

Ding S Y, Feng Y H, Loic K F, *et al.* Molecular characterization and tissue expression of the *bim* gene in *Megalobrama amblycephala* and its relationship verification with mam-miR-24-3 [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2025, 49(10): 102511. [丁思玉, 冯雅慧, LOIC Kemmadzong Foning, 等. 团头鲂基因的分子特征、组织表达及其与mam-miR-24-3的关系验证 [J]. 水生生物学报, 2025, 49(10): 102511.]

团头鲂基因的分子特征、组织表达及其与mam-miR-24-3的关系验证

丁思玉^{1,2,3} 冯雅慧^{1,2,3} LOIC Kemmadzong Foning^{1,2,3} 陈杰^{1,2,3}
郑国栋^{1,2,3} 邹曙明^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学农业农村部团头鲂遗传育种中心, 上海 201306; 2. 上海海洋大学农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306; 3. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘要: 为了明确团头鲂(*Megalobrama amblycephala*) *bim*基因的结构和功能, 研究通过TA克隆获得其编码区(CDS)全长序列, 并利用生物信息学工具系统分析Bim蛋白的一级、二级和三级结构特征。多序列比对显示, 团头鲂Bim蛋白与红鳍鲌(*Chanodichthys erythropterus*)的同源性最高(98.34%), 基于邻接法(Neighbor-Joining)构建的系统进化树进一步支持两者在进化上具有最近亲缘关系。组织表达谱分析表明, *bim*基因及其潜在调控因子mam-miR-24-3在鳃组织中表达量显著高于其他组织; 在低氧胁迫24h后, 两者在鳃中的表达均显著上调, 提示其可能协同参与团头鲂鳃组织的低氧应答过程。通过双荧光素酶报告基因实验证实, mam-miR-24-3可直接靶向结合*bim* mRNA的3'非翻译区(3'-UTR), 导致荧光素酶活性下降, 结合绿色荧光蛋白技术的共定位分析, 表明mam-miR-24-3可在转录后水平负调控*bim*表达。亚细胞定位实验显示, 在常氧与低氧条件下, Bim蛋白均主要定位于细胞核, 提示其可能通过核内信号通路直接调控下游基因转录。研究为揭示*bim*基因在团头鲂低氧适应中的分子机制提供了理论依据, 并为团头鲂耐低氧育种靶点的筛选奠定基础。

关键词: *bim*; mam-miR-24-3; 鳃; 生物信息学分析; 低氧; 团头鲂

中图分类号: Q344⁺.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2025)10-102511-09

doi: 10.3724/1000-3207.2025.2025.0077 CSTR: 32229.14.SSSWXB.2025.0077



团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)又称武昌鱼^[1], 是一种草食性鱼类, 也是我国主要养殖鱼类之一, 具有抗病性高、味道鲜美等优点^[2], 相比鲤(*Cyprinus carpio*)和鲫(*Carassius auratus*)等鱼类, 团头鲂在养殖环境中表现出较差的低氧耐受性, 这一特性已成为限制其养殖产业发展的主要瓶颈^[3,4]。

鱼类的低氧耐受能力与功能基因的表达和调控密切相关。Bim蛋白作为细胞凋亡过程中的关键调控因子, 通过BH3结构域介导线粒体途径的凋亡信号激活: 一方面与促凋亡蛋白Bax/Bak相互作用介导细胞色素c的释放, 启动凋亡级联反应^[5]; 另一

方面, 其BH3结构域能够与抗凋亡蛋白结合, 诱导细胞凋亡^[6]。研究表明, *bim*在鱼类胁迫应答中发挥双重作用, 尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)中*bim*的增加会促进细胞凋亡以应对胁迫^[7]; 异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)被寄生虫感染后, *bim*介导的线粒体凋亡通路的相关凋亡基因会上调^[8]。总的来说, *bim*在细胞凋亡和生存中发挥关键作用, 其表达受到精细调控, 但*bim*在团头鲂低氧应激中的功能及其调控机制尚未明确。

miRNA是一类长约21—23个核苷酸的非编码单链小分子RNA。研究证实, miRNA与靶基因

收稿日期: 2025-03-10; 修订日期: 2025-05-12

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFD2400600-2); 国家自然科学基金(32273100)资助 [Supported by National Key Research and Development Program of China (2022YFD2400600-2); the National Natural Science Foundation of China (32273100)]

作者简介: 丁思玉(2000—), 男, 硕士研究生; 研究方向为鱼类遗传育种。E-mail: 1805990058@qq.com

通信作者: 邹曙明, 男, 教授; 研究方向为鱼类遗传育种。E-mail: smzou@shou.edu.cn

3'UTR区域特异性结合,在转录后水平调控基因表达,发挥重要的生物学功能^[9-11]。诸多研究表明,团头鲂基因的表达受miRNA等非编码RNA的广泛调控^[12-14],但mam-miR-24-3在团头鲂上的功能及靶基因的互作研究仍属空白。值得注意的是,金鱼(*Carassius auratus*)鳃中相关研究表明低氧通过激活miR-24负调控**bim**^[15],影响金鱼鳃组织变化应对低氧胁迫。这提示miR-24与**bim**互作调控机制可能是金鱼低氧适应的调控模块。然而,该调控关系是否存在于低氧敏感的团头鲂中,仍需验证。

基于此,本研究聚焦于团头鲂**bim**基因,旨在分析其分子特征及与mam-miR-24-3的调控关系,以揭示其在鳃组织低氧应答中的潜在作用。通过TA克隆验证了团头鲂**bim**基因的CDS区,结合生物信息学方法分析该蛋白的理化特性及系统进化关系;利用实时荧光定量PCR技术检测**bim**和mam-miR-24-3在团头鲂中的组织表达谱及低氧诱导表达规律;进一步通过双荧光素酶报告基因系统、绿色荧光蛋白技术与亚细胞定位实验,阐明mam-miR-24-3对**bim**的靶向调控机制及其核内功能特性。研究结果有望为团头鲂低氧适应机制研究及耐低氧新品种选育提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用9尾团头鲂[(15±0.5) g]取自上海海洋大学农业农村部团头鲂遗传与育种中心,暂养后

