

团头鲂 *SREBP-1* 基因的克隆及其表达分析

吴文新 曹 赞 王 凡 徐 佳 王卫民 赵玉华

华中农业大学水产学院/农业农村部淡水生物繁育重点实验室/
农业动物遗传育种与繁育教育部重点实验室/
池塘健康养殖湖北省工程实验室,武汉 430070

摘要 为阐明团头鲂 *SREBP-1* 的功能,采用 RT-PCR 技术克隆获得 *SREBP-1* 基因的 cDNA 序列,利用荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 *SREBP-1* 基因在不同发育时期及不同组织中的表达情况。生物信息学分析发现,*SREBP-1* 基因 cDNA 的编码序列(coding sequence,CDS)为 3 426 bp(GenBank 登录号:MH633449),开放阅读框(ORF)编码 1 141 个氨基酸,与大西洋鲑、斑马鱼、草鱼、鲤、金线鲃 *SREBP-1* 的氨基酸序列相似性较高(74%~99%)。保守结构域分析显示,团头鲂 *SREBP-1* 蛋白具有 *SREBP*s 家族典型的“碱性螺旋-环-螺旋-亮氨酸拉链”(bHLH-Zip)结构域。表达分析结果显示, *SREBP-1* 基因在团头鲂胚胎发育过程中的表达呈现先下降后增高的趋势,在眼囊期最低,至出膜期达到最高。在团头鲂幼鱼中, *SREBP-1* 在脑组织中的表达量最高,其次是眼、肝脏、心脏、肌肉、脂肪组织、肾脏、鳃中表达量最低。在成鱼中, *SREBP-1* 在脑组织表达量最高,其次是性腺组织、肌肉、肝脏、眼、肾脏、脾脏和心脏中的表达量较低。以上结果表明, *SREBP-1* 基因在团头鲂幼鱼和成鱼的不同组织中的表达模式存在差异。

关键词 团头鲂; 固醇调节元件结合蛋白-1; 克隆; 表达

中图分类号 S 917 : Q 959.46⁺8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)02-0009-08

固醇调节元件结合蛋白(sterol regulatory element binding proteins, *SREBP*s)是一类含有高度保守结构域的核转录因子,在生物体内参与调控脂肪酸、胆固醇和甘油三酯合成与吸收,对脂质稳态的维持发挥着重要作用^[1-5]。目前已知 *SREBP-1a*、*SREBP-1c* 和 *SREBP-2* 是 *SREBP*s 家族的 3 个亚型,其中 *SREBP-1a* 和 *SREBP-1c* 是由同一个基因(*SREBP-1*)编码、由不同启动子控制、转录起始位点不同而产生的不同剪切体。此家族不同亚型的前体均由 3 部分组成,即转录激活区/N 端区(约 480 个氨基酸组成,包括 1 个富含脯氨酸、丝氨酸的区域和 1 个“碱性螺旋-环-螺旋-亮氨酸拉链”(basic helix-loop-helix leucine zipper, bHLH-Zip)的区域)、疏水区跨膜区(约 80 个氨基酸组成,由内质网腔内的氨基酸形成的环结构链接 2 个疏水跨膜结构组成)和 C 端调节区(约 590 个氨基酸组成)^[6]。*SREBP-1a* 参与脂类合成的全局性代谢调控,而 *SREBP-1c* 主要参与调控脂肪酸与甘油三酯的合

成, *SREBP-2* 则主要参与胆固醇的代谢调控,但三者的功能存在一定程度的重叠^[1-2,5]。目前,关于鱼类 *SREBP*s 的相关研究仍比较少,涉及到的鱼类也仅有少数几种。已获得 *SREBP-1* 基因序列的有斑马鱼^[7]、大西洋鲑^[8]、黄斑蓝子鱼^[9]、草鱼^[10]、红鳍东方鲂^[11]等,但关于团头鲂 *SREBP*s 的研究尚未见报道。

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*),俗称武昌鱼,肉质细嫩鲜美、含肉率高、体形好、规格适中,而且其食性广、成本低、生长快、成活率高、易捕捞,能在池塘中产卵繁殖,从 20 世纪 60 年代就被作为优良的草食性鱼类在全国普遍推广,现已成为我国主要淡水水产养殖品种之一^[12]。

本研究利用 RT-PCR 方法克隆了团头鲂 *SREBP-1* 基因的 cDNA,并利用 real-time PCR 技术分析了 *SREBP-1* 基因在不同发育阶段、不同组织的表达规律,旨在为深入研究鱼类 *SREBP*s 调控脂代谢的分子机制奠定基础。

收稿日期: 2018-07-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31401976)

吴文新,硕士研究生. 研究方向: 水产动物营养与饲料. E-mail: 1056209020@qq.com

通信作者: 赵玉华,博士,副教授. 研究方向: 水产动物营养与饲料. E-mail: zhaoyuhua2005@mail.hzau.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 试验鱼及样品采集

