

中华鲟幼鱼鳃丝 Na^+ , K^+ -ATPase α 亚基渗透调节的分子机制初步研究

封苏娅^{1,2}, 赵峰², 庄平^{2*}, 章龙珍²

(1. 华东理工大学生物工程学院, 上海 200237;

2. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 农业部东海与远洋渔业资源开发利用重点实验室, 上海 200090)

摘要: 为了研究盐度 10 条件下中华鲟幼鱼鳃丝 Na^+ , K^+ -ATPase (NKA) α 亚基的分子调节机制, 采用克隆方法得到中华鲟幼鱼鳃丝 NKA α 亚基部分基因序列, 在鲟鱼转移后 3, 6, 12, 24, 48, 72 和 96 h 检测实验组(淡水-盐水)和对照组(淡水-淡水)中华鲟幼鱼鳃丝 NKA α 亚基的 mRNA 表达水平、鳃丝 NKA 活性、血清 Na^+ 、 Cl^- 的浓度和渗透压。结果显示, 在转移后 0~12 h, 实验组中的 mRNA 表达量与酶活性为适应盐度变化而显著增加 ($P < 0.05$), 离子浓度和渗透压均显著上升 ($P < 0.05$); 在转移后 12~24 h, mRNA 表达和酶活性开始降低到一个较低值, 但仍然显著高于对照组的值 ($P < 0.05$), 离子、渗透压的变化与酶活性及 mRNA 变化趋势一致, 这表明中华鲟鳃丝 NKA 在应对盐度变化时通过改变 mRNA 表达量来增加酶活性, 高活性 NKA 调节血清离子和渗透压平衡。

关键词: 中华鲟; Na^+ , K^+ -ATPase α 亚基; 盐度; 基因克隆; 表达

中图分类号: Q 789; S 917.4

文献标志码: A

中华鲟 (*Acipenser sinensis* Gray) 是我国独有的、典型江海洄游性鱼类^[1], 有“水中大熊猫”的美誉, 是我国一级水生保护动物。近 30 年来, 由于污染、栖息地环境变迁、捕捞等原因, 中华鲟种群日益减少, 处于濒临灭绝的境地, 其保护生物学研究引起了广大科研工作者的广泛关注。

每年 5—9 月, 中华鲟幼鱼降河至长江口水域进行摄食肥育, 同时, 在河口水域半咸水刺激下完成从结构和功能的适应性调节与转变, 从而适应海洋生活环境。长江口中华鲟幼鱼阶段是其生活史中的关键时期之一, 是其入海前的准备阶段。在此时期, 中华鲟幼鱼通过生理生化调节适应河口多种盐度环境。中华鲟幼鱼可根据盐度变化改变其盐度喜好性, 这种盐度可塑性对中华鲟幼鱼从河口进入大海起着重要作用^[2]。目前对中华鲟幼鱼在河口半咸水中渗透调节机制的研究主要集中在生理生化水平和行为学方面。在盐度 10

以下, 中华鲟幼鱼正常摄食, 通过鳃有效进行离子渗透压调节使其维持在平衡状态^[3]。中华鲟幼鱼半咸水适应过程的渗透调节特征可分为应激、调节和适应阶段^[4]。但到目前为止, 中华鲟幼鱼分子水平的渗透调节机制还未见报道。

长期以来, 关于鱼类渗透调节中起关键作用的鳃丝 Na^+ , K^+ -ATPase (NKA) 有广泛研究, 大多数硬骨鱼在应对盐度变化时鳃上 NKA 活性呈现适应性变化并存在时间上的差异^[5-8], 在亚致死盐度压力下, 鱼类鳃丝 NKA 受盐度影响分为适应期和调整期, 这两个时期 NKA 活性和 mRNA 表达存在明显差异^[9]。因而, 鱼类适应性渗透调节能力可通过检测 NKA mRNA 的表达量来衡量, 高水平的 mRNA 表达体现离子转运泵的精密性和良好的渗透调节能力^[10]。本实验对中华鲟幼鱼鳃丝 NKA α 亚基的部分基因序列进行 cDNA 克隆, 并分别检测在盐度变化时中华鲟幼

