萨罗罗非鱼 NKCC1α 基因 cDNA 克隆及 mRNA 组织表达差异

范武江, 李思发*

(上海海洋大学 农业部水产种质资源与利用重点开放实验室, 上海 201306)

摘要:在鱼类适应盐度变化的过程中,鱼鳃是进行渗透调节的主要器官,NKCC1α基因是保持鳃丝氯细胞渗透 平衡的关键离子转运器,以1Na⁺:1K⁺:2C1⁻的比例进行电中性转运。萨罗罗非鱼(*Sarotherodon melanothern*)是耐盐 强的广盐性鱼类之一。该文通过快速扩增 cDNA 末端的方法,首次从萨罗罗非鱼鳃丝组织中分离出 NKCC1α 基 因 cDNA 全长序列,其开放阅读框(ORF)包含1151 个氨基酸残基。多重比对和聚类分析结果表明,该试验获得的 基因序列与莫桑比克罗非鱼、鲑及鳗鲡的 NKCC1α 最为相似,其中萨罗罗非鱼与莫桑比克罗非鱼相似性最高 (99%)。预测萨罗罗非鱼 NKCC1α蛋白质二级结构包含10个跨膜螺旋,这些跨膜螺旋的氨基酸序列及其布局都非 常保守;应用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测鳃、肝、肠、肾 NKCC1α mRNA 相对含量,这4种组织间差异显 著;盐度显著影响 NKCC1α在鳃组织中的表达,在136 盐度下 NKCC1α mRNA 相对表达水平为0 盐度下的4.9 倍, 差异极显著 (*P*<0.001),显示 NKCC1α 基因与萨罗罗非鱼的耐盐性能密切相关。

关键词: 萨罗罗非鱼; NKCC1α; 耐盐; 渗透调节; qRT-PCR 中图分类号: Q785; Q959.499; Q516 文献标志码: A 文章编号: 0254-5853-(2010)06-0601-09

cDNA cloning and tissue-differential expression of Na⁺/K⁺/2Cl⁻cotransporter 1-α isoform in *Sarotherodon melanotheron*

FAN Wu-Jiang, LI Si-Fa*

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Utilization Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The gills are the major apparatus for osmoregulation in fish to acclimate the changes of salinities. $Na^+/K^+/2Cl^-$ cotransporter 1- α (NKCC1 α) is one of the key ion cotransporter locoalized in gill chloride cells which has been associated with the maintence of osmotic homeostasis. The transport process mediated by NKCC1 α is characterized by electroneutrality with a stoichiometry of 1Na:1K:2Cl. *Sarotherodon melanotheron* is one of the most euryhaline teleosts able to withstand variations in environmental salinity ranging from freshwater to hyper-saline waters. In this study, the reverse transcription-polymerase chain reaction and rapid amplification of 3' and 5'cDNA ends methods were used to identify the full cDNA of the NKCC1 α with an Open Reading Frame which contains 1 151aa of *S.melanotheron*. The amino acid multiple alignment and phylogenetic analysis showed that this isoform is more similar with isoforms in *Oreochromis mossambicus, Salmo salar* and *Anguilla anguilla*, and there is the highest homologous of 99% between *Sarotherodon* and *Mossambique*. The predicted protein secondly structure of NKCC1 α contains 10 transmenbrane domains, which were highly conserved in sequences and locoalization sites relatively to other species. The quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) assay was developed to estimate the mRNA expression levels in gill, liver, intestine and kidney in freshwater, the results showed a tissue-specific model. Furthermore, the sanility significantly affects the relative expression level of NKCC1 α is closely related to the salt tolerance in *S.melanotheron*.

Key words: Sarotherodon melanotheron; NKCC1a; Salt-tolerance; Osmoregulation; qRT-PCR

萨罗罗非鱼(Sarotherodon melanothern), 属鲈

形目(Perciformes)丽鱼科(Cichlidae), 原产西非海岸

收稿日期: 2010-09-14; 接受日期: 2010-11-18

基金项目:罗非鱼行业技术体系(nycytx-48-3); 公益性行业(农业)科研专项:罗非鱼大规格鱼种规模化培育与生态养殖技术研究(nyhyzx07-044-01); 国家科技支撑计划专题: 耐盐罗非鱼新品种选育(2006BAD01A1203)

*通讯作者(Corresponding author), E-mail: sfli@shou.edu.cn

第一作者简介:范武江,博士在读,研究方向 水产动物种质资源与种苗工程,E-mail:fanwujiang@hotmail.com

泻湖,具有极强的耐盐性,能够适应淡水及盐度达 130的高盐度咸水(Ouattara et al, 2009), 是最耐盐的 罗非鱼种类之一(Jennings & Williams, 1992)。对于 鱼类来说,为了适应水体环境盐度的改变,必须保 持体内外离子浓度的一种动态平衡, 鱼鳃是鱼类维 持渗透压平衡的主要器官, 在鳃上皮细胞中含有氯 细胞, 与海水条件下离子分泌密切相关。罗非鱼通 过改变氯细胞的形态、数量及体积来应对水体盐度 的变化(Kültz et al, 1992), 氯细胞中含有多种离子 转运器, 其中 Na⁺-K⁺-ATPase(NKA)、Na⁺-K⁺-2Cl⁻ 联合转运体(NKCC) 和 Cl-通道(CFTR)是维持渗透 平衡的最重要的 3 种离子转运器 (Sakamoto et al, 2001; Evans et al, 2005; Hiroi et al, 2005)。免疫组织 化学实验表明(Ouattara et al, 2009), NKA、NKCC 和 CFTR 在萨罗罗非鱼鳃上皮氯细胞中的含量随着盐 度的升高而显著升高;不仅仅在罗非鱼,其他广盐 性鱼类中, NKA (Mancera & McCormick, 2000; Sangiao-Alvarellos et al, 2005; Bystriansky et al, 2006)、CFTR(Singer et al, 1998; Scott et al, 2004)也 具有类似的与水体盐度呈正相关的表达趋势。

