

团头鲂黏蛋白基因 *Muc5b* 克隆及表达分析

薛春雨^{①②} 董晶晶^① 习丙文^{②③} 任鸣春^② 梁利国^② 谢骏^{①②*}

① 南京农业大学无锡渔业学院 无锡 214081; ② 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室 无锡 214081; ③ 淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心 武汉 430072

摘要: 黏液(mucus)在鱼体防御外界病原侵袭、信息传递、调节渗透压等方面具有重要作用。黏蛋白(mucin)作为黏液的基础骨架组分,与其相关的研究正受到广泛的关注。在本研究中,作者克隆获得团头鲂(*Megalobrama amblycephala*) *Muc5b* mRNA 的部分序列 3 895 bp,并通过 qRT-PCR 分析了 *Muc5b* 在团头鲂不同组织的表达分布及其在捕捞应激后在鳃和表皮中的表达变化。序列分析结果显示,团头鲂 *Muc5b* 与鲤(*Cyprinus carpio*)等脊椎动物的 *Muc5b* 有较高的同源性,其 N 端含有黏蛋白特异性结构域:3 个 VWD 区域,3 个 C8 区域,2 个 TIL 区。组织表达分析结果表明, *Muc5b* 在鳃和表皮表达量相对较高,在脑、脾、肾中表达水平较低,在肝、肠道几乎不表达。捕捞应激后 1 h 时鳃中 *Muc5b* 显著降低($P < 0.05$),24 h 时恢复初始水平;表皮中 *Muc5b* 在 4 h 时显著上升($P < 0.05$),24 h 时恢复到初始水平。

关键词: 团头鲂;黏液; *Muc5b*; 应激

中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2014)06-886-11

Cloning and Expression of *Muc5b* in *Megalobrama amblycephala* and *Muc5b* Expression Alteration after Catching Stress

XUE Chun-Yu^{①②} DONG Jing-Jing^① XI Bing-Wen^{②③} REN Ming-Chun^②
LIANG Li-Guo^② XIE Jun^{①②*}

① *Wuxi Fishery College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081*; ② *Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081*; ③ *Hubei Collaborative Innovation Center for Freshwater Aquaculture, Wuhan 430072, China*

Abstract: Mucus plays an important role in protecting fish against pathogen invasion, signaling events, regulating osmotic pressure and so on. As mucins are the important skeleton components of the mucus, the research on fish mucins has caught wide attention. However, few studies have been reported on fish mucin gene characteristics and expression pattern. In this study, *Megalobrama amblycephala* *Muc5b* mRNA (3 895 bp length) was cloned and its tissue expression was analyzed by qRT-PCR. The result showed that sequence of *M. amblycephala* *Muc5b* had high homology with that of other vertebrates, and its N-terminal of predicted amino acid sequence contained several non-PTS region domains: three VWD domains, three C8 domains and two TIL domains (Fig. 2). Gene expression analysis showed relatively higher expression of *Muc5b* in gills and skin, lower expression in brain, spleen, kidney, and almost no expression in liver and intestine (Fig. 4). In

基金项目 现代农业产业技术体系建设专项(No. CARS-46-10),中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(No. 2013JBFM10);

* 通讯作者, E-mail: xiej@ffrc.cn;

第一作者介绍 薛春雨,男,硕士;研究方向:水产动物营养与病害防控; E-mail: xuechunyu1989@163.com。

收稿日期:2014-02-18, 修回日期:2014-05-26

addition, variation in *Muc5b* expression was detected in gills and skin after catching stress. *Muc5b* expression was significantly reduced in the gills (*t*-test, $P < 0.05$) at 1 h after catching-stress, and recovered to the initial level at 24 h; On the contrary, *Muc5b* expression was increased in the skin at 4 h (*t*-test, $P < 0.05$), then recovered to the initial level (Fig. 6). Thus, the *Muc5b* expression can be influenced by catching-stress.

Key words: *Megalobrama amblycephala*; Mucous; *Muc5b*; Stress

团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 是我国大宗淡水鱼类主要养殖鱼类之一。然而,近年来在养殖中出现的鱼体“发毛”(渔民的俗称,由黏液分泌过少造成)现象,严重影响该鱼的养殖。出现“发毛”的鱼塘往往容易发生细菌性出血病,并且商品鱼在捕捞和运输过程中的死亡率较高,给养殖户造成严重经济损失。目前,关于团头鲂鱼体“发毛”的原因众说纷纭(水质、营养、药物或应激?)。由于此前国内外关于鱼体黏液分泌的研究非常少,有关该鱼病的产生原因及防控技术需要不断探索。

