doi:10.3969/j.issn.1672-1292.2026.02.006

桂鱼血清 IgM 分离纯化及鉴定

赵玲玲[1],王荣昌[2],沙秉顺[1],饶安平[2],葛文金[2],王　玉[3],
陆青国[2],雷佳欣[1],吴梦轩[4],陶明煊[4],王小军[1]

(1.南京师范大学生命科学学院,江苏 南京 210023)
(2.江苏天美健大自然生物工程有限公司,江苏 南京 210046)
(3.南京师范大学教师教育学院,江苏 南京 210023)
(4.南京师范大学食品与制药工程学院,江 苏南京 210023)

[**摘要**]　通过从桂鱼血清中分离纯化得到免疫球蛋白 M(Immunoglobulin M,IgM),并对其纯度、分子量、结构特征进行分析,以提供基础数据用于后续的免疫学研究和应用. 采用尾静脉采集桂鱼血,通过离心获得血清,将血清用 300 kDa 超滤、50%硫酸铵盐析及超滤进行粗提取. 使用 Sepharose 4B、Sephacryl S-200 凝胶柱从粗提取产物中分离纯化出 IgM 粗产品,使用 DEAE-Sepharose FF 离子交换柱和 Sephacryl S-200 凝胶柱分离纯化出桂鱼血清 IgM,并通过还原性和非还原性 SDS-PAGE、红外光谱等方法对桂鱼血清 IgM 进行纯度、分子量、结构测定. 结果表明,得到的桂鱼血清 IgM 纯度达 91%,重链分子量为 72.948±0.528 kDa,轻链分子量为 26.239±1.217 kDa. 红外光谱显示 IgM 中可能包含羰基、氨基和羟基官能团,且具有 α 螺旋.

[**关键词**]　免疫球蛋白 M,桂鱼,凝胶层析,离子交换层析,鉴定
[**中图分类号**]TQ937　[**文献标志码**]A　[**文章编号**]1672-1292(2026)02-0046-11

Isolation, Purification and Characterization of Serum IgM from Mandarin Fish (*Siniperca chuatsi*)

Zhao Lingling[1], Wang Rongchang[2], Sha Bingshun[1], Rao Anping[2], Ge Wenjin[2], Wang Yu[3], Lu Qingguo[2], Lei Jiaxin[1], Wu Mengxuan[4], Tao Mingxuan[4], Wang Xiaojun[1]

(1.School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)
(2.Jiangsu Tianmeijian Nature Bioengineering Co., Ltd., Nanjing 210046, China)
(3.School of Teacher Education, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)
(4.School of Food Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: Immunoglobulin M(IgM) is obtained by isolation and purification from Mandarin fish(*Siniperca chuatsi*), and its purity, molecular weight, and structural characteristics are analyzed to provide basic data for subsequent immunological studies and applications. Mandarin fish blood is collected using tail vein, serum is obtained by centrifugation, and the serum is subjected to crude extraction by 300 kDa ultrafiltration, 50% ammonium sulfate salting out and ultrafiltration. Sepharose 4B and Sephacryl S-200 gel columns are used to isolate and purify the IgM crude product from the crude extracted product, and the Mandarin fish serum IgM is isolated and purified using DEAE-Sepharose FF ion-exchange columns and Sephacryl S-200 gel columns, and analyzed by both reducing and non-reducing SDS-PAGE, infrared spectroscopy and other methods. The purity, molecular weight and structure of Mandarin fish serum IgM are determined by reducing and non-reducing SDS-PAGE and infrared spectroscopy. The results show that the purity of the obtained Mandarin fish serum IgM is 91%, the molecular weight of the heavy chain is 72.948±0.528 kDa, and the molecular weight of the light chain is 26.239±1.217 kDa. Infrared spectroscopy shows that the IgM might contain carbonyl, amino, and hydroxyl functional groups, and it has α-helix.

Key words: immunoglobulin M(IgM), Mandarin fish(*Siniperca chuatsi*), gel column, ion exchange column, identification

收稿日期:2025-01-07.
基金项目:企业横向研究项目(ZK-2024-kf-6).
通讯作者:王小军,副教授,研究方向:活性物质提取及功效研究. E-mail:08268@njnu.edu.cn;陶明煊,副教授,研究方向:食品营养与健康. E-mail:45017@njnu.edu.cn

免疫球蛋白 M(Immunoglobulin M,IgM)是硬骨鱼血清中含量最为丰富的免疫球蛋白[1-3],结构类似于哺乳动物的免疫球蛋白 M,但不是五聚体,是由 2 条完全相同的重链(分子量约 60-80 KD)和 2 条完全相同的轻链(分子量约 20-30 KD)通过二硫键结合组成的四聚体,分子量在不同鱼种中有所区别[4-6]. 免疫球蛋白对机体的免疫起着至关重要的作用,免疫球蛋白的提取及纯化是研究机体免疫的前提,免疫球蛋白的纯度决定着后续的研究能否顺利进行. 在已发表的论文中,硬骨鱼血清免疫球蛋白的提取主要依靠亲和层析及硫酸铵盐析后凝胶层析[7-8].

桂鱼(Mandarin fish(*Siniperca chuatsi*))又名鳜鱼、季花鱼等,是属于鲈形目(Perciformes)鳜属(*Siniperca*)的一种淡水鱼类,在我国境内有大量养殖,存在鱼类疾病风险[9]. 养殖户对池塘进行消毒或投喂抗生素预防鱼类疾病,消毒只能在短时间内抑制疾病的传播,而抗生素可能导致药物残留. 疫苗可以成为预防鱼类疾病的有效手段[10],具有广阔的研究前景. IgM 是硬骨鱼类血清中的主要免疫球蛋白,在硬骨鱼适应性免疫中发挥重要作用. 对桂鱼 IgM 的研究有助于认识桂鱼的免疫系统工作机制. 目前对桂鱼研究主要关注其养殖方式与新鲜度变化[11-12],对其免疫系统的研究较少. 本文通过利用凝胶、离子交换层析等方法探索分离纯化桂鱼血清 IgM 的最佳条件,可为其免疫系统和免疫机理及相关免疫检测研究奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 实验材料

桂鱼(体重 400 g±50 g/尾),购于柿柿顺(南京)电子商务有限公司,产地广东省佛山市.

