

斑马鱼卵子中母源性补体成分的检测及溶菌活性研究

王志平^{1,2}

(1. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003; 2. 渭南师范学院 环境与生命科学系, 陕西 渭南 714000)

摘要: 本研究首次检测到斑马鱼(*Danio rerio*)受精卵中存在母源性补体成分C3和Bf。在斑马鱼卵子胞浆中加入适量C3(所有补体激活途径的关键因子)抗体使补体C3沉淀失活,或将卵子胞浆45℃水浴30 min(热灭活补体),均可显著降低卵子胞浆的抑菌率,说明斑马鱼卵子胞浆中的补体系统具有免疫活性。在此基础上,通过补体激活途径的抑制实验研究了母源性补体的作用方式。向斑马鱼卵子胞浆中分别加入适量C1q(经典途径关键成分)抗体和C4(同时参与经典途径和凝集素途径)抗体对其抑菌率无显著影响,而加入Bf(替代途径关键成分)抗体却能够显著降低卵子胞浆的抑菌率。另外,在斑马鱼卵子胞浆中加入EGTA螯合Ca²⁺抑制经典途径和凝集素途径,卵子胞浆的抑菌率并无明显变化,而加入EDTA同时螯合Ca²⁺和Mg²⁺使替代途径也受到抑制后,溶菌率则显著降低。补体途径抑制实验证明,斑马鱼早期胚胎中的补体成分主要是通过替代途径发挥作用。[中国水产科学,2010,17(5):1005-1011]

关键词: 母源性补体; 检测; 溶菌活性; 斑马鱼

中图分类号: S91

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)05-1005-07

大多数鱼类在其仔鱼阶段特异性免疫器官尚未发育完全,而且胚胎发育和早期胚后发育过程中不具备合成免疫相关蛋白的能力或者这种能力十分有限^[1]。因此,仔鱼对外界病原微生物的抵御能力只能依靠母源性免疫。许多实验证据表明,在鲤(*Cyprinus carpio*)^[2]、真鲷(*Sparus aurata*)^[3]、鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[4]、虹鳉(*Oncorhynchus mykiss*)^[5]、大麻哈鱼(*O. keta*)^[6]、鳎(*Pleuronectes platessa*)^[7]、罗非鱼(*Oreochromis aureus*)^[8]和鲫(*Neoditrema ransonneti*)^[9]等硬骨鱼类的卵母细胞、未受精卵、受精卵或胚胎发育的不同时期均存在母源性的特异性免疫成分IgM。此外,非特异性体液免疫因子如蛋白酶抑制剂^[10]、凝集素^[11-12]、溶菌酶^[13-14]和补体^[14-16]也存在于一些硬骨鱼类卵子中。由于卵母细胞、受精卵和胚胎中均不能合成凝集素、溶菌酶和IgM,它们被认为是来源于母体的先天免疫物质,构成了胚胎抵御病原体攻击的第一防线,在鱼类胚胎发育和早期胚

后发育中可能起着重要作用^[17]。

补体系统由30多种可溶性蛋白和膜蛋白组成,在先天性免疫和适应性免疫中均具有重要作用。补体系统存在3条激活途径即经典途径、凝集素途径和替代途径,这3种激活途径共用1条终末(或溶解)途径。经典途径是第1个被发现的补体激活途径,由结合在细胞表面的抗体激活,其作用具特异性且同时需要Ca²⁺和Mg²⁺参与。替代途径不依赖于抗体,可直接由C3或微生物表面的特定结构激活,只需要Mg²⁺。1995年后才明确了通过甘露聚糖结合凝集素(MBL)识别的凝集素途径,此途径也不依赖于抗体且仅需要Ca²⁺。

目前已在虹鳉的胚胎中检测到了母源性补体成分C3、C4、C5和Bf^[15],而且在鲤和斑点狼鱼(*Anarhichas minor* Olafsen)的胚胎中也检测到了母源性补体C3的转录^[14,16]。此外,Løvoll等^[18]还发现大西洋鲑(*Salmo salar*)的胚胎匀浆液具有微弱的补体活性。

收稿日期: 2010-01-18; 修订日期: 2010-02-12.

