

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.20023

## 花鲈 *cox6a* 基因与相关 miRNA 的鉴定及其在盐度适应中的表达调控分析

王灵钰, 李昀, 董夕梦, 于朋, 张晓燕, 齐鑫, 田源, 温海深

中国海洋大学, 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003

**摘要:** 细胞色素 c 氧化酶(COX)是线粒体电子传递链的末端酶, COX6A 是细胞色素 c 氧化酶的核编码亚基之一。为丰富花鲈(*Latolabrax maculatus*)细胞色素 c 氧化酶的基础研究, 进一步了解 *cox6a* 基因及相关 miRNAs 在花鲈渗透调节机制中的潜在作用, 本研究开展了花鲈 *cox6a* 基因的全基因组鉴定及序列分析、*cox6a* 基因的组织表达谱分析和急性盐度转换后的表达分析。此外, 预测了可能靶定花鲈 *cox6a* 基因的 miRNAs, 并对其与 *cox6a* 基因的功能相关性进行了分析。结果表明, 花鲈具有 2 个 *cox6a* 基因(*cox6a1*、*cox6a2*)。系统进化树分析进一步确认了两个花鲈 *cox6a* 基因命名的准确性。多序列比对表明 *cox6a* 基因具有高度的保守性, 尤其是 C 端。组织表达谱结果显示, 花鲈 *cox6a1* 在垂体、脑、肝脏和肾脏中的表达量较高, *cox6a2* 在心脏和肾脏中的表达量较高。共获得 4 个可能靶定 *cox6a2* 基因的 miRNA: miR-30e-5p、miR-223、miR-200a-3p 和 miR-155-5p, 但没有发现可能靶定 *cox6a1* 基因的 miRNA。qRT-PCR 的结果显示, 在花鲈适应低盐和高盐环境的过程中, *cox6a1*、*cox6a2* 基因以及 miR-30e-5p、miR-223、miR-200a-3p 都呈现显著差异表达, 而 miR-155-5p 仅在适应高盐环境时出现了显著的差异表达。这表明, *cox6a1*、*cox6a2* 基因和 4 个 miRNAs 在花鲈的渗透调节过程中发挥潜在作用。其中 miR-30e-5p、miR-223 和 miR-200a-3p 的表达趋势与 *cox6a2* 呈负相关关系, 以 miR-223 相关性最高。由此推测, miR-30e-5p、miR-223 和 miR-200a-3p 不同程度地参与了 *cox6a2* 基因的表达调控。本研究为探讨花鲈适应不同盐度环境的渗透调节机制提供了基础数据。

**关键词:** 花鲈; *cox6a*; mRNA; miRNA; 渗透调节; qRT-PCR

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)09-1021-12

细胞色素 c 氧化酶(cytochrome c oxidase, COX)是呼吸链的第 4 个酶复合物, 催化细胞色素 c 将电子传递给分子态氧, 并参与能量产生<sup>[1-2]</sup>。COX 具有 13 个亚基, 3 个由线粒体基因组编码, 10 个由细胞核编码, 而 COX6A 是核编码亚基之一<sup>[3]</sup>。哺乳动物具有 2 个 *cox6a* 基因: *cox6a1*(肝脏亚型)和 *cox6a2*(心脏亚型)。它们在 COX 装配的最后步骤加入, 推测其与 COX 二聚态的稳定性调节有关, 也可能参与 COX 分子相互作用位点的形成。Bremer 等<sup>[4]</sup>的研究表明 COX 亚基具

有较高的热敏感性, 同时 Wright 等<sup>[5]</sup>发现 pH 也会影响 COX6A 的转录水平, 而 COX6A 亚基的表达下调会导致 COX 对氧的亲合力降低<sup>[6]</sup>并造成呼吸链超复合体的改变<sup>[7]</sup>。因此 *cox6a* 是与能量生成显著相关的重要基因。但 *cox6a* 在硬骨鱼类中的表达与功能分析报道较少。有部分研究发现 *cox6a* 参与鱼类的环境胁迫响应, 例如 Little 等<sup>[8]</sup>发现斑马鱼(*Danio rerio*) *cox6a* 亚型的表达模式受缺氧诱导, 可能由于当氧气水平受到限制时, COX 转移电子的效率增加。Qian 等<sup>[9]</sup>的研究表明

收稿日期: 2020-02-07; 修订日期: 2020-03-13.

基金项目: 现代农业产业技术体系专项资金项目(CARS-47).

作者简介: 王灵钰(1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水生生物生理学. E-mail: 1014523709@qq.com

通信作者: 温海深, 教授, 从事鱼类繁殖生理与内分泌调控研究. E-mail: wenhaishen@ouc.edu.cn

当大黄鱼(*Larimichthys crocea*)受到高温胁迫后,肝脏中 *cox6a* 的表达显著降低。此外, Nie 等<sup>[10]</sup>发现低温胁迫诱导大菱鲂(*Scophthalmus maximus*) *cox6a* 基因的表达上调。鱼类终生生活在水中,盐度作为最重要的非生物因子之一,直接影响硬骨鱼的成活率、生长和生理功能<sup>[11-13]</sup>。同时其在维持渗透平衡时会进行离子和水的协调运输,而这一过程需要大量的能量<sup>[14]</sup>。由此推测 *cox6a* 基因在响应盐度胁迫时可能发挥潜在功能,然而 *cox6a* 基因在鱼类渗透调节中的作用尚缺乏报道。

microRNAs (miRNA)是一类与转录后基因沉默相关的长度为 21~25 nt 的内源性非编码小 RNA,通过与靶基因的区域部分或全部配对结合,进而降低靶基因的稳定性或抑制翻译而下调目的基因的表达<sup>[15]</sup>。而对硬骨鱼 miRNA 功能的研究表明,miRNA 广泛参与鱼类的渗透调节过程。例如在对盐胁迫处理后的花鳗鲡(*Anguilla marmorata*)<sup>[16]</sup>、底鳉(*Fundulus heteroclitus*)<sup>[17]</sup>等的转录组测序结果中发现了许多与渗透调节有关的 miRNA。此外, Yan 等<sup>[18]</sup>的研究表明, miR-429 通过靶向调控渗透胁迫转录因子 1(OSTF1)参与罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)渗透调节,而 miR-30c 功能的丧失导致罗非鱼无法对渗透胁迫做出反应<sup>[19]</sup>。Flynt 等<sup>[20]</sup>发现 miR-8 参与调节斑马鱼胚胎对盐度胁迫的响应。由上述研究结果可以发现, miRNA 在渗透调节中发挥着不可忽视的作用。因此为了解析鱼类渗透压调控的分子机制,需挖掘具有潜在渗透压调控功能的 miRNA。

花鲈(*Latolabrax maculatus*)是一种分布在中国、越南与韩国沿海地区的广盐性硬骨鱼类,是研究鱼类渗透调节的理想模型<sup>[21-23]</sup>。花鲈产量高、营养价值高、口感好,是中国海水养殖业的重要经济鱼类<sup>[24]</sup>。Zhang 等<sup>[25]</sup>前期的转录组研究数据表明, *cox6a* 基因在花鲈长期适应高盐度环境后呈现显著的差异表达,表明其具有潜在的渗透调节功能。因此,为了进一步查明 *cox6a* 基因在花鲈盐度适应中的调控机制,本研究在花鲈基因组中鉴定并注释了 2 个 *cox6a* 基因(*cox6a1*、*cox6a2*),并对其进行了组织表达谱分析及在短期盐度转换过程中的实时荧光定量分析(qRT-PCR)。

