

DOI: 10.12264/JFSC2024-0300

三角帆蚌磺基转移酶基因 *HcCHST11* 的表达特征及对贝壳生成的影响

陆婷婷¹, 王志炎¹, 张瑶¹, 胡宏辉¹, 陈扬¹, 鲍全治¹, 白志毅^{1, 2, 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, 上海水产养殖工程研究中心, 上海 201306;

3. 上海海洋大学, 上海市水产动物良种创新与绿色养殖协同中心, 上海 201306

摘要: 磺基转移酶可以通过转移磺酸基团调节蛋白聚糖的硫酸化水平, 而磺酸基团可以吸附 Ca^{2+} , 在生物矿化过程中起到重要作用。本研究旨在解析三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)磺基转移酶基因 *HcCHST11* 的表达特征及对贝壳生成的影响。本研究分析了 *HcCHST11* 序列特征, 并进一步采用逆转录实时荧光定量(qRT-PCR)、原位杂交(ISH)、RNA 干扰(RNAi)和扫描电镜(SEM)检测等技术, 探究了该基因在贝壳形成中的潜在功能。结果显示, *HcCHST11* 基因开放阅读框(ORF)长 840 bp (GenBank: PQ041469.1), 编码 279 个氨基酸, 含有 1 个磺基转移酶结构域; 组织表达特异性分析发现, *HcCHST11* 在边缘膜显著高表达; 原位杂交结果显示, 外褶、中褶、中褶和内褶连接处阳性信号强烈。RNAi 干扰 *HcCHST11* 后, *HcCHST11* 在边缘膜的表达量显著下调, 干扰 7 d 后, SEM 检测发现贝壳珍珠层文石小片形状变得不规则, 边缘出现碳酸钙沉积物; 棱柱层中的有机鞘明显变窄, 晶体表面粗糙并伴有凸起, 晶体之间出现裂纹形成沟壑。研究表明, 三角帆蚌 *HcCHST11* 基因不仅影响角质层和棱柱层形成, 而且在珍珠层形成中也发挥重要功能。本研究为理解珍珠贝的生化矿化机制发掘了关键功能基因。

关键词: 三角帆蚌; 磺基转移酶基因; 基因表达; 晶貌; 生物矿化

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2025)02-0117-11

三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)因其产珠质量高、易养殖管理等优势, 在我国广受养殖户的喜爱, 是我国淡水珍珠贝的主要养殖品种^[1]。我国淡水珍珠产量虽然很高, 但是总体质量与国外海水珍珠存在一定差距, 这是珍珠养殖业亟待解决的主要问题^[2]。蛋白质、多糖和脂质等有机大分子在贝壳生物矿化过程起重要作用, 统称为贝壳有机基质^[3]。近年来, 三角帆蚌生物矿化的机理研究主要围绕基质蛋白的功能: 参与贝壳碳酸钙沉积^[4]、矿化框架^[5]、晶形^[6]、壳色^[7]和珍珠品质等^[8], 而多糖及其相关合成酶在三角帆蚌生物矿化中的作

用还有待研究。在马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)中, 多糖及其合成酶对矿化的影响已有初步研究, 郝瑞娟^[9]在马氏珠母贝中发现 *CHST11a* 和 *CHST11b* 表达受到抑制之后, 会导致贝壳珍珠层表面粗糙, 从而影响贝壳珍珠层的形成, 说明马氏珠母贝中 *CHST11* 对贝壳形成有重要影响。

磺基转移酶(sulfotransferase, ST)是催化磺酸基团从供体分子如 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸(3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate, PAPS)转移到受体分子上的关键酶。磺基转移酶通过催化硫酸化反应, 参与调节骨基质中蛋白聚糖的硫酸化水

收稿日期: 2024-10-08; 修订日期: 2024-11-19.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFD2400105); 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-49).

作者简介: 陆婷婷(2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产动物种质资源与种苗工程. E-mail: lutt0918@163.com

通信作者: 白志毅, 教授, 研究方向为水产动物种质资源与遗传育种. E-mail: zybai@shou.edu.cn

平,而硫酸化蛋白聚糖的磺酸基团在骨基质中具有重要的结构和生物活性功能,如促进骨细胞增殖、分化和矿化等。在生物矿化过程中,硫酸化修饰对于矿化物质的稳定性和生物活性至关重要^[10]。硫酸软骨素磺基转移酶(carbohydrate sulfotransferase 11, *CHST11*) 在 N-乙酰半乳糖胺碳-4 位(GlcNAc-C4)通过催化软骨素硫酸化形成硫酸软骨素(CS),促进磺酸基团转移到软骨素链上,加速生物矿化进程^[11]。现有研究表明,生物体内硫酸软骨素磺基转移酶表达量的变化,对生物体的调控有诸多影响。秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)中 *CHST11* 对其正常寿命和氧化应激反应都起着重要作用^[12]。*CHST11* 敲除可防止 N-钙粘蛋白/ β -连环蛋白通路诱导的基底样乳腺癌细胞侵袭^[13]。Cooney 等^[14]发现小鼠乳腺细胞中 *CHST11* 表达量与受癌细胞侵袭强弱呈正相关。贝壳的主要成分是碳酸钙与哺乳动物骨骼形成具有相似特征,而在哺乳动物骨骼形成方面, *CHST11* 参与骨骼发育和生长因子信号传导。Kluppel 等^[15]发现,缺乏 *CHST11* 的小鼠(*Mus musculus*)骨骼形态严重发育不良。不仅如此, *CHST11* 还是骨形态发生蛋白(BMP)信号传导的靶基因,有助于刺激受损骨骼的内在修复能力^[16-17]。

为探明三角帆蚌硫酸软骨素磺基转移酶对贝壳生成的影响,本研究从实验室构建的三角帆蚌基因组获得三角帆蚌磺基转移酶基因(carbohydrate sulfotransferase 11, *HcCHST11*)序列,分析了其基因序列特征,并通过组织表达、原位杂交和 RNAi 实验研究三角帆蚌磺基转移酶对贝壳生成的影响,为进一步理解珍珠贝珍珠形成调控机理提供新的关键基因资源。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验所用的 1 龄三角帆蚌[壳长: (77.00 $\pm$ 8.19) mm; 壳宽: (18.33 $\pm$ 1.53) mm; 壳高: (41.00 $\pm$ 3.61) mm; 体重: (55.62 $\pm$ 2.97) g]均采自浙江武义淡水珍珠科技小院,在实验室暂养一周,每天投喂一次小球藻并 24 h 不间断充氧,挑选体质健壮、体表无伤、贝壳完整的蚌用于实验。

