

中华绒螯蟹肉碱乙酰转移酶 (CAT) 基因表达分析

刘丽^① 潘杰^① 邓登^② 成永旭^{①③④} 吴旭干^{①③④*}

① 上海海洋大学 农业部鱼类营养和环境生态研究中心 上海 201306; ② 深圳市澳华农牧有限公司 深圳 518054; ③ 上海海洋大学 上海水产养殖工程技术研究中心 上海 201306; ④ 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306

摘要: 肉碱乙酰转移酶 (CAT) 是一种作用于短链脂肪酸的酶。本研究克隆了中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) CAT 基因的开放阅读框序列 (ORF), 并采用实时荧光定量 PCR (q-PCR) 分析其在雌雄不同组织中的表达模式以及不同卵巢发育时期肝胰腺和卵巢的表达变化。结果表明, CAT 的 ORF 长为 1 929 bp, 编码 642 个氨基酸, 无跨膜域和信号肽, 预测的蛋白含有一个 Acyltransferases ChoActase 保守结构域 (40 ~ 56 aa), 和一个 Carn-acyltransf superfamily 典型结构域 (43 ~ 626 aa)。CAT 在雌雄蟹所有组织中均有表达, 雄蟹中肝胰腺和肌肉组织的表达量较高, 在其他组织中的表达量相对较低; 雌蟹中肝胰腺的表达量最高, 其次为卵巢和肌肉。肝胰腺以及卵巢的 CAT 表达量在不同卵巢发育时期之间差异显著 ($P < 0.05$), 表明 CAT 在卵巢发育过程中起着重要作用。

关键词: 中华绒螯蟹; 肉碱乙酰转移酶; 表达; 卵巢发育

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2018) 06-951-12

Expression of Carnitine Acetyltransferase (CAT) in Chinese Mitten Crab *Eriocheir sinensis*

LIU Li^① PAN Jie^① DENG Deng^② CHENG Yong-Xu^{①③④} WU Xu-Gan^{①③④*}

① Centre for Research on Environmental Ecology and Fish Nutrition of Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

② Shenzhen Alpha Feed Co. Ltd., Shenzhen 518054; ③ Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University,

Shanghai 201306; ④ National Demonstration Centre for Experimental Fisheries Science Education,

Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Carnitine acetyltransferase (CAT) is an enzyme that has effect on short-chain fatty acids. In this study, the open reading frame (ORF) of CAT was cloned from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* by PCR, to analyze the CAT tissue-specific expression and the changing patterns of CAT expression levels in

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31572630), 农业部现代农业产业技术体系专项资金项目 (No. CARS-48), 深圳市澳华农牧有限公司横向项目 (No. D-8006-15-0054), 江苏省海洋与渔业科技创新和推广项目 (No. Y2017-4);

* 通讯作者, E-mail: xgwu@shou.edu.cn;

第一作者介绍 刘丽, 女, 硕士研究生; 研究方向: 水产动物营养和生理; E-mail: 765492348@qq.com。

收稿日期: 2018-05-08, 修回日期: 2018-08-08 DOI: 10.13859/j.cjz.201806013

hepatopancreas and ovaries during different stages of ovarian development by quantitative real-time PCR (q-PCR). The results showed that the ORF of *CAT* was 1 929 bp in length and encoded 642 amino acids (Fig. 1) without transmembrane domain and signal peptide, with the predicted protein containing an Acyltransferases ChoActase conserved domain (40 - 56 aa) and a typical Carn-acyltransf superfamily domain (43 - 626 aa) (Fig. 2). For either males or females, *CAT* expressed in all detected tissues. In males, higher *CAT* expression levels were detected in hepatopancreas and muscle (Fig. 4). In females, the highest expression level was observed in hepatopancreas, followed by the ovaries and muscle (Fig. 5). The observed changes of *CAT* expression levels in hepatopancreas and ovaries significantly varied in different ovarian development stages ($P < 0.05$) (Fig. 6, 7), suggesting that *CAT* may play an important role in *E. sinensis* during its ovarian development.

Key words: *Eriocheir sinensis*; Carnitine acetyltransferase (*CAT*); Expression; Ovarian development

肉碱酰基转移酶催化辅酶 A (coenzyme A, CoA) 和肉碱之间的酰基转移。肉碱酰基转移酶家族在脂肪酸的分解代谢中至关重要, 根据底物特异性可分为肉碱棕榈酰转移酶 (carnitine palmitoyltransferase, CPT)、肉碱辛酰转移酶 (carnitine octanoyltransferase, COT) 和肉碱乙酰转移酶 (carnitine acetyltransferase, CAT) (Houten et al. 2010, Violante et al. 2013)。

肉碱乙酰转移酶 (CAT) 对 2~6 个碳原子的酰基具有活性, 已在多个真核物种中发现该基因, 包括酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) (Kispal et al. 1993)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) (陈泓 2014)、哺乳动物 (Brunner et al. 1997, Ferdinandusse et al. 1999) 等。它广泛分布在不同的组织中, 定位于线粒体、过氧化物酶体和内质网 (Colucci et al. 1988)。CAT 在哺乳动物的棕色脂肪组织、心肌和大脑中高表达 (Marquis et al. 1965)。哺乳动物 CAT 能缓冲乙酰 CoA 的快速变化, 从而防止游离 CoA 的消耗; 另一方面, 这种酶的产物乙酰肉碱, 是一个产生乙酰 CoA 的库, 即 CAT 能使乙酰 CoA 和乙酰肉碱相互转换 (Seiler et al. 2015)。CAT 也可以参与消除异生素脂肪酸, 这是因为 CAT 可以将短的支链脂肪酸转化为肉毒碱, 从而促进它们通过尿液排泄出体外 (Chalmers et al. 1983)。CAT 通过形成乙酰肉碱可以降低乙酰 CoA/CoA 的比例从而正向调节丙酮酸脱氢酶

复合物浓度 (Weyenberg et al. 2010), 因此 *CAT* 缺陷的酵母细胞中该复合物的含量减少 (Kispal et al. 1993)。在肌肉特异性 *CAT* 基因敲除的小家鼠 (*Mus musculus*) 中发现, 关键的调控酶丙酮酸脱氢酶受到抑制, 而胰岛素作用增强 (Noland et al. 2009)。此外, CAT 在调节底物转换和葡萄糖体内平衡方面起着重要作用 (Seiler et al. 2014)。

