

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15159

中华绒螯蟹脂肪酸延长酶(*ELOVL*)基因全长 cDNA 的克隆及其表达分析

杨志刚, 施秋燕, 成永旭, 姚琴琴, 阙有清, 杨青, 徐蕾, 柳梅梅, 徐泽文

上海海洋大学 农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306

摘要: 根据脂肪酸延长酶保守区序列设计引物, 采用 RT-PCR 和 RACE 技术首次克隆得到中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)脂肪酸延长酶(*ELOVL*)基因全长(GenBank 登录号: KR005628)。分析 *ELOVL* 序列表明, 该基因 cDNA 全长 2089 bp, 开放阅读框(ORF)长 1065 bp(包含终止密码子), 编码的 354 个氨基酸具有典型的延长酶特征: 1 个高度保守的氧化还原中心组氨酸簇 HVIHH, 多个保守区和多个跨膜区(KFTEFLDT、NTFVHIVMYVYY、TNFQMI)。经氨基酸同源性和系统发育树分析, 中华绒螯蟹 *ELOVL* 预测氨基酸序列与顶切叶蚁(*Acromyrmex echinator*)*ELOVL* 氨基酸序列相似性最高, 为 59%; 同时与家蝇(*Musca domestica*)聚为一支, 进而与日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)等聚为一大支。通过实时荧光定量 PCR 技术研究 *ELOVL* mRNA 在中华绒螯蟹不同组织中的表达量, 及投喂不同配合饲料后在可食部位组织中的表达情况。结果显示, *ELOVL* 在各组织中均有表达, 在肝胰腺和肠道中表达量最高, 心脏中最低, 其他组织中少量表达。养殖 98 d 后分析表明, 卵巢和肝胰腺组织中 *ELOVL* mRNA 在 SO 饲料组中表达量最高, 并且表达水平随着饲料中鱼油(富含 n-3 PUFA)比例减少、豆油(缺少 n-3 PUFA)比例增加而显著升高($P < 0.05$); 精巢组织中 *ELOVL* mRNA 表达量在 SO 饲料组中最高; 肌肉组织中 *ELOVL* mRNA 表达水平较低, 且各饲料组间表达量差异不显著($P > 0.05$)。以上结果表明, 中华绒螯蟹存在 *ELOVL* 基因, 并且 *ELOVL* 的表达受饲料脂肪水平的影响, 这为探究中华绒螯蟹自身合成 HUFA 途径及调节机制奠定了基础。

关键词: 中华绒螯蟹; 脂肪酸延长酶; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)01-0053-11

高度不饱和脂肪酸(highly unsaturated fatty acid, HUFA)是指含 3 个或 3 个以上不饱和度, 且长度超过 20 个碳原子的脂肪酸。HUFA 不仅是人体一类重要的营养成分^[1-3], 在水产动物生长发育过程中同样发挥着重要的生理功能, 其中二十碳四烯酸(又称花生四烯酸, arachidonic acid, ARA)、二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)和二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)不仅是水产动物脑神经发育、视网膜形成过程中的必需物质, 而且可以通过控制与免疫相关的酶活性而增强水生动物机体的免疫能力^[4]。

HUFA 的合成是由低不饱和脂肪酸底物, 通过一系列的延长酶及去饱和酶催化反应来完成的, 其中发挥重要作用的是脂肪酸延长酶(elongases of very long chain fatty acids, *ELOVL*)和脂肪酸去饱和酶(fatty acyl desaturase, FAD)。HUFA 中 DHA 的合成是依次通过 $\Delta 6$ FAD、延长酶和 $\Delta 5$ FAD 将 LA 或 ALA 底物生成 ARA 或 EPA, 然后再通过延长酶和 FAD 的作用延长去饱和而成。*ELOVL* 是 HUFA 合成过程中的关键酶之一^[5-6], 是内质网膜结合蛋白, 主要参与以丙二酰辅酶 A 为二碳单位供体, NADPH 为还原剂, 在内质网中将酰基-CoA 中脂肪

收稿日期: 2015-04-15; 修订日期: 2015-07-16。

基金项目: 国家 863 高技术研究发展计划项目(2012AA10A409-5); 国家自然科学基金项目(31472287); 上海教委知识服务平台项目(ZF1206); 上海市科技兴农重点攻关项目(沪农科 2013 第 5-7 号)。

作者简介: 杨志刚, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中华绒螯蟹脂类营养学研究。E-mail: zgyang@shou.edu.cn

酸延长生成 HUFA 的第一步生化反应。ELOVL 属于一个基因家族,对脂肪酸底物有特异性,对不同底物具有不同的时间空间表达模型^[7]。过去几年研究中,已经在线虫、真菌、软体动物、哺乳动物和多种鱼类中研究了 ELOVL 相关功能,根据结果大致分为两类,其中一类主要对与脂肪酸合成($C_{12}\sim C_{16}$)或鞘脂合成($C_{22}\sim C_{26}$)相关的饱和(或单一不饱和)脂肪酸底物作用,另一类则主要对 $C_{18}\sim C_{22}$ 的长链多不饱和脂肪酸(LC-PUFA)产生活性作用^[8]。

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)是中国重要的经济淡水养殖蟹类,属甲壳纲(Crustacea),十足目(Decapoda),在我国水产养殖业中占据重要位置。脂类对中华绒螯蟹的生长和性腺的发育具有十分重要的作用^[9],可以作为代谢能源和必要组织及细胞膜的成分。同时 DHA、EPA 等 n-3 HUFA 是蟹类生长发育所需的重要脂肪酸,对生长、生殖、代谢、免疫等起到重要调控作用^[10]。因此,通常在饲料中添加富含 n-3 HUFA 的鱼油来满足中华绒螯蟹对 HUFA 的需求。然而随着水产养殖业的不断发展,鱼油(fish oil, FO)资源日渐枯竭,为维持可持续发展,常常用缺乏 n-3 HUFA 而富含 C_{18} 多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFA)的植物油(vegetable oil, VO)来替代鱼油。阙有清等^[11]研究显示,以适宜的豆油(soybean oil, SO)替代鱼油可显著增加中华绒螯蟹组织中脂肪酸含量,而过低的替代比例则会降低组织中脂肪酸含量。因此,了解 ELOVL 在 HUFA 中的合成调节机制对优化配合饲料十分重要。

随着中华绒螯蟹脂肪酸营养研究的不断深入,脂肪酸合成相关酶的研究^[12-13]也越来越受到重视,但是对 ELOVL 的研究尚未见报道。因此本研究克隆了中华绒螯蟹 ELOVL 基因,研究不同油脂配比对该基因表达的影响,为揭示中华绒螯蟹 HUFA 生物合成途径及其调控机制提供分子水平上的依据,为进一步改良饲料脂类成分以调控 HUFA 的合成,提高中华绒螯蟹配合饲料中植物油替代鱼油的比例,提高中华绒螯蟹品质和经济效益奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与采样

实验所用中华绒螯蟹均采自上海海洋大学崇明基地。取未成熟扣蟹,雌雄各 4 只,体重(10 ± 1) g,解剖扣蟹,分别取肝胰腺、鳃、胃、肠、眼柄、心脏、肌肉、胸神经节、脑神经节共 9 种组织,用液氮速冻,存于 -80°C 冰箱用于提取 RNA。

