



军曹鱼 *NHE3* 和 *NKAa1a* 基因克隆、表达模式及相关 miRNA 的靶向调控

王忠良¹, 刘付柏¹, 黄宝松², 李桂英¹,
王菁¹, 王蓓^{1*}, 陈宗发¹

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524088;

2. 广东省中山市三角镇农业服务中心, 广东 中山 528445)

摘要: 为了解军曹鱼 *NHE3* 与 *NKAa1a* 的序列特征、盐度胁迫下的基因表达模式以及相关 miRNA 的靶向调控作用, 实验应用 cDNA 末端快速扩增技术克隆了 *NHE3* 与 *NKAa1a* 的全长 cDNA 序列; 应用实时定量 PCR (qPCR) 技术分析了 *NHE3* 和 *NKAa1a* 的组织特异性和盐度适应性表达模式; 采用双荧光素酶报告实验检测了 *NHE3* 和 *NKAa1a* 与相关 miRNA 的靶向调控关系。结果显示, 军曹鱼 *NHE3* 与 *NKAa1a* 基因的开放阅读框长度分别为 2 718 和 3 075 bp, 分别编码 905 和 1 024 个氨基酸; *NHE3*、*NKAa1a* 在鳃、肠、心脏等 9 种组织中均有表达, 其中以鳃组织中的表达丰度最高。随着盐度升高, *NHE3* 在鳃中表达量下降, 低盐和高盐适应后均呈显著差异。*NKAa1a* 基因表达量随着盐度升高出现不同趋势, 在鳃和肠中受低盐和高盐影响后均显著上调, 而高盐环境下其在体肾中的表达水平显著下调。在不同盐度适应过程中, *NHE3*、*NKAa1a* 均以鳃组织中的表达水平最高。*NHE3*-pmir-GLO-WT 与 miR-1335-3p 共转染时, 较对照组相对荧光素酶活性下降, 并存在极显著差异; *NKAa1a*-pmirGLO-WT 分别与 miR-1788-3p 和 mimic NC (对照组) 的共转染结果与上述结果类似。研究表明, miR-1335-3p 和 miR-1788-3p 可分别与 *NHE3* 和 *NKAa1a* 3'-UTR 序列结合, 并下调其 mRNA 表达水平。*NHE3* 和 *NKAa1a* 在物种间高度保守; *NHE3* 主要参与低盐适应, 而 *NKAa1a* 在低盐和高盐适应中均发挥作用; miR-1335-3p 和 miR-1788-3p 可分别负向调控其靶基因 *NHE3* 与 *NKAa1a*, 从而参与军曹鱼渗透压调节。以上研究结果为进一步研究军曹鱼 miRNA-mRNA 渗透压调控网络提供了理论基础。

关键词: 军曹鱼; 盐度适应; cDNA 克隆; 荧光定量 PCR; 双荧光素酶

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

作为环境非生物因子, 盐度对硬骨鱼类 (Osteichthyes) 的生长发育、繁殖、免疫应答等生理活动都有重要影响^[1-4]。广盐性硬骨鱼类能适应较大范围的盐度变化, 具备较大盐度适应范围,

但盐度的短期或长期变化仍会影响鱼类激素水平、新陈代谢活动、离子通道调控和免疫反应等^[1, 5-6]。目前, 环境胁迫对鱼类生理功能影响的研究较多集中于高渗透胁迫上。研究表明, 急性或慢性盐

收稿日期: 2021-12-06 修回日期: 2022-03-22

资助项目: 国家级大学生创新创业训练计划项目 (CXXL2020002); 广东海洋大学本科生创新团队项目 (CXTD2021001); 广东海洋大学 2019 年“冲一流”省财政专项资金建设项目; 广东省普通高校创新团队项目 (2021KCXTD026, 2022KCXTD013)

第一作者: 王忠良 (照片), 从事水产经济动物功能基因与基因组学研究, E-mail: zhongliangwang@vip.163.com

通信作者: 王蓓, 从事水产养殖学研究, E-mail: wangb@gdou.edu.cn



度变化可调控某些盐度相关基因的表达, 并诱导离子细胞的重塑和促进脂质代谢活动^[2,5]。低渗胁迫条件下的研究表明, 硬骨鱼类主要通过激素、离子通道、转运蛋白和信号蛋白来调节渗透压^[7-8]。

广盐性硬骨鱼类能借由复杂的渗透压调节机制来抵御盐度变化带来的负面影响, 维持机体渗透压稳态^[9]。近年来, 在广盐性鱼类盐度胁迫研究中, 已相继报道了多种 miRNA 参与渗透压调节, 如 miR-429、miR-30c、miR-8 和 miR-206 等^[10-13]。miRNA 通过识别靶基因的 3'-UTR 区并进行碱基互补结合, 对靶基因表达起到抑制作用或直接降解, 从而在动植物发育过程中参与转录水平和翻译水平的基因表达调控^[14]。单个 miRNA 可同时调控多个靶基因, 或同一靶基因受多个 miRNA 调控, 且其表达模式在生物发育过程中表现出阶段性和组织特异性^[15]。由此构成的复杂 mRNA-miRNA 调控网络可以实现对某个基因或蛋白的精准调控, 参与信号转导、生长发育、能量代谢、渗透调节等生物学进程调节^[1, 16-19]。

广盐性鱼类主要利用渗透压调节器官(如鳃、肠道、体肾等)通过离子转运、神经内分泌、能量代谢等途径调控适应不同的盐度环境^[20]。而在分子水平上, 已有多种基因被证实与渗透压调节相关, 包括离子转运基因钠钾泵(sodium-potassium pump, NKA)、 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ 共转运蛋白 1 ($\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter 1, NKCC1)、 Na^+/H^+ 交换蛋白 3 (sodium/hydrogen exchanger 3, NHE3)、 Na^+/Cl^- 辅助转运蛋白 (Na^+/Cl^- cotransporters, NCC) 和囊性纤维化跨膜电导调节因子 (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR); 内分泌激素基因生长激素 (growth hormone, GH)、皮质醇 (hydrocortisone, COR)、催乳素 (prolactin, PRL)、胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factors -1, IGF-1)^[21]。作为鳃上主要的活性泵, NKA 负责离子转运, 不仅对维持细胞内稳态很重要, 而且为多种渗透压调节上皮细胞内的离子转运系统提供重要驱动力^[22]。目前在硬骨鱼中已鉴定出 NKA 具有 2 种异构体 (α 亚基和 β 亚基), 前者包含 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$, 后者分为 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 和 $\beta 4$ ^[22]。在鱼类渗透压调节器官中表达多种 $\text{NKA}\alpha$ 异构体, 其表达水平受到盐度变化调控, 表现为盐依赖性表达, 显示出 $\text{NKA}\alpha$ 对离子细胞功能实现的重要性^[23-24]。日本花鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 经过高盐驯化后, 2 种 NKA 亚型 ($\text{NKA}\alpha 1a$ 和 $\text{NKA}\alpha 3b$) 在鳃中高表

达, 揭示了鳃 $\text{NKA}\alpha$ 亚型基因在盐度胁迫反应中的重要性^[25]。此外, $\text{NKA}\alpha$ 与 NKA 酶活性强弱显著正相关, 说明鱼类 $\text{NKA}\alpha$ 可能是影响 NKA 酶功能强弱的重要构成之一^[9]。

本实验基于前期高通量测序数据挖掘差异表达 miRNA 及其靶基因, 选取 miRNA-mRNA 靶基因关系对中的 miR-1335-3p 与 NHE3 、miR-1788-3p 与 $\text{NKA}\alpha 1a$ 进行靶基因全长 cDNA 克隆和表达模式分析, 并通过双荧光素酶报告检验二者间的调控关系, 为进一步探究军曹鱼 (*Rachycentron canadum*) 盐度适应的渗透压调节机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验对象 实验用军曹鱼采自广东海洋大学东海岛海洋生物研究基地。选择健康有活力、体表无伤的幼鱼 [平均体长 (18.67±1.28) cm, 平均体重 (61.08±7.96) g]。采样前暂养于室内 1.5 m³ 水体的玻璃钢水槽, 过滤海水盐度为 30 (自然海水盐度), 水温 (27±2) °C。暂养 1 周后, 挑选健康个体, 采集鳃、肠道、体肾、肝脏、心脏、脑、脾脏、胃和肌肉 9 种组织, 迅速置于液氮中速冻, -80 °C 冰箱保存。

慢性盐度适应实验 实验设置盐度为 10 (低盐组)、30 (对照组) 和 35 (高盐组) 3 个盐度梯度。利用充分曝气的淡水和用海水晶调配的高盐度海水将自然海水按照每天降低或升高 5 的幅度调至实验盐度。每个盐度组设置 3 个重复, 各放置 10 尾军曹鱼。在实验盐度暂养 1 周后, 开始正式实验; 实验周期为 4 周, 期间不断充气, 并每日投喂 6 % 体重的商业配合饲料 (粗蛋白含量 46%, 粗脂质含量 8%) 2 次, 换水率 30 %。实验结束后, 采集鳃、肠道、体肾样品。

1.2 主要试剂

293T 细胞株 (苏州吉玛基因股份有限公司)、琼脂糖 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司]、DMEM 培养基 (Gibco, 美国)、胎牛血清 (FBS) (BI, 以色列)、胶回收试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司)、磷酸盐缓冲溶液 (PBS) (Life Science Products & Services, 美国)、十二烷基硫酸钠 (SDS) (BBI, 中国)、Trypsin-EDTA Solution (Hyclone, 美国)。

1.3 实验方法

总 RNA 提取与 cDNA 一链合成 利用总 RNA 提取试剂盒抽提鳃组织总 RNA; 1.5% 凝胶电泳检测完整性, 超微量核酸测定仪测定浓度。cDNA 一链合成参照 EasyScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 说明书进行, 合成产物保存于 -20°C 冰箱。

军曹鱼 *NHE3* 和 *NKAa1a* 的克隆 基于前期高通量测序数据, 筛选出分别注释为 *NHE3* 和 *NKAa1a* 的 unigene, 经 BLAST 比对确定为硬骨鱼类 *NHE3*、*NKAa1a* 基因片段。根据 unigene 序列设计特异性引物, 扩增保守区域进一步验证基因正确性 (表 1)。PCR 扩增程序为 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 60 s, 循环 35 次; 72°C 延伸 5 min。从 PCR 产物经电泳后, 切胶纯化回收 *NHE3*、*NKAa1a* 目的

