



文蛤 *SRBI* 基因变异与红壳色性状的关联性

施鹤鸣¹, 董迎辉^{1*}, 姚韩韩¹, 包永波¹, 林志华^{1,2*}

(1. 浙江万里学院生物与环境学院, 浙江省水产种质资源高效利用技术研究重点实验室, 浙江 宁波 315100;

2. 浙江万里学院, 宁海海洋生物种业研究院, 浙江 宁波 315100)

摘要: 为了解文蛤体内类胡萝卜素代谢相关基因清道夫受体 B 类 I (*Mm-SRBI*) 与红壳色形成的关联性, 采用直接测序法对基因编码区进行 SNP 筛查和关联分析, 并用免疫荧光、蛋白免疫印迹分析了 *Mm-SRBI* 蛋白在红、白壳色文蛤外套膜中的表达差异。结果显示, 在 *Mm-SRBI* 基因的编码区筛选到 15 个 SNP 位点, 位于保守序列上的 4 个突变位点 c.647C/T、c.723A/G、c.818C/T、c.1037A/G 与红、白壳色存在显著关联, 其中 c.723A/G 位点为非同义突变 (异亮氨酸突变为缬氨酸), 且 4 个位点在遗传上存在强连锁性; 蛋白免疫印迹与免疫荧光结果表明, *Mm-SRBI* 在红壳中的蛋白表达量显著高于白壳文蛤, 主要表达部位为外套膜边缘膜的纤毛处。研究表明, *Mm-SRBI* 基因的高表达与变异可能导致文蛤对类胡萝卜素的代谢产生差异, 从而在生长发育过程中导致红壳色的形成。

关键词: 文蛤; 红壳色; *SRBI*; SNP; 蛋白表达

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

贝类壳色变异是由内部遗传到与生物化学、生活基质或营养有关等多种因素组合而产生的^[1]。类胡萝卜素是一种最常见的生物色素, 能显现出黄色到红色范围内的颜色^[2]。贝类通过摄取富含类胡萝卜素的食物, 从中积累类胡萝卜素^[3]。目前已经确定多种贝类的贝壳中存在类胡萝卜素^[4-7], 贝类需要通过体内受体吸收脂蛋白中含有的类胡萝卜素^[8]。清道夫受体 B 类 I (scavenger receptor class B, member 1, *SRBI*) 作为一种多配体受体, 能够结合多种脂蛋白, 从而促进动物体内类胡萝卜素的吸收及转运, 是类胡萝卜素代谢途径中的关键基因^[9]。迄今已在家蚕 (*Bombyx mori*)^[10-12]、鼠^[13-14] 等模式动物中克隆得到 *SRB* 家族基因, 并证明其与体内类胡萝卜素代谢有关。

在贝类中, 已克隆得到三角帆蚌 (*Hyriopsis comin-gii*)^[15]、马氏珠母贝 (*Pinctada fucata martensii*)^[16] *SRB* 基因, 并推测不同组织中类胡萝卜素的含量与该基因表达高低有关。任晓亮^[17] 对虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 类胡萝卜素代谢相关基因进行了筛查和分析, 发现不同闭壳肌颜色群体中的 *SRB* 基因表达量存在显著差异; Liu 等^[18] 干扰华贵栉孔扇贝 (*Chlamys nobilis*) *SRB-like-3* 基因表达后, 发现血液中类胡萝卜素含量显著降低, 为 *SRB* 基因与扇贝中类胡萝卜素累积有关提供了证据。

文蛤 (*Meretrix meretrix*) 是我国四大养殖贝类之一, 具有较高的经济价值和营养价值^[19]。文蛤壳色变异丰富且可稳定遗传给后代, 本课题组已培育出枣红壳色的文蛤“万里红”品种^[20], 并

收稿日期: 2020-10-07 修回日期: 2021-03-07

资助项目: 国家自然科学基金 (31772846); 国家重点研发计划 (2018YFD0901404); 国家现代贝类产业技术体系专项 (CARS-49); 浙江省生物工程一流学科 (A 类) 自设课题 (ZS2019001) 项目

第一作者: 施鹤鸣 (照片), 从事海洋贝类分子遗传学研究, E-mail: 1205756288@qq.com

通信作者: 董迎辉, E-mail: dongyinghui118@126.com; 林志华, E-mail: zhilhua9988@126.com



发现文蛤红、白壳色的差异主要是由于贝壳中类胡萝卜素含量不同引起的^[7]。崔宝月等^[21]克隆得到 *Mm-SRBI* 全长, 并检测发现红壳文蛤外套膜中 *Mm-SRBI* 基因表达量显著高于白壳文蛤。然而, 目前对 *Mm-SRBI* 基因在红壳文蛤中的变异及其蛋白表达差异与红壳色形成的关联性研究尚未见报道。

本研究以红、白壳色文蛤为对象, 采用直接测序法筛选分析 *Mm-SRBI* 基因中与壳色关联的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点, 为分子标记辅助选育提供基础; 用免疫荧光 (immunofluorescence, IF) 和蛋白免疫印迹 (Western blotting, WB) 技术对 *Mm-SRBI* 蛋白在文蛤外套膜中的表达特性进行分析, 探究 *Mm-SRBI* 表达蛋白差异与壳色变异间的关系, 为深入解析文蛤体内类胡萝卜素代谢过程提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