与陆生动物相比,鱼类生活在更为复杂的水生环境中,易于接触到病原生物(细菌、病毒、寄生虫)。为了阻挡病原侵袭机体,在鱼体的表层(肠道、表皮、鳃等)通常覆盖着一层薄薄的黏液层(mucus layer)。黏液一般由极化的表层杯状细胞和黏膜下腺分泌组成(戴海燕等 2010),成分非常复杂,含有黏蛋白、免疫球蛋白、补体、凝集素、溶菌酶等(Creeth 1978, Voynow et al. 2009),并且会随鱼体组织部位和机体状态而改变。在黏液的众多成分中黏蛋白具有非常重要作用,它形成了黏液层的基础网架结构(Voynow et al. 2009)。黏蛋白是一类富含 O-糖和脯氨酸-丝氨酸-苏氨酸(proline-threonine-serine, PTS domain)高度重复结构域的糖蛋白(Escande et al. 2004)。根据蛋白质的生化特征,目前共有个 20 基因被划归为黏蛋白基因家族(Imai et al. 2013),并被划分为分泌型和膜结合型两种类型(Moniaux et al. 2001)。鱼类体表的黏液主要由分泌型黏蛋白组成。在人和哺乳动物中,黏蛋白(如 MUC2、MUC5AC、MUC5B)的研究受到越来越多的关注,有研究发现其与癌症(Matsukita et al. 2003, Conze et al. 2010)、肠炎(Mejias-Luque et

al. 2010)、支气管炎(余君等 2006)的发生有密切的关系。然而,有关鱼类黏蛋白的研究非常少,大多数鱼类黏液方面的研究主要关注黏液中的溶菌酶、抗菌肽及免疫球蛋白等成分(Shephard 1994, Mayer 2003, 黄智慧等 2009)。近年,国外研究人员通过对红鳍东方鲀(*Fugu rubripes*) (Lang et al. 2004)、大西洋鲑(*Salmo salar*) (Micallef et al. 2012)和金头鲷(*Sparus aurata*) (Pérez-Sánchez et al. 2013)的基因组或转录组数据的挖掘,发现和报道了一些 *Mucin* 相关基因片段。van der Marel 等(2012)通过简并引物扩增获得了鲤(*Cyprinus carpio*) *Muc2* 和 *Muc5b* 的部分片段,并分析了它们在不同组织表达分布和 β -葡聚糖对其 mRNA 表达的影响。

目前,如何客观、准确的直接测量鱼类体表黏液量,缺乏相应的技术和方法。黏蛋白作为黏液的主要成分,黏液量和组分受黏蛋白基因表达影响。根据已有的鱼类黏蛋白基因的研究报道,*Muc5b* 为鱼类体表特异性表达基因。因此,在本研究中作者克隆了在体表主要表达的团头鲂 *Muc5b* 基因部分序列,并分析了 *Muc5b* 在不同组织中的表达分布,为后续探讨影响体表黏液的研究奠定基础。同时,通过应激处理,初步分析了捕捞对 *Muc5b* 在表皮和鳃表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料 团头鲂取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心无锡南泉养殖基地,实验室暂养 2 周,暂养期间投喂通威股份有限公司沉性饲料,水温 27 ~ 28℃ 左右, pH 为 7.6 ~ 7.8, 溶氧大于 5 mg/L, 氨氮小于 0.01 mg/L。

组织表达的样品: 选取 12 尾(雌雄各半)

体表正常的团头鲂, 体重 (55 ± 1.4) g, 停食 24 h 后开始采样。先用 MS-222 麻醉, 分别取每一条鱼的肝、脾、脑、肾、鳃、肠及表皮组织, 浸入装有 1 ml RNAiso Plus (Takara) 的 2 ml 离心管中, 每个样品重量小于 100 mg, 并尽量除去黏液和肌肉, 迅速放入 -80°C 保存备用。

捕捞应激的样品: 选取 24 尾(雌雄各半) 体表正常的团头鲂, 体重 (57 ± 1.1) g, 对其实施应激处理。将鱼捞起停留在网中 60 s 后放回水族箱, 分别在 0 h(应激前)、1 h、4 h、24 h 时采样, 每个时间点取 6 尾鱼, 麻醉后分别取鳃、表皮组织浸入装有 1 ml RNAiso Plus 的 2 ml 离心管中, -80°C 保存备用。对照组从 0 h 平行采样。

1.2 cDNA 制备 根据 RNAiso Plus 说明书提取各组织中的总 RNA。用分光光度法检测总 RNA 的质量和浓度(DU-600 紫外分光光度计, BECKMAN)。每个样品的总 RNA 分别稀释 100 倍, A_{260}/A_{280} 值在 1.8 ~ 2.1 为质量较好样品, 样品浓度(mg/L) = $4\,000 \times (A_{260} - A_{320})$ 。用于组织表达的 RNA 样品, 将相同组织的 2 个样品混为 1 组, 每个样品提供相同的 RNA 量, 调整成终浓度为 400 mg/L。用于捕捞应激的总 RNA 样品将每个样品单独稀释, 最终浓度 400 mg/L。所有样品采用 PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser(大连宝生物有限

公司) 除去残留的基因组 DNA 并反转录成 cDNA。用于标准曲线制作的 cDNA, 取每个组织的等量 cDNA 混合, 10 倍梯度稀释, 稀释 4 次。

1.3 分子克隆和引物设计 根据实验室完成的团头鲂转录组数据库中的 *Muc5b* 部分片段, 利用 primer5.0 软件设计 3 对引物(表 1), 通过 PCR 扩增(Eppendorf Mastercycler gradient PCR 仪), 凝胶电泳得到目的条带, 纯化, 送上海生工生物工程有限公司克隆测序。PCR 反应条件: 94°C 3 min; 94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 1 min, 40 个循环; 72°C 7 min。根据克隆得到的片段, 在 primer5.0 中设计 *Muc5b* 荧光定量引物。荧光定量分析中的内参基因选用 *RP II* (RNA polymerase II) (Zhao et al. 2011)。实验中所用引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.4 实时荧光定量 PCR 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 采用 SYBR Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒(大连宝生物有限公司) 在 ABI PRISM 7500 Real-time PCR System 仪器进行检测和分析。qRT-PCR 反应体系为 20 μl : 10 μl SYBR Premix Ex TaqTM II, 0.4 μl 20 $\mu\text{mol/L}$ Forward Primer, 0.4 μl 20 $\mu\text{mol/L}$ Reverse Primer, 0.4 μl ROX Reference Dye II, 2 μl cDNA 模板, 6.8 μl dH₂O。qRT-PCR 反应

