

文章编号: 1674 - 5566(2013)02 - 0194 - 06

干露下三疣梭子蟹家系间血淋巴免疫因子活性差异分析

陈百尧¹, 伏光辉¹, 安 健¹, 于 飞¹, 孙苗苗¹, 徐 静², 高 焕²

(1. 江苏连云港市海洋与水产科学研究所, 江苏 连云港 222042; 2. 淮海工学院 江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005)

摘 要: 分别设置了10 ℃、20 ℃和30 ℃ 3个温度干露条件, 比较了不同三疣梭子蟹家系血淋巴酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、过氧化氢酶(CAT)、一氧化氮(NO)含量、过氧化物酶(POD)等5种非特异免疫因子活性随干露时间延长的变化情况。结果表明, 酸性磷酸酶(ACP)指标在3个家系间没有差异, 碱性磷酸酶(AKP)、过氧化氢酶(CAT)、一氧化氮(NO)含量和过氧化物酶(POD)在3个家系间存在着差异, 其中一氧化氮含量(NO)可以作为指示家系是否具有耐干露特性的一个指标。在此基础上, 进一步探讨了这些差异的原因及在培育三疣梭子蟹耐干露新品种上的意义。

研究亮点: 甲壳类耐干露特性研究目前还很少, 而对不同温度干露下三疣梭子蟹各免疫因子的活性变化情况还未见报道, 本文对此展开了研究, 并在此基础上探讨了哪些免疫酶指标可以作为选育耐干露新品种的选育指标, 这对于如何选择培育三疣梭子蟹耐干露新品种的方法具有参考价值。

关键词: 三疣梭子蟹; 干露; 温度; 免疫因子; 家系

中图分类号: S 966. 16

文献标志码: A

干露是指水生动物短时间或长时间离开水体而停留在空气、沙或土壤等介质的一种状态^[1], 而这一状态是经济水产生物的养殖和销售过程中经常遇到的现象。目前, 已经有不少研究关注水生生物干露下的生物学特征, 如于瑞海等^[2]研究不同发育期太平洋牡蛎在干、湿两种干露条件下的存活率, 杨凤等^[3]研究了不同大小的长竹蛭苗耐干露下的心率变化等特征。研究干露下的生物机体特征, 一方面可以让我们了解生物在环境变化下的生理学特征方面的知识, 另一方面也对我们应用这些知识服务生产和生活提供了帮助, 如选育耐干露的养殖新品种。

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)作为海捕和养殖的重要经济蟹类, 在我国沿海渔获及养殖产量很高。但其也是离开水很易死亡的蟹类, 而死亡后的经济价值大打折扣, 因此培育耐干露的抗逆新品种是三疣梭子蟹新品种选育的一个重要目标。目前, 干露下三疣梭子蟹机体内的各

种非特异免疫因子的活性变化情况还未见研究报道, 本文期望通过检测三疣梭子蟹不同家系在不同干露温度下各种免疫相关因子活性上的差异, 以期阐明是否可以把其中一些因子的活性作为选育新品种的指标, 进而为选育耐干露的新品种提供基础生物学知识和理论指导。

1 材料与方 法

1.1 家系材料

家系培育所用亲蟹为连云港本地捕获的野生三疣梭子蟹, 每个亲蟹的后代分别单独饲养于一个室内水泥池中。在仔蟹发育到5~6期, 取出各家系中大小相近的三疣梭子蟹进行实验。

1.2 方 法

1.2.1 干露条件设置

共选取3个家系(编号#1、#2和#3), 将每个家系分为3组, 每组30只, 每只蟹放置在一个烧杯里。共设置10 ℃、20 ℃和30 ℃ 3个温度干露

收稿日期: 2012-09-20 修回日期: 2012-11-05

基金项目: 江苏省科技支撑项目(BE2009339); 江苏省水产三项工程项目(K2008-6); 江苏省“333”工程(2010); 江苏省“六大人才高峰”项目(2009)

