

# 中华鳖对 T3 菌苗的回忆应答

杨先乐<sup>1</sup> 周剑光<sup>1</sup> 蔡完其<sup>1</sup> 艾晓辉<sup>1</sup> 杨志美<sup>2</sup>

(农业部水产增殖生态、生理重点开放实验室, 上海水产大学, 200090)  
(中国水产科学研究院长江水产研究所, 荆州 434000)<sup>1</sup>  
(上海前卫中华鳖养殖场, 上海 201913)<sup>2</sup>

**摘 要** 研究证明用 T3 菌苗免疫的中华鳖具有回忆应答反应。它的回忆应答介于鱼类和哺乳类之间, 具有以下特点: (1) 回忆应答与初次应答的 IAT 峰值差异明显, 比率可达 2 左右; (2) 抗体生成速度较快, 第 16 天左右 IAT 可达峰值水平, IAT 峰值下降速度明显低于生成速度; (3) 与初次应答相比, 回忆应答抗体形成的速度较快, 而消失的速度较慢。

**关键词** 中华鳖, T3 菌苗, 回忆应答

## The anamnestic response of *Trionyx sinensis* immunized with bacterin T3

Yang Xianle, Zhou Jianguang<sup>1</sup>, Cai Wanqi, Ai Xiaohui<sup>1</sup>, Yang Zhimei<sup>2</sup>

(Key lab of Ecology and Physiology in Aquaculture of the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, 200090)  
(Yangtze River Fisheries Institute, CAFS, Jinzhou 434000)<sup>1</sup>  
(Shanghai Qianwei Turtle Farm, Shanghai 201913)<sup>2</sup>

**ABSTRACT** It was demonstrated that soft-shelled turtle, *Trionyx sinensis*, with bacterin T3 had anamnestic response that was situated between the fish and mammal. It possessed these characters: (1) the anamnestic and primary response differed significantly in peak stage of IAT of soft-shelled turtle, and its ratio reached two or so; (2) antibody of primary response produced quickly, which got to the highest level on about the 16th day after the second immunization, but its disappearing speed was slower than producing one; (3) the producing rate of IAT of anamnestic response went up faster than that of the primary, but the dropping rate was slower.

**KEYWORDS** *Trionyx sinensis*, bacterin T3, anamnestic response

中华鳖(*Trionyx sinensis*)是水栖性爬行动物。比较免疫学的研究表明, 它的免疫系统发达程度高于鱼类<sup>[1~4]</sup>, 但它仍是变温动物, 跟鱼类一样, 温度等环境因素对其免疫应答有着较大的影响(杨先乐, 1997. 影响中华鳖免疫应答因素的探讨——免疫原(菌苗)与环境条件.)。关于中华鳖免疫应答的规律, 尤其是回忆应答反应的规律是否也具备鱼类那样的特点, 至今仍鲜有报道。为了给中华鳖的免疫学防治技术指示方向, 我们进行了这方面的研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 免疫原的制备

中华鳖红底板致病株 T3 由长江水产研究所鱼病室分离, 经鉴定为嗜水气单胞菌。扩大培养后, 用 0.4% 的福尔马林 28℃ 灭活 48h, 无菌生理盐水洗涤三次(3 000 r/min 30min), 安全性检验后分装,

国家自然科学基金项目(中华鳖免疫应答规律的研究), 395705650 和农业部“九五”重点项目(中华鳖传染性疾病预防技术的研究), 渔-95-A-96-03-04。

第一作者简介: 杨先乐, 男, 1948 年生, 研究员。Tel: 021-65710870, E-mail: xlyang@shfu.edu.cn

收稿日期: 1999-05-19

4℃冰箱保存备用。

### 1.2 试验鳖

为了重复同一类试验,试验鳖分别取自于长江水产研究所鳖养殖场和上海前卫中华鳖养殖场,体重30~100g,健康无病无伤残。试验前让其适应试验环境3~5天。试验中每组试验鳖(包括对照组)8~10只。

