

文章编号:1005-8737(2000)02-0028-04

指状拟舟虫诱导牙鲆抗血清免疫球蛋白分析

周丽, 战文斌, 宋微波, 俞开康

(教育部水产养殖开放试验室, 青岛海洋大学, 山东 青岛 266003)

摘要:对引起牙鲆体表溃烂的病原纤毛虫—指状拟舟虫诱导牙鲆免疫反应产生的免疫球蛋白 IgM 进行分析, 结果表明, 病原纤毛虫免疫注射牙鲆, 可诱导牙鲆发生特异性免疫反应, 产生抗体。牙鲆抗指状拟舟虫血清的凝集试验, 发现纤毛虫停止游动并发生虫体聚集; 抗血清经与标准分子量和鼠 IgM 单克隆抗体以及对照血清的 SDS-PAGE 电泳比较分析证明, 牙鲆抗指状拟舟虫血清免疫球蛋白 IgM 重链分子量为 71 000, 轻链分子量为 23 000; IgM 为四聚体, 分子量为 752 000。

关键词:牙鲆; 指状拟舟虫; 纤毛虫; 免疫球蛋白

中图分类号:S943.3

文献标识码:A

在牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 工厂化养殖过程中, 牙鲆体表发生经常溃烂且危害严重。1986 年日本首次报道牙鲆体表溃烂病的病原是一种海洋兼性寄生盾纤类纤毛虫 (Scuticociliatid ciliate)—指状拟舟虫 (*Paralembus digitiformis* Kahl, 1933)^[1], 它可寄生于牙鲆体表皮肤甚至脑, 引起牙鲆幼鱼大量死亡^[2]。

关于鱼类对纤毛虫免疫的研究, 报道较多的是多子小瓜虫 (*Ichthyophthirius multifiliis*) 对淡水鱼免疫应答的影响^[3~6]。经多子小瓜虫免疫的鲶鱼血清, 可使多子小瓜虫纤毛虫停止游动并发生聚集^[7,8]。诱导鲶产生阻止纤毛虫游动抗体的抗原称作阻动抗原 (i-antigens), 存在于纤毛虫的皮膜和内质中, 富含表面膜蛋白。

纤毛虫诱导海水鱼免疫反应的研究则报道较少。Watts^[9]从患脑炎的兰鳍金枪鱼分离出一种盾纤类纤毛虫尾丝纤虫 (*Uronema* sp.), 用尾丝纤虫注射免疫兔, 获得兔抗尾丝纤虫多克隆抗血清, 建立

了尾丝纤虫间接荧光抗体检测技术; Yoshinaga^[10]报道, 刺激隐核虫 (*Cryptocaryon irritans*) 可诱导海水鱼 *Mummichog* (*Fundulus heteroclitus*) 发生免疫反应产生抗血清, 经免疫的鱼对刺激隐核虫的攻击具有保护性, 该抗血清在滴度为 $2^4 \sim 2^7$ 时可阻止刺激隐核虫纤毛幼虫游动并发生凝集反应。

目前, 盾纤类纤毛虫引起海水鱼类疾病还没有有效药物防治^[11]。本研究以牙鲆体表溃烂综合症的病原纤毛虫—指状拟舟虫免疫牙鲆, 获得多克隆抗血清, 利用凝集反应检测血清抗体的产生并经 SDS-PAGE 分析研究了牙鲆的免疫球蛋白 IgM 特性。这在牙鲆对盾纤类纤毛虫免疫研究方面尚属首次, 旨在为今后研究海水鱼类对纤毛虫免疫应答反应提供参考依据, 并为海水纤毛虫疫苗的研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验鱼

人工养殖健康牙鲆, 体重 300~450 g, 体长 28~36 cm。试验前先暂养 7 d, 分对照组和免疫组, 每组 3 尾。水温 24℃ 左右, pH 8.0~8.1, 盐度 32.67。每日换水 1 次, 连续充气。每日按鱼体重的 1% 投喂饲料。

收稿日期: 1999-07-19

基金项目: 国家重点基础研究规划资助项目 (G1999012002); 教育部重点课题资助项目 (99184); “长江学者奖励计划”资助项目。

作者简介: 周丽 (1963-), 女, 山东青岛人, 青岛海洋大学副教授, 从事水产养殖动物病害学研究。

1.2 抗原的制备

经人工培养的纤毛虫, 离心收集, 过滤灭菌海水反复冲洗离心(1 000 r/min, 5 min), 弃上清液, 制成 $12\ 000\ \text{ml}^{-1}$ 的虫悬液, 分装, -20°C 保存备用。