作者简介: 陈百尧(1966—), 男, 硕士, 高级工程师, 研究方向为海洋生物种质资源创新。E-mail: chengong66@126.com

条件,以水浴的方式把每个烧杯置于相应温度下的塑料泡沫箱里。用温度计测量烧杯中的实际温度,并通过控制烧杯外水体的温度来实现烧杯内温度稳定在所需的 10 ℃、20 ℃ 和 30 ℃ 3 个温度(温度误差 ± 1 ℃)。另外从 11 个家系混合后的养殖群体中随机选取 30 只大小与实验组相近的三疣梭子蟹作为对照,对照组仍然饲养于室内水泥池中,水温 25 ℃ 左右。分别在干露后 0、30、60、120、180、240 min 6 个时间点各取样 5 只梭子蟹,提取血淋巴液。

1.2.2 干露下各家系存活时间测定

分别在室温 28 ℃ 下测定每个家系干露下的存活时间。每个家系设置一组,每组 30 只,观察并记录各个家系梭子蟹死亡情况,判断死亡标准为用镊子碰触梭子蟹个体无任何生命反应特征,当把其重新放入水中进行恢复时,5 min 内也无任何生命特征。

1.2.3 血淋巴制备

用注射器从三疣梭子蟹第 3、第 4 步足或游泳足基部插入取血淋巴,置于 Eppendorf 管中,并与抗凝剂 (NaCl 450 mmol/L, KCl 10 mmol/L, EDTA-2Na 10 mmol/L, HEPES 10 mmol/L) 1:1 混合均匀,经冷冻高速离心后吸出上层血清待测酶活性。

1.2.4 非特异免疫因子活性测定

本实验所用药品购自南京生物工程研究所,共测定 5 种非特异免疫因子的活性或含量:酸性磷酸酶 (ACP)、碱性磷酸酶 (AKP)、过氧化氢酶 (CAT)、一氧化氮 (NO) 含量、过氧化物酶 (POD)。相关酶活性的测定方法参考试剂盒说明书进行。血清中蛋白含量采用考马斯亮蓝法测定,具体参见试剂盒使用说明书。牛血清白蛋白 (AMRESCO 公司) 为标准蛋白。

1.2.5 数据处理

所用数据为各个平行试验结果的平均值,采用 SPSS 11.0 软件进行方差分析 (ANOVA) 和多重比较 (LSD 法), $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 各家系耐干露特征

各家系在干露下平均存活时间依次为: #2 为 371.2 min、#3 为 358.4 min、#1 为 305.6 min,即耐干露能力为 #2 > #3 > #1。方差分析结果表明,

#2 和 #3 家系间的耐干露能力差异不显著 ($P > 0.05$), 而 #2 和 #3 家系分别与 #1 家系在耐干露能力上存在着显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.2 ACP 酶活性在不同家系间的差异

ACP 酶活性在不同温度干露下随时间延长而发生变化的情况见图 1 (a、b 和 c 分别为 10 ℃、20 ℃ 和 30 ℃, #1、#2 和 #3 分别为家系 1、2 和 3; 图 2 ~ 图 5 中的标识与此相同)。在 10 ℃、20 ℃ 和 30 ℃ 情况下, 3 个家系酶活性变化趋势一致。方差分析的结果也表明, 各实验组 (10 ℃、20 ℃、30 ℃) 内及各实验组与对照组间均不存在显著性差异。此结果也说明, 不同温度干露对 ACP 活性的影响不大。

