

DOI: 10.12264/JFSC2023-0334

鳮味觉受体 I 型(T1R)家族基因基因组鉴定与表达分析

薛文博^{1, 2, 3}, 姚晓丽^{1, 2, 3}, 谢金洋^{1, 2, 3}, 高锦华^{1, 2, 3}, 赵金良^{1, 2, 3}

1. 上海海洋大学, 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;
2. 上海海洋大学, 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心, 上海 201306;
3. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学中心, 上海 201306

摘要: 味觉受体 I 型(taste receptor type I, T1R)家族在对环境营养物质的识别中发挥关键作用。为理解鳮(*Siniperca chuatsi*)味觉受体 I 型家族成员数目、表达特征与其肉食性之间的关联, 利用基因家族分析从鳮基因组数据中鉴定了 T1R 家族成员基因, 荧光定量 PCR 测定了孵化后 0~30 d (0~30 dph, days post hatching)、驯食饲料后 T1R 家族成员基因表达水平变化。结果显示, 鳮 T1R 家族包括 4 个基因: *t1r1*、*t1r2a1*、*t1r2a2*、*t1r3*, 4 个基因序列、结构域完整; *t1r2* 基因出现了复制(*t1r2a1*、*t1r2a2*), *t1r2a1*、*t1r2a2* 外显子结构一致, 结构域相同, 仅第 3、4、5 内含子和 5' 端 UTR 长度不同。选择压力(dN/dS)分析表明, 鳮 *t1r1* 正向选择, *t1r2s* 和 *t1r3* 负选择, 鲜味受体基因 *t1r1* 进化压力可能与其独特食性(终生以活饵为食)有关。4 个味觉受体 I 型基因 *t1r1*、*t1r2a1*、*t1r2a2*、*t1r3* 自开口前开始表达, 20 d 后表达增加, 其中鲜味受体基因 *t1r1* 表达水平显著高于甜味受体基因 *t1r2s*; 饲料驯食养殖后, 4 个 *t1r* 基因表达量下调, 其中鲜味受体基因 *t1r1* 表达下调最为显著。研究结果为鳮味觉受体基因对其肉食性形成与适应研究提供了基础资料。

关键词: 鳮; 味觉受体 I 型(T1R)家族; 基因组鉴定; 发育表达

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)02-0155-10

味觉是动物的重要感觉之一, 会帮助动物选择食物。味蕾是味觉感受的外周器官, 存在于舌上皮及口腔腔^[1], 味蕾细胞有 3 种类型(I 型味蕾细胞、II 型味蕾细胞、III 型味蕾细胞), 它们兼具化学感受及物理(外形、硬度)识别功能^[2]。在味蕾细胞上起化学成分识别作用的是味觉受体(taste receptor)^[3-4]。人类具有 5 种基本味觉: 苦、酸、咸、甜和鲜味(典型的刺激是谷氨酸)功能^[5-6]。对甜味、鲜味和苦味的感知是由 2 个不同的 G 蛋白偶联受体(GPCR)家族介导的, 分别为味觉受体 I 型(taste receptor type 1, T1R)和味觉受体 II 型(taste receptor type 2, T2R)。

味觉受体 I 型家族中有 3 个成员, 分别为 T1R1

(taste receptor type 1 member 1)、T1R2 (taste receptor type 1 member 2)和 T1R3 (taste receptor type 1 member 3)^[7]。在哺乳动物中, T1R1 和 T1R2 具有 40% 的氨基酸同源性, 与 T1R3 具有 30% 的同源性^[8]。T1R1 和 T1R3 结合, 在接受 L-氨基酸和 L-谷氨酸钠反应时产生鲜味感觉, 而 T1R2 和 T1R3 结合可感受甜味刺激^[9]。

味觉受体基因以及功能的演化, 通常与动物食性的演化密切相关。研究发现, 与其近缘物种不同, 大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)为植食性, 以竹为食, 鲜味受体基因 *t1r1* 出现了假基因化^[10]; 在不同食性的蝙蝠中, 食果蝙蝠的鲜味受体基因 *t1r1* 出现了结构缺失, 而吸血、食虫、食鱼蝙蝠

收稿日期: 2023-12-04; 修订日期: 2024-01-12.

基金项目: 现代农业产业技术体系专项(CARS-46).

作者简介: 薛文博(1999-), 男, 硕士研究生, 研究方向为鱼类遗传育种. E-mail: 2657846916@qq.com

通信作者: 赵金良, 教授, 研究方向为水产种质资源与遗传育种. E-mail: jlzhao@shou.edu.cn

的甜味受体基因 *t1r2* 出现了假基因化^[11]。对不同食性鱼类 *t1r1*、*t1r2* 基因的研究发现,草食性团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)出现鲜味受体基因 *t1r1* 缺失,而在杂食性青鳉(*Oryzias latipes*)和三刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)、肉食性的大西洋鳕(*Gadus morhua*)和半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)中 *t1r1* 发生了基因复制,同时,甜味受体基因 *t1r2* 在草食性草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)和杂食性的鱼类斑马鱼(*Danio rerio*)中发生了复制,却在肉食性大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)中出现丢失^[12]。

鳊(*Siniperca chuatsi*)是我国重要的淡水名贵经济鱼类。为典型的肉食性鱼类,自开口期起,终生以活饵为食^[13]。为探明其食性形成机制,郝月月^[14]利用 RACE 技术获得了鳊 2 个甜味受体基因(*t1r2a1*, *t1r2a2*) cDNA 序列,序列结构分析表明 *t1r2a1* 有 1 个功能区域, *t1r2a2* 没有完整的结构域,推测 *t1r2a1* 功能发生退化,而 *t1r2a2* 为假基因。Ding 等^[15]在鳊全基因组数据中鉴定了 3 个味觉受体 I 型基因(*t1r1*、*t1r2*、*t1r3*)。鳊 I 型味觉受体基因是否出现复制或假基因化,是否与鳊特殊食性形成与维持有关尚不清楚。因此,本研究利用本实验室鳊鱼基因组数据资源,对鳊 *t1rs* 基因家族进行全基因组鉴定,验证鳊味觉受体 I 型基因数目与序列结构,并检测 *t1rs* 基因早期发育表达特征、驯食前后的表达变化,为理解鳊特殊食性的形成与适应提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

