

文章编号: 1674-5566(2024)01-0077-09

DOI: 10.12024/jsou.20230204098

脯氨酸对缢蛏高盐耐受性的影响

邓敏¹, 刘瑞琦¹, 杨栋¹, 袁立¹, 沈和定^{1,2}, 牛东红^{1,2}

(1. 上海海洋大学水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心, 上海 201306; 2. 上海海洋大学水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

摘要: 脯氨酸是生物体内重要的有机调节物质, 对海洋贝类适应盐度变化具有重要影响。为了研究脯氨酸对缢蛏(*Sinonovacula constricta*)高盐耐受性的影响, 本研究对缢蛏进行高盐(32)胁迫, 并在高盐条件下添加外源氨基酸, 对比不同条件处理下缢蛏脯氨酸含量、可溶性蛋白含量以及脯氨酸转运基因表达水平。高盐胁迫下, 3种游离氨基酸显著上升, 其中, 脯氨酸含量积累最多, 并始终处于高水平合成状态; 可溶性蛋白含量显著降低、排氨率升高; 脯氨酸转运基因 *SLC6A7-1* 和 *SLC6A7-2* 表达显著上升。当添加外源脯氨酸后, 脯氨酸含量积累更多, 在 72 h 时达到了峰值; 可溶性蛋白含量开始显著增加, 排氨水平显著下降; 脯氨酸转运基因 *SLC6A7-1* 表达先上升后下降, 而 *SLC6A7-2* 一直处于高表达状态, 在 24 h 时表达量达到峰值。结果表明, 脯氨酸可以促进缢蛏体内大分子蛋白合成, 为缢蛏高盐适应性生存提供更多能量。本研究为深入探究脯氨酸调控海洋贝类高盐适应性提供了重要理论依据。

关键词: 缢蛏; 高盐; 脯氨酸; 耐受性

中图分类号: S 967.5 **文献标志码:** A

盐度是影响海洋生物生长、能量代谢和渗透调节最主要的环境因素之一^[1]。极端事件(如潮汐、降雨、高温和干旱)会急剧增加沿海地区和河口海水盐度波动的频率, 导致盐度变化, 其变化同时也会使贝类受到不同程度的损害^[2]。当环境盐度升高超出贝类所能承受的范围时, 它们就需要通过生理调节增强自身耐盐能力去适应高盐环境^[3]。缢蛏(*Sinonovacula constricta*)作为我国重要的经济贝类之一, 大多分布或养殖在潮间带、滩涂或河口, 极易受盐度变化影响^[4]。

在大多数生物体中, 高盐会引起生物体内游离氨基酸积累, 从而帮助生物体提高耐盐能力^[5]。研究^[6]发现, 在高渗环境中, 长牡蛎(*Magallana gigas*)体内甘氨酸、丙氨酸、 β -丙氨酸、脯氨酸、精氨酸和牛磺酸会大量积累。将亚洲蛤蜊(*Corbicula manilensis*)暴露于盐度为 5 的海水中 70 h 后, 体内游离氨基酸含量会从 20 mmol/g 增加到 115 mmol/g^[7]。由此可见, 游离氨基酸的积累

可以帮助海洋生物适应环境盐度变化, 在逆境中更好地进行适应性生存。

脯氨酸作为游离氨基酸之一, 广泛存在于生物体内。盐度的升高会引起脯氨酸在体内迅速积累, 并通过不同方式帮助它们进行高盐适应性生存^[8]。同时, 研究发现脯氨酸的疏水端能够与蛋白质结合成疏水骨架进而可以维护生物膜结构控制离子进出, 通过保护细胞完整性让生物体进行更好地生存^[9]。且脯氨酸在生物体内最后也会以氨氮的形式排出体外^[10]。脯氨酸作为重要的渗透调节剂之一, 在盐度变化过程中可以通过自身合成积累与代谢帮助生物体维持渗透平衡。因此, 研究脯氨酸对海洋生物在盐度极易变化的环境中的影响具有重要的意义。

溶质载体超家族成员 6(Solute carrier family 6, SLC6A)中许多是钠离子和氯离子依赖转运蛋白, 同时也是神经递质转运蛋白, 并且还包括了大量的氨基酸转运蛋白, 如甘氨酸转运蛋白

收稿日期: 2023-02-26 修回日期: 2023-04-26

基金项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”专项(2019YFD0900700); 福建省科技计划项目(2021N3001)

作者简介: 邓敏(1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为贝类种质资源与遗传育种。E-mail: 1025226291@qq.com

通信作者: 牛东红, E-mail: dhniu@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

GlyT1 (SLC6A9) 和 GlyT2 (SLC6A5), 钠依赖性中性氨基酸转运蛋白 B0AT1 (SLC6A19)、B0AT2 (SLC6A15) 和 B0AT3 (XT2/SLC6A18)。SLC6A7 脯氨酸转运蛋白是 SLC6A 家族中的其中一位, 经过大量研究, SLC6A7 脯氨酸转运蛋白是用于脯氨酸转运并定位在细胞质膜上的跨膜蛋白, 在高盐下对脯氨酸的运输能力会显著增强^[12]。研究^[13]发现, SLC6A7-2 脯氨酸转运蛋白是可以通过运输脯氨酸来降低因高盐对野生水稻造成的氧化伤害, 缓解高渗对水稻造成的损伤。脯氨酸转运蛋白 SLC6A7 作为特异性脯氨酸转运载体, 通过对脯氨酸的转运对脯氨酸缺陷处进行补偿, 对脯氨酸在生物体内的合成积累具有重要作用。本实验探究了脯氨酸对高盐环境下缢蛏的影响, 为进一步研究脯氨酸提高贝类高盐耐受性的作用机制提供了参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用缢蛏取自浙江台州三门县贝类育苗基地。采集后的缢蛏在室内暂养于水箱(长×宽×高=40 cm×40 cm×56 cm) 7 d, 采用过滤后自来水加入海水晶配置 70 L 盐度为 20 的海水, 采用精密数字盐度仪(MASTER- α , ATAGO, 日本)测定盐度。

