



# 三角帆蚌溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶1 *HcLPCAT1* 基因功能分析及壳色性状相关SNP筛选

郭柏莹<sup>1,3</sup>, 张进盼<sup>1,3</sup>, 陆风辉<sup>1,3</sup>, 颜玲<sup>1,3</sup>, 王贺<sup>1,3</sup>, 白志毅<sup>1,2,3</sup>

1. 上海海洋大学, 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海, 201306
2. 上海海洋大学, 上海市水产养殖工程技术研究中心, 上海, 201306
3. 上海海洋大学, 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心, 上海, 201306

## Abstract

溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶1 (LPCAT1) 是一种重要的脂质代谢酶。为明确三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) *HcLPCAT1* 基因在类胡萝卜素代谢中的功能。本研究采用RACE技术获得*HcLPCAT1* 基因cDNA全长1675bp, ORF区1296bp编码431个氨基酸; qPCR分析发现*HcLPCAT1* 基因在紫色三角帆蚌各组织中表达量均高于白色三角帆蚌相应组织, 且在外套膜中差异显著 ( $P<0.05$ ); 原位杂交检测到的阳性信号主要定位在外套膜的外褶、背膜区、腹膜区; 紫蚌补充投喂 $\beta$ -胡萝卜素后, *HcLPCAT1* 基因在肝胰腺、中央膜、边缘膜中表达量极显著上调 ( $P<0.01$ ), 同时相应组织中总类胡萝卜素含量 (TCC) 极显著升高 ( $P<0.01$ )。采用直接测序法鉴定出三角帆蚌*HcLPCAT1* 基因5个SNP位点的基因型与内壳色存在显著相关性 ( $P<0.05$ ), 其中为紫色三角帆蚌优势单倍型两种, 白色三角帆蚌优势单倍型三种。本研究鉴定的*HcLPCAT1* 基因为解析三角帆蚌类胡萝卜素代谢机制和分子辅助育种提供了研究基础。

## Introduction

珍珠颜色是影响珍珠价值的重要性状之一, 目前已知三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 内壳色显著影响所育珍珠颜色, 上海海洋大学以三角帆蚌内壳色紫色为目标性状培育出产紫色珍珠的国审水产新品种三角帆蚌“申紫1号”。

类胡萝卜素、黑色素、卟啉等有机色素代谢影响三角帆蚌珍珠颜色的形成, 类胡萝卜素是一种稳定且着色良好的天然着色剂, 生产中通常用于改善水产品的体色。

本实验室孙明龙等补充投喂 $\beta$ -胡萝卜素后三角帆蚌的内壳色色度得到了显著提升, 三角帆蚌类胡萝卜素含量与内壳色密切相关。

溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶1 (lysophosphatidylcholine acyltransferase 1, LPCAT1) 是一种内质网膜蛋白, 参与磷脂合成, 支持脂质单层中磷脂酰胆碱 (PC) 的形成。PC是脂滴形成的关键成分, 是细胞内类胡萝卜素储存的主要场所。

对虾夷扇贝 (*Mizuhopecten yessoensis*) 的橙色和白色闭壳肌个体进行全基因组DNA甲基化分析得出4个最显著差异甲基化位点, 其中之一位于LPCAT1的基因区域, 初步证实该基因在类胡萝卜素代谢过程中的调控。

本研究克隆了三角帆蚌 *HcLPCAT1* 基因 cDNA 全长序列 采用实时荧光定量 qRT-PCR和原位杂交技术确定 *HcLPCAT1* 基因在三角帆蚌各组织中的表达特征, 通过 *HcLPCAT1* 基因上 SNP 位点及单倍型与内壳色的关联分析, 获得与内壳色相关的分子标记旨在研究三角帆蚌 *HcLPCAT1* 基因在类胡萝卜素代谢和贝壳颜色形成中的功能, 提高三角帆蚌壳色改良效率。

## Measures

一、实验材料: 实验蚌 (白色蚌 W, 紫色蚌 P) 均取自浙江武义伟民水产养殖基地 (图1)

