

# 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)血淋巴中 一氧化氮和一氧化氮合酶的研究\*

孙虎山 王宜艳 王晓安 葛玲 孙修勤 李光友

(烟台师范学院生命科学学院 烟台 264025)

(国家海洋局第一海洋研究所 青岛 266061)

**提要** 采用组织化学、免疫组化和生物化学方法对栉孔扇贝血淋巴中的一氧化氮和一氧化氮合酶(EC1.14.13.39; NOS)进行了研究。结果表明,大部分血细胞呈NOS组化阳性,少量呈强阳性或弱阳性。神经型一氧化氮合酶(nNOS)和内皮型一氧化氮合酶(eNOS)在大部分血细胞呈阳性,且多在其细胞质局部集中分布;诱生型一氧化氮合酶(iNOS)在大部分血细胞也呈阳性,但多较均匀分布。分光光度测定结果表明,血清和血细胞中均存在NOS和NO,结构型一氧化氮合酶(eNOS, nNOS+ eNOS)活力分别为2.87U和2.61U; iNOS活力分别为0.32U和0.45U; NO的含量分别为:33.64和41.67 $\mu$ mol/g蛋白。病毒感染后,血清和血细胞中总一氧化氮合酶(iNOS)活力实验组均高于对照组,3h时差异显著,9h和24h时差异极显著;血清和血细胞中iNOS活力在3h、9h和24h时,实验组均高于对照组,且均差异极显著;血清和血细胞中NO含量在3h、9h和24h时,实验组也均高于对照组,且均差异极显著。栉孔扇贝血淋巴中存在的NO-NOS体系可在抵抗病原生物感染方面发挥重要的作用。

**关键词** 栉孔扇贝,血淋巴,一氧化氮,一氧化氮合酶,酶活力

**中图分类号** Q26

自1987年发现动物体内存在内源性一氧化氮(NO)以来,NO的生理和病理作用日益受到人们的重视,大量研究表明,NO具有舒张血管、作为中枢和外周神经系统的信息物质、作为白细胞的效应器分子参与抗感染抗肿瘤免疫反应等多种生理功能(孙雷等,2003; Schar sack *et al.*, 2003)。内源性NO是由L-精氨酸通过一氧化氮合酶(EC1.14.13.39; NOS)的作用而产生的(Nathan, 1992)。有关NO和NOS的研究,主要集中在医学领域,对无脊椎动物尤其是双壳贝类的相关研究较少(Nieto-Fernandez *et al.*, 2000; Stefano *et al.*, 2000)。有关栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)NO和NOS的研究,国内外均未见报道。作者采用组织化学、免疫组化和生物化学技术,对栉孔扇贝血淋巴中NO和NOS进行了研究,以探索贝类抗感染免疫反应和免疫调节的机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 栉孔扇贝及实验病毒

栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)为烟台芝罘湾内人工养殖的3龄贝,壳长45—50mm,置于水族箱中暂养。每日换水一次,水温为20—21 $^{\circ}$ C。实验所用病毒由中国水产科学研究院黄海水产研究所农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室赠送,是从胶洲湾大批量死亡期的患病栉孔扇贝体内提取的一种非包涵体球状病毒。

### 1.2 试剂

兔抗大鼠神经型一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS, NOS1)、兔抗人诱生型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS, NOS2)和兔抗人内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS, NOS3)的多克隆抗体均

\* 国家重点基础研究发展规划项目(973)资助, G1999012005号。孙虎山, 博士, 教授, E-mail: s\_hushan@163.com

收稿日期: 2004-01-13, 收修改稿日期: 2004-04-12

购自 Santa Cruz 公司, ABC 试剂盒为福州迈新生物技术开发公司(Maixi-Bio) 产品, 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(辅酶 II, NADPH)、葡萄糖氧化酶、二盐酸联苯胺、硝酸盐还原酶、葡萄糖-6-磷酸、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、对氨基苯磺酰胺、N-(1-萘基)-乙二胺购自 Sigma 公司, 其他试剂均为国产分析纯。

