

虹鳟 IgM 重链恒定区的表达及兔抗血清的制备

赵景壮, 徐黎明, 刘 森, 曹永生, 尹家胜, 刘红柏, 卢彤岩*

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要: 为了能够成功表达虹鳟 IgM, 本研究利用生物信息学软件对虹鳟 IgM 的亲水性及抗原性进行了分析, 根据 GenBank 收录的虹鳟 IgM 重链恒定区, 参照生物信息学分析结果, 设计用于扩增截短的 IgM 基因的引物, 以虹鳟头肾 RNA 提取物为模板, 利用 RT-PCR 方法扩增虹鳟截短的 IgM 重链恒定区部分基因片段, 连接原核表达载体 pET-27b, 利用大肠杆菌 Rosetta 进行表达。SDS-PAGE 及 HPLC 结果显示, 纯化后截短的 IgM 大小约为 47.7 ku, 且纯度达到 90%。利用其制备兔抗血清后 ELISA 分析结果显示, 所制备的兔抗血清与本研究所表达的截短 IgM 蛋白的反应效价为 1:40 000, 与虹鳟血清提取的全长 IgM 反应效价为 1:20 000 并且呈现出抗原计量依赖性。研究表明, 重组 IgM 蛋白与虹鳟血清中的天然 IgM 重链恒定区具有近似的结构, 利用其所制备的兔抗血清能够与虹鳟鱼体中的天然 IgM 发生特异性反应。

关键词: 虹鳟; IgM; 基因克隆; 抗血清

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 属于鲑科鱼类, 原产于北美洲太平洋沿岸, 美国加州山涧中, 1959 年引入中国^[1], 经过几十年的驯化饲养后, 现在已经成为广泛的养殖品种之一。但是, 随着虹鳟养殖规模的扩大, 病害问题已严重困扰其养殖业的发展, 近年来关于虹鳟免疫系统的研究受到了学术界的广泛关注。

抗体是脊椎动物的免疫系统在抗原的刺激下, 由淋巴细胞所产生的可与相应的抗原发生特异性结合的免疫球蛋白^[2]。鱼类虽然是低等的脊椎动物, 但是其免疫系统同样可以产生不同类型的免疫球蛋白, 如 IgM^[3]、IgD^[4]、IgZ^[5]、IgT^[6] 等, 其中 IgM 是鱼类特异性免疫中最主要的免疫球蛋白^[7]。哺乳动物的 IgM 以五聚体存在, 而鱼类的 IgM 多以四聚体的形式存在^[8], 它由 2 条轻链(L 链)和 2 条重链(H 链)所组成的单体通过连接链“J”将 4 个单体连接成一个四聚体, 分子量为 700 ~ 800 ku^[9]。本实验克隆、表达、纯化了虹鳟截短的 IgM

重链恒定区片段, 并利用纯化的重组 IgM 蛋白制备兔抗血清, 以期对虹鳟免疫系统、免疫机制研究及相关免疫检测提供基础。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

实验虹鳟来源于黑龙江水产研究所渤海冷水性鱼类试验站所养殖的美国品系, 体质量 80 ~ 100 g; 虹鳟血清提取 IgM 由美国清泉食品公司 Scott LaPatra 博士惠赠; 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司; 克隆载体 pMD18-T simple 购自宝生物工程(大连)有限公司; T₄ 连接酶、Taq DNA 聚合酶、限制性核酸内切酶、IPTG(异丙基硫代-β-D-半乳糖苷)购自 TaKaRa 公司; 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂购自 Sigma 公司; HRP 标记的羊抗兔 IgG 购自 Abcam 公司; 大肠杆菌 JM109、Rosetta、表达载体 pET-27b 为本实验室保存; 其他化学试剂为分析

收稿日期:2014-04-03 修回日期:2014-05-15

资助项目:国家科技支撑计划(2012BAD25B02);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(HSY201204);黑龙江省冷水性鱼类种质资源及增养殖重点开放实验室(201104)

