

# 缢蛏(*Sinonovacula constricta*)耐氨氮关联 SNP 验证 及相关基因 *NKA* 在氨氮胁迫下的表达特征分析\*

胡晨馨<sup>1</sup> 吕丽媛<sup>2</sup> 孙改改<sup>1,3</sup> 姚韩韩<sup>1</sup> 林志华<sup>1,2</sup> 董迎辉<sup>2</sup>

(1. 浙江万里学院生物与环境学院 浙江省水产种质资源高效利用技术研究重点实验室 浙江宁波 315100; 2. 浙江万里学院  
宁海海洋生物种业研究院 浙江宁波 315604; 3. 宁波大学海洋学院 浙江宁波 315832)

**摘要** 为筛查和验证缢蛏(*Sinonovacula constricta*)耐氨氮相关单核苷酸多态性(SNP)和基因,为分子标记辅助育种提供参考,通过竞争性等位基因特异性 PCR (KASP)对位于缢蛏 *NKA* 基因(*Sc-NKA*)下游的 SNP (g.21062868T>A)进行验证,采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)和蛋白免疫印迹(WB)检测高氨氮胁迫下 *Sc-NKA* 基因的表达水平,用免疫荧光技术对 *Sc-NKA* 蛋白进行组织细胞定位,通过 RNA 干扰探究 *Sc-NKA* 基因在氨氮排泄中的作用。结果显示,SNP 位点(g.21062868T>A)与氨氮耐受性状显著相关( $P<0.05$ ); *Sc-NKA* 基因在氨氮胁迫后的 mRNA 和蛋白表达量均显著增加( $P<0.05$ ); 缢蛏鳃中的柱状细胞和扁平细胞是 *Sc-NKA* 蛋白分泌的主要部位,且在氨氮胁迫后细胞中的蛋白丰度增加; 干扰 *Sc-NKA* 基因 6~48 h 后,缢蛏血淋巴中氨含量显著升高( $P<0.05$ ),且  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}$  共转运蛋白 1 (*NKCC1*)的 mRNA 表达水平显著降低( $P<0.05$ )。这些研究结果表明, *Sc-NKA* 参与氨氮的排泄过程,且与 *NKCC1* 在氨氮转运中具有协同作用。

**关键词** 缢蛏;  $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{-ATPase}$ ; 氨氮排泄; 基因表达; RNA 干扰

**中图分类号** S968.3; Q953; Q789 **doi:** 10.11693/hyhz20230200033

氨氮是水环境中常见的非生物胁迫因子之一,当水生动物体内氨氮积累到一定程度时会导致组织受损和退化、离子调节失衡、氧化应激、炎症反应、生长减缓和高死亡率(Ren *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2018)。水环境中的氨氮主要有离子态氨( $\text{NH}_4^+$ )和非离子态氨( $\text{NH}_3$ )两种形式,二者可以相互转化,并处于动态平衡,机体内的氨氮大多以  $\text{NH}_4^+$  的形式存在(付莹等, 2018)。由于  $\text{NH}_4^+$  脂溶性极低且可与水结合形成水合离子,不易透过细胞膜,因此水生动物机体内的绝大多数氨氮的跨膜运输是通过各种转运蛋白来实现的(Weiner *et al.*, 2019)。细胞外的氨氮主要通过铵转运体(AMT)和 Rhesus (Rh)糖蛋白促进扩散,也可由  $\text{K}^+$  转运蛋白如  $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{-ATP}$  酶

(*NKA*)、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}$  共转运蛋白(*NKCC*)和  $\text{K}^+$  通道蛋白(*KCN*)等进行跨膜运输(Tresguerres *et al.*, 2020)。有研究表明,钠氢交换蛋白(*NHE*)、囊泡相关蛋白(*VAMP*)以及水通道蛋白(*AQP*)家族的某些成员也可能参与氨的跨膜转运(Walker, 2014)。总之,水生动物具有非常复杂的氨氮运输调控网络,而 *NKA* 是参与氨排泄的重要通道之一。

*NKA* 是一种重要的阳离子泵蛋白,由  $\alpha$  亚基、 $\beta$  亚基及调节亚基组成,其中  $\alpha$  亚基包含阳离子、核苷酸以及配体结合位点(Cao *et al.*, 2021)。*NKA* 可以在 ATP 和  $\text{Mg}^{2+}$  的催化下转运  $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$ ,从而控制细胞质膜上的  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  浓度梯度,维持细胞内外液的渗透压(Čechová *et al.*, 2016)。此外,由于  $\text{NH}_4^+$  在水溶液中

\* 国家自然科学基金项目, 32202918 号; 浙江省水产新品种选育重大科技专项课题, 2021C02069-7 号; 宁波市“科技创新 2025”重大专项, 2021Z114 号, 2019B10005 号。胡晨馨, 硕士研究生, E-mail: 849386918@qq.com

通信作者: 林志华, 博士生导师, 研究员, E-mail: zhishua9988@126.com; 董迎辉, 博士生导师, 教授, E-mail: dongyinghui118@126.com

收稿日期: 2023-02-15, 收修改稿日期: 2023-04-20

具有与  $K^+$  几乎相同的物理特性, 因此  $NH_4^+$  可以取代  $K^+$  通过 NKA 进行跨膜运输 (Tresguerres *et al.*, 2020)。目前, 在印度囊鳃鲷 (*Heteropneustes fossilis*) (Chew *et al.*, 2020)、龟壳攀鲈 (*Anabas testudineus*) (Ip *et al.*, 2012)、首长黄道蟹 (*Metacarcinus magister*) (Martin *et al.*, 2011)、岸蟹 (*Carcinus maenas*) (Fehsenfeld *et al.*, 2016)、克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) (Shen *et al.*, 2021)、鳞砗磲 (*Tridacna squamosa*) (Ip *et al.*, 2015) 和秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) (Adlimoghaddam *et al.*, 2015) 等多种动物中已证明 NKA 参与氨氮的排泄过程。

近年来, 随着贝类基因组信息的丰富、高通量单核苷酸多态性 (SNP) 芯片的开发以及基因分型技术的快速发展, 全基因组关联分析 (genome-wide association study, GWAS) 已广泛应用于贝类生长、抗逆和品质等重要经济性状的遗传位点鉴定。例如, 利用 GWAS 技术, 在虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 中筛选出了 2 个与生长显著关联的 SNP 位点 (Ning *et al.*, 2019), 在皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) 中发掘了 27 个与耐高温性状相关的遗传标记 (Meng *et al.*, 2020), 在长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 中定位了一批与脂肪酸、糖原、锌等营养性状相关的 SNP (Shi *et al.*, 2020)。在耐氨氮关联 SNP 研究方面, Xu 等 (2019) 已用 GWAS 分析在斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 中鉴定出 25 个与耐氨氮性状相关的 SNP 及 7 个候选基因; Lv 等 (2023) 利用 GWAS 分析在缢蛏 (*Sinonovacula constricta*) 中鉴定出 11 个与耐氨氮性状显著相关的 SNP 位点, 并进一步发掘了 5 个关联候选基因, 包括 NKA、 $\beta$ -半乳糖苷酶 (GLBI)、四肽重复蛋白 28 (TTC28)、微管蛋白  $\beta$  (TUBB) 和真核翻译延伸因子 1a (eEF1A)。GWAS 关联的 SNP 位点和候选基因作为重要的遗传标记, 对进一步研究氨氮耐受的分子调控机制和基因组选择育种具有重要意义。

缢蛏是我国重要的海水养殖贝类, 是虾(蟹)-贝混养模式的主要养殖种类, 该养殖系统中的大量残饵、粪便等有机废物会增加底泥中的氨氮含量, 而缢蛏是一种典型的底栖穴居双壳贝类, 其面临的氨氮环境尤为严峻 (Cong *et al.*, 2021; 柴欣如等, 2022)。已有大量研究表明, 缢蛏机体对于过量的氨存在特定的解毒方式和代谢途径 (陈凯锋等, 2020; 张欢等, 2020; Sun *et al.*, 2021; Lv *et al.*, 2022)。本研究对课题组前期通过全基因组关联分析获得的与氨氮耐受性

