

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.01377

温度对牙鲆皮肤黏液抗体产生的影响

许国晶, 绳秀珍, 战文斌

中国海洋大学 教育部海水养殖重点实验室 山东 青岛 266003

摘要: 在 9℃、15℃、21℃和 26℃ 4 种不同水温下, 用淋巴囊肿病毒(LCDV)灭活疫苗腹腔注射牙鲆, 应用间接酶联免疫吸附试验(ELISA)研究了其皮肤黏液中特异性抗体水平的变化, 以分析温度对牙鲆皮肤黏液抗体产生的影响。ELISA 结果表明, 9℃和 15℃水温下牙鲆黏液 OD 值分别在注射 LCDV 后第 9 周和第 7 周达到峰值(9℃: OD=0.179; 15℃: OD=0.233); 21℃水温下 OD 值上升最快, 5 周达到峰值(0.316); 26℃水温下 OD 值较 21℃无显著差异, 也于 5 周达到峰值(0.295)。采用硫酸铵分步盐析等技术粗提不同温度下 OD 值最高时的牙鲆皮肤黏液中的免疫球蛋白(Ig), SDS-PAGE 检测发现, 各温度组黏液蛋白中均含有 72 kD 和 26 kD 蛋白条带。Western blotting 结果显示, 抗牙鲆血清 Ig 重链的单克隆抗体只与黏液蛋白中 72 kD 条带发生反应, 确定为牙鲆皮肤黏液 Ig 重链。综上结果表明, 牙鲆在最适生活温度(21℃)下, 抗体应答强度最大。牙鲆粗提黏液蛋白中 Ig 的初步确定, 为探索牙鲆黏液免疫机制提供了材料。

关键词: 牙鲆; 皮肤黏液抗体; 免疫球蛋白; 温度; 淋巴囊肿病毒

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)06-1377-07

覆盖在鱼体皮肤、鳃和胃肠道等表面的黏膜组织及其分泌的黏液, 构成了鱼类的黏膜免疫系统, 是鱼体抵抗病原入侵的第一道防线^[1-3]。鱼类黏膜组织中分布有各种免疫细胞, 使其具有独立完成局部免疫应答的功能。目前已从虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)及鲈(*Ictalurus punctatus*)等多种鱼类皮肤黏液中发现了免疫球蛋白(Ig), 可以对病原体的入侵发生特异性的免疫应答^[4-5]。

鱼类作为变温动物, 体温直接依赖于周围环境的温度, 其免疫机能, 如 T 细胞和 B 细胞的相互作用、抗体的合成和释放等受水温的影响极大, 低温能够完全或部分抑制抗体生成, 而升高温度能加速抗体的合成^[6-7]。前人的研究大都集中在温度对鱼类系统免疫方面的影响^[8], 对其黏液免疫影响的研究较少。牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)作为中国传统的名贵商品鱼和出口创汇重要养殖品

种之一, 目前尚未发现温度对牙鲆皮肤黏液免疫影响的研究。本研究分离淋巴囊肿病毒(LCDV)并制成灭活疫苗, 腹腔注射在不同水温下养殖的牙鲆, 应用间接 ELISA 研究了其皮肤黏液中特异性抗体的动态变化; 生化方法提取牙鲆黏液免疫球蛋白粗品, 通过 SDS-PAGE 和 Western blotting 比较了温度引起的牙鲆黏液中蛋白条带的变化, 并初步验证了牙鲆黏液中的免疫球蛋白, 为探索牙鲆黏液免疫机制提供了材料及理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

患病牙鲆采自山东威海某养殖场, 病鱼体表可见有单个或聚集成团的乳头瘤状赘生物。70%酒精棉球消毒患病部位后, 用灭菌手术刀片切下囊肿物, -80℃下分装保存备用。

收稿日期: 2011-04-06; 修订日期: 2011-05-19.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31172429, 31072232).