此外,生物信息学分析数据表明, *cox6a2* 可能作为 miR-30e-5p、miR-223、miR-200a-3p 和 miR-155-5P 的靶基因,受到 miRNA 的转录后调控。因此,本研究对以上 *cox6a2* 潜在的调节 miRNAs 在盐度适应过程中的表达量进行了检测,并探讨了花鲈 *cox6a2* 基因的 mRNA 与 miRNA 在盐度调控中的互作机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 花鲈 *cox6a* 基因的全基因组鉴定

从 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库下载了人(*Homo sapiens*)和斑马鱼(*Danio rerio*) *cox6a* 基因的氨基酸序列,并通过 TBtools 软件的 TBLASTN 方法对比花鲈全基因组(PRJNA408177)和转录组数据库(NCBI: SRR4409341 and SRR4409397)<sup>[26-27]</sup>获得核苷酸序列。用 ORF-finder 在线软件(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)预测花鲈 *cox6a* 基因的开放阅读框(ORF)。

### 1.2 *cox6a* 基因的系统进化分析

利用花鲈和几种代表性脊椎动物[人(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)、牛(*Bos taurus*)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)、热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*)、金头鲷(*Sparus aurata*)、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)和斑马鱼(*Danio rerio*)]的 *cox6a* 基因的氨基酸序列,进行系统进化分析。利用 MEGA 7.0 软件,采用 Neighbor-Joining(NJ)法和 Jones-Taylor-Thornton (JTT)模型构建系统进化树。

### 1.3 花鲈 *cox6a* 基因的氨基酸序列分析

通过 ExPASy Prot-Param 在线工具(<https://web.expasy.org/protparam/>)计算得到花鲈 *cox6a* 蛋白的预测分子量(MW, kD)和等电点(pI)。通过 DNAMAN 软件对预测的人、鼠、牛、热带爪蟾、非洲爪蟾、斑马鱼、斑点叉尾鲷、金头鲷以及花鲈 *cox6a* 蛋白进行氨基酸序列同源性比对。通过 SMART 在线软件([smart.embl-heidelberg.de/](http://smart.embl-heidelberg.de/))得到花鲈 *cox6a* 预测蛋白的功能结构域。

### 1.4 预测靶向 *cox6a* 的 miRNA

利用 TargetScan 及 miRanda 靶基因预测软件,在我们前期测得的花鲈的 miRNA 数据库中,筛选出潜在的靶向 *cox6a* 的 miRNAs。

### 1.5 实验鱼收集和样品采集

在山东省青岛市本地市场选取健康的花鲈 3 尾, 体重 0.7~0.8 kg。麻醉后迅速采取心脏、肝、脾、鳃、肾、头肾、肌肉、性腺、胃、小脑、端脑、下丘脑、延髓、中脑、垂体共 15 个组织样品, 并立即放入液氮中, 随后置于-80 °C 冰箱保存, 用于总 RNA 提取。

盐度转换实验在山东省东营市双瀛水产苗种有限责任公司进行。随机选择 90 尾花鲈, 体重为 (120.66±1.87) g, 分别在淡水(盐度 0, FW)和海水(盐度 30, SW)环境中进行实验前驯化: 每个体积为 100 L 的白色塑化桶中放置 15 尾鱼, 每 3 天换 1 次水, 换水量为 50%。驯化 30 d 后正式开展急性盐度转换实验: 将淡水组中的个体迅速转入海水组, 并标记为 FW-SW 组; 同时将海水组中的个体迅速迁移到淡水中, 标记为 SW-FW 组, 每个实验组设置 3 个环境重复。其他实验条件在整个实验过程中保持恒定, 包括温度(15±0.5) °C、溶解氧(7.1±0.4) mg/L、pH (8.0±0.3)。分别于处理前(0 h)和盐度转换后(12 h、1 d、3 d 和 7 d)采集每个实验组 3×3 个个体的鳃组织样本并迅速放入液氮中, 随后在-80 °C 保存备用。

### 1.6 总 RNA 和 miRNA 的提取及实时荧光定量 (qRT-PCR) 分析

用 RNAiso Plus 和 RNAiso for Small RNA (日本 TaKaRa) 提取总 RNA 和总 miRNA。分别用核酸测定仪(Biodrops BD-1000, 北京 OSTC)和电泳仪检测 RNA 的浓度和完整性。使用 PrimeScript™ RT 试剂盒(日本 TaKaRa) 去除总 RNA 中的基因组

DNA 并反转录成 cDNA。使用 DNase I 酶(日本 TaKaRa) 去除总 miRNA 中的基因组 DNA, 并用 Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis 试剂盒(日本 TaKaRa) 反转录合成 cDNA。使用 StepOne Plus Real-Time PCR system (Applied Biosystems) PCR 仪, 对 *cox6a1*、*cox6a2*、miR-223、miR-200a-3p、miR-155-5p 以及 miR-30e-5p 进行 qRT-PCR 检测。反应体系总体积为 20 μL, 包含 2 μL cDNA 模板, 正向和反向引物各 0.4 μL, 10 μL SYBR® FAST qRT-PCR Master Mix、0.4 μL ROX Dye 和 6.8 μL ddH<sub>2</sub>O。qRT-PCR 反应程序如下: 95 °C 预变性 5 s, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 共 40 个循环。mRNA 定量以 18S RNA 为内参, 基因特异性引物使用 Primer 5 软件设计, 引物信息详见表 1。miRNA 定量中的上游引物为特异性引物, 下游引物为通用引物, 以 U6 为内参, 其上游引物为 5'-TGGAACGCTTCACGAATTTGCG-3', 下游引物为 5'-GGAACGATACAGAGAAGATTAGC-3'。其他引物信息见表 2。基因及 miRNA 的相对表达量采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法进行计算。

表 1 qRT-PCR 相关基因引物序列

Tab. 1 Relative genes primer sequences of qRT-PCR

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	产物长度/bp product length
<i>cox6a1</i> F	ACCTTCGTGGTTGCCCTAC	158
<i>cox6a1</i> R	GTTTTGGTGCCATCTCCC	
<i>cox6a2</i> F	CATTGTGCTGGCTTTTCC	258
<i>cox6a2</i> R	TTGGTGTGAGGGTTGTGG	
18s F	GGGTCCGAAGCGTTTACT	179
18s R	TCACCTCTAGCGGCACAA	

表 2 miRNA 序列及 qRT-PCR 引物序列

Tab. 2 miRNAs sequences and qRT-PCR primer sequences

miRNA 名称 miRNA name	miRNA 序列(5'-3') miRNA sequence (5'-3')	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	引物长度/bp primer length
miR-223	TGTCAGTTTGTCAAATACCCCA	TCAGTTTGTCAAATACCCCA	20
miR-200a-3p	TAACACTGTCTGGTAACGATGT	CACTGTCTGGTAACGATGT	19
miR-155-5p	TTAATGCTAATCGTGATAGGGGT	ATGCTAATCGTGATAGGGGT	20
miR-30e-5p	TGTAACATCCTTGACTGGAAGCT	TGTAACATCCTTGACTGGAAGCT	21

