

DOI: 10.12264/JFSC2024-0336

近江牡蛎 *AGL* 基因的分子特征及其在糖原分解中的作用

赵丽艳^{1,2,3}, 李转转^{2,3}, 马培振^{2,3}, 刘志鸿^{2,3}, 孙秀俊^{2,3}, 周丽青^{2,3}, 吴彪^{2,3}

1. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;
2. 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室(中国水产科学研究院黄海水产研究所), 山东 青岛 266071;
3. 青岛海洋科技中心海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266237

摘要: 糖原是影响牡蛎品质的关键指标, 而糖原脱支酶(AGL)在糖原分解过程中发挥重要作用。为明确 *AGL* 基因对近江牡蛎(*Crassostrea ariakensis*)糖原代谢的影响, 本研究在分析 *AGL* 基因序列特征和进化特点基础上, 体外构建含有该基因的质粒并转化到 HT115 (DE3) 大肠杆菌(*Escherichia coli*)中, 使其表达 *AGL* 基因的双链 RNA (dsRNA), 通过饲喂该菌株实现 RNA 干扰, 并对干扰前后近江牡蛎 *AGL* 基因表达量和糖原含量的相关性进行了研究。结果表明, *AGL* 基因编码区序列长度为 4719 bp, 编码 1572 个氨基酸, 含 4 个结构域, 预测蛋白分子量为 178.23 kDa, 理论等电点为 6.21, 基因进化关系与物种传统分类关系一致; RNA 干扰 15 d 和 30 d, 与对照组(饲喂含 *EGFP* dsRNA 的大肠杆菌)相比, 实验组(饲喂含 *AGL* dsRNA 的大肠杆菌)牡蛎的 *AGL* 基因表达量均显著降低($P < 0.05$), 糖原含量显著升高($P < 0.05$), 干扰 *AGL* 基因能够显著影响糖原水平的变化; 干扰 30 d, 实验组和对对照组牡蛎 *AGL* 表达量比干扰 15 d 时均显著增加($P < 0.05$), 糖原含量显著降低($P < 0.05$), 这可能是由于此时期性腺发育需要消耗糖原; 同时, 进一步的相关性分析结果表明, *AGL* 基因表达量与糖原含量呈显著负相关关系($P < 0.05$)。本研究明确了近江牡蛎 *AGL* 基因序列结构特征以及其表达量与糖原含量的相关性, 丰富了 *AGL* 基因功能研究的科学数据, 为深入研究牡蛎糖原代谢的分子机制提供了参考。

关键词: 近江牡蛎; *AGL* 基因; 糖原分解; RNA 干扰; 糖原含量

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2025)04-0435-10

近江牡蛎(*Crassostrea ariakensis*)隶属于双壳纲(Bivalvia)、珍珠贝目(Pterioidea)、牡蛎科(Ostreidae)、巨牡蛎属(*Crassostrea*), 具有较强的温度、盐度适应能力, 多栖息在盐度 10~25 的河口区, 主要分布于中国、朝鲜、韩国、日本、越南等海域, 在我国北至中朝边境的蜆子江、南至海南岛的沿海广泛分布^[1]。近江牡蛎是我国五大经济养殖牡蛎之一, 不仅具有重要的经济价值, 同时在近海环境系统中还具有重要的生态服务功能。

糖原是几乎存在于所有生物体中的一种支链葡萄糖聚合物, 在机体中行使多种生理学功能, 如能量存储、信号转导、氧化还原调节等^[2]。在海洋贝类中, 其糖原的含量和变化是评估贝类生理状况和营养品质的重要指标。牡蛎含有丰富的糖原、脂质和蛋白质等多种营养物质^[3], 其中糖原是影响其风味的重要营养成分^[4], 是判断牡蛎品质性状的重要标准。据已有的相关报道, 牡蛎软体部糖原含量多在 20%~50%之间^[5-6], 而近江牡蛎性腺组织糖原含量(干重)最高可达到

收稿日期: 2024-11-08; 修订日期: 2024-12-31.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFD2400105); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(20603022024002); 山东省重点研发计划项目(2022CXPT002); 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室开放课题(BRESG202302); 中国博士后科学基金资助项目(2024M753625); 山东博士后科学基金资助项目(SDCX-2G-202400100).

作者简介: 赵丽艳(1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向为贝类种质资源与遗传育种. E-mail: zliyan202212@163.com

通信作者: 吴彪, 研究员, 研究方向为贝类种质资源与遗传育种. E-mail: wubiao@ysfri.ac.cn

674.36 mg/g^[1]。此外,糖原是牡蛎配子发生的主要能量来源^[7],在性腺组织中的变化最为明显,随性腺发育呈现季节性变化,在性腺形成期和增殖期含量较高,在成熟期糖原含量显著降低^[8-10]。然而目前对牡蛎糖原代谢分子机制的研究比较匮乏,学者前期完成了高低糖原近江牡蛎的多组学分析,发现多个基因与糖原含量有关,例如糖原脱支酶基因(glycogen debranching enzyme gene, *AGL*)、糖原磷酸化酶 B 基因(glycogen phosphorylase B, *PYGB*)和己糖激酶 2 亚型 X1 基因(hexokinase-2 isoform X1, *HEX-t2*)等等^[10]。糖原脱支酶作为糖原降解途径中关键的酶,其基因表达水平直接影响糖原含量^[10]。*AGL* 基因与糖原分解直接相关且在高糖原(形成期)牡蛎中表达活跃,此时糖原分解活动强烈^[10]。在人类中,*AGL* 基因与糖原分解及糖原含量有关^[11]。在大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)的研究中发现,低蛋白高淀粉喂养导致 *AGL* 基因表达下调进而引发糖原的积累^[12]。此外,在皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)中,观察到 *AGL* 基因的表达量与糖原含量呈负相关,同时揭示了该基因的多态性与鲍体内糖原含量密切相关^[13]。这些发现进一步证实了 *AGL* 基因在糖原分解中的重要性。目前,国内外对于牡蛎糖原代谢的研究多集中于糖原含量变化及其与性腺发育^[9]和环境因子的关系上^[14-15],对于糖原代谢过程中关键酶的基因功能研究较少。因此,探究近江牡蛎 *AGL* 基因的功能,对于理解贝类糖原代谢的分子调控机制具有重要意义。

本研究分析了近江牡蛎 *AGL* 基因 cDNA 序列和基因进化特征,并利用投喂菌藻混合液的方法进行 RNA 干扰实验,研究其干扰前后 *AGL* 基因表达与糖原含量变化情况,阐明该基因在近江牡蛎糖原代谢过程中的关键作用,以丰富贝类糖原含量性状调控机制方面的基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物