制备 3 种添加不同比例油脂的配合饲料,分别添加 FO、FO 与 SO 1:1 混合以及 SO,其他营养成分均能满足中华绒螯蟹的营养需求,具体配方参照 Yang 等^[12]的实验。养殖试验在上海海洋大学崇明基地进行,共分 3 组,每组 4 个平行(养殖池大小为 $5\text{ m}\times 6\text{ m}$),每个平行随机放入 20 只中华绒螯蟹[(50 ± 3) g,雌雄各半,性腺未成熟]。3 个实验组分别用上述 3 种不同油脂比例的配合饲料投喂,饲养 98 d。试验结束后每个平行随机采取 4 对正常成熟的雌雄中华绒螯蟹,取肝胰腺、肌肉、卵巢及精巢组织,液氮速冻后置于 -80°C 冰箱保存待用。

1.2 方法

1.2.1 样品总 RNA 的提取与反转录 取中华绒螯蟹各个组织样品,参照 RNA 提取试剂盒 RNAisoTM Plus (TaKaRa)操作说明书提取总 RNA,经 Q5000 紫外分光光度计和 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 浓度及完整度。根据反转录试剂盒 PrimscriptTM Reverse transcriptase (TaKaRa)说明书,取中华绒螯蟹组织样品总 RNA 反转录成模板第一链 cDNA,置于 -20°C 冰箱保存,用于 RT-PCR 扩增和荧光定量 PCR。

参照 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech)操作说明书,取中华绒螯蟹肝胰腺的完整 RNA,反转录合成 3'RACE cDNA 第一链和 5'RACE cDNA 第一链,置于 -20°C 用于 ELOVL 基因序列 cDNA 快速扩增的模板。

1.2.2 引物设计及序列验证 根据 NCBI GenBank 中拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*) ELOVL 基因(GenBank 登录号: FJ774753)和日本囊对虾 ELOVL 基因(GenBank 登录号: EF055875)保守区序列设计上下游引物 HX ELO-F1 和 HX ELO-R1

表 1 *ELOVL* 基因克隆与表达分析引物序列
Tab. 1 Primers used in cloning and characterizing the *ELOVL* gene

引物名称 primer name	核苷酸序列(5′-3′) sequence (5′-3′)	用途 application
HXELO-F1	ACGAAGTTCCTCCCACTCCG	RT-PCR
HXELO-R1	TGTGTGAACCAACCCACTCAT	RT-PCR
3′-ELO	GGGGTCTCCTTGTATTCTACAACGCAGC	3′ RACE
5′-ELO	CGGGGAGAGGCTTGCTTCACACTAAAA	5′RACE
qRT-ELO-F	CCAGATGATCCAGTTTGCCTGA	Real-time PCR
qRT-ELO-R	TTGCCCTGGGGAGATGTGTC	Real-time PCR
β -actin-F	ACCTCGGTTCTATTTTGTCGG	Real-time PCR
β -actin-R	ATGCTTTCGCAGTAGTTCGTC	Real-time PCR

(表 1), 预计条带大小约 500 bp。以 RT-PCR 的肝胰腺 cDNA 为模板, HXELO-F1 和 HXELO-R1 为引物, PCR 扩增 *ELOVL* 核心片段, 大小与预计相似, 按照琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(天根)回收纯化, 并送上海美吉生物医药科技有限公司测序。

PCR 反应加样体系: cDNA 模板 1 μ L, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 4 μ L, 上下游引物(10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, 10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ L, *rTaq* 酶(5 U/ μ L) 0.25 μ L, 加无菌去离子水至总体积 25 μ L。PCR 仪中设置 PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 16 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.3 *ELOVL* 基因的克隆 根据测得的序列, 设计 3′-ELO RACE 上游引物和 5′-ELO RACE 下游引物(表 1), 并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。参照 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech)操作说明书, 以 3′RACE cDNA 和 5′RACE cDNA 为模板, 3′-ELO RACE/UPM 和 5′-ELO RACE/UPM 为引物, 分别进行 3′端和 5′端序列快速扩增。

PCR 反应体系: 3′RACE (5′RACE cDNA)模板 1.25 μ L, 10 μ mol/L 的 3′ELO (5′ELO)引物 0.5 μ L, 10 mmol/L dNTP Mix 0.5 μ L, 50 $\times$ Advantage 2 Polymerase Mix 0.5 μ L, 10 $\times$ Advantage 2 PCR buffer 缓冲液 2.5 μ L, UPM 通用引物 2.5 μ L, 加灭菌去离子水至总体积 25.0 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C, 3 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 70 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 25 个循环。RACE PCR 产物进行 DNA 胶回收后, 将产物连接至 pGEM-T easy

vector 载体过夜, 次日将连接产物转化至大肠杆菌 Top 10 感受态细胞中, 置于恒温培养箱中 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h。在长出的蓝白斑菌落中挑选白斑, 并接种于 LBA 液体培养基中继续振荡培养至菌液浑浊(6 h), 经菌液 PCR 初步鉴定筛选后, 送上海美吉生物医药有限公司进行测序拼接。

1.2.4 目的基因序列分析 利用 NCBI Vecscreen 网站去除测序结果的载体序列, 然后对片段进行拼接。开放阅读框的寻找利用 ORF (open reading frame) finder 软件; 序列翻译和蛋白质相似性的分析利用 Primer Premier 5 软件及 Expasy (<http://www.expasy.org/>); 相对分子量和蛋白质等电点的计算使用 Compute pI/Mw (http://web.expasy.org/compute_pi/); 氨基酸多序列比对用 BioEdit7 软件及多序列对比工具(<http://www.bio-soft.net/sms/>); 系统进化树构建用 MEGA 5.0 软件的邻接法(Neighbor-Joining, NJ)进行。

1.2.5 *ELOVL* 基因实时荧光定量 PCR 检测 取等量各组织 RNA 及不同组平行样 RNA (500 ng), 反转录成等浓度的 cDNA 第一链, 做为荧光定量 PCR (Real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction, qRT-PCR)模板。通过克隆得到的 *ELOVL* 全长设计荧光定量 PCR 引物(表 1)。根据 Livak 等^[14]提出的相对标准曲线法 $2^{-\Delta\Delta Ct}$, 以中华绒螯蟹 β -actin 基因(HM053699)为内参, 设计 β -actin-F 和 β -actin-R(表 1), 验证内参各组织表达稳定性。每个样品和内参分别设 3 个重复, 利用 ABI 7500 Real-time PCR 仪器进行标准曲线的制作及不同组织荧光定量 PCR 的扩增。

标准曲线的制作以肝胰腺 cDNA 为模板, 以 2 倍浓度梯度进行稀释, 分别进行 *ELOVL* 基因和 β -actin 基因引物的荧光定量 PCR, 得出各稀释模板 C_t 值, 制作标准曲线, 反应体系加样: SYBR Premix Ex TaqTM (2 $\times$) 10 μ L, 上下游引物各 1 μ L, cDNA 模板 2 μ L, 加去离子水至终体积为 20 μ L; 反应程序设置: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60.4 $^{\circ}$ C 34 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 65 $^{\circ}$ C 60 s, 95 $^{\circ}$ C 30 s。利用 SPSS 18.0 软件中的单因子变异数, Duncan 多重比较进行统计分析, 差异显著水平为 0.05, 数据均用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm$ SD)表示。

