

doi: 10. 3969/j. issn. 2095 - 0780. 2012. 02. 002

厚壳贻贝血细胞颗粒的蛋白质组学分析

王信超，孙敬敬，范美华，武 梅，石 戈，王日昕，廖 智

(浙江海洋学院海洋科学学院，海洋生物资源及分子工程实验室，浙江 舟山 316004)

摘要：贝类的血细胞在宿主的免疫防御机制中发挥着重要的作用。文章利用线性离子阱-四级杆质谱对厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 血细胞的颗粒蛋白质组分进行了 Shotgun 分析，结合 Mascot 数据库搜索，共鉴定了 125 种高丰度蛋白，其中包括细胞骨架蛋白、细胞粘附蛋白、精氨酸激酶和代谢相关酶类等。此结果为深入了解厚壳贻贝血细胞颗粒的蛋白组成、贻贝免疫分子标记的筛选及其免疫机制奠定了基础。

关键词：厚壳贻贝；血细胞颗粒；LTQ-Orbitrap；质谱；Shotgun

中图分类号：S 917.4 文献标志码：A 文章编号：2095-0780 - (2012) 02 - 0007 - 08

Proteomic analysis of granule of hemocytes from *Mytilus coruscus*

WANG Xinchao, SUN Jingjing, FAN Meihua, WU Mei, SHI Ge, WANG Rixin, LIAO Zhi

(Lab. of Marine Biological Source and Molecular Engineering, College of Marine Sciences,
Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316004, China)

Abstract: The blood cells of mussel play an important role in the host's immune defense mechanism. We explore the protein composition in the granule of hemocytes from *Mytilus coruscus* by using linear-ion-trap-quadrupole mass spectrometry (LTQ-Orbitrap) combined with Shotgun strategy. A total of 125 high-abundance proteins are identified by Mascot searching methods, including cytoskeletal proteins, cell adhesion proteins, arginine kinases and metabolism-related enzymes, etc.. The results lay a foundation for further studies on the composition of mussel protein particles, screening of its immune molecular markers as well as its immune mechanism.

Key words: *Mytilus coruscus*; hemocytes granule; LTQ-Orbitrap; mass spectrometry; Shotgun

贻贝是目前国内水产养殖的一个重要品种，具有很高的经济价值。近年来，随着贻贝养殖业快速发展，贻贝养殖过程中的病害也日益严重^[1]，对贻贝免疫机制的研究已成为贻贝养殖病害防治的关键。贻贝缺乏特异性免疫系统，其免疫主要依赖于血细胞的吞噬作用和血清中各种抗菌肽分子。目前，对贻贝血清抗菌肽分子的研究较为深入，已从地中海贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*) 和紫贻贝 (*M. edulis*) 等不同种类的贻贝中分离鉴定了 4 类抗菌肽分子，分别为 Mytilin、Myticin、MGD 和 Mytimycin^[2-6]。除抗菌肽分子外，贻贝体内的各种血

细胞^[7-9]，特别是颗粒细胞在贻贝的免疫机制中也发挥着重要的作用^[10]。但目前对贻贝血细胞的蛋白质组学研究尚无相关报道，对贻贝颗粒细胞中免疫颗粒的蛋白质分子组成尚不清楚。

厚壳贻贝 (*M. coruscus*) 是广泛分布于中国东部沿海的贝类，其血清中富含各种抗菌肽分子^[11-13]。为进一步了解厚壳贻贝血细胞中颗粒的蛋白质分子组成，笔者以厚壳贻贝为研究对象，通过离心方法收集厚壳贻贝血细胞，进一步分离血细胞中的颗粒，采用超声结合酸抽提方法提取颗粒中的蛋白质成分，利用线性离子阱-四级杆质谱 (linear ion trap

收稿日期：2011-09-30；修回日期：2011-11-04
资助项目：浙江省科技厅面上科研农业项目 (2008C22026, 2009C32016)
作者简介：王信超 (1987 -)，男，硕士研究生，从事海洋生物活性多肽研究。E-mail: wangxinchao198706@ 163. com
通讯作者：廖 智，E-mail: liaozhi@ zjou. edu. cn

quadrupole, LTQ) 对其进行了 Shotgun 分析, 结合 Mascot 数据库搜索, 从中鉴定了 125 种高丰度蛋白质成分, 为深入了解厚壳贻贝血细胞的免疫机制奠定了基础, 并为贻贝养殖过程中的病害防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

1.1.1 试验动物 成年厚壳贻贝采自浙江舟山东极岛海域, 以洁净海水在通氧条件下饲养于恒温水族箱(18~20℃)。

1.1.2 试剂 三氟乙酸(TFA)、 α -氰基-4-羟基-肉桂酸(CCA)、二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺(IAA)、胰蛋白酶 Trypsin(测序级)均为 Sigma 公司产品; 所有测序试剂均来自 Applied Biosystems 公司; 色谱纯乙腈购自美国 TEDIA 公司; 其余试剂均为进口或国产分析纯试剂。试验用去离子水由 Millipore synergy 纯水系统(法国 Millipore 公司出品)制取。