通信作者:卢彤岩, E-mail:lutongyan@hotmail.com

纯,由国药集团化学试剂有限公司提供。

1.2 引物设计

根据 GenBank 中收录的虹鳟 IgM 蛋白的重链基因序列(登录号:S63348),利用 DNASTar 6.0 (Protean)软件分析 IgM 蛋白的重链恒定区;利用 Primer Premier 5.0 设计用于 IgM 恒定区基因片段扩增的引物,上游引物 P1 带有 *Nco* I 酶切位点:5'-CCATGGGAGCCTCCCTCACCTTCAA-TGG-3',下游引物 P2 带有 *Bam*H I 酶切位点:5'-GGATCCTCAATCAATAAGCCAA-GCC-3',引物由哈尔滨博仕生物公司合成。

1.3 虹鳟 IgM 重链基因片段的克隆

选取健康的虹鳟,按照 RNA 提取试剂盒说明书上的方法对虹鳟头肾 RNA 进行提取。利用引物 P1 和 P2 对提取后的 RNA 进行 RT-PCR 一步反应来扩增虹鳟 IgM 重链基因,将反应后的 PCR 产物用凝胶回收试剂盒回收纯化目的片段。回收后的片段与 pMD18-T simple 载体连接,连接后的产物 pMD18-T-IgM 转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞,涂布于 LB 平板(含氨苄青霉素),挑取单菌落培养后进行菌液 PCR 鉴定。鉴定正确的阳性单菌落经质粒提取试剂盒提取质粒后进行测序。

1.4 重组表达载体 pET27b-IgM 的构建

将鉴定正确的 pMD18-T-IgM 质粒和 pET-27b 载体分别利用 *Nco* I 和 *Bam*H I 双酶切,产物分别利用凝胶回收试剂盒回收纯化后,于 16 °C 连接过夜,连接后的产物 pET-27b-IgM 转化 JM109 大肠杆菌感受态细胞,涂布于 LB 平板(含卡那霉素),37 °C 培养过夜后挑取单菌落,扩大培养后提取质粒进行双酶切鉴定。

1.5 截短的 IgM 蛋白的表达及纯化

截短的 IgM 蛋白的表达 将鉴定正确的 pET-27b-IgM 重组质粒转化大肠杆菌 Rosetta 感受态,挑取单菌落于含有卡那霉素的 20 mL LB 液体培养基中,37 °C 培养 8~10 h 后,以 1:100 接种于含卡那霉素的 500 mL LB 液体培养基中,37 °C 培养;当 OD₆₀₀ 值为 0.3~0.4 时,加入 IPTG 至终浓度为 0.25 mmol/L 进行 IgM 蛋白的诱导表达,并于诱导前及诱导后的 2、3、4、5、6 h 分别取样,4 °C、12 000 r/min 离心 5 min,沉淀经 PBS 洗涤后重悬于冰浴中进行超声波破碎,破碎后的产物分别取上清及沉淀经 SDS-PAGE 电泳分析,确定蛋白表达量的变化情况。

截短的 IgM 蛋白的纯化 按 1:100 的比例将含有 pET-27b-IgM 重组质粒的 Rosetta 菌液接种于含卡那霉素的 500 mL LB 液体培养基中,37 °C 培养至 OD₆₀₀ 值为 0.3~0.4 时,加入 IPTG 至终浓度为 0.25 mmol/L 进行 IgM 蛋白的诱导表达,5 h 后 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min 收获菌体,用 PBS 洗涤重悬后,加入溶菌酶至终浓度为 1 mg/mL,4 °C 作用 40~60 min 后反复冻融 3 次。利用超声波破碎仪冰浴破碎菌体后,4 °C、12 000 r/min 离心 10 min,沉淀中加入 2 mol/L 的尿素洗涤 3 次。将洗涤后的沉淀用 8 mol/L 的尿素进行溶解,4 °C 作用 10 h 后缓慢加入 30 倍体积的 2 mol/L 尿素溶液,4 °C 作用 10 h 后装入透析袋于 PBS(pH 8.0)中透析 24 h,期间换液 1 次,将透析后的溶液于 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min,收取上清液。所得上清液进行 SDS-PAGE 电泳分析及 HPLC 检测蛋白纯度。