收稿日期: 2011-10-17 修回日期: 2012-04-06

资助项目: 国家自然科学基金项目(31101881); 公益性行业(农业)科研专项(201203065); 长江口中华鲟自然保护区专项

通讯作者: 庄平, E-mail: pzhuang@online.sh.cn

鱼鳃丝 NKA α 亚基的 mRNA 表达量、酶活性及血清离子浓度和渗透压,从分子角度阐明中华鲟幼鱼入海洄游过程中的渗透压调节规律,为其渗透压调节机制研究提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 实验材料与 设计

实验用中华鲟为人工养殖的 1⁺ 龄幼鱼,平均体长(82.00 \pm 8.36) cm,平均体质量约(4 000.02 \pm 87.43) g。养殖水温为(27 \pm 1) $^{\circ}$ C,溶氧为(7.1 \pm 0.2) mg/L,pH 为 7.2 \pm 0.3,每天光照 12 h。实验容器为蓝色圆柱形玻璃钢水槽,直径 2.75 m,深 0.8 m,保持水深 0.40 m,桶底部有一排污换水的出水口。盐度 10 咸淡水为经颗粒活性炭及 KDF(Kinetic Degradation Fluxion)过滤(余氯 < 0.01 mg/L)的自来水与海水按相应比例配成,淡水为经上述 KDF 过滤的自来水。RIZol 试剂购自 Invitrogen 公司,RNAstore 样品保存液,PrimerScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis kit,Taq 酶,胶回收试剂盒,大肠杆菌 DH5 α ,SYBR[®] Premix Ex TaqTM,pMD-20 载体等购自 TaKaRa 公司,超微量 ATP 酶测试盒,考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒购自南京建成生物科技有限公司。

试验设对照组和实验组各 1 个,对照组为淡水,实验组为盐度 10,随机将淡水中暂养 2 周的中华鲟幼鱼各 7 尾分别移入对照组和实验组,养殖 96 h。实验开始后,分别在 3,6,12,24,48,72 和 96 h 对照组和实验组中各 5 尾中华鲟进行非致死活体取样^[11]。首先将鱼麻醉^[12],剪取鳃丝 1/8 ~ 1/6 长度,用 DEPC 水冲洗干净后浸入液氮中速冻,并置于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用;用 5 mL 一次性无菌注射器在臀鳍下方尾静脉抽血,将血液注入玻璃采血管中室温放置 0.5 h,待血清分离后,用 Eppendorf 5810R 离心机分离(2 000 r/min,10 min)血清,分离出的血清分别使用 DSI-905 电解质分析仪和 VAPRO 5520 渗透压仪(Wescor,Logan,UT)进行血清离子和渗透压检测。

1.2 NKA α 亚基部分基因序列克隆

RNA 提取和反转录 用 TRIzol 试剂盒提取所有样品的总 RNA,根据 PrimerScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis kit 的说明进行反转录得到第一条 cDNA 链。

NKA α 亚基部分序列扩增 根据 NCBI 中

已登录的大西洋鲑(*Salmo salar*),红鲑(*Oncorhynchus nerka*),人(*Homo sapiens*),白真鲨(*Carcharhinidae leucas*),白斑角鲨(*Squalusacanthias linnaeus*),太平洋电鳐(*Torpedo californica*)等物种的 NKA α 亚基基因的 mRNA 序列,进行序列对比设计简并引物,上游引物 F₁ 位于 2 330 bp 处,下游引物 R₁ 位于 2 960 bp 处,引物信息见表 1。取 1 μ L 上述反转录产物(cDNA 模板),采用 F₁ 和 R₁ 进行梯度 PCR 扩增,反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,1 个循环,94 $^{\circ}$ C 30 s,退火温度梯度为 50.2 $^{\circ}$ C,51.6 $^{\circ}$ C,52.7 $^{\circ}$ C,54 $^{\circ}$ C,56.8 $^{\circ}$ C,59.2 $^{\circ}$ C,72 $^{\circ}$ C 45 s,共 30 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。得到的目的片段经 1% 的琼脂糖凝胶电泳和胶回收,连接到 pMD-20 载体上,转化、克隆到大肠杆菌中(具体实验步骤参照宝生物公司 PMD[®] 20-T Vector 说明书)送公司测序。