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 是我国重要的养殖经济蟹类之一, 2016 年全国总产量约 80 万吨 (农业部渔业渔政管理局 2017)。肝胰腺是中华绒螯蟹脂类储存和加工的主要场所, 是脂质代谢的中心, 且对中华绒螯蟹的生长、发育和生殖具有十分重要的作用 (Mikami et al. 1994, 成永旭等 1998, 刘泽华等 2016, 施秋燕等 2016, 成永旭等 2017)。在卵巢快速发育阶段, 一部分肝胰腺中的脂类被转运到卵巢中 (成永旭等 1998, 刘丽等 2017, Long et al. 2017)。目前水产动物脂质代谢的研究受到广泛关注, 而关于中华绒螯蟹脂肪酸氧化的分子机制鲜有报道。本文获得了中华绒螯蟹 *CAT* 基因的开放阅读框, 对其序列进行分析, 并通过组织特异性、不同卵巢发育时期主要组织的表达探究该基因表达特征, 为解析中华绒螯蟹脂质代谢机制尤其是脂肪酸氧化分解机制提供帮助。

1 材料与方法

1.1 材料与采样

实验用蟹均来自上海海洋大学崇明中华绒螯蟹实验基地。从 2016 年 7 月至 2017 年 1 月, 每月挑选 12 只肢体健全且富有活力的雌蟹进行取样。对暂养后的实验用蟹用电子天平 (美国双杰公司) 进行称重, 并用游标卡尺 (日本三丰公司) 测量其甲壳长、甲壳宽, 体重和甲壳长分别为 47 ~ 135 g 和 4.3 ~ 6.1 cm。随后进行活体解剖, 取出所有个体的卵巢组织进行准确称重, 并记录卵巢颜色, 计算卵巢指数 (即卵巢重占体重的百分比)。同时分别取 0.2 g 左右卵巢和肝胰腺, 液氮速冻后置于 -80 °C 冰箱保存备用。样品采集完毕后, 再根据文献 (薛鲁征等 1987, Wu et al. 2014) 的分期方法统一将上述中华绒螯蟹的卵巢发育分为 5 期, 每个发育阶段各选取 8 只蟹的卵巢和肝胰腺, 以用于后续实验。另外, 在 8 月份取雌雄蟹各 5 只, 分别采集其肝胰腺、卵巢 (雄性为副性腺、储精囊和生精区)、血淋巴、肌肉、胸神经节、脑神经节、鳃、肠道、胃和心等 10 种组织, 用液氮速冻后置于 -80 °C 冰箱保存备用。

1.2 RNA 提取和基因克隆

使用 RNAiso Plus 试剂 (大连 TaKaRa 公司) 按照说明书提取中华绒螯蟹的总 RNA, 分别采用紫外分光光度计 Q5000 (美国 Quawell 公司) 和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的纯度及完整性。采用反转录试剂盒 (大连 TaKaRa 公司) 将提取的 RNA 进行第一链 cDNA 合成。根据从中华绒螯蟹基因组草图获得的 CAT 氨基酸序列和完整编码序列 (complete coding sequence, CDS) (Song et al. 2016), 设计基因特异性引物扩增 CAT 的开放阅读框序列 (表 1)。PCR 反应体系 25 μ l, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ l, cDNA 模板 1 μ l (0.05 g/L), 9.5 μ l 的 ddH₂O, 12.5 μ l 的 2 \times Taq PCR Master Mix。PCR 扩增程序, 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 利用 DNA 凝胶回收试剂盒 (北

京天根生化科技有限公司) 回收纯化预期大小的条带 (约 1 900 bp), 与 pMD19-T 载体 (大连 TaKaRa 公司) 进行连接, 将含有目的基因的载体转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Top10 感受态细胞 (北京天根生化科技有限公司) 中, 菌液培养 90 min 后涂布于含氨苄青霉素的 LB 固体培养基, 37 °C 倒置培养 12 h, 挑选阳性克隆经菌液 PCR 检测后送公司测序。将测序结果与从基因组数据库中获得的 CAT 序列进行比对分析。

表 1 实验用 PCR 引物及序列

Table 1 Primers and their sequences used in the experiment

| 引物名称 Primer name | 核苷酸序列 (5'-3') Sequence (5'-3') | 用途 Usage |
|---------------------|-----------------------------------|-------------|
| CAT-F | ATGGCACTTTCGGCGTCCTTCG | ORF |
| CAT-R | CTATAACTTGGCTTTGAGTCCA | |
| q-CAT-F | TGTTGAAGCCTGACCTTCCA | q-PCR |
| q-CAT-R | GGTTGTAGCAGCAGCCATAC | |
| β -actin-F | ACCTCGGTTCTATTTGTGTCGG | q-PCR |
| β -actin-R | ATGCTTTCGCAGTAGTTCGTC | |

1.3 序列分析

通过 Primer Premier 5 软件及 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 对中华绒螯蟹 CAT 序列进行验证、翻译及蛋白质分析; 利用 ProtParam on the ExPASy Server (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测等电点及分子量; 通过 TMHMM Server v2.0 在线软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测蛋白质的跨膜结构域; 使用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 在线预测信号肽; 利用 PROSITE (<http://au.expasy.org/prosite>) 分析 CAT 的蛋白结构域; 通过 BioEdit7 软件及 ClustalX 对中华绒螯蟹及其他物种 CAT 进行氨基酸序列比对分析; 使用 MEGA 6.0 软件的邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建不同物种 CAT 的系统进化树 (Tamura et al. 2013)。

1.4 实时荧光定量 PCR

通过实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, q-PCR) 测定雌雄中华绒螯蟹 *CAT* 的组织分布以及雌蟹不同卵巢发育阶段肝胰腺和卵巢的 mRNA 表达水平。按照 1.2 节的方法提取每个样品的 RNA 并合成 cDNA 模板。根据中华绒螯蟹 *CAT* 的开放阅读框全长序列, 设计 q-PCR 特异性引物以及中华绒螯蟹 β -actin 内参基因 (GenBank 序列号为 HM053699) 引物。按照 SYBR[®] RT-PCR 试剂盒说明书 (大连 TaKaRa 公司), 在 FAST-7500 系统 (ABI-7500, 新加坡 ThermoFisher 公司) 上进行 q-PCR 反应。反应体系 10 μ l: 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.2 μ l, 5 μ l 的 2 \times SYBR Master Mix, 1 μ l 的 cDNA 模板 (0.05 g/L), 0.2 μ l 的 ROX Reference Dye II, ddH₂O 补至 10 μ l。反应条件, 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 34 s, 共进行 40 个循环; 熔解曲线反应条件, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 65 $^{\circ}$ C 60 s, 95 $^{\circ}$ C 30 s。每个样品重复 3 次取平均值。