本试验所用团头鲂购自湖北省武汉市华中农业大学水产基地,幼鱼长 4 cm 左右,试验取样以 6~8 条幼鱼为 1 组,成鱼约 450~650 g,于实验室内解剖后分别取出肝脏、脾脏、心脏、脑、肾脏、肌肉、肠、性腺、眼等组织,组织取得后放入液氮中速冻,待全部组织采集后将其保存于-80 °C 冰箱待用。

1.2 总 RNA 提取及反转录

总 RNA 的提取采用 Trizol 法,取 0.1 g 左右备用组织样品,加入 1 mL 的 Trizol 试剂(南京诺唯赞生物科技有限公司),用组织匀浆机进行匀质,提取总 RNA。采用电泳检测 RNA 的完整性,分光光度计测定其浓度,符合要求的用于后续反转录反应。

反转录反应按照 HiScript II Q Select RT SuperMix for qPCR 反转录试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司)操作说明进行,合成 cDNA 第一链,反转录成功后的 cDNA 保存在-20 °C 冰箱备用。

1.3 团头鲂 SREBP-1 基因 cDNA 序列克隆

在 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中搜索获得草鱼、斑马鱼、大西洋鲑、红鳍东方鲀、黄斑篮子鱼等的 SREBP-1 的碱基序列和氨基酸序列,利用 DNASTAR 软件中的 Megalign 进行对比分析找出保守性相对较强的区域,利用 Prim-

er 5.0 生物软件设计引物,共 6 对特异性引物(表 1),其中引物 2、3、4 参考草鱼 SREBP-1 的克隆^[10]。

以反转录合成的 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增反应,分段克隆团头鲂 SREBP-1 基因。将获得的各段序列用 DNASTAR 软件中的 SeqMan 进行拼接,获得 SREBP-1 基因 cDNA 的编码序列(coding sequence, CDS)。

1.4 团头鲂 SREBP-1 基因生物信息学分析

利用 NCBI 中的 ORFfinder 在线软件(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)分析所获得的 SREBP-1 基因序列寻找开放阅读框;利用 ProtParam 软件(<https://web.expasy.org/prot-param/>)预测编码蛋白质的等电点、疏水性等理化性质;利用 NCBI 的 Conserved Domains 工具分析测序所得的团头鲂 SREBP-1 氨基酸序列,寻找其保守区域;利用 Clustal W 软件,比较所获得的团头鲂 SREBP-1 的氨基酸序列与大西洋鲑(*Salmo salar*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、鲤(*Cyprinus carpio*)和金线鲃(*Sinocyclocheilus grahami*)5 种鲤科鱼类的 SREBP-1 的氨基酸序列的同源性;利用 MEGA6.0 软件对团头鲂及其他 16 个物种的 SREBP-1 的氨基酸序列(序列均来自 GenBank)进行系统进化分析,采用邻接法(neighbor-joining, NJ)构建进化树。

表 1 团头鲂 SREBP-1 基因克隆与表达引物

Table 1 Primers for cloning and expression of SREBP-1 from *M. amblycephala*

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequences(5'→3')	用途 Usage	片段长度/ bp Product length	退火温度/°C Temperature
SREBP-1	F:GAGCAAGTCTCTGAAGGATCTGGT R:CCTCATCCACAAAGAAGCGGTG	片段扩增 Amplification	1 064	53.3
SREBP-2	F:TGAGTGCTGGGACTTGAATAC R:GCAAGAGAGAGTCTGCCTTAAT	片段扩增 Amplification	893	50.6
SREBP-3	F:CGTCTGCTTCACTTCACTACTC R:GAGCTGGTAGTTCTCAGGTTTG	片段扩增 Amplification	620	50.5
SREBP-4	F:CAGTGGCCGTGGTGATAAT R:CACTCCTCTGTTCTGCTTCC	片段扩增 Amplification	570	50.2
SREBP-5	F:TCCACCCCTCCACTTTCC R:GCTCTTGCGGGCATCTTC	片段扩增 Amplification	1 657	56.6
SREBP-6	F:CTCCAGGGCGATGATGTG R:ATCCAGACGATAACAGGTAAGTAGG	片段扩增 Amplification	1 281	54.7
SREBP-1Q	F:TGGCGTGTGCTATCT R:TGTTGGCAGTCGTGGA	qRT-PCR	124	60.0
18S-Q	F:CGGAGTTCGAAGACGATCA R:GGGTCGCATCGTTTACG	qRT-PCR	313	60.0

1.5 团头鲂 SREBP-1 基因的时空表达分析

采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR),以

18S RNA 为内参基因,检测 SREBP-1 基因在团头鲂胚胎受精卵、原肠中期、胚孔闭合期、眼囊期、尾芽

期、出膜前期、出膜期 7 个发育时期和幼鱼的肌肉肝脏、心脏、脑、肾、鳃、脂肪、眼等 8 个组织中及成鱼的眼、肝脏、脾脏、心、脑、肾、肌肉、肠道、性腺 9 个组织中的相对表达量。胚胎组以受精卵时期为对照组, 幼鱼组以肌肉为对照组, 成鱼组以眼为对照组。

