

盐度胁迫下缢蛏渗透压变化及 *V-ATPase H* 基因的表达分析

徐娴^① 何琳^① 林志华^{①②*} 陈铭^{①③}

① 浙江万里学院生物与环境学院, 浙江省水产种质资源高效利用技术研究重点实验室 宁波 315100;

② 浙江万里学院, 宁海海洋生物种业研究院 宁波 315100; ③ 宁波大学海洋学院 宁波 315100

摘要: 为研究 *V-ATPase H* 基因在缢蛏 (*Sinonovacula constricta*) 盐度胁迫中的功能, 以缢蛏成体为实验材料, 将缢蛏置于 5、15、20、25、35 盐度水体中进行胁迫实验, 测定了不同胁迫时间缢蛏的血清渗透压、*V-ATPase* 活性变化, 克隆了 *V-ATPase H* 基因的开放阅读框 (ORF) 全长序列, 并分析其 mRNA 表达特征。结果显示, 低盐组 (盐度 5 和盐度 15) 和高盐组 (盐度 25 和盐度 35) 缢蛏血清渗透压变化明显, 与对照组 (盐度 20) 有极显著差异 ($P < 0.01$)。随着时间的推移, 实验组 *V-ATPase* 活力整体呈现先下降后上升的趋势, 对照组 (盐度 20) 无明显变化。*V-ATPase H* 基因开放阅读框长度 1 440 bp, 编码 479 个氨基酸。qPCR 结果显示, *V-ATPase H* 基因在缢蛏鳃中的表达量极显著高于水管、外套膜、肾、肝胰腺、唇瓣、足 6 个组织 ($P < 0.01$); 盐度胁迫下各个实验组 *V-ATPase H* 基因在鳃中的表达量持续上升, 在 24 h 达到峰值, 显著高于对照组 ($P < 0.05$)。实验结果表明, 缢蛏 *V-ATPase H* 基因在盐度适应过程中主要在低盐和高盐环境下起到维持自身血清渗透压与外界渗透压平衡的作用。

关键词: 缢蛏; *V-ATPase H*; 盐度胁迫; 渗透压

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2020) 05-606-08

Effects of Salinity Stress on *V-ATPase H* Expression, Enzyme Activity and Osmotic Pressure in *Sinonovacula constricta*

XU Xian^① HE Lin^① LIN Zhi-Hua^{①②*} CHEN Ming^{①③}

① Key laboratory of Aquatic Germplasm Resource of Zhejiang Province Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100;

② Ninghai Institute of Marine Biology Seed Industry, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100;

③ School of Marine Sciences, Ningbo University Ningbo 315100, China

Abstract: In order to study the function *V-ATPase H* gene expression on salinity stress in *Sinonovacula constricta*, the adults were used as experimental materials, and the stress was tested in different salinities (5,

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31802322), 宁波市 2015 年度科技富民项目 (No. 2015C10008), 浙江省农业新品种选育重大科技专项 (No. 2016C02055-9), 宁波市一流学科“环境科学与工程”项目;

* 通讯作者, E-mail: zhihua9988@126.com;

第一作者介绍 徐娴, 女, 硕士研究生; 研究方向: 海洋生物种质工程; E-mail: 915350526@qq.com。

收稿日期: 2019-10-30, 修回日期: 2020-07-12 DOI: 10.13859/j.cjz.202005009

15, 20, 25, 35). The freezing point osmometer was used to determine the difference in serum osmotic pressure, and V-ATPase ELISA detection kit was used to determine the activity of V-ATPase. The full-length ORF sequence of *V-ATPase H* gene was cloned and its mRNA expression was analyzed. The results showed that the serum osmolarity of the low-salt group (salinity 5, salinity 15) and that of high-salt group (salinity 25, salinity 35) changed significantly, both were very significantly different from the control group (salinity 20) ($P < 0.01$). With the treatment time, the V-ATPase activity of the experimental group showed a decreasing first and then increasing trend, while the control group showed no significant change. The open reading frame (ORF) of the *V-ATPase H* gene was 1 440 bp in length, encoding 479 amino acids. The qPCR results showed that the expression level of *V-ATPase H* gene in the gills of *S. constricta* was significantly higher than that in the other 6 tissues including siphon, mantle, kidney, digestive gland, flaps, and foot ($P < 0.01$). Under salinity stress, the expression of *V-ATPase H* gene in the gills of each experimental group continued to rise, peaking at 24 h, which was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$). The experimental results show that the *V-ATPase H* gene plays a role in maintaining the balance between its own serum osmotic pressure and the external osmotic pressure in low-salt and high-salt environments during salinity adaptation of *S. constricta*.