作者简介: 许国晶(1984-), 女, 博士, 主要从事水产动物病害与免疫学研究. E-mail: guojingxu18@yahoo.com.cn

通信作者: 绳秀珍, 副教授. E-mail: xzsheng@ouc.edu.cn

实验牙鲈取自山东日照牙鲈鱼养殖基地, 平均体长 15 cm; 把鱼随机分为 4 组, 每组 80 尾, 饲养于 200 cm×100 cm×50 cm 容积的玻璃钢水槽中, 水温(18±1)℃, 充气, 每天换水 1/3, 投喂饵料 2 次, 暂养 7 天后, 采用空调缓慢调整水温降至 9℃, 另外 3 组采用加热棒, 分别缓慢调整水温升至 15℃、21℃和 26℃。

抗牙鲈血清 Ig 重链的单克隆抗体(2D8)由本实验室制备^[9]。

1.2 牙鲈淋巴囊肿病毒提纯

参照 Cheng^[10]的方法从牙鲈体表囊肿物中提纯 LCDV 后, 采用透射电镜检测病毒提纯结果。取纯化病毒悬液 10 μL 滴加在载玻片上, 将覆盖有 Formvar 碳膜的铜网反扣在病毒悬液滴上, 5 min 后取下铜网, 滴加 2%的磷钨酸(pH6.9), 负染 2 min 后, 用滤纸吸去多余的染液, 室温晾干, 在透射电镜下观察并拍照。

1.3 牙鲈注射淋巴囊肿病毒及黏液收集

各温度组实验鱼适应 7 d 后, 注射 LCDV 灭活疫苗。纯化的 LCDV 经 0.5%的福尔马林 4℃灭活 24 h, 调整蛋白液质量浓度至 1 mg/mL, 将病毒悬液与弗氏完全佐剂(FCA)等比混匀, 腹腔注射 0.4 mL, 肌肉注射 0.2 mL。两周后, 进行加强免疫, 腹腔注射 0.4 mL, 无佐剂。

于初次免疫牙鲈后第 2、3、4、5、6、7、8、9、11、15 周, 每个温度组分别随机选取实验鱼 6 尾, 用玻片轻轻刮取鱼体表面的黏液装于离心管中, 加等体积磷酸缓冲液(PBS, 0.01 mol/L pH 7.4), 15 000 g、4℃离心 30 min, 取上清, -80℃下冻存备用。取免疫前牙鲈皮肤黏液作为对照。

1.4 ELISA 法检测牙鲈黏液中抗体水平

将 1.2 中提纯的 LCDV 用碳酸盐包被液(pH 9.6)稀释至蛋白浓度为 30 μg/mL, 包被于 96 孔酶标板, 每孔 50 μL, 4℃过夜。次日用含 0.05%吐温 20 的磷酸盐缓冲液(PBST)洗涤 3 次, 之后每孔滴加 100 μL 含 3% BSA 的 PBS 封闭 1 h, PBST 洗 3 次后加入 1.3 中收集的免疫牙鲈黏液 100 μL(1:50 稀释), 37℃反应 2 h; 同法洗涤后加入 100 μL 抗牙鲈血清 Ig 重链的单克隆抗体 2D8, 37℃反应 1

h, PBST 洗 3 次后滴加 1:4 000 稀释的羊抗鼠 Ig 碱性磷酸酶标记抗体 100 μL, 37℃反应 1 h, 洗涤后加 0.1% (w/v) pNPP (pNPP 缓冲液稀释), 室温显色 30 min, 405 nm 波长测定平均吸光值(OD)。骨髓瘤细胞培养上清代替单克隆抗体 2D8 作为阴性对照。

1.5 牙鲈皮肤黏液中抗体的粗提

参照陈垚^[11]初步纯化鲫鱼皮肤黏液 IgM 的方法, 并适当修改, 采用 30%、50%饱和硫酸铵分步盐析粗提牙鲈黏液 Ig。根据实验中不同温度组黏液抗体 OD 值达到峰值的时间, 分别取免疫 LCDV 后第 5 周(21℃和 26℃)、第 7 周(15℃)、第 9 周(9℃)及对照组牙鲈黏液各 4.0 mL, 装于 5 个离心管中, 加等体积 0.01 mol/L 的 PBS(pH 7.4), 以 15 000 g 于 4℃下离心 30 min, 取上清液, 缓慢加入 pH 7.0 的饱和硫酸铵溶液, 使其终质量分数达 30%, 4℃静置过夜, 15 000 g 离心 30 min, 取上清继续加饱和硫酸铵溶液至最终饱和度为 50%, 同上处理, 次日离心收集沉淀, 沉淀溶解于少量的 0.02 mol/L pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液, 再用相同的缓冲液透析, 至检测不到 SO_4^{2-} 为止, 获得的黏膜蛋白粗提物于 -80℃保存。