### 1.3 免疫方法与免疫应答水平的测定

以后腿肌肉注射的方式进行免疫,接种量为0.3~0.5mL/只(菌苗浓度 $60 \times 10^8$ cfu/mL)。免疫后若干天,用红细胞间接凝集试验<sup>[5]</sup>测定其血清间接凝集抗体效价(能使致敏红细胞产生 $2^+$ 以上凝集的最高血清稀释的倒数,以下简称IAT)和用 $3 \times 10^8$ cfu/mL T3致病菌菌液攻击,测定其免疫保护率[免疫保护率(%) = (1 - 免疫组死亡率 / 对照组死亡率) × 100,以下简称PRP]。为了排除各次试验检测IAT时因操作和条件不同可能造成的系统差异,每次均以同一血清作为参照,以此同化各次试验结果,以进行分析和比较。

## 2 结果

### 2.1 中华鳖对T3菌苗的初次应答反应

从1995年到1998年,我们设计了27组免疫试验,分别检测了初次免疫后第0,5,10,20,25,30,35,40,50天的IAT和PRP。试验结果表明,免疫后第20天,IAT就由初始状态时的 $7.5 \pm 3.5(2)$ 上升到 $1768.0 \pm 447.6(4)$ ,PRP由0上升到 $91.7 \pm 14.4(4)\%$ ,达到最高值。此后开始下降,到第50天时,仅和第5天的水平相当,IAT与PRP分别为 $124.7 \pm 71.2(2)$ 与 $25.0 \pm 35.3(2)\%$ (图1)。将第20天的免疫应答水平分别与其余各天进行统计分析,可以看出,免疫应答水平达到最高值以前,大部分天数的PRP与IAT与第20天有非常显著差异(如第0天的IAT和PRP及第5天的IAT)或显著差异(如第5天的PRP及第10天的IAT和PRP);而达到最高值以后,除IAT与第20天时的差异仍显著之外,其余天数的PRP的差异程度均不如前者那样显著。

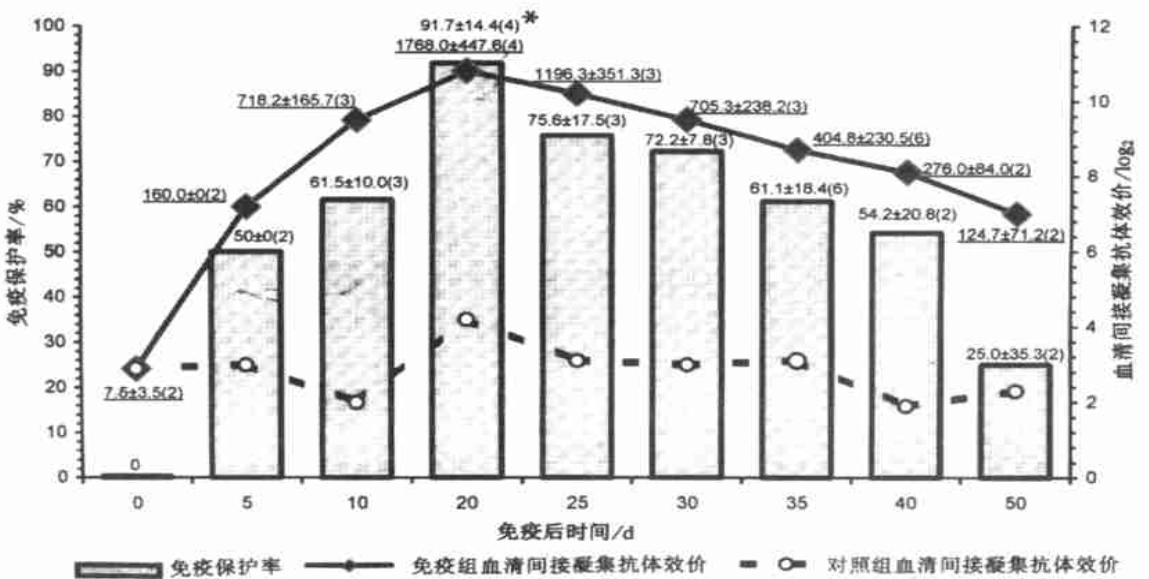


图1 中华鳖对T3菌苗初次应答反应

Fig. 1 The primary response of soft shelled turtle immunized with bacterin T3

注: \* 为平均数 ± 标准差(试验次数)