状显著关联的 SNP 位点 (g.21062868T>A) 进行了验证, 并开展了位点关联基因 NKA 的时间表达谱和蛋白组织定位分析, 探究氨氮胁迫下 NKA 基因在缢蛏鳃中的表达特征, 同时通过检测 NKA 基因干扰后 NKCC1 基因的 mRNA 表达量及血淋巴氨浓度, 探讨 NKA 在缢蛏氨氮排泄中发挥的作用, 为深入研究 NKA 在贝类氨氮解毒过程中的功能及调控机制奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

从宁波市海洋与渔业科技创新基地采集健康的 1 龄缢蛏 [湿重 (15.38±1.84) g, 壳长 (59.36±2.52) mm], 实验前暂养 7 d, 海水盐度为 20±1, pH 值为 8.1±0.1, 温度为 (19.4±0.4) °C。每 12 h 更换 1/2 海水, 每天 08:00 和 18:00 投喂小球藻 (*Chlorella vulgaris*)。

### 1.2 氨氮胁迫实验

在进行氨氮胁迫实验前, 先随机取 6 颗缢蛏的鳃、肝胰腺、肠、足、外套膜、水管和闭壳肌, 液氮速冻后保存于 -80 °C 超低温冰箱中, 用于组织表达分析。参考 Zhang 等 (2020) 缢蛏氨氮急性胁迫 96 h 的半致死浓度 (LC<sub>50</sub>-96 h), 以氨氮浓度 180 mg/L 作为实验组, 并设置对照组 (正常海水)。每组 120 颗缢蛏, 设置三个平行, 即每个平行 40 颗。分别在实验开始后 0、3、6、12、24、48、72 和 96 h 随机采集 6 颗缢蛏, 取其鳃, 液氮速冻完全后, 保存于 -80 °C 超低温冰箱中, 用于实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 和蛋白免疫印迹 (western blotting, WB) 检测。在胁迫 96 h 时, 分别从两组中取 6 颗缢蛏, 剪取鳃组织进行常规石蜡切片和 NKA 蛋白组织定位研究。

### 1.3 耐氨氮性状关联 SNP 位点的验证

选取 180 mg/L 作为缢蛏氨氮胁迫实验的浓度, 每 2 h 对死亡个体进行采样, 实验共持续 180 h, 取 150 颗最早死亡的个体 (氨氮敏感组, SG, 18~96 h) 和死亡率到达约 80% 时剩余的 150 颗存活个体 (氨氮耐受组, TG, 180 h) 的足经液氮速冻后储存在 -80 °C 超低温冰箱中。使用海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒 (TIANGEN, 北京) 提取总 DNA, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性, 并使用 Nano Drop2000 分光光度计 (Thermo Fisher Scientific, 美国) 检测 DNA 浓度。

利用竞争性等位基因特异性 PCR (KASP) 分析技术进行基因分型。使用 PolyMarker 设计 SNP 位点 (g.21062868T>A) 的 KASP 引物 (<http://www.>

polymarker.info/)并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 1)。使用 384 孔板进行 KASP 测定, 反应体系为 10  $\mu$ L, 包括 5  $\mu$ L FLu-Arms 2 $\times$ PCR 混合物、0.5  $\mu$ L KASP 引物混合物、1  $\mu$ L 基因组 DNA (浓度为 20 ng/ $\mu$ L)和 3.5  $\mu$ L 去离子水。PCR 程序在 LightCycler<sup>®</sup> 480II PCR 仪(Roche, 瑞士)中进行, 每次运行均包括非模板对照(NTC)。反应程序为: 94  $^{\circ}$ C, 15 min; 94  $^{\circ}$ C, 20 s, 61  $^{\circ}$ C, 1 min, 共 10 个循环; 94  $^{\circ}$ C, 20 s, 55  $^{\circ}$ C, 1 min, 共 26 个循环。PCR 扩增后使用 Intellifics 软件(LGC Douglas Scientific, 美国)读取每个样本的基因型。

#### 1.4 qRT-PCR 分析

使用 Trizol 法提取总 RNA, 1%琼脂糖电泳检测其完整性, 使用 Nano Drop2000 分光光度计(Thermo Fisher Scientific, 美国)检测 RNA 浓度。使用 PrimeScript<sup>®</sup> RT reagent kit with gDNA eraser (TaKaRa, 日本)合成 cDNA。根据本实验室缙蛭基因组数据库中的 *NKA* (GenBank 登录号: MN052993.1)、*NKCC1* (GenBank 登录号: OQ244851)以及 18S ribosomal RNA (*18S*) (GenBank 登录号: AY695800.2)基因序列(Dong *et al.*, 2020), 通过 Primer Premier 5.0 软件设计 PCR 引物(表 1), 并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。每对引物在进行荧光定量前都通过普通 PCR 验证。使用 LightCycler<sup>®</sup> 480II PCR 仪(Roche, 瑞士)进行 qRT-PCR 反应, 总体系为 20  $\mu$ L, 包括 cDNA 和 ddH<sub>2</sub>O 共 8  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L 上下游引物各 1  $\mu$ L, 2 $\times$ ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (Vazyme, 南京) 10  $\mu$ L。反应程序为: 95  $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 95  $^{\circ}$ C 10 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 1 min, 循环 40 次, 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 运行结束后对 PCR 产物进行溶解曲线分析, 确保只有单一的 PCR 产物得到扩增。选择 *18S* 基因作为内参基因(表 1), 用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算缙蛭 *NKA* 基因(*Sc-NKA*)的相对表达量(Sun *et al.*, 2022)。

#### 1.5 Sc-NKA 多克隆抗体制备及氨氮胁迫后 Sc-NKA 蛋白免疫印迹检测

根据 *Sc-NKA* 基因序列设计引物(表 1), 扩增开放阅读框(ORF)区域。将获得的 PCR 产物连接到 pET-32A(+)-质粒(TaKaRa, 日本), 构建含有 His-tag 的融合蛋白表达重组质粒 pET-32A-Sc-NKA。将阴性 pET-32A 质粒和阳性重组质粒分别转化到大肠杆菌(*Escherichia coli*) Rosetta (DE3)进行原核蛋白表达, 挑选阳性菌体接种至含抗生素的 LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。使用 1 mmol/L IPTG 在 37  $^{\circ}$ C 下诱导 4 h, 收集诱导表达后的菌体重悬并超声, 利

用 Ni-NTA 树脂对蛋白进行纯化。随后将抗原与等体积的佐剂完全乳化后对新西兰白兔进行多点皮下注射。采集全血后进行抗体纯化和 ELISA 测定效价, 并将制备好的抗体保存于-20  $^{\circ}$ C 冰箱中。

利用 RIPA 裂解液(碧云天, 上海)裂解缙蛭鳃组织, 通过总蛋白定量测定试剂盒(南京建成)测定各样品的蛋白浓度, 并用裂解液稀释到同样浓度, 加入 5 $\times$ loading buffer 沸水煮沸 10 min。配置合适浓度的凝胶(12%分离胶和 5%浓缩胶), 等量上样后进行 SDS-PAGE 电泳, 将凝胶中含有的目标蛋白转移到 PVDF 膜上(60 mA, 3 h), 利用 TBST 溶解的 10%脱脂奶粉室温下封闭 1 h。然后分别利用兔抗 Sc-NKA 多克隆抗体(HuaBio, 杭州, 1:500 比例稀释)和兔抗 GAPDH 多克隆抗体(上海生工, 1:3000 比例稀释)在 4  $^{\circ}$ C 下孵育过夜, 再用 HRP 标记的驴抗兔 IgG 在室温下进行二抗孵育(上海生工, 1:2000 比例稀释) 1 h。最后, 将增强化学发光液(ECL)滴加至 PVDF 膜上, 在凝胶成像系统(Bio-Rad, 美国)下观察和拍摄图像。以 GAPDH 作为内参蛋白, 利用 ImageJ2 软件对结果进行灰度值计算(Sun *et al.*, 2022)。