条带。连接 pMDTM 18-T 载体, 转化至 DH5 α 感受态细胞后适温培养, 挑选阳性单克隆菌落进行测序。设计 3' 和 5' 末端扩增巢式引物, 先分别以 3'-F1 和 Long primer、5'-R1 和 Long primer 配对扩增获取第 1 次产物, PCR 扩增程序: 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 30 s, 58°C 退火 30 s, 72°C 延伸 90 s, 循环 35 次; 72°C 延伸 10 min。将第 1 轮 PCR 产物稀释 2 倍后作为模板进行第 2 次扩增, 引物为 3'-F2 和 Short primer、5'-R2 和 Short primer。PCR 扩增程序为 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 30 s, 退火 30 s (根据引物相应 T_m 值设置退火温度), 72°C 延伸 60 s/30 s, 循环 35 次; 72°C 延伸 10 min。PCR 产物经切胶回收、连接、转化后, 挑选阳性单菌落送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序鉴定。

生物信息学分析 *NHE3*、*NKAa1a* 的

表 1 用于基因克隆和序列验证的 PCR 引物

Tab. 1 Primers used for gene cloning and sequence verification

引物 primers	序列(5'-3') sequences (5'-3')	用途 usage
<i>NHE3</i> -F1	CGCCCTGCTCATCTGCTT	中间片段克隆
<i>NHE3</i> -F2	ACGCTCCTCTTCGTCATTGTG	cloning of intermediate fragment
<i>NHE3</i> -R1	CAGAATCACCTGATCTATGAACCCG	中间片段克隆
<i>NHE3</i> -R2	TGCTGTTCTCTGCCCTTG	cloning of intermediate fragment
<i>NKAa1</i> -F1	TCTGGATGATGAGATGAAAGACGCT	中间片段克隆
<i>NKAa1</i> -F2	ACAACCTTGCCTCCATCGTTACCG	cloning of intermediate fragment
<i>NKAa1</i> -R1	TGATGAAGAGGAGGAAGGGTGAGAT	中间片段克隆
<i>NKAa1</i> -R2	GGAAGGCACAGAACCACCAAGATG	cloning of intermediate fragment
3'- <i>NHE3</i> F1	CCATTCTGGTGATGAAGATTTTGTAGT	RACE PCR
3'- <i>NHE3</i> F2	TCAGCACTCACTCCACCGACTCC	RACE PCR
5'- <i>NHE3</i> R1	GAAGACTGTTGGGGTCAGTTTGAAC	RACE PCR
5'- <i>NHE3</i> R2	AGGTAGGAGAGGTATCCCAAGAC	RACE PCR
3'- <i>NKAa1</i> F1	TCAGACACACAGTGACAGTAGCC	RACE PCR
3'- <i>NKAa1</i> F2	CCACTAAATCACCAACCACAACCTC	RACE PCR
5'- <i>NKAa1</i> R1	ACAACCTTGCCTCCATCGTTAC	RACE PCR
5'- <i>NKAa1</i> R2	CATATTGCCAGGCATGGACGT	RACE PCR
Long primer	TAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	RACE PCR
Short primer	CTAATACGACTCACTATAGGGC	RACE PCR
q <i>NHE3</i> -F	GTAGCCGTCATCGCCGTGT	qPCR
q <i>NHE3</i> -R	GCACCACTGTCAACCATCGT	qPCR
q <i>NKAa1</i> -F	GCTGTCATCTTCTCATCGGTATCA	qPCR
q <i>NKAa1</i> -R	GTTCTTACCAGGCAGTCTTCTTG	qPCR
β -actin-F	AGGGAAATTGTGCGTGAC	内参
β -actin-R	AGGCAGCTCGTAGCTCTT	internal primers

cDNA 全长序列由测序结果导入 DNAMAN 软件拼接后得到; 完整的开放阅读框 (ORF) 和氨基酸序列经 ORF Finder 在线软件 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 预测得到; 利用 TMHMM Server2.0 在线软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 预测跨膜螺旋域; 利用 signalP-5.0 在线软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽; 使用 SMART 在线软件 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测蛋白质结构和功能; 从 NCBI 数据库中下载同源氨基酸序列, 运行 ClustalX1.83 软件进行氨基酸序列多重比较和同源性分析; 使用 MEGA-X 软件以邻接法 (neighbor-joining method, NJ) 构建系统进化树。

***NHE3* 与 *NKAa1a* 基因的组织特异性和盐度适应性表达模式分析** 根据基因 cDNA 序列, 设计特异性引物 q*NHE3*-F、q*NHE3*-R、q*NKAa1*-F 和 q*NKAa1*-R (表 1), 内参选择军曹鱼 β -actin。上机仪器为 Roche light Cycler™ 96, 使用 SYBR® Select Master Mix 试剂盒检测 *NHE3* 与 *NKAa1a* 在不同组织中的表达丰度和盐度适应后在鳃、肠道、体肾等渗透压相关组织器官中的表达丰度。PCR 扩增程序: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 20 s, 循环 40 次。同一盐度组取 3 尾军曹鱼, 重复 3 次实时定量 PCR (qPCR), 以减少误差。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算 *NHE3* 和 *NKAa1a* 的 mRNA 表达水平, 使用 SPSS 22.0 软件对数据进行单因素方差分析和多重比较分析。

细胞培养 本研究借助 293T 工具细胞进行 miR-1335-3p 与 *NHE3*、miR-1788-3p 与 *NKAa1a* 靶向调控分析。基于含 10% FBS 的 DMEM 培养基 (含 1.5 mg/L 谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素) 将细胞培养于恒温培养箱; 培养条件为 37 °C、5% CO₂, 传代周期 3 d, 保留对数生长期细胞。细胞传代以细胞生长状态为准, 待细胞数量达 80% 以上即可传代。传代步骤: 先以移液枪弃去陈旧培养液, 再以 PBS 润洗并弃去润洗液, 重复 1 次润洗后加入 1 mL 0.25% 胰酶消化, 室温静置直至观察到细胞不贴壁, 复加 1 mL DMEM (含 10% FBS) 停止消化并轻柔混匀。将细胞悬液等量加入 12 孔板 (提前加好 2 mL 10% FBS 的 DMEM), 添加量约 1×10^5 个, 转移至培养箱中 37 °C 培养, 24 h 后可用于细胞转染 (密度约 80%)。

野生型 (WT) 与突变型 (MUT) 的靶基因 3'-UTR 的设计与合成 利用全基因合成得到靶基

因 3'-UTR, 引物设计依据 Primer premier 5.0 软件, 添加 *Sac* I 和 *Xho* I 酶切位点及保护碱基 (表 2)。合成步骤: ①将合成的引物稀释为 50 μ mol/L, 吸取等量体积混匀于 1.5 mL 离心管, 获得 Oligo mix; ②第 1 轮 PCR 反应体系为 0.2 μ g 的 Pfu DNA polymerase、0.6 μ L 的 dNTP、1.2 μ L 的二甲基亚砜 (DMSO)、2 μ L 的 Oligo mix、3 μ L 的 10 \times Pfu Buffer (+Mg²⁺) 和 23 μ L 的 RNA-free water, 反应程序为 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 22 s, 58 °C 退火 22 s, 72 °C 延伸 40 s, 循环 22 次; 72 °C 延伸 5 min; ③第 2 轮 PCR 反应体系为 0.3 μ g 的 Pfu DNA polymerase、1 μ L 的第 1 轮 PCR 产物、1 μ L 的 dNTP、1 μ L 的 *NHE3/NKAa1a*-WT/MUT-1、1 μ L 的 *NHE3/NKAa1a*-WT/MUT-6、2 μ L 的 DMSO、5 μ L 的 10 \times Pfu Buffer (+Mg²⁺) 和 39 μ L 的 RNA-free water, 反应程序为 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 22 s, 58 °C 退火 22 s, 72 °C 延伸 40 s, 循环 32 次; 72 °C 延伸 5 min; ④参照胶回收试剂盒, 对 PCR 产物进行切胶回收。

靶基因 *NHE3* 和 *NKAa1a* 的 3'-UTR WT 和 MUT 重组质粒的构建 设计靶基因 *NHE3* 与 *NKAa1a* 的 3'-UTR WT 和 MUT 重组质粒序列, 其中包含有结合位点与 *Sac* I、*Xho* I 酶切位点 (表 3)。将靶基因 *NHE3* 与 *NKAa1a* 的 3'-UTR (WT/MUT) 与 GP-miRGLO 载体进行 *Sac* I 和 *Xho* I 酶切, 反应条件为 37 °C、2 h; 体系为 10 \times Buffer 5 μ L, *Sac* I 和 *Xho* I 各 1.5 μ L, PCR 产物或载体 1 μ g, RNA-free water 补齐 50 μ L。酶切产物需再次胶回收; 以 T₄ DNA 连接酶完成产物连接, 反应条件为 22 °C 2 h; 体系: T₄ buffer 2 μ L, 载体 2 μ L, 插入基因片段 5 μ L, T₄ DNA 连接酶 1 μ L, RNA-free water 10 μ L; 连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞后, 移至摇床 37 °C 匀速 (250 r/min) 摇晃复苏 1 h, 取 200 μ L 涂板 (Amp LB 培养基) 倒置培养 16 h, 挑选阳性单克隆菌落扩培和测序分析, 多余菌液用甘油保存。甘油菌扩大培养, 采用质粒提取试剂盒 [DP104-02, 天根生化科技 (北京) 有限公司] 获取重组质粒。

细胞转染与双荧光素酶分析 添加 GP-transfect-Mate 和重组质粒于 DMEM 培养基中, 按照说明书配置转染液 mix, 室温孵化 5 min, 混合全部试剂, 重复室温静置 20 min。进行细胞转染, 37 °C 培养箱中培养, 6 h 后更换新鲜培养基。

