中国科学 C辑:生命科学 2008 年 第 38 卷 第 1 期: 28 ~ 35
www.scichina.com life.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

鲤鱼(*Cyprinus carpio*)血清生长激素变化的酶联免疫吸附测定

吴刚[①†], 陈丽华[②†], 钟山[①③], 李琦[②], 宋朝君[②], 金伯泉[②*], 朱作言[①*]

① 中国科学院水生生物研究所 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072;
② 第四军医大学免疫学教研室, 西安 710032;
③ 武汉大学生命科学学院, 武汉 430072
† 同等贡献
* 联系人, E-mail: immu_jin@fmmu.edu.cn; zyzhu@ihb.ac.cn

收稿日期: 2006-12-30; 接受日期: 2007-11-30
国家重点基础研究发展计划(批准号: 2007CB109206)、国家高技术研究发展计划(批准号 : 2006AA10Z141)和国家自然科学基金(批准号: 30430540)资助项目

摘要 本研究的目标是纯化鲤鱼(*Cyprinus carpio*)生长激素, 用于制备抗鲤鱼生长激素的单克隆抗体, 建立鲤鱼生长激素的酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA)技术, 并用所建立的技术检测不同环境下养殖的鲤鱼的血清生长激素水平的变化. 利用柱纯化技术纯化酵母表达草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)生长激素, 免疫新西兰白兔(*Oryctolagus cuniculus*), 获得抗草鱼生长激素多克隆抗体. 摘取鲤鱼垂体, 从中提取生长激素, 经层析纯化后, 以变性聚丙烯凝胶电泳判断其分子量和纯度, 并利用抗草鱼生长激素多克隆抗体以 Western blot 验证. 纯化并经鉴定的鲤鱼生长激素作为免疫原被用于 B 淋巴细胞杂交瘤技术. 共建立 14 株能够稳定分泌抗鲤鱼生长激素单克隆抗体的杂交瘤细胞系(FMU-cGH1~FMU-cGH14), 其中 8 个克隆(FMU-cGH1~FMU-cGH6, FMU-cGH12 和 FMU-cGH13)成功用于 Western blot 分析, 9 个克隆(FMU-cGH1~FMU-cGH7, FMU-cGH9 和 FMU-cGH10)可用于荧光标记和免疫组织化学分析. 利用竞争性 ELISA 进行表位分析, 结果表明这些单克隆抗体能够识别 5 个不同的表位. 利用其中的 FMU-cGH12 作为包被抗体, FMU-cGH6 作酶标抗体, 建立了能够检测鲤鱼生长激素含量的 ELISA 技术. 这一检测系统被证明具有高度的稳定性和灵敏度, 能够检测并定量低至 70 pg/mL 的生长激素. 利用这一检测技术, 发现限制进食和网箱养殖的鲤鱼其生长激素含量都有明显提高, 分别为对照的 6.9 和 5.8 倍, 显示不同生长环境下鲤鱼生长激素水平具有不同的反应.

关键词
鲤鱼(*Cyprinus carpio*)
生长激素
单克隆抗体
ELISA
饥饿
网箱

生长激素通过调节mRNA水平和蛋白合成, 在促进和控制生长、代谢及某些类型细胞的分化方面起着重要作用[1]. 在鱼类中, 生长激素参与了几乎所有的重要生理过程, 包括: (ⅰ)离子和渗透压平衡的调

节; (ⅱ)脂类、蛋白质、碳水化合物代谢; (ⅲ)骨骼和软组织生长; (ⅳ)生殖; (ⅴ)免疫[2]. 其中某些作用需要通过肝脏和其他组织产生的胰岛素样生长因子来实现, 而生长激素的另外一些作用则直接通过作用在靶细胞上实现[3,4]. 生长激素受体广泛存在于多种组织中, 如肝脏、肌肉、脂肪组织、骨骼、软骨、脑组织, 其中肝脏内通常具有最高的表达水平[5~7].

利用放射性免疫分析(radioimmunoassay, RIA)和酶联免疫吸附测定等检测技术, 能够检测血清中生长激素的含量[8~11]. 尽管RIA技术具有高灵敏度和特异性的特点, 但由于其必须使用放射性同位素, 一方面存在着对于安全性的担忧, 另一方面也存在着放射性衰减的问题, 影响了使用. 利用ELISA技术高灵敏度、高特异性地检测血清生长激素水平, 需要能够识别抗原不同表位的抗体组合. 但迄今为止, 多数用于生长激素检测的ELISA系统都是基于一个单克隆抗体或多克隆抗体, 影响了其特异性和灵敏度, 尚没有利用两个单克隆抗体的ELISA系统的报导[12,13].

