

黄河高原鳅血红蛋白基因家族全基因组分析及低氧胁迫响应

谭瑾 郭守全 刘丹 张存芳 聂苗苗 寇若彬 姚占雯 田菲 祁得林

GENOME-WIDE ANALYSIS OF THE *TRIPLOPHYSA PAPPENHEIMI* HEMOGLOBIN GENE FAMILY AND ITS RESPONSE TO HYPOXIA STRESS

TAN Jin, GUO Shou-Quan, LIU Dan, ZHANG Cun-Fang, NIE Miao-Miao, KOU Ruo-Bin, YAO Zhan-Wen, TIAN Fei, QI De-Lin

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2025.2024.0325>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

青海湖裸鲤Rh基因家族的全基因组分析及其碳酸盐碱胁迫响应

FULL GENOME ANALYSIS OF THE RH GENE FAMILY IN *GYMNOCYPRIS PRZEWALSKII* AND ITS RESPONSE TO CARBONATE ALKALINE STRESS

水生生物学报. 2024, 48(11): 1822–1834 <https://doi.org/10.7541/2024.2024.0141>

花斑裸鲤胚胎/仔鱼型血红蛋白基因家族成员鉴定与时序表达研究

THE SPATIO TEMPORAL EXPRESSION OF EMBRYO/LARVAL HEMOGLOBIN GENE IN *GYMNOCYPRIS ECKLONI*

水生生物学报. 2022, 46(5): 718–724 <https://doi.org/10.7541/2022.2021.0394>

翘嘴血红蛋白基因Hb α s的克隆、分子特征及系统进化分析

CLONING, MOLECULAR CHARACTERISTIC AND PHYLOGENETICS OF HEMOGLOBIN GENES IN *CULTER ALBURNUS*

水生生物学报. 2021, 45(5): 966–974 <https://doi.org/10.7541/2021.2020.134>

硬骨鱼类血红蛋白转换表达的新模式——以黄河裸裂尻鱼胚胎型血红蛋白研究为例

A NEW PATTERN OF HEMOGLOBIN SWITCHING IN TELEOST FISH—STUDY OF THE EMBRYONIC HEMOGLOBIN IN THE *SCHIZOPYGOPSIS PYLZOWI*

水生生物学报. 2020, 44(6): 1199–1207 <https://doi.org/10.7541/2020.139>

多鳞*gh-1*基因克隆及其低氧胁迫的mRNA表达

CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF *FIH-1* GENE IN *SILLAGO SIHAMA* UNDER HYPOXIA STRESS

水生生物学报. 2020, 44(4): 744–748 <https://doi.org/10.7541/2020.089>

鳊BMP基因家族成员的鉴定、进化及表达分析

GENOME WIDE IDENTIFICATION, PHYLOGENY, AND EXPRESSION OF BONE MORPHOGENETIC PROTEIN GENES IN BIGHEAD CARP (*HYPOPTHALMICHTHYS NOBILIS*)

水生生物学报. 2024, 48(7): 1085–1094 <https://doi.org/10.7541/2024.2023.0314>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2025.2024.0325

CSTR: 32229.14.SSSWXB.2024.0325

黄河高原鳅血红蛋白基因家族全基因组分析及低氧胁迫响应

谭瑾^{1,2} 郭守全^{1,2} 刘丹¹ 张存芳¹ 聂苗苗¹ 寇若彬^{1,2}
姚占雯^{1,2} 田菲³ 祁得林¹

(1. 青海大学省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室, 西宁 810016; 2. 青海大学生态环境工程学院, 西宁 810016;
3. 中国科学院高原生物适应与进化重点实验室, 西宁 810008)

摘要: 为探究血红蛋白基因家族在黄河高原鳅(*Triplophysa pappenheimi*)低氧适应中的作用, 研究基于黄河高原鳅基因组数据对血红蛋白基因家族进行了生物信息学分析, 并开展低氧胁迫和基因表达检测。结果显示, 黄河高原鳅血红蛋白基因家族由11个成员组成, 其中包括6个 α 珠蛋白基因(*hbaa1*、*hbaa2*、*hbae1*、*hbae3*、*hbae4*和*hbae5*)和5个 β 珠蛋白基因(*hbba1*、*hbba2*、*hbbe1.1*、*hbbe1.2*和*hbbe2*)。Motif、Domain及基因结构分析结果均表明该家族成员具有较高的保守性, 除*hbbe2*外, 其余基因结构相似。染色体定位分析结果显示, 血红蛋白基因家族成员分布在2条染色体上(Chr_07、Chr_17)。蛋白理化性质分析结果显示, 除*hbbe1.2*为疏水性不稳定蛋白, 其余基因产物均为疏水性稳定蛋白, 其中*hbae3*、*hbbe1.1*、*hbbe2*为酸性蛋白; 其余8个为碱性蛋白, 其中 α -螺旋是主要的二级结构。亚细胞定位预测结果显示, 除*hbae4*基因产物位于细胞质中, *hbae3*位于细胞质和细胞外; 其余血红蛋白基因均位于线粒体中。基因表达研究表明, 在急性低氧胁迫12h (0.3 ± 0.1 mg/L)后, *hbaa1*、*hbaa2*、*hbba1*和*hbba2*基因在肝脏、鳃和血液中的表达量具有上调趋势, 但是差异不显著($P < 0.05$); 在慢性低氧24h至96h [(3.0 ± 0.1) mg/L]时, *hbaa1*、*hbba1*、*hbaa2*和*hbba2*基因在肝脏和血液中的表达量达到峰值($P < 0.05$), 随着胁迫时间延长, 上述基因的表达量均有所下调。在鳃组织中, *hbaa1*、*hbaa2*和*hbba1*的最高表达量出现在慢性低氧后的196h, 而*hbba2*基因表达峰值出现在24h。研究展示了黄河高原鳅血红蛋白基因家族成员的低氧胁迫表达模式, 为黄河高原鳅的低氧适应机制研究积累科学数据。

关键词: 血红蛋白基因家族; 全基因组分析; 低氧胁迫; 黄河高原鳅

中图分类号: Q344⁺.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2025)05-052506-11



高原鳅属(*Triplophysa*)隶属于鲤形目(Cypriniformes)条鳅科(Nemacheilinae), 是适应于高原特殊水生态环境的主要鱼类群体^[1]。黄河高原鳅(*Triplophysa pappenheimi*)是高原鳅属中底栖小型鱼类, 主要分布在兰州以上黄河上游的干支流激流河段及其附属湖泊, 是适应于青藏高原季节性寒冷环境的代表性鱼类种群之一^[2]。目前, 黄河高原鳅已被列入《中国脊椎动物红色名录》, 属于濒危鱼类(Endangered, EN)^[3]。

血红蛋白(Hemoglobin, Hb), 作为一种关键的氧转运金属蛋白, 存在于几乎所有脊椎动物(除南极冰鱼科)及一些无脊椎动物组织中^[4]。肺、鳃中

的氧气被血液中的血红蛋白运输至体内各组织, 再将各组织中的二氧化碳转运出体外, 从而为生物的新陈代谢提供能量。血红蛋白由4个珠蛋白亚基构成, 每个亚基都具备与一个氧分子结合的能力, 血红蛋白最多可携带4个氧分子。平均每克血红蛋白可结合1.34 mL的氧气, 是血浆溶氧量的70倍^[5]。在一些无脊椎动物^[6]、植物^[7]和真菌^[8]中也发现了血红蛋白及类血红蛋白分子。因此, 无论是在动物、植物还是微生物中, 血红蛋白都发挥着重要的生理作用。斑马鱼拥有多个血红蛋白基因, 可分为 α 和 β 亚型。 α 亚型包括*hbae4*、*hbae5*、*hbaa2*、*hbaa1*、*hbae1*和*hbae3*; β 亚型包括*hbbe3*、*hbba2*、*hbba1*和

收稿日期: 2024-08-29; 修订日期: 2024-11-01

基金项目: 国家自然科学基金(32371578和31960127)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (32371578 and 31960127)]

