

文章编号: 1000-0615(2018)11-1719-10

DOI: 10.11964/jfc.20171211107

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

李西雷^{1,2}, 李卿青¹, 任名栋¹, 白志毅², 李家乐^{2*}

(1. 安徽农业大学动物科技学院, 安徽合肥 230036;

2. 上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

摘要: 清道夫受体(SR)是一类对化学修饰的脂蛋白具有很强结合活性的糖蛋白家族。本研究通过RACE方法克隆得到三角帆蚌*hcSRCR1*基因cDNA序列, 该序列全长1 000 bp, 其中开放阅读框819 bp, 编码272个氨基酸, 预测分子量为28.16 ku, 理论等电点为5.55; 预测含有2个SRCR结构域和6个保守的半胱氨酸残基。qRT-PCR和Western blot结果显示, *hcSRCR1* mRNA和蛋白表达模式基本相同, 均在三角帆蚌外套膜中表达量最高, 在其他组织中的表达量普遍较低, 且在紫色选育系外套膜组织中的表达量显著高于白色选育系。外套膜原位杂交结果显示, *hcSRCR1*基因主要在外套膜外褶的内、外上皮细胞层以及腹膜处的上皮细胞层中表达。研究表明, 三角帆蚌*hcSRCR1*基因与贝壳珍珠质颜色形成具有一定相关性, 可为进一步研究该基因在珍珠颜色形成过程中的调控机理提供基础资料。

关键词: 三角帆蚌; 清道夫受体; 壳色; 基因克隆; 表达模式

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)是我国特有的优质淡水育珠蚌, 它形成的珍珠具有珠质色泽鲜艳、光滑细腻等优点, 是淡水蚌中育珠质量最佳者^[1-2]。颜色是评价珍珠质量的重要指标, 颜色不同, 珍珠的价值也不同。因此, 贝壳珍珠质颜色是珍珠蚌遗传选育的重要指标之一。类胡萝卜素是一类广泛存在于自然界中的脂溶性物质, 具有重要的生物学功能, 是一种天然的着色剂, 并且与动物的健康关系密切^[3-4]。已有研究表明, 类胡萝卜素的存在与珍珠及贝壳珍珠质的颜色形成密切相关, 是珍珠和贝壳珍珠质呈色的重要原因之一^[5-7]。Urmos等^[8]首次报道在天然珍珠中探测到的有机物峰是由类胡萝卜素所引起的, 并且推测类胡萝卜素的存在是珍珠呈色的主要原因。Li等^[9]研究发现三角帆蚌体内总类胡萝卜素含量(total carotenoids content,

TCC)不仅在不同组织中差异显著, 而且在紫色选育系三角帆蚌个体中TCC总是显著高于白色选育系三角帆蚌个体, 表明三角帆蚌TCC与贝壳珍珠质颜色密切相关。然而, 大多数动物自身不能够合成类胡萝卜素, 必须从食物中摄取外源类胡萝卜素直接储存或转化后沉积于体内^[10-11]。研究表明在这一过程中涉及到一些关键基因, 它们编码的蛋白或酶类参与了类胡萝卜素的吸收、转运和代谢^[12]。

清道夫受体(scavenger receptor, SR)是一类对化学修饰的脂蛋白等具有很强结合活性的糖蛋白家族^[13]。作为模式识别受体, 其通过对多种异源成分的识别和结合, 参与多种生物学过程^[14-15]。B族I型清道夫受体(class B type I, SR-BI)是第一种被发现的可参与类胡萝卜素吸收的脂质转运蛋白, 在很多组织中都有发现^[16]。SR-BI基因编

收稿日期: 2017-12-26 修回日期: 2018-03-19

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-49); 安徽农业大学引进与稳定人才科研项目(YJ2015-17)

通信作者: 李家乐, E-mail: jlli2009@126.com

码一种单链跨膜糖蛋白,它主要和高密度脂蛋白结合,也部分地和低密度脂蛋白及极低密度脂蛋白结合,在类胡萝卜素的吸收转运过程中起着重要的作用^[17]。与脊椎动物相比,无脊椎动物中清道夫受体SR的研究还极为匮乏,关于SR家族基因的克隆及表达分析的研究文献较少。目前仅在紫色球海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)^[18]、虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)^[19]和栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)^[20]等少数几种无脊椎动物中发现有SR家族基因的存在。在本研究中,首次获得了三角帆蚌富含半胱氨酸结构域的清道夫受体(scavenger receptor cysteine-rich protein, SRCR)基因,命名为*hcSRCR1*,并对其基因结构特征及氨基酸序列进行了分析,同时对其在紫色、白色选育系三角帆蚌各组织中的表达模式进行了研究,以期阐明*hcSRCR1*基因在三角帆蚌贝壳珍珠质颜色形成中的作用机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用紫色和白色选育系三角帆蚌均为2龄蚌,采自浙江金华伟民水产养殖基地,为本实验室通过家系选育得到^[21]。随机挑选同一规格[(10±2.0) cm]的2种选育系三角帆蚌各30只,根据需要暂养于实验室1周,饲养水温(23±2) °C,以小球藻投喂(早晚各1次)。暂养结束后从紫色和白色选育系三角帆蚌中各随机挑选6只,分别取血液、肝胰腺、肾、鳃、斧足、肠、外套膜(边缘膜和中央膜)以及闭壳肌等组织,在液氮中速冻后放入-80 °C超低温冰箱中保存备用。

1.2 总RNA提取和cDNA的合成

按照SV Total RNA Isolation System试剂盒(Promega, 美国)说明书提取三角帆蚌各组织总RNA,采用分光光度计NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, 美国)和1.2%琼脂糖凝胶电泳检测提取的RNA浓度、纯度和完整性。按照PrimeScript™ RT-PCR Kit (TaKaRa, 大连)说明书反转录合成cDNA, -20 °C保存。