本研究建立了 14 株能稳定分泌抗鲤鱼(*Cyprinus carpio*)生长激素单克隆抗体的杂交瘤细胞系, 其中两株被用于建立鲤鱼生长激素特异性的 ELISA 检测系统, 以检测鲤鱼内源生长激素水平. 利用此系统, 我们发现鲤鱼内源生长激素水平随生长条件不同而显著变化.

1 材料和方法

1.1 重组草鱼(*Ctenopharyngoclon idella*)生长激素的纯化

以Wang等人[14]描述的方法制备 3 L含有重组草鱼生长激素的酵母菌(*Saccharomycetes*)发酵液. 4000×*g*离心 10 min, 去除沉淀, 上清用截留分子量 50 kD(Millipore)的超滤膜过滤, 滤过液以截留分子量 3 kD(Millipore)的超滤膜浓缩至 200 mL. 浓缩发酵液以Tris调节pH至 7.0 后, 上样至以 20 mmol/L pH 7.0 磷酸缓冲液预平衡的DEAE Sepharose Fast Flow柱(Amersham Biosciences), 并以相同缓冲液洗去未结合蛋白. 结合蛋白以含有 0.1 mol/L NaCl的 20 mmol/L pH 7.0 磷酸缓冲液进行线性梯度洗脱, 分步收集洗脱液, 以 12%的SDS-PAGE分析各洗脱组分. 取含有目标蛋白的组分, 上以 10 mmol/L NH_4HCO_3 预平衡的Sephadex G-25 柱(Amersham Biosciences), 并用同样的缓冲液洗脱蛋白脱去盐分, 然后冷冻干燥.

1.2 兔抗草鱼生长激素多克隆抗体的制备

纯化后的酵母表达重组生长激素加福氏完全佐剂(Freund's complete adjuvant, FCA), 分 20 个点皮下注射至 2 只新西兰白兔大腿. 15 天后, 加福氏不完全佐剂(Freund's incomplete adjuvant, FIA)进行加强免疫, 以后每 15 天加强一次. 初次免疫 45 天后, 取血、分离血清, 以纯化的重组草鱼生长激素作检测抗原, 并以未免疫的白兔血清为对照, 利用 ELISA 技术检测血清中抗体效价, 以后每 15 天取血检测一次直到获得高滴度抗血清, 保存于−20℃备用.

1.3 鲤鱼生长激素的制备和纯化

取大约 5 g 冰冻保存的鲤鱼垂体, 以 50 mL 含有 50 mmol/L Tris·HCl pH 9.0, 500 mmol/L NaCl, 1 mmol/L PMSF, 1% streptomycin sulphate 的抽提缓冲液匀浆后, 加入 50 mL 1 mol/L $CaCl_2$溶液和 2 mL Dextran sulphate 溶液, 混和均匀. 粗抽提物在 4℃下 1000×*g* 离心 15 min, 取上清, 继续在 4℃下 10000×*g* 离心 10 min 以去除沉淀. 抽提物上清上样至 20 mmol/L Tris·HCl pH 7.5, 250 mmol/L NaCl, 1 mmol/L $MgCl_2$, 1 mmol/L $CaCl_2$, 1 mmol/L $MnCl_2$预平衡的 Sephadex G-25 柱, 并以同样的缓冲液洗脱. 交换缓冲液后的蛋白溶液, 直接上样至 ConA Sepharose 柱, 含有生长激素的组分以含 20 mmol/L Tris·HCl pH 7.5, 500 mmol/L NaCl, 1 mmol/L $MgCl_2$, 1 mmol/L $CaCl_2$, 1 mmol/L $MnCl_2$ 的缓冲液洗脱. 洗脱部分以截留分子量 5 kD 的超滤膜浓缩, 并利用以 20 mmol/L Tris·HCl pH 8.0 预平衡的 Sephadex G-25 柱更换缓冲液. 脱盐后的样品上样至 20 mmol/L Tris·HCl pH 8.0 预平衡的 DEAE Sepharose Fast Flow 柱, 并以同样的缓冲液洗去未结合蛋白. 吸附蛋白以含 0.1 mol/L NaCl的 20 mmol/L Tris·HCl pH 8.0 进行线性梯度洗脱, 分步收集洗脱组分. 洗脱液以 12%SDS-PAGE 分析, 收集并混合含有目标蛋白的组分, 加入等体积 3 mol/L $(NH4)_2SO_4$ 溶液, 上样至以 1.5 mol/L $(NH4)_2SO_4$ 预平衡的 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow 柱(Amersham Biosciences). 以含有 1.5 mol/L $(NH_4)_2SO_4$

