

# 凡纳滨对虾类 Ig 定性和定位的初步研究

章跃陵<sup>1,2</sup>, 刘文杰<sup>1</sup>, 王三英<sup>1</sup>, 黄通旺<sup>2</sup>

(1. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005; 2. 汕头大学理学院生物学系, 广东 汕头 515063)

**摘要:**以凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)为研究对象,运用 Western-blotting 和免疫组织化学等现代免疫学方法,对对虾中的类 Ig(immunoglobulin, 免疫球蛋白)蛋白进行定性和定位研究。结果发现,虾血清中有两种分子质量约为 70 ku 和 62 ku 的蛋白可与抗人 Ig 发生特异性的结合。同时,虾血细胞——无颗粒细胞的外膜及虾类淋巴器、肝胰脏、心脏、胃和肠等 5 种组织器官的石蜡切片与抗人 Ig 反应呈不同程度的阳性,其中类淋巴器和肝胰脏显色较深。提示,虾体内确实存在能与抗人 Ig 发生特异性结合的类 Ig 蛋白,其不仅存在于虾血清中,还存在于无颗粒细胞、类淋巴器和肝胰脏等组织中,为对虾的免疫系统的研究和疾病的防治奠定基础。

**关键词:**凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*); 类 Ig 蛋白; 免疫特异性; 组织定位

**中图分类号:**S917.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3096(2005)09-0031-05

一般认为无脊椎动物体液中不具有免疫球蛋白,但近年来研究表明,无脊椎动物体内同样存在免疫球蛋白超家族分子<sup>[1~5]</sup>,甚至有类似于脊椎动物的适应性免疫反应的存在<sup>[6~10]</sup>。关于虾内是否存在类 Ig(Ig-like)分子,国内外鲜有报道。叶淑芳<sup>[11]</sup>、王雷<sup>[12]</sup>、王伟庆<sup>[13]</sup>和章跃陵等<sup>[14]</sup>分别采用免疫单向扩散法(SRID)和免疫酶斑点法(Dot-ELISA)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、IgG 和 IgA 样物质的存在。然而,此类物质是否存在于虾血清中,还存在不同的观点,更不消说对其的定性和定位的研究。因此,这些能与抗人血清发生反应的虾血清成分的本质有待于进一步研究。作者采用 SDS-PAGE、Western-blotting 和免疫组织化学等现代生物学技术对其进行定性和定位的初步研究,为丰富虾类免疫系统研究,探索对虾疾病免疫学防治提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

以凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)为实验材料,购于厦门大学菜市场,体长约 10 cm。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 虾血清制备

按王雷等<sup>[12]</sup>的方法进行,用 1 mL 注射器直接从

对虾心脏抽取血淋巴,4 °C 冰箱过夜,3 000 r/min 离心 20 min, -20 °C 保存备用。

#### 1.2.2 SDS-PAGE 电泳

用 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 将虾血清按 1:10 稀释,与 2×SDS 凝胶加样缓冲液等体积混合,100 °C 煮沸 5 min,采用 3% 浓缩胶、10% 分离胶按常规方法进行。

#### 1.2.3 Western-blotting 分析

同上进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后,恒压电转 6 h,丽春红 S (Ponceau S) 总蛋白显色, TBS 充分洗涤,5% 脱脂奶粉 37 °C 封闭 1 h,分别与羊抗人 IgM、IgG 和 IgA 抗血清(1:50)室温孵育 3 h, TBS 洗涤 3×10 min,兔抗羊 IgG-HRP (1:1 000) 37 °C 孵育 1 h, TTBS 洗涤 3×10 min, TBS 洗涤 3×5 min, DAB 显色, GDS8000PC-凝胶成像及分析系统扫描和分析。

#### 1.2.4 血细胞定位分析

用 1 mL 注射器直接对对虾心脏抽取血淋巴,涂于洁净载玻片上,置室温 5 min, TBS 洗涤 5 min, 甲

收稿日期: 2004-12-20; 修回日期: 2005-03-28

基金项目: 国家“863”计划项目基金(2002AA629050), 广东省自然科学基金——博士启动基金(130-122187)