1.3 *hcSRCR1*全长cDNA的扩增、克隆和序列测定

根据构建的紫色和白色选育系三角帆蚌外套膜转录组文库中已标注的序列^[6],利用Primer

Premier 5.0设计特异性上游引物F1和下游引物R1用于短片段的序列验证,所用引物(表1)均由上海生工生物工程股份有限公司合成。PCR反应体系: 2×Taq PCR Mix 12.5 μL, 上下游引物F1、R1各1 μL (10 μmol/L), cDNA 1 μL, RNase水9.5 μL。PCR反应程序: 94 °C预变性3 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 30 s, 32个循环; 72 °C延伸10 min。PCR扩增产物经1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测,用TIANGel Midi Purification Kit (TIANGEN, 北京)试剂盒回收目的片段PCR产物,纯化后与pMD19-T载体(TaKaRa, 大连)连接构建重组质粒,转化进大肠杆菌感受态细胞*E. coli* DH5α, 经LB平板(含Amp⁺、IPTG和X-gal)培养后,筛选重组子进行插入片段PCR检测,所获得的阳性克隆由上海生工生物工程股份有限公司进行测序。

根据测序验证的序列,分别设计3' RACE基因特异性引物(GSP-F)和5' RACE基因特异性引物(GSP-R), 3' RACE末端扩增使用TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0试剂盒(TaKaRa, 大连), 5' RACE末端扩增使用BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit与Advantage® 2PCR Enzyme System试剂盒(TaKaRa, 大连),具体反应体系和操作程序参照试剂盒说明书。PCR产物的纯化、克隆和测序与短片段的验证相同。

1.4 序列拼接和生物信息学分析

去除测序结果中的载体序列后,利用ContigExpress软件进行拼接得到*hcSRCR1*基因cDNA全序列。应用ORF Finder程序(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)确定正确的开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)。通过BLAST数据库搜索(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>),分析核苷酸序列、氨基酸序列的相似性。用ProtParam程序、Signal P 4.1 server、TMpred server及ProtScale等软件分别预测氨基酸序列的物理参数及信号肽,分析氨基酸跨膜结构及氨基酸序列的疏水区。使用ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)进行多重序列比对,所用序列: 栉孔扇贝GQ260639, 非洲象(*Loxodonta Africana*)XP_003416719.1, 普通狨(*Callithrix jacchus*)XP_002749572.1, 人(*Homo sapiens*)NP_006761.1, 小鼠(*Mus musculus*)NP_034896.1。

1.5 qRT-PCR分析*hcSRCR1*基因的组织表达模式

根据所获得的三角帆蚌*hcSRCR1*基因cDN-

表 1 引物序列表

Tab. 1 Sequences of primers

引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')	扩增用途 amplification usage
通用引物(长) UPM (long)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	5' RACE及3' RACE通用引物
通用引物(短) UPM (short)	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
F1	CAGCCGATACAAGGTCCACA	cDNA短片段
R1	CAAAGCCCTGATAGCCACAA	
基因特异性引物-FGSP-F	CGTCCATTTTGTGGCTATCAGGGCT	3' RACE
基因特异性引物-RGSP-R	CCGAGACTGAAGACAAGAGGACGAAG	5' RACE
F2	ATGCTGTTGCGTTGCCCA	荧光定量
R2	GCTGCGACATTGAGAGGAGTTC	
β -F	ACGGATAACACAAGGAAAGGAAAC	荧光定量
β -R	ATGGATGGAACACGGCTCT	
F3	AGTCAATGAGTCTGCACCC	原位杂交
R3	TCCGTACACTGAGAAAGG	

A序列设计荧光定量PCR的特异性引物F2和R2, 并以 β -actin为内参基因(表1)。取1 μ g总RNA, 按照PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa, 大连)试剂说明书进行反转录。实时荧光定量PCR反应采用Bio-Rad CFX 96TM荧光定量检测系统(Bio-Rad, 美国)进行实验, 参照SYBR[®] Premix Ex TaqTM (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa, 大连)说明书进行qRT-PCR扩增。反应体系20 μ L: SYBR[®] Premix Ex TaqTM (2 \times) 10 μ L, 上下游引物(10 μ mol/L)各0.5 μ L, 2.0 μ L cDNA模板, 7.0 μ L RNase-free水。其中每个样品的目的基因和内参基因分别进行4次重复。扩增程序: 95 $^{\circ}$ C预变性30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40个循环; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60~95 $^{\circ}$ C 获得溶解曲线。基因相对表达量数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法, 采用SPSS 18.0软件中的单因素方差分析法(One-Way ANOVA)进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

1.6 Western blot印迹分析hcSRCR1蛋白的表达

提取三角帆蚌各组织总蛋白, 用制备的hc-SRCR1多克隆抗体(北京康为世纪生物科技有限公司)进行目的蛋白表达模式的Western blot检测。提取紫色、白色选育系三角帆蚌各组织总蛋白, BCA法测定蛋白浓度, 每孔上样30 μ g总蛋白进行SDS-PAGE电泳, 转印至NC膜。5%脱脂奶粉摇床封闭1 h。将NC膜分别放入兔抗

hcSRCR1 (TBST 1 : 1 000稀释, 北京康为世纪生物科技有限公司)和 β -actin多克隆抗体(TBST 1 : 1 000稀释, 北京康为世纪生物科技有限公司)中4 $^{\circ}$ C摇床过夜。TBST漂洗4次, 每次5 min。HRP-山羊抗兔IgG (TBST 1 : 5 000稀释, 北京康为世纪生物科技有限公司)室温孵育2 h, 取出转印膜, TBST漂洗4次, 每次5 min。使用Immuno-StarTM HRP化学发光试剂盒(Bio-Rad, 美国)配置化学发光液, 滴加于转印膜上, 用Bio-Rad化学发光检测系统拍照并保存, 利用Image-pro Plus 6.0软件(Media Cybernetics, 美国)对比, 进行半定量分析。