用于后续实验。所用293T细胞为本实验室留存细胞。所有实验操作均按照上海海洋大学动物实验伦理委员会的指导方针进行。

1.2 低氧胁迫及取样

按照本研究预实验方案,将实验鱼分为常氧组[(7.9±0.1) mg/L]和低氧处理组[(2.0±0.1) mg/L],每组各设3个平行。将低氧组实验鱼通过BAW5080鱼类低氧胁迫实验工作站(重庆,江雪)处理24h,解剖并采集两组实验鱼的鳃、脑、肝脏、肌肉、肾、心和肠组织。各组织样品经PBS水冲洗干净,立即置于TRIzol (TaKaRa)中匀浆,再用于总RNA提取。

1.3 **bim**基因cDNA序列的验证以及分析

团头鲂bim**基因TA克隆** 从NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上下载团头鲂**bim**基因cDNA序列(XM_048203885.1),根据该序列通过Primer Premier 5.0设计克隆引物(表1)。采用PCR技术扩增目的基因后,经凝胶电泳分离并回收目标片段,将其与pMD19-T载体进行重组连接。将连接产物转化至感受态细胞,涂布于含氨苄青霉素的固体培养基上,37℃倒置培养12—16h。挑取单菌落送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序分析。

****bim**基因的生物信息学分析** 利用Snapgene软件比对TA克隆测序所得CDS序列,并将其翻译成氨基酸序列,通过ExPASy-ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)在线分析团头鲂Bim的理化性质、疏水性和等电点等;利用SMART ([表1 本实验所用引物和miRNA模拟物](http://</p>
</div>
<div data-bbox=)

Tab. 1 Primers and miRNA mimics used in this experiment

引物名称Primer name	引物序列Primer sequence (5'—3')	用途Application
bim	ATGTCTGACACGTCCAGAGAGCA TCATCTTCTTCGAGGAAAAACT	序列验证(TA克隆)
bim -QPCR	TCACCGATGTCCCGAAT CGGCGAACCATACCTCAT	荧光定量PCR
mam-miR-24-3	CGTGGCTCAGTTCAGCAGG AGTGCAGGGTCCGAGGTATT	
β -actin	TGCCATGTATGTGGCCATCC TCTTTCGGCTGTGGTGGTGA	
U6	GGAGCCGGCAGAGGTATTTT TGGTTTTTGACACCTTGTGGT	
pmirGLO- bim 3'UTR	tgtttaaacgagctcgctagcTTGACACATTGAATGCCCAGC caggtcgactctagactcgagATAGACTACGCAAACCAAACGCA	双荧光素酶检测
pEGFP- bim 3'UTR	tgaaccgtcagatccgctagcTTGACACATTGAATGCCCAGC aatcgaagcttgagctcgagATAGACTACGCAAACCAAACGCA	绿色荧光蛋白
mam-miR-24-3 mimics	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAGU	合成miRNA
mimics NC	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	
mam-miR-24-3stem loop-primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACACTGTT	miRNA反转录
GLO/EGFP- bim 3'UTR-M	GAAAGgatcgaggATTAGATGCTGTGTGACGTGAAAA CTAATccgcatcCTTTCCATGTGAACGCAGGAA	定点突变
pEGFP- bim	tgaaccgtcagatccgctagcATGTCTGACACGTCCAGAGAGCA aatcgaagcttgagctcgagTCATCTTCTTCGAGGAAAAACT	亚细胞定位

smart.emblheidelberg.de/)、PRABI (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html) 网站在线预测蛋白质二级结构; 利用SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 预测Bim蛋白的三级结构。

在NCBI中查询和下载不同物种**bim**的氨基酸序列, 利用DNAMAN进行团头鲂Bim和其他多个物种的氨基酸序列相似度比对。采用MEGA11软件, 基于NJ (Neighbor-Joining) 邻接法构建系统进化树。利用WolfPSort (<https://wolfsort.hgc.jp/>)、Cell-PLoc2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 网站开展亚细胞定位预测。

1.4 Real-time qPCR

用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time; Takara, 日本) 和 Seven-Clever™ First Strand cDNA Synthesis Kit (with dsDNase; 赛文, 中国) 将上述组织提取的RNA反转录为cDNA及miRNA cDNA, 同时分别通过Primer Premier 5.0和miRNA Design软件设计团头鲂**bim**和mam-miR-24-3的qPCR引物(表1), 内参引物分别为 β -actin和U6。

qPCR反应在荧光定量仪(Bio-Rad)上进行, 反应体系(25 μ L)为: TB Green Premix Ex Taq II 12.5 μ L, 上游引物和下游引物各1 μ L, cDNA 2 μ L, RNase-free water 8.5 μ L。反应程序: 95℃ 30s; 95℃ 5s, 60℃ 30s, 40 cycle; 95℃ 15s; 60℃ 1min; 95℃ 15s。

1.5 网站预测miR-202-5p的靶基因

团头鲂**bim** 3'UTR序列由NCBI获得, mam-miR-24-3序列来自本实验室前期通过高通量测序技术构建的团头鲂miRNA文库, 采用RNAhybrid (<https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>) 软件预测候选靶基因**bim**的3'UTR与mam-miR-24-3的种子序列的结合位点。