1.2 实验设计和样本采集

实验在长方形塑料盆(长 37.5 cm, 宽 25 cm, 高 20 cm)中进行, 实验设置对照组、高盐组, 其中盐度 20 为对照组, 盐度 32 为实验组, 采用过滤后自来水加海水晶配置 6 L 养殖水体, 并不断用盐度计检测盐度, 直至达到实验要求盐度。为了研究氨基酸对缢蛏高盐适应性的影响, 设计了外源氨基酸补充实验, 即在高盐条件下添加 3 种不同外源氨基酸, 分别是脯氨酸、牛磺酸和丙氨酸, 根据文献^[14]确定氨基酸添加浓度统一为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 按照每毫升水添加 5 μg 氨基酸固体粉剂(上海麦克林生化科技股份有限公司)配置养殖水体, 试验期间将缢蛏养殖于该水体中。

每组实验随机选取 40 只蛏子放入水箱(60 cm×40 cm×20 cm)中, 控制水箱内水体积都为 6 L。分别在实验开始后 0、3、6、12、24、48、72 h 取缢蛏鳃组织进行游离氨基酸含量检测, 对照组、实验组和外源氨基酸添加组各设 3 个实验重复。

设置对照组、高盐组和外源脯氨酸添加组, 水体盐度和浓度条件不变进行实验。分别在实验开始后 0、3、6、12、24、48、72 和 96 h 取缢蛏鳃组织用于后续氨基酸含量检测及 RNA 提取等。所有样本取后立刻放入液氮中, 速冻后用镊子放入样本盒, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3 氨基酸含量检测

鳃组织样品按组织总重量(g):PBS 体积(mL)为 1:9 在试管中加入 PBS。采用全自动均质机(FastPrepR-24, 上海博谊生物科技有限公司)均质。最后, 将匀浆液以 2 500 r/min 离心 20 min, 收集上清液进行检测。采用相应的 ELISA 试剂盒(上海酶联生物科技有限公司), 采用双抗体一步夹心法检测各组样本中脯氨酸、牛磺酸和丙氨酸的含量。用酶标仪在 450 nm 处测定样品的吸光度(OD 值), 用标准曲线进行线性回归计算样品的酶活性。

1.4 排氨率和蛋白质含量的检测

实验采用 250 mL 碘量瓶作为呼吸瓶, 每瓶放 3 只缢蛏, 在碘量瓶中装满盐度 20、32 和外源脯氨酸添加的海水后用塑料薄膜封口。每个梯度设 3 个平行和 1 个空白对照(不放缢蛏)。利用密闭静水法, 知道碘量瓶中始末溶氧变化和氨氮浓度的变化后根据数据计算出排氨率, 实验时间持续 1 h, 实验结束后立即用虹吸法吸取水样。采用碘量法(Winkler, GB 7489-1987)测定水中溶解氧的含量, 纳氏试剂分光光度法测定水中氨气的含量。

将鳃组织样品按组织总重量(g):0.9% 生理盐水(mL)为 1:9 的比例在试管中加入生理盐水。采用全自动均质机均质。最后, 将匀浆液以 8 000 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 收集上清液进行检测。利用总蛋白(TP)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)对样本可溶性蛋白进行检测, 用酶标仪在 620 nm 处测定样品的吸光度(OD 值, 即 y), 将吸光度代入公式 $y=7.1265x-0.0007$ (x 代表样本蛋白浓度, y 代表样本在 620 nm 处所测的 OD 值, $R^2=0.9997$) 中计算出蛋白浓度。

1.5 基因序列的获取

通过缢蛏转录组库^[15]获得 SLC6A7-1 和 SLC6A7-2 脯氨酸转运基因序列, 利用 Primer Premier 5.0 引物设计软件设计 SLC6A7-1 脯氨酸转运基因和 SLC6A7-2 脯氨酸转运基因的正向引物与反向引物(表 1)用于后续实验。

1.6 总 RNA 提取和 cDNA 合成

按 TRIzol 法用 TRIzol 试剂 (Thermo Fisher Scientific, USA) 提取总 RNA。对于 RNA 的降解和污染情况使用 1% 琼脂糖凝胶检查, 然后利用 Nano Drop 2000 分光光度计 (Thermo Fisher Scientific, USA) 对所提 RNA 浓度进行检测。根据制造商说明书 (TaKaRa, 日本), 使用 PrimeScript™ RT reagent kit with gDNA Eraser 试剂盒, 保证 20 μL 体系中 RNA 质量有 500 ng, 进行 cDNA 合成: gDNA Eraser 加 1 μL, 5×gDNA Eraser Buffer 加 2 μL, 总 RNA 与 ddH₂O 共 7 μL, 42 °C 2 min, 然后加入 primer Script RT Enzyme Mix I 1 μL, RT Primer Mix 1 μL, 5×primer Script Buffer 2.4 μL, dd H₂O 4 μL 于 37 °C 15 min, 85 °C 5 s。合格的 cDNA 产物需要立即放置于 -20 °C 冰箱保存用于后续实验。

