

对虾血细胞中一氧化氮合成酶鉴定与分析方法研究

姜国建^{1,2}, 于仁诚¹, 王云峰¹, 颜天¹, 周名江¹

(1. 中国科学院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室, 山东青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要:通过硝基蓝四唑(NBT)还原法和血细胞形态法两种一氧化氮合成酶的鉴定方法,以日本对虾(*Penaeus japonicus*)作为研究对象,对日本对虾血细胞中的一氧化氮合成酶进行初步鉴定,并优化硝基蓝四唑(NBT)还原法测定对虾血细胞中一氧化氮合成酶的实验条件。结果显示,当L-精氨酸浓度为2.5 mmol/L,脂多糖(LPS)质量浓度为100 $\mu\text{g/mL}$, Ca^{2+} 浓度为2.5 mmol/L时,NBT法测定一氧化氮合成酶活力的结果最佳。同时,还建立了两种针对一氧化氮合成酶活力的分析方法—L-精氨酸分析法和亚硝酸盐分析法,并对其测定条件进行了优化。结果表明,对虾血细胞在4℃下与L-精氨酸和LPS孵育8 h后测定的结果最为理想。利用这4种方法能够有效地鉴定和分析对虾血细胞中的一氧化氮合成酶,这为深入了解一氧化氮合成酶在对虾先天性免疫中的地位及其在对虾抗病力中的作用提供了理论依据。

关键词:日本对虾;一氧化氮合成酶;活性氮中间体;抗病力

中图分类号:S945.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2004)03-0177-08

生物体内的一氧化氮能够作为神经递质,具有松弛平滑肌的生理功能。最近的研究显示,它还具有抗菌、抗病毒、抗寄生虫等作用,其主要作用机理是通过对病原生物蛋白质、核酸或脂类的作用,破坏病原生物的结构蛋白、遗传物质或细胞膜^[1-5]。生物体内一氧化氮是由一氧化氮合成酶催化产生,因此,一氧化氮合成酶的活力应当能够在一定程度上反映生物的健康状况与抗病力水平。作为抗病力指标,一氧化氮及一氧化氮合成酶在哺乳动物、鱼类和无脊椎动物的昆虫、贝类等生物中已有较为深入的研究^[6-25]。

近年来,由于白斑综合症病毒(WSSV)、桃拉病毒(TV)和黄头病毒(YHV)的流行,使得对虾养殖业在全球范围内遭受了巨大的损失。由于对虾没有获得性免疫反应,因此先天性免疫在对虾抗病力方面具有重要的作用。但是,到目前为止,有关一氧化氮和一氧化氮合成酶在对虾先天性免疫中的作用和地位尚未见报道。因此,我们以日本对虾(*P. japonicus*)作为研究对象,根据已有的细胞学和生物化学的方法,对日本对虾血细胞中的一氧化氮合成酶进行了初步鉴定,并进一步对对虾血细胞中一氧化

氮合成酶的鉴定、分析方法进行了优化,以期对对虾免疫研究探索新的思路和方法,为搞清对虾抗病机制提供新的信息。

1 材料与方法

1.1 实验动物

日本对虾购自青岛南山海产品批发市场,体长14~16 cm,体重20~25 g,于200 L水槽中驯化3 d,期间昼夜充气。驯化用海水盐度为32,水温为(24±2)℃。驯化过程中每天投喂人工饵料,吸底换水2次。取蜕皮间期的对虾进行实验。

1.2 血样采集

以1 mL无菌、无热原的注射器从对虾腹血窦处取血,将对虾的血淋巴与4℃的抗凝剂(450 mmol/L NaCl, 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L EDTA-Na₂, 10 mmol/L HEPES, pH 7.3, 850 mOsm/kg)以1:4的比例混合后,在4℃下以600 g的转速离心10 min,去除上清液。将所得血细胞沉淀再悬浮并调节其密度为 1×10^6 cells/mL。

1.3 血细胞中一氧化氮合成酶的鉴定方法

1.3.1 硝基蓝四唑(NBT)还原法 NBT还原法

收稿日期:2004-01-19; 修订日期:2004-03-09。

基金项目:国家重点基础研究项目课题资助(G1999012011)。

作者简介:姜国建(1969-),男,博士研究生,主要从事海洋无脊椎动物免疫学研究。E-mail:jiangguojian@ms.qdio.ac.cn

通讯作者:周名江。E-mail:mjzhou@ms.qdio.ac.cn

系参照 Weiske 等^[26]采用的方法,根据 NBT 能够被一氧化氮合成酶催化产生的 NO 还原生成蓝色的三苯基甲脂化合物,以 NBT 被还原的程度反映一氧化氮合成酶的活性状况。实验过程简要描述如下:将采集的血细胞(1×10^6 cells/mL)悬浮在含有 L-精氨酸 (Sigma) 和 CaCl_2 的 0.1 mol/L Bis-Tris 缓冲液 (pH 6.4) 中。将 LPS (Sigma) 溶解在 0.1 mol/L Bis-Tris 缓冲液 (pH 6.4) 中,取 LPS 溶液与血细胞混悬液等体积混合,并在 4 °C 下孵育 4 h,用 4% 的福尔马林固定血细胞 20 min,然后去除福尔马林。将血细胞在含有 0.1% Triton X-100 (Serva) 的 0.1 mol/L Tris 缓冲液 (pH 7.8) 中洗两次,并置于新制的 0.01% NBT (Sigma) 溶液中,于室温下孵育 10 min,离心,将收集的细胞沉淀与 70% 的甲醇混匀后转入二甲基亚砜 (DMSO, Sigma) 溶液。每 10 min 振摇 1 次,待 30 min 后于室温下 10 000 g 离心 5 min,所得上清液在 670 nm 下测量吸光度。

