

母源免疫对大菱鲂(*Scophthalmus maximus*) 子代抗体 IgM 水平的影响*

丁福红 雷霖霖 韩明明 刘新富 马爱军

(中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

提要 采用鳗弧菌灭活疫苗对大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)雌性亲鱼免疫方法,进行了母源免疫对子代抗体水平、变化规律的影响及卵子中抗体蛋白空间分布特征的研究。结果表明,免疫亲鱼产出的卵子中 IgM 抗体水平显著高于对照组。胚胎发育过程中,抗体水平整体呈下降趋势,且 48h 前下降迅速,免疫组抗体水平显著高于对照组($P<0.05$); 48h 以后,免疫组和对照组间无显著差异。卵子中抗体蛋白免疫组化定位结果表明,未受精卵中 IgM 抗体集中分布在卵膜内侧边缘,卵黄部分分布不明显。研究还发现,卵巢液中抗体水平显著高于卵子匀浆液,且免疫亲鱼组卵巢液中抗体水平显著高于对照组($P<0.05$)。本实验验证了大菱鲂特异性抗体的母源传递性,并揭示了在本免疫条件下的传递时效,为进一步开展通过母源免疫对育苗早期疾病防控途径的探索奠定了基础。

关键词 大菱鲂; 母源免疫; 抗体; 亲鱼; 卵子

中图分类号 S963

初生(孵)动物的免疫系统尚未发育完善,需经历特定发育期才具备自身免疫应答能力,在此之前,幼体主要依赖从母体获得的免疫物质发挥保护作用即母源免疫(钟明超等, 1996)。母源免疫物质的保护作用动物自身保护机制,是保证其生殖繁衍的重要生态对策,也是提高子代成活率的重要保障。鱼类多属于卵生动物,卵子内富集了多种母源活性物质,是免疫因子的直接载体。因此,增强母源免疫因子的富集和传递,是提高鱼类早期发育阶段抵抗力的一条潜在的有效途径(Ian *et al.*, 2005)。目前,畜禽类的母源免疫研究已经广泛开展,并达到了应用水平,如仔猪传染性胃肠炎防治、雏鸭病毒性肝炎的防治都是母源免疫应用的成功范例,对畜禽类养殖业起到了极为有效的推动作用。这些成果为鱼类母源免疫研究提供了思路(徐汉祥, 1991)。

鱼类具有产卵量大的生物学特征,对养殖鱼类进行母源免疫具有防御在先、操作简便、可达到免疫

一尾雌鱼惠及一池鱼苗的效果,有利于避免药物残留等问题所造成的食品安全问题和环境威胁,促进健康养殖的产业发展(丁福红等, 2010)。国外有关鱼类母源免疫的研究在 20 世纪 90 年代兴起(Swain *et al.*, 2009),国内学者也对鱼类母源免疫开展了研究(陈昌福等, 1996; 彭志东等, 2009),主要针对淡水种类及模式生物种类。针对我国海水鱼类养殖业当前发展特征,开展主要养殖品种母源免疫基础性和实用性技术研究具有重要意义。

本研究在前期亲鱼免疫条件研究的基础上,选取我国重要海水养殖经济品种大菱鲂开展母源免疫工作,研究中选用大菱鲂育苗早期的高发病率、高传染性、高致死性疾病的致病菌大菱鲂弧菌制作的灭活疫苗,并采用酶联免疫吸附、免疫组化等手段对免疫亲鱼产生的卵子和仔鱼体内的特异性抗体水平进行检测,通过与非免疫亲鱼产出卵子、胚胎的对比,来阐明是否亲鱼体内高水平的特异性抗体能够富集到

* 国家自然科学基金项目资助, 31101888 号, 2012.01—2012.12; 山东省自然科学基金项目资助, ZR2011CQ004 号, 2011.07—2014.07; 国家鲆鲽类产业技术体系项目资助, CARS-50 号, 2011.01—2015.01。丁福红, 博士, E-mail: dingfh@ysfri.ac.cn

通讯作者: 雷霖霖, E-mail: lejilin@seacul.com

收稿日期: 2012-03-06, 收修改稿日期: 2012-05-27

卵子,提高卵子中的抗体水平的问题。实验同时对特异性抗体在卵子、仔鱼体内的降解代谢规律以及分布定位进行研究。以期直观揭示抗体蛋白的存在与传递,并初步揭示其传递时效特征。

