

DOI: 10.12264/JFSC2020-0574

低盐对青蛤抗氧化酶和 ATP 酶的影响及碳酸酐酶基因的克隆与表达

葛红星^{1,2}, 李雯倩¹, 柳佳玲¹, 任国梁¹, 吴雨晨¹, 谢玲莉¹, 问露洁¹, 董志国¹

1. 江苏海洋大学, 江苏省海洋生物技术重点建设实验室, 江苏 连云港 222005;

2. 江苏省海洋资源开发研究院, 江苏 连云港 222005

摘要: 为探讨青蛤(*Cyclina sinensis* Gmelin)耐低盐适应机制, 研究了低盐(盐度 8)和正常盐度(盐度 25)条件下青蛤 96 d 内超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPH-Px)、 Na^+/K^+ -ATPase、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 酶活性、丙二醛含量和碳酸酐酶 mRNA 时序性表达变化。实验结果表明: (1) 低盐条件与正常盐度相比, 青蛤超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶活性总体呈现先上升后下降的趋势, 变化具有显著性差异($P<0.05$); Na^+/K^+ -ATPase 活力在 96 d 内一直呈下降趋势, 在第 48 天下降至最小值, 显著低于初始酶活性值($P<0.05$); 实验开始后的第 6、12、24 天, $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 酶活性较初始酶活性无显著性变化($P>0.05$), 第 48 天显著升高($P<0.05$); MDA 含量呈现先上升后下降的趋势, 第 12、48 和 96 天时显著高于初始酶活性($P<0.05$)。 (2) 利用 RACE 技术克隆了青蛤碳酸酐酶基因(CsCA)的全长 cDNA 序列, 共 1672 bp, 包含 738 bp 开放阅读框, 编码 245 个氨基酸, 系统进化树结果表明青蛤与其他瓣鳃纲碳酸酐酶基因同源性高, 说明其进化保守。qRT-PCR 结果显示, 低盐条件下, 青蛤碳酸酐酶基因 mRNA 在第 24 天显著高于初始表达量($P<0.05$), 其他时间也高于初始值, 但差异不显著($P>0.05$)。综上所述, 在适应低盐环境时, 青蛤鳃组织中抗氧化酶最先被激活并出现反应, 活力增强, 随着时间的增加, 抗氧化酶活性受抑制, 随后 ATP 酶活性升高; 碳酸酐酶基因在青蛤长期适应低盐环境中发挥重要作用。本研究结果为青蛤养殖产业可持续发展提供理论指导。

关键词: 青蛤; 盐度; 抗氧化酶; ATP 酶; 丙二醛; 碳酸酐酶基因

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2021)08-0968-10

青蛤(*Cyclina sinensis* Gmelin)属软体动物门, 瓣鳃纲(Lamellibranchia), 帘蛤目(Veneroida), 帘蛤科(Veneroidae), 青蛤属, 通常称作黑蛤、圆蛤、牛眼蛤等, 广泛分布于我国南北沿海及日本、朝鲜等潮间带, 是常见的埋栖型暖水性双壳贝类^[1-2]。青蛤具有生长速度快、抗逆性强等特点, 是我国重要的滩涂贝类养殖种类之一^[3]。青蛤长期生活在中高潮区且有淡水流入的河口附近^[4], 水体盐度变化幅度较大, 其生命活动受影响较严重, 甚

至出现大批死亡现象。

盐度是重要的环境因子, 盐度变化往往影响水产动物的生长发育、生理代谢和抗氧化能力等。研究表明, 贝类在遭遇低盐胁迫时, 体内出现呼吸暴发现象并伴随过量活性氧中间体(reactive oxygen species, ROS)的产生^[5]。为防止过量活性氧分子对自身造成的伤害和保持体内环境的平衡, 贝类逐渐形成了特定的抗氧化防御机制, 包括酶和非酶系统^[6]。如超氧化物歧化酶(superoxide

收稿日期: 2020-12-21; 修订日期: 2021-01-13.

基金项目: 农业农村部国家贝类产业技术体系项目(CARS-49); 江苏省高等学校自然科学研究重大项目(18KJA240001); 江苏省渔业科技类项目(Y2018-27); 江苏省研究生科研与实践创新计划项目(SJCX19_0994); 江苏省高等学校自然科学研究面上项目(20KJB240002).

作者简介: 葛红星(1986-), 男, 博士, 讲师, 从事水产动物健康养殖研究. E-mail: hongxinggelu@163.com

通信作者: 董志国, 教授, 主要从事水产动物种质资源与遗传育种研究. E-mail: dzg7712@163.com

dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPX)、谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione S-transferases, GST)和谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)等是构成抗氧化酶系统的主要成分,在清除活性氧自由基方面发挥重要作用^[7]。抗氧化酶活性和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量是贝类免疫防御系统的重要指标。ATP 酶是一类分布广泛的膜结合蛋白酶,可作为离子载体和通道的初动力^[8]。在养殖水体盐度发生变化时,稳定细胞内外渗透压平衡,为肾脏和鳃等运输系统提供驱动力^[9]。碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA)是一种含锌金属酶,能催化 CO_2 水化反应及某些酯、醛类水化反应,参与体内酸碱平衡调节和多种离子交换过程^[10]。贝类迁移能力较弱,难以快速躲避低盐等不良环境。因此,其耐低盐适应机制日益引起学者的关注。李子牛等^[11]对不同盐度条件下(盐度 10、15、25、35) 96 h 内青蛤鳃、外套膜和肝胰腺中 SOD 和 CAT 活性变化做了研究,同时探究了不同盐度下青蛤养殖 2 个月的月增长率及增重率变化;林听听等^[12]研究了盐度 23 下青蛤鳃、斧足、外套膜和内脏团中 Na^+/K^+ -ATPase 活性差异;孙长森等^[13]搜集 4 个不同地区的青蛤自然群体,研究低盐胁迫对青蛤存活和机体抗氧化酶活性的影响。而关于青蛤长期低盐养殖下生命活动的响应及分子适应机制研究还鲜有报道。

