

文章编号: 1674-5566(2025)03-0486-13

DOI: 10.12024/jsou.20240404521

中华绒螯蟹 *Bco1* 基因的表达模式及其对高 pH 胁迫的响应

熊静怡¹, 张敏¹, 杨宗霖¹, 陈晓武¹, 姜晓东¹, 成永旭^{1,2,3,4}, 赵金山², 吴旭干^{1,2,3,4}

(1. 上海海洋大学 农业农村部鱼类营养和环境生态研究中心, 上海 201306; 2. 东营市惠泽农业科技有限公司, 山东东营 257503; 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: 结合生物信息学、实时荧光定量 PCR、原位杂交及 HPLC 技术研究了中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) *Bco1* 基因的序列特征、时空表达模式和亚细胞定位, 并探讨了高 pH 慢性胁迫下肝胰腺的 *Es-Bco1* 表达量、色泽及类胡萝卜素含量的变化。结果表明: (1) *Es-Bco1* 开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 全长 1 614 bp, 编码 537 个氨基酸, 属于 RPE65 超家族, 并与三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) BCO1 高度相似; (2) *Es-Bco1* 在多个组织中均有表达, 高表达于内膜、眼柄和肝胰腺; 蜕壳周期中蜕壳后期 (AB 期) 肝胰腺 *Es-Bco1* 表达量最高; 卵巢发育阶段 I~III 期的肝胰腺 *Es-Bco1* 表达量显著上升, 此后显著下降; (3) 原位杂交结果显示, 在蜕壳 AB 期和卵巢发育 III 期, *Es-Bco1* mRNA 主要定位于肝胰腺的 F 细胞 (纤维细胞) 和 R 细胞 (吸收细胞) 中; (4) 幼蟹在 pH 8.0 (对照)、9.0 和 10.0 条件下胁迫 30 d 后, 肝胰腺中的 *Es-Bco1* 表达水平显著上调, 其肝胰腺亮度值 (L^*)、黄度值 (b^*)、总类胡萝卜素及 β -胡萝卜素含量显著下降。综上, 中华绒螯蟹 *Bco1* 主要在内膜、眼柄和肝胰腺中表达, 且在蜕壳后期和卵巢 III 期肝胰腺中高表达。此外, 高 pH 胁迫可导致肝胰腺中 *Es-Bco1* 上调, 降低类胡萝卜素含量, 表明 *Bco1* 在中华绒螯蟹响应高 pH 胁迫过程中类胡萝卜素裂解起着重要作用。

关键词: 中华绒螯蟹; β -胡萝卜素 15, 15' 加氧酶 (BCO1); 基因表达; 亚细胞定位; pH 胁迫

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

类胡萝卜素是自然界中广泛存在的一类天然色素, 是生物体颜色多样的重要物质基础^[1-2]。在自然界上, 仅少数昆虫 [如: 烟粉虱 (*Bemisia tabaci*)、柑橘木虱 (*Diaphorina citri*) 等] 能够通过胞内共生细菌合成类胡萝卜素^[3-4], 绝大多数动物必须通过食物摄取类胡萝卜素^[5]。在动物体内, 类胡萝卜素不仅是维生素 A 的前体, 对视力、细胞生长和分化至关重要^[6], 且具有色泽调控、提高抗氧化能力和免疫性能等多种生理功能^[7]。因此, 动物体摄入一定量的类胡萝卜素至关重要^[2]。

动物体摄入类胡萝卜素后, 通常需要通过类胡萝卜素裂解酶转化为类维生素 A 和其他代谢物, 才能进一步行使其生理功能^[8-9], 如: β -胡萝卜

素经过类胡萝卜素裂解酶裂解为两个视黄醛, 此后可进一步转化为视黄酸、视黄醇和视黄醇酯参与多种生理调控^[10]。因此, 酶降解是类胡萝卜素利用的关键步骤, 有研究^[11]表明绝大部分生物体中都存在类胡萝卜素裂解酶 (Carotenoid cleavage oxygenase, CCO)。在脊椎动物中发现类胡萝卜素裂解加氧酶有两种类型, 分别命名为 β -胡萝卜素 15, 15' 加氧酶 (BCO1 或 BCMO) 和 β -胡萝卜素 9', 10' 双加氧酶 (BCO2 或 BCDO2)^[12-13]。其中, 前者可以通过对称切割 β -胡萝卜素的 15, 15' 双键, 将类胡萝卜素切割成两个全反式视黄醛^[14]; 后者主要催化不对称裂解, 可使 β -胡萝卜素在 9' 与 10' 之间的双键断裂, 生

收稿日期: 2024-04-25

修回日期: 2024-05-08

基金项目: 国家自然科学基金 (31873041); 上海市科委“科技创新行动计划”启明星项目扬帆专项 (23YF1416900); 山东省东营市黄河三角洲产业领军人才项目 (DYRC202100215); 上海市水产动物良种创制与绿色养殖协同创新中心项目 (2021 科技 02-12)

作者简介: 熊静怡 (2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向为甲壳动物营养生理。E-mail: 1694528648@qq.com

通信作者: 吴旭干, E-mail: xgwu@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部 (CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

成 β -胡萝卜素和 β -紫罗酮^[13]。有研究表明,BCO1 是维生素 A 产生的关键酶,主要在细胞质中起作用,如:人类 *Bco1* 基因突变后,体内 β -胡萝卜素含量升高,而维生素 A 含量降低^[15];BCO2 是一种与内膜相关的线粒体酶,可催化多种类胡萝卜素(包括胡萝卜素和叶黄素类),在小鼠肝脏中,缺乏 *Bco2* 会导致玉米黄质和叶黄素等底物在线粒体内膜上积累^[8]。

有关节肢动物中类胡萝卜素裂解酶的研究相对较少,在昆虫中仅发现了一种具有氧化分解和异构化双重功能的酶——NinaB。NinaB 通过对称切割 β -胡萝卜素的 15,15' 双键,将一分子 β -胡萝卜素切割成一分子 11-顺式视黄醛和一分子全反式视黄醛^[16]。进一步研究^[9,17]表明,NinaB 不仅对昆虫的视觉功能至关重要,且会影响家蚕的繁殖性能。迄今为止,有关甲壳动物类胡萝卜素裂解酶的研究刚刚起步,仅在脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)和中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)中有少量报道,在脊尾白虾和中华绒螯蟹基因组中均发现了多个有表达的类胡萝卜素加氧酶基因^[18-19],其中脊尾白虾 *EcBCO-like 6* 被干扰后,肝胰腺颜色加深,且 β -胡萝卜素含量增加,*EcBCO-like 1* 被干扰后成活率显著下降^[18]。进一步,通过分别敲除脊尾白虾中 *EcBCO2* 和 *EcNinaB*,均发现敲除后脊尾白虾抗病能力增强,肝胰腺颜色变深^[20-21],这说明 CCO 基因在甲壳动物正常生长发育过程中起着极其重要的作用。

中华绒螯蟹俗称河蟹,由于其蒸煮后具有鲜红色的甲壳、独特的风味和丰富的营养价值,故深受消费者的喜爱^[22]。自 20 世纪 90 年代以来,市场对中华绒螯蟹的需求量不断增加^[23],中华绒螯蟹养殖业迅速发展,2022 年养殖产量约 815 318 t^[24],池塘养殖是最主要的养殖方式^[25]。中华绒螯蟹室外池塘养殖过程中,大量换水、雨水注入、浮游生物种群更替以及水体污染等均会引起水体 pH 的变化。水体 pH 变化对其生长发育具有重要影响,不同 pH 会影响幼蟹发育和非特异性免疫,导致肝胰腺白化和免疫力下降^[26-27],加上饵料中缺乏类胡萝卜素,可能会导致池塘养殖中华绒螯蟹成蟹煮熟后壳色、卵巢和肝胰腺颜色较淡,在一定程度上影响其商品价值^[28]。因此,系统研究中华绒螯蟹类胡萝卜素裂解酶基因表达模式及功能,不仅可以帮助理解甲壳动物类

胡萝卜素的分解代谢规律,且有利于在中华绒螯蟹养殖过程中开展营养调控和环境调控,促进中华绒螯蟹养殖业的可持续发展。

本研究首先分析了中华绒螯蟹 β -胡萝卜素裂解酶基因 *Es-Bco1* 的基因特征及预测结构等,然后研究了该基因在不同组织、不同蜕壳期和卵巢发育阶段的表达模式,进一步通过原位杂交技术研究了该基因在肝胰腺中的表达定位,最后探讨了高 pH 慢性胁迫下肝胰腺的 *Es-Bco1* 表达量、色泽及类胡萝卜素含量变化情况,旨在初步探究 *Bco1* 在甲壳动物生长发育过程中的生理功能及水体高 pH 对甲壳动物类胡萝卜素代谢的影响,为深入理解甲壳动物类胡萝卜素的分解代谢机制提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验用蟹及组织取样