2024 年 4 月,随机选取 110 枚课题组培育的速生、糖原含量高的近江牡蛎新品系开展相关实验,其壳高为(88.76±9.81) mm,壳长为(65.58±

7.97) mm。取 20 枚个体作为空白组,解剖获得性腺并保存于-80 ℃,用于 RNA 提取、基因表达量和糖原含量测定,并分析 *AGL* 基因表达量和糖原含量相关性;其余 90 枚近江牡蛎进行 RNA 干扰(RNAi)实验。实验前,牡蛎在温度为 14 ℃的海水中暂养 7 d,期间每天投喂等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)和亚心形扁藻(*Platymonas subcordiformis*)3 次,换水 1 次,换水量为 1/2。

1.2 RNA 提取与反转录

使用 FreeZol Reagent (诺唯赞,中国)试剂盒按照说明书要求提取牡蛎的性腺组织总 RNA。利用琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, 美国)检测 RNA 质量,用无菌水将高质量的 RNA 样品浓度稀释至 1000 ng/μL。参照说明书步骤,利用反转录试剂盒 HiScript[®] III 1st Strand cDNA Synthesis Kit with gDNA wiper (诺唯赞,中国)将 RNA 反转录为 cDNA,保存在-20 ℃备用。

1.3 *AGL* 基因序列分析

在课题组前期已有的近江牡蛎基因组(GCA_020458035.1)和性腺转录组^[10]数据中查找获得 *AGL* 基因的 CDS 序列并进行分析。分别利用 SignalP-5.0 Server (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>)预测信号肽,Cell-PLoc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>)进行亚细胞定位,ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>)分析蛋白理化性质,SMART (<https://smart.embl.de/>)分析基因结构和功能域,SOPMA (https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_a_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)和 Swiss-model (<https://www.swissmodel.expasy.org/>)分别预测蛋白二级结构和蛋白质三级结构,NCBI 的 BLAST 程序进行碱基序列同源性比对分析和相似蛋白质序列搜索,MEGA 11.0 软件以邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统进化树。

1.4 dsRNA 获得与 RNAi 实验

本研究利用含有两个相反方向 T7 聚合酶启动子的 L4440 质粒,构建双链 RNA(ds RNA)表达载体并转化至 HT115(DE3)大肠杆菌(*Escherichia coli*)中,诱导菌株批量产生 dsRNA。

dsRNA 获得: (1)利用 NCBI 网站在线设计近

江牡蛎 *AGL* 基因部分 CDS 区(扩增区: 1724 bp~2354 bp)的扩增引物, 并在两条引物的 5'端分别添加限制性内切酶 *Sal* I 和 *Acc*65 I 的酶切位点(序列如表 1); 通过 PCR 技术扩增该片段, 并利用 DNA 凝胶回收试剂盒(擎科生物, 中国)回收。(2)利用 *Sal* I 和 *Acc*65 I 双酶切 L4440 质粒, 使用 ClonExpress® II One Step Cloning Kit (诺唯赞, 中国)连接目的片段, 构建载体, 并将载体转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞(诺唯赞, 中国)中, 在含氨苄青霉素的 LB 平板上培养菌株, 并挑选阳性菌落进行测序。(3)利用 Plasmid Mini Kit I (Omega Bio-Tek, 美国)提取含有目的片段的质粒, 并将其转化至不含 dsRNA 内切酶的 HT115 (DE3)感受态细胞中, 用 LB 液体培养基将其培养至 OD₅₉₅=0.4。(4)用浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG 在 37 °C、160 r/min 条件下诱导菌体 4 h 产生 dsRNA, 利用琼脂糖凝胶电泳检测确认成功诱导。实验以牡蛎缺少的增强型绿色荧光蛋白基因(*EGFP*)作为阴性对照基因, 同上述方法诱导获得对照基因的 dsRNA。

RNAi 实验: 离心获得 IPTG 诱导的菌体, 并以 100 : 1 的比例将其与单细胞藻(等鞭金藻和亚心形扁藻)混合形成菌藻混合液, 将 90 枚近江牡蛎分为对照组和实验组, 每组设置 3 个平行, 每个平行放置 15 枚牡蛎。每天 14:00 投喂近江牡蛎菌藻混合液实现 RNA 干扰。对照组饲喂含 *EGFP*dsRNA 的菌藻混合物, 实验组饲喂含 *AGL*

dsRNA 的菌藻混合物。在 8:00 和 20:00 正常投喂单胞藻。在干扰第 15 天和第 30 天每组分别取 6 枚牡蛎的性腺组织, 保存于-80 °C 备用。同时取对照组部分性腺组织, 用 4%多聚甲醛溶液固定以备用于制备组织切片。

1.5 近江牡蛎性腺发育阶段确定

利用组织切片确定实验过程中性腺组织的发育情况, 步骤如下: 将固定于 4%多聚甲醛溶液中的性腺组织, 用梯度酒精脱水, 使用二甲苯透明; 随后, 将组织包埋在石蜡中, 并切成 4 μ m 的切片; 脱蜡后, 用苏木精染色并用伊红复染; 最后, 以中性树胶封片; 随后使用数字切片扫描仪 (Pannoramic MIDI II, 匈牙利)扫描切片, 并使用 SlideViewer (V2.5.0.143918)观察并拍照记录。

1.6 基因表达量和糖原含量测定

以 β -actin 作为内参基因, 利用反转录实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术测定基因表达情况, 引物如表 1 所示。使用 SYBR Green Pro Taq Hs 预混型 qPCR 试剂盒(艾科瑞生物, 中国)在 CFX 96(Bio-rad, 美国)上进行 qRT-PCR 反应, 反应体系为: 2 $\times$ SYBR Green Pro Taq HS Premix 5 μ L, 正反向引物各 0.2 μ L, cDNA 模板 1 μ L, RNase Free H₂O 3.6 μ L。反应条件为: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。每个 qRT-PCR 实验进行 3 个重复, 采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t}法计算基因的相对表达量。

