

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20230203002

http://www.yykxjz.cn/

安思琪, 何琳, 范建勋, 原居林, 林志华. 盐度胁迫对缢蛏渗透压、游离氨基酸及肌肽合成酶基因的影响. 渔业科学进展, 2024, 45(4): 97–111

AN S Q, HE L, FAN J X, YUAN J L, LIN Z H. Effects of salinity stress on osmotic pressure, free amino acid levels, and the carnosine synthetase gene of *Sinonovacula constricta*. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(4): 97–111

盐度胁迫对缢蛏渗透压、游离氨基酸及 肌肽合成酶基因的影响*

安思琪¹ 何琳^{1①} 范建勋² 原居林³ 林志华¹

(1. 浙江万里学院生物与环境学院 浙江 宁波 315100; 2. 三门县水产技术推广站
浙江 三门 317199; 3. 浙江省淡水水产研究所 浙江 湖州 313098)

摘要 缢蛏(*Sinonovacula constricta*)为广盐性贝类,自身存在抵抗外界盐度胁迫的渗透调节机制。为探究缢蛏在适应盐度胁迫过程中发挥渗透调节作用的主要游离氨基酸(free amino acids, FAA)及其降解途径,本研究测定了不同盐度(5、20 和 35)胁迫下缢蛏组织的渗透压、FAA 含量,并结合其肌肽合成酶基因(carnosine synthase, *Sc-CARNS*)的表达及相关生理指标的变化研究了 *Sc-CARNS* 基因的功能。结果显示,缢蛏鳃、足和血淋巴中渗透压和总游离氨基酸含量随着盐度的升高而升高,且各组织渗透压都在盐度胁迫 24 h 后达到稳态。此时,缢蛏鳃、足和血淋巴中随盐度变化含量变化最明显的 FAA 分别为 Ala、Gly、Glu、Pro, Ala、Gly、Arg、Tua 和 Ala、Ser、Thr、Gly。前期研究结果显示,在缢蛏盐度胁迫转录组中, *Sc-CARNS* 表达上调,与盐度调节相关。*Sc-CARNS* 在缢蛏肌肉型组织中表达量最高。低盐胁迫下, *Sc-CARNS* mRNA 表达量和肌肽含量显著升高($P<0.05$),丙氨酸(Ala)含量变化趋势与肌肽相反。受 RNA 干扰后,正常盐度和低盐胁迫下, *Sc-CARNS* 基因在足中 mRNA 表达量和肌肽含量先下降后升高,丙氨酸含量变化则相反,48 h 干扰效率和含量变化最高,且肌肽与丙氨酸是 1:1 的转化。结果表明,缢蛏属于渗透压随变者,体内 FAA 中的丙氨酸在渗透调节方面的贡献率最大,肌肽合成酶(CARNS)是丙氨酸代谢为肌肽的关键酶,参与渗透压调节过程。本研究揭示了低盐胁迫下缢蛏渗透压调节的关键机理,为揭示竹蛏科(Solenida)贝类独特的盐度耐受性机制提供了依据。

关键词 缢蛏; 盐度; 渗透压; 游离氨基酸; 肌肽合成酶

中图分类号 Q494 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2024)04-0097-15

环境盐度的变化会影响贝类的生理活动,使体内渗透调节器官结构、渗透压、离子转运及游离氨基酸(free amino acid, FAA)含量发生一系列变化以适应环境盐度的变化(Ran *et al*, 2017)。水生动物可以通过

FAA 调节细胞体积,维持体内渗透压平衡。此机制已在丽文蛤(*Meretrix lusoria*)(Lin *et al*, 2016)、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)(Hosoi *et al*, 2003)、皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)(Gao *et al*, 2017)、凡纳滨对虾

* 浙江省重点研发计划(2022C02027)、台州市农业科技项目(21nyb01)和浙江省一流学科“生物工程”学生创新项目(CX2021016)共同资助。安思琪, E-mail: 1410865034@qq.com

① 通信作者: 何琳, 副教授, E-mail: hlwithyou@qq.com

收稿日期: 2023-02-03, 收修改稿日期: 2023-04-04

(*Litopenaeus vannamei*)(张丹等, 2016)、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)(付萍等, 2017)等水生动物中得到证明。双壳贝类中常见的调节渗透压的 FAA 主要有 Ala、Gly、Pro 和 Tau 等(Pourmozaffar *et al.*, 2020), 参与缢蛏(*Sinonovacula constricta*)体内渗透调节的主要 FAA 还尚待研究。

在双壳贝类中, 丙氨酸(Ala)是激素和酶的组成成分, 主要参与代谢途径与渗透压调节等(陆捷等, 2023)。Ala 参与许多海洋甲壳类和双壳类软体动物的渗透调节(Lynch *et al.*, 1966; Huo *et al.*, 2014)。在日本河蚶(*Corbicula japonica*)外套膜中, Ala 是构成细胞内 FAA 池的主体, 其浓度随盐度的变化而波动(Matsushima *et al.*, 1992; Koyama *et al.*, 2015)。在盐度 20~32 暴露 24 h 后, 紫贻贝(*Mytilus edulis*)鳃和外套膜中 3 种主要的 FAA(Ala、Gly 和 Tau)含量下降(May, 2017)。在砂海螂(*Mya arenaria*)中, Ala 的含量最高(Haider *et al.*, 2019)。盐度胁迫下, 香港牡蛎(*C. hongkongensis*)中主要是 Tau 和 Ala 变化最大(Huo *et al.*, 2014)。但目前对丙氨酸代谢通路研究的较少, 具体通路尚待研究。

研究表明, 肌肽(carnosine, β -alanyl-L-histidine)在生物体内发挥多种功能, 包括增加肌肉收缩力、血管紧张素转化酶抑制剂、 Ca^{2+} 敏感性调节剂、作为缓冲液维持细胞酸碱平衡和自由基清除活性等(Manhiani *et al.*, 2013; Yanase *et al.*, 2015; Baye *et al.*, 2019)。肌肽是一种由 β -Ala 和 L-His 组成的水溶性、内源性二肽(赵丹婷等, 2018)。有研究发现, 外源肌肽和乙硫氨酸 2 种生物调节物质可通过抗氧化系统保持细胞膜的结构完整性, 有效提高高羊茅(*Festuca arundinacea*)的耐盐性(王岩, 2016)。

肌肽合成酶(carnosine synthase, CARNS)是一种 ATP 偶联酶, 为 ATP-grasp 超家族成员, 更确切地说是 ATPGD1 (含 ATP-grasp 结构域的蛋白 1) (Drozak *et al.*, 2010), 其催化反应为: 丙氨酸+组氨酸+ATP $\rightarrow$ 肌肽+ADP+Pi。在几种软体动物的基因组数据中已检测到肌肽合成酶基因, 如美洲牡蛎(*C. virginica*) (XP_022325739.1)、厚壳贻贝(*M. coruscus*)(QKX_08451.1)和虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)(XP_021350145.1), 说明肌肽不仅存在于脊椎动物中, 也存在于无脊椎动物中。在盐度胁迫后的太平洋牡蛎转录组结果中, ATPGD1 基因的表达上调, 该基因与渗透调节相关(Meng *et al.*, 2013)。

缢蛏是我国传统四大养殖贝类之一(林国兰, 2016)。养殖水体中的盐度易受到潮汐、季节性降雨或高温天气等影响, 经常发生不同程度的波动, 从而

影响缢蛏的呼吸、代谢、生长和存活(陈牧霞等, 2021; 曹伟等, 2022; 丁红兵等, 2022)。缢蛏属于广盐性贝类, 其耐受范围为 3~40 (彭茂潇, 2020; Cao *et al.*, 2022), 但其广盐性耐受的原理尚不明确。FAA 在缢蛏中是否发挥渗透压调节作用及参与渗透压调节作用的 FAA 是否与其他贝类类似, 及主要 FAA 的代谢通路值得深入研究。本研究探究盐度胁迫后缢蛏鳃、足和血淋巴中渗透压和 FAA 的变化情况, 同时对肌肽合成酶基因(carnosine synthase, *Sc-CARNS*)的序列特征、组织表达、盐度胁迫及 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)后的 mRNA 表达特征, 丙氨酸和肌肽含量的变化进行分析, 以期 FAA 在缢蛏盐度适应中的作用提供理论依据, 阐明盐度胁迫后缢蛏体内丙氨酸的分解途径, 为缢蛏健康养殖及耐盐新品种的选育提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验所用缢蛏取自宁波市海洋与渔业科技创新基地, 将规格均匀、体质健康的缢蛏成贝[壳长为 (51.64 ± 3.80) mm]在循环养殖水族箱中暂养 3 d, 连续充气, 避免实验过程中的应激反应, 水体盐度为 20.00 ± 0.34 , pH 为 8.1 ± 0.2 , 水温为 (20.0 ± 0.5) °C。每天更换 1/2 养殖塘海水, 并投喂定量的小球藻(*Chlorella*)。

1.2 实验设计

1.2.1 不同盐度下缢蛏湿重测定 为探究盐度对缢蛏湿重的影响, 排除湿重变化对其体内 FAA 总量的干扰, 根据其盐度耐受范围(3~40), 设置低盐组(盐度 5)、对照组(盐度 20)、高盐组(盐度 35) 3 个梯度, 每组 3 个重复, 每个重复 6 只缢蛏, 盐度胁迫 0、2、4、6、8、12、24、48、72、96 h 后, 称其湿重。

1.2.2 不同盐度下缢蛏鳃、足、血淋巴渗透压测定

为探究盐度对缢蛏渗透压的影响, 确定其渗透调节类型。设置盐度 5、20、35 三个梯度, 每组 3 个重复, 每个重复 160 只缢蛏, 盐度胁迫 0、1、4、8、12、24、48、72 h 后, 分别从每个实验组随机取 3 只。用 1 mL 无菌注射器从缢蛏的闭壳肌中快速抽取血淋巴。取鳃、足于液氮速冻后, -80 °C 保存待用。

1.2.3 不同盐度下缢蛏鳃、足、血淋巴 FAA 含量测定

为探究缢蛏组织中 FAA 含量随盐度的变化, 找到变化最明显的 FAA。设置盐度 5、20、35 三个梯度, 每组 3 个重复, 每个重复 6 只缢蛏, 盐度胁迫

24 h 后, 分别从每个实验组随机取 3 只。用 1 mL 无菌注射器从缢蛏的闭壳肌中快速抽取血淋巴。取鳃、足于液氮速冻, -80°C 保存待用。

1.2.4 基因表达分析样品采集 利用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 分析 *Sc-CARNS* 的表达量对盐度的响应, 设置盐度 5、20、35 三个梯度, 每组 3 个重复, 每个重复 50 只缢蛏, 盐度胁迫 4、8、12、24、48、72、96 h 后, 分别从每个实验组随机取 3 只。取对照组缢蛏的鳃、唇瓣、肝胰腺、闭壳肌、外套膜、水管和足进行组织表达分析。取每组的足进行 mRNA 表达分析。样品于液氮速冻后, -80°C 保存备用。

