

插核手术对三角帆蚌血淋巴中 3 种免疫防御因子的影响

何秀娟, 施志仪, 李文娟

(上海海洋大学 生物技术研究中心, 上海 201306)

摘要: 对三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii* Lea) 进行内脏团插核手术, 并对术后机体免疫相关因子基因 alpha-2 巨球蛋白(α_2M)、酶酸性磷酸酶(ACP) 和超氧化物歧化酶(SOD) 的变化情况进行研究, 旨在为三角帆蚌内脏团育珠实践提供理论依据。实验选取 100 只健康三角帆蚌分为 2 组(各 50 只, 每组各设 5 个重复, 每重复各 10 只蚌), 一组在蚌体内脏团进行插核手术(实验组), 一组未经处理(对照组), 分别饲养于相同条件恒温(24℃) 淡水缸内。两组分别于插核后 1 天、2 天、3 天、5 天及 10 天采集淋巴血, 通过 RT-PCR 及酶活测定法研究 α_2M 基因表达和 ACP、SOD 在术后活性的变化。结果发现, α_2M 基因在手术后表达量增加, 在插核后第 3 天和第 5 天与对照组差异显著($P < 0.05$); 实验组血清和血细胞中 ACP 活性均显著高于对照组; 实验组血清中 SOD 活性在第 3 天、5 天、10 天高于对照组($P < 0.05$); 实验组血细胞中 SOD 的活性低于对照组。本研究表明, 内脏团插核手术后三角帆蚌机体的免疫防御调节增强, 血液中免疫相关基因 α_2M 的表达水平和免疫相关酶 ACP 和 SOD 活性均有明显变化。[中国水产科学, 2009, 16(6): 859-867]

关键词: 三角帆蚌; 插核手术; alpha-2 巨球蛋白; 酸性磷酸酶; 超氧化物歧化酶

中图分类号: S9

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2009)06-0859-09

三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii* Lea) 是中国培育淡水珍珠的主要蚌种。如何降低插核手术后疾病感染的风险率是珍珠培育中的重要课题。非特异性的免疫活性因子中酸性磷酸酶(ACP) 是一种重要的水解酶, 它的水解作用成为机体抵御异物的主要机制之一; 超氧化物歧化酶(SOD) 是一种重要的抗氧化酶, 作为活性氧清除剂在增强吞噬细胞的防御能力和机体的免疫功能等方面起着重要的作用。alpha-2 巨球蛋白(alpha-2 Macroglobulin, α_2M) 是动物血浆中的大分子糖蛋白, 是一种光谱蛋白酶抑制剂, 可以结合并清除组织中过量的蛋白酶以及细菌内毒素 LPS、植物凝集素 ConA、PHA 等, 从而保护组织在病理或感染条件下不受损害, 是重要的天然免疫因子, 参与广泛的免疫防御和调节^[1-2]。已有文献报道, 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*) 和三角帆蚌血浆中存在 α_2M 的免

疫防御调节系统^[3]。

本研究通过对三角帆蚌内脏团插核手术后 α_2M 定量表达及 ACP 和 SOD 活性的研究, 旨在探索三角帆蚌内脏团插核手术后免疫防御的调节作用, 为人工育珠和贝类病害防治提供理论和实际应用的依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验分组和样品的采集 实验用三角帆蚌由浙江诸暨市实验基地提供, 蚌龄 2~3 龄, 所有的三角帆蚌放在室内玻璃缸中暂养 2 周, 充氧, 以小球藻投喂, 温度控制在 24℃。选择喷水有力、个体健康、贝体规格基本一致(壳高 6~7 cm) 的 100 只个体, 分成对照组和实验组, 每组各 50 只, 每组各设 5 个重复, 每个重复各 10 只蚌。对照组不进行手术处理,

收稿日期: 2008-12-04; 修订日期: 2009-06-11.

基金项目: 上海市科委基础重大项目(06aj14003); 上海市属高校自然科学研究重大项目(01H02); 上海市重点学科建设项目(Y1101).

作者简介: 何秀娟(1980-), 女, 硕士研究生, 主要从事三角帆蚌免疫机制调节方面的研究. E-mail: hxj116688@163.com

通讯作者: 施志仪. E-mail: zyshi@shou.edu.cn

实验组进行内脏团插核手术,在三角帆蚌唇瓣右下面,斧足与内脏团交界插入直径为 8 mm 的灭菌处理的珠核,每蚌插入 1 颗珠核。在手术后第 1 天、2 天、3 天、5 天、10 天,分别从实验组和对照组各取 3 只蚌(共 30 只),在闭壳肌血窦中采集淋巴血。采集的淋巴血,一部分立即保存于液氮中,用于测定 α_2M 基因的相对表达量。取部分血淋巴以 3 000 g 的转速离心 10 min,移出上清液,即得血清。血细胞中加入与上清液等量的双蒸水,低渗法溶血后 6 000 g 转速离心 10 min,获取破碎的血细胞上清液用于 ACP 和 SOD 活性测定。

1.1.2 引物的设计与合成 根据三角帆蚌 α_2M (Accession No.: DQ993157) 和池碟蚌 β -actin (Accession No: EU047596) 的 cDNA 序列,按照荧光定量 PCR 引物设计要求,设计目的基因 α_2M 和内参基因 β -actin 基因片段的引物序列,设计的引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