本研究分析了低盐养殖下青蛤抗氧化酶(包括 SOD、CAT 和 GSH-PX)、MDA、ATP 酶(包括 Na^+/K^+ -ATPase 和 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase)活性的变化,并基于青蛤转录组及基因组分析结果筛选到青蛤响应低盐过程中的关键基因碳酸酐酶基因(*CsCA*),克隆出其 cDNA 全长序列,利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)技术分析 *CsCA* 在青蛤低盐养殖过程中的时序性表达变化,以了解青蛤耐低盐适应机制,为河口区等盐度较低区域的青蛤养殖提供实践指导,为青蛤种质资源保护及耐低盐新品种的选育提供理论基础,进而推进青蛤产业的可持续发展。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用青蛤由连云港众创水产养殖有限公司提供。实验室节能环保恒温机循环水系统控制水温(20 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,盐度 25 ± 0.5 ,暂养 7 d 后开始实验。暂养期间,24 h 连续充气,每 3 d 换水 50%,每日投喂小球藻及新月藻混合液。开始实验时,随机挑选 1200 粒体重一致[(4.08 ± 0.61) g]、健康青蛤用于实验,实验在水泥池(100 cm $\times$ 100 cm $\times$ 50 cm)中进行。实验分为对照组(盐度 25)和低盐组(盐度 8),每组 3 个平行,每个水泥池 200 粒青蛤。实验用水以经漂白粉处理的自然海水和曝气自来水配制,实验条件与暂养条件相同。

1.2 实验方法

1.2.1 青蛤鳃组织样品的制备 在实验的第 0、6、12、24、48 和 96 天,每个处理分别随机取 3 粒青蛤,解剖取鳃组织,经液氮研磨后放入预冷后的 1.5 mL 离心管,加入预冷生理盐水制备成 10%组织匀浆,3500 r/min 离心 10 min,取上清液用于酶活性测定;另取 3 粒青蛤,解剖后取鳃组织放入装有 RNA 保存液的无酶 1.5 mL 离心管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 12 h 后 -80°C 冻存,用于 RNA 提取。

1.2.2 青蛤鳃组织样品酶活测定 SOD、CAT、GSH-PX、MDA、 Na^+/K^+ -ATPase 和 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 酶活性的测定均采用试剂盒(南京建成生物工程研究所)。蛋白质含量的测定采用考马斯亮蓝试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.2.3 *CsCA* 基因克隆与测序 用 Trizol 法提取样品总 RNA,采用微量分光光度计和 1.0%琼脂糖凝胶电泳分别进行 RNA 浓度检测和质量分析。使用 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit (TaKaRa)试剂盒合成 5'及 3' ready cDNA。根据本实验全基因组测序获得的 *CsCA* 基因 CDS 序列,利用 Primer Premier 5.0 设计 5'及 3'端引物,分别以 5'及 3' ready cDNA 为模板进行巢式 PCR 扩增,获得 *CsCA* 基因 5'端和 3'端片段序列。PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后用琼脂糖凝胶回收试剂盒[天根生化科技有限公司(北京)]回收目的片段,后与 pUCm-T 载体连接,并转化至感受态细胞[大肠杆菌 DH5 α , 生工生物工程(上海)]中,

经蓝白斑筛选和阳性克隆验证后,将目标菌液送往青岛睿博科技有限公司进行测序。

1.2.4 青蛤鳃组织中 CsCA 基因实时荧光定量 PCR 从 RNA 保存液中取出青蛤鳃组织样品, RNase-Free water 冲洗 2~3 次,使用传统 Trizol RNA 提取方法提取青蛤各组织总 RNA。检验合格后的 RNA 用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)[宝生物工程有限公司(大连), TaKaRa]处理去除基因组 DNA 及合

成 cDNA 第一条链,反转录产物用 β -actin 引物检验合格后置于-40 ℃冰箱保存。CsCA 基因克隆所需引物见表 1。根据 CsCA 基因 cDNA 全长设计定量引物 CsCA-qrt-F/R,选择 β -actin 基因作为青蛤的内参基因(表 2)。采用 SYBR 法对青蛤鳃组织样品进行 qRT-PCR 分析,每个样品设置 3 个重复,反应程序为: 95 ℃预变性 30 s; 95 ℃变性 5 s, 60 ℃退火 30 s, 共 40 个循环;最后 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 95 ℃ 15 s 制备熔解曲线。

表 1 CsCA 基因克隆引物
Tab. 1 Primers used for cloning of CsCA in *Cyclina sinensis*

引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')	用途 usage
CsCA-5GSP	TGGCCTGCTGCGTCTGGAAACATC	5' RACE 外层扩增引物 5' RACE outer layer amplification primers
CsCA-5NGSP	GGTCGAGACTTTCGATGTGACTTC	5' RACE 内层扩增引物 5' RACE inner layer amplification primers
CsCA-3GSP	TATGATAGATGGACAGTCGTACGCGGC	3' RACE 外层扩增引物 3' RACE outer layer amplification primers
CsCA-3NGSP	ACGGTCTGGCTGTGCTTGGCATTAT	3' RACE 内层扩增引物 3' RACE inner layer amplification primers
Upm-long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	RACE PCR 外层扩增 RACE PCR outer layer amplification
NUP	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT	RACE PCR 内层扩增 RACE PCR inner layer amplification
M13F	GTTGTAAAACGACGGCCAG	阳性克隆验证 positive clone verification
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	阳性克隆验证 positive clone verification

表 2 CsCA 基因 qRT-PCR 的特异性引物
Tab. 2 Specific primers for qRT-PCR of CsCA from *Cyclina sinensi*

引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')	目的 purpose
CsCA-qrt-F	AAGGAGGGGAAAGA CTGGTGG	qRT-PCR
CsCA-qrt-R	CATCACCGCCCATG TATGTG	qRT-PCR
β -actin-F	CACCACAAGTGCC GAGAG	内参基因 internal reference gene
β -actin-R	CCGATAGTGATGA CTGACC	内参基因 internal reference gene

1.2.5 序列分析及数据处理 使用 Excel 2010 对酶活数据统计计算,荧光定量数据使用 ABI 7500 SDS software 分析,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法分析基因时空表达水平。运用 SPASS 26.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA),数值以平均值±标准差($\bar{x}\pm SD$)形式表示,以 $P<0.05$ 为差异显著判别标

准。本文中柱状图均用 Graphpad Prism 绘制。
对测序后的序列移除载体后,使用 DNA MAN 拼接全长 CsCA 基因,使用 NCBI 数据库中的 ORF Finder 对 CsCA 基因进行开放阅读框(ORF)预测,并用 BLAST 程序对序列进行同源性搜索和比对。在 <http://web.expasy.org/protparam/>中预测蛋白质的分子量和等电点,利用 MEGA 5.1 软件中的邻接法和最大似然法对不同物种的 CA 基因编码的氨基酸序列进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 低盐对青蛤鳃组织抗氧化酶的影响

