

DOI: 10.12264/JFSC2021-0159

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

张进盼^{1,3}, 白志毅^{1,2,3}, 张梦莹^{1,3}, 颜玲^{1,3}, 陆风辉^{1,3}, 王贺^{1,3}

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

摘要: 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, 探究该基因与三角帆蚌壳色的相关性, 本研究采用 RACE 技术克隆获得 *HcLPCAT1* 基因 cDNA 全长 1675 bp, ORF 区 1296 bp 编码 431 个氨基酸; 实时荧光定量分析发现 *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, 且在肝胰腺、外套膜中的表达量差异显著 ($P<0.05$); 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, 外褶与中褶连接处以及部分中褶; 紫色三角帆蚌补充投喂 β -胡萝卜素后, *HcLPCAT1* 基因在肝胰腺、中央膜、边缘膜各组织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 ($P<0.05$), 单倍型分析发现 H1、H2 两种单倍型为紫色三角帆蚌优势单倍型, H3、H5、H6 三种单倍型为白色三角帆蚌优势单倍型。本研究鉴定的 *HcLPCAT1* 基因可为解析三角帆蚌类胡萝卜素代谢和壳色形成的机制提供研究基础, 筛选出的与内壳色相关 SNP 及单倍型可用于分子辅助育种。

关键词: 三角帆蚌; *LPCAT1* 基因; 类胡萝卜素; SNP 标记; 内壳色

中图分类号: S961

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2021)11-1373-12

我国是世界第一淡水珍珠生产大国, 年产量占世界珍珠总产量的 80%以上^[1]。但我国淡水珍珠产业高产低值的问题突出, 提升淡水珍珠质量是我国淡水珍珠产业向高质量发展转型的关键^[2-3]。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”。但目前珍珠呈色机理研究还不够清晰, 目前主要认为类胡萝卜素、

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^[3-5], 类胡萝卜素是一种稳定且着色良好的天然着色剂^[6], 生产中通常用于改善水产品的体色^[7]。闻海波等^[8]已初步确定三角帆蚌类胡萝卜素代谢显著影响其内壳色, 孙明龙等^[9]补充投喂 β -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^[10] (lysophosphatidylcholine acyltransferase 1, LPCAT1)是一种内质网膜蛋白, 参与磷脂合成^[11], 支持脂质单

收稿日期: 2021-04-19; 修订日期: 2021-05-10.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31872565); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助项目; 上海市优秀学术带头人计划资助项目(19XD1421500).

作者简介: 张进盼(1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向为淡水贝类养殖和种苗工程. E-mail: jinpan_zhang@163.com

通信作者: 白志毅, 男, 从事水产动物种质资源与遗传育种研究. E-mail: zybai@shou.edu.cn

层中磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)的形成^[12]。PC 是脂滴形成的关键成分^[13], 是细胞内类胡萝卜素储存的主要场所^[14]。有研究表明, 利用甲基化依赖性限制酶对虾夷扇贝(*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 个差异最显著的甲基化位点, 其中之一位于 LPCAT1 的基因区域^[15], 初步证实该基因在类胡萝卜素代谢过程中的调控作用。本研究拟克隆三角帆蚌 *HcLPCAT1* 基因 cDNA 全长序列, 并采用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)和原位杂交(in situ hybridization, ISH)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, 加快其分子标记辅助育种的进程。

1 材料与方法

1.1 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, 白色蚌内壳色为白色, 紫色蚌内壳色为紫色(图 1)。实验蚌为壳长(89.25 ± 5.41) mm 的健康个体, 暂养于 120 L 水族箱中, 水温保持在(23 ± 2) °C, 24 h 充氧, 早晚各投喂小球藻一次, 实验前 48 h 停止投喂。分别提取 W、P 个体的肝胰腺、闭壳肌、斧足、边缘膜、中央膜组织, 所取样品立刻放入液氮冷冻, 随后转存至 -80 °C 冰箱保存备用。

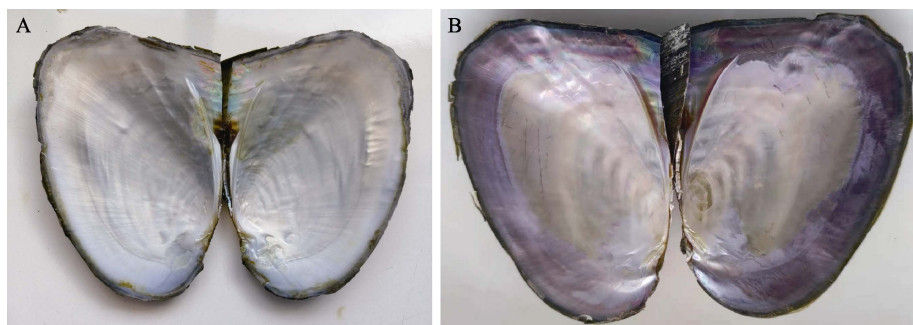


图 1 两种内壳色三角帆蚌

A 为白色蚌(W); B 为紫色蚌(P).

Fig. 1 Two kinds inner shell color of *Hyriopsis cumingii*

A: white (W); B: purple (P).

1.2 *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^[16]设计 *HcLPCAT1* 基因的引物(表 1), 根据 3' RACE 引物进行巢式 PCR 反应, 获得 *HcLPCAT1* 基因 cDNA 全长, 参照 Shen 等^[5]的方法进行序列分析, 并以 MAGE 7.0 软件中最大似然法(maximum likelihood, ML)构建三角帆蚌 *HcLPCAT1* 氨基酸序列系统发育树。

1.3 *HcLPCAT1* 的表达分析

以获得的基因 cDNA 全长序列为模板, 利用 GenScript Real-time PCR (TaqMan) Primer Design 程序 (<https://www.Genscript.com/ssl-bin/app/primer>)

设计 qRT-PCR 引物, EF-F 和 EF-R 为内参引物^[16](表 1)。

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

1.4 饵料补充投喂 β -胡萝卜素后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

表 1 *HcLPCAT1* 基因实验相关引物
Tab. 1 Primers for *HcLPCAT1* gene experiments

引物名称 primer name	序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	用途 usage
LPCAT1-F1	GACATTGGCACCACCTCAGAC	序列验证 sequence validation
LPCAT1-R1	CAAAGACATCCTCAAGTGCTG	
LPCAT1-F2	TTCAACCGCTTTTCAGTCAC	
LPCAT1-R2	AGACATCCTCAAGTGCTGGG	
L-RACE-F1	GAGATGGTTCTGGTACCATAGACTTTAGGGAG	3'端快速扩增 3' RACE
L-outer	GCTGTCAACGATACGCTACGTAAC	
L-RACE-F2	TGTCCCTAATCTCAAATCCAGTCAACAATG	
L-inner	GCTACGTAACGGCATGACAGTG	
L-RT-F	ATGATTGTCGCCTTATGCT	实时荧光定量 PCR qRT-PCR
L-RT-R	GTGCTGGGTTCACTGGTAT	
EF-F	GGAACCTCCCAGGCAGACTGTGC	
EF-R	TCAAAACGGGCCGAGAGAAT	
LPCAT1 YW-F	ATGATTGTCGCCTTATGCT	原位杂交 ISH
LPCAT1 YW-R	TAATACGACTCACTATAGGGGTGCTGGGTTCACTGGTAT	

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 β -胡萝卜素粉剂(含量 1%, 湖北欣和生物科技有限公司, 中国湖北), 投喂浓度为 20 mg/L^[17], 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, 并根据孙明龙等^[9]方法计算总类胡萝卜素含量(total carotenoids content, TCC)。

1.5 *HcLPCAT1* 基因的 SNP 位点筛选及分析

三角帆蚌内壳色参数测量参照 Bai 等^[18]方法, 测量的参数包括明度(L^*), 红绿色度(a^*)和黄蓝色度(b^*), 并计算色差值(dE^*)。使用海洋动物 DNA 提取试剂盒(天根生化科技, 中国北京)提取三角帆蚌边缘膜基因组 DNA, 检测合格后用表 2