#### 1.6 Sc-NKA 蛋白免疫荧光检测

鳃样品用 4%多聚甲醛固定, 然后在梯度乙醇(50%、70%、80%、90%、100%)中脱水, 置于二甲苯中透明, 石蜡包埋切片(厚度为 4  $\mu$ m)。将烤片后的组织切片用二甲苯脱蜡, 梯度乙醇复水, 置于 0.01 mol/L 柠檬酸钠溶液中进行抗原修复; 用 5%牛血清白蛋白(BSA, 生工生物工程, 上海)室温封闭 1 h, 甩干后滴加兔抗 Sc-NKA 多克隆抗体(HuaBio, 杭州, 1:400 比例稀释)于 4  $^{\circ}$ C 湿盒中孵育过夜; 滴加 FITC 标记的驴抗兔 IgG 二抗(1:150 比例稀释)室温避光孵育 1 h; 滴加 DAPI 染色液(碧云天, 上海)对细胞核进行染色, 在 Eclipse 80i 荧光显微镜(Nikon, 日本)下观察并拍摄鳃组织。

#### 1.7 RNA 干扰实验

*Sc-NKA* 和阴性对照(NC, 非特异性的 siRNA 对照)的 siRNA 序列由生工生物工程(上海)股份有限公司制备(表 1, 利用无 RNase 水将干扰链配制成 0.22  $\mu$ g/ $\mu$ L)。将 240 颗缙蛭随机分为氨氮胁迫组(AG, 180 mg/L)和对照组(CG, 正常海水), 使用 50  $\mu$ L 微量进样器将 siRNA-*NKA* 干扰链、NC 链及无 RNase 水(空白对照) 18.45  $\mu$ L 分别注射到两组 40 颗缙蛭的闭壳肌中。在注射后 0、6、12、24 和 48 h 随机收集各缸中 6 颗缙蛭, 采集其鳃和血淋巴用于 qRT-PCR 检测和血氨浓度测定。

表 1 本实验所用引物及其序列  
Tab.1 Primers and their sequences used in this study

引物名称	序列(5'~3')	用途
<i>Sc-NKA-F</i>	CACACCACCGAAAACTAC	实时荧光定量 PCR
<i>Sc-NKA-R</i>	AGGCAACAAAACAGAGAA	
<i>Sc-NKCCI-F</i>	ATGTCTGGTGGCTCTTTG	
<i>Sc-NKCCI-R</i>	GAACTCCTGCTTGCTCTG	
<i>18S-F</i>	TCGTTTCTATTGCGTTGGTTTT	
<i>18S-R</i>	CAGTTGGCATCGTTTATGGTCA	
<i>Sc-NKA-F1</i>	CCATGGGGATCCTGTAGCGATAAAACC	构建重组质粒
<i>Sc-NKA-R1</i>	AAGCTTCTCGAGTGCACGATACTGATC	
siRNA- <i>NKA-F</i>	GCUUUGGAUUGGUGCCAUUTT	RNA 干扰
siRNA- <i>NKA-R</i>	AAUGGCACCAAUCCAAAGCTT	
NC-F	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	
NC-R	ACGUGACACGUUCGGAGAATT	
<i>Sc-NKA-SNP-F1</i>	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAAATACATGTATCAACTTGACGCTA	SNP 验证
<i>Sc-NKA-SNP-F2</i>	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAATACATGTATCAACTTGACGCTT	
<i>Sc-NKA-SNP-R</i>	AGTAAAGTCTTTAAAATTACATAATCAGT	

## 1.8 血氨浓度测定

依据血氨测定试剂盒(A086-1-1, 南京建成)说明书检测样品反应后的吸光值。其原理主要是用蛋白质沉淀剂将血清中的蛋白沉淀以抑制酶活性, 防止游

离氨产生, 并去除大部分干扰呈色的物质。通过 Berthelot 反应在 630 nm 处测定吸光值, 与标准溶液比较计算血淋巴中的氨浓度。根据公式计算样品中的血氨浓度:

$$\text{血氨浓度}(\mu\text{mol/L}) = \frac{\text{测定OD值} - \text{空白OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \text{标准品浓度} \times \text{稀释倍数} \quad (1)$$

## 1.9 数据分析

使用 SPSS 26.0 软件进行单因素方差分析(ANOVA),  $P < 0.05$  表示差异显著,  $P < 0.01$  表示差异极显著, 所有实验数据均以平均值 $\pm$ 标准差(SD)表示。用卡方( $\chi^2$ )检验计算 SNP 位点在 SG 组和 TG 组间基因型频率的差异。使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行绘图。

状进行关联分析, 分别在 TG 组和 SG 组中检测到 148 和 150 个荧光信号。分析结果表明, 该 SNP 位点存在 3 种基因型, 其中纯合子 TT 为优势基因型, 在 TG 组有 92 个个体, SG 组有 74 个个体, 在两组中的基因型频率分别为 62.16%和 49.33%; 杂合子 TA 在 TG 组有 18 个个体, SG 组有 37 个个体, 在两组中的基因型频率分别为 12.16%和 24.67%; 纯合子 AA 在 TG 组有 38 个个体, SG 组有 39 个个体, 在两组中的基因型频率分别为 25.68%和 26.00%。对 TG 组和 SG 组的基因型频率进行卡方检验后发现, 该 SNP 位点在两组间差异显著( $P < 0.05$ ) (表 2)。

## 2 结果

### 2.1 耐氨性状关联 SNP 位点的验证与分析

应用 KASP 分析方法在验证群体中对 SNP 位点(g.21062868T>A)进行基因分型, 并与缙蛭耐氨性状

表 2 TG 和 SG 组 SNP 基因型频率的比较  
Tab.2 Comparison in genotype frequency of the SNP between the TG and SG groups

位点	基因型	数量/基因型频率/(%)		$\chi^2/P$ -value	等位基因	等位基因频率/%		突变类型	
		TG	SG			TG	SG		
g.21062868T>A	TT	92/62.16	74/49.33	8.515/0.014*	T	68.24	61.66	颠换	
	TA	18/12.16	37/24.67			A	31.76		38.34
	AA	38/25.68	39/26.00						

注:  $n=150$ ; \*表示氨氮耐受组(TG)与氨氮敏感组(SG)组之间基因型频率差异显著( $P < 0.05$ )

### 2.2 *Sc-NKA* 基因对氨氮胁迫的响应

利用 qRT-PCR 和 WB 技术检测了 *Sc-NKA* 基因在缢蛏不同组织中的表达量以及在氨氮胁迫下鳃中 mRNA 和蛋白的表达水平。结果显示, *Sc-NKA* 基因在鳃、肝胰腺、肠、足、外套膜、水管和闭壳肌中均有表达, 且在鳃组织中的表达量最高( $P<0.05$ ), 其次是肠和肝胰腺, 在外套膜、闭壳肌和足中的表达量最低(图 1a)。在 180 mg/L 的高氨胁迫后, 鳃中 *Sc-NKA* 基因 mRNA 表达水平在 6~48 h 相比 0 h 显著升高( $P<0.05$ ), 总体呈现先升高后降低的趋势, 且在 24 h 达到最大值, 约为 0 h 的 2 倍(图 1b)。通过对 *Sc-NKA* 蛋白印迹灰度值分析发现, WB 的结果与 qRT-PCR 基本一致(图 1c)。