如图 1 所示,青蛤鳃组织经低盐处理后抗氧化酶活性总体呈现先升后降的变化趋势,且均在第 6 天显著升高到最大值($P<0.05$)。对照组的青蛤鳃组织抗氧化酶活性变化不显著($P>0.05$)。低盐组在第 6 天时 CAT 活性升高后随即下降并维持在较

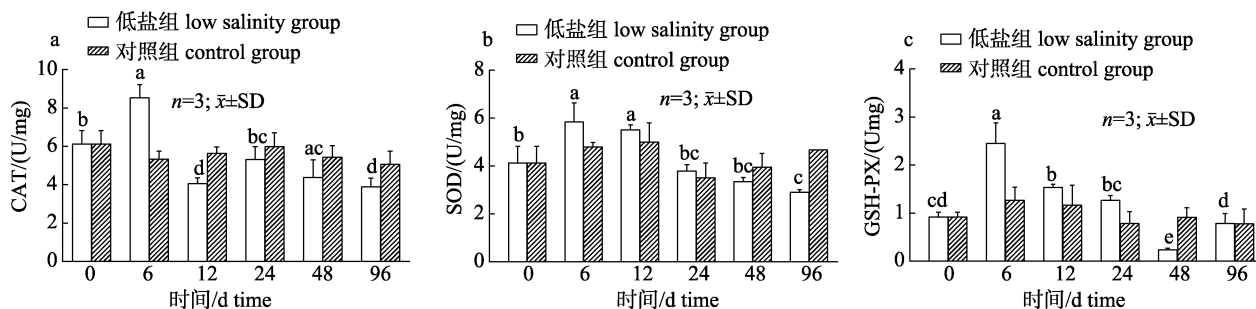


图 1 低盐(盐度 8)对青蛤鳃组织过氧化氢酶(CAT, a)、超氧化物歧化酶(SOD, b)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX, c)活性的影响

柱形图上方不同字母表示差异显著($P < 0.05$).

Fig. 1 Effect of low salinity (8) on catalase (CAT, a), superoxide dismutase (SOD, b) and glutathione peroxidase (GSH-PX, c) in the gill of *Cyclina sinensi*
Different letters on the column indicate significant differences ($P < 0.05$).

低水平, 于第 96 天下降至最低值, 并低于初始酶活性值, 两者差异显著($P < 0.05$)(图 1a)。低盐条件下青蛤鳃组织中 SOD 活性在第 6 天时显著升高, 维持至第 24 天显著下降($P < 0.05$), 到第 96 天降至最低值, 低于初始酶活并差异显著($P < 0.05$)(图 1b)。低盐条件下青蛤鳃组织中 GSH-PX 活性在第 6 天显著升高, 最低值在第 48 天, 随后又升高, 到第 96 天升高至与初始酶活性值无显著性差异($P > 0.05$)(图 1c)。

2.2 低盐对青蛤鳃组织 ATP 酶的影响

图 2 显示, 低盐组中青蛤鳃组织 ATP 酶活性的变化总体呈现先下降后上升的趋势, 且具有显著性差异($P < 0.05$), 对照组青蛤鳃组织中 ATP 酶活性变化不显著($P > 0.05$)。低盐组青蛤鳃组织 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 活性第 6 天显著下降($P < 0.05$)至最低值, 第 6~24 天 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 活性稳定维持在较低水平, 第 48 天酶活性显著升高($P < 0.05$), 第 96 天达到最大值, 但仍然低于初始酶活性, 且差异显著($P < 0.05$)。低盐组青蛤鳃组织 $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase 活性在前 48 d 持续下降达最低值, 第 48 天活性上升, 实验第 96 天时酶活性低于初始酶活性值, 差异显著($P < 0.05$)。

2.3 低盐对青蛤鳃组织丙二醛含量的影响

如图 3 所示, 随着处理时间的延长, 低盐组青蛤 MDA 含量呈现波动变化的趋势, 第 12 天时显著升高($P < 0.05$), 第 24 天含量最低, 第 48 天显著升高($P < 0.05$), 96 d 时 MDA 含量显著性高于($P < 0.05$)初始 MDA 含量。对照组青蛤 MDA 含量变化不显著($P > 0.05$)。

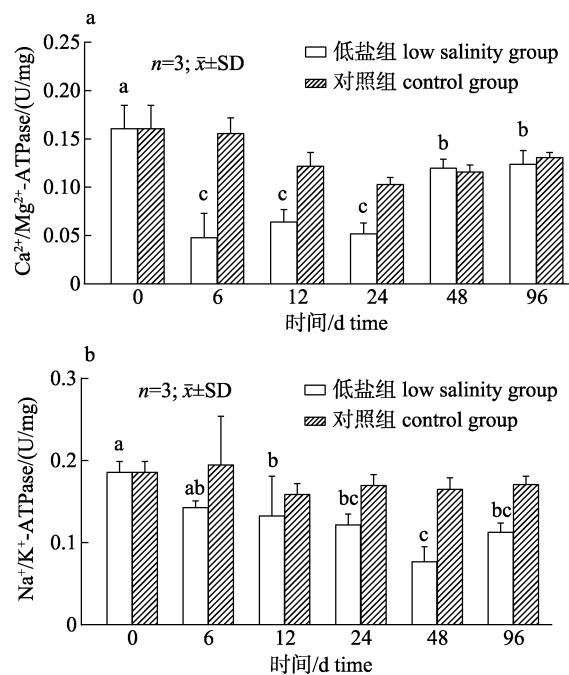


图 2 低盐(盐度 8)对青蛤鳃组织 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase (a)和 $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase (b)活性的影响

柱形图上方不同字母表示差异显著($P < 0.05$).

Fig. 2 Effect of low salinity (8) on $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase (a) and $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase (b) activities in the gill of *Cyclina sinensi*
Different letters on the column indicate significant differences ($P < 0.05$).

2.4 CsCA 基因全长 cDNA 序列及特征分析

CsCA 基因全长一共 1672 个碱基, 其中 5'非编码区(5'UTR)271 个碱基, 3'非编码区(3'UTR)663 个碱基, ORF 区 738 个碱基, 共编码 245 个氨基酸(图 4)。使用在线软件对 CsCA 基因编码的氨基酸理化性质进行预测, 蛋白预测分子式为 $\text{C}_{1207}\text{H}_{1833}\text{N}_{323}\text{O}_{382}\text{S}_{13}$,

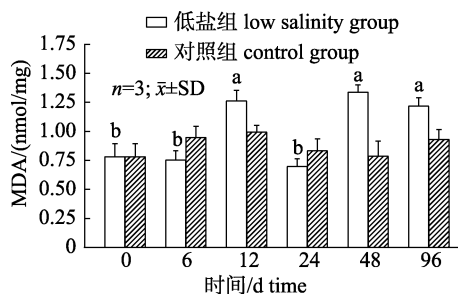


图 3 低盐(盐度 8)对青蛤鳃组织丙二醛(MDA)含量的影响

柱形图上方不同字母表示差异显著($P < 0.05$).

