

丽文蛤血清中外源凝集素的凝集性能

朱越雄 曹广力

(苏州大学水产学院 215151)

关键词 丽文蛤,血清,凝集,凝集效价

丽文蛤 (*Meretrix lusoria*) 属瓣鳃纲,帘蛤科,文蛤属。是沿海滩涂养殖的主要品种之一,内含丰富的蛋白质,具有高营养、易养殖的优势。但随着丽文蛤养殖的连年持续,其病害的发生率正逐年提高。而凝集素作为软体动物体内参与体液免疫的重要免疫因子,其在免疫防御中所起的异物成分的识别、调理、促吞噬等作用,在病害的防御中具有重要意义^[1]。动物体内的外源凝集素主要分布于甲壳动物、软体动物、昆虫等体内^[2],对其研究远远滞后于植物外源凝集素。国内有关于蚶、中华绒螯蟹、对虾、栉孔扇贝、家蚕等动物血清中外源凝集素的研究报道,但未见有关丽文蛤体内凝集素的研究报道。本文以丽文蛤为材料,研究其对多种脊椎动物血细胞和菌类的凝集效果及有关影响因素,以期深入了解外源凝集素在丽文蛤中的防御机制提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 丽文蛤血清的制备

丽文蛤购自启东市吕四镇农贸市场,在实验室暂养 12 h。选活体,轻撬贝壳,用滤纸吸去水分后,横割闭壳肌,并从切口处吸取血淋巴液,4 ℃,3 000 r/min,离心 5 min,取上清为含外源凝集素的血清样本。并用 0.9% NaCl 进行倍比稀释。

1.2 血细胞准备

小白鼠、鹌鹑、鸡、黄雀、白头翁、鳖、蟾蜍等血液用肝素钠抗凝,鲫以柠檬酸钠抗凝。各抗凝血经 1 500 r/min,5 min 离心除血浆,以 0.9% NaCl 洗涤 3 次,除去抗凝剂,再以 0.9% NaCl 稀释成血细胞悬液。

1.3 凝血活力试验

凝集试验采用凹玻片凝集法。取不同稀释度的

丽文蛤血清 30 μl,分别等量加入不同动物血细胞悬液,混匀,室温 30 min 后显微镜观察凝集的发生,以等量 0.9% NaCl 为阴性对照。以发生凝集的血清最高稀释度作为血清的凝集效价。

1.4 凝菌活力试验

16 种细菌用肉汤培养基培养 48 h 后离心,以 0.9% NaCl 洗涤后打散,并配成 10⁸ 个/ml 浓度的菌悬液。将 30 μl 二倍稀释之丽文蛤血清与菌液等量混合,室温 30 min 后镜检凝集结果。

1.5 pH 和温度敏感性试验

丽文蛤血清用 pH 1~14 的生理盐水梯度稀释后,与等量鹌鹑血细胞悬液混合,检测不同 pH 下丽文蛤血清对鹌鹑血细胞的凝集活性。温度敏感性试验以不同稀释倍数的丽文蛤血清经 -20, 0, 8, 22, 37, 56, 64, 80, 100 ℃ 分别处理 30 min 后,检测对鹌鹑血细胞的凝集效价。

1.6 凝集抑制试验

分别将 D-葡萄糖、D-半乳糖、D-甘露糖、D-果糖、D-麦芽糖、D-甘露醇、D-葡萄糖酸钠、L-鼠李糖、L-山梨糖、乳糖、蔗糖、肌醇、北虫草多糖用双蒸水配成 3%, 0.3%, 0.03% 3 种浓度的溶液,分别等量加入到 4 倍稀释之 30 μl 丽文蛤血清中,混匀后加入 30 μl 鸡血细胞悬液,30 min 后镜检凝集结果。

2 结果与分析

2.1 血细胞的凝集

丽文蛤血清对各测试动物血细胞均具一定凝集作用,以发生凝集的血清最高稀释度作为血清的凝集

效价来表示凝集作用的强度(下同),丽文蛤血清对不同动物血细胞的凝集效价显示较大差异,鹌鹑、黄雀、白头翁、小白鼠、鳖、鸡、蟾蜍、鲫的凝集效价分别为128,64,32,32,32,16,16,2。其中对鹌鹑血细胞的凝集作用最强,而对鲫血细胞凝集作用最弱。这是由于不同来源血细胞表面分子中所带糖基组成及构型存在差异。而凝集素对血细胞表面分子具有一定的识别性。凝集的产生和强度由凝集素的来源和构型、细胞表面的糖分子和构型及其两者的对应性所决定^[3]。

