

◆ 渔业养殖 ◆

黑鲷 *NKCC1* 分子特征及其对急性盐度胁迫的表达响应*林李泉^{1,2}, 刘明珠^{2**}, 林国荣¹, 黄帅帅^{2,3}, 李梦梦⁴, 童桂香^{5**}

(1. 阳西县恒生水产养殖专业合作社, 广东阳江 529500; 2. 广西壮族自治区渔业重大疫病防控与高效健康养殖产业技术工程研究中心, 广西南宁 530007; 3. 北部湾大学海洋学院, 广西北部湾海洋生物多样性养护重点实验室, 广西钦州 535011; 4. 河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453007; 5. 广西水产科学研究院, 广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室, 广西南宁 530021)

摘要: 为了解黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*) 在盐度胁迫过程中的适应机制, 本研究利用基因扩增、聚类分析、荧光定量 PCR 等技术对 *NKCC1* 基因进行生物信息学分析以及在不同组织中的表达特征研究, 并探讨其在急性盐度胁迫下的表达机制。结果表明 *NKCC1* 基因的开放阅读框(Open Reading Frame, ORF) 为 3 504 bp, 共编码 1 167 个氨基酸, 预测蛋白分子量为 127.19 kDa, 理论等电点为 5.75。结构域分析表明黑鲷 *NKCC1* 分子为跨膜蛋白, 并包含一个典型的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ 共同转运蛋白 SLC12A 结构域, 且在不同物种中具有很高的保守性; 序列比对分析表明黑鲷 *NKCC1* 氨基酸序列与金头鲷 *NKCC1a* 的同源性最高, 为 97.8%; 组织表达分析表明黑鲷 *NKCC1* 基因在所检测的 12 个组织, 即肝脏、肾脏、心、脑、眼、鳃、鳍条、脾脏、皮肤、肠、性腺和白肌中均有表达, 其中在肾脏、鳃和肠中表达量最高, 并显著高于其他组织 ($P < 0.05$); 在低盐度胁迫下, *NKCC1* 基因在鳃组织中的表达量对盐度变化响应十分迅速, 而在肾脏组织中, 低盐度和高盐度胁迫都会在不同时间点抑制 *NKCC1* 基因的表达量。综上所述, 本研究为解析 *NKCC1* 基因在黑鲷调节渗透压和离子平衡过程中的功能机制奠定了基础, 并为促进黑鲷养殖产业的可持续发展提供一定的技术理论。

关键词: 黑鲷 *NKCC1* 基因 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ 急性盐度胁迫 渗透压

中图分类号: S917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7378(2021)02-0133-11

DOI: 10.13657/j.cnki.gxkxyxb.20210806.005

0 引言

黑鲷 *Acanthopagrus schlegelii*, 属鲈形目 Perci-

formes 鲷科 Sparidae 棘鲷属 *Acanthopagrus*, 是一种暖温性底层海水经济鱼类, 广泛分布于我国沿海各个地区、朝鲜半岛、日本沿岸以及北太平洋西部。黑

收稿日期: 2021-04-25

* 广东省科技发展专项(纵向协同管理省市联动)项目(2017B020246046), 广西自然科学基金项目(2020GXNSFBA297161)和广西科学院基本科研业务费项目(2019YJJ1005)资助。

【作者简介】

林李泉(1962-), 男, 工程师, 主要从事海水鱼类繁育和养殖, E-mail: 286769182@qq.com。

【**通信作者】

刘明珠(1988-), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事水生动物医学与水产健康养殖技术研究, E-mail: 408149595@qq.com; 童桂香(1982-), 硕士, 高级工程师, 主要从事水产养殖学的研究, E-mail: Tgx15@163.com。

【引用本文】

林李泉, 刘明珠, 林国荣, 等. 黑鲷 *NKCC1* 分子特征及其对急性盐度胁迫的表达响应[J]. 广西科学院学报, 2021, 37(2): 133-143.

LIN L Q, LIU M Z, LIN G R, et al. Molecular Characteristics of *NKCC1* in Black Sea Bream *Acanthopagrus schlegelii* and Its Expression in Response to Acute Salinity Stress [J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2021, 37(2): 133-143.

鲟生长快,抗病力强,同时兼具广盐性、广温性及营养价值高等优点,因此深受广大养殖户和消费者的欢迎。盐度是鱼类生态系统最重要的环境因子之一,直接影响着鱼类生长发育^[1,2]、繁殖^[3]、生理和代谢活动^[4,5]。鱼类为响应盐度变化而改变体内生理代谢,从而进化出复杂的渗透压调控网络来适应盐度胁迫。目前有研究者指出盐度对黑鲟的生长^[6,7]、生理生化^[8]和营养成分^[9]等有一定的影响;此外,调控热休克蛋白和胰岛素生长因子 I^[10]、催乳激素及其受体^[11,12]、抗氧化^[13]、水通道蛋白和精氨酸催产素受体^[14]等功能基因对黑鲟适应盐度胁迫有着重要的调节作用。 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ 协同转运蛋白 1(NKCC1)属于 *SLC12* 基因家族的阳离子氯化物协同转运跨膜蛋白,能够介导 Na^+ 、 K^+ 和 Cl^- 这 3 种离子以电中性方式协同穿过动物细胞质膜^[15]。在急性盐度胁迫下,卵形鲳鲹 *NKCC1* 基因对盐度变化响应迅速,当转入淡水时,*NKCC1* 基因在鳃和肾中的 mRNA 水平降低,而在肠中的表达相反^[16]。在高渗盐度胁迫下,*NKCC1* 基因的表达量在欧洲鳗鲡 (*Anguilla anguilla*)^[17]、底鳉 (*Fundulus heteroclitus*)^[18] 和莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*)^[19] 鳃组织中显著升高。此外,在卵形鲳鲹的鳃、肾和肠中,*NKCC1* 基因的 mRNA 水平也显著增加。而转入淡水后,底鳉 *NKCC1* 基因在各个组织中的表达量显著降低^[18]。因此,*NKCC1* 基因在渗透压调节方面起到关键的作用。

目前尚未见有关黑鲟 *NKCC1* 基因在急性盐度胁迫中的相关报道。为探究黑鲟 *NKCC1* 基因在急性盐度胁迫中的表达特征,本研究克隆黑鲟 *NKCC1* 基因序列,分析其氨基酸同源性、进化关系及其在不同组织中的表达方式,阐明 *NKCC1* 基因在不同盐度下的 mRNA 表达特征,以期为解析黑鲟的渗透压调

表 1 实验所需引物

Table 1 Primer sequences used in the present study

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'-3')	用途 Application
ASNKCC1-ORF-F1	ATGTCAGCACCATCCTCCG	基因扩增 Gene amplification
ASNKCC1-ORF-R1	AGTTGGGGTATCCAGTCA	基因扩增 Gene amplification
ASNKCC1-ORF-F2	TCCTTACCTTTGTTATCG	基因扩增 Gene amplification
ASNKCC1-ORF-R2	TAAAGAGTAGAAAGTGAG	基因扩增 Gene amplification
ASNKCC1-qPCR-F	AAGGTCGGTTCCGTGTG	实时荧光定量 PCR Real-time quantitative PCR
ASNKCC1-qPCR-R	CGTGTCGCCGTTCTGC	实时荧光定量 PCR Real-time quantitative PCR
β -actin-F	ACCCAGATCATGTTTCGAGACC	实时荧光定量 PCR Real-time quantitative PCR
β -actin-R	ATGAGGTAGTCTGTGAGGTCG	实时荧光定量 PCR Real-time quantitative PCR

节机制奠定基础,并为黑鲟养殖的最适盐度范围提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

从阳西县恒生水产养殖专业合作社购置 500 尾黑鲟幼鱼,体质量约为 (30.1 ± 3.2) g/尾,并置于 300 L 海水循环养殖缸中暂养一周,温度为 (23.1 ± 1.3) °C,溶氧量为 6.5–7.0 mg/L。

试验所用 TRIzol Reagent 购自 Invitrogen 公司,2×Taq PCR Mastermix、PCR 产物回收试剂盒、pMD18-T 载体购自大连宝生物有限公司,SYBR Green,RT 反转录试剂盒购自 TOYOBO 公司、大肠杆菌感受态 DH5 α 购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 方法

