中华绒螯蟹溶血磷脂酰甘油酰基转移酶的基因克隆及其在卵巢发育过程中的表达特征

潘柯伍[1], 王琳[1], 郭勍[1], 吴旭干[1,2]

1. 上海海洋大学 农业农村部鱼类营养和环境生态研究中心, 上海 201306;
2. 上海海洋大学 农业农村部淡水种质资源重点实验室, 上海 201306;

前言

- 磷脂酰甘油(phosphatidylglycerol, PG)是一种重要的膜聚甘油磷脂, 它不仅是细胞膜的结构屏障, 而且是脂质介质的前体。PG有两种生成途径, 一种是通过胞苷二磷酸二酰基甘油(cytidine diphosphate-diacylglycerol, CDP-DAG)途径, CDP-DAG在磷脂酰甘油磷酸合成酶和磷酸酶作用于下生成PG; 另一种是通过溶血磷脂酰甘油酰基转移酶(lysophosphatidylglycerol acyltransferase, LPGAT)直接将溶血磷脂酰甘油(lysophosphatidylglycerol, LPG)再酰化形成PG,
- 目前, 关于LPGAT的研究除了来自各种组织微粒体的相关活性报道外, 还在其他生物中鉴定到了LPGAT, 但这主要集中在哺乳动物上。
- 甲壳动物是一类重要的水生动物, 具有重要的经济价值和生态价值,在其卵巢发育过程中, 磷脂不仅是卵母细胞卵黄体和细胞膜的重要组成物质, 且在甘油三酯乳化和运输过程中起着重要作用。
- 中华绒螯蟹是中国的重要经济蟹类, 卵巢是其重要的可食组织之一, 成熟卵巢中通常积累了大量甘油三酯和磷脂, 因此卵巢发育情况及其脂类组成直接影响河蟹的食用价值和营养价值。先前研究已经报道了饲料中添加磷脂对河蟹生长、卵巢发育和生殖性能的影响, 尚不清楚磷脂合成的主要功能基因及其在卵巢发育过程中的作用机制。因此, 以河蟹为对象研究 *lpgat* 在甲壳动物磷脂合成中的作用具有一定意义。

材料与方法

1. 河蟹来源及组织取样

实验用河蟹均来自上海海洋大学崇明河蟹科研基地，从2019年7月至2020年1月每月中旬进行采样，每次挑选12只肢体健全、体重接近和活力较好雌蟹运回实验室暂养，在循环水系统中暂养一周后用于实验，实验用蟹体重范围为60g-135g。河蟹卵巢发育分为五期, 每个发育期随机取8只河蟹的卵巢和肝胰腺用于后续实验，一份样品保存于–80℃ 冰箱中用于RNA提取，另一份样品分别固定在4%的多聚甲醛中用于组织学观察和原位杂交。

2. RNA提取和cDNA合成

采用TRlzol法将不同卵巢发育时期的组织提取总RNA。之后，使用TaKaRa公司的反向第一链cDNA合成试剂盒合成第一链cDNA。

3. Es-lpgat1的扩增、纯化及测序分析

根据现有的河蟹卵巢发育转录组数据和河蟹基因组草图筛选得到Es-lpgat1的序列, 利用Primer Premier 6软件设计PCR引物，选取质量合格的肝组织cDNA样品进行PCR扩增。

4. Es-lpgat1的生物信息学分析

使用ORF finder网站预测Es-lpgat1的开放阅读框, 后根据cDNA序列推到的氨基酸序列, 运用相应的生物学网络服务分别对Es-lpgat1的等电点、分子量、信号肽、结构域、功能位点进行预测。从NCBI的GeneBank下载不同物种LPGAT的氨基酸序列, 使用BioEdit7及多序列对比工具进行多序列比对, 利用MEGA 5.0软件的邻接法(neighbor-joining, NJ)构建不同物种LPGAT1的系统进化树。利用Missense3D获得3D结构图形。

5.实时荧光定量PCR

本研究在Es-lpgat1保守编码区域内设计特异性实时荧光定量引物，以β-actin作为内参基因。研究Es-lpgat1在河蟹不同组织和卵巢发育各阶段的表达特征, 每个组织有8只生物学样本重复, 每个样品重复3次。

