



BCO在中华绒螯蟹中的表达模式及进化历史

高亚楠^{1,2}, 熊静怡², 魏茂磊², 张敏^{1*}, 吴旭干^{2*}

¹上海海洋大学 农业农村部鱼类营养和环境生态研究中心, 上海 201306;

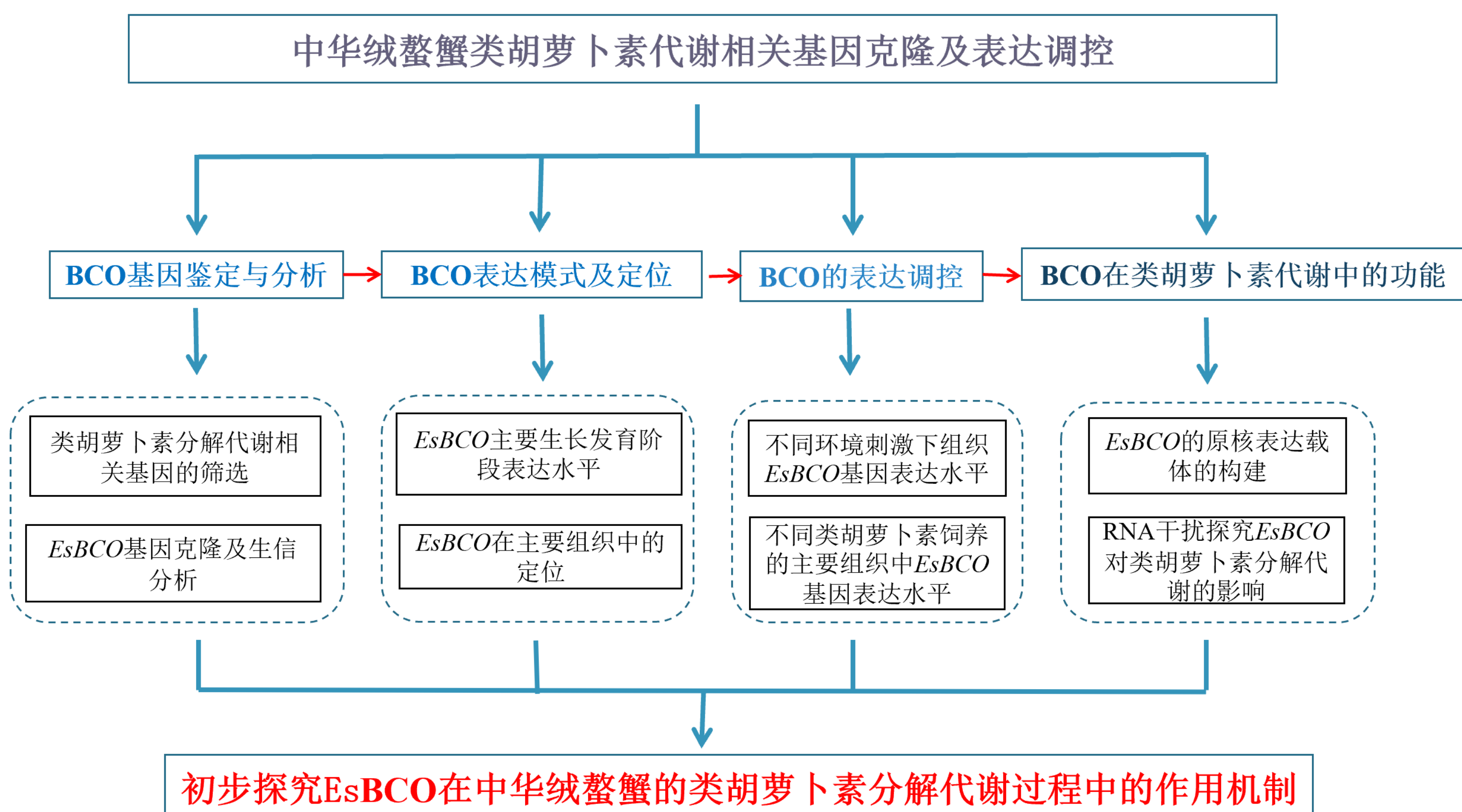
²上海海洋大学 上海水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306;