Key words: *Sinonovacula constricta*; *V-ATPase H*; Salt stress; Osmotic pressure

V-ATPase 是一种复杂的多亚基寡聚酶, 主要分为外周的 V_1 结构域和跨膜的 V_0 结构域。 V_1 结构域由 A ~ H 8 个不同的亚单位组成, 交替排列的 A 和 B 亚单位组成六聚体, 属于催化结构; 而 V_0 结构域由 a、c、c'、c''、d 和 e 共 6 个亚基组成, 负责对质子的跨膜转运 (Inoue et al. 2005, Cipriano et al. 2008), 并且只有当 V_1 及 V_0 完全组装在一起时, V-ATPase 才具有活性。V-ATPase 在渗透压调节过程中主要是通过水解 ATP 产生能量将 H^+ 泵出膜外形成电势差, 促进 Na^+ 通过 Na^+ 通道进入膜内以完成离子交换 (Lucu 1993, Merzendorfer et al. 1997, Wiczorek et al. 2000, Mcnamara et al. 2012, Marshansky et al. 2014)。研究表明, V-ATPase H 亚基是作为一个调节亚基起作用的, 该亚基在控制 V-ATPase 的组装和重新组装中是必需的, 不但调控 V_1 和 V_0 的组装而且通过调控 ATP (水解 ATP) 的活性而调控 H^+ 跨膜运输 (Kevin et al. 2003), 对 H 亚基的任何干扰都会影响 V-ATPase 的活性 (张淑静等 2015)。

缢蛏 (*Sinonovacula constricta*) 隶属于典型广盐性双壳贝类, 主要养殖在福建、浙江、

江苏三省内湾软泥滩涂中, 是我国传统的四大养殖经济贝类之一。对低盐和高盐都有着较强的耐受性, 盐度耐受范围在 3 ~ 35 之间 (吕昊泽等 2013), 适应其生长的盐度范围在 8.2 ~ 25.8 之间 (冉照收等 2017)。有研究表明, 由于盐度改变引起缢蛏体内的渗透生理调节、代谢物质、酶的改变会使缢蛏活力变差, 病害发生甚至死亡 (王刚等 2013, 焦海峰等 2015)。由于高温、暴雨、台风等极端天气频发, 导致养殖海水盐度时常发生剧烈变化, 这是影响缢蛏养殖的一个重要因素。关于贝类离子转运和渗透调节主要的离子转运酶包括 Na^+/K^+ -ATPase、V-ATPase 和碳酸酐酶 (Vagin et al. 2007)。当所处的水环境盐度变化时, 贝类会调节自身水分和无机离子的通透性, 通过改变血淋巴中无机离子和游离氨基酸等渗透压效应物含量来完成渗透调节过程。其中对渗透压水平起决定作用的是无机离子含量, 而 Na^+ 和 Cl^- 是维持血淋巴渗透压的主要离子。在渗透压调节过程中 Na^+/K^+ -ATPase 直接参与调控胞内 Na^+ 浓度, 碳酸酐酶主要参与血浆中 CO_2 水合过程的可逆催化反应, 可为 Cl^-/HCO_3^- 和 Na^+/H^+ 离子交换提供 HCO_3^- 、 H^+ (Hirose et al. 2003, Hwang et al.

2011)。而 V-ATPase 则通过泵出 H^+ 产生膜内外电势差, 使 Na^+ 通过 Na^+/H^+ 交换器进入膜内, 其效率高于 Na^+/K^+ -ATPase (Kirschner 2004)。本实验对缢蛏在不同盐度胁迫下血清渗透压、V-ATPase 活性变化以及血清离子变化进行测定, 并采用 RACE 和 qPCR 技术, 克隆 V-ATPase H 基因开放阅读框 (open reading frame, ORF) 全长, 检测该基因在缢蛏不同组织以及不同浓度盐度胁迫下的表达, 探索 V-ATPase H 基因在缢蛏急性盐度胁迫过程中的作用, 为缢蛏 V-ATPase H 基因在渗透压调节过程中的作用机理及其生物学功能研究提供基础, 同时也为缢蛏耐盐新品系的选育提供理论指导。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验用 2 龄缢蛏于 2019 年 4 月采集于浙江省宁波市鄞州区咸祥镇宁波市海洋与渔业研究院科技创新基地, 运输至浙江万里学院水产种质资源高效利用技术研究重点实验室进行实验。取健康的缢蛏成贝, 壳长 (51.64 ± 3.80) mm、壳宽 (17.15 ± 2.25) mm、壳高 (12.42 ± 2.33) mm、活体重 (9.21 ± 1.25) g ($n = 3$), 分别暂养在多个循环养殖水族箱中一周, 连续充气, 使其适应实验室环境, 水体盐度 20.47 ± 0.94 , pH 8.1 ± 0.2 , 水温 (25.12 ± 3.86) °C。每日早晚投喂金藻 (*Chrysophyta*) 与角毛藻 (*Chaetoceros*) 混合藻 2 次, 投喂量为缢蛏总重的 3%~5%。