6.原位杂交

提取Es-lpgat1阳性菌落的质粒用于扩增DNA模板, 设计带有T7启动子的引物Es-lpgat1-dsF/R (正向引物5′端添加T7序列) 扩增正向探针模板, Es-lpgat1-F/dsR (反向引物5′端添加T7序列) 扩增反向探针模板，合成好探针后做原位杂交。

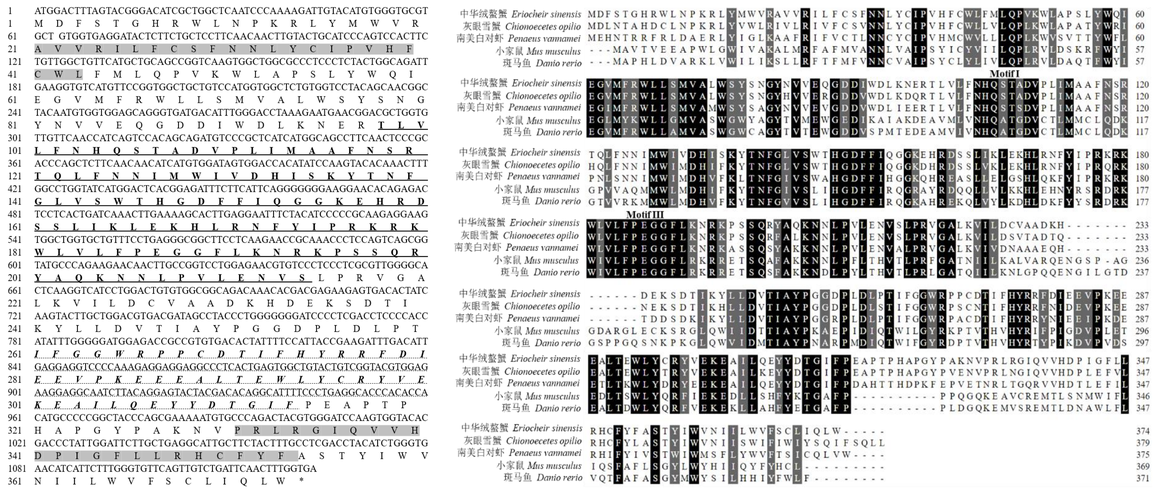
7. dsRNA的合成及活体干扰

设计三对dsEs-lpgat1-1、dsEs-lpgat1-2、dsEs-lpgat1-3干扰片段，以dsEGFP为对照组分别注射到河蟹体内, 每组重复6只河蟹, 注射24h后, 取河蟹肝胰腺组织用于提取RNA和荧光定量分析, 根据RNA表达情况筛选最佳干扰片段。为进一步了解Es-lpgat1对甘油三酯合成其余相关基因表达的影响，干扰Es-lpgat1-mRNA基因后, 检测河蟹Es-gpats、Es-agpats、Es-dgats的表达水平。

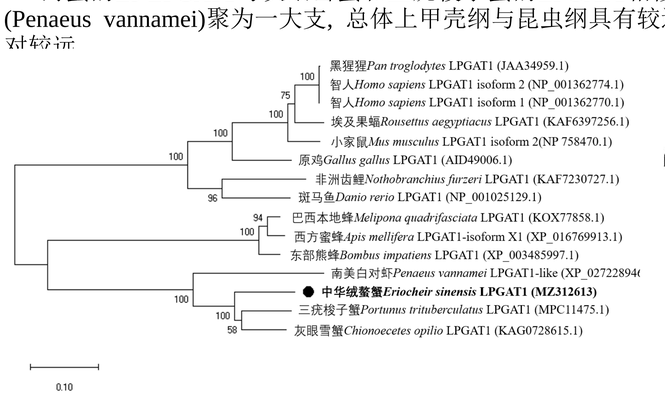
结果

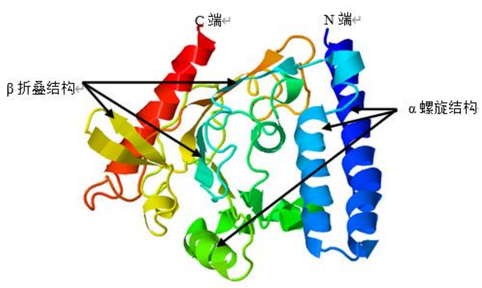
➢ Es-lpgat1 生物信息学分析

Es-lpgat1 属于 LPLAT 超级家族，包括两个跨膜螺旋区域，一个溶血磷脂酸酰基转移酶结构域Acyltransf_C以及一个磷酸酰基转移酶结构域PlsC 区域。在该区域中存在 2 个模体(motif), 即 NH(x)4D 和FPEGT。



