

# 中华绒螯蟹卵黄磷蛋白单克隆抗体制备及免疫组化应用

陆锦天, 李 住, 刘智俊\*

上海市水产研究所(上海市水产技术推广站), 上海  
Email: \*13764381007@163.com

收稿日期: 2021年7月20日; 录用日期: 2021年8月4日; 发布日期: 2021年8月20日

## 摘 要

本研究通过对中华绒螯蟹成熟卵巢中的卵黄磷蛋白进行分离, 并使用全自动蛋白纯化仪和胶回收的方对其进行纯化, 以此为抗原免疫小鼠, 使之产生针对性抗体后进行融合筛选, 获得稳定额单克隆细胞株, 将细胞株培养后打入小鼠腹腔, 制备腹水。随后从腹水中纯化收集抗体, 并进行Elisa效价监测, 结果表明, 获得三株单克隆抗体2N17、3G2、2J11效价均高于64 K, 抗体浓度为2N17: 0.8 mg/ml, 3G2: 0.8 mg/ml, 2J11: 0.7 mg/ml。随后通过免疫组化技术对中华绒螯蟹卵黄磷蛋白在其胚胎和幼体中进行定位, 结果表明, 胚胎发育在囊胚期和原肠期时, 卵黄磷蛋白强阳性位点均分布于卵黄物质中, 聚集与卵黄岛周边, 当胚胎发育至心跳期时, 卵黄囊中已无卵黄磷蛋白阳性物质变弱, 仅仅分布于卵黄囊外周, 围绕肝胰腺前体细胞有弱阳性位点, 随后胚胎孵化, 卵黄磷蛋白阳性位点消失, 大眼幼体的肝胰腺区域无发现, 暗示中华绒螯蟹在胚胎发育中期是卵黄磷蛋白动用高峰, 而末期卵黄磷蛋白已消耗殆尽, 初孵幼体已不带有卵黄磷蛋白。

## 关键词

中华绒螯蟹, 卵黄磷蛋白, 单克隆抗体, 免疫组化

## Production of Monoclonal Antibody against Vitellin of *Eriocheir sinensis* and Its Application in Immunohistochemistry

Jintian Lu, Zhu Li, Zhijun Liu\*

Shanghai Fisheries Research Institute (Shanghai Fisheries Technical Extension Station), Shanghai  
Email: \*13764381007@163.com

Received: Jul. 20<sup>th</sup>, 2021; accepted: Aug. 4<sup>th</sup>, 2021; published: Aug. 20<sup>th</sup>, 2021

\*通讯作者。

文章引用: 陆锦天, 李住, 刘智俊. 中华绒螯蟹卵黄磷蛋白单克隆抗体制备及免疫组化应用[J]. 水产研究, 2021, 8(3): 103-109. DOI: 10.12677/ojfr.2021.83012

## Abstract

The vitellogenin protein in the mature ovary of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) was separated, and purified by automatic protein purification instrument and native polyacrylamide gel electrophoresis (Native-PAGE). Mice were immunized with vitellogenin as antigen to produce targeted antibodies. After fusion and selection, a stable monoclonal cell line was obtained. The cell line was cultured and injected into the abdominal of mice to prepare ascites. The antibodies were purified and collected from ascites and titer monitored by Elisa. The titers of the three obtained monoclonal antibodies 2N17, 3G2 and 2J11 were all higher than 64 K, and antibody concentrations were 0.8 mg/ml, 0.8 mg/ml, 0.7 mg/ml, respectively. Then, immunohistochemical technology was performed to locate the vitellin in the embryonic and larvae of *Eriocheir sinensis*. The results showed that the strong positive sites of the vitellin were distributed in the vitellus material and gathered around the vitellus island during the blastula stage and the gastrula stage. When the embryo developed to the heart beating stage, there was no vitellin in the yolk sac and positive material became weaker. It was only distributed on the periphery of the yolk sac. Weak positive sites were around the hepatopancreas precursor cells, and then the positive sites disappeared after embryo hatching. No positive sites were found in the hepatopancreas of Megalopa, suggesting that the peak of vitellin mobilization was in the middle of embryo development. Vitellin was exhausted in the late stage of embryo development and no exist in the newly hatched larvae.

