

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00515

不同盐度下“吉丽”罗非鱼(尼罗罗非鱼♀×萨罗罗非鱼♂)NKCC1a mRNA 的组织特异性表达

王兵, 范武江, 李思发

上海海洋大学, 农业部水产种质资源与利用重点开放实验室, 上海 201306

摘要: 应用实时荧光定量 PCR 技术(qRT-PCR), 以“吉丽”罗非鱼[尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*, ♀)×萨罗罗非鱼(*Sarotherodon melanotheron*, ♂)]为材料, 研究 NKCC1a 基因表达的盐度-组织特异性。研究结果表明: (1)NKCC1a 基因 mRNA 表达量存在显著的组织特异性, 在低于 25 盐度环境中, NKCC1a mRNA 在鳃、肝、肾及肠中均有表达; 当盐度从 0 提高到 48 时, 表达量在鳃中与盐度变化呈高度正相关($R>0.9, P<0.01$), 在肠和肾中与盐度变化呈负相关($R\sim-0.7, P<0.05$), 但在肝中则不受盐度变化的影响。(2)当盐度提高到 64, NKCC1a 基因 mRNA 表达量在鳃和肠 3 h 后达最高值, 5 h 后下降, 前后变化差异显著($P<0.05$); 表达量在肝中则是在 5 h 后达最高值, 变化差异也显著($P<0.05$); 表达量在肾中持续下降, 但差异不显著。以上结果揭示, 在盐度高于 25 的环境中, “吉丽”罗非鱼主要由鳃组织的 NKCC1a 排出多余的离子以维持鱼体的水盐平衡, 由此认为鳃组织在“吉丽”罗非鱼高渗透压调节中起最主要作用。

关键词: 罗非鱼; NKCC1a 基因; mRNA 表达; 组织特异性; 盐度

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)03-0515-08

罗非鱼类(Tilapias)隶属于鲈形总目鲈亚目丽鱼科(Cichlidae), 按 Trewavas^[1]分类方法包括 3 个属约 70 多种, 大多数为广盐性种类, 既可以在淡水中养殖, 驯化后也可在咸水中生长。如尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)生长快, 个体大, 但耐盐性差, 适应于淡水环境, 是目前中国主要的养殖鱼类之一; 萨罗罗非鱼(*Sarotherodon melanotheron*)2002 年引进中国, 耐盐能力强, 但生长慢, 个体小^[2-3]。这 2 种罗非鱼在分类上归不同属, 尼罗罗非鱼雌鱼口孵, 萨罗罗非鱼则主行雄鱼口孵, 这 2 种鱼在自然条件下不能杂交繁殖。李思发等^[4-5]通过人工授精, 获得了耐盐性能和生长性能兼优的杂交 F₁[尼罗罗非鱼♀×萨罗罗非鱼♂], 再由杂交一代自繁得到大量的杂交 F₂。2009 年全国水产原良种审定委员会审定为新品种, 命名为“吉丽”罗

非鱼(新品种登记号: GS-02-002-2009), 由农业部公告推广。

NKCC 蛋白是一类电中性的跨膜转运蛋白, 以 $1\text{Na}^+:1\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ 的比例进行离子的跨膜运输, 包括 NKCC1 和 NKCC2 2 种基因亚型^[6]。现在已知, 水产动物如鳗鲡(*Anguilla anguilla*)^[7]、莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)^[8]的 NKCC1 基因编码 a、b 2 种蛋白, NKCC1a 编码的蛋白在大多数组织中存在, 尤其在鳃中高度表达, 这可能与鳃丝氯细胞盐分泌活动及渗透压调节密切相关^[9]; 在不同盐度水体中, 莫桑比克罗非鱼鳃 NKCC1a 基因的表达量差异显著, 30%和 100%海水条件下表达量分别比淡水条件下高出 4 倍和 7 倍^[10]。国外对罗非鱼耐盐特性的研究表明, 盐度为 15 的水体对尼罗罗非鱼来说是一种等渗环境^[11], 此时用

收稿日期: 2010-06-02; 修订日期: 2011-01-13.

基金项目: 国家科技支撑计划专题项目(2006BAD01A1203); 罗非鱼行业技术体系(nycytx-48-3); 公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx07-044-01).

作者简介: 王兵(1985-), 男, 硕士研究生, 主要从事水产动物种质资源与种苗工程研究. E-mail:wbing498352@yahoo.cn

通信作者: 李思发, 教授, 博士生导师. Tel: 021-61900450; E-mail:sfli@shou.edu.cn

来进行渗透调节的能量损耗最小,能够获得最快的生长速度。李思发等^[5]研究尼罗罗非鱼、萨罗罗非鱼及其正反杂交后代的耐盐性能,证明“吉丽”罗非鱼的最适生长盐度在 20~25 之间,可以认为这个盐度范围是“吉丽”罗非鱼的等渗盐度,从理论上来说此时 *NKCC1a* 基因的表达量应该处于一个较低的水平。