红壳文蛤为“万里红”新品种, 白壳文蛤为同属江苏群体的白壳品系, 二者均取自宁波海洋与渔业科技创新养殖基地。选取红壳和白壳文蛤各 210 粒, 取外套膜组织于液氮中速冻, 保存于 -80°C 超低温冰箱中, 用于后续 SNP 筛选实验; 另取红壳、白壳文蛤各 5 粒, 取新鲜外套膜组织于 4% 多聚甲醛中固定过夜, 用于免疫荧光实验。

1.2 *Mm-SRBI* 基因 CDS 区 SNP 筛选

根据本实验室克隆得到的 *Mm-SRBI* 基因 (GenBank 登录号: KY434116) 序列, 使用 Primer Premier 5 软件设计其编码序列 (coding sequence, CDS) 区的特异引物 (表 1)。用 Trizol 法提取红壳、

表 1 *Mm-SRBI* 基因 CDS 序列扩增引物信息

Tab. 1 Primer sets used for *Mm-SRBI* CDS sequence amplification

引物名称 primer	引物信息(5'→3') sequence (5'→3')
<i>SRBI-F1</i>	CTTTGGAATACTAAAACAGCGTGG
<i>SRBI-R1</i>	TAGCCCATTCAGTGCTCCAG
<i>SRBI-F2</i>	CCTTTGATGACACGCCCTT
<i>SRBI-R2</i>	ATTGTCACCATGACTTGTTACCTG

白壳文蛤外套膜组织 RNA, 依照 TaKaRa 公司 PrimeScript™ RT 试剂盒说明书反转录合成 cDNA, PCR 扩增后用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 将扩增结果为单一条带的 PCR 产物送测 (杭州擎科生物)。利用 ContigExpress 软件对测序结果进行拼接, 基于序列比对来查找 SNP 位点, 使用 Mutation Surveyor 软件查看测序图谱来进行人工校对以及统计突变位点, 用 SPSS 22 软件对与壳色性状关联的 SNP 位点基因型进行相关性分析。利用 POPgen 32 软件计算两种壳色文蛤群体 *Mm-SRBI* 基因的 SNP 位点信息, 利用在线分析网站 (<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>) 分析突变位点间的连锁不平衡 (LD)。

1.3 *Mm-SRBI* 蛋白表达的组织定位

取 4% 多聚甲醛固定过的红壳、白壳文蛤外套膜边缘组织, 经梯度乙醇脱水, 二甲苯/正丁醇透明, 石蜡包埋切片 (厚度为 $4\ \mu\text{m}$)。将烤片后的组织切片, 经二甲苯脱蜡, 梯度乙醇复水, PBS 冲洗, Tris-EDTA 抗原修复, 用 5% BSA 封闭液室温封闭 1 h, 甩干滴加 *Mm-SRBI* 一抗 (1 : 200), 切片平放于 4°C 孵育湿盒中过夜; PBST 冲洗 $3\times 10\ \text{min}$, PBS 冲洗 $2\times 10\ \text{min}$, 在暗室中滴加 FITC 荧光标记的鼠抗兔 IgG 二抗 (1 : 150, 含 DAPI), 室温避光孵育 1 h; 将玻片置于 PBS 中洗涤 $3\times 10\ \text{min}$; 在 Nikon 80i 荧光显微镜下观察拍照。

1.4 *Mm-SRBI* 蛋白的 WB 检测

取红壳、白壳文蛤新鲜外套膜组织, 加入适量 RIPA 裂解液, 匀浆; 利用 BCA 法测蛋白质浓度; 配置合适浓度的 SDS-PAGE 凝胶, 等量上样。蛋白胶经切割后转至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉封闭液室温孵育 1 h, 加入封闭液稀释的一抗 (1 : 100) 孵育袋中 4°C 过夜; TBST 漂洗 $3\times 10\ \text{min}$, 加入经生物素 HRP 标记的鼠抗兔二抗 (1 : 2000), 室温孵育 1 h; TBST 漂洗 $3\times 10\ \text{min}$; 暗室中配置增强化学发光法 (enhanced chemiluminescent, ECL) 发光底物混合液, 滴加至 PVDF 膜上, Bio-Rad 凝胶成像仪拍照; 利用 Image J 软件对红壳、白壳文蛤外套膜中 *SRBI* 表达蛋白的 WB 结果进行灰度值计算; 用 SPSS 22 软件对红、白壳色文蛤的蛋白印迹灰度值进行 *t* 检验, 分析其显著性差异。

2 结果

2.1 *Mm-SRBI* 基因 SNP 位点筛选与突变类型

对 *Mm-SRBI* 基因编码区进行扩增, 成功测序了 181 粒红壳文蛤、207 粒白壳文蛤, 序列比对共发现 15 个 SNP 位点。SNP 位点的位置命名

以 *Mm-SRBI* 基因的 mRNA 全长序列第 1 位碱基距离目的 SNP 位点的碱基数设定, 对 15 个 SNP 位点突变的个体基因型、基因型频率及等位基因频率与壳色关联性进行分析, 结果显示在红、白壳色群体中, c.647C/T、c.723A/G、c.818C/T、c.1037A/G 共 4 个位点与壳色存在显著关联 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 两种壳色文蛤 *Mm-SRBI* 基因 SNP 位点基因型及基因频率

Tab. 2 Genotype and gene frequency of SNPs sites in *Mm-SRBI* gene of two shell color *M. meretrix*