³上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306

前言

- 类胡萝卜素是自然界中广泛存在的一类天然色素, 是生物体颜色多样的重要物质基础。在自然界上, 仅少数昆虫(如烟粉虱(*Bemisia tabaci*)、柑橘木虱(*Diaphorina citri*)等)能够通过胞内共生细菌合成类胡萝卜素, 绝大多数动物必须通过食物摄取类胡萝卜素。
- 动物体摄入类胡萝卜素后, 通常需要经过类胡萝卜素裂解酶解转化为类维生素A和其他代谢物, 才能进一步行驶其生理功能, 有研究表明绝大部分生物体中都存在类胡萝卜素裂解酶(carotenoid cleavage-oxygenase, CCO)。在脊椎动物中发现类胡萝卜素裂解加氧酶有两种类型, 分别命名为15-, 15'- β -胡萝卜素加氧酶(BCO1)和9-, 10'- β -胡萝卜素加氧酶(BCO2)。
- 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)俗称河蟹, 消费者钟情于其鲜红色的甲壳、美味的口感和丰富的营养价值。目前已有关于中华绒螯蟹对于不同类胡萝卜素的组成和最佳需求的研究, 但关于该物种BCO基因的鉴定、进化和表达模式的信息尚不清楚。
- 本研究以中华绒螯蟹为研究对象, 鉴定BCO1及BCO2基因, 并通过生物信息分析和qPCR对其基因结构、进化选择和表达模式进行了进一步研究。该研究结果为了解甲壳类动物BCO基因的进化和功能提供了有价值的信息。