目的基因的引物序列: α_2M -F: 5'GGTGGTGATTCAAAGTCGGC/3,

α_2M -R: 5'GAAACTCGTGCTGATTCTTGTGG/3

内参基因的引物序列: β -actin-F: 5'TCCCCATCTATGAAGGTTACGC/3,

β -actin-R: 5'AGCCACGCTCTGTGAGGATTT/3

其中所扩增的目的基因 α_2M 片段长度为 207 bp; 扩增的内参基因 β -actin 片段长度为 105 bp。

1.2 总RNA提取和纯度鉴定

用 RNAiso Plus 提取血淋巴的总 RNA, DNase I 酶解可能残余的基因组 DNA, RNA 溶于 RNase-free 水,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定所提取的 RNA 的完整性。紫外分光光度法测定 RNA 样品的浓度和纯度。将提纯后的 RNA 保存在 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中备用。

1.3 RT-PCR

1.3.1 cDNA 模板的制备 10 μL 反应体系: 5 \times PrimeScriptTM Buffer 2 μL , PrimeScriptTM RT Enzyme Mix I 0.5 μL , Oligo dT Primer (50 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , Random 6 mers (100 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , 总 RNA 500 ng, RNase Free dH₂O 加至 10 μL 。反应条件: 37 $^\circ\text{C}$ 15 min, 85 $^\circ\text{C}$ 5 s。

1.3.2 常规 PCR 25 μL 反应体系含每组 cDNA 模板 2 μL , 10 \times PCR Buffer 2.5 μL , 2.5 mmol/L 的 dNTP 2 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 的上游引物和下游引物各 0.5 μL , DNA 聚合酶 (5 U/ μL) 0.2 μL , 灭菌水 17.3 μL ; 循环参数为: 94 $^\circ\text{C}$ 3 min; 94 $^\circ\text{C}$ 30 s, 55 $^\circ\text{C}$ 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 30 s, 35 cycles; 72 $^\circ\text{C}$ 10 min, 4 $^\circ\text{C}$ 保存。PCR 反应后经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测目的条带,电泳结果用 Bio-Rad 凝胶成像系统拍照。

1.3.3 实时荧光定量 PCR 20 μL 反应体系中含有 SYBR[®] Premix Ex TaqTM (2 \times) 10 μL , PCR 上下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.4 μL , DNA 模板 2 μL , dH₂O (灭菌蒸馏水) 7.2 μL 。反应条件: 95 $^\circ\text{C}$ 10 s, 1 cycles; 95 $^\circ\text{C}$ 5 s, 60 $^\circ\text{C}$ 20 s, 40 cycles; 在 65~95 $^\circ\text{C}$ 做融解曲线,最后降温至 37 $^\circ\text{C}$ 保存。每次 PCR 扩增都采用没有模板的阴性对照。

1.4 标准曲线的制备

选择一份提取质量高 ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 为 1.9~2.0), 扩增效果好的模板,作为标准品,用 EASY Dilution 将 cDNA 溶液梯度稀释 (10 倍梯度稀释) 后,各取 2 μL 在 Bio-Rad iQ5 荧光定量 PCR 仪上进行扩增。进行 PCR 扩增的时候每个标准品,采用 3 个平行。反应结束后,由电脑自动分析出定量结果,并给出 PCR 扩增的动力学曲线。

1.5 免疫相关酶活性的测定

酸性磷酸酶 (ACP) 活性的测定: 按照磷酸苯二钠法测定。ACP 活性定义为: 100 mL 血清在 37 $^\circ\text{C}$ 条件下与基质作用 30 min 产生 1 mg 酚为 1 个活力单位。超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的测定,采用黄嘌呤氧化酶法测定。SOD 活性定义为: 每毫升反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个 SOD 活力单位 (U)。具体操作参照南京建成生物研究所的试剂盒说明书。

1.6 统计学分析

α_2M mRNA 表达量的统计学分析经过内参 β -actin 校正及数据的线性转换,计算出每例标本的 $\Delta\Delta C_t$, 求出每例标本的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值 (mRNA 表达的相对量)。用 SigmaPlot 10.0 软件进行统计学分析及

绘图, $P < 0.05$ 表示 2 样本间的差异显著, $P < 0.01$ 表示 2 样本间的差异极显著。免疫相关酶活性测定结果, 采用 t -检验比较实验组和对照组的血细胞和血清中酶活性的差异, 数据统计及显著性检验通过 BioMedCalc 2.7 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 RNA纯度和完整性分析

提取的总 RNA 纯化后进行琼脂糖凝胶电泳, 出现 28 S、18 S 和 5 S 共 3 条 RNA 特征条带, 加样孔附近已没有基因组 DNA, 表明 RNA 样品较为完整, 紫外

分光光度计测定各组 RNA 样品的 OD_{260}/OD_{280} 介于 1.8~2.0 之间, 说明 RNA 质量好, 可以用于反转录反应。

2.2 常规PCR扩增结果

以 cDNA 为模板, 用 2 对引物分别进行扩增, PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 如图 1 和图 2 所示。 α_2M 基因在 207 bp 左右处出现特异性电泳条带, 内参 β -actin 基因在 105 bp 左右处出现特异性电泳条带, 与引物设计时预计产物大体相当, 因而, 推测扩增产物均为目的片段, 进而证实 α_2M 基因引物和内参 β -actin 基因引物以及 cDNA 构建子的正确性,