实验用蟹均来自上海海洋大学崇明科研基地。不同批次实验用蟹均为附肢健全、体质量接近和活力较好的个体。实验方案经上海海洋大学动物伦理委员会批准,并遵守中国科学技术部制定的《实验动物伦理待遇指南》。

挑选平均体质量为 (11.2 ± 2.3) g 的池塘养殖生长蜕壳阶段的雌体幼蟹,活体运输到上海海洋大学室内循环水养殖系统中暂养,水槽(长 \times 宽 \times 高=2.50 m \times 0.60 m \times 0.25 m)水深 12 cm,每个水槽放养 30 只幼蟹。蜕壳后的个体立即移入养殖盒(长 \times 宽 \times 高=34 cm \times 24 cm \times 18 cm)中单个体养殖,准确记录蜕壳日期和初始体质量。根据中华绒螯蟹蜕壳分期的外部形态学特征^[29],分别取蜕壳后期(AB 期)、蜕壳间期(C 期)、蜕壳前期(D 期)和蜕壳期(E 期)幼蟹 8~9 只用于解剖。解剖取出部分肝胰腺组织于液氮速冻后,−80 °C 保存,用于后续基因表达量研究;同时采集小块肝胰腺组织放入 4% 多聚甲醛中过夜固定后转移至 75% 乙醇中保存,用于原位杂交。

分别挑选生殖蜕壳前(卵巢发育 I 期)和生殖蜕壳后(卵巢发育 II~V 期)的池塘养殖雌蟹,活体运输到上海海洋大学,生殖蜕壳前雌蟹平均体质量为 (67.9 ± 7.0) g,生殖蜕壳后的雌蟹平均体质量为 (113.0 ± 9.4) g。在室内循环水养殖系统中进行群养,养殖桶为 500 L 的 PE 桶(直径 \times 高度=108 cm \times 120 cm),每只桶养殖 10~12 只雌蟹,暂养

7~10 d开始采样,暂养期间投喂配合饲料(澳华成蟹 3#,蛋白质含量为 41.3%,粗脂肪含量为 14.5%,浙江澳华饲料有限公司)。根据卵巢外观和组织学对卵巢发育进行分期^[30],每个卵巢发育时期(I~V期)均随机取 10 只雌蟹进行解剖。其中,采集生殖蜕壳前成蟹的肝胰腺、心脏、甲壳内膜、肌肉、胃、眼柄、后肠和鳃组织用于组织特异性分析。

1.2 RNA 提取及 cDNA 合成

通过 Trizol 法提取各组织的总 RNA,采用 NanoDrop 2 000 微量紫外分光光度计(ThermoFisher Scientific,美国)测定其浓度和纯度,采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,将合格的 RNA 保存于-80 °C 冰箱中。随后以提取的总 RNA 为模板,使用 *Evo-M-MLV* 反转录试剂盒(AG11706,湖南艾科瑞生物工程有限

公司)进行 cDNA 转录合成。

1.3 基因克隆与序列分析

利用 Local Blast 分析中华绒螯蟹转录组数据(PRJNA660118)以及基因组数据(GCA_024679095.1)得到了 *Es-Bco1* 的 CDS 序列。利用 Primer Premier 5.0 软件设计该基因中间片段的特异性引物(表 1),以肝胰腺 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应条件:95 °C 预变性 5 min,95 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 1 min,进行 35 个循环,72 °C 延伸 10 min。PCR 产物使用普通琼脂糖凝胶试剂盒回收[天根生化科技(北京)有限公司]。然后将目的片段连接至 pMD19-T (TaKaRa,日本),转化至 DH5 α 感受态细胞(TaKaRa,日本)中克隆筛选,并将阳性克隆菌株送测。引物合成及测序均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。本研究生物信息学分析使用软件及网址见表 2。

表 1 本文所用引物信息
Tab. 1 Primer information of the study

引物名称 Primer name	引物序列(5' - 3') Sequence (5' - 3')	用途 Usage
<i>Es-Bco1</i> -1F	ATGGAGCAGCAACAAGAAGAG	验证 ORF 引物
<i>Es-Bco1</i> -1R	GGAATCTGGAACGATAGGTAAC	验证 ORF 引物
<i>Es-Bco1</i> -2F	TCGTTCCAGATTCCTTCGC	验证 ORF 引物
<i>Es-Bco1</i> -2R	AGAAGCAGGTCTCCGTCAGG	验证 ORF 引物
<i>Es-Bco1</i> -3F	CCGACAACCTGCTTAGTGAACG	验证 ORF 引物
<i>Es-Bco1</i> -3R	GCTGCTTCATGTTCTTAGCGT	验证 ORF 引物
qRT- <i>Es-Bco1</i> -F	CAGCAACAAGAAGAGAACCG	qRT-PCR 引物
qRT- <i>Es-Bco1</i> -R	GCGAAGGAATCTGGAACGA	qRT-PCR 引物
β -Actin-F	GCATCCACGAGACCACTTACA	qRT-PCR 引物
β -Actin-R	CTCTGCTTGCTGATCCACATC	qRT-PCR 引物
<i>Es-Bco1</i> -ish-dsF	TAATACGACTCACTATAGGGCAGCAACAAGAAGAGAACCG	ISH 引物
<i>Es-Bco1</i> -ish-R	CATGAGCCGATGAAACAAAGT	ISH 引物
<i>Es-Bco1</i> -ish-F	CAGCAACAAGAAGAGAACCG	ISH 引物
<i>Es-Bco1</i> -ish-dsR	TAATACGACTCACTATAGGGCATGAGCCGATGAAACAAAGT	ISH 引物

表 2 生物信息学分析工具
Tab. 2 Bioinformatics analysis tool

目的 Aim	工具 Tool	网址 Website	参数设置 Parameter setting
氨基酸序列预测	SMS	http://www.bio-soft.net/sms/	90
蛋白理化性质分析	ProtParam	http://web.expasy.org/protParam/	默认
染色体定位可视化	TB tools	无	默认
基因结构分析	Splign	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/splign/splign.cgi	默认
信号肽分析	SignalP	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/	默认
跨膜结构分析	TMHMM-2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/	默认
蛋白质结构域分析	Pfam	http://pfam.xfam.org/search	默认
三级结构预测	SWISS-MODEL	https://swissmodel.expasy.org/interactive	默认
序列比对	BioEdit 软件	无	默认
保守基序	MEME	https://meme-suite.org/meme/doc/meme.html	10
进化分析	MEGA 11.0	无	邻接法(NJ)

1.4 *Es-Bco1* 组织特异性及表达模式分析

根据所获得的 *Es-Bco1* 序列,采用 Primer Premier 5.0 软件设计荧光定量 PCR(qPCR)的引物序列(表 1),以中华绒螯蟹 β -actin 作为内参基因,采用 BIO-RAD 荧光定量 PCR 分析仪(CFX384 Touch, BIO-RAD, USA)使用 SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司),按照试剂盒说明书研究 *Es-Bco1* 在中华绒螯蟹不同组织、蜕壳周期和卵巢发育各阶段的表达特征,每个组织有 6 只生物学样本重复,每个样本重复 3 孔。当目标基因无非特异性扩增,且扩增效率在 95%~105%时,确定 qPCR 的反应体系与条件,见表 3,扩增程序:95 °C 预变性 30 s,95 °C 5 s,60 °C 30 s,72 °C 30 s,共进行 40 个循环。溶解曲线的 PCR 程序:65~95 °C,升温 0.5 °C/次,5 s/次。

表 3 *Es-Bco1* 与 β -actin 基因荧光定量 PCR 反应体系中各试剂添加量

Tab. 3 The volume of each reagent added to the PCR mixture used for qRT-PCR μ L

试剂 Reagent	<i>Es-Bco1</i>	β -actin
SYBR Premix Ex Taq™ (2×)	5.0	5.0
PCR Forward Primer(10 μ mol/L)	0.4	0.4
PCR Reverse Primer(10 μ mol/L)	0.4	0.4
cDNA template	0.8	0.8
dH ₂ O	3.4	3.4
总体积 Total volume/ μ L	10.0	10.0

1.5 原位杂交

使用地高辛(DIG)RNA 标记试剂盒(Roche, Basel, Switzerland)和 Transcript Aid T7 高产转录试剂盒(ThermoFisher Scientific, 美国),按照试剂盒说明书合成正义和反义探针,所用引物见表 1,具体操作步骤参照潘柯伍^[31]的研究方法。使用尼康显微镜(Nikon Eclipse 80i, Japan)进行观察和拍照。

