

## 鲤神经球蛋白基因序列与低氧表达分析

赵紫霞<sup>1</sup>, 曹顶臣<sup>2</sup>, 匡友谊<sup>2</sup>, 邓海霞<sup>1</sup>, 张 研<sup>1</sup>,  
徐 茹<sup>1</sup>, 李炯棠<sup>1</sup>, 徐 鹏<sup>1</sup>, 孙效文<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国水产科学研究院生物技术研究中心, 北京 100141;

2. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070)

**摘要:** 为深入了解鲤珠蛋白家族的基因组成和表达模式, 及其与低氧适应能力的相关性, 本实验通过鲤基因组框架图比对和全长 cDNA 文库筛选, 获得鲤神经球蛋白 (neuroglobin, *Ngb*) 基因完整序列, 证实鲤不仅具有独特的脑组织特异表达的 II 型肌红蛋白 (myoglobin-2, *Mb-2*) 基因, 也具有 *Ngb* 珠蛋白基因, 实时荧光定量 PCR 实验显示, 该基因在脑组织特异性表达, 并呈现出低氧应答特征。基因结构和系统发生分析表明, 鱼类 *Ngb* 基因高度保守, 鲤 *Ngb* 蛋白可能与斑马鱼直系同源蛋白具有相似的结构及功能, 而与鲤 *Mb-2* 存在明显差异。鲤 *Ngb* 基因表达量在两个品系间存在显著差异, 耐低氧能力强的散鳞镜鲤 *Ngb* 基因表达量高于荷包红鲤抗寒品系。研究表明, 鲤 *Ngb* 基因可能以与 *Mb-2* 基因分工协作的方式共同实现脑组织供氧, 执行应对低氧胁迫的神经保护功能, 在鲤低氧适应中具有重要作用。

**关键词:** 鲤; 神经球蛋白; 脑组织特异性表达; 低氧应答; 低氧适应

**中图分类号:** Q 175; S 917.4

**文献标志码:** A

珠蛋白家族是生物体内的氧转运分子<sup>[1-2]</sup>, 可以通过含铁卟啉环与氧可逆性结合, 担负着氧分子运输、储存以及氧活性物质平衡等功能, 其成员包括血红蛋白 (hemoglobin, Hb)、肌红蛋白 (myoglobin, Mb)、神经球蛋白 (neuroglobin, *Ngb*)<sup>[3]</sup> 等。2006 年, 英国利物浦大学 Cossins 课题组<sup>[4]</sup> 在鲤 (*Cyprinus carpio*) 低氧转录组研究中发现了脑组织特异表达的珠蛋白新亚型, 但这种新的珠蛋白不同于已知的神经系统专一性表达的 *Ngb*, 反而与肌肉组织大量表达的 *Mb* 具有较高序列同源性, 被认为是起源于全基因组复制事件的 *Mb-2* 新基因。Helbo 等<sup>[5]</sup> 通过原核表达获得了鲤 *Mb-2* 的重组蛋白, 基于氧亲和力及多种酶活力测定实验, 推断 *Mb-2* 蛋白可能通过清除氧活性物质来实现神经保护功能, 这意味着 *Mb-2* 基因不仅与 *Ngb* 基因表达位置重合, 也与哺乳动物研究中推测的 *Ngb* 基因作用

途径存在重叠<sup>[6-9]</sup>。

因此, 新的科学问题应运而生: 在 *Mb-2* 基因存在的同时, 鲤 *Ngb* 基因是否同样存在, 其表达特征和生理功能与模式生物相比是否发生了改变, *Mb-2* 与 *Ngb* 在同一组织中的生物学功能是同类型叠加还是各自分化? 本实验拟通过鲤基因组序列和文库筛选, 获取鲤 *Ngb* 基因序列, 进行基因结构和系统发生分析, 并开展组织表达和低氧表达等初步功能研究。

鲤珠蛋白独特的基因拷贝及表达模式被认为与其低氧适应能力密切相关<sup>[10-12]</sup>。有氧呼吸是真核生物的主要能量代谢方式, 严重低氧将导致养殖对象死亡, 而不致死的温和低氧也能够引起对摄食<sup>[13-14]</sup>、生长<sup>[15-16]</sup>和免疫<sup>[17-19]</sup>的抑制, 造成直接或间接的经济损失。养殖水体中溶氧量受温度、盐度、气压、生物耗氧因素等影响较大, 波动明显, 低氧成为水产物种经常面临的环境胁迫。

收稿日期: 2013-10-10 修回日期: 2013-12-13

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2011AA100401); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2012C014)

通信作者: 孙效文, E-mail: sunxw2002@163.com

对鲤 *Ngb* 基因结构及其功能的研究,将有助于探索鱼类氧供应分子机理、阐释其低氧胁迫应答途径、解析耐低氧品种的低氧适应机制,具有重要的产业价值和科学意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