初次免疫使用福氏完全佐剂, 加强免疫使用福氏不完全佐剂。佐剂与抗原(1:2)混合成粘稠的似酸奶样乳剂。

1.3 免疫方法

将免疫组、对照组置于 $2\ \text{m}^3$ 水泥池中饲养。免疫组分腹腔注射和肌肉多点注射 2 种方法, 对照组分别注射灭菌生理盐水。初次注射免疫后的第 7 天和第 14 天, 分 2 次进行加强注射免疫。注射剂量为 $0.6\ \text{ml}/\text{尾}$ 。

1.4 免疫血清采集

在第 2 次加强注射免疫后的第 3、7、14 天, 分 3 次取血。将鱼捞出, 放入洁净的瓷盘中, 用 75% 酒精棉球消毒取血部位, 用灭菌注射器在牙鲆近尾柄处取血, 注入灭菌 $10\ \text{ml}$ 离心管, 封存。

1.5 分离血清

将盛血液的离心管略倾斜静置 2 h, 待血液凝固后, 再置入 4°C 冰箱, 过夜, 使血清充分析出。用滴管沿离心管壁轻轻拨离血凝块。吸取血清, 滴入无菌 $1.5\ \text{ml}$ 离心管, 离心($2\ 000\ \text{r}/\text{min}$, $20\ \text{min}$), 取上清液, 即得抗血清。分装, -20°C 保存。

1.6 凝集反应

利用玻片法, 吸取制备的病原纤毛虫抗血清和实验室培养的纤毛虫液滴于洁净的凹玻片上, 显微镜下观察。

1.7 SDS-PAGE

采用解离非连续缓冲系统垂直板电泳。丙烯酰胺体积分数: 分离胶 10%, 浓缩胶 4.75%, 每孔内加样品 $20\ \mu\text{l}$ 。稳流条件下, 起始时用低电流($30\sim 40\ \text{mA}$), 待样品在浓缩胶部分浓缩成一条线后, 加大电流($50\sim 70\ \text{mA}$), 电泳 2 h。用考马斯亮蓝 R500 染色。所测抗血清与鼠 IgM 单克隆抗体(重链分子量 $72\ 000$; 轻链分子量 $25\ 000$)、标准蛋白 Mark(分子量 $205\ 000$ 、 $116\ 000$ 、 $97\ 000$ 、 $66\ 000$ 、 $45\ 000$ 、 $29\ 000$) 同时电泳。

1.8 蛋白质分子量测定

以标准分子量蛋白同时电泳, 电泳完毕测定标准蛋白 Rf 值。以 Rf 为横坐标, 标准蛋白分子量的对数值为纵坐标, 绘制标准曲线。测定样品蛋白带的移动距离, 计算其 Rf 值, 从标准曲线上查得未知

蛋白质分子量的对数值并计算其分子量。

2 结果

2.1 玻片直接凝集反应

分别取腹腔免疫注射和肌肉免疫注射后第 3 次取血血清各 1 滴, 与纤毛虫液 1 滴混合, 显微镜下观察, 10 min 后纤毛虫缓缓游动; 15 min 后多数虫体沉于凹玻片底部停止游动, 少数虫体缓缓游动; 20 min 后纤毛虫停止游动并出现虫体聚集现象(图 1)。

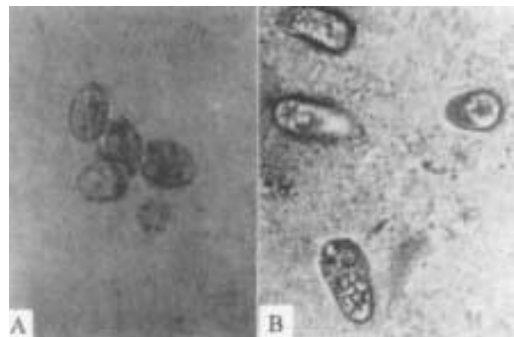


图 1 A. 指状拟舟虫在免疫血清中发生聚集; B(对照)在正常血清中未发生聚集

Fig. 1 Immobilization of *Paralembus digitiformis* in the sera of immunized(A) and control(B) Japanese flounders

2.2 SDS-PAGE 电泳

病原纤毛虫免疫牙鲆, 肌肉免疫注射第 1 次、第 2 次、第 3 次取血抗血清分别用 J1、J2、J3 表示; 同样腹腔免疫注射依次取血抗血清用 F1、F2、F3 表示。

