

DOI: 10.12264/JFSC2022-0206

## 人 IgG 诱导尼罗罗非鱼特异性抗体分泌细胞的 ELISPOT 检测

黄瑜<sup>1, 2, 3</sup>, 庞碧剑<sup>1, 2, 3, 4</sup>, 李琦<sup>1, 2, 3</sup>, 吴灶和<sup>2, 3</sup>, 简纪常<sup>1, 2, 3</sup>

1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524088;
2. 广东省水产动物病害防控与健康养殖重点实验室, 广东 湛江 524088;
3. 广东省教育厅水产经济动物病害控制重点实验室, 广东 湛江 524088;
4. 广西壮族自治区海洋环境监测中心站, 广西 北海 536000

**摘要:** 通过酶联免疫斑点法(ELISPOT)检测了经人 IgG 免疫后尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)头肾、外周血和脾脏中的特异性抗体分泌细胞(antibody secreting cell, ASC)数量。结果表明, 首次免疫 1 d 后可在头肾中检测出 ASC, 而外周血和脾脏第 3 天才能检测出 ASC; 头肾、外周血以及脾脏中的 ASC 均在第 12 天达到峰值, 随后头肾、外周血中的 ASC 数量显著减少, 而在脾脏中 ASC 数量减少不显著。二次免疫 1 d 后在头肾、外周血和脾脏中均可检测到 ASC, ASC 数量均在第 9 天达到峰值, 时间早于首次免疫, 且在首次免疫和二次免疫中, 头肾组织的 ASC 数量均是 3 个组织中最高的。酶联免疫吸附试验(ELISA)分别对首次免疫和二次免疫后血清中的抗体水平检测发现, 其变化趋势与 ASC 数量变化规律相同。研究结果表明, 尼罗罗非鱼在初次免疫后产生了免疫记忆, 在二次免疫过程中产生了更多的 ASC 和抗体, 头肾是 ASC 的主要来源组织。该结果可为鱼类的免疫记忆研究提供重要的科学依据。

**关键词:** 尼罗罗非鱼; 抗体分泌细胞; 酶联免疫斑点法; 抗体; 免疫记忆

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)10-1417-08

哺乳动物中, 机体在受到抗原刺激后会产生免疫记忆细胞如记忆 T 细胞和记忆 B 细胞, 当机体再次受到同种抗原入侵后, 机会启动记忆细胞作出快速应答, 从而消灭外源物质。免疫记忆的出现增强了生物体抵御同种病原菌再次感染的能力。现有研究表明, 免疫记忆广泛存在于脊椎动物中<sup>[1-2]</sup>。脊椎动物特异性体液免疫应答是由抗体分泌细胞及其产生的相应抗体来介导的。目前, 通过检测抗体含量以及抗体分泌细胞在数量与时间上的变化, 可对各个免疫器官的抗体产生及抗体在体内长期的维持进行评价。对抗体分泌细胞进行检测常用的方法有溶血空斑形成试验(PFC)、酶联免疫斑点法(ELISPOT)、流式细胞仪检测(FC)等, 其中酶联免疫斑点法是一种在细胞悬液中定

量检测细胞因子生成细胞的分析方法, 它结合了细胞培养技术与酶联免疫吸附技术, 最大优点是高精度度, 能在 100 万个细胞中检测出 1 个目标细胞<sup>[3]</sup>。因此, 该方法常用来检测抗体分泌细胞或记忆 B 细胞的前体细胞分化频率。近年来, 科研人员对鱼类免疫器官在免疫应答中的作用进行了系统的研究: 包括黏膜、皮肤、鳃、肠道、胸腺、头肾、脾脏以及外周血<sup>[4-9]</sup>。其中头肾及脾脏被认为是鱼类重要的免疫器官, 是 B 淋巴细胞分化成抗体分泌细胞的主要场所, 且从脾脏、外周血及头肾中都能分离得到, 如浆母细胞、浆细胞即抗体分泌细胞<sup>[10]</sup>。因此, 鱼类被认为是最早出现免疫记忆的低等脊椎动物, 但是目前对于鱼类的免疫记忆研究还相对较少, 仅在斑马鱼(*Danio rerio*)、虹鳟(*Oncor-*

收稿日期: 2022-05-25; 修订日期: 2022-07-25.

基金项目: 国家自然科学基金项目(32002426); 国家重点研发计划项目(2018YFD0900501).