采用微量蒽酮比色法测定性腺组织的糖原含量^[16]。每个样品重复测量 3 次。

表 1 实验所用的引物序列
Tab. 1 Primer sequences required for the experiment

引物名称 primer name	序列 (5'-3') sequence (5'-3')	实验 experiment
RNAi- <i>AGL</i> - <i>Sal</i> I	AAGCTTATCGATACCGTCGACTCTTCACAGGGAGTGAGTGTGTGG	构建载体 construct vector
RNAi- <i>AGL</i> - <i>Acc</i> 65I	CTATAGGGCGAATTGGGTACCGTTAGAGGTCTGATGTAGCCAGTTTC	构建载体 construct vector
<i>EGFP</i> -F- <i>Sal</i> I	AAGCTTATCGATACCGTCGACGACGTAAACGGCCACAAGTT	构建载体 construct vector
<i>EGFP</i> -R- <i>Acc</i> 65I	CTATAGGGCGAATTGGGTACCGTTCTGCTGGTAGTGGTCGGC	构建载体 construct vector
<i>AGL</i> -F	CCAAGGACTGCCCCGTATCTG	反转录实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)
<i>AGL</i> -R	CCAGCATGTACTCTGCCACA	反转录实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)
β -actin-F	CTGTGCTACGTTGCCCTGGACTT	反转录实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)
β -actin-R	TGGGCACCTGAATCGCTCGTT	反转录实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

1.7 数据处理

利用 SPSS 26 分析 *AGL* 基因表达量与糖原含量的相关性, Graphpad Prism 9.5 绘制相关性散点图。数据以平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示, 采用 SPSS 26 进行独立样本 *T* 检验, 设置 $P < 0.05$ 时差异显著。

2 结果与分析

2.1 *AGL* 基因序列及进化特征

AGL 基因的 CDS 序列长度为 4719 bp, 编码 1572 个氨基酸, 蛋白无信号肽, 亚细胞定位显示其存在于细胞质中。预测的蛋白质分子质量为 178.23 kDa, 理论等电点为 6.21, 分子式为 $C_{8009}H_{12282}N_{2166}O_{2327}S_{65}$, 脂溶系数为 80.75, 平均亲水系数 (GRAVY) 为 -0.374, 不稳定系数为 $33.42 < 40.00$, 说明 *AGL* 基因编码产物为亲水性稳定蛋白。*AGL* 存在 4 个结构域(图 1b), 分别为 *AGL*-N-末端结构域(氨基酸 30~122), *AGL*-葡聚糖转移酶催化结构域(氨基酸 138~570), *AGL*-中心结构域(氨基酸 715~988), *AGL*-C-末端结构域(氨基酸 1055~1542)。利用 Swiss-model 在线网站预

测了三维结构(图 1a), 发现 *AGL* 蛋白序列与同源模板的相似性为 97.07%, GMQE 为 0.66, 结果说明该蛋白与模板蛋白的匹配度较高, 其中 40.46%呈 α -螺旋, 11.32%呈 β -折叠, 48.22%呈无规则卷曲。

AGL 序列比对发现, 近江牡蛎与福建牡蛎(*C. angulata*)序列相似性最高, 为 97.26%, 其次是长牡蛎(*C. gigas*)为 96.88%; 与美洲牡蛎(*C. virginica*)和欧洲扁牡蛎(*Ostrea edulis*)的相似性相近, 分别为 88.68%和 84.49%; 与虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)、紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)、硬壳蛤(*Mercenaria mercenaria*)、加州海兔(*Haliotis rubra*)的相似性较低, 在 57.42%~63.38%范围内; 与斑马鱼(*Danio rerio*)等鱼类、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)等两栖动物、智人(*Homo sapiens*)等哺乳动物的同源性相近且最低, 为 49.59%~50.19% (表 2)。系统进化树如图 2 所示, 近江牡蛎先与福建牡蛎、长牡蛎聚为一支, 然后再逐步与美洲牡蛎、欧洲扁牡蛎、虾夷扇贝和紫贻贝等贝类聚为一支, 与鱼类、两栖类和哺乳动物的聚类距离较远。

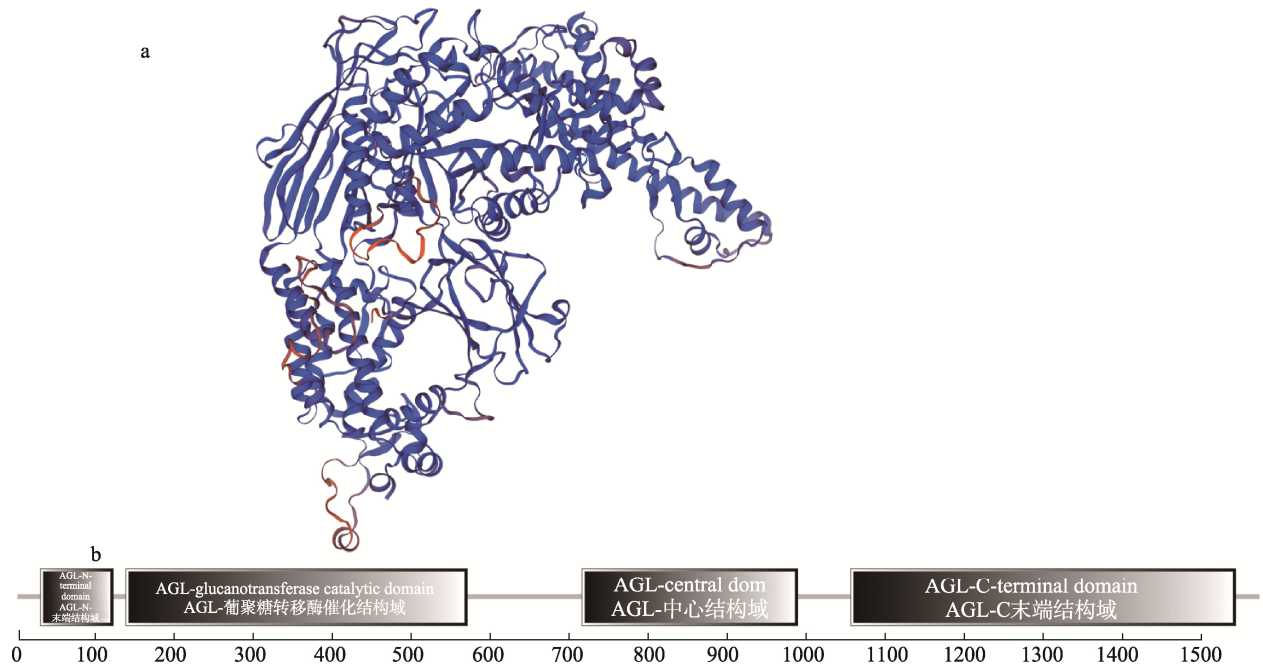


图 1 *AGL* 蛋白质三级结构及结构域预测

a. *AGL* 蛋白质三级结构预测; b. *AGL* 蛋白质结构域预测.

Fig. 1 Prediction of tertiary structure and domain of *AGL* protein

a. *AGL* protein tertiary structure prediction; b. *AGL* protein domain prediction.