1.2 试验方法

1.2.1 血细胞的收集 厚壳贻贝饲养 24 h 后, 参照文献[3]方法, 以内含抗凝剂(Alsever 液)的注射器收集厚壳贻贝血淋巴, 立即离心(4℃, 800×g, 15 min), 沉淀部分收集后以 PBS 缓冲液[137 mmol·L⁻¹氯化钠(NaCl), 7.8 mmol·L⁻¹磷酸氢二钠(Na₂HPO₄), 2.7 mmol·L⁻¹氯化钾(KCl), 1.47 mmol·L⁻¹磷酸二氢钾(KH₂PO₄), pH 7.4]洗涤 2 次后收集血细胞在光学显微镜下进行检测。收集的血细胞置于 -80℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 血细胞颗粒的收集和蛋白质的提取 厚壳贻贝血细胞颗粒的收集及蛋白质的抽提参照文献[2]方法进行。上述步骤中收集的厚壳贻贝血细胞悬浮于 50 mmol·L⁻¹ Tris 缓冲液(pH 8.7, 含 50 mmol·L⁻¹ NaCl), 采取反复冻融法对厚壳贻贝血细胞进行破裂, 之后以手持式组织匀浆器于冰浴中进行匀浆, 匀浆后经离心(4℃, 10 000×g, 20 min), 收集位于沉淀部分的血细胞颗粒, 置于 2 mol·L⁻¹醋酸溶液中[V(沉淀):V(醋酸)=1:3], 以超声波法(10×30 S)充分裂解所收集的血细胞颗粒, 裂解液经离心(4℃, 10 000×g, 20 min)后收集上清液, 加入 4 倍体积预冷(-20℃)的丙酮, 待蛋白质充分沉淀后离心(4℃, 12 000×g, 20 min)收集蛋白质沉淀, 冷冻干燥后于 -20℃ 冰箱

保存备用。

1.2.3 蛋白质的还原烷基化及酶解 上述步骤中经丙酮提取的蛋白质组分加入 50 μL 碳酸氢氨(NH₄HCO₃)(25 mmol·L⁻¹, 含 10 mmol·L⁻¹ DTT), 57℃ 保温 1 h 后室温冷却, 除去过量液体, 迅速加入同等体积的新配置的 NH₄HCO₃(25 mmol·L⁻¹, 含 55 mmol·L⁻¹碘乙酰胺), 室温下暗处放置 40 min 以进行烷基化反应, 之后将蛋白质混合物置于 NH₄HCO₃(100 mmol·L⁻¹, pH 8.5) 溶液中。将胰蛋白酶溶于 1 mmol·L⁻¹的盐酸(HCl)中, 至质量浓度为 1 g·L⁻¹。然后用 NH₄HCO₃(25 mmol·L⁻¹, 含 10% 的乙腈)溶液配成 0.02 g·L⁻¹终质量浓度的溶液, 上述蛋白质组分经还原烷基化反应后加入适量胰蛋白酶酶解液于 37℃ 条件下消化 16~18 h。

1.2.4 LC MS/MS 分析和数据处理 上述蛋白质酶解后的混合物上样反相色谱进行分离, 色谱仪为纳升级 LC-20AD(日本岛津公司出品), 色谱柱为 C18 柱(15 cm×0.01 cm, 填料粒径为 3.5 μm, 日本 Michom 公司出品)。流动相 A 相为 5% CAN(含 0.1% TFA), B 相为 95% ACN(含 0.1% TFA), 流速为 500 μL·min⁻¹。样品以 20 μL·min⁻¹ 的速度注入进样环中, 使用线性梯度洗脱分离, 45 min 内 B 相体积分数由 0% 升至 45%。

肽段鉴定在线性离子阱-轨道离子阱质谱仪(LTQ-Orbitrap, 美国 Thermo Fisher 公司出品)上进行。质谱分析模式为: 1) 以 Orbitrap 轨道离子阱在 400~2 000 的质荷比(m/z) 范围内以 60 000 的分辨率采集一级质谱图; 2) 用 LTQ 线性离子阱将第一步采集得到的质谱图中强度最高的信号进行串联质谱实验, 扫描分辨率为 7 500; 质谱条件采用纳升级电喷雾电离方式(nano-ESI), 电离电压 1 900 V, 扫描范围 m/z 400~2 000; 质谱数据由 Xcalibur 软件(V2.0.7)采集并处理; 处理后的质谱数据用 Mascot 软件分析, 搜索数据库为 Swiss Prot 的 UniProtKB(2010 年 9 月发布)。数据库搜索参数为肽段质量误差 = 50×10⁻⁶, 肽段碎片离子质量误差 = 1.0 Da, 甲硫氨酸氧化、蛋白质 N 端乙酰化作为可变修饰。

2 结果

2.1 血细胞的分离收集

厚壳贻贝经灭活大肠杆菌诱导后, 以注射器从后闭壳肌处收集血淋巴, 通过离心方式收集血细

胞，以 400 倍光镜进行检测，结果见图 1。所收集的厚壳贻贝血细胞形态完整，以颗粒细胞为主，细胞质中可见明显的具有折光性的颗粒，其形态特征与 CHENG^[9] 报道一致。

2.2 血细胞颗粒的 Shotgun 质谱分析及数据库搜索

利用 LTQ-Orbitrap 质谱对厚壳贻贝血细胞颗粒蛋白质的酶解混合物进行串联质谱分析，通过 *de novo* 方法总共获得 9 870 个肽段序列信息，经非冗余整理后总共获得 419 个非冗余肽段序列。上述肽段的串联质谱图(MS/MS) 信号峰明显，信噪比较高，图 2 展示了表 1 中序号为 3 的蛋白质的 MS/MS 质谱分析图以及推导的氨基酸序列。由图 2 可见，鉴定到的肽段质量精度非常高，图 2 - a 为质

