

DOI:10.16378/j.cnki.1003-1111.2019.02.007

碱胁迫下罗非鱼鳃氨转运蛋白 Rh 基因的表达

涂翰卿, 赵金良, 黄思颖, 郝月月, 程亚美, 曹晓颖

(上海海洋大学, 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘 要: 为研究碱环境下广盐性鱼类氨转运途径, 将尼罗罗非鱼同时进行急性碱度胁迫(2、4、6 g/L)和慢性碱度胁迫, 检测胁迫后 120 h 内的血氨浓度与鳃组织中 Rhag、Rhbg、Rhcgl 和 Rhcg2 基因 mRNA 表达变化, 并采用免疫组化技术观察鳃组织中 Rh 蛋白的阳性反应。结果表明, 急性碱度胁迫下, 血氨浓度在 12 h 内快速升高到达峰值, 4 种 Rh 基因表达量升高, 并于 24 h 到达峰值; 慢性碱胁迫组由于碱度不断升高, 血氨浓度呈波动状态, 4 种 Rh 基因的表达量均维持在较高表达水平, 表明几种 Rh 蛋白均可能参与血氨浓度调节。胁迫 24 h, Rhcg1 基因的表达量显著高于其他 3 种基因。免疫组化结果表明, 急性与慢性胁迫组中 Rhag、Rhbg 和 Rhcg 在鳃组织中均发现阳性反应, 且随碱度升高, 阳性反应增强。本研究表明, 在碱胁迫环境下, 尼罗罗非鱼会增强 Rh 基因与蛋白表达量参与氨转运过程。

关键词: 尼罗罗非鱼; 碳酸盐胁迫; 血氨; Rh 蛋白

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1003-1111(2019)02-0194-07

氨是鱼类蛋白质代谢的最终产物之一, 主要在肝脏内通过氨基酸的转氨和脱氨作用产生^[1]。鳃是鱼类对外进行气体、物质交换的重要场所, 还是维持体内酸碱平衡及排氨的重要器官。以往认为, 氨(NH₃的形式)排泄主要是经由鳃上皮细胞以被动外扩散方式排出去^[2], 最新研究显示, 鳃组织中存在一类恒河猴血型相关糖蛋白(Rh 蛋白)专职氨转运, 能以主动转运的方式排氨, 与细菌和植物氨转运载体蛋白(AMT)、酵母甲氨透明质酸酶(MEP)具有较高同源性^[3-4]。Rh 蛋白具有 3 种异构体: Rhag、Rhbg、Rhcgl^[5]。鱼类中最早在红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)鳃组织中鉴定出 Rhag、Rhbg、Rhcgl 和 Rhcg2 4 种不同亚型, 使用基因敲除技术证明其均参与了氨转运过程^[6-7]。在高氨环境下, 虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)鳃组织中 Rhbg、Rhcgl、Rhcg2 基因表达量显著上调^[8]。Rh 蛋白在鱼体内的分布具有特异性, 如 Rhag 位于红细胞上, Rhbg 几乎存在所有组织中, 而 Rhcg 则主要分布在鳃、肾和皮肤等排氨器官中^[3]。鲤鱼(*Cyprinus carpio*)鳃组织中 Rhag、Rhbg、Rhcgl 基因表达水平极显著高于其他组织^[9]。

鱼类在进入碳酸盐型碱性水体中, 血液

HCO₃⁻升高, 直接引起 pH 升高; 由于血液中 H⁺降低, 体内 NH₃ + H⁺ ⇌ NH₄⁺ 平衡的失调, 体内氨主要以 NH₃ 形式存在, 同时, 水环境中 H⁺ 过低, 也无法与转运到体外的 NH₃ 形成 NH₄⁺, 抑制氨转运过程, 最终导致 NH₃ 在鱼体内累积^[10-12]。氨的毒性主要是分子态 NH₃, 因为分子氨相较于离子氨具有更强的脂溶性, 能够穿透细胞膜对机体造成损害^[13]。研究表明, 碱性环境胁迫下, 鱼类体内可能存在两种主要氨代谢途径: 一种是血氨在肝脏中经氨甲酰磷酸合成酶作用合成氨甲酰磷酸, 参与鸟氨酸循环, 生成尿素, 以尿素的形式排出体外^[14-15]; 另一种途径是在肝脏中谷氨酰胺合成酶将血氨转化成无毒的中间产物谷氨酰胺^[16], 最终会在鳃组织中将谷氨酰胺还原成氨, 再排出体外^[17]。前期研究表明, 在尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)鳃组织上发现 Rhcg2 基因的表达升高^[18], 同时也观察到血液中谷氨酰胺含量上升和肝脏谷氨酰胺合成酶表达增强的现象^[19]。为全面探明 Rh 蛋白在氨代谢过程中的作用, 本研究进一步分析碳酸盐碱胁迫下尼罗罗非鱼鳃组织中 Rhag、Rhbg、Rhcgl、Rhcg2 基因的相对表达量变化, 通过免疫组化观察鳃组织 Rhag、Rhbg、Rhcgl 蛋白的细胞定位, 结合血氨的动

