



三角帆蚌谷胱甘肽硫转移酶基因克隆表达及其类胡萝卜素转运功能分析

颜玲¹, 钟婧妍¹, 袁永斌¹, 张瑶¹, 胡宏辉¹,
陆婷婷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, 上海市水产动物良种创新与绿色养殖协同中心, 上海, 201306;
3. 上海海洋大学, 上海水产养殖工程技术研究中心, 上海, 201306)

摘要: 为了阐明谷胱甘肽硫转移酶 Pi 类基因 (*HcGSTP1*) 在三角帆蚌类胡萝卜素转运中的作用, 并探讨该基因表达与三角帆蚌壳色的相关性。本实验克隆并鉴定了三角帆蚌 *HcGSTP1* 基因, 对其进行了序列特征和进化分析, 通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 和原位杂交 (ISH) 技术检测了 *HcGSTP1* 基因在三角帆蚌中的表达及定位情况, 利用 RNAi 技术对其功能及作用机制进行了初步分析。结果显示, *HcGSTP1* 基因的全长 cDNA 序列为 1 317 bp, 其中开放阅读框 (ORF) 区为 618 bp, 编码 205 个氨基酸, 包含一个 GST-N-pi 结构域和 GST-C-Pi 结构域。qRT-PCR 结果显示, *HcGSTP1* 基因在紫蚌肝胰腺和斧足中表达量极显著高于白蚌, 且在紫蚌边缘膜和中央膜中表达量显著高于白蚌。原位杂交结果显示, *HcGSTP1* 基因在外套膜的外褶、背膜区、腹膜区、部分中褶以及外褶与中褶连接处出现明显的阳性信号。RNAi 技术结果显示, *HcGSTP1* 基因在边缘膜中表达的干扰率达 83.74%, 同时发现边缘膜中总类胡萝卜素含量 (TCC) 降低了 30.12%。上述实验结果初步证实 *HcGSTP1* 基因参与三角帆蚌类胡萝卜素的转运, 进而可能会影响贝壳及珍珠呈色, 为深入理解三角帆蚌类胡萝卜素转运及贝壳和珍珠颜色形成机制补充了分子依据。

关键词: 三角帆蚌; *HcGSTP1* 基因; 类胡萝卜素转运

中图分类号: Q 786; S 966.23

文献标志码: A

三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 作为中国淡水水域特有的育珠蚌, 生产的淡水珍珠总量占全国 70% 以上^[1]。然而珍珠品质不高是制约珍珠产业可持续发展的关键问题, 其中, 颜色是影响珍珠品质主要因素之一^[2]。类胡萝卜素 (carotenoids) 是一类脂溶性的天然着色剂^[3], 已有较多研究表明, 类胡萝卜素代谢显著影响水生动物体色^[4], 且珍

珠颜色与类胡萝卜素密切相关^[5-7]。大多数动物缺乏与类胡萝卜素合成相关的酶, 因此只能从食物中摄取^[8]。贝类中类胡萝卜素的代谢是个复杂的过程, 其在体内吸收、转运、裂解的机制受多层次、多水平因素的调控, 涉及多个关键基因。

已有较多研究表明 *SR-BI* 和 *CD36* 是参与类胡萝卜素吸收过程中的 2 个关键基因^[9], 李雪^[10]

收稿日期: 2023-02-23 修回日期: 2023-04-25

资助项目: 国家重点研发计划 (2022YFD2400105); 国家现代农业产业技术体系 (CARS-49); 国家自然科学基金 (31872565)

第一作者: 颜玲 (照片), 从事水产动物遗传育种研究, E-mail: yl620225@163.com

通信作者: 白志毅, 从事水产动物遗传育种研究, E-mail: zybai@shou.edu.cn



在虾夷扇贝 (*Mizuhopecten yessoensis*) 中发现 *SCD* 基因可增强类胡萝卜素的吸收; 载脂蛋白 (APOL) 是一类参与动物体内类胡萝卜素转运过程的高密度脂蛋白, 在马氏珠母贝 (*Pinctada martensi*) 中研究表明 *Pm-APOL3* 基因参与类胡萝卜素代谢^[11], 同样在三角帆蚌中研究表明 *hcApo* 基因表达水平与类胡萝卜素含量呈显著正相关^[12]。Beta-Carotene-15,15-monooxygenase (BCO1) 和 Beta-Carotene-9,10-oxygenase (BCO2) 则是参与类胡萝卜素裂解过程中的 2 种关键酶^[9]。除此之外, Wang 等^[13] 研究证明 *LPCAT1* 基因可促进类胡萝卜素在虾夷扇贝闭壳肌中的积累; 张进盼等^[14] 同样发现 *HcLPCAT1* 基因可以促进类胡萝卜素的储存, 进而影响三角帆蚌内壳色的形成。总体而言, 类胡萝卜素代谢的分子调控机制尚不是很清楚。类胡萝卜素具有亲脂性, 因此需要通过类胡萝卜素结合蛋白等蛋白质在胞内运输^[15]。其中, 参与类胡萝卜素胞内转运的蛋白包括 Pi isoform of human glutathione S-transferase (GSTP1)、carotenoid-binding protein (CBP) 与 fatty acid-binding proteins (FABPs) 等^[15]。GSTP1 属于谷胱甘肽 S-转移酶家族 (GSTs) 中的 P 类, 可以编码 S-转移酶家族的酶^[16]。Bhosale 等^[17] 研究表明 GSTP1 作为类胡萝卜素结合蛋白可将玉米黄素结合沉积到特定的组织细胞; 程德伟^[18] 研究表明 *GSTP1* 基因编码的蛋白通过与类胡萝卜素结合从而推测其在类胡萝卜素转运过程中起关键作用。