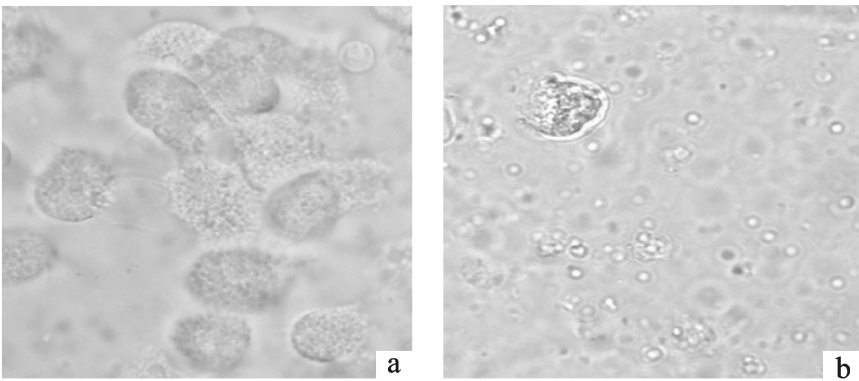


图 1 厚壳贻贝血细胞形态(×400)
a. 厚壳贻贝颗粒细胞; b. 厚壳贻贝颗粒细胞破裂后和释放的颗粒
Fig 1 Morphology of haemocytes from *M. coruscus*
a. haemocytes with granule from *M. coruscus*;
b. granule released from blood cells

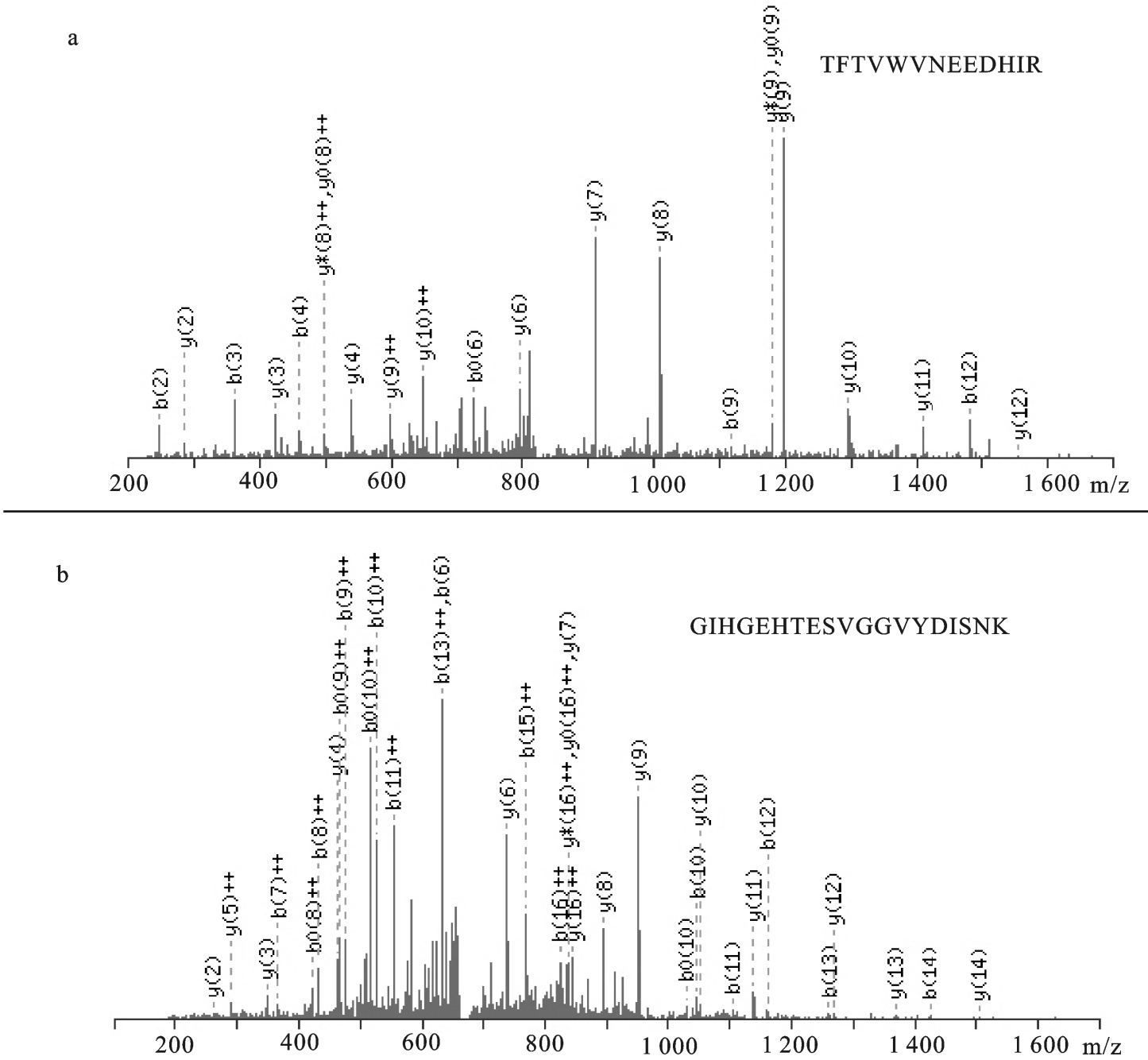


图 2 表 1 中序号为 3 的蛋白质 MS/MS 图谱

a. *m/z* 为 1 656.84 Da 的 MS/MS 图谱，分别显示了其 b 离子系列和 y 离子系列的单电荷峰及双电荷峰(“++”标注)，由此推导的肽段氨基酸序列为“TFLVWVNEEDHIR”；b. *m/z* 为 1 997.95 Da 的 MS/MS 图谱，分别显示了其 b 离子系列和 y 离子系列的单电荷峰及双电荷峰(“++”标注)，由此推导的肽段氨基酸序列为“GIHGEHTESVGGVYDISNK”；其鉴定结果为精氨酸激酶(来自 *Liolophura japonica*)