1.2.5 siRNA 对 *Sc-CARNS* 的干扰实验 利用 RNAi 验证 *Sc-CARNS* 的功能, 实验采取注射正常盐度缢蛏(个体大小均匀)闭壳肌的方式, 实验组注射浓度为 $4\text{ }\mu\text{g}$ *Sc-CARNS* 基因的 siRNA, 空白对照组和阴性对照组(NC, 非特异性 siRNA)分别注射等体积的 DEPC 处理水和 NC 链。实验组、空白对照组和阴性对照组分别注射 100 只, 1/2 放到盐度为 20 的养殖缸中(1 个缸用网分割成 3 个部分), 另外 1/2 放入盐度为 5 的养殖缸中, 每组实验设置 3 个平行。将注射后 0、24、48、72、96 h 作为取样时间点, 各组随机抽取 3 只, 取其足于液氮速冻后, -80°C 保存备用。

1.3 实验方法

1.3.1 渗透压测定 液体: 将血清或海水移入 0.5 mL 的测量管中(不少于 $50\text{ }\mu\text{L}$), 掌心离心机离心 10 s, 用冰点渗透压仪(Gonotec 3000, 德国)测定渗透压(徐娴等, 2020)。

组织: 将鳃或足用全自动样品快速研磨仪(JXFSTPRP-64L, 上海净信)研磨 3 min, 将匀浆液移入 0.5 mL 测量管中, 短暂离心, 测其渗透压(李德全等, 1988)。

1.3.2 FAA 含量测定 组织: 称取 1 g 真空冷冻干燥后的鳃或足于 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL 0.01 mol/L 盐酸和 2 颗小钢珠, 研磨 6 min, 再用 0.01 mol/L 盐酸定容至 50 mL, 浸提 30 min 后 $14\text{ }000\text{ r/min}$ 4°C 离心 15 min; 吸取上清液 2 mL 于 5 mL 离心管中, 加入 8% 磺基水杨酸 2 mL (沉淀蛋白), 混匀, 静置 15 min; $14\text{ }000\text{ r/min}$ 4°C 离心 15 min, 取上清液, 过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜后, 用全自动氨基酸分析仪(日立 L8900, 日本)测定 FAA 含量(张苏平等, 2017)。

血淋巴: 取 1.5 mL 血淋巴于 2 mL 离心管中, 3000 r/min 4°C 离心 5 min; 吸取上清液 1 mL 于 10 mL 离心管中, 加入含 0.02 mol/L 盐酸的 4% 磺基水杨酸

9 mL, 混匀, 静置 15 min; $14\text{ }000\text{ r/min}$ 4°C 离心 15 min; 取上清液, 过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜后, 上机测定 FAA 含量(付萍等, 2017)。

1.3.3 基因序列分析及结构域预测 将缢蛏盐度胁迫转录组获得的 *Sc-CARNS* 的 CDS 序列通过 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/> 预测 ORF 及氨基酸序列; 通过 https://web.expasy.org/compute_pi/ 预测蛋白质的分子量和等电点; 用 <https://web.expasy.org/protscale/> 分析蛋白质疏水性; 利用 Smart 在线软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对蛋白进行功能域预测, 通过 Swiss Model 在线软件(<https://swissmodel.expasy.org/interactive/>)预测蛋白质高级结构。

1.3.4 *Sc-CARNS* mRNA 表达 RT-qPCR 分析 用 Trizol 提取总 RNA, 再用 PrimeScriptTM RT reagent Kit 试剂(TaKaRa)反转录成 cDNA, 产物于 -20°C 冰箱保存, 备用。引物设计参照缢蛏基因转录组文库中的 CDS 序列, 用 Primer Premier 6.0 软件设计 RT-qPCR 的引物(表 1), 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master mix 试剂进行 RT-qPCR (罗氏 Light Cyclers 480 II, 瑞士), 结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行比较分析(孔祥辉等, 2022)。

表 1 实验所用引物及其序列

Tab.1 Primers and sequences used in the experiment

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'~3')
qCARNS-F	ACGACATTCCACACTGGCCT
qCARNS-R	AGCGCTTGAACCGTGCTCTA
siRNA-CARNS-F	GCUGCUCUCAUCAACGAUUTT
siRNA-CARNS-R	AAUCGUUGAUGAGAGCAGCTT
NC-F	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
NC-R	ACGUGACACGUUCGGAGAATT
18S-F	TCGGTCTATTGCGTTGGTTTT
18S-R	CAGTTGGCATCGTTTATGGTCA

1.3.5 丙氨酸和肌肽含量的测定 用贝类丙氨酸 ELISA 检测试剂盒(上海酶联)测定丙氨酸含量。用邻苯二甲醛(OPA)显色法测定肌肽含量。

1.4 数据处理

用 Excel 软件对数据进行 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 、平均值(Mean)和标准差(SD)分析, 结果用平均值 $\pm$ 标准差表示。采用 SPSS Statistics 25 软件对数据进行统计学分析。先对数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 若有显著差异, 再作 Duncan's 多重比较, $P<0.05$ 为差异显著。用 GraphPad Prism 8.0 作图。

2 结果

2.1 盐度胁迫后缢蛏湿重的变化

不同盐度对缢蛏湿重的影响不同(图 1)。对照组

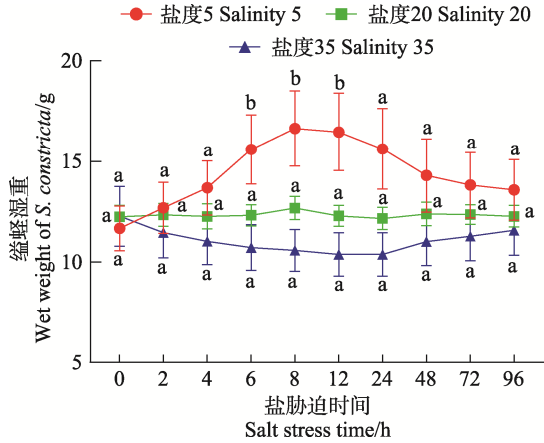


图 1 盐度对缢蛏湿重的影响

Fig.1 Effect of salinity on the wet weight of *S. constricta*

字母不同表示与对照组差异显著($P < 0.05$), 下同。

Different letters indicate significant differences with the control group ($P < 0.05$), the same below.

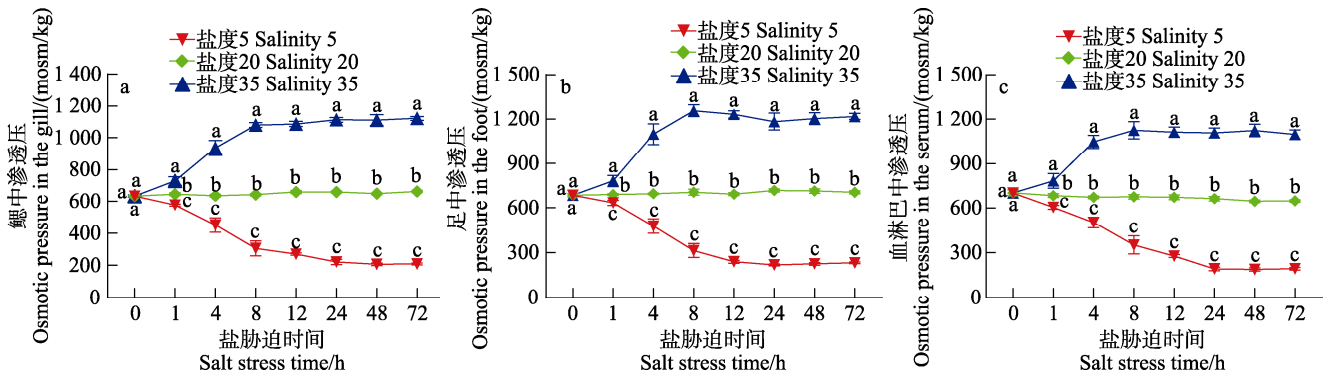


图 2 不同盐度胁迫下缢蛏鳃、足和血淋巴中渗透压的变化

Fig.2 Variation of osmotic pressures in gill, foot and hemolymph of *S. constricta* under different salinity stress

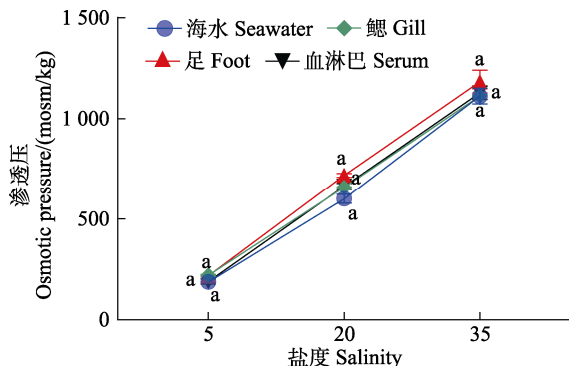


图 3 不同盐度下缢蛏鳃、足、血淋巴与海水渗透压之间的关系

Fig.3 Osmotic pressures between gills, foot, hemolymph and seawater of *S. constricta* under different salinity

0~96 h 内无明显变化。与对照组相比,低盐胁迫时,缢蛏湿重随胁迫时间先增加后降低,胁迫 6~12 h 有显著差异($P < 0.05$),24 h 后无显著差异;高盐时则先降低后升高,96 h 内与对照组无显著差异。低盐时,缢蛏的双壳张大,细胞吸水膨胀,体重增大;高盐时则双壳闭合,细胞失水皱缩,体重减小。

2.2 盐度胁迫后缢蛏鳃、足和血淋巴中渗透压的变化

不同盐度对缢蛏各组织渗透压的影响不同(图 2)。正常盐度下,各组织渗透压在 0~72 h 内均无显著变化。低盐胁迫下,各组织中渗透压在 1~72 h 内显著降低($P < 0.05$);高盐胁迫时则相反,都在 24 h 达到稳态。此时,鳃、足、血淋巴中渗透压与对照组相比,低盐组分别降低了 66.7%、69.7%和 71.6%;高盐组分别增加了 68.3%、67.5%和 70.2%。同一胁迫时间下,缢蛏各组渗透压大小为盐度 35>盐度 20>盐度 5。由图 3 可以看出,缢蛏各组织渗透压随着外界海水渗透压的升高而升高。结果表明,缢蛏体内渗透压会随外界环境的变化而变化,与外界环境一致时,达到稳定,属于渗透调节类型中的渗透压随变者。