1.6 截短的 IgM 蛋白抗血清的制备

实验采用背部皮下多点注射免疫新西兰大白兔(2~3 kg)的方法制备 IgM 蛋白抗血清,每家兔每次免疫 IgM 蛋白的计量为 1 mg/kg,每隔 10 天免疫 1 次,共免疫 3 次。首次免疫采用纯化后的 IgM 蛋白与弗氏完全佐剂等体积混合乳化后注射,阴性对照注射 PBS 与弗氏完全佐剂。其余 2 次采用 IgM 蛋白与弗氏不完全佐剂,对照组为 PBS 与弗氏不完全佐剂。免疫结束后心脏取血,37 °C 放置 1 h 后,4 °C 静置过夜。将析出的血清分装于新的离心管,留样进行 ELISA 检测其效价,其余分装保存于 -80 °C 冰箱。

1.7 兔抗虹鳟截短的 IgM 血清效价的检测

用包被液将虹鳟血清提取的 IgM 及本研究纯化的 IgM 稀释至 20 μg/mL,加入酶标板中 4 °C 包被过夜,并分别设立空白对照及阴性对照。包被后的酶标板加入 5% 脱脂奶粉 37 °C 封闭 60 min 后,加入 0.01 mol/L 的 PBST 洗涤酶标板 3 次,每次 5 min。洗涤后加入梯度稀释后的抗血清,阴性对照组加入 PBS,37 °C 作用 60 min 后加入 PBST 洗涤酶标板 3 次。加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG,37 °C 作用 60 min 后洗涤同上。每孔加入含有 H₂O₂ 的 TMB 底物液,37 °C 避光显色 30 min 后,最后加入终止液(2 mol/L 的硫酸)终止反应,放入酶标仪中于 450 nm 波长下检测 OD 值。当(阳性血清 OD₄₅₀ - 空白孔 OD₄₅₀)/(阴性

血清 OD_{450} - 空白孔 OD_{450}) > 2.1 时,阳性血清最大稀释倍数即为血清抗体的效价。

2 结果

2.1 IgM 蛋白的亲水性及抗原性分析

根据 GenBank 中收录的虹鳟 IgM 蛋白的重链恒定区基因序列,并结合 DNASTar 6.0 (Protean) 对 IgM 进行亲水性及表面概率分析(图 1),本研究选取了高亲水区及富含抗原表位的基因区段对其进行原核表达。

