

文献编号: 1000- 0615(2000)05- 0472- 04

用绿色荧光蛋白标记的细菌 研究鱼体吸收颗粒抗原的部位

陈 营, 陆承平

(南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 江苏 南京 210095)

摘要: 用绿色荧光蛋白标记的嗜水气单胞菌 4332 株 (*Ah4332^{GFP}*) 菌液高渗浸泡和直接浸泡异育银鲫, 研究鱼体对颗粒抗原的吸收。经两种方法处理的鱼, 在整个实验过程中显示, 鱼鳃的标记菌检出量均高于皮肤和肠道中的标记菌, 证实鳃是抗原吸收的主要部位。另外, 鱼体经高渗处理, 鳃和皮肤可检出的标记菌明显增加。在肠道中, 除浸泡 60min 外, 浸泡 10min、30min 及 120min 的细菌检出量也明显增加。显示高渗可促进抗原的吸收。

关键词: 抗原吸收; 绿色荧光蛋白; 嗜水气单胞菌; 异育银鲫

中图分类号: S942.5 文献标识码: A

Application of green fluorescent protein marked bacteria to investigate the site of antigen uptake in *Carassius auratus ibelio*

CHEN Ying, LU Cheng-ping

(Key Lab of Animal Disease Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agric Univ, Nanjing 210095, China)

Abstract: The uptake of granular antigen was examined in *Carassius auratus ibelio* after bath administration of GFP-marked *Aeromonas hydrophila* strain 4332 (*Ah4332^{GFP}*) by hyperosmotic infiltration (HI) and direct immersion (DI). Much more marked bacteria had been found in gills than that in skin and gut in both treatments throughout the experiment. Quantitative analyses indicated that the main site of antigen uptake were the gills in both HI and DI treatments. In addition, the amount of marked bacteria in gills and skin had increased obviously after hyperosmotic treatment, and gut also had increased bacteria during experiment of 10min, 30min and 120min with the exception of 60 min after immersion. It showed that hyperosmotic treatment facilitated antigen entrance in fish.

Key words: antigen uptake; green fluorescent protein; *Aeromonas hydrophila*; *Carassius auratus ibelio*

口服、浸泡和注射是鱼类免疫常用的三种方法, 在这当中浸泡免疫对鱼类最为实用^[1]。浸泡又分直接浸泡和高渗浸泡两种, 浸泡免疫的抗原吸收机制一直是个值得研究的课题, 尤其是抗原的吸收部位究竟在鱼体的哪些器官, 众说不一。绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 在异源细胞中的成功表达为进行这方面研究提供了有效的检测工具^[2]。GFP 作为新的基因报告系统, 可在活体内、在原位即时地检测基因表达和进行蛋白定位^[3,4]。

收稿日期: 1999- 09- 23

资助项目: 国家“九五”攻关子课题资助项目(96- 005- 03- 01)

作者简介: 陈 营(1964-), 男, 辽宁锦西人, 博士, 讲师, 主要从事鱼病学研究。Tel: 0411- 4671025- 383

通讯作者: 陆承平, 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095

本试验应用 GFP 标记的嗜水气单胞菌, 以异育银鲫为模型, 采用高渗浸泡和直接浸泡两种方法, 以观察细菌颗粒抗原在鱼体的吸收部位。

1 材料与方 法

1.1 实验菌株

Ah4332^{GFP}由作者用 pGFPuv 直接转化嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, Ah) 4332 株构建, 该菌由德国吉森大学 Baljer 教授惠赠, 分离自犊牛脏器, 对氨苄青霉素(Ampicillin, Amp)敏感。

1.2 异育银鲫吸收颗粒抗原的定量分析

试验鱼为健康异育银鲫(*Carassius auratus ibelio*), 以下简称银鲫, 购自南京市水产科学研究所, 体重为 50~ 100g·尾⁻¹。分高渗浸泡和直接浸泡两组, 每组均为 12 尾。饲养水体为 40~ 50 L, 水温为 17~ 23℃, 实验过程中保持充气。取 Ah4332^{GFP}过夜培养物稀释成约 10⁷CFU·mL⁻¹的菌悬液, 参照 Ototake^[5]等报道的方法浸泡试验鱼。高渗浸泡组进行两步处理, 首先将鱼在 5.3% NaCl 溶液中浸泡 3min, 然后在上述的菌悬液中浸泡 5min。直接浸泡组以上述的菌悬液浸泡鱼体 5min。两组鱼在浸泡菌液后放入水中漂洗 5min, 最后将鱼放入水箱饲养。

