

文章编号: 1000-0615(2019)04-0841-11

DOI: 10.11964/jfc.20180511286

Percoll不连续密度梯度离心法分离 红螯光壳螯虾血细胞

傅蓉蓉, 李 钊*, 杨 丰

(自然资源部第三海洋研究所, 国家海洋局海洋生物遗传资源重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 建立了利用Percoll不连续密度梯度离心分离红螯光壳螯虾血细胞的方法, 并对配制分离体系的缓冲液以及分离体系的密度组成进行了优化。结果显示, 由20%、65%和100%的Percoll组成的分离体系分离效果最优。在转速为1 810 r/min的条件下离心20 min之后, 可将红螯光壳螯虾血细胞分为SGC与GC 2个细胞层。经流式细胞术分析, 发现细胞层纯度均在95%以上, 细胞死亡比率低于1.5%, 可用于后续的细胞功能分析。此方法简单有效, 为后续研究螯虾的免疫防御机制及病害防治方法奠定了基础。

关键词: 红螯光壳螯虾; 血细胞类群; 不连续密度梯度离心; 免疫防御

中图分类号: S 945.6

文献标志码: A

红螯光壳螯虾(*Cherax quadricarinatus*)原产于澳大利亚, 俗称澳洲淡水龙虾, 隶属于甲壳动物亚门(Crustacea)、软甲纲(Malacostraca)、十足目(Decapoda)、拟螯虾科(Parastacidae)、滑螯虾属(*Cherax*), 具食性杂、生长快、适应性强、抗病力强等特点。其肉质细嫩、味道鲜美、可食比率高, 是目前世界上较名贵的淡水经济虾种之一, 具有广泛的养殖前景^[1-3]。

近年来, 随着虾蟹等甲壳类动物养殖规模的不断扩大, 由病毒、细菌和寄生虫等病原引起的疾病频繁暴发, 给虾蟹养殖业造成了巨大的经济损失^[1, 4-6]。血细胞是螯虾的主要免疫细胞, 在保护宿主免受病原侵害的过程中扮演了重要的角色, 而宿主免疫系统与病原的博弈决定了疾病的发生与发展。因此, 对血细胞功能的研究进而探究有助于认识疾病的发生机制, 进而探究对病害的防治方法。

无脊椎动物缺乏获得性免疫(acquired or adaptive immunity)系统, 不能产生特异性抗体, 主要依赖天然免疫(innate immunity)系统来防御或清除各种致病病原^[7], 此过程涉及细胞免疫和体液免疫^[8]。其中, 血细胞是主要的免疫细胞, 不仅

参与了吞噬作用、包囊化、结节和呼吸爆发等细胞免疫过程^[9-12], 而且能合成和释放多种免疫因子, 为体液免疫提供物质来源^[13-14]。无脊椎动物血细胞的分类研究始于20世纪60~70年代, 但至今仍以细胞质中颗粒物质的有无、大小、密度及细胞的核质比等形态学参数作为分类标准。通常甲壳动物的血细胞可分为颗粒细胞(granular cells, GC), 半颗粒细胞(semigranular cells, SGC)和透明细胞(hyaline cells, HC)^[15-19]。红螯光壳螯虾的循环血中HC数量稀少, GC与SGC是其主要的血细胞类群^[20]。目前, 人们对不同血细胞亚群在免疫反应中的分工协作的认识还比较有限。有研究表明, GC是酚氧化酶系统的主要储存细胞, SGC主要参与了外来异物的包囊和结节过程^[21], 而针对3类血细胞对异物的吞噬作用, 不同研究分歧很大^[22-28]。此外, 不同细胞类群在体液免疫中扮演的角色也尚不清楚。

不同血细胞类群的分离纯化是研究不同类群细胞功能的基础。近年来, 研究者利用流式细胞分选术、单克隆抗体免疫磁珠法(immunomagnetic bead method, IMB)等方法, 实现了血细胞类群的分离^[29-30]。然而, 这些方法需要使用特

收稿日期: 2018-05-16 修回日期: 2018-09-14

资助项目: 国家自然科学基金(31672675)

通信作者: 李钊, E-mail: lifang@tio.org.cn

殊的仪器设备或者实验材料,成本较高,因此,经典的细胞类群分离方法——密度梯度离心法仍然具有较高的实用性。早在1983年, Söderhäll等^[15]首次利用Percoll连续密度梯度离心法进行了真蟹(*Carcinus maenas*)、食用黄道蟹(*Cancer pagurus*)、地中海滨蟹(*Macropipus depurator*)和寄居蟹(*Eupagurus bernhardus*)血液中不同类群血细胞的分离。该方法也成功用于分离软尾太平洋螯虾(*Pacifastacus leniusculus*)、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)和日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)的血细胞亚群^[28, 31-33]。但此连续密度梯度的制备较为复杂,且针对红螯光壳螯虾血细胞分离的研究较少。

目前,国内养殖的红螯光壳螯虾所带病原较少、个体较大、对环境适应性强,是研究甲壳动物血细胞功能的良好模型。本研究建立了利用简单的不连续密度梯度离心分离红螯光壳螯虾血细胞的方法,所得细胞纯度较高,细胞活力较好,可用于后续实验研究,为进一步研究不同血细胞类群在免疫中的功能奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

红螯光壳螯虾购于漳州市源森泰农业科技有限公司,购买后于塑料箱中28℃暂养2周,隔天将原有暂养水全部更换并喂食。Percoll购于GE公司。多聚甲醛购于Sigma Aldrich公司。Leibovitz's L-15培养基购于Gibco公司。Propidium Iodide (PI)购于生工生物工程(上海)股份有限公司。抗凝剂^[34](140 mmol/L NaCl, 100 mmol/L葡萄糖, 30 mmol/L柠檬酸, 26 mmol/L柠檬酸钠, 10 mmol/L EDTA, pH 5.8)。所用试剂均为国产分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司(北京)与生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 实验方法

不连续密度梯度的制备 取Percoll 9 mL,加入1 mL 1.5 mol/L的生理盐水,配制为100% Percoll。随后用稀释缓冲液将100% Percoll稀释成20%~65%之间的不同浓度。在离心管中分别加入3层不同浓度的Percoll制作不连续密度梯度:最下层为100% Percoll,中间层为浓度在50%~65%之间的Percoll,最上层为20% Percoll。密度梯度制作完毕可置于4℃保存1 h。

