

红笛鲷仔鱼体内特异性母源抗体降解动力学研究

彭志东 简纪常 吴灶和 鲁义善

(广东海洋大学水产学院,广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室,湛江 524025)

摘要:应用山羊 IgG 免疫红笛鲷亲鱼,人工催产孵化出仔鱼后,用双抗体夹心法检测仔鱼特异性抗体的降解过程,发现抗体水平随时间变化呈下降趋势且可以持续 7d,每尾仔鱼特异性抗体降解量约 0.001 μ g,最低检测限为 0.482 μ g/mL。采用饱和硫酸铵分步盐析与亲和层析等方法纯化红笛鲷仔鱼特异性抗体,结果显示,盐析仔鱼特异性抗体最理想的硫酸铵饱和度为 40%—50%;亲和层析分离到两个明显独立的层析峰。SDS-PAGE 证明纯化的抗体具有极高纯度,其 L、H 链分子量分别为 29kD 和 77.5kD,抗体分子量约为 852kD。该抗体不仅能够与山羊 IgG 产生特异性免疫反应,而且能与兔抗红笛鲷 IgM 抗血清产生免疫反应,因而认为红笛鲷母源抗体可以垂直转移至仔鱼。

关键词:红笛鲷;仔鱼抗体;降解动力学;纯化

中图分类号:Q511 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3207(2009)01-0034-05

红笛鲷 (*Lutjanus erythropterus*) 俗称红鱼,生长速度快,经济价值高,是南方沿海网箱养殖的优选品种之一。随着养殖的发展,病害发生越趋严重,对苗种危害更甚,红笛鲷苗种的平均成活率仅为 4.67%^[1],严重制约了我国红笛鲷规模化育苗的健康发展。成活率低的原因除了生产管理因素之外,还可能由于仔鱼在出生或孵化后的一定时间内,其自身的免疫系统尚不完善,不能产生针对特异性病原的抗体而导致抗病力低。钟明超等认为仔鱼抵抗病原感染的主要免疫分子是来源于母体的抗体,仔鱼可通过卵黄获得母源抗体而得到强有力的被动免疫,保护其免受相应疾病的早期感染以提高其自身的抗病能力^[2]。母源抗体的转移已成为当今鱼类免疫学家所关注的热点,母源抗体提供免疫保护屏障的同时,亦可提供营养^[3]。已检测到卵母细胞、胚胎和仔鱼匀浆液中的母源抗体^[4-6],并从卵母细胞和胚胎中纯化到 IgM,分析了其性质^[7,8]。但未见仔鱼抗体性质的报道,仔鱼抗体含量则极少定量。鉴于此,本文通过免疫红笛鲷亲鱼使仔鱼获得特异性抗体,定量分析了仔鱼特异性抗体(以下均称为仔鱼抗体)的降解过程,纯化了仔鱼抗体并分析了其部分性质,以阐明红笛鲷母源抗体的部分垂直转

移机理,同时对提高红笛鲷仔鱼的抗病力和成活率具有极为重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料 150 尾性成熟红笛鲷,雌雄各半,平均体重 3kg,养于湛江港鱼排。山羊 Ig 与山羊 IgG-Agarose (USBio)、弗氏完全和不完全佐剂 (Sigma)、人标准 IgM 购自卫生部上海生物制品研究所,兔抗红笛鲷 IgM 抗血清(本实验室提供),SDS-PAGE 低分子量标准蛋白质 (BioRad)、浓硫酸等试剂均为分析纯,亲和层析柱 (10cm $\times$ 0.5cm,上海锦华层析设备厂)、酶标仪 (BioTek)。

1.2 亲鱼的免疫 按改进的 Palenzuela^[9]方法对红笛鲷亲鱼进行腹腔注射免疫。基础免疫和 14d 后的第一次加强免疫,分别每尾注射 0.3mg 和 0.6mg 山羊 IgG (溶于 0.15mL 0.01mol/L pH7.2 的 PBS,并加等体积的完全弗氏佐剂)。第 29 和第 44 天进一步加强免疫,剂量分别为每尾 1.5mg 和 3mg 山羊 IgG (加等体积不完全弗氏佐剂),对照组注射 PBS。于最后一次免疫 20d 后,人工催产,孵化繁殖。

