

鱼类体表粘液凝集素研究进展

黄智慧^{1,2}, 马爱军^{2,*}, 雷霖霖²

1. 中国海洋大学 水产学院, 山东 青岛 266003

2. 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, 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室, 山东 青岛 266071

摘要: 鱼类体表粘液是保护鱼体与水环境接触的一道物理和化学屏障, 除包围入侵微生物外, 还含有抗菌物质。其中, 凝集素作为不同于免疫球蛋白且不具酶催化活性的糖蛋白, 为体表粘液中所含有的重要免疫活性物质, 在保护鱼体免遭外界环境中的病菌、寄生物和病毒侵袭中至关重要。该文以鱼类体表粘液凝集素为研究对象, 结合国内、外研究成果, 对其研究简史、分类、生物学性质和功能等进行阐述, 为其今后的研究及应用提供参考。

关键词: 体表粘液; 凝集素; 免疫; 功能; 分类

中图分类号: Q26; Q959.4 文献标志码: A 文章编号: 0254-5853-(2013)06-0674-06

Progress in study on the skin mucus lectin in fish

Zhi-Hui HUANG^{1,2}, Ai-Jun MA^{2,*}, Ji-Lin LEI²

1. Ocean University of China, Fisheries College, Qingdao, 266003, China

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Qingdao, 266071, China

Abstract: Since water is a perfect medium for both bacteria and parasitic microbes, fish skin is constantly exposed to pathogen attacks. It is generally believed that skin mucus serves a mechanical as well as biochemical barrier. Lectins, an important part of the mucus, are carbohydrate-binding proteins that are neither antibodies nor enzymes, yet play important roles in innate and adaptive immunity. Based on the structure of the carbohydrate recognition domain (CRD) and their function, fish mucus lectins are classified as four types. Recent research has shed light on the structural diversity and functions in innate immunity of mucus lectins. Here, we reviewed recent research progress on the classification, biological properties and functions of fish mucus lectins. Analyses on other fish species are therefore important in clarifying lectin diversity and their functions in skin mucus.

Keywords: Skin mucus; Lectins; Immunity; Function; Type

鱼类皮肤上皮组织中分布有大量粘液细胞, 所分泌粘液广泛覆盖在鱼体表面构成其与外界直接接触的第一道门户, 在保护鱼体免遭外界环境中的病菌、寄生物和病毒侵袭中至关重要 (Huang et al, 2009)。普遍认为体表粘液中存在有抵抗病原微生物入侵的非特异性免疫活性物质, 尤其自 1969 年, Fletcher & Grant (1969) 提出在血清和粘液中均存在免疫球蛋白后, 国、内外研究者对鱼类粘液的免疫功能产生了浓厚兴趣。不断有学者证实鱼类体表分泌物中存在补体、溶菌酶、凝集素、C-反应体、

溶血素、抗菌肽及白细胞介素 IL-1 等多种生物活性因子 (Alexander & Ingram, 1992; Buchman & Bresciani, 1998; Ingram, 1980)。凝集素作为具有糖专一性、可促进细胞凝集的糖蛋白, 为鱼类体表粘液中的重要天然免疫因子, 且已逐渐成为研究热点。本文结合国内、外研究成果, 对鱼类体表粘液凝集素的研究简史、分类、生物学性质和功能进行阐述。

1 鱼类粘液凝集素研究简史

不同于免疫球蛋白, 凝集素为不具酶催化活性

收稿日期: 2013-03-25; 接受日期: 2013-06-20

基金项目: 国家 863 计划 (2012AA100822); 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-50-G01); “泰山学者”建设工程专项

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: maaj@ysfri.ac.cn

第一作者简介: 黄智慧 (1982—), 女, 汉族, 山东菏泽人, 博士研究生, E-mail: zhihui0710@yahoo.com.cn

的蛋白质或糖蛋白, 能专一、多价与糖非共价可逆结合, 并具有凝集细胞和沉淀聚糖或糖复合物的作用 (Sun, 1994; Zhang, 1999), 广泛存在于生物细胞膜、细胞质和细胞外基质, 在脊椎动物及无脊椎动物的先天性免疫和宿主防御过程中起重要作用, 参与异己识别、炎症反应、吞噬作用、细胞与细胞之间和细胞与外界之间的联络、受精、发育及再生等过程 (Goldstein et al, 1980; Kilpatrick, 2002)。

