

南方鲇血型的初步鉴定

黄林, 金丽, 张耀光*

(西南大学生命科学学院, 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 水产科学重庆市市级重点实验室, 重庆 400715)

摘要: 本研究旨在通过观察南方鲇血清与其红细胞的交叉反应以鉴定南方鲇的血型。实验结果表明: 南方鲇的血清与同种其他个体的红细胞进行交叉反应时均未出现凝集现象, 这表明南方鲇可能不存在血型或南方鲇具备血型但血清中相应的凝集素含量不足。以南方鲇的红细胞为抗原免疫日本种大耳白兔制备的抗血清与南方鲇的红细胞进行交叉反应, 出现了不同程度的凝集反应, 这表明南方鲇存在血型。据上述两个实验结果可以推断, 南方鲇可能存在 4 种血型, 分别命名为 N^A 、 N^B 、 N^{AB} 和 N^O 型; 同时也证实, 在鉴定南方鲇血型的研究中, 通过制备抗血清与红细胞进行交叉反应的方法更为可靠。

关键词: 南方鲇; 抗血清制备; 血型

中图分类号: Q959.4; Q172 文献标识码: A 文章编号: 1000-7083(2009)06-0848-05

Preliminary Studies on the Blood Group of Southern Catfish *Silurus meridionalis*

HUANG Lin, JIN Li, ZHANG Yao-guang*

(School of Life Sciences, Southwest University, Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region(MOE), Key Laboratory of Aquatic Science of Chongqing, Chongqing 400715, China)

Abstract: To identify the blood group of the southern catfish *Silurus meridionalis*, cross-reactions were conducted between the fish's serum and red blood cells. The results showed that there was no agglutination in all the cross-reactions between the southern catfish's serum and individual red blood cells. This indicated that southern catfish may not have blood groups or that they may have blood groups but lack enough lectin in the serum. Using southern catfish red blood cells as the antigen to immune Japanese white rabbit to prepare antiserum, the prepared antiserum was used to cross-react with southern catfish red blood cells. The results showed that there were various degrees of agglutination which indicated the blood group existed in southern catfish. We could infer that southern catfish may have four blood groups which were named as N^A , N^B , N^{AB} , N^O , and the method of preparing antiserum to cross-react with red blood cells is more reliable to identify the blood group of southern catfish.

Key words: *Silurus meridionalis*; preparation of antiserum; blood group

1901 年奥地利科学家 K. Landsteine 发现人类具有 ABO 血型系统(Sindermann & Mairs, 1959)之后, 由于医学的需要, 对人类血型的研究已经非常深入(陈守良, 1996; 王玢, 左明雪, 2001)。其他动物是否有血型呢? 经过不断的研究, 已经发现鸟类(鸡)(Matsumoto & Okada, 1961)和许多哺乳动物存在血型(佐佐木清纲, 1982)。目前, 已有动物血型的资料大部分都集中在哺乳动物, 有关鱼类血型的研究很少。从 1949 年 Suyehirs 在鳗鲡 *Anguilla anguilla* Linnaeus 和鲟 *Sparus* 中发现同种凝集反应现象开始, 其后相继有学者在其他鱼类发现红细胞抗原特异性的差别(刘成汉, 1979)。Suzuki (1962) 根据实验推断出金枪鱼具有 4 种血型。国内仅见童金苟

(1991) 等对兴国红鲫 *Carassius auratus* var. *red*, 龙华(2007) 等对鲇、大口鲇及其杂交鲇的血型分析, 兴国红鲫、鲇、大口鲇都有 4 种血型, 杂交鲇有 5 种血型。南方鲇 *Silurus meridionalis* Chen, 又名大口鲇、河鲇, 是我国特有种, 既是重要的名贵经济鱼类, 又是很好的鱼类学研究对象。本实验采用两种不同的血型鉴定方法对南方鲇的血型进行研究, 目的在于丰富鱼类血液学研究内容, 并对鱼类血液学研究方法进行一些探讨。

1 材料与方法

1.1 实验材料

用于血型观察的南方鲇购于重庆合川两个鱼类

收稿日期: 2008-12-29 修回日期: 2009-02-16 基金项目: 国家科技支撑计划项目(No. 2006BAD03B0904)

作者简介: 黄林(1984~), 男, 硕士研究生, 主要从事动物形态与发育研究, E-mail: hlky@swu.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhangyg@swu.edu.cn