全血细胞的收集与类群分离 取红螯光壳螯虾12只,用70%乙醇擦拭体表。取12个5 mL注射器,分别预装1 mL 4℃预冷的抗凝剂,于螯虾第1节腹部进针,每只虾抽取1 mL血淋巴,并轻轻颠倒注射器混匀。将混合液合并收集于15 mL离心管中。取75 μL血细胞悬液使用Scepter™ Handheld Automated Cell Counter (MILLOPORE)进行血细胞计数,得出所收集的血细胞数量。其余混合液置于15 mL离心管中,在4℃, 1 710 r/min离心3 min (湘仪, L420, 离心半径为13.7 cm),弃去上清液,将细胞重悬于2 mL抗凝剂中。在密度梯度体系上小心加入0.5 mL血细胞悬液(细胞数量约为 1.0×10^7 个),用水平转子,在4℃, 1 810 r/min离心20 min (湘仪, L420, 离心半径为13.7 cm)以分离不同血细胞类群^[35-36]。离心结束后,小心将细胞层吸出,并分别收集至离心管中。向离心管中加入4倍体积的稀释缓冲液,在4℃, 2 127 r/min离心7 min (Eppendorf, 5 430 R, 离心半径为8.9 cm)以去除Percoll^[36]。得到的血细胞沉淀用适量的抗凝剂重悬。将血细胞悬液分为4份:1份200 μL,加入等体积8%多聚甲醛溶液,室温固定10 min后进行流式细胞仪分析;1份50 μL,用抗凝剂稀释10倍后,进行血细胞计数并计算纯化得率;1份200 μL,进行原代培养;1份200 μL,进行死亡血细胞染色。

流式细胞仪分析 取适量固定后的血细胞悬液,4℃, 2 005 r/min离心3 min (Eppendorf, 5 430 R, 离心半径为8.9 cm),弃去上清液后重悬于400 μL PBS缓冲溶液中,用孔径为40 μm筛网过滤。滤液于BD FACS Calibur流式细胞仪上进行分析。流式数据用CELLQUESTPRO软件分析。

血细胞贴壁培养与观察 将血细胞于4℃, 2 005 r/min离心3 min (Eppendorf, 5 430 R, 离心半径为8.9 cm),弃上清液后,血细胞用L-15培养基小心重悬。取200 μL血细胞悬液,接种到48孔板中,静置15 min后,将原有培养基全部更换为新鲜的L-15培养基。血细胞在室温孵育45 min后,用终浓度4%多聚甲醛溶液固定10 min。吸去固定液,用PBS缓冲溶液洗涤3次,每次10 min。随后加入200 μL PBS缓冲溶液,置于光学显微镜下观察。

死亡细胞染色 实验组:向分离纯化的血细胞悬液中加入终浓度为20 μg/mL的PI,室温孵育15 min。阳性对照组:按“全血细胞的收集

与类群分离”所描述的方法收集血细胞, 取血细胞悬液(在抗凝剂中)400 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$, 2 005 r/min离心3 min (Eppendorf, 5 430 R, 离心半径为8.9 cm)。离心后弃去上清液, 用适量PBS缓冲溶液重悬血细胞, 加入终浓度70%的预冷无水乙醇, 于-20 $^{\circ}\text{C}$ 固定2 h。固定后的血细胞于4 $^{\circ}\text{C}$, 2 242 r/min离心20 min (Eppendorf, 5 430 R, 离心半径为8.9 cm)。离心后弃去上清液, 用400 μL PBS缓冲溶液洗涤血细胞。将血细胞重悬在适量PBS缓冲溶液中, 加入终浓度为20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的PI, 室温孵育15 min。阴性对照组: 按“不连续密度梯度的制备”的方法收集血细胞, 取血细胞悬液(在抗凝剂中)400 μL , 加入终浓度为20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的PI室温孵育15 min。

2 结果

2.1 分离体系的选择

以往对甲壳动物血细胞的密度梯度分离方法多使用KPBS(Kuruma shrimp PBS)、生理盐水或昆虫培养基来配制密度梯度^[15, 30, 37-38]。因此, 在本研究中首先选择使用L-15培养基作为稀释缓冲液, 将100% Percoll稀释成20%、60%、100%, 3种不同的浓度, 按密度从大到小的顺序加入5 mL流式管, 制作不连续密度梯度, 用以分离红螯光壳螯虾的血细胞。分离体系由上至下依次为0.5 mL血细胞悬液(在抗凝剂中)、1 mL 20% Percoll、2 mL 60% Percoll, 以及0.2 mL 100% Percoll, 总体积为3.7 mL。将上述体系在水平转子中4 $^{\circ}\text{C}$, 1 810 r/min离心20 min (湘仪, L420, 离心半径为13.7 cm)。

离心后, 血细胞可以被分为2个细胞层, 但细胞层界线不明显。从细胞层中收集的细胞较少, 并且存在不同程度的凝集。此外, 有部分细胞黏附在离心管壁上并聚集成团, 在后续操作中不易被分散。

于是实验改用抗凝剂作为缓冲液配置Percoll密度梯度。更改后的分离体系由上至下依次为0.5 mL血细胞悬液(在抗凝剂中)、1 mL 20% Percoll、2 mL 60% Percoll、0.2 mL 100% Percoll, 总体积3.7 mL。上述体系在水平转子中4 $^{\circ}\text{C}$, 1 810 r/min离心20 min (湘仪, L420, 离心半径为13.7 cm)。

按此条件离心后, 细胞被分为2个明显的细胞层, 第一层(上层), 位于20% Percoll与60%

Percoll的界面上; 第二层(下层), 位于60% Percoll与100% Percoll的界面上(图1)。从细胞层中收集到的细胞较多, 且基本没有发生凝集反应。

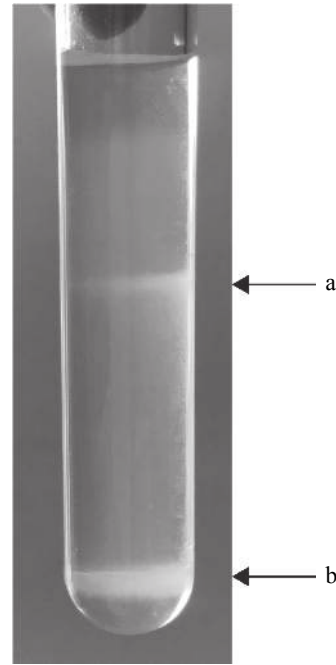


图1 不连续Percoll密度梯度离心后细胞被分为2个明显的细胞层

箭头a指示SGC细胞层, 箭头b指示GC细胞层

Fig. 1 Discontinuous Percoll density gradient centrifugation separated the hemocytes into two distinct cell layers

