

鲤鱼不同品种(系)红血球抗原特异性的初步研究

童金苟 陈荣德 吴清江

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

提 要

用血球凝集和血清吸收试验的方法, 对若干个鲤鱼品种及鲤鱼人工雌核发育系的红血球中的某些同种异型抗原纯合性进行了初步研究。①以抗雌核发育红鲤抗血清(abs/R)为试剂, 三个雌核发育系(R_{8305} , R_{8413} , $RMGF_1$)的RBC反应值分别为1521—2360, 1521—2028, 853—1521, 普通红鲤、镜鲤、白鲢的反应值在80—782。②abs/8305与abs/8413经靶细胞相互吸收后的残留活性显著降低(均为320), 而以白鲢RBC吸收后抗血清活性不变。作者认为这部分抗原在鲤鱼种以下的品种和品系中具有特异性, 可考虑将其作为鱼类品系鉴定的一种手段。

关键词 血球凝集, 品种, 品系, 鲤鱼, 同种异型抗原, 免疫

利用抗原的种的特异性反应来进行动物种的鉴别, 在家畜及家禽中已有较多的报道。有关动物品系的鉴定与检测工作在哺乳类实验动物(如小鼠)及两栖类(蟾蜍)中进行较多, 免疫遗传工作也主要在以上动物中进行^[3,4,6,7]。鱼类方面, 利用免疫方法进行种间或种内不同类群鉴定的资料极少, 仅仅限于有关种内不同族或生态种群某些抗原的特异性。为了解决鱼类品系鉴定的途径问题, 我们以鲤鱼为材料作了一些同种鱼不同品系抗原特异性的探索, 如皮肤移植排斥试验^[1]、血球凝集试验、血清吸收试验等, 这对同种鱼中不同品系的遗传背景的了解, 对于遗传育种工作无论理论上还是实践上均是有意义的。

材 料 与 方 法

(一) 实验鱼品系(品种)

①用红鲤(简称R)经二代雌核发育(gynogenesis)建立鲤鱼3个雌核发育系^[2], 其编号为 R_{8305} , R_{8413} , R_{8418} 。②以红鲤 \times 散鳞镜鲤 F_2 中分离出的红镜鲤(简称RM)的雌核发育一代($RMGF_1$)。③普通红鲤(Red Carp)。④散鳞镜鲤(Scatter-scaled Mirror Carp)。⑤鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)。

1986年3月24日收到。

1) 吴清江、童金苟, 1986, 鲤科鱼类的皮肤移植试验(手稿)。

(二) 抗鲤鱼不同品系红血球抗血清的制备

从体重 0.5—1 公斤的 R₈₃₀₅、R₈₄₁₃ 及 RMGF₁ 的鱼体尾柄血管弧抽取血液。为了防止抽血过程中血液凝固,穿刺前以肝素钠溶液(2%)少许湿润针头及针筒。血液在离心管中置室温(20—25℃)1小时。若室温过低(低于 15℃),置 37℃ 温箱。1000r/min 离心 5 分钟,将上清液(血清)分离作它用,血球以 1%NaCl 溶液洗涤 3 次,弃上清液。最后以 1% NaCl 液将红血球制成 4:1 悬液(v/v)。这时悬液中约有 3 × 10⁸ 红血球/毫升。免疫动物为 4 只健康的纯种日本大耳兔(同济医科大学实验动物室供应),每只 2 公斤左右。采用耳静脉内注射。共免疫 4 次,每两次间的间隔为 5—6 天。免疫剂量逐渐增加:第一次 0.5ml,第二次 1ml,第三次 1ml,第四次 1.5ml。各个品系的四次免疫所用红血球均是来自同一条鱼体。最后一次注射后十天将兔放血,分离出血清。将血清进行热灭活(56℃, 30 分钟),贮存于-10℃ 备用。

(三) 血球凝集试验

用甘氨酸盐酸盐溶液在 6 孔玻璃稀释板上连续顺序稀释抗血清(1:20, 1:40, 1:80, ..., 或从其中某一个滴度开始接下去进行 1/5 稀释)。必要时,抗血清需用等体积的同种或异种鱼红血球加以吸收(吸收试验,室温,30 分钟),然后再作连续稀释。每个试验血清的最高稀释孔旁边的一孔加入 1%NaCl (与血清孔等量),作为凝集对照孔。在每个稀释孔及对照孔中加入待试红血球 20ul,轻轻振荡使红血球均匀分布。室温(20—25℃)下半小时后在双目解剖镜下观察,见到有雪花状、短棒状或不规则的细胞团块即是发生凝集反应的标志。根据视野中细胞凝集团的相对大小,将凝集反应分为 4 级:① 极度凝集反应(+++);② 较强凝集反应(++);③ 凝集反应(+);④ 阴性反应(-),即不发生凝集。

