



點帶石斑血液中白血球分離技術探討

何書廷、黃美瑩、林金榮

水產試驗所水產養殖組

前言

石斑魚 (grouper) 具有肉質佳、味道鮮美、成長快速、飼料效率佳及經濟價值高等特性，為世界重要的養殖魚種之一 (Heemstra and Randall, 1993)。由於石斑魚在較高密度環境下仍能生存且快速成長，因此，石斑魚集約式養殖在台灣已相當普遍。然而集約式養殖若管理不善，容易導致養殖環境急劇惡化，甚而爆發嚴重疫病，造成重大經濟損失 (Chua et al., 1994; Fukuda et al., 1999)。當水產養殖生物發生疾病感染時，養殖業者常使用抗生素或化學藥劑加以治療，但抗生素使用過量，易因殘留而危害人體健康，而化學藥劑則會對環境造成污染，因此許多國家在動物生產上均制定嚴苛的抗生素及化學藥劑使用規範，必須尋求其他方式以維持養殖生物之健康。

魚類對於感染原的入侵會啟動非特異性及特異性的免疫機制，尤其以非特異性的免疫較為重要。目前有相當多的研究報告顯示，適當的使用免疫激活物 (immunostimulants) 可以增加非特異性及特異性的免疫反應，提高魚隻的抗病能力，對於提升水產生物的養殖成效及預防疾病具有良好的效果 (Geng et al., 2011; Gupta et al., 2008; He et al., 2003)。

免疫激活物的主要免疫分析指標包括白血球吞噬作用 (phagocytic activity)、超氧歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 及呼吸爆裂活性 (respiratory burst activity, RBA) 等 (Ai et al., 2011; He et al., 2003; Siwicki et al., 1994)。上述分析項目大多需將魚隻血液中的白血球單獨分離出來，但一般研究報告有關白血球分離技術則較少詳細說明，而且血液的操作不當，容易引起溶血或凝血，影響後續分析。本試驗以點帶石斑為試驗魚種，測試兩種常用的抗凝血劑 (heparin 與 EDTA) 之抗凝血效果，並參考 Cheng et al. (2009) 之密度梯度法 (percoll)，測試不同濃度 percoll 分離白血球之效果，以期順利取得白血球進行後續免疫相關分析試驗。

血液凝固的機制與抗凝血劑作用原理

血液凝固需要鈣離子的參與，待多種凝血因子活化後，反應產生凝血酶原活化物 (prothrombin activator)，促使凝血酶原轉變成凝血酶 (thrombin)，再由凝血酶分解纖維蛋白原 (fibrinogen) 產生纖維蛋白胨肽 (fibrinopeptides) 並活化凝血因子 X III，造成纖維蛋白的沉積和交叉結合而形成凝血

(王, 1991), 若加入抗凝血劑阻斷其中一個環節, 血液就無法順利凝固。

低劑量的 heparin 可抑制凝血因子活化, 使凝血酶原無法轉化成凝血酶, 而達到防止凝血的效果。較高劑量的 heparin 可直接抑制凝血酶的活化, 使纖維蛋白原無法轉化成纖維蛋白, 阻擾凝血作用的繼續發生。但 heparin 不能分解纖維蛋白, 因此無法溶解已形成的血塊, 但能防止血塊繼續擴大 (衛教週報, 2002)。而另一種抗凝血劑 EDTA, 則可透過與血液中的鈣離子螯合形成配位化合物, 進而阻止血液凝固。

密度梯度法分離細胞原理

不同種類的血液細胞密度各異, 如紅血球含有血紅素, 而血紅素中又含有鐵, 在血球細胞中的密度最大。利用不同溶液的密度, 使細胞在離心的過程中, 分布在與其密度相同的溶液介面, 不同沉降係數的粒子可利用離心法在密度梯度中作分離, 而常用的分層液有 ficoll 和 percoll 兩種。

Ficoll 之主要成分是一種合成的蔗糖聚合物, 稱聚蔗糖, 分子大小約 2–7 nm, 具有高密度、低滲透壓、無毒性的特點。但高濃度的 ficoll 溶液黏性高, 易使細胞聚集, 所以通常會先添加泛影葡胺 (Hypaque), 降低其黏度後再使用 (李, 2010; Wikipedia, 2012)。

Percoll 是一種含聚乙 烯吡咯烷酮 (polyvinyl pyrrolidone, PVP) 的矽膠顆粒混懸液, 擴散常數低, 所形成的梯度十分穩定, 經過高速離心後可形成一個連續密度梯度,

將比重不同的細胞分層分離。此外, percoll 不穿透生物膜, 對細胞無毒性與刺激性, 因此廣泛用於分離細胞、細菌、病毒及細胞內胞器, 還可將受損細胞及其碎片與完好的活細胞分離 (金, 2007)。本試驗以 percoll 溶液進行血液分離測試。

