

DOI: 10.12264/JFSC2022-0358

瓦氏雅罗鱼 *slc26* 基因家族的鉴定、表达与进化分析

黄晶^{1,2}, 王双毅³, 李雯^{2,4}, 梁利群², 张立民², 董志国¹, 常玉梅²

1. 江苏海洋大学, 江苏省海洋生物资源与环境重点实验室, 江苏 连云港 222005;
2. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 淡水鱼类育种国家地方联合工程实验室, 农业农村部淡水水产生物技术与遗传育种重点实验室, 黑龙江省特殊生境鱼类种质特性与抗逆育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070;
3. 深圳华大基因股份有限公司, 广东 深圳 518083;
4. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 为探究瓦氏雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*) *slc26* 基因家族在 Cl^- 、 HCO_3^- 等阴离子转运过程中的作用机制, 基于瓦氏雅罗鱼基因组及转录组数据, 结合生物信息学方法对 *slc26* 家族进行了基因鉴定、表达及进化分析。利用同源比对的方法, 从瓦氏雅罗鱼基因组中共鉴定到 10 个 *slc26* 基因家族成员, 分布在瓦氏雅罗鱼的 6 条染色体上, 分别命名为 *slc26a1*、*slc26a2*、*slc26a3.1*、*slc26a3.2*、*slc26a4*、*slc26a5*、*slc26a6*、*slc26a6l*、*slc26a10* 和 *slc26a6l1*。系统发育和模体分析显示, *slc26a3.1*、*slc26a3.2* 和 *slc26a4* 同源性较高, *slc26a5*、*slc26a6* 和 *slc26a6l* 同源性较高, *slc26a1*、*slc26a2* 和 *slc26a10* 同源性较高, 而 *slc26a11* 与其他 9 个基因的同源性相对较低, 单独聚类; RNA-seq 和实时荧光定量分析显示, 50 mmol/L NaHCO_3 碱度胁迫下瓦氏雅罗鱼 *slc26* 家族不同成员呈现出一定的组织表达特异性, 即 *slc26a3.1*、*slc26a3.2* 和 *slc26a4* 在肠组织高表达, *slc26a5*、*slc26a6* 和 *slc26a6l* 在鳃和脑组织高表达, *slc26a1*、*slc26a10* 和 *slc26a11* 在肾组织高表达, *slc26a2* 在肝脏高表达, 亲缘关系与表达结果基本一致。基于基因组重测序数据, 统计了 *slc26* 基因在瓦氏雅罗鱼碱水种群(23 尾)和淡水种群(15 尾)的 SNPs 位点, 以 F_{st} top 10% 为基准, 筛选出 12 个共享的潜在候选 SNPs, 通过进一步基因型性状关联分析鉴定出 5 个 SNPs 位点在碱水种群和淡水种群存在显著的遗传分化($P < 0.05$)。本研究结果将为瓦氏雅罗鱼酸碱调控机制的深入解析提供理论依据。

关键词: 瓦氏雅罗鱼; 盐碱水; *slc26* 基因家族; HCO_3^- 转运; 适应性进化

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)03-0309-15

据统计, 全球目前约有盐碱地 970 Mhm², 主要分布在俄罗斯、澳大利亚和南美洲等地, 至少覆盖 100 个国家和地区^[1]。我国盐碱地面积约为 99130 km², 其中低洼盐碱水域 45870 km², 约占全国湖泊总面积的 55%, 大部分盐碱水域由于高碱度、高 pH、离子组成复杂而处于荒置状态, 利用率极低^[2-3]。研究发现, HCO_3^- 和 CO_3^{2-} 是影响水体碱度的主要离子, 直接或间接作用于鱼类的组织器官, 造成器质性损伤和结构变化^[4-5], 进而引发鱼类出现呼吸和代谢碱中毒, 严重影响鱼类的生长、繁殖和存活^[6-7]。

瓦氏雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*)隶属于鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae)、雅罗鱼亚科(Leuciscinae)、雅罗鱼属(*Leuciscus*), 是我国北方知名的土著鱼类, 主要分布于黑龙江流域、辽河、内蒙古内陆淡水及盐碱湖泊^[8-9]。其中来自内蒙古达里湖的瓦氏雅罗鱼, 能够在达里湖碳酸盐碱度 53.57 mmol/L, pH 9.6 的极端恶劣环境中存活, 是达里湖渔业经济来源的重要物种之一^[8]。解析达里湖瓦氏雅罗鱼的盐碱适应性机制, 对培育耐盐碱新品种及提高盐碱水域的利用率具有重要的理论和实践意义。

收稿日期: 2022-10-27; 修订日期: 2022-11-29.

基金项目: 国家自然科学基金项目(32273120); 国家重点研发计划项目(2020YFD0900402).

作者简介: 黄晶(1996-), 女, 汉族, 硕士研究生, 研究方向为鱼类抗逆生理机制研究. E-mail: 2329255596@qq.com

通信作者: 常玉梅, 研究员, 研究方向为鱼类抗逆机制及抗逆品种培育研究. E-mail: changyumei@hrfri.ac.cn

近年来,我国学者基于高通量测序技术,从转录组^[10-12]、基因组^[13]和表观组^[14]等尺度揭示了达里湖瓦氏雅罗鱼的盐碱适应性进化机制,提出拥有高效的离子和渗透压调节、氨氮代谢及酸碱调节机制,是其能够在极端盐碱环境生存的关键。课题组前期深度挖掘这些遗传数据发现,调控 Cl^- 和 HCO_3^- 等阴离子转运的蛋白家族主要为溶质载体(solute carrier) SLC4 和 SLC26 家族,它们在达里湖瓦氏雅罗鱼的鳃、肾、肠等渗透压调节器官显著高表达^[12]。目前国外学者已在斑马鱼(*Danio rerio*)^[15]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[16]、青鳉(*Oryzias latipes*)^[17]等相关研究中证实,这些蛋白家族参与 HCO_3^- 的转运,在维持体内酸碱平衡方面发挥重要作用。我国学者在尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[18]、青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)^[19]等研究中同样发现它们参与 HCO_3^- 的跨膜转运。课题组近期通过比较生理学的方法,发现在实验室内 NaHCO_3 碱度胁迫下,达里湖瓦氏雅罗鱼能够快速启动 *slc4a4*、*slc26a5* 和 *slc26a6* 基因的高表达,并推测 SLC26A5 和 SLC26A6 可能位于鳃离子细胞顶端,是体内 HCO_3^- 外排的关键蛋白^[20]。

因此,为了全面了解 *slc26* 家族在瓦氏雅罗鱼基因组中的分布、进化和功能,本研究基于瓦氏雅罗鱼完善的基因组和转录组数据,拟通过筛选鉴定完整的 *slc26* 家族,并对其在基因组上的分布、不同组织的表达情况及在不同群体的分化进行深入研究,探讨该家族可能的生物学功能,为瓦氏雅罗鱼酸碱调控机制的解析提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 *slc26* 家族基因序列的调取和鉴定

为了避免各物种 *slc26* 基因序列的不完全,从 Ensembl (<http://asia.ensembl.org/index.html>) 和 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 两个数据库下载包括人(*Homo sapiens*)、鼠(*Mus musculus*)、鲤(*Cyprinus carpio*)、鲫(*Carassius auratus*)、斑马鱼、三刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)、虹鳟、尼罗罗非鱼、大鳞鲃(*Luciobarbus capito*)、欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)及大西洋鲱(*Clupea harengus*)等共计 10

个物种的 *slc26* 基因序列,鱼类 *slc26* 序列编号见附表 1。

基于本课题组已有的瓦氏雅罗鱼基因组和转录组数据(待发表),首先采用 *slc26* 基因家族疏转运蛋白典型的 sulfate-transp 结构域(PF00916)检索瓦氏雅罗鱼基因组 *slc26* 基因序列,并根据斑马鱼和人类的命名法命名(<https://www.genenames.org/>);然后,为了避免查询遗漏,使用斑马鱼的 *slc26* 基因,通过 TBLASTN 和 BLASTP^[21]对瓦氏雅罗鱼基因组进行查询, e 值截断为 $1e^{-5}$, 获取 *slc26* 候选基因。最后,整合其他物种的 *slc26* 基因,再次在瓦氏雅罗鱼基因组中鉴定可能的 *slc26* 基因序列。

1.2 *slc26* 基因家族在染色体上的分布和定位

根据瓦氏雅罗鱼基因组注释信息文件确定 *slc26* 的染色体位置和结构信息,使用 TBtools^[22] 软件进行染色体定位作图。

1.3 系统发育树构建

将瓦氏雅罗鱼 *slc26* 基因与鲤、鲫、斑马鱼、三刺鱼、虹鳟、尼罗罗非鱼、大鳞鲃、欧洲鳗鲡及大西洋鲱的同源基因进行整合,利用 MEGA7.0^[23]进行多物种序列同源比对,使用最大似然法(maximum likelihood, ML)构建系统发育树。使用(Kimura 2-parameter + gamma distributed)模型,迭代次数 bootstrap=1000,其余选择默认参数。

1.4 模体分析

slc26 基因家族成员之间既同源也存在差异,为了进一步确认 *slc26* 基因家族的保守结构域组成,开展了 *slc26* 基因保守基序分析。将鉴定的瓦氏雅罗鱼 *slc26* 基因序列及其在基因组上的位置信息进行整理,通过在线软件 MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>)^[24] 识别保守结构域,参数如下:重复次数不限,不适应最多 10 次。使用 TBtools 软件重新共建保守的模体信息并使其可视化。