1.1.2 主要实验试剂

十二烷基硫酸钠、含巯基还原剂、低分子量蛋白质 Marker(14.4-97.4 kD)、1M Tris-HCl 溶液(pH 6.8)、TEMED、丙烯酰胺/甲叉(29∶1,30%溶液)、1.5 mol/L Tris-HCl 溶液(pH 8.8)、碳酸氢铵、氯化钠、氢氧化钠、甲醇、乙醇、乙酸、甘油、过硫酸铵、考马斯亮蓝 R250、硫酸铵、磷酸二氢钠、十二水合磷酸氢二钠、二水合磷酸二氢钠、DEAE Sepharose Fast Flow、Sephacryl S-300 High Resolution、Sephacryl S-200 High Resolution、Superdex 200 PREP GRADE、Sephadex G-25、Sepharose 4B.

1.2 主要仪器和设备

Vivaflow:200,100 000 MWCO PES 超滤浓缩管:Sartorius;5810 R 小高速离心机,德国艾本德股份公司;Z36 HK 高速冷冻离心机,Hermle;PB-10pH 计、Vivaflow5 超滤装置,德国赛多利斯公司;PL602-S 电子分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;LX-500 迷你离心机、TS-1000 水平摇床,其林贝尔仪器制造有限公司;EV-300 紫外可见分光光度计,赛默飞世尔科技公司;SBS-Z100 数控计滴自动部分收集器、HL-2B 数显恒流泵,上海沪西分析仪器厂;DK-8D 水浴锅,上海精宏实验设备有限公司;VE-180 蛋白电泳槽,天能电池集团股份有限公司;PLUS-E2-10 TJ 纯水过滤机,易普易达科技发展有限公司;DYY-6C 蛋白电泳仪电源,北京六一生物科技有限公司.

1.3 实验方法

1.3.1 样品制备与粗提取

1.3.1.1 桂鱼血清的制备

取健康桂鱼,尾静脉采血. 全血室温放置 1 h 后转移至 4 ℃冰箱中过夜;次日于 4 ℃,18 000 r/min 条件下离心 20 min,收集血清,-20 ℃保存备用.

1.3.1.2 硫酸铵盐析法[13]

取血清样品,用纯水稀释一倍,缓慢加入等体积饱和硫酸铵溶液,置于 4 ℃冰箱过夜. 次日于 4 ℃,18 000 r/min 离心 20 min,弃去上清液,用适量 20 mmol/L pH 7.4 的 PBS 溶解沉淀.

1.3.1.3 超滤[14]

取 3 mL 血清样品,用纯水稀释至 15 mL,使用 300 kDa 超滤离心管,在 900×g 条件下离心. 直到浓缩至 5 mL,再添加纯水至 15 mL. 如此反复 6 次,继续浓缩直到剩余 2 mL.

1.3.1.4　盐析-超滤结合法

取血清样品,用纯水稀释一倍,加入等体积饱和硫酸铵溶液,于 4 ℃冰箱过夜. 次日于 4 ℃,18 000 r/min 离心 20 min,弃去上清液. 用适量纯水溶解沉淀,转移至 300 kDa 超滤离心管中进行超滤. 在 900×g 条件下离心至剩余 5 mL,加入纯水至 15 mL,如此重复 6 次,继续浓缩直到剩余 2 mL.

1.3.2　桂鱼血清 IgM 凝胶层析分离纯化

1.3.2.1　Sepharose-4B 柱层析[14]

将用于保存填料的 20%乙醇倒出,加入 0.2 mol/L 的 NaOH 溶液并缓慢搅拌填料使其形成均一的胶浆,静置一段时间使其自然沉降,弃去上清,用纯水洗涤至 pH 为中性. 待填料完全沉降后,弃去大部分上清,缓慢搅拌形成胶浆,沿长玻璃棒倒入层析柱内. 打开层析柱出水口,随着柱内液体的流出和凝胶的自然沉降,柱内水面高于凝胶床界面,用长玻璃棒搅拌成均一的胶浆后,从入水口缓慢加入胶浆. 反复多次,待柱内凝胶沉积到距柱顶端约 10 cm 后停止装柱,安装适配器,调节适配器至底端贴近凝胶床界面. 适配器连接蛋白进样器出口,蛋白进样器入口连接恒流泵,层析柱出水口连接自动收集器. 用约 5 个柱体积的 20 mmol/L pH 7.4 的 PBS 缓冲液平衡凝胶柱.

取适量经过粗提取的样品置入于插口圆底离心管,18000 r/min 离心 10 min 后,使用注射器吸取上清液注入蛋白进样器. 调节流速至 1 mL/min,设置自动收集器每管收集 4 mL,收集 100 管. 用紫外分管光度计测量每管样品在 280 nm 波长处的吸光度. 取样电泳,根据电泳结果,收集样品.

1.3.2.2　Sephacryl S-200 柱层析

方法同 1.3.2.1.

1.3.2.3　Superdex 200 柱层析

缓冲液为 150 mmol/L 的 NH_4HCO_3 溶液,流速为 1.5 mL/min,每管收集 2.25 mL,其余同 1.3.2.1.

1.3.3　桂鱼血清 IgM 离子交换层析分离纯化

1.3.3.1　Sephadex G-25 离子平衡

Sephadex G-25 适配器连接恒流泵,出水口连接核酸蛋白检测仪. 以 2 mL/min 流速向层析柱内通入约 5 个柱体积的 10 mmol/L pH 7.4 的 PB 缓冲液. 打开核酸蛋白检测系统,将样品通入层析柱,收集洗脱峰,直至记录线回到基线,停止收集,继续通入约 5 个柱体积的 PB 缓冲液.

1.3.3.2　连续梯度洗脱

DEAE-Sepharose FF(DEAE-4FF)离子柱适配器连接蛋白进样器出口,蛋白进样器入口连接恒流泵,出水口连接核酸蛋白检测仪进水口,核酸蛋白检测仪出水口连接自动收集器. 将 Sephadex G-25 离子平衡后的样品通入进样器. 调整恒流泵流速为 2 mL/min,通入 10 mmol/L pH 7.4 的 PB 缓冲液,收集洗脱峰.

用含有 0~400 mmol/L NaCl 的 PB 缓冲液连续洗脱,收集器设定为 3 mL 每管,收集 100 管.

用含有 400~600 mmol/L NaCl 的 PB 缓冲液连续洗脱,收集器设定为 3 mL 每管,收集 100 管.

将收集器收集的样品用紫外分光光度计测量在 280 nm 波长处的吸光度,根据 SDS-PAGE 电泳结果收集样品.

通入含有 2 mol/L NaCl 的 PB 缓冲液约 5 个柱体积. 通入 PB 缓冲液约 5 个柱体积.