凝集素最早由 Stillmark 在 1888 年从蓖麻籽和红豆碱中发现, 此后, 1919 年 Sumner 从豌豆中分离出结晶蛋白, 命名为 ConA, 并用此方法第一次获得了纯凝集素 (Xiong et al, 2006)。20 世纪 70 年代, 凝集素独特的性质引起越来越多学者的兴趣, 并在很多生物体中被发现。Watkins & Morgan (1952) 最早从鳗鱼中提取得到糖特异性凝集素, 后来研究确定为 L-fucose 凝集素。20 世纪 80 年代后, 在重组技术的支持下, 鱼类凝集素研究有了突飞猛进的发展, 人们从鱼体中分离筛选出多种新的具有生物活性的凝集素。经研究发现, 鱼类凝集素在体内, 如血清、体液、肌肉、血细胞及受精卵等 (Jensen et al, 1997; Russel & Lumsden, 2005; Tateno et al, 2002; Yano, 1997), 分布广泛的同时, 也分布于体外, 如鱼类体表粘液 (Suzuki et al, 2003)。

鱼类皮肤是保护鱼体与水环境接触的一道物理和化学屏障。皮肤粘液除包围入侵微生物外, 还含有抗菌物质。其中, 凝集素可有效识别和结合异己物质, 产生凝集反应, 从而防止外来微生物等入侵鱼体。Kamiya & Shimizu (1980) 第一次从斑点犁齿鲷 (*Lophopsetta maculata*) 体表粘液中分离出了凝集素, 随后, Ingram (1980) 提出了鱼类体表含有凝集素, 并将其描述为既非抗体类亦非酶类的碳水化合物结合蛋白。此后 30 年, 有关鱼类体表粘液凝集素的研究有了更长足的进步, 研究者们分别从阿拉伯海鲎 (*Arius thalassinus*)、海鳗 (*Conger myriaster*)、欧洲小龙 (*Repomucenus richardsonii*)、泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*)、岬羽鲷 (*Genypterus capensis*) 等多种鱼体表粘液中分离并纯化出了凝集素 (Goto-Nance et al, 1995; Kamiya et al, 1988; Shiomi et al, 1989, 1990; Toda et al, 1996), 不断证实凝集素存在于鱼类体表, 并与体液免疫因子, 如免疫球蛋白、补体、溶菌酶和血溶素等, 具有同等重要的抵抗病原菌侵入的功能, 在鱼体天然免疫系统中至关重要。但当时对体表粘液凝集素蛋

白质结构、分子结构及其生物学功能却鲜有报道。Suzuki (1985)、Suzuki & Kaneko (1986) 对日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 凝集素红血球凝集反应的研究, 提出的该凝集素存在于上皮组织杯形细胞中的推论, 为体表粘液凝集素定位及其生物学功能研究的首次报道。其后, Muramoto & Kamiya (1992) 对康吉鳗 (*Conger myriaster*) 粘液凝集素的氨基酸进行测序, 并于 1999 年根据其蛋白质一级结构提出了康吉鳗体表粘液凝集素包括 congerins I 和 congerins II 两种结构类型。此后将近 8 年的时间里, 东京大学又从日本鳗鲡、红鳍东方鲀 (*Takifugu. Rubripes*) 及颈带鳐 (*Leiognathus nuchalis*) 的体表粘液中分离出了不同的凝集素 (Okamoto et al, 2005; Tasumi et al, 2004; Tsutsui et al, 2006), 并分别进行了结构研究, 最终根据其糖类识别位点 (carbohydrate recognition domains, CRDs) 的差异以及 Ca^{2+} 依赖性将鱼类体表粘液凝集素确定为 4 种类型, 此后在其他鱼种中发现的粘液凝集素也都归属于以上 4 类 (Chen, 2010; Rajan et al, 2011)。