Fig. 2 Tandem mass spectrum of No. 3 protein in Tab. 1

a. *m/z* indicates MS/MS spectrum with *m/z* 1 656.84 acquired on LTQ-Orbitrap mass spectrometer and the amino acid sequence “TFLVWVNEEDHIR” deduced from precise mass difference between adjacent b-and y-ions; b. *m/z* indicates MS/MS spectrum with *m/z* 1 997.95 acquired on LTQ-Orbitrap mass spectrometer and the amino acid sequence “GIHGEHTESVGGVYDISNK” deduced from precise mass difference between adjacent b-and y-ions. The results of the Mascot search are presented as arginine kinase from *Liolophura japonica*.

荷比(m/z) 为 1 656. 837 Da 的母离子的 MS/MS 图谱, 与推导的氨基酸序列(TFLVWVNEEDHIR) 的理论分子量 1 656. 826 Da 相比仅 0. 011 Da 的差别, 且理论中的 24 个 b/y 离子找到 15 个, 说明 LTQ-Orbitrap 质谱所获得的 MS/MS 的离子碎片的质量精度和分辨率都非常好, 其结果也有助于提高 *de novo* 序列鉴定以及蛋白质鉴定的准确度。

对上述 419 个非冗余肽段序列进行 Mascot 数据库搜索, 因 Mascot 数据库过于庞大且贻贝本身没有基因组数据库, 为提高搜库结果的准确性, 采用的搜索数据库为 Protostomia 201011(原口动物门, 包含 666 319 个非冗余序列), 经数据库搜索, 总计获得得分较高($score > 40$) 的蛋白质鉴定结果为 125 个(表 1)。此次研究中所鉴定的蛋白部分来自于贝类, 如地中海贻贝、紫贻贝以及日本花棘石鳖(*Acanthopleura japonica*)、扇贝(*Chlamys farreri*)、长牡蛎(*Ostrea gigas*) 等, 还有部分鉴定结果来自于其他亲缘关系较远的物种, 例如果蝇(*Drosophila virilis*) 和黑斑海兔(*Aplysia kurodai*) 等, 这是由于厚壳贻贝没有基因组数据库或完整的蛋白质数据库, 因此在搜库过程中所匹配的结果往往是来自于其他物种的同源蛋白。

在已鉴定的 125 种蛋白中, 肌动蛋白所占比例较高, 其他高丰度蛋白还包括精氨酸激酶, 组蛋白, 细胞骨架蛋白, 代谢相关酶类, 免疫相关蛋白, 细胞粘附相关蛋白, 以及部分未知蛋白等。

3 讨论

贻贝缺乏特异性免疫系统, 其免疫机制主要依赖于呼吸爆发机制、巨噬细胞的吞噬以及血淋巴中的各种抗菌肽分子^[14-15]。其中血细胞在贝类的免疫系统中占据着中心地位, 可通过吞噬、胞内消化、细胞毒性等直接杀死或清除入侵微生物, 同时可激活或加强其他免疫反应机制, 如诱导细胞内的酶类和细胞毒分子分泌, 协同血淋巴中的体液免疫因子等^[15-16]。贻贝的颗粒细胞可运动至贻贝受伤部位或微生物入侵部位, 通过内吞作用或者释放颗粒细胞内所储存的免疫相关蛋白来达到消灭病原微生物的目的^[17-18], 但目前对于贻贝颗粒细胞的蛋白质组成尚不清楚, 贻贝颗粒细胞中免疫颗粒的蛋白质组成研究对于了解贻贝血细胞的免疫机制具有重要意义。

为了解厚壳贻贝血细胞中免疫颗粒的蛋白质组

成特点, 笔者利用 LTQ-Orbitrap 质谱对酸抽提的厚壳贻贝血细胞免疫颗粒蛋白质成分进行了 Shotgun 分析。Shotgun 策略是一种快速、高通量鉴定蛋白质混合物的质谱方法, 可直接用于微量蛋白质混合物的快速分析和鉴定, 而无需经过双向电泳对蛋白质的预先分离; 同时, LTQ-Orbitrap 质谱具有扫描速度快、分辨率高以及质量精度高等特点, 非常适合于 Shotgun 分析^[19]。利用上述方法在厚壳贻贝血细胞免疫颗粒中共鉴定了 125 种数据库评分在 40 分以上的蛋白(表 1), 具体可分为以下几大类: 1) 细胞骨架相关蛋白, 包括肌动蛋白以及其他骨架蛋白如肌凝蛋白和 catching 蛋白等; 2) 细胞粘附相关蛋白, 如钙黏着蛋白和锚蛋白等; 3) 代谢相关酶类, 如果糖二磷酸醛缩酶、己糖激酶和精氨酸激酶等; 4) 膜泡运输相关蛋白, 如单胺囊泡转运蛋白、lipid storage droplets surface-binding protein 等; 5) 解毒相关蛋白, 如超氧化物歧化酶(SOD) 等; 6) 细胞信号转导相关蛋白, 如丝裂原活化蛋白激酶(MAPK) 等; 7) 其他蛋白, 包括组蛋白、细胞凋亡相关蛋白以及未知蛋白等。