1.5 数据分析

采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 *CAT* 的相对表达水平 (Livak et al. 2001)。采用 SPSS 18.0 软件对 q-PCR 数据进行统计分析, 采用 ANOVA 进行方差分析, Duncan 法进行多重比较, 当 $P < 0.05$ 时为差异显著, 所有数据以平均值 \pm 标准误 (Mean \pm SE) 表示。利用 Sigmaplot 12.5 对统计结果进行作图。

2 结果

2.1 *CAT* 序列分析

基于基因组数据, 通过 PCR 技术获得了中华绒螯蟹 *CAT* 基因的开放阅读框 (GenBank 序列号 MH178391), 序列分析显示其长度为 1 929 bp, 编码 642 个氨基酸 (图 1)。利用 ExPASy 在线软件对 *CAT* 进行分析, 得到其分子量为 72.00 ku, 等电点为 8.54, 不稳定指数 47.03, 为不稳定蛋白, 脂溶性指数为 84.58, 总平均亲水性为 -0.305, 属于疏水性蛋白; 利用 SignalP 在线分析序列,

结果表明该蛋白没有信号肽, 属于非分泌蛋白; 通过 TMHMM 分析表明该蛋白无跨膜结构。BLAST 结果显示, 第 43 个至第 626 个氨基酸为 Carn-acyltransf superfamily 的典型结构域; 中华绒螯蟹 *CAT* 编码的氨基酸序列与端足虫 (*Hyalella azteca*) 的 *CAT* 氨基酸序列相似度高达 62%。此外, PROSITE 发现该蛋白含有一个 Acyltransferases ChoActase 保守结构域, 位于氨基酸的第 40 ~ 56 位置; 同时, 用 PROSITE 对 *CAT* 序列进行功能位点检测, 该蛋白有 6 个 N-豆蔻酰化位点, 8 个蛋白激酶 II 磷酸化位点, 10 个蛋白激酶 C 磷酸化位点, 1 个 cGMP 和 cAMP 依赖的蛋白激酶磷酸化位点, 3 个酪氨酸激酶磷酸化位点, 1 个酰胺化位点, 2 个 N-糖基化位点, 1 个细胞连接序列和 1 个微体 C 端定位信号。

2.2 *CAT* 序列比对及进化树分析

利用 ClustalX 软件, 将小家鼠、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 和斑马鱼 (*Danio rerio*) 的 *CAT* 氨基酸序列同中华绒螯蟹 *CAT* 氨基酸序列进行同源比对分析, 发现了 3 个保守基序 (图 2)。通过 MEGA6.0, 将中华绒螯蟹 *CAT* 氨基酸序列与其他物种 *CAT* 的氨基酸序列共同构建系统进化树 (图 3), 结果显示, 中华绒螯蟹 *CAT* 先与端足虫 (XP_018008579.1) *CAT* 聚为一支, 再与大型蚤 (*Daphnia magna*, JAM84334.1)、桔小实蝇 (*Bactrocera dorsalis*, JAC47893.1)、光肩星天牛 (*Anoplophora glabripennis*, XP_018569316.1)、金凤蝶 (*Papilio machaon*, KPJ15173.1)、柑橘凤蝶 (*Papilio xuthus*, KPI93856.1)、棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*, XP_021189207.1) 和家蚕 (*Bombyx mori*, XP_004929296.2) 聚为一大支; 蜃 (*Limulus polyphemus*, XP_013776464.1) 与温室希蛛 (*Parasteatoda tepidariorum*, XP_015925085.1)、虎蜘蛛 (*Cupiennius salei*, AQY19418.1) 聚为一支; 爪蟾 (*Xenopus laevis*, NP_001085496.1)、人 (*Homo sapiens*, AAH00723.1)、小家鼠 (NP_031786.2)、斑马马

```

1 M A L S A S F V L R Q G L R C S R V L R S G S V F P S L V M
1 ATGGCACTTTCGGCGTCCTTCGTCCTCCGCCAGGGGCTGAGGTGTAGCAGAGTCCCTAGGTCGGGCAGTGTATTCCCTCCCTAGTGATG
31 P P R L L H Q G D P P A L P Q L P V P Q L Q E T L Q K Y L K
91 CCCCCACGACTGCTGCACCAGGGTGACCCCCAGCCCTGCCAGCTCCAGTGCCTCAGTTGCAAGAGACACTCCAAAAGTACCTCAA
61 T V K P L V T E E E Y M V T E E I V K K F G N I D G I G Q K
181 ACAGTCAAACCCCTTGTAACAGAGGAGGAATATATGGTACAGAGGAGATAGTAAAGAAAGTTGGTAATATTGATGGAATTGGCCAGAAG
91 L Q Q K L E E R K K N T E N W L S D W W I N A A Y L D C R G
271 CTGCAGCAAAAGTTGGAAGAGAGGAAGAAAAACACTGAGAAGTGGTATCTGACTGGTGGATTAATGCAGCATATCTGGACTGCCGTGGG
121 P L V V W S S P G L V F P L Q E F K T L D D Q L N Y A A K V
361 CCATTGGTGGTGTGCTCCCGAGGGCTGTGTTCCGCTTCAGGAGTCAAGACCTTAGATGACCAACTTAATTATGCTGCCAAAGTA
151 I A G T L D F I G Q S P K D E K T L P V P V D R M G K D I L D M S Q
451 ATTGCAGGAAGTCTGGACTACAAGATCATGGTGGACGAGAAAACAGTACCAGTGGACCGCATGGGAAAGGACATCTTAGACATGTCTCAG
181 Y F K I L G T C R I P G V T R D T I R F Y G Q E A D P P K H
541 TACTTCAAGATCTGGGCACTTGTGCGATCCCGGGGTGACAAGGACACAATCAGGTTTATGGACAAGAAGCAGACCCCAAAACAC
211 I V V A H N N H F F I D V I G K H G K P L N A P D L V H Q
631 ATAGTGGTGGCAGATAACAATCATTTCCTCAAGATTGACGTTTATGGGAAGCATGGGAAGCCACTCAACGTCGCTCAGTTGGTGCATCAG
241 L R N V V E R S T H P T V P V G I L T T Q N R N V W G K A Y
721 TTGCGTAATGTTGTAGAGCGCTCAACACACCCACAGTCCCTGTTGGCATCCTCACCACACAAAACAGGAATGCTGGGGCAAGGCATAC
271 K Q L R K D K V N K A S I E E I Q R C I F L V S L D G P I V
811 AAACCACTCAGGAAAGACAAAGTAAACAAGGCTTCCATCGAAGAGATTACGCGTGCATCTTCTGGTGTCACTAGATGGTCCATTGTT
301 N P T G N I M T D A A L N C V H G N G P Q G Y A G N R W Y D
901 AACCCCACTGGCAACATCATGACAGATGTCGCCCTCAACTGTGTCCACGGCAATGGACCCAGGGTTATGCTGCAACAGGTTGATGAC
331 K T I Q F I V G K K G A V G L T Y E H T P A E G P P I A N L
991 AAGACTATCCAGTTCATCGTTGGGAAGAAGGTGCCGTGGGCTGACCTATGAACACACACCAGCTGAGGGTCCACCTATTGCCAACCTC
361 M D H I M D F I G Q S P K D E L V A E Q Q D P R P P A V E L
1081 ATGGATCACATCATGGACTTCATAGGCCAATCTCCAAAGGATGAATTAGTGGCAGAGCAGCAAGACCTCGGCCCGCCGAGTGGAGTTG
391 S R P Q R L M F N I S S E M K Q E I E D A K I A L E S L V G
1171 TCCCGGCTCAGCGTCTCATGTTAATATCAGCTCAGAAATGAACAGGAAATGAGGATGCCAAGATTGCTCTGAAAAGTTGGTTGGT
421 D L E K T C F K F T G F G K N F I K S Q K L S P D S P M
1261 GACTTGGAGATGACTTGCTTCAAGTTTACAGGCTTTGGCAAGAACTTCATCAAGTCTCAGAAATTAAGTCTGATAGTTTCTCCAAATG
451 A I Q L A F F R I H Q E P G A H Y E S A S T R K Y I Y G R T
1351 GCCATCAAATGGCATTTCAGGATCCATCAAGAGCCAGGAGCCATTATGAGTCAAGTCCACGAGGAAGTACATATGTTGTCGCAT
481 E T I R S C S Q E S V A F A Q A M L K P D L P N A E K A K A
1441 GAGACAATACGCTCCTGCTCGCAGGAATCGGTGGCTTTTGTCTAGGCCATGTTGAAGCCTGACCTTCCAAATGCTGAGAAAGCAAAGCT
511 L R A A V E E H K N Y S K R A V S G Y G I D R H L L G L K L
1531 TTGCGGCTGCTGTTGAAGAACAATAAACTATTCCAAAAGGCTGTAAGTGGCTATGGGATTGACCGCCACCTCCTTGGACTCAAATTG
541 A A I E A G M D V P K L F M D V G Y L R S S H M R L S T S Q
1621 GCTGCCATTGAGGCAGGGATGGATGTACCAAAGCTGTTCATGGATGTTGGGTACCTGCGCAGCTCTCATATGCTCTCAACAAGCCAG
571 V P A R C E A F M C Y G P L V P D G Y G C C Y N P R G D G V
1711 GTTCTGCAAGGTGTGAGGCTTTCATGCTATGGCCCTTGTGCTGATGGGTATGGGTGCTGCTACAACCCAGAGGCGGATGGTGTG
601 F F G V S A F N S S P E T D S A T F R E A L E Q S L M D M H
1801 TTCTTTGGTGTCTCGGCTTTCATTCTTCCCGAAACGACTCTGCAACCTCCGTTGAGGCCCTTGGCAAGGCTGATGGACATGCAT
631 D V I V K D G L K A K L *
1891 GATGTTATAGTTAAGGATGGACTCAAAGCAAGTTATAG

