

鲤胆汁与血清中免疫球蛋白的比较研究

杨桂文 安利国 温武军 王长法

(山东师范大学生物系, 济南 250014)

摘 要 以正常生活状态下的非免疫鲤为材料, 采用盐析、高速离心、柱层析等方法, 从鲤胆汁与血清中分离提取了免疫球蛋白, 并对它们的理化性质和免疫原性进行了比较研究。结果表明: 鲤胆汁中存在的免疫球蛋白的某些理化性质同血清中免疫球蛋白的相似, 并且二者具有相同的免疫原性。由此推断, 鲤胆汁中免疫球蛋白的来源可能与血清中免疫球蛋白具有一定的同源性。

关键词 鲤, 免疫球蛋白, 血清, 胆汁

人们已经从多种鱼类的胆汁中分离提取了免疫球蛋白[Hart 等 1987, Lobb 和 Clem 1981a, Lamers 1985, Rombout 等 1986], 但鱼类胆汁中的免疫球蛋白是否与其血清中的免疫球蛋白相同, 现有的为数不多的研究结果也不一致。Hart 等[1987] 对猫鲨 (*Scyliorhinus canicula* L.) 及 Lobb 和 Clem[1981b] 对羊头鲷 (*Archosargus probatocephalus*) 胆汁中免疫球蛋白进行了研究, 证明胆汁中的免疫球蛋白具有同其血清免疫球蛋白相同的免疫原性。但羊头鲷胆汁的免疫球蛋白为二聚体, 重链的分子量为 55kD, 而其血清中的免疫球蛋白为四聚体, 重链的分子量为 70kD。可见对于鱼类胆汁与血清中免疫球蛋白的关系, 在不同鱼类中可能存在不同的情况。本文以鲤为实验材料, 对其胆汁与血清中的免疫球蛋白进行了比较研究, 期望有助于有关鱼类免疫学方面的一些基本理论问题的解决。

1 材料和方法

1.1 实验材料

鲤 20 尾, 每条约 0.5kg, 取自山东莱芜雪野水库。

1.2 鲤免疫球蛋白的提取

血清中免疫球蛋白的提取: 将鲤断尾取血, 收集血液, 置室温 1 小时后, 于 4℃冰箱放置 3 小时, 待血清充分析出后, 3 000r/min 离心 15 分钟, 收集上清 (约 50ml 血清), 45% 饱和硫酸铵沉淀, 4℃冰箱过夜, 次日, 10 000r/min, 4℃离心 10 分钟, 收集沉淀, 用 25ml 0.05M pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液将沉淀溶解, 在 0.02M pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中透析 24 小时, 中间换缓冲液 3 次, 过葡聚糖凝胶层析柱 (Sephadex G-200), 收集第一峰, 即为血清 IgM [Kobayashi 等 1985]。

胆汁中免疫球蛋白的提取: 从取过血的鲤中取出胆囊, 仔细剥除胆囊周围组织, 用生理盐水冲洗数次, 然后用吸水纸吸干, 刺破胆囊末端, 使胆汁自由流出并收集。9 000r/min, 4℃离心 30 分钟, 取上清, 用 0.02M pH8.0 Tris-HCl 缓冲液透析 24 小时, 层析 (条件同上), 收集第一峰, 即为鲤胆汁 IgM [Lobb 和 Clem 1981b]。

1.3 高效液相色谱(HPLC)分析

在 Shimadzu LC-6A 高效液相色谱分析仪上进行, DIOL-150 柱, 工作温度为 25℃, 紫外检测波长为 280 nm, 流动相为: 10mM PBS(pH 7.0) 含 0.2M Na₂SO₄、0.01% 叠氮化钠, 流动相流速为 1mL/分钟, 进样量为 20 μL。

1.4 鲤免疫球蛋白的免疫原性分析

抗血清的制备: 取灭菌石蜡油与羊毛脂混合液(4:1)于无菌研钵中, 逐滴加入等量抗原(1mg/mL 蛋白液)及灭活卡介苗(含量一般为 3mg/mL)。边加边研磨, 使之充分乳化; 选年龄在 6 个月以上, 体重 2~3kg 的健康家兔。在兔子的四足掌处的皮下各注射 0.5mL 抗原—福氏完全佐剂乳化剂。每隔 7 天注射一次, 共注射 5 次。从耳缘静脉取少量血, 检查效价, 若抗体效价在 32 以上, 再从耳缘静脉注射抗原 0.5mL, 进行一次加强免疫, 一周后即可采血。