1.2 盐度胁迫下缢蛏血淋巴渗透压

实验设置 5 组, 水体盐度分别为 5、15、20、25、35, 每组放 50 只缢蛏。实验胁迫 0、0.5、1、1.5、2、4、8、12、24、48、72、96 h 时分别进行取样, 每组取 3 个样。使用 1 ml 无菌注射器从缢蛏的闭壳肌中快速抽取血淋巴, 移入样品管中, 利用 Gonotec 3000 冰点渗透压仪 (德国 Gonotec GmbH 公司) 测定血淋巴渗透压, 渗透压单位为 kPa。

1.3 基因序列分析及结构域预测

根据实验室缢蛏急性盐度胁迫转录组获得 V-ATPase H 基因部分序列, 利用 DNAMAN6.0 软件拼接 3' 和 5'-RACE 片段序列, 得到 V-ATPase H 基因 ORF 全长。使用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)、SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)、TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 和 Signal P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 在线生物信息分析工具对基因编码蛋白的基本物理性质、结构域、信号肽、跨膜结构和亲、疏水性进行预测分析, 利用 MEGA6.0 软件构建系统进化树。

1.4 V-ATPase H 基因差异表达分析

1.2 节实验取样同时, 分别在实验胁迫后 4、8、12、24、48、72、96 h 时取盐度 20 组缢蛏外套膜、中间膜、肝胰腺、足、水管、鳃和唇瓣 7 种组织用于 V-ATPase H 基因组织表达特征分析, 取盐度胁迫下各个时间段的缢蛏鳃组织用于 mRNA 表达分析。所有组织样品置于液氮速冻后保存于 -80 °C 冰箱中备用。Trizol 提取总 RNA, 使用 TaKaRa Prime Script RT reagent Kit 反转录成 cDNA, 产物于 -20 °C 冰箱中保存备用。用 Primer Premier 5.0 软件设计荧光定量引物 (表 1), 所有引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。使用 TaKaRa SYBR Premix Ex Taq II 试剂以及 Light Cycler 480 II 仪进行 qPCR 反应, 结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行比较分析。实验数据利用 SPSS 19.0 软件分析,

表 1 实验所用引物及其序列

Table 1 Primers and sequences used in the experiment

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'-3')
V-ATPase H-F1	ATGGCGAACATTA AAAAGCTACGAGAGC
V-ATPase H-R1	CTACTGGATGGTTT TTAGACTCGCTGT
qV-ATPase H-F4	AGGAGGAGAAGAGCCGTGTA
qV-ATPase H-R4	CCTTGAGCCAGTTGAGGTAGA
18S-F	TCGGTTCTATTGCGTTGTTTT
18S-R	CAGTTGGCATCGTTTATGTGCA

单因素方差分析进行显著性检验, 多重比较检测各测量指标的差异, 以 $P < 0.05$ 为差异显著。

1.5 V-ATPase 酶活测定

本研究采用 V-ATPase ELISA 检测试剂盒 (上海酶联) 测定 V-ATPase 的活力。实验前取 0.1 g 组织加入 1 ml 生理盐水中, 10 000 ~ 15 000 r/min 匀浆。匀浆好的组织液 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 根据说明书进行酶活性测定。用 SPSS 19.0 及 Excel 软件进行数据分析统计, 不同处理组数据间的差异采用单因素方差分析, Duncan's 检测法进行多重比较, 以 $P < 0.05$ 作为差异显著性的标志。

2 结果与分析

2.1 盐度胁迫对缙蛭渗透压的影响

不同盐度对缙蛭血清渗透压的影响见图 1, 不同盐度对缙蛭血清渗透压的影响不同。对照组 (盐度 20) 在 96 h 内缙蛭血清渗透压无显著变化。盐度 5 组在实验 24 h 时血清渗透压达到 (435 ± 2.9) kPa, 较实验开始时降低了 72%, 盐度 35 组在实验 24 h 时血清渗透压达到 $(2 472 \pm 3.7)$ kPa, 较开始增加了 60.2%, 这两组变化最为明显。盐度 15 组在实验 4 h 时缙蛭血清渗透压达到 $(1 122 \pm 2.9)$ kPa, 较开

