

## 草鱼 *SREBP-1* 基因的克隆及糖对其在肝脏中表达的影响

孙君君<sup>1,2</sup>, 卢荣华<sup>2</sup>, 杨 峰<sup>2</sup>, 秦超彬<sup>2</sup>, 杨丽萍<sup>2</sup>,  
王俊丽<sup>1</sup>, 孔祥会<sup>2</sup>, 李学军<sup>2</sup>, 聂国兴<sup>2\*</sup>

(1. 河南师范大学生命科学学院, 河南 新乡 453007;

2. 河南师范大学水产学院, 河南 新乡 453007)

**摘要:** 固醇调节元件结合蛋白(SREBPs)是调控糖脂代谢相关基因表达的关键核转录因子。为获知草鱼 *SREBP-1* 基因的序列及其在肝脏中的表达规律,本实验采用同源克隆和 RACE 方法获得了草鱼 *SREBP-1* 基因的部分 cDNA 序列,并通过生物信息学方法对该基因及所编码蛋白的结构特征进行了分析;采用实时荧光定量 PCR 技术,对 *SREBP-1* 基因在 8 种不同组织的表达规律及低糖(糖含量 24%)和高糖(糖含量 42%)投喂条件下肝脏中的表达水平进行了研究。结果显示,所克隆到的草鱼 *SREBP-1* 基因 cDNA 长 4 760 bp,其中包括开放读码框 3 426 bp,编码 1 141 个氨基酸;草鱼 *SREBP-1* 具有一个典型的碱性螺旋-环-螺旋亮氨酸拉链结构(bHLH-zip);氨基酸序列比对结果显示,草鱼 *SREBP-1* 与其他鱼类的同源性在 76%~88% 之间,与斑马鱼的进化关系最近;草鱼 *SREBP-1* 基因在脑中的表达量最高,肝脏和肠次之,在肾脏、脾脏、肌肉、脂肪和性腺中均有少量表达;与对照组相比,*SREBP-1* 基因在高糖诱导下表达量显著提高( $P < 0.05$ ),低糖诱导下没有显著性差异。研究表明,在高糖负荷条件下,草鱼肝脏中 *SREBP-1* 可能会促进糖的利用和转化,从而参与糖代谢调节过程,为丰富鱼类糖代谢调控机理提供研究资料,并有望为提高鱼类对饲料糖的利用效率提供理论依据。

**关键词:** 草鱼; *SREBP-1*; 组织分布; 糖代谢; 基因表达

**中图分类号:** Q 786; S 917.4

**文献标志码:** A

固醇调节元件结合蛋白(sterol regulatory element binding proteins, SREBPs)是一类膜结合型蛋白质,属于碱性螺旋-环-螺旋亮氨酸拉链(bHLH-zip)转录因子家族。在哺乳动物中发现 SREBPs 有 3 个亚型: SREBP-1a、SREBP-1c 和 SREBP-2。其中,前两者由同一个 *SREBP-1* 基因编码,而后者则由 *SREBP-2* 基因编码<sup>[1]</sup>。现已证明, SREBP-1 是哺乳动物肝脏脂肪生成基因的主要调节者,能调节脂肪酸、甘油三酯和胆固醇合成的 30 多个基因的表达<sup>[2-5]</sup>。在患糖尿病的小鼠中超表达 *SREBP-1* 可诱导肝脏中葡萄糖激酶(glucokinase, GK)和脂生成酶基因的表达,并抑制糖异生途径关键酶——磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)

的表达进而调节机体的糖脂代谢过程<sup>[6]</sup>。鱼类 *SREBP-1* 的研究尚不多见,仅在斑马鱼(*Danio rerio*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)和金头鲷(*Sparus aurata*)中研究显示 *SREBP-1* 和糖脂代谢有关,可调节脂肪酸合成或糖代谢相关基因的表达<sup>[7-10]</sup>。但 *SREBP-1* 基因的具体功能和调节糖脂代谢的机理尚不清晰。