表 1 PCR 的引物及其序列
Tab.1 The primers of PCR

样本 sample	引物名称 primer name	引物序列 primer sequence
中华鲟 <i>Acipenser sinensis</i>	F-1	5'-GCTGTGAWGGTGAYGGTGTGAA-TGACTCTCC-3'
	R-1	5'-GTCGTARACAYACGTCACCC-GRCTG-3'
	Z-F	5'-ATGTCACCTTCTGCTCCT-3'
	Z-R	5'-TGTTGCTATGGGTATTTC-3'
实验内参 reference internal	β -actin-F	5'-TCCGTGACATCAAGGAGAAGC-3'
	β -actin-R	5'-TACCGCAAGATTCCATACCC-3'

1.3 RT-PCR 检测 NKA α 亚基 mRNA 的表达

根据基因克隆得到的部分 NKA α 亚基的基因序列,用 Primer Premier 5.0 软件设计 RT-PCR 基因特异性上下游引物 Z-F,Z-R,以及 β -actin 上下游引物 β -actin-F, β -actin-R,引物序列见表 1。利用这两对引物进行 RT-PCR 检测 mRNA 的表达。提取各时间点样品总 RNA,反转录得到 cDNA(操作步骤和使用的试剂盒与“1.2”步骤相同)。PCR 反应体系为 20 μ L(2 μ L cDNA,50 nmol/L RT-PCR 上下游引物(Z-F,Z-R)混合液,或内参上下游引物 β -actin-F, β -actin-R 和 10 μ L 2 \times SYBR Green RT-PCR premixture)。反应条件如下:95 $^{\circ}$ C 2 min,1 个循环,95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,30 个循环,4 $^{\circ}$ C 保存。以 β -actin 作为实验内参,使用 ABI 公司 StepOnePlus Real-Time PCR System 进行荧光定

量。目标基因和参照基因扩增效率都接近100%且相互间效率偏差在5%以内。相对基因表达分析普遍采用操作简便的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法。

1.4 NKA 酶活性检测

在冰浴条件下剪碎鳃丝,用JY92-II超声波细胞粉碎机进行细胞破碎(超声时间3 s,间隙时间10 s,工作次数13次),匀浆液在4℃下3 500 r/min离心10 min,取上清液用定磷法测定ATP酶活性,蛋白质含量用考马斯亮蓝试剂盒测定。以每小时鳃组织蛋白中ATPase分解ATP产生1 mol的量为1个ATP酶活力单位[$\mu\text{mol P}/(\text{mg}\cdot\text{h})$]。

1.5 数据分析

所有实验数据采用SPSS 16.0统计软件处理分析,利用方差分析检验实验组和对照组中不同时间点的数据显著性差异,用Duncan法对数据进行多重比较。

2 结果

2.1 中华鲟 NKA α 亚基基因的部分核苷酸序列

通过PrimerScript™ 1st Strand cDNA Synthesis kit试剂盒合成模板cDNA,利用引物F₁和R₁进行PCR扩增得到一条长约625 bp的特异性NKA的条带,与理论预期的大小相同(图1)。

2.2 中华鲟血清Na⁺,Cl⁻浓度及渗透压的变化

对照组离子浓度无显著变化($P>0.05$)。转

移后0~6 h,实验组中离子浓度无显著增加($P>0.05$),转移后12~96 h,不同时间点离子浓度和渗透压变化均无显著差异($P>0.05$)。实验组在转移后0~12 h,Na⁺,Cl⁻浓度与对照组相比显著升高,在12 h达到最大值;实验组中渗透压在0~24 h显著上升($P<0.05$),达到最大值后逐渐降低并在48 h达到较低值(图2)。

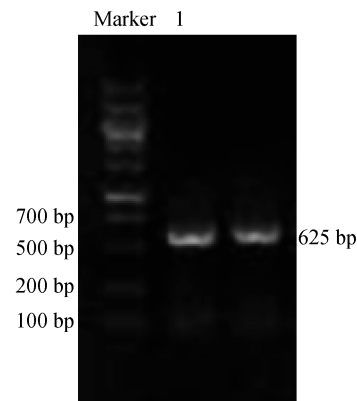


图1 中华鲟 NKA α 亚基基因 cDNA 扩增结果
Marker. DL2000 分子量标准; 1. NKA α 亚基的部分 cDNA 片段。

Fig. 1 The amplification result of Na⁺, K⁺-ATPase α -subunit gene cDNA sequence

Marker. DL2000 ladder; 1. cDNA fragment of Na⁺, K⁺-ATPase α -subunit gene.