2 结果与分析

2.1 *ELOVL* 基因 cDNA 的序列分析

从中华绒螯蟹肝胰腺中提取总 RNA, 反转录为 cDNA 模板, 设计引物获得中华绒螯蟹 *ELOVL* 核心片段, 大小为 496 bp, 与预测结果相符(图 1A)。根据获得序列片段设计 RACE 引物, 经过 3'RACE PCR 和 5'RACE PCR 扩增后分别获得 1549 bp(图 1B)和 222bp(图 1C)片段, 与预期片段大小基本一致。拼接测序结果, 该基因全长 2089 bp, 其中包括 350 bp 的 5'非编码区(UTR), 674 bp 的 3'非编码区(UTR), 开放阅读框(ORF)长 1065 bp(包含终止密码子), 编码 354 个氨基酸, 同时具有 Poly-A 尾(图 2)。蛋白质序列分析表明, 理论等电

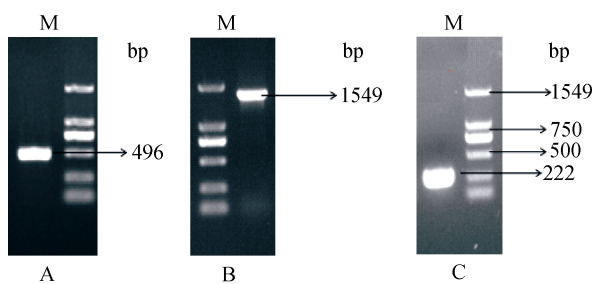


图 1 中华绒螯蟹 *ELOVL* 基因 PCR 扩增产物

A. *ELOVL* 基因部分片段 PCR 扩增结果; M: DL2000 DNA marker.
B. *ELOVL* 基因 3'RACE PCR 扩增结果; M: DL2000 DNA marker.
C. *ELOVL* 基因 5'RACE PCR 扩增结果; M: DL2000 DNA marker.

Fig. 1 PCR amplification products of *ELOVL* gene of *Eriocheir sinensis*

A. PCR product result of *ELOVL* segments; M: DL2000 DNA marker. B. 3' RACE PCR product result of *ELOVL*; M: DL2000 DNA marker. C. 5' RACE PCR product result of *ELOVL*; M: DL2000 DNA marker.

点为 9.28, 分子量为 41.05 kD, 具有 7 个跨膜区。*ELOVL* 蛋白质包括以下特征: 高度保守的氧化还原中心组氨酸簇 HVIHH(残基 146~150), 多个保守区和跨膜区: KFTEFLDT(残基 123~130)、NTFV HIVMYVYY(残基 176~187)、TNFQMI(残基 207~212)等结构域(图 3)。经 BLASTn、BLASTp 等比对表明, 此序列与达氏按蚊(*Anopheles darlingi*)、瓜实蝇(*Bactrocera cucurbitae*)、印度跳蚁(*Harpegnathos saltator*)等物种 *ELOVL* 序列具有高度相似性。

2.2 中华绒螯蟹 *ELOVL* 氨基酸同源性分析及系统进化树的构建

使用 ClustalX 软件将中华绒螯蟹 *ELOVL* 氨基酸序列与其他代表性的脊椎动物与无脊椎动物进行氨基酸多序列比对。结果表明, 中华绒螯蟹的 *ELOVL* 氨基酸与日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、烟芽夜蛾(*Heliothis virescens*)、印度跳蚁、达氏按蚊(*Acromyrmex echinator*)以及顶切叶蚁(*Acromyrmex echinator*)的相似性分别为 47%、31%、41%、33%、53%和 59%(图 3)。

利用 MEGA 5.0 软件的邻接法(Neighbor-Joining)将相关代表脊椎动物和无脊椎动物的 *ELOVL* 氨基酸序列构建发育树(图 4)。结果显示, 中华绒螯蟹 *ELOVL* 与家蝇聚为一支, 表明两者关系较近, 同时与印度跳蚁、寄生蜂(*Nasonia vitripennis*)等节肢动物有一定亲缘关系, 与鱼类脂肪酸延长酶在不同分支, 表明关系较远, 这与分子同源关系进化发展相符。

2.3 中华绒螯蟹 *ELOVL* mRNA 组织表达分析

制作得到的 *ELOVL* 基因和 β -actin 基因的标准曲线分别为: $y=-3.277x+28.946$, $R^2=0.996$ ($R^2>0.99$), 扩增效率 E 为 101.91% ($105\%>E>95\%$); $y=-3.306x+23.918$, $R^2=1$ ($R^2>0.99$), 扩增效率 E 为 100.66% ($105\%>E>95\%$), 因此满足 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法。