Fig. 3 Effect of low salinity (8) on malondialdehyde (MDA) content in the gill of *Cyclina sinensis*
Different letters on the column indicate significant differences ($P < 0.05$).

相对分子量大小为 27397.55 D, 等电点(pI)为 4.88。带负电荷氨基酸残基(Asp+Glu)总数为 32 个, 带正电荷氨基酸残基(Arg+Lys)总数为 18 个, 不稳定系数为 56.58, 为稳定蛋白。脂肪指数为 67.27, 总平均亲水系数(GRAVY)为-0.491。

2.5 CsCA 基因氨基酸序列比对及系统进化分析

将 *CsCA* 基因编码的氨基酸序列与从 NCBI 数据库中选择 5 种硬骨鱼纲、1 种哺乳动物、3 种瓣鳃纲和 1 种甲壳纲的 *CA* 基因编码的氨基酸序列(表 3)进行比对。

基于青蛤和其他物种的 *CA* 氨基酸序列所构建的 Neighbor-Joining 系统进化树如图 5 所示, 斑点叉

```

1   ACATGGGGACACAGTTCCGTCAGCTTCTACCATACTGGGTTATTTTGTGACTAATATTTACAAAATACAATCAGGACTTGTGGTCGAAA
91  CAGGGCTTGACCAGCGGGATTTAGTGAAGAAATATTGCAAGATAAGGAGGGAAAGACTGGTGGTTATAAGACAGTGGTAGAAGTCACATC
181 GAAAGTCTCGACCTTAAAAGTACAGGAGAAGAAACAGACGCAATGTCTTGGGGATACGCACACTCTAACGGTCCACATACATGGGCGGT
271 GATGTTTCCAGACGCAGCAGGCCACGCCAGTCACCAATAGATATCAACACAACAGAGACAGTGTACGACAGTGAAGTGAAGCCACGCC
1   M F P D A A G H A Q S P I D I N T T E T V Y D S E L E A T P
361 CCTGACAGTCAAGTTACTCACCTGAAGATGCCTTCACTGCCTGCAACACGGGGTCAAGTTTAAAGTTAAACATTAGCAAACTTCAGAGCT
31  L T V S Y S P E D A F T A C N T G S S F K V N I S K T S E L
451 GAAAGGTGGACCATTTGAATGATTGCTACAGACTTGAACAGTTCATTACACTGGGGTTCATGCGATAATCATGGATCAGAGCATATGAT
61  K G G P L N D C Y R L E Q F H L H W G S C D N H G S E H M I
541 AGATGGACAGTCGTACGCGGTGAGCTTCATCTTGTTCATTGGAAGTCTACAAAATACTCGAGCTTCGCCGAGGCCGTTGACCAGCCCGA
91  D G Q S Y A A E L H L V H W N S T K Y S S F A E A V D Q P D
631 CGGTCTGGCTGTGCTTGGCATTATGATTCACTCTGGCGAGGAGAATGAAGGCTTCAAAGATATGGTGGATACAATTAGAAACGTGAAGAA
121 G L A V L G I M I Q S G E E N E G F K D M V D T I R N V K K
721 GAAGGGACAAACCTGCCAAGTCTTAAAGAGTTTAAATCCAGCTGTTTTACTTCCAGAAAACACTAATGACTACTGGACCTATCACGGCTC
151 K G Q T C Q V L K E F N P A V L L P E N T N D Y W T Y H G S
811 CCTGACCACACCTCCCTGTTATGAAAGTGCCAATGGATTGTTCTACGTCAACCAGTGCA ATATTCACCAAATCAGTTTCAAGCATTGCG
181 L T T P P C Y E S V Q W I V L R Q P V Q Y S P N Q F Q A L R
901 TAATATGTTTAGTGACGAAGCAGAAGGGATGTGTATCGTCGACAACACCACCCCTATGCCATCGGGGACAGAAA AATTCGTGCTTC
211 N M F S D E A E G M C I V D N Y R P P M P I G D R K I R A S
991 TTTCAAAGGCATCTCATGAAAGCAACCGTCGTATATTCATTGTATTTTCCAAGCCGGT CATTAGCTAAACGATCTCATTAGTCGATT
241 F K G I S *
1081 TTTGATTATTTACAAGAGTTTAAATCAATATCCCTGTAAACGATTATGACATTAATACATT GAAGATTATGTTAGTGAGTTAATCCAGAG
1171 CTTTTTGGAGTCAAC GTGCAACCGACCTTTCATGTCCCAAAATCACCGAAAGAGCAGATAGTAAATAGCCTGTGAAATCATTTAGCCCGG
1261 AAAGGAAAAAGAAATTAGCACTCAGTTACTAATATTCATTGAATCATATCATACATATG TAAACTAGACTCGTACCATTACTTTCTA
1351 TGCTAGAAAGTCTCTAACGGAAGAA AATATATATGTAGACTTTCATGAATTGATGGCGTAGAGCAAAATGACAGCAGGAGATAAAATAA
1441 ATTTTGTGTTGACTGTTTGTCTGATCCACTGACTTATCGTTAAAGAAAAACGCAGATACG TTTTGTAAAAACAGTAAGAAATGCTACA
1531 TGAATAAAAGAGAAGGAAAGCTTTTGTG ATTTTGTGGTACAATTTATGCACCATTTTATTTGTATTTACTTTGCTGTATCGTAACAA
1621 TTTTATTTTGATAATATAGACATGATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 4 青蛤 *CsCA* 基因全长 cDNA 序列及预测氨基酸序列
方框内表示起始密码子 ATG; 下划线区域表示开放阅读框(ORF)。

Fig. 4 The cDNA and deduced amino acid sequence of *CsCA* in *Cyclina sinensis*
The box indicates the starting codon (ATG). The underline area indicates the open reading frame (ORF).

表 3 青蛤及其他物种碳酸酐酶(CA)氨基酸序列信息

Tab. 3 The information of carbonic anhydrase (CA) amino acid sequence in *Cyclina sinensis* and other species

物种名称 species	GenBank 注册号 accession ID	物种名称 species	GenBank 注册号 accession ID
青蛤 <i>Cyclina sinensis</i>		小鼠 <i>Mus musculus</i>	CAA36233.1
斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus punctatus</i>	NP_001187560.1	紫贻贝 <i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDI34781.1
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	NP_571185.1	菲律宾帘蛤 <i>Ruditapes philippinarum</i>	QBL56985.1
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	NP_001117693.1	囊螂蛤 <i>Archivesica packardana</i>	QFP92278.1
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	NP_001133769.1	褶皱臂尾轮虫 <i>Brachionus plicatilis</i>	RNA21817.1
罗非鱼 <i>Oreochromis mossambicus</i>	AAQ89896.1		

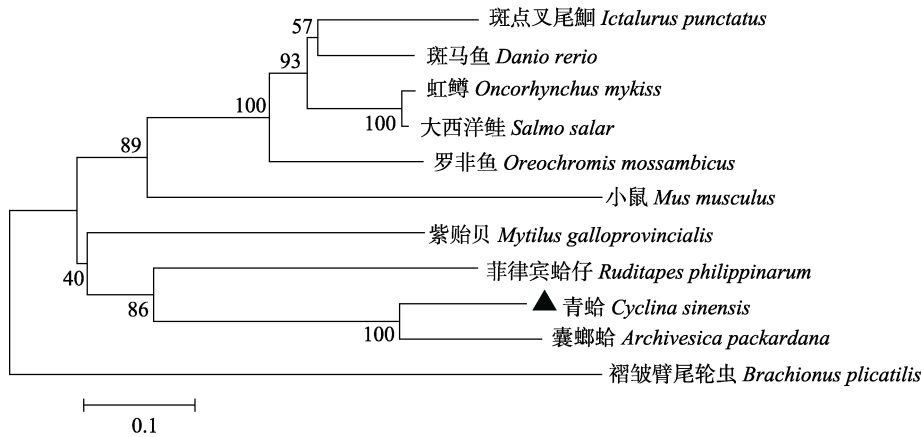


图 5 基于青蛤与其他物种碳酸酐酶(CA)氨基酸序列的系统进化树