作者在研究“吉丽”罗非鱼 2 个亲本的 *NKCC1a* 基因 mRNA 表达时发现,父本萨罗罗非鱼在 136 盐度下该基因的 mRNA 表达量是 0 盐度条件下的 4.9 倍,母本尼罗罗非鱼在 82 盐度下该基因的 mRNA 表达量是 0 盐度条件下的 14 倍(实验结果未发表)。但在这 2 个极端盐度之间发生何种变化未进行研究,在其他鱼类中也无相关报道。本研究应用实时荧光定量 PCR 技术,探讨从 0 盐度到致死盐度之间的不同梯度盐度下,“吉丽”罗非鱼鳃、肝、肠、肾组织中 *NKCC1a* mRNA 的表达差异,以期揭示鱼类 *NKCC1a* 基因在淡、咸水环境变迁过程中表达的方式和机制。

1 材料与方法

1.1 试剂和耗材

RNAstore 保存液、RNA 提取试剂盒(RNAPrep pure Tissue Kit)、Quant Reverse Transcriptase 逆转录酶及荧光定量试剂盒(Realmastermix SYBR I)购自北京天根生化科技有限公司。定量 PCR 用的一次性吸头和八联管由 AXYGENT(USA)公司提供。其他试剂和耗材均购自上海美著生物科技有限公司。

1.2 实验材料及设计

“吉丽”罗非鱼(英文简称“GILI”)取自上海海洋大学鱼类种质研究实验站。慢性耐盐实验参照 Lemari 等^[12]的方法,设计 3 个实验重复组和 1 个淡水对照组。每组实验鱼 30 尾(10~14 g/尾),先在实验用的淡水中饲养 10 d 以适应新环境,每天人工投喂罗非鱼专用浮性颗粒饲料 3 次(8:30、13:30、16:30),投喂量合计约为总鱼体质量的 7%。从第 11 天起实验组每天换水后补充咸水提高 8 个盐度。先用虹吸法排出 1/2 体积实验用水,清除残饵和粪便,再从换气点加入 1/2 体积合适

盐度(换水前盐度+16)咸水。对照组换水时加入淡水。每天换水后 1 h 和 24 h 从实验组中随机捞出活鱼 1 尾,将鱼杀死后剪取鳃、肝、肠和肾组织,用灭菌 DEPC 水清洗后,剪成边长小于 0.5 cm 的小块,迅速浸入 10 倍体积(m/V)RNAstore 液中,4 ℃暂存一昼夜,再转入-20 ℃长期保存备用。从实验开始到实验鱼开始死亡,分别对暴露于盐度 8、16、24、32、40 和 48 下 1 h 和 24 h 的个体及对照组个体取鳃、肝、后肠和肾组织保存,共取 13 批组织样品。在放入 64 盐度后 4 h 内,实验组 50% 实验鱼死亡(用玻璃棒刺激无反应作为判断实验鱼死亡的标准)。在水体盐度提高到 64 后的 1 h、3 h 和 5 h 从实验组随机取样保存;水体盐度提高到 80 后实验组鱼全部死亡,实验结束。

慢性耐盐实验在 40 cm×40 cm×30 cm 的泡沫箱中进行,实验期间水体盐度用盐度计(PINPOINT® Salinity Monitor, American Marine Inc.)进行测定和调节,精确到±0.1;每个泡沫箱中放置 1 支电热棒,保持水温在(20±0.5)℃;充气泵全程供气增氧,每 3 天检测 1 次溶解氧、pH 值和氨态氮含量。

1.3 RNA 提取

总 RNA 的提取按照总 RNA 提取试剂盒(RNAPrep pure Tissue Kit, TIANGEN)说明书的方法进行,琼脂糖电泳检测 RNA 的纯度,紫外分光光度计检测样品浓度,计算 $(OD_{260}-OD_{320})/(OD_{280}-OD_{320})$ 比值,以 OD 比值在 1.8~2.0 之间较好。加入适量 RNase free dH₂O 调整浓度到 100 ng/μL 后分装成小管-80 ℃保存备用。参照 GenBank 中的萨罗罗非鱼(*Sarotherodon melanotheron* GU066877) *NKCC1a* 基因 cDNA 序列,应用 Primer Premier 5.0 软件设计 1 对 qRT-PCR 引物(PF: 5' TGTGGAACCTTCTGGTTGGTATGGA 3', PR: 5' GGCTGTGATAAGGACGACGAGTAAG 3',产物长度 163bp);参照尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus* EU887951)管家基因 β -actin 设计 1 对内参引物(β -actin F: 5' TGTGATGGTGGGTATGGGT 3', β -actin R: 5' TCGTTGTAGAAGGTGTGAT 3',产物长度 153 bp)。用 Oligo6.0 检验引物优劣,BLASTX 验证引物特异性和唯一性。

1.4 qRT-PCR 检测 mRNA 表达差异

取 1 μg 总 RNA, 用 Quant Reverse Transcriptase 逆转录酶按照说明书合成 cDNA 第一链, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。采用 SYBR green I 荧光染料在 iCycler iQ real-time PCR system (Bio-Rad) 进行 PCR 扩增, 分别检测盐度每提高 8 后 1 h 及 24 h *NKCC1a* 基因在鳃、肝、肠和肾中的 mRNA 相对表达量。在对照组有死亡鱼出现后, 每隔 16 个盐度后才取样分析。

