

doi: 10.7541/2024.2024.0141

CSTR: 32229.14.SSSWXB.2024.0141

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

郭守全^{1,2} 谭瑾^{1,2} 刘丹¹ 晁燕³ 张存芳¹ 聂苗苗¹
寇若彬^{1,2} 姚占雯^{1,2} 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. 青海大学农牧学院动物科学系, 西宁 810016)

摘要: 为探究Rh(Rhesus)基因家族在青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)高碱适应中的作用, 研究基于青海湖裸鲤基因组数据对Rh基因家族进行了生物信息学分析, 并开展碱胁迫和基因表达检测。结果显示, 青海湖裸鲤Rh基因家族由7个成员组成, 编码425—562个氨基酸不等。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, 但基因结构差异较大。染色体定位分析结果显示, Rh基因家族成员分布在7条染色体上(Chr 37、29、46、13、14、15和26), 所有基因产物均为疏水性稳定蛋白, 除Rh_d产物外其余6个基因的产物均为酸性蛋白, 其中 α -螺旋是主要的二级结构, 亚细胞定位预测结果显示, Rh基因产物全部位于细胞膜中。选择压力分析结果显示Rhbg和Rhcg2a受到正选择作用。在碳酸盐碱度胁迫下, 青海湖裸鲤血氨浓度逐渐升高, 胁迫48h后开始下降。基因表达研究表明, 青海湖裸鲤鳃、皮肤、肾脏和肝脏组织中, Rhag、Rhbg、Rhcg1、Rhcg2a和Rh50的表达量呈现先上升后下降趋势; 在血液组织中, Rhag、Rhbg、Rhcg2a和Rh50的表达量逐渐降低, Rh_d的表达量呈现先上升后下降趋势。Rhbg和Rhcg2a可能是青海湖裸鲤氨氮代谢中发挥作用的关键基因, 同时Rhag、Rhcg1、Rhcg2b和Rh50也发挥着一定的作用。就组织器官而言, 鳃在青海湖裸鲤排氨中发挥主要作用, 皮肤、肾脏和肝脏的作用次之。研究揭示了青海湖裸鲤Rh基因家族成员在氨氮代谢中的作用, 为青海湖裸鲤资源保护提供了科学依据。

关键词: Rh基因家族; 碱胁迫; 氨氮代谢; 青海湖裸鲤

中图分类号: Q344⁺.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2024)11-1822-13



青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)属鲤科(Cyprinidae), 裂腹鱼亚科(Schizothoracinae), 裸鲤属(*Gymnocypris*)^[1], 主要栖息在我国最大的内陆咸水湖泊-青海湖^[2]。作为青藏高原土著鱼类, 在维系青海湖流域的“水-鸟-鱼”生态系统和食物链中扮演着至关重要的角色, 然而, 由于过度捕捞和生态环境等因素的影响, 青海湖裸鲤资源量由20世纪50年代末的32万吨, 逐渐减少至90年代末的0.34万吨^[3], 近30年来, 政府启动封湖育鱼、人工增殖放流等计划, 资源量逐步得到恢复, 2022年青海湖裸鲤资源量恢复至11.41万吨^[4], 2023年青海湖裸鲤资源量达到

12.03万吨, 青海湖裸鲤从“濒危”物种降为“易危”物种, 共生生态链趋于平衡^[5]。尽管如此, 湖区生态系统结构依旧脆弱、稳定性较差, 加之青海湖裸鲤自身性成熟期较晚, 繁殖力较低, 种群补充能力较弱, 资源一旦遭到破坏就难以自然恢复。因此, 加强基础研究, 保护易危的青海湖裸鲤, 在维持青海湖水生态系统稳定健康发展中具有非常重要的意义。

青海湖碱度为26—32 mg/L, pH为9.1—9.5, 生活在湖水中的青海湖裸鲤面临着诸多环境胁迫, 由HCO₃⁻和CO₃²⁻组成的碳酸盐碱度^[6]胁迫是其中最为关键的胁迫因素之一。同时, 由于蒸发和灌溉等,

收稿日期: 2024-04-08; 修订日期: 2024-05-28

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32371578); 第二次青藏高原综合考察研究项目(2019QZKK0302)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation General Project (32371578); the Second Comprehensive Survey and Research Project on the Qinghai Tibet Plateau (2019QZKK0302)]

作者简介: 郭守全(1999—), 男, 硕士研究生; 研究方向为动物生态学。E-mail: gsq0603@foxmail.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

湖水碱度逐年升高^[7,8],高碳酸盐碱度导致的血氨升高引起的氨中毒是鱼类在碱性环境中面临的主要威胁之一^[9],这是因为非离子态的 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 会将血红蛋白分子中的 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+} ,抑制了血液的载氧能力,影响呼吸系统正常功能,严重时还会引起细胞凋落和组织器官损伤,甚至导致死亡^[10-12]。

在大多数硬骨鱼中,含氮废物的60%—95%以非离子态氨(NH_3)和离子态铵(NH_4^+)的形式直接从鳃中排出^[13,14],研究发现,鱼类鳃丝上皮细胞中含有许多离子转运蛋白,在其他蛋白载体的协助下,Rh糖蛋白(Rhesus glycoprotein)能以主动转运的方式运输氨和甲胺^[13]。Rh糖蛋白早在1939年在人类红细胞中被发现^[15],后来Marini等^[16]发现其与Mep (Mythylamine permease)/Amt (Ammonium transporter)家族序列相似,而Mep/Amt家族中的部分蛋白已经被证实有氨转运功能^[17,18]。鱼类中最早在红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)鳃组织中鉴定出4种不同亚型:Rhag、Rhbg、Rhcg1和Rhcg2,并使用基因敲除等技术证实以上基因均参与了氨转运过程^[19,20]。后来在对虹鳟^[21](*Oncorhynchus mykiss*)、海湾豹蟾鱼^[22](*Opsanus beta*)、大西洋鲑^[23](*Salmo salar*)、攀鲈^[24](*Anabas testudineus*)等物种的研究中均发现Rh基因可能与氨氮代谢相关。近几年,国内研究者相继报道,尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)在碱环境下会增强Rh基因与蛋白表达量参与氨转运过程^[25];碳酸盐碱度胁迫会引起尼罗罗非鱼血氨水平升高,随着时间推移血氨水平下降,推测鳃、肝、肾中不同氨代谢基因共同参与调节氨代谢^[26];鲤(*Cyprinus carpio*)鳃组织中Rhag、Rhbg和Rhcg1基因表达水平极显著高于其他组织^[27];Rhcg1和Rhcg2可能在瓦氏雅罗鱼高碱胁迫下的排氨过程中发挥重要作用^[28];Zhou等^[29]在瓦氏雅罗鱼中鉴定出7个Rh基因,并基于RNA-Seq数据的差异基因表达分析发现Rhag与氨氮代谢有关、在鳃中的氨排泄中起主要作用。

综上所述,鱼类Rh基因在跨膜转运氨的功能已得到广泛认可。本研究针对生活在高碱度环境中的青海湖裸鲤,通过处理浓度和时间两个变量,对其Rh基因家族的全基因组进行了生物信息学分析及碳酸盐碱度胁迫后基因响应的研究,旨在探究青海湖裸鲤Rh基因家族成员在氨氮代谢中的作用,揭示青海湖裸鲤生态适应策略和分子机制,为青海湖裸鲤资源保护提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼及碳酸盐碱度胁迫

青海湖裸鲤来自青海湖裸鲤救护中心,试验前

暂养60h,暂养和实验用水均为曝气24h的自来水,暂养后挑选体色正常、活力旺盛、没有任何损伤的鱼用于试验,试验鱼体长(8.42 ± 2.50) cm,质量(30.84 ± 5.50) g。基于青海湖碳酸盐碱度和刘济源等^[30]的研究,淡水作为对照组(C_A0),设置了2个碳酸盐碱度实验组32 mmol/L (C_A32)和64 mmol/L (C_A64),每组25尾。在淡水中添加1:9的 Na_2CO_3 (AR)和 NaHCO_3 (AR),配制成相应碱度,全部溶解稳定60h后取上清液进行胁迫试验。在实验期间每12h监测pH、溶解氧和碳酸盐碱度。使用总碱度测定仪(型号:WD8221)测定水体碱度并以此做出修正,水温保持在14—18℃,pH在9.0—10.5 (C_A32 组实测值为 9.12 ± 0.12 , C_A64 组实测值为 10.25 ± 0.35),溶解氧浓度在6 mg/L以上。分别于胁迫0、6h、12h、24h、48h和96h采集的鳃、皮肤、肾脏、肝脏和血液组织(6h、12h和24h只采集血液并放回水箱继续胁迫),每次每组随机取5尾。采集的鳃、皮肤、肾脏和肝脏组织分成2份,1份用于转录组测序,另1份用于荧光定量PCR。

1.2 血氨含量测定

在采集血液后,放入1.5 mL离心管中,于4℃冰箱中静置12h后离心(4500 r/min, 4℃, 10min),取上清液(血清),经血氨含量检测试剂盒(Solarbio)处理后,用酶标仪(型号:Varioskanc LUX)测定血氨浓度。

