[J]. 水生生物学报, 2003, 27(6): 654-656.
- [21] 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.
- [22] Cain K D, Jones D R, Raison R L. Characterisation of mucosal and systemic immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using surface plasmon resonance [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2000, 10: 651-666.