

在仿刺参体腔液中发现新的调理素样分子

麦康森, 孟繁伊, 马洪明, 张文兵

(中国海洋大学教育部海水养殖重点实验室, 山东青岛 266003)

[摘要] 通过研究发现, 仿刺参体腔液中存在一种新的调理素样分子。通过 SDS-PAGE, 凝胶过滤层析, 质谱分析等方法进行蛋白质的纯化和分析, 采用荧光显微镜观察吞噬细胞对酵母细胞的吞噬作用, 发现一种分子量约为 18 kDa 的分子可以结合到酵母细胞表面, 并可以增强吞噬细胞的吞噬作用。推测这种分子是无脊椎动物调理素样分子中的新成员。同时也发现, 虽然调理素样分子能够增强吞噬细胞的吞噬作用, 但是, 它不是单独起作用的, 仍然必须依赖体腔液中其他未知成分, 而对未知成分的鉴定需要进一步研究。

[关键词] 仿刺参; 吞噬细胞; 体腔液; 调理素样分子

[中图分类号] TS7; F407.83 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1009-1742(2009)10-0108-07

1 前言

仿刺参 (*Apostichopus japonicus*) 隶属于棘皮动物门, 海参纲, 楯手目, 是我国辽宁、山东、河北等北方沿海重要的养殖经济种类, 2006 年养殖海参产值达百亿元以上^[1]。它作为一种传统的食品和保健品, 深受我国人民的欢迎^[2]。然而, 近年来海参养殖深受病害的困扰, “腐皮综合症”对海参养殖业影响尤为严重, 导致巨大的经济损失^[3]。因此, 研究海参的免疫学机理, 制定健康养殖的综合技术措施, 具有重要的理论意义和应用前景。棘皮动物与其他无脊椎动物一样具有先天性免疫系统, 但缺乏脊椎动物所具有的获得性免疫。其免疫应答是由体腔细胞和多种体液免疫因子共同介导的^[4, 5]。吞噬过程在机体所有免疫应答中居于重要地位, 吞噬作用是机体内部防御的第一道防线^[5, 6]。吞噬细胞对外源粒子的吞噬作用可由调理素介导增强, 吞噬细胞上存在调理素受体^[7]。

吞噬作用始于对非己物质的识别, 而后吞噬细胞对该物质进行吞入和破坏^[6, 8]。通常情况下, 侵入的微生物在被吞噬细胞识别之前, 先由“宿主分

子”所包被, 这些“宿主分子”是一类血浆蛋白质, 它们可对潜在病原微生物进行化学标记以便行使吞噬作用, 这些蛋白质分子名为调理素, 这种包被过程就称为调理作用^[9]。简言之, 调理素是在吞噬细胞和目标粒子间起桥梁作用的物质, 其存在有助于吞噬细胞对病原微生物的识别和黏附。与脊椎动物相同, 无脊椎动物对外源物质的吞噬作用是抗感染的有效屏障。无脊椎动物的调理素样分子在体内防御方面起着重要作用^[10]。目前, 已在贝类^[11]、蚯蚓^[12]、海星^[13]、星虫动物^[14, 15]、海胆^[16-20]、海参^[9]、昆虫^[21]等无脊椎动物中证实了存在于病原微生物周围的体液因子便于吞噬细胞对其识别, 这些体液因子的功能与脊椎动物的调理素功能相似。迄今为止已在无脊椎动物中分离出多种调理素样分子。河蚬 (*Corbicula fluminea*) 和福氏海盘车 (*Asteria forbesi*) 中分别存在分子量为 40 kDa^[22] 和 29.5 kDa^[13] 的调理素样分子, 玉足海参 (*Holothuria leucospilota*) 中存在分子量为 20 kDa 的调理素样分子^[9], 紫球海胆中存在可行使调理素功能的 SpC3。SpC3 是在无脊椎动物中鉴定出的第一种补体成分, 是后口动物 C3, C4 和 C5 家族的原始基础物质^[23]。

