

## 虾夷马粪海胆体腔液中调理素样分子的研究

张 颖, 李丹彤\*, 常亚青, 宋 坚, 叶仕根

(大连海洋大学农业部北方海水增养殖重点实验室, 辽宁 大连 116023)

**摘要:** 为研究虾夷马粪海胆体液免疫机理, 测定其体腔液吞噬细胞在不同介质中对不同处理的酵母细胞的吞噬作用。对其无细胞体腔液、从调理及非调理酵母细胞分离出的成分进行 SDS-PAGE 分析, 同时对无细胞体腔液进行透析、SephadexG-200 凝胶层析和 SDS-PAGE 分析, 在等渗缓冲液和酵母细胞吸附的无细胞体腔液中, 测定不同调理素样分子浓度和不同反应时间时吞噬率的变化。结果显示, 吞噬细胞在 3 种介质: 等渗缓冲液、酵母细胞吸附的无细胞体腔液和无细胞体腔液中对非调理酵母细胞吞噬率之比为 1.00:1.11:1.94, 在等渗溶液中对调理酵母细胞的吞噬率是非调理酵母细胞的 1.61 倍; 从调理酵母细胞分离出的成分在 SDS-PAGE 中显示一条调理素样分子带, 分子量为 250.62 ku。经透析和 SephadexG-200 凝胶层析后, 测得纯化的调理素样分子的分子量为 250.62 ku; 在所测试的浓度范围内, 调理素样分子浓度越大, 吞噬活性越高, 且 5.0 和 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组在各个测试时间均比对照组高。在等渗缓冲液中, 反应 30 min 时, 10.0 和 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组与对照组均有极显著差异 ( $P < 0.01$ ), 在酵母细胞吸附的无细胞体腔液中, 反应 30 min 时, 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组与对照组有显著差异 ( $P < 0.05$ )。结果表明, 在虾夷马粪海胆体腔液中发现一种调理素样分子, 分子量约为 250.62 ku, 一定浓度的调理素样分子能显著提高虾夷马粪海胆体腔液吞噬细胞的吞噬活性。

**关键词:** 虾夷马粪海胆; 吞噬活性; 调理素样分子; 吞噬细胞

**中图分类号:** Q 175; S 917.4

**文献标志码:** A

虾夷马粪海胆 (*Strongylocentrotus intermedius*), 又称中间球海胆, 棘皮动物门 (Echinodermata), 海胆纲 (Echinoidea), 正形目 (Cenyrchinoida), 球海胆科 (Strongylocentrotidae)<sup>[1]</sup>, 原产地是日本海域, 经过引种, 现在逐渐成为我国海胆类中经济价值最高的种类之一, 因其具有较高的食用价值、药用价值和经济价值, 具有良好的发展前景<sup>[2]</sup>。随着海胆养殖规模的扩大, 病害问题也日趋严重, 如海胆黑嘴病、红斑病、生殖腺黑斑病和海胆瘟疫病等, 给养殖业造成了巨大的经济损失<sup>[3-5]</sup>。因此, 研究虾夷马粪海胆的免疫机制, 可为其病害防治提供理论依据。

棘皮动物同其他无脊椎动物一样具有先天性

的免疫系统, 但是没有发现脊椎动物所具有的获得性免疫应答。棘皮动物体内免疫应答是由参与免疫反应的一类效应细胞——体腔细胞和多种体液免疫因子共同参与介导的, 如体腔液中的凝集素、溶血素和调理素等共同作用于入侵病原体<sup>[6]</sup>。这些体液因子能够帮助识别和攻击外来物质。调理素就是其中一种, 它是在机体吞噬细胞和外来病原体间起桥梁作用的物质, 有助于机体吞噬细胞对病原体的识别和黏附<sup>[7]</sup>。关于棘皮动物体腔液内调理素样分子的研究很多, 如 Canicatti 等<sup>[8]</sup>已从海参 (*Holothuria polii*) 中发现一种分子量为 220 ku 的体液因子, 与调理素的功能相似, 可以促进体腔细胞在吞噬异物时快速聚集; Xing 等<sup>[9]</sup>发现玉足海参 (*Holothuria leucospilota*) 体腔液内有分子量为