### 1.3 组织化学

用注射器从扇贝闭壳肌血窦中取血, 用 0.1mol/L、pH 7.4 磷酸盐缓冲液(0.9% NaCl; phosphate-buffered saline, PBS) 配制 4% 多聚甲醛, 于 4℃ 固定 24h, 3000r/min 转速离心 10min, 去上清。将所得血细胞用 0.05mol/L、pH 7.4 PBS 漂洗 3 次, 每次 10min, 滴加包埋剂后迅速冻结, 冰冻切片, 厚度为 10 $\mu$ m。放入含有 1mg/ml  $\beta$ -NADPH、0.1mg/ml 氯化硝基氮蓝四唑、0.05mol/L PBS、0.3% Triton X-100 的 NOS 反应液, 37℃, 30min。染色反应的材料经 0.05mol/L、pH 7.4 PBS 漂洗 3 次, 每次 10min, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固。镜检并拍照记录结果。实验中设  $\beta$ -NADPH 空白对照(贲长恩等, 2001)。

### 1.4 免疫组化

取血、固定、漂洗和冰冻切片等同组织化学方法。切片厚度为 10 $\mu$ m。切片用 0.3% 过氧化氢-甲醇处理 30min, 10% 正常绵羊血清孵育 30min。nNOS、iNOS 和 eNOS 一抗室温湿盒孵育 1—4h, PBS 漂洗 3 次, 每次 10min。1:200 生物素标记羊抗兔 IgG 室温湿盒孵育 1h, PBS 漂洗 3 次, 每次 10min。1:200 链霉菌抗生物素蛋白-过氧化氢复合物室温湿盒孵育 1h, PBS 漂洗 3 次, 每次 10min。二盐酸联苯胺法显色。切片经脱水、透明和封固后光镜观察并拍照。实验中以抗体稀释液代替一抗作为空白对照(贲长恩等, 2001)。

### 1.5 病毒感染

选健壮无损伤的栉孔扇贝 40 只, 随机分成实验组和对照组, 每组 20 只, 分别养于室内水族箱中, 水温 18—20℃, 每天换水一次。取经分离纯化的球状病毒上清液, 用 2% 氯化钠溶液稀释 100 倍, 按每个个体注射 100 $\mu$ l 的剂量, 用微量进样器从栉孔扇贝闭壳肌背后缘注射, 对照组注射等量的 2% 氯化钠溶液。分别于 3h、9h 和 24h 取血用于 NOS 活性和 NO 含量的测定。

### 1.6 NOS 生化测定

从闭壳肌血窦中取血, 3000r/min 的转速离心

10min, 移出血清, 将剩余的血细胞加上与血清等量的双蒸水, 经振荡溶血后, 用 5000r/min 离心 10min, 得血细胞溶血上清。NOS 生化测定采用格氏试剂法, 0.1ml 待测样品液加入 0.4ml 含与不含 2mmol/L  $Ca^{2+}$  的孵育液(内含 50mmol/L tris-HCl pH7.4, 100mmol/L NADPH, 30 $\mu$ mol/L L-精氨酸), 以分别代表总 NOS (tNOS) 和 iNOS 活性, 25℃, 30min; 加入 0.1ml 冷终止液(内含 20mmol/L 醋酸钠, 1mmol/L L-瓜氨酸, 2mmol/L EDTA, 0.2mmol/L EGTA) 终止反应, 然后再加入 0.3ml 1% 对氨基苯磺酰胺(溶于 5% 磷酸)和 0.3ml 0.1% N-(1-萘基)-乙二胺, 10min; 0.5cm 光径比色皿 550nm 下测各管吸光度值(庞战军等, 2000)。酶活力单位定义: 每 mg 蛋白每 min 生成 1nmol NO 为一个酶活力单位(U)。