暂养期间,随机挑选 3 尾鱼,采集其肝、脾、肾、心、脑、眼、鳃、肠、鳍条、皮肤、性腺和白肌等 12 个组织,液氮保存备用。

在盐度胁迫实验中,设置 5,25,35 共 3 个盐度实验组,每组 50 尾样品。黑鲟是河口性鱼类,在盐度 15 时生长速度较快,因此设置盐度 15 为对照组。将暂养的鱼随机转移到各组中,分别于第 0,4,8,12,24,48,72 h 随机在每组挑选 3 尾鱼采集鳃组织,使用液氮保存备用。

1.3 引物设计

以黑鲟基因组中 *NKCC1* 基因的 cDNA 序列为模板,利用 Primer Premier 5.0 设计 *NKCC1* 基因的开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)扩增引物和荧光定量 PCR 引物,以黑鲟 18S RNA 基因作为内参基因(表 1)。实验所有引物合成及测序均委托北京擎科生物有限公司完成。

1.4 黑鲷 *NKCC1* 基因全长 cDNA 的克隆

根据 TRIzol Reagent 试剂盒说明书提取黑鲷组织总 RNA。利用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 使用紫外分光光度计测定总 RNA 的质量和浓度。根据 PrimeScript RT Master Mix 将提取的总 RNA 反转成 cDNA。根据 2×Taq PCR Master Mix 试剂盒, 以提取的 cDNA 为模板进行 PCR, 反应总体系为 25 μ L, 上下游引物各 1 μ L, cDNA 模板 1 μ L, 反应程序为 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。利用 PCR 产物试剂盒进行产物纯化回收, 将片段连接至 pMD18-T 载体中, 转化进入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 摇菌 3 h 后, 接入带氨苄抗性的 LB 平板中, 挑取单克隆进行菌液 PCR 阳性检测。阳性检测结果送至北京擎科生物有限公司进行测序验证。

1.5 生物信息学分析

利用 NCBI ORF Finder 在线工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>) 和基因组数据库 (<http://asia.ensembl.org/info/about/species.html>) 验证预测黑鲷 *NKCC1* 基因的开放阅读框 (Open reading frame, ORF)。利用 ProParam (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) 和 NetNGlyc1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/>) 分析蛋白质的理化性质。使用 NCBI Protein BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对黑鲷

NKCC1 进行结构分析。利用 DNAMAN6.0 和 MEGA5.0 软件对序列进行多重比较和进化树构建。

1.6 黑鲷 *NKCC1* 基因组织表达分析

使用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒进行实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 实验。样品的 cDNA 模板稀释至 100 ng/ μ L, PCR 反应总体系为 12.5 μ L, 包括 1 μ L 模板, 6.5 μ L SYBR Premix, 上下游引物各 0.5 μ L, 4 μ L ddH₂O。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 55 $^{\circ}$ C 15 s, 68 $^{\circ}$ C 30 s, 45 个循环; 进行 3 次重复试验。

1.7 统计分析

实时荧光定量 PCR 的试验数据采用 $\Delta\Delta$ CT 法 ($2^{-\Delta\Delta CT}$) 进行分析; 数据统计采用 SPSS 19 进行单因素方差分析 (ANOVA), 并进行 Duncan's 多重比较分析各组间差异的显著性, 显著水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 黑鲷 *NKCC1* 基因克隆及序列分析

黑鲷 *NKCC1* 基因 ORF 全长为 3 504 bp, 共编码 1 167 个氨基酸, 预测蛋白分子量为 127.19 kDa, 理论等电点为 5.75。利用 NitNlyc1.0 预测显示黑鲷 *NKCC1* 为跨膜蛋白。利用 MEGA5.0 对黑鲷 *NKCC1* 氨基酸序列分析, 结果表明在 51-1 167 氨基酸残基间有一个典型的 Na⁺-K⁺-Cl⁻ 共同转运蛋白 SLC12A 结构域, 在不同物种中具有很高的保守性 (图 1)。

Acanthopagrus_schlegelii	---LSAPSS-APSAPT-----	-----ESAAITENEFLAQISGLRPPGPTPSQSRFQVLDVAEAAAG---RTEDKSPSSDA	: 61	
Sparus_aurata	---LSAPSS-APSAPT-----	-----ESAAITENFISFPFGLRPPGPTPSQSRFQVLDVAEAAAG---RTEDKSPSSDA	: 61	
Lepisosteus_oculatus	---LSA-SSSTTPAEG-----	-----GPGGIAQDLSAATGLRPLGPTPSQSRFQVLDVAEAAATNAGGDKPRGEEA	: 64	
Oreochromis_niloticus	---LSA-SS-ASSAPA-----	-----ENSATETHDLAPFAGGKPPGPTPSQSRFQVLDVAEAAAG---AADDKTPSSDA	: 61	
Larimichthys_crocea	---LSA-SS-TSSGPA-----	-----DSTATETDFITMSGLRPPGPTPSQSRFQVLDVAEAAAG---RTEDKSPSSDA	: 61	
Epinephelus_lanceolatus	---LSA-SS-TTSAPA-----	-----ESAAITEYDFLAPFAGLPPGPTPSQSRFQVLDVAEAAAG---RTEDKSPSSDA	: 61	
Lates_calcarifer	---LSA-SS-SPSAPA-----	-----ENVATEGDFLAPFAGGRFAGPTPSQSRFQVLDVAEAAAG---RTEDKSPSSDA	: 61	
Mus_musculus	MEPGPAALSSGAPRPARDGDAP---	LAAAAGVDLPGTAVPSSGQEDATTAGRQAGGVVRCPTPAAGGLGRPLGPTPSQSRFQVLDVAEAAAG---RRAAAAAAAAAA	: 101	
Gallus_gallus	ME-GKQQ-PQRETPGGE-----	LKVPG-AVGEEP-----RSEKGDAGAAALGRPLGPTPSQSRFQVLDVAEAAAPR-RKSG-----	: 66	
Homo_sapiens	MEPRPTAASSGAGLAGVGETPSAAALAAARVELPGTAVPSPVEDAAPASRD-GGGVVDLGPAAAGGLGRPLGPTPSQSRFQVLDVAEAAAG---RRAAAAAAAAAA	: 103		
Acanthopagrus_schlegelii	STTVPPSD-KATITAPPDGPGADPGAAGDEAKGRFRVNFADPSEAGSAASPDG-----	AQAEGIQNG-DIVMSEIS-LHSS-----	ICGQHIVYDHTIN : 148	
Sparus_aurata	STTVPPSD-KATITAPPDGPGADPGAAGDEAKGRFRVNFADPSEAGSAASPDG-----	AQAEGIQNG-DIVMSEIS-LHSS-----	ICGQHIVYDHTIN : 148	
Lepisosteus_oculatus	SSRASAPA-AGKIVELPVQP-----	VAEEAGKGRFRVNFADPSEAGSAASPDG-----	ICGQHIVYDHTIN : 147	
Oreochromis_niloticus	SAAAP-----	EAPSSDPAVSGEEAKGRFRVNFADPTEGSSVASPEA-----	APTEGAIQNG-DIVMSEIS-LHSS-----	ICGQHIVYDHTIN : 138
Larimichthys_crocea	STTVPPSD-KATITAPPEGSGTDSGVGEEAKGRFRVNFADPSEAGSAASPEA-----	PPTTEGAIQNG-DIVMSEIS-LHSS-----	ICGQHIVYDHTIN : 149	
Epinephelus_lanceolatus	STTVPPSY-KASTIAPLEGNADLVGCGEEAKGRFRVNFADPSEAGSAASPEA-----	APAEGIQNG-DIVMSEIS-LHSS-----	ICGQHIVYDHTIN : 149	
Lates_calcarifer	SSTVPPSD-KATITATPQD---ADPCTGEEAKGRFRVNFADPSEAGSAASPEA-----	APAEGIQNG-DIVMSEIS-LHSS-----	ICGQHIVYDHTIN : 146	
Mus_musculus	AAAAGAAG-KETIAAGKAGGESVAKGSEAKGRFRVNFVQIAASSAEDSLSDAAGVGG-DG	NVSPFNGGDTVLSIG-SLHSGGGG---SCHHQVIVYDHTIN	: 200	
Gallus_gallus	-----EGDASG-----	KQSEAKGRFRVNFVQISAG---DESPSEPGGGGSEGANVSPFNGGDTVLSIG-SLH	SGHHVIVYDHTIN : 140	
Homo_sapiens	AAAAGAGAGAKQETADGEASGESEPAKQSEAKGRFRVNFVQIAASSAEDSLSDAAGVGV-DG	NVSPFNGGDTVLSIG-SLHSGGGG---SCHHQVIVYDHTIN	: 206	

