

## 牙鲆红细胞对不同抗原的免疫黏附及 I 型补体受体的检测<sup>①</sup>

张振冬<sup>②</sup> 王淑芬\* 巩 宁\*\* 王秀娟\*\*\* 朱 琳\*\*\*

(国家海洋环境监测中心 大连 116023)

(\* 大连水产学院生命科学与技术学院 大连 116023)

(\*\* 大连海事大学环境系统生物学研究所 大连 116026)

(\*\*\* 南开大学环境科学与工程学院 天津 300071)

**摘 要** 采用 C3b 受体花环实验探究了牙鲆红细胞对不同种类抗原的免疫黏附能力,确定了影响免疫黏附作用的理化因子。实验选取创伤弧菌、金黄色葡萄球菌和啤酒酵母 3 种不同类别的抗原分别与牙鲆红细胞在优化条件下反应。结果表明,牙鲆红细胞对 3 种抗原均有免疫黏附作用,在 20℃、0.1mol/L PBS<sup>++</sup> 缓冲液的反应条件下,牙鲆红细胞黏附创伤弧菌、金黄色葡萄球菌和啤酒酵母的 C3b 受体花环率分别为(19.00±1.01)%、(6.09±1.36)%和(3.42±0.00)%,对 3 种抗原的免疫黏附活性差异显著( $P<0.05$ )。利用 AK-TA 快速蛋白液相层析系统的 Superdex 200 GL 型高效柱分离纯化牙鲆红细胞膜蛋白 I 型补体受体(CR1),通过 dot-ELISA 法检测发现红细胞膜蛋白组分中含有 CR1 成分,表明牙鲆红细胞膜上表达了与高等脊椎动物有较高同源性的 CR1 分子。此实验首次证明了牙鲆红细胞具有发挥免疫功能的重要物质基础。

**关键词** 牙鲆,免疫黏附,I 型补体受体(CR1),C3b 受体花环,红细胞免疫

## 0 引 言

研究发现,同人类的红细胞一样,鱼类的红细胞也具有对不同抗原的免疫黏附能力。进一步发现,红细胞免疫黏附功能的物质基础是红细胞膜上的 I 型补体受体(complement receptor I, CR1)。目前对鱼类红细胞免疫黏附等免疫功能的研究还很少。张振冬等<sup>[1]</sup>首次发现,牙鲆红细胞能够黏附金黄色葡萄球菌,本文在此基础上,采用 C3b 受体花环实验研究了牙鲆红细胞对不同种类抗原的免疫黏附能力,确定了影响免疫黏附作用的理化因子。

## 1 基本知识

脊椎动物的补体系统是非特异性免疫的重要组成部分,对特异性免疫有重要的促进作用。补体系统激活后具有裂解细菌和自身衰老细胞、调理吞噬细胞的吞噬作用、参与免疫复合物的清除及产生炎症反应等多种功能。研究发现鱼类的补体系统也有类似于高等脊椎动物的免疫功能<sup>[2-6]</sup>。补体系统的

激活有三种途径:经典途径、补体替代途径和备解素途径。除无颌鱼类(jawless fish)缺乏后两种激活途径外<sup>[7,8]</sup>,其他鱼类都有三种补体激活途径。经典途径主要由抗原抗体免疫复合物激活。而替代途径有广泛的激活物,不需要抗体的参与,可直接由病毒、细菌以及脂多糖、肽聚糖、磷壁酸、酵母多糖、肿瘤细胞和坏死的组织细胞、细胞碎片所激活<sup>[9]</sup>。C3 是补体系统中含量最多、最重要的组分,是补体系统的关键成分和三种补体激活途径的中心环节,其活性片段诱导了吞噬病原、引起炎症反应、清除免疫复合物和免疫调节等多种重要的生物学效应,发挥着重要的生物学功能。C3 裂解产生的 C3b 分子通过其表面的活化二硫键与羟基或氨基反应共价结合到蛋白分子、细菌、真菌或肿瘤细胞的表面,形成 C3b 免疫复合物(immune complex, IC)。

1953 年 Nelson 首次提出人类的红细胞具有免疫黏附功能<sup>[10]</sup>,发现了人类红细胞可黏附肺炎球菌和梅毒螺旋体,并有促进白细胞吞噬病原的作用。1963 年 Nishioka 证实人类红细胞免疫黏附功能的物质基础是红细胞膜上的 I 型补体受体 CR1<sup>[11]</sup>。CR1

① 国家自然科学基金(40606030)和 863 计划(2006AA09Z170)资助项目。

② 男,1977 年生,副研究员;研究方向:微生物和鱼类免疫学;联系人,E-mail: zlzhang@nmemc.gov.cn  
(收稿日期:2008-05-22)