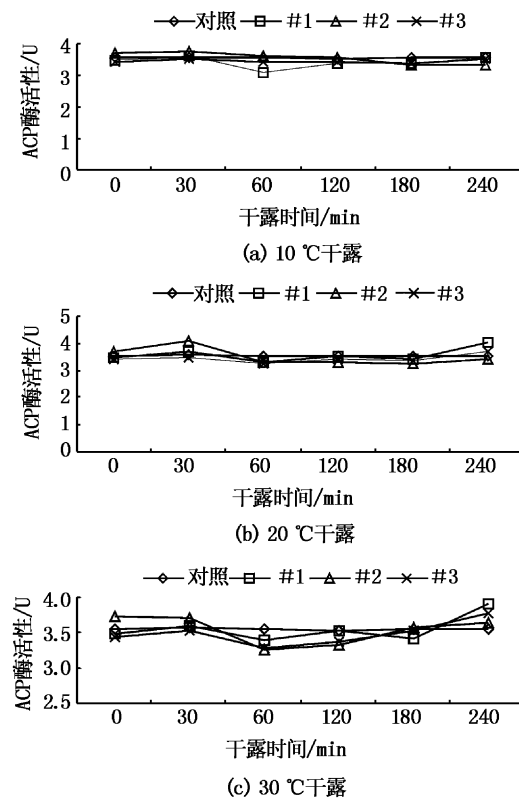


图 1 3 个家系在不同温度干露下 ACP 酶活性随时间的变化情况

Fig. 1 The change of ACP activity following the time extension in response to different desiccation temperatures in three parentages

2.3 AKP 酶活性在不同家系间的差异

AKP 酶活性在不同温度干露下随时间延长而发生变化的情况见图 2。在 10 ℃、20 ℃ 和 30 ℃ 情况下, 3 个家系酶活性变化虽然有一点差异, 但总体趋势类似。方差分析表明, 10 ℃ 干露下,

对照组与各实验组间均不存在显著性差异($P > 0.05$), 实验组中, 2 家系分别与 1 家系($P = 0.003 < 0.05$)和 3 家系($P = 0.002 < 0.05$)存在着显著性差异, 1 家系和 3 家系不存在显著性差异。20 °C 干露下, 各家系间没有发现显著性差异的存在; 30 °C 干露下, 2 家系和 3 家系间存在着显著性差异($P = 0.02 < 0.05$), 其它家系间没有检测到显著性差异。

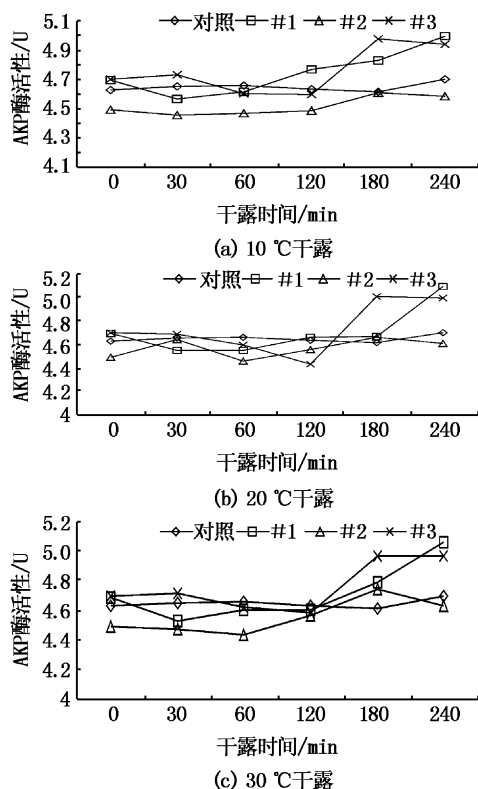


图2 3个家系在不同温度干露下 AKP 酶活性随时间的变化情况

Fig. 2 The change of AKP activity following the time extension in response to different desiccation temperatures in three parentages

2.4 CAT 酶活性在不同家系间的差异

CAT 酶活性在不同温度干露下随时间延长而发生变化的情况见图 3。方差分析表明, 各实验组(10 °C、20 °C、30 °C)内以及实验组与对照组间均不存在显著性差异。但是, 在各个温度下, 3 个家系在 CAT 酶活性的变化趋势上存在着显著差异: 10 °C 下, 3 个家系的 CAT 酶活性都是先下降, 随后上升, 在 120 min 时达到峰值, 峰值大小顺序为 #1 > #3 > #2; 在 20 °C 下, CAT 酶活性在 1# 中是先下降, 在 60 min 处达到最低值, 随后