1.5 不同组织差异表达分析

实验鱼为达里湖瓦氏雅罗鱼(简称碱水种)人工繁育 F39 尾,平均体重为 (48.72 ± 6.8) g,平均体长为 (14.61 ± 1.33) cm, 50 mmol/L NaHCO_3 胁迫 7 d。胁迫实验结束后,分别采取每条实验鱼的鳃、

肾、肠、肝、脑、脾、肌肉 7 个组织, 每 3 条鱼相同组织混合放入液氮快速冷冻后转移至-80 ℃冰箱保存备用。使用 TRIzol (Thermo Fisher, America)法提取高质量的 RNA, 并反转录为 cDNA 用于后续实时荧光定量(RT-PCR)分析。

根据已调取的 *slc26* 基因家族 mRNA 序列设计并合成引物(表 1)。以 18S 为内参基因, 检测瓦氏雅罗鱼 *slc26* 基因在不同组织的表达水平。采用两种方法进行检测, 一种为实时荧光定量 PCR 法, 根据 SYBR Premix Ex TaqTM II (TaKaRa, 日本)试剂盒说明书制样, 利用 ABI 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems7500, America)进行实时荧光定量 PCR 检测, PCR 反应程序为: 95 ℃ 30 s; 40 个循环包括 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 30 s; 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 95 ℃ 15 s, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法处理

表 1 瓦氏雅罗鱼 *slc26* 基因家族引物信息
Tab. 1 Primer information of *slc26* gene family in *Leuciscus waleckii*

基因 gene	引物序列(5'-3') sequence of primers (5'-3')	退火温度 /℃ annealing temperature	片段长 度/bp size of segment
<i>slc26a1</i>	F: ATGGCGTGAGAGCAAGATT	60	121
	R: GACCACCACACAGATCATAGAG	60	
<i>slc26a2</i>	F: GTTCTGCGCCGTCATCATAGTT	65	111
	R: GGTAACCAGCCAGATGATAGTG	60	
<i>slc26a3.1</i>	F: GGATTCTACTGTAGCCGTTGC	57	173
	R: GGGCAACGGCTCAAGTAGAA	57	
<i>slc26a3.2</i>	F: GAAGACGGCTTTGAAGACGAAC	58	121
	R: GTTGCTTGCCCCAAATGCT	55	
<i>slc26a4</i>	F: GTCAGCAACATTTTCGAGGA	56	189
	R: TGCAGAGGCTGAAGAAAGGG	57	
<i>slc26a5</i>	F: CAGAAGAGTGAAGTGGTTGT	60	108
	R: AGCGGTTCACTCAGGTAAATAG	60	
<i>slc26a6l</i>	F: TGCCTCCATTGGTTTTGCTC	55	142
	R: GAGCAAAACCAATGGAGGCA	55	
<i>slc26a6</i>	F: CCCCAAACCAACACAGACTG	57	149
	R: GCTGCGTTGACTCTGGATT	55	
<i>slc26a10</i>	F: AGAGAATTGGAGTGGCATCAG	60	103
	R: GGTTCGTAGAGGTATGTGAAAG	60	
<i>slc26a11</i>	F: CTGGTCTAAAGCCGTCAGTATTA	62	111
	R: AGTGAATGATACCGTCAGAAG	60	
18S	F: GGAGGTTTCGAAGACGATCAG	60	183
	R: GTGAGGTTTCCCGTTTGAG	60	

数据; 另外一种为基于已有的 7 种组织的 RNA-seq 数据, 利用 HISAT2 软件^[25]将过滤后的 reads 比对至瓦氏雅罗鱼参考基因组, 用 StringTie 软件^[26]进行转录本拼接并进行基因表达量 fpkm (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads) 计算, 最后通过 fpkm 值与荧光定量数据绘制双坐标轴的柱状图和折线图。

1.6 适应性进化分析

1.6.1 *slc26* 基因 SNPs 位点统计与 F_{st} 值计算 根据 Xu 等^[13]和 Wang 等^[27]发表的数据, 整合两位作者进行盐碱适应性进化分析所用的碱水种群(23 尾)和淡水种群(15 尾)共计 38 尾样本的所有 SNPs 数据。首先分析了 *slc26* 基因在 38 尾碱水和淡水个体基因组上的 SNPs 位点, 并统计其在外显子区域、内含子区域、3'UTR 和 5'UTR 的位点个数及所占百分比。然后计算每个基因 F_{st} 值, 选取 F_{st} top 10%与全基因组背景下的 F_{st} 值比较, 并进行显著性 t 检验, 通过散点图的形式展现 *slc26* 家族各成员的 F_{st} 值分布。

1.6.2 *slc26* 基因 SNPs 位点基因型分析 使用 Vcftools (http://vcftools.sourceforge.net/man_latest.html)软件分离并过滤 SNPs 位点得到 vcf 格式文件^[28]。通过 plink 参数^[29]将 vcf 文件转换为 ped/map 格式文件; 其中 ped 文件是 SNP 位点的基因型, map 文件是 SNP 位点的位置信息。采用 SPSS 19.0 的卡方检验进行 SNP 基因型与性状关联分析, 差异显著度为 0.05。

2 结果与分析

2.1 *slc26* 基因家族成员的鉴定

对瓦氏雅罗鱼 *slc26* 基因家族成员与其他物种的 *slc26* 基因进行同源比对, 结果在瓦氏雅罗鱼基因组中共鉴定到 10 个 *slc26* 基因家族成员(表 2)。从表 2 可以看出, 只有鼠中有完整的 11 个 *slc26* 基因成员, 除虹鳟和尼罗罗非鱼外, 大部分鱼类(包括瓦氏雅罗鱼)没有 *slc26a7*、*slc26a8* 和 *slc26a9* 基因。进一步比对发现, 瓦氏雅罗鱼 *slc26* 基因家族中的 *slc26a3* 和 *slc26a6* 各存在两种异构体, 分别命名为 *slc26a3.1*、*slc26a3.2*、*slc26a6* 和 *slc26a6l*。对 10 个 *slc26* 基因在瓦氏雅罗鱼基因组

上的位置信息进行统计, 结果显示, 这 10 个 *slc26* 列长度为 193~1506 个氨基酸, 外显子数目在 4~基因的基因大小在 5029~15491 bp 之间, 编码序 21 个之间(表 3)。

表 2 *slc26* 基因在各物种中的统计

Tab. 2 Statistics of *slc26* genes in different species

基因 gene	人 <i>Homo sapiens</i>	鼠 <i>Mus musculus</i>	广盐性鱼类 euryhaline fish				淡水鲤科鱼类 freshwater cyprinids			海水洄游性鱼类 catadromous fish		瓦氏雅罗鱼 <i>Leuciscus waleckii</i>
			三刺鱼 <i>Gasterosteus aculeatus</i>	虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	大鳞鲂 <i>Luciobarbus capito</i>	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	鲫 <i>Carassius auratus</i>	欧洲鳗鲡 <i>Anguilla anguilla</i>	大西洋鲱 <i>Clupea harengus</i>	
<i>slc26a1</i>	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1
<i>slc26a2</i>	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1
<i>slc26a3</i>	1	1	0	1	1	2	2	3	1	0	0	2
<i>slc26a4</i>	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1
<i>slc26a5</i>	1	1	1	0	1	1	1	2	0	1	1	1
<i>slc26a6</i>	1	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2
<i>slc26a7</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>slc26a8</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>slc26a9</i>	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>slc26a10</i>	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
<i>slc26a11</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
total	10	11	6	9	9	10	10	13	6	6	8	10

注: 表中数字表示基因在对应物种中的个数。
Note: Figures in the table indicate the unnumber of genes in the certain specie.

表 3 瓦氏雅罗鱼 *slc26* 基因家族基本信息

Tab. 3 Basic information of *slc26* genes family in *Leuciscus waleckii*

基因 gene	基因组长度/bp genomic length	编码 氨基酸/aa cds	编码序列 状态 cds status	外显子数目 number of exons
<i>slc26a1</i>	5568	1506	Complete	4
<i>slc26a2</i>	11268	775	Complete	4
<i>slc26a3.1</i>	5029	225	Complete	19
<i>slc26a3.2</i>	11826	228	Complete	21
<i>slc26a4</i>	6677	252	Complete	18
<i>slc26a5</i>	13859	210	Complete	20
<i>slc26a6l</i>	7605	405	Complete	19
<i>slc26a6</i>	15491	422	Complete	18
<i>slc26a10</i>	10476	265	Complete	19
<i>slc26a11</i>	12053	193	Complete	16

2.2 *slc26* 基因家族的染色体定位

基于课题组最新完成的瓦氏雅罗鱼 3 代基因组数据, 提取得到 10 个 *slc26* 基因在基因组上的位置信息, 并进行了染色体定位分析。结果显示, 10 个 *slc26* 基因不均匀地分布在瓦氏雅罗鱼的 6 条染色体上。其中, *slc26a3.1*、*slc26a3.2*、*slc26a4* 和 *slc26a5* 分布在 chr6; *slc26a6* 和 *slc26a10* 分布

在 chr19; 其余 4 个基因分别分布在 chr5 (*slc26a11*)、chr12 (*slc26a6l*)、chr13 (*slc26a2*)和 chr14 (*slc26a1*) (图 1)。