1.3.3.3　间隔梯度洗脱

将 Sephadex G-25 离子平衡后的样品通入 DEAE-Sepharose FF(DEAE-4FF)离子柱进样器. 调整恒流泵流速为 2 mL/min,通入 10 mmol/L pH 7.4 的 PB 缓冲液. 待记录线回到基线,分别用含有 150、200、240 mmol/L NaCl 的 PB 缓冲液洗脱,收集器设定 4 mL 每管,各收集 50 管. 将收集器收集的样品用紫外分管光度计测量在 280 nm 波长处的吸光度,根据 SDS-PAGE 电泳结果收集样品.

通入含有 2 mol/L NaCl 的 PB 缓冲液约 5 个柱体积. 通入 PB 缓冲液约 5 个柱体积.

1.3.4　冷冻干燥

将经层析柱收集的活性峰超滤脱盐后,冷冻干燥,得到桂鱼血清 IgM 纯品.

1.3.5　纯化蛋白的鉴定

1.3.5.1　还原性 SDS-PAGE[15-17]

浓缩胶(5%)缓冲液为 1 mol/L Tris HCL(pH 6.8),分离胶(12%)缓冲液为 1.5 mol/L Tris HCL(pH

8.8),样品溶解液为 5×蛋白上样缓冲(loading buffer),电泳用稳压法进行,在浓缩胶中将电压稳定在 80 V,当样品全部进入分离胶后将电压调整为 120 V,直至溴酚蓝迁移至距离凝胶下端约 1 cm 处,停止电泳. 取出平板中的凝胶置于考马斯亮蓝 R250 染色液的培养皿中,将培养皿置于摇床上染色 30 min. 将染色后的电泳胶从培养皿中取出,用清水洗去表面附着的染色液,将其放入装有脱色液的培养皿中,在摇床上摇晃脱色,直至能明显看清条带. 将脱色后的电泳胶转移至清水中浸泡,直至分离胶背景无色.

1.3.5.2 非还原性 SDS-PAGE[18-19]

取非还原 4×loading buffer 按 1∶3 的比例加入至蛋白样品中,采用 4%~12%预制胶,电泳仪电压为 160 V,电泳 40 min,其余同 1.3.5.1.

1.3.5.3 紫外吸收法测定蛋白质含量[20-22]

将待测样品稀释,使其吸光度在 0.2~2.0 间,以对应缓冲液为空白对照,测量其 260 nm 和 280 nm 波长的吸光度,根据吸收差法经验公式[23-24]计算出蛋白质浓度:

$$蛋白质浓度(mg/mL)=(1.45OD_{280}-0.74OD_{260})\times 稀释倍数.$$

1.3.5.4 红外光谱法

将冷冻干燥后的样品与 KBr 混合进行分析[25-26],使用 FT-IR 光谱仪,扫描范围为 400~4 000 cm^{-1},分辨率为 4 cm^{-1}.

2 结果与分析

2.1 技术路线

本研究比较了 300 kDa 超滤、50%硫酸铵盐析和 50%硫酸铵盐析后超滤这三种粗提取方法,最终采用 300kDa 超滤作为粗提取方法. 将得到的粗提取产物采用一系列方法进行分离纯化,最终得到桂鱼血清 IgM,并通过还原性和非还原性 SDS-PAGE、红外光谱等方法对桂鱼血清 IgM 进行纯度、分子量、结构测定. 各纯化方法之间的逻辑关系如图 1 所示.

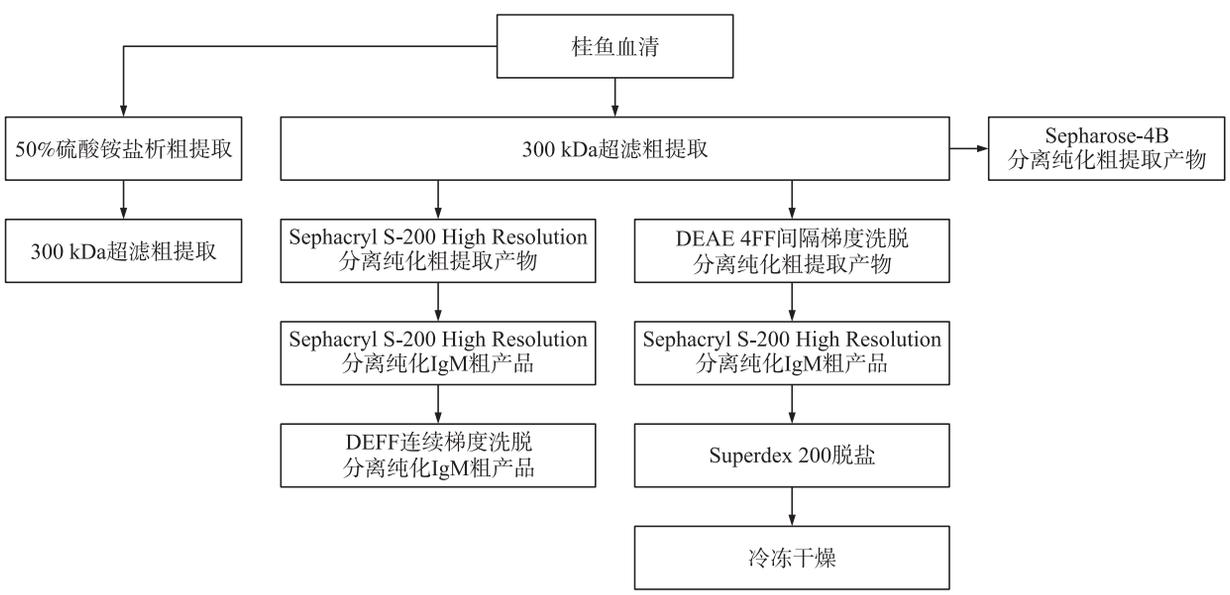


图 1 各纯化方法关系图

Fig. 1 Relationship diagram of various purification methods

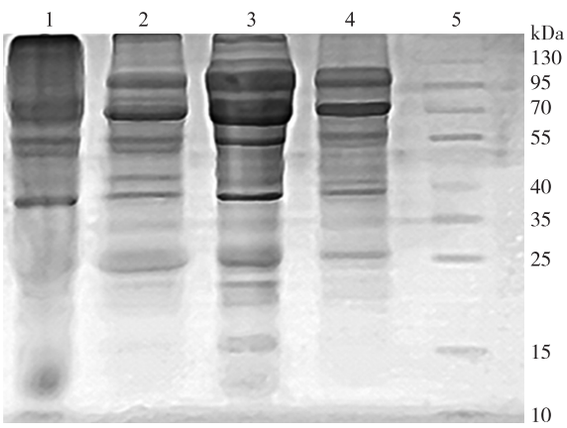
2.2 IgM 粗提取

粗提取产物的 SDS-PAGE 检测结果如图 2 所示. 在粗提取产物中均可明显看出 IgM 的重链和轻链[5,27],说明超滤和 50%硫酸铵盐析均能够有效分离 IgM. 50%硫酸铵粗提产物与超滤粗提产物相比,在 10~25 kDa 存在杂蛋白的条带,对于其余杂蛋白的去除效果基本一致,说明超滤和 50%硫酸铵粗提后超滤在纯化效果上没有明显区别.

