

中华绒螯蟹 *ELOVL6* cDNA 全长克隆及其表达分析

施秋燕, 杨志刚*, 姚琴琴, 成永旭, 杨青, 魏帮鸿

(上海海洋大学农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306)

摘要: 为了探究中华绒螯蟹自身脂肪酸合成能力, 采用RACE技术, 克隆获得中华绒螯蟹 *ELOVL6* cDNA 序列全长 (GenBank accession: KT779219)。该序列全长2247 bp, 包括235、873和1139 bp的5'非编码区(5'-UTR)、开放阅读框(ORF)和3'非编码区(3'-UTR), 编码290个氨基酸(AA), 具有ELOVL家族的全部特征: 6个跨膜区、高度保守的组氨酸簇HXXHH、多个保守区以及内质网滞留信号KXKXX。分析发育树表明, *ELOVL2*与*ELOVL5*聚为一支, *ELOVL6*聚为另一支, 其中中华绒螯蟹*ELOVL6*与其他节肢动物*ELOVL6*聚为一支, 与凡纳滨对虾聚为一小支。采用异源表达方法研究*ELOVL6*编码的蛋白质对脂肪酸的作用, GC-MS结果显示, 转基因的酵母培养物C16:0和C16:1n-7含量下降, 而C18:0和C18:1n-9的含量升高, 同时有新产物C18:1n-7产生。通过荧光定量PCR(qPCR)技术研究*ELOVL6*基因在中华绒螯蟹不同组织及不同脂肪源喂养下的表达情况, 显示该基因在肠道、胃、心脏、肝胰腺、胸神经节、肌肉、眼柄、鳃和脑神经节9个组织均有表达, 其中在肝胰腺中表达量最高, 显著高于其他组织; 在不同脂肪源饲喂的结果中, 肝胰腺、肌肉、卵巢和精巢4个组织中均有表达, 并且各组织在全鱼油组饲喂下表达量最低, 其中用全豆油组饲喂后, 肝胰腺中的表达情况显著升高, 明显高于全鱼油组和鱼油豆油混合组。以上结果综合表明, 中华绒螯蟹中*ELOVL6*能够催化C16的饱和及C16的单不饱和脂肪酸延长, 同时受到饲料中不同脂肪源的一定影响, 这为探究中华绒螯蟹PUFA合成途径及脂肪酸调控机制提供了依据。

关键词: 中华绒螯蟹; 长链脂肪酸延长酶6; 基因克隆; 异源表达; 组织表达

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFAs)是指含有2个或2个以上双键且碳链长度超过18个碳原子的脂肪酸, 是由饱和脂肪酸经过一系列碳链延长酶和去饱和酶催化反应生成。PUFAs是机体生物活性物质的前体, 构成生物体膜磷脂和血清甘油三酯等物质的主要组成成分, 通常在水产动物生长、繁殖、新陈代谢、提高饲料利用效率等过程中发挥着重要的生理功能^[1]。长链脂肪酸碳链延长酶(elongase of long-chain fatty acids, ELOVLs)是多不饱和脂肪酸生

物合成的关键酶之一, 在催化脂肪酸延伸反应中起到限速作用, 能够催化合成长链脂肪酸($\geq C16$)及超长链脂肪酸($\geq C20$)^[2]。ELOVL家族被分为ELOVL1~ELOVL7, 这7类延长酶对不同脂肪酸底物具有不同的时空表达模型与特异性。

ELOVL6是目前ELOVL家族中最受关注的新成员, 是长链脂肪酸延长酶家族中重要成员之一, 是位于内质网上的微粒体酶, 通常在脂类生物合成、脂肪酸代谢以及一些疾病代谢过程中发挥重要作用^[3-4]。ELOVL6能够延伸饱和 and 单

收稿日期: 2015-12-08 修回日期: 2016-02-06

资助项目: 国家自然科学基金(31472287); 国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA10A409-5); 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心(ZF1206); 科技部港澳台科技合作专项(2014DFT30270); 上海市科委优秀学术带头人专项(12XD1402700); 上海市科技兴农重点攻关专项(沪农科2013第5-7号)

通信作者: 杨志刚, E-mail: zgyang@shou.edu.cn

不饱和脂肪酸, 在催化棕榈酸 (C16:0) 合成硬脂酸 (C18:0) 的过程中起到至关重要的作用^[5-6], 为 PUFA 的生成奠定重要基础。

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 是我国重要的水产经济蟹类。近几年来, 针对中华绒螯蟹脂肪酸合成相关基因在营养调控过程中的功能研究越来越热门^[7-9]。Guo 等^[7]和 Yang^[8]等分别克隆了中华绒螯蟹 $\Delta 9$ 去饱和酶基因和 $\Delta 6$ 去饱和酶基因, 分析表明 $\Delta 9$ 去饱和酶基因和 $\Delta 6$ 去饱和酶基因在肝胰腺和脑神经节组织中表达量最高, 并且饲料中不同脂肪源对这 2 个基因表达有较大影响。本实验采用 RT-PCR 技术, 克隆中华绒螯蟹 *ELOVL6* cDNA 全长序列, 利用生物学信息对其进行分析, 并通过组织特异性及异源表达系统探究该基因功能, 为解析中华绒螯蟹营养代谢机制积累基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

中华绒螯蟹取自上海海洋大学崇明养殖基地。挑选有活力的扣蟹, 雌雄各 4 只, 解剖后用液氮速冻其肝胰腺、脑神经节、胸神经节、眼柄、肌肉、心脏、肠道、胃和鳃 9 个组织, 置于 -80°C 冰箱保存备用。

另取性腺未成熟、体质量为 (50 ± 3) g 的幼

蟹, 随机分为 3 组, 每组 4 个平行, 放养于 $5\text{ m} \times 6\text{ m}$ 的养殖池, 各组分别饲喂添加有全鱼油 (FO)、等比例鱼油豆油 (FO/SO) 和全豆油 (SO) 的配合饲料, 该饲料中其他营养成分参照 Guo 等^[7]的实验, 以满足中华绒螯蟹的营养需求。饲喂 98 d 后, 随机挑出各平行组中 4 对正常成熟的雌雄中华绒螯蟹, 解剖后用液氮速冻其肝胰腺、肌肉、卵巢及精巢 4 个组织, 存于 -80°C 冰箱待用。

