

文章编号:1005-8737(2001)04-0041-05

被动转移免疫在鲫感染温和气单胞菌中的作用

彭宣宪, 陈 艳, 王三英

(厦门大学 生命科学院, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘 要: 实验用鲫平均体重 100 g, 采用免疫物质被动转移试验, 探讨体液免疫在鲫感染温和气单胞菌 (*Aeromonas sobria*) 中的保护作用。结果表明, 无论免疫物质是来自异源还是自源, 是由相关的嗜水气单胞菌 (*A. hydrophila*) 诱导产生还是由攻毒的温和气单胞菌直接刺激, 均具有良好的免疫保护作用。实验还发现, 再次攻毒时, 在所有抗体组的鲫存活率为 100% 时, 全血被动转移组的死亡率高达 55.6%; 免疫前后免疫复合物发生明显变化。说明抗体在保护鲫免受温和气单胞菌的致死性感染中发挥决定性的作用。

关键词: 温和气单胞菌; 嗜水气单胞菌; 鲫; 抗体; 被动免疫

中图分类号: S943.119

文献标识码: A

目前, 鱼类细胞免疫的研究正逐步深入至细胞因子水平^[1~3], 体液免疫方面的探讨也证明免疫后血清特异性抗体水平迅速上升, 高水平的抗体与攻毒保护试验成功有一定关系^[4~7]。然而, 特异性抗体有中和与非中和之分, 只有前者才有保护作用; 攻毒保护试验虽是判断免疫保护能力的可靠方法, 但它是整体水平上的研究, 还难以对细胞和体液免疫的独立作用作出客观评价。进一步明确鱼类抗体的免疫保护能力, 无论对低等脊椎动物的免疫学理论还是对鱼类病害的免疫防治都具有十分重要的意义。国外已有一些鱼类被动免疫保护的实验研究^[8,9]。本文采用免疫物质被动转移试验, 探讨抗体在鲫感染温和气单胞菌中的保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验用鲫

鲫购自厦门博物馆菜市场, 外表健康无病, 平均

体重约 100 g。每天早晚 2 次按体重 1% 投喂人工配合饲料, 并用增氧泵增氧。驯养 7 d, 确定无异常后开始实验。实验期间控制水温 (27 ± 1)℃。

1.2 菌种及接种菌液制备

温和气单胞菌 (*Aeromonas sobria*) 和嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 购自中国科学院水生生物研究所, 试验时为本室保存菌种。复苏后转接普通斜面培养基, 28℃ 培养 24 h, 用 0.85% 无菌生理盐水洗下菌苔。在显微镜下 10 倍稀释法计数, 推算菌悬液的活菌数。按常规法测得其半数致死量 (LD_{50}) 在温和气单胞菌为 0.4×10^8 cfu/ml, 在嗜水气单胞菌为 0.4×10^{10} cfu/ml。

1.3 温和气单胞菌外毒素的提取

按文献[10]进行。将菌接种于普通肉汤培养基, 35℃ 培养 36 min; 经 10 000r/min 离心 30 min, 取上清, 加入硫酸铵至 20% 饱和度, 4℃ 静置 4 h, 同上离心, 弃沉淀, 上清中加入硫酸铵至 60% 饱和度, 同上洗涤和离心, 弃上清, 沉淀溶于 50 mmol/L Tris·HCl (pH7.8) 缓冲液中, 对相同缓冲液透析过夜, 即为粗提毒素。

1.4 外毒素对鲫的致死试验

将粗提毒素适当稀释, 在波长 260 和 280 nm 处分别测出 A 值, 利用公式 ($1.45A_{280} - 0.74A_{260}$)

收稿日期: 2000-12-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39770585); IFS 基金资助项目 (A/2338-2)

作者简介: 彭宣宪 (1954-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事免疫学和分子生物学研究。Tel: (0592) 2186392, E-mail: wangpeng@jmgxian.xmu.edu.cn