NKCC 是一类电中性的跨膜转运蛋白,以 1Na⁺:1K⁺:2Cl⁻的比例进行离子的跨膜运输,包括 NKCC1 和 NKCC2 两种基因亚型 (Hebert et al, 2004)、NKCC2 分布在肾脏组织、如肾升支粗段细 胞中(Haas & Forbush, 1998), 而 NKCC1 在动物的 各种组织中都有表达。现已知道、鳗鲡(Anguilla anguilla)(Cutler & Cramb, 2002)、莫桑比克罗非鱼 (Oreochromis mossambicus)NKCC1 编码 α、β 两种 不同的基因亚型,其中NKCC1β主要分布在脑细胞, 而 NKCC1α 在大多数组织中存在, 尤其在鳃中高度 表达, 与鳃丝氯细胞盐分泌活动密切相关(Cutler & Cramb, 2008); 在不同盐度水体中, 莫桑比克罗非 鱼鳃NKCC1α的表达量差异显著,30%和100%海水 条件下表达量分别比淡水条件下高出 4 倍和 7 倍 (Inokuchi et al, 2008)。对于萨罗罗非鱼,本课题组研 究了 IGF-Iβ 基因的结构及该基因与渗透调节的相 关关系,揭示萨罗罗非鱼 IGF-Iβ 基因的分子结构与 另外两种耐盐性较强的罗非鱼保持一致(Fan et al, 2010)。但在 NKCC1α 基因方面, 国内外尚未有相关 报道。本文运用 RACE 技术,首次克隆了萨罗罗非 鱼 NKCC1α 基因 cDNA 全长序列, 并采用荧光实时 定量 PCR 方法分析 NKCC1a 基因在不同组织中的 差异表达,对0盐度和136盐度下鳃NKCC1基因

的 mRNA 表达的水平作一初步探讨。

1 材料和方法

1.1 实验用鱼及处理

萨罗罗非鱼(以下简称萨罗),取自河北中捷国 家级罗非鱼良种场。取淡水条件下鳃、肝、肠、肾 组织,用灭菌 DEPC 水清洗后,迅速浸入 10 倍体积 (m/v) RNAstore 液中,4℃暂存一昼夜,再转入-20℃ 长期保存备用。另参照 Lemarié 等 (2004) 的实验 方法,进行慢性耐盐致死实验,在最高盐度下对最 后存活的 5 尾实验鱼按同样方法取鳃组织保存备 用。

1.2 试剂药品

RNAstore 保存液、Quant Reverse Transcriptase 逆转录酶及荧光定量试剂盒(Realmastermix SYBR I) 购自北京天根生化科技有限公司。Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司。PrimeScriptTM RT-PCR Kit、 pMD19TM-T Vector 及 3'-Full RACE Core Set Ver.2.0 试剂盒由 Takara 公司提供。SMART RACE cDNA Amplification Kit 和 Advantage II PCR Enzyme System 购自 Clontech 公司。胶回收使用博日公司 的 Bio Spin Gel Extraction Kit 试剂盒, X-gal、IPTG、 氨苄青霉素为上海生物工程公司产品。引物合成与 DNA 测序由上海生工生物工程公司完成。

1.3 RNA 提取及 NKCC1α 基因克隆

总 RNA 的提取按照总 RNA 提取试剂盒 Trizol 说明书的方法进行, 检测后-80℃保存备用。参照 Genebank 中的莫桑比克罗非鱼 (AY513737) NKCC1 α 基因 cDNA 序列, 应用 Primer Primier 5.0 软件设计引物 (表 1); 用 Oligo6.0 检验引物优劣, BLASTX 验证引物特异性和惟一性。

使用 PrimeScriptTM RTase 逆转录合成 cDNA 第 一链,反应体系参照试剂盒说明书。应用 P1、P2 和 P3 三对引物进行 PCR 扩增 NKCC1 的 cds 片段, 预计产物长度分别为 1 840、1 570 和 1 114 bp。反 应条件: 94℃ 3 min; 30 个循环 94℃ 30 s, 52~ 63℃ 30 s, 72℃ 1 min/1 kb; 再 72℃ 10 min; 3'RACE cDNA 第一链由 M-MLV 酶逆转录合成,用 3'GSP1 和 3'GSP2 引物分别与 3'RACE OUT 和 3'RACE IN 引物进行巢式 PCR 扩增,获得 NKCC1α 基因的 3'端序列;用 SMART RACE cDNA Amplification Kit 中的 Oligo (dT)引物,按照说明书 在 MMLV 酶作用下合成 5'RACE cDNA 第一链,再 用 Advantage II Polymerase mix 与试剂盒中的 5'UPM 引物和 5'NUP 引物结合 5'GSP1、5'GSP2 进 行 PCR 扩增,获得 NKCC1α 基因 5'端序列。PCR 反应产物经1.2%琼脂糖电泳,Biospin Gel Extraction Kit 回收目的片段;连接 pMD19-T 载体,4℃过夜, 转化 DH5a 感受态细胞,菌液涂布在含有 X-gal 底 物、IPTG 诱导物和氨苄青霉素(1‰ Amp⁺)的固体 培养基平板,利用蓝白斑进行筛选,挑选白色单一 菌落,LB(1‰ Amp⁺)液体培养基中 37℃ 250 r/m 过 夜;菌液经 PCR 鉴定,随机挑选 5 个阳性克隆的菌 液委托上海生工测序。应用 Vector NTI8.0、 BioEdit7.0、MEGA4.0、DNAMAN 等生物软件对测 序结果进行分析。

1.4 氨基酸序列分析

将测序所得到的 cDNA 序列用 NCBI 网站 (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) BLASTP 软件 进行同源基因氨基酸序列的搜索;开放阅读框 (open reading frame, ORF)氨基酸序列的推断通过软 件 DNAMAN 6.0 完成;氨基酸同源性使用 Clustal X2.0 软件进行分析,理化性质分析在 http:// www.expasy.org/tools/protparam.html 进行;利用网 上资源 SignalP 3.0 Server: http://www.cbs.dtu.dk/ services/SignalP/ 在线预测可能的信号肽及切割位 点;在 PredictProtein: https://www.predictprotein.org 网站在线预测氨基酸的一级和二级结构。

1.5 系统进化分析

用 MEGA 4.0 软件进行 NKCC1 基因的系统发 生分析,根据萨罗与莫桑比克罗非鱼(Oreochromis mossambicus)、鲈(Dicentrarchus labrax, ABB84251)、 大西洋鲑(Salmo salar, ABI74746)、鳗鲡(Anguilla anguilla, CAD31111)、斑马鱼(Danio rerio, ACT52814)、白斑角鲨(Squalus acanthias, AAB60617)、非洲爪蟾 (Xenopus laevis, ABN05233)、家鼠(Mus musculus, NP_033220)、小 鼠(Rat norvegicus, NP_113986)及人(Homo sapiens, NP_001037)的 NKCC1α/β 的 ClustalX 多重比较结 果,构建 Neighbor-Joining 树,以最早分化的模式 动物隐杆秀丽线虫(Caenorhabditis elegans, NP_001076724.1) NKCC1 作为 NJ-树的外类群, Bootstrap 法进行 1 000 次评估。

1.6 qRT-PCR 检测 mRNA 表达差异

应用实时荧光定量 PCR (quantitative real time PCR, qRT-PCR)检测 NKCC1 α 基因在鳃、肝、肠、 肾中的 mRNA 相对表达量。取 1 μ g 总 RNA, 用 Quant Reverse Transcriptase 逆转录酶按照说明书合 成 cDNA 第一链, -20℃保存。根据已经获得的 cDNA 序列设计一对实时定量 PCR 引物 RTPF/PR(表 1), 参照尼罗罗非鱼(EU887951)管家

