

# 日本对虾血清三类免疫球蛋白样物质的研究\*

章跃陵 彭宣宪 王三英

(厦门大学生命科学院细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室 361005)

**提要** 采用单向免疫扩散法 (SRID) 和免疫酶斑点法 (Dot-ELISA) 对日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 血清中类 IgM, IgG, IgA 样物质进行了较系统的研究分析。结果发现, 虾血清中存在能与羊抗人 IgM, IgG, IgA 发生结合且能被特异性阻断试验确证的物质。文中还对 12 例对虾血清类 IgM, IgG, IgA 样物质的含量进行了检测。结果提示, 虾血清中确实存在与人免疫球蛋白 (Ig) 特异性抗原决定簇极为相似的物质, 它的存在对研究虾的抗病机制具有重要意义。

**关键词** 日本对虾, 免疫球蛋白, 单向免疫扩散, 免疫酶斑点法

一般认为, 无脊椎动物体内没有免疫球蛋白 (Ig) 存在。但近年来, 随着虾类免疫系统研究的逐步深入, 一些研究结果显示虾血清同样存在与脊椎动物 Ig 功能非常类似、能识别“异己”成分的特异性物质<sup>[2, 3]</sup>。叶淑芳 1991 年, 王雷 1995 年和王伟庆等 1998 年报道了

运用测定人体 Ig 的方法测得虾血清中存在类 Ig 样物

\* 国家海洋局第三海洋研究所海洋生物工程重点实验室  
开放课题基金资助项目。

收稿日期: 2000-07-25 ; 修回日期: 2000-09-16

质。但迄今为止,虾血清中存在类 Ig 样物质的观点并未被学术界广泛接受。究其原因,可能与现有报道对其含量的结论不太一致和未进行过特异性确认实验有关。本文运用单向免疫扩散法(SRID)和免疫酶斑点法(Dot-ELISA)两种方法,以统一人 Ig 参考血清为对照,通过研究虾血清的最佳实验条件和应用特异性阻断试验,进一步论证类 IgM, IgG, IgA 样物质的存在,以期丰富和发展虾类免疫系统的基础研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验用虾

以日本对虾(*Penaeus japonicus*)为实验材料,购于厦门大学菜市场,体长约 10 cm 左右。

### 1.2 虾血清制备

按王雷 1995 年报道的方法进行。

### 1.3 羊抗人 IgM, IgG, IgA 和 Ig 统一参考血清

购于卫生部上海生物制品研究所,单扩效价:抗人 IgM( $\mu$  链特异性)为 1:140,抗人 IgG( $\gamma$  链特异性)为 1:100,抗人 IgA( $\alpha$  链特异性)为 1:100。

### 1.4 HRP 羊抗人 IgM, IgG, IgA

采用简易过碘酸钠法,将辣根过氧化物酶(HRP)标记到羊抗人 IgM, IgG, IgA 的 IgG 组分上。

### 1.5 单向免疫扩散法测定类 IgM, IgG, IgA 样物质

将羊抗人 IgM, IgG, IgA 倍比稀释,用于制备不同抗血清浓度的免疫单向扩散检测板,其中羊抗人 IgM 板为 1:140, 1:280, 1:560, 1:1120, 羊抗人 IgG, IgA 板为 1:100, 1:200, 1:400, 1:800。取混合虾血清及其 1:2, 1:4, 1:8 的稀释液,分别加入免疫单向扩散板,每孔点样 15  $\mu$ l,置水平湿盒内 37  $^{\circ}$ C 24 h (IgM 检测板为 48 h),扩散完毕后,用盐度为 9 的生理盐水浸泡 4 d,其间换液数次,然后用 0.57%氨基黑染色 90 s, 10%醋酸脱色数天,待沉淀环清晰时,测定沉淀环直径并记录结果。