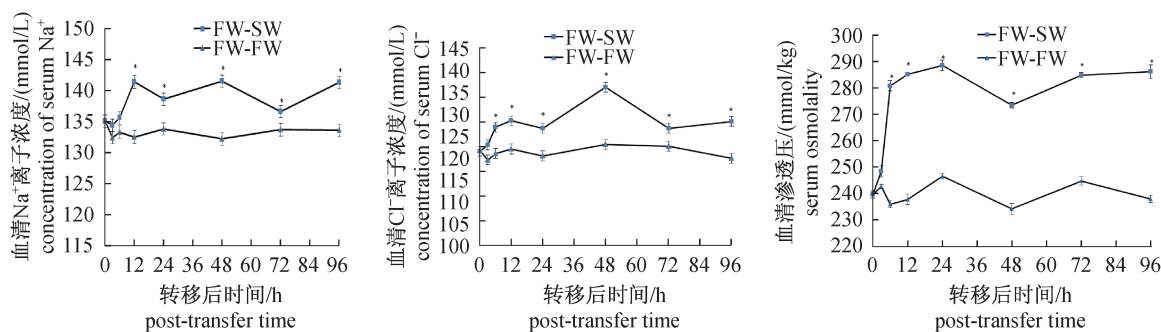


图2 中华鲟在实验组(淡水转移到盐水,FW-SW)和对照组(淡水转移到淡水,FW-FW)中不同时间点的Na⁺和Cl⁻浓度和渗透压的变化

每个值由平均值 \pm 标准差($n=5$)。星号表示显著性差异($P<0.05$)。下图注释同此。

Fig. 2 Time-course changes of concentration of [Na⁺], [Cl⁻] and osmolality in Chinese sturgeon transferred from FW to SW (experimental group) and from FW to FW (control group)

All values are presented as means \pm SEM ($n=5$). Asterisk indicates significant differences ($P<0.05$). The same as the following.

2.3 中华鲟鳃丝 NKA 酶活性变化

在96 h实验过程中,中华鲟NKA酶活性变化的结果分析见图3。结果显示,对照组中酶活性变化无显著差异($P>0.05$)。实验组中,转移

后6~96 h,不同时间点的酶活性与对照组相比均有显著差异($P>0.05$)。转移后12 h内,NKA活性显著上升,在12 h达到最高值;在转移后12~96 h,NKA活性显著降低,在72 h NKA活性最

低,在 72 ~ 96 h 又升高,与初始值相比,酶活性仍显著升高。

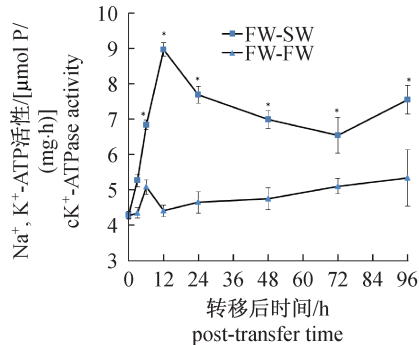


图 3 不同时间段实验组(淡水转移到盐水,FW-SW)和对照组(淡水转移到淡水,FW-FW)中华鲟鳃丝 NKA 活性的变化

Fig. 3 Changes of NKA activity in gill epithelia of the Chinese sturgeon from FW to SW (experimental group) and from FW to FW (control group)

2.4 中华鲟鳃丝 NKA α 亚基 mRNA 的相对表达

在 96 h 实验过程中,在对照组中不同时间点 NKA α 亚基的 mRNA 相对表达量无显著性差异 ($P > 0.05$)。实验组中不同时间点的 NKA α 亚基 mRNA 相对表达量与对照组相比存在显著差异 ($P < 0.05$) (图 4)。转移后 24 h 内, NKA α 亚基的 mRNA 相对表达量显著上升,在 6 h 达到最大值后逐渐减少,在 24 h 降到最低值,但与初始值相比仍显著增加。在转移后 24 ~ 96 h, NKA 的 mRNA 转录水平先增加后保持在稳定水平,变化并不显著 ($P > 0.05$)。