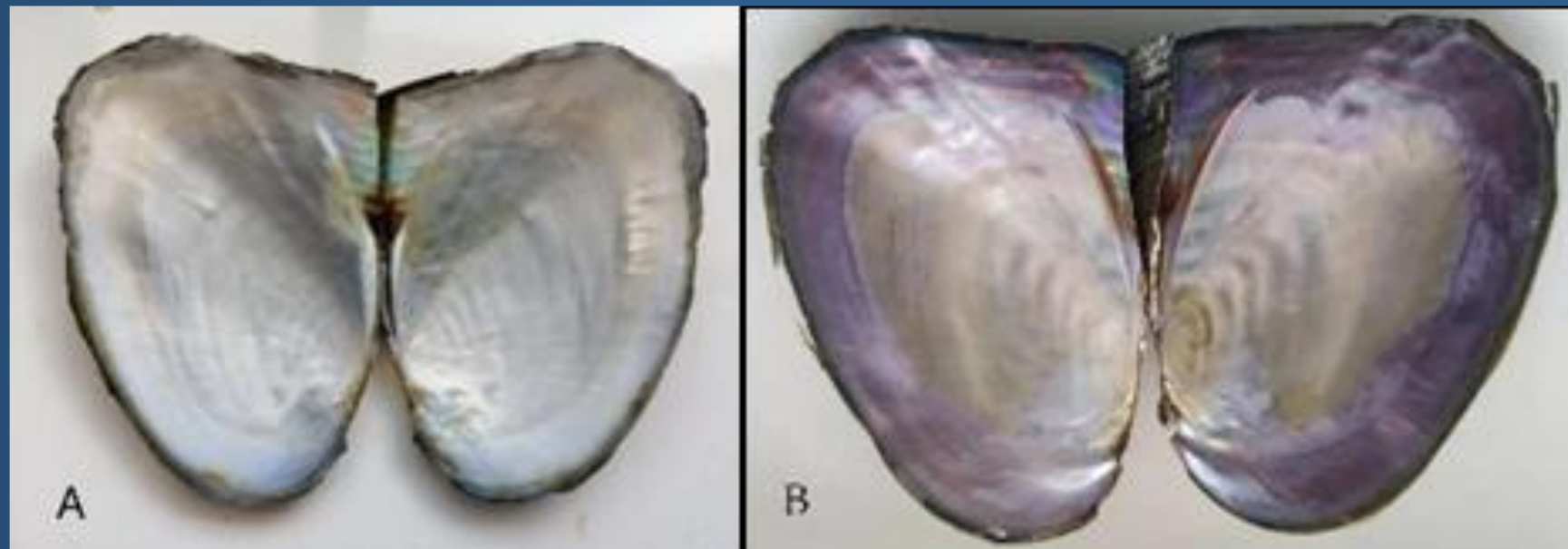


图1 两种内壳色三角帆蚌  
A为白色蚌 (W) B为紫色蚌 (P)

二、*HcLPCAT1* 基因克隆及序列分析

使用TRIzol法提取总RNA并验证其纯度和完整性。基于三角帆蚌外套膜转录组库设计*HcLPCAT1*基因的引物, 根据RACE引物进行巢式PCR反应获得*HcLPCAT1*基因cDNA全长并以MAGE 7.0软件最大似然法Maximum Likelihood ML构建三角帆蚌*HcLPCAT1*氨基酸序列系统发育树。

三、*HcLPCAT1* 的表达分析

参照*HcLPCAT1*基因全长序列设计引物制备探针并纯化。设计引物制备探针并纯化。取三角帆蚌外套膜组织, 在4%的多聚甲醛溶液固定6h后, 脱水20h以上; 使用Leica CM1950 (Leica, 德国) 冰冻切片机切出厚度为10 $\mu$ m的切片。按ISH步骤进行杂交后洗涤, 再用稀释的NBT/BCIP Stock Solution NBT/BCIP Stock Solution (Roche中国) 避光显色, 洗涤光显色, 洗涤2次后显微镜下拍照记录。

