

文章编号: 1000-0615(2019)04-0820-13

DOI: 10.11964/jfc.20180111146

黄姑鱼锰超氧化物歧化酶基因的克隆及氨氮和亚硝态氮胁迫对其表达的影响

王小龙¹, 宋青², 王志勇¹, 韩芳^{1*}

(1. 集美大学水产学院, 农业农村部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021;

2. 西北工业大学柔性电子研究院, 陕西 西安 710072)

摘要: 锰超氧化物歧化酶(MnSOD)是一种含金属辅基的抗氧化酶, 广泛存在于各种需氧生物中, 能将氧自由基快速歧化为分子氧(O₂)和过氧化氢(H₂O₂)。本研究首次获得了黄姑鱼MnSOD基因的cDNA序列, 其全长958 bp, 包括47 bp的5'端非编码区(untranslated region, UTR)、233 bp的3'UTR和678 bp的开放阅读框(open reading frame, ORF), 编码225个氨基酸残基(aa)。氨基酸序列分析显示, MnSOD含有一条信号肽序列(1~27 aa), 4个Mn结合位点(His 53、101、190和Asp 186)和一条保守的锰/铁SOD特征序列(186~193 aa)。系统进化树分析显示, 黄姑鱼MnSOD在进化上与大黄鱼最近, 并与其他鱼类(斜带石斑鱼、暗纹东方鲀、牙鲆、斑马鱼和日本鳗鲡)聚为一支。荧光定量PCR检测显示, MnSOD基因在所检测的11个黄姑鱼组织/器官中均有表达, 其中心脏中表达量最高, 其次为脑、肝脏、鳃、中肾、肠、胃、头肾、肌肉和鳃, 在脾脏中表达量最低。氨氮和亚硝态氮对黄姑鱼的急性毒性实验显示, 黄姑鱼对氨氮胁迫更为敏感, 其氨氮和亚硝态氮的96 h半致死浓度(LC₅₀)分别为20.23 mg/L(换算成非离子氨0.57 mg/L)和99.08 mg/L, 安全浓度分别为2.02 mg/L(换算成非离子氨0.06 mg/L)和9.91 mg/L。此外, 黄姑鱼经氨氮和亚硝态氮急性攻毒后, 其肝脏、鳃和头肾中MnSOD基因的表达水平均不同程度上调, 推测MnSOD的上调是为了及时清除由氨氮和亚硝态氮刺激产生的氧自由基, 或可用作水体污染检测的早期生物标志物。

关键词: 黄姑鱼; 锰超氧化物歧化酶; 氨氮; 亚硝态氮

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

黄姑鱼(*Nibea albiflora*)属鲈形目(Perciformes)、石首鱼科(Sciaenidae)、黄姑鱼属(*Nibea*), 为近海中下层肉食性鱼类, 主要分布于中国沿海、日本及朝鲜半岛西南岸^[1]。近年来, 随着人工繁育技术的不断突破, 黄姑鱼养殖业在福建、浙江沿海迅速发展^[2]。然而, 由于工业废水、农业径流及养殖水体内有机物(养殖动物排泄物、残饵及动植物尸体等)分解的影响, 近海海水中氨氮及其在细菌硝化作用下的中间产物亚硝态氮含

量不断升高^[3]。高浓度的氨氮会造成鱼体氧化损伤、离子浓度失衡, 从而破坏鱼体组织结构, 导致其生长迟缓、体质变差、抗应激能力下降甚至死亡^[4-5]。亚硝态氮可以被鱼类鳃组织的上皮细胞吸收, 并在血液中逐渐积累, 造成鱼类氧化应激, 引起多种生理过程紊乱, 如缺氧、溶血性贫血和抗病能力下降等^[6-8]。导致巨大的经济损失, 制约着水产养殖业的发展。

氧自由基广泛存在于各种需氧生物中, 是

收稿日期: 2018-01-17 修回日期: 2018-05-19

资助项目: 国家海水鱼类产业技术体系专项(CARS-47-G04); 福建省科技厅重大专项(2018N5010); 福建省自然科学基金(2018J01450, 2019J01693)

通信作者: 韩芳, E-mail: hanfangyc@jmu.edu.cn

生命代谢过程中不可避免的代谢副产物。正常范围内, 由于自身极为活泼的化学性质, 它可以破坏病原微生物, 促进吞噬细胞清除损伤和衰老的细胞^[9]。此外, 氧自由基还扮演着第二信使的角色, 介导生物体细胞信号传导, 调节细胞功能^[10]。然而, 生物体的氧自由基水平会因许多外界因素(电离辐射、环境污染、高压氧、药物等)的刺激而急剧增长, 特别是直接暴露于污染水体中的水生动物^[11]。过量的氧自由基会破坏生物体蛋白、不饱和脂肪酸及核酸等多种生物大分子的结构与功能, 导致许多疾病, 如炎症、癌症、动脉粥样硬化和衰老等^[12]。生物体在长期的进化过程中, 形成了一套复杂的抗氧化系统来维持体内氧自由基的动态平衡^[13]。

超氧化物歧化酶(SODs, EC 1.15.1.1)是一种关键的抗氧化酶, 将氧自由基快速歧化为普通分子氧(O₂)和过氧化氢(H₂O₂)^[14]。当前, 自然界中已发现4种SOD, 按其所含金属辅基不同可分为铜/锌SOD (CuZnSOD)、锰SOD (MnSOD)、铁SOD (FeSOD)^[15]和镍SOD (NiSOD)^[16]。截至目前, 只有CuZnSOD和MnSOD在鱼类中发现并被克隆出来。MnSOD广泛存在于真核生物线粒体内, 在一些甲壳类动物的细胞质中也有发现^[17]。线粒体是真核生物三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)的主要来源。据估计, 在以氧呼吸链为中心的电子传递过程中会有1%~2%的氧逃逸变成氧自由基, 占正常脊椎动物氧自由基水平的90%以上^[18]。一旦线粒体内的氧自由基浓度超过10⁻¹¹~10⁻¹² mol/L的正常范围时, 会造成线粒体内重要功能大分子的损伤、信号通路紊乱甚至生物体死亡^[19]。当前针对MnSOD的研究主要集中在哺乳动物上: MnSOD的敲除会导致小鼠(*Mus musculus*)扩张型心肌病和神经退行性疾病^[20]; MnSOD能影响某些转录因子(如HIF-1 α , AP-1、NF- κ B和kp53)的活性及DNA稳定性^[21-22]; MnSOD的过表达能抑制人(*Homo sapiens*)黑色素瘤细胞、乳腺癌细胞、胶质瘤细胞的生长^[23]等。鱼类中有关MnSOD的研究鲜有报道, 目前MnSOD基因已在金头鲷(*Sparus aurata*)^[24]、线鳢(*Channa striata*)^[25]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[26]、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)^[27]等中克隆出来, 但针对其基因表达特征和功能的研究还很薄弱, 结合氨氮和亚硝态氮攻毒的研究还未见报道。

本研究通过对黄姑鱼MnSOD进行克隆, 并

在氨氮和亚硝态氮急性攻毒条件下对基因表达变化的分析, 以期揭示MnSOD在黄姑鱼抗氧化应激过程中的作用机制, 也为黄姑鱼养殖过程中氨氮和亚硝态氮半致死及安全浓度提供参考依据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

健康黄姑鱼取自福建宁德金玲水产科技有限公司, 体长为(8.8 \pm 0.5) cm, 体质量为(10.0 \pm 0.5) g/尾。实验前在温度为24~26 $^{\circ}$ C, 盐度为27~28和pH为7.7~7.9的充气海水中驯养2周, 备氨氮和亚硝态氮攻毒实验。另取6尾正常个体, 剖取心脏、肝脏、脾脏、头肾、中肾、鳃、肠、胃、脑、肌肉和鳃组织, 液氮冷冻, 存放于-80 $^{\circ}$ C超低温冰箱备RNA提取。