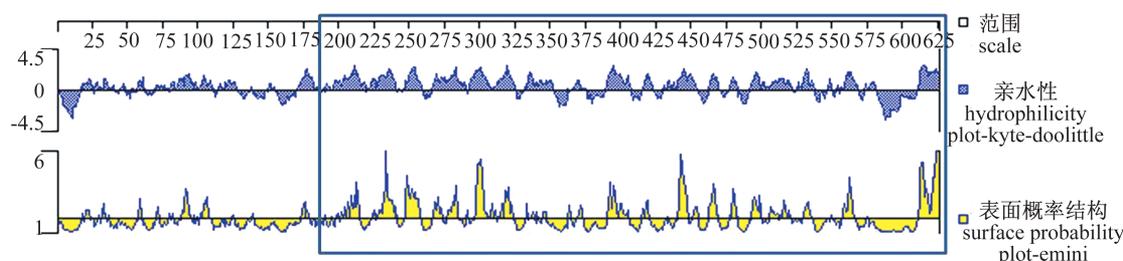


图 1 IgM 蛋白的抗原表位及疏水性分析

Fig.1 The hydrophobicity and surface probability analysis of IgM protein

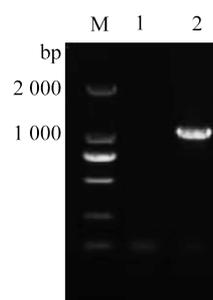


图 2 IgM 基因扩增产物电泳图

M. DL2000 分子量标准; 1. 阴性对照; 2. IgM 基因片段

Fig.2 Agrose gel analysis of IgM PCR products

M. DL2000 DNA marker; 1. negative control; 2. PCR product of IgM

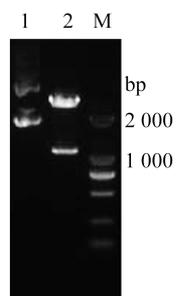


图 3 pET-27b-IgM 重组质粒酶切鉴定

M. DL2000 分子量标准; 1. pET-27b-IgM 重组质粒; 2. 双酶切后的 pET-27b-IgM 重组质粒

Fig.3 Identification of pET-27b-IgM by dual-digestion

M. DL2000 DNA marker; 1. recombinant plasmid; 2. dual-digestion plasmid

2.2 截短的 IgM 重链恒定区的克隆及表达载体的构建

以虹鳟头肾提取的 RNA 为模板,P1 和 P2 分别为上、下游引物扩增目的基因,将扩增后的产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。分析结果显示,PCR 产物为单一的特异性条带,大小约为 1 302 bp,与目的片段大小相符(图 2)。将测序正确的片段连接 pET-27b 载体,转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞,提取质粒进行双酶切鉴定。结果与目的片段相符(图 3),表明 pET-27b-IgM 重组质粒构建成功。

2.3 截短的 IgM 的诱导表达

将诱导前及诱导 2、3、4、5、6 h 后的菌体破碎离心,分别取上清液及沉淀进行 SDS-PAGE 电泳分析。结果显示,在 37 °C、IPTG 终浓度为 0.25 mmol/L 进行诱导表达时,在 40 ~ 55 ku 之间有明显的特异条带表达(与预期的理论值 47.7 相符);诱导 5 h 的目的蛋白的表达量达到最大值(图 4);由 SDS-PAGE 可以看出,目的蛋白主要在沉淀中(图 5),说明 IgM 蛋白主要以包涵体的形式进行表达。

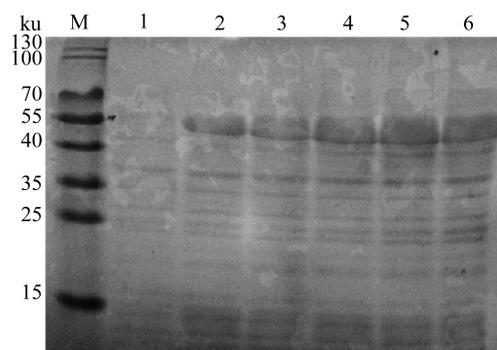


图 4 不同诱导时间下目的蛋白的表达

M. 蛋白分子量标准; 1. 未诱导菌体总蛋白; 2 ~ 6. 诱导 2 ~ 6 h 后菌体总蛋白

Fig.4 IgM expression induced for different times

M. protein marker; 1. uninduced bacteria; 2 - 6. protein expression induced for 2 - 6 h

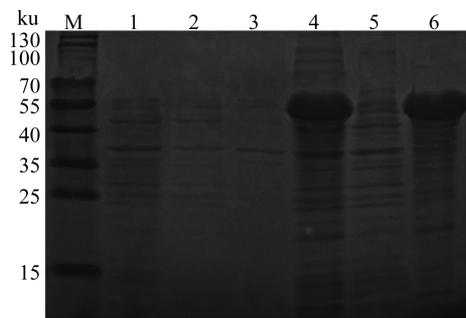


图5 目的蛋白的可溶性分析

M. 蛋白分子量标准; 1. 未诱导菌体总蛋白; 2. 未诱导菌体破碎后上清; 3. 未诱导菌体破碎后沉淀; 4. 诱导后破碎菌体总蛋白; 5. 诱导后破碎菌体上清; 6. 诱导后破碎菌体沉淀

Fig. 5 Soluble analysis of IgM protein

M. protein marker; 1. uninduced bacteria; 2. supernatant of uninduced bacteria; 3. sediment of uninduced bacteria; 4. supernatant of induced bacteria; 5. sediment of induced bacteria