基金项目: 国家863计划项目(2006CB101805); 陕西省自然科学基金项目(2010JQ3010); 渭南师范学院研究计划项目(10ygz008).

作者简介: 王志平(1978-),女,博士,讲师,研究方向为分子生物学. Email: wzhp1978@yahoo.com.cn

然而,这些母源性补体成分是否参与了鱼类的胚胎免疫还缺乏实验验证。本研究以新型模式动物斑马鱼为研究对象,检测其受精卵中是否存在母源性补体成分。在此基础上,通过体外实验验证斑马鱼母源性补体成分的免疫功能,并初步探讨其作用机制。该研究不仅有助于加深和完善对鱼类母源性补体功能的理解和认识,同时也可作为母源性免疫在水产养殖中的开发利用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 化学试剂

细菌级琼脂粉、酵母提取物、蛋白胨均购自OXOID(Japan),乙二胺四乙酸(EDTA)、乙二醇双(2-氨基乙基)四乙酸(EGTA)、牛血清白蛋白(BSA)和考马斯亮蓝G-250购自Sigma(USA),其他化学试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 大肠杆菌的培养及处理

将大肠杆菌(*E. coli* P8760,由中国科学院海洋研究所肖天研究员赠送)在LB液体培养基中37℃,150 r/min培养12~16 h,使细菌生长至静止期。将上述菌液3 000 r/min离心10 min,弃去上清。用无菌生理盐水将菌体洗涤3次,并稀释至菌数约 1×10^6 个/mL待用。

1.3 斑马鱼饲养及卵子胞浆的制备

将性成熟的斑马鱼雌雄分开,饲养于玻璃缸内。缸内连续充气,温度控制在25~27℃,光周期为自然光周期。产卵前1天晚上将雌鱼和雄鱼以2:1放入产卵缸,第2天早上收集卵子(2~8细胞期)。用灭菌蒸馏水洗涤卵子后,迅速置于冰上匀浆(2 000 r/min,10 s/次,3次)。将匀浆液15 000 g,4℃离心30 min,取上清即得斑马鱼卵子胞浆^[19]。用0.22 μm的滤器过滤除菌后40 μL分装,液氮速冻,-70℃保存待用。采用Brandford方法测定斑马鱼卵子胞浆的总蛋白浓度。

1.4 斑马鱼卵子胞浆的杀菌试验

取处理好的菌悬液(1×10^6 个/mL)2 μL加入40 μL斑马鱼卵子胞浆中(以无菌生理盐水代替卵

子胞浆做空白对照),以无菌生理盐水将体积补足至50 μL,100 r/min,25℃孵育2 h。取出20 μL稀释5倍后涂板,每个培养皿涂30 μL,每个样品涂3个板,37℃培养12~16 h后进行菌落计数。结果以细菌的抑制率表示:

$$\text{抑菌率} = \left(1 - \frac{\text{处理组细菌数}}{\text{对照组细菌数}}\right) \times 100\%$$

1.5 斑马鱼卵子胞浆中补体杀菌活性的检测

将兔抗人补体C3的多克隆抗体(Abcam)以0.01 mmol/L的PBS缓冲液稀释为4 μg/mL的应用液,过滤除菌后4℃保存备用。在40 μL斑马鱼卵子胞浆中分别加入0 μL、1.5 μL、2.5 μL、3.0 μL、3.5 μL、4.0 μL和5.0 μL的C3抗体稀释液,混合均匀后在25℃轻微振荡孵育0.5 h,使抗体与C3充分结合。之后加入处理好的菌悬液2 μL,并以无菌生理盐水将体积补至50 μL。按1.4方法统计抑菌率。

将40 μL斑马鱼卵子胞浆在45℃水浴30 min以灭活其中的补体^[20],对照组不进行热灭活处理。加入2 μL菌悬液,以无菌生理盐水将体积调至50 μL,在25℃、100 r/min孵育2 h。按1.4方法统计抑菌率。

1.6 斑马鱼卵子胞浆中补体激活途径的抑制试验

1.6.1 特异性抗体处理 将羊抗人Bf多克隆抗体(R&D)稀释为4 μg/mL的应用液,将羊抗人C1q多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司)和羊抗鼠C4多克隆抗体(博士德)稀释为2 μg/mL应用液,过滤除菌后4℃保存待用。