1.3 仔鱼匀浆液的制备 自出膜时每天取约 4 万尾仔鱼称重,加入 2 倍体积 (w/V) 的 PBS,低温匀

收稿日期:2006-12-20;修订日期:2007-11-01

基金项目:国家自然科学基金(30471337);广东省自然科学基金(05106515);广东海洋大学项目资助

作者简介:彭志东(1979—),男,湖北孝感人;硕士研究生;研究方向为水产动物免疫学与病害控制。E-mail: pzd800805@163.com

通讯作者:简纪常,教授;Tel: 0759-2339319;E-mail: jianjc@gmail.com

浆, 4℃、8000 r/min 离心 20 min, 上清液重复离心一次, 收集上清 - 20℃保存。

1.4 仔鱼抗体含量的测定

1.4.1 ELISA条件的优化 各级抗原和抗体的 2 倍稀释范围分别为: 山羊 IgG 浓度为 0.195—25 μg/mL, 免疫组和对照组红笛鲷仔鱼匀浆液稀释倍数为 1:1—1:32, 同时设一组空白对照。兔抗红笛鲷 IgM 抗血清稀释倍数为 1:100—1:3200, 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 稀释倍数为 1:500—1:8000。每一反应设两个平行加样孔。(P+B)/(N+B) 值最大者为最佳条件 (P、N、B 分别代表阳性反应加样孔、阴性反应加样孔和空白对照孔的平均光密度值)。

1.4.2 仔鱼抗体的含量 以每孔 100 μL 1.563 μg/mL 山羊 IgG (溶于 0.05 mol/L 碳酸钠 碳酸氢钠缓冲液, pH 9.6) 包被, 4℃过夜; 甩干后用洗涤液 (PBST, pH 7.4) 洗板 3 次, 每次 5 min, 每孔加满 5% 脱脂奶粉, 37℃温育 1 h; 洗涤后每孔加 100 μL 2 倍系列稀释的仔鱼匀浆液, 设两个平行组和对照组, 37℃温育 1 h; 洗涤后每孔加 100 μL 兔抗红笛鲷 IgM 抗血清 (1:800), 37℃温育 1 h; 洗涤后每孔加 100 μL 辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG (1:2000), 37℃温育 1 h; PBST 洗板 5 次, 每次 5 min, 然后每孔加 100 μL OPD 显色液, 37℃避光显色 20 min; 最后快速加入 50 μL 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 于酶标仪上读取 OD_{492nm} 值。

1.5 人 IgM 标准曲线的绘制 同 1.4, 主要加样顺序为: 羊抗人 IgM、人标准 IgM、兔抗人 IgM 血清、辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG。

1.6 饱和硫酸铵分步盐析 向上清液缓慢加入 pH 7.2 的饱和硫酸铵溶液, 并不断搅拌, 使硫酸铵的终浓度为 30% 饱和度, 于 4℃静置 12 h 后, 4℃、8000 r/min 离心 20 min, 沉淀用 Tris-HCl (20 mmol/L, pH 7.2, 含 2 mmol/L EDTA) 重悬, 即得 0—30% 的沉淀重悬液。往上清液继续加饱和硫酸铵, 依次得到 30%—40%, 40%—50% 和 50%—60% 的沉淀重悬液。将重悬液于 4℃、Tris-HCl (20 mmol/L, pH 7.2) 透析除盐, 此后加入等体积 Tris-HCl 稀释分装, -20℃保存备用。

1.7 亲和层析 将山羊 IgG-Agarose 悬液装柱 (高 8 cm), 先用平衡液 (0.01 mol/L, pH 7.2 PBS, 含 0.5 mol/L NaCl) 预洗, 后用 20 mL 洗脱液 (0.1 mol/L Gly-NaOH, pH 11.0) 冲洗, 再用平衡液重新平衡。将 2 mL 上述各级沉淀重悬液和亲鱼血清经 0.22 μm

微孔滤膜过滤后上柱, 平衡液洗至 OD_{280nm} 降到基线后改用洗脱液洗脱, 流速为 20 mL/h, 分别收集不同的洗脱峰, 立即用中和液 (0.1 mol/L, pH 7.2 的 Tris-HCl) 中和。中和后置于 0.02 mol/L, pH 7.2 的 Tris-HCl (含 0.15 mol/L NaCl) 中, 4℃透析 24 h, 每 3 h 更换一次透析液。最后经 PEG20000 浓缩后于 -20℃保存。