图 2 从左至右各泳道分别为鼠 IgM 单克隆抗体、腹腔免疫注射血清、标准蛋白 Mark、肌肉免疫注射血清。由图 2 可见, 牙鲆抗血清在鼠 IgM 单克隆抗体重链($72\ 000$)与第 4 条标准蛋白带($66\ 000$)之间, 出现 1 条明显的蛋白带, 根据其迁移距离, 由标准曲线计算其蛋白分子量大约为 $71\ 000$, 推测该蛋白带为所测牙鲆抗血清免疫球蛋白 IgM 的重链。同时, 比较图 3(正常鱼血清、鼠 IgM 单克隆抗体、J1、J2、J3、F1、F2、F3)可见, 正常鱼血清在蛋白分子量 $71\ 000$ 位置左右无蛋白带出现; 免疫血清(J1、J2、J3、F1、F2、F3)在鼠 IgM 单克隆抗体轻链($25\ 000$)电泳位置均出现 1 条蛋白带, 根据其迁移距离, 由标准曲线计算其蛋白分子量大约为 $23\ 000$, 推测该蛋白带为所测抗血清 IgM 的轻链。推算牙鲆抗

血清免疫球蛋白 IgM 每个单体的分子量为 188 000 ($71\ 000 \times 2 + 23\ 000 \times 2$); 4 个单体的分子量为 752 000 ($188\ 000 \times 4$)。

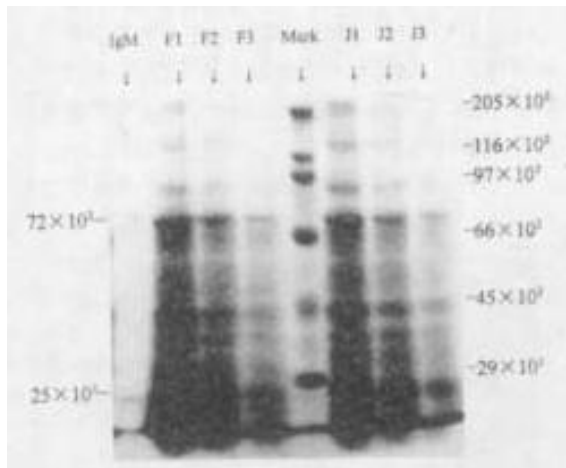


图 2 抗血清与鼠 IgM 单克隆抗体和标准蛋白电泳
Fig.2 SDS-PAGE of IgM, Mark and sera against *Paralembus digitiformis* in Japanese flounder

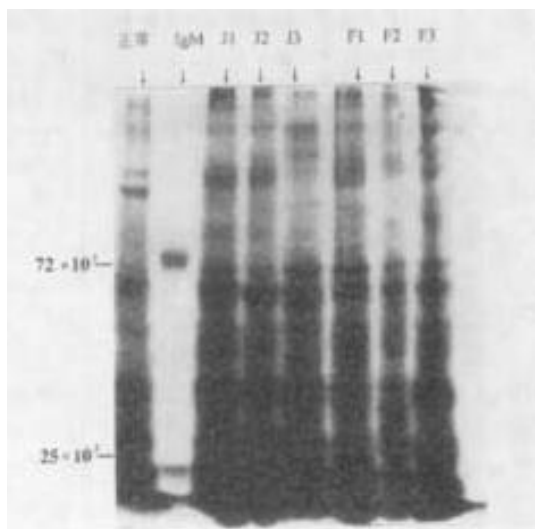


图 3 抗血清与正常血清和鼠 IgM 单克隆抗体电泳
Fig.3 SDS-PAGE of control sera, IgM and sera against *Paralembus digitiformis* in Japanese flounder

3 讨论

由指状拟舟虫诱导牙鲆血清可使纤毛虫停止游动并发生聚集,推断指状拟舟虫具有与多子小瓜虫类似的表面阻动抗原,免疫注射后,牙鲆产生了抗指

状拟舟虫表面抗原的免疫球蛋白。但由于免疫牙鲆获得的抗血清量较少,无法将少量的抗血清进行提纯。因此,只有结合凝集试验、SDS-PAGE 电泳分析来判断牙鲆对指状拟舟虫诱导产生的免疫球蛋白 IgM。试验表明,所设计的病原纤毛虫抗原的制备、免疫途径、免疫方法、免疫剂量等对诱导牙鲆的免疫反应是有效的,可诱导牙鲆发生特异性免疫反应,产生免疫球蛋白 IgM。

目前多数人认为,硬骨鱼类只有 1 种免疫球蛋白(Ig),即 IgM 是由 2 条重链和 2 条轻链所组成的单体,在血清中通过连接键“J”将 4 个单体结合成四聚体^[12]。牙鲆血清中免疫球蛋白(Ig)的含量占血清总蛋白含量的 4%^[13]。Nishida 报道^[14]牙鲆 IgM 的分子量在非还原下的 3% SDS-PAGE 电泳为 750 000,在还原后的 SDS-PAGE 电泳显示重链(H 链)分子量为 75 000、轻链(L 链)为 23 000,每个单体分子量为 196 000,4 个单体的分子量为 784 000,推断牙鲆的 IgM 为四聚体。

