

# 用免疫消浊比浊法测定中国对虾 血清中的免疫因子

## MEASURING IMMUNE FACTORS IN THE SERUM OF *PENAEUS CHINENSIS* WITH THE METHOD OF NEPHELOMETRY

王伟庆 李爱杰

(青岛海洋大学水产学院, 266003)

WANG Wei-Qing, LI Ai-Jie

(Fisheries College, Ocean University of Qingdao, 266003)

兰翠霞 郭 健

(青岛市第二人民医院, 266033)

LAN Cui-Xia, GUO Jian

(The 2nd People's Hospital of Qingdao, 266033)

关键词 中国对虾, 血清, 免疫因子, 类免疫球蛋白, 免疫消浊比浊法

KEYWORDS *Penaeus chinensis*, Serum, Immune factor, Immunoglobulin-like substances, Nephelometry

近年来, 对虾养殖业受到虾病的极大危害, 防治虾病的关键之一是提高虾体本身的免疫抵抗力; 为此, 必须首先了解对虾的免疫机制, 而目前这方面的报道不多。Söderhäll [1982] 及 Ashida 等 [1982] 分别提出, 酚氧化酶原系统 (proPO System) 在昆虫及甲壳动物中起识别和防御作用; Söderhäll 和 Lage [1992] 认为甲壳动物在进行吞噬作用 (Phagocytosis)、包裹作用 (Encapsulation) 等免疫反应时, 血细胞的作用是非常关键的, 当寄生虫侵入到甲壳动物体内时, 酚氧化酶能起到黑化作用。Anderson [1992] 认为, 甲壳类的免疫机制以非特异性免疫 (Nonspecific immune response) 为主。Marchalonis 和 Edelman [1968] 曾从大眼蟹 (*Limulus polyphemus*) 的血清中分离到一种血细胞凝集素, 它的结构与脊椎动物的不太相同。William [1974] 认为在无脊椎动物中尚未发现免疫球蛋白。叶淑芳 [1991]、王雷等 [1993] 用免疫单扩散法进行了一些对虾血淋巴免疫因子测定方法的研究, 测出了虾体内有免疫球蛋白样物质的存在。本文运用免疫消浊比浊法来测定中国对虾血清, 测得血清中存在类 IgG、类 IgA、类 IgM 等免疫球蛋白样物质、类 C3、类 C4 等补体蛋白样物质及类 CRP (C 反应蛋白) 等物质的存在; 用本法对健康与带病的养殖中国对虾进行测定, 其免疫因子皆有一定程度的差异。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验用虾

实验 1.3.1 及 1.3.2 中用到的中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 为产卵后约一个月的海捕中国对虾, 每尾虾重约 0.08kg, 体长约 23cm, 体表光滑, 无病症; 实验 1.3.3 中用到的健康虾及病虾均取自青岛上马镇养殖场, 体长 5.5~7.0cm。病虾取自发病池, 活动缓慢, 肝胰腺呈红色, 体色灰白, 经电镜检查及平板培养, 证明有细

小病毒、杆状病毒及弧菌等。

## 1.2 血清制备

以酒精棉球擦拭对虾头胸甲及后面第一腹节, 用无菌 1mL 注射器及 5 号针头自心脏取血, 置于 Ependorf 离心管中, 3000rpm 离心 6min(4℃), 析出血清备用。

## 1.3 中国对虾血清中免疫因子的测定

### 1.3.1 用消浊比浊法测定血清中的免疫因子

用消浊比浊法 [王小明和刘中令 1993] 测定对虾血清中的免疫因子。把每份血清稀释成 1:20(0.05mL 血清:1mL 生理盐水), 试剂盒由上海北海精细化工研究所生产, 抗体液分别由羊抗人 IgG、IgM、IgA、C3、C4、CRP 血清及表面活性剂、防腐剂、保护蛋白组成; 按表 1 加入各试剂。

表 1 消浊比浊法所加入的血清量及试剂量

Tab. 1 Reagent expense for measurement of immune factors in the serum of *P. chinensis*

测定项目	IgG	IgA	IgM	C3	C4	CRP*
稀释血清(μL)	10	40	80	100	200	20
抗体液(mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0

\*CRP 的测定用原血清

把各试剂混合均匀, 于 37℃ 水浴放置 15min 后, 在波长 340nm 处以生理盐水调零, 最后在 RA-50 电脑记忆式生化分析仪上测定, 并打印输出结果。