2.3 低盐胁迫后缢蛏鳃、足、血淋巴中 FAA 组成分析

本研究共测了 18 种 FAA,低盐胁迫 24 h 后缢蛏鳃、足、血淋巴中 FAA 组成成分见表 2。正常盐度下,鳃中总游离氨基酸(TOFAA)含量为 65.05 mg/g,含量最高的为 Gly (23.05 mg/g),占 TOFAA 的 35.43%。其次为 Ala、Tau、Glu 和 Thr,分别占 TOFAA 的 25.63%、14.48%、7.26%和 3.77%,未检测到 Phe 和 Cys。足中 TOFAA 含量为 96.28 mg/g,Ala 含量最高(40.26 mg/g,占 41.82%),其次为 Arg (17.72%)、Gly (9.14%)、Glu (8.32%)和 Asp (6.48%),未检测到 Cys 和 Phe。血淋巴中 Ala 含量最高(26.69 mg/L),占 TOFAA 的 42.37%,其次为 Gly (10.90%)、Thr (8.68%)、

Glu (8.16%)和 Ser (7.11%), 未检测到 Cys 和 Ile。

低盐胁迫 24 h 后, 各组织中主要 FAA 浓度变化如图 4 所示, 与对照组比, 缢蛏鳃中 TOFAA 的含量降低, Gly 含量发生显著下降($P<0.05$), 由 23.05 mg/g 下降到 0.75 mg/g; 其次为 Ala (由 16.67 mg/g 下降到 1.80 mg/g)和 Tau (由 9.42 mg/g 下降到 5.56 mg/g)。缢蛏足中 TOFAA 的含量降低, Ala 含量发生显著下降($P<0.05$), 由 40.26 mg/g 下降到 9.96 mg/g; 其次为 Gly (由 8.80 mg/g 下降到 1.04 mg/g)和 Asp (由 6.24 mg/g 下降到 2.08 mg/g)。缢蛏血淋巴中 TOFAA

表 2 低盐胁迫下缢蛏鳃、足、血淋巴中 FAA 的含量(Mean±SD)

Tab.2 Concentrations of free amino acid in the gill, foot, hemolymph of *S. constricta* under low salinities (Mean±SD)

游离氨基酸 FAA	盐度 Salinity					
	鳃 Gill/(mg/g)		足 Foot/(mg/g)		血淋巴 Hemolymph/(mg/L)	
	盐度 5 Salinity 5	盐度 20 Salinity 20	盐度 5 Salinity 5	盐度 20 Salinity 20	盐度 5 Salinity 5	盐度 20 Salinity 20
牛磺酸 Tau	5.56±0.60 ^a	9.42±0.58 ^b	1.81±0.10 ^a	2.42±0.11 ^a	1.15±0.10 ^a	0.24±0.01 ^b
天冬氨酸 Asp	0.47±0.09 ^a	1.39±0.07 ^b	2.08±0.22 ^a	6.24±0.11 ^b	—	2.02±0.10 ^b
苏氨酸 Thr	1.17±0.17 ^a	2.45±0.08 ^b	3.50±0.17 ^a	1.90±0.15 ^b	18.28±0.65 ^a	5.47±0.04 ^b
丝氨酸 Ser	0.85±0.12 ^a	1.03±0.27 ^a	2.04±0.03 ^a	2.22±0.05 ^a	23.07±0.91 ^a	4.48±0.38 ^b
谷氨酸 Glu	2.77±0.15 ^a	4.72±0.56 ^b	5.27±0.01 ^a	8.01±0.07 ^b	—	5.14±0.21 ^b
甘氨酸 Gly	0.75±0.05 ^a	23.05±2.72 ^b	1.04±0.12 ^a	8.80±0.26 ^b	0.25±0.02 ^a	6.87±1.28 ^b
丙氨酸 Ala	1.80±0.18 ^a	16.67±0.32 ^b	9.96±0.76 ^a	40.26±1.29 ^b	13.48±0.50 ^a	26.69±6.55 ^b
半胱氨酸 Cys	0.37±0.07 ^b	—	0.69±0.12 ^b	—	3.84±0.20 ^b	—
缬氨酸 Val	0.48±0.02 ^a	0.98±0.14 ^b	0.61±0.01 ^a	2.35±0.28 ^b	4.74±0.40 ^a	1.46±0.01 ^b
甲硫氨酸 Met	0.31±0.02 ^a	0.41±0.06 ^a	0.40±0.03 ^a	1.18±0.17 ^b	3.16±0.75 ^a	0.47±0.01 ^b
异亮氨酸 Ile	0.10±0.01 ^a	0.15±0.03 ^a	0.15±0.01 ^a	0.53±0.05 ^b	1.45±0.16 ^b	—
亮氨酸 Leu	0.15±0.02 ^a	0.17±0.01 ^a	0.10±0.01 ^a	0.43±0.09 ^b	1.96±0.02 ^a	0.34±0.01 ^b
酪氨酸 Tyr	0.21±0.01 ^a	0.36±0.04 ^a	0.74±0.03 ^a	0.46±0.04 ^b	1.33±0.34 ^a	2.52±0.15 ^b
苯丙氨酸 Phe	0.24±0.01 ^b	—	0.24±0.09 ^a	—	1.19±0.33 ^a	2.81±0.58 ^b
赖氨酸 Lys	1.33±0.10 ^a	1.12±0.19 ^b	1.56±0.13 ^a	2.09±0.35 ^b	3.36±0.11 ^a	2.00±0.22 ^b
组氨酸 His	0.13±0.01 ^a	0.32±0.05 ^b	0.39±0.02 ^a	0.63±0.03 ^b	1.31±0.30 ^a	0.55±0.09 ^b
精氨酸 Arg	1.17±0.13 ^a	1.47±0.11 ^b	16.61±0.25 ^a	17.06±0.07 ^a	0.25±0.01 ^a	0.40±0.01 ^b
脯氨酸 Pro	—	1.35±0.18 ^b	—	1.72±0.05 ^b	—	1.54±0.83 ^b
总游离氨基酸 TOFAA	17.87±1.76 ^a	65.05±5.42 ^b	47.19±2.10 ^a	96.28±3.07 ^b	78.83±4.78 ^a	63.00±10.45 ^a

注: 各组织上标字母不同表示不同盐度差异显著($P<0.05$), 相同字母表示不显著。下同。

Note: Different superscript letters in different tissues indicate significant difference between different salinities ($P<0.05$), while the same letter indicates no significant difference. The same below.

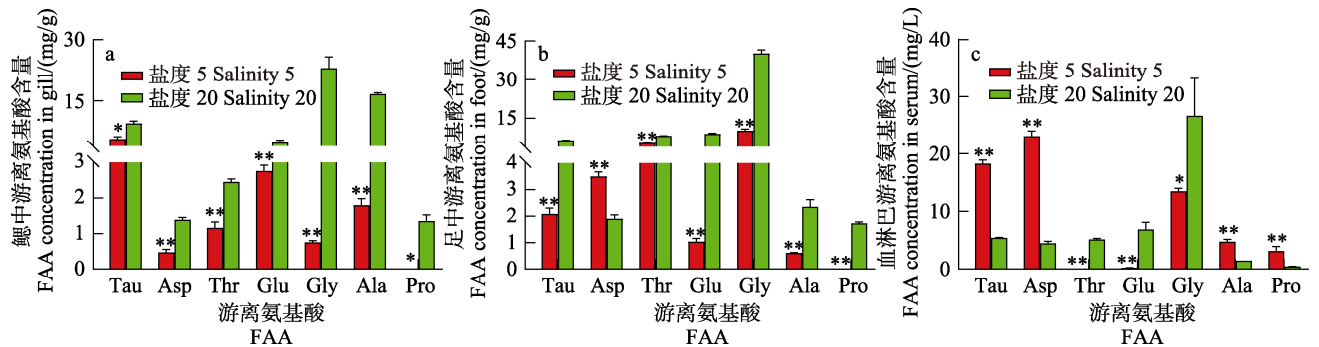


图 4 低盐胁迫下缢蛏鳃、足、血淋巴中主要游离氨基酸的浓度变化

Fig.4 Concentrations of the main amino acids in the gill, foot, hemolymph tissue of *S. constricta* under low salinity stress

*代表不同盐度组与对照组差异显著($P<0.05$), **代表差异极显著($P<0.01$), 下同。

* represents significant differences between the different salinity stress with control ($P<0.05$),

** represents highly significant differences ($P<0.01$). The same below.

的含量无显著变化, Ala 含量显著降低的含量 ($P<0.05$), 由 26.69 mg/L 下降到 13.48 mg/L; Ser 和 Thr 显著升高($P<0.05$)。

综上所述, 低盐胁迫时, 缢蛭体内 Ala 含量降低幅度最大, 推测当 FAA 发挥渗透压调节作用时 Ala 的贡献率最大。

2.4 高盐胁迫后缢蛭鳃、足、血淋巴中 FAA 组成分析

高盐胁迫 24 h 后, 缢蛭鳃、足、血淋巴中 FAA 组成成分见表 3。缢蛭鳃、足、血淋巴中的 TOFAA 含量显著升高($P<0.05$)。高盐胁迫 24 h 后, 各组织中主要 FAA 浓度变化如图 5 所示。与对照组相比, 高盐组鳃中 Ala 含量显著升高($P<0.05$), 由 16.67 mg/g 增加到 37.29 mg/g, 其次为 Pro, 由 1.35 mg/g 增加到 3.33 mg/g。足中 FAA 含量升高幅度最大的是 Ala, 其含量由 40.26 mg/g 增加到 60.18 mg/g, 其次为 Tau (由 2.42 mg/g 增加到 4.93 mg/g)、Arg (由 17.06 mg/g 增加到 20.95 mg/g)和 Pro (由 1.72 mg/g 增加到 2.01 mg/g)。血淋巴中也为 Ala 含量变化最大, 由 26.69 mg/L 升到

69.94 mg/L, 其次为 Val (由 1.46 mg/L 增加到 6.46 mg/L)和 Gly (由 6.87 mg/L 增加到 11.06 mg/L), 分别增加了 5.00 mg/L 和 4.19 mg/L。因此, 高盐胁迫时, 缢蛭体内 Ala 含量升高幅度最大, 是主要的渗透调节氨基酸。

2.5 Sc-CARNS 基因特征性分析

Sc-CARNS 基因蛋白质编码区(coding sequence, CDS)长度为 1 260 bp。ExPASy 软件推导出编码 419 个氨基酸, 包含 49 个碱性氨基酸(Arg、Lys 和 His), 55 个酸性氨基酸(Asp 和 Glu), 182 个疏水性氨基酸(Ala、Val、Leu、Pro、Ile、Phe、Trp 和 Met), 133 个亲水性氨基酸(Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn 和 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 47.15 kDa, 等电点 pI 为 5.09。二级结构预测结果显示, 缢蛭 Sc-CARNS 蛋白质序列含有 38.66% α -螺旋、6.44% β -折叠和 37.23%无规则卷曲。三级结构域预测结果如图 6 所示, 缢蛭肌肽合成酶含有 1 个 ATP-grasp 结构域。