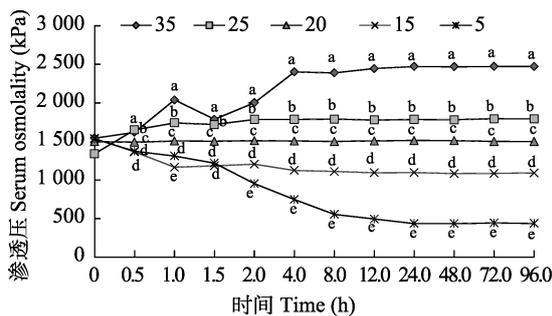


图 1 急性盐度胁迫对血清渗透压的影响

Fig. 1 Effects of abrupt salinity stress on serum osmolality

不同字母表示同一时间不同盐度的血清渗透压差异极显著 ($P < 0.01$)。

Different letters show serum osmolality is significantly different in the same time and different salinities ($P < 0.01$).

始降低了 27%; 盐度 25 在实验 4 h 时缙蛭血清渗透压达到 $(1 784 \pm 2.1)$ kPa, 较开始增加了 15%, 这两组在实验 4 h 后基本就已达到稳定状态, 而盐度 5、35 则是在 24 h 以后才趋于稳定。

2.2 缙蛭 *V-ATPase H* 基因开放阅读框(ORF)的验证及序列分析

V-ATPase H 基因开放阅读框 (ORF) 长度 1 440 bp。ExpASy 软件推导出 ORF 编码 479 个氨基酸, 包含 68 个碱性氨基酸 (Arg, Lys, His), 66 个酸性氨基酸 (Asp, Glu), 198 个疏水性氨基酸 (Ala, Val, Leu, Pro, Ile, Phe, Trp, Met), 147 个亲水性氨基酸 (Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln)。该蛋白质含有很大比例的疏水性氨基酸, 表现为疏水性。该蛋白的分子量为 56.00 ku, 等电点 pI 为 5.84。TMHMM 软件和 SignalP 软件预测该蛋白质无跨膜区, 无信号肽。Smart 软件进行功能域预测, *V-ATPase H* 存在 2 个保守结构域: *V-ATPase_H_N* (26 ~ 335 aa) 和 *V-ATPase_H_C* (341 ~ 457 aa) (图 2)。

2.3 *V-ATPase H* 基因在缙蛭不同组织中差异分析

利用 qRT-PCR 技术分析了 *V-ATPase H* 基因在缙蛭成体不同组织中的表达分布特征 (图 3), *V-ATPase H* 基因在缙蛭水管、外套膜、鳃、肾、肝胰腺、唇瓣、足中均有表达。其中, 在鳃中表达量显著高于其他组织 ($P < 0.01$), 其次是肝胰腺, 在足中表达量最低。

