

鳗鲡拟指环虫的免疫原性

刘晓东¹, 李敏², 朱春华³, 陈强¹, 林天龙¹

(1. 福建省农业科学院 生物技术研究所, 福建 福州 350003; 2. 福建师范大学 生命科学学院, 福建 福州 350007; 3. 福建农林大学 动物科学学院, 福建 福州 350002)

摘要:拟指环虫病是严重危害养殖鳗鲡 (*Anguilla* sp.) 的寄生虫病, 为了寻求更为安全有效的免疫防治方法, 对鳗鲡拟指环虫 (*Pseudodactylogyrus* spp.) 的结构蛋白及其免疫原性进行分析。以鳗鲡拟指环虫全虫蛋白为抗原, 制备了鼠和鳗鲡抗拟指环虫免疫血清, ELISA 检测效价分别为 1:51 200 和 1:3 200。SDS-PAGE 分析表明, 虫体含有 16 kD、21 kD、29 kD、37 kD、43.5 kD、68 kD 和 110 kD 等主要结构蛋白, 其中 29 kD 的多肽为高丰度蛋白; Western blot 证实免疫鳗和康复鳗血清均能识别 25 kD、43.5 kD、62 kD、81 kD 等虫体蛋白。间接荧光抗体试验显示, 个别虫体在头部、尾部有明显的荧光染色, 大多数虫体中部两侧, 特别是卵黄腺丰富区域, 呈较强的荧光染色。[中国水产科学, 2007, 14 (4): 654–658]

关键词:鳗鲡; 拟指环虫; 结构蛋白; 免疫原性

中图分类号: S941.5 文献标识码: A 文章编号: 1005–8737–(2007)04–0654–05

拟指环虫病是由拟指环虫 (*Pseudodactylogyrus* spp.) 引起的一种鱼类单殖吸虫病。鳗鲡 (*Anguilla* sp.) 是福建省最重要的经济鱼类之一, 近年来, 养殖鳗鲡拟指环虫病频繁发生, 严重威胁着鳗鲡养殖业的发展^[1–3]。拟指环虫寄生于鳗鲡鳃部, 破坏鳃丝, 导致宿主呼吸障碍, 食欲下降, 并常常诱发细菌性感染, 导致更严重的并发症。而且拟指环虫极易造成反复感染, 耐药性日趋严重, 反复用药对鳗鲡的食品安全性也构成一种潜在威胁。通过对拟指环虫病进行免疫预防的方式, 有望减少该病的发生。国外有研究表明, 欧洲鳗能对感染的外部寄生虫产生免疫应答, 初次感染拟指环虫的欧洲鳗经甲苯咪唑治疗后在第 14 天和 33 天进行二次感染时, 拟指环虫明显减少, 但并未获得完全的免疫效果^[4]。Monni 等^[5]研究了欧洲鳗在不同溶氧条件下对拟指环虫的免疫应答, 结果表明, 在高溶氧条件下欧洲鳗的免疫血清能与更多的拟指环虫虫体蛋白条带反应, 这与其拟指环虫感染水平的下降相关。国内尚无拟指环虫抗原分析的报道, 为了进一步研究鳗鲡对拟指环虫的免疫应答情况, 本研究对福建分离的鳗鲡拟指环虫进行了免疫原性分析, 对虫体抗原进行免疫荧光标记定位, 旨在为拟指环虫病的免疫预防提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

感染拟指环虫的鳗鲡取自福建永泰樟曦鳗场, 实验小鼠购自福建医科大学, 实验鳗鲡 (平均体长 22.8 cm; 平均体质量 100 g) 购自长乐漳港海林鳗场。鳗鲡 IgM 单抗 4B7 由本实验室制备。

1.2 鳗鲡拟指环虫全虫抗原的制备

取感染拟指环虫的鳗, 体视显微镜下分离拟指环虫。虫体经过 PBS 洗涤 3 次, –20 ℃ 保存。将冻存的鳗鲡拟指环虫加入大约 4 倍于虫体总体积的 PBS (0.01 mol/L, pH 7.2) 和蛋白保护剂 (1 mmol/L PMSF + 10 mmol/L EDTA) 中, 冰浴下超声波破碎 (300 W, 超声 7 s, 间隔 15 s, 99 次)。光学显微镜下镜检确认虫体全部破碎, Bradford 方法^[6]测定全虫抗原的蛋白质浓度后 –20 ℃ 保存备用。

1.3 自然感染的康复鳗鲡血清的采集

待鳗鲡的拟指环虫病康复后, 取数尾康复鳗, 尾静脉采血, 室温下静置 1 h, 4 ℃ 过夜, 次日离心收集上层血清, 编号为康复鳗血清, –20 ℃ 保存备用。

1.4 鼠抗拟指环虫免疫血清的制备及效价测定

按常规方法免疫小鼠, ELISA 测定血清抗体滴度, 抗体效价达 1:25 600 以上时摘眼球法大量采

收稿日期: 2006–10–13; 修订日期: 2006–12–26.

