

DOI: 10.12264/JFSC2021-0348

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^{1,2,3}

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;
3. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306

摘要: 为探究溶血磷脂酰甘油酰基转移酶(lysophosphatidylglycerol acyltransferase, LPGAT)在中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)卵巢发育过程中的表达调控特征, 本研究首先克隆了中华绒螯蟹 *Es-lpgat1* 的开放阅读框序列(登录号 MZ312613), 进一步采用实时荧光定量 PCR (q-PCR)、原位杂交(*in situ* hybridization, ISH)和 RNA 干扰分析其在卵巢发育过程中的时空表达模式。结果表明: (1) *Es-lpgat1* 的开放阅读框全长 1125 bp, 编码 374 个氨基酸, 其蛋白质分子量为 44 kD, 属于 LPLAT 超级家族, 氨基酸序列与三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)的 LPGAT1 相似性最高; (2) qPCR 结果表明, *Es-lpgat1* 在中华绒螯蟹卵巢发育期的多种组织中均有表达, 其中卵巢中的表达量最高, 鳃中表达量最低($P < 0.05$); (3) 卵巢发育过程中, II 期卵巢和肝胰腺中 *Es-lpgat1* 表达量最高($P < 0.05$), 在卵巢 III~V 期的发育过程中有显著上升趋势; (4) 原位杂交结果显示, 在卵巢发育 II 期, *Es-lpgat1* mRNA 定位于卵黄发生前卵母细胞(PRO)和内源性卵黄合成期卵母细胞(EN)的细胞质中, 此阶段信号较强; 在卵巢发育 IV 期, 卵巢中 *Es-lpgat1* mRNA 信号较弱; 在 II 期和 IV 期肝胰腺中的 *Es-lpgat1* mRNA 均主要定位于成纤维细胞(F)和吸收细胞(R)中; (5) 干扰 *Es-lpgat1* 后, *Es-gpat2* 和 *Es-dgat2* 的表达水平显著上调; 而 *Es-agpat4* 和 *Es-dgat1* 的表达水平下调。综上所述, *Es-lpgat1* 主要在中华绒螯蟹卵巢和肝胰腺中表达, 可能参与卵巢发育期间的磷脂代谢。

关键词: 中华绒螯蟹; 卵巢发育; 溶血磷脂酰甘油酰基转移酶; 荧光定量 PCR; 原位杂交; RNA 干扰

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)01-0028-13

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, 这可以防止

LPG 积累对生物体产生的有害影响^[1-2]。LPGAT1 属于 LPLAT 超级家族中的 AGPAT (1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase, AGPAT)家族^[3], 定位于内质网上, 在生物组织中广泛表达, 并且该基因在所有真核生物中都是保守的, 对维持正常细胞功能起着重要作用^[4]。

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^[5-6], 还在其他生物中鉴定到了 LPGAT, 但这主要集中在哺乳动物上, 如人类重组 LPGAT 能识别各种酰基 CoA 和 LPG

收稿日期: 2021-07-30; 修订日期: 2021-10-08.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31572630); 现代农业产业技术体系项目(CARS-48); 上海市人才发展资金项目(2018100).

作者简介: 潘柯伍(1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向为甲壳动物营养生理. E-mail: 2544653456@qq.com

通信作者: 吴旭干, 教授, 研究方向为甲壳动物营养饲料和品质育种. E-mail: xgwu@shou.edu.cn

作为底物,但明显偏好长链饱和脂肪酸酰基 CoA (acyl-CoAs)和油酰 CoA (oleoyl-CoA)作为酰基供体,这与其组织中内源性 PGs 的脂质组成一致^[2]; Zhang 等^[7]在哺乳动物或昆虫细胞系的研究表明,过表达 *lpgat* 能显著提高细胞中 LPGAT 的酶活,*lpgat* 突变会导致组织中甘油三酯过度存储; Hiramine 等^[8]发现在小鼠中 LPGAT1 具有单酰基甘油酰基转移酶(monoacylglycerol acyltransferases, MGAT)活性,当选择性敲除小鼠肝脏中 *lpgat* 基因时,不仅肝脏中 *lpgat1*mRNA 显著下降,且 MGAT 活性下降。以上研究表明,*lpgat1* 在哺乳动物脂质代谢过程中起着重要作用,但是尚未见甲壳动物 *lpgat1* 的研究报道。

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,卵巢发育是甲壳动物生殖生物学的重要研究内容^[9]。甲壳动物卵巢发育过程主要包括卵原细胞增殖阶段和初级卵母细胞的发育阶段^[10-11],卵母细胞发育过程中卵母细胞主要积累卵黄磷蛋白和脂类,其中甘油三酯和磷脂主要存在于卵母细胞中的脂肪滴和卵黄体中^[12-14]。因此,甲壳动物卵巢发育过程中,磷脂不仅是卵母细胞卵黄体和细胞膜的重要组成物质,而且在甘油三酯乳化和运输过程中起着重要作用^[15-17]。

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*, 以下简称河蟹)是中国的重要经济蟹类^[18],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^[17],因此卵巢发育情况及其脂类组成可直接影响河蟹的食用价值和营养价值^[9,19]。先前研究已经报道饲料中添加磷脂对河蟹生长、卵巢发育和生殖性能的影响^[16-17,20],但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尚不清楚。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。本研究基于河蟹基因组草图和卵巢发育转录组数据获得了河蟹一个 *lpgat* 基因的开放阅读框(ORF),命名为 *Es-lpgat1*,进行了相关的生物信息学分析,进一步通过荧光定量 PCR (qPCR)和原位杂交(ISH)技术研究了该基因在河蟹卵巢发育过程中的表达特征及其 mRNA 定位,结果可为进一步研究甲壳动物的磷脂代谢机制和卵巢发育生理提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 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的雌蟹运回实验室暂养,在循环水系统中暂养 1 周后用于实验,实验用蟹体重范围为 60~135 g。解剖前准确测定甲壳长、甲壳宽和体重,解剖后迅速取出卵巢和肝胰腺,准确称量并记录好卵巢颜色。根据生殖蜕壳、卵巢外观和组织学结构对河蟹卵巢发育进行分期^[7]。河蟹卵巢发育分为 5 个时期: I 期,生殖蜕壳前,卵原细胞增殖期; II 期,生殖蜕壳后,卵黄发生前卵母细胞和内源性卵母细胞为主; III 期,外源性卵黄发生期; IV 期,卵巢近成熟期,卵母细胞直径大于 150 μm ,卵黄颗粒分布不均匀; V 期,卵巢成熟期,卵母细胞中的卵黄颗粒和脂肪滴均匀分布,卵母细胞中核偏位。确定卵巢发育分期后,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 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中用于 RNA 提取,另一份样品固定在 4%的多聚甲醛中用于组织学观察和原位杂交。同时采集卵巢发育 III 期河蟹的血淋巴、心脏、眼柄、肠道、胃、胸神经节、脑神经节、鳃和三角膜,用于该基因的组织特异性表达规律分析。

1.2 RNA 提取和 cDNA 合成

采用 TRIzol 法将不同卵巢发育时期的组织提取总 RNA。分别用 Q5000 紫外分光光度计(Quawell Q5000, USA)和 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 浓度和质量。之后,使用 TaKaRa 公司的反向第一链 cDNA 合成试剂盒(RR036A, Takara Bio, Japan)合成第一链 cDNA。该反应体系为 500 ng RNA 与 2 μL 5 \times Reverse Mix 加 ddH₂O 至 10 μL ,在 PCR 仪中 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 s。得到的 cDNA 样本保存在 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以备进一步使用。

1.3 *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(表 1),后续

实验所用引物均为该软件设计,由上海生工生物工程股份有限公司合成。选取质量合格的肝组织 cDNA 样品进行 PCR 扩增,将 PCR 产物进行凝胶电泳检测,根据 DNA 纯化回收试剂盒说明书对目的片段进行回收纯化,将纯化产物连接到 pMD[®]T-19 载体,转化至 *E.coli* DH5 α ,挑选阳性克隆菌送到上海生工生物工程股份有限公司进行序列分析。