作者简介: 黄瑜(1986-), 男, 博士, 讲师, 研究方向为水产经济动物病害防治. E-mail: huangyu@gdou.edu.cn;

并列第一作者: 庞碧剑(1986-), 女, 硕士, 研究方向为水产经济动物病害防治. E-mail: 438953041@qq.com

通信作者: 简纪常, 教授, 博士, 研究方向为水产经济动物病害防治. E-mail: jianjc@gdou.edu.cn

*hynchus mykiss*)、鲇(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鲤(*Cyprinus carpio*)等少数物种中有研究<sup>[2, 11-13]</sup>。

罗非鱼源自非洲的尼罗河流域, 因其抗逆性强、生长快、繁殖力强。罗非鱼养殖在我国发展迅速, 已成为继四大家鱼之后的第五大养殖鱼类。然而, 近些年在世界各地不断爆发的病毒病和细菌病等, 给罗非鱼养殖产业带来了巨大的经济损失<sup>[14-16]</sup>。本研究以罗非鱼为对象, 应用 ELISPOT 技术研究人 IgG 免疫后罗非鱼头肾、脾脏及外周血中 ASC 的数量变化规律以及抗体的表达水平, 结果将有助于了解罗非鱼免疫记忆的存在与否, 同时为罗非鱼疫苗的应用以及鱼类免疫记忆的研究提供重要的科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验鱼

将 150 尾体重为 70~80 g 的罗非鱼养于 10 个盛有 1 m<sup>3</sup> 水的池中, 每个池 15 尾鱼。实验前驯养 1 周, 每日早晚投喂 2 次人工合成饲料, 水温控制在 25 ℃左右, 每 2.5 d 换水 1 次。

### 1.2 罗非鱼免疫

实验组用 1 mg/mL 人 IgG 加等量弗氏完全佐剂乳化后每尾鱼腹腔注射 0.2 mL, 对照组用无菌 PBS 溶液加等量弗氏完全佐剂乳化后注射相同剂量, 注射后放回池里。分别于第 1、3、6、9、12、15、18 天取样, 每次取实验组及对照组罗非鱼各 3 尾, 取样前 24 h 停止喂食。首次免疫后第 30 天给予二次免疫, 注射剂量、注射部位、对照组的设置都与首次相同。

### 1.3 免疫组化分析

将首次免疫后 12 d 的实验组鱼用 MS-222 麻醉后消毒, 取头肾和脾脏组织, 石蜡包埋后进行切片。将石蜡切片进行脱蜡, 步骤为: 二甲苯 I-二甲苯 II-无水乙醇 I-无水乙醇 II-85%乙醇-75%乙醇, 每步进行 15 min, 最后用蒸馏水洗。将组织切片置于 EDTA 抗原修复缓冲液(pH 8.0)的修复盒中于微波炉内进行抗原修复。自然冷却后将玻片置于 PBS (pH 7.4)中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。切片放入 3%过氧化氢溶液, 室温避光孵育 30 min, 用 PBS(pH 7.4)在脱色摇床上晃动

洗涤 3 次, 每次 5 min。滴加 10%正常鼠血清均匀覆盖组织, 室温封闭 30 min。滴加 100 μL 鼠抗罗非鱼 IgM 一抗, 切片平放于湿盒内 4 ℃孵育过夜。PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。切片稍甩干后加入 100 μL 的辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG(HRP-羊抗鼠 IgG)二抗, 37 ℃孵育 1 h。PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。切片稍甩干后滴加二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色液, 显微镜下控制显色时间, 阳性为棕黄色, 自来水冲洗切片终止显色。Harris 苏木素复染 3 min 左右, 自来水洗, 1%的盐酸酒精分化数秒, 自来水冲洗, 氨水返蓝, 流水冲洗。将切片依次放入 75%乙醇、85%乙醇、无水乙醇 I、无水乙醇 II、二甲苯 I 脱水透明, 各步骤 5 min, 切片稍晾干后中性树胶封片。显微镜镜检, 图像采集分析。

### 1.4 淋巴细胞悬液制备

实验罗非鱼用 MS-222 麻醉后, 将罗非鱼浸泡于 75%的酒精中消毒 5 min, 在超净工作台中用 1%肝素钠润湿的注射器从罗非鱼尾静脉采血, 加入等量 D-Hank's 液稀释, 制备成悬液; 同时抽取 2 mL 血液缓慢加入到无菌离心管中, 4 ℃静置过夜, 2000 r/min 离心后收取血清, 保存于-20 ℃用于后续抗体检测。取头肾、脾脏组织放入 2 mL D-Hank's 液中, 用消毒剪刀将组织剪碎, 过 200 目不锈钢筛网制成组织悬液。取 15 mL 无菌离心管, 先加入 2 mL 淋巴细胞分离液 Histopaque-1077, 将等量的外周血、头肾和脾脏细胞悬液分别缓慢叠加到分离液上层, 900 g 离心 35 min。将淋巴细胞层细胞移至干净的 15 mL 离心管, 加入 2 mL RPMI-1640 完全培养基洗涤, 900 g 离心 15 min, 去上清后加入 2 mL 完全培养基重复洗涤 2 次, 加入完全培养基重悬, 用 0.4%台盼蓝检测存活率>96%后, 将细胞个数调整为  $1.00 \times 10^7$  个/mL。

### 1.5 瑞氏染色观察

将分离好的头肾淋巴细胞悬液按照常规方法进行涂片: 在室温下迅速晾干, 用瑞氏染料染色 1 min 后加等量的 PBS, 轻轻晃动玻片, 使其均匀混合, 静置 5 min 后用自来水冲洗, 于室温下干燥。在 100 倍油镜下观察淋巴细胞形态及数量变化, 随机计数 200 个细胞, 计算其百分比。