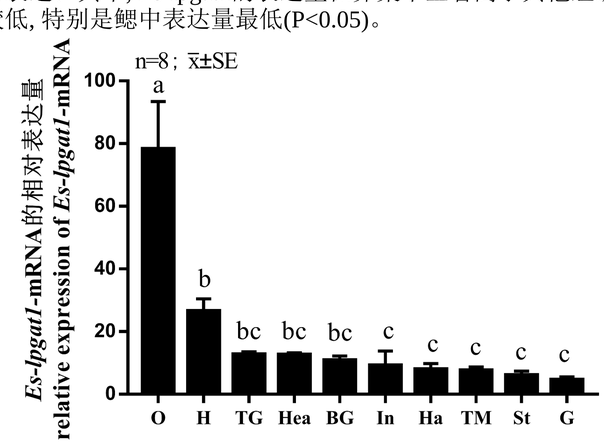
河蟹的Es-LPGAT1与灰眼雪蟹和三疣梭子蟹的LPGAT1相似性最高，聚为一支，之后再与南美白对虾(Penaeus vannamei)聚为一大支，总体上甲壳纲与昆虫纲具有较近的亲缘关系，而与脊椎动物的亲缘关系相对较远





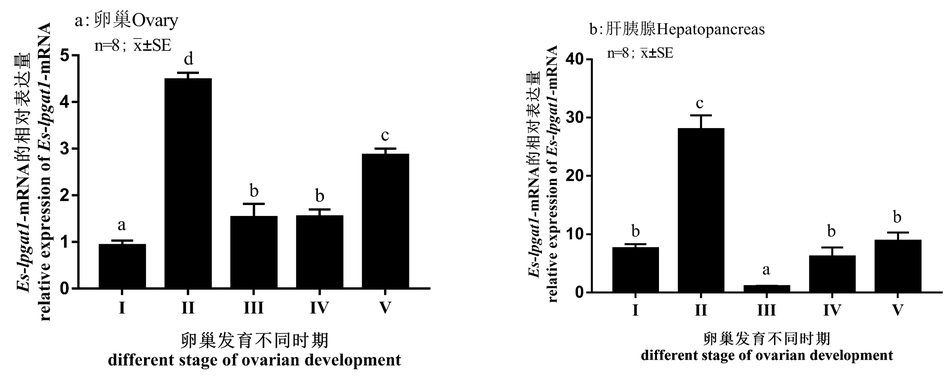
➢ Es-lpgat1 在河蟹不同组织中的表达特征

qRT-PCR结果表明Es-lpgat1在河蟹的卵巢、肝胰腺、胸神经节、心脏、脑神经节、肠道、血淋巴、三角膜、胃和鳃中均有表达。其中, Es-lpgat1的表达量在卵巢中显著高于其他组织(P<0.05), 其次为肝胰腺, 在其余组织中表达量较低, 特别是鳃中表达量最低(P<0.05)。