四、饵料补充投喂 $\beta$ 胡萝卜素基因表达与总胡萝卜素沉积的关联分析

饵料补充投喂实验, 选取同一规格2龄紫色蚌, 将其分成2组, 补充投喂组和对照组。对照组仅投喂小球藻, 补充投喂组除日常投喂小球藻饵料外, 另外添加 $\beta$ 胡萝卜素粉剂 (含量1%, 湖北欣和生物科技有限公司, 湖北), 投喂浓度为20 mg/L, 连续投喂15 d。每天8:00和20:00定时进行投喂。完成投喂周期后, 对两组三角帆蚌的肝胰腺、中央膜、边缘膜等组织进行总类胡萝卜素提取, 并计算总类胡萝卜素含量 (TCC)。

五、*HcLPCAT1* 基因的 SNP 位点筛选及分析

三角帆蚌内壳色参数测量, 并计算色差值 $\Delta E$ 。使用海洋动物DNA提取试剂盒 (天根生化科技, 北京, 中国) 提取三角帆蚌边缘膜基因组DNA, 检测合格后用引物进行扩增测序, 测序结果使用Sequencher 5.4.6进行比对分析获得SNP位点采用SPSS 19.0软件将*HcLPCAT1*基因上单个SNP位点不同基因型与140只三角帆蚌的内壳色参数进行关联分析, 采用SHEsis软件进行位点间连锁不平衡分析和单倍型构建。