基金项目: 福建省科技重大专项 (2004NZ03-2); 福建省农业科学院院长基金 (2005256 预-13).

作者简介: 刘晓东 (1977–), 男, 硕士, 助理研究员, 主要从事鱼类寄生虫免疫学研究. Tel: 0591-87817514; E-mail: xdlu777@163.com

通讯作者: 林天龙. Tel: 0591-87817514; E-mail: Lint05@163.com

血,标记为免疫鼠血清, -20°C 冻存备用。

1.5 鳊鲮抗拟指环虫免疫血清的制备

按常规方法免疫欧洲鳊(3尾),基础免疫时每尾鳊鲮腹腔注射约 $50\text{ }\mu\text{g}$ 虫体蛋白(与等量弗氏完全佐剂混匀),第14天腹腔注射等量虫体蛋白加强免疫1次(与等量弗氏不完全佐剂混匀),在加强免疫之后的第14天尾静脉采血,其余步骤同1.3,编号为免疫鳊血清。对照组每次每尾鱼腹腔注射 $200\text{ }\mu\text{L}$ PBS(0.01 mol/L , pH 7.2)。

1.6 鳊鲮抗拟指环虫免疫血清抗体效价测定

参照文献[7]进行,包被 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的虫体抗原,一抗分别加免疫组和对照组的鳊鲮血清,从1:200开始2倍比稀释至1:204 800;二抗为单抗4B7(1:1 000稀释),酶标抗体为辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG(1:5 000稀释),底物邻苯二胺 OPD,室温显色约15 min后加入 $50\text{ }\mu\text{L}$ 2 mol/L H_2SO_4 终止反应,用酶标仪(BioRad Model 550)读取 OD_{490} 值, P/N 大于3为阳性,各样本以最高阳性稀释倍数为其 ELISA 效价。

1.7 全虫抗原的 SDS-PAGE

采用 Laemmli 等的方法[6]进行垂直平板电泳。分离胶浓度12%,浓缩胶浓度4%,每孔上样 $20\text{ }\mu\text{g}$ 虫体蛋白。起始电压为70 V,进入分离胶时调至100 V,电泳结束后,双胺银染色。拍照后用 Quantity One 软件(Bio-Rad, Version 4.5.2)进行蛋白条带分子量分析。

1.8 免疫印迹试验(Western-blot)

参照文献[8]进行,一抗为1:100稀释的免疫鳊血清、康复鳊血清和免疫鼠血清,二抗为单抗4B7(1:1 000稀释),酶标抗体为碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG(1:15 000稀释),同1.7进行免疫印迹结果的蛋白条带分析。

1.9 鳊鲮拟指环虫的抗原定位

利用间接荧光抗体实验(IFAT)对拟指环虫进行初步的抗原定位。完整虫体涂片,设免疫组3组、阳性对照组、阴性对照组,每组10只拟指环虫,室温下自然风干,用 -20°C 丙酮固定5 min后自然风干, 0.01 mol/L PBS(pH 7.2)洗涤3次,每次1 min,晾干,加免疫鳊血清(含2% BSA的PBS作1:50体积比稀释),非免疫鳊血清作阴性对照,免疫鼠血清作阳性对照, 37°C 湿盒温育0.5 h,同上洗涤,再依次加单抗4B7(1:500稀释,阳性对照不加)和羊抗鼠 IgG-FITC 荧光标记抗体(1:100体积比稀释),每一步同上温育洗涤3次。用含50%甘油的PBS封片,荧光显微镜下观察拍照。

