

鲫鱼 (*Carassius auratus*) 卵和 胚胎中母源性免疫球蛋白的定位^{*}

李大疆, 钟明超, 林浩然

(中山大学水生经济动物研究所, 广东 广州 510275)

摘 要: 自鲫鱼血清中沉淀出免疫球蛋白(Ig)并层析纯化. 纯化后的Ig加福氏完全佐剂和福氏不完全佐剂免疫大白兔制得特异抗血清. 免疫组化研究显示母源性Ig最初是在IV时相早期卵中出现. 在卵子的发育过程中, Ig遍布整个卵子并由卵膜至卵中心逐渐减少, 其中卵膜内壁Ig最多. 在心跳期前的胚胎发育过程中, 母源性Ig存在于卵膜内壁、胚胎和卵黄中, 至尾鳍形成期完全消失; 首先是胚胎和卵黄中的Ig消失(心跳期), 然后是卵膜内壁的IgM消失(尾鳍形成期). 在胚胎发育过程中, Ig亦遍布于卵黄之中; 其中, 卵膜内壁含Ig最多; 在胚胎和卵黄中无Ig集中的现象.

关键词: 鲫鱼(*Carassius auratus*); 卵; 胚胎; 免疫球蛋白

中图分类号: Q959.4; Q4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579(2001)02-0082-04

鱼类卵和胚胎在其自身免疫系统发育之前缺乏免疫保护机制. 卵和胚胎依靠其卵壳(或称为放射冠), 以及其它的特异性和非特异性物质(如免疫球蛋白、凝集素和溶菌酶)的保护来抵御来自外部水环境疾病的侵袭^[1]. 现已有证据表明母源免疫球蛋白(Ig)从亲鱼传至卵和胚胎^[2]. 这些免疫物质可能对卵、胚胎和幼鱼具有保护作用. 也有研究证明这一假说的正确性^[3]. 为进一步了解母源性Ig在卵中的作用, 已有人通过免疫组化对Ig在卵中进行了定位^[4,5], 同时也测定了卵、胚胎和幼鱼中Ig的含量^[3], 并在母体免疫后对卵和幼鱼进行了攻毒实验^[3], 结果证明母源性Ig能够保护卵、胚胎和幼鱼抵抗外界病害的侵袭. 但在鲫鱼中尚无母源性Ig的类似报道. 鱼类胚胎中的Ig定位也未见报道. 本文报道了在鲫鱼中分离到的母源性Ig, 并对其在卵子和胚胎中进行了定位.

1 材料和方法

1.1 鲫鱼血清的收集

市场中购得成熟鲫鱼. 自尾静脉用注射器抽血. 室温下凝血1 h, 然后在4℃冰箱中放置一夜. 1 000 r/min离心30 min分离血清, -20℃冰箱储存备用.

1.2 Ig的纯化

方法依Pilstöm等^[6]. 血清加(NH₄)₂SO₄至有50%沉淀Ig. 1 000 r/min离心10 min, 收集沉淀, 溶于2倍血清体积的0.02 mol/L pH 7.6磷酸缓冲液(PBS1), 再加(NH₄)₂SO₄至有33%沉淀Ig, 同法再次离心收集并再溶于同体积的PBS1. 之后, 双蒸水中透析30 h, 0.02 mol/L pH 7.6 Tris缓冲液中透析12 h. 低温下, 再用同一Tris缓冲液在2.5 cm×125 cm Sephadex G-200(Sigma)层析. 收集峰值洗脱液并冰冻干燥. 洗脱曲线用紫外监测仪自动记录.

1.3 SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳

纯化的Ig, 经β-巯基乙醇变性, 用φ=12% SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析, 电泳和染色方法参照Avtanlion和Mor(1992)^[7]. 电泳用Bio-Rad公司的Mini-gel系统. 电泳后的胶经常规考马斯亮蓝染色、脱色后直接干燥于滤纸上.