1.7 RNA探针制备与原位杂交检测

根据hcSRCR1基因序列设计原位杂交特异性引物F3和R3, 扩增片段长度214 bp。扩增产物经割胶回收纯化后连接到pGEM-T easy载体, 筛选阳性克隆并测序验证后扩大培养, 提取质粒。分别用Nco I 和Spe I 限制性内切酶(TaKaRa, 大连)对重组质粒进行双酶切, 酶切完全后的线性化质粒用MiniBEST Plasmid Purification Kit (TaKaRa, 大连)进行纯化, 用于下一步的体外转录制备探针。用纯化后的质粒分别经T7和SP6 RNA聚合酶(Roche, 瑞士)体外转录制备地高辛标记的hcSRCR1基因的正义和反义RNA探针, 具体步骤参照说明书。经分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测RNA探针浓度和纯度后, -80 $^{\circ}$ C保存

备用。

取紫色、白色选育系三角帆蚌外套膜分别于含0.1% DEPC的4%多聚甲醛中, 4 °C固定24 h后, 进行浓度梯度的脱水处理, 用二甲苯透明, 浸入石蜡、包埋、切成7 μm的切片, 过夜烘烤。依次进行杂交前处理、杂交过夜、杂交后处理^[22], NBT/BCIP避光显色, 中性树脂封片保存, 显微镜观察并拍照。

2 结果

2.1 三角帆蚌 *hcSRCR1* 基因cDNA全长的克隆与序列分析

经3'RACE及5'RACE扩增, 分别获得*hcSRCR1*基因的3'末端序列和5'末端序列, 再通过序列拼接获得三角帆蚌*hcSRCR1*基因cDNA序列全长。*hcSRCR1*基因cDNA全长1 000 bp, 包含59 bp的5'端非翻译区、122 bp的3'端非翻译区, 以及一个编码272个氨基酸的819 bp的开放阅读框序列(图1)。GenBank登录号为KC691745。

用SignalP软件对编码氨基酸中的信号肽序列进行预测, 结果显示, *hcSRCR1*编码的氨基酸序列中含有一段20个氨基酸序列的信号肽。*hcSRCR1*成熟肽长度为252个氨基酸, 分子量为28.16 ku, 预测等电点为5.55。利用NCBI网站BLAST搜索工具和ClustalW2软件分析不同物种SR-

CR之间的相似度, 结果显示三角帆蚌*hcSRCR1*与其他物种的SRCR序列相似度较低, 为30%~37%。利用SMART软件预测发现三角帆蚌*hcSRCR1*具有2个富含半胱氨酸的SRCR结构域, 不含有跨膜区。*hcSRCR1*的SRCR结构域分别为47~144位氨基酸以及152~233位氨基酸。SRCR结构域均含有6个保守的半胱氨酸残基, 形成3个域内二硫键。序列比对分析结果显示, 三角帆蚌*hcSRCR1*的SRCR结构域中6个二硫键结合的半胱氨酸无论在高等动物还是低等动物中都都很保守(图2)。

2.2 *hcSRCR1* 基因在紫色蚌和白色蚌各组织中的表达分析

采用实时荧光定量PCR技术, 检测三角帆蚌不同组织中*hcSRCR1*基因mRNA的表达分布, 及其在紫色和白色选育系中的差异表达情况。结果显示, 三角帆蚌*hcSRCR1*基因在紫色和白色蚌中的表达规律基本相同, 均在外套膜中表达量最高, 在其他组织中的表达量普遍较低, 在血液、鳃、肾和肠中表达量极低。但*hcSRCR1*基因在紫色选育系外套膜组织中的表达量显著高于白色选育系($P<0.05$)(图3)。此外, 前期研究发现外套膜的边缘膜所对应的贝壳珍珠质颜色强度及饱和度均显著高于中央膜所对应的贝壳珍珠质^[9], 而三角帆蚌*hcSRCR1*基因同样在边缘膜中