### 1.3.2 用免疫单扩散法(SRID)测定血清中的免疫因子

采用叶淑芳 [1991] 的免疫单扩散(SRID)法测定各免疫因子。取四尾虾的原血清及 1:3 的稀释血清(0.1mL 待测血清:0.3mL 生理盐水), 按表 2 加入单扩散板(北京科兴医用试剂开发中心研制)。

表 2 免疫单扩散法中的血清加入量

Tab. 2 Serum expense for measurement of factors with SRID

测定项目	IgG	IgA	IgM	C3	C4	CRP*
血清(mL)	10	10	20	10	10	10

\*CRP 的测定用原血清

各试剂加入后, 置室温在第 1、3、6、12、24 小时时观察沉淀环直径及清晰度, 两种血清分别记录结果。

### 1.3.3 健康虾与病虾血清中免疫因子的测定

健康虾与病虾各取 5 尾, 依 1.2 方法取血清, 按 1.3.1 方法测两种血清中的各免疫因子。

## 2 结果与讨论

### 2.1 用消浊比浊法测定中国对虾血清中的免疫因子

测定海捕中国对虾血清中免疫因子, 结果如表 3 所示。

由表 3 可以看出, 中国对虾血清中不但含有类 IgG、类 IgA、类 IgM 等免疫球蛋白, 还含有类 C3、类 C4、类 CRP 等免疫因子; 中国对虾血清中各免疫因子含量顺序依次为: 类 IgG > 类 IgM > 类 IgA > 类 C3 > 类 C4 > 类 CRP, 这与人血清中的顺序稍有区别: IgG > IgA > IgM > C3 > C4 > CRP [陶以训 1988], 与人血清标准比较起来, 其含量差异见图 1。

表 3 消浊比浊法测定中国对虾血清中的免疫因子含量

Tab. 3 Contents of immune factors in the serum of *P. chinensis* with nephelometry

测定项目	IgG(g/L)	IgA(g/L)	IgM(g/L)	C3(g/L)	C4(g/L)	CRP( $\mu$ g/L)
1	2.48	0.9	1.25	0.25	0.14	1538.4
2	3.49	2.52	2.81	0.29	0.04	3185.4
3	4.91	1.27	2.04	0.35	0.08	3564.1
4	3.47	2.47	2.18	0.29	0.04	3185.4
5	3.72	1.01	1.45	0.69	0.12	2151.9
6	3.49	2.36	2.16	0.27	0.06	2015.9
7	6.20	1.24	1.39	0.38	0.08	3158.2
8	5.55	1.04	1.27	0.29	0.09	2803.9
9	4.18	3.05	1.75	0.35	0.09	3456.1
10	5.02	1.12	1.30	0.39	0.06	3100.1
11	3.19	1.02	1.65	0.25	0.10	3481.9
12	4.05	1.11	1.69	0.22	0.04	2567.2
平均值± 标准差	4.15± 1.08	1.59± 0.77	1.75± 0.47	0.34± 0.12	0.08± 0.03	2843.6± 646.3

由图1可以看出, 虾血清中的类IgG、类C3、类C4、类CRP比人血清(正常情况下的标准值)中的含量低, 而类IgA、类IgM却接近或略高于人血清中的含量。比浊法是近年发展起来的, 其基本原理是抗原与相应的抗体相遇, 在液相中形成抗原抗体复合物, 从而形成一定的浊度, 该浊度在抗体存在时与抗原的含量成正比。虽然本实验所用抗体液是羊抗人的, 而非羊抗虾的, 但从能够形成抗原抗体复合物这一点来看, 中国对虾血清中含有的类免疫球蛋白及类补体蛋白的结构是与人血清中的免疫球蛋白及补体蛋白的结构应该还是比较相似或相近的, 否则, 就不会发生反应, 这主要是由抗原抗体的特异性决定的。据1968年和1972年世界卫生组织和国际免疫学联合会所属专门委员会先后决定[郑武飞1989], 将具有抗体活性和化学结构与抗体相似的球蛋白统称为免疫球蛋白。本实验中国对虾血清中有结构类似于免疫球蛋白、C3、C4、CRP等物质的存在, 说明虾与人的免疫因子在结构上存在

图1 中国对虾与人血清中

IgG、IgA、IgM、C3、C4、CRP含量的比较

Fig. 1 Comparison of contents of IgG, IgA, IgM, C3, C4, CRP in the serum of *P. chinensis* and human