1 材料与方法

1.1 亲鱼选取

实验亲鱼取自烟台天源水产有限公司,选取鱼体健康、性腺发育启动的大菱鲂雌鱼 24 尾,亲鱼体重范围 4—6kg。通过液氮体表标记的方法对试验鱼进行标记,与其它养殖亲鱼同池培育,培育水温 12—15℃。

1.2 亲鱼免疫

疫苗采用大菱鲂鳃弧菌 M3 菌株 1×10^{10} cfu/mL 灭菌液浓度与弗氏佐剂乳化制备。菌液按照 1:1 体积比与弗氏佐剂进行混合乳化,完成疫苗制备。首次免疫采用弗氏完全佐剂(Sigma),加强免疫采用弗氏不完全佐剂(Sigma)。菌体疫苗存于 4℃ 备用。对照组采用生理盐水与弗氏佐剂乳化液注射。

免疫中采用背部肌肉多点注射的方法。注射量 0.5mL/kg。首次免疫后,两周为间隔加强免疫两次。疫苗注射组共 17 尾亲鱼,生理盐水对照组共 7 尾。

至首免 12 周后,部分试验亲鱼性腺陆续发育成熟,其中免疫组共 5 尾亲鱼产卵、对照组 3 尾亲鱼产卵。

1.3 样品收集

分别于亲鱼免疫后 5 周,以及末次产卵后一日内采集亲鱼血液,并收集血清,检测亲鱼血清抗体水平。

分别收集成熟亲鱼卵巢液 20mL,通过筛绢过滤方法收集卵巢液,直接冻存于-20℃。卵子用磷酸缓冲液(pH 7.8)反复冲洗,并且用筛绢过滤,用滤纸吸干后冰浴研磨,提取匀浆液分装冻存于-20℃,作为未受精卵样品。

其余的卵子全部进行人工授精,并且在受精卵发育过程中,每间隔 8—24h 连续进行胚胎和仔鱼的样品收集,直至受精后 206h。收集的胚胎样品均采用磷酸缓冲液进行反复冲洗过滤,并且用滤纸吸干后冰浴研磨,提取匀浆液分装冻存于-20℃,至进行检测分析。

1.4 样品检测

1.4.1 抗体水平检测 采用间接 ELISA 方法进行亲鱼免疫应答效果检测及子代样品匀浆液特异性免疫抗体 IgM 的水平检测。其中亲鱼血清抗体效价采用梯度稀释对比获得滴度值的表达。卵子、胚胎匀浆

液样品采用原始浓度上样,并用吸光值反映抗体含量。ELISA 方法中的一抗采用鼠抗大菱鲂多抗(ADL Co. F08),二抗采用羊抗鼠 IgG-HRP(Tiangen SA101-02)。吸光值采用酶标仪(BioRad, Model 680, USA)在 490nm 检测。

1.4.2 免疫组化 将胚胎样品进行石蜡切片,经一抗、二抗培育孵育后,采用 DAB 显色试剂盒显色并用苏木素复染、在经 1% 盐酸酒精分化、二甲苯中浸泡,后封片,显微镜观察采图,对特异性免疫抗体 IgM 卵中分布进行定位。

1.5 数据统计分析

对照组数据采用基于 SNK 函数的双边 ANOVA 方法进行显著性分析,显著性分析的概率置信度为 95% ($P < 0.05$)。所有的统计采用 Windows 版本 SPSS11.5 软件进行分析。

2 实验结果

2.1 亲鱼免疫应答情况

在首免五周后随机抽取 3 尾亲鱼血清样品进行检测,抗体水平检测结果表明,免疫亲鱼特异性抗体水平显著升高,三尾抗体平均效价滴度分别为 10×2^{10} 、 10×2^{10} 、 10×2^{11} 。对产卵后亲鱼三尾亲鱼血清抗体水平检测结果表明,效价依然保持在 10×2^{10} — 10×2^{11} 滴度水平。

2.2 胚胎、仔鱼中抗体水平

胚胎、仔鱼匀浆液样品抗体水平检测结果表明,免疫组子代匀浆液中的抗体水平显著高于对照组(图 1)。免疫组卵子样品吸光值为 0.81 ± 0.23 ,对照组为 0.32 ± 0.10 。在胚胎发育过程中,抗体水平呈下降趋势,在受精 8h 后显著下降,且在受精 0—48h 阶段免疫组胚胎抗体水平显著高于非免疫对照组;48h 后抗体水平变化趋于平缓,且两组间显著差异消失 ($P < 0.05$)。