引物 Primer	引物序列 Sequence	Tm值 Tm(℃)	备注 Note
P1F	5' CTTACTCGTCGTCCTTATCACAG 3'	56.4	cds PCR
P1R	5' TACATTCCTTCCACCGCTTC 3'	57.6	cds PCR
P2F	5' CTGTGATGAGCGAGACGAG 3'	52.0	cds PCR
P2R	5' CAGCCTGGTGAGTTAGCC 3'	53.2	cds PCR
P3F	5'-ATCAGGCTCGCTACCAACGC-3'	62.6	cds PCR
P3R	5'-TTGCCACGCACCAGAAGGAT-3'	63.5	cds PCR
3' `GSP1	5' GAACAGCCCAGCAGTCCAGAAAGAT 3'	65.1	3'RACE
3' GSP2	5' AGATGATATGGAGCAGGAGGCAG 3'	62.4	3'RACE
5' `GSP1	5' TGGAGAGCCCAGTGATGGTTGTC 3'	65.8	5'RACE
5' GSP2	5' CTCCGACAGGGTGGGTCTGGTGAGTTTC 3' `	68.3	5'RACE
RTPF	5' TGTGGAACTTCTGGTTGGTATGGA 3'	63.2	qRT-PCR
RTPR	5' GGCTGTGATAAGGACGACGAGTAAG 3'	63.7	qRT-PCR
β -actin F	5' TGTGATGGTGGGTATGGGT 3'	55.8	qRT-PCR
β -actin R	5' TCGTTGTAGAAGGTGTGAT 3'	54.4	qRT-PCR
3' `RACE OUT	5' ` TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT 3'		*
3'RACE IN	5' CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG 3'		*
5''PM	5'CTAATACGACTCACTATAGGGC3'		*
5' NUP	5'AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT3'		*

表 1 基因克隆、RACE 及 qRT-PCR 的引物 Tab. 1 List of primers used for cDNA cloning, RACE and qRT-PCR

*指示 RACE 通用引物 (Indicates the universal primers for RACE)。

基因β-actin 设计内参引物。采用 SYBR green I 荧光 染料在 iCycler iQ real-time PCR system (Bio-Rad)进 行 PCR 扩增,在 8 联管(Axygen)中分装以下反应体 系: 2.5×Real MasterMix 8 μ L,20×SYBR solution 1 μ L, 正、反向引物(10 μ mol/mL)各 0.4 μ L,模板 cDNA1 μ L, 阴性对照则以等量水代替,补充 RNase free dH₂O 至 20 μ L; PCR 反应条件 95°C 2 min, 40 个循环 94°C 20 s, 55.4°C 20 s, 68°C 15 s;最后在 55~95°C制作熔解曲线。反应结束后,应用 iQ5 RT-PCR 系统中的 GeneExpr 软件在校正表达模式 (Normalized expression, ^ΔCT)下进行相对定量分 析; 另以 0 盐度下鳃 NKCC1α 基因 mRNA 表达量 作为对照组,比较了 136 盐度下表达量变化趋势。 相对表达量以平均值土标准误(Mean±*SE*)表示。

2 结 果

2.1 慢性耐盐试验的结果

通过逐步提高试验组水体盐度,到 136 盐度后 三个试验组总共还有 6 尾存活,死亡率达 94%,且 剩余个体无法长时间地保持正常的游泳姿态。取其 中 5 尾的鳃组织保存备用。整个试验期间,淡水对 照组没有个体死亡。试验结果见图 1。

2.2 NKCC1a 基因 cDNA 克隆

分别以引物 P1、P2、P3 扩增萨罗鳃 cDNA 保 守区, 扩增结果如图 2a 所示。分别回收扩增产物, 克隆测序后, 经 Blast 分析, 与莫桑比克罗非鱼 NKCC1α基因高度相似。用 Vector NTI 8.0 软件拼 接, 获得长 3 470 bp 的 cds 核心序列。根据获得的 序列分别设计 3' RACE 和 5' RACE 基因特异性引物 (GSPs, 表 1), 扩增 NKCC1α 基因的 3' 端和 5' 端, 扩增结果如图 2 b 所示。回收产物, 克隆测序后再 与 cds 核心序列拼接, 得到萨罗 cDNA 编码区全长 序列。萨罗 NKCC1 基因(Genebank 登录号: GU066877)包含 3 456 bp 的开放阅读框(open reading frame, ORF)和 44 bp 的 5'非翻译区(UTR), 及 202 bp 的 3' UTR 序列(图 3、4)。

2.3 NKCC1 基因氨基酸序列分析

使用 DNAMAN6.0 软件推导萨罗 NKCC1 基因 ORF 编码的 1 151 个氨基酸,预测蛋白质的相对分 子质量为 125.58 k,理论等电点为 5.77。在 ORF 的



图 1 萨罗罗非鱼慢性耐盐的试验结果

Fig. 1 Salt-tolerance result of Sarotherodon melanotheron 三个试验组每天提高水体盐度 8。 ★. ★. 实验组; ★.对照。 The salinity increased 8/day in the three replicated treatments. ★. ★. experiments; ★.control.



图 2 NKCC1a 基因 cDNA 扩增结果

Fig. 2 The results of cds PCR of NKCC1α gene M: DNA 相对分子质量标准 DL2 000; Sp1、Sp2、Sp3: 引物 P1、 P2 和 P3 的扩增结果; S3'和 S5': 3' RACE 和 5' RACE 扩增结果。 M: DNA Marker DL2000; Sp1,Sp2 and Sp3: PCR results by P1, P2 and P3,respectively; S3' and S5: 3' RACE and 5' RACE products of NKCC1α precursor cDNA.



图 3 萨罗 NKCC1α 基因核苷酸序列结构示意图及本文使用的 PCR 引物的相对位置 Fig. 3 The primary structure of neucleotide of *Sarotherodon melanotheron* NKCC1α gene and the relative sites of PCR primers in this study

