

文章编号: 1000-0615(2001)01-0052-06

欧洲鳗血清免疫球蛋白纯化及部分特性分析

林天龙¹, 陈强², 俞伏松¹, 杨金先¹, 龚晖¹, 林能锋¹, 许斌福¹, 伊光辉³

(1. 福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福建 福州 350003;

2. 福建省农业科学院地热农业利用研究所, 福建 福州 350003; 3. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 采用饱和硫酸铵分步盐析法结合柱层析提取、纯化欧洲鳗血清免疫球蛋白(Ig), 实验证实欧洲鳗 Ig 主要分布在硫酸铵饱和度 30% - 50% 的区间内; Sephacryl- S200 进一步提纯的 Ig 主要存在于第一个蛋白峰; 而 Sepharose- 4B 柱层析提纯的 Ig 则存在于第二个蛋白峰; DEAE- 52 离子交换柱层析可进一步纯化 Sepharose- 4B 柱层析的产物; ELISA 和 Western- blot 分析证实上述提取物具有抗体的免疫学活性; SDS- PAGE 分析纯化的 Ig, 显示欧洲鳗 Ig 重链约为 68kD、轻链约为 26kD。

关键词: 欧洲鳗; 免疫球蛋白; 纯化

中图分类号: S917 **文献标识码:** A

Purification and partial characterization of serum immunoglobulin in *Anguilla anguilla*

LIN Tian-long¹, CHEN Qiang², YU Fu-song¹, YANG Jin-xian¹, GONG Hui¹,
LIN Neng-feng¹, XU Bin-fu¹, YI Guang-hui³

(1. Animal Husbandry and Veterinary Medicine Institute,

Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China;

2. Geothermic Utilization Institute, Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China;

3. Fisheries College, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: The purification of serum immunoglobulin in European eel (*Anguilla anguilla*) was carried out by using ammonium sulfate precipitation followed by column chromatography. The results showed that most of the eel serum Ig was precipitated at 30% to 50% ammonium sulfated saturation. Further purification by Sephacryl-S200 showed that the Ig presented in the first protein peak, and by Sepharose 4B the eel Ig existed at the second protein peak; the purified production from Sepharose 4B were further separated by DEAE-52 column into two fractions, and the Ig was found in the first fraction. The antibody activity of the productions stated above was proved by ELISA and Western-blot. SDS-PAGE showed that the heavy chain and light chain of the eel serum Ig were 68kD and 26kD respectively.

Key word: *Anguilla anguilla*; immunoglobulin; purification

鱼类是低等的脊椎动物, 其免疫系统不如高等脊椎动物那样完善。尽管鱼类免疫学的研究起步较

收稿日期: 2000-03-14

资助项目: 福建省科委重点项目、回国留学人员 A 类资助项目(97-2-139)

第一作者: 林天龙(1955-), 男, 福建福州人, 研究员, 主要从事鱼类免疫学、病原学研究。Tel: 0591-7817514, E-mail: lint@

pub3.fj.cn

晚,但近几年的研究发现,多数硬骨鱼都有类似于高等脊椎动物的免疫器官与免疫效应细胞,能产生类似高等脊椎动物 IgM 的免疫球蛋白,人们已经证实,在鲑(*Salmo salar*)、鳟(*Ictalurus punctatus*)、鲟(*Acipenser baeri*)、鳊(*Siniperca chuatsi*)、鲤(*Cyprinus carpio*)等鱼类中 Ig 的存在^[1-4]。此外,还发现鱼类的鳃、肠道、皮肤粘液和鱼卵中也存在类似的 Ig^[5-9]。这些免疫球蛋白在鱼体的免疫防御中起着十分重要的作用,在鱼病防制和鱼类疫苗学研究方面也具有重要意义^[10]。