收稿日期: 2013-11-26 修回日期: 2014-03-05

资助项目: 辽宁省教育厅团队项目 (2008T021)

通信作者: 李丹彤, E-mail: lidantong@dlou.edu.cn

20 ku 的调理素样蛋白,该蛋白能够明显增强海参与体腔吞噬细胞的吞噬作用;麦康森等<sup>[10]</sup>发现仿刺参(*Apostichopus japonicus*)体腔液中存在一种分子量为 18 ku 调理素样分子;Al-Sharif 等<sup>[11]</sup>发现紫球海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)体腔细胞中存在补体 C3 的同系物,即 SpC3,分子量为 210 ku。关于虾夷马粪海胆体腔液中的调理素样分子研究国内外未见报道。

本实验在不同条件下测定虾夷马粪海胆体腔液中吞噬细胞的吞噬活性,并对体腔液和从调理及非调理酵母细胞分离出的成分进行 SDS-PAGE 分析,以及对纯化后的调理素样分子进行功能测定,旨在更深入地了解虾夷马粪海胆体液免疫机理,以期对虾夷马粪海胆绿色养殖提供基础理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

**实验动物** 虾夷马粪海胆购于大连市旅顺柏岚子太平洋渔业有限公司,平均体质量为 45.3 g,水温为 13 ~ 17 °C,9 只实验虾夷马粪海胆暂养于 300 L 充气水槽中(100 cm × 50 cm × 60 cm),连续充气,日换水 1 次(18:00),换水量 30% ~ 40%,实验前暂养 4 周;

#### 酵母细胞悬液

(1) 酵母细胞悬液制备。

将适量酵母(100 mg)悬于 0.5 mL 溶液中(150 mmol/L NaCl,10 mmol/L pH 7.0 磷酸盐缓冲液),加入的液体要保证沸水浴过程中缓冲液不会蒸发致干,放入沸水浴中 30 min 加热致死酵母细胞,然后用 PBS 冲洗 6 次,冲洗过程中加入的 PBS 不要超过离心管的 2/3,4 000 r/min 离心 10 min,离心 6 次。将离心冲洗后的酵母细胞悬液用 PBS 按体积比 1:90 稀释。

(2) 酵母细胞的计数。血细胞计数板上计数酵母细胞<sup>[12]</sup>,保证细胞数为  $10^7 \sim 10^9$  个/mL。

**吞噬细胞** 采用新鲜海胆体腔液制备吞噬细胞,即从健康的海胆围口膜处注射 1% 无菌海水 100  $\mu$ L,12 h 后采集体腔液,以 2 000 r/min 离心,弃去上清液,将沉淀物中的吞噬细胞以无菌海水稀释成  $10^8$  个/mL,4 °C 冰箱贮存备用<sup>[13]</sup>。

**无细胞体腔液** 海胆体腔液经过 0.22  $\mu$ m 滤膜重复过滤 4 ~ 5 次得无细胞体腔液,上清液取

10  $\mu$ L,镜下检测是否将细胞过滤完全。

**酵母细胞吸附的无细胞体腔液** 将制备好的酵母细胞悬液与无细胞体腔液共同培养,浓度为  $10^8$  个酵母细胞/mL 无细胞体腔液。室温培养 1 h 后,8 000 r/min 离心 10 min,上清液即为酵母细胞吸附的无细胞体腔液,下层沉淀即为受调理的酵母细胞(调理酵母细胞是在海胆体腔液里培养,吸附了调理素的酵母细胞)。

### 1.2 实验方法

**不同反应介质中吞噬率的检测** 将虾夷马粪海胆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。

(1) 分别向 2 mL 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 2 mL 吞噬细胞;

(2) 取制备好的酵母细胞悬液 1 mL,分别加入上述反应介质和 2 mL 的等渗缓冲液中;