2.3 *slc26* 基因家族的系统发育和模体分析

利用最大似然法对广盐性鱼类、淡水鲤科鱼类、海水洄游性鱼类 *slc26* 家族每个成员构建了系统发育树(图 2)。根据聚类结果可以看出, *slc26* 家族可以划分成 3 大分支: 第一大分支包含两个小分支, 其中 *slc26a5* 和 *slc26a6*、*slc26a6l* 同源性较高, 聚为一支, *slc26a3.1*、*slc26a3.2* 和 *slc26a4* 同源性较高, 聚为另一支; 第二大分支同样包含两个小分支, *slc26a1* 和 *slc26a2* 同源性较高, 聚在一起, *slc26a10* 单独一支; 不同种类的 *slc26a11* 归类到第三大分支。

结合 *slc26* 基因家族在瓦氏雅罗鱼基因组上的位置信息、内含子和外显子数目, 使用 MEME 在线软件对其进行了模体分析(图 3)。由图 3 可知, 瓦氏雅罗鱼 10 个 *slc26* 基因成员的亲缘关系与系统发育进化树的结果基本一致, 且共享 6 个模体, 分别为 Motif 1、Motif 2、Motif 3、Motif 4、Motif 8 和 Motif 16。

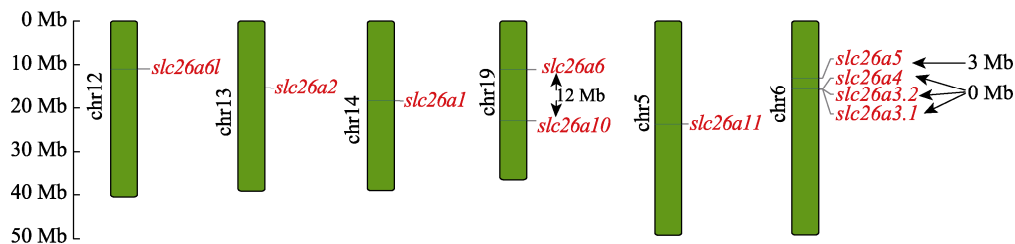


图 1 瓦氏雅罗鱼 10 个 *slc26* 基因在 6 个染色体中的位置分布
Fig. 1 Distribution of 10 *slc26* genes in six chromosomes of *Leuciscus waleckii*

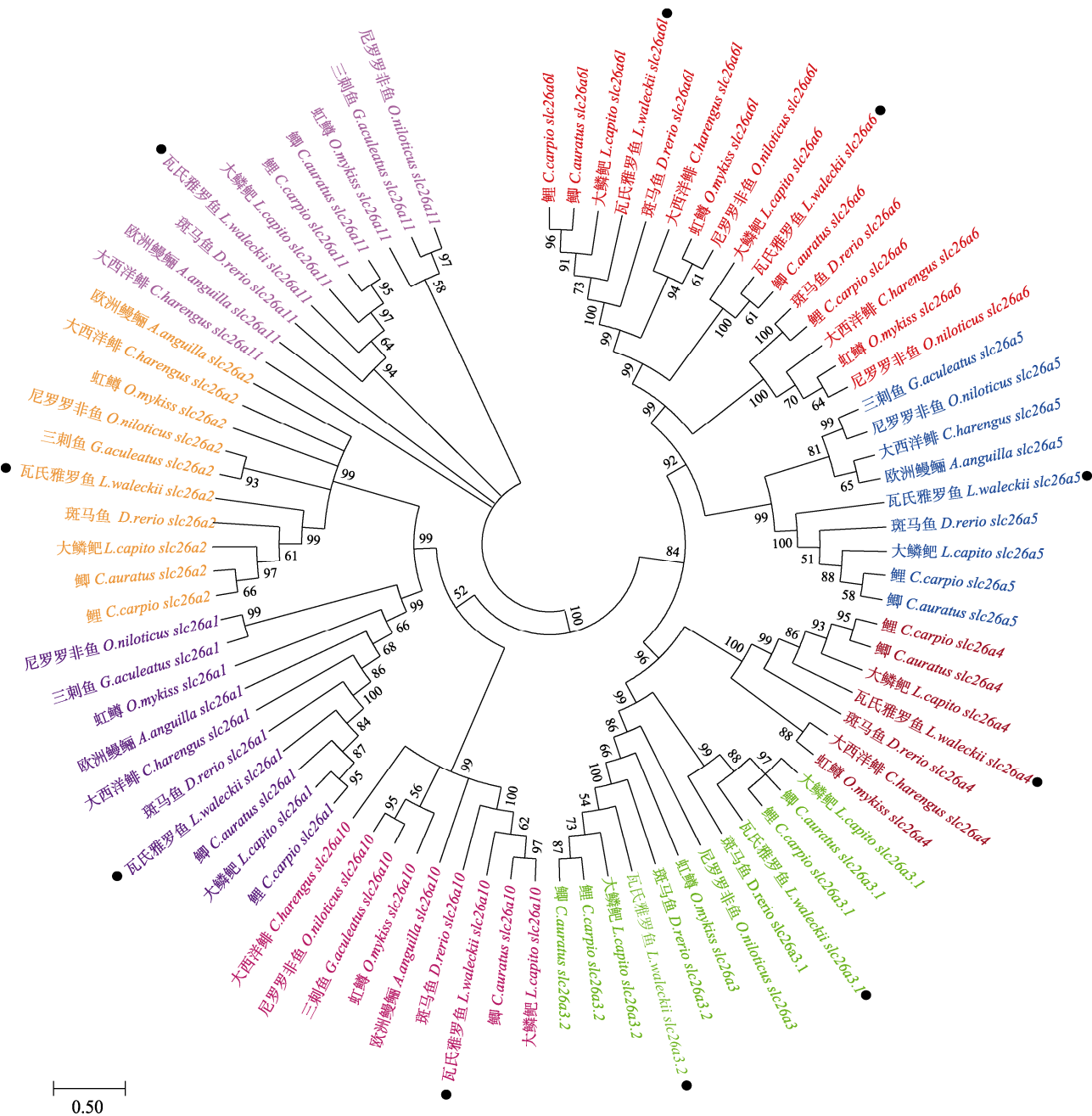


图 2 不同鱼类 *slc26* 基因的系统进化树
10 个瓦氏雅罗鱼 *slc26* 基因用黑点表示。
Fig. 2 Phylogenetic tree of *slc26* genes in different fish species
Ten *slc26* genes of *Leuciscus waleckii* were marked with black dots.

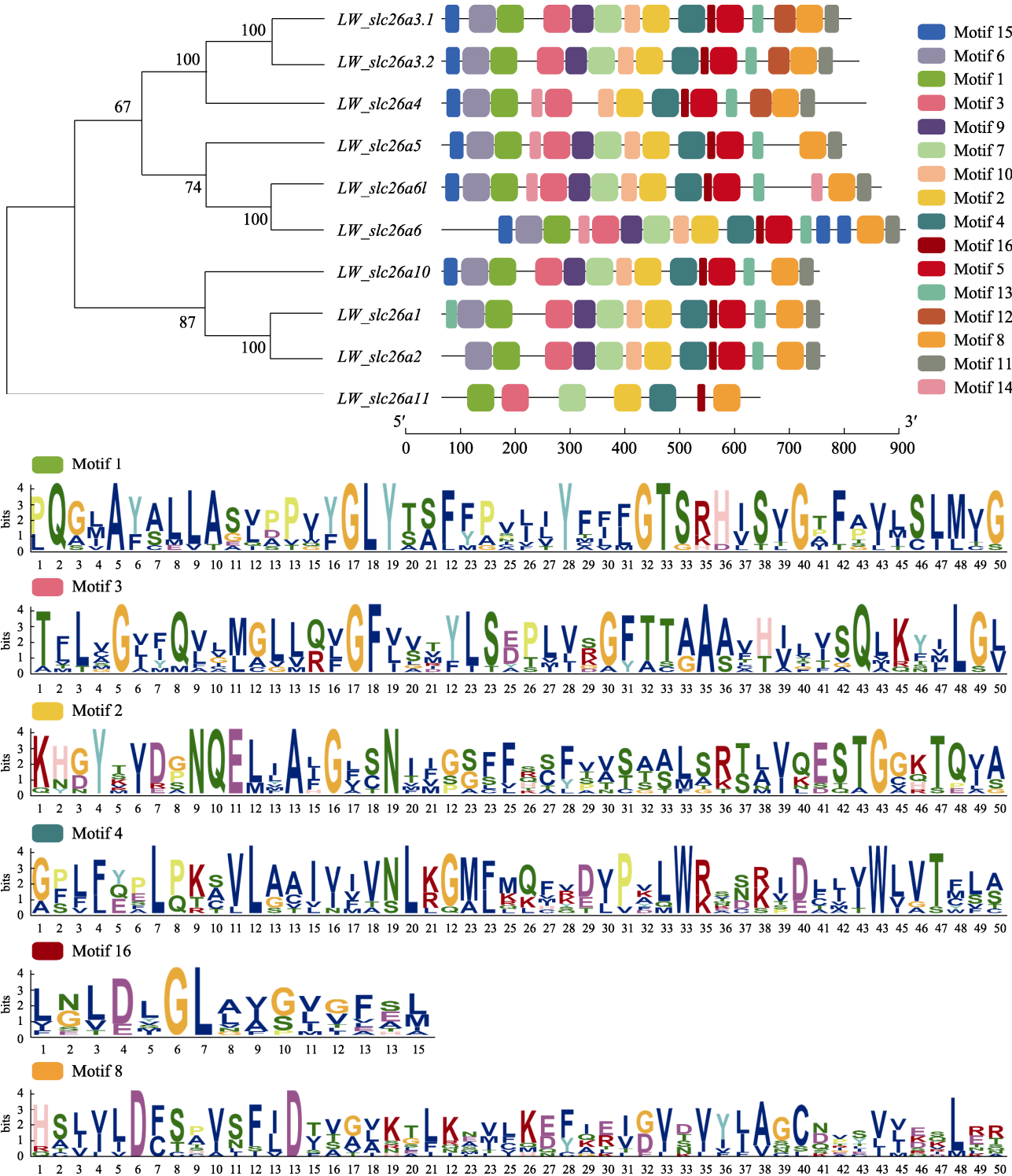


图 3 瓦氏雅罗鱼 *slc26* 基因家族的模体分析结果

Motif 1–Motif 6 为 *slc26* 基因家族共有模体。

Fig. 3 Motif analysis of *slc26* genes in *Leuciscus waleckii*
Motif 1–Motif 6 are the common motifs of *slc26* genes.

