

## 牙鲈皮肤黏液免疫球蛋白的纯化及部分特性分析

许国晶, 绳秀珍\*, 唐小千, 邢婧, 战文斌

(中国海洋大学水产学院, 教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003)

**摘要:** 采用饱和硫酸铵分步盐析结合 Sephacryl S-300 凝胶过滤层析及 DEAE Sepharose 离子层析法, 对牙鲈皮肤黏液中的免疫球蛋白(Ig)进行了分离纯化, 并通过 SDS-PAGE 及 Western-blotting 技术对纯化蛋白的部分特性进行了分析。结果表明, 30%、50% 饱和硫酸铵分步盐析可以去除牙鲈黏液中除 Ig 外的很多杂蛋白, 得到粗提黏液 Ig; 再经 Sephacryl S-300 纯化, Ig 纯度较高, 其中含有 72 和 26 ku 的条带; DEAE Sepharose 层析法可进一步纯化 Sephacryl S-300 柱层析的产物, 所提取黏液 Ig 经 SDS-PAGE 检测, 只含有 72 和 26 ku 两个条带, 初步认为是牙鲈黏液 Ig 的重链和轻链。Western-blotting 结果显示, 抗牙鲈血清 Ig 单克隆抗体可与黏液 Ig 重链 72 ku 条带发生反应。

**关键词:** 牙鲈; 肤黏液免疫球蛋白; 盐析; 凝胶过滤层析; 离子交换层析

**中图分类号:** Q 176; S 917

**文献标识码:** A

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>, 在免疫应答与免疫保护过程中起着极其重要的作用<sup>[4]</sup>。鱼类黏液除含有非特异性免疫成分外, 还含有特异性抗体<sup>[5]</sup>。因此, 对鱼类黏膜免疫的深入研究特别是黏膜免疫球蛋白 (Ig) 的研究, 将有利于阐明鱼类黏膜系统的发生与来源, 局部体液免疫应答的规律及其介导免疫保护的机理, 对鱼类传染性疾病的免疫预防、鱼用疫苗的设计等具有重要意义。

国外早在二十世纪八九十年代就已经从羊头鲷 (*Archosargus probatocephalus*)、香鱼 (*Plecoglossus altivelis*)、硬头鲷 (*Salmo gairdneri*) 及鲈 (*Parasilurus asorus*) 等多种鱼类皮肤黏液中发现了免疫球蛋白 IgM, 对其理化特性进行了较为详尽的阐述, 并与血清 Ig 在免疫原性等多方面进行了比较<sup>[5-8]</sup>。国内对鱼类黏膜免疫的研究起步较晚, 近几年才对草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)、鲤 (*Cyprinus carpio*)、鲫

(*Carassius auratus*) 及鳊 (*Siniperca chuatsi*) 等鱼类皮肤黏液中的免疫球蛋白, 以及斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 等鱼类皮肤、眼角膜、鳃、肠道等黏膜免疫组织结构进行研究<sup>[9-13]</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牙鲈 (*Paralichthys olivaceus*) 的免疫学研究主要集中在系统免疫方面<sup>[14-15]</sup>, 本实验室曾分离纯化了牙鲈血清 Ig, 并制备了其单克隆抗体<sup>[14]</sup>。但对牙鲈黏膜免疫的研究尚未见报道。本文主要利用盐析、凝胶过滤和离子交换层析 3 种方法, 对牙鲈皮肤黏液中的免疫球蛋白进行提取纯化, 并通过 SDS-PAGE 及 Western-blotting 技术对纯化蛋白的部分特性进行了分析。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 实验材料及试剂

健康牙鲈购自山东胶南牙鲈鱼养殖场, 平均体长 20 cm。于实验室内 80 cm × 50 cm × 40 cm 的玻璃钢水槽中暂养 7 d, 水温 (20 ± 0.5) °C, 连续充气, 日换水一次, 换水量 1/3 ~ 1/2, 日投饵 2

收稿日期: 2010-12-08 修回日期: 2011-02-17

资助项目: 国家自然科学基金项目 (30771648, 31072232)

通讯作者: 绳秀珍, E-mail: xzsheng@ouc.edu.cn

次,吸污 2 次。

碱性磷酸酶(AP)标记的羊抗鼠免疫球蛋白(IgG)、氯化硝基四氮唑蓝(NBT)、5-溴-4-氯-3-吡啶-磷酸(BCIP)购自 Sigma 公司,其他化学试剂购自上海生工生物技术有限公司。