1.4 *Es-lpgat1* 的生物信息学分析

使用 ORF finder 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)预测 *Es-lpgat1* 的开放阅读框,之后根据 cDNA 序列推导的氨基酸序列,运用相应的生物学网络服务分别对 *Es-LPGAT1* 的等电点、分子量(http://web.expasy.org/compute_pi/)、信号肽(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、结构域、功能位点(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)进行预测。从 NCBI 的 GenBank 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 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/missense3d/>)获得 3D 结构图形。

1.5 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(表 1)。运用 ABI 荧光定量 PCR 分析仪(ABI-7500, ThermoFisher, Singapore),使用 TB-green[®]预混料 Ex Taq[™] II 试剂盒(RR420A, TaKaRa Bio, Japan)按照说明检测 *Es-lpgat1* 在河蟹不同组织和卵巢发育各阶段的表达特征,每种组织设 8 个生物学样本,每个样品重复 3 次。反应程序为:95 °C 30 s; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环; 72 °C 10 min。

1.6 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。探针经 MiniBEST DNA 片段

纯化试剂盒(9761, TaKaRa Bio, Japan)纯化后,使用地高辛(DIG) RNA 标记混合物(Roche, Basel, Switzerland)和 TranscriptAid T7 高产转录试剂盒(K0441, Thermo Fisher Scientific, USA)体外转录合成。分别用 Q5000 紫外分光光度计(Quawell Q5000, USA)和 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测探针浓度和质量,放在-80 °C 保存以便后续使用。室温下将组织切片脱蜡复水后,开始杂交前处理,用蛋白酶 K 在 37 °C 处理 30 min, 4%多聚甲醛固定 5 min。PBS 清洗后,用 20 \times SSC、50%去离子甲酰胺、DEPC 水配制预杂交液,在 37 °C 孵育 3 h。将正反探针放入 PCR 仪中 95 °C 变性 5 min 后,冰浴冷却 10 min,随后向离心管中加入杂交液(包括 1 \times Denhardt's、1 mg/mL 鲑鱼精 DNA、4 \times SSC、40%去离子甲酰胺、10%硫酸葡聚糖、1 mg/mL 酵母-tRNA)。将正反探针配制成 5 ng/ μ L,振荡混匀,每张片子上加入 100 μ L 含有探针的杂交液,55 °C 杂交 15 h。杂交后,用 SSC 清洗玻片,再用含 150 μ g/mL RNaseA 的 NTE 溶液消化未结合的探针。之后用封闭液覆盖玻片 4 h,再加入抗体溶液过夜。最后, PBS 清洗后加入显色液显色,用乙醇脱水封片后,使用尼康(Nikon Eclipse 80i microscope)显微镜进行观察并拍照。

1.7 dsRNA 的合成及干扰后对甘油三酯合成相关基因的变化

根据 *Es-lpgat1* 序列设计 3 对带有 T7 启动子的引物 *dsEs-lpgat1*-F/R 以及 1 对 *dsEGFP*-F/R 作为对照组(正向和反向引物 5'端都添加 T7 序列),通过 PCR 获得 DNA 模板后纯化,使用 TranscriptAid T7 高产转录试剂盒体外转录合成 dsRNA,分别加入 5 \times Buffer 8 μ L、NTP 各 4 μ L、Transcript Aid Enzyme Mix 4 μ L、DNA 纯化产物 1600 ng,加 DEPC 水至 40 μ L。在 37 °C 水浴 6 h;加入 4 μ L DNase I 于 37 °C 水浴 15 min;之后加入 4 μ L EDTA 于 65 °C 水浴 10 min。最后用醋酸钠、氯仿水饱和酚、无水乙醇纯化得到 dsRNA。根据预实验结果,河蟹 dsRNA 最佳干扰剂量为 2 μ g/g 体重,通过单个体养殖实验获得蜕壳后 3~5 d 的河蟹(体重为 3~6 g),用 10 μ L 的微量注射器分别将 *dsEs-lpgat1*-1、*dsEs-lpgat1*-2、*dsEs-lpgat1*-3 和 *dsEGFP* 注射到河

表 1 *Es-lpgat1* 基因的鉴定及功能研究所用引物序列Tab. 1 Primer sequences for the identification and functional studies of *Es-lpgat1*

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') sequence (5'-3')	用途 usage
<i>Es-lpgat1</i> -gene-F	ATGGACTTTAGTACGGGACAT	基因克隆 gene clone
<i>Es-lpgat1</i> -gene-R	CCAAAGTTGAATCAGACAAC	基因克隆 gene clone
qRT- <i>Es-lpgat1</i> -F	GGAGACCATACTCACTCATCAAC	qRT-PCR
qRT- <i>Es-lpgat1</i> -R	GAGAGAGACAACAGAGACCCACT	qRT-PCR
β -Actin-F	GCATCCACGAGACCACTTACA	qRT-PCR
β -Actin-R	CTCCTGCTTGCTGATCCACATC	qRT-PCR
ds <i>Es-lpgat1</i> -ISHF	TAATACGACTCACTATAGGGGTGCTGTGGTGAGGATAC	ISH
<i>Es-lpgat1</i> -ISHR	GTGAGGAGTCTCTGTGTTC	ISH
<i>Es-lpgat1</i> -ISHF	GTGCTGTGGTGAGGATAC	ISH
ds <i>Es-lpgat1</i> -ISHR	TAATACGACTCACTATAGGGGTGAGGAGTCTCTGTGTTC	ISH
dsEGFP-F	TAATACGACTCACTATAGGGCAGTGCTTCAGCCGCTACCC	RNAi
dsEGFP-R	TAATACGACTCACTATAGGGAGTTCACCTTGATGCCGTTCTT	RNAi
ds <i>Es-lpgat1</i> -F1	TAATACGACTCACTATAGGGGTGCTGTGGTGAGGATAC	RNAi
ds <i>Es-lpgat1</i> -R1	TAATACGACTCACTATAGGGTTCGGTCTTGAGGAAG	RNAi
ds <i>Es-lpgat1</i> -F2	TAATACGACTCACTATAGGGGGAAGGAACACAGAGACTC	RNAi
ds <i>Es-lpgat1</i> -R2	TAATACGACTCACTATAGGGCCTCAGCAAGAATCCAA	RNAi
ds <i>Es-lpgat1</i> -F3	TAATACGACTCACTATAGGGTCTGCTCCTTCAACAACCTT	RNAi
ds <i>Es-lpgat1</i> -R3	TAATACGACTCACTATAGGGTCTGTAAGATTGCCTCCT	RNAi
q <i>Es-gpat1</i> -F	TGAAAAGTTGAGGAACCACGCCCAT	RNAi
q <i>Es-gpat1</i> -R	GCCCCCTTCTTGAAGTGCATGACTG	RNAi
q <i>Es-gpat2</i> -F	TCTTTTGGGTGGTGGGCTTC	RNAi
q <i>Es-gpat2</i> -R	TGGCGGTTGTGATATGTGAC	RNAi
q <i>Es-agpat2</i> -F	GGAGACCATACTCACTCATCAAC	RNAi
q <i>Es-agpat2</i> -R	GAGACAACAGAGACCCACTAACA	RNAi
q <i>Es-agpat3</i> -F	GCCTCTCGGAGTCAATCTGG	RNAi
q <i>Es-agpat3</i> -R	AAGCGCTGGTAGAGGGAGTA	RNAi
q <i>Es-agpat4</i> -F	GGAGACCATACTCACTCATCAAC	RNAi
q <i>Es-agpat4</i> -R	GAGAGAGACAACAGAGACCCACT	RNAi
q <i>Es-dgat1</i> -F	TATCCTGCTGATCGGTGGTC	RNAi
q <i>Es-dgat1</i> -R	AACAAGGGCGTGTGGTAGTA	RNAi
q <i>Es-dgat2</i> -F	TATGACCAAGTAGCAAACCC	RNAi
q <i>Es-dgat2</i> -R	GCACATCAATGGCAGAACC	RNAi

蟹体内, 每组重复 6 只河蟹, 注射 24 h 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。

1.8 数据分析

所有数据采用平均值 \pm 标准误($\bar{x} \pm SE$)表示, 每个卵巢发育期重复测定 8 个个体。*Es-lpgat1* 的相对表达水平计算使用比较循环阈值(C_t)与方程 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法^[21]。采用 Levene's 法进行方差齐性