1.4 抗鲫鱼Ig兔抗血清的制备

抗血清自新西兰大白兔制得. 纯化Ig溶于福氏完全佐剂免疫大白兔, 每隔2个星期用纯化Ig溶于福氏不完全佐剂加强免疫1次. 在第2次加强免疫10 d后, 兔子放血制得抗血清.

1.5 卵和胚胎的制备

每月自市场购回成熟鲫鱼并剖取不同时相卵

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39400015)

收稿日期: 2000-06-19; 作者简介: 李大疆(1969—), 男, 工程师, 现在中山医科大学中山眼科中心眼遗传及分子生物学实验室; 通讯联系人: 林浩然.

子. 5 月自市场购得亲鱼, 用 5 μ g LHRH-a+5 mg DOM 催产后收集受精卵并在水族箱中孵化, 收集不同时相卵子和不同发育时期胚胎, 用 Karnovsky 固定液 (在 0.1 mol/L p H7.4 PBS 缓冲液中溶解多聚甲醛至终浓度为 1%, 再加戊二醛至质量浓度为 0.0125%) 固定后用液氮速冻, 储于-20 $^{\circ}$ C 冰箱. 卵子和胚胎的分相、分期参照文 [8], [9].

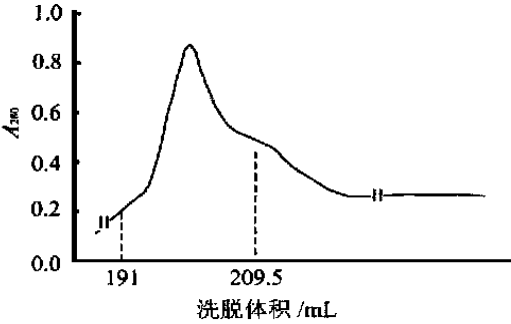


图 1 Sephadex G-200 柱层析粗制鲫鱼 Ig 洗脱曲线

Fig 1 Elution curve of the filtration on sephadex G-200 column for purification of crude Ig of crucian carp
上样量 12 mL, 收集拐点 191 mL 和 209.5 mL 间的 18.5 mL 峰值洗脱液. 在 280 nm 紫外光下监测.

1.6 免疫组织化学

方法依 Hayman 等^[4], 并作部分改动. 在冰冻切片机上切得 12 μ m 切片, 粘贴于涂有明胶粘贴剂的玻片上, 再用 0.01 mol/L pH 7.2 磷酸缓冲液 (PBS2) 预处理. 依次用 0.01 mol/L HIO₄ 和 0.01 mg/mL NaBH₄ 各浸泡 10 min. 37 $^{\circ}$ C 下, 切片用前面制得的兔抗血清在湿盒中孵育 1 h. PBS2 洗涤 30 min. 37 $^{\circ}$ C 下湿盒中, 切片用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗血清 (Sigma) 孵育 1 h. PBS2 洗涤 30 min. 切片在 Karnovsky 染色液 [ρ =0.05% 3, 3'-diamino-benzidine (3, 3', 4, 4'-tetramino biphenyl) tetrahydro-chloride (DAB) 溶于 pH 7.6 Tris-HCl 缓冲液, 加 φ =0.01% H₂O₂] 中浸泡 30 min. 在切片上有褐色沉淀时即有 Ig. 在实验前, 依据 V 时相成熟卵达最佳染色且背景染色最低, 确定最适抗血清和抗体浓度. 处理后的切片在光学显微镜下检查并选择拍照.