表 1 团头鲂 *Muc5b* 基因克隆和荧光定量表达分析使用的引物

Table 1 Primers used for *Megalobrama amblycephala Muc5b* cloning and quantity analysis

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')	基因 Gene	用途 Usage	PCR 产物 PCR product (bp)
<i>Muc5b</i> -1F	TCTGCAGCACATGGGGAAAT	<i>Muc5b</i>	终点法 PCR	888
<i>Muc5b</i> -1R	AGCCACTCTGACCAATGTCTG		Endpoint PCR	
<i>Muc5b</i> -2F	ATCCAGGCGGAAGTCTAAT	<i>Muc5b</i>	终点法 PCR	1 065
<i>Muc5b</i> -2R	TGGTCACGCTGTAGGAGTA		Endpoint PCR	
<i>Muc5b</i> -3F	GACTGGTGTTCCTGCTCAC	<i>Muc5b</i>	终点法 PCR	1 342
<i>Muc5b</i> -3R	CGTCACAAGGATGCTTCACG		Endpoint PCR	
<i>Muc5b</i> -YF	CTGGTGTTCCTGCTCACAA	<i>Muc5b</i>	实时荧光定量 PCR	176
<i>Muc5b</i> -YR	CAACTCCTTTGGCAGCACAC		qRT-PCR	
<i>RP II</i> -F	CGCGAGTCATTCTGTAAACATC	<i>RP II</i>	实时荧光定量 PCR	
<i>RP II</i> -R	TGACCCTTCTCAGCTTTACCA		qRT-PCR	

程序: 第一阶段 50℃ 2 min, 95℃ 3 min; 第二阶段 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 40 次循环; 第三阶段溶解曲线分析 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 30 s, 60℃ 15 s。每个样品设 3 个平行, 每个基因设一个阴性对照。

1.5 序列和数据分析 获得的序列在 NCBI/BLAST 中使用 Blastx 比对分析查找同源性序列。由于 GenBank 中存在大量软件预测和未经验证的 *Mucin* 基因相关片段, 因此, 作者在后续同源性分析中以实验验证过的人 (*Homo sapiens*) 和小鼠 (*Mus musculus*) 的黏蛋白为参考依据。综合 DNAMAN 分析和 Blastx 比对结果预测团头鲂 *Muc5b* 开放阅读框和氨基酸序列。荧光定量标准曲线由 ABI PRISM 7500 Real-time PCR System 软件自动生成。*Muc5b* 表达分析采用双标准曲线法(唐永凯等 2008)计算相对表达量。数据间差异显著性分析采用 SPSS18.0 软件中的单因素方差分析(One-way ANOVA), 显著性水平设置为 0.05。

2 结果

2.1 基因克隆和序列分析 终点法 PCR 产物凝胶电泳结果见图 1。结合克隆测序和转录组中部分片段, 获得 3 895 bp 的团头鲂 *Muc5b* mRNA 序列(GenBank 登录号 KF926688), 包含 50 bp 前端非编码区域和 3 843 bp 的开放阅读框。同源性分析表明, 该序列编码的氨基酸与鲤 *Muc5b* 同源性最高, 与人和小家鼠的 3 种黏蛋白(MUC2、MUC5AC、MUC5B)比较, 与 MUC5B 同源性最高(表 2)。DNAMAN 序列比对分析结果表明, 该序列位于黏蛋白 N 端, 含有 3 个保守结构域(Von Willebrand D domain, Pfam00094, VWD), 3 个 C8 区域(Pfam08742 保守结构域, 富含半胱氨酸, 通常与 VWD 相邻出现), 以及 2 个 TIL 区域(trypsin inhibitor-like, Pfam01826 保守结构域, 富含半胱氨酸)(图 2, 3)。

2.2 *Muc5b* 在不同组织中的表达 实验中内参基因 *RP II* 的 RT-PCR 标准曲线扩增效率 104%, 相关系数 $R^2 = 0.997$, 目的基因 *Muc5b*

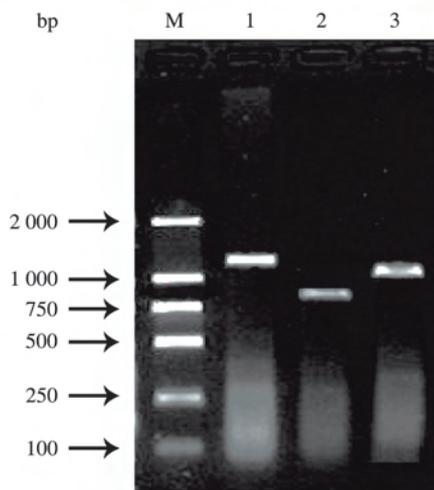


图 1 PCR 扩增产物

Fig. 1 The products of PCR amplification

M. DNA 分子量标准 DM2000; 1. PCR 产物(*Muc5b-3*);
2. PCR 产物(*Muc5b-1*); 3. PCR 产物(*Muc5b-2*)
M. DM2000 DNA marker; 1. PCR product (*Muc5b-3*);
2. PCR product (*Muc5b-1*); 3. PCR product (*Muc5b-2*)