16 181 46 271 76 361451 H T N T Y Y L R T F G H N T I D A V P N I D F Y R Q T A A P TGGGGGGAGAAACTCACCAGACCCACCCTGTCGGAGCTGCACCGATGAGCTGGACCAAGGAACCCTTTGAGGATGGCTTTGCCAACGGTGATG $136 \\ 541$ 166 631 196 721 E L T P A E E A A A K E A A E S K G V V K F G W I K G V L V GCTGCATGTTGAACATTTGGGGTGTGATGCTCTTCATTCGCATGTCCTGGATTGTGGGCCAGGCTGGGATTGCTCTTTCCTGTGTGATCG R C M L N I W G V M L F I R M S W I V G Q A G I A L S C V I TCGCCATGGCTACTGTAGTGACAACCATCACTGGGCTCTCCACCTTGCCATTGCCACCATGGATTTGTAAGGGGAGGATGAAGCATATT 226 811 256 901 286 991 316 1081 346 1171 376 The arrow of the transformation of the transformation of the transformation of the transformatic tr 1261 406 1351 $1351 \\ 436 \\ 1441$ $1441 \\ 466 \\ 1531 \\ 496 \\ 1621 \\ 526 \\ 1711 \\ 556 \\ 1801 \\ 586 \\ 1801$ 1891 616 1981 646 2071 2161 706 2251 736 2341 766 2431 796 2521 826 2611 856 2701 886 2791 916 $\begin{array}{cccccc} \label{eq:constraint} \textbf{A} \label{A$ 2881 946 2971 976 1066 1096 acataaaaaaataattgtcttgcatctcaggaatgaatcactttgcttagctgatgtataagccaaaaagaag

图 4 萨罗 NKCC1α 基因 cDNA 序列及推导的 ORF 氨基酸序列

Fig. 4 cDNA sequence encoding the NKCC1α of black-chin tilapia and the deduced amino acid sequence (LATG) 表示起始密码子, *表示终止密码子, PolyA 信号序列和 PolyA 尾巴用方框(□)标注。 (LATG) indicates the start codon, * represents the stop codon, the PolyA signal and Poly A were squared with □.

N-端存在一个由 16 个氨基酸残基组成的信号肽, 信号肽序列为: MSAPSSASSAPAENSA, 分界位点 在 16 和 17 号氨基酸之间。PHDrhtm 预测的萨罗 NKCC1 蛋白质二级结构包含 10 个跨膜螺旋, 分布 在氨基酸序列的第 225~682 号残基之间(跨膜位 点依次为 230~246、259~275、302~318、343~359、 368~385、420~436、454~470、534~550、602~618、 649~665), 每个跨膜片段 17 个氨基酸残基, 约 4.72 个螺旋; 膜内侧部分包含大片段的 NH₂-末端和 COOH-末端, 含 8 个酪蛋白激酶-II 磷酸化位点 (CK2)、7 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(P)、 膜外序列 含 1 个 CK2 和第 7、8 个跨膜螺旋之间有两个 N-连接糖基化位点。

萨罗 NKCC1α 编码区氨基酸序列与其他物种 NKCC1α/β 的相似性比较结果表明, 萨罗与莫桑比 克罗非鱼之间的同源相似性最高(99%); 其次为与 狼鲈的相似性(90%);此后依次为与鲑、鳗鲡、斑马 鱼、爪蟾、鼠、人;与鲨的同源相似性最低(71%);而 在 NKCC1β,萨罗与莫桑比克罗非鱼、鳗鲡的同源 相似性分别只有 73%和 79%。在聚类图(图 5),萨罗 与莫桑比克亲缘关系最为相近,共享遗传树的一个 分支;所有硬骨鱼类的 NKCC1α/β 先聚类为一个大 支,其中 NKCC1α 聚类更加紧密。进一步将萨罗 NKCC1 与莫桑比克、鲑及鳗鲡 NKCC1α 作差异性 多重比较的结果如图 6 所示,除了 NH₂-端有部分差 异之外,在整个编码区都是高度保守,证明本试验 所获得的萨罗 NKCC1 基因就是 NKCC1α 基因。

2.4 qRT-PCR 结果

qRT-PCR 结果表明,淡水条件下,萨罗鳃、肝、



图 5 萨罗与其他物种 NKCC1 基因系统发生树 Fig. 5 Construction of phylogenetic tree based onNKCC1α/β amino acids of *Sarotherodon melanotheron* and other animals 隐杆秀丽线虫作为外类群(*Caenorhabditis elegans* was used as the outgroup)。

