

文章编号:1000 - 0615(2006)02 - 0285 - 04

研究简报 ·

鳊免疫球蛋白单克隆抗体的制备及特性

王 凡^{1,2}, 林天龙², 潘厚军³, 吴淑勤³, 杨金先², 李巧苹²

(1. 福建农林大学动物科学学院,福建 福州 350002;2. 福建省农业科学院畜牧兽医研究所,福建 福州 350013;

3. 中国水产科学研究院珠江水产研究所,广东 广州 510380)

关键词:鳊;免疫球蛋白;单克隆抗体

中图分类号:Q511;S942.5 文献标识码:A

Production and characterization of monoclonal antibodies against *Siniperca chuatsi* Ig

WANG Fan^{1,2}, LIN Tian-long², PAN Hou-jun³, WU Shu-qin³, YANG Jin-xian², LI Qiao-ping²

(1. College of Animal Sciences, University of Fujian Agriculture and Forestry, Fuzhou 350002, China;

2. Animal Husbandry and Veterinary Medicine Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China;

3. Pearl River Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: This paper described the preparation and characterization of monoclonal antibodies (Mab) against mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) immunoglobulin (Ig), using the Mabs as a tool for analyzing the structure of *S. chuatsi* Ig, and monitoring the humoral immunity level of *S. chuatsi*. The purified serum Ig of *S. chuatsi* was used as antigen to immunize Balb/C mice, after cell fusion and screening the antibody secreting cell, eleven hybridoma cell lines which secreting Mab against *S. chuatsi* Ig had been established. The characteristics of these Mabs had been analyzed. In isotyping analysis, the results showed that two of them were IgM, three of them were IgG₃, five of them were IgG₁ and one of them belonged to IgA; Further experiments proved that Mab 7F12-F6 only specifically bound to the Ig of *S. chuatsi*; Mab1F12-A3,4D3-A7,3F8-H3,3A5-D11,5C3-A7,5D11-F9 and 6G6-A11 were able to recognise the Ig of *S. chuatsi*, *Anguilla anguilla* and *Anguilla japonica*. And Mab3D5-H7,3D3-A6,4C1-H11 had the cross reaction with the Ig of *A. anguilla*, *A. japonica* and *Colossoma brachypomum*. All of Mabs did not have any cross reaction on the Ig of *Pseudosciaena crocea*, *Epinephelus drummondhayi*, *Carrassius auratus*, Hybrid tilapia, *Clarias fuscus*, ornamental carp, *Micropterus salmonoides* and the fish common bacterial pathogens, such as *Aeromonas*, *Edwardsiella*, *Vibrio*, *Salmonella* and *Escherichia coli*. And their ELISA titer ranged from 10⁴ to 10⁶, the sensitivity of the Mabs purified *Siniperca chuatsi* Ig was at least lower than 39 ng mL⁻¹. These results suggested that the different fish species had both species specific epitopes and the common epitopes on their Ig. These common epitopes not only existed between the close relative species, such as the Japanese eel and European eel, but also existed between the distant relative ones such as *S. chuatsi*, eel and *C. brachypomum* *cuvier*. The studies revealed that the Ig of *S. chuatsi* had evolutionary relationship with the Ig of eel and *C. brachypomum* *cuvier*, and the specific Mab has the potential to be used for detecting the humoral immunity level and the pathogen of *S. chuatsi*.

Key words: *Siniperca chuatsi*; immunoglobulin; monoclonal antibody

收稿日期:2004-12-08

资助项目:国家 863 课题(2003AA622050);国家自然科学基金(30471336)

作者简介:王 凡(1978 -),女,硕士研究生,主要从事水产养殖动物病原微生物研究。Tel:0591 - 87817514, E-mail:wangfanfz@yahoo.com.cn

