

文章编号:1005-8737(2001)03-0001-04

几种淡水鱼血清免疫复合物的初步研究

彭宣宪, 章跃陵, 王三英

(厦门大学 生命科学学院, 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:采用 SDS-PAGE 技术和免疫酶斑点法(Dot-ELISA), 对罗非鱼、草鱼、鲫、鳊和鲤 5 种淡水鱼的血清免疫复合物(IC)进行了研究。结果表明, 鲤科的 4 种鱼之间的电泳条带差异较小, 丽鱼科的罗非鱼与鲤科的 4 种鱼之间的电泳条带有差异但较小。2%PEG 能较好地沉淀 5 种鱼血清 IC, 且不同鱼血清 IC 含量有一定的差异。

关键词:淡水鱼; 免疫复合物; SDS-PAGE; 免疫酶斑点法

中图分类号: S941

文献标识码: A

免疫复合物(Immune complex, IC)是抗原抗体相结合的产物, 是免疫学研究的重要内容之一^[1]。IC 的免疫球蛋白是结合了抗原的抗体, 在体液免疫中起重要作用。在人类疾病和一些动物疾病的研究中, 有关 IC 的报道很多^[2-4], 认为不但可作为疾病诊断、鉴别诊断、发病机理研究和预后判断的良好指标^[5], 而且对 IC 的监测还可以估价机体的免疫功能状态^[5,6]。但在鱼类免疫学研究领域, 关于 IC 的研究报道甚少。研究鱼血清 IC 对于从免疫学角度探讨鱼病的诊断和治疗、鱼类免疫的机制以及抗体在鱼类体液免疫中的作用都有积极意义。因此, 本文采用 SDS-PAGE 技术和免疫酶斑点法(Dot-ELISA), 以常见淡水养殖经济鱼类为研究对象, 对 5 种淡水鱼血清 IC 进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 实验鱼

罗非鱼、草鱼、鲫、鳊和鲤 5 种淡水鱼均购自厦门市水产销售市场, 每种鱼各取 5 尾, 尾静脉采血

取血, 常规分离血清, 混匀, 于 -20℃ 保存备用。

1.2 样品制备

1.2.1 全血清稀释样品 用 0.01 mol/L, pH 7.4 PBS 将上述血清按 1:7 稀释即为全血清稀释样品。

1.2.2 2%PEG 上清和 2 种 2%PEG 沉淀样品 取 0.5 ml 血清, 加入 1.25 ml PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)混匀; 再加入 1.75 ml 4% PEG 混匀, 4℃ 过夜; 3 500 r/min 离心 20 min 取上清(即为 2%PEG 上清样品)。沉淀用 1.25 ml PBS 和 1.25 ml 4% PEG 悬浮混匀后, 4℃ 过夜; 3 500 r/min 离心 20 min, 溶解沉淀(用 100 μl PBS 溶解), 并一分为二(每份 50 μl), 一份直接用于电泳(即为 2%PEG 沉淀 a); 另一份用 450 μl PBS 和 500 μl 4% PEG 同上处理, 所得沉淀继续用 500 μl PBS 和 500 μl 4% PEG 处理, 最后将沉淀用 30 μl PBS 溶解(即为 2%PEG 沉淀样品 b)。

1.2.3 免疫酶斑点法(Dot-ELISA)点样样品 用 0.01 mol/L, pH 7.4 PBS 将上述沉淀样品 b 按 1:5, 1:25, 1:125 稀释即为 Dot-ELISA 点样样品。

1.3 HRP-鸡抗草鱼抗体制备

1.3.1 草鱼 IgM 的提纯 采用江育林^[7]的硫酸铵分级沉淀法提纯正常草鱼血清中的 IgM。

1.3.2 鸡 IgG 抗草鱼 IgM 将纯化 IgM 按常规方法免疫鸡, 分离抗血清, 采用 DEAE-硫酸盐析法提

收稿日期:2000-07-24

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, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事免疫生物学研究。