检验, 当不满足齐性方差时, 对百分比数据进行反正弦或平方根处理, 采用 ANOVA 对实验结果进行方差分析, 显著性差异采用 Tukey 多极差检验, 当 $P < 0.05$ 时为差异显著。

2 结果与分析

2.1 *Es-lpgat1* 生物信息学分析

Es-lpgat1 (GenBank 序列号 MZ312613) 的开放阅读框(ORF)全长为 1125 bp (包括终止密码子), 编码 374 个氨基酸, 终止密码子为 TGA, 其蛋白分子量为 44 kD, 理论等电点为 8.31。通过 SMART

结构域分析发现 Es-LPGAT1 属于 LPLAT 超级家族, 包括两个跨膜螺旋区域, 分别位于其氨基酸序列 Ala²¹-Leu⁴³ 和 Phe³⁵¹-Leu³⁷³; 一个溶血磷脂酸酰基转移酶结构域 Acyltransf_C, 位于其氨基酸序列 Ile²⁶¹-Arg³³⁴, 暗示在磷脂生物合成中起作用; 以及一个磷酸酰基转移酶结构域 PlsC, 位于其氨基酸序列 Thr⁹⁸-Ser²¹⁴(图 1)。通过序列比对发现(图 2), 相对比较保守的氨基酸也多位于 PlsC 区域。在该区域中存在 2 个模体(motif), 即 NH(x)₄D 和 FPEGT。通过 NCBI 数据库 BLASTP 比对同源氨基酸, 发现河蟹与三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)相似性最高, 为 86.39%; 其次为灰眼雪蟹(*Chionoecetes opilio*)、南美白对虾(*Penaeus vannamei*), 相似度分别为 85.83%和 69.17%。对编码区进行分析, 未发现信号肽。利用 MEGA 6.0 软件进行系统发育分析显示(图 3), 河蟹的 Es-LPGAT1 与三疣梭子蟹和灰眼雪蟹的 LPGAT1 亲缘关系近, 聚为一支。河蟹的 Es-LPGAT1 3D 结构预测结果如图 4 所示。

```

1 ATGGACTTACTACGGGACATCGTGGCTCAATCCAAAAGATTGCATGTGGTGGCT
  M D F S T G H R W L M P K R L Y M W V R
61 GCTGTGGTGGAGGACTCTTCTGCTCCTTCAACAATGTACTGTGATCCAGTCCACTC
  A V V R I L F C S F N N L Y C I P V H I
121 TGTGGCTGTTCATGCTGCAGCCGGTCAAGTGGCTGGCCGCTCCCTCTACTGGCAGAT
  C W L F M L Q P V K W L A P S L Y W Q I
181 GAAGGTGTATGTCGCGTGGCTGCTGCATGTGGCTCTGTGGCTCAGCAACGGC
  E G V M F R W L L S M W L A H W S Y S N G
241 TACAATGTGGTGGACAGGGTGTGACATTTGGGACCTAAGAATGAAGCGGCGCTGGT
  Y N V V E Q G D D I W D L K N E R T L V
301 TTGTCAACCATCAGTCCAGCAGATGTCGCGCTCATATGGCAGCTTCACTCCCG
  L F N H Q S T A D V P L I M A F N S R
421 ACCAGCTTTCACACACATCATGTGATAGTGCACACATATCCAGTACACAACTT
  T Q L F N N I M W I V D H I S K Y T N F
481 GCGCTGTATCATGGACTACGGAGATTTCTCATTTCAGCGGGGAAGAACACAGAG
  G L V S W T H G D F F I Q G G K E H R D
541 TCTCACTGATCAAACCTGAAAAGCACTTGAGGAATTTCTACATCCCCGCAAGGAG
  S S L I K L E K H L R N F Y I P R K R K
541 TGGCTGTGCTGTTCTCGAGGGCGCTTCTCAAGAACCCAAACCTCAGTACGGG
  W L V L F P E G G F L K N R K P S S Q R
601 TATCCAGAGAACAACCTTCCCGTCTGGAGAACGTGCTCCCTCCCTCGGTTGGGGCA
  Y A Q K N N L P V L E N V S L P R V G A
661 CTCAGGCTCATCTGGACTGTGTGGCGCACACACAGAGAGAGTGCATATC
  L K V I L D C V A A D K H D E K S D T I
721 AGTACTTGTGGAGTGCAGATAGCTACCTGCGGGGGGATCCCTCCCTCCAC
  K Y L L D V T I A Y P G G D P L D L P T
781 ATATTGGGGGATGGAGCCCGCTGTGACATTTCCATCCGAAGATTGACAT
  I F G G W R P P C D T I F H Y R R F D I
841 GAGGAGTCCCAAAGAGGAGGCGCTCCTCAGTGGCTGTACTGCTGGTACCTGGAG
  E E V P K E E E A L E K H L R N F Y I P R K R K
901 AAGGAGCAATCTTACAGGACTACTACGACACAGGACTTTCCCTGAGCCACCA
  K E A I L Q E Y Y D T I F P E A P T P
961 CATGCCCCGGCTACCAGCGAAAATGTGCCAGACTGCTGGATCCAAAGTGTAC
  H A P G Y P A K N V P R L G I Q V H C
1021 GACCCTATTGGATTCTGCTGAGGACATGCTCTACTTGGCTGCACTACATCTGGGT
  D P I G F L L R H R H F A S T Y I W V
1081 AACATCATCTTGGGTGTGAGTGTGATCACTTGGTGA
  N I I L W V F S C L I Q W G

```

图 1 *Es-lpgat1* 预测的氨基酸序列和结构域
阴影部分表示螺旋跨膜区域; 下划线部分表示 PlsC 结构域; 斜体部分表示 Acyltransf_C 结构域。

Fig. 1 Deduced amino acid sequence and predicted domains of *Es-lpgat1*
The shaded part indicates the spiral transmembrane region; the underlined part indicates the PlsC domain; the italic part indicates the Acyltransf_C domain.