通讯作者:林天龙, E-mail:lint@pub3.fz.fj.cn

鳊 (*Siniperca chuatsi*) 是我国传统名贵淡水鱼。近年来,随着鳊养殖业的发展,鳊病害也日益猖獗。暴发性疾病的发生与流行阻碍了鳊养殖业的健康发展^[1]。要解决这些问题,除了加强管理、提高养殖技术外,还必须重视其病原学、免疫学等领域的研究,将免疫预防手段引入到鳊养殖业,通过免疫手段有效增强鱼体主动防御能力,减少疾病发生机率^[2]。然而对鳊免疫学的研究还处于初始状态,张永安等^[3,4]提纯了鳊血清免疫球蛋白并进行亚单位分子量的测定。Zhang 等^[5]克隆并分析了鳊免疫球蛋白分子轻链 cDNA 的一些特性。但未见到鳊免疫球蛋白单抗的研制和应用的报道。基于这种认识和生产上的需求,我们开展了鳊血清免疫球蛋白(Ig)单克隆抗体的研究,试图将单克隆抗体运用于鳊 Ig 结构与功能的分析以及病原诊断学和免疫应答规律的研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

鳊,由珠江水产研究所提供,平均每尾 400 g;BALB/C 小鼠,6~8 周龄,购自中科院上海实验动物中心;SP2/O 小鼠骨髓瘤细胞,作者实验室保存;嗜水气单胞菌,编号 GYK-1,珠江水产研究所惠赠;参考血清 10 种,参考菌株 19 株均为作者实验室保存。

1.2 主要试剂

D7777、HAT、HT 培养基,羊抗鼠 IgG 碱性磷酸酶标记物、羊抗鼠亚级份、兔抗羊 IgG-HRP 标记物、融合剂 PEG/DMSO 均购自 Sigma 公司,新生牛血清购自杭州四季青公司。

1.3 免疫原制备

采集嗜水气单胞菌 GYK-1 免疫鳊血液,分离血清,用饱和硫酸铵分步沉淀法初步提纯血清蛋白,测定各分步纯化蛋白的菌体凝集度,收集高效价提取物,测定蛋白含量。分装后 -20℃ 保存备用。

1.4 BALB/C 鼠的免疫和细胞杂交融合

取 50 μg 纯化的鳊血清免疫球蛋白与等体积弗氏完全佐剂充分乳化,腹腔注射 8 周龄 BALB/C 小鼠,21 d 后用等量抗原与弗氏不完全佐剂混匀进行第二次免疫,免疫 14 d 后用 50 μg 加强免疫,3 d 后取免疫鼠脾细胞与 SP2/O 进行杂交融合。细胞融合方法参照文献^[6]进行。

1.5 阳性杂交瘤细胞的筛选及腹水的制备

细胞筛选按文献^[6]的方法。抗体阳性孔的细胞株用有限稀释法进行克隆和亚克隆,扩大培养后冻存于液氮中。复苏冻存的细胞,ELISA 检测仍具有抗体阳性反应的细胞株,按每只 5×10^6 CFU 腹腔接种经石蜡油预先诱导 12 周龄的 BALB/C 小鼠,10~14 d 后抽取小鼠腹水,10 000 r·min⁻¹离心 5 min 取上清,-20℃ 保存备用。

1.6 单抗特性的鉴定

亚级份的测定 按亚级份鉴定试剂盒说明书进行。

单抗特异性的测定 收集石斑鱼、大黄鱼等海水鱼和鳊、欧洲鳊、日本鳊、鲈等淡水鱼血清;以及气单胞菌 10 株、海水鱼弧菌 4 株、大肠杆菌 2 株、沙门氏菌 2 株及爱德华氏菌 1 株作为待检抗原。各种血清均用 PBS 以 1:1000 稀释后包被酶标板,各种病原菌以 PBS 重悬至 OD_{600nm} = 0.5,超声波破碎后包被酶标板。一抗加各种单抗腹水,稀释为 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 3 个梯度。其余步骤同 1.5。

腹水 ELISA 效价的测定 以 5 μg·mL⁻¹ 纯化鳊免疫球蛋白包被酶标板,4 过夜,封闭后加腹水抗体,腹水稀释度为 1:10³~10⁸,每孔 50 μL,其余步骤同 1.5。

