水产学报, 2023, 47(8): 089104

JOURNAL OF FISHERIES OF CHINA

DOI: 10.11964/jfc.20220813640

Science Press

花鲈 *ncc*、*nkcc* 基因在海、淡水适应中鳃组织的表达与定位分析

王志远， 李金库， 李 昀， 王灵钰， 齐 鑫， 李吉方， 温海深*

(中国海洋大学水产学院，海水养殖教育部重点实验室，山东 青岛 266603)

摘要： 为探究 *ncc*、*nkcc* 基因在花鲈渗透调节中发挥的作用，实验通过全基因组鉴定、多重序列比对、系统进化树构建以及蛋白结构预测对花鲈 *ncc* 进行了鉴定及序列分析，利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 *ncc* 和 *nkcc* 在海水、淡水花鲈鳃组织中的表达水平，利用原位杂交技术确定 *ncc*2 和 *nkcc*1*a* 在海水及淡水花鲈鳃中的表达位置。结果显示，从花鲈中鉴定出 2 个 *ncc* 基因，即 *ncc*1 和 *ncc*2，其编码序列 (CDS) 长度分别为 2 691 和 3 120 bp，编码 896 和 1 039 个氨基酸，在进化上具有保守性。*ncc*2 在淡水花鲈鳃组织中的表达量显著高于海水，而 *nkcc*1*a* 在海水花鲈鳃组织中的表达量显著高于淡水，*ncc*1、*nkcc*1*b*、*nkcc*2 在海淡水中的表达量则无显著差异。淡水适应过程中花鲈鳃组织中的 *ncc*2 的表达量逐渐上调，而 *nkcc*1*a* 的表达量逐渐下调；海水适应过程则呈现相反的表达趋势。此外，原位杂交结果显示，*ncc*2 和 *nkcc*1*a* 基因分别位于淡水与海水中鳃组织的相邻鳃小片间的鳃丝上皮。以上结果表明，*ncc*2 和 *nkcc*1*a* 基因分别编码淡水及海水花鲈鳃中重要的 Na^+及 Cl^-离子转运蛋白亚型，可作为区分淡水、海水养殖花鲈的分子标志物，在渗透调节及盐度适应中发挥重要作用。

关键词: 花鲈；*ncc*；*nkcc*；鳃；渗透调节

中图分类号: S 917　　**文献标志码:** A

相比于陆地环境，鱼类赖以生存的水环境更加复杂多变，这对鱼类的渗透调节能力提出了更高的要求。硬骨鱼类的渗透调节主要通过激活参与离子运输的离子转运蛋白和通道实现[1-3]。而溶质载体转运家族 12(solute carrier family 12，SLC12) 的成员编码阳离子-氯离子共转运体，参与细胞体积调节、氯离子浓度调节和血压调节等多个过程[4]，对于维持机体的稳态平衡至关重要。该家族内的基因高度同源，编码的蛋白主要分为两个功能分支，其一是 Na^+驱动的蛋白家族, 由 Na^+-Cl^-协同转运蛋白 (NCC) 和 Na^+-K^+-2Cl^-协同转运蛋白 (NKCC) 组成；另一分支是 K^+驱动的 K^+-Cl^-协同转运蛋白家族 (KCCs)，由 KCC1-KCC4 组成[5-6]。

在硬骨鱼中，NCC 一般分为 2 个亚型，NCC1 和 NCC2。其中，*ncc*1 基因的表达主要集中在肾脏组织。如在广盐性的暗纹东方鲀(*Takifugu fasciatus*) 中发现，*ncc*1 在肾脏中高度表达，其表达量在由淡水转入海水的适应过程中逐渐下调；而适应于海水生活的红鳍东方鲀(*T. rubripes*) 肾脏中 *ncc*1 的表达量相对于广盐性的暗纹东方鲀较低[7]。同样，在莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*) 的肾脏中也发现了淡水驯化过程中 *ncc*1 表达

收稿日期： 2022-08-09　　**修回日期：** 2022-11-12

资助项目： 国家重点研发计划 (2020YFD0900204)；国家自然科学基金 (32072947)；现代农业产业技术体系-国家海水鱼产业技术体系 (CARS-47)

第一作者： 王志远 (照片)，从事鱼类生理学研究，E-mail：1315508180@qq.com

通信作者： 温海深，从事鱼类生理与内分泌研究，E-mail：wenhaishen@ouc.edu.cn

版权所有 ©《水产学报》编辑部（CC BY-NC-ND 4.0）
中国水产学会主办　sponsored by China Society of Fisheries

Copyright © Editorial Office of Journal of Fisheries of China (CC BY-NC-ND 4.0)
https://www.china-fishery.cn

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

升高的趋势[8]。但在欧洲鲈 (*Dicentrarchus labrax*) 中，鳃和肾脏 *ncc*1 的表达量在淡水与海水驯化 2 周后的个体之间不存在显著差异[9]，表明 *ncc*1 在不同物种中的渗透调节功能存在一定的差异。而 *ncc*2 主要在鳃组织中表达，对莫桑比克罗非鱼的研究表明，其编码蛋白主要位于淡水型离子细胞的顶端，主动参与离子吸收过程[10]，与血浆 Na^+ 和 Cl^-水平呈负相关，是鳃 Na^+和 Cl^-摄取过程的关键转运蛋白，对于跨上皮的 Na^+和 Cl^-摄取至关重要[1, 11]。在淡水驯化两周的欧洲鲈中，*ncc*2 在鳃中的表达量与海水个体相比显著上调，推测 *ncc*2 通过吸收 Na^+和 Cl^-维持机体的离子稳态[2, 12]。在莫桑比克罗非鱼中，*ncc*2 在鳃中的表达量在由海水向淡水的适应过程中也发生显著上调[8, 13]，表明 NCC 在广盐性鱼类适应淡水环境中发挥着重要作用。

多数硬骨鱼的 NKCC 也具有两个亚型，NKCC1 和 NKCC2，主要位于上皮细胞的基底外侧质膜上，主动参与离子分泌过程[10]。NKCC1 主要在海水驯化的硬骨鱼鳃和板鳃类直肠腺的离子细胞的基底外侧发挥重要作用，NKCC2 则在淡水驯化的硬骨鱼鳃、肾以及海水驯化的硬骨鱼肠道离子细胞的顶膜内表达[13-15]。底鳉(*Fundulus heteroclitus*) 由半咸水环境转入海水环境后，鳃中 *nkcc*1 的表达呈现即时的上升，而由半咸水转淡水后 *nkcc*1 的表达量逐渐下降[16]。莫桑比克罗非鱼在三周的海水驯化过程中，*nkcc*1*a* 在鳃、食道和肠中的表达量均显著上调[15]。同样，卵形鲳鲹 (*Trachinotus ovatus*) 在海水适应过程中，*nkcc*1*a* 在鳃和肠中的表达水平显著上调[17]。欧洲鲈中的研究也表明，由海水转至淡水环境后 *nkcc*1 的表达量下降[18]。而 *nkcc*2 在适应海水生活的红鳍东方鲀肾脏集合管中高度表达，可能通过介导 NaCl 的再吸收参与红鳍东方鲀对于海水的适应过程[7]。上述结果表明，NKCC 对于硬骨鱼类适应高渗环境至关重要。