上升, 而 #2 和 #3 是先上升, 分别在 60 min 和 120 min 处开始下降, 随后再次上升; 在 30 °C 下, CAT 酶活性在 #1 中也是先下降, 在 60 min 处达到最低值, 随后上升, 而 #2 是先下降(0 ~ 30 min), 再上升(30 ~ 60 min), 随后又下降(60 ~ 120 min), 最后再次上升(120 ~ 240 min), #3 则是先上升至 60 min 处达到峰值, 随后下降(60 ~ 180 min), 最后又略有上升(180 ~ 240 min)。

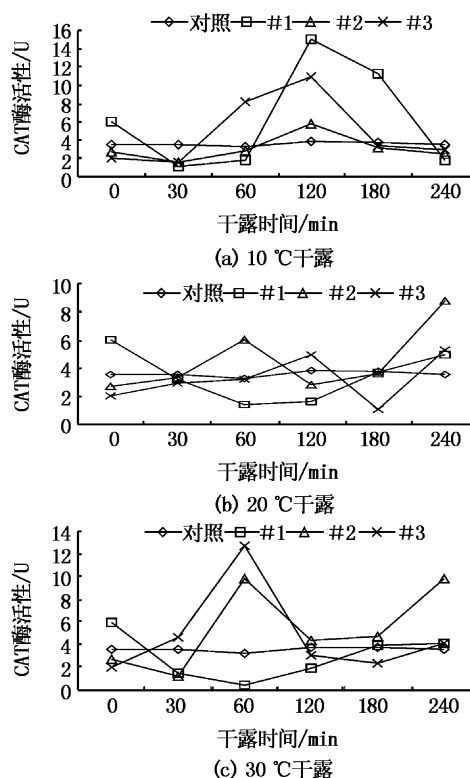


图3 3个家系在不同温度干露下 CAT 酶活性随时间的变化情况

Fig. 3 The change of CAT activity following the time extension in response to different desiccation temperatures in three parentages

2.5 NO 含量在不同家系间的差异

NO 含量在不同温度干露条件下随时间延长而发生变化的情况见图 4。在 10 °C 下, 3 个家系 NO 含量的变化趋势差异不大; 20 °C 下, #1 与 #2 和 #3 两个家系存在着明显的差别, 表现为在 #1 中 0 ~ 60 min 期间 NO 含量呈上升趋势, 随后开始下降, 而 #2 和 #3 家系是 0 ~ 60 min 期间先下降, 随后上升; 30 °C 情况下, 3 个家系 NO 含量的变化趋势差异不大。

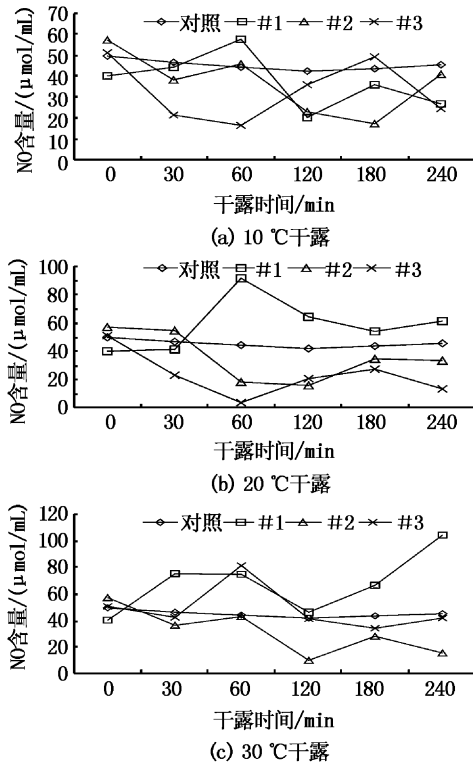


图4 3个家系在不同温度干露下 NO 含量随时间的变化情况

Fig. 4 The change of NO contents following the time extension in response to different desiccation temperatures in three parentages