2.4 *V-ATPase H* 基因在缙蛭不同盐度胁迫下的表达分析

V-ATPase H 基因在缙蛭不同盐度胁迫下的 qRT-PCR 结果见图 4。对照组在 96 h 内表达量无显著变化, 在盐度胁迫下各实验组 (盐度 5、15、25、35) *V-ATPase H* 基因在鳃中的表达量持续上升, 在 24 h 达到峰值, 显著高于对照组 ($P < 0.01$), 随后表达量显著下降。其中, 低盐组 (盐度 5) 和高盐组 (盐度 35) 在 24 h 时明显高于其他盐度组, 72 h 以后低盐组 (盐

```

1      ATGGCGAACATTAAAAAGCTACGAGAGCGTCATCGGCAACATCGACGACATAGAGAAAGGT
1      M A N I K S Y E S V I G N I D D I E K G
61     GCCCAAGTGGCTACATCCCTTCTCAGCAGCGTGCCAATGATGTCCGCTCTAACAGAGTC
21     A Q V A T S L L Q Q R A N D V R S N R V
121    AACTGGCAGTCCTACCTGCAAGGTCAGATGATCTCCAATGAAGACTTTGAGTTCATCTCT
41     N W Q S Y L Q G Q M I S N E D F E F I S
181    AACTTTGACAAAGCCAACAGTGAACAGAGCCATCATGTTGTCAGACAGTCAGGAAAG
61     N F D K A N S E Q R A I M L S D T S G K
241    TACCAGTTTGCCAAGACATTCTTTAACCTGATGAGCCACATTGCCAAGGACCAGACATTA
81     Y Q F A K T F F N L M S H I A K D Q T L
301    CAGTATATTCTGACAATGATGGATGACTTCCTTCAGGAGGAGAAGGCCGTGTGAAATC
101    Q Y I L T M M D D F L Q E E K S R V E I
361    TTGAAGATGTACTCGAGGAAGAACAAGCAGTCCGTGTGGGCTCCATTCTGCACCTCCTC
121    L K M Y S R K N K Q S V W A P F L H L L
421    GACAGGCAGGACAGATTTATTGTCAACCAGACTAGCCGTATCATTGCCAAGATTGCATGC
141    D R Q D R F I V N Q T S R I I A K I A C
481    TGGAGTCAGAAAGAATGGAGAATAATGACCTCAAGTCTACCTCAACTGGCTCAAGGAC
161    W S Q E R M E N N D L K F Y L N W L K D
541    CAGCTTAGGCTTCAGGGTAATGAATATCTTCAACAGCTGCCAGGTGTCTTCAGATGATG
181    Q L R L Q G N E Y L Q T A A R C L Q M M
601    CTACGTGTGATCCATACAGAGAGGTGTTGTACATGTGGATGGTGTGCCACTATTATT
201    L R V D P Y R E V F V H V D G V A T I I
661    GCGGTGTGGACTCGACCAAGATGGGCTTCCAGATTCAGTACCAGCTTATCTTTGTCTA
221    A V L D S T K M G F Q I Q Y Q L I F C L
721    TGGTGTCTCACCTTCAACTCACAGCTTCTGGAGAAATTGAACAAGTATAACATCATCCA
241    W C L T F N S Q L L E K L N K Y N I I P
781    ATCTTGTCTGATGTATTGAGTGATACAGTGAAGGAGAAGGTATCAAGAATCATCCTGGCC
261    I L S D V L S D T V K E K V S R I I L A
841    ACGTTCAGGAATCTGATTGAGAAGCCTGAAGAGAAGGAGACCATCCAGGAGAATGCCCTA
281    T F R N L I E K P E E K E T I Q E N A L
901    GGGATGGTACAGTGAAGTCCCTTAAACAGCTGGAGTTGCTGGAAGCGAGGAAGTTTGAT
301    G M V Q C K V L K Q L E L L E A R K F D
961    GACCCAGATATTGTGGAGGATCTACAGTTCCTGCAGGAGAAACTACAGGAGTCAGTTCAG
321    D P D I V E D L Q F L Q E K L Q E S V Q
1021   GATCTCAGTTCATTTGATGAATATGTACGGAGATCAAGTCTGGCGTCTGGAGTGGAGC
341    D L S S F D E Y V T E I K S G R L E W S
1081   CCAGTTCACAAAAGTGATAGATTCTGGCGGAAAATGCCATCAAGCTCAACGATAAGAAC
361    P V H K S D R F W R E N A I K L N D K N
1141   TACGAGCTTCTCAAGATCCTTGTACATCTCCTTGAGGCCAATAAGGATCCTCTAATACTG
381    Y E L L K I L V H L L E A N K D P L I L
1201   TCAGTGGCTGCCATGATATCGGAGAATATGTACGATACTACCCCGGGCAAGAATGTA
401    S V A A H D I G E Y V R Y Y P R G K N V
1261   ATAGAACAACGGGTGCCAAGCACCTTGTGATGCAGTATCTGACCCACGATGACCCCAAT
421    I E Q L G A K H L V M Q Y L T H D D P N
1321   GTACGATATGAAGCACTTATAGCTGTACAGAAATTGATGGTTCACAACCTGGGAATATCTT
441    V R Y E A L I A V Q K L M V H N W E Y L
1381   GGCAAAAAGATATCTCAAGCTGCTAATCCTCCGACAGCGAGTCTAAAACCATCCAGTAG
461    G K K I S Q A A N P S D S E S K T I Q *
    
```

图 2 *V-ATPase H* 基因的 ORF 全长序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 2 The full length of ORF and deduced amino acid sequence of *V-ATPase H* gene

加框代表 *V-ATPase H* 基因的起始密码子和终止子，单下划线部分代表 *V-ATPase_H_N* (26 ~ 335 aa)，双划线部分代表 *V-ATPase_H_C* (341 ~ 457 aa) 功能区。

Frame represents start codon and terminator of *V-ATPase_H* gene, the single underlined part represents *V-ATPase_H_N*(26 - 335 aa) and the double-lined part represents the *V-ATPase_H_C* (341 - 457 aa) functional area.