为了阐明三角帆蚌 *HcGSTP1* 基因在类胡萝卜素代谢中的作用, 本实验克隆并分析了三角帆蚌 *HcGSTP1* 基因的全长序列; 通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 和原位杂交 (ISH) 技术探究了 *HcGSTP1* 基因在三角帆蚌中的表达及定位情况; 利用 RNAi 技术抑制 *HcGSTP1* 基因的表达, 以研究其与类胡萝卜素转运的相关性, 为进一步分析贝壳、珍珠颜色形成机制提供分子基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用三角帆蚌均为课题组培育的三角帆蚌新品种, 取自学校产学研合作基地, 位于安徽铜陵东联新村, 三角帆蚌“申浙 3 号”为白色内壳色简称“白蚌”, 三角帆蚌“申紫 1 号”内壳色为紫色简称“紫蚌”, 白蚌紫蚌且均为 6 月龄。挑选喷

水有力、大小相近的健康个体, 于实验室暂养 7 d, 水温保持在 (24 ± 2) °C, 投喂普通小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 且保持充氧。随机选取白蚌和紫蚌各 3 只, 采集肝胰腺、闭壳肌、斧足、边缘膜和中央膜 5 个组织, 分析 *HcGSTP1* 基因的组织表达差异。实验过程中操作人员严格遵守上海海洋大学伦理规范, 并按照上海海洋大学伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 实验方法

总 RNA 提取及 cDNA 合成 采用 TRIzol 法分别提取白蚌、紫蚌不同组织, 并借助分光光度计和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的浓度和质量。基因克隆所用 cDNA 采用 TaKaRa RACE 试剂盒 (Code No. 634858) 合成, qRT-PCR 所用 cDNA 采用 TaKaRa 反转试剂盒 (Code No. RR047A) 合成, 合成的 cDNA 于 -20 °C 保存待用。

***HcGSTP1* 基因的克隆及分析** 根据三角帆蚌外套膜转录组数据库^[19] 中获取 *HcGSTP1* 基因的部分序列, 并设计所需引物 (表 1)。采用 TaKaRa RACE 试剂盒 (Code No. 634858) 进行 PCR 扩增 (50 μ L), 割胶回收, 将产物连接到 PMD19-T 载体上并转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 中, 倒置培养 (过夜)。经菌落 PCR 验证后, 样品送往生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序, 测序结果经 DNAMAN 软件拼接得到 *HcGSTP1* 基因的全长序列。根据 Zhang 等^[20] 方法进行序列分析并构建三角帆蚌 *HcGSTP1* 基因氨基酸序列系统进化树。

***HcGSTP1* 基因的表达分析** 根据 *HcGSTP1* 基因的全长序列, 以 EF1 α -F、EF1 α -R 为内参^[19], 设计 qRT-PCR 的特异性引物 (表 1)。根据 TaKaRa 荧光定量试剂盒 (Code No. RR820A) 进行 qRT-PCR (每个样品进行 3 次重复实验), 检测白蚌、紫蚌不同组织中的基因表达。使用 Excel 软件进行数据处理, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算相对基因表达量, 在 IBM SPSS Statistics 和 GraphPad-Prism-7.0 软件下进行显著性差异和作图分析。

设计原位杂交特异性引物 (表 1) 并制备探针 (-80 °C 保存备用)。取紫蚌外套膜组织固定在 4% 多聚甲醛溶液中, 浸泡约 14 h, 经过脱水、透明、浸蜡、包埋等一系列步骤制备石蜡切片。杂交过程参照敏感性加强型原位杂交检测试剂盒 II (碱性磷酸酶) 说明书进行, 研究镜下观察实验结果并拍照记录。

表 1 *HcGSTP1* 基因实验所用引物
Tab. 1 Primers for *HcGSTP1* gene experiments

引物 primers	序列 (5'-3') primer sequences (5'-3')	目的 purpose
GSTP1-3'-outer	TAATGATGGAGTGGAGGACTACCG	3'RACE扩增
GSTP1-3'-inner	GAGATAGCCAACCGACCAAACA	
GSTP1-YG-F	TGACGTCAAGGAAGGTGCTC	qRT-PCR
GSTP1-YG-R	GGTCGGTTGGCTATCTCCTG	
EF1 α -F	GGAACCTCCAGGCAGACTGTGC	
EF1 α -R	TCAAAACGGGCCGAGAGAAT	
GSTP1-YW-F	TGACGTCAAGGAAGGTGCTC	原位杂交
T7-GSTP1-YW-R	TAATACGACTCACTATAGGGGGTCGGTTGGCTATCTCCTG	
GSTP1-GRNAi-F	GAAGACGTGAATTGCAGCGA	RNAi干扰
T7-GSTP1-GRNAi-R	TAATACGACTCACTATAGGGTTGATGTTTGGTCGGTTGGC	
GSTP1-GRNAi-R	TTGATGTTTGGTCGGTTGGC	
T7-GSTP1-GRNAi-F	TAATACGACTCACTATAGGGGAAGACGTGAATTGCAGCGA	
T7-GFP-GRNAi-F	TAATACGACTCACTATAGGGGAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCG	
GFP-GRNAi-R	CAGCAGGACCATGTGATCGCGC	
GFP-GRNAi-F	AAGGGCGAGGAGCTGTTACCCG	
T7-GFP-GRNAi-R	TAATACGACTCACTATAGGGCAGCAGGACCATGTGATCGCGC	

RNA 干扰 根据 *HcGSTP1* 基因设计 RNA 干扰特异性引物, 需分别在正反引物 5'端添加 T7 启动子 (表 1)。经 PCR 扩增 (50 μ L、模板为肝胰腺 cDNA) 和胶回收后, 用 T7 试剂盒 (JT101-01) 合成干扰链。随机选取 6 月龄紫蚌并分为 3 组 (每组 10 只紫蚌): 实验组 (注射 GSTP1-GRNAi 干扰链)、空白对照组 [注射磷酸盐缓冲溶液 (PBS)] 以及阴性对照组 (注射 GFP-GRNAi 干扰链), 每只紫蚌注射总物质的量为 60 μ g 的干扰链 (注射部位为闭壳肌)。48 h 后取边缘膜组织, 用于 qRT-PCR 和总类胡萝卜素含量检测。参考孙明龙等^[21]的方法对类胡萝卜素含量进行检测。