2.3 卵子中免疫组化定位结果

采用免疫组化的方法对刚刚挤出的成熟卵子切片进行免疫组化染色,见图 2。通过切片观察发现,卵子中免疫球蛋白抗体非常集中分布在卵膜内侧,而卵子中间卵黄部位未见有明显分布。由于卵子含水量较大加之免疫组化操作步骤较多,因此卵膜外壁有一定断裂现象,但未影响结果观察。

2.4 卵巢液中抗体水平

成熟亲鱼人工挤卵获得的卵巢液中的抗体水平检测结果表明(图 3),注射免疫组特异性抗体的吸光

值为 1.23 ± 0.16 , 对照组抗体的吸光值为 0.46 ± 0.10 , 免疫组亲鱼卵巢液中抗体水平显著高于对照组($P < 0.05$)。

3 讨论与分析

3.1 母源抗体传递的有效性

本研究结果表明亲鱼免疫对子代卵子中抗体水平产生了显著影响, 通过特异性的疫苗免疫可提高亲鱼体内抗体水平, 提高卵子中抗体水平, 进而证实了抗体蛋白的可传递性。卵子中抗体蛋白的免疫组化定位也直观反映了抗体蛋白在卵子中的分布情况。该结果的揭示证实了实现亲鱼不同病源免疫强化及子代免疫强化的可行性。但从子代中抗体水平变化结果看, 抗体的代谢消耗非常快, 在受精发育 48h 后免疫组和对照组间抗体水平显著差异消失。高水平抗体持续时间如果过短就会导致对子代的保护效率受到限制, 这为实现子代免疫加强提出了需要进一步探明和解决的问题。

在其它种类的研究中也

发现了类似问题, 如 Tanaka 等(1999)对真鲷研究发现, 亲本抗体在卵子孵化后水平急剧降低, 无法对仔鱼起到保护作用。但也有一些种类, 母源免疫保护时效很长, 如 Hanif 等(2005)对金头鲷研究表明, 免疫亲鱼后代的抗病优势甚至能延续到幼鱼阶段。针对这一问题, 可以考虑从两个途径入手解决, 第一是通过亲鱼免疫程序的进一步优化, 提高抗体传递水平, 进而延长抗体保护时期; 第二是开展有关抗体降解代谢的酶活力基因分子水平调控, 减慢免疫蛋白的消耗, 为防御病原侵害实现储备。

3.2 亲鱼免疫方法

提高亲鱼免疫应答水平和抗体传递效率, 是实现鱼类自身母源免疫应用的基础环节(Swain *et al.*,

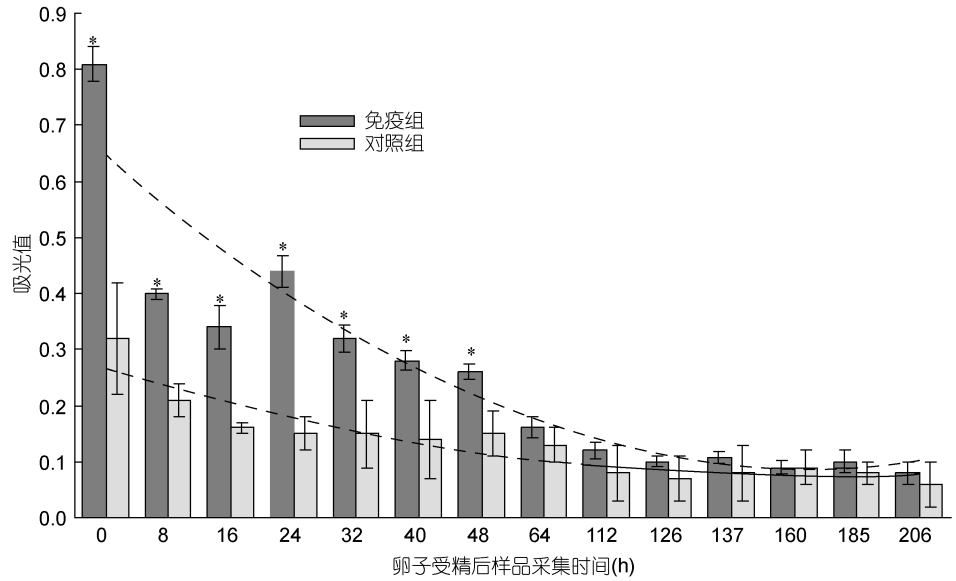


图 1 大菱鲂胚胎发育过程中的母源抗体 IgM 水平

Fig.1 The antibody IgM level in turbot embryos at different development stages
注: 数值由平均值 ± 标准差表示, n=3. *表示与对照组存在显著差异($P < 0.05$)