## Keywords

*Eriocheir sinensis*, Vitellin, Monoclonal Antibody, Immunohistochemical

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

卵黄蛋白原是一种普遍存在于卵生非哺乳动物血液中的雌性特异性蛋白，是几乎所有卵生动物中卵黄磷蛋白的前体[1]。在中华绒螯蟹中卵黄蛋白原主要是作为载体蛋白进入卵母细胞，合成卵黄磷蛋白为卵巢发育提供必需营养物质，同时也是卵的主要成分，为后续胚胎发育提供必要的能量[2]。由于中华绒螯蟹的卵黄发生的调控过程受内分泌系统、营养条件和环境因子多重调节[3]，而卵巢中卵黄积累的多少直接影响到其后生殖过程和幼体质量[4]，因此深入研究卵黄发生的调控机制对于中华绒螯蟹的人工繁殖具有重要的现实意义。免疫组化技术是利用抗原与抗体特异性结合的原理，通过化学反应使标记抗体的显色剂(荧光素、酶、金属离子、同位素)显色来确定组织细胞内抗原，对其进行定位、定性的方法，具有特异性强、灵敏度高和易重复等优点，被广泛用于甲壳动物卵黄磷蛋白的组织学定位[5] [6]。由于不同甲壳动物卵黄磷蛋白的亚基数目、空间结构存在差异，必须制备特异性抗体，才能保证免疫组化实验结果准确，此外，现有对于中华绒螯蟹卵黄磷蛋白免疫组化的研究均集中与其合成位点(肝胰腺)和沉积部位(卵巢)，且均基于多克隆抗体进行免疫识别。对于胚胎发育期间卵黄磷蛋白空间分布尚无报道，本研究通过纯化中华绒螯蟹卵黄磷蛋白，随后制备单克隆抗体，建立了中华绒螯蟹卵黄磷蛋白免疫组化方法，为后续中华绒螯蟹卵黄发生机制及胚胎发育生物学打下基础。

## 2. 材料和方法

### 2.1. 样品采集

实验中中华绒螯蟹于 2018 年 12 月取自上海海洋大学崇明基地成蟹养殖池塘, 挑选活力良, 肢体健全个体用于样品采集, 采样前对蟹进行称重, 随后迅速解剖出卵巢并进行称重, 计算性腺指数, 随后置于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保藏, 挑选性腺指数 10 以上个体的样品用于进一步的蛋白纯化。

### 2.2. 试剂配制

参考《基因工程试验指南》中聚丙烯酰胺变性凝胶电泳相关实验方法配制所需试剂, 具体配方如下。

匀浆缓冲液: IM Tris-HCl (pH = 7.6) 10 ml、NaCl 2.925 g、EDTA: 0.05 g 和 100mM PMSF 0.5 ml 用蒸馏水定容至 500 ml;

PBS 缓冲液:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  1.45 g、NaCl 4.0 g 和 KCl 0.1 g 用蒸馏水定容至 500 ml;

丙烯酰胺单体贮液: 14.55 g 丙烯酰胺加上 0.45 g N, N'-甲叉双丙烯酰胺, 先用 40 mL 双蒸水搅拌溶解, 直到溶液变成透明, 再用双蒸水稀至 50 mL, 过滤。用棕色瓶  $4^{\circ}\text{C}$  保存备用。

浓缩胶缓冲液贮液(0.5 mol/L Tris-HCl, pH6.8): 3.03 g Tris 溶解在 40 mL 双蒸水中, 用 4 mol/L 盐酸调 pH6.8。再用双蒸水稀至 50 mL。保存在  $4^{\circ}\text{C}$  备用。

分离胶缓冲液贮液(1.5 mol/L Tris-HCl, pH8.9): 18.16 g Tris 溶解在 80 mL 双蒸水中, 用 4 mol/L 盐酸调 pH8.9。再用双蒸水稀至 100 mL, 保存在  $4^{\circ}\text{C}$  备用。

10% (AP)过硫酸铵: 0.1 g 过硫酸铵溶于 1.0 mL 双蒸水, 使用前新鲜配制。

电极缓冲液(0.025 mol/L Tris, 0.2 mol/L 甘氨酸, pH8.3): 15.14 g Tris 加上 72.07 g 甘氨酸, 用双蒸水稀释到 5 L。可在室温保存一个月。

样品缓冲液(0.1 mol/L Tris-HCl, pH6.8): 2 ml 浓缩胶缓冲液贮液加上 1 mL 87%甘油、0.1 mg 溴酚蓝, 用双蒸水稀释至 10 mL, 可在 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存 6 个月。

分离胶配方双蒸水: 6.6 ml、30%丙烯酰胺溶液: 8.0 ml、1.5 mol/L Tris (pH8.8): 5.0 ml、10% AP (W/V): 200 ul、TEMED: 15 ul。