### 1.7 统计方法

实验所得数据用统计软件 SPSS 21 单因素方

差分析中的 LSD 法进行差异显著性检验。P<0.05 作为差异显著水平。实验数据结果用“平均值±标

准误”( $\bar{x} \pm SE$ )表示,用 Microsoft<sup>®</sup> Excel<sup>®</sup> 2016 MSO 进行作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 *cox6a* 基因的鉴定与命名

在花鲈中共鉴定出了 2 个 *cox6a* 基因,分别命名为 *cox6a1* 和 *cox6a2*。*cox6a1* 基因位于花鲈 8 号染色体上,编码区长度为 345 bp,预测蛋白长度为 114 aa,分子量为 12.56 kD,等电点为 9.36。*cox6a2* 基因位于花鲈 15 号染色体上,编码区长度

为 309 bp,预测蛋白长度为 102 aa,分子量为 11.31 kD,等电点为 9.43。基因信息详见表 3。

由系统进化树(图 1)可知,6 种低等动物的 *cox6a* 基因聚在一起,其中花鲈 *cox6a1* 基因与斑马鱼 *cox6a1*、斑点叉尾鲷的 *cox6a* 聚集在同一枝,花鲈 *cox6a2* 与金头鲷 *cox6a*、斑马鱼 *cox6a2* 聚集在同一枝,同源关系较近。而哺乳动物与 6 种低等动物的 *cox6a* 基因分离,单独聚为 2 支,同源关系较远。该结果支持了本研究对花鲈 *cox6a* 基因的命名。

表 3 花鲈 2 个 *cox6a* 基因信息  
Tab. 3 Characteristics of 2 *cox6a* genes identified in *Latolabrax maculatus*

基因名 gene name	染色体位置 chromosome location	编码区长度/bp CDS length	预测蛋白长度/aa predicted protein	分子量/kD molecular weight	理论等电点 isoelectric point (pI)	NCBI 序列号 NCBI access number
<i>cox6a1</i>	Chr8: 14944839-14946887	345	114	12.56	9.36	MN714338
<i>cox6a2</i>	Chr15: 9766016-9768161	309	102	11.31	9.43	MN714339

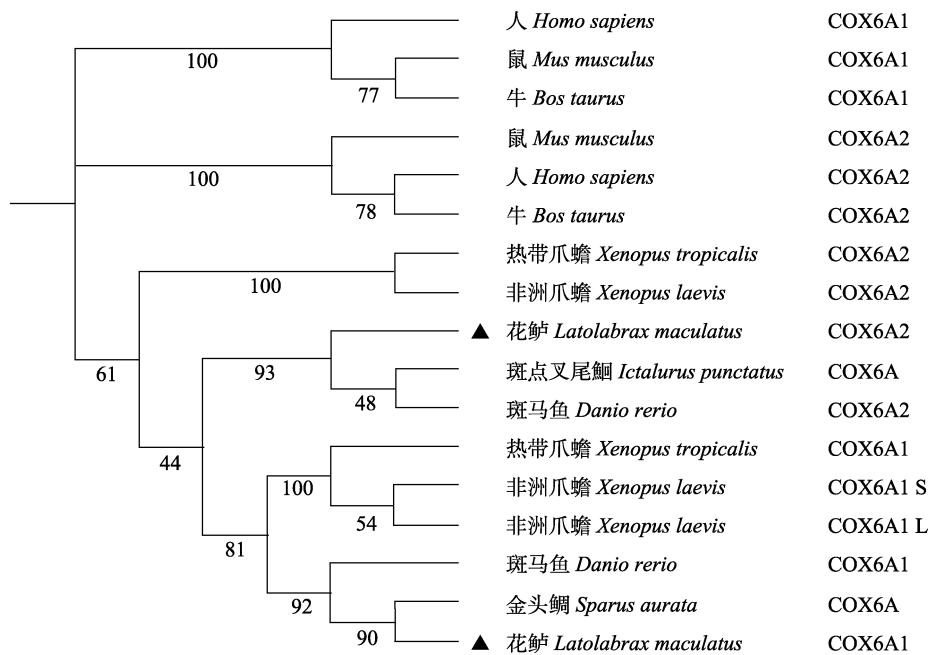


图 1 通过 MEGA 7 软件基于 9 个脊椎动物 COX6A 的氨基酸序列构建的系统进化树  
▲示花鲈 COX6A.

Fig. 1 Phylogenetic tree constructed using the amino acid sequences of COX6A in 9 vertebrate species by MEGA7 software  
The COX6A of *Latolabrax maculatus* are indicated by black triangle.

### 2.2 花鲈 COX6A 氨基酸序列分析

对花鲈 *cox6a* 基因的预测氨基酸序列进行结构分析,发现 *cox6a* 基因编码的蛋白结构主要由一个高度保守的功能结构域组成,即 COX6A 功

能域(PF02046)。将花鲈 *cox6a1*、*cox6a2* 基因编码的氨基酸序列与其他几个脊椎动物的序列进行比对,结果发现,*cox6a* 基因的序列保守程度均非常高(图 2),尤其是序列的 C 端。

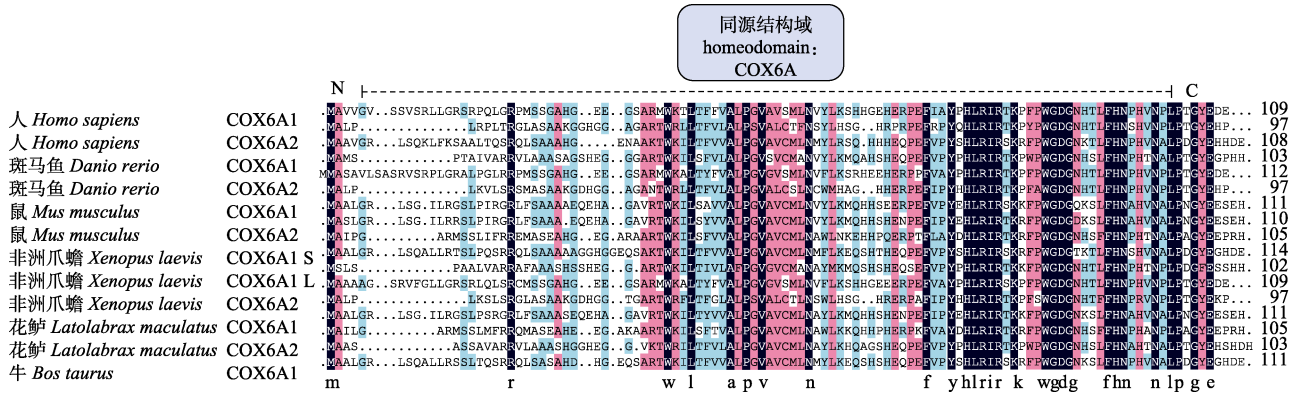


图 2 花鲈 2 条 COX6A 蛋白序列与其他脊椎动物的同源性比对

不同颜色代表不同的同源性级别: 浅蓝色 ≥ 50%, 红色 ≥ 75%, 深蓝色 = 100%.

Fig. 2 Alignment of COX6A protein sequences in *Latolabrax maculatus* and other vertebrate species

Three colors in the figure represent different homology: light blue ≥ 50%, red ≥ 75%, dark blue = 100%.