该研究从厚壳贻贝血细胞颗粒中鉴定的蛋白质种类与其他无脊椎动物血细胞的蛋白质组学研究结果具有一致性, 例如, HERBINIERE 等^[20] 在对普通卷甲虫(*Armadillidium vulgare*) 的血细胞进行蛋白质组学分析时, 发现丰度最高的蛋白主要是细胞骨架蛋白、酶类、细胞粘附蛋白等。此外, 上述鉴定结果中已有部分蛋白被证明与无脊椎动物的免疫存在直接联系。例如, 发现部分无脊椎动物的肌动蛋白在宿主细胞遭受微生物入侵时, 其表达量会显著上升^[21-23]; 精氨酸激酶在甲壳动物受到免疫刺激或者病毒感染后, 其表达量大量增加^[24-25]; 丝裂原活化蛋白激酶则在宿主清除体内入侵病原体的时候被激活, 在无脊椎动物免疫系统中发挥着至关重要的作用^[26]。

在上述鉴定的蛋白中, SOD 被认为是贝类通过呼吸爆发参与免疫反应过程中的一种关键酶, 可通过产生过氧化氢(H_2O_2) 来达到杀菌效果, 并且 SOD 可以保护贝类细胞在呼吸爆发过程中保护自身细胞免受超氧化物的损伤^[26-27]; 而其他蛋白, 如肌动蛋白、膜泡运输相关蛋白、精氨酸激酶及细胞信号转导相关蛋白等, 推测在贻贝的免疫过程中也发挥着关键作用。例如, 由于贝类血细胞具有较强的趋化以及吞噬作用, 高丰度的肌动蛋白、骨架

表 1 LTQ 质谱 MS /MS 数据的搜库结果

Tab. 1 Protein identification of hemocyte granule from <i>M. coruscus</i> by LTQ-Orbitrap with Mscot searching					
序号 No.	数据库编号 accession No. in UniProtKB	同源性 identity/homology	物种 species	匹配肽段 matched peptide	得分 score
1	B4J603_DROGR	GH21113	<i>Drosophila grimshawi</i>	1	305
2	Q6UQ16_MYTED	EP protein	<i>Mytilus edulis</i>	3	258
3 ~4	KARG_LIOJA	arginine kinase	<i>Liolophura japonica</i>	2	215
5	B3MCR5_DROAN	GF11480	<i>Drosophila ananassae</i>	1	209
6	ACT_PLAMG	actin	<i>Placopecten magellanicus</i>	6	209
7	Q5BQE3_9VEST	actin A3	<i>Haliotis iris</i>	5	209
8 ~9	Q760P6_CRAGI	arginine kinase	<i>Crassostrea gigas</i>	3	179
10	B3N2H1_DROAN	GF20391	<i>Drosophila ananassae</i>	4	153
11	Q9NC09_9MOLL	actin	<i>Mastigoteuthis magna</i>	1	137
12	ACT_MAYDE	actin	<i>Mayetiola destructor</i>	4	111
13 ~14	D7GXP9_TRICA	histone H2B	<i>Tribolium castaneum</i>	3	111
15	Q17C86_AEDAE	actin	<i>Aedes aegypti</i>	4	103
16	Q2LDZ7_HIRME	cytoplasmic actin	<i>Hirudo medicinalis</i>	3	98
17	MLE_TODPA	myosin catalytic light chain	<i>Todarodes pacificus</i>	1	97
18	Q9NC07_9MOLL	actin (fragment)	<i>Alluroteuthis antarcticus</i>	3	87
19	D0ES27_9HYME	beta actin	<i>Polyrhachis vicina</i>	6	84
20 ~24	B3VN78_BOMMOL L-1A	actin	<i>Bombyx mandarina</i>	5	84
25	B4LVN2_DROVI	histone H4	<i>Drosophila virilis</i>	1	79
26	B2YGD6_9ARAC	actin	<i>Goleba lyra</i>	2	79
27 ~30	B0FRF9_LITVA	arginine kinase	<i>Litopenaeus vannamei</i>	1	78
31	B4LB51_DROVI	GJ12598	<i>Drosophila virilis</i>	1	78
32	B6EAU5_HOMAM	skeletal muscle actin	<i>Homarus americanus</i>	4	78
33	B3MQE5_DROAN	histone H2A	<i>Drosophila ananassae</i>	2	77
34	A4FT58_9BILA	actin	<i>Macrobiotus sp.</i>	3	76
35 ~37	B4KDT0_DROMO	histone H2A	<i>Drosophila mojavensis</i>	2	75
38	C7SP19_9BILA	fructose-bisphosphate aldolase	<i>Glottidia sp.</i>	1	75
39 ~41	E2IV58_HELAM	actin	<i>Helicoverpa armigera</i>	4	72
42	Q7Q944_ANOGA	AGAP004835-PA	<i>Anopheles gambiae</i>	2	70
43 ~45	B2YGB1_9ARAC	actin	<i>Habronattus americanus</i>	4	70
46	B0LUD9_LYMDI	beta-actin	<i>Lymantria dispar</i>	2	70
47	TPM_MYTED	tropomyosin	<i>Mytilus edulis</i>	2	66
48 ~50	Q966R4_9DIPT	actin	<i>Chironomus yoshimatsui</i>	2	64
51	D2A3B9_TRICA	putative protein	<i>Tribolium castaneum</i>	1	62
52	B0X6X2_CULQU	dumpy	<i>Culex quinquefasciatus</i>	1	60
53	B3MD57_DROAN	GF11439	<i>Drosophila ananassae</i>	1	59
54	B4JTF2_DROGR	GH24039	<i>Drosophila grimshawi</i>	1	59
55	B4N5S6_DROWI	GK17871	<i>Drosophila willistoni</i>	1	59
56	Q6S015_DROME	reverse transcriptase	<i>Drosophila melanogaster</i>	1	59
57	Q7PYN5_ANOGA	AGAP002033-PA	<i>Anopheles gambiae</i>	1	59
58	Q6X4W3_HAELO	actin	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	5	59
59	D2DGZ3_9CUCU	cytoplasmic actin	<i>Ips confusus</i>	2	59

