

用酶联免疫吸附受体法检测 鱼类生长激素的生物活性

陈松林 邓文涛 贺路 陈细华

(中国水产科学研究院长江水产研究所, 沙市 434000)

摘要 根据激素—受体反应的原理,结合酶联免疫吸附测定法(ELISA)和放射受体测定法(RRA)的优点,应用我们纯化的草鱼生长激素(gcGH)和大鳞大马哈鱼生长激素(sGH)及其特异抗体,采用鱼类肝细胞膜受体试剂,首次建立了测定鱼类GH生物活性的酶联免疫吸附受体测定法(ELISA-RA)。此法检测草鱼GH的灵敏度达0.063~0.125ug/ml,检测大马哈鱼GH与草鱼肝膜受体结合的灵敏度达0.25ug/ml。同时表明草鱼GH、基因重组鲤GH以及大马哈鱼GH均可不同程度地与草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、鲤(*Cyprinus carpio*)、鲢(*Silurus meridionalis*)和黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)肝细胞GH受体特异结合。本测定系统可用于测定鱼类垂体中的GH含量以及监测鱼类GH分离纯化过程。

关键词 鱼类,生长激素,酶联免疫吸附受体测定法

生长激素(GH)是由动物脑垂体合成与分泌的一种蛋白质激素。肝脏是GH作用的主要部位,在肝细胞膜上存在许多能与GH特异结合的受体[Herington等,1977;Moore等,1978]。GH发挥促生长效应的第一步就是与其受体发生特异性结合反应。因此,借助于激素—受体特异结合的原理可以检测GH的生物活性及其含量。据此原理,Fryer[1979]率先建立了罗非鱼GH放射受体测定方法(RRA)。随后,Tarpey和Nicoll[1985]用此方法对虎鱼和高首鲟的肝GH受体进行了研究;LeBail等[1989]和陈松林等[1992]则将哺乳类GH的RRA方法应用于大马哈鱼GH分离纯化研究中。由于RRA法利用放射性同位素作标记物,具有污染环境 and 影响操作者身体等缺点,加之对实验室条件要求较高,因而其应用受到较大限制。本文利用酶联免疫吸附测定法的优点,建立了一种用酶标代替同位素标记的鱼类GH酶联免疫吸附受体测定方法(ELISA-RA)。

1 材料与方法

1.1 试剂及药品

牛血清白蛋白(BSA)购自华美生物工程公司;羟基过氧化物酶标记羊抗兔(或鼠)IgG购自卫生部北京生物制品所;邻苯二胺(OPD)为Sigma产品。

1.2 激素和抗体来源

大马哈鱼生长激素(sGH)和草鱼生长激素(gcGH)均由笔者分离提纯而来[陈松林等, 1992; Chen 等, 1993]。基因重组鲤生长激素(rcGH)大肠杆菌表达产物由上海生物工程中心孙玉昆教授惠赠, 后经我们分离纯化而来。兔抗sGH和gcGH血清以及鼠抗gcGH单克隆抗体(gcGH MoAb)均由本实验室自制[陈松林等, 1995]。

1.3 鱼肝受体制剂的制备

将从渔场购来的鲜活草鱼、鲤、鲢及黄颡鱼杀死后, 用剪刀剪碎取出的肝脏后加5倍于肝重的0.02mol/L Tris-HCl, pH7.5, 内含MgCl₂ 6mM, 蔗糖0.3 mol/L; 匀浆后置1500g离心30min, 收集上清再用100000g离心60min, 倾去上清收集沉淀重悬于上述缓冲液中。用Bradford方法测定受体膜制剂中的蛋白质含量, 然后稀释成4mg/ml, 分装后置-30℃保存备用。