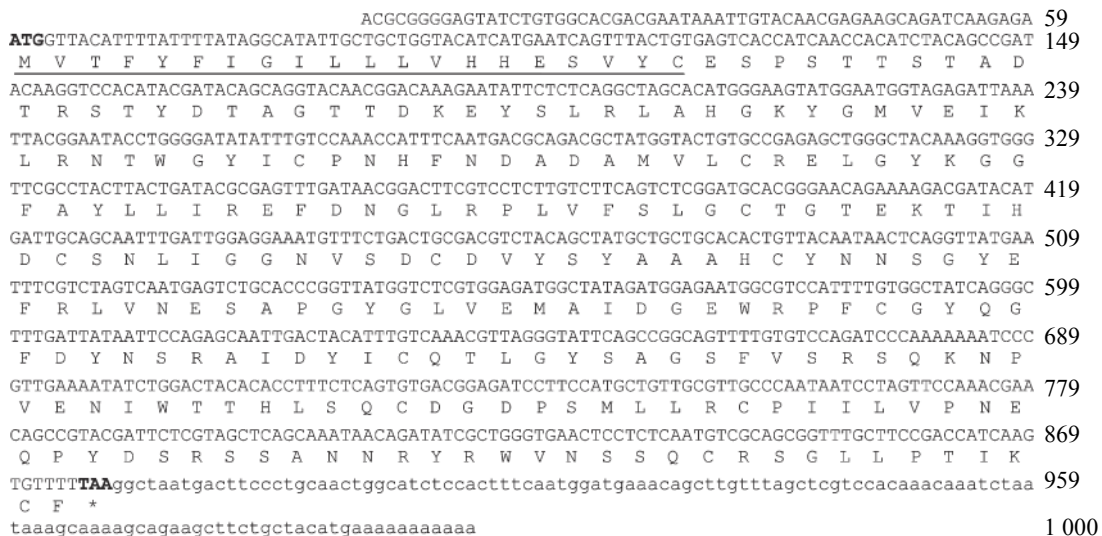


图1 三角帆蚌 *hcSRCR1* cDNA序列分析图

字体加粗分别表示起始密码子和终止密码子, 下划线表示信号肽序列, *表示蛋白质翻译结束

Fig. 1 cDNA sequence of *hcSRCR1* in *H. cumingii*

The initiation codon (ATG) and the stop codon (TAA) are all characterized in bold, the underlined sequences indicate the signal peptides, the * represents the end of the protein translation

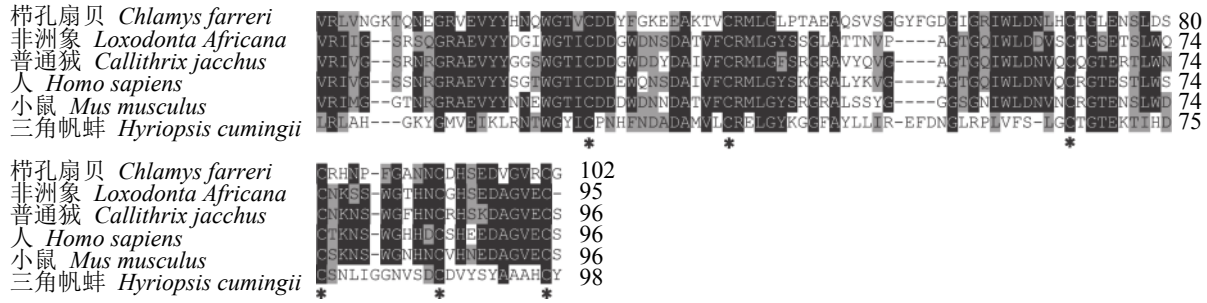


图 2 清道夫受体富含半胱氨酸(SRCR)结构域多序列比对图

黑色阴影部分表示完全保守的氨基酸残基, 灰色阴影部分表示相似的氨基酸残基, SRCR区域保守的半胱氨酸残基用“*”标示

Fig. 2 Multiple alignment of SRCR domains from hcSRCR and other SRCR proteins

The consensus residues are in black, the similar residues are in grey, the conserved cysteines in the SRCR domain are marked with asterisks

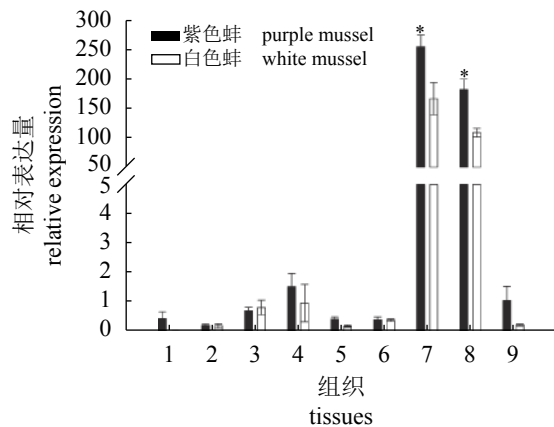


图 3 三角帆蚌 *hcSRCR1* 基因的荧光定量检测

1. 血液; 2. 鳃; 3. 斧足; 4. 肝胰腺; 5. 肾; 6. 肠; 7. 边缘膜; 8. 中央膜; 9. 闭壳肌。*表示显著性差异($P<0.05$)

Fig. 3 Real-time PCR analysis of *hcSRCR1* expressions in various tissues of *H. cumingii*

Lane 1-9 represent blood, gill, axe foot, hepatopancreas, kidney, intestine, fringe mantle, middle mantle and adductor, respectively. * represents significant difference ($P<0.05$)

的表达量显著高于中央膜, 基因表达量与贝壳珍珠质颜色强度呈正相关。

2.3 *hcSRCR1* 蛋白在紫色蚌和白色蚌各组织中的表达分析

Western blot结果显示, 三角帆蚌外套膜中检测到约28 ku的高表达的特异条带, 大小与*hcSRCR1*成熟肽的分子量基本一致, 而在其他组织中基本检测不到该条带的存在或者条带微弱(图4), Western blot检测结果和荧光定量检测结果比较一致。

分别提取紫色、白色选育系三角帆蚌外套膜组织的总蛋白, 进行目的蛋白的Western blot检测。在同等曝光条件下拍照, 经Image-pro Plus

6.0软件进行半定量分析, 结果显示, *hcSRCR1*在紫色蚌外套膜组织中的蛋白表达水平显著高于白色选育系三角帆蚌($P<0.05$)(图5)。

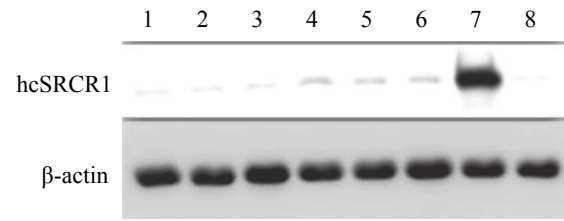


图 4 *hcSRCR1*在三角帆蚌各组织中的Western blot检测

1. 血液; 2. 鳃; 3. 斧足; 4. 肝胰腺; 5. 肾; 6. 肠; 7. 外套膜; 8. 闭壳肌

Fig. 4 Western blot detection of *hcSRCR1* in various tissues of *H. cumingii*

Lane 1-8 represent blood, gill, axe foot, hepatopancreas, kidney, intestine, mantle and adductor, respectively

