

·研究简报·

鲤肠粘液与血清中免疫球蛋白的比较研究

Comparative studies on the immunoglobulin in intestine mucus and serum of *Cyprinus carpio*

杨桂文 安利国 王长法 温武军

(山东师范大学生物系, 济南 250014)

Yang Guiwen An Liguang Wang Changfa Wen Wujun

(Department of Biology of Shandong Normal University, Jinan 250014)

关键词 鲤, 免疫球蛋白, 血清, 肠粘液

Key words *Cyprinus carpio*, immunoglobulin, serum, intestine mucus

鱼类肠道中存在大量粘液, 而其中所含的免疫球蛋白无疑对体内以血清 IgM 为中心的免疫系统是一个补充, 在鱼类免疫中起着重要的作用。目前人们已从多种鱼类的肠粘液中分离提取了免疫球蛋白^[1,2], 但至今未见对鲤肠粘液中免疫球蛋白研究的报道。由于鲤是我国的主要淡水养殖鱼类之一, 对其肠粘液与血清中免疫球蛋白进行比较研究, 不仅有助于全面了解鱼类的特异性体液免疫机制, 而且将会对鱼类病害口服疫苗的免疫防治提供重要理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

鲤 20 尾, 每尾重约 0.5 kg, 取自莱芜雪野水库。

1.2 免疫球蛋白的提取

1.2.1 血清免疫球蛋白的提取 将鲤断尾取血, 收集血液, 置室温 1h 后, 于 4℃ 冰箱放置 3 h, 待血清充分析出后, 3000 r/min 离心 15 min, 收集上清液(约 50 ml 血清), 45% 饱和硫酸铵沉淀, 4℃ 冰箱过夜, 次日, 10 000 r/min 离心 10 min (4℃), 收集沉淀, 用 25 ml 0.05 mol/L pH 8.0 的 Tris·HCl 缓冲液将沉淀溶解, 用 0.02 mol/L pH 8.0 的 Tris·HCl 缓冲液透析 24 h, 中间换缓冲液 3 次, 层析(Sephadex G-200), 洗脱液为 0.02 mol/L pH 8.0 Tris·HCl 缓冲液(含 2% NaCl), 洗脱速度为 20 ml/h, 收集速度为每只试管 10 min。收集第 1 峰, 即为血清 IgM^[3]。

1.2.2 肠粘液免疫球蛋白的提取 取采过血的鱼肠, 仔细剔除肠系膜和血管, 用 0.6% 的生理盐水洗净, 剪成小段, 再纵向剪开, 浸入 0.6% 生理盐水中, 4℃ 温和搅拌 3 h。9000 r/min 离心 30 min (4℃), 取上清液, 用 0.02 mol/L pH 8.0

Tris·HCl 缓冲液透析 24 h, 层析(条件同上)。收集第 1 峰, 即为鲤肠粘液 IgM^[4]。

1.2.3 人免疫球蛋白工作标准液层析 将含 IgM、IgA、IgG 的人免疫球蛋白工作标准液(兰州产)按上述相同条件进行 Sephadex G-200 层析。

1.3 高效液相色谱(HPLC)分析

1.3.1 不解离免疫球蛋白的 HPLC 分析 将收集到的鲤血清免疫球蛋白、肠粘液免疫球蛋白及人 IgM 在 Shimadzu LC-6A 高效液相色谱分析仪上进行 HPLC 分析, DIOL-150 柱, 工作温度 25℃, 紫外检测波长为 280 nm, 流动相为 10 mmol/L pH 7.0 PBS(含 0.2 mol/L NaCl 和 0.01% 叠氮化钠), 流动相流速为 1 ml/min, 进样量为 20 μl。

1.3.2 解离免疫球蛋白的 HPLC 分析 将收集到的鲤血清免疫球蛋白、肠粘液免疫球蛋白及人 IgM 参照《实验免疫学》上的方法经巯基乙醇处理使免疫球蛋白解离^[5], 然后进行 HPLC 分析(条件同上)。

1.4 鲤免疫球蛋白的免疫原性分析

1.4.1 抗血清的制备 参照《实验免疫学》方法将提纯的鲤血清免疫球蛋白、肠粘液免疫球蛋白分别与福氏完全佐剂制成抗原-福氏完全佐剂乳化剂(免疫球蛋白含量为 0.5 mg/ml), 在兔的四足掌处每次各注射 0.5 ml, 每隔 7 d 注射 1 次, 共注射 5 次。测其效价, 若大于 32, 心脏穿刺取血, 收集抗血清。

1.4.2 双向免疫扩散试验 参照《实验免疫学》方法进行双向免疫扩散试验。

2 结果与讨论

2.1 免疫球蛋白的理化性质分析

从提纯免疫球蛋白的 HPLC 层析分析中可以看出, 肠粘液及血清 IgM 都呈单一对称峰, 并且每个峰在柱中的保留

收稿日期: 1998-07-27

时间大致相同(肠粘液 IgM 为 4.971 min, 血清 IgM 为 4.883 min), 接近人 IgM 的保留时间(4.742 min)。图 2 为提纯的鲤免疫球蛋白及人 IgM 经巯基乙醇处理后的 HPLC 色谱图, 可以看出, 除在原有 IgM 峰的位置上继续留有 1 个较小峰外, 在其后每组免疫球蛋白都新出现 2 个明显的峰, 显然是经巯基乙醇处理后, 免疫球蛋白解离为重链和轻链, 所以出现 2 个新峰, 它们分别为重链峰和轻链峰(2 峰的保留时间肠粘液 IgM 为 9.625 min 和 10.592 min、血清 IgM 为 9.

