



## 中华绒螯蟹 *Scarb1* 基因功能及其与生长性状的关联分析

姜鹏飞, 侯鑫, 王军, 陈晓雯, 王成辉\*

(上海海洋大学, 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306)

**摘要:** 为研究 B 类 I 型清道夫受体 (SCARB1/SR-BI) 在中华绒螯蟹代谢、生长以及免疫等生物学过程中的分子功能, 实验对中华绒螯蟹 *Scarb1* 的克隆及时空表达进行了分析, 观察了 RNA 干扰该基因后的相关组织结构和类胡萝卜素含量变化, 筛选了该基因的 SNP 标记并与生长相关性状进行关联分析。结果显示, 中华绒螯蟹的 *Scarb1* 由 2 个外显子和 1 个内含子组成, 开放阅读框为 2 415 bp, 编码 805 个氨基酸; 系统进化分析显示中华绒螯蟹与三疣梭子蟹的氨基酸同源性高达 80.51%, 具有较高的物种间保守性。该基因在不同蜕壳时期的肝胰腺、肠道、血淋巴细胞、心脏、鳃和肌肉组织中均有表达, 但在肝胰腺、肠道和血淋巴细胞中的表达量相对较高。RNA 干扰 *Scarb1* 后, 组织切片观察发现肝胰腺的肝小管管腔模糊并产生了部分空泡化结构, 肠道内膜的肌肉层和黏膜下层处出现显著空洞现象; 肝胰腺的颜色由黄色变成灰白色, 其中的类胡萝卜素含量显著下降。在该基因的第一外显子筛选到 1 个 SNP 位点 (C432T) 与蜕壳后体重和壳长增长率存在显著相关性。本研究结果为 *Scarb1* 在中华绒螯蟹的遗传研究和育种应用提供参考。

**关键词:** 中华绒螯蟹; *Scarb1*; 基因表达; 基因敲降; SNP 位点; 生长性状

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

B 类 I 型清道夫受体 (SCARB1/SR-BI) 是一种跨膜蛋白, 是 CD36 超家族的一员。SCARB1 作为高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 和低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 的转运受体, 能够介导胆固醇酯的选择性摄取<sup>[1-2]</sup>、转运<sup>[3]</sup>和胆固醇的逆转运<sup>[4-5]</sup>, 以及参与各种固醇相关激素的调节过程<sup>[6]</sup>和先天性免疫反应<sup>[7]</sup>。此外, SCARB1 在类胡萝卜素吸收和运输中也具有极为重要的作用<sup>[8-9]</sup>。

*Scarb1* 在水产生物中的研究较为少见, Sundvold 等<sup>[10]</sup>对大西洋鲑 (*Salmo salar*) 中 *Scarb1* 和 *Scarb1-2* 的结构和表达等进行了研究; 杜金星等<sup>[11-12]</sup>

报道了 *Scarb1* 在瓯江彩鲤 (*Cyprinus carpio* var. *color*) 红、白体色方面的作用, 发现敲除 *Scarb1* 后, 瓯江彩鲤的类胡萝卜素吸收与运输功能产生障碍, 全红皮肤断裂, 红色区域大范围褪色为白色。在蟹类方面, 吴耀萌等<sup>[13-14]</sup>首次发现并鉴定了一种 B 类清道夫受体 (*EsSR-B1*), 认为其在血淋巴细胞吞噬作用中起关键作用。Kong 等<sup>[15]</sup>首次报道了拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 的 B 类清道夫受体及在抗白斑病方面的作用。杨宁等<sup>[16]</sup>利用免疫荧光技术在蛋白水平上研究了三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) B 类清道夫受体在消化道、肝胰腺、心脏及肌肉组织中的分布和在血淋巴细

收稿日期: 2022-04-10 修回日期: 2022-09-05

资助项目: 上海市中华绒螯蟹现代农业产业技术体系建设项目 (沪农科产字 2022-4 号)

第一作者: 姜鹏飞 (照片), 从事分子生物学研究, E-mail: 827061574@qq.com

通信作者: 王成辉, 从事水产动物种质资源与种苗工程研究, E-mail: wangch@shou.edu.cn



胞中的定位。总体说来, 与该基因的重要性相比, 其在蟹类上的研究极为薄弱。

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 俗称河蟹, 是我国重要的经济蟹类, 已成为很多地区水产养殖业的支柱产业<sup>[7]</sup>。生长和病害是中华绒螯蟹产业中两个最受关注的主题, 选育生长快、抗病力强的中华绒螯蟹新品种是主要育种方向之一。本实验通过基因克隆、时空表达分析和 RNA 干扰, 分析了中华绒螯蟹 *Scarb1* 的结构和功能, 筛选该基因的 SNP 标记并通过与生长相关性状的关联分析, 以期中华绒螯蟹的遗传研究和育种应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验蟹的饲养与生长性状测定

实验用蟹为处于蜕壳间期的“江海 21”幼蟹, 来自上海海洋大学水产动物种质试验站, 规格为 (16.84±5.68) g/只, 附肢健全, 饲养在循环水恒温河蟹个体养殖系统内 (遵循本实验室动物管理规定)。实验周期为所有实验蟹完成一个蜕壳周期。实验期间每天晚上 8:00 投喂饲料, 第二天早上 8:00 捞取残饵与粪便。记录初始体重 (Sartorius-AG BS124S 电子天平测量)、壳长和壳宽 (游标卡尺测定), 蜕壳 7 d 后再记录体重、壳长、壳宽, 统计这些指标的蜕壳后增长率:

$$GR = (T_2 - T_1) / T_1 \times 100\%$$

式中, *GR* 为生长相关性状 (体重、壳长和壳宽) 的蜕壳增长率 (%);  $T_1$  为生长相关性状的蜕壳前测量值 (g/cm);  $T_2$  为生长相关性状的蜕壳后测量值 (g/cm)。

### 1.2 *Scarb1* 的克隆与同源性比较

从实验蟹的第三步足基部柔软膜处抽取血淋巴液 200  $\mu$ L, 参照本实验室的方法进行 RNA 提取、cDNA 合成及 *Scarb1* 的克隆<sup>[18]</sup>。扩增所需的引物如表 1 所示。扩增产物经克隆后送生工生物工程 (上海) 有限公司进行测序。最后通过对比已发表的中华绒螯蟹基因组确定该基因的相关结构。