细胞转染 24 h 后, PBS 润洗 2 次后弃去废液,

表 2 用于靶基因 3'-UTR 合成的引物

Tab. 2 Primers used for the 3'-UTR of targeted genes

引物 primers	序列(5'-3') sequences (5'-3')
<i>NHE3-WT-1</i>	TCTAGTTGTTAAACGAGCTCCAGCATCC
<i>NHE3-WT-2</i>	AGCCAGGTAAAGGGGAGATGAGGTGATAGGGTGAGGGCTGAGGGCAGGATGCTGGAGCTCGTTTA
<i>NHE3-WT-3</i>	ATCTCCCTTTACCTGGCTGCAGAGACACAGGACCTAACCTCAGACTTTACACCTCCGCTCCAA
<i>NHE3-WT-4</i>	GATTAACAGTCTCACAGAAAAGAAAACACTCCCTAGTCAATATTTTGGAGCGGAAGGTGTAAAG
<i>NHE3-WT-5</i>	TTTTCTTTCTGTGAGACTGTTAATCTCAGTCTCGTTTTCAGACAAAACATTCACAATCCACA
<i>NHE3-WT-6</i>	CAGGTCGACTCTAGACTCGAGAGGAGCACAAAGGTTGTGGGATTGTGAATGTTTTGT
<i>NHE3-MUT-1</i>	TCTAGTTGTTAAACGAGCTCCAGCT
<i>NHE3-MUT-2</i>	GGTAAAGGGGAGATGAGGTGATAGGGTGAGCTGTCCCCGACCTAGCTGGAGCTCGTTTAAACAA
<i>NHE3-MUT-3</i>	CACCTCATCTCCCTTTACCTGGCTGCAGAGACACAGGACCTAACCTCAGACTTTACACCTCCG
<i>NHE3-MUT-4</i>	CAGTCTCACAGAAAAGAAAACACTCCCTAGTCAATATTTTGGAGCGGAAGGTGTAAAGTCTGAGG
<i>NHE3-MUT-5</i>	AGTGTTTCTTTCTGTGAGACTGTTAATCTCAGTCTCGTTTTCAGACAAAACATTCACAATCC
<i>NHE3-MUT-6</i>	CAGGTCGACTCTAGACTCGAGAGGAGCACAAAGGTTGTGGGATTGTGAATGTTTTGTCTGAAAA
<i>NKAa1a-WT-1</i>	TCTAGTTGTTAAACGAGCTCGTC
<i>NKAa1a-WT-2</i>	ACAACGAAACACTGACTGCTCCCTCCGTGAATGTGTCGTGTTGACGAGCTCGTTTAAACAACCTAG
<i>NKAa1a-WT-3</i>	AGCAGTCAGTGTTCGTTGTTTTTCTTGCCATGTTACATATCCTGACATAGTCAGACCCCAAAA
<i>NKAa1a-WT-4</i>	AATGACAAACATCAAGATATCTTAATTTATCCATGTTTGTGTTTTGGGGTCTGACTATGTCA
<i>NKAa1a-WT-5</i>	AAATTAAGAATATCTTGATGTTTGTCAATTCACAATAAAAACATTTCTGTGCCATTGTAAAACTCGA
<i>NKAa1a-WT-6</i>	CAGGTCGACTCTAGACTCGAGTTTTACAATGGCAGAC
<i>NKAa1a-MUT-1</i>	TCTAGTTGTTAAACGAGCTCGTC
<i>NKAa1a-MUT-2</i>	TGTTGAAACACTGACTGCTCCCTCCGTGAATGTGTCGTGTTGACGAGCTCGTTTAAACAACCTAG
<i>NKAa1a-MUT-3</i>	GAGCAGTCAGTGTTCGAACAAATTTCTTGCCATGTTACATATCCTGACATAGTCAGACCCCAAAA
<i>NKAa1a-MUT-4</i>	ATGACAAACATCAAGATATCTTAATTTATCCATGTTTGTGTTTTGGGGTCTGACTATGTCA
<i>NKAa1a-MUT-5</i>	GATAAATTAAGAATATCTTGATGTTTGTCAATTCACAATAAAAACATTTCTGTGCCATTGTAAAACT
<i>NKAa1a-MUT-6</i>	CAGGTCGACTCTAGACTCGAGTTTTACAATGGCAGACAAATGT
<i>PMIRGLO-PC-F</i>	CGGGATCCCACCTCAGCCGAGCTGGGATCCCACCTCAGCCGC
<i>PMIRGLO-PC-R</i>	TCGAGCGGCTGAGGTGGGATCCCAGCTCGGCTGAGGTGGGATCCCAGCT

表 3 WT / MUT 重组质粒载入序列

Tab. 3 Loading sequence for WT/MUT recombinant plasmid

引物 primers	序列(5'-3') sequences (5'-3')
<i>NHE3-pmirGLO-WT</i>	CAG <u>CATCTGCCCTCAGCCC</u> TACCCTATCACCTCATCTCCCCTTTACCTGGCTGCAGAGACACAGGAC CTAACCTCAGACTTTACACCTTCCGCTCCAAAATATTGACTAGGGAGTGTTCCTTTCTGTGAGACTGTT
<i>NHE3-pmirGLO-MUT</i>	TAATCTCAGTCTCGTTTTCAGACAAAACATTCACAATCCACAACCTTTGTGCTCCT CAG <u>CTAGGTCCGGGACAGC</u> TACCCTATCACCTCATCTCCCCTTTACCTGGCTGCAGAGACACAGGA
<i>NKAa1a-pmirGLO-WT</i>	CCTAACCTCAGACTTTACACCTTCCGCTCCAAAATATTGACTAGGGAGTGTTCCTTTCTGTGAGACTG TTAATCTCAGTCTCGTTTTCAGACAAAACATTCACAATCCACAACCTTTGTGCTCCT
<i>NKAa1a-pmirGLO-MUT</i>	GTCAACACGACACATTACCGAGGG <u>AGCAGTCAGTGTTCGTTGTTTT</u> TCTTGCCATGTTACATATC CTGACATAGTCAGACCCCAAAAACACAAAACATGGATAAATTAAGAATATCTTGATGTTTGTCAATCAC AATAAAACATTTCTGTGCCATTGTAAAA GTCAACACGACACATTACCGAGGG <u>AGCAGTCAGTGTTCGAACAAAT</u> TCTTGCCATGTTACATATC CTGACATAGTCAGACCCCAAAAACACAAAACATGGATAAATTAAGAATATCTTGATGTTTGTCAATCAC AATAAAACATTTCTGTGCCATTGTAAAA

注: 下划线部分分别为miR-1335-3p、miR-1788-3p与靶基因WT、MUT质粒结合位点。

Notes: the horizontal lines are the binding sites of miR-1335-3p and miR-1788-3p to the target genes WT and MUT plasmids, respectively.

再分别吸取 400 μ L PLB 裂解液至每个培养孔, 室温下裂解 15 min, 裂解期间轻柔摇晃 12 孔板, 最后收集裂解液至检测试管; 分别吸取 20 μ L 被动裂解液 (Passive Lysis Buffer, PLB) 和 100 μ L 萤光素酶检测试剂 II (Luciferase Assay Reagent II, LAR II) 至 96 孔白板, 多功能酶标仪检测萤火虫萤光素酶信号 (FL); 再添加 100 μ L Stop & Glo, 检测海肾萤光素酶信号 (RL)。记录分析 FL、RL 和 FL/RL (相对萤光素酶活性)。

本实验过程中操作人员严格遵守广东海洋大学动物实验伦理审查委员会实验动物伦理规范, 并按照广东海洋大学动物实验伦理委员会制定的规章制度执行。

2 结果

2.1 *NHE3* 与 *NKA α 1a* 全长 cDNA 序列的克隆及分析

经 RACE 克隆、序列拼接获得军曹鱼 *NHE3*、*NKA α 1a* 的 cDNA 全长序列 (GenBank 登录号分别为 MW800836 和 MW800837)。*NHE3* 全长 3 579 bp, 包括开放阅读框 2 718 bp、5'UTR 96 bp 和 3'UTR 765 bp; 编码 905 个氨基酸。*NKA α 1a* 基因全长 3 075 bp, 包括开放阅读框 3 075 bp、5'UTR 260 bp 和 3'UTR 191 bp, 编码 1 024 个氨基酸。

跨膜螺旋域预测结果表明, *NHE3*、*NKA α 1a* 分别含有 12 和 8 个跨膜螺旋域。信号肽预测发现, *NHE3* 信号肽位于 1~21 个氨基酸, 剪切位点为第 22~23 个氨基酸; *NKA α 1a* 未发现信号肽序列。功能结构域预测结果显示, *NHE3* 含有钠质子交换蛋白结构域 (Na⁺/H⁺ exchanger domain, NHE, 406 个氨基酸, aa); *NKA α 1a* 基因阳离子转运 ATP 酶 N 端结构域 (cation transporter/ATPase, N-terminus, CPA-N, 43~177 aa)、水解酶结构域 (hydrolase domain, 669~730 aa)、阳离子转运 ATP 酶 C 端结构域 (cation transporter/ATPase, C-terminus, CPA-C, 800~1 009 aa) (图 1, 图 2)。

2.2 *NHE3* 与 *NKA α 1a* 氨基酸序列同源比较和系统进化分析

BLAST 同源性比对结果显示, 军曹鱼 *NHE3* 与黄条鲷 (*Seriola lalandi*)、鲷 (*Echeneis naucrates*)、鞍带石斑鱼 (*Epinephelus lanceolatus*) 同源序列的一致性最高, 分别为 89.86%、89.35% 和 89.07%,

而与花鲈 (*L. maculatus*)、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)、攀鲈 (*Anabas testudineus*)、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 同源序列的一致性分别为 88.97%、88.32%、85.99% 和 82.04%。*NKA α 1a* 与卵形鲳鲹 (*Trachinotus ovatus*)、花鲈、舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*)、黄鳍 (*Monopterus albus*) 序列的一致性最高, 分别为 92.40%、89.74%、89.66% 和 89.49%, 而与大黄鱼、大刺鲷 (*Mastacembelus armatus*)、莫桑比克罗非鱼 (*O. mossambicus*)、尼罗罗非鱼的一致性分别为 89.37%、88.74%、88.58% 和 88.16%。

系统进化分析表明, 军曹鱼 *NHE3* 与鲷、黄条鲷最为接近并聚为一支, 邻近一支分别为鲈形目 (Perciformes) 的大黄鱼、鞍带石斑鱼和日本花鲈。*NKA α 1a* 先与大刺鲷、日本花鲈、舌齿鲈、莫桑比克罗非鱼、大黄鱼等聚为一支, 再与大西洋鲑 (*Salmo salar*)、卵形鲳鲹、黄鳍、尼罗罗非鱼等硬骨鱼类聚为一支。此外, 与人 (*Homo sapiens*)、小鼠 (*Mus musculus*)、绿头鸭 (*Anas platyrhynchos*) 和红原鸡 (*Gallus gallus*) 等非鱼类物种聚为一支 (图 3)。

2.3 *NHE3* 与 *NKA α 1a* 基因的表达水平分析

qPCR 检测结果显示, *NHE3*、*NKA α 1a* 在军曹鱼鳃、肠道、体肾、肝脏、心脏、脑、脾脏、胃和肌肉这 9 种组织中均有表达, 且在鳃组织中的表达丰度最高, 体肾中的表达水平次之 (图 4)。