Sarotherodon	1	MSAP-SSAS <mark>SAPAENSATEHDLLAPDAGOKPPGPTPSOSRFOVDLVAEAAGAAD</mark> DKTPS <mark>SDASAAAPEAPSSDPAN</mark> SGEEAKGRFRVV
Mossambicus	1	MSAP SSASSAFAENSATEHDULAPDAGGKPPGFTPSQSRFQVDLVAEAAGAADEAPSSDPAVSGEEAKGRFRVV
Salmon	1	MSAT-SELPPAQUENPVPBNGEAVDIGLEAAGUTSSSREQVDEVABAAGADRILASDRAADAFEGSPAAGGEBARGRERVV
Ee1	1	MSVESSSSBAFGENPYSDQEGE-LDAGLAALGFTPSQSRFQVDLVAEAAGASAGEARPADIDASEHAADERATEDEGAPEGPEPPAACEEARGRFRVV
Sarotherodon	88	NFADPMCECSVASPEAAFTEGMONGDTVMSETSLHSSTGGOHHYHYDTHTNTYYLRTFGHNTIDAVPNIDFYROTAAPLGEKLTRPTLSELHDELDKEPF
Mossambicus	88	NFADPTCECSVASPEAAPTECMONGDTVMSETSLHSSTGCOHHYHYDTHTNTYYLRTFGHNTIDAVPNIDFYROTAAPLCEKLTRPTLSELHDELDKEPF
Salmon	86	NFVDPSCASPPEAVPAECFONGDTVMSECSLHSSTGGQHHYHYDTHTNTYYLRTFGHNTIDAVPNIDFYRQTAAPLCDKLIRPTLSELHDELDKEPF
<i>Eel</i>	100	NFVDPSVAGSPPDAVPAEG50NGDTVMSECSLHSSTGGQHHYHYDTHTNTYYLRTFGHNTIDAVPNIDFYRQTAAPLGEKLIRPTLSELHDELDKEPF
Sarotherodon	188	EDGFANGDELTPAEEAAAKEAAESKGVVKFGWIKGVLVRCMLNIWGVMLFIRMSWIVGQAGI <mark>AL</mark> SCVIV <mark>A</mark> MATVVTTITGLSTSAIATNGFVRGGGAYYL
Mossambicus	188	EDGFANGDELTPAEEAAAKEAAESKGVVKFGWIKGVLVRCMLNIWGVMLFIRMSWIVGQAGI <mark>A</mark> LACVIVAMATVVTTITGLSTSAIATNGFVKGGGAYYL
Salmon	183	EDGFANGDELTPAEEAAAKEA <mark>SEF</mark> KG <mark>A</mark> VKFGW <u>I</u> KGVLVRCMLNIWGVMLFIRMSWIVGQAGI <mark>VLS</mark> CVIV <mark>L</mark> MATVVTTITGLSTSAIATNGFVRGGGAYYL
Eel	198	EDGFANGDELTPAEEAAAKECAESKGVVKFGWVKGVLVRCMLNIWGVMLPIRMWVIGQAGIVLACHILMATVVTITGLSTSATATNOFVRGGAYYL
Carotherodon	288	MANAMANAMANAMANANAMANAMANAMANAMANAMANAM
Morrambicur	288	ISRSIGFEPUGGIGLIFAFANAVAANITVUGAETVELLVGMUATNIDETNJRTIGTITTITLUGISVAGMEMEARAQUFLVVLITATFNIFUGSFI
Salmon	283	ISRSLOFEPERGSTOLITERRANAVANITVOPRETVVELUSION MIDELADIRITOTITITILOSSA AMEMERANAVITLUVLITAITATITITISST
Ee 7	298	ISRSIGEPUGGIGLIPARANAVANITVUGRETVUELLASIDEINDEINDIKIGIITILLISVAMEWEAKAVILLVVLITAITNIFIGST
		MARANANANANANANANANANANANANANANANANANANA
Sarotherodon	388	PVKSKBAKGFLGYDASIMWENMGPDFRG-ETFFSVFAIFFPAATGILAGANISGDLADPQUAIPKGTLLAILITGIVYLGVAVSTGSCILRDASGNVNDT
Mossambicus	388	PVKSKE <mark>AK</mark> GFLGYDASIMMENIGPDFRG-ETFFSVFAIFFPAATGILAGANISGDLADPQMAIPKGTLLAILITGIVYLGVAVSTGSCILRDASGNVNDT
Salmon	383	PLCSKESCGFFGYDSCIMMENMGPDFRGTESFFSVFAIFFPAATGILAGANISGDLSDPQLAIPRGTLLAILITGIVYLGVAISTGSCIVRDATGNDNDT
Eel	398	AIKSKESQGFFGYHSEIMMENMGPDFRKGETFFSVFAIFFPAATGILAGANISGDLADPQLAIPRGTLLAILITGIVYLGVAVSTGSCIVRDAICS-NST
		MDDBDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD
Sarotherodon	487	ISSQFMANCS <mark>T</mark> AACKFGYDFS <mark>TCKNEDTCRYGL</mark> HRDFQVMSLVSGFGPIITAGIFSATLSSALASLVSAPKVFQALCKDNIYPGLQMFAKGYGKNNE
Mossambicus	487	${\tt ISSQFMANCS}{\tt TAACKFGYDFS}{\tt TCKN}{\tt ED}{\tt}{\tt TCRYGL}{\tt HR}{\tt DFQVMSLVSGFGPIITAGIFSATLSSALASLVSAPKVFQALCKDNIYPGLQMFAKGYGKNNE}$
Salmon	483	HSAQIMANCIDAACKFGYDFSSCKSINGLYNCRYGLONDFOVMSIVSGFGPIITAGIFSATLSSALASLVSAPKVFQALCKDNIYPGLEMFAKGYGKNNE
Eel	497	$\mathbf{ISG} = \mathbf{AINCSD}\mathbf{AACNL}\mathbf{GYDFSSC}\mathbf{RSSD} = = -\mathbf{CAYGL}\mathbf{QNDFQ}\mathbf{ISSV}\mathbf{VSG}\mathbf{FGPL}\mathbf{ITAG}\mathbf{IFSATLSSALASL}\mathbf{VSAPKV}\mathbf{FQALCKDN}\mathbf{IYPGL}\mathbf{CMFAKGYGKNNE} = \mathbf{IST}\mathbf{ISSV}\mathbf$
		MMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMM
Sarotherodon	584	PLRGYILTHCIALAFILIAELNIIAPIISNFFLASYALINFSVFHASLANSPGWRPSFKYYNMWVSLAGAILCOCVMFVINWAAALLTNVIVMALYIYVS
Mossambicus	584	PLRGYILTHCIALAFILIAECNIIAPIISNFFLASYALINFSVFHASLANSPGWRPSFKYYNMWVSLAGAILCCGVMFVINWAAALLTNVIVMALYIYVS
Salmon	583	PLRGY ILI PCIALAFILI AUCHVIAPIISNPPLASTALI NESVEHASLANSPGWRPSEKYYNNWYSLAGAVLCO VMEVINWAALMIDVI VLGLYI YVS
Lei	231	PERGILINC INTRAFILIATELIN TAFI ISINFILASTALINGSV PHASLANSFGWRFSPH INNIVSLAGATICC IMMEVING ATLEINVIV ALITIVS MUMOMMANDANDANDANMA
Sarotherodon	684	HKKPDVNWGSSTØALTYHØALTHTILHLSGVEDHUKNFRPOCLVMTGYPNSRPALLDLVHSFTKNVGLMICGHIRTGYRRPNFKELATDØARYØRWLLKNE
Mossambicus	684	HKKPDVNWGSST9ALTYH9ALTHTLHLSGVEDHVKNFRP9CLVMTGYPNSRPALLDLVHSFTKNVGLMICGHIRTGYRRPNFKELATD9ARY9RWLLKNE
Salmon	683	YKKPDVNWGSSTQALTYHQALTHSLHLSSVEDHIKNFRPQCLVMTGYPNSRPALLHLVHAFTKNVGLMICGHVRTGSRRPNFKELSNDQTRYQRWLMKNE
Eel	691	YKKPDVNWGSSTQALTYHQALTHSLQLSAVEDHIKNFRPQCLVI TGYPNSRPALLHLVHAFTKNVGLMICGHIRSTSRRHNFKDLANDQVRYQRWLLRSE
Sarotherodon	784	TKAFYTPVFAEDLKQGSQYLLQAAGLGRLKPNTLVLGFKNDWRDGDMMNVETYISMIHDAFDPQPGAVILRLKEGLDVSHIQGQDPSLSSQEKPSGMKDVILVLGFKNDWRDGDMMNVETYISMIHDAFDPQPGAVILRLKEGLDVSHIQGQDPSLSSQEKPSGMKDVILVLGFKNDWRDGDMMNVETYISMIHDAFDPQPGAVILRLKEGLDVSHIQGQDPSLSSQEKPSGMKDVILVLGFKNDWRDGDMMNVETYISMIHDAFDPQPGAVILRLKEGLDVSHIQGQDPSLSSQEKPSGMKDVILVLGFKNDWRDGDMMNVETYISMIHDAFDPQPGAVILRLKEGLDVSHIQGQDPSLSSQEKPSGMKDVILVLGFKNDWRDGDMMNVETYISMIHDAFDPQPGAVILRLKEGLDVSHIQGQDPSLSSQEKPSGMKDVILVLGFKNDWRDGDMMNVETYISMIHDAFDPQPGAVILRLKEGLDVSHIQGQDPSLSSQEKPSGMKDVILVLGFKNDWRDGDMMNVETYISMIHDAFDPQPGAVILRLKEGLDVSHIQGQDPSLSSQEKPSGMKDVILVLGFKNDWRDWRDWRDWITHIAAFDPQPGAVILRLKEGLDVSHIQGQDPSLSSQEKPSGMKDVILVLGFKNDWRDWRDWRDWRDWRDWRDWRDWRDWRDWRDWRDWRDWRD
Mossambicus	784	TKAFYTPVFAEDLKqCSQYLLQAAGLGRLKPNTLVLGFKNDWRDGDMMNVETYISMIHDAFDFQFGAVILRLKEGLDVSHIQCQDESLSSQEKPSGKKDV
Salmon	783	TKAFYTPVFAEDINECTQYLLQAAGLGRLEPNTLVTGFKNDWKDCDMMNVETYIOMIHDAFDYQVGAVVLRLKEGLDVSHISEQDDLLSSQEKTSGMKDV
Ee1	791	TKAFYTPVFADDL KQGSQYLMQASGLGRLKPNTLVLGFKNDWREGDMRDVETYTN THDVFDFQVGAVT RLKEGLDLSH1QGQDDLLSSQERTSGMKDV
Sarotherodon	884	IVSTD SKDSDADSSKPSSKATSLONSPAVOKDDEDDCKATTOPI I IKDKKSPTVPI NVSDORI I FASOOFOKKOCKCVDVWWI EDDCCI TI I IPVI I T
Mossambigus	884	TUSTIN SKRSBARSSKPSSKATSLONSA VOKDREDDIGKATTOPI LIKKRKSPTVPI NVSDORI I FASOPOKISCE CTVD/WWLEDDIGCI I LITITILI
Salmon	883	WSTINK-DSDCDSSKPSSKATSVONSPATOKCDDDERKAANPLLIKEKSP-OVINVADORILIDASCIEKKKOCKCTVDVWIEDDOGETLIATILIT
Eel	891	TVSTDMSKDSDGDSSKPSSKATTAONSPALIOKDDDDWKAPTOPLLKKDKKSPTVGLNVADORLLEASOOFOKKOGKGTVDVWWLFDDGGLTLLTPYLLT
Sarotherodon	984	NKKRWK <mark>E</mark> CKIRVFIGGKINRIDHDRRAMATLLSKFRIDFSDITVLGDINTKPKKE <mark>HMAAFEEMIEPYRLKEDDMEQEAAERLK</mark> NSEPWRITDNELELYRA
Mossambicus	984	NKKRWK <mark>E</mark> CKIRVFIGGKINRIDHDRRAMATLLSKFRIDFSDI <mark>T</mark> VLGDINTKPKKE <mark>RWA</mark> AFEEMIEPYRLKEDDMEQEAAERLK <mark>N</mark> SEPWRITDNELELYR <mark>T</mark>
Salmon	980	NKKKWNDCKIRVFIGGKINRIDHDRRAMATLLSKFRIDFSDINVLGDINTKPKKEN <mark>MT</mark> AFEEMIEPYRLKEDDMEG <mark>DT</mark> AEALKASEPWRITDNELELYRA
Eel	991	NKKRWKDCRIRVFIGGKINRIDHDRRAMATLLSKFRIDFSDITVLGDINTKPKKEN <mark>VT</mark> AFEEMIEPYRLKEDDMEQEAAERLKAE
Sanotherodon	1084	PTOPATELNELL VERSTANL TVESTOLADVCAVSALVANU EN SKULDELL VERHOSVLTEVS
Mossambicus	1084	ATTRACTICE DETECTION TO A TRACTA VISAL CARGA VSSAL CARDED STATE TO CONTRACT CONTRACT CONTRACT A CONTRACT
Salmon	1080	TTNRURE LEILING THE TENET TO THE ANALYSIS AND
Eel	1091	KSNRQTRI NELL KEHSSTANLTVISVELARKGTVSSALVISVI DTI SEDI PETLI VRGNIGSVI TEVS