从 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载其他相关物种的 *Scarb1* 并翻译成氨基酸序列: 斑节对虾 (*Penaeus monodon*, XP\_037793733.1); 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*, XP\_027208402.1); 日本对虾 (*Penaeus japonicus*, QIH\_55563.1); 三

疣梭子蟹 (MPC\_11265.1); 斑马鱼 (*Danio rerio*, NP\_944603.2); 小鼠 (*Mus musculus*, NP\_001192011.1); 人 (*Homo sapiens*, NP\_001076428.1)。使用 DNAMAN 进行多序列比对和同源比较, 使用 MEGAX 构建亲缘关系树, 使用 ML (Maximum Likelihood) 计算方法, 设定 bootstrap 为 1 000。

### 1.3 *Scarb1* 的时空表达分析

分别取蜕壳前期、后期和间期的实验蟹各 6 只, 在无菌环境下解剖取肝胰腺、肠道、鳃、心脏、血淋巴细胞、肌肉共 6 种组织提取总 RNA 并合成 cDNA。应用在线网站 (<https://www.genscript.com/tools/real-time-pcr-taqman-primer-design-tool>) 设计 qPCR 引物 (表 1)。qPCR 的反应体系为 20  $\mu$ L, 包括 SYBR Green remix Ex Taq 10  $\mu$ L, 上下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 0.4  $\mu$ L, cDNA (1  $\mu$ g/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 8.2  $\mu$ L。反应条件为两步法扩增程序: 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 94  $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 40 个循环; 设置熔解曲线温度从 65  $^{\circ}$ C 每 5 s 上升 0.5  $^{\circ}$ C, 逐步提高到 95  $^{\circ}$ C。每个样本设置 3 个技术重复, 并作空白对照。

按照  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法进行基因的相对表达量计算。当比较不同蜕壳阶段基因的相对表达量时, 以蜕壳前期的  $C_t$  值作为对照。具体计算方法:  $\Delta\Delta C_t = [(C_{t_{目的}} - C_{t_{内参}})_{蜕壳阶段} - (C_{t_{目的}} - C_{t_{内参}})_{蜕壳前期}]$ 。当计算同一个蜕壳阶段不同组织的基因相对表达量时, 则以鳃组织的  $C_t$  值作为对照。使用 Graphpad prism 9.0.0 分析相对表达量的差异性。

### 1.4 RNA 干扰实验

从在线网站 (<http://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaidesigner/>) 设计用于合成中华绒螯蟹 *Scarb1* 的 dsRNA 引物 (表 1)。根据本实验室前期的 RNA 干扰成果和本研究的预实验结果, 选取注射剂量为 3  $\mu$ g/g 作为 RNA 干扰剂量。随机挑选处于蜕壳间期的“江海 21”幼蟹分为 3 组, 每组 8 只蟹。干扰组 1 为每 2 d 注射 1 次 dsRNA, 至 15 d 结束 (简称 15 d 干扰组), 干扰组 2 也为每 2 d 注射一次 dsRNA, 至 30 d 结束 (简称 30 d 干扰组), 最后 1 组为对照组, 每 2 d 注射同剂量的双蒸水, 至 30 d 结束。

实验结束时, 对每组实验蟹进行肝胰腺和肠道取样。肝胰腺在拍照观察后, 取适量组织用于类胡萝卜素含量测定和组织学观察。取肠道中段

表 1 *Scarb1* 基因克隆、表达检测和 RNA 干扰试验的引物

引物 primers	序列(5'-3') sequences	用途 usage
<i>Scarb1</i> -1F	GACGTGGACGAGATGAAGGT	<i>Scarb1</i> 序列1
<i>Scarb1</i> -1R	GTTGACGAAGGGGATGTTGA	
<i>Scarb1</i> -2F	TCTAAAGGGAGCGAGAACGA	<i>Scarb1</i> 序列2
<i>Scarb1</i> -2R	CGTGAGAGCTGTGCAGAGAG	
<i>Scarb1</i> -3F	CTCTCTGCACAGCTCTCACG	<i>Scarb1</i> 序列3
<i>Scarb1</i> -3R	GCATCTCACTCCGCCTACTC	
<i>Scarb1</i> -qper1-F	ACATCTCCACAGTGTCCTG	<i>Scarb1</i> 荧光定量引物
<i>Scarb1</i> -qper1-R	ATCTGACGTCTCCTCCTCT	
Es-S27-F	GGTCGATGACAATGGCAAGA	内参引物S-27
Es-S27-R	CCACAGTACTGGCGGTCAA	
<i>Scarb1</i> -ds-F	GCTGAACCAGTGGAGTGTG	dsRNA引物
<i>Scarb1</i> -ds-R	AGACAGGTGAGGCTGGAAGA	
<i>Scarb1</i> -T7-ds-F	taatacgaactactatagggGCTGAACCAGTGGAGTGTG	dsRNA引物(带T7)
<i>Scarb1</i> -T7-ds-R	taatacgaactactatagggAGACAGGTGAGGCTGGAAGA	
<i>Scarb1</i> -W1-F	TACCCACGAACAGGAGAAGG	<i>Scarb1</i> SNP筛选引物
<i>Scarb1</i> -W1-R	TCGTTCTCGCTCCCTTTAGA	

用于组织学观察。组织学观察采用常规的石蜡切片,并在显微镜下(LEICA-DM500)观察拍照。

取适量肝胰腺组织与丙酮按照 0.1 g/mL 比例混合,用超声波破碎机(XM-150T)进行破碎,破碎完成后置于离心机中 3 000 r/min, 4 °C 离心 5 min,吸取上清 1.5 mL,重复 3 次;使用紫外分光光度计(EVO-60)于波长 447 nm 处测定吸光度值,用于肝胰腺类胡萝卜素含量测定。

### 1.5 *Scarb1* 的 SNP 筛选与生长性状关联分析

设计扩增 *Scarb1* 第一外显子部分序列的引物(表 1),取本实验室前期实验的 175 只中华绒螯蟹蜕壳后增长率数据,参见本实验室方法进行 DNA 提取和 PCR 扩增<sup>[19]</sup>,产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。使用 Bioedit 软件比对序列并结合峰图筛选 *Scarb1* 的 SNP 位点。随后将筛选到的 SNP 位点与 175 只蟹的生长性状(蜕壳后的增重率、壳长增长率、壳宽增长率)进行关联分析,使用 Graphpad Prism 9.0.0 将生长性状与基因型进行统计显著差异性检验。对筛选出的 SNP 位点进行生长性状的百分位排序统计,分析基因型频率在百分位中的分布特征。