不同盐度条件下, *NHE3* 在鳃中表达量随着盐度升高而下降, 低盐和高盐适应后均呈显著差异 ($P < 0.05$); 而在肠与体肾中变化趋势相反, 低盐和高盐适应后分别出现显著上调或下调 ($P < 0.05$)。*NKA α 1a* 随着盐度升高呈现不同趋势, 与对照组相比, 在鳃和肠中受低盐和高盐影响后均显著上调, 而在体肾中仅在高盐环境下出现显著下调 ($P < 0.05$)。在不同盐度适应过程中, *NHE3* 和 *NKA α 1a* 均以鳃组织中的表达量最高 (图 5)。

2.4 miR-1335-3p 与 *NHE3*、miR-1788-3p 和 *NKA α 1a* 结合位点的预测

通过 RNAhybrid 进行靶基因 (*NHE3* 和 *NKA α 1a*) 结合位点预测。发现最小折叠自由能 (MFE) 分别为 -27.5 和 -17.9 kcal/mol, 结合稳定性高, 提示 *NHE3* 和 *NKA α 1a* 分别与 miR-1335-3p 和 miR-1788-3p 存在潜在作用位点, 属于潜在靶基因。

```

1                               ACCGCCGACCTGGGTAC
19  CCCGAAGTTCGGTTTCTTAAACCTTTAAAAACACTGGCGAAAAAGGGGTTGAAATTTTTTTTTTTTCTAAT
97  ATCGATCGACTGGCGACTTGCATTTTATGTCATGTTGTAGTGTCCAGAGGCTGAGCCTGGACAGTAGG
1  M A S T W R L A L F M S M L L I V S R G L S L D S E
175  GAGGAAGCGAGGTGAGAAGGATCATGGGACACCTCAAGCTCACACTGGGTACCAGGAAACAGGATGGACACGGC
27  E E G R V R R D H G D T S S S H W V T G N R M D T G
253  CATGACACGAGCAGTACACTGGTCATGAGGACAGCAGTAATGGTGGCAGTGGACAGGATGACAGCAGCAGTGTGAC
53  H D T S S D T G H E D S S N G G S G H D D S S H V D
331  AGTGGACATGACAGCAGTAATGGTGGAGTGGACATGGTGTGATGAAATGGAGGAGGACCCACTACCTACCTCGCC
79  S G H D S S N G E S G H G D G E H G G G P I T T L P
409  ATTGTGACTGGAGTGGTCCATGTGTCCACCGCTACCTGGTGGCCCTGGATCTGGTCTGTGGATCTGCAA
105  I V T W R W S H V S T P Y L V A L W I L V C W I C K
487  CTCATCATCGAGGCGAACCCATGTGACCAATGTATCCAGAGAGCGCCCTCATCTGCTTGGCTTCACTCG
131  L I I E A N H H V T N V I P E S A L L I C F G F I L
565  GGTGGATAATTTGGGGTGCAGACAAGTGCAGACGTTCAAACGACCCCAACAGTCTTCTTCTACCTGTGGCT
157  G G I I W G A D K V Q T F K L T P T V F F F Y L L P
643  CAAGTCATCTCGACCGGGCTACTCCTATGCGAACAAGCTCTCTCAGCACTGGGGGACCTGGTCTACGCC
183  Q V I L D A G Y S M P N K L F F S N L G G I L V Y A
721  ATCATCGGACCTGGGAATGCCAGCTGGGGCTGTCTATGGGGTGCACAAAGGAGGACCCATGGGTGAC
209  I I G T C W N A A S L G L S L W G C H K G G A M G D
799  CTGGACATCGGCTTCTGAGTACCTTCTTTCGGCAGTCTGATGGCGCTGGACCCGCTAGCCGCTATGCGCGTG
235  L D I G L L Q Y L L F G S L I A A V D P V A V I A V
877  TTTGAGCAAGTCAAGTCAATGAAGTCTTCTCATATGGTGTGGAGAGTGGTCTCAACGATGGTGGACAGT
261  F E Q V H V N E V L F I M V F G E S L L N D G V T V
955  GTGCTCTCAATGATTTGATGATTTGTTTCACTGGGAGATCCAAAATTAACGCTGGAGATCATAAAGGAATA
1033  V L F N V F D A F V S L G G S K I N A V E I I K G I
313  ATTCTCTTGTGGTGGCGTTGGAGGATCCCTCTGGGCTTGTGTTGGCTGCTGCTCTCTCTGACGAGA
313  I S F F V V A F G G S L L G F V F G L L V S L L T R
1111  TGCATAAAAATCCAAATCATAGAGCCAGGCTTCACTTGTCTGGGATACCTCTCTCACTGAGTGGATG
339  C T K N I Q I I E P G F I F V L G Y L S Y L T A E M
1189  CTCTCCGTCTGCATCTCGATGGTCTGTGGTATTGCTGCCAGAAATACATCAATGCAAAATGAGCAGG
365  L S L S A I L S I V F C G I C C Q K Y I N A N M D E
1267  AATTCGGTCAACAGTCAAGATTTTCATGAAGTTCCTGCCAATGGATCAGAAATCATCTTGTGTTCTCGCC
391  N S V N T V R Y F M K V L A N G S E T I I F V F L G
1345  ATCTCGGCACTGCAAGTCAATGGTGGTGAACACAGGCTTCACTCTCACTGCTCTGCTGATGGTATC
417  L S A I D K S I W V W N T G F I L I T L I F V I V Y
1423  AGATGCATTGGTGTCTTTCTCACCTGGATCCGAACAAGTTCAGGCTGGTCCGATCGGGTTCATAGATCAGGTG
443  R C I G V F F L T W I L N K F R L V P I G F I D Q V
1501  ATTCTGAGCTATGGTGGCTTACGAGGGGCTGTTCCTATGGCTGGCTGTGATGTTGGATGAGAACAAGATAAGGAG
469  I L S Y G G L R G A V A Y G L A V M L D E N K I K E
1579  AAGAATCTGAGTGGTCAACCACTCTCATGCTGATATCTCACTGCTATTTTACAGGAAATACCAATGAACTCTG
495  K N L M V S T T L I V V Y F T V I F Q G I T M K P L
1657  GTCAGTGGCTAAAGTAAAGAGAGTGCATGTCTGAGCTCAGCTCATAGAAAAGTGCAGAAAGGTTGTAT
521  V T W L K V K R A A M S E L T L I E K V Q N K V F D
1735  CACATGCTTGTCCATAGAAGACATATCGACAATAAGACATAACTACATGAGGCAAGTGGAAATACTTTGAG
547  H M L V A I E D I S G Q I G H N Y M R D K W N N F E
1813  GAGAAGTGGATGCGAGGGTTTGTATGAAACCGTCTGCAAGGAAACCGTACTACGCTTCAACGCTTCCATCAA
573  E K W M S R V L M K P S A R K N R D Y V F N V F H Q

```

(a)

```

1891  CTGAACCTCAAGACGCCATGAGTACGTGGCTGAGGGGAAACGACAGGCTCGTGGAGTTTATCCGTAAACACAAC
599  L N L K D A M S Y V A E G E R R G S L E F I R N D N
1969  GCATTTGACTTCAAGAAAAAGTTGGGGAGCAATTCACAGGTTTATGCTGACATATCGGGCAGATCTGACAC
625  A F V D F K K K F G D E F S E V M P D I M A D M S D
2047  GATCATGGTCAATGCTGTATGAGAAGAGACCTGTGGCATCAGTGGATGGAGTGCAGCAGCAGCAGCAAGT
651  D H G A M S V M R R D P V P S V S L E M H E Q T T N
2125  GTAATGAGAGGAGCTGAGGATCACTCTACCACCTGCAACAGCATCTGTACAAGGGCAGGAAACAGCAGCGG
677  V M R G A E E I N S H H L L Q Q H L Y K G R K Q H R
2203  CACAGGTACAGCCGAGCCATTTGACGTCAACAAAGATGAAAATGAGGTGAGGATCTCCAGAGGACCATGAGG
703  H R Y S R S H F D V N K D E N E V Q E I F Q R T M R
2281  AGTCGTTGGAGTCTTAAATCTGCAAAGTGGGCTGGCCCGCAAGAGCATTCCCAAGCACACAAGAAAGAT
729  S R L E S F K S A K M G V A P P K T I S K H T K K D
2359  CAGCACCATAAGATGCAAAATGCAAAATGCAAAAGTAAAGTACCATTCTGGTGTGATGAAGATTTGAGTTC
755  Q H H K M S N G K S L D K S K S Y H S G D E D F E F
2437  TCAGAGGGAAGCAGTGCCTCGGATGATGATCAGGACGATTCACCCATGAGGGTCACTACAGAGCAGGAGCT
781  S E G D S A S G Y D A S G S S F P M R V T Y R A G A
2515  GGAATGAGAACCCAGCCTTATGGGGACATGGACCCACGGCCAGGATCGATCCCTCGTGGCTCGAGAGGCC
807  G I E N P A F M A D M D P T D P M Q I P P W L A E A
2593  GAGCTTGACAGCAGTGGTGGCTCTTACAGCAGCCAGGCTGGCTGGCTGAGCCAGCAACTCGCGCGC
833  E L D S S M V A P S Q R A Q V R L P L T P S N L R R
2671  CTGGCTCGCTCGCATCAGCACTACTCCAGGACTCTTCACTGTCGGCGACACTCTCGCGGCGAGCAGAGGGAC
859  L A P L R I S T H S T D S F M L A D T P A A Q Q R D
2749  GGTGACGATCTCCCGCACCTCCACCTCCTCTCCAGAGAGCAGCAGCAGTATG
885  G D D L P P P P P P P P P P Q R D D D H M *
2815  CAGACTCTGCCCTCAGCCCTACCCTATACCTCATCTCCCTTACCTGGTGCAGAGACAGGACCTAACCTCA
2893  GACTTTACACTTCGGCTCAAAAATTTGACTAGGGAGTGTCTTCTTCTGTGAGACTGTTAATCTAGTCTCGT
2971  TCAGACAAAACATTCAAAATCCCAACACTTTGTGCTCTCAATGAGCTTCTCTGCTCAACCTCACCTGGCAG
3049  GTACCCACTCAGATCTGTGCAAGTGGCATGTTATTTACCAGCACCTGTTGAACATTTATCTTATTTCTCTCTG
3127  GTTCACTAACATGTAATGACCTCTTAAGCCTCATCTCTGAATGTAATGCAAAAACCTTTTCAAGCACTGCA
3205  GATATTTATAGATTGTTTAAAGATAATTAAGAGTGTATGAAATCAATCCAAAGCTATAATCTGAATTTCTCT
3283  TGTGTTTCTCAGTCTGAGAAAAGTACTGAGTTCATGTTAACTGAAAGATTAAGCCGTGTAATAATCTG
3361  GACTTGTATGATAACGAAATTAATTTATCAAAATGAAGTGTGATGATGAGTGGTGGTGCACCATCTCAATCTG
3439  TGCACCTGCCAGCTGTACACTTATGACTCCAACAAGAACCTTGCAGTACTGGGCAATGTTTCAACTGTAT
3517  GCATTTAAATGTGAATTTAGAAATAAAAATAAGAAAATGAAAAAATGAAAAAATGAAAAAATGAAAAAATG