花鲈 (*Lateolabrax maculatus*) 又称中国花鲈，俗称海鲈、寨花等，是一种广盐性的重要经济鱼类，也是渗透调节机制研究的理想模式鱼。本实验基于花鲈基因组、转录组等数据对花鲈 *ncc* 基因进行了鉴定，结合课题组前期已鉴定出的 *nkcc* 基因，利用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 检测了 *ncc* 和 *nkcc* 各基因在海、淡水花鲈鳃组织中的表达模式，并通过原位杂交探究了其在海、淡水花鲈鳃组织中的表达定位。研究结果不仅有助于解析花鲈及其他广盐性鱼类的渗透调节与盐度适应机制，还为区分海、淡水养殖花鲈提供了分子标志物，在理论研究及服务养殖生产方面均提供了重要的基础数据。

1　材料与方法

1.1　基因鉴定及系统进化分析

在 NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) 数据库中下载人 (*Homo sapiens*)、穴兔 (*Oryctolagus cuniculus*)、红原鸡 (*Gallus gallus*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、红鳍东方鲀、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、底鳉、三刺鱼 (*Gasterosteus aculeatus*)、日本青鳉 (*Oryzias latipes*)、欧洲鲈等几种常见脊椎动物的 NCC 氨基酸序列，使用 TBtools 软件的 TBLASTEN 比对到花鲈参考基因组 (PRJNA407434) 及全长转录组数据库 (PRJNA515783)，获得候选核苷酸序列。使用 ORF(open reading frame) Finder 在线网站 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/) 预测氨基酸序列。使用 BLASTP 比对 NCBI 非冗余蛋白序列数据库进一步验证。选择花鲈和上述物种的 NCC 氨基酸序列进行系统进化分析，使用 MEGA 7.0 软件的 NJ(Neighbor-Joining) 法构建系统进化树。

1.2　序列分析

使用 ExPASy Prot-Param 在线网站 (https://web.expasy.org/protparam/) 预测蛋白分子量 (MW，ku) 和等电点 (pI)。通过 MEME (https://meme-suite.org/meme/tools/meme) 在线网站进行保守结构域预测，并利用 TBools 软件使其可视化。使用 CDD 数据库 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/) 预测花鲈 *ncc* 基因的特征结构域。使用 NCBI 和 DNAMAN 对蛋白序列进行同源比对分析。

1.3　盐度转换实验

实验所用的花鲈由青岛市黄岛区鲁海丰海洋牧场提供。驯化实验前，所用花鲈生活的水环境盐度为 30.00 ± 0.50。随机选取 30 尾健康的花鲈成鱼 [(40.50 ± 3.21) cm，(812.20 ± 25.71) g] 平均分配到 6 个 400 L 的塑化桶中，分别为 3 桶海水组 (SW，盐度：30.00 ± 0.50，pH：8.30 ± 0.30)、3 桶淡水组 (FW，盐度：0 ± 0.50，pH：7.50 ± 0.30)，每桶 5 尾鱼，驯化 3 周。在此期间于每日 9：00 和 16：30 投喂配合饲料，在投喂 1 h 后除粪便和残饵，每隔 1 d 换水，换水量为 50%。驯化 3 周后进行盐度转换实验，将淡水组花鲈迅速转入海水中，记为 FW-SW 组；将海水组花鲈迅速转入

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

淡水中，记为 SW-FW 组，在实验过程中温度 [(16.00 ± 0.50) °C]、溶解氧 [(7.10 ± 0.40) mg/L] 等条件保持不变。

选取盐度转换前后的 4 个时间点 (0 h、1 d、3 d 和 7 d)，每个时间点分别于 FW-SW 组和 SW-FW 组的 3 个桶中随机选取 3 尾鱼，用 MS-222 (200 mg/L) 进行麻醉后捞出解剖，取鳃组织。一部分样品于液氮中进行速冻而后转移至−80 °C 冰箱中保存，用于后续 RNA 的提取；另一部分于 4% PFA 中保存，固定 12~24 h 后换 70% 乙醇 (DEPC 水配)，固定样品保存于−20 °C 冰箱中，用于原位杂交实验。实验过程中操作人员严格遵守中国海洋大学关于实验动物使用的伦理规范，并按照中国海洋大学伦理委员会制定的规章制度执行 (审批号：20141201)。

1.4　RNA 提取及 qRT-PCR 分析

用 TRIzol(Invitrogen，美国) 法提取花鲈鳃组织 RNA，通过 1% 琼脂糖凝胶电泳来检测 RNA 的完整性，用 BD1000 核酸分析仪来测定 RNA 浓度。使用反转录试剂 (HiScript® Ⅲ RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper))(Vazyme，中国) 将提取的 RNA 反转录为 cDNA。使用 Primer premier 5.0 软件及 Primer-BLAST 网站设计花鲈 *ncc* 和 *nkcc* 基因特异性定量引物，花鲈 18S *rRNA* 基因作为内参[19]，引物序列见表 1。qRT-PCR 实验在 StepOnePlus™ Real-Time PCR 系统 (Applied Biosystems, 美国) 上进行，以花鲈鳃组织 cDNA 为模板，使用试剂盒为 ChamQ TM SYBR® Color qPCR Master Mix (High ROX Premixed)(Vazyme，中国)，反应体系为 2 × ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix (High ROX Premixed) 5.0 μL，上下游引物各 0.2 μL，模板 cDNA 1.0 μL，ddH_2O 3.6 μL，共计 10 μL。qPCR 反应程序：95 °C 30 s；95 °C 10 s，60 °C 30 s，72 °C 30 s，40 个循环。每个时间点的鳃组织样品有 3 个生物学重复，每个样品设 3 个技术重复，并采用 $2^{-\triangle\triangle C_T}$法计算花鲈 *ncc*、*nkcc* 基因的相对表达水平。