的 20 mmol/L Tris·HCl pH 8.0 缓冲液, 以线性梯度洗脱柱子上结合的蛋白组分, 分步收集后, 以 12% SDS-PAGE 分析. 利用截留分子量 3 kD 的离心式超滤器, 浓缩含有鲤鱼生长激素的组分至大约 1 mL, 上 10 mmol/L NH_4HCO_3 预平衡 Sephacry S-100 High Resolution 柱(Amersham Biosciences), 并以同样的缓冲液洗脱目标蛋白, 收集目标组分. 纯化后的鲤鱼生长激素以 12% SDS-PAGE 分析, 并利用制备的兔抗重组草鱼生长激素多克隆抗体做 Western blot 鉴定.

1.4 杂交瘤的制备

取 20 μg 鲤鱼生长激素加 FCA, 皮下注射免疫 8 周龄的 BALB/c 小鼠(*Mus musculus*), 并继续以 3 周的间隔以 20 μg 鲤鱼生长激素加 FIA 皮下注射免疫 2 次, 以不加佐剂的 20 μg 鲤鱼生长激素腹腔注射免疫一次. 实验小鼠第 3 次免疫 10 天后, 尾静脉取血, 以间接 ELISA 技术检测小鼠抗血清滴度, 并继续腹腔注射 20 μg 免疫原. 免疫小鼠的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞培养在含有 20%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基内, 添加 PEG(MW4000, Merk)融合细胞. 以 ELISA 筛选阳性杂交瘤细胞, 并继续以有限稀释法稀释 4 次. 单克隆抗体可以从杂交瘤细胞培养液上清中获得, 也可以从腹腔注射杂交瘤细胞的 BALB/c 小鼠的腹水内获得. 以 Isotype kit(Sigma, M-5907)检测获得的单克隆抗体的类和亚类, 并利用竞争 ELISA 鉴别抗体所识别的特异性表位.

1.5 间接 ELISA

为了筛选针对鲤鱼生长激素的单克隆抗体, 我们用以包被缓冲液(0.05 mol/L, 碳酸盐-重碳酸盐缓冲液, pH 9.5)稀释至 5 μg/mL 的鲤鱼生长激素 4℃包被 96 孔板(NUNC)过夜. 以含 0.05% Tween-20 的 0.01 mol/L PBS 洗板 3 次, 并以 0.1% BSA 封闭后, 加入不同稀释度的免疫兔或小鼠的血清或杂交瘤细胞培养液上清, 37℃ 孵育 1 h. 以缓冲液洗板 3 次后, 加入 100 μL 以 PBS 稀释 5000 倍的辣根过氧化物酶标记羊抗兔或羊抗小鼠抗体(Vector), 37℃ 孵育 1 h. 洗板 3 次, 加入 100 μL 2,2′-azobis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic(ABTS, Vector)显色, 读取 410 nm 波长吸光度.

1.6 Western blot

取纯化鲤鱼生长激素, 以 SDS-PAGE 分离, 并转移至 PVDF 膜(BioRad). 以含 5%脱脂奶的 TBS(20 mmol/L Tris·HCl, 0.5 mmol/L NaCl, pH 7.5)于 4℃封闭过夜. 加入抗鲤鱼生长激素抗体, 室温结合 2 h 后, 洗膜, 继续以 1∶1000 稀释的辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠 Ig 结合 2 h. 利用增强型化学发光试剂盒(ECL, Roche)检测目标条带.

1.7 免疫组织化学

20 μm 鲤鱼垂体切片用于鲤鱼生长激素的免疫组织化学分析. 抗体稀释至不同浓度, 以测试最优染色条件. 切片不进行蛋白酶处理, 直接染色. 首先, 切片以 0.01 mol/L PBS 洗涤 20 min, 利用甲醇-过氧化氢去除样品内源过氧化物酶, 以 0.1 mol/L PBS 冲洗切片, 加入 30 mL/L 的羊血清孵育 40 min. 然后, 加入 1∶200 稀释的小鼠抗鲤鱼生长激素抗体, 4℃条件下孵育 24 h 后, 继续加入 1∶200 稀释生物素标记羊抗小鼠 IgG 二抗, 室温孵育 3 h. 切片继续以 1∶100 稀释的(辣根过氧化物酶标记生物素结合蛋白)ABC 复合物(ABC Vector)室温孵育 1 h 后, 洗涤 3 次, 每次 10 min. 最后, 切片以二氨基联苯氨(DAB)显色. 阴性对照组织切片以抗葡萄球菌肠毒素 D (Staphylococcus enterotoxin D, SED)作为一抗.

