

文章编号: 1000-0615(2008)03-0464-07

黄鳍鲷骨骼肌伴肌动蛋白的纯化及其抗体制备

杜雪莉^{1,2}, 周利亘³, 王锡昌², 熊何健¹, 苏文金¹, 曹敏杰¹

(1. 集美大学生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 上海水产大学食品学院, 上海 200090;
3. 浙江省农业科学院食品加工研究所, 浙江 杭州 310021)

摘要: 采用 Sephacryl S-400 凝胶过滤柱层析和电洗脱等纯化方法, 首次从黄鳍鲷骨骼肌中分离纯化到伴肌动蛋白, 并制备了特异性多克隆抗体。多克隆抗体经 Protein A-Sepharose 亲和层析柱纯化得到高纯度免疫球蛋白 G (IgG)。采用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)、免疫斑点印迹 (Dot-Blot) 和免疫印迹 (Western-Blot) 等方法对纯化的伴肌动蛋白及其多克隆抗体进行分析鉴定, 并研究了不同贮藏条件下伴肌动蛋白的变化情况。SDS-PAGE 结果显示本研究从黄鳍鲷骨骼肌中分离纯化了高纯度伴肌动蛋白; Dot-Blot 检测结果显示兔抗黄鳍鲷伴肌动蛋白多克隆抗体效价为 5×10^4 ; Western-blot 检测表明兔抗黄鳍鲷伴肌动蛋白多克隆抗体能与肌原纤维蛋白中的伴肌动蛋白发生特异性反应, 而与其它蛋白不发生免疫交叉反应。

关键词: 黄鳍鲷; 伴肌动蛋白; 纯化; 抗体

中图分类号: Q 512 **文献标识码:** A

伴肌动蛋白 (Nebulin) 是存在于肌原纤维肌小节中的一种大分子量蛋白, 分子量约为 500~900 ku^[1], 也有文献报道约为 800 ku^[2], 占肌原纤维蛋白总量的 3% 左右。Wang 等^[2] 在研究脊椎动物骨骼肌大分子量蛋白时发现, 除了肌联蛋白和肌球蛋白重链以外, 还有一种大分子量的肌原纤维蛋白, 它与肌联蛋白和肌球蛋白重链在免疫化学性质上有一定区别, 最初将其命名为 “band3”。在随后的研究中, 该蛋白被命名为伴肌动蛋白。伴肌动蛋白自 Z 线向骨骼肌 N 末端细丝自由延伸, 跟 N 末端细丝连接或是部分连接^[3-4]。伴肌动蛋白在肌原纤维结构中起 “分子标尺” 的作用^[5-9], 调节参与组装细丝的肌动蛋白单体的数量。伴肌动蛋白与肌联蛋白 (Titin) 共同形成肌原纤维周围的柔性丝状网。

迄今为止, 仅有 Wang 等^[10] 从兔的背肌中利用 SDS 加热处理、凝胶过滤等方法得到变性的伴肌动蛋白。作为高分子量肌原纤维结构蛋白, 伴

肌动蛋白在鱼体肌肉弹性的形成及品质变化过程中的作用具有较高的研究价值。最近, Mitsuhashi 等^[11] 研究了鲭鱼在 4 °C 贮藏条件下肌联蛋白和伴肌动蛋白的变化发现, 即使贮藏至第 7 天, 仍有 50% 左右的肌联蛋白未被降解, 提示该蛋白良好的稳定性。相反, 在同样贮藏条件下, 伴肌动蛋白至第 4 天几乎完全被降解。因此推测, 伴肌动蛋白的降解与鱼体死后弹性变化有直接关系。

黄鳍鲷 (*Sparus latus*), 属鲈形目 (Percoiformes) 鲷科 (Sparidae), 广泛分布于红海、阿拉伯海、印度、日本、朝鲜、印度尼西亚、菲律宾的近海及我国广东、福建和台湾等省近海, 是我国海水养殖的重要经济鱼类之一。本文以海水黄鳍鲷为研究对象, 旨在从其肌肉中分离纯化伴肌动蛋白并制备高特异性多克隆抗体, 为进一步研究该蛋白在鱼类保鲜贮藏过程中的分解变化提供参考。