结 果

(一) 各抗鲤鱼红血球抗原抗血清(abs)的效价测定

各个兔抗血清分别与它的供体鱼红血球(“靶红血球” target RBC)反应,以检验抗血清的活性水平(表 1)。

表 1 鲤鱼不同品系 RBC 抗血清(abs)效价
Tab. 1 The titre of anti-Carp clone RBC sera

抗血清 abs	稀释度 dilution	反应 reaction								对照 control
		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2028	1:2560
abs/8413		+++	+++	+++	++	++	+	+	+	-
abs/8305		+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+
abs/RMGF ₁		+++	+++	+++	++	++	+	+	+	+

(二) 各雌核发育系鲤鱼品系间的交互凝集反应

将特异性的各个抗鲤鱼红血球抗血清分别与下列各品系的鲤鱼[雌核发育二代红鲤、(R₈₃₀₅ 和 R₈₄₁₃)、雌核发育一代红镜鲤 (RMGF₁)、普通红鲤、散鳞镜鲤]以及鲢中随机抽检的 4—5 条鱼的红血球反应(这几条鱼中包括有免疫家兔时的红血球供体鱼),以了解雌核发育红鲤间及雌核发育红鲤与其他鲤科鱼间 RBC 抗原差异性的大小 (表 2)。表中二个数值系所有受试鱼反应值的下限与上限,上下限相同则只注明一个数值。 各种 RBC 的对照均呈阴性反应。

表 2 鲤鱼各雌核发育系间的交互凝集反应

Tab. 2 The results of cross agglutination among various gynogenetic strains of Carp

红血球 RBC 抗血清 abs	红鲤 red carp R ₈₄₁₃	红鲤 red carp R ₈₃₀₅	红镜鲤 red mirror carp RMGF ₁	兴国红鲤 red carp	散鳞镜鲤 scatter scaled mirror carp	白鲢 Hy. m.
abs/8305	1521,2028	1521,2028	1141,1521	782	320,640	80
abs/8413	2028,2360	1521	853,1141	782	320	80
abs/RMGF ₁	1141,1521	640,853	2028	305	640,746	160

(三) 兔抗 R₈₃₀₅ 及 R₈₄₁₃ 红血球抗原抗血清的吸收试验

分别取 1ml 的兔抗 R₈₃₀₅ 及 R₈₄₁₃ 红血球抗原的抗血清,加入 1ml 体积经洗涤过的如下红血球: R₈₄₁₃、R₈₃₀₅、RMGF₁、鲢,室温中(20—25℃)半小时, 1000r/min 离心 4 分钟,上清液作前述的连续稀释,然后加入各自的靶红血球, 30 分钟后观察结果 (表 3)。

表 3 抗 R₈₃₀₅ 及 R₈₄₁₃ 红血球抗原抗血清的吸收试验

Tab. 3 The results of absorption test of abs/8305 and abs/8413

抗血清 abs/8413 抗原 RBC	未吸收前 unabsorpted	R ₈₃₀₅ RBC 吸收 absorpted by R ₈₃₀₅ RBC	RMGF ₁ RBC 吸收 absorpted by RMGF ₁ RBC	Hy. m.RBC 吸收 absorpted by Hy. m. RBC
R ₈₄₁₃ RBC	1280	320	640	1280

抗血清 abs/8305 抗原 RBC	未吸收前 unabsorpted	R ₈₄₁₃ RBC 吸收 absorpted by R ₈₄₁₃ RBC	RMGF ₁ RBC 吸收 absorpted by RMGF ₁ RBC	Hy.m.RBC 吸收 absorpted by Hy. m. RBC
R ₈₃₀₅ RBC	2560	320	640	1280

表 3 结果表明,经 R₈₄₁₃RBC 吸收后, abs/8305 的上清液活性明显降低。同样, abs/8413 经 R₈₃₀₅RBC 吸收后,上清液残留活性也只有 1:320,说明这二者之间抗原在很大程度上是相同的,因为吸收后上清液的残留活性同吸收者与受试者在成份上的相似性的大小程度成反比。

讨 论 与 结 语

抗原抗体反应的状态在某种程度上取决于温度、时间等外在因子,因而在涉及有抗原抗体反应的试验应尽可能在温度相仿的条件下进行,对反应的观察也需要有一个固定的时间^[5]。本试验是在 20—25℃ 下进行的,有时气温稍低,则采取人工调节的方法(如恒温箱等)加以补偿。同时,由于红血球是一个脆性较大的细胞,因此血球凝集试验(hemagglutination test)又是较为特殊的抗原抗体反应,反应时间过长则红血球有可能破裂(溶血),影响试验结果。我们通过摸索,在血球与抗血清接触后 30 分钟观察,结果较为理想。

