

Zhang Z Y, Liu H M, Quan R, *et al.* Loss of *ca12* gene significantly enhances the tolerance of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) to carbonate alkalinity stress [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2026, 50(3): 032610. [张子瑜, 刘慧敏, 全睿, 等. 缺失*ca12*基因显著提高草鱼耐碳酸盐碱度胁迫能力 [J]. 水生生物学报, 2026, 50(3): 032610.]

缺失*ca12*基因显著提高草鱼耐碳酸盐碱度胁迫能力

张子瑜^{1,2} 刘慧敏³ 全睿² 肖武汉² 蔡孝廉²

(1. 大连海洋大学水产与生命学院, 大连 116023; 2. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072;

3. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070)

摘要: 为了探究碳酸酐酶*ca12* (Carbonic Anhydrase 12)在草鱼应对碳酸盐碱度胁迫中的功能, 本研究设置不同NaHCO₃浓度梯度(0、20、40、60、80、100、150 mmol/L)对野生型和基因编辑草鱼进行碱度胁迫, 系统分析草鱼各组织(脑、心、肾、鳃)中*ca12*的表达水平变化, 以及在60 mmol/L的NaHCO₃溶液下鳃和肠道组织的组织病理学变化。结果显示, 相比野生型草鱼, 经过CRISPR/Cas9技术编辑的*ca12*草鱼嵌合体在不同碱度水平不同时间下存活率更高, 并且随碱度提高, 肾和鳃组织中*ca12*的表达量均显著下调。在60 mmol/L NaHCO₃溶液刺激下, 嵌合体草鱼的鳃和肠道组织形态发生适应性改变, 细胞凋亡率显著低于野生型。研究表明, 高碱度胁迫会对鱼体产生不利影响, 而经过编辑的草鱼嵌合体在高碱度水体下的存活率明显优于野生型草鱼, 说明*ca12*基因在鱼体处于高碱环境中发挥重要的调控作用, 可视为草鱼适应高碱环境的关键靶点, 其功能缺失可显著增强草鱼的碱度耐受性。本研究利用基因编辑技术创制的耐碱草鱼新种质, 将对实施“改种适地”策略开发盐碱地, 拓宽宜渔空间具有战略意义。

关键词: 基因编辑; NaHCO₃胁迫; 组织病理学; 草鱼

中图分类号: S965.1 文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2026)03-032610-08

doi: 10.3724/1000-3207.2025.2025.0204

CSTR: 32229.14.SSSWXB.0000.0000



盐碱水作为全球性边际资源, 中国拥有超过4000万公顷盐碱化水域, 但目前利用率极低^[1]。这类水体具有高盐或高碱等特征, 在造成生态胁迫的同时, 其资源化潜力也逐渐凸显。在淡水资源日益匮乏的大环境下, 突破盐碱水利用瓶颈已成为践行大食物观的关键路径。目前主流的治理模式主要聚焦“改地适种”与“改种适地”两大技术路线^[2, 3]。由于盐碱水特殊的理化特性, 想要开发利用就需要花费更多的人力、物力和财力。所以, 综合开发利用盐碱水域, 培育适合盐碱水域养殖的新品种, 对拓展渔业发展空间、践行大食物观具有重要意义。

由于我国大部分经济品种采用淡水养殖, 在盐碱水体中养殖的品种较为单一, 主要为罗非鱼、梭鱼等低附加值鱼类, 经济效益明显低于淡水养殖系

统。因此, 培育具有潜力的盐碱耐受性高价值鱼类, 是维持渔业可持续发展的强有力保障。近年来, 国内相关研究单位已对鲫^[4]、鲤^[5]、尼罗罗非鱼^[6]、青鳉^[7]、乌苏里白鲑^[8]、瓦氏雅罗鱼^[9]和青海湖裸鲤^[10]等鱼类开展了相应的机制研究, 其中以极端耐盐碱的青海湖裸鲤和瓦氏雅罗鱼的研究较为系统和全面^[9, 10]。通过对青海湖裸鲤盐碱耐受过程中的差异表达基因比较, 研究人员已初步筛选到了其渗透相关蛋白, 包括钠/钾转运ATP酶、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶、丝裂原活化蛋白激酶和溶质载体家族等^[11]。同样, 通过采取比较生理学的研究方法, 研究人员发现瓦氏雅罗鱼碱水型可能通过鳃离子细胞基底NKA、NBC1、NKCC1及顶端NCC、SLC26A5和SLC26A6等离子转运蛋白的高表达, 来

收稿日期: 2025-06-16; 修订日期: 2025-09-05

基金项目: 农业生物育种国家科技重大专项(2023ZD0406505)资助 [Supported by the Biological Breeding-National Science and Technology Major Project (2023ZD0406505)]

作者简介: 张子瑜(2000—), 男, 硕士研究生; 研究方向为鱼类遗传育种。E-mail: Zhangziyu@ihb.ac.cn

通信作者: 蔡孝廉(1991—), E-mail: xiaoliancai@ihb.ac.cn

实现高碱胁迫下机体对离子和酸碱平衡的快速调节^[12]。这些研究变相加快了耐盐碱鱼类新品种的培育,对我国盐碱水体的利用具有重要意义,也是我国水产领域近几年研究的热点问题。