### 2.2 中华鳖对T3菌苗回忆应答与初次应答的比较

在中华鳖初次免疫后第5、10、20、30天分别测定各免疫组的IAT;第30天对免疫组部分中华鳖进行加强免疫,然后在加强免疫后第5、10、30、60、90、122天分别测定初次与加强免疫的IAT,图2是其试验结果。从图2可以看出初次免疫后第30天IAT由第20天高峰期时的 $853.1 \pm 195.6(3)$ 下降至 $597.4 \pm 391.1(3)$ ,如不进行加强免疫,IAT将继续下降,到第35天时就与高峰期有非常显著的差异( $P < 0.01$ );相反,加强免疫后的第5天中华鳖的IAT就开始回升,到第30天时达到第二个更高的高峰,IAT为 $1706.7 \pm 591.2(3)$ ,峰值约为第一个峰值的2倍左右。以后IAT缓缓下降,第60天时的IAT与第二个峰值时比较仍没有显著差异( $0.5 > P > 0.4$ );持续到第90天IAT仍达 $512.0 \pm 443.4(3)$ ,虽与第二个峰值的IAT差异显著( $0.05 > P > 0.02$ ),但与第一个峰值相比无显著差异( $0.3 > P > 0.2$ );第122天时,IAT仍基本保持在初次应答第5~10天的水平。

以初次免疫与加强免疫的起始接种日、IAT值高峰日以及初次免疫后的第40天与加强免疫后的第122天为起止点,分别得到初次免疫与加强免疫IAT上升期与下降期的4个线性回归方程(表1)。回归方程表明,无论是IAT上升期还是下降期初次免疫的回归系数b都要大于加强免疫,而加强免疫回归方程的a值都大于初次免疫,说明初次免疫IAT的上升速度与下降速度均比加强免疫快,在相同天数情况下加强免疫后的IAT值要大于初次免疫;根据回归方程,若以免疫后IAT要达到1000计算,则初次免疫约需24天,而加强免疫只需10天;若IAT分别从现有的高峰值降到100,则加强免疫需89天,而初次免疫只要18天。

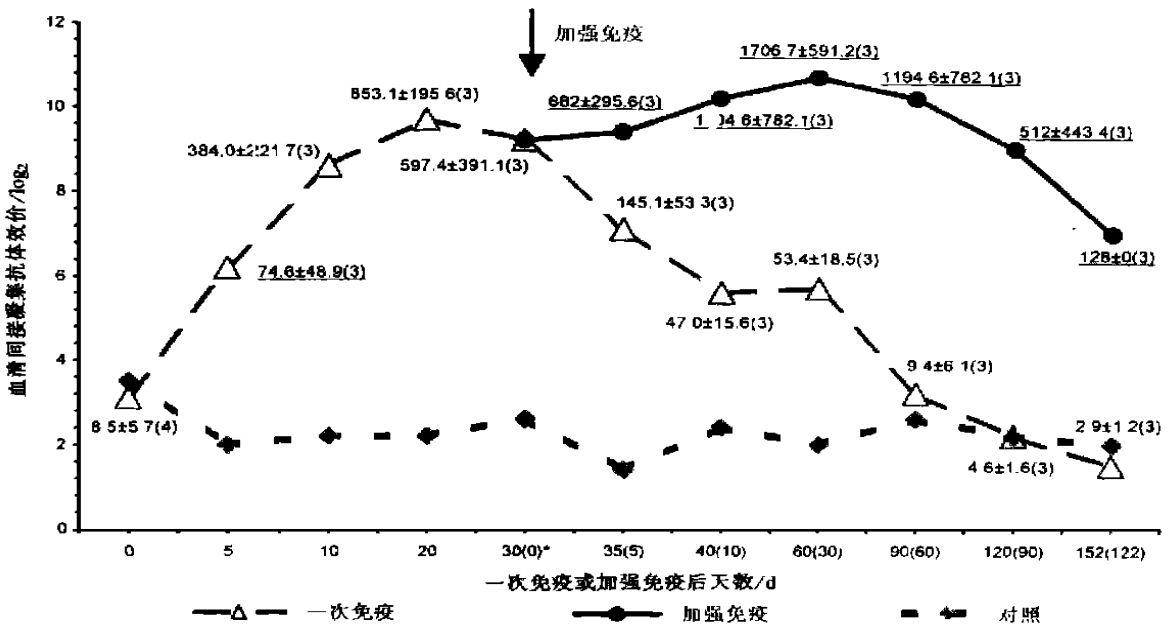


图2 中华鳖对T3菌苗的回忆应答与初次应答的比较

Fig.2 The comparison between primary and anamnestic response of soft shelled turtle immunized with bacterin T3