1.8 纯度鉴定 SDS-PAGE 检测制备样品的纯度及其 H、L 链的分子量, 浓缩胶浓度为 5%, 分离胶 12%, 上样量为 20 μL, 200 V 恒压电泳 60 min。

2 结果

2.1 人 IgM 标准曲线

人标准 IgM 160、320、640、1280、2560、5120 倍稀释后, 对应 IgM 质量浓度分别为 18.750、9.375、4.688、2.344、1.172、0.586 μg/mL, OD_{492nm} 分别为 0.541、0.482、0.405、0.313、0.224、0.189。用 CurveExpert1.3 绘人 IgM 标准曲线 (图 1), 可见线性效果较好。

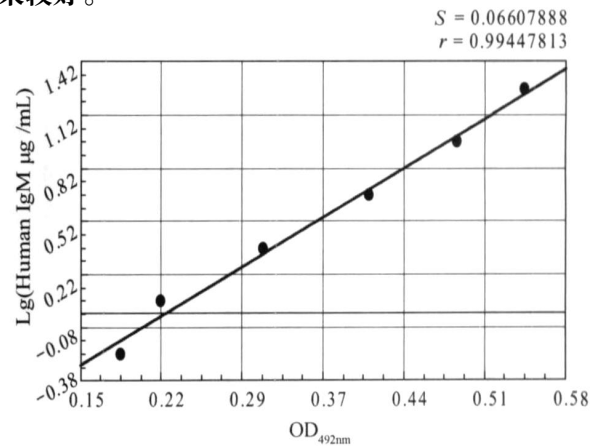


图 1 人 IgM ELISA 标准曲线

Fig. 1 The standard curve of human IgM with ELISA

2.2 仔鱼抗体的降解

确定的 ELISA 的最佳优化条件为山羊 IgG 浓度为 1.563 μg/mL, 兔抗红笛鲷 IgM 血清的稀释度为 1:800, 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 的稀释度为 1:2000, 最低检测限为 0.482 μg/mL。利用仔鱼 OD_{492nm} 分别得到前 7 天免疫组仔鱼抗体含量分别为 12.23、9.73、7.26、6.05、4.95、3.47、1.84 μg/mL, 8 d 后的仔鱼和对照组均检测不出。第 1 天 4 万尾仔鱼的重量为 4.492 g, 第 7 天时重量为 4.501 g, 得出每尾仔鱼抗体的降解量约为 0.001 μg。绘仔鱼抗体含量和光密度值随时间变化图 (图 2、3)。

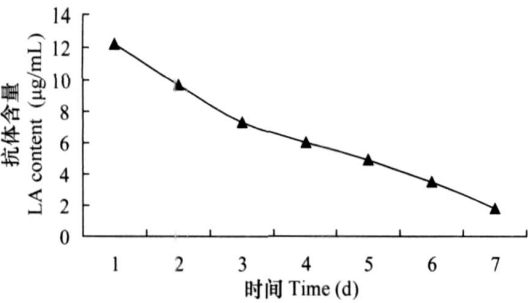


图2 仔鱼抗体含量变化
Fig. 2 Content change of larval antibody

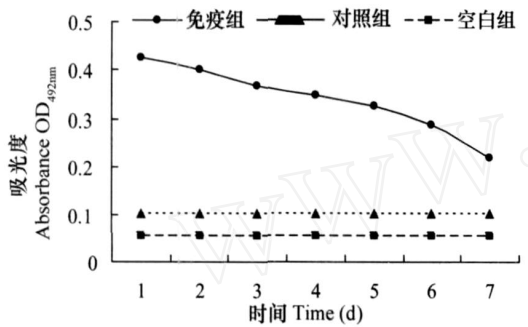


图3 仔鱼抗体 OD 值
Fig. 3 The OD value of larval antibody

2.3 仔鱼抗体的分离纯化

饱和硫酸铵分步盐析时,仅在 40%—50%饱和度间的沉淀重悬液在洗脱时有层析峰出现 (图 4)。I峰为杂蛋白峰,没有与山羊 IgG结合;II峰为洗脱峰,能跟山羊 IgG反应,证明是仔鱼抗体。