1.8 单克隆抗体的纯化、辣根过氧化物酶标记以及夹心 ELISA

从小鼠腹水中纯化筛选出的单克隆抗体. 利用 HiTrap G蛋白柱(Amersham Biosciences)纯化IgG组分. 根据Tijssen等人 [15]的方法以辣根过氧化物酶标记纯化后的单克隆抗体. 为了检测鲤鱼生长激素水平, 我们利用本研究中获得的FMU-cGH12 抗体作为包被抗体, 以FMU-cGH6 作为酶标抗体, 建立了夹心ELISA 检测方法. 首先, 向ELISA板(Maxisorp, NUNC)样品孔中加入 100 μL用 0.05 mol/L pH 9.5 的碳酸盐缓冲液稀释至 5 μg/mL 的抗鲤鱼生长激素单克隆抗体, 4℃ 孵育过夜. 用含有 0.1%(*V*/*V*) Tween- 20 的 0.01 mol/L PBS洗板 3 次后, 以 0.1% BSA溶液封闭. 用含有0.1% BSA和0.1%(*V*/*V*)Tween-20的PBS稀释至不同浓度的标准品鲤鱼生长激素或鲤鱼血清样品, 加入

ELISA板样品孔, 37℃孵育 1 h. 以 0.1% (*V*/*V*) Tween-20 的PBS冲洗样品孔, 加入以含 3% PEG的PBS稀释的辣根过氧化物酶标记FMU-cGH6, 37℃孵育 1 h. 样品孔再次冲洗 3 次, 加入 100 μL ABTS底物显色, 410 nm波长读板. 每组测批内和批间变异系数.

1.9 实验鱼和实验设计

一年龄鱼池饲养鲤鱼 45 条, 随机分成 3 组. 组 1, 对照组, 15 条, 移至一个 10 m ×10 m × 0.8 m 的鱼池; 组 2, 网箱组, 15 条, 养殖在与组 1 相同鱼池内隔离出的一个 3 m × 1.5 m × 0.8 m 网箱中; 组 1 和组 2 以正常水平投喂饲料; 组 3, 限制进食组, 15 条, 置于一个与组 1 类似的鱼池中, 但并不人为投喂. 3 个月后, 每组实验鱼尾动脉取血, 4℃下 3000×*g* 离心 5 min, 收集血清, 以本研究建立的夹心 ELISA 系统测定生长激素含量.

1.10 统计分析

实验获得的鲤鱼血清生长激素水平以 Student-Newman-Keuls-q test 进行分析. 不同实验组间平均激素水平以 $\bar{x} \pm$ SD 的形式表达; $P < 0.05$ 即具有显著性差异.

2 结果

2.1 纯化鲤鱼生长激素的验证

从鲤鱼垂体中, 共纯化获得 18 mg 目标蛋白. 利用抗重组草鱼生长激素多克隆抗体进行 Western blot 分析, 结果显示本研究获得的 23 kD 目标蛋白为鲤鱼生长激素(图 1). 鲤鱼生长激素纯度约为 87%.

2.2 抗鲤鱼生长激素单克隆抗体的制备

本研究共获得 14 株能够稳定分泌抗鲤鱼生长激素的杂交瘤细胞系, 分别命名为 FMU-cGH1~FMU-cGH14. 除 FMU-cGH4 和 FMU-cGH14 分泌的单克隆抗体 Ig 亚类为 IgG2b(κ)外, 其他杂交瘤细胞株分泌的单克隆抗体 Ig 亚类都是 IgG1(κ). 通过间接 ELISA 分析表明, 含有单克隆抗体的小鼠腹水的滴度范围达到 10^{-7}~10^{-5}. 杂交瘤细胞株 FMU-cGH1~FMU-cGH6, FMU-cGH12, FMU-cGH13 分泌的单克隆抗体, 被成功地用于 Western blot 分析, 同时, FMU-cGH1~FMU-cGH7, FMU-cGH9 和 FMU-cGH10 分泌的单克隆抗体被用于荧光染色和免疫组织化学分析研究. 利用特异性单克隆抗体进行 Western blot 分析, 更进一步验证了鲤鱼生长激素分子量为 23 kD(图 2). 免疫组织化学染色结果表明, 鲤鱼生长激素定位于细胞质中, 而膜和核区都没有染色信号的存在(图 3).