在 8 联管(Axygen)中分装以下反应体系: $2.5\times$ Real MasterMix 8 μL , $20\times$ SYBR solution 1 μL , 正、反向引物($10\mu\text{mol/ml}$)各 0.4 μL , 模板 cDNA 1 μL , 阴性对照则以等量 RNase free 水代替, 补充 RNase free 水至 20 μL 。PCR 反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 s, $55.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 s, $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s, 40 个循环; 最后在 $55\sim 95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 制作熔解曲线。反应结束后, 应用 iQ5 PCR 系统中的 GeneExpr 软件在校正表达模式(Normalized Expression, $\Delta\Delta\text{CT}$ 法)下进行相对定量分析, 相对表达量以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm\text{SD}$)表示。用 SPSS17.0 对盐度-组织特异性结果进行回归分析。

2 结果与分析

2.1 慢性耐盐实验结果

本研究通过逐日提高水体盐度, 水体盐度从 0 到 80, 整个实验共经历 17 d, 实验期间水体溶解氧变动为 $3.78\sim 6.86\text{ mg/L}$, pH 值变动为 $7.62\sim 8.15$, 氨态氮变动为 $1.5\sim 3.67\text{ mg/L}$ 。第一尾实验鱼死亡出现在盐度 48, 但是在盐度 48 之后累计存活率急速降低, 64 盐度左右时 50% 鱼死亡(图 1); 盐度升高到 72 以后, 24 h 内累计存活率下降到 6.67%; 水体盐度提高到 80 以后, 3 h 内实验鱼全部死亡。

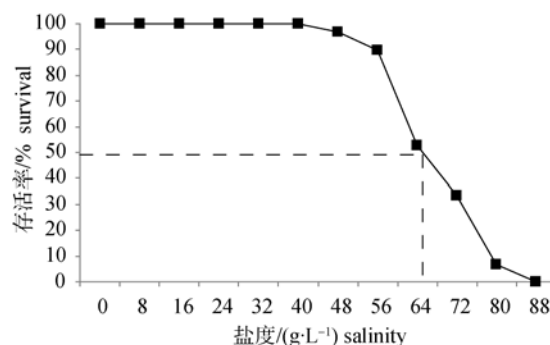


图 1 盐度升高对“吉丽”罗非鱼累计存活率的影响

Fig. 1 Cumulative survival versus salinity for “GILI” tilapia

2.2 RNA 质量

提取的 RNA 用适量 RNase free 水溶解, 取 2 μL 样品与 RNA loading buffer 混合均匀, 于 1.0% 的琼脂糖(含 EB)凝胶上 100 V 电泳 30 min, 电泳缓冲液为 0.5% 的 TBE。电泳结果如图 2 所示, 大部分 RNA 样品可以清晰地分辨出 28S 和 18S 条带, 表明纯度较好。另各取 1 μL RNA 样品用 RNase free 水稀释 100 倍, 紫外分光光度计检测其浓度, 计算 $(\text{OD}_{260}-\text{OD}_{320})/(\text{OD}_{280}-\text{OD}_{320})$ 比值。根据纯度和浓度检测结果, 挑选出电泳条带清晰、OD 比值在 1.8~2.0 之间的 RNA 样品用于后续实验。

2.3 qRT-PCR 检测结果

SYBR green I 法检测“吉丽”罗非鱼 *NKCC1a* 基因在鳃、肝、肠和肾组织中都有表达, 为了检测不同盐度对 *NKCC1a* 基因 mRNA 表达量的影响, 本研究设计了逐步提高盐度的慢性适应性实验, 将各个盐度梯度下的 RNA 逆转录成 cDNA, 设计的基因引物和 β -actin 引物用常规 PCR 均能扩增出单一目的条带(图 3), 目的产物分别为 163 bp、153 bp。在 0~48 盐度区间, *NKCC1a* 基因 mRNA 在不同组织中的相对表达量有较大差异(图 4、5), 不论是提高盐度后 1 h 还是 24 h, “吉

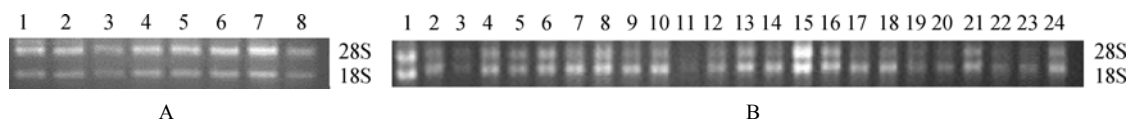


图 2 “吉丽”罗非鱼部分 RNA 样品电泳结果

A1-8: 鳃; B1-8: 肠; B9-16: 肝; B17-24: 肾。

Fig. 2 Electrophoresis of some RNA samples of “GILI” tilapia

A1-8: gill; B1-8: intestine; B9-16: liver; B17-24: kidney.