1.2 实验方法

1.2.1 序列分析 从三角帆蚌基因组文库中获得 *HcCHST11* 序列^[18]。使用 ORF Finder 预测 *HcCHST11* 开放阅读框(ORF),并设计三对引物,进行 PCR 扩增,对产物进行胶回收并进行测序,验证序列的正确性。使用 Phyre2 来预测蛋白质结构。ProParam 和 SMART 分别来鉴定蛋白质的物理和化学参数和预测蛋白质结构域特征。使用 MEGA7.0 软件,以 neighbour-Joining 方法(NJ 法)构建 *HcCHSR11* 系统发育树,并使用 Chiplot^[19]对系统发育树进行修改和美化。

表 1 本研究所用的软件和网站信息
Tab. 1 Software and website information used in this study

名称 name	网址 website
ORF Finder	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/
Phyre2	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2
ProParam	https://web.expasy.org/protparam/
SMART	http://SMART.embl-heidelberg.de/
MEGA7.0	https://www.megasoftware.net/

1.2.2 总 RNA 提取与 cDNA 合成 使用 TRIzol 法提取三角帆蚌组织(鳃、肝胰腺、斧足、闭壳肌、边缘膜和中央膜)的总 RNA。使用 1%琼脂糖凝胶电泳验证所提 RNA 质量的完整性并使用 Nanodrop 2000C 超微量分光光度计来检测总 RNA 浓度。使用 EVO M-MLVRT Mix Kit with gDNA Clean for qPCR Ver.2 (艾科瑞,中国)将来自不同组织的总 RNA 反转录成 cDNA。

1.2.3 引物设计 按照引物设计原则,使用软件 Primer Premier 5.0 设计 *HcCHST11* 引物(表 2)。

1.2.4 逆转录实时荧光定量(qRT-PCR)检测 *HcCHST11* 基因组织表达量 使用 *EF-1 α* 作为内参基因,通过 qRT-PCR 技术检测 *HcCHST11* 在三角帆蚌各个组织中的表达分布,根据 TB Green Premix Ex Taq II 试剂盒(TaKaRa, 日本)说明书配置反应体系(3 个技术重复),采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法处理荧光定量数据: Δt =目的基因 C_t 值-内参基因 C_t 值, $\Delta\Delta t$ = Δt -所有组织目的基因与内参基因 C_t 值差值的最大值。

表 2 本研究涉及到的引物
Tab. 2 The primers used in this study

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	用途 usage
<i>HcCHST11</i> -1F	GAACGATTGCCGAGATTAGTGA	序列验证 sequence verification
<i>HcCHST11</i> -1R	GCTGTCTACAATGGCGTCATAA	
<i>HcCHST11</i> -2F	TTATGACGCCATTGTAGACAG	
<i>HcCHST11</i> -2R	GAACGCTATGGAATGCTTCT	
<i>HcCHST11</i> -3F	AGTAGACAAGAAGCATTCC	
<i>HcCHST11</i> -3R	GGAGATTGACGGATATTACATC	
<i>HcCHST11</i> -qRT-PCR-F	GCATGTCGGTTTATGACGCC	逆转录实时荧光 定量 PCR qRT-PCR
<i>HcCHST11</i> -qRT-PCR-R	TTTGATGCGCATTCCATGCC	
EF1-αF	GGAAC TTCCCAGGCAGACTGTGC	
EF1-αR	TCAAAACGGCCGCAGAGAAT	
<i>HcCHST11</i> -RNAi-F+T7	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGGG</u> TCAGCGTATGTAGACAAGGTGT	RNA 干扰 RNAi
<i>HcCHST11</i> -RNAi-R	CAAATGGAATGCAGCGGTCA	
<i>HcCHST11</i> -RNAi-F	TCAGCGTATGTAGACAAGGTGT	
<i>HcCHST11</i> -RNAi-R+T7	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGGG</u> CAAATGGAATGCAGCGGTCA	
GFP-RNAi-F+T7	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGGG</u> AAGG GCGAGGAGCTGTTACCCG	
GFP-RNAi-R	CAGCAGGACCATGTGATCGCGC	
GFP-RNAi-F	AAGGGCGAGGAGCTGTTCACCG	
GFP-RNAi-R+T7	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGGG</u> CAGCA GGACCATGTGATCGCGC	
<i>HcCHST11</i> -ISH-F+T7	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGGG</u> GATGTCGGTTTATGACGCC	原位杂交 ISH
<i>HcCHST11</i> -ISH-R	TTTGATGCGCATTCCATGCC	
<i>HcCHST11</i> -ISH-F	GCATGTCGGTTTATGACGCC	
<i>HcCHST11</i> -ISH-R+T7	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGGG</u> TTTGATGCGCATTCCATGCC	

注: 表中下划线代表 T7 启动子序列; 波浪线用于增加体外转录效率。
Note: The sequences underlined with straight lines represent the T7 promoter sequence; The sequences underlined with wary are used to increase transcription efficiency *in vitro*.

1.2.5 原位杂交分析 *HcCHST11* 基因在边缘膜表达定位 用 T7-RNA 聚合酶来合成具有特异性的 RNA 探针, 用地高辛标记的探针来特异性地定位核酸。三角帆蚌的新鲜边缘膜组织用 4% 的多聚甲醛固定 6 h, 然后在 4 ℃ 下转移到 20% 的蔗糖溶液中 24 h, 然后使用冷冻切片机(Leica CM1950, 德国)切片。杂交操作和信号检测标准参考敏感性加强型原位杂交检测试剂盒 II (AP)(博士德, 中国)的说明书进行。在显微镜下观察杂交信号并使用数字化全景扫描仪(智跃 WS-10, 中国)扫描成像。

1.2.6 *HcCHST11* RNA 干扰 根据 Yan 等^[20]的方法, 对 *HcCHST11* 进行 RNAi 实验。按照 T7 High Efficiency Transcription Kit 试剂盒(全式金, 中国)合成 ds*HcCHST11* 和 *GFP* (阴性对照组), 所用引物见表 2。使用磷酸盐缓冲液(PBS)稀释 ds*HcCHST11*

和 *GFP* 浓度至 60 μg/100 μL, 并分别将 100 μL 稀释后的 ds*HcCHST11*、*GFP* (阴性对照组)和 PBS (空白对照组)注射到三角帆蚌的闭壳肌中得到 3 个不同处理组。

注射后第 7 天采集外套膜组织进行 RNA 提取, 用 qRT-PCR 检测 *HcCHST11* 表达, 参照 1.2.4 的方法进行 qRT-PCR 技术检测。对取完组织的三角帆蚌贝壳清洗阴干, 使用扫描电子显微镜(SEM)观察并拍摄壳表面形态结构。

1.3 统计分析

以平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示数据, 使用 SPSS 20.0 和 GraphPad Prism 10 软件进行数据分析和绘图, qRT-PCR 结果采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 采用 Duncan 法进行多重比较。当 $P < 0.05$ 认为数据具有统计学显著性差异。

