

草鱼催乳素抗血清的制备与鉴定

陈松林 陈细华 邓文涛 夏盛芹

(中国水产科学研究院长江水产研究所淡水鱼类种质资源与生物技术国家重点实验室 沙市 434000)

摘要 应用从草鱼垂体中分离纯化的催乳素(PRL)免疫兔子制备了特异抗血清。用常规酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测表明该抗血清与大马哈鱼生长激素(sGH)及促性腺激素(sGtH)完全没有交叉反应,而与草鱼生长激素(gcGH)有微弱交叉反应。免疫细胞化学染色表明该抗血清主要与草鱼垂体前叶(RPD)催乳素细胞发生结合反应,与垂体间叶(PPD)细胞有微弱染色反应,但与神经垂体(NP)及垂体后叶(PI)细胞则完全没有免疫结合反应。

关键词 草鱼 催乳素 抗体 鉴定

催乳素(Prolactin,简称为PRL)是由动物脑垂体合成与分泌的一种多肽激素,它与垂体中的另一种激素——生长激素在生化性质及结构上具有一定的类似性,均由一个共同的祖先分子进化而来,隶属于同一个激素家族^[1]。PRL在脊椎动物中具有多种生理作用,而在鱼类上其主要生理功能是调节鱼体渗透压和离子平衡^[2,3]。由于PRL在洄游性及广盐性鱼类渗透压调节及海、淡水转换过程中所起的重要作用,近年来,国际上一些学者对罗非鱼^[4]、大马哈鱼^[5],及鲤鱼^[6]等几种硬骨鱼类的PRL进行了分离纯化和抗体制备的研究,并建立了鲑鳟鱼类PRL的放射免疫测定方法。但有关草鱼PRL的分离纯化及抗体制备方面,目前国内外均未见报道。我们在分离纯化出草鱼PRL的基础上,又进行了抗血清制备和鉴定的研究,旨在为下一步建立草鱼PRL微量测定技术及开展鲤科鱼类催乳素内分泌学研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

草鱼PRL由笔者分离提纯而来。草鱼GH、大马哈鱼GH及GtH均为陈松林等制备^[7,8]。羊抗兔IgG、酶标羊抗兔IgG购自北京生物制品研究所,过氧化物酶-抗过氧化物酶

(rPAP)购自华美公司,邻苯二胺(OPD)和福氏(Freund's)佐剂,二氨基联苯胺(DAB)均购自Sigma公司。

免疫用的大耳白兔购自湖北省医学科学院实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 抗血清制备 按常规方法制备兔抗草鱼PRL抗血清。抗原PRL用量为100 μ g/次,共注射4次,注射间隔时间为15天。最后一次注射后10天左右杀死兔子取全血,分离血清后经离心收集抗血清置-30 $^{\circ}$ C冰箱保存。

1.2.2 抗血清效价及特异性测定 用常规ELISA测定法检测兔抗血清的效价及特异性。其方法简述如下:先用系列稀释的PRL(或其它激素抗原)包被96孔板,然后添加适度稀释的兔抗PRL血清,再添加酶标羊抗兔IgG,最后添加底物OPD显色。在490nm处测各孔光密度值(O.D.)。

1.2.3 垂体免疫细胞化学染色 取性腺未成熟草鱼垂体,用Bouin-Holland-升汞固定液固定,按常规方法进行石蜡包埋和切片,厚度为3 μ m。将切片先与兔抗草鱼PRL血清反应,然后与羊抗兔IgG反应,再与rPAP反应,最后添加酶反应底物DAB显色。

收稿日期:1995-05-02,修回日期:1995-10-05

2 结果

2.1 抗血清的滴度测定 ELISA 测定表明当 gcPRL 包被浓度为 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 抗血清稀释度在 $1:100000$ 以上时, 均可产生明显的结合反应, 按 50% 结合率时的稀释度计算, 该抗血清的效价应为 $1:50000$ 左右。同时可见不用 gcPRL 包被的空白对照孔, 不论抗血清浓度多高, 均无阳性反应 (图 1)。

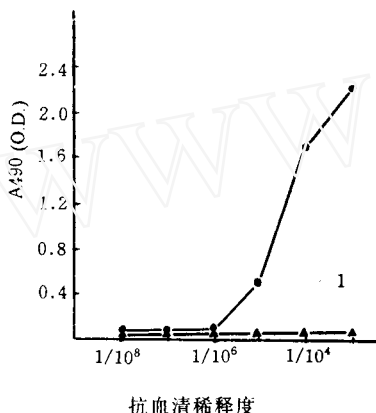


图 1 草鱼催乳素抗血清的效价测定

●—●: 催乳素包被浓度为 $1\mu\text{g}/\text{ml}$;