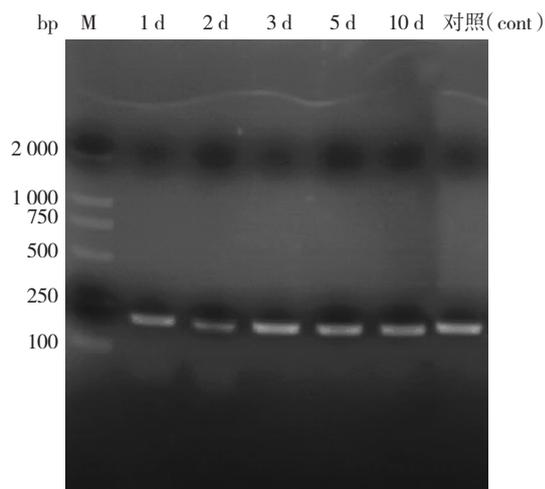


图 1 三角帆蚌 α_2M 基因片段 RT-PCR 结果

M: DNA marker; 1 d~10 d: 手术后的时间, d.

Fig. 1 RT-PCR amplifying result of α_2M gene in *Hyriopsis cumingii*

M: DNA marker; 1 d-10 d: Days after surgery operation.

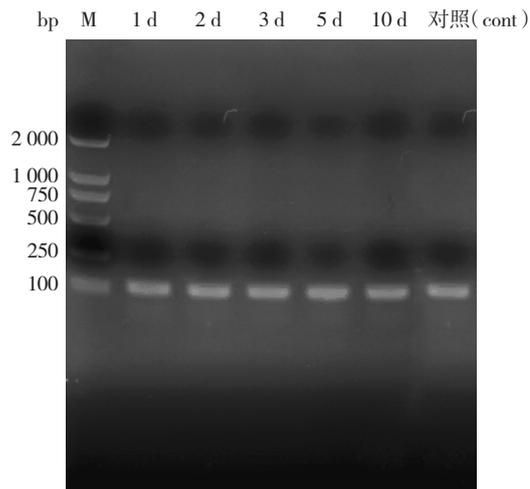


图 2 三角帆蚌 β -actin 基因片段 RT-PCR 结果

M: DNA marker; 1 d~10 d: 手术后的时间, d.

Fig. 2 RT-PCR amplifying result of β -actin gene in *Hyriopsis cumingii*

M: DNA marker; 1 d-10 d: Days after surgery operation.

可以用于下一步的定量 PCR。

2.3 荧光定量RT-PCR扩增的特异性

以 cDNA 为模版, 用 2 对引物分别进行荧光定量 PCR, 扩增后进行融解曲线的观察, 进而检测产物的特异性, 实验结果见图 3、图 4。图 3 的融解曲线是 α_2M 片段, 所有管的解链曲线的 T_m 值均在 83°C ; 图 4 的融解曲线是 β -actin 片段, 所有管的解链曲线的 T_m 值均在 82°C 。2 对引物扩增效果良好, 图中未见由于非特异性扩增及引物二聚体所导致的杂峰。说明 2 对引物的特异性高, 在样品基因组中所扩增的

片段都是唯一的。

2.4 双标准曲线的构建

将 cDNA 溶液进行梯度稀释并作为荧光定量 PCR 模板, 分别对 2 对引物进行扩增。图 5 和图 6 分别为目的基因和内参基因的 cDNA 模板浓度和 C_t 值的标准曲线。结果表明, 2 条标准曲线的样品与标准品同时进行反应, 样品的 C_t 值均落在标准曲线的线性范围内。经软件分析, 可知 2 个标准曲线方程的线性相关系数 R^2 均大于 0.996, 曲线斜率均在 -3.4 与 -3.2 之间, 扩增效率均接近 100%, 说明实时定量