在40 μL斑马鱼卵子胞浆中分别加入Bf抗体(0 μL、1 μL、2 μL、2.5 μL、3 μL、3.5 μL、4.0 μL和5.0 μL)、C1q抗体(0 μL、0.25 μL、0.5 μL、1 μL、2 μL和4 μL)和C4抗体(0 μL、0.5 μL、1.0 μL、2.0 μL、3.0 μL、5.0 μL),混合均匀后在25℃轻微振荡孵育0.5 h,使抗体与相应补体成分充分结合。之后加入菌悬液2 μL,并以无菌生理盐水调至50 μL。将此反应体系在25℃、100 r/min孵育2 h。按1.4方法统计抑菌率。

1.6.2 离子螯合剂处理 配制50 mmol/L的EDTA和EGTA溶液,过滤除菌后室温保存。在40 μL斑马

鱼卵子胞浆中分别加入不同体积的EDTA (0.1 μL 、0.3 μL 、0.5 μL 、0.8 μL 、1.0 μL 、2.0 μL 、3.0 μL 和5.0 μL)和EGTA (0.1 μL 、0.3 μL 和0.5 μL) 溶液,25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育0.5 h,使螯合剂与相应二价离子充分作用。之后,向各反应体系分别加入2 μL 菌悬液并以无菌生理盐水调至50 μL ,混合均匀后25 $^{\circ}\text{C}$ 、100 r/min培养2 h。按1.4方法统计抑菌率。

1.7 斑马鱼卵子胞浆中补体成分的Western blot检测

取适量斑马鱼卵子胞浆,加入SDS上样缓冲液,煮沸5 min,冷却后进行12% SDS-PAGE电泳。经转膜、5%脱脂奶粉封闭后,分别与兔抗人C3多克隆抗体和山羊抗人Bf多克隆抗体杂交,再分别加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔-Ig(北京中杉金桥生物工程有限公司)和兔抗山羊-Ig(武汉博士德生物工程有限公司),按照增强型HRP-DAB底物显色试剂盒(Tiagen 生物技术有限公司)的说明进行显色。对照组以人炎症血清(青岛大学医学院附属医院提供)代替斑马鱼卵子胞浆。

1.8 数据处理

上述每个实验做3次,每次至少3个重复。所有数据用SPSS 13.0进行单因素方差分析, $P<0.05$ 被认为差异具有统计学意义。所有数据用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm\text{SD}$)表示。

2 结果与分析

2.1 斑马鱼母源性补体的溶菌活性

C3是补体系统的中心因子,同时参与3条补体激活途径。在斑马鱼卵子胞浆中加入C3抗体,能够与卵子胞浆中的C3b特异性结合成抗原抗体复合物,从而抑制C3的活性。从图1可以看出,斑马鱼卵子胞浆的抑菌活性体现出一定的C3抗体浓度依赖效应。在一定范围内,抑菌率随C3抗体浓度的升高而降低,当C3抗体质量浓度为0.28 $\mu\text{g/mL}$ 时,卵子胞浆的抑菌率最低。然而,当C3抗体浓度继续升高而过量时,抗原抗体复合物的稳定性降低,导致抗体对C3活性的抑制作用降低,使得部分C3恢复其生物活性,斑马鱼卵子胞浆的抑菌活性也逐渐升高。

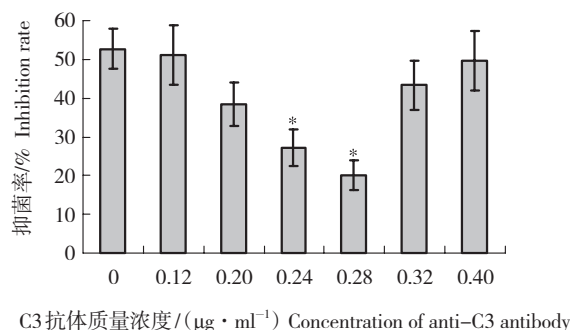


图1 C3抗体浓度对斑马鱼卵子胞浆溶菌活性的影响

*表示与对照组(抗体浓度为0)相比差异显著($P<0.05$)。

Fig. 1 Effects of anti-C3 antibody concentration on bacteriolytic activity of zebrafish egg cytosol

* means significant difference compared with control (no antibody was added) ($P<0.05$).