位点 locus	基因型 genotype	数量(基因型频率/%)		等位基因 allele	等位基因频率/%		χ^2 (P值) χ^2 (P-value)
		number (genotype frequency)			allele frequency		
		红壳 red shell	白壳 white shell		红壳 red shell	白壳 white shell	
c.647 C/T	CC	77(25.97)	68(32.85)	C	58.01	47.58	6.201
	CT	56(30.94)	61(29.47)	T	41.99	52.42	(0.045)*
	TT	48(26.52)	78(37.68)				
c.723A/G	AA	75(41.44)	128(61.84)	A	63.54	73.43	20.626
	AG	80(44.20)	48(23.19)	G	36.46	26.57	(0.000033)*
	GG	26(14.36)	31(14.98)				
c.818C/T	CC	67(37.02)	57(27.54)	C	56.91	43.96	12.966
	CT	72(39.78)	68(32.85)	T	43.09	56.04	(0.002)*
	TT	42(23.20)	82(39.61)				
c.1037A/G	AA	64(35.36)	46(22.22)	A	55.80	37.68	12.598
	AG	74(40.88)	64(30.92)	G	44.20	62.32	(0.002)*
	GG	43(23.76)	97(46.86)				

注: *为 χ^2 检验结果显示 $P < 0.05$

Notes: * represents $P < 0.05$ of χ^2 test results

对位点突变导致的氨基酸多态性进行分析, 其中 c.723A/G 位点为非同义突变所在位点编码的异亮氨酸 (Ile) 突变为缬氨酸 (Val), 其余位点为同义突变, 所在位点编码的氨基酸未发生变化。

对 15 个 SNP 位点突变类型进行统计分析, 发现 *Mm-SRBI* 基因在突变类型上只存在转换和颠换两种变异类型, 其中转换的频率大于颠换的频率, 二者比例约为 3 : 1 (表 3)。

2.2 SNP 位点多态性信息及连锁不平衡分析

对 *Mm-SRBI* 基因 CDS 区 SNP 位点进行分析, 得到与壳色显著关联的 4 个 SNP 位点在红壳、白壳群体中的遗传参数 (表 4)。依照 Botstein 等^[22]划分原则, 位点的 PIC 值在 0.25~0.5 为中度多态, $PIC < 0.25$ 为低度多态。统计发现, 与壳色相关联的 4 个突变位点都属于中度多态性位点 ($0.5 > PIC > 0.25$)。在红壳文蛤群体中, 观测杂合度为

0.309 4~0.442 0, 期望杂合度为 0.468 8~0.494 6, 有效等位基因数为 1.863 4~1.973 4; 白壳文蛤群

表 3 两种壳色文蛤 *Mm-SRBI* 基因型的变异类型及总数

Tab. 3 Variation type and number of genotypes in two shell color *M. meretrix SRBI* gene

变异类型 variation type	基因型 genotype	位点 sites	总数 total number
转换 transition	GA	723、944、1037、1043、 1190、1316	6
	CT	503、647、653、 818、974	5
颠换 transversion	TA	1049	1
	AC	992	1
	GT	1061	1
	CG	1091	1

表 4 两种壳色群体 *Mm-SRBI* 基因 SNP 位点多态性信息

群体 strain	位点 locus	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	有效等位基因数 N_e	多态性信息含量 PIC
红壳文蛤 red shell <i>M. meretrix</i>	c.647C/T	0.3094	0.4885	1.9499	0.3685
	c.723A/G	0.4420	0.4688	1.8634	0.3560
	c.818C/T	0.3978	0.4918	1.9626	0.3702
	c.1037A/G	0.4088	0.4946	1.9734	0.3716
白壳文蛤 white shell <i>M. meretrix</i>	c.647C/T	0.2947	0.5000	1.9953	0.3744
	c.723A/G	0.2319	0.4939	1.6399	0.3141
	c.818C/T	0.3285	0.3244	1.9712	0.3713
	c.1037A/G	0.3092	0.4708	1.8855	0.3594

体中, 观测杂合度为 0.231 9~0.328 5, 期望杂合度为 0.324 4~0.500 0, 有效等位基因数为 1.639 9~1.995 3。

Mm-SRBI 基因突变位点间的连锁不平衡分析显示, 在红壳、白壳文蛤群体内与壳色关联的突变位点之间都存在强连锁不平衡 ($D' > 0.75$), 表明这些位点存在一定程度上的连锁遗传现象 (表 5)。

表 5 两种壳色文蛤群体 *Mm-SRBI* 基因 4 个 SNP 位点连锁不平衡分析Tab. 5 Linkage disequilibrium analysis of four SNP loci of *Mm-SRBI* gene in two shell color *M. meretrix* strains

位点 loci	c.647C/T	c.723A/G	c.818C/T	c.1037A/G
c.647C/T		0.973 (1)	0.918 (1)	0.940 (1)
c.723A/G	0.750 (0.328)		1 (1)	1 (1)
c.818C/T	0.814 (0.864)	0.766 (0.284)		1 (1)
c.1037A/G	0.807 (0.666)	0.725 (0.219)	0.945 (0.771)	

注: 对角线上方为 D' , 对角线下方为 R^2 , 括号外为红壳文蛤群体位点信息, 括号内为白壳文蛤群体位点信息

Notes: the figure above the diagonal represents D' , the figure below the diagonal represents R^2 ; outside the parentheses is the linkage disequilibrium analysis of red shell color *M. meretrix* strain, inside the parentheses is white shell color *M. meretrix* strain