收稿日期: 2007-07-05

资助项目: 国家自然科学基金 (30571450); 福建省自然科学基金 (2006J0418); 集美大学中青年创新团队基金 (2006A002)

作者简介: 杜雪莉 (1978-), 女, 河北石家庄人, 硕士研究生, 主要从事食品生物化学与营养卫生等研究。

通讯作者: 曹敏杰, Tel: 0592-6180378, E-mail: mjcao@jmu.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

体重 200 g 左右的鲜活养殖黄鳍鲷购自集美菜市场,即杀后取背部肌肉,立即使用或冻存于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用。免疫动物为健康雄性纯种新西兰大白兔,体重约 2 kg。购自厦门大学医学院实验动物中心。

Sephacryl S-400 和 Protein A Sepharose 从 Amersham Biosciences 公司购得;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 从 DAKO 公司购得;二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)从 Pierce 公司购得;完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂、苯甲基磺酰氟(Phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)、二硫苏糖醇(DL-dithiothreitol, DTT)、考马斯亮蓝 R-250 和 EGTA 为美国 Sigma 公司产品;其它试剂均为化学纯或分析纯。

1.2 主要仪器及设备

高速冷冻离心机(Beckman);凝胶成像仪(Vilber Lourmat);组织捣碎机(Kinematica);紫外分光光度计(Varian);电洗脱装置(442, Bio-Rad);恒温水浴(Memmert);蛋白电泳及电转移装置(Bio-Rad)等。

1.3 方 法

伴肌动蛋白的提取与纯化 以下整个过程在 $0\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 进行。新鲜的黄鳍鲷背肌(约 30 g),加入 10 倍体积的低盐浓度缓冲液($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-maleate, $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGTA, $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT, $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PMSF, $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, pH 6.8),用组织捣碎机捣碎 2 次(每次不超过 15 s,间隔 1 min), $5\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,弃上清,重复以上操作 2 次。将沉淀悬浮于 10 倍体积含 0.1% (v/v) Triton X-100 的低盐浓度缓冲液(组成同上)中,快速组织捣碎 1 次,搅拌 10 min 后, $5\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,弃上清。再次将沉淀悬浮于 10 倍体积的低盐浓度缓冲液中,组织捣碎 1 次,不超过 10 s,离心后弃上清,重复以上操作 2 次。在 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下将沉淀溶于 SDS 缓冲液($10\text{ mmol}\cdot$

L^{-1} Tris-HCl, 3% SDS, $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGTA, $40\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT, $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PMSF, pH 8.0) 中,搅拌 20 min 后,离心,收集上清。

取上述制备的上清液 7.5 mL 上样于用缓冲液($40\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, 0.1% SDS, $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸钠, $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGTA, $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT, pH 8.0)平衡的 Sephacryl S-400 ($1.5\times 98\text{ cm}$)凝胶过滤柱,用相同缓冲液洗脱,每管收集 1 mL。测定蛋白质的 A_{280} 值并进行 SDS-PAGE 检测,收集部分纯化的伴肌动蛋白。

将部分纯化的伴肌动蛋白 SDS 化后上样于 SDS-PAGE 凝胶电泳(4%凝胶)^[12],电泳完毕后,切下胶的两个泳道进行染色,对照染色结果将含有目的蛋白的胶条切下。在离心管中捣碎后,转移到 Bio-Rad 公司的 442 型电洗脱装置中,进行电泳回收,电泳条件为每管 8 mA,时间 15 h。电泳完毕后,检测洗脱蛋白的 A_{280} 值并进行 SDS-PAGE 作蛋白纯度检测。