1.6 pH 胁迫实验

根据河蟹养殖池塘水体的 pH 变化范围,分别设置 8.0、9.0、10.0 等 3 个 pH 组,河蟹养殖于塑料盒(长×宽×高=55 cm×40 cm×25 cm)内,每个塑料盒中放 25 只幼蟹(体质量 5~7 g,处于蜕壳间期),每个 pH 设置 3 个重复组。采用 0.1 mol/L 的氢氧化钠或盐酸调节水体 pH,每隔 8 h 调整 1 次;每日下午投喂幼蟹配合饲料,次日上午清除残饵和记录死亡情况;胁迫 30 d 后采样,取

出部分肝胰腺组织液氮速冻后,置于 RNA 保存液中-80 °C 保存,用于后续荧光定量 PCR 分析,具体实验步骤同 1.4 节;剩余肝胰腺组织避光保存于-40 °C,用于色泽测定及类胡萝卜素含量测定。

1.7 肝胰腺色泽及类胡萝卜素含量测定

使用色差仪(CR-400, Konica Minolta Marunouchi, 日本)测定中华绒螯蟹肝胰腺的色泽(L^* 值, a^* 值和 b^* 值,分别代表亮度值,红度值和黄度值),在避光条件下用吸水纸擦干装有肝胰腺的自封袋表面水分,随后在肝胰腺样品选择 3 个相对光滑的点进行 L^* 值、 a^* 值和 b^* 值测定。

避光条件下,取 0.2~0.3 g 肝胰腺湿样加入丙酮后涡旋震荡混匀,超声震荡 10 min 后离心,取出上清液。随后,使用丙酮进行 4~5 次重复提取,直到提取液无色,将所有上清液合并用于后续测定。采用分光光度计(T6 新世纪,北京普析通用仪器有限责任公司)测定提取液在波长 470 nm 下的 OD 值。以纯化的虾青素(纯度:95.2%, Dr. Ehrenstorfer, 德国)为标准品,制备标准曲线,根据标准曲线计算样品中总类胡萝卜素含量。采用高效液相色谱(HPLC)法对样品中类胡萝卜素进行分离和定量,具体方法参照孙秋凤等^[32]。

1.8 数据处理

所有实验数据以平均值±标准误(Mean±SE)表示。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的相对表达量^[33]。利用 SPSS 22.0 对基因表达量数据进行统计分析,采用 Levene's 法进行方差齐性检验,当不满足齐性方差时对百分比数据进行反正弦或平方根处理,采用单因素方差分析(ANOVA)对实验数据进行方差分析以确定差异是否显著。如果检测到显著差异,采用 Duncan's 法对结果进行多重比较, $P < 0.05$ 为显著性差异。

2 结果

2.1 中华绒螯蟹 *Bco1* 基因生物信息学分析

中华绒螯蟹 *Bco1* 的开放阅读框(ORF)全长为 1 614 bp(包括终止密码子),编码 537 个氨基酸(图 1),该蛋白预测理论等电点为 5.95,预测分子量为 60.69 ku,没有跨膜区和信号肽。*EsBCO1* 在 19~529 aa 处具有 RPE65 结构域,为 CCO 家族的保守结构域。图 2 显示 *Es-Bco1* 基因含有 4 个外显子和 3 个内含子。多序列比对分析显示(图

3a), 中华绒螯蟹与三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) BCO1 的相似性最高, 为 73.08%; 与美洲螯龙虾 (*Homarus americanus*) 和克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 的相似度分别为 43.28% 和 42.88%。这 4 个物种的 BCO1 蛋白比较保守, 但是中华绒螯蟹和三疣梭子蟹出现了 LPKVA 和 KISS 序列的缺失。系统发育树分析结果显示 (图

3b), 中华绒螯蟹 EsBCO1 与三疣梭子蟹聚为一支, 美洲螯龙虾和克氏原螯虾聚为另一分支。进一步分析表明, 这 13 个物种的 BCO 均具有 RPE65 结构域。对 BCO1 的保守基序分析发现, 13 个物种中共检测到 10 个 Motif, 其中所有的物种 BCO1 中均含有 Motif 1-6 和 Motif 8, 但软甲纲和线虫纲均缺少 Motif 10。

```

1 M E Q Q Q E E N R V A G S E D L F C R N C D K E T E E A E A
1 ATGGAGCAGCAACAAGAAGAGAACCGCTGGCTGGCAGCGAGGACCTCTTCTGACGGAACGTGATAAGGAGACGGAGGAGGCCGAGGCG
31 V G M E G R V P E W L E G R V T R N G P G M V Q V G A T H Y
91 GTGGGCATGGAGGGCCGCTCCCGAATGGCTGGAGGGACGGGTACGCGGAACGGGCCGGGCATGGTGCAGGTGGGCGCCACGCACCTAC
61 D H L F D S L A M L H Q F T I Q R G R V T Y R S R F L R S D
181 GACCACCTCTTCGACTCCCTCGCCATGCTGCACCACTTACCATTCAGCGAGGACGTGTACCTATCGTTCCAGATTCTTCGACGCGAC
91 S Y T N N T Q A N R I V V G E L G T V A F P D P C K T L F H
271 TCCTACCAACAACACGCGCAACAGGACGTGGTGGGAGCTGGGACCGGTGGCGTTCCTCCGACCCGTGCAAGACTTTGTTTCAT
121 R L M T N F F K L P V P A S V M S D N C L V N V C Q A R D Q
361 CGGCTCATGACAACTTCTCAAGCTCCCGTCCCGCCAGCGTCATGTCCGACAACTGCTTAGTGAACGTGTGCCAGGCGAGGGACCAA
151 M F A L T E T C F L R R L D P D S L T T L G K K E D I S N Y
451 ATGTTTGCCCTGACGGAGACCTGCTTCTTGCGGCGCCTCGATCCAGACTCCCTCACGACGCTCGGGAAGAAGGAGGACATCAGTAACATAC
181 V A V N M A T A H P H I D R D G T V F N V D C S F S L L N G
541 GTGGCGGTCAACATGGCCACGGCACACCCGCACATTGACCGGACGGGACGGTCTTCAACGTTGATTGTTCTCTCGTGTCTCAACGGC
211 P E L R I V R L P E G R L E G A R V S A T V V S R W R A A L
631 CCCGAGCTGCGCATCGTCCGCTGCCCCGAGGGAAGGCTAGAGGGCGCTCGTGTGTCGGTACGGTGGTACGAGGTGGCGTGGCGCGTTA
241 P Y V H S F A M T K N Y W V I V E Q P L V L S L G K M V Q Q
721 CCTACGTGCACAGCTTCGCGCATGACCAAGAACTACTGGGTAATCTGTGGAACAGCCTTTGGTTTATCGCTCGGGAAGATGGTCCAGCAG
271 Y A T F G R L M N A L T W L P H E N L R L L V I D R N T G E
811 TACGCGACATTCGGGAGGCTGATGAACGCCCTGACGTGGCTGCGCATGAAACTTGAGGCTCCTGGTGTGATGATAGGAATACGAGAG
301 L L P T T Y T G P P I L L F H H I N A Y E K D G H L V V D F
901 TTGCTCCCCACCACCTACACGGGGCCGCGATCCTCTTCCACCACATCAACGCCCTATGAGAAGGACGGGCACTTGGTCTGGGACTTC
331 S C T N N K S P Y N C F E F S N C A T R K L D T D P S K V F P D
991 TCCTGCACCAACAACAGTGCCTTACAACCTGTTTCTTCTTCCAGCAACTTCCGCAAACTCGACACAGACCCCTCAAGGTCTTCCCGGAC
361 A K A C R F V L P L Y V P A K G E V G E Q L V T L K D T T C
1081 GCAAAGGCGTGTAGTTTGTATTGCTCTGTATGTACCGGCTAAAGGGGAGGTGCGGCGAGCAGCTAGTACTCTGAAGGACACCACCTGC
391 T A I R T D G G E V H C S P A L L L C P L T F E L P R I N Y Q
1171 ACCGCCATAAGAACAGATGGCGGTGAGGTACACTGCTCGCCGCTCTCCTTTGCCCACTAACATTGAACTCCCTAGAACTCACTACCAG
421 R N G Q P Y R Y T Y G I T S G S D L Y L Q R L I K L D V V T
1261 AGGAACGGCCAGCCTTACCGCTACACCTACGGCATCACAGCGGTTCTGATTGTACCTCCAGCGCTGATAAAGCTGGACGTGGTGACC
451 G E T W I F H D R G Y V A A E P I F V P A P G A T E E D D G
1351 GGCAGAGCTTGGATCTCCACGATAGAGGCTACGTCGTCGAGAGCCCATCTTCGTGCCCCGCCGAGCCACCGAGGAGGATGACGGG
481 V V L S T L L K I N D L R Y V A L L V L D A R N M K Q L A R
1441 GTGGTGTGTCTACTTTACTAAAGATCAACGACCTCCGCTACGTGGCGCTACTGGTGTGGACGCTAGGAACATGAAGCAGCTGGCCAGG
511 V E F T A E G D V T F P F H G Q F V D P R Q D V H A Y *
1531 GTGGAGTTTACTGCTGAAGGGATGTGACGTTCCCTTTTACGGGCGAGTTTGTGACCCCGCCAGGACGTCCACGCTTACTGA

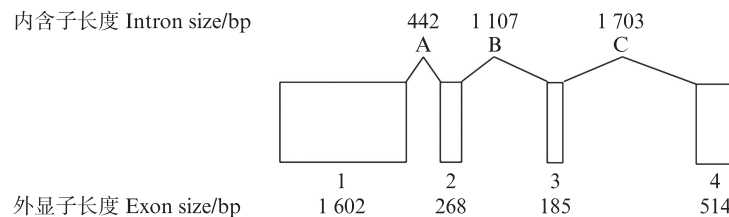
```