2.3 *Mm-SRBI* 蛋白组织分布及定位

免疫荧光结果显示, *Mm-SRBI* 蛋白在文蛤外套膜各部位均有表达 (FITC 绿色荧光信号), 但在红壳中的表达量明显高于白壳文蛤 (图 1), 在外套膜组织中, 其边缘膜处的荧光信号显著高于其他部位。DAPI 染色显示, 边缘膜组织纤毛处含有大量排列整齐的单层柱状细胞, 其余

分布少量的肌纤维。合并图显示, 绿色荧光与蓝色荧光未重合, 表明 *Mm-SRBI* 蛋白为核外蛋白, 在外套膜组织中, 边缘膜为分泌 *Mm-SRBI* 蛋白的主要部位。

2.4 外套膜 *Mm-SRBI* 蛋白表达差异

WB 结果显示, 在预测 *Mm-SRBI* 蛋白分子量大小为 56.82 ku 处出现目的条带, 而 *Mm-SRBI* 在红壳文蛤外套膜组织中的表达量明显高于白壳文蛤 (图 2-a)。WB 结果的灰度值分析显示, 红壳文蛤灰度值平均为 5.9×10^5 , 白壳文蛤为 1.3×10^5 , 二者存在极显著差异 ($P < 0.01$) (图 2-b)。

3 讨论

类胡萝卜素所呈现出的特征颜色在非光合组织和生物体中起着色素的作用。早期研究表明, 在肠道上皮组织中 *SRBI* 转运蛋白负责 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素、叶黄素、 β -隐黄素等类胡萝卜素的吸收^[23-24], 并将类胡萝卜素转运到相应的组织细胞中^[25]。*SRBI* 蛋白的差异表达影响着生物体内类胡萝卜素的含量, 在类胡萝卜素水平较低的组织中, *SRBI* 蛋白表达下调^[26]。另外, 有学者揭示了灵长类动物体内循环中的类胡萝卜素富集于视网膜中的机制, 推测 *SRBI* 蛋白的高表达是导致该区域呈现黄斑的原因^[27]。在贝类中, 已有研究证明 *SRB* 基因与类胡萝卜素含量有关^[15-18], 而在本研究中, 红壳文蛤外套膜内高表达的 *Mm-SRBI* 基因可能与高水平的类胡萝卜素相关, 并影响着贝壳着色过程。