```

(b)

图 1 军曹鱼 *NHE3* 基因 cDNA 序列及其氨基酸序列

~~~~. 信号肽; —. 跨膜螺旋域; □. 起始密码子; ==. 终止密码子; 灰色表示钠质子交换蛋白结构域 NHE, 下同。

Fig. 1 Full-length cDNA sequence and amino acid sequences of *NHE3* gene in *R. canadum*

~~~~. signal peptide; —. transmembrane helix domain; □. initiation codon; ==. termination codon; the grey part indicates sodium proton exchange protein domain NHE, the same below.

```

1          GAGTTTCACTCCCTCTGTCCCCC
27  CCCCCCTCTCTAACTCTCTTAAAGCAGGTGAGCCAGTTGGGTATATAGGTATGGTAACTGAAGCAACTA
105 TCTTCTGTCTGGGGAGTGGGAAGACAGGACCAACAGGCTGAGACAGAGAGTGTGTGAGAGAGAGTGTG
183 AGAGAGAGAGAGGGGGTGAAGAAATTAATTTAAAAAGCAATGGATTGACTGCTCAGACTGTTGTTCACACC
261 ATCGGAAGAGGAGGAGGAGCTGAGCAGTATGAGCTGGCTGACCTGGAGCAGGCGGCAAGAAAGGGGAGGGG
1  M G R G E G R E Q Y E L A A T S E Q G G K K K K G K G
339 AAGAAGAAAGAAAGATATGGACGAGCTGAAGAAGGAGTGGATATGATGATCACAAGCTGACCTGGATGAGCTC
27  K K K E K D M D E L K K E V D M D D H K L T L D E L
417 AATCGCAATATGGAACAGACTTAGCAACGGTTTGAAGTGAAGGCTGCTGAGATTCTGGCCCGTATGGGCC
53  N R K Y G T D L S N G L T S A K A A E I L A R D G P
495 AACGCCCTACTCTCTCCACACCCAGAGTGGTCAAGTCTGCAACAGATGTTGGCGGTTTCTCCATGCTT
79  N A L T P P P T T P E W V K F C K Q M F G G F S M L
573 CTGTGGACTGGTGCATCTCTGTTCTGGCTACGGTATCCAGGCTGCAATGGAGGATGAGCCGCAATGACAA
105 L W T G A I L C F L A Y G I Q A A M E D E P A N D N
651 TTGACTTGGGTGTGTCTTCTGCTGTGTCTATCATCACTGGTTGCTCTCTACTACAAGAGGCAAGAGCTCC
131 L Y L G V V L S A V V I I T G C F S Y Y Q E A K S S
729 AAAATCATGGATTCTTCAAGAAGCTGGTCCACAGCAAGCCGGTCCGCTGATGGTGAAGAAGACATCAAC
157 K I M D S F K N L V P Q Q A L V V R D G E K K S I N
807 GCTGAGGAGTTGTGGTGTATTAGTGGAGTGAAGGTGGAGCAGGATCCCTGATCTGCGAATATCTCT
183 A E E V V V G D L V E V K G G D R I P A D L R I I S
885 GCCATGGCTGCAAGTGGAACTCTCTGACCGCGAATCAGAGCTCAGACCCGACCCCGACTCTCCAAT
209 A H G C K V D N S S L T G E S E P Q T R T P D F S N
963 GAGAACCCTGAGACCAAGAACTGTTCTTCTCAACCACTGTTGAAGAAACCGCTGGTATCTGTGATC
235 E N P L E T R N I A F F S T N C V E G T A R G I V I
1 041 AGCACCGAGATCGACTTATGGTGTATTGCTACTGCTGGCTCCGAGTTGAAGTGGAGCACTCATCTCC
261 S T G D R T V M G R I A T L A S G L E V G R T P I S
1 119 ATTGATGTAGCACTTATCCAACTATCACTGGCTGGCGCTCTCTTGGGCTGCTCTTCTCATCTCACTC
287 I E I E H F I H I I T G V A V F L G V S F F I L S L
1 197 ATCTCGGATACACTGGCTGGAGGCTGCTATCTTCTTATGGCATATTGCGCAAGTGGCAAGGCTCTCTG
313 L L G Y T W F E A V L F L I G I I V A N V P E G L L
1 275 GCTACTGCTACTGTGTCTGACTGACTGCTAAGCGTATGGCAAGAAGTCCCTGGTGAAGAAGCTGGAGCT
339 A T V T V C L T L T A K R M A K K N C L V K N L E A
1 353 GTCGAGACCTGGCTCCACTCCACATCTGCTGACAGACAGCCGGACCTGACCCAGACAGGATGACTGTGGCC
365 V E T L G S T S T I C S D K T G T L T Q N R M T V A
1 431 CACATGTGGTTGACAAAGATCCAGGAGCTGACACACCGAAGACAGAGCGGAGCTCTTTCAGACAGGACTCA
391 H M W F D N Q I H E A D T T E N Q S G A S F D R S S
1 509 CCCACTGGGCTGCCAGAAATGCTGGACTTGAACCGCTGCTTCTTGGCTGAGCAGGCAATGTCC
417 P T W A A L A R I A G L C N R A V F L A E Q G N V P
1 587 ATCTGAAGAGAGTGTGCTGGTGGCTCAGAGCTGCTTGGTGAAGTGTATTGAGCTGTGTGGCTGTGTA
443 I L K R D V A G D A S E A A L L K C I E L C C G S V
1 665 GGTGGCTGAGAGCAAGTACCCAAAGATGCTGAGATCCCTTCACTCCACCAAAATACAGCTTTCACCTCAC
469 G G M R D K Y P K N A E I P F N S T N K Y Q L S I H
1 743 AAAAATCTACTCCGAGAGTCAAAACACTGCTGGTGAAGAGTCCAGACAGGATTTGGACCGCTCTCC
495 K N F T P G E S K H L L V M K G A P E R I L D R C S
1 821 ACCATGATGATCAGGCAAGAGCAGCTCTGATGATGAGTGAAGACCGTTCAGAACGCTACTGTTGAGTTG
521 T I M I Q G K E Q P L D D E M K D A F Q N A Y V E L
1 899 GGAGGACTGGAGAGAGTACTGGTTTCTGCCATTTCCACCTGCTGACGATCAGTTTCCAGAGGGCTTGTCTTT
547 G G L G E R V L G F C H F H L S D D Q F P E G F A F