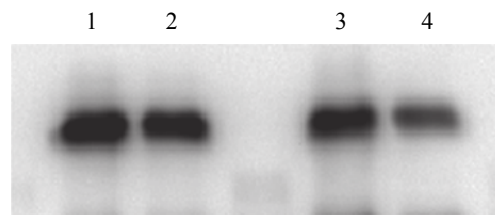


图 5 *hcSRCR1*在三角帆蚌外套膜中的Western blot检测

1. 紫色边缘膜; 2. 白色边缘膜; 3. 紫色中央膜; 4. 白色中央膜

Fig. 5 Western blot detection of *hcSRCR1* in the mantle of *H. cumingii*

Lane 1. fringe mantle of purple mussel; lane 2. fringe mantle of white mussel; lane 3. middle mantle of purple mussel; lane 4. middle mantle of white mussel

2.4 *hcSRCR1* 基因原位杂交结果分析

外套膜作为直接参与贝壳和珍珠形成的组

织,在贝壳珍珠质形成及呈色过程中发挥着重要作用。为研究其在紫色、白色选育系三角帆蚌外套膜中的精确表达位置,通过RNA原位杂交技术对*hcSRCR1*基因进行了表达定位检测,结果显示*hcSRCR1*在紫色、白色选育系三角帆蚌外套膜组织中的原位杂交信号没有显著差异,*hcSRCR1*较强的杂交阳性信号均出现在外套膜外褶的内、外上皮细胞层以及腹膜处的上皮细胞层,在中央膜的背膜处以及边缘膜的中褶和内褶处未检测到明显的杂交阳性信号,阴性对照中无杂交信号(图版)。

3 讨论

在本研究中,从软体动物三角帆蚌体内克隆获得了一个富含半胱氨酸的清道夫受体(SR-CR)基因的cDNA全序列,命名为*hcSRCR1*。三角帆蚌*hcSRCR1*基因共编码272个氨基酸,序列比对分析表明三角帆蚌*hcSRCR1*与其他物种中的SR-CR基因序列相似度较低,但均含有A型SR-CR结构域的典型特征,即SR-CR结构域含有6个高度保守的半胱氨酸残基,这些残基能够组成3对胞内二硫键,这些特征表明*hcSRCR1*属于A型SR-CR家族^[23]。具有SR-CR结构域是SR-CR超家族蛋白成员的共同特点,虽然SR-CR结构域中主要残基半胱氨酸非常保守,其在进化中很少发生变异,但其他非保守序列的突变率较高,于是产生了大量具有不同功能的蛋白^[24]。本研究获得的*hcSRCR1*与已发现清道夫受体具有明显不同的特点:首先,三角帆蚌*hcSRCR1*不含有跨膜结构域,信号肽预测结果显示*hcSRCR1*具有一段信号肽序列,表明它们是一种分泌蛋白,而已发现清道夫受体大多属于一次或多次跨膜蛋白;其次,*hcSRCR1*含有2个SR-CR结构域,并且第2个结构域为缩短了SR-CR结构域,只含有4个半胱氨酸残基。这些结果表明,*hcSRCR1*是一种新型的含有SR-CR结构域的分泌蛋白。

本实验中紫色蚌和白色蚌的主要区别在于外套膜缘膜部(制作细胞小片的部位)所对应的贝壳珍珠质颜色的不同^[25]。荧光定量分析结果显示*hcSRCR1*在外套膜中具有最高的表达量,而在其他组织中表达量极低甚至检测不到表达。外套膜作为直接参与贝壳和珍珠形成的组织,在贝壳形成及呈色过程中起着关键作用^[26]。*hcSRCR1*

在外套膜中特异性的高表达,说明其与贝壳及珍珠的形成密切相关。同时通过对*hcSRCR1*基因在紫色、白色选育系三角帆蚌外套膜组织中的表达量进行比较发现,*hcSRCR1*在紫色选育系三角帆蚌外套膜中的表达量显著高于白色选育系。清道夫受体的基本特征是结合并转运一些低密度脂蛋白,三角帆蚌*hcSRCR1*基因在外套膜中的差异表达,可能反映了这2种壳色三角帆蚌在脂类物质吸收和运输方面所具有的不同生物学效率,也暗示了三角帆蚌体内的此种SR-CR可能具有某些不同于脊椎动物体内SR-CR的新功能。在哺乳动物中,SR-BI基因编码一种单链跨膜糖蛋白,它主要和高密度脂蛋白结合,也部分地和低密度脂蛋白及极低密度脂蛋白结合^[12]。SR-BI不仅可以协助游离胆固醇的摄入,还可以协助胆固醇酯化物、磷脂及甘油三酯水解产物的摄入^[27]。在Caco-2细胞系中,研究人员发现SR-BI不仅可以促进叶黄素Lutein的吸收,还可以促进 β -类胡萝卜素和玉米黄质的吸收,同时视网膜色素上皮细胞吸收类胡萝卜素也需要SR-BI的参与^[28]。以上结果表明类胡萝卜素的吸收至少部分是通过包括SR-BI在内的转运载体参与的易化运输过程^[29]。作为清道夫受体家族成员,三角帆蚌体内的*hcSRCR1*可能也参与了某些脂蛋白和类胡萝卜素的吸收,这些还需要进一步的验证。同时,在本研究中发现*hcSRCR1*基因的表达水平也与贝壳珍珠质颜色强度这一性状有关。在紫色选育系三角帆蚌中,边缘壳的贝壳珍珠质颜色强度和饱和度显著高于中央壳,而*hcSRCR1*基因在外套膜缘膜部的表达量也相应的显著高于中央膜。结果表明,*hcSRCR1*基因在紫色选育系中的大量表达,可能为类胡萝卜素的吸收和累积提供了大量必要的载体物质基础。经Western blot检测,在三角帆蚌外套膜组织中检测到一条28 ku的高表达条带,与*hcSRCR1*预测成熟肽的大小基本吻合。蛋白表达谱和mRNA表达谱之间具有一致性,均显示三角帆蚌*hcSRCR1*主要在外套膜中表达和分布,且在紫色选育系三角帆蚌外套膜中的表达量显著高于白色选育系,进一步表明了*hcSRCR1*对三角帆蚌贝壳珍珠质的形成及呈色具有重要作用。