收稿日期: 2018-04-25; 修回日期: 2018-07-10。

基金项目: 国家现代农业产业技术体系专项(CARS-46)。

作者简介: 涂翰卿(1993—), 男, 硕士研究生; 研究方向: 水产动物种质资源与遗传育种。E-mail: tuhanqing2010@126.com。通讯作者: 赵金良(1969—), 男, 教授; 研究方向: 水产动物种质资源与遗传育种。E-mail: jlzha@shou.edu.cn。

态变化,分析尼罗罗非鱼 Rh 蛋白氨转运的作用,为广盐性鱼类碱性适应机理研究提供进一步参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验鱼来源于上海海洋大学罗非鱼种质资源试验站,平均体质量约 50 g,试验前将尼罗罗非鱼于室内 0.6 m×0.5 m×0.4 m 淡水水族箱内暂养 14 d,期间正常投喂、排污、换水。正式试验前 3 d 停食,排空肠道粪便,并挑选具有良好体征、活力强的个体进行碱胁迫试验。碱度通过在淡水中添加 NaHCO₃ 调节,配置好后曝气 1 d 备用。使用便携式 HI83200 多参数水质分析仪测量水体碱度并以此作出修正。

参照文献[18]分别设置 2、4、6 g/L NaHCO₃ 的急性胁迫组和初始碱度为 2 g/L NaHCO₃ 并每日提高 1 g/L 的慢性胁迫组,胁迫共进行 120 h。此时慢性胁迫组正好是到达 6 g/L 后 24 h,同时设置 1 个空白对照组。每个试验组放置 20 尾试验鱼,设置 3 个重复。试验期持续充氧,保证溶解氧>3 g/L。

急性胁迫组分别于胁迫 0、2、4、6、12、24、48、72、96、120 h 时自每个试验组随机选取 3 尾鱼,慢性胁迫组于胁迫 24、48、72、96、120 h 时自每个试验组随机取 3 尾鱼。使用注射器自鱼尾端静脉抽血,4 ℃ 静置 12 h 后 3000 r/min,4 ℃,离心 10 min 取上层血清保存在-20 ℃ 冰箱。对鱼进行活体解剖,取出鳃组织分成两部分,一部分置于-80 ℃ 冰箱内保存,另一部分立刻用于免疫组化。

血氨测定试剂盒(南京建成生物公司),RT-

PCR 相关试剂盒(TaKaRa 公司)。Rhag 一抗为兔单克隆抗体、Rhbg 一抗为鼠单克隆抗体(Abcam 公司),Rhcg 一抗为鼠单克隆抗体(Santa 公司)。防脱玻片、SABC 三步法试剂盒(武汉博士德公司和上海威奥生物科技有限公司)。RT-PCR 所用特异性引物均由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 血氨浓度测定

使用试剂盒检测血液中氨的浓度,用 Synergy H1 酶标仪(Bio-tek, USA)检测样本吸光值,建立吸光值与标准品的相关性,换算得出血液样品的实际氨浓度。

1.2.2 Rh 基因 mRNA 相对表达

根据美国国立生物技术信息中心网站已经公布的尼罗罗非鱼 Rh 家族基因 Rhag(登录号:XM_003446300.3)、Rhbg(登录号:XM_003456422.4)、Rhcg1(登录号:XM_003440579.3)、Rhcg2(登录号:XM_005467111.3)的序列,通过使用 Primer 5 软件对序列进行分析设计特异性引物(表 1)。液氮研磨鳃,Trizol 提取总 RNA,用 RNase free ddH₂O 溶解,用 OD-1000 分光光度计(Onedrop, 国产)检测 RNA 含量和 A₂₆₀/A₂₈₀ 值,ABS 值为 1.8~2.1 的样本保留。以总 RNA 为模板作反转录合成 cDNA。按照 SYBR Premix ExTaq 说明书进行 RT-PCR 扩增。反应程序为:95 ℃ 预变性 30 s;95 ℃ 变性 5 s,58~62 ℃ 退火延伸 30 s,40 个循环;95 ℃ 溶解 10 s,65 ℃ 退火 5 s。根据试验结果调整扩增程序,提高扩增效率。采用 2^{-ΔΔCt} 法换算不同基因的相对表达量。