欧洲鳗(*Anguilla anguilla*)作为近几年我国水产养殖的主要品种之一,其免疫学研究几乎处于空白状况,伴随大规模集约化养殖而来的是暴发性、毁灭性疾病的漫延,严重打击了养殖户的生产积极性。要从根本上解决这些问题,必需将免疫预防手段引入到欧洲鳗养殖业,积极开展欧洲鳗基础免疫学研究,建立欧洲鳗体液免疫和细胞免疫水平的分析检测手段,建立快速、特异、准确的病原学检测方法,为鱼类疫苗学、鱼类预防医学研究奠定基础。为此,我们分离纯化了欧洲鳗的血清免疫球蛋白(Ig),并对其特性进行了初步研究与分析。

1 材料与方法

1.1 实验动物与菌株

欧洲鳗体重 150~180g,取自长乐市顺德养殖场,室温暂养于 40L 水族箱中,日换水约 1/3,观察一周后用于实验。

新西兰大白兔是由福建省药检所提供的标准实验动物(合格证 23-004 号);

温和气单胞菌(本所研究中心分离),大肠杆菌(福建省卫生防疫站惠赠)。

1.2 欧洲鳗血清抗体的制备与纯化

1.2.1 欧洲鳗血清制备

健康鳗经 250×10^{-6} 的 MS-222(Sigma)麻醉后,由后腹主动脉采血,全血置 4℃,待血清充分析出后,以 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,收集血清, -20℃ 冻存备用。

1.2.2 饱和硫酸铵分步盐析

欧洲鳗血清用 2 倍量的生理盐水稀释后,加入 pH 7.0 的饱和硫酸铵,使其最终饱和度为 30%,4℃ 静置过夜, $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,沉淀用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.4) 重悬(30% 饱和硫酸铵提取物),上清继续加入饱和硫酸铵至终浓度为 50%,同上处理,重悬沉淀(50% 饱和硫酸铵提取物),以 PBS 透析除盐, -20℃ 保存备用。

1.2.3 柱层析提纯

Sephacryl-S200 柱层析:盐析法所得的 50% 饱和硫酸铵提取物通过 Sephacryl-S200(Pharmacia)柱层析进一步纯化,柱长 70cm,直径 1.6cm,洗脱液为 PBS,流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,BSZ-160 自动部分收集器分管收集洗脱液,每管 2mL,收集蛋白峰。

Sepharose-4B 柱层析:盐析法所得的 50% 饱和硫酸铵提取物通过 Sepharose-4B(Pharmacia)柱,柱长 70cm,直径 1.6cm,洗脱液同上,流速 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,收集洗脱液,每管 2mL,收集蛋白峰。

DEAE-52 阴离子交换层析: Sepharose-4B 柱层析的第二个蛋白峰合并浓缩后再经 DEAE-52(华美进口分装)进一步纯化,柱长 15 cm,直径 1 cm,盐梯度洗脱,缓冲液为 pH 8.5 的 $0.015 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris buffer, NaCl 浓度由 0 至 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,洗脱流速为 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,每管 1.5mL,收集蛋白峰。

1.3 欧洲鳗抗温和气单胞菌免疫血清 Ig 的制备

免疫菌株:温和气单胞菌接种 LB 培养基,置 27℃ 恒温摇床过夜,再以 1% 甲醛 25℃ 灭活 24h,经检验无活菌后用灭菌生理盐水洗菌 3 次,并调节至 $6.0 \times 10^9 \text{ CFU}$,4℃ 备用。健康鳗经 250×10^{-6} 的 MS-222 麻醉后,每尾腹腔注射上述灭活菌体 0.15~0.20mL,15d 后加强免疫一次,二免 2 周后腹主动脉采