```

(a)

```

1977  GACACTGAGGAGTGAACCTCCCACTGAGAACTGTGCTTATTGGCTCATGTCATGATGACCTCTCGTGT
573  D T E E V N F P T E N L C F I G L M S M I D P P R A
2 055  GCTGTGCCGATGCTGTGGCAATGACAGGAGCTGGAATCAAGTTATATGCTCACTGGTACCACTCAACACA
599  A V P D A V G K C R S A G I K V I M V T G D H P I T
2 133  GCTAAGGCCATTGCTAAGGGTGTGGCATCTCTGAAGGCAAGCAGACTTGAAGACATGCTGCGCCGCTTGAAT
625  A K A I A K G V G I I S E G N E T V E D I A A R L N
2 211  GTTCCAGTTTCAGAGGTCAACCCAGGAGCCAGGCTGCTGATGATGAGTGGGAGCTGAAGACATGACCTCA
651  V P V S E V N P R D A K A C V V H G G E L K D M T S
2 289  GAGCACTGAGAGTGTGCTGAACACCACTGAAATGCTTTGCGAGAACCTCTCTCAGCAGAACTGATTATT
677  E Q L D D V L K H H T E I V F A R T S P Q Q K L I I
2 367  GTGGAGGTTGCCAGAGACAGGTTGCCATTGTGGCTGACAGGTTGGTGAATGACTCTCTGCTTTGAAGAAG
703  V E G C Q R Q G A I V A V T G D G V N D S P A L K K
2 445  GCGCACTTGTGTGCCATGGTATTGCTGATCTGATGCTCTAAGCAGGCTGCTGACATGATCTCTGAGAC
729  K D I G V A M G I A G S D V S K Q A A D M I L L D D
2 523  AACTTTGCTCCATGTTACCGGCTGGAAGAGTGTGATCTTGAACAATTGAAGAATCCATGGCTTACACT
755  N F A S I V T G V E E G R L I F D N L K K S I A Y T
2 601  CTGACCAAGTAACTCCCTGAGATCTCACTCTCTCTCATCATGCAACATCTCTGCCCCGGGAACCGTC
781  L T S N I P E I S P F L L F I A N I P L P L G T Y
2 679  ACCATCTCTGATGACTGGAACTGACATGGTCCCTGCCATCTCCCTGGCTTATGAAGCAGCTGAGAGCAGATC
807  T I L C I D L G T D M V P A I S L A Y E A E A E S D I
2 757  ATGAAGGAGCCAGAAACCCAAACAGCAAACTGGTGAACGAGAGCTCATCAGCATGCTACCGCAGATC
833  M K R Q P R N P K T D K L V N E R L L S I A Y G Q I
2 835  GGTATGATGAGCCACAGCTGGTTCTTACATACTTGTGATCTGGGGAAAATGGCTTCTCCCATGGACCTG
859  G M W Q A T A G F F T Y F V L L A E N G F L P M D L
2 913  CTGGGCTCAGAGTCTAGGATGACAACTCAATGACCTAGAAGACAGCTACGGACAGCAGTGGACATATGAG
885  L G L R V Y W D D K Y V N D L E D S Y G Q Q W T Y E
2 991  CCGAAGATGCTGAGATTCACTGCCACAGCTTCTTGGCAGATTGATGATGCTGAGTGGCGGATGATGATC
911  R R K I V E F T C H T A F F A S I V I V Q W A D L I
3 069  ATCTGAAGACCAGGAGCACTCACTATCAGCAAGGATGAAGAACCAGCTTCTCATCTTGGTCTATTGGAG
937  I C K T R R N S I I Q Q G M K N R I L I F G L F E E
3 147  AGGCTCTGGCTCTCTGCTCATATGCCCAGGCTGAGCTTGCCTCAGAATGACCCCTCAAGCCATCTGG
963  T A L A A F L S Y C P G M D V A L R M Y P L K P S W
3 225  TGGTCTGTGCTTCCCTACTCCCTCATCTCTCTGATGAGGAGGAGGATATCTCAGACGCAACCA
989  W F C A F P Y S L L I F L Y D E A R R Y I L R R N P
3 303  GCGGTTGGTGAAGCAAGCACTACTGCA
1015  G G W E Q E T Y Y *
3 336  GTCACACGACATCAGGAGGAGCAGTGTGTTGTTTCTTCCATGTTACATCTGACATAGT
3 414  CAGACCCCAACCAAAACATGATAAATAGAATATCTGATGTTGTCTACAAATAAACATTTGTGGC
3 492  ATTGTAACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

(b)

图2 军曹鱼 *NKAa1a* 基因 cDNA 序列及其氨基酸序列

■ .阳离子转运 ATP 酶 N 端结构域; 长方框.水解酶结构域; ···.阳离子转运 ATP 酶 C 端结构域。

Fig. 2 The full-length cDNA sequence and amino acid sequences of *NKAa1a* gene in *R. canadum*

■ . N-terminal domain of cation transporting ATPase; long rectangular box. hydrolase domain; ··· . C-terminal domain of cation transporting ATPase.

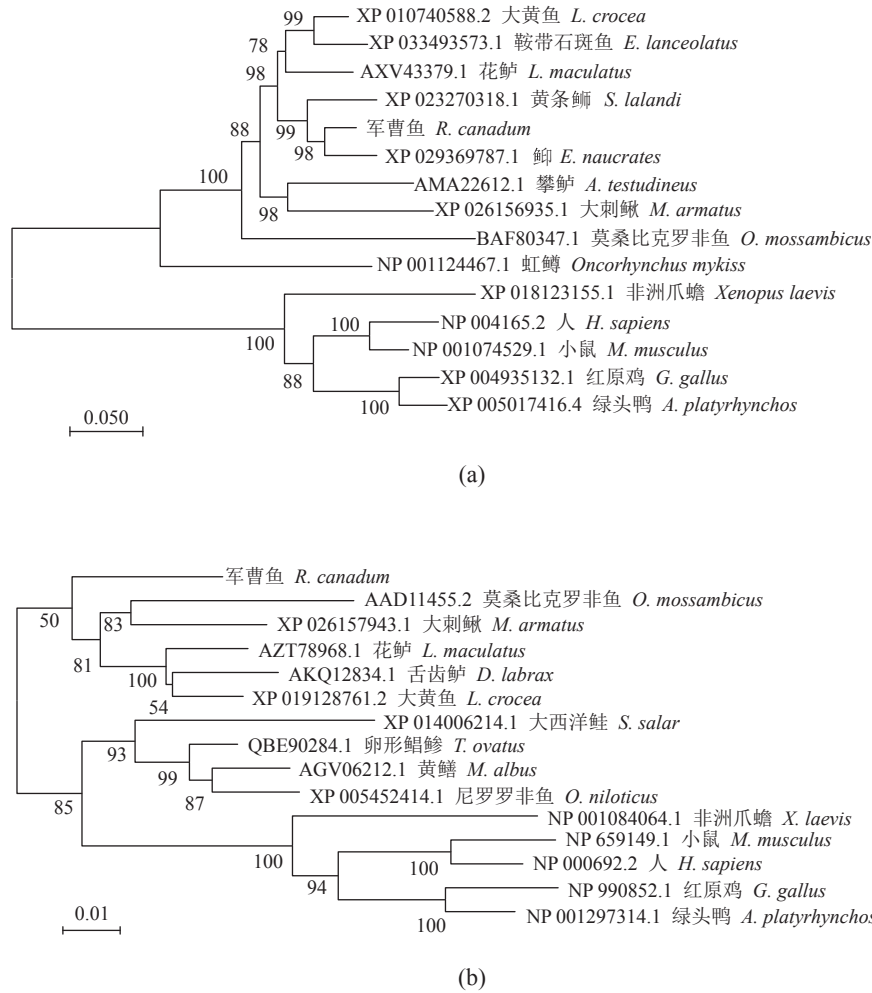


图 3 军曹鱼 NHE3 (a) 及 NKAα1a (b) 系统进化分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of NHE3 (a) and NKAα1a (b) in *R. canadum*

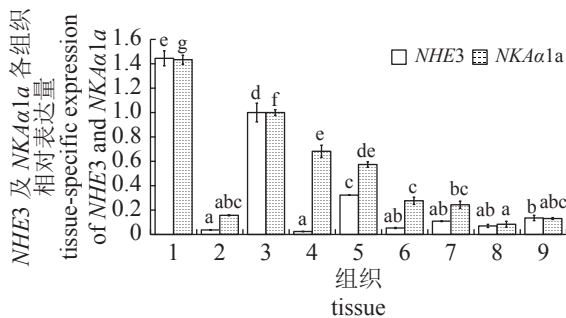


图 4 军曹鱼 NHE3 (a) 及 NKAα1a (b) 的组织特异性表达

1. 鳃, 2. 肠道, 3. 体肾, 4. 肝脏, 5. 心脏, 6. 脑, 7. 脾脏, 8. 胃, 9. 肌肉; 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 4 Tissue-specific expression of NHE3 (a) and NKAα1a (b) in *R. canadum*

1. gill, 2. intestine, 3. kidney, 4. liver, 5. heart, 6. brain, 7. spleen, 8. stomach, 9. muscle; different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

2.5 靶基因验证

重组质粒经测序鉴定后, 开展靶基因验证实验。双荧光素酶检测显示, *NHE3*-pmirGLO-WT 分别与 miR-1335-3p 和 mimic NC 共转染时, 前者相对荧光素酶活性与 mimic NC (转染对照组) 存在极显著差异, 呈下降趋势 ($P < 0.001$)。此外, 结合位点突变的 *NHE3*-pmirGLO-MUT 分别与 miR-1335-3p 和 mimic NC 共转染时, 前者相对荧光素酶活性比后者略微下降, 无显著差异。*NKAα1a*-pmirGLO-WT 和 *NKAα1a*-pmirGLO-MUT 与 miR-1788-3p 和 mimic NC 的转染结果与上述结果类似, 同样为 WT 被抑制, 而 MUT 无影响 (图 6)。以上结果表明, miR-1335-3p 和 miR-1788-3p 可与 *NHE3* 和 *NKAα1a* 3'-UTR 序列结合, 下调其 mRNA 表达水平。

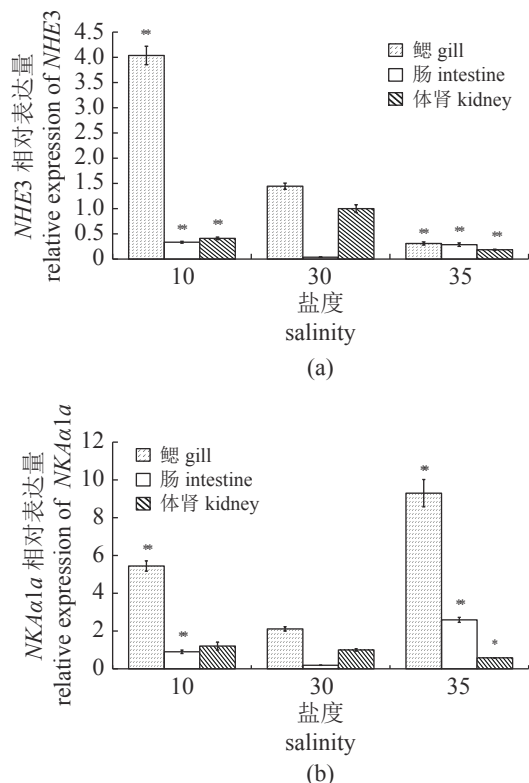


图5 盐度适应后 *NHE3* (a) 及 *NKAa1a* (b) 基因在各组织中的表达水平

*. 差异显著 ($P < 0.05$), **. 差异极显著 ($P < 0.01$); 下同。

Fig. 5 Tissue-specific expression of *NHE3* (a) and *NKAa1a* (b) after salinity adaptation

*. significant difference ($P < 0.05$), **. extremely significant difference ($P < 0.01$); the same below.

3 讨论

鱼类的生长、繁殖受到复杂的生理代谢机制调控, 且与盐度密切相关^[26]。作为一种普遍存在的离子转运蛋白, NHEs 在生物中广泛存在, 主要功能是调控 Na^+ 和 H^+ 浓度梯度完成离子交换, 对生理过程具有重要的生物学功能^[27]。NHE 基因家族成员高度参与细胞过程, 包括细胞内酸碱平衡、细胞体积调节以及肾和胃肠对 Na^+ 的重吸收^[28]。在鱼类渗透压研究中, NHE 1~3 通常被认为是 NHE 家族主要候选基因之一, 主要探讨其与 pH 动态平衡、渗透压稳态和排氨活动的关系^[29]。

本研究中, 通过 SMART 预测发现军曹鱼 NHE3 具有 12 个完整的跨膜区以及 1 个钠质子交换蛋白结构域, 与花鲈、斑马鱼 (*Danio rerio*) 类似^[30-31]。多重序列比对结果表明, NHE3 与其他物种序列高度同源, 说明 NHE3 在鱼类和哺乳动物进化上相对保守。系统进化分析结果显示, 军曹

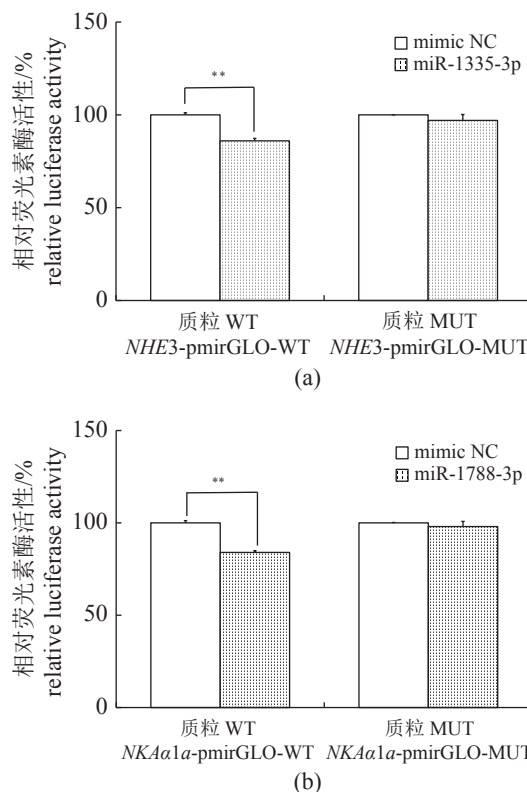


图6 双荧光素酶活性检测

(a) *NHE3*-pmirGLO-WT 及 *NHE3*-pmirGLO-MUT 分别与 miR-1335-3p 和 mimic NC 共转染的荧光素酶活性, (b) *NKAa1a*-pmirGLO-WT 及 *NKAa1a*-pmirGLO-MUT 分别与 miR-1788-3p 和 mimic NC 共转染的荧光素酶活性。

Fig. 6 Analysis of dual-luciferase reporter assays

(a) luciferase activity of *NHE3*-pmirGLO-WT and *NHE3*-pmirGLO-MUT cotransfected with miR-1335-3p and mimic NC, respectively, (b) luciferase activity of *NKAa1a*-pmirGLO-WT and *NKAa1a*-pmirGLO-MUT cotransfected with miR-1788-3p and mock NC, respectively.

鱼 NHE3 与鲷、黄条鲷等最为接近, 与人、小鼠等哺乳动物较远, 符合物种进化规律, 进一步说明本研究中 NHE3 属于鱼类 NHE 家族成员。此外, 小鼠在 *NHE3* 敲除后, 肠上皮和肾小管上皮细胞中出现钠和水重吸收障碍^[32]。本研究中, 军曹鱼 *NHE3* 在鳃和体肾等主要渗透压调节器官中表达水平最高, 表明 *NHE3* 高度参与军曹鱼渗透压调节过程。Inokuchi 等^[33]发现, 日本花鲈经历低盐胁迫后, 鳃组织中 *NHE3* mRNA 表达水平上调, 与本研究结果一致。此外, 随着盐度降低, *NHE3* 在肠组织中表达量上调, 呈显著差异, 说明 *NHE3* 在鱼类响应低盐胁迫中发挥了重要作用。在日本花鲈的鳃中还鉴定到 MR 细胞 (MRCs) 从海水型转化为淡水型, 位置由鳃丝上皮迁移到鳃丝基底, 暗示 *NHE3* 可调节离子细胞形态和分布,

从而调控离子吸收效率^[33]。军曹鱼 *NHE3* 在肠与体肾中的变化趋势相反, 低盐和高盐适应后分别出现显著上调或下调, 说明 *NHE3* 在不同组织中发挥渗透压调节作用的机制或有所不同。

广盐性鱼类能适应较大范围盐度的水环境, 主要与其鳃、肠道、体肾和皮肤等渗透压调节器官有关。其中, 鳃作为鱼类与外界水体直接接触的器官之一, 已有大量研究证实其渗透压调节能力与鱼鳃中的 MRCs 和 NKA 密切相关。其中, MRCs 进行 Na^+ 和 Cl^- 离子的运输, NKA 为其运输离子提供动力。鱼类在外界水环境盐度由低渗转向高渗时, 鳃丝结构与生理功能存在显著差异。中华鲟 (*Acipenser sinensis*) 在盐度为 15 的水体胁迫 60 d 后, 鳃丝和鳃小片中 MRC 数量显著超过淡水驯化组, 其细胞体积膨大, 这与 MRC 排出过量的 Na^+ 、 Cl^- 以辅助鱼体适应高渗环境的特征相适应^[34]。本研究中, 军曹鱼 *NKA α 1a* 在鳃和肠中受低盐和高盐影响后均显著上调, 且体肾在高盐环境中显著下调, 与在施氏鲟 (*A. schrenckii*)、马苏大麻哈鱼 (*O. masou*) 中的研究结果相一致^[35-36]。

在广盐性硬骨鱼类的鳃组织中, NKA 通过电化学梯度的形成, 以分泌 (高渗) 和吸收 (低渗) 2 种方式运输 Na^+ 和 Cl^- , 在鱼类高盐和低盐胁迫中参与渗透压调节。然而, 在不同物种中 *NKA* 具有不同的基因表达模式。在大多数硬骨鱼中, *NKA* 基因表达丰度随着水体盐度增加而上调, 如青鳉 (*Oryzias latipes*) 等, 但在部分物种中发现相反的趋势, *NKA* 基因表达丰度随着盐度增加而下调, 如遮目鱼 (*Chanos chanos*) 和缘边鲟 (*Trachinotus marginatus*) 等^[22, 37-38]。随着盐度升高, 军曹鱼 *NKA α 1a* 在鳃中表达模式为 U 型, 与花鲈、黑棘鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*) 类似, 表明盐度胁迫可促使鱼类增强 NKA 活性来补偿离子浓度, 从而维持渗透压稳态^[25, 39-40]。

miRNA 通过降低靶基因表达或直接降解靶基因等途径参与基因转录后调控, 影响着机体内环境稳态^[14]。miRNA 因与 mRNA 形成靶标关系构成复杂 mRNA-miRNA 调控网络, 通过研究 miRNA 与 mRNA 调控关系可有效解析渗透压调控机制^[15]。在广盐性鱼类盐度胁迫研究中, miRNA 已被证实参与渗透压调节过程。尼罗罗非鱼通过 miR-429 和 miR-30c 负调控盐度相关基因 (*OSTF1* 和 *HSP70*) 都参与了渗透调节^[12-13]。抑制 MiR-206 表达可以显著上调内分泌激素 IGF-1 的表达水平,