1.4 ELISA-RA 程序

1.4.1 包被

用0.05mol/L Na₂CO₃-NaHCO₂ (pH9.6)缓冲液稀释受体膜, 添加到96孔板中, 每孔100 μ l, 4℃包被过夜。

1.4.2 封闭

每孔添加100 μ l 0.5%BSA于37℃封闭1h。

1.4.3 添加激素

用含0.05%Tween20的PBS洗板3次后, 在每孔中加入100 μ l适度稀释的GH溶液, 37℃温育2h。

1.4.4 添加第一抗体

洗板3次后, 每孔加100 μ l适度稀释的兔抗gcGH血清(1:10000)、兔抗sGH血清(1:20000)或鼠抗gcGH单抗(1:20000), 37℃温育2h。

1.4.5 添加酶标第二抗体

经3次洗涤后, 各孔加100 μ l 1:100稀释的过氧化物酶标记羊抗兔IgG或酶标羊抗鼠IgG, 37℃温育1h。

1.4.6 底物

经四次洗涤后, 各孔加100 μ l酶反应底物(OPD), 浓度为0.05%(W/V), 室温下反应30分钟。

1.4.7 检测

各孔加50 μ l 2N H₂SO₄终止显色反应, 然后用Bio-Rad450全自动酶标仪测定各孔在490nm的光密度值(O.D值)。

1.5 样品制备

草鱼垂体激素抽提液的制备按以前报道的方法进行[陈松林等, 1991], 共用1.5g垂体进行匀浆, 最后获得8ml抽提液。将抽提液经过偶联了gcGH单克隆抗体的免疫亲和柱层析后, 获得了gcGH组分, 其蛋白质浓度约为30 μ g/ml。草鱼血清的制备则按常规方法进行。

2 结果

2.1 ELISA-RA 条件的确定

首先,进行了不同浓度草鱼肝受体包被效果的试验。由图 1 可见,受体浓度对测定值(490nm 处的光密度值)有一定影响,但不是很大,当受体包被浓度在 1:25~1:100 之间时,添加的 gcGH 浓度与光密度值之间均存在明显的剂量反应关系,随着激素浓度的升高,光密度值也相应升高;据此,我们选择 1:50 作为受体的适宜包被浓度;其次,我们确定了非特异性结合程度,当用加热失活受体包被时,只有当 GH 浓度很高(2 μ g 和 4 μ g/ml 组)时,才有一定的结合反应,但其结合率明显低于未失活的受体(图 1A);当不用受体包被,而直接用 BSA 封闭时,不管 GH 的添加浓度多高,均没有明显结合(图 1B)。由此表明,在本 ELISA-RA 系统中,gcGH 和 sGH 与草鱼肝受体制备物之间存在着明显的特异性结合,其非特异性结合很低。

