

# 鱼类生长激素生物活性和定量免疫测定技术的研究进展

肖东 林浩然

(中山大学生命科学学院水生经济动物研究所 广州 510275)

关键词 鱼类;生长激素;生物活性和定量免疫测定技术

中图分类号:Q575 文献标识码:A 文章编号:10250-3263(2000)04-43-04

## The Progress of Technology of Bioactive Detection and Quantitatively Immunological Determination of Fish Growth Hormone

XIAO Dong LIN Hao-Ran

(Institute of Aquatic Economic Animals, School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

**Key words** Fish; Growth hormone; Technology of bioactive detection and quantitatively immunological determination

生长激素(growth hormone, GH)是调节鱼类生长、发育和代谢的一种重要激素。为了弄清鱼体内GH水平与鱼体生长的关系,以及研究外源GH基因在受体鱼体内的表达部位、表达效率和表达调控等问题,首先必须建立鱼类GH灵敏、特异的微量检测技术。此外,在进行鱼类GH分离纯化中,很重要的一点就是鉴定所获得的GH制品是否具有生物活性,同样也需要建立鱼类GH灵敏、特异的生物活性检测技术。因此,建立鱼类GH生物活性和特异的定量免疫分析技术引起各国学者的广泛关注与重视。

### 1 鱼类生长激素(GH)生物活性检测技术的研究概况

鱼类生长激素(GH)的主要作用是刺激鱼体的生长,提高生长率<sup>[1]</sup>。在进行鱼类GH分离纯化中,很重

要的一点就是鉴定所获得的GH制品是否具有生物活性。GH,在高等脊椎动物是通过测定促进鼠胫骨生长的方法(rat tibia assay)验证其生物活性;早期的研究多是借用鼠胫骨生长测定法来测定鱼类GH制品的生物活性,即将GH制品注射到切除垂体的大鼠体内,观察其胫骨生长情况。Farmer<sup>[2]</sup>成功地用这一方法测定出高剂量的罗非鱼GH对大鼠胫骨具有低而明显的促生长效应。但除板鳃鱼纲、肺鱼亚纲、软骨鱼纲和全头类等鱼的GH能促进鼠胫骨生长外,其它硬骨鱼类均无此作用,因此不能用此法鉴定鱼类GH制品是否具有生物活性。因此后来又建立了在体促生长法用于鉴

---

第一作者介绍:肖东,男,31岁,博士研究生;研究方向:鱼类生长的神经内分泌调控;

收稿日期:1998-12-25,修回日期:1999-04-19

定鱼类 GH 的生物活性。即将 GH 制品注射到鱼体内,观察其是否具有促生长活性。由于这种方法简单、准确,无需特殊的设备,因而成为鱼类 GH 生物活性检测的一种主要方法。大多数学者在进行鱼类 GH 分离纯化时都采用此方法<sup>[3,4]</sup>。但该法的不足之处在于实验周期长,通常需要 2~3 个月,激素用量大,耗费的人力、物力也很大,且鱼体生长受到饲料条件、饵料状况的影响也较大。因此,在进行鱼类 GH 分离纯化中,迫切需要一种快速、简便和有效的生物活性检测方法。鉴于肝脏是鱼类 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,GH 发挥其促生长效应的第一步是与细胞膜上的 GH 受体发生特异结合反应<sup>[22]</sup>。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。据此原理, Fryer<sup>[5]</sup>率先建立了罗非鱼 GH 放射受体法(radio receptor assay, RRA)。随后 Tarpey 和 Nicoll<sup>[6]</sup>用此方法对鰕虎鱼和高首鲟的肝 GH 受体进行了研究, LeBail<sup>[7]</sup>和陈松林等<sup>[8]</sup>则将哺乳类 GH 的 RRA 方法应用于大麻哈鱼 GH 分离纯化研究中,都取得了较好的效果,大大缩短了 GH 生物活性检测的周期。然而, RRA 由于利用放射性同位素作标记物,具有污染环境、影响操作者健康等缺点,其应用受到较大的限制。因此,研究一种简单、快速、有效,且无放射性污染的 GH 生物活性检测方法就成为摆在人们面前的一项重要课题。