2 体表粘液凝集素结构类型及其功能研究

迄今为止, 共鉴定有 4 种鱼类体表粘液凝集素, 即: 半乳凝集素、C 型凝集素、Lily 型凝集素及 L-鼠李糖结合凝集素 (Suzuki et al, 2003), 表现广泛的分子多样性。第 1 种类型属于半乳凝素, 其中包括从康吉鳗中分离出的 congerins I, congerins II, 以及从日本鳗鲡中分离出的 AJL-1, 由于此类凝集素可特异性结合半乳糖或乳糖, 故在皮肤粘液中占大多数 (Suzuki, 1985; Suzuki & Kaneko, 1986)。第 2 种类型是典型的 C 型凝集素, 最早发现于日本鳗鲡, 命名为 AJL-2 (Tasumi et al, 2002)。第 3 种类型是由红鳍东方鲀中提取的特异性甘露糖凝集素, 结构与单子叶植物凝集素相似, 被命名为 Lily-type lectin (Suzuki et al, 2003)。第 4 种提取自颈带鳐 (*Leiognathus nuchalis*), 为特异性乳糖结合凝集素 (PFL-1, PFL-2) (Okamoto et al, 2005), 由于其与从某些鱼卵中所提取的 L-鼠李糖结合凝集素具有高度同源性, 故被归属于 L-鼠李糖结合凝集素家族。另外, 近期还发现了一种存在于鱼类体表粘液中的特异内源性凝集素 (Tsutsui et al, 2011), 目前尚未确定该凝集素的分类, 本文暂将其单列一类。

表 1 体表粘液凝集素分类及特征汇总
Table 1 Characteristics of skin mucus lectin in fish

	半乳凝集素 Galectin	C 型凝集素 C-type lectin	Lily 型凝集素 Lily-type lectin	L-鼠李糖结合凝集素 Rhamnose-lectin	内源性凝集素 Intelectin
鱼 种 Species	康吉鳗 Conger 日本鳗 <i>Anguilla japonica</i>	日本鳗 <i>Anguilla japonica</i> 康吉鳗 Conger	红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	颈带鲷 <i>Leiognathus nuchalis</i>	鲶 鱼 <i>Silurus asotus</i>
凝集素名称 Lectin name	Congerins I II AJL-1	AJL-2 ConCL-s	Pufflectin	PFL-1 PFL-2	Intelectin
特异性结合糖类 Specific sugar	β -半乳糖 β -galactosid	乳糖 Lactose	甘露糖 Mannose	β -半乳糖 β -galactosid	甘露糖 Mannose
凝集细菌/寄生虫 Agglutination of bacteria or parasite	<i>V. anguillarum</i> <i>Streptococcus</i> sp.	<i>E. coli</i>	<i>Microcycylus marina</i> <i>Met-schnikowia reukaufii</i> ,	—	—
氨基酸残基 Amino acid residues	AJL-1 142aa	AJL-2 166aa ConCL-s 174aa	116aa	PFL-1 231aa	308aa

2.1 半乳凝集素——galectins

Galectins 又称半乳凝集素，是广泛存在的主要凝集素类型，具以下特性： Ca^{2+} -不依赖性、特异的 β -半乳糖苷酶活性、N-末端封闭、缺少单肽与糖基以及主要定位与细胞质（Kilpatrick, 2000）。Galectin 存在于动物体内及某些低等脊椎动物的体表粘液中，如非洲爪蟾（*Xenopus laevis*）（Marschal et al, 1992）以及康吉鳗（congerins I 和 congerins II）等（Suzuki, 1985; Suzuki & Kaneko, 1986）。Tasumi et al（2002）对提取自日本鳗鲡的凝集素——AJL-1 的结构研究显示，其表现 β -半乳糖苷酶活性及 Ca^{2+} -不依赖性，N-末端封闭，由 142 个氨基酸残基组成，无半胱氨酸，未非共价键结合的二聚体结构，属于 galectin。而对其基因全长的研究则显示，AJL-1 426 bp 的开放阅读框编码 142 个氨基酸，同源性比较分析表明其与 congerins II 表现较高相似度（45%），且 AJL-1 具三个不同的糖结合残基，与 congerins I 结构相似（Shirai et al, 1999）。这些证据都表明 AJL-1 与康吉鳗粘液凝集素同源性较高。基因表达检测显示该凝集素仅存在于体表粘液，且表达含量很高（Kilpatrick, 2000）。AJL-1 具有较强的抵抗病原微生物能力，对致病菌、链球菌属均表现凝集活性，是鱼类体表粘液中重要的防御因子。