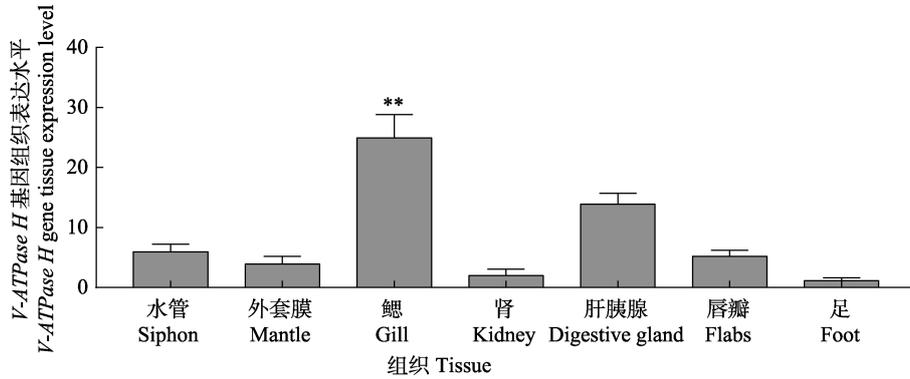


图 3 V-ATPase H 基因在缢蛏不同组织的表达分析 ($n = 3$)

Fig. 3 Expression analysis of V-ATPase H gene in different tissues of *Sinonovacula constricta*

** 代表极显著差异, $P < 0.01$. ** Represents extremely significant difference, $P < 0.01$.

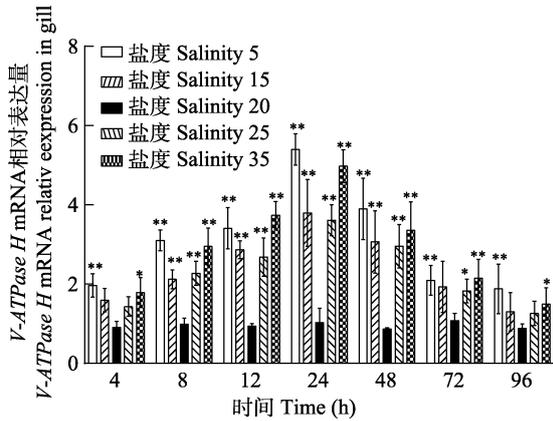


图 4 盐度胁迫下缢蛏 V-ATPase H 基因在鳃中的表达情况

Fig. 4 Expression of V-ATPase H gene in gill tissue of *Sinonovacula constricta* under salinity stress

* 代表显著差异, $P < 0.05$; **代表极显著差异, $P < 0.01$.

* represents significant difference, $P < 0.05$; ** represents extremely significant difference, $P < 0.01$.

度 5) 趋于稳定。

2.5 盐度胁迫对缢蛏 V-ATPase 活力的影响

不同盐度对缢蛏 V-ATPase 活力的影响见图 5。各实验组 (盐度 5、15、25、35) 酶活力随着时间整体呈现先下降后上升的趋势, 对照组 (盐度 20) 无明显变化, 在 24 h 除了对照组其余盐度组都下降到最低值, 24 h 后都开始上升, 在这之后保持稳定水平直至实验结束。

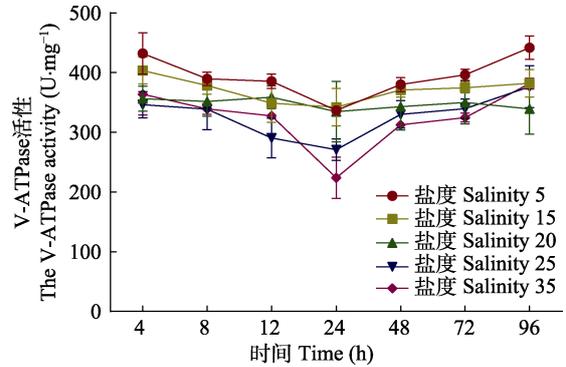


图 5 盐度胁迫对缢蛏 V-ATPase 活力的影响

Fig. 5 Effect of salinity stress on the activity of V-ATPase in *Sinonovacula constricta*

3 讨论

水生生物按照其对水环境盐度变化的渗透调节能力, 主要分为 2 类, 一类是渗透压随变者, 另一类则是渗透压调节者, 而海洋贝类则大多数属于前者 (Péqueux 1995, Gosling 2003, 李子牛 2012, 王劭雯 2012)。在不同盐度胁迫后, 缢蛏在盐度 5 和盐度 35 的环境下的渗透压比盐度 15 和盐度 25 的变化更加明显, 盐度 15 和盐度 25 在实验 4 h 后基本就已达到稳定状态, 而盐度 5、35 则是在 24 h 以后才趋于稳定, 这与李敏等 (2018) 在盐度胁迫对泥蚶 (*Tegillarca granosa*) 血液渗透压影响的研究中结果一致。分析不同盐度胁迫后缢蛏