2 结果与分析

2.1 抗拟指环虫免疫鼠血清和免疫鳊血清的抗体效价

经 ELISA 检测,免疫鼠血清抗体效价在1:25 600到1:51 200之间,免疫鳊血清效价在1:800~1:3 200之间。

2.2 全虫抗原的 SDS-PAGE 和 Western-blotting

SDS-PAGE 电泳图谱如图1所示,在从分子量大于97.4 kD到小于14.4 kD的区域,可见许多的蛋白质条带,其中至少有7条清晰可辨。其中丰度较高的蛋白分子量为29 kD、37 kD,其次是16 kD、21 kD、43.5 kD、68 kD和110 kD等较低丰度蛋白带。

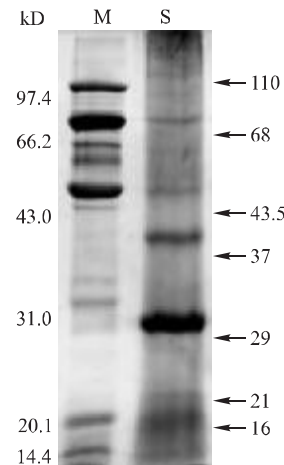


图1 拟指环虫全虫蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig.1 Silver stained 12% SDS-PAGE slab of sonicated *Pseudodactylogyrus* (right lane) and molecular weight standards (left lane)

Western blot 结果由图2所示,康复鳊血清与18 kD、25 kD、43.5 kD、62 kD、81 kD的蛋白带均发生反应;免疫鳊血清除了与上述条带反应外,免疫鳊血清C还会与29 kD的蛋白带反应;鼠抗拟指环虫血清与18 kD、43.5 kD、62 kD、81 kD的虫体蛋白发生反应,其中与81 kD的蛋白带反应显色最深。

2.3 鳊鲮拟指环虫的抗原定位

间接免疫荧光抗体实验显示,免疫鳊血清抗体针对的抗原位于拟指环虫虫体中部和头部,集中于卵黄腺丰富的两个侧面(图3),阳性对照组中可见鼠抗拟指环虫高免血清对虫体头和尾的部分区域有较好的荧光反应(图4A、4B),阴性对照组的虫体未见特异性的绿色荧光(图4C、4D)。

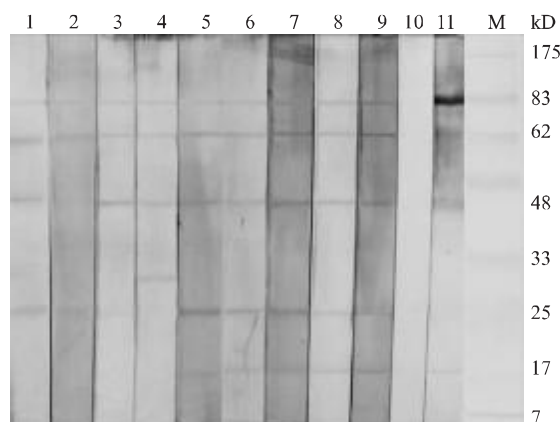


图2 拟指环虫体蛋白的 Western blot

1: 海林欧鳗血清; 2~4: 免疫鳗血清 A~C; 5~9: 康复鳗血清 A~E; 10: 阴性对照; 11: 高免小鼠血清; M: 分子量标准

Fig.2 Western blot analysis of *Pseudodactylogyris* spp. proteins

Lane 1: Serum of eel from Hailin farm; Lane 2 – Lane 4: serum of immunized eel; Lane 5 – Lane 9: serum of convalescent eel; Lane 10: negative control; Lane 11: mouse polyclonal antiserum; M: molecular weight marker.

3 讨论

SDS-PAGE 分析结果显示拟指环虫虫体含有 16 kD、21 kD、29 kD、37 kD、43.5 kD、68 kD、110 kD 等主要结构蛋白,这与 Buchmann^[9]的报道基本一致。

Western blot 显示免疫鳗血清和康复鳗血清基本都会与 25 kD、43.5 kD、62 kD、81 kD 的蛋白带反应,推测这些蛋白可能是虫体中具有较强免疫原性的抗原。令人感兴趣的是除了 1 尾免疫鳗血清与 29 kD 的蛋白带产生反应外,其他免疫鳗血清均不能与之反应,这一结果提示鳗鲡在抗原识别上存在个体差异。鼠抗拟指环虫血清与虫体蛋白的 Western blot 反应结果表明,18 kD、43.5 kD、62 kD 和 81 kD 这几种虫体蛋白对于小鼠有着较好的免疫原性,其中 81 kD 的蛋白带免疫原性最强,但免疫鳗血清与 81 kD 的蛋白带反应并非最强,这可能是由于物种间免疫系统的差异而导致的对抗原反应性的不同。Western blot 结果提示上述这几种虫体蛋白能够诱导宿主产生免疫应答,但这些抗原是否能诱导宿主产生保护性免疫应答,有待进一步研究证实。