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)是我国特有的淡水性鱼类,属于“四大家鱼”之一,生长快、肉质好,具有较高的经济价值。近几年来,随着养殖规模不断加大,生产中经常出现强化投饲、植物蛋白源替代鱼粉而导致碳水化合物含量过高以及饲料营养组成不平衡等诸多问题,从而造成肝脏代谢障碍、肝脏脂肪大量蓄积、脂肪滴增大、肝功能下降等

收稿日期:2014-04-03 修回日期:2014-05-07

资助项目:国家自然科学基金(31372545);河南省教育厅科学技术研究重点项目(14A240002)

通信作者:聂国兴, E-mail: niegx@htu.cn

症状<sup>[11-13]</sup>。提高鱼类对糖的利用可有效预防鱼类的营养代谢性疾病和节约蛋白源,因此,探讨调控草鱼糖代谢相关基因的作用,具有重要的理论价值和实践意义,并为深入了解 SREBP-1 的功能及提高鱼类对糖类的利用提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

RNA 提取试剂 RNAiso Plus、反转录试剂盒 PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit、PrimeScript RT Kit (Perfect Real Time) 和荧光定量试剂盒 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (Tli RNase Plus) 均购自 TaKaRa; Quick Gel Extraction Kit 购自北京康为世纪生物科技有限公司; PGEM-T Vector 购自 Promega 公司。

### 1.2 草鱼 SREBP-1 基因部分 cDNA 序列克隆

健康草鱼,体质量约 100 g,取自河南师范大学水产养殖基地,在实验室流水养殖系统中暂养,水交换量 1 L/min,喂食商品料,每天饲喂 3 次:8:30、13:00、17:30,平均水温为 (25 ± 1) °C, DO > 5 mg/

L,氨氮 < 0.01 mg/L,光照周期为 12L:12D。无菌条件下取肝脏,以液氮为介质,在研钵中将组织研磨成粉末状,按照 RNAiso Plus 说明书提取并纯化总 RNA。琼脂糖凝胶电泳法检测其完整性,微量分光光度计法检测其浓度和纯度。

根据 GenBank 中已报道的鲤科鱼类的 SREBP-1 cDNA 的保守序列,利用 Primer Premier 5.0 生物软件设计 5 对特异性引物(表 1),全部用于 SREBP-1 中间片段的克隆。以提取的草鱼肝脏总 RNA 为模板,按照 PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒的说明,合成第一链 cDNA。进行 PCR 扩增反应,克隆草鱼 SREBP-1 基因部分 CDS 序列。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后,将目的条带切胶回收,并采用 Quick Gel Extraction Kit 进行纯化,然后将纯化产物连接至 pGEM-T 载体,经 16 °C 连接 6 ~ 8 h 后,转染 JM109 感受态细胞,进行蓝白斑筛选。37 °C 倒置培养 10 ~ 14 h 后,挑取 6 ~ 8 个阳性菌落,用于 PCR 验证。选择阳性克隆进行测序 [英潍捷基(上海)贸易有限公司]。

表 1 本研究所用的主要引物  
Tab.1 Primers used in the study

引物名称 primer name	序列 primer sequences(5'→3')	用途 usage	产物长度/bp product length	退火温 度/°C $T_m$
SREBP-1-F1	GCAGGTTCCCTGTTTTGTTGCA	中间片段扩增	1 423	54.0
SREBP-1-R1	AAAACCAGCCTACCCCGTCTG	中间片段扩增		
SREBP-1-F2	TACCACCGTCTACACCAACT	中间片段扩增	300	50.0
SREBP-1-R2	CCTCTGGGTCATCGTTTCTTT	中间片段扩增		
SREBP-1-F3	TGAGTGCTGGGACTTGAATAC	中间片段扩增	893	47.5
SREBP-1-R3	GCAAGAGAGAGTCTGCCTTAAT	中间片段扩增		
SREBP-1-F4	CGTCTGCTTCACTTCACTACTC	中间片段扩增	621	50.0
SREBP-1-R4	GAGCTGGTAGTTCTCAGGTTTG	中间片段扩增		
SREBP-1-F5	CAGTGGCCGTGGTGATAAT	中间片段扩增	571	50.0
SREBP-1-R5	CACTCCTCTGTTCTGCTTC	中间片段扩增		
GSPP1	GCGGGAGCCAGTCCAACACGCACAC	3'-RACE	1 579	69.3
NGSPP1	CAGAACAGAGGAGTGCGAGATGCGT	3'-RACE	1 521	63.0
3'-RACE-Q(T)	CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTT	3'-RACE		
3'-RACE-Q(0)	CCAGTGAGCAGAGTGACG	3'-RACE		
3'-RACE-Q(1)	GAGGACTCGAGCTCAAGC	3'-RACE		
SREBP-1-F	GGATTGAGGTGAGCCGACAT	qRT-PCR	185	60.0
SREBP-1-R	TGAGGAAAGCCATTGACTACATT	qRT-PCR		
$\beta$ -actin F	CGTGACATCAAGGAGAAG	qRT-PCR	288	60.0
$\beta$ -actin R	GAGTTGAAGGTGGTCTCAT	qRT-PCR		