V-ATPase 活力, 对照组 V-ATPase 活力在整个盐度胁迫过程中基本维持稳定, 各实验组 (盐度 5、15、25、35) 整体呈现了一个先降后升的趋势, 在 24 h 除了对照组其余盐度组都下降到最低值, 24 h 后开始上升, 并且低盐与高盐组变化最为明显。结果表明, 酶活变化较渗透压变化具有一定的滞后性, 并且在海水适应过程中缢蛭渗透生理调节表现出了三个阶段 (夏保密等 2015)。首先是应激反应阶段, V-ATPase 受到了一定程度的抑制, 因此酶活力逐渐下降, 导致血清渗透压、离子浓度异常升高或者降低。随后是调节阶段, 为了快速应对环境中盐度的改变, 维持自身渗透压平衡, 缢蛭被动失水或吸水, 引起渗透压改变, 促使机体新陈代谢, 缢蛭鳃细胞 Na^+/K^+ -ATP 酶被激活 (蔡星媛等 2015), 不断向血淋巴中输入或排出 Na^+ , V-ATPase 活力也逐渐上升, 通过水解 ATP 快速产生能量将 H^+ 泵出膜外形成电势差, 促进 Na^+ 通过 Na^+ 通道等进出细胞以完成离子交换 (He et al. 2009, Faleiros et al. 2010)。最后则是适应阶段, 缢蛭体内渗透压和 V-ATPase 活性达到一个稳定的状态, 缢蛭内环境趋向新的稳态。

本研究利用 TMHMM 软件和 Signal 软件预测的 V-ATPase H 基因编码蛋白质结构中无跨膜区, 表示 V-ATPase H 基因编码蛋白位于膜外, 属于膜外蛋白, 并且无信号肽, 证明该蛋白为非分泌蛋白, 区段主要呈疏水性, 这与其结构功能相符。利用 qPCR 分析表明, V-ATPase H 基因在缢蛭鳃中显著表达, 鳃是双壳贝类进行呼吸、调节渗透压、感受水体盐度变化的重要器官, 亦是主要的调节器官。V-ATPase H 亚基是参与离子转运的主要部分, V-ATPase H 基因在鳃中高表达正是印证了该基因的功能。该结果与三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) V-ATPase a 基因的组织表达规律有相似之处 (马金武 2016)。根据盐度胁迫过程中各实验组和对照组缢蛭鳃组织 V-ATPase H 基因的表达规律及特点, 证明缢蛭 V-ATPase H 基因在盐

度适应过程中主要在低盐和高盐环境下起作用, 在接近对照组盐度的环境下 (盐度 15、25) 作用不明显。盐度 5 和盐度 35 实验组在 0~96 h 内表达量显著高于其他盐度 (盐度 15、20、25) 实验组, 推测低盐和高盐胁迫刺激缢蛭 V-ATPase H 亚基在短时间内迅速上调表达, 以此适应环境的变化。盐度 5、15、25、35 实验组在 0~24 h 呈整体上升趋势, 24~96 h 呈下降趋势。分析认为, 在盐度胁迫初期, 缢蛭出现短暂的应激反应, V-ATPase H 基因表达量明显升高, 以协助离子的转运, 从而达到维持缢蛭渗透压水平的作用。随后 V-ATPase H 基因在鳃中的表达量显著下降, 表明是因为在盐度胁迫前期该基因的高表达已满足了缢蛭的渗透压调节作用。李晨 (2016) 在 V-ATPase H 亚基对东亚飞蝗 (*Locusta migratoria manilensis*) 蜕皮和存活的研究中发现, 通过注射抑制 V-ATPase H 基因表达的试剂后, V-ATPase 的活性显著降低。而本实验所测定酶活性结果与盐度胁迫下 V-ATPase H 基因表达结果相符, 进一步证明缢蛭 V-ATPase 在盐度适应过程中不仅在低盐适应中起渗透调节和离子转运作用, 在高盐度环境下也参与了渗透调节和离子转运过程。本实验通过测定缢蛭不同胁迫时间的血清渗透压、V-ATPase 活性变化及 V-ATPase H 基因的 mRNA 表达特征, 推测该基因在盐度适应过程中的生理作用。

参 考 文 献

- Cipriano D J, Wang Y, Bond S, et al. 2008. Structure and regulation of the vacuolar ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA): Bioenergetics*, 1777(7/8): 599–604.
- Faleiros R O, Goldman M H, Furriel R P, et al. 2010. Differential adjustment in gill Na^+/K^+ -and V-ATPase activities and transporter mRNA expression during osmoregulatory acclimation in the cinnamon shrimp *amazonicum Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae). *Journal of Experimental Biology*, 213(22): 3894–3905.
- Gosling E M. 2003. *Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture*.