使用紫外吸收法测定 3 种粗提取方式产物的蛋白质含量. 0.5 mL 桂鱼血清超滤后蛋白质浓度约为

1.318 5 mg/mL,体积为 10 mL,质量约为 13.185 mg;50%硫酸铵盐析后蛋白质浓度约为 3.435 mg/mL,体积为 2 mL,质量约为 6.87 mg;50%硫酸铵盐析后超滤,蛋白质浓度约为 0.789 mg/mL,体积为 10 mL,质量约为 7.89 mg. 超滤粗提产物的蛋白浓度最高.

超滤和 50%硫酸铵盐析均可以提取桂鱼血清中的 IgM,但粗提取产物中仍含有大量杂蛋白的条带,需要进一步纯化. 相较而言,超滤的纯化效果较好且蛋白损失最少,因此采用超滤作为后续实验的粗提取方式.



1. 桂鱼血清;2. 超滤粗提产物;3. 50%硫酸铵粗提产物;4. 50%硫酸铵粗提后超滤产物;5. Marker.

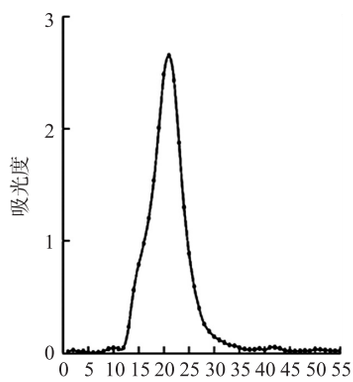
图 2　桂鱼血清 IgM 粗提取的 SDS-PAGE 图

Fig. 2　SDS-PAGE of IgM crude extraction from mandarin fish serum

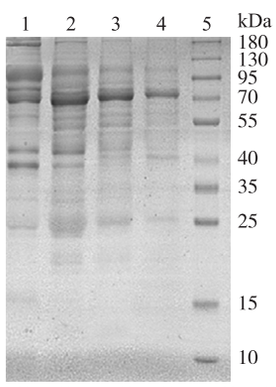
2.3　桂鱼血清 IgM 层析分离纯化

2.3.1　Sepharose-4B 柱层析

将超滤粗提取样品 5 mL 上样 Sepharose-4B,结果如图 3(a)所示. 图中仅可以观察到一个明显的主峰,在 12-15 管处可见一没有完全分离的小峰,可知桂鱼血清 IgM 和杂蛋白没有完全分离. 取点电泳结果如图 2(b)所示. 第 24、26 管 IgM 纯度较高,因此收集 24-28 管,使用紫外吸收法测定蛋白质浓度约为 0.499 85 mg/mL,体积为 20 mL,质量约为 9.997 mg.



(a) 层析图



1. 第18管;2. 第21管;3. 第24管;4. 第26管;5. Marker.

(b) SDS-PAGE

图 3　Sepharose-4B 分离结果

Fig. 3　Result of Sepharose-4B separation

2.3.2　Sephacryl S-200 柱层析

将超滤粗提取样品 5 mL 上样 Sephacryl S-200,进行两组实验,结果如图 4 所示(a)和(b)所示. 层析图中可以观察到 3 个峰,其中峰 1 分离效果较好,峰 2 和峰 3 均未完全分离. 取图 4(a)中管号为 46、47、52、54、55、58、61、62 的样品进行 SDS-PAGE 鉴定,结果如图 5 所示,第 58、61、62 管的电泳结果中的主要条带是桂鱼血清 IgM 的重链和轻链,其余管均不能明显观察到. 结合层析图分析,峰 1 和峰 2 主要是杂蛋白,IgM 主要位于峰 3,因此收集 55-62 管,使用紫外吸收法测定蛋白质浓度约为 0.524 25 mg/mL,体积为 36 mL,质量约为 18.873 mg. 但峰 3 的电泳结果中在 43-66.2 kDa 间可以明显观察到杂蛋白的条带,仍需要进一步分离纯化. Sephacryl S-200 一次纯化样品浓缩后再次通入 Sephacryl S-200,结果如图 6(a)所示. 可以观察到图中仅有一对称主峰. 收集纯化产物电泳,结果如图 6(b)所示. 可以观察到 Sephacryl S-200 二次纯化和 Sephacryl S-200 一次纯化的产物无明显区别,杂蛋白的条带基本一致,仍需进一步分离纯化.