表 2 *HcLPCAT1* 基因 SNP 相关引物
Tab. 2 The primers of SNP in *HcLPCAT1* gene

引物名称 primer name	序列 (5'-3') primer sequence (5'-3')
LPCAT1-1F	TGTTGGATCGAAATTCAGTCTGC
LPCAT1-1R	ACATAAAGTGATGGCGAGTTTGC
LPCAT1-2F	AGCATGTATATTTGAGTTGGGGC
LPCAT1-2R	TTTGTGGAAGTTACTTCAGTGGC
LPCAT1-3F	CAAGGATTGAACCCACTACATCC
LPCAT1-3R	TGTGCCGTTTTGTACAATATTTGC

所示引物进行扩增测序, 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。

2 结果与分析

2.1 *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* 基因蛋白质分子质量(Mw)约 49.04 ku, 理论等电点为 8.01, 包含 1 个跨膜螺旋区, 不具备信号肽; 通过 NetPhos 3.1 程序分析发现 *HcLPCAT1* 具有 22 个丝氨酸(S)磷酸化位点, 11 个苏氨酸(T)磷酸化位点和 2 个酪氨酸(Y)磷酸化位点; 使用 SWISS-MODEL 预测 *HcLPCAT1* 蛋白三级结构中包含 48%的 α 螺旋、10%的 β 折叠和 13%的无规则卷曲(图 2, 图 3)。