表 3 高盐胁迫下缢蛭鳃、足、血淋巴中 FAA 的含量(Mean $\pm$ SD)

Tab.3 Concentrations of free amino acid in the gill, foot, hemolymph of *S. constricta* under high salinity stress (Mean $\pm$ SD)

游离氨基酸 FAA	盐度 Salinity					
	鳃 Gill/(mg/g)		足 Foot/(mg/g)		血淋巴 Hemolymph/(mg/L)	
	盐度 20 Salinity 20	盐度 35 Salinity 35	盐度 20 Salinity 20	盐度 35 Salinity 35	盐度 20 Salinity 20	盐度 35 Salinity 35
牛磺酸 Tau	9.42 $\pm$ 0.58 ^a	6.82 $\pm$ 0.11 ^b	2.42 $\pm$ 0.11 ^a	4.93 $\pm$ 0.93 ^b	0.24 $\pm$ 0.01 ^a	0.92 $\pm$ 0.11 ^b
天冬氨酸 Asp	1.39 $\pm$ 0.07 ^a	0.23 $\pm$ 0.04 ^b	6.24 $\pm$ 0.11 ^a	2.33 $\pm$ 0.27 ^b	2.02 $\pm$ 0.10 ^c	0.24 $\pm$ 0.02 ^b
苏氨酸 Thr	2.45 $\pm$ 0.08 ^b	2.29 $\pm$ 0.20 ^b	1.90 $\pm$ 0.15 ^a	1.81 $\pm$ 0.20 ^a	5.47 $\pm$ 0.04 ^a	4.79 $\pm$ 0.84 ^a
丝氨酸 Ser	1.03 $\pm$ 0.27 ^a	1.52 $\pm$ 0.15 ^b	2.22 $\pm$ 0.05 ^a	2.40 $\pm$ 0.22 ^a	4.48 $\pm$ 0.38 ^a	5.20 $\pm$ 0.25 ^a
谷氨酸 Glu	4.72 $\pm$ 0.56 ^a	6.20 $\pm$ 0.13 ^b	8.01 $\pm$ 0.07 ^a	7.00 $\pm$ 0.99 ^a	5.14 $\pm$ 0.21 ^a	8.14 $\pm$ 0.90 ^b
甘氨酸 Gly	23.05 $\pm$ 2.72 ^a	21.51 $\pm$ 2.17 ^a	8.80 $\pm$ 0.26 ^a	7.21 $\pm$ 0.27 ^b	6.87 $\pm$ 1.28 ^a	11.06 $\pm$ 0.33 ^b
丙氨酸 Ala	16.67 $\pm$ 0.32 ^a	37.29 $\pm$ 4.13 ^b	40.26 $\pm$ 1.29 ^a	60.18 $\pm$ 5.49 ^b	26.69 $\pm$ 6.55 ^a	69.94 $\pm$ 7.95 ^b
半胱氨酸 Cys	—	—	—	—	—	—
缬氨酸 Val	0.98 $\pm$ 0.14 ^a	2.52 $\pm$ 0.16 ^b	2.35 $\pm$ 0.28 ^a	3.13 $\pm$ 0.15 ^b	1.46 $\pm$ 0.01 ^a	6.46 $\pm$ 0.01 ^b
甲硫氨酸 Met	0.41 $\pm$ 0.06 ^a	0.95 $\pm$ 0.14 ^b	1.18 $\pm$ 0.17 ^a	1.28 $\pm$ 0.12 ^a	0.47 $\pm$ 0.01 ^a	2.89 $\pm$ 0.69 ^b
异亮氨酸 Ile	0.15 $\pm$ 0.03 ^a	0.90 $\pm$ 0.05 ^b	0.53 $\pm$ 0.05 ^a	1.11 $\pm$ 0.04 ^b	—	2.96 $\pm$ 0.09 ^b
亮氨酸 Leu	0.17 $\pm$ 0.01 ^a	1.05 $\pm$ 0.18 ^b	0.43 $\pm$ 0.09 ^a	1.28 $\pm$ 0.15 ^b	0.34 $\pm$ 0.01 ^a	2.54 $\pm$ 0.40 ^b
酪氨酸 Tyr	0.36 $\pm$ 0.04 ^a	0.51 $\pm$ 0.14 ^a	0.46 $\pm$ 0.04 ^a	0.87 $\pm$ 0.07 ^b	2.52 $\pm$ 0.15 ^a	3.08 $\pm$ 0.10 ^b
苯丙氨酸 Phe	—	—	—	0.22 $\pm$ 0.02 ^b	2.81 $\pm$ 0.58 ^a	4.98 $\pm$ 0.51 ^b
赖氨酸 Lys	1.12 $\pm$ 0.19 ^a	1.39 $\pm$ 0.06 ^b	2.09 $\pm$ 0.35 ^a	1.90 $\pm$ 0.04 ^a	2.00 $\pm$ 0.22 ^a	2.14 $\pm$ 0.18 ^a
组氨酸 His	0.32 $\pm$ 0.05 ^a	0.67 $\pm$ 0.05 ^b	0.63 $\pm$ 0.03 ^a	0.80 $\pm$ 0.11 ^b	0.55 $\pm$ 0.09 ^a	0.95 $\pm$ 0.08 ^b
精氨酸 Arg	1.47 $\pm$ 0.11 ^a	1.96 $\pm$ 0.09 ^b	17.06 $\pm$ 0.07 ^a	20.95 $\pm$ 1.33 ^b	0.40 $\pm$ 0.01 ^a	1.67 $\pm$ 0.12 ^b
脯氨酸 Pro	1.35 $\pm$ 0.18 ^a	3.33 $\pm$ 0.09 ^b	1.72 $\pm$ 0.05 ^a	2.01 $\pm$ 0.34 ^a	1.54 $\pm$ 0.83 ^a	2.50 $\pm$ 0.16 ^b
总游离氨基酸 TOFAA	65.05 $\pm$ 5.42 ^a	89.14 $\pm$ 7.87 ^b	96.28 $\pm$ 3.07 ^a	119.41 $\pm$ 10.75 ^b	63.00 $\pm$ 10.45 ^a	130.45 $\pm$ 12.74 ^b

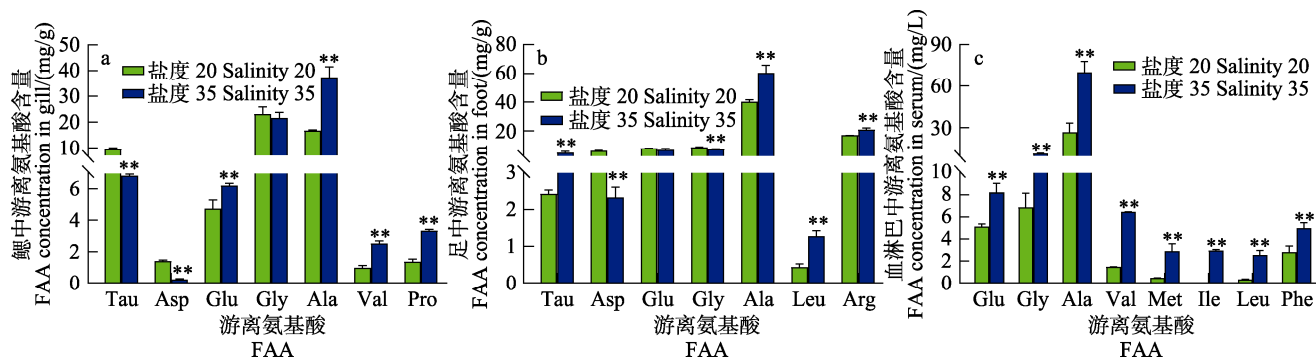
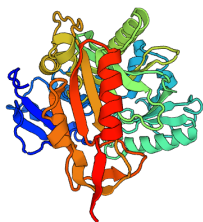


图 5 高盐胁迫下缢蛏鳃、足、血淋巴中主要游离氨基酸的含量变化

Fig.5 Concentrations of the main amino acids in the gill, foot, hemolymph tissue of *S. constricta* under high salinity stress

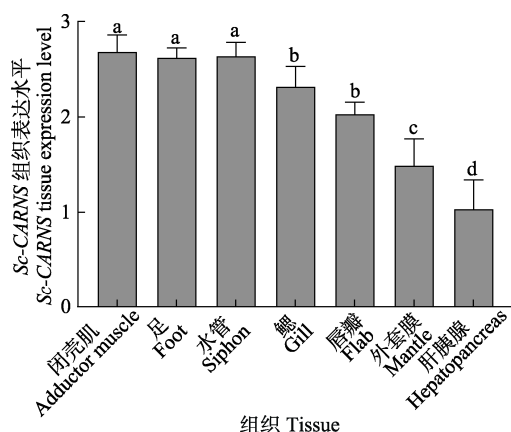
2.6 *Sc-CARNS* 基因组织表达分析

如图 7 所示, *Sc-CARNS* 基因在缢蛏水管、外套膜、鳃、闭壳肌、肝胰腺、唇瓣和足 7 个组织中均有表达。其中,在闭壳肌、足和水管中显著表达($P<0.05$),说明其主要在肌肉类型的组织中表达,其次为鳃,肝胰腺中的表达量最低。

图 6 *Sc-CARNS* 蛋白质三级结构预测Fig.6 Predicted protein tertiary structure of *Sc-CARNS*

螺旋和箭头分别代表 α -螺旋和 β -折叠。

Spiral and arrows represent α -helix and β -fold, respectively.

图 7 *Sc-CARNS* 基因在缢蛏不同组织的表达分析Fig.7 Expression analysis of *Sc-CARNS* gene in different tissues of *S. constricta*

不同字母表示存在显著差异($P<0.05$)。下同。

Different letters indicate significant differences ($P<0.05$). The same below.