▲—▲: 未用催乳素包被对照。

2.2 抗血清特异性鉴定 特异性试验表明草鱼 PRL 抗血清与大鳞大马哈鱼 GH 和 GtH 完全没有交叉反应, 而与草鱼 GH 却有弱的交叉反应 (图 2)。

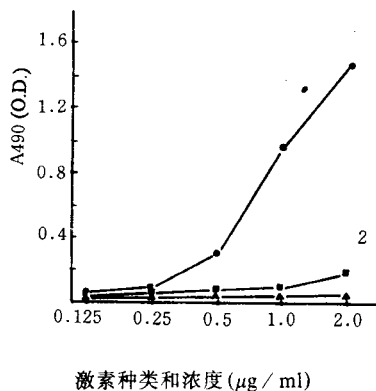


图 2 草鱼催乳素抗血清 ($1:55000$ 稀释) 特异性测定

●—●: 草鱼 PRL; ■—■: 草鱼 GH

▲—▲: 大马哈鱼 GH 或 GtH。

2.3 垂体免疫细胞化学染色 根据前人的研究结果, 鱼类 PRL 是由脑垂体前叶 (RPD) 细胞合成与分泌的。为此, 我们用 PRL 抗血清对草鱼垂体进行了免疫化学染色。结果表明, 该抗血清主要与 RPD 细胞发生染色反应, 与 PPD 细胞有微弱的结合反应; 而与 PI 细胞则完全没有反应 (图 3, 见封 4 上)。

3 讨论

催乳素是鱼类进行渗透压调节及维持离子平衡的最重要激素。长期以来由于缺乏鱼类催乳素制品及其抗血清, 导致我国在鲤科鱼类催乳素内分泌学方面研究很少, 与国际上差距很大。本文首次获得了草鱼 PRL 抗血清, 为进一步建立草鱼 PRL 微量免疫分析技术打下了物质基础。试验表明, 本文制备的草鱼 PRL 抗血清效价为 $1:50000$ 左右, 基本上达到了建立 PRL 测定技术的要求。但在 ELISA 测定中, 草鱼 PRL 抗血清表现出与草鱼 GH 具有微弱的交叉反应; 在免疫细胞化学鉴定中, 草鱼 PRL 抗血清主要与 RPD 区域的细胞有免疫反应, 这一结果与其他学者在其它鱼类上观察到的 PRL 抗血清免疫染色的结果相类似^[5,6]。不过, 本文同时还观察到该抗血清与 PPD 细胞也有一弱的免疫反应, 这一现象到底是由于 PRL 分子在结构上与 GH 分子具有一定的同源性, 因而 PRL 抗体与 GH 分子之间也有一定的交叉反应所造成呢? 还是由于其它原因所致, 有待今后进一步研究。

参 考 文 献

1. Bewley, T. A., and Li, C. H. Sequence comparison of human pituitary growth hormone, human chorionic gonadotropin and ovine pituitary lactogenic hormone. *Experientia*. 1971, 27: 1368—1371.
2. Clarke, W. C., and H. A. Bern. Comparative endocrinology of prolactin. In "Hormonal proteins and peptides" (C. H. Li, Ed.), 1980, 8: 105—197. Academic press, New York.
3. Hirano, T. The spectrum of prolactin action in teleosts. In "Comparative Endocrinology: Developments and Directions" (C. L. Ralph, Ed.), 1986, 53—74. A. R. Liss.

- New York.
- 4 Specker, J. L., D. S. King, R. S. Nishioka *et al.*, Isolation and partial characterization of a pair of prolactins released in vitro by the pituitary of a cichlid fish, *Oreochromis mossambicus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, **82**: 7490—7494.
 - 5 Kawauchi, H., K., Abe, A. Takahashi *et al.*, Isolation and properties of chum salmon prolactin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1983, **49**: 446—458.
 - 6 Miyajima, K., A., P. Yasuda and Swanson *et al.*, Isolation and characterization of carp prolactin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1988, **70**: 407—417.
 - 7 陈松林, Breton B. and LeBail, P. Y. 大鳞大马哈鱼生长激素的分离、纯化与鉴定. 生物化学杂志, 1992, **8**: 656—660.
 - 8 陈松林, Breton, B and LeBail, P. Y. 大鳞大马哈鱼垂体促甲状腺素和促性腺激素分离纯化的研究. 动物学报, 1991, **37**: 263—270.