作者简介: 章跃陵(1971-), 男, 湖南桃江人, 讲师, 博士, 现从事海洋分子免疫学研究, E-mail: zhangyxlxmu@vip.sina.com

醇浸泡 10 s, 自然晾干, TBS 洗涤 2×5 min, 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温处理 20 min, TBS 洗涤 3×5 min, 1% 奶粉 37 °C 封闭 10 min, 用 TBS 代替第一抗体为阴性对照, 羊抗人 IgG 抗血清 (1 : 50) 37 °C 孵育 4 h, TBS 洗涤 3×5 min, 兔抗羊 IgG-HRP (1 : 1 000) 37 °C 孵育 1 h, TBS 洗涤 3×5 min, DAB 显色, Olympus BH-2 型显微镜观察并摄片。

### 1.2.5 组织定位分析

选体长约 10 cm 的凡纳滨对虾, 迅速取其新鲜组织(心脏、肝胰脏、胃、肠和类淋巴器), Bouin's 液固定 18 h, 70% 酒精充分冲洗, 常规梯度酒精脱水, 石蜡包埋, 切 6 μm 厚的连续切片。取相邻间断连续切片, 常规复水, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 30 min, 5% 脱脂奶粉封闭 45 min, 以 TBS 代替第一抗体为阴性对照, 用间接免疫组织化学法染色。所用抗体及稀释度如下: 第一抗体为羊抗人 IgG 抗血清 (1 : 100), 37 °C 孵育 3 h, 第二抗体为兔抗羊 IgG-HRP (1 : 1 000), 37 °C 孵育 1 h。标本最后用 DAB 显色, 常规脱水, 透明, 封固, 用 Olympus BH-2 型显微镜观察并摄片。

## 2 结果与分析

### 2.1 3 种类 Ig(IgM, IgG 和 IgA) 的定性分析

采用 SDS-PAGE 和 Western-blotting 方法检测凡纳滨对虾血清中的类 Ig 物质, 结果如图 1 所示, 虾血清与羊抗人 IgM, IgG 和 IgA 抗血清反应均呈阳性, 其中表观分子质量为 70 ku 的阳性条带(命名为 ILp70)分别与羊抗人 IgM, IgG 和 IgA 3 种羊抗人 Ig 特异性结合, 而表观分子质量为 62 ku 的阳性条带(命名为 ILp62)只与羊抗人 IgG 特异性结合。说明虾血清中确实存在与羊抗人 Ig 反应的类 Ig。

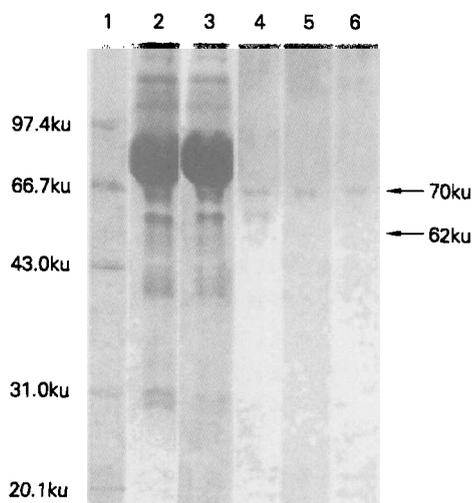


图 1 凡纳滨对虾血清的 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析

Fig. 1 SDS-PAGE and Western-blotting analysis of *L. vannamei* serum.

1: 分子质量标准; 2: 虾血清 SDS-PAGE 分析; 3: 0.57% 氨基黑总蛋白染色; 4~6, 分别为虾血清与一抗为羊抗人 IgG (1 : 50)、IgA (1 : 50) 和 IgM (1 : 50) 的 Western-blotting 分析

1: molecular mass markers; 2: SDS-PAGE analysis of shrimp serum; 3: the staining of total proteins of shrimp serum with 0.57% amido black; 4-6: shrimp serum incubated with goat anti-human IgG (1 : 50), IgA (1 : 50), IgM (1 : 50) antiserum respectively for Western blotting analysis