为建立针对对虾血细胞的鉴定方法,在下述 (1)~(4) 中分别针对溶液中的 L-精氨酸浓度、脂多糖浓度和 Ca^{2+} 浓度进行了优化,用 NADH (Sigma) 代替实验组中的 NADPH 所得的实验结果作为空白对照,以实验组的测定值扣除空白对照组的测定值作为一氧化氮合成酶活力的反映。同时,试验了一氧化氮合成酶的阻断剂 L-NMMA (N-monomethyl-L-arginine) 对酶活性的抑制效应,每个处理取 6 个重复。

(1) L-精氨酸浓度的优化

将上述操作过程中脂多糖的终质量浓度设为 100 $\mu\text{g/mL}$ 。并将实验中所用精氨酸的终浓度分别设为 0、1.0、2.5、3.0、5.0 mmol/L,其余操作同上。分析所得到的溶液吸光度值的差异。

(2) 脂多糖浓度的优化

根据 L-精氨酸浓度优化实验的结果,选择适当的 L-精氨酸浓度,并将实验中采用的脂多糖的终浓度分别设置为 0、10、20、40、80、100、1 000 $\mu\text{g/mL}$,其余操作同上。分析所得到的溶液吸光度值的差异。

(3) Ca^{2+} 浓度的优化

根据精氨酸和脂多糖浓度优化实验的结果,选择适当的精氨酸与脂多糖浓度,并将实验中采用的 0.1 mol/L 的 Bis-Tris 缓冲液中的 CaCl_2 的终浓度设置为 0.0、2.5、5.0、7.5 mmol/L,其余操作同上。分析所得到的溶液吸光度值的差异。

(4) 阻断剂的影响实验

首先将一氧化氮合成酶的阻断剂 L-NMMA (Sigma) 添加到 0.1 mol/L Bis-Tris 缓冲液 (pH 6.4, 含有 5 mmol/L 的 L-精氨酸, 10 mmol/L 的 CaCl_2) 中,并设置 4 个梯度,终浓度分别为 0.0、0.2、0.4、0.8 mmol/L,并以之将 1.2 中采集的血细胞再悬浮,进行 NBT 还原法分析。观察阻断剂对一氧化氮合成酶活力的影响效果。

1.3.2 血细胞形态观察法 血细胞形态观察法参照 Ottaviani 等^[25]采用的方法。当血细胞与外源性 NO 供体及细菌共同孵育后,其形态将由常见的阿米巴形变为圆形,且有大量细菌聚集在周围。在添加一氧化氮合成酶的诱导物后,如果血细胞产生相似的效应,可以认为血细胞中有可诱导的一氧化氮合成酶。方法基本过程如下:将采集的对虾血淋巴与抗凝剂的混合液 100 μL 滴加到洁净的载玻片上,在室温下湿盒中放置 30 min 后,用蒸馏水淋洗,然后加入密度为 1×10^8 cells/mL 的大肠杆菌混悬液 50 μL 。在室温下湿盒中孵育 4 h 后,用蒸馏水淋洗 2 min,用甲苯氨蓝溶液染色 10 min,再用蒸馏水淋洗 2 min。在 400 倍显微镜下观察拍照。

样品分为 4 组,每组 3 个重复。第 1 组为对照组,加入 Bis-Tris 缓冲液;第 2 组加入 LPS 溶液;第 3 组加入 LPS 溶液和阻断剂 L-NMMA 溶液;第 4 组加入外源性 NO 的供体-亚硝基铁氰化钠 (SNP, Sigma) 溶液。

1.4 血细胞一氧化氮合成酶活力分析

血细胞一氧化氮合成酶活力的分析采用 L-瓜氨酸法和亚硝酸盐法两种方法^[26-32]。血细胞中的一氧化氮合成酶能够催化 L-精氨酸生成 NO 和 L-瓜氨酸,而 NO 在细胞内经过一系列反应可以生成硝酸盐和亚硝酸盐,据此可以定量分析一氧化氮合成酶的活力。

为了解反应过程中底物精氨酸和诱导物 LPS 的作用,将实验分为 3 组。对实验过程简述如下:将采集的血细胞 (5×10^4 cells/mL) 悬浮在 Bis-Tris 缓冲液中,作为对照组 (Bis-Tris 组);另取血细胞悬浮在含 L-精氨酸和 CaCl_2 的 Bis-Tris 缓冲液中,调节细胞密度为 1×10^5 cells/mL。取 500 μL 悬浮细胞加入 500 μL Bis-Tris 缓冲液,作为 ARG 组,再取 500 μL 悬浮细胞与 500 μL LPS 溶液混合作为 ARG+LPS 组。在 4 °C 下,将各实验组分别孵育 1 h、4 h、8 h 后加入 1% Triton X-100 溶液破碎细胞