```

图 1 *CAT* 基因开放阅读框全长及预测的氨基酸序列

Fig. 1 Full ORF sequence and its deduced amino acid sequence of *CAT*

鱼 (NP_001005587.1)、虹鳟 (XP_021457405.1) 同属于脊椎动物, 聚为一支。

2.3 *CAT* 在中华绒螯蟹雌雄各组织中的表达

通过 q-PCR 对雌性和雄性中华绒螯蟹的肝胰腺、卵巢 (雄性为副性腺、储精囊和生精区)、血淋巴、肌肉、胸神经节、脑神经节、鳃、肠道、胃和心等组织进行 *CAT* 表达分析, *CAT* 基因在这些组织中都有表达, 但表达量存在很大差异。就雄蟹而言, *CAT* 在肝胰腺中的表达量最高, 其次为肌肉, 在其他组织中表达量较低 (图 4)。就雌蟹而言, 肝胰腺中表达量最高, 其次为卵巢和肌肉, 在肠道、胃、脑神经节、

心、胸神经节、鳃和血淋巴中微量表达 (图 5)。

2.4 *CAT* 在不同卵巢发育时期肝胰腺和卵巢的表达

对中华绒螯蟹雌蟹不同卵巢发育时期 *CAT* 在肝胰腺和卵巢的表达进行分析发现, 随着卵巢的发育, 肝胰腺中 *CAT* 的表达量呈现先升高后降低再升高的趋势, 表达量依次为 II 期 > V 期 > I 期 > IV 期 > III 期, II 期的表达量是 III 期的 6.48 倍 (图 6); 卵巢中的 *CAT* 表达量在 II、IV 期最高, 其次是 I、V 期, III 期的表达量显著低于其他时期 ($P < 0.05$) (图 7)。