2 结果

2.1 *HcGSTP1* 基因序列特征和进化分析

HcGSTP1 基因全长 cDNA 为 1 317 bp (GenBank: OP 963708, 图 1), 由 56 bp 5'-UTR、643 bp 3'-UTR 和 618 bp 开放阅读框 (ORF) 组成, 编码了 205 个氨基酸; 经 InterPro 预测其在 3~74 氨基酸 (AA) 处为 GST-N-Pi 结构域和 83~205 AA 处为 GST-C-Pi 结构域, 这 2 个结构域是 GSTs 家族典型的功能域, 说明该基因属于 Pi 类 GST^[16]。Expsay 预测该蛋白的分子量约为 23.38 ku 和理论

等电点为 6.90, 氨基酸组成中亮氨酸含量最高, 为 12.70%。

基于氨基酸序列同源性分析, 三角帆蚌与褶纹冠蚌 (*Cristaria plicata*) 的同源性最高, 为 95.12%。BioEdit 多序列比对结果显示, 三角帆蚌 *HcGSTP1* 基因与褶纹冠蚌结构域相似度最高。以斑马鱼 (*Danio rerio*) 和大西洋鲑鱼 (*Salmo salar*) 为外群, 与其他贝类物种 *GSTP1* 基因氨基酸序列比对后构建的进化树显示, 三角帆蚌 *HcGSTP1* 氨基酸序列与褶纹冠蚌最接近, 聚为一个类群, 关系最近; 其次与紫贻贝 (*Mytilus edulis*)、欧洲牡蛎 (*Ostrea edulis*) 和菲律宾帘蛤 (*Ruditapes philippinarum*) 聚为一大支, 与腹足纲的中华圆田螺 (*Cipangopaludina cathayensis*) 相似较低 (图 2、图 3), 基因进化关系与物种分类地位基本一致。总体而言进化较为保守。