Acanthopagrus_schlegelii : **YYLRTFGINTIDAVPNIDFVRCFAAPLGEKLRPTLSLHIDELDKPEFEDGFANGDELTPAEBAAAKEAESKGVKFGVKGVLVRCMLNFWGMVLFIRMSWI** : 253
 Sparus_aurata : **YYLRTFGINTIDAVPNIDFVRCFAAPLGEKLRPTLSLHIDELDKPEFEDGFANGDELTPAEBAAAKEAESKGVKFGVKGVLVRCMLNFWGMVLFIRMSWI** : 253
 Lepisosteus_oculatus : **YYLRTFGINTIDAVPNIDFVRCFAAPLGEKLRPTLSLHIDELDKPEFEDGFANGDELTPAEBAAAKEAESKGVKFGVKGVLVRCMLNFWGMVLFIRMSWI** : 252
 Oreochromis_niloticus : **YYLRTFGINTIDAVPNIDFVRCFAAPLGEKLRPTLSLHIDELDKPEFEDGFANGDELTPAEBAAAKEAESKGVKFGVKGVLVRCMLNFWGMVLFIRMSWI** : 243
 Larimichthys_crocea : **YYLRTFGINTIDAVPNIDFVRCFAAPLGEKLRPTLSLHIDELDKPEFEDGFANGDELTPAEBAAAKEAESKGVKFGVKGVLVRCMLNFWGMVLFIRMSWI** : 254
 Epinephelus_lanceolatus : **YYLRTFGINTIDAVPNIDFVRCFAAPLGEKLRPTLSLHIDELDKPEFEDGFANGDELTPAEBAAAKEAESKGVKFGVKGVLVRCMLNFWGMVLFIRMSWI** : 254
 Lates_calcarifer : **YYLRTFGINTIDAVPNIDFVRCFAAPLGEKLRPTLSLHIDELDKPEFEDGFANGDELTPAEBAAAKEAESKGVKFGVKGVLVRCMLNFWGMVLFIRMSWI** : 251
 Mus_musculus : **YYLRTFGINTMDAVPRIDHVFHFAAQGEKLRPSLAHLHIDELDKPEFEDGFANGDELTPAGDAAATYTPDSKGVKFGVKGVLVRCMLNFWGMVLFIRLSWI** : 305
 Gallus_gallus : **YYLRTFGINTMDAVPRIDHVFHFAAQGEKLRPSLAHLHIDELDKPEFEDGFANGDELTPAGDAAATYTPDSKGVKFGVKGVLVRCMLNFWGMVLFIRLSWI** : 245
 Homo_sapiens : **YYLRTFGINTMDAVPRIDHVFHFAAQGEKLRPSLAHLHIDELDKPEFEDGFANGDELTPAGDAAATYTPDSKGVKFGVKGVLVRCMLNFWGMVLFIRLSWI** : 311

Acanthopagrus_schlegelii : **VQAQGLSCLVYAMATVVTITGLSTSAIATNGFVRGGGAYLLISRSLGPEFGGATGLTFAPANAVAVMYVVGFAETVVELLAGVDAIMTDEINDIRITGTH** : 358
 Sparus_aurata : **VQAQGLSCLVYAMATVVTITGLSTSAIATNGFVRGGGAYLLISRSLGPEFGGATGLTFAPANAVAVMYVVGFAETVVELLAGVDAIMTDEINDIRITGTH** : 358
 Lepisosteus_oculatus : **VQAQGLSCLVYAMATVVTITGLSTSAIATNGFVRGGGAYLLISRSLGPEFGGATGLTFAPANAVAVMYVVGFAETVVELLAGVDAIMTDEINDIRITGTH** : 357
 Oreochromis_niloticus : **VQAQGLSCLVYAMATVVTITGLSTSAIATNGFVRGGGAYLLISRSLGPEFGGATGLTFAPANAVAVMYVVGFAETVVELLAGVDAIMTDEINDIRITGTH** : 348
 Larimichthys_crocea : **VQAQGLSCLVYAMATVVTITGLSTSAIATNGFVRGGGAYLLISRSLGPEFGGATGLTFAPANAVAVMYVVGFAETVVELLAGVDAIMTDEINDIRITGTH** : 359
 Epinephelus_lanceolatus : **VQAQGLSCLVYAMATVVTITGLSTSAIATNGFVRGGGAYLLISRSLGPEFGGATGLTFAPANAVAVMYVVGFAETVVELLAGVDAIMTDEINDIRITGTH** : 359
 Lates_calcarifer : **VQAQGLSCLVYAMATVVTITGLSTSAIATNGFVRGGGAYLLISRSLGPEFGGATGLTFAPANAVAVMYVVGFAETVVELLAGVDAIMTDEINDIRITGTH** : 356
 Mus_musculus : **VQAQGLSCLVYAMATVVTITGLSTSAIATNGFVRGGGAYLLISRSLGPEFGGATGLTFAPANAVAVMYVVGFAETVVELLKEHSTIMTDEINDIRITGAT** : 410
 Gallus_gallus : **VQAQGLSCLVYAMATVVTITGLSTSAIATNGFVRGGGAYLLISRSLGPEFGGATGLTFAPANAVAVMYVVGFAETVVELLKEHSTIMTDEINDIRITGAT** : 350
 Homo_sapiens : **VQAQGLSCLVYAMATVVTITGLSTSAIATNGFVRGGGAYLLISRSLGPEFGGATGLTFAPANAVAVMYVVGFAETVVELLKEHSTIMTDEINDIRITGAT** : 416

Acanthopagrus_schlegelii : **VILLLGSVAGMEWEAKAQIVLLVLLDAMVNFVIGTFLPKSKESVYFGYDGAIMWENMGPDFR-GETFFSVFAIFPPAATGFLAGANISGDLADPQAIIPRG** : 462
 Sparus_aurata : **VILLLGSVAGMEWEAKAQIVLLVLLDAMVNFVIGTFLPKSKESVYFGYDGAIMWENMGPDFR-GETFFSVFAIFPPAATGFLAGANISGDLADPQAIIPRG** : 462
 Lepisosteus_oculatus : **VILLLGSVAGMEWEAKAQIVLLVLLDAMVNFVIGTFLPKSKESVYFGYDGAIMWENMGPDFR-GETFFSVFAIFPPAATGFLAGANISGDLADPQAIIPRG** : 462
 Oreochromis_niloticus : **VILLLGSVAGMEWEAKAQIVLLVLLDAMVNFVIGTFLPKSKESVYFGYDGAIMWENMGPDFR-GETFFSVFAIFPPAATGFLAGANISGDLADPQAIIPRG** : 452
 Larimichthys_crocea : **VILLLGSVAGMEWEAKAQIVLLVLLDAMVNFVIGTFLPKSKESVYFGYDGAIMWENMGPDFR-GETFFSVFAIFPPAATGFLAGANISGDLADPQAIIPRG** : 463
 Epinephelus_lanceolatus : **VILLLGSVAGMEWEAKAQIVLLVLLDAMVNFVIGTFLPKSKESVYFGYDGAIMWENMGPDFR-GETFFSVFAIFPPAATGFLAGANISGDLADPQAIIPRG** : 463
 Lates_calcarifer : **VILLLGSVAGMEWEAKAQIVLLVLLDAMVNFVIGTFLPKSKESVYFGYDGAIMWENMGPDFR-GETFFSVFAIFPPAATGFLAGANISGDLADPQAIIPRG** : 460
 Mus_musculus : **VILLLGSVAGMEWEAKAQIVLLVLLDAMVNFVIGTFLPKSKESVYFGYDGAIMWENMGPDFR-GETFFSVFAIFPPAATGFLAGANISGDLADPQAIIPRG** : 515
 Gallus_gallus : **VILLLGSVAGMEWEAKAQIVLLVLLDAMVNFVIGTFLPKSKESVYFGYDGAIMWENMGPDFR-GETFFSVFAIFPPAATGFLAGANISGDLADPQAIIPRG** : 455
 Homo_sapiens : **VILLLGSVAGMEWEAKAQIVLLVLLDAMVNFVIGTFLPKSKESVYFGYDGAIMWENMGPDFR-GETFFSVFAIFPPAATGFLAGANISGDLADPQAIIPRG** : 521