Arrow a indicates SGC layer, arrow b indicates GC layer

2.2 确定不同细胞层的细胞类型

为了确定上述2个细胞层的细胞类型, 分别收集2层细胞, 用终浓度4%的多聚甲醛溶液固定10 min后, 利用流式细胞仪进行细胞类型分析^[20]。用固定后的全血细胞(图2-a)以及2个细胞层的细胞1:1混合悬液(图2-b)作为对照。结果显示, 第1层的细胞在流式散点图中的位置与SGC重合(图2-c, 粉色); 第2层的细胞在流式散点图中的位置与GC重合(图2-d, 绿色); 2个细胞层细胞1:1混合的悬液在流式散点图上出现了2群细胞, 其位置分布与全血细胞一致。由此, 确定第1层细胞为SGC, 第2层细胞为GC(图1)。在流式散点图上, 将2群细胞所在的区域设为R1, 代表总细胞; GC所在区域设为R2(绿色); SGC所在区域设为R3(粉色); R1之外为细胞碎片(黑色)。利用流式细胞仪的分析软件CELLQUESTPRO, 将目标细胞数除以总细胞数, 计算出各个样品

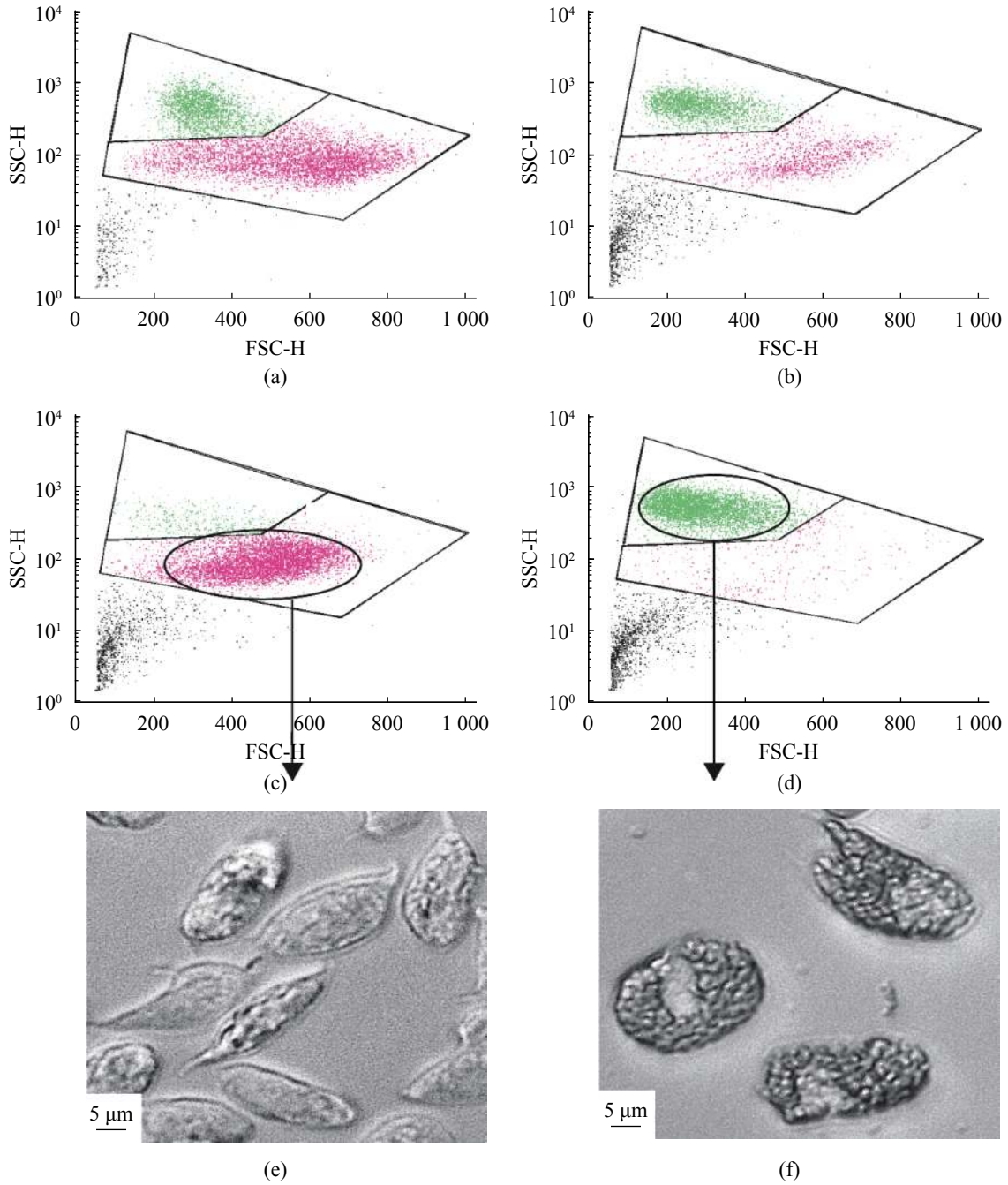


图 2 不同细胞的流式散点图与光学显微镜照片

散点图的横坐标为前向角信号(FSC),反映待测细胞的大小,纵坐标为侧向角信号(SSC),反映待测细胞的颗粒度;图中(a)-(d)分别表示BD FACS Calibur流式细胞仪分析全血细胞、分离后的GC与SGC 1:1混合、分离后的GC,以及分离后的SGC,(e)、(f)分别表示纯化的GC、SGC在光学显微镜下的形态

Fig. 2 Flow cytometry and microscopy analysis of different hemocytes

The X-axis in the scatter plots is forward scatter signal intensity (represents the size of cells) and Y-axis side scatter (represents the granularity of cells); (a)-(d) indicate FSC/SSC scatter plot of total hemocytes, the 1:1 mixture of purified GC and SGC, purified GC, and purified SGC, (e) and (f) are the images of purified GC and SGC

中不同细胞所占的比例。经过计算,全血细胞中GC比例为23.7%,SGC比例为76.3%;纯化之后,第1层GC比例为5.8%,SGC比例为94.2%,

第2层GC比例为94.7%,SGC比例为5.3%。进一步用显微镜观察得出同样的结论。因此使用该条件进行密度梯度离心分离血细胞,可获得2层

细胞。其中位于20% Percoll与60% Percoll界面上的细胞为SGC, 而位于60% Percoll与100% Percoll界面上的细胞为GC。

2.3 不同密度梯度的分离效果

密度梯度离心分离获得的SGC层的细胞中仍然混有一些GC, 反之亦然(图2)。由前面的分离实验可以看出中间层Percoll的浓度对纯化起到决定性作用, 因此, 实验进一步分析了中间层Percoll的浓度对细胞分离效果的影响。选择了50%、55%、60%、65%, 4种浓度的Percoll进行实验(图3), 分离方法同“不连续密度梯度的制备”。分离后得到的细胞被分别收集进行流式细胞仪分析, 通过比较分离后细胞的纯度确定最佳的密度梯度组成。