续表 1(to be continued)

60	B3MDN4_DROAN	GF11378	<i>Drosophila ananassae</i>	1	57
61	B4NFT1_DROWI	GK22698	<i>Drosophila willistoni</i>	2	56
62	D6X1R9_TRICA	putative protein	<i>Tribolium castaneum</i>	1	56
63	Q9VLL1_DROME	D12	<i>Drosophila melanogaster</i>	1	55
64	B4KI41_DROMO	GI10553	<i>Drosophila mojavensis</i>	1	54
65	B0WCT3_CULQU	leucine-rich transmembrane protein	<i>Culex quinquefasciatus</i>	1	54
66	E0AD92_BOOMI	angiotensin-converting enzyme-like protein	<i>Boophilus microplus</i>	1	50
67	E2B904_9HYME	putative protein	<i>Harpegnathos saltator</i>	1	50
68	D6WDM1_TRICA	putative protein	<i>Tribolium castaneum</i>	2	49
69	B0W6D8_CULQU	survivin	<i>Culex quinquefasciatus</i>	2	49
70	A2AXC2_TRICA	gustatory receptor	<i>Tribolium castaneum</i>	1	49
71	B0XCW8_CULQU	putative protein	<i>Culex quinquefasciatus</i>	1	49
72	B4MJJ2_DROWI	GK20842	<i>Drosophila willistoni</i>	1	48
73	B3P4Z6_DROER	GG11834	<i>Drosophila erecta</i>	1	48
74	E2BDR6_9HYME	lipid storage droplets surface-binding protein 1	<i>Harpegnathos saltator</i>	1	48
75	B7UEY4_MYTGA	superoxide dismutase	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	1	47
76	B4NIN2_DROWI	GK13512	<i>Drosophila willistoni</i>	1	47
77	B0XJN8_CULQU	phosphatase Slingshot	<i>Culex quinquefasciatus</i>	1	47
78	E2BKC0_9HYME	MAP kinase	<i>Harpegnathos saltator</i>	1	47
79	E2BI22_9HYME	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	<i>Harpegnathos saltator</i>	1	46
80	Q75W49_CRAGI	78kDa glucose regulated protein	<i>Crassostrea gigas</i>	2	46
81	D7EKZ5_TRICA	putative protein	<i>Tribolium castaneum</i>	1	46
82	E2AMK0_9HYME	DE-cadherin	<i>Camponotus floridanus</i>	1	46
83	B0W9Q9_CULQU	putative protein	<i>Culex quinquefasciatus</i>	1	46
84	B3MMOL L-1U1_DROAN	GF15119	<i>Drosophila ananassae</i>	1	45
85	Q95UF1_DROSI	ankyrin	<i>Drosophila simulans</i>	1	45
86	B4KUQ4_DROMO	GI11592	<i>Drosophila mojavensis</i>	1	45
87	Q16WC1_AEDAE	putative protein	<i>Aedes aegypti</i>	1	45
88	Q1HPK0_BOMMOL L-1O	vesicle amine transport protein	<i>Bombyx mori</i>	1	45
89	D6X0H5_TRICA	putative protein	<i>Tribolium castaneum</i>	1	45
90	E0VRW9_PEDHC	putative protein	<i>Pediculus humanus</i>	1	45
91	B4M706_DROVI	GJ16541	<i>Drosophila virilis</i>	2	45
92	B0W417_CULQU	ataxia telangiectasia	<i>Culex quinquefasciatus</i>	1	45
93	Q7PK24_ANOGA	AGAP009815-PA	<i>Anopheles gambiae</i>	1	45
94	D0IQG5_DROME	MIP13274p	<i>Drosophila melanogaster</i>	1	44
95	B7P8Q8_IXOSC	putative protein	<i>Ixodes scapularis</i>	1	44
96	B3ME79_DROAN	GF12460	<i>Drosophila ananassae</i>	1	44
97	D7F165_BOMMOL L-1O	endonuclease-reverse transcriptase	<i>Bombyx mori</i>	1	44
98	D7EKS8_TRICA	putative protein	<i>Tribolium castaneum</i>	1	43
99	D7ELX7_TRICA	putative protein	<i>Tribolium castaneum</i>	1	43
100	Q9U0S5_MYTGA	catchin protein	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	2	43
101	Q9U0S7_MYTGA	myosin heavy chain	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	1	43
102	B4JUI7_DROGR	GH15720	<i>Drosophila grimshawi</i>	1	43
103	Q966V3_MYTGA	calponin-like protein	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	5	43
104	Q16SH8_AEDAE	putative protein	<i>Aedes aegypti</i>	1	43