后,在室温下 13 000 g 离心 15 min,取上清液超滤,滤液用于 L-瓜氨酸和亚硝酸盐的定量分析,以比较不同孵育时间所得到测定结果的差异。

1.4.1 亚硝酸盐法 亚硝酸盐的分析参照 Weiske 等^[26]采用的方法。在 300 μ L 滤液中加入 20 μ L 的 Bis-Tris 缓冲液[含有 FAD (Sigma), NADPH (Sigma), 硝酸盐还原酶(Sigma)],在 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min。之后加入 20 μ L Bis-Tris 缓冲液[含有 L-乳酸脱氢酶(Sigma), 丙酮酸钠(Sigma)],在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,然后 4 $^{\circ}$ C 下 10 000 g 离心 15 min。取 300 μ L 上清液与 150 μ L 氨基苯砷(dapsone, Sigma)溶液充分混合,5 min 后加入 150 μ L NEDA[N-(1-naphthyl)ethylenediamine, Sigma]溶液,4 $^{\circ}$ C 下 10 000 g 离心 5 min。取上清液在 550 nm 处测量吸光度,通过与亚硝酸盐浓度标准曲线对比,计算出上清液中亚硝酸盐浓度。

1.4.2 L-瓜氨酸的分析 L-瓜氨酸的分析参照 Marzinzig 等^[32]采用的方法。取 150 μ L 滤液加入 50 μ L 尿素酶溶液(Sigma),于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后,加入 50 μ L 的三氯乙酸溶液,充分混匀后室温下 13 000 g 离心 15 min,取 150 μ L 上清液与 450 μ L ADMS 试剂在沸水中孵育 25 min 后,样品避光并冷至室温,13 000 g 离心 5 min,收集上清液并于 450 nm 测量吸光度,通过与 L-瓜氨酸(Sigma)浓度标准曲线对比,计算出上清液中 L-瓜氨酸的浓度。

1.5 数据分析

采用 Excel 软件的所附的单因素方差分析和 t 检验等统计功能对所得数据进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 NBT 还原法

2.1.1 L-精氨酸浓度的优化 L-精氨酸浓度优化的结果如图 1 所示,纵坐标为添加 NADPH 的实验组测定值扣除空白组后的差值。可以看出,当 L-精氨酸终浓度为 2.5 mmol/L 时,经 LPS 诱导的一氧化氮合成酶的活力最高,在 670 nm 处的吸收度为 0.35。单因素方差分析显示各浓度组之间有显著差异($P=0.016 < 0.05$),但 L-精氨酸浓度为 2.5 和 1.0 mmol/L 的两个实验组测定值没有显著差异($P=0.71 > 0.05$),说明在这两个浓度下可以得到比较理想的测定结果。据此将 L-精氨酸的最佳终浓度优选为 2.5 mmol/L。

2.1.2 LPS 浓度的优化 如图 2 所示,各试验浓度

下的 LPS 对一氧化氮合成酶都有一定的诱导作用,但在终浓度为 100 μ g/mL 时,LPS 诱导得到的一氧化氮合成酶活力最大。单因素方差分析结果显示,各浓度组之间有显著差异($P=0.0014 < 0.05$)。因此,将 LPS 的最佳终浓度优选为 100 μ g/mL。

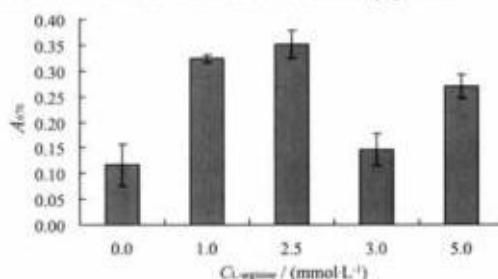


图1 不同浓度 L-精氨酸对测定结果的影响

Fig. 1 Effects of different concentrations of L-arginine on analytical results

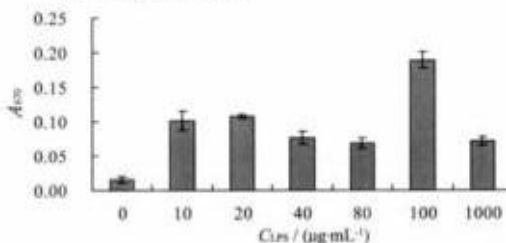


图2 不同浓度的 LPS 对测定结果的影响

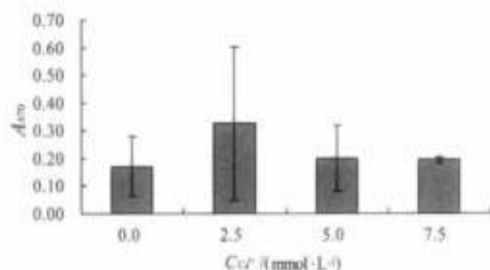
Fig. 2 Effects of different concentrations of LPS on analytical results

2.1.3 Ca²⁺浓度的优化 如图 3 所示,Ca²⁺浓度从 0 到 7.5 mmol/L 时对一氧化氮合成酶测定结果的影响并不显著,单因素方差分析结果显示各实验组之间没有显著差异($P=0.61 > 0.05$)。但是,在 Ca²⁺终浓度为 2.5 mmol/L 时吸光度值最大,因此选择 2.5 mmol/L 作为实验时的浓度。

2.1.4 阻断剂 L-NMMA 的影响效应 如图 4 所示,在添加一氧化氮合成酶阻断剂 L-NMMA 后,无论有无 LPS 的诱导,酶活性均受到 L-NMMA 的显著抑制。但是有 LPS 诱导的实验组一氧化氮合成酶活力还是高于酶活力本底值。