丽”罗非鱼鳃 *NKCC1a* mRNA 表达量与盐度变化呈高度正相关关系($P<0.01$); 而肠和肾中 *NKCC1a* mRNA 表达量与盐度变化则呈负相关关系($P<0.05$), 随盐度的升高而降低; 在肝中 *NKCC1a* mRNA 的表达随着盐度升高呈现高-低-高的趋势, 在低于和高于等渗盐度的条件下, *NKCC1a* mRNA 表达量都相对较高。

在盐度提高到 64 后的 1 h、3 h、5 h, *NKCC1a* mRNA 表达量也表现出组织差异性(图 6)。以提高盐度 1 h 后每种组织表达量为基准, 鳃和肠 *NKCC1a* mRNA 表达量在 3 h 后达到峰值, 鳃中 3 h 后的表达量与 1 h 和 5 h 有显著差异($P<0.05$), 肠 5 h 后表达量下降, 显著高于 1 h、3 h 的表达量有显著差异($P<0.05$); 肝组织中 5 h 的表达量显著高于 1 h、3 h 的表达量($P<0.05$), 而肾 *NKCC1a* mRNA 表达量随时间延长而略有下降, 但是 3 个时间段间差异不显著($P>0.05$)。

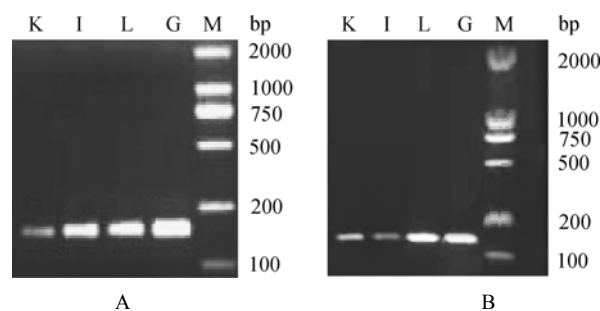


图 3 “吉丽”罗非鱼不同组织中 *NKCC1a* 和 β -actin 的 PCR 扩增结果

A. *NKCC1a* 引物的扩增产物; B. β -actin 引物的扩增产物。

M: marker DL2000; G: 鳃; L: 肝; I: 肠; K: 肾。

Fig. 3 PCR amplification of *NKCC1a* and β -actin in different tissues of “GILI” tilapia

A. amplification results of *NKCC1a*; B. amplification results of β -actin. M: marker DL2000; G: gill; L: liver; I: intestine; K: kidney.

3 讨论

罗非鱼是一种广盐性鱼类, 能够适应淡水、咸水甚至海水环境。衡量罗非鱼耐盐性能的一种

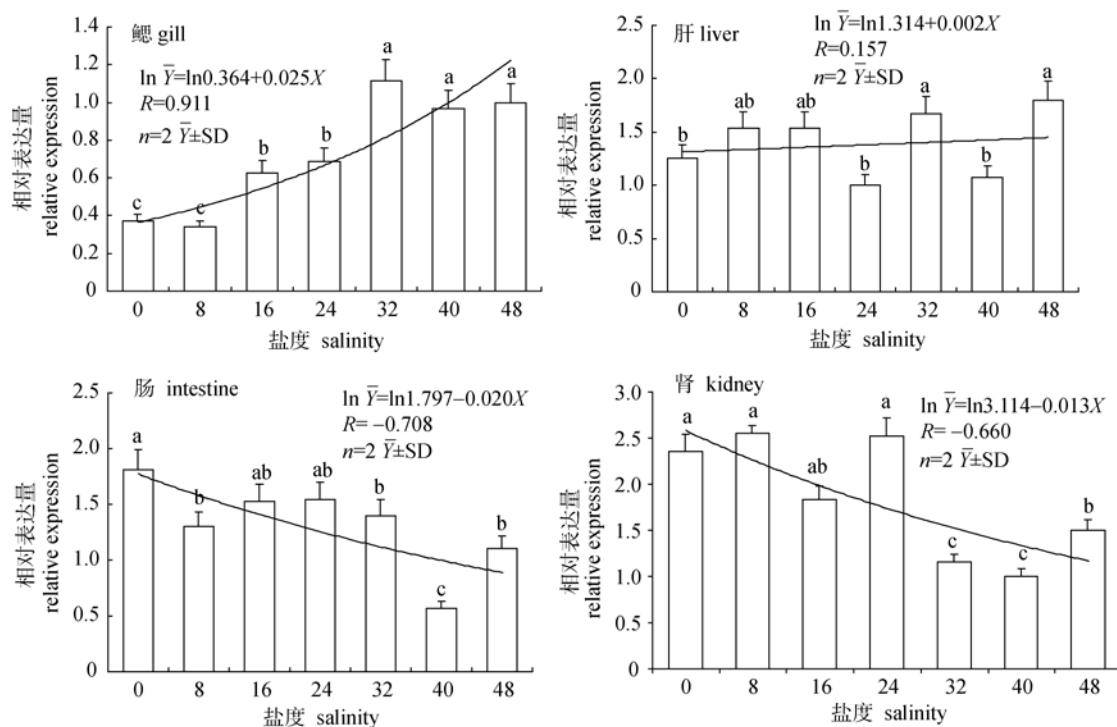


图 4 不同盐度下适应 1 h 后 *NKCC1a* mRNA 在“吉丽”罗非鱼鳃、肝、肠、肾中的表达(*NKCC1a*/ β -actin)

图中带箭头弧线表示表达量的变化趋势; $\bar{Y}$: 相对表达量平均值, X : 盐度, R : 相关系数。标有不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

Fig. 4 Expression (*NKCC1a*/ β -actin) of *NKCC1a* mRNA in gill, liver, intestine and kidney of “GILI” tilapia after 1 h acclimation to different salinity

The line with an arrow shows change trend of *NKCC1a* expression. $\bar{Y}$: mean of relative expression level; X : salinity; R : correlation coefficient. Different letters donate significant difference ($P<0.05$).