2.4 截短的 IgM 蛋白的纯化

将菌体冰浴破碎, 沉淀首先用 PBS 洗涤 3 次, 再加入复性液洗涤 3 次, 最后加入变性液, 4 °C 变性 10 h 后加入 30 倍体积的复性液进行稀释复性。4 °C 复性 10 h 后离心弃去沉淀, 上清液于 PBS 中透析 24 h 后离心, 取上清液进行 SDS-PAGE 电泳分析, HPLC 检测蛋白纯度。由 SDS-

PAGE 结果可以看出, 经变性、复性、透析后得到了可溶性的 IgM 蛋白, 并且 SDS-PAGE 中没有肉眼可见的杂蛋白(图 6-a)。经 HPLC 分析(图 6-b), 根据目标蛋白所占总蛋白的积分面积百分比, 计算出蛋白纯度在 90% 以上, 可以用于 IgM 蛋白抗血清的制备。

2.5 截短的 IgM 蛋白抗血清效价的检测

分别以表达纯化后的 IgM 蛋白及虹鳟血清中提取的 IgM 为抗原, 以所制备的兔抗血清作为阳性血清, 并按 1: 500、1: 1 000、1: 10 000、1: 20 000、1: 40 000、1: 80 000、1: 100 000 稀释阳性血清作为一抗, 进行 ELISA 检测。结果表明, 当(阳性血清 OD_{450} - 空白孔 OD_{450}) / (阴性血清 OD_{450} - 空白孔 OD_{450}) > 2.1 时, 包被本研究表达纯化 IgM 蛋白的阳性血清最大稀释倍数为 1: 40 000, 包被虹鳟血清提取 IgM 的阳性血清最大稀释倍数为 1: 20 000(图 7), 并且随着兔抗血清计量的增加, OD_{450} 的反应值逐步升高。以上结果说明, 兔抗血清不但能够识别表达纯化的 IgM, 而且能够很好地识别虹鳟天然 IgM 并发生特异性的反应。该实验说明, 本研究所制备的重组 IgM 蛋白与鱼血清中的天然 IgM 重链恒定区具有近似相同的结构。

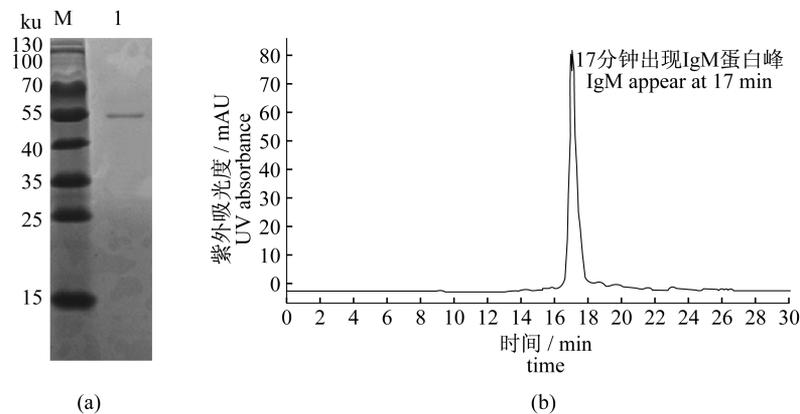


图6 纯化重组 IgM 蛋白的纯度鉴定

(a) IgM 的 SDS-PAGE 检测, M 为蛋白分子量标准, 1. 纯化重组 IgM; (b) 重组 IgM 蛋白的 HPLC 检测

Fig. 6 Purity identification of the purified recombinant IgM protein by SDS-PAGE and SEC-HPLC

(a) SDS-PAGE gel analysis of IgM, M. protein marker, 1. purified recombinant IgM; (b) analysis of IgM protein by SEC-HPLC