### 1.6 免疫酶斑点法测定类 IgM, IgG, IgA 样物质

1.6.1 梯度实验 用 0.01 mol/L, pH7.4 PBS 将虾血清和 Ig 统一参考血清按 5 倍稀释,虾血清依次为原液, 1:5, 1:5<sup>2</sup>, 1:5<sup>3</sup>; 参考血清依次为 1:5, 1:5<sup>2</sup>, 1:5<sup>3</sup>, 1:5<sup>4</sup> (IgM 为 1:2, 1:10, 1:50, 1:250)。取硝酸纤维(NC)膜用 0.02 mol/L pH7.4 TBS 浸泡 5 min, 晾干;取 1  $\mu$ l 样品点于 NC 膜上;用含 5%脱脂奶粉的 TBS 37  $^{\circ}$ C 封闭 75 min; TBS 洗涤 3 次  $\times$  5 min; 将膜分别移至用封闭液稀释的 HRP-羊抗人 IgM (1:100), IgG (1:50), IgA (1:50) 中, 37  $^{\circ}$ C 2.5 h; TBS 洗涤 3 次  $\times$  10 min; TBS 洗涤 3 次  $\times$  5 min; DAB 显色; GDS8000PC 凝胶成像及分析系统扫描、分析。

1.6.2 含量分析实验 用 0.01 mol/L, pH 7.4 PBS 将统一参考血清按 5 倍稀释(1:5, 1:5<sup>2</sup>, 1:5<sup>3</sup>, 1:5<sup>4</sup>), 分别取 12 尾虾原血清; 同上进行 Dot-ELISA 和扫描分析。该测定采用 3 次重复, 所给结果为 3 次重复平均的结果。

1.6.3 阻断实验 按彭宣宪 1989, 1994 年报道的方法进行。设实验组和对照组, 取 NC 膜浸泡, 晾干; 分别点虾原血清(与 HRP-羊抗人 IgM 反应的为 2  $\mu$ l) 和 Ig 统一参考血清 1  $\mu$ l (人 IgG 和 IgA 按 1:5 稀释, 人 IgM 按 1:2 稀释); 同上封闭, 洗涤。阻断组分别加羊抗人 IgM (1:20), IgG (1:5), IgA (1:5) 抗血清(依次用于阻断 IgM, IgG, IgA 样物质), 37  $^{\circ}$ C 2.5 h (羊抗人 IgM 1.5 h), 对照组仅加稀释液, TBS 洗涤 3 次  $\times$  10 min, TBS 3 次  $\times$  5 min。然后, 将两组膜移至 HRP-羊抗人 IgM, IgG 或 IgA 的稀释液中, 同上 Dot-ELISA 和分析步骤。

## 2 结果

### 2.1 单向免疫扩散法对 3 种 Ig 样物质的检测结果

从表 1 可以看出, 同一份样品在同一类型不同浓度抗血清的检测板中, 其沉淀环直径在一定的范围内随着抗血清浓度的降低而增大, 但清晰度呈现出“两头弱, 中间强”的现象, 即中间稀释度时沉淀环最明

表 1 不同正常日本对虾血清稀释度在不同抗血清浓度免疫单向扩散板上的检测结果

Tab.1 Diameters of different dilutions of shrimps (*Penaeus japonicus*) serum in single radial immunodiffusion plates with different dilutions of goat anti human Ig serum

血清稀释度	检测结果 (mm)											
	类 IgM				类 IgG				类 IgA			
	1/140	1/280	1/560	1/1120	1/100	1/200	1/400	1/800	1/100	1/200	1/400	1/800
原血清	5.5	6.5	8.5	9.0	5.5	6.5	7.5	9.0	5.0	6.0	7.0	8.5
1/2	无	5.5	6.5	7.5	无	5.5	6.5	7.5	无	5.0	6.0	7.0
1/4	无	5.0	5.5	6.5	无	5.0	5.5	6.0	无	无	5.5	5.75
1/8	无	无	无	无	无	无	4.5	5.0	无	无	5.0	5.2

显。如在 4 种不同浓度的抗人 IgG 稀释血清检测板中, 1: 400 浓度时清晰度最好, 1: 800 浓度时沉淀环直径最大; 同一份标本的不同稀释度样品在同一稀释度检测板中, 沉淀环直径随着虾血清浓度的降低而逐渐变小, 即原血清 > 1/2 稀释血清 > 1/4 稀释血清 > 1/8 稀释血清, 而清晰度变化不明显。图 1 示正常日本对虾不同血清稀释度在羊抗人 IgM 检测板 (1: 400) 上 SRID 扩散图。