而 IGF-1 在鱼类适应盐度变化中起着重要的作用^[11, 41]。此外, miR-190b 的上调导致 IGF-1 的表达受抑制, 这也表明同一盐度相关基因可能受多个 miRNA 调控^[42]。高度保守的 miR-8 家族成员 (miR-200) 被证明通过抑制 Na^+/H^+ 交换蛋白调节因子 1 (NHERF1) 的表达而在离子转运调控中发挥功能性作用, 而后者通过 NHE 来辅助斑马鱼调节离子细胞依赖性的渗透压调节反应^[10, 43]。此外, miRNA 在调节体液和电解质平衡中也起着至关重要的作用^[43]。然而, 对于 miRNA-mRNA 调控网络在军曹鱼低渗适应调节中的作用尚不明确。本研究中, 双荧光素酶检测结果显示, 军曹鱼 miR-1335-3p 和 miR-1788-3p 能识别 *NHE3* 与 *NKA α 1a* 3'-UTR 结合位点; 共转染后, 相对荧光素酶活性发生降低, 并与对照组 (mimic NC) 间存在显著性差异, 说明 *NHE3* 和 *NKA α 1a* 分别是 miR-1335-3p 和 miR-1788-3p 的靶基因, 并受负调控作用。同时, 突变型质粒 *NHE3*-pmirGLO-MUT 和 *NKA α 1a*-pmirGLO-MUT 共转染结果显示, 相对荧光素酶活性无显著变化。证实其结合位点突变后, miR-1335-3p 和 miR-1788-3p 已无法识别靶基因, 失去调控能力。

4 结论

本研究完成了军曹鱼 *NHE3* 和 *NKA α 1a* 全长 cDNA 序列的克隆, 生物信息学分析显示 *NHE3* 和 *NKA α 1a* 基因在物种间高度保守。基因表达水平分析显示, *NHE3* 主要参与低盐适应, 而 *NKA α 1a* 在低盐和高盐适应中均发挥作用。miR-1335-3p 和 miR-1788-3p 可分别负向调控其靶基因 *NHE3* 与 *NKA α 1a*, 从而参与军曹鱼渗透压调节。以上研究结果为进一步研究军曹鱼 miRNA-mRNA 渗透压调控网络提供了理论基础。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Lin G M, Zheng M, Gao D, et al. Hypoosmotic stress induced tissue-specific immune responses of yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) revealed by transcriptomic analysis[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 99: 473-482.
- [2] Bertucci J I, Tovar M O, Blanco A M, et al. Influence of water salinity on genes implicated in somatic growth, lipid metabolism and food intake in pejerrey (*Odontesthes bonariensis*)[J]. *Comparative Biochem-*

- istry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2017, 210: 29-38.
- [3] Wang H, Wei H L, Tang L, *et al.* Identification and characterization of miRNAs in the gills of the mud crab (*Scylla paramamosain*) in response to a sudden drop in salinity[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 609.
- [4] Yoğurtçuoğlu B, Uyan U, Ekmekçi F G. The influence of environmental instability on the reproductive strategy of the critically endangered Acıgöl killifish (*Aphanius transgrediens*)[J]. *Journal of Fish Biology*, 2020, 97(1): 246-256.
- [5] 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.
- [6] Kokou F, Con P, Barki A, *et al.* Short- and long-term low-salinity acclimation effects on the branchial and intestinal gene expression in the European seabass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2019, 231: 11-18.
- [7] Blondeau-Bidet E, Hiroi J, Lorin-Nebel C. Ion uptake pathways in European sea bass *Dicentrarchus labrax*[J]. *Gene*, 2019, 692: 126-137.
- [8] Guo B Y, Tang Z R, Wu C W, *et al.* Transcriptomic analysis reveal an efficient osmoregulatory system in Siberian sturgeon *Acipenser baeri* in response to salinity stress[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 14353.
- [9] 马爱军, 崔文晓, 刘志峰, 等. 广盐性鱼类渗透压适应性与其生理可塑性机制研究[J]. *海洋与湖沼*, 2018, 49(6): 1308-1317.
Ma A J, Cui W X, Liu Z F, *et al.* Study on mechanisms of osmotic oressure adaptability and physiological plasticity on euryhaline[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2018, 49(6): 1308-1317 (in Chinese).
- [10] Flynt A S, Thatcher E J, Burkewitz K, *et al.* MiR-8 microRNAs regulate the response to osmotic stress in zebrafish embryos[J]. *Journal of Cell Biology*, 2009, 185(1): 115-127.
- [11] Yan B, Zhu C D, Guo J T, *et al.* MiR-206 regulates the growth of the teleost tilapia (*Oreochromis niloticus*) through the modulation of IGF-1 gene expression[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2013, 216(7): 1265-1269.
- [12] Yan B, Zhao L H, Guo J T, *et al.* MiR-429 regulation of osmotic stress transcription factor 1 (OSTF1) in tilapia during osmotic stress[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, 426(3): 294-298.
- [13] Yan B, Guo J T, Zhao L H, *et al.* MiR-30c: a novel regulator of salt tolerance in tilapia[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, 425(2): 315-320.
- [14] Bushati N, Cohen S M. MicroRNA functions[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2007, 23: 175-205.
- [15] Lim L P, Lau N C, Garrett-Engele P, *et al.* Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs[J]. *Nature*, 2005, 433(7027): 769-773.
- [16] Jung H M, Hu C T, Fister A M, *et al.* MicroRNA-mediated control of developmental lymphangiogenesis[J]. *eLife*, 2019, 8: e46007.
- [17] Yuan J, Xiao G L, Peng G, *et al.* MiRNA-125a-5p inhibits glioblastoma cell proliferation and promotes cell differentiation by targeting TAZ[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 457(2): 171-176.
- [18] Deng D N, Wang L, Chen Y, *et al.* MicroRNA-124-3p regulates cell proliferation, invasion, apoptosis, and bioenergetics by targeting PIM1 in astrocytoma[J]. *Cancer Science*, 2016, 107(7): 899-907.
- [19] Suzuki H I. MicroRNA control of TGF- β signaling[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(7): 1901.
- [20] Yamaguchi Y, Breves J P, Haws M C, *et al.* Acute salinity tolerance and the control of two prolactins and their receptors in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Mozambique tilapia (*O. mossambicus*): a comparative study[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2018, 257: 168-176.
- [21] 贾倩倩, 吕为群. 低盐胁迫对褐牙鲷成鱼血浆渗透压、皮质醇、生长激素和催乳素的影响[J]. *上海海洋大学学报*, 2016, 25(1): 71-77.
Jia Q Q, Lü W Q. Effects of low salinity stress on plasma osmolality, cortisol, prolactin and growth hormone of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2016, 25(1): 71-77 (in Chinese).
- [22] Lin Y M, Chen C N, Lee T H. The expression of gill Na, K-ATPase in milkfish, *Chanos chanos*, acclimated to seawater, brackish water and fresh water[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2003, 135(3): 489-497.
- [23] Yang W K, Chung C H, Cheng H C, *et al.* Different expression patterns of renal Na⁺/K⁺-ATPase α -isoform-like proteins between tilapia and milkfish following salinity challenges[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 202: 23-30.

- [24] Hu Y C, Chu K F, Yang W K, *et al.* Na⁺, K⁺-ATPase β 1 subunit associates with α 1 subunit modulating a “higher-NKA-in-hypotonic media” response in gills of euryhaline milkfish, *Chanos chanos*[J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2017, 187(7): 995-1007.
- [25] Zhang X Y, Wen H S, Qi X, *et al.* Na⁺-K⁺-ATPase and nka genes in spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) and their involvement in salinity adaptation[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2019, 235: 69-81.
- [26] Zhang X Y, Wen H S, Wang H L, *et al.* RNA-Seq analysis of salinity stress-responsive transcriptome in the liver of spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*)[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0173238.
- [27] Orłowski J, Grinstein S. Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family[J]. *Pflügers Archiv*, 2004, 447(5): 549-565.
- [28] Counillon L, Pouyssegur J. The expanding family of eucaryotic Na⁺/H⁺ exchangers[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(1): 1-4.