3 讨论

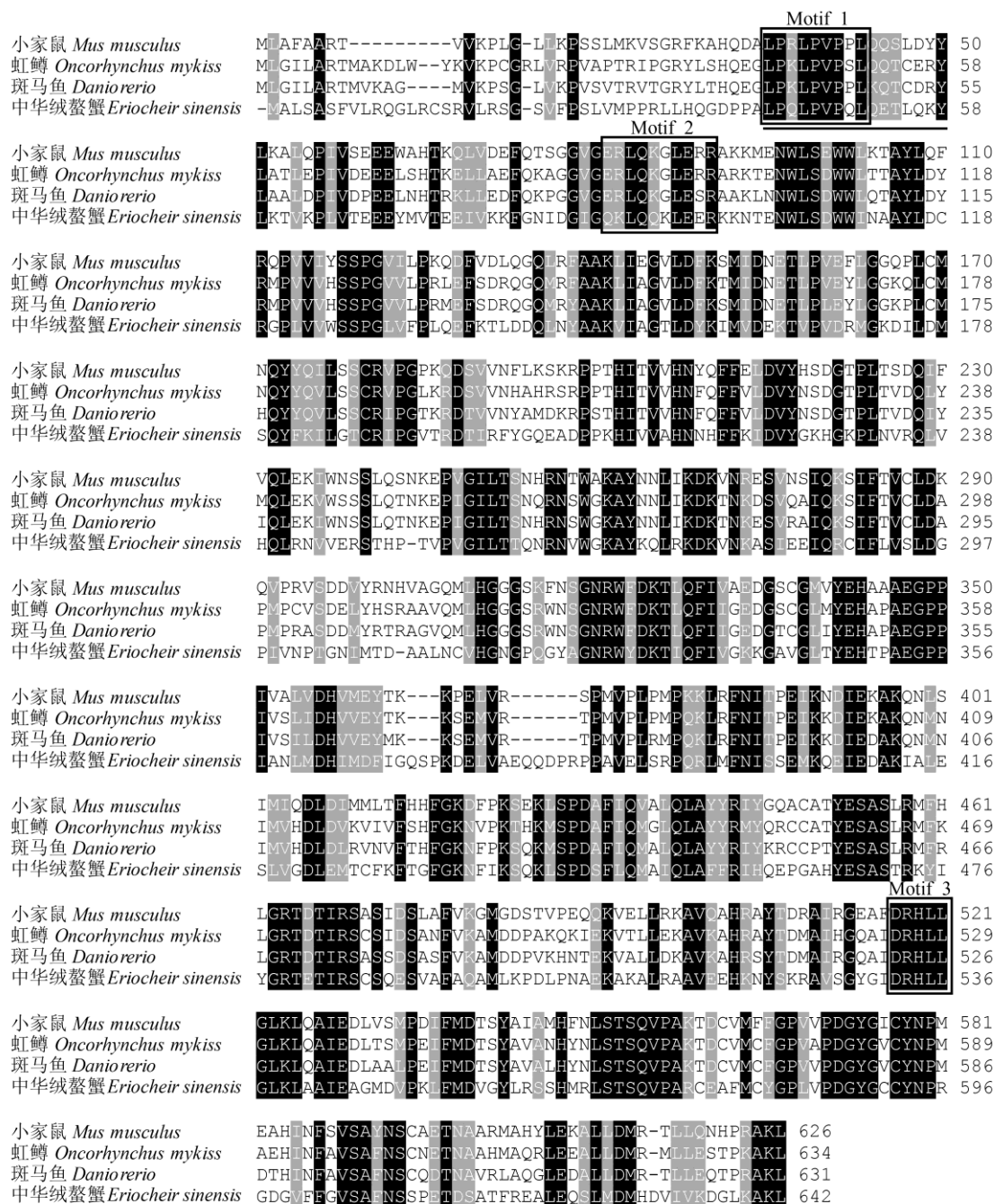


图 2 中华绒螯蟹与其他物种 CAT 氨基酸序列比对

Fig. 2 Comparison of amino acid sequences of CAT between *Eriocheir sinensis* and other species

黑底色表示同样的氨基酸，灰黑底色表示类似性氨基酸；方框 Motif 1 ~ 3 是保守基序，黑线上方是 Acyltransferases ChoActase 保守结构域。

The black background represents the same amino acids, while the grey black background represents similar amino acids; the boxes motif 1 - 3 are conserved motifs, and Acyltransferases ChoActase is a conserved domain above the black line.

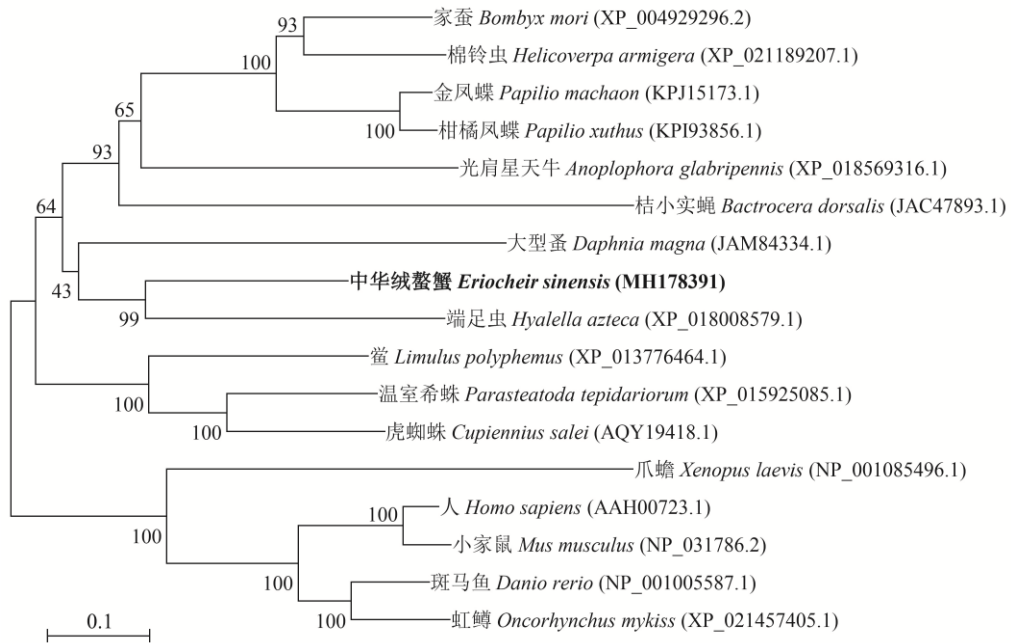


图3 CAT氨基酸序列的邻接(NJ)进化树

Fig. 3 The neighbor-joining phylogenetic tree for CATs

节点处的数字为1 000次引导值中该节点的自举置信水平；比例尺表示每千碱基的替换数目。

The numbers at the branch nodes represent the bootstrap confidence levels of 1 000 replication; scale represents the numbers of substitutions per 1 000 bases.