1.3 基因家族成员鉴定与分析

将已发表的青海湖裸鲤基因组序列(CNGB序列号: CNP0002001)构建为本地数据库,以NCBI中已公布的斑马鱼(*Danio rerio*)Rh基因家族成员(NM_212845.1、NM_200071.3、NM_001089577.1、NM_001320382.1、NM_001024819.1、AF209468.1)的CDS序列为搜索条件(Queries),通过TBtools软件^[31]获取青海湖裸鲤Rh基因家族成员CDS序列。同时,利用HMMER v3.3.2软件中的“nhmmer”搜索青海湖裸鲤基因组序列,以保证Rh基因家族的完整性^[32]。使用MEGA 11^[33]对小家鼠(*Mus musculus*)、斑纹隐小鲈(*Kryptolebias marmoratus*)、红鳍东方鲀、斑马鱼、鲤和青海湖裸鲤Rh基因家族成员序列进行比对,并使用邻接法(Neighbor-Joining)^[34]构建系统进化树(表1),校验参数Boostrtrap重复1000次。使用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。使用PRABI (https://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)进行蛋白质二级结构预测。使用Cell-PLoc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/euk-multi-2/>)预测Rh基因家族成员的亚细胞

定位。使用TMHMM 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>)进行蛋白质的跨膜结构域预测。使用MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>), Select the site distribution设置为10, 基于Motif分析成员序列保守特征, 使用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, 并使用TBtools可视化。使用TBtools进行基因结构分析和染色体定位分析。

1.4 选择压力分析

从NCBI下载各物种Rh基因家族成员的CDS序列(表1), 使用MEGA 11^[33]进行序列比对并使用最大似然法(Maximal likelihood)^[35]构建系统进化树, 导出序列比对文件和树文件后, 利用EasyCodeML-1.4^[36]中的枝位点模型(Branch site model)对基因进行选择压力分析, 以青海湖裸鲤的Rh基因为前景枝, 仅允许前景支中出现正选择位点, 并对其进行LRT检验。用 $\omega=dN/dS$ (或 Ka/Ks)值来判定位点是否受到了正选择压力, 其中 $\omega>1$ 表示正选择(Posi-

tive selection), $\omega=1$ 表示中性进化(Neutral selection), 即不受选择, $0<\omega<1$ 则受负选择(Negative selection), 也叫净化选择或纯化选择(Purifying selection)^[37, 38]。

1.5 基于RNA-seq的基因表达分析

将采集的鳃、皮肤、肾脏和肝脏样本送至百迈客生物科技有限公司进行测序, 以 $\log_2(\text{FPKM}+1)$ 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。

1.6 基于qRT-PCR的基因表达分析

使用TRIzol裂解法提取鳃、皮肤、肾脏、肝脏和血液总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Primer6.0设计引物(表2), 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。首先, 使用Premix TaqTM试剂盒(TaKaRa)进行半定量RT-PCR初步确定Rh基因家族成员在各组织中的表达情况, 然后使用实时荧光定量PCR (Quantitative Real-time PCR, 以下简称qRT-

表1 用于构建系统进化树及选择压力分析的物种

Tab. 1 Species used for constructing phylogenetic trees and analyzing selection pressure

基因 Gene	物种名称 Species	GenBank登录号 GenBank accession number	基因 Gene	物种名称 Species	GenBank登录号 GenBank accession number
Rhag	<i>Mus musculus</i>	NM_011269.2	Rhcg	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	NM_001124523.1
Rhag	<i>Kryptolebias marmoratus</i>	XM_017412036.3	Rhcg1	<i>Cyprinus carpio</i>	KF051940.1
Rhag	<i>Takifugu rubripes</i>	NM_001037867.1	Rhcg2	<i>Kryptolebias marmoratus</i>	DQ423779.2
Rhag	<i>Danio rerio</i>	NM_212845.1	Rhcg2	<i>Takifugu rubripes</i>	AB218982.1
Rhag	<i>Cyprinus carpio</i>	KC820797.1	Rhcg2	<i>Danio rerio</i>	NM_001320382.1
Rhag	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	XM_036984796.1	Rhcg2	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	XM_051899486.1
Rhag	<i>Oreochromis niloticus</i>	XM_003446300.4	Rhcg2	<i>Oncorhynchus nerka</i>	XM_029625170.2
Rhag	<i>Oncorhynchus nerka</i>	XM_029631000.2	Rh50	<i>Kryptolebias marmoratus</i>	XM_017415795.3
Rhbg	<i>Mus musculus</i>	NM_021375.3	Rh50	<i>Danio rerio</i>	AF209468.1
Rhbg	<i>Kryptolebias marmoratus</i>	NM_001329354.1	Rh50	<i>Oncorhynchus nerka</i>	XM_065000796.1
Rhbg	<i>Takifugu rubripes</i>	NM_001032646.1	Rh50	<i>Synchiropus splendidus</i>	XM_053848410.1
Rhbg	<i>Danio rerio</i>	NM_200071.3	Rh50	<i>Latimeria chalumnae</i>	XM_064564216.1
Rhbg	<i>Cyprinus carpio</i>	XM_019073603.2	Rh50	<i>Dicentrarchus labrax</i>	XM_051416163.1
Rhbg	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	NM_001124662.1	Rhd	<i>Mus musculus</i>	NM_011270.3
Rhbg	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	XM_051866484.1	Rhd	<i>Kryptolebias marmoratus</i>	XM_017418546.3
Rhbg	<i>Oncorhynchus nerka</i>	XM_029679668.2	Rhd	<i>Takifugu rubripes</i>	NM_001032763.1
Rhcg	<i>Mus musculus</i>	NM_019799.3	Rhd	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	NM_001124663.1
Rhcg1	<i>Kryptolebias marmoratus</i>	DQ995210.1	Rhd	<i>Danio rerio</i>	NM_001024819.1
Rhcg1	<i>Takifugu rubripes</i>	AB218981.1	Rhd	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	XM_051917910.1
Rhcg1	<i>Danio rerio</i>	NM_001089577.1	Rhd	<i>Oncorhynchus nerka</i>	XM_029688294.2
Rhcg1	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	XM_051884846.1	Rhd	<i>Dicentrarchus labrax</i>	XM_051395943.1
Rhcg1	<i>Oncorhynchus nerka</i>	XM_029667792.2	Rhd	<i>Latimeria chalumnae</i>	XM_064552082.1

注: 表中除*Mus musculus*外所有物种的基因都用于选择压力分析, 部分物种的基因用于构建系统发育树(图1)

Note: The genes of all species in the table, except *Mus musculus*, are used for selection pressure analysis, while some species' genes are used to construct phylogenetic trees (Fig. 1)

PCR)检测Rh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CP值, 每份样品重复3次, 以0h样品为对照, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[39]计算相对表达量。

1.7 数据分析

使用Excel 2019计算血氨含量及Rh基因家族成员在各组织中的相对表达量, 使用SPSS 26.0软件通过单因素方差分析检测显著性, 以 $P < 0.05$ 为差异显著, 并使用Origin 2021作图。

2 结果

2.1 青海湖裸鲤Rh基因家族成员及其蛋白理化性质

在青海湖裸鲤基因组中共鉴定出7个成员, 通过系统进化分析(图1)将7个家族成员分别命名为*Rhag*、*Rhbg*、*Rhcg1*、*Rhcg2a*、*Rhcg2b*、*Rh50*和*Rhd*。各家族成员的编码序列(CDS)长度差异较小, 介于1278—1689 bp, 其中*Rhd*最短, 编码425个氨基酸, *Rhcg1*最长, 编码562个氨基酸。分子量(Molecular weight)为45875.70 (*Rhag*)—62392.23 Da (*Rhcg1*)。蛋白理论等电点(Theoretical isoelectric point) 介于5.52—9.00。脂溶性指数(Aliphatic index)介于97.13—110.94。亲水性平均指(Grand average of hydropathicity)介于0.253—0.558, 不稳定性指数(Instability index)介于26.57—39.29 (表3)。