鼠抗牙鲈血清免疫球蛋白的单克隆抗体由本实验室制备<sup>[13]</sup>。

### 1.2 牙鲈注射淋巴囊肿病毒及黏液收集

实验鱼于水槽中暂养 7 d 后,进行淋巴囊肿病毒(LCDV)基础免疫。参照 CHENG<sup>[16]</sup>的方法,从患病牙鲈体表囊肿物中提纯 LCDV,并调整 LCDV 悬液蛋白浓度至 1 mg/mL,将病毒悬液与弗氏完全佐剂(FCA)等比混匀,腹腔注射 0.4 mL,肌肉注射 0.2 mL。两周后,进行第一次加强免疫,将病毒悬液与弗氏不完全佐剂(FIA)等比混匀,注射剂量和部位同基础免疫;1 周后再加强免疫 1 次,腹腔注射 0.4 mL,无佐剂;再 1 周后加强免疫第 2 次,腹腔注射 0.4 mL,无佐剂。

于最后一次加强免疫后第 7 天,取 10 尾牙鲈用洁净的玻片轻轻刮取鱼体表面皮肤,将所取黏液混合,加入等量 0.01 mol/L PBS(137 mmol/L NaCl,2.7 mmol/L KCl,8.09 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,1.47 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,pH 7.4),15 000 × g、4 °C 离心 30 min,取上清,-80 °C 保存备用。

### 1.3 牙鲈黏液免疫球蛋白(Ig)的提取纯化

**饱和硫酸铵分步盐析** 取上述 1.2 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 30%,4 °C 静置过夜,15 000 × g 离心 30 min,取上清继续加饱和硫酸铵溶液至最终饱和度为 50%,同上处理,次日离心收集沉淀,沉淀溶于少量的 0.02 mol/L pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液,再用相同的缓冲液透析,至检测不到 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 为止,获得的黏液抗体粗提物于 -80 °C 保存。

**Sephacryl S-300 柱层析** 将上述提取物通过 Sephacryl S-300 凝胶层析柱(GE Healthcare)进一步纯化,柱长 60 cm,直径 1.6 cm,应用蛋白质纯化系统(AKTA prime, Amersham),以 0.02 mol/L pH 8.0 Tris-HCl 洗脱,流速 0.5 mL/min,收集第一峰,-80 °C 保存备用。

**DEAE 离子交换柱层析** Sephacryl S-300 凝胶层析的第一个蛋白峰合并浓缩后再经 0.02 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)平衡的 DEAE Sepharose 柱(Amersham)上进一步纯化,应用蛋白质纯化系

统(AKTA prime, Amersham),以浓度分别为 0.05, 0.1,0.15,0.2,0.4 和 1 mol/L 的 NaCl 溶液分步洗脱,得到 6 个洗脱峰,收集 0.1 mol/L NaCl 的洗脱峰,透析,冻干浓缩,重悬于 0.01 mol/L 的 PBS(pH 7.4)中,-80 °C 保存备用。

### 1.4 SDS-PAGE 电泳分析

采用 Mini-Protein cell III 系统(BioRad),按文献<sup>[17]</sup>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(50 mmol/L 的 Tris-HCl,pH 6.8,甘油,1% 溴酚蓝,10% SDS, $\beta$ -巯基乙醇 14.4 mmol/L)1:1 混合后,沸水中煮 5 min,每孔上样量 20  $\mu$ L。样品在浓缩胶时调电流 30 mA,分离胶时加大到 60 mA,至溴酚蓝(BPS)指示剂达到底部边缘时停止电泳。凝胶用考马斯亮兰(CBB-R250)染色液染色。

### 1.5 蛋白质免疫印迹(Western-blotting)试验

牙鲈黏液免疫球蛋白经 SDS-PAGE 后,Mini Trans-Blot Transfer Cell(Bio-Rad)转移至 PVDF 膜上(恒压 30 V 转移 2 h),转移后以封闭液(0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS,含 5% 脱脂奶粉)封闭过夜,加鼠抗牙鲈血清 Ig 单克隆抗体,37 °C 反应 1 h,PBST 洗 3 次;再加 AP 标记的羊抗鼠 IgG,1:5 000 稀释,37 °C 反应 1 h,PBST 洗 3 次后,放入新鲜配制的 NBT/BCIP 发色液中,室温显色 30 min 后水洗终止反应。