3 讨论

鉴于鱼类所处的进化地位以及水产养殖业的高速发展, 对鱼类免疫系统的研究不仅为日趋严重的养殖鱼类的病害防治提供必要的免疫理论与应用基础, 同时也为高等生物免疫演

化途径提供重要的参考。由于虹鳟养殖中疾病的暴发越来越频繁^[10-13], 因而阐明该鱼 IgM 在抗病反应中的表达规律对于免疫防病技术的建立具有重要的作用。因此, 极有必要制备出用于 IgM 检测的抗体, 为虹鳟免疫学研究奠定基础。

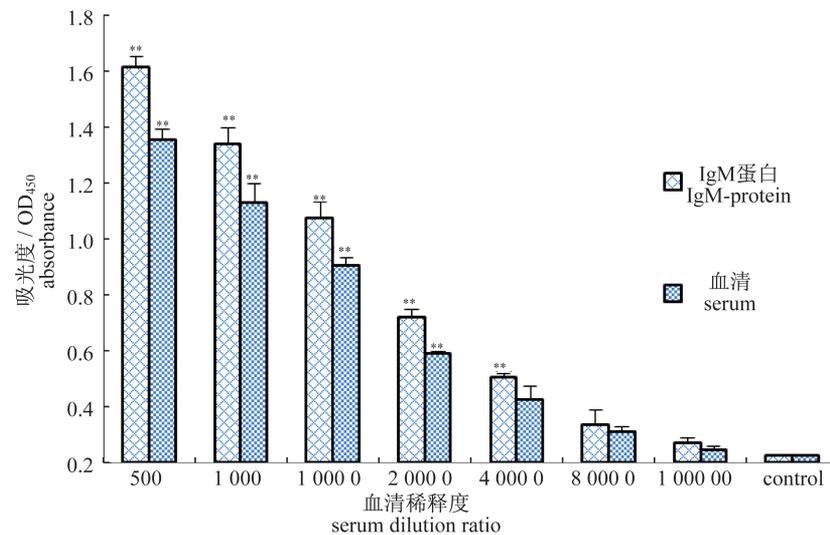


图7 抗血清效价 ELISA 检测

Fig. 7 ELISA analysis of anti-serum

目前针对鱼类 IgM 的纯化方法主要有 2 种: 第一种是运用盐析、离子交换层析及凝胶层析等相结合的方法^[14-15], 这种方法纯化蛋白时不但需要对蛋白质进行除盐处理, 而且纯化步骤繁琐, 蛋白的损失较大, 导致蛋白收率较低; 第二种是利用蛋白 A 亲和层析对 IgM 进行纯化^[16-17], 这种纯化方式中由于 IgM 与蛋白 A 的特异性相互作用很弱, 导致鱼血清中大量 IgM 蛋白不能够有效结合而损失, 因而需要采集大量的血清, 并且最终得到蛋白的纯度不高。鉴于上述原因, 本研究最终利用大肠杆菌对 IgM 进行原核表达。鱼类 IgM 分子结构复杂, 与轻链相比重链恒定区其氨基酸数量较多^[18-19], 并且含有多个抗原表位, 在抗体的形成过程中产生的多是抗 IgM 重链抗体, 仅有少量的抗 IgM 轻链抗体, 因此, 本研究选择 IgM 的重链基因序列对其进行表达。

本研究利用 pET 表达系统对截短的 IgM 进行表达。pET 表达系统可以表达不同类型的异源蛋白, 但是其表达的异源蛋白多为包涵体的形式^[20-22], 考虑到在蛋白表达后的包涵体的复性效果, 本研究结合 DNASTar 6.0 (Protean) 软件对 IgM 进行亲水性及表面概率分析, 选取了富含高亲水区及抗原表位的区段基因对其进行原核表达, 以期通过降低疏水区来提高复性过程中蛋白正确折叠的效率, 提高蛋白的复性率, 得到完全可溶的 IgM 重链蛋白。