方差分析的结果也表明, 10 °C 下, 3 个家系与对照组间及 3 个家系之间都不存在显著性差异; 20 °C 下, 对照组与 3 家系存在着显著性差异 ($P=0.021 < 0.05$), 1 家系与 2 家系 ($P=0.016 < 0.05$) 和 3 家系 ($P=0.001 < 0.05$) 都存在着显著性差异, 而 2 家系与 3 家系间不存在显著性差异, 此结果与各家系耐干露特征相吻合; 30 °C 下, 对照组与 1 家系存在着显著性差异 ($P=0.029 < 0.05$), 1 家系与 2 家系 ($P=0.001 < 0.05$) 存在着显著性差异, 1 家系与 3 家系以及 2 家系与 3 家系间不存在显著性差异。

2.6 POD 酶活性在不同家系间的差异

POD 酶活性在不同温度干露条件下随时间延长而发生变化的情况见图 5。10 °C 下, #2 和 #3 的变化趋势类似, 而 #1 的变化趋势与 #2 和 #3 显著不同。20 °C 下, 在 #1 中, POD 酶活性在 0 ~ 180 min 阶段呈上升趋势, 180 ~ 240 min 开始下降; 在 #2 中, POD 酶活性在 0 ~ 60 min 阶段呈上升趋势, 随后在 60 ~ 180 min 阶段呈下降趋势, 随后又

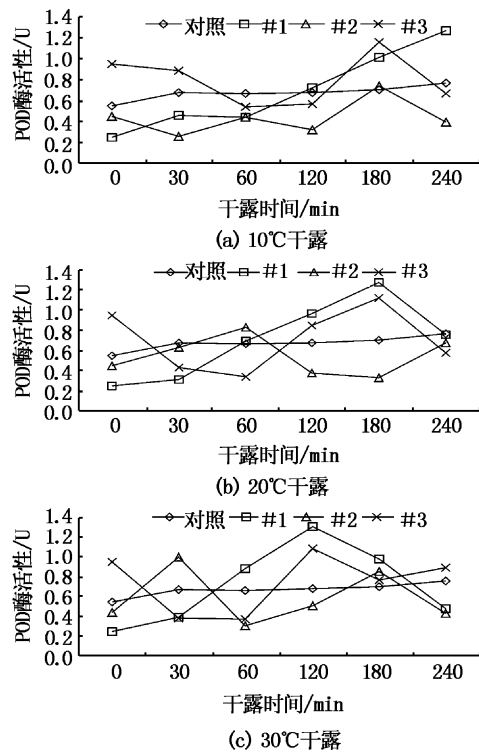


图5 3个家系在不同温度干露下 POD 酶活性随时间的变化情况

Fig. 5 The change of POD activity following the time extension in response to different desiccation temperatures in three parentages

开始上升; 在 #3 中, POD 酶活性在 0 ~ 60 min 阶段呈下降趋势, 在 60 ~ 180 min 呈上升趋势, 达到峰值后开始下降。30 °C 下, 在 #1 中, POD 酶活性在 0 ~ 120 min 阶段呈上升趋势, 180 ~ 240 min 开始下降; 在 #2 中, POD 酶活性在 0 ~ 30 min 阶段呈上升趋势, 在 30 ~ 60 min 阶段下降, 60 ~ 180 min 阶段又开始上升, 随后又开始下降, 起伏波动较大; 在 #3 中, POD 酶活性在 0 ~ 60 min 阶段呈下降趋势, 60 ~ 120 min 阶段呈上升趋势, 随后开始下降, 并在最后 240 min 处又略有上升。方差分析表明, 10 °C 下, 2 家系与 3 家系间存在着显著性差异 ($P=0.020 < 0.05$), 其它家系间及各家系与对照组间不存在显著性差异; 20 °C 下, 对照组与各家系间, 及各家系之间都不存在显著性差异; 30 °C 下, 对照组与各家系间, 及各家系之间都不存在显著性差异。