反应为 20 μ L 体系: 上下游引物各 0.4 μ L, cDNA 模板 2 μ L, SYBR[®] Green Real-Time PCR Master Mix 10 μ L, 去离子水 7.2 μ L, 模板为 10 倍稀释的 cDNA。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环。每个处理重复 3 次。荧光定量 PCR 反应在罗氏 LightCycler96 实时荧光定量 PCR 仪 (Roche, USA) 上进行。SREBP-1 及 18S RNA 基因实时定量引物见表 1。

1.6 数据分析

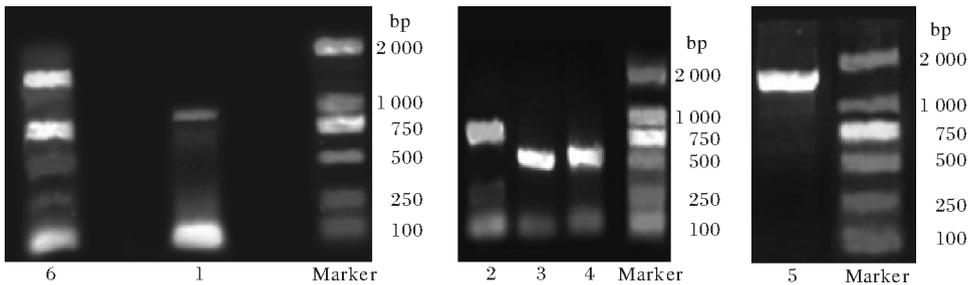
采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算每个基因的相对表达量。利用 SPSS16.0 进行单因素方差分析 (One-Way

ANOVA) 和 Duncan's 多重比较确定各试验组间差异的显著性。其中 $P < 0.01$ 表示极显著差异, $P < 0.05$ 表示差异显著。结果以平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示。

2 结果与分析

2.1 团头鲂 SREBP-1 基因的克隆

以团头鲂肝组织 cDNA 为模板, 分别用表 1 中的 6 对引物进行 PCR, 获得 SREBP-1 基因 PCR 产物, 6 条扩增条带的位置都和预期的片段大小一致 (图 1)。利用 NCBI 中的 Blast 在线软件对测序所得的团头鲂 SREBP-1 基因片段进行序列比对, 以判断是否是目的基因。比对结果表明, 各 PCR 产物的测序序列均属于 SREBP-1 基因, 并且与鲤科鱼类的 SREBP-1 基因高度相似。用 DNASTAR 软件中的 SeqMan 进行拼接, 获得 1 条长度为 3 246 bp 的 cDNA 序列 (GenBank 登录号: MH633449)。



M: 分子质量标准 Marker; 1~6: SREBP-1 PCR 扩增片段 Amplification products of SREBP-1.

图 1 团头鲂 SREBP-1 基因的克隆

Fig.1 Cloning of SREBP-1 gene from *M. amblycephala*

2.2 团头鲂 SREBP-1 基因的生物信息学分析

团头鲂 SREBP-1 基因的 CDS 序列长度为 3 426 bp, 共编码 1 141 个氨基酸。根据 ProtParam 推导预测, 团头鲂的 SREBP-1 分子包括非极性疏水性氨基酸 509 个, 极性氨基酸 410 个, 碱性氨基酸为 128 个, 酸性氨基酸为 94 个, 其相对分子质量 123 743.22, 理论 pI 值 8.27, 不稳定系数为 57.66, 是不稳定性蛋白, 脂溶指数 85.98, 属脂溶性蛋白。

利用 NCBI 的 Conserved Domains 工具分析团头鲂 SREBP-1 的氨基酸序列, 寻找团头鲂 SREBP-1 蛋白的保守区域 (图 2)。与斑马鱼、草鱼等的 SREBP-1 蛋白相似, 它在 354~404 aa 具有 1 个典型的 bHLH-zip 结构。比对不同鱼类 SREBP-1 的 bHLH-zip 结构域, 发现团头鲂的 bHLH-zip 与其他物种的相似度很高 (图 3), 这也再次证实 bHLH-zip 结构是一个进化比较保守的区域。

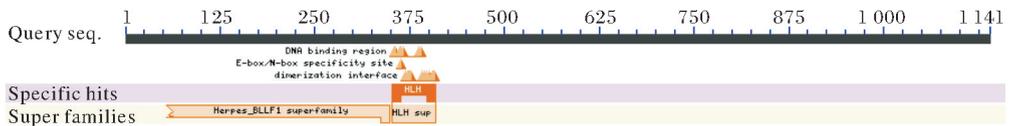


图 2 团头鲂 SREBP-1 保守结构预测

Fig.2 Conserved structure domain prediction of *M. amblycephala* SREBP-1



* 表示氨基酸残基相同,黑色背景部分表示 bHLH-zip 结构域 * indicates the same amino acid in all species, bHLH-zip area is represented by a black background. 金线鲃 *Sinocyclocheilus grahami* (XP_016094027.1), 鲤 *Cyprinus carpio* (XP_018928861.1), 草鱼 *Ctenopharyngodon idella* (AIZ50708.1), 斑马鱼 *Danio rerio* (NP_001098599.1), 大西洋鲑 *Salmo salar* (NP_001182747.1).

