

中华鳖体液免疫应答的初步研究

简纪常 吴婷婷 杨弘 董在杰 曹莹

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 无锡 214081)

摘要 不同季节用嗜水性单胞杆菌免疫中华鳖所产生的体液免疫应答有所不同。7~9月, 抗体效价较高, 免疫后第20 d, 效价为1:8, 免疫后第30 d, 效价为1:64, 第40 d为1:128; 而在冬春季免疫中华鳖后, 均未检测到特异性抗体。对其进行2次免疫后, 也未见抗体水平升高。还探索了纯化中华鳖血清抗体的条件和方法, 并获得高纯度抗体, 它与人IgM无免疫源性。

关键词 中华鳖, 嗜水性单胞菌, 体液免疫, 抗体

体液免疫是高等脊椎动物抵御病原微生物入侵的主要防御系统之一。爬行动物同哺乳类一样具有较强的体液免疫应答。70年代, 国外已有对龟科的陆龟、拟龟、锦龟和鳄龟等体液免疫研究的报道^[4~6,9], 但龟鳖目的鳖科动物体液免疫反应尚未见报道。中华鳖是中国鳖科爬行动物的代表种, 随着高密度和集约化养殖的发展, 鳖的病害越来越多, 几乎没有非常有效的防治方法。本文研究了最基础而又最重要的中华鳖体液免疫应答, 在不同季节合成抗体的能力以及中华鳖抗体纯化的条件等, 为提高鳖自身免疫能力以预防鳖病提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 中华鳖

自中华鳖养殖场每次购10只, 体质健壮, 体重为600~2 000 g, 雄雌皆有, 养于水族箱中备用。

1.2 抗原的制备

用无菌生理盐水洗脱嗜水性单胞菌的平板, 洗脱液经12 000 r/min离心5 min, 沉淀悬浮于生理盐水中, 制成细胞浓度 $2 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$ 的菌悬液, 加入终浓度为0.3%的福尔马林杀灭细菌, 即成抗原。

1.3 中华鳖的免疫和效价测定

在7~9月和11~4月分别取上述制备的抗原4 ml与等量佛氏完全佐剂(FCA)混匀, 对8只中华鳖作腹腔内注射, 每只1 ml。2只注射等量无菌生理盐水作对照。40 d后作2次免

收稿日期: 1997-05-15

疫。采用玻片凝集法测定血清效价,效价达 1:128 的中华鳖颈动脉放血,制备抗血清,于 -20°C 贮存备用。

1.4 鳖抗体的纯化

先用终饱和度为 50% 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 对适量的鳖抗血清进行盐析,沉淀重悬于 PBS 中,再用终浓度为 35% 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析,沉淀重悬于 PBS 中,然后于 0.01 mol/L PBS 中透析去盐,即可得抗体粗品。用 Sephadex G-200 对抗体粗品进行层析,以 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 7.4) 为洗脱液,流速 4 ml/15 min,收集含抗体的洗脱液;再用阴离子交换剂 DEAE-52 进一步纯化,先用 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液洗脱,然后用 0.015 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) + 0.5 mol/L NaCl 进行洗脱,流速 0.25 ml/min,收集含抗体部分,PEG 浓缩抗体到 2.5 mg/ml,即得抗体的纯品。

1.5 抗血清的制备

1.5.1 兔抗鳖血清的抗血清 0.3 ml 鳖血清作 5 倍稀释,与等量 FCA 混匀,对 3 只新西兰兔作背部皮内多点注射,每只 1.0 ml;10 d 后,0.5 ml 鳖血清作 3 倍稀释,与等量佛氏不完全佐剂(FIA)混匀,皮内多点注射,每只兔 1.0 ml;10 d 后,1.0 ml 鳖血清作 3 倍稀释,皮内多点注射,1 周后,耳静脉采血,测得血清效价为 1:16。然后,用 1.5 ml 鳖血清作 2 倍稀释,进行加强免疫,当血清效价达到 1:32 时,对兔进行心脏采血,制备得兔抗鳖血清的抗血清, -20°C 保存备用。1 只对照兔注射等量的无菌生理盐水。