生物矿化是一个由基因控制的,由生物体通过生物大分子的调控最终形成复杂无机矿物的过程^[30]。这个过程对双壳类软体动物中贝壳和

珍珠的形成至关重要, 并且对有色贝壳和珍珠来说, 需要大量的钙和有机色素如类胡萝卜素的吸收和富集^[31]。一般而言, 软体动物的贝壳是由角质层、棱柱层及珍珠层组成的。外套膜作为直接参与贝壳和珍珠形成的组织, 在生物矿化过程中起着关键作用。由于贝壳是由不同层次的结构组成的, 与贝壳的结构相对应, 外套膜的不同部位也有着明确的不同分工。外套膜的中褶和外褶之间的壳皮沟主要负责分泌形成角质层的蛋白; 外表皮靠近腹侧的一部分(腹膜), 细胞呈长柱状, 主要分泌形成棱柱层有机基质; 而外套膜外表皮靠近背侧的部分(中央膜), 细胞呈立方体状, 主要分泌形成珍珠层的有机基质^[32-33]。本研究中, 采用原位杂交技术对三角帆蚌 *hcSRCR1* 基因在紫色、白色选育系三角帆蚌外套膜组织中的精确表达位置进行了检测, 以探究其在三角帆蚌贝壳形成及呈色过程中可能发挥的作用。结果显示, *hcSRCR1* 在紫色、白色选育系三角帆蚌外套膜组织中的原位杂交信号没有显著差异, *hcSRCR1* 较强的杂交阳性信号均出现在外套膜外褶的内、外上皮细胞层以及腹膜处的上皮细胞层, 而在中央膜的背膜处以及边缘膜的中褶和内褶处未检测到明显的杂交阳性信号。这些区域主要分布着分泌和增殖功能较强的扁平状上皮细胞, 由此推测三角帆蚌 *hcSRCR1* 主要参与了贝壳珍珠层和棱柱层的形成。珍珠颜色和贝壳内壳色主要体现在珍珠层的颜色, 因此珍珠或贝壳内壳色的形成与生物矿化, 尤其是珍珠层的形成密切相关。珍珠层的无机相为碳酸钙晶体, 约占总质量的 95%, 有机相主要由基质蛋白组成, 基质蛋白在碳酸钙生物矿化中起着重要的调控作用^[34]。研究表明 *SRCR* 结构域具有广泛的配基识别谱, 主要识别结合化学修饰的脂蛋白、磷脂等, 可能在脂类代谢中具有多元的作用机制^[35]。因此, 推测三角帆蚌 *hcSRCR1* 可能是将类胡萝卜素等呈色物质与其他基质蛋白结合起来参与珍珠层的形成并最终致使贝壳内壳呈色, 而具体的机制仍有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 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.
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(in Chinese).
- [2] 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.
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(in Chinese).
- [3] Desmarchelier C, Borel P. Overview of carotenoid bioavailability determinants: from dietary factors to host genetic variations[J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 69: 270-280.
- [4] Liñán-Cabello M A, Paniagua-Michel J, Hopkins P M. Bioactive roles of carotenoids and retinoids in crustaceans[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2002, 8(4): 299-309.
- [5] Zheng H P, Liu H L, Zhang T, et al. Total carotenoid differences in scallop tissues of *Chlamys nobilis* (Bivalve: Pectinidae) with regard to gender and shell colour[J]. *Food Chemistry*, 2010, 122(4): 1164-1167.
- [6] 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.
- [7] Zhang W G, Zhang G S. Dynamic structural color in the nacre of *Hyriopsis cumingii* and its cause[J]. *Optik-International Journal for Light and Electron Optics*, 2017, 135: 252-255.
- [8] Urmos J, Sharma S, Mackenzie F. Characterization of some biogenic carbonates with Raman spectroscopy[J]. *American Mineralogist*, 1991, 76: 641-646.
- [9] Li X L, Bai Z Y, Luo H R, et al. Comparative analysis of total carotenoid content in tissues of purple and white inner-shell color pearl mussel, *Hyriopsis cumingii*[J]. *Aquaculture International*, 2014, 22(5): 1577-1585.
- [10] Li N, Hu J J, Wang S, et al. Isolation and identification of the main carotenoid pigment from the rare orange muscle of the Yesso scallop[J]. *Food Chemistry*, 2010, 118(3): 616-619.
- [11] Toews D P L, Hofmeister N R, Taylor S A. The evolution and genetics of carotenoid processing in animals[J]. *Trends in Genetics*, 2017, 33(3): 171-182.
- [12] Yonekura L, Nagao A. Intestinal absorption of dietary carotenoids[J]. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2007, 51(1): 107-115.