### 2.2 类 Ig 血细胞定位分析

以羊抗人 IgG 抗血清为一抗, 检测类 IgG 在凡纳滨对虾血细胞中的分布。从图 2 可知, 部分血细胞的外膜有明显的阳性反应。参照光镜下对虾三种血细胞(无颗粒细胞, 小颗粒细胞和大颗粒细胞)的形态特征, 初步推断该阳性细胞应该为无颗粒细胞, 它可能与凡纳滨对虾中的类 Ig 在血淋巴中的合成和分

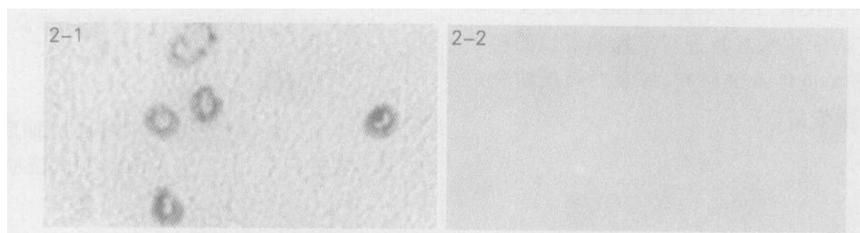


图 2 凡纳滨对虾类 IgG 的血细胞免疫定位分析

Fig. 2 Immunolocalization of the IgG-like protein in hemocyte specimen of *L. vannamei*.

2-1: 虾血细胞组织与一抗为羊抗人 IgG (1 : 50) 的免疫酶分析 (1 680×); 2-2: 虾血细胞组织与一抗为正常羊血清 (1 : 50) 的免疫酶分析 (1 680×)

2-1: goat anti-human IgG (1 : 50) reacted with hemocyte specimen (1 680×); 2-2: normal goat serum (1 : 50) reacted with hemocyte specimen (1 680×).

泌有关。

### 2.3 类 Ig 组织定位分析

选取凡纳滨对虾类淋巴器、肝胰脏、心脏、胃和肠等 5 种组织器官为材料,以羊抗人 IgG 抗血清为一抗,采用免疫酶免疫组织化学法检测类 IgG 在对虾组织中的分布。结果表明(图 3),5 种组织器官的组

织切片与羊抗人 IgG 抗血清反应均有不同程度的显色,其中类淋巴器和肝胰脏显色较深,而其它 3 种组织显色相对较浅。类淋巴器、心脏和肝胰脏的显色部位主要集中在组织的胞间、胞质或胞核,而胃和肠主要集中在其表皮组织。由此说明,类 Ig 是对是体内的一种分布相当广泛的蛋白。

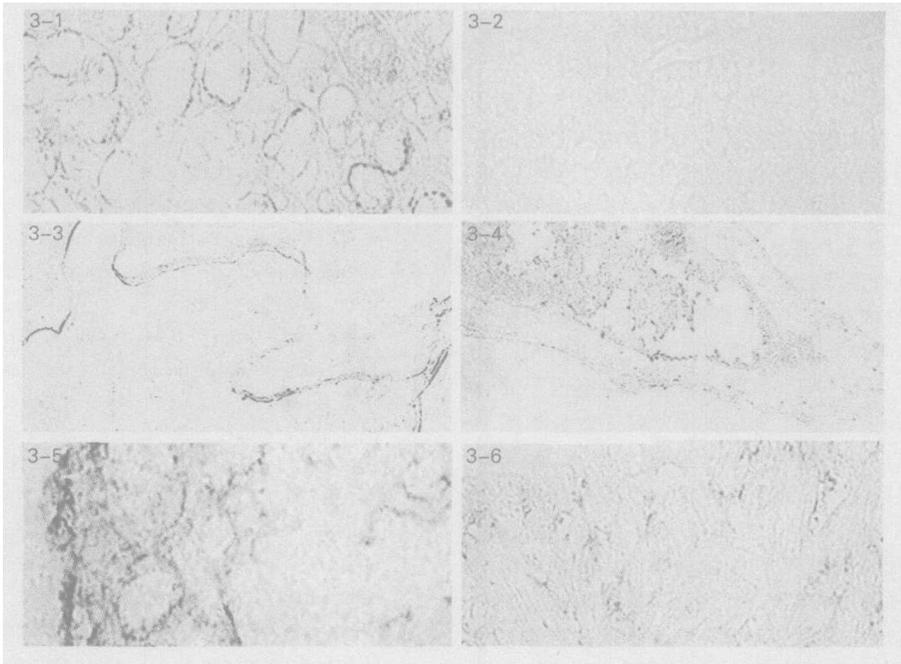


图 3 凡纳滨对虾类 IgG 的石蜡切片定位分析

Fig. 3 Immunolocalization of the IgG-like protein in paraffin section of *L. vannamei* tissues