2 结 果

2.1 免疫球蛋白的纯化和兔抗血清的制备

在沉淀制得粗 Ig 后, 透析并在 Sephadex G-200 柱上层析, 收集收集上升段和下降段拐点之

间的峰值洗脱液 (191 ~ 209.5 mL 间的 18.5 mL 峰值洗脱液). 冰冻干燥. 图 1 是 (NH₄)₂SO₄ 沉淀制得的粗 Ig 的层析曲线. 在曲线上只出现一个主峰. 纯化 Ig 的 SDS-PAGE 显示只有 2 条蛋白带出现, 是 1 种 Ig 变性后的产物——轻链和重链 (见图 2). 因此, 本实验只分离到了一种鲫鱼 Ig. 用此纯化 Ig 和相应的兔抗血清进行免疫双扩散也只出现一条沉淀线 (未示). 因此, 我们认为本实验所用分离和纯化血清 Ig 是有效的, 而且得到了纯的 Ig, 制得的相应抗血清亦具有极强的特异性.

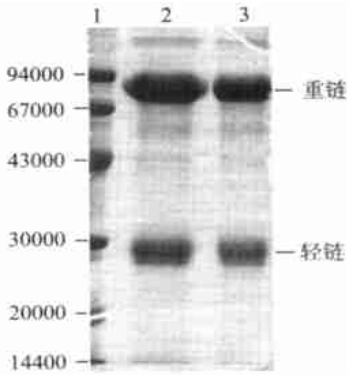


图 2 12%SDS-PAGE 分析纯化鲫鱼 Ig

Fig 2 SDS-PAGE (12%) of crucian carp Ig

1 标准蛋白质; 2, 3 变性降解 Ig
(分别上样 10 μ g 和 5 μ g)

2.2 免疫组织化学

Ig 最早在 IV 时相早期卵的卵黄和卵膜中出现 (图 3). 其位置和其它各时相卵中 Ig 的位置相同. 图 4 显示 V 时相成熟卵中, Ig 分布于整个卵子, 且由卵膜至卵中心逐渐减少; 其中, 卵膜内侧 Ig 最多.

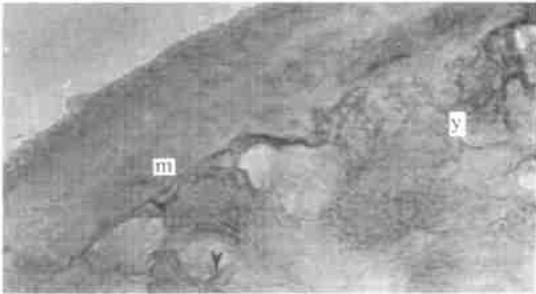


图 3 IV 时相早期卵免疫组化染色

Fig 3 Immunohistochemistry of the early IV phase egg

卵膜 (m)、卵黄 (y) 示 Ig 位置 (黑色箭头) $\times 100$

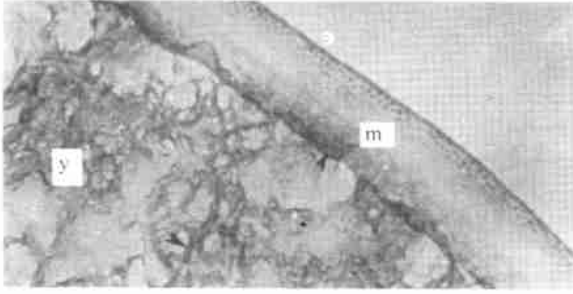


图 4 V 时相成熟卵免疫组化染色

Fig 4 Immunohistochemistry of mature egg of V phase
卵膜 (m)、卵黄 (y) 示 Ig 位置 (黑色箭头) × 100

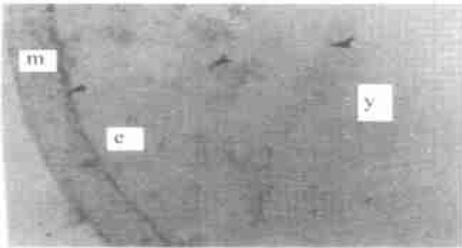


图 5 神经胚期胚胎免疫组化染色

Fig 5 Immunohistochemistry of the neural stage
卵膜(m)、卵黄(y)和
胚体(e)示 Ig 位置(黑色箭头)× 100