1.5　原位杂交定位

使用 Primer premier 5.0 软件和 Primer-BLAST 网站设计花鲈 *ncc*2 和 *nkcc*1*a* 基因的探针合成引物，在上游、下游引物 5′端添加 SP6 和 T7 启动子，引物序列见表 1。以花鲈鳃组织 cDNA 为模板，使用 2 × Phanta® Max Master Mix (Dye Plus) 进行 PCR 反应，通过 Sanger 测序验证产物序列准确性，使用 DIG RNA labeling kit (SP6/T7)(Roche Diagnostics，德国) 试剂进行体外转录，分别合成 DIG 标记的正义、反义探针。利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测所合探针的完整性，用 BD1000 核酸分析仪测定探针浓度，于−80 °C 冻存备用。

表 1　实验用引物

Tab. 1　Primers sequence in the study

基因 genes		引物(5′-3′) primers (5′-3′)
qPCR	*ncc*1	F: TGGGGDGTGATCCTGTACCT
		R: AAGAAGTTGGAGATGATBGGAGC
	*ncc*2	F: GGGCGTATTTCATGATCTCC
		R: AATCCCGCATCATGTCAACG
	*nkcc*1*a*	F: ACGCTCATCACCTGGAAGTC
		R: TCAGCGCTCAGTCACAAAC
	*nkcc*1*b*	F: CGCAGAGACCGTCGTTGAGATG
		R: CAGCAGGATGAACAGGAGGACAATC
	*nkcc*2	F: ATCCTACGCCAAGTCTCCAG
		R: GCAGCCCACCAGTTGATAA
原位杂交探针 ISH probe sequences	*nkcc*1*a*	F: CCCAGGCTCTGACCTACCA
		R: AATCAGCGTCAGAGTCTTTAC
	*ncc*2	F: CTCATCCCTCCCAGTCCAGA
		R: ACTTTAGGGGCGGAAACGAG

固定好的花鲈鳃组织于电脑程控组织脱水机 (PPDT-12C) 中脱水、浸蜡，而后进行石蜡包埋。用 LEICA-RM206 切片机进行切片，切片厚度为 7 μm，40 °C 水浴展片后置于防脱载玻片上，37 °C 烘箱过夜烘干。烘干后的组织切片分别于二甲苯和梯度乙醇中脱蜡、复水，使用合成的探针进行预杂交、杂交实验，利用 NBT/BCIP 显色液 (Roche Diagnostics，德国) 进行显色。梯度乙醇脱水和二甲苯处理后，中性树胶封片，自然晾干后使用显微镜 (OLYMPUS BX53) 拍照观察。

2　结果

2.1　花鲈 *ncc* 基因的鉴定及序列分析

在花鲈中共鉴定得到 2 个 *ncc* 基因，即 *ncc*1 和 *ncc*2。*ncc*1 编码区长度为 2 691 bp，编码 896 个氨基酸，预测蛋白分子量为 98.07 ku，等电点为 8.57。*ncc*2 基因编码序列 (CDS) 编码区长度为 3 120 bp，编码 1 039 个氨基酸，预测蛋白分子量为 116.06 ku，等电点 5.90。花鲈 *ncc*1、*ncc*2 基因 cDNA 序列已经提交到 GenBank，登录号为 OP

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

004349-OP004350。

2.2　氨基酸序列比对及同源性分析

将预测的花鲈 NCC1 氨基酸序列与其他几种脊椎动物进行同源比对，结果如图 1 所示，花鲈 NCC1 与欧洲鲈的同源性最高为 85%，其次是底鳉80%，与其他硬骨鱼类的同源性为 73%~79%，与高等脊椎动物的同源性较低为 57%。预测的花鲈 NCC1 蛋白含有 10 个相对保守的跨膜螺旋区及 5 个 N-糖基化位点，其中有 3 个位点 (N1、N3、N5) 在脊椎动物中高度保守，N2 和 N4 两个位点只在硬骨鱼类中保守，N1 位于跨膜螺旋区 (图 1)。其预测的蛋白结构如图 2-a 所示。将预测的花鲈 NCC2 氨基酸序列与其他物种进行同源比对，结果显示，花鲈 NCC2 与日本青鳉NCC2 的两个亚型同源性最高为 81%，与斑马鱼 NCC2 各个亚型

图 1　花鲈与其他物种 NCC1 氨基酸序列的多重比对

图中黑色框标注的 TM1～TM10 代表跨膜螺旋区，N1～N5 代表糖基化位点；红色区域为完全相同区域，蓝色框为较高相似区域。

Fig. 1　Multiple alignment comparisons of the NCC1 amino acid sequences of *L. maculatus* with other species

The black frame marked TM1-TM10 represents the transmembrane helical region, and N1-N5 represent the N-glycosylation sites; the red domains are identical domains, and the blue boxes are highly similar domains.

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

之间的同源性为 60~68%，与高等脊椎动物的同源性为 58%(图 3)。而花鲈 NCC2 蛋白含有 11 个较为保守的跨膜螺旋区及 6 个 N-糖基化位点，其中有 3 个位点 (N1、N4、N5) 在脊椎动物中高度保守，另外 3 个位点 (N2、N3、N6) 仅在硬骨鱼类中高度保守，N1 和 N5 位于跨膜螺旋区 (图 3)。其预测的蛋白结构如图 2-b 所示。

2.3　系统进化分析

将其他几种脊椎动物的 NCC 氨基酸序列与花鲈 NCC 氨基酸序列一起构建系统进化树，结果显示，高等脊椎动物 NCC 聚成一枝，随后与硬骨鱼类 NCC1 聚为一枝，另一枝由硬骨鱼类 NCC2 组成，该聚类结果进一步验证了花鲈 *ncc* 基因命名的准确性 (图 4)。

2.4　*ncc* 和 *nkcc* 在海、淡水花鲈鳃组织中的表达水平分析

通过 qRT-PCR 对 *ncc*1、*ncc*2 在海、淡水花鲈鳃中的表达模式进行检测。结果显示，*ncc*1 在海水 (SW)、淡水 (FW) 花鲈鳃中的表达量无显著差异，而 *ncc*2 在淡水鳃组织中的表达量显著高于海水鳃组织的表达量，约为 SW 的 3.22 倍 (图 5-a)。

课题组前期已经鉴定出 3 个花鲈的 *nkcc* 基因 (*nkcc*1*a*、*nkcc*1*b* 和 *nkcc*2)[20]。本实验通过 qRT-PCR 对 *nkcc*1*a*、*nkcc*1*b* 和 *nkcc*2 在海、淡水花鲈鳃中的表达模式进行检测。结果显示，*nkcc*1*b* 和 *nkcc*2 在海水、淡水花鲈鳃中的表达量无显著差异，而 *nkcc*1*a* 在海水鳃组织中的表达量显著高于淡水鳃组织中的表达量，约为 FW 的 2.13 倍 (图 5-b)，这与之前的研究基本一致[20]。以上结果表明，花鲈鳃组织中的 *ncc*2 与 *nkcc*1*a* 分别在适应淡水、海水的渗透调节过程中发挥重要作用。