氨氮和亚硝态氮溶液采用氯化铵及亚硝酸钠(国药集团化学试剂有限公司, 上海)配制, 试剂均为分析纯, 实验前用双蒸水配制成20 g/L的母液, 使用时按比例稀释至实验所需浓度。

1.2 总RNA的提取及cDNA的合成

黄姑鱼组织样品RNA的提取采用TransZol Up Plus RNA Kit (TransGen Biotech, 北京), 参照其实验说明具体操作, 并采用RNase-free Dnase (Promega, 美国)除去其中的DNA杂质, 产物于1%琼脂糖凝胶电泳以检测RNA质量。cDNA第一条链的合成采用GoScriptTM Reverse Transcription kit (Promega, 美国)并参照其实验说明具体操作。

1.3 黄姑鱼MnSOD基因的克隆

黄姑鱼MnSOD基因cDNA具体数据, 筛选自本实验室构建的黄姑鱼多种组织转录组数据库, 通过比对GenBank数据库拼接获得。参考该序列信息设计引物(表1), 进行实时荧光定量PCR(qRT-PCR)扩增其ORF, 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 59 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR产物纯化后连接pMD-19T vector (TaKaRa, 大连)送于华大基因(上海)科技有限公司测序。

1.4 生物信息学分析

黄姑鱼MnSOD蛋白的等电点及分子质量预测采用ExPasy tools (http://web.expasy.org/compute_

表1 实验中所用的引物
Tab. 1 Primers used in the study

引物 primers	序列(5'→3') sequences (5'→3')
<i>MnSOD</i> -F	ATGAGCACTATCATGAACAT
<i>MnSOD</i> -R	CTACTTTTGGCGATCTG
β - <i>actin</i> -F	TTATGAAGGCTATGCCCTGCC
β - <i>actin</i> -R	TGAAGGAGTAGCCACGCTCTGT
<i>MnSOD</i> -qF	TTCGATCGCTGCTGTGCTAAC
<i>MnSOD</i> -qR	CGTCCAGATTGCCTTCACATAGTCC

pi); 氨基酸序列同源性比对采用BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>); 利用Motif Scan在线工具(http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan/)预测蛋白保守结构域; 蛋白的糖基化位点预测采用NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>); 采用SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)并结合Swiss-pdbviewer 4.1.0预测蛋白三级空间结构; 不同物种MnSOD的氨基酸多重比对采用CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustaw/>), 而后利用MEGA 5.02软件的NJ法(Neighbor-Joining method)构建系统进化树。

1.5 氨氮和亚硝态氮毒性实验

实验采用96 h半静水法, 先进行预实验确定正式实验浓度区间, 区间内设置6个梯度, 每个梯度另设2个平行, 浓度设置参考Ullah等^[28]的研究方法。实验在体积为50 L的水族箱中进行, 氨氮浓度依次为0.05、9.84、15.52、19.16、25.12和30.64 mg/L; 亚硝态氮浓度依次为0.03、47.19、80.21、121.09、150.35和178.27 mg/L。每个浓度组放置实验鱼20尾, 实验过程中不投饵, 每12 h用含有相应氨氮/亚硝态氮浓度的实验用水换水1次, 换水量为50%。玻璃棒碰触5 s无任何反应即视为死亡, 及时捞出死亡个体并做相应记录。半致死浓度的计算采用概率单位法^[29], 将实验鱼96 h的死亡率通过Excel 2010软件换算成死亡概率单位, 并求出死亡概率单位(Y)-氨氮/亚硝态氮浓度对数(X)的线性回归方程。非离子氨浓度的换算依据《海水水质标准》(GB3097-1997), 安全浓度(SC)= $0.1 \times LC_{50}$ (96 h)。

另取200尾实验鱼分为2组, 分别暴露于氨氮或亚硝态氮[浓度为各自的 LC_{50} (96 h)]的溶液中, 并在攻毒后0、3、6、12、24、48、72和96 h

随机捞取5尾实验鱼, 分别取鳃、肝脏和头肾组织, 液态氮冷冻, 存放于-80 °C超低温冰箱备RNA提取。实验重复3次。

1.6 实时荧光定量PCR分析

根据测序获得的黄姑鱼*MnSOD*基因序列, 设计定量引物*MnSOD*-qF和*MnSOD*-qR(表1), 以黄姑鱼管家基因 β -*actin*为内参, 并设计内参引物 β -*actin*-F和 β -*actin*-R(表1)。qRT-PCR实验采用SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)(TaKaRa, 大连)试剂盒, 并在LightCycler® 480 II (Roche, 瑞士)上按其操作说明进行。反应体系为20 μ L: SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)(2 \times)10 μ L, 上下游引物(10 μ mol/L)各0.4 μ L, Passive Reference Dye (50 \times)0.4 μ L, cDNA模板5 μ L及ddH₂O 3.8 μ L, 扩增程序为: 94 °C 30 s; 94 °C 5 s, 60 °C 15 s, 72 °C 10 s, 共40个循环。每个样品分别进行3次技术重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行*MnSOD*基因差异表达分析, 结果用平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示。结合SPSS 19.0中的One-Way ANOVA及S-N-K法(Student-Newman-Keuls method)分析各样品间基因表达差异的显著性($P < 0.05$)。

2 结果

2.1 黄姑鱼*MnSOD*基因cDNA序列分析

MnSOD cDNA长958 bp, 包括47 bp的5'端非编码区、233 bp的3'端非编码区和678 bp的开放阅读框, 编码225个氨基酸(图1)。序列已提交GenBank (登录号: MG208872)。预测*MnSOD*蛋白的分子量为22.2 ku, 理论等电点为6.53, 且N末端含有一条27个氨基酸(aa)组成的信号肽。此外, *MnSOD*蛋白还包含2个潜在的N-糖基化位点, 一条保守的锰/铁超氧化物歧化酶特征序列(186~193 aa)和4个Mn结合位点(His 53、101、190和Asp 186)。

2.2 黄姑鱼*MnSOD*氨基酸序列的同源性分析

BLASTp比对分析显示, 黄姑鱼*MnSOD*氨基酸序列与许多物种均具有较高的一致性, 在鱼类中为87%~99%, 在鸟类和哺乳类中也保持着78%以上的一致性, 在无脊椎动物中较低(61%~72%)。选取其中几个代表性物种: 大黄鱼、斑马鱼、热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*)、人、原鸡

```

1 CGTGTAGTTACCCCTGTGCCGTCAACCGCATGAGCACTATCATGAACATGCTTTGCAGAG 60
1 M L C R V 5
61 TTGGTCAGATACGCAGGTGTGCAGCCAGCCTGAGCCAACTATAAACAGGTGGCTGCTT 120
6 G Q I R R C A A S L S Q T I N Q V A A S 25
121 CAAGGCAGAAGCACACCCTCCAGACCTGACCTACGACTATGGTGCCTGGAGCCCCACA 180
26 R Q K H T L P D L T Y D Y G A L E P H I 45
181 TCTGTGCAGAGATCATGCAGCTGCACCACAGCAAGCACCACGCCACATACGTCAACAACC 240
46 C A E I M Q L H S K H H A T Y V N N L 65
241 TCAACGTACAGAGGAGAAATATCAGGAGGCACTAGCAAAGGGAGATGTGACGACACAGG 300
66 N V T E E K Y Q E A L A K G D V T T Q V 85
301 TCGCCCTCCAGCCTGCTCTGAAGTTAATGGAGGAGGCCACATTAACCACACTATCTTCT 360
86 A L Q P A L K F N G G G H I N H T I F W 105
361 GGACAAACCTCTCTCCTAATGGTGGAGGCGAGCCACAGGGGAGCTGATGGAGGCCATTA 420
106 T N L S P N G G G E P Q G E L M E A I K 125
481 AGCGGACTTTGGCTCCTCCAGAAAATGAAGGAGAAGATGTCTGTCTACAGTGGCCG 480
126 R D F G S F Q K M K E K M S A A T V A V 145
481 TGAGGCTCGGGCTGGGGCTGGGCTACGAGAAGGAGAGTGAAGACTTCGTATCG 540
146 Q G S G W G W L G Y E K E S G R L R I A 165
541 CTGCTTGTGCTAACCAGGATCCCCTGCAGGGATCTACAGGTCTCATCCCCTCCTGGTA 600
166 A C A N Q D P L Q G S T G L I P L L G I 185
601 TCGATGTATGGGAGCATGCTTACTACCTTCAGTACAAAAATGTGCGGCCGACTATGTGA 660
186 D V W E H A Y Y L Q Y K N V R P D Y V K 205
661 AGGCAATCTGGAACGTCGTAACCTGGGAGAACGTGAGCGAGCGTCTCCAGATCGCCAAA 720
206 A I W N V V N W E N V S E R L Q I A K K 225
721 AGTAGAATCTAATCTTCAGAGCTSCGTTACCTGGACCTGGGTCAAATAGTAGATGTA 780
*
781 ATAATGATCAGATTGCATCAAAGTTGAATATATTTGGGCGGATTACATTTTCTTGGCCT 840
841 GTACGCACAGAAAGCTTGAAGCAAGCTTTAAATATTTGCAACTGCTTTTATCTCAGGT 900
901 CTGACCTCCAGGTGATTTCAAGCGCACAGTTCGGCCTCCCTCACATTAAGGCTGGCT 958