## 1.6 ELISPOT 检测

室温下每孔加 100  $\mu\text{L}$  70% 的酒精孵育 MultiScreen<sub>HTS</sub>-IP Filter 96 孔板 10 min 后弃去, 无菌 PBS 洗涤 3 次, 每孔加 100  $\mu\text{L}$  人 IgG (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 4  $^{\circ}\text{C}$  包被过夜; 弃液后加入含 0.1% 吐温-20 的 PBS (PBS-T) 洗涤 3 次, PBS 洗 2 次; 加入 10% 胎牛血清(FBS)的培养液封闭 2 h, 弃液后每孔加入 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液, 25  $^{\circ}\text{C}$  孵育 9~12 h 后倒去液体, PBS-T 洗涤 3 次, PBS 洗涤 2 次; 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  鼠抗罗非鱼 IgM, 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜, PBS-T 洗涤 3 次, PBS 洗涤 2 次; 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  的辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG(HRP-羊抗鼠 IgG)二抗, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h, 弃去液体, PBS-T 洗 3 次, PBS 洗 2 次。在吸水纸上拍打, 吸干残留的洗涤液后每孔加入 100 的 3-氨基-9-乙基呋唑(AEC)显色底物, 室温下避光反应 8~10 min。弃去显色液, 用蒸馏水充分洗涤膜的两边。吸水纸上轻拍, 使膜干燥。室温干燥后在体式显微镜下进行斑点计数。

## 1.7 ELISA 检测

96 孔酶标板中每孔加 100  $\mu\text{L}$  人 IgG (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 4  $^{\circ}\text{C}$  包被过夜, PBS-T 洗涤 3 次, 每孔加满封闭液

(PBS-T+10% FBS)37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h, 弃去, PBS-T 洗涤 3 次, 每孔加入血清 100  $\mu\text{L}$ , 每个样品重复 3 个孔, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 90 min, PBS-T 洗涤 3 次, 每次 5 min, PBS 洗 2 次, 拍干。每孔加入 100  $\mu\text{L}$  鼠抗罗非鱼 IgM(1:33), 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h, PBS-T 洗涤 3 次, 每次 5 min, PBS 洗 2 次, 拍干。每孔加入 100  $\mu\text{L}$  HRP-羊抗鼠 IgG(1:2000), 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h, PBS-T 洗涤 3 次, 每次 5 min, PBS 洗 2 次, 拍干。每孔加入 100  $\mu\text{L}$  的 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物溶液, 室温避光反应 10 min, 加入 50  $\mu\text{L}$  浓度为 2 M 的  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止液, 同时设立对照孔。酶标仪测定各孔 450 nm 的 OD 值。

## 2 结果与分析

### 2.1 ASC 在各组织中的分布

本研究通过抗体孵育染色确定 ASC 在头肾和脾脏 2 个组织中的分布情况。其中组织细胞的核被苏木素染为蓝色, DAB 染料着色的阳性结果, 颜色为棕黄色。结果表明所选取的 2 个组织的实验组中均有阳性信号。由此表明罗非鱼经过人 IgG 免疫后, 头肾和脾脏 2 个组织中, 具有弥散性的 ASC 细胞分布(图 1)。

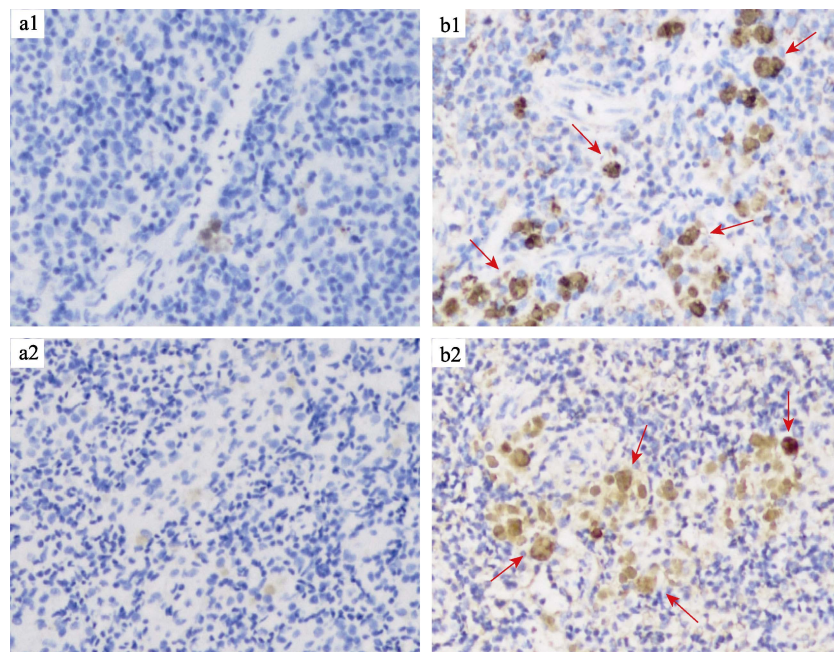


图 1 免疫组化检测尼罗罗非鱼头肾和脾脏组织中 ASC 的分布( $\times 200$ )

a1. 头肾对照组; b1. 头肾实验组; a2. 脾脏对照组; b2. 脾脏实验组; 红色箭头: ASC.