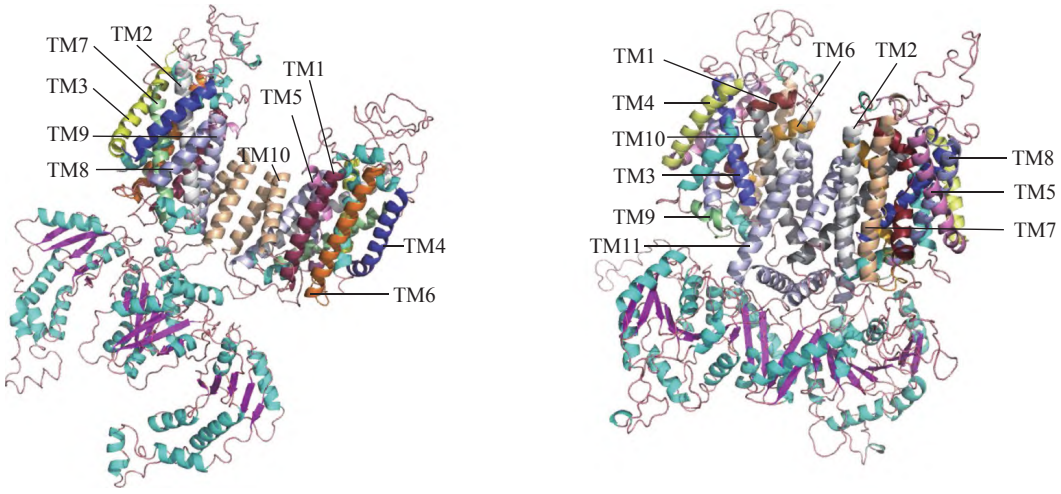
2.5　花鲈 *ncc*2、*nkcc*1*a* 在盐度驯化中的表达量分析

为进一步探究 *ncc*2、*nkcc*1*a* 在海水、淡水驯化中过程中的表达模式，对花鲈在驯化中不同时间点的鳃组织进行 qRT-PCR 检测。在海水驯化 (FW-SW) 过程中，*ncc*2 的表达量呈逐渐下调的趋势，由淡水转入海水后的 1、3、7 d，*ncc*2 的表达量分别下调至 0 h 的 66.10%、51.60% 与 37.95% (图 6-a)。相反，在整个淡水驯化 (SW-FW) 过程中，*ncc*2 的表达量呈逐渐上调的趋势，由海水转入淡水后的 1、3、7 d，*ncc*2 的表达量分别上调为 0 h 的 1.58 倍、2.02 倍与 2.99 倍。

与之相反，整个海水驯化过程中，*nkcc*1*a* 的表达量呈逐渐上调趋势，由淡水转入海水后的 1、3、7 d，*nkcc*1*a* 的表达量分别上调为 0 h 的 1.81 倍、1.83 倍及 2.13 倍 (图 6-b)。相反在整个淡水驯化过程中，*nkcc*1*a* 的表达量呈逐渐下调趋势，由海水转入淡水后的 1、3、7 d，*nkcc*1*a* 的表达量分别下调至 0 h 的 63.50%、46.70%、51.10%。

2.6　花鲈 *ncc*2、*nkcc*1*a* 在海、淡水鳃中的原位杂交定位

通过原位杂交技术对花鲈 *ncc*2、*nkcc*1*a* 在海水、淡水鳃组织中的定位模式进行探究, T7 为反义探针，SP6 为正义探针。结果显示，*ncc*2 主要定位于淡水花鲈鳃组织的相邻鳃小片间的鳃丝上



(a)　(b)

图 2　花鲈 NCC1(a)、NCC2(b) 的预测蛋白三维结构

Fig. 2　Predicted three-dimensional structure of NCC1(a) and NCC2(b) of *L. maculatus*