1.7 荧光定量分析

实时荧光定量 PCR 检测以 18S rRNA 为内参基因。qRT-PCR 反应体系含 500 ng cDNA、6.8 μL 无核酸酶水、10 μL 2× SYBR Premix Ex Taq™ (TaKaRa, 日本) 和每个基因特异性引物 0.8 μL (10 mmol/L)。qRT-PCR 循环方案为: 95 °C, 30 s; 35 个循环, 95 °C 持续 5 秒, 55 °C 持续 30 秒; 在 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s 下分析解离曲线, 验证单个产物的扩增。最终利用 2^{-ΔΔC_t} 法将实时荧光定量 PCR 最终得到的数值代入计算样本基因和内参在样本中的表达结果。

1.8 数据分析

所有数据都以平均值±标准差(SD)表示, 采用 SPSS 软件 (IBM SPSS STATISTICS 23.0, USA) 进行 T 检验和 Duncan 氏多重比较, 以确定不同处理组之间都有显著差异, 以 $P < 0.05$ 为差异显著。使用 Origin 2018 (OriginLab, USA) 进行作图。

表 1 实验所用的引物及序列
Tab. 1 Primers and sequences used in the experiment

引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	用途 Usage
SLC6A7-1 antiporter-F	CCAAAGTTGTCGTTGTAGCG	qRT-PCR
SLC6A7-1 antiporter-R	GGCCATCGTCCAGATCATAAC	qRT-PCR
SLC6A7-2 antiporter-F	CAAAAAAGTTCATCCGTCGG	qRT-PCR
SLC6A7-2 antiporter-R	GTATGATCTGGACGATGGCC	qRT-PCR
18S-F	TCGGTTCTATTGCGTTGTTTT	内参
18S-R	CAGTTGGCATCGTTTATGGTCA	内参

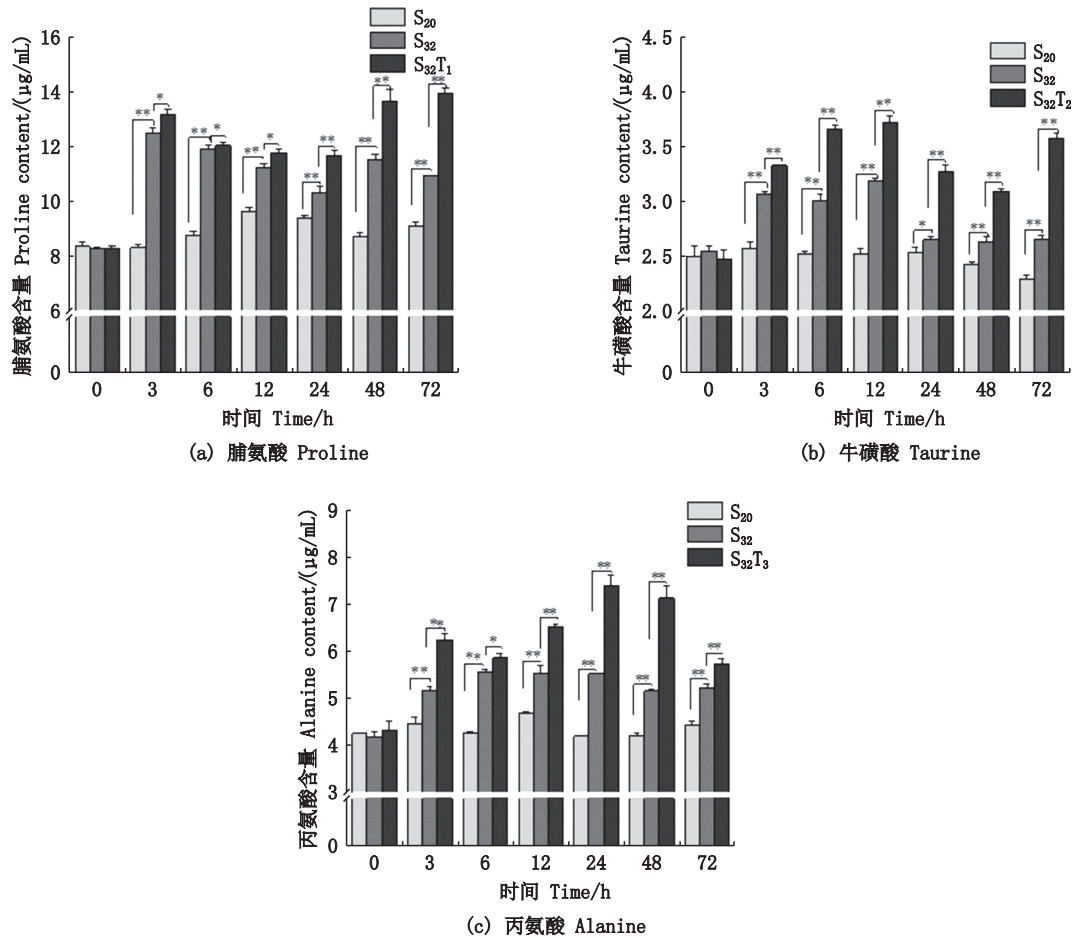
2 结果与分析

2.1 高盐胁迫对氨基酸积累的影响

在高盐胁迫下, 缙蛭体内脯氨酸、牛磺酸和丙氨酸含量显著上升。3 种氨基酸含量在胁迫 3 h 时就开始显著上升。胁迫期间脯氨酸在 3 h 积累量达到峰值, 牛磺酸于 12 h 达到峰值, 丙氨酸于 6 h 达到峰值。外源氨基酸添加后, 3 种氨基酸含量甚至比高盐条件下积累更多, 且都维持在正常水平之上。脯氨酸随时间积累越来越多, 牛磺酸在 12 h 达到峰值, 丙氨酸则在 24 h 达到峰值。最后, 不同处理组 and 不同氨基酸变化对比下发现脯氨酸积累量是最多也是增加最快的 ($P < 0.05$), 见图 1。