陈松林等<sup>[9]</sup>根据激素-受体特异结合的原理,结合 ELISA 和 RRA 的优点,应用鱼类肝细胞膜受体制剂和纯化的鱼类 GH 及其抗体,首次成功建立了一套检测鱼类 GH 生物活性的酶联免疫吸附受体测定法(ELISA-receptor assay, ELISA-RA)。该法是建立在 GH 先与受体相结合,然后再与其特异抗体结合的基础上。因此,该系统既检测了 GH 的生物活性(与受体结合的能力),又检测了 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 分子才能被检测出来,因而该方法的特异性很强。在这一点,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<sup>[5]</sup>,因而只能检测出 GH 的生物活性,而检测不出 GH 的免疫学活性。陈松林等<sup>[9]</sup>建立的 ELISA-RA 的灵敏度一般在 0.063~0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,略低于 RRA 法,但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,具有快速、准确的特点。但由于受灵敏度的限制,该系统不宜用于测定鱼类血液中的微量 GH 水平。

## 2 鱼类生长激素(GH)定量免疫测定技术的研究概况

### 2.1 放射免疫测定技术(radioimmunoassay, RIA)的研究概况

建立鱼类 GH 免疫测定方法是开展鱼类 GH 生理学及其分泌调节研究的前提。在 70 年代,由于缺乏高度纯化的鱼类 GH 及其特异抗体,人们通常采用异源 GH RIA 系统测定鱼类垂体及血液中的 GH 水平。Mckeown 和 Van Overbeeke<sup>[10]</sup>采用人 GH RIA 系统测定了大麻哈鱼垂体及血液中的 GH 水平; Peter 等<sup>[11]</sup>利用人 GH RIA 系统研究了金色硫葡萄糖对金鱼血清 GH 水平的影响。由于种族特异性的存在,鱼类 GH 的结构与人类 GH 只有 40% 左右的同源性,因而异源 GH RIA 测定系统的特异性很低,所检测出来的物质是何种激素很难判断,其检测的灵敏度非常有限。Cook 等<sup>[3]</sup>利用鲤 GH 作标准品,用兔抗鲤 GH 血清做第一抗体率先建立了同源鲤 GH RIA 测定系统,这个测定系统能测定鲤鱼和金鱼垂体及血液中的 GH 水平,其灵敏度为 5 ng/ml,其组间和组内变异系数分别为 12% 和 6.28%,特异性不太好,鲤催乳素(PRL)和鲤促性腺激素(GtH)在该系统中分别有 1% 和 5% 的交叉反应,但基本上达到了可应用的水平。随后 Wagner 等<sup>[12]</sup>和 Bolton 等<sup>[13]</sup>用大麻哈鱼 GH 做标准品,用兔抗大麻哈鱼 GH 血清做第一抗体,分别在各自的实验室建立了同一种同源大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*) GH 的 RIA 技术。前一作者报道的 GH RIA 系统的灵敏度为 3.0 ng/ml,组间和组内变异系数分别为 11.5% 和 7.9%,该系统的特异性不够好,大麻哈鱼 PRL 在该系统中有较明显的交叉反应。后一作者报道的 GH RIA 系统的灵敏度为 0.6 ng/ml,组间和组内变异系数分别为 4.1% 和 3.9%,来自大麻哈鱼、银大麻哈鱼和马苏大麻哈鱼等多种鲑科鱼类的垂体和血清在该 RIA 系统中都有良好的交叉反应,因而该系统可以在鲑科鱼类上应用。此后,特异、灵敏的鱼类 GH 同源 RIA 系统又相继在大鳞大麻哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)<sup>[14]</sup>,罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)<sup>[15]</sup>,日本鳗鲡<sup>[16]</sup>,欧洲鳗鲡(*Anguilla Anguilla*)<sup>[17]</sup>以及胡子鲶(*Clarias gariepinus*)<sup>[18]</sup>等鱼上建立。尽管 RIA 法特异性强,灵敏度高,但同位素标记品不稳定,需要经常的标记和纯化,以及测定周期长、对实验室设备条件要求高等缺点,因而深索其可靠的替代技术成为鱼类内分泌学领域的一个重要课题。