2.4 瓦氏雅罗鱼 *slc26* 基因在不同组织的表达谱分析

通过整合 RNA-seq 和实时荧光定量的结果可

以看出, *slc26* 家族各成员在瓦氏雅罗鱼不同组织的表达趋势基本相符。*slc26* 家族各成员在鳃组织均有表达; *slc26a3.1*、*slc26a3.2* 和 *slc26a4* 在两种

检测方法中得到的结果的拟合度最高, 在肠组织中表达量最高, 在肌肉中表达量最低(图 4); *slc26a5*、*slc26a6l* 和 *slc26a6* 在两种检测方法中的表达结果稍有不同, RNA-seq 显示 *slc26a5* 和 *slc26a6* 在鳃组织中表达量最高, 但实时荧光定量

则显示 3 种基因均在脑组织中高表达(图 5); *slc26a1*、*slc26a2*、*slc26a10* 和 *slc26a11* 在两种检测方法中得到的结果基本相似, 其中 *slc26a1*、*slc26a10* 和 *slc26a11* 在肾组织表达量最高, *slc26a2* 在肝脏中表达量最高, 其次为鳃(图 6)。

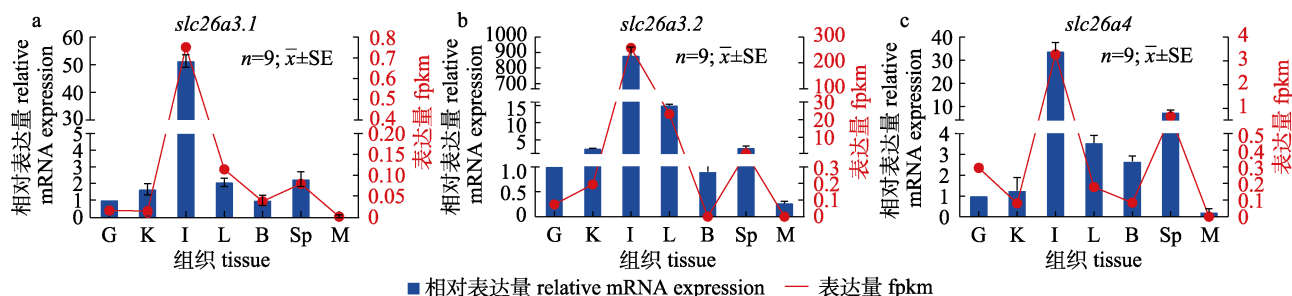


图 4 *slc26a3.1* (a)、*slc26a3.2* (b)、*slc26a4* (c)在瓦氏雅罗鱼不同组织的表达量

G: 鳃; K: 肾; I: 肠; L: 肝; B: 脑; Sp: 脾; M: 肌肉。

Fig. 4 Expression levels of *slc26a3.1* (a), *slc26a3.2* (b) and *slc26a4* (c) in different tissues of *Leuciscus waleckii*

G: gill; K: kidney; I: intestine; L: liver; B: brain; Sp: spleen; M: muscle.

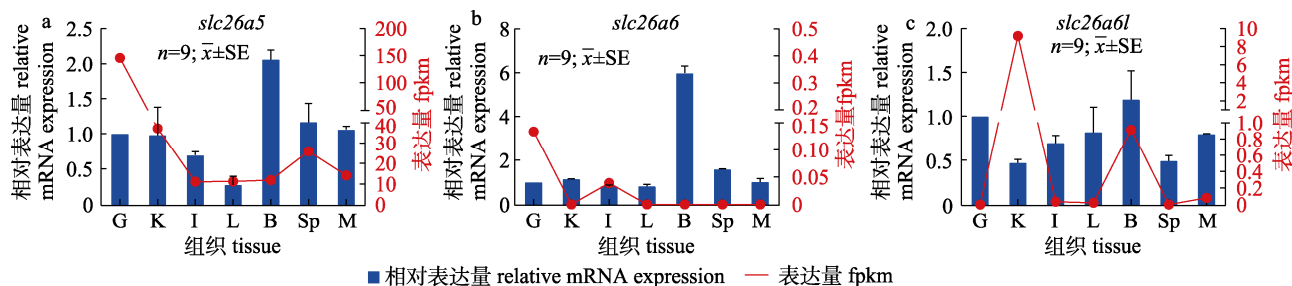


图 5 *slc26a5* (a)、*slc26a6* (b)、*slc26a6l* (c)在瓦氏雅罗鱼不同组织的表达量

G: 鳃; K: 肾; I: 肠; L: 肝; B: 脑; Sp: 脾; M: 肌肉。

Fig. 5 Expression levels of *slc26a5* (a), *slc26a6* (b) and *slc26a6l* (c) in different tissues of *Leuciscus waleckii*

G: gill; K: kidney; I: intestine; L: liver; B: brain; Sp: spleen; M: muscle.

2.5 *slc26* 基因在不同种群的 SNPs 位点的鉴定与分化

本研究统计了瓦氏雅罗鱼碱水种群(23 个)和淡水种群(15 个)共 38 个个体的 *slc26* 基因在基因组上的 SNPs 位点, 并将其比对到参考基因组上。在 38 个个体的 *slc26* 基因外显子区域共找到 313 个 SNPs 位点, 占 12%; 内含子区域共找到 2190 个 SNPs 位点, 占 82%; 3'UTR 区域共找到 137 个 SNPs 位点, 占 5%, 5'UTR 区域共找到 42 个 SNPs 位点, 占 1% (图 7)。

统计了 38 个个体 *slc26* 基因的 SNPs 位点的 F_{st} 值(图 8)。结果发现 *slc26* 家族所有基因成员均有一些 SNPs 位点超过 F_{st} top 10% 阈值($F_{st} > 0.686047$), 在碱水和淡水种群呈现出不同程度的

遗传分化。

2.6 *slc26* 基因 SNPs 位点在不同种群的基因型频率

将碱水和淡水种群共 38 个个体的 SNPs 位点进行基因型检测, 共筛选到 12 个共享且存在潜在遗传分化的 SNPs 位点, 其中 *slc26a5* 基因 1 个(SNP_{chr6-13028814}), *slc26a6l* 基因 8 个(SNP_{chr12-10938592}、SNP_{chr12-10938758}、SNP_{chr12-10938788}、SNP_{chr12-10939255}、SNP_{chr12-10939394}、SNP_{chr12-10939886}、SNP_{chr12-10941063}和 SNP_{chr12-10941274}), *slc26a10* 基因 3 个(SNP_{chr19-22935057}、SNP_{chr19-22937713}和 SNP_{chr19-22939939})(表 4)。

基因型与性状关联分析显示, *slc26a6l* 的 4 个 SNPs 位点(SNP_{chr12-10938592}、SNP_{chr12-10938758}、SNP_{chr12-10938788}和 SNP_{chr12-10939394})和 *slc26a10* 的 1