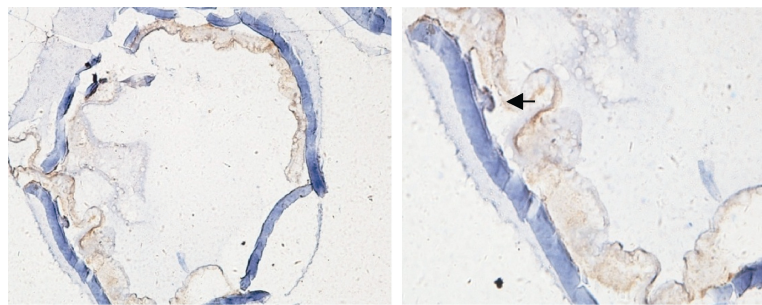


图 2 大菱鲂卵子中抗体 IgM 分布

Fig.2 The antibody IgM location in turbot eggs
左: 免疫亲鱼成熟卵子 IgM 免疫组化切片, 整体卵子切面; 右: 免疫亲鱼成熟卵子 IgM 免疫组化切片观察, 靠近卵膜放大切面

2009)。目前大菱鲂养殖生产中的亲鱼性腺发育调控周期一般是 2—3 个月或更长(雷霆霖, 2004)。作者希望在卵子发育过程中亲鱼自身能保持较高抗体水平,

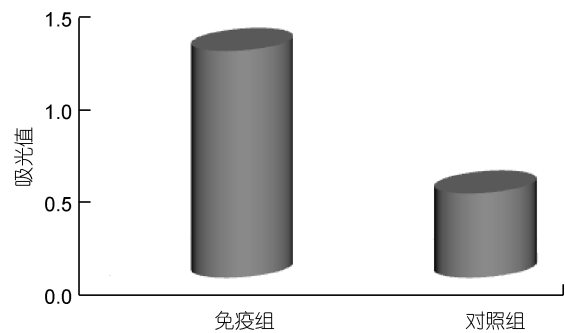


图 3 大菱鲂卵巢液中抗体 IgM 水平

Fig.3 The antibody IgM level in ovarian fluid of turbot

同时保证充足的抗体富集时间,因此免疫时机的选择十分重要。根据本实验结果,作者在免疫后3个月左右,获得了成熟卵子,并且卵子中抗体的富集有显著提高,因此初步建议免疫时间在产卵前3个月以上。注射剂量方面,为使亲鱼能够产生高效的免疫应答,本实验选择高浓度 1×10^{10} cfu/mL, 0.5 mL/kg的菌苗剂量,同时,为避免腹腔注射影响性腺发育,选择等效的背部肌肉注射,这些操作环节是建立在前期工作基础上的。免疫效果表明,亲鱼的抗体水平在免疫后第5周就达到了 10×2^{10} — 10×2^{11} 以上的水平,并且在产卵后依然维持较高,说明了免疫的有效性,可为相关研究提供参考。

归纳实验中的发现与思考,作者认为,对繁殖期亲鱼免疫进行研究有两方面突出问题值得关注。第一,是将亲鱼免疫应答水平与繁殖期生殖发育特征结合开展研究,这是选择亲鱼免疫时机、有的放矢的建立好亲鱼免疫程序、实现亲鱼免疫的有效强化的依据,也是实现对子代早期免疫力主动调控的基础;第二,亲鱼免疫程序选择需结合抗体传递效率和对子代保护效率开展。发挥对子代的保护作用亲鱼免疫应用的主要目的。有效的亲鱼免疫既要提高亲鱼抵抗力,同时也需要提高免疫因子在子代富集效率,从而充分发挥亲本免疫保护作用。因此,免疫程序中免疫时机、接种剂量等因素的选择需要考虑亲鱼免疫应答水平和配子内富集传递效果两方面因素。