ATG. 起始密码子; *. 终止密码子; 下划线及蓝色部分为 *Es-Bco1* 基因 RPE65 结构域。

ATG. start codon; *. Stop codon; The underlined and blue parts are the RPE65 domain of *Es-Bco1* gene.

图1 中华绒螯蟹 *Bco1* 基因的开放阅读框 (ORF) 及其推导的氨基酸序列

Fig. 1 Open reading frame (ORF) of *Bco1* gene and its derived amino acid sequence of *Eriocheir sinensis*

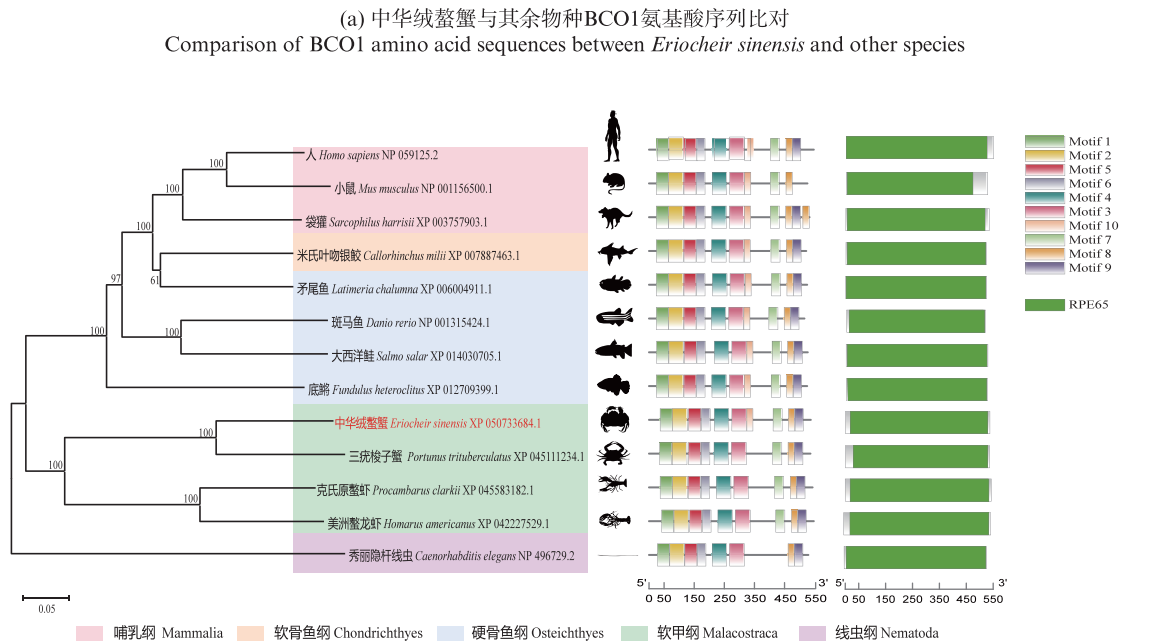
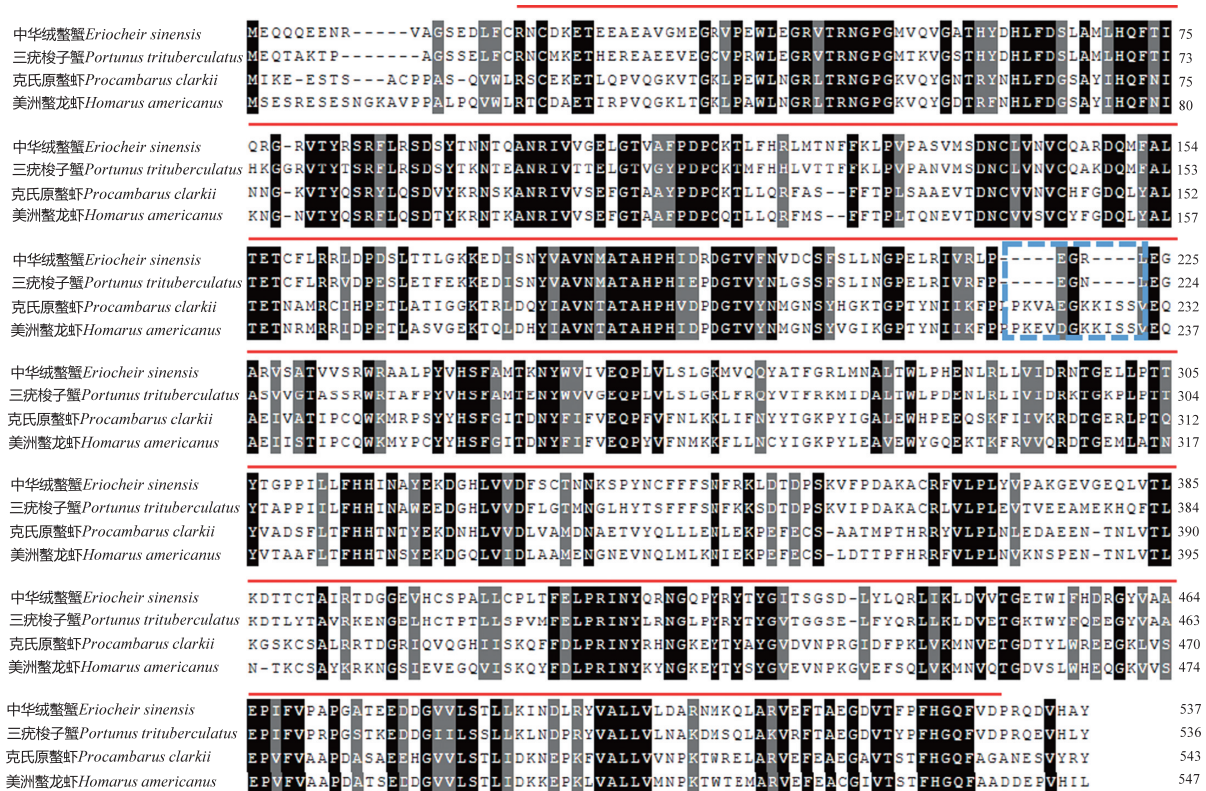


A, B, C 代表内含子; 方框区域代表外显子。

A, B, and C stand for introns; The box areas represent exons.

图2 中华绒螯蟹 *Bco1* 基因结构

Fig. 2 Gene structure of *Bco1* of *Eriocheir sinensis*



(a) 黑色背景表示完全一致的氨基酸序列, 灰色背景表示相似氨基酸序列, 红色划线区域为 RPE65 结构域, 蓝色虚线框为缺失片段 LPKVA 和 KISS。

(a) The black background represents the identical amino acid sequence, the gray background represents the similar amino acid sequence, the red underlined area is the RPE65 domain, and the blue dashed box represents the missing fragments LPKVA and KISS.