血,收集血清,测定凝集效价,血清 Ig 提纯按 1.2.3 中叙述的方法进行。

1.4 兔抗欧洲鳗 Ig 高免血清抗体的制备与纯化

Sephacryl- S200 柱层析纯化的 Ig 与等量弗氏完全佐剂(FCA)混合乳化,对新西兰大白兔背部皮内多点注射,每只兔子注射蛋白量约 50 μ g,首免 15d 后,用纯化 Ig 与等量弗氏不完全佐剂(FIA)混合乳化进行二次免疫;二免 15d 后,用 100 μ g 纯化 Ig 进行加强免疫;三免 10d 后由耳静脉采血,ELISA 测定血清抗体滴度, - 20 $^{\circ}$ C 冻存储备用。

1.5 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS- PAGE)分析

用 Mini- Protean $\text{\textcircled{C}}$ cell 系统(BioRad)按 Laemmli 系统^[11]进行变性不连续凝胶电泳,积层胶浓度为 4%,分离胶浓度为 13%,待测样品 10~ 20 μ g 与等体积样品缓冲液混合,沸水浴 3min,稍作离心后上样。20mA,恒流电泳 20min,再改为 30mA,恒流电泳 50min,电泳后凝胶按郭尧君^[12]中的双胺银染色法进行染色,分子量标准 14.3~ 200kD(GIBCO/BRL)。

1.6 免疫印迹试验(Western-blot Analysis)

待测样品经 SDS- PAGE 分离后用 Mini- Protean $\text{\textcircled{C}}$ cell 系统(BioRad)电泳转移至 0.45 μ m 的硝酸纤维素膜上,电泳条件为 100V 恒压,时间 60min,转移后以封闭液(pH7.4 的 0.01mol \cdot L⁻¹ PBS,含 20% 牛血清,0.05% tween- 20)封闭 120min,加兔抗欧洲鳗 Ig 高免血清,稀释度 1: 3 000,室温反应 90min, PBST (pH7.4 的 0.01mol \cdot L⁻¹ PBS,含 0.05% tween- 20)洗三次;再加碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG (Sigma),稀释度 1: 5 000,室温反应 90min, PBST 洗三次,加底物为 NBT 和 BCIP(GIBCO/BRL),室温显色 30min 后水洗终止反应。

1.7 酶联免疫吸附试验(ELISA)

温和气单胞菌接种于 LB 培养基,生长至 OD₆₀₀约 0.5,以 5 000r \cdot min⁻¹离心 5min,用等体积 PBS 重悬,1% 甲醛室温固定 24h, PBS 洗三次,再以原体积 1/4 的 PBS 重悬菌体,用于包被 96 孔酶标板,阴性抗原对照为大肠杆菌,空白对照为 PBS, 50 μ L/well, 4 $^{\circ}$ C 过夜,次日用封闭液封闭 120min,再依次滴加一抗、二抗和酶标抗体,温育时间均为 90min,洗涤同 1.6。一抗为相同蛋白浓度的欧洲鳗血清 30% 饱和硫酸铵提取物、或 50% 饱和硫酸铵提取物、或柱层析法提纯的 Ig,稀释度 1: 2³~ 2¹⁴;二抗为兔抗欧洲鳗 Ig 高免血清,稀释度为 1: 1 000;酶标抗体为碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG,稀释度为 1: 5 000;稀释液同封闭液,底物 P- NPP(BioRad),室温显色 60min。结果判定用自动酶联仪 Microplate Reader(BioRad Model550 型)读取 OD₄₀₅值,以 P/N > 2 的为阳性反应,测得抗体的滴度。

1.8 蛋白浓度测定

用 DU Series 7000 分光光度计(BECKMAN)按 Bradford 法^[11]进行,在波长 595nm 处测定 OD 值,参照标准曲线得出蛋白的浓度。

2 结果

2.1 欧洲鳗血清 Ig 的纯化

欧洲鳗血清 50% 饱和硫酸铵提取物经 Sephacryl- S200 柱层析,出现 2 个有部分重叠的蛋白峰(图 1),其中主峰 F1 经 ELISA 测定含有抗体活性,第二峰 F2 存在极低的抗体活性。此 F1 即为 Sephacryl- S200 柱纯化的 Ig。