2.3.3　离子交换层析分离纯化

2.3.3.1　连续梯度洗脱

选用 Sephacryl S-200 二次纯化样品进行连续梯度洗脱. 只有在通入含 0~400 mmol/L NaCl 的

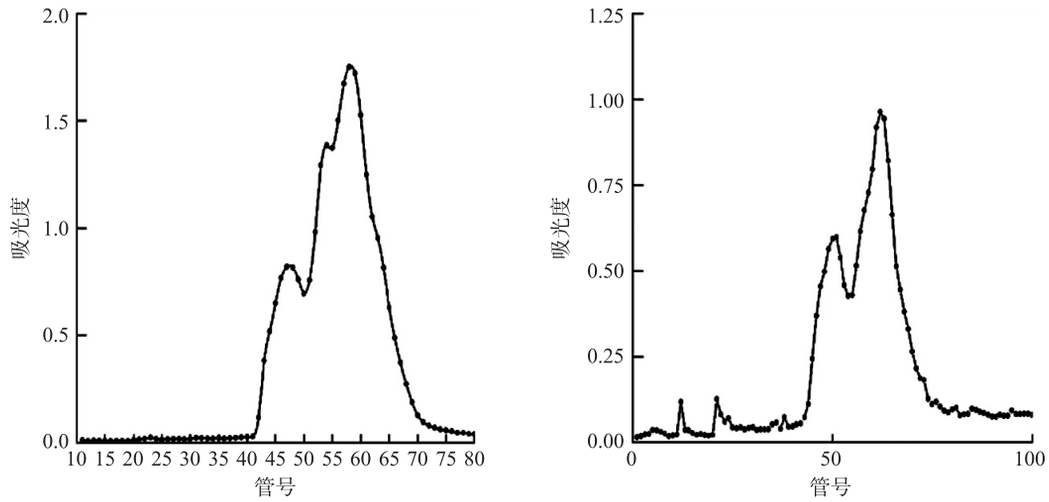
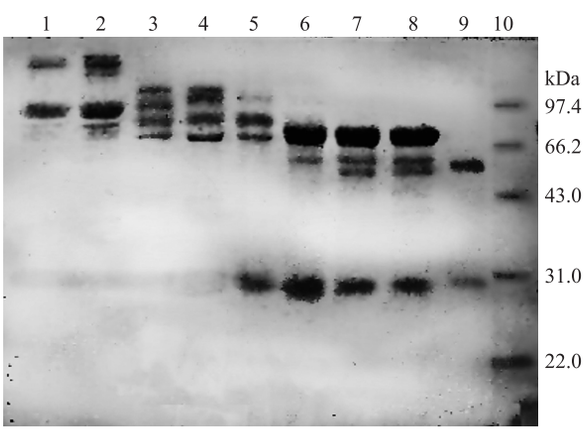


图 4　Sephacryl S−200 分离的层析图

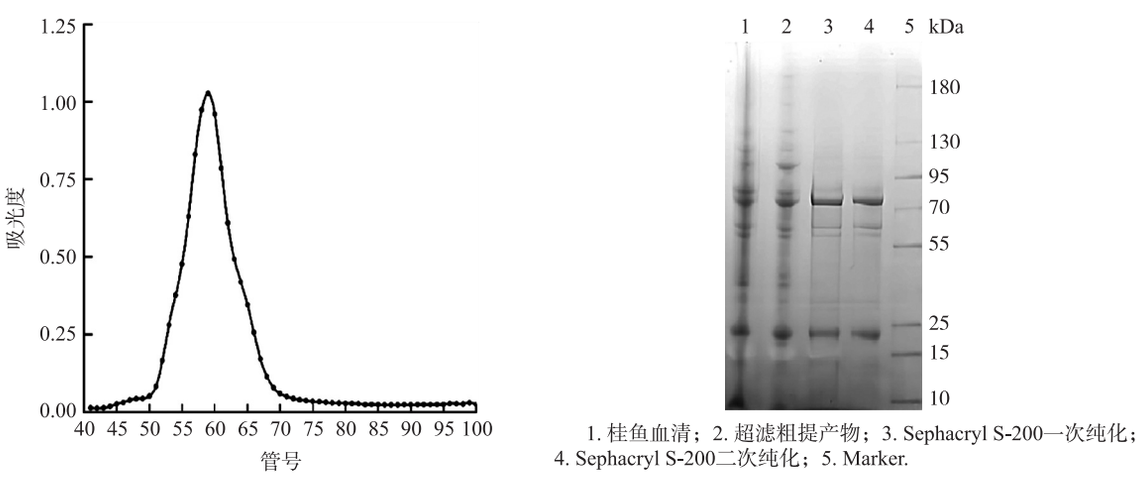
Fig. 4　Chromatographic diagram of Sephacryl S−200 separation



1. 第 46 管;2. 第 47 管;3. 第 52 管;4. 第 54 管;5. 第 55 管;6. 第 58 管;7. 第 61 管;8. 第 62 管;9. 牛初乳 IgG;10. Marker.

图 5　Sephacryl S−200 分离样品的 SDS-PAGE 图

Fig. 5　SDS-PAGE of Sephacryl S−200 isolated sample



(a) 层析图

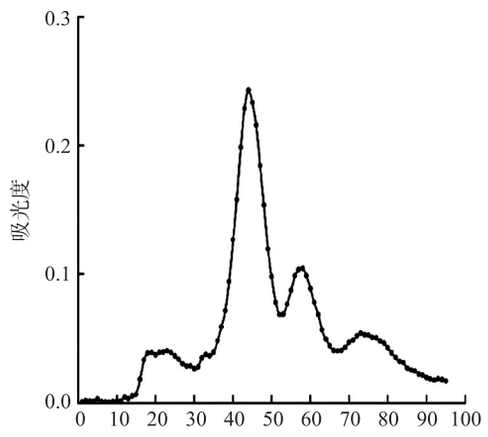
1. 桂鱼血清；2. 超滤粗提产物；3. Sephacryl S-200一次纯化；4. Sephacryl S-200二次纯化；5. Marker.

(b) SDS-PAGE

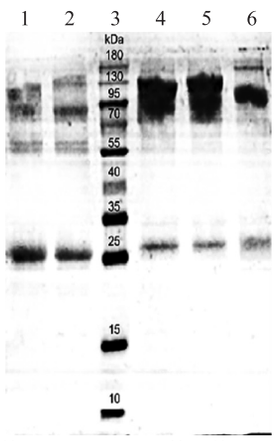
图 6　Sephacryl S−200 二次纯化结果

Fig. 6　Result of Sephacryl S−200 secondary purification

10 mmol/L PB 时出现 3 个洗脱峰. 每管在 280 nm 波长处的吸光度如图 7(a)所示,可以观察到 1 个主峰和 3 个小峰,因为 Sephacryl S-200 二次纯化样品已经具有一定纯度,推测主峰(即第 39-50 管)为 IgM. 取样第 39、44、50、54、58 进行 SDS-PAGE 进行验证,结果如图 7(b)所示,从第 39、44 管可以清晰观察到 IgM 的重链和轻链,其余管未观察到 IgM 的重链且轻链的条带也不明显,因此可推测主峰为 IgM,3 个小峰为杂蛋白. 第 39、44 管可以观察到杂蛋白的条带,推测由于 NaCl 浓度变化过快导致 IgM 和杂蛋白未分离,需要使用间隔梯度洗脱. 根据管数大致推测 NaCl 浓度为 160 mmol/L 左右时 IgM 开始洗脱,峰值出现在 NaCl 浓度为 176 mmol/L 左右时,据此进行间隔梯度洗脱.



(a) 层析图



1. 第39管；2. 第44管；3. Marker；4. 第50管；5. 第54管；6. 第58管.