1.6 SDS-PAGE 电泳分析

采用 Mini-Protein cell III 系统(BioRad), 按文献^[12]的方法进行不连续垂直凝胶电泳, 5%浓缩胶, 12%分离胶。1.4 中粗提的牙鲈皮肤黏液抗体样品与上样缓冲液(50 mmol/L 的 Tris-HCl, pH 6.8, 甘油, 1%溴酚蓝, 10%SDS, β-巯基乙醇 14.4 mmol/L)1:1 混合后, 沸水中煮 5 min, 每孔上样量 20 μL。样品在浓缩胶时调电流 30 mA, 分离胶时加大到 60 mA。电泳结束后, 凝胶用考马斯亮兰(CBB-R250)染色液染色。

1.7 Western blotting 实验

样品经 SDS-PAGE 后, Mini Trans-Blot Transfer Cell (Bio-Rad)转移至 PVDF 膜上(恒压 30 V 转移 2 h), 转移后以封闭液(PBS, 含 5%脱脂奶粉)封闭过夜, 加抗牙鲈血清 Ig 重链的单克隆抗体 2D8, 37℃反应 1 h, PBST 洗 3 次; 再加 AP 标记的羊抗鼠 IgG(1:5 000 稀释), 37℃反应 1 h,

PBST 洗 3 次后放入新鲜配制的 NBT/BCIP 发色液中, 室温显色 30 min, 水洗终止反应。

1.8 数据分析

实验所得数据均表示为 $\bar{x} \pm SD$, 用 SPSS 16.0 统计软件进行方差分析和 Duncan 多重比较, 当 $P < 0.05$ 时差异显著。

2 结果与分析

2.1 淋巴囊肿病毒的提纯

淋巴囊肿病毒粒子经脱糖、负染后, 透射电镜观察发现所提纯的 LCDV 密度大, 杂质很少(图 1)。

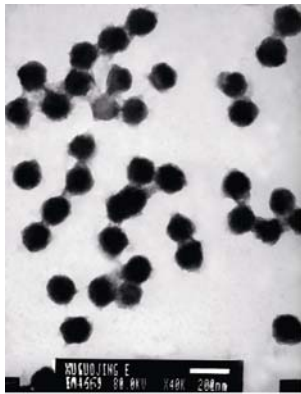


图 1 提纯淋巴囊肿病毒电镜负染观察结果(bar=200 nm)
Fig.1 Negative staining of purified lymphocystis disease virus (LCDV) (bar = 200 nm).

2.2 不同水温下牙鲆黏液抗体水平的动态变化

应用抗牙鲆血清 Ig 重链的单克隆抗体 2D8, 通过 ELISA 检测牙鲆黏液中抗体的变化(图 2), 结果显示, 在 9℃水温下, 牙鲆黏液中抗体水平上升很慢, 9 周达到峰值但很低, 405 nm 处的光密度值(OD)从对照组的 0.079 上升到 0.179 ($P < 0.05$); 在 15℃水温下, 黏液中抗体水平上升较快, 于 7 周达到峰值, OD 值从对照组的 0.089 上升至 0.233 ($P < 0.05$); 21℃水温下, 黏液中抗体水平上升最快, 5 周从对照的 0.093 升至峰值 0.316 ($P < 0.05$); 26℃水温下的抗体水平较 21℃略有下降, 5 周时达到峰值 0.295, 但与 21℃的峰值无显著差异。

2.3 硫酸铵粗提后牙鲆皮肤黏液蛋白电泳分析

根据电泳迁移率计算结果, 各温度组牙鲆皮肤黏液经 30%、50%饱和硫酸铵分步盐析后的蛋白中均含有相对分子质量约 72 kD 及 26 kD 的条带(图 3), 分别与李强等^[9]提取的牙鲆血清 Ig 重链(74 kD)和轻链(24 kD)接近, 说明牙鲆黏液 Ig 可能具有与血清 Ig 相似的重链和轻链。21℃和 26℃温度组较 9℃和 15℃温度组中电泳条带数增多。