2.2 *HcGSTP1* 基因在不同壳色三角帆蚌的组织差异表达

HcGSTP1 基因在白蚌紫蚌各组织中均有表达, 但在不同组织中的表达水平存在显著差异, 在紫蚌的肝胰腺和斧足中表达量最高。*HcGSTP1* 基因在紫蚌的肝胰腺和斧足中的表达量极显著高于白蚌 ($P < 0.01$), *HcGSTP1* 基因在紫蚌的中央膜和

```

1      agttacaaccagctttaggcctagctcagtgagtagaccggcatagctagcagaacaATGACGGCATACAAGCTTGTCTACTTCCCTATTA
1      M T A Y K L V Y F P I
91     GAGGTGCTATTGAGCCAATCCGTCTCCTGCTTGTGACAATGGTCTCTCCTACGAAGACGTGAATTGCAGCGATGGCTGGCCAGACAGCT
12     R G R I E P I R L L L V D N G L S Y E D V N C S D G W P D S
181    GGAAACCAAACTGGCTTTTGGACAAGTGCCACAGTTAATTGATGGTGACTTTGAACTTGTACAGTCCAACACCATGCTGAGGTATTTGG
42     W K P K L A F G Q V P Q L I D G D F E L V Q S N T M L R Y L
271    GAAGAAAACATGATCTATATGGTGCTGACGTCAAGGAAGGTGCTCATATTGACATGATTAATGATGGAGTGGAGGACTACCGACTTGCAT
72     G R K H D L Y G A D V K E G A H I D M I N D G V E D Y R L A
361    ATGTGAAACTGATCTATCAAACTATGATGCTGGAAAAGAAGATTCAATTGCTGGCTTGCCTGCCAAATCCAGTACCTAGAGAAAAGTGT
102    Y V K L I Y Q N Y D A G K E E F I A G L P A K F Q Y L E K L
451    TGAAGGCTTCATCTGGAGCAATTATTAAGGGGAAGAAAACCTATGCCGACTACAACCTTTTGTATCTCCTTACATTCATCTTTTGTCTGG
132    L K A S S G A I I K G K K T Y A D Y N L F D L L D I H L L L
541    CACCATCATGCTGGATTCTTCCCAACCTGAAAGCCTTCCATCAGGAGATAGCCAACCGACCAAAACATCAAGAAAATACAGAGACACCG
162    A P S C L D S F P T L K A F H Q E I A N R P N I K K Y R D T
631    ATGCCTGGAAGAAGTGCCTGTTAATGGCAATGGAAAACAATAAaccaccagaaaagacattgaaataagaacaattcatagacagta
192    D A W K K L P V N G N G K Q *
721    ggacagatgtgaatgtaaatcaccagaaaagacgtcagacaataataaaattcatagaccgtaaatggcagatattttattttgaaacctc
811    tgataactttttatcaccatgggcatgtgtattcttttaattaaaaatgtcaacccaaaaaaattacaggttttctttcaacaaatcca
901    gtcacatttacggaaaaagtattgagttttcattattattttgtttatctgattttgtggagtactcagatttgccaagtttgagctaa
991    gagtttttagagaaaatgctgctttttctttttgtttgtcttttcatttatacactattttgtttttgcattatgtcaattttaaatg
1 081  tttcactgtacagagatactcttaaatcagctctttttctcatttaaaggtagttttatcttttagttaccagtggtttatgatg
1 171  acctaatgatgataaaaattgctgtctaaagggtgatcatttaacaatcttgaagggtgaaattttactacttgtgttccactccgacaa
1 261  taggaccaaataaacctgtgtaactttcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图 1 HcGSTP1 基因 cDNA 序列及其编码氨基酸序列

方形框中 ATG 和 TAA 分别代表起始密码子和终止密码子。下划线部分代表 GST-N-Pi (3-74 AA) 结构域; 阴影部分代表 GST-C-Pi (83-205 AA) 结构域; 矩形框 aataaa 表示加尾信号位点。

Fig. 1 cDNA sequence and encoded amino acid sequence of HcGSTP1 gene

In the square box, ATG and TAA represent start and stop codon. The underline part represents the GST-N-Pi (3-74 AA) domain; the shaded part represents the GST-C-Pi (83-205 AA) domain; rectangular box aataaa represents tail signal site.

边缘膜中的表达量显著高于白蚌 ($P<0.05$), 但在闭壳肌中的表达量无显著差异 ($P>0.05$) (图 4)。

2.3 HcGSTP1 基因在外套膜组织空间表达特征

利用合成的 RNA 探针, 对三角帆蚌外套膜切片进行原位杂交实验。结果显示, HcGSTP1 基因在外套膜边缘均有表达。其中, 外褶、腹膜区、背膜区、外褶与中褶连接处以及部分中褶 (OF、VM、DM、MF) 阳性信号强于内褶 (IF) (图 5-a)。阴性对照的相应组织中均无杂交信号 (图 5-b)。

2.4 干扰 HcGSTP1 基因后三角帆蚌边缘膜组织类胡萝卜素含量变化分析

在 dsRNA 干扰后的紫蚌边缘膜组织的 cDNA 中, 通过 qRT-PCR 检测 HcGSTP1 基因的相对表

达量 (图 6)。结果显示, 实验组 HcGSTP1 基因的表达量较空白对照组和阴性对照组显著降低 ($P<0.05$), 降低 83.74%, 干扰链成功抑制了 HcGSTP1 基因的表达。

检测干扰 48 h 后三角帆蚌边缘膜组织中总类胡萝卜素的含量 (TCC)。结果显示, 注射 PBS 组测量的 TCC (表 2) 为 (33.47 ± 0.13) $\mu\text{g/g}$, 注射 GFP 组和注射干扰链组后测量的 TCC 分别为 (33.21 ± 0.19) $\mu\text{g/g}$ 和 (23.39 ± 0.27) $\mu\text{g/g}$ 。类胡萝卜素含量在 2 个对照组间无显著差异 ($P>0.05$), 但 RNAi 组类胡萝卜素含量比对照组显著降低 ($P<0.05$), 降低了 30.12%。说明 HcGSTP1 基因的表达可能会影响类胡萝卜素在三角帆蚌体内转运过程。

3 讨论

HcGSTP1 基因进化较保守, 同褶纹冠蚌、欧

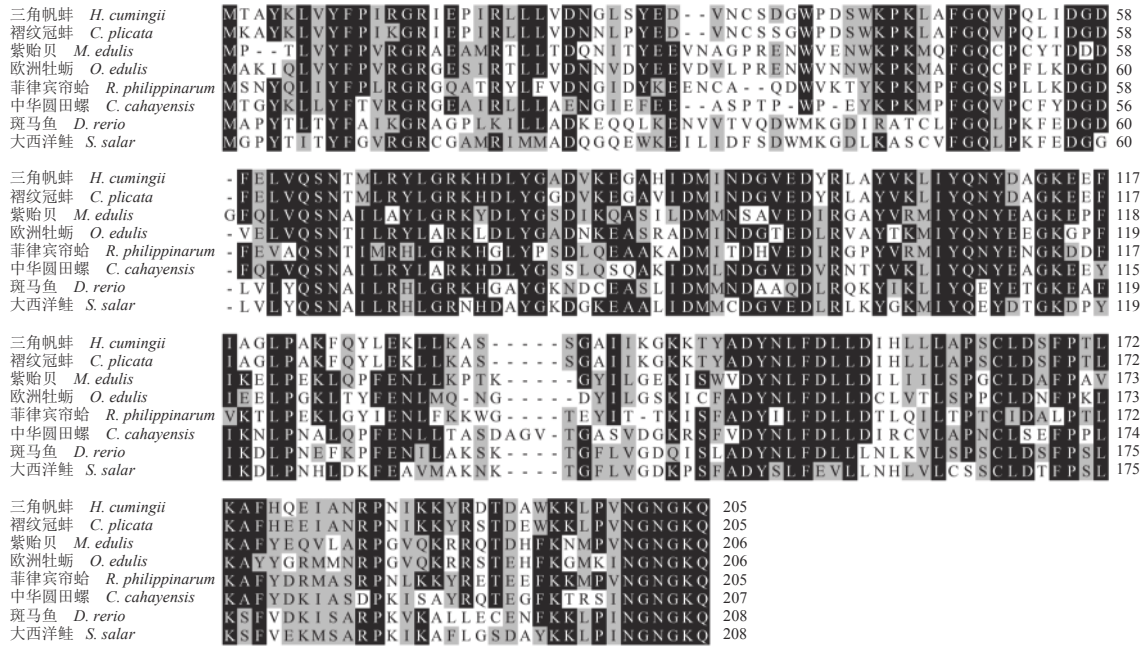


图 2 GSTP1 基因与其他物种氨基酸序列比对

颜色的深浅代表蛋白序列相似的程度, 颜色越深代表相似的程度越高。

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of GSTP1 genes with other species

The depth of color represents the degree of similarity of the protein sequence, and the darker the color represents a higher degree of similarity.

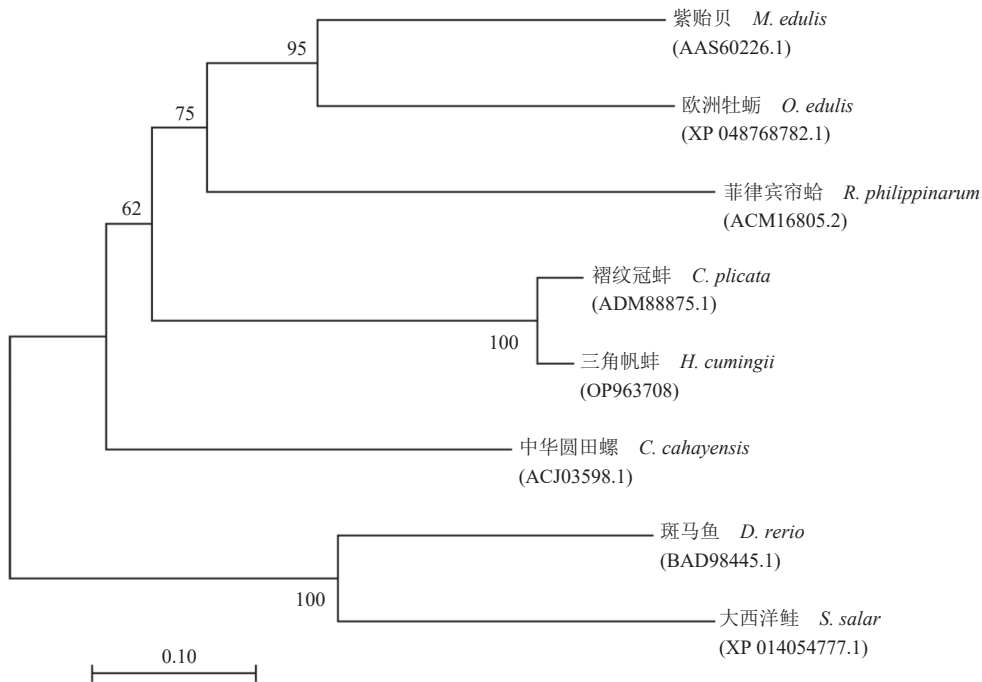


图 3 GSTP1 基因氨基酸序列在不同物种中构建的 NJ 系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of GSTP1 amino acid sequence in different species