图3 中华绒螯蟹和其他物种的 BCO1 氨基酸序列比对及其系统进化树

Fig. 3 Multiple sequence alignment and phylogenetic tree of BCO1 between *Eriocheir sinensis* and the other animal species

2.2 *Es-Bco1* 基因的组织特异性及时空表达分析

qPCR 结果显示, *Es-Bco1* 在河蟹的鳃、眼柄、内膜、肌肉、后肠、肝胰腺、胃和心脏中均有表达(图4)。其中, 内膜中 *Es-Bco1* mRNA 的相对表达量显著高于其他组织 ($P < 0.05$), 其次为眼柄和肝胰腺, 在其余组织中表达量较低, 特别是心脏中的表达量最低 ($P < 0.05$)。就河蟹蜕壳周期而言, 肝胰腺中 *Es-Bco1* mRNA 的相对表达量变化显著(图5a), AB期最高, C期快速下降 ($P < 0.05$), D期继续下降至最低水平, 但C期和D期差异不显著 ($P > 0.05$), E期又显著上升 ($P < 0.05$), 见图5a。就不同卵巢发育阶段而言, 肝胰腺中 *Es-Bco1* mRNA 的表达量也存在显著变化(图5b), 卵巢 I 期和 II 期, 肝胰腺中 *Es-Bco1* mRNA 的相对表达量均较低 ($P > 0.05$), III 期肝胰腺中 *Es-Bco1* mRNA 表达水平快速上升至最高水平 ($P < 0.05$), 在 IV 期显著下降 ($P < 0.05$), V 期继续下降至最低表达水平, 但 IV 期和 V 期肝胰腺中 *Es-Bco1* mRNA 表达水平不存在显著差异 ($P > 0.05$), 见图5b。

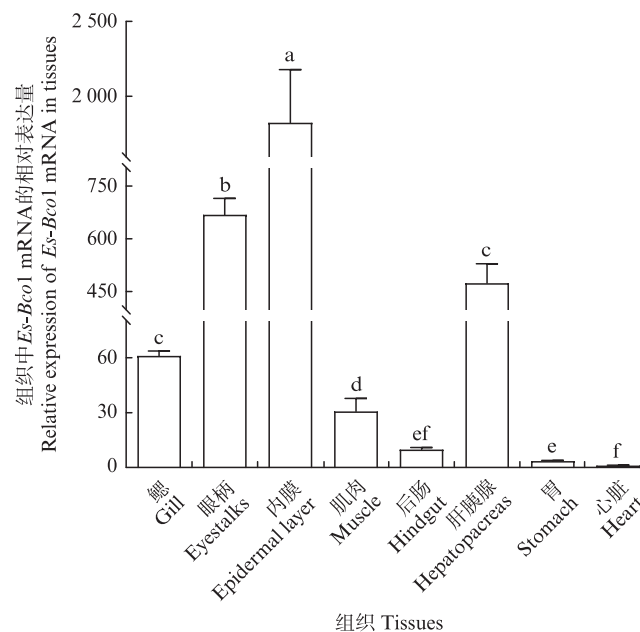
2.3 *Es-Bco1* 在肝胰腺中的 mRNA 定位

原位杂交结果(图版)显示, 在蜕壳 AB 期 *Es-Bco1* mRNA 在中华绒螯蟹肝胰腺中出现了明显

的阳性信号, 且阳性信号定位于纤维细胞(Fibrillar cell, F细胞)和吸收细胞(Resorptive cell, R细胞), R细胞中的阳性高于F细胞(图版-1)。卵巢发育 III 期, 肝胰腺中的 *Es-Bco1* mRNA 主要存在于F细胞中(图版-4), 其余细胞中没有阳性信号。

2.4 高 pH 慢性胁迫对中华绒螯蟹肝胰腺 *Bco1* 基因表达、色泽及类胡萝卜素含量的影响

为了探讨水体高 pH 慢性胁迫对河蟹肝胰腺 *Es-Bco1* 基因表达、色泽及类胡萝卜素含量的影响, 本研究检测了3种常见 pH 条件下(pH 8.0对照、pH 9.0、pH 10.0), 河蟹肝胰腺中该基因的相对表达水平、肝胰腺色泽及类胡萝卜素含量变化情况。结果表明, 河蟹在高 pH 胁迫 30 d 后, 随着 pH 的提高其肝胰腺中 *Es-Bco1* mRNA 呈现增加趋势(图6a), 色泽参数 L^* 值、 a^* 值和 b^* 值均显著下降 ($P < 0.05$)。其中, pH 10.0 组和 pH 9.0 组的 L^* 值和 b^* 值显著低于 pH 8.0 组 ($P < 0.05$); pH 10.0 组的 a^* 值显著低于 pH 8.0 组 ($P < 0.05$), 见图6b。此外, 肝胰腺中总类胡萝卜素和 β -胡萝卜素含量随水体中 pH 升高而呈现显著下降趋势 ($P < 0.05$)。其中, pH 10.0 组和 pH 9.0 组的总类胡萝卜素和 β -胡萝卜素含量显著低于 pH 8.0 组 ($P < 0.05$), 见图6c。

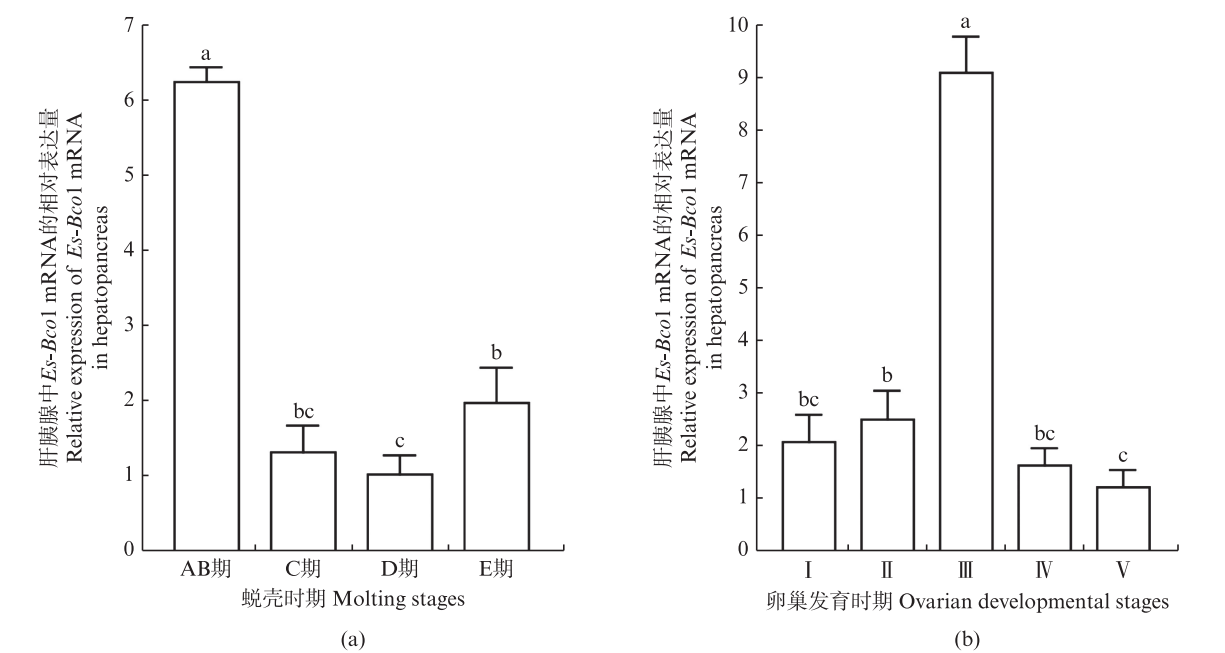


柱状图上方含有不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Different letters above the bar chart indicate significant differences ($P < 0.05$).

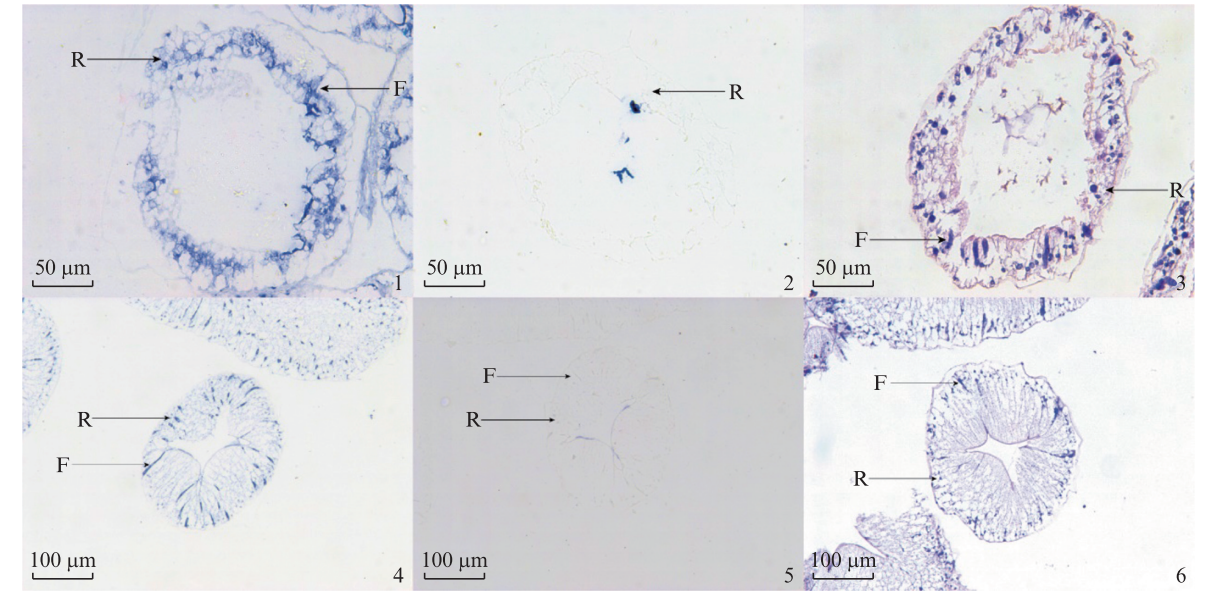
图4 中华绒螯蟹不同组织中 *Es-Bco1* mRNA 的相对表达量

Fig. 4 Relative expression levels of *Es-Bco1* mRNA in different tissues of *Eriocheir sinensis*