取中华绒螯蟹的肠、胃、心脏、肝胰腺、胸神经节、肌肉、眼柄、鳃和脑神经节 9 个组织, 利用荧光定量 PCR 方法研究中华绒螯蟹 *ELOVL* mRNA 不同组织表达特征, 设定中华绒螯蟹在心脏中的表达量为 1, 根据 *ELOVL* 在各个组织中的

```

1  ACATGGGGAGTGTGGAGGGTGTGTCGTAGTGAGTGGTTGTGTTGCCCCGTTGGGCTCCTCA
61  GGGTTTCTATTGACGCCACACTACGTTGAAACCTAGTGAGCATAACAGTCGGCTGTTGAGA
121 CTATCCACTCCAACGAACCTCTCTCCCACTCCGCGGACTTGTGAGCGCGAAACAGAAATTT
      5'RACE Primer
181 AGATGTCCTTAAGGATTTTAGTGTGAAGCAAGCCTCTCCCCGGCCGGTGCTCGTGTGATA
241 CCTAGTGCAGGGAGTAGCGGGTAACAGTGTGGGAGGCTGTGGGAGCAGCCTCGGCAGGA
301 CAGGGAACACGAGCGGAAGTTAAAGGGTGTGAGGATCAACAGGAGACAGGATGAAGCACA
      M K H
361 TCGTCGAGACAGTGGTGGACAGCTACAATGACCTCTTCATCAACCAGCGAGACCCAAGGG
4  I V E T V V D S Y N D L F I N Q R D P R
421 TCGATGGCTGGCTCTTATGGACTCGCCATGGCCAACCTCTTCATGTGCGTGAGTTATG
24  V D G W L F M D S P W P T F F M C V S Y
481 TTATACTGGTGAAGTGATCGGGCCGCTACATGAAGGACAGGCCGCCCTTTGATCTCA
44  V I L V K V I G P R Y M K D R P P F D L
      3'RACE Primer
541 GGGGTCTCCTTGATTTCTACAACGCGAGCTCAAGTCATCTTTTCTACCTGGTGTTCATG
64  R G L L V F Y N A A Q V I F S T W L F Y
601 AGATTGGAATGAGTGGGTGGTTCACACATTATTCATTCCGCTGTCAACCTGTTGATTATT
84  E I G M S G W F T H Y S F R C Q P V D Y
661 CGGACAATCCTTCAGCTATCCGTATGGCTCATGCTTCCTGGTGGTATTACTTTTCCAAGT
104 S D N P S A I R M A H A S W W Y Y F S K
721 TCACCGAATTCCTAGACACAATTTCTTTGTACTGCATAAGAAGAATGAGCATATTTAC
124 F T E F L D T I F F V L H K N E H I S
781 TGCTGCATGTCCACACGCTGTATGCCCATGAGTGTCTGGTTCGGCGTCAAGTTCA
144 L L H V I H H G C M P M S V W F G V K F
841 CTGCAGGTGGACACAGCACTTTCTTTGGTCTTGTCAACACCTTCGTGCATATTGTGATGT
164 T A G G H S T F F G L V N T F V H I V M
901 ACGTCTACTACATGTTGTCTGCCATGGGACCCAAATACCGCCGTTTCATTTGGTGAAGA
184 Y V Y Y M L S A M G P K Y R R F I W K
961 AGTACCTTACCAACTTCCAGATGATCCAGTTTGTCTGATCTTTAGTCATGCATTCCAGC
204 K Y L T N F Q M I Q F V L I F S H A F Q
1021 TCGCCTTCACTGAATGTCAATTACCCACGTGCCTTCATGTGGTGGATTGGAGGTCATGCAG
224 L A F T E C H Y P R A F M W W I G G H A
1081 TCATGTTCTTCTTCTGTTTTCGGAGTTCTACATCAAGGCTTATCTTCGTAGCACTAAGA
244 V M F F F L F S E F Y I K A Y L R S T K
1141 AGTTCATGAAATGGGACGACACATCTCCCCAAGGCAAATGGAAGTCTTACTAATGGAC
264 K F Y G N G T T H L P K A N G S L T N G
1201 ATATCAAACATGCCAATGGTCATGCAAATGGCAAAGCAAATGGCGTAGCAAATGGATATA
284 H I K H A N G H A N G K A N G V A N G Y
1261 GCAATGGCCATGCAAATGGCCATGCCAACGGACACCTCCGCTCCAATGGAGTGCAACAA
304 S N G H A N G H A N G H L R S N G A T
1321 AGGACTCTAATGGCCACATTCTCAAAGTGAAGTCTTTCAGTGTGCGAGCGCGGCAAC
324 K D S N G H I P Q T E E S F S V R A R Q
1381 TAGTGTGTATGAGCGTAGATACTAGCGTGGAGTAAAGTCTCAGTGTCTTACTACTACCTCAT
344 L V C M S V D T S V E *
1441 ACTTCAAAGTAAATCATAATACTGCATCCAGACCTCTCACATATGTAAGTGAGCAGTTAC
1501 ATCCCAGACTGAGCCTGACAGCTAAACAGTGGTGTGAGCTTGGCACAAGATGTAACCT
1561 TTGGTAGTTGACATGTGACACAATATAAGCATGATCACAGAGCAGGGTCTCGCATTAAC
1621 TTATACCCATGAATTATCAGGTCATTTTCTTTCTCCAAGGTAATGACGAAAACCTCGCAGA
1681 CCAAGACGATAAACCAACTGCATTATTTTAACTTTTACTAAATTATTGTTTCCCTAG
1741 TTGAGGATTACTTCAAATACGGCACTCTGTATAGGAGTGAACACTGACAATTTACTAA
1801 CTAGTGCAATTGATAGAATATCATCCATTGGTTATTATTTTGGTCTTGTGTTTGTGGA
1861 CAAAGGTGCTCATGGGGAGAATTTGAGCTCTCATGACCTTGCAAAATATTACAAAGGAAC
1921 TGGCCTTTCTGGATGTTGCACAGATTGCACTGGAGTATGGAAGCACTTTAAGTGATACAT
1981 TTTATTCTAAATGTCTTAGTGTGAGAAAAGAAGGGTATGGAAGAAAAAGTTGTGCTGAAT
2 041 CATTTCAGTGCCAAGATGTCTGTAGACAAAAA

```

图 2 中华绒螯蟹 *ELOVL* 基因 cDNA 核苷酸序列及其预测的氨基酸序列

“→”表示 3'RACE PCR 引物,“←”表示 5'RACE PCR 引物,“—”表示荧光定量 PCR 引物,“■”表示高保守氧化中心,“■”表示几个跨膜区。起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA)用“□”表示。Poly(A)用“□”表示。

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *ELOVL* gene of *Eriocheir sinensis*

“→”stands for 3'RACE PCR primers, and “←” stands for 5'RACE PCR primers; “—”stand for real-time PCR primers, “■”stand for high conservative oxidation center, and the “■”stand for transmembrane regions. The start codon (ATG) and the stop codon (TAA) are in “□”. The poly (A) are in “□”.

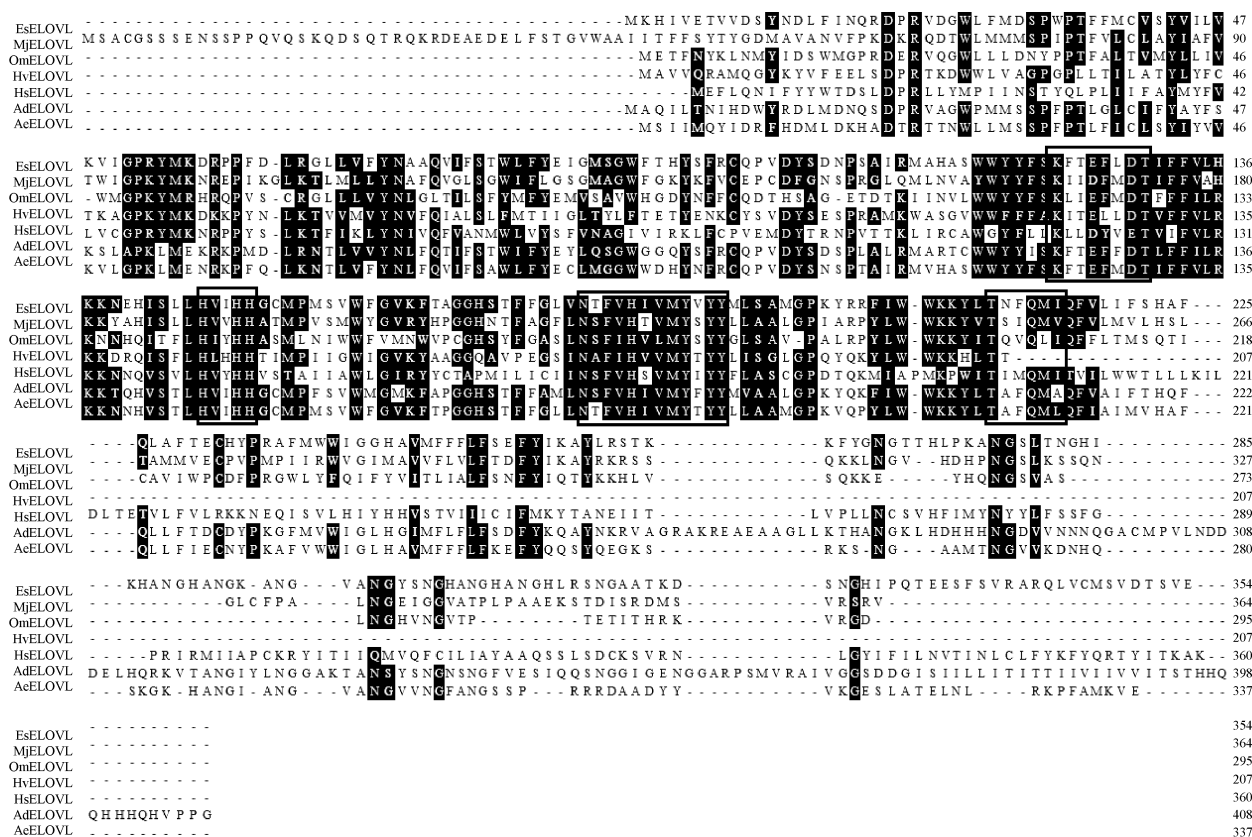


图 3 中华绒螯蟹 ELOVL 氨基酸序列与其他物种 ELOVL 氨基酸序列比较

EsELOVL: 中华绒螯蟹 ELOVL (KR005628); MjELOVL: 日本囊对虾 ELOVL (EF055875.1); OmELOVL: 虹鳟 ELOVL (AAV67803.1); HsELOVL: 烟芽夜蛾 ELOVL (ACX53823.1); HsELOVL: 印度跳蚁 ELOVL (EFN76074.1); AdELOVL: 达氏按蚊 ELOVL (ETN62308.1); AeELOVL: 顶切叶蚁 ELOVL (XP_011054336.1).