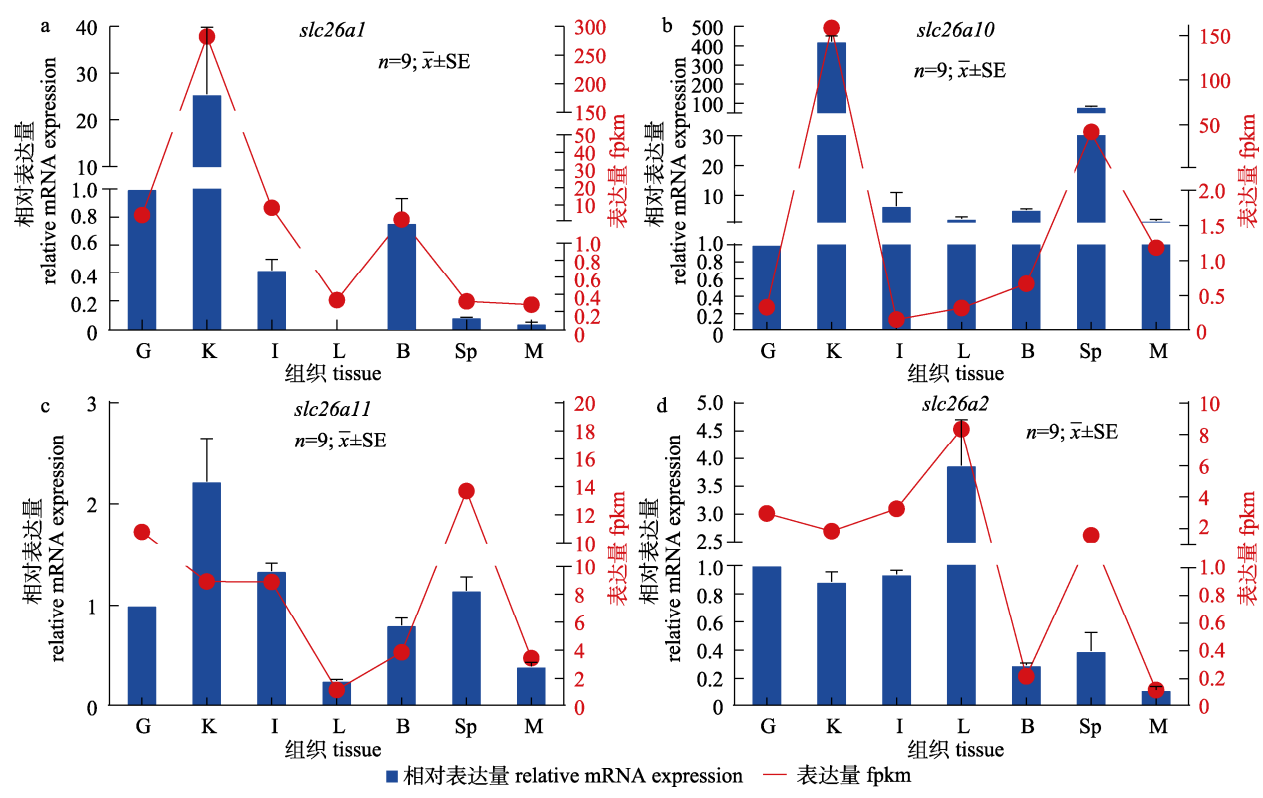


图 6 *slc26a1* (a)、*slc26a10* (b)、*slc26a11* (c)、*slc26a2* (d)在瓦氏雅罗鱼不同组织的表达量
G: 鳃; K: 肾; I: 肠; L: 肝; B: 脑; Sp: 脾; M: 肌肉。
Fig. 6 Expression levels of *slc26a1* (a), *slc26a10* (b), *slc26a11* (c) and *slc26a2* (d) in different tissues of *Leuciscus waleckii*
G: gill; K: kidney; I: intestine; L: liver; B: brain; Sp: spleen; M: muscle.

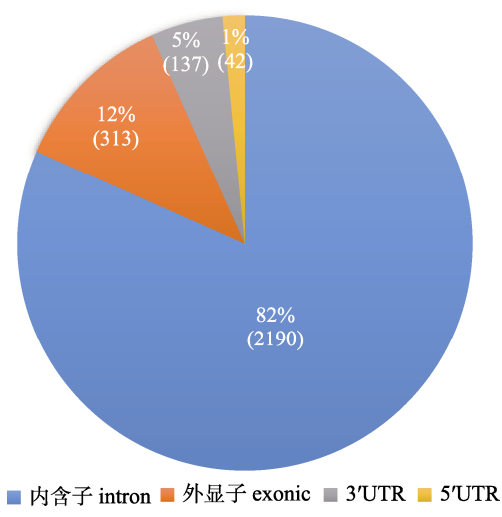


图 7 38 个瓦氏雅罗个体的 *slc26* 基因的 SNPs 占比
Fig. 7 Proportion of SNPs of *slc26* genes in 38 *leudscus waleckii* individuals

个 SNPs 位点(SNP_{chr19-22935057})在碱水和淡水种群存在显著分化($P<0.05$)(表 4)。*slc26a1* 基因的 4 个 SNPs 位点在碱水种群的优势基因型分别为 TT、TG、CT、CA 和 GA, 基因型频率为 43.5%~ 63.7%;

slc26a10 基因的 SNP_{chr19-22935057} 存在 3 种基因型, 分别为 TT、TG 和 GG, 其中 TT 基因型是碱水种群的优势基因型, 基因型频率为 43.5% (表 4)。

3 讨论

目前 *slc26* 基因家族已在人类、小鼠、畜禽、鱼类等物种中进行了鉴定和功能研究。在人和鼠中, 共鉴定了 10~11 个 *slc26* 基因, 分别命名为 *slc26a1*~*slc26a11*, 其中 *slc26a3* 和 *slc26a6* 在人和鼠中不存在异构体, 只在鱼类中存在异构体, 其属于硬骨鱼类特有的基因^[30-31]。另外, 除虹鳟、尼罗罗非鱼等少数广盐性鱼类外, 绝大部分淡水和海水鱼类不具有 *slc26a7*、*slc26a8* 和 *slc26a9* 这 3 个基因(表 2)。本研究在瓦氏雅罗鱼基因组中共鉴定出 10 个 *slc26* 基因家族成员, 具备上述两个特征, 即 *slc26a3* 和 *slc26a6* 存在异构体, 无 *slc26a7*、*slc26a8* 和 *slc26a9* 基因, 表明本研究鉴定的瓦氏雅罗鱼 *slc26* 基因家族是完整的, 为后续功能和进化分析奠定了基础。

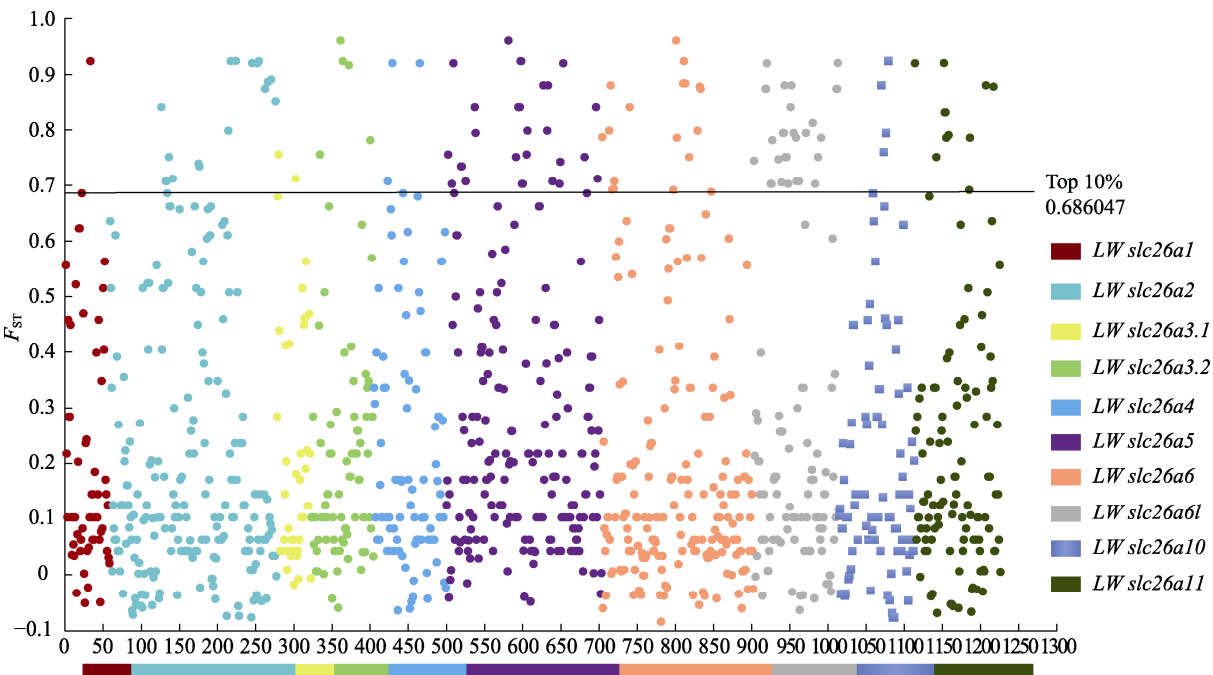


图 8 瓦氏雅罗鱼 38 个个体的 *slc26* 基因所有 SNPs 位点的 F_{st} 值
不同颜色的圆点代表不同的 *slc26* 基因。

Fig. 8 F_{st} values of all SNPs loci of *slc26* genes in 38 individuals of *Leuciscus waleckii*
Different color dots represent different *slc26* genes.