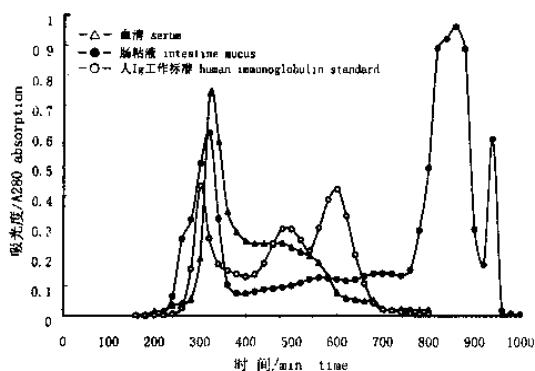


图 1 鲤肠粘液、血清及免疫球蛋白工作标准液层析图

Fig.1 The Sephadex G-200 gel filtration of carp intestine mucus, serum and human immunoglobulin standard

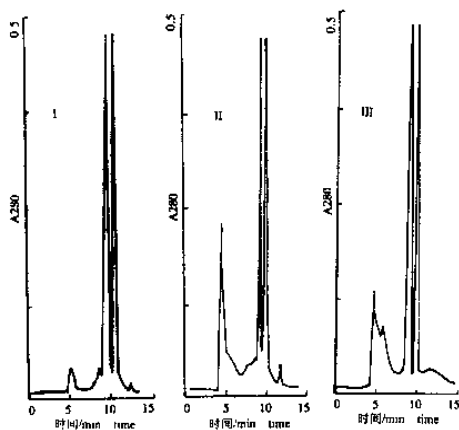
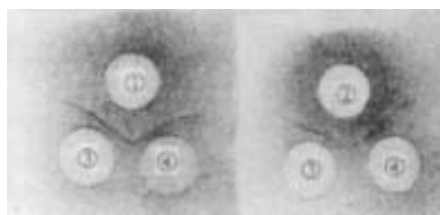


图 2 提纯的鲤肠粘液(I)、血清免疫球蛋白(II)及人 IgM (III)经巯基乙醇处理后的 HPLC 层析图

Fig.2 The HPLC of reduced immunoglobulin in carp intestine mucus, serum and human IgM

472 min 和 10.462 min、人 IgM 为 9.150 min 和 10.658 min)。此结果表明, 过 Sephadex G-200 收集到的免疫球蛋白是比较纯的; 鲤肠粘液免疫球蛋白与其血清中免疫球蛋白分子量相近, 略低于人 IgM。解离后重链的分子量也基本一致, 同人解离后的重链相近(图 1, 2)。我们的结果与不少研究者的结果是一致的, 如 Fletcher 对鳃肠粘液免疫球蛋白及 Agius 对硬头鳟肠粘液免疫球蛋白进行分离, 都得到了与其血清免疫球蛋白相同的层析峰^[1,2]。



1 兔抗鲤肠粘液 IgM 的抗血清 Rabbit-anti-carp intestine mucus IgM; 2 兔抗鲤血清 IgM 的抗血清 Rabbit-anti-carp serum IgM; 3 血清 IgM Carp serum IgM; 4 肠粘液 IgM Carp intestine IgM.

图 3 免疫沉淀反应图

Fig.3 Ouchterlony comparison of carp serum and intestine mucus immunoglobulin

2.2 鲤免疫球蛋白免疫原性分析

抗鲤血清 IgM 的抗血清清除与鲤血清免疫球蛋白发生沉淀反应外, 也可与肠粘液中免疫球蛋白发生沉淀反应, 并且沉淀线之间互相融合, 不出现交叉或部分交叉现象。抗鲤肠粘液 IgM 的抗血清清除与鲤肠粘液 IgM 有沉淀反应外, 也可与血清中免疫球蛋白发生沉淀反应, 并且沉淀线之间互相融合, 同样出现交叉或部分交叉现象(图 3)。结果表明, 鲤肠粘液免疫球蛋白具有与其血清免疫球蛋白的免疫原性相同的成分。

参 考 文 献

- 1 Fletcher T C, White A. Antibody production in the plaice (*Pleuronectes platessa*) after oral and parenteral immunization with *Vibrio anguillarum* antigens. *Aquaculture*, 1973, 8:417~428
- 2 Agius C, Horne M T, Ward P D. Immunization of rainbow trout *Salmo gairdneri* richardson against vibrosis; comparison of an extract antigen with whole cell bacterins by oral and intraperitoneal routes. *J Fish Dis*, 1983, 6:129~134
- 3 Kobayashi K, et al. Isolation and characterization of immunoglobulin of hagfish, *Eptatretus burgeri*, a primitive vertebrate. *Molecular Immunol*, 1985b, 22(9):1 091~1 097
- 4 Lobb C J, Clem L W. Immunoglobulin light chain classes in a teleost fish. *J Immunol*, 1984, 132(4):1 917~1 922
- 5 北京医学院微生物学教研室编. 实验免疫学. 北京: 人民卫生出版社, 1980