2.4 Western blotting 检测

由图 4 可知, 对照组中牙鲆黏液含有 72 kD 蛋白条带, 且可与鼠抗牙鲆血清 Ig 重链的单克隆抗体发生反应; 经 LCDV 免疫后的各组牙鲆黏液

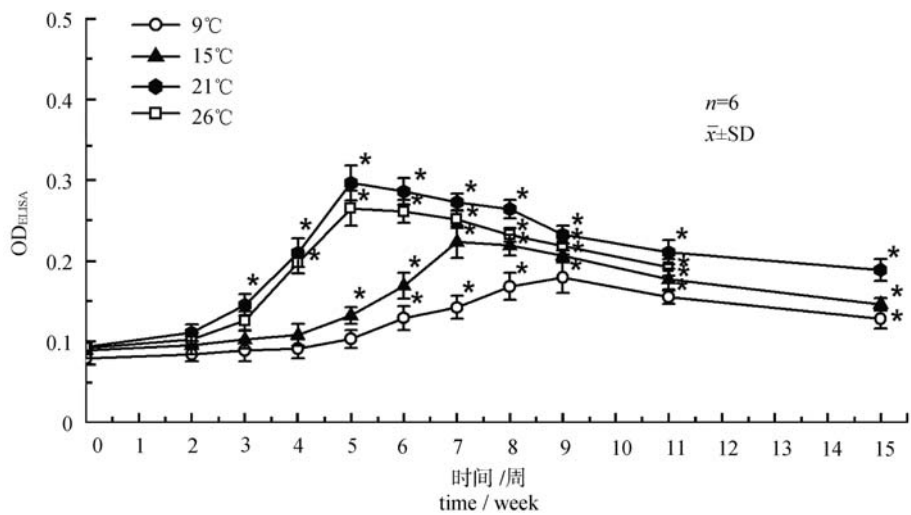


图 2 不同温度下注射灭活 LCDV 后牙鲆皮肤黏液抗体的变化
Fig.2 Kinetics of the skin mucus antibody of flounder kept at different temperatures after intraperitoneal injection with inactivated LCDV

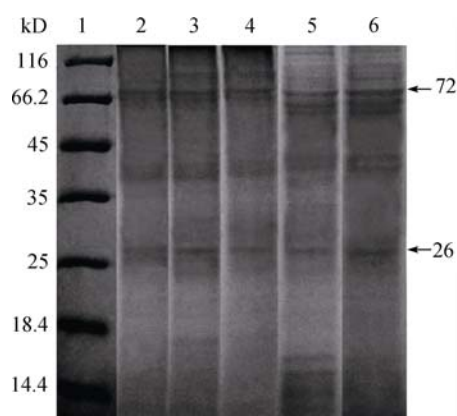


图 3 牙鲆皮肤黏液蛋白 SDS-PAGE 图谱

1. 标准分子量蛋白; 2. 对照组皮肤黏液; 3. 9℃皮肤黏液;
4. 15℃皮肤黏液; 5. 21℃皮肤黏液; 6. 26℃皮肤黏液.

Fig.3 SDS-PAGE profiles of crude protein extracted from skin mucus of flounder

1. marker; 2. skin mucus of the control; 3. skin mucus at 9℃;
4. skin mucus at 15℃; 5. skin mucus at 21℃;
6. skin mucus at 26℃.

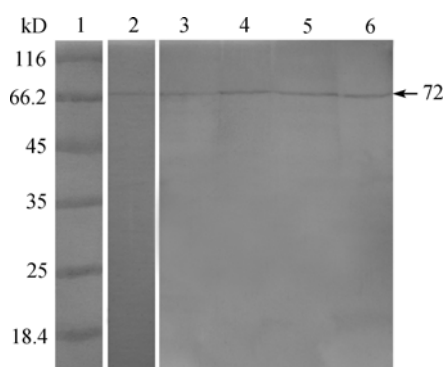


图 4 牙鲆皮肤黏液蛋白 western blotting 图谱

1. 标准分子量蛋白; 2. 对照组皮肤黏液; 3. 9℃皮肤黏液;
4. 15℃皮肤黏液; 5. 21℃皮肤黏液; 6. 26℃皮肤黏液.

Fig.4 Western blotting of crude immunoglobulin extracted from skin mucus of flounder

1. marker; 2. skin mucus of the control; 3. skin mucus at 9℃;
4. skin mucus at 15℃; 5. skin mucus at 21℃;
6. skin mucus at 26℃.