1.2 中华绒螯蟹 *ELOVL6* 基因全长克隆

根据凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) *ELOVL6* (GenBank accession: KP271446.1)、褐家鼠 (*Rattus norvegicus*) *ELOVL6* (GenBank accession: NM_134383.2)、豌豆长管蚜 (*Acyrtosiphon pisum*) *ELOVL6* (GenBank accession: NM_001163253.1) 等物种基因的保守序列设计 *ELOVL6*-F1 和 *ELOVL6*-R1 引物 (表 1), 并委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。利用 Trizol 法提取中华绒螯蟹肝胰腺组织总 RNA, 并将其反转录成 cDNA 第一链, 以此为模板, 进行 PCR 反应, 获得中华绒螯蟹 *ELOVL6* 基因核心片段。PCR 反应加样体系: cDNA 模板 $1\text{ }\mu\text{L}$, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) $4\text{ }\mu\text{L}$, 上下游引物 ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) 各 $0.5\text{ }\mu\text{L}$, $10\times\text{PCR buffer}$ $2.5\text{ }\mu\text{L}$, *rTaq* 酶 ($5\text{ U}/\mu\text{L}$) $0.25\text{ }\mu\text{L}$, 加无菌去离子水至总体积 $25\text{ }\mu\text{L}$ 。设置的 PCR 反应条件: 94°C 预变性 5 min ; 94°C 变性 30 s , 57°C 退火 30 s , 72°C 延伸 30 s , 32 个循环; 72°C 延伸 10 min , 16°C 保存。

表 1 *ELOVL6* 实验所用引物

Tab. 1 Primers used in the experiments of *ELOVL6*

引物名称 primer name	核苷酸序列 (5'-3') sequence (5'-3')	用途 usage
ELOVL6-F1	TGGATGCAGGAGAACTGGA	RT-PCR
ELOVL6-R1	TGGTGGTACCAGTGCAGGAA	RT-PCR
3'-ELOVL6	CTGCTCTACGTCCTCAACCAGTTCGGG	3' RACE
5'-ELOVL6	CCCGAACTGGTTGAGGACGTAGAGCAG	5' RACE
ELOVL6-F2	<u>CGGGATCC</u> ATGGAGTCGGTCACCATGCC	ORF cloning
ELOVL6-R2	<u>CCCTCGAG</u> TTATTCCAGTTTACCCTTGGTG	ORF cloning
qRT-ELOVL6-F	TACTTCGTACTGTTCGCTCGCTT	real-time PCR
qRT-ELOVL6-R	TTACCCTTGGTGCTCTTTCCTT	real-time PCR
β -actin-F	ACCTCGGTTCTATTGTGTCGG	real-time PCR
β -actin-R	ATGCTTTCGCAGTAGTTCGTC	real-time PCR

注: 下划线部分表示限制性酶切位点

Notes: restriction sites are underlined

根据上述所得*ELOVL6*基因核心片段, 分别设计3'-*ELOVL6* RACE上游引物和5'-*ELOVL6* RACE下游引物(表1)。提取完整的中华绒螯蟹肝胰腺总RNA, 将其合成3'-RACE cDNA和5'-RACE cDNA第一链, 以此为模板, 进行3'和5'末端快速扩增反应(rapid amplification of cDNA ends, RACE)。RACE PCR反应加样体系: 3'-cDNA(5'-cDNA) 1.25 μ L, 10 μ mol/L的 3'-*ELOVL6*(5'-*ELOVL6*) 0.5 μ L, 10 mmol/L dNTP Mix 0.5 μ L, 50 $\times$ Advantage 2 Polymerase Mix 0.5 μ L, 10 $\times$ Advantage 2 PCR buffer 2.5 μ L, UPM 2.5 μ L, 加灭菌去离子水至总体积25.0 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C, 3 min, 5个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 70 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 5个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 28个循环。

回收各PCR产物, 克隆到T载体上, 转化至大肠杆菌感受态培养12 h后, 挑取阳性克隆菌送美吉生物公司测序, 结果通过去载体拼接确定中华绒螯蟹*ELOVL6* cDNA全长。

1.3 *ELOVL6*基因的生物信息学分析

获得的测序结果利用NCBI Vecscreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecsreen/>)进行分析, 去除载体后, 将各片段进行拼接获得cDNA全长; 开放阅读框利用ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)进行分析; 同时利用Primer Premier 5软件及NCBI BLAST、BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)对序列进行翻译及对蛋白质分析; 跨膜结构的分析使用TMHMM Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>); ProtParam程序(<http://web.expasy.org/protparam/>)用于预测氨基酸等电点、分子量等参数; 氨基酸多序列比对用BioEdit 7软件及多序列对比SMS工具包(<http://www.bio-soft.net/sms/>)。

查找GenBank中脊椎动物和无脊椎动物*ELOVL6*、*ELOVL5*和*ELOVL2*氨基酸序列, 使用MEGA 6.0软件邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统发育进化树, 其中Bootsrap值设置为1000次。

利用NCBI BLASTP软件将中华绒螯蟹*ELOVL6*氨基酸与凡纳滨对虾、小家鼠(*Mus musculus*)、人(*Homo sapien*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、金头鲷(*Sparus aurata*)*ELOVL6*氨基酸比对。

1.4 酵母功能验证

根据获得的*ELOVL6*全长cDNA序列设计分别带有*Bam*H I和*Xho* I限制性酶切位点的上下游引物*ELOVL6*-F2/*ELOVL6*-R2(表1), 以反转录的第一链cDNA为模板, 通过PCR扩增开放阅读框, 经回收后的产物通过TA克隆, 与pMD-19T构建pMD-*ELOVL6*重组质粒。将构建的pMD-*ELOVL6*质粒和表达载体pYES2同时经*Bam*H I和*Xho* I双酶切后, 用T₄ DNA连接酶将回收后产物*ELOVL6*基因片段与pYES2过夜连接, 构建重组表达质粒pYES-*ELOVL6*; 表达质粒转化入大肠杆菌Top10中, 37 $^{\circ}$ C恒温培养12 h后挑取阳性克隆菌, 经PCR和测序验证后提取质粒。连接反应体系: 1 μ L 10 $\times$ T₄ Buffer, *ELOVL6* 片段4 μ L, pYES2 4 μ L, T₄ DNA连接酶1 μ L。以电穿孔法将酶切验证正确的重组表达载体pYES-*ELOVL6*转化到酵母INVScl菌株中, 将其培养在含2%半乳糖的固体SC-U上, 挑选出阳性转化子, 经PCR和酶切验证后保存于冻存液中, 置-80 $^{\circ}$ C备用。电击条件: 电压1.5 kV, 时间5 ms, 次数1次。

将保存的菌液接种到YPD培养基28 $^{\circ}$ C活化, 以1:100接种到SC-U培养基中过夜培养, 收集菌液, 转入到诱导培养基中(使诱导初始OD₆₀₀=0.4), 摇床上恒温30 $^{\circ}$ C培养48 h后, 回收洗涤, -80 $^{\circ}$ C保存备用。同时用空载菌株作为对照。

1.5 GC-MS分析脂肪酸组分

脂肪酸组分分析根据Wu等^[10]方法加以适当修改。将回收的酵母培养物在真空冷冻干燥机内冷冻干燥8 h, 称取约100 mg酵母粉末于安瓿瓶中, 将其中的脂肪酸进行2次甲酯化。过程如下, 加入2 mL 14%的三氟化硼, 充氮气后100 $^{\circ}$ C水浴25 min, 再加入2 mL苯和2 mL甲醇, 重复上述步骤, 转移至离心管, 加5 mL蒸馏水, 离心(1500 r/min, 15 min)后, 将上清液转移到干净的小烧杯中真空干燥, 用1 mL正己烷溶解, 过膜到进样瓶中, 4 $^{\circ}$ C保存。