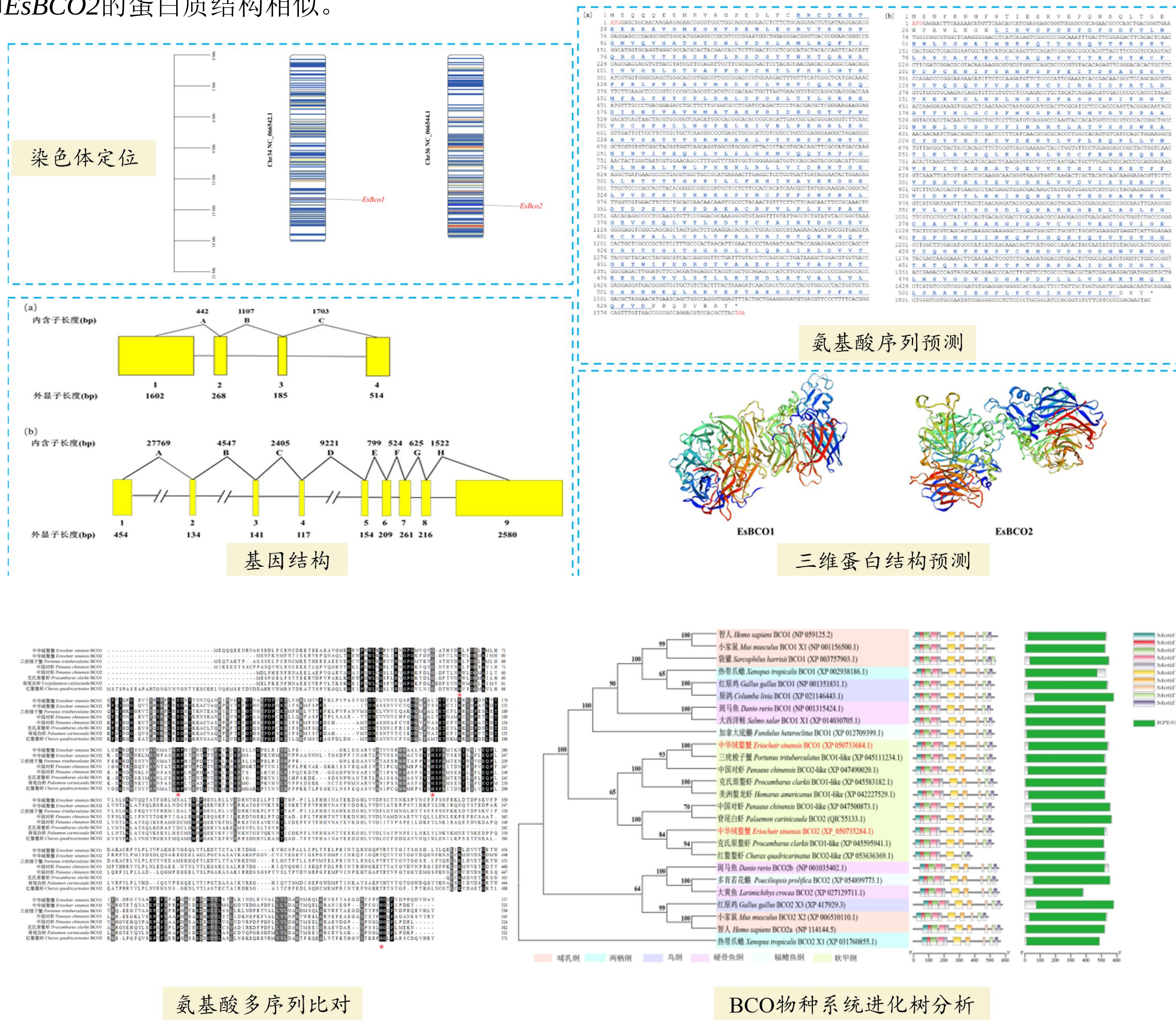
材料与方法



研究结果

中华绒螯蟹EsBCO的生物信息学分析

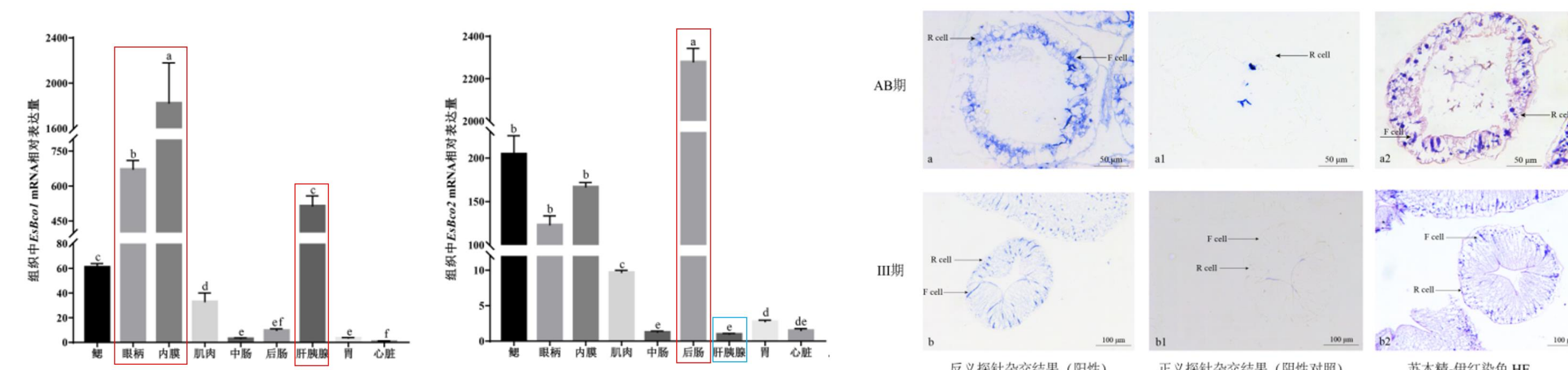
中华绒螯蟹EsBCO1的开放阅读框(ORF)全长为1614 bp(包括终止密码子), 编码537个氨基酸。预测理论等电点为5.95, 蛋白分子量为60.69kD。中华绒螯蟹EsBCO2的ORF全长为1572 bp(包括终止密码子), 编码523个氨基酸。预测理论等电点为5.47, 蛋白分子量为58.67kD。使用TBtools软件对染色体定位进行可视化分析, 结果表明, EsBCO1定位于34号染色体, EsBCO2定位于36号染色体。Splign对比发现EsBCO1基因含有4个外显子和3个内含子, EsBCO2基因含有9个外显子和8个内含子; EsBCO1和EsBCO2均没有跨膜区和信号肽。通过Pfam结构域分析显示EsBCO1和EsBCO2具有典型的RPE65结构域, 分别位于19~529 aa和34~520 aa, 属于CCO家族。利用SWISS-MODEL进行三级结构预测, 发现EsBCO1和EsBCO2的蛋白质结构相似。