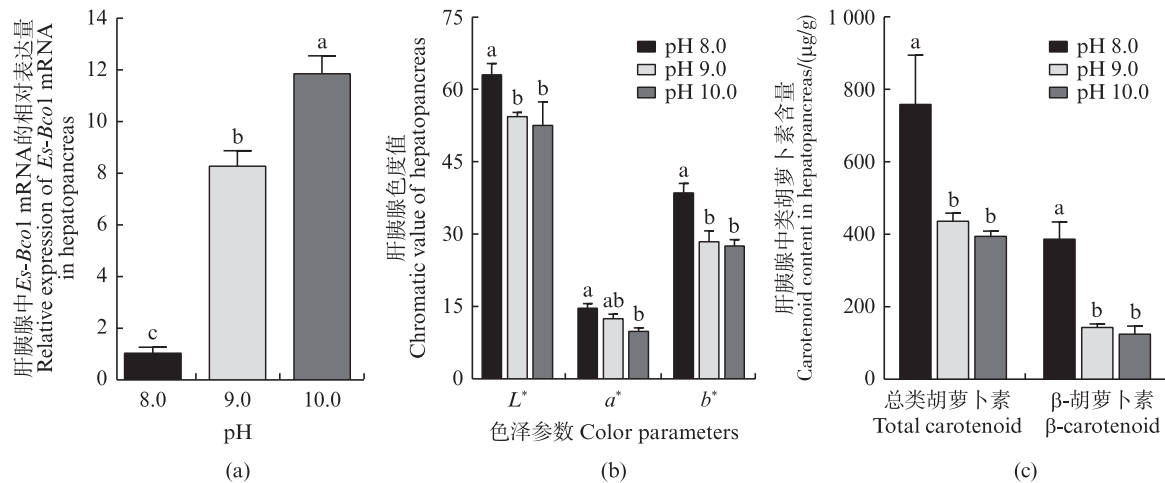
AB期. 蜕壳后期;C期. 蜕壳间期;D期. 蜕壳前期;E期. 蜕壳期; I~V 分别代表卵巢发育 I~V 期。柱状图上方含有不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。
Stage AB. postmolt stage; C stage. intermolt stage; Stage D. premolt stage; Stage E. ecdysis stage; I - V respectively represent the stages of ovarian development I - V. Different letters above the bar chart indicate significant differences ($P<0.05$).

图5 中华绒螯蟹肝胰腺中*Es-Bco1* mRNA在不同蜕壳阶段和不同卵巢发育阶段的相对表达量变化
Fig. 5 Relative expression levels of *Es-Bco1* mRNA in the hepatopancreas during the different molting stages and different ovarian developmental stages of *Eriocheir sinensis*



1-3 为蜕壳后期(AB期)肝胰腺组,4-6 为卵巢发育Ⅲ期肝胰腺组。其中,原位杂交反义探针结果为 1 和 4;正义探针为对照,杂交结果为 2 和 5;H. E 染色结果为 3 和 6。F. 纤维细胞;R. 吸收细胞。
1-3 were hepatopancreas groups at the post-molting stage (AB), 4-6 were hepatopancreas groups at the stage III of ovarian development. Among them, the results of in situ hybridization antisense probe were 1 and 4, as the control, the hybridization results were 2 and 5. H. E staining results were 3 and 6. F. Fibrillar cell; R. Resorptive cell.

图版 中华绒螯蟹蜕壳后期(AB期)和卵巢发育Ⅲ期肝胰腺中*Es-Bco1* mRNA的组织定位
Plate Localization of *Es-Bco1* mRNA in hepatopancreas at post-molting stage (AB) and ovarian developmental stage of *Eriocheir sinensis*



柱状图上方含有不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Different letters above the bar chart indicate significant differences ($P < 0.05$).

图6 高pH慢性胁迫对中华绒螯蟹肝胰腺中*Es-Bco1* mRNA表达水平、色泽及类胡萝卜素含量的影响

Fig. 6 Effects of chronic stress of high pH on *Es-Bco1* mRNA expression level, color parameter and carotenoid content in hepatopancreas of *Eriocheir sinensis*

3 讨论

动物体内类胡萝卜素经类胡萝卜素加氧酶(如BCO1, BCO2和NinaB)分解代谢成一系列重要的生物产物来维持机体正常的生理代谢^[12-13, 16]。基于前期从中华绒螯蟹基因组数据中筛选到EsCCO1 - EsCCO6^[19], 本研究成功获得了中华绒螯蟹*Bco1*基因序列, 该基因编码的蛋白具有1个RPE65结构域, 符合典型的CCO家族结构特征, RPE65结构域在单个供氧分子或两个氧原子的结合下发挥氧化还原酶活性^[34], 说明*Es-Bco1*可能起到促进类胡萝卜素代谢的作用。系统进化树结果显示EsBCO1与三疣梭子蟹亲缘性最高且4种甲壳动物聚为一簇, 揭示了*Bco1*基因在甲壳动物进化过程中相对保守, 可能具有相似的生物学功能。此外, 在中华绒螯蟹和三疣梭子蟹BCO1蛋白序列中缺失LPKVA和KISS序列, 而软甲纲物种和线虫纲物种均缺少Motif 10, 推测这可能与蟹类进化过程中的片段丢失有关。

哺乳动物BCO1可以裂解类胡萝卜素产生维生素A^[14], 维生素A缺乏会导致黄斑变性等眼部疾病^[35], 且果蝇NinaB对其视觉色素产生也起到重要作用^[17], 本研究发现*Es-Bco1*在眼柄中高表达, 推测*Bco1*可能在中华绒螯蟹视觉功能上也发挥着重要的作用。此外, 在水产动物的相关研究中, *Bco*基因的下调会导致脊尾白虾肝胰腺和虾夷扇贝闭壳肌颜色变黄, 增加其类胡萝卜素的积

累^[18, 36]。在本研究中, *Es-Bco1*还高表达于内膜组织, 甲壳动物的内膜和甲壳中类胡萝卜素的积累决定其体色^[37], *Bco1*在中华绒螯蟹体色形成上存在一定作用。肝胰腺作为甲壳动物最主要的营养物质消化吸收和存储器官^[38], 参与类胡萝卜素等物质的代谢, 且肝胰腺颜色与其类胡萝卜素组成和含量相关, 推测*Bco1*在中华绒螯蟹体色形成与肝胰腺类胡萝卜素代谢功能上也发挥着重要的作用。然而, 关于*Bco1*在中华绒螯蟹各组织中的具体功能还有待于进一步研究。

蜕壳与卵巢发育是中华绒螯蟹的重要生物学过程。处于蜕壳AB期的中华绒螯蟹刚完成蜕壳, 新的外骨骼还未完全硬化, 肝胰腺中高表达的*Bco1*加快了体内类胡萝卜素的裂解, 提供了更多的类胡萝卜素代谢产物来促进身体发育^[39]。随后, 蜕壳C期其新的外骨骼已经完全硬化, 不再需要大量的营养物质。此外, 类胡萝卜素经BCO1裂解代谢成维生素A, 而维生素A的代谢物维甲酸是维甲类X受体(Retinoid X receptor, RXR)的天然配体, 甲壳动物RXR可以与蜕皮激素受体形成二聚物, 参与蜕壳的调控^[40], 中华绒螯蟹RXR mRNA在蜕壳AB期的肝胰腺中高表达与*Es-Bco1*结果吻合^[41], 进一步揭示了*Bco1*可能参与中华绒螯蟹蜕壳调控。完成蜕壳的雌体成蟹的卵巢通常开始快速发育, 需要摄取大量的营养物质以促进其发育^[42]。*Es-Bco1*基因在卵巢发育Ⅲ期肝胰腺组织高表达, 可能是因为卵巢发育