实验用鱼采自中国水产科学研究院黑龙江水产研究所呼兰实验基地,包括3月龄散鳞镜鲤 (*Cyprinu carpio* L. *mirror*) 全同胞家系45尾,平均体质量( $170 \pm 20$ ) g,3月龄荷包红鲤 (*Cyprinus carpio* var. *wuyuanensis*) 抗寒品系全同胞家系45尾,平均体质量( $163 \pm 20$ ) g,个体选择标准为健康、正常摄食、体质量相近。

### 1.2 基因序列获取与分析

使用 CLC Genomics Workbench4.03 数据分析平台,依据斑马鱼 (*Danio rerio*) *Ngb* 基因 (GenBank 登陆号:NM\_131853.1) 序列,在本课题组鲤基因组框架图中进行 BLAST (basic local alignment search tool) 序列同源性比对,获取鲤 *Ngb* 基因所在区域基因组序列并提交 NCBI 数据库 (GenBank 登陆号:KC342291.1)。在鲤全长 cDNA 文库序列数据中比对获得基因的 cDNA 克隆, Sanger 测序获得全长 cDNA 序列,利用该序列对基因结构进行注释。基因结构图使用在线工具 fancyGENE v1.4 绘制<sup>[20]</sup>,系统发生分析使用 Mega 5.2.2 软件<sup>[21]</sup>完成。

### 1.3 低氧处理

低氧处理前,所有个体在实验缸中混合饲养14 d 以适应环境,水温 25 °C,每日3次(7:00,13:00,21:00)定时记录溶氧 (dissolved oxygen, DO) 值,保证 DO 值维持在 6.0 mg/L 以上,所有个体处于正常游泳、呼吸和摄食状态。禁食 24 h 后,停止气泵充氧,令 DO 值持续缓慢下降,每隔 30 min 在水面下 10 cm 处定点监测 DO 值,并记录实验鱼行为。根据品种和低氧表现划分实验组,每组 5 尾个体,采集组织样品分别保存于 RNAlater (life technologies) 中。每个家系设置 4 个实验组:常氧对照组,采集于停止充氧前;低氧浮头组,采集于个体严重浮头、拍打鱼缸外侧仍不潜回水下时;低氧昏迷组,采集于个体失去平衡漂浮于水上,但未停止呼吸时;低氧复苏组,个体低氧昏迷状态持续 10 min 后将其移入 DO 值高于

6.0 mg/L 的正常充氧鱼缸中,10 min 后采样。

### 1.4 基因表达分析

使用 Trizol 试剂 (life technologies) 分别提取脑、血液、鳃、头肾、体肾、心脏、肝、脾和肌肉组织总 RNA, DNase I (Sigma-Aldrich) 处理以避免基因组 DNA 污染。使用 ReverTra Ace- $\alpha$ -RT-PCR cDNA 第一链合成试剂盒 (TOYOBO) 进行 mRNA 反转录。分别使用各组织 cDNA 为模板对 *Ngb* 基因进行 PCR 扩增,1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,以确定 *Ngb* 基因组织表达分布。使用 SYBR Green RT-PCR 试剂盒 (TOYOBO) 在 AB 7500 real-time PCR 系统 (life technologies) 上进行实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 实验分析 *Ngb* 基因表达量。使用酸性核糖体磷蛋白 P0 (acidic ribosomal phosphoprotein P0, ARP, GenBank 登陆号:KF572122) 作为低氧表达内参基因<sup>[22-23]</sup>,  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算基因相对表达量。*Ngb* 扩增引物 *Ngb*-F: AGGAAGCACCAGGCAGTT; *Ngb*-R: ATGGCTGATACCACGATG; Mb-2 扩增引物<sup>[4]</sup> Mb2-F: ATGGCTGATTACGAGCGGTTT; Mb2-R: ACCGTGGGACGCCACCAACGTGTC; ARP 扩增引物 ARP-F: GGCTTTGGGAATCACCACCA; ARP-R: GCTGTAGACGCTGCCGTTAT。

## 2 结果

### 2.1 鲤 *Ngb* 基因结构

鲤 *Ngb* 基因编码区长度为 480 bp,由 4 个外显子组成。基因组序列上共 4 个内含子,其中一个 89 bp 短内含子位于 5' 非翻译区 (5' untranslated region, 5' UTR), 编码区 3 个内含子位置分别为 B12.2、E11.0 和 G7.0, B12.2 表示内含子位于珠蛋白螺旋 B 的第 12 个密码子第 2 个碱基之后<sup>[24]</sup>,其他类同。

鲤 *Ngb* 基因与人和斑马鱼直系同源基因的结构比较发现,非翻译区内含子为 2 种鱼类所共有,人 *Ngb* 基因则不具有该内含子,3 个物种间编码区内含子的位置相同,但内含子长度存在明显差异,鲤基因内含子较短。

### 2.2 鲤 *Ngb* 基因序列与系统发生分析

BLAST 比对表明,鲤和斑马鱼 *Ngb* 基因间相似度较高,核苷酸序列一致性达到 90%,氨基酸序列一致性更高达 96%,超过这 2 种鱼多数直系同源基因间的相似性,例如同属于珠蛋白家族的

