

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15464

## 周期性盐度波动对凡纳滨对虾游离氨基酸含量及渗透调节相关基因表达的影响

张丹<sup>1,2</sup>, 王芳<sup>1,2</sup>, 董双林<sup>1,2</sup>

1. 中国海洋大学, 教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003

2. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071

**摘要:** 在实验室条件下, 以盐度 30 为对照组(S0), 4 d 为 1 个盐度波动周期, 研究了幅度为 4(S4)和 10(S10)的周期性盐度波动对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)稚虾离子通道和水通道相关基因表达、游离氨基酸(FAA)含量及其 FAA 代谢相关基因表达的影响。结果发现: (1)在盐度波动条件下, 凡纳滨对虾离子通道相关基因  $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase } \alpha$  (*NKA \alpha*)、 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase } \beta$  (*NKA \beta*)、碳酸酐酶(*CA*)、V 型  $\text{H}^+-\text{ATPase } 1$  (*VHA 1*)表达量随盐度波动幅度的增加而极显著升高( $P < 0.01$ ); S4 组对虾  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交换因子(*NHE*)和 F 型  $\text{H}^+-\text{ATPase } 1$  (*FHA 1*)表达量显著高于 S0 和 S10 组( $P < 0.05$ ); 而  $\text{Cl}^-$ 通道蛋白(*CLC*)表达量在各组间差异不显著( $P > 0.05$ ); (2)周期性盐度波动极显著影响凡纳滨对虾水通道蛋白(*AQP 4*)的基因表达( $P < 0.01$ ), 其表达量随盐度波动幅度的升高而下降; (3)周期性盐度波动对凡纳滨对虾肌肉中 FAA 总量无显著影响( $P > 0.05$ ); 鳃中 FAA 总量随盐度波动幅度的增加而显著升高( $P < 0.05$ ), 各组甘氨酸、精氨酸、脯氨酸等含量存在显著差异( $P < 0.05$ )。 (4)与 S0 组相比, S10 组对虾的丙氨酸转氨酶(*ALT*)表达量极显著升高, S4 和 S10 组对虾的氨基转移酶(*AMT*)、脯氨酸脱氢酶(*PDH*)基因表达量极显著降低( $P < 0.01$ )。实验结果初步表明, 周期性盐度波动条件下, 凡纳滨对虾渗透调控在转录水平上产生积极响应, 且随着盐度波动幅度的增大, 对虾的渗透适应性调控水平升高。在盐度波动幅度达到 10 时, 凡纳滨对虾仍能维持体内的渗透平衡, 说明其具有较强的耐受盐度波动的能力。

**关键词:** 凡纳滨对虾; 盐度波动; 渗透调节; 离子通道; 水通道; 游离氨基酸; 基因表达

中图分类号: S966

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)05-1130-07

在不同的养殖环境中如池塘和河口等, 水体盐度会因气候和季节的影响发生变化<sup>[1]</sup>。在养殖管理过程中, 大规模换水也会导致水体盐度发生变化<sup>[2]</sup>。已有研究表明, 盐度变化直接影响甲壳动物的蜕皮<sup>[3]</sup>、生长<sup>[4-5]</sup>及生理<sup>[6]</sup>和分子水平<sup>[7]</sup>的变化等, 而这些适应性响应均与甲壳动物的渗透调节活动密不可分。目前, 有关盐度波动影响甲壳动物渗透调节机制的研究较为缺乏。

当环境盐度发生变化时, 广盐性甲壳动物能够通过某些离子和水的转运, 主动调节体内的离

子含量和细胞体积, 从而维持机体正常的生理代谢水平。其中, 起主要作用的是渗透调节器官鳃中的离子转运酶, 如  $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ 、 $\text{V}-\text{H}^+-\text{ATPase}$ 、 $\text{F}-\text{H}^+-\text{ATPase}$  和碳酸酐酶等, 近年来已被国内外学者广泛关注<sup>[8-10]</sup>。此外, 甲壳动物还能够通过水通道蛋白(AQPs)建立水的体内平衡<sup>[11]</sup>。

游离氨基酸(FAA)在改变甲壳动物细胞容量和渗透调节过程中发挥重要作用<sup>[12]</sup>。在不同盐度条件下, 甲壳动物能够调节体内 FAA 的含量, 调控细胞的渗透势。此时, 机体会随之改变 FAA 的

收稿日期: 2015-12-11; 修订日期: 2016-01-23.

基金项目: 山东省自然科学基金项目(ZR2014CM042); 青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划项目(2015ASKJ02).