兔抗黄鳍鲷伴肌动蛋白抗血清的制备 选用体重 2 kg 左右的新西兰家兔进行免疫。第一次基础免疫用纯化的伴肌动蛋白 100 μg 和等体积(1 mL)弗氏完全佐剂混匀进行皮下肌肉多点注射;两周后第二次加强免疫,用纯化的伴肌动蛋白 100 μg 和等体积弗氏不完全佐剂;隔两周后加强免疫 1 次,重复 2 次。抗原用量同第二次。加强免疫 3 次后取血并收集血清。

将上述中获得的兔抗伴肌动蛋白抗血清经 Protein A-Sepharose 亲和层析柱($1\times 5\text{ cm}$)纯化,纯化步骤参照分子克隆实验指南(第三版)^[13]。并以 SDS-PAGE 鉴定纯化的免疫球蛋白 G (IgG)。

多克隆抗体效价及其特异性检测 将纯化的 IgG 经不同倍数稀释,利用免疫斑点印迹法、Western-Blot 鉴定抗体的效价及其特异性。

伴肌动蛋白原液浓度为 $232\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,用毛细管在硝酸纤维素膜上点样。待膜干后,用 5% 脱脂乳封闭 1 h。然后将膜小条分别与不同稀释度稀释的抗血清反应 2.5 h,用 TBST($40\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8.0, $145\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 0.05% Tween20)清洗膜 $4\times 5\text{ min}$ 后与

HRP 标记的羊抗兔 IgG 反应 1 h, TBST 清洗膜 4×5 min 后, 用 DAB 显色液显色。以能使蛋白条带显色的最高抗体稀释度为抗体的滴度。

本研究制备的抗体的特异性还通过免疫印迹法进行检测。

鱼体冷藏过程中伴肌动蛋白的变化 鲜活黄鳍鲷先置于冰水中使休克数分钟, 立即用刀背敲鱼头致死, 去内脏、去鳞、去腮洗净后, 从背部取一小块肉供实验用。鱼体分别置于 4℃ 冰箱和 18℃ 条件下。为避免冷藏过程中微生物的繁殖, 用浸泡于浓度为 0.02% 叠氮钠的滤纸包裹住鱼身。此后按时取一小块背肌, 仍用浸有叠氮钠的滤纸包裹住鱼身后冷藏, 如此每日取样直至最终贮藏天数。

肌原纤维的制备方法参照 Huff-Lonergan 等^[14]并根据 Mitsuhashi 等^[11]的方法稍加修改。

2 结果与分析

2.1 伴肌动蛋白的 Sephacryl S-400 柱层析纯化结果 经 SDS 缓冲液处理后的上清液上样于 Sephacryl S-400 后, 得到三个主要蛋白洗脱峰(图 1)。经 SDS-PAGE 检测第一个蛋白洗脱峰的下坡处主要为伴肌动蛋白, 收集图 1 中实线表示的对应组分用于伴肌动蛋白的下一步纯化。

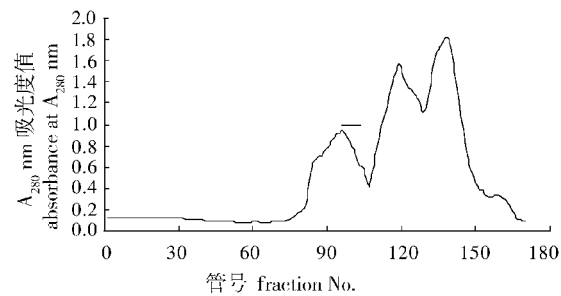


图 1 黄鳍鲷伴肌动蛋白 Sephacryl S-400 的柱层析结果
Fig. 1 Sephacryl S-400 chromatography of Nebulin derived from sea bream

2.2 伴肌动蛋白 Sephacryl S-400 柱层析的电泳检测结果 利用 4% 浓度的 SDS-PAGE 检测 Sephacryl S-400 凝胶过滤后得到的第一个蛋白洗脱峰右侧的不同组分(图 2), 表明本研究得到的蛋白主要是伴肌动蛋白和肌联蛋白的混合物。但从 107 管后即有肌球蛋白重链的出现。收集 97~105 管用于下一步电洗脱纯化。