2.2 *HcLPCAT1* 系统进化树分析

图 4 显示, 三角帆蚌 *HcLPCAT1* 的氨基酸序列与厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)和紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)相似度最高, 与虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)、中国真蛸(*Octopus sinensis*)

```

1   tacttattactaatcaccATGAATCACGGATTCTCGTCAAGCATCACTGATGGGACCT
1       M K S R I P R Q A S L M G P
61  GATATACAGAACCCATTTTGCATAAATTACATCTCAGTCCCTTTTATATTGTACAGATA
15       D I Q N P F L H K L H L S P F H I V Q I
121 GTACTGATGTCCGTGACATTGGCACCCTCAGACTTGTCCTTATTGGACTGCTCCTGATA
35       V L M S V T L A P L R L V L I G L L L I
181 TTGTTATGGCCCCCTTGCATTCAATTCACCGCTTTTCAGTCACAAGAAGACAGGGACAAA
55       L L W P L A F I S T A F Q S Q E D R D K
241 CCTATCACTGGATGGAGAAAGTATTTGAACTTCCTTTTATCTACATTGGACGTGCAATA
75       P I T G W R K Y F E L P F I Y I G R A I
301 GTGTTGTGATAGGTTTTACAAATGTAAAGGTCAAAGGTGAACCCAAACCATCATCAGAG
95       V F V I G F H N V K V K G E P K P S S E
361 GCCCCATTATTTGTGGAGCACCACATTCCAGTTTCTTTGATACACTAGCAATATTTTAT
115      A P I I C G A P H S S F F D T L A I F Y
421 TGCTCTGGGCTTCCATCTGCAGTATCAAAGAAAGAGAACTCTTCAGTGTTTATATCTGGA
135      C S G L P S A V S K K E N S S V F I L G
481 AGTTTGATGTCTATGCCCAACAGTTTGGGTCAAGCGGAGGATCACAATTCACGAACA
155      S L M S Y A Q P V W V K R E D H N S R T
541 AGTACCATCAAAGAGATCCAGAGACGAGTTCAAACACGTGGAGAGTGGCCGAAATTATT
175      S T I K E I Q R R V Q T R G E W P Q I I
601 CTTTTCCCTGAGGTACATGTACCAACAGGAGCTGTTTGATTACTTTTAACTAGGTGCA
195      L F P E G T C T N R S C L I T F K L G A
661 TTCCATCCAGGAGTCCAGTTTCCAGCTATGTGTTTACGATATCCAACAGACTGGACACA
215      F H P G V P V Q P M C L R Y S N R L D T
721 GTAACCTGGACATGGGATGGACCTGGAGCGTTTTGCCAGTTCTGGCTGACTTTATGTGAG
235      V T W T W D G P G A F C Q F W L T L C Q
781 TTTATACAAATCTTGAGATAGAGTTTTTGCCAGTGTATGTACCCAAATGAAGAAGAAAAA
255      F H T N L E I E F L P V Y V P N E E E K
841 AAAGATCCCAAGCTATTTGCCAGTAATGTTCCGAGAGATGTCAGAATGTCTTGAATC
275      K D P K L F A S N V R Q K M S E C L E I
901 CCAGTGACAGATCACACATTTGATGATTGTGCGCTTATGCTGCAGGCACAGAAGCTTAAA
295      P V T D H T F D D C R L M L Q A Q K L K
961 CTACCAATGCAAGCTGGTCTTGTGCAATTCAGAAGCTGCACAAAAGTTGGGAATTTCC
315      L P M Q A G L V E F Q K L H K K L G I S
1021 TTGGAGCAGATGCAGAAATTGCTTGAGACGTTTGGCAGTATTAATAAAGGAGATGGT
335      L E Q M Q K L L E T F G S I N Y K G D G
1081 CTTATTTCCCTGAAGAGTTCTCCACTTACCTCCAGATACCAGTGAACCCAGCACTTGAG
355      L I S L E E F S T Y L Q I P V N P A L E
1141 GATGTCTTTGCAATGTACGACAGAGATGGTCTGTTGACCATAGACTTTAGGGAGTATGTT
375      D V F A M Y D R D G S G T I D F R E Y V
1201 ATTGGATTGTCCCTAATCTCAAATCCAGTCAACAATGAGGAACTATACAATTAGCATTT
395      I G L S L I S N P V N N E E T I Q L A F
1261 AAGGGTGAATACAAGGAATGATCCCATACATGATTTTCTGCTGTTTCGCTGAaggatca
415      K G V I Q G M I P Y M I F L A V R *
1321 tgccagaatgccacattcatgcagacaaaggcggaagaatgatcgcaaaagaactgaacc
1381 atagtaaacatgacctcctgcagcacacatcactgtttccaacttatgtcactggaattc
1441 agctagaaatatttgcaaatgaacctgtaataacatgagtataaatttgaaatgttt
1501 tgcttcagataccactatacatgatgatgtgtgttgacaagaaaagacctgggttaaac
1561 tttaaactgttatattctcagaatgattatgtgaaattaaataataaccatgttcagaac
1621 tatgatatacacaagataattaaactgaattcttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图 2 *HcLPCAT1* cDNA 完整序列及其编码的氨基酸序列

上一行为核苷酸序列，下一行为氨基酸序列，第一个框表示起始密码子，*表示终止密码子，阴影部分表示跨膜区，下划线部分表示不同的结构域。

Fig. 2 Full cDNA length and encoded amino acid sequence of *HcLPCAT1*

Upper: nucleotides. Lower: amino acids. The first box represents the start codon. *: stop codon. Shaded regions indicate transmembrane regions. Underlined part indicates different domains.

<i>Hyriopsis cumingii</i>	MKSR--IPRQ	AS-----	--LMGPDION	PFLHKLHLSF	FHIVQIVLMS	VTLAPLRLVL	48
<i>Mytilus coruscus</i>	MKRQIAIPRQ	MS-----	--LITPEILN	PFVHKIHLSP	MQKIQIVFMS	LFVVPRLML	50
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	MKRQIAIPRQ	MS-----	--LITPEILN	PFVHKIHLSP	MQKIQIVFMS	VFVVPRLML	50
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	MKRNVGIPRQ	TS-----	--LATPVVFN	PFVHQIDLTN	VDKIRIALMS	IFVVPRLIF	50
<i>Danio rerio</i>	MRFPNRKLHT	AVNGGDSG--	--VSTHFRN	PFVHELRLFTT	LQKLKIAVMT	VTLLFPRLIF	55
<i>Homo sapiens</i>	MRLRGCGPRA	APASSAGASD	ARLLAPPGRN	PFVHELRLLSA	LQKAQVALMT	LTLLFPRLLV	60
<i>Octopus sinensis</i>	MRLRGCGPRA	APASSAGASD	ARLLAPPGRN	PFVHELRLLSA	LDVVKIGVMS	FTIAPRLLI	37
<i>Rattus norvegicus</i>	MRLRGCGPRA	APSSSSGAGD	ARRLAPPGRN	PFVHELRLLSA	LQKAQVAFMT	LTLLFPRLLF	60
Clustal consensus	..:..:	..:..:	..:..:	..:..:	..:..:	..:..:	
<i>Hyriopsis cumingii</i>	IGLLILLLWP	LAFISTAFQS	QEDRDKPIIG	WRK-YFELPF	IYIGRAIVFV	IGFHNKVKVG	107
<i>Mytilus coruscus</i>	IFTCLIFAWM	LAKASLAFRS	KEEQDKPKMG	WRKTLFHKTI	MYLGRAICFF	YGFQNVKVG	110
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	IFTCLILAWM	LAKASLAFRS	KEEQDKPKMG	WRKTLFHKTI	MNLGRAICFF	YGFQNVKVG	110
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	CAIFLLSGFV	LATIALAFRT	PEEKQKPLCG	WRN-IFRPLV	VLNCRGLFLA	GGFWVTIKG	109
<i>Danio rerio</i>	KRVCAAEAPI	LTVPHSTYF	EN-AVEPLSW	WRW-LVDLAL	KATMRAMWFS	GGFHWVVKVG	113
<i>Homo sapiens</i>	AAAMMLLAWP	LALVASLGSA	EKEPEQPAL	WRK-VVDFLL	KATMRTMWFA	GGFHWVVKVG	119
<i>Octopus sinensis</i>	AGILLMLAWS	LASLLFLQT	EIERQKPLIG	WRK-IVNYVL	LKISRIFFV	FTIAPRLLI	96
<i>Rattus norvegicus</i>	AAFMMLLAWP	FALVASLGPP	DKEPEQPLAL	WRK-VVDFLL	KATMRTMWFA	GGFHWVVKVG	119
Clustal consensus	..:..:	..:..:	..:..:	..:..:	..:..:	..:..:	
<i>Hyriopsis cumingii</i>	EPKPSSEAPI	ICGAPHSSFF	DTLAIIFYCSG	LPSAVSKKEN	SSVFILGSLM	SYAQPVVVKR	167
<i>Mytilus coruscus</i>	QPVGSDVAPI	LVCAPHSTFM	DAFVIFYCST	LPSLSSSRKEN	SALPLGLSLI	EYTOPLVVKR	170