## 2 结果

### 2.1 牙鲈黏液 Ig 的纯化

牙鲈黏液 30%、50% 饱和硫酸铵分步盐析后,提取物经 Sephacryl S-300 柱层析,呈现典型的 IgM 吸收峰(图 1)。该峰的洗脱时间为 50 min。经 Sephacryl S-300 柱层析得到的蛋白峰,再经 DEAE Sepharose 柱进一步纯化,在不同的 NaCl 浓度各出现了一个蛋白洗脱峰(图 2),其中 NaCl 浓度为 0.1 mol/L 时,洗脱蛋白经 SDS-PAGE 分析含有牙鲈黏液 Ig 相应的蛋白带。

### 2.2 牙鲈黏液 Ig 电泳图谱

免疫牙鲈黏液与健康牙鲈黏液相比,黏液免疫球蛋白在重链和轻链位置上条带明显增粗(图 3)。30%、50% 饱和硫酸铵可以去除黏液中部分杂蛋白,含有约十几条电泳条带,包括 72 和 26 ku 两条蛋白带,与牙鲈皮肤黏液相比,仅去除了少数几条蛋白带,因此该法仅适用于粗提黏液免疫球蛋白;粗提样品过 Sephacryl S-300 凝胶柱后,所提

蛋白除含有 72 和 26 ku 两条蛋白条带外,仅含有少量杂蛋白;再过 DEAE Sepharose 层析柱后,所提蛋白较纯,只含有 72 和 26 ku 两条蛋白条带。

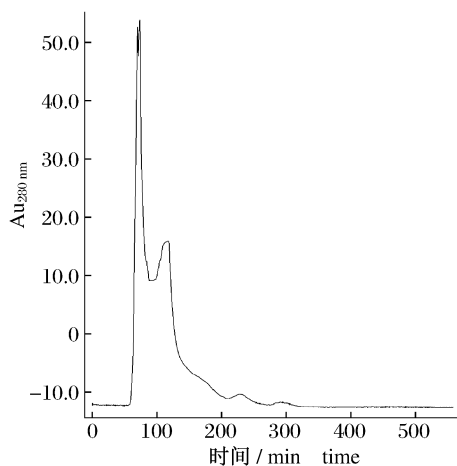


图 1 牙鲆皮肤黏液饱和硫酸铵提取物的 Sphacryl S-300 凝胶层析图

峰 1: 皮肤黏液 IgM。

Fig. 1 The Sphacryl S-300 gel chromatography of the Japanese flounder skin mucus extracted by saturated ammonium sulfate

peak 1: Japanese flounder skin mucus IgM.

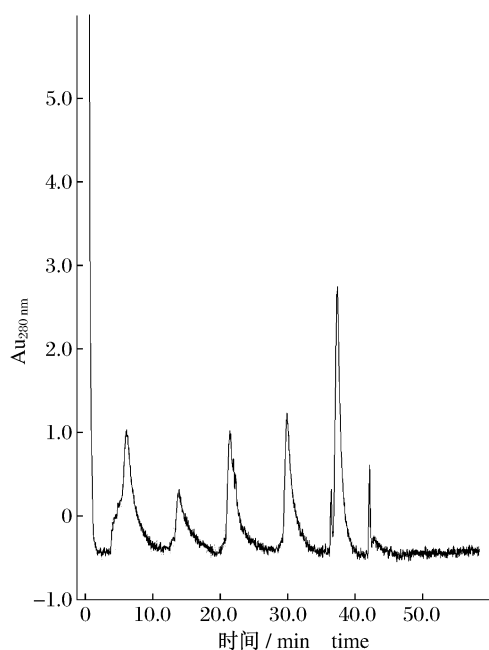


图 2 牙鲆黏液 Sphacryl S-300 提取物的 DEAE Sepharose 层析图

从左到右六个峰依次代表洗脱液 NaCl 浓度分别为 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.4, 1 mol/L 的洗脱蛋白。

Fig. 2 The DEAE Sepharose chromatography of the Japanese flounder mucus Ig extracted by Sphacryl S-300