### 2.3 花鲈 *cox6a* 基因 mRNA 的组织表达谱

利用 qRT-PCR 技术对花鲈 15 个组织中的 *cox6a1*、*cox6a2* 基因表达水平进行分析, 结果显示(图 3), 两个 *cox6a* 基因在各个组织中的表达情况存在显著差异。其中 *cox6a1* 在垂体中的表达量最高, 端脑其次, 在肌肉和胃中的表达量最低(图 3A)。而 *cox6a2* 在心脏中表达量最高, 肾其次, 在端脑中的表达量最低(图 3B)。这与其在斑马鱼中的表达模式类似<sup>[9]</sup>。

### 2.4 花鲈盐度适应中 *cox6a* 的表达情况

qRT-PCR 结果显示, 花鲈鳃中的 *cox6a* 基因的表达量在适应盐度过程中发生了显著变化。在 FW-SW 组中, 与淡水对照组(0 h)相比, 转入海水 1 d 后, *cox6a1* 基因的表达水平提高了 8.8 倍, 达到高峰值, 3 d 后, 其表达水平恢复到初始水平

(图 4A)。而 *cox6a2* 基因在 12 h 的表达量呈现出显著下降趋势, 其表达量与淡水对照组(0 h)相比下调了 91.9%, 达到最低峰, 处理 1 d 和 3 d 表达量略有上升, 但与 0 h 相比仍分别下调了 82.8% 和 79.2%, 7 d 后仍然保持该表达水平(图 4B)。在 SW-FW 组中, 与海水对照组(0 h)相比, 转入淡水 12 h 后, *cox6a1* 基因的表达水平降低了 76.7%。1 d 后, 相对于 12 h, 其表达水平提高了 20.7 倍, 达到高峰值, 7 d 后, 其表达水平再次恢复到 12 h 的水平(图 4A)。*cox6a2* 的表达量在转入淡水 12 h 后出现了显著下降趋势, 其表达量与 0 h 相比下调了 66.7%, 处理 1 d 后其表达量上升为 12 h 的 4.2 倍, 达到高峰值, 并在 3 d 下降至与 12 h 相同的表达水平, 直至 7 d 仍保持该表达水平(图 4B)。实验结果表明, *cox6a1*、*cox6a2* 基因均参与了

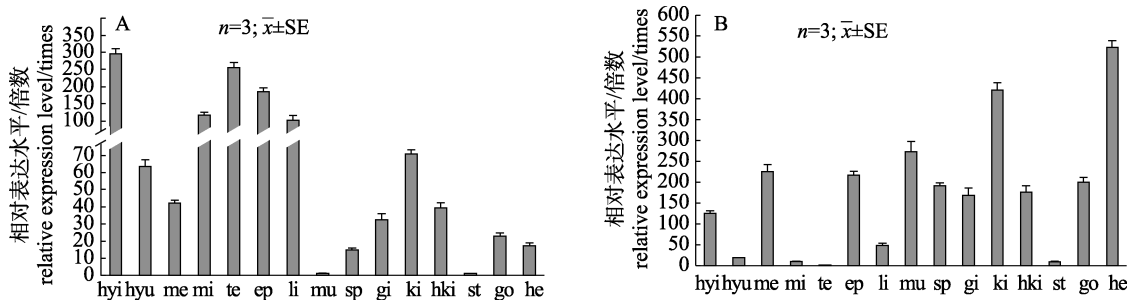


图 3 花鲈 *cox6a1* (A)及 *cox6a2* (B)基因在不同组织的 mRNA 相对表达量

ep: 小脑; gi: 鳃; go: 性腺; he: 心脏; hki: 头肾; hyi: 垂体; hyu: 下丘脑; ki: 肾; li: 肝; me: 延髓; mi: 中脑; mu: 肌肉; sp: 脾; st: 胃; te: 端脑。

Fig. 3 Relative mRNA expression level of *cox6a1* (A) and *cox6a2* (B) genes in various tissues of *Latolabrax maculatus*

ep: epencephalon; gi: gill; go: gonad; he: heart; hki: head-kidney; hyi: hypophysis; hyu: hypothalamus; ki: kidney; li: liver; me: medulla; mi: midbrain; mu: muscle; sp: spleen; st: stomach; te: telencephalon.

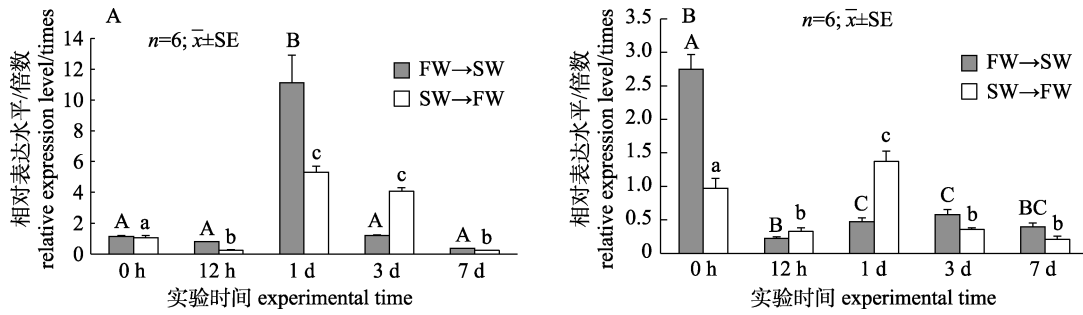


图 4 盐度转换实验中花鲈 *cox6a1* (A)及 *cox6a2* (B)基因的表达情况

FW: 淡水; SW: 海水. 柱形图上方大写和小写字母不同分别表示不同处理组内不同时间差异显著( $P < 0.05$ ).

Fig. 4 Expression pattern of *cox6a1* (A) and *cox6a2* (B) mRNA in *Latolabrax maculatus* gill tissue in salinity conversion experiment  
FW: fresh water; SW: sea water. Different capital and lowercase letters on the column indicate significant difference among different time in different groups ( $P < 0.05$ ).

花鲈的渗透调节过程,且在适应高盐和低盐过程中发挥不同的功能。

### 2.5 预测靶向 *cox6a* 的 miRNA

根据 TargentScan 和 miBRD 的预测结果,在已测得的花鲈鳃组织 miRNA 数据库中鉴定获得了 4 个可能靶向调控 *cox6a2* 基因的 miRNA,分别为 miR-30e-5p、miR-223、miR-200a-3p 和 miR-155-5p,预测结合位点情况如图 5 所示。并未发现靶向调控 *cox6a1* 基因的 miRNA。

### 2.6 盐度适应中花鲈 *cox6a* 相关调控 miRNA 的表达

本研究对 4 个 *cox6a2* 基因相关的 miRNA 进行了 qRT-PCR 分析。结果显示,miR-30e-5p、miR-223 和 miR-200a-3p 在 FW-SW 组、SW-FW 组中均表现出了相似的表达变化趋势:在 FW-SW 组中(图 6),相对于淡水对照组(0 h),miR-30e-5p、miR-223 和 miR-200a-3p 在处理 12 h 后表现出不