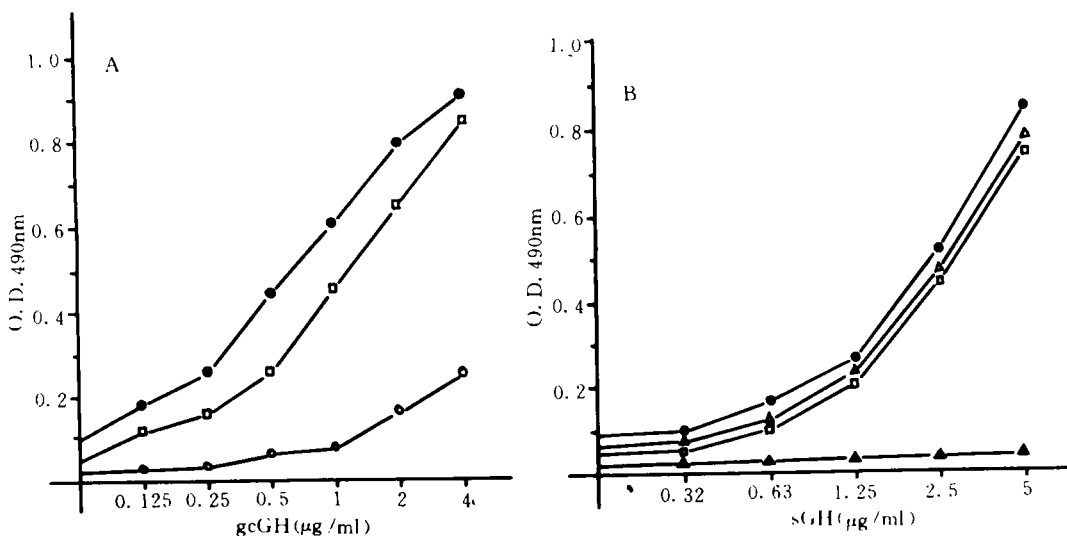


图 1 草鱼 GH(A)和大鳞大马哈鱼 GH(B)与不同浓度草鱼肝膜受体的结合曲线

Fig. 1 The binding curve of grass carp GH(A) and chinook salmon GH(B)

to grass carp liver membrane receptor with different concentration

A: 第一抗体为 gcGH 单克隆抗体; B: 第一抗体为兔抗 sGH 血清。

受体包被浓度为: ●-●1:25; Δ - Δ 1:50; \square - \square 1:100;

○-○用失活受体包被; \blacktriangle - \blacktriangle 用牛血清白蛋白包被的非特异性结合。

2.2 草鱼 GH(gcGH)与不同鱼类肝受体的结合

图 2 表明,gcGH 不仅能与鲤科鱼类(草鱼和鲤)肝 GH 受体相结合,而且还能与鲢及黄颡鱼肝受体发生明显的特异性结合。但是,草鱼 GH 与草鱼和鲤肝受体的结合率大于与鲢和黄颡鱼肝受体的结合率。当 gcGH 浓度为 0.063 或 0.125 μ g/ml 时就可看到 gcGH 与草鱼或鲤肝受体明显的阳性结合,而对鲢、颡而言,只有当 gcGH 达 0.125 μ g/ml 以上时,才可见到明显的阳性反应。由图可见,用兔抗 gcGH 抗血清(图 2A)和鼠抗 gcGH 单抗(图 2B)均获得类似结果。