(3) 将上述各混合液在室温下培养,每隔 0.5 h 震荡一次试管,培养 2 h 后,检测吞噬率。

(4) 吞噬率计算公式<sup>[12]</sup>:吞噬率 = 吞噬酵母的吞噬细胞数/100 个吞噬细胞 × 100%。

**SDS-PAGE** 根据 Sambrook 等<sup>[14]</sup>的方法进行 SDS-PAGE,共进行以下 3 种样品的电泳分析:(1) 从已经受调理的酵母细胞中分离出来的成分(存在调理素样分子),用等渗缓冲液将已经被调理的酵母细胞洗涤一次,然后加入到 200  $\mu$ L 1% SDS 中,沸水浴中保持 5 min,4 000 r/min 离心 5 min,弃去下面的沉淀,上清液中含有从受调理酵母细胞中分离的成分;(2) 从非调理的酵母细胞中分离出来的成分(不含有调理素样分子),制备方法同上述受调理酵母细胞;(3) 海胆无细胞体腔液(存在调理素样分子和其他蛋白);蛋白标准为高分子量蛋白 Marker,分子量范围 44.0 ~ 200.0 ku,浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 10%,起始电压为 60 V,当样品跑至浓缩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 4 ~ 5 h。用考马斯亮蓝 R-250 染色。

**调理素样分子的纯化及 SDS-PAGE** 将抽取的虾夷马粪海胆体腔液通过透析膜(截留分子量为 3.5 ku)透析脱盐,放置在 4 °C 冰箱中透析 60 h,缓冲液为 0.01 mol/L Tris-HCl,0.005 mol/L CaCl<sub>2</sub>,pH 8.0,在透析的过程中,每 15 小时更

换一次透析液,共更换4次,经过透析的无细胞体腔液经 SephadexG-200 凝胶层析<sup>[15]</sup> (1.6 cm × 90 cm),平衡液为上述缓冲液,再用同样的缓冲液以 18 mL/h 的流速洗脱,每管 3 mL,280 nm 波长下进行紫外检测,然后对峰 1 进行 SDS-PAGE 分析,条件同上述 SDS-PAGE 的条件。

**调理素样分子功能的测定** 将制备好的吞噬细胞在室温下平衡 1.5 h。取 4 支试管,编号分别为 a、b、c 和 d。其中 a 加入 2.0 mL 等渗缓冲液作为对照,b~d 分别加入 1.0 mL 等渗缓冲液再依次加入等体积的 1.0、5.0 和 10.0 μg/mL 纯化的调理素样分子;另取 4 支试管,编号分别为 e、f、g 和 h。其中 e 加入 2.0 mL 经酵母细胞吸附的无细胞体腔液作为对照,f~h 分别加入 1.0 mL,再依次加入等体积的 1.0、5.0、10.0 μg/mL 纯化的调理素样分子;依次在上述两组试管中加入 1.0 mL 吞噬细胞,再分别添加 1 mL 处理好的酵母细胞悬液,混合均匀,每隔 15 min 震荡一次试管,室温下培养 2 h,在不同的反应时间下,显微镜观察并计算吞噬率。

**数据处理** 采用 SPSS 13.0 软件对实验数据进行单因素方差分析, $P < 0.05$  表示差异显著, $P < 0.01$  表示差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 不同反应介质中吞噬细胞的吞噬活性

在等渗缓冲液、酵母细胞吸附的无细胞体腔液和无细胞体腔液中进行吞噬细胞对酵母细胞的吞噬活性检测,结果显示这 3 种介质中吞噬细胞都具有吞噬酵母细胞的能力。3 种介质中对非调理酵母细胞的吞噬率之比为 1.00:1.11:1.94,这表明在虾夷马粪海胆体腔液中可能存在调理素样分子可提高其吞噬活性。而等渗缓冲液中吞噬细胞对调理酵母细胞的吞噬率是对非调理酵母细胞吞噬率的 1.61 倍,这可能是由于酵母细胞被无细胞体腔液中的调理素样分子所作用,从而提高了吞噬细胞对酵母细胞的吞噬率(图 1)。

### 2.2 SDS-PAGE 分析

对不同的组分进行 SDS-PAGE 分析,受调理的酵母细胞吸附了海胆体腔液中的调理素样分子,电泳结果显示,约 250.62 ku 处呈现一个条带(图 2-a);非调理的酵母细胞没有吸附调理素样分子,在调理素样分子的对应位置没有条带(图 2-b);无细胞体腔液中存在调理素样分子,约在