Fig. 5 The phylogenetic tree derived from multiple alignments of carbonic anhydrase (CA) amino acid sequences from *Cyclina sinensis* and other species

尾鲷、斑马鱼、虹鳟、大西洋鲑和罗非鱼都属于硬骨鱼纲,其 *CA* 基因编码的氨基酸聚为一个进化分支;小鼠作为哺乳动物单独列为一个进化分支;菲律宾帘蛤、青蛤和囊螂蛤作为瓣鳃纲类聚为一个进化分支,其中青蛤和囊螂蛤成并列关系,表明亲缘关系较近;紫贻贝和瓣鳃纲类聚为一个进化分支;褶皱臂尾轮虫为轮虫门单独列为一个分支,与以上动物亲缘关系较远。

2.6 *CsCA* 基因时序性表达量分析

qRT-PCR 技术检测 *CsCA* mRNA 在青蛤鳃组织中的表达水平情况(图 6), *CsCA* mRNA 的时空表达量随时间的延长呈先上升后下降的趋势。低盐组前 12 d *CsCA* mRNA 表达量变化不显著($P>0.05$),第 24 天急速升高,表达量为各时间点最高,48 d 时显著下降($P<0.05$),至 96 d 稳定,但相比初始值高。仅 24 d 时的表达量与各时间点差异显著($P<0.05$),其余各时间点间无差异($P>0.05$)。对照组各时间点无差异($P>0.05$)。

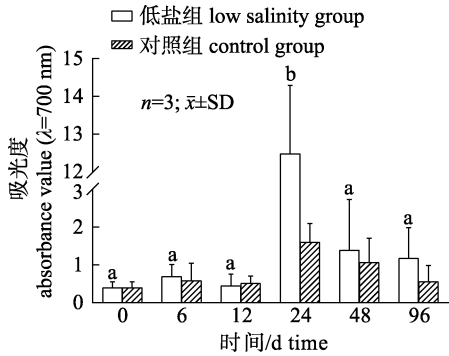


图 6 低盐条件下(盐度 8)青蛤 *CsCA* mRNA 的时序性表达

柱形图上方的不同字母表示低盐组各时间点间差异显著($P<0.05$).

Fig. 6 Sequential expression of *CsCA* mRNA in *Cyclina sinensis* under low salinity (8)

Different letters indicate significant differences between different time points in the low salinity group ($P<0.05$).

3 讨论

青蛤是一种具有重要经济价值的海洋贝类,

在我国滩涂贝类养殖中占有重要的经济地位^[14]。青蛤应对环境因子(如温度、盐度等)的变化时,机体会产生较多的 ROS,易造成体内脂质和蛋白质的氧化及 DNA 损伤,导致免疫能力下降^[15-16]。抗氧化酶具有清除体内过多 ROS、增强机体免疫功能及维持细胞内部稳态等作用,其活性变化在一定程度上反映了海洋生物在特定的环境条件下的生理状态^[17]。在生物体内 SOD 和 CAT 是两种相互关联的抗氧化酶, SOD 将超氧阴离子转化为 O₂ 和 H₂O₂, 然后 CAT 再将 H₂O₂ 转化成 H₂O^[18], 以消除氧自由基对机体的伤害。在本研究中低盐组青蛤在实验开始的 6 d 内, SOD 和 CAT 均有显著性的上升($P<0.05$)。但第 12 天时, SOD 还维持在一个较高的水平, CAT 已经显著下降($P<0.05$); 第 48~96 天, SOD 及 CAT 活性均下降, 且低于初始酶活性。推测是因为青蛤处于低盐条件时间较长, 酶活性受到抑制。林岗等^[19]测定了低盐(盐度 18)胁迫下华贵栉孔扇贝(*Mimachlamys nobilis*)鳃组织抗氧化酶(SOD、CAT)、髓过氧化物酶(MPO)活性的变化, 均呈现先上升后下降的趋势, 与本研究的结果一致。生物机体在氧化应激时, GSH-PX 以谷胱甘肽(GSH)为底物, 催化过氧化氢分解为水, 氢过氧化物降解为醇类物质^[20-21]。本研究中低盐组青蛤鳃组织 GPX 酶活先显著升高, 说明低盐胁迫下 GSH 的氧化反应增强, 抗氧化能力得到提升^[22]。而从研究的第 12 天起, GSH-PX 酶活性显著下降($P<0.05$), 第 48 天时达到最低值。聂芳红等^[23]研究发现低盐(盐度 8)胁迫会使斑马鱼肝脏 GSH-PX 活力减弱后增强而后趋于稳定的较低水平。MDA 含量是机体脂质过氧化作用的产物, 其含量也间接地反映了机体细胞受活性氧自由基攻击的程度。徐永健等^[24]研究发现盐度升高或降低都会使大海马(*Hippocampus kuda*)组织 MDA 含量显著增加。研究开始至第 12 天, 青蛤鳃组织中 MDA 含量急剧升高, 表明青蛤受盐度胁迫, 体内产生了大量有害物质。第 24 天 MDA 含量明显下降, 说明青蛤能够很好地清理并抑制有害物质在体内的堆积。以上实验结果表明, 青蛤受盐度胁迫时, 抗氧化酶会立刻做出响应, 加快酶的合成以抵御不利环境对机体的影响; 而随着时间的延

长, 机体逐渐适应, 酶合成逐渐受到抑制。

Na⁺/K⁺-ATPase 又称 Na⁺-K⁺泵(NKA 酶), 主要参与细胞内外 Na⁺、K⁺的主动跨膜运输, 镶嵌 ATP 和离子, 以保持细胞内环境中各种离子的相对稳定以及细胞内、外环境的渗透压平衡^[25-26]。施兆鸿等^[27]设置 4 个盐度梯度(盐度 27、21、15 和 9)对云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)进行胁迫后, 结果发现, 盐度 21 组和盐度 15 组的云纹石斑鱼 NAK 酶呈先上升后下降的趋势, 而盐度 9 组均一直呈下降趋势。王怡等^[28]研究了低盐(盐度 15)胁迫下紫石房蛤(*Saxidomus purpurata*)鳃组织 NKA 酶的变化, 发现在急性低盐胁迫下活力升高, 在胁迫 1 h 后活力显著高于自然海水对照组, 5 h 后则显著低于对照组。而本研究在低盐养殖 6 d 后才取样, 因此与研究初始值相比, NKA 酶活性下降, 并一直处于较低的水平。林听听等^[12]通过骤降盐度(盐度 23→16)探索青蛤鳃组织中 NKA 酶的变化, 结果表明青蛤鳃组织中 Na⁺/K⁺-ATPase 活性在前 16 d 仅缓慢上升, 第 17 天显著上升, 到第 18 天达到峰值, 随后即回落。本研究结果与林听听结果不相同, 可能因为青蛤鳃组织中 NKA 酶对不同低盐水平的反应能力不同。Ca²⁺/Mg²⁺-ATPase 主要驱动细胞内 Ca²⁺泵出, 保持细胞内低 Ca²⁺水平, 在维持机体渗透压平衡中发挥重要作用^[29]。本研究中 Ca²⁺/Mg²⁺-ATPase 在 24 d 内下降至活力最低值, 而在 48 d 时便升高至与初始酶活力较近的值, 表明 Ca²⁺/Mg²⁺-ATPase 参与青蛤低盐适应过程, 升高酶活性以使青蛤能够在低盐环境下更好地生存。目前对低盐胁迫下 NAK 酶及 Ca²⁺/Mg²⁺-ATPase 活性的研究较多集中在硬骨鱼类中。研究表明, 由于物种的差异, 其渗透压调节酶类的适应时间存在较大的差异, 短的只需要 6 h^[30], 而鲮鳃丝 NKA 酶则在研究第 20 天才恢复^[31]。在本研究中发现, 青蛤 ATP 酶对低盐环境的响应也需要一个较长的时间。

本研究获得了 CsCA 基因全长 cDNA 序列, 序列分析表明, CsCA 基因全长 1672 bp, ORF 区 738 bp, 编码 245 个氨基酸。进化树分析可知, CsCA 基因氨基酸序列与其他瓣鳃纲贝类亲缘关系最近, 与硬骨鱼类次之, 与节肢动物类关系较远, 说明

该基因在进化上相对保守。Henry 等^[32]研究表明, 通过 CO_2 水和为 H^+ 和 HCO_3^- , *CA* 基因能快速提供抗平衡离子参与 NaCl 的吸收调节, 为转运机制提供支持, 在离子转运过程中起基础作用。本研究中, 低盐组 *CsCA* mRNA 表达量在第 24 天急速升高, 推测 *CsCA* 基因在青蛤适应低盐环境时参与渗透压调节, 发挥调控作用。鳃是双壳贝类进行渗透压调节和离子转运的重要场所, 抗氧化酶活性变化推测, 在青蛤适应低盐过程中, 抗氧化系统最先做出反应, 在抗氧化系统抵御能力不足时, *CsCA* 基因通过调节离子转运起主导作用, $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 活力上升起辅助作用, 刺激机体产生大量转运调节蛋白参与调节鳃离子转运, 来适应低盐环境。本研究关于抗氧化酶、ATP 酶和 *CsCA* 基因之间是否存在协作关系, 其协作机制还尚未明确交代, 有待进一步研究。本研究初步探索了青蛤对低盐环境的响应机制, 对河口区等盐度较低区域的青蛤养殖具有实践指导意义, 为青蛤种质资源保护及耐低盐新品种的选育提供了理论基础。

4 结论

本研究结果表明, 低盐环境对青蛤生命活动造成了一定的影响, 但是机体抗氧化及渗透压调节功能能够对低盐做出响应, 且 *CsCA* 基因在此过程中发挥着重要的作用。另外, 青蛤应对低盐环境时, 抗氧化功能反应较渗透压调节功能更灵敏, 但随着时间的推移, 渗透压调节功能起主要作用。

参考文献:

- [1] Wang L P, Geng R Q, Liu Y, et al. Research and utilization of clam *Cyclina sinensis* germplasm resources in China[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2007, 35(4): 254-255. [王兰萍, 耿荣庆, 刘意, 等. 我国青蛤种质资源研究与利用现状[J]. 江苏农业科学, 2007, 35(4): 254-255.]