鳊仔稚鱼样品于 2023 年 5 月 1 日至 5 月 30 日取自安徽省池州市秋浦特种水产开发有限公司,鳊雌雄亲鱼经人工催产,受精卵于环道内孵化,水温 26~27 °C;孵化后 3 dph (days post hatching) 仔鱼开口;分别取胚胎期 0 dph、1 dph、3 dph、5 dph、10 dph、20 dph、30 dph 的样本(各 60 尾),RNA 保存液分装-20 °C 保存;饲料驯化组(实验组)及活饵投喂组(对照组)鳊样品取自江苏同洮生态环境科技有限公司,采用配合饲料驯化养殖 8

周[体长(8.2±0.5) cm],实验组及对照组鳊各取 9 尾,取其上、下颌、鳃、舌、口咽腔、头部皮肤样品,-80 °C 保存。

1.2 实验方法

1.2.1 基因数据收集 鳊基因组及转录组数据文件(未公开)来自本实验室(Genomics Illumina 10X)高通量测序,基因组与转录组文件利用软件 Complete ORF Predict (Batch Mode)与 ORF finder 分别预测 ORF,将输出文件上传至 GXF rebuild from sequence 重构鳊的基因注释文件。将注释文件上传至软件 GSaman 和 EvidenceModeler 中对 GFF 文件进行整合矫正,利用 Gxf Sequence Extract 提取全基因组 CDS 序列,利用 Batch Translator 翻译成氨基酸序列。

在公共数据库 Ensembl 和 GenBank 中检索鱼类味觉受体基因,得到鱼类味觉受体及基因数量如表 1。

1.2.2 基因家族成员鉴定 基于 HMM 隐马尔科夫模型:将斑马鱼、大口黑鲈味觉受体基因使用 MAFFT 进行核苷酸多序列比对,结果上传 hmmbuild 建立隐马尔科夫模型,利用建立模型在鳊核苷酸序列中搜索同源基因。从 PFAM 网站(<http://pfam-legacy.xfam.org/>)下载现有味觉受体氨基酸的隐马尔科夫模型(HMM, Hidden Markov Model)文件,使用 hmm search (v3.0.0)软件在鳊氨基酸序列中进行搜索,得到味觉受体氨基酸序列。

基于 BLAST 方式:在 Ensembl (<https://www.ensembl.org/>)下载斑马鱼、大口黑鲈 *t1rs* 基因及氨基酸序列,使用 blast (v2.13.0)分别与鳊全基因序列及氨基酸序列文件比对,得到同源基因。合并上述候选 Gene ID,上传同源氨基酸序列至 Pfam、CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>)和 SMART (<https://smart.embl.de>)数据库进行结构域确认,确定鳊 *t1rs* 基因和氨基酸序列。

1.2.3 基因结构、系统发育、保守基序与结构域分析 上传鳊基因注释文件至 GSDS2.0 (<http://gsds.gao-lab.org/>)分析基因结构,鉴定基因蛋白质编码区(CDS)及非翻译区(UTR)。

表 1 鱼类味觉受体基因数量
Tab. 1 Number of fish taste receptor genes

种类 species	食性 feeding habit	基因组版本 genome version	<i>t1r1</i>	<i>t1r2</i>	<i>t1r3</i>
翘嘴鳊 <i>Siniperca chuatsi</i>	肉食性 carnivorous	ASM2008510v1	3	0	1
大口黑鲈 <i>Micropterus salmoides</i>	肉食性 carnivorous	ASM1485139v1	2	0	1
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	杂食性 omnivorous	USDA_OmykA_1.1	2	1	2
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	肉食性 carnivorous	fTakRub1.3	1	2	2
尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	杂食性 omnivorous	GCA_001858045.3	1	1	1
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	杂食性 omnivorous	ASM223467v1	1	3	1
半滑舌鳎 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	肉食性 carnivorous	Cse_v1.0	3	1	1
贝氏隆头鱼 <i>Labrus bergylta</i>	肉食性 carnivorous	BallGen_V1	4	1	1
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	杂食性 omnivorous	GRCz11	1	2	1
高体鲷 <i>Seriola dumerili</i>	肉食性 carnivorous	Sdu_1.0	1	1	1
三刺鱼 <i>Gasterosteus aculeatus</i>	肉食性 carnivorous	GCA_016920845.1	3	6	1
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>	草食性 herbivorous	HZGC01	1	4	1

利用 Clustal W 对表 1 的氨基酸序列进行比对; bootstrap 值设置为 1000, 使用 MEGA 11 构建邻接树 (neighbor-joining method)。采用在线网站 Evolview (<https://evolgenius.info/evolview/>)进行进化树美化。

保守基序使用鳃氨基酸序列在网站 MEME (<https://meme-suite.org/meme/>)进行。参数设置为: 基序数量 10, motif 最大长度 50, 检索 10000 次; 只列出保存最好的 3 个 motif。氨基酸序列上传 CDD 网站用以识别保守结构域。

1.2.4 基因位置与共线性分析 上传鳃基因注释文件至 Tbttools 绘制基因位置图, 使用 one step MC scan X 进行物种间的共线性分析, 利用不同颜色高亮显示味觉受体基因的共线性。

1.2.5 选择压力分析 鱼类 *t1rs* 基因的 CDS 序列使用 tbttools 提取, 去除终止子, 采用 Data monkey (<http://www.datamonkey.org/>)中的单可能性祖先计数方法(SLAC); 用非同义替换率(dN)和同义替换率(dS)来代表不同鱼类的自然选择压力。

1.2.6 基因表达分析 利用 Trizol 法(TIANGEN, TRNzol Universal Reagent)提取样品总 RNA, 将生物样品平均分为 3 组提取总 RNA。提取的 RNA 调整浓度 1000 mg/μL 用于后续实验。使用 Evo M-MLV RT Kit with gDNA Clean for qPCR II 反转录试剂盒得到 cDNA。根据本实验室鳃 CDS 序列。使用 Primer Premier 5.0 设计引物(表 2), 委托上海金唯智生物科技有限公司合成。之后 SYBR green

法建立荧光定量体系, 反应程序: 95 ℃ 预变性 5 min, 95 ℃ 变性 20 s, 58~62 ℃ 退火延伸 30 s, 40 个循环; 95 ℃, 30 s, 65 ℃, 1 min。最后进行熔解曲线分析检测反应特异性。调整扩增体系, 使目的基因和内参基因扩增效率都接近 100%。扩增程序与标准曲线的扩增程序相同。每个样品均设 3 个重复。以 β -actin 基因作为 qPCR 的内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算受体基因的相对表达量。