2.2 独特的 C 型凝集素

在动物凝集素中，C 型凝集素分布广泛，功能复杂，涉及体内许多重要的生理、病理过程。C 型凝集素成员均含有一个或多个特征性糖类识别功能域（CRD），且该功能域能够通过两对或三对二硫键形成明显而稳定的结构，具有 Ca^{2+} -依赖性，其中有 14 个恒定残基（包括 4 个 C 残基）和 18 个保

守残基。大多数 C 型凝集素都与 D 型甘露糖（D-mannose）、D 型葡萄糖（D-glucose）这一类的 Man 型配体（Gal-type ligands）或 D 型半乳糖（D-galactose）及其衍生物结合（Kolatkar & Weis, 1996）。目前研究最多甘露糖结合（mannose-binding protein, MBP）C 型凝集素是激活免疫系统补体途径的最主要因子（Dong et al, 2004; Wei et al, 2010; Zhang et al, 2010）。在鱼类中，虹鳟（*Oncorhynchus mykiss*）、鲤鱼（*Cyprinus carpio*）、大西洋鲑（*Salmo salar*）、日本牙鲆（*Paralichthys olivaceus*）以及大菱鲆（*Scophthalmus maximus*）中的 C 型凝集素均已被克隆并进行了部分功能验证（Kondo et al, 2007; Nakao et al, 2006; Nikolakopoulou & Zarkadis, 2006; Richards et al, 2003; Zhang et al, 2010）。

上述 C 型凝集素均分布于体内，直到 2002 年，Tasumi 从日本鳗鲡体表粘液中分离出凝集素 AJL-2，其结构与 C-type lectin 相似，均具有一段保守性氨基酸序列，以及 4 个需要二硫键链接的保守半胱氨酸残基。AJL-2 具有 Ca^{2+} -不依赖性，其基因序列中包括 498 bp 的开放阅读框，编码 166 个氨基酸，同源性比对分析发现其与肋突鳃（*Pleurodeles*），响尾蛇（*Crotalus atrox*）及小鼠等多个物种的 C 型凝集素同源，同源性 $\geq 30\%$ 。Northern blot 分析发现，AJL-2 仅存在于体表，且在鱼体上皮组织中的杯型细胞分泌液泡中积累。凝集反应实验表明，AJL-2 的凝集模式与 MBP 结合方式相似，对病原菌 *E.coli* K 12 具有凝集作用，进而抑制细菌穿透细胞膜进入机体，或促使细菌陷入到体表粘液中最终被新分泌出来的粘液冲洗掉而起到保护鱼体的作用（Tasumi et al, 2002）。

Tsutsui et al (2007) 由康吉鳗体表粘液中发现了另一种对酵母菌具凝集活性的甘露糖特异性结合凝集素, 并称之为 conCL-s, 与之前在康吉鳗中发现的 congerins I 和 congerins II 不属于同一类型。该凝集素为四聚体结构, 由两个以二硫键结合且单体分子量为 16×10^3 的二聚体组成, 其结构属于 C-type lectin 家族。conCL-s 对酵母菌的结合表现明显 Ca^{2+} -不依赖性。基因表达实验发现其广泛存在于机体内部和外部粘膜组织中, 如皮肤、鳃、舌和食道, 在这些组织中, conCL-s 对细菌具有凝集性, 且在康吉鳗巨噬细胞中, lectin 结合微球体可显著提高细胞的吞噬作用。这些发现均表明 conCL-s 具有调理素的作用, 在体表天然免疫系统中起重要作用。