*Mb* 基因,鲤和斑马鱼间的核苷酸和氨基酸序列一致性均为 82%。

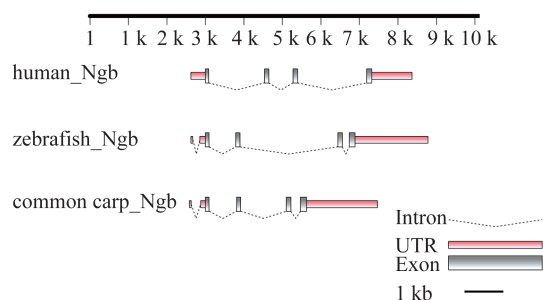


图 1 人、斑马鱼和鲤 *Ngb* 基因结构示意图

虚线表示内含子 (intron), 粉色表示非翻译区 (UTR), 灰色表示外显子 (exon), 比例尺为 1 kb

Fig. 1 Schematic structures of human (NC\_000014.8), zebrafish (NC\_007128.5) and common carp (KC342291.1) *Ngb* genes

Introns, UTRs, and exons were indicated in black dashes, pink boxes and grey boxes, respectively. One kb scale bar was shown

针对这种高度保守的基因,实验中使用核苷酸序列来构建系统发生树,选择珠蛋白中与 *Ngb* 相似性最高的 X 珠蛋白 (X globin, Xgb) 作为外群。基于 16 个物种 *Ngb* 基因全编码区序列 (coding sequence, CDS), 采取邻接法 (neighbor-joining, NJ)、最大似然法 (maximum likelihood, ML)、最小进化法 (minimum evolution, ME)、和非加权组平均法 (unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA) 构建的系统发生树均相似, NJ 树见图 2。由图可见鱼类与其他脊椎动物 *Ngb* 基因聚为距离较远的两支, 与鲤 *Ngb* 基因距离最近的是金鱼 (*Carassius auratus*), 斑马鱼次之。

### 2.3 鲤 *Ngb* 基因的组织表达

对 2 个品种鲤的 9 种组织检测显示, *Ngb* 基因仅在脑组织特异性表达, 血液、鳃、头肾、体肾、心脏、肝、脾和肌肉中均不表达。图 3 显示其中 1 尾散鳞镜鲤组织样品检测结果。

### 2.4 2 个品种低氧耐受能力比较

在本实验设置的条件下, 散鳞镜鲤表现出的低氧耐受能力明显强于荷包红鲤抗寒品系, 其低氧表现记录于表 1 中。在水中 DO 值降至 3 mg/mL 以下后, 2 种鲤都出现明显的呼吸加快; 进一步缺氧, 2 种鲤都表现出水面呼吸 (aquatic surface respiration, ASR), 即浮头行为, 但荷包红鲤抗寒品系浮头远早于散鳞镜鲤; 继续缺氧, 个体运动越

来越迟缓, 并陆续失去平衡漂浮在水面上, 只维持鳃盖开合的呼吸动作, 轻轻触碰鱼体无反应, 陷入昏迷或半昏迷状态, 在这一阶段两品种间的差异表现得更加明显, 80% 以上的荷包红鲤都昏迷后, 才有镜鲤出现昏迷。为防止实验鱼死亡, 在每尾个体维持漂浮 10 min 以后, 将其移入预充氧的鱼缸复苏, 所有个体均能迅速恢复正常游动, 一般只需 2 ~ 3 min。

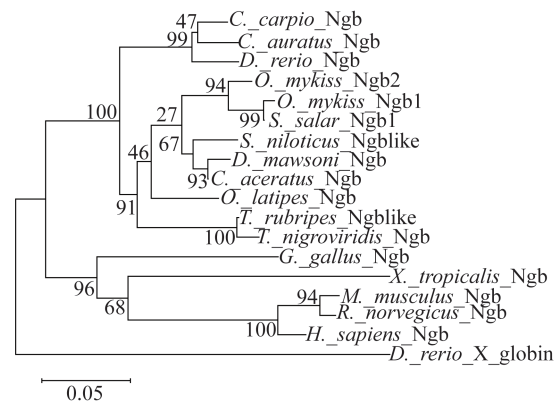


图 2 基于邻接法构建的 *Ngb* 基因系统发生树

基因序列分别来源于鲤 (*C. carpio*, KC342291.1), 金鱼 (*C. auratus*, AM933145.1), 斑马鱼 (*D. rerio*, NM\_131853.1), 虹鳟 (*O. mykiss*, NM\_001124388.1, NM\_001124389.1), 大西洋鲑 (*S. salar*, NM\_001173664.1), 尼罗罗非鱼 (*O. niloticus*, XM\_003453052.2), 南极犬牙鱼 (*D. mawsoni*, JQ684712.1), 黑鳍冰鱼 (*C. aceratus*, JQ684711.1), 青鳉 (*O. latipes*, XM\_004082312.1), 红鳍东方鲀 (*T. rubripes*, XM\_003962460.1), 黑青斑河鲀 (*T. nigroviridis*, AJ315609.1), 鸡 (*G. gallus*, EU016142.1), 热带爪蟾 (*X. tropicalis*, AJ634914.1), 小鼠 (*M. musculus*, NM\_022414.2), 大鼠 (*R. norvegicus*, NM\_033359.3), 人 (*H. sapiens*, NM\_021257.3), 选取斑马鱼 X 珠蛋白 (*D. rerio*, NM\_001012261.2) 序列作为外群