求出蛋白含量,腹腔注射8尾鲫,每尾0.6 ml(2.5 mg/ml)。对照组6尾鲫,每条注射0.6 ml生理盐水。

1.5 抗体凝集效价的检测

取血清20 μ l,以10倍为起始稀释倍数,然后用对倍稀释法稀释。稀释液与20 μ l菌悬液混合,进行凝集反应,台式摇床混匀约15 min,检测血清凝集效价。

1.6 抗体的制备和纯化

1.6.1 鱼抗温和气单胞菌抗体的制备和纯化 采用活菌免疫实验鲫,尾静脉采血法取血,每尾约1 ml,共采20尾。将所有血清混匀后,测其血清凝集效价为1:120,按江育林法提纯抗体^[11]。于血清中加入终质量分数为40%饱和硫酸铵,4℃搅拌1 h,9 000 r/min离心20 min,收集沉淀;沉淀重悬于PBS后,再用终质量分数为25%饱和硫酸铵处理,收集上清。如此重复3个轮次,最后恢复原血清体积,即为提纯抗体。

1.6.2 鸡抗温和气单胞菌抗体的制备和纯化 采用灭活菌免疫家鸡,测其血清效价为1:160,翅下静脉取血,按饱和硫酸铵四步法纯化抗体。于血清中加入等量的PBS,混匀,加入饱和硫酸铵至50%饱和度,4℃静置8 h,3 500 r/min离心30 min,重复沉淀1次;弃上清,加入2倍原体积的PBS,加入饱和硫酸铵至33%饱和度,同上静置和离心,弃上清,重复沉淀1次。所得沉淀用少量PBS溶解,于PBS中透析,最后恢复原血清体积,即为提纯抗体。

1.7 实验分组及实验方案

1.7.1 嗜水气单胞菌免疫组(嗜水气免疫组) 取浓度为 10^6 cfu/ml的嗜水气单胞菌,不灭活,直接腹腔注射20尾健康鲫,每尾0.4 ml;1周后加强免疫注射1次,检测抗嗜水气单胞菌抗体。然后,进行攻毒试验。开始注射浓度为 10^9 cfu/ml的温和气单胞菌活菌,每尾0.4 ml,连续观察10 d。10 d后,对存活鲫再次注射等量同浓度的温和气单胞菌活菌。本组与1.7.2互为对照。

1.7.2 温和气单胞菌免疫组(温和气免疫组) 取浓度为 10^6 cfu/ml的温和气单胞菌为实验细菌,其余同1.7.1。

1.7.3 鸡抗温和气单胞菌抗体被动转移组(鸡抗体被动免疫组) 取纯化鸡抗温和气单胞菌抗体,腹腔注射20尾健康鲫,每尾0.1 ml;随后,同1.7.1进行攻毒试验。

1.7.4 鱼抗温和气单胞菌抗体被动转移组(鱼抗体被动免疫温和气组) 从温和气免疫组(1.7.2)取血,提取抗体。取纯化抗体腹腔注射20尾健康鲫,每尾0.1 ml。随后,同1.7.1进行攻毒试验。

1.7.5 鱼抗嗜水气单胞菌抗体被动转移组(鱼抗体被动免疫嗜水气组) 从嗜水气组取血,提取抗体。取纯化抗体腹腔注射20尾健康鲫,每尾0.1 ml。随后,同1.7.1进行攻毒试验。

1.7.6 鱼抗温和气单胞菌血液被动转移组(鱼血液被动免疫组) 在1.7.2组取血为1.7.4组提取抗体时,同时取血抗凝,用于直接腹腔注射20尾健康鲫,每尾0.3 ml。随后,同1.7.1进行攻毒试验。

1.7.7 对照组 用 10^9 cfu/ml温和气单胞菌注射未进行免疫20尾健康鲫,每尾0.4 ml,连续观察10 d。10 d后,对存活鲫再次注射等量同浓度的温和气单胞菌活菌。

1.8 聚丙烯酰胺凝胶电泳

按文献[12]用4%和7%的PEG处理鲫血清,得上清和沉淀样品。然后,采用不连续SDS-PAGE系统进行电泳,浓缩胶为3%,分离胶为7.5%,4℃120V电泳2.5 h,考马斯亮兰染色。

1.9 统计学方法

采用卡方检测对计数资料进行显著性检验。

2 结果

2.1 死亡鲫的症状

实验发现,鲫在感染温和气单胞菌后的死亡时间在3 d左右。死亡时的症状表现为:鱼体有血斑,肛门红肿外突,鱼鳃充血,胸鳍、尾鳍、腹鳍、背鳍基部充血。肝脏棕黄色,肿大不明显;脾脏紫红色,与其他脏器有粘连;基本无腹水。