2.7 盐度胁迫下 *Sc-CARNS* 的表达响应及调节效应

如图 8 所示,盐度胁迫 96 h 内对照组中 *Sc-CARNS* 的表达量、丙氨酸和肌肽含量均无显著变化。低盐胁迫后,缢蛏足中 *Sc-CARNS* 基因 mRNA 表达量随胁迫时间先升高后降低,且胁迫 4 h 后均极显著高于对照组($P<0.01$),并在 24 h 时达到峰值。丙氨酸的含量随时间显著降低,肌肽含量随时间显著增加($P<0.05$)。高盐胁迫后, *Sc-CARNS* 表达量则呈下降趋势,与对照组相比无显著变化。丙氨酸的含量在 8 h 后先升高后降低再升高,其含量均不低于对照组。肌肽的含量在 24 h 后表现为降低趋势。

上述结果表明, *Sc-CARNS* 主要在低盐胁迫时发挥作用。在低渗条件下, *Sc-CARNS* 高表达,此时丙氨酸含量降低了(30.57 ± 0.51) mg/g,肌肽含量升高了(4.90 ± 1.50) mg/g,变化量比为 6 : 1。按照生物反应式:丙氨酸+组氨酸+ATP $\rightarrow$ 肌肽+ADP+Pi,丙氨酸与肌肽转化为 1 : 1。实验结果说明,一部分丙氨酸被转化成肌肽,其余丙氨酸则被其他途径消耗掉了。例如,丙氨酸通过谷丙转氨酶脱氨基作用形成谷氨酸,再通过谷氨酰氨合成酶转化为谷氨酰氨,维持缢蛏体内渗透压平衡(Zhang *et al*, 2020; Ahmad *et al*, 2021)。在低盐条件下,双壳贝类需要消耗更多的能量防止生理变化,因此,丙氨酸也可分解成丙酮酸进入三羧酸循环进行能量转换(Maar *et al*, 2015)。同时,为维持体内肌肽含量的稳定,当肌肽含量过高时,肌肽酶会将其降解,再被转运蛋白运出体外(潘晨, 2021)。

2.8 RNAi 对正常盐度下 *Sc-CARNS* 表达和调节作用的影响

利用 RNA 干扰技术验证 *Sc-CARNS* 在缢蛏中的功能。如图 9 所示,正常盐度下,阴性对照组(NC)和 DEPC 处理水中 *Sc-CARNS* 的 mRNA 表达量、丙氨酸和肌肽的含量无显著变化。干扰组 *Sc-CARNS*

mRNA 表达水平随干扰时间先降低后升高。在 24 h 和 48 h 时, *Sc-CARNS* mRNA 表达水平显著低于 NC ($P<0.05$), 干扰效率分别为 24%和 69%, 48 h 的干扰效率最高。此时干扰组中丙氨酸含量随着时间先升高后降低, 48 h 达到最高值。干扰组肌肽的含量先降低后升高, 在 48 h 达到最低值。

RNAi 结果显示, *Sc-CARNS* 表达量在 48 h 干扰效率最高, 此时丙氨酸的含量升高了 (5.90 ± 0.81) mg/g, 肌肽的含量降低了 (4.71 ± 1.09) mg/g。且在盐度 20 时, 缢蛏体内无需提供额外的能量, 因此, 丙氨酸与肌肽符合 1:1 的转化关系, 证明了肌肽合成酶是丙氨酸转化成肌肽的关键酶。

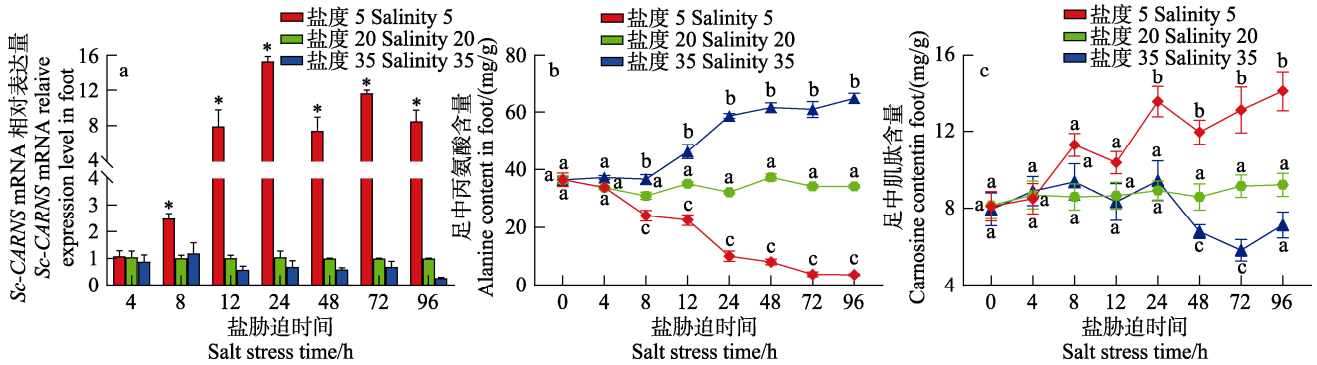


图 8 不同盐度胁迫后缢蛏足中 *Sc-CARNS* mRNA 表达量和丙氨酸、肌肽含量变化
Fig.8 Expression of *Sc-CARNS* mRNA and contents of alanine and carnosine in the foot of *S. constricta* under different salinity stresses

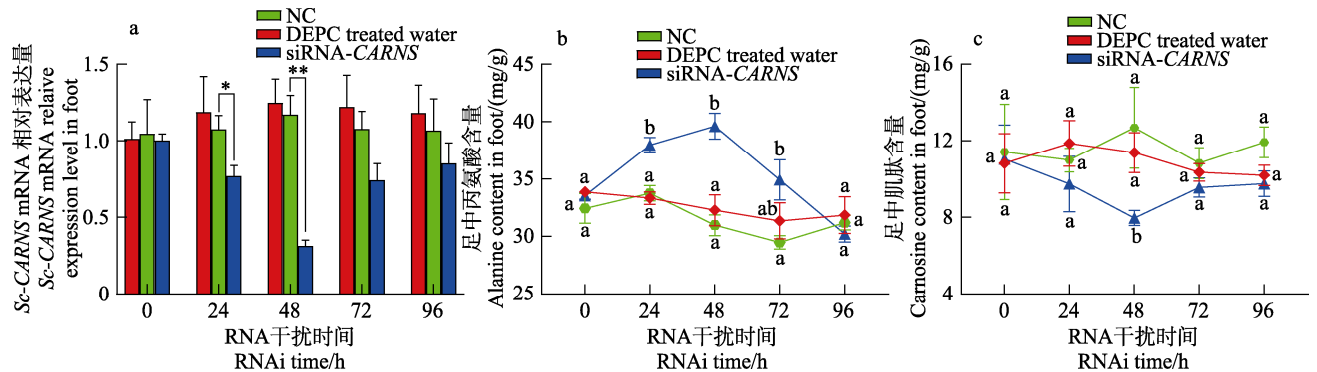


图 9 RNA 干扰后正常盐度(20)下缢蛏足中 *Sc-CARNS* mRNA 表达量和丙氨酸、肌肽含量变化
Fig.9 Expression of *Sc-CARNS* mRNA and contents of alanine and carnosine in the foot of *S. constricta* under normal salinity (20) after RNA interference

2.9 RNAi 对低盐时 *Sc-CARNS* 表达和调节作用的影响

利用 RNA 干扰技术进一步验证 *Sc-CARNS* 在缢蛏中的功能。注射干扰链后, 低盐胁迫后, 缢蛏足中 *Sc-CARNS* mRNA 表达量和丙氨酸、肌肽含量的变化情况如图 10 所示。低盐胁迫 0~24 h, *Sc-CARNS* mRNA 表达量升高, 丙氨酸含量降低, 肌肽含量升高。注射干扰链 24~96 h 后, 干扰组 *Sc-CARNS* mRNA 表达水平随干扰时间先降低后升高, 丙氨酸含量随时间先升高后降低, 肌肽含量先降低后升高。在干扰 48 h 时, *Sc-CARNS* mRNA 表达水平显著低于 NC ($P<0.05$), 干扰效率为 43%, 此时丙氨酸和肌肽的含量都处于极值。

上述实验结果表明, 注射干扰链 0~24 h, 缢蛏足

中 *Sc-CARNS* mRNA 表达量、肌肽和丙氨酸含量变化与未干扰时低盐胁迫下的变化一致。在干扰 48 h 时, *Sc-CARNS* mRNA 表达量达到最低值, 此时肌肽含量降低了 (4.93 ± 1.34) mg/g, 丙氨酸含量升高了 (5.17 ± 1.01) mg/g, 与正常盐度下的干扰结果一致, 更加印证了他们之间是相互影响的, *Sc-CARNS* 是丙氨酸代谢成肌肽的限速酶, 合成肌肽是低盐条件下丙氨酸减少的一条重要途径。

3 讨论

3.1 缢蛏体内渗透压和 FAA 对盐度的响应

按照对水环境盐度变化的渗透调节能力不同, 水生生物分为渗透压调节者和渗透压随变者。前者是能

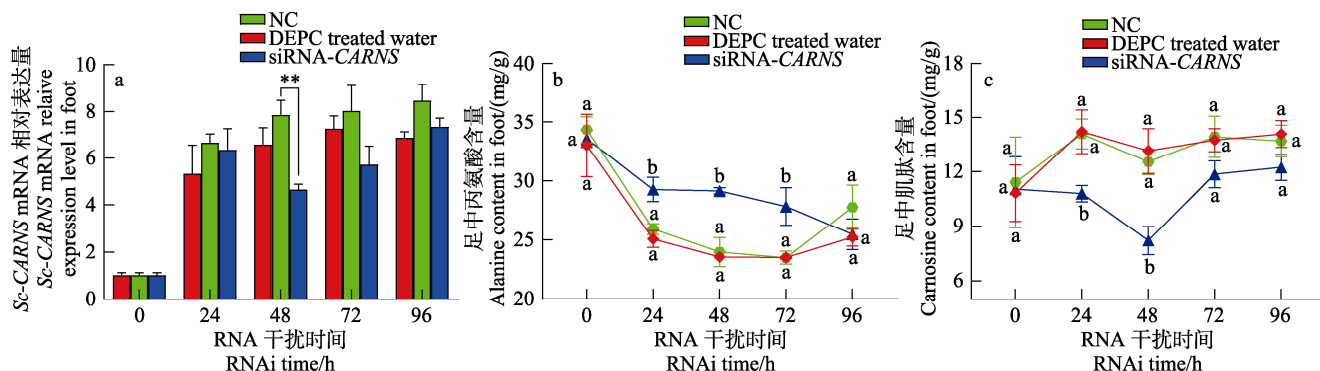


图 10 RNA 干扰后低盐(5)胁迫下缢蛏足中 *Sc-CARNS* mRNA 表达量和丙氨酸、肌肽含量变化

Fig.10 Expression of *Sc-CARNS* mRNA and contents of alanine and carnosine in the foot of *S. constricta* under low salt (5) stress after RNA interference

主动调节自身渗透压和离子浓度,并维持在一定水平,其调节渗透压的能力较强。而后者则较弱,其血淋巴中渗透压和离子浓度会随外界环境变化而变化,最终与外界环境保持一致(Péqueux, 1995)。通过对缢蛏鳃、足、血淋巴渗透压的测定发现,随着盐度的升高,缢蛏各组织中渗透压随时间先升高后趋于平稳,最终与外界盐度保持基本一致。与魁蚶(*Scapharca broughtonii*)(蔡星媛等, 2015)和泥蚶(*Tegillarca granosa*)(李敏等, 2018)的研究结果一致,因此,缢蛏属于渗透压随变者。