作者简介: 张丹(1988-), 博士研究生, 研究方向为水产养殖分子生态学. E-mail: tongtian225@163.com

通信作者: 王芳, 教授. Tel: 0532-82032435; E-mail: wangfang249@ouc.edu.cn

代谢速率, 分解氨基酸释放氨来调节渗透平衡。鳃是 FAA 分解代谢的重要场所<sup>[13]</sup>。已有研究证实, 在水体盐度发生变化时, 甲壳动物体内 FAA 含量的调节在渗透压调控方面起到重要作用<sup>[12-14]</sup>。

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)是世界范围内最具价值的经济虾类之一, 具有生长速度快和适盐能力强等优点。在对虾的野外或者半集约化养殖过程中, 很难使水体盐度维持在一个恒定的范围里, 因此, 研究盐度波动对凡纳滨对虾渗透调节机制的影响, 具有重要的理论意义和潜在的应用价值。本研究探讨了在 2 种盐度波动幅度下, 凡纳滨对虾离子通道、水通道、FAA 代谢相关基因的表达, 监测了凡纳滨对虾肌肉和鳃中 FAA 含量的变化, 初步探讨了周期性盐度变化对对虾渗透调节影响的机制, 以期丰富甲壳动物生理生态学理论, 为养殖生产中的水质调控提供参考。

## 1. 材料与方法

### 1.1 实验虾来源及管理

实验于 2015 年 7—9 月于山东省青岛国家海洋科学研究中心进行。凡纳滨对虾(3~5 cm)购自青岛胶州养虾场(水体盐度 30), 对虾运回实验室后, 暂养于室内玻璃钢水槽中。暂养期间水温(22.0±0.5)°C, 光照周期 14L:10D, 连续充气。每天 7:00、14:00 和 21:00 定时投喂人工配合饲料, 并于 2 h 后除去残饵和粪便, 每天换水 1/2 以保持良好水质, 暂养 7 d 后挑选体色透明、健康活泼的个体用于实验。

### 1.2 实验设计

实验盐度波动幅度的设计参照本课题组之前的研究结果<sup>[15]</sup>, 分别设盐度波动幅度为 4 和 10 的两个处理组, 分别用 S4 和 S10 表示; 以盐度波动幅度 0(水体盐度始终维持在 30)为对照组, 用 S0 表示。盐度波动周期为 4 d, 即由盐度 30 为起始, 4 d 后通过换水降低盐度 4 和 10, 再过 4 d 后升高盐度, 恢复至盐度 30。实验周期为 30 d。实验在室内玻璃水族箱(50 cm×40 cm×30 cm)中进行, 每个水族箱放初始湿体重为(1.262±0.005) g 的实验用虾 5 尾, 每个处理组设 5 个重复。实验期间

的水温、光照周期和投喂管理等与暂养一致。

### 1.3 样品采集

实验结束前 2 d, 各组盐度均恢复为 30, 并于样品采集前饥饿 24 h。样品采集时, 将对虾放于冰盘上迅速解剖, 取其鳃和肌肉组织, 放入 1.5 mL 离心管(Axygen, RNase free)中, 立即置于液氮环境中速冻, 而后转入-80°C 保存待测。

### 1.4 肌肉准备及 FAA 分析

肌肉样品随机取自每个处理组各 15 尾对虾混合, 准确称取 3.0~3.5 g 的样品于 50 mL 的容量瓶中, 加 0.01 mol/L 的盐酸 40 mL, 旋涡混匀 5 min, 超声提取 5 min, 定容至 50 mL 混匀。避光静置 2 h, 取 5 mL 4000 r/min 离心 10 min, 准确取 1 mL 上清液, 加入 1 mL 4%磺基水杨酸, 涡旋 1 min, 避光静置 1 h, 15000 转离心 15 min, 取上清液用 0.22 μm 的滤膜过滤后, 用日立 L-8900 高速氨基酸分析仪进行 FAA 测定。

### 1.5 RT-qPCR 分析

取对虾冷冻的鳃组织在液氮中研磨成粉末后, 加入 Trizol(TaKaRa)提取总 RNA; 参照 TaKaRa PrimeScript RT reagent Kit 说明书, 将 RNA 反转录成 cDNA 第一链; 用 1.2%琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 及 cDNA 的完整性, 同时用 Nano Drop ND-1000 微量紫外/可见分光光度计测定总 RNA 浓度。

凡纳滨对虾渗透调节相关基因分为 3 类进行表达分析, 包括离子通道相关基因 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase α (*NKA α*); Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase β (*NKA β*); V 型 H<sup>+</sup>-ATPase 1 (*VHA 1*); F 型 H<sup>+</sup>-ATPase 1 (*FHA 1*); Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交换因子(*NHE*); Cl<sup>-</sup>通道蛋白(*CLC*); 碳酸酐酶(*CA*); 水通道蛋白(*AQP 4*)和 FAA 代谢相关基因(氨基转移酶 *AMT*; 丙氨酸转氨酶 *ALT*; 脯氨酸脱氢酶 *PDH*)。应用 Primer 5.0 软件进行引物设计, 所用引物序列见表 1。