表 2 不同物种 *AGL* 氨基酸序列号与同源性
Tab. 2 *AGL* amino acids sequences numbers and identity of different species

物种名 species name	GenBank 登录号 GenBank access number	同源性/% homology
福建牡蛎 <i>Crassostrea angulata</i>	XP_052685139.1	97.26
长牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>	XP_034313713.2	96.88
美洲牡蛎 <i>Crassostrea virginica</i>	XP_022315798.1	88.68
欧洲扁牡蛎 <i>Ostrea edulis</i>	XP_056019966.1	84.49
虾夷扇贝 <i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021377015.1	63.38
紫贻贝 <i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDI24190.1	62.47
硬壳蛤 <i>Mercenaria mercenaria</i>	XP_053393789.1	58.90
加州海兔 <i>Haliotis rubra</i>	XP_046544672.1	57.42
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	NP_001166124.1	50.19
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	XP_042573998.1	49.59
半滑舌鳎 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	XP_008333011.1	49.62
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	XP_041417474.1	50.13
平原旱掘蟾 <i>Spea bombifrons</i>	XP_053324912.1	50.00
中华大蟾蜍 <i>Bufo gargarizans</i>	XP_044158432.1	49.94
牛 <i>Bos taurus</i>	NP_001179400.1	49.75
沟鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	NP_001102034.1	49.59
智人 <i>Homo sapiens</i>	AAB41040.1	49.68

2.2 表达载体构建和诱导结果

构建的载体结构示意图如图 3a 和图 3c 所示。琼脂糖凝胶电泳检测结果表明, 经 IPTG 诱导的样品中检测到 dsRNA (图 3b 和图 3d 中的泳道 3), 而未经诱导的样品中则未检测到(图 3b 和图 3d 中的泳道 2), 这表明本研究在体外成功诱导表达出了 *AGL* 基因和 *EGFP* 基因的 dsRNA。

2.3 近江牡蛎性腺发育情况

在 RNAi 实验期间, 对照组中雌性和雄性牡蛎的性腺组织切片如图 4 所示。尽管性腺在实验期间均处在增殖期, 但随着培养时间延续, 可以明显观察到性腺发育。在实验开始时, 雌性和雄性近江牡蛎中均可观察到少量精原细胞和卵原细胞, 性腺中的细胞以发育中的卵母细胞和精母细胞为主, 雄性中可见少量精子。在实验进行 15 d 时, 可以观察到卵母细胞体积逐渐增大, 精子逐渐增多; 实验 30 d, 性腺中出现成熟的卵母细胞, 而雄性个体精母细胞数量减少, 精子数量进一步增多。

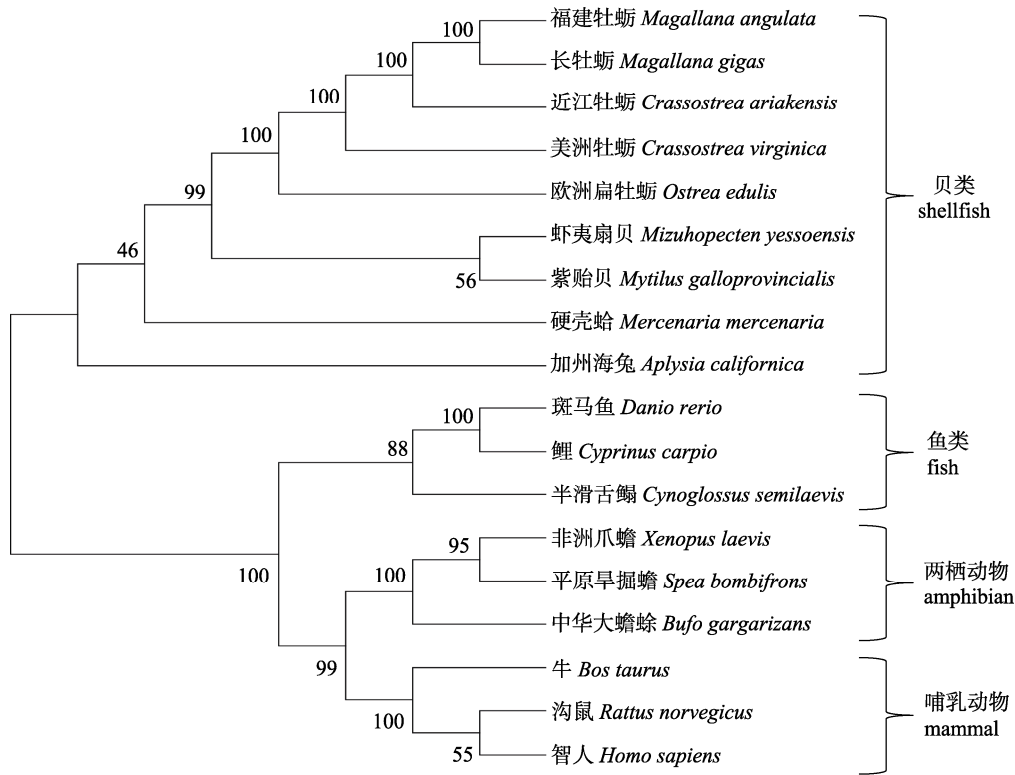


图 2 不同物种 *AGL* 氨基酸序列系统进化树
Fig. 2 Phylogenetic tree of *AGL* amino acid sequence in different species