注:括号内的数字代表加强免疫后的天数

表 1 用 T3 菌苗初次免疫与加强免疫后的中华鳖血清间接凝集抗体效价上升期与下降期的回归方程

Tab.1 The regression equation of IAT of soft shelled turtle in single and booster immunized with bacterin T3 in increasing and decreasing phases

免疫类型	抗体变化类型	回归方程	F	P
初次免疫	上升期	$Y = -54.48 + 44.489X$	67.564	0.014
	下降期	$Y = 893.52 - 42.92X$	26.484	0.036
加强免疫	上升期	$Y = 621.992 + 37.630X$	25.611	0.037
	下降期	$Y = 1649.702 - 17.349X$	145.707	0.007

### 2.3 中华鳖对 T3 菌苗回忆应答抗体产生的高峰期的确定

图 3 是加强免疫第 0, 5, 8, 10, 16, 30, 40, 60, 70 天后, 加强免疫、初次免疫与未免疫的对照中华鳖血清 IAT 的变化情况, 以进一步确切测定加强免疫后抗体峰值出现的时间。结果表明, IAT 高峰出现在第 16 天, 达  $5760.0 \pm 2790.0(4)$ , 它与加强免疫开始时及这一天未加强的一次免疫的 IAT(第 46 天)有极为显著的差异( $P < 0.01$ ), 与加强免疫后的其余各天的差异均不显著。但从显著性差异的程度来说, IAT 上升的速度要大于下降的速度(第 5、8、10、30、40、60、70 天分别为  $0.2 > P > 0.1, 0.2 > P > 0.1, 0.3 > P > 0.2, 0.6 > P > 0.5, 0.5 > P > 0.4, 0.3 > P > 0.2, 0.2 > P > 0.1$ )。此时, 初次免疫的 IAT 下降到  $103.2 \pm 47.8(4)$ , 与一次应答高峰的第 20 天相比有显著差异( $P < 0.05$ )。