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	EPVGSADVAPM	LVCAPHSTFM	DAFVIFYCST	LPSLSSSRKEN	SALPLGLSLI	EYTOPLVVKR	170
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	KRVCAAEAPI	LTVPHSTYF	DALPVVAL-E	LTIVAKSQA	EKVFFGTLN	AFTQPVVVKR	168
<i>Danio rerio</i>	RPALPSEAPI	LTMAPHSSYF	DAIPVTMT--	MASIVMKAES	KDIPVWGTLL	KFIRPVVVKR	171
<i>Homo sapiens</i>	HQALPTEAAI	LTMAPHSSYF	DAIPVTMT--	MSSIVMKAES	RDIPWGTLL	QYIRPVVVKR	177
<i>Octopus sinensis</i>	RCAQAKAEPI	VCIAPHSSLF	DALVFMTP	LPAVVSADH	IKVPFIKLI	QYTOPLVVKR	156
<i>Rattus norvegicus</i>	RQALPTEAAI	LTMAPHSSYF	DAIPVTMT--	MSSIVMKAES	RDIPWGTLL	RYIRPVVVKR	177
Clustal consensus	..:..:	..:..:	..:..:	..:..:	..:..:	..:..:	
<i>Hyriopsis cumingii</i>	EDHNSRTSTI	KEIQRRVQTR	GEWPQIILFP	EGTCTNRSCL	ITFKLGAFHP	GVPVQPVVLR	227
<i>Mytilus coruscus</i>	YLNLSLDITW	TWEGPGAFTC	LWLTSLCQFHN	NLEIEFLPVY	VNEEEKKQDP	KLFASNVVR	287
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	YLNLSLDITW	TWEGPGAFTC	LWLTSLCQFHN	NLEIEFLPVY	VNEEEKKQDP	KLFASNVVR	287
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	EDHNSRQNTI	KEINRRAKSG	GEWPQIILFP	EGTCTNRSCL	ITFKLGAFHP	GVPVQPVVLR	228
<i>Danio rerio</i>	SDQDSRRKTV	EEIKRRASSN	GEWPQIMIFP	EGTCTNRSCL	ITFKLGAFHP	GVPVQPVVLR	231
<i>Homo sapiens</i>	SDQDSRRKTV	EEIKRRASSN	GEWPQIMIFP	EGTCTNRSCL	ITFKLGAFHP	GVPVQPVVLR	237
<i>Octopus sinensis</i>	SDQDSRRKTV	EEIKRRASSN	GEWPQIMIFP	EGTCTNRSCL	ITFKLGAFHP	GVPVQPVVLR	216
<i>Rattus norvegicus</i>	SDQDSRRKTV	EEIKRRASSN	GEWPQIMIFP	EGTCTNRSCL	ITFKLGAFHP	GVPVQPVVLR	237
Clustal consensus	..:..:	..:..:	..:..:	..:..:	..:..:	..:..:	
<i>Hyriopsis cumingii</i>	YLNLSLDITW	TWEGPGAFTC	LWLTSLCQFHN	NLEIEFLPVY	VNEEEKKQDP	KLFASNVVR	287
<i>Mytilus coruscus</i>	YLNLSLDITW	TWEGPGAFTC	LWLTSLCQFHN	NLEIEFLPVY	VNEEEKKQDP	KLFASNVVR	287
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	YLNLSLDITW	TWEGPGAFTC	LWLTSLCQFHN	NLEIEFLPVY	VNEEEKKQDP	KLFASNVVR	287
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	YPNKMDITW	TWQGPFAFKI	LWLTSLCQFHN	NLEIEFLPVY	VNEEEKKQDP	KLFASNVVR	288
<i>Danio rerio</i>	YPNKMDITW	TWQGPFAFKI	LWLTSLCQFHN	NLEIEFLPVY	VNEEEKKQDP	KLFASNVVR	291
<i>Homo sapiens</i>	YPNKMDITW	TWQGPFAFKI	LWLTSLCQFHN	NLEIEFLPVY	VNEEEKKQDP	KLFASNVVR	297
<i>Octopus sinensis</i>	YPNKMDITW	TWQGPFAFKI	LWLTSLCQFHN	NLEIEFLPVY	VNEEEKKQDP	KLFASNVVR	276
<i>Rattus norvegicus</i>	YPNKMDITW	TWQGPFAFKI	LWLTSLCQFHN	NLEIEFLPVY	VNEEEKKQDP	KLFASNVVR	297
Clustal consensus	..:..:	..:..:	..:..:	..:..:	..:..:	..:..:	
<i>Hyriopsis cumingii</i>	MSECLIPVT	DHTFDDCRLM	LQAQKLKLP	QAGLVEFQKL	HKKLGI SLEQ	MQKLLETFG-	346
<i>Mytilus coruscus</i>	MAESLKIPT	DHTFDDCRLM	LQAQKLKLP	QAGLVEFQKL	HKKLGI SLEQ	MQKLLETFG-	349
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	MAESLKIPT	DHTFDDCRLM	LQAQKLKLP	QAGLVEFQKL	HKKLGI SLEQ	MQKLLETFG-	349
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	MAECLGVPT	DHTFDDCRLM	LQAQKLKLP	QAGLVEFQKL	HKKLGI SLEQ	MQKLLETFG-	347
<i>Danio rerio</i>	MAEALGLPII	DYSFEDCQLA	MAKGRLRLPK	HTCCLLEFARL	VRLGLLKTKEV	TDEVLQEEAC	351
<i>Homo sapiens</i>	MAEALGLVST	DHTFDDCRLM	LQAQKLKLP	QAGLVEFQKL	HKKLGI SLEQ	MQKLLETFG-	357
<i>Octopus sinensis</i>	MAKCLNCTIT	DHTFDDCRLM	LQAQKLKLP	QAGLVEFQKL	HKKLGI SLEQ	MQKLLETFG-	336
<i>Rattus norvegicus</i>	MAKALGVST	DHTFDDCRLM	LQAQKLKLP	QAGLVEFQKL	HKKLGI SLEQ	MQKLLETFG-	357
Clustal consensus	..:..:	..:..:	..:..:	..:..:	..:..:	..:..:	
<i>Hyriopsis cumingii</i>	SINYKGDGLI	SLEEFSTYLO	IPVNPALDVI	FAMYDRDGS	TIDFREYVIG	LSLISNPNVNN	406
<i>Mytilus coruscus</i>	AISQKDKGSI	TLGEFAAYLH	VPVSPALEEM	FSLYDRNGSE	TIDFREYVIG	LSLISNPNVNN	409
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	AISQKDKGSI	TLGEFAAYLH	VPVSPALEEM	FSLYDRNGSE	TIDFREYVIG	LSLISNPNVNN	409
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	SLAQNTGVI	TLQFAKYVH	LPKSEALEQV	FALYDRNSSG	VIDFREYVIG	LSLISNPNVNN	407
<i>Danio rerio</i>	SARQLCGRR	DMGFAQYVH	QPMTEAVQDI	FSLFEEHGG	MMDVREYVIA	LSLVCRFPART	409
<i>Homo sapiens</i>	RARMKGGEKI	GIAEFAASLE	VPVSDLEDLM	FSLFDESGSG	EVDLRECVVA	LSLVCRFPART	417
<i>Octopus sinensis</i>	QVSSSEPQEKI	TYREFEYVH	ISQNDLSLRL	FKIYDFEQTG	HTDIRDYVVD	LCLVSGEAT	396
<i>Rattus norvegicus</i>	SARMKGGEKI	RLPEFAAYLE	VPVSDLEDLM	FSLFDESGSG	EVDLREYVVA	LSLVCRFPART	417
Clustal consensus	..:..:	..:..:	..:..:	..:..:	..:..:	..:..:	
<i>Hyriopsis cumingii</i>	EETIQALAFKG	VIQGG--MIP	--LITPEILN	AFGIDDLDFE	KLFQEVNDINK	DDKITFDEFK	423
<i>Mytilus coruscus</i>	DDTLKLAFLQ	FDNGDKGYIT	QAEELTGILN	AFGIDDLDFE	KLFQEVNDINK	DDKITFDEFK	469
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	DDTLKLAFLQ	FDNGDKGYIT	QAEELTGILN	AFGIDDLDFE	KLFQEVNDINK	DDKITFDEFK	469
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	EDTKLAFLQ	FDKEDKGYIT	RDDLTEILHN	AFGMDVDR-	LFEQVNDINK	DDKITFDEFK	465
<i>Danio rerio</i>	LDITVLAFLRM	FEAQEDGAIIV	EDTELVLKLT	ALGVGDLAVS	ELFRAIDSDQ	KGKITFDEFK	469
<i>Homo sapiens</i>	LDITVLAFLRM	FEAQEDGAIIV	EDTELVLKLT	ALGVGDLAVS	ELFRAIDSDQ	KGKITFDEFK	477
<i>Octopus sinensis</i>	EEVLKMAFQA	FEYGHEGFI	SQGFKSVMVH	IFEMSDESEC	QIFQDIDSDD	DQKITFDEFK	456
<i>Rattus norvegicus</i>	LATIQALAFKM	YGSPEGGSID	EADLSCLIKT	ALGISELTIT	DLFQAIDQEE	RGRITFDEFK	477
Clustal consensus	..:..:	..:..:	..:..:	..:..:	..:..:	..:..:	
<i>Hyriopsis cumingii</i>	--MIFLAVR	--VLT	--VLT	--VLT	--VLT	--VLT	431
<i>Mytilus coruscus</i>	KVAETKPEYA	KLFMTYQELK	K--VLT	NGNGISKLE-	--VLT	--VLT	503
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	KVAETKPEYA	KLFMTYQELK	K--VLT	NGNGISKLE-	--VLT	--VLT	503
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	AFAELNPEYA	KLETTVBAK	V--APGN	GHAHVKSSE-	--VLT	--VLT	499
<i>Danio rerio</i>	SFMKCPDLV	EQYHCLCHSI	SQHSRETS	--SNGFCADF	SP--R	NHKKQD	517
<i>Homo sapiens</i>	RFAEMYPFAFA	EEYLPDQTH	FESCAETS	PIPNFGCADF	SPENSAGRK	PVRKKLD	534