表 1 引物信息

引物	核酸序列(5'→3')	用途	退火温度/℃
Rhag F	ACACGACACCCACAATAACACTGAC	Rhag 基因荧光定量 PCR	59.3
Rhag R	CGCCAAATGAAATCAGGACCGTAGC		60.9
Rhbg F	GCCAGCCTGCACTCTGTCTA	Rhbg 基因荧光定量 PCR	60.2
Rhbg R	GCTTGCTCTCCAGGATGGGT		60.4
Rhcg1 F	CCAGGATGTCCATGTGATGATATTT	Rhcg1 基因荧光定量 PCR	62.0
Rhcg1 R	TTTCAATTCCAATTTTGATCTTCCC		63.0
Rhcg2 F	GCAATTTGGACTGGTTGGA	Rhcg2 基因荧光定量 PCR	52.7
Rhcg2 R	GACTCGTGTGTGTCGTGG		56.4
β-actin F	CAGCAGATGTGGATCAGCAAGC	内参引物	61.9
β-actin R	TGAAGTTGTTGGCGTTTGG		57.8

1.2.3 免疫组化

急性与慢性胁迫 120 h 时间点的鳃组织经生理盐水漂洗后,放入 4% 多聚甲醛中固定 12~16 h,用 1×PBS 溶液冲洗 3 次,逐级经过 30%~100% 梯度酒精脱水,再经二甲苯透明(鳃组织处理 2~3

min),石蜡包埋制作蜡块切片(5 μm),脱蜡复水。敷上 0.3% 的过氧化氢甲醇溶液 10 min 以灭活内源性酶,1×PBS 溶液冲洗 3 次,10% 山羊血清封闭 30 min,血清甩干不冲洗。敷上稀释到合适含量的一抗,4 ℃ 孵育过夜(通常 12 h),再 1×PBS 漂洗 3

次。敷上相应二抗室温孵育 30 min, $1\times$ PBS 漂洗 3 次。敷上辣根过氧化物酶标记的高灵敏度链霉亲和素, 室温 30 min, 水洗后使用 DAB 试剂盒显色 5 min, 苏木精复染 10 s 后自来水冲洗, 再经梯度酒精脱水、二甲苯透明各 10 min, 最后滴加中性树胶封片。其中阴性对照组不敷一抗, 其他步骤均相同。不同碱度下的每种 Rh 蛋白随机选取 5 个 40 倍视野采集成像。

1.2.4 数据分析

试验数据使用 SPSS 22 统计软件分析, 统计试验样本的平均值和标准差, 通过单因素方差分析检测显著性, Duncan 多重比较检测差异性, 以 $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 不同碱胁迫下尼罗罗非鱼血氨浓度的变化

碱胁迫开始后, 空白对照组 (0 g/L) 尼罗罗非鱼血氨较长时间后出现波动但总体变化不显著。急性胁迫组 (2、4、6 g/L) 血氨在 0~12 h 内快速升高达到峰值, 12 h 之后出现回落并维持在高于空白对照组的水平, 呈现随碱度的升高而升高的趋势。

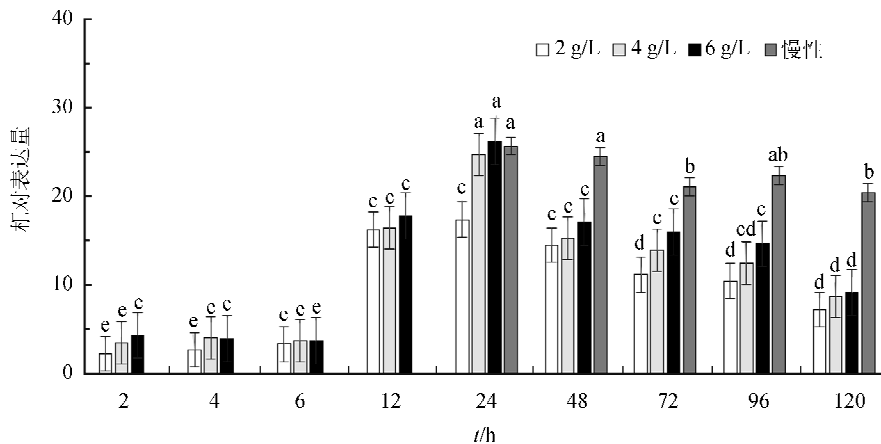


图2 碱胁迫对尼罗罗非鱼鳃 Rhag 基因相对表达量的影响

2.2.2 Rhbg mRNA 的相对表达量变化

急性胁迫组中, 鳃组织中的 Rhbg 基因的相对表达量随时间的变化在 6 h 出现显著上升 ($P < 0.05$), 在 24 h 达峰值, 随后开始下降。慢性胁迫组 Rhbg 基因则在 48 h 达峰值后开始显著下降 ($P < 0.05$) (图 3)。