2.2 血细胞形态法

根据 Ottaviani 等^[25]采用的方法,对日本对虾血细胞中的一氧化氮合成酶进行了血细胞形态学方法的鉴定。结果如图 5 所示,日本对虾的血细胞经与大肠杆菌(*E. coli*)孵育 4 h 后,血细胞主要呈阿米

图3 不同 Ca²⁺ 浓度对测定结果的影响Fig. 3 Effects of different concentrations of Ca²⁺ on analytical results

巴形,少数呈圆形,并有少量大肠杆菌吸附在血细胞的周围,或被其吞噬(图5-A)。而当血细胞与LPS孵育后,其形状主要为圆形,并有大量的大肠杆菌吸附在细胞周围(图5-B)。这一现象可以被一氧化氮合成酶的阻断剂L-NMMA所抑制,表现在添加

了L-NMMA的实验组中,血细胞主要呈阿米巴形(图5-C)。当血细胞与NO供体亚硝基铁氰化钠(SNP)共同孵育时,由于NO的产生,血细胞也同样呈现圆形,并有大量杆菌吸附在细胞的周围。从而证明,对虾血细胞中存在一氧化氮合成酶。

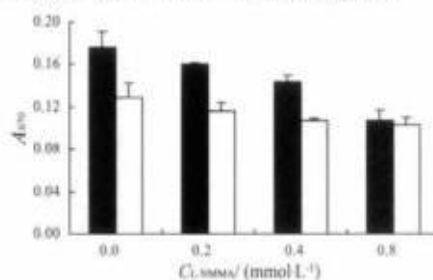


图4 不同浓度的阻断剂对测定结果的影响

Fig. 4 Effects of different concentrations of L-NMMA on the analytical results with LPS without LPS

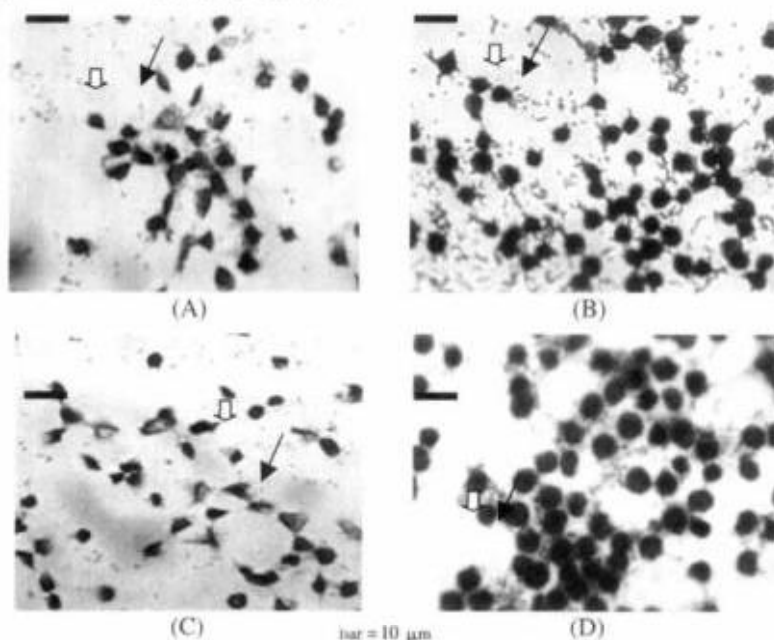


图5 不同实验组血细胞形态比较

- (A) 与大肠杆菌孵育4 h后血细胞形状及血细胞对大肠杆菌的粘附和吞噬状况。
 (B) 与LPS和大肠杆菌孵育4 h后血细胞形状及血细胞对大肠杆菌的粘附和吞噬状况。
 (C) 与LPS、L-NMMA和大肠杆菌孵育4 h后血细胞形状及血细胞对大肠杆菌的粘附和吞噬状况。
 (D) 与SNP和大肠杆菌孵育4 h后血细胞形状及血细胞对大肠杆菌的粘附和吞噬状况。

Fig. 5 Morphological comparison of haemocytes with different treatments

- (A) Haemocytes incubated with *E. coli*. (B) Haemocytes incubated with LPS and *E. coli*.
 (C) Haemocytes incubated with LNMMA, LPS and *E. coli*. (D) Haemocytes incubated with SNP and *E. coli*.
 ◯ - 血细胞 Haemocyte; ↓ - 大肠杆菌 *E. coli*

