

文章编号:1000 - 0615(2001)04 - 0359 - 05

中国对虾血淋巴抗凝剂的筛选

蒋 琼, 王 雷, 罗日祥

(中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071)

摘要:依据中国对虾血细胞电镜照片中血细胞整体形态和细胞器、细胞核的变化,研究对虾抗凝剂成分配比。初步确认了一种理想的抗凝剂配方 NaCl 450mM、KCl 10mM、EDTA·Na₂ 10mM、HEPES 10mM (pH 7.45)。它能够良好的保持细胞的整体形态以及细胞器、细胞核的形态。

关键词:中国对虾;血细胞;抗凝剂;筛选

中图分类号:S917 **文献标识码:**J

Selection of Anticoagulant to the Hemolymph of *Penaeus chinensis*

JIANG Qiong, WANG Lei, LUO Ri-xiang

(Institute of Oceanology, CAS, Qingdao 266071, China)

Abstract: The morphology of the whole hemocyte and the variation of organelle and nucleus were observed by TEM in order to determine the composition of shrimp anticoagulant. A confirmed desirable anticoagulant is composed of NaCl 450mM, KCl 10mM, EDTA·Na₂ 10mM, HEPES 10mM (pH 7.45), which can maintain successfully the form of the whole hemocyte, organelle and nucleus.

Key words: *Penaeus chinensis*; hemocyte; anticoagulant; selection

中国对虾是中国一种重要的海水养殖经济动物,但从 1993 年开始受到了前所未有的养殖病害袭击,随之,中国对虾的抗病力研究、免疫机理的研究也被推向高潮。

在免疫机理的研究方面,血淋巴的免疫防御功能是最基础、最重要的研究方向。中国对虾的血淋巴在离体后很容易凝集,也极易在抽血过程中发生凝集。凝集后的血淋巴没有办法逆转,也就不能对其成分进行研究,所以找出适合中国对虾的抗凝剂是中国对虾免疫学、细胞化学研究中必不可少的重要环节。一种理想的抗凝剂不仅能使血液不发生凝固,而且应该能维持血细胞的完整性和功能性,以及血清中各种蛋白的活性,使离体后的血淋巴状态尽量接近体内的生理状况。

本文以血细胞的状态为依据,衡量抗凝剂成分的优劣,其中血细胞的分类方法主要依据 Martin 等^[1]在 1990 年提出的分类标准,即严格依据颗粒的有无和核质比等特征来区分血细胞类型,将中国对虾的血细胞分为透明细胞(HG)、大颗粒细胞(LG)、小颗粒细胞(SG)三类。

其中,透明细胞是几种细胞中最小的一种,它有一个或两个非常大的核,核质比非常高。而且它的细胞质较别种血细胞的电子密度高,存在着许多既不是糖蛋白也不是核糖体的小沉淀物。透明细胞中也可能存在颗粒,为卵圆形,有交替的电子致密层和透明物质。Hose 等^[2]认为凝集过程是由透明细胞引发。

收稿日期:2000-08-14

基金项目:国家“973”课题资助项目(G1999012005);国家“95”攻关计划课题中子专题(96005301)

第一作者:蒋 琼(1976-),女,硕士生。Tel.:0532-2879079, E-mail:jiangqiong@ms.qdio.ac.cn

颗粒细胞包括大颗粒细胞(LG)和小颗粒细胞(SG),一般情况下,较透明细胞大,含有大小不均的许多颗粒状物质。颗粒细胞是免疫防御的一线细胞,在颗粒细胞中存在大量酶类反应的活性位点,例如:溶酶体酶,这种酶经常被观察存在于反面高尔基体囊泡、小泡中,而不是颗粒中。另外,颗粒细胞还负责吞噬和包囊^[3]。由此,本文依据电镜照片中血细胞整体形态和细胞器、细胞核的变化对抗凝剂进行研究,力图寻找到一种适应于中国对虾血淋巴的抗凝剂。同时,也对不同细胞中的细胞器和细胞核进行了仔细的观察、研究。

1 材料与方

1.1 所选抗凝剂的配方

实验过程中一共选用了四种以往甲壳类动物中被广泛采用的抗凝剂。配方1最早是 Stutman 和 Dolliver^[4]在 1968 年就提出了,后来经过逐渐改进得到的。Martin 等^[1]将其应用于单肢虾(*Sicyonia ingentis*)中,认为它有抗凝作用。配方2来自蟹(*Carcinus maenus*)生理盐水的配方^[5]根据中国对虾的体液性质略做调整。配方3是 S derh ll 和 Smith^[6]设计的,后被广泛应用于甲壳纲十足目动物中。配方4是由 Vargas-Albores 等^[7]提出的一种新的抗凝剂,充分考虑到了抗凝剂的 pH 和渗透压需与体内血淋巴的值相同。他主要是将其应用于加州对虾(*Penaeus californiensis*),证明能够很好抑制蛋白沉淀和保持细胞活性。加州对虾的血淋巴 pH 7.3 和渗透压 850mOsm \cdot kg⁻¹与 Huang 等提出的中国对虾的血淋巴 pH 7.5 和渗透压 870mOsm \cdot kg⁻¹^[8]非常接近。所以我们适当调整后使用了这种配方。