## 2 结果

### 2.1 中华绒螯蟹 *Scarb1* 的基因结构与同源性分析

经克隆和测序,中华绒螯蟹 *Scarb1* 由 2 个外显子(1 012、1 403 bp)和 1 个内含子(32 181 bp)组成,其开放阅读框全长为 2 415 bp(GenBank 登录号:OM 824436),共编码 805 个氨基酸,具有一个 CD36 结构域。氨基酸序列多重比对和相关物种构建的系统进化树(图 1)表明,中华绒螯蟹与三疣梭子蟹的同源性最高,氨基酸序列的相似性达 80.51%,与同为节肢动物的对虾类物种的同源性在 72.84% 以上,*Scarb1* 在不同物种间具有较高的保守性。

### 2.2 中华绒螯蟹 *Scarb1* 基因的时空表达分析

研究发现,中华绒螯蟹 *Scarb1* 在不同蜕壳时期的肝胰腺、肠道、血淋巴细胞、心脏、鳃和肌肉组织中均有表达。综合来看,在肝胰腺、肠道和血淋巴细胞中的表达量相对较高,如蜕壳前期血淋巴细胞中的表达量最高(图 2-a),蜕壳后期肝胰腺的表达量最高(图 2-a),蜕壳间期肠道中的表达量最高(图 2-a),而肌肉组织在 3 个蜕壳时期的

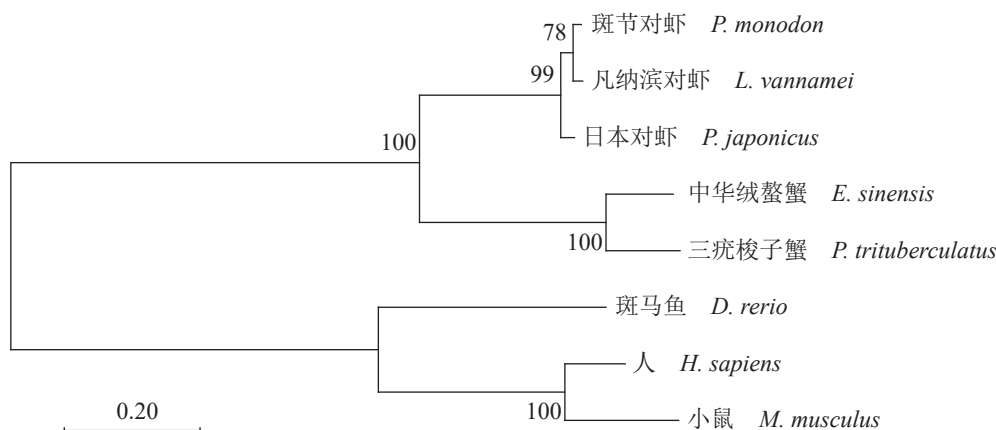


图1 中华绒螯蟹与相关物种 *Scarb1* 的氨基酸序列系统树

Fig. 1 Phylogenetic tree of *E. sinensis* and other relative species based on amino acid sequences of *Scarb1* gene

表达量均最低(图2-a, b, c)。

从蜕壳周期看, *Scarb1* 在肝胰腺、心脏和肌肉均是蜕壳后期的表达量最高, 然后是蜕壳前期, 蜕壳间期的表达量最低, 但均不存在显著的统计差异 ( $P > 0.05$ )(图2-d, g, i); 在鳃与肠道的表达量均在蜕壳间期显著高于蜕壳前期与蜕壳后期 ( $P < 0.05$ )(图2-e, h); 而在血淋巴细胞中的表达量是从蜕壳前期, 到后期和间期逐步降低, 但没有显著差异 ( $P > 0.05$ )(图2-f)。

### 2.3 RNA 干扰效应研究

经 15 d 干扰, 实验蟹的肝胰腺颜色较对照组变浅(图3-a), 其类胡萝卜素含量 [(7.37±1.19) mg/kg] 较对照组 [(9.91±2.90) mg/kg] 下降 25.64%(图3-b)。组织观察发现, 15 d 干扰后的基膜(Bm)完整, 肝胰腺肝小管管腔(Lu)腔壁出现模糊状, 细胞排列开始紊乱<sup>[20-22]</sup>; 而对照组肝胰腺的基膜完整、肝小管管腔清晰、细胞无坏死解体现象。15 d 干扰组的肠道内膜肌肉层和黏膜下层处出现明显的空洞现象(图3-c)。

经 30 d 干扰, 实验蟹的肝胰腺颜色变为灰白色(图3-a), 其类胡萝卜素含量 [(4.03±2.18) mg/kg] 较对照组下降 59.36%(图3-b)。组织观察发现, 肝胰腺肝小管管腔腔壁模糊状加剧并产生了部分空泡化结构, 细胞排列紊乱增多; 肠道内膜肌肉层和黏膜下层处的空洞变得更大(图3-c)。

### 2.4 SNP 标记筛选与生长性状的关联分析

对 175 个中华绒螯蟹样本的 *Scarb1* 进行扩增和测序, 在第 1 外显子上鉴定到 3 个 SNP 位点(C432T、C672T、G684T)。将此 3 个 SNP 位点与

生长性状进行关联分析, 发现 SNP C432T 的 TT 基因型的蜕壳后增重率和壳长增长率都显著高于 TC 和 CC 基因型 ( $P < 0.05$ ), 而壳宽增长率没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。而另 2 个位点(SNP C672T 和 SNP G684T)的基因型与生长相关性状均没有显著的关联性(表2)。

将 SNP 位点与 3 个生长相关性状进行百分位排序分析, 发现 SNP C432T 的 TT 基因型的数量在生长性状的百分比区间内, 从低到高呈现上升趋势(图4-a, d, g)。而 SNP C672T 和 SNP G684T, 以及 SNP C432T 的其他基因型在百分比区间没有表现出增加或降低的规律性(图4)。