编码区突变在调控和编码蛋白质中起着重要作用, 从而影响表型性状。在分子水平上, 单

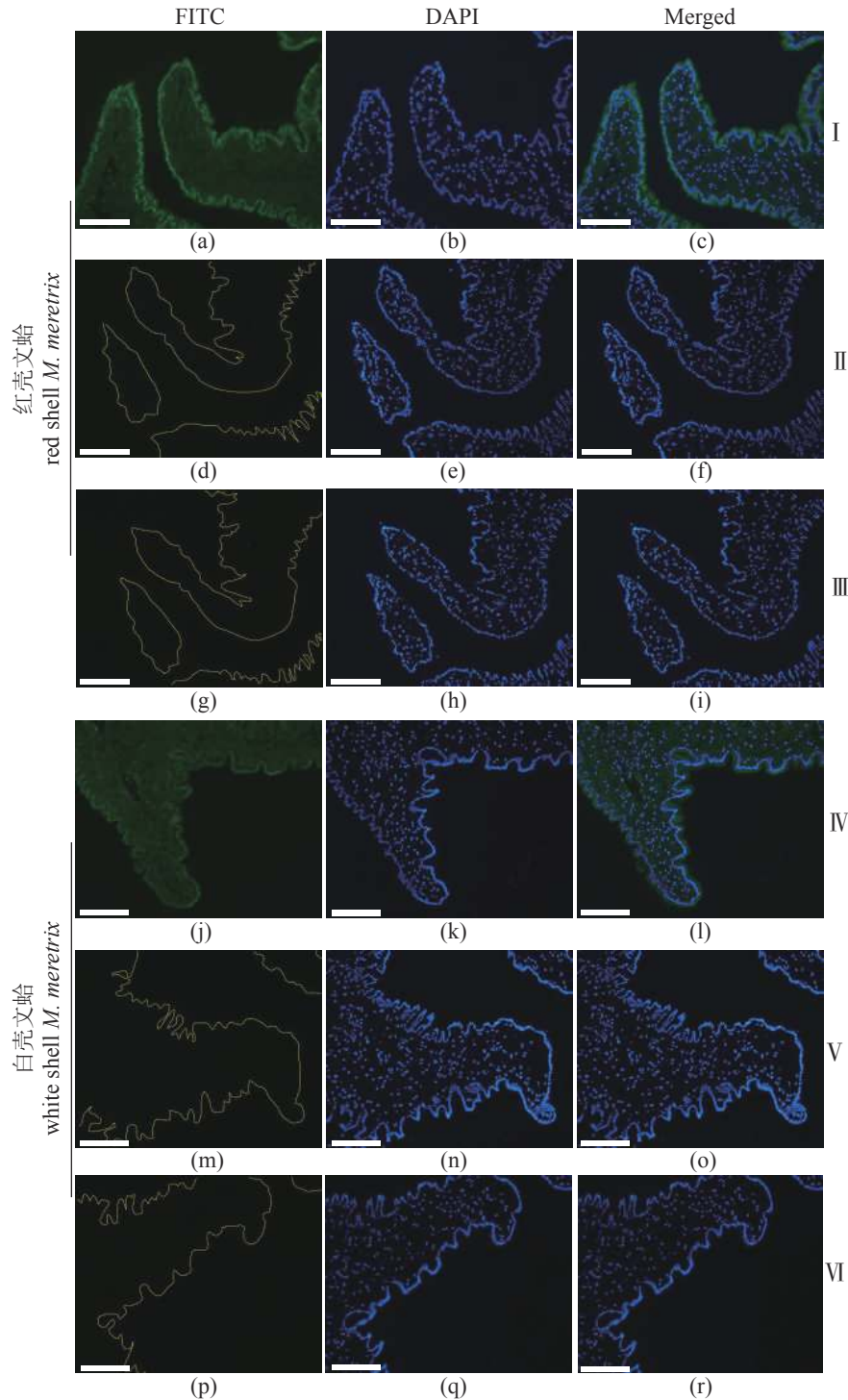


图 1 Mm-SRBI 蛋白在两种壳色文蛤外套膜中的表达分布图

从上到下每行为一组。I~III 行为红壳文蛤外套膜免疫荧光：I 为实验组，II 为阴性对照组，III 为空白对照组；IV~VI 为白壳文蛤外套膜免疫荧光：IV 为实验组，V 为阴性对照组，VI 为空白对照组。绿色荧光信号 FITC，蓝色荧光信号 DAPI，黄色虚线“----”为对照组外套膜组织描边。标尺为 50 μm

Fig. 1 Distribution of SRBI in mantle of two shell color *M. meretrix*

From top to bottom, each line is a group. I-III are the red shell *M. meretrix* mantle immunofluorescence: I is the experimental group, II is the negative control group, III is the blank control group; IV-VI are the white shell *M. meretrix* mantle immunofluorescence: IV is the experiment group, V is negative control group, VI is blank control group. Green fluorescence signal FITC, blue fluorescence signal DAPI, yellow dotted line----banding of mantle tissue in control groups. Scale bar: 50 μm

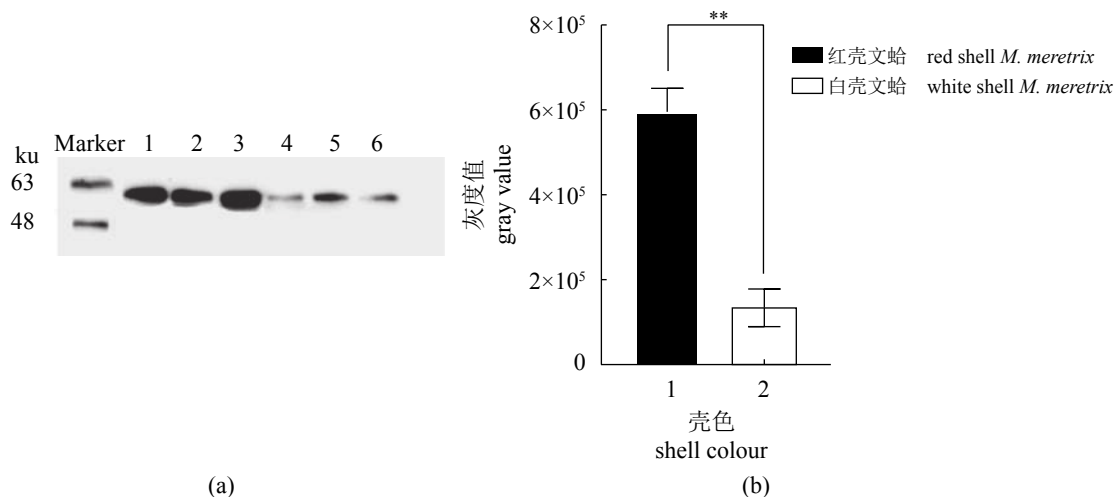


图 2 两种壳色文蛤 *Mm-SRBI* 蛋白免疫印迹结果分析

(a) WB 结果图, 1~3 泳道为红壳文蛤, 4~6 泳道为白壳文蛤; (b) 灰度值分析图, 1. 红壳, 2. 白壳, **代表差异极显著 ($P < 0.01$)

Fig. 2 Analysis of *Mm-SRBI* protein and the result of Western blotting in two shell color *M. meretrix*

(a) result of WB, 1-3 represent red shell, 4-6 represent white shell; (b) gray value of WB, 1. red, 2. white, ** represents extremely significant differences ($P < 0.01$)

核苷酸多态性 (SNP) 标记作为第三代分子标记, 因其位点丰富、遗传稳定、易于分析等优点, 被广泛用于遗传作图和性状连锁分析^[28-29]。在高等动物中已有不少针对 *SRBI* 基因多态性与个体性状的相关性分析, 如在小鼠和 humans 中, *SRBI* 基因多态性会造成体内脂蛋白和甘油酸酯的水平异常, 从而显现出不同群体脂类代谢的差异^[30-33], 不同基因型个体也与血液中的类胡萝卜素含量相关联^[34]; 在鸟类中, *SRBI* 基因突变会破坏类胡萝卜素的转运功能, 导致羽毛着色发生变化^[35]。对本实验结果的 15 个 SNP 位点进行信息注释, 发现在突变类型上只存在转换和颠换两种类型, 且 CT 之间的转换频率大于 AG, 可能是因为胞嘧啶 (C) 常发生甲基化, 自发脱氨形成胸腺嘧啶 (T)。经序列比对发现, 与壳色显著关联的 4 个 SNP 位点都位于 *Mm-SRBI* 基因保守序列上, 并且非同义突变位点 c.723A/G 位于糖基化位点上。糖基化是重要的蛋白修饰之一, 糖基化位点突变会使蛋白的功能、理化性质发生改变, 如凝血因子 VIII 基因上的 N-糖基化位点突变, 导致蛋白的转运功能发生变化^[36]; 膜糖蛋白 CD133 上的糖基化位点突变降低了其与受体的相互作用^[37]。因此推测, *Mm-SRBI* 基因上 c.723A/G 位点多态性可能使表达蛋白活性或与脂蛋白结合能力发生变化, 从而导致血液和外周组织类胡萝卜素代谢水平的差异; 其余 3 个位点虽为同义突变,