蛋白, 72 kD 条带均与鼠抗牙鲆血清 Ig 重链的单克隆抗体发生反应, 确定为牙鲆黏液 Ig 的重链。

3 讨论

环境温度是最重要的外界因素之一, 它涉及鱼类的整个生命过程, 影响鱼类免疫的各个方面^[13-14]。有学者认为特异性免疫对低温十分敏感, 这种敏感性是由于低温抑制或延迟了抗体的释放,

或是由于低温减慢了代谢循环^[15], 而升高温度则能加速抗体的合成^[16]。参考 Fonds 等^[17]的研究结果, 本研究选择牙鲆在 4 种不同温度下(9℃、15℃、21℃和 26℃)适应饲养后, 温度范围包括最低免疫临界温度、最适生长温度及最高免疫临界温度, 用灭活 LCDV 疫苗腹腔注射牙鲆, 检测了其黏液抗体水平变化。

本研究 ELISA 结果显示, 不同温度组牙鲆接种 LCDV 灭活疫苗后, 黏液中特异性抗体水平明显升高, 说明 LCDV 灭活疫苗对牙鲆黏液免疫是有效的。邵蓬等^[18]曾用 LCDV 注射牙鲆, 发现血清中抗 LCDV 的特异性抗体水平明显升高。作者也曾用 LCDV 灭活疫苗免疫不同温度下养殖的牙鲆, 发现血清中特异性抗体水平有明显升高^[8], 因此 LCDV 灭活疫苗可引起牙鲆黏液特异性免疫及系统特异性免疫。这与在白鲟(*Acipenser transmontanus*)腹腔注射白鲟虹彩病毒(white sturgeon iridovirus)、黑鲈(*Lates calcarifer*)中腹腔注射海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)^[19-20]的研究结果一致, 腹腔注射抗原后黏液及血清中特异性抗体水平均明显升高, 且两者变化动力学规律一致, 呈现出血清抗体向皮肤黏液渗透的迹象, 推断黏液抗体可能来源于系统免疫应答。但在鲇、欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla* L.)^[21-22]中, 腹腔注射引起了明显的血清抗体水平变化, 而黏液抗体水平变化不明显, 作者推断黏膜免疫系统可独立于系统免疫而完成免疫应答。对于牙鲆黏膜免疫是否能够独立完成特异性免疫应答还有待于进一步的研究。

本研究在 9~21℃温度范围, 牙鲆的黏液抗体水平随水温的升高而升高, 并且达到峰值的时间随温度升高而加快。鳊(*Siniperca chuatsi*)在较高温度时, 黏液抗体滴度峰值出现时间早, 且抗体滴度明显高于低温^[23]。草鱼(*Ctenopharyngodonidella*)受抗原刺激后在 25℃水温下产生的中和抗体效价较 15℃和 20℃时高得多, 且峰值出现时间早^[24], 这与本研究的结果一致。产生这种结果可能是因为低温下牙鲆进食量少, 体内能量代谢和物质代谢水平低, 主要的能量代谢用来维持它的基本生命活动需求, 导致其血液中的总蛋白含量少, 缺

乏抗体产生的物质和能量基础; 而较高的温度下, 由于进食量增加, 其抗体产生的物质和能量基础增加^[25]。同样低温能够影响牙鲈免疫机制中的某一环节, 特别是跟抗体产生有关的淋巴细胞, 在低温下不能发挥其正常的免疫功能^[26-27]。有研究表明, 皮质醇水平的变化是温度依赖型的, 皮质醇的升高会抑制 IgM 的水平^[6]。本研究中 26℃ 水温下养殖牙鲈至第 13~14 周时鱼体变黑, 活力很低, 并开始出现死亡, 推测可能是因为 26℃ 高于牙鲈的适宜生长温度, 长期生活在该温度下导致鱼体的不适应甚至死亡, 因而没有统计 15 周黏液抗体水平; 该温度组中牙鲈黏液抗体水平略低于 21℃, 可能是因为在该温度下皮质醇水平升高, 抑制淋巴细胞分裂或导致 B 细胞死亡^[28-29], 从而使抗体水平受到抑制。

盐析法是利用抗体与杂质之间对盐浓度敏感程度的差异性进行的, 是实验室常用的粗提免疫球蛋白的方法^[30]。本研究采用 30%、50% 的饱和硫酸铵溶液对牙鲈皮肤黏液中的免疫球蛋白进行粗提, 抗体粗提物经 SDS-PAGE 检测发现, 牙鲈于较低水温 (9℃ 和 15℃) 下电泳条带数较少, 可能是由于温度降低, 具有免疫活性的蛋白质也有所减少。这与 Dunel 等^[31]对鳗鲡的研究结果一致, 当鳗鲡处于低温时, 鳃组织的黏液细胞会减少, 因此分泌的相关蛋白也会相应减少。