Fig. 2 Neighbor-joining phylogram describing phylogenetic relationships among vertebrate *Ngb* genes

Coding sequences of *Ngb* from common carp (*C. carpio*, KC342291.1), goldfish (*C. auratus*, AM933145.1), zebrafish (*D. rerio*, NM\_131853.1), rainbow trout (*O. mykiss*, NM\_001124388.1, NM\_001124389.1), Atlantic salmon (*S. salar*, NM\_001173664.1), Nile tilapia (*O. niloticus*, XM\_003453052.2), Antarctic toothfish (*D. mawsoni*, JQ684712.1), blackfin icefish (*C. aceratus*, JQ684711.1), medaka (*O. latipes*, XM\_004082312.1), takifugu (*T. rubripes*, XM\_003962460.1), tetraodon (*T. nigroviridis*, AJ315609.1), chicken (*G. gallus*, EU016142.1), western clawed frog (*X. tropicalis*, AJ634914.1), mouse (*M. musculus*, NM\_022414.2), rat (*R. norvegicus*, NM\_033359.3), human (*H. sapiens*, NM\_021257.3) were analyzed, with X globin from zebrafish (*D. rerio*, NM\_001012261.2) as outgroup sequence

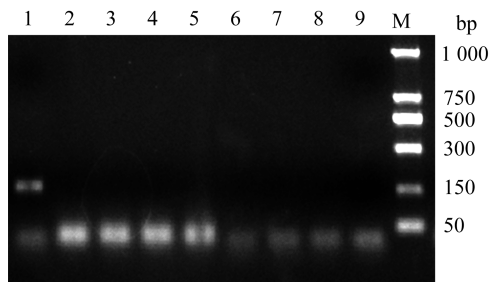


图3 *Ngb* 基因在鲤成鱼中的组织表达

1. 脑; 2. 血液; 3. 鳃; 4. 头肾; 5. 体肾; 6. 心脏; 7. 肝; 8. 脾;  
9. 肌肉; M. 1 kb 分子量标准

Fig. 3 Tissue distribution of common carp *Ngb* gene in an adult fish

1. brain; 2. blood; 3. gill; 4. head kidney; 5. kidney; 6. heart;  
7. liver; 8. spleen; 9. muscle; M. 1 kb DNA marker

## 2.5 鲤 *Ngb* 基因的低氧表达

2 种鲤表现出相似的 *Ngb* 基因低氧应答特征(图4):在持续缺氧、浮头严重的情况下,*Ngb* 基因表达量明显上调;而继续缺氧导致鱼体不能维持自主运动、陷入昏迷状态时,*Ngb* 基因表达量又回落到与常氧状态下相近的水平;在氧供应恢复、鱼体复苏阶段,*Ngb* 基因表达量没有显著变化。

最显著的差异发生在 2 个品种之间,散鳞镜鲤的 *Ngb* 基因表达量在本实验的任何时间点都远远高于荷包红鲤抗寒品系,差值近 10 倍;同时在脑组织表达的 *Mb-2* 基因也表现出相似特征,散鳞镜鲤 *Mb-2* 基因表达量约为荷包红鲤抗寒品系的 3 倍(图5)。

表1 溶氧量持续下降时散鳞镜鲤和荷包红鲤抗寒品系的低氧表现

Tab. 1 Hypoxia behaviours of mirror carp and hebao carp with continuously dropping DO value

时间/h time	DO/(mg/L) DO	散鳞镜鲤 mirror carp	荷包红鲤抗寒品系 hebao carp	备注 notes
0	6.23	水下正常游泳 normal swimming under water	水下正常游泳 normal swimming under water	完成 2 品种常氧对照组样品采集 samples of both normoxia control groups collected
3	1.25	水下正常游泳 normal swimming under water	出现浮头,有人靠近时下潜 aquatic surface respiration(ASR)	
3.5	0.94	出现浮头,有人靠近时下潜 ASR	大量浮头,活动迟缓,拍打缸壁时部分个体仍留在水面 serious ASR	完成荷包红鲤抗寒品系低氧浮头组样品采集 samples of hebao carp ASR group collected
4	0.72	明显浮头,活动减缓,有人靠近时下潜 ASR	多数严重浮头,拍打缸壁仍留在水面 serious ASR	
5	0.41	大量浮头,活动迟缓,拍打缸壁时部分个体仍留在水面 serious ASR	2 尾个体失去平衡漂浮于水面 two individuals lost balance	完成散鳞镜鲤低氧浮头组样品采集 samples of mirror carp ASR group collected
5.5	0.27	多数严重浮头,拍打缸壁仍留在水面 serious ASR	缸内剩余 22 尾个体 twenty two individuals left	开始荷包红鲤抗寒品系低氧昏迷组样品采集 samples collection of hebao carp coma group started 将水放掉一半,约 500 L,以加快缺氧 draining half of the water (about 500 L) to facilitate hypoxia
6	0.20	1 尾个体失去平衡漂浮于水面 one individual lost balance	剩余 6 尾个体 six individuals left	
6.5	0.21	剩余 26 尾个体 twenty six individuals left	已全部移走 zero individual left	开始散鳞镜鲤低氧昏迷组样品采集 samples collection of hebao carp coma group started
7	0.18	剩余 12 尾个体 twelve individuals left		