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

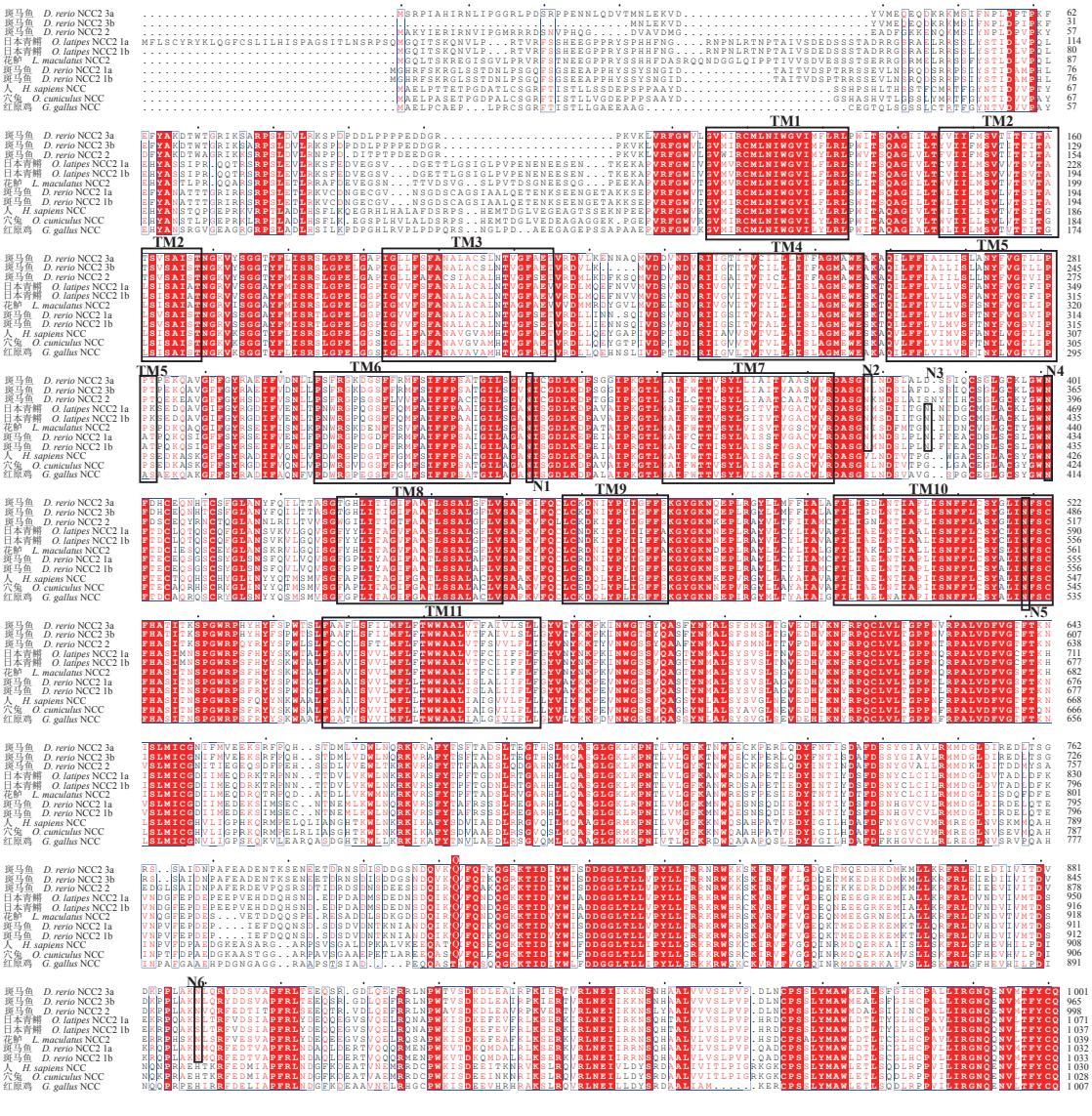


图 3　花鲈与其他物种 NCC2 氨基酸序列的多重比对

图中黑色框标注的 TM1～TM11 代表跨膜螺旋区，N1～N6 代表糖基化位点；红色区域为完全相同区域，蓝色框为较高相似区域。

Fig. 3　Multiple alignment comparisons of the NCC2 amino acid sequences of *L. maculatus* with other species

The black frame marked TM1-TM11 represents the transmembrane helical region, and N1-N6 represent the N-glycosylation sites; the red domains are identical domains, and the blue boxes are highly similar domains.

皮 (图版-1)，而在海水花鲈鳃组织中几乎检测不到阳性信号 (图版-3)；*nkcc1a* 主要定位于海水花鲈鳃组织的相邻鳃小片间的鳃丝上皮 (图版-7)，在淡水花鲈鳃组织中鳃小片底部上皮中仅检测到少量的表达 (图版-5)。结果表明，*ncc2*、*nkcc1a* 分别编码淡水、海水花鲈鳃中关键的 Na^+及 Cl^-离子协同转运蛋白亚型。

3　讨论

本研究首先从花鲈中鉴定出 *ncc1* 和 *ncc2* 基因，通过系统进化分析确定其命名的准确性。多物种的氨基酸序列对比结果表明该基因具有较高的保守性。蛋白结构分析显示，预测的花鲈 NCC 蛋白呈现二聚体结构，结合非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 中的研究结果，NCC 蛋白可能通过形成同源二聚体的方式发挥作用[21-22]。同时，预测的花鲈 NCC1、NCC2 蛋白中存在硬骨鱼中高度保守的糖基化位点 (图 1，图 3)，这些位点对 *ncc* 的表达及其功能的发挥至关重要[23]。氯化物的亲和力修饰残基位于 TM1-7 区域 (图 3) 内[24]，表明该区域可能在 NCC2 蛋白发挥 Cl^-的摄取功能中起到重要作用。

除此之外，qRT-PCR 的结果显示，在花鲈适

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

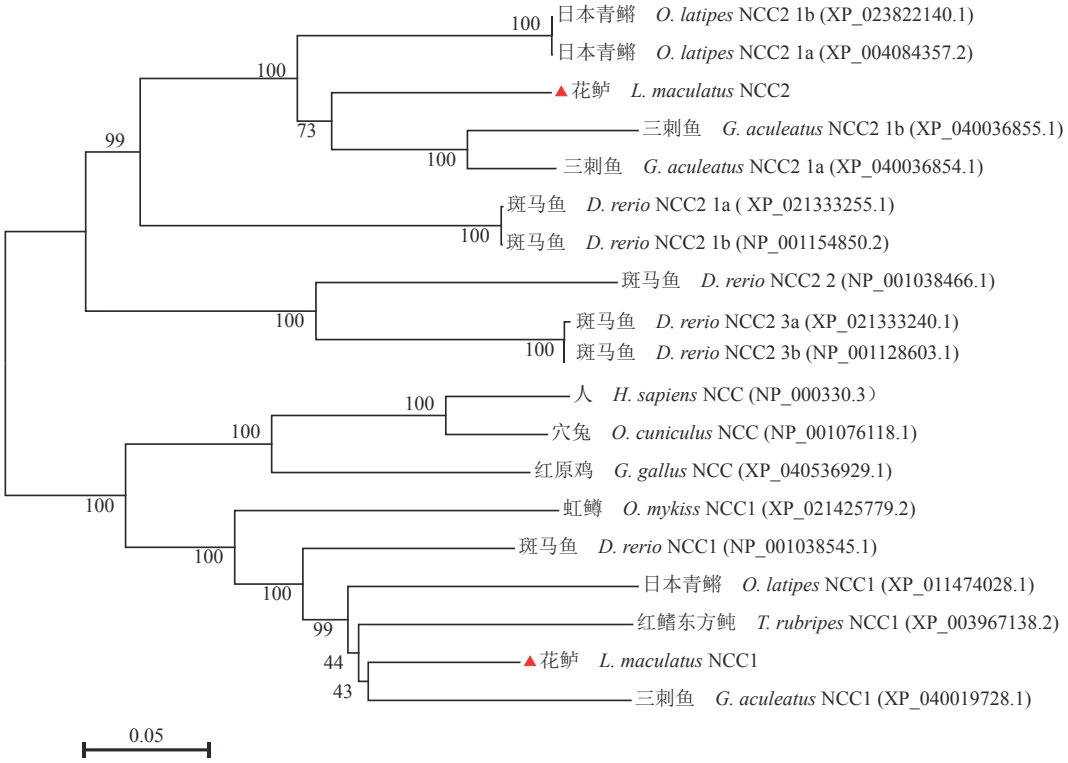


图 4　NCC 氨基酸序列构建的系统发育树

图中用红色三角形标注花鲈在系统进化树中的位置。

Fig. 4　Phylogenetic tree of NCC amino acid sequences

Red triangles are used to mark the NCC amino acid sequences of *L. maculatus* in the phylogenetic tree.