## Results

*HcLPCAT1*基因克隆及序列分析

*HcLPCAT1*基因cDNA全长1675 bp其中包含1296 bp的ORF区编码了431个氨基酸 (GenBank登录号: MT821805)。

*HcLPCAT1* 系统进化树分析

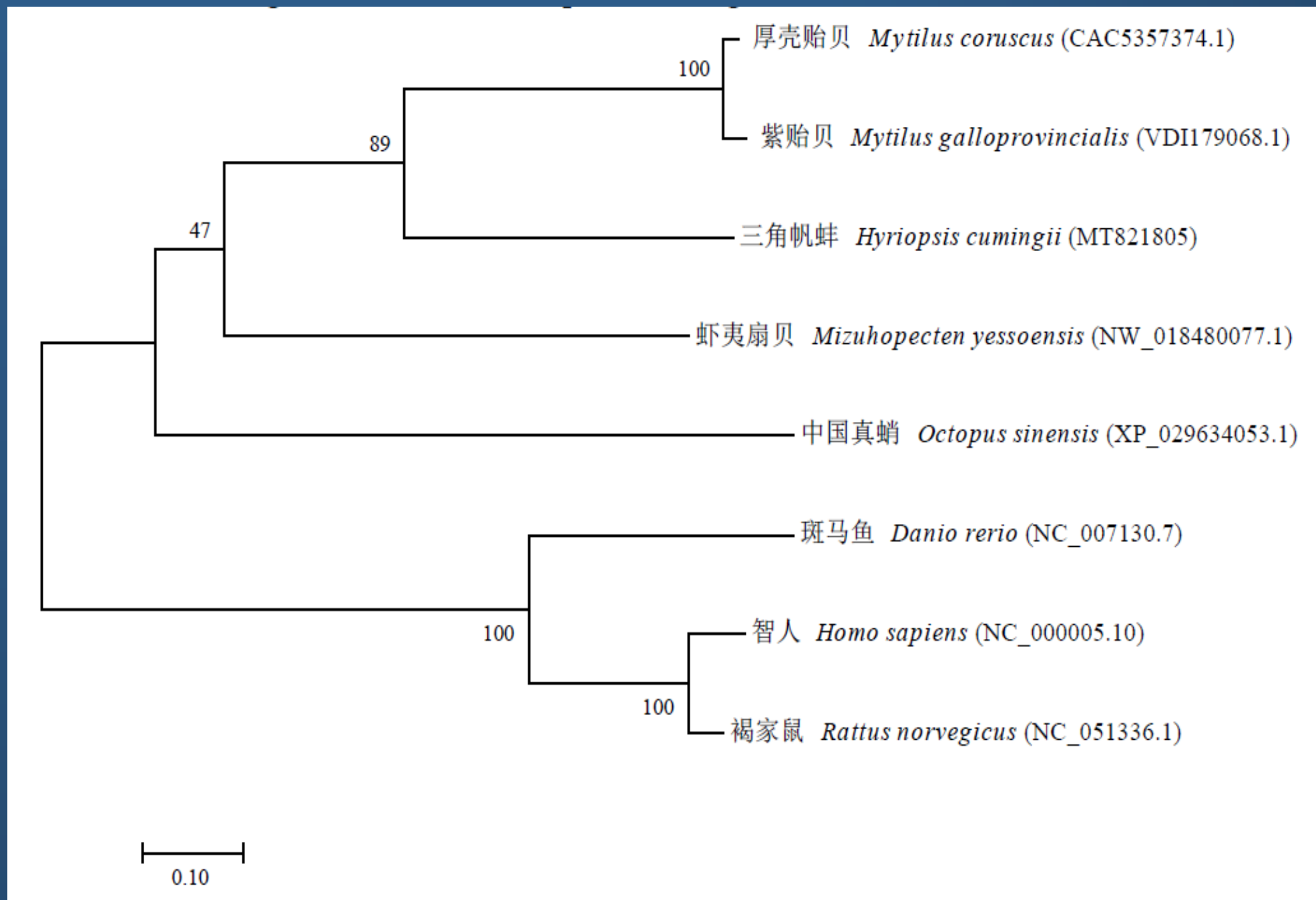


图2 *HcLPCAT1*氨基酸序列构建的ML进化树

*HcLPCAT1* 基因在不同壳色三角帆蚌组织中的表达分析

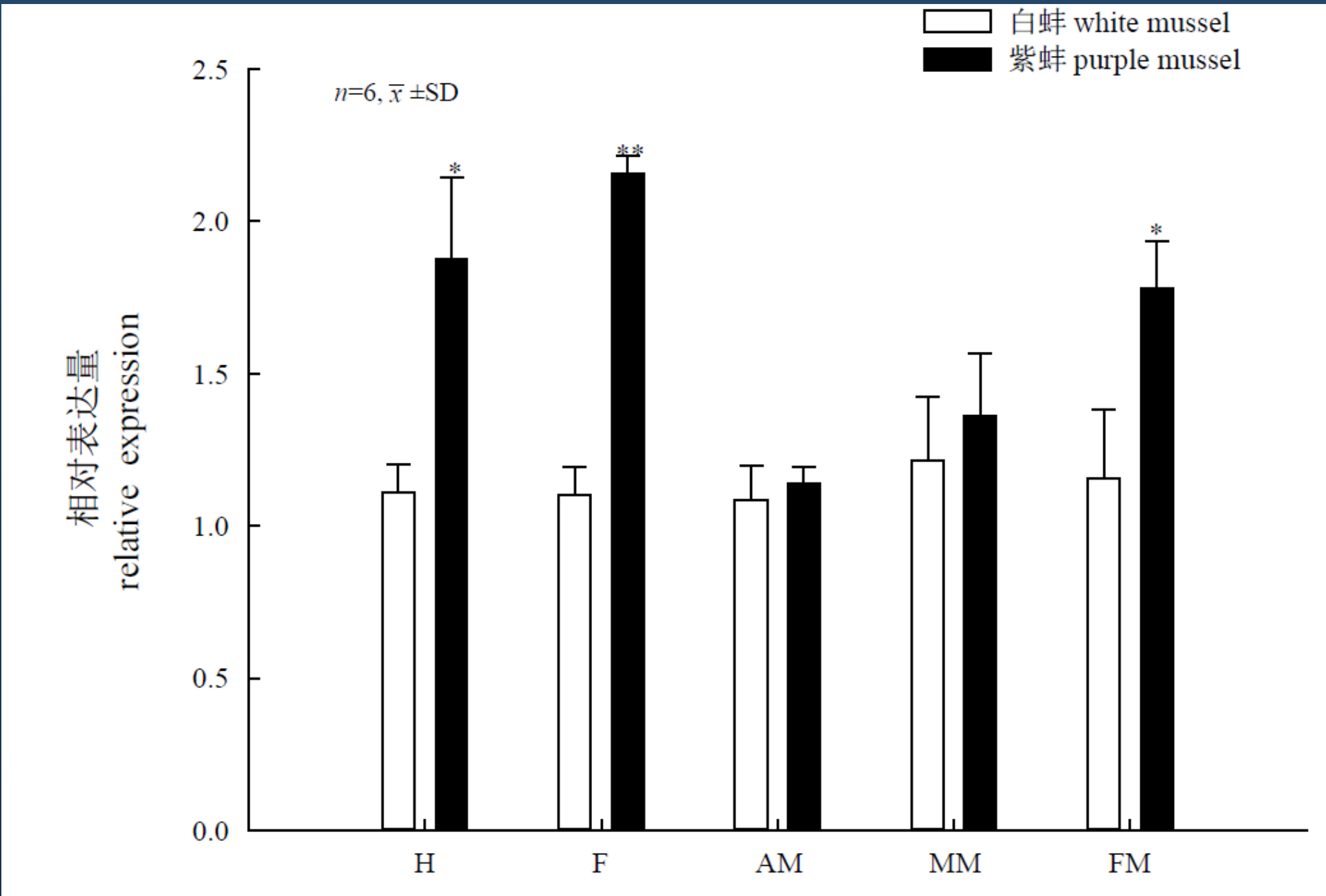


图3 *HcLPCAT1*基因在白色、紫色三角帆蚌不同组织中的表达

H: 肝胰腺, F: 斧足, AM: 闭壳肌, MM: 中央膜, FM: 边缘膜; “\*”表示相同组织白色和紫色三角帆蚌间*HcLPCAT1*表达差异显著 ( $P<0.05$ ), “\*\*”表示差异极显著 ( $P<0.01$ )。

ISH 结果分析

ISH分析结果显示*HcLPCAT1*基因在外套膜的外褶、背膜区、腹膜区, 外褶与中褶连接处以及部分中褶均有较强的阳性信号出现 (图A), 这些组织均是贝壳形成的关键部位。阴性对照的相应组织中并未检测到阳性信号 (图B)。