## 3 讨论

本研究获得中华绒螯蟹 *Scarb1* 的 CDS 全长为 2 415 bp, 共编码 805 个氨基酸, 具有一个 B 类清道夫受体的 CD36 结构域, 与三疣梭子蟹氨基酸同源性高达 80.51%, 表明该基因在不同物种间具有较高的保守性, 有较为重要的生物学功能。组织时空表达分析发现, 该基因在肝胰腺、肠道和血淋巴细胞中高表达, 且在蜕壳间期的肠道中高表达, 可能是因为肠道作为重要的消化器官, 并通过 *Scarb1* 介导吸收脂质<sup>[23-25]</sup>与脂溶性类胡萝卜素<sup>[26-27]</sup>, 为中华绒螯蟹的生长积累能量。在蜕壳各时期的血淋巴细胞中较平均表达, 表明该基因在脂质转移过程中发挥作用<sup>[28]</sup>。蜕壳后期肝胰腺中 *Scarb1* 表达量有明显升高现象, 这可能是河蟹刚完成蜕壳, 急需通过 *Scarb1* 介导将脂类转运到肝胰腺<sup>[29-31]</sup>, 并分解代谢产生能量, 以满足蜕壳后的生长发育。总的来说, 在中华绒螯蟹体内, 肠道内 *Scarb1* 可能介导脂质的吸收, 并通过血淋

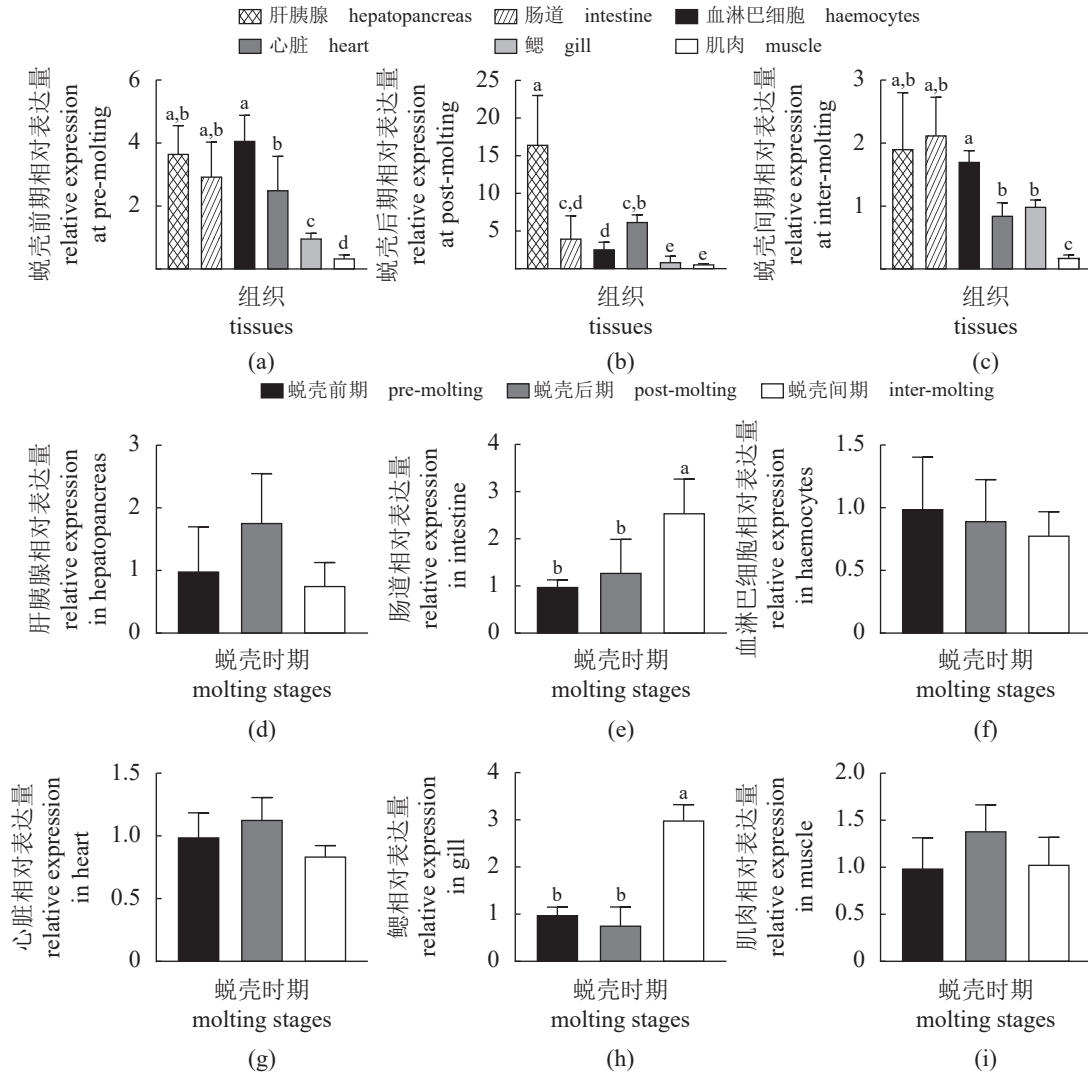


图2 中华绒螯蟹 *Scarb1* 在不同蜕壳时期和不同组织中的表达变化

(a, b, c) *Scarb1* 在不同组织的表达比较; (a) 蜕壳前期, (b) 蜕壳后期, (c) 蜕壳间期; (d, e, f, g, h, i) *Scarb1* 在相关组织不同蜕壳时期的表达比较; (d) 肝胰腺, (e) 肠道, (f) 血淋巴细胞, (g) 心脏, (h) 鳃, (i) 肌肉。图中的不同小写字母表示组间存在显著差异 ( $P < 0.05$ )

**Fig. 2 Spatio-temporal expression profiles of *scarb1* gene among different tissues and molting stages in *E. sinensis***

(a, b, c) the expression profiles of *Scarb1* gene among different tissues, (a) pre-molting, (b) post-molting, (c) inter-molting. (d, e, f, g, h, i) the expression profiles of *Scarb1* gene among different molting stages in relative tissues, (d) hepatopancreas, (e) intestine, (f) haemocytes, (g) heart, (h) gill, (i) muscle. Different lowercase letters indicates significant differences among groups ( $P < 0.05$ )

巴细胞将脂质转运到肝胰腺进行积累、分解代谢。然而, SCARB1 作为免疫受体, 其在蛋白层面的研究将是本研究结果的重要支撑, 后续将进一步开展 SCARB1 蛋白在中华绒螯蟹不同蜕壳时期以及相关组织中的表达研究以支持本研究结论。

动物从外界食物中获得类胡萝卜素后, 首先在肠道中对类胡萝卜素进行分解吸收, 随后在特异的载体下转移至特定组织。由于类胡萝卜素的脂溶性及高度疏水性, 需要特定的脂蛋白或载脂蛋白从血液或者血淋巴中运输, 随后转移至特定组织进行沉积。所以动物血液中类胡萝卜素的吸