图 3 团头鲂与其他鱼类 SREBP-1 氨基酸序列比对

Fig.3 Amino acid sequence alignment of SREBP-1 within *M. amblycephala* and other fishes

利用 Clustal W 软件,将测序所得的团头鲂 SREBP-1 的氨基酸序列与大西洋鲑、斑马鱼、草鱼、鲤、金线鲃等 5 种鲤科鱼类的 SREBP-1 的氨基酸序列进行同源性比较,发现团头鲂与草鱼的同源性最高,达 99%;与鲤、金线鲃同源性相同,都是 94%;而与斑马鱼、大西洋鲑同源性较低,分别为 84%、74%,见图 3。将团头鲂 SREBP-1 的 bHLH-zip 结构区域的氨基酸序列进行相同的比对后发现,这 6 个物种 SREBP-1 bHLH-zip 区域的保守性都非常高(图 3),其中团头鲂与草鱼的同源性最高,达 100%,与鲤、金线鲃同源性相同,都是 99%,与斑马鱼、大西洋鲑同源性较高,分别为 96%、92%。

利用 MEGA6.0 软件对团头鲂及其他 16 个物种的 SREBP-1 的氨基酸序列进行系统进化分析,用邻接法(neighbor-joining, NJ)构建进化树,结果如图 4 所示。从图 4 中可以看出,鱼类单独地为一分支,鸟类、两栖类和哺乳类为一支。团头鲂与其他 4 种鲤科鱼类 SREBP-1 的系统进化关系较近,其中与草鱼最近,聚在一起,其次是鲤和金线鲃,斑马鱼相对较远,符合氨基酸同源性的比对结果,也与传统分类学的进化关系相一致。

2.3 团头鲂 SREBP-1 基因的时空表达特性

1)团头鲂不同胚胎时期 SREBP-1 基因表达情

况。采用实时荧光定量 PCR 检测了 SREBP-1 在团头鲂胚胎受精卵、原肠中期、胚孔闭合期、眼囊期、尾芽期、出膜前期、出膜期 7 个发育时期的表达情况,结果如图 5 所示。

在图 5 中, SREBP-1 表达趋势是先下降后增高,在受精卵时期、原肠中期、胚孔闭合期、眼囊期依次下降,其中眼囊期最低,且显著低于受精卵时期的表达量($P < 0.05$);随后在尾芽期、出膜前期、出膜期时升高,在出膜期达到最高,是受精卵时期 SREBP-1 表达量的 3.8 倍左右,且显著高于受精卵、原肠中期、胚孔闭合期、眼囊期及尾芽期的表达量($P < 0.05$)。

2)团头鲂幼鱼不同组织 SREBP-1 基因表达情况。通过实时荧光定量 PCR 检测了 SREBP-1 在团头鲂幼鱼(体质量 4 g 左右)肌肉、肝脏、心脏、脑、肾、鳃、脂肪、眼 8 个组织的表达情况,如图 6 所示。

结果显示:团头鲂幼鱼期, SREBP-1 在脑组织中表达量最高,是肌肉组织的 18 倍左右,且与其他各组织差异均显著($P < 0.05$);其次是眼组织,是肌肉组织的 10 倍左右,显著高于除脑之外其他各组织($P < 0.05$);肝脏和心脏中的表达量下降,是肌肉组织的 5 倍左右;而在肾脏和脂肪组织中表达量更低,在鳃中表达量最少。