中间层Percoll浓度为50%的情况下, 体系对GC的分离效果较差, GC细胞层中参杂的SGC比例达到了15.1%。随着中层Percoll浓度增高, GC中参杂的SGC逐渐减少。在中间层Percoll浓度为65%时, GC中参杂的SGC比例降至4.2%, 达到了较好的GC分离效果。相对而言, 梯度组成的改

变对SGC的分离效果则影响不大, 分离后的SGC中参杂的GC比例在3.8%~4.5%间波动, 均不超过5%(图3)。使用不连续密度梯度由上至下依次为20% Percoll、65% Percoll、100% Percoll的密度梯度, 分离细胞总量为 $(1.04 \pm 0.1) \times 10^7$ 的全血细胞, 分离后的GC总量为 $(4.6 \pm 0.1) \times 10^5$ 个血细胞, SGC总量为 $(2.3 \pm 0.5) \times 10^6$ 个血细胞。总血细胞得率为 $26.0\% \pm 2.1\%$ 。

2.4 分离后血细胞的细胞活力分析

为了解分离过程对细胞活力的影响, 将分离得到的2种血细胞分别接种于培养板中, 培养1 h后2种血细胞均贴壁(图4-a, b), 并伸出了伪足, 形状由原来的圆形或月牙形变成了上皮细胞状或成纤维细胞状。这证明分离后的血细胞依然存活。此外, 通过分析GC的脱颗粒情况(表1), 发现全血细胞在接种1 h后, 有 $68.7\% \pm 2.7\%$ 的GC发生了脱颗粒(图4-c), 而纯化的GC中仅 $19.5\% \pm 6.0\%$ 的血细胞发生脱颗粒(图4-d), 这说明脱颗粒反应可能是由不同类群的血细胞协作完成的。

为了进一步证明分离后血细胞的存活情况,

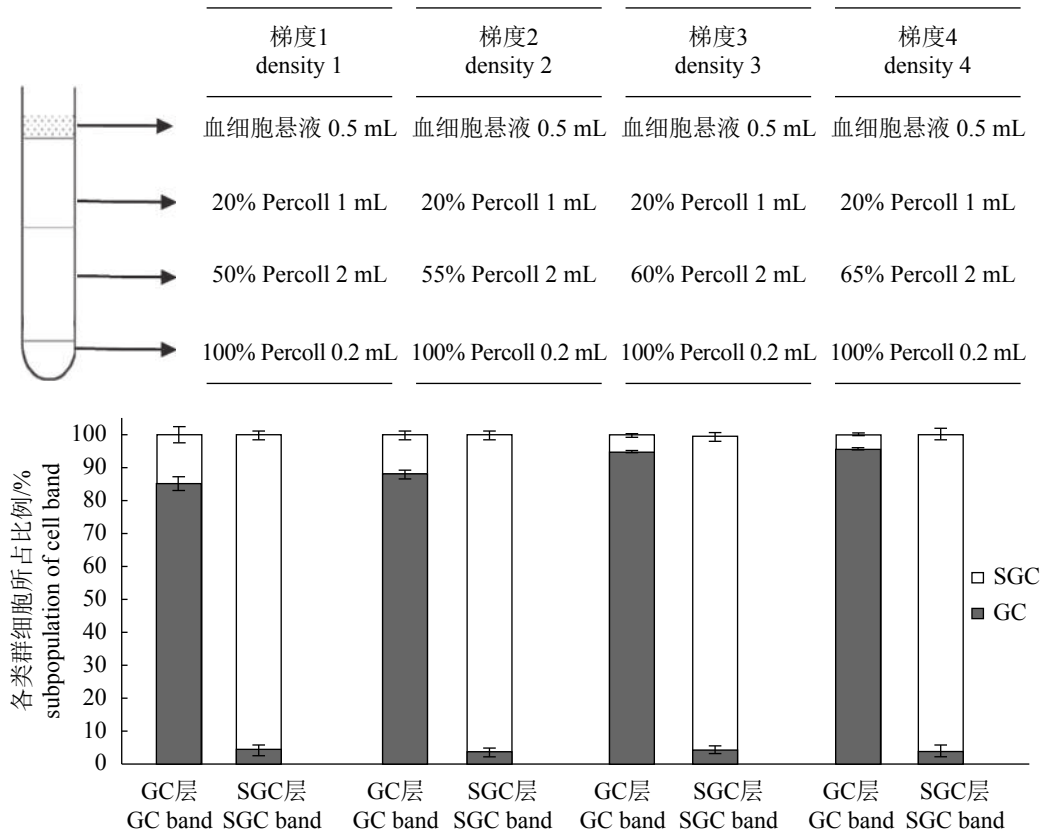


图3 4种不连续Percoll密度梯度的组成及其分离效果对比

Fig. 3 Composition of discontinuous Percoll density gradients and corresponding purification results