红细胞膜上的抗原相当复杂。根据较多种的鱼与两栖类、哺乳类等动物一样以“急性”排斥移植皮肤的事实⁹,推断鱼类中也有一个相当于高等脊椎动物的主要组织相容复合体() 的基因控制座位。鉴于在高等脊椎动物中的研究表明,红细胞膜上的某些同种异型抗原(allotypic antigens)与 MLR(混合白细胞反应)及“急性”皮肤移植排斥是受同一个基因座位控制的,但同种异型抗原决定簇与 MLR 决定簇是相分离的。这些同种异型抗原在两栖类和鸟类中的检测较为容易。这也许是由于这二种动物的红细胞均有一个活性核的缘故^[6]。鱼类的红细胞也为有核细胞,为此我们拟通过检测鱼类的某些同种异型抗原的遗传相似性,以探讨作为品系鉴定的标志,初步结果表明,这种手段是有意義的。兔抗血清与各品系的鲤鱼红细胞反应,其凝集值各不相同,但各品系中随机抽检的 4—5 条鱼的反应值基本位于同一水平。每个品系中测试的个体均包括有制取抗血清时 4 次免疫用的红血球供体鱼,抗血清与其反应凝集值达最大值(2,000 以上),其它个体反应值与此十分接近。上述结果表明控制红细胞膜上同种异型抗原的基因在各品系中呈不同水平的纯合。以 R_{8413} 和 R_{8305} 的凝集值最为接近,吸收值也相同,推断它们具有很接近(或相同)的基因型。因为 R_{8413} 和 R_{8305} 是由同一个雌性红鲤的卵子(同“外祖母”)经二次连续雌核发育而来的,在雌核发育中虽然需要近类的去势精子的参与,但它只起激发作用,本身的遗传物质并不能在卵中表达,所以由“外祖母”而来的基因没有受到外来基因的掺入。

RMGF₁ 与 R_{8305} 及 R_{8413} 间的反应值差别较大,它们之间的抗原成份相同部分较少。RMGF₁RBC 与抗红鲤 RBC 抗血清的反应值居于红鲤与镜鲤之间,由于未作 abs/RMGF₁ 的吸收试验,故其抗原性质是偏向于红鲤还是偏向于镜鲤,抑或是具有区别于它的“外祖父”、“外祖母”的特性,有待进一步明确。3 个鲤鱼雌核发育系(R_{8305} , R_{8413} , RMGF₁)与普通红鲤、镜鲤之间的反应值差别是明显的,与白鲢^[1]则差别更大。这说明鲤鱼的红细胞抗原在种以下的类群间具有明显的特异性,它不仅可作为鱼类品种鉴定的指标,亦可考虑作为鱼类品系鉴定的指标之一。

参 考 文 献

- [1] 伍献文等著,1964。中国鲤科鱼类志(上卷),225页。上海科技出版社。
- [2] 吴清江、陈荣德、叶玉珍、柯鸿文,1981。鲤鱼人工雌核发育及其作为建立近交系新途径的研究。遗传学报,

1) 同 P₃ 页脚注 1)。

- 8(1): 50—55。
- [3] 金玖蕾、鲍世民、张雅芳, 1985。近交系小鼠遗传监测中几种方法使用的探讨。上海实验动物科学, 5(1): 6—9。
- [4] 张明华、陈杞、杨如俊、贺广彩、胡开元, 1985。SMMC/C 系小鼠混合淋巴细胞反应观察。上海实验动物科学, 5(1): 21—22。
- [5] 尾崎久雄, 1982。鱼类血液与循环生理, 229—249 页。上海科技出版社。
- [6] L. Du Pasquier, X. Chardonnens, and V. C. Miggiano, 1975. A major histocompatibility complex in the toad *Xenopus laevis* (Daudin). *Immunogenetics*, (1): 482—494.
- [7] Louis Du Pasquier and Xavier Chardonnens, 1975. Genetic aspects of the tolerance to allografts induced at metamorphosis in the toad *Xenopus laevis*. *Immunogenetics*, (2): 431—440.

PRELIMINARY STUDY ON THE SPECIFICITY OF RED BLOOD CELL ANTIGENS IN VARIOUS VARIETIES (STRAINS) OF CARP

Tong Jingou Chen Rongde and Wu Chingjiang

(*Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan*)

Abstract

This paper reports the results of preliminary study on the specificity of red blood cell antigens from varieties (or strains) of carp (*Cyprinus carpio* L.). By means of hemagglutination and serological absorption tests, cross reactions between special antiserum and RBC of gynogenetic red carp F₂ and gynogenetic red mirror carp F₁ (RMGF₁) were investigated. It was found that the reaction values are different between these strains, but the values of random samples in a strain are of the same level. These results show that the genes controlling the red blood cell allotypic antigens of carp are homogenous to a great degree in the same strain. Among these tested strains, R₈₃₀₅ and R₈₄₁₃ have the most close reaction values and their absorptions are also identical. It implies that R₈₃₀₅ and R₈₄₁₃ are very similar in their genotypes. The differences among three gynogenetic strains (R₈₃₀₅, R₈₄₁₃ and RMGF₁) and normal red carp, mirror carp and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) are quite obvious. It appears that the allotypic antigens of RBC are peculiar to given carp strain or variety, and it can be considered as one of the markers for fish strain identification.

Key words hemagglutination, variety, strain, carp (*Cyprinus carpio* L.), allotypic antigen, immunity