2.2.3 Rhcg1 mRNA 的相对表达量变化

急性胁迫组中, 鳃组织中的 Rhcg1 基因的相对表达量随时间的变化在 4 h 出现显著上升 ($P < 0.05$), 在 24 h 达峰值后开始显著下降 ($P < 0.05$)。慢性胁迫组在 48 h 达峰值后开始显著下降 ($P <$

慢性胁迫组血氨在 24~120 h 内均高于空白对照组的水平, 呈波动状态 (图 1)。

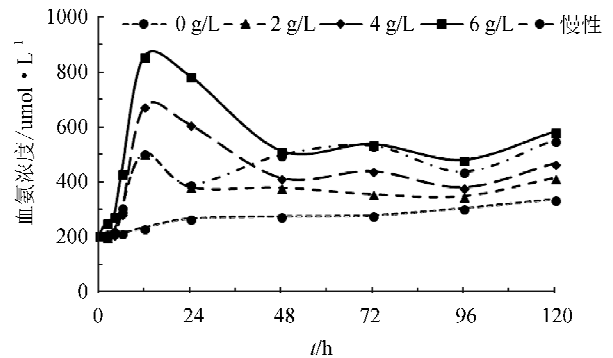


图1 不同碱胁迫对尼罗罗非鱼血氨浓度的影响

2.2 碱胁迫对尼罗罗非鱼鳃组织中 Rh 基因表达量影响

2.2.1 Rhag mRNA 的相对表达量变化

急性胁迫组中, 尼罗罗非鱼鳃组织中的 Rhag 基因的相对表达量随时间的变化在 12 h 开始出现显著上升 ($P < 0.05$), 并于 24 h 达峰值。慢性胁迫组在 24~120 h 内, Rhag 基因表达量均维持在较高水平 (图 2)。

0.05) (图 4)。

2.2.4 Rhcg2 mRNA 的相对表达量变化

急性胁迫组中, 鳃组织中的 Rhcg2 基因的相对表达量随时间的变化在 4 h 出现显著上升 ($P < 0.05$), 并在 24 h 达峰值后开始显著下降 ($P < 0.05$)。慢性胁迫组于 24 h 达峰值后开始显著下降 ($P < 0.05$) (图 5)。

2.2.5 急性胁迫 24 h 4 种 Rh 基因的相对表达量

比较 4 种 Rh 基因各碱度组 24 h 的相对表达量可知, 在鳃组织中 Rhcg1 基因的相对表达量显著高于 Rhag、Rhbg、Rhcg2 基因 ($P < 0.05$) (图 6)。