Fig. 1 Distribution of ASC in the head kidney and spleen tissue of *Oreochromis niloticus* by immunohistochemical ( $\times 200$ )

a1. control group of head kidney; b1. experimental group of head kidney; a2. control group of spleen;

b2. experimental group of spleen; red arrow: ASC.

## 2.2 免疫前后罗非鱼淋巴细胞的形态变化

经特异性抗原免疫后的罗非鱼淋巴细胞在形态和数量会发生一系列的变化,以头肾淋巴细胞为例,细胞经瑞氏染色后于显微镜下观察,发现免疫前后淋巴细胞均有部分变大的现象,而且细胞核变松散,几乎充斥着整个细胞内部,为淋巴母细胞。图 2 的 a1 和 a2 中箭头所指即为淋巴母细胞(lymphoblast, Lb)。不同之处在于免疫后组织中有很多体积较小的淋巴细胞,数量较多而且染色较深,图 2 的 b1 和 b2 中箭头所指即为小淋巴细胞(small lymphocyte, sL)。随机计数 200 个淋巴细胞中小淋巴细胞的百分比为 48%~57%,而对照组仅为 5%~7%。

## 2.3 首次免疫后 3 个组织中 ASC 数量的检测

首次用人 IgG 腹腔注射罗非鱼 1 ℃后可在头肾组织中检测出相应的 ASC,浓度为 $(1.00\pm0.35)$ 个/ $10^6$ 个淋巴细胞;而外周血及脾脏中第 3 天才

能检测出 ASC,分别为 $(2.00\pm0.50)$ 和 $(1.00\pm0.35)$ 个/ $10^6$ 个淋巴细胞;从第 6 天开始至第 9 天,头肾中的特异性 ASC 显著性增加,到第 12 天达到最高峰,即 $(80.00\pm5.50)$ 个/ $10^6$ 个淋巴细胞;同时外周血在第 12 天也达到最大值为 $(28.00\pm2.50)$ 个/ $10^6$ 个淋巴细胞;脾脏特异性 ASC 的增加较为缓慢,在第 9 天观察到 ASC 数量最多,为 $(15.00\pm2.80)$ 个/ $10^6$ 个淋巴细胞。脾脏中 ASC 的数量在第 6 天与第 12 天之间差异并不大,变化趋势较为缓慢。各时间点 3 种组织中的淋巴组织相比,头肾 ASC 数量最多,外周血 ASC 数量次之,脾脏中 ASC 数量最少。3 种组织 ASC 数量在达到峰值之后都呈现下降趋势。头肾第 12 天至第 18 天呈现显著下降趋势,到第 18 天检测到 ASC 的数量仅为 $(35.00\pm3.20)$ 个/ $10^6$ 个淋巴细胞,外周血 ASC 数量也显著下降到 $(9.50\pm1.60)$ 个/ $10^6$ 个淋巴细胞(图 3)。

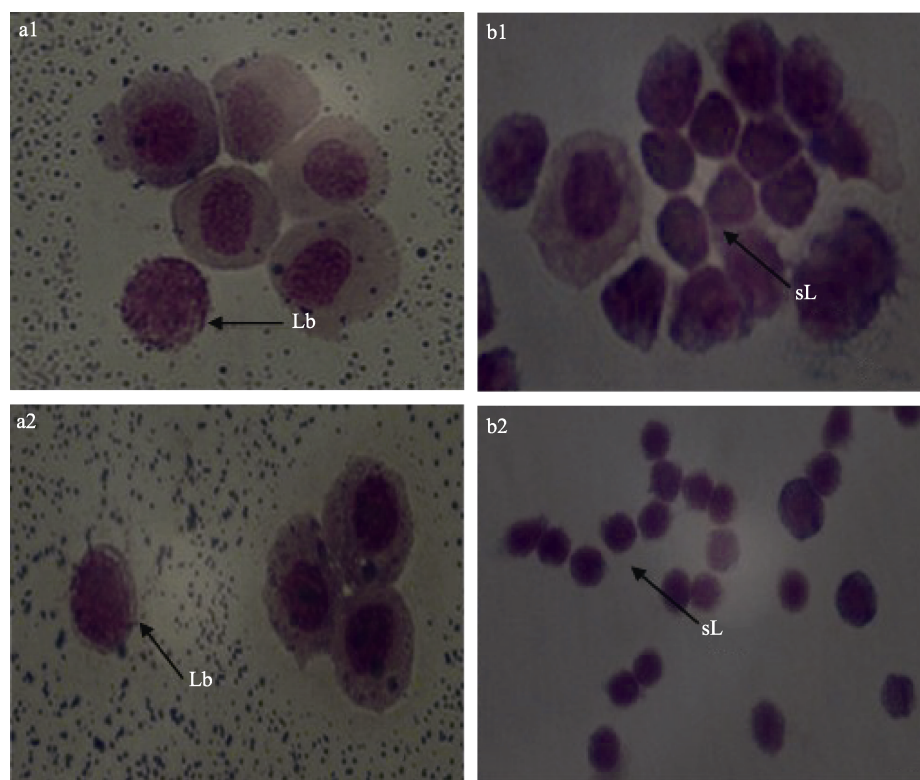


图 2 免疫前(a1 和 a2)与免疫后(b1 和 b2)罗非鱼淋巴细胞形态对比(×100)

Lb: 淋巴母细胞, sL: 小淋巴细胞.