双向免疫扩散试验: 按常规方法进行。

2 实验结果

2.1 鲤胆汁及血清免疫球蛋白的提取

鲤胆汁、血清及人的免疫球蛋白工作标准液, 在完全相同的条件下过 Sephadex G-200 层析柱, 洗脱速度均为 20mL/小时, 收集速度为每只试管/10 分钟。

鲤血清经 45% 饱和硫酸铵沉淀后层析, 只出现一个峰(图 1-a), 该峰的洗脱时间同人的 IgM(图 1-c)峰相近, 此峰即为鲤血清 IgM。胆汁经 9 000r/min 低温离心后层析。也出现了一个同鲤血清 IgM 峰和人 IgM 峰位置相近的峰(图 1-b), 即鲤胆汁 IgM 峰。从胆汁的层析图上看, 除第一峰外还有另外一个较明显的峰, 该峰接近人的 IgG 峰。

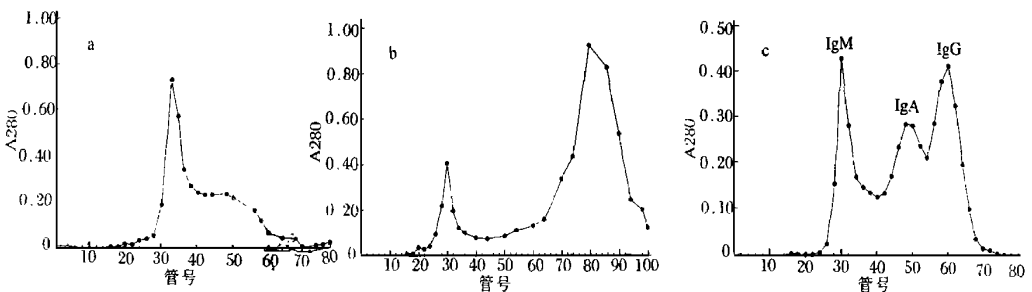


图 1 鲤胆汁、血清及人的免疫球蛋白工作标准液层析图(Sephadex G-200)

Fig. 1 The Sephadex G-200 gel filtration of carp bile, serum and human immunoglobulin standard

a. 鲤血清经 45% 饱和硫酸铵处理后, 过 Sephadex G-200 层析图, 该峰即为血清 IgM;

b. 鲤胆汁经离心处理后的 Sephadex G-200 层析图。第一峰即为胆汁 IgM;

c. 人的 IgM(900kD)、IgA(390kD)、IgG(150kD) 免疫球蛋白工作标准液 (兰州产) 的 Sephadex G-200 层析图。三峰依次为 IgM、IgA、IgG

2.2 鲤免疫球蛋白的高效液相色谱(HPLC)分析

2.2.1 不解离的各种免疫球蛋白的高效液相色谱分析

将收集到的鲤胆汁和血清中的免疫球蛋白及人的 IgM、IgA、IgG 以完全相同的条件进行高效液相层析, 两组免疫球蛋白都呈单一对称峰, 并且每个峰在柱中的保留时间大致相同(胆汁 IgM 为 4.983 秒, 血清 IgM 为 4.883 秒, 人 IgM 为 4.742 秒)。

2.2.2 解离免疫球蛋白的高效液相色谱分析

将提纯的鲤胆汁和血清中的免疫球蛋白经巯基乙醇 α -ME 处理后进行高效液相层析。从图 2 可以看出, 除在原有 IgM 峰的位置上继续留有一较小峰外, 在其后每组免疫球蛋白都新出现两个明显的峰, 两峰的保留时间分别为胆汁 9.892 秒和 10.592 秒、血清 9.742 秒和 10.462 秒。人 IgM 经相同处理后的高效液相层析图同上述两组 IgM 相似, 有两个新峰出现, 保留时间分别为 9.150 秒和 10.658 秒。