图 3 *LPCAT1* 的氨基酸序列比对
Fig. 3 Amino acid sequences alignment of *LPCAT1*

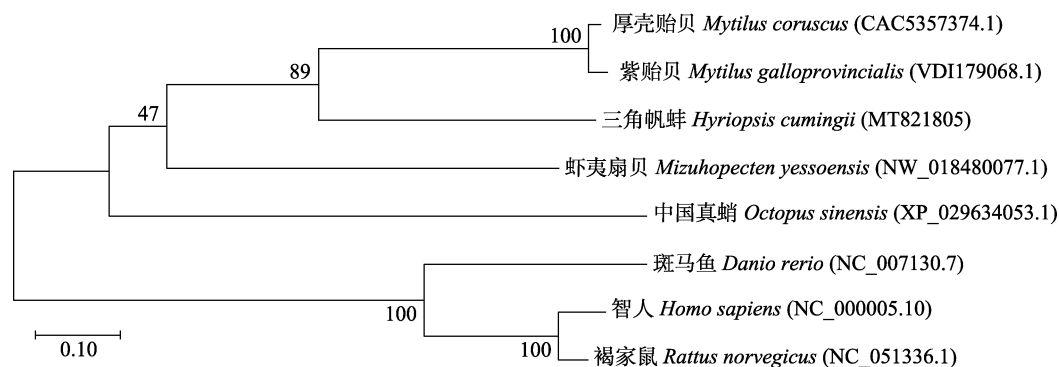


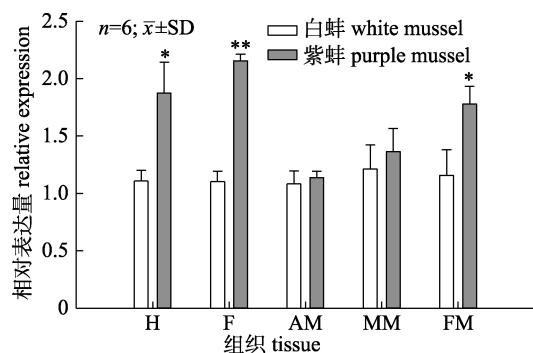
图 4 LPCAT1 氨基酸序列构建的 ML 进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of LPCAT1 amino acid sequences

的相似度较低。*HcLPCAT1* 具有磷酸甘油酰基转移酶活性的典型结构域, 属于溶血磷脂酰基转移酶(lysophospholipid acyltransferase, LPLAT)大家族, 进化较为保守。

2.3 *HcLPCAT1* 基因在不同壳色三角帆蚌组织中的表达分析

通过 qRT-PCR 技术, 检测三角帆蚌肝胰腺、斧足、闭壳肌、中央膜、边缘膜组织中 *HcLPCAT1* 的表达情况, 发现 *HcLPCAT1* 基因在紫色蚌所有组织中表达量均高于白色蚌相应组织, 且在肝胰腺、边缘膜中差异显著($P < 0.05$), 在斧足中差异极显著($P < 0.01$), 其余组织中差异不显著(图 5)。

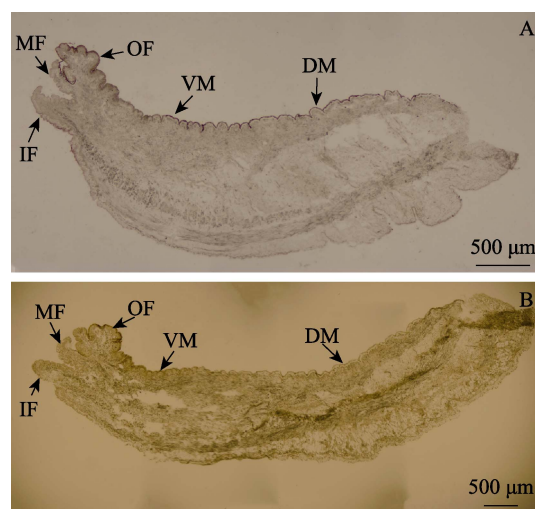
图 5 *HcLPCAT1* 基因在白色、紫色三角帆蚌不同组织中的表达

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($P < 0.01$)。

Fig. 5 Tissue expression profile of the *HcLPCAT1* in W- and P-mussels detected by qRT-PCR in *Hyriopsis cumingii*. H: hepatopancreas; F: foot; AM: adductor muscle; MM: middle mantle; FM: fringe mantle. “*” indicates that there is significant differences between W- and P-mussels in the same tissue ($P < 0.05$). “**” means extremely significant differences ($P < 0.01$).

2.4 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 6A), 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 6B)。

图 6 三角帆蚌外套膜中 *HcLPCAT1* 基因的 ISH

A: 反义探针; B: 同义探针; DM: 背膜区;

IF: 内褶; MF: 中褶; OF: 外褶; VM: 腹膜区。

Fig. 6 ISH analysis of *HcLPCAT1* in the mantle of *Hyriopsis cumingii*

A: antisense probe; B: sense probe; DM: dorsal mantle;

IF: inner fold; MF: middle fold; OF: outer fold;

VM: ventral mantle.

2.5 补充投喂 β-胡萝卜素对 *HcLPCAT1* 基因表达和组织 TCC 的影响

图 7 与表 3 显示, 对紫色蚌进行 β-胡萝卜素的饵料补充投喂, 补充投喂组 *HcLPCAT1* 基因的

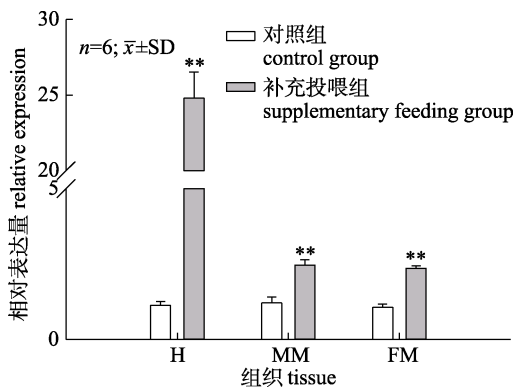


图 7 紫色三角帆蚌补充投喂 β -胡萝卜素后 *HcLPCAT1* 基因在各组织中的表达变化
H: 肝胰腺; MM: 中央膜; FM: 边缘膜;
“**”表示差异极显著($P<0.01$).

Fig. 7 Tissue expression profile of the *HcLPCAT1* in P-mussels between β -carotene supplement group and the control group of *Hyriopsis cumingii*
H: hepatopancreas; MM: middle mantle;
FM: fringe mantle. “**” indicates $P<0.01$.

表 3 补充投喂 β -胡萝卜素后三角帆蚌
各组织 TCC 的变化

Tab. 3 Changes of TCC in different tissues after β -carotene supplement of *Hyriopsis cumingii*

<i>n</i> =6; $\bar{x} \pm SD$				
组别 group	肝胰腺 hepatopancreas	中央膜 middle mantle	边缘膜 fringe mantle	
实验组 trial	122.03 $\pm$ 2.16 ^a	15.01 $\pm$ 0.41 ^a	12.89 $\pm$ 0.09 ^a	
对照组 control	40.40 $\pm$ 0.26 ^b	6.69 $\pm$ 0.53 ^b	6.13 $\pm$ 0.16 ^b	

注: 同一组织中不同小写字母表示差异极显著($P<0.01$).

Note: Different lowercase letters indicate extremely significant differences in the same tissue ($P<0.01$).

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($P<0.01$).

2.6 *HcLPCAT1* 基因 SNP 与内壳色性状的关联分析

SNP 与内壳色性状关联分析发现(表 4), *HcLPCAT1* 基因 G123A、A126G、T585A 位点的

表 4 三角帆蚌 *HcLPCAT1* 基因 8 个 SNP 位点各基因型与内壳色性状关联分析

Tab. 4 Association of 8 SNP sites of *HcLPCAT1* gene polymorphisms with nacre color of *Hyriopsis cumingii*

n=6; $\bar{x} \pm SD$

位点 locus	基因型 genotype	样本量 number of samples	<i>L</i> *平均值 mean <i>L</i> *	<i>a</i> *平均值 mean <i>a</i> *	<i>b</i> *平均值 mean <i>b</i> *	<i>dE</i> *平均值 mean <i>dE</i> *
G123A	GG	104	55.98 $\pm$ 13.00 ^a	2.95 $\pm$ 4.24 ^a	-1.49 $\pm$ 10.70 ^a	45.51 $\pm$ 13.39 ^a
	GA	36	49.34 $\pm$ 14.83 ^b	4.44 $\pm$ 4.89 ^b	4.95 $\pm$ 11.19 ^b	52.60 $\pm$ 15.63 ^b
A126G	AA	66	53.89 $\pm$ 13.97 ^a	3.45 $\pm$ 4.31 ^{ab}	1.15 $\pm$ 11.14 ^a	47.59 $\pm$ 14.81 ^b
	AG	51	56.78 $\pm$ 12.93 ^a	2.82 $\pm$ 4.30 ^b	-2.65 $\pm$ 10.71 ^b	44.80 $\pm$ 13.14 ^b
C156G	GG	23	49.81 $\pm$ 14.00 ^b	4.14 $\pm$ 5.10 ^a	3.59 $\pm$ 11.02 ^a	52.24 $\pm$ 14.27 ^a
	CC	136	54.26 $\pm$ 13.89 ^a	3.40 $\pm$ 4.48 ^a	0.31 $\pm$ 11.20 ^a	47.38 $\pm$ 14.45 ^a
T306C	CG	4	54.88 $\pm$ 9.69 ^a	1.10 $\pm$ 2.82 ^a	-4.78 $\pm$ 9.33 ^a	45.96 $\pm$ 9.39 ^a
	TT	116	55.90 $\pm$ 13.42 ^a	3.00 $\pm$ 4.24 ^a	-1.65 $\pm$ 10.84 ^b	45.55 $\pm$ 13.93 ^b
T585A	TC	21	46.53 $\pm$ 13.28 ^b	5.04 $\pm$ 5.25 ^a	9.08 $\pm$ 8.42 ^a	55.91 $\pm$ 13.48 ^a
	CC	3	45.62 $\pm$ 10.04 ^b	4.46 $\pm$ 4.44 ^a	8.11 $\pm$ 7.65 ^a	56.52 $\pm$ 10.66 ^a
A954C	TT	112	56.21 $\pm$ 13.33 ^a	2.97 $\pm$ 4.18 ^b	-1.78 $\pm$ 10.87 ^b	45.22 $\pm$ 13.85 ^b
	TA	15	46.44 $\pm$ 12.48 ^b	4.63 $\pm$ 5.61 ^a	6.79 $\pm$ 9.43 ^a	55.98 $\pm$ 12.49 ^a
C1032T	AA	13	46.69 $\pm$ 13.50 ^b	5.01 $\pm$ 4.79 ^a	9.29 $\pm$ 7.85 ^a	55.58 $\pm$ 13.91 ^a
	AA	131	53.95 $\pm$ 13.85 ^a	3.49 $\pm$ 4.53 ^a	0.59 $\pm$ 11.18 ^a	47.71 $\pm$ 14.40 ^a
C1140T	AC	4	62.47 $\pm$ 10.13 ^a	1.92 $\pm$ 2.40 ^{ab}	-10.46 $\pm$ 6.93 ^b	38.71 $\pm$ 10.64 ^a
	CC	5	56.19 $\pm$ 12.84 ^a	0.25 $\pm$ 1.52 ^b	-2.41 $\pm$ 9.64 ^a	44.45 $\pm$ 12.89 ^a
C1140T	CC	136	54.10 $\pm$ 13.90 ^a	3.35 $\pm$ 4.51 ^a	0.51 $\pm$ 11.10 ^a	47.51 $\pm$ 14.46 ^a
	CT	2	59.55 $\pm$ 9.08 ^a	3.24 $\pm$ 0.98 ^a	-14.43 $\pm$ 3.61 ^b	42.62 $\pm$ 7.91 ^a
C1140T	TT	2	61.00 $\pm$ 4.93 ^a	1.97 $\pm$ 1.62 ^a	-8.30 $\pm$ 8.98 ^{ab}	40.09 $\pm$ 3.56 ^a
	CC	121	54.65 $\pm$ 13.74 ^a	3.22 $\pm$ 4.42 ^a	0.00 $\pm$ 11.23 ^a	46.95 $\pm$ 14.24 ^a
C1140T	CT	8	52.48 $\pm$ 13.70 ^a	3.30 $\pm$ 4.27 ^a	-1.12 $\pm$ 11.53 ^a	49.45 $\pm$ 13.61 ^a
	TT	11	50.60 $\pm$ 14.54 ^a	4.49 $\pm$ 4.83 ^a	3.22 $\pm$ 9.78 ^a	50.91 $\pm$ 15.79 ^a

注: 同一位点同列中不同小写字母表示差异显著($P<0.05$).

Notes: Different superscript letters in the same column of the same locus indicate significant differences ($P<0.05$).

基因型与 L^* 、 a^* 、 b^* 及 dE^* 值都存在显著差异 ($P<0.05$); T306C 位点的基因型与 L^* 、 b^* 和 dE^* 值存在显著差异($P<0.05$); A954C 位点的基因型与 a^* 、 b^* 值差异显著($P<0.05$); C1032T 位点基因型仅与 b^* 值差异显著($P<0.05$); C156G 和 C1140T 位点的基因型与 L^* 、 a^* 、 b^* 和 dE^* 值差异都不显著。利用 SHEsis 软件分析各位点基因型(G)与等位基因型(A)频率,发现 T306C 位点的 TC 和 C, T585A 的 TA、AA 和 A 与紫色三角帆蚌壳色存在显著相关($P<0.05$)(表 5 中下划线标出); A954C 位点的 C 和 AC 与白色三角帆蚌壳色显著相关($P<0.05$)(表 5 中波浪线标出)。A126G 位点的基因型 GG 和 C1032T 的等位基因型 T 分别与三角帆蚌内壳紫色和白色显著相关($P<0.05$)。