作者简介: 谭瑾(1999—), 女, 硕士研究生; 研究方向为动物生态学。E-mail: 631999450@qq.com

通信作者: 祁得林(1973—), 男, 博士; 研究方向为动物分子遗传与生态学。E-mail: delinqi@126.com

hbbe1^[9]。 *hbae1*、*hbae3*、*hbae4*、*hbae5*、*hbbe1*和*hbbe3*基因表达在斑马鱼胚胎期和仔鱼期早期发育阶段,称为胚胎型血红蛋白基因;而*hbaa1*、*hbaa2*、*hbba1*和*hbba2*基因表达在斑马鱼晚期发育阶段(成年个体),称为成年型血红蛋白。胚胎型血红蛋白和成年型血红蛋白在斑马鱼不同发育阶段分别发挥运输和储存O₂的功能^[10]。

溶解氧(Dissolved Oxygen, DO)是以分子态溶解在水体中的氧气,水生生物通过获取DO来进行有氧代谢。水体环境以低氧为特征(只有空气氧分压的1/30),并呈现出溶氧的时空波动^[10-14]。水体缺氧常常会导致鱼类摄食量减少、生长速度减慢、生殖力下降,甚至引起死亡^[15-17]。应对低氧环境,鱼类在漫长的进化历程中形成了一整套形态、生理和行为等方面的适应策略。鱼类可通过降低基础代谢率减少耗氧量、提高呼吸频率、加速血液循环、浮出水面呼吸、增强血氧亲和力来应对急性低氧环境^[18-20];而面对时长几天的慢性低氧,鱼类甚至可能通过改变形态特征,如增大鳃丝表面积等来提高其适应能力^[17, 20, 21]。机体亦可启动分子机制应对低氧环境,例如,在长时间低氧环境中,鱼类糖酵解通路相关基因的表达将显著增强^[12],而一些通过氧依赖性产能相关的基因表达和蛋白翻译将受到限制^[20]。通过关键基因的表达调控来帮助鱼类更有效地运输、贮存和利用氧^[22, 23]。对于其他分子机制而言,由血红蛋白基因表达调控介导的低氧应答机制在鱼类低氧适应中发挥着更为直接和重要的作用^[24, 25]。

对鱼类低氧适应相关的研究大多数集中于模式生物及经济鱼类如斑马鱼(*Danio rerio*)、鲤(*Cyprinus carpio*)和鲫(*Carassius auratus*)等,而对高原土著鱼类应对低氧环境的研究鲜有报道。鉴于黄河高原鳅在高原淡水生态系统中的重要地位及对高原环境极强的适应性,本研究以黄河高原鳅为研究对象,首先利用基因组数据鉴定其血红蛋白基因家族成员,并进行生物信息学分析;然后实施急性和慢性低氧胁迫处理,检测血红蛋白基因表达模式。目的在于探讨高原土著鱼类低氧适应的生物学过程和分子机制,为高原土著鱼类生态适应机制、保护生物学等领域的深入研究积累科学数据,同时为高原鱼类的资源保护、创新利用、人工驯养等方面奠定基础。

1 材料与方法

1.1 血红蛋白基因家族成员鉴定

以实验室前期测得的黄河高原鳅基因组序列

(国家基因库生命大数据平台, ID: CNP0006118)构建本地数据库,以NCBI中已公布的斑马鱼胚胎型、成年型血红蛋白编码基因*hbae1* (NM_182940)、*hbae3* (NM_183066)、*hbae4* (NM_001082834)、*hbae5* (NM_001326701)、*hbbe1* (NM_198073)、*hbbe2* (NM_212846)、*hbbe3* (NM_001015058)、*hbaa1* (NM_131257)、*hbaa2* (NM_001013461)、*hbba1* (NM_131020)、*hbba2* (NM_001003431)的CDS序列为搜索条件,通过TBtools软件^[26](E值设置为 ≤ 0.001)进行blast比对,获得黄河高原鳅血红蛋白基因家族成员。为验证通过上述方法是否获得黄河高原鳅血红蛋白基因家族完整库,利用TBtools软件中的“Simple HMM Search”再次对黄河高原鳅基因组数据全面搜索珠蛋白基因家族序列,并鉴定血红蛋白基因序列。通过上述两种方法所获得的基因序列与斑马鱼相应血红蛋白编码序列比对,通过GT-AG原则确定基因内含子和外显子。使用ClustalX^[27]对斑马鱼和黄河高原鳅血红蛋白序列进行比对,然后使用MEGA11^[28]中的邻接法构建进化树,设置循环数为1000次。

1.2 血红蛋白基因结构、染色体定位和蛋白保守结构域分析

使用在线分析工具ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>)进行蛋白理化特征分析和蛋白质三级结构预测;用在线网站Cell-PLoc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/euk-multi-2/>)预测血红蛋白基因家族的亚细胞定位;使用MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>), Select the site distribution设置为6,基于Motif分析成员序列保守特征;用NCBI的Batch CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>)基于Domain分析成员结构的保守性,并用TBtools可视化。使用TBtools进行基因结构和染色体定位分析。

1.3 实验用鱼及低氧胁迫试验

实验用鱼 黄河高原鳅采集于黄河上游支流泽库河(青海省泽库县),运送至青海大学后暂养于循环水养殖车间,水温14—16℃, pH 7.0—8.0左右。随机选择30尾黄河高原鳅用于试验,实验鱼平均全长(11.20±0.60) cm,平均体重(47.30±0.53) g。实验前,将试验用鱼置于水族箱预养3d,用氧泵维持常氧状态。实验期间禁止投喂饵料。

慢性低氧胁迫实验 黄河高原鳅急性和慢性低氧处理实验均在自制水族箱(100 L)中开展,水箱顶部覆盖塑料膜,通过充氮除氧方法降低水体中溶解氧。维持低氧期间,利用HQ便携式电化学分析仪(HQ4300,美国哈希公司)实时监控水体溶解氧情况。

急性低氧处理: 常氧组和处理组各1组, 每组6尾。常氧组用氧泵持续供氧, 溶解氧浓度维持在 (8.4 ± 0.1) mg/L (在室温条件下, 持续供氧时水体溶解氧); 处理组水体进行充氮除氧, 溶解氧在1h内从 (8.4 ± 0.1) mg/L下降到 (0.3 ± 0.1) mg/L (溶解氧降速 1.35 mg/10min), 紧接水体溶解氧 (0.3 ± 0.1) mg/L维持12h。

慢性低氧处理: 常氧组和处理组各1组。常氧组6尾; 处理组共3组(24h、96h、168h), 每组6尾, 共18尾。处理组水体进行充氮除氧, 溶解氧在1h内从 (8.4 ± 0.1) mg/L 1h下降到 (3.0 ± 0.1) mg/L (溶解氧降速 0.9 mg/10min), 维持168h, 期间24h、96h、168h分别取样, 每次取6尾; 对照组用氧泵维持常氧状态。

在低氧处理结束后, 立刻用MS-222麻醉, 用无菌注射器从尾静脉处采集血样, 解剖取肝脏、腮组织, 分成两份, 1份用于转录组测序, 另1份用于荧光定量PCR, 液氮保存备用。

1.4 血红蛋白基因家族基因的组织表达分析

基于RNA-seq的基因表达分析 将采集的肝脏组织、腮组织和血液样本送至百迈客生物科技有限公司进行转录组测序, 以 $\log_2$ (FPKM+1)对转录组数据进行均一化, 并使用TBtools软件绘制热图, 分析各组织Rh基因家族各成员的表达模式。

基于qRT-PCR的基因表达分析 使用TRIzol裂解法提取肝脏、腮和血液总RNA并用NanoDrop 2000微量分光光度计(赛默飞世尔科技有限公司)检测RNA的浓度及质量。使用Prime ScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒(TaKaRa)反转录得到cDNA。用Primer 6.0设计引物(表1), 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。使用实时荧光定量PCR (Quantitative Real-time PCR, qRT-PCR)检测血红蛋白基因家族成员在各组织中的相对表达量, qRT-PCR以 β -actin为内参基因, 使用TB GreenTM Premix Ex TapTM II 试剂盒(TaKaRa)在LightCycler[®] 480 II 实时荧光定量PCR仪(罗氏诊断产品(上海)有限公司)上测定Ct值, 每份样品重复3次, 以0样品为对照, 使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法^[29]计算相对表达量。