取样分别在鱼体浸泡后的 10min、30min、60min 和 120min, 每组分别取 3 尾。首先采血 0.1mL, 然后分别取皮肤、鳃、肝脏和肠道各约 0.1g。血样直接涂布含 Amp(100μg·mL⁻¹)的 TSA 平板; 其它样品加 1mL 生理盐水后研磨, 对样品悬液进行 10 的倍比稀释, 取 10⁻¹、10⁻²和 10⁻³稀释液各 0.1mL 涂布上述平板。紫外光(UV)下计数发绿色荧光的菌落。以各样品的平均值为试验结果。饲养鲫的水体及稀释菌液用水均未检出发荧光的细菌。

2 结 果

2.1 高渗浸泡银鲫对细菌颗粒抗原的吸收

鱼体在 5.3% NaCl 溶液中浸泡 10min 后, Ah4332^{GFP}在鳃部的检出量就高达 3 × 10³CFU·g⁻¹, 60min 后达最高值, 为 4 × 10³CFU·g⁻¹, 到 120min 时菌量明显下降。皮肤的检出菌呈波动分布; 在肠道中, 开始时菌量就达最高值, 为 1.8 × 10³CFU·g⁻¹; 60min 时, 菌的检出量急剧下降, 而 120min 时, 则略有回升。血液中一直维持较低的检出量, 在 120min 时, 菌量略微增加(图 1)。肝脏中该菌的检出与血液中的相似, 开始时菌量较低, 只有 50CFU·g⁻¹的标记菌检出。60min 及 120min 时菌量略微增加, 菌量与肠道菌量相同, 达 2 × 10²CFU·g⁻¹(图 1 中未标出)。在浸泡后 60min, 鳃部标记菌的检出量达最高值, 在整个实验过程中, 鳃部的带菌量均高于其它部位。到 120min 以后, 鳃带菌量下降, 肠道、血液和肝脏的带菌量则略有升高(图 1)。

2.2 直接浸泡银鲫对细菌颗粒抗原的吸收

直接浸泡 Ah4332^{GFP}在鳃部检出的动态变化与高渗浸泡相似, 在浸泡后 10min, 菌量达 1.2 × 10³CFU·g⁻¹, 60min 时, 菌量略增, 达最高值 2.1 × 10³CFU·g⁻¹, 到 120min 时菌量明显下降; 皮肤标记菌的检出与高渗浸泡组的相似, 呈波动分布, 但幅度较小; 在肠道中, 检出菌量逐渐升高, 60min 时, 菌量最大为 1.2 × 10³CFU·g⁻¹, 随后菌的检出量急剧下降, 到 120min 时, 降为 2 × 10²CFU·g⁻¹; 血液中一直维持较低的检出量, 在 120min 时, 菌量略微减少; 肝脏中只在 10min 时有菌检出。菌量为 50CFU·g⁻¹, 其余时间均未检出。在整个实验过程中, 鳃部的带菌量均高于其它部位。到 120min 以后, 所有部位的检出量均下降(图 2)。

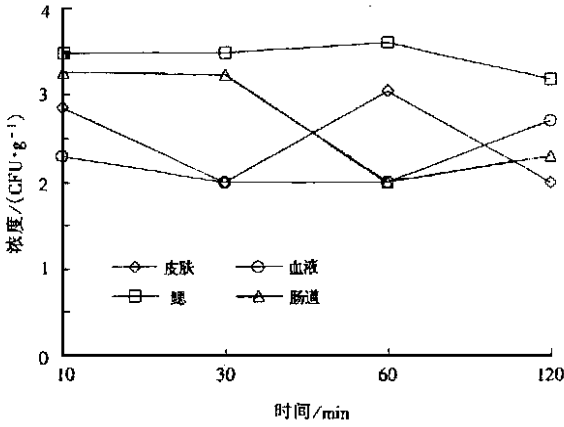


图1 高渗浸泡鲫对细菌颗粒抗原的吸收

Fig. 1 Uptake of bacterial granular antigen by crucian carp after hyperosmotic infiltration