250.62 ku 处出现条带,但其中也含有其他蛋白,所以会出现多个条带(图 2-c)。3 组成分进行对比,说明海胆体腔液中存在一种调理素样分子,其分子量为 250.62 ku。

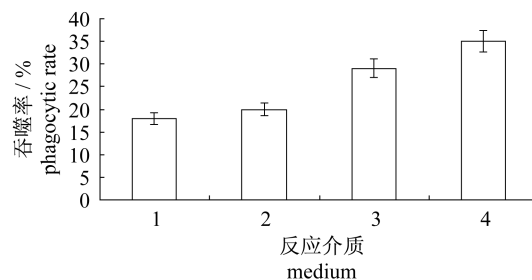


图 1 不同反应介质中吞噬细胞对非调理与受调理酵母细胞的吞噬活性

1. 等渗缓冲液 + 非调理酵母细胞; 2. 酵母细胞吸附的无细胞体腔液 + 非调理酵母细胞; 3. 等渗缓冲液 + 调理酵母细胞; 4. 无细胞体腔液 + 非调理酵母细胞

Fig. 1 Phagocytes in different reaction media for regulating and non-regulating yeast cells

1. Isotonic buffer + non-regulating yeast cells; 2. Cell free coelomic fluid by yeast cell adsorption + non-regulating yeast cells; 3. Isotonic buffer + regulating yeast cells; 4. Non-cell coelomic fluid + non-regulating yeast cells

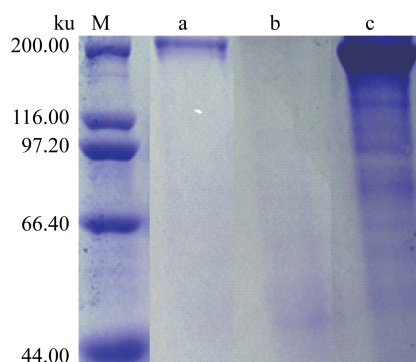


图 2 虾夷马粪海胆体腔液中调理素样分子的 SDS-PAGE 分析

- M. 蛋白质 Marker; a. 从受调理酵母细胞中分离出来的成分; b. 从非调理酵母细胞中分离出来的成分; c. 虾夷马粪海胆无细胞体腔液

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of opsonin-like molecule in coelomic fluid of *S. intermedius*

- M. Protein marker; a. The ingredient separated from regulating yeast cells; b. The ingredient separated from non-regulating yeast cells; c. Non-cell coelomic fluid of *S. intermedius*

### 2.3 调理素样分子的纯化

将虾夷马粪海胆无细胞体腔液透析后,经 SephadexG-200 凝胶层析,出现 2 个峰值(图 3)。对峰 1 进行 SDS-PAGE 分析,在 250.62 ku 处出

现蛋白条带(图4)。

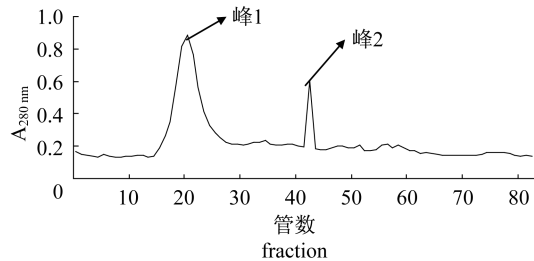


图3 调理素样分子的 Sephadex G-200 层析柱分析  
Fig. 3 The analysis of Sephadex G-200 column on the purified opsonin-like molecule

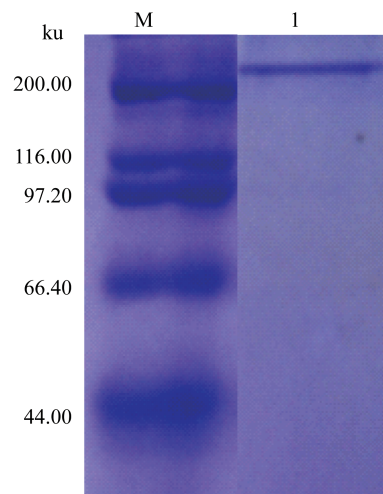


图4 纯化的海胆体腔液调理素样分子  
SDS-PAGE 分析

M. 标准蛋白 Marker; 1. 纯化的调理素样分子 20  $\mu\text{L}$  (浓度为 1.50 mg/mL)

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of purified opsonin-like molecule in cell-free coelomic fluid of *S. intermedium*