2.7 *HcLPCAT1* 基因上 SNP 位点连锁不平衡分析及单倍型构建

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($D>0.75$, $r^2>0.33$) (表 6)。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(表 7)。

表 5 *HcLPCAT1* 基因在白色系和紫色系三角帆蚌中的 SNPs 基因型分析
Tab. 5 SNPs analysis of *HcLPCAT1* gene in white and purple *Hyriopsis cumingii*

位点 locus	基因型 genotype	基因型(频率) genotype (frequency)			等位基因型 allele	等位基因型频率 allele frequency		
		紫色蚌 P-mussel	白色蚌 W-mussel	$\chi^2(P)$		紫色蚌 P-mussel	白色蚌 W-mussel	$\chi^2(P)$
G123A	GG	47(0.671)	57(0.814)	3.739 (0.053)	G	117(0.836)	127(0.907)	3.188 (0.074)
	GA	23(0.329)	13(0.186)		A	13(0.093)	23(0.164)	
A126G	AA	31(0.443)	35(0.500)	6.464 (0.040*)	A	84(0.600)	99(0.707)	3.549 (0.060)
	AG	22(0.314)	29(0.414)		G	56(0.400)	41(0.293)	
	<u>GG</u>	17(0.243)	6(0.086)					
C156G	CC	69(0.986)	67(0.957)	1.029 (0.310)	C	139(0.993)	137(0.979)	1.014 (0.314)
	CG	1(0.014)	3(0.043)		G	1(0.007)	3(0.021)	
T306C	TT	47(0.671)	69(0.986)	24.363 (0.000**)	T	114(0.814)	139(0.993)	25.618 (0.000**)
	<u>TC</u>	20(0.286)	1(0.014)		<u>C</u>	26(0.186)	1(0.007)	
	CC	3(0.043)	0(0.000)					
T585A	TT	43(0.614)	69(0.986)	30.343 (0.000**)	T	101(0.721)	138(0.986)	39.118 (0.000**)
	<u>TA</u>	15(0.214)	0(0.000)		<u>A</u>	39(0.279)	2(0.014)	
	<u>AA</u>	12(0.171)	1(0.014)					
A954C	AA	69(0.986)	62(0.886)	6.174 (0.046*)	A	138(0.986)	128(0.914)	7.518 (0.006**)
	<u>AC</u>	4(0.057)	0(0.000)		<u>C</u>	2(0.014)	12(0.086)	
	CC	1(0.014)	4(0.057)					
C1032T	CC	70(1.000)	66(0.943)	4.118 (0.128)	C	140(1.000)	134(0.957)	6.131 (0.013*)
	CT	0(0.000)	2(0.029)		<u>T</u>	0(0.000)	6(0.043)	
	TT	0(0.000)	2(0.029)					
C1140T	CC	58(0.829)	63(0.900)	1.525 (0.467)	C	121(0.864)	129(0.921)	2.389 (0.122)
	CT	5(0.071)	3(0.043)		T	19(0.136)	11(0.079)	
	TT	7(0.100)	4(0.057)					

注: “*”表示差异显著($P<0.05$); “**”表示差异极显著($P<0.01$).
Note: “*” indicates significant differences ($P<0.05$); “**” indicates extremely significant differences ($P<0.01$).

表 6 三角帆蚌 *HcLPCAT1* 基因 SNPs 连锁不平衡分析
Tab. 6 Linkage disequilibrium analysis of SNPs in the *HcLPCAT1* gene of *Hyriopsis cumingii*

	G123A	A126G	C156G	T306C	T585A	A954C	C1032T	C1140T
G123A	—	0.892	0.043	0.367	0.077	1.000	1.000	0.998
A126G	0.062	—	0.914	0.640	0.386	0.999	0.349	0.878
C156G	0.000		—	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
T306C	0.002	0.082	0.002	—	0.955	1.000	1.000	1.000
T585A	0.005	0.048	0.002	0.568	—	1.000	1.000	1.000
A954C	0.008	0.028	0.001	0.006	0.009	—	1.000	1.000
C1032T	0.003	0.001	0.000	0.002	0.004	0.001	—	1.000
C1140T	0.018	0.049	0.002	0.013	0.021	0.006	0.003	—

注: 对角线上方值为 D , 对角线下方值为 r^2 .
Note: The figures above the diagonal represent D , and the figures below the diagonal represent r^2 .

表 7 *HcLPCAT1* 基因单倍型在不同壳色三角帆蚌的出现频率
Tab. 7 Frequency of *HcLPCAT1* haplotypes in *Hyriopsis cumingii* with different shell colors

单倍型 haplotype	单倍型序列 sequence	紫色蚌(频率) P-mussel (frequency)	白色蚌(频率) W-mussel (frequency)	χ^2 (P)
H1	CCAACC	24.91(0.178)	1.00(0.007)	24.189(0.000**)
H2	CTAACC	14.09(0.101)	1.00(0.007)	11.919(0.000**)
H3	CTTACC	77.91(0.557)	106.00(0.757)	13.528(0.000**)
H4	CTTACT	19.00(0.136)	11.00(0.079)	2.335(0.127)
H5	CTTATC	0.00(0.000)	6.00(0.043)	6.175(0.013*)
H6	CTTCCC	2.00(0.014)	12.00(0.086)	7.596(0.006**)

注: “*”表示差异显著($P<0.05$); “**”表示差异极显著($P<0.01$).
Note: “*” indicates significant differences ($P<0.05$); “**” indicates extremely significant differences ($P<0.01$).

3 讨论

本研究克隆了三角帆蚌 *HcLPCAT1* 基因 cDNA 全长, 分析发现 *HcLPCAT1* 基因包含 LPLAT 家族典型的功能域, 属于 LPLAT 超家族成员, LPLAT 超家族成员是甘油磷脂生物从头合成和重构途径的酰基转移酶^[10], 在脂质形成中具有重要作用。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^[13,19]。*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^[15], 推测 *LPCAT1* 在三角帆蚌中具有相似功能。

对三角帆蚌不同组织进行检测发现 *HcLPCAT1* 基因在紫色蚌肝胰腺、边缘膜中的相对表达量显著高于白色蚌($P<0.05$)。肝胰腺是三角帆蚌类胡萝卜素沉积转化的重要器官^[8], 边缘膜则参与贝壳

和珍珠的形成及呈色^[20-21]。*HcLPCAT1* 基因在紫色蚌的肝胰腺高表达说明其可能与类胡萝卜素的积累相关, 在边缘膜中的高表达说明 *HcLPCAT1* 基因可能与三角帆蚌贝壳和壳色形成密切相关。孙明龙等^[9]、李西雷等^[17]在紫色三角帆蚌肝胰腺、外套膜中测得的 TCC 均高于白色三角帆蚌, 也印证了 *HcLPCAT1* 基因表达量与 TCC 存在相关性。类胡萝卜素影响水产动物的体色, 如对红白锦鲤 (*Cyprinus carpio* L.) 补充投喂 β -胡萝卜素后, β -胡萝卜素主要转化成虾青素沉积在红白锦鲤的红色区域^[22]; 对雌雄锦龟(*Chrysemys picta*)进行类胡萝卜素剥夺后, β -胡萝卜素含量显著减少, 与类胡萝卜素补充投喂组相比, 类胡萝卜素剥夺组黄色色度降低, 增加了黄色和红色条纹或斑点的亮度^[23]; 三角帆蚌进行 β -胡萝卜素补充投喂后, 紫色三角帆蚌肝胰腺和外套膜中 TCC 显著上升, 内壳色也得到了提升, 类胡萝卜素的富集影响了三

角帆蚌的壳色^[9]。本研究对紫色三角帆蚌进行 β -胡萝卜素补充投喂实验, 投喂完成后肝胰腺、中央膜、边缘膜中 *HcLPCAT1* 基因表达量极显著上升($P<0.01$), 同时这 3 个组织中的 TCC 也极显著上升($P<0.01$), 表明 *HcLPCAT1* 基因的表达量与 TCC 呈正相关, 且可能通过类胡萝卜素积累影响三角帆蚌内壳色。三角帆蚌边缘膜的中褶负责角质层的形成, 外褶负责引导棱柱层的结构^[21], 腹膜区分泌形成棱柱层基质, 背膜区细胞则主要分泌有机基质形成珍珠层^[20]。研究发现, *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颜色^[24], 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。

分子标记辅助育种是一种便捷、高效的育种技术, 能够精确、快速地改良目标性状进而选育出优良品种^[25], 广泛应用于水产动物经济性状的选育^[26]。吉富尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[27]、葡萄牙牡蛎(*Crassostrea angulata*)^[28]、中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)^[29]等物种通过 SNP 标记选择进行性状改良。三角帆蚌现已筛选出内壳色性状的标记基因酪氨酸酶(Typ)^[30]及酪氨酸酶相似蛋白(Typ-1)^[31]。这两个基因均存在内壳色性状关联位点, 且通过连锁不平衡分析构建出白色、紫色群体的优势单倍型作为三角帆蚌壳色选育的分子标记。本研究共发现 *HcLPCAT1* 基因上 8 个 SNP 位点, 其中 5 个 SNP 位点基因型与三角帆蚌内壳色的形成存在显著相关, *HcLPCAT1* 基因的 8 个位点中有 3 个位点 G 和 A 与紫色系三角帆蚌显著相关, 有 2 个位点的 G 和 A 与白色系三角帆蚌显著相关。为了突破单个位点分析的缺陷^[32], 本研究采用位点间的连锁不平衡分析进一步判断 *HcLPCAT1* 基因与壳色性状的关联性, 选择了高度连锁的位点进行单倍型构建, 发现 H1、H2 这 2 种单倍型几乎只在紫色系三角帆蚌中出现, 为紫色三角帆蚌优势单倍型; H5 仅在白色系三角帆蚌中出现, H3、H6 在白色系出现频率显著高于紫色系中出现频率($P<0.05$), 可作为白色三角帆蚌优