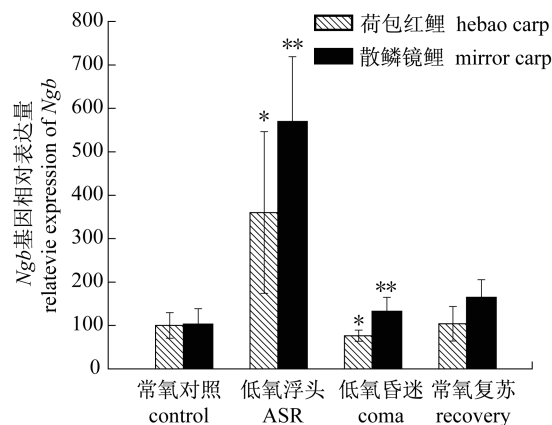


图4 鲤脑组织 *Ngf* 基因在不同低氧生理状态下的表达量变化

图中实验组相对表达量以各自同品种常氧对照组为基准计算,误差棒示相对标准差 ( $n=5$ ),星号表示  $t$  检验显著性水平 (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ )

Fig. 4 Hypoxia expression of *Ngf* gene in common carp brain

The relative expression value of each group was calculated by comparing with the strain's normoxia control. Error bars represented standard error of the mean ( $n=5$ ). Statistical differences relative to normoxia controls were calculated by using Student's  $t$  test (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ )

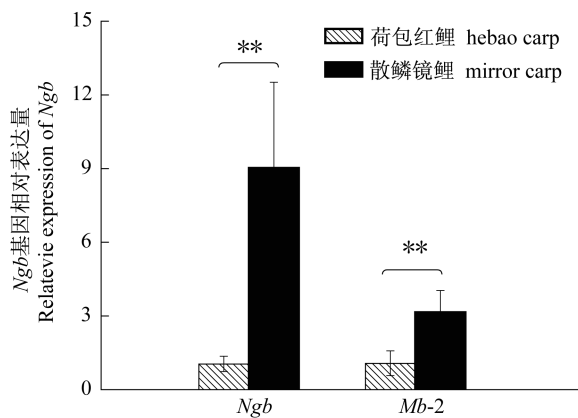


图5 常氧状态下,镜鲤和荷包红鲤脑组织中 *Ngf* 和 *Mb-2* 基因表达量比较

图中基因相对表达量以荷包红鲤该基因的表达量为基准计算,误差棒示相对标准差 ( $n=5$ ),星号表示  $t$  检验显著性水平 (\*\*,  $P < 0.01$ )

Fig. 5 Expression of *Ngf* and *Mb-2* genes in brain tissues of two common carp strains under normoxia

The relative expression value of each gene was calculated by comparing with its expression of hebao carp. Error bars represented standard error of the mean ( $n=5$ ). Statistical differences relative to normoxia controls were calculated by using Student's  $t$  test (\*\*,  $P < 0.01$ )

### 3 讨论

鲤基因组、转录组数据都支持 *Ngf* 与 *Mb-2* 基因共存,且 2 个基因在脑组织共同表达,但 *Ngf* 表达量低于 *Mb-2*。*Mb-2* 被认为起源于鲤独特的全基因组复制事件<sup>[4,11]</sup>,是鲤 *Mb* 基因复制后出现的新基因拷贝,而目前在鲤基因组、转录组装配数据,以及鲤成鱼全长 cDNA 文库中筛查都仅发现 1 个 *Ngf* 基因,没有找到其复制证据,这可能是由于 *Ngf* 所在的基因组区域保守性较高,在全基因组复制后没有发生明显分化,因而在目前的基因组数据中无法区分,或者该基因组区域在复制后又发生了缺失,仅剩余 1 个基因拷贝。

从获得的 *Ngf* 基因序列信息来看,鲤和斑马鱼的 *Ngf* 基因结构均具有珠蛋白家族共同的 B12.2 和 G7.0 内含子<sup>[24]</sup>,具有 *Ngf* 和细胞球蛋白 (cytoglobin, Cygb) 共有的 E11.0 内含子,以及人 *Ngf* 基因不具备的 5'UTR 内含子。鲤和斑马鱼 *Ngf* 编码的蛋白长度完全一致,蛋白序列高度相似,保守性超出这 2 个物种间的多数其他直系同源基因,从系统发生树也可看出各种鱼类 *Ngf* 基因间的遗传距离都较短,是一个保守性非常高的基因。