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*),是我国四大家鱼之一,也是我国产量最高的淡水经济鱼类,具有分布广泛、生长速度快、营养价值高、肉质鲜美等优点。然而,当前我国草鱼养殖模式主要以淡水养殖为主,未能有效利用我国大面积的盐碱水资源。培育耐碱草鱼新种质,有利于拓展水产养殖空间,增加水产品有效供给。已有研究表明,碳酸酐酶(Carbonic anhydrase, CA)家族相关基因在鱼类盐碱胁迫中具有重要的作用^[13,14]。因此,利用CRISPR/Cas9基因编辑技术靶向编辑草鱼碳酸酐酶关键基因,并对嵌合体进行耐碱性能评价,筛选出具有高耐碱性能的草鱼新种质。这种精准育种技术有望节约盐碱水预处理成本,更促进了盐碱水资源逐渐从“生态包袱”转变为可开发的战略资源。因此,利用基因编辑技术创制耐碱草鱼新种质,对于开发利用盐碱水域和通过精准分子设计育种加快培育耐碱鱼类新种质具有重要的指导和借鉴意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所使用的实验鱼均来自中国科学院水生生物研究所梁子湖实验基地,为同批孵化的野生型和经基因编辑的*cal2*嵌合体草鱼幼鱼,平均体质量为 (1.3 ± 0.5) g,体长为 (5 ± 0.5) cm,在室内循环系统中饲养。

1.2 实验方法

***cal2*在草鱼不同组织中的表达分析** 合成表达检测引物,引物序列为F: 5'-ATGGACACTCTGTGCAGTTGTCTT-3'和R: 5'-TACTACATGCATCTCTCCGGCAA-3'。将发育至两月龄的野生型草鱼,经不同浓度 NaHCO_3 胁迫后,取其脑、心脏、肾脏和鳃组织,加入TransZol UP(北京全式金生物,ET111-01-V2),根据此试剂盒说明书提取RNA,并利用Easy Script一步法gDNA去除及cDNA合成试剂盒(北京全式金生物,AE311-03)合成cDNA,作为荧光定量PCR检测的模板。经荧光定量PCR仪(CFX96 Touch,美国Bio-rad)检测并使用GraphPad Prism 10软件绘制柱状图,验证*cal2*在 NaHCO_3 胁迫后草鱼各组织中的表达差异。

草鱼*cal2*敲除靶位点的设计 根据NCBI上草鱼*cal2*基因的序列(序列号为NC_067243.1),筛选最优的敲除靶位点,两个靶位点均位于*cal2*基因的

第4个外显子上,靶位点序列为F: 5'-GGCTCCTCCA GTCTGCTGACAGG-3'和R: 5'-GGATCAGAACAC ACTGTTAATGG-3'。

gRNA的体外扩增、合成与纯化 扩增:设计合成gRNA的引物,在靶位点序列两端添加T7启动子序列和pUC19-gRNA载体同源臂作为F引物,R引物为pUC19-gRNA载体上通用引物,引物序列为F1: 5'-GTAATACGACTCACTATAGGCTCCTCC AGTCTGCTGACGTTT TAGAGCTAGAAATAG C-3', F2: 5'-GTAATACGACTCACTATAGGATCAG AACACACTGTTAAGTTT TAGAGCTAGAAAT AGC-3'和R: 5'-AAAAGCACCGACTCGGTGCC-3'。以pUC19-gRNA载体为模板,通过PCR程序扩增sgRNA,扩增片段大小为118 bp。PCR反应体系: I5 DNA聚合酶(购自MCLAB,货号I5HM-OEM) 20 μL , F1/F2引物(浓度为10 $\mu\text{mol/L}$) 1.6 μL , R引物(浓度为10 $\mu\text{mol/L}$) 1.6 μL , ddH₂O 15.8 μL , pUC19-gRNA质粒模板(浓度为100 ng/ μL) 1 μL 。PCR反应条件: 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性2min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性10s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火15s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸15s, 40个循环; 75 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸5min。将PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,条带大小为118 bp。将PCR产物进行纯化回收后,检测其浓度,置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

合成 根据TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (Thermo Scientific, 美国)试剂盒说明书体外转录合成gRNA,总体系为10 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育4h。

纯化 根据试剂盒说明书,首先在gRNA体外转录体系中加入1 μL DNase I,在PCR仪上37 $^{\circ}\text{C}$ 15min 以去除DNA污染;其次,加入1 μL 0.5 mol/L EDTA 8.0, 65 $^{\circ}\text{C}$ 10min;加入57.5 μL DEPC水和7.5 μL 3 mol/L sodium Acetate solution (pH 5.2),以及等体积的酚氯仿溶液(1:1混合,各38.5 μL ,共77 μL),混合后于4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 r/min离心15min;吸取水相到新的PCR管,加入等体积氯仿,于4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 r/min离心15min;收集水相到新的PCR管,加入2倍体积无水乙醇,置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀过夜;次日4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 r/min离心15min,获得gRNA沉淀,继续加入100 μL 预冷的70%乙醇,于4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 r/min离心6min漂洗3次;去除70%乙醇,自然干燥后加入20 μL DEPC水溶解沉淀。最后利用超微量分光光度计(DeNovix, DS-11+)检测RNA浓度,剩余RNA置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待用。

显微注射 注射当日,将解冻的gRNA与Cas9蛋白(TrueCutTM Cas Protein V2, A36498, Thermo Fisher)以gRNA:Cas9=300 ng/ μL :500 ng/ μL ,配制成混合液置于冰上备用。分别取少量草鱼卵子和

精液进行人工授精, 受精时长1min。然后将受精卵置于显微镜下, 使用Picoliter Microinjector注射仪(Warner, PL-100A)将约0.002 μL 的gRNA/Cas9蛋白混合液注射到受精卵动物极细胞内, 作为嵌合体。同时, 将未注射的受精卵作为野生型与嵌合型分别置于水温为23—28℃的孵化桶中孵育, 观察受精卵发育情况。