2.3 Lily 型凝集素——pufflectin

Suzuki et al (2003) 将从红鳍东方鲀体表粘液中提取出的 pufflectin 认定为第 3 种类型凝集素, 并命名为“Lily-type lectin”。该凝集素较为特殊, cDNA 全长 527 bp, 包括编码 116 个氨基酸的 348 bp 开放阅读框, 其上游区无 ATG 翻译起始位点, 即不含单肽的特征常见于半乳凝集素 (Kilpatrick, 2000)。Pufflectin 氨基酸序列与目前发现的任何一类动物凝集素均无同源性, 却与单子叶植物的甘露糖凝集素高度同源, 如雪花莲 (*Galanthus nivalis*)、水仙花 (*Narcissus hybrid cultivar*)、韭菜 (*Allium prorrhum*) 和大蒜 (*A.sativum*) 等。这些植物的凝集素都含有三个甘露糖结合位点, 而 pufflectin 被证实含有其中两个 (Tsutsui et al, 2007)。这类凝集素在体内分布广泛, 在鳃、口腔壁、食道以及体表都有表达。据报道, 凝集素与细菌具有特异性凝集现象, 而 pufflectin 与细菌并不发生凝集反应, 但却对寄生虫具有凝集活性, 这一发现指出其对鱼体在由寄生虫引起的机体防御系统中起重要作用。Pufflectin 是第一个被发现与寄生虫有凝集现象的鱼类体表粘液凝集素, 证实了凝集素对细菌及寄生虫均具天然免疫功能。

2.4 L-鼠李糖结合凝集素——PFL-1, PFL-2

第四种类型粘液凝集素为提取自颈带鳐 (ponyfish *Leiognathus nuchalis*) 的特异性乳糖结合凝集素 (PFL-1, PFL-2), cDNA 全长 1086 bp, 包括 693 bp 开放阅读框, 编码 231 个氨基酸。PFL-1 与从某些鱼卵中提取的 L-鼠李糖结合凝集素高度同源, 均拥有一段保守的串联重复序列, 故归属于 L-鼠李糖结合凝集素家族。但 PFL-1 仅表达于体表粘

液, 而不存在于性腺、鳃、肝脏、脾脏以及肠道。PFL-2 与 PFL-1 的 N-末端氨基酸序列高度相似, 被确认与 PFL-1 同型 (Okamoto et al, 2005)。该种凝集素亦具有凝集细菌, 阻止其进入而保护鱼体的重要免疫功能, 但其具体作用机理尚无报道。

2.5 新发现的粘液凝集素

Tsutsui et al (2011) 在鲮鱼 (*Silurus asotus*) 体表粘液中发现了具甘露糖结合的 Ca^{2+} -依赖活性的甘露糖结合凝集素。凝胶过滤结果显示, 其具有单聚体和二聚体形式, 为由 308 个氨基酸组成的分泌蛋白, 与哺乳动物和鱼类内源凝集素同源。该凝集素基因在鱼类的鳃部、肾和皮肤都有所表达。抗血清反应监测显示, 内源性凝集素蛋白存在于皮肤和鳃的杯型细胞、肾脏及血浆。此凝集素对病原微生物具有凝集活性, 揭示其在鱼类体表抵抗外来细菌侵入的自我保护系统中至关重要。而且, 该凝集素的发现证实内源性蛋白同样存在于鱼类体表粘液, 为对凝集素家族功能的补充。目前该凝集素分类尚未确定, 暂将其归为内源性凝集素类。随着分子生物学、蛋白组学技术及测序技术的迅猛发展, 通过转录组文库、蛋白组图谱等高端技术, 研究者在其他鱼种中发现了粘液凝集素, 如 Rajan et al (2011) 在对大西洋鲑鱼 (*Gadus morhua*) 粘液进行比较蛋白组学研究时, 就发现其存在 Galectin-1 及甘露糖凝集素 (MBL), Bo et al (2012) 构建感染鳊鱼 (*Oryzias latipes*) 的消减文库, Blast 比对获得了其粘液凝集素。但目前尚未深入开展这些凝集素分子结构特点及凝集反应现象等有关功能特性的研究。

3 鱼类体表粘液凝集素功能性研究展望

凝集素功能性研究开展较早的是植物凝集素, 对其生理功能以及分子机制等都有较深入探究, 尤其是为防治病虫害开拓了新思路。植物凝集素被认为是植物防御系统的重要组成部分, 目前, 更多应用于转基因抗虫品种的培育及抗病品种的筛选。海洋生物凝集素相对发展较晚, 自 20 世纪 70 年代后期, 其在贝类免疫识别中的作用才为人们所关注, 随着研究的深入, 现已发现海洋生物凝集素的生物活性绝不逊色于陆生植物凝集素, 且水产动物凝集素的研究也已有不少报道 (James & Rowland, 1974; Muramoto et al, 1994)。其中, 鱼类凝集素通过有效识别和结合异物, 提高吞噬细胞