由序列特征推测,鲤 *Ngf* 蛋白的结构和功能也与斑马鱼相似。*Ngf* 基因一经发现就引起了研究者的广泛关注,但以哺乳动物模型及人类细胞系研究为主<sup>[6-9]</sup>,鱼类中的研究较少。早期研究推测斑马鱼 *Ngf* 功能与 *Mb* 类似,主要起到帮助氧分子转运的作用<sup>[25]</sup>,在 2008 年, Watanabe 等<sup>[26]</sup> 研究发现,人 *Ngf* 在蛋白质转运试剂 Chariot 存在的条件下可以穿过细胞膜,而斑马鱼 *Ngf* 则具有自主穿膜能力,无需 Chariot 帮助就能够通过质膜发挥 G 蛋白抑制功能,是第一个被发现的天然穿膜珠蛋白。*Ngf* 进入细胞后,还能够抑制三聚体 G 蛋白  $\alpha$  亚基上的鸟苷酸解离,从而影响信号转导通路,抑制低氧导致的细胞凋亡,发挥神经保护作用<sup>[26-27]</sup>。斑马鱼 *Ngf* 蛋白 M1 模块上的 Lys7、Lys9、Lys21 和 Lys23 是其细胞导入功能的关键位点<sup>[28-29]</sup>,这 4 个赖氨酸残基在鲤 *Ngf* 蛋白中都存在,因此预测鲤 *Ngf* 蛋白也能够实现自主穿膜行为。而同样在脑组织表达的鲤 *Mb-2* 蛋白则不具有该穿膜结构, Helbo 等<sup>[5]</sup> 认为 *Mb-2* 的作用可能是清除过氧化物等氧活性物质,以减少氧化性神经损伤。比较可见,鲤脑组织中

这2种珠蛋白结构差异明显,其生理功能并不是同类叠加,而更可能是通过不同的分工协作来共同实现供氧和神经保护等功能。

通过qRT-PCR方法检测鲤*Ngb*基因在9种组织的表达情况,仅在脑组织中检测到*Ngb*基因表达,这一结果与斑马鱼略有不同,斑马鱼*Ngb*基因在鳃组织中也有微量表达。

德国汉堡大学Burmester课题组在2006至2011年间,对斑马鱼<sup>[23]</sup>、鲫<sup>[11]</sup>和青鳉<sup>[30]</sup>3种鱼类的珠蛋白进行了低氧表达研究,结果各不相同:低氧胁迫后斑马鱼*Ngb*基因表达量显著上调,而鲫和青鳉*Ngb*基因表达量却没有显著变化,因此他们推测*Ngb*基因的低氧应答方式是因物种而异的。在这些实验中,低氧处理的方式都是在恒定氧分压下持续缺氧,在同一时间内(如24h)对所有个体同时采样。

本实验通过设置自然下降的溶氧条件,将采样时间与实验鱼的生理反应联系起来,对缺氧过程中的典型时间点进行连续采样,发现在缺氧过程中,*Ngb*基因表达量是随着缺氧生理状态的变化而波动的:在缺氧浮头的阶段,低氧胁迫已经持续了一段时间,各组织处于严重供氧不足状态,鱼体以加快呼吸、吞咽空气等方式增加氧供应,此时*Ngb*基因表达量上调,增加脑组织供氧;当缺氧更加严重,鱼体已经无法通过自身的适应行为增加氧供给时,开始陷入昏迷阶段,通过抑制自身的各类生理活动和代谢反应来降低氧消耗,*Ngb*基因表达量又出现回落。在同一物种内,品种间、家系间、乃至个体间的低氧耐受能力也表现出一定差异,在同一时间点采集的样品,可能实际上处于不同的生理状态,因而有不同的基因表达特征,例如在本实验中,在低氧持续5~6h的时间段内,DO值从0.4mg/L降至0.2mg/L左右,散鳞镜鲤处于缺氧浮头,*Ngb*表达量上升的状态,而荷包红鲤抗寒品系则陆续缺氧昏迷,*Ngb*表达量已回落。

从*Ngb*基因的低氧应答特征来看,也与*Mb-2*存在明显区别,暗示着二者的功能分化。脑*Mb-2*在低氧诱导后表达量无显著变化<sup>[4]</sup>,而*Ngb*呈现出类似肌肉*Mb*的低氧上调现象,可能执行类似肌肉*Mb*的氧转运功能。

*Ngb*表达量分析还显示,2个低氧适应能力差别明显的鲤品种(家系)间,*Ngb*表达量有显著差异,低氧适应能力强的*Ngb*表达量高。类似现象在

啮齿动物中也曾被报道<sup>[31]</sup>,生活在地底低氧洞穴中的2种穴居鼯鼠(*Spalax galili*和*Spalax judaei*),*Ngb*表达量比它们的近亲大鼠分别高出2.8和1.8倍。而本实验则是首次在同一物种中展示出*Ngb*表达量与低氧适应能力的相关性。值得提及的是,实验表明,*Mb-2*基因在散鳞镜鲤脑组织中的表达量也高于荷包红鲤抗寒品系。散鳞镜鲤脑组织的2种主要珠蛋白类型表达量都高于荷包红鲤抗寒品系,可能意味着更强的脑供氧能力和神经保护效应,从而增强该品种的低氧适应能力。