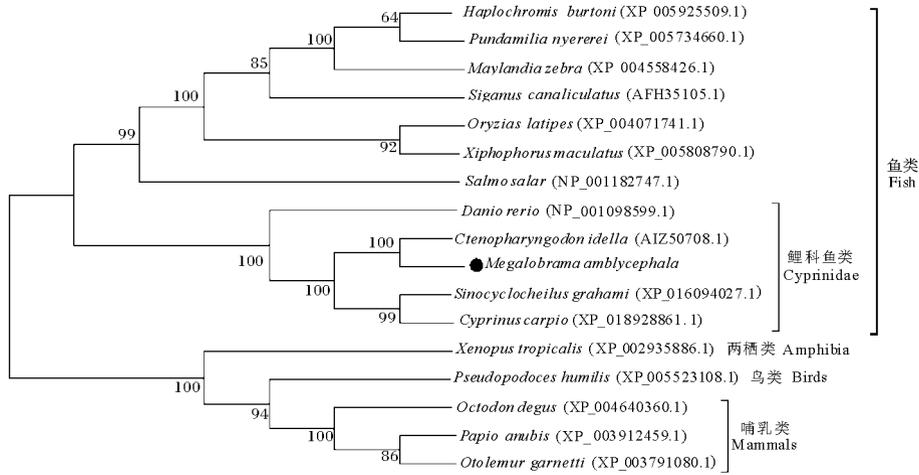
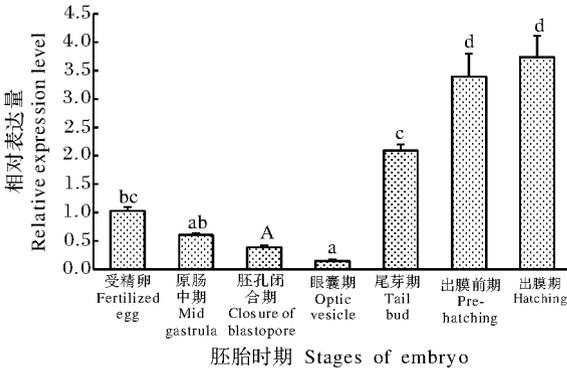


图 4 团头鲂和其他脊椎动物 SREBP-1 氨基酸序列的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of SREBP-1 of *M. amblycephala* and other vertebrates



柱间字母不同表示差异显著。下同。Values with different letters between columns mean significant difference. The same as below.

图 5 SREBP-1 mRNA 在团头鲂不同胚胎时期相对表达量

Fig.5 The relative expression level of SREBP-1 in different stage of embryo of *M. amblycephala*

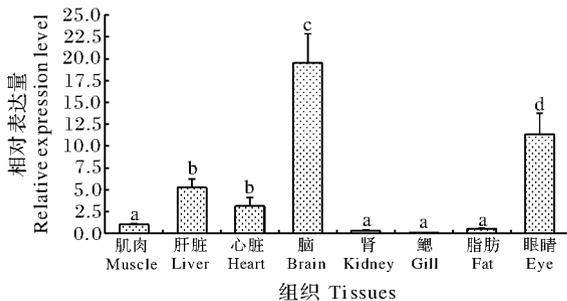


图 6 SREBP-1 mRNA 在团头鲂幼鱼不同组织相对表达量

Fig.6 The relative expression level of SREBP-1 in different tissues of juvenile *M. amblycephala*

鲂成鱼的眼、肝脏、脾脏、心、脑、肾、肌肉、肠道、性腺 9 个组织的表达情况,结果如图 7 所示。

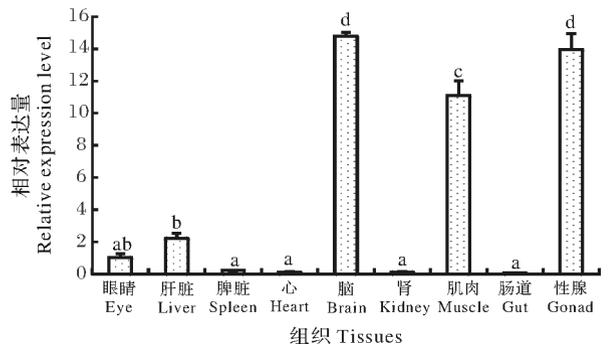


图 7 SREBP-1 mRNA 在团头鲂成鱼不同组织相对表达量

Fig.7 The relative expression level of SREBP-1 in different tissues of adult *M. amblycephala*

试验结果显示,团头鲂 SREBP-1 在成鱼的脑组织表达量最高,是眼组织的 15 倍左右;性腺组织其次,是眼组织的 14 倍左右,且二者均显著高于眼、肝脏、脾脏、心、肾、肌肉、肠道等组织的表达量(P < 0.05);肌肉组织中表达量是眼睛组织的 11 倍左右;之后是肝脏,表达量是眼睛组织的 2.1 倍左右;在肾脏和脾脏组织中表达量更低,心脏中表达量最少。

3 讨论

3.1 团头鲂 SREBP-1 基因的序列结构特性

SREBP-1 通过对内源性胆固醇、脂肪酸、甘油三酯和磷脂合成酶基因转录的调控进而调节这些酶的活性,对维持体内脂类的动态平衡发挥着极其重要的作用。SREBP-1 及其靶基因的异常表达能够

3) 团头鲂成鱼不同组织 SREBP-1 基因表达情况。利用荧光定量 PCR 检测了 SREBP-1 在团头

导致糖脂代谢的紊乱,进而导致脂肪在非脂肪组织中过度积聚,从而导致肥胖、胰岛素抵抗、II 型糖尿病和脂肪肝等一系列代谢性疾病^[11-15]。目前,已获得 *SREBP-1* 基因序列的生物有人、大鼠、小鼠、鸡、猪、山羊、鹅、牛等^[16-21],对其功能和作用机制也有比较深入的研究。在水产动物中,获得的 *SREBP-1* 基因序列除了前面几种鱼类外^[7-11],还有华贵栉孔扇贝等^[22],但其功能及作用机制均有待进一步的深入研究。