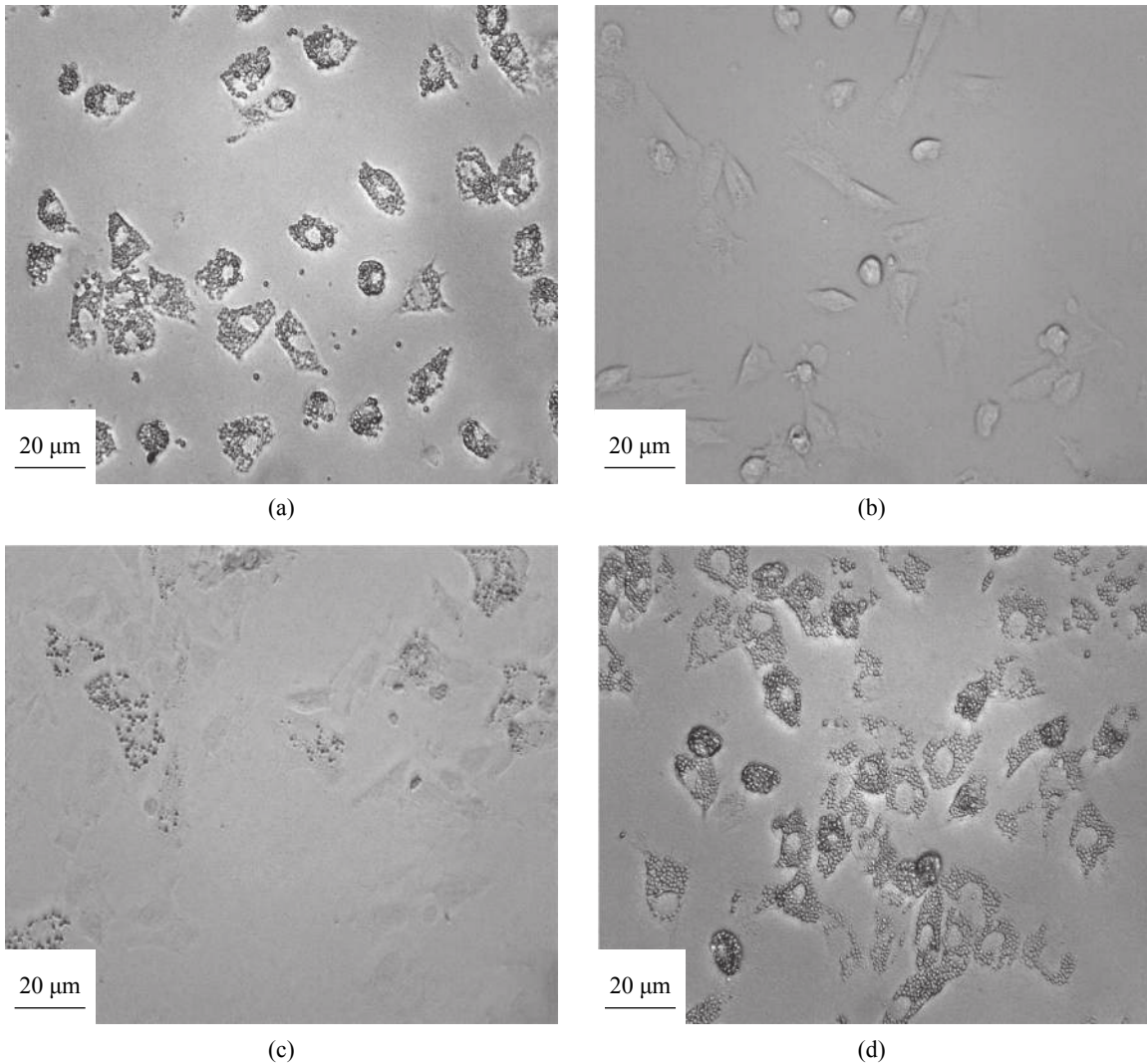


图 4 不同细胞的贴壁及脱颗粒情况

(a)、(b)表示分离后的GC、分离后的SGC的贴壁情况；(c)、(d)表示未分离的血淋巴细胞、分离后的GC出现脱颗粒情况

Fig. 4 Adhesion and degranulation of hemocytes

(a), (b) indicate adhesion of purified GC and SGC; (c), (d) indicate the degranulation of adherent total hemocytes cell and purified GC

表 1 全血细胞与纯化后的GC脱颗粒比例计算
Tab. 1 Degranulation of total hemocytes and isolated GC

| 样品 samples | 实验1 test 1 | 实验2 test 2 | 实验3 test 3 | 实验4 test 4 | 平均值 mean | 标准差 SD | % |
|-------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-------------|-----------|---|
| 分离后的GC isolated GC | 14.29 | 21.05 | 28.57 | 13.95 | 19.47 | 5.97 | |
| 全血细胞 total hemocytes | 69.23 | 70.00 | 64.29 | 71.43 | 68.74 | 2.69 | |

用终浓度20 μg/mL的PI对分离后得到的2种细胞进行染色。死亡的细胞会被染上红色荧光，而活细胞不被染色。流式分析显示(图 5)，纯化后的SGC与阴性对照血细胞的死亡细胞比例均小于1.5%，纯化GC的死亡细胞比例为4.91%，而阳性对照死亡细胞比例为99.04%。用荧光显微镜观察也得出同样结论(图6)。以上结果说明，经过分