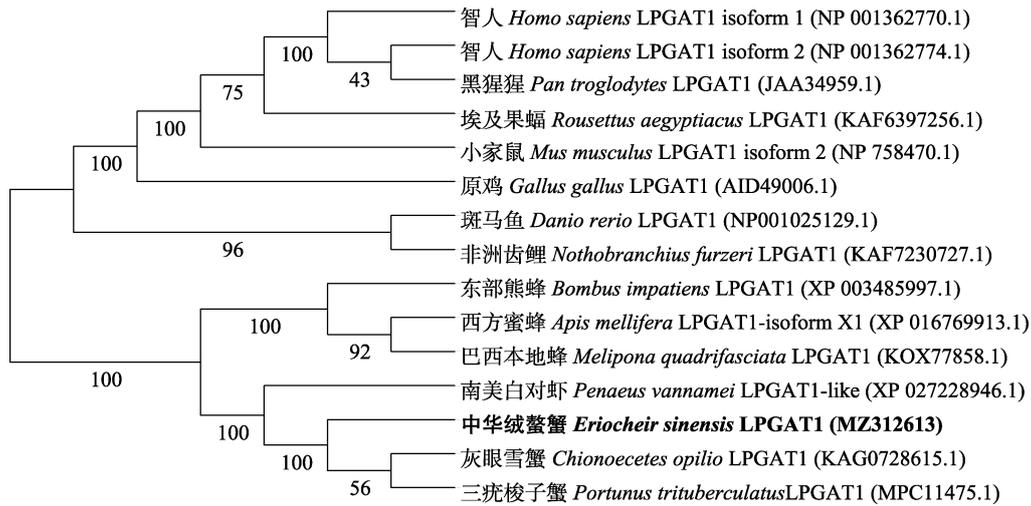
中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i>	MDFSTGHRWLNPKRLMVMVRAVVEILFCSFNLLYCIIEVHFQWLEMLQPVKMLAPSLWYQI	60
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	~~~MAPHLDVARKLVVTLIKSLRFTTFMFVNNCVAIEFSYCLYLVLVLOPLRVDLDAOTFYFI	57
灰眼雪蟹 <i>Chionoecetes opilio</i>	MDLNTAHDCLNPKRLVWLRVLRIVFCSVNLLYCIIEVHFQWLVLOPLRVDLDAOTFYFI	60
南美白对虾 <i>Penaeus vannamei</i>	MEHNTRRFRCLNDAERLVTGLKAAPRIFVCTLNCCYCIIEVHMCWVLLVLOPLRVDLDAOTFYFI	60
小家鼠 <i>Mus musculus</i>	~~~MAVTVEEAPLWGLVAKLMLFAFVANNLVAIEFSYICVYVLLLOPLRVDLDSKREWYI	57
Motif I		
中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i>	EGVMFRWLLSMVALNSVNSGYNVVBQCDIWDLKNERTLVLENHQSADVPLIIMAAFNSR	120
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	EGVMFRWLLSMVALNSVNSGYNVVBQCDIWDLKNERTLVLENHQSADVPLIIMAAFNSR	117
灰眼雪蟹 <i>Chionoecetes opilio</i>	EGVMFRWLLSMVALNSVNSGYNVVBQCDIWDLKNERTLVLENHQSADVPLIIMAAFNSR	120
南美白对虾 <i>Penaeus vannamei</i>	EGVMFRWLLSMVALNSVNSGYNVVBQCDIWDLKNERTLVLENHQSADVPLIIMAAFNSR	120
小家鼠 <i>Mus musculus</i>	EGLMYKWLQMVASGQWYAGYVMEWEGDITKATKDEAVMLVNHQAGDVCILMLCLODK	117
中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i>	TQIFNNIMWIVDHIKRYTNFGLVSWTHGDFFTQGGKDHRSLSLLEKHLRNFYI P R K R K	180
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	GTVVRKMMWLDHVBRYTNFGLVSWTHGDFFTQGGKDHRSLSLLEKHLRNFYI P R K R K	177
灰眼雪蟹 <i>Chionoecetes opilio</i>	HQIFNNIMWIVDHIKRYTNFGLVSWTHGDFFTQGGKDHRSLSLLEKHLRNFYI P R K R K	180
南美白对虾 <i>Penaeus vannamei</i>	PNIISNNIMWIVDHIKRYTNFGLVSWTHGDFFTQGGKDHRSLSLLEKHLRNFYI P R K R K	180
小家鼠 <i>Mus musculus</i>	GFVVAQMMWLDHVBRYTNFGLVSWTHGDFFTQGGKDHRSLSLLEKHLRNFYI P R K R K	177
Motif III		
中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i>	WLVLFPGGGFLKRRKESQRFYAKNNLPLVLENVSLPRVGALRVLLDCVAADKHD-----	234
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	WLVLFPGGGFLKRRKESQRFYAKNNLPLVLENVSLPRVGALRVLLDSVATADQN-----	237
灰眼雪蟹 <i>Chionoecetes opilio</i>	WLVLFPGGGFLKRRKESQRFYAKNNLPLVLENVSLPRVGALRVLLDSVATADQN-----	234
南美白对虾 <i>Penaeus vannamei</i>	WLVLFPGGGFLKRRKESQRFYAKNNLPLVLENVSLPRVGALRVLLDVAADKHD-----	234
小家鼠 <i>Mus musculus</i>	WLVLFPGGGFLKRRKESQRFYAKNNLPLVLENVSLPRVGALRVLLDVAADKHD-----	236
中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i>	-----EKSDTKYLLDVTIAYEGGDPDLDELTFGQWRPDCDTIFHYRRFDIEDVKEE	287
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	GSPPGQSNKPKGQWVLDVTIAYENARMDIQTWIFGQWRPDCDTIFHYRRFDIEDVKEE	297
灰眼雪蟹 <i>Chionoecetes opilio</i>	-----EKSDTKYLLDVTIAYEGGDPDLDELTFGQWRPDCDTIFHYRRFDIEDVKEE	287
南美白对虾 <i>Penaeus vannamei</i>	-----DSDDKYLLDVTIAYEGGDPDLDELTFGQWRPDCDTIFHYRRFDIEDVKEE	287
小家鼠 <i>Mus musculus</i>	GDARGLECKSRGQWVLDVTIAYEKAPDIDQWILGYRKPVTVHVHYRFDIEDVKEE	296
中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i>	EALTDWLYCRVVEKBAITLQEYYDTGTFPEAPTTPHAPGYPAKNVPRLRGIQVHDPFGLL	347
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	EALTDWLYCRVVEKBAITLQEYYDTGTFPEAPTTPHAPGYPAKNVPRLRGIQVHDPFGLL	347
灰眼雪蟹 <i>Chionoecetes opilio</i>	EALTDWLYCRVVEKBAITLQEYYDTGTFPEAPTTPHAPGYPAKNVPRLRGIQVHDPFGLL	347
南美白对虾 <i>Penaeus vannamei</i>	EALTDWLYCRVVEKBAITLQEYYDTGTFPEAPTTPHAPGYPAKNVPRLRGIQVHDPFGLL	347
小家鼠 <i>Mus musculus</i>	EALTDWLYCRVVEKBAITLQEYYDTGTFPEAPTTPHAPGYPAKNVPRLRGIQVHDPFGLL	346
中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i>	RHCYFASVYIWNVILWVFE-----SCLIQWL	374
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	VQTFAPASGVMYVSIHHIYFWLF-----	371
灰眼雪蟹 <i>Chionoecetes opilio</i>	RHCYFASVYIWNVILWVFE-----SCLIQWL	379
南美白对虾 <i>Penaeus vannamei</i>	RHIFVIVSIVWIMSEFVWVFE-----TSICQLWV	375
小家鼠 <i>Mus musculus</i>	IQSEAFLSGVLWYHTIQYFY-----HCL-----	369

图 2 不同物种 LPGAT 氨基酸多序列对比结果

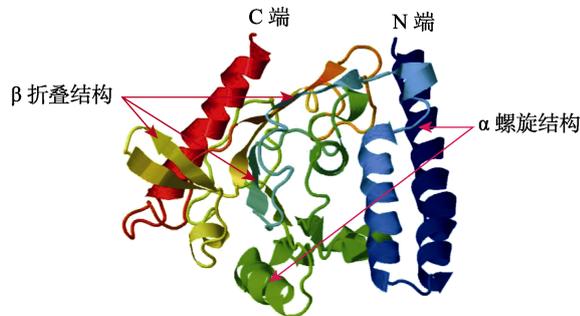
Motif I 代表 NH(x)₄D 保守域, Motif III 代表 FPEGT 保守域; 黑色阴影代表相同序列, 灰色阴影代表相似序列。

Fig. 2 Multiple alignment of the LPGAT amino acid sequences from different species

Motif I represents the conserved domain of NH(x)₄D, Motif III represents the conserved domain of FPEGT; the black shading represents the same sequence, and the gray shading represents the similar sequence.

图 3 河蟹 *Es-LPGAT1* 和其他物种的系统发育分析

括号中为物种 NCBI 登录号。

Fig. 3 Phylogenetic analysis of *Es-LPGAT1* from *Eriocheir sinensis* and other species
NCBI accession number of each species is shown in the bracket.图 4 河蟹 *Es-LPGAT1* 的 3D 结构预测Fig. 4 Prediction of 3D protein structure of
Es-LPGAT1 for *Eriocheir sinensis*

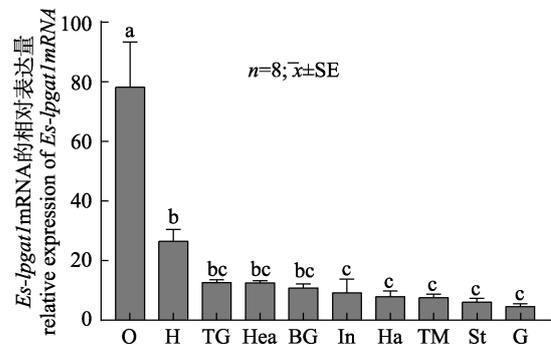
2.2 *Es-lpgat1* 在河蟹不同组织中的表达特征

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(图 5)。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 ($P < 0.05$)。

2.3 *Es-lpgat1* 在河蟹卵巢发育过程中的表达特征

图 6a 为河蟹卵巢发育过程中卵巢中 *Es-lpgat1*-mRNA 的表达模式, *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 ($P < 0.05$)。河蟹卵巢发育过程中肝胰腺

中 *Es-lpgat1*-mRNA 的变化模式见图 6b, *Es-lpgat1* 的表达量在卵巢发育 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 ($P < 0.05$)。由此可见, 卵巢发育 II 期, 卵巢和肝胰腺中的 *Es-lpgat1*-mRNA 的表达量最大, 卵巢发育 III~V 期, 均表现为缓慢上升的趋势。

图 5 *Es-lpgat1* 在河蟹卵巢发育 III 期不同组织中的相对表达量

O: 卵巢; H: 肝胰腺; TG: 胸神经节; Hea: 心脏; BG: 脑神经节; In: 肠; Ha: 血淋巴; TM: 三角膜; St: 胃; G: 鳃. 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 5 Relative expression level of *Es-lpgat1* in different tissues of female *Eriocheir sinensis* at ovarian stage III
O: ovary; H: hepatopancreas; TG: thoracalia ganglia; Hea: heart; BG: brain ganglia; In: intestine; Ha: haemolymph; TM: triangular membrane; St: stomach; G: gill. Different letters indicate significant difference among different tissues ($P < 0.05$).