Fig. 3 ELOVL deduced amino acid sequence comparison from *Eriocheir sinensis* with other organisms

EsELOVL: *Eriocheir sinensis* ELOVL (KR005628); MjELOVL: *Marsupenaeus japonicus* ELOVL (EF055875.1); OmELOVL: *Onchorynchus mykiss* ELOVL (AAV67803.1); HsELOVL: *Heliothis virescens* ELOVL (ACX53823.1); HsELOVL: *Harpegnathos saltator* ELOVL (EFN76074.1); AdELOVL: *Anopheles darlingi* ELOVL (ETN62308.1); AeELOVL: *Acromyrmex echinator* ELOVL (XP_011054336.1).

相对表达量作柱形图(图5)。从图中可以看出, *ELOVL* 在上述所有检测的 9 种组织中均有表达, 但表达水平有所不同。在中华绒螯蟹的肝胰腺和肠道中表达量最高, 表达水平显著高于其他组织($P<0.05$); 其他组织中少量表达, 其中心脏中表达量最低。

2.4 不同油脂配比饲料对中华绒螯蟹 *ELOVL* 表达的影响

饲喂生长周期中的中华绒螯蟹含不同鱼油/豆油比的配合饲料, 每个饲料组取雌雄各 4 只, 取可食部位肌肉、精巢、卵巢和肝胰腺 4 个主要组织。利用上述荧光定量 PCR 方法分析 *ELOVL* mRNA 在不同组织及不同饲料组间表达量的变化情况(图 6)。结果表明, 经过 98 d 的投喂, *ELOVL*

mRNA 在肝胰腺、肌肉和性腺中均有表达。在各配合饲料组中, *ELOVL* 均在卵巢组织中表达量最高。不同油脂比例饲料组中, 不同组织表达量呈现不同变化模式。卵巢中的 *ELOVL* mRNA 表达水平随着豆油替代比例不断增加, 鱼油比例不断减小而显著升高($P<0.05$), 在 SO 组表达量最高; 肝胰腺中表达情况与卵巢相同, FO 组中表达量最低, FO/SO 组表达处于中间水平, SO 组中表达量最高, 且各组之间差异显著($P<0.05$); 精巢组织中 *ELOVL* mRNA 的表达量在 SO 饲料组中最高, 表达水平依次为 SO 组>FO 组>FO/SO 组; 肌肉组织中 *ELOVL* mRNA 的表达水平较低, 且各饲料组间差异不显著($P>0.05$)。

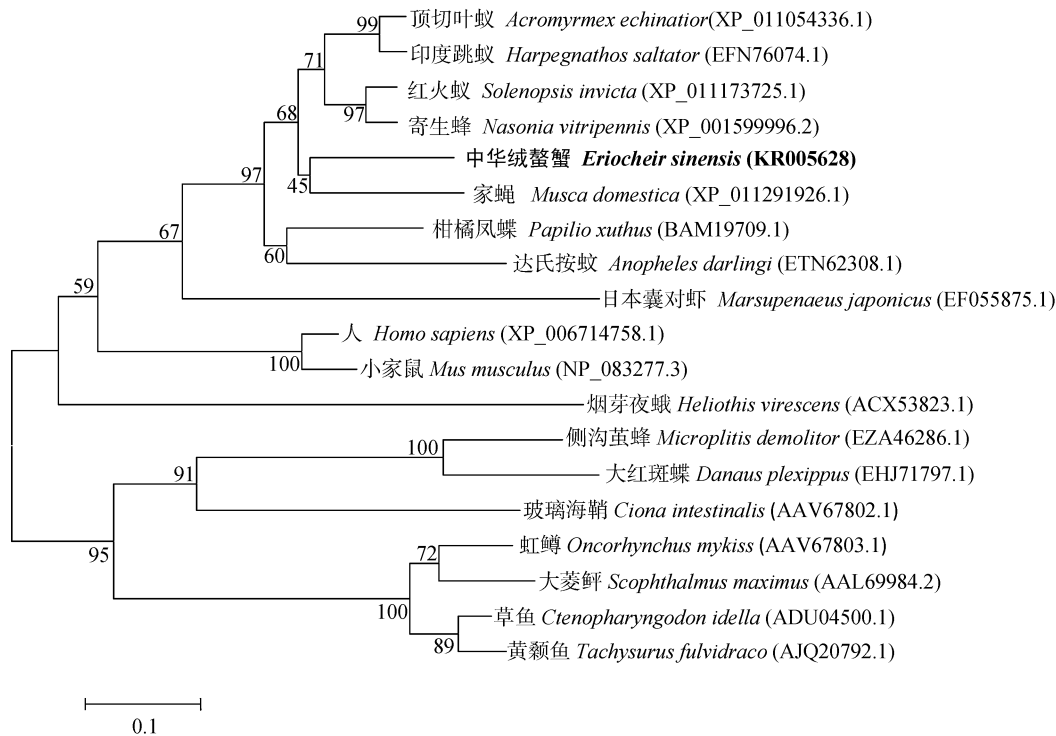


图 4 中华绒螯蟹 ELOVL 系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on the sequences of the *Eriocheir sinensis* ELOVL and elongase proteins from other organisms

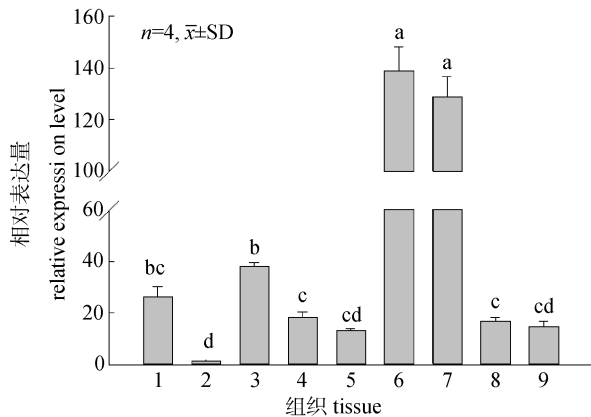


图 5 中华绒螯蟹 ELOVL mRNA 在不同组织中的相对表达情况

柱上不同小写字母表示不同组织间差异显著($P<0.05$).

1. 鳃; 2. 心脏; 3. 胃; 4. 脑神经节; 5. 眼柄; 6. 肝胰腺;
7. 肠; 8. 肌肉; 9. 胸神经节.