表2 用于qRT-PCR分析的引物序列

Tab. 2 Primer sequences for qRT-PCR analysis

基因 Gene	序列 Sequence (5'—3')	退火温度 Annealing temperature (°C)
<i>β-actin</i> F	GAACCCCAAGGCTAACAGAGAA	56.9
<i>β-actin</i> R	AGGCATACAGGGACAGCACA	59.1
<i>Rhag</i> F	GATGGCTCGGTCTATCACTCAGATT	58.7
<i>Rhag</i> R	TCACCAGGTTTCAGCAATAGCAGAAT	59.2
<i>Rhbg</i> F	GGAATGGCTCTGATTGGTGGTCTC	59.7
<i>Rhbg</i> R	CATGATCCTCCTCCTCCTCGGTAG	59.7
<i>Rhcg1</i> F	CCTCCACCGTCCTCACTACAGT	59.2
<i>Rhcg1</i> R	AAGAACCGTATGGCGACAGCAT	58.7
<i>Rhcg2a</i> F	CGCTGAGAGGACACCTGCCATA	60.1
<i>Rhcg2a</i> R	AGACCTACTACCACTCCACCTACGA	60.1
<i>Rhcg2b</i> F	GGTGGTATCGTTGGAGCAATTACTG	58.7
<i>Rhcg2b</i> R	TGTTGACTGTCCTGTTAGCAATGGT	59.3
<i>Rh50</i> F	CAATCACCGCCTTCGCACTGT	59.7
<i>Rh50</i> R	ACGCCACCAGCCAATGTTACG	59.7
<i>Rhd</i> F	GCCACAACGACACCACAGAAGA	59.4
<i>Rhd</i> R	ACCTCCACCAGAGCCATCAGTAA	59.2

2.2 蛋白质的亚细胞定位和跨膜结构域及二三级结构预测

蛋白质二级结构预测显示, Rh糖蛋白由 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55.76%—43.24%, 无规则卷曲和延伸链在蛋白结构中占比在35.94%—27.53%和15.84%—12.24%, 而 β -转角的占比均低于5%(表4); 亚细胞定位预测显示, Rh糖蛋白全部位于细胞膜中; 跨膜结构域预测显示Rh糖蛋白的跨膜螺旋(TMhelix)数量在9—12个; 此外, 模拟7个Rh糖蛋白的三级结构发现, 与二级结构预测一致Rh糖蛋白主要由 α -螺旋组成, 而且7个Rh糖蛋白都存在跨膜区域, 跨膜螺旋数量与跨膜结构域预测结果一致(图2)。

2.3 基于Motif分析成员序列保守特征及基于Domain分析成员结构的保守性

以10个motif作为查询上限, Rh基因家族各成员不同聚类组间的motif分布差异较小(图3a), 除*Rhag*和*Rhd*缺少5'端的motif 10外, 其余组的成员均有10个motif。Domain分析(图3b)显示, Rh基因家族成员与细菌、酵母和植物中甲基氨和氨转运基因*Mep1Aml*^[17, 34]均属于铵转运超基因家族(Ammonium transport superfamily)。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。

2.4 基因结构分析

青海湖裸鲤Rh基因家族7个成员的基因结构分析显示(图4), *Rh50*有1个3'-UTR, *Rhbg*和*Rhd*的5'和3'端均有1个UTR, *Rhag*有1个5'-UTR和2个3'-UTR, 其余3个*Rhcg*没有UTR, *Rh50*的外显子最多有21个, 其余基因外显子的数量相差不大在9—13个, 且各基因外显子分散稀疏, 这种结构上的差异可能与基因的功能和调控机制有关。

2.5 染色体定位分析

已发表青海湖裸鲤基因组共2.03 G, 并挂载到46条染色体上^[40]。本研究根据基因组注释文件中获取的青海湖裸鲤Rh基因家族所在染色体位置信息, 对Rh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5), 7个Rh家族成员分布在7条染色体上, 分别为Chr 37、Chr 29、Chr 46、Chr 13、Chr 14、Chr 15和Chr 26。

2.6 选择压力分析

所有Rh基因家族成员的零假设模型(Model A null)结果不显著, 接受备选假设模型(Model A), 拒绝零假设模型(表5)。 *Rhag*的 $\omega_1=1$, 不受选择; *Rhbg*中6个位点受到正选择; *Rhcg1*的 $\omega_1=1$, 不受选择, 但

结果显示有3个位点受到正选择; *Rhcg2a*中8个位点受到正选择; *Rhcg2b*中3个位点受到正选择; *Rhcg50*中20个位点受到正选择; *Rhd*的 $\omega_1=2.59$, 受到正选择, 但没有正选择位点。最终, 经似然比检验, 仅 *Rhbg*的第151个位点的异亮氨酸(I), *Rhcg2a*的第113个位点的组氨酸(H)和第445个位点的甲硫氨酸(M)受到正选择显著, 后验概率(Posterior Probability)小于0.05, 支持其检测出正选择位点的结论, 其余分支和位点不可靠, 拒绝其受到正选择作用。

2.7 不同碳酸盐碱胁迫下青海湖裸鲤血氨含量的变化

在胁迫开始后, 实验鱼应激反应强烈, 表现为口吐白沫、乱窜乱游, 然后症状逐渐消失, 实验鱼均保持存活。在各碱度胁迫下, 随着胁迫时间推移, 青海湖裸鲤血氨浓度呈现先上升、后下降的趋势, 48h时达到最大值[C_{A32} 浓度为 $(4.39\pm0.64)\mu\text{mol/L}$, C_{A64} 浓度为 $(4.52\pm0.63)\mu\text{mol/L}$], 之后缓慢下降, 24h、48h和96h各低碱度组与对照组血氨含量差异

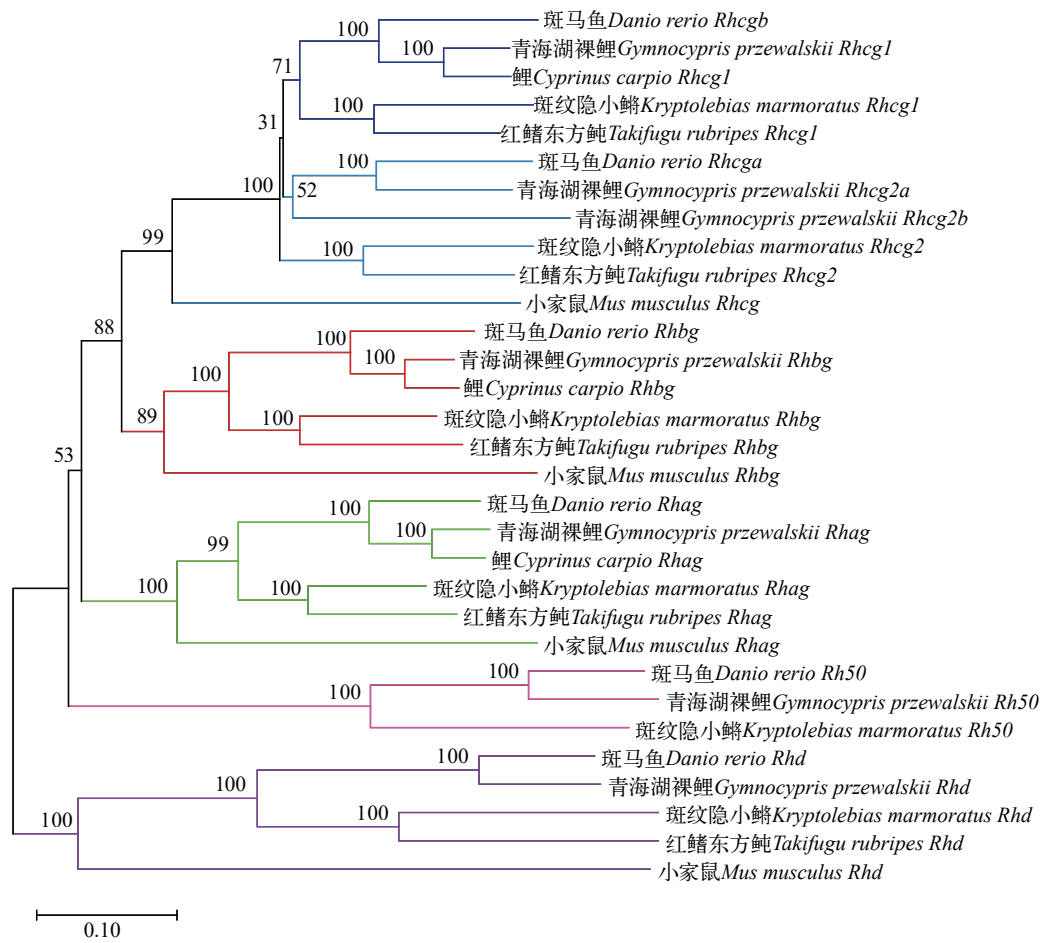


图1 各物种Rh基因家族成员系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of Rh gene family members in the selected species

表3 青海湖裸鲤Rh基因家族成员理化性质

Tab. 3 Physical and chemical properties of Rh gene family members in *Gymnocypris przewalskii*

基因 Gene	CDS长度 CDS length (bp)	氨基酸数目 Number of amino acid	分子质量 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>Rhag</i>	1281	426	45875.7	5.63	107.86	0.512	39.29
<i>Rhbg</i>	1389	462	50503.22	5.72	97.51	0.314	26.57
<i>Rhcg1</i>	1689	562	62392.23	5.97	99.57	0.253	33.49
<i>Rhcg2a</i>	1470	489	53988.51	5.52	98.3	0.412	29.65
<i>Rhcg2b</i>	1416	471	51911.87	5.8	97.13	0.325	33.94
<i>Rh50</i>	1443	480	52445.4	5.8	110.94	0.52	32.48
<i>Rhd</i>	1278	425	47605.47	9	105.29	0.558	36.14