表 2 qPCR 所用引物表
Tab. 2 Primers used for quantitative real-time PCR

引物 premier	序列(5'-3') sequence (5'-3')	退火温度/℃ annealing temperature
<i>qt1r1F</i>	TGGGTCCATGCAATGAAGGT	60
<i>qt1r1R</i>	CCTGGTAAAAGAAGCTGCGG	
<i>qt1r2a1F</i>	GTACCCACACATGGTTCTAGC	58.5
<i>qt1r2a1R</i>	CGATGGGTGAAATGTATGAAAGCC	
<i>qt1r2a2F</i>	CACACAAGAATCTGTCCAAAGTGA	59
<i>qt1r2a2R</i>	AGCAGCTCCATAACTGACCATA	
<i>qt1r3F</i>	TCTATCCCTGGAAGCTGTTGG	60.5
<i>qt1r3R</i>	CTTCCCAGACCCACTCAATCA	
<i>qβ-actinF</i>	GCGTGACATCAAGGAGAA	58-60.5
<i>qβ-actinR</i>	CATACCGAGGAAGGAAGG	

2 结果与分析

2.1 鳃 *t1r* 家族成员基因鉴定及序列分析

根据 Hmsearch 结果, 利用现有 GCPRs 的隐马尔可夫模型(PF00003、PF07652、PF01094)^[16]

分别检索, 合并重复部分得到 163 个候选基因。

利用模式生物斑马鱼和与鳅进化关系、习性接近的大口黑鲈 *t1r* 基因核苷酸序列 blast 到鳅的全基因序列文件中, 共寻找到 7 个同源基因。同时, 对斑马鱼及大口黑鲈的 T1rs 氨基酸序列进行结构域分析, 鉴定出结构域名称分别为 7tmC_TAS1R (cd15046)、pbp1_taste_receptor (cd06363)、7tmC_TAS1R2a_like (cd15287)、7tmC_TAS1R2 (cd15288)、7tmC_TAS1R3 (cd15290)^[17-20], 经结构域信息过滤, 与 hmm 鉴定的候选基因合并, 得到 4 个鳅 *t1r* 基因家族成员 *t1r1*、*t1r2a1*、*t1r2a2* 及 *t1r3*。

表 3 列出了鳅 4 个 *t1r* 基因名称、基因簇上位置、编码氨基酸长度、蛋白质相对分子质量和蛋白等电点。该基因家族成员编码氨基酸长度分布在 820~855, 对应蛋白质相对分子质量为 92.10~94.73 ku, 平均蛋白质相对分子质量为 93.24 ku。等电点分布在 5.53~7.82。

表 3 鳅 4 个味觉受体基因序列信息
Tab. 3 Sequence information of four taste receptor genes in *Siniperca chuatsi*

基因 gene	长度/bp length	外显子 数目 number of exons	位置 location	氨基酸数目 number of amino acids	分子量/ ku molecular weight	等电点 isoelectric point
<i>t1r1</i>	5825	6	Scaffold.19	851	93.49	5.53
<i>t1r2a1</i>	5588	6	Scaffold.19	826	92.64	6.91
<i>t1r2a2</i>	5115	6	Scaffold.19	820	92.10	7.82
<i>t1r3</i>	4572	8	Scaffold.14	855	94.73	6.09

2.2 基因结构、保守基序与结构域分析、系统发育

如图 1, 鳅 *t1r1*、*t1r2a1*、*t1r2a2* 基因具有 6 个外显子, 且外显子结构相似; *t1r3* 基因具有 8 个外显子。除第 2 外显子外, *t1r1*、*t1r2a1*、*t1r2a2* 其他外显子结构相似, 第 3、4、5 内含子及 5'端 UTR 长度不同。*t1r2a1*、*t1r2a2* 结构外显子结构一致, 第 3、4、5 内含子及 5'端 UTR 长度不同。

鳅 T1Rs 蛋白在保守基序方面一致性较高, 均有 Motif1, motif2, motif3 基序(图 1)。T1R1 结构域为 PBP1_superfamily (cd01536)、NCD3G (pfam07652)、7tmC_GCPRs_superfamily (cl28897)。T1R2a1、T1R2a2 结构域一致, 为 PBP1_superfamily、NCD3G、7tmC_tas1r2a-like (cd15287)。T1R3 结构域为 PBP1_taste_receptor (cd06363)、NCD3G (pfam07652)、7tmC_tas1r3 (cd15290)。T1R1、T1R2a1、T1R2a2 含有 PBP1_superfamily 结构域; 4 个蛋白都含有 NCD3G 结构域。

鳅 *t1r2a1*、*t1r2a2* 聚为一支, 结构相似, 这两个基因具有相似的进化关系。

如图 2 所示, 脊椎动物中 *t1r* 家族蛋白具有相同的保守结构域结构, 通常由胞外结合域 (PBP1_taste_receptor, PBP1_superfamily)、富含半胱氨酸的区域(NCD3G)与不同类型的 N 端氨基酸残基结构域 (7tmC_TAS1R1, 7tmC_TAS1R2, 7tmC_TAS1R2a-like, 7tmC_TAS1R3)构成^[7]。

鳅 T1R2 (T1R2a1、T1R2a2)与斑马鱼(T1R2b)、青鳉(T1R2b、T1R2c)、虹鳟(T1R2)、红鳍东方鲀

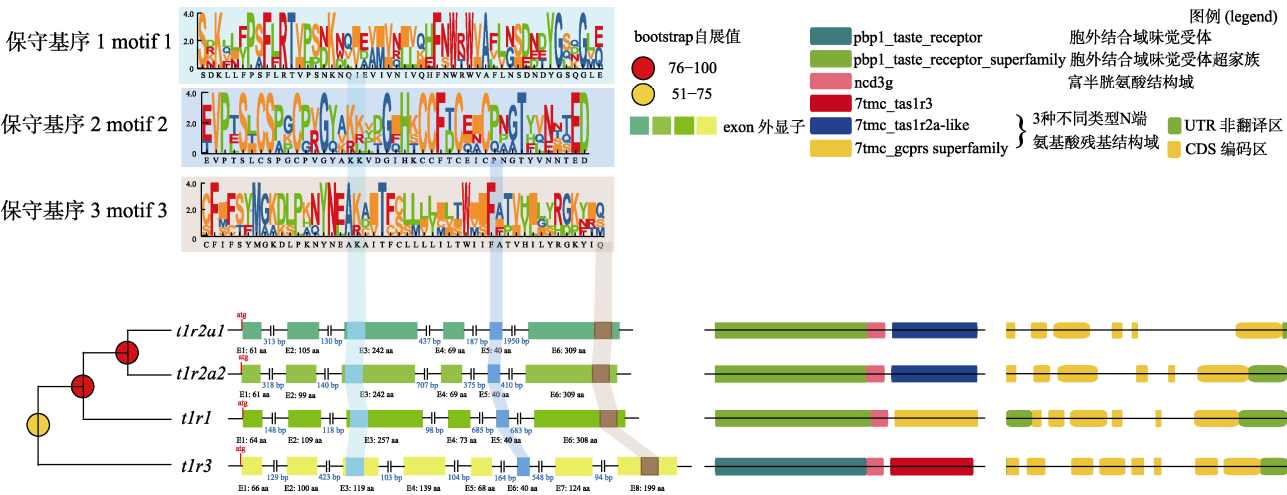


图 1 鳅味觉受体 T1R 氨基酸序列 motif, domain 结构图
Fig. 1 Structure of the motifs and domains in mandarin fish taste receptor T1R