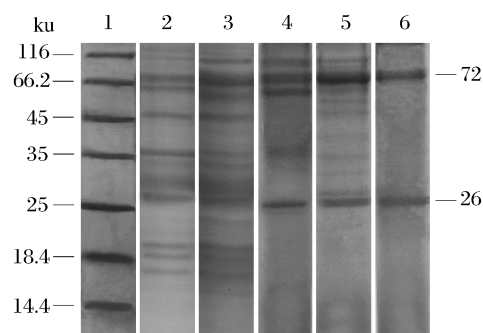


图 3 牙鲆皮肤黏液蛋白 SDS-PAGE 图谱

1. 标准分子量蛋白; 2. 健康牙鲆皮肤黏液; 3. 免疫牙鲆皮肤黏液; 4. 30%、50% 饱和硫酸铵提取牙鲆黏液 Ig; 5. Sphacryl S-300 层析柱提取牙鲆黏液 Ig; 6. DEAE Sepharose 层析柱提取牙鲆黏液 Ig。

Fig. 3 SDS-PAGE profiles of immunoglobulin extracted from skin mucus of Japanese flounder

1. Marker; 2. Skin mucus of healthy flounder; 3. Skin mucus of immunized flounder; 4. Flounder skin mucus Ig purified by 30%, 50% saturated ammonium sulfate; 5. Flounder skin mucus Ig purified by Sphacryl S-300 gel chromatography; 6. Flounder skin mucus Ig purified by DEAE Sepharose.

### 2.3 Western-blotting 检测

由图 4 可知,健康牙鲆黏液中存在 Ig,且 Ig 重链(72 ku)可与鼠抗牙鲆血清 Ig 单克隆抗体发生反应;经淋巴囊肿病毒免疫后牙鲆黏液及上述

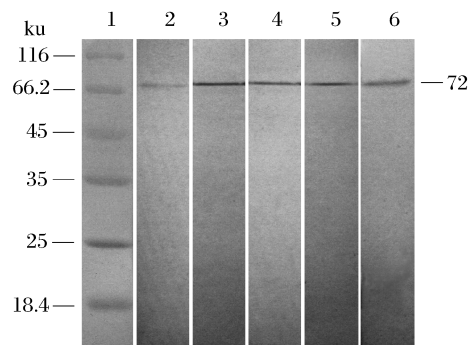


图 4 牙鲆皮肤黏液 Ig Western-blotting 图谱

1. 标准分子量蛋白; 2. 健康牙鲆皮肤黏液; 3. 免疫牙鲆皮肤黏液; 4. 30%、50% 饱和硫酸铵提取牙鲆黏液 Ig; 5. Sphacryl S-300 层析柱提取牙鲆黏液 Ig; 6. DEAE Sepharose 层析柱提取牙鲆黏液 Ig。

Fig. 4 Western-blotting analysis of skin mucus Ig of Japanese flounder

1. Marker; 2. Skin mucus of healthy flounder; 3. Skin mucus of immunized flounder; 4. Flounder skin mucus Ig purified by 30%, 50% saturated ammonium sulfate; 5. Flounder skin mucus Ig purified by Sphacryl S-300 gel chromatography; 6. Flounder skin mucus Ig purified by DEAE Sepharose.

3 种方法分离纯化后的黏液 Ig,重链(72 ku)均与鼠抗牙鲆血清 Ig 单克隆抗体发生反应,而轻链(26 ku)无反应发生。

### 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广泛关注,也取得了一定的进展<sup>[10-15]</sup>。就鱼类 Ig 的结构分析而言,Ig 的纯度将影响分析结果的准确性,因此,必须获得高纯度的 Ig。由于健康牙鲆黏液中免疫球蛋白含量低,为了获得大量的免疫球蛋白,本文通过淋巴囊肿病毒免疫刺激健康牙鲆。经过 SDS-PAGE 分析显示,免疫牙鲆黏液与健康牙鲆黏液相比,黏液中产生了大量的免疫球蛋白,这为下一步实验提供了充足的材料。本实验过程中所有牙鲆均未出现发病症状,其原因可能是淋巴囊肿病潜伏期长,而我们的实验周期短,症状还未显现出来。但经过 SDS-PAGE 分析表明,提纯的病毒粒子具有明显的免疫原性,可刺激牙鲆产生相应的抗体,这与孙修勤等<sup>[18]</sup> 研究结果一致。