1.6 载体构建

双荧光素酶报告基因、绿色荧光蛋白报告基因及亚细胞定位重组载体构建和酶切鉴定 根据团头鲂**bim**基因的3'UTR和CDS序列, 使用诺唯赞线上工具 (<https://crm.vazyme.com/cetool/singlefragment.html>) 设计带有酶切位点和同源臂序列的特异性引物(表1), 以团头鲂cDNA为模板, 通过PCR扩增获得候选靶基因的3'UTR和CDS片段, 经1.2%琼脂糖凝胶电泳检测显示特异性目的条带。确认条带单一且清晰后, 将PCR产物进行2%琼脂糖凝胶电泳分离, 在凝胶成像系统下快速切取目的条带, 并采用胶回收试剂盒(Omega, 美国)进行纯化回收。同时, 使用Nhe I和Xho I限制性内切酶(Thermo,

美国)对pmir-GLO和pEGFP-N1载体进行双酶切, 酶切产物经2%琼脂糖凝胶电泳检测后割胶回收。

采用碧云天(中国)生产的无缝克隆试剂盒, 将纯化后的目的片段分别与双酶切处理的pmir-GLO和pEGFP-N1载体进行连接, 随后将连接产物转化至感受态细胞, 得到重组质粒pmirGLO-**bim** 3'UTR、pEGFP-**bim** 3'UTR及pEGFP-**bim**, 分别以含氨苄青霉素和卡那霉素的LB培养基分别进行抗性筛选, 通过菌液PCR验证正确后, 将阳性克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序分析。确认序列无误后, 进行扩大培养, 并按照质粒提取试剂盒(Omega, 美国)的操作说明提取重组质粒。

采用Nhe I和Xho I限制性内切酶对构建成功的重组质粒进行双酶切验证。

定点突变 使用定点突变试剂盒(诺唯赞, 中国)将所提野生型质粒pmirGLO-**bim** 3'UTR和pEGFP-**bim** 3'UTR中与mam-miR-24-3的种子序列-CTGAGCC定点突变为-GATGCGG, 突变型质粒命名为pmirGLO-**bim** 3'UTR-M和pEGFP-**bim** 3'UTR-M, 随后将突变质粒进行抗性筛选, 经菌液PCR验证正确的阳性克隆被送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序分析。质粒测序确认突变后, 进行扩大培养并提取质粒。

1.7 双荧光素酶和绿色荧光蛋白实验

共转染mam-miR-24-3 mimics和相关质粒

将0.75 μ L lipofectamine™ 3000转染试剂与0.5 μ g重组质粒 (pmirGLO-**bim** 3'UTR和pmirGLO-**bim** 3'UTR-M、pEGFP-**bim** 3'UTR和pEGFP-**bim** 3'UTR-M) 和20 pmol的mam-miR-24-3 mimics (mimics组)、negative control mimic (NC组) 分别用Opti-MEM稀释到25 μ L, 将稀释后的质粒与lipofectamine™ 3000按1:1比例混合并充分混匀, 室温孵育10—15min。随后将50 μ L混合液分别加入相应孔中, 置于37℃、5% CO₂培养箱中继续培养24h。空白对照组仅加入0.5 μ g重组质粒DNA, 不添加mam-miR-24-3 mimics和negative control mimics, 其余实验步骤与实验组保持一致。

双荧光素酶检测 荧光素酶活性检测根据Double-Luciferase Reporter Assay Kit (金开瑞, 中国) 说明书进行, 记录Firefly Luciferase与Renilla Luciferase比值($n=3$), 采用GraphPad Prism 9软件进行数据可视化分析并作图, 运用单因素方差分析(One-Way ANOVA)评估各组间的统计学差异, 显著和极显著概率值(P)的阈值分别设置为0.05和0.01。

绿色荧光蛋白检测 用荧光显微镜(Leica, 德国)观察并拍照, 野生型重组质粒和突变型重组

质粒分别与mimics和NC转入293T细胞,同时设置空白组即分别仅转入野生型和突变型质粒,观察记录转染24—36h后的细胞绿色荧光蛋白表达情况变化。

1.8 亚细胞定位实验

转染 pEGFP-bim 质粒 将 lipofectamine™ 3000 转染试剂与 1 μg 重组质粒 pEGFP-bim 分别用 Opti-MEM 稀释到 50 μL, 稀释质粒与稀释 lipofectamine™ 3000 1:1 充分混匀, 孵育 10—15 min, 分别将 100 μL 混合液加入共聚焦小皿内, 于 37℃, 5% CO₂ 环境中继续培养 24 h。

常氧和低氧亚细胞定位检测 细胞转染 24—48 h 后, 将其分为常氧组[(7.9±0.1) mg/L]和低氧组[(2.0±0.1) mg/L], 其中低氧组细胞用低氧袋(三菱, 日本)低氧处理 24 h。首先吸除孔板中的培养基, 用 PBS 轻柔洗涤细胞 3 次; 随后在室温条件下, 使用预冷的 4% 多聚甲醛固定细胞 25 min; 去除固定液后, 以 PBS 洗涤细胞, 加入 DAPI 染液并用锡纸避光孵育 10 min; 吸除 DAPI 染液后, 再次用 PBS 洗涤细胞 3 次, 每次 10 min。最后使用激光共聚焦显微镜(Leica, 德国)进行观察和图像采集。

2 结果

2.1 bim cDNA 的序列克隆

bim 的序列特征与理化性质 TA 克隆所得 bim 基因编码区序列, 共 546 bp, 该序列编码 182 个 aa。Bim 分子式为 C₈₃₇H₁₂₈₈N₂₆₀O₂₇₂S₉, 分子质量为 19.63 kD, 亲水系数(Hydrophilic coefficient)为 -0.629, 理论等电点(Theoretical isoelectric point)为 5.54, 不稳定系数(Instability index)为 77.11, 消光系数(Extinction coefficients)为 13980, 脂肪族指数(Aliphatic Index)为 55.03, 因此 Bim 蛋白为不稳定疏水性蛋白。

Bim 蛋白质二级结构包括 1 个 BH3 结构域和 2 个低复杂功能结构域, 仅含有 19.89% 的 α-螺旋、60.22% 的无规则卷曲、19.89% 的延伸链。