将上述保存的甲酯化样品加样到GC-MS气质联用仪上, 进行脂肪酸成分测定。使用仪器为美国Agilent公司生产的高效气质联用仪, 色谱柱为HP-88-脂肪酸色谱柱(30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μ m)。升温程序70 $^{\circ}$ C, 保持1 min, 以10 $^{\circ}$ C/min升至210 $^{\circ}$ C, 然后再以10 $^{\circ}$ C/min升至220 $^{\circ}$ C, 最后以10 $^{\circ}$ C/min

升至235 °C后保持8 min, 运行时间25.5 min。

1.6 实时荧光定量PCR检测组织 *ELOVL6*-mRNA 表达情况

以各组饲料平行样及不同组织样的等量RNA 反转成的等浓度cDNA作为荧光定量PCR(qRT-PCR)模板, 荧光定量PCR引物和内参根据中华绒螯蟹 *ELOVL6* 全长和中华绒螯蟹 β -actin 基因 (GenBank accession: HM053699) 设计(表1)。利用 ABI 7500 荧光定量仪的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法检测中华绒螯蟹 *ELOVL6*-mRNA 的各组织相对表达情况, 反应体系加样如下, SYBR Premix Ex *Taq*TM (2×) 5 μ L, 上下游引物各0.2 μ L, ROX Reference Dye II 0.2 μ L, cDNA模板1 μ L, 加去离子水至终体积为10 μ L; 反应程序设置为95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60.3 °C 34 s, 40个循环; 65 °C至熔解曲线; 95 °C 15 s,

65 °C 60 s, 95 °C 30 s。数据分析利用SPSS 18.0 软件中的单因子变异数, 差异显著以0.05为标准, 数据结果用平均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示。

2 结果

2.1 中华绒螯蟹 *ELOVL6* 序列分析及系统进化树的构建

中华绒螯蟹 *ELOVL6* cDNA (GenBank accession: KT779219) 全长2247 bp, 其中含有235、873和1139 bp的5'URT区域、开放阅读框以及3'URT区域, 同时3'末端具有表明序列完整性的加尾信号AATAAA及polyA尾(图1)。该cDNA序列编码的290个氨基酸符合典型的延长酶家族特性: 6个预测的跨膜区, 高度保守的组氨酸簇HWYHH(位于第3个跨膜区内), 多个保守区以及

```

1  ACATGGGGGCTTGTCAGCGGCGGCACACAGCGAGGGCAAGACCTGTGCCCGCTCCCTCCT
61  CACCAGCCACACCTCATACCGCCCGCACCCTTCCCGCCCTTCACTCCTCGCCCCGGTGC
121 CTCAGCGTGCAGGTGGTCAAGTCTGTGTGTCGCTGTTGACCAGGCGAGAGTCGTAAGCTTC
181 GTGTCCCCAAGCCTCAAAAGTCCCCCATCCCGGCGTCCCGTCACTTGCTTCACCATGGA
1      M E
241 GTCGGTCACCATGCCTAACTATTCTTACGTCTTCAAGTTCGAGAAGGACTTTGACAACCTT
3      S V T M P N Y S Y V F K F E K D F D N F
301 TGAGAAGCGGCAATGGATGAAGGAGAACTGGATCATCTCCTTCTACTACATCGGCGCCTA
23      E K R Q W M K E N W I I S F Y Y I G A Y
361 CATGCTAGTGATCTATGGCGGGCAGCTGTACATGCAGACGCGGCCGCGGTTCTGAACTCAA
43      M L V I Y G G Q L Y M Q T R P R F E L K
421 AATCCCGCTCTTCATCTGGAACGTCTTCTGCCCCTCTTCTCCATCTGGGGCGCCTACCG
63      I P L F I W N V F L A L F S I W G A Y R
481 CAGCGCACCCGAGCTGCTCTACGTCTCAACCAGTTTCGGGTTTAGATACTCCGTGTGCAT
83      S A P E L L Y V L N Q F G F R Y S V C I
541 CCCC GCCCAGTTTCTCTGACAACCGTGTGGCGGGTCTGGAAGTGGATGTTACGCT
103      P G P S F L D N R V G G F W N W M F T L
601 CAGCAAGGTCCAGAGCTCGGAGACACAGTGTTCATCGTTCTCCGGAAGCAGCCGCTCAT
123      S K V P E L G D T V F I V L R K Q P L I
661 CTTCCTGCACTGGTACCACCACGTCACTGTCTCTCTACGCCTGGTACTCCTACTCCGA
143      F L H W Y H H V T V L L Y A W Y S Y S D
721 CTACATCGCCACCGCCCGCTGGTTCGTCTGCATGAACCTTGTCACAGTGCCATGTA
163      Y I A T A R W F V C M N Y L V H S A M Y
781 CAGCTACTATGCCCTCAAGGCCCTCAAGTTCCGAGTACCTCGCTGGATCGCCATGAGCAT
183      S Y Y A L K A L K F R V P R W I A M S I
841 CACCACGGCTCAGCTCGCCAGATGGTGATGGGGCGGCGGTCAACATTGGGCCTACCA
203      T T A Q L A Q M V M G A A V N I W A Y Q
901 GGTCAAGCAGGCCGGAATGAGTGCCACGTCTCCTACGACAACATTAAATATCTCTCCT