- [13] Miller M M, Robinson C M, Abernathy J, *et al.* Mapping genes to chicken microchromosome 16 and discovery of olfactory and scavenger receptor genes near the major histocompatibility complex[J]. *Journal of Heredity*, 2014, 105(2): 203-215.
- [14] Huang F L, Shiao Y J, Hou S J, *et al.* Cysteine-rich domain of scavenger receptor AI modulates the efficacy of surface targeting and mediates oligomeric A β internalization[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2013, 20: 54.
- [15] Holm D, Fink D R, Steffensen M A, *et al.* Characterization of a novel human scavenger receptor cysteine-rich molecule SCART1 expressed by lymphocytes[J]. *Immunobiology*, 2013, 218(3): 408-417.
- [16] Kiefer C, Sumser E, Wernet M F, *et al.* A class B scavenger receptor mediates the cellular uptake of carotenoids in *Drosophila*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(16): 10581-10586.
- [17] During A, Doraiswamy S, Harrison E H. Xanthophylls are preferentially taken up compared with beta-carotene by retinal cells via a SRBI-dependent mechanism[J]. *Journal of Lipid Research*, 2008, 49(8): 1715-1724.
- [18] Rast J P, Smith L C, Loza-Coll M, *et al.* Genomic insights into the immune system of the sea urchin[J]. *Science*, 2006, 314(5801): 952-956.
- [19] 任晓亮, 侯睿, 王珊, 等. 控制虾夷扇贝闭壳肌积累类胡萝卜素相关基因的筛查[J]. *中国海洋大学学报*, 2012, 42(9): 41-47.
- Ren X L, Hou R, Wang S, *et al.* Identification of genes relating to carotenoids accumulation in adductor muscles of Yesso scallops (*Patinopecten yessoensis*)[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2012, 42(9): 41-47(in Chinese).
- [20] 刘琳. 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)新型清道夫受体的基因克隆、重组表达及活性分析[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2010.
- Liu L. Molecular cloning, recombinant expression and functional analysis of a novel scavenger receptor from Zhikong scallop[D]. Qingdao: Graduate University of Chinese Academy of Sciences (The Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences), 2010 (in Chinese).
- [21] 王照旗, 韩学凯, 白志毅, 等. 三角帆蚌紫色选育系1龄阶段内壳色及生长性状的遗传参数估计[J]. *水产学报*, 2014, 38(5): 644-650.
- Wang Z Q, Han X K, Bai Z Y, *et al.* Estimates of genetic parameters for inner shell color and growth traits during one year old stage in the purple strain of *Hyriopsis cumingii* using microsatellite based parentage assignment[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(5): 644-650(in Chinese).
- [22] 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.
- [23] Whelan F J, Meehan C J, Golding G B, *et al.* The evolution of the class A scavenger receptors[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2012, 12: 227.
- [24] Yap N V L, Whelan F J, Bowdish D M E, *et al.* The evolution of the scavenger receptor cysteine-rich domain of the class A scavenger receptors[J]. *Frontiers in Immunology*, 2015, 6: 342.
- [25] 罗红瑞, 白志毅, 刘晓军, 等. 三角帆蚌*HcCUBDC*基因cDNA的全长克隆与表达分析[J]. *水产学报*, 2015, 39(9): 1313-1323.
- Luo H R, Bai Z Y, Liu X J, *et al.* Full-length cDNA cloning and expression analysis of *HcCUBDC* gene from *Hyriopsis cumingii*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(9): 1313-1323(in Chinese).
- [26] Sun X J, Yang A G, Wu B, *et al.* Characterization of the mantle transcriptome of Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*): identification of genes potentially involved in biomineralization and pigmentation[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0122967.
- [27] Bietrix F, Yan D G, Nauze M, *et al.* Accelerated lipid absorption in mice overexpressing intestinal SR-BI[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(11): 7214-7219.
- [28] Reboul E, Abou L, Mikail C, *et al.* Lutein transport by Caco-2 TC-7 cells occurs partly by a facilitated process involving the scavenger receptor class B type I (SR-BI)[J]. *Biochemical Journal*, 2005, 387(Pt2): 455-461.
- [29] Shyam R, Vachali P, Gorusupudi A, *et al.* All three human scavenger receptor class B proteins can bind and transport all three macular xanthophyll carotenoids[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2017, 634: 21-28.
- [30] Li H M, Zhang B, Fan S G, *et al.* Identification and dif-

- ferential expression of biomineralization genes in the mantle of pearl oyster *Pinctada fucata*[J]. *Marine Biotechnology*, 2017, 19(3): 266-276.
- [31] Cusack M, Curry G, Clegg H, *et al.* An intracrystalline chromoprotein from red brachiopod shells: implications for the process of biomineralization[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Comparative Biochemistry*, 1992, 102(1): 93-95.
- [32] Sudo S, Fujikawa T, Nagakura T, *et al.* Structures of mollusc shell framework proteins[J]. *Nature*, 1997, 387(6633): 563-564.
- [33] Takeuchi T, Endo K. Biphasic and dually coordinated expression of the genes encoding major shell matrix proteins in the pearl oyster *Pinctada fucata*[J]. *Marine Biotechnology*, 2006, 8(1): 52-61.
- [34] Marin F, Luquet G, Marie B. Molluscan shell proteins: primary structure, origin, and evolution[J]. *Current Topics in Developmental Biology*, 2007, 80: 209-276.
- [35] Neubauer E F, Poole A Z, Weis V M, *et al.* The scavenger receptor repertoire in six cnidarian species and its putative role in cnidarian-dinoflagellate symbiosis[J]. *PeerJ*, 2016, 4: e2692.