本研究利用抗牙鲈血清 Ig 重链的单克隆抗体研究了温度对牙鲈黏液抗体产生的影响, 发现牙鲈在最适生活温度下, 抗体应答强度最大; 亚适温条件下, 抗体应答的强度会减弱。同时本研究采用饱和硫酸铵粗提了黏液中的蛋白质, 并用 western blotting 检测了其中有 Ig, 为进一步探索牙鲈黏液免疫机理奠定了基础。

参考文献:

- [1] Remeth D C, Darren R J, Robert L R. Characterization of mucosal and systemic immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using surface plasmon response [J]. Fish Shellfish Immunol, 2000, 10: 651-666.
- [2] Xu D H, Klesius P H, Shelby R A. Cutaneous antibodies in excised skin from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) immune to *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. J Fish Dis, 2002, 25: 45-52.
- [3] Press C M. The Morphology of the immune system in teleost fishes [J]. Fish Shellfish Immunol, 1999, 9: 309-318.
- [4] Lumsden J S, Ostland V E, MacPhee D D, et al. Production of gill-associated and serum antibody by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following immersion immunization with acetone-killed *Flavobacterium branchiophilum* and the relationship to protection from experimental challenges [J]. Fish Shellfish Immunol, 1995, 5: 151-165.
- [5] Xu D H, Klesius P H, Shelby R A. Cutaneous antibodies in excised skin from channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque, immune to *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. J Fish Dis, 2002, 25: 45-52.
- [6] 侯亚义, 韩晓冬. 温度和类固醇激素对虹鳟免疫球蛋白 M(IgM) 的影响[J]. 南京大学学报: 自然科学, 2001, 37 (5): 563-568.
- [7] Le Morvan C, Troutaud D, Deschaux P. Differential effects of temperature on specific and nonspecific immune defences in fish [J]. J Exp Biol, 1998, 201: 165-168.
- [8] Xu G J, Sheng X Z, Xing J, et al. Effect of temperature on immune response of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) to inactivated lymphocystis disease virus (LCDV) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2010, 30(2): 525-531.
- [9] Li Q, Zhan W B, Xing J, et al. Production, characterisation and applicability of monoclonal antibodies to immunoglobulin of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 23: 982-990.
- [10] Cheng S F, Zhan W B, Xing J, et al. Development and characterization of monoclonal antibody to the lymphocystis disease virus of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* isolated from China [J]. J Virol Methods, 2006, 135: 173-180.
- [11] 陈磊, 王石泉, 韩晓冬, 等. 鲫鱼血清和皮肤黏液 IgM 的分离纯化及部分性质的鉴定 [J]. 动物学研究, 2003, 24(2): 111-115.
- [12] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 77-92.
- [13] Bisset K A. The effect of temperature upon antibody production in cold-blooded vertebrates [J]. J Pathol Bacteriol, 1948, 60: 87-92.
- [14] Le Morvan C, Troutaud D, Deschaux P. Differential effects of temperature on specific and nonspecific immune defences in fish [J]. J Exp Biol, 1998, 201: 165-168.