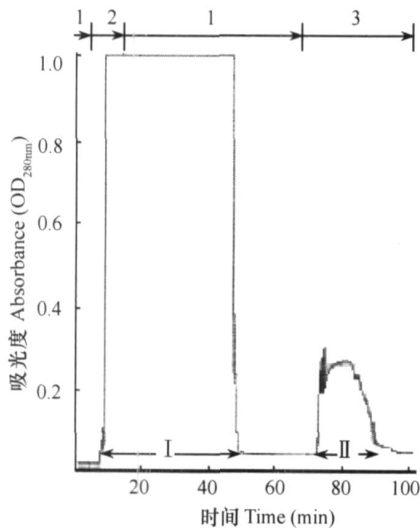


图4 仔鱼抗体的亲和层析图
Fig. 4 Affinity chromatography of larval antibody
1. PBS; 2. 仔鱼抗体 + PBS; 3. 甘氨酸 + NaOH; 检测波长: 280nm; 流速: 20mL/h
1. PBS; 2. Larval antibody + PBS; 3. Glycine-NaOH; wavelength: 280nm; Flow rate: 20mL/h

2.4 分子量与纯度测定

图 5 为 SDS-PAGE结果,仅见分子量约 77.5kD 和 29kD的两条蛋白带,即分别是 Ig的 H、L 链,仔鱼抗体与亲鱼血清抗体的分子量相同;由于没有多余的杂带,表明获得的仔鱼抗体的纯度极高。

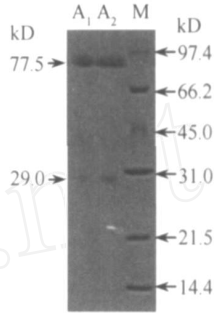


图5 仔鱼抗体 SDS-PAGE图
Fig. 5 SDS-PAGE of larval antibody
A₁ 仔鱼抗体; A₂ 亲鱼血清抗体; M 标准蛋白 (kD)
A₁ Larval antibody; A₂ Mother fish serum antibody; M Standard protein marker (kD)

3 讨论

抗体的含量是评价免疫功效的一个重要指标,由于仔鱼抗体的浓度极低,且单向免疫扩散 (SRD) 的灵敏度低,误差大,故采用高灵敏度的酶联免疫吸附 (ELISA) 来测定其浓度。本研究的最低检测限为 0.482µg/mL,与 ELISA 的检测限 0.1µg/mL^[10]较接近。ELISA 时发现仔鱼抗体既能与山羊 IgG,又能与兔抗红笛鲷血清 IgM 发生免疫反应,与 Fuda^[6]对大麻哈鱼 (*Oncorhynchus keta*) 和 Avtalion^[7]对罗非鱼 (*Sarotherodon galiaeus*) 的研究结果一致。而红笛鲷卵巢中又不存在抗体分泌细胞 (待发表),这就说明仔鱼抗体不是卵巢产生的,而是来自于母源抗体的,其抗原特异性未发生变化。

红笛鲷仔鱼抗体的浓度明显低于亲鱼血清抗体的浓度,但与特异性卵黄抗体的含量 (待发表) 较接近。研究表明仔鱼抗体前 3 天下降速度比后几天快,可能此时仔鱼尚未开口,仅靠卵黄供给自身的营养,而第 4 天开口后,可从外界吸取营养,故降低较缓慢。8d 后检测不到仔鱼抗体,表明卵黄已完全被吸收,同时说明前仔鱼阶段抗体的变化和卵黄的吸收有关。这与 Takahashi^[4]以嗜水气单胞菌免疫虹 (Poecilia reticula) 亲鱼后,在刚产出、产出 1d 或 7d 的小鱼均检测到抗嗜水气单胞菌特异抗体的存在; Mor^[5]以 3 种白蛋白免疫罗非鱼 (*Oreochromis aureus*)

亲鱼后,在 0—9 日龄的胚胎或仔鱼匀浆液中均可检测到特异抗体的存在,并且发现检测到的抗体和免疫亲鱼的蛋白具有特异性;Takemura^[6]研究莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*) 仔鱼 MLP 的变化过程时,认为前期仔鱼的 MLP 来源于母体,在孵化后 12d 降至最低等相关报道相似。确定了仔鱼首免日的同时,将为亲鱼的免疫提供参考,如在某特定时间内免疫亲鱼会使母源抗体在仔鱼体内存留时间更久,但尚待研究。前 7 天的仔鱼仅以微弱的 0.001 μ g 特异性抗体即可抵抗水中特异性病原的侵袭,这也是首次对每尾仔鱼的降解量进行定量分析,而对照组仔鱼没有发现特异性抗体,由于本文是理论研究,对亲鱼用疫苗等免疫,探讨对仔鱼的免疫保护也有待研究。