采用荧光定量 PCR 法测定各基因 mRNA 相对表达水平, 反应体系包括: 10 μL SYBR premix Ex Taq(TaKaRa), 0.75 μL 上下游引物, 2 μL cDNA, 加超纯水至 20 μL。反应条件为: 95°C 2 min, 1 个循环, 95°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 15 s, 40 个循环。每

表 1 凡纳滨对虾渗透调节相关基因的定量引物  
Tab. 1 qRT-PCR primers of osmoregulation related genes in *Litopenaeus vannamei*

定量引物 qRT primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')	产物大小/bp product length
NKA α-F	GCCTGCCATTTCCTTGC	237
NKA α-R	TTGATGGCCTTGCTGTCCC	
NKA β-F	GTCTCTCAATGAGTTCATCAAGCC	270
NKA β-R	GACTGGGACATATCTGCGGG	
CA-F	CTTCGCTCAGTTCCTTCCA	152
CA-R	GACCGTCGGCCTTCTTCAC	
NHE-F	GCGTCTGCCAAAGATGTCC	248
NHE-R	TTCAGCGAACTGTTAGCCTCA	
CLC-F	CTGAGTCTAGAGCCCCTGTG	146
CLC-R	AAGTGAGCTCTCCAATACGC	
VHA 1-F	CGATTCTTGTGTTGCGTTGG	178
VHA 1-R	CATGCACTTCTCTGTGGCTG	
FHA 1-F	AGGTAGGGCAAGAGCTAGTGTTA	146
FHA 1-R	CTTTATTAGGTTTCATCTCATTTTGG	
AQP 4-F	TCATGGGAATGGGAGGACC	118
AQP 4-R	GGGACAGCCGCATACAACA	
ALT-F	TGATACGAAAACCCACAAAACG	184
ALT-R	CCGCCATCTCTTCTCCA	
AMT-F	TCCAAGACCAGCAAGGTGAAC	272
AMT-R	GAGACGCCGAACTCGAAATC	
PDH-F	CAACCTCAACTCGGGTCAGAT	176
PDH-R	GACGGGAAATGGCTGGCT	

个基因均以模板浓度为梯度, 以 β-actin 为内参建立标准曲线, 验证基因表达的线性规律。每批反应均设阴性对照, 确保反应体系未受污染。β-actin 的稳定性已在不同组织以及不同处理下得到验证<sup>[16]</sup>。

1.6 数据计算与分析

实验中, 根据  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算各基因的相对表达水平<sup>[17]</sup>。实验各数据均以平均值±标准误( $\bar{x} \pm SE$ )表示, 用 Origin9.0 软件进行数据绘图。利用 SPSS13.0 软件对凡纳滨对虾 FAA 含量和渗透调节相关基因表达量等参数进行单因子方差分析(ANOVA)和 Duncan 多重比较分析, 以  $P < 0.05$  作为差异显著水平。

2. 结果与分析

2.1 盐度波动对凡纳滨对虾离子通道及水通道相关基因表达量的影响

盐度波动下凡纳滨对虾离子通道及水通道相

关基因表达量如图 1 所示。结果表明, *NKA α*、*NKA β*、*CA* 基因表达量随盐度波动幅度的增加而极显著升高( $P < 0.01$ ); *S4* 组对虾 *NHE* 基因表达量显著低于 *S0*、*S10* 组( $P < 0.05$ ); 而 *CLC* 基因表达量在各组间差异不显著( $P > 0.05$ )。就 *VHA 1* 和 *FHA 1* 而言, 前者在 *S10* 组表达量最高, 后者表达量最高值出现于 *S4* 组( $P < 0.01$ )。 *AQP 4* 基因表达量随盐度波动幅度的升高而极显著下降( $P < 0.01$ )。

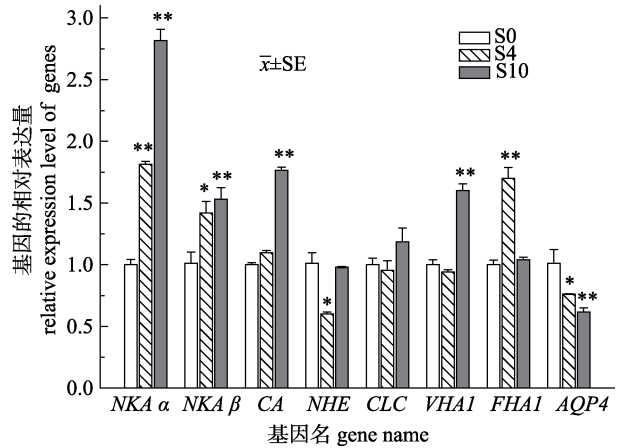


图 1 不同盐度波动下凡纳滨对虾离子通道和水通道相关基因的表达差异

\*表示处理组与对照组 *S0* 相比较差异显著( $P < 0.05$ ), \*\*表示差异极显著( $P < 0.01$ )。

Fig. 1 Relative expression level of ion channel and aquaporin related genes of *Litopenaeus vannamei* under different salinity fluctuation amplitudes

\* stands for significant difference compared with *S0* group ( $P < 0.05$ ), while \*\* stands for highly significant difference compared with *S0* group ( $P < 0.01$ ).