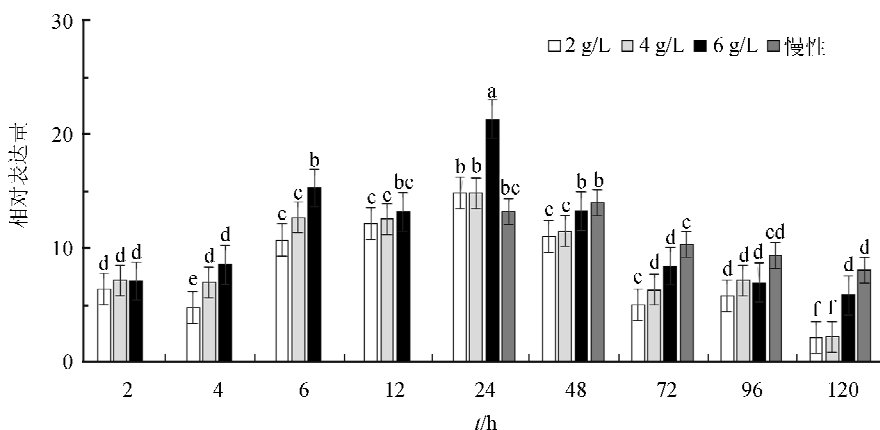


图3 碱胁迫对尼罗罗非鱼鳃 Rhbg 基因相对表达量的影响

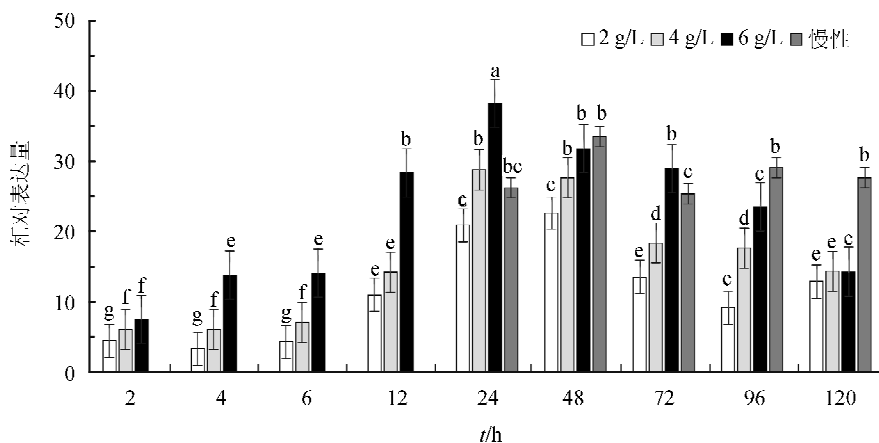


图4 碱胁迫对尼罗罗非鱼鳃 Rhcg1 基因相对表达量的影响

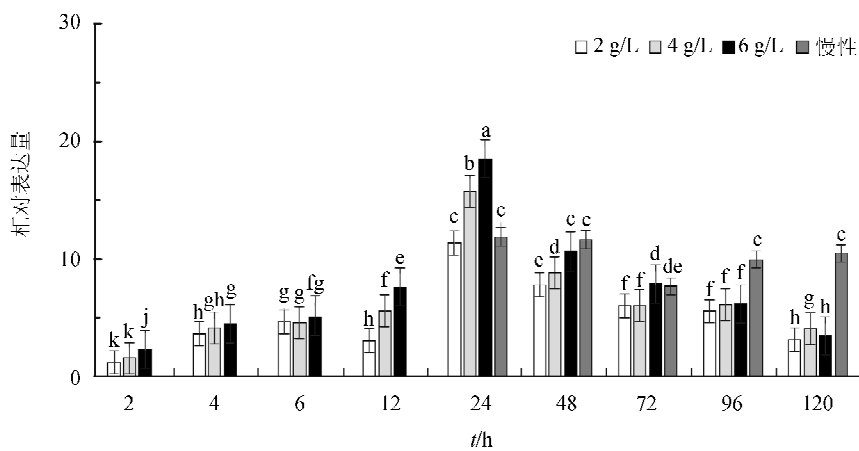


图5 碱胁迫对尼罗罗非鱼鳃 Rhcg2 基因相对表达量的影响

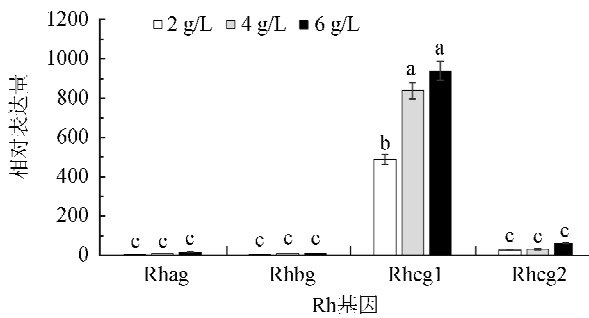


图6 碱胁迫24 h尼罗罗非鱼鳃组织中Rhag、Rhbg、Rhcg1、Rhcg2基因的相对表达量

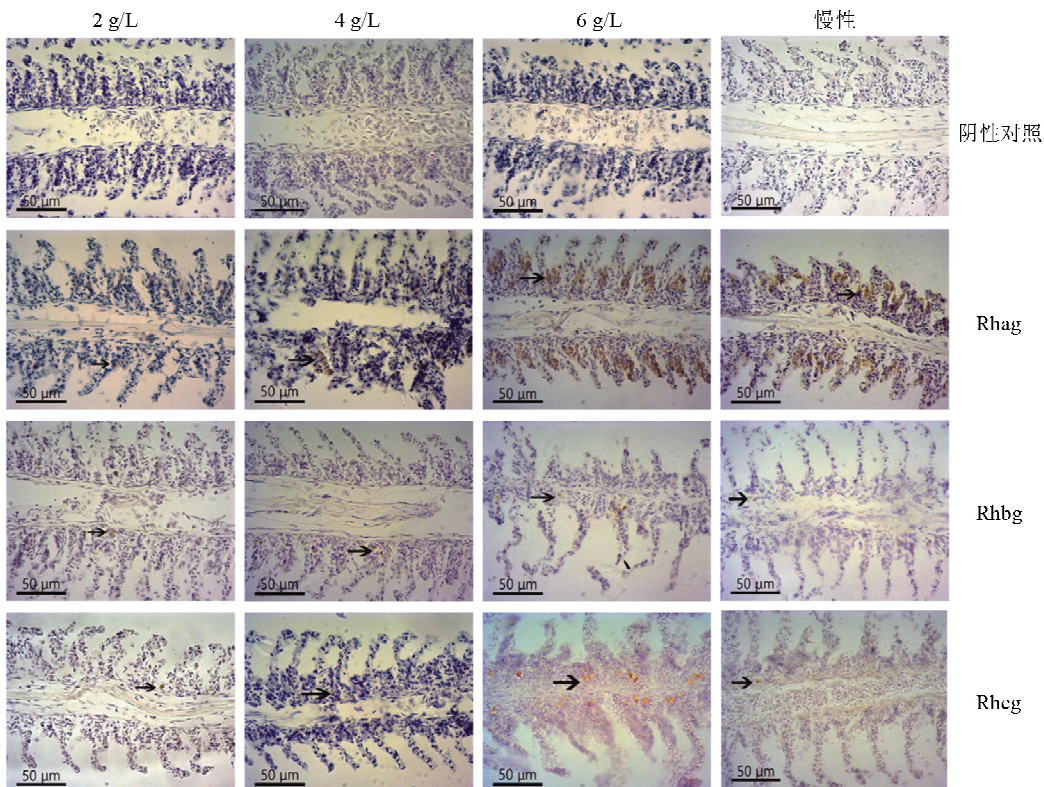


图7 不同碱度下尼罗罗非鱼鳃组织Rh蛋白免疫组化(40×)

3 讨论

3.1 不同碱度胁迫对血氨浓度变化的影响

氨是鱼体内代谢的重要终产物,大部分鱼类的含氮废物是以 NH_3 的形式排泄^[20]。碱胁迫开始后,受外部碱环境的影响,氨的被动扩散受到抑制,鱼体内的 NH_3 开始累积。 NH_3 具有较强的毒性,当 NH_3 含量过高会导致鱼类死亡^[21]。本研究中,急性碱胁迫条件下,尼罗罗非鱼血氨浓度快速上升,于12 h到达峰值,并呈现随碱度升高而升高的趋势,之后逐渐回落并维持在高于空白对照的水平。证明尼罗罗非鱼能通过自身调节适应6 g/L以下碱度环境^[18]。

慢性胁迫组在0~24 h所处条件与2 g/L急性

2.3 免疫组化

免疫组化的结果显示,急性胁迫组中,在鳃组织中分别检测到Rhag、Rhbg和Rhcg免疫阳性反应,且表现出随碱度的升高阳性反应增强的现象,阴性对照组中未发现阳性反应;慢性胁迫组中也在鳃组织中检测到3种Rh蛋白的阳性反应。Rhag免疫阳性细胞主要分布在鳃小片上,Rhbg和Rhcg免疫阳性细胞主要分布在鳃小片的基部(图7)。