图 6 萨罗与莫桑比克、鲑、鳗鲡 NKCC1a 氨基酸序列多重比较

Fig. 6 Analysis of variance of amino acid alignments of NKCC1α isoforms found in Sarotherodon melanotheron, Oreochromis mossambicus, Salmo salar and Anguilla anguilla

下标 M 表示 PHDrhtm 预测的萨罗跨膜螺旋区域。

Lowercase "M" indicate the location of putative transmembrane domains along sequence of S.melanotheron as predicted by PHDrhtm.



图 7 萨罗 NKCC1α 基因 mRNA 组织表达差异(A)及 0 盐度和 136 盐度下鳃组织中表达差异(B) Fig. 7 Variated expressions of NKCC1α mRNA of black-chin tilapia in different tissues and between 0 and 136 salinity water in gill mRNA 量以平均值±标准误表示; "*"和 "**"分别表示差异显著和极显著。

Values are means \pm SE; the * and ** over bars indicate significantly different with P<0.01 and P<0.001, respectively.

肠和肾 NKCC1α 基因 mRNA 表达差异显著(图 7A); 在鳃中, NKCC1α 基因 mRNA 表达量极其 显著地高于其他 3 种组织, 肠道中的表达量也显著 高于肝和肾, 肝组织中表达量水平最低。经 15 d 的 慢性耐盐致死实验, 136 盐度下, 萨罗鳃 NKCC1α 基因 mRNA 相对表达水平显著高于 0 盐度结果, 分 别为 4.91±0.465 和 1.00±0.089 (*P*<0.001, 图 7B)。

3 讨 论

NKCC1a 隶属于阳离子-Cl-家族(CCCs), CCCs 家族包括8类离子共转运子(Xu et al, 1994), 尽管这 些共转运子在不同物种间的氨基酸序列同源相似 性从 25%~67%不等, 却具有相似的二级结构, 即由 疏水氨基酸构成 8~12 个跨膜螺旋, 亲水的氨基端 (N-端)和羧基端(C-端)组成膜内区域(Xu et al, 1994)。如鲨(Haas & Forbush, 1998)和人(Payne et al, 1995)NKCC1的二级结构模型(图 8a、b)包含 12 个 跨膜螺旋, 莫桑比克罗非鱼 NKCC1α 的二级结构包 含 10 个跨膜螺旋(Inokuchi et al, 2008)。本文对萨罗 NKCC1a的蛋白质二级结构的预测结果与莫桑比克 罗非鱼一致。氨基酸序列多重比对结果表明, 萨罗 与莫桑比克罗非鱼仅有八个氨基酸残基的差异,但 是跨膜螺旋区域的分布非常保守,这些区域的氨基 酸序列完全一致。比较鲨和人 NKCC1 基因的二级 结构可以看出, 第2、4、7号跨膜螺旋残基变异大(图 8c), 提示这些变异导致了人和鲨 NKCC1 基因的离