收和运输与脂肪酸、脂蛋白、胆固醇等密切相关。清道夫受体 (scavenger receptors) 具有跨膜运输的分子特性, 通常结合化学修饰后的脂蛋白或者其他阴离子配体, 参与细胞内类胡萝卜素的吸收过程<sup>[26]</sup>。本实验发现, *Scarb1* 经 RNA 干扰后, 实验蟹的肝胰腺表观颜色由原来的黄色变为灰白色, 肝小管管腔和肝细胞的组织结构也发生了较大变化, 特别是类胡萝卜素含量显著降低, 表明实验蟹体内的脂溶性类胡萝卜素吸收与转运等发生了障碍。同时, 肠道组织结构也产生一定的变化, 表现为肠道内膜肌肉层和黏膜下层处的空洞变得更

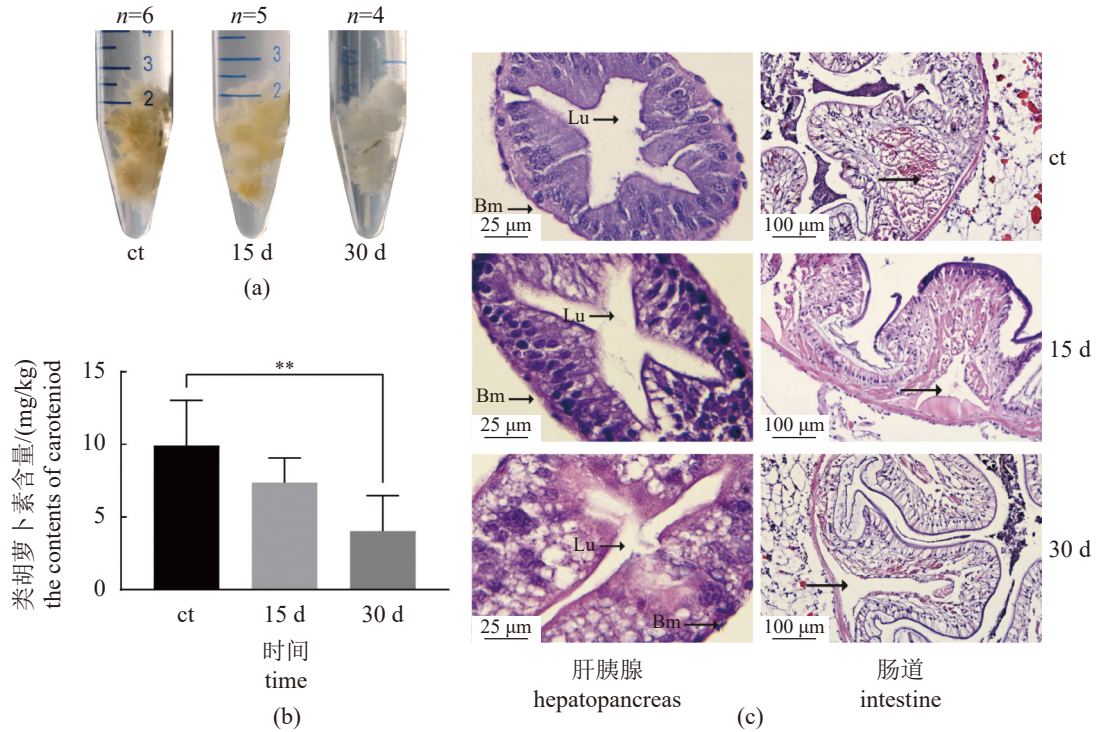


图3 中华绒螯蟹 *Scarb1* 干扰后的肝胰腺颜色、类胡萝卜素含量和相关组织结构比较

(a) 中华绒螯蟹 *Scarb1* 干扰后的肝胰腺颜色比较, "n"代表最终收集的合格样品的数量; (b) 中华绒螯蟹 *Scarb1* 干扰后的肝胰腺内类胡萝卜素含量变化, "\*\*\*"表示组间存在极显著差异 ( $P < 0.01$ ); (c) 中华绒螯蟹 *Scarb1* 干扰后的肝胰腺与肠道组织切片观察, ct: 对照组; 15 d: 15 d RNA 干扰组; 30 d: 30 d RNA 干扰组; Bm: 基膜; Lu: 管腔

Fig. 3 Comparisons of coloration, carotenoid contents in hepatopancreas and histological observation in relative tissues after *Scarb1* gene interference in *E. sinensis*

(a) comparison of hepatopancreas coloration after *Scarb1* gene interference in *E. sinensis*, "n" indicates the number of lastly qualified samples; (b) carotenoid content change in hepatopancreas after *Scarb1* gene interference in *E. sinensis*, "\*\*\*" indicates significant differences among groups ( $P < 0.01$ ); (c) histological observation in hepatopancreas and intestinal tissues after *Scarb1* gene interference in *E. sinensis*, ct: control group; 15 d: RNAi for 15 day; 30 d: RNAi for 30 day; Bm: basement membrane; Lu: lumen

表2 *Scarb1* 不同突变位点基因型与生长性状的关联性比较

Tab. 2 Association comparisons between genotypes and growth traits of the SNP sites in *Scarb1* gene

位点 SNP sites	基因型 genotypes	样本量/个 numbers	频率/% frequencies	体重增长率/% weight gain rate	壳长增长率/% carapace length gain rate	壳宽增长率/% carapace width gain rate
C432T	CC	42	24.00	0.47±0.11 <sup>b</sup>	0.14±0.03 <sup>b</sup>	0.13±0.02
	TC	82	46.86	0.46±0.11 <sup>b</sup>	0.14±0.04 <sup>b</sup>	0.13±0.03
	TT	51	29.14	0.53±0.11 <sup>a</sup>	0.17±0.04 <sup>a</sup>	0.13±0.03
C672T	CC	133	76.00	0.48±0.11 <sup>b</sup>	0.15±0.04	0.13±0.03
	TC	37	21.14	0.52±0.12 <sup>a</sup>	0.16±0.05	0.13±0.03
	TT	5	2.86	0.43±0.05 <sup>ab</sup>	0.12±0.02	0.13±0.01
G684T	GG	22	12.57	0.49±0.11	0.17±0.05	0.13±0.03
	TG	72	41.14	0.48±0.11	0.15±0.04	0.14±0.03
	TT	81	46.29	0.49±0.11	0.15±0.04	0.13±0.03