Tel:0592-2186392, E-mail: wangpeng@jingxian.xmu.edu.cn

纯鸡 IgG 抗草鱼 IgM。

1.3.3 HRP-鸡 IgG 抗草鱼 IgM 采用简易过碘酸钠法将辣根过氧化物酶(HRP)标记到鸡 IgG 抗草鱼 IgM 上。

1.4 电泳及显色

采用 SDS-PAGE 垂直平板法,分离胶为 10%,浓缩胶为 4%。先 70 V 恒压约 50 min,待样品进入分离胶后,120 V 恒压 120 min 电泳。按常规考马斯亮蓝染色。

1.5 Dot-ELISA

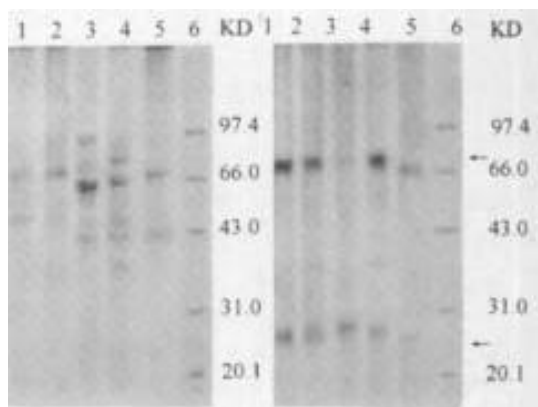
取硝酸纤维素膜用 0.02 mol/L、pH 7.4 TBS 浸泡 5 min,晾干,将样品点滴在 NC 膜上(1 μ l),用含 5% 脱脂奶粉的 TBS 37℃ 封闭 1 h, TBS 洗涤 3 $\times$ 5 min;将膜移至稀释度为 1:100 的 HRP-鸡 IgG 抗草鱼 IgM 中 37℃ 2.5 h;TTBS 洗涤 3 次,每次 10 min, TBS 洗涤 3 次,每次 5 min;DAB 显色;GDS 8000pc-凝胶成像分析系统扫描,打印输出照片。

2 结果

2.1 5 种鱼血清及其各组分间的电泳图谱

对 5 种鱼的 4 种实验样品进行 SDS-PAGE 分析,结果见图 1、图 2。从电泳图谱可以看出,不同鱼全血清的条带的数量和位置差异不大;5 种鱼的全血清、2% PEG 上清、2% PEG 沉淀 a 及 2% PEG 沉

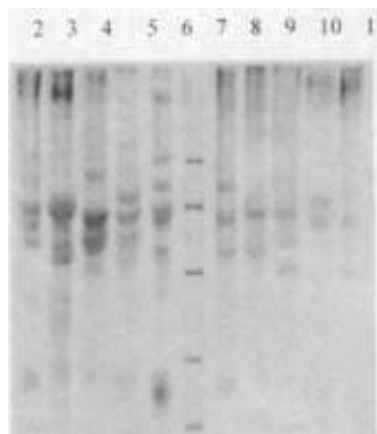
淀 b 之间条带的变化趋势均为依次逐渐减少。在全血清和 2% PEG 上清之间,5 种鱼条带均明显的减少;在 2% PEG 上清与 2% PEG 沉淀 a 之间,罗非鱼、草鱼变化较大,鲤、鳊、鲫变化很小;在 2% PEG 沉淀 a 与 2% PEG 沉淀 b 之间,条带均减少。但在 2% PEG 沉淀 b 的图谱上,5 种鱼均有 2 条位置相近的条带(箭头标记),一条带在 80.0 kD 左右,另一条带在 25.0 kD 左右。



1. 鳊 *A. nobilis*, 2. 鲤 *C. carpio*, 3. 草鱼 *C. idellus*, 4. 罗非鱼 *Tilapia*, 5. 鲫 *C. auratus*; 6. Marker.

图 2 5 种鱼血清的 2% PEG 沉淀 a(左)、b(右)的 SDS-PAGE 分析

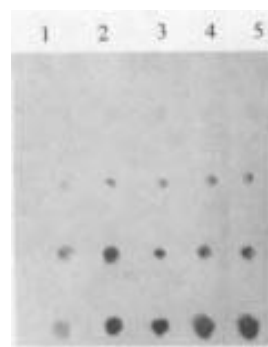
Fig.2 Analyses of 2% PEG-soluble serum from 5 fishes by SDS-PAGE a:left, b:right



1. 鳊 *A. nobilis*, 2. 鲤 *C. carpio*, 3. 草鱼 *C. idellus*, 4. 罗非鱼 *Tilapia*, 5. 鲫 *C. auratus*; 6. Marker; 7. 鳊 *A. nobilis*, 8. 鲤 *C. carpio*, 9. 草鱼 *C. idellus*, 10. 罗非鱼 *Tilapia*, 11. 鲫 1~5 全血清 Serum, 7~11 上清 20% PEG-soluble serum.