的扩增效率为 104%, 相关系数 $R^2 = 1$ (表 3), 适合用于相对荧光定量分析。荧光定量 PCR 结果表明, 团头鲂 *Muc5b* 在脑、脾、肾中都有表达, 在表皮和鳃组织表达量较高(图 4), 而在肝和肠道组织中不表达或表达量非常低, CT 值大于 30, 内参基因 CT 值见图 5。此外, 鳃中 *Muc5b* 的表达量明显高于表皮。团头鲂鳃中 *Muc5b* 的表达水平可达脑中 1 000 倍以上, 为表皮的 10 倍以上。

2.3 捕捞应激后 *Muc5b* 在鳃和表皮的变化

捕捞应激对团头鲂鳃和表皮 *Muc5b* 表达都有显著影响($P < 0.05$)。处理组鳃 *Muc5b* 表达量在 1 h 时显著降低, 其对照组表达量是处理组的 4 倍, 4 h 与 1 h 表达量无显著差异, 24 h 时又显著升高恢复到应激前水平。表皮 *Muc5b* 的表达与鳃中相反, 处理组 1 h 时表达无显著差异, 4 h 显著升高, 24 h 又下降。鳃部 4 h 处理组和表皮 24 h 处理组的 *Muc5b* 表达量 SD 数值较大, 个体间差异较大。但统计分析表明 4 h 时鳃的处理组与对照组有显著差异, 24 h 时表皮的处理组与对照组无显著差异(图 6)。

表 2 氨基酸序列同源性 (%)
Table 2 Percentage of homology of amino acid sequence

基因 Gene	鲂 <i>Muc5b</i> Bream- <i>Muc5b</i>	鲤 <i>Muc5b</i> Carp- <i>Muc5b</i>	人 MUC5B Human-MUC5B	鼠 <i>Muc5b</i> Mouse- <i>Muc5b</i>	人 MUC5AC Human-MUC5AC	鼠 <i>Muc5ac</i> Mouse- <i>Muc5ac</i>	人 MUC2 Human-MUC2	鼠 <i>Muc2</i> Mouse- <i>Muc2</i>
鲂 <i>Muc5b</i> Bream- <i>Muc5b</i>	100	79.70	45.80	45.60	43.40	44.80	41.70	42.10
鲤 <i>Muc5b</i> Carp- <i>Muc5b</i>		100	44.60	43.50	42.90	43.60	41.80	41.70
人 MUC5B Human-MUC5B			100	76.00	62.10	60.90	48.40	47.10
鼠 <i>Muc5b</i> Mouse- <i>Muc5b</i>				100	59.00	59.60	47.20	47.20
人 MUC5AC Human-MUC5AC					100	73.80	48.70	47.90
鼠 <i>Muc5ac</i> Mouse- <i>Muc5ac</i>						100	47.40	46.50
人 MUC2 Human-MUC2							100	80.90
鼠 <i>Muc2</i> Mouse- <i>Muc2</i>								100

鲂 *Muc5b*. 团头鲂, KF926688; 鲤 *Muc5b*. 鲤鱼, JF343438; 人 MUC5B. 现代人, Q9HC84. 3; 鼠 *Muc5b*. 小家鼠, NP_083077. 2; 人 MUC5AC. 现代人, P98088. 3; 鼠 *Muc5ac*. 小家鼠, CAD54412. 1; 人 MUC2. 现代人, Q02817. 2; 鼠 *Muc2*. 小家鼠, Q80Z19. 2。

Bream-*Muc5b*. *Megalobrama amblycephala*, KF926688; Carp-*Muc5b*. *Cyprinus carpio*, JF343438; Human-MUC5B. *Homo sapiens*, Q9HC84. 3; Mouse-*Muc5b*. *Mus musculus*, NP_083077. 2; Human-MUC5AC. *Homo sapiens*, P98088. 3; Mouse-*Muc5ac*. *Mus musculus*, CAD54412. 1; Human-MUC2. *Homo sapiens*, Q02817. 2; Mouse-*Muc2*. *Mus musculus*, Q80Z19. 2。

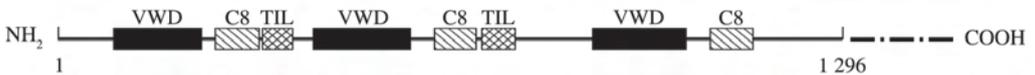


图 2 推测的团头鲂 *Muc5b* 氨基酸结构域示意图

Fig. 2 The putative amino acid motifs of *Megalobrama amblycephala Muc5b*

VWD. von Willebrand factor D 型结构域; C8. 含有 7~8 个保守半胱氨酸的结构域; TIL. 胰蛋白酶抑制剂相似结构域。

VWD. von Willebrand factor D domain; C8. Contain 7 or 8 conserved cysteine domains; TIL. Trypsin Inhibitor like domain.