对异己物质的吞噬、灭杀作用,以及作为免疫活性物质保护机体的防御功能已得到了越来越多的关注。

鱼类体表粘液及其中所包含的凝集素,以及凝集素的分子结构多样性在保护鱼体免遭外界环境中的病菌、寄生物和病毒的侵袭中至关重要(Huang et al, 2009)。粘液凝集素对寄生虫也表现强烈的凝集活性,同时,还具有调理素的功能。因此,掌握其生物功能的多样性及特殊性,对于了解鱼类粘液免疫系统以及抵抗外界环境胁迫效应都有着广泛的应用前景。

日本东京大学 SuzukiYuzuru 教授经过近 10 年的研究,目前,已从多个物种中分离纯化出了凝集素,并对其蛋白及分子结构作了详细分析和功能验证,根据其对糖特异性结合位点及对 Ca^{2+} -依赖性等结构性特性进行了初步分类。但这些成果对于大规模凝集素功能性应用开发而言,只是初级阶段,关于体表粘液凝集素的功能性分子机理以及应用性

研究仍需进一步研究。笔者认为,凝集素具有多价结合能力,能与荧光素、酶、生物素、铁蛋白及胶体金等结合,而不影响其生物活性,可用于光镜或电镜水平的免疫细胞化学研究工作,探究机体在处于环境胁迫条件下的体表上皮细胞分化、增生和恶变的生物学演变过程,了解病理变化,从而对机体状态作出诊断评价。而且粘液凝集素对于不同类型的细菌具有特异凝集活性,可以作为粗略鉴定病原微生物的指示因子。

总之,粘液凝集素作为生物体内特殊的糖蛋白,存在于鱼体与外界直接接触的第一道门户——体表粘液中,在鱼类整个生命过程中至关重要。它在认识和解决鱼类集约化、半集约化养殖疾病防治中的重要意义也得到了越来越多的关注,而且随着生物工程研究手段和研究领域的不断扩大,对其开发、利用和生化工程技术的拓展将具有广阔应用前景。

参考文献:

- Alexander JB, Ingram GA. 1992. Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Diseases*, **2**: 249-279.
- Bo J, Giesy JP, Ye R, Wang KJ, Lee JS, Au DW. 2012. Identification of differentially expressed genes and quantitative expression of complement genes in the liver of marine medaka *Oryzias latipes* challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D*, **7**(2): 191-200.
- Buchman K, Bresciani J. 1998. Microenvironment of *Gyrodactylus derjavini* on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: association between mucous cell density in skin and site selection. *Parasitology Research*, **84**(1): 17-24.
- Chen YY. 2010. Identification and Molecular Characterization of Three Kinds of Lectin in Large Yellow Croaker. Guangzhou: Sun Yar-sen University, 12-14. [陈园园. 2010. 大黄鱼三种凝集素的克隆表达、进化分析和功能研究. 广州: 中山大学, 12-14.]
- Dong CH, Yang ST, Yang ZA, Zhang L, Gui JF. 2004. A C-type lectin associated and translocated with cortical granules during oocyte maturation and egg fertilization in fish. *Developmental Biology*, **265**(2): 341-354.
- Fletcher TC, Grant PT. 1969. Immunoglobulins in the serum and mucus of the plaice (*Pleuronectes platessa*). *The Journal of Biochemistry*, **115**(5): 1-65.
- Goldstein IJ, Huges RC, Monsigny M, Osawa T, Sharon N. 1980. What should be called a lectin. *Nature*, **285**(5760): 66.
- Goto-Nance R, Watanabe Y, Kamiya H, Ida H. 1995. Characterization of lectins from the skin mucus of the loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *Fisheries Science*, **61**(1): 137-140.
- Huang ZH, Ma AJ, Wang M. 2009. Research progression in secretion of fish skin mucous and its function. *Marine Sciences*, **33**(1): 90-94. [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.]
- Ingram GA. 1980. Substances involved in the natural resistance of fish to infection: a review. *Journal of Fish Biology*, **16**(1): 23-60.
- James LH, Rowland DT Jr. 1974. Heterogeneity of lobster agglutinins. Purification and physicochemical characterization. *Biochemistry*, **13**(4): 821-827.
- Jensen LE, Thiel S, Petersen TE, Jensenius JC. 1997. A rainbow trout lectin with multimeric structure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **116**(4): 385-390.
- Kamiya H, Shimizu Y. 1980. Marine biopolymer with cell specificity: II. Purification and characterization of agglutinins from mucus of windowpane flounder *Lophopsetta maculata*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, **622**(2): 171-178.
- Kamiya H, Muramoto K, Goto R. 1988. Purification and properties of agglutinins from conger eel, *Conger myriaster* (Brevoort), skin mucus. *Developmental & Comparative Immunology*, **12**(2): 309-318.
- Kilpatrick DC. 2000. Handbook of Animal Lectins. Chichester: Wiley, 245-276.
- Kilpatrick DC. 2002. Animal lectins: a historical introduction and overview. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1572**(2-3): 187-197.
- KolatkAR, Weis WI. 1996. Structural basis of galactose recognition by C-type animal lectins. *Journal of Biological Chemistry*, **271**(12): 6679-6685.
- Kondo H, Yeu Tzeh AG, Hirano I, Aoki T. 2007. Identification of a novel C-type lectin gene in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Fish & Shellfish Immunology*, **23**(5): 1089-1094.
- Muramoto K, Kamiya H. 1992. The amino-acid sequence of a lectin from conger eel, *Conger myriaster*, skin mucus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **1116**(2): 129-136.
- Muramoto K, Yako H, Kamiya H. 1994. Multiple lectins as major proteins