Fig. 5 Expression level of *Eriocheir sinensis* ELOVL gene in tissues
Different letters indicate significant difference at 0.05 level among different tissues. 1. Gill; 2. Heart; 3. Stomach; 4. Cranial ganglia; 5. Sight gland; 6. Hepatopancreas; 7. Intestine; 8. Muscle; 9. Thoracic ganglia.

3 讨论

延长酶基因家族参与 HUFA 合成的缩合反应,

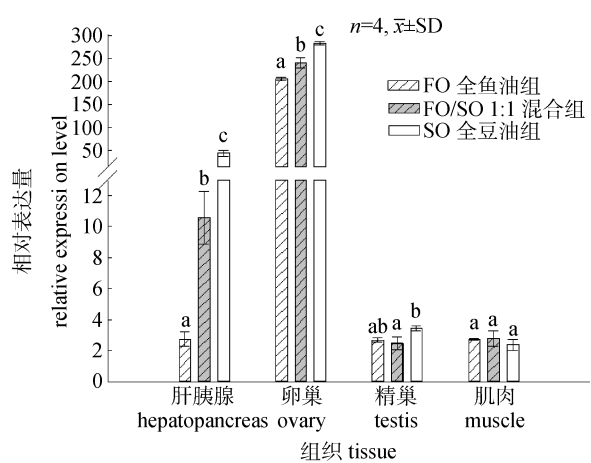


图 6 中华绒螯蟹 4 种组织 ELOVL mRNA 在不同膳食配方饲料下的表达情况

不同小写字母表示不同饲料配方差异显著($P<0.05$).

Fig. 6 ELOVL mRNA expression of different dietary lipid levels on four kinds of tissues
Different letters indicate significant difference at 0.05 level among different dietary lipid groups.

能够延长脂肪酸碳链, 在脂肪酸合成代谢调节中起到十分广泛而不可或缺的作用。近年来不断有研究表明 ELOVL 具有多种生物学功能, 并逐渐成为研究热点。到目前为止, ELOVL 已在脊椎动

物的研究中取得一定进展,尤其是在水产生物中。研究者分别从斑马鱼(*Danio rerio*)^[15]、虹鳟^[16]、罗非鱼(*Tilapia*)^[17]、大西洋鲑(*Salmo salar*)^[18]、栉孔扇贝(*Chlamys nobilis*)^[19]等多种水产动物中克隆得到 *ELOVL* 基因全长,并验证了其相应功能。但在无脊椎动物中,尤其是甲壳动物中相关报道较少。

本研究利用 RT-PCR、RACR 等技术首次克隆得到了一个完整的中华绒螯蟹延长酶基因。该基因全长 1065 bp, 编码 354 个氨基酸, 同时包括 5' 非编码区(5'UTR) 350 bp, 3'非编码区(3'UTR) 674 bp (图 2)。同其他已知延长酶一样, 该 *ELOVL* 具有典型的延长酶结构特征: 1 个高保守的氧化还原组氨酸簇 HXXHH; 多个跨膜区以及高保守的氨基酸序列^[20]。有研究表明, *ELOVL* 是内质网(endoplasmic reticulum, ER)膜结合蛋白, 一般具有跨膜结构和内质网滞留信号(retention signal)。其中内质网滞留信号是某些内质网滞留蛋白肽链的 C 端所含的特定氨基酸序列, 是确保脂类在内质网上合成的关键^[21]。通常可溶性蛋白的滞留信号为“KDLE”, 而膜蛋白的滞留信号有两个赖氨酸, 第一个赖氨酸必须位于 C 端第三位, 第二个赖氨酸则位于 C 端第四或第五位^[21]。但是本研究克隆的中华绒螯蟹 *ELOVL* 与日本囊对虾 *ELOVL*^[22]、栉孔扇贝 *ELOVL*^[19]的结果相同, 缺乏内质网滞留信号, 因此推测有些物种 *ELOVL* 可能不在内质网膜上, 因此这些 *ELOVL* 可能存在不同的调节机制或生理功能。

生物体对 HUFA 的需求量与其自身 HUFA 合成能力密切相关, 而基因的表达量是直接影响 HUFA 的合成能力的关键^[23]。碳链延长酶做为脂肪酸合成关键酶, 在组织中广泛表达^[18, 24-26]。本研究荧光定量 PCR 表明, 中华绒螯蟹 *ELOVL* mRNA 在胃、心脏、胸神经组织、脑神经节、肌肉、肝胰腺、肠道、眼柄和鳃组织中均有表达, 但是表达水平明显不同, 这预示着不同器官中 *ELOVL* 参与脂肪酸代谢的程度不同。*ELOVL* 在中华绒螯蟹肝胰腺中表达量最高。肝胰腺是甲壳动物脂类储存和加工的主要器官, 是脂类合成代谢

的主要场所^[27]。可见 *ELOVL* 在肝胰腺中的高表达与肝胰腺参与脂类新陈代谢有关。其次, *ELOVL* mRNA 在中华绒螯蟹肠道中表达。肠道作为重要的消化场所, 暗示着 *ELOVL* 参与将肠道食物中较短链脂肪作用生成长链脂肪酸的过程。上述结果与大西洋鲑^[18]中 *ELOVL5*、*ELOVL2* 的表达情况一致。但是 Monroig 等^[24]报道 *ELOVL4* 在军曹鱼(*Rachycentron canadum*)脑组织中表达量最高, 而本研究 *ELOVL* 在脑中的表达水平略低, 与本研究存在一定出入, 原因可能是不同 *ELOVL* 参与不同脂肪酸合成, 因此推测本次克隆的 *ELOVL* 存在不同的表达机制, 从而来满足中华绒螯蟹自身的营养需求。

虾蟹类的必需脂肪酸包括豆油鱼油中的 PUFA, 但是有研究表明鱼油中的 DHA、EPA 营养价值较豆油中的亚油酸、亚麻酸要高^[28]。然而, 随着养殖业的迅速发展, 鱼油需求量越来越大, 鱼油资源不断消耗, 导致鱼油供应受到限制, 因此, 寻找鱼油的替代脂肪源成为了新的研究热点。近年来, 研究人员一直关注于合成关键酶与合成 PUFA 之间的联系。大西洋鲑研究显示, 用亚麻油替代鱼油后 *ELOVL* 的表达显著增高^[29]; 同时鲤鱼(*Cyprinus carpio* var. *jian*)的相关报道表明, *FAD* 和 *ELOVL* 的表达能够调节其利用 C_{18} PUFA 合成 HUFA 这一过程^[30]。本试验为研究不同脂肪源对中华绒螯蟹 *ELOVL* 基因表达的影响, 在满足中华绒螯蟹基本营养的配合饲料中, 分别添加 FO、FO/SO、SO 的脂肪源。饲养 98 d 后, 各组织 *ELOVL* mRNA 呈现不同的表达模式。同一组织 *ELOVL* mRNA 在不同配合饲料组中表达水平各不相同, 这个结果与延长酶的表达量受到不同脂质水平的影响的结果相符^[18]。用同一配合饲料饲喂的中华绒螯蟹, 卵巢中表达水平最高。这可能因为在甲壳动物卵巢成熟过程中, 脂类起到十分重要的作用, 是卵黄合成和胚胎发育的必需物质^[31]。在中华绒螯蟹卵巢发育时期, n-3 PUFA(主要是 $C_{20:5}$ 和 $C_{22:6}$)百分比组成显著增加, n-6 PUFA 百分比显著下降^[32]。因此卵巢组织中的高表达暗示着该基因编码的蛋白质在卵巢发育过