2.3 L-瓜氨酸法分析一氧化氮合成酶活力

L-瓜氨酸法是通过分析,溶液中L-瓜氨酸的

浓度变化来反映一氧化氮合成酶活力的。不同的孵育时间对一氧化氮合成酶活力测定有显著影响。在

4 ℃,日本对虾的血细胞在 Bis-Tris 缓冲液组、ARG 组以及 LPS + ARG 组中孵育 1 h 后产生的 L-瓜氨酸的浓度分别为 $(6.66 \pm 0.49) \mu\text{mol/L}$ 、 $(7.27 \pm 1.20) \mu\text{mol/L}$ 、 $(6.36 \pm 1.18) \mu\text{mol/L}$,各组结果之间没有显著差异($P > 0.05$)。孵育 4 h 后产生的 L-瓜氨酸的浓度分别为 $(5.14 \pm 0.58) \mu\text{mol/L}$ 、 $(5.83 \pm 0.44) \mu\text{mol/L}$ 、 $(8.90 \pm 2.06) \mu\text{mol/L}$,LPS + ARG 组与 ARG 组和 Bis-Tris 组相比有极显著差异($P < 0.001$)。孵育 8 h 后产生的 L-瓜氨酸的浓度分别为 $(5.94 \pm 0.70) \mu\text{mol/L}$ 、 $(5.62 \pm 0.57) \mu\text{mol/L}$ 、 $(11.78 \pm 3.43) \mu\text{mol/L}$,LPS + ARG 组与 ARG 组和 Bis-Tris 组相比有极显著差异($P < 0.001$)。结果如图 6 所示。可以看出,孵育时间和 LPS 的诱导对于诱导型一氧化氮合成酶活力测定非常重要,所产生的 L-瓜氨酸浓度随孵育时间的延长而呈持续上升趋势。在我们的实验中,孵育 8 h 后得到了一氧化氮合成酶活力测定的最大值,因此,在对虾血细胞一氧化氮合成酶活力的测定中,建议采取 8 h 的孵育时间。添加 LPS 能够诱导一氧化氮合成酶活力的增加。空白对照组和添加精氨酸的实验组在实验过程中一氧化氮合成酶活力没有显著差异,这一实验结果也与以往在其他生物中的报道相符。

2.4 亚硝酸盐法分析一氧化氮合成酶活力

亚硝酸盐法是通过分析,溶液中亚硝酸盐的浓度变化来反映一氧化氮合成酶活力。通过亚硝酸盐法也证实了孵育时间在一氧化氮合成酶活力测定中的重要性。在 4 ℃,日本对虾的血细胞在 Bis-Tris 组、ARG 组、ARG + LPS 组经孵育 1 h 后产生亚硝酸盐的浓度分别为 $(5.56 \pm 1.38) \mu\text{mol/L}$ 、 $(5.74 \pm 2.60) \mu\text{mol/L}$ 、 $(5.70 \pm 1.48) \mu\text{mol/L}$ ($P > 0.05$),差异不显著(图 7)。孵育 4 h 后各组产生的亚硝酸盐的浓度分别为 $(3.63 \pm 0.44) \mu\text{mol/L}$ 、 $(5.68 \pm 0.83) \mu\text{mol/L}$ 、 $(8.85 \pm 1.04) \mu\text{mol/L}$,LPS + ARG 组与 ARG 组和 Bis-Tris 组相比有极显著差异($P < 0.001$)(图 7)。孵育 8 h 后各组产生的亚硝酸盐的浓度分别为 $(6.73 \pm 1.14) \mu\text{mol/L}$ 、 $(7.02 \pm 0.89) \mu\text{mol/L}$ 、 $(9.84 \pm 0.35) \mu\text{mol/L}$,LPS + ARG 组与 ARG 组和 Bis-Tris 组相比有极显著差异($P < 0.001$)(图 7)。可以看出,亚硝酸盐法和 L-瓜氨酸法所得到的结果有很好地重现性。因此,建议采用 8 h 的孵育时间,并且不同实验组的孵育时间必须严格一致。

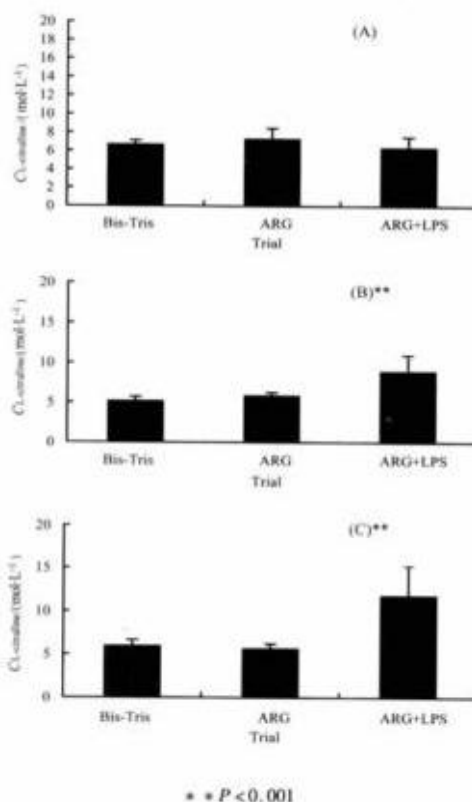


图6 不同孵育时间后各实验组所产生的 L-瓜氨酸浓度比较

(A) 孵育 1 h 后; (B) 孵育 4 h 后; (C) 孵育 8 h 后。

Fig. 6 Comparison of L-citrulline concentration among treatments after different incubation time

(A) Incubation for 1 h; (B) Incubation for 4 h; (C) Incubation for 8 h.