PREPARATION AND IDENTIFICATION OF ANTIBODY AGAINST GRASS CARP PROLACTIN

CHEN Songlin CHEN Xihua DENG Wentao XIA Shengqin

(State Key Laboratory of Fish Germplasm Resources & Biotechnology, China Jiang Fisheries Institute Shashi 434000)

ABSTRACT The antibody against grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) prolactin (gcPRL) was prepared by 4 injections of gcPRL into rabbit. The titre of the antiserum was determined to be 1:50000 by enzymelinked immunosorbent assay (ELISA). ELISA showed that the antiserum mainly reacted with gcPRL, not cross reacted with salmon growth hormone and gonadotropin. Immunocytochemistry demonstrated that the antiserum mainly stained the cells in rostral pars distalis (RPD) and had a faint cross reaction with cells in proximal pars distalis (PPD), but did not stained the cells in pars intermedia (PI) and neurohypophysis (NP).

Key words Grass carp Prolactin Antiserum Identification

白鹇分布区在我国东南部的新扩展

高 育 仁

(华南濒危动物研究所 广州 510260)

摘要 湖北省东南部通山县九宫山自然保护区存在白鹇的重要发现, 加上在赣北发现白鹇; 结合湖南、江西、浙江的近期调查结果, 证实皖南白鹇分布区并非孤立的分布小区, 而是湘、鄂、赣、浙、皖白鹇新分布区的一部分。本文论证了比原分布区几乎扩大近二分之一的白鹇国内新分布区的实际存在。白鹇如此大面积新分布区的发现, 是国内雉类研究中近些年来少有的现象。

关键词 白鹇 分布 新区域

迄今按已发表的资料, 白鹇 (*Lophura nycthemera*) 在国内分布区北缘的划线东起浙江中部, 经江西东南缘及南部, 湖南南缘, 广西东北部, 贵州东南至西北部, 四川西南部进入云

南西北部止^[10]。增加了皖南白鹇的新分布区^[4]后, 在原划线范围以外又出现了一个孤立

收稿日期: 1995-04-18

表 1 白鹇在鄂、湘、赣、浙的新分布地

省别	新分布地	资料来源
湖北	通山县九宫山保护区	朱明圭、阮长武反映
	通山县九宫山、大幕山; 崇阳县桂口、桂花林场; 蒲圻市丁母山、官塘镇; 阳新县东源乡; 咸宁市花纹乡	阮长武 1986—1989 年见到及采获标本; 九宫山保护区现主任程应池反映
湖南	湘南包括宜章以至酃县等地	[5]
	浏阳、长沙、衡阳、怀化	沈猷慧 1993 年 6 月 5 日来信惠告
江西	赣北武宁、修水、瑞昌、庐山	阮长武野外及市场见
	黎川、乐安、永修、鄱阳湖区丘陵山地、井冈山地区	[3]
	泰和	广东省昆虫所动物室考察队 1979 年 8 月—1980 年 1 月赴赣调查结果
	全省山区	[9]
	赣南山区	[2]
浙江	建德、临安、淳安、天台、余姚、奉化及全省植被良好山区	[1]
	临安、淳安	[7]
	全省植被良好山区	[8]