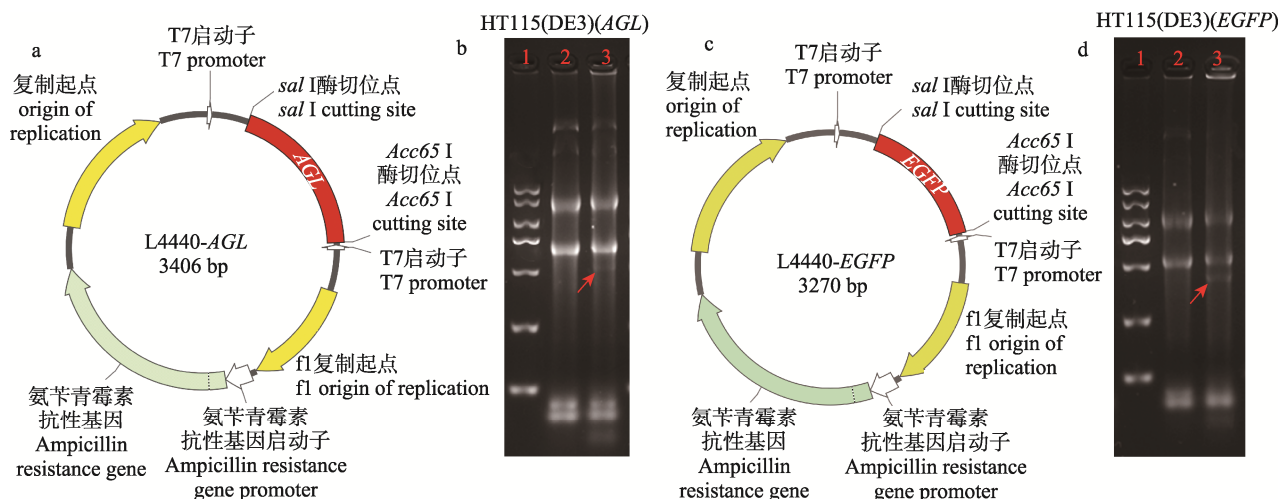


图 3 外源基因重组质粒的构建与诱导的 dsRNA 电泳检测

a. 导入 *AGL* 基因片段的 L4440 质粒(L4440-*AGL* 质粒); b. dsRNA 电泳检测。1 泳道为 DNA marker (诺唯赞, 中国), 2 泳道为未诱导菌体的 RNA 条带, 3 泳道为 IPTG 诱导菌体的 RNA 片段, 箭头所指为 *AGL* 基因的 dsRNA; c. 导入 *EGFP* 基因片段的 L4440 质粒(L4440-*EGFP* 质粒); d. dsRNA 电泳检测。1 泳道为 DNA marker(诺唯赞, 中国), 2 泳道为未经诱导菌体的 RNA 条带, 3 泳道为 IPTG 诱导菌体的 RNA 片段, 箭头所指为 *EGFP* 基因的 dsRNA。

Fig. 3 Construction of recombinant plasmid with exogenous gene and induced dsRNA electrophoresis detection

a. The L4440 plasmid with *AGL* gene fragment was introduced (L4440-*AGL* plasmid); b. Induced dsRNA electrophoresis detection. Lane 1 is DNA marker (Vazyme, China), lane 2 represents the band of uninduced bacterial RNA, lane 3 represents bacterial RNA fragments induced by IPTG, and the arrow points to the dsRNA of the *AGL* gene; c. The L4440 plasmid with *EGFP* gene fragment was introduced (L4440-*EGFP* plasmid); d. Induced dsRNA electrophoresis detection. Lane 1 is DNA marker (Vazyme, China), lane 2 represents the band of uninduced bacterial RNA, lane 3 represents bacterial RNA fragments induced by IPTG, and the arrow points to the dsRNA of the *EGFP* gene.

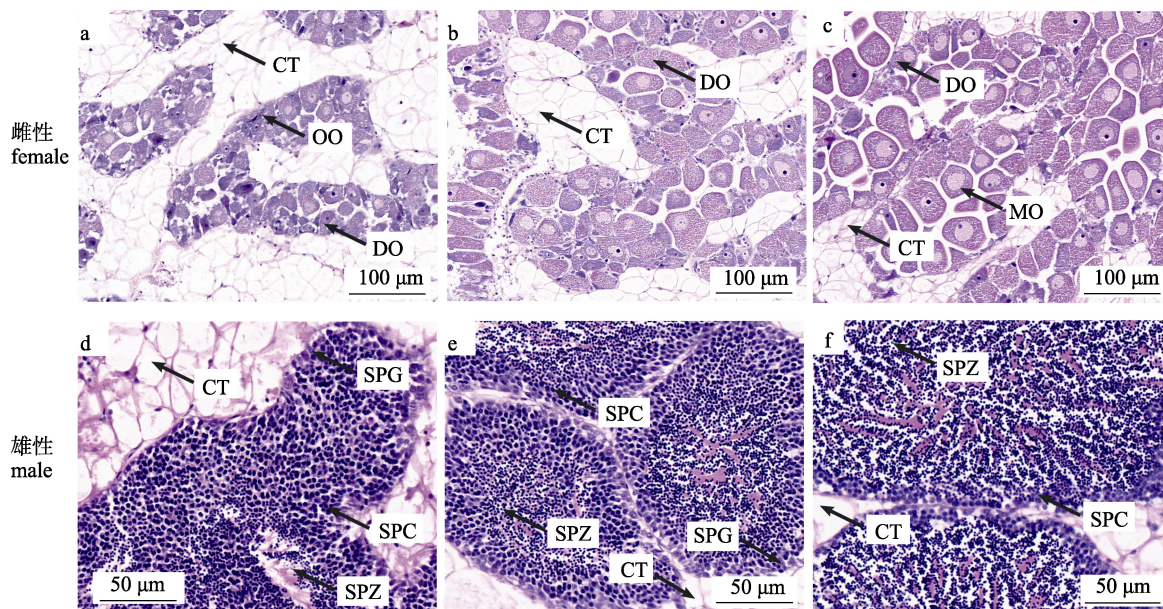


图 4 不同 RNAi 时间点近江牡蛎性腺发育情况

a, d. 对照组实验第 0 天的性腺组织切片图; b, e. 对照组实验第 15 天的性腺组织切片图; c, f. 对照组实验第 30 天的性腺组织切片图。CT: 结缔组织; OO: 卵原细胞; DO: 发育中的卵母细胞; MO: 成熟的卵母细胞; SPG: 精原细胞; SPC: 精母细胞; SPZ: 精子。

Fig. 4 Gonadal development of Jinjiang oysters at different RNAi time points

a, d. The gonadal tissue slices of the control group on day 0 of the experiment; b, e. The gonad tissue slices of the control group on the 15th day of the experiment; c, f. The gonadal tissue slices of the control group on the 30th day of the experiment. CT: connective tissue; OO: oogonia; DO: developing oocyte; MO: mature oocyte; SPG: spermatogonia; SPC: spermatocyte; SPZ: spermatozoa.