```

```

223   V K Q A G N E C H V S Y D N I K I S L L
961 CATGTACACATCCTACTTCGTACTGTTTCGCTCGCTTCTTCCGTAGAGCTTACGTTGTCAA
243   M Y T S Y F V L F A R F F R R A Y V V N
1021 CCCCAGCAGACCGGGTCTCAGCCACCCAAAAAGGGCCAGGAGTCTCTCGCCTACGAAGG
263   P K Q T G S Q P P K K G Q E S L A Y E G
1081 AAAGAGCACCAAGGGTAAACTGGAAATAAGTTACACTAAGTTTACAGGAATTTGTAGGGA
283   K S T K G K L E *
1141 AGAAAAAGCTCTGATAATTCATTTGTCAAACACATGGGTCCCACTAATGGCACTGACTGG
1201 CTGGTGTCTCTGCATTTGTTTGTCTTACTACCAATCAGGACTTGCCAAATCCAAATTTTTC
1261 TCATTTTCACCAACAACCTGTAGGGCTTAACAAAGACTTCTAGAAAATGTCATGATTACAG
1321 TTTACAATGGTTTGTCTTCTTACCTTTGAGCAGCTGTATTCAATGGCTTCAGGTAGC
1381 AACAGTTCAAGGTTTGGCAGCACAAGACACAGCCATTGCCTCTCAGATCCTGGACCATT
1441 TGTGTCATGCCAGATGCCTGAATGAGCTTCTGGGAAAGTTGAACACTTTCCACACAGAAG
1501 TTTGTTTTGCTGTTTCAAAGAGTTTGAAAATCATCGCATTGACAATTAAGTATTTTACT
1561 AATGGTATCACAGAAGCGTGGCCACGATCCTTACGTGATGTGGTAATGCCTCCTCTGGT
1621 TCAATATTCGAATGAACAGTTTTGTAGCCAGTCTTCTGTTGCATAAAATTAGCTTTCACT
1681 TTTAGCATTGGCAAACCTTCAAAGTTATGCATAGCGGGATGCATTTTATCCTGCCATCAAG
1741 TGACTGCACCCGCGGTGAGAGAACACTAGTACGTCTGTAGTTGTAAAACATTCGTCAAGC
1801 TAGGTTTGTACACAGGCACCCACCCTTCATAGGTAAAGGTATAAAATTCAGCAGCATAA
1861 GTAAAATGAAGATCACATGTTCCCTCATGATGAATTTTCTGAGGACCTGAACCACAGAA
1921 AGTCCAAATGGAGCACACAGCTTCACAGTCATTGTAAATAGGCTGCTATGCAGTTTCAT
1981 GTTTAAACTGACACAGGTTGTCTACCATTTCCTCTCTTCTTTAGCTTTTCC TTTCTTC
2041 TTCTGAACCTTGCTTTGTGGCTGTGGCTTCAACCAAGTCATGCACACCCAGCAAGGACAAA
2101 GTACAGTATTTGGTAACATTCCTTTTATACCGTAACCTTCCCACATGTCTGATCTCTTTA
2161 CTGCATTCCAGACGTCAAACCTTTGTCTCTACAAATGTTTCTCCAAATAAAGAACTCCTG
2221 CAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图1 中华绒螯蟹 *ELOVL6* 基因核苷酸序列及推测的氨基酸序列

起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA)用实线框标出; poly(A)加尾信号(AATAAA)用虚线框标出; *. 终止密码子, 不翻译

Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *E. sinensis* *ELOVL6* gene

The start codon (ATG) and the stop codon (TAA) are in the solid box; the poly (A) addition signal AATAAA are in the dashed box; *. the stop codon no translation

内质网滞留信号KXKXX。预测该蛋白等电点为9.48, 分子量为34.32 ku。

利用MEGA 6.0软件邻接法将中华绒螯蟹 *ELOVL6* 氨基酸与相关代表脊椎动物和无脊椎动物的 *ELOVL6* 氨基酸序列共同构建发育树, 其中包括部分代表动物的 *ELOVL2* 和 *ELOVL5* (图2)。结果显示, 中华绒螯蟹 *ELOVL2* 和 *ELOVL5* 等其他延长酶家族基因聚为一支, *ELOVL6* 则与脊椎动物和无脊椎动物的 *ELOVL6* 另聚一支, 同时与凡纳滨对虾 *ELOVL6* 单独聚为一小支, 二者相距最近。经BLASTP比对表明, 中华绒螯蟹 *ELOVL6* 氨基酸序列与人、斑马鱼、小家鼠、金头鲷的 *ELOVL6*

相似度达到49%~51%, 其中与凡纳滨对虾的 *ELOVL6* 相似度最高, 达89%(图3)。

2.2 真核表达验证基因功能

分别将空载和含重组表达质粒pY-*ELOVL6* 的酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 共同培养48 h, 实验设计4个平行, 数据结果用平均值±标准差(mean±SD)表示。

收集菌液, 干燥后对培养物进行甲酯化, 检测其脂肪酸的组分, 结果显示空载酵母细胞中主要含有棕榈酸(palmitic acid, PA, C16: 0)、棕榈油酸(palmitoleic acid, PAM, C16:1 Δ^9 , n-7),

硬脂酸(stearic acid, SA, C18: 0)和油酸(oleic acid, OA, C18:1 Δ^9 , n-9)4种脂肪酸, 与已报道的结果一致^[11-13]; 而在转 *ELOVL6* 基因的酵母细胞中, 伴随着外源 *ELOVL6* 的碳链延长作用, 4种脂肪酸含量发生明显变化: C16:0和C16:1n-7脂肪酸含量分别由14.41% $\pm$ 0.45%和46.51% $\pm$ 2.04%下降为12.82% $\pm$ 0.44%和37.95% $\pm$ 0.37%, 而C18:0和C18:1n-9脂肪酸分别由6.32% $\pm$ 0.55%和32.95% $\pm$ 1.59%上升到9.12% $\pm$ 1.35%和37.84% $\pm$ 0.91%, 同时检测到新产物C18:1n-7, 新产物产量为3.52% $\pm$ 0.30%(表2)。表明酵母细胞中的外源 *ELOVL6* 能够催化C16: 0和C16: 1脂肪酸底物, 并通过添加碳原子将其延长为C18: 0和C18: 1脂肪酸。

2.3 中华绒螯蟹 *ELOVL6* 表达分析

以qRT-*ELOVL6*-F/qRT-*ELOVL6*-R为引物, β -actin为内参基因, 利用荧光定量PCR方法研究中华绒螯蟹 *ELOVL6* mRNA在肠道、胃、心脏、肝胰腺、胸神经节、肌肉、眼柄、鳃和脑神经节9个不同组织中的表达特征, 将中华绒螯蟹 *ELOVL6* 基因在心脏中的表达量设为1, 以各个组织中的相对表达量作柱形图(图4)。结果显示, *ELOVL6*在上述所有检测的9种组织中均有表达, 但表达水平各不相同。其中在中华绒螯蟹的肝胰腺中表达量最高, 表达水平与其他组织差异显著($P<0.05$); 其次在脑神经节、胸神经节、肠道中表达; 在心脏中表达量最低。

取不同鱼油/豆油比的配合饲料饲喂的中华绒

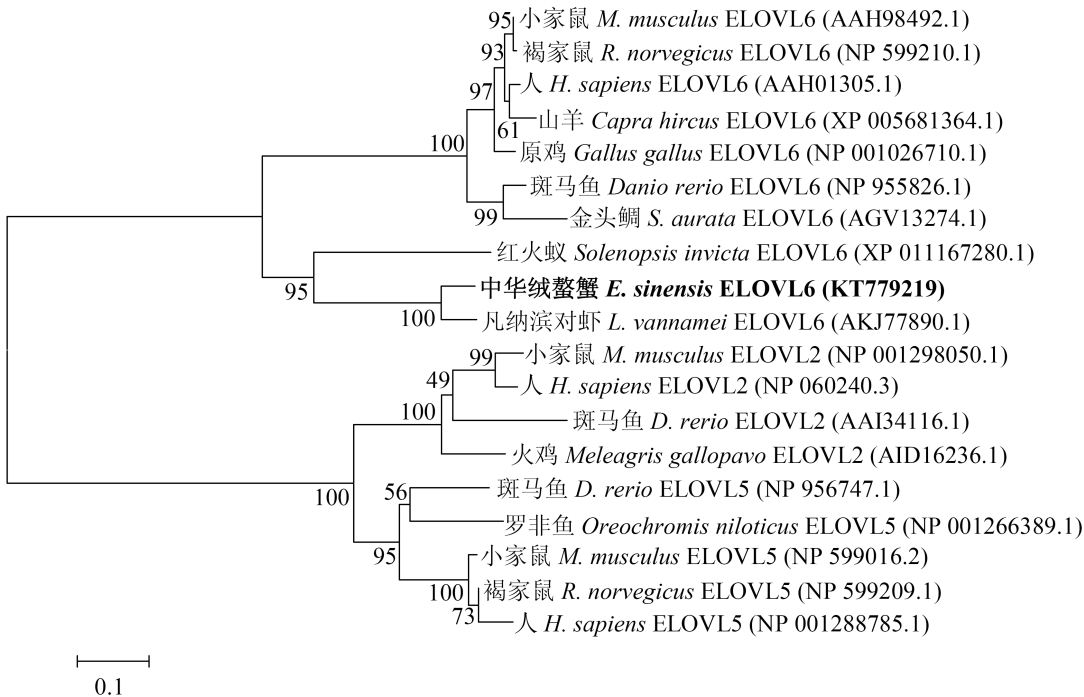


图2 利用MEGA 6.0邻接法构建的中华绒螯蟹*ELOVL6*与其他物种基因的系统发育树
分支上数字表示统计1000次后进化树呈现的概率, 置信度为1000

Fig. 2 Phylogenetic tree comparing the *E. sinensis* ELOVL6 with elongase proteins from other organisms using MEGA 6.0 NJ