养殖场,且非同一亲本的后代。实验用鱼共 10 尾,取健康、活泼的个体,雌雄不论,体重约 900 ~ 1100 g;实验用日本种大耳白兔共 10 只,健康活跃,全为雄性,体重 2400 ~ 3000 g,取自西南大学生命科学学院实验基地。实验兔和实验鱼暂养 7 d,进行驯化,实验兔养殖室温控制在 20℃,实验鱼水温为 9.8℃ ~ 10.2℃,待其完全适应环境后开始实验。

1.2 实验方法

1.2.1 采血方法 用一次性注射器从南方鲇尾动(静)脉取血;实验用日本种大耳白兔从心脏取血(卢宗藩等,1983)。

1.2.2 鱼血清及红细胞悬液的制备 实验用南方鲇分别编为 1 ~ 10 号。参考童金苟(1991)等的方法并略有改动。将从实验个体抽取的 5 ml 新鲜血液装入离心管,在低速离心机中以 3000 r/min 离心 10

min。吸取上层血清 -4℃ 保存备用;将红细胞用鱼用生理盐水洗涤 3 次之后按 1:4 加入 1% 的 NaCl 溶液制备成 20% 的红细胞悬液,置 -4℃ 冰箱待用。各实验鱼血清和红细胞悬液分别编号存放。凝集反应时将 20% 的红细胞悬液与 1% 的 NaCl 溶液按 1:3 稀释成 5% 红细胞悬液。

1.2.3 兔抗血清的制备 实验兔分别编为 1 ~ 10 号,与实验鱼一一对应。注射用器具严格消毒后,将制好的实验鱼 20% 红细胞悬液经耳下静脉注射入实验兔体内,每间隔 7 d 注射一次,共注射 3 次,注射剂量分别为 0.5 ml、1 ml、1.5 ml。最后一次注射后 7 d 对实验兔心脏采血,以 3000 r/min 离心 10 min 分离血清,将分离出的血清 56℃ 水浴 30 min 以去除补体(Kuhns *et al.*, 1972),得到所需抗血清(表 1)。

表 1 兔抗血清的抗体滴度
Table 1 The titer of rabbit's anti-serum

兔抗血清(No.)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
滴度	19200	9600	16000	16000	16000	16000	16000	16000	12800	16000

1.2.4 平板凝集反应 取各南方鲇血清与其他南方鲇的 5% 红细胞悬液在双凹板上进行交叉反应(解景田,赵静,1987),观察反应情况并记录实验结果。

取制备好的兔抗血清与各南方鲇的 5% 红细胞

悬液在双凹板上进行交叉反应(解景田,赵静,1987),观察反应情况并记录实验结果。

2 实验结果

南方鲇血清与南方鲇红细胞交叉反应结果如表 2。

表 2 南方鲇血清与南方鲇红细胞交叉反应结果
Table 2 Agglutination level of cross-reaction with southern catfish's serum and RBC

不同个体血清(No.)	不同个体红细胞(No.)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

注:“0”表示没有发生凝集反应。

从表 2 可以看出,1 ~ 10 号南方鲇的红细胞和 1 ~ 10 号南方鲇的血清进行交叉反应均未出现凝集反应,据此无法判断南方鲇是否具有血型。

兔抗血清与南方鲇红细胞交叉反应结果如表

3。

从表 3 可以看出,1 ~ 10 号南方鲇的红细胞与 1 ~ 10 号兔的抗血清进行交叉反应均有凝集反应,但反应强弱各有不同。从凝集反应结果分析,1、3 号

南方鲇具有同一血型;2、5、10 号具有同一血型;4、9 号具有同一血型;6、7、8 号具有同一血型。各兔抗血清与相应实验鱼反应均强烈;1、3 号兔抗血清与 4、6、7、8、9 号实验鱼反应均强烈;2 号兔抗血清与其他实验鱼的反应均很弱;而 5、10 号兔抗血清与各实验鱼反应均强烈;4、9 号兔抗血清与 1、3 号实验鱼

反应均强烈,与 2、5、6、7、8、10 号实验鱼反应均很弱;6、7、8 号兔抗血清与 1、3 号实验鱼的反应均强烈,与 2、4、5、9、10 号实验鱼反应均很弱。根据本实验可将 10 尾南方鲇的红细胞血型分为 4 种,分别命名为 N^A 型(4、9 号)、 N^B 型(6、7、8 号)、 N^{AB} 型(1、3 号)、 N^O 型(2、5、10 号)。