Fig. 2 Comparison of Nile tilapia lymphocytes morphology before (a1 and a2) and after (b1 and b2) immunization (×100)

Lb: Lymphoblast, sL: small Lymphocyte.



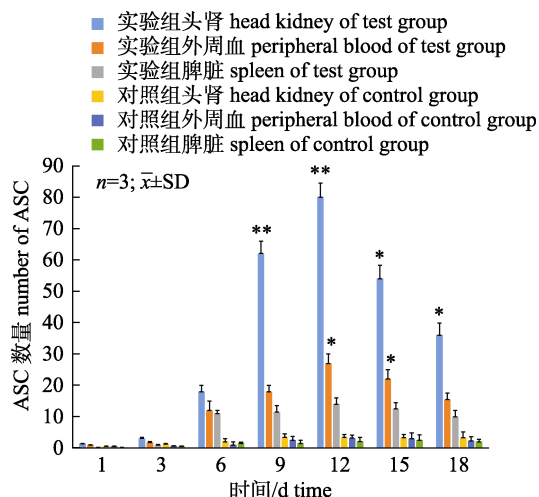


图 3 首次免疫人 IgG 后罗非鱼头肾、外周血及脾脏中特异性 ASC 数量的变化  
\*代表不同时间点处理组与对照组间差异显著( $P<0.05$ ), \*\*表示差异极显著( $P<0.01$ ).

Fig. 3 The changes of ASCs in head kidney, peripheral blood and spleen of tilapia after primary immunization with human IgG

\* means significant difference between treatment group and control group at different time points ( $P<0.05$ ), \*\* means extremely significant difference ( $P<0.01$ ).

## 2.4 二次免疫后 3 个组织中 ASC 数量的检测

二次免疫罗非鱼后, 结果如图 4 所示, 头肾、外周血和脾脏组织均在第 1 天检测到 ASC, 数量分别为 $(8.00\pm1.50)$ 、 $(5.00\pm1.50)$ 和 $(2.00\pm0.75)$ 个/ $10^6$ 个淋巴细胞。头肾中的特异性 ASC 数量迅速增加, 在第 9 天就达到最大值为 $(181.00\pm8.90)$ 个/ $10^6$ 个淋巴细胞, 是首次免疫最大值的 2 倍以上, 而且出现最高峰的时间提前了 3 d, 达到峰值后头肾中 ASC 的数量并没有出现显著减少, 较大值维持时间较长, 第 12 天至第 15 天才出现明显的下降趋势; 外周血中 ASC 数量在第 9 天出现最大值为 $(132.00\pm10.50)$ 个/ $10^6$ 个淋巴细胞, 是首次免疫后外周血 ASC 最大值的 4 倍以上, 第 9 天后外周血的 ASC 数量呈现逐渐下降; 与首次免疫相比, 脾脏在第 9 天的 ASC 的数量出现明显峰值, 为 $(89.00\pm5.50)$ 个/ $10^6$ 个淋巴细胞, 是首次免疫后脾脏 ASC 最大值的 6 倍, 但仍然是 3 种组织中最低的。

## 2.5 首次免疫及二次免疫后血清中特异性抗体水平检测

对每次取样的血清进行 ELISA 检测, 血清所

含的特异性抗体水平以吸光度 OD 值表示(如图 5)。首次免疫后罗非鱼的血清特异性抗体水平从第 1 天至第 12 天为缓慢持续的增加, 至第 12 天达到峰值后开始下降, 但第 15 天与第 12 天相比

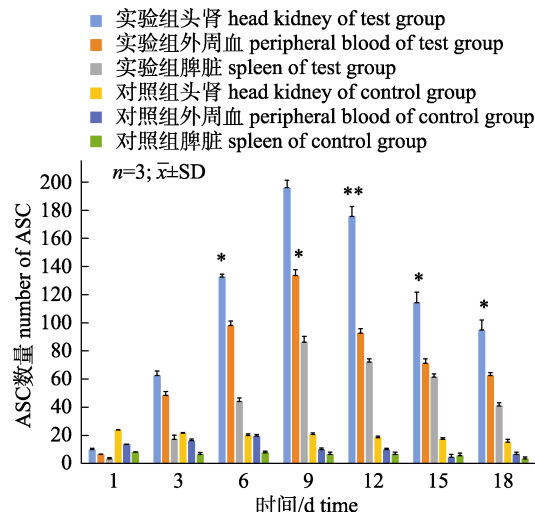


图 4 二次免疫人 IgG 后罗非鱼头肾、外周血及脾脏中特异性 ASC 数量的变化

\*代表不同时间点处理组与对照组间差异显著( $P<0.05$ ), \*\*表示差异极显著( $P<0.01$ ).