2.4 RNAi 后 *AGL* 基因表达的变化

qRT-PCR 检测 RNAi 后 *AGL* 基因表达结果显示(图 5), 经过 15 d 和 30 d 的处理, 近江牡蛎性腺中 *AGL* 基因的表达量相对于对照组显著下降($P < 0.05$)。处理 15 d, 其表达量降至对照组的 51.79%; 处理 30 d 降至对照组的 61.27%, 这说明基因敲降效果明显。30 d 时, 实验组和对照组 *AGL* 的表达量均显著高于 15 d 的表达量($P < 0.05$), 其中对照组 *AGL* 表达量升高 75.98%, 实验组升高 108.19%, 这可能是性腺发育等原因所致。

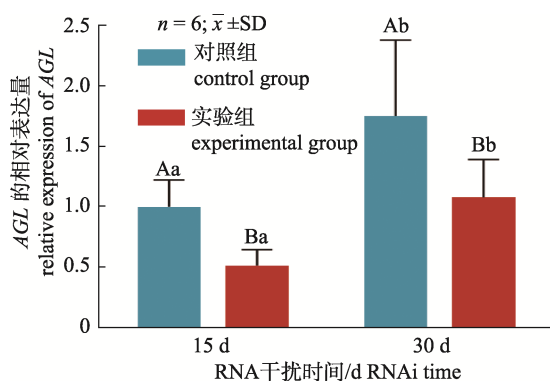


图 5 不同 RNAi 时间点实验组和对照组

近江牡蛎 *AGL* 的相对表达量对比

小写字母不同代表同一组在不同时间点有显著性差异 ($P < 0.05$); 大写字母不同代表在同一时间点不同组有显著性差异 ($P < 0.05$)。

Fig. 5 Comparison on the relative expression of *AGL* of *Crassostrea ariakensis* in experimental group and control group at different RNAi time points

Different lowercases indicate significant difference ($P < 0.05$) among different time points in the same group, different uppercases indicate significant difference ($P < 0.05$) among different groups at the same time.

2.5 RNAi 后糖原含量的变化

糖原含量的测定结果显示(图 6), 干扰 *AGL* 基因 15 d 和 30 d 时牡蛎糖原含量分别为 (460.18 ± 46.74) mg/g 和 (402.62 ± 40.96) mg/g, 均显著高于对照组的 (356.53 ± 67.59) mg/g 和 (283.65 ± 33.22) mg/g。此外, 实验 30 d 时, 不论实验组还是对照组, 牡蛎性腺中的糖原含量均显著低于实验 15 d 时的糖原含量 ($P < 0.05$)。

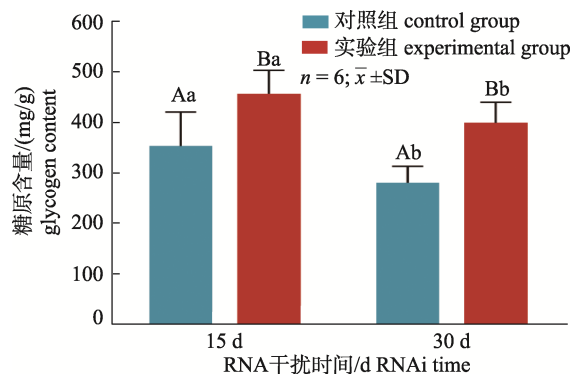


图 6 不同 RNAi 时间点实验组和对照组

近江牡蛎性腺组织糖原含量对比

小写字母不同代表同一组在不同时间点有显著性差异 ($P < 0.05$); 大写字母不同代表在同一时间点

不同组有显著性差异 ($P < 0.05$)。

Fig. 6 Comparison on glycogen content in gonad tissue of *Crassostrea ariakensis* in experimental group and control group at different RNAi time points
Different lowercases indicate significant difference ($P < 0.05$) among different time points in the same group; different uppercases indicate significant difference ($P < 0.05$) among different groups at the same time.

2.6 *AGL* 基因表达量与糖原含量的相关性

空白组、实验组和对照组牡蛎的性腺组织中 *AGL* 基因表达量与糖原含量相关性分析结果如图 7 所示, 空白组 Spearman 相关系数(R)为 -0.7861 ($P < 0.05$), 实验组和对照组 R 为 -0.7053 ($P < 0.05$), 说明 *AGL* 基因表达量与糖原含量呈显著负相关, 该基因可能负调控糖原含量。

3 讨论

RNAi 技术通过将双链 RNA(dsRNA)导入细胞内以引起特定基因的 mRNA 降解^[17]。目前, 注射法^[18]、饲喂法^[19-21]和浸没法^[22]是水产生物相关研究中运用的 3 种转运 dsRNA 的方法。饲喂法不会对动物造成身体损伤, 适合进行长期实验。本研究通过此种方法对处于增殖期近江牡蛎的 *AGL* 基因进行长期干扰, 即构建载体, 诱导细菌产生 dsRNA, 再将其与单细胞藻混合饲喂牡蛎, 这在贝类相关研究中具有一定创新性。RNAi 实验结果表明, 对近江牡蛎 *AGL* 基因进行干扰处理 15 d 和 30 d 后, *AGL* 基因的表达量分别降低了 48.21% 和 38.73% ($P < 0.05$), 显著低于对照组。此前, Li 等^[20]

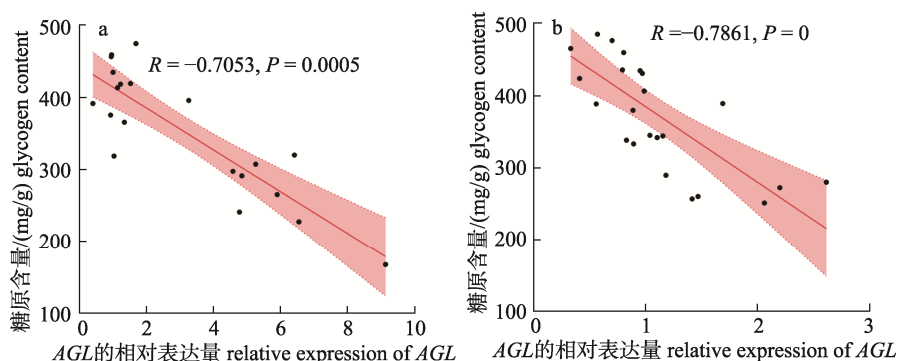


图 7 *AGL* 基因表达量与糖原含量的相关系数

a. 空白组 *AGL* 基因表达量和糖原含量的相关性; b. 实验组和对照组 *AGL* 基因表达量和糖原含量的相关性.

Fig. 7 Correlation coefficient between *AGL* expression and glycogen content

a. The correlation between *AGL* gene expression and glycogen content in blank group; b. The correlation between *AGL* gene expression and glycogen content in experimental group and control group.