```

图1 黄姑鱼MnSOD基因cDNA全长及其氨基酸序列

起始(ATG)和终止(TAG)密码子用黑色方框标出; 氨基酸信号肽序列用下划线标出; 潜在的糖基化位点用椭圆圈出; 锰/铁超氧化物歧化酶特征序列用灰色阴影突出显示; Mn结合位点(His53、101、190和Asp 186)用黑色阴影标出

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of MnSOD

The letters in boxes indicate the start codon (ATG) and the stop codon (TAG); the predicted signal peptide is underlined and N-linked glycosylation site is circled; the manganese and iron superoxide dismutases signature is highlighted in gray shade; the manganese binding sites (His53, 101, 190 and Asp 186) is in black shade

(*Gallus gallus*)和黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)对MnSOD氨基酸序列进行多重比对分析, 发现除信号肽区域差异较大之外, 其余部分特别是Mn结合位点及锰/铁SOD特征序列高度保守(图2)。

2.3 黄姑鱼MnSOD的系统进化树分析

对选取的21个物种的MnSOD氨基酸序列进行多重比对后, 构建出NJ系统进化树, 以研究黄姑鱼MnSOD与其他物种的进化关系。结果显示, 黄姑鱼MnSOD在进化上与大黄鱼最近, 并与其他鱼类[斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)、暗纹东方鲀(*Takifugu fasciatus*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、斑马鱼和日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)]聚为一支(图3)。其余物种的MnSOD基因分别以鸟类、哺乳类、无脊椎类及两栖类为单位各自形成

一个分支, 与传统的物种分类方法所得结果一致。

2.4 黄姑鱼MnSOD的三级结构分析

采用SWISS-MODEL在线工具并结合已知三级结构的人类MnSOD蛋白(PDB登录号: 1VAR)^[30]同源建模预测黄姑鱼MnSOD蛋白三级结构(图4)。MnSOD蛋白包含9个典型的 α 螺旋和3个 β 折叠结构, 各结构域分别以不同的颜色标出。Mn结合位点的4个主要氨基酸残基(His53、101、190和Asp 186)在三级结构中相互聚拢, 形成一个类似抓手的结构, 与Mn紧密结合。

2.5 黄姑鱼MnSOD基因的组织表达分析

采用qRT-PCR技术分析黄姑鱼不同组织中MnSOD基因的表达情况。结果显示, MnSOD基因在所检测的11个黄姑鱼组织/器官中均有表达, 其中心脏中表达量最高, 其次为脑、肝脏、鳃、

		信号肽 singal peptides	
黄姑鱼 <i>N. albiflora</i>	1	--MLCRVGGIIRCAASLSQTLNQVAASRQKHTLPDLTYDYGALPEPHICAEIMQLHHSKHHATYVNNLNVT	68
大黄鱼 <i>L. crocea</i>	1	MNMLCRVGGIIRCAASLSQTLNQVAASRQKHTLPDLTYDYGALPEPHINAEIMQLHHSKHHATYVNNLNVT	70
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	1	--MLCRVGYVRRCAATFNPLLGAVTS--RQKHALPDLTYDYGALPEPHICAEIMQLHHSKHHATYVNNLNVT	67
热带爪蟾 <i>X. tropicalis</i>	1	--MLCRLSVCGRGRLRCAPALTYFTS--REKHTLPDLPYDYGALQPHISAEIMQLHHSKHHATYVNNLNIT	67
人 <i>H. sapiens</i>	1	--MLSR--AVCGTSR--QLAPALGYLGS--RQKHSLPDLPYDYGALPEPHINAIQIMQLHHSKHHAAVYVNNLNVT	65
原鸡 <i>G. gallus</i>	1	--MLCRLASAGRSRAALVAPLGLCLVA--RQKHTLPDLPYDYGALPEPHISAEIMQLHHSKHHATYVNNLNVT	67
黑腹果蝇 <i>D. melanogaster</i>	1	-----MFVARRITQASLAV-----RQKHTLPKLPYDVAALPEPIICREIMELHHSKHHATYVNNLNAA	58
		: **:	34
<hr/>			
黄姑鱼 <i>N. albiflora</i>	69	EEKYQEALAKGDVTTQVALQPALKFNNGGHHNITIFWTNLSPNGGGEPPQELMEAIKRDFGSPQKMKEM	138
大黄鱼 <i>L. crocea</i>	71	EEKYQEALAKGDVTAQVALQPALKFNNGGHHNITIFWTNLSPNGGGEPPQELMEAIKRDFGSPQKMKEM	140
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	68	EEKYQEALAKGDVTTQVSLQPALKFNNGGHHNITIFWTNLSPNGGGEPPQELLEAIKRDFGSPQKMKEM	137
热带爪蟾 <i>X. tropicalis</i>	68	EEKYAEALAKGDVTTQVSLQALAKFNNGGHHNITIFWTNLSPNGGGEPPQELLDIAIKRDFGSPQKMKEM	137
人 <i>H. sapiens</i>	66	EEKYQEALAKGDVTAQVALQPALKFNNGGHHNITIFWTNLSPNGGGEPPQELLEAIKRDFGSPQKMKEM	135
原鸡 <i>G. gallus</i>	68	EEKYQEALAKGDVTAQVSLQPALKFNNGGHHNITIFWTNLSPNGGGEPPQELMEAIKRDFGSPQKMKEM	137
黑腹果蝇 <i>D. melanogaster</i>	59	EEQLEEAAKSDTTKLIQLAPALRFNNGGHHNITIFWQNLSPNKS--QPSEELKKAIESQWKSFEFKKEL	127
	35	**:	81
<hr/>			
黄姑鱼 <i>N. albiflora</i>	139	SAATVAVQSGSGWGLGYEKESGRLRIAACANQDPLQGGTGLIPLLGIDVVEHAYYLYQKNVDPDYKAIW	208
大黄鱼 <i>L. crocea</i>	141	SAATVAVQSGSGWGLGYEKESGRLRIAACANQDPLQGGTGLIPLLGIDVVEHAYYLYQKNVDPDYKAIW	210
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	138	SAATVAVQSGSGWGLGYEKESGRLRIAACANQDPLQGGTGLIPLLGIDVVEHAYYLYQKNVDPDYKAIW	207
热带爪蟾 <i>X. tropicalis</i>	138	STVSVGVQSGSGWGLGYNKESNRLQIAACANQDPLQGGTGLIPLLGIDVVEHAYYLYQKNVDPDYKAIW	207
人 <i>H. sapiens</i>	136	TAAVSGVQSGSGWGLGFNKRERHQLIAACANQDPLQGGTGLIPLLGIDVVEHAYYLYQKNVDPDYKAIW	205
原鸡 <i>G. gallus</i>	138	TAVSVGVQSGSGWGLGYNKESNRLQIAACANQDPLQGGTGLIPLLGIDVVEHAYYLYQKNVDPDYKAIW	207
黑腹果蝇 <i>D. melanogaster</i>	128	STLTAVAVQSGSGWGLGYNKESGRLQLAALPNQDPLEASTGLIPLFGIDVVEHAYYLYQKNVDPDYKAIW	197
	82	:::*:	143
<hr/>			
黄姑鱼 <i>N. albiflora</i>	209	NVNVNENVSERLQIAKK---	225
大黄鱼 <i>L. crocea</i>	211	NVNVNENVSERLQIAKK---	227
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	208	NVNVNENVGERFQAARK---	224
热带爪蟾 <i>X. tropicalis</i>	208	NVINWENVAERYRASKK---	224
人 <i>H. sapiens</i>	206	NVINWENVTERYMACKK---	222
原鸡 <i>G. gallus</i>	208	NVINWENASSRYESCRR---	224
黑腹果蝇 <i>D. melanogaster</i>	198	DIANWDDISCRFQEAKKLSC	217