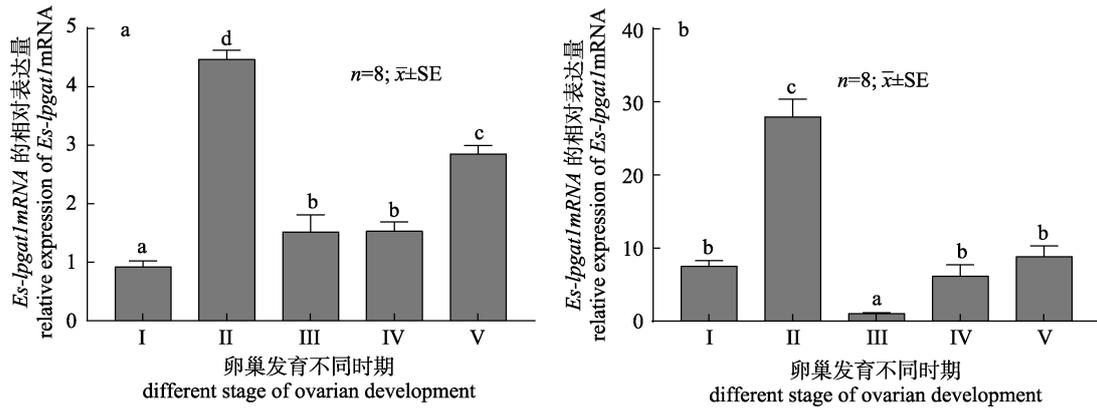


图 6 河蟹卵巢发育期间 *Es-lpgat1* 在卵巢(a)和肝胰腺(b)中的相对表达量变化
不同字母表示不同发育时期差异显著($P < 0.05$).

Fig. 6 The relative expression level of *Es-lpgat1* mRNA in ovary (a) and hepatopancreas (b) during ovarian maturation cycle of *Eriocheir sinensis*
Different letters indicate significant difference among different development stages ($P < 0.05$).

2.4 *Es-lpgat1* 在河蟹肝胰腺和卵巢中的 mRNA 定位

原位杂交结果显示(图 7), 在卵巢发育 II 期, *Es-lpgat1* mRNA 在肝胰腺和卵巢中都有强烈的阳性信号, 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)(图 7a), 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(图 7c)。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(图 7b); IV 期卵巢中 *Es-lpgat1*-mRNA 信号较弱, 此阶段卵巢组织有少量 PRO 细胞(图 7d), 其中存在中等强度的阳性。

2.5 *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 24 h 后的结果显示, *ds-lpgat1-1* 为最佳干扰片段, *Es-lpgat1* 的表达量显著降低至对照组的 41% (图 8a)。为进一步了解干扰 *Es-lpgat1* 对甘油三酯合成其余关键基因表达的影响, 采用荧光定量 PCR 检测 *Es-gpats*、*Es-agpats*、*Es-dgats* 的表达量。*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(图 8b)。

3 讨论

本研究通过河蟹基因组草图和 PCR 技术, 获得和验证了河蟹 *lpgat1* 基因的开放阅读框, 通过序列比对发现 *Es-LPGAT1* 具有 AGPAT 家族特征性的保守模体: NH(x)₄D 和 FPEGT^[22-23], 这与人体 LPGAT1 的保守序列一致^[2]。已知 NH(x)₄D 中的天冬氨酸和组氨酸是重要的酰基转移酶活性中心, 可以与酰基 CoA 结合并催化溶血磷脂酸酰化为磷脂酸, 而 FPEGT 模体在动物体中高度保守, 显示了它的重要作用, 该模体中的甘氨酸是酰基转移酶的重要活性中心, 可以与溶血磷脂酸结合^[24]。从系统发育分析可以看到(图 3), 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。对其序列分析发现, *Es-LPGAT1* 属于 LPLAT 超级家族, 具有一个 Acyltransf_C 结构域, 暗示其在磷脂生物合成中起作用。LPGAT1 会以各种 LPG 和酰基 CoA 作为底物, 能高效地催化 LPG 再酰化成 PG, 能够优先利用长链饱和脂肪酸酰基 CoA 作为酰基供体^[2]。