[收稿日期] 2009-09-05

[基金项目] 国家“八六三”资助项目(2006AA100313)

[作者简介] 麦康森(1958-), 男, 广东化州市人, 中国海洋大学“长江学者奖励计划”特聘教授, 博士生导师, 研究方向为水产动物营养与饲料学; E-mail: kmai@ouc.edu.cn

笔者针对仿刺参体腔液中调理素样分子进行研究,旨在深入探究仿刺参吞噬细胞的免疫机理,丰富无脊椎动物的免疫学理论^[5],并为研发安全、高效的新型仿刺参免疫增强剂提供理论依据,为仿刺参的病害防治、健康养殖和高效生产奠定基础。

2 材料与方法

2.1 试验动物的准备

选择成体仿刺参(长约 20 cm)在实验室玻璃缸中以流动海水暂养,试验前暂养 3 d。

2.2 热致死荧光标记酵母细胞悬液的制备

采用面包酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)作为吞噬作用研究的靶细胞。将酵母(100 mg)悬于 0.5 mL 磷酸盐缓冲液中(PBS:150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄, pH 7.0),放入沸水浴中 30 min 杀死酵母细胞,然后用 PBS 冲洗 6 次。悬液用 PBS 稀释 90 倍,37 °C 避光与异硫氰酸荧光素(FITC)共同培养 30 min,浓度为 1.5 μg FITC/10⁸个酵母细胞。将荧光标记酵母细胞在 PBS 中洗 5 次,在等渗缓冲液(0.34 mol/L NaCl, 0.001 mol/L 乙二醇二乙醚二胺四乙酸(EGTA), 0.01 mol/L Tris-HCl, pH 8.0)中洗 3 次,然后悬浮于等渗缓冲液中,浓度为 1×10⁸个酵母细胞/mL,4 °C 避光贮存。使用时,用等渗缓冲液 1:10 稀释,确保 1×10⁷个酵母细胞用于调理实验^[16, 17]。

2.3 吞噬细胞的制备

引流法获取仿刺参体腔液,与等体积的抗凝液(0.02 mol/L EGTA, 0.34 mol/L NaCl, 0.019 mol/L KCl, 0.068 mol/L Tris-HCl, pH 8.0)混合。向其中加入蔗糖缓冲液(0.8 mol/L 蔗糖溶液, 0.34 mol/L NaCl, 0.001 mol/L EGTA, 0.01 mol/L Tris-HCl, pH 8.0),5 000 × g/min 离心 5 min,吞噬细胞在体腔液-抗凝液混合物与蔗糖缓冲液之间。收集后在等渗缓冲液中洗两次,置于 4 °C 贮存备用。

2.4 反应介质及受调理酵母细胞的制备

无细胞体腔液制备方法:仿刺参体腔液经过 0.22 μm 滤膜过滤而获得。

经酵母细胞吸附的无细胞体腔液及受调理酵母细胞制备方法:为了验证可能存在的调理素样分子的功能,通过酵母细胞吸附作用处理无细胞体腔液,从而剔除调理素样分子。将酵母细胞储备悬液加入

无细胞体腔液中,浓度为 2×10⁸个酵母细胞/mL 无细胞体腔液。室温培养 1 h 后,500 × g/min 离心 10 min,上清液即为经酵母细胞吸附的无细胞体腔液(剔除调理素样分子),保存备用。下层的酵母细胞即为受调理的酵母细胞,在等渗缓冲液中洗两次备用^[9]。