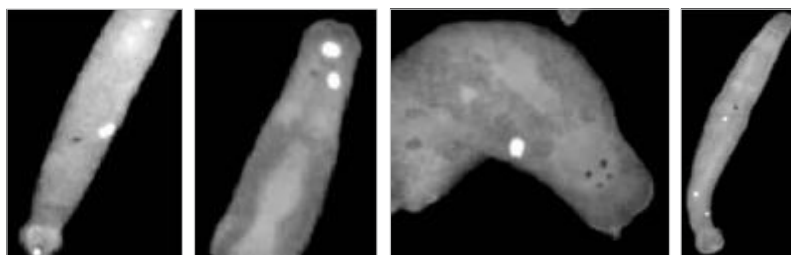


图3 鳗鲡拟指环虫的间接荧光照片(×250) - I

Fig.3 Indirect immunofluorescence staining of *Pseudodactylogyris* spp. with immunized *Anguilla* sp. sera(×250) - I

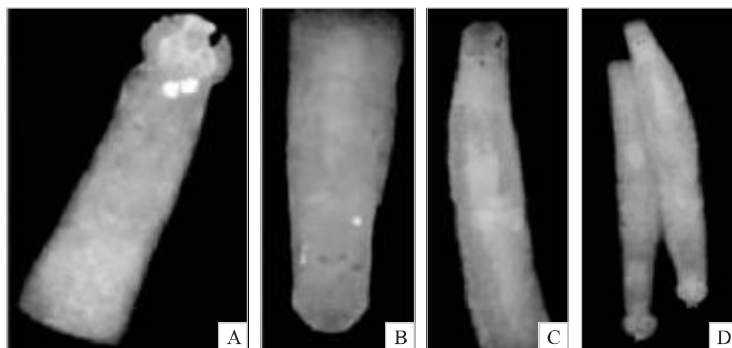


图4 鳗鲡拟指环虫的间接荧光照片(×250) - II

A 和 B 为阳性对照; C 和 D 为阴性对照。

Fig.4 Indirect immunofluorescence staining of *Pseudodactylogyris* spp. with immunized *Anguilla* sp. sera(×250) - II

A and B were positive control; C and D were negative control.

间接荧光抗体实验结果显示,在对照组鳗鲡血清的免疫荧光反应均阴性的情况下,免疫组中个别拟指环虫的头部、尾部有明显的阳性反应,可能是虫体中富含抗原的结构。值得注意的是,大多数拟指环虫的中部两侧,特别是卵黄腺丰富的区域,显示了较强的荧光,这一现象与高谦^[10]对河鲈锚首吸虫(与拟指环虫同属锚首虫科)的研究结果相似,由于这一区域原肾系统的终端部分也较丰富,且单殖吸虫的表皮是分泌型表皮,因此尚不能判断这一区域抗原物质的来源。免疫荧光实验结果表明,免疫鳗血清中含有针对拟指环虫虫体表面抗原的抗体,说明在自然感染时虫体表面抗原能诱导宿主产生免疫应答,这些抗原是否是分泌性抗原有待于进一步研究。

已有一些国外的研究表明,鳗鲡对拟指环虫可产生特异性的体液免疫,但并非具有完全的免疫保护效果,仅对虫体感染数量有一定的影响^[4-5,9,11]。本研究证实,自然感染拟指环虫的鳗鲡和腹腔注射虫体抗原的鳗鲡均可产生特异性抗体反应,且后者反应较为强烈,免疫组的鳗鲡血清虽然有着较高的抗体水平,但似乎并未对拟指环虫的感染数量有明显影响,这可能是由于制备的虫体抗原中保护性抗原含量较少,虽然总体抗体水平较高,但其中的保护性抗体水平不足以对拟指环虫的寄生构成影响。可将那些拟指环虫感染数量明显低于平均水平的免疫鳗鲡血清与那些感染数量并无明显下降的免疫鳗血清进行 Western blotting 比较,以进一步寻找保护性抗原。

参考文献:

- [1] 姜礼燮,宗网华,朱大白.鳗鲡拟指环虫的抗药性及防治对策[J].水产科技情报,2001,28(5):210-211.
- [2] 樊海平,余培建,曾占壮,等.吡啶酮和克螨特对寄生欧洲鳗鲡的拟指环虫的效果[J].浙江农业学报,2005,17(1):23-26.
- [3] 刘晓东,陈强,杨金先.一例欧鳗拟指环虫病的诊治报道[J],福建畜牧兽医,2004,26(5):26.
- [4] Slotved H C, Buchmann K. Acquired resistance of the eel, *Anguilla anguilla* L., to challenge infections with gill monogeneans [J]. J Fish Dis, 1993, 16: 6: 585-591.
- [5] Monni G, Cognetti Varriale A M. Antigenicity of *Pseudodactylogyrus anguillae* and *P. bini* (Monogenea) in the European eel (*Anguilla anguilla*, L.) under different oxygenation conditions [J]. Fish Shellfish Immunol. 2002, 13: 125-131
- [6] 汪家政,范明.蛋白质技术手册[M].北京:科学出版社,2000: 8.
- [7] 林天龙,陈强,俞伏松,等.欧洲鳗免疫球蛋白单克隆抗体的制备与特性[J].水产学报,2001,25(6):532-537.
- [8] 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[J].水产学报,2001,25(1):52-57.
- [9] Buchmann K. A note on the humoral immune response of infected *Anguilla anguilla* against the gill monogenean *Pseudodactylogyrus bini* [J]. Fish Shellfish Immunol. 1993, 3: 397-399.
- [10] 高谦.寄生鳗鱼的河鲈锚首吸虫的形态、嗜血特性及免疫原性研究[D].武汉:中国科学院水生生物研究所,2001:1-10.
- [11] Mazzanti C, Monni G, Cognetti V A M. Observations on antigenic activity of *Pseudodactylogyrus anguillae* (Monogenea) on the European eel (*Anguilla anguilla*) [C]. Bull Eur Assoc Fish Pathol, 1999, 19: 2: 57-59.

Immunogenicity of *Pseudodactylogyris* spp. from eel, *Anguilla* sp.

LIU Xiao-dong¹, LI Min², ZHU Chun-hua³, CHEN Qiang¹, LIN Tian-long¹

(1. Biotechnology Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China; 2. College of Life Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China; 3. College of Animal Sciences, University of Fujian Agriculture and Forestry, Fuzhou 350002, China)

Abstract: *Pseudodactylogyris* infection is a severe disease that threatens the eel industry. Due to the repeated and persistent infection of *Pseudodactylogyris*, the anthelmintics were frequently applied to control the branchial parasite *Pseudodactylogyris* spp. in eel, which caused the *Pseudodactylogyris* extensively resisting to many anthelmintics, and made the prophylaxes and therapy of *Pseudodactylogyris* became a thorny matter. In the present study, analysis of the structural protein and immunogenicity of *Pseudodactylogyris* is described. The purpose of the study was to seek a safer and more effective approach to resist *Pseudodactylogyris* by means of immunological technique. The mouse and eel antisera were prepared with sonicated *Pseudodactylogyris* as immunogen. The antibody titers of mouse and eel antisera tested by ELISA were 1:51 200 and 1:3 200, respectively. SDS-PAGE analysis of *Pseudodactylogyris* proteins was performed, and then stained with silver nitrate. The results showed that sonicated *Pseudodactylogyris* contained seven major structural proteins with molecular weight of 16 kD, 21 kD, 29 kD, 37 kD, 43.5 kD, 68 kD and 110 kD, respectively, among which the 29 kD polypeptide was most abundant. The sera of both immunized eel and convalescent eel recognized the 25 kD, 43.5 kD, 62 kD and 81 kD proteins of sonicated *Pseudodactylogyris* on Western blot. Significantly elevated anti-*Pseudodactylogyris* antibodies were detected in the immunized fish. The immunofluorescence staining revealed that, in addition to some bright fluorescence spot being observed on the head and tail of individual *Pseudodactylogyris*, both sides in the middle part of *Pseudodactylogyris*, especially the areas which was adjacent to yolk gland showed stronger fluorescence. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (4): 654 – 658]

Key words: *Anguilla* sp.; *Pseudodactylogyris* spp.; structural protein; immunogenicity

Corresponding author: LIN Tian-long. E-mail: lint05@163.com