2 结果与分析

2.1 基因序列分析和系统发育树

三角帆蚌的 *HcCHST11* 基因(GenBank: PQ041469.1)的序列全长长达 2245 bp, 开放阅读框(ORF)长 840 bp (图 1), SMART 分析发现 *HcCHST11* 氨基酸 1 到 141 编码 Sulfotransfer_2 结构域(图 2), 编码序列在图 1 中以灰色背景标

出。A、C、G、T 分别占比 28.6%, 23.2%, 25.9%, 22.4%。三角帆蚌的 *HcCHST11* 蛋白由 279 个氨基酸组成, 用 ProtParam 预测显示 *HcCHST11* 蛋白的分子式为 $C_{1482}H_{2238}N_{400}O_{420}S_{13}$, 原子总数共 4553 个, 分子质量约为 32795.28 kDa, 蛋白的理论等电点为 9.11, BMI 为 66.70。Phyre2 预测显示 *HcCHST11* 蛋白的二级结构由 32%的 α -螺旋, 6%的 β -折叠, 14%的无规卷曲组成(图 3, 图 4)。

```

1  gtccggtgggaaaagtcgcatctactttctggcggcgagttttctacattttatacggtaacgcctcgcagatttacaatcatccattag
91  aagttccgattgtcgacgctcttactcaaaagtatgaacgattgcccagatttagtgaggATGTC AAGTCAGGTTAGGATGTTTCTGAACA
30  M S S Q V R M F L N
181 ATTCTTTCAAATTTATGTTTGAAGAAATCCTTTCAGTAGGATTTTGTGACGGTATGTAGACAAGGTGTAATCCCAATCCAGTATATT
60  N S F K F M F A R N P F S R I L S A Y V D K V Y S P N P V Y
271 GGAAGAACTTTGGTATCCCATCGATTTCGCAACAGCCGTCATAATGCATCCAAGCACAGTTTGACATGCGGTCATGATGTCATCTCCAG
90  W K N F G I P S I R N S R H N A S K H S L T C G H D A T F P
361 AATTCCTTCGCTACGTCATTAAGTGAAGTGCAGACTTAGAAACCGTGATAGTCATTTCAAAAGCATGTCCAGTTTGTGCAACCGTGCT
120  E F L R Y V I K S E S T L R N R D S H F K S M S S L C K P C
451 CAGTTCACATAATTTTCATTGGGAAGATGGAACCTTCGAAAGAGATGCCATAGTTTATTTTCATAAACTTGAATGAATTCCTTTGTAC
150  S V H Y N F I G K M E T F E R D A I V L F H K L G M N S F V
541 AAGCTATGAGCGACAAATTTACAGCATGTCGGTTTATGACGCCATTGTAGACAGCATTAATGACCATATCACTGGAATAAATCATTG
180  Q A M S D K F Y S M S V Y D A I V D S I N G P Y H W K I N I
631 ACCGCTGCATTCCATTGAACAGTCACAAAGAAGAGCCTGGCGCAAGCTTCAGCTAAAAGGTATTATAGCTATGACCCAGGGTTATCCAT
210  D R C I P F E Q S Q R R T W R K L Q L K G I I A M S Q G Y P
721 TTAAGAAGACGAAGTTTCAAATGAGACATTTATTCACGTGGCATGGAATGCGCATCAAAATTCATCTACGACGAAGTTAAAGCACAGA
240  F K E D E V S N E T F I H V A W N A H Q N S S T D E L K A Q
811 AGAATAAAGTAGCACAAGAAGCATTCATAGCGTTCCTTTACGAGATCTAGAACTCTTAAAGAATGTGTTCAAAGATGATTTACCATCT
270  K N K V A Q E A F H S V P L R D L E L F K N V F K D D F T I
901 TTGAATACGATGATACTCCTGAAGAATACTTTAATAGATCTCAAAAGTGCAGCCAGTTATTCAGTATTATCATTCAAAAACGTTTAAAT
300  F E Y D D T P E E Y F N R S Q K V Q P V I Q Y L S F K N V *
991 tactagtagacattctgttttagttccttttattgtacacattttctaagtcagaggagccgacaatatataatgatacatgtttaaattt
1081 tatatatattttacgtcgaaatatacatcggttctctagtccttttacaacgtatgctaattagaattcagaagaattgttttttaaaagtcac
1171 cgaatgagtcgaatataaggaacacttaaccagaaatcacatttctgatgtaatatccgtcaatcctccgacatcagtggtgagttttctgt
1261 gaagatttggcgtcttttagcaaaatctcgtcggctttgagcgtctagatttgttttaacagaaccttgcacgtttcgtgagatctt
1351 caccaataaaactccgtgcgaggactggtcatcgaactaatcaaaaggccaccataccctagtcctgttcaggtatattatccggtg
1441 gctccatgacatctcggccgttccgaggtctgcttaaatgcatactctgacatctctggagccctttccttaagctcttttgaacaaaaact
1531 accaagatgtctgaacattttcattttcctagacataattccctgcaatctttcaaacgaaattgaattgaaaactttaaggcactccac
1621 tgtatatgaagagggtgtgtcttaaacgtttcaagaatttgcgtccatattaaagaatcggttgtaacaccaagttctccaacaaagg
1711 tacctagaagcacttagcaataactgagccaaagatcttcacctaataatgccagtaaaactgtctatgtgtacgtcaactcttgacgtca
1801 tcttgcctgacaatgacacaaggcatcgcatcaactattaccgccacaaccaatgctatgatcagcagccactaatattactgtcatca
1891 ttgctactacctctactactcagatgctattaatccaaaaacttaagaagacgaagaagaagataggctgatgataatgacg
1981 atgaagatgataatgtcgactatgacaactacgttgttgatgatgacgatgatatctatgattggaaatatacattttctttgttttgg
2071 acgaatttagttaccatgtaaacacgttttaagcttttcggagctcgcgtttccaaaattatcttagctgatgggaatattgtata
2161 tatctggccataaaggacatggtgttttgattatcattagactattcattaaatcatagtcagccatgacgctggtacactgtc

```

图 1 *HcCHST11* 基因的 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列图

大写字母为 *HcCHST11* 基因的 ORF 序列及编码的氨基酸序列, 小写字母为 *HcCHST11* 基因的非编码区; 利用方框区分 ATG(起始密码子)和 TAA(终止密码子); 阴影部分编码 sulfotransfer-2 结构域。

Fig. 1 The cDNA sequence of *HcCHST11* gene and its encoding amino acid sequence

Capital letters are the CDS sequence of *HcCHST11* gene and the encoding amino acid sequence; The frames represent the ATG (initiator codon) and the TAA (the stop codon); The shaded part represents the sulfotransfer-2 domain.