2.2 盐度波动对凡纳滨对虾 FAA 含量的影响

盐度波动下凡纳滨对虾 FAA 的含量如表 2 所示。结果表明, 凡纳滨对虾在盐度波动幅度为 0、4 和 10 时, 肌肉中 FAA 总量分别为 206.98 μmol/g、209.77 μmol/g 和 215.71 μmol/g。随着盐度波动幅度的增加, FAA 总量虽无显著增加, 但有增加趋势( $P > 0.05$ )。甘氨酸、精氨酸、脯氨酸、丙氨酸及谷氨酸是肌肉 FAA 的主要成分, 除丙氨酸外, 其他主要 FAA 在各组间差异均达到显著水平( $P < 0.05$ )。苏氨酸、丝氨酸和缬氨酸含量随盐度波动幅度的增加而显著增大( $P < 0.05$ ), 其他 FAA 虽也有相似趋势, 但各组间的差异不显著( $P > 0.05$ )。凡纳滨对

表 2 不同盐度波动幅度下凡纳滨对虾肌肉中游离氨基酸(FAA)的含量  
 Tab. 2 Free amino acid concentrations in muscle of *Litopenaeus vannamei* under different salinity fluctuation amplitude  
 $\bar{x} \pm SE; \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ (湿重 wet weight)

氨基酸 amino acid	组别 group					
	S0		S4		S10	
	肌肉 muscle	鳃 gill	肌肉 muscle	鳃 gill	肌肉 muscle	鳃 gill
天门冬氨酸 Asp	0.74±0.12	0	0.78±0.04	0	0.81±0.04	0
苏氨酸 Thr	5.98±0.13 <sup>a</sup>	4.29±0.03 <sup>a</sup>	8.66±0.39 <sup>b</sup>	4.58±0.12 <sup>a</sup>	9.56±0.52 <sup>b</sup>	5.97±0.15 <sup>b</sup>
丝氨酸 Ser	5.09±0.12 <sup>a</sup>	4.10±0.02 <sup>a</sup>	6.39±0.84 <sup>ab</sup>	4.84±0.14 <sup>b</sup>	7.33±0.45 <sup>b</sup>	4.85±0.26 <sup>b</sup>
谷氨酸 Glu	8.54±0.77 <sup>a</sup>	9.89±0.27	10.80±0.28 <sup>b</sup>	9.62±0.25	11.32±0.25 <sup>b</sup>	9.56±0.06
甘氨酸 Gly	111.35±1.21 <sup>a</sup>	39.33±1.17 <sup>a</sup>	98.25±0.96 <sup>b</sup>	44.51±0.28 <sup>b</sup>	104.31±2.20 <sup>c</sup>	47.75±1.43 <sup>b</sup>
丙氨酸 Ala	14.33±1.83	27.12±1.00	11.37±0.28	28.07±0.17	15.06±0.79	29.12±0.82
胱氨酸 Cys	0.55±0.09	1.31±0.01 <sup>a</sup>	0.80±0.07	1.12±0.03 <sup>b</sup>	0.78±0.13	1.62±0.07 <sup>c</sup>
缬氨酸 Val	1.86±0.08 <sup>a</sup>	3.32±0.02	2.82±0.26 <sup>b</sup>	3.30±0.09	2.80±0.18 <sup>b</sup>	3.51±0.09
蛋氨酸 Met	0.45±0.08	1.15±0.01 <sup>a</sup>	0.58±0.11	1.25±0.03 <sup>a</sup>	0.39±0.01	1.75±0.08 <sup>b</sup>
异亮氨酸 Ile	0.73±0.07	2.04±0.09 <sup>a</sup>	0.92±0.18	1.53±0.04 <sup>b</sup>	0.94±0.05	2.63±0.12 <sup>c</sup>
亮氨酸 Leu	1.36±0.15	3.66±0.37 <sup>ab</sup>	1.75±0.38	2.50±0.31 <sup>a</sup>	1.95±0.14	4.58±0.62 <sup>b</sup>
酪氨酸 Tyr	1.28±0.13	1.32±0.01 <sup>a</sup>	1.34±0.19	1.67±0.05 <sup>b</sup>	1.45±0.08	2.16±0.10 <sup>c</sup>
苯丙氨酸 Phe	0.99±0.15	2.28±0.02 <sup>a</sup>	1.13±0.19	2.12±0.06 <sup>a</sup>	1.11±0.04	2.94±0.13 <sup>b</sup>
赖氨酸 Lys	1.69±0.33	5.96±0.16 <sup>a</sup>	2.25±0.22	4.71±0.13 <sup>b</sup>	1.56±0.17	6.14±0.08 <sup>a</sup>
组氨酸 His	1.71±0.16	1.51±0.01 <sup>a</sup>	1.91±0.24	1.31±0.04 <sup>b</sup>	1.92±0.05	1.77±0.03 <sup>c</sup>
精氨酸 Arg	30.45±0.68 <sup>a</sup>	9.19±0.05	33.86±0.39 <sup>b</sup>	9.69±0.57	32.16±0.26 <sup>c</sup>	10.09±0.33
脯氨酸 Pro	19.89±0.85 <sup>a</sup>	5.03±0.14 <sup>a</sup>	26.15±1.85 <sup>b</sup>	6.24±0.29 <sup>b</sup>	22.26±1.31 <sup>ab</sup>	6.44±0.04 <sup>b</sup>
总氨基酸 TAA	206.98±4.93	120.39±1.22 <sup>a</sup>	209.77±3.89	128.11±1.21 <sup>b</sup>	215.71±3.44	140.47±0.76 <sup>c</sup>

