

Method of immunoferment analysis for determination of lysozyme of mucus and fish tissues

V. Tsviliovskyy, N. Vovk, T. Gavrilova

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine

Kyiv, Ukraine, E-mail: nvovk@ukr.net

Submitted: 28.04.2016. Accepted: 11.05.2017

The possibility of using the immunoferment analysis for determination of lysozyme of mucus and fish tissues has been investigated. This method was adapted by reducing the dilution of the supernatant of biological material with buffer from 1:5 to 1:1. Clinically healthy fish (10 samples of pike and 10 samples of carp) were taken from fish ponds at water temperature of 14–16°C. Biological material (blood, spleen, mucus of superficial integuments) was selected concerning the commonly used methods in ichthyopathology. The determination of lysozyme activity was carried out using high sensitivity RIDASCREEN®FAST Lysozym test kit. When diluting the supernatant of biological material with buffer in a ratio of 1:5 (according to the method), it was not possible to calculate the data by the calibration curve, since the lysozyme parameters of the samples were lower than the lysozyme standard (0,050 mkg/g). Therefore, the final dilution was reduced and the experiment was continued with dilution of the supernatant with a protein extraction buffer in a ratio of 1:1. The data of the statistical processing of the results have led to conclusion the use of RIDASCREEN®FAST Lysozym test kit in the proposed modification for the immunoferment analysis of lysozyme activity in tissues and mucus of fish is possible. A high content of lysozyme was noted in the mucus of the superficial integuments of fish, the lowest – in the blood serum. The content of lysozyme in the tissues and organs of pike is higher than in carp.

Key words: fish, pike, carp, humoral factors, lysozym method of immunoferment definition.

Імуноферментний метод визначення лізоциму слизу та тканин риб

В. Цвіліховський, Н.Вовк, Т. Гаврилова

Національний університет біоресурсів і природокористування України

м. Київ, E-mail: nvovk@ukr.net

Досліджена можливість використання методу імуноферментного аналізу для визначення лізоциму слизу і тканин риб. Для цього методу імуно-ферментного аналізу для визначення лізоцимної активності було адаптовано за рахунок зменшення розведення супернатанту біологічного матеріалу буфером з 1:5 до 1:1. Для досліджень брали клінічно здорову рибу (по 10 екземплярів щуки та коропа з рибницьких ставів) за температури води 14–16°C. Біологічний матеріал (кров, селезінку, слиз поверхневих покривів) відбирали згідно загальноприйнятих в іхтіопатології методів. Визначення лізоцимної активності проводили методом імуноферментного аналізу за допомогою тест-набору RIDASCREEN®FAST Lysozym, перевагою якого є висока чутливість. За розведення супернатанту біологічного матеріалу буфером 1:5 (згідно методики) дані не піддавались обрахунку за калібрувальною кривою, оскільки показники лізоциму зразків були нижчі за показники стандарту лізоциму (0,050 мкг/г) на калібрувальній кривій. Тому було зменшено кінцеве розведення і дослід продовжили із розведенням супернатанту буфером екстракції білку у співвідношенні 1:1. Дані статистичного опрацювання результатів дозволили зробити висновок про придатність використання тест-набору RIDASCREEN®FAST Lysozym в запропонованій модифікації для імуноферментного аналізу лізоцимної активності в тканинах та слизу риб. Найвищий вміст лізоциму відмічали у слизу поверхневих покривів риб, найнижчий – у сироватці крові. Вміст лізоциму у тканинах та органах щуки вищий ніж у коропа.

Ключові слова: риба, щука, короп, гуморальні фактори, лізоцим, імуноферментний аналіз.

Вступ

Імунна система риб представлена нефросом, селезінкою, лімфоїдним органом, печінкою (гепатопанкреасом) та багаточисельними включеннями лімфоїдної тканини в шлунково-кишковому тракці, серці, зябрах (Van Muiswinkel et al., 2006). В основі її функціонування лежать загальні закономірності, властиві теплокровним, але у риб як пойкилотермних тварин, існують певні особливості в її організації.