### 2.3 *Sc-NKA* 蛋白的组织细胞定位

缢蛏的鳃丝由单层上皮细胞(柱状细胞和扁平细胞)以及其围绕的血腔组成。DAPI 染色显示, 鳃组织纤毛处含有大量排列整齐的单层柱状细胞, 而靠近鳃内腔的约一半区域为扁平细胞。免疫荧光结果显示, *Sc-NKA* 在鳃组织的柱状细胞和扁平细胞中均有表达(FITC 绿色荧光信号), 且其在柱状细胞中的荧光信号强于其他部位。同时, 与 CG 组相比, TG 组表现出

更强烈的阳性信号(图 2)。

### 2.4 *Sc-NKA* 基因 RNA 干扰对 *NKCC1* 基因表达和血氨含量的影响

利用 RNAi 技术检测了 *Sc-NKA* 基因表达受到抑制后对 *NKCC1* 基因表达和血氨含量的影响。qRT-PCR 结果表明, 注射 siRNA-*NKA* 干扰链 6、12、24 和 48 h 后, AG 组和 CG 组 *Sc-NKA* 的 mRNA 表达水平显著下调( $P<0.05$ ), 其中 AG 组干扰效率分别为 23%、84%、83%和 80%, CG 组分别为 33%、78%、85%和 79% (图 3a, 3b)。对 *Sc-NKA* 基因的干扰影响了 *Sc-NKCC1* 的 mRNA 表达水平。在 12~48 h, AG 和 CG 两组中 siRNA-*NKA* 实验组的 *Sc-NKCC1* 表达量相较阴性和空白对照组均显著降低( $P<0.05$ ), 其中 AG 组在 12、24 和 48 h 分别下降 37%、99%和 99%, CG 组分别下降 44%、80%和 95%。同时, 整个干扰实验期间 siRNA-*NKA* 实验组的 *Sc-NKCC1* mRNA 表达水平总体呈现下降趋势, 与 *Sc-NKA* 的表达量变化趋势一致(图 3c, 3d)。

使用血氨测定试剂盒测定 *Sc-NKA* 基因 RNAi 后缢蛏血淋巴中的氨浓度。结果表明, AG 组和 CG 组的 siRNA-*NKA* 实验组中血氨浓度在 6~48 h 均显

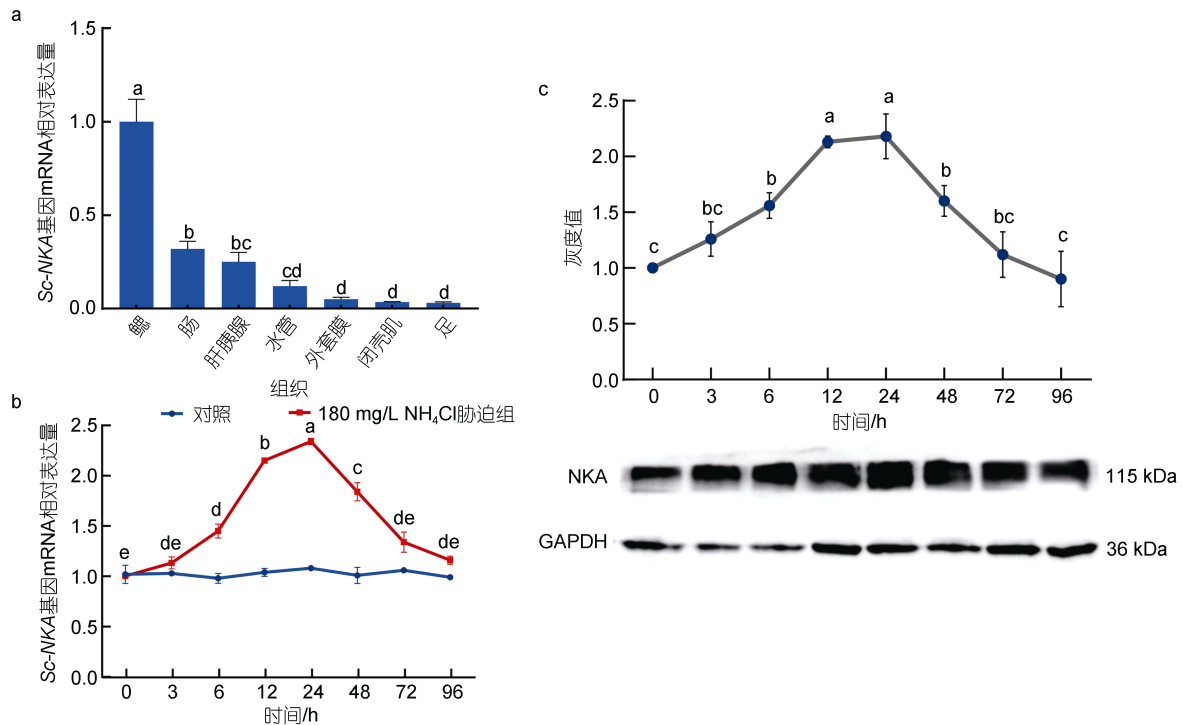


图 1 缢蛏 *Sc-NKA* 基因的组织表达分析及在氨氮胁迫下鳃中 mRNA 和蛋白的表达变化

Fig.1 Expression of *Sc-NKA* in different tissues and the mRNA and protein expression in the gill of *S. constricta* under ammonia stress  
注: a. *Sc-NKA* 基因 mRNA 在缢蛏不同组织中的表达分析; b. 180 mg/L 氨氮胁迫 96 h 后鳃组织中 *Sc-NKA* mRNA 的表达分析; c. 180 mg/L 氨氮胁迫下鳃组织中 *Sc-NKA* 和 GAPDH 的表达分析。*Sc-NKA* 蛋白的相对表达由目标蛋白/GAPDH 的灰度值得到。数值表示为平均值±标准差(n=6); 使用单因素方差分析, 不同小写字母间存在显著差异( $P<0.05$ )