3-1: 虾肝胰脏石蜡切片与一抗为羊抗人 IgG(1:100)的免疫酶分析(400×);3-2: 虾肝胰脏石蜡切片与一抗为正常羊血清(1:100)的免疫酶分析(400×);3-3~3-6: 分别为虾胃、肠、类淋巴器和心脏的石蜡切片与一抗为羊抗人 IgG(1:100)的免疫酶分析,其放大倍数依次为:100×,100×,400× 和 400×

3-1: goat anti-human IgG (1:100) reacted with hepatopancrea (400×);3-2: normal goat serum (1:100) reacted with hepatopancreas (400×); 3-3~3-6: goat anti-human IgG (1:100) reacted with stomach (100×), intestine (100×), lymphatic-like organ (400×) and heart (400×) respectively

### 3 讨论

研究表明,免疫球蛋白超家族(immunoglobulin gene superfamily, IgSF)是一类数量庞大,功能多样的家族系统,它广泛分布在脊椎动物和无脊椎动物中,其一般是细胞表面结合分子,主要参与细胞与细胞之间的相互作用<sup>[15,16]</sup>。据初步推算,人、苍蝇和蚯蚓中分别约含有 765,140 和 64 个 IgSF 分子<sup>[17]</sup>。然而,目前关于虾内是否存在类 Ig 分子学术界尚存在争论。本课题率先运用 Western-blotting 和免疫组织化学等现代免疫学方法证实对虾体内确实存在能与抗人 Ig 发生特异性结合的一类 Ig 分子,并发现其同样分布于对虾的血细胞和组织中,对丰富和发展对

虾免疫系统基础的研究,探索对虾疾病的免疫学防治具有重要意义。

根据目前所掌握的资料分析,虾血清中可能存在类 Ig 样物质,但均未对其进行进一步的研究,也无确凿的证据加以证实<sup>[11~14]</sup>。作者在此基础之上,运用 Western-blotting 检测对虾血清中的类 Ig,结果发现虾血清中的两种蛋白——ILp70 和 ILp62 与抗人 Ig 抗血清呈明显的阳性反应(图 1),说明对虾体内确实存在与人 Ig 相类似的类 Ig 分子,其抗原位点可能与人 Ig 存在较大的同源性。目前,在一些无脊椎动物中人们发现了很多与人 Ig 高度同源的蛋白,如 Zenteno 等<sup>[18]</sup>报道淡水虾 *Macrobrachium rosenbergii* 血淋巴中的唾液酸特异凝集素分别与人 Ig κ 和 Ig λ 具

有 22% 和 27% 的同源性。由此推测,作者所发现的与抗人 Ig 抗血清发生特异性结合的 ILp70 和 ILp62 蛋白与人 Ig 在氨基酸序列上也应当存在一定的同源性,其可能是存在于对虾血淋巴中的两种新的 IgSF 分子,至于其具体的氨基酸序列和基因结构还有待于通过质谱和基因克隆等分子生物学技术进行进一步的研究和鉴定。