1.5.2 兔抗鳖 IgM 的抗血清 0.3 ml 鳖 IgM 溶液与等量 FCA 混匀,对 3 只新西兰白兔进行背部皮内多点注射,每只 0.2 ml;10 d 后,0.3 ml 鳖 IgM 与等量 FIA 混匀,免疫方法同前;10 d 后,0.6 ml 鳖 IgM 溶液作皮下注射;10 d 后,测得血清抗本效价为 1:8。再用 0.9 ml 抗体作皮下注射,各 0.3 ml;14 d 后,血清效价为 1:32,1.2 ml 鳖 IgM 溶液加强免疫,每只 0.4 ml;10 d 后,心脏采血,制备兔抗鳖 IgM 的抗血清, -20°C 下保存备用。

1.6 免疫电泳

按武建国的方法^[1]进行。中间小槽内加入兔抗鳖血清的抗血清,小槽 2 侧的小孔中加入 15 μl DEAE-52 纯化的含抗体部分,沉淀带用氨基黑染色。

2 结果

2.1 中华鳖对嗜水性单胞杆菌的免疫应答

在 7~9 月,免疫后第 20 d,中华鳖产生抗体,效价为 1:8,30 d 时为 1:64,40 d 时为 1:128。但在 11~4 月的冬眠期间,均未检测到特异性抗体。在 7~9 月,免疫后 40 d,给予 2 次免疫,一直未见抗体效价升高,只维持在 1:128。

2.2 中华鳖血清抗体的纯化

先用饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀制备抗体粗品,后用 Sephadex G-200 对抗体粗品进一步层析纯化,结果见图 1。用凝集试验检测到 F I 峰中含有抗体,其它峰不存在抗体。为了得到更纯的抗体,对 F I 峰再经过 DEAE-52 阴离子交换层析进一步纯化,结果见图 2;凝集试验显示出抗体在 F II 部分。对 F II 进行免疫电泳,结果只获得单一沉淀带(图 3)。

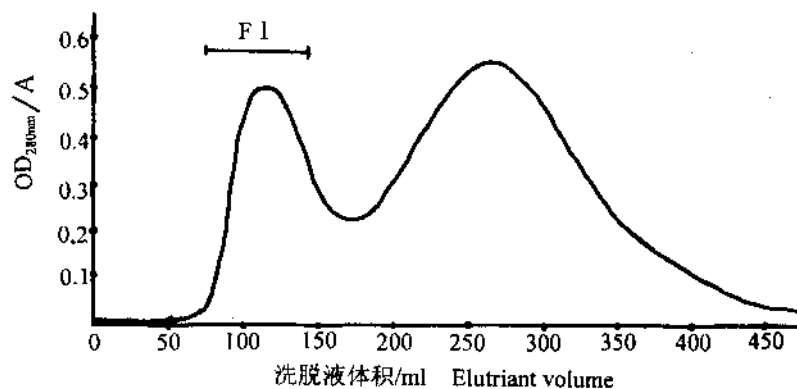


图 1 鳖抗血清经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀后的 Sephadex G-200 的层析图

Fig.1 Chromatogram of soft-shelled turtle anti-serum from sephadex G-200 column

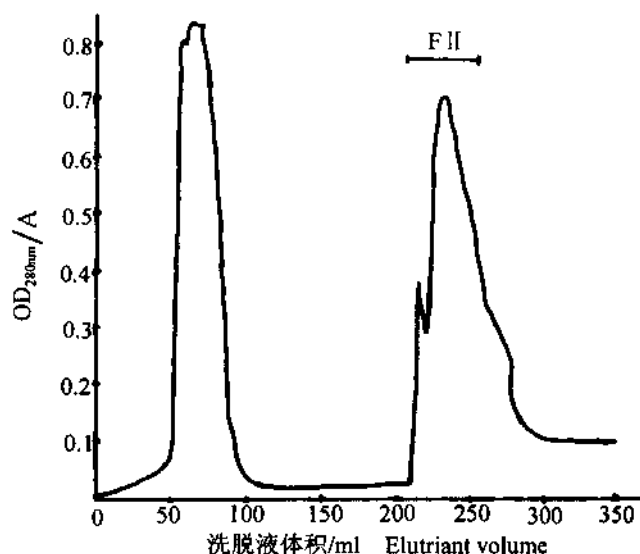


图 2 对图 1 F I 部分再用阴离子交换剂 DEAE-52 进一步纯化

Fig.2 Chromatogram of active fraction (F I, Fig.1) purified with anion exchange reagent DEAE-52 column