本研究将选取的 IgM 目的基因片段连接到

pET-27b 载体后对其进行诱导表达, 结果显示目的蛋白以包涵体的形式存在。利用尿素对蛋白质进行变性、复性后, 得到了完全可溶的截短的 IgM 重链蛋白, 并且纯度达到了 90% 以上。本研究利用纯化后的可溶截短的 IgM 制备了兔抗截短的 IgM 蛋白血清, 并对其效价进行了测定, 由结果可以看出: 阳性血清最大稀释倍数为 1:40 000。为了检测复性后的可溶截短的 IgM 是否同样具有免疫原性, 实验包被虹鳟血清提取的天然 IgM 对其进行了检测, 结果表明, 包被虹鳟鱼血清提取 IgM 的阳性血清最大稀释倍数为 1:20 000 并且呈现出抗原剂量依赖性, 说明实验所得的兔抗血清不但能够识别表达的截短 IgM, 而且能够很好地识别虹鳟天然 IgM 并与其发生特异性的反应。本实验证明, 表达的 IgM 重链蛋白片段与虹鳟天然 IgM 重链恒定区具有近似相同的结构, 并且制备的兔抗血清可以用于虹鳟免疫机制研究中不同条件下 IgM 表达量的检测。

综上所述, 本研究成功克隆、表达、纯化了虹鳟 IgM 重链蛋白片段, 并且制备了抗 IgM 片段的兔抗血清, 为研究虹鳟 IgM 蛋白在抗病免疫反应中的表达规律与机制及建立有效的免疫防病技术奠定基础。

参考文献:

- [1] Sun D J, Wang B Q. Aquaculture of Salmonids in China[J]. Chinese Journal Fisheries, 2010, 23 (2):

- 56-63. [孙大江,王炳谦. 鲑科鱼类及其养殖状况. 水产学杂志,2010,23(2):56-63.]
- [2] Wang X X, Sun B J, Chang M X, *et al.* The sequence and expression of the immunoglobulin M heavy chain cDNA of *Ctenopharyngodon idellus*[J]. Journal of Fisheries of China,2008,32(1):13-20. [王欣欣,孙宝剑,昌鸣先,等. 草鱼免疫球蛋白M重链基因的克隆及表达. 水产学报,2008,32(1):13-20.]
- [3] Warr G W. The immunoglobulin genes of fish[J]. Developmental & Comparative Immunology,1995,19(1):1-12.
- [4] Hirono I, Nam B H, Enomoto J, *et al.* Cloning and characterization of a cDNA encoding Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* IgD [J]. Fish & Shellfish Immunology,2003,15(1):63-70.
- [5] Danilova N, Bussmann J, Jekosch K. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z [J]. Nature Immunology,2005,6(3):295-302.
- [6] 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]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2005,102(19):6919-6924.
- [7] Wang D, Liu H B. A Rresearch on Ig heavy chain constant region of five acipenseridae[J]. Hereditas, 2006,28(10):1247-1253. [王荻,刘红柏. 5种鲟鱼免疫球蛋白重链恒定区序列研究. 遗传,2006,28(10):1247-1253.]
- [8] Zhang Y A, Nie P, Wang Y P. cDNA sequence encoding immunoglobulin M heavy chain of the mandarin fish *Siniperca chuatsi*[J]. Fish & Shellfish Immunology,2003,14(5):477-480.
- [9] Jurd R D. Specialisation in the teleost and anuran immuneresponse[M]//M J Manning, M F Tatner. A comparative critique in fish immunology. London: Academic Press,1985.
- [10] Hill B J. Infectious pancreatic necrosis virus and its virulence[M]. London: Academic Press, 1982.
- [11] Amend D F, Yasutake W T, Mead R W. A hematopoietic virus disease of rainbow trout and sockeye salmon [J]. Transactions of the American Fisheries Society,1969,98(4):796-804.
- [12] Studer J, Janies D A. Global spread and evolution of viral haemorrhagic septicaemia virus [J]. Journal of Fish Diseases,2011,34(10):741-747.
- [13] Crane M, Hyatt A. Viruses of fish: an overview of significant pathogens [J]. Viruses, 2011, 3(11):2025-2046.
- [14] Lin T L, Chen Q, Yu F S, *et al.* Purification and partial characterization of serum immunoglobulin in *Anguilla anguilla*[J]. Journal of Fisheries of China, 2001,25(1):53-57. [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. 水产学报,2001,25(1):52-57.]
- [15] Zhang F M, Yang G W, Li G T, *et al.* Isolation, purification and partial characterization of serum immunoglobulin in sea bass (*Lateolabrax japonicus*) [J]. Chinese Journal of Zoology,2004,39(5):9-12. [张福森,杨桂文,李国田,等. 鲈血清免疫球蛋白分离纯化及部分特性分析. 动物学杂志,2004,39(5):9-12.]
- [16] Ding W D, Cao L P, Cao Z M. Purification of serum IgM from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and preparation of rabbit sera anti-IgM [J]. Acta Hydrobiologica Sinica,2010,34(1):164-169. [丁炜东,曹丽萍,曹哲明. 草鱼血清IgM蛋白的纯化及抗血清的制备. 水生生物学报,2010,34(1):164-169.]
- [17] Yan Q P, Han Y F, Gao T X, *et al.* Purification of serum IgM from large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) and preparation of rabbit sera anti-IgM [J]. Journal of Fishery Science of China,2006,13(3):475-479. [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. 中国水产科学,2006,13(3):475-479.]
- [18] Shambloot M J, Litman G W. Genomic organization and sequences of immunoglobulin light chain genes in a primitive vertebrate suggest coevolution of immunoglobulin gene organization [J]. The European Molecular Biology Organization Journal, 1989, 8(12):3733-3739.
- [19] van der Heijden M H, Rooijackers J B, Booms G H, *et al.* Production, characterisation and applicability of monoclonal antibodies to European eel (*Anguilla anguilla* L., 1758) immunoglobulin [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 1995, 45(1-2):151-164.
- [20] Qi J Y, Kan F M, Ye X L, *et al.* A bispecific antibody against IL-1 β and IL-17A is beneficial for experimental rheumatoid arthritis [J]. International Immunopharmacology,2012,14(4):770-778.