2.2 菌细胞的凝集

丽文蛤血清对所测试的16种细菌的凝集效果是:枯草杆菌、苏云金杆菌、蕈状芽孢杆菌、北京棒状杆菌、棒状链球菌、链球菌、八叠球菌明显凝集;变形杆菌、大肠杆菌、杀螟杆菌、谷氨酸棒状杆菌、蜡样芽孢杆菌弱凝集;金黄色葡萄球菌、白色葡萄球菌、四联球菌、双球菌不凝集。可见对不同细菌的凝集作用差异显著。丽文蛤血清凝集素对菌细胞的凝集选择性机理应与凝集血细胞相类。对菌细胞凝集差异较大的可能原因,一方面与菌细胞表面分子结构有关,同时有些菌生长分泌物可能会对凝集素活力产生影响。由于条件限制,所测试菌并非丽文蛤致病菌。要弄清丽文蛤的抗菌作用机理,有必要用水生动物致病菌作进一步的实验。

2.3 pH和温度敏感性

丽文蛤血清对鹌鹑血细胞的凝集作用具有相当范围的pH和温度适应性,即对pH和温度的改变表现出敏感性。在pH2~12,温度为-20℃~80℃范围内仍具有一定的凝集活性。pH值为1,2,4,6,8,10,12,13,14时凝集效价分别为:0,8,32,128,64,16,4,0,0;处理温度分别为-20,0,8,22,37,56,64,80,100℃

时,凝集效价分别为:128,128,128,128,128,64,32,4,0。其中pH为稀释丽文蛤血清用的生理盐水pH值,在凝集反应中加入等量血细胞悬液后,凝集作用过程中最终pH会有所变化。另外,丽文蛤血清在-20,0,8℃存放2周后凝集效价仍不变。丽文蛤血清中凝集素的这种稳定性为深入开展其分子水平的研究提供了便利。

2.4 糖抑制作用

在测试的14种糖类中只有北虫草多糖、甘露糖、麦芽糖可在不同程度上抑制丽文蛤血清对鸡血细胞的凝集,其余糖对凝集无影响(表1)。北虫草多糖因未经透析去除还原糖,其中可能含有多种单、双糖。

表1 丽文蛤血清凝集鸡血细胞的糖抑制作用

Tab.1 Hemagglutination inhibition of serum of *Meretrix lusoria* by carbohydrate

糖的终浓度 (%)	凝集效果		
	北虫草多糖	D-甘露糖	D-麦芽糖
1	-	+	+
0.1	-	+	+
0.01	-	+	++

注:++明显凝集,+弱凝集,-不凝集。

糖抑制作用的产生可用以确定凝集素结合部位对糖的特异性,即糖抑制剂的结构互补于凝集素结合部位的结构^[4],这也是凝集素在机体免疫中识别异种细胞表面分子的机理之一。

参考文献

- 1 陈竟春等.水生生物学报,1996,20(1):74~78
- 2 孙册等,凝集素.北京:科学出版社,1986.43~52
- 3 曹广力等.水产养殖,1999,5:16~18
- 4 刘恒等.海洋与湖沼,1998,29(2):113~118

PROPERTIES OF HEMAGGLUTININ IN SERUM OF BIVALVE *Meretrix lusoria*

ZHU Yue-xiong CAO Guangli

(Aquatic College, Suzhou University, 215151)

Key Words: *Meretrix lusoria*, serum, hemagglutinin, agglutination titer

Abstract

Hemagglutinin in serum of *Meretrix lusoria* can agglutinate erythrocyte of *Mus albula*, *Coturnix japonica*, *Gallus do nestica*, *Canuelis spinus*, *Pycnonotus sinensis*, *Amyda sinensis*, *Bufo ganizars* and *Camassium aumtus*. It can also agglutinate bacteria such as *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *B. cereus var mycoides*, *Corynebacterium pekinense*, *Sarcina ventriculi*, *Streptococcus pyomyi et al.*. The activity of the hemagglutinin can be inhibited by D mannose, D maltose and *Conthycaps militaris* polysaccharide. The experiment shows that the hemagglutinin has activity in pH range of 2~12, temperature range of -20℃~80℃.

(本文编辑:李本川)