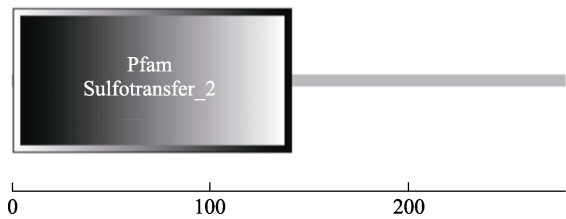


图 2 三角帆蚌 *HcCHST11* 结构域
Fig. 2 The *HcCHST11* structural domain of *Hyriopsis cumingii*

以斑马鱼(*Danio rerio*)、青鳉(*Oryzias latipes*)、智人(*Homo sapiens*)、热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*)和小家鼠(*Mus musculus*)为外群, 构建 *HcCHST11*

系统发育树(图 5)。结果显示以无脊椎动物和有脊椎动物分为两支。无脊椎动物中, 腹足纲的澳洲黑边鲍(*Haliotis rubra*)和枝角螺(*Physella acuta*), 而双壳纲聚为另一支。在双壳纲中斑马贻贝(*Dreissena polymorpha*)和硬壳蛤(*Mercenaria mercenaria*)先聚为一支, 再与菲律宾帘蛤(*Ruditapes philippinarum*)聚为一支, 最后与三角帆蚌聚成一支。三角帆蚌 *HcCHST11* 在生物进化中与淡水贝类斑马贻贝、和滩涂贝类菲律宾帘蛤、硬壳蛤亲缘性较近, 反映了双壳贝类从海生到陆生的演化过程。

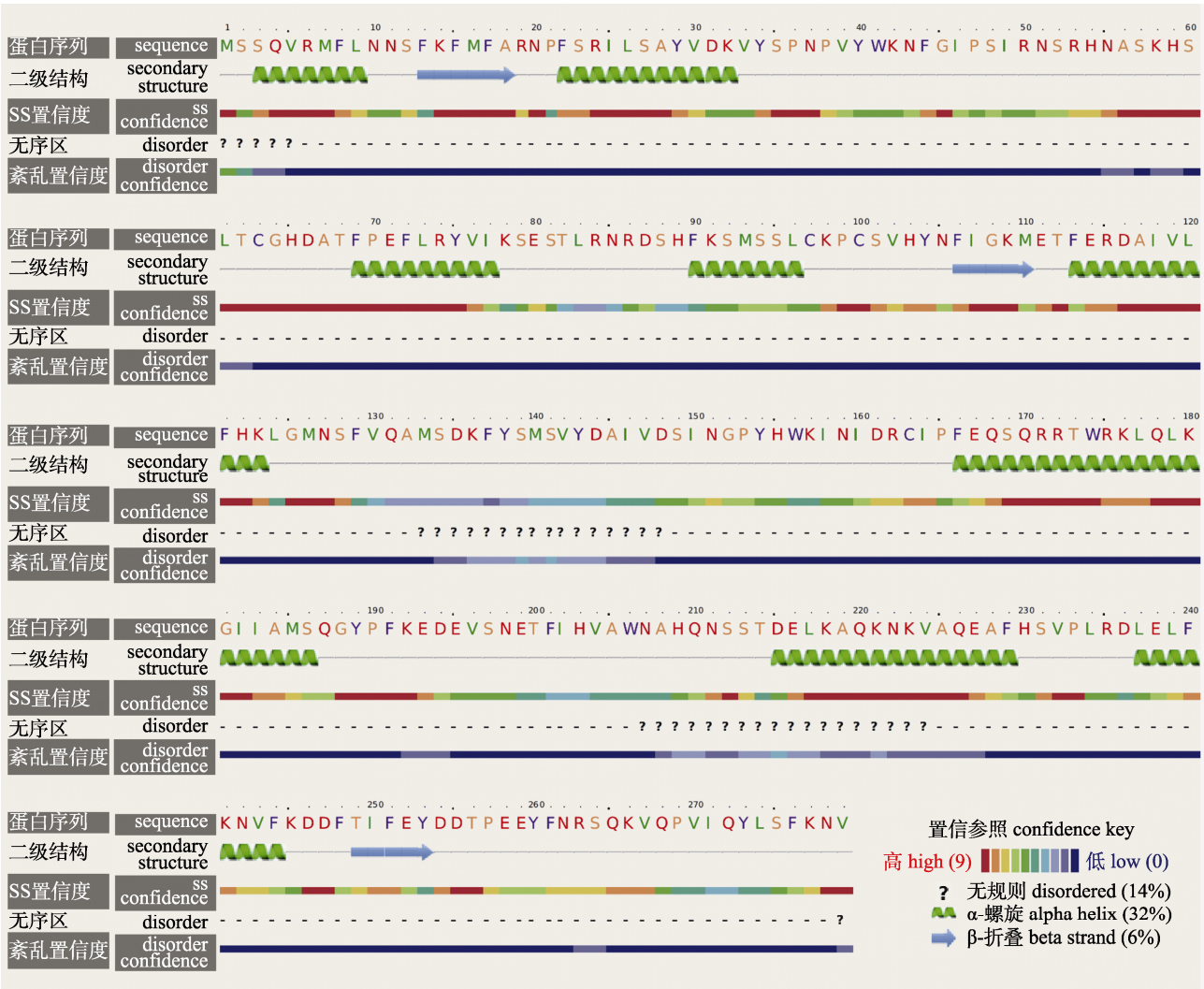


图 3 三角帆蚌 *HcCHST11* 二级结构

氨基酸基于性质着色: 极性的氨基酸为黄色, 疏水性的氨基酸为绿色, 荷电性的氨基酸为红色, 芳香性的氨基酸为紫色。
Fig. 3 *HcCHST11* secondary structure prediction of *Hyriopsis cumingii*
Amino acids are colored based on their properties: polar amino acids are yellow, hydrophobic amino acids are green, charged amino acids are red, and aromatic amino acids are purple.