### 1.7 NO 生化测定

血清和血细胞溶血上清的制备同 NOS 生化测定。NO 生化测定采用硝酸盐还原酶偶联法, 0.1ml 待测样品液或 100 $\mu$ mol/L  $KNO_3$  标准品液中加入 0.2ml 2.5 $\mu$ mol/L NADPH 和 0.2ml 基质液(含 1.25mmol/L 葡萄糖-6-磷酸, 400U/L 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, 200U/L 硝酸盐还原酶), 25℃, 60min; 加入 0.2ml 200mmol/L  $ZnSO_4$  和 0.1ml 440mmol/L NaOH, 10min, 4000r/min 离心 10min; 取离心上清 0.5ml, 加入 0.3ml 1% 对氨基苯磺酰胺(溶于 5% 磷酸)和 0.3ml 0.1% N-(1-萘基)-乙二胺, 10min; 蒸馏水调零, 0.5cm 光径比色皿 550nm 下测各管吸光度值(庞战军等, 2000)。NO 含量按下列公式计算:

$$NO(\mu\text{mol/g 蛋白}) = (\text{样品管吸光度} - \text{空白管吸光度}) / (\text{标准管吸光度} - \text{空白管吸光度}) \times \text{标准品浓度}(100\mu\text{mol/L}) \div \text{样品的 g 蛋白/L}$$

### 1.8 蛋白含量测定和数据处理

蛋白含量的测定采用 Lowry 等(1951)的 Folin-酚试剂法, 以牛血清蛋白为标准蛋白。生化测定实验结果统计处理采用 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 血细胞 NOS 组织化学定位

组织化学方法显示栉孔扇贝血细胞内的 NOS, 大部分血细胞呈 NOS 阳性, 阳性物质浅蓝色, 分布于细胞质中, 较均匀, 可清楚地看到呈 NOS 阴性的细胞核; 少量血细胞呈 NOS 强阳性, 细胞质中的阳性物质为深蓝色团块状, 常遮盖了

细胞核; 另有少量血细胞呈 NOS 弱阳性(图 1a)。

### 2.2 血细胞 NOS 免疫组化定位

免疫组化显示栉孔扇贝血细胞内的 3 种类型 NOS, nNOS(图 1b) 和 eNOS(图 1d) 在大部分血细胞

呈阳性, NOS 阳性物质多呈团块状且多在其细胞质局部集中分布; iNOS 在大部分血细胞也呈阳性, 但多在其细胞质中较均匀分布, 可看到呈 NOS 阴性的细胞核(图 1c)。