研究结果

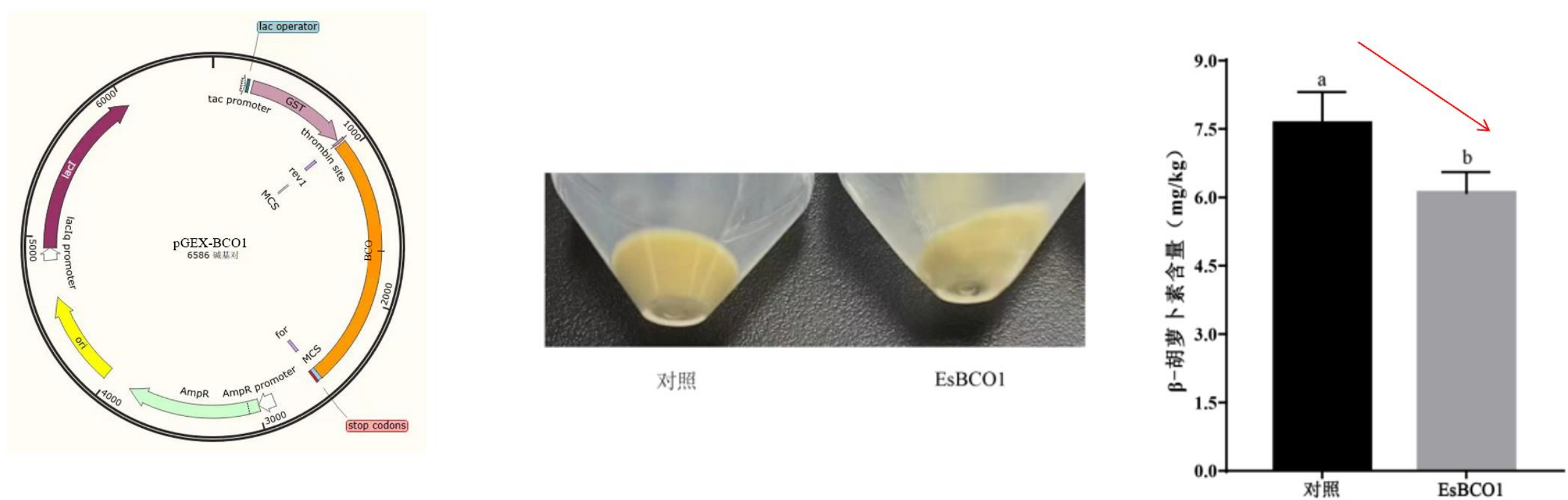
中华绒螯蟹EsBCO的组织分布及定位

在中华绒螯蟹蜕壳C期, EsBCO1在眼柄、内膜和肝胰腺组织中显著高表达($P < 0.05$), 在肠道、胃和心脏组织中低表达。EsBCO2在后肠中显著高表达($P < 0.05$), 鳃、眼柄和内膜中的表达量显著高于肌肉、后肠、肝胰腺、胃和心脏($P < 0.05$), 其中, 中肠和肝胰腺中的表达量最低。EsBCO1在蜕壳AB期和卵巢发育III期的肝胰腺中有阳性信号, 定位于F细胞和R细胞中。