图 1 5 种鱼血清和 2% PEG 上清的 SDS-PAGE 分析

Fig.1 Analyses of serum and 2% PEG-soluble serum from 5 fishes by SDS-PAGE



1. 鳊 *A. nobilis*, 2. 鲤 *C. carpio*, 3. 草鱼 *C. idellus*, 4. 罗非鱼 *Tilapia*, 5. 鲫 *C. auratus*.

图 3 5 种鱼血清 2% PEG 沉淀的 Dot-ELISA 检测

Fig.3 Analyses of 2% PEG-insoluble serum from 5 fishes by Dot-ELISA

2.2 Dot-ELISA 检测结果

由图 3 可见,同一种鱼的斑点随着样品稀释度的下降逐渐减小,直至消失。不同点同一稀释度的斑点大小有一定的差异。其中,罗非鱼最大,鳊、鲫相对较小。

3 讨论

不同浓度的 PEG 可以沉淀不同分子量的 IC^[1]。本文采用 2% PEG 沉淀 5 种淡水鱼血清发现,随着沉淀次数的增加,条带逐渐减少,揭示 PEG 的沉淀次数是可靠获得真正不溶于该浓度的血清成分的保证,这可能与 PEG 溶液的粘稠性有关。以往对血清 IC 的有关报道,均是采用 2 次 PEG 沉淀。本文对 5 种鱼血清 IC 的研究结果说明,应进行 4 次为好,其原因可能与不同类别的动物有关。在经 4 次 2% PEG 处理后的沉淀中,5 种鱼均有 2 条分子量分别相互接近的条带,其中分子量较小的带在 20.1~31 kD 之间,分子量较大的带在 66~97.4 kD 之间。一般认为,硬骨鱼只含有 1 种类似于哺乳动物的 IgM,每条重链和轻链分子量分别在 70~90 kD 和 27~30 kD 范围内^[9,10]。由此可以认为,本文采用 SDS-PAGE 检测 2% PEG 沉淀 b 时发现的 5 种鱼均存在的 2 条带,应分别为 IC 中免疫球蛋白重链、轻链的带型。同时也观察到 5 种实验鱼条带位置只是相近,其中草鱼轻链分子量明显较大。由于在 SDS-PAGE 条件下,蛋白质是以亚基存在,故不同鱼之间的免疫球蛋白存在一定的差异性。这与有关 IgM 的结构在不同鱼类甚至在同一种鱼的不同部位也有所差异的报道^[11]有一致性。

本文采用 Dot-ELISA 检测 5 种淡水鱼血清 IC 的结果表明,5 种鱼 2% PEG 沉淀 b 中均能与 HRP-鸡 IgG 抗草鱼 IgM 发生特异性反应。说明 2% PEG 确能沉淀 IC,并进一步支持上述 SDS-PAGE 的结果。在实验中,我们还分别使用了 HRP-鸡 IgG 抗鳊和鲫 IgM 进行研究,结果此 2 种酶标抗体均能分别与 5 种鱼血清的 2% PEG 沉淀 b 发生反应。并采用未被包、包被入 IgM 和牛血清白蛋白等对照实验证明有关酶标抗鱼抗体的特异性。结果说

明,5 种鱼 IgM 之间有交叉反应。为使结果有利于比较,还采用统一稀释度(1:100)的 HRP-鸡 IgG 抗草鱼 IgM 进行实验。并注意到,鳊、鲫所形成的斑点与其他 3 种鱼相比相对较小,提示不同鱼血清 IC 含量有一定差异。这与在 2% PEG 沉淀 b 的 SDS-PAGE 电泳结果一致。有作者还发现草鱼和鲫血清中有类似人 IgG 样组分^[7,8]。IgG 的分子量较 IgM 为小,是否与 5 种鱼在 2% 沉淀 b 的 SDS-PAGE 图谱上的条带有差异有关,有待于进一步探讨。