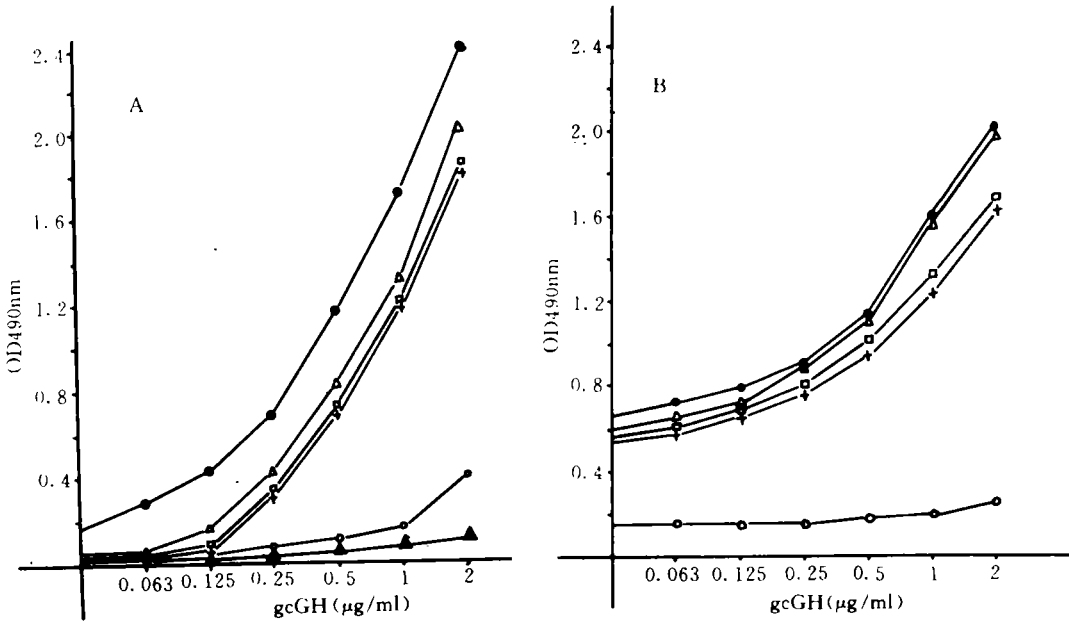


图2 草鱼GH与草鱼(●-●)、鲤(△-△)、鲢(□-□)、黄颡鱼(+--+),肝膜受体以及草鱼失活受体(○-○)的结合曲线

Fig. 2 The binding curves of gcGH to the liver membranes from grass carp(●-●), common carp(△-△), southern sheatfish (□-□) and yellow catfish (+--+).

受体浓度为1:50。A:用兔抗gcGH抗血清作第一抗体;

B:用gcGH单克隆抗体作第一抗体。▲-▲为用BSA包被的非特异性结合。

2.3 基因工程重组鲤GH(rcGH)与不同鱼类肝受体的结合

鉴定rcGH是否具有生物活性乃是使这种高技术产品走向产业化的重要一步。本文应用ELISA-RA方法测定了rcGH与几种鱼类肝GH受体的结合情况(见图3)。由图可见,rcGH与草鱼、鲤、鲢及黄颡肝膜受体均有特异结合,而与加热失活的草鱼肝受体则几乎无结合反应。rcGH与草鱼和鲤鱼肝受体的亲和力略大于鲢和黄颡受体。rcGH的检测灵敏度约为0.125µg/ml。

2.4 大鳞大马哈鱼GH(sGH)与不同鱼类肝受体的结合

大鳞大马哈鱼属鲑鳟鱼类,与鲤科、鲢科及鳊科鱼类亲缘关系相差较远,但sGH与草鱼、鲤、鲢及黄颡肝膜受体仍有特异结合反应(图4)。其中,与草鱼肝受体结合率最高,与鲢、鲤、颡三种鱼肝受体的结合率相差不大。不过,与gcGH及rcGH相比,sGH与上述几种鱼肝受体的亲和力相对要低些,sGH的检测灵敏度为0.25µg/ml。

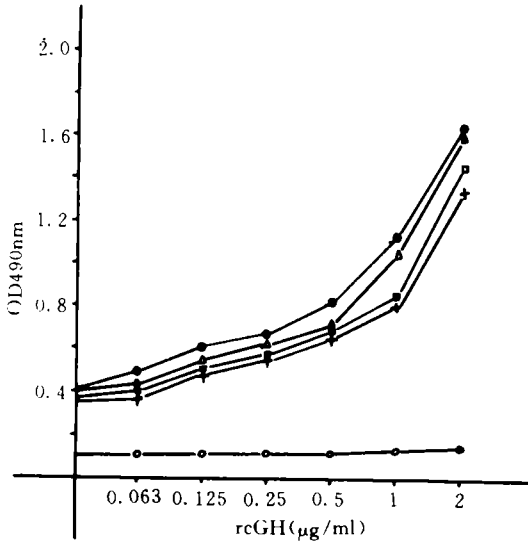


图3 重组鲤GH与草鱼(●-●)、鲤(△-△)、鲢(□-□)或黄颡鱼(+ - +)肝膜受体以及草鱼失活受体(○-○)的结合曲线

Fig. 3 The binding curves of recombinant carp GH to the liver membranes from grass carp (●-●), common carp (△-△), southern sheatfish (□-□) and yellow catfish (+ - +) 受体浓度为 1 : 50; 第一抗体为 gcGH 单克隆抗体。