单抗灵敏度的测定 纯化鳊免疫球蛋白起始浓度为 5 μg·mL⁻¹,倍比稀释至 10 ng·mL⁻¹,每孔 50 μL,4 过夜,封闭后滴加各种腹水抗体,腹水工作浓度 1:1000,每孔 50 μL,其余步骤同 1.5。

2 结果与分析

2.1 细胞的融合和筛选

免疫脾细胞与骨髓瘤细胞按 4:1 混合杂交融合,融合阳性率达 90% 以上。经过筛选最终获得能稳定分泌抗体的细胞株 11 株:分别命名为 3D5-H7,3D3-A6,4C1-H11,7F12-F6,1F12-A3,4D3-A7,3F8-H3,3A5-D11,5C3-A7,5D11-F9 和 6G6-A11。

2.2 单抗特异性的测定

特异性结果表明,其中 7F12-F6 只与鳊血清发生反应。其余 10 种单抗与欧洲鳊、日本鳊血清存在不同程度的交叉反应,而 3D5-H7,3D3-A6,4C1-H11 等 3 株单抗还与淡水白鲢有交叉反应。所有单抗与被试的 19 种细菌均无任何交叉反应(表 1)。

2.3 单抗效价及特性分析

经抗体的亚级份测定,其中 IgG1 有 5 株,IgG3 有 3 株,IgM 有 2 株,IgA 有 1 株。腹水抗体效价在 10⁴~10⁶ 之间。单抗灵敏度测定结果表明,8 株单抗能检测出 39 ng·mL⁻¹ 的鳊免疫球蛋白,有 3 株(3D5-H7,1F12-A3,4D3-A7)甚至能检测出 15 ng·mL⁻¹ 的鳊免疫球蛋白(表 2)。

3 讨论

近年来,鱼类免疫球蛋白的研究受到免疫学家的广泛关注,并取得显著的进展,人们已经深入探讨了部分鱼类免疫球蛋白的结构、理化性质及其免疫生物学特性^[7],但众多养殖鱼类的免疫学研究还处于初始或空白状况。我国养殖鱼类品种繁多,其免疫学研究相对滞后,这严重制约了鱼类病原学和疫苗学研究的深入发展。因此加强对鱼类免疫球蛋白的研究,既有助于人们对高等动物和鱼类免疫球蛋白的个体发生及免疫系统发育的理解,又可以加快病原学和免疫学诊断技术的发展,将有力地促进鱼类免疫预防技术的进步。

表 1 单克隆抗体的特异性

Tab. 1 The specificity of monoclonal antibodies

	3D5-H7	3D3-A6	4C1-H11	7F12-F6	1F12-A3	4D3-A7	3F8-H3	3A5-D11	5C3-A7	5D11-F9	6G6-A11
鳎 <i>Siniperca chuatsi</i>	++	++	++	+	++	++	++	++	++	+	++
欧洲鳎 <i>Anguilla anguilla</i>	++	+	+	-	+	+	+	+	++	++	+
日本鳎 <i>Anguilla japonica</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
白鲢 <i>Colossoma brachypomum</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
鲶 <i>Clarias fuscus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
鲫 <i>Carrasius auratus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
鲈 <i>Micropterus salmonoides</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
锦鲤 ornamental carp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
罗非鱼 Hybrid tilapia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
大黄鱼 <i>Pseudosciaena crocea</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
石斑鱼 <i>Epinephelus drummondhayi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注: ++ 表示强阳性反应; + 表示阳性反应; - 表示阴性反应

Notes: ++ indicates strong positive result; + indicates positive result; - indicates negative result