2.5 吞噬细胞对酵母细胞吞噬率的检测

将体腔吞噬细胞悬于不同反应介质中进行吞噬细胞对酵母细胞吞噬率的测定,具体步骤如下:a. 分别向等渗缓冲液、无细胞体腔液和经酵母细胞吸附的无细胞体腔液中加入吞噬细胞,使细胞数量达到 1×10⁶个/mL;b. 把制备好的荧光标记的非调理酵母细胞悬液分别加入上述 3 个反应介质中,使酵母细胞和吞噬细胞的数量比达到 50:1。同时,以同样的比例把荧光标记的受调理酵母细胞悬液加入另一个等渗缓冲液中;c. 将以上 4 种混合液置于平台振荡器上 20 °C,50 r/min 震荡 2 h 后,向混合液中加入等体积的台盼蓝(0.06 mg/mL)以消除未被吞噬酵母的荧光。消除荧光之后,取 10 μL 吞噬细胞混合液在荧光显微镜下观察,并计算发生吞噬作用的吞噬细胞百分率,即吞噬率^[16, 17, 24]。

$$\text{吞噬率} = \frac{\text{发生吞噬的吞噬细胞数量}}{\text{吞噬细胞总数量}} \times 100\%$$

2.6 SDS-PAGE 分析

根据 Sambrook 等的方法^[25]进行 SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳)分析,共进行以下 4 种样品的电泳分析。a. 无细胞体腔液(可能存在调理素样分子);b. 经酵母细胞吸附的无细胞体腔液(剔除调理素样分子);c. 从受调理酵母细胞中分离出来的成分(包括可能存在的调理素样分子),其制备方法为:用等渗缓冲液将受调理的酵母细胞洗涤一次,然后将其悬于 200 μL 1% SDS 中,煮沸 3 min,500 × g/min 离心 5 min,弃去沉淀,上清液即含有从受调理酵母细胞中分离的成分;d. 从非调理酵母细胞中分离出来的成分(应该不存在调理素样分子),制备方法同 c。蛋白标准为低分子量蛋白 Marker(编号 SM 0431, MBI 公司提供),基层胶浓度为 5%,分离胶浓度为 12%,起始电压为 60 V,当样品跑至基层胶与分离胶分界处时,将电压调至 100 V,当样品跑至距分离胶底部 0.5 cm 时停止电泳,用时约 210 min。用考马斯亮蓝 R-250 染色。

2.7 调理素样分子的纯化

将 20 头仿刺参的无细胞体腔液混合,通过透析

膜(截留分子量为3.5 kDa)透析脱盐,4℃在透析缓冲液(0.01 mol/L Tris-HCl, 0.005 mol/L CaCl₂, pH 8.0)中透析60 h。在透析过程中,更换4次透析缓冲液,脱盐的无细胞体腔液经冷冻干燥浓缩至0.5 mL。使用快速蛋白液相色谱系统AKTA FPLC进行分析,层析柱为葡聚糖G-75柱(1.6 cm × 50 cm),用透析缓冲液平衡,用同样的缓冲液以0.5 mL/min洗脱,280 nm波长下进行紫外检测,收集每一个峰值的部分,经冷冻干燥浓缩至0.5 mL。对每个浓缩的样品都进行SDS-PAGE分析,获得纯化的调理素样分子。

2.8 调理素样分子功能的检测

将吞噬细胞在等渗缓冲液中洗两次,然后分别悬浮于0.5 mL的以下8种吞噬介质中。a. 等渗缓冲液;b. 等渗缓冲液加0.6 μg/mL纯化的调理素样分子;c. 等渗缓冲液加3.0 μg/mL纯化的调理素样分子;d. 等渗缓冲液加6.0 μg/mL的纯化调理素样分子;e. 经酵母细胞吸附的无细胞体腔液;f. 经酵母细胞吸附的无细胞体腔液加0.6 μg/mL的纯化调理素样分子;g. 经酵母细胞吸附的无细胞体腔液加入3.0 μg/mL的纯化调理素样分子;h. 经酵母细胞吸附的无细胞体腔液加6.0 μg/mL的纯化调理素样分子,使吞噬细胞浓度为 1×10^6 个/mL。然后,在以上8种吞噬介质中添加荧光标记非调理酵母细胞悬液,使酵母细胞和吞噬细胞的数量比达到50:1,共同培养2 h后,向吞噬介质中加入等体积的台盼蓝(0.06 mg/mL)以消除未被吞噬的酵母细胞的荧光。在荧光显微镜下观察,并计算吞噬率。