浓缩胶配方: 双蒸水: 6.8 ml、30%丙烯酰胺溶液: 1.7 ml、1 mol/L Tris (pH6.8): 1.25 ml、10%过硫酸铵(W/V): 100 ul、TEMED: 10 ul [7]。

### 2.3. 蛋白分离

蛋白初分离参考江洪波(2003)研究方法, 取 5.0 g 左右中华绒螯蟹的成熟卵巢, 加入 10 ml 预冷的匀浆缓冲液, 用手持式分散机充分冰浴匀浆, 然后将匀浆液在  $4^{\circ}\text{C}$  下 12, 000 转离心 30 分钟, 取紫色上清液 3~5 ml, 并加入等体积的饱和硫酸铵溶液, 冰浴 2 h 后在  $4^{\circ}\text{C}$  下 12000 转离心 30 分钟, 弃上清液, 向离心管中加入 5 ml 的 PBS 缓冲液溶解沉淀, 重复以上步骤 3 次, 最后用 5 ml PBS 缓冲液溶解沉淀, 用于蛋白纯化[8]。

采用伯乐全自动蛋白质和多肽的纯化仪(型号: BioLogic DouFlowTM, 美国伯乐公司生产)对卵巢提取物进行分离纯化。其中凝胶柱体积为 120 ml, 装入 30 ml 凝胶, 纯化前首先采用 PBS 溶液平衡凝胶柱, 流速 3 mL/min, 平衡 3 小时。用注射器上样蛋白提取液(蛋白浓度约为 1 mg/ml), 流速为 0.6 ml, 在 280 nm 和 470 nm 条件下检测洗脱液的吸光度(OD), 当出现蛋白组分时每 1mL 收集一次。洗脱液于 $-70^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

## 2.4. 蛋白纯化

将玻璃板、胶垫、梳子用双蒸水洗干净，用酒精棉球擦拭，将电泳槽安装好，配制分离胶(12%)和浓缩胶(5%)。过硫酸铵和 TEMED 最后加入，加入后聚合即开始，应立即混匀倒入两块玻璃板之间。分离胶倒入两块玻璃板间，应该留下适合的高度，使点样孔前端离分离胶有 2.5 cm 左右的距离，在胶顶部缓缓加入约 0.5 cm 高的双蒸水，待分离胶聚合完全后，倾去上层的双蒸水，用双蒸水清洗凝胶顶层，用吸水纸吸去残余的水滴。将浓缩胶倒入玻璃板夹层，插上梳子，待浓缩胶聚合完全后，拔去梳子，立即用双蒸水清洗点样孔，加入电极缓冲液[7]。

将中华绒螯蟹卵黄磷蛋白洗脱液经 PBS 稀释为浓度 20 ug/ul 后与上样缓冲液 4:1 混合，用微量进样器点入点样孔底部，200 伏电泳。当溴酚蓝到达分离胶时，电压改为 250 伏，继续电泳至溴酚蓝到达凝胶底部。将凝胶剥下，浸泡在 100 ml 的底物液中，染色 1 小时，待胶带显色后立即照相。然后将凝胶进行染色，中华绒螯蟹卵黄磷蛋白共有两个亚基条带，分别为 70 和 100 kD，对条带进行割胶回收蛋白。

## 2.5. 动物免疫

初免抗原为蛋白与等体积弗氏完全佐剂混匀乳化。二免、三免、四免抗原为蛋白与等体积弗氏不完全佐剂混匀乳化。五免冲击为蛋白与等体积生理盐水混合，冲击免疫。选用健康 B1bc 小鼠，6~8 周龄。一免：第 1 天，免疫用抗原为弗氏完全佐剂+蛋白；二免：第 14 天，免疫用抗原为弗氏不完全佐剂+蛋白；三免：第 28 天，免疫用抗原为弗氏不完全佐剂+蛋白；四免：第 42 天，免疫用抗原为弗氏不完全佐剂+蛋白；四免后采血：第 49 天，尾根静脉采血 10 ul，ELISA 检测抗血清效价；五免：第 56 天，免疫用抗原为生理盐水+蛋白。五免冲击后 5 天，取小鼠脾脏，研磨后与 SP2/0 进行细胞融合，并铺板。