3.3 卵巢液中的抗体含量

本研究中发现大菱鲆卵巢液中含有很高水平的IgM,显著高于卵子匀浆液中抗体水平,并且也呈现免疫组显著高于对照组的规律,该结果对探讨卵巢中抗体的传递路径以及功能有重要启示。硬骨鱼类多种不同类型血清蛋白转移进入卵黄和发生水解的机制已经明确(Tyler *et al*, 1988; Wallace *et al*, 1990),有学者认为免疫球蛋白抗体的吸收和转移机制也与其基本相同(Suzuki *et al*, 1994; 王志平等, 2010)。亦有研究表明抗体进入卵子是通过胞转方式进入卵细胞的,在此过程中,抗体是通过血液传递到滤泡,通过滤泡释放渗透进入卵子(Picchiatti *et al*, 2004)。由于滤泡存在于卵子细胞鞘和粒层细胞的胞浆中,因此可能对IgM转移发挥重要作用。作者对卵巢液的分析结果为这一推理提供了佐证,也为深入理解抗体传递路径奠定了基础。

3.4 卵子中的抗体分布

免疫组化定位结果显示大菱鲆卵子中抗体蛋白集中分布于卵膜内侧,这一结果与有些鱼类报道基

本一致,但也有不同。国内学者李大疆等(2001)对鲫(*Carassius auratus*)卵子和胚胎中母源抗体进行定位研究,结果发现,抗体在整个卵子中都有分布,并由卵膜至卵中心逐渐减少,其中卵膜内壁最多,在胚胎和卵黄中无集中现象;消减代谢过程中,首先是胚胎和卵黄中的抗体消失,然后是卵膜内壁的抗体消失,在胚胎尾鳍形成期完全消失。Olsen等(1997)研究表明,大西洋鲑卵子母源抗体主要分布于卵膜的内部边缘;Hayman等(1993)研究表明,斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)卵中的母源抗体分散于整个卵黄中,并且在卵膜处集中。

卵子中抗体的分布与其功能发挥紧密相关,研究者还指出,母源抗体在卵子中可能发挥两种作用,在卵膜中的抗体能够起到卵子免疫屏障的作用,而在卵黄中的抗体主要是传递到胚胎和仔鱼体内发挥保护作用。可见,探明卵子中母源抗体的空间分布和迁移规律与母源抗体功能研究紧密相关(Takemura, 1993)。本实验结果为抗体蛋白在大菱鲆早期发育中的功能探索提供了参考。

3.5 免疫对亲鱼繁殖生理的影响

本研究中,亲鱼产卵情况表明免疫组17尾,产卵5尾;对照组7尾,产卵3尾。产卵比例较低。这一现象一方面与实验亲鱼自身生理状态密切相关,另一方面也可能与免疫操作存在一定关系。动物机体的免疫反应受到抗原、机体等多方面因素影响(李彦等, 1995)。亲鱼免疫除了受到营养状态、环境因素等基本因素影响外,还存在突出的特点,即亲鱼处于繁殖生理的特定时期,体内内分泌环境变化剧烈,尤其是性激素水平快速升高,免疫调控和生殖调控存在相互作用,因此免疫应答也存在特殊性。

鱼类关于繁殖生理和免疫反应间的相互影响的研究相对较少。目前研究表明性激素水平对免疫应答存在影响,如在虹鳟(*O. mykiss*, *S. trutta*)、大马哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)、金鱼(*Carassius auratus*)中的研究均表明性激素雌二醇、睾酮水平升高都显著影响淋巴细胞增殖和抗体水平(Fuda *et al*, 1991; Harris *et al*, 2000; 侯亚义等, 2001)。可见,繁殖期亲鱼免疫应答有其自身生理特性。现有研究多采取体外实验或单种激素注射模拟繁殖生理环境等方法开展,未见有针对繁殖期亲鱼免疫应答过程进行系统研究的报道,这为今后研究提出了新的方向。