一定程度的相似。但是, 其分子结构与活性大小还有待于进一步研究。所以, 本实验用比浊法进一步证实和支持了叶淑芳[1991]、王雷等[1993]用免疫单扩散法所做的实验。尽管在无脊椎动物中未发现与脊椎动物类似的免疫球蛋白, 但在腔肠动物, 免疫识别已被发现, 有的环节动物、软体动物、节肢动物显示有杀菌素(bactericidins)、血细胞凝集素(Hemagglutinins)、溶素(lysins)形式的体液免疫, 节肢动物体内有循环蛋白质(circulating proteins), 能使病毒失活, 只不过无特异性, 可以推断这可能是一种初级形式的抗体; 棘皮动物存在着原始的细胞介导的免疫, 原索动物(Protochordate)有的淋巴细胞能够形成玫瑰花结, 有天然存在的凝集素。从进化的角度可以推断, 对虾体内极有可能含有与高等脊椎动物的免疫球蛋白相似的物质, 只不过发生机制有所不同罢了。Boyle和James[1996]采用从一种龙虾(*Panulirus argus*)得到的蛋白质P450(70% pure)作抗原以产生抗体(Anti-P450), 然后再以该抗体作为抗原做实验发现, 该抗体也能与其它两种龙虾和

两种鱼发生交叉反应, 这说明较低等的虾类的抗原决定簇不是唯一的, 但抗原与抗体的反应是存在的, 这与本实验是一致的。因此, 甲壳动物乃至无脊椎动物的免疫机制有待于进一步的深入探讨。

## 2.2 免疫单扩散法与消浊比浊法的比较

当用稀释血清做时, 只有 IgM 有微弱的反应, 而其余各因子皆未见沉淀反应, 因而, 全改用原血清做实验, 观测结果如表 4 所示。

表 4 中国对虾血清中各免疫因子的免疫单扩散法测定结果

Tab. 4 Results of SRID measurement for immune factors in the serum of *P. chinensis*

免疫因子	血清号数	1h	3h	6h	12h	24h	沉淀环直径(mm)
IgG	1	+	±	—	—	—	4.4
IgG	2	+	±	—	—	—	4.4
IgG	3	+	±	—	—	—	4.4
IgG	4	+	±	—	—	—	4.4
IgA	1	+	±	—	—	—	5.0
IgA	2	+	±	—	—	—	5.0
IgA	3	+	±	—	—	—	5.0
IgA	4	+	±	—	—	—	5.0
IgM	1	+++	+++	+	±	—	6.0
IgM	2	+++	+++	+	±	—	6.0
IgM	3	+++	+++	+	±	—	6.0
IgM	4	+++	+++	+	±	—	6.0
C3	1	+	±	—	—	—	3.6
C3	2	+	±	—	—	—	3.6
C3	3	+	±	—	—	—	3.6
C3	4	+	±	—	—	—	3.6
C4	1	+	±	—	—	—	3.6
C4	2	+	±	—	—	—	3.6
C4	3	+	±	—	—	—	3.6
C4	4	+	±	—	—	—	3.6
CRP	1	+	±	—	—	—	3.8
CRP	2	+	±	—	—	—	3.8
CRP	3	+	±	—	—	—	3.8
CRP	4	+	±	—	—	—	3.8

注: — ± + ++ 表示清晰度

由表 4 可以看出, 各组血清间的同一免疫因子没有差别, 沉淀环大小也一致; 在各因子间, 只有类 IgM 显色较清楚且时间较长, 而其余的因子清晰度较弱且到第 6 小时时沉淀线已消失。由此可以认为: 在该实验条件下, 对虾血清免疫因子的亲和力远不如人的, 因为, 用稀释的人血清可在 24、48 小时内观察结果, 这可能由于对虾的体液免疫力低于人的体液免疫力的结果, 这附合“亲和力随免疫进程提高”的原理[郑武飞 1989], 其中类 IgM 的亲性和性较高; 也可能是由于对虾血清中的免疫因子结构与人的只有某种程度的相似, 其中 IgM 物质与人的更为接近些。

SRID 测定血清中的免疫因子本应用的是稀释血清, 而对虾血清稀释后却未测出, 且各组间无差异, 说明此法灵敏度不高。消浊比浊法则准确且灵敏, 能达到  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的水平, 对于特殊的水浆蛋白已足够应用[王小明和刘中令 1993]。王伟庆和李爱杰[1996]用 SRID 检测体长为 4cm 左右的对虾血清中的免疫因子时, 却无沉淀现象发生, 其原因可能是因此法灵敏度低的缘故。此外, 此法用在对虾上需用原血清, 结果与脊椎动物的无法比较, 而消浊比浊法则能够做到。