是补体片段 C3b 和 C4b 的受体,对其有高度的亲和性。红细胞的免疫黏附功能是凭借细胞膜表面的 CR1 将被补体片段 C3b 调理过的 IC 黏附,通过血液循环将 C3b-IC 带到肝、脾等器官的固定吞噬系统加以清除<sup>[12-14]</sup>。红细胞的免疫黏附作用可促进吞噬细胞对 IC 的吞噬。在补体的免疫调节作用下,红细胞的免疫黏附作用将游离的病原等结合在红细胞上,集中转运到免疫组织和器官中进行杀灭,促进了机体对病原的杀伤清除。CR1 是红细胞免疫黏附作用的分子基础,也是红细胞发挥其他免疫功能的重要物质基础之一。在血液中红细胞占有绝对的优势,对体内循环免疫复合物的清除起主要作用的是红细胞,而不是白细胞。Fearon 首次从人类红细胞上分离纯化到 CR1<sup>[15]</sup>。在黑猩猩、猕猴及狒狒等灵长类动物的红细胞上也证明有 CR1 的存在<sup>[16,17]</sup>。Schraml 等发现虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 的红细胞具有补体依赖的免疫黏附活性,初步证明了虹鳟的红细胞表面有 CR1 的表达<sup>[18]</sup>。但目前对鱼类红细胞免疫黏附等免疫功能的研究还很少。张振冬等<sup>[1]</sup>首次发现牙鲆红细胞能够黏附金黄色葡萄球菌。在此基础上,我们将分析牙鲆红细胞对不同种类抗原的免疫黏附功能以及影响免疫黏附作用的理化因子,并探究牙鲆红细胞 CR1 的表达情况。

牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 属鲽形目冷水性底栖鱼类,是我国北方沿海地区重要养殖品种之一。但各种病害特别是细菌性疾病的频繁爆发成为牙鲆养殖业发展的严重阻碍。研究牙鲆红细胞的免疫黏附活性对于深入了解牙鲆红细胞的免疫功能,分析补体系统参与非特异性免疫的机制和途径,探明鱼类红细胞的免疫防御机制以及丰富鱼类免疫学理论具有重要的意义,也可为提高养殖鱼类免疫机能、抵抗病害发生和促进鱼类养殖业的健康发展积累经验。

## 2 材料与方法

### 2.1 菌株培养及抗原制备

用作抗原的创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*) 购自中国科学院微生物研究所,金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 由上海水产大学和大连诺维信科技有限公司提供。挑取创伤弧菌和啤酒酵母菌单菌落分别接种于液体 2216E 海水培养基和酵母培养基中,28℃ 过夜振荡培养。挑取金黄色葡萄球菌单菌落于 LB 液体培养

基中,37℃ 过夜振荡培养。上述三种菌体分别用 0.1mol/L、pH 7.4 PBS 缓冲液离心洗涤两次,用终浓度 1% 的福尔马林溶液 65℃ 水浴 40 min 将其灭活。

为优化实验条件,分析离子强度对牙鲆红细胞免疫黏附活性的影响,选用 pH 7.4、0.1mol/L PBS<sup>++</sup> (0.1mol/L PBS, 0.75mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 2.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>) 和 0.2mol/L PBS<sup>++</sup> (0.2mol/L PBS, 0.75mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 2.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>) 两种不同离子强度的缓冲体系。灭活后的创伤弧菌菌体分别用上述缓冲液离心洗涤 3 次,并调整成浓度为  $2 \times 10^8$  CFU/mL 的菌悬液,4℃ 保存备用。

### 2.2 实验牙鲆

大连近海的野生牙鲆 4 尾,体长相近,平均体长  $(29.4 \pm 1.7)$  cm。于过滤海水中暂养 1 个月,使其适应暂养环境,并定期投喂鲜活沙蚕和杂色蛤肉。每天换水,水温 19℃。

### 2.3 牙鲆血清的制备

用 2.5mL 无菌注射器从实验牙鲆的尾静脉采血,注入 5mL 离心管中,平放于桌面上,室温放置 30min。待血凝固后,放于 4℃ 冰箱中过夜。收集析出的血清,分装于 1.5mL 灭菌离心管中, -80℃ 保存备用。

### 2.4 C3b-IC 的制备

取上述处理好的各种菌悬液 300μL 于 2mL 灭菌离心管中,加入等体积牙鲆血清,冰上充分混匀后,于 20℃ 孵育 30min。每隔 10min 轻轻混匀 1 次,防止菌体沉淀。孵育完成后,4℃ 条件下 10000r/min 离心 5min,菌体沉淀用 300μL 相应缓冲液重悬,恢复至原来的菌悬液浓度,4℃ 保存备用。