敲除*cal2*嵌合体的筛选鉴定与基因编辑效率验证 设计鉴定引物, 在敲除靶位点前后100 bp左右截取一段序列作为鉴定引物: F: 5'-TGCCAGC GAAATTTTGCTGAAATC-3'和R: 5'-GCATCATG CACTGTTGAGTCCAGA-3'。将发育至两月龄的经基因编辑的草鱼幼鱼, 剪尾鳍并用50 mmol/L NaOH在裂解仪中(ALLSHENG, MK2000-2)95℃裂解40min提取基因组, 加入1mol/L Tris-HCl 8.0中和pH, 作为PCR检测模板。PCR反应体系: 2× San Taq Fast PCR Master Mix (with Blue Dye; 购自生工, 货号K820KC0060) 20 μL , F引物(浓度为10 $\mu\text{mol/L}$) 1.6 μL , R引物(浓度为10 $\mu\text{mol/L}$) 1.6 μL , ddH₂O 15.8 μL , 模板1 μL 。PCR反应条件: 95℃ 5min; 95℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 30s, 40个循环; 72℃ 5min。取20 μL PCR产物进行10%聚丙烯酰胺凝胶电泳, 进行编辑效率初筛。另取20 μL PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳, 将目的片段进行胶回收纯化后, 与T载体(TaKaRa, 6011)连接并进行单克隆测序。将测序结果与野生型草鱼*cal2*序列进行比对, 并绘制草鱼*cal2*基因编辑效果图, 获得具有编辑效果的草鱼*cal2*嵌合体。

野生型和嵌合体对不同碱度的耐受性分析 将野生型和嵌合体各70尾, 分别在室内循环系统饲养1周, 每天投饵3次, 碱度耐受实验开始前禁食24h。NaHCO₃碱度胁迫实验共设置6个碱度梯度和1个淡水对照, 取500 mL锥形瓶分别配置0、20、40、60、80、100和150 mmol/L的NaHCO₃溶液各300 mL, 置于28℃恒温环境中曝气过夜。每个NaHCO₃溶液浓度处理10尾体重相近、健康的野生型或嵌合体, 每个锥形瓶1尾。

每隔1h记录1次死亡情况, 已死亡的草鱼不做处理留在溶液中, 直至全部草鱼死亡, 使用Graph-Pad Prism 10软件根据死亡情况绘制死亡曲线。

野生型和嵌合体在碱度60 mmol/L下鳃和肠道组织微观结构观察和细胞凋亡检测 另取野生型和嵌合体各3尾, 置于60 mmol/L的NaHCO₃溶液中胁迫40h后, 采集鳃和肠道组织, 并经4%多聚甲醛溶液固定24h。将固定好的鳃、肠组织进行石蜡包埋、切片。

用于HE染色的石蜡切片, 依次放入环保型脱蜡液连续脱蜡2次, 每次20min, 再转置于无水乙醇15min, 75%酒精5min, 最后用超纯水清洗干净。晾干切片, 放入高清恒染预处理液处理1min, 立即进行苏木素染色3—5min和伊红染色15s, 依次放入无水乙醇连续清洗3次, 每次2min; 正丁醇2次, 每次2min; 二甲苯透明2次, 每次2min, 最后中性树胶封片, 显微镜镜检并进行图像采集分析。

用于Tunel染色的石蜡切片, 依次放入环保型脱蜡液连续脱蜡3次, 每次10min; 无水乙醇漂洗3次, 每次5min; 最后用超纯水清洗干净。切片轻微甩干后用组化笔在组织周围画圈, 在圈内滴加蛋白酶K工作液覆盖组织, 37℃温箱孵育20min。将玻片置于PBS中在脱色摇床上晃动洗涤3次, 每次5min。切片轻微甩干后在圈内滴加缓冲液覆盖组织, 缓冲液常温孵育10min。按组织大小取适量TDT酶、dUTP、buffer按2:5:50比例混合, 加到圈内覆盖组织, 切片平放于湿盒内, 37℃恒温箱孵育1h, 湿盒内加少量水保持湿度。切片用PBS洗涤3次, 每次5min。去除PBS后, 在圈内滴加DAPI染色液, 避光室温孵育10min。玻片置于PBS中, 在脱色摇床上晃动洗涤3次, 每次5min。切片稍甩干, 用抗荧光猝灭封片剂封片, 并于荧光显微镜下观察并采集图像。

2 结果

2.1 NaHCO₃碱度胁迫显著抑制野生型草鱼肾和鳃组织*cal2*的表达

为探究草鱼*cal2*在NaHCO₃碱度胁迫下的功能, 我们通过梯度NaHCO₃碱度胁迫处理草鱼, 并对草鱼脑、心、肾和鳃这四种组织中*cal2*的表达是否会随着碱度的增加发生改变进行检测。实验结果表明, 随着碱度的升高, 脑和心组织中*cal2*的表达变化不明显。相反, 肾和鳃组织中*cal2*的表达均呈现下调趋势(图1)。尤其是草鱼肾组织, 在20 mmol/L NaHCO₃碱度胁迫时, *cal2*的表达水平显著下调。以上结果表明, *cal2*基因在草鱼响应碱度胁迫中具有重要作用。

2.2 *cal2*基因编辑效率的检测和*cal2*缺失嵌合体获得

根据NCBI上提供的草鱼*cal2*基因序列, 并按照CRISPR/Cas9基因编辑靶位点所需遵循的(GG.....NGG) 23 bp的原则, 本研究在第四个外显子中选择了两个靶位点, 分别标记为靶位点1和靶位点2(图2)。随后, 合成gRNA并与Cas9蛋白进行混合, 并在受精后的草鱼胚胎一细胞期进行显微注