2.9 数据处理与统计分析

实验数据采用SPSS 11.5统计软件进行方差分析,若差异显著,则进行Turkey多重比较,显著性水平为 $P < 0.05$,每组数据均用平均值 ± 标准误表示。

2.10 蛋白浓度的测定

采用Bradford法进行蛋白质浓度测定,蛋白标准为牛血清白蛋白^[26]。

2.11 调理素样分子的质谱分析

样品送往北京蛋白质组学研究中心进行质谱分析,酶切后的样品使用离子阱质谱(Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA)分析。检测结果通过NCBI数据库进行序列相似性比对,并用相关软件进行分析。

2.12 主要试剂药品及仪器设备

面包酵母、EDTA, Tris, FITC, 牛血清白蛋白

(Sigma公司);蛋白质Marker(MBI公司);葡聚糖凝胶G-75(GE Healthcare公司)。

GeneGenius全自动凝胶成像系统(美国Syngene公司);Biofuge Strates高速冷冻离心机(德国Heraeus公司);PowerPac 300电泳仪(美国Bio-rad公司),AKTA FPLC快速蛋白液相色谱系统(美国GE Healthcare公司);Alpha1-2冷冻干燥机(德国Martin Christ公司);UV-2401PC紫外可见分光光度计(日本岛津公司);LDZX-40BI立式全自动电热压力蒸汽灭菌器(中国上海申安医疗器械厂);Millipore Milli-Q超纯水系统(美国Millipore公司)。

3 结果

3.1 吞噬率

在等渗缓冲液、无细胞体腔液和经酵母细胞吸附的无细胞体腔液中,吞噬细胞都具有吞噬酵母细胞的能力。在无细胞体腔液中吞噬细胞对非调理酵母细胞的吞噬率是35.98%,在等渗缓冲液中只有18.15%,前者显著高于后者($P < 0.05$),这表明在仿刺参体腔液中可能存在某种可提高吞噬功能的物质。在经酵母细胞吸附的无细胞体腔液中吞噬细胞对非调理酵母细胞的吞噬率为19.60%,显著低于其在无细胞体腔液($P < 0.05$)中的值(35.98%),但与等渗缓冲液中吞噬结果(18.15%)相比,差异不显著($P > 0.05$),说明无细胞体腔液中可提高吞噬功能的物质已基本被酵母细胞吸附。而在等渗缓冲液中吞噬细胞对受调理酵母细胞吞噬率为29.85%,显著高于对非调理酵母细胞的吞噬率18.15% ($P < 0.05$),这可能是由于酵母细胞被无细胞体腔液中的某些分子所标记,从而提高了吞噬细胞对酵母细胞的吞噬率(见图1)。图1中1为等渗缓冲液+非调理酵母细胞;2为等渗缓冲液+受调理酵母细胞;3为无细胞体腔液+非调理酵母细胞;4为经酵母细胞吸附的无细胞体腔液+非调理酵母细胞。每组数据采用平均数 ± 标准误表示($n = 3$)。平均数上标字母(a, b, c)相同表示差异不显著($P > 0.05$)。

3.2 SDS-PAGE分析

如图2所示,泳道1、泳道2分别在约18 kDa处出现条带,而泳道3、泳道4则无条带,推测仿刺参体腔液中存在分子量约为18 kDa的调理素样分子。泳道4为经酵母细胞吸附的无细胞体腔液,在约

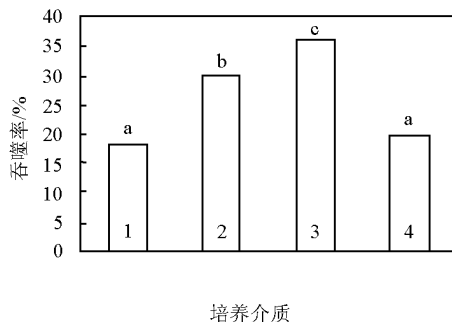


图1 不同吞噬介质条件下吞噬细胞对非调理与受调理热致死酵母细胞的吞噬情况

Fig. 1 Phagocytosis of opsonized and non-opsonized yeast cells by the phagocytes in different treatments