鱼类的补体比哺乳动物的补体对热更敏感,将斑马鱼卵子胞浆在45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min即可使补体灭活,而不影响免疫球蛋白等其他免疫因子的活性。从图2可以看出,热灭活能够显著降低斑马鱼卵子胞浆的抑菌率,即补体灭活后卵子的溶菌活性显著降低。结合C3抗体浓度对斑马鱼卵子胞浆溶菌活性的影响(图1),可以推断出补体系统参与斑马鱼胚胎的早期免疫作用。

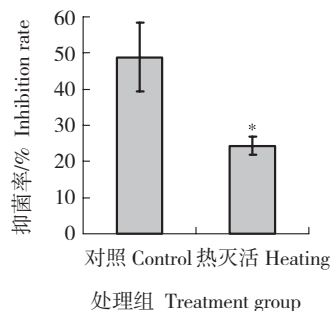


图2 补体热灭活对斑马鱼卵子胞浆溶菌活性的影响

*表示与对照组(未进行热灭活处理)相比差异显著($P<0.05$)。

Fig. 2 Effects of heating on bacteriolytic activity of zebrafish egg cytosol

* means significant difference from control (no heat inactivation) ($P<0.05$).

2.2 补体抗体对斑马鱼卵子胞浆溶菌活性的影响

补体系统的3条激活途径均需要一些特异性成分参与,其中Bf仅参与替代途径,C1仅参与经典途径,C4同时参与经典途径和凝集素途径。因此,在斑马鱼卵子胞浆中加入这些成分的特异性抗体后,可使相应成分失去生物活性,进而抑制相应补体途径的激活。

从图3可以看出,在斑马鱼卵子胞浆中加入Bf抗体可显著抑制其溶菌活性,而且在一定浓度范围内存在剂量依赖效应。当Bf抗体质量浓度为0.24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,卵子胞浆的抑菌率可降至23.9%,不足正常卵子胞浆抑菌率(51.6%)的一半。之后随着Bf抗体浓度继续升高,抗体过量导致抗原抗体复合物稳定性降低,从而在一定程度上恢复了抗原即Bf的生物活性,因此

卵子胞浆的抑菌率也随之升高。

相比之下,在斑马鱼卵子胞浆中加入C1q或C4抗体对其抑菌率没有显著影响,说明斑马鱼卵子胞浆中的经典途径和凝集素途径不参与补体系统的溶菌作用,或其作用比较小。将3种抗体对斑马鱼卵子胞浆抑菌率的影响进行比较很容易发现,斑马鱼卵子胞浆中补体系统主要通过替代途径发挥其溶菌作用。