表 4 *slc26* 基因在瓦氏雅罗鱼碱水和淡水种群存在潜在遗传分化的 SNPs 及其基因型

Tab. 4 Potentially differentiated SNPs and their genotypes of <i>slc26</i> genes in alkali-adapted and freshwater <i>Leuciscus waleckii</i> populations											
基因 gene	位点 locus	基因型 genotype	基因型频率(个体数) genotype frequency (no.)		<i>P</i>	基因 gene	位点 locus	基因型 genotype	基因型频率(个体数) genotype frequency (no.)		<i>P</i>
			碱水种群(23) alkaline population	淡水种群(15) freshwater population					碱水种群(23) alkaline population	淡水种群(15) freshwater population	
<i>slc26a5</i>	SNP _{chr6-13028814} (intron)	AA	0.0% (0)	13.3% (2)	0.212	<i>slc26a6l</i>	SNP _{chr12-10939886} (intron)	TT	13.6% (3)	0.0% (0)	0.299
		AC	26.1% (6)	20.0% (3)				TC	22.7% (5)	20.0% (3)	
		CC	73.9% (17)	66.7% (10)				CC	63.7% (14)	80.0% (12)	
<i>slc26a6l</i>	SNP _{chr6-10938592} (intron)	TT	43.5% (10)	13.3% (2)	0.003*		SNP _{chr12-10941063} (intron)	GG	22.7% (5)	6.6% (1)	0.055
		TG	43.5% (10)	20.0% (3)				GC	50.0% (11)	26.7% (4)	
		GG	13.0% (3)	66.7% (10)				CC	27.3% (6)	66.7% (10)	
	SNP _{chr6-10938758} (intron)	TT	13.0% (3)	66.7% (10)	0.003*		SNP _{chr12-10941274} (exon)	AA	73.9% (17)	60.0% (9)	0.376
		CT	52.2% (12)	20.0% (3)				GA	21.8% (5)	40.0% (6)	
		CC	34.8% (8)	13.3% (2)				GG	4.3% (1)	0.0% (0)	
	SNP _{chr12-10938788} (intron)	CC	34.8% (8)	13.3% (2)	0.003*	<i>slc26a10</i>	SNP _{chr12-22935057} (intron)	TT	43.5% (10)	0.0% (0)	0.011*
		CA	52.2% (12)	20.0% (3)				TG	21.7% (5)	33.3% (5)	
		AA	13.0% (3)	66.7% (10)				GG	34.8% (8)	66.7% (10)	
	SNP _{chr12-10939255} (intron)	TT	27.3% (6)	66.7% (10)	0.059		SNP _{chr19-22937713} (intron)	TT	91.4% (21)	93.3% (14)	0.688
		GT	40.9% (9)	20.0% (3)				AT	4.3% (1)	0.0% (0)	
		GG	31.8% (7)	13.3% (2)				AA	4.3% (1)	6.7% (1)	
	SNP _{chr12-10939394} (intron)	GG	13.6% (3)	13.3% (2)	0.005*		SNP _{chr19-22939939} (intron)	AA	43.5% (10)	40.0% (6)	0.889
		GA	63.7% (14)	13.3% (2)				TA	30.4% (7)	26.7% (4)	
		AA	22.7% (5)	73.4% (11)				TT	26.1% (6)	33.3% (5)	

*表示基因型频率在碱淡水种群间差异显著。
* represents significant difference between the genotype frequency of the alkaline and the fresh water population.

3.1 *slc26* 基因家族的功能分析

前期研究发现, 达里湖瓦氏雅罗鱼在遭受碱刺激时, 多个组织参与了机体渗透压和酸碱平衡的调节过程, 而且与氨氮、 Na^+ 、 HCO_3^- 等离子转运相关蛋白的表达和分布也呈现出一定的组织特异性^[10-12]。如 Rh 蛋白被认为主要在瓦氏雅罗鱼鳃组织行使转氨功能^[12,32]。“鸟氨酸-尿素循环”(ornithine-urea cycle, OUC)通路中的精氨基琥珀酸合酶(argininosuccinate synthase, ASS)和精氨酸酶 1 (arginase 1, ARG1)主要在肝脏显著高表达, 将体内的余氨转化为毒性较弱的尿素^[11,13]; 碳酸酐酶(CA)在各组织均有分布和表达, 有利于维持体内离子平衡和内环境稳定^[33]。本研究发现, 无论从纵向的系统进化关系还是横向的模式分析结果来看, 瓦氏雅罗鱼的 10 个 *slc26* 家族成员既有同源性亦有分化, 而且表达也呈现出明显的组织特异性, 这可能与其盐碱适应过程中的功能分化有关。

肠道是海水鱼类渗透压调节的重要器官, 鱼类通过饮水补偿水分的被动损失, 并将盐主动分泌出去^[34]。青海湖裸鲤已被证实饮水, 其肠道参与调节渗透压^[19,35], 另外, 在小鼠的最新研究发现, SLC26A3 (DRA)作为肠上皮腔膜中的关键 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交换蛋白, 与 Na^+/H^+ 交换蛋白共同参与 NaCl 的电中性吸收, 在维持肠上皮屏障功能中发挥重要作用^[36]。本研究发现, *slc26a3.1*、*slc26a3.2* 和 *slc26a4* 同时定位在了瓦氏雅罗鱼的 Chr6, 而且在基因组上近乎重合(遗传距离 0 Mb), 表明这 3 个基因发生基因重组的概率较小, 同步遗传的概率极大; 此外, 基因表达分析显示它们均在肠组织高表达(图 4), 这与青海湖裸鲤被证实肠道参与渗透压调节这一观点一致。根据 *slc26a3.1*、*slc26a3.2* 和 *slc26a4* 的遗传同源性和组织表达特异性来看, 推测 *slc26a3* 和 *slc26a4* 可能分布在瓦氏雅罗鱼肠黏膜上皮, 通过调控 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 的吸收和排泄, 维持体内酸碱平衡。

鱼类鳃组织与水体直接接触, 对水体变化敏感, 是鱼类渗透压调节和离子运输的主要器官^[37-38]。前期很多研究主要围绕鱼类鳃组织, 从生理、生化

和分子水平证实了 *slc26a5* 和 *slc26a6* 参与鳃离子细胞 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 的转运^[15-16,20]。本研究首次发现, *slc26a6* 存在两种异构体, 且与 *slc26a5* 具有较高的同源性(图 2); 高碱胁迫下 *slc26a5* 和 *slc26a6* 在鳃和脑组织均显著高表达。这与 *slc26a5* (*prestin*) 在人和鼠方面的研究结果一致, 证实其表达水平与听力发展同步^[39]。靶向敲除 *prestin* 后, 实验动物的听敏度下降达 100~1000 倍, 导致约 40~60 dB 的听力损失^[40-42]。Chang 等^[20]通过 50 mmol/L NaHCO_3 碱度胁迫实验发现, 瓦氏雅罗鱼碱水种的 *slc26a5* 和 *slc26a6* 基因似乎对碱胁迫比较敏感, 胁迫第 7 天迅速高表达, 加快 HCO_3^- 的转运, 保持血液 pH 稳定。上述研究表明, 瓦氏雅罗鱼大脑皮层感受环境刺激信号后, 可能通过下丘脑-垂体-肾间细胞(hypothalamus-pituitary-interrenal, HPI)轴释放皮质醇和催乳素等应激激素, 促进鳃离子细胞的增殖和分化, 细胞膜上的 SLC26A5 和 SLC26A6 与 NBC、NCC、NKA 等蛋白协同作用参与渗透压和酸碱平衡的调节过程^[20,43]。

肾是鱼类重要的排泄器官, 也是鱼体进行酸碱平衡和渗透调节的主要器官^[3]。本研究发现, 尽管 *slc26a11* 单独聚类, 但相较于其他成员, *slc26a11* 与 *slc26a1*、*slc26a2*、*slc26a10* 亲缘关系较近(图 2); 除 *slc26a2* 在肝组织表达量相对较高外, *slc26a1*、*slc26a10* 和 *slc26a11* 均在肾组织显著高表达, 其中 *slc26a10* 的表达倍数是其对照组的 400 倍以上(图 6)。这与前期在瓦氏雅罗鱼^[5]和青海湖裸鲤^[44]研究中发现鱼类肾脏的萎缩程度与水体环境的渗透压成正相关的结果相类似^[3,45], 肾脏同样在鱼体的渗透压和酸碱调节过程中发挥重要作用。

3.2 *slc26* 基因家族的盐碱适应性进化分析

根据地质学和遗传学的研究结果, 达里湖瓦氏雅罗鱼在不足 1 万年的时间从开放型淡水种演变为陆封型碱水种, 是进行盐碱适应性进化研究的理想物种^[46-47,13,27]。Xu 等^[13]通过分析达里湖碱水种群和黑龙江淡水种群, 鉴定了 614 个受选择基因; 随后 Wang 等^[27]通过消除背景空间差异, 分析了达里湖碱水种群及其姊妹岗更湖淡水种群

和松花江淡水种群, 鉴定了 51 个受选择区域包含 21 个基因。本研究为了全面了解 *slc26* 基因家族是否受到正向选择作用, 下载整合了 Xu 等^[13]和 Wang 等^[27]的重测序样本数据。结果发现 *slc26* 家族所有基因成员在碱水种和淡水种均出现了不同程度的遗传分化(图 8); 但由于二者采集样本的时间、地点、数量不同, 本研究只在 *slc26a5*、*slc26a6l* 和 *slc26a10* 中筛选出 12 个共享候选 SNPs 位点, 几乎都位于内含子区(表 4)。基因型性状关联分析显示, 只有 *slc26a6l* 和 *slc26a10* 基因的 5 个 SNPs 位点在碱、淡水种群存在较为明显的遗传分化。研究发现 SNPs 发生在基因非编码区可能会影响基因的转录水平、剪接(内含子剪接增强子或沉默子)等机制进而影响基因的功能^[48]。目前关于 *slc26a6l* 的相关研究几乎没有, 而 *slc26a10* 被认为是一种表达的假基因, 其具体功能也不明确^[49]。所以, 这两个基因将是后续研究的重点。从系统进化关系来看, 瓦氏雅罗鱼的这两个基因与海水洄游性鱼类亲缘关系较近, 推测这两个基因可能属于海水型或碱水型基因; 另外, 从基因表达来看, *slc26a6l* 和 *slc26a10* 在碱胁迫下不同组织均有表达, 而且 *slc26a10* 在肾、肠、脑等渗透调节组织显著高表达(图 5), 推测该基因可能具有离子和渗透压调节功能, 参与瓦氏雅罗鱼盐碱适应过程。