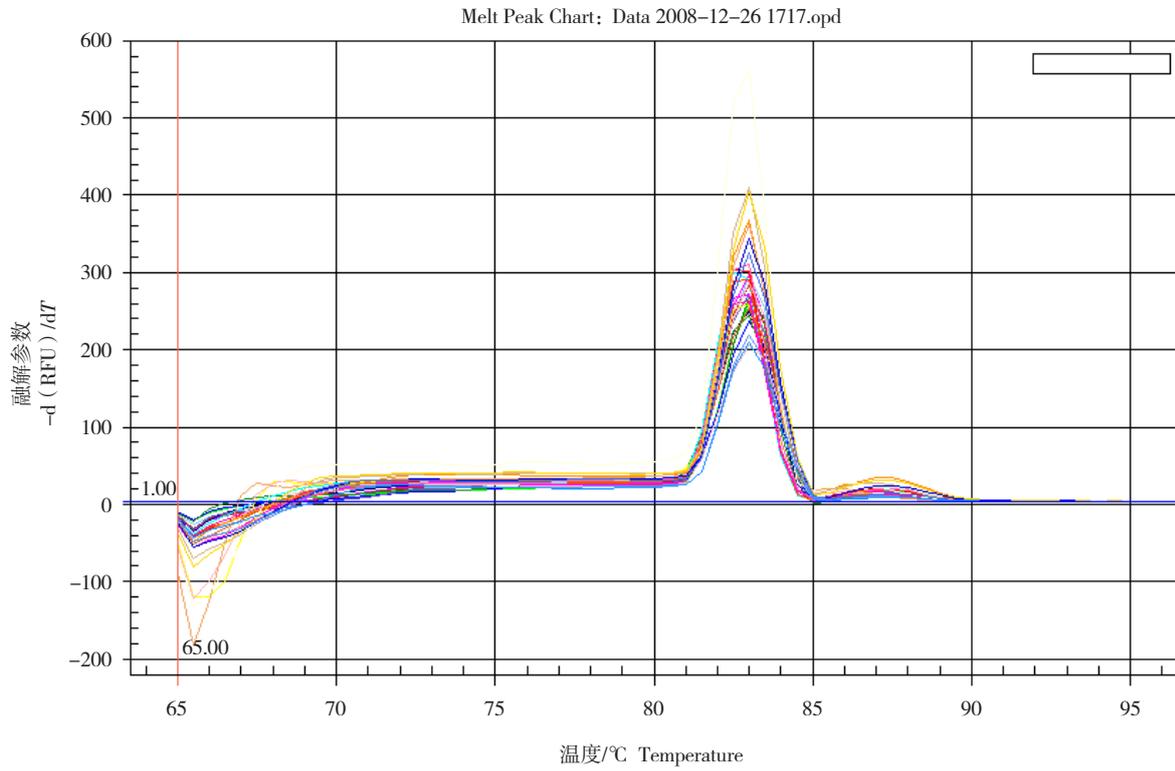


图3 α_2M 扩增产物的融解曲线
Fig. 3 Melt curve of α_2M amplified products

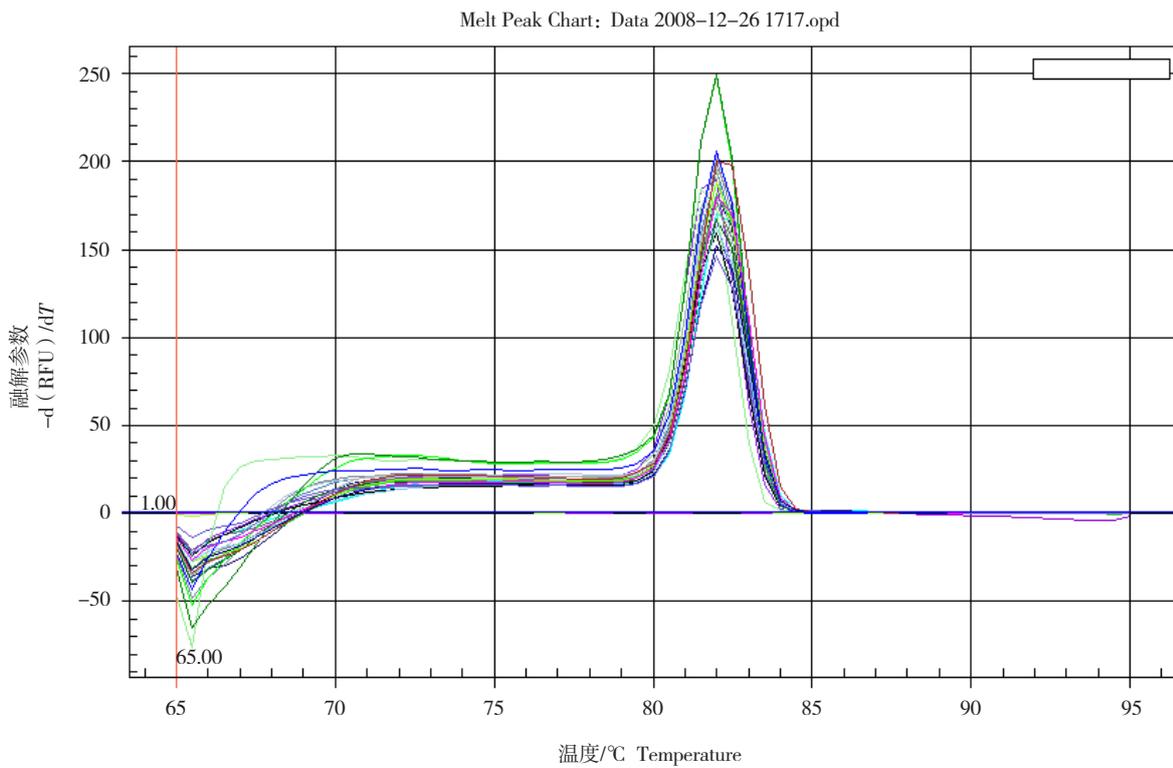


图4 β -actin 扩增产物的融解曲线
Fig. 4 Melt curve of β -actin amplified products

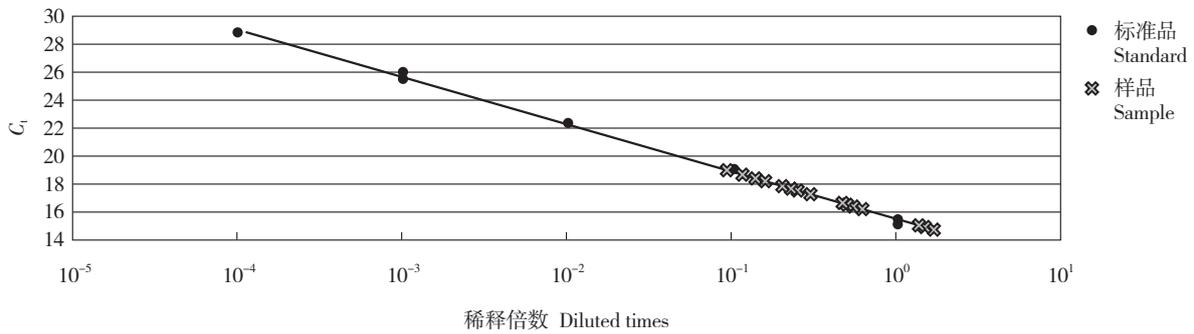


图 5 目的基因 α_2M 标准曲线
Fig. 5 Standard curve of α_2M gene

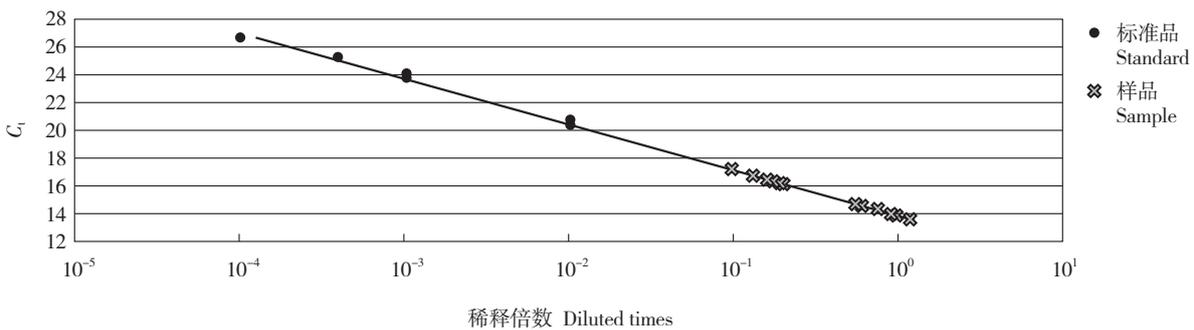


图 6 内参基因 β -actin 标准曲线
Fig. 6 Standard curve of β -actin gene

PCR 反应效果好, 2 个标准曲线制备良好。

2.5 插核手术后 α_2M 的相对表达量

本研究设定 α_2M 基因在对照组的相对表达量为 1, 根据对照组和实验组 α_2M 基因的相对表达量作柱形图(图 7)。统计学分析结果表明: 插核手术后 α_2M 基因在第 1 天和第 2 天表达相对稳定, 与对照组相比差异不显著 ($P>0.05$); 在手术后第 3 天表达量明显增加并达到了最高点, 差异极显著 ($P<0.01$); 在手术后第 5 天表达量高于对照组, 差异显著 ($P<0.05$); 第 10 天时表达量高于对照组, 差异不显著 ($P>0.05$)。