Acanthopagrus_schlegelii : **FLLAHLITGVYVAVSTGSCVVRDASGVNDTITLAFNGSDVACGLGDFSSCSAK-NDDTGHNDFQVMSVSGGEPITISAGIFSATLSSALASIASAM** : 565
 Sparus_aurata : **FLLAHLITGVYVAVSTGSCVVRDASGVNDTITLAFNGSDVACGLGDFSSCSAK-NDDTGHNDFQVMSVSGGEPITISAGIFSATLSSALASIASAM** : 565
 Lepisosteus_oculatus : **FLLAHLITGVYVAVSTGSCVVRDASGVNDTITLAFNGSDVACGLGDFSSCSAK-NDDTGHNDFQVMSVSGGEPITISAGIFSATLSSALASIASAM** : 566
 Oreochromis_niloticus : **FLLAHLITGVYVAVSTGSCVVRDASGVNDTITLAFNGSDVACGLGDFSSCSAK-NDDTGHNDFQVMSVSGGEPITISAGIFSATLSSALASIASAM** : 556
 Larimichthys_crocea : **FLLAHLITGVYVAVSTGSCVVRDASGVNDTITLAFNGSDVACGLGDFSSCSAK-NDDTGHNDFQVMSVSGGEPITISAGIFSATLSSALASIASAM** : 567
 Epinephelus_lanceolatus : **FLLAHLITGVYVAVSTGSCVVRDASGVNDTITLAFNGSDVACGLGDFSSCSAK-NDDTGHNDFQVMSVSGGEPITISAGIFSATLSSALASIASAM** : 568
 Lates_calcarifer : **FLLAHLITGVYVAVSTGSCVVRDASGVNDTITLAFNGSDVACGLGDFSSCSAK-NDDTGHNDFQVMSVSGGEPITISAGIFSATLSSALASIASAM** : 564
 Mus_musculus : **FLLAHLITGVYVAVSTGSCVVRDASGVNDTITLAFNGSDVACGLGDFSSCSAK-NDDTGHNDFQVMSVSGGEPITISAGIFSATLSSALASIASAM** : 617
 Gallus_gallus : **FLLAHLITGVYVAVSTGSCVVRDASGVNDTITLAFNGSDVACGLGDFSSCSAK-NDDTGHNDFQVMSVSGGEPITISAGIFSATLSSALASIASAM** : 556
 Homo_sapiens : **FLLAHLITGVYVAVSTGSCVVRDASGVNDTITLAFNGSDVACGLGDFSSCSAK-NDDTGHNDFQVMSVSGGEPITISAGIFSATLSSALASIASAM** : 623

Acanthopagrus_schlegelii : **KVFQALCKDNVYPCLSIFARGYGKNEPLRGYILTFGLALAFILIAELNIAPLISNFFLASVALINFVSHASLAKSI-GWRPFRKYVMWVSLGAILCCVV** : 668
 Sparus_aurata : **KVFQALCKDNVYPCLSIFARGYGKNEPLRGYILTFGLALAFILIAELNIAPLISNFFLASVALINFVSHASLAKSI-GWRPFRKYVMWVSLGAILCCVV** : 668
 Lepisosteus_oculatus : **KVFQALCKDNVYPCLSIFARGYGKNEPLRGYILTFGLALAFILIAELNIAPLISNFFLASVALINFVSHASLAKSI-GWRPFRKYVMWVSLGAILCCVV** : 671
 Oreochromis_niloticus : **KVFQALCKDNVYPCLSIFARGYGKNEPLRGYILTFGLALAFILIAELNIAPLISNFFLASVALINFVSHASLAKSI-GWRPFRKYVMWVSLGAILCCVV** : 659
 Larimichthys_crocea : **KVFQALCKDNVYPCLSIFARGYGKNEPLRGYILTFGLALAFILIAELNIAPLISNFFLASVALINFVSHASLAKSI-GWRPFRKYVMWVSLGAILCCVV** : 670
 Epinephelus_lanceolatus : **KVFQALCKDNVYPCLSIFARGYGKNEPLRGYILTFGLALAFILIAELNIAPLISNFFLASVALINFVSHASLAKSI-GWRPFRKYVMWVSLGAILCCVV** : 671
 Lates_calcarifer : **KVFQALCKDNVYPCLSIFARGYGKNEPLRGYILTFGLALAFILIAELNIAPLISNFFLASVALINFVSHASLAKSI-GWRPFRKYVMWVSLGAILCCVV** : 667
 Mus_musculus : **KVFQALCKDNVYPCLSIFARGYGKNEPLRGYILTFGLALAFILIAELNIAPLISNFFLASVALINFVSHASLAKSI-GWRPFRKYVMWVSLGAILCCVV** : 720
 Gallus_gallus : **KVFQALCKDNVYPCLSIFARGYGKNEPLRGYILTFGLALAFILIAELNIAPLISNFFLASVALINFVSHASLAKSI-GWRPFRKYVMWVSLGAILCCVV** : 659
 Homo_sapiens : **KVFQALCKDNVYPCLSIFARGYGKNEPLRGYILTFGLALAFILIAELNIAPLISNFFLASVALINFVSHASLAKSI-GWRPFRKYVMWVSLGAILCCVV** : 726

Acanthopagrus_schlegelii : **MFVINWAAALLTNVIVLGLFYVSYKRPDYNWGSSTQALTYHQALDITLHLSGVEDHVKNFRPQCLVMTGYPNSRPALLDLVHFTKNVGLMICGHIHRTGYRRPN** : 773
 Sparus_aurata : **MFVINWAAALLTNVIVLGLFYVSYKRPDYNWGSSTQALTYHQALDITLHLSGVEDHVKNFRPQCLVMTGYPNSRPALLDLVHFTKNVGLMICGHIHRTGYRRPN** : 773
 Lepisosteus_oculatus : **MFVINWAAALLTNVIVLGLFYVSYKRPDYNWGSSTQALTYHQALDITLHLSGVEDHVKNFRPQCLVMTGYPNSRPALLDLVHFTKNVGLMICGHIHRTGYRRPN** : 776
 Oreochromis_niloticus : **MFVINWAAALLTNVIVLGLFYVSYKRPDYNWGSSTQALTYHQALDITLHLSGVEDHVKNFRPQCLVMTGYPNSRPALLDLVHFTKNVGLMICGHIHRTGYRRPN** : 764
 Larimichthys_crocea : **MFVINWAAALLTNVIVLGLFYVSYKRPDYNWGSSTQALTYHQALDITLHLSGVEDHVKNFRPQCLVMTGYPNSRPALLDLVHFTKNVGLMICGHIHRTGYRRPN** : 775
 Epinephelus_lanceolatus : **MFVINWAAALLTNVIVLGLFYVSYKRPDYNWGSSTQALTYHQALDITLHLSGVEDHVKNFRPQCLVMTGYPNSRPALLDLVHFTKNVGLMICGHIHRTGYRRPN** : 776
 Lates_calcarifer : **MFVINWAAALLTNVIVLGLFYVSYKRPDYNWGSSTQALTYHQALDITLHLSGVEDHVKNFRPQCLVMTGYPNSRPALLDLVHFTKNVGLMICGHIHRTGYRRPN** : 772
 Mus_musculus : **MFVINWAAALLTNVIVLGLFYVSYKRPDYNWGSSTQALTYHQALDITLHLSGVEDHVKNFRPQCLVMTGYPNSRPALLDLVHFTKNVGLMICGHIHRTGYRRPN** : 825
 Gallus_gallus : **MFVINWAAALLTNVIVLGLFYVSYKRPDYNWGSSTQALTYHQALDITLHLSGVEDHVKNFRPQCLVMTGYPNSRPALLDLVHFTKNVGLMICGHIHRTGYRRPN** : 764
 Homo_sapiens : **MFVINWAAALLTNVIVLGLFYVSYKRPDYNWGSSTQALTYHQALDITLHLSGVEDHVKNFRPQCLVMTGYPNSRPALLDLVHFTKNVGLMICGHIHRTGYRRPN** : 831