注：表中同一行数据中不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。  
 Note: Different letters in the same row denote significant differences at 0.05 level.

虾鳃中 FAA 总量随盐度波动幅度的增加而显著升高( $P < 0.05$ ), 且大部分 FAA 均表现出此趋势。与肌肉中相似, 甘氨酸、丙氨酸、谷氨酸、精氨酸和脯氨酸占鳃中 FAA 总量比例较高。

### 2.3 盐度波动对凡纳滨对虾 FAA 代谢相关基因表达量的影响

如图 2 所示, 盐度波动极显著影响凡纳滨对虾 FAA 相关基因的表达水平( $P < 0.01$ )。其中, S10 组对虾的 *ALT* 基因表达量极显著高于其他两组; 而 S4 和 S10 组对虾的 *PDH*、*AMT* 基因表达量相对于 S0 组极显著下降( $P < 0.01$ )。

### 3. 讨论

关于甲壳动物离子通道相关基因在不同盐度条件下的作用一直是国内外学者的研究热点<sup>[18-20]</sup>。

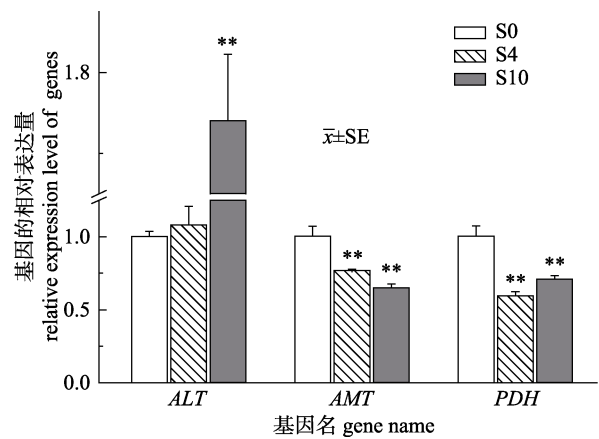


图 2 不同盐度波动下凡纳滨对虾 FAA 代谢相关基因的表达差异

\*\*表示处理组相对对照组 S0 差异极显著( $P < 0.01$ )。

Fig. 2 Relative expression level of FAA related genes under different salinity fluctuation amplitudes

\*\* stands for highly significant difference compared with S0 group ( $P < 0.01$ ).

NKA 主要存在于对虾的鳃和肠上皮细胞中, 在高盐和低盐适应过程中均起到维持体内渗透平衡的作用<sup>[18]</sup>。其中, NKA  $\alpha$  参与具有双向性和致电性的离子转运<sup>[21]</sup>, 而 NKA  $\beta$  具有协助阳离子转运的作用<sup>[22]</sup>。NKA 在甲壳动物渗透调节中的作用已被广泛证实<sup>[19-20]</sup>, 其在细胞的渗透平衡过程中占据主导地位。CA 不仅双向催化  $\text{CO}_2$ 、 $\text{H}_2\text{O}$  与  $\text{HCO}_3^-$ 、 $\text{H}^+$  之间的转化, 同时在甲壳动物的渗透调节过程中提供  $\text{HCO}_3^-$  和  $\text{H}^+$ , 以平衡体内的  $\text{Na}^+$  和  $\text{Cl}^-$ <sup>[18]</sup>。研究表明, 在斑节对虾 (*Penaeus monodon*)<sup>[23]</sup> 和普通滨蟹 (*Carcinus maenas*)<sup>[24]</sup> 受低盐胁迫时, CA 表达水平显著升高。VHA 和 FHA 是存在于真核细胞内和膜上的两种重要的 ATP 载体质子泵, 在代谢过程中发挥多种作用。其中, VHA 1 和 FHA1 分别在跨膜过程和能量转换过程中起重要作用<sup>[25]</sup>。此外, NHE 和 CLC 也是影响甲壳动物渗透调节的重要的离子转运蛋白<sup>[8, 26]</sup>。本研究中, NKA  $\alpha$ 、NKA  $\beta$ 、CA 和 VHA 1 基因表达量均随盐度波动幅度的增加而极显著升高。这些离子通道相关基因的激活说明其在凡纳滨对虾响应盐度波动的过程中起到重要作用, 同时, 盐度波动幅度越大, 这些基因在对虾体内的调控水平也随之加强。FHA 1 基因表达量在 S4 组达到最高值, 可能与其在代谢过程中供能相关, 该组对虾获得的较多的能量可能用于蜕皮和生长, 这与笔者之前的研究结果, 即 S4 组对虾生长较好一致<sup>[15]</sup>。CLC 和 NHE 基因受盐度波动的影响不显著或未表现出明显规律, 并不能否定其在对虾渗透调节过程中的作用, 只能说明这些转运蛋白在转录水平上的调控不显著, 但可能在蛋白水平上发挥作用<sup>[8]</sup>。