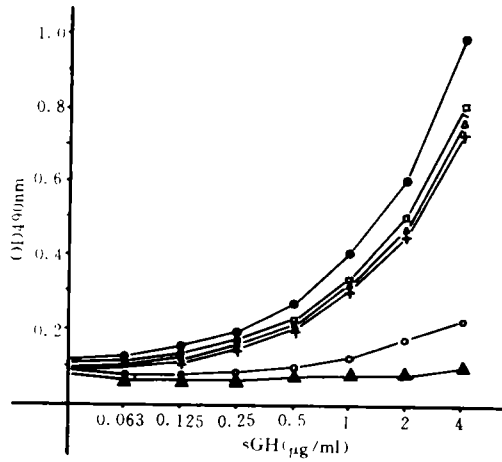


图4 大鳞大马哈鱼GH与草鱼(●-●)、鲤(△-△)、鲢(□-□)或黄颡鱼(+ - +)肝膜受体以及草鱼失活受体(○-○)的结合曲线

Fig. 4 The binding curves of chinook salmon GH to the liver membranes from grass carp (●-●), common carp (△-△), southern sheatfish (□-□) and yellow catfish (+ - +) 受体浓度为 1 : 50; 第一抗体为兔抗 sGH 血清; ▲-▲为未用受体包被的非特异性结合。

2.5 ELISA-RA 的应用实例

应用本文建立的鱼类GH ELISA-RA 技术分别测定了草鱼垂体激素抽提物,经gcGH单克隆抗体亲和层析柱纯化的gcGH组分以及草鱼血清的GH活性。结果表明,垂体抽提物及亲和层析获得的gcGH组分在该测定系统中均有明显的交叉反应,其序列稀释曲线与标准曲线相平行(图5),根据标准品的浓度与光密度值的关系,还可对上述样品中的GH含量进行粗略定量估计。但草鱼血清的序列稀释曲线则非常平坦,与标准曲线不平行(结果未显示出来),从而暗示该测定系统可能不宜用于测定血清中微量的GH水平。

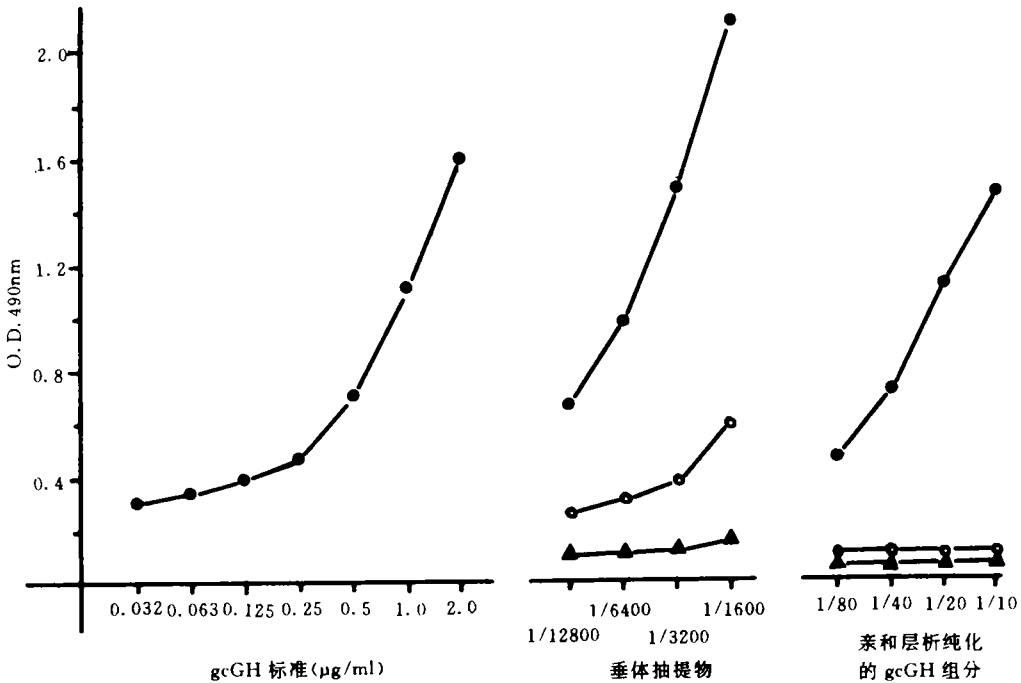


图5 草鱼垂体抽提物和免疫亲和纯化的 gcGH 组分与草鱼肝受体(1:50)的结合曲线

Fig. 5 The binding curves of grass carp pituitary extract and immunoaffinity purified gcGH with the liver membranes (1:50) of grass carp