水体盐度变化时水生动物可以通过改变胞内可溶物质(FAA)浓度来调节细胞渗透压(Nie *et al.*, 2017)。鳃是水生动物与外界环境进行离子和气体交换的场所,是调节渗透压和血液离子浓度的主要器官(江山等, 2011)。肌肉组织是 FAA 代谢最适合的场所,是 FAA 参与渗透压调节最主要的场所(Li *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012)。血淋巴是应对外界盐度变化的直接场所,血淋巴中的 FAA 会直接参与渗透压的调节(Cheng *et al.*, 1986; 梁萌青等, 2009; 马金武等, 2016)。因此,鳃、足和血淋巴是研究 FAA 含量变化最主要的组织。

在正常盐度下,缢蛏体内含量最高的 FAA 是 Ala(张苏平等, 2017)。鳃中含量最高的为 Gly,其次为 Ala、Tau 和 Glu。足和血淋巴中含量最高的为 Ala,其次分别为 Arg、Gly、Glu、Asp 和 Gly、Thr、Glu,与虾蟹等水生生物中研究结果类似(黄凯等, 2010; Wang *et al.*, 2012; 付萍等, 2016)。说明同一物种的不同组织中含量最高的 FAA 存在一定的特殊性。缢蛏组织中含量高的 Ala、Gly、Glu 和 Asp 都是鲜味氨基酸,会影响肉质和鲜味,赋予它鲜美的口感(陈德慰等, 2012; 张苏平等, 2017)。在高盐度(30~35)水中暂养 12~24 h 可以提高其鲜度,反之,在低盐度水中暂

养会大大降低鲜度。

双壳类动物体内 TOFAA 的含量与外界环境盐度呈正相关(Pourmozaffar *et al.*, 2020)。Lin 等(2016)研究发现,低盐胁迫 30 d 后,丽文蛤鳃中 TOFAA 浓度显著下降($P<0.05$)。盐度胁迫后,缢蛏体内 TOFAA 的含量随盐度的变化而变化。因为低盐胁迫时,细胞吸水膨胀,FAA 脱氨分解使细胞与周围海水保持等渗,最终细胞内 TOFAA 含量显著下降(Haider *et al.*, 2019)。高盐胁迫时,缢蛏则双壳闭合,细胞失水皱缩,部分蛋白分解成 FAA,使细胞中 TOFAA 含量显著升高,以适应环境的变化(Baker *et al.*, 2007; Matoo, 2013; Fuhrmann *et al.*, 2018)。

在水生动物中,Ala、Gly、Pro、Tau 和 Glu 通常是促进细胞内渗透压和渗透形成过程的主要 FAA,但不同物种的不同组织中起渗透调节作用的 FAA 存在一定的差异(Lee *et al.*, 2004; Hosoi *et al.*, 2008)。研究发现,盐度胁迫时,南美蓝对虾(*Penaeus stylirostris*)(Cobb *et al.*, 19752002)和海蛤(*Macoma balthica*)(Sokolowski *et al.*, 2003)中主要是 Gly 调节细胞内的渗透压,而丽文蛤鳃和外套膜中则是 Tau (Lin *et al.*, 2021)。在美洲牡蛎肌肉中,FAA 占总渗透效应的 20.9%,尤其是 Tau、Ala 和 Gly 的含量随盐度变化显著(Lynch, 1966)。盐度胁迫时,缢蛏鳃、足和血淋巴中分别为 Ala、Gly、Glu、Pro, Ala、Gly、Arg、Tau 和 Ala、Gly、Pro 与外界环境呈正调控,且变化显著($P<0.05$)。Ala 是各组织中含量变化最大的氨基酸,与 Cao 等(2022)在缢蛏鳃中的研究结果一致。Ala 从头合成所需的能量要比其他 FAA 少,体内有多条途径可以合成丙酮酸,再通过谷丙转氨酶合成 Ala (Meng *et al.*, 2013)。Ala 也可通过肌肽合成酶降解成肌肽(Zhao *et al.*, 2016)。因此,认为 Ala 在缢蛏渗透压调节过程中发挥重要作用。

3.2 缢蛏体内 *Sc-CARNS* 基因对盐度的响应

Sc-CARNS 在缢蛏肌肉型组织中表达量高, 其次是鳃。该结果与其他物种的研究结果类似(Everaert *et al.*, 2013; Pan *et al.*, 2022)。肌肉是调动、存储、代谢 FAA 最适合的场所, 是主要的“FAA 库”(Wang *et al.*, 2012)。鳃在调节渗透压和离子转运方面起重要作用, 是水环境发生变化后主要的调节器官(金彩霞等, 2008)。在盐度胁迫后的缢蛏转录组结果中, *Sc-CARNS* 基因的表达也上调(团队成果, 尚未发表), 由此推测, *Sc-CARNS* 基因参与缢蛏渗透压调节过程。

为进一步了解 *Sc-CARNS* 基因及其所在的通路在缢蛏渗透压调节过程发挥的作用, 本研究通过 RT-qPCR 分析发现, 低盐胁迫后, *Sc-CARNS* mRNA 表达量显著增加($P < 0.05$), 高盐时则下降。与太平洋牡蛎 (Meng *et al.*, 2013) 和 菲 律 宾 蛤 仔 (*Ruditapes philippinarum*) (Nie *et al.*, 2017) 中的研究结果一致, 表明低渗条件下丙氨酸的代谢速率显著增加。此时, 缢蛏足中丙氨酸含量随着盐度的升高而升高。肌肽含量在低盐胁迫下升高, 高盐胁迫下降低。与 Koyama 等 (2015) 在日本河蚬中研究结果一致, 低盐时丙氨酸含量降低, 肌肽含量变化则相反。肌肽作为 Ca^{2+} 和 H^{+} 耦合调节剂, 通过直接或间接机制摄取 Ca^{2+} , 发挥调节 Ca^{2+} 水平的作用(Jones *et al.*, 2017)。说明低盐胁迫时, 缢蛏可以通过肌肽合成酶的作用降低体内丙氨酸的含量, 改变 FAA 的总含量, 进而适应环境盐度的变化。为维持体内肌肽含量的平衡, 多余的肌肽会被肌肽酶降解, 再由转运蛋白运到细胞外(潘晨, 2021)。

潘晨(2021)研究发现, 给厚壳贻贝注射 β -丙氨酸后, 体内肌肽合成酶的活性出现上调。肌肽含量显著上升, 是对照组的 2.87 倍。同时, 部分氨基酸含量发生变化, 具体表现为丙氨酸含量上升和半胱氨酸含量下降(王春月, 2021)。本研究通过对正常盐度条件下缢蛏的 *Sc-CARNS* 基因进行干扰, 0~96 h 缢蛏足中 *Sc-CARNS* 表达量和肌肽含量均先上升后降低, 丙氨酸含量均先下降后上升。表明 *Sc-CARNS* 基因的变化会影响丙氨酸和肌肽的含量, 肌肽合成酶是丙氨酸降解成肌肽的关键酶, 是盐胁迫后影响丙氨酸代谢速率的限速因子。在干扰 *Sc-CARNS* 后, 缢蛏的收缩功能受损, 伴随细胞内 Ca^{2+} 降低, Ca^{2+} 去除能力减慢, 调节离子浓度的能力减弱, 影响渗透调节过程(Brownlee *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2017; Gonçalves *et al.*, 2021)。

为进一步验证 *Sc-CARNS* 基因的功能, 通过对低盐胁迫下 *Sc-CARNS* 基因进行干扰, 24~96 h 缢蛏足

中 *Sc-CARNS* 表达量和肌肽含量均先上升后降低, 丙氨酸含量均先下降后上升。干扰 48 h 时, 符合丙氨酸与肌肽 1:1 的转化关系, 结果再次验证, *Sc-CARNS* 基因会影响缢蛏体内丙氨酸的含量, 认为 *Sc-CARNS* 基因在低盐胁迫下的渗透压调节过程中发挥重要作用。

4 结 论

本研究表明, 缢蛏属于渗透压随变者, 体内渗透压会随着外界环境的变化而变化。缢蛏鳃、足和血淋巴中 TOFAA 都随着盐度的升高而升高, 其中 Ala 含量变化幅度最大, 因此, Ala 是盐度变化时缢蛏体内调节渗透压的主要 FAA。通过对 *Sc-CARNS* 基因功能的研究, 初步明确了 *Sc-CARNS* 基因在缢蛏盐度适应过程中的作用, 表明丙氨酸代谢为肌肽是低盐胁迫时缢蛏体内丙氨酸含量降低的重要途径之一, 是缢蛏适应盐度应激的方式之一。后续可以通过补充丙氨酸协助缢蛏适应环境盐度的变化, 为其他物种研究 FAA 在渗透调节中的作用及氨基酸代谢通路提供基础参考, 为水生双壳动物在受到盐度胁迫后的环境适应性调控机制提供基础数据。

参 考 文 献

- AHMAD S, JIANG L, ZHENG S, *et al.* Silencing of a putative alanine aminotransferase (ALT) gene influences free amino acid composition in hemolymph and fecundity of the predatory bug, *Cyrtorhinus lividipennis* Reuter. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2021, 108(2): e21836
- BAKER S, HOOVER E, STURMER L. The role of salinity in hard clam aquaculture. IFAS Extension, University of Florida, 2007, 1-8
- BAYE E, UKROPEC J, COURTEN M, *et al.* Carnosine supplementation reduces plasma soluble transferrin receptor in healthy overweight or obese individuals: A pilot randomised trial. Amino Acids, 2019, 51(1): 73-81
- BROWNLEE C, GODDARD H, HETHERINGTON A M, *et al.* Specificity and integration of responses: Ca^{2+} as a signal in polarity and osmotic regulation. Journal of Experimental Botany, 1999, 50: 1001-1011
- CAI X Y, ZHANG X M, TIAN L, *et al.* Effect of salinity stress on hemolymph osmolality and gill $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase activity of juvenile ark shell (*Anadara broughtonii*). South China Fisheries Science, 2015, 11(2): 12-19 [蔡星媛, 张秀梅, 田璐, 等. 盐度胁迫对魁蚶稚贝血淋巴渗透压及鳃 $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATP 酶活性的影响. 南方水产科学, 2015, 11(2): 12-19]
- CAO W, BI S Q, CHI C F, *et al.* Effects of high salinity stress on the survival, gill tissue, enzyme activity and free amino acid