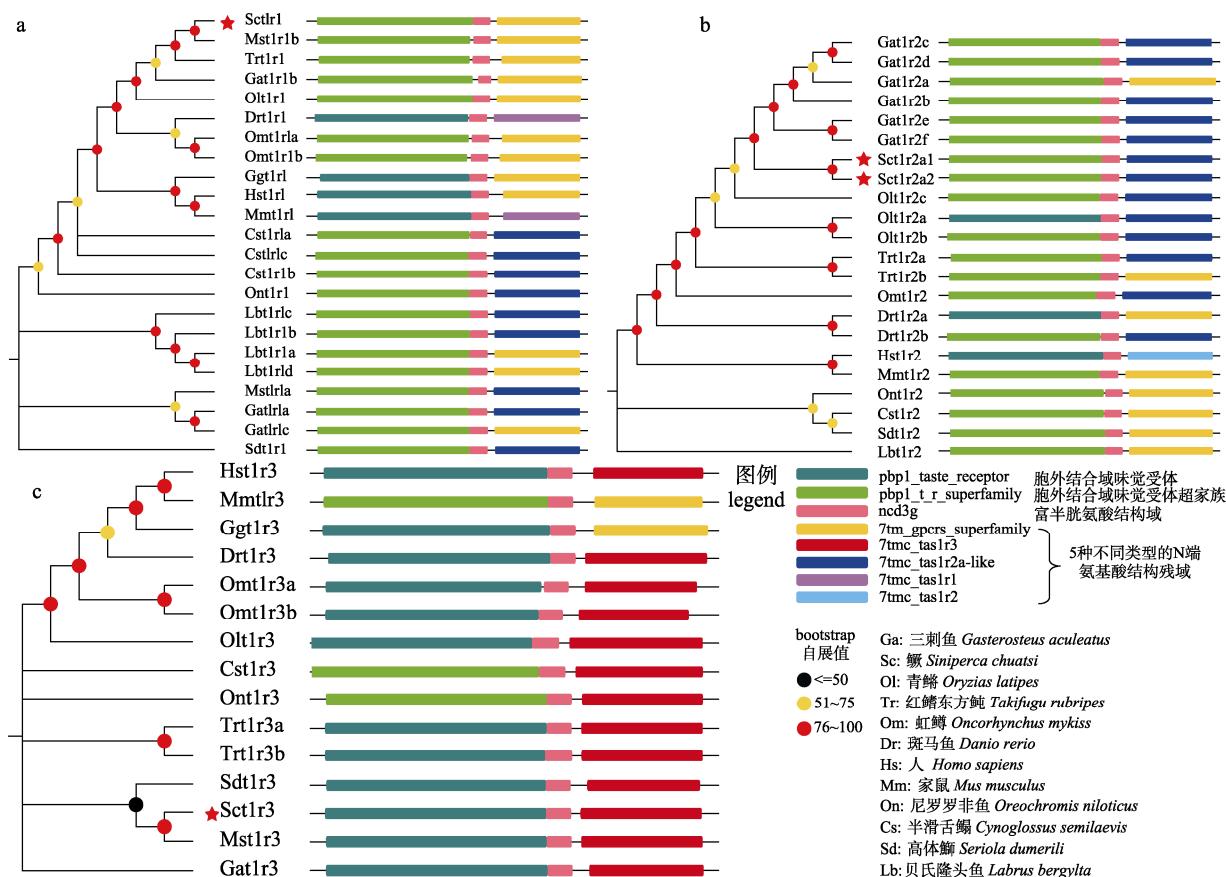


图 2 脊椎动物味觉受体 T1R 氨基酸序列进化树及 domain 结构

a. T1R1s; b. T1R2s; c. T1R3s.

Fig. 2 Evolutionary tree and domain structure of the vertebrate taste receptor T1R amino acid sequence

a. T1R1s; b. T1R2s; c. T1R3s.

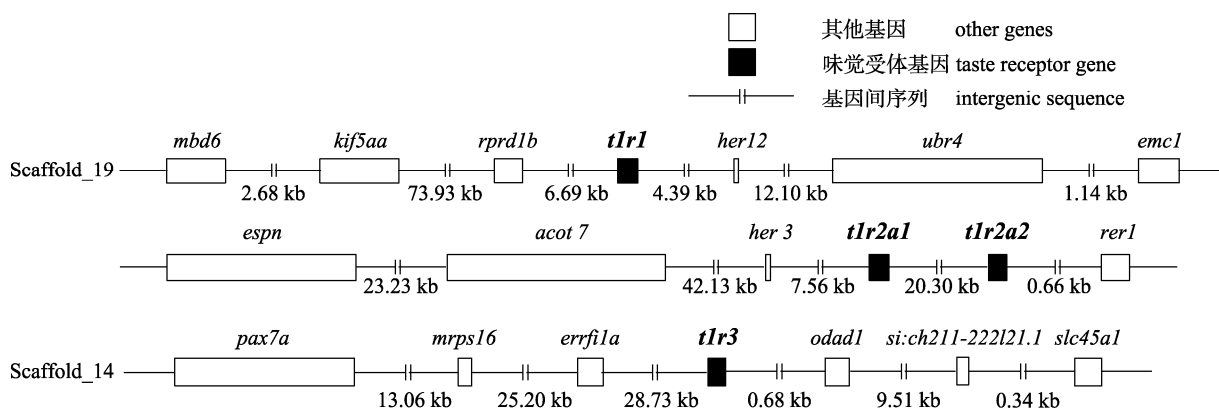
(T1R2a)、三刺鱼(T1R2b、T1R2c、T1R2d、T1R2e、T1R2f)结构域一致。