2 结果

2.1 血红蛋白基因家族成员的鉴定及蛋白理化性质

通过与斑马鱼血红蛋白基因家族成员blast比对, “Simple HMM Search”进行验证, 在黄河高原鳅中共鉴定出11个血红蛋白基因家族成员。以斑马鱼脑红蛋白(NGB)为外群构建的系统进化树显示, 斑马鱼和黄河高原鳅血红蛋白家族分别形成 α 和 β 珠蛋白两个族群(图1)。按照斑马鱼血红蛋白家

族的命名法^[10], 将黄河高原鳅基因家族11个成员命名为hbaa1、hbaa2、hbae1、hbae3、hbae4、hbae5、hbba1、hbba2、hbbe1.1、hbbe1.2和hbbe2。黄河高原鳅11个血红蛋白基因的编码序列(CDS)长度为426—528 bp, 编码氨基酸长度在141—175个。蛋白理化性质分析显示(表2), 分子量(Molecular weight)介于15552.07 (hbaa1)—19411.69 Da (hbae3); 蛋白理论等电点(pI)为6.37—9.58, 其中hbae3、hbbe1.1、hbbe3为酸性蛋白, 其余8个为碱性蛋白; 脂溶性指数(Aliphatic index)在88.98—112.57; 亲水性平均指数(Grand average of hydropathicity)为0.092, 不稳定性指数(Instability index)在9.9—96.87。除hbbe1.2外, 其余蛋白不稳定指数均小于40^[30], 说明hbbe1.2为疏水性不稳定蛋白, 其余血红蛋白均为疏水性稳定蛋白。

2.2 血红蛋白基因亚细胞定位预测和二三级结构预测

蛋白质二级结构预测结果显示(表3), 血红蛋

表1 用于qRT-PCR分析的引物序列

Tab. 1 Primer sequences for qRT-PCR analysis

基因 Gene	序列 Sequence (5'—3')	退火温度 Annealing temperature (°C)
β -actin F	GAACCCCAAGGCTAACAGAGAA	56.9
β -actin R	AGGCATACAGGGACAGCACA	59.1
hbae1 F	TGGTGTGGTGAAGCTGTTGAGAA	58.8
hbae1 R	GCCAGAACGACGAGTATGTTGTGA	59.3
hbae3 F	GAGCCAGGAACCTTATCCACAGACA	58.7
hbae3 R	CCTCAGACCAAGACCTACTTCTCC	58.8
hbae4 F	CATTACGCTGCCACGGGAAGAA	60.4
hbae4 R	TGCTGAGGTGTGCCAGTGTAGT	61.2
hbae5 F	TCTCACTGGAGCGACCTGACAC	61.7
hbae5 R	GGAAGAGCATGGCAATCACACAAG	59.0
hbbe1.1 F	TACAACGCCGCCGCCATCAT	63.2
hbbe1.1 R	RGAGGAGACCACAACAGCGAGGAA	61.6
hbbe1.2 F	TACAACGCCGCCGCCATCAT	63.2
hbbe1.2 R	RAGAGACCACAACAGCGAGGAACCTT	60.5
hbbe2 F	ACTCAGCGGTACTTCGGCAGTT	61.3
hbbe2 R	GCAGCAATCACGATAGTCAGGCAAT	59.8
hbaa1 F	GACAAGGACAAGGCTGCCGTAAG	61.0
hbaa1 R	TGAGCGAAGTAGGTCTTGGTCTGAG	60.3
hbba2 F	ACGATCTTGTGTGGATTGAGCAA	58.7
hbba2 R	AGCAGATACAGCCGACAGGAACCT	60.5
hbba1 F	TCCACCTTCGGCAACCTGTCA	61.8
hbba1 R	AGCGGACACGACCACAGACA	61.9
hbba2 F	GCCTTTACGCCAACTAAGCAAACCT	58.1
hbba2 R	GCCACGACGACAGACAGGAATT	60.1

白由 α -螺旋(Alpha-helix)、 β -折叠(Beta-turn)、无规则卷曲(Random coil)和延伸链(Extended strand)4种二级结构元件组成,其中 α -螺旋是主要的二级结构,占比介于73.47%—58.29%,无规则卷曲和延伸链在蛋白结构中占比分别在25.87%—14.97%和13.14%—4.76%,而 β -折叠的占比均低于7%。亚细胞定位预

测显示, *hbae4*位于细胞质中, *hbae3*位于细胞质和细胞外, 其余血红蛋白基因均位于线粒体中。黄河高原鳅血红蛋白三级结构预测显示, 与二级结构预测一致, 血红蛋白主要由 α -螺旋组成(图2)。

2.3 血红蛋白基因家族成员蛋白结构域分析

以6个motif作为查询上限, 血红蛋白基因家族

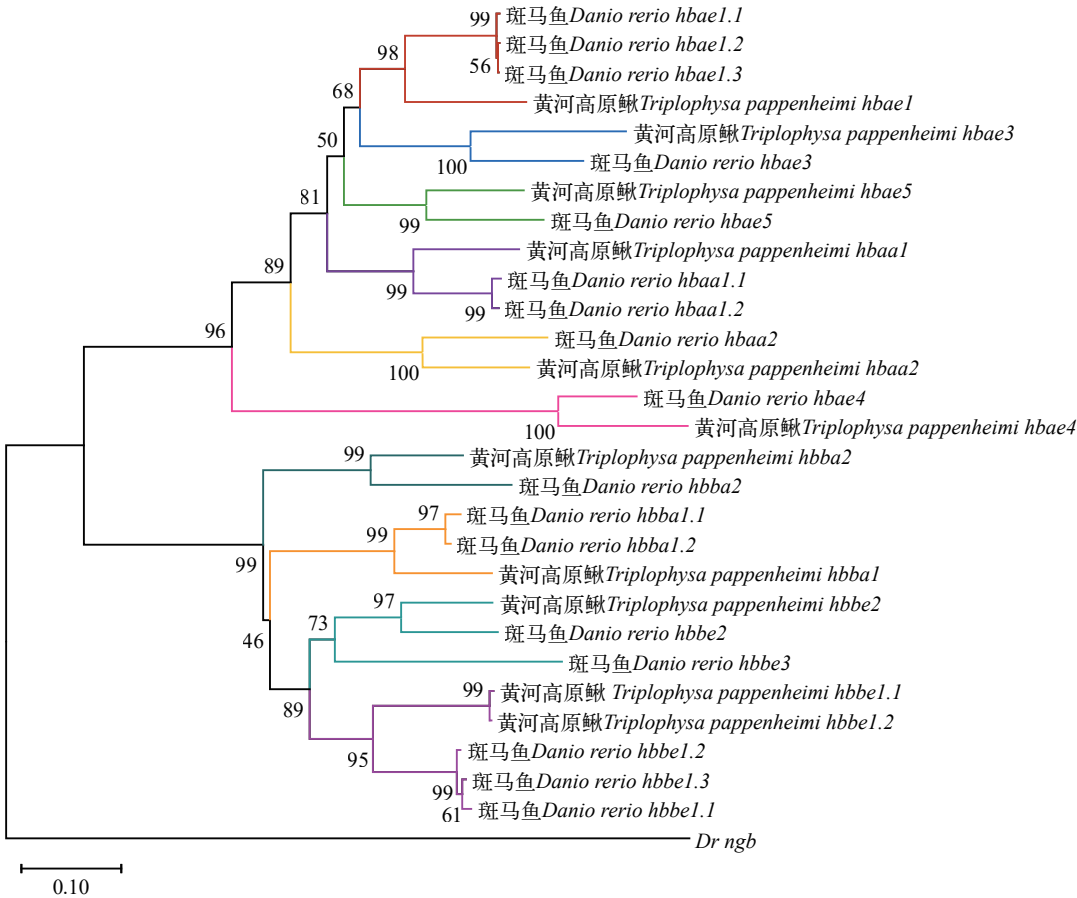


图1 斑马鱼和黄河高原鳅血红蛋白系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of hemoglobin from *Danio rerio* and *Triplophysa pappenheimi* based on the protein sequences