为了进一步探索对虾血淋巴中的类 Ig 在血细胞和组织中的分布情况,我们采用免疫组织化学方法对其进行了进一步的研究,结果显示,我们所选的 5 种组织切片和血细胞涂片均有不同程度的阳性反应(图 2.3),提示虾的组织 and 血细胞中同样存在类 Ig 蛋白。尤其值得一提的是,其中淋巴器和肝胰脏与抗人 Ig 孵育后显色比其它 3 种组织明显的要深,由此推测该两种组织很可能是类 Ig 的合成和分泌器官。研究表明,与脊椎动物中的免疫细胞相似,一些无脊椎动物血细胞不仅其表面存在具有“异己”识别和信号传导功能的类 Ig 分子,而且具有释放免疫因子的功能<sup>[19]</sup>。Rodriguez 等<sup>[20]</sup>发现日本对虾无颗粒细胞和小颗粒细胞可以释放一种分子质量为 27 ku 的与凝集活性有关的蛋白。刘晓云等<sup>[21]</sup>在研究中国对虾时发现无颗粒细胞中的一种具有类似淋巴细胞的性质,即在接受抗原刺激后,细胞表现出一种浆细胞样分化,在内质网中有免疫物质合成,并以细胞表面形成泡状突起的方式进行释放。作者发现凡纳滨对虾无颗粒细胞外膜与羊抗人 Ig 反应呈阳性,暗示其细胞表面应当含有与血淋巴中一致的类 Ig 分子,对虾无颗粒细胞可能是我们在血淋巴中所发现的两种类 Ig 分子(70 ku 和 62 ku)的分泌细胞。

业已证实,无脊椎动物中的 IgSF 分子在机体防御方面具有重要地位,如参与细胞与细胞之间的信号传导作用<sup>[15]</sup>,抑制血细胞凝集<sup>[1]</sup>,刺激细胞的吞噬作用与包裹作用,充当调理性素<sup>[22]</sup>,作为病毒受体<sup>[23]</sup>,甚至可能参与无脊椎动物的初级适应性免疫反应<sup>[24]</sup>。作者所发现的 ILp70 和 ILp62 两种类 Ig 分子,虽说其具体功能尚不明白,但根据其可与抗人 Ig 特异性结合以及大量存在于细胞和组织中的特点,推测对虾中的类 Ig 分子可能与对虾的免疫防御密切相关,它可能是一种新发现的重要的粘附分子,也可能是一种免疫识别分子,甚至可能是凝集素。相信,随着研究的深入,在明确其蛋白质结构和基因序列的基础之上,其功能必将彻底阐明。

#### 参考文献:

- [1] Ladendor N E, Kanost M R. Bacteria-induced protein P4 (hemolin) from *Manduca Sexta*; a member of the immunoglobulin superfamily which can inhibit hemocyte aggregation [J]. *Arch Insect Biochem Physiol*, 1991, 18: 285-300.
- [2] Hoek R M, Smit A B, Frings H, et al. A new Ig-superfamily member, molluscan defence molecule (MDM) from *Lynnea stagnalis*, is down-regulated during parasitosis [J]. *Eur J Immunol*, 1996, 26: 939-944.
- [3] Seeger M A, Ha. ey L, Kaufman T C. Characterization of amalgam; a member of the immunoglobulin superfamily from *Drosophila* [J]. *Cell*, 1988, 55: 589-600.
- [4] Bailey C H, Chen M, Keller F, et al. Serotonin-mediated endocytosis of apCAM: an early step of learning-related synaptic growth in *Aplysia* [J]. *Science*, 1992, 256: 645-648.
- [5] Zhang S M, Leonard P M, Adema C M, et al. Parasite-responsive IgSF members in the snail *Biomphalaria glabrata*; characterization of novel genes with tandemly arranged IgSF domains and a fibrinogen domain [J]. *Immunogenetics*, 2001, 53: 684-694.
- [6] Teunissen O S P, Faber R, Booms G H R, et al. Influence of vaccination of vibriosis resistance of giant black tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius [J]. *Aquaculture*, 1998, 164: 359-366.
- [7] Witteveldt J, Vlask J M, Van Hulst M C. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus using a WSSV subunit vaccine [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 16: 571-579.
- [8] Moret Y, Siva-Jothy M T. Adaptive innate immunity? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor* [J]. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 2003, 270: 2 475-2 480.
- [9] Little T J, O'Connor B, Colegrave N, et al. Maternal transfer of strain-specific immunity in an invertebrate [J]. *Curr Biol*, 2003, 13: 489-492.
- [10] Lazzaro B P, Scurman B K, Clark A G. Genetic basis of natural variation in *D. melanogaster* antibacterial immunity [J]. *Science*, 2004, 303: 1 873-1 876.
- [11] 叶淑芳. 中国对虾体液免疫实验方法的探讨[J]. *海洋科学*, 1991, 6: 66-67.
- [12] 王雷, 李光友, 毛远兴. 口服免疫药物后中国对虾某些血淋巴因子的测定及方法研究[J]. *海洋与湖泊*, 1995, 26 (1): 43-40.
- [13] 王伟庆, 李爱杰, 兰翠霞, 等. 用免疫消浊法测定中国对虾血清中的免疫因子[J]. *水产学报*, 1998, 22: 170-174.
- [1] Ladendor N E, Kanost M R. Bacteria-induced protein