大, 会影响肠道对类胡萝卜素的吸收, 进而造成向其他组织转运的类胡萝卜素减少。因而, 本研究进一步证明, *Scarb1* 在类胡萝卜素的吸收和运输等方面发挥了重要作用<sup>[32-33]</sup>, 从而对中华绒螯

蟹的生长和发育产生影响<sup>[9, 34]</sup>。

蜕壳是中华绒螯蟹等甲壳动物生长发育的生理过程, 每蜕一次壳, 中华绒螯蟹的体重和体型发生一次跳跃式增长。据报道, 中华绒螯蟹蜕壳

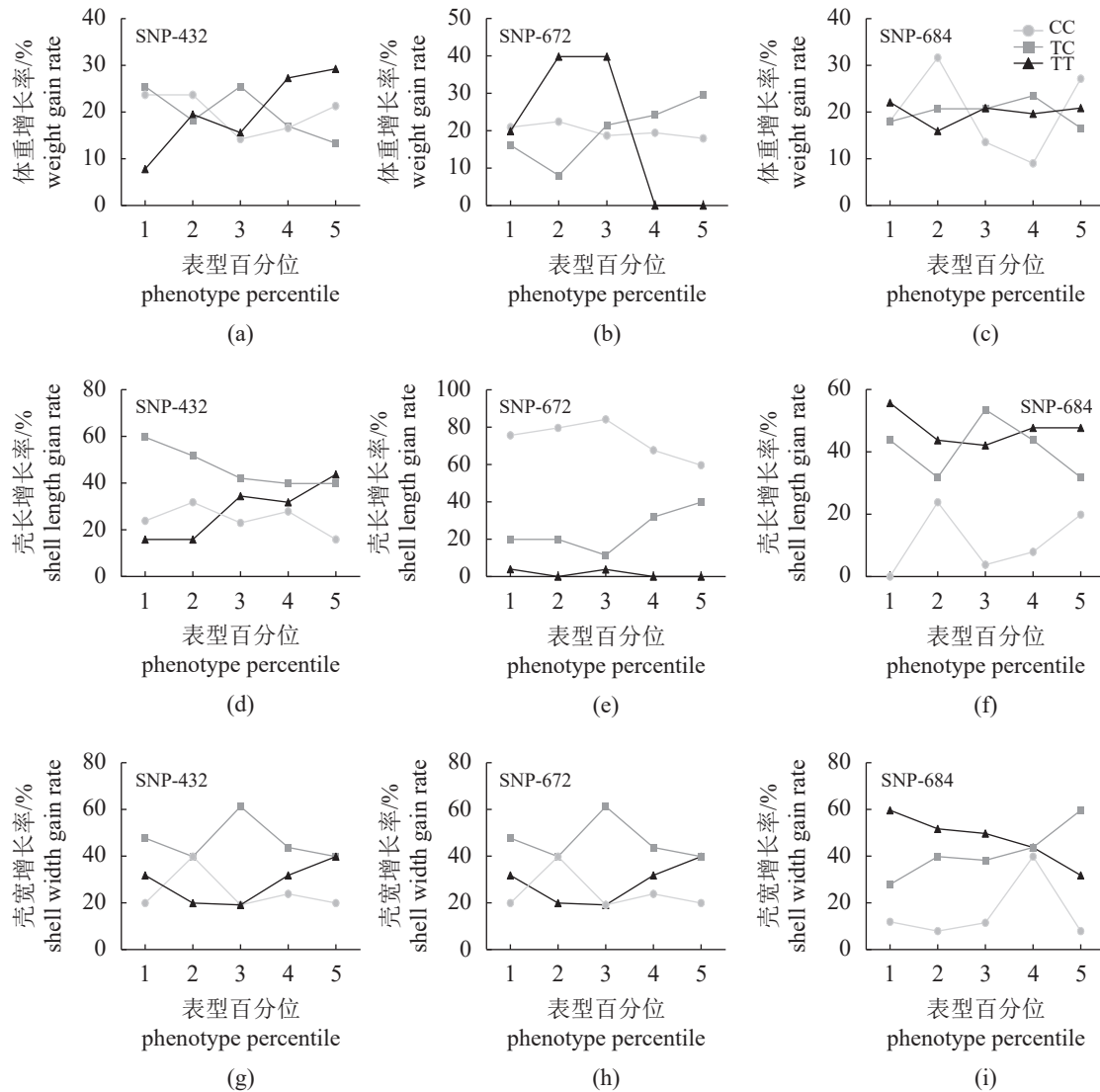


图4 中华绒螯蟹 *Scarb1* 不同表型百分位的基因型分布图

横坐标数字 1~5 指生长性状的表型百分位 (1: 0%~20%, 2: 20%~40%, 3: 40%~60%, 4: 60%~80%, 5: 80%~100%), 表型百分位越高则相应性状的增长率越大

Fig. 4 Schematic diagram of genotype distribution of different phenotypes percentile of *scarb1* gene in *E. sinensis*

Numbers 1 to 5 indicates the phenotype percentile of growth traits (1: 0%~20%, 2: 20%~40%, 3: 40%~60%, 4: 60%~80%, 5: 80%~100%), the higher phenotype percentile indicates the larger growth rate

后的体重增长率差异很大, 蜕壳后增生率低的仅为 5.9%, 高的达 160.0%<sup>[35]</sup>。中华绒螯蟹作为较为低等的无脊椎动物, 且具有开放式血液循环系统, 生长易受到环境条件影响, 与鱼类等脊椎动物相比, 其生长的遗传与环境互作效应更为明显。对于受环境效应影响大的物种开展其良种选育时, 分子标记辅助育种或基因组选择育种比传统的表型育种将具有更为有效的选育效果。在 2011 年, 吴滢等<sup>[36]</sup>报道了中华绒螯蟹 4 个微卫星标记与生长性状的相关性。2018 年, 陈义培等<sup>[19]</sup>报道了中华绒螯蟹 MSTN 的 SNP 标记与生长性状的相关性。

但总体上, 中华绒螯蟹分子标记与生长性状的相关性研究仍非常匮乏, 中华绒螯蟹分子标记辅助育种进展十分缓慢, 用于育种的分子标记极为稀少。本研究初步筛选到 *Scarb1* 的一个 SNP 位点与蜕壳后生长相关性性状的增长率存在显著相关性, 且表型的百分位与基因型频率存在较为明显的同步增长趋势, 该位点可作为潜在的分子辅助育种标记。由于该位点为同义突变位点, 分析的样本量仍较少, 其在中华绒螯蟹育种上的应用需进一步验证。