第一抗体为 gcGH 单抗, ○—○用失活受体包被; ▲—▲未用受体包被的非特异性结合。

3 讨论

(1)长期以来,人们测定鱼类 GH 的生物活性主要依靠生物测定法,即刺激鱼体快速生长的方法。这种方法虽然较准确、有效,但实验周期长、耗费的人力、物力也很大,且鱼体生长受饲养条件、饵料状况的影响也较大。后来,人们在放射免疫测定(RIA)的基础上发展了放射受体测定法(RRA)[Fryer, 1979; LeBail 等, 1989]。但由于放射性同位素作为标记物,不仅污染环境,而且影响操作人员的身体健康,因而大大限制了其使用范围。本文根据激素—受体特异结合的原理,利用酶联免疫吸附测定法(ELISA)的优点,首次建立了一套测定鱼类 GH 生物活性的酶标受体检测法(ELISA-RA)。初步研究表明,该法快速、准确,灵敏度一般在 0.063~0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$,略低于 RRA 法,但却明显高于经典生物测定法(1~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。这种酶标受体法主要用于检测鱼类 GH 制备物的生物活性,在鱼类 GH 分离纯化中有重要应用价值。同时,该方法还可用于开展鱼类 GH 与其受体相互作用等研究。但由于受灵敏度限制,该系统不宜用来测定鱼类血液中微量的 GH 水平。关于鱼类血液中 GH 含量的微量分析技术,我们将另文报道。

(2)本文报道的 ELISA-RA 是建立在 GH 先与受体相结合,然后再与其特异的抗体结合的基础上。因此,该系统既测定了 GH 的生物活性(与受体结合的能力),又测定了 GH 的免疫学活性(与抗体结合的能力),只有这二种活性都具备的 GH 分子才能测定出来。因此,这种方法的特异性很强。在这一点上,放射受体测定法(RRA)则显得不足,RRA 是根据未标记激素

和同位素标记激素竞争结合同一受体的原理进行的[Fryer, 1979],因而只能测定出 GH 的生物活性,而测定不出 GH 的免疫学活性。

(3)由上可知,gcGH 不仅能与亲缘关系较近的鲤鱼肝 GH 受体相结合,而且还能与亲缘关系较远的鲢和黄颡鱼肝膜受体结合。同样,sGH 也能与草鱼、鲤、鲢和黄颡鱼受体结合,也就是说,sGH 对上述几种鱼都是有生物活性的。Yao 等[1991]也发现,真鲷 GH 能与虹鳟肝受体特异结合,这与本文报道的相类似。可见,在进化上较低等的鱼类肝膜 GH 受体对异源 GH 的识别能力较弱,不仅能与哺乳类来源的 GH 相结合[LeBail 等,1989;陈松林等,1992],而且能与其它鱼类的 GH 相结合,这也暗示着一种鱼类的 GH 对另一种鱼类的生长是有促进作用的,这为异源鱼类 GH 基因转移及应用异源鱼类重组 GH 产品促进鱼类生长的研究提供了重要的理论依据。当然,亲缘关系越远,其受体与异源鱼类 GH 的亲合力也越小,但至于鱼类 GH 和其受体之间的亲合力与鱼类进化之间的定量关系问题还有待进一步研究。