Проти екзогенних агентів і, зокрема збудників хвороб, у риб досить добре функціонують як неспецифічні механізми загальної резистентності, так і специфічні фактори захисту. Першою ланкою захисту організму риб проти збудника є епітеліальні покриви шкіри, зябер, травного тракту, які разом з осморегуляцією відіграють важливу роль протимікробної та противірусної дії. Важлива функція епітеліальних клітин – продукування слизу, який перешкоджає колонізації мікроорганізмами поверхневих покривів. Слиз риб містить лізоцим, бактеріолізину, секреторні імуноглобуліни та інші речовини, що забезпечує йому нейтралізуючу та кровоспинну здатність, а також антибактеріальні, антивірусні, протигрибкові і антипаразитарні властивості. За тривалої дії екзогенних подразників (ектопаразитів, токсикантів) настає виснаження секреції слизу, змінюються його захисні властивості, що призводить до зниження бар'єрних функцій шкіри. Від механізмів взаємодії багатьох клітинних та гуморальних факторів імунітету залежить вроджена та набута резистентність, оскільки вони створюють потужний бар'єр, який у здоровому організмі зумовлює бактеріостатичні властивості тканин, крові та слизу риб.

Лізоцим, як один з гуморальних факторів імунітету, має виражені ферментативні та антибактеріальні властивості і присутній в слизі, тканинах внутрішніх органів риб, сироватці та клітинах крові (зокрема лейкоцитах). Він перешкоджає проникненню антигенів у внутрішнє середовище організму, стимулює фагоцитоз, підсилює активність Т-субпопуляцій лімфоцитів. Окрім того він бере участь в антитоксичних процесах, здатний реагувати з нуклеїновими кислотами та кислотними медіаторами запальних процесів. Титр лізоциму у риб значно залежить від сезону року, температури, фізіологічного стану організму, виду риби. Так, у коропа активність лізоциму максимальна восени, а мінімальна – наприкінці зими. Є дані, що хижі риби мають вищі титри лізоциму, ніж мирні (Lukianenko, 1989; Subbotkina, Subbotkina, 2003).

У фаховій літературі дані щодо факторів імунітету у риб досить обмежені, більшість з них відноситься до 70–90-х рр. ХХ ст., коли для визначення лізоциму в біологічному матеріалі переважно використовували турбидиметричний метод, який базується на визначенні зменшення ступеня мутності суспензії тест-бактерій *M. lysodeicticus* (*M. luteus*) під дією лізоциму в певний інтервал часу (Lukianenko, 1971; Labinskaya, 1978; Mikryakov, 1978; Vladimirov, 1982; Vovk et al., 1997; Metodicheskiye ukazaniya..., 1987; Ellis, 1990). Турбидиметричний метод застосовують при вивченні організму риб і на даний час (Milla et al., 2010; Garth L Fletcher et al., 2011). Використання високочутливих сучасних методів досліджень дасть можливість уточнити та доповнити знання з імунобіології риб.

Мета дослідження – дослідити можливість використання методу імуноферментного аналізу та адаптувати його для визначення лізоциму слизу і тканин риб.

Методи дослідження

Біологічний матеріал для дослідження було відібрано у ранньо осінній період від коропа та щуки з водойм навчально-науково-виробничої лабораторії кафедри аквакультури Національного університету біоресурсів і природокористування України (сmt. Немішаєве, Бородянського району, Київської області). Господарство розташоване в зоні Полісся. Джерело водопостачання ставів – річка Ірпінь та підземні води. Гідрохімічні показники води ставів відповідали вимогам для риборозведення (SOU 05.01–37–385:2006).

Рибницькі показники (масу, довжину, вік) визначали за Правдіним (Pravdin, 1966). Середні значення маси коропа знаходились на рівні $0,9 \pm 0,18$ кг, довжина $29 \pm 1,43$ см, вік 2+; маса щуки становила $0,237 \pm 0,037$ кг, довжина $26 \pm 1,0$ см, вік 0+.

Для досліджень відбирали клінічно здорову рибу – по 10 екземплярів щуки та коропа з рибницьких ставів (температура води знаходилась на рівні 14–16°C). Клінічний огляд та патологоанатомічний розтин риби здійснювали за загальноприйнятими методами (Musselius et al., 1983). Кров відбирали із серця риб за допомогою ін'єкційної голки, промитою невеликою кількістю гепарину. Для отримання плазми кров збирали у центрифужні пробірки, після утворення згустку, центрифугували. Слиз із поверхневих покривів риб збирали у чашку Петрі за допомогою шпателя та скальпеля, слідкуючи, щоб не було сторонніх домішок. Після цього її піддавали гомогенізації.

Для вилучення селезінки робили розтин риби. Її гомогенізацію здійснювали за допомогою ножового гомогенізатора «Біомікс».