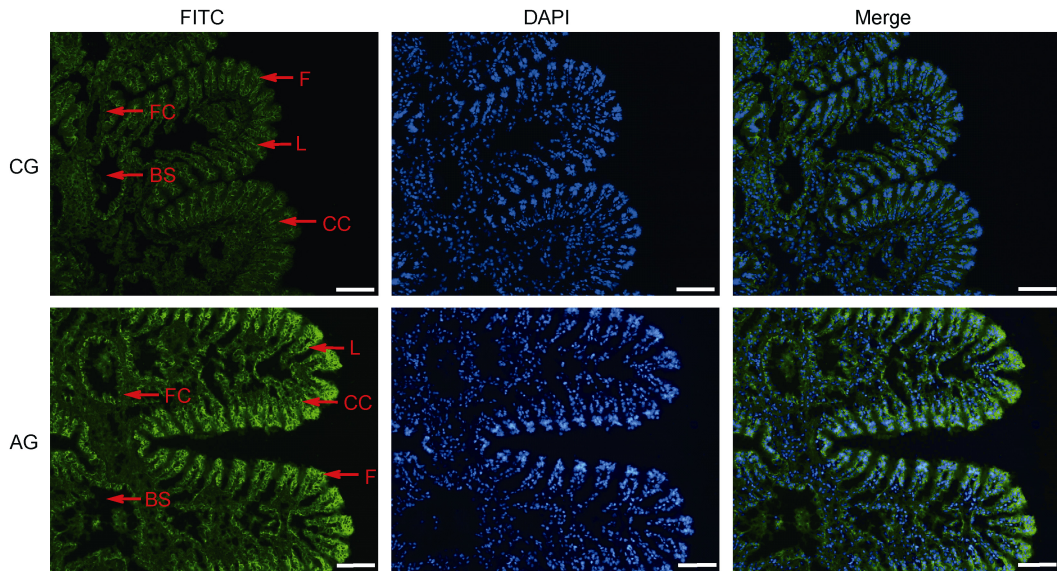


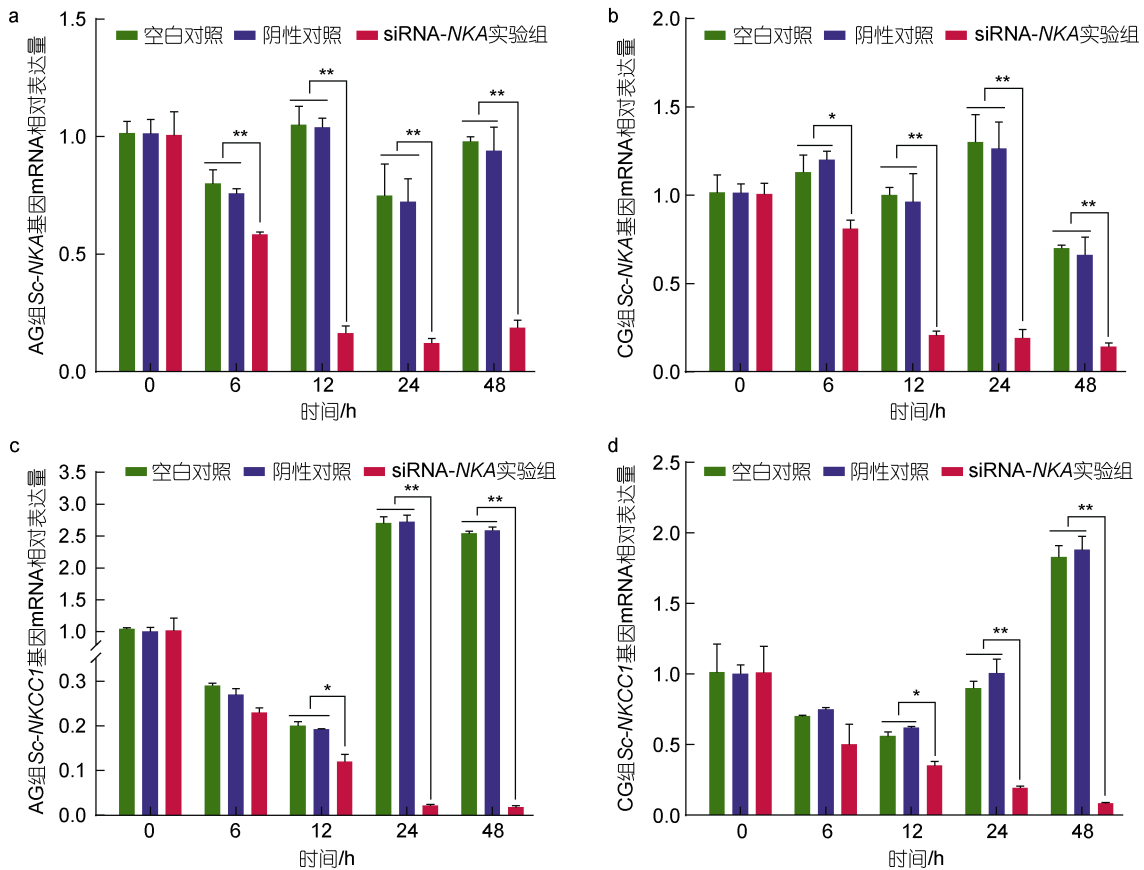
图 2 缙蛭鳃组织 Sc-NKA 蛋白的免疫荧光分析

Fig.2 Immunofluorescence of Sc-NKA in the gill

注: 抗-NKA 抗体使 Sc-NKA 蛋白染为绿色, DAPI 使细胞核染为蓝色。其中 CG 为对照组(正常海水养殖), AG 为氨氮胁迫组(180 mg/L)。CC: 柱状细胞; FC: 扁平细胞; BS: 血管; F: 前纤毛; L: 侧纤毛。比例尺为 50  $\mu\text{m}$

著高于阴性和空白对照组( $P < 0.05$ ), 其中 AG 组血氨浓度在 48 h 达到最大值(5 163.16  $\mu\text{mol/L}$ ), 约为对照组的 2.32 倍; CG 组血氨浓度在 6 h 达到最大值

(161.03  $\mu\text{mol/L}$ ), 约为对照组的 1.23 倍(图 3e, 3f)。此外, 在实验期间, 阴性和空白对照组的上述指标之间均没有显著差异( $P > 0.05$ ) (图 3a~3f)。



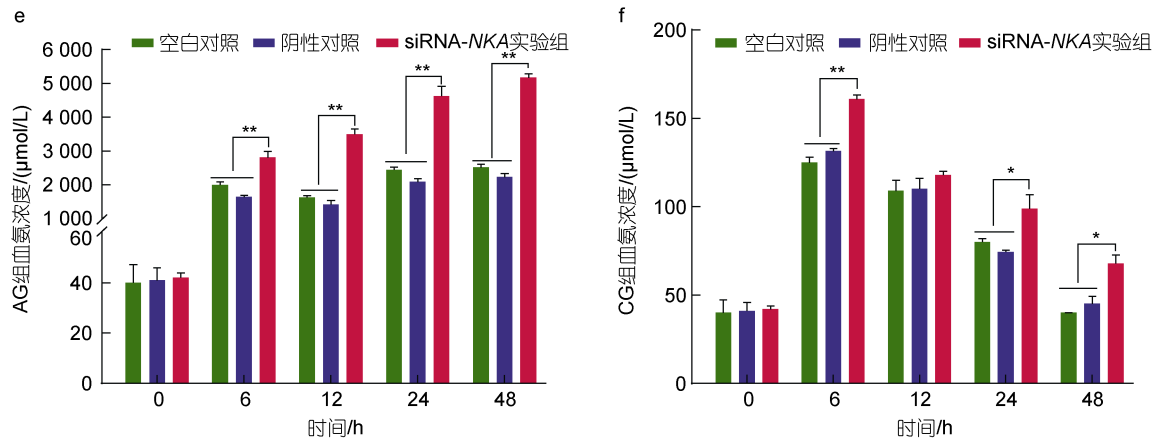


图3 RNAi后鳃组织中 *Sc-NKA* 和 *Sc-NKCC1* 基因 mRNA 相对表达量和血氨浓度的变化

Fig.3 Relative expression of *Sc-NKA* and *Sc-NKCC1* gene in the gill and ammonia concentration in the hemolymph after RNAi 注: a. 氨氮胁迫组(AG, 180 mg/L) RNAi 后 *Sc-NKA* 基因的 mRNA 表达分析; b. 对照组(CG, 正常海水养殖) RNAi 后 *Sc-NKA* 基因的 mRNA 表达分析; c. AG 组 RNAi 后 *Sc-NKCC1* 基因的 mRNA 相对表达水平; d. CG 组 RNAi 后 *Sc-NKCC1* 基因的 mRNA 相对表达水平; e. AG 组 RNAi 后缢蛏血氨浓度; f. CG 组 RNAi 后缢蛏血氨浓度。数值表示为平均值±标准差( $n=6$ )。\*表示 siRNA-*NKA* 实验组与阴性对照(NC)和空白对照(无 RNase 水)组之间差异显著( $P<0.05$ ); \*\*表示 siRNA-*NKA* 与阴性和空白对照组之间差异极显著( $P<0.01$ )