参 考 文 献

丁福红, 雷霖霖, 张家松等, 2010. 鱼类母源免疫研究现状和

- 展望. 中国水产科学, 17(2): 369—373
- 王志平, 张士瑾, 2010. 鱼类免疫因子的母体传递及其对子代的保护作用. 水生生物学报, 34(2): 426—430
- 李彦, 江育林, 1995. 环境胁迫因子对鱼类免疫功能的影响及免疫学检测方法. 鱼类病害研究, 17(3): 1—10
- 李大疆, 钟明超, 林浩然, 2001. 鲫鱼(*Carassius auratus*)卵和胚胎中母源性免疫球蛋白的定位. 中山大学学报, 40(2): 82—85
- 陈昌福, 李静, 楠田理一, 1996. 草鱼母源免疫的初步研究. 华中农业大学学报, 15(1): 73—78
- 钟明超, 林浩然, 1996. 硬骨鱼类胚胎和胚后发育阶段的免疫机制. 中国水产科学, 3(1): 96—102
- 侯亚义, 韩晓冬, 2001. 睾酮抑制虹鳟淋巴细胞的 IgM 分泌. 水生生物学报, 25(6): 577—582
- 徐汉祥, 1991. 畜禽母源抗体的传递与作用. 江苏农业科学, 1: 62—63
- 彭志东, 简纪常, 吴灶和等, 2009. 红笛鲷仔鱼体内特异性母源抗体降解动力学研究. 水生生物学报, 33(1): 34—39
- 雷霖霖, 2004. 大菱鲂养殖技术. 上海: 上海科学技术出版社, 23—25
- Fuda H, Soyano K, Yamazaki F *et al*, 1991. Serum IgM during early development of masu salmon (*Oncorhynchus masou*). *Comp Biochem Physiol*, 9A(4): 637—643
- Hanif A, Bakopoulos V, Leonardos I *et al*, 2005. The effect of sea bream (*Sparus aurata*) broodstock and larval vaccination on the susceptibility by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and on the humoral immune parameters. *Fish Shellfish Immunol*, 19(4): 345—361
- Harris J, Bird D J, 2000. Modulation of the fish immune system by hormones. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 77(3—4): 163—176
- Hayman J R, Lobb C J, 1993. Immunoglobulin in the eggs of the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev Comp Immunol*, 17(3): 241—248
- Ian Bricknell, Roy A Dalmo, 2005. The use of immunostimulants in fish larva aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*, 19(5): 457—472
- Olsen Y A, Press C McL, 1997. Degradation kinetics of immunoglobulin in the egg, alevin and fry of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and the localisation of immunoglobulin in the egg. *Fish Shellfish Immunol*, 7(2): 81—91
- Picchietti S, Taddei A R, Scapigliati G *et al*, 2004. Immunoglobulin protein and gene transcripts in ovarian follicles throughout oogenesis in the teleost *Dicentrarchus labrax*. *Cell Tissue Res*, 315(2): 259—270
- Suzuki Y, Orito M, Furukawa K *et al*, 1994. Existence of low molecular weight immunoglobulin-M in carp eggs. *Fisheries Science*, 60: 159—162
- Swain P, Nayak S K, 2009. Role of maternally derived immunity in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 27(2): 89—99
- Takemura A, 1993. Changes in an immunoglobulin M-like protein during larval stages in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture*, 115(3—4): 233—241
- Tanaka T, Furukawa K, Suzuki Y *et al*, 1999. Transfer of maternal antibody from mother to egg may have no protective meaning for larvae of red sea bream *Pagrus major*, a marine teleost. *Fish Sci*, 65(2): 240—243
- Tyler C R, Sumpter J P, Bromage N R, 1988. Selectivity of protein sequestration by vitellogenic oocytes of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Journal of Experimental Zoology*, 248(2): 199—206
- Wallace R A, Selman K, 1990. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *J Elect Microscop*, 16(3): 175—201

EFFECT OF MATERNAL IMMUNITY ON THE ANTIBODY IgM LEVEL IN TURBOT *SCOPHTHALMUS MAXIMUS* OFFSPRING

DING Fu-Hong, LEI Ji-Lin, HAN Ming-Ming, LIU Xin-Fu, MA Ai-Jun

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract To understand the effect of bacterin on the antibody level in the offsprings of turbot *Scophthalmus maximus*, we vaccinated the broodstocks of the fish with *Vibrio anguillarum* bacterin, and studied the position of antibody in the turbot eggs. Results indicate that the antibody level in the eggs of vaccinated broodstock was significantly higher than that of the control ($P < 0.05$). Within 48h post fertilization, the antibody level in embryos of vaccinated fish was significantly higher than un-vaccinated group ($P > 0.05$), whereas, such difference was not detected after 48h. In addition, the maternal antibody was concentrated on the internal side of chorion, indicated by immunohistochemical analysis of egg samples. Therefore, the antibody could transfer through maternal immunity in turbot *S. maximus*, which may lay a foundation for future study on maternal immunity of turbot.

Key words turbot *Scophthalmus maximus*; maternal immunity; antibody; broodstock; eggs