3 讨论

3.1 团头鲂 *Muc5b* 序列分析 本研究克隆获得了团头鲂 *Muc5b* 基因 5'端 3 895 bp 的 mRNA 序列, 预测的氨基酸序列包含了黏蛋白中 N 端重要的保守结构域 VWD(3 个位点)、C8(3 个位点)和 TIL(2 个位点)。所获得的团头鲂 *Muc5b* 比已发表的鲤鱼 *Muc5b* 基因片段(van der Marel et al. 2012)的序列略长(3 895 bp vs. 3 212 bp)。由于大多数分泌型黏蛋白 mRNA 大于 10 kb, 且序列中间富含高度重复单元(如

PTS domain), 使获得 *Mucin* 的全长序列面临很多困难和挑战(Lang et al. 2007)。目前, 没有任何鱼类的黏蛋白基因通过克隆获得序列全长。近年来, 基因组和转录组测序在鱼类研究中的应用, 使 *Mucin* 基因不需要通过传统的同源序列引物扩增而获得 *Mucin* 基因片段。如, 在 GenBank 核苷酸序列库中模式生物斑马鱼(*Danio rerio*)、红鳍东方鲀、大西洋鲑、金头鲷和泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*) (Long et al. 2013)等鱼类已收录大量不完整 *Mucin* 基因片段。

表 3 相关基因的 PCR 扩增效率及拟合系数 (R^2)

Table 3 PCR amplification efficiency and correlation coefficient (R^2) of related genes

相关基因 Reference gene	PCR 扩增效率(%) PCR amplification efficiency	拟合系数(R^2) Correlation coefficient	斜率 Slope
<i>Muc5b</i>	104	1	-3.229
<i>RP II</i>	104	0.997	-3.218

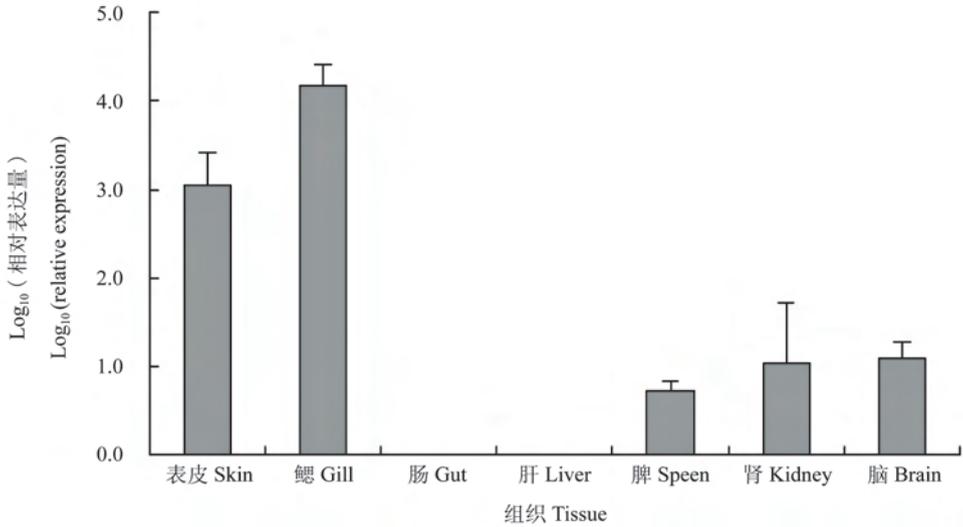


图 4 团头鲂 *Muc5b* 在不同组织中的相对表达量(平均值 ± 标准差)

Fig. 4 The relative expression of *Megalobrama amblycephala Muc5b* in different tissues (Mean ± SD)

图中的“相对表达量”表示根据双标准曲线法(唐永凯等 2008)计算的相对表达量值。

The “relative expression” in this figure indicates the value calculated by the two standard curves (Tang et al. 2008).

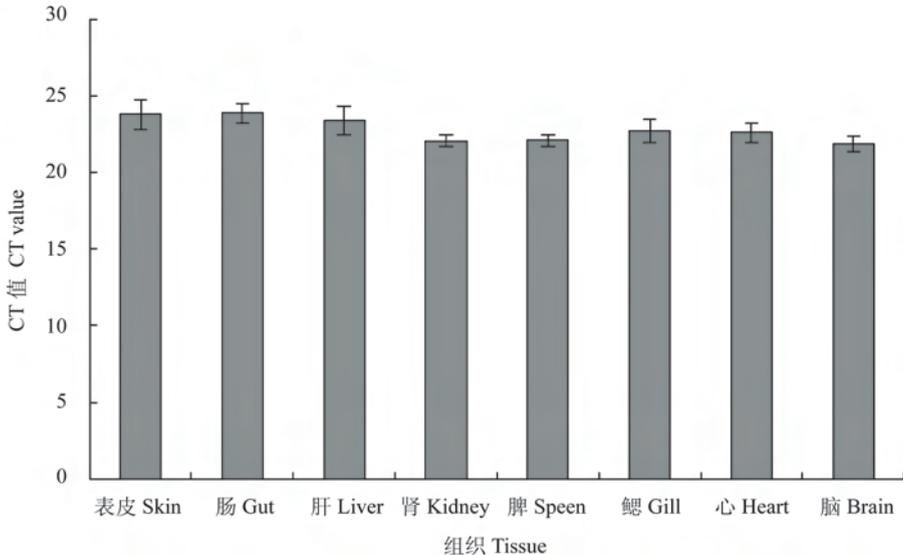


图 5 团头鲂 *RP II* 在不同组织中的 CT 值(平均值 ± 标准差)

Fig. 5 The CT values of *Megalobrama amblycephala RP II* in different tissues (Mean ± SD)