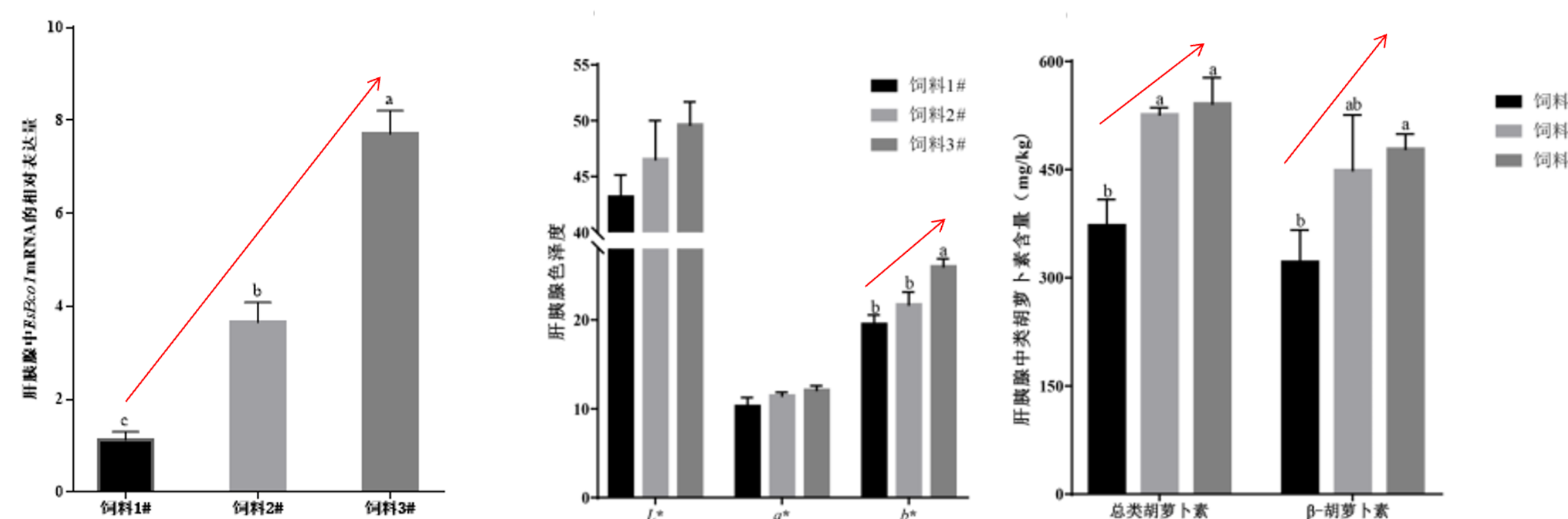
中华绒螯蟹EsBCO1重组蛋白裂解类胡萝卜素含量的能力

原核表达结果显示, 对照组菌体为黄色, 与对照组相比, EsBCO1组的菌体颜色变白。与之对应, HPLC结果显示EsBCO1组的 β -胡萝卜素含量与对照组相比出现显著的降低。