- [2] Lin T T, Zhou K, Liu X, et al. Effects of clam size, food type, sediment characteristic, and seawater carbonate chemistry on grazing capacity of Venus clam *Cyclina sinensis* (Gmelin, 1791)[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2017, 35(5): 1239-1247.
- [3] Yoon J M. Geographic variations and genetic distance of three geographic *Cyclina* clam (*Cyclina sinensis* Gmelin) populations from the Yellow Sea[J]. Development & Reproduction, 2012, 16(4): 315-320.
- [4] Wang R C, Wang Z P, Zhang J Z. Science of Marine Culture[M]. Qingdao: Qingdao Ocean University Press, 1993. [王如才, 王昭萍, 张建中. 海水贝类养殖学[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1993.]
- [5] Wu N, Chen M M, Wang S F. Research progress of shellfish immune mechanism[J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2017, 24(1): 68-71. [吴宁, 陈梦玫, 王素芳. 贝类免疫机制的研究进展[J]. 药物生物技术, 2017, 24(1): 68-71.]
- [6] Yin F, Sun P, Peng S M, et al. Effects of low salinity stress on the antioxidant enzyme activities in juvenile *Pampus argenteus* liver and the ATPase activities in its gill and kidney[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2011, 22(4): 1059-1066. [尹飞, 孙鹏, 彭士明, 等. 低盐度胁迫对银鲳幼鱼肝脏抗氧化酶、鳃和肾脏 ATP 酶活力的影响[J]. 应用生态学报, 2011, 22(4): 1059-1066.]
- [7] da Silva A Z, Zanette J, Fernando Ferreira J, et al. Effects of salinity on biomarker responses in *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca, Bivalvia) exposed to diesel oil[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2005, 62(3): 376-382.
- [8] Yang W K, Hseu J R, Tang C H, et al. Na^+/K^+ -ATPase expression in gills of the euryhaline sailfin molly, *Poecilia latipinna*, is altered in response to salinity challenge[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2009, 375(1-2): 41-50.
- [9] Lin C H, Tsai R S, Lee T H. Expression and distribution of Na, K-ATPase in gill and kidney of the spotted green pufferfish, *Tetraodon nigroviridis*, in response to salinity challenge[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2004, 138(3): 287-295.
- [10] Zhang P, Li X J. Biological research progress of carbonic anhydrase[J]. Progress in Physiological Sciences, 1997(4): 359-361. [张蓬, 李学军. 碳酸酐酶的生物学研究进展[J]. 生理科学进展, 1997(4): 359-361.]
- [11] Li Z N, Lin T T, Yao Z L, et al. Effects of water salinity on the antioxidant enzyme activities and growth of clam *Cyclina sinensis*[J]. Chinese Journal of Ecology, 2012, 31(10): 2625-2630. [李子牛, 林听听, 么宗利, 等. 盐度对青蛤抗氧化酶活性及生长的影响[J]. 生态学杂志, 2012, 31(10): 2625-2630.]
- [12] Lin T T, Lai Q F, Lu J X, et al. Effects of abrupt variations in salinity on the Na^+/K^+ -ATPase activity in gills of *Cyclina sinensis*[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2012, 32(1): 54-58. [林听听, 来琦芳, 陆建学, 等. 盐度突变对青蛤(*Cyclina sinensis*) Na^+/K^+ -ATPase 活性的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2012, 32(1): 54-58.]
- [13] Sun C S, Wang W J. Effects of low salt stress on survival and antioxidant enzyme activities of *Cyclina sinensis*[C]//

- Abstracts of the 13th Congress and Symposium of Zhejiang Zoological Society. Hangzhou: Zhejiang Association for Science and Technology, 2018: 28. [孙长森, 王文基. 低盐胁迫对青蛤存活和抗氧化酶活性的影响[C]//浙江省动物学会第十三次会员代表大会暨学术研讨会论文摘要集. 杭州: 浙江省科学技术协会, 2018: 28.]
- [14] Li X Y, Dong Z G, Yan B L, et al. Analysis and evaluation of nutritional components in *Cyclina sinensis* and *Meretrix meretrix*[J]. Food Science, 2010, 31(23): 366-370. [李晓英, 董志国, 阎斌伦, 等. 青蛤与文蛤的营养成分分析与评价[J]. 食品科学, 2010, 31(23): 366-370.]
- [15] Yang J, Chen G, Huang J S, et al. Effects of temperature and salinity on the growth and activities of antioxidant enzymes of cobia (*Rachycentron canadum*) juveniles[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2007, 27(4): 25-29. [杨健, 陈刚, 黄建盛, 等. 温度和盐度对军曹鱼幼鱼生长与抗氧化酶活性的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2007, 27(4): 25-29.]
- [16] Zhao F, Zhuang P, Zhang L Z, et al. Responses of antioxidants in different tissues of *Acipenser schrenckii* to increased salinity in water[J]. Marine Fisheries Research, 2008, 29(5): 65-69. [赵峰, 庄平, 章龙珍, 等. 施氏鲟不同组织抗氧化酶对水体盐度升高的响应[J]. 海洋水产研究, 2008, 29(5): 65-69.]