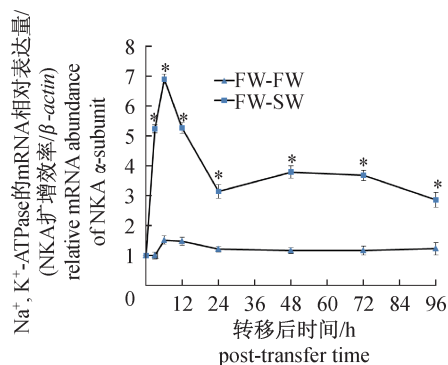


图 4 不同时间在实验组和对照组中中华鲟鳃丝 NKA α 亚基 mRNA 相对丰度的变化

Fig. 4 Changes of relative mRNA abundance of NKA α -subunit of the Chinese sturgeon from FW to SW (experimental group) and from FW to FW (control group)

3 讨论

3.1 生理调节

中华鲟幼鱼应对盐度刺激的生理调节表现为血清渗透压、 Na^+ 、 Cl^- 浓度和鳃丝 NKA 活性均显著升高,这与 Zhao 等^[2,13] 和 He 等^[3] 的研究结果总体趋势一致。但本实验中酶活性增加过程快于离子浓度和渗透压的上升过程,这表明鳃丝 NKA 活性先增加并进一步调控离子浓度和渗透压升高以适应环境变化。

3.2 适应期的分子调节机制

中华鲟幼鱼从淡水转移到盐度 10 水体中 0 ~ 12 h 为适应期,此阶段实验组中 Na^+ 、 Cl^- 浓度和渗透压快速升高并达到最大值, NKA α 亚基 mRNA 表达量迅速增加并在 6 h 达到最大值, NKA 活性在 12 h 升高到最大值。这是由于在环境渗透压改变时,一方面鳃丝 MR 细胞^[14] 受到盐度刺激后通过信号传导途径中的一系列传导因子将此信号传递到细胞核内,调控 NKA α 亚基的 mRNA 大量转录表达,并进一步翻译成 NKA 蛋白,通过 NKA 蛋白能够有效的逆浓度梯度进行离子进出细胞的转运;同时可能因为 Na^+ 、 H^+ 离子转运子^[15] 对 Na^+ 的转运能力提高,调节离子转运速度,使机体迅速适应外界环境,从而使细胞内稳态维持在稳定水平。另一方面,在此适应阶段 (0 ~ 12 h) NKA 活性和 α 亚基的 mRNA 表达量均显著增加,且 mRNA 表达量的增加先于酶活性上升,可能因为 NKA 活性的增加是通过酶蛋白表达总量增加来实现,而酶蛋白表达要先后经过 NKA mRNA 的转录和翻译,这两个分子生物学过程在时间和空间上的差异造成了 NKA 活性和 mRNA 表达量变化在时间上的不一致性。此外,根据不同学者的研究, NKA 的适应性调节还表现为构型变化,如 NKA 中 α 亚基有 4 种异构体 ($\alpha 1$ - 4),分别为 $\alpha 1a$ 、 $\alpha 1b$ 、 $\alpha 1c$ 和 $\alpha 3$ ^[16-17]。故推测本实验中 NKA 活性增加还可能是鳃丝 NKA 离子转运复合体通过改变构型来增强与离子的亲和力, Richards 等^[18] 发现在虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 从淡水转移到海水中 10 天后,其鳃丝上 NKA α 亚基的四种异构体 ($\alpha 1a$ 、 $\alpha 1b$ 、 $\alpha 1c$ 和 $\alpha 3$) 分布随着鳃丝 NKA 活性升高而变化,并且各种异构体表达水平的变化会引起酶对 Na^+ 、 K^+ 亲和力的变化。同样在鲑^[19] 幼鱼期基于 mRNA 结果

分析发现,mRNA通过翻译功能蛋白来增加全酶活性这一基本调节机制,本质上是NKA α 亚基两种主要异构体($\alpha 1a, \alpha 1b$)和 β 亚基三者之间相互调节的过程,异构体 $\alpha 1b$ 在海水调控模式中转录水平升高,异构体 $\alpha 1a$ 在淡水调控模式中表达量降低^[20]。但中华鲟幼鱼NKA α 亚基是否也存在多种异构体,以及是否也在环境变化时也通过异构体之间的转变实现酶离子亲和力的改变等问题还有待于进一步研究。