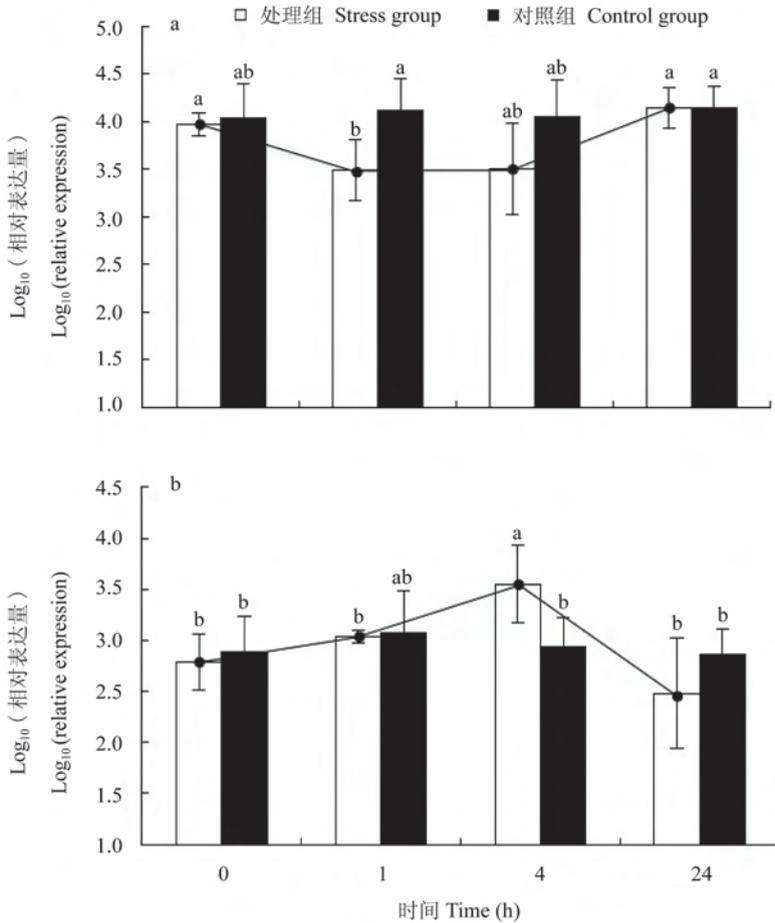


图 6 捕捞应激后团头鲂 *Muc5b* 在鳃 (a) 和表皮 (b) 的表达量变化 (平均值 \pm 标准差)

Fig. 6 The variation of *Megalobrama amblycephala Muc5b* expression in gill and skin after catching-stress (Mean \pm SD)

图中的“相对表达量”表示根据双标准曲线法(唐永凯等 2008)计算的相对表达量值。各组间有不同上标字母者表示显著性差异(t -检验, $P < 0.05$)。

The “relative expression” in this figure indicates the value calculated by the two standard curves (Tang et al. 2008).

Within each group, bars sharing different superscript letters indicate a significant difference (t -test, $P < 0.05$).

根据已有研究发现,分泌型黏液蛋白(gel-forming mucins)不仅具有黏蛋白共有的PTS重复结构域,而且具有其特有的多个VWD结构域。来自不同脊椎动物的VWD1、VWD2、VWD3和VWD4区域分别在系统发育上非常保守(Dekker et al. 2002),因此,这些序列片段常被用于系统发育分析推断黏液蛋白基因类型。本研究获得的团头鲂mRNA预测编码的氨基酸序列,包含多个可以鉴定黏蛋白的保守区域 VWD1-C8-TIL-VWD2-C8-TIL-VWD2-C8

(图1, 2),表明该片段是分泌型黏蛋白基因片段。核苷酸序列Blast比对分析发现,团头鲂*Muc5b* mRNA与鲤*Muc5b* mRNA序列相似性最高(86%)。氨基酸序列同源性分析,团头鲂*Muc5b*编码的氨基酸序列与van der Marel等(2012)在鲤上研究鉴定的*Muc5b*蛋白序列同源性最高(79.70%),与人类和小鼠的3种黏液蛋白(MUC2, MUC5AC, MUC5B)同源性比较时,分别与人的MUC5B和鼠的*Muc5b*同源性最高(45.80%, 45.60%)。因此,根据序列

同源性分析, 本文获得的基因片段为团头鲂 *Muc5b mRNA* 片段。

值得注意的是该基因编码的氨基酸序列与人类 MUC5AC 也有较高的同源性, 这与一些作者在确定黏液基因的研究遇到的问题相同 (Rousseau et al. 2007, Pérez-Sánchez et al. 2013)。由于 MUC5AC 和 MUC5B 同位于人类 11p15 染色体上, 且它们的非 PTS(脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸) 区域被认为很可能是从同一原始基因复制进化而来的, 因此有较高的同源性 (Rousseau et al. 2007)。在没有得到该黏蛋白完整的开放阅读框前, 本研究只能根据已获得序列的分析结果, 将其命名为 *Muc5b*。

3.2 *Muc5b* 在不同组织中的表达 组织表达分布的结果表明, 团头鲂 *Muc5b* 主要在鳃和表皮大量表达, 在脑部也有表达, 但在肠道不表达。这与鲤 *Muc5b* 组织表达的结果 (van der Marel et al. 2012) 是一致的, 与人类 MUC5B 主要在呼吸道表达也相似 (Corfield et al. 2001)。根据已有的研究, 多数黏蛋白的分布都呈现出组织特异性, 如人类的 MUC2 主要在肠道特异性表达 (Corfield et al. 2001)。