参考文献:

- [1] 彭宣宪.乙型肝炎免疫复合物的研究进展[A].病毒性肝病研究进展[M].北京:中国科学技术出版社,1992.10-29.
- [2] 周裕琳,彭宣宪,柳 玟,等.检测 HBVDNA/Ig-双特异性循环免疫复合物的免疫捕捉法 PCR[J].中国免疫学杂志,2000,16(2):71-75.
- [3] Margairite J M. Levels of IgM and IgA circulating immune complexes in dogs with Leishmaniasis[J]. Zentralbl Veterinarmed, 1998,45(5):263-267.
- [4] Peng X X, Tao Yzh, Wainberg M A, et al. Immunoglobulin and complement complexes in blood following infection with human immunodeficiency virus type 1 [J]. Clin Diagnos Lab Immunol, 1996,3(1):128-132.
- [5] 彭宣宪,罗玉萍,程 华,等.乙型肝炎患者免疫状态与 HBsAg 免疫复合物关系的探讨[J].中国免疫学杂志,1995,11(增刊):689-691.
- [6] 彭宣宪.双特异性免疫复合物的研究进展[J].上海免疫学杂志,1996,16(4):315-317.
- [7] 江育林,李 燕,李 平,等.草鱼免疫应答的初步研究[J].水生生物学报,1991,15(4):321-326.
- [8] 彭宣宪,吴 兰,李思光,等.用 ELISA 法测定 SPA 与多种动物 IgG 的结合特性[J].江西科学,1992,10(4):246-250.
- [9] Bour C A F, Romestand B, Bouix G, et al. Isolation and partial characterization of IgM-like seabass immunoglobulins[J]. Agriculture, 1995,132(1-2):53-58.
- [10] Scapigliati G, Chausson F, Coopen E L, et al. Qualitative and quantitative analysis of serum immunoglobulins of four Antarctic fish species[J]. Polar Biology, 1997,18(3):209-213.
- [11] Wilson M R, Warr G W. Fish immunoglobulins and the genes that encode them[J]. Annual Review Fish diseases, 1992,2:201-221.

Circulating immune complexes of some fresh water fishes

PENG Xuan-xian, ZHANG Yue-ling, WANG San-ying

(The Key Laboratory of Education Ministry for Cell Biology

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

Abstract: Circulating immune complexes of *Tilapia*, *Ctenopharyngodon idellus*, *Carassius auratus*, *Aristichthys nobilis* and *Cyprinus carpio* were characterized by SDS - PAGE and Dot - ELISA. The results show that the circulating immune complexes of the 5 fishes can be isolated by 4% PEG, and the differences between the 4 fishes of Cyprinidae are not very obvious in the bands of electropherogram, and neither does the difference between *Tilapia* and the 4 Cyprinidae fishes, but there are some obvious difference between these immune complexes, which may be related to the molecular weight of their antibodies.

Key words: fresh water fish; immune complex; SDS - PAGE; Dot - ELISA

欢迎订阅 2002 年《中国水产科学》

《中国水产科学》是中国水产科学研究院主办的国家级学术期刊,已经正式编入《中国学术期刊(光盘版)》,并加入“CinaInfo(中国信息)网络资源系统(电子期刊)”及“中国期刊网”。主要刊载水产资源、海淡水捕捞、水产养殖与增殖、水产品保鲜与加工、渔业水域环境保护、渔船、渔业机械与仪器及渔业基础研究的学术论文、研究简报、综述和学术动态等文稿。它的主要服务对象是水产科学研究、教学、科技管理人员以及大专院校师生。是反映水产科研成果的窗口和培养人才的园地。它面向水产业,为水产业的持续发展和水产经济建设服务。

本刊是季刊,大 16 开,每期 96 页,国内外公开发行。国内定价 14.00 元/期,全年 56.00 元/期(含邮费)。本刊邮发代号:18—250,国内统一刊号:CN11—3021/S,国际标准刊号:ISSN1005—8737,国外代号 4639Q。全国各地邮局办理订阅手续(可破季订阅)。漏订或补订当年和过期期刊,请直接向编辑部订阅。

地址:北京市丰台区青塔村 150 号

邮政编码:100039

电话:010—68673921

E. mail: jfishok@publica. bj. cninfo. net