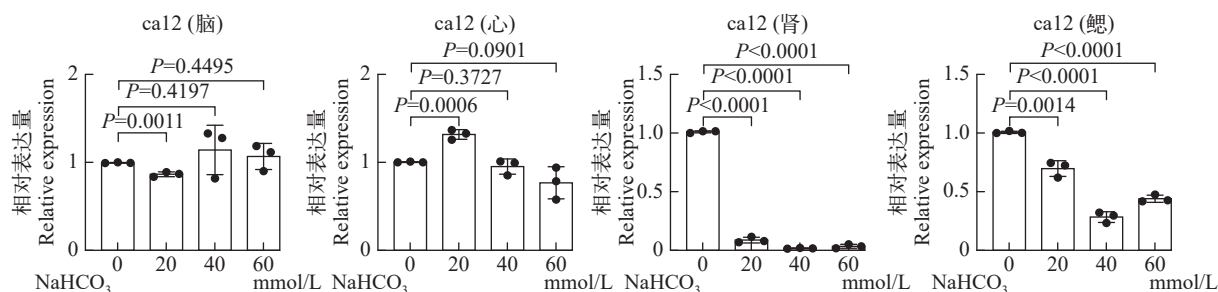


图1 不同浓度 NaHCO_3 胁迫下草鱼脑、心、肾、鳃组织中 $cal2$ 的表达情况

Fig. 1 The expression of *cal2* in the brain, heart, kidney, and gill tissues of grass carp under different concentrations of NaHCO_3 stress



图2 草鱼 $cal2$ 基因编辑靶点信息

Fig. 2 The editing target sites of grass carp *cal2* gene

射。待鱼苗平游后,选取野生型和基因编辑的部分鱼苗提取总DNA进行特异靶位点PCR,检测基因靶位点编辑效率为87.8%。PCR产物经10%聚丙烯酰胺凝胶电泳检测显示,与野生型(WT)相比,基因编辑后的嵌合体存在多种复杂条带(图3),表明基因编辑后的草鱼 $cal2$ 嵌合体存在多种基因型。进一步将PCR产物与T载体连接、转化、克隆并测序,共检测到4种不同的突变核苷酸序列(图4)。氨基酸比对发现,因4种突变序列提前出现终止密码子,导致氨基酸长度由509 aa缩短至128—146 aa(图4)。另外,本文也通过荧光定量PCR检测野生型和嵌合体草鱼 $cal2$ 基因在脑、心、肾和鳃组织中的表达量,显示嵌合体草鱼 $cal2$ 基因的表达均受到抑制(图5)。

2.3 野生型和 $cal2$ 嵌合体耐碱性能对比分析

为了验证 $cal2$ 的个体生物学功能,本研究配制不同浓度梯度的 NaHCO_3 溶液进行碱度胁迫。当处于20 mmol/L的 NaHCO_3 溶液下,野生型及嵌合体草鱼均无死亡;当处于40 mmol/L的 NaHCO_3 溶液下,野生型草鱼在48h开始死亡,嵌合体草鱼直到72h无死亡;当处于60 mmol/L的 NaHCO_3 溶液下,野生型草鱼48h开始快速死亡,到60h全部死亡,嵌合体直到72h无死亡;当草鱼处于80 mmol/L的 NaHCO_3 溶液下,野生型草鱼从18h开始死亡,直到36h全部死亡,且死亡速度逐渐加快,嵌合体草鱼从36h开始死亡,到60h全部死亡,且死亡速度稍慢于野生型;当草鱼处于100 mmol/L的 NaHCO_3 溶液下,野生型草鱼从4h开始死亡,到18h全部死亡,嵌合体草鱼从

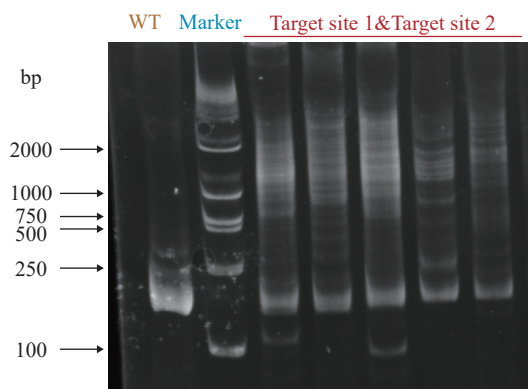


图3 草鱼 $cal2$ 基因编辑效率检测

Fig. 3 Detection of editing efficiency of grass carp *cal2* gene

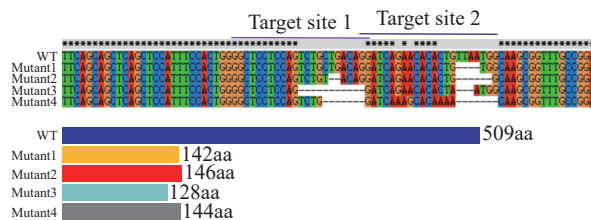


图4 不同草鱼嵌合体 $cal2$ 氨基酸序列和蛋白序列信息

Fig. 4 Amino acid sequence and protein sequence of different grass carp chimeras *cal2* gene

12h开始死亡,到36h全部死亡,死亡速度慢于野生型草鱼;当草鱼处于150 mmol/L的 NaHCO_3 溶液下,野生型草鱼从第2h开始死亡,到12h全部死亡,嵌合体草鱼从第3h开始死亡,到第30h全部死亡,死亡速度同样慢于野生型草鱼(图6和图7)。

2.4 NaHCO_3 碱度胁迫对野生型和 $cal2$ 嵌合体草鱼组织结构的影响

鳃组织 为了检测碱度胁迫下,野生型和 $cal2$ 嵌合体草鱼鳃组织的病变差异。本研究选取了60 mmol/L的 NaHCO_3 胁迫处理40h后的草鱼鳃组织进行组织病理学分析。经HE染色后根据组织病理学观察,发现相比于野生型草鱼,嵌合体草鱼鳃小片(GL)显著变短,减少与碱度水体的接触面积,并且伴随着线粒体富集细胞(MRC)增多,增加鳃组织与外界环境的离子交换。为了检测鳃组织的细胞凋亡情况,本研究通过Tunel染色,并经荧光显微镜拍照,发现野生型草鱼鳃组织的凋亡细胞占比明显,