## 2.6. 亚克隆筛选及建立细胞株

融合后 14~16 天，镜检观察细胞，取上清 elisa 检测。阳性孔细胞转孔，并有限稀释，进入第一轮亚克隆筛选。6~7 天后，镜检观察细胞，取上清 elisa 检测。阳性孔细胞转孔，并有限稀释，进入第二轮亚克隆筛选。5~6 天后，镜检观察细胞，取上清 elisa 检测。阳性孔细胞转孔，并有限稀释，进入第三轮亚克隆筛选。第三轮亚克隆筛选后，elisa 检测阳性细胞株，扩大培养，90% 铺满培养皿后，取少量接入 T25 瓶中，剩余细胞收集并冻存。

## 2.7. 腹水制备

提前 1 周给小鼠腹腔注射矿物油。T25 瓶中细胞培养至 90% 铺满，收集细胞，注射入小鼠腹腔。8~20 天内观察小鼠腹腔，鼓胀到行动受限时，收集腹水。腹水离心并过滤后，用等体积 PBS 稀释，ProteinAG 纯化，收集抗体。

## 2.8. 抗体效价检测

将抗原用 0.05 mol/L 碳酸盐(PH = 9.6)稀释至 3 ug/ml，100 ul/孔，4℃ 孵育过夜。取出用 0.05% Tween-20 (PBST)洗涤三次，3 分钟/次。每孔加入 5% 脱脂奶粉(PBST) 150 ul 封闭液，37℃ 封闭 120 分钟。取出用 0.05% Tween-20 (PBST)洗涤三次，3 分钟/次。将抗体分别按照 1:1000 稀释，然后倍比稀释，至 1:512K，37℃ 孵育 1 小时。取出用 5% Tween-20 (PBST)洗涤三次，3 分钟/次。加辣根酶标记山羊抗兔 IgG (H+L)。1:8000 稀释，37℃ 孵育 45 分钟。取出用 0.05% Tween-20 (PBST)洗涤五次，3 分钟/次。加入底物溶液(TMB) 100 ul/孔，反应 5~10 分钟，最后加入 100 ul 2 mol/L 硫酸终止反应。用酶标仪在 450 nm 波长下测定 OD 值。

## 2.9. 免疫组化验证

选取中华绒螯蟹囊胚期、原肠期、卵内无节幼体期胚胎和大眼幼体作为实验材料,验证制备的抗体的特异性,胚胎经波恩液固定 24 小时后,转移至 70% 的酒精保存,随后经过梯度脱水,浸蜡(56℃~58℃),包埋后进行切片,切片厚度为 5~7 μm。(神经组织先经过 2% 琼脂预包埋其他处理步骤相同),切片经过脱蜡水化后,进行抗原热修复 10 分钟(修复液为枸橼酸修复液 Ph6.0),随后滴加 0.3% 双氧水用于封闭内源性过氧化物酶活性 10 分钟, PBST 漂洗三次,每次 2 分钟,滴加鼠抗中华绒螯蟹卵黄磷蛋白,稀释比例为 1:200,湿盒中 4℃ 过夜, PBST 漂洗三次,每次 2 分钟,滴加二抗(抗鼠 IgG-hrp),湿盒中 37℃ 孵育 1 小时, PBST 漂洗三次,每次 2 分钟, DAB 显色后封片,随后拍照。

## 3. 结果

### 3.1. 抗体效价检测

抗体效价 Elisa 检测数据见表 1,其中血清效价值  $\geq 2.5 \times$  阴性值。由表一可知,三株小鼠抗中华绒螯蟹卵黄蛋白原抗体效价: 2N17  $\geq 64$  K, 3G2  $\geq 64$  K, 2J11  $\geq 64$ , 抗体浓度检测可知, 2N17: 0.8 mg/ml, 3G2: 0.8 mg/ml, 2J11: 0.7 mg/ml。

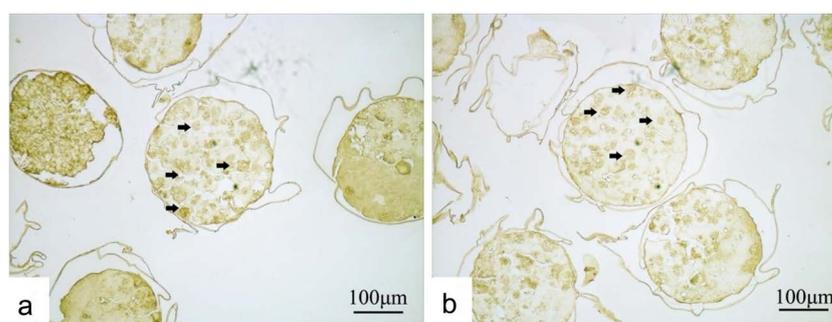
**Table 1.** Antibody titer test of ELISA data