表 3 兔抗血清与南方鲇红细胞交叉反应结果
Table 3 Agglutination level of cross-reaction with rabbit's anti-serum and southern catfish's RBC

南方鲇红细胞 (No.)	兔抗血清(No.)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	4	1	4	3	3	4	4	4	3	3
2	1	3	1	1	3	1	1	1	1	3
3	4	1	4	3	3	4	4	4	3	3
4	3	1	3	4	3	1	1	1	4	3
5	1	1	1	1	4	1	1	1	1	3
6	3	1	3	1	3	4	3	3	1	3
7	3	1	3	1	3	3	4	3	1	3
8	3	1	3	1	3	3	3	4	1	3
9	3	1	3	4	3	1	1	1	4	3
10	1	1	1	1	3	1	1	1	1	4

注:“4”=“++++”表示凝集反应很强烈;“3”=“+++”表示凝集反应强烈;“2”=“++”表示凝集反应一般;“1”=“+”表示凝集反应很弱。具有相同血型的南方鲇红细胞与各个兔抗血清的反应情况绝大部分相同。

3 讨论

3.1 鱼类血型的研究

有关鱼类的血型研究开展较晚,在方法上大多沿用了人类血型的研究方法,主要方法有以下 3 种:同种凝集、异种凝集、免疫凝集。同种凝集指同一种动物的某些个体的红细胞抗原与另一些个体血清中的自然抗体反应,出现凝集反应现象。但是鱼类与人类和其他哺乳动物及鸟类的情况不同,在鱼类中同种凝集素比较少见,虽然最初鱼的血型是根据同种凝集发现的,但是已报道的绝大多数鱼类的血型却不是用这种方法发现的,甚至有的科学家一度错误地认为血型可能是由爬行类开始发生(刘成汉, 1979)。异种凝集指一种动物的红细胞抗原与其他动物的血清中的自然抗体以及植物凝集素反应,出现凝集反应现象。人们利用异种凝集研究鱼类的血型取得了良好的效果,很多鱼类的血型通过这种方法得以发现(Cushing, 1952; Sindermann, 1962; Kuhns *et al.*, 1969)。免疫凝集指通过免疫同种或异种动物从而得到比自然血清中效价高出很多倍的免疫抗体,从而检测到自然血清不能或不易检测到的红细胞抗原。免疫凝集区分鱼的血型成功地报道很

多,如 Sindermann 和 Maris (1959) 利用鲱鱼 *Clupea harengus* Linnaeus 红细胞免疫角鲨,所获得的抗血清成功地区分了鲱鱼的血型。单克隆抗体是一种新型的实验技术,自 1975 年出现至今,该技术已经相当成熟,但是却很少有人将其用于鱼类的血型研究,邢婧(2005)等曾制备出牙鲆 *Paralichthys olivaceus* 红细胞的单克隆抗体并将其与 5 种养殖鱼类的红细胞进行交叉反应,得到了一些不同的凝集结果。

目前对鱼类血型的研究仅限于对红细胞表面抗原和相应的血清同种凝集素,目的是通过血型的频率来研究鱼的种群的地理分布情况、亚种间的杂交、鱼的洄游等;通过不同的鱼的红细胞和血清同其他鱼及其他动物乃至人类的红细胞和血清的反应情况来判断相互间的亲缘关系等。目前的研究表明,鱼类红细胞表面存在抗原,具备血型,一些鱼的血清中存在同种凝集素(Sindermann & Honey, 1964; Kuhns *et al.*, 1969);同科不同种的鱼具有部分相似的红细胞抗原,同时也具有不同的红细胞表面抗原(Suzuki, 1962; Kuhns *et al.*, 1969);同种不同个体的血清凝集素的含量也不相同(Cushing, 1952);鱼类的血型系统具有多样性(Suzuki, 1962; Kuhns *et al.*, 1969)等。