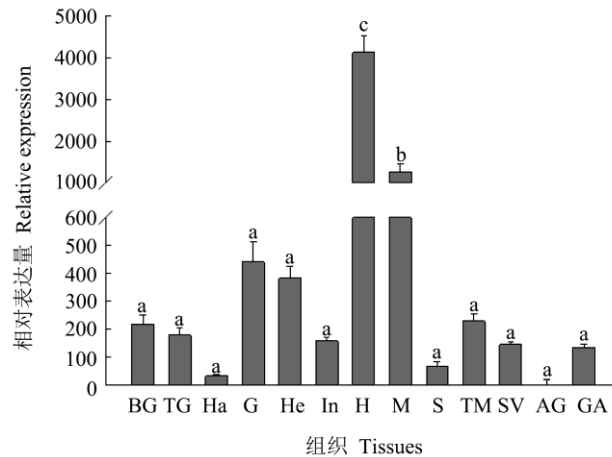


图4 中华绒螯蟹雄蟹不同组织中CAT-mRNA的表达差异分析

Fig. 4 Analysis of expression difference of CAT-mRNA in various tissues of male *Eriocheir sinensis*

AG. 副性腺; BG. 脑神经节; G. 鳃; GA. 生精区; H. 肝胰腺; Ha. 血淋巴; He. 心; In. 肠道; M. 肌肉; S. 胃; SV. 储精囊; TG. 胸神经节。不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

AG. Accessory gland; BG. Brain ganglia; G. Gill; GA. Germinative area; H. Hepatopancreas; Ha. Haemolymph; He. Heart; In. Intestine; M. Muscle; S. Stomach; SV. Seminal vesicle; TG. Thoracic ganglia. Different letters above bars indicate significant difference ($P < 0.05$).

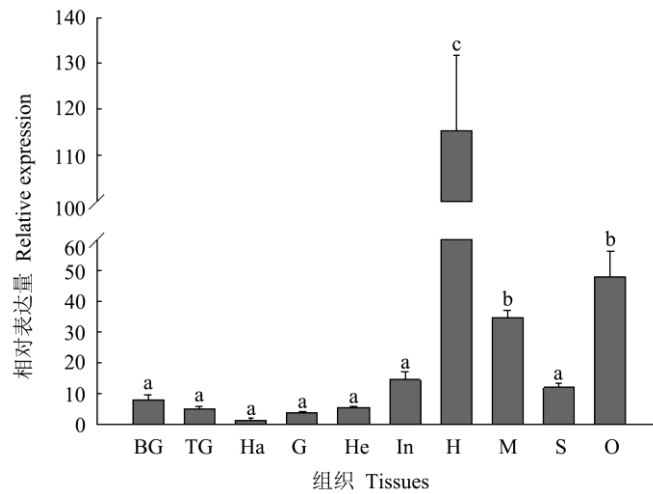


图 5 中华绒螯蟹雌蟹不同组织中 *CAT*-mRNA 的表达差异分析

Fig. 5 Analysis of expression difference of *CAT*-mRNA in various tissues of female *Eriocheir sinensis*

BG. 脑神经节; G. 鳃; H. 肝胰腺; Ha. 血淋巴; He. 心; In. 肠道; M. 肌肉; O. 卵巢; S. 胃; TG. 胸神经节。不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

BG. Brain ganglia; G. Gill; H. Hepatopancreas; Ha. Haemolymph; He. Heart; In. Intestine; M. Muscle; O. Ovaries; S. Stomach; TG. Thoracic ganglia. Different letters above bars indicate significant difference ($P < 0.05$).

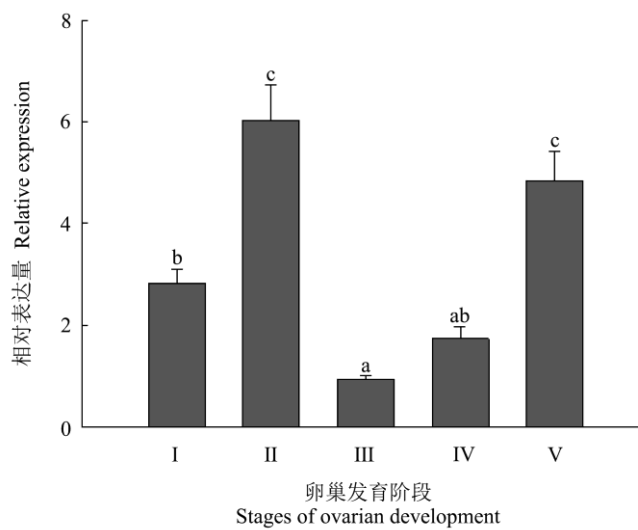


图 6 不同卵巢发育阶段肝胰腺中的 *CAT*-mRNA 表达差异分析

Fig. 6 Analysis of expression difference of *CAT*-mRNA in hepatopancreas at different ovarian development stages

不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Different letters above bars indicate significant difference ($P < 0.05$).

本研究通过基因组草图和 PCR 技术,克隆了中华绒螯蟹 *CAT* 基因的开放阅读框。对该序列进行分析显示, *CAT* 预测的蛋白无信号肽和跨膜

结构,这与大多数物种 *CAT* 的结构相似;而且含有多个蛋白激酶磷酸化位点、N-豆蔻酰化位点和 N-糖基化位点。BLAST 比对发现 *CAT* 具

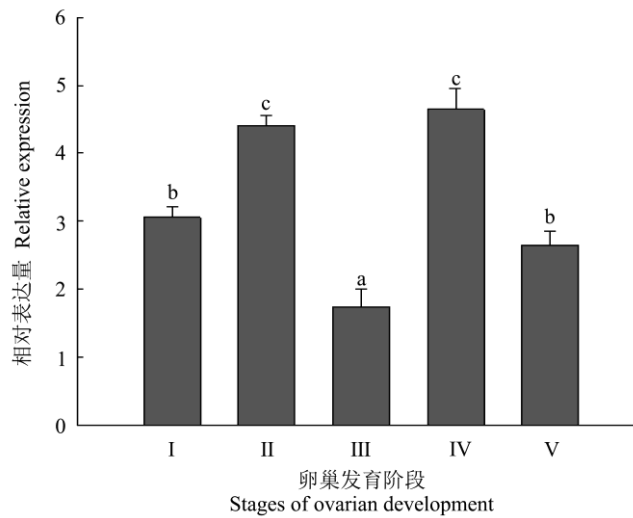


图 7 不同卵巢发育阶段卵巢中的 CAT-mRNA 表达差异分析

Fig. 7 Analysis of expression difference of CAT-mRNA in ovary at different ovarian development stages

不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Different letters above bars indicate significant difference ($P < 0.05$).