程中为卵巢提供所需的脂类, 并且生成产物为 n-3 PUFA 的可能性较产物为 n-6 PUFA 的可能性大。然而与卵巢表达量对比, 在精巢中表达十分微量, 这是因为中华绒螯蟹在性腺发育过程中精巢对 PUFA 的需求远小于卵巢^[33], 这可能就是不同脂肪源对卵巢的影响明显大于精巢的原因。投喂不同油脂配合饲料, 结果显示, 在胰腺和卵巢组织中, *ELOVL* 表达水平随豆油比例增加, 鱼油比例减少而不断提高, 并且各组间差异显著, 这与之前的研究报道^[18, 26]结果一致。生物体自身所需脂肪酸营养成分不仅来源于食物中, 而且可以依靠自身转化合成所需物质, 卵巢和胰腺的表达情况表明低含量的 n-3 PUFA 能够促进 *ELOVL* 的表达, 因此推测该 *ELOVL* 有合成卵巢胰腺中自身所需 n-3 PUFA 的能力。有研究表明, 中华绒螯蟹肌肉 EPA 和 DHA 含量不随着饲料水平而变化是因为其具有将 C₁₈ 脂肪酸转变为 HUFA 的能力^[11], 而本研究中 *ELOVL* 在肌肉组织的表达较为微量且恒定, 受脂肪水平影响差异不显著, 推测该 *ELOVL* 在肌肉中的作用比较有限, 可能存在其他作用不同的延长酶基因。本研究表明, *ELOVL* 表达受到不同油脂配比的调控, 符合饲料营养组成能够调节机体自身基因转录强弱从而来调整各组织所需物质组成的规律^[34], 为优化配合饲料, 解决鱼油替代关键, 提高鱼油利用率提供了参考。

目前, 哺乳动物家族中包含 7 种脂肪酸碳链延长酶: *ELOVL1*, *ELOVL2*, *ELOVL3*, *ELOVL4*, *ELOVL5*, *ELOVL6* 和 *ELOVL7*。*ELOVL1* 对 C₁₄ 的脂肪酸有显著活性; *ELOVL2* 则主要负责对 C₂₀ 和 C₂₂ 的底物进行延伸, 同时对 C₁₈ 底物也有一定活性, 但是作用微弱; *ELOVL3* 对底物的选择范围较广, 延长产物多为 C₂₆ 脂肪酸^[23]; *ELOVL4* 既可以作用于长链饱和脂肪酸, 也可以作用与长链多不饱和脂肪酸, 且能够延伸生成 C₃₆^[21]; *ELOVL5* 可利用膳食中 n-3 和 n-6 的 C₁₈ 和 C₂₀ 多不饱和脂肪酸(PUFA)最终生成相应的 n-3 和 n-6 C₂₄ 必需脂肪酸, 但是对于底物作用的活性则是 C₁₈>C₂₀。有研究表明, 大部分鱼类 *ELOVL* 作用于 n-3 PUFAs 底物的效率高于作用于 n-6 PUFAs 底物^[17], 而在

软体动物中, *ELOVL* 对 n-6 PUFAs 的作用效率则更高^[19]。尽管这些 *ELOVL* 在不同的物种中具有相同高保守区且相同活性位点, 但是对底物具有不同的偏好性和酶活性, 表明 PUFA 的合成途径存在着相当复杂的进化过程。因此本研究虽首次克隆得到中华绒螯蟹 *ELOVL* 基因全长, 并对其进行生物学功能分析和在组织中的表达分析, 推测其在中华绒螯蟹中的生理功能, 但由于缺乏相关的功能验证, 故该基因类属尚未清楚, 对底物的选择及延长作用还有待进一步研究, 对中华绒螯蟹 HUFA 合成能力的评估有待继续探索。

参考文献:

- [1] Du J H, Liang X F, Cheng J Q, et al. Molecular cloning and analyzing of fatty acid desaturase and elongase genes in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. Journal of Jinan University: Natural Science, 2011, 32(5): 513–520. [杜嵇华, 梁旭方, 程佳齐, 等. 草鱼脂肪酸去饱和酶和延长酶基因 cDNA 全序列的克隆与分析[J]. 暨南大学学报: 自然科学版, 2011, 32(5): 513–520.]
- [2] Torrejon C, Jung U J, Deckelbaum R J. n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: Actions and molecular mechanisms[J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2007, 77(5–6): 319–326.
- [3] Kimura Y, Kono S, Toyomura K, et al. Meat, fish and fat intake in relation to subsite-specific risk of colorectal cancer: The Fukuoka Colorectal Cancer Study[J]. Cancer Sci, 2007, 98(4): 590–597.
- [4] Qiu R J. Effect of dietary fatty acid nutrition on the immunological ability and resistance to hypoxia in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2011. [邱仁杰. 脂肪酸营养对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 免疫及耐低氧能力的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2011.]
- [5] Cook H W. Fatty Acid Desaturation and Chain Elongation In Eukaryotes[M]. Amsterdam: New Comprehensive Biochemistry, 1996: 129–152.
- [6] Sprecher H. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2000, 1486(2–3): 219–231.
- [7] Jakobsson A, Westerberg R, Jacobsson A. Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism[J]. Prog Lipid Res, 2006, 45(3): 237–249.
- [8] Agaba M K, Tocher D R, Zheng X Z, et al. Cloning and functional characterisation of polyunsaturated fatty acid