嵌合体草鱼鳃组织少见凋亡细胞(图8)。以上结果表明, NaHCO_3 胁迫下嵌合体草鱼鳃组织病变情况显著低于野生型草鱼,碱度对嵌合体的鳃组织器质性损伤影响较小。

肠道结构 通过对60 mmol/L的 NaHCO_3 胁迫处理40h后的草鱼肠组织在4%多聚甲醛溶液中固定24h后,经HE染色发现,野生型草鱼肠绒毛排列紧密,长度较长;嵌合体草鱼肠绒毛排列疏松,长度显著变短,绒毛中央淋巴管显著增大。

在Tunel染色下观察肠道组织的细胞凋亡情况,我们发现野生型肠道组织的凋亡细胞占比明显,嵌合体肠道组织少见凋亡细胞(图9)。以上结果表明, NaHCO_3 胁迫下嵌合体草鱼肠组织病变情况显著低于野生型草鱼。

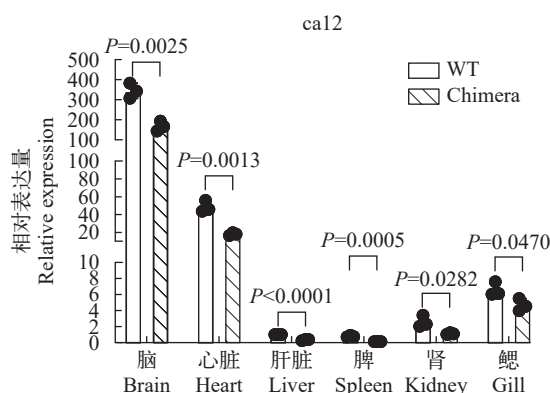


图5 野生型及嵌合体草鱼各组织中 $cal2$ 的表达情况

Fig. 5 The expression of $cal2$ in various tissues of wild-type and chimeric grass carp

3 讨论

本研究基于CRISPR/Cas9系统靶向敲除草鱼 $cal2$ 基因,创制耐碱新种质,旨在为盐碱水养殖提供优良种源。碳酸酐酶是一个庞大的锌金属酶家族,催化二氧化碳可逆的水合作用,也参与多种生物学过程。现已发现13种具有催化活性的CA亚型,包括与胞质有关的I、II、III、VII和XIII型;与膜相关的IV、IX、XII和XV型;与线粒体有关的VA和VB型;以及与分泌有关的VI型^[15, 16]。相较于陆生脊椎动物通过肾-肺系统精密调控酸碱平衡,水生生物60%以上的离子交换依赖鳃/肠等上皮组织的

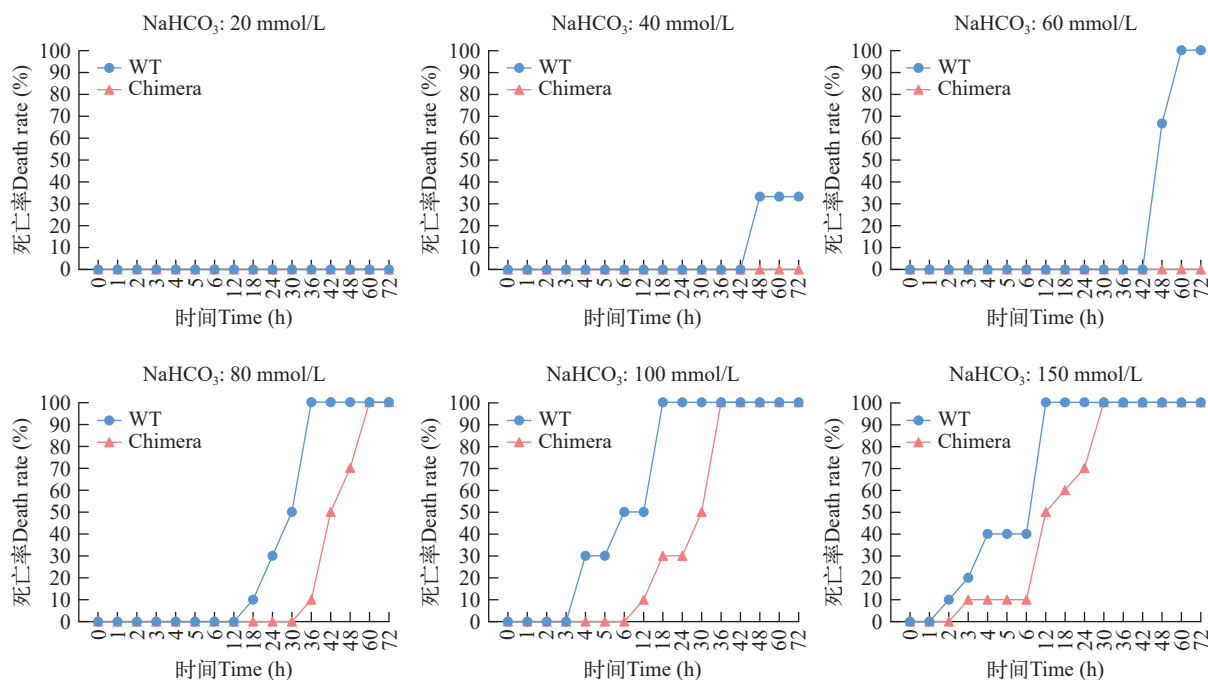


图6 野生型及 $cal2$ 基因编辑嵌合体草鱼在不同浓度梯度 NaHCO_3 溶液中的死亡曲线

Fig. 6 The death curve of wild-type and $cal2$ edited chimeric grass carp in different concentration gradient of NaHCO_3 solution