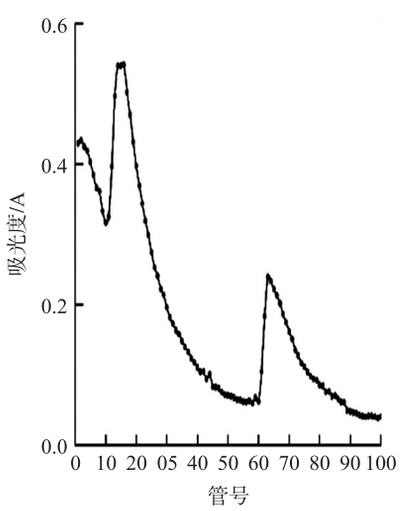
(b) SDS-PAGE

图 7　Sephacryl S-200 二次纯化样品连续梯度洗脱

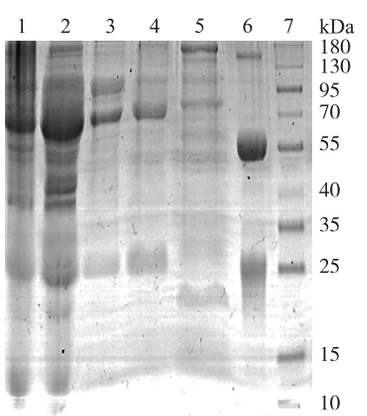
Fig. 7　Continuous gradient elution of Sephacryl S-200 secondary purification

2.3.3.2　间隔梯度洗脱

对桂鱼血清超滤粗提取产物间隔进行梯度洗脱,层析图如图 8(a)所示. 含 200 mmol/L NaCl 的 10 mmol/L PB 洗脱产物和含 240 mmol/L NaCl 的 10 mmol/L PB 洗脱产物电泳结果如图 8(b)所示. 含 200 mmol/L NaCl 的 10 mmol/L PB 洗脱和含 240 mmol/L NaCl 的 10 mmol/L PB 洗脱的蛋白质均主要为桂鱼血清 IgM,在 70-95 kDa 均可见一杂蛋白条带,需要使用凝胶层析进一步分离纯化,因此合并收集.



(a) 层析图



1. 桂鱼血清；2. 超滤粗提产物；3. 含有200 mmol/L NaCl的10 mmol/L PB洗脱；4. 含有240 mmol/L NaCl的10 mmol/L PB洗脱；5. 含有2 mol/L NaCl的10 mmol/L PB洗脱；6. 牛初乳IgG；7. Marker.

(b) SDS-PAGE

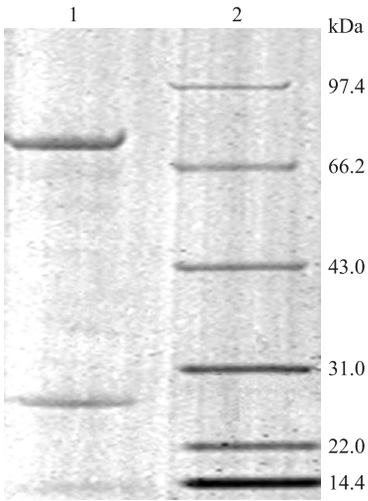
图 8　桂鱼血清超滤粗提取产物间隔梯度洗脱

Fig. 8　Interval gradient elution of ultrafiltration crude products from mandarin fish serum

2.3.3.3　DEAE 4FF IgM 粗产品经 Sephacryl S-200 分离纯化

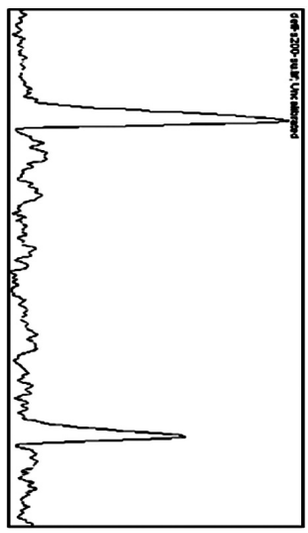
将 DEAE 4FF 洗脱产物通入 Sephacryl S-200 进行分离纯化,使用 Superdex 200 脱盐. SDS-PAGE 结果如图 9(a)所示,可以清晰观察到桂鱼血清 IgM 的轻链和重链,且无其他杂蛋白的条带. 使用 ImageJ 进行

纯度分析[28],见图 9(b),纯度为 91%.



1. DEAE 4FF-Sephacryl S-200-Superdex 200产物; 2. Marker.

(a) SDS-PAGE



(b) ImageJ纯度分析

图 9 DEAE 4FF-Sephacryl S-200 产物电泳纯度分析

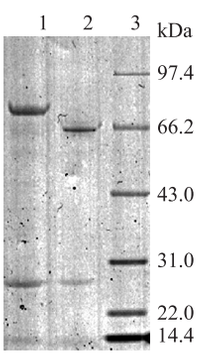
Fig. 9 Analysis of the electrophoretic purity of DEAE 4FF-Sephacryl S-200

2.4 桂鱼血清 IgM 鉴定

2.4.1 还原和非还原 SDS-PAGE

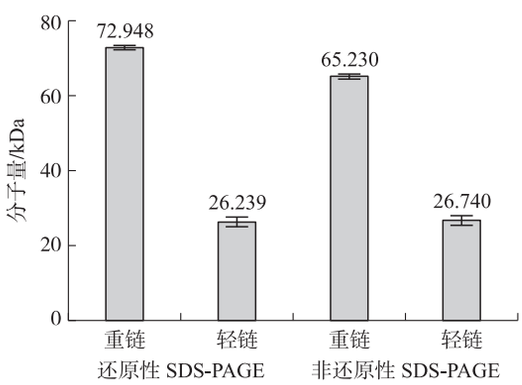
使用 4%~12%预制胶进行还原性和非还原性 SDS-PAGE,结果如图 10(a)所示. 还原性和非还原性 SDS-PAGE 均可观察到明显的两条链,其中轻链的条带基本一致,重链条带的位置有差异,非还原性的重链条带较还原性的靠下.

使用 Quantity One 对此电泳图进行分子量测定[29],结果见图 10(b). 还原性 SDS-PAGE 重链分子量为 72.948±0.528 kDa,轻链分子量为 26.239±1.217 kDa. 非还原性 SDS-PAGE 重链分子量为 65.230±0.618 kDa,轻链分子量为 26.740±1.240 kDa.