18 kDa处无条带,说明无细胞体腔液中的调理素样分子已被酵母细胞吸附。而泳道2为从受调理酵母细胞中分离出来的成分,在约18 kDa处出现了条带,说明酵母细胞壁吸附了无细胞体腔液中的调理素样分子。图2中M为蛋白质分子量Marker;泳道1为仿刺参无细胞体腔液;泳道2为从受调理酵母细胞中分离出来的成分;泳道3为从非调理酵母细胞中分离出来的成分;泳道4为酵母细胞吸附的无细胞体腔液。

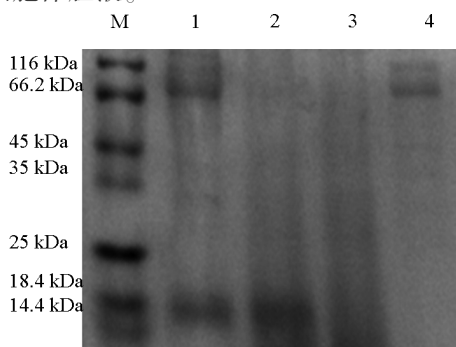
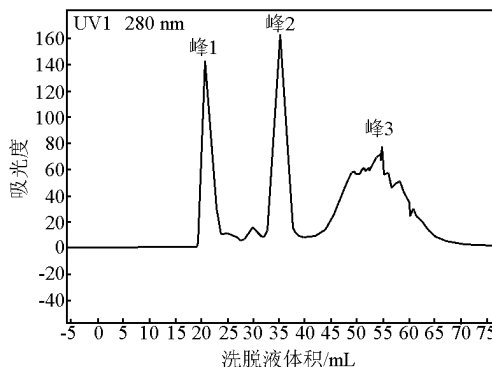


图2 仿刺参体腔液中调理素样分子鉴定的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of opsonin-like molecule in coelomic fluid of *Apostichopus japonicus*

3.3 调理素样分子的纯化

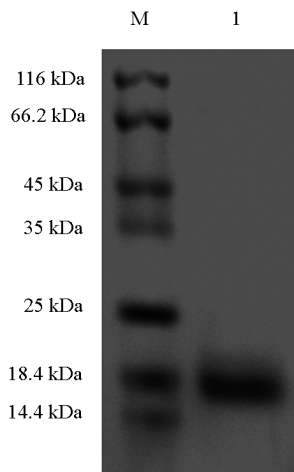
由图3可看出,经快速蛋白液相色谱系统纯化后,共出现3个主要峰值。SDS-PAGE分析结果表明,第2个峰值为18 kDa左右的调理素样分子。图4为纯化后的调理素样分子 SDS-PAGE 分析结果。



注:峰2为调理素样分子

图3 经 AKTA 蛋白质快速层析系统纯化的无细胞体腔液

Fig. 3 Gel-filtration profile of cell-free coelomic fluid



注:M为蛋白质分子量Marker;泳道1为AKTA纯化的调理素样分子

图4 纯化的仿刺参体腔液中调理素样分子 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of purified opsonin-like protein in cell-free coelomic fluid of *Apostichopus japonicus*

3.4 调理素样分子的功能

图5为在经酵母细胞吸附的无细胞体腔液或等渗缓冲液中分别加入不同浓度的调理素样分子后吞噬细胞对非调理酵母细胞的吞噬率。当吞噬介质为等渗缓冲液时,吞噬率为18.39%。当向等渗缓冲液添加不同浓度的纯化调理素样分子时对吞噬率没有显著影响,吞噬率在18.05%~20.01%之间。然而,在经酵母细胞吸附的无细胞体腔液中,吞噬细胞对非调理酵母细胞的吞噬率为19.67%。当加入