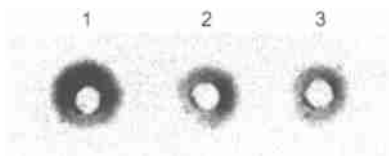


图 1 正常日本对虾不同血清稀释度在羊抗人 IgM 检测板 (1: 400) 上 SRID 扩散

Fig. 1 Map of single radial immunodiffusion of normal shrimps (*Penaes japonicus*) in the plates with different dilutions of goat anti-human

### 2.2 免疫酶斑点法的检测结果

从图 2 可以看出, Dot ELISA 与 SRID 结果一致, 同一份样品可与 HRP-羊抗人 IgM, IgG 或 IgA 发生特异性反应, 且三者之间差异不明显。同一标本的不同稀释度样品与同一酶标抗体反应时随着虾血清浓度的降低, 斑点直径逐渐减少, 但颜色基本上无变化。此外, 虾血清与参考血清相比, 前者斑点颜色较浅, 而后

者较深, 但二者直径相差不大。

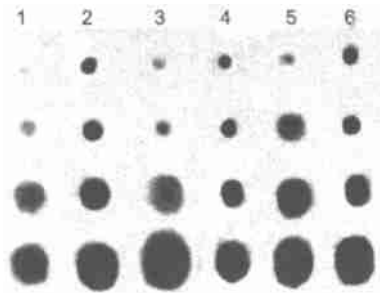


图 2 日本对虾血清梯度实验扫描  
Fig. 2 Map of goat anti-human IgM, IgG or IgA to different dilutions of shrimps (*P. japonicus*) serum by Dot ELISA  
1. 采用 HRP 羊抗人 IgM 检测人 Ig 参考血清; 2. 采用 HRP 羊抗人 IgM 检测虾类 Ig 虾血清; 3. 采用 HRP 羊抗人 IgG 检测人 Ig 参考血清; 4. 采用 HRP 羊抗人 IgG 检测虾类 Ig 虾血清; 5. 采用 HRP 羊抗人 IgA 检测人 Ig 参考血清; 6. 采用 HRP 羊抗人 IgA 检测虾类 Ig 虾血清

### 2.3 免疫酶斑点法的特异性阻断考察

从表 2 和图 3 可知, 3 种类 Ig 样物质在 Dot ELISA 均可被阻断, 其阻断率大小顺序为类 IgG > 类 IgA > 类 IgM, 其中类 IgG 的阻断率为 60.90%, 是类 IgM 阻断率的 4 倍。与参考血清相比, 虾血清被阻断的情况表现为 3 种不同的形式: 人 IgA 的阻断率稍大于类 IgA 的阻断率, 人 IgG 的阻断率明显小于类 IgG 的阻断率, 而人 IgM 和类 IgM 阻断率几乎相等。

表 2 日本对虾血清阻断实验 IDO 分析结果

Tab. 2 Blocking test for specificity of IgM, IgG and IgA like components in shrimps (*P. japonicus*) serum

测定项目	相对吸光度 (IOD) 分析结果					
	虾血清			参考血清		
	对照	阻断	阻断率 (%)	对照	阻断	阻断率 (%)
类 IgM	60.486 4	51.150 4	15.43	80.607 9	67.966 7	15.68
类 IgG	12.148 0	4.747 4	60.90	49.945 4	37.490 8	24.94
类 IgA	14.011 1	10.291 9	26.54	65.197 9	41.008 8	37.06

### 2.4 3 种类 Ig 样物质含量分析

从表 3 可以看出, 日本对虾血清中 3 种类 Ig 样物质含量顺序依次为: 类 IgG > 类 IgM > 类 IgA。与人血清相应的 3 种球蛋白相比, 其含量明显减少, 而且 3 者大小顺序也不同。