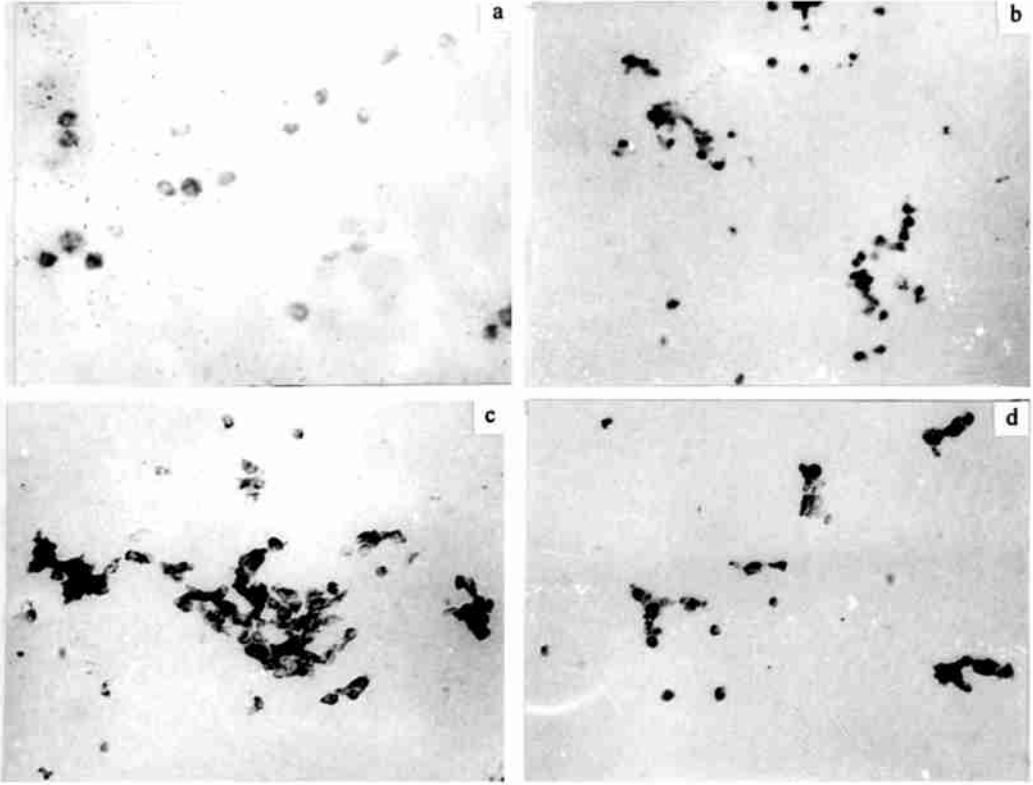


图 1 栉孔扇贝血细胞一氧化氮合酶的组织化学和免疫组化定位

Fig. 1. Histochemical and immunohistochemical localization of the NOS in the haemocytes of *C. farreri*

a. NOS 组织化学定位; b. nNOS 免疫组化定位; c. eNOS 免疫组化定位; d. iNOS 免疫组化定位。

放大倍数均为 300 倍

### 2.3 血淋巴中 NOS 活力和 NO 含量

栉孔扇贝血清和血细胞中总一氧化氮合酶 (tNOS)、结构型一氧化氮合酶 (cNOS, nNOS + eNOS) 和 iNOS 活力及其 NO 含量的测定结果见表

1。结果表明, 血清和血细胞中均存在 cNOS、iNOS 和 NO, cNOS 活力分别为 2.87U 和 2.61U; iNOS 活力分别为 0.32U 和 0.45U; NO 的含量分别为 33.64 和 41.67 $\mu$ mol/g 蛋白。

表 1 栉孔扇贝血淋巴中 NOS 活力和 NO 含量

Tab. 1 Activity of NOS and content of NO in haemolymph of *C. farreri*

类别	tNOS(U)	结构型一氧化氮合酶(U)	iNOS(U)	NO( $\mu$ mol/g 蛋白)
血清	3.19 $\pm$ 0.21	2.87 $\pm$ 0.13	0.32 $\pm$ 0.03	33.64 $\pm$ 2.33
血细胞	3.06 $\pm$ 0.23	2.61 $\pm$ 0.17	0.45 $\pm$ 0.05	41.67 $\pm$ 2.68

注: 活力值或含量为平均值 $\pm$ 标准误( $n=5$ ), 表 2、表 3 同

### 2.4 病毒感染后栉孔扇贝的症状

感染病毒的扇贝 3h 时取血较困难, 体内血淋巴减少; 于 6h 开始即出现染病症状, 并逐渐加重。

闭壳肌开闭无力, 对外界刺激反应迟钝; 外套眼无光泽, 外套膜附着肌与贝壳脱离, 整个外套膜向壳顶方向收缩; 足丝易脱落; 肾脏变脆, 易剥离; 严重

的个体鳃丝糜烂, 24h 开始陆续死亡。

## 2.5 病毒感染后血淋巴中 NOS 活力的变化

注射病毒后, 栉孔扇贝血清和血细胞中的 NOS 活力的测定结果见表 2。由表 2 可以看出, 血清中的 tNOS 活力实验组均高于对照组, 在 3h 时差异显著, 在 9h 和 24h 时差异极显著。血清中的

iNOS 活力实验组也均高于对照组, 且均差异极显著。血细胞中的 tNOS 活力实验组均高于对照组, 在 3h 时差异显著, 在 9h 和 24h 时差异极显著。血细胞中的 iNOS 活力也均高于对照组, 且均差异极显著。随着病毒感染时间的延长, 实验组血清和血细胞中 tNOS 和 iNOS 活力均有升高的趋势。