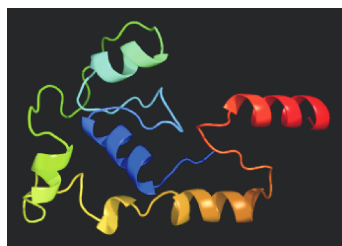
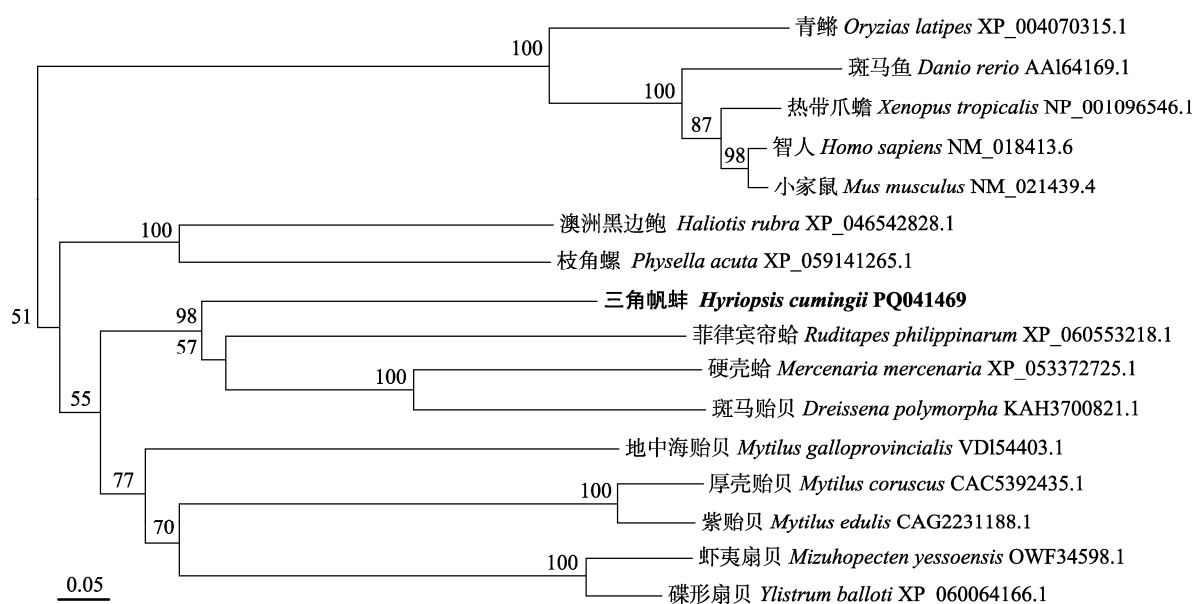
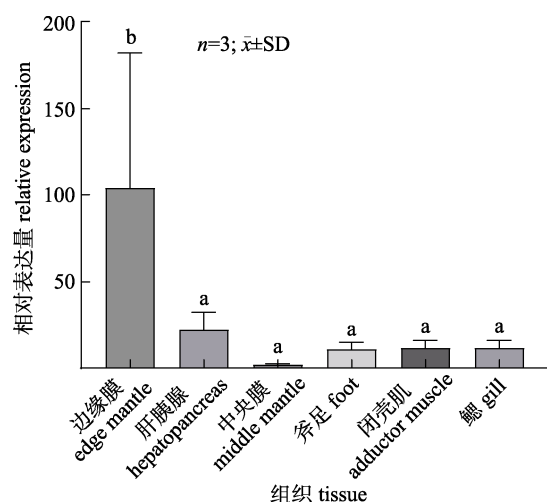


图 4 三角帆蚌 HcCHST11 高级结构

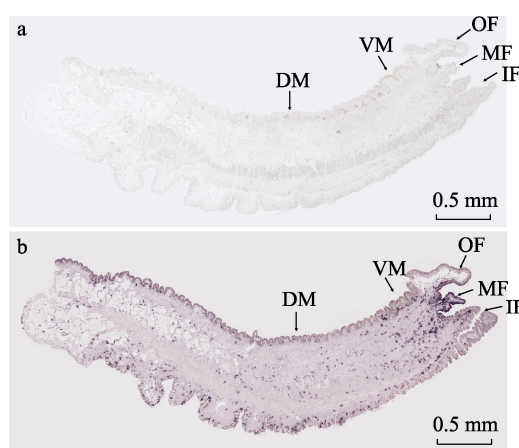
Fig. 4 Advanced structure of *Hyriopsis cumingii* HcCHST11

2.2 组织表达和原位杂交

根据 qRT-PCR 结果显示, *HcCHST11* 在三角帆蚌各组织中广泛表达, 但是在边缘膜中的表达量显著高于其他组织($P<0.05$)(图 6)。在外套膜组织进一步原位杂交实验, 结果表明, *HcCHST11* 在外套膜边缘广泛表达, 在外褶(OF)、中褶(MF)、中褶和内褶连接处阳性信号强烈(图 7)。

图 5 不同物种的 *CHST11* 基因氨基酸序列构建的 NJ 系统发育树Fig. 5 NJ phylogenetic tree constructed by amino acid sequence of *CHST11* gene from different species图 6 *HcCHST11* 在三角帆蚌各组织中的相对表达水平
柱形图上不同字母代表组织间差异显著($P<0.05$).Fig. 6 The relative expression level of *HcCHST11* in different tissues of *Hyriopsis cumingii*

Different letters on the bars represent significant difference between different tissues ($P<0.05$).

图 7 *HcCHST11* 基因在三角帆蚌边缘膜中的表达定位

a. 阴性对照; b. 阳性信号定位图; IF: 内褶; MF: 中褶; OF: 外褶; DM: 背膜区; VM: 腹膜区。

Fig. 7 Expression and localization of *HcCHST11* gene in *Hyriopsis cumingii* edge mantle

a. Negative control; b. Positive signal location map; IF: in fold; MF: mid fold; OF: outer fold; DM: dorsal mantle; VM: peritoneal mantle.

2.3 RNAi 干扰对贝壳形成的影响

注射干扰链后, qRT-PCR 结果显示: 空白组(PBS)与阴性对照组(*GFP*)无统计学差异, 而实验组的 *HcCHST11* 表达被抑制, 抑制率为 83.89%, 显著低于对照组($P<0.05$)(图 8)。SEM 扫描结果显示, 珍珠层文石小片在贝壳结构的阴性对照组(*GFP*)和空白组(PBS)排列整齐, 文石晶体表面光滑, 呈六面体, 而珍珠层晶体受干扰后抑制明显, 文石小片形状变得不规则, 一圈碳酸钙沉积物出现在文石小片的边缘。阴性对照组(*GFP*)和空白组(PBS)的新生贝壳的棱柱层结构中, 晶体排列整齐, 表面平滑, 形成蜂巢状, 并且各晶体间被有机鞘分隔开。沉默 *HcCHST11* 基因后, 棱柱层中的有机鞘明显变窄, 晶体表面粗糙有凸起, 晶体之间出现裂纹形成沟壑(图 9)。

3 讨论

3.1 磺基转移酶基因序列特征及系统进化分析

磺基转移酶是一类负责转运磺酸基团的蛋白家族。硫酸软骨素磺基转移酶(*CHST11*)是将磺酸基团转移到硫酸软骨素上的酶, 但是在哺乳动物研究广泛, 软体动物研究较少。本研究通过对三角帆蚌硫酸软骨素磺基转移酶(*HcCHST11*)序列和功能