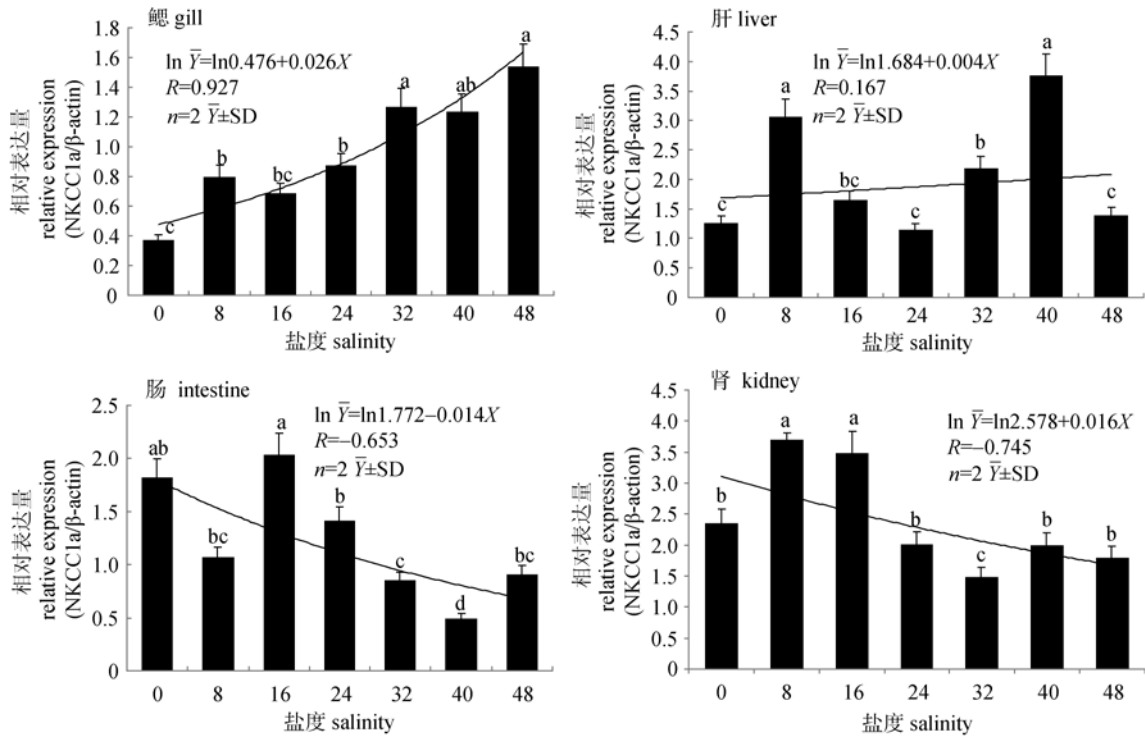


图 5 不同盐度下适应 24 h 后 *NKCC1a* mRNA 在“吉丽”罗非鱼鳃、肝、肠、肾中的表达(*NKCC1a*/ β -actin)
图中带箭头弧线表示表达量的变化趋势; $\bar{Y}$: 相对表达量平均值, X : 盐度, R : 相关系数. 标有不同字母表示差异显著($P < 0.05$).

Fig. 5 Expression of *NKCC1a* mRNA in gill, liver, intestine and kidney of “GILI” tilapia, 24 h acclimation to different salinity
The line with an arrow shows change trend of *NKCC1a* expression. $\bar{Y}$: mean of relative expression value; X : salinity; R : correlation coefficient. Different letters donate significant difference ($P < 0.05$).