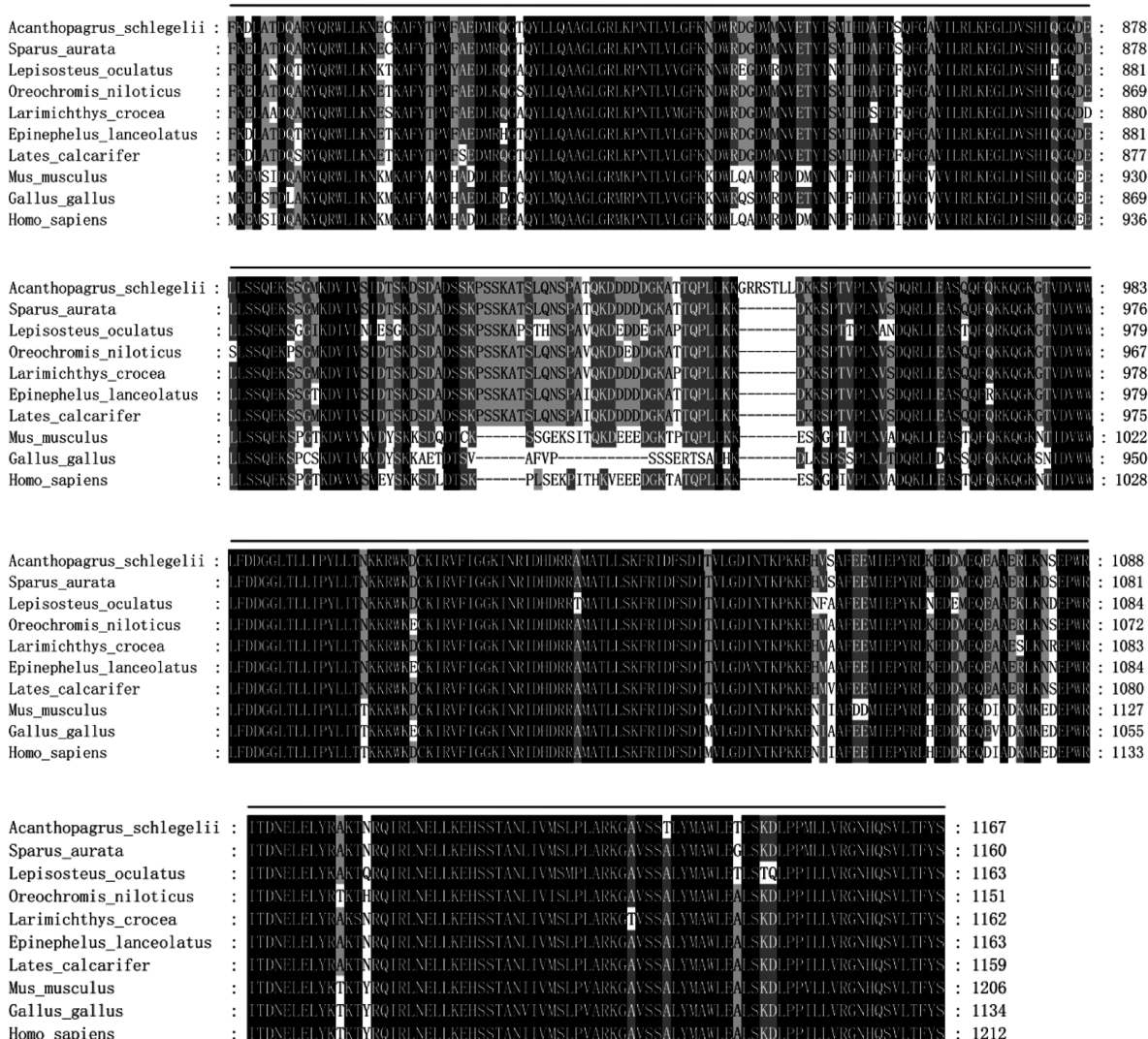


图1 黑鲷 NKCC1 的氨基酸序列对比和结构域分析

Fig.1 Amino acid sequences and domains analysis of NKCC1 in *A. schlegelii*

2.2 同源性分析及进化树

黑鲷 NKCC1 氨基酸序列与其他物种的 NKCC1 同源性为 66.1% - 97.8% (表 2)。其中,与金头鲷

同源性最高,为 97.8%;与斑马鱼的同源性最低,为 66.1%。此外,与大黄鱼、鞍带石斑鱼和尖吻鲈的同源性均大于 90%。

表 2 黑鲷 NKCC1 氨基酸与其他物种的同源性

Table 2 Homology of NKCC1 amino acids of *A. schlegelii* with other species

物种 Species	预测氨基酸的相似性 Prediction of amino acid similarity (%)	基因序列编号 GenBank No.
黑鲷 <i>A. schlegelii</i> NKCC1	100.0	—
金头鲷 <i>Sparus aurata</i> NKCC1a	97.8	XP_030290529.1
金头鲷 <i>S. aurata</i> NKCC1b	73.3	XP_030273833.1
斑马鱼 <i>Danio rerio</i> NKCC1a	79.6	ENSADAR00000131505
斑马鱼 <i>D. rerio</i> NKCC1b	66.1	ENSADAR00000140839
斑点雀鲷 <i>Lepisosteus oculatus</i> NKCC1	77.7	ENSLOC00000010254
罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i> NKCC1b	72.5	ENSONIP00000017387
罗非鱼 <i>O. niloticus</i> NKCC1a	88.8	ENSONIP00000014249

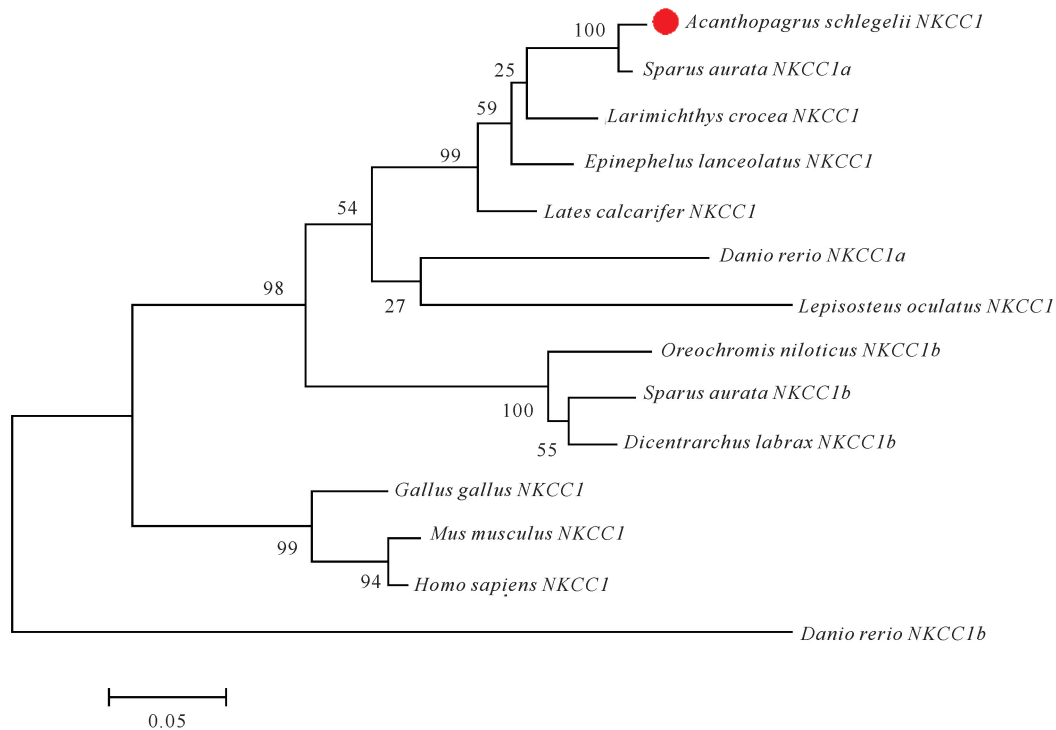
续表 2

Continued table 2

物种 Species	预测氨基酸的相似性 Prediction of amino acid similarity (%)	基因序列编号 GenBank No.
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i> NKCC1	92.0	XP_019127704.1
欧洲鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i> NKCC1a	93.7	ENSDLAT00005051426.1
欧洲鲈 <i>D. labrax</i> NKCC1b	71.7	ENSDLAT00005038362.1
鞍带石斑鱼 <i>Epinephelus lanceolatus</i>	92.2	XP_033502841.1
尖吻鲈 <i>Lates calcarifer</i> NKCC1	91.9	XP_018529108.1
小鼠 <i>Mus musculus</i> NKCC1	74.1	NP_033220.2
人 <i>Homo sapiens</i> NKCC1	72.8	NP_001037.1
鸡 <i>Gallus gallus</i> NKCC1	72.4	XP_004949435.1