本次实验得到的南方鲇的 N 血型系统与 Suzuki (1962) 所发现的金枪鱼的 Tg 血型系统、Sindermann (1964) 等发现的北大西洋鳕鱼 *Raja ocellata* Mitchill 的 SK_{ab} 血型系统和童金苟 (1991) 等所发现的兴国红鲫的 S 血型系统以及人的 ABO 血型系统极其相似, 这表明某些鱼类存在着与人类相似的血型系统。如同人有多个不同的血型系统一样, 在一些鱼的红细胞上也发现了不同血型系统的抗原, 如 Kuhns (1969) 等利用人的血清及植物凝集素将鲷 *Ictaluridae* 的红细胞反应结果分为两个类群, 后来又通过吸收实验发现了不同的红细胞表面抗原; Sindermann (1959) 等在大西洋鲱鱼中发现了 C 血型系统, 将鲱鱼分为 C 阳性和 C 阴性两种; Sindermann (1962) 在对大西洋鲱鱼的继续研究中发现 D 抗原, Suzuki (1962) 在黄鳍金枪鱼中除了发现 Tg 血型系统外还发现了 X 血型系统。这些都说明同一种鱼可能不止有一种血型系统, 这与人的红细胞表面具有多种抗原及人有多种血型相似。

本试验通过免疫凝集法来区分和确定血型, 实验中通过异种免疫的方法制备出了南方鲇红细胞表面抗原的抗体。由于本次实验是用完整的红细胞进行注射后直接制备出抗血清, 而红细胞表面可能存在不止一种抗原决定簇, 所以本次实验制备出了红细胞表面抗原的多种抗体, 虽然通过各南方鲇红细胞与不同的兔抗血清的反应结果我们确定出了含相同抗原决定簇的南方鲇红细胞, 但是要更加精确地鉴定南方鲇红细胞血型系统应该进一步制备出红细胞表面抗原的单克隆抗体, 从而才能深入地进行血型基因的定位等研究。

3.2 南方鲇的血型及其特点

通过异体免疫注射制备出兔抗血清与南方鲇红细胞进行交叉反应, 除 2 号南方鲇的凝集反应极微弱外, 其余个体均发生了强烈的凝集反应, 这说明大部分南方鲇的红细胞表面存在凝集原, 即这些南方鲇个体具有血型。根据实验结果分析, 南方鲇红细胞的血型可以分为 4 种, 用南方鲇第一个字拼音的第一个字母分别命名为 N^A、N^B、N^{AB}、N⁰ 血型。这与已有对南方鲇血型的研究结果有明显差异, 已有的工作是: 用南方鲇的血液与人 A、B 血型的单克隆抗体抗血清反应来鉴别其血型, 根据试验中出现了凝集、有沉淀等现象, 将南方鲇的血型分为 YY、NY、YN、YYN 4 类, 分别由 N⁰、N¹、N² 3 个复等位基因控制, 并确定其基因型分别为 N¹N¹、N⁰N¹、N¹N⁰、

N²N⁰ (龙华等, 2007)。重复相关实验发现, 部分南方鲇的血液与抗人 A 血型的单克隆抗体抗血清发生了强烈的凝集反应, 部分南方鲇的血细胞在抗人 A、B 血型的单克隆抗体抗血清中出现的是自然沉淀, 而不是凝集反应。单克隆抗体为单一种 B 细胞克隆所产生的一种均一的免疫球蛋白分子, 它的特异性是针对一个抗原决定簇的 (于善谦等, 1999)。由于单克隆抗体只是针对一种抗原或者与它非常相似的抗原反应, 所以当血细胞上有相应的抗原时, 一般都会出现强烈的凝集反应, 如果血液中没有相应的抗原, 就不会有凝集反应或者沉淀出现, 因此 YYN 型血型是比较确定的, 但其他 3 种血型尚待商榷。对于与相同的抗体反应所出现的沉淀, 应视为同一抗原抗体反应, 即为同一血型, 而不应根据反应的强烈程度将其分为不同的血型, 由此来看 YN、YYN 应为同一血型, 只是由于不同的个体的红细胞的抗原含量不同, 从而导致凝集情况不同, 这与 Sindermann (1959) 等对不同的大西洋鲱鱼的个体的红细胞与兔抗血清和龙虾血清的反应的凝集程度不一致的研究结果的情况是一致的。另外, 根据基因与性状可以一一对应的原则, 如果 NO 基因是一种隐形基因, 则其所鉴定出的南方鲇血型就只有两种——即 N¹ 型, N² 型 (即 YY、NY、YN 为同一种血型, YYN 为一种血型); 如果 N⁰ 基因是一种显性基因, 那么血型也只有 3 种 (即 YY 为一种血型, NY、YN 为同一种血型, YYN 为一种血)。