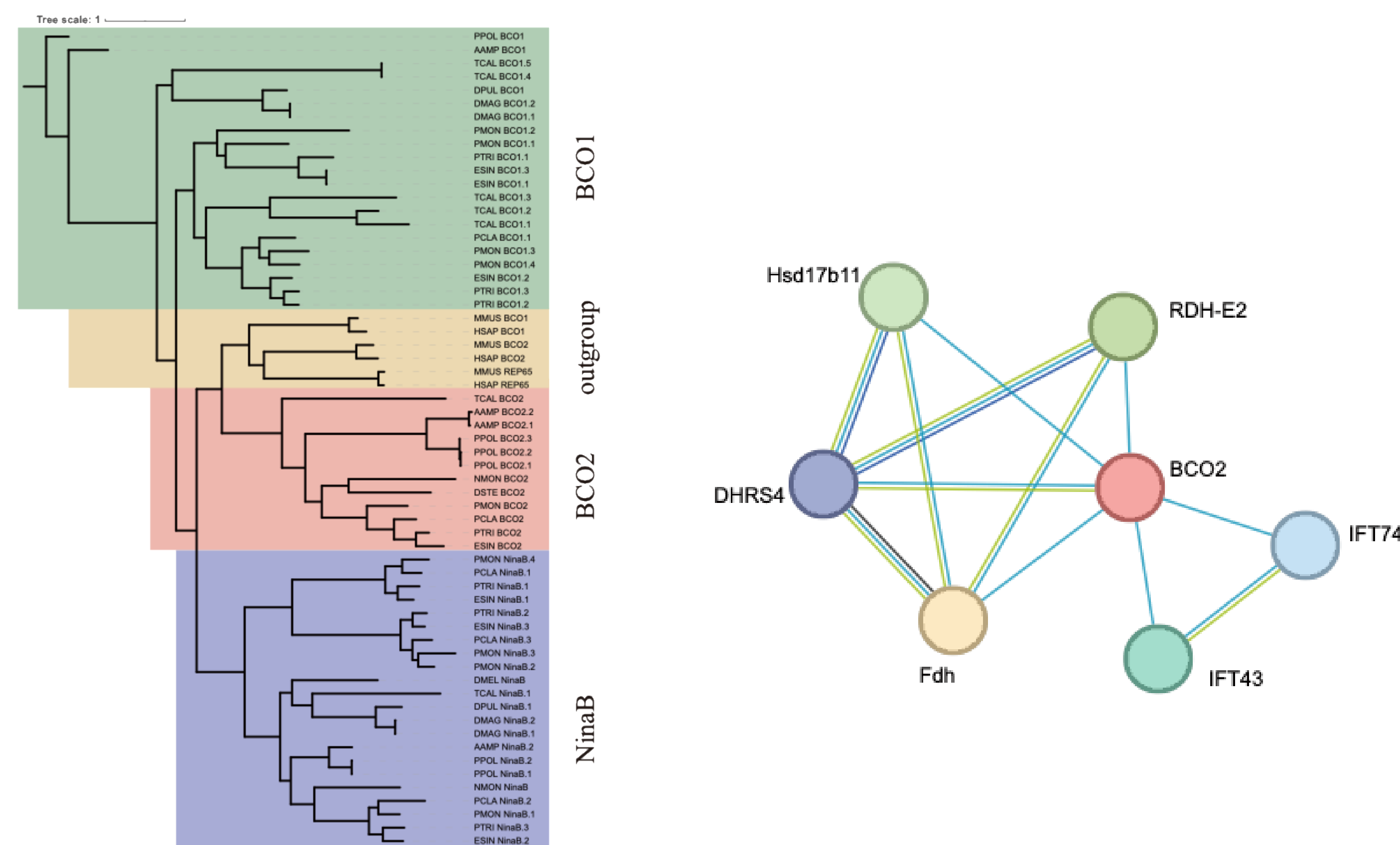
饲料中添加 β -胡萝卜素对中华绒螯蟹肝胰腺色泽和类胡萝卜素组成的影响

肝胰腺色度值 L^* 和 a^* 均随着饲料中 β -胡萝卜素添加量的增加而呈上升趋势, 但差异不显著。肝胰腺 b^* 值在饲料中 β -胡萝卜素水平上升的情况下, 出现显著升高, 其中120 mg/kg β -胡萝卜素饲料组的 b^* 显著高于其他两组($P < 0.05$)。在饲料中 β -胡萝卜素含量增加的情况下, 肝胰腺中总类胡萝卜素和 β -胡萝卜素含量均出现上升趋势。



BCO进化历史及EsBCO2蛋白互作

结果表明, BCO1 是祖先, 然后出现BCO2, 最后是NinaB。此外, NinaB 仅存在于甲壳类动物和果蝇中, 在十足目中经历了两次扩展活动。来自十足目的BCO2的ka/ks比率大约低于来自其他甲壳类动物的BCO2 (0.014 至 0.045 对 0.112 至 0.185) 为了进一步了解 EsBCO2 的上游和下游调控因素, String 数据库预测了蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)分析。结果表明, 6 个基因与 BCO2 存在相互作用, 如 DHRS4、Fdh 等。



结论

- 本实验克隆得到2个EsBCO基因, 都具有保守的功能结构域RPE65, EsBCO1在内膜、眼柄和肝胰腺中高表达, EsBCO2在后肠中表达量高;
- 原位杂交结果显示 EsBCO1 定位于蜕壳AB期和卵巢发育III期肝胰腺的F和R细胞中;
- 原核表达重组蛋白结果表明: EsBCO1组的菌体颜色变白, β -胡萝卜素含量显著降低;
- 随着饲料中类胡萝卜素含量增加, 肝胰腺EsBCO1表达量、肝胰腺 b^* 值、类胡萝卜素含量均显著上升;
- 调查BCO2的进化历史, 发现它起源于BCO1。Ka/Ks 分析表明, 十足目中的BCO2处于较小的选择压力下, 反映了其保守的结构。