分析, 探究三角帆蚌硫酸软骨素磺基转移酶基因在生物矿化过程中的作用。根据本实验室前期测序结果, 从数据库中获得 *HcCHST11* 序列。SMART 网站预测发现 *HcCHST11* 具有 Sulfotransfer_2 domain,

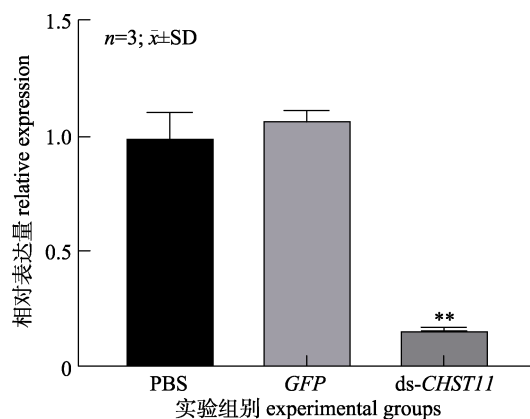


图 8 干扰实验三角帆蚌边缘膜中 *HcCHST11* 基因的相对表达

ds-*CHST11* 为注射 ds*HcCHST11* 干扰链的实验组、PBS 为注射磷酸盐缓冲溶液(PBS)的空白对照组以及 *GFP* 为注射 *GFP* 干扰链的阴性对照组, **表示组间显著差异($P<0.05$)。

Fig. 8 Expression of *HcCHST11* gene in the edge mantle of *Hyriopsis cumingii* in interference experiment ds-*CHST11* was the experimental group injected with ds*HcCHST11* interference chain, PBS was the blank control group injected with phosphate buffer solution (PBS), and *GFP* was the negative control group injected with *GFP* interference chain, ** indicated significant difference among groups ($P<0.05$).

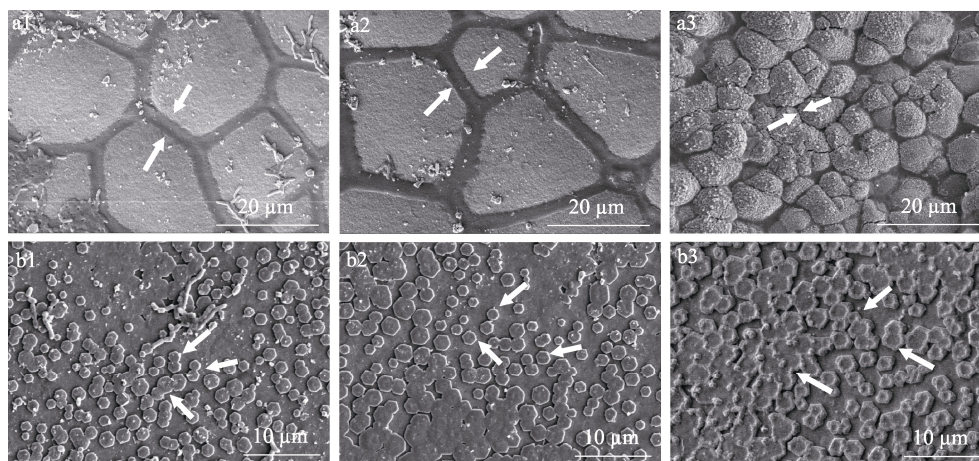


图 9 干扰实验不同处理组三角帆蚌珍珠层和棱柱层的扫描电镜图

a. 放大至 2000×的棱柱层图像; b. 放大至 3000×的珍珠层图像; 1. 阴性对照组(*GFP*); 2. 对照组(PBS); 3. 实验组(dsRNA-*CHST11*)。

Fig. 9 SEM images of the nacreous and prismatic layers of *Hyriopsis cumingii* in different treatment groups during interference experiment

a. Prismatic layer image magnified to 2000×; b. Nacreous layer magnified to 3000×; 1. Negative control group (*GFP*); 2. The control group (PBS); 3. The experimental group (dsRNA-*CHST11*).

该结构域为磺基转移酶结构域,这符合磺基转移酶的特征^[21-22]。系统发育树构建了 5 脊索动物门、2 个腹足纲和 11 个双壳纲动物的 *CHST11* 系统发育树,结果表明, *HcCHST11* 在淡水双壳贝中聚为一支,与传统分类一致。此外, *CHST11* 以软体动物和脊椎动物分为两个大支,说明软体动物的 *CHST11* 可能来自同一个祖先。

3.2 海水淡水珍珠贝间磺基转移酶基因组织表达模式差异

双壳贝的外套膜组织是生物矿化发生的重要部位,具有功能特异性,外套膜中央称为中央膜与珍珠层形成有关,而外套膜边缘称为边缘膜则与棱柱层形成有关^[23]。本研究组织表达分析发现, *HcCHST11* 具有显著的组织表达差异,在边缘膜中显著高表达,而在其他组织中表达量较低。这一结果与海水贝不同, *CHST11* 在海水贝中在中央膜高表达被认为是参与珍珠层的形成^[9], *HcCHST11* 在三角帆蚌外套膜中的表达模式,则可能是主要参与棱柱层的形成,同时又对珍珠层形成有一定的影响,这可能是淡水贝外套膜和海水贝外套膜的基因表达模式具有差异性。进一步表达定位分析, *HcCHST11* 基因在边缘膜广泛表达,但是阳性信号富集在外褶、中褶、中褶和内褶连接处。研究表明,边缘膜由腹膜区、背膜区、外褶、中褶和内褶组成,不同的部分具有不同的功能。外褶被认为是分泌矿化基质,参与棱柱层形成的主要区域,而中褶及中褶和内褶连接处被认为参与编码多糖和形成角质层^[24]。已有研究表明与壳形成有关的三角帆蚌转凝蛋白类蛋白(*Hc-transgelin*)基因在外褶信号强烈,进一步验证发现影响棱柱层的有机鞘的形成^[25];双壳贝的角质层是动态结构,允许钙化形成保护外壳,为矿化提供的支撑点和划定封闭的矿化空间,而阿尔新蓝可与磺酸基团显蓝色信号,被发现富集在角质层^[26]。 *CHST11* 被证实是合成硫酸软骨素的关键酶,骨形态发生蛋白(*BMP4*)与硫酸软骨素结合紧密,而沉默 *Wnt9A* 会增加 *CHST11* 和 *BMP4* 的表达^[27];同时 *CHST11* 影响骨关节炎易感性和软骨形成^[28]。通过分析三角帆蚌外套膜中 *HcCHST11* 基因的表达模式,发现与