欧洲鳗血清 50% 饱和硫酸铵提取物经 Sepharose- 4B 柱层析后,出现 2 个完全分离的蛋白峰(图

2), 其中主峰 F2 经 ELISA 测定含有抗体活性, 第一峰 F1 不存在抗体活性, 此 F2 即为 Sepharose-4B 柱纯化的 Ig。

经 Sepharose-4B 柱层析所得的 F2 部分, 再经阴离子交换剂 DEAE-52 进一步纯化, 得到 2 个分离的蛋白峰(图 3), 其中 F1 经 ELISA 测定含有抗体活性, F2 没有抗体活性。此 F1 即为 DEAE-52 进一步纯化的 Ig。

欧洲鳗免疫血清 50% 饱和硫酸铵提取物经 Sepharose-4B 柱层析, 得到类似图 2 的蛋白浓度曲线, 经 ELISA 检测, 其抗体活性峰与蛋白峰不完全一致(图 4)。

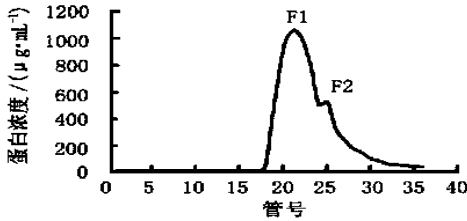


图 1 欧洲鳗血清 50% 饱和硫酸铵提取物
Sephacryl-S200 的层析图

Fig. 1 The Sephacryl-S200 chromatogram of the 50% ammonium sulfate purified European eel Ig

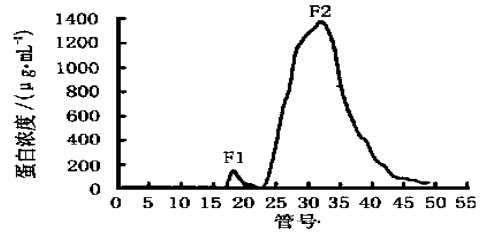


图 2 欧洲鳗血清 50% 饱和硫酸铵提取物
Sepharose-4B 的层析图

Fig. 2 The Sepharose-4B chromatogram of the 50% ammonium sulfate purified European eel Ig

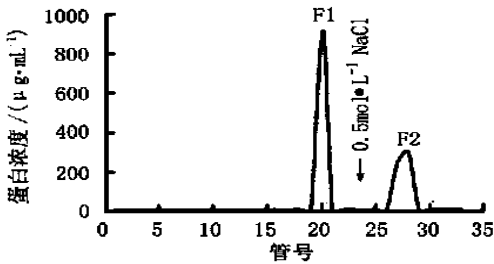


图 3 对图 2 F2 部分用 DEAE-52 离子交换的层析图
Fig. 3 The DEAE-52 anion-exchange column chromatogram of the Peak 2 from Sepharose-4B column

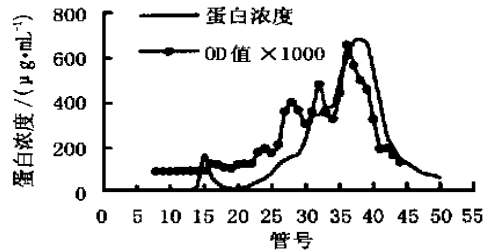


图 4 欧洲鳗免疫血清 50% 饱和硫酸铵提取物
Sepharose-4B 层析图谱及其抗体活性图
Fig. 4 The Sepharose-4B chromatogram and antibody activity curve of the 50% ammonium sulfate purified immunized eel Ig

2.2 SDS-PAGE 分析结果

免疫球蛋白分子会被 2-巯基乙醇(2-ME)还原, 降解为重链(H 链)和轻链(L 链)2 个亚单位, 在此基础上进行 SDS-PAGE, 电泳结果见图 5, 从图中可看出:

(1) 欧洲鳗血清 50% 饱和硫酸铵提取物有大量蛋白富集在分子量约 68kD、26kD 与 17kDa 三处, 其蛋白条带总数明显少于全血清。

(2) 3 份柱层析纯化的 Ig 图谱均可见分子量约为 68kD 和 26kD 的两条主要蛋白带, 它们可能分别代表欧洲鳗血清 Ig 的 H 链和 L 链; 而且纯化 Ig 的蛋白条带明显少于 50% 饱和硫酸铵提取物, 表明 Ig 得到进一步纯化。

(3) 纯化 Ig 除 H、L 链外, 还存在少量蛋白条带。

2.3 Western-blot 分析结果

从图 6 中可看出, 在分子量 68kD 附近, 全血清、50% 饱和硫酸铵提取物和 Sephacryl-S200 柱纯化的 Ig 都存在明显的蛋白反应条带, 而 Sepharose-4B 柱纯化的 Ig、DEAE-52 进一步纯化的 Ig 除在 H 链(68kD)外, 其他蛋白反应条带明显少于前两者。在分子量 26kD 附近, 除 Sephacryl-S200 柱纯化的 Ig 和 50% 饱和硫酸铵提取物有微弱的反应条带外, 全血清、Sepharose-4B 柱纯化的 Ig、DEAE-52 进一步纯

化的 Ig 均未见相应的条带。

2.4 ELISA 检测抗体活性结果

欧洲鳗血清 50% 饱和硫酸铵提取物的抗体滴度达 1: 1 024, 而 30% 饱和硫酸铵提取物的抗体滴度只有 1: 64, 说明 30% - 50% 饱和硫酸铵分步沉析可回收大部份欧洲鳗 Ig。

Sephacryl- S200、Sephacrose- 4B、DEAE- 52 纯化的 Ig, 抗体滴度分别为 1: 1 024、1: 2 048 和 1: 1 024, 它们可特异性结合温和气单胞菌并被兔抗欧洲鳗 Ig 免疫血清所识别, 表明它们均含有具抗体活性的 Ig。

Sephacrose- 4B 第二峰各管蛋白, 经 ELISA 检测显示 3 个抗体活性峰(图 4)。

柱层析提纯的欧洲鳗免疫血清 Ig 对大肠杆菌的反应为阴性, 表明该纯化 Ig 的特异性较好。

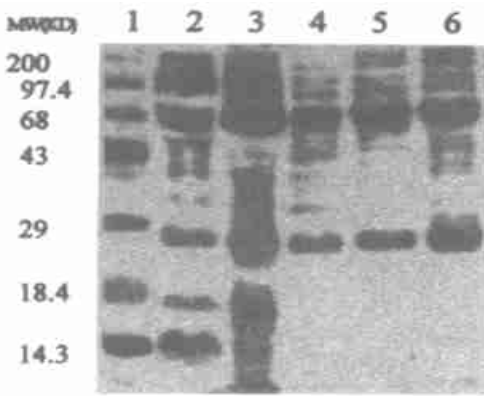


图 5 欧洲鳗血清、抗体粗提取物和纯化 Ig 的 SDS- PAGE (13%) 图谱

Fig. 5 SDS- PAGE analysis of European eel serum, globulin fraction precipitated from 50% ammonium sulfate saturation and purified Ig

- 1. 标准 Markers ; 2. 欧洲鳗全血清;
- 3. 50% 饱和硫酸铵提取物; 4. Sephacryl- S200 纯化的 Ig;
- 5. Sephacrose- 4B 纯化的 Ig; 6. DEAE- 52 进一步纯化的 Ig