2.2 外源脯氨酸对蛋白合成和排氨的影响

通过结果分析发现高盐条件下, 缙蛭体内蛋白质含量始终低于对照组外源脯氨酸添加组, 仅在 72 h 时高于外源脯氨酸添加组。在 3 h 蛋白含量骤降, 然后上升, 72 h 后最终呈下降趋势。而在外源脯氨酸添加条件下, 缙蛭体内蛋白含量始终高于高盐组, 在 12 和 48 h 时积累量显著上升, 甚至高于对照组, 96 h 蛋白含量与对照组无明显差异。分析对照组、高盐组和外源脯氨酸添加后缙蛭排氨结果, 发现高盐胁迫下, 缙蛭体内排氨率呈现先上升后下降的趋势。添加外源脯氨酸后, 排氨率显著降低, 3 h 后也呈现了先上升后下降的趋势, 高盐和外源脯氨酸添加条件下都于 72 h 达到峰值。各组在不同时间点都有显著差异 ($P < 0.05$), 见图 2。

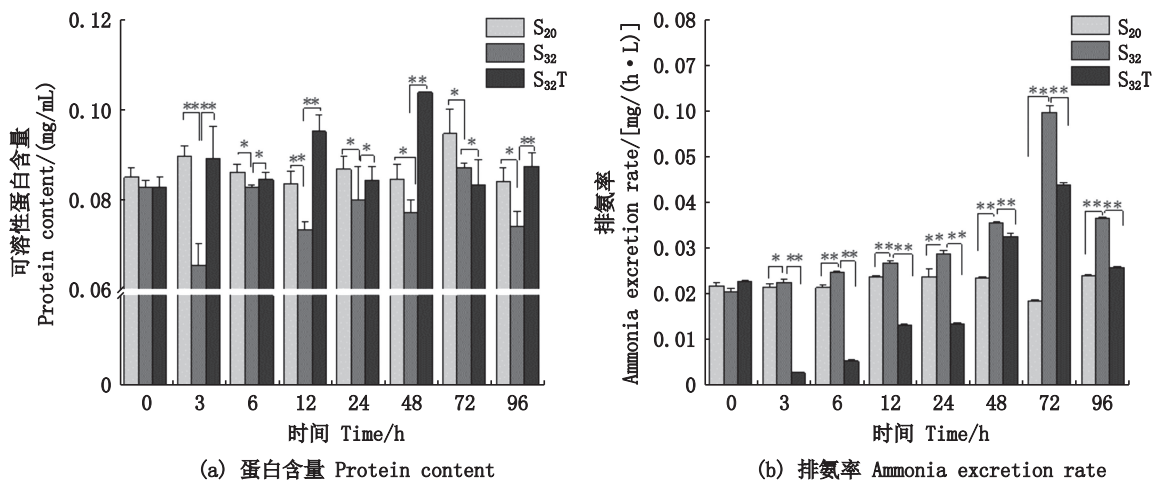


S₂₀ 对照组; S₃₂ 高盐组; S₃₂T₁ 添加脯氨酸; S₃₂T₂ 添加牛磺酸; S₃₂T₃ 添加丙氨酸; “*”表示两组结果存在显著性差异, “**”表示两组结果存在极显著性差异(*P < 0.05, **P < 0.01)。

S₂₀ Control group; S₃₂ High salt group; S₃₂T₁ Proline added; S₃₂T₂ Taurine was added; S₃₂T₃ Alanine was added; “*” indicates a significant difference between the two groups(*P < 0.05, **P < 0.01)。

图1 添加外源氨基酸后缢蛏体内游离氨基酸含量(n=3)

Fig. 1 Content of free amino acids in *S. constricta* after adding exogenous amino acids(n=3)



S₂₀ 对照组; S₃₂ 高盐组; S₃₂T 添加脯氨酸; “*”表示两组结果存在显著性差异, “**”表示两组结果存在极显著性差异(*P < 0.05, **P < 0.01)。

S₂₀ Control group; S₃₂ High salt group; S₃₂T Proline added; “*” indicates a significant difference between the two groups(*P < 0.05, **P < 0.01)。

图2 不同处理组下缢蛏体内可溶性蛋白含量和排氨率(n=3)