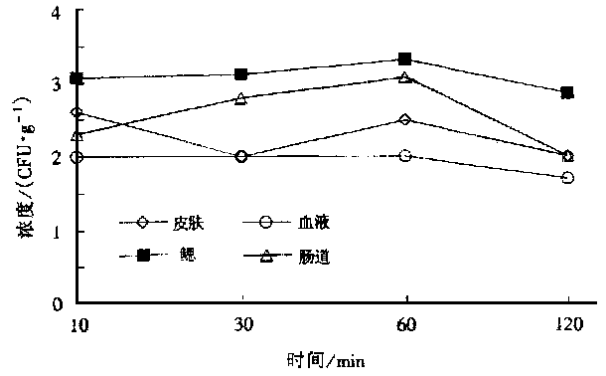


图2 直接浸泡鲫对细菌颗粒抗原的吸收

Fig. 2 Uptake of bacterial granular antigen by crucian carp after direct immersion

2.3 高渗处理对颗粒抗原吸收的影响

高渗处理鲫后, 鱼体的鳃、皮肤、血液及肠道各部位的 Ah4332^{GFP} 检出量均较直接浸泡法为高。只有 60min 时高渗处理组的肠道检出菌量是个例外(图 3)。

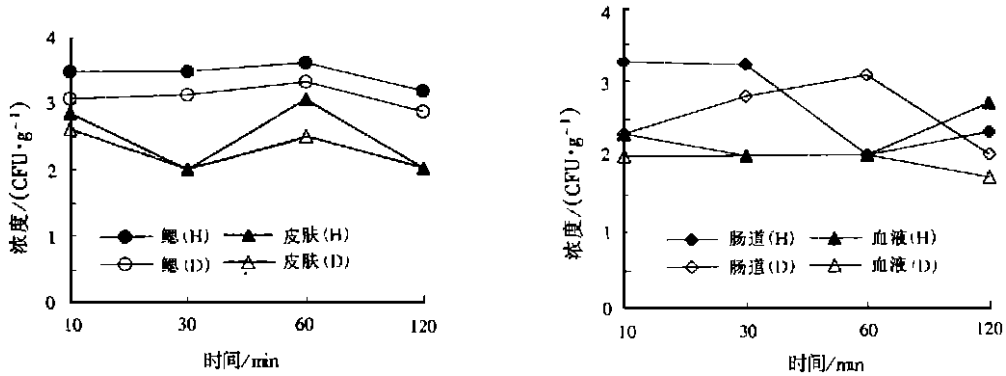


图3 高渗处理对细菌颗粒抗原吸收的影响

Fig. 3 Influence of hyperosmotic infiltration treatment on uptake of bacterial granular antigen

H: 高渗浸泡; D: 直接浸泡

3 讨论

浸泡途径对鱼类免疫而言最为方便、有效, 但浸泡免疫的抗原是否吸收以及从何部位吸收, 尚无定论。本试验用绿色荧光蛋白标记的嗜水气单胞菌浸泡鱼体, 证实鱼体通过浸泡可以吸收细菌颗粒抗原。该方法先进、直观而又准确, 其结果明白无误, 为鱼类免疫途径的研究提供了新手段。

抗原吸收是一个复杂的体内过程, 高渗浸泡和直接浸泡的抗原吸收机制不尽相同, 高渗处理使表皮脱水, 促进了抗原的吸收^[6]。本试验结果显示, 无论是高渗浸泡还是直接浸泡, 鳃部 Ah4332^{GFP} 颗粒抗原的量均比鱼体其它部位高, 这可能与鳃部的结构和功能有关。证实鳃是鱼类免疫抗原吸收的主要部位, 印证了先前的有关报道^[7-12]。Ototake 等^[5]、Moore 等^[13] 先后报道, 鱼的躯干表皮是抗原吸收的主要部位, 其次为鳃。他们试验所用的抗原为牛血清白蛋白, 是可溶性抗原, 与本试验所用的颗粒抗原不同, 可能是造成结果差异的原因所在。