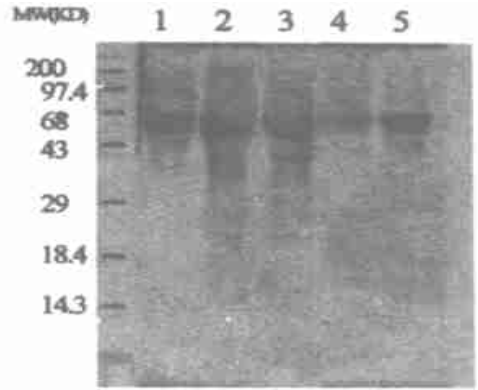


图 6 欧洲鳗血清、抗体粗提取物和纯化 Ig 的 Western- blot 图谱

Fig. 6 Western- blot of European eel serum, globulin fraction precipitated from 50% ammonium sulfate saturation and purified Ig

- 1. 欧洲鳗全血清; 2. 50% 饱和硫酸铵提取物;
- 3. Sephacryl- S200 纯化的 Ig; 4. Sephacrose- 4B 纯化的 Ig;
- 5. DEAE- 52 进一步纯化的 Ig

3 讨论

盐析法是实验室最常用的抗体蛋白提取方法, 它可一步沉淀出大量的免疫球蛋白, 从而使免疫球蛋白得到浓缩, 但是此法得到的免疫球蛋白往往混杂很多的杂蛋白, 常常影响免疫球蛋白的最终纯度。我们尝试以饱和硫酸铵分步沉淀法提取欧洲鳗血清 Ig, 通过不同饱和度的硫酸铵, 沉析除去大多数杂蛋白, 并保留大部分的 Ig。实验结果表明欧洲鳗血清 Ig 主要分布在 30% ~ 50% 饱和硫酸铵沉析物中, 经分步盐析提取的 Ig 不仅浓度和纯度提高, 而且回收率比较理想。但 30% ~ 50% 浓度范围是否最合理, Ig 的回收率是否最高有待进一步探讨。

盐析初提的免疫球蛋白经柱层析可进一步得到纯化。杨桂文等^[5-6]用 SephadexG- 200 纯化制备了鲤血清 IgM、胆汁 IgM 和皮肤粘液 IgM; Ourth^[2]用 DEAE- Sephacel 和 Sepharose- 6B 纯化制备了斑点叉尾鮰血清 IgM; 简纪常等^[13]用 Sephadex- 200 和 DEAE- 52 纯化制备了中华鳖血清 Ig; 王翠兰等^[14]用 SephadexG- 200 和 DEAE- SephadexA - 50 纯化兔血清 IgG。Sephacryl- S200 是一种较新型的凝胶介质, 它与 Sephadex、Sephacrose 等介质相比, 具有耐压、耐腐蚀、流速快等特点, 短时间内就可分离待纯化物, 降低有效成分的失活率, 其缺点是分离的物质分子量较小; 而 Sepharose- 4B 虽然分离速度较慢, 但

其分离范围较大, 为 60kD~ 2.0×10^4 kD, 故也常用于抗体蛋白的分离纯化。我们采用 Sephacryl- S200、Sephacrose- 4B、DEAE- 52 等柱层析方法, 对饱和硫酸铵提取物进行纯化比较, 结果证实三种方法均可获得较高纯度的欧洲鳗血清 Ig, 经间接 ELISA 检测, 证实它们都具有抗体活性。

通过比较欧洲鳗免疫血清与非免疫血清的 Sepharose- 4B 柱层析结果, 我们发现两者的层析图谱略有差异, 但 ELISA 检测结果表明 Sepharose- 4B 第二蛋白峰内出现三个明显的抗体活性峰, 这提示欧洲鳗 Ig 可能存在多聚体、双聚体、单聚体等多种形式, 有待用 agarose 凝胶在非降解条件下电泳加以证实。