洲牡蛎及紫贻贝^[22]等双壳贝类一样, 三角帆蚌 *HcGSTP1* 基因包含 GSTs 家族典型的功能域——GST-N-pi 结构域和 GST-C-Pi 结构域, 说明该基因属于 pi 类 GST^[16]。根据系统进化树, 淡水双壳

贝类三角帆蚌 *HcGSTP1* 与褶纹冠蚌 *GSTP1* 首先聚为一个分支, 然后与海水双壳贝类 (紫贻贝、欧洲牡蛎及菲律宾帘蛤) 聚为一大支, 最后与腹足纲中华圆田螺聚为一支, 表明淡水双壳贝类与海水

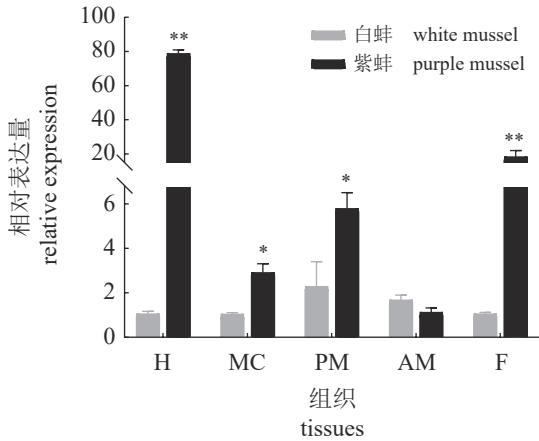


图4 *HcGSTP1* 在白蚌紫蚌各组织中的相对表达水平
H. 肝胰腺, MC. 中央膜, PM. 边缘膜, AM. 闭壳肌, F. 斧足; “*”表示差异显著 ($P<0.05$), “**”表示差异极显著 ($P<0.01$); 下同。

Fig. 4 The relative expression level of *HcGSTP1* in various tissues of white and purple mussel

H. hepatopancreas, MC. middle mantle, PM. fringe mantle, AM. adductor muscle, F. foot; “*” indicate the significant difference in the level of $P<0.05$, “**” indicate the significant difference in the level of $P<0.01$; the same below.

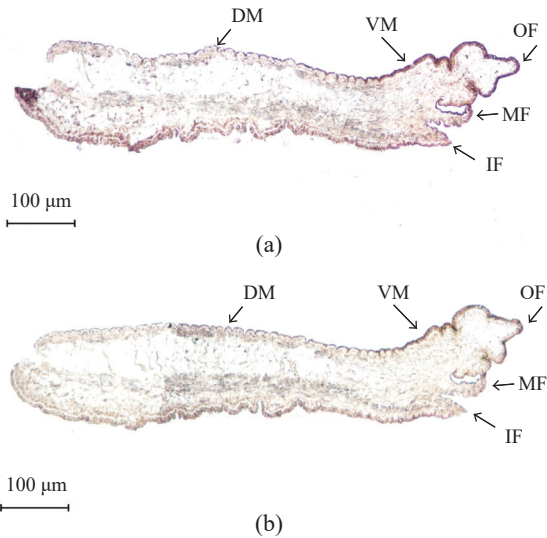


图5 三角帆蚌外套膜中 *HcGSTP1* 基因的表达定位

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

Fig. 5 Expression and localization of *HcGSTP1* in the mantle of *H. cumingii*

(a) the location map of positive signal, (b) the negative control; IF. inner fold, MF. middle fold, OF. outer fold, DM. dorsal mantle, VM. ventral mantle.

双壳贝类进化的独立性, 在类胡萝卜素代谢机制方面可能存在不同功能; 就淡水鱼与海水鱼在类

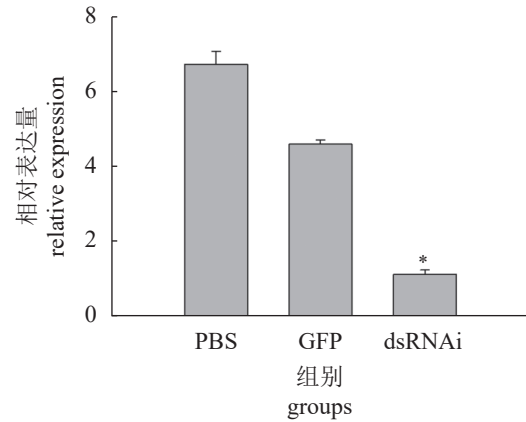


图6 干扰实验 *HcGSTP1* 在紫蚌边缘膜中的表达
Fig. 6 The expression of *HcGSTP1* in the fringe mantle of purple mussel in interference experiment

表2 干扰后紫蚌边缘膜中 TCC 测定

Tab. 2 Changes of TCC in fringe mantle of purple mussel in interference experiment

组别 groups	TCC/(μg/g)
PBS	33.47±0.13 ^a
GFP	33.21±0.19 ^a
dsRNAi	23.39±0.27 ^b

注: 字母相同表示差异不显著 ($P>0.05$), 字母不同表示差异显著 ($P<0.05$)。Notes: The same letters indicate no significant difference ($P>0.05$), with different letters indicating significant difference ($P<0.05$).

胡萝卜素代谢机制方面而言有很大差异, 如金鱼 (*Carassius auratus*)、锦鲤 (*Cyprinus carpio*) 和红鲤 (*C. flammans*) 等大部分淡水鱼类能将类胡萝卜素转化虾青素, 鲑鳟等海水鱼类却因缺乏转化类胡萝卜素的功能会直接将其储存在体内^[23]。本研究中, 与白蚌相比, *HcGSTP1* 基因在紫蚌肝胰腺和斧足中表达极显著高 ($P<0.01$), 已有研究表明在三角帆蚌中肝胰腺的类胡萝卜素含量比其他组织高, 且肝胰腺在类胡萝卜素沉积和转化中起重要作用^[7]。在栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 中, *CfGSTpi* 基因在组织间均有表达且存在差异, 在消化腺中表达水平最高, 闭壳肌中表达最低^[24], 这一结果与本研究紫蚌组织表达谱一致。李庆昌^[25]研究表明波纹巴非蛤 (*Paphia undulata*) 斧足较其他组织类胡萝卜素含量高, 结合本研究结果, 我们推测三角帆蚌在斧足中类胡萝卜素含量会较高; 张进盼等^[14]研究发现, *HcLPCAT1* 基因在白蚌紫蚌中斧足中显著高表达, 说明斧足可能在类胡萝卜素转运过程充当重要角色。此外, *HcGSTP1* 基因在紫蚌的中央膜和边缘膜中的表达量显著高于白蚌

($P < 0.05$), 而外套膜在贝壳和珍珠的形成和着色中起作用^[12, 26]。因此, *HcGSTP1* 基因在紫蚌的肝胰腺、斧足和外套膜显著高表达, 说明该基因可能参与类胡萝卜素转运, 并可能与三角帆蚌贝壳和珍珠的形成及呈色密切相关。然而, 有关 *HcGSTP1* 基因在不同组织中表达量差异的原因及生物学功能还有待进一步研究。

有研究表明 *GSTP1* 通过结合类胡萝卜素在类胡萝卜素转运过程中发挥重要作用。类胡萝卜素主要以蛋白质结合的形式存在于食物中, 在动物体内被消化酶分离, 然后在十二指肠中与其他脂质乳化形成乳糜颗粒, 最后借助载体转运或被动扩散吸收^[27]。目前发现, 由于类胡萝卜素的疏水性, 无论是无脊椎动物还是植物, 其体内的类胡萝卜素往往是和蛋白质相结合, 形成类胡萝卜素结合蛋白, 从而便于类胡萝卜素的稳定。靳远祥等^[28]总结了类胡萝卜素结合蛋白在类胡萝卜素转运过程中发挥重要作用, 继而通过 dsRNA 对体内的 *HcGSTP1* 进行 RNA 干扰后, 各组织的荧光定量检测表明, 该基因的表达被成功抑制, 干扰效果显著; 与注射 PBS 的空白对照组相比有明显下降趋势; 与此同时, 总类胡萝卜素含量也显著降低。综上所述, *HcGSTP1* 基因在三角帆蚌中的表达水平与 TCC 呈显著正相关, *HcGSTP1* 基因的高表达可以促进类胡萝卜素在三角帆蚌中的积累, 进一步说明该基因参与了三角帆蚌体内类胡萝卜素的转运过程。鉴于 Bhosale 等^[17]的研究表明, *GSTP1* 作为一种类胡萝卜素结合蛋白, 可以将玉米黄质结合沉积到特定的组织细胞; Vachali 等^[29]基于表面等离子共振 (SPR) 的生物传感技术证明 *GSTP1* 与玉米黄质 (类胡萝卜素的一类) 转运有关; 程德伟^[18]推测该基因是类胡萝卜素转运过程中的关键基因。由于不同物种类胡萝卜素代谢功能不同, *HcGSTP1* 基因结合类胡萝卜素的类型和代谢途径有待进一步研究。综上所述, 推测 *HcGSTP1* 可能作为玉米黄质结合蛋白参与了三角帆蚌类胡萝卜素的转运。

原位杂交技术分析发现, *HcGSTP1* 基因杂交信号主要存在于三角帆蚌边缘膜的外褶、腹膜区、背膜区、部分中褶及外褶与中褶连接处。已有学者证明外套膜的中褶和外褶内的壳皮沟以及中褶主要负责分泌蛋白质, 形成角质层; 腹膜处和外褶内外上皮细胞主要分泌有机质, 形成棱柱层; 背膜处细胞主要分泌有机基质, 形成珍珠层^[30-31],

且壳色的形成与珍珠层的颜色密切相关^[32], 这表明 *HcGSTP1* 基因参与了贝壳角质层、棱柱层和珍珠层的形成, 进而影响壳色的形成。因此推测, *HcGSTP1* 基因可以通过影响类胡萝卜素转运过程进而影响三角帆蚌贝壳和珍珠的颜色的形成。关于 *HcGSTP1* 基因在珍珠呈色方面的具体机制还不清楚, 期望后来学者能够深入研究。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [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] 姜琦, 白志毅, 孙朝虎. 三角帆蚌所育不同颜色珍珠及其相关组织金属元素种类和含量差异分析 [J]. 上海海洋大学学报, 2019, 28(6): 882-889.