鲤*Ngb*基因的这些表达特征,暗示着它在低氧适应,尤其是脑组织氧供应和神经保护方面的重要作用。*Ngb*与*Mb-2*在鲤脑组织中共同表达,但蛋白结构和表达特征都存在明显差异,二者功能并不相同,其功能分化和协同可能是鱼类对生活溶氧波动的一种适应性策略。

#### 参考文献:

- [1] Hoffmann F G, Opazo J C, Storz J F. Whole-genome duplications spurred the functional diversification of the globin gene superfamily in vertebrates [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2012, 29 (1): 303 - 312.
- [2] Rezende E L. Better oxygen delivery [J]. *Science*, 2013, 340(6138): 1293 - 1294.
- [3] Burmester T, Weich B, Reinhardt S, et al. A vertebrate globin expressed in the brain [J]. *Nature*, 2000, 407(6803): 520 - 523.
- [4] Fraser J, de Mello L V, Ward D, et al. Hypoxia-inducible myoglobin expression in nonmuscle tissues [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American*, 2006, 103 (8): 2977 - 2981.
- [5] Helbo S, Dewilde S, Williams D R, et al. Functional differentiation of myoglobin isoforms in hypoxia-tolerant carp indicates tissue-specific protective roles [J]. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2012, 302 (6): R693 - R701.
- [6] Zhao T B, Chang Z J, Zhao X Q. A new oxygen-binding globin: neuroglobin [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2003, 30 (6): 844 - 846. [赵同标, 常智杰, 赵新全. 一种新的氧合球蛋白——神经球蛋白. *生物化学与生物物理进展*, 2003, 30(6): 844 - 846.]
- [7] Burmester T, Hankeln T. What is the function of

- neuroglobin? [ J ]. The Journal of Experimental Biology, 2009, 212 ( Pt 10 ): 1423 – 1428.
- [ 8 ] Yu Z, Fan X, Lo E H, *et al.* Neuroprotective roles and mechanisms of neuroglobin [ J ]. Neurological Research, 2009, 31 ( 2 ): 122 – 127.
- [ 9 ] Fiocchetti M, De Marinis E, Ascenzi P, *et al.* Neuroglobin and neuronal cell survival [ J ]. Biochimica et Biophysica Acta, 2013, 1834 ( 9 ): 1744 – 1749.
- [ 10 ] Riggs A F, Gorr T A. A globin in every cell? [ J ]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American, 2006, 103 ( 8 ): 2469 – 2470.
- [ 11 ] Roesner A, Mitz S A, Hankeln T, *et al.* Globins and hypoxia adaptation in the goldfish, *Carassius auratus* [ J ]. FEBS Journal, 2008, 275 ( 14 ): 3633 – 3643.
- [ 12 ] Helbo S, Weber R E, Fago A. Expression patterns and adaptive functional diversity of vertebrate myoglobins [ J ]. Biochimica et Biophysica Acta, 2013, 1834 ( 9 ): 1832 – 1839.
- [ 13 ] Li J, Sun X T, Zhao F Z. Observation on effects of temperature and dissolved oxygen on ingestion of *Penaeus chinensis* [ J ]. Journal of Fisheries of China, 1993, 17 ( 4 ): 333 – 336. [ 李健, 孙修涛, 赵法箴. 水温 and 溶解氧含量对中国对虾摄食影响的观察. 水产学报, 1993, 17 ( 4 ): 333 – 336. ]
- [ 14 ] Zhao Z G. The relationships between breathing and feeding and their regulatory mechanism in silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* Val. and grass carp *Ctenopharyngodon idellus* [ D ]. Qingdao: Ocean University of China, 2011. [ 赵志刚. 鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 的呼吸与摄食的关系及其调节机制. 青岛: 中国海洋大学, 2011. ]
- [ 15 ] Chabot D, Dutil J D. Reduced growth of Atlantic cod in non-lethal hypoxic conditions. [ J ]. Journal of Fish Biology, 1999, 55 ( 3 ): 472 – 491.
- [ 16 ] Wei L Z. Effects of Low Dissolved Oxygen on the Growth of Chinese Shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* and the mechanism [ D ]. Qingdao: Ocean University of China, 2010. [ 韦柳枝. 低溶解氧对中国明对虾生长的影响及其机制的实验研究. 青岛: 中国海洋大学, 2010. ]
- [ 17 ] Scapigliati G, Scalia D, Marras A, *et al.* Immunoglobulin levels in the teleost sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) in relation to age, season, and water oxygenation [ J ]. Aquaculture, 1999, 174 ( 3 – 4 ): 207 – 212.
- [ 18 ] Chen J H, Mai K S, Ma H M, *et al.* Effects of dissolved oxygen on survival and immune responses of scallop (*Chlamys farreri* Jones et Preston) [ J ]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 22 ( 3 ): 272 – 281.
- [ 19 ] Shen F, Fan Q X, Yang K, *et al.* The immune responses of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) and its susceptibility to *Aeromonas hydrophila* at different dissolved oxygen levels [ J ]. Freshwater Fisheries, 2010, 40 ( 4 ): 44 – 49, 55. [ 沈凡, 樊启学, 杨凯, 等. 不同溶氧条件下黄颡鱼免疫机能及抗病力的研究. 淡水渔业, 2010, 40 ( 4 ): 44 – 49, 55. ]
- [ 20 ] Rambaldi D, Ciccarelli F D. FancyGene: dynamic visualization of gene structures and protein domain architectures on genomic loci [ J ]. Bioinformatics, 2009, 25 ( 17 ): 2281 – 2282.
- [ 21 ] Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [ J ]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28 ( 10 ): 2731 – 2739.
- [ 22 ] Simpson D A, Feeney S, Boyle C, *et al.* Retinal VEGF mRNA measured by SYBR green I fluorescence: A versatile approach to quantitative PCR [ J ]. Molecular Vision, 2000, 6 ( 24 ): 178 – 183.
- [ 23 ] Roesner A, Hankeln T, Burmester T. Hypoxia induces a complex response of globin expression in zebrafish (*Danio rerio*) [ J ]. The Journal of Experimental Biology, 2006, 209 ( Pt 11 ): 2129 – 2137.
- [ 24 ] Dröge J, Pande A, Englander E W, *et al.* Comparative genomics of neuroglobin reveals its early origins [ J ]. PLoS One, 2012, 7 ( 10 ): e47972.
- [ 25 ] Fuchs C, Heib V, Kiger L, *et al.* Zebrafish reveals different and conserved features of vertebrate neuroglobin gene structure, expression pattern, and ligand binding [ J ]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279 ( 23 ): 24116 – 24122.
- [ 26 ] Watanabe S, Wakasugi K. Zebrafish neuroglobin is a cell-membrane-penetrating globin [ J ]. Biochemistry, 2008, 47 ( 19 ): 5266 – 5270.
- [ 27 ] Kamioka Y, Fujikawa C, Ogai K, *et al.* Functional characterization of fish neuroglobin: zebrafish neuroglobin is highly expressed in amacrine cells after optic nerve injury and can translocate into ZF4 cells [ J ]. Biochimica et Biophysica Acta, 2013, 1834 ( 9 ): 1779 – 1788.
- [ 28 ] Watanabe S, Wakasugi K. Identification of residues