从系统进化树可以看出黑鲷 *NKCC1* 首先与金头鲷 *NKCC1a* 聚为一支(图 2), 然后再与大黄鱼、鞍带石斑鱼、尖吻鲈 *NKCC1* 聚为一支, 再与斑马鱼和

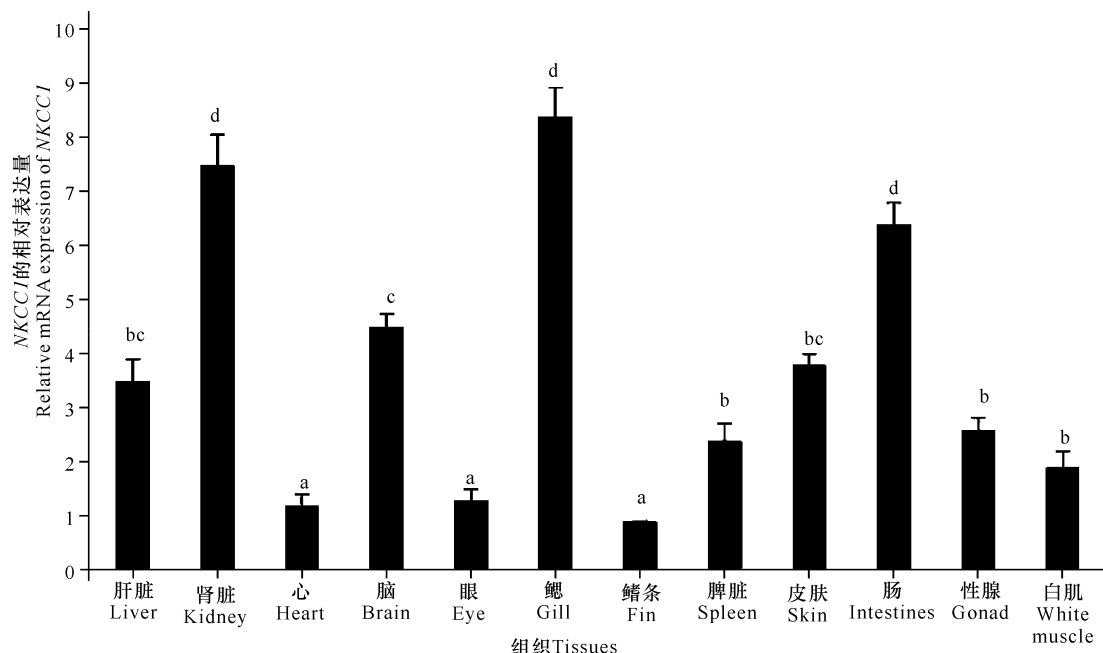
斑点雀鲷 *NKCC* 聚为一支, 而罗非鱼、金头鲷、欧洲鲈的 *NKCC1b* 则单独聚为一支。此外, 小鼠、鸡和人等外源物种的 *NKCC1* 聚为一支。

图 2 黑鲷 *NKCC1* 基因的系统进化树分析Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of *NKCC1* gene in *A. schlegelii*

2.3 黑鲷 *NKCC1* 基因不同组织表达分析

黑鲷 *NKCC1* 基因在所检测的 12 个组织, 即肝脏、肾脏、心、脑、眼、鳃、鳍条、脾脏、皮肤、肠、性腺和白肌中均有表达量(图 3)。其中, 在肾脏、鳃和肠中

表达量较高, 显著高于其他组织 ($P < 0.05$); 其次为肝脏、脑、脾脏、皮肤、性腺和白肌, 表达量最低的组织为心、眼、鳍条, 显著低于其他组织 ($P < 0.05$)。



不同字母表示两组间具有显著性差异 ($P < 0.05$)

Different letters indicate a significant difference between the two groups ($P < 0.05$)

图3 黑鲷 *NKCC1* 基因的组织表达模式

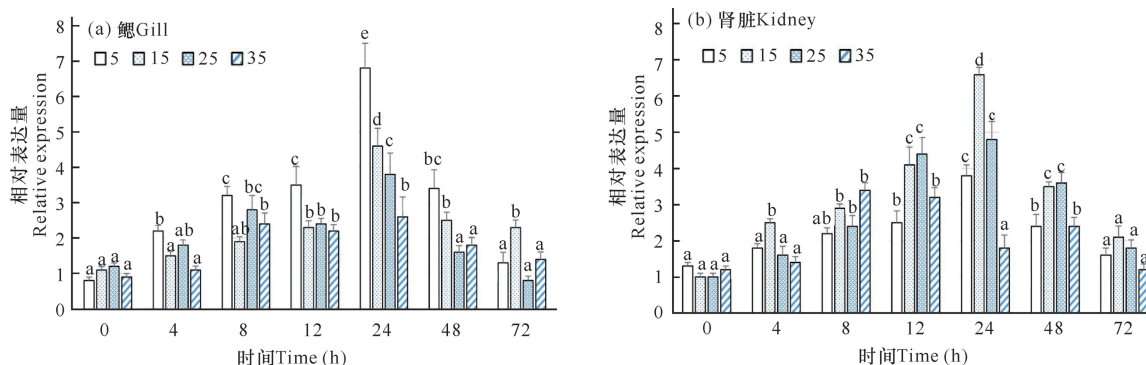
Fig. 3 Tissue expression patterns of *NKCC1* genes in *A. schlegelii*

2.4 不同盐度胁迫条件下黑鲷 *NKCC1* 基因的表达分析

不同盐度胁迫下 *NKCC1* 基因在黑鲷鳃和肾脏组织中的相对表达量如图4所示。在鳃组织中(图4a),在对照组(盐度15组)中, *NKCC1* 基因在12 h后显著上升,在24 h后达到顶峰,随后开始逐渐下降;在盐度5组中, *NKCC1* 基因在处理4 h后就显著上调,且其表达量在第4, 8, 12和24 h均显著高于对照组,而在72 h则显著低于对照组;在盐度25组中, *NKCC1* 基因表达量随着时间推移而缓慢上升,至24 h达到顶峰,在24, 48和72 h时的表达量均显著低于对照组;在盐度35组中,其表达变化与盐度

25组类似。

在肾脏组织中(图4b),在对照组(盐度15组)中, *NKCC1* 基因表达量随着时间推移而明显升高,至24 h后达到顶峰(相比于0 h提高6.6倍),随后慢慢下降,至72 h仍高于0 h;在盐度5组中, *NKCC1* 基因的表达量随着时间推移而缓慢升高,至24 h达到顶峰,随后开始慢慢下降,至72 h后逐渐恢复到开始时的水平;在盐度25组中, *NKCC1* 基因在第8 h开始出现明显上调 ($P < 0.5$),至24 h到达顶峰,随后开始下降;在盐度35组中, *NKCC1* 基因表达量缓慢升高,至8 h到达顶峰,随后开始下降。



不同字母表示两组间具有显著性差异 ($P < 0.05$)

Different letters indicate a significant difference between the two groups ($P < 0.05$)

图4 急性盐度胁迫下黑鲷 *NKCC1* 基因在组织中的表达特征

Fig. 4 Expression patterns of *NKCC1* gene in tissues of *A. schlegelii* under acute salinity stress