2.3 基因位置与共线性分析

鳊 4 个 *t1rs* 基因, 分布不均匀(图 3), *t1r1*, *t1r2a1*, *t1r2a2* 在 Scaffold_19 上集中分布, *t1r2a1*,

t1r2a2 在基因簇上的位置较近, *t1r3* 单独位于 Scaffold_14 上。

如图 4 所示, 鳊 *t1r1* 与尼罗罗非鱼、青鳉、贝氏隆头鱼、半滑舌鳎、斑马鱼 *t1r2* 存在共线性关系; 鳊 *t1r2a1* 与尼罗罗非鱼、半滑舌鳎、高

图 3 鳊 *t1r1*, *t1r2a1*, *t1r2a2*, *t1r3* 基因在基因簇上的位置Fig. 3 Location of *t1r1*, *t1r2a1*, *t1r2a2*, *t1r3* genes on gene clusters in mandarin fish

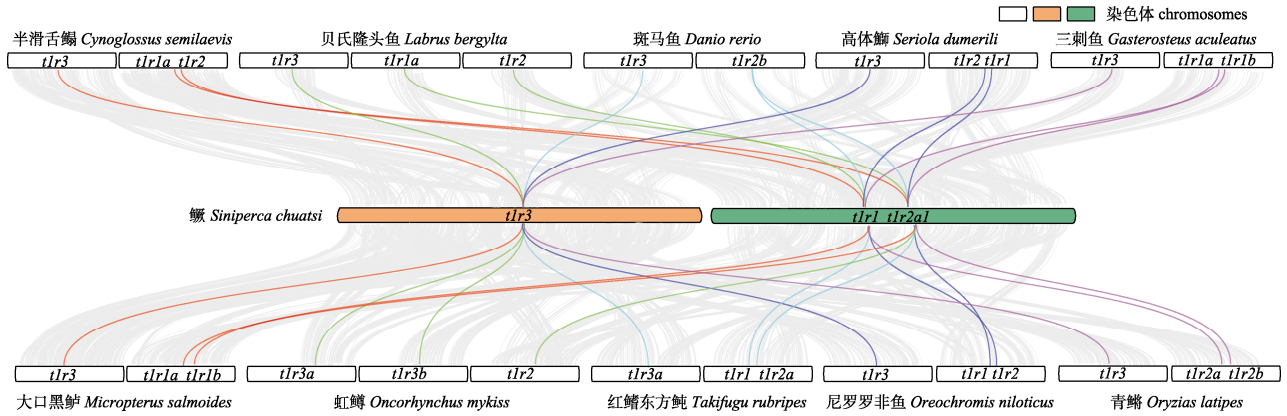


图 4 鳊味觉受体基因与其他鱼类共线性关系
相同颜色线对应的基因存在共线性关系。
Fig. 4 Covariance of mandarin fish taste receptor genes with other fish
Covariance exists for genes corresponding to the same colour line.

体鳊、三刺鱼 *tlr1* 存在共线性关系; 鳊 *tlr3* 与其他 10 种鱼类都存在共线性关系(虹鳟 *tlr3a*、*tlr3b*)。鳊 *tlr2a2* 基因与 10 种鱼类味觉受体基因间未发现共线性关系。

2.4 选择压力分析

肉食性、杂食性鱼类 *tlr1* 呈现出正选择, *tlr2s*、*tlr3* 呈现负选择; 草食性鱼类的 *tlr2* 基因呈现出正向选择, *tlr1*、*tlr3* 呈现负选择。鳊 *tlr1* 基因呈现正选择, *tlr2*、*tlr3* 基因呈现负选择(表 4)。

表 4 不同食性鱼类味觉受体基因选择压力
Tab. 4 Selection pressure on taste receptor genes in fish with different feeding habits

鱼类(种类数) fish (species number)	<i>tlr1</i>	<i>tlr2</i>	<i>tlr3</i>
肉食性鱼(6) carnivorous fish	1.01	0.935	0.911
草食性鱼(1) herbivorous fish	0.904	1.09	0.978
杂食性鱼(4) omnivorous fish	1.00	0.763	0.771
鳊 <i>Siniperca chuatsi</i>	1.02	0.824	0.941

2.5 味觉受体基因的早期表达

胚胎期, 4 个 *tlr* 基因表达未明显检测; 1 dph, 4 个 *tlr* 基因开始表达; 此后, 表达量逐渐升高(图 5)。3 dph 起, *tlr1* 表达量开始高于 *tlr2*, 其中 *tlr2a1*、*tlr2a2* 表达差异不显著。

如图 6, 鳊味觉受体基因表达量在舌最高, 其次是口腔上皮, 之后是上颌、下颌、鳃、头部皮肤。经历饲料驯食之后, *tlr1*、*tlr2*、*tlr3* 基因表

达水平下调, 其中 *tlr1* 基因表达水平下调显著。

3 讨论

3.1 鳊 *tlr* 基因家族数目

鱼类味觉受体基因具有多样性, 硬骨鱼类的 *tlr* 基因多样性体现在 *tlr1*、*tlr2* 的数量上。Ding 等^[15]在鳊全基因组数据鉴定了 3 个味觉受体 I 型基因(*tlr1*, *tlr2*, *tlr3*), 鲜味受体与甜味受体基因各 1 个。本研究鉴定了 4 个味觉受体 I 型基因(*tlr1*, *tlr2a1*, *tlr2a2*, *tlr3*), *tlr1* 为单基因, *tlr2* 存在基因复制, 这种数目差异可能是由于不同基因组测序的数据质量或检索方法差异导致。

郝月月^[14]通过 RACE 技术扩增出 2 个鳊 *tlr2* 基因(*tlr2a1*, *tlr2a2*) cDNA 序列, 这与本研究基因组鉴定结果一致(*tlr2* 存在基因复制)。由于 RACE 技术不能保证序列扩增、拼接的完整性, 获得的 *tlr2a1* 仅有 1 个结构域, *tlr2a2* 没有完整的结构域, 推测 *tlr2a2* 可能为假基因。本研究中鉴定的鳊 4 个 *tlr* 基因, 其编码区序列与结构完整, 未发现假基因现象。

此外, 在公共数据库 GenBank (ASM2008510v1) 中, 也检索发现鳊含有 4 个味觉受体 I 型基因(表 1), 有 3 个命名为鲜味受体基因 *tlr1* (*tlr1*: 122882744, *tlr1*: 122882770, *tlr1*-like: 122882772)。鉴定鳊 *tlrs* 家族基因数目(4 个)与本实验一致, 仅分类命名出现分歧。