Fig. 4 The changes of ASCs in head kidney, peripheral blood and spleen of tilapia after secondary immunization with human IgG

\* means significant difference between treatment group and control group at different time points ( $P<0.05$ ), \*\* means extremely significant difference ( $P<0.01$ ).

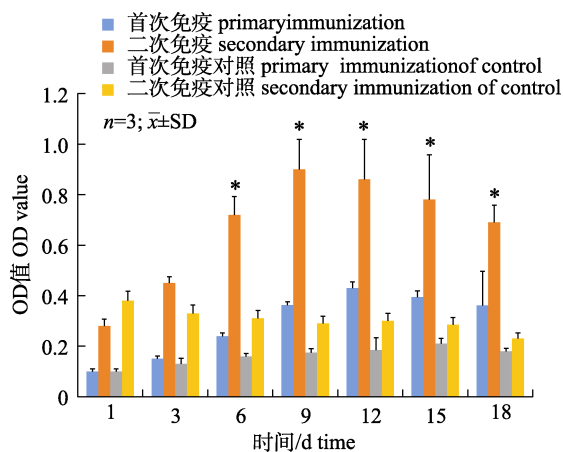


图 5 首次免疫及二次免疫人 IgG 后罗非鱼血清抗体含量变化

\*代表不同时间点处理组与对照组间差异显著( $P<0.05$ ).

Fig. 5 The changes of antibody level in serum of Tilapia after primary and secondary immunization with human IgG

\* means significant difference between treatment group and control group at different time points ( $P<0.05$ ).

抗体水平下降不明显,首次免疫的抗体水平达到最大值的时间与 ASC 数量最大值的时间一致,同时发现对照组特异性抗体水平也有轻微的增加。二次免疫后特异性抗体水平呈现快速增加趋势,最大值出现在第 9 天,是首次免疫最大值的 2 倍,而且比首次免疫达到峰值的时间提前了 3 d,这也与检测到的二次免疫后 ASC 数量达到峰值的时间符合。到达峰值后至第 12 天抗体水平下降并不明显,与最大值相比差异不大,维持较高水平抗体的时间较长。二次免疫对照组的特异性抗体水平总体呈现逐渐降低的趋势,除第 1 天以外,二次免疫的抗体水平实验组均比对照组高。

### 3 讨论

目前,防治罗非鱼细菌性疾病最主要的措施仍然是使用抗生素,由于抗生素的长期应用或不合理使用,已导致严重的环境污染和各种耐药菌的出现,进而给疾病的防治工作带来更大的困难<sup>[17-18]</sup>。为此,免疫预防逐渐被认为是防治鱼类细菌性疾病的重要途径。而免疫预防的关键点是机体具有免疫记忆。鱼类作为低等脊椎动物,已具有较完善的由头肾、脾脏、外周淋巴组织等组成的免疫系统,在抗原的刺激下能产生特异性免疫应答<sup>[19-21]</sup>。本研究用人源 IgG 通过腹腔注射使罗非鱼产生相应的特异性抗体,以 ELISPOT 法检测罗非鱼头肾、脾脏及外周血中特异性 ASC 数量的变化,同时采用 ELISA 法检测血清中特异性抗体水平的变化趋势,结果为罗非鱼的病害防治提供一定的帮助。

在所检测的尼罗罗非鱼 3 种组织中,头肾是最先产生抗体反应组织,免疫后第 1 天即在头肾中检测出 ASC,随后是外周血,最后是脾脏。首次免疫后第 12 天头肾及外周血中 ASC 数量达到最大,而脾脏中 ASC 的数量变化过程中并没有明显的峰值出现。从峰值来看,头肾中 ASC 的数量是外周血的 3 倍,脾脏的 5 倍,头肾中 ASC 数量远大于外周血及脾脏中 ASC 数量,且脾脏中 ASC 的数量也是 3 种组织中最少的。该结果与虹鳟头肾、脾脏、外周血中的 ASC 研究类似<sup>[9]</sup>。由此可见,在罗非鱼免疫应答过程中,头肾起到了关键作用。头肾被认为是 B 淋巴细胞发育的主要部位<sup>[22]</sup>。

进入到机体的抗原首先在头肾中经呈递、识别等作用激活效应 B 淋巴细胞,随后 B 淋巴细胞转化为浆细胞分泌抗体,抗体以及浆细胞通过血管输送到别的组织和器官中发挥免疫应答作用<sup>[23-24]</sup>。而脾脏中 ASC 的数量在 3 种组织中是最低的,且随着时间变化的趋势也有别于其他两种组织,说明脾脏在体液免疫反应过程中可能处于相对次要的地位<sup>[25]</sup>。同时,对罗非鱼血清中特异性抗体水平的检测发现,抗体水平随着时间的变化而逐渐增加,至第 12 天达到最大值,随后逐渐下降,变化趋势与头肾中 ASC 数量的变化趋势基本一致,暗示罗非鱼血清中的抗体主要来源于头肾中的淋巴细胞。而虹鳟鱼对半抗原 DNP-KLH 的抗体应答在免疫后 50 d 才达到高峰,且抗体滴度在免疫后的 150 d 一直保持较高水平。由此表明不同种鱼对不同免疫原的应答有较大差别。