The numbers on branches show the probability of evolutionary tree after 1000 statistics, confidence level 1000

表2 导入pYES2和pY-ELOVL6载体的酵母细胞脂肪酸组成
Tab. 2 Fatty acids contents of pYES2 and pY-ELOVL6 of *S. cerevisiae*

酵母细胞内载体	脂肪酸/% fatty acids					C16:0/C18:0	C16:1/C18:1
	C16:0	C16:1n-7	C18:0	C18:1n-9	C18:1n-7		
pYES	14.41 $\pm$ 0.45	46.51 $\pm$ 2.04	6.32 $\pm$ 0.55	32.95 $\pm$ 1.59	0	2.41 $\pm$ 0.24	1.43 $\pm$ 0.14
pY-ELOVL6	12.82 $\pm$ 0.44	37.95 $\pm$ 0.37	9.12 $\pm$ 1.35	37.84 $\pm$ 0.91	3.52 $\pm$ 0.30	1.48 $\pm$ 0.17	0.94 $\pm$ 0.02

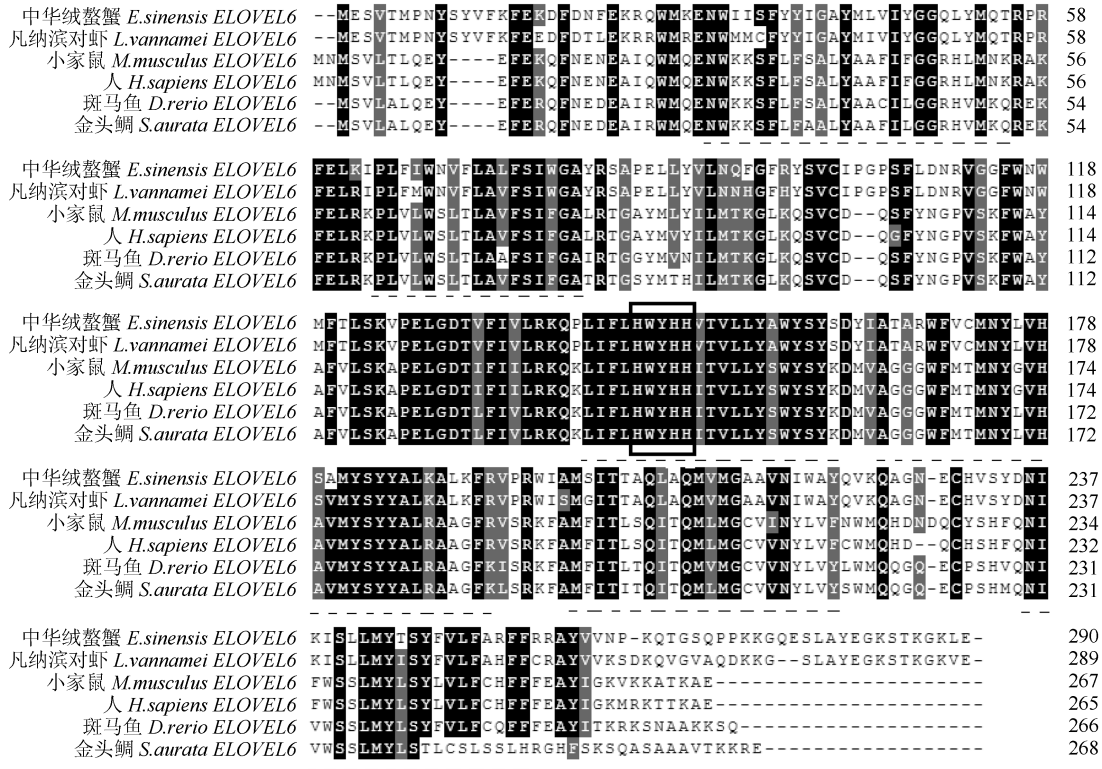


图3 中华绒螯蟹ELOVL6预测氨基酸序列与其他物种氨基酸的序列比较

组氨酸簇用实线框表示，预测的6个跨膜区域用下划虚线表示。中华绒螯蟹ELOVL6: KT779219; 凡纳滨对虾ELOVL6: AKJ77890.1; 小家鼠ELOVL6: AAH98492.1; 人ELOVL6: AAH01305.1; 斑马鱼ELOVL6: NP 955826.1; 金头鲷ELOVL6: AGV13274.1

Fig. 3 Deduced amino acid sequence of *E. sinensis* ELOVL6 comparison with different organisms

The solid box marks the histidine box, the dash lines mark the predicted transmembrane domain structure. *E. Sinensis* ELOVL6: KT779219; *L. vannamei* ELOVL6: AKJ77890.1; *M. musculus* ELOVL6: AAH98492.1; *H. sapiens* ELOVL6: AAH01305.1; *D. rerio* ELOVL6: NP 955826.1; *S. aurata* ELOVL6: AGV13274.1

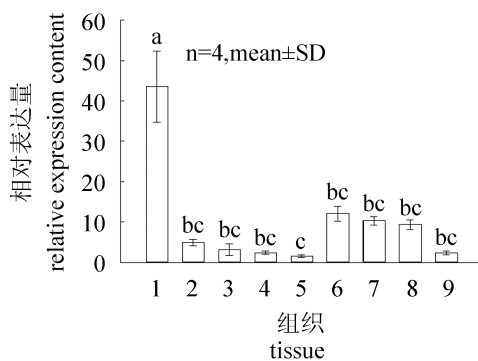


图4 中华绒螯蟹ELOVL6 mRNA在不同组织中的相对表达情况

1. 肝胰腺; 2. 胃; 3. 眼柄; 4. 鳃; 5. 心脏; 6. 脑神经节; 7. 胸神经节; 8. 肠道; 9. 肌肉。不同字母表示差异显著($P < 0.05$), 下同

Fig. 4 The relative expression content of *E. sinensis* ELOVL6 mRNA in different tissues

1. hepatopancreas; 2. stomach; 3. eyestalk; 4. gill; 5. heart; 6. cranial ganglia; 7. thoracic ganglia; 8. intestine; 9. muscle. Different letters mean significant difference ($P < 0.05$), the same below

螯蟹主要可食组织(肌肉、肝胰腺和性腺), 其中不同饲料组取雌雄蟹各4只。同样利用上述荧光定量PCR方法, 以qRT-ELOVL6-F/qRT-ELOVL6-R为引物, β -actin为内参基因, 检测ELOVL6-mRNA的表达变化情况。ELOVL6 mRNA在肝胰腺、肌肉和性腺中均有表达(图5)。从组织上看, ELOVL6在肝胰腺组织中表达量最高。然而在不同油脂比例饲料组中, 不同组织的表达量呈现不同变化模式。精巢和肝胰腺组织基本呈现随着豆油替代比例增加, 鱼油替代比例减小而表达量升高的趋势。肌肉和卵巢组织内各饲料的ELOVL6 mRNA水平没有显著性差异($P > 0.05$), 但是均在全鱼油组表现最低。肝胰腺组织中, 全豆油组的表达量最高, 显著高于其他2个饲料组($P < 0.05$)。

3 讨论

ELOVL6为长链脂肪酸碳链延长酶6, 早前也

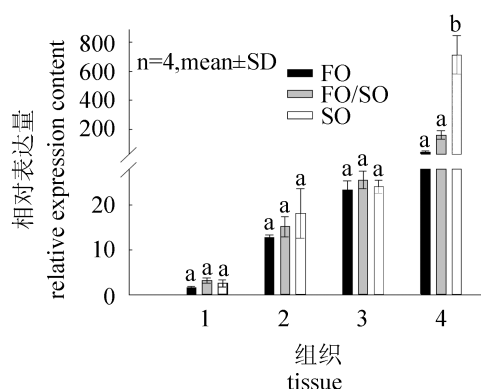


图5 中华绒螯蟹4种组织中的ELOVL6-mRNA在各饲料组下表达分析

1. 肌肉; 2. 精巢; 3. 卵巢; 4. 肝胰腺

Fig. 5 The analysis of expression differences of *E. sinensis* ELOVL6 mRNA in different tissues of different dietary lipid levels

1. muscle; 2. testicle; 3. ovary; 4. hepatopancreas

被称为LCE、FACE、rELO2等^[3-4,6],首次通过寡核苷酸序列分析从小鼠肝脏中克隆得到^[3]。通常ELOVL6参与利用动物机体中从头合成的脂肪酸以及从食物中摄取的脂肪酸,能够催化C12-C16的饱和或单不饱和脂肪酸的底物延长^[4],是长链脂肪酸延长反应中的限速酶。目前为止,已经从多个物种中克隆获得,包括小鼠^[6]、山羊(*Capra hircus*)^[14]、斑马鱼^[15]、金头鲷^[16]等。本研究则以中华绒螯蟹肝胰腺组织cDNA为模板,利用物种基因同源性及RACE技术首次克隆获得中华绒螯蟹ELOVL6 cDNA基因全长(GenBank accession: KT779219)。

分析ELOVL6基因序列表明,ELOVL6 cDNA全长2247 bp,3'端具有表明该序列完整性的加尾信号AATAAA及polyA尾。分析cDNA序列编码的290个氨基酸发现如下特征:6个预测的跨膜结构,高度保守的组氨酸簇HWYHH(位于第3跨膜区内),多个保守区以及内质网滞留信号KXKXX。中华绒螯蟹ELOVL6基因编码的蛋白质的内质网滞留信号包含2个赖氨酸残基,分别位于羧基端第5位和第3位,其中位于羧基端第3位的赖氨酸残基在内质网滞留功能上发挥主要作用^[17],同时基于ELOVL6的6个跨膜区,表明其主要功能同其他延长酶一样在内质网上发挥作用。中华绒螯蟹ELOVL6编码的氨基酸含有的组氨酸簇HXXHH在所有的ELOVL中均高度保守,因此推测在ELOVL中可能参与该延长酶家族还原反应

时的电子信号调节过程,然而HWYHH位于第3跨膜区内,与所报道的ELOVL5位置(位于第2跨膜区内)^[18]不同,猜测组氨酸簇应该与酶活性相关,不同ELOVL可能有着不同位置的组氨酸簇。

MAGE 6.0邻接法构建的系统发育树显示,ELOVL2和ELOVL5二者聚为一支,ELOVL6单独聚为一支。ELOVL5对C18和C20的多不饱和脂肪酸底物有明显活性,但对C22的延长作用较弱;相反地,ELOVL2对C20和C22活性显著,但是对C18作用活性低^[19]。Hashimoto等^[20]系统地分析了数十个真核生物的上百个脂肪酸延伸酶,通过构建系统发育树将ELOVL家族分为2个亚家族:饱和和单不饱和脂肪酸长链延长酶(ELOVL1、ELOVL3和ELOVL6)和多不饱和脂肪酸长链延长酶(ELOVL2、ELOVL4和ELOVL5),本实验结果与之相符,这也预示了中华绒螯蟹ELOVL6编码的蛋白质在合成脂肪酸上发挥的功能存在着较大的差别。聚为一支的ELOVL6中,中华绒螯蟹ELOVL6与节肢动物红火蚁、凡纳滨对虾聚为一支,同时与凡纳滨对虾单独聚为一小支,表明中华绒螯蟹与凡纳滨对虾关系最近,与红火蚁有着密切的亲缘关系,该结果符合分子生物学进化论。