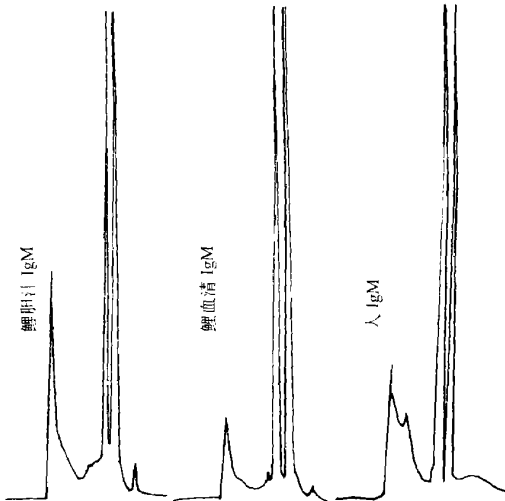


图 2 提取的鲤鱼胆汁、血清免疫球蛋白及人的免疫球蛋白工作标准液(IgM)经巯基乙醇 α -ME 解离后的层析图(HPLC)

Fig. 2 The HPLC of reduced immunoglobulin in carp bile, serum and human immunoglobulin standard(IgM) by α -ME

图 3 免疫沉淀反应图

Fig. 3 Ouchterlony comparison of carp serum and bile immunoglobulin

- 孔中分别是: 1. 兔抗鲤胆汁 Ig 的抗血清;
- 2. 兔抗鲤血清 Ig 的抗血清;
- 3. 血清 Ig 4. 胆汁 Ig

2.3 鲤免疫球蛋白的免疫原性分析

抗鲤胆汁 IgM 的抗血清除与鲤胆汁 IgM 有沉淀反应外, 与血清 IgM 也有沉淀反应, 并且沉淀线之间互相融合, 不出现交叉或部分交叉现象(图 3)。

抗鲤血清 IgM 的抗血清不仅与鲤血清 IgM 有沉淀反应, 而且与鲤胆汁中的免疫球蛋白也有沉淀反应, 并且沉淀线之间互相融合, 同样不出现交叉或部分交叉现象(图 3)。

3 讨论

本文以正常生活状态下的非免疫鲤为材料,参照 Lobb 和 Clem[1981b] 等人的方法,对鲤胆汁及血清中的免疫球蛋白进行了初步分离纯化,从鲤免疫球蛋白 Sephadex G-200 和 HPLC 层析峰的位置可以看出,胆汁 IgM 的分子量同血清 IgM 的分子量相近,比人 IgM 分子量(900kD)略低,约 700kD。从未解离的 HPLC 层析分析可以看出,我们分离得到的两组 IgM 都呈现单一对称峰,说明经过 Sephadex G-200 收集到的各种 IgM 还是比较纯的。将收集到的两组免疫球蛋白经巯基乙醇解离后进行 HPLC 层析分析,从分析中可以看出,解离后的免疫球蛋白都出现了两个新峰,即重链峰和轻链峰,同人 IgM 解离后的层析峰相似,并且重链峰和轻链峰在柱中的保留时间都与 IgM 的重链峰和轻链峰在柱中的保留时间相近,表明两组免疫球蛋白的重、轻链分子量相近,并与人 IgM 重、轻链的分子量接近。实验中还发现在鲤胆汁的层析图上还有另外一个较明显的峰,从峰位置上看,比人 IgG 的分子量要小。

从双向免疫扩散结果来看,鲤胆汁免疫球蛋白的抗血清除与自身相对应的免疫球蛋白发生沉淀反应外,同血清中的免疫球蛋白也可发生沉淀反应,形成沉淀线,并且沉淀线互相融合,不出现交叉或半交叉反应。抗鲤血清免疫球蛋白的抗血清除与血清免疫球蛋白发生沉淀反应外,也可同胆汁中的免疫球蛋白发生免疫沉淀反应,并且形成的沉淀线互相融合,同样不出现交叉或半交叉反应。这些结果表明鲤胆汁中的免疫球蛋白具有与血清免疫球蛋白的免疫原性相同的成份。