2.3 建立基于 ELISA 的鲤鱼生长激素定量方法

利用竞争 ELISA 技术进行单克隆抗体表位分析, 结果表明, 本研究中获得的单克隆抗体共能识别 5 个不同的表位. 识别第一个表位的包括 FMU-cGH1, FMU-cGH3, FMU-cGH8, FMU-cGH12 和 FMU-cGH13, 第 2 个表位的包括 FMU-cGH6 和 FMU-cGH7, 第 3 个包括 FMU-cGH9 和 FMU-cGH11, FMU-cGH4 和 FMU-cGH10 各识别一个单独的表位(图 4). 利用

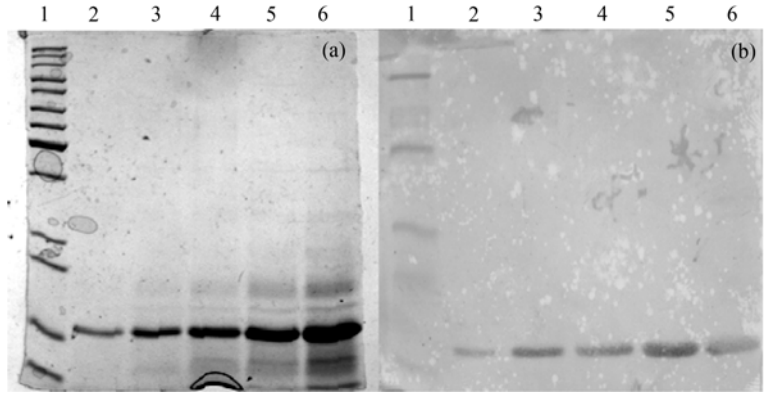

图 1　鲤鱼生长激素的鉴定

(a) 纯化鲤鱼生长激素的 SDS-PAGE 分析; (b) 利用抗重组草鱼生长激素鉴定鲤鱼生长激素. 泳道 1: 分子量 Marker; 泳道 2~6: 蛋白浓度梯度

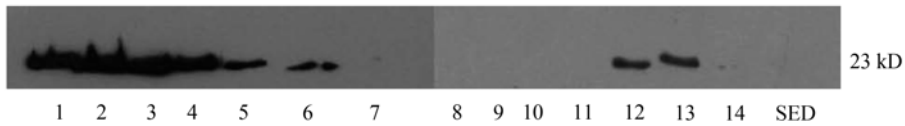

图 2　抗鲤鱼生长激素单克隆抗体的鉴定

泳道 1~14: 分别利用 FMU-cGH1~14 分泌的单克隆抗体

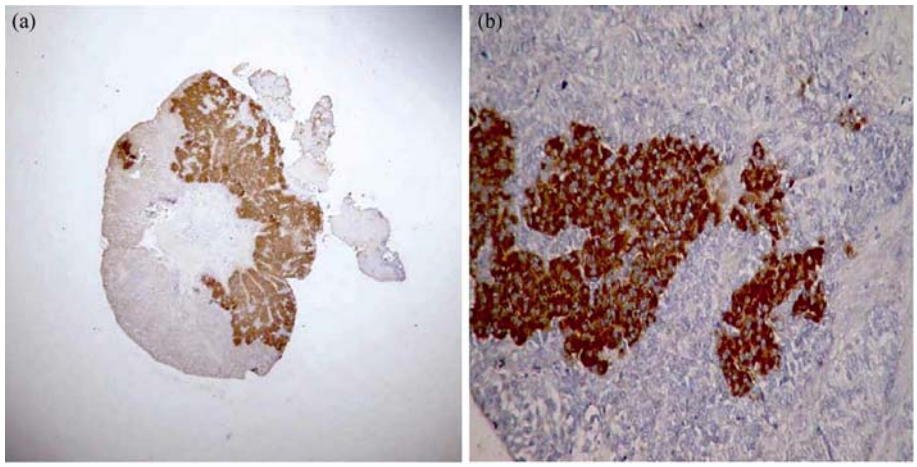

图 3　生长激素在鲤鱼垂体内的分布

阳性信号主要分布在细胞质内. (a) 整体垂体切片, 40 ×; (b) 垂体切片, 400 ×

	cGH1	cGH2	cGH3	cGH4	cGH5	cGH6	cGH7	cGH8	cGH9	cGH10	cGH11	cGH12	cGH13	cGH14
FMU-cGH1	■		■					■				■	■	
FMU-cGH2		■												
FMU-cGH3	■		■					■				■	■	
FMU-cGH4				■										
FMU-cGH5					■									
FMU-cGH6						■	■							
FMU-cGH7						■	■							
FMU-cGH8	■		■					■				■	■	
FMU-cGH9									■		■			
FMU-cGH10										■				
FMU-cGH11									■		■			
FMU-cGH12	■		■					■				■	■	
FMU-cGH13	■		■					■				■	■	
FMU-cGH14														■