- [17] Yang L. Effects of salinity on survival, growth, osmoregulation, and several related physiological parameters of the lined seahorse, *Hippocampus erectus*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015. [杨琳. 低盐胁迫对灰海马存活、生长、渗透压及相关生理指标的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.]
- [18] Wang H Z, Wang H, Li R W, et al. Combined effect of temperature and salinity on two kinds intestinal antioxidant enzymes of GIFT tilapia juveniles (*Oreochromis niloticus*)[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2012, 32(1): 47-53. [王海贞, 王辉, 李瑞伟, 等. 温度和盐度对吉富罗非鱼幼鱼肠道两种抗氧化酶活力的联合效应[J]. 广东海洋大学学报, 2012, 32(1): 47-53.]
- [19] Lin G, Rao X Z, Wu J, et al. Effects of low-salinity stress on antioxidant enzymes and Na^+/K^+ -ATPase activities of *Mimachlamys nobilis*[J]. Journal of Fujian Normal University (Natural Science Edition), 2018, 34(1): 71-78. [林岗, 饶小珍, 吴静, 等. 低盐胁迫对华贵栉孔扇贝抗氧化酶、 Na^+/K^+ -ATPase 活力的影响[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 2018, 34(1): 71-78.]
- [20] Arnaiz S L, Llesuy S, Cutrín J C, et al. Oxidative stress by acute acetaminophen administration in mouse liver[J]. Free Radical Biology and Medicine, 1995, 19(3): 303-310.
- [21] Wang L, Wang D X, Wang Q, et al. Effect of cadmium on ultrastructure of hepatopancreas cells of freshwater crab (*Sinopotamon yangtsekiense*)[J]. Acta Anatomica Sinica, 2003, 34(5): 522-526. [王兰, 王定星, 王茜, 等. 镉对长江华溪蟹肝胰腺细胞超微结构的影响[J]. 解剖学报, 2003, 34(5): 522-526.]
- [22] Zhang C J, Zhang Y L, Gao Q X, et al. Effect of low salinity stress on antioxidant function in liver of juvenile *Nibea albiglora*[J]. South China Fisheries Science, 2015, 11(4): 59-64. [张晨捷, 张艳亮, 高权新, 等. 低盐胁迫对黄姑鱼幼鱼肝脏抗氧化功能的影响[J]. 南方水产科学, 2015, 11(4): 59-64.]
- [23] Nie F H, Kong Q B, Liu L P, et al. Effects of two DLCs on hepatic MDA, SOD and GST in Zebrafish[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2009, 28(2): 210-213. [聂芳红, 孔庆波, 刘连平, 等. 两种二噁英类化合物对斑马鱼肝脏MDA、SOD和GST的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(2): 210-213.]
- [24] Xu Y J, Sun B. Effect of salinity stress on the growth, body composition and enzyme activities of juvenile *Hippocampus kuda*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 43(6): 1279-1285. [徐永健, 孙彬. 盐度胁迫对大海马(*Hippocampus kuda*)幼体生长、组分及酶活力的影响[J]. 海洋与湖沼, 2012, 43(6): 1279-1285.]
- [25] Evans D H, Piermarini P M, Choe K P. The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste[J]. Physiological Reviews, 2005, 85(1): 97-177.
- [26] Towle D W. Role of Na^+/K^+ -ATPase in ionic regulation by marine and estuarine animals[J]. Marine Biology Letters, 1981, 2(1): 107-122.
- [27] Shi Z H, Liao Y L, Wang X S, et al. Impact of the abrupt salinity decrease on ion-regulation enzyme activity in the gill and serum osmolality from *Epinephelus moara*[J]. Journal of Safety and Environment, 2017, 17(3): 1210-1214. [施兆鸿, 廖雅丽, 王孝杉, 等. 盐度胁迫对云纹石斑鱼鳃离子调节酶及渗透压的影响[J]. 安全与环境学报, 2017, 17(3): 1210-1214.]
- [28] Wang Y, Hu W B, Li J X, et al. Effects of acute salinity stress on gill structure and four enzyme activities in *Saxidomus purpurata*[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2016, 18(5): 178-186. [王怡, 胡婉彬, 李家祥, 等. 急性盐度胁迫对紫石房蛤(*Saxidomus purpurata*)鳃组织结构及4种酶活性的影响[J]. 中国农业科技导报, 2016, 18(5): 178-186.]
- [29] Zhu Y F, Xiao Y Z, Li W H, et al. Effects of low salinity stress on survival rate, gill ATPase and liver antioxidant enzymes in the young yellowfin porgy *Acanthopagrus latus*[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2013, 52(3): 414-420. [朱友芳, 肖懿哲, 李文辉, 等. 低盐胁迫对黄鳍棘鲷幼鱼存活率、鳃ATP酶和肝脏抗氧化酶的影响[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2013, 52(3): 414-420.]
- [30] Park M S, Shin H S, Choi C Y, et al. Effect of hypoosmotic and thermal stress on gene expression and the activity of an-

- tioxidant enzymes in the cinnamon clownfish, *Amphiprion melanopus*[J]. *Animal Cells and Systems*, 2011, 15(3): 219-225.