河蟹 *lpgat1* mRNA 在卵巢中的表达量显著高于其他组织, 一方面这可能是因为河蟹卵巢发育过程中需要在卵巢中积累大量磷脂, 以满足卵黄

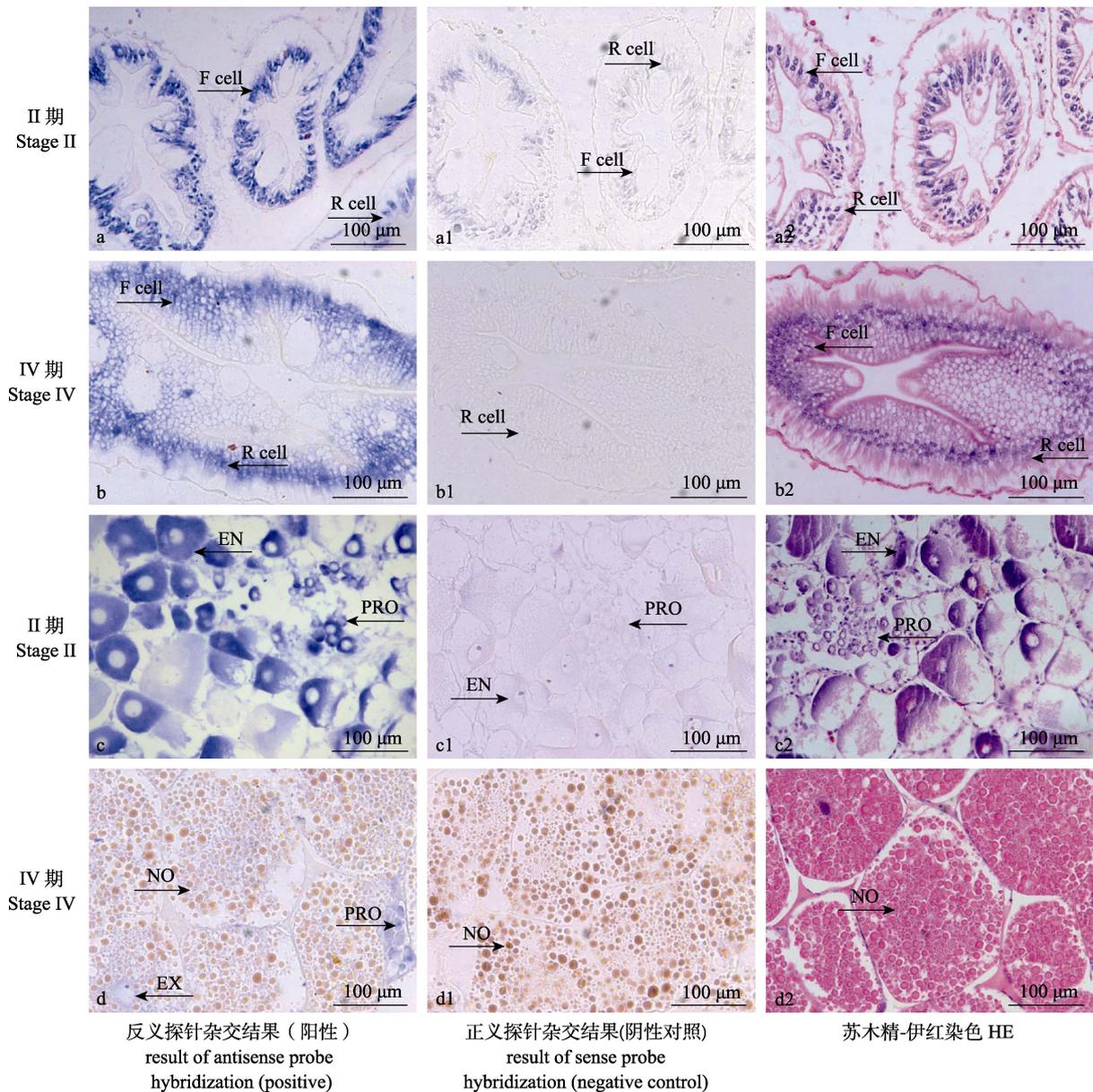


图 7 河蟹卵巢发育过程中 *Es-lpgat1* mRNA 在卵巢和肝胰腺中的定位

原位杂交反义探针杂交结果分别为 a、b、c、d; 正义探针作为对照, 杂交结果为 a1、b1、c1、d1; HE 染色

结果为 a2、b2、c2、d2。前两排代表肝胰腺, 后两排代表卵巢。F cell: 成纤维细胞; R cell: 吸收细胞;

PRO: 卵黄前卵母细胞; EN: 内源性卵黄源卵母细胞; EX: 外源性卵黄源卵母细胞; NO: 接近成熟卵母细胞。

Fig. 7 The localization of *Es-lpgat1* mRNA in the ovary and hepatopancreas during ovarian maturation cycle of *Eriocheir sinensis*

The hybridization results of the antisense probes are a, b, c, d; the sense probes were used as the control while the results are

a1, b1, c1 and d1; the corresponding HE stained sections are shown in a2, b2, c2, d2. The first two lines represent hepatopancreas,

while the last two lines represent ovary. F cell: fibrillar cell; R cell: resorptive cell; PRO: previtellogenic oocytes;

EN: endogenous vitellogenic oocytes; EX: exogenous vitellogenic oocytes; NO: nearly mature oocyte.

物质合成和卵膜构建的需要^[17,25]; 另一方面, 饲料中摄食的外源磷脂可能不能完全满足卵巢发育的磷脂需求, 故卵巢自身可能需要合成部分磷脂^[26]。*Es-lpgat1* 在河蟹肝胰腺中表达量也较高, 这是因为肝胰腺是甲壳动物的脂质代谢中心, 可能涉及

到磷脂的合成与分解过程^[27]。*Es-lpgat1* 在河蟹胸神经节、脑神经节和心脏中表达中等, 其可能原因有两个: (1)神经组织需要大量磷脂来进行细胞膜重构和信号传递^[28]; (2)动物心脏组织需要合成大量心磷脂(cardiolipin, CL)来维持其正常功能^[29-30],

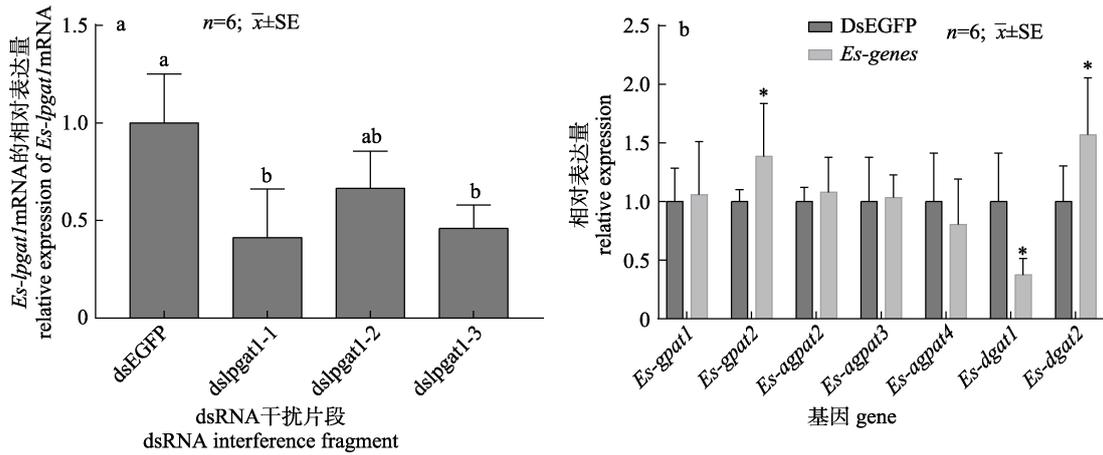


图 8 不同 dsRNA 干扰片段干扰 24 h 对 *Es-lpgat1* mRNA 表达水平的影响(a)及其干扰后甘油三酯合成相关基因的表达特征(b)

柱顶部带有不同字母或星号(*)表示 ds*Es-lpgat1* 和 dsEGFP 组的基因表达水平差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 8 Selection of the best interfering fragment of dsRNA (a) and expression characteristics of genes related to triglyceride biosynthesis after 24 h interference (b) Different letters or stars (*) indicate significant differences ($P < 0.05$) in gene expression level between ds*Es-lpgat1* treatment and dsEGFP treatment groups.

而磷脂酰甘油(phosphatidylglycerol, PG)是其 CL 合成的重要前体, *Es-lpgat1* 主要负责将 LPG 转化为 PG, 故河蟹心脏中 *Es-lpgat1* 表达量相对较高。有关 *Es-lpgat1* 在不同组织中表达量差异的具体原因及其准确的生物学功能尚有待于进一步研究。

不同于哺乳动物中的肝脏和昆虫中的脂肪体, 肝胰腺是甲壳动物最主要的脂质代谢和储存器官, 其储存的脂质在卵巢发育过程中可运输到卵巢中参与卵黄合成和脂滴形成等过程, 此阶段的卵巢会成为甲壳动物的第二个脂质代谢中心^[31-33]。因此, 研究 *Es-lpgat1* 在肝胰腺和卵巢中的表达特征具有一定的必要性。根据卵黄发生位点的差异, 可将河蟹卵黄蛋白原合成分为内源性卵黄合成期(卵巢合成阶段, 卵巢发育 II 期)和外源性卵黄合成期(肝胰腺合成阶段, 卵巢发育 III-V 期)^[9]。在本研究中, 河蟹卵巢发育过程中肝胰腺和卵巢中的 *Es-lpgat1* mRNA 变化规律基本一致, 卵巢 I 期到 II 期快速上升至最高, II 期到 III 期显著下降, III 期到 V 期为上升趋势。造成这种变化特征的可能原因如下: (1)河蟹卵巢从 I 期到 II 期, 卵巢中的卵原细胞转化为卵黄合成前的卵母细胞和内源性卵黄合成期的卵母细胞, 卵细胞体积迅速增加 20 倍以上^[9], 此阶段卵巢中必须大量合成磷脂以满足

卵母细胞体积增长的膜磷脂需求, 因此 II 期卵巢中 *Es-lpgat1*-mRNA 水平最高; (2)卵巢发育 II 期, 雌性河蟹刚刚完成生殖蜕壳, 此时肝胰腺中的大量磷脂需要运输到肌肉等组织中供组织生长^[34], 因此, 此阶段肝胰腺中需要大量合成磷脂, 这可能是导致卵巢发育 II 期肝胰腺中 *lpgat1* mRNA 表达水平升高的重要原因之一; (3)卵巢发育 III 期, 肝胰腺和卵巢中的 *lpgat1* mRNA 表达水平最低, 这暗示此阶段河蟹卵巢和肝胰腺中的磷脂需求量相对较低, 此阶段肝胰腺中主要合成和积累的是甘油三酯^[35], 此后, 卵巢发育速度加快, 卵巢中的磷脂需要量有所增加, 故卵巢发育 III~V 期, 卵巢和肝胰腺中的 *lpgat1* mRNA 表达水平有所上升。

河蟹的肝胰腺主要由 4 种类型细胞组成, 即胚胎细胞(embryonic cell, E 细胞)、囊泡细胞(blister-like cell, B 细胞)、R 细胞和 F 细胞^[36-37]。而原位杂交结果显示, 在河蟹的卵巢发育 II 期和 IV 期的肝胰腺中, *Es-lpgat1* 均定位于 F 细胞和 R 细胞中, 这可能与其功能有关。研究表明, 甲壳动物 F 细胞的特征是粗面内质网和高尔基体数量多^[38], 这两者都是蛋白质合成和输出细胞的典型特征。先前研究表明, F 细胞是甲壳动物消化酶的主要合成位点, 合成后的消化酶被输送到肝胰腺