有 Carn-acyltransf superfamily 结构域，这是肉毒碱脂酰转移酶家族典型的结构域；位于氨基酸第 40 ~ 56 位置的 Acyltransferases ChoActase 保守结构域也存在于中华绒螯蟹 *CPT1α*、*CPT1β* 和 *CPT2* 氨基酸序列中（待发表），说明该基因确实是 CAT 基因。多序列比对发现，中华绒螯蟹与端足虫的同源性最高（62%），与其他动物的同源性在 45% ~ 55% 之间，与中华绒螯蟹 *CPT1α*、*CPT1β* 和 *CPT2* 的相似性分别仅为 30%、32% 和 28%，这与哺乳动物 CAT 同 *CPT* 的比对结果相似（Corti et al. 1994），表明 CAT 与 *CPT* 有一定的同源性但又有自身独特的结构特点。系统进化树分析显示中华绒螯蟹 CAT 与家蚕、凤蝶、蜘蛛等聚为一大支，进一步证明了中华绒螯蟹与昆虫纲的亲缘关系比较近，而与脊椎动物的亲缘关系相对较远。此外，也发现了 CAT 序列一些保守基序（motif），其中，motif 1 的“LPXLPXPXL”序列（Acyltransferases ChoActase 的一部分）在人和酵母的 CAT 中都是高度保守的（Finocchiaro et al. 1991, Kispal et al. 1993）；motif 3 中的组氨酸被认为是 CAT 的活化位点（Colucci et al.

1988）。

左旋肉碱是一种必需营养物质，可作为酰基转移酶家族的底物，催化 CoA 和肉毒碱之间酰基的可逆交换。与它们的酰基 CoA 前体不同，酰基肉碱可以穿过细胞膜，因此，这些分子的相互转换可以影响细胞和组织间的碳交换。*CPT1* 和 *CPT2* 分别位于线粒体外膜和线粒体内膜上，与肉碱酰基肉碱易位酶一起，将长链脂酰 CoA 导入线粒体基质进行 β -氧化（Ramsay et al. 2004）。酰基转移酶家族的 CAT 主要存在于线粒体基质内，选择性作用于短链脂酰 CoA（Cordente et al. 2004, Kienesberger et al. 2014）。研究表明 CAT 影响全身葡萄糖体内平衡，肌肉特异性 CAT 基因缺失的小鼠，在心、血浆和骨骼肌中的 CAT-mRNA 表达量显著低于正常小鼠，且以类似于胰岛素抵抗状态的方式损害机体的代谢控制（Muoio et al. 2012, Berg et al. 2017）。目前 CAT 在中华绒螯蟹中的代谢机制尚不清楚。

CAT 在自然界分布极广，在哺乳动物包括脑的几乎所有组织中，微生物、昆虫体内，甚至精液中都发现了该基因。它存在于线粒体、

过氧化物酶体和内质网上 (Ramsay et al. 2001)。哺乳动物中, *CAT* 的表达量在骨骼肌中最高, 其次是心、肝和胰腺, 而在脑、胎盘、肺和肾中的表达量较低 (Corti et al. 1994)。而中华绒螯蟹雌雄蟹的 *CAT* 在肝胰腺和肌肉中表达量均较高, 这说明肝胰腺作为中华绒螯蟹脂质代谢的中心, 短链脂肪酸的氧化作用在其中是不可或缺的。有趣的是, 雌蟹卵巢 *CAT* 相对大多数组织有较高的表达量, 而雄蟹的生精区、储精囊和副性腺都没有发现 *CAT* 高表达, 表明中华绒螯蟹 *CAT* 的代谢机制存在性别差异。

之前的研究显示, 中华绒螯蟹卵巢发育期间, 卵巢和肝胰腺脂类含量变化显著, 肝胰腺脂类含量呈现先增加后降低的趋势, 卵巢脂类含量持续上升直到排卵前 (Wen et al. 2001)。肝胰腺和卵巢内脂类含量的变化受脂质代谢及其他相关基因调控 (刘立鹤等 2005, 陈志强等 2016)。由于 *CAT*-mRNA 表达量在中华绒螯蟹卵巢中较高, 推测其与卵巢发育密切相关, 因此进一步分析其在不同卵巢发育时期的变化情况。结果表明, 不同卵巢发育时期肝胰腺和卵巢的 *CAT*-mRNA 表达量差异显著 ($P < 0.05$)。就肝胰腺而言, II 期的表达量最高, III、IV 期的表达量很低, 这是因为在 I、II 期肝胰腺积累了大量脂肪并用于氧化供能, III、IV 期时肝胰腺的脂肪向卵巢转移, 用于氧化供能的脂肪比较少。就卵巢而言, 随着卵巢发育 *CAT* 的表达量呈现先上升后下降再上升的趋势, II 期和 V 期的 *CAT* 表达量显著高于其他时期 ($P < 0.05$), 原因可能是 I 期到 II 期经历了第一次蜕壳后, 卵巢的总脂开始增加, 使得 II 期的表达量显著高于 I 期 ($P < 0.05$); III、IV 期的脂类主要来自肝胰腺, 并大量储存在卵巢中; V 期的卵巢已经成熟, 第一批卵基本排出体外, 总脂含量低于 III、IV 期 (薛鲁征等 1987, 成永旭等 1998), 但 V 期卵巢内少量残留成熟卵的脂类仍需要用于氧化供能。