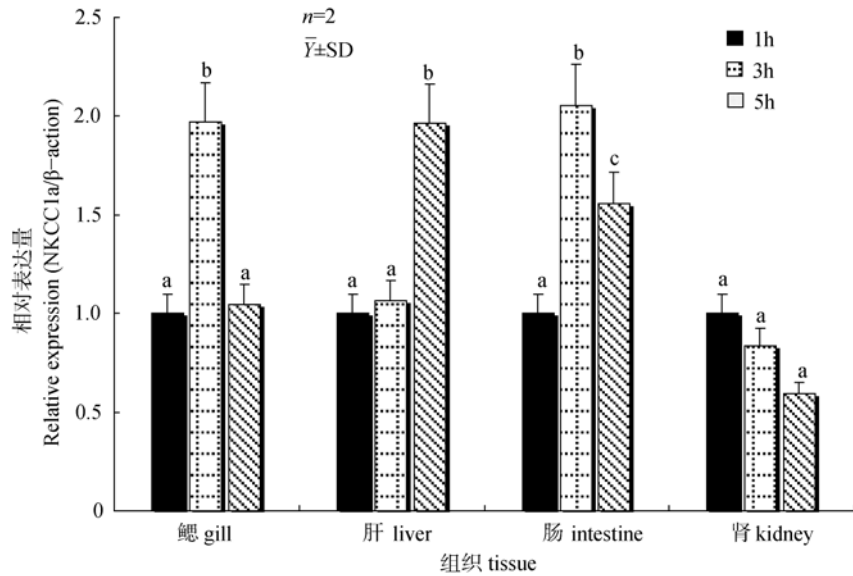


图 6 盐度提高至 64 后不同时间 *NKCC1a* mRNA 在“吉丽”罗非鱼鳃、肝、肠和肾中的表达

$\bar{Y}$: 相对表达量平均值; 图中不同的字符表示差异显著($P < 0.05$).

Fig. 6 Expression of *NKCC1a* mRNA in gill, liver, intestine and kidney of “GILI” tilapia after 1 h, 3 h and 5 h acclimation to 64 salinity

$\bar{Y}$: mean of relative expression value; different letters indicate significant difference($P < 0.05$).

常用方法是直接把鱼从淡水转入到咸水水体或海水中, 然后计算一系列耐盐指标, 如 96 h 半致死盐度(MLS-96h)、平均存活时间(MST)、50%存活时间(ST₅₀)等。由于不同鱼类对盐度变化的适应能力不一致, 特别是对急性胁迫的适应能力与物种密切相关, 这些检测方法并非完美。比如尼罗罗非鱼生长速度快, 但是耐盐能力较差, 如果直接将鱼转入海水, 往往短时间内就会 100%死亡, 因而无法统计计算 MLS-96h^[13]; Villegas 等^[14]也发现直接将尼罗罗非鱼转入海水中, 24 h 内死亡率 100%, MLS-96h 值仅为 15。而萨罗罗非鱼等耐盐性强的种类, 从淡水直接转入海水或更高盐度咸水时, 死亡率就较低, 可能会得到无穷大值。笔者认为, 上述指标并不完全适用于所有罗非鱼的耐盐性能检测。相关研究工作表明, 如果改进实验方法, 罗非鱼能够适应从淡水到海水甚至盐度达到 70 的咸水^[15]。本研究参照 Lemari 等^[12]的方法, 每天提高水体 8 个盐度, 发现“吉丽”罗非鱼经过慢性应激适应, 其耐盐能力测定值高于直接转入高盐度咸水的急性应激适应方法取得的结果^[5]。因此, 以合适的盐度梯度进行慢性耐盐实验, 可以较准确地反映罗非鱼的耐盐能力。

本研究证明, “吉丽”罗非鱼鳃中 *NKCC1a* mRNA 相对表达量与水体盐度呈正相关, 这与在其他鱼类中的研究结果一致^[7, 16-18]。这一结果证实在鱼类向高渗透压环境适应过程中, *NKCC1a* 蛋白是一种负责离子分泌的关键转运蛋白^[19]。高盐度环境下, 鱼体内 Na^+ 、 Cl^- 含量高, 氯细胞基底侧膜上存在的 *NKCC1* 蛋白将 Na^+ 和 Cl^- 沿着 Na^+ 的电化学梯度由血液转移到氯细胞内。进入氯细胞的 Na^+ 又通过基底侧膜上的 Na^+/K^+ -ATP 酶的活动而排出氯细胞外, 同时 K^+ 进入氯细胞; Cl^- 通过顶膜排入水体中^[19]。而在肠中随盐度的不断提高, *NKCC1a* mRNA 相对表达量呈下降趋势。分析其原因可能是肠内 *NKCC1a* 基因表达的调控机制与鳃不同。盐度升高时, 肠道的主要功能是吸收水分和 Na^+ 等, 对肠腔中 Na^+ 和 Cl^- 的重吸收同时也是水吸收的驱动力^[20], *NKCC1a* mRNA 表达量的降低可能对此具有重要意义; 同时由此产生

的盐负荷必须排出, 这主要是通过鳃的功能来实现^[21-22], 而这也间接解释鳃中 *NKCC1a* mRNA 相对表达量与水体盐度呈正相关。淡水硬骨鱼类肾单位发达, 尿量多; 海水硬骨鱼类肾脏退化, 肾小球小, 尿量少而浓, 主要含有二价离子, 以防止水分流失^[23]。离子的分泌和吸收通常与水的分泌和吸收协同进行, 而 *NKCC1* 蛋白主要负责单价离子运输, 因此尿量的大量减少导致 *NKCC1a* mRNA 在肾中的相对表达量下降。这也说明, 随着盐度的不断增加, *NKCC1a* mRNA 在肾中的相对表达量下降是与肾脏的生理机能的改变相适应的。