表 2 病毒感染后栉孔扇贝血淋巴中 NOS 活力

Tab. 2 The activities of NOS in haemolymph of *C. farrei* after challenge with virus

时间(h)	3	9	24
血清 tNOS 实验组(U)	4.76±0.45	5.46±0.39	7.53±0.72
血清 tNOS 对照组(U)	3.43±0.37	3.89±0.31	3.55±0.46
<i>P</i>	< 0.05	< 0.01	< 0.01
血清 iNOS 实验组(U)	1.24±0.07	1.67±0.05	2.01±0.06
血清 iNOS 对照组(U)	0.36±0.03	0.41±0.03	0.55±0.07
<i>P</i>	< 0.01	< 0.01	< 0.01
血细胞 tNOS 实验组(U)	4.64±0.51	5.33±0.77	5.67±0.55
血细胞 tNOS 对照组(U)	3.40±0.33	3.54±0.21	3.57±0.19
<i>P</i>	< 0.05	< 0.01	< 0.01
血细胞 iNOS 实验组(U)	1.03±0.07	1.29±0.11	1.33±0.09
血细胞 iNOS 对照组(U)	0.61±0.05	0.54±0.05	0.63±0.03
<i>P</i>	< 0.01	< 0.01	< 0.01

## 2.6 病毒感染后血淋巴中 NO 含量的变化

注射病毒后, 栉孔扇贝血清和血细胞中的 NO 含量的测定结果见表 3。由表 3 可知, 血清和血细胞中均存在 NO。血清和血细胞中 NO 的含量在 3h、9h 和 24h 时, 均为实验组高于对照

组, 且均差异极显著。血细胞中 NO 的含量也均为实验组高于对照组, 且均差异极显著。随着病毒感染时间的延长, 实验组血清中 NO 含量有升高的趋势, 实验组血细胞中 NO 含量则先升后降。

表 3 病毒感染后栉孔扇贝血淋巴中 NO 含量

Tab. 3 The content of NO in haemolymph of *C. farrei* after challenge with virus

时间(h)	3	9	24
血清 NO 实验组( $\mu\text{mol/g}$ 蛋白)	62.36±3.26	112.25±7.67	149.18±7.89
血清 NO 对照组( $\mu\text{mol/g}$ 蛋白)	39.82±1.33	35.71±1.06	49.06±2.23
<i>P</i>	< 0.01	< 0.01	< 0.01
血细胞 NO 实验组( $\mu\text{mol/g}$ 蛋白)	102.16±11.56	127.01±13.33	110.52±13.02
血细胞 NO 对照组( $\mu\text{mol/g}$ 蛋白)	44.13±5.77	52.58±4.98	44.13±4.67
<i>P</i>	< 0.01	< 0.01	< 0.01

### 3 讨论与结语

本研究结果表明, 栉孔扇贝血清和血细胞中均存在含量较高的NO, 且在病毒感染后NO的含量升高, 说明NO与扇贝抗病毒的免疫反应有关。一氧化氮(NO)分子小, 结构简单, 属脂溶性, 能通过生物膜快速扩散, 具有多种生物学功能, 对人和高等动物的研究表明, NO在动物循环、呼吸、神经、免疫和内分泌等许多系统中发挥重要作用(孙雷等, 2003; Moncada *et al.*, 1991)。NO的分子结构中具有不配对的电子, 因此是一种自由基, 作为细胞毒性介质, 在动物体内发挥着生理和病理的双重角色。小剂量的NO起一种重要的第二信使作用, 又是一种新的细胞间信息交换载体, 在血管扩张、神经传导、大脑发育、学习与记忆等方面进行调节; 大剂量的NO可产生细胞毒性作用, 一方面可抑制和杀灭病毒等微生物, 参与机体抗感染免疫和防御, 另一方面也可损伤正常组织细胞(孙雷等, 2003)。NO在动物体内不稳定, 极易生成NO<sub>2</sub>和NO<sup>-</sup>, 以硝酸根和亚硝酸根的形式存在于细胞内外液中, 从而使NO失去活性。