- [14] 章跃陵, 彭宜宪, 王三英. 日本对虾血清三类免疫球蛋白样物质的研究[J]. *海洋科学*, 2001, 25: 37-41.
- [15] Mendoza H L, Fayeb I. Physiological aspects of the immunoglobulin superfamily in invertebrates [J]. *Dev Comp Immunol*, 1999, 23: 359-374.
- [16] Brümendorf T, Lemmon V. Immunoglobulin superfamily receptors: cis-interaction, intracellular adaptors and alternative splicing regulate adhesion [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, 13: 611-618.
- [17] Lander E S, Linton L M, Birren B, *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome [J]. *Nature*, 2001, 409: 860-921.
- [18] Zenteno R, Vaquez L, Claudia S, *et al.* Chemical characterization of the lectin from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) by MALDI-TOF [J]. *Comp Biochem Physiol Part B*, 2000, 127: 243-250.
- [19] Lanz-Mendoza H, Bettencourt R, Fabbri M, *et al.* Regulation of the insect immune response: the effect of hemolin on cellular immune mechanisms [J]. *Cell Immunol*, 1996, 169: 47-54.
- [20] Rodriguez J, Boulo V, Mialhe E, *et al.* Characterisation of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies [J]. *J Cell Sci*, 1995, 108: 1 043-1 050.
- [21] 刘晓云, 刘树青, 姜明. 中国对虾类淋巴器结构观察及功能探讨[J]. *青岛海洋大学学报*, 1999, 29: 167-171.
- [22] Bettencourt R, Assefaw-Redda Y, Faye I. The insect immune protein hemolin is expressed during oogenesis and embryogenesis [J]. *Mech Dev*, 2000, 95: 301-304.
- [23] Garbe J C, Yang E, Gristrom J W. IMPL-2: an essential secreted immunoglobulin family member implicated in neural and ectodermal development in *Drosophila* [J]. *Development*, 1993, 119:1237-50.
- [24] Arala-Chaves M, Sequeira T. Is there any kind of adaptive immunity in invertebrates? [J]. *Aquaculture*, 2000, 191: 247-258.

## On immunolocalization of Ig-like proteins in shrimp *Litopenaeus vannamei*

ZHANG Yue-ling<sup>1,2</sup>, LIU Wen-jie<sup>1</sup>, WANG San-ying<sup>1</sup>, HUANG Tong-wang<sup>2</sup>

(1. School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Department of Biology, School of Science, Shantou University, Shantou 515063, China)

Received: Dec. ,20,2004

**Key words:** *Litopenaeus vannamei*; Ig-like proteins; immune specificity; immunolocalization

**Abstract:** In the paper, an attempt was made to analysis the immunolocalization of Ig-like proteins that bound to anti-human Ig (immunoglobulin, Ig) in shrimp *L. vannamei* using modern methods of Western-blotting and immunohistochemistry. The results showed two types of protein which reacted strongly with goat anti-human Ig in the shrimp hemolymph, whose molecular weights were about 70 ku and 62 ku respectively. And the outer membrane of the hyalocyte and five tissues including lymphatic-like organ, hepatopancreas, heart, intestine and stomach were also bound with anti-human Ig specially, of which, the lymphatic-like organ and hepatopancreas were stained stronger than other samples. These results indicated that there do exist Ig-like proteins in the shrimp, which localized not only in hemolymph but also in haemocytes, lymphatic-like organ and hepatopancreas.

(本文编辑:刘珊珊)