AQPs 是建立甲壳动物体内水平平衡的重要参与者, 其功能在脊椎动物、植物和细菌中均有研究<sup>[11, 27]</sup>, 但有关无脊椎动物的研究十分缺乏<sup>[28]</sup>。本研究中, AQP 4 作为水平平衡中的一个载体, 其基因表达量随盐度波动幅度的增加而极显著下降, 说明 AQP 4 基因的活动受盐度波动的影响而减弱, 限制了细胞内水的转运, 从而减少细胞的膨胀和收缩, 这与长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 等<sup>[28]</sup> 相关研究结果一致。

已有研究表明, FAA 是甲壳动物适应不同盐度环境的重要渗透物<sup>[29]</sup>。Dalla Via<sup>[12]</sup> 发现, 日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 在低盐或高盐环境中, 甘氨酸、脯氨酸、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸及丙氨酸是渗透调节的主要贡献者。Fang 等<sup>[14]</sup> 也发现当环境盐度发生变化时, 斑节对虾体内 FAA 在调节渗透压方面起主要作用。本研究中, 凡纳滨对虾肌肉中 FAA 总量虽无显著差异, 但随盐度波动幅度的增大, 有增加趋势; 而对虾鳃中的 FAA 总量随盐度波动幅度的增加有显著提高。甘氨酸、丙氨酸、谷氨酸、精氨酸和脯氨酸是盐度波动环境中凡纳滨对虾渗透调节过程的主要参与者, 同时, 在对虾的鳃中, 各 FAA 含量随盐度波动幅度的增大而显著提高, 而对虾肌肉中大部分 FAA 含量增加不显著。本研究结果一方面证实了 FAA 在凡纳滨对虾渗透调节过程中发挥的重要作用; 另一方面说明在对虾的肌肉和鳃中 FAA 的适应盐度变化的模式或程度不同, 反映了不同组织在对虾渗透调节过程中发挥的不同作用。

FAA 代谢过程中的关键酶调控了 FAA 的合成分解, 同时也是甲壳动物渗透调控的关键因子。在动物体内, 丙氨酸主要通过 ALT 催化丙酮酸形成<sup>[28]</sup>。AMT 参与甘氨酸代谢最关键的途径, 催化甘氨酸降解; 而 PDH 催化脯氨酸分解<sup>[30]</sup>。本研究中, ALT 基因表达量在盐度波动环境中极显著升高, 而 AMT 和 PDH 基因表达量显著降低, 说明盐度波动促进了凡纳滨对虾体内丙氨酸、甘氨酸和脯氨酸的积累, 从而激发了对虾体内 FAA 的渗透调控。

研究甲壳动物的渗透调节过程有利于了解其在自然或养殖环境中遇到水体盐度波动时的响应机制。本研究以凡纳滨对虾作为研究对象, 探究其在盐度波动环境中有关渗透调节的分子机制。结果发现, 在盐度波动条件下, 凡纳滨对虾在离子转运、水转运以及游离氨基酸调节方面表现出积极响应, 且随着盐度波动幅度的增大, 对虾的渗透调控作用越明显。凡纳滨对虾耐受盐度波动的能力较强, 当盐度波动幅度达到 10 时, 仍能维持体内的渗透平衡。