用此方法研究了 *Pax7* 基因在长牡蛎黑色素合成中的作用, 发现在干扰 30 d 后, 基因表达量降低 60.1%。Sun 等^[21]同样应用此方法分析了 *Foxl2* 和 *Dmrt1* 基因在长牡蛎性别分化和性腺发育中的作用, 发现干扰 20 d 和 60 d, *Foxl2* 分别降低了 82% 和 62%, *Dmrt1* 分别降低 70% 和 58%。这些均证实了在牡蛎中使用该方法有效、可行。此外, 笔者还观察到处理 30 d 时 *AGL* 基因敲降效率低于 15 d, 在 Sun 等^[21]的研究中同样观察到随着时间的延长 RNA 敲降效率轻微降低。这说明生物在长期 RNAi 处理下可能激活某些补偿机制来减弱 RNAi 的效果, 以维持其自身的生理平衡。Olejniczak 等^[23]曾指出 RNAi 会诱发免疫脱靶效应进而影响 RNAi 的效果, Xie 等^[24]在果蝇中也发现细胞死亡可以通过阻止 dsRNA 转化成 siRNA 的方式来抑制本细胞和邻近细胞的 RNAi。

糖原不仅是牡蛎风味的重要影响因素, 也是牡蛎中能量储存的主要形式之一。在长牡蛎^[8]、香港牡蛎^[9]和近江牡蛎^[10]中发现糖原随牡蛎的性腺发育呈季节性变化。牡蛎会分解糖原产生能量去支持配子发生^[7], 糖原脱支酶在糖原分解过程中发挥着至关重要的作用。Guin 等^[25]的研究表明, 通过 RNAi 技术在体外干扰细胞 *AGL* 基因的表达会导致糖原分解减少, 极限糊精增加。本研究发现 *AGL* 基因的 CDS 序列长度为 4719 bp, 编码 1572 个氨基酸, 具有 4 个结构域, 这一数量与先前预测的人类糖原脱支酶结构域的数量相同^[26]。氨基酸序列的同源性比对和进化树表明, 亲缘关

系越近, 氨基酸序列的同源性越高。近江牡蛎的 *AGL* 基因与其他牡蛎的同源性较高, 表明 *AGL* 基因在牡蛎中相对保守。增殖期牡蛎糖原合成和分解旺盛且含量波动剧烈^[10], 而 *AGL* 是参与糖原分解的重要基因, 此时 *AGL* 基因表达活跃, 干扰 *AGL* 基因的表达可能会显著影响糖原含量。RNAi 之后笔者进一步测定了两组间糖原含量的差异, 结果表明, 在 RNAi 处理 15 d 和 30 d 后, 实验组的糖原含量均显著高于对照组, 分别提高了 103.65 mg/g 和 118.97 mg/g, 这一结果表明降低 *AGL* 基因的表达水平会导致糖原含量增加。人^[26]和马(*Equus caballus*)^[27] *AGL* 基因的缺乏或者突变也会导致糖原异常积累。本研究中, 无论是实验组还是对照组, 干扰处理 30 d 的牡蛎性腺糖原含量均显著低于 15 d 时含量, 但 *AGL* 基因表达量均显著升高, 这可能说明此阶段牡蛎性腺发育需要更多的糖原分解以便提供能量^[10]。*AGL* 基因表达水平和糖原含量的 Spearman 相关性分析, 进一步证实了 *AGL* 基因的表达水平与糖原含量之间存在极显著的负相关关系。

前期基因家族分析中未发现近江牡蛎 *AGL* 基因存在其他家族成员。本研究对 *AGL* 基因序列及其三维结构的分析, 为深入理解其分子功能奠定了基础, 同时, 通过饵料投喂法进行 RNAi, 成功抑制了近江牡蛎 *AGL* 基因的表达, 证实该方法可有效地应用在牡蛎基因研究中。而且, 本研究发现近江牡蛎性腺 *AGL* 基因表达量与糖原含量呈显著负相关, 且敲降 *AGL* 基因表达能显著影响糖原含量,

研究结果为丰富牡蛎糖原代谢机制相关研究提供了参考资料。

参考文献:

- [1] Wu B, Chen X, Hu J, et al. Combined ATAC-seq, RNA-seq, and GWAS analysis reveals glycogen metabolism regulatory network in Jinjiang oyster (*Crassostrea ariakensis*)[J]. Zoological Research, 2024, 45(1): 201-214.
- [2] Zhang H F, Ma J W, Tang K, et al. Beyond energy storage: Roles of glycogen metabolism in health and disease[J]. The FEBS Journal, 2021, 288(12): 3772-3783.
- [3] Zhu Y J, Li Q, Yu H, et al. Biochemical composition and nutritional value of different shell color strains of Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Journal of Ocean University of China, 2018, 17(4): 897-904.
- [4] Lin H, Wang X X, Zhang B, et al. Comparison of taste components between triploid and diploid oyster[J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 2002, 1(1): 55-58.
- [5] Li B S, Song K, Meng J, et al. Integrated application of transcriptomics and metabolomics provides insights into glycogen content regulation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. BMC Genomics, 2017, 18(1): Article No.713.
- [6] Liu S. Study on the genetic basis and molecular mechanism of nutritional quality traits of the Pacific oyster[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2019. [刘圣. 长牡蛎糖原等品质性状的遗传基础与分子机制研究[D]. 青岛: 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所), 2019.]
- [7] Mathieu M, Lubet P. Storage tissue metabolism and reproduction in marine bivalves—a brief review[J]. Invertebrate Reproduction & Development, 1993, 23(2-3): 123-129.
- [8] Dridi S, Romdhane M S, Elcafsi M. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic cycle and environmental conditions of the Bizert lagoon, Tunisia[J]. Aquaculture, 2007, 263(1-4): 238-248.
- [9] Qin Y P, Li X Y, Li J, et al. Seasonal variations in biochemical composition and nutritional quality of *Crassostrea hongkongensis*, in relation to the gametogenic cycle[J]. Food Chemistry, 2021, 356: 129736.
- [10] Li Z Z, Zhao L Y, Wang Y, et al. Glycogen variations and glycometabolism during the gametogenesis cycle of Jinjiang oyster *Crassostrea (Magallana) ariakensis*[J]. Aquaculture Reports, 2024, 37: 102251.
- [11] Adeva-Andany M M, González-Lucán M, Donapetry-García C, et al. Glycogen metabolism in humans[J]. BBA Clinical, 2016, 5: 85-100.
- [12] Wang K W, Liu Q Q, Zhu J, et al. Transcriptome analysis provides insights into the molecular mechanism of liver inflammation and apoptosis in juvenile largemouth bass *Micropterus salmoides* fed low protein high starch diets[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 2023, 45: 101047.
- [13] Tang X Y, Li S S, Zhuo L, et al. Correlation study of SNP of glycogen degradation metabolism related genes and glycogen content in *Halotis discus Hannai*[J]. Aquaculture, 2024, 578: 740022.
- [14] Zhang H, Wang H, Chen H, et al. The transcriptional response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* under simultaneous bacterial and heat stresses[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2019, 94: 1-10.
- [15] Cao C, Wang W X. Copper-induced metabolic variation of oysters overwhelmed by salinity effects[J]. Chemosphere, 2017, 174: 331-341.
- [16] Chen X, Wu B, Wang Y, et al. Establishment and optimization of micro-reaction system for determination of oyster glycogen content[J]. South China Fisheries Science, 2021, 17(4): 126-132. [陈夕, 吴彪, 王岩, 等. 测定牡蛎糖原含量的微量反应体系的建立与优化[J]. 南方水产科学, 2021, 17(4): 126-132.]
- [17] Mello C C, Conte D. Revealing the world of RNA interference[J]. Nature, 2004, 431(7006): 338-342.
- [18] Wang Y, Liu Z H, Chen X, et al. Identification and characterization of *GYS* and *GSK3 β* provides insights into the regulation of glycogen synthesis in Jinjiang oyster *Crassostrea ariakensis*[J]. Fishes, 2023, 8(2): 65.
- [19] Feng D D, Li Q, Yu H. RNA interference by ingested dsRNA-Expressing bacteria to study shell biosynthesis and pigmentation in *Crassostrea gigas*[J]. Marine Biotechnology, 2019, 21(4): 526-536.
- [20] Li Z Z, Li Q, Xu C X, et al. Molecular characterization of *Pax7* and its role in melanin synthesis in *Crassostrea gigas*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2022, 260: 110720.
- [21] Sun D F, Yu H, Li Q. Examination of the roles of *Foxl2* and *Dmrt1* in sex differentiation and gonadal development of oysters by using RNA interference[J]. Aquaculture, 2022, 548: 737732.
- [22] Baum J A, Bogaert T, Clinton W, et al. Control of coleopteran insect pests through RNA interference[J]. Nature Biotechnology, 2007, 25(11): 1322-1326.
- [23] Olejniczak M, Polak K, Galka-Marciniak P, et al. Recent advances in understanding of the immunological off-target effects of siRNA[J]. Current Gene Therapy, 2011, 11(6): 532-543.
- [24] Xie W W, Liang C Z, Birchler J A. Inhibition of RNA interference and modulation of transposable element expression by cell death in *Drosophila*[J]. Genetics, 2011, 188(4): 823-834.
- [25] Guin S, Pollard C, Ru Y B, et al. Role in tumor growth of a glycogen debranching enzyme lost in glycogen storage disease[J]. Journal of the National Cancer Institute, 2014, 106(5): dju062.
- [26] Zmasek C M, Godzik A. Phylogenomic analysis of glycogen branching and debranching enzymatic duo[J]. BMC Evolutionary Biology, 2014, 14(1): Article No.183.
- [27] Ward T L, Valberg S J, Adelson D L, et al. Glycogen branching enzyme (GBE1) mutation causing equine glycogen storage disease IV[J]. Mammalian Genome, 2004, 15(7): 570-577.

Molecular characterization of *AGL* gene in Jinjiang oyster (*Crassostrea ariakensis*) and its role in glyco genolysis

ZHAO Liyan^{1,2,3}, LI Zhuanzhuan^{2,3}, MA Peizhen^{2,3}, LIU Zhihong^{2,3}, SUN Xiujun^{2,3}, ZHOU Liqing^{2,3}, WU Biao^{2,3}

1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071, China;
3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao Marine Science and Technology Center, Qingdao 266237, China

Abstract: Glycogen serves as a crucial indicator for assessing the quality of oysters, and glycogen debranching enzyme (*AGL*) plays a pivotal role in glycogenolysis. The Jinjiang oyster (*Crassostrea ariakensis*), widely distributed along China's coast, is highly sought after in the high-end market. However, the molecular mechanism of glycogen metabolism in the Jinjiang oyster has been inadequately investigated. This study aimed to explore the *AGL* gene expression during the proliferative stage by administering dsRNA, and subsequently to investigate the relationship between the mRNA expression and glycogen content, thereby elucidating the pivotal role of this gene in glycogen metabolism. First, bioinformatics tools were employed to analyze the *AGL* gene sequence. Subsequently, dsRNA expression vectors were constructed for inducing the dsRNA production by the HT115 (DE3) bacteria, which were then co-cultured with unicellular algae as attachment hosts. Finally, the bacterial-algal mixture was fed daily to the Jinjiang oyster for RNA interference (RNAi). Furthermore, on days 15 and 30 of RNAi treatment, gonadal tissues were collected for subsequent determination of glycogen content and gene expression analysis. In the control group, gonadal development was observed using tissue sections. The software SPSS 26 was employed to analyze the correlation between *AGL* gene expression and glycogen content in gonads as well as to determine differences in data. According to the findings, the coding region of the *AGL* gene had a sequence length of 4719 bp and encoded 1572 amino acids. It contained four structural domains and exhibited a predicted protein molecular weight of 178.23 kDa, a theoretical isoelectric point of 6.21, and an *AGL* sequence similarity with other selected species ranging from 49.59% to 97.26%. Phylogenetic analysis revealed that the *C. ariakensis* *AGL* gene was genetically most closely related to mollusks. Throughout the experimental period, gonads in the control group showed progressive development but remained in the proliferative stage. Following interference for 15 and 30 days, expression levels of the *AGL* gene were significantly lower ($P<0.05$) while glycogen content was significantly higher ($P<0.05$) in comparison to those in the control group. In addition, after RNAi for 30 days compared to 15 days, there was a significant increase ($P<0.05$) in *AGL* gene expression accompanied by a significant decrease ($P<0.05$) in glycogen content. Importantly, it was observed that there existed a highly significant strong negative correlation ($P<0.05$) between *AGL* gene expression and glycogen content within *C. ariakensis* gonads. In this study, we successfully employed the RNAi technology to downregulate the gene expression of *AGL* in the Jinjiang oyster and observed corresponding alterations in glycogen content, thereby confirming the critical role of the *AGL* gene in glycogenolysis. By manipulating the gene expression to validate its function, it is anticipated that the artificial regulation of glycogen content and other quality traits can be achieved, ultimately enhancing oyster quality and increasing market value. The present study contributes to the comprehensive understanding of the *AGL* gene in oyster glycogen metabolism, thereby offering valuable insights for the exploration of novel technologies aimed at regulating glycogen content.

Key words: *Crassostrea ariakensis*; *AGL* gene; glycogenolysis; RNA interference; glycogen content

Corresponding author: WU Biao. E-mail: wubiao@ysfri.ac.cn