Jiang Q, Bai Z Y, Sun C H. Analysis of metallic element types and contents in pearls of different colors and their related tissues in *Hyriopsis cumingii* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2019, 28(6): 882-889 (in Chinese).
- [3] 徐铮奎. 类胡萝卜素保健作用研究及其产品市场情况 [J]. 中国制药信息, 2021, 37(2): 31-35.
Xu Z K. Study on the health effects of carotenoids and market situation of their products [J]. Chinese Pharmaceutical Information, 2021, 37(2): 31-35 (in Chinese).
- [4] 陈斌, 吴天星. 类胡萝卜素改善水产动物体色研究进展 [J]. 中国饲料, 2004(15): 32-33.
Chen B, Wu T X. Advance in carotenoid on improving the body color of aquatic animals [J]. China Feed, 2004(15): 32-33 (in Chinese).
- [5] 张刚生, 谢先德, 王英. 三角帆蚌贝壳珍珠层中类胡萝卜素的激光拉曼光谱研究 [J]. 矿物学报, 2001, 21(3): 389-392.
Zhang G S, Xie X D, Wang Y. Raman spectra of carotenoid in the nacre of *Hyriopsis cumingii* (Lea) shell [J]. Acta Mineralogica Sinica, 2001, 21(3): 389-392 (in Chinese).
- [6] 李西雷, 李卿青, 朱庭耀, 等. 添加类胡萝卜素对三角帆蚌总类胡萝卜素含量及贝壳珍珠质颜色的影响 [J].

- 上海海洋大学学报, 2018, 27(4): 477-486.
- Li X L, Li Q Q, Zhu T Y, *et al.* Effect of dietary carotenoid on total carotenoids content and shell color in *Hyriopsis cumingii*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2018, 27(4): 477-486 (in Chinese).
- [7] 闻海波, 聂志娟, 曹哲明, 等. 不同颜色珍珠层的三角帆蚌组织中类胡萝卜素含量的分析 [J]. 大连海洋大学学报, 2012, 27(3): 265-268.
- Wen H B, Nie Z J, Cao Z M, *et al.* Carotenoid levels in soft tissues of triangle pearl mussel *Hyriopsis cumingii* with different color nacreous layer[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2012, 27(3): 265-268 (in Chinese).
- [8] 王伟杰, 徐昌杰. 天然类胡萝卜素生物合成与生物技术应用 [J]. 细胞生物学杂志, 2006, 28(6): 839-843.
- Wang W J, Xu C J. Natural carotenoid biosynthesis and biotechnological applications[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2006, 28(6): 839-843 (in Chinese).
- [9] 靳青, 毕宇霖, 刘晓牧, 等. 类胡萝卜素代谢及功能研究进展 [J]. 动物营养学报, 2014, 26(12): 3561-3571.
- Jin Q, Bi Y L, Liu X M, *et al.* Recent advances on research of carotenoid metabolism and functions[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2014, 26(12): 3561-3571 (in Chinese).
- [10] 李雪. 虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 类胡萝卜素积累相关基因和 SNP 位点筛查 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
- Li X. Identification of genes and SNPs associated with carotenoids accumulation in Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*)[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012 (in Chinese).
- [11] 陈雪欣, 雷超, 彭慧萍, 等. 马氏珠母贝载脂蛋白基因 *Pm-APOL3* 克隆、表达量与类胡萝卜素含量相关分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(7): 1707-1714.
- Chen X X, Lei C, Peng H P, *et al.* Cloning of *Pm-APOL3* and its correlations between relative expression and total carotenoid in pearl oyster *Pinctada fucata martensii*[J]. Genomics and Applied Biology, 2016, 35(7): 1707-1714 (in Chinese).
- [12] 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.
- [13] Wang S, Lv J, Zhang L L, *et al.* MethylRAD: a simple and scalable method for genome-wide DNA methylation profiling using methylation-dependent restriction enzymes[J]. *Open Biology*, 2015, 5(11): 150130.
- [14] 张进盼, 白志毅, 张梦莹, 等. 三角帆蚌溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶 1 *HcLPCAT1* 基因功能分析及壳色性状相关 SNP 筛选 [J]. 中国水产科学, 2021, 28(11): 1373-1384.
- Zhang J P, Bai Z Y, Zhang M Y, *et al.* Functional analysis and SNP screening of lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 *HcLPCAT1* gene and its association analysis with shell color traits in *Hyriopsis cumingii*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2021, 28(11): 1373-1384 (in Chinese).
- [15] 张洪宽, 刘合露, 罗刚, 等. 动物类胡萝卜素代谢的分子研究进展 [J]. 中国农学通报, 2015, 31(1): 247-251.
- Zhang H K, Liu H L, Luo G, *et al.* Molecular research progress of carotenoid metabolism in animals[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2015, 31(1): 247-251 (in Chinese).
- [16] 王晶, 曹阳, 魏铭宏, 等. 哺乳动物 *GSTP1* 基因研究进展 [J]. 中国畜牧杂志, 2021, 57(6): 20-24.