- in the coelomic fluid of the acorn barnacle *Megabalanus rosa*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, **107**(3): 395-399.
- Muramoto K, Kagawa D, Sato T, Ogawa T, Nishida Y, Kamiya H. 1999. Functional and structural characterization of multiple galectins from the skin mucus of conger eel, *Conger myriaster*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **123**(1): 33-45.
- Nakao M, Kajiya T, Sato Y, Somamoto T, Kato-Unoki Y, Matsushita M, Nakata M, Fujita T, Yano T. 2006. Lectin pathway of bony fish complement: identification of two homologs of the mannose-binding lectin associated with MASP2 in the common carp (*Cyprinus carpio*). *The Journal of Immunology*, **177**(8): 5471-5479.
- Nikolakopoulou K, Zarkadis IK. 2006. Molecular cloning and characterisation of two homologues of mannose-binding lectin in rainbow trout. *Fish & Shellfish Immunology*, **21**(3): 305-314.
- Richards RC, Hudson DM, Thibault P, Ewart KV. 2003. Cloning and characterization of the Atlantic salmon serum lectin, a long-form C-type lectin expressed in kidney. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **1621**(1): 110-115.
- Okamoto M, Tsutsui S, Tasumi S, Suetake H, Kikuchi K, Suzuki Y. 2005. Tandem repeat L-rhamnose-binding lectin from the skin mucus of ponyfish, *Leiognathus nuchalis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **333**(2): 463-469.
- Rajan B, Fernandes JMO, Caipang CMA, Kiron V, Rombout JHWM, Brinchmann MF. 2011. Proteome reference map of the skin mucus of Atlantic cod (*Gadus morhua*) revealing immune competent molecules. *Fish & Shellfish Immunology*, **31**(2): 224-231.
- Russel S, Lumsden JS. 2005. Function and heterogeneity of fish lectins. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **108**(1-2): 111-120.
- Shiomi K, Uematsu H, Yamanaka H, Kikuchi T. 1989. Purification and characterization of a galactose-binding lectin from the skin mucus of the conger eel *Conger myriaster*. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, **92**(2): 255-261.
- Shiomi K, Uematsu H, Ito H, Yamanaka H, Kikuchi T. 1990. Purification and properties of a lectin in the skin mucus of the dragonet *Repomucenus richardsonii*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**(1): 119-123.
- Shirai T, Mitsuyama C, Niwa Y, Matsui Y, Hotta H, Yamane T, Kamiya H, Ishii C, Ogawa T, Muramoto K. 1999. High-resolution structure of the conger eel galectin, congerin I, in lactose-liganded and ligand-free forms: emergence of a new structure class by accelerated evolution. *Structure*, **7**(10): 1223-1233.
- Sun C. 1994. Talk about the basic principles of the lectin role and the structure of the glycoprotein oligosaccharide. *Biology of Chemical*, **14**(2): 36-37. [孙册. 1994. 谈谈凝集素作用的基本原理和糖蛋白的寡糖结构. 生物化学, **14**(2): 36-37.]
- Suzuki Y. 1985. Hemolysin and hemagglutinin in skin mucus of the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **51**: 2083.
- Suzuki Y, Kaneko T. 1986. Demonstration of the mucous hemagglutinin in the club cells of eel skin. *Developmental & Comparative Immunology*, **10**(4): 509-518.