0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的纯化调理素样分子时,吞噬率提高到 34.95 %;加入 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的纯化调理素样分子时,吞噬率提高到 42.41 %;加入 6.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的纯化调理素样分子时,吞噬率上升至 48.90 %。可见,吞噬率随调理素样分子浓度的增加而显著增加 ($P < 0.05$),表明这种调理素样分子可显著增强吞噬作用。比较两种吞噬介质对吞噬作用的影响时,发现体腔液还存在对调理素样分子的调理作用必不可少的未知物质。图 5 中 1 为等渗缓冲液;2 为等渗缓冲液 + 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 纯化调理素样分子;3 为等渗缓冲液 + 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 纯化调理素样分子;4 为等渗缓冲液 + 6.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 纯化调理素样分子;5 为经酵母细胞吸附的无细胞体腔液;6 为经酵母细胞吸附的无细胞体腔液 + 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 纯化调理素样分子;7 为经酵母细胞吸附的无细胞体腔液 + 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 纯化调理素样分子;8 为经酵母细胞吸附的无细胞体腔液 + 6.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 纯化调理素样分子。每组数据采用平均数 \pm 标准误差表示 ($n = 3$)。平均数上标字母 (a, b, c, d) 相同表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

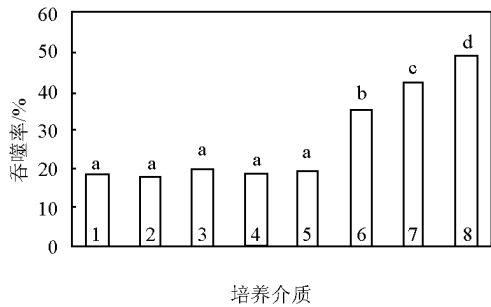


图 5 不同反应基质条件下吞噬细胞对非调理热致死酵母细胞吞噬情况

Fig. 5 Phagocytosis of non-opsonized yeast cells by sea cucumber phagocytes in different medias

3.5 质谱分析

将考染调理素样品酶解后提取肽段,进行质谱分析,经过质谱数据库检索,并未找到任何与该调理素样分子有同源性的蛋白质,因此鉴定该蛋白质为新蛋白。

4 结语

对 6 种棘皮动物的研究发现,数量上吞噬细胞和桑椹细胞在体腔细胞中占主导地位,并参与免疫应答。吞噬细胞与脊椎动物的巨噬细胞有着功能上的相似性^[27]。紫球海胆的吞噬细胞在吞噬过程中起着主要作用,可对外源粒子进行搜索、捕获和破

坏。用海胆体腔液来调理酵母细胞,可增强体腔细胞对酵母细胞的吞噬作用,这也许是海胆抵抗外来病原体最常见的免疫应答方式^[13, 28]。

研究结果证实了仿刺参体腔液中存在着调理素样分子。研究发现,无论无细胞体腔液存在与否,吞噬细胞均对酵母细胞具有吞噬功能,但在无细胞体腔液中,其吞噬能力可显著提高。同时,也发现如将酵母细胞放在无细胞体腔液中预培养一段时间后,体腔液中的调理素样分子就会被酵母细胞所吸附(调理作用)。吞噬介质相同时,吞噬细胞对受调理酵母细胞的吞噬率显著高于对非调理酵母细胞的吞噬率。这进一步证实了在仿刺参体腔液中存在调理素样分子。

SDS-PAGE 分析表明,分子量约为 18 kDa 的蛋白质就是调理素样分子。分子量小于河蚬 (40 kDa)^[22]、福氏海盘车 (29.5 kDa)^[13] 所分离的调理素样分子的分子量,而与玉足海参的调理素样分子的分子量接近 (20 kDa)^[9]。另外,仿刺参的这种调理素样分子并不能单独提高吞噬率,当向缓冲液中添加纯化的调理素样分子时,并不能提高吞噬细胞对酵母细胞的吞噬率。然而,将这种纯化的调理素样分子添加到经酵母细胞吸附的无细胞体腔液中,便可提高吞噬功能。这表明在体腔液中必然存在着其他起着增强吞噬作用的未知因子,并且该调理素样分子必须依赖未知因子而发挥作用。对未知因子的鉴定和特征有待进一步研究。对这种调理素样分子的质谱分析表明,这种蛋白是迄今未被发现的新蛋白质,是无脊椎动物调理素样分子中的新成员。