Визначення лізоцимної активності проводили у відділі хроматографічного та спектрального аналізу Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК (УЛЯБП АПК) методом імуноферментного аналізу (сендвіч-варіант) за допомогою тест-набору RIDASCREEN®FAST Lysozym перевагою якого є висока чутливість (Instruktsiia do vykorystannia test-nabogu...). На першому етапі досліджень визначення лізоциму в слизу та тканинах риб проводили чітко за інструкцією виробника тест-набору RIDASCREEN®FAST Lysozym. Оскільки в доступній науковій літературі відсутня інформація щодо його використання при вивченні гуморальних факторів риби, орієнтувалися на нижню межу кількісного визначення лізоциму імуноферментним методом для продуктів харчування (0,25 мг/кг) та дані фахової літератури щодо вмісту лізоциму в тканинах мирних і хижих риб (від 1 мг/кг і вище). Було зроблено припущення, що метод у відповідних межах повинен працювати.

Дослідження вмісту лізоциму в слизу та тканинах риб здійснювали у наступній послідовності:

1. Необхідну кількість лунок для всіх стандартів та зразків вставляли в утримувач мікролунок для запуску у двох паралелях. Записували позиції стандартів та зразків.
2. В мікролунки додавали по 100 мкл стандартного розчину і підготовлених зразків; інкубували протягом 10 хв за кімнатної температури (20–25°C). Промивання мікролунок здійснювали тричі буфером для промивання (250 мкл), висушували.
3. У кожну лунку вносили по 100 мкл ферментного кон'югату. Вміст мікролунок планшету обережно перемішували та інкубували протягом 10 хв при кімнатній температурі. Знову проводили промивання мікролунок за допомогою промивача – тричі 250 мкл буфером для промивання.
4. У лунки додавали 100 мкл розчину хромогену, обережно перемішували та інкубували протягом 10 хв при кімнатній температурі в темряві.
5. У кожну лунку додавали 100 мкл стоп-розчину, обережно перемішували
6. Протягом 10 хв враховували результати за допомогою ІФА-фотометра.

Супернатант розводили буфером екстракції білку (1:10) у співвідношенні 1:5 (перший етап досліджень) та 1:1 (другий етап досліджень) Стійкість розведеного супернатанту складала 2 год. Для імуоферментного аналізу використовували 100 мкл розведеного супернатанту в кожну лунку. Для оцінки імуоферментного аналізу RIDASCREEN®FAST Lysozym використовували спеціальне програмне забезпечення RIDA@SOFT Win.

Розрахунки виконували шляхом використання кубічної сплайн-функції. Для визначення концентрацій використовувалась програма Spline, 450/405 nm за допомогою якої було побудовано калібрувальну криву.

Результати дослідження

Інструкція на тест-набір RIDASCREEN®FAST Lysozym використовується для кількісного визначення лізоциму в сирі, ковбасі та вині. Тому, методику для визначення лізоциму в слизу і тканинах риб, необхідно було адаптувати.

Побудова калібрувальної кривої здійснювалась на основі даних абсорбції в двох паралелях, заданих значень стандартних концентрацій лізоциму, отриманих значень абсорбції між паралелями по точках та коефіцієнту варіації (рис. 1, табл. 1).