图 4　利用竞争 ELISA 分析进行单克隆抗体表位分析

黑色代表两个单克隆抗体识别相同的表位

FMU-cGH12 作包被(抗原)抗体, FMU-cGH6 作酶标抗体, 建立了可用于鲤鱼生长激素定量检测的夹心 ELISA 系统. 如图 5 所示, 本研究建立的 ELISA 系统具有非常高的灵敏度, 其检测下限达到 70 pg/mL 的水平. 批内和批间变异系数分别为 7%和 5%. 本系统同样适用于检测草鱼体内的生长激素水平, 但不能检测垂体内的其他蛋白, 如促泌乳激素、促甲状腺释放激素、促卵泡激素、促黄体激素等(n=3, 分别检测).

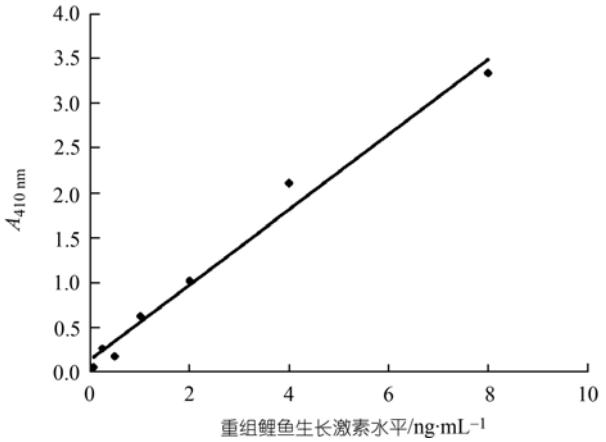

图 5　夹心 ELISA 检测鲤鱼生长激素标准曲线

其检测下限达 70 pg/mL(R^2=0.9827)

2.4　限制进食或网箱养殖会导致鲤鱼血清生长激素水平的提高

组 1(对照组)鲤鱼平均血清生长激素水平为 0.73 ± 0.74 ng/mL, 组 2(网箱组)为 4.21 ± 4.41 ng/mL, 组 3(限制进食组)为 5.04 ± 5.04 ng/mL. 与对照组相比, 网箱养殖组或限制进食组的鲤鱼, 其生长激素水平都有明显提高, 分别达到对照组的 5.8 倍(P<0.05)和 6.9 倍(P<0.05). 如图 6 所示, 对照组 15 条鲤鱼中, 只有 4 条的生长激素水平超过 1.5 ng/mL, 最高值为 2.2 ng/mL. 相比之下, 网箱养殖组和限制进食组分别有 11 条和 9 条鲤鱼激素水平达到或超过 1.5 ng/mL, 其中网箱养殖组最高生长激素水平达到 16.0 ng/mL, 限制进食组则达到 14.0 ng/mL 水平.

3　讨论

在硬骨鱼中, 垂体分泌的生长激素对鱼体的生长过程起着重要的作用. 在本研究中, 我们研制了一系列抗鲤鱼生长激素单克隆抗体, 并验证其中 8 株可以用于 Western blot 分析, 其中 9 株可以用于荧光染色和免疫组织化学分析. 此外, 本研究也证明了这些单克隆抗体能够识别鲤鱼生长激素分子上 5 个不同的表位. 基于以上研究结果, 本研究成功建立了一个灵敏度达到 70 pg/mL 的鲤鱼生长激素夹心 ELISA 检测系统.

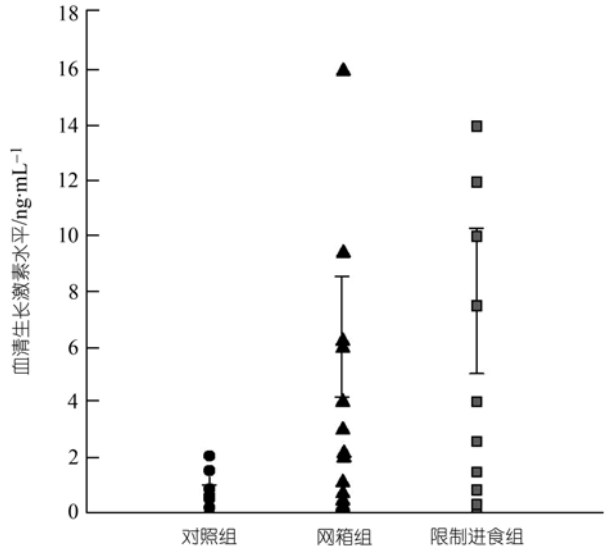

图 6　不同组养殖鲤鱼血清生长激素水平($\bar{x}$ ±SD)