海水贝表达模式存在差异,推测 *HcCHST11* 不仅参与角质层和棱柱层的形成,而且可能对珍珠层形成具有重要影响。

3.3 磺基转移酶基因对贝类矿化的影响

为了进一步挖掘 *HcCHST11* 基因对贝壳矿化的影响,通过干扰 *HcCHST11* 基因表达,借助扫描电镜观察矿化层的变化。本研究发现,干扰 *HcCHST11* 基因后,实验组表达量显著受到抑制 ($P<0.05$),扫描电镜结果显示棱柱层和珍珠层晶体形态紊乱。这一结果与马氏珠母贝的干扰实验一致^[9]。研究表明,磺酸基团带负电荷,通过富集 Ca^{2+} 促进碳酸钙的成核与生长,在生物矿化,成骨细胞分化和促进体外骨组织修复发挥方面重要作用^[29-30]。由此推测当三角帆蚌体内 *HcCHST11* 的基因表达被沉默后,硫酸软骨素磺基转移酶的功能受到抑制,进而三角帆蚌体内的磺酸基团丰度降低,从而影响三角帆蚌新壳矿化层碳酸钙的堆积,导致棱柱层和珍珠层的晶体形态紊乱。综上所述, *HcCHST11* 基因通过影响矿化层的碳酸钙堆积,对贝壳生成具有重要的影响。

贝壳的生物矿化是由蛋白质和多糖等有机大分子参与的复杂的反应。白志毅等^[3]总结了基质蛋白对贝壳的形成具有重要的调控作用:三角帆蚌低复杂结构域蛋白质(*LCDP*)基因表达被抑制后,碳酸钙晶体减少导致棱柱层更粗糙^[31];同样三角帆蚌转凝蛋白类蛋白(*Hc-transgelin*)基因被抑制后,棱柱层有基鞘出现裂纹^[25]。然而本研究在未影响基质蛋白正常表达的基础上,干扰多糖合成酶基因的表达,结果与基质蛋白研究结果高度相似,推测在三角帆蚌中,多糖生物矿化调控与基质蛋白生物矿化调控具有协同作用。同时, *HcCHST11* 虽然在中央膜低表达,但是当 *HcCHST11* 基因表达受到干扰时仍然影响珍珠层的形成,说明在三角帆蚌生物矿化过程, *HcCHST11* 的表达受到精密调控。

4 结论

本文研究了三角帆蚌 *HcCHST11* 的表达模式,并通过抑制 *HcCHST11* 基因的表达探究该基因对

三角帆蚌贝壳形成过程的影响。*HcCHST11* 基因在边缘膜高表达并且在边缘膜的外褶、中褶、中褶和内褶连接处阳性信号富集,表明该基因参与了棱柱层和角质层的形成;尽管 *HcCHST11* 在中央膜处于低表达水平,但当RNAi干扰*HcCHST11*表达后,新壳表面棱柱层和珍珠层的矿化结构均发生紊乱,因此可推断*HcCHST11*全面参与了包括角质层、棱柱层和珍珠层的贝壳整体结构形成,为贝壳生物矿化的关键基因。然而,关于*HcCHST11*基因具体调控贝壳矿化的机制尚不明确,需进一步研究。

参考文献:

- [1] Li J L, Wang D F, Bai Z Y, et al. Report on the development of freshwater pearl culture industry in China[J]. China Fisheries, 2019(3): 23-29. [李家乐, 王德芬, 白志毅, 等. 中国淡水珍珠养殖产业发展报告[J]. 中国水产, 2019(3): 23-29.]
- [2] Gao J P, Li J L, Bai Z Y. Correlation and path analysis between the quality of nucleated pearls from the mantle of *Hyriopsis cumingii* and the growth traits of host mussels[J]. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(5): 204-212. [高金平, 李家乐, 白志毅. 三角帆蚌外套膜有核珍珠质量与育珠蚌生长性状相关和通径分析[J]. 渔业科学进展, 2024, 45(5): 204-212.]
- [3] Bai Z Y, Yuan L, Liu X J, et al. Research progress of matrix proteins in *Hyriopsis cumingii*[J]. Journal of Fisheries of China, 2021, 45(6): 982-991. [白志毅, 袁立, 刘晓军, 等. 三角帆蚌贝壳基质蛋白研究进展[J]. 水产学报, 2021, 45(6): 982-991.]
- [4] Liu X J, Dong S J, Jin C, et al. Silkmapin of *Hyriopsis cumingii*, a novel silk-like shell matrix protein involved in nacre formation[J]. Gene, 2015, 555(2): 217-222.
- [5] Jin C, Zhao J Y, Liu X J, et al. Expressions of shell matrix protein genes in the pearl sac and its correlation with pearl weight in the first 6 months of pearl formation in *Hyriopsis cumingii*[J]. Marine Biotechnology, 2019, 21(2): 240-249.
- [6] Jin C, Li J L, Liu X J. Teosin, a novel basic shell matrix protein from *Hyriopsis cumingii* induces calcium carbonate polycrystal formation[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 150: 1229-1237.
- [7] Xia Z H. Cloning and functional analysis of three shell matrix protein genes from *Hyriopsis cumingii*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019. [夏中慧. 三角帆蚌3个贝壳基质蛋白基因的克隆及功能分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.]
- [8] Gu Z F, Yin X L, Yu C C, et al. Expression profiles of nine biomineralization genes and their relationship with pearl nacre thickness in the pearl oyster, *Pinctada fucata martensii* dunker[J]. Aquaculture Research, 2016, 47(6): 1874-1884.
- [9] Hao R J. Cloning and Function Analysis of Sulfotransferase Genes in *Pinctada fucata martensii*[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2016. [郝瑞娟. 马氏珠母贝磺基转移酶基因的克隆及功能分析[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2016.]
- [10] Negishi M, Pedersen L G, Petrotchenko E, et al. Structure and function of sulfotransferases[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2001, 390(2): 149-157.
- [11] Klüppel M. The roles of chondroitin-4-sulfotransferase-1 in development and disease[J]. Progress in Molecular Biology and Translational Science, 2010, 93: 113-132.
- [12] Izumikawa T, Dejima K, Watamoto Y, et al. Chondroitin 4-O-sulfotransferase is indispensable for sulfation of chondroitin and plays an important role in maintaining normal life span and oxidative stress responses in nematodes[J]. Journal of Biological Chemistry, 2016, 291(44): 23294-23304.
- [13] Nadanaka S, Kinouchi H, Kitagawa H. Chondroitin sulfate-mediated N-cadherin/ β -catenin signaling is associated with basal-like breast cancer cell invasion[J]. Journal of Biological Chemistry, 2018, 293(2): 444-465.
- [14] Cooney C A, Jousheghany F, Yao-Borengasser A, et al. Chondroitin sulfates play a major role in breast cancer metastasis: A role for *CSPG4* and *CHST11* gene expression in forming surface P-selectin ligands in aggressive breast cancer cells[J]. Breast Cancer Research, 2011, 13(3): Article No. R58.
- [15] Klüppel M, Wight T N, Chan C, et al. Maintenance of chondroitin sulfation balance by chondroitin-4-sulfotransferase 1 is required for chondrocyte development and growth factor signaling during cartilage morphogenesis[J]. Development, 2005, 132(17): 3989-4003.
- [16] Fukui N, Zhu Y, Maloney W J, et al. Stimulation of *BMP-2* expression by pro-inflammatory cytokines *IL-1* and *TNF- α* in normal and osteoarthritic chondrocytes[J]. Journal of Bone & Joint Surgery, 2003, 85(3): 59-66.
- [17] Blaney Davidson E N, Vitters E L, Van Lent P L E M, et al. Elevated extracellular matrix production and degradation upon bone morphogenetic protein-2 (*BMP-2*) stimulation point toward a role for *BMP-2* in cartilage repair and