- [15] Ainsworth A J, Dexiang C, Waterstrat P R, et al. Effect of temperature on the immune system of channel catfish (*Ictalurus punctatus*)—I. Leucocyte distribution and phagocyte function in the anterior kidney at 10 °C[J]. Comp Biochem Physiol, 1991, 100A: 907–912.
- [16] Schneider B, Ambrosius H. The influence of environmental temperature on the lymphocyte populations in carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Biomed Biochim Acta, 1987, 46(1): 135–142.
- [17] Fonds M, Tanaka M, and van der Veer H W. Feeding and growth of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in relation to temperature and food supply [J]. Neth J Sea Res, 1995, 34 (1-3): 111–118.
- [18] 邵蓬, 战文斌, 绳秀珍, 等. 人工感染淋巴囊肿病毒牙鲆的免疫球蛋白水平变化[J]. 海洋水产研究, 2008, 29(6): 52–56.
- [19] Drennan J D, Lapatra S E, Swan C M, et al. Characterization of serum and mucosal antibody responses in white sturgeon (*Acipenser transmontanus* Richardson) following immunization with WSIV and a protein hapten antigen [J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 23: 657–669.
- [20] Delamare-Deboutteville J, Wood D, Barnes A C. Response and function of cutaneous mucosal and serum antibodies in barramundi (*Lates calcarifer*) acclimated in seawater and freshwater [J]. Fish Shellfish Immunol, 2006, 21: 92–101.
- [21] Maki J L, Dickerson H W. Systemic and cutaneous mucosal antibody response of channel catfish immunized against the protozoan parasite *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2003, 10: 876–881.
- [22] Esteve-Gassent M D, Nielsen M E, Amaro C. The kinetics of antibody production in mucus and serum of European eel (*Anguilla anguilla* L.) after vaccination against *Vibrio vulnificus*: development of a new method for antibody quantification in skin mucus [J]. Fish Shellfish Immunol, 2003, 15: 51–61.
- [23] 罗霞, 潘厚军, 巩华, 等. 温度对鳊皮肤黏膜抗体产生的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2007, 27(3): 45–49.
- [24] 江育林. 草鱼免疫应答的初步研究[J]. 水生生物学报, 1991, 15 (4): 321–326.
- [25] 李亚男, 王冀平, 邵健忠, 等. 鱼类免疫应答中的温度效应研究[J]. 浙江大学学报, 1999, 26(3): 87–91.
- [26] Collazos M E, Barriga C, Rincon E O. Seasonal variations in the immune system of the tench, *Tinca tinca* (Cyprinidae): proliferative response of lymphocytes induced by mitogens [J]. J Comp Physiol B: Biochem System Environ Physiol, 1996, 165: 592–595.
- [27] Alcorn S W, Murray A L, Pascho R J. Effects of rearing temperature on immune functions in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2002, 12: 303–334.
- [28] Weyts F A A, Verburg-van Kemenade B M L, Flik G, et al. Conservation of apoptosis as an immune regulatory mechanism: effects of cortisol and cortisone on carp lymphocytes [J]. Brain Behav Immun, 1997, 11: 95–105.
- [29] Verburg-van Kemenade B M L, Nowak B, Engelsma M Y, et al. Differential effects of cortisol on apoptosis and proliferation of carp B-lymphocytes from head kidney, spleen and blood [J]. Fish Shellfish Immunol, 1999, 9: 405–415.
- [30] 林天龙, 陈强, 俞伏松, 等. 欧洲鳊血清免疫球蛋白纯化及部分特性分析[J]. 水产学报, 2001, 25(1): 52–57.
- [31] Dunel S, Sebert P, Chevalier C, et al. Morphological changes induced by acclimation to high pressure in the gill epithelium of the freshwater yellow eel [J]. J Fish Biol, 1996, 48(5): 1018–1022.

Effect of temperature on production of skin mucus antibody in flounder (*Paralichthys olivaceus*)

XU Guojing, SHENG Xiuzhen, ZHAN Wenbin

The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China

Abstract: We evaluated the effects of water temperature on the kinetics of skin mucus antibody in the flounder (*Paralichthys olivaceus*) using an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The fish were held at 9°C, 15°C, 21°C, and 26°C and given an intraperitoneal injection of inactivated lymphocystis disease virus (LCDV). The optical density (OD) of mucus antibody peaked 9 and 7 weeks after treatment in the groups held at 9°C and 15°C, respectively (9°C: OD=0.179; 15°C: OD=0.233). The OD increased most rapidly in fish held at 21°C, peaking at 0.316 during the 5th week. The OD was lower in fish held at 26°C than at 21°C and peaked (0.295) in the 5th week. We collected a sample of skin mucus from fish with the highest OD and extracted mucus Ig by ammonium sulfate precipitation. The mucus proteins from all four treatment groups yielded bands at 72 kD and 26 kD. Western blotting analysis revealed that the monoclonal antibody against serum Ig heavy chain could only recognize the 72 kD protein, which represents the heavy chain of skin mucus Ig. In conclusion, the most pronounced immune response was measured in fish that were maintained at their optimal temperature (21°C). In addition, the isolated mucus Ig may be used to study mucosal immunity in flounder.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; skin mucus antibody; immunoglobulin; temperature; lymphocystis disease virus

Corresponding author: SHENG Xiuzhen. E-mail: xzsheng@ouc.edu.cn