综上, 本研究为进一步探究瓦氏雅罗鱼 *slc26* 基因家族功能奠定基础, 也为其他鱼类 *slc26* 基因的研究提供了参考数据, 以期可以在不同鱼类之间进行 *slc26* 的比较分析, 解析 *slc26* 在鱼类酸碱调控过程中的作用机制。

参考文献:

- [1] Purakayastha T, Bhaduri D, Aishwath O, et al. Soil management strategies to enhance carbon sequestration potential of degraded lands[J]. Indian Journal of Agronomy, 2016, 61(4): 407-419.
- [2] Lin T T, Lai Q F, Yao Z L, et al. Combined effects of carbonate alkalinity and pH on survival, growth and haemocyte parameters of the Venus clam *Cyclina sinensis*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35(2): 525-531.
- [3] Chang Y M, Liang L Q. Advances of research of physiological and molecular mechanisms related to alkali-saline adaptation for fish species inhabiting alkali-saline water[J]. Journal of Fisheries of China, 2021, 45(5): 798-812. [常玉梅, 梁利群. 耐盐碱鱼类的生理和分子机制研究进展[J]. 水产学报, 2021, 45(5): 798-812.]
- [4] Gao S, Chang Y M, Zhao X F, et al. The effect of different bicarbonate alkalinity on the gill structure of Amur ide(*Leuciscus waleckii*)[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2020, 44(4): 736-743. [高珊, 常玉梅, 赵雪飞, 等. 不同 NaHCO₃ 碱度对瓦氏雅罗鱼鳃组织结构的影响[J]. 水生生物学报, 2020, 44(4): 736-743.]
- [5] Gao S, Zhao X F, Chang Y M, et al. Effect of different bicarbonate alkalinity on microstructures of kidney and intestine in Amur ide *Leuciscus waleckii*[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2020, 33(3): 24-30. [高珊, 赵雪飞, 常玉梅, 等. 不同 NaHCO₃ 碱度对瓦氏雅罗鱼肾和肠组织显微结构的影响[J]. 水产学杂志, 2020, 33(3): 24-30.]
- [6] Lei Y Z, Dong S L, Shen C G. Study on the toxicity of carbonate-alkalinity to fishers[J]. Journal of Fisheries of China, 1985, 9(2): 171-183. [雷衍之, 董双林, 沈成钢. 碳酸盐碱度对鱼类毒性作用的研究[J]. 水产学报, 1985, 9(2): 171-183.]
- [7] Wilkie M P, Wood C M. The adaptations of fish to extremely alkaline environments[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 1996, 113(4): 665-673.
- [8] Chi B J, Chang Y M, Yan X C, et al. Genetic variability and genetic structure of *Leuciscus waleckii* Dybowski in Wusuli River and Dali Lake[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(2): 228-235. [池炳杰, 常玉梅, 闫学春, 等. 瓦氏雅罗鱼达里湖群体和乌苏里江群体的遗传多样性和遗传结构分析[J]. 中国水产科学, 2010, 17(2): 228-235.]
- [9] Chang Y M, He Q, Sun Y C, et al. Changes in plasma free amino acid levels in *Leuciscus waleckii* exposed to different environmental alkalinity levels[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(1): 117-124. [常玉梅, 何强, 孙言春, 等. 碳酸盐碱度胁迫下瓦氏雅罗鱼血浆游离氨基酸水平的变化[J]. 中国水产科学, 2016, 23(1): 117-124.]
- [10] Xu J, Ji P F, Wang B S, et al. Transcriptome sequencing and analysis of wild Amur Ide (*Leuciscus waleckii*) inhabiting an extreme alkaline-saline lake reveals insights into stress adaptation[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e59703.
- [11] Xu J, Li Q, Xu L M, et al. Gene expression changes leading extreme alkaline tolerance in Amur ide (*Leuciscus waleckii*) inhabiting soda lake[J]. BMC Genomics, 2013, 14: 682.
- [12] Chang Y M, Tang R, Dou X J, et al. Transcriptome and expression profiling analysis of *Leuciscus waleckii*: An

- exploration of the alkali-adapted mechanisms of a freshwater teleost[J]. *Molecular BioSystems*, 2014, 10(3): 491-504.
- [13] Xu J, Li J T, Jiang Y L, et al. Genomic basis of adaptive evolution: The survival of Amur ide (*Leuciscus waleckii*) in an extremely alkaline environment[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2017, 34(1): 145-159.
- [14] Zhao X F, Liang L Q, Liew H J, et al. Identification and analysis of long non-coding RNAs in *Leuciscus waleckii* adapted to highly alkaline conditions[J]. *Frontiers in Physiology*, 2021, 12: 665268.
- [15] Perry S F, Vulesevic B, Grosell M, et al. Evidence that SLC26 anion transporters mediate branchial chloride uptake in adult zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2009, 297(4): R988-R997.
- [16] Boyle D, Clifford A M, Orr E, et al. Mechanisms of Cl^- uptake in rainbow trout: Cloning and expression of *slc26a6*, a prospective $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2015, 180: 43-50.
- [17] Liu S T, Horng J L, Chen P Y, et al. Salt secretion is linked to acid-base regulation of ionocytes in seawater-acclimated medaka: New insights into the salt-secreting mechanism[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 1-13.
- [18] Wang Y, Zhao J L, Wu J W, et al. Effects of alkalinity on morphology of gill ionocytes and HCO_3^- transporters in gill, kidney and intestine of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2016, 51(6): 1027-1037. [王燕, 赵金良, 吴俊伟, 等. 碱度胁迫对尼罗罗非鱼鳃离子细胞形态以及鳃、肾和肠中 HCO_3^- 转运因子的影响[J]. *动物学杂志*, 2016, 51(6): 1027-1037.]
- [19] Wang P, Lai Q F, Yao Z L, et al. Differential expressions of genes related to HCO_3^- secretion in the intestine of *Gymnocypris przewalskii* during saline-alkaline water transfer[J]. *Marine Fisheries*, 2015, 37(4): 341-348. [王萍, 来琦芳, 么宗利, 等. 盐碱环境下青海湖裸鲤肠道 HCO_3^- 分泌相关基因表达差异[J]. *海洋渔业*, 2015, 37(4): 341-348.]
- [20] Chang Y M, Zhao X F, Liew H J, et al. Effects of bicarbonate stress on serum ions and gill transporters in alkali and freshwater forms of Amur ide (*Leuciscus waleckii*)[J]. *Frontiers in Physiology*, 2021, 12: 676096.
- [21] Gertz E M, Yu Y K, Agarwala R, et al. Composition-based statistics and translated nucleotide searches: Improving the TBLASTN module of BLAST[J]. *BMC Biology*, 2006, 4: 41.
- [22] Migliori G B, Lienhardt C, Weyer K, et al. Ensuring rational introduction and responsible use of new TB tools: Outcome of an ERS multisector consultation[J]. *The European Respiratory Journal*, 2014, 44(6): 1412-1417.
- [23] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [24] Bailey T L, Williams N, Misleh C, et al. MEME: Discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs[J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(suppl_2): W369-W373.
- [25] Kim D, Langmead B, Salzberg S L. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(4): 357-360.
- [26] Pertea M, Pertea G M, Antonescu C M, et al. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads[J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(3): 290-295.
- [27] Wang S Y, Kuang Y Y, Liang L Q, et al. Resequencing and SNP discovery of Amur ide (*Leuciscus waleckii*) provides insights into local adaptations to extreme environments[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 5064.
- [28] Zhao Y C, Zhao X H, Zhang S, et al. A short unix shell script for vcftools commands iteration to obtain the genotypes of variations for forensic purpose[J]. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2017, 6: e49-e51.
- [29] Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al. PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses[J]. *The American Journal of Human Genetics*, 2007, 81(3): 559-575.
- [30] Hu M Y, Michael K, Kreiss C M, et al. Temperature modulates the effects of ocean acidification on intestinal ion transport in Atlantic cod, *Gadus morhua*[J]. *Frontiers in Physiology*, 2016, 7: 198.
- [31] Marius T, Wood Chris M, Harald K, et al. Ion transporters and osmoregulation in the kidney of teleost fishes as a function of salinity[J]. *Frontiers in Physiology*, 2021, 12: 664588.
- [32] He Q, Chang Y M, Su B F, et al. Effects of carbonate alkalinites on oxygen consumption, ammonia excretion and ammonia excretion gene expression in *Leuciscus waleckii* Dybowski[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2016, 25(4): 551-558. [何强, 常玉梅, 苏宝锋, 等. 碳酸盐碱度对达里湖瓦氏雅罗鱼耗氧率、氨氮排泄和排氨基因表达的影响[J]. *上海海洋大学学报*, 2016, 25(4): 551-558.]
- [33] Lv H Z. Genome wide identification of carbinic anhydrase gene family in Amur ide (*Leuciscus waleckii*) and adaptive evolution analysis in extremely alkaline environment[D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2020. [吕红皂. 瓦氏