罗非鱼二次免疫后,头肾及外周血中 ASC 数量出现最大值的时间比首次免疫提前了 3 天,头肾的峰值要比首次免疫的峰值多 2 倍以上,且维持高水平免疫反应的时间较长。外周血的峰值要比首次免疫的峰值多 4 倍以上,脾脏在二次免疫后中也出现峰值,且是首次免疫脾脏 ASC 数量峰值的 6 倍。头肾中 ASC 的数量仍然是 3 个组织中最高。对罗非鱼血清中的特异性抗体水平的检测发现,抗体水平随着时间的变化而呈现快速增加,第 9 天达到最大值,比首次免疫提前了 3 天,且是首次免疫抗体水平最大值的 2 倍以上,表明罗非鱼的二次免疫引起了比首次免疫更快速、更效率的免疫应答。免疫记忆的形成特征是二次免疫或者感染时具有更快以及更高水平的抗体产生<sup>[26]</sup>。虽然罗非鱼抗体及免疫细胞的克隆倍数并没有像高等脊椎动物的免疫记忆应答那样呈现指数增长的趋势<sup>[27]</sup>,但是依赖于相同抗原再次刺激引发的免疫记忆作用使免疫应答比首次迅速,维持免疫作用时间较长。由此表明,二次免疫引发了罗非鱼的免疫记忆,且头肾组织发挥重要作用。

本实验利用 ELISPOT 技术研究人 IgG 在初次和二次免疫罗非鱼后,罗非鱼头肾、脾脏及外周血中 ASC 的数量变化规律,结果表明,初次免疫后的 3 个组织中 ASC 数量均发生了上调变化,且

头肾组织最先检测到 ASC, 各组织 ASC 分别在 12 天达到峰值, 外周血中的抗体水平变化也与各组织 ASC 数量的变化趋势相同。二次免疫后, 各组织 ASC 数量和抗体水平达到峰值的时间与强度均早于初次免疫, 同时在初次和二次免疫中, 头肾组织的 ASC 数量均是 3 个组织中最高的。结果表明, 罗非鱼具有免疫记忆, 且头肾组织是罗非鱼发挥免疫记忆最重要的器官。该结果为鱼类的免疫记忆研究提供了重要的科学依据。

### 参考文献:

- [1] Netea M G, Joosten L A B, Latz E, et al. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease[J]. *Science*, 2016, 352(6284): aaf1098.
- [2] Yamaguchi T, Quillet E, Boudinot P, et al. What could be the mechanisms of immunological memory in fish?[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 85: 3-8.
- [3] Pang P J, Zhang F X, Li C A. The advance of enzyme-linked immunosorbent sopt[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010(3): 67-71. [庞盼姣, 张付贤, 李长安. 酶联免疫斑点法的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2010(3): 67-71.]
- [4] Zhao X G, Findly R C, Dickerson H W. Cutaneous antibody-secreting cells and B cells in a teleost fish[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2008, 32(5): 500-508.
- [5] Xu Z, Chen C F, Mao Z J, et al. Detection of serum and mucosal antibody production and antibody secreting cells (ASCs) in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) following vaccination with *Vibrio harveyi* via different routes[J]. *Aquaculture*, 2009, 287(3-4): 243-247.
- [6] Rombout J H W M, Abelli L, Picchiatti S, et al. Teleost intestinal immunology[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 31(5): 616-626.
- [7] Davidson G A, Lin S H, Secombes C J, et al. Detection of specific and 'constitutive' antibody secreting cells in the gills, head kidney and peripheral blood leucocytes of dab (*Limanda limanda*)[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1997, 58(3-4): 363-374.
- [8] Press C M, Evensen Ø. The morphology of the immune system in teleost fishes[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1999, 9(4): 309-318.
- [9] Bromage E S, Kaattari I M, Zwollo P, et al. Plasmablast and plasma cell production and distribution in trout immune tissues[J]. *Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)*, 2004, 173(12): 7317-7323.
- [10] Ye J M, Kaattari I, Kaattari S. Plasmablasts and plasma cells: Reconsidering teleost immune system organization[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(12): 1273-1281.
- [11] Swaim L E, Connolly L E, Volkman H E, et al. *Mycobacterium marinum* infection of adult zebrafish causes caseating granulomatous tuberculosis and is moderated by adaptive immunity[J]. *Infection and Immunity*, 2006, 74(11): 6108-6117.
- [12] Yamasaki M, Araki K, Nakanishi T, et al. Role of CD4+ and CD8α+T cells in protective immunity against *Edwardsiella tarda* infection of gibel carp, *Carassius auratus langsdorffii*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 36(1): 299-304.
- [13] Saha N R, Usami T, Suzuki Y. *In vitro* effects of steroid hormones on IgM-secreting cells and IgM secretion in common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2004, 17(2): 149-158.
- [14] Bacharach E, Mishra N, Briesse T, et al. Characterization of a novel orthomyxo-like virus causing mass die-offs of Tilapia[J]. *mBio*, 2016, 7(2): e00431-e00416.
- [15] Barato P, Martins E R, Melo-Cristino J, et al. Persistence of a single clone of *Streptococcus agalactiae* causing disease in tilapia (*Oreochromis* sp.) cultured in Colombia over 8 years[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2015, 38(12): 1083-1087.
- [16] Jansen M D, Dong H T, Mohan C V. Tilapia lake virus: A threat to the global Tilapia industry? [J]. *Reviews in Aquaculture*, 2019, 11(3): 725-739.
- [17] Liang J Z, Huang L C, Wei M L, et al. Detection of antibiotics resistance and tetracycline resistance genes in *Streptococcus agalactiae* from tilapia in Guangxi[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2018, 49(10): 2077-2086. [梁静真, 黄立春, 韦慕兰, 等. 广西罗非鱼源无乳链球菌耐药性及其四环素耐药基因检测[J]. *南方农业学报*, 2018, 49(10): 2077-2086.]
- [18] Hu L J, Zhu S S, Peng L, et al. The harm and problem analysis of drug abuse in aquaculture[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2015, 28(2): 47-54. [胡梁及, 朱盛山, 彭亮, 等. 水产养殖中药物滥用的危害及问题分析[J]. *水产学杂志*, 2015, 28(2): 47-54.]
- [19] Lorenzen N, Lapatra S E. Immunity to rhabdoviruses in rainbow trout: The antibody response[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1999, 9(4): 345-360.
- [20] Ellis A E. Immunity to bacteria in fish[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1999, 9(4): 291-308.
- [21] Pang B J. Immunological memory and *in vitro* proliferation responses of lymphocytes of Tilapia (*Oreochromis niloticus*)[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2012. [庞碧剑. 罗非鱼免疫记忆及体外淋巴细胞增殖的研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2012.]