### 3 讨论

氨氮是水产养殖环境中最常见的胁迫因子之一, 氨氮水平的升高是水生动物健康和生命的主要威胁(Zhao *et al.*, 1997; Harris *et al.*, 2001)。氨氮浓度过高会对机体产生多种危害, 因此需要将其转化成毒性较小的分子或迅速排出, 以避免有害物质在体内积聚(Larsen *et al.*, 2014)。缢蛏作为一种底栖滤食性贝类, 经常面临高浓度的氨氮环境, 是研究氨氮解毒分子机制的重要模式物种(Peng *et al.*, 2016)。本课题组 Lv 等(2023)对缢蛏耐氨氮性状进行了 GWAS 分析, 发现了一个位于 *NKA* 基因(Chr8: 21038162-21054270)下游 8.6 kb 基因间区内的显著性 SNP 位点(g.21062868T>A) ( $P<0.05$ ), 本实验通过 KASP 技术验证了其缢蛏耐氨氮性状之间存在显著关联( $P<0.05$ ), 推测该 SNP 可能通过影响与其相邻的 *NKA* 基因的表达参与氨氮胁迫下的调控过程。近年来, 许多研究表明, 基因间区包含非编码 RNA 如 miRNA, rRNA, snRNA 和 tRNA 等尚未鉴定的重要功能元件(Hess *et al.*, 2007; Zhong *et al.*, 2014; Cai *et al.*, 2016; Kanwal *et al.*, 2019)。基因间区含有的增强子 DNA 序列可以控制相距几千个碱基对以上的离散基因的表达(Ingvarsson *et al.*, 2016; Bakhtiarizadeh *et al.*, 2018)。这一发现也在水产动物中得到广泛验证, 如在对刺参(*Apostichopus japonicus*)疣足数量进行 GWAS 分析中, 筛选并验证了与 *PATSI* 基因相邻的位于基因间区的显著性 SNP 位点, 证明

其在细胞生长和增殖中的重要作用(Zhu *et al.*, 2022); 在对长牡蛎脂肪酸品质性状的 GWAS 分析中, 选取了 7 个与不饱和脂肪酸含量显著相关的 SNP 位点, 这些位点均位于基因间区, 最后通过分析与这些 SNP 相邻的 *NFYA* 基因的 mRNA 表达水平等方式证明该基因可能参与调控牡蛎饱和脂肪酸代谢(史瑞辉, 2020)。

研究表明, 绝大多数水生生物, 包括两栖动物、硬骨鱼和大多数无脊椎动物的大部分含氮废物都是直接以  $\text{NH}_4^+$  的形式排出, 这是因为  $\text{NH}_3$  在水环境中很容易转化为  $\text{NH}_4^+$  并通过离子转运系统由鳃排泄到体外(Cragg *et al.*, 1961; Wood *et al.*, 1989; Wright, 1995; Weihrauch *et al.*, 2009; Wright *et al.*, 2009)。水生动物的鳃是一个多功能器官, 是进行多种生理过程的场所, 包括氨排泄、离子转运、酸碱平衡和气体交换等(涂翰卿等, 2019)。作为离子调节系统中的重要成员, *NKA* 通常在鳃中发挥作用(Henry *et al.*, 2012)。在对遮目鱼(*Chanos chanos*)鳃中的 *NKA* 蛋白进行免疫荧光检测后发现, *NKA* 位于鳃上皮细胞的基底外侧膜上(Tang *et al.*, 2011)。同样, 在黑小鲃(*Hynobius nigrescens*)的鳃扁平细胞和富含线粒体的细胞基底外侧膜上观察到了 *NKA* 的免疫阳性反应(Uchiyama *et al.*, 2011)。本研究发现, *NKA* 定位于缢蛏鳃的扁平细胞与柱状细胞中, 与参与渗透调节的水通道蛋白(AQP)在鳃中的定位结果较为一致(Ruan *et al.*, 2022)。此外, 氨氮胁迫后的 *NKA* 阳性信号较未胁迫的对照组明显更强, 且高氨氮胁迫下鳃中 *NKA* 基因的 mRNA

和蛋白表达水平均有显著上调( $P < 0.05$ ), 这一现象在印度囊鳃鲷(Chew *et al.*, 2020)和龟壳攀鲈(Ip *et al.*, 2012)中也有发现, 表明 *NKA* 对氨氮刺激具有明显的响应。在亚致死氨氮浓度(1.5 mg/L 和 3 mg/L)胁迫下菲律宾蛤仔(*Tapes philippinarum*)鳃中的 *NKA* 酶活性明显增强( $P < 0.05$ ), 且用相同浓度的  $K^+$  或  $NH_4^+$  进行体外实验时, *NKA* 均受到最大程度的激活, 表明  $NH_4^+$  可以替代  $K^+$  从而被 *NKA* 运输(Pagliarani *et al.*, 2008)。暴露于高氨下, *NKA* 基因的高表达可能是调节机体对氨氮应激的适应性反应: *NKA* 可以像结合  $K^+$  一样结合  $NH_4^+$ , 然后直接将其从细胞中转运出来(Tresguerres *et al.*, 2020)。在本研究中, 高氨胁迫 6~48 h, *NKA* 基因的持续高表达表明, 短期氨氮胁迫下缙蛭可通过诱导 *NKA* 基因 mRNA 的转录水平和蛋白丰度上调, 来促进鳃中  $NH_4^+$  的跨膜转运。

$NH_4^+$  在水溶液中不能通过自由扩散的方式穿过细胞膜, 而需要转运蛋白参与(Henry *et al.*, 2012)。由于  $NH_4^+$  与  $K^+$  的离子半径、迁移率等物理特性相似,  $NH_4^+$  可以竞争性结合  $K^+$  转运蛋白, 如 *NKA*、*NKCC* 和 *KCN* (Kinne *et al.*, 1986; Choe *et al.*, 2000; Weiner *et al.*, 2007)。研究发现, 红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)、热带雀鲷(*Atractosteus tropicus*)、许氏齿弹涂鱼(*Periophthalmodon schlosseri*)在氨氮胁迫下鳃中 *NKA* 和 *NKCC1* 的 mRNA 表达水平均上调, 表明二者在氨排泄过程中均发挥作用(Nawata *et al.*, 2010; Chew *et al.*, 2015; Aranda-Morales *et al.*, 2021)。本实验通过对 *Sc-NKA* 基因进行 RNAi 后发现, 缙蛭血淋巴氨浓度在干扰后显著升高, 证实了 *NKA* 在氨氮转运中的重要作用。同时, qRT-PCR 检测 *Sc-NKA* 基因干扰后 *Sc-NKCC1* 的 mRNA 表达量发现, 对 *NKA* 基因的抑制会下调 *NKCC1* 基因的转录水平, 表明两者之间可能存在着协同作用。水生生物通过鳃细胞基底外侧膜上的 *NKCC1* 替代  $K^+$  运输  $NH_4^+$  的生理活动将导致流入上皮细胞的  $Na^+$  增加, 因此, 增强 *NKA* 酶的活性对于维持  $Na^+$  电化学梯度至关重要(Chew *et al.*, 2020)。也有研究推测, *NKA* 能够维持  $Na^+$  梯度进而驱动 *NKCC1* (任琴, 2015)。结合本研究的实验结果, 当 *NKA* 表达水平降低时, 细胞内的  $Na^+$  浓度将增加, 影响细胞内外的  $Na^+$  浓度梯度, 进而使 *NKCC1* 的表达受到抑制。

#### 4 结论

本研究在缙蛭氨氮耐受和敏感群体中验证了位

于 *NKA* 基因下游的 SNP 位点(g.21062868T>A)与氨氮耐受性状存在显著关联性( $P < 0.05$ ), 分析了该基因在高氨胁迫下的时空表达规律, 发现氨氮刺激可以诱导 *Sc-NKA* 的高表达。*Sc-NKA* 蛋白定位于缙蛭鳃的柱状细胞和扁平细胞中, 并且在氨氮胁迫后蛋白丰度增加。此外, 干扰 *Sc-NKA* 使血淋巴中的氨浓度升高, 并下调了同为  $K^+$  转运蛋白的 *Sc-NKCC1* 基因的转录水平, 这表明 *Sc-NKA* 在氨运输过程中具有重要作用。后续将深入探究 *NKA* 与其他转运蛋白在氨氮排泄中的互作关系, 为进一步阐明缙蛭氨氮胁迫响应分子机制奠定理论基础, 也为耐氨氮新品种的分子标记辅助选育工作提供候选基因。