通过 SWISS MODEL 同源建模法预测蛋白质三级结构, 以 PDB ID 为 B8JK68.1.A 的结构作为模板建立 Bim 蛋白三级结构。全局模型质量估计(GMQE)得分为 0.56, 处于 0 至 1 的正常区间范围内, 表明该预测模型具有可靠的准确性; B8JK68.1.A 与目标蛋白 Bim 的氨基酸序列相似性高达 84.66%, 表明 Bim 蛋白与模板蛋白的匹配度较优。上述结果表明, 预测模型能够准确反映 Bim 蛋白的三级结构特征, 且三级结构预测结果与二级结构分析结果高度一致。通过 SignalP 6.0 软件分析显示, Bim 蛋白不存在信号肽和跨膜结构域, 表明该蛋白既不属于分泌蛋白

也不属于跨膜蛋白。基于 WolfPSort 和 Cell-PLoc 2.0 软件的亚细胞定位预测结果显示, Bim 蛋白主要定位于细胞核内。

Bim 多物种氨基酸序列比对及系统发育树分析

多物种氨基酸序列比对结果显示, 团头鲂 Bim 氨基酸序列与红鳍鲌相似度最高, 为 98.34%; 其次是草鱼(*Ctenopharyngodon idella*), 为 95.58%; 与麦穗鱼(*Pseudorasbora parva*)、鲤、多鳞白甲鱼(*Onychostoma macrolepis*)、鲫和斑马鱼(*Danio rerio*) Bim 氨基酸序列的相似度分别为 86.19%、86.19%、85.64%、81.77% 和 81.22%。

系统发育树显示(图 1), 团头鲂 Bim 与红鳍鲌最为接近, 其次是草鱼, 三者聚为一支。

2.2 bim 和 mam-miR-24-3 在团头鲂不同组织中的表达分布

荧光定量 PCR 证明 bim 在鳃中表达量最高, 极显著高于其他组织($P < 0.01$; 图 2A); mam-miR-24-3 同样在团头鲂鳃中表达量最高, 极显著高于其他组织($P < 0.01$; 图 2B)。

2.3 bim 和 mam-miR-24-3 在低氧胁迫后团头鲂鳃组织中的表达量变化

根据荧光定量 PCR 结果显示, 低氧胁迫 24 h 组(H24)团头鲂鳃组织中 bim 和 mam-miR-24-3 的相对表达水平平均极显著高于常氧组(N0)($P < 0.01$; 图 3)。

2.4 mam-miR-24-3 与 bim 靶向关系预测

通过 RNAhybrid 软件预测分析, 发现 mam-miR-24-3 的种子序列(2—8 位)与 bim 3'UTR 区存在完整的互补结合位点(图 4), 因此推测 bim 可能是 mam-miR-24-3 潜在的靶基因。

2.5 野生型和突变型载体构建与验证

以团头鲂鳃 cDNA 为模板, 针对 bim 基因的 CDS 区和 3'UTR 区设计特异性引物, 分别克隆出长度为 546 和 560 bp 的 bim 基因 CDS 和 3'UTR 片段(包含结合位点序列), 凝胶电泳结果显示条带大小与预期相符, 证实 bim 基因 CDS 区和 3'UTR 区片段已成功

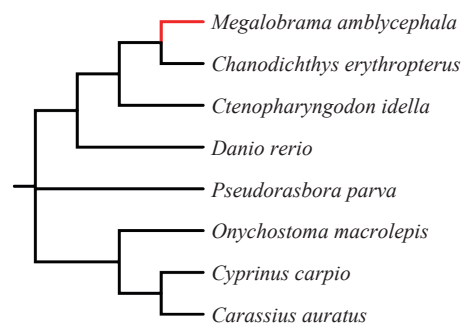


图 1 Bim 蛋白系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of Bim protein

克隆。将构建的野生型重组质粒p**mir**-GLO-**bim** 3'UTR、pEGFP-**bim**、pEGFP-**bim**3'UTR和突变型重组质粒p**mir**GLO-**bim**3'UTR-M、pEGFP-**bim**-3'

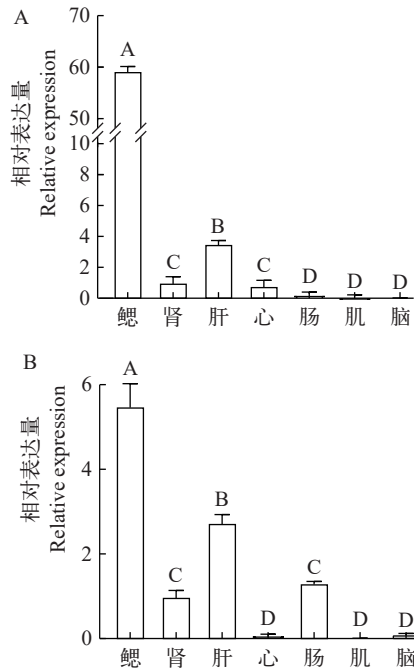


图2 团头鲂**bim** (A)、mam-miR-24-3(B)组织表达

Fig. 2 Relative expression level of *bim* (A), and mam-miR-24-3 (B) in different tissues of *Megalobrama amblycephala*

注: 不同大写字母表示组间差异极显著($P < 0.01$)

Note: Different uppercase letters indicated significant differences between groups ($P < 0.01$)