- elongases of marine and freshwater teleost fish[J]. *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol*, 2005, 142(3): 342–352.
- [9] 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): 9–15. [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育成仔蟹的成活率和生长的影响[J]. *水产学报*, 1998, 22(1): 9–15.]
- [10] Qi J. Dietary polyunsaturated fatty acids and choline requirement of juvenile China mitten crab, *Eriocheir sinensis*[D]. Shanghai: East China Normal University, 2013. [齐霁. 中华绒螯蟹幼蟹对饲料中多不饱和脂肪酸和胆碱需要量的研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2013.]
- [11] Que Y Q, Yang Z G, Ji L Y, et al. Effects of formulated dietary replacement of trash fish on growth performance, body composition and fatty acid composition of *Eriocheir sinensis*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(10): 1612–1623. [阙有清, 杨志刚, 纪连元, 等. 配合饲料替代杂鱼对中华绒螯蟹生长发育、体成分及脂肪酸组成的影响[J]. *水产学报*, 2012, 36(10): 1612–1623.]
- [12] Yang Z G, Guo Z H, Ji L Y, et al. Cloning and tissue distribution of a fatty acyl $\Delta 6$ -desaturase-like gene and effects of dietary lipid levels on its expression in the hepatopancreas of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol*, 2013, 165(2): 99–105.
- [13] Guo Z H, Yang Z G, Cheng Y X, et al. Molecular characterization, tissue expression of acyl-CoA $\Delta 9$ -desaturase-like gene, and effects of dietary lipid levels on its expression in the hepatopancreas of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. *Aquaculture*, 2013, 402–403: 58–65.
- [14] 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.
- [15] Agaba M, Tocher D R, Dickson C A, et al. Zebrafish cDNA encoding multifunctional fatty acid elongase involved in production of eicosapentaenoic (20: 5n-3) and docosahexaenoic (22: 6n-3) acids[J]. *Mar Biotechnol*, 2004, 6(3): 251–261.
- [16] Meyer A, Kirsch H, Domergue F, et al. Novel fatty acid elongases and their use for the reconstitution of docosahexaenoic acid biosynthesis[J]. *J Lipid Res*, 2004, 45: 1899–1909.
- [17] Agaba M K, Tocher D R, Zheng X Z, et al. Cloning and functional characterisation of polyunsaturated fatty acid elongases from marine and freshwater teleost fish[J]. *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol*, 2005, 142(3): 342–352.
- [18] Morais S, Monroig O, Zheng X Z, et al. Highly unsaturated fatty acid synthesis in Atlantic salmon: Characterization of ELOVL5- and ELOVL2-like elongases[J]. *Mar Biotechnol*, 2009, 11(5): 627–639.
- [19] Liu H L, Zheng H P, Wang S Q, et al. Cloning and functional characterization of a polyunsaturated fatty acid elongase in a marine bivalve noble scallop *Chlamys nobilis* Reeve[J]. *Aquaculture*, 2013, 416–417: 146–151.
- [20] Tvrdik P, Westerberg R, Silve S, et al. Role of a new mammalian gene family in the biosynthesis of very long chain fatty acids and sphingolipids[J]. *J Cell Biol*, 2000, 149(3): 707–718.
- [21] Jackson M R, Nilsson T, Peterson P A. Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum[J]. *EMBO J*, 1990, 9(10): 3153–3162.
- [22] Lyons R E, Dierens L M, Tan S H, et al. Characterization of AFLP markers associated with growth in the Kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*, and identification of a candidate gene[J]. *Mar Biotechnol*, 2007, 9(6): 712–721.
- [23] Cook H W, McMaster C R. Fatty acid desaturation and chain elongation in eukaryotes[M]. 4th ed. Amsterdam: New Comparative Biochemistry, 2002: 181–204.
- [24] Monroig Ó, Webb K, Ibarra-Castro L, et al. Biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in marine fish: Characterization of an Elov14-like elongase from cobia *Rachycentron canadum* and activation of the pathway during early life stages[J]. *Aquaculture*, 2011, 312(1–4): 145–153.
- [25] Carmona-Antoñanzas G, Monroig Ó, Dick J R, et al. Biosynthesis of very long-chain fatty acids (C>24) in Atlantic salmon: Cloning, functional characterisation, and tissue distribution of an Elov14 elongase[J]. *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol*, 2011, 159(2): 122–129.
- [26] Zheng X Z, Tocher D R, Dickson C A, et al. Highly unsaturated fatty acid synthesis in vertebrates: New insights with the cloning and characterization of a $\Delta 6$ desaturase of Atlantic salmon[J]. *Lipids*, 2005, 40(1): 13–24.
- [27] Cheng Y X, Du N S, Lai W. Lipid composition in hepatopancreas of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1998, 44(4): 420–429. [成永旭, 堵南山, 赖伟. 不同阶段中华绒螯蟹肝胰腺的脂类及脂肪酸组成[J]. *动物学报*, 1998, 44(4): 420–429.]
- [28] Ren Z L, Li A J, Xue C H. Nutrient requirements of *Penaeus chinensis* for essential fatty acids[J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 1994, 24(1): 24–32. [任泽林, 李爱杰,

- 薛长湖. 中国对虾必需脂肪酸的营养需求[J]. 青岛海洋大学学报, 1994, 24(1): 24–32.]
- [29] Zheng X Z, Tocher D R, Dickson C A, et al. Effects of diets containing vegetable oil on expression of genes involved in highly unsaturated fatty acid biosynthesis in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. Aquaculture, 236(1–4): 467–483.
- [30] Ren H T, Yu J H, Xu P, et al. Influence of dietary fatty acids on muscle fatty acid composition and expression levels of $\Delta 6$ desaturase-like and Elovl 5-like elongase in common carp (*Cyprinus carpio* var. Jian)[J]. Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol, 2012, 163(2): 184–192.
- [31] Ai C X, Chen L Q, Wen X B, et al. Effect of vitamin E and vitamin C, highly unsaturated fatty acids, in broodstock dier on reproduction performance of *Eriocheir sinensis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2002, 26(6): 533–541. [艾春香, 陈立侨, 温小波, 等. 维生素 E、C 和 HUFA 交互作用对中华绒螯蟹生殖性能的影响[J]. 水产学报, 2002, 26(6): 533–541.]
- [32] Chen Y X, Du N S, Lai W. The lipid accumulations during the stages of the ovarian fast maturation and their effect on the spawning of *Eriocheir sinensis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2000, 24(2): 113–118. [成永旭, 堵南山, 赖伟. 中华绒螯蟹卵巢快速发育期内脂类积累以及对抱卵的影响[J]. 水产学报, 2000, 24(2): 113–118.]
- [33] Wu X, Chang G, Cheng Y, et al. Effects of dietary phospholipid and highly unsaturated fatty acid on the gonadal development, tissue proximate composition, lipid class and fatty acid composition of precocious Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. Aquacult Nutr, 2010, 16(1): 25–36.
- [34] Tocher D R, Bell J G, Dick J R, et al. Fatty acyl desaturation in isolated hepatocytes from Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. Lipids, 1997, 32(12): 1237–1247.

Full-length cDNA cloning and expression analysis of the fatty acid elongase gene from Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)

YANG Zhigang, SHI Qiuyan, CHENG Yongxu, YAO Qinqin, QUE Youqing, YANG Qing, XU Lei, LIU Meimei, XU Zewen

Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Highly unsaturated fatty acids (HUFA) play a particularly important role in normal growth, immune function, and reproduction. In this study, the full-length cDNA of fatty acid elongase (ELOVL) from Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) was cloned for the first time using reverse transcription-polymerase chain reaction and rapid amplification of cDNA ends analyses. The ELOVL cDNA sequence (GenBank accession number: KR005628) was 2089 bp long, with a 350-bp 5'-untranslated region (UTR), a 674-bp 3'-UTR, and an open reading frame of 1065 bp, including stop codons that specified a protein of 354 amino acids. The presumed protein had a typical ELOVL structure with a diagnostic histidine box HVIHH motif, several conserved regions, and three putative transmembrane-spanning domains (KFTEFLDT, NTFVHIVMYVYY, and TNFQMI). The encoded protein shared 59% amino acid sequence identity with *Acromyrmex echinator* (GenBank number: XP_011054336.1) and was clustered closely with *Musca domestica* and *Marsupenaeus japonicus* in a phylogenetic tree. The ELOVL gene was expressed in the hepatopancreas, intestine, muscle, stomach, heart, and gill. Higher levels were detected in the hepatopancreas and intestine ($P < 0.05$) and lower levels were observed in stomach, gill, cranial ganglia, muscle, thoracic ganglia, and the eyes, with trace levels expressed in the heart. We designed three different lipid-containing feeds and analyzed ELOVL mRNA expression in muscle, hepatopancreas, and gonads. The results showed the highest expression in the ovary after feeding for 98 days ($P < 0.05$). ELOVL transcripts increased in the ovary and hepatopancreas with increased inclusion of SO in the diet, but no expression differences were detected in muscle or testis. These results lay the foundation for further research into the mechanisms regulating *E. sinensis* HUFA biosynthesis.

Key words: *Eriocheir sinensis*; elongases of very long chain fatty acids; gene clone; expression analysis

Corresponding author: YANG Zhigang. E-mail: zgyang@shou.edu.cn