- [21] Liu L, Xu S Y, Li J H, *et al.* Prokaryotic expression, purification and immune efficacy of VP6 protein of grass carp reovirus [J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(3) :429 - 435. [刘林,徐诗英,李婧慧,等. 草鱼出血病病毒 VP6 蛋白的原核表达、纯化及免疫效果. 水产学报, 2012, 36 (3): 429 - 435.]
- [22] Gu Z, Weidenhaupt M, Ivanova N, *et al.* Chromatographic methods for the isolation of, and refolding of proteins from, *Escherichia coli* inclusion bodies [J]. Protein Expression and Purification, 2002, 25(1) :174 - 179.

Expression and rabbit antisera preparation of IgM heavy chain gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

ZHAO Jingzhuang, XU Liming, LIU Miao, CAO Yongsheng,
YIN Jiasheng, LIU Hongbai, LU Tongyan*

(Heilongjiang River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China)

Abstract: Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, is one of the cold water fishes cultured in our country, and the intensification of culture of rainbow trout led to outbreak of several diseases which made the immune system study a new research field. In this study, the truncated heavy chain of IgM was obtained by RT-PCR from rainbow trout head-kidney RNA extracts and cloned into pET-27b vector. The predicted molecular weight of recombinant IgM was approximately 47.7 ku. After purification, the purity of recombinant IgM reached approximately 90% confirmed by SDS-PAGE and HPLC analyses. The rabbit antisera against recombinant truncated IgM in this study could react specifically with both natural IgM from rainbow trout serum and the purified IgM in ELISA test. The titer of rabbit antisera against the recombinant truncated IgM was 1:40 000, the natural IgM was 1:20 000 in an antiserum dose-dependent manner. These results indicated that the recombinant IgM expressed in this study had the comparable structure with the natural IgM of the rainbow trout serum. The results provide important experimental basis for trout immune system study and related immunodetection of rainbow trout.

Key words: *Oncorhynchus mykiss*; IgM; clone; antisera

Corresponding author: LU Tongyan. E-mail: lutongyan@hotmail.com