Muc5b 在团头鲂鳃中的表达量略要高于表皮, 这与鲤鱼 (van der Marel et al. 2012) 中表皮表达量略高于鳃的结果不同。这可能由于物种间的差异造成不同。此外, 因为选择不同的内参基因和取样部位可能影响结果。在大西洋鲑 (Ingerslev et al. 2006, Jorgensen et al. 2006)、斑马鱼 (Tang et al. 2007) 的研究表明, 使用不同的内参可能导致目的基因表达结果有差异; 研究表明同一种鱼的不同部位黏液细胞的数目也是不同的 (杨桂文等 1999), 其 mRNA 量也会有不同。尽管 *Muc5b* 的表达在团头鲂和鲤鱼存在差异, 但总体表明 *Muc5b* 在团头鲂和鲤鱼的鳃和表皮都大量表达。

3.3 捕捞应激对 *Muc5b* 表达的影响 在养殖生产中, 放养密度、温度变化、水质变化、药物使用和捕捞等操作都会引起养殖动物应激反应 (Selye 1950)。有研究表明应激会影响生物体黏液蛋白表达 (Castagliuolo et al. 1996, 1998,

全巧云等 2005)。应激对鱼类黏液分泌量及组分影响的研究有很多报道 (Shephard 1994), 然而对鱼类黏液蛋白分泌的影响还不清楚。在生产实践中, 鲇 (*Silurus asotus*)、鳗 (*Anguilla japonica*) 等无鳞鱼被捕捞出水面后的鱼体表往往分泌出更多的黏液, 这往往被看作防御伤害的生理自然反应。

团头鲂是一种容易产生应激反应的鱼类。养殖中轻微的扰动, 都会引起激烈的跳跃和游动。捕捞对鱼类的应激很大, 使其表皮因机械摩擦而掉鳞, 严重时出血, 并使鱼类体内肾上腺素和皮质醇(酮)大量分泌, 机体分解代谢加强, 合成代谢减弱 (王国强等 2009), 免疫功能降低, 这让病原趁虚而入, 鱼类容易被感染。

捕捞应激后, *Muc5b* 表达在鳃中先下降后恢复到正常水平。这可能是团头鲂被捕捞后, 离开水面其鳃不能发挥正常呼吸功能, 细胞代谢减慢以减少能量代谢 (王国强等 2009), 以便克服应激的一种适应对策。然而, *Muc5b* 在表皮表达量先升高后恢复到正常水平。这也有可能同团头鲂受捞起刺激后, 需分泌更多的黏液, 保持体表湿润, 减少机械摩擦, 防止细菌感染有关。动物应对体内外非特异有害因子的刺激时, 会产生一系列相应的机制来克服胁迫, 维持机体平衡 (于淼 2008)。

鱼类的黏液对其生命活动有重要作用, 因此需要更多的研究来揭示分泌型 *Mucin* 家族在鱼类中的功能。本研究克隆了团头鲂 *Muc5b* 部分序列, 采用荧光定量分析了其组织差异表达和捕捞应激对其表达的影响, 为进一步研究鱼类 *Muc5b* 的序列和功能奠定了基础。

参 考 文 献

- Castagliuolo I, Lamont J T, Qiu B, et al. 1996. Acute stress causes mucin release from rat colon: role of corticotropin releasing factor and mast cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 271 (5): G884 - G892.
- Castagliuolo I, Wershil B K, Karalis K, et al. 1998. Colonic mucin release in response to immobilization stress is mast cell dependent. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal*