小管的管腔中进行细胞外消化^[39]; 甲壳动物 R 细胞主要功能为营养物质吸收、分解代谢和脂质储存^[40]。本研究结果表明, *Es-lpgat1* mRNA 主要定位于 F 细胞中, 这暗示河蟹肝胰腺中 LPGAT1 酶原主要来源于 F 细胞, F 细胞也可能会向 R 细胞转化。甲壳动物卵巢发育过程中, 依次经过卵原细胞(oogonia)、卵黄前卵母细胞(previtellogenic oocyte)、内源性卵黄合成期的卵母细胞(endogenous vitellogenic oocyte)、外源性卵黄合成期的卵母细胞(exogenous vitellogenic oocyte)和成熟卵母细胞(mature oocyte)五个主要细胞发育阶段^[9], 成熟卵母细胞中均匀分布着脂肪滴(甘油三酯)和卵黄蛋白(含有磷脂), 这也是卵母细胞生长成熟的重要标志^[25]。河蟹卵巢发育 II 期为卵母细胞进行内源性卵黄蛋白原的合成时期^[41], *Es-lpgat1* mRNA 主要定位于此阶段的内源性卵黄合成期卵母细胞和卵黄发生前的卵母细胞中, 这暗示内源性卵黄合成期的卵母细胞中可能内源性磷脂合成能力较强, 以满足细胞发育的磷脂需求; 卵巢 IV 期属于外源性卵黄发生阶段, 此时卵母细胞中的卵黄蛋白、磷脂和甘油三酯主要由肝胰腺转运而来^[9], 所以 IV 期卵巢中的 *Es-lpgat1* mRNA 信号较弱, 这与卵巢中荧光定量的研究结果基本一致。

为了进一步了解河蟹 *Es-lpgat1* 表达对甘油三酯合成过程中其余重要关键基因的调控作用, 本研究采用 dsRNA 对 *Es-lpgat1* 进行活体 RNA 干扰, 并检测甘油三酯合成路径上的重要基因表达情况。因为大多数脂代谢相关酶具有不同的亚型和不同的功能^[42], 所以本结果中不同基因也有不同的表达变化。甘油-3-磷酸酰基转移酶(sn-1-glycerol-3-phosphate acyltransferase, GPAT)催化甘油-3-磷酸(glycerol-3-phosphate, G3P)生成溶血磷脂酸(lysophosphatidic acid, LPA), 这是甘油三酯合成的第一步反应^[43]; 此后, AGPAT 酰化溶血磷脂酸形成磷脂酸(phosphatidic acid, PA), 磷脂酸磷酸酶(phosphatidic acid phosphatase, PAP)催化 PA 产生二脂酰甘油(diacylglycerol, DAG), 最后二酰基甘油酰基转移酶(diacylglycerol acyltransferase, DGAT)催化 DAG 产生甘油三酯, 该步骤直接影响甘油三酯的含量^[44], 故 DGAT 活性与

甘油三酯含量密切相关^[45]。当干扰 *Es-lpgat1* 后, LPGAT 将 LPG 转化为 PG 的途径受阻, 河蟹可能通过 CDP-DAG 途径来弥补磷脂合成的不足, 故 *Es-gpat2* 的表达量增高, 这与 Zhu 等^[28]推测的 *Es-gpat2* 在磷脂合成过程中发挥作用的结论相一致。GPAT 的表达量升高, 不仅可以增加磷脂的合成(提供磷脂合成需要的 LPA), 还可以增加甘油三酯的合成^[46], 这可能是本研究中 *Es-dgat2*-mRNA 表达量升高的重要原因。由此可见, *Es-lpgat1* 对河蟹组织中磷脂和甘油三酯的合成均具有较大影响, 今后需要通过重组蛋白酶活功能鉴定和代谢产物检测等验证其准确的生理功能。

4 结论

综上所述, 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, 这表明不同组织中的磷脂合成能力不同。在卵巢发育期间, 卵巢和肝胰腺中的 *Es-lpgat1* mRNA 均在卵巢发育 II 期最高, 此后缓慢上升; 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。有关 *Es-lpgat1* 在河蟹卵巢发育过程中的具体生理功能和调控机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Tocher D R, Bendiksen E Å, Campbell P J, et al. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish[J]. *Aquaculture*, 2008, 280(1-4): 21-34.
- [2] Yang Y Z, Cao J S, Shi Y G. Identification and characterization of a gene encoding human LPGAT1, an endoplasmic reticulum-associated lysophosphatidylglycerol acyltransferase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(53): 55866-55874.
- [3] Shindou H, Eto M, Morimoto R, et al. Identification of membrane O-acyltransferase family motifs[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 383(3): 320-325.
- [4] Shindou H, Shimizu T. Acyl-CoA: Lysophospholipid acyltransferases[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009,

- 284(1): 1-5.
- [5] Funkhouser J D, Batenburg J J, van Golde L M G. Acylation of 1-palmitoyl-lysophosphatidylglycerol in alveolar type II cells from rat lung[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Lipids and Lipid Metabolism*, 1981, 666(1): 1-6.
- [6] Sanford G L, Frosolono M F. The role of acyl transferase in the biosynthesis of pulmonary microsomal phosphatidylglycerol[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1983, 116(1): 23-29.
- [7] Zhang J, Xu D, Nie J, et al. Comparative gene identification-58 (CGI-58) promotes autophagy as a putative lysophosphatidylglycerol acyltransferase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(47): 33044-33053.
- [8] Hiramane Y, Emoto H, Takasuga S, et al. Novel acyl-coenzyme A: Monoacylglycerol acyltransferase plays an important role in hepatic triacylglycerol secretion[J]. *Journal of Lipid Research*, 2010, 51(6): 1424-1431.
- [9] Wu X G, Liu M M, Pan J, et al. The ovarian development pattern of pond-reared Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* H. Milne-Edwards, 1853[J]. *Crustaceana*, 2017, 90(4): 449-470.
- [10] Nagaraju G P C. Reproductive regulators in decapod crustaceans: An overview[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2011, 214(1): 3-16.
- [11] Subramoniam T. Mechanisms and control of vitellogenesis in crustaceans[J]. *Fisheries Science*, 2011, 77(1): 1-21.
- [12] Cheng Y X, Lai W, Du N S. Lipid accumulation and hepatopancreatic fat changes during ovarian development in decapod crustaceans[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 1997, 32(2): 57-60. [成永旭, 赖伟, 堵南山. 十足类甲壳动物卵巢发育过程中脂肪的积累与胰腺脂肪的变化[J]. *动物学杂志*, 1997, 32(2): 57-60.]
- [13] Mourente G, Rodríguez A. Variation in the lipid content of wild-caught females of the marine shrimp *Penaeus kerathurus* during sexual maturation[J]. *Marine Biology*, 1991, 110(1): 21-28.
- [14] Ravid T, Tietz A, Khayat M, et al. Lipid accumulation in the ovaries of a marine shrimp *Penaeus semisulcatus* (de haan)[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 1999, 202(13): 1819-1829.
- [15] Teshima S I, Kanazawa A, Sasada H. Nutritional value of dietary cholesterol and other sterols to larval prawn, *Penaeus japonicus* Bate[J]. *Aquaculture*, 1983, 31(2-4): 159-167.
- [16] Sui L Y, Wu X G, Wille M, et al. Effect of dietary soybean lecithin on reproductive performance of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards) Broodstock[J]. *Aquaculture International*, 2009, 17(1): 45-56.
- [17] Wu X G, Cheng Y X, Sui L Y, et al. Effect of dietary supplementation of phospholipids and highly unsaturated fatty acids on reproductive performance and offspring quality of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards), female broodstock[J]. *Aquaculture*, 2007, 273(4): 602-613.
- [18] Wang C H, Li C H, Li S F. Mitochondrial DNA-inferred population structure and demographic history of the mitten crab (*Eriocheir sensu stricto*) found along the Coast of mainland China[J]. *Molecular Ecology*, 2008, 17(15): 3515-3527.
- [19] Long X W, Guo Q, Wang X C, et al. Effects of fattening period on ovarian development and nutritional quality of adult female Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. *Aquaculture*, 2020, 519: 734748.
- [20] Cheng Y X, Yan S L, Wang W, et al. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids, phospholipids on the survival and growth of *Eriocheir sinensis* from the megalopa to the juvenile[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1998, 22(1): 10-16. [成永旭, 严生良, 王武, 等. 饲料中磷脂和多不饱和脂肪酸对中华绒螯蟹大眼幼体发育成仔蟹的成活率和生长的影响[J]. *水产学报*, 1998, 22(1): 10-16.]
- [21] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [22] Coleman R A, Lee D P. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation[J]. *Progress in Lipid Research*, 2004, 43(2): 134-176.
- [23] Gonzalez-Baró M R, Lewin T M, Coleman R A. Regulation of triglyceride metabolism II. Function of mitochondrial GPAT1 in the regulation of triacylglycerol biosynthesis and insulin action[J]. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2007, 292(5): G1195-G1199.
- [24] Lewin T M, Wang P, Coleman R A. Analysis of amino acid motifs diagnostic for the sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase reaction[J]. *Biochemistry*, 1999, 38(18): 5764-5771.
- [25] Du N S, Lai W, Chen P C, et al. Studies on vitellogenesis of *Eriocheir sinensis*[J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1999, 45(1): 88-92, 125. [堵南山, 赖伟, 陈鹏程, 等. 中华绒螯蟹卵黄形成的研究[J]. *动物学报*, 1999, 45(1): 88-92, 125.]
- [26] Wouters R, Lavens P, Nieto J, et al. Penaeid shrimp broodstock nutrition: An updated review on research and development[J]. *Aquaculture*, 2001, 202(1-2): 1-21.
- [27] Ando T, Kanazawa A, Teshima S I, et al. Variation in the lipids of tissues during the molting cycle of prawn[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1977, 43(12): 1445-1449.
- [28] Zhu W L, Guo Q, Cheng Y X, et al. Identification and functional expression of two subtypes of glycerol-3-phosphate