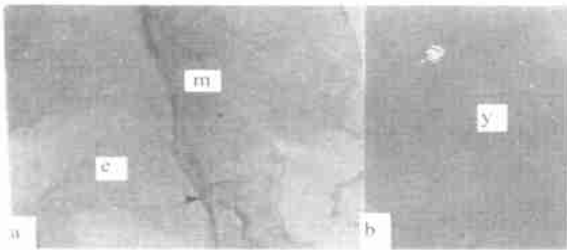


图 6 心跳期胚胎免疫组化染色

Fig 6 Immunohistochemistry of the heart beating stage
卵膜(m)示 Ig 位置 (黑色箭头),
但是卵黄(y)和胚体(e)无染色× 100

在胚胎各期亦发现 Ig 的存在. 胚胎各期 Ig 的分布亦大体相似. 图 5 显示神经胚期 Ig 分布于卵膜内侧和整个胚体与卵黄之中; 其中, 卵膜内侧 Ig 最多. 最后一次测到 Ig 是在心跳期. 图 6 显示只有卵膜内侧有 Ig 分布. 在尾鳍形成期, 卵膜、胚体和卵黄中均未发现 Ig 存在 (未示). 比较图 3 和图 4, 我们发现 V 时相成熟卵染色较 IV 时相未成熟卵深; 比较图 5 和图 6, 可见神经胚期卵膜内侧染色较心跳期深. 从各期卵和胚胎

切片比较可知, IV 时相未成熟卵到 V 时相成熟卵的染色逐渐加深, 而受精卵到心跳期的染色逐渐变浅. 由于事先固定了两种抗体的稀释浓度, 因此卵中 Ig 的量在发育过程中逐渐增加, 并在 V 时相成熟卵达最多; 然后随着胚胎的发育而逐渐减少.

3 讨 论

许多研究人员在鱼血清、表皮和粘液中发现了类似于人 IgM 的免疫球蛋白的存在^[10], 同时也发现在层析粗鱼 Ig 时, 有若干个峰出现^[6, 11, 12]. 因此我们用分离人 IgM 的方法分离鱼 Ig. 但在本实验的 Ig 层析图中只出现一个主峰, 而且 SDS-PAGE 也证明仅有一种 Ig, 这与钟等^[13]在金鱼和鲤鱼中的结果相一致. 需用其它方法进一步的研究才能确定鲫鱼血清中, 除 IgM 外, 是否还有其它种类的 Ig 存在.

卵和胚胎的膜、胚体和卵黄中存在 Ig, 可能表示 Ig 具有保护功能. 因此我们用免疫组织化学的办法对 Ig 在卵和胚胎中进行了定位. 结果表明卵和胚胎的卵膜内侧和卵黄中 Ig 的分布与用同样方法在斑^[4]和鲑鱼^[3]卵中的定位结果一致. 进一步的研究表明 Ig 亦存在于胚胎的卵膜内侧、胚体和卵黄之中. 这一结果符合卵中的 Ig 具有两个功能的假设. 第一是在病原体透过卵壳侵害卵和胚胎内部结构时提供一个免疫保护屏障, 第二是幼鱼吸收卵黄中的 Ig 而获得了母源性免疫功能^[4].

尽管我们未定量测定卵和胚胎中 Ig 浓度的变化, 但还是可以通过卵和胚胎染色的变化, 得出在卵子和胚胎发育过程中, Ig 含量逐渐增加而在受精后则逐渐减少, 这与 Olsen 和 Press^[3]以及 Mor 等^[12]的结果相一致. 但是我们用来定位卵和胚胎中 Ig 的抗血清是用母源性纯化 Ig 免疫获得的. 这两个结果证明了母体免疫的传递. 本实验只在 IV 时相早期卵至胚胎心跳期 (约受精 2 d 后) 间测到 Ig, 这可能是测定方法不够敏感所致, 因为许多研究人员在幼鱼自体产生 Ig 时都测到了母源性 Ig 的存在 (约受精后 130 d)^[3].