- Wang J, Cao Y, Wei M H, *et al.* Advances in mammalian *GSTP1* gene[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2021, 57(6): 20-24 (in Chinese).
- [17] Bhosale P, Larson A J, Frederick J M, *et al.* Identification and characterization of a Pi isoform of glutathione S-transferase (*GSTP1*) as a zeaxanthin-binding protein in the macula of the human eye[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(47): 49447-49454.
- [18] 程德伟. 华贵栉孔扇贝转运类胡萝卜素的关键基因筛选及功能解析 [D]. 汕头: 汕头大学, 2020.
- Cheng D W. Screening and functional analysis of key genes for carotenoid transport in noble scallop *Chlamys nobilis*[D]. Shantou: Shantou University, 2020 (in Chinese).
- [19] 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.
- [20] Zhang M Y, Chen X J, Zhang J P, *et al.* Cloning of a *HcCreb* gene and analysis of its effects on nacre color and melanin synthesis in *Hyriopsis cumingii*[J]. *PLoS One*, 2021, 16(5): e0251452.

- [21] 孙明龙, 白志毅, 傅百成, 等. 补充投喂 β -胡萝卜素对不同色系三角帆蚌内壳色、组织总类胡萝卜素含量及生长的影响 [J]. 南方水产科学, 2020, 16(5): 80-86.
Sun M L, Bai Z Y, Fu B C, *et al.* Effects of β -carotene supplement in bait on inner shell color, tissue total carotenoids content and growth of different color strains in *Hyriopsis cumingii*[J]. South China Fisheries Science, 2020, 16(5): 80-86 (in Chinese).
- [22] Liu H X, Zhang H K, Cheng D W, *et al.* Differential responses of a Pi-class glutathione S-transferase (*CnG-STp*) expression and antioxidant status between golden and brown noble scallops under pathogenic stress[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 105: 144-151.
- [23] 贺国龙, 刘立鹤. 鱼类体色成因及其调控技术研究进展 (上)[J]. 水产科技情报, 2010, 37(2): 88-91.
He G L, Liu L H. Advance of fish color mechanism and it's control technology[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2010, 37(2): 88-91 (in Chinese).
- [24] Miao J J, Pan L Q, Liu N, *et al.* Molecular cloning of CYP4 and *GSTpi* homologues in the scallop *Chlamys farreri* and its expression in response to benzo[a]pyrene exposure[J]. Marine Genomics, 2011, 4(2): 99-108.
- [25] 李庆昌. 波纹巴非蛤不同组织总类胡萝卜素含量比较及斧足颜色差异的转录组分析 [D]. 厦门: 集美大学, 2018.
Li Q C. The comparative study of total carotenoid content in different tissues of *Paphia undulata* and transcriptome analysis with foot color differences[D]. Xiamen: Jimei University, 2018 (in Chinese).
- [26] 李西雷, 李卿青, 任名栋, 等. 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 [J]. 水产学报, 2018, 42(11): 1719-1728.
Li X L, Li Q Q, Ren M D, *et al.* Cloning and tissue expression of a novel *hcSRCR1* gene in differential inner-shell color pearl mussel *Hyriopsis cumingii*[J]. Journal of Fisheries of China, 2018, 42(11): 1719-1728 (in Chinese).
- [27] 周孝明. 类胡萝卜素在动物养殖中的应用 [J]. 畜牧兽医科技信息, 2021(1): 50.
Zhou X M. The application of carotenoid in animal feeding[J]. Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2021(1): 50 (in Chinese).
- [28] 靳远祥, 姜永煌, 陈玉银, 等. 家蚕体内的类胡萝卜素及其结合蛋白 [J]. 科技通报, 2003, 19(6): 516-520.
Jin Y X, Jiang Y H, Chen Y Y, *et al.* Carotenoids and carotenoids binding protein in silkworm, *Bombyx mori* L.[J]. Bulletin of Science and Technology, 2003, 19(6): 516-520 (in Chinese).
- [29] Vachali P P, Li B X, Bartschi A, *et al.* Surface plasmon resonance (SPR)-based biosensor technology for the quantitative characterization of protein-carotenoid interactions[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2015, 572: 66-72.
- [30] Shu S, Fujikawa T, Nagakura T, *et al.* Structures of mollusc shell framework proteins[J]. Nature, 1997, 387(6633): 563-564.
- [31] 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.
- [32] Chen X J, Zhang M Y, Zhang J P, *et al.* miR-4504 is involved in nacre color formation in *Hyriopsis cumingii*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2019, 517(2): 210-215.