同程度的上升趋势,表达量分别为 0 h 的 9.9、14.6、23.8 倍。其中 miR-30e-5p (图 6A)、miR-200a-3p (图 6C)在 1 d 仍维持高表达,miR-223(图 6B)在 1 d 后表达量相对于 12 h 下降了 50%。这 3 个 miRNAs 在 3 d 后都迅速下降为接近 0 h 的表达水平,但在 7 d 又出现小幅度的上升(0 h 的 2.7~3.5 倍)。而 miR-155-5p 的表达呈现相反的趋势:在处理 12h 后迅速下降了 89.1%,并在 3 d 后回升为 0 h 的水平,在 7 d 时又下降为 12 h 的水平(图 6D)。在 SW-FW 组中(图 7),相对于海水对照组(0 h),miR-30e-5p (图 7A)、miR-223 (图 7B)和 miR-200a-3p (图 7C)均在处理 12 h 后表现出了显著的上升趋势,其表达量分别为 0 h 的 12.2、8.5、19.9 倍,并在处理 7 d 后分别下降为 0 h 的 2.1、2.6、2.2 倍,其中 miR-200a-3p (图 7C)的表达变化最为显著。而 miR-155-5p (图 7D)在整个过程中没有表现出明显的变化趋势。

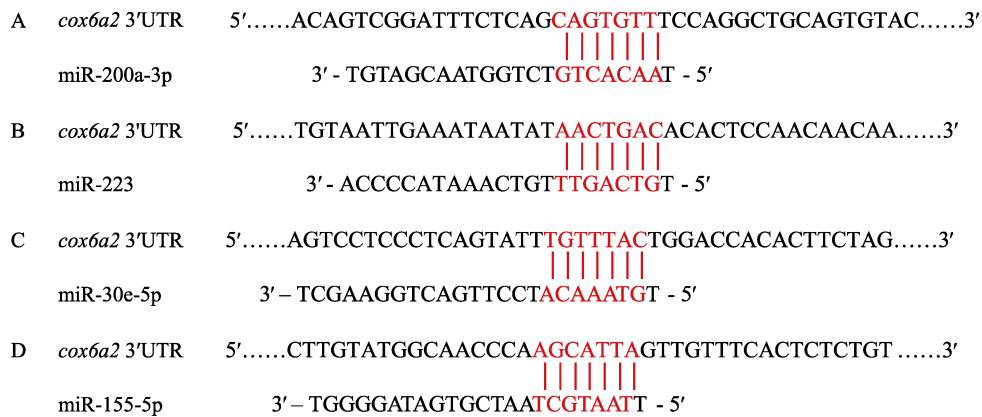


图 5 miRNAs 与 *cox6a2* mRNA 3' UTR 的预测结合位点

Fig. 5 Predicted binding sites of miRNAs and *cox6a2* mRNA 3' UTR

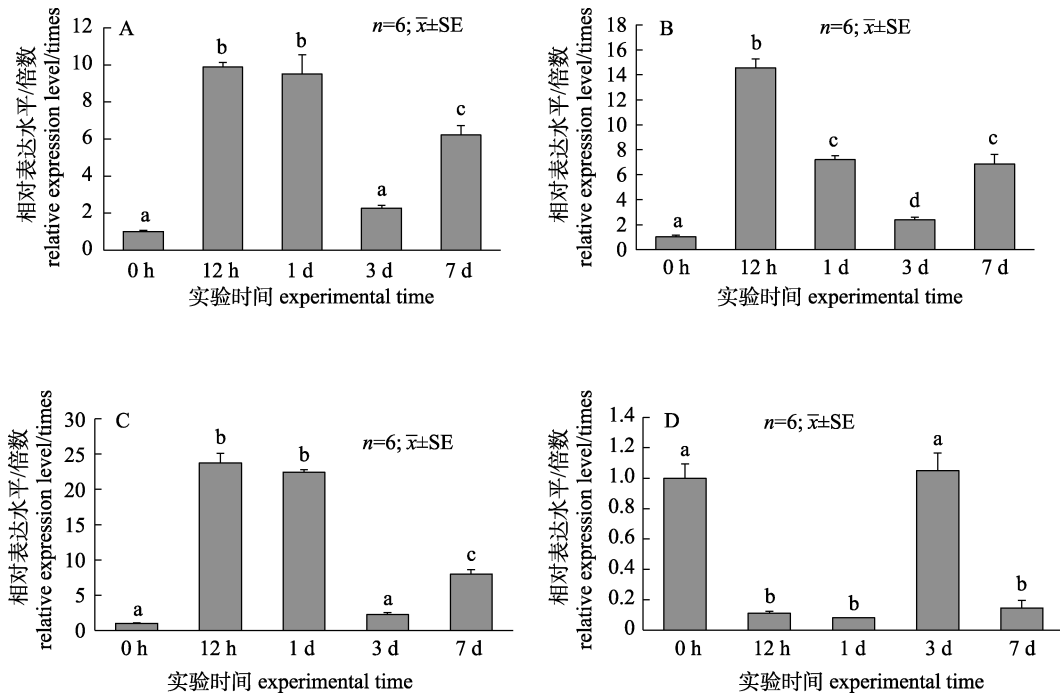


图 6 淡水转海水处理组(FW→SW)花鲈鳃中 miRNAs 的表达

A. miR-30e-5p; B. miR-223; C. miR-200a-3p; D. miR-155-5p. 柱形图上方法字母不同表示差异显著( $P<0.05$ ).

Fig. 6 Expression pattern of miRNAs in *Latolabrax maculatus* gill tissue in fresh water to sea water (FW→SW) treatment group A. miR-30e-5p; B. miR-223; C. miR-200a-3p; D. miR-155-5p. Different letters on the column indicate significant difference ( $P<0.05$ ).

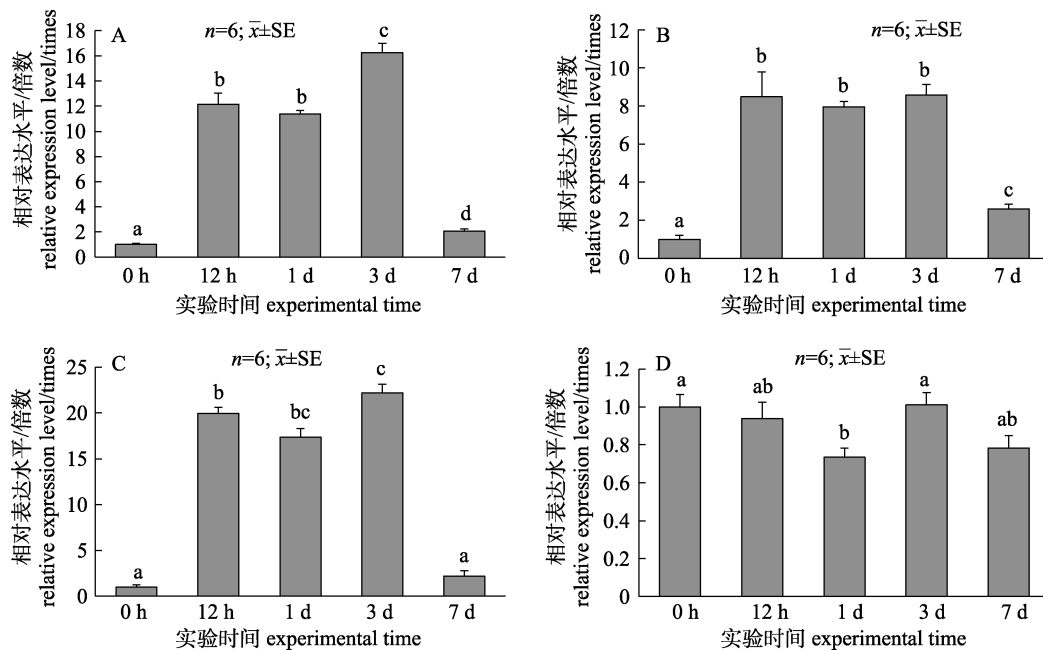


图 7 海水转淡水处理组(SW→FW)花鲈鳃中 miRNAs 的表达情况

A. miR-30e-5p; B. miR-223; C. miR-200a-3p; D. miR-155-5p. 柱形图上方法字母不同表示差异显著( $P<0.05$ ).

Fig. 7 Expression pattern of miRNAs in *Latolabrax maculatus* gill tissue in sea water to fresh water (SW→FW) treatment group A. miR-30e-5p; B. miR-223; C. miR-200a-3p; D. miR-155-5p. Different letters on the column indicate significant difference ( $P<0.05$ ).