配方 1		配方 2		配方 3		配方 4	
柠檬酸钠	50mM	NaCl	580mM、	柠檬酸	200 mM、	NaCl	450mM、
EDTA. Na ₂	10mM	CaCl ₂ · 6H ₂ O	13mM、	柠檬酸三钠	30 mM、	KCl	10mM、
(pH 7.3)		Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0.54mM、	葡萄糖	100mM、	EDTA. Na ₂	10mM、
		KCl	12.6mM、	EDTA. Na ₂	10mM、	HEPES	10mM
		MgCl ₂ · 6H ₂ O	28mM、	NaCl	510mM	(pH 7.45)	
		Tris	50mM	(pH 7.3)			
		(pH7.3)					

1.2 实验步骤

实验材料:购自青岛四方路水产批发市场,为产卵后亲虾,体长 17~18cm。所有抗凝剂均新鲜配制,冰箱中预冷至 10℃。

样品制备:分别抽取 3mL 抗凝剂在注射器中,从对虾心脏抽取 2mL 血淋巴,将混合物注入离心管中。若 10min 后不凝集则继续后续电镜制片过程。配方4与虾血淋巴的混合物放置 1h 后进行电镜制片。

电镜制片步骤:混合物离心(1000rpm, 8min),将收集到的血细胞用缓冲液洗两次(0.1M 二甲砷酸盐,7%葡萄糖,pH 7.45),沿管壁加入 1~2mL 固定液(3%戊二醛、0.1M 二甲砷酸盐、12%蔗糖,pH 7.5),预固定 30min 令细胞聚集成团,再将细胞团块铲离管底,翻面继续固定过夜。后固定在缓冲液为二甲砷酸盐的钨酸中。乙醇脱水,环氧树脂 Eton812 包埋、切片。醋酸铀和柠檬酸铅双染色。日立 H7000 透射电镜观察。

2 实验结果

四种配方中 1、2、4 成功起到抗凝剂效果,配方 3 反复实验三次,但都出现凝集现象。所以对 1、2、4 进行进一步电镜观察。

血细胞对照照片参考叶燕玲和陈宽智^[9]对中国对虾进行超微结构分析、计数及分类的结果。因为

他们的实验材料为同期中国对虾亲虾,血淋巴离体后直接固定,未采用任何抗凝剂,而且,他们对血细胞的分类采用的也是 Martin^[1]等提出的分类方法。

2.1 颗粒细胞的观察结果

(图版 1~4)表明各种抗凝剂都对颗粒细胞有影响,颗粒细胞不同程度的出现了水肿和膨胀,其中在配方 2 中观察到颗粒溶解的现象(图版 - 2)。

2.2 透明细胞的观察结果

各种抗凝剂对透明细胞的影响要小于颗粒细胞(图版 5~8),水肿和膨胀的程度要轻一些,可能是由于颗粒细胞有吞噬和包裹外来物质的功能,所以它受外来物质的影响就要大一些。

2.3 细胞器的观察结果

高尔基体 由于高尔基体在细胞中的含量较少,而电镜照片数量有限,故只在配方 4(10min)和配方 2 中观察到。配方 4(10min)中的高尔基体,其扁囊结构、层次清晰可见,小泡结构也很清楚。(图版 - 2)是配方 2 中观察到的,能够很明显的看出状态不如配方 4(10min)中的好。

线粒体 存在于各种细胞中,但分布不均匀,有的细胞多,有的细胞少,双层膜及嵴结构清晰可见(图版 - 3)。配方 1 对它的影响很大,剧烈膨胀,充满染色浅的液状物质(图版 - 1)。

内质网 各种细胞中均存在粗面和滑面内质网,细胞质中有游离的核糖体。内质网均有一定程度的膨胀,粗面内质网有脱颗粒现象,但在配方 4(10min)中程度很轻,而在配方 1 中则很难观察到有核糖体存在的粗面内质网(图版 - 1)。