Cloning and tissue expression of a novel *hcSRCR1* gene in differential inner-shell color pearl mussel *Hyriopsis cumingii*

LI Xilei^{1,2}, LI Qingqing¹, REN Mingdong¹, BAI Zhiyi², LI Jiale^{2*}

(1. College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China;

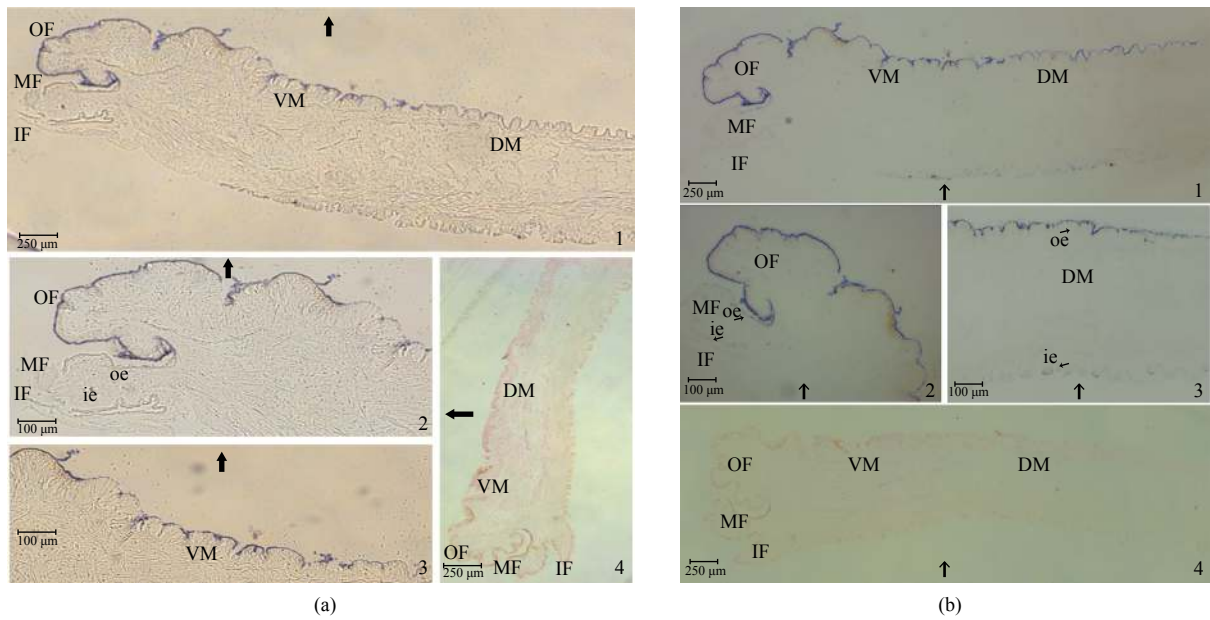
2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: As a superfamily of glycoproteins, scavenger receptors play a crucial role in the identification and assembly of chemically modified lipoproteins. In this study, cDNA of *Hyriopsis cumingii* scavenger receptor cysteine-rich gene (*hcSRCR1*) was cloned by using rapid amplification of cDNA ends (RACE) approaches, then the bioinformatics and expression profiles were analyzed. The complete *hcSRCR1* cDNA consists of 1 000 nucleotides with a 819 bp open reading frame encoding 272 amino acid residues. The molecular weight of *hcSRCR1* was 28.16 ku and pI was 5.55. It was also predicted that protein *hcSRCR1* had two scavenger receptor cysteine rich domains and six conserved cysteine residues. qRT-PCR and Western blot showed that *hcSRCR1* was constitutively expressed in a wide range of tissues with the highest expression level in the mantle. Moreover, differential expression analysis revealed that *hcSRCR1* was more highly expressed in the mantle of purple line mussels compared to white line mussels. *In situ* hybridization investigations of the precise expression site of *hcSRCR1* mRNA in the mantle showed that *hcSRCR1* mRNA is specifically expressed in the inner epithelial cells of the outer fold mantle, as well as throughout the outer epithelium of the outer fold and ventral mantle. Our results suggest that *hcSRCR1* play a role in the formation of shell and pearl color formation, and may provide useful information for further studies on regulation mechanism in the color formation of pearls.

Key words: *Hyriopsis cumingii*; scavenger receptor; shell color; gene cloning; expression pattern

Corresponding author: LI Jiale. E-mail: jlli2009@126.com

Funding projects: China Agriculture Research System (CARS-49); Anhui Agricultural University Talent Introduction and Stable Project (YJ2015-17)



图版 *hcSRCR1*在外套膜中的原位杂交结果

(a) 紫色选育系, (b) 白色选育系; 2、3为1中阳性信号区的放大图像; 4为阴性对照图像; 箭头指向外壳方向, 蓝紫色信号为阳性杂交信号; DM.背膜区, VM.腹膜区, IF.内褶, MF.中褶, OF.外褶, oe.外上皮细胞层, ie.内上皮细胞层

Plate Detection of *hcSRCR1* in the mantle of *H. cumingii* by *in situ* hybridization

(a) purple mussel, (b) white mussel; sections were probed with either *hcSRCR1* antisense (1, 2 and 3) or sense probes (4). Panels are cross-sectional views of the mantle. Block arrows orient images with respect to the shell. Expression is indicated in dark blue and arrow heads, alternative coloration is background. DM. dorsal mantle, VM. ventral mantle, IF. inner fold, MF. middle fold, OF. outer fold, oe. outer epithelium, ie. inner epithelium