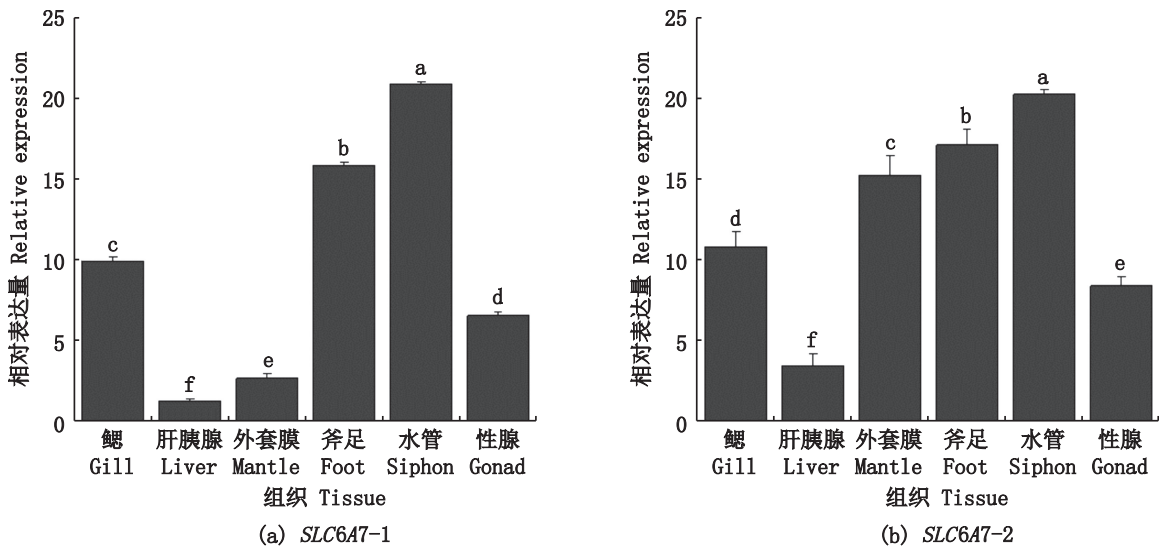
Fig. 2 Soluble protein content and ammonia excretion rate in *S. constricta* in different treatment groups(n=3)

2.3 外源脯氨酸对脯氨酸转运基因 *SLC6A7-1* 和 *SLC6A7-2* 基因表达的影响

对缢蛏 *SLC6A7-1* 脯氨酸转运基因在 6 个组织中的表达进行检测(图 3a),结果发现 *SLC6A7-1* 脯氨酸转运基因在 6 个组织中都有表达。通过比较发现该基因在水管中的表达最高,其次是斧足、鳃、性腺和外套膜,肝胰腺中表达量最低($P < 0.05$)。然后对 *SLC6A7-2* 脯氨酸转运基因也进行与上述同样的操作(图 3b),发现 *SLC6A7-2* 脯氨酸转运基因在肌肉组织水管、斧足和外套膜中的

表达量都比较高,然后是鳃、性腺,肝胰腺中表达量最低($P < 0.05$)。

通过 *SLC6A7-1* 脯氨酸转运基因在对照组、高盐组和外源脯氨酸添加组中的表达结果分析发现该基因在高盐组和外源脯氨酸添加组都有显著表达(图 4a)。在 3、6、12、96 h 时 *SLC6A7-1* 脯氨酸转运基因在外源脯氨酸添加组中的表达要高于高盐组,而在 24、48、72 h 时 *SLC6A7-1* 脯氨酸转运基因在高盐组中的表达超过了外源脯氨酸组。各组在不同时间点都有显著差异($P < 0.05$)。

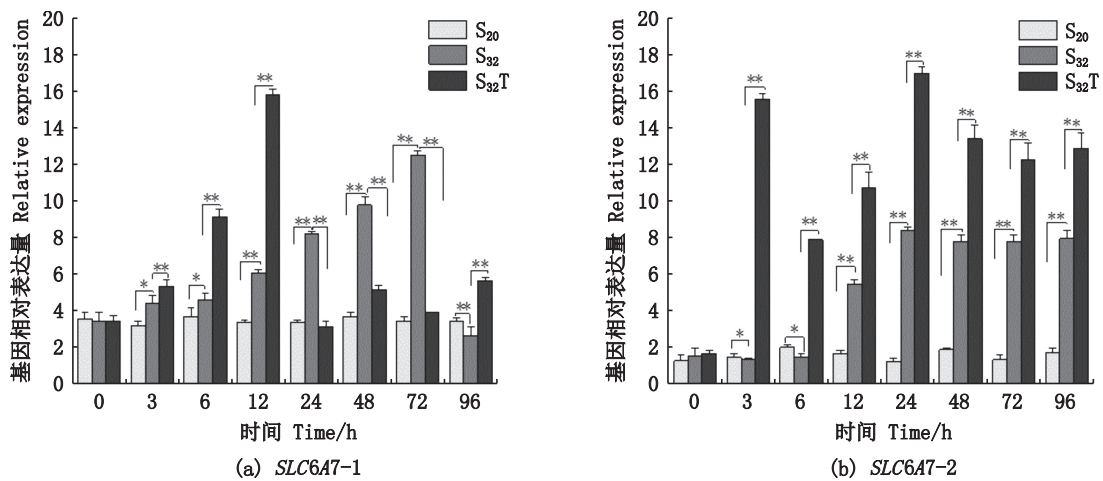


不同字母表示不同处理组在同一时间点下有显著差异 ($P < 0.05$)。

Different letters indicate significant differences between different treatment groups at the same time point ($P < 0.05$).