本研究根据已有几种鱼类的 *SREBP-1* 基因序列,设计引物,扩增得到了团头鲂 *SREBP-1* 基因 cDNA 的 CDS 序列,其长度为 3 426 bp,共编码 1 141 个氨基酸。对其氨基酸序列进行分析发现,团头鲂 *SREBP-1* 具有 *SREBPs* 家族典型的 bHLH-zip 结构域,该结构域赋予了 *SREBPs* 转录因子的 DNA 结合能力,*SREBPs* 的 DNA 结合能力和同源二聚化作用对于其调控脂代谢的功能是必需的^[23]。在获得的团头鲂 *SREBP-1* 中,发现存在 bHLH-zip 结构域,可以推测其具有转录因子功能。*SREBP-1* 氨基酸序列同源性比较表明,团头鲂与大西洋鲑、斑马鱼、草鱼、鲤及金钱鲃同源性很高,其中与草鱼 *SREBP-1* 的同源性达到 99%,与鲤、金钱鲃的同源性也达到了 94%。对其中的 bHLH-zip 结构域进行同源性分析,团头鲂与草鱼的序列完全一致,同源性为 100%,与鲤、金钱鲃同源性均达到 99%。上述分析证实获得的团头鲂 *SREBP-1* 基因是其他鱼类 *SREBP-1* 基因的同源基因,推测其具有调控脂类合成的功能,也再次证实了 bHLH-zip 结构域在各物种中的高度保守性。

人和其他哺乳动物的 *SREBP-1* 包含 2 个亚型: *SREBP-1a* 和 *SREBP-1c*。2 个亚型具有完全不同的转录起始位点,导致 *SREBP-1a* 及 *SREBP-1c* 具有不同的第一外显子。人类的 *SREBP-1a* 与 *SREBP-1c* 除第一外显子和最后一个外显子以外的区域均相同,而它们的差异主要集中在氨基末端区域^[16]。鱼类中是否也存在 *SREBP-1* 的不同亚型,尚无充分的证据,有待进一步研究。

3.2 团头鲂 *SREBP-1* 基因的表达特性

对团头鲂不同胚胎发育阶段 *SREBPs* 的差异性表达研究目前几乎未见报道。本试验利用荧光定量 PCR 方法检测了团头鲂 *SREBP-1* 基因分别在受精卵、原肠中期、胚孔闭合期、眼囊期、尾芽期、出膜前期、出膜期(1/3 出膜)各阶段的表达情况。结

果显示, *SREBP-1* 在团头鲂胚胎时期表达趋势是先下降后增高,即在受精卵、原肠中期、胚孔闭合期、眼囊期这几个时期依次下降,其中眼囊期最低,在尾芽期、出膜前期、出膜期这几个时期依次升高,在出膜时达到最高。本试验中, *SREBP-1* 在受精卵期间有一定的表达,而且在团头鲂成鱼性腺组织中高表达,因此,可以推测细胞还没分化时 *SREBP-1* 就已经有一定的转录水平,该基因是母源性表达。在鱼类胚胎发育阶段,需要依靠内源营养进行必要的生理活动,其中脂类在鱼类的胚胎发育过程中起着十分重要的作用,既是重要的供能物质,也是脑、视网膜等器官的重要组成部分。因此,必然伴随着相当数量的脂类合成与分解代谢活动,因而也必然涉及到脂类代谢调控因子的表达水平变化。*SREBP-1* 基因在胚胎发育期的表达水平的变化正体现了这一点。研究发现,瓯江彩鲤胚胎发育过程中总脂含量逐渐降低,其中磷脂含量随胚胎发育进程明显下降,而中性脂肪含量趋于稳定^[24]。另一项研究也发现,普安银鲫胚胎不同发育时期的总脂含量随着胚胎的不断发育而降低,胚胎对不同脂肪酸的利用率因胚胎发育时期的不同而有差异,饱和脂肪酸在囊胚期与出膜前期升高,其他时期均表现为不同程度的降低;单不饱和脂肪酸呈波浪式上升趋势;高不饱和脂肪酸呈波浪式降低趋势,但原肠胚期到肌肉效应期高不饱和脂肪酸不断升高,到出膜前期有所下降^[25]。同样利用普安银鲫进行的研究显示,乙酰辅酶 A 羧化酶 α 、脂肪酸合成酶、脂蛋白脂酶和肝脂酶等 4 种脂代谢酶基因随胚胎发育而表达上升^[26]。这表明鱼类胚胎发育期脂类的代谢是活跃而复杂的,其过程可能随鱼的品种、配子的质量乃至发育环境条件的不同而有所不同。鱼类胚胎发育期对脂类的利用、脂代谢相关基因的表达等具体的变化规律、调控机制仍有待深入研究。