3 讨论

大多数海洋甲壳类生物干露条件下的存活

时间都不是很长,如虾蛄(*Oratosquilla oratoria*)一般可耐干露 8~12 h^[4],Ⅱ期三疣梭子蟹幼蟹在 20℃ 下的存活时间约为 7~8 h^[1]。在前期试验中,观察到很多三疣梭子蟹在干露时间超过 4 h 以上就处于濒临死亡的状态,因此为保证所得数据具有可比性(死后血淋巴液很难抽取到),本实验中选择的最大测试时间为 4 h。

在受检测的 5 种免疫指标中,酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(AKP)是溶酶体的重要的组成酶类,参与机体的水解作用^[5],过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)是抗氧化酶类,参与消除体内产生的氧化自由基^[6],一氧化氮(NO)则属于体内产生的可以清除氧化自由基的一类自由基^[7]。与对照相比,酸性磷酸酶(ACP)在各个温度干露条件下其活性变化都不明显,可能该酶不参与三疣梭子蟹干露下的生理学反应。已知 AKP 酶的活力与斑节对虾(*Penaeus monodon*)的成活率呈负相关,而 POD 酶的活力与对虾的成活率没有相关性^[8]。在受检测的三疣梭子蟹中,干露下两种酶的活性在不同家系间都检测到了活性变化的差异,说明这两种是与干露下的生理反应有关的酶类。CAT 酶在受测试的 3 个家系中活性变化趋势相差很大,甚至截然相反,这种差异性与三疣梭子蟹耐干露特性需要进一步深入研究。对于 NO 含量这一指标而言,WINK 和 MICHELL^[9]曾提出,适量的 NO 能清除活性氧,过量的 NO 能抑制抗氧化系统,使机体的过氧化损伤作用增强。在 3 个家系中,这一指标显示出与温度变化相关的一些特性,如 10℃ 下与对照相比,3 个家系的 NO 含量是低于对照的,而在 20℃ 和 30℃ 下,其中一个家系的含量显著升高。这种 NO 含量的升高可能会对干露下的生物机体造成进一步的伤害。因此,在育种选择上,应该选择干露下 NO 含量较低的家系作为选育的基础材料,因为对于三疣梭子蟹而言,干露下的温度越高,其体内水分损失的速率也越快^[1],相应的生理反应也就越强烈。此结果揭示了 NO 是一个与干露相关的生理测试指标,同时在 20℃ 下该指标所反应的各家系差异与实际获得的各个家系耐干露特性相一致,因此可以作为选育耐干露新品种或新品系的一个备选指标。

基于家系模式的育种方法是当前水产养殖新品种选育的主要方法,已经在中国对虾

(*Fenneropenaeus chinensis*)^[10]、斑节对虾^[8]、拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)^[11]等新品培育中发挥了重要的作用。在这些新品种选育过程中,经常需要测试遗传背景不同的各家系在所选育性状上的差异,已有的一些研究结果表明,各个家系在某些性状上的差异很大,如饵料系数、特定生长率以及氨氮胁迫下斑节对虾成活率在各家系间均具有较大的差异性^[8,12]。本研究则希望从干露下不同免疫相关因子在各个家系的活性变化入手,探讨三疣梭子蟹各个家系间的差别。在受检测的 5 种免疫指标中,除了酸性磷酸酶(ACP)外,各个家系间不仅在各种指标随时间的变化趋势上存在着差异,也在具体指标的数值上存在着差异。此结果表明,三疣梭子蟹各家系间在不同温度干露下具有较大的差异,这些差异性将为进一步展开三疣梭子蟹耐干露新品种的选育提供理论指导。如果把这些指标具体与耐干露特性联系起来,将为三疣梭子蟹新品种的选育提供新的思路,这也是以后我们将要进一步深入开展的研究工作之一。