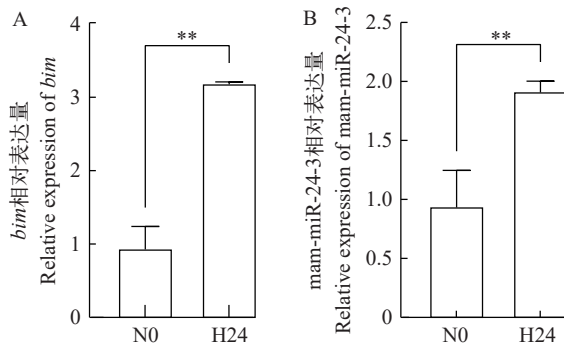


图3 低氧24h后团头鲂鳃中**bim** (A)、mam-miR-24-3 (B)的表达量

Fig. 3 The expression levels of *bim* (A), and mam-miR-24-3 (B) in the gills of *Megalobrama amblycephala* after hypoxia for 24h

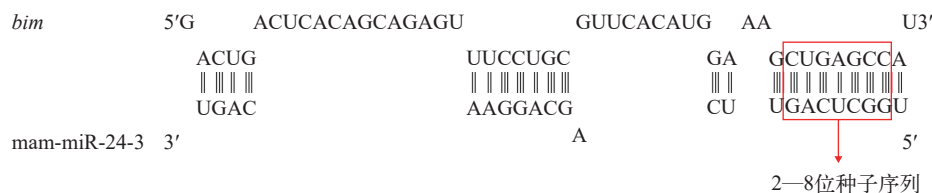


图4 mam-miR-24-3靶基因预测

Fig. 4 Prediction of target gene of mam-miR-24-3

UTR-M采用*Nhe* I 和*Xho* I 限制性内切酶进行双酶切验证, 凝胶电泳结果如图5所示。结合测序公司返回的测序结果, 证实重组质粒已成功构建。

2.6 mam-miR-24-3与**bim**靶向关系的鉴定

双荧光素酶报告基因检测及数据分析

293T细胞双荧光素酶报告基因检测结果表明, 在转染野生型质粒p**mir**GLO-**bim** 3'UTR的细胞中, 与空白组和阴性组(NC)相比, mam-miR-24-3 mimics组的荧光素酶活性显著下降, 而空白组与阴性组之间未呈现显著差异(图6A)。在转染突变型质粒p**mir**-GLO-**bim** 3'UTR-M的细胞中, mimics、NC和空白组荧光素酶活性皆无显著差异(图6B)。实验结果显示, mam-miR-24-3的过表达显著降低了**bim** mRNA的表达水平, 初步证实**bim**是mam-miR-24-3的直接作用靶基因。

绿色荧光蛋白表达观测

图7为荧光显微镜观察结果, 展示了野生型绿色荧光蛋白重组质粒pEGFP-**bim**-3'UTR和突变型绿色荧光蛋白重组质粒pEGFP-**bim**-3'UTR-M分别与mam-miR-24-3共转染后的荧光表达情况。其中野生型中空白组和NC组荧光强度未有明显变化, mimics组荧光强度与两组相比显著下降, 荧光点数也显著减少; 突变型中mimics组、空白组及NC组荧光活性皆无显著差距(图7)。总体荧光强度变化结果与双荧光素酶报告基因实验结果相一致。

2.7 亚细胞定位

在转染 36—48h后, 按照DAPI 染色方法处理细胞样品, 通过荧光倒置显微镜观察可见HEK-293T 细胞中EGFP 蛋白为绿色, DAPI染色显示细胞核呈现蓝色荧光, pEGFP-**bim**融合蛋白的绿色荧光信号与细胞核区域高度重叠, 表明其定位于细胞核内。在低氧处理后, pEGFP-**bim**融合蛋白的荧光信号仍与细胞核区域完全共定位(图8)。这些结果表明, 无论是在常氧还是低氧条件下, Bim蛋白均特异性定位于细胞核中表达。

3 讨论

本研究首次成功克隆了团头鲂**bim**基因编码区序列, 并系统解析了其分子特征及功能调控机制。

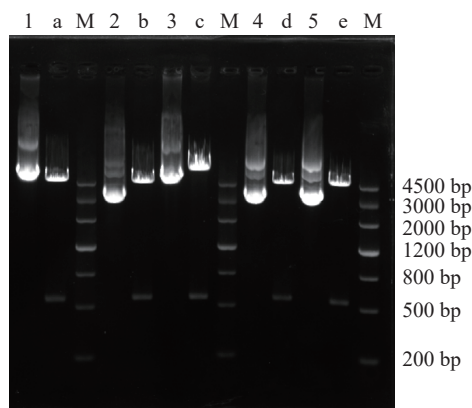


图5 重组质粒及其双酶切验证电泳结果

Fig. 5 Electrophoresis results of recombinant plasmid and digestion verification of recombinant plasmid

M. Marker III; 1, 2, 3, 4, 5 分别为重组质粒pmirGLO-bim 3'UTR-M、pEGFP-bim-3'UTR-M、pmir-GLO-bim-3'UTR、pEGFP-bim 3'UTR 和 pEGFP-bim; a, b, c, d, e 分别为重组质粒对应双酶切产物

M. Marker III; 1, 2, 3, 4, and 5 are the recombinant plasmids pmirGLO-bim 3'UTR-M, pEGFP-bim-3'UTR-M, pmir-GLO-bim-3'UTR, pEGFP-bim 3'UTR and pEGFP-bim respectively; a, b, c, d, and e are the double digestion products corresponding to the recombinant plasmids

生物信息学分析表明, Bim蛋白为不稳定的疏水性蛋白, 其表面疏水性特征不仅影响蛋白质的变性过程, 也是评估蛋白质功能特性的重要指标之一^[16, 17], Bim蛋白缺乏信号肽与跨膜结构域, 其核内定位特征与亚细胞定位预测及实验结果一致, 提示Bim可能通过核内途径参与基因转录调控。结构分析显示, Bim蛋白包含典型的BH3结构域, 该结构域是