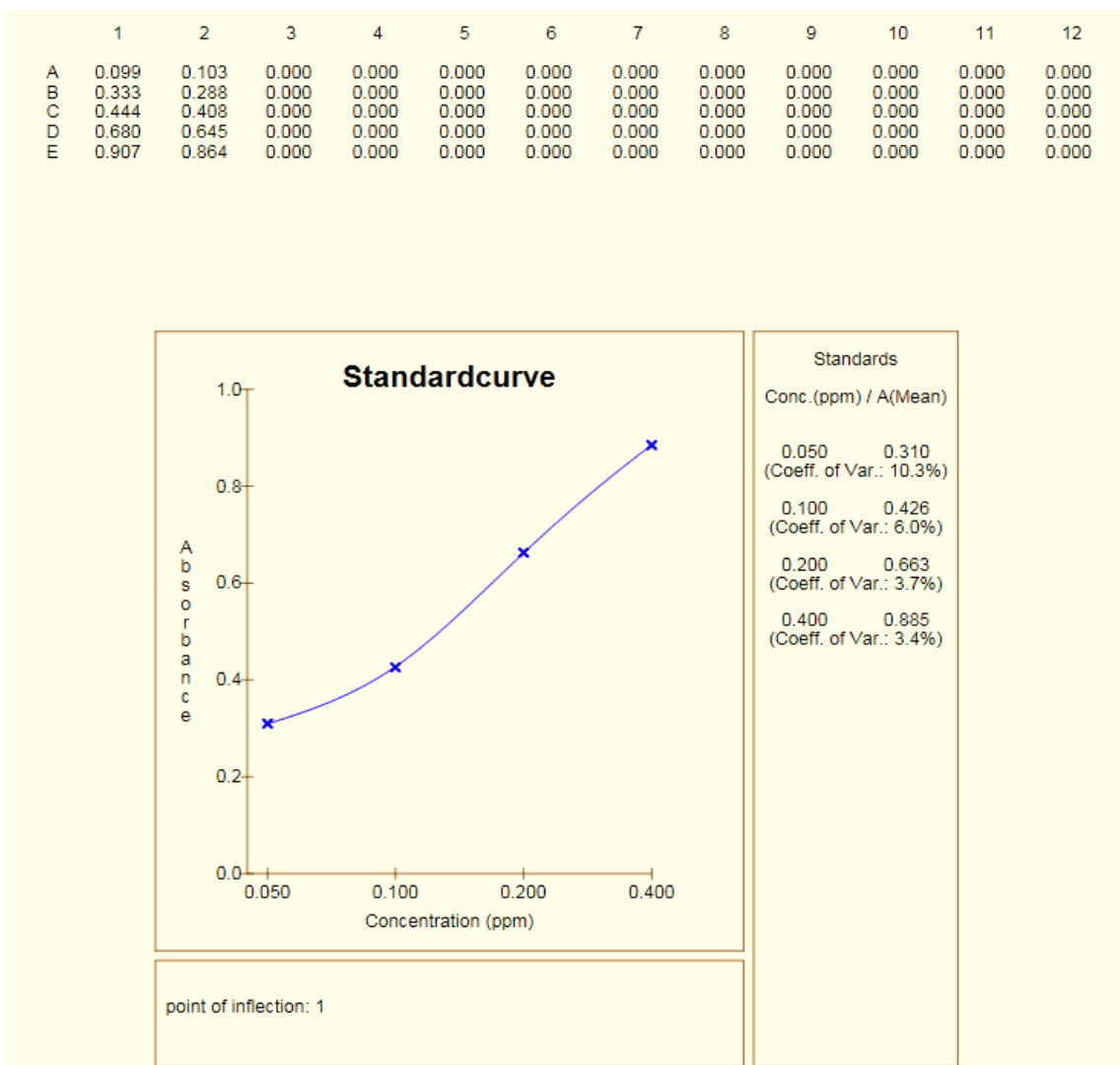


Рис. 1. Калібрувальна крива стандартних концентрацій лізоциму з програми Spline, 450/405 nm

За методикою значення абсорбції для 5-го стандарту повинно бути не менше 0,8. Дані калібрувальної кривої вказують на те, що правильність побудови графіка та придатність реактивів відповідала вимогам. Коефіцієнт варіації між паралелями складав 2,8 %; 10,3 %; 6,0 %; 3,7 % та 3,4 %, що свідчить про відсутність значних розбіжностей і задовольняє подальше проведення досліджень вибраним методом (табл. 1).

Таблиця 1. Дані калібрувальної кривої стандартних концентрацій лізоциму

№ п/п	Концентрація, мкг/г	Значення абсорбції	Коефіцієнт варіації (CV),%
1	0	0,101	2,80
2	0,050	0,310	10,30
3	0,100	0,426	6,0
4	0,200	0,663	3,70
5	0,400	0,885	3,40

Результати першого етапу дослідження, де попередньо підготовлені зразки, розводили екстракційним буфером у співвідношенні 1:5 (згідно інструкції до використання тест-набору) подано у табл. 2.

Таблиця 2. Результати досліджень з визначення вмісту лізоциму в сироватці крові, селезінці та слизу поверхневих покривів риб (розведення супернатанту буфером 1:5), n=10

№ п/п	Абсорбція					
	Кров	Короп Селезінка	Слиз	Кров	Щука Селезінка	Слиз
1	0,101	0,180	0,265	0,183	0,286	0,305
2	0,109	0,195	0,235	0,173	0,296	0,300
3	0,112	0,165	0,284	0,158	0,262	0,309
4	0,125	0,179	0,275	0,177	0,255	0,299
5	0,130	0,186	0,254	0,195	0,235	0,288
6	0,108	0,197	0,301	0,186	0,264	0,304
7	0,120	0,192	0,294	0,158	0,246	0,310
8	0,124	0,180	0,256	0,196	0,288	0,304
9	0,128	0,178	0,248	0,156	0,268	0,288
10	0,125	0,123	0,280	0,192	0,265	0,298