## 2.7 *cox6a2* 基因的 mRNA 与 miRNA 表达相关性分析

由图 8 可知,在花鲈的盐度适应过程中,*cox6a2* 与 miR-30e-5p、miR-223 和 miR-200a-3p 表达量变化趋势相反,结合其序列特征,表明 miR-30e-5p、miR-223 和 miR-200a-3p 可能靶向调控 *cox6a2* 的表达。其中 miR-223 与 *cox6a2* 之间存在最显著的负相关关系,通过下调 *cox6a2* 基因 mRNA 的表达参与花鲈的渗透调节。

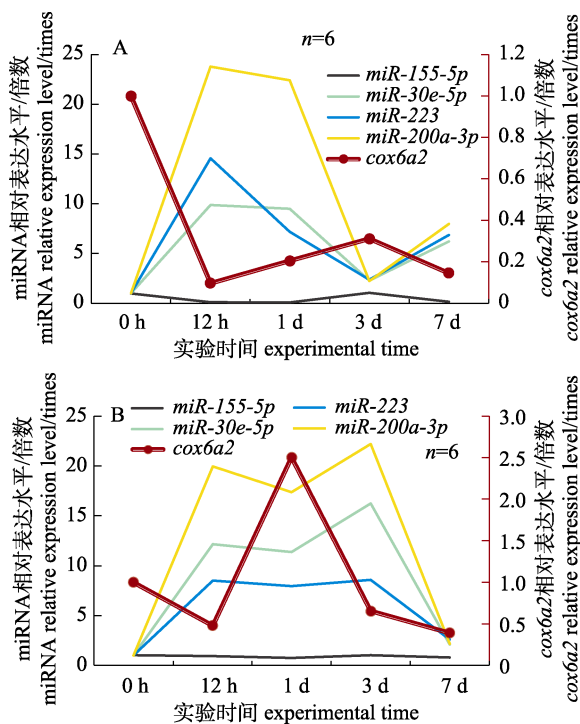


图 8 花鲈盐度转换实验中 *cox6a2* 基因与相关 miRNAs 表达的变化趋势

A. 淡水→海水; B. 海水→淡水。

Fig. 8 The change trend of *cox6a2* gene and related miRNAs expression in *Latolabrax maculatus* under salinity conversion  
A. Fresh water→sea water; B. Sea water→fresh water.

## 3 讨论

本研究在花鲈的基因组中鉴定出了 2 个 *cox6a* 基因,并通过系统进化树分析确定了命名的准确性。与哺乳动物一致,低等脊椎动物的 *cox6a1* 和 *cox6a2* 分别各自聚为一支。*cox6a1* 和 *cox6a2* 属于旁系同源基因,一般直系同源基因在不同种仍执行相似的功能,在进化上比较保守,

而旁系基因尽管存在于同一个种内,但是通常执行不同的功能,因此基因结构差异相对较大。通过基因序列分析发现,*cox6a* 是高度保守的基因,并且其编码的蛋白主要由一个功能性结构域 COX6A 组成。

在高等脊椎动物中,COX6A1 在组织中表达广泛,而 COX6A2 的表达仅局限于心肌、横纹肌等少数组织<sup>[7]</sup>。Little 等<sup>[8]</sup>的研究证实,*cox6a1* 和 *cox6a2* 基因在斑马鱼脑、鳃、肝、肌肉、心脏组织中呈现特异性组织表达。其中 *cox6a1* 基因在脑中高表达,在肌肉中表达最低,而 *cox6a2* 基因在肌肉中表达最高,其次是心脏,在脑中表达最低。本研究检测了 *cox6a* 基因在花鲈包括鳃、肝、肌肉、心脏在内的 15 个组织中的 mRNA 表达规律,并对脑组织进行了分区检测(端脑、中脑、小脑、下丘脑、延髓)。发现花鲈 *cox6a1* 和 *cox6a2* 基因的 mRNA 表达模式同样具有显著的组织特异性,*cox6a1* 在花鲈脑、垂体组织中的表达较高,这与斑马鱼中的结果一致<sup>[9]</sup>。脑和脑垂体作为神经及内分泌调控的核心器官,其正常运转需要消耗大量能量。此外,心肌细胞持续收缩舒张,肾细胞持续过滤、排泄体内废物同样需要消耗大量能量。因此,*cox6a1* 在中枢系统垂体及脑中的功能可能是为激素合成及分泌提供能量。而 *cox6a2* 在心脏和肾脏组织中的表达较高,表明其可能为心肌细胞持续收缩、肾细胞持续排泄提供能量,具有潜在的代谢调节作用。与斑马鱼<sup>[9]</sup>不同的是,*cox6a2* 在肌肉中的表达量比在心脏和肾脏中的低,这可能是因为样本的生长发育时期不同。*cox6a2* 基因在小鼠和人肌肉中的表达在发育过程中不断增加在一定程度上可以解释这一现象<sup>[28]</sup>,同时说明 *cox6a2* 与生长发育显著相关。值得注意的是,鱼类的代谢与渗透调节密切相关<sup>[29]</sup>。鱼类进行代谢的基本生理活动是呼吸与排泄,在此过程中,鳃组织也起着重要作用,并且由组织表达谱可知,花鲈 *cox6a1* 和 *cox6a2* 在鳃组织中都有着一定程度的表达,这为接下来的短期盐度适应实验提供了基础。另一方面,鳃组织,尤其是鳃中的泌氯细胞在适应急性和慢性渗透环境变化方面起着关键作用<sup>[30-31]</sup>,同时鳃组织直接暴露于水环境中,对