进一步的研究应证明母源性 Ig 的保护作用以及促进母源性免疫物质传递的方法.

参考文献:

- [1] VADSTEIN O. The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges[J]. Aquaculture, 1997, 155: 401—417.
- [2] BROWN L L, EVELYN T P T, IWAMA G K. Specific protective activity demonstrated in eggs of broodstock salmon injected with rabbit antibodies raised against a fish pathogen[J]. Disease of Aquatic Organisms, 1997, 31(2): 95—101.
- [3] EGCSET G, MORTENSEN A, LEOKEN S. Vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) before and during smoltification; effects on smoltification and immunological protection[J]. Aquaculture, 1997, 170(2): 101—112.
- [4] HAYMAN J R, LOBB C J. Immunoglobulin in the eggs of the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. Dev Comp Immunol, 1993, 17: 241—248.
- [5] OLSEN Y A, PRESS C M. Degradation kinetics of immunoglobulin in the egg, alevin and fry of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and the localisation of immunoglobulin in the egg[J]. Fish & Shellfish Immunol, 1997, 7: 81—91.
- [6] PILSTRÖM L, PETERSSON A. Isolation and partial characterization of immuno-globulin from cod (*Gadus morhua* L.) [J]. Dev Comp Immunol, 1991, 15: 143—152.
- [7] AVTANLION R R, MOR A. Monomeric IgM is transferred from mother to egg in tilapia[J]. Israeli J Aquaculture-Bamidgen, 1992, 44: 93—98.
- [8] 曲淑慧. 动物胚胎学[M]. 北京: 人民教育出版社, 1981. 250—252.
- [9] 李璞, 汪安琦, 崔道枋, 等. 鲫鱼和金鱼 (*Carassius auratus*) 胚胎发育的分期[J]. 动物学报, 1959(11): 145—157.
- [10] ROMBOUT J H W M, TAVERNE N, KAMP M van den, et al. Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Dev Comp Immunol, 1993, 17: 309—317.
- [11] SANCHER G A, GAFARDO M K, De LOANNES A E. IgM-like natural hemagglutinin from ratfish (*Callorhynchus callorhynchus*) serum: isolation and physico-chemical characterization[J]. Dev Comp Immunol, 1981, 4: 667—678.
- [12] TRUMP G N, HILDMANN W H. Goldfish immunoglobulins and antibodies to bovine serum albumin[J]. J Immunol, 1970, 104: 1267—1275.
- [13] ZHONG M H, MOR A, AVTALION R. One step procedure for the purification of goldfish (*Carassius auratus*) and carp (*Cyprinus carpio* L.) serum immunoglobulin by precipitation with 9% polyethylene glycol 6000[J]. Israeli J Aquaculture-Bamidgen, 1999, 51(1): 3—9.

Location of Maternal Immunoglobulin in the Egg and Embryo of Crucian Carp (*Carassius auratus*)

LI Da-jiang, ZHONG Ming-chao, LIN Hao-ran

(Institute of Aquatic Economic Animals, School of Life Sciences,
Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Immunoglobulin (Ig) were precipitated and purified from crucian carp's sera. After immunized with pure Ig of crucian carp in FCA and FIA, we obtained special antisera from rabbit. Immunohistochemical studies showed maternal Ig began to appear in the early IV phase egg. During the development of egg, Ig dispersed throughout the yolk of the egg and decreased from the membrane to the center, and more Ig localized inside the internal membrane than at other sites. Maternal Ig exist in the internal membrane, embryo body and yolk during embryonic development until heart beating stage and disappeared completely at the stage of caudal fin forming. Ig in embryo and yolk disappeared first, and then disappeared inside the internal membrane of egg. During the embryonic development, Ig also dispersed throughout the yolk of the embryo, and more Ig localized inside the internal membrane than at other sites; there was no phenomena of Ig concentrating in the embryo or yolk.

Keywords: crucian carp (*Carassius auratus*); egg; embryo; immunoglobulin