在鳃组织中(图 4a),在低盐度胁迫下,*NKCC1* 基因的表达量对盐度变化反应十分迅速,在处理 4 h 后就会显著刺激 *NKCC1* 基因的表达量,且一直持续至 48 h;而在高盐度胁迫下,*NKCC1* 的表达量对盐度变化的响应在早期并不明显,至 24 h 后会出现显著抑制现象,一直持续至 72 h。在肾脏组织中(图 4b),低盐度和高盐度胁迫下,*NKCC1* 基因的表达量均会随着时间推移而出现先增高后降低的现象。此外,相比于对照组,低盐度和高盐度胁迫在都会在不同时间点抑制 *NKCC1* 基因的表达量。上述实验表明,*NKCC1* 基因在维持黑鲟渗透压和离子平衡过程中起着重要的调节作用。

3 讨论

NKCC 是一类电中性跨膜转运蛋白,是溶质载体家族的成员之一,可以按 $\text{Na}^+ : \text{K}^+ : \text{Cl}^- = 1 : 1 : 2$ 的比例进行离子跨膜转运^[20,21],从而参与调节极化细胞中的离子和水分运动。在脊椎动物和无脊椎动物中都发现有 NKCC,其在维持细胞体积的稳态和电解质含量的过程中起关键作用^[22]。在不同渗透压环境中,鱼类的 NKCC 会被激活,向体外分泌离子,从而维持渗透压平衡。在低盐度情况下,鱼类体内 Na^+ 、 Cl^- 浓度低于外界环境;在高盐度情况下,鱼类体内的 Na^+ 、 Cl^- 浓度高于外界,此时机体激活细胞膜上的 NKCC 蛋白,通过主动运输调节离子浓度,使机体内外的渗透压达到平衡^[20,21]。

许多研究报道 NKCC 蛋白参与鱼类渗透压的调节,例如在鳉鱼(*Fundulus heteroclitus*)中,当进行淡水转移后,其 *NKCC1a* 表达量在每个组织中均被抑制;而从微咸水转移至海水后,*NKCC1a* mRNA 的表达增加^[23]。在罗非鱼(*Sarotherodon melanoth-ern*)中,不同盐度环境会显著影响鳃组织中 *NKCC1a* mRNA 的表达水平,在 136‰ 盐度海水中其表达量会比在淡水中高 4.9 倍^[24]。已有学者研究黑鲟在盐度胁迫下,为适应环境所起重要调节作用的相关基因^[10-14],但尚未见有关于黑鲟 *NKCC1* 基因参与渗透压调节的相关报道。在本研究中,通过克隆获得黑鲟 *NKCC1* 基因,该基因 cDNA 的 ORF 全长为 3 504 bp,编码 1 167 个氨基酸,理论蛋白分子量为 127.19 kDa,理论等电点为 5.75。蛋白结构域分析显示在 51-1 167 氨基酸残基间有一个典型的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ 共同转运蛋白 SLC12A 结构域,这与斑马鱼、金鲳、罗非鱼等物种的 SLC12A 结构域具有高

度一致性,表明 SLC12A 结构域在不同物种中具有很高的保守性,同时也表明黑鲟 *NKCC1* 与其他物种的 *NKCC1* 一样,具有潜在的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ 离子共同转运功能。

组织表达分析表明 *NKCC1* 基因在黑鲟各组织中均有表达,且在肾脏、鳃和肠中表达量最高。在其他硬骨鱼类如舌齿鲈、罗非鱼和大西洋鲑的组织中,均发现有 *NKCC1* 基因的表达^[25-27],而本研究的结果与其他鱼类中的研究类似。此外,肾脏、鳃和肠均为参与鱼类渗透压调节的重要组织,黑鲟 *NKCC1* 基因在上述组织中具有显著高于其他组织的表达量,暗示该基因在渗透压调节中发挥重要功能。

对不同盐度胁迫下 *NKCC1* 基因在鳃和肾脏中的时间表达特征分析表明,与肾脏组织相比,*NKCC1* 基因在鳃组织中的渗透压调节作用更明显,且在低盐度胁迫下反应十分迅速。这一结果与大西洋鲑和攀鲈(*Anabas tesseuclineus*)中的结果相似^[28],说明黑鲟 *NKCC1* 基因主要发挥作用的器官是鳃组织。另外,相较于高盐度胁迫,黑鲟 *NKCC1* 基因对低盐度胁迫的响应更为明显迅速。

鱼类在海水中通过吞饮吸收水分,再通过肠道摄取,进而用鳃排泄。当转移至淡水环境中时,由于吞咽水的反射和水分扩散,鱼机体增加了肠内的水量。为停止反射、促进水分泌,鱼机会提高 *NKCC1* 基因的表达,促进离子进入细胞以增加细胞液浓度。尽管黑鲟渗透调节能力较强,但仍不能在急性条件下适应淡水,因此也会激活 *NKCC1* 基因表达以适应低盐度环境。有学者认为 *NKCC1* 基因的快速响应受磷酸化和去磷酸化调节的影响,而触发 *NKCC1* 基因磷酸化的信号似乎是细胞内 Cl^- 本身^[29]。因此,推测在低盐度胁迫条件下,黑鲟鳃组织中的 *NKCC1* 基因的磷酸化因细胞内 Cl^- 浓度的降低而激活,继而提高 *NKCC1* 基因的表达量,增加进入细胞内的离子量,从而促进水分泌,以维持细胞内的稳态。综上所述,本研究可为解析黑鲟 *NKCC1* 基因参与渗透压调节的功能机制和建立黑鲟最适盐度养殖模式提供了一定的技术理论,并为研究鱼类渗透压调节机制奠定理论基础。

4 结论

本研究分析黑鲟 *NKCC1* 基因的分子特征及其在不同盐度胁迫环境下的表达特征,得出以下结论:
(1)黑鲟 *NKCC1* 基因 ORF 全长为 3 504 bp,共编码

1 167个氨基酸,为跨膜蛋白,定位在细胞膜上,且含有一个典型的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ 共同转运蛋白 SLC12A 结构域;(2) *NKCC1* 基因在黑鲟的渗透压调节组织中均有表达,其中,在肾脏、鳃和肠3个组织中的表达量显著高于其他组织 ($P < 0.05$);(3)与肾脏组织相比, *NKCC1* 基因在鳃组织中发挥的渗透压调节作用更为明显,且在低盐度胁迫时发挥的作用更为迅速,推测是由于低盐度胁迫,黑鲟鳃组织 *NKCC1* 基因的磷酸化因细胞内 Cl^- 浓度的降低而被激活,继而提高 *NKCC1* 基因的表达量,增加进入细胞内的离子量,从而促进水分泌,以维持细胞内的稳态。本研究成果有助于揭示黑鲟 *NKCC1* 参与渗透压调节的功能机制,并为鱼类渗透压调节研究提供一定的理论基础。