续表 1(to be continued)

105	E2BDB9_9HYME	putative protein	<i>Harpegnathos saltator</i>	1	43
106	MLE_ AEQIR	myosin essential light chain	<i>Aequipecten irradians</i>	1	43
107	E2C3M9_9HYME	hexokinase-2	<i>Harpegnathos saltator</i>	1	43
108	B5DNP1_ DROPS	GA22337	<i>Drosophila pseudoobscura</i>	1	42
109	A7UTW9_ ANOGA	AGAP005832- PA	<i>Anopheles gambiae</i>	1	42
110	B7P2A1_ IXOSC	26S proteasome regulatory complex	<i>Ixodes scapularis</i>	1	42
111	B0WTT0_ CULQU	putative protein	<i>Culex quinquefasciatus</i>	1	42
112	B7PXU8_ IXOSC	CAP-Gly linker protein	<i>Ixodes scapularis</i>	1	42
113	B0WAH4_ CULQU	WD repeat protein 36	<i>Culex quinquefasciatus</i>	1	42
114	E2A5M0_9HYME	putative protein	<i>Camponotus floridanus</i>	1	42
115	B4JPX7_ DROGR	GH13313	<i>Drosophila grimshawi</i>	1	42
116	C4WX22_ ACYPI	ACYPI004711 protein	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	1	42
117	B4J2K3_ DROGR	GH16634	<i>Drosophila grimshawi</i>	1	42
118	Q0C728_ AEDAE	golgi protein	<i>Aedes aegypti</i>	1	42
119	E0VRY6_ PEDHC	guanine nucleotide exchange factor DBS	<i>Pediculus humanus subsp. corporis</i>	1	41
120	D2T1I1_9NEOP	cadherin-like protein	<i>Polyplectropus</i> sp.	1	41
121	Q16U82_ AEDAE	putative protein	<i>Aedes aegypti</i>	1	41
122	E0VM19_ PEDHC	alpha-actinin-4	<i>Pediculus humanus</i>	1	41
123	D1M9K5_9MAXI	elongation factor 1	<i>Notochtha malus scabrosus</i>	1	40
124	E2A3P3_9HYME	N-acetylgalactosaminyltransferase	<i>Camponotus floridanus</i>	1	40
125	E2C7U1_9HYME	putative protein	<i>Harpegnathos saltator</i>	1	40

注：按数据库得分从高到低排列，展示得分在 40 分以上的结果
Note: Scores are ranked from high to low, and those more than 40 are shown.

蛋白和膜泡运输相关蛋白可能与贻贝血细胞趋化、吞噬、免疫囊泡的释放等有关；而精氨酸激酶与细胞信号转导相关蛋白则可能与贻贝免疫细胞的激活和细胞杀伤作用有关；尽管上述蛋白与贻贝免疫反应之间的联系尚缺乏进一步试验证据，但该研究结果为深入了解免疫颗粒的蛋白质成分的组成以及在贻贝免疫过程中的机制奠定了基础，其鉴定结果中的部分蛋白可作为贻贝免疫相关蛋白进行深入的结构与功能分析。该研究未能鉴定到溶菌酶以及抗菌肽等常规的免疫相关蛋白，这可能与该类分泌蛋白在血细胞颗粒中的丰度较低有关。

对于无脊椎动物的细胞免疫，目前的研究多集中于免疫细胞的分类、功能和细胞杀伤机制等。多数无脊椎动物免疫细胞均含有不同类型的免疫颗粒，免疫颗粒在无脊椎动物的免疫系统中发挥着关键作用^[16]。但是，对于无脊椎动物免疫细胞的颗粒蛋白质组成，由于其提取困难、蛋白质丰度极低，因此相关研究尚不多见。目前对于无脊椎动物免疫相关蛋白的研究大多数采用直接从血清和血细胞中纯化或是在不同物种中克隆和鉴定与已知免疫

因子同源的免疫相关基因，这样的研究策略显然限制了高通量发现新颖无脊椎动物的免疫相关蛋白及其免疫机制的深入分析。该研究利用 Shotgun 技术的高通量和高分辨率优势，初步探明了厚壳贻贝血细胞颗粒的蛋白质组成及特点，为深入了解厚壳贻贝血细胞颗粒的蛋白组成、贻贝免疫分子标记的筛选及其免疫机制奠定了基础。

参考文献:

[1] UN Jingfeng, WU Xinzhong. Histology, ultrastructure and morphogenesis of a Rickettsi-like organism causing disease in the oyster, *Crassostrea ariakensis* [J] . Invertebr Pathol, 2004, 86(3) : 77 - 86.

[2] CHARLET M, CHERNYSH S, PHILIPPE H, et al. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusk, *Mytilus edulis* [J] . J Biol Chem, 1996, 271(36): 21808 - 21813.

[3] MITTA G, VANDENBULCKE F, HUBERT F, et al. Involvement of Mytilins in mussel antimicrobial defense [J] . J Biol Chem, 2000, 275(17) : 12954 - 12962.

[4] YANG Y S, MITTA G, CHAVANIEU A. Solution structure and activity of the synthetic four-disulfide bond Mediterranean mussel

defensin (MGD-1) [J]. Biochemistry, 2000, 39(47): 14436 - 14447.