### 2.5 牙鲆红细胞的制备

分别从 4 尾实验牙鲆尾静脉取血,采用阿氏抗凝剂与牙鲆外周血 1:1 混合。利用比重为 1.083 的淋巴细胞分离液 (TBD 公司) 分离制备牙鲆红细胞。将采集的牙鲆抗凝血与淋巴细胞分层液按比例混合,于水平离心机 2500r/min 离心 15min 来分离牙鲆红细胞组分。离心后外周血细胞总共分为 4 层,小心地吸走上面的分离液、白细胞和血浆,将最底层的红细胞沉淀用 0.1mol/L PBS 于 4℃ 下离心洗涤两次,用血球计数板计数后调整浓度至  $1 \times 10^7$  /mL。然后取适量红细胞分别用处理 3 种菌体的相应缓冲液于 4℃ 离心洗涤两次,恢复至  $1 \times 10^7$  /mL。

### 2.6 牙鲆红细胞免疫黏附活性的检测

EDTA 缓冲液可螯合 Mg<sup>2+</sup> 以同时阻断补体激活的经典途径和替代途径,在 0.1mol/L PBS 缓冲液中

加入 10mmol/L EDTA 作为阴性对照缓冲体系。将创伤弧菌、金黄色葡萄球菌和啤酒酵母分别用 0.1mol/L PBS<sup>++</sup> 和 0.1mol/L PBS-EDTA 两种缓冲液离心洗涤 3 次,并调整成浓度为  $2 \times 10^8$  A 菌落形成单位(CFU)/mL 的菌悬液,4℃ 保存备用。分别取 50μL 三种菌悬液与牙鲆红细胞悬液等体积混合,细胞数比例约为 20:1,操作在冰上进行。轻轻混匀后,于 20℃ 恒温孵育 30min。孵育过程中每隔 10min 轻轻摇动混匀,防止红细胞和菌体细胞沉淀。孵育完成后,于冰上终止反应。每管加入 20μL 预冷的 0.25% 的戊二醛溶液,4℃ 固定 15min。取适量孵育液制作涂片,晾干后甲醇固定 2min。用蜡笔在涂片上画出染色区,防止染液溢流。每张涂片加入适量的 Wright 染液染色 3min,用蒸馏水冲洗至水流无色。晾干后油镜下观察红细胞对抗原的免疫粘附,计算红细胞 C3b 受体花环率。每个样品涂 3 张片观察计数取平均值。将每个红细胞粘附两个及两个以上创伤弧菌、金黄色葡萄球菌或啤酒酵母记为一个花环。0.1mol/L PBS<sup>++</sup> 实验组中 200 个红细胞中形成的花环数记为  $x_1$ , 0.1mol/L PBS-EDTA 阴性对照组中 200 个红细胞中形成的花环数记为  $x_2$ 。红细胞 C3b 受体花环率 =  $((x_1 - x_2)/200) \times 100\%$ 。实验结果采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。

## 2.7 牙鲆红细胞膜蛋白的制备和初步纯化

按 2.5 节收集制备足量牙鲆红细胞,用 0.1mol/L PBS 于 4℃ 下离心洗涤后,利用预实验优化的方法制备牙鲆红细胞膜蛋白提取液,分装后于 -80℃ 保存。选用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天)测定牙鲆红细胞膜蛋白提取液浓度。利用 AKTA 快速蛋白液相层析系统(FPLC, Pharmacia)对膜蛋白进行初步纯化,分离柱为 Superdex 200 10/300 GL 型高效柱。红细胞膜蛋白经 0.22μm 滤膜去除杂质,4℃ 条件下 12000r/min 离心 5min 去除沉淀后上柱分离,洗脱液为 50mmol/L、pH 7.0 的 PBS 缓冲液,洗脱速度 0.5mL/min,收集各个波峰组分 -80℃ 保存备用。利用分离胶为 7% 的 SDS-PAGE 电泳分析牙鲆红细胞膜蛋白初步分离的组分,电泳结果用考马斯亮兰 R 250 染色观察。

## 2.8 牙鲆红细胞膜蛋白中 CR1 的检测

利用 dot-ELISA 法检测牙鲆红细胞膜蛋白 CR1 成分。一抗选用美国 eBioscience 公司大鼠 Anti-mouse CD35 (CR1)单克隆抗体,二抗为辣根酶标记的山羊抗大鼠 IgG(进口分装)。dot-ELISA 检测程序如下:

(1)将 PVDF 膜划出 0.5cm × 0.5cm 的小方格方便点样,放入甲醇中浸泡 60s,取出晾干备用。

(2)向 PVDF 的小方格中心位置点样 1.5μL,晾干后,加入 3% 的 BSA 封闭液,于 37℃ 摇床轻摇封闭 60min 或 4℃ 封闭过夜。

(3)封闭后,用含 0.05% 吐温 - 20 的洗涤液摇动洗涤 3 次,每次 3min。

(4)将膜置于稀释 150 倍(预实验确定)的一抗反应液中,37℃ 摇床轻摇反应 45min。

(5)与一抗反应完后,将膜用洗涤液摇动洗涤 3 次,每次 3min。

(6)将膜置于稀释 5000 倍(预实验确定)的二抗反应液中,37℃ 摇床轻摇反应 45min。

(7)与二抗反应完后,将膜用洗涤液摇动洗涤 3 次,每次 3min。

(8)将膜放入二氨基联苯胺(DAB)显色液中显色。DAB 显色液配方: DAB 12mg, 50mmol/L pH 7.6 Tris-HCl 20mL, CoCl<sub>2</sub> 6mg, 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20μL。

(9)反应结束时用蒸馏水终止反应。

## 3 结果

### 3.1 离子强度对免疫粘附活性的影响

为优化实验条件,分析了离子强度对牙鲆红细胞免疫黏附创伤弧菌的影响(表 1)。0.2mol/L PBS<sup>++</sup> 缓冲液体系中牙鲆红细胞免疫黏附创伤弧菌的 C3b 受体花环数显著低于 0.1mol/L PBS<sup>++</sup> 缓冲液体系中花环数( $P < 0.05$ )。说明高离子强度对牙鲆红细胞的免疫黏附活性有明显抑制作用,不适合牙鲆红细胞免疫黏附活性的测定。0.2mol/L PBS<sup>++</sup> 缓冲液对牙鲆红细胞状态影响较大,出现了明显的萎缩和褶皱(如图 1)。

表 1 离子强度对牙鲆红细胞免疫黏附创伤弧菌影响的方差分析

| PBS <sup>++</sup> 缓冲液<br>离子强度 | 每尾鱼每 200 红细胞中黏附两个<br>及两个以上创伤弧菌的细胞数 |       |       |       | C3b 受体花环数    | 方差齐性检验<br>(F 检验)Sig. | t 检验<br>Sig. (2-tailed) |
|-------------------------------|------------------------------------|-------|-------|-------|--------------|----------------------|-------------------------|
| 0.1 mol/L                     | 71.67                              | 75.33 | 69.67 | 77.00 | 73.42 ± 3.35 | 0.925                | 0.000**                 |
| 0.2 mol/L                     | 38.00                              | 38.33 | 31.33 | 34.33 | 35.50 ± 3.32 |                      |                         |

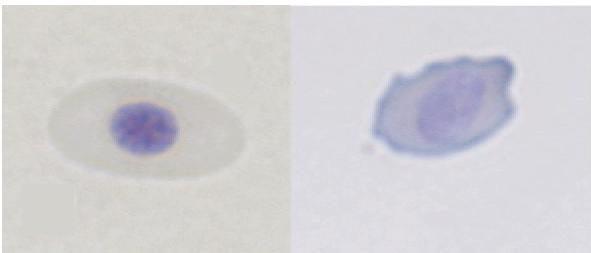


图1 牙鲆红细胞在 0.1 mol/L(左)和 0.2 mol/L [右]PBS++缓冲液中的状态

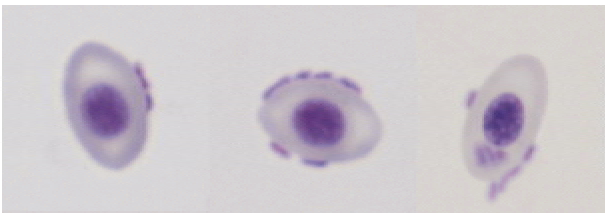


图2 牙鲆红细胞免疫黏附创伤弧菌(1000×)



图3 牙鲆红细胞免疫粘附金黄色葡萄球菌(1000×)

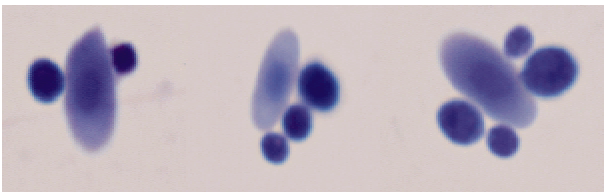


图4 牙鲆红细胞免疫粘附啤酒酵母(1000×)