Cloning and expression of glutathione S-transferase *pi* gene and analysis of carotenoid transport function in *Hyriopsis cumingii*

YAN Ling¹, ZHONG Jingyan¹, YUAN Yongbin¹, ZHANG Yao¹,
HU Honghui¹, LU Tingting¹, 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 Collaborative Innovation Center of Aquatic Animal Breeding and Green Aquaculture,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Shanghai Aquaculture Engineering Technology Research Center, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: *Hyriopsis cumingii*, a pearl mussel endemic to China's freshwater waters, produces more than 70% of the country's freshwater pearls. However, the low quality of pearls is a crucial issue, among which color is one of the main factors affecting pearl quality. Carotenoids are the class of fat-soluble natural colorants, and many studies have shown that carotenoids metabolism significantly affects the color of aquatic objects, and pearl color is closely related to carotenoids. Carotenoids cannot be synthesized directly in most animals and must be ingested from food. The metabolism of carotenoids in shellfish is a complex process, and the mechanism of absorption, transport and cleavage in the body is regulated by multi-level and multi-level factors, involving many key genes. Carotenoids are important natural pigments, and it has been found that carotenoids metabolism is significantly related to shell color of shellfish. Glutathione S-transferase Pi (GSTP1), a carotenoid-binding protein, was used to elucidate the function of the *HcGSTP1* gene in carotenoids transportation in *H. cumingii* and to explore the correlation between the expression of *HcGSTP1* gene and shell color of *H. cumingii*. *HcGSTP1* gene was cloned and identified in this study, its sequence characteristics and evolution were analyzed. The expression and localization of *HcGSTP1* gene in *H. cumingii* were detected by qRT-PCR and *in situ* hybridization technology. The function and mechanism of *HcGSTP1* gene were preliminarily analyzed by RNAi technology. The results showed that the full-length cDNA sequence of *HcGSTP1* gene in *H. cumingii* was 1 317 bp, of which opening reading frame (OFR) was 618 bp, encoding 205 amino acids and containing a GST-N-pi domain and a GST-C-Pi domain. The results of qRT-PCR showed that the expression level of *HcGSTP1* gene in hepatopancreas and axetopods of purple mussel was significantly higher than that in the corresponding tissues of white mussel ($P < 0.01$), and the expression level in the marginal membrane and central membrane of purple mussel was significantly higher than that in the corresponding tissues of white mussel ($P < 0.05$). The results of *in situ* hybridization (ISH) showed that the positive signals appeared in the outer fold, dorsal mantle, ventral mantle, partial middle fold, and junction of outer fold and middle fold of pallial mantle. RNAi technology results showed that the interference rate of *HcGSTP1* gene expression in the fringe mantle reached 83.74% ($P < 0.05$), and the total carotenoids content (TCC) in the fringe mantle was reduced by 30.12% ($P < 0.05$). These experimental results preliminarily validated the vital function of *HcGSTP1* gene on carotenoids transportation in *H. cumingii*. Furthermore, it might affect the color of shells and pearls, and would provided molecular basis for further understanding of the mechanism of carotenoids transport and color formation of shells and pearls in *H. cumingii*.

Key words: *Hyriopsis cumingii*; *HcGSTP1* gene; carotenoids transport

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

Funding projects: National Key Research and Development Program of China (2022YFD2400105); China Agriculture Research System (CARS-49); National Natural Science Foundation of China (31872565)