本研究系国家自然科学基金资助项目,编号为 39300102。南开大学生物系 94 级研究生杨春同志参加部分工作,中国农科院生物技术中心杨峰同志协助制备单抗腹水,上海生物工程中心孙玉昆教授惠赠重组鲤 GH,在此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] 陈松林等,1991。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,37: 263—270。
- [2] ——, 1992。大鳞大马哈鱼生长激素分离、纯化与鉴定。生物化学杂志,8(6): 656—660。
- [3] ——, 1995。草鱼生长激素单克隆抗体制备、鉴定及分离纯化的研究。中国科协第二届青年学术年会论文集(农业科学分册),533—537。中国科技出版社(京)。
- [4] Chen Songlin *et al.*, 1993. Purification of growth hormone from grass carp pituitary. In "Progress in comparative Endocrinology—Proceedings of the Second Intercongress Symposium of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology". Ching Mai, Thailand. pp. 66—67.
- [5] Fryer, J. N., 1979. A radioreceptor assay for purified teleost growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinology*, 39: 123—130.
- [6] Herington, A. C. and N. M. Veith, 1977. Solubilization of a growth hormone—specific receptor from rabbit liver. *Endocrinology*, 101: 984—987.
- [7] LeBail, P. Y. *et al.*, 1989. Purification of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) GH for receptor study. *Fish Physiol. Biochem.*, 7: 243—252.
- [8] Moore, W. V. and D. Jin, 1978. Polymeric and monomeric human growth hormone binding to rabbit liver plasma membranes. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 46: 374—380.
- [9] Tarpey, J. F. and C. S. Nicoll, 1985. Characterization of hepatic growth hormone binding sites in two fish species, *Gillichthys mirabilis* and *Acipenser transmontanus*. *Gen. Coimp. Endocrinol.*, 60: 39—50.
- [10] Yao, K. K. *et al.*, 1991. Presence of specific growth hormone binding sites in rainbow trout tissues: Characterization of the hepatic receptor. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 81: 72—82.

ELISA-RECEPTOR ASSAY FOR TESTING THE BIOACTIVITY OF FISH GROWTH HORMONE

Chen Songlin, Deng Wentao, He Lu and Chen Xihua

(Changjiang Fisheries Research Institute, Shashi 434000)

ABSTRACT According to the principle of hormone-receptor specific binding and combining the advantages of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and radioreceptor assay (RRA), we developed an ELISA-receptor assay (ELISA-RA) for testing the bioactivity of fish growth hormone. In this ELISA-RA system, the fish GH molecules can bind to both fish liver membrane receptors and its antibodies. This method can examine both bioactivity and immunoreactivity of fish GH. In the case of grass carp liver membrane as receptor, the sensitivity of this assay is 0.063—0.125 $\mu\text{g/ml}$ for grass carp GH and 0.25 $\mu\text{g/ml}$ for chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) GH, respectively. The present study also shows that grass carp GH, recombinant common carp GH and chinook salmon GH can specifically bind to liver membranes of common carp (*Cyprinus carpio*), southern sheatfish (*Silurus meridionalis*), yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) as well as grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*).

KEYWORD fish, growth hormone, ELISA-receptor assay

1996 年度《中国水产文摘》征订启事

本刊系我国水产系统唯一的一本全面报道国内水产科技文献的综合性检索期刊,由中国水产科学研究院信息研究所主办。其宗旨是全面、及时地报道全国各地以各种形式出版的水产科技文献,为读者快速、方便地检索国内水产科技文献服务。

本刊所收录的文献类型有期刊、专著、汇编、会议录、科技报告、技术标准等。按以下主要类目编排:(1)水产总论;(2)水产基础科学;(3)水产资源和环境保护;(4)水产捕捞;(5)海水养鱼;(6)淡水养殖;(7)水产生物病害及防治;(8)饲料和肥料;(9)水产品保鲜及加工;(10)渔业机械仪器和渔船;(11)渔业经济。年报道量约 3000 条。每年第一期刊登本刊引用主要期刊一栏表,年终编辑出版本年度主题索引、著者索引。

本刊为双月刊,逢双月底出版,国内外公开发行。每期定价 8.00 元,全年六期共 48.00 元。邮发代号 18—126,请广大老订户和新读者及时到当地邮局办理订阅手续。如在当地邮局订阅不便,也可向本刊编辑部办理邮购。

编辑部地址:北京市永定路南青塔村 150 号 邮政编码:100039