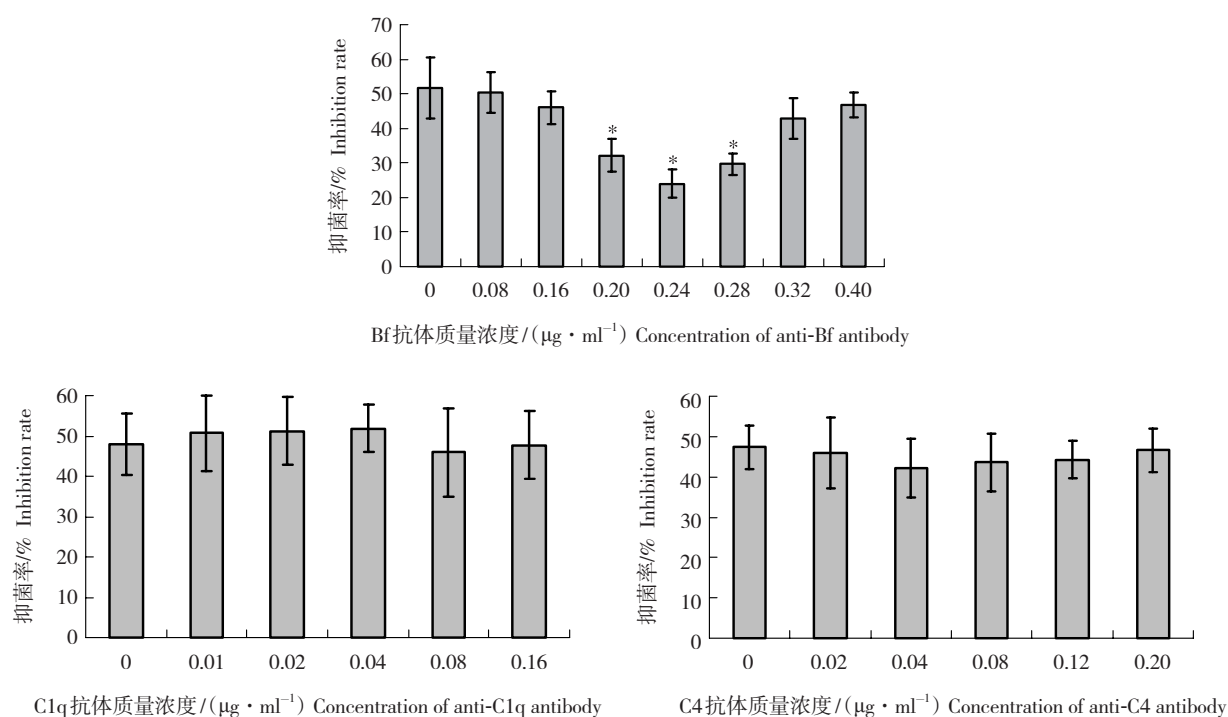


图3 补体抗体浓度对斑马鱼卵子胞浆溶菌活性的影响

*表示与对照组(抗体浓度为0)相比差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 3 Effects of anti-complement antibody on bacteriolytic activity of zebrafish egg cytosol

* means significant difference from control (no antibody was added) ($P < 0.05$).

2.3 二价离子对斑马鱼卵子胞浆杀菌活性的影响

参与补体激活途径的金属离子主要是二价 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} , 其中经典途径同时需要2种离子的参与, 凝集素途径只需要 Ca^{2+} , 而替代途径仅需要 Mg^{2+} 。EGTA对 Ca^{2+} 的螯合作用最强, 而对其他二价离子的螯合作用则比较弱。因此在斑马鱼卵子胞浆中加入EGTA后, 由于 Ca^{2+} 被螯合, 经典途径和凝集素途径可同时被抑制。而EDTA可同时螯合 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} , 使3条补体途径同时被抑制。

实验结果表明(图4), 经一定浓度EDTA处理的卵

子胞浆的抑菌率显著降低, 当EDTA浓度为0.5 mmol/L时, 抑菌率最低(12.2%)。但随着EDTA浓度的继续升高, 斑马鱼卵子胞浆的抑菌率又逐步升高。已有研究表明, 革兰氏阴性菌的外层膜是抵御血清杀伤作用的主要屏障^[21]。对血清具有抗性的细菌经 Tris 和 EDTA 处理后则对血清十分敏感, 其原因可能是EDTA处理影响了细菌细胞壁LPS的释放进而降低了外层膜的渗透屏障。另外, 笔者还通过实验证明, EDTA单独作用对细菌的存活率并无显著影响(数据未列出)。这也进一步验证了EDTA只是通过影响大肠杆菌的细胞壁结构, 使其更