饱和硫酸铵分步盐析法是粗提免疫球蛋白比较常用的方法,鱼类血清免疫球蛋白主要沉淀于 35%—55% 的区间^[11],对仔鱼抗体进行盐析的报道还未涉及。本研究发现红笛鲷仔鱼抗体沉淀于 40%—50% 的区间,与红笛鲷特异性卵黄抗体沉淀于 45%—55% 区间较接近(待发表)。本研究中范围较窄,避免了因区间范围宽而导致盐析物含较多杂蛋白的发生。这为仔鱼抗体的进一步纯化提供了保障。以商品化的耦联抗原的琼脂糖作亲和层析介质时可以有效纯化仔鱼抗体。该法不仅可得到高纯度红笛鲷仔鱼抗体,而且相对其他纯化方法^[12-15]操作简便、耗时少、实验条件要求低。

本研究首次分离得到纯度极高的仔鱼抗体及测定 Ig 的 H、L 链分子量。如果红笛鲷仔鱼抗体也像大多数硬骨鱼类 IgM 那样在自然状态下为四聚体,则其分子量理论值为 852kD,那么与 Wilson^[16]报道的硬骨鱼类 IgM 范围(H 链 60—81kD, L 链 20—30kD,完整分子 610—900kD)一致,但尚需进一步验证红笛鲷仔鱼抗体的类型和亚基数。红笛鲷仔鱼抗体轻链分子量与血清抗体和特异性卵黄抗体的轻链分子量(待发表)相等,进一步证实了红笛鲷母源抗体的垂直转移,但重链与前两者重链(80kD)略有差别,而本次试验时 SDS-PAGE 结果表明仔鱼抗体与血清抗体具有相同的轻重链,估计由于测量误差导致了细微差异。这表明红笛鲷血清抗体、卵黄抗体和仔鱼抗体是一致的,卵黄抗体和仔鱼抗体从母体免疫系统转移而来。这也继续验证了^[8,12,17,18]关于母源抗体转移的报道。

本研究可应用于生产实践中,如将抗病原体(细菌、病毒)抗体导入卵母细胞,来提高仔鱼抵御

病原体侵袭的能力,以达到提高仔鱼成活率的生产需求。

参考文献:

- [1] Huang H, Yin SW, Chen GH, et al. Studies on larvae rearing of *Lutjanus erythropterus* in sea water ponds [J]. *Marine Culture*, 2005, 2: 58—59 [黄海,尹绍武,陈国华,等.红鳍笛鲷土池人工育苗技术.海水养殖,2005,2: 58—59]
- [2] Zhong M C, Lin H R. Immunomechanism of teleosts during embryonic and early postembryonic developments [J]. *Journal of Fishery Science of China*, 1996, 3 (3): 96—101 [钟明超,林浩然.硬骨鱼类胚胎和胚后发育阶段的免疫机制.中国水产科学,1996,3 (3): 96—101]
- [3] Magnadottir B, Lange S, Gudmundsdottir S, et al. Ontogeny of humoral immune parameters in fish [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2005, 19: 429—439
- [4] Takahashi Y, Kawahara E. Maternal immunity in newborn fry of the ovoviparous guppy [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1987, 53: 721—725
- [5] Mor A, Avtalion R R. Transfer of antibody activity from immunized mother to embryo in tilapia [J]. *Fish Biol*, 1990, 37: 249—255
- [6] Takemura A. Changes in an immunoglobulin M (IgM)-like protein during larval stages in tilapia, *Oreochromis mossambicus* [J]. *Aquaculture*, 1993, 115: 233—241
- [7] Fuda H, Hara A, Yamazaki F, et al. A peculiar immunoglobulin M (IgM) identified in eggs of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) [J]. *Dev Comp Immunol*, 1992, 16: 415—423
- [8] Avtalion R R, Mor A. Monomeric IgM is transferred from mother to egg in tilapia [J]. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 1992, 44 (3): 93—98
- [9] Palenzuela O, Bobadilla S A, Pellitero A. Isolation and partial characterization of serum immunoglobulins from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1996, 6: 81—94
- [10] Taylor J K. Quality assurance of chemical measurements [M]. Michigan: Lewis Publishers, 1987: 328
- [11] Yi G H, Lin T L, Xiong B X, et al. Purification and preliminary structure analysis of serum immunoglobulin in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Fujian Journal of Agricultural Science*, 2005, 20 (2): 91—96 [伊光辉,林天龙,熊邦喜,等.斑点叉尾鲷血清免疫球蛋白纯化及其结构分析.福建农业学报,2005,20 (2): 91—96]
- [12] Bly J E, Grimm A S, Morris I G. Transfer of passive immunity from mother to young in a teleost fish: haemagglutinating activity in the serum and eggs of plaice *Pleuronectes platessa* [J]. *Comp Biochem. Physiol*, 1986, 84 (2A): 309—313
- [13] Olsen Y A, Press C M. Degradation kinetics of immunoglobulin in the egg, alevin and fry of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and the localization of immunoglobulin in the egg [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1997, 7: 81—91