#### 参 考 文 献

- 史瑞辉, 2020. 长牡蛎脂肪酸品质性状的遗传及分子解析[D]. 青岛: 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所): 34-48.
- 付莹, 赵玉蓉, 2018. 氨氮对鱼类的毒性及鱼类应对氨氮毒性的策略[J]. 水产学杂志, 31(3): 49-54.
- 任琴, 2015. 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)在氨氮胁迫下氨氮代谢终产物排出途径的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学: 27.
- 张欢, 董迎辉, 姚韩韩, 等, 2020. 缙蛭(*Sinonovacula constricta*)*GST* 和 *HSP90* 基因克隆及其在氨氮胁迫下的表达特征分析[J]. 海洋学报, 42(4): 66-78.
- 陈凯锋, 董迎辉, 姚韩韩, 等, 2020. 缙蛭(*Sinonovacula constricta*)氨氮胁迫应答 miR-8245a-5p 靶基因 *GOT* 验证及其表达特征分析[J]. 海洋与湖沼, 51(2): 388-394.
- 柴欣如, 许文军, 张东旭, 等, 2022. 缙蛭混养对三疣梭子蟹-日本囊对虾综合养殖系统理化环境和小型底栖动物的影响[J]. 海洋与湖沼, 53(3): 718-725.
- 涂翰卿, 赵金良, 黄思颖, 等, 2019. 碱胁迫下罗非鱼鳃氨转运蛋白 Rh 基因的表达[J]. 水产科学, 38(2): 194-200.
- ADLIMOGHADDAM A, BOECKSTAENS M, MARINI A M, *et al.*, 2015. Ammonia excretion in *Caenorhabditis elegans*: mechanism and evidence of ammonia transport of the Rhesus protein CeRhr-1 [J]. *Journal of Experimental Biology*, 218(5): 675-683.
- ARANDA-MORALES S A, PEÑA-MARÍN E S, JIMÉNEZ-MARTÍNEZ L D, *et al.*, 2021. Expression of ion transport proteins and routine metabolism in juveniles of tropical gar (*Atractosteus tropicus*) exposed to ammonia [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 250: 109166.
- BAKHTIARIZADEH M R, SALEHI A, RIVERA R M, 2018. Genome-wide identification and analysis of A-to-I RNA editing events in bovine by transcriptome sequencing [J]. *PLoS One*, 13(2): e0193316.
- CAI L Y, CHANG H D, FANG Y P, *et al.*, 2016. A comprehensive characterization of the function of lincRNAs in transcriptional regulation through long-range chromatin interactions [J]. *Scientific Reports*, 6(1): 36572.



- CAO L, XIONG S P, WU Z Y, *et al*, 2021. Anti- $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase immunotherapy ameliorates  $\alpha$ -synuclein pathology through activation of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha$ 1-dependent autophagy [J]. *Science Advances*, 7(5): eabc5062.
- ČECHOVÁ P, BERKA K, KUBALA M, 2016. Ion pathways in the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase [J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 56(12): 2434-2444.
- CHENG C H, YANG F F, LING R Z, *et al*, 2015. Effects of ammonia exposure on apoptosis, oxidative stress and immune response in pufferfish (*Takifugu obscurus*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 164: 61-71.
- CHEW S F, HIONG K C, LAM S P, *et al*, 2015. Ammonia exposure increases the expression of  $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$  cotransporter 1a in the gills of the giant mudskipper, *Periophthalmodon schlosseri* [J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 185(1): 57-72.
- CHEW S F, TAN S Z L, IP S C Y, *et al*, 2020. The non-ureogenic stinging catfish, *Heteropneustes fossilis*, actively excretes ammonia with the help of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase when exposed to environmental ammonia [J]. *Frontiers in Physiology*, 10: 1615.
- CHOE H, SACKIN H, PALMER L G, 2000. Permeation properties of inward-rectifier potassium channels and their molecular determinants [J]. *The Journal of General Physiology*, 115(4): 391-404.
- CONG M, LI Y M, XU H C, *et al*, 2021. Ammonia nitrogen exposure caused structural damages to gill mitochondria of clam *Ruditapes philippinarum* [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 222: 112528.
- CRAGG M M, BALINSKY J B, BALDWIN E, 1961. A comparative study of nitrogen excretion in some amphibia and reptiles [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 3(4): 227-235.
- DONG Y H, ZENG Q F, REN J F, *et al*, 2020. The chromosome-level genome assembly and comprehensive transcriptomes of the razor clam (*Sinonovacula constricta*) [J]. *Frontiers in Genetics*, 11: 664.
- FEHSENFELD S, WEIHRAUCH D, 2016. The role of an ancestral hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated  $\text{K}^+$  channel in branchial acid-base regulation in the green crab, *Carcinus maenas* [J]. *Journal of Experimental Biology*, 219(6): 887-896.
- HARRIS R, COLEY S, COLLINS S, *et al*, 2001. Ammonia uptake and its effects on ionoregulation in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana) [J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 171(8): 681-693.
- HENRY R P, LUCU Č, ONKEN H, *et al*, 2012. Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals [J]. *Frontiers in Physiology*, 3: 431.
- HESS N K, SINGER P A, TRINH K, *et al*, 2007. Transcriptional regulation of the *Drosophila melanogaster* muscle myosin heavy-chain gene [J]. *Gene Expression Patterns*, 7(4): 413-422.
- INGVARSSON P K, HVIDSTEN T R, STREET N R, 2016. Towards integration of population and comparative genomics in forest trees [J]. *New Phytologist*, 212(2): 338-344.
- IP Y K, CHING B, HIONG K C, *et al*, 2015. Light induces changes in activities of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase,  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase and glutamine synthetase in tissues involved directly or indirectly in light-enhanced calcification in the giant clam, *Tridacna squamosa* [J]. *Frontiers in Physiology*, 6: 68.
- IP Y K, LOONG A M, KUAH J S, *et al*, 2012. Roles of three branchial  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha$ -subunit isoforms in freshwater adaptation, seawater acclimation, and active ammonia excretion in *Anabas testudineus* [J]. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 303(1): R112-R125.
- KANWAL F, LU C R, 2019. A review on native and denaturing purification methods for non-coding RNA (ncRNA) [J]. *Journal of Chromatography B*, 1120: 71-79.
- KINNE R, KINNE-SAFFRAN E, SCHÜTZ H, *et al*, 1986. Ammonium transport in medullary thick ascending limb of rabbit kidney: Involvement of the  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ -cotransporter [J]. *The Journal of Membrane Biology*, 94(3): 279-284.
- LARSEN E H, DEATON L E, ONKEN H, *et al*, 2014. Osmoregulation and excretion [J]. *Comprehensive Physiology*, 4(2): 405-573.
- LV L Y, HU C X, XU H Q, *et al*, 2023. Insight into the genetic basis of ammonia tolerance in razor clam *Sinonovacula constricta* by genome-wide association study [J]. *Aquaculture*, 569: 739351.
- LV L Y, REN J F, ZHANG H, *et al*, 2022. Transcriptomic analysis of gill and hepatopancreas in razor clam (*Sinonovacula constricta*) exposed to acute ammonia [J]. *Frontiers in Marine Science*, 9: 832494.
- MARTIN M, FEHSENFELD S, SOURIAL M M, *et al*, 2011. Effects of high environmental ammonia on branchial ammonia excretion rates and tissue Rh-protein mRNA expression levels in seawater acclimated dungeness crab *Metacarcinus magister* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 160(2): 267-277.
- MENG J, WANG W X, SHI R H, *et al*, 2020. Identification of SNPs involved in Zn and Cu accumulation in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) by genome-wide association analysis [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 192: 110208.
- NAWATA C M, HIROSE S, NAKADA T, *et al*, 2010. Rh glycoprotein expression is modulated in pufferfish (*Takifugu rubripes*) during high environmental ammonia exposure [J]. *Journal of Experimental Biology*, 213(18): 3150-3160.
- NING X H, LI X, WANG J, *et al*, 2019. Genome-wide association study reveals *E2F3* as the candidate gene for scallop growth [J]. *Aquaculture*, 511: 734216.
- PAGLIARANI A, BANDIERA P, VENTRELLA V, *et al*, 2008. Response of  $\text{Na}^+$ -dependent ATPase activities to the contaminant ammonia nitrogen in *Tapes philippinarum*: possible atpase involvement in ammonium transport [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 55(1): 49-56.
- PENG C, ZHAO X G, LIU S X, *et al*, 2016. Effects of