## 2.3 健康虾与带病虾血清中各免疫因子的比较

分别取健康虾与带病虾各 5 尾, 取血清进行测定(由于血清量不够, 故未测 CRP 的含量)。结果见表 5。

表 5 健康虾与带病虾血清中各免疫因子的比较(N=5)

Tab. 5 Comparison of contents of immune factors in the serum of healthy prawns and diseased prawns (N=5)

测定项目	IgG (g/L)	IgA (g/L)	IgM (g/L)	C3 (g/L)	C4(g/L)
健康虾	4.76±0.19	0.85±0.09	1.22±0.39	0.32±0.03	0.29±0.03
带病虾	3.21±0.40 **	1.41±0.11	0.73±0.08 *	0.24±0.03 **	0.24±0.02 *

\* t 检验差异显著(P<0.05), \*\* 差异极显著(P<0.01)

经 t 检验(N=5), 健康虾与带病虾的类 IgG 差异极显著(P<0.01), 类 IgA 有差异但不显著, 类 IgM 差异显著(P<0.05), 类 C3 差异极显著(P<0.01), 类 C4 差异显著(P<0.05)。由表 5 可知, 除类 IgA 外, 其余因子的含量健康虾均较病虾含量高, 且差异显著或极显著, 但类 IgA 差异不显著; 且病虾各因子含量高低顺序为类 IgG> 类 IgA> 类 IgM> 类 C3> 类 C4, 这与健康虾以及前述海捕亲虾的免疫因子含量顺序类 IgG> 类 IgM> 类 IgA> 类 C3> 类 C4 是不同的。因此, 用类 IgG、类 IgA、类 IgM、类 C3、类 C4 等做定量指标, 可以反映出机体不同的免疫状况。

### 3 小结

用消浊比浊法研究中国对虾血清中的免疫因子, 测得虾体内含有类似于人的免疫球蛋白样物质及补体蛋白质, 其结构、分子量、活性大小等仍需进一步研究; 此法测定病虾与健康虾, 二者所含免疫因子差异显著; 此法灵敏度高, 较免疫单扩散法精确, 值得推广。

中国科学院海洋研究所李光友教授及王雷博士提供部分资料、青岛大学医学院微生物及免疫学教研室邵济钧教授对本实验的指导及青岛市第二人民医院王学礼主任医师对本实验的建议, 谨在此表示诚挚的感谢。

### 参 考 文 献

- 王小明, 刘中令. 1993. 用一种特型的快速免疫消浊比浊法测定血浆特种蛋白. 上海医学检验杂志, 8(2): 71~73.
- 王伟庆, 李爱杰. 1996. LAPP 对中国对虾生长、缺氧耐受性及免疫抵抗力的影响. 海洋湖沼通报, 67(1): 42~49.
- 王雷, 李光友, 毛远兴. 1993. 口服免疫药物后中国对虾某些血淋巴因子的测定及方法研究. 海洋与湖沼, 26(1): 34~41.
- 叶淑芳. 1991. 中国对虾体液免疫实验方法的探讨. 海洋科学, (6): 66~67.
- 郑武飞(主编). 1989. 医学免疫学. 人民卫生出版社, 36~52.
- 陶义训(主编). 1988. 免疫学和免疫学检验. 人民卫生出版社, 12~21.
- Anderson D P. 1992. Immunostimulant, adjuvants and vaccine carriers in fish; application to aquaculture. Annual Review of Fish Disease, 281~307.
- Ashida M, Iwama R, Iwahana H, et al. 1982. Control and function of the prophenoloxidase activating system. In: Proc. 3rd Int. Colloq. Invertebrate Pathology, University of Sussex, Brighton, England. 81~86.
- Boyle S M, James M O. 1996. Cross-reactivity of an antibody to spiny lobster P450 2L with microsomes from other species. Marine Environmental Research, 42(1~4): 1~6.
- Marchalonis J J, Edelman G M. 1968. Isolation and characterization of a hemagglutinin from Limulus polyphemus. J Mol Bio, 32: 453~465.
- Söderhäll K. 1982. Prophenoloxidase activating system and melanization — A recognition mechanism of arthropods — A review. Dev Comp Immunol, 6: 601~611.
- Söderhäll K, Lage C. 1992. Crustacean immunity. Annual Review of Fish Diseases, 3~23.
- William H. 1974. Phylogeny of immune responsiveness in invertebrates. Life Sciences, 14: 605~614.