- and Liver Physiology, 274(6): G1094 – G1100.
- Conze T, Carvalho A S, Landegren U, et al. 2010. MUC2 mucin is a major carrier of the cancer-associated sialyl-Tn antigen in intestinal metaplasia and gastric carcinomas. *Glycobiology*, 20(2): 199 – 206.
- Corfield A P, Carroll D, Myerscough N, et al. 2001. Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease. *Frontiers in Bioscience*, 6(10): D1321 – 1357.
- Creeth J M. 1978. Constituents of mucus and their separation. *British Medical Bulletin*, 34(1): 17 – 24.
- Dekker J, Rossen J W A, Büller H A, et al. 2002. The MUC family: an obituary. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(3): 126 – 131.
- Escande F, Porchet N, Bernigaud A, et al. 2004. The mouse secreted gel-forming mucin gene cluster. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA): Gene Structure and Expression*, 1676(3): 240 – 250.
- Imai Y, Yamagishi H, Fukuda K, et al. 2013. Differential mucin phenotypes and their significance in a variation of colorectal carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 19(25): 3957 – 3968.
- Ingerslev H C, Pettersen E F, Jakobsen R A, et al. 2006. Expression profiling and validation of reference gene candidates in immune relevant tissues and cells from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Molecular Immunology*, 43(8): 1194 – 1201.
- Jorgensen S M, Kleveland E J, Grimholt U, et al. 2006. Validation of reference genes for real-time polymerase chain reaction studies in Atlantic salmon. *Marine Biotechnology*, 8(4): 398 – 408.
- Lang T, Alexandersson M, Hansson G C, et al. 2004. Bioinformatic identification of polymerizing and transmembrane mucins in the puffer fish *Fugu rubripes*. *Glycobiology*, 14(6): 521 – 527.
- Lang T, Hansson G C, Samuelsson T. 2007. Gel-forming mucins appeared early in metazoan evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(41): 16209 – 16214.
- Long Y, Li Q, Zhou B, et al. 2013. De novo assembly of mud loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) skin transcriptome to identify putative genes involved in immunity and epidermal mucus secretion. *PLoS ONE*, 8(2): e56998.
- Matsukita S, Nomoto M, Kitajima S, et al. 2003. Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6) in mucinous carcinoma of the breast: comparison with invasive ductal carcinoma. *Histopathology*, 42(1): 26 – 36.
- Mayer L. 2003. Mucosal immunity. *Pediatrics*, 111(Suppl 3): 1595 – 1600.
- Mejias-Luque R, Lindén S K, Garrido M, et al. 2010. Inflammation modulates the expression of the intestinal mucins MUC2 and MUC4 in gastric tumors. *Oncogene*, 29(12): 1753 – 1762.
- Micallef G, Bickerdike R, Reiff C, et al. 2012. Exploring the transcriptome of Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin, a major defense organ. *Marine Biotechnology*, 14(5): 559 – 569.
- Moniaux N, Escande F, Porchet N, et al. 2001. Structural organization and classification of the human mucin genes. *Frontiers in Bioscience*, 6: 1192 – 1206.
- Pérez-Sánchez J, Estensoro I, Redondo M J, et al. 2013. Mucins as diagnostic and prognostic biomarkers in a fish-parasite model: transcriptional and functional analysis. *PLoS ONE*, 8(6): e65457.
- Rousseau K, Kirkham S, McKane S, et al. 2007. Muc5b and Muc5ac are the major oligomeric mucins in equine airway mucus. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 292(6): L1396 – L1404.
- Selye H. 1950. Stress and the general adaptation syndrome. *British Medical Journal*, 1(4667): 1383.
- Shephard K L. 1994. Functions for fish mucus. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4(4): 401 – 429.
- Tang R, Dodd A, Lai D, et al. 2007. Validation of zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(5): 384 – 390.
- van der Marel M, Adamek M, Gonzalez S F, et al. 2012. Molecular cloning and expression of two β -defensin and two mucin genes in common carp (*Cyprinus carpio* L.) and their up-regulation after β -glucan feeding. *Fish & Shellfish Immunology*, 32(3): 494 – 501.
- Voynow J A, Rubin B K. 2009. Mucins, mucus, and sputum. *CHEST Journal*, 135(2): 505 – 512.
- Zhao Y H, Gu Y, Li S, et al. 2011. Cloning, identification and accurate normalization expression analysis of *PPAR α* gene by GeNorm in *Megalobrama amblycephala*. *Fish and Shellfish Immunology*, 31(3): 462 – 468.
- 戴海燕, 李昌崇. 2010. 气道黏蛋白的结构及其基因表达的调节. *国际呼吸杂志*, 30(1): 49 – 53.
- 黄智慧, 马爱军, 汪岷. 2009. 鱼类体表黏液分泌功能与作用研究进展. *海洋科学*, 33(1): 90 – 94.
- 唐永凯, 贾永义. 2008. 荧光定量 PCR 数据处理方法的探讨. *生物技术*, 18(3): 89 – 91.
- 全巧云, 罗和生, 朱宗耀, 等. 2005. 慢性应激对大鼠结肠粘蛋白 muc2 表达的影响. *中国医师杂志*, 7(5): 629 – 631.

王国强, 王雯. 2009. 应激反应对鱼类影响的研究进展. 安徽农业科学, 37(24): 1157-1158.

杨桂文, 安利国. 1999. 鱼类黏液细胞研究进展. 水产学报, 23(4): 403-408.

于森. 2008. 拥挤胁迫对鱼类影响研究进展. 安徽农业科学, 36(3): 1078-1080.

余君, 沈策. 2006. 弥漫性泛细支气管炎相关基因的研究进展. 国际呼吸杂志, 26(7): 518-521.

欢迎订阅《动物学杂志》

《动物学杂志》是中国科学院动物研究所、中国动物学会主办的科技期刊,亦是中國自然科学核心期刊。主要报道动物学领域的最新研究成果,介绍有创见的新思想、新学说、新技术、新方法。报道范围既有宏观生态研究,又有微观实验技术。报道层次既有科学前沿性、资料性的,也有技术性、知识性的。稿件内容涉及范围广,实用性强,主要栏目有:研究报告、珍稀濒危动物、技术与方法、研究简报和快讯、科技动态等等。读者对象为动物科学领域的研究、教学、技术、管理人员及广大业余爱好者。

《动物学杂志》双月刊,16开,112页,2015年每册定价65元,全年390元,国内外公开发行。国内邮发代号:2-422;国外发行代号(Code No.):BM58。全国各地邮局均可订阅。如未能在当地邮局订到,可与编辑部直接联系。本刊对在校学生及个人订户7折优惠(直接与编辑部联系订阅)。

地址:北京市朝阳区北辰西路1号院5号 中国科学院动物研究所内《动物学杂志》编辑部

邮编:100101; 电话:(010)64807162。

E-mail: journal@ioz.ac.cn。网址:dwxzz.ioz.ac.cn。

欢迎投稿、欢迎订阅、欢迎刊登广告。