## 3 讨论

叶淑芳 1991 年采用测定人 Ig 的方法——免疫单向扩散法检测对虾体液中的类似物质, 结果发现对

虾血清中存在能与抗人 Ig 发生特异性结合的物质, 提示对虾血清中有类 IgM, IgA, IgG 样物质的存在。随后, 王雷 1995 年, 王伟庆 1998 年分别采用同样的方法也发现对虾体内有类 IgM, IgA, IgG 样物质的存在。据王雷报道, 检测板中出现的沉淀环比较模糊, 有内、外缘之分。而王伟庆则发现, 沉淀环易消失, 且直径不及王雷所描述的 1/2。从理论上考虑, 既往不同学者所报道的结果有明显差异的原因, 可能与既往有关报道都是采用与检测人血清 Ig 相同抗血清浓度的免

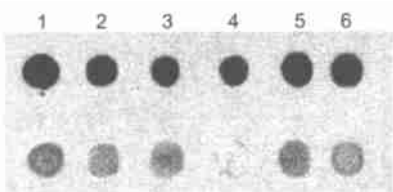


图3 特异性阻断试验结果

Fig. 3 Blocking test for specificity of IgM, IgG and IgA like components in shrimps (*Penaeus japonicus*) serum by Dot-ELISA

1. 采用 HRP 羊抗人 IgM 检测人(上排) 虾(下排)血清对照组; 2. 采用 HRP 羊抗人 IgM 检测人(上排)、虾(下排)血清阻断组; 3. 采用 HRP 羊抗人 IgG 检测人(上排) 虾(下排)血清对照组; 4. 采用 HRP 羊抗人 IgG 检测人(上排)、虾(下排)血清阻断组; 5. 采用 HRP 羊抗人 IgA 检测人(上排) 虾(下排)血清对照组; 6. 采用 HRP 羊抗人 IgA 检测人(上排) 虾(下排)血清阻断组

表3 3 种类 Ig 物质含量分析

Tab 3 Concentration of IgM, IgG and IgA - like components in shrimps (*P. japonicus*) serum

标本号	物质含量分析 (ng/ml)		
	类 IgM	类 IgG	类 IgA
1	0.475 5	2.912 6	0.211 3
2	0.406 3	1.921 9	0.188 4
3	0.472 4	1.653 1	0.230 7
4	0.411 9	1.711 3	0.195 2
5	0.332 5	0.791 7	0.095 3
6	0.253 4	0.704 3	0.166 7
7	0.239 4	0.820 5	0.140 4
8	0.418 0	0.788 9	0.135 4
9	0.309 8	0.923 1	0.143 8
10	0.261 0	0.782 4	0.165 2
11	0.112 7	0.936 9	0.117 6
12	0.121 4	0.759 6	0.104 5
$\bar{X} \pm S$	$0.3178 \pm 0.1243$	$1.2255 \pm 0.6844$	$0.1578 \pm 0.0427$

疫单扩板和结果观察前的处理有关,因为沉淀环的清晰与否,与抗原、抗体之间的比例,检测板的染色、漂洗密切相关。由此,本文采取了:(1)采用不同稀释度的抗血清检测板进行;(2)扩散过程中每隔 2 h 观察 1 次;(3)扩散完毕,对检测板进行“漂洗-染色-漂洗”处理。结果表明,在扩散过程中,观测到虾血清逐渐向四周扩散,但随着时间的推移,颜色越来越淡,扩散 24~48 h 之后,沉淀环模糊。染色后,沉淀环颜色变深,内、外缘明显,经脱色、漂洗,外缘逐渐消失,内缘逐渐明显、清晰。有趣的是,作者将琼脂板在水中连续

浸泡和观测 3 个月,内缘非但没消失,反而更清晰。上述结果提示,在浸泡过程中,不与抗血清结合的大量杂蛋白逐渐扩散出琼脂胶,而与抗血清特异性结合的种类 Ig 物质因已形成抗原抗体免疫复合物则滞留在琼脂胶中以沉淀环的形式存在。同时,作者通过比较发现,抗血清稀释度降低至原来的 1/4 或 1/8 时,沉淀环最清晰。这与对虾血清中类 IgM、IgG、IgA 浓度可能低于人血清相关 Ig 有关。这些结果提示,采用 SRID 法研究对虾血清类 Ig 物质时,应优选抗血清最佳浓度,其沉淀环的测量应在浸泡的基础上以内缘直径为准。预计方法规范后,不同实验室报道的结果将趋向一致。