- anthropogenic sound on digging behavior, metabolism,  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  ATPase activity, and metabolism-related gene expression of the bivalve *Sinonovacula constricta* [J]. Scientific Reports, 6(1): 24266.
- REN Q, PAN L Q, 2014. Digital gene expression analysis in the gills of the swimming crab (*Portunus trituberculatus*) exposed to elevated ambient ammonia-N [J]. Aquaculture, 434: 108-114.
- RUAN W B, DONG Y H, LIN Z H, *et al*, 2022. Molecular characterization of aquaporins genes from the razor clam *Sinonovacula constricta* and their potential role in salinity tolerance [J]. Fishes, 7(2): 69.
- SHEN C C, TANG D, BAI Y Z, *et al*, 2021. Comparative transcriptome analysis of the gills of *Procambarus clarkii* provide novel insights into the response mechanism of ammonia stress tolerance [J]. Molecular Biology Reports, 48(3): 2611-2618.
- SHI R H, LI C Y, QI H G, *et al*, 2020. Construction of a high-resolution genetic map of *Crassostrea gigas*: QTL mapping and GWAS applications revealed candidate genes controlling nutritional traits [J]. Aquaculture, 527: 735427.
- SUN G G, DONG Y H, SUN C S, *et al*, 2021. Vital role of *Glutamate dehydrogenase* gene in ammonia detoxification and the association between its SNPs and ammonia tolerance in *Sinonovacula constricta* [J]. Frontiers in Physiology, 12: 664804.
- SUN G G, ZHANG H, YAO H H, *et al*, 2022. Characteristics of *glutathione peroxidase* gene and its responses to ammonia-N stress in razor clam *Sinonovacula constricta* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 261: 110752.
- TANG C H, HWANG L Y, SHEN I D, *et al*, 2011. Immunolocalization of chloride transporters to gill epithelia of euryhaline teleosts with opposite salinity-induced  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase responses [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 37(4): 709-724.
- TRESGUERRES M, CLIFFORD A M, HARTER T S, *et al*, 2020. Evolutionary links between intra- and extracellular acid-base regulation in fish and other aquatic animals [J]. Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology, 333(6): 449-465.
- UCHIYAMA M, KUMANO T, KOMIYAMA M, *et al*, 2011. Immunohistological classification of ionocytes in the external gills of larval Japanese black salamander, *Hynobius nigrescens* Stejneger [J]. Journal of Morphology, 272(8): 1017-1024.
- WALKER V, 2014. Ammonia metabolism and hyperammonemic disorders [J]. Advances in Clinical Chemistry, 67: 73-150.
- WEIHRAUCH D, WILKIE M P, WALSH P J, 2009. Ammonia and urea transporters in gills of fish and aquatic crustaceans [J]. Journal of Experimental Biology, 212(11): 1716-1730.
- WEINER I D, HAMM L L, 2007. Molecular mechanisms of renal ammonia transport [J]. Annual Review of Physiology, 69(1): 317-340.
- WEINER I D, VERLANDER J W, 2019. Emerging features of ammonia metabolism and transport in acid-base balance [J]. Seminars in Nephrology, 39(4): 394-405.
- WOOD C M, MUNGER R S, TOEWS D P, 1989. Ammonia, urea and  $\text{H}^+$  distribution and the evolution of ureotelism in amphibians [J]. Journal of Experimental Biology, 144(1): 215-233.
- WRIGHT P A, 1995. Nitrogen excretion: three end products, many physiological roles [J]. Journal of Experimental Biology, 198(2): 273-281.
- WRIGHT P A, WOOD C M, 2009. A new paradigm for ammonia excretion in aquatic animals: role of Rhesus (Rh) glycoproteins [J]. Journal of Experimental Biology, 212(15): 2303-2312.
- XU T F, ZHANG X H, RUAN Z Q, *et al*, 2019. Genome resequencing of the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) for a genome-wide association study on ammonia tolerance [J]. Aquaculture, 512: 734332.
- ZHANG L, PAN L Q, XU L J, *et al*, 2018. Effects of ammonia-N exposure on the concentrations of neurotransmitters, hemocyte intracellular signaling pathways and immune responses in white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 75: 48-57.
- ZHANG H, SUN G G, LIN Z H, *et al*, 2020. The razor clam *Sinonovacula constricta* uses the strategy of conversion of toxic ammonia to glutamine in response to high environmental ammonia exposure [J]. Molecular Biology Reports, 47(12): 9579-9593.
- ZHAO J H, LAM T J, GUO J Y, 1997. Acute toxicity of ammonia to the early stage-larvae and juveniles of *Eriocheir sinensis* H. Milne-Edwards, 1853 (Decapoda: Grapsidae) reared in the laboratory [J]. Aquaculture Research, 28(7): 517-525.
- ZHONG C C, ANDREWS J, ZHANG S J, 2014. Discovering non-coding RNA elements in *Drosophila* 3' untranslated regions [J]. International Journal of Bioinformatics Research and Applications, 10(4/5): 479-497.
- ZHU X H, NI P, STURROCK M, *et al*, 2022. Fine-mapping and association analysis of candidate genes for papilla number in sea cucumber, *Apostichopus japonicus* [J]. Marine Life Science & Technology, 4(3): 343-355.

## VERIFICATION OF SNP ASSOCIATED WITH AMMONIA TOLERANCE AND EXPRESSION OF SNP-RELATED *NKA* GENE RESPONDING TO AMMONIA STRESS IN RAZOR CLAM (*SINONOVACULA CONSTRICTA*)

HU Chen-Xin<sup>1</sup>, LYU Li-Yuan<sup>2</sup>, SUN Gai-Gai<sup>1,3</sup>, YAO Han-Han<sup>1</sup>, LIN Zhi-Hua<sup>1,2</sup>, DONG Ying-Hui<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Aquatic Germplasm Resource of Zhejiang, College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China; 2. Ninghai Marine Biological Seed Industry Research Institute, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315604, China; 3. College of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315832, China)

**Abstract** To screen and verify the single nucleotide polymorphisms (SNPs) and genes that are related to ammonia tolerance of *Sinonovacula constricta* to guide the molecular marker-assisted breeding, the SNP (g.21062868T>A) located at the downstream of the *NKA* gene in *S. constricta* (*Sc-NKA*) was validated by competitive allele-specific PCR (KASP) analysis. The expression of *Sc-NKA* gene under high ammonia stress was detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and the western blotting. The tissue localization of Sc-NKA protein was carried out using immunofluorescence, and the function of *Sc-NKA* gene in ammonia excretion was analyzed via RNA interference. The results show that the SNP (g.21062868T>A) was significantly associated with ammonia tolerance ( $P<0.05$ ). The expression of *Sc-NKA* significantly increased under ammonia stress ( $P<0.05$ ). In addition, the columnar cells and flat cells in the gill of *S. constricta* were the main sites of Sc-NKA protein secretion, and the protein abundance in these cells increased under ammonia stress. Furthermore, the hemolymph ammonia concentration was significantly increased in 6~48 h after the interference of *Sc-NKA* ( $P<0.05$ ), with a significant decrease of the mRNA expression of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl cotransporter 1 (*NKCC1*) ( $P<0.05$ ). This study demonstrated that Sc-NKA was involved in ammonia excretion, and NKA and NKCC1 might have synergism in ammonia transport.

**Key words** *Sinonovacula constricta*; Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase; ammonia excretion; gene expression; RNA interference