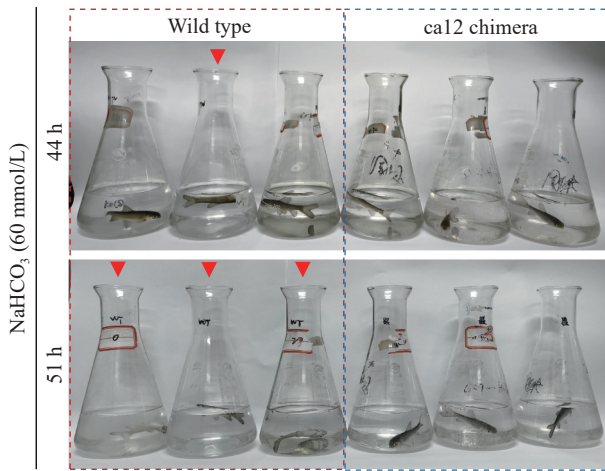


图7 野生型及 $cal2$ 基因敲除嵌合体草鱼在60 mmol/L NaHCO_3 碱性水体中的存活情况

Fig. 7 The survival analysis of wild-type and $cal2$ edited chimeric grass carp in an 60 mmol/L NaHCO_3 alkaline water

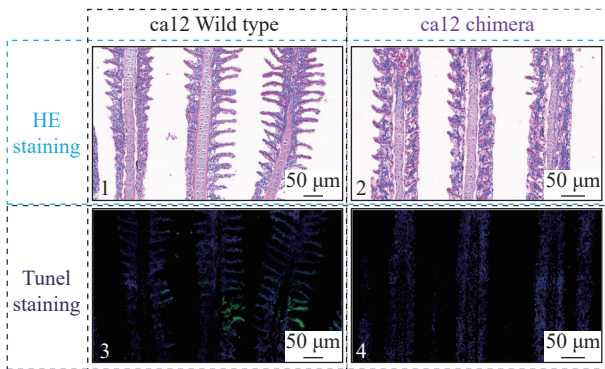


图8 野生型及 $cal2$ 基因敲除嵌合体草鱼经60 mmol/L NaHCO_3 胁迫后鳃组织的病理变化情况

Fig. 8 The pathological change of the gill tissue in wild-type and $cal2$ edited chimeric grass carp in 60 mmol/L NaHCO_3 alkaline water

CA活性^[17], 在鱼类的酸碱调节中发挥重要作用。在正常环境下, 生物的能量主要用于正常的生长和繁殖, 而水生生物在高碱度环境中要消耗大量能量维持渗透压平衡, 以此减少正常生理机能的能量消耗^[18, 19]。Lin等^[1]研究证实, 高碳酸酐酶活性和高pH对水生生物有很强的抑制作用, 会导致水生生物生长迟缓、血细胞参数急剧波动等, 这或许是盐碱水体产能低下的原因之一。

鳃在碱胁迫中的功能 鳃作为鱼类的呼吸器官, 是气体交换的主要部位。同时, 因为与水接触, 它也是鱼类渗透压调节的主要部位^[20]。本研究发现, $cal2$ 除了在脑和心中高表达外, 在鳃中的表达量也很高, 它被认为是产生 HCO_3^- 所必需的, 即参与 CO_2 的排泄过程^[21]。同时, 还促进了 Na^+ 和 Cl^- 的吸收^[20], 这个过程应该有助于维持鱼体酸碱平衡。但

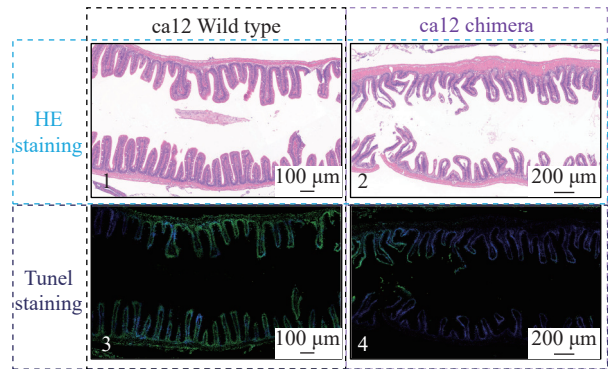


图9 野生型及 $cal2$ 基因敲除嵌合体草鱼经碳酸氢盐碱度胁迫后肠道组织的病理变化情况

Fig. 9 The pathological change of the intestinal tissue in wild-type and $cal2$ edited chimeric grass carp in 60 mmol/L NaHCO_3 alkaline water

是 Na^+ 和 Cl^- 进入血液会增加血浆渗透压, 这间接导致了幼鱼的呼吸性碱中毒^[22]。嵌合体因为经过基因编辑, 使 $cal2$ 无法产生正常功能的蛋白, 进而减缓了鳃部位的离子交换, 缓解了血浆渗透压的剧烈变化, 提高幼鱼在高碱胁迫下的存活率。为了适应高碱环境, 鳃丝在高渗透压的影响下发生脱水, 尤其是高表达CA的鳃丝上皮细胞, 脱水坏死脱落^[22], 导致鳃片的长度和厚度的减少, 也影响了鳃丝之间的间距, 这种适应性结构退化虽降低气体交换效率, 却有效减少离子交换面积, 是鱼体在高碱度胁迫下的生存妥协策略。同样, 肾脏也是机体维持酸碱平衡的重要器官, 其中以肾小管的重吸收和分泌两方面最为重要。在肾小管上皮细胞中, 有丰富的酸碱转运通道, 包括碳酸酐酶、钠氢交换体、氯酸盐共转运体等, 通过碳酸酐酶的作用, 可产生大量的氢离子, 达到排酸保碱的作用。因此, 在响应碱胁迫过程中, 适当降低碳酸酐酶活性, 可提高草鱼的耐碱能力。本研究发现, $cal2$ 在草鱼肾脏中的表达量显著低于其他组织, 但是在碳酸盐梯度碱度胁迫下, $cal2$ 在肾脏中的下调趋势最为明显。这种精准的调控模式更有利于鱼类维持体内的酸碱平衡, 以适应高碱环境, 从而提高其生存能力。