显著(图 6)。

2.8 青海湖裸鲤Rh基因家族成员在不同组织中的碳酸盐碱度胁迫响应模式

为探讨Rh基因在青海湖裸鲤氨氮代谢中的作用, 本研究通过转录组测序对青海湖裸鲤Rh基因家族成员的表达模式进行分析(已上传国家基因库生命大数据平台<https://db.cngb.org/>, ID: CNP0005676)。结果显示(图 7), 在鳃组织中, *Rhag*、*Rhbg*、*Rhcg1*、*Rhcg2a*和*Rhcg2b*的表达量在胁迫后均有所上调, 其中*Rhbg*和*Rhcg1*表达量维持较高水平, 而*Rhd*表达量在胁迫后有所下调。在皮肤组织中*Rhbg*、*Rhcg2a*

和*Rhcg2b*表达量在胁迫后均有所上调, 其中*Rhbg*表达量相对较高, *Rhcg2a*和*Rhcg2b*的表达量在胁迫后开始上调, 48h后逐渐降低, 而*Rhcg1*和*Rhd*表达量在胁迫后有所下调。在肾脏组织中, *Rhag*和*Rhcg1*表达量相对较高, *Rhcg2b*表达量最低, 相较于其他组织*Rhd*表达量最高。肝脏组织中各基因表达量都相对较低, *Rhbg*和*Rhcg1*在胁迫后有所上调。

研究中首先利用半定量RT-PCR方法检测了所有基因家族成员在不同组织器官中的表达情况, 然后通过RT-PCR结果进一步确定qRT-PCR检测的组织 and 基因。qRT-PCR检测结果显示, 在鳃组织中

表 4 青海湖裸鲤Rh基因家族成员二级结构和亚细胞定位

Tab. 4 Secondary structure and subcellular localization of Rh gene family members in *Gymnocypris przewalskii*

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	跨膜螺旋数(个) Number of Tmhelix
<i>Rhag</i>	53.05	4.23	28.64	14.08	Cell membrane	9
<i>Rhbg</i>	49.57	4.55	32.68	13.28	Cell membrane	12
<i>Rhcg1</i>	43.24	4.98	35.94	15.84	Cell membrane	11
<i>Rhcg2a</i>	48.47	4.5	33.13	13.91	Cell membrane	12
<i>Rhcg2b</i>	50.74	4.88	31.21	13.16	Cell membrane	11
<i>Rh50</i>	48.33	3.96	34.58	13.12	Cell membrane	10
<i>Rhd</i>	55.76	4.47	27.53	12.24	Cell membrane	10

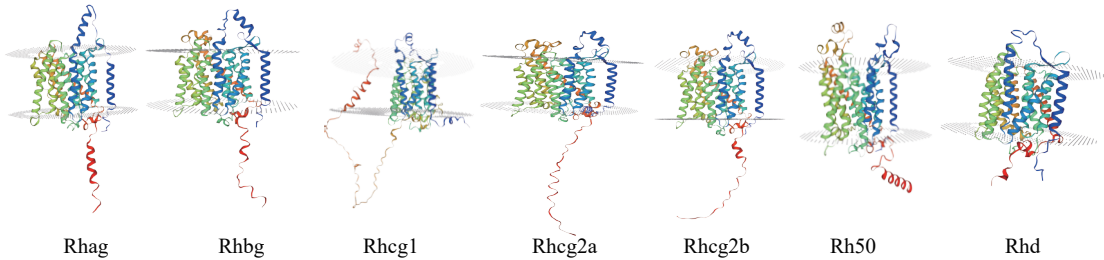


图 2 青海湖裸鲤Rh糖蛋白三级结构模型

Fig. 2 Protein tertiary structure model of Rh glycoprotein in *Gymnocypris przewalskii*

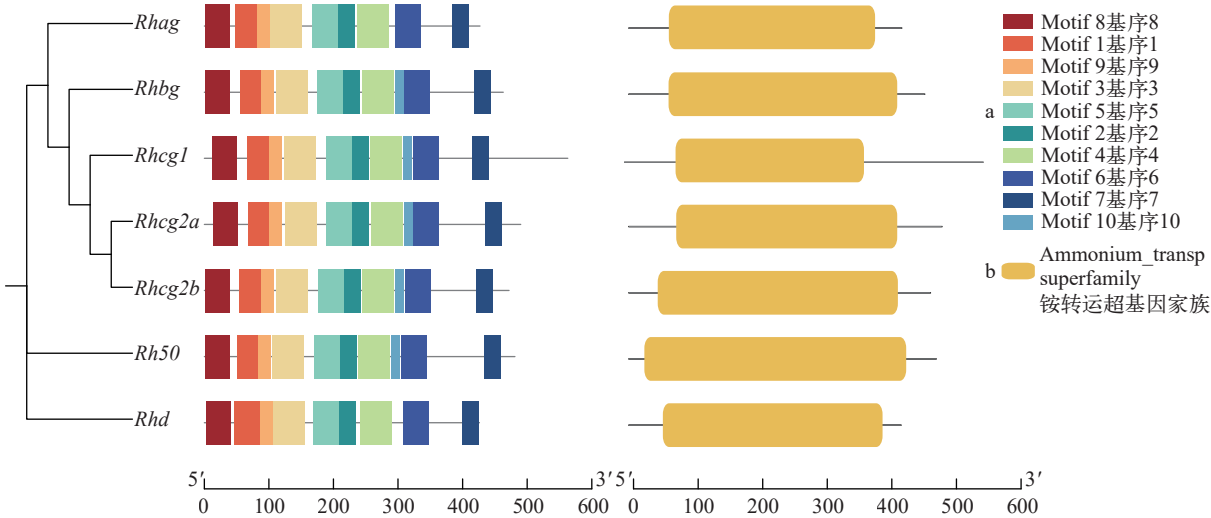


图 3 青海湖裸鲤Rh基因家族的基序(a)和结构域(b)

Fig. 3 Motif (a) and domain (b) of the Rh gene family in *Gymnocypris przewalskii*

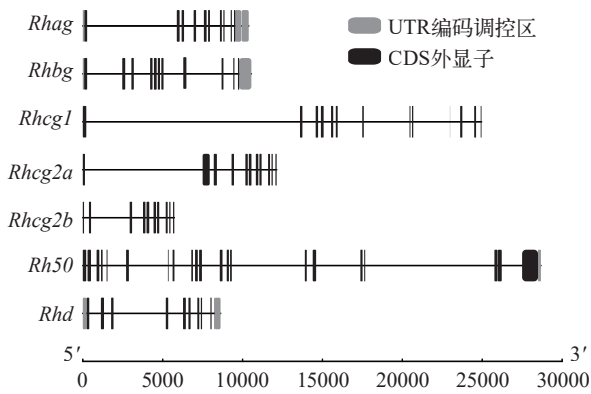


图4 青海湖裸鲤Rh家族基因结构

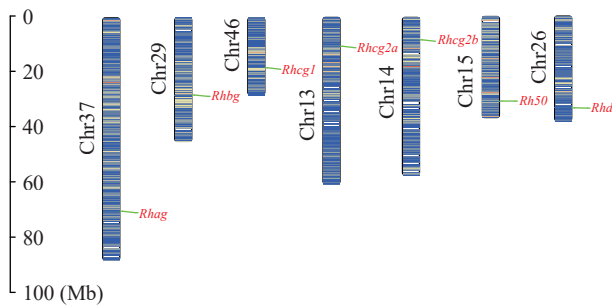
Fig. 4 Gene structure of Rh family in *Gymnocypris przewalskii*

图5 青海湖裸鲤Rh基因在染色体上的分布

Fig. 5 Distribution of Rh gene on chromosomes in *Gymnocypris przewalskii*

(图 8a), *Rhag*、*Rhbg*、*Rhcg2a*、*Rh50* mRNA 的表达量均呈现先上升后下降趋势; *Rhbg*和*Rhcg2a* mRNA 的表达量相对较高,且在48h时与碱度呈正相关;相较于对照组, *Rhag* mRNA 的表达量在胁迫48h时显著上调; *Rhbg* mRNA 的表达量是对照组的6.22—10.99倍, C_A32 组在胁迫后显著上调, C_A64 组在胁迫48h时显著上调; *Rhcg1* mRNA 的表达量在时间和浓度两个变量上都没有任何显著趋势; *Rhcg2a* mRNA 在表达量是对照组的4.70—23.70倍,在胁迫48h时显著上调; *Rhcg2b* mRNA 的表达量在胁迫96h时显著下调; *Rh50* mRNA 在胁迫48h时都显著上调;胁迫组*Rhd* mRNA 的表达量在胁迫后都显著下调。在皮肤组织中(图 8b),相较于对照组, C_A64 组的*Rhag*和*Rh50* mRNA 表达量在胁迫96h时都显著上调; *Rhbg* mRNA 表达量呈现持续上升趋势,表达量是对照组的1.59—4.71倍,在96h时都显著上调; *Rhcg2a* mRNA 表达量都呈现先上升后下降趋势,表达量是对照组的3.81—12.51倍,在胁迫48h时显著上调,且胁迫后碱度与表达量呈正相关; *Rhcg2b* mRNA 的表达量在胁迫后显著上调,表达量是对照组的4.61—5.79倍; *Rhd* mRNA 的表达量在时间和浓度两个变量上都没有任何显著趋势。在肾脏组