1. 还原性; 2. 非还原性; 3. Marker

(a) SDS-PAGE



(b) Quantity One分析结果

图 10 桂鱼血清 IgM SDS-PAGE 结果

Fig. 10 SDS-PAGE of IgM from mandarin fish serum

2.4.2 红外光谱

桂鱼血清 IgM 的红外光谱如图 11 所示. 3 421 cm^{-1}吸收峰为 O-H 的强伸缩振动吸收峰;2 927 cm^{-1}吸收峰为 CH_2 的对称伸缩振动峰;2 853 cm^{-1}吸收峰可能为 C-H 键的弱伸缩振动峰;1 734 cm^{-1}处的吸收峰为酯基上 C=O 键的伸缩振动峰;1 654 cm^{-1}处为酰胺中 C=O 伸缩振动峰(酰胺Ⅰ),主要是蛋白质 α 螺旋;1 540 cm^{-1}处的吸收峰可能是酰胺中 N-H 伸缩振动峰(酰胺Ⅱ)[30-31]. 因此,该 IgM 中可能包含羰基、氨基和羟基官能团,且具有 α 螺旋.

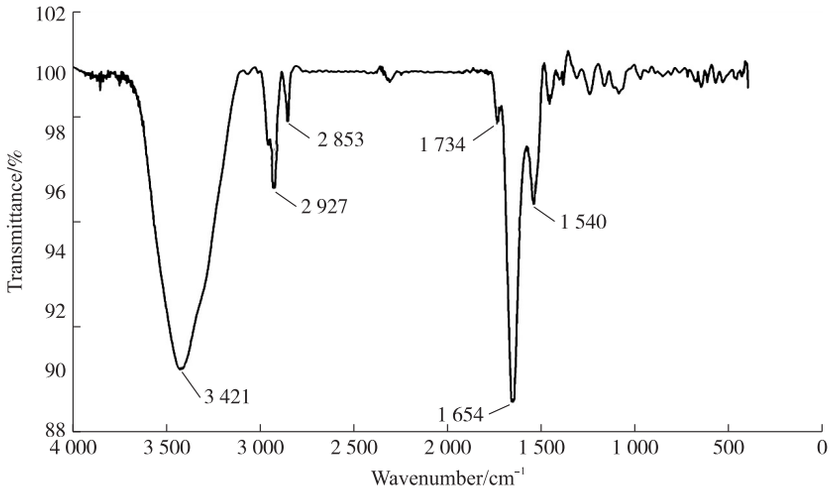


图 11　桂鱼血清 IgM 红外曲线图

Fig. 11　IgM infrared curve of mandarin fish serum

3　结论

本研究比较了 300 kDa 超滤、50%硫酸铵盐析和 50%硫酸铵盐析后超滤这 3 种粗提取方法,通过 SDS-PAGE 和紫外吸收法对粗提取产物的纯化效果和蛋白质质量进行比较,并最终采用 300kDa 超滤作为粗提取方法. 用 Sephacryl S-200 和 Sepharose 4B 两种凝胶层析柱对粗提取产物进行分离纯化,通过 Sephacryl S-200 二次纯化得到具有一定纯度的桂鱼血清 IgM. 通过连续梯度洗脱和间隔梯度洗脱确定 IgM 的 NaCl 洗脱浓度为 200、240 mmol/L NaCl. 使用 DEAE-Sepharose FF(DEAE-4FF)间隔洗脱和 Sephacryl S-200 得到桂鱼血清 IgM. 使用 SDS-PAGE 计算得桂鱼血清 IgM 纯度约为 91%,重链分子量为 72.948±0.528 kDa,轻链分子量为 26.239±1.217 kDa. 通过红外光谱测得 IgM 中可能包含羰基、氨基和羟基官能团,且具有 α 螺旋.

相较于传统的主要依靠亲和层析和硫酸铵盐析后凝胶层析进行免疫球蛋白的提取,近些年来,研究者们不断寻找低成本、高效率的分离纯化免疫球蛋白的方法. 高莉莉[32]利用 PEG 对水溶蛋白质的沉淀作用,通过加入不同浓度的 PEG6000 对卵黄球蛋白进行分离,但得到的蛋白纯度并不高;向明霞等[33]采用离子交换色谱对 α_s酪蛋白进行分离;王丽英等[34]也曾采用离子交换色谱法对鸡卵黄中的免疫球蛋白进行提取,该方法虽可以显著提高提取蛋白的浓度,但样品需要预先调整 pH 和离子强度,增加操作的复杂性,成本也较高;马宇菲[35]构建了一种新型的生物偶联纳米材料作为固相萃取剂对 IgG 进行吸附选择,提高了分离效率,但该方法可能存在非特异吸附,吸附容量也有限,会影响吸附的效率.

本文通过利用凝胶、离子交换层析等方法探索分离纯化桂鱼血清 IgM 的最佳条件,所采用的方法操作方便高效,最终得到纯度较高的桂鱼血清 IgM,可为其免疫系统和免疫机理及相关免疫检测研究奠定基础.

[参考文献](References)

[1] Lyu M F, Malyutin A G, Stadtmueller B M. The structure of the teleost immunoglobulin M core provides insights on polymeric antibody evolution, assembly, and function[J]. Nature Communications, 2023, 14: 7583.

[2] Yang S, Tang X Q, Sheng X Z, et al. Development of monoclonal antibodies against IgM of sea bass(*Lateolabrax japonicus*) and analysis of phagocytosis by mIgM+lymphocytes[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2018, 78: 372-382.

[3] Wu L T, Yang Y J, Gao A L, et al. Teleost fish IgM(+) plasma-like cells possess IgM-secreting, phagocytic, and antigen-presenting capacities[J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13: 1016974.

[4] Cui Z W, Zhao H, Chen X H. Molecular and functional characterization of two IgM subclasses in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2023, 134: 108581.