子转运功能差异(Isenring & Forbush, 2001); 类似于 人和鲨的比对结果, 萨罗 NKCC1α 基因二级结构对 应于鲨 NKCC1 跨膜螺旋第 2、4、5、7 号分别相差 6、5、9、4 个氨基酸残基(图 8d)。CCCs 家族各种 亚基的离子动力学特征具有物种特异性, 如鲨 NKCC1基因的离子亲和力比人NKCC1基因要低得 多(Xu et al, 1994), 本实验预测的萨罗 NKCC1 只有 10个跨膜螺旋, 萨罗 NKCC1α 与鲨 NKCC1 编码区 同源相似性只有 71%, 但是对应于鲨 NKCC1 跨膜 螺旋第2、4、5、7号分别相差6、5、9、4个氨基 酸残基; Isenring & Forbush (2001)发现 NKCC1 基 因第2号跨膜螺旋的氨基酸突变会影响对 Na、K 等 阳离子的亲和力,而第4~7号跨膜螺旋区的氨基酸 组成对 Cl 离子的亲和力起决定作用, 目前对萨罗 罗非鱼 NKCC1 基因各跨膜螺旋的功能还没有相关 报道,但可以推测它与人及鲨 NKCC1 基因在这些 区域的氨基酸变异是导致其广盐性适应的主要原因。

Lemari et al(2004) 比较分析了萨罗罗非鱼和 尼罗罗非鱼对水体盐度地适应规律发现,当每一天 提高 8 个水体盐度时,萨罗罗非鱼的被激活的鳃丝 氯细胞数目随着盐度的升高而增加,其半致死盐度 值达到 123.7±3.5。因此,本文参照 Lemarié et al (2004) 的实验方法进行慢性耐盐试验,获得与文献 记录基本一致的实验结果,实测半致死盐度在 120~128之间(图 1)。本研究中,当试验水体盐度达 到 136 时,试验鱼基本死亡,残存下来的几尾鱼也



图 8 NKCC1 二级结构预测模型

Fig. 8 Putative model of NKCC1 secondary structure

a: 人(引自 Xu & Forbush, 1994); b: 鲨(引自 Haas & Forbush, 1998); c: 鲨和人比对结果, 深色代表鲨的特异残基(引自 Isenring & Forbush, 2001); d: 萨罗和鲨比对结果, 红色代表萨罗的特异残基。

a: Human(Cited from Xu & Forbush, 1994); b: Shark(Cited from Haas & Forbush, 1998); c: Identity plot of shark NKCC1 to human NKCC1, dark residues are unique to the shark NKCC1(Cited from Isenring & Forbush, 2001); d: *Sarotherodon melanotheron* NKCC1a to shark NKCC1, red residues are unique to *S.melanotheron* NKCC1a.

表现为游泳姿态异常,因此可以认为此时的盐度已 经达到了萨罗罗非鱼的盐度耐受极限(Sardella et al, 2004),此值可能是目前已知的广盐性鱼类所能耐 受的最高盐度值(Tine et al, 2008)。

对 0 与 136 两种极端盐度下萨罗 NKCC1a 基因 mRNA 在鳃中的表达差异的比较发现, 136 盐度下 mRNA 表达量为 0 盐度下表达量的 4.9 倍,可见萨 罗鳃 NKCC1a 基因 mRNA 表达量随着水体盐度增 大而显著升高,我们的结果与已经报道的鳗鲡 (Cutler & Cramb, 2002)、鳉(Scott et al, 2005)、鲈 (Tipsmark et al, 2004)、莫桑比克罗非鱼(Inokuchi et al, 2008)等的 NKCC1 表达情况基本一致,表明在高 渗环境中, NKCC1a 是萨罗维持渗透平衡的关键离 子转运通道。从理论上说,鱼类的等渗环境盐度约 为 12(McCormick, 1993),当盐度降低或升高时,鱼 类都必须消耗额外的能量以保持细胞内外各种盐 离子和水分的动态平衡。为此,通常有两种应对策 略,一是改变鳃上皮氯细胞结构、数量及类型;二 是提高具有离子转运活性的基因,如 NKCCs 表达 水平。萨罗是一种超强耐盐的广盐性鱼类,适应盐 度范围广(Panfili et al, 2004; Tine et al, 2008), 最适 生长盐度 20~25 (Li et al, 2008), 因此在低于和高于 这个盐度时, NKCC1α的表达量应该都会有所增加, 本试验虽然没有等渗条件下的 NKCC1α 的 mRNA 表达数据,但136盐度这一极高盐度下 NKCC1α 的 mRNA 表达量显著高于0 盐度下表达量的结果可以 说明, NKCC1α 基因与萨罗耐受高盐度咸水条件的 关系更为密切 (Ouattara et al, 2009)。 这些结果会 同我们在萨罗罗非鱼、尼罗罗非鱼及其杂交子代胰 岛素样生长因子(IGF-IB)基因 3'cDNA 末端克隆及 序列分析的结果(Fan et al, 2010; Fan & Li, 2011), 丰富了萨罗罗非鱼耐盐相关基因研究的理论基础, 为选育耐盐性较强的、适合海水环境养殖的罗非鱼 新品种提供了一些理论依据。

参考文献:

- Bystriansky, JS, Richards, JG, Schulte, PM, Ballantyne, JS. 2006. Reciprocal expression of gill Na⁺/K⁺-ATPaseα-subunit isoforms α1α and α1β during seawater acclimation of three salmonid fishes that vary in their salinity tolerance [J]. J Exp Biol, 209(Pt 10): 1848-1858.
- Cutler, CP, Cramb, G. 2002. Two isoforms of the Na⁺/K⁺/2Cl⁻cotransporter are expressed in the European eel (*Anguilla anguilla*) [J]. *Biochim Biophys Acta*, **1566**(1-2): 92-103.
- Cutler, CP, Cramb, G. 2008. Differential expression of absorptive cation-chloride-cotransporters in the intestinal and renal tissues of the European eel (Anguilla anguilla) [J]. Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol, 149(1): 63-73.
- Evans, DH, Piermarini, PM, Choe, KP. 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste [J]. *Physiol Rev*, 85(1): 97-177.
- Fan, WJ, Li, SF. 2011. Isolation and characterization of Insulin-like growth factor Iβ in Sarotherodon melanotheron: cDNA cloning and mRNA expression [J]. Isr J Aquacult Bamidgeh, 63(3): xxx-xxx.
- Fan, WJ, Li, SF, Wang, B, Meng, QH. 2010. Cloning And sequencing of IGF-Iβ 3'cDNA in Oreochromis niloticus, Sarotherodon melanotheron and their hybrid [J]. J Fish Chn, 34: 489-499.[范武江,李思发,王兵, 孟庆辉, 2010. 尼罗罗非鱼、萨罗罗非鱼及其杂交子代胰岛素样生 长因子(IGF-Iβ)基因 3'cDNA 末端克隆及序列分析.水产学报, 34, 489-499.]
- Haas, M, Forbush, B, III. 1998. The Na-K-Cl cotransporters [J]. J Bioenerg Biomembr, 30(2): 161-172.
- Hebert, SC, Mount, DB, Gamba, G. 2004. Molecular physiology of cation-coupled Cl'cotransport: the SLC12 family [J]. *Pflugers Arch*, 447(5): 580-593.
- Hiroi, J, McCormick, SD, Ohtani-Kaneko, R, Kaneko, T. 2005. Functional classification of mitochondrion-rich cells in euryhaline Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos, by means of triple immunofluorescence staining for Na⁺/K⁺-ATPase, Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter and CFTR anion channel [J]. *J Exp Biol*, 208(Pt 11): 2023-2036.
- Inokuchi, M, Hiroi, J, Watanabe, S, Lee, KM, Kaneko, T. 2008. Gene expression and morphological localization of NHE3, NCC and NKCC1α in branchial mitochondria-rich cells of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) acclimated to a wide range of salinities [J]. Comp Biochem Physiol A: Mol Integr Physiol, 151(2): 151-158.
- Isenring, P, Forbush, B. 2001. Ion transport and ligand binding by the Na'K'Cl cotransporter, structure-function studies [J]. Comp Biochem Physiol: A Mol Integr Physiol, 130(3): 487-497.
- Jennings, DP, Williams, JD. 1992. Factors influencing the distribution of blackchin tilapia Sarotherodon melanotheron (Osteichthyes : Cichlidae) in the Indian River system, Florida [J]. Northeast Gulf Sci, 12(2): 111-117.
- Kültz, D, Bastrop, R, Jürss, K, Siebers, D. 1992. Mitochondria-rich (MR) cells and the activities of Na⁺/K⁺-ATPase and carbonic anhydrase in the gill and opercular epithellium of *Oreochromis mossambicus* adapted to various salinities [J]. *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol*, **102**: 293-301.
- Lemarié, G, Baroiller, JF, Clota, F, Lazard, J, Dosdat, A. 2004. A simple test to estimate the salinity resistance of fish with specific application to *O. niloticus* and *S. melanotheron* [J]. *Aquaculture*, **240**(1-4): 575-587.
- Li, SF, Yan, B, Cai, WQ, Li, TY, Jia, JH, Zhang Yan Hong. 2008. Evaluation of growth, salt tolerance and parents'heterosis contribution in reciprocal hybrids F2 between Oreochromis niloticus and Sarotherodon

melanotheron [J]. J Fish Chn., 32(3): 335. [李思发,颜标,蔡完其, 李腾云,荚金华,张艳红, 2008. 尼罗罗非鱼与萨罗罗非鱼正反交 鱼自繁后代 F2 耐盐性、生长性能及亲本对杂种优势贡献力的评估. 水产学报, 32, 335-342.]

- Mancera, JM, McCormick, SD. 2000. Rapid activation of gill Na⁺,K⁺-ATPase in the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus* [J]. J Exp Zool, 287(4): 263-274.
- McCormick, SD. 1993. Methods for non lethal gill biopsy and measurement of Na⁺,K⁺-ATPase activity [J]. *Can J Fish Aquat Sci*, 50: 653-658.
- Ouattara, NG, Bodinier, C, Nègre-Sadargues, G, D'Cotta, H, Messad, S, Charmantier, G, Panfili, J, Baroiller, J-F. 2009. Changes in gill ionocyte morphology and function following transfer from fresh to hypersaline waters in the tilapia *Sarotherodon melanotheron* [J]. *Aquaculture*, 290(1-2): 155-164.
- Panfili, J, Mbow, A, Durand, JD, Diop, K, Diouf, K, Thior, D, Ndiaye, P, Lae, R. 2004. Influence of salinity on the life-history traits of the West African black-chinned tilapia (*Sarotherodon melanotheron*): Comparison between the Gambia and Saloum estuaries [J]. Aquat Living Resour, 17(1): 65-74.
- Payne, JA, Xu, JC, Haas, M, Lytle, CY, Ward, D, Forbush, B, 3rd. 1995. Primary structure, functional expression, and chromosomal localization of the bumetanide-sensitive Na^{*}K^{*}Cl cotransporter in human colon [J]. *J Biol Chem*, 270(30): 17977-17985.
- Sakamoto, T, Uchida, K, Yokota, S. 2001. Regulation of the ion-transporting mitochondrion-rich cell during adaptation of teleost fishes to different salinities [J]. Zool Sci, 18(9): 1163-1174.
- Sangiao-Alvarellos, S, Arjona, FJ, del Rio, MPM, Miguez, JM, Mancera, JM, Soengas, JL. 2005. Time course of osmoregulatory and metabolic changes during osmotic acclimation in *Sparus auratus* [J]. *J Exp Biol*, 208(22): 4291-4304.
- Sardella, BA, Cooper, J, Gonzalez, RJ, Brauner, CJ. 2004. The effect of temperature on juvenile Mozambique tilapia hybrids (*Oreochromis* mossambicus x O. urolepis hornorum) exposed to full-strength and hypersaline seawater [J]. Comp Biochem Physiol: A Mol Integr Physiol, 137(4): 621-629.
- Scott, GR, Rogers, JT, Richards, JG, Wood, CM, Schulte, PM. 2004. Intraspecific divergence of ionoregulatory physiology in the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*: possible mechanisms of freshwater adaptation [J]. *J Exp Biol*, **207**(Pt 19): 3399-3410.
- Scott, GR, Claiborne, JB, Edwards, SL, Schulte, PM, Wood, CM. 2005. Gene expression after freshwater transfer in gills and opercular epithelia of killifish: insight into divergent mechanisms of ion transport [J]. J Exp Biol, 208(14): 2719-2729.
- Singer, TD, Tucker, SJ, Marshall, WS, Higgins, CF. 1998. A divergent CFTR homologue: highly regulated salt transport in the euryhaline teleost *F. heteroclitus* [J]. Am J Physiol, 274(3 Pt 1): C715-723.
- Tine, M, de Lorgeril, J, D'Cotta, H, Pepey, E, Bonhomme, F, Baroiller, JF, Durand, J-D. 2008. Transcriptional responses of the black-chinned tilapia Sarotherodon melanotheron to salinity extremes [J]. Mar Genomics, 1(2): 37-46.
- Tipsmark, CK, Madsen, SS, Borski, RJ. 2004. Effect of salinity on expression of branchial ion transporters in striped bass (*Morone saxatilis*) [J]. J Exp Zool A: Comp Exp Biol, 301(12): 979-991.
- Xu, JC, Lytle, C, Zhu, TT, Payne, JA, Benz, EJ, Forbush, Br. 1994. Molecular cloning and functional expression of the bumetanide-sensitive Na^{*}K^{*}Cl cotransporter [J]. *Proc Natl Acad Sci* USA, 91(6): 2201-2205.