2.6 插核手术对血淋巴中两种酶活力的影响

插核手术后, 三角帆蚌血清和血细胞中 ACP 活性测定结果见图 8。结果表明, 实验组血清和血细胞中 ACP 活性均高于对照组。手术后第 1、2、3、5、10 天血清中 ACP 活性与对照组相比均为差异极显著 ($P<0.01$), 且手术后第 3 天活性达最高; 血细胞中 ACP 活性第 1、2、3 天与对照相比亦显示差异极显著

($P<0.01$), 第 5 天、10 天差异不显著 ($P>0.05$), 手术后第 2 天活性最高。

插核手术后, 血清和血细胞中 SOD 活性的测定结果见图 9。结果表明, 血清中 SOD 活性实验组均高于对照组, 随着插核天数的增加, 其 SOD 活性呈二次曲线增加, 在插核第 3 天达到最大。对照组和实验组相比: 第 1 天、2 天其差异不显著 ($P>0.05$), 第 3、5 天差异极显著 ($P<0.01$), 第 10 天差异显著 ($P<0.05$)。血细胞中 SOD 的活性实验组均低于对照组, 其随插核天数的变化趋势与血清中 SOD 活性变化趋势相同, 在插核第 3 天达到最大。对照组和实验组相比, 第 3 天其差异不显著 ($P>0.05$), 其余时间差异极显著 ($P<0.01$)。