织中(图 8c), *Rhag*、*Rhbg*和*Rhcg1* mRNA 的表达量都呈现先上升后下降趋势; *Rhbg*、*Rhcg2a*和*Rh50* mRNA 的表达量在48h时与碱度呈正相关;相较于对照组, *Rhag* mRNA 的表达量在胁迫48h时显著上调; *Rhbg* mRNA 的表达量在96h时显著下调, C_A64 组在48h时显著上调; *Rhcg1* mRNA 的表达量在时间和浓度两个变量上都没有任何显著趋势; *Rhcg2a* mRNA 的表达量在胁迫后都显著下调; *Rhcg2b*、*Rh50*和*Rhd* mRNA 的表达量在胁迫96h时都显著下调。在肝脏组织中(图 8d), *Rhag*、*Rhbg*、*Rhcg1*、*Rhcg2b*和*Rh50* mRNA 的表达量都呈现先上升后下降趋势;相较于对照组,在胁迫48h时表达量都显著上调; *Rhag*、*Rhbg*和*Rhcg2b* mRNA 的表达量在胁迫96h时都显著下调; C_A32 组*Rhcg2b*和*Rhd* mRNA 的表达量在48h时都显著上调。在血液组织中(图 8e),相较于对照组, *Rhag*和*Rhbg* mRNA 的表达量在胁迫后都显著下调; C_A32 组*Rhcg1* mRNA 的表达量呈持续下降趋势, C_A64 组呈先上升后下降趋势; *Rhcg2a*、*Rh50*和*Rhd* mRNA 的表达量在胁迫96h时都显著下调; *Rhcg2b* mRNA 的表达量在时间和浓度两个变量上都没有任何显著趋势。

3 讨论

3.1 青海湖裸鲤Rh基因家族成员及其蛋白理化性质

Rh基因家族进化的特点是经历了两次大的复制事件,第1次是*Rh50*和*Rh30*基因的起源,第2次是产生*Rhce*和*Rhd*基因^[41],目前已知的Rh基因家族存在广泛,脊椎动物中通常存在4个Rh基因: *Rh30*、*Rhag*、*Rhbg*、*Rhcg*。相比之下,鱼类拥有更多的Rh基因拷贝数。截至目前,国内外对鱼类Rh基因家族的研究仍然滞后,基因及基因亚型的分类也比较混乱,据报道,鱼类中存在*Rhag*、*Rhbg*、*Rhcg1*、*Rhcg2*、*Rhd*几种基因^[42—44]。本研究在青海湖裸鲤中鉴定出了7个Rh基因家族成员,与已公布的斑马鱼、鲤、虹鳟、斑纹隐小鲮、红鳍东方鲀、尼罗罗非鱼等鱼类的Rh基因家族成员不同。在青海湖裸鲤中*Rhcg2*发生了分化,产生了*Rhcg2a*和*Rhcg2b*两个亚型,这两个基因长度差异较大,蛋白理化性质、蛋白结构、蛋白基序和结构域基本相似,分别位于13和14号染色体上。

*Rhd*糖蛋白的理论等电点为9,表明*Rhd*糖蛋白为碱性蛋白,而其余各Rh糖蛋白的理论等电点均低于7,为酸性蛋白。亲水性平均指数均为正值,不稳定指数均小于40^[45],说明所有Rh糖蛋白均为疏水性稳定蛋白。亚细胞定位于细胞膜上,表明它们属于膜蛋白。此外,蛋白质的三级结构模型显示这些

Rh糖蛋白均具有跨膜区域, 属于跨膜蛋白, 跨膜蛋白质通常为载体蛋白, 负责特定物质的跨膜运输: 既包括物质的进入细胞, 也包括代谢废物的排出^[46]。青海湖裸鲤Rh基因家族成员的跨膜螺旋数量在9—12个, 与Huang等^[47]的研究一致。这是目前已知最大的膜转运蛋白超家族——主要协同转蛋白超家族(Major facilitator superfamily, MFS)常见的数量^[48]。这进一步表明Rh基因家族与物质运输功能密切相

关。此外, *Rhbg*和*Rhcg2a*具有铵转运蛋白特有的12个跨膜螺旋^[49], 且选择压力分析结果表明, *Rhbg*和*Rhcg2a*受到正选择作用, 这些结果可能暗示着*Rhbg*和*Rhcg2a*在青海湖裸鲤氨氮代谢中发挥一定的作用。

3.2 碳酸盐碱胁迫对青海湖裸鲤血氨含量的影响

在胁迫组中, 从24h开始青海湖裸鲤血氨浓度相较于对照组都有显著的提升, 在胁迫后48h达到

表 5 青海湖裸鲤Rh基因家族成员正选择位点
Tab. 5 Positive sites of Rh gene family members in *Gymnocypris przewalskii*

基因 Gene	模型 Model	参数估计Estimates of parameter					似然值LRT P-value	正选择位点Positive site		
		Site class	0	1	2a	2b				
<i>Rhag</i>	Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00	1.00	无None		
		ω_0	0.05	1.00	0.05	1.00				
		ω_1	0.05	1.00	1.00	1.00				
<i>Rhbg</i>	Model A	1					0.27	不允许Not allowed 103 L 0.564, 151 I 0.971*, 154 I 0.506, 263 H 0.523, 417 L 0.536, 436 S 0.536		
	null Model A	f	0.84	0.13	0.02	0.00				
		ω_0	0.05	1.00	0.05	1.00				
		ω_1	0.05	1.00	4.65	4.65				
	Model A	1							0.97	不允许Not allowed 373 S 0.504, 387 F 0.514, 433 S 0.540
	null Model A	f	0.82	0.11	0.06	0.01				
ω_0		0.04	1.00	0.04	1.00					
ω_1		0.04	1.00	1.00	1.00					
<i>Rhcg2a</i>	Model A	1					0.07	不允许Not allowed 57 S 0.685, 113 H 0.976*, 168 V 0.504, 285 A 0.521, 348 A 0.662, 377 E 0.841, 404 V 0.523, 445 M 0.984*		
	null Model A	f	0.84	0.12	0.04	0.01				
		ω_0	0.05	1.00	0.05	1.00				
		ω_1	0.05	1.00	4.42	4.42				
	Model A	1							0.09	不允许Not allowed 138 C 0.544, 201 S 0.949, 438 I 0.946
	null Model A	f	0.89	0.10	0.01	0.00				
ω_0		0.05	1.00	0.05	1.00					
ω_1		0.05	1.00	172.93	172.93					
<i>Rh50</i>	Model A	1					0.01	不允许Not Allowed 24 L 0.596, 34 E 0.566, 36 D 0.569, 61 V 0.575, 83 L 0.589, 92 I 0.529, 167 V 0.603, 171 K 0.578, 309 L 0.576, 331 L 0.840, 370 Q 0.611, 374 Y 0.564, 383 L 0.560, 385 A 0.535, 413 V 0.618, 420 A 0.694, 440 C 0.733, 466 V 0.621, 470 V 0.785, 471 L 0.756		
	null Model A	f	0.81	0.08	0.11	0.01				
		ω_0	0.04	1.00	0.04	1.00				
		ω_1	0.04	1.00	1.28	1.28				
	Model A	1							1.00	不允许Not allowed
	null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00				
ω_0		0.16	1.00	0.16	1.00					
ω_1		0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1					1.00	不允许Not allowed			
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1							1.00	不允许Not allowed	
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1					1.00	不允许Not allowed			
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1							1.00	不允许Not allowed	
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1					1.00	不允许Not allowed			
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1							1.00	不允许Not allowed	
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1					1.00	不允许Not allowed			
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1							1.00	不允许Not allowed	
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1					1.00	不允许Not allowed			
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1							1.00	不允许Not allowed	
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1					1.00	不允许Not allowed			
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1							1.00	不允许Not allowed	
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1					1.00	不允许Not allowed			
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1							1.00	不允许Not allowed	
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1					1.00	不允许Not allowed			
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1							1.00	不允许Not allowed	
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1					1.00	不允许Not allowed			
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1							1.00	不允许Not allowed	
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1					1.00	不允许Not allowed			
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1							1.00	不允许Not allowed	
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1					1.00	不允许Not allowed			
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1							1.00	不允许Not allowed	
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1					1.00	不允许Not allowed			
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1							1.00	不允许Not allowed	
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1					1.00	不允许Not allowed			
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1							1.00	不允许Not allowed	
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1					1.00	不允许Not allowed			
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1							1.00	不允许Not allowed	
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1					1.00	不允许Not allowed			
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1							1.00	不允许Not allowed	
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1					1.00	不允许Not allowed			
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1							1.00	不允许Not allowed	
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1					1.00	不允许Not allowed			
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1							1.00	不允许Not allowed	
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1					1.00	不允许Not allowed			
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1							1.00	不允许Not allowed	
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1					1.00	不允许Not allowed			
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1							1.00	不允许Not allowed	
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1					1.00	不允许Not allowed			
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1							1.00	不允许Not allowed	
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1					1.00	不允许Not allowed			
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1							1.00	不允许Not allowed	
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1					1.00	不允许Not allowed			
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1							1.00	不允许Not allowed	
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1					1.00	不允许Not allowed			
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1							1.00	不允许Not allowed	
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59	2.59					
Model A	1					1.00	不允许Not allowed			
null Model A	f	0.87	0.13	0.00	0.00					
	ω_0	0.16	1.00	0.16	1.00					
	ω_1	0.16	1.00	2.59						