- Suzuki Y, Tasumi S, Tsutsui S, Okamoto M, Suetake H. 2003. Molecular diversity of skin mucus lectins in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, **136**(4): 723-730.
- Tateno H, Ogawa T, Muramoto K, Kamiya H, Saneyoshi M. 2002. Distribution and molecular evolution of rhamnose-binding lectins in Salmonidae: isolation and characterization of two lectins from white-spotted Charr (*Salvelinus leucomaenis*) eggs. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **66**(6): 1356-1365.
- Tasumi S, Ohira T, Kawazoe I, Suekake H, Suzuki Y, Aida K. 2002. Primary structure and characteristics of a lectin from skin mucus of the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Journal of Biological Chemistry*, **277**(30): 27305-27311.
- Toda M, Goto-Nance R, Muramoto K, Kamiya H. 1996. Characterization of the lectin from the skin mucus of the kingklip *Genypterus capensis*. *Fisheries Science*, **62**(1): 138-141.
- Tsutsui S, Iwamoto K, Nakamura O, Watanabe T. 2007. Yeast-binding C-type lectin with opsonic activity from conger eel (*Conger myriaster*) skin mucus. *Molecular Immunology*, **44**(5): 691-702.
- Tsutsui S, Tasumi S, Suetake H, Kikuchi K, Suzuki Y. 2006. Carbohydrate-binding site of a novel mannose-specific lectin from fugu (*Takifugu rubripes*) skin mucus. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, **143**(4): 514-519.
- Tsutsui S, Komatsu Y, Sugiura T, Araki K, Nakamura O. 2011. A unique epidermal mucus lectin identified from catfish (*Silurus asotus*): first evidence of intelectin in fish skin slime. *The Journal of Biochemistry*, **150**(5): 501-504.
- Tasumi S, Ohira T, Kawazoe I, Suetake H, Suzuki Y, Aida K. 2002. Primary structure and characteristics of a lectin from skin mucus of the Japanese Eel *Anguilla japonica*. *Journal of Biological Chemistry*, **277**(30): 27305-27311.
- Tasumi S, Yang WJ, Usami T, Tsutsui S, Ohira T, Kawazoe I, Wilder MN, Aida K, Suzuki Y. 2004. Characteristics and primary structure of a galectin in the skin mucus of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Developmental and Comparative Immunology*, **28**(4): 325-335.
- Watkins WM, Morgan WTJ. 1952. Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars. *Nature*, **169**(4307): 825-826.
- Wei JG, Xu D, Zhou JG, Cui HC, Yan Y, Ouyang ZL, Gong J, Huang YH, Huang XH, Qin QW. 2010. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a C-type lectin (Ec-CTL) in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology*, **28**(1): 178-186.
- Xiong CN, Li W, Bai XF, Du YG. 2006. Research history of lectin and its bio-functions. *Fine and Specialty Chemicals*, **14**(8): 12-16. [熊川男, 李伟, 白雪芳, 杜昱光. 2006. 凝集素的研究历史及其生物功能. 精细与专用化学品, **14**(8): 12-16.]
- Yano T. 1997. The non-specific immune system: humoral defence. In: Iwama G, Nakanishi T, Hoar WS, Randall DJ. The Fish Immune System: Organism, Pathogen, and Environment. New York: Academic Press, 106-140.
- Zhang M, Hu YH, Sun L. 2010. Identification and molecular analysis of a novel C-type lectin from *Scophthalmus maximus*. *Fish & Shellfish Immunology*, **29**(1): 82-88.
- Zhang WJ. 1999. Biochemical Research Technology of Glycoconjugates. 2nd ed. Huangzhou: Zhejiang University Press. [张惟杰. 1999. 糖复合物生化研究技术. 2 版. 杭州: 浙江大学出版社.]