本试验表明, 高渗处理可促进鱼体对细菌颗粒抗原的吸收, 对鳃和表皮的抗原吸收尤为明显。

这一结果对提高鱼类用细菌疫苗浸泡免疫的功效有重要参考价值。

参考文献:

- [1] Ellis A E. Fish vaccination[M]. London: Academic Press, 1988. 55- 66.
- [2] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G. Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J]. Science, 1994, 263: 802- 805.
- [3] Kain SR, Adams M, Kondepudi A. Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization[J]. Biotechniques, 1995, 19(4): 650- 655.
- [4] Tombolini R, Jansson J K. Monitoring of GFP Tagged Bacterial cells[J]. Methods Mol Biol, 1998, 102: 285- 298.
- [5] Ootake M, Iwama G K, Nakanishi T. The uptake of bovine serum by the skin of bath immunised rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. Fish Shell Immunol, 1996, 6: 321- 333.
- [6] Amend D F, Fender D C. Uptake of bovin serum albumin by rainbow trout from hyperosmotic infiltration: a model for vaccinating fish[J]. Science, 1976, 192: 793- 794.
- [7] Alexander J B, Bowers A, Shamssoon S M. Hyperosmotic infiltration of bacteria into trout: Route of entry and the fate of infiltrated bacteria[J]. Developments in Biological Standardization, 1981, 49: 441- 445.
- [8] Bowers A, Alexander J B. Hyperosmotic infiltration: Immunological demonstration of infiltrating bacteria in brown trout, *Salmo Trutta L* [J]. J Fish Biology, 1981, 18: 9- 13.
- [9] Kawahara E, Kusuda R. Location of *Pasteurella piscicida* antigen in tissue of yellowtail *Seriola quinqueradiata* vaccinated by immersion[J]. Jap Fish Sci Soc, 1981, 54: 1101- 1105.
- [10] Smith P D. Analysis of the hyperosmotic and bath methods for fish vaccination comparison of uptake of particulate and non-particulate antigens[J]. Development and Comparative Immunology, 1982, 2: 181- 186.
- [11] Tatner M F, Johnson C M, Home M T. The tissue localization of *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, following three methods of administration[J]. J Fish Biology, 1984, 25: 95- 108.
- [12] Zapata A G, Torroba M, Alvarez F. Electron microscopic examination of antigen uptake by salmonid gill cells after bath immunization with a bacterin[J]. J Fish Biology, 1987, 31: 209- 217.
- [13] Moore J D, Ootake M, Nakanishi T. Particulate antigen uptake during immersion immunisation of fish: The effectiveness of prolonged exposure and the roles of skin and gill[J]. Fish Shell Immunol, 1998, 8(6): 393- 407.

欢迎订阅 2001 年《中国水产科学》

《中国水产科学》是中国水产科学研究院主办的学术性期刊, 主要刊登水产资源、海淡水捕捞、水产养殖与增殖、水产品保鲜与加工、渔业水域环境保护、渔船、渔业机械与仪器及渔业基础研究的学术论文、研究简报、综述和学术动态。主要服务对象是水产研究、教学、科技管理人员以及大专院校师生。

本刊是季刊, 大 16 开, 每期 96 页, 季末出版, 国内外公开发行。国内定价 14 元/期, 全年 56 元(含邮费)。本刊邮发代号: 18- 250, 国内统一刊号: CN 11- 3446/ S, 国际标准刊号: ISSN1000- 8737, 国外代号: 4639Q。全国各地邮局办理订阅手续(可破季订阅)。漏订或补订当年或过期刊, 请直接向编辑部订阅。编辑部地址: 北京市丰台区青塔村 150 号, 邮编: 100039。

联系电话: 010- 68673921, E- mail: jfishok@publica.bj.cninfo.net