- acyltransferase differently regulating triacylglyceride synthesis during ovary development in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology, 2019, 331(9): 494-505.
- [29] Schlame M, Rua D, Greenberg M L. The biosynthesis and functional role of cardiolipin[J]. Progress in Lipid Research, 2000, 39(3): 257-288.
- [30] Wang H Y J, Jackson S N, Woods A S. Direct MALDI-MS analysis of cardiolipin from rat organs sections[J]. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2007, 18(3): 567-577.
- [31] Teshima S I, Kanazawa A. Variation in lipid compositions during the ovarian maturation of the prawn[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1983, 49(6): 957-962.
- [32] Clarke A. Lipid synthesis and reproduction in the polar shrimp *Chorismus antarcticus*[J]. Marine Ecology Progress Series, 1982, 9: 81-90.
- [33] Harrison K E. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of Decapod crustacean: A review[J]. Journal of Shellfish Research, 1990, 9(1): 1-28.
- [34] Ma M J, Wang C, Wu X G, et al. Dynamic changes of lipids in hepatopancreas and muscle during the molting cycle of young Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(11): 1889-1898. [马明君, 王春, 吴旭干, 等. 中华绒螯蟹幼蟹蜕皮周期中肝胰腺和肌肉脂类的动态变化[J]. 水产学报, 2014, 38(11): 1889-1898.]
- [35] Wen X B, Chen L Q, Ai C X, et al. Variation in lipid composition of Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis* during ovarian maturation[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2001, 130(1): 95-104.
- [36] Sousa L G, Petriella A M. Changes in the hepatopancreas histology of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Caridea) during moult[J]. Biocell: Official Journal of the Sociudades, 2001, 25(3): 275-281.
- [37] Al-Mohanna S Y, Nott J A. Functional cytology of the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda) during the moult cycle[J]. Marine Biology, 1989, 101(4): 535-544.
- [38] Al-Mohanna S Y, Nott J A, Lane D J W. Mitotic E- and secretory F-cells in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda)[J]. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 1985, 65(4): 901-910.
- [39] Vogt G, Stöcker W, Storch V, et al. Biosynthesis of *Astacus* protease, a digestive enzyme from crayfish[J]. Histochemistry, 1989, 91(5): 373-381.
- [40] Vogt G. Life-cycle and functional cytology of the hepatopancreatic cells of *Astacus astacus* (Crustacea, Decapoda)[J]. Zoomorphology, 1994, 114(2): 83-101.
- [41] Rotllant G, González-Gurriarán E, Fernández L, et al. Ovarian maturation of the multi-spawning spider crab *Maja brachydactyla* (Decapoda: Majidae) with special reference to yolk formation[J]. Marine Biology, 2007, 152(2): 383-394.
- [42] Takeuchi K, Reue K. Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis[J]. American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism, 2009, 296(6): E1195-E1209.
- [43] Kennedy E P. Biosynthesis of complex lipids[J]. Federation Proceedings, 1961, 20: 934-940.
- [44] Kennedy E P, Weiss S B. The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides[J]. Journal of Biological Chemistry, 1956, 222(1): 193-214.
- [45] Smith S J, Cases S, Jensen D R, et al. Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat[J]. Nature Genetics, 2000, 25(1): 87-90.
- [46] Cattaneo E R, Pellon-Maison M, Rabassa M E, et al. Glycerol-3-phosphate acyltransferase-2 is expressed in spermatogenic germ cells and incorporates arachidonic acid into triacylglycerols[J]. PLoS One, 2012, 7(8): e42986.

Analysis of cloning and expression characteristics of lysophosphatidylglycerol acyltransferase during ovarian development of *Eriocheir sinensis*

PAN Kewu¹, WANG Lin¹, GUO Qing¹, WU Xugan^{1,2,3}

1. Centre for Research on Environmental Ecology and Fish Nutrition of Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. National Demonstration Centre for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: To explore the regulation of lysophosphatidylglycerol acyltransferase (LPGAT) expression patterns during the ovarian development of *Eriocheir sinensis*, the open reading frame (ORF) sequence of *Es-lpgat1* of *E. sinensis* (accession number: MZ312613) was cloned. Then, its temporal and spatial expression patterns during ovarian development were analyzed using real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR), *in situ* hybridization, and RNA interference. The results showed that the ORF of *Es-lpgat1* was 1125 bp in length, encoding a 374-amino acid protein with a molecular weight of 44 kD. It belonged to the LPGAT superfamily, and the amino acid sequence deduced from *Es-lpgat1* exhibited the highest identity with *Portunus trituberculatus*. qRT-PCR results showed that *Es-lpgat1* was expressed in different tissues during the ovarian development of *E. sinensis*, with the highest expression in the ovary and the lowest level in the gills ($P < 0.05$). During the ovarian development cycle, both the hepatopancreas and ovary at ovarian stage II presented the highest expression levels of *Es-lpgat1* mRNA ($P < 0.05$), and there was a significant increasing trend during the period from ovarian stage III to stage V. The results of *in situ* hybridization showed that in ovarian stage II, the strong signal of *Es-lpgat1* mRNA was localized in the cytoplasm of previtellogenic oocytes and endogenous vitellogenic oocytes of the ovary, while a very weak signal was detected in stage IV ovaries. However, a strong signal of *Es-lpgat1* mRNA was localized in fibrillar cells (F cells) and resorptive cells (R cells) of hepatopancreas at stages II and IV. After knockdown of *Es-lpgat1*, the expression levels of *Es-gpat2* and *Es-dgat2* were significantly up-regulated, while the expression levels of *Es-agpat4* and *Es-dgat1* were significantly down-regulated. In summary, *Es-lpgat1* mRNA was mainly expressed in the ovary and hepatopancreas of *E. sinensis*, which was significantly related to the ovarian stages. These results suggested that *Es-lpgat1* may be involved in phospholipid metabolism during ovarian development of *E. sinensis*.

Key words: *Eriocheir sinensis*; ovarian development; lysophosphatidylglycerol acyltransferase (LPGAT); quantitative real-time PCR; *in situ* hybridization; RNA interference

Corresponding author: WU Xugan. E-mail: xgwu@shou.edu.cn