表 2 单克隆抗体的特性分析

Tab. 2 The characterization of monoclonal antibodies

单抗 monoclonal antibodies	Ig 亚类 isotype	ELISA 效价 ELISA titer	灵敏度/ ng sensitivity
7F12 - F6	IgG ₁	10 ⁴	78
4C1 - H11	IgG ₁	10 ⁶	39
3D3 - A6	IgG ₁	10 ⁶	39
5C3 - A7	IgG ₁	10 ⁶	39
1F12 - A3	IgG ₁	10 ⁶	15
3A5 - D11	IgG ₃	10 ⁵	39
3F8 - H3	IgG ₃	10 ⁶	39
4D3 - A7	IgG ₃	10 ⁵	15
6G6 - A11	IgM	10 ⁵	39
3D5 - H7	IgM	10 ⁵	15
5D11 - F9	IgA	10 ⁴	20

单克隆抗体由于其特异性强、灵敏度高等优点成为免疫学、血清学研究的重要工具。在过去 10 年中,国内外一些学者对鱼类免疫球蛋白的单抗进行了大量的研究,建立了部分淡水鱼类免疫球蛋白的单克隆抗体。成功研制出抗欧洲鳎免疫球蛋白的单克隆抗体^[6],抗紫红笛鲷血清免疫球蛋白的单克隆抗体^[7]。本文报道了鳎血清免疫球蛋白单克隆抗体的制备及其部分特性研究。经过融合筛选,共获得 14 株抗体阳性细胞株。有限稀释法进行 2 次克隆化,其中 3 株杂交瘤细胞产生抗体的能力消失,这可能是由于多次的继代培养,导致细胞部分染色体丢失所造成的结果,这与王晓春等^[8]的报道相一致。从单抗的特性试验的结果可看出,不同鱼类的免疫球蛋白存在特异性抗原位点,但也存在相同的抗原决定簇。这种共同的抗原决定簇会存在于亲缘关系较近的品种之间,3D5-H7、3D3-A6、4C1-H11 3 株单抗与淡水白鲢血清免疫球蛋白的交叉就证明了这一点,即鲈形目不同种属之间的血清免疫球蛋白之

间有一定的相似度,冯娟等^[7]也报道了类似结果。同时,从鳎免疫球蛋白单抗能与欧洲鳎、日本鳎血清有交叉反应来看,亲缘距离较远的品种之间也可能存在相同或相近的抗原位点。本次所制备的鳎免疫球蛋白单抗与欧洲鳎、日本鳎血清均有交叉,而且与欧鳎的交叉更强,当腹水稀释至 10⁻⁵时,和欧洲鳎血清免疫球蛋白还有很强的交叉反应,而在 10⁻⁴浓度时,和日本鳎血清免疫球蛋白的交叉已经很弱甚至消失。林天龙等^[6]研制出欧洲鳎血清免疫球蛋白单抗,特异性结果表明该单抗与日本鳎血清有着同等强度的反应。从中可以看出,欧洲鳎与日本鳎血清免疫球蛋白之间有高度的相似性,但又存在着种属的差异。

所制备的单抗大多数能检测出 39 ng·mL⁻¹的鳎免疫球蛋白,有 3 株还能检测出 15 ng·mL⁻¹的蛋白含量,而本次我们使用的免疫原只是采用饱和硫酸铵盐析法初步提纯,若使用高纯度的蛋白,相信灵敏度会更高。这种高灵敏性在今后的血清学调查和病原诊断方面将有重要的用途。

鱼类除了血清中有免疫球蛋白外,在皮肤粘液,肠粘液以及鳃粘液中也有特异性免疫球蛋白的存在,它们构成抵御病原微生物侵袭的第一道免疫保护屏障。但是对粘液免疫球蛋白的发生、来源与免疫调控,及其与血清免疫球蛋白的关系,人们尚未取得一致观点^[9,10]。利用鳎单克隆抗体高度特异性可以制备成亲和层析柱,纯化鳎血清免疫球蛋白并制备多抗,从而对鳎免疫球蛋白结构与功能进行深入分析,并分析阐明鳎粘膜免疫球蛋白和血清免疫球蛋白两者之间的异同点,从而说明粘膜免疫球蛋白的发生与来源。总之,特异性单抗的研制为鳎免疫球蛋白结构与功能的分析、血清学流行病学调查,以及鳎免疫应答水平监测和疫苗免疫效果的评价提供了强有力的工具,这将有助于开展更深层次的鳎免疫学研究。