胁迫组相同。24 h之后,随着碱度的不断升高,受到新的碱度胁迫,慢性胁迫组血氨浓度均明显高于空白对照水平,并呈现一定的波动。相较于6 g/L急性胁迫,慢性胁迫对血氨浓度的影响持续时间长,但是影响程度轻。这表明慢性胁迫条件下,尼罗罗非鱼能够更好地适应碱环境的变化^[22-23]。

3.2 碱胁迫下Rh基因在鳃组织中的表达特征

前期研究表明,为缓解体内高浓度 NH_3 的毒害作用,尼罗罗非鱼可能存在两种氨代谢途径:一种是尿素代谢,另一种是谷氨酰胺代谢^[18]。其中谷氨酰胺途径是主要的氨代谢途径,此种途径最终会在鳃组织中将谷氨酰胺还原成氨排出体外。研究表明,鱼类Rhag、Rhbg、Rhcg1和Rhcg2具有 NH_3 转运能力,并直接参与鳃组织的主动排 NH_3 ^[24]。本

试验中,急性胁迫组血氨浓度升高在 12 h 到达峰值后开始回落,同时 Rhag、Rhb_g、Rhc_{g1} 和 Rhc_{g2} 基因在鳃组织中的表达显著上调,并于 24 h 到达峰值,并随着血氨开始逐渐下降并趋于稳定水平时,Rh 基因的表达量也开始出现下调,表明 Rh 蛋白参与血氨调节;慢性胁迫组由于碱胁迫持续加强,血氨浓度在 24~120 h 继续波动,相应的 Rh 基因的表达量也依然维持在较高水平,进一步表明,Rh 蛋白确实参与了血氨调节过程。根据在急性碱度胁迫 24 h 时 Rhag、Rhb_g、Rhc_{g1} 和 Rhc_{g2} 基因之间的相对表达水平,Rhc_{g1} 基因的相对表达量显著高于其他 3 种基因($P < 0.05$),推测 Rhc_{g1} 是尼罗罗非鱼鳃组织中重要的氨转运基因,与 Mak 等^[25-26] 研究结果一致。