## 参考文献:

- [1] Ding S, Wang F, Sun H, et al. Effects of salinity fluctuation frequency on the osmolarity,  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  activity and HSP70 expression in juvenile chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*[J]. J Ocean Univ Chin, 2009, 8(1): 71–76.
- [2] Mu Y, Wang F, Dong S, et al. Effects of salinity fluctuation in different ranges on the intermolt period and growth of juvenile *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Acta Oceanol Sin, 2005, 24(3): 141–147.
- [3] Shinozaki-Mendes R A, Manghi R F, Lessa R. Comparative study of the molting cycle of wild and reared swimming crabs *Callinectes danae* (Crustacea: Portunidae)[J]. J Appl Ichthyol, 2014, 30(3): 502–506.
- [4] Romano N, Wu X, Zeng C, et al. Growth, osmoregulatory responses and changes to the lipid and fatty acid composition of organs from the mud crab, *Scylla errata*, over a road salinity range[J]. Mar Biol Res, 2014, 10: 460–471.
- [5] Liu C Q, Wang J X, Zhang Y J, et al. Effects of salinity and  $\text{Na}^+\text{/K}^+$  in percolating water from saline-alkali soil on the growth of *Litopenaeus vannamei*[J]. J Appl Ecol, 2008, 19(6): 1337–1342.
- [6] Henry R P, Watts S A. Early carbonic anhydrase induction in the gills of the blue crab, *Callinectes sapidus*, during low salinity acclimation is independent of ornithine decarboxylase activity[J]. J Exp Zool, 2001, 289(6): 350–358.
- [7] Towle D W, Paulsen R S, Weihrauch D, et al.  $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{-ATPase}$  in gills of the blue crab *Callinectes sapidus*: cDNA sequencing and salinity-related expression of  $\alpha$ -subunit mRNA and protein[J]. J Exp Biol, 2001, 204(22): 4005–4012.
- [8] Towle D W, Henry R P, Terwilliger N B. Microarray-detected changes in gene expression in gills of green crabs (*Carcinus maenas*) upon dilution of environmental salinity[J]. Comp Biochem Physiol D: Genom Proteom, 2011, 6(2): 115–125.
- [9] Genovese G, Ortiz N, Urcola M R, et al. Possible role of carbonic anhydrase,  $\text{V-H}^+\text{-ATPase}$ , and  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchanger in electrogenic ion transport across the gills of the euryhaline crab *Chasmagnathus granulatus*[J]. Comp Biochem Physiol A: Mol Integr Physiol, 2005, 142(3): 362–369.
- [10] Pan A J, Lai Q F, Wang H, et al. Effects of abrupt salinity changes on the carbonic anhydrase activity in the tissues of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2006, 15(1): 47–51. [潘爱军, 来琦芳, 王慧, 等. 盐度突变对凡纳滨对虾组织碳酸酐酶活性的影响[J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(1): 47–51.]
- [11] Berger V J, Kharazova A D. Mechanisms of salinity adaptations in marine molluscs[J]. Hydrobiologia, 1997, 355(1): 115–126.
- [12] Dalla Via G J. Salinity responses of the juvenile penaeid shrimp *Penaeus japonicus*: I. Oxygen consumption and estimations of productivity[J]. Aquaculture, 1986, 55(4): 297–306.
- [13] McNamara J C, Rosa J C, Greene L J, et al. Free amino acid pools as effectors of osmotic adjustment in different tissues of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda) during long-term salinity acclimation[J]. Mar Freshw Behav Physiol, 2004, 37(3): 193–208.
- [14] Fang L S, Tang C K, Lee D L, et al. Free amino acid composition in muscle and hemolymph of the prawn *Penaeus monodon* in different salinities[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1992, 58: 1095–1102.
- [15] Ding S, Wang F, Guo B, et al. Effects of salinity fluctuation on the molt, growth and energy budget of juvenile *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2008, 19(2): 419–423. [丁森, 王芳, 郭彪, 等. 盐度波动对中国对虾稚虾蜕皮, 生长和能量收支的影响[J]. 应用生态学报, 2008, 19(2): 419–423.]
- [16] Cheng W, Liu C H, Tsai C H, et al. Molecular cloning and characterisation of a pattern recognition molecule, lipopolysaccharide-and  $\beta$ -1, 3-glucan binding protein (LGBP) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2005, 18(4): 297–310.
- [17] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402–408.
- [18] Pequeux A. Osmotic regulation in crustaceans[J]. J Crust Biol, 1995, 15(1): 1–60.
- [19] Xu Q, Liu Y. Gene expression profiles of the swimming crab *Portunus trituberculatus* exposed to salinity stress[J]. Mar Biol, 2011, 158(10): 2161–2172.
- [20] Lucu Č, Towle D W.  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  in gills of aquatic crustacea[J]. Comp Biochem Physiol A: Mol Integr Physiol, 2003, 135(2): 195–214.
- [21] Mendonça N N, Masui D C, McNamara J C, et al. Long-term exposure of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* to elevated salinity: Effects on gill ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ )-ATPase  $\alpha$ -subunit expression and  $\text{K}^+$ -phosphatase activity[J]. Comp Biochem Physiol A: Mol Integr Physiol, 2007, 146(4): 534–543.
- [22] Wang L, Wang W N, Liu Y, et al. Two types of ATPases from the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* in response to environmental stress[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(6): 6427–6438.
- [23] Pongsomboon S, Udomlertprecha S, Amparyup P, et al. Gene expression and activity of carbonic anhydrase in salinity stressed *Penaeus monodon*[J]. Comp Biochem Physiol A: Mol Integr Physiol, 2009, 152(2): 225–233.
- [24] Henry R P, Garrelts E E, McCarty M M, et al. Differential induction of branchial carbonic anhydrase and  $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{-ATPase}$  activity in the euryhaline crab, *Carcinus maenas*, in response to low salinity exposure[J]. J Exp Zool, 2002, 292(7): 595–603.
- [25] You H Y, Deng Y, Qin W X. Progress in the functions of V-ATPases and its inhibitors[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2009(4): 499–503. [游海燕, 邓云, 覃文新.]