2.4 细胞核的观察结果

核膜 变化都不大,在配方 4 中基本无变化。但在配方 1 中局部有溶解现象。

核质 由各图均可以看出,各种细胞中核质都较均匀,但也观察到了核膜皱缩的现象。

总体来说,各种抗凝剂对细胞核的影响都不大。

3 讨论

从电镜照片中很容易发现配方 4 是一种良好的抗凝剂,它不仅将细胞整体状态维持得较好,而且各个细胞器的状态也都正常。特别难得的是血细胞在这种抗凝剂中 1h 后,仍能维持比较好的状态。这样就给研究工作提供了非常充裕的时间。

配方 2 也是一种较为理想的抗凝剂,虽然在电镜照片中有伪足状突起(图版 - 2),但这种突起很有可能是实验过程的误差引起,在实际观察中比例也并不是很大。六十年代的时候,曾有学者认为甲壳动物血细胞为变形虫状,但后来随着固定液的改进,大家一致认为在正常状态下中国对虾血细胞呈圆形或卵圆形,然而在某些环境条件或生理条件下,血细胞有形成伪足的能力。

配方 1 对细胞有破坏作用,但其配方简单。在实验条件比较差或紧急的情况下,可以考虑采用。

配方 3 在甲壳动物中被广泛采用,但笔者认为对中国对虾的血淋巴来说,它不能起到抗凝的效果,可能它对蟹类更为有效。

4 结语

从细胞形态的观察来看我们认为配方 4 是一种较理想的抗凝剂,从实验中发现,它的加入量在 1~1.5 倍血淋巴之间,一般来说,从血窦中抽取的血淋巴,加入 1 倍的量即可,但从心脏中抽取的则需 1.5 倍量。同时,它还受到对虾健康状况的影响。实验中,最好新鲜配制,储存的时间不宜超过一个月。

单从细胞形态的角度判断一种抗凝剂的优劣有一定局限性,还应参考细胞酶化学的指标和血清酶化学的指标,以及血淋巴中多种蛋白质的变化。这部分工作有待进一步完善。

参考文献:

- [1] Martin G G, Hose J E, Omori S, et al. Localization and roles of coagulogen and transglutaminase in hemolymph coagulation in decapod crustaceans[J]. *Comp Biochem Physiol*, 1990, 100B(3):517 - 522.
- [2] Hose J E, Martin G G, Gerard A S. A decapod classification scheme integrating morphology, cytochemistry and function[J]. *Biol Bull*, 1990, 178:33 - 45.
- [3] Martin G G, Hose J E, Vascular Elements and blood (hemolymph) [J]. *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, 1992, 10:117 - 146.
- [4] Stutman L J, Dolliver M. Mechanism of coagulation in *Geocacinus lateralis* [J]. *Am Zool*, 1968, 8:481 - 489.
- [5] Cornick J W, Stewart J E. Partial characterization of a natural agglutinin in the hemolymph of the lobster, *Homarus americanus* [J]. *J Invertebr Pathol*, 1973, 21(3):255 - 262.
- [6] Söderhäll K, Smith V J. Separation of hemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution [J]. *Devel Comp Immunol*, 1983, 7:229 - 239.
- [7] Vargas - Albores F, Guzman Maria - Antonia, Ochoa Jose - Luis. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*) [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1993, 106A(1):299 - 303.
- [8] Huang J, Song X L, Yu J, et al. The components of an inorganic physiological buffer for *Penaeus chinensis* [J]. *Methods Cell Sci*, 1999, 21(4):225 - 230.
- [9] 叶燕玲、陈宽智. 中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 血细胞超微结构、分类及计数 [J]. *青岛海洋大学学报*, 1993, 23(2):35 - 42.

欢迎订阅 2002 年《应用生态学报》

《应用生态学报》(1990 年创刊) 是经国家科委批准、科学出版社出版的国内外公开发行的综合性学术刊物。本刊宗旨是坚持理论联系实际、结合科研、教学、生产实际, 报导生态科学诸领域在应用基础研究方面具有创新的研究成果, 交流基础研究和应用研究的最新信息, 促进生态学研究为国民经济建设服务。