3.3 调整期的分子调节机制

中华鲟幼鱼转移后12~96 h为调整期,在此阶段离子浓度和渗透压没有显著变化,NKA活性和 α 亚基的mRNA表达量呈现上述变化趋势,因为此阶段基因调控系统通过反馈调节使各项指标与环境条件相适应。细胞内基因表达调控系统和环境密切相关,环境变化时鳃丝细胞协同机体其他调节器官快速应答以适应环境,所以适应期NKA蛋白和mRNA表达量大量增加后,过量的表达产物在调节渗透压平衡的同时产生反馈抑制作用,从而调控细胞内NKA α 亚基mRNA表达量和NKA的分泌量下降,外在表现为渗透压和离子浓度的基本稳定。经过初步反馈调节后的酶活性和mRNA表达量略低于平衡状态,NKA基因表达调控系统进行补偿性少量表达。另外,基因应对环境变化的调节机制是一个多基因协同作用的过程,Mbaye等^[21]发现非洲西海岸野生罗非鱼(*Sarotherodon melanotheron*)鳃丝上 Na^+, K^+ -ATPase 1a亚基,阴离子电压依赖型离子通道,细胞色素C氧化酶,NADH脱氢酶等基因的表达相互关联,并且这些基因的表达与盐度紧密相关。本实验从分子水平和蛋白水平研究中华鲟鳃丝NKA α 亚基与环境盐度变化的关系,初步了解中华鲟鳃丝渗透调节机制,发现盐度变化时鳃丝通过增加mRNA的表达量来提高NKA活性,进而调节离子和渗透压平衡,但对于中华鲟鳃丝NKA整体结构、功能和分子机制以及NKA和鳃组织中其他酶蛋白之间的协同作用还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 胡小琴,姜翠玲,裴海峰,等.水环境变化对中华鲟的影响[J].水电能源科学,2009,27(3):35-37.
- [2] Zhao F, Qu L, Zhuang P, et al. Salinity tolerance as well as osmotic and ionic regulation in juvenile Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis* Gray, 1835) exposed to different salinities[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2011, 27(2):231-234.
- [3] He X, Zhuang P, Zhang L, et al. Osmoregulation in juvenile Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis* Gray) during brackish water adaptation[J]. Fish Physiology Biochemistry, 2009, 35(2):223-230.
- [4] 庄平,刘健,王云龙,等.长江口中华鲟自然保护区科学考察与综合管理[M].北京:海洋出版社,2009:239-240.
- [5] Evans D H, Piermarini P M, Choe K P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste [J]. Physiological Review, 2005, 85(34):197-177.
- [6] Hwang P P, Lee T H. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2007, 148(3):479-497.
- [7] Marshall W S. Na^+, Cl^-, Ca^{2+} and Zn^{2+} transport by fish gills: retrospective review prospective synthesis [J]. Journal of Experimental Zoology, 2002, 293(3):264-283.
- [8] Fiol D F, Kültz D. Osmotic stress sensing and signaling in fishes [J]. FEBS, 2007, 274(22):5790-5798.
- [9] Mancera J M, McCormick S D. Rapid activation of gill Na^+, K^+ -ATPase in the euryhaline teleosts *Fundulus heteroclitus* [J]. Journal of Experimental Zoology, 2000, 287(4):263-274.
- [10] Cheol Y C, Kwangwook A N. Cloning and expression of Na/K -ATPase and osmotic stress transcription factor 1 mRNA in black porgy, *Acanthopagrus schlegelii* during osmotic stress [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2008, 149(1):91-100.
- [11] McCormick S D. Methods for nonlethal gill biopsy and measurement of Na^+, K^+ -ATPase activity [J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1993, 50(3):656-658.
- [12] 冯广朋,庄平,章龙珍,等.电麻醉对西伯利亚鲟幼鱼行为特性与血清离子浓度的影响[J].海洋渔业,2009,31(1):41-47.
- [13] 赵峰,庄平,章龙珍,等.盐度驯化对史氏鲟鳃 Na^+/K^+ -ATP酶活力、血清渗透压及离子浓度的影响[J].水产学报,2006,30(4):444-449.
- [14] Wong C K C, Chan D K O. Isolation of viable cell types from the gill epithelium of Japanese eel