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>[10-11,14-15]</sup>。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。本文中采用 30%、50% 的饱和硫酸铵溶液对牙鲆皮肤黏液中的蛋白进行分步沉淀,但此法得到的 Ig 仍混有较多杂蛋白,仅适于粗提之用。凝胶过滤法是基于 Ig 相对分子质量大于其它蛋白来分离的,是一种温和的纯化方法。鱼类 Ig 在血清中通常以四聚体的形式存在,分子量为 700 ~ 850 ku,因此在 Sephacryl S-300 柱中 Ig 作为第一个洗脱峰被洗脱下来。离子交换层析是根据电荷性的差异进行分子的分离,结果使不同类的蛋白质被分别洗脱下来,该法简单易行,经常和凝胶过滤法合用。陈昌福等<sup>[10]</sup> 利用 SephadexG-200 和 DEAF-Sephadex A-50 对受免草鱼体表和肠黏液中 Ig 进行了分离提纯。本文首次尝试利用盐析、凝胶过滤和离子交换层析三种方法结合对牙鲆皮肤黏液中的免疫球蛋白进行提取纯化,结果三种方法结合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 和 26 ku,初步推断为牙鲆黏液 Ig 的重链和轻链。

关于鱼类黏液 Ig 的产生、来源及其与血清 Ig 的关系目前还存在许多争议。LOBB 等<sup>[6]</sup> 在研究羊头鲷时发现,在其皮肤黏液中存在四聚体和二聚体两种类型的 IgM;ROMBOUT 等<sup>[19]</sup> 在研究鲤鱼皮肤黏液免疫球蛋白和血清免疫球蛋白关系时发现,以纯化的黏液免疫球蛋白制备的单克隆抗体只与黏液免疫球蛋白反应,而不能与血清免疫球蛋白结合。同样,鱼类通过注射、浸泡或口服等途径进行免疫后,在血清和皮肤中抗体出现的时间、效价明显不同<sup>[20-21]</sup>。本文中鼠抗牙鲆血清 Ig 单克隆抗体在 Western-blotting 反应中能识别牙鲆黏液 Ig 的重链,从而表明牙鲆的皮肤黏液中存在与血清 Ig 在理化特性和免疫原性基本一致的免疫球蛋白,本文结果也与其他研究者的结果一致,如:STLOUIS-CORMIER<sup>[7]</sup> 和 ITAMI<sup>[8]</sup> 发现硬头鲷和香鱼的皮肤黏液免疫球蛋白与各自血清中的免疫球蛋白理化性质一致;杨桂文等<sup>[9]</sup> 通过对鲤鱼肠黏液与鲤鱼血清中 IgM 的某些理化性质和免疫原性进行比较研究,推断二者具有一定的同源性。但牙鲆皮肤黏液免疫球蛋白与其血清免疫球蛋白的多聚体形式及抗原特性等是否相同仍需进一步的验证。

不同种鱼类的免疫球蛋白存在着相当大的差异,目前在硬骨鱼中已发现有 IgM、IgD、IgZ/IgT、IgM-IgZ 及从红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*) 中报道的新型 IgH 等 Ig 类型,参与皮肤黏液免疫的有 IgM,参与肠黏液免疫的有 IgM、IgZ/IgT,而 IgD 不参与黏液免疫<sup>[7,22-25]</sup>。也有报道表明根据系统进化树分析结果,鱼类 IgM 和 IgZ/T 以及 IgM-IgZ 和 IgH 都聚为一枝表明 IgM 和 IgZ/T 可能具有共同的起源<sup>[26]</sup>。根据本文实验数据推断从牙鲆中分离得到的皮肤黏液免疫球蛋白为 IgM 型,但其基因结构、功能及参与黏液免疫防御的方式等有待进一步的研究。