2.2 温和气单胞菌外毒素的致死作用

3 d后,8尾实验鲫均死亡,死亡症状与上述症状相同。对照组无1尾死亡。

2.4 攻毒试验

将5个试验组的同一批鱼分2次进行攻毒,依次称为初次和再次攻毒试验。结果表明,在初次攻毒时,5个试验组均有明显的保护力,其中主动免疫的2个组其保护率均为100%,而被动免疫的3个组的保护率也在90%以上,较对照组均有极显著差异。再次攻毒时,除含有细胞免疫物质的鱼血液被动免疫组的保护率仅44.4%外(且血清抗体效价明显低),其余组的保护率均为100%,相互间有非常

明显差异(表1)。

表1 攻毒的免疫保护性试验

Table 1 Immune protection against bacteria injected

分组 Group	实验鱼/尾 Sample nos.	抗体效价/ $\times$ Antibody titer	初次攻毒 First challenge				再次攻毒 Rechallenge			
			存活鱼/尾 Survival nos.	存活率/% Survival rate	免疫保护 率/% Immune protection rate	存活鲫抗 体效价/ $\times$ Antibody titer of survival fish	存活鱼/尾 Survival nos.	存活率/% Survival rate	免疫保护 率/% Immune protection rate	存活鲫抗 体效价/ $\times$ Antibody titer of survival fish
①	20	1:160	20	100*	100	232	20	100**	100	426
②	20	1:120	20	100*	100	188	20	100**	100	420
③	20	1:160	19	95*	90	163	19	100**	100	293
④	20	1:120	18	90*	80	84	18	100**	100	167
⑤	20	1:160	19	95*	90	96	19	100**	100	170
⑥	20	1:120	18	90*	80	96	8	44.4	44.4	80
⑦	20	0	10	50	—	—	10	100**	100	120

*—初次攻毒各组与对照组相比较; $P < 0.01$; The differences between test groups and control are significant in the first challenge.

**—再次攻毒各组与鱼血液被动免疫组相比较; $P < 0.01$. The differences between test groups and control are significant in the rechallenge.

①—⑦分别为嗜水气免疫组、温和气免疫组、鸡抗体被动免疫组、鱼抗体被动免疫温和气组、鱼抗体被动免疫嗜水气组、鱼血液被动免疫组和对照组。

①—⑦referring to *A. hydrophila* immune group, *A. sobria* immune group, chicken antibody passive immune group, fish antibody passive *A. sobria* immune group, fish antibody passive *A. hydrophila* immune group, fish blood passive immune group and control.

2.5 抗体效价的动态观察

图1示血清凝集效价随时间变化结果。由图1可见,其抗体效价约在第4周达到较高水平,并能稳定较长时间。

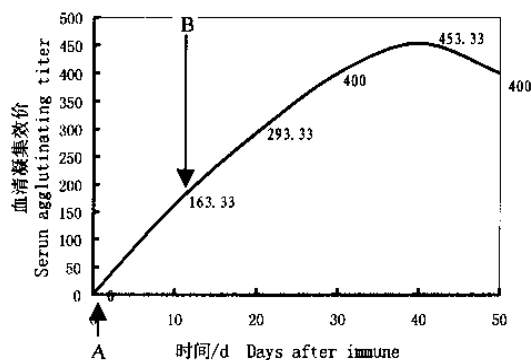


图1 鸡抗组鲫血清抗体凝集效价动态变化

Fig. 1 Trend on agglutination titer of serum antibody to *Aeromonas sobria* in Crucian carp immunized passively by chicken antibody to the bacteria.