SRID 测定虾血清类 Ig 物质存在周期较长、重复性较差、灵敏度较低等缺点。Dot-ELISA 是近年发展起来的应用相当广泛的一种固相免疫检测法,其结果可通过 GDS8000PC 凝胶成像及分析系统特定的 IOD 值加以量化。作者运用该方法对虾血清进行检测(梯度实验)时发现它具有周期短、操作简便、重复性好以及灵敏度高等优点。为此,作者进一步运用该方法对虾血清中类 Ig 物质进行特异性考察,结果表明,类 IgM、IgG、IgA 在特定的实验室条件之下均可以被阻断。尤其值得一提的是,与作为对照的人 Ig 阻断率相比,类 IgG 的阻断率为 IgG 阻断率的 2.5 倍,而类 IgM 和 IgM 的阻断率却惊人地相似。一般认为阻断率大于 50% 为阻断成功,但本文对照的参考血清,其阻断率最大不超过 40%,可能与所采用的测试方法有关。参照对照组,故认为阻断成功。由此推断,虾血清中的类 Ig 物质与参考血清中的 Ig 的抗原决定簇很可能极为相似,其 DNA 序列、分子结构也可能存在某种同源性。Roitt I. 等 1993 年已在无脊椎动物机体中发现与人 Ig 抗原决定簇高度同源的蛋白,如昆虫 P<sub>4</sub> 蛋白与之同源性高达 38%。

王伟庆采用免疫比浊法对虾血清中类 Ig 物质的含量进行了报道<sup>[1]</sup>。本文采用 Dot-ELISA 技术,以参考血清为标准,对 12 只虾血清类 Ig 含量进行了检测。结果发现,虾血清中类 IgA、IgG、IgM 样物质的含量依次为  $0.1578 \pm 0.0427$  g/L,  $1.2255 \pm 0.6844$  g/L 和  $0.3178 \pm 0.1243$  g/L, 分别是健康成人血清 IgA、IgG 和 IgM 的 1/12.56, 1/9.81 和 1/3.15; 而王伟庆测量的结果为  $1.590 \pm 0.77$  g/L,  $4.15 \pm 1.08$  g/L 和  $75 \pm$

0.47 g/L, 分别是健康成人血清 IgA、IgG 和 IgM 的 1/1.26, 1/2.89, 1/0.57。后者的结果表明, 虾血清 Ig 含量与健康成人血清 Ig 相差不大, 其中 IgM 在虾血清还高于人血清。两者差别较大, 可能主要与种属差异有关。可以相信, 随着检测虾血清 Ig 方法的不断规范和深入探讨, 实验结果会更好地反应确实情况。🌸

参考文献

- 1 王伟庆 李爱杰 兰翠霞等. 水产学报, 1998, 22(2): 170~174
- 2 牟海津 江晓路 刘树青等. 中国水产科学, 1999, 6(3): 32~35
- 3 罗日祥. 海洋学报, 1997, 17(4): 117~120

## STUDY ON THREE CLASSES OF IMMUNOGLOBULIN-LIKE COMPONENTS IN *Penaeus japonicus*

ZHANG Yue-ling PENG Xuan-xian WANG Sa-ying

(The Key Laboratory of Education Ministry for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Science, Xiamen University, 361005)

Received: Jul. 25, 2000

Key Words: *Penaeus japonicus*, Immunoglobulin, Single radial immunodiffusion, Dot-ELISA

### Abstract

Both methods of single radial immunodiffusion (SRID) and dot-ELISA were used to characterize three kinds of immunoglobulin-like proteins (IgM, IgG and IgA) in serum of *Penaeus japonicus*. The results showed that there were components reacted with anti-human  $\mu$ ,  $\gamma$  or  $\alpha$  chain in the serum, which could be blocked by specific tests. Furthermore, the IgM-like, IgG-like and IgA-like components were measured in 12 cases of *Penaeus japonicus*. These findings suggest that there were materials with similar isotopes in serum from both the shrimp and human. And Ig-like proteins in the shrimps were important to understand their disease-free mechanism. (本文编辑:刘珊珊)