材料與方法

一、試驗魚種

點帶石斑 (Orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*)。

二、不同抗凝血劑之抗凝血試驗

有關 heparin 的適用濃度鮮少被討論, 故根據製造廠商建議的使用濃度 20–50 units/ml 擴大, 以 L-15 medium 配製不同濃度之 heparin 各 1 ml, 分別調製為 4、10、20、40 及 120 units/ml 共五種, 再加入 0.7 ml 石斑魚血液, 於 4°C 下靜置觀察其變化。另, 利用生理食鹽水配製不同濃度之 EDTA, 分別為飽和 EDTA、10% EDTA 及 125 mM EDTA 共三種, 將 50 μ L 上述不同濃度之 EDTA 與 1 ml L-15 medium 均勻混和後, 加入 0.7 ml 石斑魚血液, 於 4°C 下靜置觀察其變化。

三、不同濃度之 percoll 密度梯度法分離白血球之比較

本試驗將市售 percoll 與 10 倍濃度生理食鹽水以 9:1 比例調製成等滲透壓之 percoll 溶液, 再以生理食鹽水稀釋成 45%、47%、50% 及 55% 四種濃度之 percoll 備用。抽取石斑魚血液 0.7 ml, 加入裝有 50 μ L 125 mM EDTA 與 1 ml L-15 medium 之微量離心管

中，避免血液凝固，再將此混合液分別緩緩加入含有 4 ml 45%、47%、50% 及 55% percoll 之離心管，並小心使其分層（圖 1），以 $400 \times g$ 離心 15 分鐘（ 4°C ）後（圖 2），抽取分層之界面液體 2 ml 加至另一離心管中，再加入 3 ml HBSS (Hank's balance salt solution)，於 $600 \times g$ 離心 10 分鐘（ 4°C ）後（圖 3），去除上清液，共重複三次，最後將沉澱物溶入 1 ml L-15 medium，以血球計數盤計算白血球濃度（圖 4）。

結果與討論

一、不同抗凝血劑之抗凝血效果

(一) Heparin

在點帶石斑血液中分別添加 4、10、20、40 及 120 units/ml 等五種不同濃度的 heparin，觀察其抗凝血效果。結果顯示，此五種濃度的 heparin 之抗凝血效果均不甚穩定，同一血液樣品有時不會凝血，有時會產生凝血塊，效果均不甚理想。故推測本試驗所測試之 heparin 濃度（4—120 units/ml）尚無法有效抑制點帶石斑血液凝血因子的活化，使部分凝血酶原轉化成凝血酶，導致點帶石斑血液之凝固。

(二) EDTA

以配製之飽和 EDTA、10% EDTA 及 125 mM EDTA 加入點帶石斑血液中，結果顯示均具有很好的抗凝血效力。由於血液凝固需要鈣離子的參與，故推測 125 mM EDTA 就足夠將血液中的鈣離子螯合形成配位化合物，進而阻止點帶石斑血液之凝固。

二、不同濃度 percoll 分離白血球效果

以 percoll 進行點帶石斑血液中之白血球分離，結果顯示，45%、47%、50% 及 55% 四種 percoll 濃度均可分離點帶石斑血液中之白血球，所分離出之白血球濃度依序為 $2.42 \times 10^7 \text{ cell/ml}$ 、 $2.48 \times 10^7 \text{ cell/ml}$ 、 $5.27 \times 10^7 \text{ cell/ml}$ 及 $4.26 \times 10^7 \text{ cell/ml}$ 。一般進行免疫指標分析所需的白血球濃度為 10^7 cell/ml ，而本試驗所分離出之白血球濃度均在 10^7 cell/ml ，其中則以 50% percoll 所分離之 $5.27 \times 10^7 \text{ cell/ml}$ 略勝一籌。此外，45%、47%、50% 及 55% 四種濃度 percoll 將血球分層之效果均佳，但以 50% 及 55% percoll 之分層效果較好（圖 2），比較容易以微量吸管準確的吸取該層，因此所分離之白血球濃度較高。

以 percoll 分離點帶石斑血液中之白血球的效果雖佳，但因其價格較高（約 5,000 元/100ml），若從經濟面考量，使用濃度越低越能節省經費，故嘗試以 40% percoll 進行初步測試，結果魚血液混合液與 percoll 之分層情形不甚理想。因此，本試驗採用 45%、47%、50% 及 55% 四種濃度，雖然皆可順利分離出點帶石斑血液中之白血球，但若以分離效果及配製方便為前提的話，建議以 50% percoll 進行試驗。

結語

本試驗添加 4—120 units/ml 等五種不同濃度的 heparin 於點帶石斑血液，但抗凝血效果均不甚理想。以飽和 EDTA、10% EDTA 及 125 mM EDTA 加入點帶石斑血液後，則均獲致良好的抗凝血效力。Heparin 價格高於 EDTA，效果又不佳，因此建議以 EDTA 作