SREBP-1 基因广泛表达于各个组织中,但表达水平具有组织差异性。Assaf 等^[27]发现在鸡的各个组织中, *SREBP-1* 基因在肝脏以及尾脂腺中表达很高,其中该基因在尾脂腺表达量最高,而在鸡的其他组织比如脂肪组织、肌肉、心脏、肾、脾、肠、大脑等组织中表达量低。水牛 *SREBP-1* 基因在乳腺组织中表达量最高,其次是胰脏、肺、上皮、子宫、小肠、瓣胃、皱胃、大肠、卵巢、脑、肾、瘤胃、心、脾、淋巴、肝脏,在肌肉组织中的表达量最低^[21]。刘芳^[9]对黄斑篮子鱼进行组织表达分析时显示, *SREBP-1* 在脑、

眼和肠组织中的表达水平比较高,其中在脑组织中表达最高;在心脏、肝脏、脾、鳃、肌肉组织中也有表达,但表达水平不高。Minghetti等^[8]在大西洋鲑中发现,*SREBP-1*基因在肠组织中的表达水平最高,其次是脑、鳃、肝脏等组织,在心脏、肾脏、红肌、白肌等组织中的表达量很低。草鱼 *SREBP-1* 基因在脑中的表达量最高,其次是肝脏和肠,在肾脏、脾脏、肌肉、脂肪和性腺中均有表达,但表达量较低^[10]。在红鳍东方鲀中,*SREBP-1*基因在脑组织中表达丰度最高,其次为眼、脂肪组织、肠、鳃、脾脏、心脏及肝脏,在肌肉中表达丰度最低^[11]。

动物体内脂肪生成的主要部位是肝脏和脂肪组织,因此,这两个部位是 *SREBP-1* 基因的主要表达位点。大脑代谢活动旺盛,消耗大量的能量,*SREBP-1*基因表达水平也较高。众多的研究及本试验结果基本支持了这一论点,但不同种类动物也有各自的特点。如本研究中,*SREBP-1*基因在团头鲂幼鱼脂肪组织中的表达水平并不高;在成鱼中,肌肉组织中的表达水平相当高,仅次于脑组织,幼鱼与成鱼的表达模式不完全一致,与其他动物也有所不同。可见,*SREBP-1*基因的表达不仅具有组织差异性,同时具有时间差异性和物种差异性。