进入外源性卵黄合成期^[29],需要从饲料中摄取更多的类胡萝卜素用于性腺发育,在肝胰腺中类胡萝卜素可以被 BCO1 酶解后进一步通过其他代谢步骤转化为维生素 A^[43]。此外,本研究还发现在卵巢中 *Es-Bco1* 几乎不表达。由此可见, *Es-Bco1* 在河蟹蜕壳和卵巢发育的肝胰腺中起着非常重要的作用。另外,有研究^[44]表明, R 细胞在蜕壳 AB 期肝胰腺中占主要优势, F 细胞是甲壳动物消化酶的主要合成位点。所以 *Es-Bco1* mRNA 在蜕壳 AB 期和卵巢发育 III 期肝胰腺中的定位差异,可能与细胞的功能及细胞数量变化有关,进一步导致 *Es-Bco1* 在蜕壳时期和卵巢发育过程中发挥不同的功能。

高 pH 胁迫是水产养殖中常见的环境压力,可导致水产动物机体中活性氧自由基(Reactive oxygen species, ROS)增加,引起氧化应激,使得体色改变^[45-46]。甲壳动物的体色与其类胡萝卜素含量和组成密切相关^[47],研究^[48]发现暴露于溴氰菊酯的幼蟹肝胰腺色泽度出现明显的下降,且总类胡萝卜素和 β -胡萝卜素含量均显著降低。与本研究结果相似,所以我们推测幼蟹在高 pH 胁迫下,肝胰腺中的类胡萝卜素被过度消耗导致肝胰腺白化。长时间(30 d)高 pH 胁迫引起肝胰腺 *Es-Bco1* 表达量上升,这一结果与先前的溴氰菊酯胁迫研究趋势相似^[48],推测其原因:(1)高 pH 胁迫导致幼蟹摄食能力下降,使其难以获得足够的类胡萝卜素,经 *EsBCO1* 等酶催化转化成的维生素 A 减少,造成维生素 A 缺乏。在视黄酸信号通路中,肠特异性转录因子(Intestine specific homeobox, ISX)会抑制 *Bco1* 的表达,而维生素 A 缺乏会降低 ISX 的表达,导致 *Bco1* 表达增加^[49];(2)类胡萝卜素作为动物体内强大的抗氧化剂能够清除 ROS^[50],甲壳动物受到环境胁迫时,ROS 水平升高,促进 *Es-Bco1* 表达水平上调,同时造成肝胰腺中沉积的类胡萝卜素水平降低^[51]。总之,中华绒螯蟹 *Bco1* 对高 pH 慢性胁迫有一定的调控作用,且可能参与免疫调控。

4 结论

中华绒螯蟹 *Es-Bco1* 基因具有一个典型的 RPE65 结构域,广泛表达于各组织,其中内膜中、眼柄和肝胰腺中表达量相对较高。中华绒螯蟹蜕壳和卵巢发育过程中,肝胰腺中 *Es-Bco1*

mRNA 表达水平分别在蜕壳后期(AB 期)和卵巢发育 III 期最高,且主要定位于 AB 期的 F 细胞和 R 细胞,卵巢发育 III 期的 F 细胞中。高 pH 胁迫会导致中华绒螯蟹肝胰腺中 *Es-Bco1* 基因表达量显著上调, L^* 值、 b^* 值、总类胡萝卜素含量及 β -胡萝卜素含量显著下降。有关 *Es-Bco1* 在中华绒螯蟹蜕壳周期和卵巢发育过程中的具体生理功能和表达调控机制尚有待深入研究。

作者声明本文无利益冲突。

参考文献:

- [1] BRITTON G. Carotenoid research: history and new perspectives for chemistry in biological systems [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2020, 1865(11): 158699.
- [2] WADE N M, GABAUDAN J, GLENCROSS B D. A review of carotenoid utilisation and function in crustacean aquaculture [J]. *Reviews in Aquaculture*, 2017, 9(2): 141-156.
- [3] SLOAN D B, MORAN N A. Endosymbiotic bacteria as a source of carotenoids in whiteflies [J]. *Biology Letters*, 2012, 8(6): 986-989.
- [4] NAKABACHI A, PIEL J, MALENOVSKÝ I, et al. Comparative genomics underlines multiple roles of proffittella, an obligate symbiont of psyllids: providing toxins, vitamins, and carotenoids [J]. *Genome Biology and Evolution*, 2020, 12(11): 1975-1987.
- [5] MORAN N A, JARVIK T. Lateral transfer of genes from fungi underlies carotenoid production in aphids [J]. *Science*, 2010, 328(5978): 624-627.
- [6] MA L, LIN X M. Effects of lutein and zeaxanthin on aspects of eye health [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, 90(1): 2-12.
- [7] JIANG X D, XIE Z L, WADE N M, et al. Using response surfaces to explore the interactive effect of dietary astaxanthin and β -carotene on growth and antioxidant capability of juvenile Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* [J]. *Aquaculture*, 2022, 555: 738196.
- [8] HARRISON E H, KOPEC R E. Enzymology of vertebrate carotenoid oxygenases [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2020, 1865(11): 158653.
- [9] CHAI C L, XU X, SUN W Z, et al. Characterization of the novel role of NinaB orthologs from *Bombyx mori* and *Tribolium castaneum* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2019, 109: 106-115.
- [10] O'BYRNE S M, BLANER W S. Retinol and retinyl esters: biochemistry and physiology [J]. *Journal of Lipid*

- Research, 2013, 54(7): 1731-1743.
- [11] POLIAKOV E, UPPAL S, ROGOZIN I B, et al. Evolutionary aspects and enzymology of metazoan carotenoid cleavage oxygenases [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2020, 1865(11): 158665.
- [12] WYSS A, WIRTZ G, WOGGON W D, et al. Cloning and expression of β , β -carotene 15,15'-Dioxygenase[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 271(2): 334-336.
- [13] KIEFER C, HESSEL S, LAMPERT J M, et al. Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(17): 14110-14116.
- [14] AMENGUAL J, WIDJAJA-ADHI M A K, RODRIGUEZ-SANTIAGO S, et al. Two carotenoid oxygenases contribute to mammalian provitamin A metabolism [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(47): 34081-34096.
- [15] LINDQVIST A, SHARVILL J, SHARVILL D E, et al. Loss-of-function mutation in carotenoid 15, 15'-monooxygenase identified in a patient with hypercarotenemia and hypovitaminosis A[J]. *The Journal of Nutrition*, 2007, 137(11): 2346-2350.
- [16] OBERHAUSER V, VOOLSTRA O, BANGERT A, et al. NinaB combines carotenoid oxygenase and retinoid isomerase activity in a single polypeptide[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(48): 19000-19005.
- [17] VOOLSTRA O, OBERHAUSER V, SUMSER E, et al. NinaB is essential for *Drosophila* vision but induces retinal degeneration in opsin-deficient photoreceptors[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(3): 2130-2139.
- [18] JIN Y, YU Y, ZHANG C S, et al. Characterization and function analysis of the beta-carotene oxygenase-like genes in carotenoids metabolism of the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda* [J]. *Frontiers in Physiology*, 2020, 11: 745.
- [19] LIU Y F, LI M J, ZHANG M, et al. Evolution and expression analysis of carotenoid cleavage oxygenase gene family in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 257: 128475.
- [20] SUN Y Y, LIU M F, YAN C C, et al. CRISPR/Cas9-mediated deletion of β , β -carotene 9', 10'-oxygenase gene (*EcBCO2*) from *Exopalaemon carinicauda* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 151: 168-177.
- [21] SUN Y Y, YAN C C, LIU M F, et al. CRISPR/Cas9-mediated deletion of one carotenoid isomeroxygenase gene (*EcNinaB-X1*) from *Exopalaemon carinicauda* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 97: 421-431.
- [22] LI Q Q, ZU L, CHENG Y X, et al. Carapace color affects carotenoid composition and nutritional quality of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* [J]. *LWT*, 2020, 126: 109286.
- [23] LIU X, WU H J, WANG Y, et al. Comparative assessment of Chinese mitten crab aquaculture in China: spatiotemporal changes and trade-offs [J]. *Environmental Pollution*, 2023, 337: 122544.
- [24] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴 2023 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2023: 24.
- Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. 2023 China fishery statistical year book [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2023: 24.
- [25] CHENG Y X, WU X G, LI J Y. Chinese mitten crab culture: current status and recent progress towards sustainable development [M]//GUI J F, TANG Q S, LI Z J, et al. *Aquaculture in China: Success Stories and Modern Trends*. Oxford: John Wiley & Sons Ltd., 2018.
- [26] 龚志, 蔡春芳, 朱健明, 等. 高 pH 值对中华绒螯蟹抗氧化能力及虾青素沉积的影响 [J]. *淡水渔业*, 2015, 45(1): 20-24.
- GONG Z, CHAI C F, ZHU J M, et al. Effects of high pH on antioxidant capacity and astaxanthin content in *Eriocheir sinensis* [J]. *Freshwater Fisheries*, 2015, 45(1): 20-24.
- [27] 陈春宇. pH 和盐度胁迫对中华绒螯蟹幼蟹生理影响的初步研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2023.
- CHEN C Y. Preliminary study on the physiological effects of pH and salinity stress on junior Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2023.
- [28] WANG Q J, JIANG X D, YAO Q, et al. Comparative study on the nutrition composition of adult male Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) with different coloured hepatopancreases [J]. *Aquaculture Research*, 2021, 52(1): 196-207.
- [29] 康现江, 田志环, 吴江立, 等. 中华绒螯蟹蜕皮周期及蜕皮过程中肝胰腺消化酶活性的变化 [J]. *中国水产科学*, 2012, 19(5): 806-812.
- KANG X J, TIAN Z H, WU J L, et al. Molt stages and changes in digestive enzyme activity in hepatopancreas during molt cycle of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(5): 806-812.
- [30] WU X G, LIU M M, PAN J, et al. The ovarian