- [31] Wu Q Y, Jiang M, Li L, et al. Effects of chronic stress of lower salinity on activity of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ and content of MDA in branchial filament, muscle, intestine of juvenile mullet (*Mugil cephalus*)[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2014, 30(4): 481-487. [吴庆元, 蒋玫, 李磊, 等. 低盐度胁迫对鲻鱼(*Mugil cephalus*)幼鱼鳃丝、肌肉、肠 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 酶活性和 MDA 含量的影响[J]. *生态与农村环境学报*, 2014, 30(4): 481-487.]
- [32] Henry R P, Campoverde M. Neuroendocrine regulation of carbonic anhydrase expression in the gills of the euryhaline green crab, *Carcinus maenas*[J]. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 2006, 305A(8): 663-668.

Effects of salinity stress on antioxidant, ATPase, and carbonic anhydrase gene expression in *Cyclina sinensis*

GE Hongxing^{1,2}, LI Wenqian¹, LIU Jialing¹, REN Guoliang¹, WU Yuchen¹, XIE Lingli¹, WEN Lujie¹, DONG Zhiguo¹

1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China;

2. Jiangsu Institute of Marine Resources Development, Lianyungang 222005, China

Abstract: Salinity fluctuation often causes physiological stress responses in aquatic animals, which may result in stunted growth and sometimes death. The clam *Cyclina sinensis* is one of the most commercially important bivalves in China, and it is necessary to study its adaptation mechanism to low salinity. In this study, the changes in superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase activities, malondialdehyde content, $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{-ATPase}$, $\text{Ca}^{2+}\text{/Mg}^{2+}\text{-ATPase}$, and carbonic anhydrase enzyme mRNA temporal expression levels were studied under low (8) and normal (25) salinity conditions for 96 d. The results showed that: (1) compared to the normal salinity group, the SOD, CAT, and GSH-PX activities in the gills first increased and then decreased under low salinity ($P<0.05$). The $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{-ATPase}$ activity showed a downward trend over 96 d and reached the minimum at 48 d, which was significantly different from the initial enzyme activity ($P<0.05$). The $\text{Ca}^{2+}\text{/Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ activity did not change significantly in the first 48 d ($P>0.05$), but increased significantly at 48 d ($P<0.05$), and maintained a higher level afterward. The MDA content increased first and then decreased, increased significantly at 12 and 48 d ($P<0.05$), and decreased significantly at 24 d ($P<0.05$), and was significantly higher than the initial MDA content ($P<0.05$) at 96 d. (2) The full-length cDNA sequence of the carbonic anhydrase gene from *C. sinensis* was cloned via rapid amplification of cDNA ends-polymerase chain reaction. The full-length cDNA of CA was 1672 bp, consisting of an open reading frame of 738 bp and encoding 245 amino acids. The phylogenetic tree results showed that the carbonic anhydrase gene had high homology with other lamellibranchids, indicating that evolution was conservative. The qRT-PCR results showed that the mRNA expression of the carbonic anhydrase gene under low salinity increased significantly at 24 d. This study indicates that antioxidant enzymes, including SOD, CAT, and GSH-PX, were first activated and reacted in the gill tissue of *C. sinensis* during adaptation to low salinity environments. With time, the activities of antioxidant enzymes were inhibited after reaching the tolerance limit of the organism; then, the $\text{Ca}^{2+}\text{/Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ activities increased, with the carbonic anhydrase gene playing a regulatory role. The antioxidant enzymes, ATPase, and carbonic anhydrase play important combinatory roles in the long-term adaptation of *C. sinensis* to low salinity conditions. The results of this study could benefit the healthy and sustainable development of the clam breeding industry.

Key words: *Cyclina sinensis*; salinity; antioxidant enzyme; ATPase; malondialdehyde; carbonic anhydrase

Corresponding author: DONG Zhiguo. E-mail: dzg7712@163.com