肠在碱胁迫中的功能 有研究表明, 大多数硬骨鱼的肠道上皮细胞可以分泌 HCO_3^- , 而且这个 HCO_3^- 不全是来源于外界环境, 体内代谢产生的 CO_2 也通过 HCO_3^- 从肠道上皮细胞排出^[23]。与鳃类似, 肠道的上皮细胞也是CA高表达的组织, 当外界环境的碱度发生变化时, 肠道和鳃会发生一套协同的调整^[24], 其中包括CA家族的表达变化、对离子的吸收排出及一些结构上的变化。处于高碱度胁迫状态下的鱼, 鳃从水体中吸收过多盐分的同时也

失去了部分的水, 肠道中则是吸收水的场所并且排出 HCO_3^- 以动态调整渗透压的平衡, 从肠道排出的 HCO_3^- 会跟水体中部分二价金属离子形成碳酸盐沉淀^[23, 25]。或许是这种碱性沉淀对肠道上皮细胞有明显的刺激, 导致肠道细胞的凋亡。嵌合体 $cal2$ 蛋白的缺失, 使得 HCO_3^- 的排出有所减缓, 减轻了碳酸盐沉淀对肠道的刺激。

综上, 本研究通过建立草鱼碱胁迫模型, 系统解析 $cal2$ 在鳃和肾组织中的表达动态, 同时发现高碱度胁迫下草鱼鳃和肠道组织出现大量凋亡细胞, 并伴随鳃丝上皮细胞大面积脱落坏死及肠道绒毛显著萎缩等典型病理损伤。利用CRISPR/Cas9基因编辑技术成功创制草鱼 $cal2$ 功能缺失型突变体, 其F0代在碱性水体中的存活率明显高于野生型。此项工作不仅为耐碱鱼类育种提供一个可工程化操作的靶点基因, 更构建了“基因编辑-表型验证-应用推广”的完整研发链条, 对提高盐碱水域渔业经济效益和生态效益具有重要的战略意义。

(作者声明本文符合出版伦理要求)

参考文献:

- [1] Lin T, Lai Q, Yao Z, *et al.* Combined effects of carbonate alkalinity and pH on survival, growth and haemocyte parameters of the Venus clam *Cyclina sinensis* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, **35**(2): 525-531.
- [2] Sharma B R, Minhas P S. Strategies for managing saline/alkali waters for sustainable agricultural production in South Asia [J]. *Agricultural Water Management*, 2005, **78**(1/2): 136-151.
- [3] Heng T, He X L, Yang L L, *et al.* Mechanism of Saline-Alkali land improvement using subsurface pipe and vertical well drainage measures and its response to agricultural soil ecosystem [J]. *Environmental Pollution*, 2022(293): 118583.
- [4] Sun Y C, Han S C, Yao M Z, *et al.* Exploring the metabolic biomarkers and pathway changes in crucian under carbonate alkalinity exposure using high-throughput metabolomics analysis based on UPLC-ESI-QTOF-MS [J]. *RSC Advances*, 2020, **10**(3): 1552-1571.
- [5] Zhao L, Xu P, Sun X W. Ammonia excretion related genes expression of common carp under the stress of carbonate alkalinity [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2013, **29**(4): 185-193. [赵兰, 徐鹏, 孙效文. 碳酸盐碱度胁迫下鲤鱼氨排泄相关基因的差异表达 [J]. *生物技术通报*, 2013, **29**(4): 185-193.]
- [6] Zhao Y, Wu J W, Wang Y, *et al.* Role of miR-21 in alkalinity stress tolerance in tilapia [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, **471**(1): 26-33.
- [7] Yao Z, Lai Q, Hao Z, *et al.* Carbonic anhydrase 2-like and Na^+/K^+ -ATPase α gene expression in medaka (*Oryzias latipes*) under carbonate alkalinity stress [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2015, **41**(6): 1491-1500.
- [8] Liu X F, Huang T Q, Liu E H, *et al.* Effects of carbonate alkalinity stress on growth, antioxidant capacity and expression of growth-related genes in ussuri whitefish *Coregonus ussuriensis* [J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2024, **37**(1): 1-8. [刘雪峰, 黄天晴, 刘恩慧, 等. 碳酸盐碱度胁迫对乌苏里白鲑幼鱼生长、抗氧化能力和生长基因表达的影响 [J]. *水产学杂志*, 2024, **37**(1): 1-8.]
- [9] Cui Y R, Li J, Yan L Y, *et al.* Saline and alkaline stress on intestinal structure and permeation-related gene expression of *Gymnocypris przewalskii* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2025, **49**(4): 40-49. [崔妍蓉, 李瑾, 颜鲁杨, 等. 盐碱胁迫对青海湖裸鲤肠道结构和渗透相关基因表达的影响 [J]. *水生生物学报*, 2025, **49**(4): 40-49.]
- [10] Zhao X F, Liang L Q, Liew H J, *et al.* Identification and analysis of long non-coding RNAs in *Leuciscus waleckii* adapted to highly alkaline conditions [J]. *Frontiers in Physiology*, 2021(12): 665268.
- [11] Zhang H C, Ma Q H, Xu B K, *et al.* Screening and analysis of the osmotic, immune, metabolic related genes of *Gymnocypris przewalskii* in saline-alkali tolerance [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2023, **47**(12): 19-38. [张海琛, 马清花, 许保可, 等. 青海湖裸鲤盐碱耐受过程中的渗透、免疫、代谢相关基因筛选和分析 [J]. *水产学报*, 2023, **47**(12): 19-38.]
- [12] Chang Y M, Zhao X F, Liew H J, *et al.* Effects of bicarbonate stress on serum ions and gill transporters in alkali and freshwater Forms of Amur ide (*Leuciscus waleckii*) [J]. *Frontiers in Physiology*, 2021(12): 676096.
- [13] Chang Y M, Liang L Q. Advances of research of physiological and molecular mechanisms related to alkali-saline adaptation for fish species inhabiting alkali-saline water [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, **45**(5): 798-812. [常玉梅, 梁利群. 耐盐碱鱼类的生理和分子机制研究进展 [J]. *水产学报*, 2021, **45**(5): 798-812.]
- [14] Xiao H X, Liu T Q, Lu C Y, *et al.* Effects of acute sodium bicarbonate carbonate alkalinity stress on survival and related enzyme activity of grass carp [J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2024, **44**(6): 1-9. [肖黄璇, 刘天奇, 鲁翠云, 等. 急性碳酸氢钠碱度胁迫对草鱼存活及相关酶活性的影响 [J]. *广东海洋大学学报*, 2024, **44**(6): 1-9.]
- [15] Supuran C T. Carbonic anhydrase inhibitors and activators for novel therapeutic applications [J]. *Future Medicinal Chemistry*, 2011, **3**(9): 1165-1180.
- [16] Aspatwar A, Tolvanen M E E, Ortutay C, *et al.* Carbonic anhydrase related protein VIII and its role in neurodegeneration and cancer [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2010, **16**(29): 3264-3276.
- [17] Gilmour K M, Perry S F. Carbonic anhydrase and acid-base regulation in fish [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2009, 212(Pt 11): 1647-1661.
- [18] Su H, Ma D, Fan J, *et al.* Metabolism response mechanism in the gill of *Oreochromis mossambicus* under salinity, alkalinity and saline-alkalinity stresses [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2023(251): 114523.