图 3 对经 DEAE-52 纯化的鳖抗体进行免疫电泳结果

Fig.3 Immunoelectrophoresis analysis of soft-shelled turtle antibody purified from DEAE-52 column

2.3 中华鳖抗体与人 IgM 的同源性

采用免疫扩散法测定鳖 IgM 和人 IgM 之间的同源性。鳖 IgM 只与兔抗鳖 IgM 的血清形成沉淀带, 不与羊抗人 IgM 的血清形成沉淀带(图 4-a); 人 IgM 与兔抗鳖 IgM 的血清之间也无沉淀带出现, 而人 IgM 只与羊抗人 IgM 的血清形成沉淀带(图 4-b)。

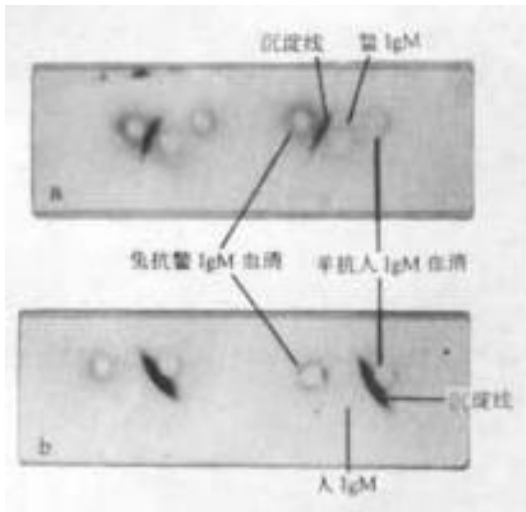


图4 鳖IgM与羊抗人IgM、兔抗鳖IgM血清(a)和人IgM与羊抗人IgM、兔抗鳖IgM血清(b)之间的免疫交叉沉淀反应

Fig.4 Immuno-crossing precipitation between soft-shelled turtle IgM and goat anti-serum against human IgM, rabbit anti-serum against turtle IgM(a), as well as human IgM and goat anti-serum against human IgM, rabbit anti-serum against turtle IgM(b)

3 讨论

养殖水体中所含的嗜水性单胞杆菌能引起淡水鱼的暴发病、鳖的出血病、红斑病等,因此本研究首选嗜水性单胞菌作抗原免疫中华鳖,研究其免疫应答能力,为鳖用疫苗的研制提供依据。简纪常^[2]的研究表明,HRP刺激中华鳖后第10 d,脾脏中有浆细胞出现;20 d时,浆细胞数量达到最高。因而本研究在用嗜水性单胞杆菌免疫中华鳖后的第20、30和40 d分别从颈静脉采血测定抗体效价。在7~9月,中华鳖有较强的体液免疫应答,随着免疫时间的延长,抗体效价逐步上升,到免疫后第40 d,抗体效价最高,达1:128;但在11~4月的冬眠期间,未检测到特异性抗体,与龟科动物合成抗体的水平相一致^[4,5]。这可能是因为在夏、秋季中华鳖活动旺盛,新陈代谢能力强,淋巴组织最发达,因而免疫系统的功能较强,抗体的合成水平较高,所以检测到的抗体效价也高。而在冬、春季中华鳖一般处于

冬眠状态,生命活动处在最低点,且淋巴组织萎缩,结缔组织增多^[3],从而导致免疫系统功能降到最低,抗体的合成也降到最低点,甚至受到抑制,至使抗体水平低于检测极限。可见,中华鳖合成抗体的能力受环境温度的影响极大,亦即中华鳖体液免疫应答有很强的温度依赖性。