3 讨论

对于诱导型一氧化氮合成酶的检测,现在已建立了多种方法^[22, 25-26, 32-36]。这些方法根据酶的自身特征或其催化的反应过程,对一氧化氮合成酶的存在及其活性进行鉴定和分析。目前,常用的一氧化氮合成酶的鉴定方法有:(1)基于抗原与抗体反应^[33-34]的多克隆抗体法(pAg);(2)DAF-2 (2-(3,6-dihydroxy-4,5-diamino-9H-xanthen-9-yl)-benzoic acid)法^[34],利用 DAF-2 与 NO 作用后产生特殊的荧光物质进行一氧化氮合成酶的鉴定;(3)NBT 还原法^[26]和(4)血细胞形态法^[25]。在上述 4 种一氧化氮合成酶的鉴定方法中,只有多克隆抗体法能够直接检测一氧化氮合成酶存在与否,而其他 3 种方法均通过间接方法进行鉴定,其中 NBT 还原法和血细胞形态法是比较常用的、简便的一氧化氮合成酶鉴定方法。

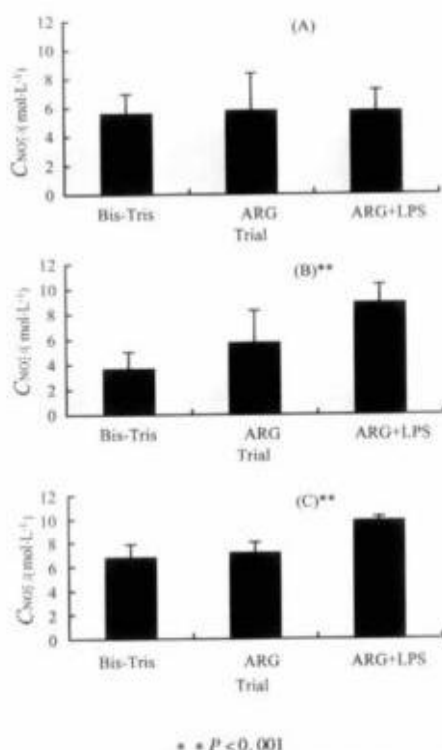


图7 不同孵育时间后各实验组所产生的亚硝酸盐浓度比较

(A) 孵育1 h后; (B) 孵育4 h后; (C) 孵育8 h后。

Fig. 7 Comparison of nitrite concentration among treatments after different incubation time

(A) Incubation for 1 h; (B) Incubation for 4 h; (C) Incubation for 8 h.

应当指出, NBT还原法并非鉴定一氧化氮合成酶的特异反应, 这种方法可以用来测定活性氧、NO等许多能够还原NBT为三苯基甲脂的化合物; 另外, 根据文献报道, 在NADPH存在的条件下, 至少有6种酶能够催化电子传递反应^[27], 将NBT还原为三苯基甲脂。但是, 根据Ou等^[28]的报道, 对福尔马林不敏感甚至能被福尔马林诱导的NADPH-硫辛酰胺脱氢酶是诱导型一氧化氮合成酶的特征酶。这种酶经福尔马林固定后, 仍然可以在NADPH存在时催化L-精氨酸生成NO及其衍生物, 从而将NBT还原为三苯基甲脂。因此, 福尔马林固定后的NBT还原反应是鉴定一氧化氮合成酶的有效生化反应之一^[29-30]。在本实验中, 日本对虾的血细胞经福尔马林固定后, 在L-精氨酸存在时, 添加NADPH实验组的测定结果显著高于添加NADH的实验组(图1~3), 而且这一反应能被一氧化氮合成酶的阻断剂L-NMMA所阻断(图4), 说明日本对虾的

血细胞中存在一氧化氮合成酶。同时, 图1到图3显示, 这一鉴定方法中使用的各种试剂最适浓度分别为: L-精氨酸 2.5 mmol/L, LPS 100 μg/mL。实验结果还表明, 对虾血细胞中存在的可诱导的一氧化氮合成酶活性与Ca²⁺有关。

此外, 血细胞形态法也是鉴定一氧化氮合成酶的一项重要方法。Franchini等^[23]报道: 鉴定紫贻贝(*Mytilus edulis*)和一种田螺(*Viviparus ater*)的血细胞中是否具有诱导型一氧化氮合成酶, 可以根据它与NO的供体—亚硝基铁氰化钠对细菌和血细胞产生相似的效应判断, 因为亚硝基铁氰化钠在水溶液中可以释放NO^[31], 因此, 具有与一氧化氮合成酶相同的效应。Ottaviani等^[25]发现, 在LPS诱导下, 紫贻贝和田螺的血细胞周围聚集有大量的细菌, 且血细胞的形状呈圆形, 亚硝基铁氰化钠对血细胞有同样的作用, 以此推断血细胞中存在一氧化氮合成酶。在本实验中也得到了类似的结果, 说明日本对虾血细胞中存在一氧化氮合成酶, 而且这种一氧化氮合成酶可以被LPS所诱导, 并对细菌具有杀灭作用。

本实验的亚硝酸盐法和L-瓜氨酸法, 是在Weiske等^[26]和Marzinzig等^[32]方法的基础上经过优化而建立起来的。L-瓜氨酸法和亚硝酸盐法测定和分析日本对虾血细胞一氧化氮合成酶活力的结果基本一致(图6~7)。LPS对日本对虾血细胞的激活作用在一定时间内与孵育时间相关, 在1到8小时内随时间的延长酶活力逐渐增强, 这与Ottaviani等^[25]和Weiske等^[26]报道的一氧化氮合成酶的性质类似。建议在酶活力测定中严格控制孵育时间, 最好为8 h, 以得到可比的实验结果。