表2 黄河高原鳅血红蛋白基因家族成员理化性质

Tab. 2 Physical and chemical properties of hemoglobin gene family members in <i>Triplophysa pappenheimi</i>							
基因 Gene	CDS长度 CDS length (bp)	氨基酸数目 Number of amino acid	分子量 Molecular weight (ku)	理论等电点 Theoretical isoelectric point	脂溶性指数 Aliphatic index	亲水性平均值 Grand average of hydropathicity	不稳定性指数 Instability index
<i>hbae1</i>	444	143	15615.17	9.16	103.71	0.064	23.46
<i>hbae3</i>	528	175	19411.69	6.37	112.57	0.245	24.81
<i>hbae4</i>	426	141	15971.74	9.58	94.89	0.040	39.90
<i>hbae5</i>	432	143	15796.51	9.04	101.68	0.121	24.35
<i>hbbe1.1</i>	444	147	16417.94	6.96	96.87	0.083	16.63
<i>hbbe1.2</i>	444	147	16426.95	7.01	96.87	0.085	96.87
<i>hbbe2</i>	444	147	16786.39	6.90	94.22	-0.073	11.10
<i>hbba1</i>	432	143	15552.07	8.89	99.65	0.129	21.91
<i>hbba2</i>	432	143	15556.10	9.33	100.98	0.097	16.03
<i>hbba1</i>	444	147	16113.64	7.70	88.98	0.086	20.53
<i>hbba2</i>	444	147	16181.79	8.89	99.52	0.134	9.90

各成员不同聚类组间的motif分布差异较小(图 3a), hbae3多出3'端的motif 5、motif 6; hbae4缺少5'端的motif 2、motif 4, 而多出motif 5和motif 6; 其余组的成员均有4个motif。

Domain分析显示(图 3b), hbba1、hbba2、hbbe1.1、hbbe1.2、hbbe2属于 β 型血红蛋白基因家族, hbaa1、hbaa2、hbae1、hbae3、hbae4、hbae5属于 α 型血红蛋白基因家族。不同组内部的motif分布较为均匀, 其结构域相似, 具有较高的保守性。基因结构分析显示(图 3c), 11个血红蛋白基因均由3个外显子组成。

2.4 血红蛋白基因家族染色体定位分析

根据基因组注释文件中获取的黄河高原鳅血红蛋白基因家族所在染色体位置信息, 对血红蛋白基因家族成员在染色体分布进行可视化分析, 获得染色体定位图(图 4)。11个血红蛋白基因家族成员

表 3 黄河高原鳅血红蛋白基因家族成员二级结构和亚细胞定位
Tab. 3 Secondary structure and subcellular localization of hemoglobin gene family members in *Triplophysa pappenheimi*

基因 Gene	α -螺旋 Alpha-helix (%)	β -折叠 Beta-turn (%)	无规卷曲 Random coil (%)	延伸链 Extended strand (%)	亚细胞定位 Subcellular localization
hbae1	66.43	4.20	19.58	9.79	Mitochondrion
hbae3	58.29	6.29	22.29	13.14	Cytoplasm, Extracell
hbae4	63.83	4.26	22.70	9.22	Cytoplasm
hbae5	65.73	4.20	21.68	8.39	Mitochondrion
hbbe1.1	65.31	6.80	17.69	10.20	Mitochondrion
hbbe1.2	70.75	6.12	17.01	6.12	Mitochondrion
hbbe2	63.27	3.40	24.49	8.84	Mitochondrion
hbaa1	67.13	4.90	16.78	11.19	Mitochondrion
hbaa2	61.54	4.20	25.87	8.39	Mitochondrion
hbba1	73.47	6.80	14.97	4.76	Mitochondrion
hbba2	70.07	6.12	19.05	4.76	Mitochondrion

分布在2条染色体上, hbae1、hbae3、hbbe1.1、hbbe1.2、hbaa1、hbaa2、hbba1、hbba2分布在Chr 07上, 而hbae4、hbbe2、hbbe5分布在Chr 17上。

2.5 血红蛋白基因在不同组织中的低氧胁迫响应模式

在本研究中, 首先利用RNA-seq方法检测了黄河高原鳅急性低氧胁迫后肝脏、鳃和血液中所有血红蛋白基因的表达模式(已上传国家基因组生命大数据平台<https://db.cngb.org/>, ID: CNP0006110)。基于FPKM (The fragments kilobase of exon model per million)组织表达量检测结果显示(表 4和图 5), 在常氧条件下, hbaa1、hbaa2、hbba1和hbba2基因在黄河高原鳅肝脏、鳃和血液中高表达, 而hbae4、hbbe1和hbbe2为微量表达基因, 其他3个基因(hbae1、hbae3和hbae5)均无表达; 在急性低氧胁迫12h后, hbaa1、hbaa2、hbba1和hbba2基因在肝脏、鳃和血液中的表达量略微上调, 而hbae4、hbbe1和hbbe2基因在组织和血液中的表达量基本维持不变; 在慢性低氧条件下, hbaa1、hbaa2、hbba1和hbba2在肝脏和鳃中的表达量呈现出先上升后下降的趋势; 在慢性低氧24h至96h时, 上述4个基因的表达量比对照上调2—3倍, 而在慢性低氧至168h时, 4个基因的表达量明显下降, 接近对照的表达量或略有上调。与肝脏和鳃相反, 在慢性低氧24h时, 血液中hbaa1、hbaa2、hbba1和hbba2基因表达量显著下调, 只有对照的一半左右, 而在慢性低氧96h和168h时, 血液中上述4个基因的表达量上升至对照水平或略高。总体而言, 无论是常氧还是在低氧条件下, hbaa1和hbba1基因对在组织和血液中的表达量远高于hbaa2和hbba2基因对的表达量。

接着, 用qRT-PCR方法检测了黄河高原鳅急性低氧胁迫后肝脏、鳃和血液中血红蛋白基因的

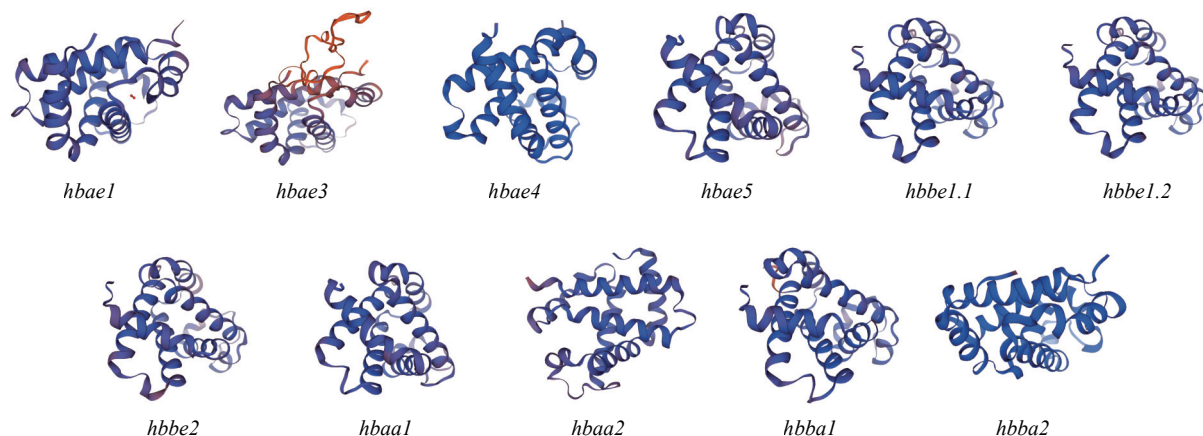


图 2 黄河高原鳅血红蛋白三级结构模型

Fig. 2 Protein tertiary structure model of Hemoglobin in *Triplophysa pappenheimi*