M. Protein marker; 1. Purified opsonin-like molecule 20  $\mu\text{L}$  (concentration: 1.50 mg/mL)

## 2.4 调理素样分子功能测定

在等渗缓冲液和酵母细胞吸附的无细胞体腔液中,不同调理素样分子浓度和不同时间中测定调理素样分子对吞噬作用的影响。在等渗缓冲液和经酵母细胞吸附的无细胞体腔液中,5.0 和 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组的吞噬率都比对照组高(图5)。由两种介质的吞噬率变化可知,一定浓度的调理素样分子可以提高吞噬细胞的吞噬率,并且经酵母细胞吸附的无细胞体腔液中的吞噬率比等渗缓冲液中的高,说明海胆体腔液中除了调理素样分子,也许还存在某种对调理素的调理作用必不可少的其他物质。

## 2.5 不同调理素样分子浓度及不同作用时间对吞噬活性的影响

在 3 种调理素样分子浓度及不同的反应时间下,测定虾夷马粪海胆体腔吞噬细胞对酵母细胞的吞噬率,结果表明:一定浓度的调理素样分子对于虾夷马粪海胆的体腔吞噬细胞的吞噬率有显著的影响,其中两种介质 5.0 和 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组的吞噬率均比对照组高(图6,图7)。等渗缓冲液中,反应 30 min 时,5.0 和 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组与对照组有极显著差异 ( $P < 0.01$ ) (图6)。在经酵母细胞吸附的无细胞体腔液中,3 种调理素浓度组均在 30 min 出现吞噬率的最大值,随后吞噬活性开始下降。反应 30 min 时,10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组与对照组有显著差异 ( $P < 0.05$ ) (图7)。

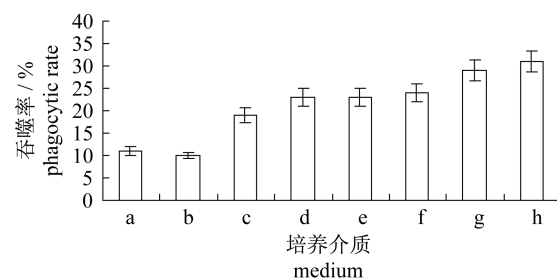


图5 不同反应介质及不同浓度调理素样分子下  
吞噬细胞对酵母细胞的吞噬情况

(a) 等渗缓冲液(对照); (b) 等渗缓冲液 + 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  纯化调理素样分子; (c) 等渗缓冲液 + 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  纯化调理素样分子; (d) 等渗缓冲液 + 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  纯化调理素样分子; (e) 经酵母细胞吸附的无细胞体腔液(对照); (f) 经酵母细胞吸附的无细胞体腔液 + 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  纯化调理素样分子; (g) 经酵母细胞吸附的无细胞体腔液 + 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  纯化调理素样分子; (h) 经酵母细胞吸附的无细胞体腔液 + 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  纯化调理素样分子

Fig. 5 Phagocytosis of yeast cells by *S. intermedium* phagocytes in different media and different concentration of opsonin-like molecule

(a) isotonic buffer (control); (b) isotonic buffer + 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  purified opsonin-like molecule; (c) isotonic buffer + 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  purified opsonin-like molecule; (d) isotonic buffer + 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  purified opsonin-like molecule; (e) cell free coelomic fluid by yeast cell adsorption (control); (f) cell free coelomic fluid by yeast cell adsorption + 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  purified opsonin-like molecule; (g) cell free coelomic fluid by yeast cell adsorption + 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  purified opsonin-like molecule; (h) cell free coelomic fluid by yeast cell adsorption + 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  purified opsonin-like molecule