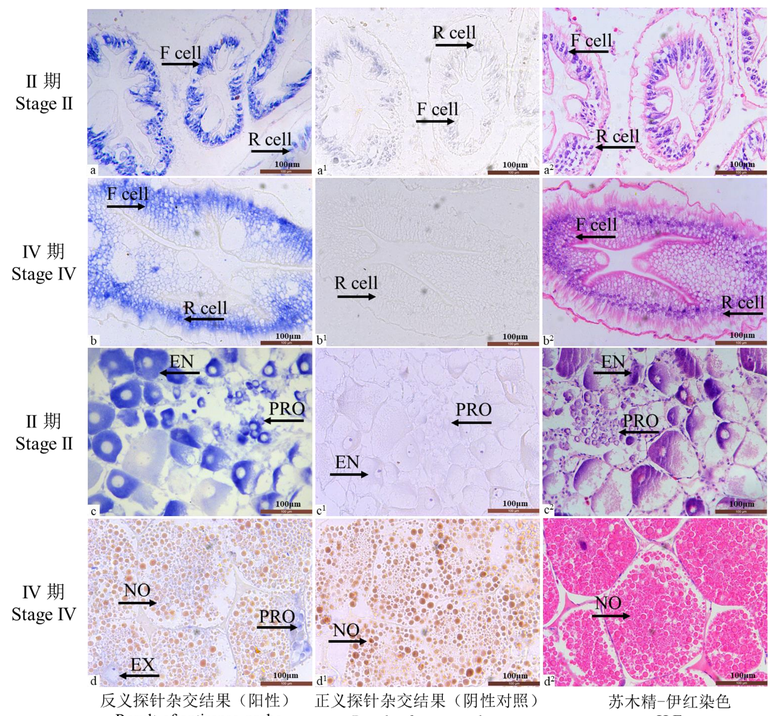
➢ Es-lpgat1在河蟹卵巢发育过程中的表达特征

河蟹卵巢中Es-lpgat1的表达水平在卵巢发育I期最低, 在卵巢发育II期快速上升至最高水平(P<0.05), 之后快速下降，III期和IV期的表达量均较低，且差异不显著(P>0.05)，V期又显著上升(P<0.05)。肝胰腺中Es-lpgat1-mRNA表达量在卵巢发育II期快速上升达到最高值(P<0.05)，之后在III期快速下降至最低点，随后又从III期到V期逐渐增加(P<0.05)。



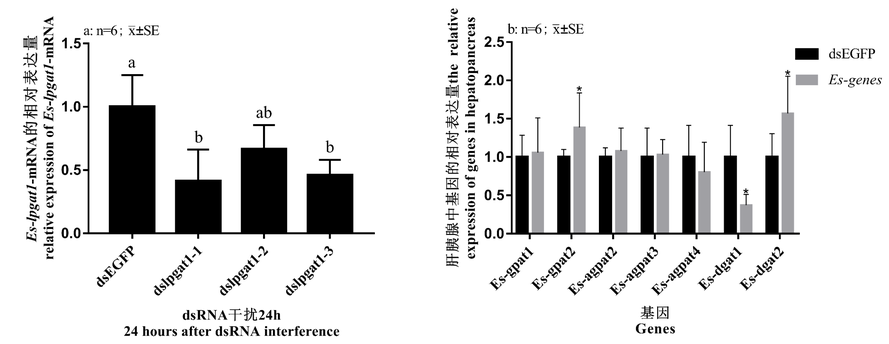
➢ Es-lpgat1在河蟹肝胰腺和卵巢中的mRNA定位

在卵巢发育II期，Es-lpgat1-mRNA在肝胰腺和卵巢中都有强烈阳性信号，肝胰腺中Es-lpgat1-mRNA信号定位于成纤维细胞(fibrillar cell, F细胞)和吸收细胞(resorptive cell, R细胞)，卵巢中Es-lpgat1-mRNA信号定位于卵黄前卵母细胞(previtellogenic oocytes, PRO)和内源性卵黄源卵母细胞(endogenous vitellogenic oocytes, EN)的细胞质中。在卵巢发育IV期，肝胰腺中的Es-lpgat1-mRNA仍然定位于F细胞和R细胞中；IV期卵巢中Es-lpgat1-mRNA信号较弱。



➢ Es-lpgat1最佳干扰片段的筛选及甘油三酯合成相关基因表达特征

dsRNA干扰24h后的结果显示, dslpgat1-1为最佳干扰片段, Es-lpgat1干扰后, Es-gpat2和Es-dgat2的表达水平分别上调了39%和57%，同时Es-agpat4和Es-dgat1的表达水平分别下调了20%和63%，而Es-gpat1、Es-agpat2和Es-agpat3的转录水平无显著变化。



结果

- 河蟹Es-lpgat1在多个组织中广泛表达, 特别在卵巢和肝胰腺中的表达量最高, 其次为神经组织和心脏
- 原位杂交结果显示Es-lpgat1-mRNA的阳性信号主要定位于卵黄发生前的卵母细胞、内源性卵黄合成期的卵母细胞、早期肝胰腺的F细胞和R细胞中。
- dsRNA干扰Es-lpgat1对河蟹磷脂合成可能具有负面作用, 但促进甘油三酯合成途径中的部分基因表达。