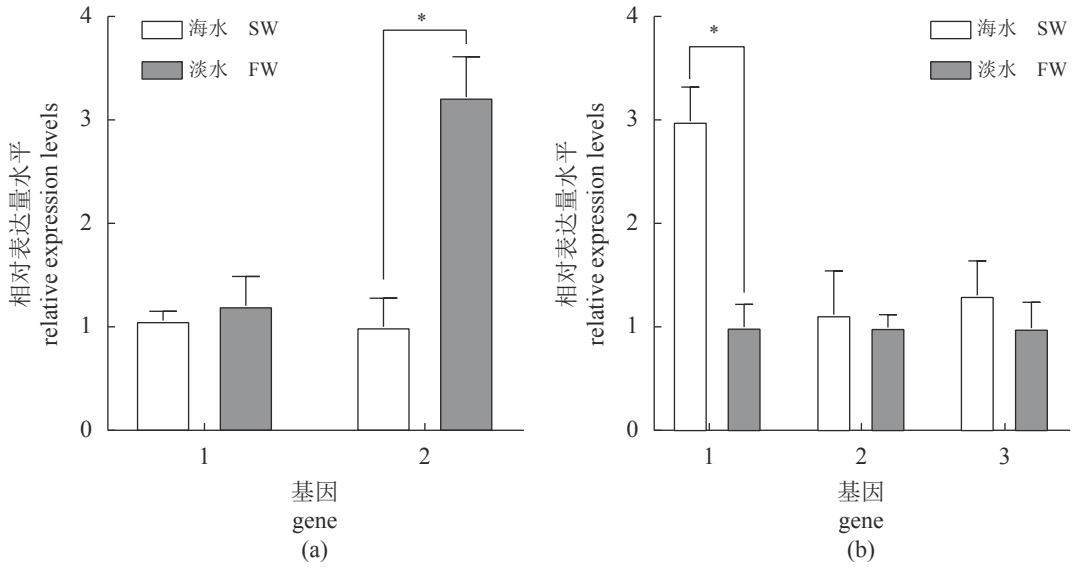


图 5　花鲈 *ncc* (a)、*nkcc* (b) 基因在海、淡水鳃组织中的相对表达水平

(a) 1. *ncc*1，2. *ncc*2， (b) 1. *nkcc*1*a*，2. *nkcc*1*b*，3. *nkcc*2；*表示差异显著，$P<0.05$。

Fig. 5　Relative expression levels of *ncc* (a), *nkcc* (b) genes in seawater and freshwater gill tissues of *L. maculatus*

(a) 1. *ncc*1, 2. *ncc*2, (b) 1. *nkcc*1*a*, 2. *nkcc*1*b*, 3. *nkcc*2; * indicates significant difference, $P < 0.05$.

应海淡水环境变化时，*ncc*1 在鳃中的表达量没有显著变化，而 *ncc*2 在淡水鳃组织中的表达量显著高于海水 (图 5)。这与在欧洲鲈中的研究一致，相对于海水组，淡水组花鲈鳃组织中 *ncc*1 的表达不

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

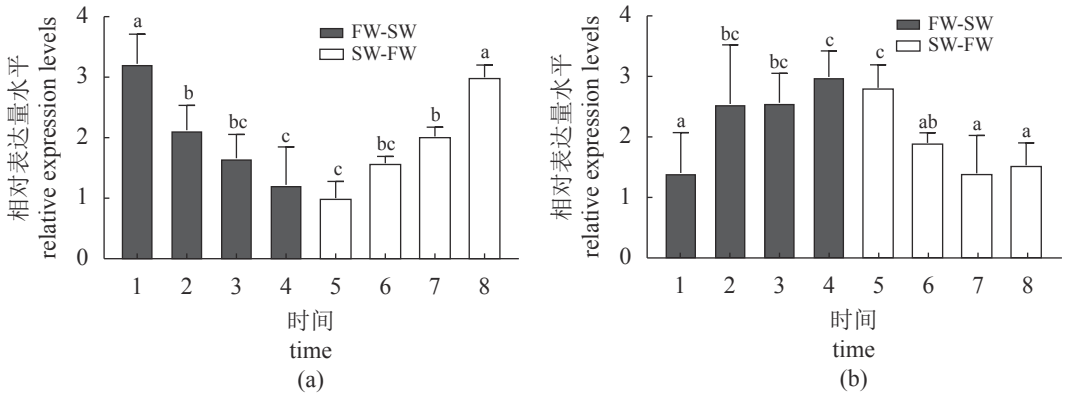


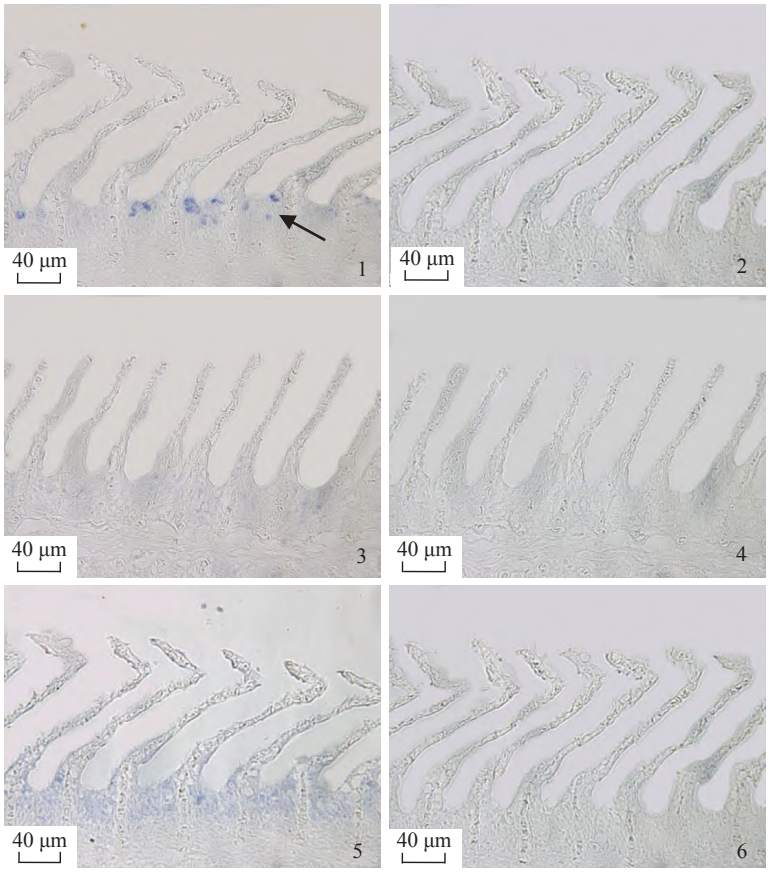
图 6　花鲈鳃组织中的 *ncc*2 (a)、*nkcc*1*a* (b) 在盐度驯化过程中的相对表达水平

不同字母代表显著性差异，$P<0.05$。

Fig. 6　Relative expression levels of *ncc*2 (a) and *nkcc*1*a* (b) genes in gill tissues of *L. maculatus* during salinity adaptation