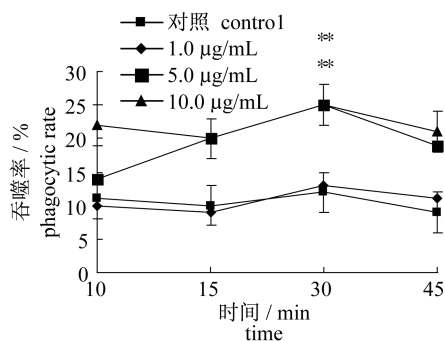


图6 调理素样分子在等渗缓冲液中对虾夷马粪海胆吞噬细胞吞噬率的影响

Fig. 6 The impact of opsin-like molecule on *S. intermedius* phagocytic rate in isotonic buffer

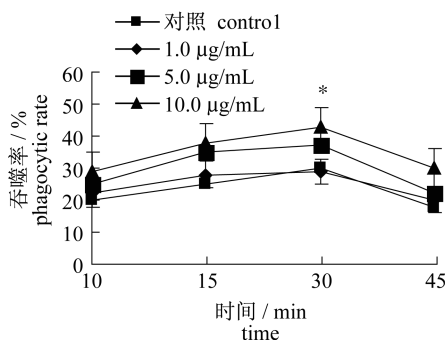


图7 调理素样分子在经酵母细胞吸附的无细胞体腔液中对虾夷马粪海胆吞噬细胞吞噬率的影响

Fig. 7 The impact of opsin-like molecule on *S. intermedius* phagocytic rate in cell free coelomic fluid by yeast cell absorption

### 3 讨论

棘皮动物的体内免疫主要依靠吞噬作用来完成,是参与免疫应答的主要方式,并与脊椎动物的吞噬作用相类似,即吞噬细胞的吞噬作用是通过趋化、接触、内化和消化4个连续步骤对入侵病原体进行杀伤吞噬<sup>[16]</sup>,这一连续过程是机体清除异物的主要途径之一,也被广泛用于衡量棘皮动物机体健康状况及在恶性环境或病原体存在下的免疫防御能力。张峰<sup>[17]</sup>阐明外界环境中存在细菌或者其他异源物质进入棘皮动物体内时,可引起一系列的免疫反应,此时体液中的吞噬细胞对病原菌等异物主要作用机制就是利用氧自由基发挥杀菌作用。此外棘皮动物的免疫应答还由体腔液中存在其他多种体液免疫因子,如凝集素、溶血素

和调理素等共同并直接作用。Dheilly等<sup>[18]</sup>研究证明,紫海胆体内吞噬作用在自身免疫应答中占主导地位,可对外来物质进行搜索、捕获和破坏。Clow等<sup>[19]</sup>在紫海胆中发现一种新调理素样分子SpC3,具有同脊椎动物调理素相似的功能。

本研究中分离出虾夷马粪海胆体腔液中的调理素样分子,分子量大约为250.62 ku,与紫海胆中所分离出的调理素样分子210.00 ku接近。在等渗缓冲液、无细胞体腔液和酵母细胞吸附的无细胞体腔液这3种介质中,吞噬细胞对调理和非调理酵母细胞的吞噬作用不同,这与麦康森等<sup>[10]</sup>对仿刺参的3种介质的分析结果一致,即在无细胞体腔液中的吞噬率最高,因其存在调理素样分子,又存在一种同调理素样分子共同起作用的物质,这种未知物质需要进一步研究。虾夷马粪海胆体腔液中的调理素样分子经过分离纯化,可在体外促进吞噬细胞的吞噬作用,使吞噬细胞的活性增强,这可能是由于在体外介质中,调理素样分子与酵母接触后,酵母细胞便吸附了调理素样分子,即发生一定的调理作用,这有利于吞噬细胞对酵母细胞的吞噬。并且,在相同介质中,随着调理素样分子浓度的升高吞噬率增加,这就更进一步说明了调理素样分子具有促进吞噬作用的功能。进一步研究这种调理素样分子作用机制,可更好地了解虾夷马粪海胆的免疫机制,丰富无脊椎动物的免疫学理论。