- content in razor clam *Sinonovacula constricta*. *Frontiers in Marine Science*, 2022, 9: 839614
- CAO W, CHI C F, DONG Y H, *et al.* Effects of high salt stress on survival and enzyme activities of *Sinonovacula constricta* juvenile. *Marine Sciences*, 2022, 46(7): 44–51 [曹伟, 迟长风, 董迎辉, 等. 高盐胁迫对缢蛏幼贝存活和三种酶活性的影响. *海洋科学*, 2022, 46(7): 44–51]
- CHEN D W, SU J, LIU X L, *et al.* Taste evaluation of non-volatile taste compounds in bivalve mollusks from Beibu Gulf, Guangxi. *Food Science*, 2012, 33(10): 165–168 [陈德慰, 苏键, 刘小玲, 等. 广西北部湾3种贝类中主要呈味物质的测定及呈味作用评价. *食品科学*, 2012, 33(10): 165–168]
- CHEN M X, LAI Q F, ZHOU K, *et al.* Effects of salinity on survival of Razor Clam *Sinonovacula constricta* under salinity acclimation, feeding and starvation. *Chinese Journal of Fisheries*, 2021, 34(6): 31–35 [陈牧霞, 来琦芳, 周凯, 等. 盐度驯化、投喂和饥饿条件下盐度对缢蛏存活的影响. *水产学杂志*, 2021, 34(6): 31–35]
- CHENG J H, LIAO I C. Effect of salinity on the osmotic and ionic concentrations in the hemolymph of *Penaeus monodon* and *P. penicillatus*. *Asian Fisheries Forum*, Manila (Philippines), 1986, 26–31
- COBB B F, CONTE F S, EDWARDS M A. Free amino acids and osmoregulation in penaeid shrimp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1975, 23(6): 1172–1174
- DING H B, LI H Y, CHEN Y H, *et al.* Effects of high salinity on growth and survival, Na^+/K^+ -ATPase activity and energy metabolism related indexes of razor clam *Sinonovacula constricta*. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2022, 31(4): 831–838 [丁红兵, 李浩宇, 陈义华, 等. 高盐对缢蛏生长存活、 Na^+/K^+ -ATPase活性及能量代谢相关指标的影响. *上海海洋大学学报*, 2022, 31(4): 831–838]
- DROZAK J, VEIGA-DA-CUNHA M, VERTOMMEN D, *et al.* Molecular identification of carnosine synthase as ATP-grasp domain-containing protein 1 (ATPGD1). *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(13): 9346–9356
- EVERAERT I, DENAEYER H, TAES Y, *et al.* Gene expression of carnosine-related enzymes and transporters in skeletal muscle. *European Journal of Applied Physiology*, 2013, 113(5): 1169–1179
- FU P, LÜ J J, LIU P, *et al.* Effects of different salinities on the free amino acids composition in the gill of *Portunus trituberculatus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 122–126 [付萍, 吕建建, 刘萍, 等. 盐度胁迫对三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)鳃中游离氨基酸含量的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(5): 122–126]
- FU P, LÜ J J, LIU P, *et al.* Effects of different salinity level on free amino acid composition in muscle and hemolymph of the swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(3): 374–381 [付萍, 吕建建, 刘萍, 等. 盐度胁迫对三疣梭子蟹肌肉和血淋巴中游离氨基酸含量的影响. *水产学报*, 2017, 41(3): 374–381]
- FUHRMANN M, DELISLE L, PETTON B, *et al.* Metabolism of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* influenced by salinity and modulates survival to the Ostreid herpesvirus OsHV-1. *Biology Open*, 2018, 7: bio028134
- GAO X L, LI Y, LI X, *et al.* The response and osmotic pressure regulation mechanism of *Haliotis discus hannai* (Mollusca, Gastropoda) to sudden salinity changes. *Hydrobiologia*, 2017, 795(1): 181–198
- GONÇALVES L D S, SALES L P, SAITO T R, *et al.* Histidine dipeptides are key regulators of excitation-contraction coupling in cardiac muscle: Evidence from a novel CARNIS1 knockout rat model. *Redox Biology*, 2021, 44, 102016
- HAIDER F, SOKOLOV E P, TIMM S, *et al.* Interactive effects of osmotic stress and burrowing activity on protein metabolism and muscle capacity in the soft shell clam *Mya arenaria*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2019, 228: 81–93
- HOSOI M, KUBOTA S, TOYOHARA M, *et al.* Effect of salinity change on free amino acid content in Pacific oyster. *Fisheries Science*, 2003, 69(2): 395–400
- HOSOI M, YOSHINAGA Y, TOYOHARA M, *et al.* Freshwater bivalve *Corbicula sandai* uses free amino acids as osmolytes under hyperosmotic condition. *Fisheries Science*, 2008, 74(6): 1339–1341
- HUANG K, JIANG H C, WU H Y, *et al.* Salinity responses of free amino acids in the muscle of *Litopenaeus vannamei*. *Marine Fisheries*, 2010, 32(4): 422–426 [黄凯, 蒋焕超, 吴宏玉, 等. 盐度对凡纳滨对虾肌肉中游离氨基酸含量的影响. *海洋渔业*, 2010, 32(4): 422–426]
- HUO Z M, WANG Z P, LIANG J, *et al.* Effects of salinity on embryonic development, survival, and growth of *Crassostrea hongkongensis*. *Journal of Ocean University of China*, 2014, 13(4): 666–670
- JIANG S, XU Q H. Influence of salinity stress on the activity of gill Na^+/K^+ -ATPase in swimming crab (*Portunus trituberculatus*). *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(10): 1475–1480 [江山, 许强华. 盐度胁迫对三疣梭子蟹鳃 Na^+/K^+ -ATPase酶活的影响. *水产学报*, 2011, 35(10): 1475–1480]
- JIN C X, PAN L Q. Preliminary studies on physiological adaptive mechanism of *Procambarus clarkii* osmoregulation under different ambient salinities. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, 32(6): 894–899 [金彩霞, 潘青. 盐度变化对克氏原螯虾渗透调节影响机制的初步研究. *水生生物学报*, 2008, 32(6): 894–899]
- JONES R, BARNETT C, DAVIDSON J, *et al.* β -alanine supplementation improves in-vivo fresh and fatigued skeletal muscle relaxation speed. *European Journal of Applied Physiology*, 2017, 117(5): 867–879
- KONG X H, WANG S S, DONG Y H, *et al.* Analysis of

- expression characteristics of related genes in response to acute thermal stress in the razor clam *Sinonovacula constricta*. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(2): 194–203 [孔祥辉, 王莎莎, 董迎辉, 等. 缢蛏急性高温胁迫应答主要候选基因的表达特征分析. *渔业科学进展*, 2022, 43(2): 194–203]
- KOYAMA H, OKAMOTO S, WATANABE, *et al.* Dynamic changes in the accumulation of metabolites in brackish water clam *Corbicula japonica* associated with alternation of salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, 181: 59–70
- LEE N H, HAN K N, CHOI K S. Effects of salinity and turbidity on the free amino acid composition in gill tissue of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research*, 2004, 23(1): 129–133
- LI D Q, ZHOU Q, CHENG B S, *et al.* Determination of osmotic potential of plant cell fluid by freezing point lowering method - Principle and application technology of FM-4 freezing point osmometer. *Shandong Agricultural Sciences*, 1988(1): 42–45 [李德全, 邹琦, 程炳嵩, 等. 利用冰点降低法测定植物细胞液的渗透势——FM-4 型冰点渗透压计的原理及使用技术. *山东农业科学*, 1988(1): 42–45]
- LI E C, ARENA L, CHEN L Q, *et al.* Characterization and tissue-specific expression of the two glutamate dehydrogenase cDNAs in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Crustacean Biology*, 2009, 29(3): 379–386
- LI M, ZHENG Y N, XU K L, *et al.* Effects of salinity stress on survival rate of *Tegillarca granosa* and enzyme activity. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 2018, 59(4): 650–653, 657 [李敏, 郑伊诺, 许凯伦, 等. 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*, 2018, 59(4): 650–653, 657]
- LIANG M Q, WANG S W, WANG J L, *et al.* Effects of different salinities on free amino acid composition in muscle and hemolymph of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(2): 34–39 [梁萌青, 王士稳, 王家林, 等. 不同盐度对凡纳滨对虾血淋巴及肌肉游离氨基酸组成的影响. *渔业科学进展*, 2009, 30(2): 34–39]
- LIN C H, YEH P L, LEE T H. Ionic and amino acid regulation in hard clam (*Meretrix lusoria*) in response to salinity challenges. *Frontiers in Physiology*, 2016, 7, DOI: 10.3389
- LIN C H, YEH P L, LEE T H. Time-course changes in the regulation of ions and amino acids in the hard clam *Meretrix lusoria* upon lower salinity challenge. *Journal of Experimental Zoology Part A, Ecological and Integrative Physiology*, 2021, 335(7): 602–613
- LIN G L. *Sinonovacula constricta* pond culture technology. *Agricultural Engineering Technology*, 2016, 36(23): 60 [林国兰. 缢蛏池塘养殖技术. *农业工程技术*, 2016, 36(23): 60]
- LU J, WANG G D, WANG R M, *et al.* Advances in microbial synthesis of alanine. *Food and Fermentation Industries*, 2023, 49(5): 299–305 [陆捷, 王国栋, 王瑞明, 等. 丙氨酸制备研究进展. *食品与发酵工业*, 2023, 49(5): 299–305]
- LYNCH M P, WOOD L. Effects of environmental salinity of free amino acids of *Crassostrea virginica* gmelin. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1966, 19(4): 783–790
- MA J W, LÜ J J, LIU P, *et al.* Effects of abrupt salinity stress on serum osmolarity and ion concentration of “Huangxuan No.1” *Portunus trituberculatus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(1): 58–62 [马金武, 吕建建, 刘萍, 等. 急性盐度胁迫对三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)“黄选 1 号”血清渗透压及离子含量的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(1): 58–62]
- MAAR M, SAUREL C, LANDES A, *et al.* Growth potential of blue mussels (*M. edulis*) exposed to different salinities evaluated by a dynamic energy budget model. *Journal of Marine Systems*, 2015, 148: 48–55
- MANHIANI P S, NORTH CUTT J K, HAN I, *et al.* Antioxidant activity of carnosine extracted from various poultry tissues. *Poultry Science*, 2013, 92(2): 444–453
- MATOO O B. Interactive effects of ocean acidification and multiple stressors on physiology of marine bivalves. *Dissertation of University of North Carolina at Charlotte*, 2013
- MATSUSHIMA O, HAYASHI Y S. Metabolism of D- and L-alanine and regulation of intracellular free amino acid levels during salinity stress in a brackish-water bivalve *Corbicula japonica*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1992, 102(3): 465–471
- MAY M A, BISHOP K D, RAWSON P D. NMR profiling of metabolites in larval and juvenile blue mussels (*Mytilus edulis*) under ambient and low salinity conditions. *Metabolites*, 2017, 7(3): 33
- MENG J, ZHU Q H, ZHANG L L, *et al.* Genome and transcriptome analyses provide insight into the euryhaline adaptation mechanism of *Crassostrea gigas*. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58563
- NIE H T, JIANG L W, CHEN P, *et al.* High throughput sequencing of RNA transcriptomes in *Ruditapes philippinarum* identifies genes involved in osmotic stress response. *Scientific reports*, 2017, 7(1): 4953
- PAN C, LIAO Z, HE J Y, *et al.* Carnosine concentration and expression profiles of carnosine related genes in *Mytilus* after beta-alanine injection. *Journal of Oceanology Limnology*, 2022, 40(3): 1121–1134
- PAN C. Transcriptome analysis and expression of genes related to carnosine metabolism in *Mytilus coruscus*. Master's Thesis of Zhejiang Ocean University, 2021 [潘晨. 厚壳贻贝肌肽代谢相关基因的表达研究及转录组分析. *浙江海洋大学硕士研究生学位论文*, 2021]
- PENG M X. Study on tolerance of Chinese razor clam (*Sinonovacula constricta*) to important water environmental factors in inland waters. *Doctoral Dissertation of Shanghai Ocean University*, 2020 [彭茂潇. 缢蛏对内陆水域重要水