- development pattern of pond-reared Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* H. Milne-Edwards, 1853 [J]. Crustaceana, 2017, 90(4): 449-470.
- [31] 潘柯伍. 1-酰基甘油-3-磷酸酰基转移酶(AGPAT)和溶血磷脂酰甘油酰基转移酶(LPGAT)在中华绒螯蟹脂质合成中的功能初探[D]. 上海: 上海海洋大学, 2022.
- PAN K W. A preliminary investigation on the functions of 1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase (AGPAT) and lysophosphatidylglycerol acyltransferase (LPGAT) in the lipid synthesis of *Eriocheir sinensis* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2022.
- [32] 孙秋风, 柳梅梅, 何杰, 等. 三疣梭子蟹卵巢发育过程中主要类胡萝卜素组成变化及其与抗氧化性能的关系[J]. 水生生物学报, 2023, 47(5): 713-722.
- SUN Q F, LIU M M, HE J, et al. Changes in carotenoid composition and antioxidant capacity of *Portunus trituberculatus* during ovarian development [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2023, 47(5): 713-722.
- [33] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [34] RIBAYA-MERCADO J D. Influence of dietary fat on β -carotene absorption and bioconversion into vitamin A [J]. Nutrition Reviews, 2002, 60(4): 104-110.
- [35] THOMAS L D, BANDARA S, PARMAR V M, et al. The human mitochondrial enzyme BCO2 exhibits catalytic activity toward carotenoids and apocarotenoids [J]. Journal of Biological Chemistry, 2020, 295(46): 15553-15565.
- [36] LI X, WANG S Y, XUN X G. A carotenoid oxygenase is responsible for muscle coloration in scallop [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Molecular and Cell Biology of Lipids, 2019, 1864(7): 966-975.
- [37] MAOKA T. Carotenoids as natural functional pigments [J]. Journal of Natural Medicines, 2020, 74(1): 1-16.
- [38] WEN X B, CHEN L Q, AI C X, et al. Variation in lipid composition of Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis* during ovarian maturation [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2001, 130(1): 95-104.
- [39] MCGRANE M M. Vitamin A regulation of gene expression: molecular mechanism of a prototype gene [J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2007, 18(8): 497-508.
- [40] DURICA D S, CHUNG A C K, HOPKINS P M. Characterization of *EcR* and *RXR* gene homologs and receptor expression during the molt cycle in the crab, *Uca pugnator* [J]. American Zoologist, 1999, 39(4): 758-773.
- [41] 王瑶, 杨志刚, 郭子好, 等. 中华绒螯蟹 *RXR* 基因全长 cDNA 克隆及表达分析[J]. 水产学报, 2013, 37(12): 1761-1769.
- WANG Y, YANG Z G, GUO Z H, et al. The full length cDNA cloning and expression analysis of *RXR* from the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(12): 1761-1769.
- [42] SUI L Y, SUN H X, WU X G, et al. Effect of dietary HUFA on tissue fatty acid composition and reproductive performance of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards) broodstock [J]. Aquaculture International, 2011, 19(2): 269-282.
- [43] LIÑÁN-CABELLO M A, PANIAGUA-MICHEL J, HOPKINS P M. Bioactive roles of carotenoids and retinoids in crustaceans[J]. Aquaculture Nutrition, 2002, 8(4): 299-309.
- [44] 田志环, 康现江, 焦传珍. 中华绒螯蟹蜕皮周期中肝胰腺细胞组成的变化[J]. 中国水产科学, 2013, 20(6): 1175-1181.
- TIAN Z H, KANG X J, JIAO C Z. Changes in cell type composition in the hepatopancreas of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* during the molting cycle[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(6): 1175-1181.
- [45] WANG W N, ZHOU J, WANG P, et al. Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme gene expression in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* when exposed to acute pH stress [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2009, 150(4): 428-435.
- [46] HAN S Y, WANG M Q, WANG B J, et al. A comparative study on oxidative stress response in the hepatopancreas and midgut of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* under gradual changes to low or high pH environment[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 76: 27-34.
- [47] SUPAMATTAYA K, KIRIRATNIKOM S, BOONYARAT-PALIN M, et al. Effect of a *Dunaliella* extract on growth performance, health condition, immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. Aquaculture, 2005, 248(1/4): 207-216.
- [48] 石今朝. 溴氰菊酯对中华绒螯蟹养殖性能、类胡萝卜素代谢、抗氧化性能和肠道健康的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2022.
- SHI J Z. Effects of deltamethrin on culture performance, carotenoid metabolism, antioxidant capability and intestinal health of Chinese mitten crab [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2022.
- [49] SEINO Y, MIKI T, KIYONARI H, et al. Isx participates in the maintenance of vitamin A metabolism by regulation of β -carotene 15, 15'-Monooxygenase (*Bco1*) expression [J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(8): 4905-4911.

- [50] MIKI W. Biological functions and activities of animal carotenoids [J]. Pure and Applied Chemistry, 1991, 63 (1): 141-146.
- [51] BARIM O, KARATEPE M. The effects of pollution on the vitamins A, E, C, β -carotene contents and oxidative stress of the freshwater crayfish, *Astacus leptodactylus* [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2010, 73 (2): 138-142.

Expression pattern and high pH stress response of the *Bco1* gene in the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)

XIONG Jingyi¹, ZHANG Min¹, YANG Zonglin¹, CHEN Xiaowu¹, JIANG Xiaodong¹, CHENG Yongxu^{1,2,3,4}, ZHAO Jinshan², WU Xugan^{1,2,3,4}

(1. Centre for Research On Environmental Ecology and Fish Nutrition, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Dongying Huize Agricultural Technology Co., Ltd., Dongying 257503 Shandong, China; 3. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 4. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: This article combines bioinformatics, quantitative real-time PCR, *in situ* hybridization, and HPLC techniques to investigate the sequence characteristics, spatiotemporal expression patterns, and subcellular localization of the *Bco1* gene in the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). It also explores the variations in *Es-Bco1* expression, color, and carotenoid content in the hepatopancreas under chronic stress caused by high pH levels. The findings reveal that the full-length of *Es-Bco1* open reading frame (ORF) spans 1 614 bp and encodes 537 amino acids. It belongs to the RPE65 superfamily and exhibits a high similarity to BCO1 in the *Portunus trituberculatus*. (2) *Es-Bco1* was expressed in multiple tissues, with high expression in the endoderm, eyestalks, and hepatopancreas; the expression of *Es-Bco1* in the hepatopancreas was highest during the post-molt stage (stage AB); the expression of *Es-Bco1* in the hepatopancreas significantly increased during ovarian stages I - III and then significantly decreased. (3) *In situ* hybridization results showed that *Es-Bco1* mRNA was mainly localized in the F cells (Fibrillar cell) and R cells (Resorptive cell) of the hepatopancreas during the AB stage and ovarian development stage III. (4) After 30 days of exposure to pH 8.0 (control), 9.0, and 10.0, the expression level of *Es-Bco1* in the hepatopancreas of juvenile crabs significantly increased, while the lightness value (L^*), yellowness value (b^*), total carotenoid content, and β -carotene content in the hepatopancreas significantly decreased. In conclusion, *Bco1* in *E. sinensis* is mainly expressed in the epidermal layer, eyestalks, and hepatopancreas, with high expression during the post-molt stage and ovarian stage III. Furthermore, high pH stress can upregulate *Es-Bco1* expression in the hepatopancreas and reduce carotenoid content, indicating that *Bco1* plays an important role in carotenoid cleavage of *E. sinensis* in response to high pH stress.

Key words: *Eriocheir sinensis*; β -carotene 15, 15' oxygenase (BCO1); gene expression; subcellular localization; pH stress