每组 15 条中, 对照组仅有 4 条生长激素水平达到或超过 1.5 ng/mL, 而网箱组和限制进食组则分别有 11 条和 9 条鲤鱼血清激素水平达到或超过 1.5 ng/mL 水平

随着生长激素的分离和纯化, 以及兔抗生长激素抗血清的制备, 早在 1983 年就建立起了可以用于检测鲤鱼和金鱼(*Carassius auratus*)垂体和血清生长激素水平的放射性免疫分析系统 [16], 其检测下限为 5 ng/mL. 此后不久, 先后建立了其他硬骨鱼, 如鲑鱼(*Oncorhynchus keta*)、切努克鲑鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)、欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)、非洲鲶鱼(*Arius africanus* Günther)等的生长激素放射性分析系统 [8~11]. 但是, 这些检测系统显然存在着一些局限性, 比如对放射性同位素安全性的担忧和同位素的稳定性问题.

ELISA 系统最大的优势之一就是避免了放射性污染问题. 1991 年, 报道了第一个可以用于大马哈鱼

(*Salmon Salar*)生长激素检测的夹心ELISA系统[12]. 但是该系统只能用于虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、银鲑(*Oncorhynchus kisutch*)、切努克鲑鱼等鲑鳟鱼类垂体和血清生长激素的检测, 而不能用于鲤鱼、鲫鱼等其他重要硬骨鱼类. 而且, 其灵敏度仅为 1.56 ng/mL 水平. 2003 年, 一个新的能够检测鲶鱼生长激素水平的竞争性ELISA系统被报道[17]. 在这个系统中, ELISA板以 25 μg鲶鱼(*Ictalurus punctatus*)生长激素包被, 标准品激素或样品与兔抗鲶鱼生长激素混和后, 加入样品孔, 最后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体并显色测定其吸光度值.

利用两个识别同一分子上不同表位的单克隆抗体组合建立的 ELISA 系统具有良好的特异性和稳定性. 据我们所知, 本研究建立的鲤鱼生长激素检测系统是第一种基于两个识别同一生长激素分子不同表位的单克隆抗体的 ELISA 系统. 除了具有特异性和稳定性优势之外, 本研究建立的 ELISA 系统具有高度的灵敏度, 其检测下限达到70 pg/mL水平. 足够高的灵敏度使研究鲤鱼在不同生长环境下的生长激素水平的变化成为可能.

已有研究者指出, 与陆地脊椎动物相似, 硬骨鱼类对环境胁迫存着很多不同方式的反应[18~20]. 生长激素是硬骨鱼类应对外界胁迫的指示剂之一. 在本研究中, 我们发现限制进食组鲤鱼具有高于对照组 6.9 倍的血清生长激素水平, 而网箱养殖也使生长激素水平提高 5.8 倍. 这些数据与其他鱼类在相似环境下的研究结果类似, 比如鲑鱼、虹鳟、硬头鳟、欧洲鳗鲡、黑鲷(*Acanthopagrus schlegeli*)等[9,21~23].

综上所述, 本研究利用识别鲤鱼生长激素不同表位的高亲和性单克隆抗体建立了灵敏、稳定和易于操作的鲤鱼生长激素 ELISA 检测系统. 该系统使我们能够检测不同生长环境下鲤鱼血清生长激素水平的变化. 与对照组相比, 限制进食和网箱养殖条件下鲤鱼血清生长激素水平显著提高. 本文中研制的抗鲤鱼生长激素单克隆抗体未来也可用于对鲤鱼生长激素的其他研究, 如生长激素与其他激素的关系, 以及转生长激素基因鲤鱼血清生长激素的动态过程与生长的关系等.