脊椎动物的调理素和补体成分均由巨噬细胞所分泌,而抗体则是由浆细胞产生^[29]。已有报道表明,玉足海参体腔液中的吞噬细胞和桑椹细胞均能合成调理素样分子并将其释放到体腔液中^[9]。关于调理素样分子的释放和外源物质刺激间的特殊关系仍有待于进一步探讨。

参考文献

- [1] 李人光,姜永新,孙俊荣. 海参深加工质量管理体系的建立齐鲁渔业 [J]. 齐鲁渔业, 2008, 25(12): 46-47
- [2] Yuan X T, Yang H S, Zhou Y, et al. The influence of diets containing dried bivalve feces and/or powdered algae on growth and energy distribution in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) (Echinodermata: Holothuroidea) [J]. Aquaculture, 2006, 256: 457-467
- [3] Wang Y G, Zhang C Y, Rong X J, et al. Diseases of cultured sea

- cucumber, *Apostichopus japonicus*, in China [A]. Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management [C]. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004. 297 – 310
- [4] Chia F S, Xing J. Echinoderm coelomocytes [J]. Zool Stud, 1996, 35: 231 – 254
- [5] 孟繁伊, 麦康森, 马洪明, 等. 棘皮动物免疫学研究进展 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2009, 36(7): 803 – 809
- [6] Greenberg S S. Immunity and Survival [M]. New York: Human Sciences Press, 1989: 19 – 34
- [7] Smith L C. The sea urchin immune system [J]. J Immunol, 2006, (3): 25 – 39
- [8] Wilson M E, Pearson R D. Roles of CR3 and mannose receptors the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes [J]. Infect Immun, 1988, 56: 363 – 369
- [9] Xing J, Chia F S. Opsonin – like molecule found in coelomic fluid of a sea cucumber, *Holothuria leucospilota* [J]. Marine Biology, 2000, 136: 979 – 986
- [10] Yang R, Yoshino T P. Immunorecognition in the freshwater bivalve, *Corbicula fluminea*. I. electrophoretic and immunologic analyses of opsonic plasma components [J]. Dev Comp Immunol, 1990b, 14: 385 – 395
- [11] Fryer S E, Bayne C J. Phagocytosis of latex beads by *Biomphalaria glabrata* hemocytes is modulated in a strain – specific manner by adsorbed plasma components [J]. Dev Comp Immunol, 1996, 20: 23 – 27
- [12] Bilej M, Vetricka V, Tuckova L, et al. Phagocytosis of synthetic particles in earthworms, effect of antigenic stimulation and opsonization [J]. Folia Biologica, 1990, 36: 273 – 280
- [13] Beck G, O’ Brien R F, Habicht G S, et al. Invertebrate cytokines III: Invertebrate interleukin – 1 – like molecules stimulate phagocytosis by tunicate and echinoderm cells [J]. Cell Immunol, 1993, 146: 284 – 299
- [14] Blanco G A C, Escalada A M, Alvarez E, et al. LPS – induced stimulation of phagocytosis in the sipunculan worm *Themiste petricola*: possible involvement of human CD14, CD11B and CD11C cross reactive molecules [J]. Dev Comp Immunol, 1997, 21: 349 – 362
- [15] Blanco G A C, Alvarez E, Amor A, et al. Phagocytosis of yeast by coelomocytes of the Sipunculan worm *Themiste petricola*: opsonization by plasma components [J]. J Invert Pathol, 1995, 66: 39 – 45
- [16] Clow L A, Raftos D A, Gross P S, et al. The sea urchin complement homologue, SpC3, functions as opsonin [J]. J Experimental Biology, 2004, 207: 2147 – 2155
- [17] Clow L A, Gross P S, Shih C S, et al. Expression of SpC3, the sea urchin complement component, in response to lipopolysaccharide [J]. Immunogenetics, 2000, 51: 1021 – 1033
- [18] Brockton V, Henson J H, Raftos D A, et al. Localization and diversity of 185/333 proteins from the purple sea urchin—unexpected protein – size range and protein expression in a new coelomocyte type [J]. J Cell Sci, 2008, 121(3): 339 – 348
- [19] Gross P S, Clow L A, Smith L C. SpC3, the complement homologue from the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*, is expressed in two subpopulations of the phagocytic coelomocytes [J]. Immunogenetics, 2000, 51: 1034 – 1044
- [20] Gross P S, Al – Sharif W Z, Clow L A, et al. Echinoderm immunity and the evolution of the complement system [J]. Dev Comp Immunol, 1999, 23: 429 – 442
- [21] Pendland J C, Boucias D G. Phagocytosis of lectin – opsonized fungal cells and endocytosis of the ligand by insect *Spodoptera exigua* granular hemocytes: an ultrastructural and immunocytochemical study [J]. Cell Tissue Res, 1996, 285: 57 – 67
- [22] Yang R, Yoshino T P. Immunorecognition in the freshwater bivalve, *Corbicula fluminea*. I. electrophoretic and immunologic analyses of opsonic plasma components [J]. Dev Comp Immunol, 1990b, 14: 385 – 395
- [23] Al – Sharif W Z, Sunyer J O, Lambris J D. Sea urchin coelomocytes specifically express a homologue of the complement component C3 [J]. J Immunol, 1998, 160: 2983 – 2997
- [24] Smith L C. Thioester function is conserved in SpC3, the sea urchin homologue of the complement component C3 [J]. Dev Comp Immunol, 2002, 26: 603 – 614
- [25] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory manual [M]. 2nd ed, Cold Spring Harbor: CSHL Press, 2001
- [26] Bradford N. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding [J]. Analyt Biochem, 1976, 72: 248 – 254
- [27] Ratcliffe N S, Millar D A. Comparative aspects and possible phylogenetic affinities of vertebrate and invertebrate blood cells [A]. Vertebrate blood cells [C]. New York: Cambridge University Press, 1988: 1 – 17
- [28] Brockton V, Henson J H, Raftos D A, et al. Localization and diversity of 185/333 proteins from the purple sea urchin—unexpected protein – size range and protein expression in a new coelomocyte type [J]. J Cell Sci, 2008, 121(3): 339 – 348
- [29] Davey B. Immunology [M]. New Jersey: Prentice Hall, Englewood Cliffs, 1990