NOS是动物体内合成NO的关键因素, 由L-精氨酸在NOS催化、NADPH提供电子及其他辅助因子作用下生成L-瓜氨酸和NO(Marletta, 1994)。NOS存在于体内许多脏器细胞中, 是一类复杂的酶系, 它至少有3种同工酶: NOS1主要在神经细胞中, 即nNOS; NOS2主要在细胞因子诱导的巨噬细胞中, 即iNOS; NOS3主要在内皮细胞中, 即eNOS。其中nNOS和eNOS依赖于钙离子和钙调蛋白, 不受内毒素与细胞因子的诱导, 合称cNOS(陈晋文等, 1996)。当细胞受到某些因素刺激时, 细胞浆内的钙离子浓度升高, 使无活性的单体cNOS变成具有催化能力的二聚体cNOS, 二聚体在体内存活时间短, 仅几分钟, 所以一次性催化产生的NO量较少, 而iNOS在正常生理情况下基因不表达, 只有细胞受到某些炎症、免疫因子等刺激时, 经基因转录蛋白而产生, 其反应不需钙离子与钙调蛋白参与, 它存在时间可长达5天, 因此催化产生的NO比cNOS的量多, 且持续时间长(李金贵等, 2002)。本研究中免疫组化显示栉孔扇贝血细胞中3种类型的NOS均呈阳性, 可能与扇贝进化地位低、细胞分化程度低有关; 也可能与扇贝的NOS的分子组成与人和鼠的有所差异有关。生化测定表明, 栉孔扇贝血淋巴NOS至少分为依

赖于钙离子的cNOS和不依赖于钙离子iNOS两类, 病毒感染后其NOS活力显著提高, 尤其是iNOS活力显著提高, NOS活力的变化又影响到NO的含量的变化, 通过产生更多的NO来抵抗和杀伤病毒等病原生物。血淋巴中的NO-NOS体系可在主要依赖非特异性免疫的栉孔扇贝等贝类(孙虎山等, 2000, 2002; Hemroth, 2003)抵抗病原生物感染方面发挥重要的作用。

### 参 考 文 献

- 孙雷, 孔小明, 2003. 一氧化氮与病毒感染研究进展. 动物医学进展, 24(1): 23—25
- 孙虎山, 李光友, 2000. 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. 海洋与湖沼, 31(3): 259—265
- 孙虎山, 李光友, 2002. 硒化卡拉胶和酵母葡聚糖对栉孔扇贝血淋巴中两种水解酶活力的影响. 海洋与湖沼, 33(3): 245—249
- 李金贵, 朱蓓蕾, 蒋金书, 2002. 诱导型一氧化氮合酶与动物疾病. 动物医学进展, 23(4): 41—45
- 陈晋文, 孙长凯, 黄远桂, 1996. 一氧化氮合酶的若干研究进展. 生物化学与生物物理进展, 23(4): 293—297
- 庞战军, 周玫, 陈瓊, 2000. 自由基医学研究方法. 北京: 人民卫生出版社, 221—252
- 贾长恩, 李叔庚, 王士平等, 2001. 组织化学. 北京: 人民卫生出版社, 427—429
- Hemroth B, 2003. Factors influencing bactericidal activity of blue mussel (*Mytilus edulis*) haemocytes against *Salmonella typhimurium*. Fish & Shellfish Immunology, 14: 93—104
- Lowry O H, Rosebrough N J, Farr AL *et al.*, 1951. Protein measurement with the Forlin phenol reagent. J Biol Chem, 193: 265—275
- Marletta M A, 1994. Nitric Oxide Synthase: Aspects concerning structure and catalysis. Cell, 78: 927—930
- Moncada S, Palmer R M, Higgs E A, 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharmacol Rev, 43(2): 109—134
- Nathan C, 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J, 6: 3051—3064
- Nieto-Fernandez F E, Alcide K, Rialas C, 2000. Heavy metals and neuroimmunomodulation in *Mytilus edulis*. Acta Biol Hung, 51: 325—329
- Scharsack J P, Steinhagen R, Kleczka C *et al.*, 2003. The haemoflagellate *Trypanoplasma borreli* induces the production of nitric oxide, which is associated with modulation of carp (*Cyprinus capio* L.) leucocyte function. Fish & Shellfish Immunology, 14: 207—222