[5] MITTA G, HUBERT F, DYRYNDA E A, et al. Mytilin B and MGD-2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis [J]. Dev Comp Immunol, 2000, 24(4): 381 - 393.

[6] MITTA G, HUBERT F, NOEL T, et al. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from hemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis* [J]. Eur J Biochem, 1999, 265(1): 71 - 78.

[7] FRIEBEL B, RENWRANTZ L. Application of density gradient centrifugation for separation of eosinophilic and basophilic haemocytes from *Mytilus edulis* and characterization of both cell groups [J]. Comp Biochem Physiol, 1996, 112(1): 81 - 90.

[8] BAYNE C J, MOORE M N, CAREFOOT T H, et al. Hemolymph functions in *Mytilus californianus*: the cytochemistry of hemocytes and their responses to foreign implants and hemolymph factors in phagocytosis [J]. Invertebr Pathol, 1979, 34(1): 1 - 20.

[9] CHENG T C. Bivalves invertebrate blood cells [M]. New York: Academic Press, 1981: 233 - 330.

[10] MOORE M N, LOWE D M. The cytology and cytochemistry of the hemocytes of *Mytilus edulis* and their response to experimentally injected carbon particles [J]. Invertebr Pathol, 1977, 29(1): 18 - 30.

[11] 王日昕, 廖智, 刘梅, 等. 厚壳贻贝血细胞 cDNA 文库的构建及部分 EST 序列分析 [J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(5): 603 - 607.

WANG Rixin, LIAO Zhi, LIU Mei, et al. Construction of haemolymph cDNA library of *Mytilus coruscus* and the partial screening of expressed sequence tags [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2009, 40(5): 603 - 607. (in Chinese).

[12] 廖智, 刘梅, 王日昕, 等. 厚壳贻贝抗菌肽 Mytilin 和 Myticin 的 cDNA 基因的克隆与序列分析 [J]. 水产学报, 2010, 34(7): 1025 - 1033.

LIAO Zhi, LIU Mei, WANG Rixin, et al. cDNA clone and sequence analysis of mytilin and myticin from *Mytilus coruscus* [J]. J Fish China, 2010, 34(7): 1025 - 1033. (in Chinese).

[13] 王日昕, 刘梅, 廖智, 等. 厚壳贻贝抗菌肽 Mytilin 的初步鉴定 [J]. 水产学报, 2010, 334(1): 153 - 159.

WANG Rixin, LIU Mei, LIAO Zhi, et al. Purification and identification of Mytilins from *Mytilus coruscus* [J]. J Fish China, 2010, 334(1): 153 - 159. (in Chinese).

[14] BACH RE E, HERVIO D, MIALHE E, et al. Luminol-dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* [J]. Dis Aquat Org, 1991, 11: 173 - 180.

[15] LEIPPE M, RENWRANTZ L. Release of cytotoxic and agglutinating molecules by *Mytilus* hemocytes [J]. Dev Comp Immunol, 1988, 12(2): 297 - 308.

[16] ROCH P. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates [J]. Aquaculture, 1999, 172(1/2): 125 - 145.

[17] BACHERE E, MIALHE E, NOEL D, et al. Knowledge and research prospects in marine mollusk and crustacean immunology [J]. Aquaculture, 1995, 132(1/2): 17 - 32.

[18] PIPE R K. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis* [J]. Histochem J, 1990, 22(11): 595 - 603.

[19] PAN C, PARK B H, MCDONALD W H, et al. A high-throughput *de novo* sequencing approach for Shotgun proteomics using high-resolution tandem mass spectrometry [J]. BMC Bioinformatics, 2010, 11(1): 118.

[20] HERBINIERE, PIERRE G, JEAN-MARC S, et al. Protein profiling of hemocytes from the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare* [J]. Dev Comp Immunol, 2008, 32(8): 875 - 882.

[21] 贺淹才. 肌动蛋白和肌动蛋白基因的研究进展 [J]. 生命的化学, 2002, 22(3): 248 - 250.

HE Yancai. Research progress in actin and its gene [J]. Chem Life, 2002, 22(3): 248 - 250. (in Chinese)

[22] YOSHIDA S, SASAKAWA C. Exploiting host microtubule dynamics: a new aspect of bacterial invasion [J]. Trends Microbiol, 2003, 11(3): 139 - 143.

[23] PHATTARA-ORN C, APICHA B, CHU-FANG L, et al. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in *Penaeus vannamei* hemocytes upon Taura syndrome virus infection [J]. Proteomics, 2007, 7(19): 3592 - 3601.

[24] YAO Cuiluan, WU Changgong, XIANG Jianhai, et al. Molecular cloning and response to laminarin stimulation of arginine kinase in haemolymph in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2005, 19(4): 317 - 329.

[25] ASTROFSKY K M, ROUX M M, KLIMPEL K R, et al. Isolation of differentially expressed genes from white spot virus (WSV) infected Pacific blue shrimp (*Penaeus stylirostris*) [J]. Arch Virol, 2002, 147(9): 1799 - 1812.

[26] NAKAMURA M, MORI K, INOOKA S, et al. *In vitro* production of hydrogen peroxide by the haemocytes of the scallop, *Potinopecten yessoensis* [J]. Dev Comp Immunol, 1985, 9(3): 407 - 417.

[27] PIPE R K. Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis* [J]. Dev Comp Immunol, 1992, 16(2/3): 111 - 112.

[28] ROSERBERGER C M, FINLAY B B. Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens [J]. Mol Cell Biol, 2003, 4(5): 385 - 396.