图 3 *SLC6A7-1* 和 *SLC6A7-2* 在缢蛏组织中的表达 ($n=3$)

Fig. 3 Expression of *SLC6A7-1* and *SLC6A7-2* in different tissues of *S. constricta* ($n=3$)



S₂₀: 对照组; S₃₂: 高盐组; S_{32T}: 添加脯氨酸; “*”表示两组结果存在显著性差异, “**”表示两组结果存在极显著性差异 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。

S₂₀: Control group; S₃₂: High salt group; S_{32T}: Proline added; “*” indicates a significant difference between the two groups (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

图 4 *SLC6A7-1* 和 *SLC6A7-2* 在不同处理组下各时间点的表达 ($n=3$)

Fig. 4 Expression of *SLC6A7-1* and *SLC6A7-2* at different time points in different treatment groups ($n=3$)

然后对 *SLC6A7-2* 脯氨酸转运基因在对照组、高盐组和外源脯氨酸添加组中的表达结果也进行分析(图 4b)。发现胁迫前期, *SLC6A7-2* 脯氨酸转运基因在高盐组中的表达比对照组低, 从 12 h 开始后, 它在高盐胁迫下表达开始显著上升。在外源脯氨酸添加组中 *SLC6A7-2* 脯氨酸转运基因表达显著升高, 尤其是在 3 h 时表达量大约是对照组和高盐组的 8 倍, 并在 24 h 时达到了峰值。各组在不同时间点都有显著差异 ($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 高盐胁迫对氨基酸积累的影响

对于大多数海洋生物来说, 为了应对盐度环境的变化, 它们都会将游离氨基酸积累于体内^[16]。研究^[17-18]发现当盐度升高时, 淡水蛤蜊 (*Lampsilis teres*) 鳃中游离氨基酸随盐度的升高而增加。脯氨酸、牛磺酸和丙氨酸作为研究较多较广的游离氨基酸, 被视作是重要的有机渗透调节剂, 可以通过渗透调节去提高生物体在高盐中的耐受性。脯氨酸和丙氨酸是短角双眼钩虾 (*Ampelisca brevicornis*) 细胞内 FAA 库的主要贡献者, 在高盐胁迫下, 其含量显著增加以维持细胞内外渗透压平衡, 从而提高了短角双眼钩虾 (*Hirondellea gigas*) 对高盐的耐受^[19]。在本研究中, 高盐胁迫致使缢蛭体内脯氨酸、牛磺酸和丙氨酸含量显著上升, 外源氨基酸的添加使缢蛭体内积累了更多的游离氨基酸, 从而去应对外界盐度的升高, 提高缢蛭对高盐的耐受能力。而在这 3 种氨基酸对比下脯氨酸既是缢蛭体内拥有量最多的也是胁迫下积累量最多的, 说明脯氨酸在缢蛭对高盐耐受方面具有重要的影响作用。

3.2 外源脯氨酸对蛋白合成和排氨的影响

缢蛭进入高盐环境后, 脯氨酸会被脯氨酸转运蛋白大量转运至细胞内, 作为溶质积累于细胞中帮助缢蛭去抵抗外界高盐环境。并且, 脯氨酸也作为蛋白合成底物时刻影响着缢蛭体内蛋白质含量的变化。GILLES 等^[20]发现高盐胁迫下中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 可以将蛋白质分解为游离氨基酸, 盐度越高时, 体内游离氨基酸积累就越多, 且该变化是一种可逆变化。这与我们的研究结果一致, 缢蛭在高盐胁迫下可溶性蛋白含量显著降低, 说明高盐抑制了蛋白质的合成, 未合成蛋白的脯氨酸大部分积累于缢蛭体内, 帮助

缢蛭在高盐环境中进行适应性生存。

海洋贝类在应对外界盐度变化时, 往往也伴随着能量的消耗, 因此, 脯氨酸并不是全部积累于生物体内, 还有一部分可以转化为 ATP 用于对机体供能, 后者则需要通过排氨率进行判断^[21]。排氨率越高说明用于供能的脯氨酸越多, 反之也是如此。例如, 中华绒螯蟹雄蟹进入咸水 2~3 d 后排氨率显著增加, 血淋巴中的血蓝蛋白的总蛋白含量也呈上调趋势^[22]。在本研究结果中, 高盐下缢蛭体内的排氨率显著升高, 说明此时缢蛭需要更多脯氨酸用于供能作用, 在外源脯氨酸添加后, 排氨率显著降低, 说明脯氨酸的添加可以帮助缢蛭减少生物体内自身脯氨酸消耗, 大多能量消耗来源于外源脯氨酸的供给。至于脯氨酸通过积累对盐度变化的影响与氧化供能的比例及具体情况, 还有待进一步研究。

3.3 外源脯氨酸对脯氨酸转运基因 *SLC6A7-1* 和 *SLC6A7-2* 基因表达的影响

脯氨酸能保护生物免受盐度胁迫伤害, 能够被脯氨酸转运蛋白 *SLC6A7* 高效特异性运输, *SLC6A7-1* 和 *SLC6A7-2* 作为脯氨酸转运基因, 其表达对脯氨酸转运蛋白对脯氨酸在生物体中的运输有重要作用^[23]。高盐胁迫下生物体内发生脯氨酸积累现象, 而外源脯氨酸的添加也可以通过上调 *SLC6A7-1* 脯氨酸转运基因序列特征和 *SLC6A7-2* 脯氨酸转运基因的表达, 增强对脯氨酸的运输, 从而能够使生物增强对高盐的抵抗能力^[24]。有研究发现对非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 卵母细胞内脯氨酸抑制后, *SLC6A7* 脯氨酸转运基因也被抑制表达, 其表达量显著降低, 脯氨酸的运输被阻断, 而在非洲爪蟾卵母细胞内注射 *SLC6A7* 脯氨酸转运基因后发现脯氨酸显著表达, 且细胞渗透压得到了很好的平衡调节^[25]。研究通过在小鼠中将 *SLC6A7* 脯氨酸转运基因抑制后发现, 小鼠对脯氨酸的摄取比对照组减少了 70% 以上, 说明了 *SLC6A7* 脯氨酸转运基因是小鼠大脑区域最显著的脯氨酸转运基因, 小鼠大脑中突触的兴奋程度显著升高, 表明了 *SLC6A7* 脯氨酸转运基因的下调调节了生物体内稳态的平衡^[26]。将贻贝暴露于高浓度甲藻中, 通过蛋白质组学研究发现在贻贝钠依赖脯氨酸转运蛋白 (*SLC6A7*) 上调, 脯氨酸等有机物质被大量转运至细胞内帮助贻贝进行长时间适应性生存^[27]。 *SLC6A7* 脯氨酸转