图2 黄姑鱼和其他物种MnSOD氨基酸序列的多重比对
 Fig. 2 Amino acid sequence alignment of MnSOD among *N. albiflora* and other species

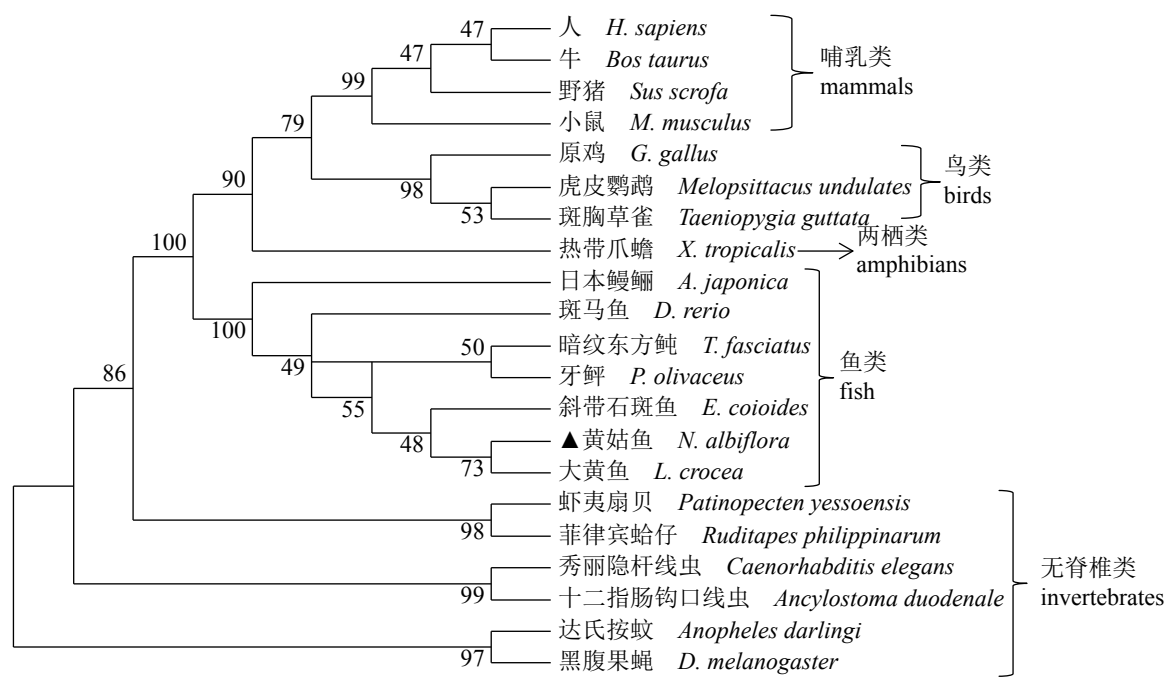


图3 不同物种MnSOD的NJ系统进化树

节点处数字是bootstrap算法重复计算1 000次计算出的支持率，所用物种氨基酸序列的GenBank登录号详见表2

Fig. 3 NJ molecular phylogenetic tree of the MnSOD amino acid sequence between *N. albiflora* and other species
 The numbers at the nodes indicate the bootstrap confidence values of 1 000 replicates, and the GenBank accession numbers of amino acid sequences used are listed in Tab. 2

表 2 MnSOD系统发育树分析所用氨基酸序列的
GenBank登录号

Tab. 2 The GenBank accession numbers of amino acid
sequences used in phylogenetic analysis of MnSOD

序号 no.	物种 species	同源一致性/% identity	GenBank登录号 accession no.
1	黄姑鱼 <i>N. albiflora</i>	100	MG208871
2	大黄鱼 <i>L. crocea</i>	99	KKF17418.1
3	斜带石斑鱼 <i>E. coioides</i>	97	AAW29024.1
4	暗纹东方鲀 <i>T. fasciatus</i>	93	ABV24053.1
5	牙鲆 <i>P. olivaceus</i>	93	XP_019952982.1
6	斑马鱼 <i>D. rerio</i>	91	AAP34300.1
7	日本鳀鲷 <i>A. japonica</i>	87	BAL03637.1
8	斑胸草雀 <i>T. guttata</i>	81	NP_001232398.1
9	原鸡 <i>G. gallus</i>	80	AAK97214.1
10	野猪 <i>S. scrofa</i>	80	NP_999292.2
11	虎皮鹦鹉 <i>M. undulatus</i>	79	NP_001268469.1
12	牛 <i>B. taurus</i>	79	AAA30655.1
13	热带爪蟾 <i>X. tropicalis</i>	79	NP_001005694.1
14	小鼠 <i>M. musculus</i>	78	CAA28645.1
15	人 <i>H. sapiens</i>	78	CAA32502.1
16	虾夷扇贝 <i>P. yessoensis</i>	72	BAE78580.1
17	菲律宾蛤仔 <i>R. philippinarum</i>	69	AFO64928.1
18	十二指肠钩口线虫 <i>A. duodenale</i>	68	KIH60312.1
19	秀丽隐杆线虫 <i>C. elegans</i>	67	NP_492290.1
20	黑腹果蝇 <i>D. melanogaster</i>	64	XP_017044660.1
21	达氏按蚊 <i>A. darlingi</i>	61	ETN64551.1

中肾、肠、胃、头肾、肌肉和鳔, 在脾脏中表达量最低(图5)。

2.6 氨氮和亚硝态氮对黄姑鱼的急性毒性实验

不同浓度氨氮/亚硝态氮攻毒的结果显示, 黄姑鱼对氨氮的耐受能力远不及亚硝态氮, 且随着氨氮/亚硝态氮浓度的升高, 黄姑鱼死亡率也不断升高(表3)。此外, 黄姑鱼的死亡概率(Y)和氨氮/亚硝态氮浓度对数(X)呈线性关系, 其中氨氮为 $Y=4.67X-1.10$, $R^2=0.948$; 亚硝态氮为