Отримані результати за розведення супернатанту буфером 1:5 не дозволяли оцінити ефективність методики, оскільки їх дані не піддавались обрахунку за калібрувальною кривою. Показники лізоциму зразків були нижчі за показники стандарту лізоциму (0,050 мкг/г) на калібрувальній кривій. Тому було зменшено кінцеве розведення, і дослід продовжили із розведенням супернатанту буфером екстракції білку (1:10) у співвідношенні 1:1 (табл. 3).

Таблиця 3. Результати досліджень з визначення вмісту лізоциму в сироватці крові, селезінці та слизу поверхневих покривів риб (розведення супернатанту буфером 1:1), n=10

№ п/п	Абсорбція					
	Кров	Короп Селезінка	Слиз	Кров	Щука Селезінка	Слиз
1	0,311	0,412	0,623	0,422	0,605	0,809
2	0,312	0,464	0,653	0,465	0,616	0,838
3	0,322	0,472	0,679	0,426	0,626	0,849
4	0,328	0,497	0,627	0,413	0,651	0,879
5	0,314	0,488	0,633	0,418	0,656	0,818
6	0,321	0,446	0,651	0,448	0,663	0,852
7	0,328	0,466	0,612	0,442	0,673	0,907
8	0,338	0,482	0,633	0,429	0,646	0,903
9	0,326	0,414	0,673	0,436	0,654	0,844
10	0,325	0,423	0,622	0,456	0,686	0,887

Отримані показники за розведення супернатанту буфером 1:1 дозволили провести підрахунок вмісту лізоциму у досліджуваному біологічному матеріалі за калібрувальною кривою (табл. 4).

Таблиця 4. Вміст лізоциму в сироватці крові, селезінці та слизу поверхневих гоокривів риб, $M \pm m$ мкг/г, $n=10$

№, п/п	Короп			Щука		
	Кров	Селезінка	Слиз	Кров	Селезінка	Слиз
1	1,24	1,65	2,49	1,69	2,42	4,05
2	1,25	1,86	2,61	1,86	2,46	4,19
3	1,29	1,89	2,72	1,70	2,50	4,25
4	1,31	1,99	2,51	1,65	2,60	4,40
5	1,26	1,95	2,53	1,67	2,62	4,09
6	1,28	1,78	2,60	1,79	2,65	4,26
7	1,31	1,86	2,45	1,77	2,69	4,54
8	1,35	1,93	2,53	1,72	2,58	4,52
9	1,30	1,66	2,69	1,74	2,62	4,22
10	1,30	1,69	2,49	1,82	2,74	4,44
M	1,29	1,83	2,56	1,74	2,59	4,29
m	0,03	0,12	0,09	0,07	0,10	0,17
CV, %	2,60	6,80	3,50	3,90	3,90	4,0

Відносне стандартне відхилення активності лізоциму в наших розрахунках для сироватки крові коропа склало 2,6 %, щуки – 3,9 %; для селезінки коропа – 6,8 %, щуки – 3,9 %; для слизу з поверхневих покривів коропа – 3,5 %, щуки – 4,0 %, що узгоджується з даними літератури для аналітичних методів, а отже є задовільним (Validation techniques, 2002).

Як видно із отриманих результатів, вміст лізоциму в сироватці крові коропа (мирні риби), селезінці та слизу поверхневих покривів знаходились на рівні 1,24 – 1,35 мкг/г; 1,65 – 1,99 мкг/г; 2,45 – 2,72 мкг/г відповідно, у щуки (хижі риби) – 1,65 – 1,86; 2,42 – 2,74; 4,05 – 4,54 мкг/г (табл. 5).

Таблиця 5. Лізоцимна активність тканин та органів коропа і щуки, мкг/г, $n=10$

Показник	Короп		Щука	
	min	max	min	max
Сироватка крові	1,24	1,35	1,65	1,86
Селезінка	1,65	1,99	2,42	2,74
Слиз поверхневих покривів	2,45	2,72	4,05	4,54

Необхідно відмітити, що вміст лізоциму у тканинах та органах щуки, як представника хижих риб, вищий, ніж у коропа (представник мирних риб); найвищий вміст лізоциму відмічався у слизу поверхневих покривів риб, найнижчий – у сироватці крові, що загалом узгоджується з даними фахової літератури (Lukianenko, 1989; Subbotkina, 2003).