运基因作为特定的脯氨酸转运蛋白基因,其表达在生物体中对脯氨酸转运具有重要的作用,但至今对于SLC6A7脯氨酸转运蛋白对脯氨酸的转运是否为主动转运尚未清楚^[28]。在本研究中,对缢蛏体内SLC6A7脯氨酸转运基因的两个亚型分别进行了组织表达和不同处理组下各时间点的表达情况进行了分析,与大部分研究结果一致,在盐度胁迫下脯氨酸作为渗透调节物质需要被大量转运,SLC6A7-1脯氨酸转运基因和SLC6A7-2脯氨酸转运基因表达升高,增强了脯氨酸的运输从而维持生物体在高渗下的生物稳态。添加外源脯氨酸后,前期SLC6A7-1脯氨酸转运基因和SLC6A7-2脯氨酸转运基因表达都显著升高,而在24 h后,SLC6A7-1脯氨酸转运基因表达水平与对照组相似,SLC6A7-2脯氨酸转运基因仍呈现高表达水平,说明在脯氨酸转运过程中SLC6A7-2脯氨酸转运基因可能比SLC6A7-1脯氨酸转运基因活性更强。

综上所述,本研究通过测定缢蛏在添加外源脯氨酸条件下游离氨基酸含量、可溶性蛋白含量、排氨情况、脯氨酸转运基因SLC6A7-1和SLC6A7-2的表达情况,证明了脯氨酸可以帮助缢蛏进行大分子蛋白合成,并为缢蛏在高盐下生存提供能量。研究结果为探究脯氨酸对缢蛏高盐耐受响应机制提供了参考资料。

参考文献:

- [1] RUAN W B, DONG Y H, LIN Z H, et al. Molecular characterization of aquaporins genes from the razor clam *Sinonovacula constricta* and their potential role in salinity tolerance[J]. *Fishes*, 2022, 7(2): 69.
- [2] CARREGOSA V, FIGUEIRA E, GIL A M, et al. Tolerance of *Venerupis philippinarum* to salinity: osmotic and metabolic aspects[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2014, 171: 36-43.
- [3] 展文豪,周书洪,袁春营,等. 盐度对凡纳滨对虾血细胞吞噬与免疫相关因子基因表达的影响[J]. *水产学杂志*, 2021, 34(1): 18-22.
ZHAN W H, ZHOU S H, YUAN C Y, et al. Effect of salinity on lymphocytes phagocytosis and expression of immune-related factor genes in pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2021, 34(1): 18-22.
- [4] GAGNAIRE B, FROUIN H, MOREAU K, et al. Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 20(4): 536-547.
- [5] 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]. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 2004, 37(3): 193-208.
- [6] HOSOI M, KUBOTA S, TOYOHARA M, et al. Effect of salinity change on free amino acid content in *Pacific oyster* [J]. *Fisheries Science*, 2003, 69(2): 395-400.
- [7] LOUIS JR G F. The response of the corbiculidae (Mollusca: Bivalvia) to osmotic stress: the cellular response[J]. *Physiological Zoology*, 1978, 51(1): 79-91.
- [8] 颜志明,冯英娜,韩艳丽,等. 外源脯氨酸对盐胁迫下甜瓜脯氨酸代谢的影响[J]. *西北植物学报*, 2015, 35(10): 2035-2041.
YAN Z M, FENG Y N, HAN Y L, et al. Effects of exogenous proline on proline metabolism of *Cucumis melo* under salt stress [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2015, 35(10): 2035-2041.
- [9] 陈吉宝,赵丽英,景蕊莲,等. 植物脯氨酸合成酶基因工程研究进展[J]. *生物技术通报*, 2010(2): 8-10, 23.
CHEN J B, ZHAO L Y, JING R L, et al. Advance in genetic engineering of proline synthetase in plant [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010(2): 8-10, 23.
- [10] 王悦如,李二超,陈立侨,等. 急性高渗胁迫对中华绒螯蟹雄蟹组织中可溶性蛋白质、血蓝蛋白、血糖与肝糖原含量的影响[J]. *水生生物学报*, 2022, 36(6): 1056-1062.
WANG Y R, LI E C, CHEN L Q, et al. Effect of acute salinity stress on soluble protein, hemocyanin, haemolymph glucose and hepatopancreas glycogen of *Eriocheir sinensis* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2022, 36(6): 1056-1062.
- [11] PRAMOD A B, FOSTER J, CARVELLI L, et al. SLC6 transporters: structure, function, regulation, disease association and therapeutics [J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2013, 34(2/3): 197-219.
- [12] 杨婷婷,张炜. 红树甜菜碱/脯氨酸转运蛋白基因 *Bet/ProT2* 转化水稻及耐盐性的研究[J]. *南京农业大学学报*, 2013, 36(5): 51-58.
YANG T T, ZHANG W. Transformation of Mangrove betaine/proline transporter gene *Bet/ProT2* into rice and salt-tolerance study in transgenic plants [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2013, 36(5): 51-58.
- [13] 杨婷婷. 红树甜菜碱/脯氨酸转运蛋白基因 *Bet/ProT2* 转化水稻及耐盐性的初步研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
YANG T T. The preliminary salt-tolerance study of transforming a betaine/proline transporter gene *Bet/ProT2*