未导致编码的氨基酸发生变化, 但也有研究证明同义突变可影响 mRNA 的剪接、稳定性和结构以及 tRNA 的翻译效率, 从而影响蛋白质合成的功能^[38], 但要证明这些位点突变与红、白文蛤类胡萝卜素代谢差异相关还有待进一步研究。

免疫荧光和蛋白免疫印迹技术将蛋白进行可视化, 对目标蛋白进行检测和评价, 已然成为蛋白表达特性的有效研究方法^[39]。在分子水平上, 已验证 *Mm-SRBI* 基因在红壳文蛤外套膜组织中的表达量高于白壳文蛤, 且存在显著差异^[21]。在蛋白水平上, 对家蚕^[40]、猪^[41]、人^[42]等 *SRBI* 蛋白的定位分析中发现, 该蛋白表达位置位于细胞膜上。本实验结果表明, *Mm-SRBI* 蛋白在文蛤外套膜中均有表达, 但主要表达在文蛤外套膜边缘膜纤毛上皮细胞膜上, 且红壳文蛤的蛋白表达量显著高于白壳文蛤。WB 结果显示在预期 *Mm-SRBI* 蛋白分子量大小处出现条带, 灰度值比较发现, *Mm-SRBI* 蛋白在红壳外套膜中的表达量约为白壳的 4.4 倍, 与 IF 结果基本一致。在小鼠中已有研究发现, *SRBI* 蛋白的缺失会导致小鼠体内相关脂类的表达下调^[43], 功能上 *SRBI* 蛋白介导高密度脂蛋白对胆固醇酯的选择性摄取, 并对细胞内类胡萝卜素的代谢物进行转运, 将类胡萝卜素及代谢产物运输至相应的组织中^[44]。因此, 推测红壳、白壳文蛤中 *Mm-SRBI* 蛋白表达存在差异可能与其类胡萝卜素代

谢水平相关联。红壳文蛤相较于白壳文蛤对类胡萝卜素代谢更为旺盛, 外套膜作为文蛤贝壳的生壳组织, 高表达的 SRBI 蛋白促进其对类胡萝卜素吸收及转运, 进而形成红、白文蛤在壳色外观上的差异。

综上所述, 本实验在文蛤体内类胡萝卜素代谢相关的关键基因 *Mm-SRBI* 中筛查到 4 个与壳色相关联的 SNP 位点, 并对 *Mm-SRBI* 蛋白在外套膜边缘组织中进行细胞定位和表达分析, 研究结果可为今后红壳色文蛤分子辅助育种提供候选标记, 为深入解析文蛤类胡萝卜素代谢途径及与红壳色形成的机制研究提供理论基础。

参考文献 (References):

- [1] Cook L M. Reflections on molluscan shell polymorphisms[J]. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2017, 121(4): 717-730.
- [2] 惠伯棣. 类胡萝卜素化学及生物化学 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005.
- Hui B D. Carotenoid chemistry and biochemistry[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2005 (in Chinese).
- [3] de Carvalho C C C R, Caramujo M J. Carotenoids in aquatic ecosystems and aquaculture: a colorful business with implications for human health[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2017, 4: 93.
- [4] Bergamonti L, Bersani D, Mantovan S, *et al.* Micro-Raman investigation of pigments and carbonate phases in corals and molluscan shells[J]. *European Journal of Mineralogy*, 2014, 25(5): 845-853.
- [5] Stemmer K, Nehrke G. The distribution of polyenes in the shell of *Arctica islandica* from North Atlantic localities: a confocal Raman microscopy study[J]. *Journal of Molluscan Studies*, 2014, 80(4): 365-370.
- [6] Hedegaard C, Bardeau J F, Chateigner D. Molluscan shell pigments: an *in situ* resonance raman study[J]. *Journal of Molluscan Studies*, 2006, 72(2): 157-162.
- [7] 詹艳玲. 文蛤 (*Meretrix meretrix*) 壳色的鉴定及其相关基因和 microRNA 研究 [D]. 宁波: 浙江万里学院, 2015.
- Zhan Y L. Identification of shell color and the related gene and microRNA research of *Meretrix meretrix*[D]. Ningbo: Zhejiang Wanli University, 2015 (in Chinese).
- [8] Shete V, Quadro L. Mammalian metabolism of β -carotene: gaps in knowledge[J]. *Nutrients*, 2013, 5(12): 4849-4868.
- [9] Quadro L, Giordano E, Costabile B K, *et al.* Interplay between β -carotene and lipoprotein metabolism at the maternal-fetal barrier[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2020, 1865(11): 158591.
- [10] 赵羽卒, 张奎, 唐梅, 等. 家蚕 B 类清道夫受体 *BmSCR8* 基因的克隆及表达 [J]. 生物工程学报, 2016, 32(10): 1408-1421.
- Zhao Y Z, Zhang K, Tang M, *et al.* Cloning and expression of scavenger receptor class B *BmSCR8* in silkworm *Bombyx mori*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2016, 32(10): 1408-1421 (in Chinese).
- [11] Dong Z P, Chai C L, Dai F Y, *et al.* Expression pattern and tissue localization of the class B scavenger receptor *BmSCR8* in *Bombyx mori*[J]. *Insect Science*, 2015, 22(6): 739-747.
- [12] Sakudoh T, Kuwazaki S, Iizuka T, *et al.* CD36 homolog divergence is responsible for the selectivity of carotenoid species migration to the silk gland of the silkworm *Bombyx mori*[J]. *Journal of Lipid Research*, 2013, 54(2): 482-495.
- [13] Altmann S W, Davis Jr H R, Yao X R, *et al.* The identification of intestinal scavenger receptor class B, type I (SR-BI) by expression cloning and its role in cholesterol absorption[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2002, 1580(1): 77-93.
- [14] van Bennekum A, Werder M, Thuahnai S T., *et al.* Class B scavenger receptor-mediated intestinal absorption of dietary β -carotene and cholesterol[J]. *Biochemistry*, 2005, 44(11): 4517-4525.
- [15] 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).
- [16] Lei C, Hao R J, Zheng Z, *et al.* Molecular cloning and characterisation of scavenger receptor class B in pearl