### 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. 硬骨鱼类黏膜免疫机理研

- 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. 鱼类黏膜免疫研究进展[J]. 水产学报, 2005, 29(3): 411-416.
- [4] CAIN K D, JONES D, RAISON R L. Characterization of mucosal and systemic immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using surface plasmon resonance[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2000, 10(8): 651-666.
- [5] LOBB C J. Secretory immunity induced in catfish, *Ictalurus punctatus*, following bath immunization[J]. Developmental and Comparative Immunology, 1987, 11: 727-738.
- [6] LOBB C, CLEM L W. Phylogeny of immunoglobulin structure and function X Humoral immunoglobulins of the sheepshead, *Archosargus probatocephalus* [J]. Developmental and Comparative Immunology, 1981, 5: 271-282.
- [7] STLOUIS-CORMIER E A. Evidence for a cutaneous secretory immune system in rainbow trout [J]. Developmental and Comparative Immunology, 1984, 8: 71-80.
- [8] ITAMI T. Purification and characterization of immunoglobulin in skin mucus and serum of ayu[J]. Nippon Suisan Gaakkaish, 1988, 54: 1611-1617.
- [9] 杨桂文, 安利国, 王长法, 等. 鲤肠黏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.
- [10] 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.
- [11] 陈垚, 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.
- [12] 罗霞, 潘厚军. 温度对鳜皮肤黏膜抗体产生的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2007, 27(3): 45-49.
- [13] 罗晓春, 李安兴, 谢明权. 斜带石斑鱼黏免疫系统结构的研究[J]. 水生生物学报, 2005, 29(2): 193-198.
- [14] LI Q, ZHAN W B, 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.
- [15] 冯娟, 胡超群. 四种海水养殖鱼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.
- [16] CHENG S F, ZHAN W B, XING J, et al. Development and characterization of monoclonal antibody to the lymphocystis disease virus of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* isolated from China [J]. Journal of Virological Methods, 2006, 135: 173-80.
- [17] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227: 680-685.
- [18] 孙修勤, 曲凌云, 张进兴. 牙鲆淋巴囊肿病毒的病原性与免疫原性[J]. 高技术通讯, 2000, 9: 19-21.
- [19] ROMBOUT J H. Differences in mucus and serum immunoglobulins of carp [J]. Developmental and Comparative Immunology, 1993, 17: 309-317.
- [20] ROMBOUT J H W M, VAN DER BERG A A, BENG C T G A, et al. Immunological importance of the second gut segment of the carp systemic and/or mucosal immune responses after immunization with soluble and particulate antigens [J]. Journal of Fish Biology, 1989, 35: 179-186.
- [21] LOGHOTHEIC P N, AUSTIN B. Immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) to *Aeromonas hydrophila* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1994, 4: 239-254.
- [22] FLAJNIK M F. Comparative analyses of immunoglobulin genes: surprises and portents [J]. Nature Reviews Immunology, 2002, 2: 688-698.
- [23] ZHANG Y A, SALINAS I, LI J, et al. IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity [J]. Nature Immunology, 2010, doi:10.1038/ni.1913.
- [24] 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.
- [25] SAVAN R, AMAN A, SATO K, et al. Discovery of a new class of immunoglobulin heavy chain from fugu [J]. European Journal of Immunology, 2005, 35(11): 3320-3331.
- [26] 肖凡书, 聂品. 鱼类免疫球蛋白重链基因与基因座的研究进展[J]. 水产学报, 2010, 34(10): 1617-1628.

## Purification and characterizations of skin mucus immunoglobulin in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)

XU Guo-jing, SHENG Xiu-zhen\*, TANG Xiao-qian, XING Jing, ZHAN Wen-bin  
(Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** Teleost fish have a unique physical barrier composed of mucus and skin which act as the first line of defence. It has been shown that lymphocytes are present in the epidermis of fish, and the cutaneous mucus of several fish species contains immunoglobulin(Ig). As fish mucosal composition was complicated and the content of Ig was low, it is difficult to obtain high purity mucus Ig. In this study, skin mucus Ig of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) was purified by the combination of saturated ammonium sulfate precipitation, Sephacryl S-300 gel filtration chromatography and DEAE Sepharose chromatography, and partial characteristics of purified proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western-blot. According to SDS-PAGE, many other proteins were removed from mucus by precipitation of 30% and 50% saturated ammonium sulfate solution, and Ig that was crudely extracted could reach a high purity by further purification using Sephacryl S-300. After being finally purified by DEAE Sepharose chromatography, skin mucus Ig has only two bands of 72 and 26 ku, initially presumed as the heavy chain and light chain of Japanese flounder mucus Ig. Western-blot analysis showed that the monoclonal antibody produced from serum Ig could recognize the heavy chain of mucus Ig(72 ku).

**Key words:** *Paralichthys olivaceus*; mucus immunoglobulin; ammonium sulfate precipitation; gel filtration chromatography; DEAE Sepharose chromatography

**Corresponding author:** SHENG Xiu-zhen. E-mail: xzsheng@ouc.edu.cn