离操作的细胞依然存活，因此，本研究建立的分选方法对细胞伤害较小。

3 讨论

本研究首先对配置密度梯度体系的基础缓冲液进行了筛选，发现使用L-15培养基作为

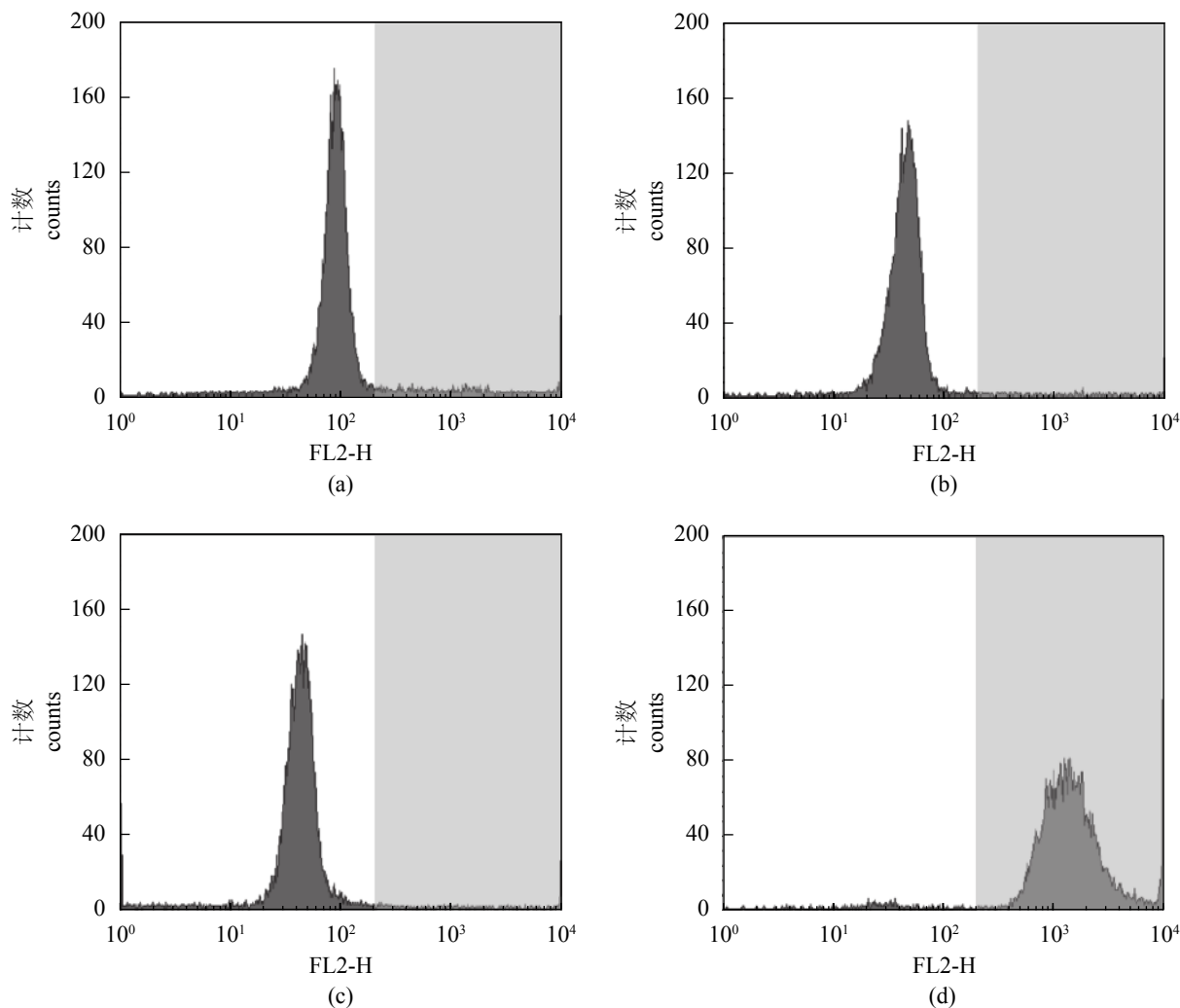


图 5 死亡细胞染色的流式分析结果

横坐标为荧光强度, 纵坐标为相应的细胞数量, 阴影部分为死亡细胞计算范围; 图中(a)~(d)分别表示BD FACS Calibur流式细胞仪分析PI染色分离后的GC (死亡细胞比例为4.9%)、PI染色分离后的SGC (死亡细胞比例为1.2%)、活体全血细胞(死亡细胞比例为1.4%)、PI染色乙醇固定通透后的血细胞(死亡细胞比例为99.0%)

Fig. 5 The flow cytometry results of death cell staining

The X-axis represent fluorescence intensity and Y-axis cell counts, the shaded parts represent range of calculation about death cells; (a)-(d) indicate the flow cytometry images of GC isolated from primary hemocytes dyed with PI (dead cells ratio is 4.9%), SGC isolated from primary hemocytes dyed with PI (dead cells ratio is 1.2%), normal primary hemocytes dyed with PI (dead cells ratio is 1.4%), primary hemocytes fixed with 70% ethanol then dyed with PI (dead cells ratio is 99.0%), respectively

Percoll稀释缓冲液进行分离后, 细胞存在凝集现象, 不易分散, 细胞得率较低, 细胞状态较差, 因此, 推测细胞凝集现象的出现与血细胞的凝集反应有关。由于L-15培养基不能抑制细胞的凝集反应, 离心过程中一旦凝集反应被触发, 细胞就会相互聚集, 形成细胞团。抗凝剂可以抑制螯虾血细胞的凝集反应^[39], 因此, 改用抗凝剂作为缓冲液配置Percoll密度梯度, 这有效地减少了血细胞在分离过程中的凝集、贴壁情况, 使收集的细胞达到了后续实验的要求。因此, 在

对血细胞等易发生自凝集反应的细胞进行处理时, 可用相应的抗凝剂作为缓冲液稀释工作液, 使细胞处于封闭状态, 从而降低凝集反应所带来的影响。

其次, 本研究对密度梯度的组成进行了优化, 发现中间层Percoll的浓度对分离的效果起到决定性作用。并最终确定最优的分离体系为20% Percoll (1 mL)、65% Percoll (2 mL)、100% Percoll (0.2 mL)。此时纯化的2种细胞中掺杂的其他类群的细胞比例, 以及死亡细胞比率均小于5%, 达