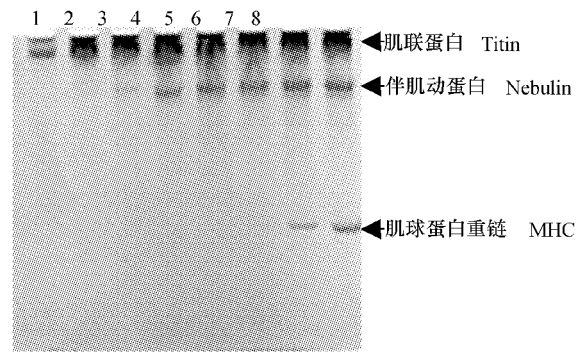


图 2 Sephacryl S-400 凝胶过滤纯化伴肌动蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of purified Nebulin by Sephacryl S-400 chromatography

1. 91 管; 2. 93 管; 3. 95 管; 4. 97 管; 5. 100 管; 6. 105 管; 7. 107 管; 8. 109 管

1. No.91; 2. No. 93; 3. No. 95; 4. No. 97; 5. No. 100; 6. No. 105; 7. No. 107; 8. No. 109

2.3 电洗脱结果

经电洗脱纯化后, SDS-PAGE (4% 浓度) 检测所得到的目的蛋白为伴肌动蛋白(图 3), 无肌联蛋白和肌球蛋白重链的污染, 表明该蛋白已达到电泳级纯度。

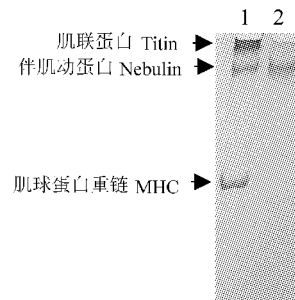


图 3 电洗脱法提纯伴肌动蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of Nebulin purified by electrophoretic elution

1. 肌原纤维总蛋白; 2. 纯化的伴肌动蛋白
1. myofibrillar proteins; 2. purified nebulin

2.4 兔抗黄鳍鲷伴肌动蛋白抗血清的制备及纯化结果 利用制备的高纯度伴肌动蛋白为抗原免疫新西兰家兔, 获得了高滴度抗血清。以 Protein A Sepharose 亲和层析柱纯化抗体, 以 0.1 mol·L⁻¹ 甘氨酸-HCl 缓冲液洗脱得到一特异性结合峰, 结果如图 4 所示。

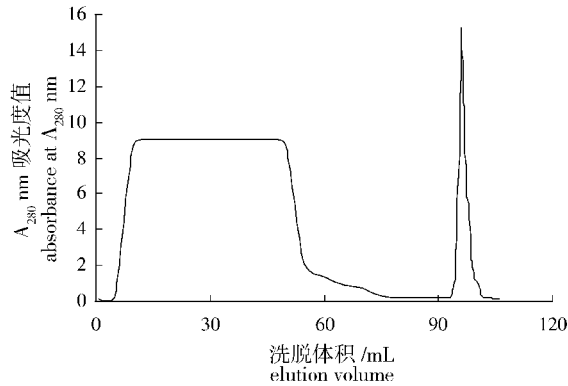


图4 兔抗黄鳍鲷伴肌动蛋白抗体
Protein A Sepharose 亲和层析结果

Fig. 4 Protein A Sepharose affinity column
purification of rabbit anti-nebulin antibody

2.5 兔抗黄鳍鲷伴肌动蛋白抗体电泳检测结果

纯化抗体的 SDS-PAGE 分析结果如图 5 所示。该蛋白为由分子量为 50 ku 的重链和 25 ku 的轻链组成,蛋白纯度大于 95%。计算可得抗体的分子量为 150 ku,表明纯化所得的抗体为免疫球蛋白 G(Immunoglobulin G, IgG)。