- [19] Truchot J P, Forgue J. Effect of water alkalinity on gill CO₂ exchange and internal pco [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 1998, 119(1): 131-136.
- [20] Evans D H, Piermarini P M, Choe K P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste [J]. *Physiological Reviews*, 2005, 85(1): 97-177.
- [21] Gilmour K M. New insights into the many functions of carbonic anhydrase in fish gills [J]. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 2012, 184(3): 223-230.
- [22] Wen J, Chen S L, Xu W Y, *et al.* Effects of high NaHCO₃ alkalinity on growth, tissue structure, digestive enzyme activity, and gut microflora of grass carp juvenile [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2023, 30(36): 85223-85236.
- [23] Wilson R W, Wilson J M, Grosell M. Intestinal bicarbonate secretion by marine teleost fish—why and how [J]? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2002, 1566(1/2): 182-193.
- [24] Gilmour K M, Perry S F, Esbaugh A J, *et al.* Compensatory regulation of acid-base balance during salinity transfer in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2012, 182(2): 259-274.
- [25] Chourasia T K, D'Cotta H, Baroiller J F, *et al.* Effects of the acclimation to high salinity on intestinal ion and peptide transporters in two tilapia species that differ in their salinity tolerance [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 2018(218): 16-23.

LOSS OF *CA12* GENE SIGNIFICANTLY ENHANCES THE TOLERANCE OF GRASS CARP (*CTENOPHARYNGODON IDELLA*) TO CARBONATE ALKALINITY STRESS

ZHANG Zi-Yu^{1,2}, LIU Hui-Min³, QUAN Rui², XIAO Wu-Han² and CAI Xiao-Lian²

(1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China; 2. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 3. College of Fisheries of Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: To explore the function of carbonic anhydrase 12 (*ca12*) in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) response to carbonate alkalinity stress, we subjected grass carp to alkalinity stress at different NaHCO₃ concentration gradients (0, 20, 40, 60, 80, 100, 150 mmol/L), and systematically analyzed the expression level of *ca12* in various tissues (brain, heart, kidney, and gill) as well as the histopathological changes in gill and intestinal tissues. Compared with wild-type grass carp, chimeric grass carp edited by CRISPR/Cas9 technology had higher survival rate at different alkalinity levels and time points. Moreover, the expression levels of *ca12* in the kidney and gill tissues were significantly downregulated with increasing alkalinity. Under stimulation with 60 mM/L NaHCO₃, gill and intestinal tissues of chimeric grass carp showed adaptive morphology changes, with a significantly lower apoptosis rate than that of wild-type grass carp, and the survival rate of chimeric grass carp was also higher under this condition. The study indicates that high alkalinity stress exerts adverse effects on grass carp, and the chimeric grass carp edited by CRISPR/Cas9 technology display significantly higher survival rates in high-alkalinity water than wild-type grass carp. This suggests that the *ca12* plays an important regulatory role in grass carp under high-alkaline conditions, making it a critical target for grass carp adaptation to high-alkaline environments. Loss of *ca12* function significantly enhances the alkalinity tolerance of grass carp, providing a new strategy to improve the aquaculture rate in saline-alkali areas and expand the development space of the fishery industry.

Key words: Gene editing; NaHCO₃ stress; Histopathology; *Ctenopharyngodon idella*