### 2.2 ELISA 测定技术的研究概况

酶联免疫测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)由于具有无放射性污染、特异性强、灵敏度相当于甚至优于RIA法,测定周期短、对实验室条件要求不高等许多优点,因而受到人们的普遍关注和重视。目前,用ELISA技术代替RIA系统已成为国际比较内分泌学领域的发展趋势。随着杂交瘤技术的发展及鱼类GH单克隆抗体的成功制备,为建立鱼类GH ELISA测定技术提供了可能。Furuyd<sup>[19]</sup>利用大麻哈鱼GH单抗服水建立的GH ELISA测定方法的灵敏度仅为160 ng/ml,远远达不到应用的水平。随后,Farbridge和Leatherland<sup>[20]</sup>成功地应用抗重组大麻哈鱼GH(rcsGH)的单克隆抗体建立了大麻哈鱼GH非竞争性的ELISA测定系统。这个ELISA测定系统的灵敏度为1.56 ng/ml,组间和组内变异系数分别为4.2%和4.6%,回收率为80%左右;由于种族特异性的存在,这个ELISA测定系统只适合于鲑科鱼类,能检测出虹鳟、大麻哈鱼、银大麻哈鱼等鲑科鱼类垂体和血液中的GH,但不能检测金鱼等鲤科鱼类垂体和血液中的GH,表现出良好的种族特异性。

Fukada等<sup>[21]</sup>建立了大麻哈鱼GH非竞争性的夹心式亲和素-生物素ELISA测定系统。该ELISA测定系统用兔抗大麻哈鱼GH多克隆抗体作为第一抗体,用生物素酰化的Fab'片段作为第二抗体,利用亲和素和生物素的反应来放大信号。该系统测定周期为3天,测定系统的灵敏度为0.5 ng/ml。这个ELISA测定系统能检测出鲑科鱼类垂体和血液中的GH,表现出良好的种族特异性。

Chen等<sup>[22]</sup>利用单抗作包被抗体,利用纯化的草鱼GH作标准品,用兔抗草鱼GH血清作后续覆盖抗体,用羊抗兔IgG作为连接抗体,用兔PAC(过氧化物酶-抗过氧化物酶)作为酶标记物,成功地建立了草鱼GH双抗夹心式ELISA测定系统。这个夹心式ELISA测定系统的灵敏度为0.8 ng/ml,组间和组内变异系数分别为7.6%和5.9%,回收率达90%以上;初步的研究表明:鲤、鲫和团头鲂垂体抽提液,草鱼、鲤和鲫鱼在该测定系统中有剂量依存的反应曲线,表明该测定系统可以检测上述几种与草鱼亲缘关系相隔很近的鱼类血液中GH分子;而大口鲶、黄颡鱼、中华鲟及黄鳝垂体抽提液,大口鲶、胡子鲶及罗非鱼血清在该测定系统中则没有免疫交叉反应,也就是说,该测定方法不能检测上述几种与草鱼亲缘关系相隔较远的鱼类血液和垂体中GH分子。从目前已掌握的资料看,草鱼GH双抗夹心式ELISA测定系统至少可以在草鱼、白鲢、花鲢、鲤、鲫和团头鲂等几种主要鲤科养殖鱼类上

推广应用。这一结果与Farbridge等<sup>[20]</sup>采用大麻哈鱼GH作为抗原建立的GH ELISA系统在虹鳟、大麻哈鱼、银大麻哈鱼等多种鲑科鱼类上应用的结果相类似。

### 3 小结

鱼类GH RRA法和ELISA-RA法(尤其是ELISA-RA法)的建立,为鱼类GH生物活性的检测提供了新的技术手段,在鱼类GH的分离纯化中有重要应用价值;同时,该方法还可用于研究鱼类GH特异受体在鱼体各组织的分布情况以及GH与受体的相互作用等。

鱼类特异、灵敏的GH RIA和ELISA方法的建立,为开展鱼类生长、发育及生殖的GH调控及鱼类GH基因转移和表达的研究提供了一种行之有效的GH检测手段。借助RIA和ELISA系统,可以开展鱼体内GH水平与生长、发育及生殖的确切关系的研究,还可以探讨鱼类GH基因转移到其它鱼体内后的表达部位、表达效率及表达的调控等问题。这对于加快鱼类生长内分泌学的研究进程具有重要意义和应用价值。