环境盐度的变化有着直接的响应。因此,为了解 *cox6a* 基因在花鲈渗透调节中的作用,需要分析其在盐度适应后鳃组织中的表达模式。

以往鱼类的研究多集中于 *cox* 对温度和低氧胁迫的响应<sup>[10-11,32]</sup>,对于渗透调节方面几乎没有研究报道。鱼类调节机体渗透压以适应不同的盐度环境,这依赖于溶质和水分子的主动运输,而物质的跨膜运输过程大多伴随着 ATP 的输出<sup>[33]</sup>。Kadenbach 等<sup>[34]</sup>的研究证明 *cox6a* 基因在能量产生过程中具有调节作用。本课题组的前期组学结果也表明,花鲈的 *cox6a* 基因可能参与盐度适应过程。为了进一步研究 *cox6a* 基因在花鲈渗透调节中的作用,我们进行了急性盐度适应实验,结果表明,在盐度适应过程中花鲈 *cox6a1* 和 *cox6a2* 的 mRNA 表达水平均发生了显著的变化,而两个 *cox6a* 基因的表达模式的差异性可能与两者之间的功能差异相关。*cox6a1* 基因在花鲈适应淡水和海水环境时的表达量总体都呈现短暂的上升趋势,这表明在渗透调节过程中,花鲈提高了能量的产生效率,*cox6a1* 基因在渗透调节的供能方面发挥了潜在作用。*cox6a2* 的表达量在花鲈适应淡水和海水环境时总体呈下降趋势,这表明花鲈需要持续抑制 *cox6a2* 的表达进行渗透压调控。Quintens 等<sup>[35]</sup>的研究表明敲除 *cox6a2* 基因的小鼠能量消耗增加,这在一定程度上可以解释 *cox6a2* 表达量在花鲈盐度转换过程中的下调现象,可能 *cox6a2* 起到了部分抑制能量过度消耗的作用,而 *cox6a2* 表达下调后才能满足花鲈适应盐度环境的能量消耗需要。相对而言,花鲈 *cox6a1* 基因对盐度的响应能力更强,而 *cox6a2* 基因对盐度的响应速度更快。

动物成熟的 miRNA 多通过引导沉默复合蛋白(RNA-induced silencing complex, RISC),以碱基互补配对的方式识别靶 mRNA 并抑制翻译过程<sup>[36]</sup>。Rajewsky<sup>[37]</sup>和崔俊霞<sup>[38]</sup>的研究都能证明一个 mRNA 可以由多个 miRNA 靶向调控。miRanda 是最早的 miRNA 靶基因预测软件,主要通过 miRNA 与 mRNA 的序列匹配度,靶点的热稳定性以及靶点的跨物种保守性筛选 3'UTR。TargetScan 对靶基因的筛选则主要根据靶基因的跨物种保守性及 miRNA-靶基因二聚体的热力学

特征。本研究通过 TargetScan 和 miRanda 靶基因预测软件,在花鲈 miRNA 数据库中筛选出了 4 个可能靶定 *cox6a2* 基因的 miRNA: miR-30e-5p、miR-223、miR-200a-3p 和 miR-155-5p。Wang 等<sup>[16]</sup>、Goodale 等<sup>[17]</sup>、Yan 等<sup>[18-19]</sup>、Flynt 等<sup>[20]</sup>对鱼类的研究证明,miRNA 参与了渗透调节,并发挥着重要作用。因此本研究分析了 miR-30e-5p、miR-223、miR-200a-3p 和 miR-155-5p 在短期盐度转换过程中的表达情况。结果显示在淡水转海水处理组中,4 个 miRNA 的表达水平均出现了显著的变化,而在海水转淡水处理组中,只有 miR-30e-5p、miR-223 和 miR-200a-3p 的表达水平发生了显著变化。这表明,miR-155-5p 可能只参与了适应高盐环境的渗透调节,而 miR-30e-5p、miR-223 和 miR-200a-3p 可能在花鲈适应高盐和低盐环境的过程中都发挥了关键作用。除此之外,本研究还发现,miR-30e-5p、miR-223 和 miR-200a-3p 与 *cox6a2* 的 mRNA 表达水平的变化趋势相反,并具有高度的负相关性,尤其是 miR-223。这表明 miR-30e-5p、miR-223 和 miR-200a-3p 与 *cox6a2* 基因具有功能相关性,并可能直接或间接地下调了 *cox6a2* 基因的表达,而这种表达量趋势相反的应答可能使得花鲈在适应盐度转换的过程中能量供给充足,可以更为有效地进行渗透调节。但 *cox6a2* 基因与这些 miRNA 在渗透调节中的具体功能如何,有待于深入的功能实验进行探索。

综上所述,本研究通过基因序列分析及短期盐度适应实验中的基因表达检测研究了花鲈 *cox6a* 基因和相关 miRNAs 在渗透调节中的作用。在花鲈基因组中鉴定出 2 个 *cox6a* (*cox6a1* 和 *cox6a2*)基因,系统进化树、基因结构分析表明其具有高度保守性。组织表达谱分析结果表明,*cox6a* 的表达具有显著的组织特异性。此外,在盐度适应过程中,*cox6a1* 和 *cox6a2* 基因的表达均发生了显著变化,表明其在花鲈渗透调节中发挥潜在功能。同时本研究检测了 4 个可能靶向调控 *cox6a2* 基因的 miRNA (miR-30e-5p、miR-223、miR-200a-3p 和 miR-155-5p)在盐度适应中的表达变化,发现 miR-30e-5p、miR-223 和 miR-200a-3p 表达量的变化趋势与 *cox6a2* 基因呈现显著的负

相关关系,尤其是 miR-223。这表明,miR-30e-5p、miR-223 和 miR-200a-3p 可能在短期盐度适应过程中参与了 *cox6a2* 的表达调控,但其机理有待研究。本研究结果为进一步探索 *cox6a* 基因及 miRNA 在花鲈渗透调节中的作用提供了基础数据,并为全面解析鱼类渗透调节的分子机制研究提供了有价值的参考。

#### 参考文献:

- [1] Curi G C, Welchen E, Chan R L, et al. Nuclear and mitochondrial genes encoding cytochrome c oxidase subunits respond differently to the same metabolic factors[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2003, 41(8): 689-693.
- [2] Srinivasan S, Avadhani N G. Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2012, 53(6): 1252-1263.
- [3] Schmidt T R, Jaradat S A, Goodman M, et al. Molecular evolution of cytochrome c oxidase: Rate variation among subunit VIa isoforms[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1997, 14(6): 595-601.
- [4] Bremer K, Moyes C D. mRNA degradation: An underestimated factor in steady-state transcript levels of cytochrome c oxidase subunits?[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2014, 217(12): 2212-2220.
- [5] Wright R M, Simpson S L, Lanoil B D. pH and the cAMP dependent protein kinase mediate growth phase induction of the cytochrome c oxidase subunit VI gene, COX6, in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1995, 214(3): 1051-1059.
- [6] Wenchich L, Fornuskova D, Stiburek L, et al. 44 Knock-down of Cox6a subunit leads to decreased affinity for oxygen of cytochrome c oxidase[J]. *Mitochondrion*, 2010, 10(2): 211.
- [7] Fornuskova D, Stiburek L, Wenchich L, et al. Novel insights into the assembly and function of human nuclear-encoded cytochrome c oxidase subunits 4, 5a, 6a, 7a and 7b[J]. *Biochemical Journal*, 2010, 428(3): 363-374.
- [8] Little A G, Kocha K M, Lougheed S C, et al. Evolution of the nuclear-encoded cytochrome oxidase subunits in vertebrates[J]. *Physiological Genomics*, 2010, 42(1): 76-84.
- [9] Qian B Y, Xue L Y. Liver transcriptome sequencing and *de novo* annotation of the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) under heat and cold stress[J]. *Marine Genomics*, 2016, 25: 95-102.
- [10] Nie M M, Tan X G, Lu Y L, et al. Network of microRNA-transcriptional factor-mRNA in cold response of turbot *Scophthalmus maximus*[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2019, 45(2): 583-597.
- [11] Rubio V C, Sánchez-Vázquez F J, Madrid J A. Effects of salinity on food intake and macronutrient selection in European sea bass[J]. *Physiology & Behavior*, 2005, 85(3): 333-339.
- [12] Pritchard J B. The gill and homeostasis: Transport under stress[J]. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2003, 285(6): R1269-R1271.
- [13] Nordlie F G. Environmental influences on regulation of blood plasma/serum components in teleost fishes: A review[J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2009, 19(4): 481-564.
- [14] Evans D H, Piermarini P M, Choe K P. The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste[J]. *Physiological Reviews*, 2005, 85(1): 97-177.
- [15] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. *Nature*, 2004, 431(7006): 350-355.
- [16] Wang X L, Yin D Q, Li P, et al. microRNA-sequence profiling reveals novel osmoregulatory microRNA expression patterns in catadromous eel *Anguilla marmorata*[J]. *PLoS ONE*, 2015, 10(8): e0136383.
- [17] Goodale B C, Hampton T H, Ford E N, et al. Profiling microRNA expression in Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) gill and responses to arsenic and hyperosmotic stress[J]. *Aquatic Toxicology*, 2019, 206: 142-153.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] Flynt A S, Thatcher E J, Burkewitz K, et al. miR-8 microRNAs regulate the response to osmotic stress in zebrafish embryos[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2009, 185(1): 115-127.
- [21] Zhang M Z, Gao T X, Ruan S H, et al. Study on artificial cultivation and spawning inducement technique of *Lateolabrax japonicus*[J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 2001, 31(2): 195-200. [张美昭, 高天翔, 阮树会, 等. 花鲈亲鱼人工培育与催产技术研究[J]. 青岛海洋大学学报(自然科学版), 2001, 31(2): 195-200.]
- [22] Shao C W, Chen S L, Xu G B, et al. Eighteen novel microsatellite markers for the Chinese sea perch, *Lateolabrax*