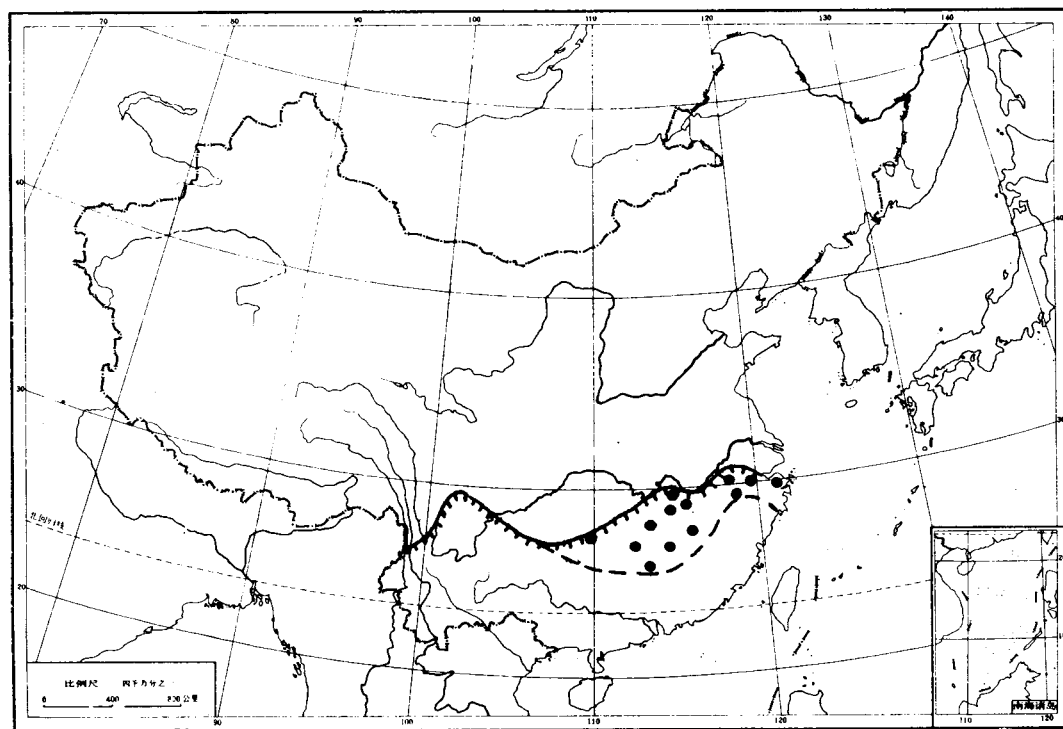


图 1 白鹇分布图

——新分布区界 ————原分布区界 ●主要新分布点

的分布小区^[6]。

1991年6月湖北省通山县九宫山自然保护区主任朱明圭专程来反映,该保护区内存在白鹇。笔者经与湖北省咸宁地区林业局干部、中国鸟类学会会员阮长武讨论;1993年5月亲临九宫山保护区考察,证实该地确有白鹇分布。预感白鹇在我国境内中部地区的分布区划线将大幅度向北推移。后与湖南省师范大学沈猷慧教授联系,并蒙惠告湖南方面工作的新发现,结合江西资料,进一步证实白鹇的分布区确实比以往大大向北扩展,直达湖北省南部接近长江边沿。占有大半个湖南省和江西全省,与皖南白鹇的孤立区域联成一片,几占浙江省全部,现把新分布区各省至县的分布点及资料来源列于表1。

据此,白鹇在我国的分布区已扩大至湖南中部以北长沙至怀化一线;湖北东南部长江以南;江西全境;皖南长江以南大部地区和浙江北部直至杭州、临安。新分布区划线如图1所示,可见与前相比白鹇在国内的分布范围扩大了近二分之一。

白鹇是山区森林雉类,浙江杭州以北;安徽南部现分布区以北;湖北东南部咸宁地区以北;湖南长沙以北再不见分布是因为地理位置上出现平原和长江、鄱阳湖、洞庭湖等自然屏障。而湖南西北部、贵州北部和东北部目前虽不在分布区内,但其地理纬度低于皖南和鄂东南,且都是连片的高原山地,如进一步深入调查,相信有可能再发现白鹇的分布地。

据阮长武反映,咸宁地区的白鹇于1983年始被发现,他本人于1984年采获标本。华中师范大学黎德武等,湖北省林业学校孙琼华等均率队在九宫山保护区进行过考察(至今未见发表资料)。白鹇标本先后经省内学者数人鉴定,

为福建亚种(*L. n. fokiensis*)。九宫山保护区的植被类型是中亚热带森林。白鹇在海拔600m到1400m处都见到活动。鄂、湘、赣三省交界处的山区属于幕阜山系,是连续的,说明白鹇的存在是历史性的。阮长武1988年10月29日晨8:00在崇阳县桂口乡黄帝脑林场的一片松阔混交林中见到一群白鹇,经点数有80多只。在九宫山保护区冬季一般结群为20—30只,附近其他地区也有20—40只的结群,这证实了南方山区,特别是广东、广西等地民间传说白鹇冬季集几十至一、二百只大群,特别在五、六十年代见到如此大数量群白鹇存在的可能性。

致谢 蒙沈猷慧教授、阮长武先生、程应池先生提供未发表资料,特致深切谢意。

参 考 文 献

- 1 丁平、姜仕仁、石斌山等。浙江西部山区白鹇生态的初步研究。动物学杂志,1992,27(3):20—23。
- 2 卢筹。赣南山区野生动物趣闻。大自然,1989,(2):45—46。
- 3 刘世平。江西鸟类区系研究。1934—1994中国动物学会成立60周年纪念论文集,北京:中国科学技术出版社,1994,607—627。
- 4 李炳华,陈壁辉。皖南白鹇的地理分布及生态初步调查。动物学杂志,1984,(4):15—18。
- 5 沈猷慧。湖南鸡形目鸟类资源。爱鸟护鸟资料选编。湖南省森林保护局,1984,30—34。
- 6 高育仁。白鹇。自卢汰春(主编)中国珍稀濒危野生鸡类。福州:福建科学技术出版社,1991,272—291。
- 7 诸葛阳主编。浙江动物志 鸟类。杭州:浙江科学技术出版社,1990,131—132。
- 8 诸葛阳,丁平。浙江省珍稀雉类的分布生境和资源保护。野生动物,1988,(4):3—4。
- 9 傅道言,丁铁明。江西省的珍稀鸟类。野生动物,1986,(4):3—4。
- 10 Cheng Tso-hsin. A Synopsis of the Avifauna of China. Science Press, Beijing, 1987, 157—159。