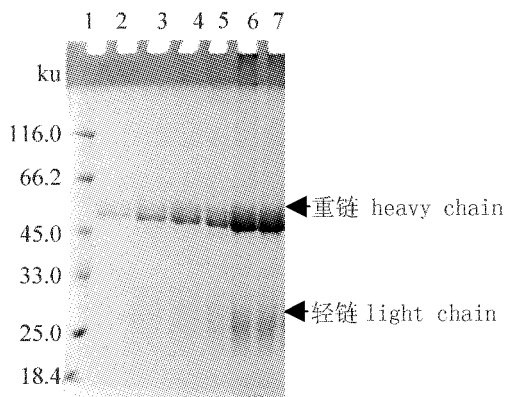


图5 纯化的兔抗伴肌动蛋白抗体的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of purified rabbit
anti-nebulin immunoglobulin G

1. 蛋白标准;2~7. 纯化免疫球蛋白 G
1. protein marker;2~7. purified immunoglobulin G

2.6 免疫斑点印迹法检测抗体效价

按照免疫斑点法检测多克隆抗体效价,结果如图 6 所示。由图可知,即使将抗体稀释至 51 200 倍,仍可用免疫斑点法检测到阳性结果,说明用该法测得的抗体效价至少为 5×10^4 以上。

2.7 Western Blot 检测结果

图 7 为用 Western-Blot 法检测兔抗黄鳍鲷

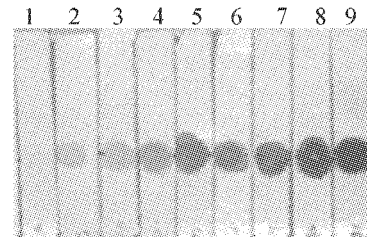


图6 免疫斑点法测定多克隆抗体效价

Fig. 6 Dot blot detection of rabbit anti-sea
bream nebulin polyclonal antibody

1. 阴性对照;2. 51200 倍;3. 25600 倍;4. 12800 倍;5. 6400 倍;6. 3200 倍;7. 1600 倍;8. 800 倍;9. 400 倍
1. negative control;2. 51200 times;3. 25600 times;4. 12800 times;5. 6400 times;6. 3200 times;7. 1600 times;8. 800 times;9. 400 times

伴肌动蛋白多克隆抗体特异性的结果。抗体经 5000 倍稀释后,与纯化的伴肌动蛋白和肌原纤维总蛋白反应的结果表明,该多克隆抗体能与纯化的伴肌动蛋白和肌原纤维总蛋白中的伴肌动蛋白产生特异性免疫反应,而与其它蛋白(如肌球蛋白重链、 α -辅肌动蛋白等)无交叉反应。显示本研究制备了高滴度、高特异性的多克隆抗体。

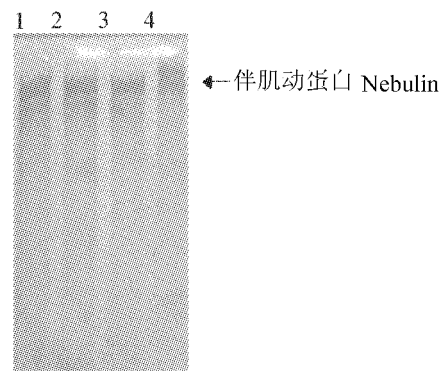


图7 免疫印迹法检测多克隆抗体特异性

Fig. 7 Western-Blot of nebulin using polyclonal antibody

- 1~3. 纯化的伴肌动蛋白;4. 肌原纤维总蛋白
1-3. purified nebulin;4. myofibrillar proteins

2.8 不同贮藏温度(4℃、18℃)下伴肌动蛋白的分解情况

4℃下伴肌动蛋白相当稳定,至第 9 天才有较明显的降解条带出现,即使贮藏 18 d 仍有约 30% 的初始蛋白条带未被降解(图 8-a)。从感官指标看,4℃贮藏条件下,第 5 天开始鱼体变软,弹性及光泽度降低。尽管从第 14 天开始有明显的腥臭味产生,但直至第 18 天,腹腔中鱼骨与肌肉尚未分离。

18 °C下伴肌动蛋白自 24 h 开始降解, 48 h 后有降解产物出现, 120 h 后几乎观察不到伴肌动蛋白的初始条带, 仅能观察到其降解产物(图 8b)。从感官指标看, 18 °C 贮藏条件下, 鱼体在 12 h 即出现异味, 96 h 时有明显的腥臭味产生。