- [29] Edwards S L, Wall B P, Morrison-Shetlar A, *et al.* The effect of environmental hypercapnia and salinity on the expression of NHE-like isoforms in the gills of a euryhaline fish (*Fundulus heteroclitus*)[J]. *Journal of Experimental Zoology-Part A: Comparative Experimental Biology*, 2005, 303A(6): 464-475.
- [30] Liu Y, Wen H S, Qi X, *et al.* Genome-wide identification of the Na⁺/H⁺ exchanger gene family in *Lateolabrax maculatus* and its involvement in salinity regulation[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part D: Genomics and Proteomics*, 2019, 29: 286-298.
- [31] Yan J J, Chou M Y, Kaneko T, *et al.* Gene expression of Na⁺/H⁺ exchanger in zebrafish H⁺-ATPase-rich cells during acclimation to low-Na⁺ and acidic environments[J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2007, 293(6): C1814-C1823.
- [32] Ledoussal C, Woo A L, Miller M L, *et al.* Loss of the NHE2 Na⁺/H⁺ exchanger has no apparent effect on diarrheal state of NHE3-deficient mice[J]. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2001, 281(6): G1385-G1396.
- [33] 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.
- [34] 赵峰, 杨刚, 张涛, 等. 淡水和半咸水条件下中华鲟幼鱼鳃上皮泌氯细胞的形态特征与数量分布[J]. *海洋渔业*, 2016, 38(1): 35-41.
- Zhao F, Yang G, Zhang T, *et al.* Characters of morphology, distribution and quantity of branchial chloride cells of juvenile *Acipenser sinensis* acclimated in freshwater and brackish water[J]. *Marine Fisheries*, 2016, 38(1): 35-41 (in Chinese).
- [35] 侯俊利, 陈立侨, 庄平, 等. 不同盐度驯化下施氏鲟幼鱼鳃泌氯细胞结构的变化[J]. *水产学报*, 2006, 30(3): 316-322.
- Hou J L, Chen L Q, Zhuang P, *et al.* Structural changes of chloride cells in gills epithelia of juvenile *Acipenser schrenckii* acclimated to various salinities[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2006, 30(3): 316-322 (in Chinese).
- [36] Mizuno S, Ura K, Okubo T, *et al.* Ultrastructural changes in gill chloride cells during smoltification in wild and hatchery-reared masu salmon *Oncorhynchus masou*[J]. *Fisheries Science*, 2000, 66(4): 670-677.
- [37] Bollinger R J, Madsen S S, Bossus M C, *et al.* Does Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exhibit a gill Na⁺/K⁺-ATPase isoform switch during salinity change?[J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2016, 186(4): 485-501.
- [38] Anni I S A, Bianchini A, Barcarolli I F, *et al.* Salinity influence on growth, osmoregulation and energy turnover in juvenile pompano *Trachinotus marginatus* Cuvier 1832[J]. *Aquaculture*, 2016, 455: 63-72.
- [39] Laiz-Carrión R, Guerreiro P M, Fuentes J, *et al.* Branchial osmoregulatory response to salinity in the gilthead sea bream, *Sparus auratus*[J]. *Journal of Experimental Zoology-Part A: Comparative Experimental Biology*, 2005, 303A(7): 563-576.
- [40] Laiz-Carrión R, Sangiao-Alvarellos S, Guzmán J M, *et al.* Growth performance of gilthead sea bream *Sparus aurata* in different osmotic conditions: implications for osmoregulation and energy metabolism[J]. *Aquaculture*, 2005, 250(3-4): 849-861.
- [41] McCormick S D. Endocrine control of osmoregulation in teleost fish[J]. *American Zoologist*, 2001, 41(4): 781-794.
- [42] Hung T M, Ho C M, Liu Y C, *et al.* Up-regulation of microRNA-190b plays a role for decreased IGF-1 that induces insulin resistance in human hepatocellular carcinoma[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e89446.
- [43] Chandrasekaran K, Karolina D S, Sepramaniam S, *et al.* Role of microRNAs in kidney homeostasis and disease[J]. *Kidney International*, 2012, 81(7): 617-627.

Cloning and expression analysis of *NHE3* and *NKA α 1a* in cobia (*Rachycentron canadum*) and targeted regulation of related miRNAs

WANG Zhongliang¹, LIU Fubai¹, HUANG Baosong², LI Guiying¹,
WANG Jing¹, WANG Bei^{1*}, CHEN Zongfa¹

(1. College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. Agricultural Service Center of Sanjiao Town, Guangdong Province, Zhongshan 528445, China)

Abstract: To study the sequence characteristics, the gene expression patterns under salinity stress and the targeted regulation of related miRNAs of *NHE3* and *NKA α 1a* in cobia, *Rachycentron canadum*, the full-length cDNA sequences of *NHE3* and *NKA α 1a* were cloned by rapid amplification of cDNA ends; the tissue-specific and salinity-adaptive expression patterns of *NHE3* and *NKA α 1a* were analyzed by real-time quantitative PCR; the double-luciferase reporter assay was used to detect the targeted regulatory relationship between *NHE3* and *NKA α 1a* and related miRNAs. The open reading frames of cobia *NHE3* and *NKA α 1a* were 2718 bp and 3075 bp in length, encoding 905 and 1024 amino acids, respectively. *NHE3* and *NKA α 1a* were expressed in all detected tissues, including gill, intestine, and heart, among which the highest expression abundance was found in gill. With the increase of salinity, the expression of *NHE3* in gill decreased gradually, and there were significant differences between low-salt and high-salt adaptation. With the increase of salinity, the expression level of *NKA α 1a* showed different trends, and it was significantly up-regulated in gill and intestine after being challenged by low-salt and high-salt conditions, while its expression level was significantly down-regulated in kidney in high-salt environment. In different salinity adaptation processes, the highest expression levels of *NHE3* and *NKA α 1a* were all found in the gill. When *NHE3*-pmirGLO-WT was co-transfected with miR-1335-3p, the relative luciferase activity decreased compared with the control group, and there was a very significant difference, and the similar results were found when *NKA α 1a*-pmirGLO-WT was co-transfected with miR-1788-3p and mimic NC (control). The results of the double-luciferase reporter assay suggested that miR-1335-3p and miR-1788-3p could bind to *NHE3* and *NKA α 1a* 3'-UTR sequences, respectively, and downregulate their mRNA expression levels; *NHE3* and *NKA α 1a* were highly conserved among species; *NHE3* was mainly involved in low-salt adaptation, while *NKA α 1a* played a role in both low-salt and high-salt adaptation; miR-1335-3p and miR-1788-3p could negatively regulate their target genes *NHE3* and *NKA α 1a*, respectively, and thus participate in osmotic pressure regulation in *R. canadum*. The above results provided a theoretical basis for the further studies of the miRNA-mRNA osmotic pressure regulatory network in *R. canadum*.

Key words: *Rachycentron canadum*; salinity adaptation; cDNA clone; quantitative real-time PCR (qPCR); double-luciferase

Corresponding author: WANG Bei. E-mail: wangb@gdou.edu.cn

Funding projects: National Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students (CXXL2020002); 2021 Undergraduate Innovation Team Project of Guangdong Ocean University (CXTD2021001); Guangdong Ocean University's 2019 "First-Class" Provincial Financial Special Fund Construction Project; Guangdong Province Ordinary University Innovation Team Project (2021KCXTD026, 2022KCXTD013)