综上, 本研究获得了中华绒螯蟹 *CAT* 基因的开放阅读框, 分析显示该基因在雄蟹的肝胰

腺和肌肉, 雌蟹的肝胰腺、卵巢和肌肉中表达量较高, 且在卵巢发育过程中起着重要作用。

参 考 文 献

- Berg S M, Beck-Nielsen H, Færgeman N J, et al. 2017. Carnitine acetyltransferase: a new player in skeletal muscle insulin resistance? *Biochemistry & Biophysics Reports*, 9: 47–50.
- Brunner S, Kramar K, Denhardt D T, et al. 1997. Cloning and characterization of murine carnitine acetyltransferase: evidence for a requirement during cell cycle progression. *Biochemical Journal*, 322(2): 403–410.
- Chalmers R A, Roe C R, Tracey B M, et al. 1983. Secondary carnitine insufficiency in disorders of organic acid metabolism: modulation of acyl CoA/CoAsH ratios by L-carnitine *in vivo*. *Biochemical Society Transactions*, 11(6): 724–725.
- Colucci W J, Gandour R D. 1988. Carnitine acetyltransferase: a review of its biology, enzymology, and bioorganic chemistry. *Bioorganic Chemistry*, 16(3): 307–334.
- Cordente A G, Lópezviñas E, Vázquez M I, et al. 2004. Redesign of carnitine acetyltransferase specificity by protein engineering. *Journal of Biological Chemistry*, 279(32): 33899–33908.
- Corti O, Finocchiaro G, Rossi E, et al. 1994. Molecular cloning of cDNAs encoding human carnitine acetyltransferase and mapping of the corresponding gene to chromosome 9q34.1. *Genomics*, 23(1): 94.
- Ferdinandusse S, Mulders J, Ijlst L, et al. 1999. Molecular cloning and expression of human carnitine octanoyltransferase: evidence for its role in the peroxisomal β -oxidation of branched-chain fatty acids. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 263(1): 213–218.
- Finocchiaro G, Taroni F, Rocchi M, et al. 1991. cDNA cloning, sequence analysis, and chromosomal localization of human carnitine palmitoyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(23): 10981–10981.
- Houten S M, Wanders R J A. 2010. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 33(5): 469–477.
- Kienesberger K, Pordes A G, Völk T G, et al. 2014. L-carnitine and

- PPAR α -agonist fenofibrate are involved in the regulation of carnitine acetyltransferase (CrAT) mRNA levels in murine liver cells. *BMC Genomics*, 15(1): 1–10.
- Kispal G, Sumegi B, Dietmeier K, et al. 1993. Cloning and sequencing of a cDNA encoding *Saccharomyces cerevisiae* carnitine acetyltransferase, use of the cDNA in gene disruption studies. *Journal of Biological Chemistry*, 268(3): 1824–1829.
- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T) (-Delta Delta C) method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Long X W, Wu X G, Zhao L, et al. 2017. Effects of dietary supplementation with *Haematococcus pluvialis*, cell powder on coloration, ovarian development and antioxidation capacity of adult female Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Aquaculture*, 473: 545–553.
- Marquis N R, Fritz I B. 1965. The distribution of carnitine, acetylcarnitine, and carnitine acetyltransferase in rat tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 240(4): 2193.
- Mikami S, Greenwood J G. 1994. Functional morphology and cytology of the phyllosomal digestive system of *Ibacus ciliatus* and *Panulirus japonicus* (Decapoda, Scyllaridae and Palinuridae). *Crustaceana*, 67(2): 212–225.
- Muoio D M, Noland R C, Kovalik J P, et al. 2012. Muscle-specific deletion of carnitine acetyltransferase compromises glucose tolerance and metabolic flexibility. *Cell Metabolism*, 15(5): 764–777.
- Noland R C, Koves T R, Seiler S E, et al. 2009. Carnitine insufficiency caused by aging and over nutrition compromises mitochondrial performance and metabolic control. *Journal of Biological Chemistry*, 284(34): 22840–22852.
- Ramsay R R, Gandour R D, Fr V D L. 2001. Molecular enzymology of carnitine transfer and transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1546(1): 21–43.
- Ramsay R R, Zammit V A. 2004. Carnitine acyltransferases and their influence on CoA pools in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 25(5): 475–493.
- Seiler S E, Koves T R, Gooding J R, et al. 2015. Carnitine acetyltransferase mitigates metabolic inertia and muscle fatigue during exercise. *Cell Metabolism*, 22(1): 65–76.
- Seiler S E, Martin O J, Noland R C, et al. 2014. Obesity and lipid stress inhibit carnitine acetyltransferase activity. *Journal of Lipid Research*, 55(4): 635–644.
- Song L S, Bian C, Luo Y J, et al. 2016. Draft genome of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Gigascience*, 5(1): 5.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725–2729.
- Violante S, Ijlst L, Ruiter J, et al. 2013. Substrate specificity of human carnitine acetyltransferase: implications for fatty acid and branched-chain amino acid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1832(6): 773–779.
- Wen X, Chen L, Ai C, et al. 2001. Variation in lipid composition of Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis* during ovarian maturation. *Comparative Biochemistry & Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 130(1): 95–104.
- Weyenberg S V, Buyse J, Janssens G P J. 2010. Increased plasma leptin through L-carnitine supplementation is associated with an enhanced glucose tolerance in healthy ponies. *Journal of Animal Physiology & Animal Nutrition*, 93(2): 203–208.
- Wu X G, Chen H, Liu Z J, et al. 2014. Immunorecognition and distribution of progesterone receptors in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* during ovarian development. *Journal of Shellfish Research*, 33(1): 35–43.
- 陈泓. 2014. 黑曲霉中肉碱乙酰转移酶基因功能的研究. 天津: 天津科技大学博士学位论文.
- 陈志强. 2016. 固城湖中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 可食部位营养组成与代谢的性别差异. 江苏: 南京农业大学硕士学位论文.
- 成永旭, 堵南山, 赖伟. 1998. 不同阶段中华绒螯蟹肝胰腺的脂类及脂肪酸组成变化. *动物学报*, 9(4): 420–429.
- 成永旭, 郑善玉, 李京昊, 等. 2017. 不同脂肪酸对中华绒螯蟹肝胰腺组织三种 FABP 表达的影响. *基因组学与应用生物学*, 36(10): 4100–4107.
- 刘立鹤, 吴建开, 周永奎, 等. 2005. 中华绒螯蟹性腺发育期脂肪合成酶活性变化研究. *水生态学杂志*, 25(6): 18–20.
- 刘丽, 姜晓东, 吴旭干, 等. 2017. 育肥饲料中植物油替代鱼油对

- 中华绒螯蟹生殖性能的影响. 上海海洋大学学报, 26(4): 501-510.
- 刘泽华, 吴旭干, 龙晓文, 等. 2016. 育肥饲料中植物油混合替代鱼油对中华绒螯蟹雄体脂肪酸代谢相关基因表达的影响. 水生生物学报, 40(4): 767-778.
- 农业部渔业渔政管理局. 2017. 2016 年中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社.
- 施秋燕, 杨志刚, 姚琴琴, 等. 2016. 中华绒螯蟹 Elov16 cDNA 全长克隆及其表达分析. 水产学报, 40(6): 844-855.
- 薛鲁征, 堵南山, 赖伟. 1987. 中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 雌性生殖系统的组织学研究. 华东师范大学学报: 自然科学版, (3): 92-101.