- oyster *Pinctada fuctada martensii*[J]. [Electronic Journal of Biotechnology](#), 2017, 30: 12-17.
- [17] 任晓亮. 虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 闭壳肌积累类胡萝卜素相关基因的筛查 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
- Ren X L. Identification of genes relating to carotenoids accumulation in adductor muscles of Yesso scallops (*Patinopecten yessoensis*)[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011 (in Chinese).
- [18] Liu H L, Zheng H P, Zhang H K, *et al.* A de novo transcriptome of the noble scallop, *Chlamys nobilis*, focusing on mining transcripts for carotenoid-based coloration[J]. [BMC Genomics](#), 2015, 16(1): 44.
- [19] 庄启谦. 中国动物志: 软体动物门 双壳纲 帘蛤科 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- Zhuang Q Q. Fauna Sinica: Molluscs Lamellibranchia Veneridae[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [20] 林志华, 董迎辉. 文蛤“万里红”[J]. [中国水产](#), 2015(10): 50-52.
- Lin Z H, Dong Y H. "Wanlihong" hard clam (*Meretrix meretrix*)[J]. [China Fisheries](#), 2015(10): 50-52 (in Chinese).
- [21] 崔宝月, 董迎辉, 赵家熙, 等. 文蛤 *SRBI* 基因克隆及其在不同壳色群体中的差异表达 [J]. [水生生物学报](#), 2018, 42(3): 488-493.
- Cui B Y, Dong Y H, Zhao J X, *et al.* Cloning and expression analysis of *SRBI* gene in different shell-color strains of *Meretrix meretrix*[J]. [Acta Hydrobiologica Sinica](#), 2018, 42(3): 488-493 (in Chinese).
- [22] Botstein D, White R L, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. [American Journal of Human Genetics](#), 1980, 32(3): 314-331.
- [23] During A, Hussain M M, Morel D W, *et al.* Carotenoid uptake and secretion by CaCo-2 cells: β -carotene isomer selectivity and carotenoid interactions[J]. [Journal of Lipid Research](#), 2002, 43(7): 1086-1095.
- [24] During A, Harrison E H. Mechanisms of provitamin A (carotenoid) and vitamin A (retinol) transport into and out of intestinal Caco-2 cells[J]. [Journal of Lipid Research](#), 2007, 48(10): 2283-2294.
- [25] 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.
- [26] During A, Dawson H D, Harrison E H. Carotenoid transport 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.
- [27] 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.
- [28] Wang J L, Li Q, Zhong X X, *et al.* An integrated genetic map based on EST-SNPs and QTL analysis of shell color traits in Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. [Aquaculture](#), 2018, 492: 226-236.
- [29] Rasal K D, Chakrapani V, Pandey A K, *et al.* Status and future perspectives of single nucleotide polymorphisms (SNPs) markers in farmed fishes: way ahead using next generation sequencing[J]. [Gene Reports](#), 2017, 6: 81-86.
- [30] Zanon P, Khetarpal S A, Larach D B, *et al.* Rare variant in scavenger receptor BI raises HDL cholesterol and increases risk of coronary heart disease[J]. [Science](#), 2016, 351(6278): 1166-1171.
- [31] Goodarzynejad H, Boroumand M, Behmanesh M, *et al.* The rs5888 single nucleotide polymorphism in scavenger receptor class B type 1 (*SCARB1*) gene and the risk of premature coronary artery disease: a case-control study[J]. [Lipids in Health and Disease](#), 2016, 15: 7.
- [32] Zeng T T, Tang D J, Ye Y X, *et al.* Influence of *SCARB1* gene SNPs on serum lipid levels and susceptibility to coronary heart disease and cerebral infarction in a Chinese population[J]. [Gene](#), 2017, 626: 319-325.
- [33] Wang H B. Relationship between *SR-BI* genetic polymorphism and coronary heart disease and blood lipid level[J]. [International Journal of Clinical and Experimental Medicine](#), 2016, 9(10): 19886-19892.
- [34] Borel P, Lietz G, Goncalves A, *et al.* CD36 and SR-BI are involved in cellular uptake of provitamin A carotenoids by CaCo-2 and HEK Cells, and some of their genetic variants are associated with plasma concentra-