3.3 碱胁迫下 Rh 蛋白在鳃组织中的表达特征

Rh 蛋白基因在鱼类的鳃、肝、肾等组织中均有表达^[9,18]。免疫组化结果表明,急性胁迫组中 Rhag、Rhb_g 和 Rhc_g 在鳃组织中均发现免疫阳性反应,且随着碱度的升高,阳性反应有增强的现象;慢性胁迫组中也发现阳性反应,但阳性反应要弱于 6 g/L 碱度组。其中 Rhag 是一种红细胞相关蛋白,主要存在红细胞上,免疫组化结果显示,Rhag 的阳性反应在鳃小片上,这是因为鳃小片上密布毛细血管,Rhag 阳性反应可能与鳃小片内大量红细胞的聚集有关。Rhb_g 和 Rhc_g 的阳性反应均位于鳃小片基部的扁平上皮细胞上,与红鳍东方鲀中发现 Rhb_g 位于鳃扁平上皮细胞的基底侧质膜上、Rhc_{g2} 位于顶部质膜^[27],及斑马鱼(*Danio rerio*) Rhc_{g1} 位于鳃上 V 型 H⁺-ATPase 富含线粒体细胞顶膜^[6] 等结果较为类似。结果表明,尼罗罗非鱼 NH₃ 转运过程主要通过鳃小片基部的上皮细胞进行。

本研究表明,在碱胁迫环境下,体内氨的被动扩散受到抑制,引发血氨水平上升,尼罗罗非鱼能够通过加强鳃组织中 Rh 糖蛋白的主动转运氨来参与血氨平衡过程,Rhc_g 蛋白可能是主要转运蛋白。

参考文献:

- [1] Chew S F, Ip Y K. Excretory nitrogen metabolism and defence against ammonia toxicity in air-breathing fishes [J]. *Journal of Fish Biology*, 2014, 84(3): 603-638.
- [2] Wilkie M P. Ammonia excretion and urea handling by fish gills; present understanding and future research challenges [J]. *Journal of Experimental Zoology*, 2002, 293(3): 284-301.
- [3] Wright P A, Wood C M. A new paradigm for ammonia excretion in aquatic animals; role of Rhesus (Rh) glycoproteins [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2009, 212(15): 2303-2312.
- [4] Huang C H, Liu P Z. New insights into the RH superfamily of genes and proteins in erythroid cells and nonerythroid tissues [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2001, 27(1): 90-101.
- [5] Weiner I D, Hamm L L. Molecular mechanisms of renal ammonia transport [J]. *Annual Review of Physiology*, 2007, 69(1): 317-340.
- [6] Nakada T, Westhoff C M, Kato A, et al. Ammonia secretion from fish gill depends on a set of Rh glycoproteins [J]. *Faseb Journal Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2007, 21(4): 1067-1074.
- [7] Nawata C M, Hirose S, Nakada T, et al. Rh glycoprotein expression is modulated in pufferfish (*Takifugu rubripes*) during high environmental ammonia exposure [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2010, 213(18): 3150-3160.
- [8] Nawata C M, Wood C M. MRNA expression analysis of the physiological responses to ammonia infusion in rainbow trout [J]. *Journal of Comparative Physiology B—Biochemical Systemic & Environmental Physiology*, 2009, 179(7): 799-810.
- [9] 董晓丽, 位莹莹, 徐奇友. 鲤 (*Cyprinus carpio*) Rh 糖蛋白家族基因的克隆与组织 mRNA 表达 [J]. *水产学杂志*, 2013(5): 6-10.
- [10] Wilkie M P, Wood C M. The effects of extremely alkaline water (pH 9.5) on rainbow trout gill function and morphology [J]. *Journal of Fish Biology*, 1994, 45(1): 87-98.
- [11] Wood C M, Du J, Rogers J, et al. Przewalski's naked carp (*Gymnocypris przewalskii*): an endangered species taking a metabolic holiday in lake Qinghai, China [J]. *Physiological & Biochemical Zoology*, 2007, 80(1): 59-77.
- [12] Parra J E G, Baldisserotto B. Effect of water pH and hardness on survival and growth of freshwater teleosts [M]. Enfield; Science Publishers, 2007: 135-150.
- [13] Smart G R. Investigations of the toxic mechanisms of ammonia to fish-gas exchange in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) exposed to acutely lethal concentrations [J]. *Journal of Fish Biology*, 1978, 12(1): 93-104.
- [14] Wood C M. Toxic response of the gill [G]//Schlenk D, Benson W H. Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts, London; Taylor & Francis, 2001: 1-89.
- [15] Ip Y K, Chew S F. Ammonia production, excretion, toxicity, and defense in fish; a review [J]. *Frontiers in Physiology*, 2010(1): 134.