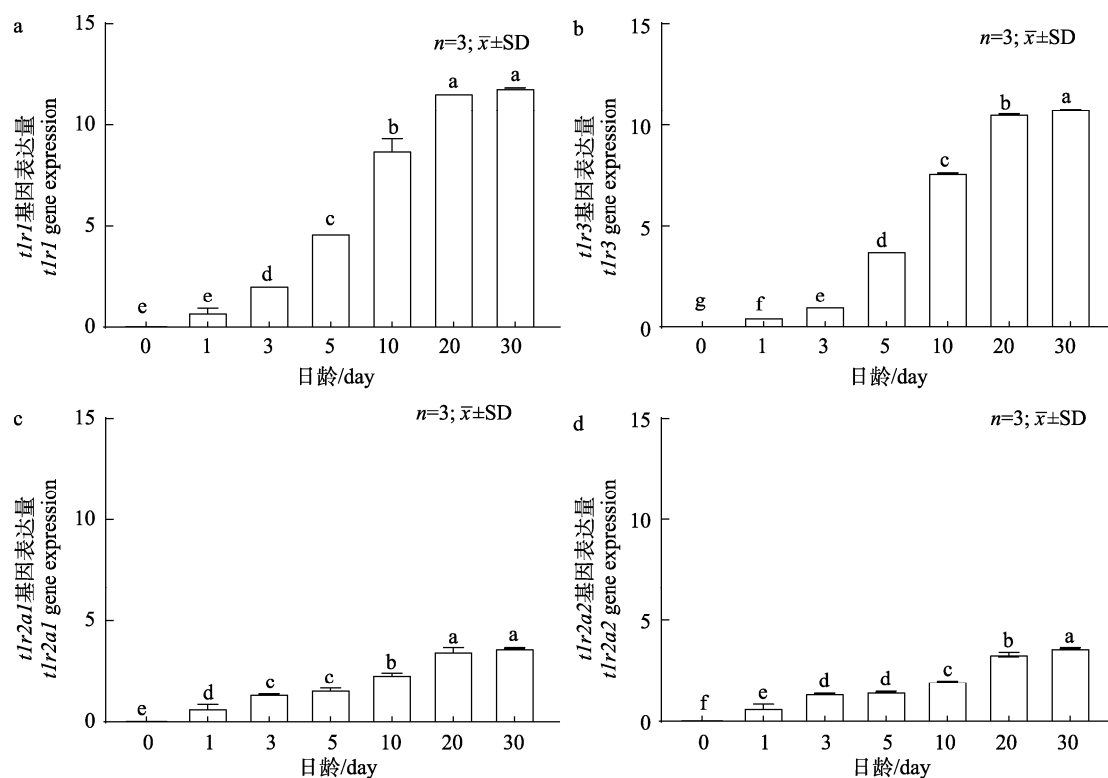


图5 鳊味觉受体 *t1r* 基因早期发育表达

a. *t1r1*, b. *t1r3*, c. *t1r2a1*, d. *t1r2a2*; 图中不同小写字母(a, b, c, d, e, f, g)代表组间有显著差异($P < 0.05$).

Fig. 5 Early developmental expression of the taste receptor *t1r* gene in mandarin fish
a. *t1r1*, b. *t1r3*, c. *t1r2a1*, d. *t1r2a2*; Different lowercase letters (a, b, c, d, e, f, g) in the figure represent significant differences between groups ($P < 0.05$).

3.2 鳊 *t1r* 基因复制与选择压力

甜味、鲜味受体基因缺失或复制常与鱼类的食性演化有关。肉食性鱼类鲜味受体基因 *t1r1* 复制, 甜味受体基因 *t1r2* 缺失; 而草食性鱼类甜味受体基因 *t1r2* 复制, 鲜味受体基因 *t1r1* 缺失^[21-22]。鳊具有典型的肉食性, 本研究中发现鳊 *t1r1*、*t1r3* 为单基因, *t1r2* 出现基因复制(*t1r2a1*、*t1r2a2*), 但未出现鲜味基因复制或甜味基因缺失(假基因)现象。如表1所示, 在红鳍东方鲀中也出现 *t1r1* 单基因, *t1r2* 基因复制; 三刺鱼中, *t1r1* 出现复制(3个), 但甜味受体基因 *t1r2* 复制数目更多(6个)。因此, 仅依据味觉受体基因复制现象, 来判断鱼类的食性可能并不准确。

本研究中, 鳊 *t1r1* 受到正选择压力, *t1r2s* 受到负选择压力。这与肉食性鱼类 *t1r1* 表现出正选择, *t1r2s* 表现出负选择; 草食性鱼类 *t1r2* 基因表现为正选择, *t1r1* 基因表现为负选择的结果一致。*t1r1*+*t1r3* 共同负责鲜味感知, 在肉食性鱼类食物

识别中作用更为明显; 正向选择压力说明, 在肉食性鱼类中 *t1r1* 基因可能正经历基因功能的特化^[23]。*t1r2*+*t1r3* 基因负责甜味感知, 草食性鱼类食物中含有更多的糖类, 在草食性鱼类中 *t1r2s* 会出现较高选择压力^[24]。这也说明甜、鲜味受体基因受到的选择压力与鱼类长期的摄食习性有关^[25]。

鳊 *t1r2* 虽有两个拷贝, 其选择压力呈现出负选择。由于鲜味是鳊识别食物的重要基础, 因此, *t1r1* 在其食性形成和维持中呈现正向选择, 功能出现特化, *t1r2* 基因功能发挥次要作用, 2个 *t1r2* 基因的进化压力小。

3.3 鳊 *t1r* 基因早期发育与摄食表达特征

开口前, 鳊消化系统快速发育, 口裂与口咽腔形成, 伴随味觉细胞分化, 味蕾出现^[26]。开口期前, 4个味觉受体基因均开始表达, 这表明味觉发育对鳊开口摄食(只食活鱼苗)具有重要作用。开口后, 4个味觉受体 *t1r* 基因表达量快速提高, 且 *t1r1* 基因表达水平显著高于 *t1r2*。鳊鲜味受体