- tions of these micronutrients in humans[J]. *The Journal of Nutrition*, 2013, 143(4): 448-456.
- [35] Toomey M B, Lopes R J, Araújo P M, *et al.* High-density lipoprotein receptor *SCARBI* is required for carotenoid coloration in birds[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(20): 5219-5224.
- [36] Wei W, Zheng C L, Zhu M, *et al.* Missense mutations near the N-glycosylation site of the A2 domain lead to various intracellular trafficking defects in coagulation factor VIII[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 45033.
- [37] Liu Y, Ren S F, Xie L Q, *et al.* Mutation of N-linked glycosylation at Asn548 in CD133 decreases its ability to promote hepatoma cell growth[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(24): 20650-20660.
- [38] Zwart M P, Schenk M F, Hwang S, *et al.* Unraveling the causes of adaptive benefits of synonymous mutations in TEM-1 β -lactamase[J]. *Heredity*, 2018, 121(5): 406-421.
- [39] Lugos M D, Davou G I, Choji T P P, *et al.* Using immunohistochemistry without linkers to determine the optimum concentrations of primary antibodies for immunofluorescence staining of formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections[J]. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 2020, 28(3): 249-257.
- [40] Tsuchida K, Sakudoh T. Recent progress in molecular genetic studies on the carotenoid transport system using cocoon-color mutants of the silkworm[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2015, 572: 151-157.
- [41] Hansen H G, 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.
- [42] Miquel J F, Moreno M, Amigo L, *et al.* Expression and regulation of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in gall bladder epithelium[J]. *Gut*, 2003, 52(7): 1017-1024.
- [43] Cardoso R M, Creemers E, Absalah S, *et al.* Hyperalphalipoproteinemic scavenger receptor BI knockout mice exhibit a disrupted epidermal lipid barrier[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2020, 1865(3): 158592.
- [44] Acton S, Rigotti A, Landschulz K T, *et al.* Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor[J]. *Science*, 1996, 271(5248): 518-520.

Mutation in *SRBI* gene and its association with the red shell color in *Meretrix meretrix*

SHI Heming¹, DONG Yinghui^{1*}, YAO Hanhan¹, BAO Yongbo¹, LIN Zhihua^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Aquatic Germplasm Resources of Zhejiang, College of Biology and Environment Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China;

2. Ninghai Marine Biological Seed Industry Research Institute, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China)

Abstract: The hard clam (*Meretrix meretrix*) is one of the most commercially important cultured shellfish in China. The red shell clam is richer in carotenoids, which makes its shell color red and has higher nutritional value compared with the white shell clam. In order to understand the mutation of scavenger receptor class B type I (*SRBI*) and its association with the formation of red shell color in *M. meretrix*, we analyzed the SNPs of *Mm-SRBI* gene CDS by using direct sequencing among 181 red shell clams and 207 white shell clams. Immunofluorescence (IF) and Western blot (WB) were used to analyze the expression characteristics of *Mm-SRBI* protein in the mantle of two shell color strains. The results showed that a total of 15 single nucleotide polymorphisms (SNPs) were detected, and there were only two types of mutation in *Mm-SRBI*: transition and transversion, and the ratio of the two was about 3 : 1. Among the 15 loci, 4 loci were significantly associated with shell color. The statistical results indicated that in red shell strain the range of H_o was 0.309 4–0.442 0, H_e 0.468 8–0.494 6, and N_e 1.863 4–1.973 4, while in the white shell strain H_o was 0.231 9–0.328 5, H_e 0.324 4–0.500 0, and N_e 1.639 9–1.995 3. The PIC value evidenced that these loci were all moderately polymorphic ($0.5 > PIC > 0.25$). Additionally, all of them were in conserved sequences, in which c.723 A/G site was non-synonymous mutation that led to amino acid changes Ile723Val, and 4 loci were genetically strongly linked ($D' > 0.75$). The results of IF and WB revealed that *Mm-SRBI* protein was higher expressed in the mantle of red-shelled clams compared to that of the white-shelled clams and was mainly expressed at the outer epithelium of the mantle. Moreover, the quantitative analysis of gray values demonstrated that *Mm-SRBI* protein expression in red-shell clams was approximately 4.5 times higher than that in white-shell clams. In summary, our results suggested that the mutations of *Mm-SRBI* and the high expression of its protein may lead to differences in the metabolism of carotenoids in *M. meretrix*, which may further lead to the formation of red shell color. It also provided a helpful basis to explore the molecular mechanisms of carotenoids metabolism underlying shell coloration and could be potentially applied to marker-assisted selection breeding programs for *M. meretrix*.

Key words: *Meretrix meretrix*; red shell color; *SRBI*; SNP; protein expression

Corresponding authors: DONG Yinghui. E-mail: dongyinghui118@126.com;

LIN Zhihua. E-mail: zhihua9988@126.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31772846); National Key R & D Program (2018YFD0901404); Modern Agro-industry Technology Research System (CARS-49); First-class Discipline of Bioengineering (Class A) in Zhejiang Province (ZS2019001)