ELOVL6在饱和和单不饱和脂肪酸合成过程中起重要作用,其催化合成的内源性脂肪酸对维持生物体内脂代谢平衡有重要作用。本研究利用酵母异源表达系统来探究中华绒螯蟹ELOVL6的蛋白质功能。以酿酒酵母空载为对照,中华绒螯蟹ELOVL6蛋白质的表达引起了酵母细胞中脂肪酸含量的变化。转基因酵母培养物与空载酵母培养物的脂肪酸测定结果表明,转基因组中棕榈酸(C16:0)和棕榈油酸(C16:1n-7)含量降低,而硬脂酸(C18:0)和十八碳一烯酸(C18:1n-9)的含量升高,同时检测到新产物C18:1n-7,在异源表达系统中,ELOVL6被诱导表达,蛋白质产生活性,将内源性C16:0与C16:1n-7延伸为C18:0和C18:1n-7,该结果与Inagaki等^[6]研究结果相一致。在ELOVL6功能抑制的研究中,结果则呈现反向趋势,其中C18:0和C18:1n-9含量降低,而C16:0和C16:1n-7含量升高^[21]。然而上述结果中都没有检测到C20以上产物的变化,可见ELOVL6不能催化C18以上的脂肪酸。ELOVL6催化C16:0延长为C18:0,同时将

C16:1n-7延伸为C18:1n-7,但是结果中C18:1n-9含量随之明显上升,推测原因为ELOVL6的活性促进了INVScl酵母中内源性 $\Delta 9$ 去饱和酶的活性^[6],具体原因有待用另一种 $\Delta 9$ 去饱和酶缺陷型酵母进行验证。

ELOVL家族在动物很多组织器官中均有表达,且存在组织特异性^[18-19, 22]。本实验中,荧光定量PCR结果显示ELOVL6 mRNA在中华绒螯蟹肝胰腺、肌肉、脑神经节、胸神经节、眼柄、鳃、胃、肠道和心脏中均有表达,与在其他物种中报道的结果相符^[18]。然而不同组织中表达水平各不相同,ELOVL6在肝胰腺组织中表达丰度最高,与其他组织差异显著,这预示着ELOVL6在肝胰腺组织中有不同寻常的作用。这与Moon等^[3]和Matsuzaka等^[4]通过Northern杂交法对鼠的ELOVL6基因进行组织表达分析,发现该基因在所有组织中均有表达,并且在肝脏、脂肪组织中高表达的结果一致。肝胰腺作为甲壳动物脂类存贮加工的主要场所,其脂质含量高,脂类新陈代谢十分旺盛^[23],可见ELOVL6在脂类合成代谢途径中的重要性。近年来,为了适应养殖业的迅速发展,如何解决鱼油替代问题成了新的热点话题。与此同时,与PUFA合成相关的去饱和酶和延长酶同样受到关注,研究者纷纷从分子角度来探究该问题^[7-8]。本实验试用不同比例水平豆油替代鱼油探究ELOVL6 mRNA表达变化情况。结果显示,在精巢和肝胰腺组织中基本呈现随着豆油替代比例增加,鱼油替代比例减少而表达量升高的趋势。尤其在肝胰腺组织中,豆油全替代组的表达丰度明显高于全鱼油组和豆油鱼油等比例混合组。有研究表明饲料营养成分能够调节机体自身基因转录强弱,从而调整各组织中所需物质组成^[24],因此豆油组饲料中DHA、EPA等PUFA的减少促进了ELOVL6活性的增强,从而促进生物体内源性PUFA合成通路,补足机体所需的脂肪酸,该结果同报道的多个研究结果类似^[7, 25]。这为进一步解决中华绒螯蟹鱼油替代问题、饲料配方优化问题提供了一定的理论基础。

ELOVL6在脂肪酸代谢过程中起着十分重要的作用。有研究显示,在ELOVL6^{-/-}小鼠中参与脂肪酸转运的基因表达水平下调,同时肺脏中的脂肪酸含量也发生显著变化^[26];在人的胰岛细胞研究中,ELOVL6^{-/-}的细胞脂肪酸去饱和指数显

著下降,而ELOVL6超表达细胞的脂肪酸去饱和指数显著上升^[27]。敲除或超表达ELOVL6基因不仅影响小鼠肝脏及肺脏中脂肪酸的组成,而且对脂质的积累有显著的影响^[21]。吴敏等^[14]研究了ELOVL6基因超表达和干扰对细胞的影响,结果表明ELOVL6会影响细胞内TG(甘油三酯)合成,但对细胞中脂滴积累没有影响。因此,虽然本实验通过荧光定量PCR技术以及外源表达系统对不同组织进行了表达情况比较和ELOVL6的活性分析,为研究中华绒螯蟹HUFA的合成途径及调节机制奠定了基础,但是要探究ELOVL6基因对中华绒螯蟹准确生理功能还需要通过RNAi干扰、超表达等技术手段进行进一步验证,进而深入研究ELOVL6在中华绒螯蟹脂质积累、脂肪酸代谢过程中的确切生理功能及调控机理。

参考文献:

- [1] 齐霖. 中华绒螯蟹幼蟹对饲料中多不饱和脂肪酸和胆碱需要量的研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2013.
Qi J. Dietary polyunsaturated fatty acids and choline requirement of juvenile Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[D]. Shanghai: East China Normal University, 2013 (in Chinese).
- [2] Guillou H, Zdravcov D, Martin P G P, *et al.* The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: insights from transgenic mice[J]. *Progress in Lipid Research*, 2010, 49(2): 186-199.
- [3] Moon Y A, Shah N A, Mohapatra S, *et al.* Identification of a mammalian long chain fatty acyl elongase regulated by sterol regulatory element-binding proteins[J]. *Journal of Biochemistry*, 2001, 276(48): 45358-45366.
- [4] Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, *et al.* Cloning and characterization of a mammalian fatty acyl-CoA elongase as a lipogenic enzyme regulated by SREBPs[J]. *Journal of Lipid Research*, 2002, 43(6): 911-920.
- [5] Green C D, Ozguden-Akkoc C G, Wang Y, *et al.* Role of fatty acid elongases in determination of de novo synthesized monounsaturated fatty acid species[J]. *Journal of Lipid Research*, 2010, 51(7): 1871-1877.
- [6] Inagaki K, Aki T, Fukuda Y, *et al.* Identification and expression of a rat fatty acid elongase involved in the biosynthesis of C18 fatty acids[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2002, 66(3): 613-621.

- [7] Guo Z H, Yang Z G, Cheng Y X, *et al.* Molecular characterization, tissue expression of acyl-CoA $\Delta 9$ -desaturase-like gene, and effects of dietary lipid levels on its expression in the hepatopancreas of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. *Aquaculture*, 2013, 402-403: 58-65.
- [8] Yang Z G, Guo Z H, Ji L Y, *et al.* Cloning and tissue distribution of a fatty acyl $\Delta 6$ -desaturase-like gene and effects of dietary lipid levels on its expression in the hepatopancreas of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. *Comparative Biochemistry Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 165(2): 99-105.