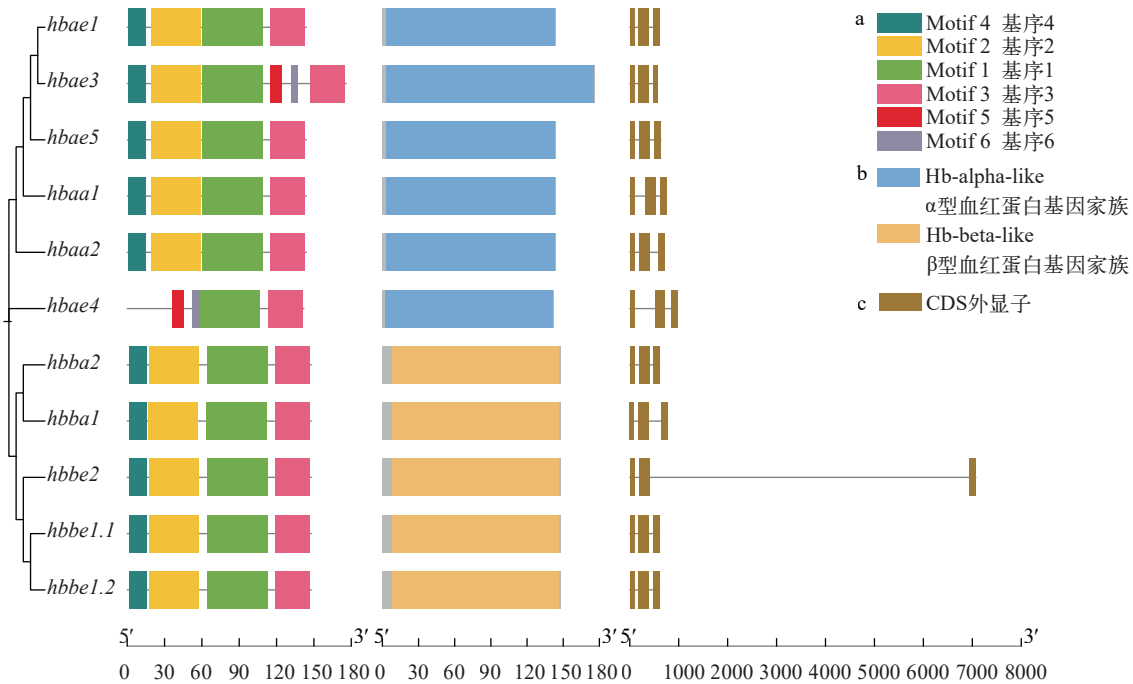


图3 黄河高原鳅血红蛋白基因家族的Motif基序(a)、Domain结构域(b)及基因结构(c)

Fig. 3 Motif (a), domain (b), and gene structure (c) of the hemoglobin gene family in *Triplophysa pappenheimi*

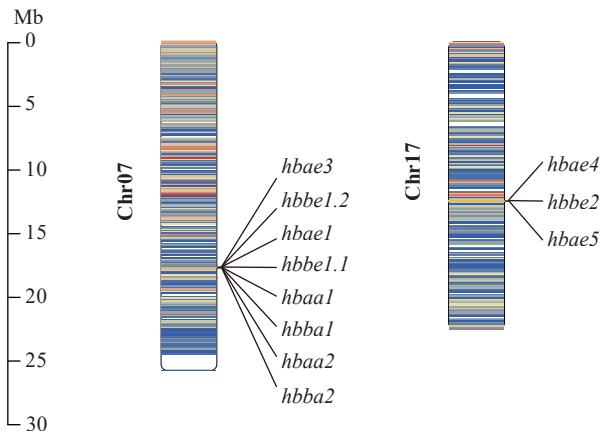


图4 黄河高原鳅血红蛋白基因在染色体上的分布

Fig. 4 Distribution of hemoglobin gene on chromosomes in *Triplophysa pappenheimi*

表达模式(图6), 因*hbae4*、*hbbe1*和*hbbe2*基因表达量低且不稳定, 此处仅展示*hbaa1*、*hbba1*、*hbaa2*和*hbba2*基因的表达结果。结果显示, qRT-PCR检测结果与RNA-seq结果基本相一致。在急性低氧胁迫12h后, *hbaa1*、*hbaa2*、*hbba1*和*hbba2*基因在肝脏、鳃和血液中的表达量具有上调趋势, 但是差异不显著($P < 0.05$); 在慢性低氧24h至96h时, *hbaa1*、*hbba1*、*hbaa2*和*hbba2*基因在肝脏和血液中的表达量达到峰值($P < 0.05$), 随着胁迫时间的延长, 上述基因的表达量有所下调。在鳃组织中, *hbaa1*、*hbaa2*和*hbba1*的最高表达量出现在慢性低氧后的196h,

而*hbba2*基因表达峰值出现在24h。

3 讨论

3.1 黄河高原鳅血红蛋白基因库及其进化

与其他脊椎动物相比, 硬骨鱼拥有相对较大的血红蛋白基因库, 而且在不同鱼类之间血红蛋白基因家族的大小和成员组成具有明显的差异^[10, 31, 32]。比如, 斑马鱼基因组拥有17个血红蛋白基因, 其中11个基因(*hbae1.1*、*hbae1.2*、*hbae1.3*、*hbbe1.1*、*hbbe1.2*、*hbbe1.3*、*hbae3*、*hbae4*、*hbae5*、*hbbe2*、*hbbe3*)编码7个胚胎/仔鱼型血红蛋白(*hbae1*、*hbbe1*、*hbae3*、*hbae4*、*hbae5*、*hbbe2*和*hbbe3*), 6个基因(*hbaa1.1*、*hbaa1.2*、*hbba1.1*、*hbba1.2*、*hbaa2*和*hbba2*)编码4个成年型血红蛋白(*hbaa1*、*hbba1*、*hbaa2*和*hbba2*)^[10, 31]。花斑裸鲤(*Gymnocypris eckloni*)基因组拥有19个血红蛋白基因, 分别编码5个胚胎/仔鱼型血红蛋白(*hbae1*、*hbae4*、*hbae5*、*hbbe1*和*hbbe3*), 以及4个成年型血红蛋白(*hbaa1*、*hbaa2*、*hbba1*和*hbba2*)^[33]。鲤(*Cyprinus carpio*)、鲫(*Carassius auratus*)和滇池金线鲃(*Sinocyclocheilus grahami*)基因组拥有更多的血红蛋白基因^[25]。

硬骨鱼类血红蛋白基因数量和种类的变化是鱼类在长期的进化历程中由于基因组加倍和基因复制或删除的结果^[10]。研究表明, 在脊椎动物共同祖先发生两轮全基因组复制^[34-38], 硬骨鱼类经历了第三轮全基因组复制^[39], 这次硬骨鱼类特异性基因

组复制(Teleost-specific genome duplication, TGD)事件及基因的复制或删除事件对硬骨鱼类血红蛋白基因和功能多样性产生了深刻的影响^[10, 40]。以往研究发现^[25], 大部分二倍体鱼类的血红蛋白基因由非连锁的2个基因簇(LA和MN基因簇)组成, 分别分布在2条染色体或连锁群上, 被认为源自硬骨鱼类特异性基因组复制。比如, 斑马鱼和露斯塔野鲮(*Labeo rohita*)是典型的二倍体鱼类, 它们的基因组分别拥有17和16个血红蛋白基因, 均分布在2条染色体上; 而鲤(*Cyprinus carpio*)、鲫(*Carassius auratus*)和滇池金线鲃(*Sinocyclocheilus grahami*)被认为是四倍体鱼类, 经历了硬骨鱼类特异性基因组复制后的另一轮基因组复制事件, 它们的基因组拥有更

多数量的血红蛋白基因, 并且分布在3—4个基因簇上。本研究通过本地数据库搜索, 在黄河高原鳅基因组中鉴定到11个血红蛋白基因(*hbaa1*、*hbaa2*、*hbae1*、*hbae3*、*hbae4*、*hbae5*、*hbba1*、*hbba2*、*hbbe1.1*、*hbbe1.2*和*hbbe2*), 且与斑马鱼和露斯塔野鲮相同, 其血红蛋白基因分布在2个连锁群上, 由此推断黄河高原鳅是二倍体鱼类^[41], 其血红蛋白基因库源自硬骨鱼类特异性基因组复制。但是, 与斑马鱼和露斯塔野鲮相比, 黄河高原鳅血红蛋白基因数量明显偏少, 对此最有可能的解释是在黄河高原鳅基因组进化过程中发生了特定基因的丢失^[10, 25]。

3.2 黄河高原鳅血红蛋白理化性质

除*hbbe1.1*、*hbbe2*、*hbae3*之外, Hb蛋白的理

表 4 基于转录组数据的血红蛋白基因在不同组织中的相对表达量

Tab. 4 The relative expression of hemoglobin genes in different tissues based on RNA-seq data