- V-ATPases 的功能及其抑制剂研究进展[J]. 生命科学, 2009(4): 499–503.]
- [26] Zhang G P. Progress in the study of background chloride channels[J]. Progress Biochemistry and Biophysics, 1998, 25(4): 324–328. [张光平. 背景氯离子通道研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 1998, 25(4): 324–328.]
- [27] Madsen S S, Bujak J, Tipsmark C K. Aquaporin expression in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*) in freshwater and seawater: challenging the paradigm of intestinal water transport?[J]. J Exp Biol, 2014, 217(17): 3108–3121.
- [28] Meng J, Zhu Q, Zhang L, et al. Genome and transcriptome analyses provide insight into the euryhaline adaptation mechanism of *Crassostrea gigas*[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e58563.
- [29] Shi X F. Fish Physiology[M]. Beijing: Agriculture Press, 1991: 156–159. [施腺芳. 鱼类生理学[M]. 北京: 农业出版社, 1991: 156–159.]
- [30] Birdsey G M, Lewin J, Holbrook J D, et al. A comparative analysis of the evolutionary relationship between diet and enzyme targeting in bats, marsupials and other mammals[J]. Proc Royal Soc London B: Biol Sci, 2005, 272(1565): 833–840.

## Effects of periodic salinity fluctuations on free amino acid contents and transcription patterns of osmo-related genes in *Litopenaeus vannamei*

ZHANG Dan<sup>1,2</sup>, WANG Fang<sup>1,2</sup>, DONG Shuanglin<sup>1,2</sup>

1. The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education; Ocean University of China, Qingdao 266003, China;
2. Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China

**Abstract:** Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, is one of the most important commercially farmed species worldwide because of its rapid growth and osmoregulatory capacity. Abiotic factors such as freshwater inflow, rainfall, and seasonal variations result in fluctuations in water salinity in various aquaculture environments such as ponds and estuaries. To determine the response of *L. vannamei* to periodic salinity fluctuations, a 30-day experiment was conducted in the laboratory. In this experiment, two salinity fluctuation amplitudes of 4 (S4 group) and 10 (S10 group) were designed, using constant salinity of 30 (S0 group) as the control. The free amino acids (FAA) content, and the transcript levels of genes related to water, ion channels and FAA metabolism were determined. Fluctuations in salinity strongly affected the transcript levels of genes related to ion and water channels. With increasing amplitude of salinity fluctuations, the transcript levels of genes encoding Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$  and  $\beta$ , carbonic anhydrase, and V-H<sup>+</sup>-ATPase 1 significantly increased, while the transcript levels of the gene encoding aquaporin 4 significantly decreased ( $P < 0.01$ ). The highest transcript levels of the genes encoding F-H<sup>+</sup>-ATPase 1 and the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger were in the S4 group ( $P < 0.05$ ). The transcript level of the gene encoding chloride channel protein did not differ significantly among the three groups ( $P > 0.05$ ), nor did the FAA total contents in muscle ( $P > 0.05$ ). However, the FAA total content in the gill was significantly increased by increasing salinity fluctuations ( $P < 0.05$ ). Compared with the control shrimps (salinity of 30; S0 group), those in the S10 group showed significantly increased transcript levels of the gene encoding alanine transaminase, and significantly decreased transcript levels of the genes encoding aminomethyltransferase and proline dehydrogenase ( $P < 0.01$ ). These results indicate that *L. vannamei* generates an active response to salinity fluctuations at the transcriptional level. With the increasing amplitude of salinity fluctuations, the osmoregulation capacity can increase. These results provide a scientific reference for further research on the osmoregulation of shrimps in stressful environments and also for the regulation of water quality in aquaculture.

**Key words:** *Litopenaeus vannamei*; periodical salinity fluctuation; osmo-related gene; ion channel; water channel; FAA; gene expression

**Corresponding author:** WANG Fang. E-mail: wangfang249@ouc.edu.cn