- [9] 姚琴琴, 杨志刚, 郭子好, 等. 中华绒螯蟹 $\Delta 9$ 脂肪酸去饱和酶基因克隆与原核表达[J]. *中国水产科学*, 2015, 22(6): 1177-1185.
- Yao Q Q, Yang Z G, Guo Z H, *et al.* Prokaryotic expression of fatty acyl-CoA $\Delta 9$ desaturase in *Eriocheir sinensis*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(6): 1177-1185(in Chinese).
- [10] Wu X G, Zhou B, Cheng Y X, *et al.* Comparison of gender differences in biochemical composition and nutritional value of various edible parts of the blue swimmer crab[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2010, 23(2): 154-159.
- [11] Hastings N, Agaba M, Tocher D R, *et al.* A vertebrate fatty acid desaturase with $\Delta 5$ and $\Delta 6$ activities[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(25): 14304-14309.
- [12] Monroig Ó, Li Y Y, Tocher D R. Delta-8 desaturation activity varies among fatty acyl desaturases of teleost fish: high activity in delta-6 desaturases of marine species[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 159(4): 206-213.
- [13] Liu H, Zheng H, Wang H, *et al.* Cloning and functional characterization of a polyunsaturated fatty acid elongase in a marine bivalve noble scallop *Chlamys nobilis* Reeve[J]. *Aquaculture*, 2014, 416-417(2): 146-151.
- [14] 吴敏, 罗军, 朱江江, 等. 奶山羊超长链脂肪酸延伸酶 6 基因(*ELOVL6*)的克隆及其对 4 个脂肪酸代谢基因表达水平的影响[J]. *农业生物技术学报*, 2014, 22(6): 672-680.
- Wu M, Luo J, Zhu J J, *et al.* Cloning of elongase of very long chain fatty acids 6 gene (*ELOVL6*) and its effect on four genes expression involved in fatty acid metabolism in dairy goat (*Capra hircus*)[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2014, 22(6): 672-680 (in Chinese).
- [15] Lam S H, Ung C Y, Hlaing M M, *et al.* Molecular insights into 4-nitrophenol-induced hepatotoxicity in zebrafish: Transcriptomic, histological and targeted gene expression analyses[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2013, 1830(10): 4778-4789.
- [16] Laura B P, Gabriel B L, Jaume P S. Wide-gene expression analysis of lipid-relevant genes in nutritionally challenged gilthead sea bream (*Sparus aurata*)[J]. *Gene*, 2014, 547(1): 34-42.
- [17] Jackson M R, Nilsson T, Peterson P A. Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum[J]. *The EMBO Journal*, 1990, 9(10): 3153-3162.
- [18] 吴景, 郑先虎, 匡友谊, 等. 镜鲤脂肪酸延长酶 5 基因的克隆和表达分析[J]. *中国水产科学*, 2015, 22(1): 9-16.
- Wu J, Zheng X H, Kuang Y Y, *et al.* Cloning and characteristic analysis of fatty acid elongase 5 in mirror carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(1): 9-16 (in Chinese).
- [19] Morais S, Monroig O, Zheng X Z, *et al.* Highly unsaturated fatty acid synthesis in Atlantic salmon: characterization of ELOVL5- and ELOVL2-like elongases[J]. *Marine Biotechnology*, 2009, 11(5): 627-639.
- [20] Hashimoto K, Yoshizawa A C, Okuda S, *et al.* The repertoire of desaturases and elongases reveals fatty acid variations in 56 eukaryotic genomes[J]. *Journal of Lipid Research*, 2008, 49(1): 183-191.
- [21] Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, *et al.* Crucial role of a long-chain fatty acid elongase, Elovl6, in obesity-induced insulin resistance[J]. *Nature Medicine*, 2007, 13(10): 1193-1202.
- [22] Carmona-Antoñanzas G, Monroig Ó, Dick J R, *et al.* Biosynthesis of very long-chain fatty acids ($C > 24$) in Atlantic salmon: cloning, functional characterization, and tissue distribution of an Elovl4 elongase[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 159(2): 122-129.
- [23] 成永旭, 堵南山, 赖伟. 不同阶段中华绒螯蟹肝胰腺的

- 脂类及脂肪酸组成[J]. 动物学报, 1998, 44(4): 420-429.
- Cheng Y X, Du N S, Lai W. Lipid composition in hepatopancreas of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* at different stages[J]. Acta Zoologica Sinica, 1998, 44(4): 420-429 (in Chinese).