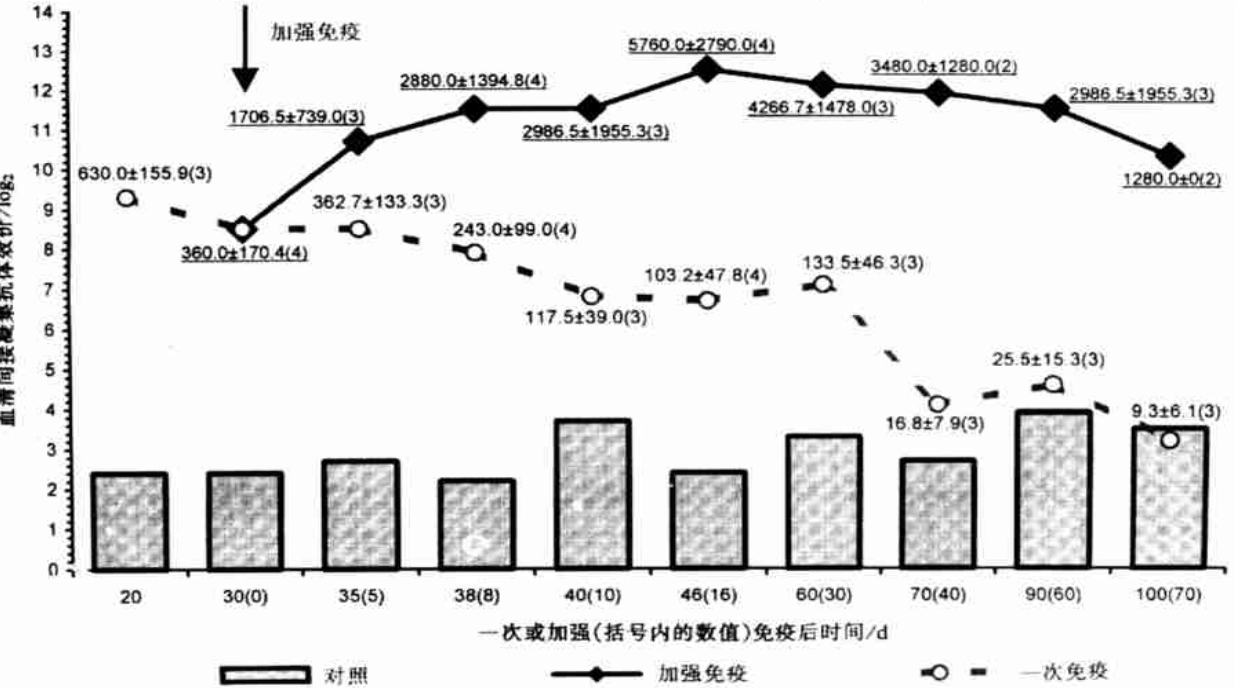


图 3 中华鳖对 T3 菌苗回忆应答抗体产生的高峰期

Fig. 3 The peak stage of anamnestic response antibody of soft shelled turtle immunized with bacterin T3

### 3 讨论

自 Avtalin<sup>[6]</sup> 首先报道用牛血清白蛋白再次免疫鲤, 能导致抗体再度升高, 具有回忆应答之后, 已先后证明鲫、鲈、草鱼、鲢、鳙鱼类也具有类似的反应<sup>[7~12]</sup>。中华鳖属龟鳖类爬行动物, 进化地位高于鱼类, 免疫系统也较鱼类复杂<sup>[1~3]</sup>, 理应具有回忆应答现象, 我们的试验证明了这一点。

中华鳖的分类地位介于哺乳类与鱼类之间, 本试验证明它的初次应答与回忆应答也介于二者之间, 既不同于鱼类, 也与哺乳类有所区别。它具有以下的特点: ①初次应答抗体上升和下降速度较快, 维持时间较短。大部分鱼类对于抗原的刺激, 抗体产生的速度较慢, 但持续的时间较长<sup>[13]</sup>。传染性胰脏坏

死症病毒疫苗免疫的硬头鳊,要在第8周时中和抗体才达到峰值<sup>[14]</sup>,而弧菌疫苗浸泡免疫硬头鳊,血清抗体达到峰值的时间却在第17周<sup>[15]</sup>;人和哺乳类抗体出现较快,但高峰出现后则会很快下降<sup>[16]</sup>。在这一点上,中华鳖比较接近人类和哺乳类。②中华鳖的回忆应答与初次应答抗体的峰值有较明显的区别,回忆应答与初次应答的 IAT 之比可达到 2 左右。对于鱼类,回忆应答与初次应答的抗体的比率较低<sup>[6,7]</sup>,有的鱼类(如硬头鳊等)在某些时候回忆应答与初次应答几乎没有区别,出现回忆应答抑制现象<sup>[17,10]</sup>;而对于哺乳动物或人类,回忆应答的抗体水平可高出初次应答几倍乃至 20 倍以上<sup>[16]</sup>。由此可见,中华鳖回忆应答与初次应答抗体的比率介于二者之间。③从图 2 可以看出,中华鳖回忆应答抗体峰值出现在第 30 天左右;进一步缩小测定的期限,得到第 16 天回忆应答抗体就可达到峰值水平(图 3)。由此我们认为,中华鳖的回忆应答抗体产生速度相应较快,而鱼类要获得较强的回忆应答则需经较长的记忆时间<sup>[18,19,11]</sup>,人类却无潜伏期或经较短的潜伏期就可产生较强的抗体。另一方面,中华鳖回忆应答抗体达到峰值后,下降的速度明显低于抗体峰值产生的速度,这一点也与鱼类有较大的区别。④与初次应答相比,中华鳖回忆应答抗体形成的速度较快,而消失的速度较慢。本试验证明,回忆应答的 IAT 维持到 4 个月左右仍非常明显地高于未免疫对照组,虽比鱼类所维持的时间短(鱼类 10 个月左右)<sup>[20,15]</sup>,但比人类(可维持一个月以上)明显要长。