- [22] Daggfeldt A, Bengtén E, Pilström L. A cluster type organization of the loci of the immunoglobulin light chain in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) indicated by nucleotide sequences of cDNAs and hybridization analysis[J]. Immunogenetics, 1993, 38(3): 199-209.
- [23] Matsumoto S E, Yamashita M, Katakura Y, et al. A rapid and efficient strategy to generate antigen-specific human monoclonal antibody by *in vitro* immunization and the phage display method[J]. Journal of Immunological Methods, 2008, 332(1-2): 2-9.
- [24] Solem S T, Stenvik J. Antibody repertoire development in teleosts—a review with emphasis on salmonids and *Gadus morhua* L[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2006, 30(1-2): 57-76.
- [25] Tang M, Ma G Z, Xu J. Advances in research of fish immunology[J]. Immunological Journal, 2002, 18(S1): 112-116, 127. [唐玫, 马广智, 徐军. 鱼类免疫学研究进展[J]. 免疫学杂志, 2002, 18(S1): 112-116, 127.]
- [26] Kaattari S L, Piganelli J D. The specific immune system: Humoral defense[J]. Fish Physiology, 1996, 15: 207-254.
- [27] Pei J W, Collisson E W. Specific antibody secreting cells from chickens can be detected by three days and memory B cells by three weeks post-infection with the avian respiratory coronavirus[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2005, 29(2): 153-160.

## Detection of Nile tilapia specific antibody secreting cells induced by human IgG via ELISPOT assay

HUANG Yu<sup>1,2,3</sup>, PANG Bijian<sup>1,2,3,4</sup>, LI Qi<sup>1,2,3</sup>, WU Zaohe<sup>2,3</sup>, JIAN Jichang<sup>1,2,3</sup>

1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;
2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Animal Disease Control and Healthy Culture, Zhanjiang 524088, China;
3. Key Laboratory of Diseases Controlling for Aquatic Economic Animals of Guangdong Higher Education Institutions, Zhanjiang 524088, China;
4. Marine Environmental Monitoring Center of Guangxi, Beihai 536000, China

**Abstract:** Specific antibody secreting cells (ASC) play an important role in the immune response. In this study, to detect changes in specific ASCs in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in response to exogenous stimuli, the number of ASCs in the head kidney, peripheral blood, and spleen of this fish after immunization with human IgG was detected by enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT). The results showed that ASCs could be detected in the head kidney on day 1 after the first immunization, while ASC could be detected in the peripheral blood and spleen on day 3. The number of ASCs in the head kidney, peripheral blood, and spleen all reached their peak on day 12. While the number of ASCs in the kidney and peripheral blood was significantly reduced, that in the spleen was not significantly reduced. Subsequently, ASCs could be detected in the head kidney, peripheral blood, and spleen on day 1 after the second immunization, with the number of ASCs reaching their peak on day 9, earlier than the first immunization. In both the first and second immunizations, the number of ASCs in the head kidney tissue was the highest among the three tissues. Using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) to detect the antibody levels in serum after the first and second immunizations, the change trend was found to be the same as that of the ASCs. These results indicate that the Nile tilapia developed immune memory after the first immunization and produced more ASCs and antibodies during the second immunization. Furthermore, the head kidney was identified as the main source of ASCs. These findings provide an important scientific basis for the study of immune memory in fish.

**Key words:** Nile tilapia; antibody secreting cell; ELISPOT; antibody; immune memory

**Corresponding author:** JIAN Jichang. E-mail: jianjc@gdou.edu.cn