- [16] Veauvy C M, McDonald M D, Van A J, et al. Ammonia affects brain nitrogen metabolism but not hydration status in the gulf toadfish (*Opsanus beta*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2005, 74(1):32-46.
- [17] Wlikie M P, Wood C M. Nitrogenous waste excretion, acid-base regulation, and ionoregulation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to extremely alkaline water [J]. *Physiological Zoology*, 1991, 64(4):1069-1086.
- [18] 吴俊伟, 赵金良, 赵岩, 等. 高碳酸盐碱胁迫对尼罗罗非鱼氨代谢基因表达变化的影响 [J]. *中国水产科学*, 2016, 23(6):1290-1299.
- [19] 涂翰卿, 赵金良, 赵岩, 等. 碳酸盐碱胁迫下尼罗罗非鱼氨代谢两种途径时序研究 [J]. *淡水渔业*, 2018, 48(3):25-31.
- [20] Wood C M. Ammonia and Urea Metabolism and Excretion [M]. Boca Raton: CRC Press, 1993:1-20.
- [21] Randall D J, Tsui T K N. Ammonia toxicity in fish [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2002, 45(s1/12):17-23.
- [22] 吴俊伟, 涂翰卿, 笄金华, 等. 尼罗罗非鱼选育二代盐碱耐受性和生长研究 [J]. *水产学杂志*, 2016, 29(3):30-34.
- [23] 涂翰卿, 笄金华, 张艳红, 等. 尼罗罗非鱼盐碱选育三代盐碱耐受及生长性能研究 [J]. *广东农业科学*, 2017, 44(2):154-159.
- [24] Nawata C M, Hung C C, Tsui T K, et al. Ammonia excretion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): evidence for Rh glycoprotein and H⁺-ATPase involvement [J]. *Physiological Genomics*, 2007, 31(3):463-474.
- [25] Mak D O, Dang B, Weiner I D, et al. Characterization of transport by the kidney Rh glycoproteins, Rh-BG and RhCG [J]. *Am J Physiol*, 2006, 290(2):297-305.
- [26] Maloij G M O, Lykkeboe G, Johansen K, et al. Osmoregulation in *Tilapia grahami*: a fish in extreme alkalinity [G] // Schmidt-Nielsen K, Bolis L, Maddrell S H P. *Comparative physiology: water, ions and fluid mechanics*, Cambridge: Cambridge University Press, 1978:229-238.
- [27] Nawata C M, Hung C C, Tsui T K, et al. Ammonia excretion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): evidence for Rh glycoprotein and H⁺-ATPase involvement [J]. *Physiological Genomics*, 2007, 31(3):463-474.

Ammonia Transporter Expression of Rh Protein Gen in Gills of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* under Stress of Alkali

TU Hanqing, ZHAO Jinliang, HUANG Siying, HAO Yueyue, CHENG Yamei, CAO Xiaoying

(Key Laboratory of Freshwater Aquatic Germplasm Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs,

Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding, National

Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Blood ammonia concentration and mRNA expression of Rhag, Rhbg, Rhcg1 and Rhcg2 genes in gill were analyzed in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* with body weight of some 50 g exposed to acute alkalinity (NaHCO₃) stress (2, 4, and 6 g/L) and chronic alkalinity stress for 120 h, and the positive reaction of Rh glycoprotein in gill was determined by immunohistochemistry. The results showed that blood ammonia levels were found to be increased rapidly to peak at 12 h, and the expression of four kinds of Rh genes was increased, with the peak at 24 h, under acute alkalinity stress. The concentration of blood ammonia was fluctuated, and the expression of the four Rh genes was maintained at a high level due to the increasing alkalinity in the chronic alkali stress group, indicating that the four kinds of Rh proteins were involved in the regulation of blood ammonia concentration. There was significantly higher expression in Rhcg1 gene than that in the other three genes at 24 h. The immunohistochemical results showed that Rhag, Rhbg and Rhcg in the acute and chronic stress groups were found to be positive in the gill, with increase with the elevated alkalinity. The findings indicated that Nile tilapia exposed to alkalinity had increase in the expression of Rh gene and protein involved in the process of ammonia transport.

Key words: *Oreochromis niloticus*; carbonate stress; blood ammonia; Rh protein