## 4 结论

中华绒螯蟹 *Scarb1* 由 2 个外显子和 1 个内含子组成, 编码 805 个氨基酸, 具有一个 CD36 结构域和较高的保守性。该基因在中华绒螯蟹不同蜕壳时期的肝胰腺、肠道和血淋巴细胞中的表达量相对较高, 而肌肉中的表达量最低。敲降该基因后, 造成中华绒螯蟹的肝胰腺颜色变成灰白色, 其中的类胡萝卜素含量显著下降, 肝胰腺和肠道组织的空泡化结构增多。初步筛选到该基因的一个 SNP 标记与生长相关性状具有关联性, 且表现出表型百分位与基因型频率的同步增长趋势。因而, 结合该基因在免疫上的作用和功能, 可将 *Scarb1* 作为中华绒螯蟹选择育种研究的一个候选基因。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

### 参考文献 (References):

- [1] Thuahnai S T, Lund-Katz S, Dhanasekaran P, et al. Scavenger receptor class B type I-mediated cholesteryl ester-selective uptake and efflux of unesterified cholesterol: Influence of high density lipoprotein size and structure[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(13): 12448-12455.
- [2] Out R, Hoekstra M, Spijkers J A A, et al. Scavenger receptor class B type I is solely responsible for the selective uptake of cholesteryl esters from HDL by the liver and the adrenals in mice[J]. *Journal of Lipid Research*, 2004, 45(11): 2088-2095.
- [3] Silver D L, Tall A R. The cellular biology of scavenger receptor class B type I[J]. *Current Opinion in Lipidology*, 2001, 12(5): 497-504.
- [4] Mavridou S, Venihaki M, Rassouli O, et al. Feedback inhibition of human scavenger receptor class B type I gene expression by glucocorticoid in adrenal and ovarian cells[J]. *Endocrinology*, 2010, 151(7): 3214-3224.
- [5] Nakagawa-Toyama Y, Hirano K I, Tsujii K I, et al. Human scavenger receptor class B type I is expressed with cell-specific fashion in both initial and terminal site of reverse cholesterol transport[J]. *Atherosclerosis*, 2005, 183(1): 75-83.
- [6] Hoekstra M. Identification of scavenger receptor BI as a potential screening candidate for congenital primary adrenal insufficiency in humans[J]. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2020, 319(1): E102-E104.
- [7] Zheng Z, Ai J T, Li X A. Scavenger receptor class B type I and immune dysfunctions[J]. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*, 2014, 21(2): 121-128.
- [8] Voolstra O, Kiefer C, Hoehne M, et al. The *Drosophila* class B scavenger receptor NinaD-I is a cell surface receptor mediating carotenoid transport for visual chromophore synthesis[J]. *Biochemistry*, 2006, 45(45): 13429-13437.
- [9] van Bennekum A, Werder M, Thuahnai S T, et al. Class B scavenger receptor-mediated intestinal absorption of dietary  $\beta$ -carotene and cholesterol[J]. *Biochemistry*, 2005, 44(11): 4517-4525.
- [10] Sundvold H, Helgeland H, Baranski M, et al. Characterisation of a novel paralog of scavenger receptor class B member I (*SCARB1*) in Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. *BMC Genetics*, 2011, 12: 52.
- [11] Du J X, Chen H L, Mandal B K, et al. HDL receptor/Scavenger receptor B1-*Scarb1* and *Scarb1*-like mediate the carotenoid-based red coloration in fish[J]. *Aquaculture*, 2021, 545: 737208.
- [12] 杜金星. 瓯江彩鲤 *Scarb1* 和 *Scarb1*-like 基因对其红色体色形成的调控机制 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2019. Du J X. The regulation mechanism of *Scarb1* and *Scarb1*-like genes in controlling red coloration in Oujiang color common carp (*Cyprinus Carpio* var. *color*)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019 (in Chinese).
- [13] Wu Y M, Yang L, Li X J, et al. A class B scavenger receptor from *Eriocheir sinensis* (*EsSR-B1*) restricts bacteria proliferation by promoting phagocytosis[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 70: 426-436.
- [14] 吴耀萌. 中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) B 类清道夫受体 (*EsSR-B1*) 调控血细胞吞噬的功能研究 [D]. 上海: 华东师范大学, 2018. Wu Y M. Phagocytosis function research of class B scavenger receptor (*EsSR-B1*) in hemocytes of Chinese mitten crab (*Eriocheir Sinensis*)[D]. Shanghai: East China Normal University, 2018 (in Chinese).
- [15] Kong T T, Gong Y, Liu Y, et al. Scavenger receptor B promotes bacteria clearance by enhancing phagocytosis and attenuates white spot syndrome virus proliferation in