- 雅罗鱼碳酸酐酶基因家族的鉴定及在极端碱性环境中的适应性进化分析[D]. 新乡: 河南师范大学, 2020.]
- [34] Whittamore J M. Osmoregulation and epithelial water transport: Lessons from the intestine of marine teleost fish[J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2012, 182(1): 1-39.
- [35] Wood C M, Du J Z, Rogers J, et al. Przewalski's naked carp (*Gymnocypris przewalskii*): An endangered species taking a metabolic holiday in Lake Qinghai, China[J]. *Physiological and Biochemical Zoology*: PBZ, 2007, 80(1): 59-77.
- [36] Kumar A, Priyamvada S, Ge Y, et al. A novel role of SLC26A3 in the maintenance of intestinal epithelial barrier integrity[J]. *Gastroenterology*, 2021, 160(4): 1240-1255.e3.
- [37] 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.
- [38] Hwang P P, Perry S F. Ionic and acid-base regulation[J]. *Fish Physiology*, 2010, 29: 311-344.
- [39] Hang J F, Pan W L, Chang A S, et al. Synchronized progression of prestin expression and auditory brainstem response during postnatal development in rats[J]. *Neural Plasticity*, 2016, 2016: 4545826.
- [40] Zheng J, Shen W X, He D Z Z, et al. Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells[J]. *Nature*, 2000, 405(6783): 149-155.
- [41] Cheatham M A, Huynh K H, Gao J, et al. Cochlear function in Prestin knockout mice[J]. *The Journal of Physiology*, 2004, 560(3): 821-830.
- [42] Wu X D, Gao J G, Guo Y K, et al. Hearing threshold elevation precedes hair-cell loss in prestin knockout mice[J]. *Molecular Brain Research*, 2004, 126(1): 30-37.
- [43] Guh Y J, Hwang P P. Insights into molecular and cellular mechanisms of hormonal actions on fish ion regulation derived from the zebrafish model[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2017, 251: 12-20.
- [44] Liu J Y. Effect of saline-alkali stress on oxygen consumption, osmoregulation and ionic regulation of przewalski's naked carp, *Gymnocypris przewalskii*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012. [刘济源. 盐碱胁迫对青海湖裸鲤呼吸耗氧、渗透和离子调节的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.]
- [45] Yang J, Xu W, Geng L W, et al. Effects of salinity on survival, gill and kidney tissue in juveniles of 5 species[J]. *Freshwater Fisheries*, 2014, 44(4): 7-12. [杨建, 徐伟, 耿龙武, 等. 盐度对5种幼鱼的生存及鳃、肾组织的影响[J]. *淡水渔业*, 2014, 44(4): 7-12.]
- [46] Geng K, Zhang Z C. The geomorphic characteristics and evolution of the lakes in dalairuoe area of Neimenggu Plateau during the Holocene[J]. *Journal of Beijing Normal University (Natural Science)*, 1988, 24(4): 94-101. [耿侃, 张振春. 内蒙古达拉诺尔地区全新世湖群地貌特征及其演化[J]. *北京师范大学学报(自然科学版)*, 1988, 24(4): 94-101.]
- [47] Xiao J L, Si B, Zhai D Y, et al. Hydrology of Dali Lake in central-eastern Inner Mongolia and Holocene East Asian monsoon variability[J]. *Journal of Paleolimnology*, 2008, 40(1): 519-528.
- [48] Wilkie G S, Dickson K S, Gray N K. Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2003, 28(4): 182-188.
- [49] Sindić A, Chang M H, Mount D B, et al. Renal physiology of SLC26 anion exchangers[J]. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 2007, 16(5): 484-490.

Identification, expression, and evolution of *slc26* gene family in *Leuciscus waleckii*

HUANG Jing^{1,2}, WANG Shuangyi³, LI Wen^{2,4}, LIANG Liquan², ZHANG Limin², DONG Zhiguo¹, CHANG Yumei²

1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biological Resources and Environment, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China;
2. National and Local Joint Engineering Laboratory for Freshwater Fish Breeding; Key Laboratory of Freshwater Aquatic Biotechnology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Heilongjiang Province's Key Laboratory of Fish Stress Resistance Breeding and Germplasm Characteristics on Special Habitat; Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;
3. BGI Genomics, BGI-Shenzhen, Shenzhen 518083, China;
4. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: The high bicarbonate (HCO_3^- and CO_3^{2-}) and pH in alkali-saline water have a significant impact on fish growth, reproduction and survival. Amur ide (*Leuciscus waleckii*) can survive in Lake Dali, Inner Mongolia, with an alkalinity of more than 54 mmol/L and a pH of 9.6 and become a dominant population. The *slc26* gene family has been extensively studied in humans, mice, livestock, and fish and codes for important proteins which regulate the transmembrane transport of Cl^- and HCO_3^- . The *slc26* gene family in Amur ide was identified to investigate the mechanism of HCO_3^- transport, and its expression and evolution were studied using genome and transcriptome data from various tissues and populations. As a result, a total of 10 members of the *slc26* gene family were identified in Amur ide, which were distributed on 6 chromosomes and named *slc26a1*, *slc26a2*, *slc26a3.1*, *slc26a3.2*, *slc26a4*, *slc26a5*, *slc26a6*, *slc26a6l*, *slc26a10*, and *slc26a6l1*. Phylogenetic and motif analysis showed that the clusters of *slc26a3.1*, *slc26a3.2*, and *slc26a4*, had higher homology than those of *slc26a5*, *slc26a6*, and *slc26a6l*, and of *slc26a1*, *slc26a2*, and *slc26a10*, while *slc26a6l1* had lower homology with other nine genes and clustered singly; RNA-seq combined with real-time fluorescence quantitative analysis revealed that with 50 mmol/L bicarbonate stress, different members of the *slc26* family in Amur ide had tissue expression specificity. Among them, *slc26a3.1*, *slc26a3.2*, and *slc26a4* were highly expressed in the intestine; *slc26a5*, *slc26a6*, and *slc26a6l* were highly expressed in the gills and brain; *slc26a1*, *slc26a10*, and *slc26a6l1* were highly expressed in the kidney; and *slc26a2* was highly expressed in the liver only. The genetic relationships between the *slc26* genes were basically consistent with their expression patterns. Based on the genome resequencing data, the SNP loci of *slc26* genes of Amur ide in the alkali-adapted population (23 individuals) and freshwater population (15 individuals) were calculated, and 12 potential shared candidate SNPs were identified based on the threshold of the top 10%. The association analysis between SNP genotypes and traits showed that there was significant genetic differentiation between the alkali-adapted population and the freshwater population at five SNPs loci ($P < 0.05$). The results of this study will provide a valid scientific basis for further analysis of the acid-base regulation mechanism in *L. waleckii*. Taken together, this study will provide a theoretical basis for the in-depth analysis of the acid-base regulation mechanism of the *slc26* gene family in Amur ide.

Key words: *Leuciscus waleckii*; alkali-saline water; *slc26* gene family; HCO_3^- transportation; adaptive evolution

Corresponding author: CHANG Yumei. E-mail: changyumei@hrfri.ac.cn

附表 1 各物种 *slc26* 基因序列编号
Appendix 1 Gene ID of *slc26* genes in different species

基因 gene	三刺鱼 <i>Gasterosteus aculeatus</i>	虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	大鳞鲃 <i>Luciobarbus capito</i>	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	鲫 <i>Carassius auratus</i>	欧洲鳗鲡 <i>Anguilla anguilla</i>	大西洋鲱 <i>Clupea harengus</i>	瓦氏雅罗鱼 <i>Leuciscus waleckii</i>
<i>slc26a1</i>	XM_040197011.1	XM_021577256.2	XM_005451403.2	ctg37.9	NM_001080667.1	ENSCCART000000019066.1	XM_026196362.1	XM_035389688.1	XM_012837634.3	LW14G017250.1
<i>slc26a2</i>	XM_040175264.1	XM_021583603.2	XM_019355502.2	ctg11.139	XM_005173160.4	ENSCCART000000049220.1	ENSCART00000014131.1	XM_035410386.1	XM_031568942.2	LW13G014940.1
<i>slc26a3.1</i>		XM_021577256.2	XM_019346365.2	ctg48.76	NM_001135683.1	XM_042722117.1	ENSCART00000012342.1			LW06G013390.1
<i>slc26a3.2</i>				ctg48.75	NM_001040175.1	XM_042722116.1	ENSCART00000012081.1			LW06G013360.1
<i>slc26a4</i>		XM_036944754.1		ctg10.451	NM_001165915.1	XM_042722113.1	ENSCART00000011446.1		XM_012828053.3	LW06G013350.1
<i>slc26a5</i>	XM_040172810.1		XM_003458674.5	ctg10.351	NM_201473.1	XM_042722816.1	ENSCART00000013517.1	XM_035425520.1	XM_031583181.2	LW06G011560.1
<i>slc26a6</i>		XM_036947317.1	XM_005478355.3	ctg3.79	XM_001344207.7	ENSCCART000000039154.1	ENSCART000000041786.1		XM_031565540.2	LW19G012110.1
<i>slc26a6l</i>	XM_040205093.1	XM_036950171.1	XM_003454561.4	ctg23.92	NM_001114417.1	XM_042726261.1	ENSCART00000018552.1	XM_035389301.1	XM_012814985.3	LW12G007390.1
<i>slc26a10</i>	XM_040192915.1	XM_021565860.2	XM_003448240.5	ctg3.463	XM_021473701.1		ENSCART000000146672.1	XM_035381846.1	XM_042707586.1	LW19G021620.1
<i>slc26a11</i>	XM_040185819.1	XM_036948033.1	XM_013264444.3	ctg31.254	NM_199767.1	ENSCCART000000051176.1	ENSCART000000047128.1	XM_035406480.1	XM_042703864.1	LW05G024210.1