3.2 牙鲆红细胞对创伤弧菌、啤酒酵母和金黄色葡萄球菌的免疫黏附活性

在 0.1 mol/L PBS++ 缓冲液体系中,利用 C3b 受体花环实验研究牙鲆红细胞对创伤弧菌、金黄色葡萄球菌和啤酒酵母 3 种不同抗原的免疫黏附作用(见图 2、图 3、图 4)。免疫黏附结果见表 2。通过公式红细胞 C3b 受体花环率 =  $\frac{x_1 - x_2}{200} \times 100\%$  计算,牙鲆红细胞免疫黏附创伤弧菌、金黄色葡萄球菌和啤酒酵母菌的 C3b 受体花环率分别为  $(19.00 \pm 1.01)\%$ 、 $(6.09 \pm 1.36)\%$  和  $(3.42 \pm 0.00)\%$ ,牙鲆红细胞对 3 种抗原的免疫黏附活性存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

表 2 牙鲆红细胞对创伤弧菌、啤酒酵母和金黄色葡萄球菌的免疫黏附活性

| 抗原细胞    | 反应中每尾鱼每 200 红细胞中黏附<br>两个及两个以上抗原细胞数 |                             |              |       | 方差齐性检验<br>(F 检验)Sig. | <i>t</i> 检验<br>Sig. (2-tailed) | C3b 受体花环率        |
|---------|------------------------------------|-----------------------------|--------------|-------|----------------------|--------------------------------|------------------|
|         | <i>x</i> <sub>1</sub> (实验组)        | <i>x</i> <sub>2</sub> (对照组) |              |       |                      |                                |                  |
| 创伤弧菌    | 71.67                              | 75.33                       | 37.33        | 35.33 | 0.034 *              | 0.000 **                       | (19.00 ± 1.01) % |
|         | 69.67                              | 77.00                       | 34.33        | 34.67 |                      |                                |                  |
|         | 73.42 ± 3.35                       |                             | 35.42 ± 1.34 |       |                      |                                |                  |
| 金黄色葡萄球菌 | 41.00                              | 49.00                       | 34.33        | 26.33 | 0.564                | 0.015 *                        | (6.09 ± 1.36) %  |
|         | 41.67                              | 33.67                       | 27.67        | 28.33 |                      |                                |                  |
|         | 41.34 ± 6.26                       |                             | 29.17 ± 3.54 |       |                      |                                |                  |
| 啤酒酵母    | 8.00                               | 7.00                        | 1.33         | 0.67  | 0.789                | 0.000 **                       | (3.42 ± 0.00) %  |
|         | 8.00                               | 8.00                        | 1.33         | 0.33  |                      |                                |                  |
|         | 7.75 ± 0.50                        |                             | 0.92 ± 0.50  |       |                      |                                |                  |

注:  $\alpha = 0.05$ ; \* 表示差异显著; \* \* 表示差异极显著。

3.3 牙鲆红细胞膜蛋白的制备和初步纯化

利用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测得牙鲆红细胞膜蛋白提取液的浓度为  $53.4 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ,经 FPLC Superdex 200 初步分离并收集各洗脱峰(图 5)。收集的各洗脱组分为:a 号为 7.2 ~ 9.5 mL,b 号为 9.5 ~ 11.0 mL,c 号为 11.0 ~ 13.0 mL,d 号为 13.0 ~ 14.0

mL,e 号为 14.0 ~ 15.9 mL,f 号为 15.9 ~ 17.8 mL。各组分 SDS-PAGE 电泳结果如图 6 所示。膜蛋白中分子量在 116 ~ 200 kD 的组分含量较多。通过初步分离纯化,确定了牙鲆红细胞膜蛋白的主要组成情况,并去除了膜蛋白提取液中高含量的去污剂成分,为进一步分离纯化和活性检测奠定了基础。

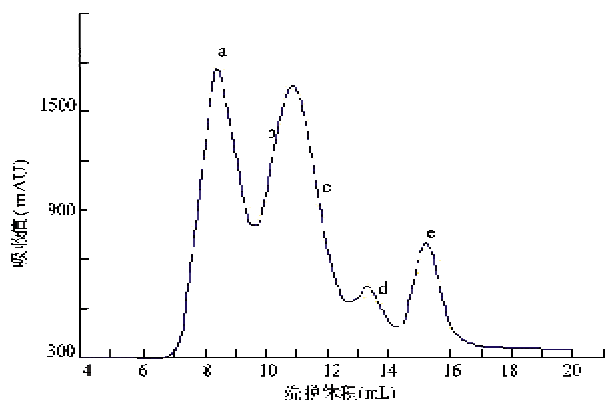
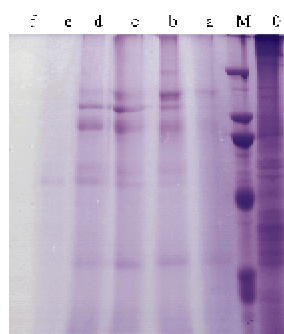