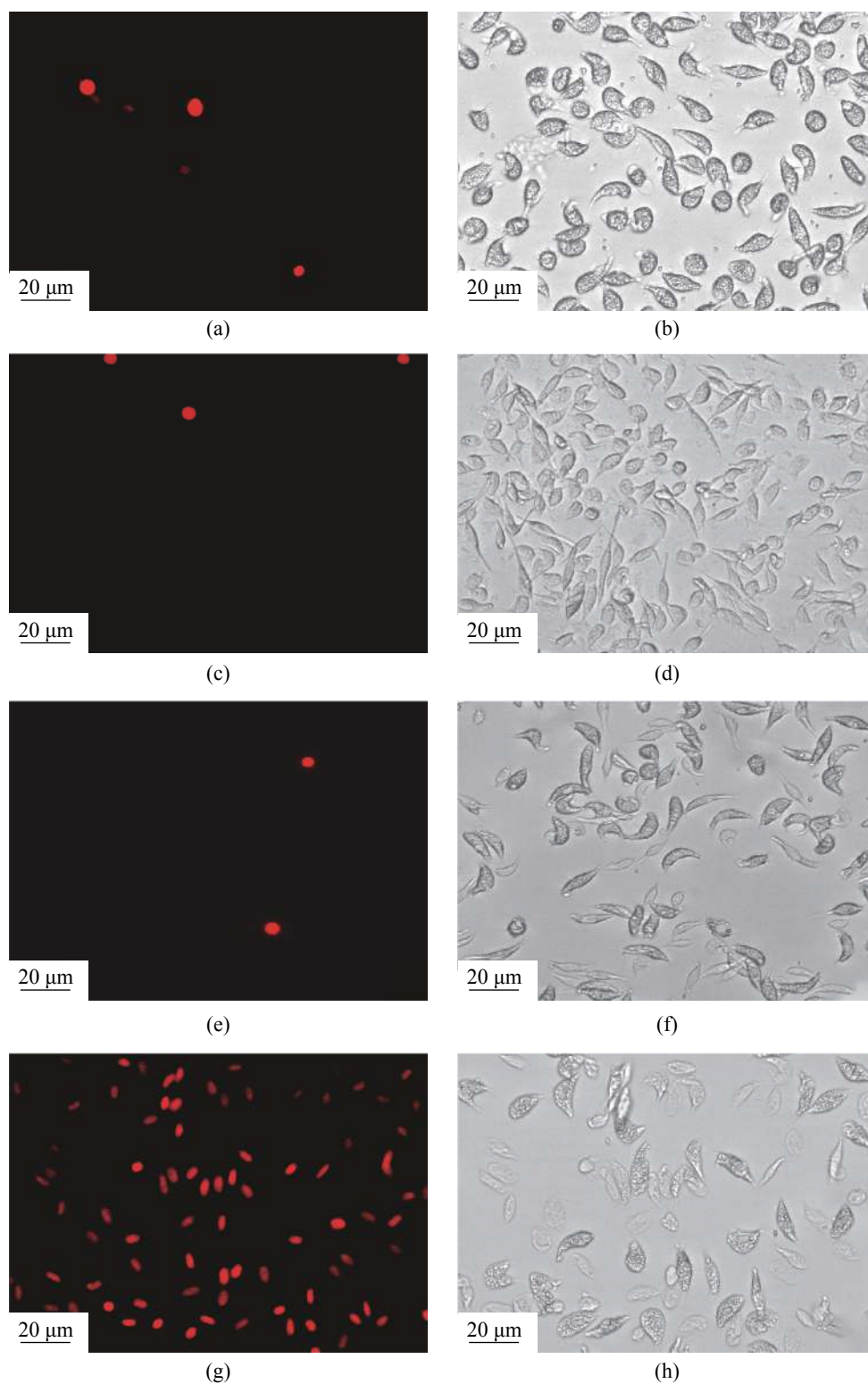


图 6 荧光显微镜观察死亡细胞染色

(a)、(b)表示分离后的GC的死亡细胞染色结果，(c)、(d)表示分离后的SGC的死亡细胞染色结果，(e)、(f)表示活全血细胞(阴性对照)的死亡细胞染色结果，(g)、(h)表示死亡全血细胞(阳性对照)的死亡细胞染色结果

Fig. 6 The fluorescence micrograph of death cell staining

(a) and (b) indicate the death cell staining results of isolated GC, (c) and (d) indicate the death cell staining results of isolated SGC, (e) and (f) indicate the death cell staining results of living primary hemocytes (negative control), (g) and (h) indicate the death cell staining results of death primary hemocytes (positive control)

到了较好的血细胞类群分离效果。

已有研究显示, 通过密度梯度离心, 螯虾或蟹的血细胞能分为3个细胞类群: HC, SGC和GC^[15], 但在本实验中仅获得了SGC与GC 2类细胞。这主要是由于本研究所使用的红螯光壳螯虾循环血中HC数量稀少^[20], 虽然通过光学显微镜观察, 可以发现极少量细胞符合HC的特征, 但是由于数量太低, 流式分析中不能看到单独的HC细胞群。因此, 密度梯度离心中也没有出现HC细胞层。此外, 螯虾的HC被认为是一类含量低的未成熟的血细胞, 在某种条件下被提前释放到循环系统中^[40], 因此, HC的含量可能会随着螯虾的种类、生理和免疫状态而出现差异。

此外, 发现经过分离操作后, GC的脱颗粒速率减缓, 程度减轻。有研究证实, 细胞裂解液的上清液(haemocyte lysate supernatant, HLS)可通过PKC通路诱导细胞脱颗粒, 从而导致酚氧化酶原系统(proPO system)启动^[41]。因此推测, 经过分离操作后不同类群的细胞被分开, GC的脱颗粒反应无法被SGC产生的某些物质启动, 使脱颗粒情况得到缓解。

综上所述, 本研究建立了一种简单的不连续密度梯度离心方法, 能分离获得纯度高活力好的红螯光壳螯虾SGC与GC。分离得到的细胞可用于研究不同类群细胞在细胞或体液免疫中功能。

参考文献:

- [1] 潘晓艺, 沈锦玉, 曹铮, 等. 红螯光壳螯虾主要病害的研究进展[J]. *水产科学*, 2009, 28(8): 485-488.
Pan X Y, Shen J Y, Cao Z, *et al.* Advances in disease research in prawn *Cherax quadricarinatus*[J]. *Fisheries Science*, 2009, 28(8): 485-488(in Chinese).
- [2] Tropea C, Piazza Y, Greco L S L. Effect of long-term exposure to high temperature on survival, growth and reproductive parameters of the "redclaw" crayfish *Cherax quadricarinatus*[J]. *Aquaculture*, 2010, 302(1-2): 49-56.
- [3] 蒋琦辰, 张文逸, 谭红月, 等. 不同光周期下红螯光壳螯虾幼虾摄食节律的研究[J]. *淡水渔业*, 2012, 42(5): 89-91.
Jiang Q C, Zhang W Y, Tan H Y, *et al.* A study on the feeding rhythm of juvenile Australia red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) under different photoperiods[J]. *Freshwater Fisheries*, 2012, 42(5): 89-91(in Chinese).
- [4] Bachère E. Shrimp immunity and disease control[J]. *Aquaculture*, 2000, 191(1-3): 3-11.
- [5] Lightner D V, Poulos B T, Tang-Nelson K F, *et al.* Application of molecular diagnostic methods to penaeid shrimp diseases: advances of the past 10 years for control of viral diseases in farmed shrimp[J]. *Developments in Biologicals*, 2006, 126: 117-22; discussion 325-6.
- [6] Lightner D V, Redman R M. Opportunities for training in shrimp diseases[J]. *Developments in Biologicals*, 2007, 129: 137-146.
- [7] Kurtz J, Franz K. Evidence for memory in invertebrate immunity[J]. *Nature*, 2003, 425(6953): 37-38.
- [8] 马寨璞, 张繁霜, 佟霁坤. 甲壳动物免疫系统概述及其图论表示[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(1): 291-294.
Ma Z P, Zhang F S, Tong J K. Overview and graph theory of the immune system of *Crustacean*[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(1): 291-294(in Chinese).
- [9] 姚翠鸾, 王志勇, 相建海. 甲壳动物血细胞及其在免疫防御中的功能[J]. *动物学研究*, 2006, 27(5): 549-557.
Yao C L, Wang Z Y, Xiang J H. Crustacean haemocytes and their function in immune responses[J]. *Zoological Research*, 2006, 27(5): 549-557(in Chinese).
- [10] Thörnqvist P O, Johansson M W, Söderhäll K. Opsonic activity of cell adhesion proteins and β -1, 3-glucan binding proteins from two crustaceans[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 1994, 18(1): 3-12.
- [11] Hoffmann J A, Kafatos F C, Janeway Jr C A, *et al.* Phylogenetic perspectives in innate immunity[J]. *Science*, 1999, 284(5418): 1313-1318.
- [12] Torres M A, Dangl J L. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2005, 8(4): 397-403.
- [13] Johansson M W, Keyser P, Sritunyalucksana K, *et al.* Crustacean haemocytes and haematopoiesis[J]. *Aquaculture*, 2000, 191(1-3): 45-52.
- [14] 邹广众, 孙虎山. 水产甲壳动物免疫学研究进展与前景展望[J]. *生命科学仪器*, 2009, 7(6): 17-21.
Zou G Z, Sun H S. Research advances and prospect in aquatic crustaceans immunology[J]. *Life Science Instruments*, 2009, 7(6): 17-21(in Chinese).
- [15] Söderhäll K, Smith V J. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution[J]. *Developm-*