3 讨论

3.1 插核手术对 alpha-2 巨球蛋白基因表达的影响

α_2M 是一种大分子糖蛋白, 存在于脊椎动物^[4]和非脊椎动物^[5]血浆中的一种非特异性蛋白酶抑制

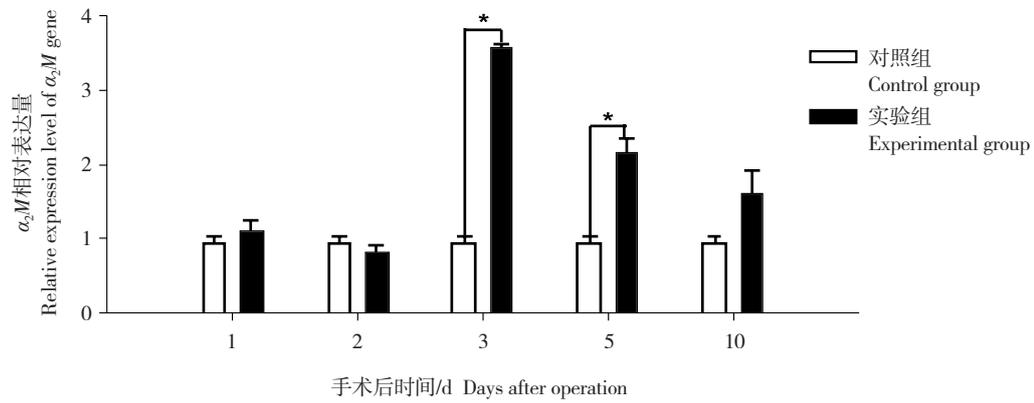


图7 三角帆蚌 α_2M 基因在插核手术后表达量的变化

数据表示为平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm SD$); “*” 代表与对照组相比具有显著性差异 ($P < 0.05$).

Fig. 7 Relative expression level of α_2M gene after pearl-nucleus-inserting operation
Date are represented as $\bar{x} \pm SD$; “*” means significant difference compared with control ($P < 0.05$).

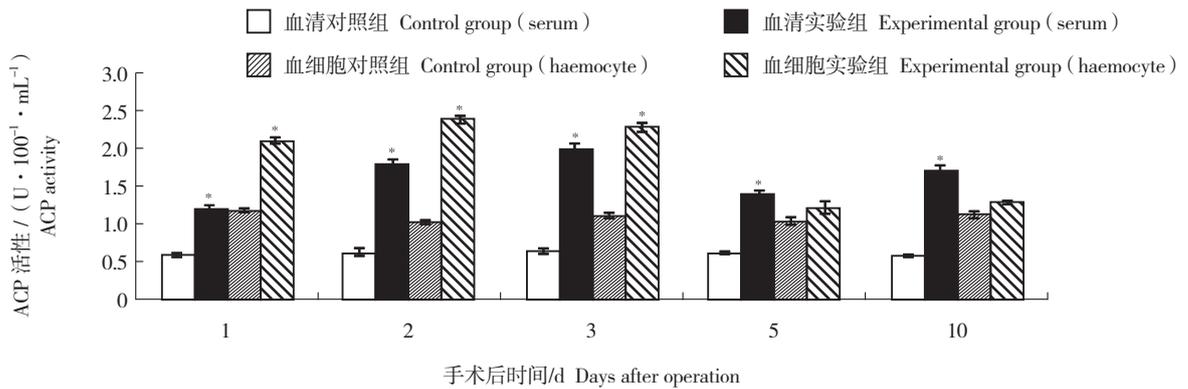


图8 手术刺激后三角帆蚌血清和血细胞中酸性磷酸酶活性的测定结果

注: 数据表示为平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm SD$); “*” 代表与对照组相比具有显著性差异 ($P < 0.05$).

Fig. 8 Activities of ACP in serum and haemocytes of *Hyriopsis cumingii* challenged through pearl-nucleus-inserting operation
Note: Date are represented as $\bar{x} \pm SD$; “*” means significant difference compared with control ($P < 0.05$).

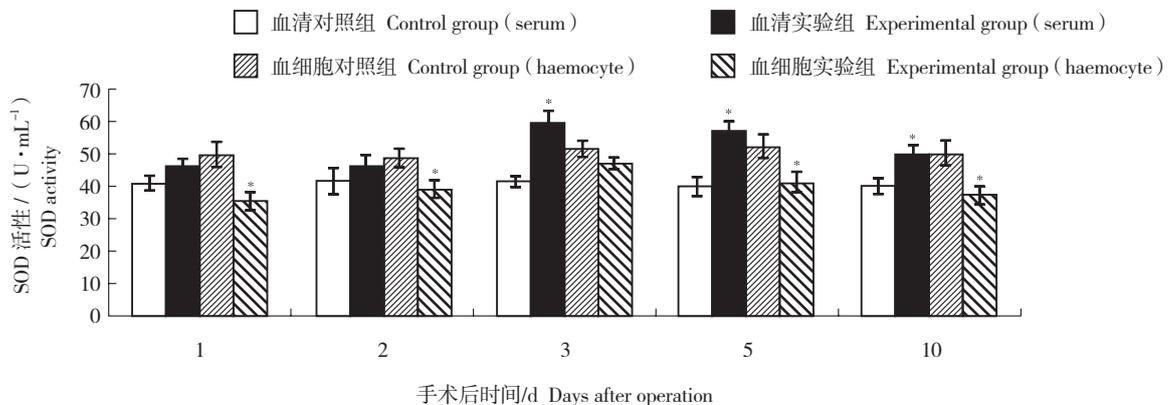


图9 手术刺激后三角帆蚌血清和血细胞中超氧化物歧化酶活性的测定结果

注: 数据表示为平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm SD$); “*” 代表与对照组相比具有显著性差异 ($P < 0.05$).

Fig. 9 Activities of SOD in serum and haemocytes of *Hyriopsis cumingii* challenged through pearl-nucleus-inserting operation
Note: Date are represented as $\bar{x} \pm SD$; “*” means significant difference compared with control ($P < 0.05$).