参考文献:

- [1] 高 谦, 聂 品. 鳊鱼病害研究概况[J]. 鱼类病害研究, 2001, 23(3) : 24 - 28.
- [2] 陈红燕, 林天龙, 陈日升, 等. 抗嗜水气单胞菌单克隆抗体的制备及特性分析[J]. 中国水产科学, 2003, 10(2) : 122 - 124.
- [3] 张永安, 聂 品. 鳊血清免疫球蛋白的分离纯化及其亚单位分子量的测定[J]. 水生生物学报, 1998, 22(2) : 192 - 194.
- [4] Zhang Y A, Nie P. Serum immunoglobulin of the mandarin fish *Siniperca chuatsi* with development of polyclonal antibody [J]. Chinese Journal of Oceanology and Immunology, 2002, 20(4) : 332 - 337.
- [5] Zhang Y A, Nie P, Luo H Y, *et al.* Characterization of cDNA encoding immunoglobulin light chain of the mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2003, 95(1 - 2) : 81 - 90.
- [6] 林天龙, 陈 强, 俞伏松, 等. 欧洲鳗免疫球蛋白单克隆抗体的制备及其特性分析[J]. 水产学报, 2001, 25(6) : 532 - 537.
- [7] 冯 娟, 胡超群. 抗紫红笛鲷血清免疫球蛋白单克隆抗体的制备[J]. 热带海洋学报, 2002, 21(4) : 14 - 21.
- [8] 王晓春, 吉水守. 抗杀鲑气单胞菌抗原的单克隆抗体的制备及初步应用[J]. 江西大学学报, 1992, 16(2) : 117 - 120.
- [9] St Louis-Cormier E A, Osterland C K, Anderson P D, *et al.* Evidence for a cutaneous secretory immune system in rainbow trout [J]. Dev Comp Immunol, 1984, 8:71 - 80.
- [10] Lobb C J. Secretory immunity induced in catfish, *Ictalurus punctatus*, following bath immunization [J]. Dev Comp Immunol, 1987, 11:727 - 738.

会议预告·

第五届世界华人虾蟹类养殖研讨会

由中国甲壳动物学会主办、上海水产大学承办的“第五届世界华人虾蟹类养殖研讨会”定于2006年11月2-5日在中国现代化的国际大都市——上海举行,会议主题是“健康养殖、绿色食品”。在此,盛情邀请世界各地的华人虾蟹类科技专家、虾蟹类养殖从业者以及与虾蟹类养殖相关的管理与企业界人士相聚上海,共话虾蟹类养殖的心得,提升虾蟹类养殖之精华,为中国乃至世界虾蟹养殖业的发展做出更大的贡献。会议期间将特邀国内外在虾、蟹或甲壳动物相关研究方面做出突出成绩的知名科学家做大会报告。

会议的议题:主要围绕虾蟹健康养殖和为市场提供安全绿色水产品。内容包括:种质资源保护与良种培育;繁殖发育和苗种培育;养殖环境与生态调控;养殖虾蟹的品质改良;疾病发生与防治;病原、宿主与环境的相互作用,营养与饲料、养殖模式和技术;遗传与基因组学等方面以及相关科技成果的推广与介绍等。

论文提交:提供会议论文摘要(中英文皆可)400字左右,同时标明题目、作者和单位地址,并注明口头报告或墙报。用A4纸打印,于2006年9月30日前寄给会议联系人,或用E-mail提交。

联系人:蔡生力,刘红,通讯地址:上海水产大学,邮编:200090

联系电话:(021)65711733; 65710362; 13386292008 转 5572 或 5283,传真:(021)65711733

E-mail: slcai@shfu.edu.cn; hliu@shfu.edu.cn; xxhuang@shfu.edu.cn