近年来, 养殖生物的疾病问题已经成为制约水产养殖业持续发展的严重问题之一, 这在对虾养殖中尤为突出。各种病毒性和细菌性疾病使对虾养殖业遭受了巨大的经济损失, 因此, 对虾流行病的控制和预防是对虾养殖业需要首先解决的问题, 也是水产科学的研究热点之一。而搞清宿主的免疫机理是制定防病策略的重要依据。对虾和其他无脊椎动物一样只有先天性免疫系统, 目前有关对虾的先天性免疫已有比较系统深入的研究工作。特别对于先天性免疫的重要组成部分——活性氧中间体(Reactive oxygen intermediates, ROIs)和活性氮中间体(Reactive nitrogen intermediates, RNIs)的研究近来特别受到关注。由于活性氧和活性氮中间体对细菌、病毒和寄生虫等病原生物具有广谱抵抗能力, 因此对它

们的深入探讨有重要意义。本研究所建立的对虾血细胞一氧化氮合成酶的鉴定和分析方法,对了解一氧化氮合成酶在对虾先天性免疫中的地位及其在对虾抗病力中的作用具有重要意义。

参考文献:

- [1] Enoch T, Norbury C. Cellular responses to DNA damage: cell-cycle checkpoints, apoptosis and the roles of p53 and ATM [J]. Trends Biochem Sci, 1995, 20: 426-430.
- [2] Chernova O B, Chernov M V, Agarwal M L, et al. The role of p53 in regulating genomic stability when DNA and RNA synthesis are inhibited [J]. Trends Biochem Sci, 1995, 20: 431-434.
- [3] de Murcia G, de Murcia J M. Poly (ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor [J]. Trends Biochem Sci, 1994, 19: 172-176.
- [4] Lindahl T, Satoh M S, Poirier G G, et al. Post-translational modification of poly (ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks [J]. Trends Biochem Sci, 1995, 20: 405-411.
- [5] Nishida K J, Ohta Y S J, Ishiguro I. Relation of inducible nitric oxide synthase activity to lipid peroxidation and nonprotein sulfhydryl oxidation in the development of stress-Induced gastric mucosal lesions in Rats [J]. Nitric Oxide, 1998, 2 (4): 215-223.
- [6] Chakravorty D, Hensel M. Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens [J]. Microbes and Infection, 2003, 5: 621-627.
- [7] De Groote M A, Testerman T, Xu Y, et al. Homocysteine antagonism of nitric oxide-related cytostasis in *Salmonella typhimurium* [J]. Science, 1996, 272: 414-417.
- [8] Incze K, Farkas J, Mihalyi V, et al. Antibacterial effect of cysteine-nitrosothiol and possible precursors thereof [J]. Appl Microbiol, 1974, 27: 202-205.
- [9] Davies S-A. Nitric oxide signalling in insects [J]. Insect Biochem Molec Biol, 2000, 30: 123-138.
- [10] Laing K J, Hardie L J, Aartsen W, et al. Expression of an inducible nitric oxide synthase gene in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. Devel Compar Immunol, 1999, 23: 71-85.
- [11] Laing K J, Grabowski P S, Belosevic M, et al. A partial sequence for nitric oxide synthase from a goldfish *Carassius auratus* macrophage cell line [J]. Immunol Cell Biol, 1996, 74: 374-379.
- [12] Scharsack J P, Steinhagen D, Kleczka C, et al. The haemoflagellate *Trypanoplasma borreli* induces the production of nitric oxide, which is associated with modulation of carp (*Cyprinus carpio* L.) leucocyte functions [J]. Fish Shellfish Immunol, 2003, 14: 207-222.
- [13] Tafalla C, Go'mez-Leo'n J, Novoa B, et al. Nitric oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes [J]. Devel Compar Immunol, 2003, 27: 197-205.
- [14] Tafalla C, Novoa B. Requirements for nitric oxide production by turbot (*Scophthalmus maximus*) head kidney macrophages [J]. Devel Compar Immunol, 2000, 24: 623-631.
- [15] Regulski M, Tully T. Molecular and biochemical characterization of dNOS: A *Drosophila* Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 90 722-90 726.
- [16] Yuda M, Hirai M, Hirai K, et al. cDNA cloning, expression and characterization of nitric oxide synthase from the salivary glands of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus* [J]. Eur J Biochem, 1996, 242: 807-812.
- [17] Luckhart S, Li K. Transcriptional complexity of the *Anopheles stephensi* nitric oxide synthase gene [J]. Insect Biochem Molec Biol, 2001, 31: 249-256.
- [18] Luckhart S, Rosenberg R. Gene structure and polymorphism of an invertebrate nitric oxide synthase gene [J]. Gene, 1999, 232: 25-34.
- [19] Luckhart S, Vodovotz Y, Cui L, et al. The mosquito *Anopheles stephensi* limits malaria parasite development with inducible synthesis of nitric oxide [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 5 700-5 705.
- [20] Nappi A J, Vass E, Frey F, et al. Nitric oxide involvement in drosophila immunity [J]. Nitric Oxide: Biology and Chemistry, 2000, 4 (4): 423-430.
- [21] Dimopoulos G, Müller H-M, Levashina E A, et al. Innate immune defense against malaria infection in the mosquito [J]. Current Opinion in Immunology, 2001, 13: 79-88.
- [22] Conte A, Ottaviani E. Nitric oxide synthase activity in molluscan hemocytes [J]. FEBS Letters, 1995, 365: 120-124.
- [23] Franchini A, Conte A, Ottaviani E. Nitric oxide: An ancestral immunocyte effector molecule [J]. Adv Neuroimmunol, 1995, 5: 463-478.
- [24] Ottaviani E, Franchini A, Cassanelli S, et al. Cytokines and invertebrate immune responses [J]. Biol Cell, 1995, 85: 87-91.
- [25] Ottaviani E, Paeman L R, Cadet P, et al. Evidence for nitric oxide production and utilization as a bacteriocidal agent by invertebrate immunocytes [J]. Eur J Pharmacol, 1993, 248: 319-324.
- [26] Weiske J, Wiesner A. Stimulation of NO synthase activity in the immune-competent lepidopteran estigmenae acraea hemocyte line [J]. Nitric Oxide: Biology and Chemistry, 1999, 3 (2): 123-131.
- [27] Stoward P J, Meijer A E F H, Seidler E, et al. Dehydrogenases [A]. Histochemistry Theoretical and Applied [M], Vol 3, Enzyme histochemistry, 4th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1991. 27-71.
- [28] Ott S R, Burrows M. NADPH diaphorase histochemistry in the Thoracic Ganglia of Locusts, Crickets, and Cockroaches: Species differences and the impact of fixation [J]. Compar Neurol, 1999, 410: 387-397.
- [29] Dawson T M, Bredt D S, Fotuhi M, et al. Nitric oxide and NADPH-diaphorase are identical in brain and peripheral tissue [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 7 797-7 801.
- [30] Hope B T, Michael G J, Knigge K M, et al. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 2 881-2 814.
- [31] Feelish M R, Noack E. The in vivo metabolism of nitrovasodilators and their conversion in to vasoactive species [A]. Heart Failure-Mechanisms and Management [M]. Berlin: Springer Verlag, 1991. 241-255.
- [32] Marzinzig M, Nussler A K, Stadler J, et al. Improved methods to