由此可见, 与 4 °C 相比, 18 °C 贮藏温度下伴肌动蛋白的降解速度明显加快, 提示伴肌动蛋白的分解与冷藏温度之间的密切关系。相对而言, 这两种贮藏温度下更高分子量蛋白肌联蛋白的变化并不明显。

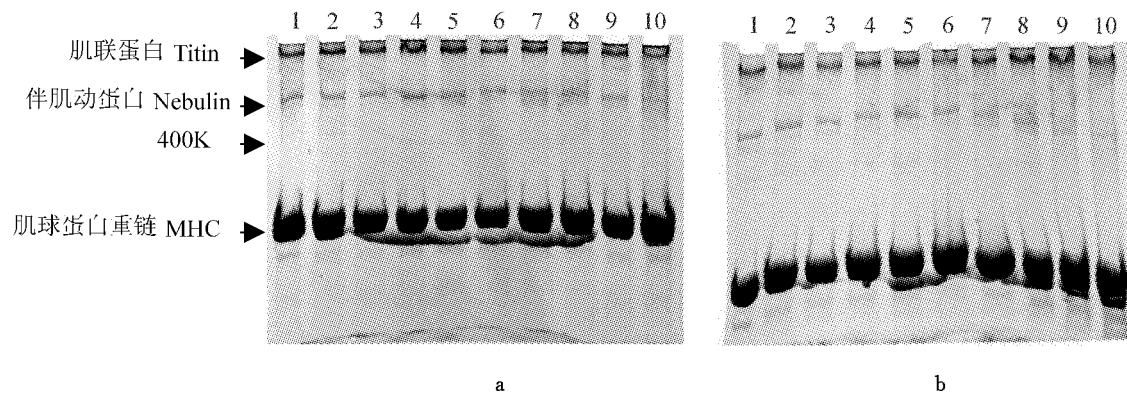


图 8 4 °C (a) 和 18 °C (b) 下伴肌动蛋白的变化

Fig. 8 The degradation of titin and nebulin at 4 °C (a) and 18 °C (b)

a. 1, 0 d; 2, 1 d; 3, 2 d; 4, 3 d; 5, 4 d; 6, 5 d; 7, 9 d; 8, 11 d; 9, 14 d; 10, 18 d

b. 1, 0 h; 2, 1.5 h; 3, 3 h; 4, 6 h; 5, 12 h; 6, 24 h; 7, 48 h; 8, 96 h; 9, 120 h; 10, 188 h

3 讨论

伴肌动蛋白是骨骼肌弹性蛋白的重要组成部分, 在维持肌原纤维结构的完整性和稳定性上起关键作用。近年的研究表明伴肌动蛋白的降解是引起动物死后肌肉软化的影响因素^[11], 引起肌肉软化的确切机理还有待于进一步的研究。

本文中伴肌动蛋白的纯化结果与前期的研究报道基本一致^[2,10]。但是, 经 Sphacryl S-400 凝胶过滤柱层析得到的蛋白峰的分布情况(图 1)与 Wang 等^[10]的报道有所区别, 这可能与蛋白的来源及前处理方法不同有关。Wang 等^[10]是利用兔背肌分离纯化伴肌动蛋白, 与陆生脊椎动物相比, 水产动物蛋白更容易受到蛋白酶的攻击而产生降解。经 Sphacryl S-400 凝胶过滤柱层析后, 并未得到高纯度的伴肌动蛋白。这种原因除了不同种类间蛋白的性质有差别外, 还可能与伴肌动蛋白在鱼肌原纤维蛋白中含量低, 位置比较特殊以及高分子量蛋白与其它蛋白间的相互结合作用等因素有关。剧烈的组织捣碎极易引起肌肉结构蛋白的破坏, 为了得到完整的伴肌动蛋白, 在前期的预处理过程中, 减少了捣碎和离