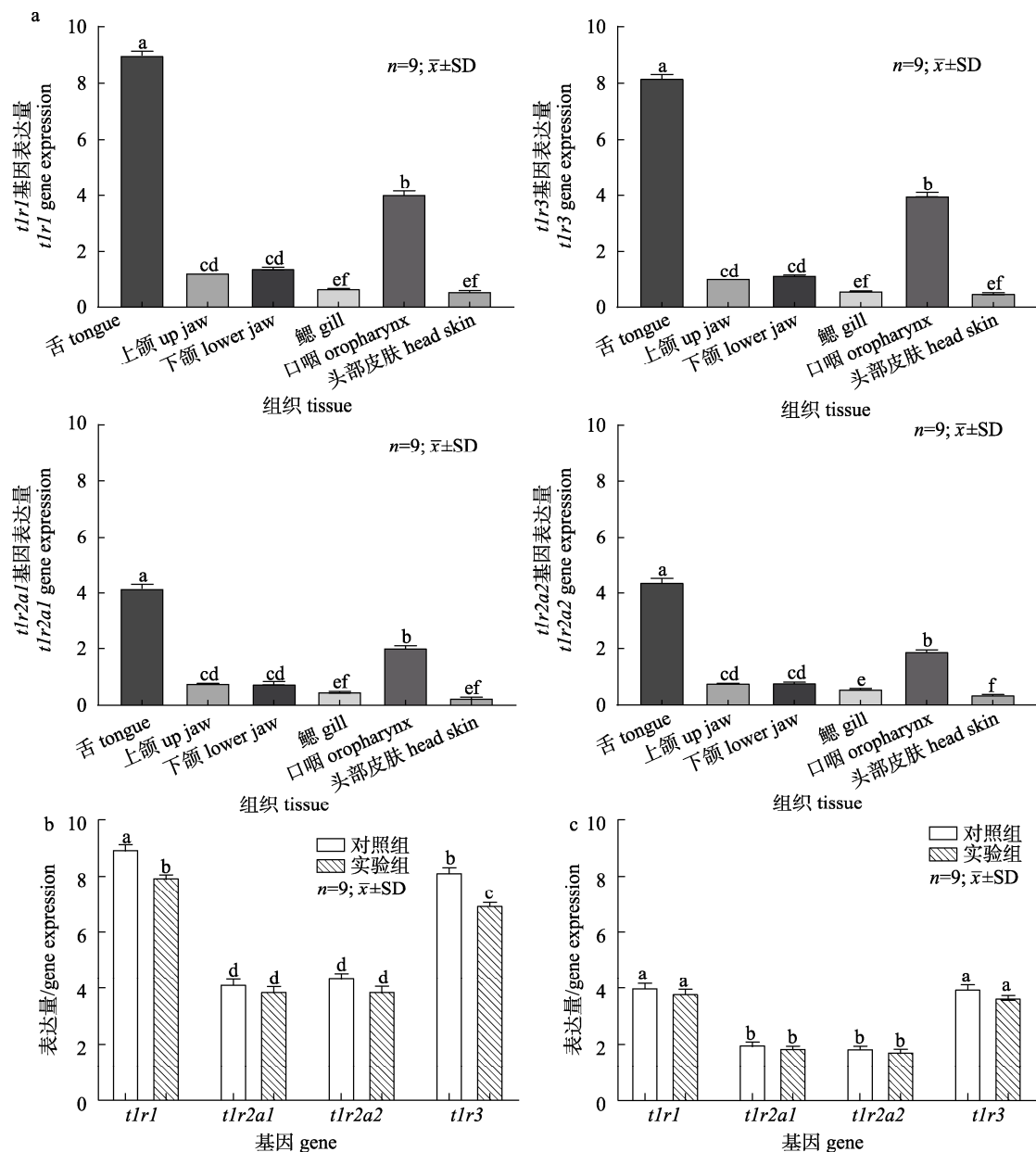


图 6 鳊饲料驯化养殖后味觉受体基因表达变化

a. 组织表达, b. 舌, c. 口咽腔; 图中不同小写字母(a, b, c, d)代表组间有显著差异($P < 0.05$).

Fig. 6 Changes in the expression of taste receptor genes in mandarin fish after feed-domestication culture
a. Tissue expression, b. gene expression in the tongue, c. gene expression in the oropharyngeal cavity. Different lowercase letters (a, b, c, d) in the figure represent significant differences between groups ($P < 0.05$).

基因 *tlr1* 表达水平上升, 为其摄食选择(终生以活饵为食)提供了重要条件。这些结果表明, 鳊味觉受体基因(特别是 *tlr1*)发育表达与其专食活鱼饵间存在一定关联。

前期研究表明, 鳊口咽腔中, 上下颌味蕾数目最多, 其次是口咽腔、舌^[27], 这表明味蕾在上下颌咬住食物、食物通过舌进入口咽腔, 以及食物吞咽过程中均发挥识别作用。本研究, *tlr* 基

因表达水平由高到低依次是舌、口咽腔、下颌、上颌、鳃、头部皮肤, 表达水平顺序与口咽腔中味蕾数目分布基本一致。

与活饵组相比, 饲料驯食组味觉受体 *tlr* 基因表达水平均表现下调, 其中, *tlr1*, *tlr3* 基因表达水平下调显著。研究发现, 与经历一次驯食相比, 二次驯食饲料鳊的 *tlr1* 基因表达水平也显著降低^[28]。相较于鲜活鱼类, 配合饲料中鲜味物质

含量明显降低, 对鲮味觉刺激减小, 推测由于食物类型变化, 饲料中鲜味成分下降, 鲮 *t1r1* 表达下调与食物中低鲜味物质的感受性相适应。

参考文献:

- [1] Ahmad R, Dalziel J E. G protein-coupled receptors in taste physiology and pharmacology[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11: 587664.
- [2] Roper S D, Chaudhari N. Taste buds: Cells, signals and synapses[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2017, 18(8): 485-497.
- [3] Diószegi J, Llanaj E, Ádány R. Genetic background of taste perception, taste preferences, and its nutritional implications: A systematic review[J]. *Frontiers in Genetics*, 2019, 10: 1272.
- [4] Töle J C, Behrens M, Meyerhof W. Taste receptor function [J]. *Handbook of Clinical Neurology*, 2019, 164: 173-185.
- [5] Chandrashekar J, Hoon M A, Ryba N J, et al. The receptors and cells for mammalian taste[J]. *Nature*, 2006, 444(7117): 288-294.
- [6] Iwata S, Yoshida R, Ninomiya Y. Taste transductions in taste receptor cells: Basic tastes and moreover[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2014, 20(16): 2684-2692.
- [7] Bachmanov A A, Bosak N P, Lin C L, et al. Genetics of taste receptors[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2014, 20(16): 2669-2683.
- [8] Mombaerts P. Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2004, 5(4): 263-278.
- [9] Nelson G, Hoon M A, Chandrashekar J, et al. Mammalian sweet taste receptors[J]. *Cell*, 2001, 106(3): 381-390.
- [10] Jin K, Xue C Y, Wu X L, et al. Why does the giant panda eat bamboo? A comparative analysis of appetite-reward-related genes among mammals[J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22602.
- [11] Jiao H W, Xie H W, Zhang L B, et al. Loss of sweet taste despite the conservation of sweet receptor genes in insectivorous bats[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(4): e2021516118.
- [12] Cai W J, He S, Liang X F, et al. DNA methylation of T1R1 gene in the vegetarian adaptation of grass carp *Ctenopharyngodon idella*[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): Article No.6934.
- [13] Li W, Hicks B J, Lin M L, et al. Impacts of hatchery-reared mandarin fish *Siniperca chuatsi* stocking on wild fish community and water quality in a shallow Yangtze Lake[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): Article No.11481.
- [14] Hao Y Y. Early development of taste buds and pseudogenes of putative sweet taste receptors (T1R2s) of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019. [郝月月. 鲮味蕾早期发育与甜味受体假基因化研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.]
- [15] Ding W D, Zhang X H, Zhao X M, et al. A chromosome-level genome assembly of the mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)[J]. *Frontiers in Genetics*, 2021, 12: 671650.
- [16] Jiang P H, Cui M, Zhao B H, et al. Identification of the cyclamate interaction site within the transmembrane domain of the human sweet taste receptor subunit T1R3[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(40): 34296-34305.
- [17] Civelli O, Reinscheid R K, Zhang Y, et al. G protein-coupled receptor deorphanizations[J]. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2013, 53: 127-146.
- [18] Nuemket N, Yasui N, Kusakabe Y, et al. Structural basis for perception of diverse chemical substances by T1r taste receptors[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: Article No.15530.
- [19] Vaidehi N, Bhattacharya S, Larsen A B. Structure and dynamics of G-protein coupled receptors[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2014, 796: 37-54.
- [20] Duarte J M, Biyani N, Baskaran K, et al. An analysis of oligomerization interfaces in transmembrane proteins[J]. *BMC Structural Biology*, 2013, 13: Article No.21.
- [21] Morais S. The physiology of taste in fish: Potential implications for feeding stimulation and gut chemical sensing[J]. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 2017, 25(2): 133-149.
- [22] Liu H. Based on the genomics of *Megalobrama amblycephala* reveals the adaption to herbivorous diet[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016. [刘寒. 基于基因组学的团头鲂植食性机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.]
- [23] Wachter J, Hill S. Positive selection pressure drives variation on the surface-exposed variable proteins of the pathogenic *Neisseria*[J]. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0161348.
- [24] Mahalapbutr P, Darai N, Panman W, et al. Atomistic mechanisms underlying the activation of the G protein-coupled sweet receptor heterodimer by sugar alcohol recognition [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 10205.
- [25] Mouritsen O G, Khandelia H. Molecular mechanism of the allosteric enhancement of the umami taste sensation[J]. *The FEBS Journal*, 2012, 279(17): 3112-3120.
- [26] Shen Y W, Li H Y, Zhao J L, et al. The digestive system of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) can adapt to domestication by feeding with artificial diet[J]. *Aquaculture*, 2021, 538: 736546.
- [27] Hao Y Y, Zhao J L, Zhang R Q, et al. Histological characteristics

of taste bud during early development of mandarin fish *Siniperca chuatsi*[J]. Chinese Journal of Zoology, 2018, 53(5): 752-759. [郝月月, 赵金良, 张瑞祺, 等. 鳊早期味蕾发育的组织学特征[J]. 动物学杂志, 2018, 53(5): 752-759.]

[28] Dou Y Q, He S, Liang X F, et al. Memory function in feeding habit transformation of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(4): Article No.1254.

Genomic identification and expression analysis of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) taste receptor type I (T1R) family genes

XUE Wenbo^{1,2,3}, YAO Xiaoli^{1,2,3}, XIE Jinyang^{1,2,3}, GAO Jinhua^{1,2,3}, ZHAO Jinliang^{1,2,3}

1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Taste serves as the foundation for choosing food and is one of the most vital senses of animals. Numerous taste cells, specialized structures that can sense taste, form taste buds. Taste receptors are present in the membranes of these cells. Taste receptors include type I and type II receptors, which are responsible for identifying distinct flavors in food. The taste receptor type I (T1R) family plays a crucial role in the identification of nutrients in the environment. T1R family genes rely on different heterodimers for flavor recognition and can recognize fresh (T1R1+T1R3) and sweet (T1R2+T1R3) flavors. Animal feeding habits are frequently associated with the number and replication of T1R family genes. Mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) have a unique carnivorous lifestyle and eat live bait throughout their lifetimes. To understand the correlation between the quantity and expression patterns of T1R family members in mandarin fish and their carnivorous nature, gene family analysis was conducted to identify T1R family member genes in mandarin fish genomic data. Changes in the T1R family member gene expression levels were then determined using Quantitative Real-time PCR (qPCR) from 0–30 days post hatching (0–30 dph) and after the domestication of their diet. This study found that the T1R family in mandarin fish comprises four genes, *t1r1*, *t1r2a1*, *t1r2a2*, and *t1r3*, each of which possesses complete sequences and structural domains. The *t1r2* gene was duplicated as *t1r2a1* and *t1r2a2*, and the exons of both displayed identical structural domains. However, the length of the 3rd, 4th, and 5th introns and 5' UTR varied among them. Selection pressure (dN/dS) analysis indicated positive selection for *t1r1* in mandarin fish, whereas *t1r2s* and *t1r3* showed negative selection. The possible cause of evolutionary pressure on the umami receptor gene *t1r1* might be related to the uncommon diet of this fish species. The expression of four taste receptor type I genes, *t1r1*, *t1r2a1*, *t1r2a2*, and *t1r3*, began before the oropharyngeal cavity of mandarin fish was completely formed, and increased after 20 d. The umami receptor gene (*t1r1*) was found to have a much higher expression among these genes than that of the sweet taste receptor gene (*t1r2s*). All four *t1r* genes showed lower expression levels after domestication, with *t1r1*, the umami receptor gene, showed the most significant downregulation. These findings provide fundamental data for investigating the effects of taste receptor genes on the development and adaptation of mandarin fish to carnivores.

Key words: *Siniperca chuatsi*; taste receptor type I (T1R) family; genomic identification; gene expression

Corresponding author: ZHAO Jinliang. E-mail: jlzhao@shou.edu.cn