容易被卵子胞浆中的免疫活性成分所破坏。因此在本研究中, EDTA 过量时表现出抑菌率升高的趋势。

在斑马鱼卵子胞浆中加入 EGTA 对其抑菌率无显著影响。这说明, 斑马鱼的母源性补体系统并不

是通过经典途径和凝集素途径来发挥其溶菌作用的。结合 EDTA 浓度对卵子胞浆抑菌率的影响, 可以得出替代途径在斑马鱼卵子胞浆的溶菌功能中具有重要作用这一结论。

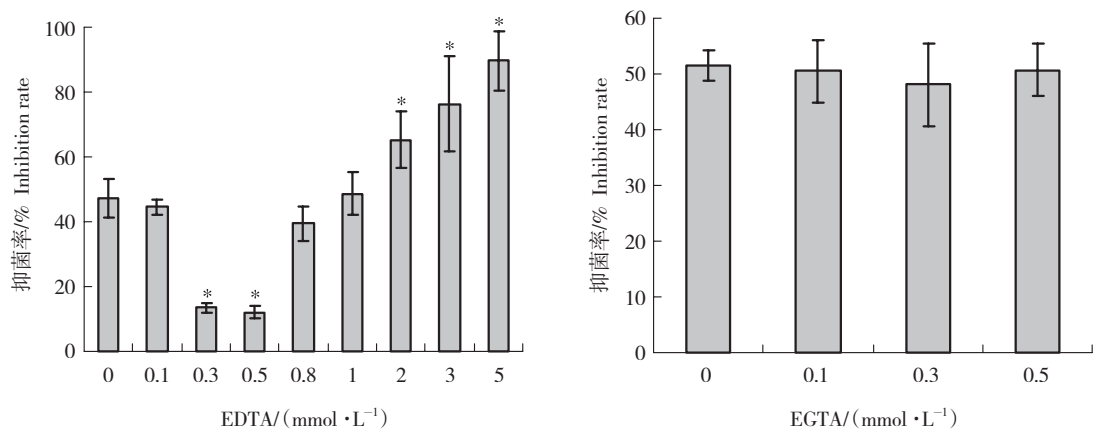


图4 EDTA 和EGTA 浓度对斑马鱼卵子胞浆溶菌活性的影响
*表示与对照组 (EDTA 和EGTA 浓度为0) 相比差异显著 ($P<0.05$).
Fig. 4 Effects of EDTA and EGTA concentration on bacteriolytic activity of zebrafish egg cytosol
* means significant difference from control (no EDTA or EGTA was added) ($P<0.05$).

2.4 斑马鱼母源性补体成分存在于新受精卵

Western blot 结果表明, 兔抗人 C3 多克隆抗体和羊抗人 Bf 多克隆抗体与人血清和斑马鱼卵子胞浆均有反应 (图 5)。兔抗人 C3 抗体与斑马鱼卵子胞浆形成了 3 条特异性条带, 其中 1 条带对应的分子量约为 185 kD, 与人 C3 的分子量大小相当; 此外, 还

有 2 条分子量约为 115 kD 和 70 kD 的条带, 分别与人 C3 α 和 C3 β 的大小相一致。

斑马鱼卵子胞浆与羊抗人 Bf 抗体的反应仅产生了 1 条特异性条带, 分子量与人的 Bf 很接近, 约 93 kD。这一结果说明在斑马鱼卵子中确实存在参与替代途径的补体成分。

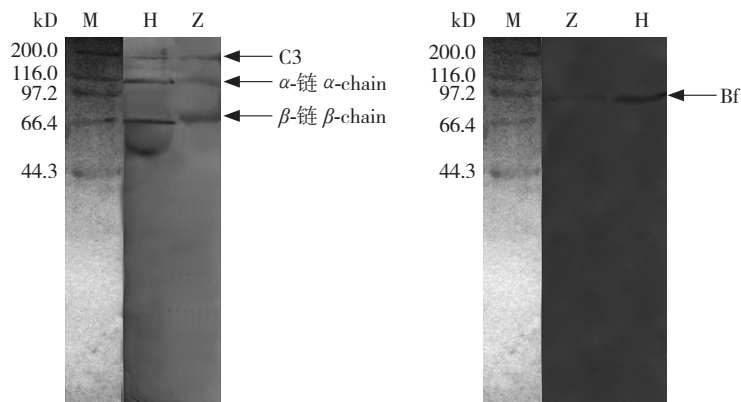


图5 斑马鱼卵子胞浆中 C3 和 Bf 的 Western blot 检测
M: 分子量标准; H: 人血清; Z: 斑马鱼卵子胞浆。
Fig. 5 Western blot analysis of C3 and Bf in zebrafish egg cytosol
lane M: molecular marker; lane H: human serum; lane Z: zebrafish egg extract.