从中华鳖对 T3 菌苗初次应答与回忆应答的试验结果来看,以免疫防治的方法控制中华鳖重大传染性疾病的发生是一条可行的途径。只要我们根据中华鳖免疫应答反应的规律性,研制抗原性强的疫(菌)苗,采取恰当适时的给予方法,就能有效地控制其疾病的发生。

岳阳农校学生何淑云、卢玲娟参加部分工作,谨致谢意。

## 参 考 文 献

- 1 Borysenko M, Cooper E J. Lymphoid tissue in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. J Morph, 1972, 138: 487
- 2 Zapata A, Fernandez J. Thymus of reptiles: A structural study in *Lamerta hispanica* and *Elaphe scalaris*, Dev Comp Immunol, 1984, 21: 185~192
- 3 刘恩勇,陈万芳,朱普智. 中华鳖外周细胞形态学观察. 南京农业大学学报, 1991, 14(3): 91~94
- 4 杨先乐,贺路,柯福恩. 鳖病研究的现状及其展望. 中国水产科学, 1995, 2(4): 78~85
- 5 杨先乐,贺路,艾晓辉等. 间接红细胞凝集反应检测中华鳖血清抗体的方法. 水产学报, 1999, 23(1): 59~66
- 6 Avtalin R R. Temperature effect on antibody production and immunological memory in carp (*Cyprinus carpio*) immunized against bovine serum albumin (BSA). Immunol, 1969, 17: 927
- 7 Trump G N, Hillemann W H. Antibody responses of Goldfish to bovine serum albumin: primary and secondary responses. Immunol, 1970, 19: 621
- 8 Ambrosius H, Frenzel E V. Anti DPN antibodies in carps and tortoises. Immunochemistry, 1971, 9: 65~71
- 9 Ingram G A, Alexander J B. The immune response of brown trout (*Salmo trutta* L.) to injection with soluble antigens. Acta Biol Med Germ, 1980, 35: 1561~1570
- 10 Dunier M. Absence of anamnestic response to DNP Haemocyanin and DNP Ficoll in rainbow trout. Proceedings of the Fish Immunology Symposium, 1984, 83
- 11 Lamers C H J, De Haas M J H, Van Muiswinkel W B. The reaction of the immune system of fish to vaccination: Development of immunological memory in carp, *Cyprinus carpio* L., following direct immersion in *Aeromonas hydrophilla* bacterin. J Fish Dis, 1985, 8: 253~262
- 12 杨先乐,曾令兵. 草鱼对 CFRV 疫苗免疫应答的研究. 水产学报, 1993, 17(4): 312~318
- 13 杨先乐. 鱼类免疫学研究进展. 水产学报, 1989, 13(3): 272~284
- 14 Dixon P F, Hill B J. Inactivation of infectious pancreatic necrosis virus for vaccine use. J Fish Dis, 1983, 6: 399~409
- 15 Thuvander A, Hongslo T, Jansson E, et al. Duration of protective immunity and antibody titres measured by ELISA after vaccination of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson, against vibriosis. J Fish Dis, 1987, 10: 479~486
- 16 陈仁. 免疫学基础. 北京:人民卫生出版社. 1984, 85~87
- 17 O'neill J G. Temperature and the primary and secondary immune responses of three teleosts, *Salmo trutta*, *Cyprinus carpio* and *Notemnis rossi*, to MS2 bacteriophage. Phylogeny of Immunological. Memory, 1980, 141~157
- 18 Rijkers G T, Wiegierink J A M, Van Oosterom R, et al. The immune system of cyprinid fish. The immunosuppressive effect of the antibiotic oxytetracycline in Carp (*Cyprinus carpio*). Aqac, 1980, 19: 177~189
- 19 Smith P D, McCarthy D H, Paterson W D. Further studies on furunculosis vaccination. Fish Diseases. Academic Press. 1980, 29
- 20 Krantz G E, Reddcliff J M, Heist C E. Development of antibodies against *Aeromonas salmonicida* in trout. J Immunol, 1963, 91: 757~760