参考文献:

- [1] 姜令绪,刘群,王仁杰,等.三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)幼体不同干露温度下死亡率的研究[J].海洋与湖沼,2012,43(1):127-131.
- [2] 于瑞海,王昭萍,孔令锋,等.不同发育期的太平洋牡蛎在不同干露状态下的成活率研究[J].中国海洋大学学报,2006,36(4):617-620.
- [3] 杨凤,谭文明,闫喜武,等.干露及淡水浸泡对菲律宾蛤仔稚贝生长和存活的影响[J].水产科学,2012,31(3):143-146.
- [4] 张义浩,梅文襄,王春琳,等.活虾蛄离水干露试验[J].浙江水产学院学报,1996,15(1):43-48.
- [5] 顾晓英,钱云霞,施祥元,等.多环芳烃一屈对三疣梭子蟹免疫影响的初步研究[J].浙江海洋学院学报:自然科学版,2009,28(3):352-357.
- [6] 陈寅儿,王国良,金珊,等.三疣梭子蟹患“乳化病”后几种保护酶活力的变化[J].水产科学,2006,25(9):448-451.
- [7] 刘红柏,卢彤岩,张春燕,等.黄芪对史氏鲟抗氧化能力及免疫力的影响[J].大连水产学院学报,2006,21(3):231-235.
- [8] 孙苗苗,黄建华,杨其彬,等.13个斑节对虾家系的生长及抗氨氮特性比较[J].上海海洋大学学报,2011,20(4):513-516.
- [9] WINK D A, MICHELL J B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective

- mechanisms of nitric oxide [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1998, 25:434-456.
- [10] 张天时, 孔杰, 栾生, 等. 应用 BLUP 法对中国对虾一代选择的遗传进展 [J]. *海洋水产研究*, 2008, 29 (3): 35-40.
- [11] 崔海玉, 马洪雨, 马春艳, 等. 利用微卫星标记比较分析拟穴青蟹不同家系的遗传多样性 [J]. *海洋渔业*, 2011, 33 (3): 274-281.
- [12] 黄忠, 林黑着, 黄建华, 等. 斑节对虾 6 个家系生长、饲料利用和全虾营养成分的比较 [J]. *南方水产*, 2009, 5 (1): 42-47.

Analysis of the activity differences of immune factors among different parentages in *Portunus trituberculatus* at different desiccation temperatures

CHEN Bai-yao¹, FU Guang-hui¹, AN Jian¹, YU Fei¹, SUN Miao-miao¹, XU Jing², GAO Huan²

(1. *Marine Fisheries Research Institute of Lianyungang, Lianyungang 222042, Jiangsu, China*; 2. *Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, Jiangsu, China*)

Abstract: The swimming crab *Portunus trituberculatus* (Crustacea: Decapoda: Brachyura), is an important commercial crab, widely distributed in the coastal zones of Japan, Korea, China and Southeast Asia countries. In this paper, the activity difference of five immune factors among different parentages of *P. trituberculatus* following the time extension were compared at different desiccation temperature, 10 °C, 20 °C and 30 °C. The five immune factors were acid phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (AKP), catalase (CAT), nitrogen monoxide (NO), peroxidase (POD), respectively. The results showed that no significant difference was found among the parentages for the enzyme activity of ACP, but there existed some differences, more or less, for the other immune factors. The profile of the content of NO following the time extension has the same trend with the ability of the desiccation tolerance in three parentages, and this suggests that the content of NO can be used as a marker of desiccation tolerance for the inbreeding of *P. trituberculatus*.

Key words: *Portunus trituberculatus*; desiccation; temperature; immune factors; parentages