7~9月第1次免疫后的第40 d,对中华鳖进行2次免疫,未发现抗体效价升高,其原因可能是中华鳖本身就缺乏2次免疫应答能力,或者是其2次免疫应答出现的时间间隔很长,以至未见抗体水平升高,或者是饲养于水族箱中,受外界环境、饲养条件的限制,使抗体合成能力下降。

用凝集试验只检测到在Sephadex G-200层析的FⅠ峰中含有特异性抗体,其它洗脱峰不含抗体,可知抗体具高分子量。这与龟在免疫早期合成高分子量的IgM抗体,免疫后期合成低分子量抗体^[6-8]有所不同。其原因可能有3种:①中华鳖血清不含低分子量抗体;②中华鳖因营养不良导致低分子量抗体合成受抑;③中华鳖抗体类型的转换需很长时间。本研究未发现中华鳖的2次免疫反应,也未分离到低分子量抗体,因而认为2次免疫可能与低分子量抗体的合成有关。对图1中FⅠ的洗脱液用DEAE-S2进一步作阴离子交换层析,凝集试验发现抗体只存在于FⅡ部分,对FⅡ峰进行免疫电泳,结果只呈现1条沉淀带,因而可断定FⅡ中只存在1种抗体,不存在其它蛋白质。这说明上述对中华鳖抗体的纯化方法有效,可获得用于抗体理化特性分析的高纯度抗体。

免疫扩散的结果表明, 鳖 IgM 和人 IgM 无抗原相似性, 即它们的 1、2 级以至更高级的蛋白质结构无同源性。目前对人抗体理化特性研究得较透彻, 而对中华鳖抗体的研究极少。因其抗体有自身的特点, 这就要我们对中华鳖抗体作更深入细致的研究, 为中华鳖病害的防治, 特别是疫苗的研制打下坚实的基础。

参 考 文 献

- 1 武建国主编. 实用临床免疫学检验. 江苏科学技术出版社, 1989
- 2 简纪常, 等. 中华鳖脾脏在 HRP 刺激下形态结构的变化. 中国水产科学, 1996, 3(1): 21~26
- 3 陈秋生, 等. 中华鳖胸腺的显微和亚显微结构研究. 南京农业大学学报, 1995, 18(3): 81~87
- 4 Maung H T. Immunity in the tortoise, *Testudo ibera*. J Pathol Bacterio, 1963, 85: 51~56
- 5 Frenzel E M, H Ambrosius. Anti-bapten antikorpenbei noiderem wirbeltieren. Acta Biol Med Ger, 1971, 26: 165~171
- 6 Chartrand S L, et al. The evolution of the immune response. X II. The immunoglobulins of the turtle, molecular requirements for biologic activity of the 5.7 s immunoglobulin. J Immunol, 1971, 107: 1~11
- 7 Coe T E. Immune response in the turtle, *Chrysemys picta*. J Immunol, 1972, 23: 45~52
- 8 Grey J M. Phylogeny of the immune response, studies on some physical, chemical and serological characteristics of antibody production in turtle. J Immunol, 1963, 91: 819~825
- 9 Lielie G A, Clem L W. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. V 1. 17 s, 7.5 s, and 5.7 s anti-DNP of the turtle, *Pseudemys scripta*. J Immunol, 1972, 108: 1656~1664

Preliminary studies on humoral immune response of soft-shelled turtle

Jian Jichang Wu Tingting Yang Hong Dong Zaijie Cao Ying

(Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081)

Abstract The soft-shelled turtle has different humoral immune response to *Aeromonas hydrophilla* in different seasons. The titers of antibodies are higher during July to Sep. . The titers are 1:8, 1:64 and 1:128 on day 20, 30, 40 after immunization respectively, but no special antibody is detected in the soft-shelled turtle immunized with *Aeromonas hydrophilla* in spring and winter. After second immunization the titer isn't higher. Some purificating methods and conditions of serum antibody of the soft-shelled turtle are also researched. A kind of pure antibody has been isolated, which has no immune homology with human IgM.

Key words *Trionyx sinensis*, *Aeromonas hydrophilla*, humoral immunization, antibody