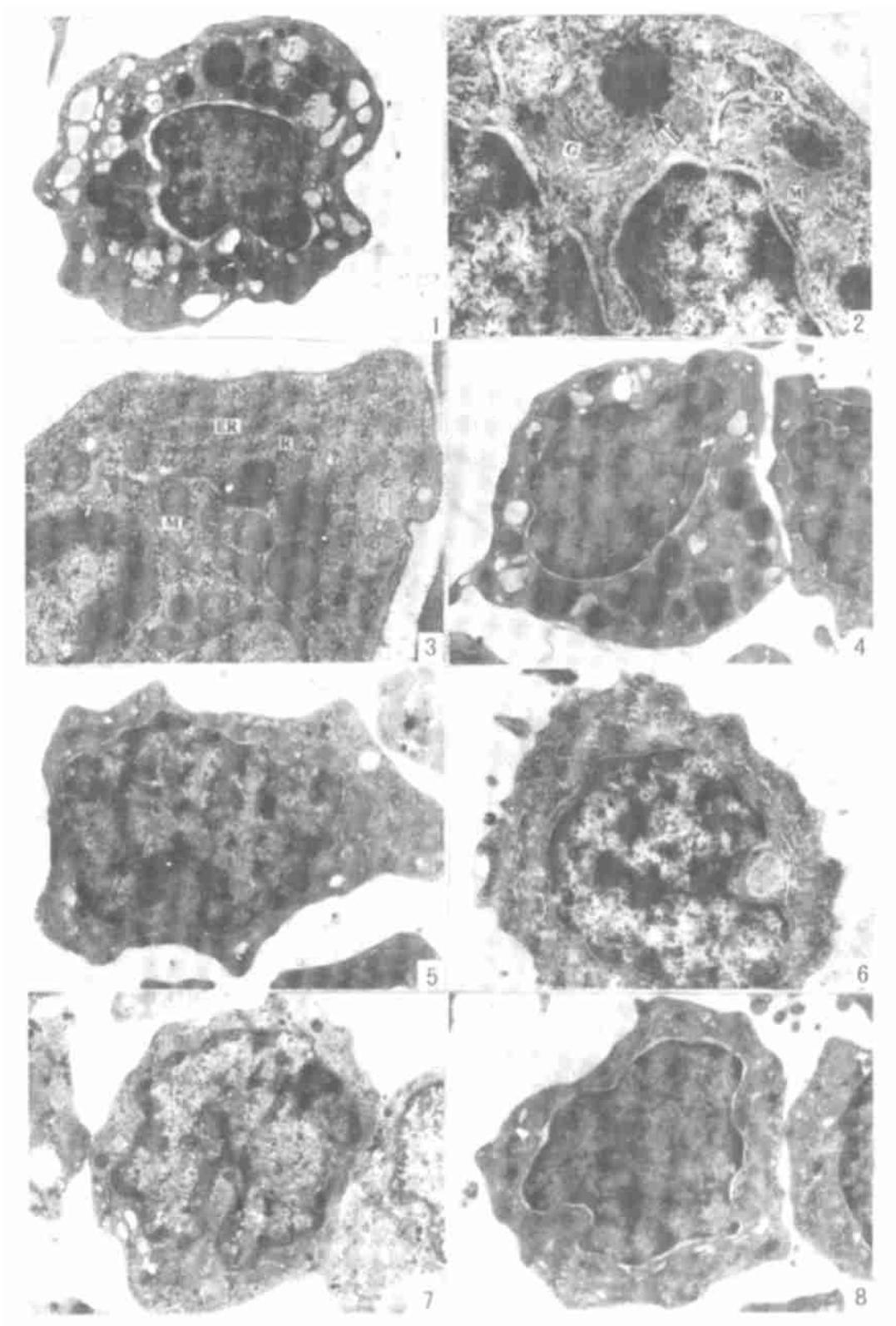
本刊专门登载有关应用生态学(主要包括森林生态学、农业生态学、草地牧业生态学、渔业生态学、自然资源生态学、全球生态学、污染生态学、生态工程学等)的综合性论文、创造性研究报告和研究简报等。

本刊读者对象主要是从事生态学、地学、林学、农学和环境科学研究、教学、生产的科技工作者, 有关专业的大学生及经济管理和决策部门的工作人员。

本刊为月刊, A4 开本, 128 页, 每月 18 日出版, 期定价 20.00 元, 全国各地邮政局(所)均可订阅, 邮发代号 8 - 98, 错过订期也可直接向本刊编辑部邮购, 个人订阅优惠 30%。

地址: 辽宁省沈阳市文化 72 号《应用生态学报》编辑部 邮编: 110016

电话: 024 - 23916250 E-mail: cjae@iae.ac.cn



1. 加入配方 1 十分钟后对颗粒细胞的影响 $\times 6\ 000$; 2. 加入配方 2 十分钟后对颗粒细胞的影响, 箭头所指为局部溶解的颗粒 $\times 23\ 200$; 3. 加入配方 4 十分钟后对颗粒细胞的影响, 线粒体(M)、内质网(ER)、核糖体(R)的结构 $\times 26\ 100$; 4. 加入配方 4 一小时后对颗粒细胞的影响 $\times 7\ 500$; 5. 加入配方 1 十分钟后对透明细胞的影响 $\times 10\ 500$; 6. 加入配方 2 十分钟后对透明细胞的影响 $\times 8\ 400$; 7. 加入配方 4 十分钟后对透明细胞的影响 $\times 7\ 000$; 8. 加入配方 4 一小时后对透明细胞的影响 $\times 7\ 350$ 。