峰值, 24h开始血氨含量随着碳酸盐碱度的升高而升高。本胁迫实验中所用的碳酸盐碱主要成分为 NaHCO_3 , 水体中 HCO_3^- 浓度较高, 短时间内, 由于体内外渗透平衡作用, 大量 HCO_3^- 进入到鱼体内, 使得鱼体内pH上升, 引起 H^+ 含量减少, 致使机体氨氮代谢受到抑制。同时, 水环境中 H^+ 含量过低, 也无法与转运到体外的 NH_3 形成 NH_4^+ , 抑制氨转运过程, 最终导致 NH_3 在鱼体内累积^[50]。在48h之前血氨积累快速上升, 随着时间的推移血氨浓度缓慢下降, 表明青海湖裸鲤具有一定的碱环境适应能力, 可能

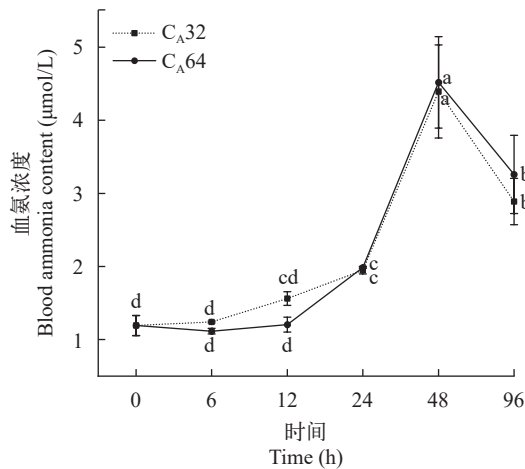


图6 碳酸盐碱度胁迫下青海湖裸鲤血氨浓度的变化

Fig. 6 Changes in blood ammonia concentration of *Gymnocypris przewalskii* under carbonate alkalinity stress

相同字母表示差异不显著 ($P>0.05$), 不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)

The same letter indicates no significant difference ($P>0.05$), while different letters indicate significant differences ($P<0.05$)

是通过体内某些基因的高度表达, 有效地降低了血氨含量。

3.3 青海湖裸鲤各组织中Rh基因家族成员碳酸盐碱胁迫响应

研究认为, 硬骨鱼类氨的主要排泄组织是鳃^[51], 给虹鳟注入 NH_4HCO_3 会上调鳃组织中*Rhbg*、*Rhcg1*和*Rhcg2*基因的表达^[21], 鲤*Rhag*、*Rhbg*、*Rhcg1*在鳃中的表达极显著高于其他组织, 因为位于鳃上皮细胞顶膜的*Rhcg2*糖蛋白和基底膜的*Rhbg*糖蛋白参与氨转运排泄^[19]。在鳃上皮中, *Rhbg*糖蛋白负责将 NH_4^+ 从血浆中运载到鳃上皮细胞中, 然后顶膜上的*Rhcg2*糖蛋白将上皮细胞中的 NH_4^+ 运载到水环境中。在本研究中, RNA-seq和qRT-PCR的基因表达分析均表明, 鳃组织中*Rhbg*和*Rhcg2a*的表达量全程维持较高水平, 显著高于其他基因, 且随碱度升高表达量也升高; *Rhag*、*Rhcg1*和*Rh50*的表达在胁迫也有上调, 由此可以推断青海湖裸鲤的鳃在高碱度环境下启动*Rhbg*和*Rhcg2a*的高表达来促进氨从血液进入到上皮细胞以降低血氨浓度, 避免氨中毒。

鳃是氨排泄主要器官, 而皮肤在鱼类氨排泄中更多的是起辅助作用^[42], 在青海湖裸鲤皮肤组织中, *Rhbg*、*Rhcg2a*和*Rhcg2b*表达量较高且随碱度升高表达量也升高, 但这一水平远低于鳃组织, 在其他研究中也验证了这一点^[27, 52, 53]。*Rhbg*表达量随着时间逐渐升高, *Rhcg2a*和*Rhcg2b*呈先上升后下降趋势, 说明青海湖裸鲤皮肤在氨氮代谢中也发挥着一一定的作用。RNA-seq结果表明*Rhcg1*在肝脏组织中表达极低, 但半定量RT-PCR的结果表明此基因在肝脏中完全不表达, 可能是由于转录组测序的灵敏

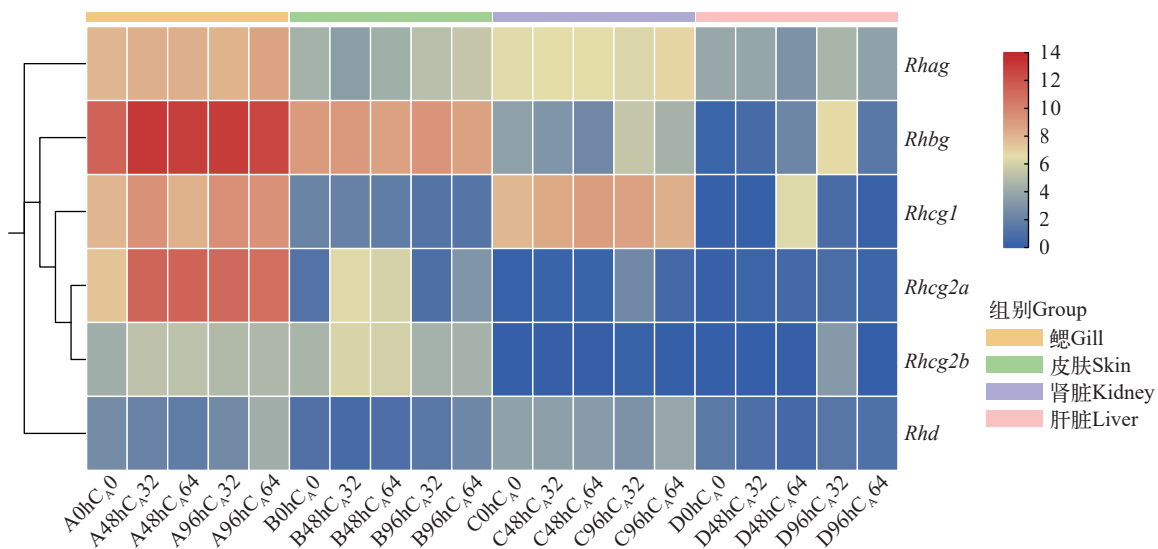


图7 Rh基因家族成员在不同组织的表达量热图

Fig. 7 Heat map of expression levels of Rh gene family members in different tissues

度较高,能够检测到低表达水平的基因,而PCR可能存在技术限制或者特定条件下未能准确检测到该基因的表达。

在肾脏组织中, *Rhag*、*Rhbg*、*Rhcl*和*Rh50*表现出先上升后下降的趋势,而*Rhcg2a*和*Rhcg2b*明显下调, *Rhd*没有明显趋势。这表明肾脏具有排氮功能,但其作用机制与鳃和皮肤不同,尤其是*Rhcg2a*和*Rhcg2b*在此过程中有可能没有发挥排氮作用。肝脏组织中的基因表达量也呈现出先上升后下降的趋势,48h时上调,表明肝脏在氮代谢中也具有一定作用,胁迫至96h,表达量极低,这可能是由于细胞屏障机制和细胞凋亡的共同效应所致。在血液组织中,所有基因的表达量均较低,表明血液在氮代谢过程中不起主要作用。

在本研究中,胁迫组血氨浓度逐渐升高,于48h到达峰值。同时,各组织中*Rhag*、*Rhbg*、*Rhcg1*、*Rhcg2a*、*Rhcg2b*和*Rh50*的表达量也逐渐上调并于48h到达峰值。随着血氨浓度回落,以上基因的表达量也随之下降,且胁迫48h及96h时C_A32组血氨浓度高于C_A64组,对应的鳃组织中*Rhbg*、*Rhcg2a*的表达量也是C_A64组高于C_A32组,在皮肤组织中*Rhbg*、