- [24] Tocher D R, Bell J G, Dick J R, *et al.* Fatty acyl desaturation in isolated hepatocytes from Atlantic salmon (*Salmo salar*): stimulation by dietary borage oil containing γ -linolenic acid[J]. Lipids, 1997, 32(12): 1237-1247.
- [25] Zheng X Z, Tocher D R, Dickson C A, *et al.* Highly unsaturated fatty acid synthesis in vertebrates: new insights with the cloning and characterization of a $\Delta 6$ desaturase of Atlantic salmon[J]. Lipids, 2005, 40(1): 13-24.
- [26] Sunaga H, Matsui H, Ueno M, *et al.* Deranged fatty acid composition causes pulmonary fibrosis in *ELOVL6*-deficient mice[J]. Nature Communications, 2013, 4(10): 2563.
- [27] Green C D, Olson L K. Modulation of palmitate-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in pancreatic β -cells by stearoyl-CoA desaturase and Elov16[J]. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2011, 300(4): e640-e649.

Full-length cDNA cloning of *ELOVL6* and its tentative study in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)

SHI Qiuyan, YANG Zhigang*, YAO Qinqin, CHENG Yongxu, YANG Qing, WEI Banghong

(Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: We cloned full length cDNA of *ELOVL6* gene (GenBank accession KT779219) in *Eriocheir sinensis* using genetic homology and RACE methods. The full sequence was 2247 bp, including of 235, 873 and 1139 bp of 5'-URT, ORF and 3'-URT. *ELOVL6* gene specified a protein of 290 amino acids which got all of *ELOVL* features: six transmembrane-spanning regions, one diagnostic histidine box HXXHH motif, several conservative regions and ER retention signal KKKXX. The phylogenetic tree established by the Neighbor Joining method showed that *ELOVL2* is clustered closely with *ELOVL5* and *ELOVL6* is clustered by itself. At the same time, *ELOVL6* of Chinese mitten crab is the closest to the *ELOVL6* of *Litopenaeus vannamei*. Its biochemical function characterized by heterologous expression showed that it caused reduction of C16:0 and C16:1n-7 and increase of C18:0 and C18:1n-9, while produced new product C18:1n-7. Relative gene expression levels of *ELOVL6* mRNA in nine tissues and three kinds of different lipids formula feed by quantitative real-time PCR. The results suggested that *ELOVL* gene was expressed in all of these tissues and it was highest in the hepatopancreas, while lower in the cranial ganglia and thoracic ganglia, and trace in the other tissues. Real-time Q-PCR also revealed that on one side, levels were expressed in hepatopancreas, ovary, transcripts and muscle, on the other side, levels were highest in the hepatopancreas when fed the SO diet compared with the FO diet and FO/SO diet. The results above showed that *E. sinensis* *ELOVL6* could catalyze the production of C16 long-chain fatty acids including both saturated and monounsaturated fatty acids which laid a base for PUFA biosynthesis and its function was influenced by different levels of lipids. Thus, it provided a foundation for fatty acids biosynthetic pathway and its regulation mechanism.

Key words: *Eriocheir sinensis*; *ELOVL6*; gene cloning; heterologous expression; tissue expression

Corresponding author: YANG Zhigang. E-mail: zg yang@shou.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31472287); National High Technology R & D Program of China (863 program) (2012AA10A409-5); Shanghai Collaborative Innovation Center for Aquatic Animal Genetics and Breeding (ZF1206); Science and Technology Cooperation Project between Hong Kong, Macao and Taiwan from Ministry of Science and Technology (2014DFT30270); the Excellent Academic Leaders of Shanghai (12XD1402700); Shanghai Agriculture Science and Technology Key grant (2013D5-7)