心的时间及次数。

本研究利用从黄鳍鲷骨骼肌中提纯的伴肌动蛋白对新西兰家兔进行免疫, 获得兔抗黄鳍鲷伴肌动蛋白抗血清。再经 Protein A Sepharose 亲和层析柱纯化, SDS-PAGE 检测结果显示出高纯度的免疫球蛋白 G(图 5)。Dot Blot 和 Western-Blot 检测结果证明获得了高滴度、高特异性多克隆抗体。这种首次获得的抗体为今后通过免疫组织化学法研究伴肌动蛋白在肌肉细胞中的分布以及鱼体冷藏过程中该蛋白的变化规律等提供了有力的技术和理论支持。

伴肌动蛋白的分子量高达 500~900 ku^[1], 是肌肉中仅次于肌联蛋白(3000 ku)的第二大蛋白质, 在 SDS-PAGE 检测时需采用低浓度凝胶。凝胶浓度越低, 胶的柔软度也越高, 加大了 Western-Blot 转膜的难度。此外, 在转膜过程中, 多层滤纸的叠加极易导致凝胶变形及蛋白条带位置移位, 不利于目的蛋白的检测。因此, 本研究采用了在 4% 凝胶中添加浓度为 0.5% 的琼脂糖以增加凝胶的硬度, 收到了良好的效果。

Mitsubishi 等^[11]报道, 鲷 (*Trachurus japonicus*) 急杀处理后, 在 4 °C 贮藏条件下, 伴

肌动蛋白自第 1 天开始即发生降解,至第 4 天蛋白条带完全消失。而本实验采用的黄鳍鲷在 4 °C 贮藏条件下直至第 9 天伴肌动蛋白条带才开始降解,至 18 d 仍有约 30% 的初始蛋白条带未被降解。分析原因可能是鲭为中上层红色肉鱼类,而鲷是中下层白色肉鱼类,前者体内酶活力强、鲜度下降快而后者体内酶活力弱、鲜度下降慢。因此,这两种鱼肌肉中伴肌动蛋白的降解速度的差异极可能与鱼种密切相关。Astier 等^[15]曾报道鲈、剑鱼等在 0、8 和 20 °C 下 72 h 内的降解变化情况,其研究结果与本实验中黄鳍鲷伴肌动蛋白的降解变化情况基本一致,进一步表明伴肌动蛋白的降解速度因鱼种而异。

本研究通过凝胶过滤和电洗脱等方法,首次从黄鳍鲷骨骼肌中分离纯化到伴肌动蛋白并制备了高特异性多克隆抗体。由于相关研究在国内外开展较少,因此,本研究为进一步探索伴肌动蛋白在鱼类低温保藏过程中与鲜度、弹性等指标的变化规律提供了技术和理论支持,也为研究其它种类鱼伴肌动蛋白的变化提供了重要参考。

参考文献:

- [1] Wang K, Wright J. Architecture of the sarcomere matrix of skeletal muscle: Immunoelectron microscopic evidence that suggests a set of parallel inextensible nebulin filaments anchored at the Z line[J]. *J Cell Biol*, 1988, 107: 2199–2212.
- [2] Wang K, Williamson C L. Identification of an N₂ line protein of striated muscle[J]. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.*, 1980, 77: 3254–3258.
- [3] Wallgren-Pettersson C, Pelin K, Hilpela P, *et al.* Clinical and genetic heterogeneity in autosomal recessive nemaline myopathy [J]. *Neuromuscul Disord*, 1999, 9: 564–572.
- [4] Wallgren-Pettersson C, Donner K, Sewry C, *et al.* Mutations in the nebulin gene can cause severe congenital nemaline myopathy [J]. *Neuromuscul Disord*, 2002, 12: 674–679.
- [5] Trinick J. Titin and nebulin: protein rulers in muscle [J]. *Trends Biochem Sci*, 1994, 19: 405–409.
- [6] Marshall W F. Cellular length control systems [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004, 20: 677–693.
- [7] Labeit S, Gibson T, Lakey A, *et al.* Evidence that nebulin is a protein-ruler in muscle thin filaments[J]. *FEBS Lett*, 1991, 282(2): 313–316.
- [8] McElhinny A S, Kazmierski S T, Labeit S, *et al.* Nebulin: the nebulous, multifunctional giant of striated muscle [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2003, 13: 195–201.
- [9] Gerald K. *Cell and Molecular Biology* (第四版, 影印版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 375–378.
- [10] Wang K. Purification of titin and nebulin[J]. *Methods Enzymol*, 1982, 85: 264–274.
- [11] Mitsuhashi T, Kasai M, Hatae K. Detection of giant myofibrillar proteins connectin and nebulin in fish meat by electrophoresis in 3% – 5% gradient sodium dodecyl sulfate polyacrylamide slab gels[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50: 7499–7503.
- [12] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4[J]. *Nature*, 1970, 227: 680–685.
- [13] 金冬雁,等(译). 分子克隆实验指南(第三版)[M]. 北京: 科学出版社, 1992: 858–859.
- [14] Huff-Lonergan E, Mitsuhashi T, Parrish F C Jr, *et al.* Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and western blotting comparisons of purified myofibrils and whole muscle preparations for evaluating titin and nebulin in postmortem bovine muscle[J]. *J Anim Sci*, 1996, 74(4): 779–785.
- [15] Astier C, Labbe J P, Roustan C, *et al.* Sarcomeric disorganization in post-mortem fish muscles[J]. *Comp Biochem Physiol*, 1991, 100: 459–465.

Purification and antibody preparation of nebulin from the skeletal muscle of sea bream (*Sparus latus*)

DU Xue-li^{1,2}, ZHOU Li-gen³, WANG Xi-chang²,
XIONG He-jian¹, SU Wen-jin¹, CAO Min-jie¹

(1. School of Biotechnology, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. College of Food Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

3. Institute of Food Processing, Zhejiang Academy of Agriculture Sciences, Hangzhou 310021, China)

Abstract: As a giant actin-binding protein with molecular weight of approximately 500 – 900 ku, nebulin is thought to act as a molecular template that regulates the length of thin filaments and plays an essential role in the assembly and maintenance of I – Z – I bands in myofibrillar muscles. Though nebulins from mammals have been studied widely, much less study was performed on nebulin from fish muscle. In the present study, nebulin from the skeletal muscle of sea bream (*Sparus latus*) was first extracted with low ionic strength buffer, followed by applying to Sephacryl S-400 gel filtration chromatography and finally purified by electrophoretic elution. Purified nebulin revealed a single protein band on sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), suggesting its high homogeneity. A polyclonal rabbit anti-nebulin antibody was thus prepared by immunizing rabbit with purified nebulin and immunoglobulin G (IgG) was purified by Protein A-Sepharose affinity column. The immunogenicity of the purified antibody was further identified by Dot-Blot and Western-Blot. The potency of anti-nebulin antibody reached 5×10^4 by Dot-Blot analysis. Western-Blot revealed that the antibody immunologically reacted with purified nebulin and nebulin in myofibrils while no cross reaction with other myofibrillar proteins was detected, suggesting the high specificity of the polyclonal antibody. Thus, the antibody prepared in the present study will surely be beneficial to further study concerning the detection of this protein immunologically. The degradation of nebulin during fish storage at two temperatures of 4 °C and 18 °C was also investigated by SDS-PAGE. At 4 °C, protein degradation could be detected after storage for 9 d and after 18 d, more than 70% of the nebulin original band disappeared. However, at 18 °C, nebulin deterioration could be detected even at 24 h and after 120 h, the original protein band disappeared completely. The decomposition of nebulin as detected by SDS-PAGE was in accordance with sensory freshness change, suggesting the completeness of nebulin is an index of fish muscle freshness. Interestingly, the largest protein (titin) almost did not change even after storage at 4 °C for 18 d or at 18 °C for 188 h. In conclusion, this present study, especially the anti-nebulin antibody prepared provided an effective tool for the investigation of fish freshness.

Key words: *Sparus latus*; nebulin; purification; antibody