- [14] Picchietti S, Scapigliati G, Fanelli M, *et al* Sex-related variations of serum immunoglobulin during reproduction in gilthead sea bream and evidence for a transfer from the female to the egg [J]. *Journal of Fish Biology*, 2001, **59**: 1503—1511
- [15] Hayman J R, Lobb C J. Immunoglobulin in the eggs of the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Dev Comp Immunol*, 1993, **17**: 241—248
- [16] Wilson M R, Warr G W. Fish immunoglobulins and the genes that encode them [J]. *Annual Review of Fish Diseases*, 1992, **2**: 201—221
- [17] Sin Y M, Ling K H, Lam T J. Passive transfer of protective immunity against ichthyophthiriasis from vaccinated mother to fry in tilapia [J]. *Aquaculture*, 1994, **120**: 229—237
- [18] Swain P, Dash S, Bal J, *et al* Passive transfer of maternal antibodies and their existence in eggs, larvae and fry of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, **20**: 519—527

DEGRADATION KINETICS OF LARVAL SPECIFIC MATERNAL ANTIBODY FROM CRIMSON SNAPPER (*LUTJANUS ERYTHOPTERUS*)

PENG Zhi-Dong, JIAN Ji-Chang, WU Zao-He and LU Yi-Shan

(Fisheries College of Guangdong Ocean University, Guangdong Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals, Zhanjiang 524025)

Abstract: The mature female crimson snapper (*Lutjanus erythropterus*) which was immunized with goat IgG propagated the larvae. Degradation kinetics of the larval specific antibody was analysed by using the double antibody sandwich ELISA. Purification and partial characterization of the specific antibody of larvae was studied. The purposes above were to elucidate the transfer mechanism of fish maternal antibody and increase the resistance diseases of larvae. The female fish were immunized by intraperitoneal (i. p.) injection with the mixture of the goat IgG added equal volumes of FCA or FIA adjuvant four times interval two week during the period of egg development. After twenty days of final immunization, the female fish were i. p. injected with the mixture of LRH-A₃ + HCG, then propagated the larvae. The results showed that the optimal concentration of the coating antigen, rabbit polyclonal antibody against crimson snapper IgM and horseradish peroxidase-labelled goat anti-rabbit IgG were 1.563 μg/mL, 1 300 and 1 2000 respectively. The standard curve indicated that the detection limit was 0.482 μg/mL. The specific antibody of larvae degraded gradually and dropped to the lowest levels at 7 day after hatching. Meanwhile, ELISA showed that the specific antibody of larvae reacted with goat IgG and the serum of rabbit anti fish serum IgM, which suggested that the specific antibody of larvae had some homology with the serum IgM. The specific antibody of larvae was purified from the larval homogenization using ammonium sulfate precipitation and affinity chromatography. The results showed that the larval antibody was salted out with 40% - 50% saturation of ammonium sulfate. Two independent peaks were obtained with the affinity chromatography method. SDS-PAGE showed that other proteins were not found in the purified larval antibody. The molecular weights of light and heavy chain of the antibody were 29 kD and 77.5 kD respectively, and gross molecular weight was calculated to be 852 kD. It should play an important role in enhancing resistance disease and viability of the larval fishes that the passively immunized mechanism through acquiring special maternal antibody via the yolk of the female fish immunized with antigen.

Key words: *Lutjanus erythropterus*; Larval antibody; Degradation kinetics; Purification