- of mangrove into rice [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012.
- [14] 李新强. 半胱亚磺酸脱羧酶(CSD)在小鼠卵巢中的表达及功能的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
- LI X Q. Expression and function of cysteine sulfinatase decarboxylase (CSD) in the mouse ovary [D]. Beijing: China Agricultural University, 2015.
- [15] LI Y, NIU D H, WU Y H, et al. Integrated analysis of transcriptomic and metabolomic data to evaluate responses to hypersalinity stress in the gill of the razor clam (*Sinonovacula constricta*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2021, 38: 100793.
- [16] GILLES R. "Compensatory" Organic osmolytes in high osmolarity and dehydration stresses: history and perspectives [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1997, 117(3): 279-290.
- [17] PIERCE S K, AMENDE L M. Control mechanisms of amino acid-mediated cell volume regulation in salinity-stressed molluscs [J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1981, 215(3): 247-257.
- [18] JORDAN P J, DEATON L E. Osmotic regulation and salinity tolerance in the freshwater snail *Pomacea bridgesi* and the freshwater clam *Lampsilis teres* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 1999, 122(2): 199-205.
- [19] CHARMANTIER G, CHARMANTIER-DAURES M, TOWLE D. Osmotic and ionic regulation in aquatic arthropods [M]//EVANS D H. *Osmotic and Ionic Regulation*. Boca Raton: CRC Press, 2009: 165-230.
- [20] GILLES R. Effects of osmotic stresses on the proteins concentration and pattern of *Eriocheir sinensis* blood [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1977, 56(2): 109-114.
- [21] CHANG E W Y, LOONG A M, WONG W P, et al. Changes in tissue free amino acid contents, branchial Na⁺/K⁺ATPase activity and bimodal breathing pattern in the freshwater climbing perch, *Anabas testudineus* (Bloch), during seawater acclimation [J]. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 2007, 307A(12): 708-723.
- [22] 王顺昌, 许立. 不同盐度下中华绒螯蟹血清总蛋白和血红蛋白含量的变化 [J]. *淮南师范学院学报*, 2003, 5(3): 24-26.
- WANG C S, XU L. *Chinensis sinensis* with different salinity Changes of serum total egg white and blood blue egg white content [J]. *Journal of Huainan Normal University*, 2003, 5(3): 24-26.
- [23] SHARMA S, VILLAMOR J G, VERSLUES P E. Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential [J]. *Plant Physiology*, 2011, 157(1): 292-304.
- [24] SILVA-ORTEGA C O, OCHOA-ALFARO A E, REYES-AGÜERO J A, et al. Salt stress increases the expression of *p5cs* gene and induces proline accumulation in cactus pear [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2008, 46(1): 82-92.
- [25] ANAS M K I, LEE M B, ZHOU C X, et al. SIT1 is a betaine/proline transporter that is activated in mouse eggs after fertilization and functions until the 2-cell stage [J]. *Development*, 2008, 135(24): 4123-4130.
- [26] SCHULZ D, MORSCHEL J, SCHUSTER S, et al. Inactivation of the mouse L-Proline transporter ProT alters glutamatergic synapse biochemistry and perturbs behaviors required to respond to environmental changes [J]. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2018, 11: 279.
- [27] PELLAND A M D, CORBETT H E, BALTZ J M. Amino acid transport mechanisms in mouse oocytes during growth and meiotic maturation I [J]. *Biology of Reproduction*, 2009, 81(6): 1041-1054.
- [28] TRELEAVEN T, HARDY M L M, GUTTMAN-JONES M, et al. In vitro fertilisation of mouse oocytes in L-Proline and L-Pipecolic acid improves subsequent development [J]. *Cells*, 2021, 10(6): 1352.

Effect of proline on high salt tolerance of razor clam

DENG Min¹, LIU Ruiqi¹, YANG Dong¹, YUAN Li¹, SHEN Heding^{1,2}, NIU Donghong^{1,2}

(1. Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Proline is an important organic regulatory substance in organisms, which plays an important role in adapting marine shellfish to salinity changes. To study the effect of proline on the salt tolerance of *S. constricta*, high salt stress and exogenous proline were added to *S. constricta*. The proline content, soluble protein content and proline transporter gene expression levels of *S. constricta* were compared in different conditions. Under high salt stress, three free amino acids increased significantly, with the highest proline accumulation and high synthesis. Soluble protein content decreased significantly and ammonia excretion rate increased. The expressions of proline transporter *SLC6A7-1* and *SLC6A7-2* were significantly increased. When exogenous proline was added, the accumulation of proline content increased and reached the peak at 72 h. Soluble protein content was significantly increased, and ammonia excretion level was significantly decreased. The expression of proline transporter *SLC6A7-1* increased firstly and then decreased, while *SLC6A7-2* remained in a high expression state and reached its peak at 24 h. The results showed that proline could promote the synthesis of macromolecular protein and provide more energy for the salt-sensitive survival of *S. constricta*. It provides an important theoretical basis for further study on the regulation of proline in the salt-sensitive survival of marine molluscs.

Key words: *S. constricta*; high salt; proline; tolerance