本次试验中 5、10 号抗血清与南方鲇红细胞反应均强烈, 可能原因有二, 一是两兔产生了大量的种抗体; 二是南方鲇可能还存在其他血型乃至其他的血型系统。但由于本次实验只有 10 尾南方鲇, 实验结果还有一定的局限性, 有关问题值得在今后的工作中进一步研究。

南方鲇血液同种异体交叉反应时没有出现凝集, 这与兴国红鲫和鲷不同个体之间的血液交叉反应出现明显的凝集反应不同 (Kuhns *et al.*, 1970; 童金苟, 吴清江, 1991), 与小鼠、家兔、家鸽、蟾蜍、鲫鱼的不同个体之间的红细胞与血清之间不发生凝集反应的情况相似 (艾洪滨等, 2002)。出现这种情况可能有以下两种原因: 南方鲇血清内不含同种凝集素; 南方鲇血清含有同种凝集素, 但采集时温度太低从而导致血清凝集素浓度太低而不足以引起凝集反应 (Kuhns *et al.*, 1968)。

4 参考文献

- 艾洪滨,张静,付惠远,等. 2002. 几种脊椎动物红细胞血型的比较研究[J]. 山东师范大学学报(自然科学版),17(2):67~70.
- 陈守良. 1996. 动物生理学(第二版)[M]. 北京:北京大学出版社:113~114.
- 解景田,赵静. 1987. 生理学实验[M]. 北京:高等教育出版社:68~71.
- 刘成汉. 1979. 鱼类的血型及其在区分种群上的应用[J]. 淡水渔业,7:27~31.
- 龙华,邹桂伟,陈建武,等. 2007. 鲇、大口鲇及其杂交鲇的血型分析[J]. 水利渔业,27(3):19~20.
- 卢宗藩,吴维芬,王宗元,等. 1983. 家畜及实验动物生理生化参数[M]. 北京:农业出版社:11~38.
- 童金苟,吴清江. 1991. 红鲫血型的血清学研究[J]. 水生生物学报,15(4):343~349.
- 王玢,左明雪. 2001. 人体及动物生理学(第二版)[M]. 北京:高等教育出版社:197~200.
- 邢婧,战文斌,曾晓华,等. 2005. 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)红细胞单克隆抗体与五种养殖鱼类红细胞的交叉反应[J]. 海洋与湖沼,36(2):123~129.
- 于善谦,王洪海,朱乃硕,等. 1999. 免疫学导论[M]. 北京:高等教育出版社:139.
- 佐佐木清纲(李世安译). 1982. 家畜的血液型及其应用[M]. 上海:上海科学技术出版社:1~267.
- Cushing JE. 1952. Individual variation in the hemagglutinin content of yellowfin tuna and skipjack bloods[J]. J Immunol, 68: 543~547.
- Kuhns WJ, Chuba JV, Nigrelli RF. 1970. The antigenic specificity of blood groups which differentiate populations of fresh water catfish[J]. J Immunol, 105(2): 299~305.
- Kuhns WJ, Chuba JV, Nigrelli RF. 1972. Heterophilic antigens and antibodies in fresh water and marine fish [J]. J Immunology, 22: 907~913.
- Kuhns WJ, Nigrelli RF, Chuba JV, et al. 1968. Effects of temperature upon "Naturally Occurring" blood group agglutinins in fresh water catfish[J]. J Immunol, 103(1): 62~65.
- Kuhns WJ, Nigrelli RF, Chuba JV. 1969. Differences between populations of fresh water catfish defined by blood group antigens and antibodies[J]. J Immunology, 103: 454~459.
- Matsumoto K, Okada I. 1961. The blood group systems in the chicken [J]. The Japanese journal of genetics, 36(7-8): 257~267.
- Sindermann CJ, Honey KA. 1964. Serum hemagglutinins of the winter skate, *Raja ocellata* Mitchell, from the western north Atlantic ocean [J]. Copeia, 1: 139~144.
- Sindermann CJ, Mairs DF. 1959. A major blood group system in Atlantic sea herring[J]. Copeia, 3: 228~232.
- Sindermann CJ. 1962. Serology of Atlantic clupeoid fishes[J]. Am Nar, 96(889): 225~231.
- Suzuki A. 1962. On the blood types of yellow fin and bigeye tuna[J]. Am Nar, 96(889): 239~246.