- Oxford: Fishing New Books, 201–224.
- He X, Zhuang P, Zhang L, et al. 2009. Osmoregulation in juvenile Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis* Gray) during brackish water adaptation. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(2): 223–230.
- Hirose S, Kaneko T, Naito N, et al. 2003. Molecular biology of major components of chloride cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 136(4): 593–620.
- Hwang P P, Lee T H, Lin L Y. 2011. Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 301(1): 28–47.
- Inoue T, Wang Y, Jefferies K, et al. 2005. Structure and Regulation of the V-ATPases. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 37(6): 393–398.
- Kirschner L B. 2004. The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *Journal of Experimental Biology*, 207(9): 1439–1452.
- Lucu C. 1993. Ion transport in the gill epithelium of aquatic crustacea. *Journal of Experimental Zoology*, 265(4): 378–386.
- Marshansky V, Rubinstein J L, Grüber G. 2014. Eukaryotic V-ATPase: Novel structural findings and functional insights. *Biochimica et Biophysica Acta: Bioenergetics*, 1837(6): 857–879.
- Mcnamara J C, Faria S C. 2012. Evolution of osmoregulatory patterns and gill ion transport mechanisms in the decapod Crustacea: a review. *Journal of Comparative Physiology B*, 182(8): 997–1014.
- Merzendorfer H, Gräf R, Huss M, et al. 1997. Regulation of proton-translocating V-ATPases. *Journal of Experimental Biology*, 200(2): 225–235.
- Péqueux A. 1995. Osmotic Regulation in Crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*, 15(1): 1–60.
- Vagin O, Sachs G, Tokhtaeva E. 2007. The roles of the Na, K-ATPase beta 1 subunit in pump sorting and epithelial integrity. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 39(5/6): 367–372.
- Wieczorek H, Grber G, Harvey W R, et al. 2000. Structure and regulation of insect plasma membrane H(+)V-ATPase. *Journal of Experimental Biology*, 203(1): 127–135.
- 蔡星媛, 张秀梅, 田璐, 等. 2015. 盐度胁迫对魁蚶稚贝血淋巴渗透压及鳃Na⁺/K⁺-ATP酶活性的影响. *南方水产科学*, 11(2): 12–19.
- 焦海峰, 严巧娜, 郑丹, 等. 2015. 温度和盐度对埋栖性双壳类泥蚶(*Tegillarca granosa*)呼吸、排泄的影响. *海洋与湖沼*, 46(6): 1333–1338.
- 李晨. 2016. V-ATPaseH 亚基对东亚飞蝗蜕皮和存活的影响. 重庆: 重庆大学硕士学位论文.
- 李敏, 郑伊诺, 许凯伦, 等. 2018. 盐度胁迫对泥蚶存活率及 3 种酶活性的影响. *浙江农业科学*, 59(4): 650–653.
- 李子牛, 林昕昕, 么宗利, 等. 2012. 盐度对青蛤抗氧化酶活性及生长的影响. *生态学杂志*, 31(10): 2625–2630.
- 吕昊泽, 刘健, 陈锦辉, 等. 2013. 盐度对缢蛏超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性的影响. *海洋渔业*, 35(4): 474–478.
- 马金武. 2016. 三疣梭子蟹不同盐度下血淋巴理化指标分析 Na⁺/H⁺-exchanger 和 V-ATPase 基因的克隆和功能研究. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文.
- 冉照收, 芦文奇, 徐继林, 等. 2017. 盐度对缢蛏稚贝脂肪酸和甾醇组成的影响. *中国食品学报*, 17(9): 53–62.
- 王刚, 张其中, 喻子牛, 等. 2013. 盐度对近江牡蛎耗氧率、排氨率、O:N 和吸收率的影响. *海洋科学*, 37(2): 101–106.
- 王劭雯. 2012. 皱纹盘鲍幼鲍对海水盐度的耐受性分析. 山东: 中国科学院海洋研究所硕士学位论文.
- 夏保密, 侯俊利, 赵峰, 等. 2015. 盐度胁迫对日本鳗鲡成鳗血清渗透压、离子浓度(Na⁺, K⁺, Cl⁻)和鳃丝 Na⁺/K⁺-ATP酶活性的影响 // 中国水产学会. 中国水产学会学术年会论文摘要集. 杭州: 中国水产学会学术年会, 2015, 64–65.
- 张淑静, 王高振, 刘爽, 等. 2015. 利用 RNAi 技术沉默东方粘虫 V-ATP 酶 H 亚基研究. *西北农业学报*, 24(1): 170–174.