图 5 牙鲆红细胞膜蛋白经 FPLC Superdex 200 纯化洗脱图谱

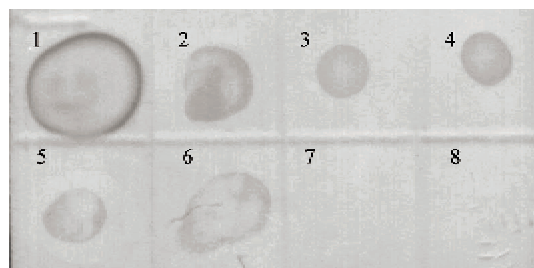


0 为膜蛋白原液, a~f 为收集洗脱组分, M 为高分子量蛋白 marker  
(由上至下: 200 kD, 116 kD, 97.2 kD, 66.4 kD, 44.3 kD)

图 6 牙鲆红细胞膜蛋白分离纯化组分 SDS-PAGE 电泳

### 3.4 牙鲆红细胞膜蛋白中 CR1 的检测

以 Anti-mouse CD35 (CR1) 单克隆抗体为一抗, 利用 dot-ELISA 法对牙鲆红细胞膜蛋白提取液和分离纯化组分进行检测。结果如图 7 所示。牙鲆红细胞膜蛋白提取液和经 FPLC Superdex 200 分离纯化的部分组分与抗小鼠 CR1 单克隆抗体呈阳性反应, 说明牙鲆红细胞膜蛋白提取液中含有与小鼠同源的 CR1 成分, CR1 分子在牙鲆红细胞上有表达。



1 为牙鲆红细胞膜蛋白提取液, 2 为小鼠外周血细胞膜蛋白提取液(阳性对照); 3~7 为 FPLC Superdex 200 分离的牙鲆红细胞膜蛋白组分, 8 为空白对照

图 7 dot-ELISA 检测牙鲆红细胞膜蛋白组分

## 4 讨论

研究表明, 离子强度对补体激活、C3b-IC 的形成及 C3b-IC 与 CR1 的结合有明显的影响<sup>[19-21]</sup>, 而且 C3b 与 CR1 结合在体外反应的最佳离子强度要低于体内的离子强度<sup>[21, 22]</sup>。因此在进行红细胞免疫黏附活性实验时, 反应条件对实验结果影响显著, 需要选择合适的离子强度, 特别是海水鱼和淡水鱼生境差异较大, 离子强度的选择更为重要, 否则所得实验结果不具可信性。本研究结果表明, 高离子强度对牙鲆红细胞的免疫黏附活性有明显抑制作用, 这与已报道的研究结果一致<sup>[23]</sup>。

此外, 温度对红细胞免疫黏附活性同样具有重要的影响。Bly 等研究发现温度可能通过影响鳗鱼 B 淋巴细胞膜的流动性而影响其结合免疫球蛋白的能力, 最终影响其免疫功能<sup>[24]</sup>。Holland 等提出在 15~25℃ 条件下鱼类红细胞的免疫黏附效率最高<sup>[25]</sup>。张振冬等研究发现牙鲆红细胞在接近其最适生理温度时(16~21℃), 吞噬活性较高, 表明温度对牙鲆发挥免疫功能具有明显影响<sup>[1]</sup>。因此本实验在分析牙鲆红细胞免疫黏附活性时, 选择适宜牙鲆生长的 20℃ 条件。通常开展相关研究, 恒温动物应选择其正常体温<sup>[26]</sup>, 变温动物选择其最适生长温度<sup>[18]</sup>。

本研究通过 C3b 受体花环实验证明了牙鲆红细胞对创伤弧菌、金黄色葡萄球菌和啤酒酵母 3 种不同种类抗原具有免疫黏附作用, 同时对 3 种抗原的免疫黏附率存在明显差异。目前有关红细胞对不同抗原免疫黏附率差异的研究很少。本实验中所选取的创伤弧菌、金黄色葡萄球菌和啤酒酵母 3 种抗原分别属于革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌和真核细胞, 我们推测 3 种抗原细胞壁结构和组成的不同是导致免疫黏附率差异明显的主要原因。C3 裂解产生的 C3b 分子通过活化的二硫键与抗原表面的羟基或氨基共价结合形成 C3b-IC, 因此抗原表面的羟基或氨基的多寡对 C3b-IC 的形成有一定的影响, 进而影响黏附效率。