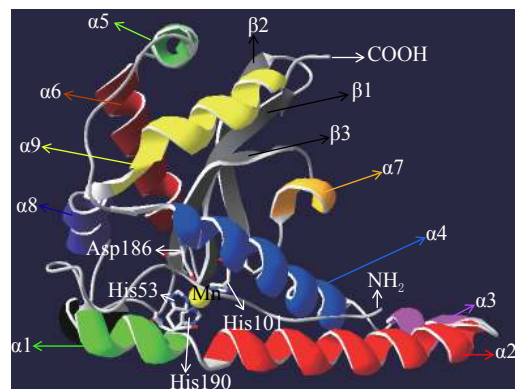


图 4 黄姑鱼MnSOD蛋白三级结构

Fig. 4 The tertiary structure of MnSOD protein

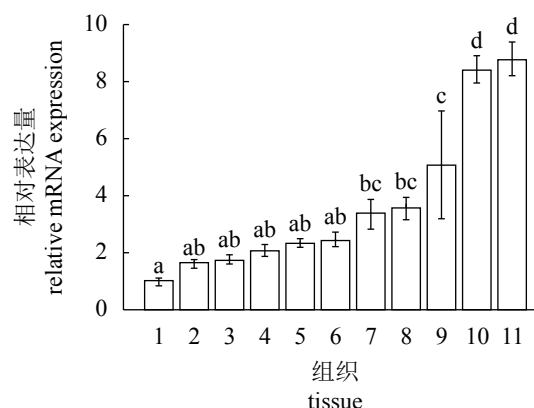


图 5 qRT-PCR方法检测MnSOD基因在
黄姑鱼不同组织内的表达

1. 脾脏; 2. 鳔; 3. 肌肉; 4. 头肾; 5. 胃; 6. 肠; 7. 中肾; 8. 鳃;
9. 肝脏; 10. 脑; 11. 心脏; 不同字母表示差异显著($P<0.05$)

Fig. 5 Expression of MnSOD mRNA in *N. albiflora*
among different tissues by qRT-PCR

1. spleen; 2. swim bladder; 3. muscle; 4. head-kidney; 5. stomach; 6. intestine; 7. kidney; 8. gill; 9. liver; 10. brain; 11. heart; different letter superscripts indicate significant differences ($P<0.05$)

$Y=5.13X-5.24$, $R^2=0.967$ 。获得黄姑鱼对氨氮和亚硝态氮的96 h半致死浓度分别为20.23 mg/L (换算成非离子氨为0.57 mg/L)和99.08 mg/L, 安全浓度分别为2.02 mg/L (换算成非离子氨为0.06 mg/L)和9.91 mg/L (图6)。

2.7 黄姑鱼MnSOD基因在氨氮和亚硝态氮急性攻毒条件下的表达分析

黄姑鱼鳃、肝脏和头肾组织中MnSOD基因表达量随着氨氮和亚硝态氮急性攻毒时间的延长而呈现不同程度变化。在鳃中, 黄姑鱼经氨氮和亚硝态氮攻毒后, MnSOD基因表达量均迅

表 3 黄姑鱼在氨氮和亚硝态氮攻毒下的死亡率及死亡概率

Tab. 3 The mortality and death probability of *N. albiflora* under the stress of ammonia nitrogen/nitrite nitrogen

浓度/(mg/L) concentration	浓度对数 lg concentration	个体总数/尾 total individuals	平行实验个体数/尾 individuals of parallel test	死亡数/尾 mortality	平均死亡率/% average mortality	死亡概率 probability of death
氨氮 ammonia nitrogen						
0.05		60	20	0	0	0
			20	0		
			20	0		
9.84	0.99	60	20	2	10.00	3.72
			20	1		
			20	3		
15.52	1.19	60	20	4	23.33	4.27
			20	5		
			20	5		
19.16	1.28	60	20	9	40.00	4.75
			20	7		
			20	8		
25.12	1.40	60	20	11	65.00	5.39
			20	15		
			20	13		
30.64	1.49	60	20	18	85.00	6.04
			20	16		
			20	17		
亚硝态氮 nitrite nitrogen						
0.03		60	20	0	0	0
			20	0		
			20	0		
47.19	1.67	60	20	1	6.67	3.50
			20	1		
			20	2		
80.21	1.90	60	20	5	26.67	4.38
			20	6		
			20	5		
121.09	2.08	60	20	11	58.33	5.21
			20	13		
			20	11		
150.35	2.18	60	20	16	83.33	5.97
			20	16		
			20	18		
178.27	2.25	60	20	19	93.33	6.50
			20	18		
			20	19		

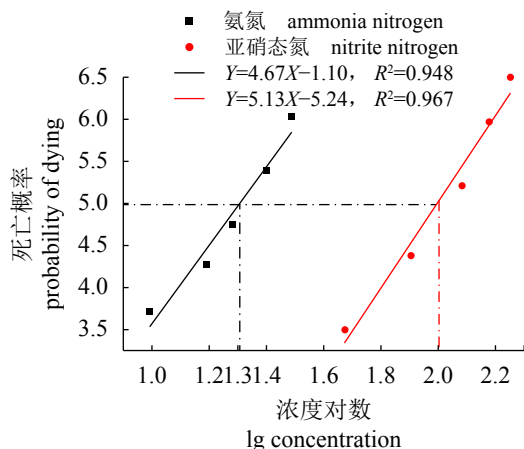


图 6 黄姑鱼死亡概率(Y)与氨氮及亚硝态氮浓度对数(X)之间的回归曲线

Fig. 6 Regression line between the probability of dying (Y) of *N. albiflora* and lg (concentration) of ammonia nitrogen/nitrite nitrogen (X)

速升高, 并分别于6 h (相对于攻毒前的3.47倍, $P<0.05$)和12 h (相对于攻毒前的3.77倍, $P<0.05$)达到峰值, 此后逐渐下降至攻毒前水平甚至更低(亚硝态氮组)(图7-a)。在肝脏中, 黄姑鱼经氨氮和亚硝态氮攻毒后的表达变化与鳃中类似, 但相对滞后。攻毒开始后, *MnSOD*基因表达量先缓慢上调, 并分别于24 h (相对于攻毒前的1.80倍, $P<0.05$)和48 h (相对于攻毒前的2.30倍, $P<0.05$)达到峰值, 随后均下调至攻毒前水平(图7-b)。在头肾中, 黄姑鱼经氨氮攻毒后, *MnSOD*基因表达量于48 h前无显著变化, 后逐渐上升并于72 h (相对于攻毒前的1.42倍, $P<0.05$)达到最高, 此后恢复至攻毒前水平。亚硝态氮组中*MnSOD*基因的表达水平于12 h达到最高(相对于攻毒前的1.68倍, $P<0.05$), 随后逐渐降低至无显著性差异(图7-c)。

3 讨论

本研究获得了黄姑鱼*MnSOD*的cDNA序列, 预测其编码一条由225个氨基酸组成的分子量约为22.2 ku的蛋白。与大多数其他物种的*MnSOD*类似, 黄姑鱼*MnSOD*的N末端也含有一条信号肽序列(27 aa), 帮助其分泌至线粒体发挥生物学功能^[31]。此外, 预测黄姑鱼*MnSOD*蛋白还含有2个潜在的糖基化位点, 在海湾扇贝(*Argopecten irradians*)^[32]、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenber-*

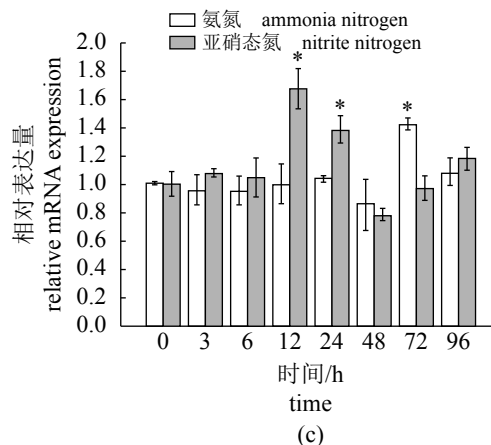
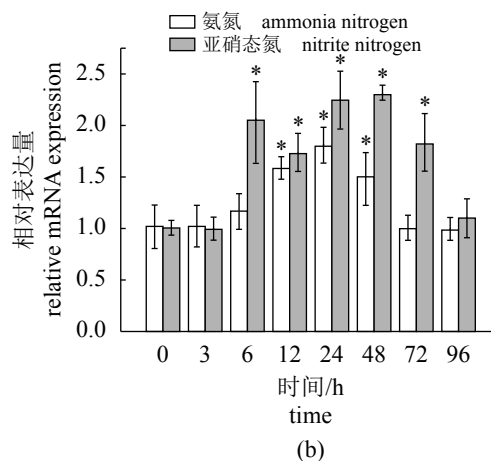
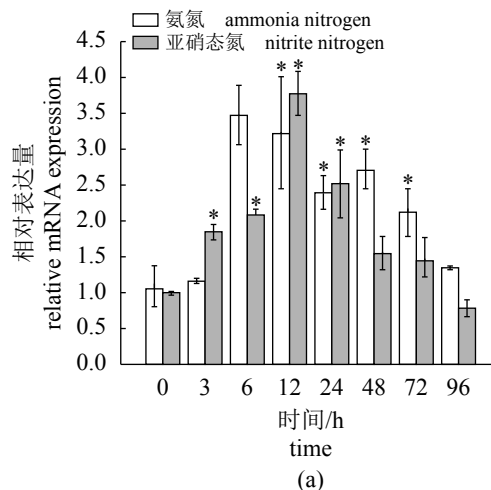