参考文献

1 Carter-Su C, Schwartz J, Smit L S. Molecular mechanism of growth hormone action. Annu Rev Physiol, 1996, 58: 187—207 [DOI]

2 Reinecke M, Bjornsson B T, Dickhoff W W, et al. Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: where we are and where to go. Gen Comp Endocrinol, 2005, 142: 20—24 [DOI]

3 Wabitsch M, Hauner H, Heinze E, et al. The role of growth hormone/insulin-like growth factor in adipocyte differentiation. Metabolism, 1995, 44: 45—49 [DOI]

4 Waters M J, Rowlinson S W, Clarkson R W, et al. Signal transduction by the growth hormone receptor. Proc Soc Exp Biol Med, 1994, 206: 216—220

5 Mertani H C, Waters M J, Jambou R, et al. Growth hormone receptor binding protein in rat anterior pituitary. Neuroendocrinol, 1994, 59: 483—494

6 Perez Sanchez J, Smal J, Le Bail P Y. Location and characterization of growth hormone binding sites in the central nervous system of a teleost fish (*Oncorhynchus mykiss*). Growth Regul, 1992, 1: 145—152

7 Sun X, Zhu S, Chan S S, et al. Identification and characterization of growth hormone receptors in snakehead fish (*Ophiocephalus argusCantor*) liver. Gen Comp Endocrinol, 1997, 108: 374—385 [DOI]

8 Lescroart O, Roelants I, Mikolajczyk T, et al. A radioimmunoassay for African catfish growth hormone: validation and effects of substances modulating the release of growth hormone. Gen Comp Endocrinol, 1996, 104: 147—155 [DOI]

9 Marchelidon J, Schmitz M, Houdebine L M, et al. Development of a radioimmunoassay for European eel growth hormone and application to the study of silvering and experimental fasting. Gen Comp Endocrinol, 1996, 102: 360—369 [DOI]

10 Le Bail P Y, Sumpter J P, Carragher J F, et al. Development and validation of a highly sensitive radioimmunoassay for chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) growth hormone. Gen Comp Endocrinol, 1991, 83: 75—85 [DOI]

11 Bolton J P, Takahashi A, Kawauchi H, et al. Development and validation of a salmon growth hormone radioimmunoassay. Gen Comp

Endocrinol, 1986, 62: 230—238 [DOI]

12 Farbridge K J, Leatherland J F. The development of a noncompetitive enzyme-linked immunosorbent assay for oncorhynchid growth hormone using monoclonal antibodies. Gen Comp Endocrinol, 1991, 83: 7—17 [DOI]

13 Chen S, Yang F, He L, et al. Generation and characterization of monoclonal antibodies against grass carp. Asian Fish Sci, 1996, 9: 183—189

14 Wang W, Sun Y H, Wang Y P, et al. Expression of Grass carp growth hormone in the yeast *Pichia pastoris*. A G Sinica, 2003, 30: 301—306

15 Tijssen P, Kurstak E. Highly efficient and simple methods for the preparation of peroxidase and active peroxidase-antibody conjugates for enzyme immunoassays. Anal Biochem, 1984, 136: 451—457 [DOI]

16 Cook A F, Wilson S W, Peter R E. Development and validation of a carp growth hormone radioimmunoassay. Gen Comp Endocrinol, 1983, 50: 335—347 [DOI]

17 Drennon K, Moriyama S, Kawauchi H, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the measurement of plasma growth hormone (GH) levels in channel catfish (*Ictalurus punctatus*): assessment of environmental salinity and GH secretogogues on plasma GH levels. Gen Comp Endocrinol, 2003, 133: 314—322 [DOI]

18 Wendelaar Bonga S E. The stress response in fish. Physiol Rev, 1997, 77: 591—625

19 Rotllant J, Balm P H, Perez-Sanchez J, et al. Pituitary and interrenal function in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Teleostei) after handling and confinement stress. Gen Comp Endocrinol, 2001, 121: 333—342 [DOI]

20 Auperin B, Baroiller J F, Ricordel M J, et al. Effect of confinement stress on circulating levels of growth hormone and two prolactins in freshwater-adapted tilapia (*Oreochromis niloticus*). Gen Comp Endocrinol, 1997, 108: 35—44 [DOI]

21 Wagner G F, McKeown B A. Development of salmon growth hormone radioimmunoassay. Gen Comp Endocrinol, 1986, 62: 452—458 [DOI]

22 Sumpter J P, Le Bail P Y, Pickering A D, et al. The effect of starvation on growth and plasma growth hormone concentration of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Gen Comp Endocrinol, 1991, 83: 94—102 [DOI]

23 Deng L, Zhang W M, Lin H R, et al. Effects of food deprivation on expression of growth hormone receptor and proximate composition in liver of black seabream *Acanthopagrus schlegeli*. Comp Biochem Physiol B, 2004, 137: 421—432 [DOI]