组织Tissue	时间Time (h)	基因相对表达量 Relative expression of gene						
		<i>hbae4</i>	<i>hbbe1</i>	<i>hbbe2</i>	<i>hbaa1</i>	<i>hbaa2</i>	<i>hbba1</i>	<i>hbba2</i>
肝脏Liver	0	0.06	0.22	0.63	447.34	150.68	447.78	48.50
	12	0.07	0.22	0.52	481.01	204.95	676.54	70.12
	24	0.12	0.35	0.50	1333.31	554.80	1336.64	177.50
	96	0.16	0.31	0.33	1192.53	448.94	1109.33	113.44
	168	0.13	0.30	0.62	835.76	354.51	871.58	71.14
鳃Gill	0	0.35	0.51	0.04	2253.08	957.55	2217.45	264.53
	12	0.58	2.14	10.16	4603.07	2103.87	6968.25	776.39
	24	1.26	1.34	4.46	6961.28	3612.67	6321.26	996.59
	96	1.13	2.00	0.58	8994.12	3892.07	8518.22	857.03
	168	0.73	1.75	1.82	3693.78	1528.61	4072.82	285.90
血液Blood	0	23.77	42.62	0.40	163575.34	64712.88	189796.58	20481.05
	12	15.11	96.02	3.22	187315.80	82866.30	331174.66	39786.25
	24	13.01	16.84	9.21	102190.19	43706.21	127182.48	16116.07
	96	21.54	58.55	1.13	222169.69	87838.61	226260.85	24392.49
	168	29.12	86.19	17.44	201510.76	66919.83	217962.24	19762.22

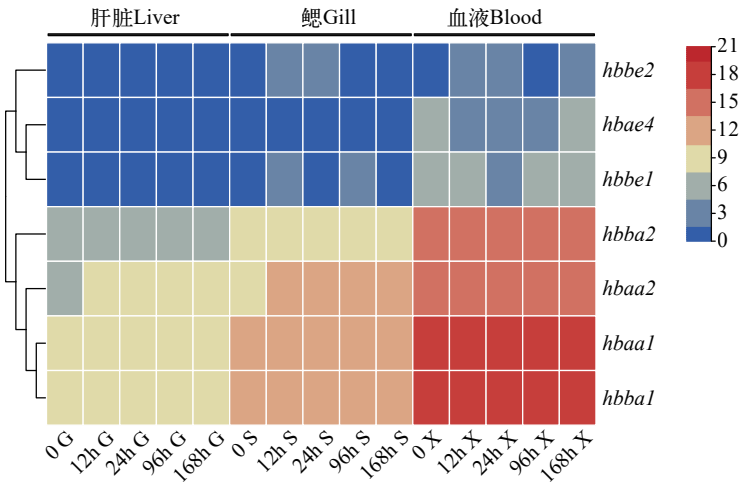


图 5 血红蛋白基因在不同组织的表达热图

Fig. 5 Heat map of hemoglobin gene expression in different tissues

论等电点均大于7, 这表明除*hbbe1.1*、*hbbe2*、*hbae3*之外的基因产物是碱性蛋白, 而*hbbe1.1*、*hbbe2*、*hbae3*是酸性蛋白; 亲水性平均指数除*hbbe2*为负数, 其余均为正值, 不稳定指数除*hbbe1.2*大于40, 其余均小于40^[42], 说明所有除*hbbe2*和*hbbe1.2*的血红蛋白

白均为疏水性稳定蛋白; 亚细胞定位显示除*hbae4*蛋白定位于细胞质上, *hbae3*位于细胞质与细胞外, 其余均定位于线粒体上, 表明它们属于线粒体蛋白。氧的代谢主要是在线粒体中进行, 线粒体是参与机体低氧调控的主要细胞器之一, 其对低氧环境极为敏感。在低氧环境中, 线粒体中电子受体氧分子供应不足, 进而导致活性氧(ROS)的大量产生^[43]。蛋白质的三级结构模型显示, 与二级结构预测一致, 血红蛋白主要由 α -螺旋组成。

3.3 黄河高原鳅血红蛋白基因对低氧胁迫的响应

黄河高原鳅11个血红蛋白基因家族成员分布在假定染色体Chr 07和Chr 17上, 也就是MN基因簇位于Chr07染色体上, 包括*hbae1*、*hbae3*、*hbbe1.1*、*hbbe1.2*、*hbaa1*、*hbaa2*、*hbba1*和*hbba2*基因; LA基因簇位于Chr 17染色体上, 包括*hbae4*、*hbbe2*和*hbbe5*基因。在二倍体鱼类中, 早期发育阶段(胚胎期、仔鱼期)主要表达的血红蛋白基因是位于LA基因簇的*hbae3*、*hbae5*、*hbbe2*、*hbbe3*, 以及MN基因簇3'端的*hbae1*、*hbbe1*和*hbae3*基因; 在发育后期(幼鱼期、成年期)主要表达的血红蛋白基因是位于MN基因簇5'端的*hbaa1*、*hbaa2*、*hbba1*和*hbba2*^[25]。在花斑裸鲤(*Gymnocypris eckloni*)和黄河裸裂尻鱼(*Schizopygopsis pylzovi*)中, 不是所有的位于LA基因簇的基因都在早期发育阶段表达, 也不是只有MN基因簇5'端的基因在发育后期表达^[30, 32]。本研究中黄河高原鳅样本均为成体, RNA-seq和qRT-PCR检测结果均表明, 胚胎/仔鱼型血红蛋白基因*hbae1*、*hbae3*、*hbae4*、*hbae5*、*hbbe1*和*hbbe2*在成体中不表达或微量表达, 而成年型血红蛋白基因*hbaa1*、*hbaa2*、*hbba1*和*hbba2*均为高表达, 该结果与已有研究相一致^[31, 32, 44]。

应对低氧环境, 不同鱼类血红蛋白表达模式有所不同。比如, 成年型斑马鱼在慢性低氧和急性低氧48h后, 其组织中成年型血红蛋白基因*hbaa*和*hbba*转录水平的表达量显著下降^[10]; 而成年型鲫(*Carassius auratus*)在同样急慢性低氧条件下其 α 和 β 珠蛋白转录水平的表达量基本保持不变^[12]; 但是, 青鳉在急慢性低氧条件下其血红蛋白基因转录水平的表达量明显上调^[45]。前期课题组的研究发现, 黄河裸裂尻鱼在急性低氧(DOC=0.3 mg/L) 4h后, 其肝胰脏、脾脏和肾脏中*hbaa*和*hbba*转录水平的表达量显著降低; 在慢性低氧(DOC=3.0 mg/L) 12h时, *hbaa*和*hbba*在肾脏中的表达量明显上升, 之后持续降低, 而在脾脏和肝胰脏中, 慢性低氧12h、24h、36h、48h、60h和72h后*hbaa*和*hbba*的表达量明显降低^[24]。在本研究中, 急性低氧胁迫12h后,

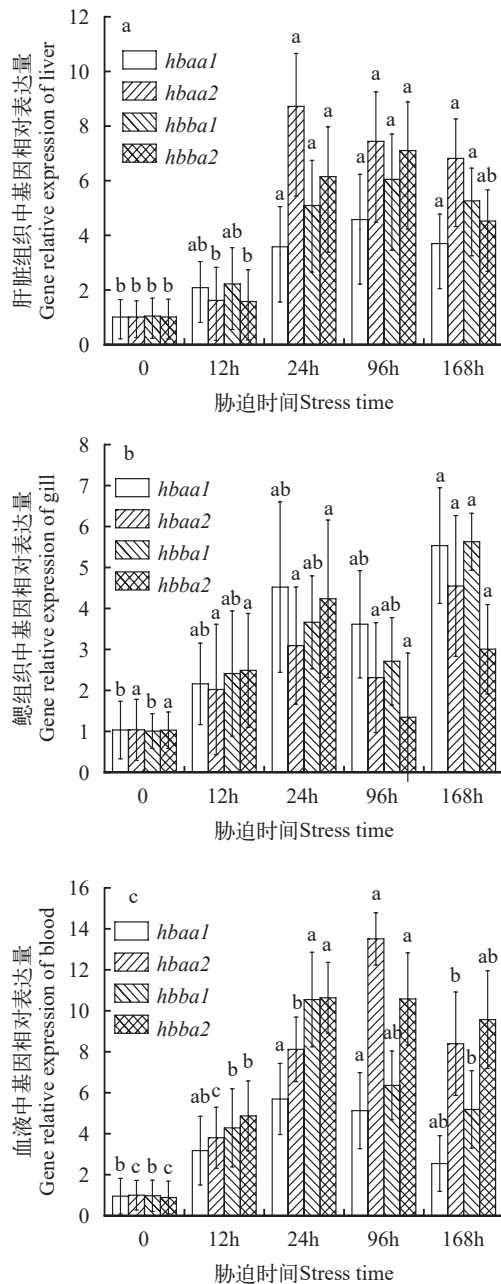


图6 血红蛋白各基因在各组织中的表达量

Fig. 6 Expression levels of hemoglobin gene in various tissues

a. 肝脏组织中的相对表达量; b. 鳃组织中的相对表达量; c. 血液中的相对表达量; 相同字母表示差异不显著($P>0.05$); 不同字母表示差异显著($P<0.05$)