本实验发现在低于或高于等渗盐度(20~25)的条件下, 肝中 *NKCC1a* mRNA 相对表达量都相对升高, 证实肝在硬骨鱼类渗透压调节过程中起一定作用。内分泌系统是硬骨鱼类对环境信号做出适应性生理反应的关键感受器。PRL、IGF 等与渗透压调节相关的激素在肝中都有表达^[24-25], 以此推测其原因可能是: *NKCC1a* mRNA 相对表达量升高有助于肝细胞提高对内分泌系统激素和底物的灵敏性, 从而间接调节鱼类对盐度的耐受能力。

在向高盐度环境适应的过程中, 鱼类血浆渗透压和 Na^+ 、 Cl^- 的含量等处于波动性适应阶段(先上升然后下降)和再恢复的调节性阶段^[26]。在不同鱼类, 即使在同种鱼类, 适应阶段的离子变化幅度和持续时间在不同组织中也是不同的。但是也有人认为, 2 h 不足以使氯细胞大量增殖、相关离子泵和转运蛋白(*NKA*、*NKCC* 和 *CFTR* 等)经过转录翻译大量表达^[27]。推测这些可能是半致死盐度下 1 h、3 h 和 5 h *NKCC1a* mRNA 在不同组织中表达量不同的原因。本研究检测到在 64 盐度下, *NKCC1a* mRNA 在不同时间段不同组织中的表达存在差异, 充分说明 *NKCC1a* mRNA 表达的盐度-组织特异性。

本研究的实验材料“吉丽”罗非鱼由不耐盐的尼罗罗非鱼(♀)和耐盐性极强的萨罗罗非鱼(♂)的杂交后代自繁而成, 它基本继承了亲本生长快及耐盐的优点^[4]。*NKCC1a* mRNA 在“吉丽”罗非鱼

不同盐度下的表达呈现出组织差异,这可能与它的渗透调节生理相关。在盐度从0提高到48(第1尾实验鱼死亡)的过程中, *NKCC1a* mRNA 表达量在鳃中逐步上升,在肠和肾中逐步下降,而且鳃、肠、肾是硬骨鱼类的主要渗透压调节器官,故此推测在高盐度水体中(高于等渗盐度25),“吉丽”罗非鱼主要依赖鳃组织来调节水盐代谢维持渗透平衡。本研究仅限于转录水平,尚需从蛋白水平(即翻译水平)研究 *NKCC1a* 基因的表达及功能。

参考文献:

- [1] Trewavas E. Tilapia and sarotherodon[J]. Buntbarsche Bull, 1980, 81(1): 1–6.
- [2] 李学军, 李思发, 么宗利, 等. 不同盐度下尼罗罗非鱼、萨罗罗非鱼和以色列红罗非鱼幼鱼生长、成活率及肥满系数的差异[J]. 中国水产科学, 2005, 12(3): 245–251.
- [3] Jennings D P, Williams J D. Factors influencing the distribution of blackchin tilapia *Sarotherodon melanotheron* (Osteichthyes: Cichlidae) in the Indian River system, Florida[J]. Northeast Gulf Science, 1992, 12(2): 111–117.
- [4] 李思发, 颜标, 蔡完其, 等. 尼罗罗非鱼与萨罗罗非鱼正反交鱼自繁后代 F_2 耐盐性、生长性能及亲本对杂种优势贡献力的评估[J]. 水产学报, 2008, 32(3): 335–342.
- [5] 李思发, 颜标, 蔡完其. 尼罗罗非鱼与萨罗罗非鱼正反交后代耐盐性能的杂种优势及其与遗传的相关性的 SSR 分析[J]. 中国水产科学, 2008, 15(2): 189–198.
- [6] Hebert S C, Mount D B, Gamba G. Molecular physiology of cation-coupled Cl^- cotransport: the SLC12 family[J]. Pflugers Arch, 2004, 447(5): 580–593.
- [7] Cutler C P, Cramb G. Two isoforms of the $Na^+/K^+/2Cl^-$ cotransporter are expressed in the European eel (*Anguilla anguilla*)[J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1566(1-2): 92–103.
- [8] Hiroi J, Miyazaki H, Katoh F, et al. Chloride turnover and ion-transporting activities of yolk-sac preparations (yolk balls) separated from Mozambique tilapia embryos and incubated in freshwater and seawater[J]. J Exp Biol, 2005, 208(20): 3851–3858.
- [9] Cutler C P, Cramb G. Differential expression of absorptive cation-chloride-cotransporters in the intestinal and renal tissues of the European eel (*Anguilla anguilla*)[J]. Comp Biochem Physiol B, 2008, 149(1): 63–73.
- [10] Inokuchi M, Hiroi J, Watanabe S, et al. Gene expression and morphological localization of NHE3, NCC and NKCC1a in branchial mitochondria-rich cells of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) acclimated to a wide range of salinities[J]. Comp Biochem Physiol, 2008, 151(2)A: 151–158.
- [11] Woo N Y S, Hg T B, Leung T C, et al. Enhancement of growth of tilapia *Oreochromis niloticus* in iso-osmotic medium[J]. J Appl Ichthyol, 1997, 13(2): 67–71.
- [12] Lemari G, Baroiller J F, Clota F, et al. A simple test to estimate the salinity resistance of fish with specific application to *O. niloticus* and *S. melanotheron*[J]. Aquaculture, 2004, 240(1-4): 575–587.
- [13] Al-Amoudi M M. Acclimation of commercially cultured oreochromis species to sea water—an experimental study [J]. Aquaculture, 1987, 65: 333–342.
- [14] Villegas C T. Evaluation of the salinity tolerance of *Oreochromis mossambicus*, *O. niloticus* and their F_1 hybrids[J]. Aquaculture, 1990, 85(1-4): 281–292.
- [15] Perschbacher P W. A review of seawater acclimation procedures for commercially important euryhaline tilapias. [J]. Asian Fish Sci, 1992, 5: 241–148.
- [16] Scott G R, Claiborne J B, Edwards S L, et al. Gene expression after freshwater transfer in gills and opercular epithelia of killifish: Insight into divergent mechanisms of ion transport[J]. J Exp Biol, 2005, 208(14): 2719–2729.
- [17] Tipsmark C K, Madsen S S, Borski R J. Effect of salinity on expression of branchial ion transporters in striped bass (*Morone saxatilis*)[J]. J Exp Zool A, 2004, 301(12)A: 979–991.
- [18] Hiroi J, Yasumasu S, McCormick S D, et al. Evidence for an apical Na-Cl cotransporter involved in ion uptake in a teleost fish[J]. J Exp Biol, 2008, 211(16): 2584–2599.
- [19] Marshall W S, Grosell M. Ion transport, osmoregulation, and acidbase balance [M]//Evans D H, Claiborne J B. The Physiology of Fishes, Boca Raton: CRC Press, 2006: 177–230.
- [20] Grosell M, Wood C M, Wilson R W, et al. Bicarbonate secretion plays a role in chloride and water absorption of the European flounder intestine[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005, 288(4): 936–946.
- [21] 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]. Physiol Rev, 2005, 85(1): 97–177.