- measure and products of nitric oxide in biological fluids: nitrite, nitrate, and S-nitrosothiols[J]. NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry, 1997, 1(2): 177-189.
- [33] Ottaviani E, Barbieri D, Malagoli D, et al. Nitric oxide induces apoptosis in the fat body cell line IPLB-LdFB from the insect *Lymantria dispar*[J]. Compar Biochem Physiol Part B, 2001, 128: 247-254.
- [34] Marr K M, Quai S, Fulman J A. Nitric oxide synthase in *Filariacae*: Demonstration of nitric oxide production by embryos in *Brugia malayi* and *Acanthocheilonema viteae*[J]. Experim Parasitol, 2001, 97: 205-214.

Studies on the methods of identification and activity assay of inducible nitric oxide synthase in haemocytes of shrimp

JIANG Guo-jian^{1,2}, YU Ren-cheng¹, WANG Yun-feng¹, YAN Tian¹, ZHOU Ming-jiang¹

(1. Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: The study of shrimp immunology in response to pathogen infection is necessary for the sound management strategies in controlling shrimp diseases and elevating the production. Shrimp is lack of adaptive immune system, and the disease resistance ability relies mainly on the non-specific innate immune system, among which NOS system should play a very important role. NOS system could produce reactive nitrogen intermediates (RNIs) which have the antiviral, antibacterial and anti-parasite properties. However, the role of NOS in shrimp immunological system is seldom reported. In our present studies, four methods previously reported in identification and assay of inducible NOS (iNOS) in other creatures have been reestablished and modified for the application in shrimps. The two methods based on NBT-reduction reaction and cellular morphological observation were employed to identify the iNOS in haemocytes of *Penaeus japonicus* according to Weiske et al (1999) and Franchini et al (1995). Both of the methods showed that shrimp haemocytes have the activity of iNOS, especially after induction with LPS. The conditions for NBT method were modified according to the experimental results, and the optimal concentrations of L-arginine, LPS and Ca^{2+} were 2.5 mmol/L, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 2.5 mmol/L, respectively. The results of cellular morphological observation showed that haemocytes treated with LPS had the similar effects with that treated with NO donor—SNP, which suggested the existence of iNOS in the haemocytes of *P. japonicus*. The effect could be blocked with the addition of NOS inhibitor further confirmed the result.

The two methods based on the analysis of L-citrulline and NO_2^- were used in the experiment for assay of iNOS activity in haemocytes of shrimps quantitatively. The standard curve for measurement of L-citrulline and NO_2^- were established for the analysis, and the incubation time for the assay of iNOS enzyme activity was optimized. The results showed that 8 h incubation with arginine and LPS was necessary, and enzyme activity of iNOS would not be well induced if the incubation time was not enough. The two methods could get comparable results under controlled experimental conditions. Therefore, either of the method could be used in the following experiment to assay the variation of iNOS enzyme activity under different conditions.

The reestablished methods have identified the iNOS activity in haemocytes of *P. japonicus* and analyzed the enzyme activity effectively. The results of the experiment would provide a good way for the further studies of iNOS in immunology and disease resistance ability of shrimps.

Key words: *Penaeus japonicus*; nitric oxide synthase; reactive nitrogen intermediates; disease resistance ability

Corresponding author: ZHOU Ming-jiang. E-mail: mjzhou@ms.qdio.ac.cn

* This research was funded by the key Project (973) from the Ministry of Science and Technology (No. G199012011).