- Anguilla japonica* [J]. American Journal of Physiology, 1999, 276(2): R363 – R372.
- [15] Scott G R J, Richards G, Forbush B, *et al.* Changes in gene expression in gills of the euryhaline killifish *Fundulus heteroclitus* after abrupt salinity transfer [J]. American Journal of Physiology, 2004, 287(2): 300 – 309.
- [16] Scheiner-Bobis G. The sodium pump. Its molecular properties and mechanics of ion transport [J]. European Journal of Biochemistry, 2002, 269(10): 2424 – 2433.
- [17] Hiroi J, McCormick S D. Variation in salinity tolerance, gill Na^+/K^+ -ATPase, $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ cotransporter and mitochondria-rich cell distribution in three salmonids. *Salvelinus namaycush*, *Salvelinus fontinalis* and *Salmo salar* [J]. Journal of Experimental Biology, 2007, 210(10): 1015 – 1024.
- [18] Richards J G, Semple J W, Bystriansky J S, *et al.* Na^+/K^+ -ATPase α -isoform switching in gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during salinity transfer [J]. Journal of Experimental Biology, 2003, 206(10): 4475 – 4486.
- [19] Tipsmark C K, Jørgensen C, Brande-Lavridsen N, *et al.* Corticosteroid regulation of Na^+ , K^+ -ATPase α 1-isoform expression in Atlantic salmon gill during smolt development [J]. General and Comparative Endocrinology, 2011, 170(3): 283 – 289.
- [20] Madsen S S, Kiilerich P, Tipsmark C K. Multiplicity of expression of Na^+ , K^+ -ATPase alpha-subunit isoforms in the gill of Atlantic salmon (*Salmo salar*): cellular localization and absolute quantification in response to salinity change [J]. Journal of Experimental Biology, 2009, 212(10): 78 – 88.
- [21] Mbaye T, Mckenzie D J, Francois B, *et al.* Salinity-related variation in gene expression in wild populations of the black-chinned tilapia from various West African coastal marine, estuarine and freshwater habitats [J]. Estuarine Coastal and Shelf Science, 2011, 91(1): 102 – 109.

Preliminary studies on molecular mechanism of salinity regulation of Na^+ , K^+ -ATPase α -subunit in gills of juvenile Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*)

FENG Su-ya^{1,2}, ZHAO Feng², ZHUANG Ping^{2*}, ZHANG Long-zhen²

(1. School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China;

2. Key Laboratory of East China Sea and Oceanic Fishery Resources Exploitation, Ministry of Agriculture, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China)

Abstract: In order to explore the molecular regulation mechanism of Na^+ , K^+ -ATPase (NKA) α -subunit in gills of juvenile Chinese sturgeon at salinity 10, partial NKA α -subunit gene sequence was cloned, and the abundance of α -subunit mRNA, NKA activity, ion concentration and osmolality were examined at 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 hours post-transfer. Results showed that: in experimental group (fresh water-salinity water, FW-SW), the expression of NKA α -subunit mRNA and NKA activity increased significantly ($P < 0.05$) during the adaptation phase (0 – 12 h), and the concentration of Na^+ , Cl^- and osmolality rose to a maximum level at 12 h post-transfer. In regulatory phase (12 – 24 h), the amounts of NKA α -subunit mRNA and NKA activity fell to a relatively lower level which was still higher than that of fish in control group ($P < 0.05$). The change both in ion concentration and osmolality were in accordance with the change of NKA and mRNA expression. In conclusion, gill Na^+ , K^+ -ATPase in Chinese sturgeon plays an important role in osmolality regulation by changing α -subunit mRNA expression. The different α -subunit mRNA expression can lead to the variation of enzyme activity which can further regulate the ion concentration and osmolality.

Key words: *Acipenser sinensis*; Na^+ , K^+ -ATPase α -subunit; salinity; gene clone; expression

Corresponding author: ZHUANG Ping. E-mail: pzhuang@online.sh.cn