- [22] Hwang P P, Lee T H. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells[J]. *Comp Biochem Physiol*, 2007, 148(3)A: 479–497.
- [23] 林浩然. 鱼类生理学[M]. 排泄和渗透压调节. 广州: 广东高等教育出版社, 1999: 109–139.
- [24] 左映平, 曹劲松. 鱼体内催乳素的渗透调节作用[J]. *生命的化学*, 2007, 27(5): 455–457.
- [25] 马细兰, 易诗白, 张勇, 等. 荧光实时定量 PCR 检测尼罗罗非鱼 GH、GHR、IGF- 基因方法的建立及初步应用[J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2009, 48(3): 74–79.
- [26] Jobling M. Osmotic and ionic regulation-water and salt balance[M]//Jobling M. *Environmental biology of fishes*. London: Chapman & Hall, 1995: 211–249.
- [27] Kaneko T, Watanabe S, Lee K M. Functional morphology of mitochondrion-rich cells in Euryhaline and Stenohaline teleosts[J]. *Aqua-Bio Sci Monogr*, 2008, 1(1): 1–62.

Tissue-specific changes of *NKCC1a* mRNA expression by salinity in “GILI” tilapia

WANG Bing, FAN Wujiang, LI Sifa

Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Utilization Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: In this paper, Quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to study the tissue-specific changes of *NKCC1a* mRNA expression by salinity in case of the hybrid(named “GILI” tilapia)by *Oreochromis niloticus*(♀)×*Sarotherodon melanothron*(♂). As a new variety, “GILI” tilapia characterized by high salt tolerance and fast growth is suitable for marine culture. The present results showed that: (1) The *NKCC1a* mRNA expression level has significant tissue specificity. The *NKCC1a* gene expressed in all tested tissues of gill, liver, kidney and intestine under salinity below 25. When the salinity increased from 0 to 48, the *NKCC1a* mRNA expression level showed a positive correlation with salinity in gill ($R>0.9$, $P<0.01$), but negative correlation in intestine and kidney ($R\approx-0.7$, $P<0.05$) and no significant correlation in liver($P>0.05$). (2) When the salinity raised to 64, the mRNA expression level reached the highest peak after 3 h in gill and intestine, and decreased after 5 h, and there were significant differences between 1 h and 3 h, and between 3 h and 5 h ($P<0.05$). In liver, the maximum level appeared in 5 h and significantly higher than those in 1 h and 3 h($P<0.05$). In kidney, the expression levels descended continually with the increase of exposure time, but no significant differences were detected in different time($P>0.05$). Above results revealed that, in the “GILI” fish which acclimates to environmental salinity over 25, it is primarily the gill chloride cells to secrete the cation ions and to maintain water and salt balance. So, it could be considered that gill plays a leading role in osmoregulation of “GILI” tilapia. Meanwhile, it is expected to revealing the expression mode of *NKCC1a* gene in euryhaline teleosts in fresh, saline and hypersaline water.

Key words: tilapia; *NKCC1a* gene; mRNA expression; tissue-specific change; salinity

Corresponding author: LI Sifa. Tel: 021-61900450; E-mail: sfli@shou.edu.cn