参考文献

- [1] ALLEN P J, MITCHELL Z A, DEVRIES R J, et al. Salinity effects on Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus* Mitchell, 1815) growth and osmoregulation [J]. Journal of Applied Ichthyology, 2015, 30(6): 1229-1236.
- [2] ANNI A I S, BIANCHINI A, JUNIOR V A S, et al. Salinity influence on growth, osmoregulation and energy turnover in juvenile pompano *Trachinotus marginatus* Cuvier 1832 [J]. Aquaculture, 2016, 455: 63-72.
- [3] PREZ-ROBLES J, DIAZ F, IBARRA-CASTRO L, et al. Effects of salinity on osmoregulation during the embryonic development of the bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus* Jenyns 1842) [J]. Aquaculture Research, 2016, 47(3): 838-846.
- [4] MUHAMMADAR A A, MAZLAN A G, SAMAT A, et al. Growth, survival and feed conversion of juvenile tiger grouper *Epinephelus fuscoguttatus* in different salinity regimes [J]. Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation International Journal of the Bioflux Society, 2014, 7(4): 241-247.
- [5] MOUTOU K A, PANAGIOTAKI P, MAMURIS Z. Effects of salinity on digestive protease activity in the euryhaline sparid *Sparus aurata* L.: A preliminary study [J]. Aquaculture Research, 2004, 35(9): 912-914.
- [6] KODA K, TSUYUKI A, UMINO T, et al. Effect of rearing salinity on growth, body composition, and otolith Sr: Ca ratio in fingerling black seabream *Acanthopagrus schlegelii* [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 2016, 82(5): 720-726.
- [7] 王裕玉, 徐跑, 张志伟, 等. 不同养殖模式对黑鲟生长、血清生化指标及抗氧化性能的影响 [J]. 江苏农业科学, 2020, 48(23): 155-160.
- [8] MIN B H, SEO J S, PARK J J, et al. Gill $\text{Na}^+ / \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity and expression in black sea bream *Acanthopagrus schlegelii* exposed to a hyposaline environment [J]. Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2015, 48(1): 64-70.
- [9] 贾超峰, 祝斐, 孟乾, 等. 低盐养殖对黑鲟营养成分的影响 [J]. 食品工业科技, 2020, 41(1): 284-288, 294.
- [10] 邓利, 张为民, 林浩然. 盐度变化对黑鲟生长激素及其受体的影响 [J]. 热带海洋学报, 2003, 22(6): 9-14.
- [11] CHANG Y J, MIN B H, CHOI C Y. Black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*) prolactin cDNA sequence: mRNA expression and blood physiological responses during freshwater acclimation [J]. Comparative Biochemistry and Physiology b-Biochemistry & Molecular Biology, 2007, 147(1): 122-128.
- [12] TOMY S, CHANG Y M, CHEN Y H, et al. Salinity effects on the expression of osmoregulatory genes in the euryhaline black porgy *Acanthopagrus schlegelii* [J]. General and Comparative Endocrinology, 2009, 161(1): 123-132.
- [13] AN K W, KIM N N, SHIN H S, et al. Profiles of antioxidant gene expression and physiological changes by thermal and hypoosmotic stresses in black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2010, 156(2): 262-268.
- [14] AN K W, KIM N N, CHOI C Y. Cloning and expression of aquaporin 1 and arginine vasotocin receptor mRNA from the black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*: Effect of freshwater acclimation [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2008, 34(2): 185-194.
- [15] PAYNE J A, FORBUSH B. Molecular characterization of the epithelial Na-K-Cl cotransporter isoforms [J]. Current Opinion in Cell Biology, 1995, 7(4): 493-503.
- [16] ZHAO C P, GUO H Y, ZHU K C, et al. Molecular characterization of $\text{Na}^+ / \text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ cotransporter 1 alpha from *Trachinotus ovatus* (Linnaeus, 1758) and its expression responses to acute salinity stress [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2018, 223: 29-38.
- [17] CUTLER C P, CRAMB G. Two isoforms of the $\text{Na}^+ / \text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ cotransporter are expressed in the European eel (*Anguilla anguilla*) [J]. Acta Biochimica Et Biophysica Sinica, 2002, 1566(1/2): 92-103.
- [18] SCOTT G R, RICHARDS J G, FORBUSH B, et al. Changes in gene expression in gills of the euryhaline

- killifish *Fundulus heteroclitus* after abrupt salinity transfer [J]. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 2004, 287(2): C300-C309.
- [19] INOKUCHI M, HIROI J, WATANABE S, et al. Gene expression and morphological localization of NHE3, NCC and NKCC1a in branchial mitochondria-rich cells of *Mozambique tilapia* (*Oreochromis mossambicus*) acclimated to a wide range of salinities [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2008, 151(2): 151-158.
- [20] SUVITAYAVAT W, DUNHAM P B, HAAS M, et al. Characterization of the proteins of the intestinal $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ cotransporter [J]. *American Journal of Physiology*, 1994, 267(2): C375-C384.
- [21] TOWLE D W, RUSHTON M E, HEIDYSCH D, et al. Sodium/proton antiporter in the euryhaline crab *carcinus maenas*: Molecular cloning, expression and tissue distribution [J]. *Journal of Experimental Biology*, 1997, 200(Pt6): 1003-1014.
- [22] PAYNE J A, FORBUSH B. Molecular characterization of the epithelial Na-K-Cl cotransporter isoforms [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 1995, 7(4): 493-503.
- [23] SCOTT G R, RICHARDS J G, FORBUSH B, et al. Changes in gene expression in gills of the euryhaline killifish *Fundulus heteroclitus* after abrupt salinity transfer [J]. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 2004, 287(2): C300-C309.
- [24] 范武江, 李思发. 萨罗罗非鱼 *NKCC1 α* 基因 cDNA 克隆及 mRNA 组织表达差异 [J]. *动物学研究*, 2010, 31(6): 601-609.
- [25] LORIN-NEBEL C, BOULO V, BODINIER C, et al. The $\text{Na}^+ / \text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ cotransporter in the sea bass *Dicentrarchus labrax* during ontogeny: Involvement in osmoregulation [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2006, 209(24): 4908-4922.
- [26] HIROI J, YASUMASU S, MCCORMICK S D, et al. Evidence for an apical Na-Cl cotransporter involved in ion uptake in a teleost fish [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2008, 211(16): 2584-2599.
- [27] SUNDH H, NILSEN T O, LINDSTR M J, et al. Development of intestinal ion-transporting mechanisms during smoltification and seawater acclimation in Atlantic salmon *Salmo salar* [J]. *Journal of Fish Biology*, 2014, 85(4): 1227-1252.
- [28] HWANG P P, LEE T H, LIN L Y. Ion regulation in fish gills; Recent progress in the cellular and molecular mechanisms [J]. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2011, 301(1): R28-R47.
- [29] GAGNON K B, DELPIRE E. Molecular determinants of hyperosmotically activated NKCC1-mediated K^+ / K^+ exchange [J]. *Journal of Physiology*, 2010, 588(18): 3385-3396.

Molecular Characteristics of *NKCC1* in Black Sea Bream *Acanthopagrus schlegelii* and Its Expression in Response to Acute Salinity Stress

LIN Liqun^{1,2}, LIU Mingzhu², LIN Guorong¹, HUANG Shuaishuai^{2,3}, LI Mengmeng⁴, TONG Guixiang⁵

(1. Yangxi Hengsheng Aquaculture Professional Cooperative, Yangjiang, Guangdong, 529500, China; 2. Guangxi Engineering Research Center for Fishery Major Diseases Control and Efficient Healthy Breeding Industrial Technology, Nanning, Guangxi, 530007, China; 3. Guangxi Key Laboratory of Beibu Gulf Marine Biodiversity Conservation, College of Marine Sciences, Beibu Gulf University, Qinzhou, Guangxi, 535011, China; 4. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang, Henan, 453007, China; 5. Guangxi Key Laboratory of Aquatic Genetic Breeding and Healthy Breeding, Guangxi Academy of Fishery Science, Nanning, Guangxi, 530021, China)

Abstract: To understand the adaptation mechanism of black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) under salinity stress, the bioinformatics analysis and the expression characteristics of *NKCC1* gene in different tissues were carried out by using gene amplification, cluster analysis and fluorescence quantitative PCR techniques, and the expression mechanism of *NKCC1* gene under acute salinity stress was also detected. The results showed that the open reading frame (ORF) of *NKCC1* gene was 3 504 bp, encoding 1 167 amino acids. The predicted molecular weight of *NKCC1* protein was 127.9 kDa, and the theoretical isoelectric point was 5.75. The domain analysis showed that *NKCC1* was a transmembrane protein and contained a typical $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ cotransporter SLC12A domain, which was highly conserved in different species. Sequence alignment analysis showed that the amino acid sequence of *NKCC1* and *NKCC1a* had the highest homology, which was 97.8%. Tissue expression analysis showed that *NKCC1* gene was expressed in the 12 tissues tested: liver, kidney, heart, brain, eye, gill, fin, spleen, skin, intestine, gonad and white muscle of black sea bream, and the highest expression was found in kidney, gill and intestine, and significantly higher than other tissues ($P < 0.05$). When under low salinity stress, the expression of *NKCC1* gene in gill tissue responded rapidly to salinity changes, while in kidney tissue, the expression of *NKCC1* gene was inhibited at different time points by both low and high salinity stress. In conclusion, this study lays a foundation for exploring the mechanism of *NKCC1* gene in regulating osmotic pressure and ion balance in black sea bream, and provides a certain technical theory for promoting the sustainable development of black sea bream farming industry.

Key words: black sea bream, *NKCC1* gene, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$, acute salinity stress, osmotic pressure

责任编辑:米慧芝



微信公众号投稿更便捷

联系电话:0771-2503923

邮箱:gxxkxyxb@gxas.cn

投稿系统网址:<http://gxxkx.ijournal.cn/gxxkxyxb/ch>