- Scylla paramamosian*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 78: 79-90.
- [16] 杨宁, 周素明, 王国良, 等. 三疣梭子蟹B型清道夫受体蛋白的原核表达及细胞、组织分布[J]. *水产学报*, 2018, 42(1): 39-47.
- Yang N, Zhou S M, Wang G L, *et al.* Prokaryotic expression, cell and tissue distribution of the class B scavenger receptor in *Portunus trituberculatus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(1): 39-47 (in Chinese).
- [17] Wang Q D, Liu J S, Zhang S Y, *et al.* Sustainable farming practices of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) around Hongze Lake, lower Yangtze River Basin, China[J]. *Ambio*, 2016, 45(3): 361-373.
- [18] Hou X, Chen X W, Yang H, *et al.* V-ATPase subunit B plays essential roles in the molting process of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Biology Open*, 2020, 9(5): bio048926, doi: 10.1242/bio.048926.
- [19] 陈义培, 吴廉, 陈晓雯, 等. 中华绒螯蟹*MSTN*基因SNPs多态性及与生长性状的关联分析[J]. *水生生物学报*, 2018, 42(2): 293-299.
- Chen Y P, Wu L, Chen X W, *et al.* Polymorphism of *MSTN* gene and its association with growth traits in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, 42(2): 293-299 (in Chinese).
- [20] 张瑶. 中华绒螯蟹肝胰腺病症的病理分析 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.
- Zhang Y. Histopathological study on hepatopancreas symptoms of *Eriocheir sinensis*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013 (in Chinese).
- [21] 江洪波, 陈立桥, 周忠良, 等. 脂质营养对中华绒螯蟹幼体肝胰腺超微结构的影响[J]. *动物学研究*, 2001, 22(1): 64-68.
- Jiang H B, Chen L Q, Zhou Z L, *et al.* Effects of lipid nutrition on hepatopancreatic ultrastructure of *Eriocheir sinensis* larvae (Crustacea: Decapoda)[J]. *Zoological Research*, 2001, 22(1): 64-68 (in Chinese).
- [22] 常国亮, 成永旭, 于智勇, 等. 脂类营养对中华绒螯蟹幼体肝胰腺超微结构的影响[J]. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 2011, 39(4): 108-111.
- Chang G L, Cheng Y X, Yu Z Y, *et al.* Effects of lipid nutrition on the hepatopancreas micro-ultrastructure of juvenile Chinese mitten crabs, *Eriocheir Sinensis*[J]. *Journal of Henan Normal University (Natural Science Edition)*, 2011, 39(4): 108-111 (in Chinese).
- [23] Hansen G H, Niels-Christiansen L L, Immerdal L, *et al.* Scavenger receptor class B type I (SR-BI) in pig enterocytes: Trafficking from the brush border to lipid droplets during fat absorption[J]. *Gut*, 2003, 52(10): 1424-1431.
- [24] Kleveland E J, Syvertsen B L, Ruyter B, *et al.* Characterization of scavenger receptor class B, type I in Atlantic salmon (*Salmo salar* L. ) [J]. *Lipids*, 2006, 41(11): 1017-1027.
- [25] Lino M, Farr S, Baker C, *et al.* Intestinal scavenger receptor class B type I as a novel regulator of chylomicron production in healthy and diet-induced obese states[J]. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2015, 309(5): G350-G359.
- [26] 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.
- [27] Reboul E, Klein A, Bietrix F, *et al.* Scavenger receptor class B type I (SR-BI) is involved in vitamin E transport across the enterocyte[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(8): 4739-4745.
- [28] Liu B, Krieger M. Highly purified scavenger receptor class B type I reconstituted into phosphatidylcholine/cholesterol liposomes mediates high affinity high density lipoprotein binding and selective lipid uptake[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(37): 34125-34135.
- [29] Saddar S, Carriere V, Lee W R, *et al.* Scavenger receptor class B type I Is a plasma membrane cholesterol sensor[J]. *Circulation Research*, 2013, 112(1): 140-150.
- [30] Fioravanti J, Medina-Echeverez J, Berraondo P. Scavenger receptor class B, type I: A promising immunotherapy target[J]. *Immunotherapy*, 2011, 3(3): 395-406.
- [31] Ahras M, Naing T, McPherson R. Scavenger receptor class B type I localizes to a late endosomal compartment[J]. *Journal of Lipid Research*, 2008, 49(7): 1569-1576.
- [32] Harrison E H. Mechanisms involved in the intestinal absorption of dietary vitamin A and provitamin A carotenoids[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2012, 1821(1): 70-77.
- [33] During A, Dawson H D, Harrison E H. Carotenoid trans-

- port is decreased and expression of the lipid transporters SR-BI, NPC1L1, and ABCA1 is downregulated in Caco-2 cells treated with ezetimibe[J]. *The Journal of Nutrition*, 2005, 135(10): 2305-2312.
- [34] Alharbi A M, Kilani M A, Berendschot T T J M. Overflow phenomenon in serum lutein after supplementation: A systematic review supported with SNPs analyses[J]. *International Journal of Ophthalmology*, 2021, 14(7): 1114-1119.
- [35] 黄妹, 王中清, 茅海成, 等. 中华绒螯蟹在实验室条件下的成蟹阶段蜕壳与生长观察[J]. 上海海洋大学学报, 2014, 23(3): 359-365.
- Huang S, Wang Z Q, Mao H C, *et al.* Observation on molting and growth of adult Chinese mitten crab reared in the laboratory condition[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2014, 23(3): 359-365 (in Chinese).
- [36] 吴滢, 付春鹏, 蒋速飞, 等. 中华绒螯蟹微卫星标记与生长性状相关性的初步分析[J]. *水生生物学报*, 2011, 35(2): 197-202.
- Wu Y, Fu C P, Jiang S F, *et al.* Preliminary studies on the correlation between microsatellite markers and growth traits in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35(2): 197-202 (in Chinese).

## Study on function of *scarb1* gene in *Eriocheir sinensis* and its association with growth traits

JIANG Pengfei, HOU Xin, WANG Jun, CHEN Xiaowen, WANG Chenghui\*

(Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources certificated by the Ministry of Agriculture and Rural Affairs/National Demonstration Centre for Experimental Fisheries Science Education/Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** In order to study the functions of class B type I scavenger receptor (SR-BI/SCARB1) in the metabolism, growth, immunity and other biological processes of *Eriocheir sinensis*, the cloning and spatiotemporal expression analysis of *scarb1* gene in *E. sinensis* were analyzed, the changes of related tissue structure and carotenoid content after RNA interference were observed, the SNP markers of the gene were screened and their association with the growth related traits were evaluated. The results showed that the *scarb1* gene in *E. sinensis* was composed of the two exons and one intron. The open reading frame (ORF) was 2 415 bp and 805 amino acids were encoded; phylogenetic tree based on the amino acid sequences showed that the highest similarity with 80.51% were found between *E. sinensis* and *Portunus trituberculatus*, indicating its high conservation among species. Its expression was detected in all tissues encoded, including hepatopancreas, intestines, blood cells, heart, gills and muscle tissues at different molting stages, but the relatively high expression existed in hepatopancreas, intestines and blood cells. After RNA interference in *scarb1* gene for 15 days and 30 days, histological observation showed that the lumen of the hepatic tubules in hepatopancreas was blurred and partially vacuolized, and significant cavities appeared in the muscular layer and submucosa of the intestinal intima. The color of hepatopancreas changed from yellow to gray white, and the content of carotenoids decreased significantly. One SNP locus (C432T) was screened in the first exon of the gene, which was significantly correlated with the weight gain rate and carapace length growth rate after molting ( $P < 0.05$ ). The results of this study provide useful guidance for genetic research of *scarb1* gene in *E. sinensis* and its breeding.

**Key words:** *Eriocheir sinensis*; *Scarb1*; gene expression; gene knockdown; SNP; growth traits

**Corresponding author:** WANG Chenghui. E-mail: wangch@shou.edu.cn

**Funding projects:** Agriculture Research System of Shanghai, China (Grant No2022-4)