科技研究

為點帶石斑之抗凝血劑為宜。有關點帶石斑血液中之白血球分離效果比較，以 45%、47%、50% 及 55% 四種 percoll 濃度均可分離點帶石斑血液中之白血球，但若以分離效果及配製方便，則以 50% percoll 進行試驗較佳。

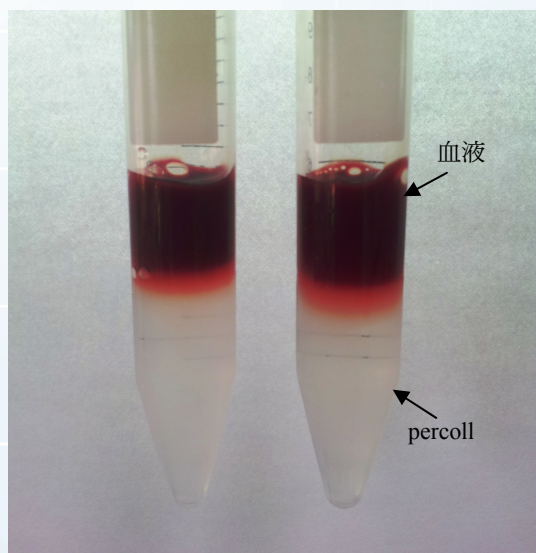


圖 1 魚血混合液加入 percoll 溶液

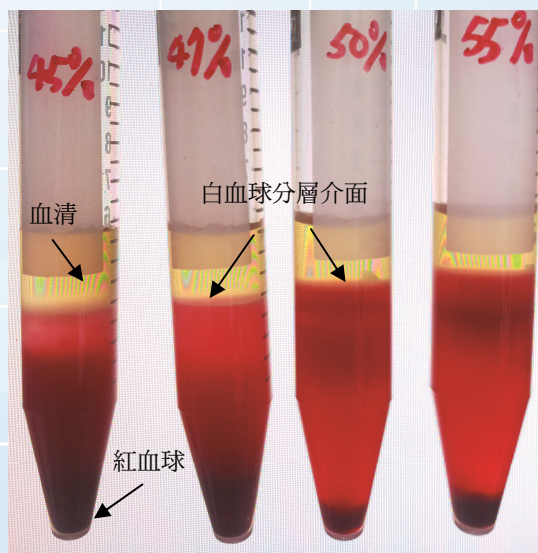


圖 2 離心後魚血混合液於 percoll 中的分層情形，由左至右依序為 45%、47%、50% 及 55% percoll

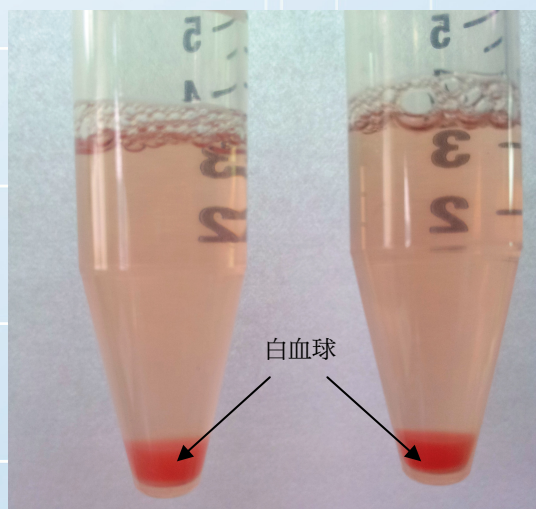


圖 3 白血球界面液體以 HBSS 清洗並離心後之情形，底部的沉澱物為白血球

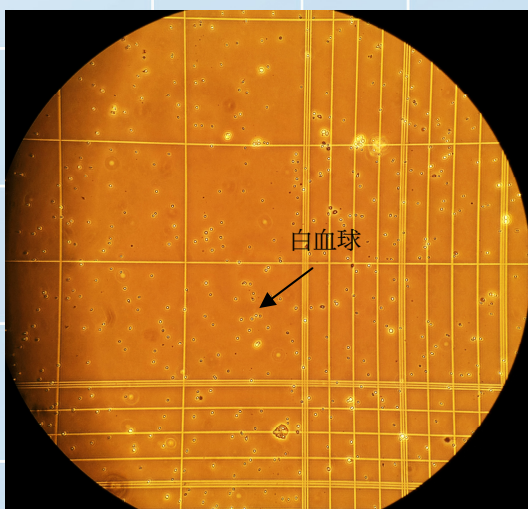


圖 4 以血球計數盤計算白血球濃度

謝辭

本試驗承蒙中央研究院細胞與個體生物研究所一宜蘭臨海研究站邱助理研究員品文提供之魚類抗凝血的相關寶貴經驗，特此致謝。