势单倍型。*HcLPCAT1* 基因在白蚌、紫蚌的边缘膜中表达差异显著($P<0.05$), 且表达定位在背膜区, 与珍珠层形成相关, 紫色蚌补充投喂 β -胡萝卜素后外套膜中 *HcLPCAT1* 基因的表达量与 TCC 显著上升; 筛选出了 *HcLPCAT1* 基因与壳色相关的 SNP 位点和优势单倍型。推测 *HcLPCAT1* 基因通过参与三角帆蚌类胡萝卜素代谢影响三角帆蚌内壳色的形成, 可作为三角帆蚌壳色性状改良的候选分子标记。

参考文献:

- [1] Wang G L, Bai Z Y, Liu X J, et al. Research progress on germplasm resources of *Hyriopsis cumingii*[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(9): 1618-1627. [汪桂玲, 白志毅, 刘晓军, 等. 三角帆蚌种质资源研究进展[J]. 水产学报, 2014, 38(9): 1618-1627.]
- [2] Wang Z M, Adzibli L, Zheng Z, et al. How cultured pearls acquire their colour[J]. Aquaculture Research, 2020, 51(10): 3925-3934.
- [3] Wen H B, Gu R B, Hua D, et al. Research progress on genetics and breeding of *Hyriopsis cumingii*[J]. Journal of Yangtze University (Natural Science Edition), 2011, 8(1): 233-236, 239. [闻海波, 顾若波, 华丹, 等. 三角帆蚌遗传育种研究进展[J]. 长江大学学报(自然科学版), 2011, 8(1): 233-236, 239.]
- [4] Li J L, Liu Y. The main influencing factors on the quality of cultured pearls[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(11): 1753-1760. [李家乐, 刘越. 影响养殖珍珠质量的主要因子[J]. 水产学报, 2011, 35(11): 1753-1760.]
- [5] Shen J X, Huang D D, Sun C H, et al. Cloning of a microphthalmia-associated transcription factor gene and its functional analysis in nacre formation and melanin synthesis in *Hyriopsis cumingii*[J]. Aquaculture and Fisheries, 2018, 3(6): 217-224.
- [6] Shi L, Liu X, Mao J, et al. Study of coloration mechanism of cultured freshwater pearls from mollusk *Hyriopsis cumingii*[J]. Journal of Applied Spectroscopy, 2014, 81(1): 97-101.
- [7] Li Z Q, Wang K Y, Du Z J. Carotenoids for improving body color of aquatic products[J]. Scientific Fish Farming, 2001(5): 41-42. [李志琼, 汪开毓, 杜宗君. 改善水产品体色的类胡萝卜素[J]. 科学养鱼, 2001(5): 41-42.]
- [8] Wen H B, Nie Z J, Cao Z M, et al. Carotenoid levels in soft tissues of triangle pearl mussel *Hyriopsis cumingii* with different color nacreous layer[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2012, 27(3): 265-268. [闻海波, 聂志娟, 曹哲明, 等. 不同颜色珍珠层的三角帆蚌组织中类胡萝卜素含量的分析[J]. 大连海洋大学学报, 2012, 27(3): 265-268.]

- [9] Sun M L, Bai Z Y, Fu B C, et al. Effects of β -carotene supplement in bait on inner shell color, tissue total carotenoids content and growth of different color strains in *Hyriopsis cumingii*[J]. South China Fisheries Science, 2020, 16(5): 80-86. [孙明龙, 白志毅, 傅百成, 等. 补充投喂 β -胡萝卜素对不同色系三角帆蚌内壳色、组织总类胡萝卜素含量及生长的影响[J]. 南方水产科学, 2020, 16(5): 80-86.]
- [10] Lands W E M. Metabolism of glycerolipids: A comparison of lecithin and triglyceride synthesis[J]. Journal of Biological Chemistry, 1958, 231(2): 883-888.
- [11] Zheng Q. Gene isolation and enzymatic study of lysophosphatidylcholine acyltransferase in *Brassica napus*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2011. [郑倩. 油菜溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶基因分离及酶活性分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.]
- [12] Soupene E, Rothschild J, Kuypers F A, et al. Eukaryotic protein recruitment into the *Chlamydia* inclusion: Implications for survival and growth[J]. PLoS ONE, 2012, 7(5): e36843.
- [13] Moessinger C, Kuerschner L, Spandl J, et al. Human lysophosphatidylcholine acyltransferases 1 and 2 are located in lipid droplets where they catalyze the formation of phosphatidylcholine[J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(24): 21330-21339.
- [14] Penno A, Hackenbroich G, Thiele C. Phospholipids and lipid droplets[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2013, 1831(3): 589-594.
- [15] Wang S, Lv J, Zhang L L, et al. MethylRAD: a simple and scalable method for genome-wide DNA methylation profiling using methylation-dependent restriction enzymes[J]. Open Biology, 2015, 5(11): 150130.
- [16] Bai Z Y, Zheng H F, Lin J Y, et al. Comparative analysis of the transcriptome in tissues secreting purple and white nacre in the pearl mussel *Hyriopsis cumingii*[J]. PLoS ONE, 2013, 8(1): e53617.
- [17] Li X L, Li Q Q, Zhu T Y, et al. Effect of dietary carotenoid on total carotenoids content and shell color in *Hyriopsis cumingii*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2018, 27(4): 477-486. [李西雷, 李卿青, 朱庭耀, 等. 添加类胡萝卜素对三角帆蚌总类胡萝卜素含量及贝壳珍珠质颜色的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2018, 27(4): 477-486.]
- [18] Bai Z Y, Han X K, Luo M, et al. Constructing a microsatellite-based linkage map and identifying QTL for pearl quality traits in triangle pearl mussel (*Hyriopsis cumingii*)[J]. Aquaculture, 2015, 437: 102-110.
- [19] McKean M L, Smith J B, Silver M J. Phospholipid biosynthesis in human platelets. Formation of phosphatidylcholine from 1-acyl lysophosphatidylcholine by acyl-CoA: 1-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine acyltransferase[J]. Journal of Biological Chemistry, 1982, 257(19): 11278-11283.
- [20] Li X L, Li Q Q, Ren M D, et al. Cloning and tissue expression of a novel *hcSRCR1* gene in differential inner-shell color pearl mussel *Hyriopsis cumingii*[J]. Journal of Fisheries of China, 2018, 42(11): 1719-1728. [李西雷, 李卿青, 任名栋, 等. 三角帆蚌 *hcSRCR1* 基因的克隆及在不同壳色选育系中的表达模式[J]. 水产学报, 2018, 42(11): 1719-1728.]
- [21] Li X L, Bai Z Y, Luo H R, et al. Cloning, differential tissue expression of a novel *hcApo* gene, and its correlation with total carotenoid content in purple and white inner-shell color pearl mussel *Hyriopsis cumingii*[J]. Gene, 2014, 538(2): 258-265.