不少人认为鱼类存在着粘液性免疫系统,支持这一观点的主要实验证据包括以下几个方面。其一,以特异性抗原经口服或浸泡免疫后,可在胆汁中检测到特异性抗体,而在血清中则很少或检测不到这些特异性抗体[Lamers 1985];其二,在粘液免疫球蛋白和血清免疫球蛋白的比较研究中,有人发现这两类免疫球蛋白之间有不同之处。Lobb 和 Clem[1981a, b] 在研究羊头鲷时发现,羊头鲷的胆汁免疫球蛋白为二聚体,分子量约为 380kD,重链为 55kD,而血清中的免疫球蛋白为四聚体,分子量为 750kD,重链为 70kD;其三, Lobb 和 Clem[1981a] 将羊头鲷的血清免疫球蛋白用 I¹²⁵ 标记后注射于羊头鲷的血液内,在胆汁中未检测到具放射性的免疫球蛋白。据此他们提出鱼类体内存在着独立于血清免疫球蛋白以外的分泌性免疫系统。但是,我们认为已有的实验证据并不能充分证明在鱼类中存在着一个完全独立于血清免疫球蛋白的分泌性免疫系统。不同的免疫途径导致胆汁和血清中免疫球蛋白水平的差异,是由于不同部位的淋巴细胞接触抗原程度不同造成的; Lobb 和 Clem 用 I¹²⁵ 标记血清免疫球蛋白被动注入鱼体内,未在胆汁中发现被标记的免疫球蛋白,可能是由于他们标记的是多聚体的免疫球蛋白,分子量很大,很难由血液进入胆汁中,而实际上,由血液向分泌性组织转运的可能是一些小分子量 Ig 单链;免疫球蛋白向血液转运可能需要数月时间,而 Lobb 和 Clem 在被动注射放射性 Ig 后 45 天进行检测[Rombout 1993];另外,对鱼类胆汁和血清中免疫球蛋白的免疫原性的研究表明了二者具有相同的免疫原性[Hart 等 1987, Lobb 和 Clem 1981b]。鱼类的免疫系统在不同种类中存在着相当大的差异,在部分鱼类中也可能存在类似高等动物的免疫球蛋白的分泌机制,但是,认为鱼类存在着一个完全独立于血清免疫球蛋白的分泌性免疫系统,证据明显不足。至少,在鲤中所得到的实验结果说明胆汁中的免疫球蛋白与血清免疫球蛋白可能是同源的。

本研究系山东省自然科学基金资助项目, 编号 Q94D0222。

参 考 文 献

- Hart S, et al. 1987. An investigation of the biliary and intestinal immunoglobulin and the plasma cell distribution in the gall bladder and liver of the common dogfish (*Scyliorhinus canicula* L.). *Aquaculture*, 67: 147.
- Kobayashi K, et al. 1985. Isolation and characterization of immunoglobulin of hagfish (*Eptatretus burgeri*), a primitive vertebrate. *Molecular Immunol*, 22 (9): 1091 ~ 1097.
- Lamers C H J. 1985. The reaction of the immune system of fish to vaccination. Wageningen; Ph D Thesis Agricultural University.
- Lobb C J, Clem L W. 1981 a. The metabolic relationships of the immunoglobulins in fish serum, cutaneous mucus, and bile. *J Immunol*, 127(4): 1525 ~ 1529.
- Lobb C J, Clem L W. 1981 b. Phylogeny of immunoglobulin structure and function — X II. Secretory immunoglobulins in the bile of the marine teleost *Archosargus probatocephalus*. *Mole Immunol* 18(7): 615 ~ 619.
- Rombout J H W N, et al. 1986. Immunization of carp (*Cyprinus carpio*) with a *Vibrio anguillarum* bacterin; indications for a common mucosal immune system. *Dev Comp Immunol* 10: 341.
- Rombout J H W N, et al. 1993. Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev Comp Immunol*, 17: 309 ~ 317.

COMPARATIVE STUDIES ON THE IMMUNOGLOBULIN IN BILE AND SERUM OF *CYPRINUS CARPIO*

YANG Gui-Wen, AN Li-Guo, WEN Wu-Jun, WANG Chang-Fa
(Department of Biology, Shandong Normal University, Jinan 250014)

ABSTRACT In this paper, immunoglobulins were purified separately from bile and serum of untreated carp by techniques of salting, high speed centrifugation and gel filtration chromatography (Sephadex G-200), moreover, its antigenic, chemical and physical characteristics were studied. The results indicate that immunoglobulin from bile and serum of carp showed identical antigenicity, similar chemical and physical characteristics. A inference would be reasonable that immunoglobulins in different tissues of carp have the same origin.

KEYWORDS *Cyprinus carpio*, Immunoglobulin, Serum, Bile