*Rhcg2a*和*Rhcg2b*也有这种变化关系,但在肾脏和肝脏组织中这种关系不明显。这表明碱度、血氨浓度与基因表达量呈正相关,也进一步证明在高碱环境下*Rhbg*和*Rhcg2a*可能是青海湖裸鲤氮代谢中发挥的关键基因,同时*Rhag*、*Rhcg1*、*Rhcg2b*和*Rh50*也发挥着一一定的作用、鳃在青海湖裸鲤排氮中发挥主要作用,皮肤、肾脏和肝脏的作用次之。

Rh基因家族成员都承担各自的作用,Nakada等^[19]在红鳍东方鲀鳃中发现了*Rhag*主要是负责与内环境的物质交换,*Rhcg*负责与外环境的物质交换,*Rhbg*则是细胞内的物质交换。在一些文献中,*Rh50*通常指*Rhag*,或者是与*Rhag*蛋白功能相似的其他蛋白,因为它们具有相似的分子量(约50 kD),青海湖裸鲤Rh基因家族成员中,*Rh50*遗传距离最远(图1),但在转录组序列中并未找到,可能是未被注释或者数据质量存在问题。在qRT-PCR的结果中,*Rh50*与*Rhag* mRNA的表达量在各组织中的变化趋势非常相似,可能也与氮代谢相关。*Rhd*和*Rhce*(又称*Rh30*),编码了RH血型系统中的D、C、c、E、e等不同抗原,对RH血型系统的多样性至关重要^[54],根据本研究结果,它在青海湖裸鲤氮代谢中不发挥作用。

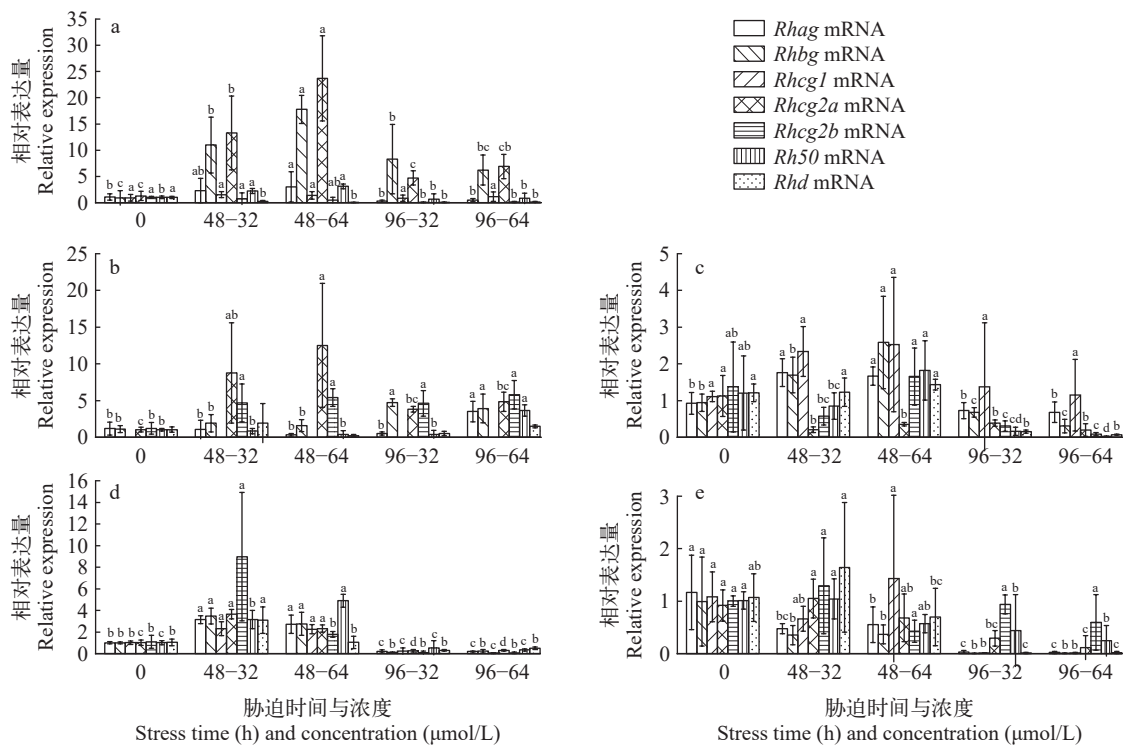


图8 Rh基因家族成员在各组织中的表达量

Fig. 8 The expression levels of Rh gene family members in various tissues

a. 鳃组织中的相对表达量; b. 皮肤组织中的相对表达量; c. 肾脏中的相对表达量; d. 肝脏中的相对表达量; e. 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 gill; b. Relative expression in skin; c. Relative expression in kidney; d. Relative expression in liver; e. Relative expression in blood; The same letter indicates no significant difference ($P>0.05$), while different letters indicate significant differences ($P<0.05$)

(作者声明本文符合出版伦理要求)

参考文献:

- [1] Wu Y F. The Fishes of the Qinghai-Xizang Plateau [M]. Chengdu: Sichuan Science & Technology Press, 1992: 441-444. [武云飞. 青藏高原鱼类 [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1992: 441-444.]
- [2] Zhao K. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Gymnocypris przewalskii*, crucian carp, *Carassius auratus* and *Ctenopharyngodon idella* [J]. *Freshwater Fisheries*, 2001(5): 49-51. [赵凯. 青海湖裸鲤与鲤、鲫、草鱼的随机扩增多态DNA分析 [J]. *淡水渔业*, 2001(5): 49-51.]
- [3] Shi J Q, Qi H F, Yang J X, *et al.* Evaluation on the effect of proliferation and release of *Gymnocypris przewalskii* [J]. *Agricultural Technology Service*, 2016, **33**(12): 128-129. [史建全, 祁洪芳, 杨建新, 等. 青海湖裸鲤增殖放流效果评估 [J]. *农技服务*, 2016, **33**(12): 128-129.]
- [4] Fan Y N. *Gymnocypris przewalskii* reserves recovered to 114100 tons [N]. 2022-12-08. [樊娅楠. 青海湖裸鲤蕴藏量恢复到11.41万吨 [N]. 2022-12-08.]
- [5] Fang, X. 120300 tons! *Gymnocypris przewalskii* downgraded from endangered to vulnerable species [N]. 2024-02-27. [芳旭. 12.03万吨!青海湖裸鲤“降级”从濒危降为易危物种 [N]. 2024-02-27.]
- [6] Liu F, Li J, Li J T, *et al.* Effects of carbonate alkalinity stress on the survival, growth, reproduction, and immune enzyme activities of *Exopalaemon carinicauda* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, **23**(5): 1137-1147. [柳飞, 李健, 李吉涛, 等. 碳酸盐碱度对脊尾白虾生存、生长、繁殖及免疫酶活性的影响 [J]. *中国水产科学*, 2016, **23**(5): 1137-1147.]
- [7] Yao Z, Guo W, Lai Q, *et al.* *Gymnocypris przewalskii* decreases cytosolic carbonic anhydrase expression to compensate for respiratory alkalosis and osmoregulation in the saline-alkaline Lake Qinghai [J]. *Journal of Comparative Physiology B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 2016, **186**(1): 83-95.
- [8] Shi, J Q, Qi H F, Yang J X, *et al.* Monitoring of *Gymnocypris przewalskii* and Freshwater Intensive Aquaculture Technology [M]. Xining: Qinghai Ethnic Publishing House, 2012: 1-6. [史建全, 祁洪芳, 杨建新, 等. 青海湖裸鲤资源监测与淡水全人工养殖技术 [M]. 西宁: 青海民族出版社, 2012: 1-6.]
- [9] Wilson J M, Iwata K, Iwama G K, *et al.* Inhibition of ammonia excretion and production in rainbow trout during severe alkaline exposure [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1998, **121**(1): 99-109.
- [10] Campa-Córdova A I, Hernández-Saavedra N Y, Ascencio F. Superoxide dismutase as modulator of immune function in American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology* *Toxicology & Pharmacology*, 2002, **133**(4): 557-565.
- [11] 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.
- [12] Wang Y B, Xu Z R, Deng Y S. Toxicity of ammonia and nitrite to aquaculture and the control measures [J]. *Feed Industry*, 2002, **23**(12): 46-48. [王彦波, 许梓荣, 邓岳松. 水产养殖中氨氮和亚硝酸盐氮的危害及治理 [J]. *饲料工业*, 2002, **23**(12): 46-48.]
- [13] Randall D J, Wood C M, Perry S F, *et al.* Urea excretion as a strategy for survival in a fish living in a very alkaline environment [J]. *Nature*, 1989, **337**(6203): 165-166.
- [14] Mommsen T P, Walsh P J. Biochemical and environmental perspectives on nitrogen metabolism in fishes [J]. *Experientia*, 1992, **48**(6): 583-593.
- [15] Levine P, Stetson R E. An unusual case of intra-group agglutination [J]. *Vox Sanguinis*, 1980, **38**(5): 297-300.
- [16] Marini A M, Urrestarazu A, Beauwens R, *et al.* The Rh (rhesus) blood group polypeptides are related to NH_4^+ transporters [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1997, **22**(12): 460-461.
- [17] Wright P A, Wood C M. A new paradigm for ammonia excretion in aquatic animals: role of Rhesus (Rh) glycoproteins [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2009, **212**(Pt 15): 2303-2312.
- [18] 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, Molecules, and Diseases*, 2001, **27**(1): 90-101.
- [19] Nawata C M, Hirose S, Nakada T, *et al.* Rh glycoprotein expression is modulated in pufferfish (*Takifugu rubripes*) during high environmental ammonia exposure [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2010, **213**(Pt 18): 3150-3160.
- [20] Nakada T, Westhoff C M, Kato A, *et al.* Ammonia secretion from fish gill depends on a set of Rh glycoproteins [J]. *The FASEB Journal*, 2007, **21**(4): 1067-1074.
- [21] 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, and Environmental Physiology*, 2009, **179**(7): 799-810.
- [22] Rodela T M, McDonald M D, Walsh P J, *et al.* Interactions between cortisol and Rhesus glycoprotein expression in ureogenic toadfish, *Opsanus beta* [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2012, **215**(Pt 2): 314-323.
- [23] Kolarevic J, Takle H, Felip O, *et al.* Molecular and physiological responses to long-term sublethal ammonia exposure in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2012(124/125): 48-57.
- [24] Chen X L, Zhang B, Chng Y R, *et al.* Ammonia exposure affects the mRNA and protein expression levels of certain