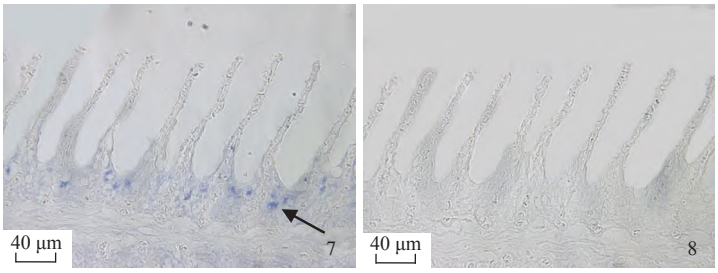
(a) 1. FW 0 h, 2. FW-SW 1 d, 3. FW-SW 3 d, 4. FW-SW 7 d, 5. SW 0 h, 6. SW-FW 1 d, 7. SW-FW 3 d, 8. SW-FW 7 d. (b) 1. FW 0 h, 2. FW-SW 1 d, 3. FW-SW 3 d, 4. FW-SW 7 d, 5. SW 0 h, 6. SW-FW 1 d, 7. SW-FW 3 d, 8. SW-FW 7 d; different letters represent significant difference, $P<0.05$.

存在显著差异，*ncc*2 则显著高于海水组[9]。这表明 *ncc*1 在花鲈鳃组织渗透调节功能中贡献较少，而 *ncc*2 作为主要的亚型起到离子运输的作用。同时，*ncc*2 的表达量在淡水适应过程中逐渐上调，海水适应过程中则逐渐下调 (图 6-a)，这与在多种硬骨鱼类中的研究结果一致，如暗纹东方鲀、红鳍东方鲀[7]、欧洲鲈[9] 、莫桑比克罗非鱼[15] 等，表明低渗环境持续激活 *ncc*2 的表达，从而诱导上皮细胞顶端产生 NCC2 以摄取 Na^+和 Cl^-，维持机体离子平衡。而 *nkcc*1*a* 基因表达量的变化趋势则



(图版　Plate)

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



图版　花鲈 *ncc*2、*nkcc*1*a* 在海、淡水鳃组织中的原位杂交定位结果

1、3. *ncc*2 反义探针在淡水、海水鳃组织中的定位结果；5、7. *nkcc*1*a* 反义探针在淡水、海水鳃组织中的定位结果，2、4、6、8. 阴性对照；黑色箭头所示为部分阳性信号。

Plate　Situ hybridization localization results of *ncc*2 and *nkcc*1*a* genes in gills of *L. maculatus* in seawater and freshwater, respectively

1, 3. the in situ hybridization results of antisense probes of *ncc*2 gene in gill tissues of *L. maculatus* in freshwater and seawater, respectively; 5, 7. the in situ hybridization results of antisense probes of *nkcc*1*a* gene in gill tissues of *L. maculatus* in freshwater and seawater, respectively; 2, 4, 6 and 8. negative controls; the black arrow indicates some positive signals.

恰恰相反 (图 6-b)，海水的高浓度离子环境促使花鲈鳃组织产生 NKCC1a 分泌 Na^+和 Cl^-，维持离子稳态，这种海水适应过程中在鳃组织中的表达上升的趋势在欧洲鳗鲡和莫桑比克罗非鱼中同样存在[10, 25]。此外，*ncc* 和 *nkcc* 还常作为离子细胞的标志物存在，在不同的离子细胞类型中表达。淡水驯化的罗非鱼鳃中的离子细胞群顶端主要由顶端表达 NHE3(Na^+/H^+交换体-3) 和 NCC 的细胞组成，实现离子吸收的机能[26]。同样的，在淡水驯化的欧洲鲈中，鳃的离子细胞顶端表达的 NCC2 与基底外侧 NKA(Na^+/K^+-ATPase) 耦合以吸收 Na^+和 Cl^-[2, 12]。而海水驯化的莫桑比克罗非鱼主要由鳃的离子细胞基底外侧的 NKCC1a 进行离子分泌[26]，对底鳉和大西洋鲑鱼的研究也表明 NKCC1 存在于鳃中离子细胞的基底外侧表面[27-28]。本研究中原位杂交的结果也显示 *ncc*2 和 *nkcc*1*a* 分别主要定位于淡水和海水花鲈鳃组织的相邻鳃小片间的鳃丝上皮 (图版)。这些结果表明在花鲈适应低渗环境时，NCC2 参与了 Na^+和 Cl^-的摄取，维持在淡水环境中的离子平衡，而 NKCC1a 参与 Na^+和 Cl^-的分泌，对花鲈适应高渗环境至关重要。综上所述， NCC2、NKCC1a 可分别作为淡水和海水型离子细胞的标志物，在花鲈的鳃组织渗透调节过程中发挥着重要作用，但其具体作用机制还需要进一步探索研究。

（作者声明本文无实际或潜在的利益冲突）

参考文献 (References)：

[1] Blondeau-Bidet E, Hiroi J, Lorin-Nebel C. Ion uptake pathways in European sea bass *Dicentrarchus labrax*[J]. Gene, 2019, 692: 126-137.

[2] 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.

[3] Thibaut L H, Emilie F, Béatrice C, *et al*. Are European sea bass as euryhaline as expected? Intraspecific variation in freshwater tolerance[J]. Marine Biology, 2019, 166(8): 102.

[4] Arroyo J P, Kahle K T, Gamba G. The SLC12 family of electroneutral cation-coupled chloride cotransporters[J]. Molecular Aspects of Medicine, 2013, 34(2-3): 288-298.

[5] Azlan N F M, Koeners M P, Zhang J W. Regulatory control of the Na-Cl co-transporter NCC and its therapeutic potential for hypertension[J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2021, 11(5): 1117-1128.

[6] Virtanen M A, Uvarov P, Hübner C A, *et al*. NKCC1, an elusive molecular target in brain development: making sense of the existing data[J]. Cells, 2020, 9(12): 2607.

[7] Kato A, Muro T, Kimura Y, *et al*. Differential expression of Na^+-Cl^- cotransporter and Na^+-K^+-Cl^- cotransporter 2 in the distal nephrons of euryhaline and seawater pufferfishes[J]. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2011, 300(2): R284-R297.

[8] Breves J P, Nelson N N, Koltenyuk V, *et al*. Enhanced expression of *ncc*1 and *clc*2*c* in the kidney and urinary

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

bladder accompanies freshwater acclimation in Mozambique tilapia[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2021, 260: 111021.

[9] L'Honoré T, Farcy E, Blondeau-Bidet E, *et al*. Inter-individual variability in freshwater tolerance is related to transcript level differences in gill and posterior kidney of European sea bass[J]. Gene, 2020, 741: 144547.