a. Relative expression in liver; b. Relative expression in gill; c. Relative expression in blood; The same letter indicates no significant difference ($P>0.05$), while different letters indicate significant differences ($P<0.05$)

hbba1、*hbba2*、*hbba1*和*hbba2*基因在黄河高原鳅肝脏、鳃和血液中的表达量略微上调;在慢性低氧条件下,*hbba1*、*hbba2*、*hbba1*和*hbba2*在肝脏和鳃中的表达量呈现出先上升后下降的趋势;与肝脏和鳃相反,在慢性低氧24h时,血液中*hbba1*、*hbba2*、*hbba1*和*hbba2*基因表达量显著下调,而在慢性低氧96h和168h时,血液中上述4个基因的表达量上升至0h水平或略高。同时发现,黄河高原鳅*hbba1*-*hbba1*基因对在低氧条件下的表达量及其变化幅度远大于*hbba2*-*hbba2*基因对,揭示*hbba1*-*hbba1*基因对针对低氧环境的敏感性要高于*hbba2*-*hbba2*基因对,表明*hbba1*-*hbba1*基因对在黄河高原鳅低氧适应中发挥主导作用。

目前针对鱼类血红蛋白的低氧适应性表达调控存在三种解释,一是低氧条件下关闭血红蛋白转录合成机器,启动机体的节能机制^[10];二是增强血红蛋白转录水平,提高血液输氧能力,保障组织脏器官在低氧条件下的需氧^[45];三是节能和储血调控机制^[24]。在本研究中,急性低氧引起黄河高原鳅组织器官和血液中血红蛋白表达量上调,在慢性低氧条件下肝脏和鳃呈现出先上升后下降的趋势,其可能的解释是鳃和肝脏是鱼类最为重要且敏感的组织,低氧初期为保证重要器官的生理机能,血循环中的血红蛋白向重要器官集中,引起重要组织器官表达量暂时上升,而血液中血红蛋白表达量明显下降。随着低氧时间的延长,造血器官增强血红蛋白转录机器,致使血循环中的表达量逐步恢复。尽管RNA-seq和qRT-PCR数据基本支持这一推断,但是还需进一步深入研究证实。

(作者声明本文符合出版伦理要求)

参考文献:

- [1] Chen Y Y. Fauna Sinica, Osteichthyes, Cypriniformes II [M]. Beijing: Science Press, 1998: 389-393. [陈宜瑜. 中国动物志·硬骨鱼纲·鲤形目(中卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1998: 389-393.]
- [2] Zhu S Q. Chinese Nemacheilinae [M]. Nanjing: Jiangsu Science and Technology Press, 1989: 101-102. [朱松泉. 中国条鳅志 [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1989: 101-102.]
- [3] Cao L, Zhang E, Zang C X, et al. Evaluating the status of China's continental fish and analyzing their causes of endangerment through the red list assessment [J]. *Biodiversity Science*, 2016, **24**(5): 598-609. [曹亮, 张鄂, 臧春鑫, 等. 通过红色名录评估研究中国内陆鱼类受威胁现状及其成因 [J]. *生物多样性*, 2016, **24**(5): 598-609.]
- [4] Sidell B D. When bad things happen to good fish: the loss of hemoglobin and myoglobin expression in Antarctic icefishes [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2006, **209**(10): 1791-1802.
- [5] Villota E D, Carmona M G, Rubio J J, et al. Equality of the in vivo and in vitro oxygen-binding capacity of haemoglobin in patients with severe respiratory disease [J]. *British Journal of Anaesthesia*, 1981, **53**(12): 1325-1328.
- [6] Weber R E, Vinogradov S N. Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations [J]. *Physiological Reviews*, 2001, **81**(2): 569-628.
- [7] Qi X Q, Wang T. Molecular evolution of hemoglobin families [J]. *Hubei Agricultural Science*, 2014, **53**(18): 4447-4456. [齐小琼, 王艇. 植物血红蛋白基因家族的分子进化研究 [J]. *湖北农业科学*, 2014, **53**(18): 4447-4456.]
- [8] Feng L, Tan Z J, Hu Y L, et al. Construction of recombinant strain containing vitreoscilla hemoglobin gene (VHb) of *Pseudomonas aeruginosa* and its rhamnolipid expressing conditions [J]. *Industrial Microbiology*, 2012, **42**(3): 78-82. [冯蕾, 谭之京, 胡鸢雷, 等. 含血红蛋白基因(VHb)的铜绿假单胞菌重组菌的构建及鼠李糖脂表达条件的研究 [J]. *工业微生物*, 2012, **42**(3): 78-82.]
- [9] Meng L, Chen L B. The effect of *hbba1.1* gene on hemoglobin production in zebrafish knocked out by CRISPR/Cas9 [J]. *Journal of Biology*, 2021, **38**(5): 12-16. [孟琳, 陈良标. CRISPR/Cas9技术敲除*hbba1.1*基因对斑马鱼血红蛋白生成的影响 [J]. *生物学杂志*, 2021, **38**(5): 12-16.]
- [10] Opazo J C, Butts G T, Nery M F, et al. Whole-genome duplication and the functional diversification of teleost fish hemoglobins [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, **30**(1): 140-153.
- [11] Roesner A, Hankeln T, Burmester T. Hypoxia induces a complex response of globin expression in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2006, **209**(11): 2129-2137.
- [12] Roesner A, Mitz S A, Hankeln T, et al. Globins and hypoxia adaptation in the goldfish, *Carassius auratus* [J]. *The FEBS Journal*, 2008, **275**(14): 3633-3643.
- [13] Lü L L, Li Z X, Cui C Y. Study on the variation of dissolved oxygen in the plateau river [J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, **41**(7): 133-140. [吕琳莉, 李朝霞, 崔崇雨. 高原河流溶解氧变化规律研究 [J]. *环境科学与技术*, 2018, **41**(7): 133-140.]
- [14] Liu Z, Wei Y, Chen Q, et al. Spatial and temporal distribution characteristics of dissolved oxygen in surface water in the upper reaches of the Yangtze River and the Yellow River-Taking Sichuan Province as an example [J]. *Environmental Protection Science*, 2023, **49**(3): 74-80. [刘壮, 魏晓, 陈强, 等. 长江黄河上游地表水溶解氧时空分布特征研究-以四川省为例 [J]. *环境保护科学*, 2023, **49**(3): 74-80.]
- [15] Shang E H H, Wu R S S. Aquatic hypoxia is a teratogen