- ental & Comparative Immunology, 1983, 7(2): 229-239.
- [16] Van De Braak C B T, Botterblom M H A, Liu W, *et al.* The role of the haematopoietic tissue in haemocyte production and maturation in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2002, 12(3): 253-272.
- [17] Li C W, Shields J D. Primary culture of hemocytes from the Caribbean spiny lobster, *Panulirus argus*, and their susceptibility to *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1)[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2007, 94(1): 48-55.
- [18] Van De Braak C B T, Faber R, Boon J H. Cellular and humoral characteristics of *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) haemolymph[J]. *Comparative Haematology International*, 1996, 6(4): 194-203.
- [19] Vargas-Albores F, Gollas-Galván T, Hernández-López J. Functional characterization of *Farfantepenaeus californiensis*, *Litopenaeus vannamei* and *L. stylirostris* haemocyte separated using density gradient centrifugation[J]. *Aquaculture Research*, 2005, 36(4): 352-360.
- [20] Li F, Chang X F, Xu L M, *et al.* Different roles of crayfish hemocytes in the uptake of foreign particles[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 77: 112-119.
- [21] Ratcliffe N A, Rowley A F, Fitzgerald S W, *et al.* Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances[J]. *International Review of Cytology*, 1985, 97: 183-350.
- [22] Johansson M W, Söderhäll K. The prophenoloxidase activating system and associated proteins in invertebrates[M]//Rinkevich B, Müller W E G. *Invertebrate Immunology*. Berlin, Heidelberg: Springer, 1996, 15: 46.
- [23] Söderhäll K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity[J]. *Current Opinion in Immunology*, 1998, 10(1): 23-28.
- [24] Galko M J, Krasnow M A. Cellular and genetic analysis of wound healing in *Drosophila* larvae[J]. *PLoS Biology*, 2004, 2(8): E239.
- [25] Christensen B M, Li J Y, Chen C C, *et al.* Melanization immune responses in mosquito vectors[J]. *Trends in Parasitology*, 2005, 21(4): 192-199.
- [26] Jiravanichpaisal P, Lee B L, Söderhäll K. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization[J]. *Immunobiology*, 2006, 211(4): 213-236.
- [27] Lemaitre B, Hoffmann J. The host defense of *Drosophila melanogaster*[J]. *Annual Review of Immunology*, 2007, 25: 697-743.
- [28] Cerenius L, Lee B L, Söderhäll K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity[J]. *Trends in Immunology*, 2008, 29(6): 263-271.
- [29] Zhu L, Chang Y H, Xing J, *et al.* Comparative proteomic analysis between two haemocyte subpopulations in shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 72: 325-333.
- [30] Zhou Y L, Gu W B, Tu D D, *et al.* Hemocytes of the mud crab *Scylla paramamosain*: cytometric, morphological characterization and involvement in immune responses[J]. *Fish Shellfish Immunology*, 2018, 72: 459-469.
- [31] Johansson M W, Söderhäll K. Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish haemocytes[J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 1985, 156(2): 175-181.
- [32] Koiwai K, Alenton R R R, Shiomi R, *et al.* Two hemocyte sub-populations of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*[J]. *Molecular Immunology*, 2017, 85: 1-8.
- [33] Liu C H, Cheng W, Chen J C. The peroxinectin of white shrimp *Litopenaeus vannamei* is synthesised in the semi-granular and granular cells, and its transcription is up-regulated with *Vibrio alginolyticus* infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2005, 18(5): 431-444.
- [34] 洗建安, 王安利, 苗玉涛. 流式细胞术在克氏原螯虾血细胞的分类、活性和免疫功能研究中的应用[J]. *淡水渔业*, 2012, 42(1): 9-14.
- Xian J A, Wang A L, Miao Y T. Application of flow cytometry in studies of classification, viability and immune parameters of *Procambarus clarkii* Haemocytes[J]. *Freshwater Fisheries*, 2012, 42(1): 9-14(in Chinese).
- [35] Smith V J, Söderhäll K. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 1991, 15(4): 251-261.
- [36] Johansson M W, Söderhäll K. Separation of crustacean blood cells by continuous density gradient centrifugation[M]//Stolen J S, Fletcher T C, Smith S A, *et al.* *Techniques in Fish Immunology: Fish Immunology Technical Communication 4*. New Jersey: SOS Publicat-

- ions, 1995: 141-145.
- [37] Mangkalan S, Sanguanrat P, Utairangsri T, *et al.* Characterization of the circulating hemocytes in mud crab (*Scylla olivacea*) revealed phenoloxidase activity[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 44(1): 116-123.
- [38] Ding Z F, Du J, Ou J T, *et al.* Classification of circulating hemocytes from the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* and their susceptibility to the novel pathogen *Spiroplasma eriocheiris in vitro*[J]. *Aquaculture*, 2012, 356-357: 371-380.
- [39] Durliat M, Vranckx R. Action of various anticoagulants on hemolymphs of lobsters and spiny lobsters[J]. *The Biological Bulletin*, 1981, 160(1): 55-68.
- [40] Söderhäll I. Crustacean hematopoiesis[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2016, 58: 129-141.
- [41] Jiravanichpaisal P, Sricharoen S, Söderhäll I, *et al.* White spot syndrome virus (WSSV) interaction with crayfish haemocytes[J]. *Fish Shellfish Immunology*, 2006, 20(5): 718-727.

Separation of hemocytes of *Cherax quadricarinatus* by Percoll discontinuous density gradient centrifugation

FU Rongrong , LI Fang * , YANG Feng

(Key Laboratory of Marine Genetic Biogenetic Resources, Third Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Xiamen 361005, China)

Abstract: we developed a method to separate the GC and SGC of *Cherax quadricarinatus* by using discontinuous Percoll density gradient centrifugation. The dilution buffer and the combination of density gradient were optimized. We found that the density gradient should be diluted in anti-clotting buffer to prevent hemocytes aggregation, and the discontinuous Percoll density gradient that consisted of 20%, 65% and 100% of Percoll provided the best result compared with others. After centrifugation at 1 810 r/min for 20 min, the hemocytes were separated into two layers, corresponding to SGC and GC, respectively. Flow cytometry analysis showed that the purities of both fractions were >95% and the cell mortalities were <1.5%. The isolated cells were in good status and could be readily used for further analysis. This simple and effective method will facilitate the study on the function of different hemocytes and thus provide information for disease control.

Key words: *Cherax quadricarinatus*; subpopulation of hemocytes; discontinuous density gradient centrifugation; immune defence

Corresponding author: LI Fang. E-mail: lifang@tio.org.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31672675)