A new opsonin-like protein identified from coelomic fluid of sea cucumber *Apostichopus japonicus*

Mai Kangsen, Meng Fanyi, Ma Hongming, Zhang Wenbing

(The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education,
Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China)

[**Abstract**] In order to determine if opsonin-like molecules exist in the coelomic fluid of sea cucumber *Apostichopus japonicus* and identify their properties, immunochemical methods including phagocytosis assay, SDS-PAGE, gel filtration and mass spectrometric analysis were performed. The phagocytosis of sea cucumber phagocytes was quantified in vitro using heat-killed yeast cells as target cells. Phagocytes of the sea cucumber were capable of phagocytosis in isotonic buffer, cell-free coelomic fluid (CFCF) and yeast cell-adsorbed CFCF, but the phagocytosis was significantly enhanced when the incubation medium was CFCF. This phagocytosis promoting activity of CFCF was eliminated by pre-adsorption of CFCF with yeast cells. SDS-PAGE analysis showed that a protein with 18 kDa was able to bind to yeast cells. By using gel filtration, the protein was isolated from coelomic fluid of the sea cucumber. Functional test of this molecule demonstrated that it was a phagocytosis-enhancing opsonin-like molecule. However, the phagocytosis-enhancing function of the opsonin-like molecule was dependent on some unknown factor(s) in the CFCF, which needs further investigations. Mass spectrometric analysis indicated that this opsonin-like molecule is a new protein.

[**Key words**] *Apostichopus japonicus*; phagocyte; coelomic fluid; opsonin-like molecule