图 7 黄姑鱼经氨氮/亚硝态氮攻毒后*MnSOD*基因在鳃(a)、肝脏(b)和头肾(c)中不同时相(0、3、6、12、24、48、72和96 h)的表达变化

“*”代表显著差异 $P<0.05$

Fig. 7 Temporal mRNA expressions of *MnSOD* in gill (a), liver (b) and head-kidney (c) at 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 h after *N. albiflora* exposed to ammonia nitrogen/nitrite nitrogen

“*” indicates significant difference

gii)^[33]、黑腹果蝇^[34]等物种上也有类似发现,推测该MnSOD可能是一种糖蛋白。同源比对结果显示,黄姑鱼MnSOD的成熟蛋白(无信号肽)特别是4个潜在的Mn结合位点和锰/铁SOD特征序列与其他物种高度保守,表明黄姑鱼MnSOD蛋白与其他物种的MnSOD有着类似的结构和功能。将黄姑鱼MnSOD蛋白与人类MnSOD蛋白同源建模,结果显示,黄姑鱼MnSOD包含9个典型的 α 螺旋和3个 β 折叠结构,与人^[35]、秀丽隐杆线虫^[36]和线鳢^[25]的MnSOD一致。而嗜热菌(*Thermus thermophilus*) MnSOD^[37]则包含10个 α 螺旋和3个 β 折叠,大肠杆菌(*Escherichia coli*) MnSOD^[38]包含11个 α 螺旋和3个 β 折叠。Abreu等^[39]采用脉冲辐解的方法比较人、耐辐射奇球菌(*Deinococcus radiodurans*)和大肠杆菌MnSOD的酶活性,结果显示,活性依次为耐辐射奇球菌>大肠杆菌>人。另有研究表明,不同物种脂蛋白的 α 螺旋数量和位置与其抗动脉粥样硬化能力密切相关^[40]。推测不同物种的MnSOD蛋白拥有大致相同的 β 折叠数量,主要区别在于 α 螺旋,这可能与MnSOD在不同物种中的活力有关,以适应其不同的新陈代谢速率。

黄姑鱼MnSOD基因的组织表达分析显示其在所检测的11个组织/器官中均有表达,这与线鳢^[25]中的研究结果类似。但MnSOD基因在黄姑鱼不同的组织/器官表达量差异显著,在心脏中表达量最高,脑和肝脏中也有高峰期表达。有研究表明,MnSOD的合成是诱导性的,主要位于线粒体内膜,在含有大量线粒体的细胞中都有较高的表达水平^[41]。线粒体是需氧生物合成ATP的主要场所,为细胞的各项生理活动提供能量。细胞中线粒体的数量因生物体、组织和细胞类型而异,一般能量消耗越多的细胞含有越多的线粒体^[42]。研究表明,心脏是人体最大的耗能器官之一,心肌细胞具有大量的线粒体分布^[43];大脑具有极其复杂的功能,其能量代谢十分活跃,正常情况下人类约25%的葡萄糖和20%的氧用于供应脑细胞的能量消耗^[44];哺乳动物肝脏细胞中含有高达1 000~2 000的线粒体^[45];推测MnSOD在黄姑鱼心脏、脑和肝脏组织中的高表达是为了及时清除这些组织因大量消耗ATP而产生的氧自由基,保护组织/器官正常工作。

氨氮和亚硝态氮的毒性实验结果表明,黄姑鱼对氨氮的耐受能力远低于亚硝态氮,这与Rodrigues等^[46]的研究结果一致。事实上,氨氮在

水中主要以离子氨和非离子氨的形式存在,后者是氨氮具有毒性的主要原因。由于非离子氨不带电荷,具有较强脂溶性,它能够很容易地通过扩散穿过细胞膜,降低血液载氧能力,损害其代谢、免疫系统,甚至造成养殖动物死亡^[47]。研究表明,不同鱼类对氨氮(换算为非离子氨)和亚硝态氮胁迫的96 h LC₅₀也不一样。规格相近的短吻鲟(*Acipenser brevirostrum*) 96 h LC₅₀为0.58 mg/L^[48]、红鳍东方鲀(*T. rubripes*)为1.20 mg/L^[49]、锦鲤(*Cyprinus carpio*)^[50]为0.82 mg/L。对于亚硝态氮胁迫,规格相近的饰妆铠弓鱼(*Chitala ornata*) 96 h LC₅₀为109.48 mg/L^[51],金鱼(*Carassius auratus*)为341.47 mg/L^[52],红鳍东方鲀为159.25 mg/L^[53]。本研究中,黄姑鱼的96 h氨氮和亚硝态氮半致死浓度分别为0.57 mg/L(非离子氨)和99.08 mg/L,由于不同鱼类的生活习性以及生活环境不一样,很难将此结果与其他鱼类的氨氮和亚硝态氮攻毒实验作直接比较。从数据分析,黄姑鱼对氨氮和亚硝态氮的耐受能力都不高,表明在黄姑鱼的集约化养殖过程中,对养殖水体中氨氮和亚硝态氮的实时监控尤为重要。本研究获得的黄姑鱼对氨氮和亚硝态氮的96 h LC₅₀及安全浓度数据,可以为黄姑鱼养殖中水体氨氮和亚硝态氮浓度的监控,并及时调节水质具有一定的指导意义。

生物体的氧自由基水平会因许多外界因素(电离辐射、环境污染、高压氧、某些药物等)的刺激而急剧增长^[11]。有研究表明,鱼类应对氧化应激的主要组织/器官是鳃、肝脏和肾脏^[27]。本研究中,黄姑鱼在氨氮和亚硝态氮96 h半致死浓度攻毒条件下,其鳃、肝脏和头肾组织中MnSOD基因的表达水平均呈先升高后降低的趋势,且在鳃组织中上调时间较早。Zhou等^[54]在以0~24 h氨氮半致死浓度区间,对草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)进行急性攻毒,草鱼CuZnSOD基因表达量也出现类似的变化趋势,且24 h后草鱼的鳃组织出现严重的病理性损伤。推测黄姑鱼鳃、肝脏和头肾组织中MnSOD的上调是为了及时清除由氨氮和亚硝态氮刺激产生的氧自由基,而后期的下调是因为这些组织出现了不可逆的病理性损伤。此外,鳃是多数水生动物的呼吸器官,用以吸收溶解在水中的氧,直接与水体接触,这也印证了黄姑鱼鳃组织中MnSOD基因表达水平上调时间较早的原因^[55]。黄姑鱼鳃、肝脏和头肾组织中MnSOD基因的表达水平在氨氮和亚硝