本试验牙鲆抗指状拟舟虫血清,经还原后的 SDS-PAGE 电泳,辅以标准蛋白 Mark、鼠 IgM 单克隆抗体及未免疫牙鲆血清同时电泳,根据所测抗血清电泳蛋白带位置,对照标准蛋白 Mark 及其标准曲线,参考鼠 IgM 单克隆抗体重链分子量和轻链分子量,推断牙鲆抗指状拟舟虫血清免疫球蛋白 IgM 的重链分子量为 71 000、轻链分子量为 23 000,每个单体的分子量为 188 000,四聚体的分子量为 752 000,与 Nishida^[14]报道的非还原下电泳结果(750 000)非常接近,推测本试验牙鲆抗指状拟舟虫血清免疫球蛋白 IgM 为四聚体。

参考文献:

- [1] 周 丽. 牙鲆体表溃烂综合症的研究[D]. 青岛: 青岛海洋大学, 1999.
- [2] Ototake M, et al. Notes on Scuticociliata infection of cultured juvenile flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Bull Nat Res Inst Aquaculture, 1986, 9: 65 - 68.
- [3] Dickerson H W, et al. Immune response of fishes to ciliates[J]. Ann Rev Fish Dis, 1996, 6: 107 - 120.
- [4] Clark T G, et al. In vitro response of *Ichthyophthirius multifiliis* to sera from immune channel catfish[J]. J Fish Biol, 1987, 31 (Supplement A): 203 - 208.
- [5] Hines R S, et al. Ichthyophthiriasis in the mirror carp *Cyprinus carpio* L. acquired immunity[J]. J Fish Biol, 1974, 6: 373 - 378.
- [6] McCallum H I. Acquired resistance of black mollies (*Poecilia latipinna*) to infection by *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. Par-

- asitology, 1986, 93:251 - 261.
- [7] Clark T G, et al. Immune response of channel catfish to ciliary antigens of *Ichthyophthirius multifiliis*[J]. Dev Comp Immunol, 1988, 12:203 - 208.
- [8] Dickerson H W, et al. *Ichthyophthirius multifiliis* has membrane - associated immobilization antigens[J]. J Protozool, 1989, 39 (4):159 - 164.
- [9] Watts M, et al. The development of a fluorescent antibody stain to identify a *Uronema* sp. (Ciliophora, Scuticociliatida) implicated in fatal encephalitis in southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) [J]. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 1996, 16(3):104 - 108.
- [10] Yoshinaga T, et al. Acquired protection and production of immobilization antibody against *Cryptocaryon irritans* (Ciliophora, Hymenostomatida) in Mummichog (*Fundulus heteroclitus*) [J]. Fish Pathol, 1997, 32(4):229 - 230.
- [11] 周 丽, 等. 环境因子及药物对牙鲆盾纤类纤毛虫病病原纤毛虫的影响[J]. 海洋湖沼通报, 1997, 4:55 - 61.
- [12] 钟明超, 等. 硬骨鱼类胚胎和胚后发育阶段的免疫机制[J]. 中国水产科学, 1996, 3(3):96 - 102.
- [13] Furuta T, et al. Indirect Enzyme - Linked Immunosorbent Assay for the detection of antibody in serum of Japanese flounder [J]. Fish Sci, 1995, 61(4):663 - 667.
- [14] Nishida H, et al. Purification of Immunoglobulin M (IgM) in serum of Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. 北海道大学水产学报, 1998, 49(3):157 - 164.

Analysis of immunoglobulin M (IgM) in serum of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*

ZHOU Li, ZHAN Wen-bin, SONG Wei-bo, YU Kai-kang

(Aquaculture Research Laboratory, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China)

Abstract: The immune response of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) against antigen of *Paralembus digitiformis* was detected. Agglutination test and SDS - PAGE were used respectively to investigate the serum antibody response in flounder injected with frozen - killed ciliates. The sera from immunized fish with the ciliated protozoan, *Paralembus digitiformis*, immobilized the parasite and caused the parasites agglutinated in vitro by agglutination test. The antiserum was analyzed by SDS - PAGE and proved that IgM had produced in the serum of immunized flounder. The molecular weights of the 2 subunits (H - chain and L - chain) of Japanese flounder IgM were estimated 71 000 and 23 000 respectively, by SDS - PAGE with 2 - mercaptoethanol. The molecular weight of Japanese flounder IgM was determined to be 752 000.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; *Paralembus digitiformis*; ciliate; IgM