CR1 是红细胞发挥免疫黏附功能的物质基础。本实验提取和初步纯化了牙鲆红细胞膜蛋白, 并利用 dot-ELISA 法检测发现其与特异的抗小鼠 CR1 单克隆抗体呈阳性反应, 首次证实了牙鲆红细胞膜表达了与高等脊椎动物具有较高同源性的 CR1 分子。初步纯化后的牙鲆红细胞膜蛋白成分主要集中在

116~200 kD 之间。高等脊椎动物 CR1 的分子量为 160~250 kD,具有明显的多态性,普遍存在于红细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、巨噬细胞和 T、B 淋巴细胞等细胞上。截至目前,对鱼类补体受体的研究还很少,只有鲶鱼 (*Ictalurus punctatus*) CR3 的基因被克隆<sup>[27]</sup>。Schraml 等研究证明虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 的红细胞表面有 CR1 的表达,参与了类似的免疫复合物清除过程<sup>[18]</sup>。本实验为进一步查明牙鲆 CR1 分子结构、理化特性及牙鲆红细胞免疫黏附的作用过程和特点打下了基础,我们也正在进行这方面的研究工作。

#### 参考文献

- [1] 张振冬, 张培军, 莫照兰. 牙鲆红细胞免疫功能的初步研究. 高技术通讯, 2006, 16(12): 1312-1315
- [2] Sakai D K. Lytic and bactericidal properties of salmonid sera. *Journal of Fish Biology*, 1983, 23(4): 457-466
- [3] Jenkins J A, Ourth D D. Membrane damage to *E. coli* and bactericidal kinetics by the alternative complement pathway of channel catfish. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 1990, 97(3): 477-481
- [4] Boesen H T, Pedersen K, Larsen J L, et al. *Vibrio anguillarum* resistance to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) serum: role of O-antigen structure of lipopolysaccharide. *Infection and Immunity*, 1999, 67(1): 294-301
- [5] Jenkins J A, Ourth D D. Opsonic effect of the alternative complement pathway on channel catfish peripheral blood phagocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1993, 39(4): 447-459
- [6] Sakai D K. Opsonization by fish antibody and complement in the immune phagocytosis by peritoneal exudate cells isolated from salmonid fishes. *Journal of Fish Diseases*, 1984, 7: 29-38
- [7] Fujii T, Nakamura T, Sekizawa A, et al. Isolation and characterization of a protein from hagfish serum that is homologous to the third component of the mammalian complement system. *The Journal of Immunology*, 1992, 148(1): 117-123
- [8] Nonaka M. Molecular analysis of the lamprey complement system. *Fish & Shellfish Immunology*, 1994, 4(6): 437-446
- [9] 王重庆. 分子免疫学基础. 北京: 北京大学出版社, 1997. 123-126
- [10] Nelson R A. The immune adherence phenomenon; an immunologically specific reaction between microorganisms and erythrocytes leading to enhanced phagocytosis. *Science*, 1953, 118 (3077): 733-737
- [11] Nishioka K, Linscott W D. Components of guinea pig complement I. separation of a serum fraction essential for hemolysis and Immune adherence. *The Journal of Experimental Medicine*, 1963, 118: 767-793
- [12] Cornacoff J B, Hebert L A, Smead W L, et al. Primate erythrocyte-immune complex-clearing mechanism. *The American Society for Clinical Investigation*, 1983, 71(2): 236-247
- [13] Craig M L, Bankovich A J, Taylor R P. Visualization of the transfer reaction: tracking immune complexes from erythrocyte complement receptor 1 to macrophages. *Clinical Immunology*, 2002, 105(1): 36-47
- [14] Reinagel M L, Taylor R P. Transfer of immune complexes from erythrocyte CR1 to mouse macrophages. *The Journal of Immunology*, 2000, 164(4): 1977-1985
- [15] Fearon D T. Regulation of the amplification C3 convertase of human complement by an inhibitory protein isolated from human erythrocyte membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979, 76 (11): 5867-5871
- [16] Chen W, Logar C M, Shen X P, et al. The chimpanzee and cynomolgus monkey erythrocyte immune adherence receptors are encoded by CR1-like genes. *Immunogenetics*, 2000, 52 (1-2): 46-52
- [17] Clemenza L, Subramanian B, Hourcade D, et al. Primary sequence of baboon CR1 demonstrates concerted evolution within the CR1 gene. *Molecular immunology*, 1997, 34(4): 297-304
- [18] Schraml B, Baker M A, Reilly B D. A complement receptor for opsonized immune complexes on erythrocytes from *Oncorhynchus mykiss* but not *Ictalurus punctatus*. *Molecular Immunology*, 2006, 43(10): 1595-1603
- [19] Gorgani N N, Easterbrook-Smith S B, Altin J G. The formation of insoluble immune complexes between ovalbumin and anti-ovalbumin IgG occurs in at least two distinct phases dependent on reactant concentration and ionic strength. *Biochimica et biophysica acta*, 1996, 1317(1): 45-54
- [20] Eisenberg R A, Theofilopoulos A N, Dixon F J. Use of Bovine Conglutinin for the Assay of Immune Complexes. *The Journal of Immunology*, 1977, 118: 1428-1434
- [21] Arnaut M A, Dana N, Melamed J, et al. Low ionic strength or chemical cross-linking of monomeric C3b increases its binding affinity to the human complement C3b receptor. *Immunology*, 1983, 489(2): 229-237
- [22] Berger M, Gaither T A, Hammer C H, et al. Lack of binding of human C3, in its native state, to C3b receptors. *Journal of immunology*, 1981, 127(4): 1329-1334
- [23] Imrie H J, Jones D R E. Complement coating of erythrocytes is reduced following their interaction with neutrophils *in vitro* without loss of complement receptor 1 (CR1). *Clinical & Experimental Immunology*, 1997, 109(1): 217-222