- [22] Bai D Q, Yan S S, Wu X, et al. Primary study of β -carotene on growth, colouring and deposition of red-white koi carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. Journal of Tianjin Agricultural University, 2010, 17(1): 1-5. [白东清, 闫珊珊, 吴旋, 等. β -胡萝卜素对红白锦鲤生长、体色及代谢的初步研究[J]. 天津农学院学报, 2010, 17(1): 1-5.]
- [23] Steffen J E, Quigley R, Whibley I, et al. Carotenoid deprivation and beta-carotene's effects on male and female turtle color[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2021, 253: 110546.
- [24] Chen X J, Zhang M Y, Zhang J P, et al. miR-4504 is involved in nacre color formation in *Hyriopsis cumingii*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2019, 517(2): 210-215.
- [25] Shao Z, Wang Y L, Liu L, et al. Analysis of the development trend of molecular marker assisted breeding from the perspective of papers and patents[J]. China Seed Industry, 2021(2): 14-20. [邵卓, 王娅丽, 刘璐, 等. 论文与专利双维度视角下分子标记辅助育种发展态势分析[J]. 中国种业, 2021(2): 14-20.]
- [26] Dou Y Q, Liang X F, Gao J J, et al. Single nucleotide polymorphisms in pepsinogen gene, growth hormone gene and their association with food habit domestication traits in *Siniperca chuatsi*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2020, 27(5): 485-493. [窦亚琪, 梁旭方, 高俊杰, 等. 鳊 *pep* 和 *gh* 基因 SNP 标记与驯食性状的关联分析[J]. 中国水产科学, 2020, 27(5): 485-493.]
- [27] Chen K P, Lu M X, Liu Z G, et al. Molecular cloning analysis of the 5' regulatory region of *Ikaros* gene from *Oreochromis niloticus* and screening of its SNP markers for *Streptococcus agalactiae* resistance[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2018, 25(2): 237-250. [陈昆平, 卢迈新, 刘志刚, 等. 吉富尼罗罗非鱼 *Ikaros* 基因 5'调控区的克隆、序列分析及抗无乳链球菌相关 SNP 位点筛选[J]. 中国水产科学, 2018, 25(2): 237-250.]
- [28] Vu S V, Gondro C, Nguyen N T H, et al. Prediction accuracies of genomic selection for nine commercially important

- traits in the Portuguese oyster (*Crassostrea angulata*) using DArT-seq technology[J]. *Genes*, 2021, 12(2): 210.
- [29] Zeng D, Li X, Wang X Q, et al. Development of SNP markers associated with growth-related genes of *Pelodiscus sinensis*[J]. *Conservation Genetics Resources*, 2020, 12(1): 87-92.
- [30] Han X K, Chen X J, Bai Z Y, et al. Detection of shell nacre colour-related SNP and gene mapping of HcTyr gene in *Hyriopsis cumingii*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(7): 1044-1053. [韩学凯, 陈夏君, 白志毅, 等. 三角帆蚌 *HcTyr* 基因内壳色性状相关 SNP 筛选及图谱定位[J]. 水产学报, 2017, 41(7): 1044-1053.]
- [31] Chen X J, Han X K, Bai Z Y, et al. Detection of nacre colour-related SNPs and genetic mapping of HcTyp-1 gene in *Hyriopsis cumingii*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(2): 467-473. [陈夏君, 韩学凯, 白志毅, 等. 三角帆蚌 *HcTyp-1* 基因珍珠层颜色性状相关 SNP 筛选及图谱定位[J]. 水产学报, 2019, 43(2): 467-473.]
- [32] Vignal A, Milan D, SanCristobal M, et al. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics[J]. *Genetics Selection Evolution*, 2002, 34(3): 275.

Functional analysis and SNP screening of lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 *HcLPCAT1* gene and its association analysis with shell color traits in *Hyriopsis cumingii*

ZHANG Jinpan^{1,3}, BAI Zhiyi^{1,2,3}, ZHANG Mengying^{1,3}, YAN Ling^{1,3}, LU Fenghui^{1,3}, WANG He^{1,3}

1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1) is an important lipid metabolic enzyme. In order to clarify the function of *HcLPCAT1* gene in carotenoid metabolism and the correlation of *HcLPCAT1* gene with the shell nacre color in *Hyriopsis cumingii*. The cDNA full-length sequence of *HcLPCAT1* gene in *H. cumingii* was cloned by RACE. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and in situ hybridization (ISH) were used to analyze the expression pattern of *HcLPCAT1* in different tissues. The effect of *HcLPCAT1* on carotenoid metabolism was determined by supplementary feeding experiment. The direct sequencing method was used to screen the SNP sites related to inner shell color in the *HcLPCAT1* gene. The results showed that the full-length cDNA of *HcLPCAT1* was 1675 bp with a 1296 bp-long open reading frame (ORF) encoding 431 amino acids. *HcLPCAT1* was expressed in the white and purple mussel tissues, with the expression levels being higher in the purple mussel than in the white mussel, and there was significant difference ($P < 0.05$) between hepatopancreas and fringe mantle. The situ hybridization analysis showed that the positive signal of *HcLPCAT1* located at the outer fold of mantle, dorsal mantle, ventral mantle, the joint of outer fold and middle fold of mantle and part of middle fold. After supplementation with β -carotene to purple mussel, the expression of *HcLPCAT1* gene in hepatopancreas, middle mantle and fringe mantle increased significantly ($P < 0.01$), and total carotenoids content (TCC) in these tissues also increased significantly ($P < 0.01$). The genotypes of five SNP sites on the *HcLPCAT1* gene were identified to be significantly correlated with the inner shell color parameters of *H. cumingii*. Haplotype analysis revealed that the H1 and H3 were the dominant haplotypes in the purple mussel, and the H3, H5 and H6 were the dominant haplotypes in the white mussel. The *HcLPCAT1* gene identified in this study provides a molecular basis for analyzing the carotenoid metabolism and shell color formation of *H. cumingii*. The selected SNPs and haplotypes of *HcLPCAT1* gene related to inner shell color can be used in molecular assisted breeding.

Key words: *Hyriopsis cumingii*; *LPCAT1* gene; carotenoid; SNP marker; inner shell color

Corresponding author: BAI Zhiyi. E-mail: zybai@shou.edu.cn