3 讨论

补体系统是先天性免疫的重要组成部分。已有研究发现,在鲤^[14]、虹鳟^[15]和斑点狼鱼^[16]的胚胎中存在母源性补体成分如C3和Bf。本实验在斑马鱼新受精卵中检测到了补体成分C3和Bf,这是斑马鱼卵子中存在母源性补体蛋白的首次报道。

鱼类胚胎发育和早期胚后发育过程中,母源性补体在机体免疫中可能具有重要作用。但这一结论仅限于推测,关于母源性补体功能的报道则更少,仅有Løvoll等^[18]发现大西洋鲑胚胎匀浆液具有微弱的补体活性。本研究首次通过体外实验证明了革兰氏阴性菌大肠杆菌能够被斑马鱼受精卵的胞浆所杀灭,而且首次建立了胚胎补体活性体外检测方法,并通过该方法证明了母源性补体系统在卵子的溶菌活性中起重要作用。首先,在斑马鱼卵子胞浆中加入适量C3抗体使补体C3沉淀失活能够显著降低其抑菌活性;其次,将斑马鱼卵子胞浆在45℃水浴30 min灭活补体^[20]后,其抑菌活性也显著降低。

在确定补体系统参与斑马鱼胚胎溶菌作用的基础上,本研究通过不同方法分别抑制特定补体激活途径进而比较3条补体激活途径的相对作用。实验结果均表明,斑马鱼早期胚胎主要是通过替代性补体激活途径来发挥其溶菌作用的,经典途径和凝集素途径的作用很小或者几乎不参与溶菌作用。第一,在斑马鱼卵子胞浆中分别加入一定量的C1q(经典途径的关键成分)抗体、C4(同时参与经典途径和凝集素途径)抗体和Bf(替代途径的关键成分)抗体,使C1q和C4沉淀失活后,卵子胞浆的溶菌活性无明显变化,但加入Bf抗体使Bf沉淀失活却能够显著降低其溶菌活性;第二,在斑马鱼卵子胞浆中加入EGTA螯合Ca²⁺而抑制经典途径和凝集素途径对卵子胞浆的抑菌活性并无显著影响,但加入EDTA同时螯合Ca²⁺和Mg²⁺从而使替代途径也受到抑制后,卵子胞浆的溶菌活性则显著降低。

综上所述,补体系统不仅参与了斑马鱼胚胎的早期免疫,而且主要是通过替代途径发挥其溶菌作

用的。在鱼类胚胎发育中免疫因子的母源性传递是普遍存在的,因此可以推测补体调节的病原微生物的杀灭在鱼类胚胎发育早期也是普遍存在的。另外,在鱼类的胚胎发育过程中,母源性IgM是否有助于补体经典途径的激活还需要深入研究。

参考文献:

- [1] Zapata A Torroba M, Varas A, et al. Immunity in fish larvae [J]. Dev Biol Stand, 1997, 90: 23–32.
- [2] Swain P, Dash S, Bal J, et al. Passive transfer of maternal antibodies and their existence in eggs, larvae and fry of Indian major carp, *Labeo rohita* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2006, 20: 519–527.
- [3] Picchiatti S, Abelli L, Buonocore F, et al. Immunoglobulin protein and gene transcripts in sea bream (*Sparus aurata* L.) oocytes [J]. Fish Shellfish Immunol, 2006, 20: 398–404.
- [4] Picchiatti S, Taddei A R, Scapigliati G, et al. Immunoglobulin protein and gene transcripts in ovarian follicles throughout oogenesis in the teleost *Dicentrarchus labrax* [J]. Cell Tissue Res, 2004, 315: 259–270.
- [5] Castillo A, Sanchez C, Dominguez J, et al. Ontogeny of IgM and IgM-bearing cells in rainbow trout [J]. Dev Comp Immunol, 1993, 17: 419–424.
- [6] Olsen Y A, Press C M L. Degradation kinetics of immunoglobulin in the egg, alevin and fry of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and the localization of immunoglobulin in the egg [J]. Fish Shellfish Immunol, 1997, 7: 81–91.
- [7] Bly J E, Grimm A S, Morris I G. Trasfer of passive immunity from mother to young in a eleost fish: haemagglutinating activity in the serum and eggs of plaice, *Pleuronectes platessa* L [J]. Comp Biochem Physiol, 1986, 84A: 309–313.
- [8] Mor A, Avtalion R R. Transfer of antibody activity from immunised mother to embryos in tilapias [J]. J Fish Biol, 1990, 37: 249–255.
- [9] Nakamura O, Kudo R, Aoki H, et al. IgM secretion and absorption in the materno-fetal interface of a viviparous teleost, *Neoditrema ransonneti* (Perciformes; Embiotocidae) [J]. Deve Comp immunol, 2006, 30: 493–502.
- [10] Choi J H, Park P J, Kim S K. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from the egg of skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* [J]. Fish Sci, 2002, 68: 1367–1373.
- [11] Jung W K, Park P J, Kim S K. Purification and characterization of a new lectin from the hard roe of skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis* [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2003, 35:

- 255–265.
- [12] Tateno H, Yamaguchi T, Ogawa T, et al. Immunohistochemical localization of rhamnose-binding lectins in the steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Dev Comp Immunol, 2002, 26: 543–550.
- [13] Yousif A N, Albright L J, Evelyn T P T. In vitro evidence for the antibacterial role of lysozyme in salmonid eggs [J]. Dis Aquat Organ, 1994, 19: 15–19.
- [14] Huttenhuis H B T, Grou C P O, Taverne-Thiele A J, et al. Carp (*Cyprinus carpio* L.) innate immune factors are present before hatching [J]. Fish Shellfish Immunol, 2006, 20: 586–596.
- [15] Løvoll M, Kilvik T, Boshra H, et al. Maternal transfer of complement components C3–1, C3–3, C3–4, C4, C5, C7, Bf and Df to offspring in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Immunogenetics, 2006, 58: 168–179.
- [16] Ellingsen T, Strand C, Monsen E, et al. The ontogeny of complement component C3 in the spotted wolfish (*Anarhichas minor* Olafsen) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2005, 18: 351–358.
- [17] Swain P, Nayak S K. Role of maternally derived immunity in fish [J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 27: 89–99.
- [18] Løvoll M, Johnsen H, Boshra H, et al. The ontogeny and extrahepatic expression of complement factor C3 in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 23: 542–552.
- [19] 刘晓玲, 陶伟, 高云飞, 等. 甲藻染色体在非细胞体系核重建过程中核小体的组装 [J]. 植物学报, 2001, 43 (12): 1224–1228.
- [20] Rubio-Godoy M, Porter R, Tinsley R C. Evidence of complement-mediated killing of *Discocotyle sagittata* (Platyhelminthes, Monogenea) oncomiracidia [J]. Fish Shellfish Immunol, 2004, 17: 95–103.
- [21] Taylor P W. Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against gram-negative bacteria [J]. Microbiol Rev, 1983, 47: 46–83.

Presence and immune activity of maternal complement in zebrafish eggs

WANG Zhiping

(1. Department of Marine Biology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Department of Environment and Life Sciences, Weinan Normal University, Weinan 714000, China)

Abstract: The presence of maternal complement C3 and Bf in fertilized eggs of zebrafish *D. rerio* was verified. Moreover, it was shown that *E. coli* was sensitive to the zebrafish egg cytosol, and maternal complement was involved in the bacteriolytic activity. First, the immune activity was abolished by pre-incubation of anti-C3 antibody with the egg cytosol, a process which would cause the precipitation of the central component of all known complement pathways, C3. Second, the lytic activity was depleted by heating at 45 °C (a temperature known to inactivate fish complement). To determine which pathway of complement activation might be involved in the bacteriolytic activity of the egg cytosol, the antibodies against C1q (a key component of classical pathway), C4 (a key component of both classical and lectin pathways) and Bf (a key component of alternative pathway) were utilized to block the special complement pathway, respectively. It was found that precipitation of C1q and C4 causes little loss of the bacteriolytic activity of the egg cytosol, whereas precipitation of Bf results in a significant reduction of the bacteriolytic activity. Furthermore, addition of EGTA to remove Ca^{2+} (necessary for both classical and lectin pathway) from the egg cytosol induces little decrease in the bacteriolytic activity. In contrast, pre-incubation of EDTA to remove both Ca^{2+} and Mg^{2+} (necessary for alternative pathway) from the egg cytosol leads to a substantial reduction of the bacteriolytic activity. Taken all the above results into consideration, it was found that activation of alternative pathway is responsible for the bacteriolytic activity of the maternal complement in zebrafish egg cytosol. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17 (5): 1005–1011]

Key words: maternal complement; detection; bacteriolytic activity, zebrafish