A—第1次免疫温和气单胞菌 Injection of *Aeromonas sobria* at the first time; B—第2次免疫温和气单胞菌 Injection of *Aeromonas sobria* at the second time

2.6 血清 SDS-PAGE 分析

从免疫前后的鲫血清电泳图谱中可以发现,免疫后不管是7%PEG还是4%PEG处理的沉淀样品其条带均变宽,颜色均变深。这些结果提示,血清免疫复合物成分有明显变化^[12](图2)。

3 讨论

本文结合常规免疫后攻毒试验,研究抗体被动转移和全血被动转移的免疫保护作用。结果表明,无论免疫物质是来自异源(鸡免疫抗体)还是自源(鱼免疫抗体),是由相关细菌(嗜水气单胞菌)诱导产生还是由攻毒细菌(温和气单胞菌)直接刺激,均具有良好的免疫保护作用。其保护效果与非转移试验(主动免疫)无明显差异,而显著高于无免疫物质的对照组。Akhlaghi^[8]也证明免疫血清和纯化抗体的被动转移与主动免疫一样,对鳃弧菌的感染均有明显的保护作用。然而,通过再次攻毒试验发现,在所有抗体组存活率为100%时,全血被动转移组的死亡率高达55.6%。与抗体被动转移组相比较,全血被动转移组不但转移了细胞成分,而且也转移了与抗体被动转移组相同的抗体成分。已知从全血中一般可分离到约50%的血清,故从理论上推算全血

被动转移组的抗体含量约为抗体被动转移组的 50%。鉴于该组抗体效价仍维持在一定水平,可认为较高死亡率可能与细胞免疫有一定关系,其机理有待于进一步研究。实验还证实了温和气单胞菌外毒素对鲫的致死性作用,而已知抗毒素(抗体)在中和外毒素的毒性作用中起决定性作用。并且,免疫前后的免疫复合物发生明显变化,可能系免疫抗体与相应抗原形成了较多的免疫复合物所致。这些结果提示,抗体在保护鲫免受温和气单胞菌的致死性感染中发挥决定性的作用。



图 2 鲫免疫前后血清上清和沉淀的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 Comparison of supernatant and pellet of pre-immune sera with immune sera in Crucian carp by SDS-PAGE

- A. 7% PEG 处理后的未免疫血清上清 Supernatant from pre-immune sera treated by 7% PEG.
 B. 7% PEG 处理后的未免疫血清沉淀 Pellet from pre-immune sera treated by 7% PEG.
 C. 4% PEG 处理后的未免疫血清上清 Supernatant from pre-immune sera treated by 4% PEG.
 D. 4% PEG 处理后的未免疫血清沉淀 Pellet from pre-immune sera treated by 4% PEG.
 E. 7% PEG 处理后的免疫血清上清 Supernatant from immune sera treated by 7% PEG.
 F. 7% PEG 处理后的免疫血清沉淀 Pellet from pre-immune sera treated by 7% PEG.
 G. 4% PEG 处理后的免疫血清上清 Supernatant from immune sera treated by 4% PEG.
 H. 4% PEG 处理后的免疫血清沉淀 Pellet from immune sera treated by 4% PEG.

有关嗜水气单胞菌免疫效果的研究已有报道^[1-3]。然而实验发现嗜水气单胞菌免疫后,可以保护鲫免受温和气单胞菌的感染。这一实验结果提示,研究常见鱼病病原菌的免疫交叉保护作用,对发明多价高效的新疫苗具有重要意义。

参考文献:

- [1] Clem L W, Bly J E, Wilson M, et al. Fish immunology, the utility of immortalized lymphoid cells - A mini review[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 1996, 54(1-4):137-144.
- [2] Scapigliati G, Romano N, Abelli L, et al. Monoclonal antibodies in fish immunology: identification, ontogeny and activity of T- and B-lymphocytes[J]. Aquaculture, 1999, 172(1-2):3-28.
- [3] Verburgvankemende B M, Weyts F A A, Oebets R, et al. Carp macrophages and neutrophilic granulocytes secrete an interleukin-1-like factor[J]. Developmental Comparative Immunology, 1995, 19(1):59-70.
- [4] 彭宣宪, 章跃陵, 王三英. 几种淡水鱼血清免疫复合物的初步研究[J]. 中国水产科学, 2001, 8(3):1-4.
- [5] 范红结, 黄国庆, 陈怀青, 等. 嗜水气单胞菌疫苗的检验及免疫效力试验[J]. 畜牧与兽医, 1998, 30(6):252-253.
- [6] 罗琳, 俞开康, 孟庆显. 尼罗罗非鱼对嗜水气单胞菌的免疫反应[J]. 西南农业大学学报, 1998, 20(1):86-89.
- [7] 贺路, 曾令兵, 杨先乐. 银鲫对嗜水气单胞菌灭活菌苗的免疫应答研究[J]. 淡水渔业, 1999, 29(1):3-6.
- [8] Akhlaghi M. Passive immunisation of fish against vibriosis, comparison of intraperitoneal, oral and immersion routes[J]. Aquaculture, 1999, 180(3-4):191-205.
- [9] Akhlaghi M, Munday B L, Whittington R J. Comparison of passive and active immunization of fish against streptococcosis (enterococcosis)[J]. J Fish Dis, 1996, 19:251-258.
- [10] 涂小林, 陈承平. 嗜水气单胞菌毒素的提纯及其特性分析[J]. 微生物学报, 1992, 32(6):432-438.
- [11] 江育林, 李燕, 于平. 草鱼免疫应答的初步研究[J]. 水生生物学报, 1991, 15(4):321-326.
- [12] 彭宣宪, 高静, 贾雪芳. 脐血免疫复合物的检测及其意义[J]. 中国公共卫生学报, 1997, 16(3):187-189.