- [24] Bly J E, Butke T M, Cuchens M A, et al. Temperature-mediated processes in teleost immunity: the effects of temperature on membrane immunoglobulin capping on channel catfish B lymphocytes. *Comparative biochemistry and physiology A, Comparative physiology*, 1987, 88(1):65-70
- [25] Holland M C H, Lambris J D. The complement system in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology*, 2002, 12(5):399-420
- [26] Gröndahl G, Johansson A, Jensen W M, et al. Opsonization of yeast cells with equine iC3b, C3b, and IgG. *Veterinary immunology and immunopathology*, 2001, 80(3-4):209-223
- [27] Qian Y, Ainsworth A J, Noya M. Identification of a beta 2 (CD18) molecule in a teleost species, *Ictalurus punctatus Rafinesque*. *Developmental and Comparative Immunology*, 1999, 23: (7-8)571-583

## ***Paralichthys olivaceus* erythrocytes' immune adherence to different antigens and detection of their complement receptor I**

Zhang Zhendong, Wang Shufen<sup>\*</sup>, Gong Ning<sup>\*\*</sup>, Wang Xiujuan<sup>\*\*\*</sup>, Zhu Lin<sup>\*\*\*</sup>

(National Marine Environmental Monitoring Center, Dalian 116023)

(<sup>\*</sup> College of Life Science and Technology, Dalian Fisheries University, Dalian 116023)

(<sup>\*\*</sup> Institute of Environmental Systems Biology, Dalian Maritime University, Dalian 116026)

(<sup>\*\*\*</sup> College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071)

### **Abstract**

The C3b receptor rosette technique was employed to investigate the erythrocytes immune adherence activity of left-eyed flounder (*Paralichthys olivaceus*) to different antigens under the optimized immune adherence conditions. Three different kinds of antigens (gram-negative bacteria, gram-positive bacteria and eukaryote) were chosen to incubate with erythrocytes in the 0.1 mol/L PBS<sup>++</sup> buffer at 20°C for 30 min. The results indicated that the flounder erythrocytes were able to adhere to all the three kinds of antigens with the C3b receptor rosette rates for *Vibrio vulnificus*, *Staphylococcus aureus* and *Saccharomyces cerevisiae* being  $(19.00 \pm 1.01)\%$ ,  $(6.09 \pm 1.36)\%$  and  $(3.42 \pm 0.00)\%$  respectively. The external structures of the antigens were inferred to be responsible for the significant difference of rosette rates. Furthermore, erythrocyte membrane proteins were extracted and purified by the Superdex 200 FPLC gel chromatography to prepare the complement receptor I (CR1) component. The Dot-ELISA assay confirmed there was the CR1 component in erythrocyte membrane proteins and the CR1 molecule homologous to higher vertebrate was expressed on erythrocytes of left-eyed flounder. Erythrocytes have been proved to possess key immune molecules and play an important role in the left-eyed flounder immune system in the study.

**Key words:** *Paralichthys olivaceus*, immune adherence, complement receptor I (CR1), C3b receptor rosette, erythrocyte immune