- remodeling[J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2007, 9(5): Article No. R102.
- [18] 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.
- [19] Xie J M, Chen Y R, Cai G J, et al. Tree Visualization By One Table (tvBOT): A web application for visualizing, modifying and annotating phylogenetic trees[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(W1): W587-W592.
- [20] Yan F, Luo S J, Jiao Y, et al. Molecular characterization of the *BMP7* gene and its potential role in shell formation in *Pinctada martensii*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(11): 21215-21228.
- [21] Zhang L, Shi R X, Ouyang H F, et al. Cloning and characterization of *chst11* from *Procambarus clarkii* involved in the host immune response of white spot syndrome virus and *Aeromonas hydrophila*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 102: 82-91.
- [22] Wang Q H, Yang C Y, Hao R J, et al. Molecular characterization of *CHST11* and its potential role in nacre formation in pearl oyster *Pinctada fucata martensii*[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2017, 28: 113-119.
- [23] Marin F, Le Roy N, Marie B. The formation and mineralization of mollusk shell[J]. *Frontiers in Bioscience*, 2012, 4(3): 1099-1125.
- [24] Gardner L D, Mills D, Wiegand A, et al. Spatial analysis of biomineralization associated gene expression from the mantle organ of the pearl oyster *Pinctada maxima*[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: Article No.455.
- [25] Yuan Y B, Hu H H, Li J L, et al. *Hc-transgelin* is a novel matrix protein gene involved in the shell biomineralization of triangle sail mussel (*Hyriopsis cumingii*)[J]. *Aquaculture and Fisheries*, 2024, 9(4): 543-550.
- [26] Marxen J C, Hammer M, Gehrke T, et al. Carbohydrates of the organic shell matrix and the shell-forming tissue of the snail *Biomphalaria glabrata* (say)[J]. *Biological Bulletin*, 1998, 194(2): 231-240.
- [27] Bhattacharyya S, Feferman L, Tobacman J K. Regulation of chondroitin-4-sulfotransferase (CHST11) expression by opposing effects of arylsulfatase B on BMP4 and Wnt9A[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 2015, 1849(3): 342-352.
- [28] Reynard L N, Ratnayake M, Santibanez-Koref M, et al. Functional characterization of the osteoarthritis susceptibility mapping to *CHST11*—A bioinformatics and molecular study[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0159024.
- [29] Salbach J, Rachner T D, Rauner M, et al. Regenerative potential of glycosaminoglycans for skin and bone[J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2012, 90(6): 625-635.
- [30] Hao J X, Wan Q Q, Mu Z, et al. A seminal perspective on the role of chondroitin sulfate in biomineralization[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2023, 310: 120738.
- [31] Yuan Y B, Hu H H, Zhong J Y, et al. Low-complexity domain-containing protein (LCDP), induced accumulation of calcium carbonate individual crystals to irregular polycrystals in the triangle sail mussel *Hyriopsis cumingii*[J]. *Gene*, 2023, 859: 147216.

Expression characteristics of the carbohydrate sulfotransferase 11 gene *HcCHST11* and its effects on shell formation in *Hyriopsis cumingii*

LU Tingting¹, WANG Zhiyan¹, ZHANG Yao¹, HU Honghui¹, CHEN Yang¹, BAO Quanzhi¹, BAI Zhiyi^{1,2,3}

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

Abstract: The negative charge of sulfotransferase can enrich Ca^{2+} and promote the nucleation and growth of calcium carbonate crystals by increasing the level of sulfation and transferring exogenous sulfonic acid groups to polysaccharide chains. Although the pearl yield of *Hyriopsis cumingii* is very high, the overall quality of its pearls is still different from that of seawater pearls produced abroad, which is one of the main problems that remain to be addressed in pearl culture industry. Organic macromolecules such as proteins, polysaccharides, and lipids play an important role in the process of shell biomineralization, collectively referred to as shell organic matrices. In recent years, research on the biomineralization mechanism in *H. cumingii* has mainly focused on the functionalities of matrix proteins, whereas the roles of polysaccharides and their respective synthesis enzymes in the biomineralization of *H. cumingii* remain to be elucidated. The main component of shells is calcium carbonate, which is similar to that of pearls. Thus, studying the effects of sulfotransferase on the formation of *H. cumingii* shells may help improve freshwater pearl quality. In this study, the sequence characteristics of the sulfotransferase gene *HcCHST11* in *H. cumingii* were analyzed, and the potential functions of this gene in shell formation were further explored using real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR), *in situ* hybridization (ISH), and RNAi and scanning electron microscopy (SEM) detection techniques. The results showed that the *HcCHST11* gene open reading frame (ORF) was 840 bp long and encoded 279 amino acids, containing 1 sulfotransferase domain. The tissue expression specificity analysis found that *HcCHST11* was highly expressed in the edge mantle. The *in situ* hybridization results showed that the positive signals were strong in the outer fold (OF), middle fold (MF), and at the connection between the middle fold and the inner fold. After interfering with *HcCHST11*, the expression of *HcCHST11* in the edge mantle was significantly downregulated ($P < 0.05$). Seven days after interference, SEM detection showed that the shape of the pearl layer's aragonite platelets became irregular, and carbonate deposits appeared on the edge. The organic sheath of the prism layer became significantly narrower, the crystal surface was rough and protruded, and cracks formed between the crystals. Functional characterization demonstrates that *HcCHST11* serves as a master regulator in shell biomineralization, orchestrating the development of multilayered shell structures (periostracum, prismatic, and nacreous layers) via sulfate-dependent modulation of organic-inorganic interfaces. However, the specific mechanism by which *HcCHST11* regulates shell mineralization remains unclear and needs further investigation. The precise mechanism through which the *HcCHST11* gene governs shell mineralization remains undefined, and further exploration is indispensable.

Key words: *Hyriopsis cumingii*; carbohydrate sulfotransferase; gene expression; crystal morphology; biomineralization

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