- critical for the cell-membrane-penetrating activity of zebrafish neuroglobin [J]. FEBS Letters, 2010, 584 (11): 2467 – 2472.
- [29] Watanabe S, Wakasugi K. Module M1 of zebrafish neuroglobin acts as a structural and functional protein building block for a cell-membrane-penetrating activity [J]. PLoS One, 2011, 6(2): e16808.
- [30] Wawrowski A, Gerlach F, Hankeln T, *et al.* Changes of globin expression in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*) in response to acute and chronic hypoxia [J]. Journal of Comparative Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2011, 181(2): 199 – 208.
- [31] Avivi A, Gerlach F, Joel A, *et al.* Neuroglobin, cytoglobin, and myoglobin contribute to hypoxia adaptation of the subterranean mole rat *Spalax* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American, 2010, 107 (50): 21570 – 21575.

## Analysis of common carp neuroglobin gene sequence and hypoxia expression

ZHAO Zixia<sup>1</sup>, CAO Dingchen<sup>2</sup>, KUANG Youyi<sup>2</sup>, DENG Haixia<sup>1</sup>, ZHANG Yan<sup>1</sup>,  
XU Ru<sup>1</sup>, LI Jiongtang<sup>1</sup>, XU Peng<sup>1</sup>, SUN Xiaowen<sup>1,2\*</sup>

(1. The Center for Applied Aquatic Genomics, Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China;  
2. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China)

**Abstract:** The study aimed to better understand the constitution and expression pattern of common carp (*Cyprinus carpio*) globin family, and their contributions to hypoxia adaptation of the species. Complete gene sequence of common carp neuroglobin (*Ngb*) was obtained by BLAST searching in draft genome sequence and screening in full-length cDNA library, proving that *Ngb* gene co-existed in common carp genome with myoglobin-2 (*Mb-2*), a unique paralog of globin previously reported to be specifically expressed in brain. Quantitative real-time PCR results indicated that common carp *Ngb* gene expression was brain-specific and hypoxia responsive. *Ngb* expression was up-regulated during the aquatic surface respiration, and followed by a decline when the fish fell into coma, then no significant change in *Ngb* expression was observed during the reoxygenation recovery. Analysis on gene structure and phylogeny indicated that teleost *Ngb* genes were highly conserved, suggesting that common carp *Ngb* might have similar protein structure and biological functions to its zebrafish ortholog, while distinct from the paralogous *Mb-2*. Expression quantity was significantly different between two common carp strains with distinct hypoxia tolerance. Nearly 10 times higher *Ngb* expression was detected in the hypoxia tolerant mirror carp. These results suggested that *Ngb* and *Mb-2* might serve the brain in different ways, to accomplish better oxygen delivery and neuron protection against hypoxia, playing an important role in hypoxia adaptation of common carp.

**Key words:** *Cyprinus carpio*; neuroglobin; brain-specific expression; hypoxia responses; hypoxia adaption  
**Corresponding author:** SUN Xiaowen. E-mail: sunxw2002@163.com