### 参 考 文 献

- [1] Peter, R. E., T. A. Marchant. The endocrinology of growth in carp and related species. *Aquaculture*, 1995, **129**: 299~321.
- [2] Farmer, S. W. Purification and properties of teleost growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1976, **30**: 91~100.
- [3] Cook, A. F., S. W. Wilson, R. E. Peter. Development and validation of a carp growth hormone radioimmunoassay. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1983, **50**: 335~347.
- [4] Kawauchi, H. Isolation and characterization of chum salmon growth hormone. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1986, **244**: 542~552.
- [5] Fryer, J. N. A radioreceptor assay for purified teleost growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1979, **39**: 123~130.
- [6] Tarpey, J. F., C. S. Nicoli. Characterization of hepatic growth hormone binding sites in two fish species, *Gillichthys mirabilis* and *Acipenser transmontanus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1985, **60**: 39~50.
- [7] LeBail, P. Y. Purification of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) GH for receptor study. *Fish Physiol. Biochem.*, 1989, **7**: 243~251.
- [8] 陈松林, Bernard Breton. 大麻哈鱼垂体生长激素的

- 分离纯化与鉴定. 生物化学杂志, 1992, 8(6): 656~660.
- [ 9 ] 陈松林, 邓文涛, 贺路等. 用酶联免疫吸附受体法检测鱼类生长激素的生物活性. 水产学报, 1995, 19(3): 217~221.
- [ 10 ] Mckeown, B. A., A. P. Van Overbeeke. Prolactin and growth hormone concentrations in the serum and pituitary gland of adult migratory sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *J. Fish. Res. Board. Canad.*, 1972, 29: 303~309.
- [ 11 ] Peter, R. E. The effects of gold thioglucose on food intake, growth and forebrain histology in goldfish, *Carassius auratus*. *Physiol. Behav.*, 1976, 17: 303~312.
- [ 12 ] Wagner, G. F., B. A. Mckeown. Development of a Salmon growth hormone radioimmunoassay. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1986, 62: 452~458.
- [ 13 ] Bolton, J. P., A. Takahashi, H. Kawauchi *et al.* Development and validation of a salmon growth hormone radioimmunoassay. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1986, 62: 230~238.
- [ 14 ] LeBail, P. Y., J. P. Sumpter, J. F. Carragher *et al.* Development and validation of a highly sensitive radioimmunoassay for chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1991, 83: 75~85.
- [ 15 ] Ayson, F. G. Effects of acclimation to hyper tonic environment on plasma and pituitary levels of two prolactin and growth hormone in two species of tilapia, *Oreochromis mossambicus* and *Oreochromis niloticus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1993, 89: 138~148.
- [ 16 ] Kishida, M., T. Hirano. Development of radioimmunoassay for eel growth hormone. *Nipp. Suis. Cakkaish*, 1988, 54: 321~327.
- [ 17 ] Marohelidon, J. 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.
- [ 18 ] Lescroart, O., I. Roklants, T. Mikolajczyk *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.
- [ 19 ] Furnya, A. Generation and application of monoclonal antibodies against salmon somatotropin and prolactin. *Agric. Bio. Chem.*, 1987, 51: 2331~2335.
- [ 20 ] Farbridge, K. J., J. F. Leatherland. The development of a noncompetitive enzyme-linked immunosorbent assay for oncorhynchid growth hormone using monoclonal antibodies. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1991, 83: 7~17.
- [ 21 ] Fukada, H., N. Hiramatsu, A. Hara. A sensitive non-competitive avidin-biotin enzyme-linked immunosorbent assay for chum salmon (*Oncorhynchus keta*) growth hormone. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1997, 17(1~6): 253~259.
- [ 22 ] Chen Songlin, Chen Xihua, Den Wentao *et al.* Development and validation of a noncompetitive enzyme-linked immunosorbent assay for the growth hormone of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Acta Zoologica Sinica*, 1996, 42(4): 386~393.