态氮的攻毒条件下上调, 或可作为水体污染的早期生物标志物, 但其具体机制及应用还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 朱元鼎, 罗云林, 伍汉霖. 中国石首鱼类分类系统的研究和新属新种的叙述[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1963.
- Zhu Y D, Luo Y L, Wu H L. The study of classification system of family sciaenidae and the description of new genus and new species[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1963(in Chinese).
- [2] 郑娇, 曹款, 杨安冉, 等. 黄姑鱼染色体识别与重复序列定位[J]. 水产学报, 2016, 40(8): 1156-1162.
- Zheng J, Cao K, Yang A R, *et al.* Chromosome mapping using genomic DNA and repetitive DNA sequences as probes for somatic chromosome identification in *Nibea albiflora*[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(8): 1156-1162(in Chinese).
- [3] 韩春艳, 郑清梅, 陈桂丹, 等. 氨氮胁迫对奥尼罗非鱼非特异性免疫的影响[J]. 南方水产科学, 2014, 10(3): 47-52.
- Han C Y, Zheng Q M, Chen G D, *et al.* Effect of ammonia-N stress on non-specific immunity of tilapia (*Oreochromis niloticus*×*O. aureus*)[J]. South China Fisheries Science, 2014, 10(3): 47-52(in Chinese).
- [4] Benli A Ç K, Köksal G, Özkul A. Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): effects on gill, liver and kidney histology[J]. Chemosphere, 2008, 72(9): 1355-1358.
- [5] Sinha A K, AbdElgawad H, Giblen T, *et al.* Antioxidative defences are modulated differentially in three freshwater teleosts in response to ammonia-induced oxidative stress[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e95319.
- [6] Jia R, Han C, Lei J L, *et al.* Effects of nitrite exposure on haematological parameters, oxidative stress and apoptosis in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Aquatic Toxicology, 2015, 169: 1-9.
- [7] Tucker C S, Francis-Floyd R, Bealeu M H. Nitrite-induced anemia in channel catfish, *Ictalurus punctatus rafinesque*[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1989, 43(2): 295-301.
- [8] Moraes G, Avilez I M, Hori T S. Comparison between biochemical responses of the teleost pacu and its hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus*×*Colossoma macro-*
pomum) to short-term nitrite exposure[J]. Brazilian Journal of Biology, 2006, 66(4): 1103-1108.
- [9] Devasagayam T P A, Tilak J C, Boloor K K, *et al.* Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects[J]. Journal of the Association of Physicians of India, 2004, 52: 794-804.
- [10] Hwang Y S, Jeong M, Park J S, *et al.* Interleukin-1 β stimulates IL-8 expression through MAP kinase and ROS signaling in human gastric carcinoma cells[J]. Oncogene, 2004, 23(39): 6603-6611.
- [11] Winston G W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Comparative Pharmacology, 1991, 100(1-2): 173-176.
- [12] 李建喜, 杨志强, 王学智. 活性氧自由基在动物机体内的生物学作用[J]. 动物医学进展, 2006, 27(10): 33-36.
- Li J X, Yang Z Q, Wang X Z. Biological function of reactive oxygen free radicals in animals[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2006, 27(10): 33-36(in Chinese).
- [13] Jacob R A. The integrated antioxidant system[J]. Nutrition Research, 1995, 15(5): 755-766.
- [14] 张克烽, 张子平, 陈芸, 等. 动物抗氧化系统中主要抗氧化酶基因的研究进展[J]. 动物学杂志, 2007, 42(2): 153-160.
- Zhang K F, Zhang Z P, Chen Y, *et al.* Antioxidant defense system in animals[J]. Chinese Journal of Zoology, 2007, 42(2): 153-160(in Chinese).
- [15] Yost F J Jr, Fridovich I. An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1973, 248(14): 4905-4908.
- [16] Wuerges J, Lee J W, Yim Y I, *et al.* Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(23): 8569-8574.
- [17] Gómez-Anduro G A, Barillas-Mury C V, Peregrino-Urriarte A B, *et al.* The cytosolic manganese superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: molecular cloning and expression[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2006, 30(10): 893-900.
- [18] Dhar S K, St Clair D K. Manganese superoxide dismutase regulation and cancer[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2012, 52(11-12): 2209-2222.
- [19] Giuliivi C, Boveris A, Cadenas E. The steady-state concentrations of oxygen radicals in mitochondria[M]//

- Gilbert D L, Colton C A. Reactive Oxygen Species in Biological Systems. Boston, MA: Springer, 2002: 77-102.
- [20] Lebovitz R M, Zhang H, Vogel H, *et al.* Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(18): 9782-9787.
- [21] Li S J, Yan T, Yang J Q, *et al.* The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase[J]. Cancer Research, 2000, 60(14): 3927-3939.
- [22] Wang M, Kirk J S, Venkataraman S, *et al.* Manganese superoxide dismutase suppresses hypoxic induction of hypoxia-inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor[J]. Oncogene, 2005, 24(55): 8154-8166.
- [23] Miriyala S, Spasojevic I, Tovmasyan A, *et al.* Manganese superoxide dismutase, MnSOD and its mimics[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2012, 1822(5): 794-814.
- [24] Pérez-Sánchez J, Borrel M, Bermejo-Nogales A, *et al.* Dietary oils mediate cortisol kinetics and the hepatic mRNA expression profile of stress-responsive genes in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) exposed to crowding stress. Implications on energy homeostasis and stress susceptibility[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 2013, 8(2): 123-130.
- [25] Arockiaraj J, Palanisamy R, Bhatt P, *et al.* A novel murrel *Channa striatus* mitochondrial manganese superoxide dismutase: gene silencing, SOD activity, superoxide anion production and expression[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2014, 40(6): 1937-1955.
- [26] Nathiga Nambi K S, Abdul Majeed S, Taju G, *et al.* Effects of nicotine on zebrafish: a comparative response between a newly established gill cell line and whole gills[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology, 2017, 195: 68-77.
- [27] Liu H H, He J Y, Chi C F, *et al.* Identification and analysis of icCu/Zn-SOD, Mn-SOD and ecCu/Zn-SOD in superoxide dismutase multigene family of *Pseudosciaena crocea*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 43(2): 491-501.
- [28] Ullah A, Rehman H U, Saeed W, *et al.* Determination of 96-hr LC₅₀ value of cadmium for a fish, *Labeo rohita*[J]. Journal of Entomology and Zoology Studies, 2016, 4(5): 380-382.
- [29] Reish D L, Oshida P S. Manual of methods in aquatic environment research. Part 10: Short-term static bioassays[R]. FAO Fisheries Technical Paper, Rome: FAO, 1987, 247: 59-66.
- [30] Borgstahl G E O, Parge H E, Hickey M J, *et al.* Human mitochondrial manganese superoxide dismutase polymorphic variant Ile58Thr reduces activity by destabilizing the tetrameric interface[J]. Biochemistry, 1996, 35(14): 4287-4297.
- [31] Fukuhara R, Tezuka T, Kageyama T. Structure, molecular evolution, and gene expression of primate superoxide dismutases[J]. Gene, 2002, 296(1-2): 99-109.
- [32] Bao Y B, Li L, Wu Q, *et al.* Cloning, characterization, and expression analysis of extracellular copper/zinc superoxide dismutase gene from bay scallop *Argopecten irradians*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(1): 17-25.
- [33] Cheng W, Tung Y H, Chiou T T, *et al.* Cloning and characterisation of mitochondrial manganese superoxide dismutase (mtMnSOD) from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 21(4): 453-466.
- [34] Duttaroy A, Meidinger R, Kirby K, *et al.* A manganese superoxide dismutase-encoding cDNA from *Drosophila melanogaster*[J]. Gene, 1994, 143(2): 223-225.
- [35] Hsieh Y, Guan Y, Tu C, *et al.* Probing the active site of human manganese superoxide dismutase: the role of glutamine 143[J]. Biochemistry, 1998, 37(14): 4731-4739.
- [36] Hunter G J, Trinh C H, Bonetta R, *et al.* The structure of the *Caenorhabditis elegans* manganese superoxide dismutase MnSOD-3-azide complex[J]. Protein Science, 2015, 24(11): 1777-1788.
- [37] Ludwig M L, Metzger A L, Patridge K A, *et al.* Manganese superoxide dismutase from *Thermus thermophilus*: a structural model refined at 1.8 Å resolution[J]. Journal of Molecular Biology, 1991, 219(2): 335-358.
- [38] Edwards R A, Whittaker M M, Whittaker J W, *et al.* Outer sphere mutations perturb metal reactivity in manganese superoxide dismutase[J]. Biochemistry, 2001, 40(1): 15-27.
- [39] Abreu I A, Hearn A, An H, *et al.* The kinetic mechanism of manganese-containing superoxide dismutase from