Stefano G B, Bilfinger T V, Rialas C M *et al.*, 2000. 2-arachidonyl-glycerol stimulates nitric oxide from human immune

and vascular tissues and invertebrate immunocytes by cannabinoid receptor 1. *Pharmacol Res*, 42: 317—322

## STUDY ON NITRIC OXIDE AND NITRIC OXIDE SYNTHASE IN HAEMOLYMPH OF SCALLOP *CHLAMYS FARRERI*

SUN Hu-Shan, WANG Yi-Yan, WANG Xiao-An, GE Ling, SUN Xi-Qin, LI Guang-You

(College of Life Science, Yantai Normal University, Yantai, 264025)

(First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao, 266061)

**Abstract** Nitric oxide (NO), which is produced from L-arginine by nitric oxide synthase (EC1. 14. 13. 39; NOS), act as a regulating agent in many areas such as immune system, nervous, and cardiovascular. In this study, the NOS in the haemocytes of scallop *Chlamys farreri* (sampled from Zhifu Bay, on the north of Yellow Sea; shell length 45—50mm) was studied with histochemical and immunohistochemical localization method. Activity of NOS and content of NO in the serum and haemocytes of normal scallop and the spherical viruses treated scallop were analyzed in spectrophotometric assay. The virus were isolated from infected *C. farreri* in a severe mortality in Jiaozhou Bay, and kept in stock in the Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resource, China's Ministry of Agriculture. The aim of this study is to determine the roles that NO and NOS play in immunological defending and regulating.

The histochemical analysis of haemocytes showed that most of the haemocytes presented positive reaction to NOS and a few of them presented strongly or weakly positive reaction to NOS. The immunohistochemical analysis of the haemocytes showed that both neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) were detected in most of haemocytes. The stained granules were clumped in the cytoplasm; inducible nitric oxide synthase (iNOS) were detected in most of haemocytes too; and the stained granules were uniform in the cytoplasm. The biochemical test showed that both NOS and NO were detected in the serum and haemocytes. Enzyme activities of constitutive nitric oxide synthase (cNOS, nNOS+ eNOS) in the serum and haemocytes were 2.87 and 2.61U respectively. The enzyme activities of iNOS in the serum and haemocytes were 0.32 and 0.45U respectively. The contents of NO in the serum and haemocytes were 33.64 and 41.67 $\mu$ mol/gprot respectively. After treated with the spherical viruses, the biochemical test results were as follow. The levels of total nitric oxide synthase (tNOS) activity of experimental groups both in the serum and haemocytes were higher than the control groups, the differences between experimental groups and control groups were significant at 3h, extremely significant at 9h and 24h. Levels of iNOS activity of experimental groups in the serum and haemocytes were significantly higher than control groups' at 3h, 9h and 24h. The contents of NO of experiment groups in the serum and haemocytes were significantly higher than control groups' at 3h, 9h and 24h.

In summary, there are NO-NOS system in the haemolymph of the scallop *C. farreri*. The content of NO and the activity of NOS in haemolymph have significant changes after the animal was treated with virus. Results suggest that the NO-NOS system in haemolymph of the scallop plays an important role in its immunological defense.

**Key words** Scallop *Chlamys farreri*, Haemolymph, Nitric oxide, Nitric oxide synthase, Enzyme activities