### 参考文献:

- [1] Chang Y Q, Zhang W J, Ding J, et al. Comparison of gonad traits among families and between genders of thesea urchin *Strongylocentrotus intermedius* [J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(7): 1080 - 1088. [常亚青, 张伟杰, 丁君, 等. 虾夷马粪海胆不同家系和性别间性腺性状的比较. 水产学报, 2010, 34(7): 1080 - 1088.]
- [2] Zhang W F. Research progress of China's sea urchin [J]. Knowledge Economy, 2011(11): 93. [张文峰. 我国海胆研究进展. 工程技术, 2008, 10(8): 92 - 93.]
- [3] Wang D, Wang Z Q, Tian H W, et al. Research progress and application status of sea urchin [J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2006, 25(4): 52 - 54. [王冬, 王政乾, 田红伟, 等. 海胆的研究进展及其应用现状. 中国海洋药物杂志, 2006, 25(4): 52 - 54.]

- [ 4 ] Zhao X Y, Chang Y Q, Ding J, *et al.* Effects of four immunopotentiators for two herd immunity *Strongylocentrotus intermedius* [ J ]. *Advances in Marine Science*, 2011, 29(1) : 9 - 16. [ 赵新亚, 常亚青, 丁君, 等. 4 种免疫促进剂对 2 种虾夷马粪海胆群体免疫影响. *海洋科学进展*, 2011, 29 ( 1 ) : 9 - 16. ]
- [ 5 ] Wang B, Li Y, Li X, *et al.* Pathogenic mechanism of the causative vibrio found in " red spotting" diseased sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* [ J ]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2005, 20(1) : 11 - 15. [ 王斌, 李岩, 李霞, 等. 中间球海胆红斑病病原弧菌致病机理的研究. *大连水产学院学报*, 2005, 20(1) : 12 - 15. ]
- [ 6 ] Ding J, Chang Y Q, Wang C H, *et al.* Coelomocyte types and enzyme activities of coelomic fluid in sea urchines [ J ]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(1) : 33 - 38. [ 丁君, 常亚青, 王长海, 等. 不同种海胆体腔细胞类型及体液中的酶活力. *中国水产科学*, 2006, 13(1) : 33 - 38. ]
- [ 7 ] Meng F Y, Mai K S, Ma H M, *et al.* The evolution of echinoderm immunology [ J ]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2009, 36 ( 7 ) : 803 - 809. [ 孟繁伊, 麦康森, 马洪明, 等. 棘皮动物免疫学研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2009, 36 ( 7 ) : 803 - 809. ]
- [ 8 ] Canicatti C, Rizzo A. A 220 kDa coelomocyte aggregating factor involved in *Holothuria polii* cellular clotting [ J ]. *European Journal of Cell Biology*. 1991, 56(10) : 79 - 83.
- [ 9 ] Xing J, Chia F S. Opsonin-like molecule found in coelomic fluid of a sea cucumber, *Holothuria leucospilota* [ J ]. *Marine Biology*, 2000, 136 ( 6 ) : 979 - 986.
- [ 10 ] Mai K S, Meng F Y, Ma H M, *et al.* A new opsonin-like protein identified from coelomic fluid of sea cucumber *Apostichopus japonicas* [ J ]. *Engineering Sciences*, 2009, 11 ( 10 ) : 108 - 114. [ 麦康森, 孟繁伊, 马洪明, 等. 在仿刺参体腔液中发现新的调理素样分子. *中国工程科学*, 2009, 11 ( 10 ) : 108 - 114. ]
- [ 11 ] Al-Sharif W Z, Sunyer J O, Lambris J D, *et al.* Sea urchin coelomocytes specifically express a homologue of the complement component C3 [ J ]. *The Journal of Immunology*, 1998, 160 ( 6 ) : 2983 - 2997.
- [ 12 ] Gui Y M. Functional experiment for aquatic livestock [ M ]. Beijing : China Agriculture Press, 2004 : 167 - 171. [ 桂远明. 水产动物机能学实验. 北京 : 中国农业出版社, 2004 : 167 - 171. ]
- [ 13 ] Li X, Wang B, Liu J, *et al.* Type and function of coelomocyte in sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* [ J ]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2003, 10(5) : 381 - 385. [ 李霞, 王斌, 刘静, 等. 虾夷马粪海胆体腔细胞的类型及功能. *中国水产科学*, 2003, 10(5) : 381 - 385. ]
- [ 14 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, *et al.* Molecular cloning : A laboratory Manual [ M ]. Cold Spring Harbor : CSHL Press, 2001 : 57 - 89.
- [ 15 ] Li D T, Lin C J, Hou X H, *et al.* Reduced activity of lectin purified from red alga *Porphyra yezoensis* Ueda by chemical modification for tryptophan residues [ J ]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2012 ( 9 ) : 850 - 857. [ 李丹彤, 林春江, 侯小杭, 等. 红藻条斑紫菜凝集素的纯化及其色氨酸化学修饰对其活性的抑制作用. *中国生物化学与分子生物学报*, 2012, 28 ( 9 ) : 850 - 857. ]
- [ 16 ] Shi F F, Li C H, Song L S, *et al.* Application of flow cytometry in the measurement of phagocytic activity in scallop haemocytes [ J ]. *Biotechnology Bulletin*, 2006(10) : 430 - 433. [ 石芳芳, 李成华, 宋林生, 等. 用流式细胞仪测定扇贝血细胞吞噬活性. *生物技术通报*, 2006, 52(10) : 430 - 433. ]
- [ 17 ] Zhang F. Progresses in research on defence mechanism of echinoderms [ J ]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2005, 20(4) : 340 - 344. [ 张峰. 棘皮动物体内防御机制的研究进展. *大连水产学院学报*, 2005, 4(20) : 340 - 344. ]
- [ 18 ] Dheilly N M, Naiv S V, Smith L C, *et al.* Highly variable immune-response proteins ( 185/333 ) from the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus* : Proteomic analysis identifies diversity within and between individuals [ J ]. *Journal of Immunology*, 2009, 182(4) : 2203 - 2212.
- [ 19 ] Clow L A, Raftogs D A, Gress P S, *et al.* The sea urchin complement homologue, SpC3, function as opsonin [ J ]. *Journal of Experimental Biology*, 2004, 207 ( Pt12 ) : 2147 - 2155.