[5] Calvert R A,Nyamboya R A,Beavil A J,et al. The evolution of flexibility and function in the Fc domains of IgM,IgY,and IgE[J]. Frontiers in Immunology,2024,15:1389494.
[6] Ueno H,Takizawa F,Yamamoto K,et al. Characterization of zebrafish IgM+ cells and plasma IgM by antibodies against the heavy chain of zebrafish IgM[J]. Developmental and Comparative Immunology,2023,148:105016.
[7] 魏光彩. 鲤鱼免疫球蛋白 V 区多样性及 Aicda 基因功能的初步研究[D]. 济南:山东师范大学,2022.
[8] 王艺萌. 鲤鱼(*Cyprinus carpio*)免疫球蛋白 IgD 基因克隆及其粘膜免疫功能的初步研究[D]. 济南:山东师范大学,2022.
[9] 李世元,胡莲,丁庆秋. 鳜鱼人工养殖常见病害及防治技术[J]. 科学养鱼,2024(2):54-56.
[10] 张彪. 浅谈鳜鱼传染性脾肾坏死病流行特点及灭活疫苗使用要点[J]. 科学养鱼,2023(11):57-58.
[11] Tedesco P,Seraiva M,Sandoval-Sierra J V,et al. Impact of abiotic factors and husbandry on saprolegniosis in salmonid farms[J]. Aquaculture,2022,561:738679.
[12] Condie C M,Alexander K A,Fulton E A,et al. Polarised perspectives in salmon aquaculture warrant a targeted long-term approach to communication[J]. Aquaculture Reports,2023,30:101557.
[13] Tripathi P,Nath A,Dixit I. Estimation of protein precipitation in pulses by different salt gradients,using ammonium sulfate[J]. Indian Journal of Scientific Research,2019,10(1):39-43.
[14] Belal A,Kazory A. The art of ultrafiltration,from pump to peritoneum[J]. Cardiorenal Medicine,2024,14(1):588-599.
[15] Gore V B,Kundan,Thombre P R,et al. Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) characterization of protein fractions in ten peanut bunch type varieties[J]. International Journal of Biochemistry Research & Review,2024,33(6):60-70.
[16] Perez-Atehortua M,Short S E,Aranzaez-Rios C,et al. Preparation and extraction of chorion proteins from Salmo salar embryos at the pigmented eye stage for electrophoresis with SDS-polyacrylamide gel[J]. MethodsX,2024,12:102533.
[17] Yadav V K,Khan N A,Yadav B,et al. Comparative analysis of peroxidase and catalase isoenzymes via Native-PAGE electrophoresis and SDS-PAGE profiling of leaf proteins in rice varieties under infection stress[J]. Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology,2024,25(9/10):47-56.
[18] 沈斌彬. 蛋白类生物药的非还原十二烷基硫酸钠-毛细管凝胶电泳分析[D]. 杭州:浙江大学,2021.
[19] Cernosek T,Dalphin M,Sakowski J,et al. Application of analytical quality by design to the development and validation of reduced and non-reduced capillary electrophoresis analytical procedures for mAb purity determination[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,2024,249:116386.
[20] Ehnert S,Seehase J,Mueller-Renno C,et al. Simultaneous quantification of total carbohydrate and protein amounts from aqueous solutions by the sulfuric acid ultraviolet absorption method(SA-UV method)[J]. Analytica Chimica Acta,2021,1174:338712.
[21] De Lemos I A,Da Silva Junior J G,Spisso B F. Evaluation of spectrophotometric methods for determination of proteins in capsular polysaccharide of haemophilus influenzae type b(PRP)[J]. Revista Virtual de Química,2017,9(6):2625-2641.
[22] 曹红翠. 紫外分光光度法测定蛋白质的含量[J]. 广东化工,2007,34(8):93-94.
[23] 杨丽莉,陶娟,张冬梅. 紫外线吸收光谱法在水质 COD 检测中的应用[J]. 山西化工,2024,44(10):176-177.
[24] Elgailani I E H,Alsakka M M. Determination of iron content in different hemoglobin samples from some patients by UV-visible spectrophotometer[J]. Advances in Analytical Chemistry,2016,6(2):35-40.
[25] Schwaighofer A,Lendl B. Infrared spectroscopy for structure analysis of protein inclusion bodies[J]. Methods in Molecular Biology,2023,2617:209-223.
[26] Fan J H,Liu X J,Liu M Y,et al. Characterization of thermal behavior of two types of kaolin in China by ultrafast Joule heating combined with XRD,FT-IR,TG-DSC and SEM[J]. Thermochimica Acta,2024,742:179894.
[27] Landivar S M,Melli L J,Maiztegui C,et al. A novel multiplex and glycoprotein-based immunochromatographic serologic IgM test for the rapid diagnosis of Escherichia coli O157 and O145 causing bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome[J]. Journal of Clinical Microbiology,2024,62(12):e0100324.
[28] 邓胜朝,刘佳旭,贾爱卿,等. 猪初乳中分泌型免疫球蛋白 A 的分离纯化及鉴定[C]//中国畜牧兽医学会动物传染病学分会第九次全国会员代表大会暨第十七次全国学术研讨会,2017.
[29] 银雪. 鲜牛乳中免疫球蛋白的分离制备研究[D]. 长春:吉林大学,2019.
[30] 王一然,丁瑞雪,耿丽娟,等. 基于红外光谱分析巴氏杀菌乳贮藏期间蛋白质二级结构的变化[J]. 沈阳农业大学学报,2019,50(1):93-100.

[31] Liu C,Wang N,Wang L,et al. Rapid quantitative analysis of soybean protein isolates secondary structure by two-dimensional correlation infrared spectroscopy through pH perturbation[J]. Food Chemistry,2024,448:139074.
[32] 高莉莉. 抗 IL-1β 卵黄免疫球蛋白(IgY)的抗炎活性及作用机制研究[D]. 大连:大连海洋大学,2024.
[33] 向明霞,王丽娜,李子超,等. DEAE-Sepharose CL-6B 离子交换色谱分离 α_s 酪蛋白的研究[J]. 四川大学学报(自然科学版),2013,50(2):371-376.
[34] 王丽英,马美湖,蔡朝霞,等. 离子交换色谱法分离纯化鸡卵黄免疫球蛋白[J]. 色谱,2012,30(1):80-85.
[35] 马宇菲. 重组链球菌蛋白 G 修饰的金属有机骨架选择性分离纯化健康人血清中免疫球蛋白的研究[D]. 沈阳:沈阳医学院,2024.

[责任编辑:严海琳]

(上接第 45 页)

[19] Zhu Y R,Huang J,Fu X Y,et al. Bijective mapping network for shadow removal[C]//2022 IEEE/CVF Conference on Computer Vision and Pattern Recognition. New Orleans,LA,USA,2022.
[20] Rahman Z U,Jobson D J,Woodell G A. Retinex processing for automatic image enhancement[J]. Human Vision Electronic Imaging VII,2002,4662:390-401.
[21] 田小平,程新,吴成茂,等. 基于同态滤波的彩色图像增强[J]. 西安邮电大学学报,2015,20(6):5.
[22] 王海晖,彭嘉雄,吴巍,等. 多源遥感图像融合效果评价方法研究[J]. 计算机工程与应用,2003(25):33-37.
[23] 吴翔. 数字正射影像图质量评价研究[J]. 科技创新与生产力,2015(6):48-50.
[24] 赵有松,尹粟,张莉,等. 航空遥感影像质量评价方法探讨[J]. 测绘科学,2016,41(1):158-161.

[责任编辑:陈　庆]