[10] 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.

[11] Inokuchi M, Nakamura M, Miyanishi H, *et al*. Functional classification of gill ionocytes and spatiotemporal changes in their distribution after transfer from seawater to freshwater in Japanese seabass[J]. Journal of Experimental Biology, 2017, 220(24): 4720-4732.

[12] Kumai Y, Perry S F. Mechanisms and regulation of Na^+ uptake by freshwater fish[J]. Respiratory Physiology & Neurobiology, 2012, 184(3): 249-256.

[13] Tang C H, Lee T H. Ion-deficient environment induces the expression of basolateral chloride channel, ClC-3-like protein, in gill mitochondrion-rich cells for chloride uptake of the tilapia *Oreochromis mossambicus*[J]. Physiological and Biochemical Zoology, 2011, 84(1): 54-67.

[14] Shaughnessy C A, Breves J P. Molecular mechanisms of Cl^- transport in fishes: new insights and their evolutionary context[J]. Journal of Experimental Zoology Part A:Ecological and Integrative Physiology, 2021, 335(2): 207-216.

[15] Li Z J, Lui E Y, Wilson J M, *et al*. Expression of key ion transporters in the gill and esophageal-gastrointestinal tract of euryhaline Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* acclimated to fresh water, seawater and hypersaline water[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e87591.

[16] 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.

[17] Zhao C P, Guo H Y, Zhu K C, *et al*. Molecular characterization of $Na^+/K^+/2Cl^-$ 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.

[18] Masroor W, Farcy E, Blondeau-Bidet E, *et al*. Effect of salinity and temperature on the expression of genes involved in branchial ion transport processes in European sea bass[J]. Journal of Thermal Biology, 2019, 85: 102422.

[19] Wang H L, Wen H S, Li Y, *et al*. Evaluation of potential reference genes for quantitative RT-PCR analysis in spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) under normal and salinity stress conditions[J]. PeerJ, 2018, 6: e5631.

[20] Zhang K Q, Zhang X Y, Wen H S, *et al*. Spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) *cftr, nkcc*1*a, nkcc*1*b* and *nkcc*2: genome-wide identification, characterization and expression analysis under salinity stress[J]. Journal of Ocean University of China, 2019, 18(6): 1470-1480.

[21] de Jong J C, Willems P H G M, Mooren F J M, *et al*. The structural unit of the thiazide-sensitive NaCl cotransporter is a homodimer[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(27): 24302-24307.

[22] Gamba G. The thiazide-sensitive Na^+-Cl^- cotransporter: molecular biology, functional properties, and regulation by WNKs[J]. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2009, 297(4): F838-F848.

[23] Hebert S C, Mount D B, Gamba G. Molecular physiology of cation-coupled Cl^- cotransport: the SLC12 family[J]. Pflügers Archiv, 2004, 447(5): 580-593.

[24] Moreno E, San Cristóbal P, Rivera M, *et al*. Affinity-defining domains in the Na-Cl cotransporter: a different location for Cl^- and thiazide binding[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(25): 17266-17275.

[25] Cutler C P, Cramb G. Two isoforms of the $Na^+/K^+/2Cl^-$ cotransporter are expressed in the European eel (*Anguilla anguilla*)[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2002, 1566(1-2): 92-103.

[26] 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.

[27] Marshall W S, Lynch E M, Cozzi R R F. Redistribution

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

of immunofluorescence of CFTR anion channel and NKCC cotransporter in chloride cells during adaptation of the killifish *Fundulus heteroclitus* to sea water[J]. Journal of Experimental Biology, 2002, 205(9): 1265-1273.

[28] Pelis R M, Zydlewski J, Mccormick S D. Gill Na^+-K^+-$2Cl^-$ cotransporter abundance and location in Atlantic salmon: effects of seawater and smolting[J]. American Journal of Physiology- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2001, 280(6): R1844-R1852.

Expression and localization analysis of *ncc* and *nkcc* genes in gill tissues of *Lateolabrax maculatus* during salinity adaptation

WANG Zhiyuan , LI Jinku , LI Yun , WANG Lingyu , QI Xin , LI Jifang , WEN Haishen *

(*Key Laboratory of Mariculture*, *MOE*, *Fisheries College*, *Ocean University of China*, *Qingdao* 266603, *China*)

Abstract: The *ncc* gene encodes Na^+-Cl^- synergistic transporter, while the *nkcc* gene encodes Na^+-K^+-$2Cl^-$ synergistic transporter. Both of them belong to the solute carrier family12 (SLC12), and play key roles in the osmotic regulation mechanism of fish. In order to explore the roles of *ncc* and *nkcc* in the osmotic regulation of spotted sea bass in this study, whole genome identification, multiple sequence alignment, phylogenetic tree construction and protein structure prediction were performed to identify the *ncc* genes of spotted sea bass and analyse their sequence structure. The expression levels of *ncc* and *nkcc* genes in gill tissues were detected by qRT-PCR, and the sites of expression of *ncc*2 and *nkcc*1*a* in gills of spotted sea bass in freshwater and seawater were determined by in situ hybridization (ISH). The results showed that two *ncc* genes, *ncc*1 and *ncc*2, were identified in spotted sea bass. Their CDSs length were 2 691 and 3 120 bp, encoding 896 and 1 039 amino acids, respectively. The expression of *ncc*2 gene in gill tissue of freshwater fish was significantly higher than that in seawater, while the expression of *nkcc*1*a* in gill tissue of seawater fish was significantly higher than that in freshwater. Moreover, the expression of *ncc*2 in gill was gradually up-regulated during freshwater adaptation, while the expression of *nkcc1a* was gradually down-regulated. Meanwhile, the opposite expression trend was showed in seawater adaptation process. In addition, the ISH results showed that *ncc*2 and *nkcc*1*a* genes were located in the epithelium between adjacent gill lamellae in freshwater and seawater, respectively. The above results indicate that *ncc*2 and *nkcc*1*a* genes encode important Na^+-Cl^- transporter subtypes in the gills of spotted sea bass in freshwater and seawater, respectively. They can be used as specific markers to distinguish the spotted sea bass in freshwater and seawater, and play an important role in osmotic regulation and salinity adaptation.

Key words: *Lateolabrax maculatus*; *ncc*; *nkcc*; gill; osmotic regulation

Corresponding author: WEN Haishen. E-mail: wenhaishen@ouc.edu.cn

Funding projects: National Key R&D Program of China (2020YFD0900204); National Natural Science Foundation of China (32072947); Modern Agricultural Industry Technology System-National Marine Fish Industry Technology System (CARS-47)

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net