Висновки

Адаптовано методику імуноферментного аналізу для визачення лізоцимної активності крові, селезінки та слизу риб за рахунок зменшення розведення супернатанту буфером з 1:5 до 1:1. Дані статистичного опрацювання результатів дозволяють зробити висновок про придатність використання тест-набору RIDASCREEN®FAST Lysozym Lysozym для імуноферментного аналізу лізоцимної активності в тканинах та слизу риб.

Найвищий вміст лізоциму відмічали у слизу поверхневих покривів риб, найнижчий – у сироватці крові. Вміст лізоциму у тканинах та органах щуки вищий ніж у коропа.

References

- Ellis, A.E. (1990). Lysozyme activity (pp. 101-103). In: T.C. Stolen, P.D. Fletcher, B.S. Anderson, B.S. Roberson and W.B. Muiswinkel (Eds.). *Technique in Fish Immunology*. SOS Publications, New Jersey, USA.
- Fletcher, G.L., Hobbs, R.S., Evans, R.P., Shears, M.A., Hahn, A.L., Hew, C.L. (2011). Lysozyme transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Research*, 427–440. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2010.0263.x
- Instruktsiia do vykorystannia test-naboru RIDASCREEN®FAST Lysozym (artykul: R 6452). R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany.
- Labinskaya, A.S. (1978). *Mikrobiologiya s tekhnikoy mikrobiologicheskikh issledovaniy*. Moscow. Meditsina (in Russian).
- Lukianenko, V. I. (1989). *Immunobiologiya ryb. Vrozhdenyy immunitet*. Moscow (in Russian).
- Lukianenko, V.I. (1971). *Immunobiologiya ryb. M. «Legkaya i pishchevaya promyshlennost»*, 215 (in Russian).
- Metodicheskiye ukazaniya po opredeleniyu urovnya estestvennoy rezistentnosti organizma ryb. (1987). Moscow (in Russian).

-
- Mikryakov, V.R. (1978) Aktualnyye voprosy immunologii ryb. Trudy Instituta biol. Vnutr. Vod. Teoretich. aspekty rybokhoz. Isledovaniy vodokhr. Leningrad. Nauka, 32, 116 – 133 (in Russian).
- Milla, S., Mathieu, C., Wang, N., Lambert, S., Nadzialek, S. et al. (2010). Spleen immune status is affected after acute handling stress but not regulated by cortisol in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. *Fish, Shellfish, Immunol.*, May–June, 28(5–6), 931–941.
- Musselius, V.A., Vanyatinskiy, A.A., Vikhman, V.F. (1983). *Laboratornyy praktikum po boleznyam ryb*. Moscow. Legkaya promyshlennost (in Russian).
- Pravdin, I.F. (1966). *Rukovodstvo po izucheniyu ryb (preimushchestvenno presnovodnykh)*. Moscow. Pishchevaya promyshlennost (in Russian).
- SOU 05.01–37–385:2006. *Voda rybohospodarskykh pidpriemstva. Zahalni vymohy ta normy* (in Ukrainian).
- Subbotkina, T.A., Subbotkina, M.F. (2003) Soderzhaniye lizotsima u razlichnykh vidov ryb v zavisimosti ot ikh sistematicheskogo polozheniya. *Proceed. All-Russian Sc. Conf. Moscow* (in Russian).
- Validation techniques (2002). Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC. *Official Journal of the European Community*.
- Van Muiswinkel, W., Vervoorn–Van Der Wal, B. (2006). The immune system of fish. *Fish Diseases and Disorders*, 1, 678-701.
- Vladimirov, V.L. (1982). Immunitet u ryb pri infektsionnykh zabolevaniyakh. *Proceed I All-Soviet Union Symp. Moscow* (in Russian).
- Vovk, N.I., Yakimchuk, O.N., Tomay, A.A., Melnik, E.N. (1997). K voprosu sovershenstvovaniya metodov izucheniya kletochnykh i gumoralnykh faktorov immuniteta ryb. *Proceed. Conf. "Fizicheskiye i biokhimicheskiye metody issledovaniy v veterinarii"*. Rovno (in Ukrainian).
-

Citation:

Tsviliovskyy, V., Vovk, N., Gavrilova, T. (2017). Method of immunoferment analysis for determination of lysozyme of mucus and fish tissues. *Ukrainian Journal of Ecology*, 7(2), 210–215.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0. License