- 环境因子耐受性研究. 上海海洋大学博士研究生学位论文, 2020]
- PÉQUEUX A. Osmotic regulation in crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*, 1995, 15(1): 1–60
- POURMOZAFFAR S, JAHROMI S T, Rameshi H, *et al.* The role of salinity in physiological responses of bivalves. *Reviews in Aquaculture*, 2020, 12(3): 1548–1566
- RAN Z S, CHEN H, RAN Y, *et al.* Fatty acid and sterol changes in razor clam *Sinonovacula constricta* (Lamarck 1818) reared at different salinities. *Aquaculture*, 2017, 473: 493–500
- SOKOLOWSKI A, WOLOWICZ M, HUMMEL H. Free amino acids in the clam *Macoma balthica* L. (Bivalvia, Mollusca) from brackish waters of the southern Baltic Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology: Part A Molecular and Integrative Physiology*, 2003, 134(3): 579–592
- WANG C Y. Determination of histidine-containing dipeptides in marine organisms and carnosine-related metabolomes analysis of *Mytilus coruscus*. Master's Thesis of Zhejiang Ocean University, 2021 [王春月. 海洋生物组氨酸二肽分析及贻贝肌肽相关代谢组研究. 浙江海洋大学硕士研究生学位论文, 2021]
- WANG Y R, LI E C, YU N, *et al.* Characterization and expression of glutamate dehydrogenase in response to acute salinity stress in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37316
- WANG Y. Effects of exogenous carnosine and ethionine on tall fescue under salt stress. Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2016 [王岩. 外源肌肽和乙硫氨酸对高羊茅耐盐性的影响. 南京农业大学硕士研究生学位论文, 2016]
- XU X, HE L, LIN Z H, *et al.* Effects of salinity stress on V-ATPase H expression, enzyme activity and osmotic pressure in *Sinonovacula constricta*. *Chinese Journal of Zoology*, 2020, 55(5): 606–613 [徐娴, 何琳, 林志华, 等. 盐度胁迫下缢蛏渗透压变化及 V-ATPase H 基因的表达分析. 动物学杂志, 2020, 55(5): 606–613]
- YANAS K, FUNAGUCHI N, IIHARA H, *et al.* Prevention of radiation esophagitis by polaprezinc (zinc L-carnosine) in patients with non-small cell lung cancer who received chemoradiotherapy. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2015, 8(9): 16215–16222
- ZHANG D, WANG F, DONG S L. Effects of periodic salinity fluctuations on free amino acid contents and transcription patterns of osmo-related genes in *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(5): 1130–1136 [张丹, 王芳, 董双林. 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. 中国水产科学, 2016, 23(5): 1130–1136]
- ZHANG H, SUN G G, LIN Z H, *et al.* The razor clam *Sinonovacula constricta* uses the strategy of conversion of toxic ammonia to glutamine in response to high environmental ammonia exposure. *Molecular Biology Reports*, 2020, 47(12): 9579–9593
- ZHANG S P, QIU W Q, LU Q, *et al.* Determination of glutathione and free amino acids in muscles of four shellfish species by automatic amino acid analyzer. *Food Science*, 2017, 38(4): 170–176 [张苏平, 邱伟强, 卢祺, 等. 全自动氨基酸分析仪法测定 4 种贝类肌肉中谷胱甘肽和游离氨基酸含量. 食品科学, 2017, 38(4): 170–176]
- ZHAO D T, LIU Y, ZHAO Y, *et al.* Effect of carnosine on oxidative stress and NF- κ B signaling pathway in hippocampus of diabetic rats. *Chinese Journal of Clinical Anatomy*, 2018, 36(5): 514–519 [赵丹婷, 刘影, 赵艳, 等. 肌肽对糖尿病大鼠海马中氧化应激及 NF- κ B 信号通路的影响. 中国临床解剖学杂志, 2018, 36(5): 514–519]
- ZHAO X L, YU H, KONG L F, *et al.* High throughput sequencing of small RNAs transcriptomes in two *Crassostrea oysters* identifies microRNAs involved in osmotic stress response. *Scientific Reports*, 2016, 6: 22687

(编辑 马瑾艳)

Effects of Salinity Stress on Osmotic Pressure, Free Amino Acid Levels, and the Carnosine Synthetase Gene of *Sinonovacula constricta*

AN Siqi¹, HE Lin^{1①}, FAN Jianxun², YUAN Julin³, LIN Zhihua¹

(1. College of Biological & Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China;

2. Sanmen County Aquatic Technology Extension Station, Sanmen 317199, China;

3. Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313098, China)

Abstract *Sinonovacula constricta* is one of the four traditional cultured shellfish in China. The salinity in the aquaculture water body is easily affected by tides, seasonal rainfall, and high temperatures, and often fluctuates to different degrees. This affects the physiological activities of *S. constricta* and causes a series of changes in the structure of the osmoregulation organs, osmotic pressure, ion transport, and free amino acid (FAA) content in the body to adapt to the changes in environmental salinity. Aquatic animals can regulate cell volume and maintain osmotic pressure balance through FAAs. This mechanism has been proven in aquatic animals, such as *Meretrix lusoria*, *Crassostrea gigas*, *Haliotis discus hannai*, *Penaeus vannamei*, and *Portunus trituberculatus*. The common FAAs that regulate osmotic pressure in bivalves mainly include Ala, Gly, Pro, and Tau. Whether FAAs play an osmoregulation role in *S. constricta*, whether their involvement in osmoregulation is similar to that in other shellfish, and what the metabolic pathway is of main FAAs deserve further study. This study explored the changes of osmotic pressure and FAAs in the gill, foot, and hemolymph of *S. constricta* after salinity stress and analyzed the sequence characteristics, tissue expression, and mRNA expression characteristics after salinity stress and RNA interference (RNAi) of the *Sc-CARNS* gene, and the changes of alanine and carnosine contents. The osmotic pressure and FAA contents in the gills, foot, and hemolymph of *S. constricta* under different salinities (5, 20, and 35) were measured by freezing point osmometer and automatic amino acid analyzer. At the same time, the expression of the *Sc-CARNS* gene in the foot under different salinities (5, 20, and 35) was analyzed by RT-qPCR and RNAi technology. The content of alanine was determined with the shellfish alanine ELISA kit. The content of carnosine was determined by phthalaldehyde colorimetry. The results showed that the osmotic pressure in the gills, foot, and hemolymph of *S. constricta* significantly decreased within 1–72 h under low salt stress ($P < 0.05$), while under high salt stress, the osmotic pressure in the gills, foot, and hemolymph reached a steady state within 24 h, which was consistent with the osmotic pressure of external seawater. Compared with the control group, the osmotic pressure in the gills, foot, and hemolymph decreased by 66.7%, 69.7%, and 71.6%, respectively, when the salinity was low. The wet weight of tissues was then increased by 68.3%, 67.5%, and 70.2%, respectively. At the same stress time, the osmotic pressure of each group of *S. constricta* was salinity 35 > salinity 20 > salinity 5. Under normal salinity, the FAAs with the highest content in the gills, foot, and hemolymph of *S. constricta* were Gly, Arg, and Gly, respectively. After salinity stress, the content of total free amino acids in all tissues increased significantly with the increase of salinity. The main FAAs with the largest content change in the gills, foot, and hemolymph, respectively, were Ala, Gly, Glu, and Pro; Ala, Gly, Arg, and Tau; and Ala, Ser, Thr, and Gly. Ala was the most variable FAA in all tissues. According to the transcriptome results of *S. constricta* after salinity stress, it was speculated that *Sc-CARNS* is related to

① Corresponding author: HE Lin, E-mail: hlwithyou@qq.com

osmotic regulation. The expression of *Sc-CARNS* was the highest in the muscle type tissues of *S. constricta*, followed by the gills, and was the lowest in the hepatopancreas. After low salt stress, the expression of the *Sc-CARNS* gene mRNA in *S. constricta* increased at first and then decreased with the stress time, and was significantly higher than that in the control group after 4 h of stress ($P < 0.01$), and reached the peak at 24 h. The content of alanine decreased significantly with time, and the content of carnosine increased significantly with time ($P < 0.05$). After high salt stress, the expression of *Sc-CARNS* decreased, and there was no significant change compared with the control group. The content of alanine first increased, then decreased, and then increased after 8 h, and was not lower than that of the control group. The content of carnosine showed a decreasing trend after 24 h. After RNAi, the expression level of *Sc-CARNS* mRNA in the interference group decreased first and then increased with the interference time under normal salinity. At 24 and 48 h, the expression level of *Sc-CARNS* mRNA was significantly lower than that of negative control ($P < 0.05$), and the interference efficiency was 24% and 69%, respectively. The interference efficiency at 48 h was the highest. In the interference group, the content of alanine first increased and then decreased, and the content of carnosine first decreased and then increased, reaching the maximum at 48 h. Under low salt stress, the expression of *Sc-CARNS* mRNA increased, the content of alanine decreased, and the content of carnosine increased after interference for 0–24 h. After interference for 24 h and 96 h, the mRNA expression of *Sc-CARNS* and the contents of alanine and carnosine did not change significantly in control group and diethyl pyrocarbonate treated water. The expression level of *Sc-CARNS* mRNA in the interference group first decreased and then increased with the interference time, the content of alanine first increased and then decreased with time, and the content of carnosine first decreased and then increased. At 48 h, the expression of *Sc-CARNS* mRNA and the content of carnosine were significantly decreased, and the content of alanine was significantly increased. The results showed that *S. constricta* has a variable osmotic pressure. Ala as a FAA *in vivo* contributed the most to osmotic regulation. Moreover, carnosine synthetase was the key enzyme for converting alanine to carnosine. This study revealed the key mechanism of osmotic pressure regulation under low salt stress and provided a basis for revealing the unique salinity tolerance mechanism of Solenida shellfish.

Key words *Sinonovacula constricta*; Salinity; Osmotic pressure; Free amino acids; Carnosine synthase