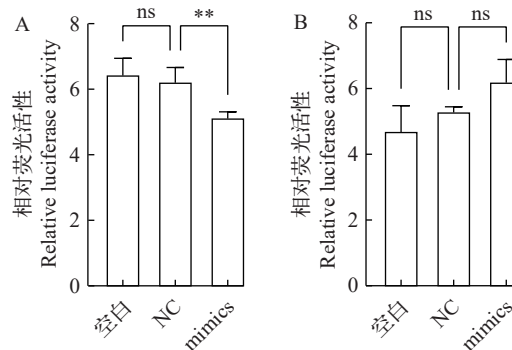


图6 转染重组载体pmirGLO-bim 3'UTR (A)和pmirGLO-bim 3'UTR-M (B)双荧光素酶活性分析

Fig. 6 Luciferase activity analysis of cells transfected recombinant vector pmirGLO-bim 3'UTR (A) and pmirGLO-bim 3'UTR-M (B) (** $P < 0.01$)

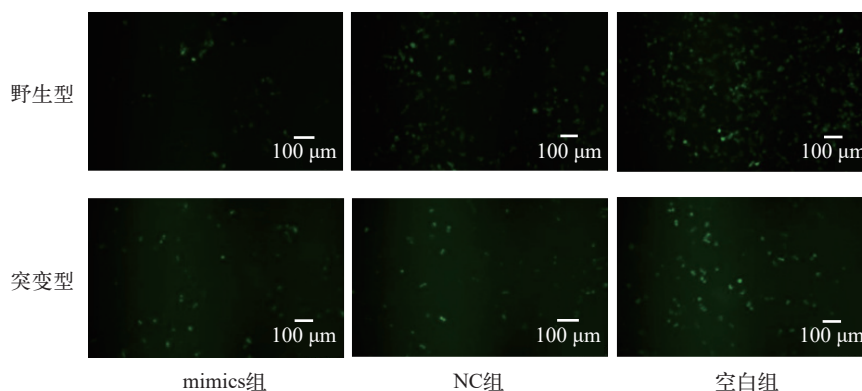


图7 野生型与突变型重组质粒绿色荧光蛋白结果

Fig. 7 Green fluorescent protein results of wild type and mutant recombinant plasmid

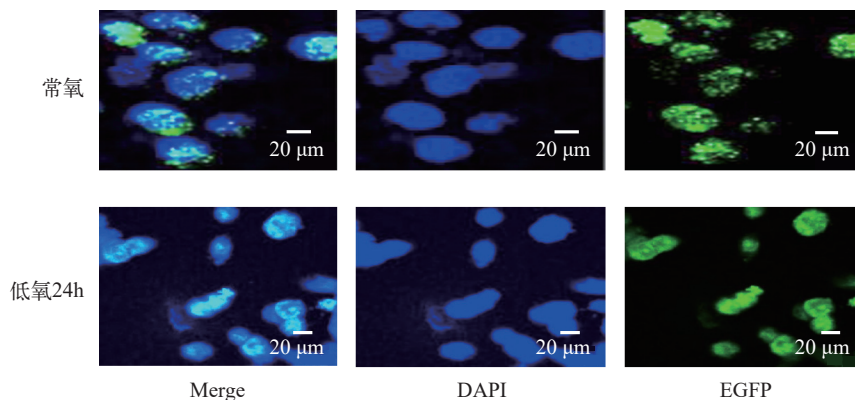


图8 Bim蛋白亚细胞定位图

Fig. 8 Subcellular localization map of Bim protein

Bcl-2家族蛋白介导凋亡调控的核心功能域^[18,19],因此团头鲂Bim可能通过BH3结构域与其他凋亡相关蛋白互作,进而调控细胞凋亡过程^[6,20,21]。系统发育分析表明,团头鲂Bim与红鳍鲌、草鱼等鲤科鱼类聚为一支,氨基酸序列相似性高达95%以上,体现了该蛋白在鱼类中的进化保守性,同时也为研究Bim在不同物种中的功能分化提供了分子进化依据。

不同组织中的荧光定量结果显示,*bim*和mam-miR-24-3在鳃组织中表达量显著高于其他组织。鳃作为鱼类直接接触外界环境的重要器官^[22],研究表明大口黑鲈鳃在低氧时通过减少黏液细胞数量和重新排布富线粒体细胞(MRCs)^[23]或者低氧和Cu²⁺暴露同时诱导实现鳃重塑^[24],应对低氧胁迫;团头鲂在低氧时同样可以通过鳃重塑应对低氧胁迫^[25,26],因此鳃在低氧胁迫响应中发挥关键作用^[27,28]。在低氧24h后,鳃组织中*bim*与mam-miR-24-3的表达同步显著上调,这一现象提示二者可能共同参与低氧应激调控网络。

*bim*受多种miRNA负调控,抑制相关miRNA表达后,*bim*的表达上调,影响细胞凋亡水平^[29-31]。双荧光素酶报告基因技术是鉴定miRNA靶基因的一种重要手段,miRNA靶基因的预测及鉴定是研究miRNA功能的关键依据^[32]。双荧光素酶报告基因和绿色荧光蛋白实验证实mam-miR-24-3可通过靶向结合*bim* 3'UTR抑制其表达,结合低氧条件下二者表达呈现正相关结果,推测低氧可能通过其他途径如激活上游转录因子等调控机制,同时促进*bim*转录与mam-miR-24-3表达,形成动态平衡,使得mam-miR-24-3虽然升高,但是对*bim*的抑制作用并未得到有效发挥,进而参与调控凋亡信号强度,具体尚需深入验证。这种转录后调控与转录水平调控的协同作用,可能是团头鲂应对低氧应激的重要方式。此外,本研究发现mam-miR-24-3对*bim*的靶向调控具有位点特异性,突变种子序列结合位点后调控效应消失,证实二者互作具有严格的序列依赖性,这为后续利用过表达或者干扰mam-miR-24-3定向调控*bim*表达提供了理论依据。