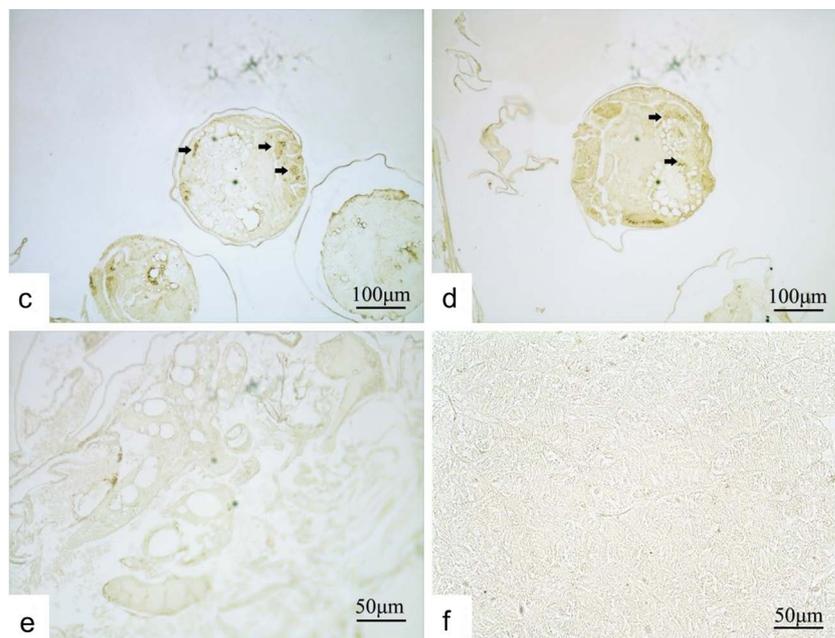
**表 1.** 抗体效价检测 ELISA 检测数据

	阴性	空白	1k	2k	4k	8k	16k	32k	64k	128k	256k	512k
2N17	0.056	0.055	3.617	3.408	3.162	2.885	2.586	1.955	1.519	1.006	0.567	0.289
3G2	0.036	0.036	3.094	3.074	2.985	2.742	2.732	2.221	1.928	0.993	0.547	0.275
2J11	0.038	0.030	3.567	3.483	3.157	2.879	2.879	2.086	1.417	0.815	0.407	0.205

### 3.2. 免疫组化验证

卵黄磷蛋白在甲壳动物中可作为载体蛋白进入卵母细胞,为胚胎和早期幼体提供必需的营养物质。因此可以通过免疫组化技术对中华绒螯蟹卵黄磷蛋白在其胚胎和幼体中进行定位,结果见图 1,胚胎发育在囊胚期和原肠期时,卵黄磷蛋白强阳性位点均分布于卵黄物质中,聚集与卵黄岛周边(图 1(a),图 1(b)箭头),当胚胎发育至卵内无节幼体期,卵黄囊中阳性物质变弱,数量变少(图 1(c)箭头),发育至心跳期时(图 1(d)箭头),卵黄囊中已无卵黄磷蛋白阳性物质变弱,仅仅分布于卵黄囊外周,围绕肝胰腺前体细胞有弱阳性位点(图 1(d)箭头),随后胚胎孵化,卵黄磷蛋白阳性位点消失,蚤状幼体和大眼幼体的肝胰腺区域均无发现(图 1(e)箭头),暗示中华绒螯蟹在胚胎发育中期是卵黄磷蛋白动用高峰,而末期卵黄磷蛋白已消耗殆尽,初孵幼体已不带有卵黄磷蛋白。





(a) 中华绒螯蟹囊胚期胚胎中卵黄磷蛋白定位(黑色箭头); (b) 中华绒螯蟹原肠胚期胚胎中卵黄磷蛋白定位(黑色箭头); (c) 中华绒螯蟹无节幼体期胚胎中卵黄磷蛋白定位(黑色箭头); (d) 中华绒螯蟹心跳期胚胎中卵黄磷蛋白定位(黑色箭头); (e) 中华绒螯蟹大眼幼体中卵黄磷蛋白定位(无阳性物质); (f) 阴性对照