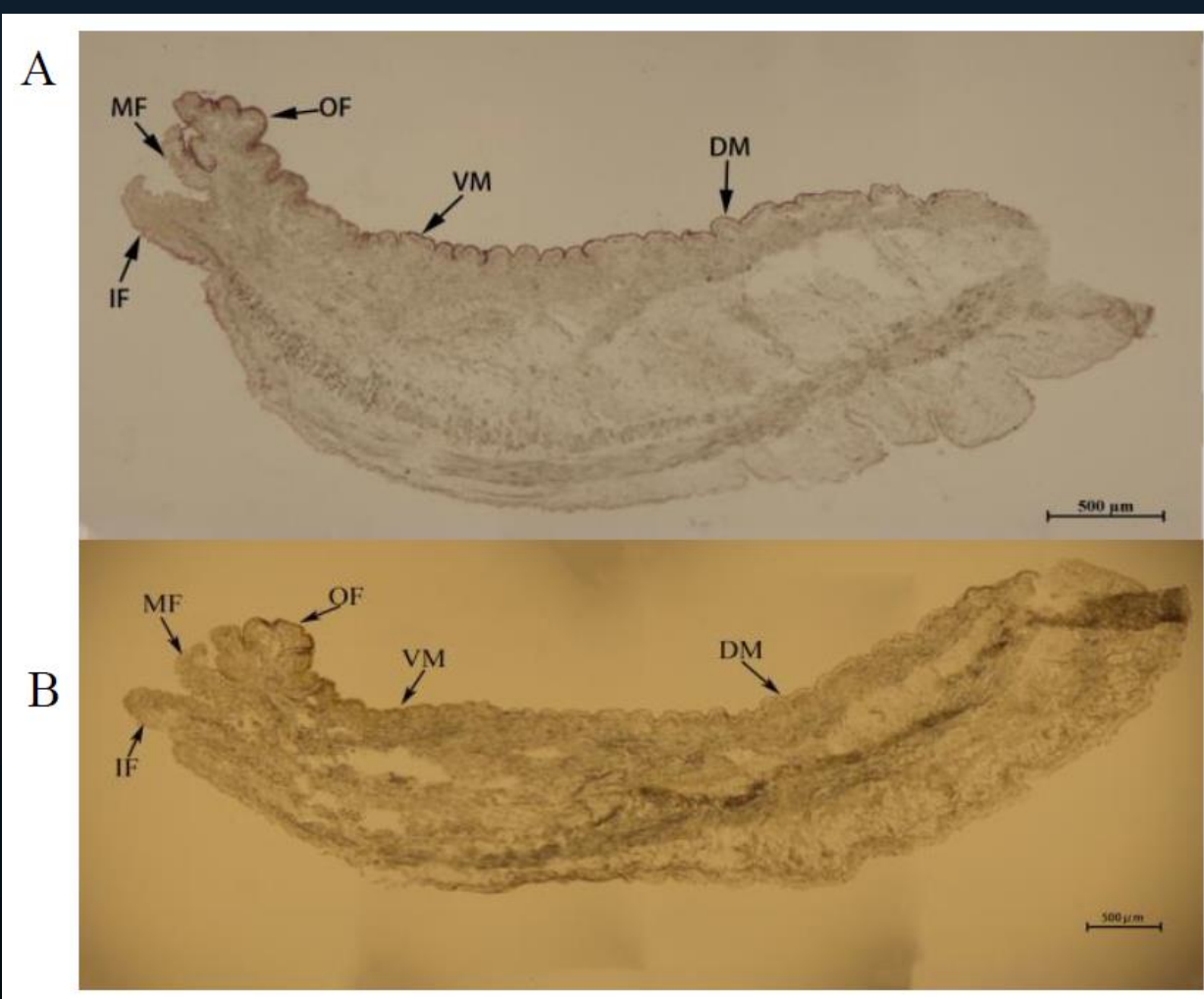


图4 三角帆蚌外套膜中 *HcLPCAT1*基因的ISH图A反义探针; 图B同义探针; OF: 外褶; MF: 中褶; IF: 内褶; DM: 背膜区; VM: 腹膜区。

## Results (continued)

补充投喂 $\beta$ -胡萝卜素对*HcLPCAT1* 基因表达和组织TCC的影响

对紫色蚌进行 $\beta$ -胡萝卜素的饵料补充投喂, 补充投喂组*HcLPCAT1*基因的表达量在肝胰腺、中央膜、边缘膜中较对照组极显著升高 ( $P<0.01$ ), 且在投喂组相应组织中的TCC也极显著高于对照组 ( $P<0.01$ )。