参 考 文 献

- [1] SHAO W, ESPENSHADE P J. Expanding roles for SREBP in metabolism [J]. *Cell-metabolism*, 2012, 16(4): 414-419.
- [2] SHIMANO H, SATO R. SREBP-regulated lipid metabolism: convergent physiology- divergent pathophysiology [J]. *Nature reviews endocrinology*, 2017, 13(12): 710-730.
- [3] DEBOSE-BOYD R A, YE J. SREBPs in lipid metabolism, insulin signaling, and beyond [J]. *Trends in biochemical sciences*, 2018, 43(5): 358-368.
- [4] EBERLE D, HEGARTY B, BOSSARD P, et al. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis [J]. *Biochimie*, 2004, 86(11): 839-848.
- [5] JEON T, OSBOME T F. SREBPs: metabolic integrators in physiology and metabolism [J]. *Trends in endocrinology and metabolism*, 2012, 23(2): 65-72.
- [6] BROWN M S, GOLDSTEIN J L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor [J]. *Cell*, 1997, 89(3): 331-340.
- [7] WANG Y, CHEN K, YAO Q, et al. Phylogenetic analysis of zebrafish basic helix-loop-helix transcription factors [J]. *Journal of molecular evolution*, 2009, 68(6): 629-640.
- [8] MINGHETTI M, LEAVER M J, TOUCHER D R. Transcriptional control mechanisms of genes of lipid and fatty acid metabolism in the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) established cell line, SHK-1 [J]. *Biochimica et biophysica acta (BBA) - molecular and cell biology of lipids*, 2011, 1811(3): 194-202.
- [9] 刘芳. 黄斑蓝子鱼固醇调节元件结合蛋白-1 基因克隆及表达研究[D]. 汕头: 汕头大学, 2011.
- [10] 孙君君, 卢荣华, 杨峰, 等. 草鱼 *SREBP-1* 基因的克隆及糖对其在肝脏中表达的影响[J]. *水产学报*, 2014, 38(8): 1057-1067.
- [11] 张伟, 姬明丽, 郭前进, 等. 红鳍东方鲀 *SREBP-1* 和 *SREBP-2* 基因克隆及表达分析[J]. *华北农学报*, 2016, 31(4): 74-79.
- [12] 王卫民. 团头鲂养殖产业现状[J]. *科学养鱼*, 2009(4): 44-45.
- [13] 汤晓丽, 邓立彬, 林加日, 等. 固醇调节元件结合蛋白 1 及其靶基因网络[J]. *遗传*, 2013, 35(5): 607-615.
- [14] XIAO X, SONG B L. SREBP: a novel therapeutic target [J]. *Acta biochimica et biophysica sinica*, 2013, 45(1): 2-10.
- [15] SOYAL S M, NOFZIGER C, DOSSENA S, et al. Targeting SREBPs for treatment of the metabolic syndrome [J]. *Trends in pharmacological sciences*, 2015, 36(6): 406-416.
- [16] SHIMOMURA I, SHIMANO H, HORTON J D, et al. Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells [J]. *The journal of clinical investigation*, 1997, 99(5): 838-845.
- [17] KHESHT F A, HASSANABADI A. Effects of sterol regulatory element-binding protein (SREBP) in chickens [J]. *Lipids in health and disease*, 2012, 11: 20. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-11-20>.
- [18] 聂涛. 猪 SREBPs 和 CREB-1 基因的克隆、染色体定位及其功能研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2005.
- [19] 杨云超. 山羊 *SREBP1-1a*、*SREBP1-1c* 基因的鉴定及功能初步研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.
- [20] 付常振, 管林森, 王虹, 等. 秦川牛 *SREBP1* 基因重组腺病毒载体的构建与病毒包装[J]. *畜牧兽医学报*, 2013, 44(8): 1323-1329.
- [21] 廖碧云. 水牛 *SCAP* 和 *SREBP-1* 基因的克隆、表达规律和多态性检测研究[D]. 南宁: 广西大学, 2015.
- [22] LIU H L, ZHANG H K, ZHENG H P. Regulatory roles of sterol regulatory element-binding protein (SREBP) on lipid metabolism in marine invertebrate *Chlamys nobilis* [J]. *Aquaculture*, 2018, 493: 251-257.
- [23] JONES S. An overview of the basic helix-loop-helix proteins [J]. *Genome biology*, 2004, 5(6): 226. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-6-226>.
- [24] 何登菊, 姚俊杰, 赵云龙, 等. 瓯江彩鲤胚胎发育过程中脂、蛋白及碳水化合物水平的变化[J]. *动物学杂志*, 2011, 46(2): 102-107.
- [25] 牟洪民, 马珊, 姚俊杰, 等. 普安银鲫胚胎发育早期的总脂与脂肪酸变化[J]. *西南农业学报*, 2012, 25(5): 1925-1928.
- [26] 蒋左玉, 熊锋龙, 姚俊杰, 等. 普安银鲫胚胎发育中脂质代谢酶基因的表达及葡萄糖的影响[J]. *水产科学*, 2017, 36(3): 359-363.
- [27] ASSAF S, HAZAR D, PITEL F, et al. Cloning of cDNA enco-

ding the nuclear form of chicken sterol response element binding protein-2 (SREBP-2), chromosomal localization, and tissue

expression of chicken SREBP-1 and -2 genes [J]. Poultry science, 2003, 82(1): 54-61.

Cloning and expression of *SREBP-1* gene in *Megalobrama amblycephala*

WU Wenxin CAO Zan WANG Fan XU Jia WANG Weimin ZHAO Yuhua

College of Fisheries, Huazhong Agricultural University/Key Lab of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/
Key Lab of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Ministry of Education/Hubei Provincial Engineering Laboratory for Pond Aquaculture, Wuhan 430070, China

Abstract This study was conducted to investigate the function of the *SREBP-1* gene in *Megalobrama amblycephala*. The *SREBP-1* gene was cloned by RT-PCR, and its expression were analyzed using qRT-PCR. Bioinformatics analysis showed that the cDNA coding sequence (CDS) of *SREBP-1* was 3 426 bp (GenBank Accession number: MH633449), with an open reading frame (ORF) encoding 1 141 amino acids. The *M. amblycephala* *SREBP-1* protein shared high similarity (74%~99%) with *Salmo salar*, *Danio rerio*, *Ctenopharyngodon idella*, *Cyprinus carpio* and *Sinocyclocheilus grahami*. Conserved domain analysis showed that the *SREBP-1* protein has the bHLH-Zip domains, which belong to the SREBPs family. Expression analysis showed that the *SREBP-1* expression leveled was the lowest at the optic vesicle stage and highest at the hatching stage during embryonic development of *M. amblycephala*. For juvenile *M. amblycephala*, the *SREBP-1* gene expressed highest in the brain, followed by the eye, liver, heart, fat tissue, kidney and gill. For adult *M. amblycephala*, the *SREBP-1* gene expressed highest in the brain, followed by the gonad, muscle, liver, eye, while expressed relatively low in the kidney, spleen and heart. The tissue expression pattern of the *SREBP-1* gene was different between the juvenile and adult *M. amblycephala*.

Keywords *Megalobrama amblycephala*; sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1); cloning; expression

(责任编辑:边书京)