**Figure 1.** IHC identification of vitellogenin in embryo and larval of *Eriocheir sinensis*

**图 1.** 中华绒螯蟹胚胎及幼体中卵黄磷蛋白免疫组化识别

#### 4. 讨论

甲壳动物卵黄磷蛋白的分子量在 280 kDa 左右, 有 2~4 个亚基组成, 通过 SDS-PAGE 分析确定 Vg 中亚基的数量和大小在不同物种间有所差异, 以常见的经济甲壳动物为例, 三疣梭子蟹卵黄磷蛋白拥有三个亚基 (100, 75 和 66 kDa), 分子量 287 kDa [9], 罗氏沼虾卵黄磷蛋白拥有两个亚基 (97 和 95 kDa), 分子量 286 kDa [10], 斑节对虾卵黄磷蛋白拥有两个亚基 (170 和 82 kDa) [11], 分子量 284 kDa。本研究中, 中华绒螯蟹卵黄磷蛋白拥有 70 和 100 kDa 两个亚基, 与先前的研究基本一致 [8]。由于卵黄磷蛋白是十足目甲壳动物整个卵巢发育周期中储存营养物质的主要形式, 同时产卵后继续为胚胎发育提供氨基酸、脂类、碳水化合物和维生素等各类营养物质, 先前较多的研究均关注与甲壳动物卵黄磷蛋白 Elisa 方法的建立 [8] [9], 此外, 原有我国两大经济蟹类的卵黄磷蛋白研究的免疫学手段均是基于多克隆抗体制备技术, 与之相比, 本研究中的卵黄磷蛋白单克隆抗体在实际应用中特异性更强, 而本研究则进一步将卵黄磷蛋白单克隆抗体应用于免疫组化研究, 也验证了卵黄磷蛋白在胚胎过程中是所起的重要作用, 对于研究卵黄磷蛋白在甲壳动物各器官或胚胎中的时空分布提供了有力支撑。

#### 基金项目

上海市自然科学基金项目《中华绒螯蟹胚胎发育过程中卵黄物质动用机制及其幼体肝胰腺发育模型构建》(18ZR1434300)。

#### 参考文献

- [1] Utarabhand, P. and Bunlipatanon, P. (1996) Plasma Vitellogenin of Grouper (*Epinephelus malabaricus*): Isolation and Properties. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, **115**, 101-110. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(96\)00055-2](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(96)00055-2)

- 
- [2] Harrison, K.E. (1990) The Role of Nutrition in Maturation, Reproduction and Embryonic Development of Decapod Crustacean: A Review. *Journal of Shellfish Research*, **9**, 1-28.
- [3] 蔡生力. 甲壳动物内分泌学研究展望[J]. 水产学报, 1998, 22(2): 154-161.
- [4] 吴旭干, 成永旭, 常国亮, 等. 亲本强化培育对中华绒螯蟹雌体生殖性能和 Z1 幼体质量的影响[J]. 水产学报, 2007, 31(6): 757-764.
- [5] 柳梅梅, 吴旭干, 刘智俊, 等. 中华绒螯蟹卵巢发育期间两种雌激素受体在卵巢和肝胰腺的分布及变化[J]. 水生生物学报, 2015(4): 822-830.
- [6] 杨筱珍, 李彤, 李萌, 等. 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)肠道和肝胰腺 5-羟色胺(5-HT)和 5-羟色胺受体 2(5-HTR2)的定位研究[J]. 海洋与湖沼, 2015, 46(5): 1139-1145.
- [7] 李玮瑜, 李姗, 张洪映. 基因工程实验指南[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2004.
- [8] 江洪波. 中华绒螯蟹蛋白质营养生理研究[D]: [博士学位论文]. 上海: 华东师范大学, 2003.
- [9] 张艳, 吴旭干, 杨帆, 等. 三疣梭子蟹卵黄磷蛋白纯化及其 ELISA 测定方法[J]. 水产学报, 2011, 35(8): 1146-1157.
- [10] Sagi, A., Soroka, Y., Snir, E., *et al.* (1995) Ovarian Protein Synthesis in the Prawn *Macrobrachium rosenbergii*: Does Ovarian Vitellin Synthesis Exist? *Invertebrate Reproduction & Development*, **27**, 41-47. <https://doi.org/10.1080/07924259.1995.9672432>
- [11] Chang, C.F. and Jeng, S.R. (1995) Isolation and Characterization of the Female-Specific Protein (Vitellogenin) in Mature Female Hemolymph of the Prawn *Penaeus chinensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **112**, 257-263. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(95\)00059-3](https://doi.org/10.1016/0305-0491(95)00059-3)