不连续 SDS- PAGE 检验分析表明, 欧洲鳗血清 Ig 重链、轻链分子量分别为 68kD 和 26kD。如果欧洲鳗和多数硬骨鱼类一样, 血清 Ig 也是四聚体结构^[8-9, 15-17], 那么其分子量应在 752kD 左右。在纯化 Ig 的 H、L 链以外, 还存在一些蛋白条带。这些蛋白带可能是因为盐析法及柱层析法进行蛋白纯化的过程较长, 产生了蛋白质降解, 而且溶液的离子强度、pH 值、温度等因素也会导致纯化蛋白质的聚合。因此, 这些蛋白带可能是免疫球蛋白的聚合物、降解物、或连接链, 也可能是其它杂蛋白, 这还有待采用亲和层析方法进一步验证。Western- blot 分析发现, 兔抗欧洲鳗 Ig 高免血清, 对欧洲鳗血清 Ig 的 H 链 (68kD) 有较强的反应, 而对 L 链区只有微弱的反应。原因可能有: ①欧洲鳗血清 Ig 经过 SDS- PAGE 电泳后, 其 L 链空间构象发生了改变, 而针对 L 链的兔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 L 链, 从而降低了反应强度。④欧洲鳗血清 Ig 的 L 链免疫原性弱, 不能有效激发新西兰白兔产生针对欧洲鳗 Ig 轻链的体液免疫应答。

通过对欧洲鳗血清 Ig 提取、纯化和部分特性分析, 我们对欧洲鳗免疫球蛋白的特性有了初步的了解, 同时制备了兔抗欧洲鳗血清 Ig 的特异性免疫血清, 这将为分析欧洲鳗的体液免疫和粘膜免疫的应答水平提供科学的手段, 为欧洲鳗传染性疾病的血清学和免疫学调查提供可靠的方法, 也为进一步开展欧洲鳗的免疫预防研究奠定必要的基础。

参考文献:

- [1] Corbel M J. The immune response in fish: a review[J]. J Fish Biol, 1975, 7: 539- 563 .
- [2] Ourth D D. Purification and quantitation of Channel Catfish(*Ictalurus punctatus*) Immunoglobulin M [J]. J Appl Ichthyol, 1986, 3: 140- 143.
- [3] Sylvie P, Jacques C. Characterization of serum immunoglobulins in a chondrosteian fish, *Acipenser baeri* [J]. Dev Comp Immunol, 1993, 17: 515 - 524.
- [4] 张永安, 聂 品. 鳗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.
- [5] 杨桂文, 安利国, 王长法, 等. 鲤鱼皮肤粘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.
- [6] 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.
- [7] Hayman J R, Craig J L. Immunoglobulin in the eggs of Channel Catfish(*Ictalurus punctatus*) [J]. Dev Comp Immunol, 1993, 17: 241- 248.
- [8] 孟凡国, 李亚南, 张彦明. 鱼类体液免疫研究进展[J]. 国外兽医学, 1996, 17(4) 16- 18.
- [9] 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.
- [10] Lin T L, Dickerson H W. Passive Immunization of Channel Catfish(*Ictalurus punctatus*) against the Ciliated Protozoan Parasite *Ichthyophthirius multifiliis* by Use of Murine Monoclonal Antibodies [A]. Infection and Immunity, Oct [C]. 1996, 4085- 4090.
- [11] Frederick M A, Roger B, Robert E K, et al. Current protocols in molecular biology (Vol. 2) [M]. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1987. 10. 1. 1- 10. 2. 1.
- [12] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1999. 88- 89.
- [13] 简纪常, 吴婷婷, 杨 弘, 等. 中华鳖体液免疫应答的初步研究[J]. 中国水产科学, 1998, 5(4): 6- 10.
- [14] 王翠兰, 王云峰, 王英厚. 山羊抗兔 IgG 抗血清的提纯及测定[J]. 中国兽医科技, 1997, 27(11): 24- 26.
- [15] 杨先乐. 鱼类免疫学研究的进展[J]. 水产学报, 1989, 13(3): 271- 284.
- [16] 张寿山, 华鼎. 鱼类免疫学 [M]. 北京: 农业出版社, 1984. 75- 77.
- [17] Wilson M R, Warr G W. Fish immunoglobulins and the genes that encode them [J]. Ann Rev Fish Dis, 1992, 2: 201- 221.