- Rhesus* glycoproteins in the gills of climbing perch [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2017, **220**(Pt 16): 2916-2931.
- [25] Tu H Q, Zhao J L, Huang S Y, *et al.* Ammonia transporter expression of Rh protein gen in gills of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* under stress of alkali [J]. *Fisheries Science*, 2019, **38**(2): 194-200. [涂翰卿, 赵金良, 黄思颖, 等. 碱胁迫下罗非鱼鳃氨转运蛋白Rh基因的表达 [J]. 水产科学, 2019, **38**(2): 194-200.]
- [26] Wu J W, Zhao J L, Zhao Y, *et al.* Change in ammonia metabolism gene expression of *Oreochromis niloticus* under the stress of high carbonate alkalinity [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, **23**(6): 1290-1299. [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.]
- [27] Dong X L, Wei Y Y, Xu Q Y. Cloning and expression of *Rhesus* glycoprotein genes in tissues in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2013, **26**(5): 6-10. [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, **26**(5): 6-10.]
- [28] He Q, Chuang Y M, Su B F. Effects of carbonate alkalinities 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.]
- [29] Zhou Z, Yang J, Lv H, *et al.* The adaptive evolution of *Leuciscus waleckii* in Lake Dali Nur and convergent evolution of Cypriniformes fishes inhabiting extremely alkaline environments [J]. *Genome Biology and Evolution*, 2023, **15**(5): evad082.
- [30] 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: 10-14. [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: 10-14.]
- [31] 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.
- [32] Potter S C, Luciani A, Eddy S R, *et al.* HMMER web server: 2018 update [J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, **46**(W1): W200-W204.
- [33] Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, **38**(7): 3022-3027.
- [34] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, **4**(4): 406-425.
- [35] Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1981, **17**(6): 368-376.
- [36] Gao F, Chen C, Arab D A, *et al.* EasyCodeML: a visual tool for analysis of selection using CodeML [J]. *Ecology and Evolution*, 2019, **9**(7): 3891-3898.
- [37] Yang Z, Nielsen R. Estimating synonymous and nonsynonymous substitution rates under realistic evolutionary models [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2000, **17**(1): 32-43.
- [38] Nielsen R. Statistical tests of selective neutrality in the age of genomics [J]. *Heredity*, 2001, **86**(Pt 6): 641-647.
- [39] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method [J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402-408.
- [40] Tian F, Liu S, Zhou B, *et al.* Chromosome-level genome of Tibetan naked carp (*Gymnocypris przewalskii*) provides insights into Tibetan highland adaptation [J]. *DNA Research*, 2022, **29**(4): dsac025.
- [41] Matassi G, Chérif-Zahar B, Pesole G, *et al.* The members of the RH gene family (RH50 and RH30) followed different evolutionary pathways [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1999, **48**(2): 151-159.
- [42] Shang, Z H. Transcriptomic analysis and Rh glycoprotein gene expression in *Paramisgurus dabryanus* during ammonia loading [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2022: 16-35. [商泽昊. 氨胁迫下大鳞副泥鳅的转录组分析和Rh糖蛋白基因表达变化 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2022: 16-35.]
- [43] Zhang L, Michele Nawata C, De Boeck G, *et al.* Rh protein expression in branchial neuroepithelial cells, and the role of ammonia in ventilatory control in fish [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 2015(186): 39-51.
- [44] Caner T, Abdunnour-Nakhoul S, Brown K, *et al.* Mechanisms of ammonia and ammonium transport by rhesus-associated glycoproteins [J]. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2015, **309**(11): C747-C758.
- [45] 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, Genetic Engineering & Biotechnology*, 2018, **16**(2): 721-730.
- [46] Ryu H, Fuwad A, Yoon S, *et al.* Biomimetic membranes with transmembrane proteins: state-of-the-art in transmembrane protein applications [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, **20**(6): 1437.
- [47] Hung C Y C, Tsui K N T, Wilson J M, *et al.* *Rhesus* glycoprotein gene expression in the mangrove killifish *Kryptolebias marmoratus* exposed to elevated environmental ammonia levels and air [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2007, **210**(Pt 14): 2419-2429.

- [48] Busch W, Saier M H Jr. The transporter classification (TC) system, 2002 [J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, **37**(5): 287-337.
- [49] Huang C H, Peng J. Evolutionary conservation and diversification of Rh family genes and proteins [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, **102**(43): 15512-15517.
- [50] 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.
- [51] Nawata C M, Hung C C Y, Tsui T K N, *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.
- [52] Braun M H, Steele S L, Perry S F. The responses of zebrafish (*Danio rerio*) to high external ammonia and urea transporter inhibition: nitrogen excretion and expression of rhesus glycoproteins and urea transporter proteins [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2009, **212**(Pt 23): 3846-3856.
- [53] Wood C M, Nawata C M, Wilson J M, *et al.* Rh proteins and NH₄(+)-activated Na⁺-ATPase in the Magadi tilapia (*Alcolapia grahami*), a 100% ureotelic teleost fish [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2013, **216**(Pt 16): 2998-3007.
- [54] Mollison P L, Hughes-Jones N C, Lindsay M, *et al.* Suppression of primary RH immunization by passively-administered antibody. Experiments in volunteers [J]. *Vox Sanguinis*, 1969, **16**(4): 421-439.

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

GUO Shou-Quan^{1,2}, TAN Jin^{1,2}, LIU Dan¹, CHAO Yan³, ZHANG Cun-Fang¹, NIE Miao-Miao¹,
KOU Ruo-Bin^{1,2}, YAO Zhan-Wen^{1,2} 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. Department of Animal Science, College of Agricultural and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, China)

Abstract: This study delves into the significance of the Rh (Rhesus) gene family in the high alkali adaptation of *Gymnocypris przewalskii*, conducting bioinformatics analysis on the genome data and exploring alkali stress responses through gene expression detection. The results showed that seven Rh gene family members encoding proteins ranging from 425 to 562 amino acids. Despite notable differences in gene structure, motif and domain analysis showcased a high level of conservation among these members. Chromosome mapping revealed the dispersion of Rh gene family members across seven chromosomes (Chr 37, 29, 46, 13, 14, 15, and 26), all encoding hydrophobic stable proteins, except for *Rhd* products, which were acidic proteins. The predominant alpha-helix secondary structure was observed in these proteins. Subcellular localization prediction positioned all Rh gene products within the cell membrane. Selection pressure analysis highlighted positive selection in *Rhbg* and *Rhcg2a*. Under carbonate alkalinity stress, *Gymnocypris przewalskii* exhibited a gradual increase in blood ammonia concentration, followed by a decline after 48h. Gene expression studies showed that the expression levels of *Rhag*, *Rhbg*, *Rhcg1*, *Rhcg2a*, and *Rh50* in the gills, skin, kidney, and liver of *Gymnocypris przewalskii* increased initially and then decreased. In the blood tissue, the expression levels of *Rhag*, *Rhbg*, *Rhcg2a*, and *Rh50* gradually decreased, while the expression level of *Rhd* first increased and then decreased. *Rhbg* and *Rhcg2a* may be the key genes involved in ammonia nitrogen metabolism in *Gymnocypris przewalskii*, while *Rhag*, *Rhcg1*, *Rhcg2a*, and *Rh50* also playing significant role. In terms of tissues and organs, gills are primarily responsible for ammonia excretion followed by skin, kidney, and liver. This study revealed the role of RH gene family members in ammonia nitrogen metabolism of *Gymnocypris przewalskii*, and provided a scientific foundation for the conservation of this species.

Key words: Rh gene family; Alkaline stress; Ammonia nitrogen metabolism; *Gymnocypris przewalskii*