- maculatus*[J]. Conservation Genetics, 2009, 10(3): 623-625.
- [23] An H S, Lee J W, Kim H Y, et al. Genetic differences between wild and hatchery populations of Korean spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) inferred from microsatellite markers[J]. Genes & Genomics, 2013, 35(5): 671-680.
- [24] Tian Y, Wen H S, Qi X, et al. Identification of *mapk* gene family in *Lateolabrax maculatus* and their expression profiles in response to hypoxia and salinity challenges[J]. Gene, 2019, 684: 20-29.
- [25] 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.
- [26] Zhang K Q, Wen H S, Li J F, et al. 14-3-3 gene family in spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*): Genome-wide identification, phylogenetic analysis and expression profiles after salinity stress[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2019, 235: 1-11.
- [27] Fan H Y, Zhou Y Y, Wen H S, et al. Genome-wide identification and characterization of glucose transporter (*glut*) genes in spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) and their regulated hepatic expression during short-term starvation[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 2019, 30: 217-229.
- [28] Boczonadi V, Giunta M, Lane M, et al. Investigating the role of the physiological isoform switch of cytochrome c oxidase subunits in reversible mitochondrial disease[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2015, 63: 32-40.
- [29] Tang X M. Studies on osmoregulatory mechanism and metabolize physiology of flounder[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2004. [唐贤明. 鲆科鱼类渗透调节与代谢的基础研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004.]
- [30] Claiborne J B, Edwards S L, Morrison-Shetlar A I. Acid-base regulation in fishes: Cellular and molecular mechanisms[J]. Journal of Experimental Zoology, 2002, 293(3): 302-319.
- [31] Marshall W S. Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> transport by fish gills: Retrospective review and prospective synthesis[J]. Journal of Experimental Zoology, 2002, 293(3): 264-283.
- [32] Yan Y L, Xie X J. Metabolic compensation based on regulating mechanism in mitochondrion of fish in response to environmental temperature[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2012, 36(3): 532-540. [闫玉莲, 谢小军. 鱼类适应环境温度的代谢补偿及其线粒体水平的调节机制[J]. 水生生物学报, 2012, 36(3): 532-540.]
- [33] Wang J. Effects of environmental factors on the tolerance of *Takifugu obscurus* to salinity and their differences in transcription level[D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2018. [王骏. 暗纹东方鲀耐受盐度能力的环境因子效应及其在转录组学水平上的差异[D]. 南京: 南京师范大学, 2018.]
- [34] Kadenbach B, Hüttemann M, Arnold S, et al. Mitochondrial energy metabolism is regulated via nuclear-coded subunits of cytochrome c oxidase[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2000, 29(3-4): 211-221.
- [35] Quintens R, Singh S, Lemaire K, et al. Mice deficient in the respiratory chain gene Cox6a2 are protected against high-fat diet-induced obesity and insulin resistance[J]. PLoS ONE, 2013, 8(2): e56719.
- [36] Pasquinelli A E. MicroRNAs and their targets: Recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship[J]. Nature Reviews Genetics, 2012, 13(4): 271-282.
- [37] Rajewsky N. microRNA target predictions in animals[J]. Nature Genetics, 2006, 38(S6): S8-S13.
- [38] Cui J X. Identification and regulation of two immune related microRNA target genes in miiuy croaker[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2018. [崔俊霞. 鲈鱼两种免疫相关microRNA的靶基因验证及调控研究[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2018.]

## Characterization and expression analysis of the *cox6a* gene and the relative miRNAs from spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) in response to salinity changes

WANG Lingyu, LI Yun, DONG Ximeng, YU Peng, ZHANG Xiaoyan, QI Xin, TIAN Yuan, WEN Haishen

Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education; Ocean University of China, Qingdao 266003, China

**Abstract:** Cytochrome c oxidase (COX) is the terminal enzyme of the mitochondrial electron transport chain, and COX6A is one of the nuclear-encoded subunits. To gain insights into the potential function of *cox6a* genes in spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) and the related miRNAs, genome-wide identification and sequence analysis of *cox6a* genes, as well as the expression patterns in different tissues and in response to salinity changes were accomplished. In addition, miRNAs which target to *cox6a* genes were predicted and their functional correlation with *cox6a* gene was analyzed. The results showed that two *cox6a* genes, *cox6a1* and *cox6a2*, were identified in the spotted sea bass genome. The phylogenetic relationships confirmed their annotations. Multiple sequence alignment suggested that the C-terminal amino acid sequences of COX6A are relatively conserved. The higher expression level of *cox6a1* mRNA was detected in the hypophysis, brain, liver, and kidney, while *cox6a2* was highly expressed in the heart and kidney. We obtained four candidate microRNAs (miR-30e-5p, miR-223, miR-200a-3p, and miR-155-5p) which target *cox6a2* (no miRNAs target *cox6a1*). Quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) results showed that *cox6a1*, *cox6a2*, miR-30e-5p, miR-223, and miR-200a-3p expressed differentially during the low and high salinity environments, while the expression of miR-155-5p only changed significantly in response to the high salinity treatment, indicating that *cox6a1*, *cox6a2*, and the four miRNAs are involved in osmoregulation in the spotted sea bass. During the acute salinity transfer experiment, the expression of miR-30e-5p, miR-223, and miR-200a-3p was negatively correlated with *cox6a2*, and the correlation between miR-223 and *cox6a2* was the strongest, which suggested that miR-30e-5p, miR-223, and miR-200a-3p may be involved in the regulation of *cox6a2* gene expression. This study also provides a valuable reference for the comprehensive analysis of the molecular mechanisms of osmotic regulation in fish.

**Key words:** *Lateolabrax maculatus*; *cox6a*; mRNA; miRNA; osmoregulation; qRT-PCR

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