Effect of passive immunization on Crucian carp against *Aeromonas sobria*

PENG Xuan-xian, CHEN Yan, WANG San-ying

(The Key Laboratory of Education Ministry for Cell Biology and

Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Passive immunization of *Crucian carp* was conducted to evaluate the role of immune protection when the *C. carp* was infected with *Aeromonas sobria*. The immune substances came from heterogeneous source such as chicken immune antibody, or self-antibody, or the antibodies induced from *Aeromonas hydrophila* or by stimulating the challenging bacterium (*A. Sobria*) directly. The results show that the protection effects above are all better than the control (unimmune *C. carp* injected with *A. sobria*). But the rechallenge test shows that all the immune antibody groups have 100% survival rate except the whole-fish-blood immune group which has 55.6% mortality. Moreover, the immune complexes changes largely compared with pre-immune sera. It comes to the conclusion that the antibody plays a key role in protecting *C. carp* from fatal infection by *A. sobria*. It's also verified that after *A. hydrophila* immune, *C. carp* can be protected from *A. sobria*, which implies that research of immune cross protection is very significant for the invention of new vaccine.

Key words: *Aeromonas sobria*; *Aeromonas hydrophila*; *Crucian carp*; antibody; passive immune

金枪鱼 2002 – 马来西亚·吉隆坡 TUNA 2002 – KUALA LUMPUR·MALAYSIA

第七届金枪鱼交易会将于 2002 年 5 月 29~31 日在马来西亚首都吉隆坡举行。这次盛会由 INFOFISH、FAO-GLOBE-FISH、印度洋金枪鱼协会、马来西亚农业部等机构主办,由马来西亚渔业部和马来西亚渔业发展委员会协办。

由 INFOFISH 主办的历届金枪鱼交易会都被誉为金枪鱼从业人士的最高盛会,总计有近 500 个代表团来自世界 50 个不同国家。

本届交易会的中心议题为:

- 全球金枪鱼资源与供货趋势等。
- 欧洲市场:对来自 ACP 国家与非 ACP 国家金枪鱼罐头制品的供需情况。
- WTPO 与全球自愿缩减捕捞强度。
- 网络金枪鱼交易。
- 日本金枪鱼鱼糜的市场趋势与变化。
- 影响消费与进口的海产品安全问题。
- 罐装与非罐装金枪鱼制品的市场总观。
- 与生态平衡相关的环境议题。
- 金枪鱼浅红肉与白肉罐头及袋装制品在美国的最新趋势。
- 其他:共同关心的或特殊的议题。
- 金枪鱼罐头制品在亚洲的前景。

机会难得,不要错过。详情请以下方式垂询:

1) 邮寄:INFOFISH, PO Box 10899, 50728

KUALA LUMPUR MALAYSIA

2) 电话:(603)26914466

3) 传真:(603)26916804

4) Email: infish@po.jaring.my

5) 上网查询: <http://www.infofish.org>

有意参加者请复制下列表格填写并寄至上述地址:

Name: _____
Company: _____
Address: _____
Tel: _____ Fax: _____ E-mail: _____