- Deinococcus radiodurans*: a specialized enzyme for the elimination of high superoxide concentrations[J]. *Biochemistry*, 2008, 47(8): 2350-2356.
- [40] Wool G D, Reardon C A, Getz G S. Apolipoprotein A-I mimetic peptide helix number and helix linker influence potentially anti-atherogenic properties[J]. *The Journal of Lipid Research*, 2008, 49(6): 1268-1283.
- [41] 张艳红, 廖晓全, 袁勤生. 人锰超氧化物歧化酶(hMn-SOD)的研究进展[J]. *药物生物技术*, 2001, 8(6): 352-356.
- Zhang Y H, Liao X Q, Yuan Q S. Progress in the studies of human manganese superoxide dismutase[J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2001, 8(6): 352-356(in Chinese).
- [42] Sauvanet C, Duvezin-Caubet S, di Rago J P, *et al.* Energetic requirements and bioenergetic modulation of mitochondrial morphology and dynamics[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2010, 21(6): 558-565.
- [43] 阿力木江·买买提江, 施海明. 线粒体动力学与心肌细胞能量代谢的研究进展[J]. *复旦学报(医学版)*, 2013, 40(5): 625-628.
- Alimujiang M, Shi H M. Advance on the relationship between mitochondrial dynamics and myocardial energy metabolism[J]. *Fudan University Journal of Medical Sciences*, 2013, 40(5): 625-628(in Chinese).
- [44] Bélanger M, Allaman I, Magistretti P J. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation[J]. *Cell Metabolism*, 2011, 14(6): 724-738.
- [45] 穆长征, 席焕久, 包翠芬, 等. 大鼠肝细胞线粒体形态的三维重建[J]. *解剖学报*, 1999(2): 141-143.
- Mu C Z, Xi H J, Bao C F, *et al.* Three-dimensional reconstruction of mitochondria in rat hepatocyte[J]. *Acta Anatomica Sinica*, 1999(2): 141-143(in Chinese).
- [46] Rodrigues R V, Schwarz M H, Delbos B C, *et al.* Acute toxicity and sublethal effects of ammonia and nitrite for juvenile coho *Rachycentron canadum*[J]. *Aquaculture*, 2007, 271(1-4): 553-557.
- [47] Randall D J, Tsui T K N. Ammonia toxicity in fish[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2002, 45(1-12): 17-23.
- [48] Isely J J, Tomasso J R. Acute toxicity of ammonia and nitrite to shortnose sturgeon fingerlings[J]. *The Progressive Fish-Culturist*, 1998, 60(4): 315-318.
- [49] 杨晶晶, 孟祥科, 王鑫, 等. 非离子氨对红鳍东方鲀的急性毒性研究[J]. *现代农业科技*, 2013(6): 253-254.
- Yang J J, Meng X K, Wang X, *et al.* Study on acute toxicity of non-ionic ammonia on *Takifugu rubripes*[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2013(6): 253-254(in Chinese).
- [50] Abbas H H. Acute Toxicity of ammonia to common carp fingerlings (*Cyprinus carpio*) at different pH levels[J]. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2006, 9(12): 2215-2221.
- [51] Gam L T H, Jensen F B, Damsgaard C, *et al.* Extreme nitrite tolerance in the clown knifefish *Chitala ornata* is linked to up-regulation of methaemoglobin reductase activity[J]. *Aquatic Toxicology*, 2017, 187: 9-17.
- [52] 王凡, 刘海芳, 杨利. 亚硝酸盐氮对金鲫鱼种的急性毒性效应[J]. *水产科学*, 2010, 29(6): 369-371.
- Wang F, Liu H F, Yang L. Acute toxicity of nitrite nitrogen to goldfish juveniles[J]. *Fisheries Science*, 2010, 29(6): 369-371(in Chinese).
- [53] 汪家鑫, 张钊, 胡盼, 等. 亚硝酸盐对红鳍东方鲀的毒性效应[J]. *广东海洋大学学报*, 2013, 33(6): 52-56.
- Wang J X, Zhang Z, Hu P, *et al.* Effect of nitrite on hepatic antioxidant enzymes and acute toxicity in juvenile *Takifugu rubripes*[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2013, 33(6): 52-56(in Chinese).
- [54] Zhou X, Dong Y W, Wang F, *et al.* The effect of high ammonia concentration on gill structure alternation and expression of sod and hsp90 genes in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(2): 321-328.
- [55] Lease H M, Hansen J A, Bergman H L, *et al.* Structural changes in gills of lost river suckers exposed to elevated pH and ammonia concentrations[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2003, 134(4): 491-500.

Cloning of manganese superoxide dismutase gene and expression analysis in response to ammonia and nitrite challenge in *Nibea albiflora*

WANG Xiaolong¹, SONG Qing², WANG Zhiyong¹, HAN Fang^{1*}

(1. Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Institute of Flexible Electronics, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China)

Abstract: Manganese superoxide dismutase (MnSOD), a transition-metal-containing antioxidant enzyme that dismutates the superoxide radicals to either ordinary molecular oxygen (O₂) or hydrogen peroxide (H₂O₂), widely existed in many aerobic organisms. In this study, the cDNA of *MnSOD*, identified from *Nibea albiflora*, was 958 bp in length including 5'-untranslated region (UTR) of 47 bp, 3'-UTR of 233 bp and an open reading frame (ORF) of 678 bp encoding a polypeptide of 225 amino acids. The deduced amino acid sequence analysis showed that MnSOD contains a putative signal peptide in the N-terminus (1-27 aa), four Mn binding sites (His 53, 101, 190 and Asp 186) and a Mn/Fe SOD signature sequence (186-193 aa). Phylogenetic tree analysis indicated that *N. albiflora* has the closest relationship with *Larimichthys crocea*, and was classified into the same cluster with other teleosts (*Epinephelus coioides*, *Takifugu fasciatus*, *Paralichthys olivaceus*, *Danio rerio* and *Anguilla japonica*). Quantitative real-time qRT-PCR analysis showed that the mRNA transcripts of *MnSOD* were detected in all examined tissues and the predominant distribution was in heart, followed by brain, liver, gill, kidney, intestine, stomach, head-kidney, muscle and swim bladder, and the minimum level was displayed in spleen. Moreover, during the acute toxic experiment of ammonia nitrogen or nitrite nitrogen, *N. albiflora* showed more sensitive to ammonia nitrogen, and the 96 h median lethal concentration (LC₅₀) value was found to be 20.23 mg/L for ammonia nitrogen (or 0.57 mg/L for non-ionic ammonia) with safe concentration (SC) values of 2.02 mg/L (or 0.06 mg/L for non-ionic ammonia) and 99.08 mg/L with SC of 9.91 mg/L for nitrite nitrogen, successively. Furthermore, the temporal expression of *MnSOD* was significantly up-regulated in the liver, gill and head-kidney of *N. albiflora*. The expression features of the *MnSOD* suggested its important role in scavenging oxygen free radicals caused by ammonia nitrogen/nitrite nitrogen and could be used as an early biomarker for detection of environmental pollution.

Key words: *Nibea albiflora*; MnSOD; ammonia nitrogen; nitrite nitrogen

Corresponding author: HAN Fang. E-mail: hanfangyc@jmu.edu.cn

Funding projects: National Marine Fisheries Industrial Technology System Post Scientist Project (CARS-47-G04); Major Project of Fujian Science and Technology Department (2018N5010); Natural Science Foundation of Fujian Province (2018J01450, 2019J01693)