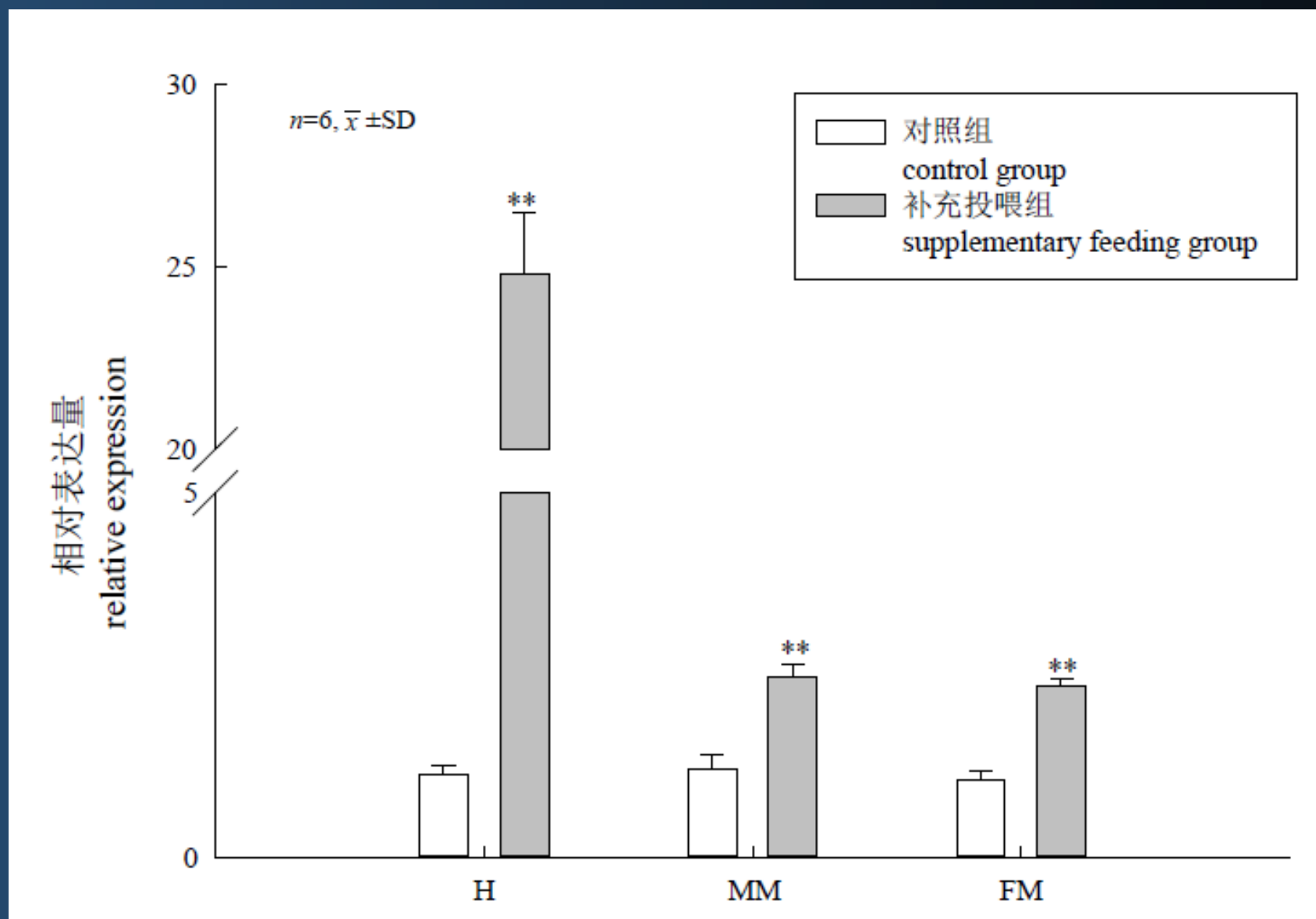


图5 紫色三角帆蚌补充投喂 $\beta$ -胡萝卜素后*HcLPCAT1*基因在各组织中的表达变化  
H: 肝胰腺, MM: 中央膜, FM: 边缘膜; “\*\*”表示差异极显著。

*HcLPCAT1*基因上SNP位点连锁不平衡分析及单倍型

用SHEsis软件分析8个位点的连锁不平衡性, 发现*HcLPCAT1*基因上T585A和T306C这2个位点之间存在强连锁不平衡 ( $D'>0.75$ ,  $r^2>0.33$ )。选择高度连锁 ( $D'>0.8$ ) 位点C156G、T306C、T585A、A954C、C1032T、C1140T构建单倍体基因型 (单倍型), 共获得6种单倍型, 其中H1和H2这2种单倍型在紫色系三角帆蚌中出现的频率极显著高于白色系 ( $P<0.01$ ), 可以作为紫色三角帆蚌的优势单倍型。H3、H6这2种单倍型在白色系中出现频率极显著高于紫色系 ( $P<0.01$ ), H5在白色系出现频率显著高于紫色系 ( $P<0.05$ ), 可以作为白色三角帆蚌优势单倍型。

## Discussion

克隆了三角帆蚌*HcLPCAT1*基因cDNA全长分析发现*HcLPCAT1*基因包含LPLAT家族典型的功能域。LPCAT1催化形成的PC可促进脂滴形成, 为细胞内的类胡萝卜素提供储存场所。*HcLPCAT1*氨基酸序列与软体动物相似度较高, 进化相对保守 虾夷扇贝闭壳肌中LPCAT1基因具有促进类胡萝卜素积累的功能推测LPCAT1在三角帆蚌中具有相似功能。

*HcLPCAT1*基因原位杂交信号主要出现在边缘膜的外褶、背膜区、腹膜区、外褶与中褶连接处以及部分中褶, 这些区域负责三角帆蚌角质层、棱柱层和珍珠层的形成。壳色的形成主要依赖珍珠层, 筛选出了*HcLPCAT1*基因与壳色相关的SNP位点和优势单倍型。因此推测*HcLPCAT1*基因可通过影响类胡萝卜素代谢进而影响三角帆蚌贝壳珍珠层颜色。