剂。大多数高等脊椎动物在 α_2M 方面已有较多的研究报道^[6-8],但对于三角帆蚌 α_2M 方面的研究报道较少,至今尚未见有关插核手术后三角帆蚌 α_2M 基因表达情况方面的文献报道。施志仪等^[3]曾对病理条件下三角帆蚌 α_2M 表达情况进行了研究,结果显示,注射大肠杆菌组和注射嗜水气单胞菌组 α_2M 的表达水平明显高于对照组 ($P<0.01$)。本实验结果显示插核手术后的 5 d 观测中, α_2M 基因相对表达量均有升高,说明血浆中的 α_2M 参与了三角帆蚌插核手术后的免疫调节,对三角帆蚌机体起到保护作用。

3.2 插核手术对酸性磷酸酶活性的影响

磷酸酶等水解酶不仅存在于细胞内,而且存在于血浆中,从而形成一个水解酶体系,当异物进入体内或有寄生虫寄生时,血清和血细胞中的磷酸酶活性显著增强^[9-11]。魏炜等^[12]模拟育珠手术对背角无齿蚌外套膜进行大量创伤后,发现 ACP 随损伤后天数增加,酶活力呈上升趋势,后又逐渐下降。本实验结论与此一致,手术后的前 3 天 ACP 活性表现为上升趋势,手术后第五天时开始有所下降。焦钰等^[13]对马氏珠母贝进行插核手术后发现育珠手术后 ACP 的活力在插核后第 1 天和第 2 天稍微升高,与对照组差异不显著,而在插核后第 3~10 天都比正常贝的活力显著提高,差异显著 ($P<0.05$)。本实验在三角帆蚌进行插核手术后,实验组血清和血细胞中 ACP 的活力均高于对照组与其结论相一致;但本实验血细胞中 ACP 活性在手术后的前 3 天均显著高于对照组 ($P<0.01$),第 5 天、10 天与对照组差异不显著;血清中 ACP 活性实验组均高于对照组,并且差异极显著 ($P<0.01$)。推测三角帆蚌内脏团的手术刺激较马氏珠母贝更为敏感,手术刺激能促进机体 ACP 的快速合成,手术后第 2 天、3 天血细胞和血清中 ACP 的活性便达到峰值。

3.3 插核手术对超氧化物歧化酶活性的影响

超氧化物歧化酶 (SOD) 是广泛存在于需氧和耐氧生物体各组织中的重要抗氧化酶,能作为活性氧清除剂参与清除体内自由基 O_2^- 和 H_2O_2 ,以消除 O_2^- 等的中间产物对细胞的毒害,并能够增强吞噬细胞的防

御能力和机体的免疫功能^[14]。许秀芹等^[15]对栉孔扇贝感染球状病毒后的第 8 小时、24 小时、48 小时后活性氧的含量进行了观测,结果表明,扇贝在受到病毒感染后血清中的 H_2O_2 含量显著高于对照组,血细胞中的 H_2O_2 含量显著低于对照组,对照组和实验组血清中 H_2O_2 含量都高于对应血细胞中 H_2O_2 含量,进一步得出活性氧在受到病毒感染后从细胞中释放到血清中。此结论与本实验三角帆蚌在插核手术刺激后作为活性氧清除剂的 SOD 活性变化相符合,与未进行插核的蚌相比,血细胞中 SOD 的活力均降低,血清中 SOD 的活力均升高。周畅等^[16]对插核手术前后合浦珠母贝血清的 SOD 活力进行了比较,发现插核手术后血清的 SOD 活力明显上升。王江勇等^[17]、王淑红等^[18]、孙虎山等^[19]、赵元凤等^[20]的研究都证明当异物物质侵入个体后血清中的 SOD 活性会明显高于对照组。这与本实验中插核手术后三角帆蚌血清中 SOD 活性,实验组均高于对照组的结论相一致,血清中 SOD 活性于第 3 天时达到最高值,随后开始降低,直到第 5 天、10 天活性仍比对照组高出许多,且差异显著。一定浓度的血细胞和血清中 SOD 共同发挥监测活性氧浓度正常与否的功能,从而对机体加以保护。

4 小结

综合三角帆蚌插核手术后第 1 天、2 天、3 天、5 天、10 天时免疫相关基因 α_2M 表达情况,以及血清和血细胞中 ACP 和 SOD 活性变化,研究结果显示插核手术后免疫相关基因和免疫相关酶的活性都发生了一定变化,说明手术后三角帆蚌非特异性免疫系统有所增强,手术后自我防御调节能力增强。本实验对珍珠囊形成初期的前 10 天进行了观测,整个珍珠囊以及珍珠形成过程中免疫相关基因和免疫相关酶活性变化规律有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] James K. Interactions between cytokines and α_2 -macroglobulin [J]. Immunology Today, 1990, 11 (5): 163-166.
- [2] Mathew S, Arandjelovic S, Beyer W F, et al. Characterization of the interaction between alpha2-macroglobulin and fibroblast growth factor:

- the role of hydrophobic interactions [J]. *Biochem*, 2003, 374: 123-129.
- [3] 施志仪, 杨显祥, 陈晓武, 等. 三角帆蚌 alpha-2 巨球蛋白 cDNA 全长的克隆及表达特征 [J]. *水产学报*, 2008, 32 (4): 526-532.
- [4] Starkey P M, Barrett A J. Evolution of alpha2-macroglobulin: the demonstration in a variety of vertebrate species of a protein resembling human α_2 -macroglobulin [J]. *Biochem*, 1982, 205: 91-95.
- [5] Quigley J P, Armstrong P B. Invertebrate α_2 -macroglobulin: structure-function and the ancient thiolester bond [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1994, 712: 131-145.
- [6] Matthijs G, Devriendt K, Cassiman J J, et al. Structure of the human α_2 -macroglobulin gene and its promotor [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 184 (2): 596-603.
- [7] Iwaki D, Kawabata S, Armstrong P B, et al. Molecular cloning of *Limulus* α_2 -macroglobulin [J]. *Eur Biochem*, 1996, 242: 822-831.
- [8] Rojinnakom J, Takahashi Y, Aoki T, et al. Gene expression in haemocytes of kuruma prawn, *Penacus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2002, 13: 69-83.
- [9] 王江勇, 郭志勋, 冯娟, 等. 病毒感染后杂色鲍部分血清免疫因子的变化 [J]. *中国水产科学*, 2005, 12 (3): 345-347.
- [10] 王淑红, 王艺磊, 张朝霞, 等. 弧菌和大肠杆菌感染对杂色鲍血细胞血淋巴中几种酶活力的影响 [J]. *中国水产科学*, 2004, 11 (1): 37-40.
- [11] 孙虎山, 李光友. 大肠杆菌感染后栉孔扇贝血淋巴中 7 种酶活力的变化 [J]. *海洋科学*, 1999, 5: 40-43.
- [12] 魏炜, 张洪渊, 石安静. 育珠蚌酸性磷酸酶活力与免疫反应关系的研究 [J]. *水生生物学报*, 2001, 25 (4): 413-415.
- [13] 焦钰, 杜晓东, 师尚丽, 等. 珍珠囊发育中马氏珠母贝血清免疫因子的变化规律 [J]. *广东海洋大学学报*, 2007, 27 (4): 21-24.
- [14] 孙虎山, 李光友. 栉孔扇贝血淋巴中超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性及其性质的研究 [J]. *海洋与湖沼*, 2000, 31 (3): 259-265.
- [15] 许秀芹. 栉孔扇贝感染球状病毒的病理学研究 [D]. 上海: 上海水产大学, 2006: 1-61.
- [16] 周畅, 谢莉萍, 张荣庆. 插核手术对合浦珠母贝免疫水平的影响 [J]. *水产学报*, 2001, 25 (5): 419-423.
- [17] 王江勇, 郭志勋, 冯娟, 等. 病毒感染后杂色鲍部分血清免疫因子的变化 [J]. *中国水产科学*, 2005, 12 (3): 345-347.
- [18] 王淑红, 王艺磊, 张朝霞, 等. 弧菌和大肠杆菌感染对杂色鲍血细胞血淋巴中几种酶活力的影响 [J]. *中国水产科学*, 2004, 11 (1): 37-40.
- [19] 孙虎山, 王宜艳, 杨静, 等. 病毒感染对栉孔扇贝血淋巴中过氧化氢酶和过氧化物酶活力的影响 [J]. *水产科学*, 2004, 23 (18): 4-6.
- [20] 赵元凤, 吕景才, 宋晓阳, 等. 海洋污染对毛蚶过氧化氢酶影响研究 [J]. *环境科学学报*, 2002, 22 (4): 534-536.

Effects of pearl-nucleus-inserting operation on three immune factors in *Hyriopsis cumingii* Lea

HE Xiu-juan, SHI Zhi-yi, LI Wen-juan

(Research Center of Biotechnology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: To study the immunoregulation of *Hyriopsis cumingii* after pearl-nucleus-inserting operation in visceral mass, the alpha-2 Macroglobulin (α_2M) gene and activities of acid phosphatase (ACP) and superoxide dismutase (SOD) were researched by fluorescence Real-Time Q-PCR and determination of enzyme activity. One hundred *Hyriopsis cumingii* were randomly divided into two groups (50 individuals/group), each group including 5 replicated (10 individuals/replicated). The *Hyriopsis cumingii* in one group (test group) were carried out by pearl-nucleus-inserting operation in visceral mass, while the individuals in the other group were not operated (control group). The hemolymphs were withdrawn to α_2M mRNA levels and activities of ACP and SOD at the first, second, third, fifth, tenth days after operation from both test group and control group, respectively. The results showed that the mRNA levels of α_2M were up-regulated significantly at the 3rd, 5th days than that in other groups ($P < 0.05$). The activities of ACP from both haemocytes and serum increased remarkably after operation compared with control group ($P < 0.05$). Similarly, the activities of SOD from serum increased significantly by pearl-nucleus-inserting operation, and significant differences were obtained in groups at the 3rd, 5th, 10th days compared with control group ($P < 0.05$). By contrast, the activities of SOD from haemocytes were lower in test groups than those in control group ($P < 0.05$). These results indicated that the immune activities were enhanced by pearl-nucleus-inserting operation in *Hyriopsis cumingii*. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16 (6): 859–867]

Key words: *Hyriopsis cumingii* Lea; pearl-nucleus-inserting operation; alpha-2 Macroglobulin; ACP; SOD

Corresponding author: SHI Zhi-yi. E-mail: zyshi@shou.edu.cn