亚细胞定位能有效查找生物大分子如蛋白在细胞内具体位置,有助于深入研究蛋白质功能^[33,34]。本研究结果显示,Bim蛋白在常氧与低氧条件下均定位于细胞核,推测团头鲂Bim在常氧和低氧情况下都可能通过细胞核内一些途径参与低氧相关信号通路的转录调控,其具体作用机制需进一步探究。

4 结论

本研究成功克隆了团头鲂*bim*基因,其编码的

Bim蛋白具有BH3结构域,属不稳定疏水性核内蛋白,进化上与鲤科鱼类高度同源。在低氧胁迫下,鳃组织中*bim*与mam-miR-24-3表达同步显著上调,双荧光素酶与绿色荧光蛋白实验证实mam-miR-24-3通过特异性靶向*bim* 3'UTR抑制其表达,揭示了低氧应激中二者的负向转录后调控关系。亚细胞定位显示Bim蛋白核内特异性分布,提示其可能通过一些核内通路参与低氧响应。本研究为探究团头鲂低氧适应机制及凋亡调控网络提供了关键分子证据,未来需深入探究Bim蛋白在核内的具体功能及*bim*与mam-miR-24-3在低氧胁迫下的动态调控机制,以推动团头鲂低氧抗性育种技术的理论创新与应用。

(作者声明本文符合出版伦理要求)

参考文献:

- [1] Shuang L, Chen S L, Ren C, *et al.* Effects of hypoxia and reoxygenation on oxidative stress, histological structure, and apoptosis in a new hypoxia-tolerant variety of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2023(278): 111358.
- [2] Wu C B, Zheng G D, Zhao X Y, *et al.* Hypoxia tolerance in a selectively bred F4 population of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) under hypoxic stress [J]. *Aquaculture*, 2020(518): 734484.
- [3] Zhao S S, Su X L, Pan R J, *et al.* The transcriptomic responses of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) to acute hypoxia stress alone, and in combination with bortezomib [J]. *BMC Genomics*, 2022, **23**(1): 162.
- [4] Guan W Z, Guo D D, Sun Y W, *et al.* Characterization of duplicated heme oxygenase-1 genes and their responses to hypoxic stress in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2017, **43**(2): 641-651.
- [5] Li L, Wang C, Wen Y, *et al.* ERK1/2 and the Bcl-2 family proteins Mcl-1, tBid, and BIM are involved in inhibition of apoptosis during persistent *Chlamydia psittaci* infection [J]. *Inflammation*, 2018, **41**(4): 1372-1383.
- [6] Gogada R, Yadav N, Liu J, *et al.* Bim, a proapoptotic protein, up-regulated via transcription factor E2F1-dependent mechanism, functions as a prosurvival molecule in cancer [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, **288**(1): 368-381.
- [7] Qiang J, Tao Y F, Zhu J H, *et al.* Effects of heat stress on follicular development and atresia in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) during one reproductive cycle and its potential regulation by autophagy and apoptosis [J]. *Aquaculture*, 2022(555): 738171.