## Study of opsonin-like molecule from coelomic fluid of *Strongylocentrotus intermedius*

ZHANG Ying, LI Dantong<sup>\*</sup>, CHANG Yaqing, SONG Jian, YE Shigen

(Laboratory of North Mariculture, Ministry of Agriculture, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

**Abstract:** In order to study the immune mechanism of coelomic fluid of *Strongylocentrotus intermedius*, we researched the phagocytosis activity in different media and different treatments of yeast cell. Then we analysed the non-cell coelomic fluid and ingredient which was isolated from regulating yeast cells and non-regulating yeast cells with SDS-PAGE, and the non-cell coelomic fluid was dialysed, SephadexG-200 gel chromatography, and SDS-PAGE; In isotonic buffer and cell-free coelomic fluid by yeast cell adsorption, we determined the phagocytosis effected by opsonin-like molecule of different concentration and different time. The result showed that isotonic buffer, cell-free coelomic fluid by yeast cell adsorption and non-cell coelomic fluid all can regulate phagocytosis, and the ratio was 1.00 : 1.11 : 1.94, and the phagocytosis rate of regulating yeast cells was 1.61 times of non-regulating yeast cells in isotonic buffer; There was a new opsonin-like molecular band from ingredient which was isolated from regulating yeast cells, and the molecular weight is 250.62 ku. We also found the molecular weight is 250.62 ku after dialysis, SephadexG-200 gel chromatography; In tested concentration range, the greater the opsonin-like concentration, the higher the phagocytosis and 5.0 and 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  groups were higher than control group in each test time. In isotonic buffer, 10.0 and 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  groups had very significant difference ( $P < 0.01$ ) compared to control group in 30 min after reaction. In cell-free coelomic fluid by yeast cell adsorption, 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  group had significant difference compared to control group ( $P < 0.05$ ) in 30 min after reaction. These results indicate that there is a kind of new opsonin-like molecule in coelomic fluid of *S. intermedius* and the molecular weight is 250.62 ku which can promote phagocytosis.

**Key words:** *Strongylocentrotus intermedius*; phagocytic activity; opsonin-like molecule; phagocytes

**Corresponding author:** LI Dantong. E-mail: lidantong@dlou.edu.cn