- and affects fish embryonic development [J]. *Environmental Science & Technology*, 2004, **38**(18): 4763-4767.
- [16] Wu R S S, Zhou B S, Randall D J, *et al.* Aquatic hypoxia is an endocrine disruptor and impairs fish reproduction [J]. *Environmental Science & Technology*, 2003, **37**(6): 1137-1141.
- [17] Sollid J, Nilsson G E. Plasticity of respiratory structures-adaptive remodeling of fish gills induced by ambient oxygen and temperature [J]. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 2006, **154**(1-2): 241-251.
- [18] Cossins A R, Crawford D L. Fish as models for environmental genomics [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2005, **6**(4): 324-333.
- [19] Zhu C D, Wang Z H, Yan B. Strategies for hypoxia adaptation in fish species: A review [J]. *Journal of Comparative Physiology B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 2013, **183**(8): 1005-1013.
- [20] Qi D L, Chao Y, Wu R R, *et al.* Transcriptome analysis provides insights into the adaptive responses to hypoxia of a schizothoracine fish (*Gymnocypris eckloni*) [J]. *Frontiers in Physiology*, 2018(9): 1326.
- [21] Tzaneva V, Bailey S, Perry S F. The interactive effects of hypoxemia, hyperoxia, and temperature on the gill morphology of goldfish (*Carassius auratus*) [J]. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2011, **300**(6): R1344-R1351.
- [22] Vuori K A M, Soitamo A, Vuorinen P J, *et al.* Baltic salmon (*Salmo salar*) yolk-sac fry mortality is associated with disturbances in the function of hypoxia-inducible transcription factor (*HIF-1α*) and consecutive gene expression [J]. *Aquatic Toxicology*, 2004, **68**(4): 301-313.
- [23] Øijordsbakken M. Effects of hypoxia on angiogenesis and angiogenic factors in crucian carp brain [D]. Oslo: University of Oslo, 2007: 35-47.
- [24] Xia M Z, Chao Y, Jia J L, *et al.* Changes of hemoglobin expression in response to hypoxia in a Tibetan schizothoracine fish, *Schizopygopsis pylzovi* [J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2016, **186**(8): 1033-1043.
- [25] Lei Y, Yang L, Jiang H, *et al.* Recent genome duplications facilitate the phenotypic diversity of Hb repertoire in the cyprinidae [J]. *Science China Life Sciences*, 2021, **64**(7): 1149-1164.
- [26] Chen C, Chen H, Zhang Y, *et al.* TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. *Molecular Plant*, 2020, **13**(8): 1194-1202.
- [27] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, **25**(24): 4876-4882.
- [28] Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, **38**(7): 3022-3027.
- [29] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402-408.
- [30] Bhattacharya M, Hota A, Kar A, *et al.* In silico structural and functional modelling of antifreeze protein (AFP) sequences of Ocean pout (*Zoarces americanus*, Bloch & Schneider 1801) [J]. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2018, **16**(2): 721-730.
- [31] Ganis J J, Hsia N, Trompouki E, *et al.* Zebrafish globin switching occurs in two developmental stages and is controlled by the LCR [J]. *Developmental Biology*, 2012, **366**(2): 185-194.
- [32] Wang F Y. Genomic structure and spatiotemporal expression of functional differentiation of hemoglobin in *Gymnocypris eckloni* [D]. Xining: Qinghai University, 2022: 13-33. [王发艳. 花斑裸鲤血红蛋白基因组结构及其功能分化的时空表达调控 [D]. 西宁: 青海大学, 2022: 13-33.]
- [33] Wang F Y, Liu D, Gao Q, *et al.* The spatio temporal expression of embryo/larval hemoglobin gene in *Gymnocypris eckloni* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2022, **46**(5): 718-724. [王发艳, 刘丹, 高强等. 花斑裸鲤胚胎/仔鱼型血红蛋白基因家族成员鉴定与时序表达研究 [J]. 水生生物学报, 2022, **46**(5): 718-724.]
- [34] Chen J S C, Wang T Y, Tzeng T D, *et al.* Evidence for positive selection in the TLR9 gene of teleosts [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, **24**(2): 234-242.
- [35] Escriva H, Manzoni L, Youson J, *et al.* Analysis of lamprey and hagfish genes reveals a complex history of gene duplications during early vertebrate evolution [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2002, **19**(9): 1440-1450.
- [36] Hoffmann F G, Opazo J C, Storz J F. Whole-genome duplications spurred the functional diversification of the globin gene superfamily in vertebrates [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2012, **29**(1): 303-312.
- [37] Shimeld S M, Holland P W H. Vertebrate innovations [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, **97**(9): 4449-4452.
- [38] Jaillon O, Aury J M, Brunet F, *et al.* Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype [J]. *Nature*, 2004, **431**(7011): 946-957.
- [39] Meyer A, Van de Peer Y. From 2R to 3R: evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD) [J]. *Bioessays*, 2005, **27**(9): 937-945.
- [40] Quinn N L, Boroevich K A, Lubieniecki K P, *et al.* Genomic organization and evolution of the Atlantic salmon hemoglobin repertoire [J]. *BMC Genomics*, 2010(11): 539.
- [41] Wu Y F, Kang B, Men Q, *et al.* Chromosome diversity of Tibetan fishes [J]. *Zoological Research*, 1999, **20**(4): 258-264. [武云飞, 康斌, 门强, 等. 西藏鱼类染色体多样性的

- 研究 [J]. 动物学研究, 1999, **20**(4): 258-264.]
- [42] Lei Y, Yang L, Zhou Y, *et al.* Hb adaptation to hypoxia in high-altitude fishes: Fresh evidence from Schizothoracinae fishes in the Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021(185): 471-484.
- [43] He Y L, Wu L Y, Zhu L L, *et al.* The role of mitophagy in hypoxic adaptation [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2012, **39**(3): 217-223. [何云凌, 吴丽颖, 朱玲玲, 等. 线粒体自噬在低氧适应中的作用 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2012, **39**(3): 217-223.]
- [44] Chen Q C, Zheng Z Q, Liu D, *et al.* A new pattern of hemoglobin switching in teleost fish-study of the embryonic hemoglobin in the *Schizopygopsis pylzovi* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, **44**(6): 1199-1207. [陈祺昌, 郑志琴, 刘丹, 等. 硬骨鱼类血红蛋白转换表达的新模式-以黄河裸裂尻鱼胚胎型血红蛋白研究为例 [J]. *水生生物学报*, 2020, **44**(6): 1199-1207.]
- [45] Wawrowski A, Gerlach F, Hankeln T, *et al.* Changes of globin expression in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*) in response to acute and chronic hypoxia [J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2011(181): 199-208.

GENOME-WIDE ANALYSIS OF THE *TRIPLOPHYSA PAPPENHEIMI* HEMOGLOBIN GENE FAMILY AND ITS RESPONSE TO HYPOXIA STRESS

TAN Jin^{1,2}, GUO Shou-Quan^{1,2}, LIU Dan¹, ZHANG Cun-Fang¹, NIE Miao-Miao¹, KOU Ruo-Bin^{1,2}, YAO Zhan-Wen^{1,2}, TIAN Fei³ and QI De-Lin¹

(1. State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Qinghai University, Xining 810016, China; 2. College of Ecological Environmental Engineering, Qinghai University, Xining 810016, China; 3. Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China)

Abstract: *Triplophysa pappenheimi* is a representative species of Nemacheilinae, which can adapt to the aquatic environment of Tibetan Plateau. To investigate the role of hemoglobin gene family in *T. pappenheimi* adaptation to hypoxia, bioinformatics analysis of hemoglobin gene family was performed based on genome data, followed by an examination of expression changes of hemoglobin genes in response to hypoxia. The hemoglobin gene family to *T. pappenheimi* consists of 11 members, including six α -globin genes (*hbaa1*, *hbaa2*, *hbae1*, *hbae3*, *hbae4*, and *hbae5*) and five β -globin genes (*hbba1*, *hbba2*, *hbbe1.1*, *hbbe1.2*, and *hbbe2*). Motif, domain, and gene structure analysis showed high conservation among these genes; with the exception of *hbbe2*, the others exhibited similar structure features. Chromosomal localization analysis showed that the members of hemoglobin gene family were distributed on two chromosomes (Chr_07 and Chr_17). The results of physicochemical analysis indicated that all the gene products were stable hydrophobic proteins, except *hbbe1.2*, among which, *hbae3*, *hbbe1.1*, and *hbbe2* were classified as acidic proteins, and the other eight were basic proteins, with α -helix is the main secondary structure. Subcellular localization prediction showed that *hbae3* and *hbae4* were located in the cytoplasm and the other hemoglobin genes were found in the mitochondria. The expression of *hbaa1*, *hbaa2*, *hbba1* and *hbba2* genes in liver, gill and blood showed an up-regulated trend after 12h of acute hypoxia stress, though the difference was not significant ($P < 0.05$). The expression levels of *hbaa1*, *hbba1*, *hbaa2*, and *hbba2* genes in liver and blood reached the peak at 24 h to 96h under chronic hypoxia ($P < 0.05$). In gill tissue, the highest expression of *hbaa1*, *hbaa2*, and *hbba1* appeared at 196h after chronic hypoxia, while *hbba2* reached its peak at 24h. This study reveals the role of the hemoglobin gene family in hypoxic environment of *T. pappenheimi*, accumulating valuable scientific data for its conservation.

Key words: Hemoglobin gene family; Genome-wide analysis; Hypoxia stress; *Triplophysa pappenheimi*