- [8] Bu X, Zhao W, Zou H, *et al.* Immune response and apoptosis of gibel carp (*Carassius auratus* Gibelio) gills to *Chilodonella hexasticha* infection: Insights from histopathological and multi-omics analyses [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2024(147): 109429.
- [9] Sharma M, Pal P, Gupta S K. Deciphering the role of miRNAs in Alzheimer's disease: predictive targeting and pathway modulation-A systematic review [J]. *Ageing Research Reviews*, 2024(101): 102483.
- [10] Guan Y, Liang G, Hawken P A R, *et al.* Roles of small RNAs in the effects of nutrition on apoptosis and spermatogenesis in the adult testis [J]. *Scientific Reports*, 2015(5): 10372.
- [11] Tang D, Huang Y, Liu W, *et al.* Up-regulation of microRNA-210 is associated with spermatogenesis by targeting IGF2 in male infertility [J]. *Medical Science Monitor*, 2016(22): 2905-2910.
- [12] Lin J, Wang G, Wu D, *et al.* Blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) circARHGEF15 enhances antibacterial immunity against *Aeromonas hydrophila* infection via *CeRNA* regulatory axis [J]. *Aquaculture*, 2024(590): 741080.
- [13] Song C, Liu B, Ge X, *et al.* miR-34a/Notch1b mediated autophagy and apoptosis contributes to oxidative stress amelioration by emodin in the intestine of teleost *Megalobrama amblycephala* [J]. *Aquaculture*, 2022(547): 737441.
- [14] Song C, Liu B, Xu P, *et al.* miR-144 is the epigenetic target for emodin to ameliorate oxidative stress induced by dietary oxidized fish oil via Nrf2 signaling in Wuchang bream, *Megalobrama amblycephala* [J]. *Aquaculture*, 2021(534): 736357.
- [15] Jin X, Han Q, Wang H, *et al.* The effect of BimEL on gill remodeling of goldfish (*Carassius auratus*) [J]. *Aquaculture*, 2019(500): 469-476.
- [16] Collada A, Mertens J, Batllori-Badia E, *et al.* Effect of hydrophobic proteins in modulating the mechanical properties of lung surfactant membranes [J]. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2025(267): 105464.
- [17] Jiang L, Wang Z, Li Y, *et al.* Relationship between surface hydrophobicity and structure of soy protein isolate subjected to different ionic strength [J]. *International Journal of Food Properties*, 2015, **18**(5): 1059-1074.
- [18] Tessoulin B, Papin A, Gomez-Bougie P, *et al.* BCL2-family dysregulation in B-cell malignancies: from gene expression regulation to a targeted therapy biomarker [J]. *Frontiers in Oncology*, 2018(8): 645.
- [19] Rodnin M V, Vasquez-Montes V, O'Neil P T, *et al.* Comparison of BH3-dependent and BH3-independent membrane interactions of pro-apoptotic factor BAX [J]. *Biophysical Journal*, 2025, **124**(9): 1521-1531.
- [20] Rathmell J C, Lindsten T, Zong W X, *et al.* Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis [J]. *Nature Immunology*, 2002, **3**(10): 932-939.
- [21] Akiyama T, Bouillet P, Miyazaki T, *et al.* Regulation of osteoclast apoptosis by ubiquitylation of proapoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim [J]. *The EMBO Journal*, 2003, **22**(24): 6653-6664.
- [22] Li D, Zhang W, Wang T, *et al.* Hypoxia stress alters gene expression in the gills and spleen of greater amberjack (*Seriola dumerili*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2024(150): 109602.
- [23] Liu Q, Guo L, Zhang H, *et al.* Hypoxia induces reversible gill remodeling in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) through integrins-mediated cell adhesion [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2024(154): 109918.
- [24] Liu Q, Wang H, Ge J, *et al.* Chronic hypoxia and Cu²⁺ exposure induce gill remodeling of largemouth bass through endoplasmic reticulum stress, mitochondrial damage and apoptosis [J]. *Aquatic Toxicology*, 2023 (255): 106373.
- [25] Shuang L, Su X L, Zheng G D, *et al.* Effects of hypoxia and reoxygenation on gill remodeling, apoptosis, and oxidative stress in hypoxia-tolerant new variety blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2022, **48**(1): 263-274.
- [26] Yu X X, Zheng G D, Chen J, *et al.* Advances in research on effects of hypoxic stress in fish [J]. *Fisheries Science*, 2024, **43**(2): 333-340. [余欣欣, 郑国栋, 陈杰, 等. 低氧胁迫对鱼类影响的研究进展 [J]. 水产科学, 2024, **43**(2): 333-340.]
- [27] Eskandrani A A, Alsubaie N, Bawahab A A, *et al.* Whey protein hydrolysate from camel mitigates hypoxia-induced renal and gill damage in Nile Tilapia: Effects on stress, HIF- α , apoptosis, inflammation, and metabolic pathways [J]. *Aquaculture*, 2025(601): 742256.
- [28] Jia L W, Zhang L L, Yang H W, *et al.* The hypoxia adaptation strategy of the big-belly seahorses (*Hippocampus abdominalis*) with tuft gills [J]. *Aquaculture Reports*, 2025(40): 102544.
- [29] Chen Z, Chen L Y, Dai H Y, *et al.* miR-301a promotes pancreatic cancer cell proliferation by directly inhibiting BIM expression [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2012, **113**(10): 3229-3235.
- [30] Su H, Trombly M I, Chen J, *et al.* Essential and overlapping functions for mammalian Argonautes in microRNA silencing [J]. *Genes & Development*, 2009, **23**(3): 304-317.
- [31] Sionov R V. microRNAs and glucocorticoid-induced apoptosis in lymphoid malignancies [J]. *ISRN Hematology*, 2013(2013): 348212.
- [32] Campos-Melo D, Droppelmann C A, Volkening K, *et al.* Comprehensive luciferase-based reporter gene assay reveals previously masked up-regulatory effects of miRNAs [J]. *International Journal of Molecular*

Sciences, 2014, **15**(9): 15592-15602.

- [33] Yang F, Liu Y, Wang Y, *et al.* MIC_Locator: a novel image-based protein subcellular location multi-label prediction model based on multi-scale monogenic signal representation and intensity encoding strategy [J]. *BMC*

Bioinformatics, 2019, **20**(1): 522.

- [34] Paul S N, De Visser A, Motta F, *et al.* Patterns of corticosterone exposure affect the subcellular localisation of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor complexes and gene expression [J]. *Steroids*, 2025(214): 109524.

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND TISSUE EXPRESSION OF THE *BIM* GENE IN *MEGALOBrama AMBLYCEPHALA* AND ITS RELATIONSHIP VERIFICATION WITH MAM-MIR-24-3

DING Si-Yu^{1,2,3}, FENG Ya-Hui^{1,2,3}, LOIC Kemmadzong Foning^{1,2,3}, CHEN Jie^{1,2,3},
ZHENG Guo-Dong^{1,2,3} and ZOU Shu-Ming^{1,2,3}

(1. Genetics and Breeding Center for Blunt Snout Bream, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: To elucidate the structure and function of the *bim* gene in *Megalobrama amblycephala*, this study obtained the full-length coding sequence (CDS) of *bim* through TA cloning and systematically analyzed the primary, secondary, and tertiary structural characteristics of Bim protein by using bioinformatics tools. Multiple sequence alignment revealed that the Bim protein of *Megalobrama amblycephala* exhibited the highest homology (98.34%) with that of *Chanodichthys erythropterus*, and a Neighbor-Joining phylogenetic tree further supported their closest evolutionary relationship. Tissue expression profiling demonstrated that both the *bim* gene and its putative regulatory factor mam-miR-24-3 were predominantly expressed in gill tissues compared to other organs. After 24h of hypoxia stress, their expression levels in gills were significantly upregulated, suggesting potential synergistic roles in hypoxia adaptation. Dual-luciferase reporter assays confirmed that mam-miR-24-3 directly bound to the 3'-untranslated region (3'-UTR) of *bim* mRNA, leading to reduced luciferase activity. When combined with fluorescence co-localization analysis using green fluorescent protein, these results indicated that mam-miR-24-3 negatively regulated *bim* expression at the post-transcriptional level. Subcellular localization experiments revealed that Bim protein predominantly localized to the nucleus under both normoxic and hypoxic conditions, implying its potential involvement in nuclear signaling pathways to directly regulate downstream gene transcription. This study provides a theoretical foundation for elucidating the molecular mechanisms by which *bim* contributes to hypoxia adaptation in *Megalobrama amblycephala* and lays the groundwork for screening molecular targets in hypoxia-tolerant breeding strategies.

Key words: *bim*; mam-miR-24-3; Gill; Bioinformatics analysis; Hypoxia; *Megalobrama amblycephala*