采用如下 5 条引物扩增 3' 端: GSPP1、NGSPP1、3'-RACE-Q (T)、3'-RACE-Q (0)、3'-RACE-Q(1)。其中 GSPP1、NGSPP1 是根据扩增出的中间片段设计的特异性引物,3'-RACE-Q(T)、3'-RACE-Q(0)、3'-RACE-Q(1) 是通用引物。以 3'-RACE-Q(T) 代替反转录试剂盒中的 Olig(T) 合

成第一链 cDNA, 然后进行巢式 PCR。首先,以 GSPP1 和 3'-RACE-Q(0) 为引物进行第一轮 PCR, 扩增条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 30 s, 69.3 °C 30 s, 72 °C 1 min 共 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。然后,以第一轮 PCR 产物稀释 50 倍后为模板, NGSPP1 和 3'-RACE-Q(1) 为引物进行第二轮

PCR,扩增条件:94 °C 预变性 3 min;94 °C 30 s, 63 °C 30 s,72 °C 1 min 共 35 个循环;72 °C 延伸 10 min。PCR 产物验证方法同上。

### 1.3 序列分析

将测序获得的中间片段和 3'-UTR 序列进行拼接,得到了 *SREBP-1* 的部分 cDNA 序列。通过 ExPASy (<http://www.expasy.ch/tools/>) 的 TranslateTool 软件预测其氨基酸序列;利用 ClustalX 1.83 软件比较草鱼与其他 7 种鱼类的 *SREBP-1* 氨基酸序列(序列均来自 GenBank)的同源性,并用 Mega 5.0 软件构建邻接(Neighbour-Joining, NJ)进化树,1 000 次自举(Bootstrap)重复检验进化树的置信度;使用 <http://swissmodel.expasy.org/WorkspaceTools> 软件分析草鱼 *SREBP-1* 的 bHLH-zip 结构域的二级结构;利用 microRNA(miRNA)预测软件(<http://regrna.mbc.nctu.edu.tw/html/prediction.html>) 预测草鱼 *SREBP-1* 3'-UTR 区的 miRNA 作用靶位点。

### 1.4 草鱼 *SREBP-1* 基因组织表达分析

采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术,检测 *SREBP-1* 基因在草鱼 8 个组织中的相对表达量。首先根据所获得的 *SREBP-1* 的部分 cDNA 序列设计正反向引物 *SREBP-1-F* 和 *SREBP-1-R*(表 1),内参引物为  $\beta$ -actin F 和  $\beta$ -actin R(表 1),将模板进行梯度稀释,检测目的基因和内参基因的扩增效率,其扩增效率分别为 91% 和 92%。取 3 条草鱼,其养殖条件同“1.2”。取样前禁食 12 h,草鱼麻醉后,无菌条件下迅速分离脑、肝脏、肠、肾脏、脾脏、肌肉、脂肪和性腺组织。液氮速冻后 -80 °C 保存备用。按照 RNAiso Plus 说明书提取总 RNA,利用 PrimeScript RT Kit(Perfect Real Time)反转录获得第一链 cDNA。采用 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪,参照 SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNase Plus)说明书,进行实时定量 PCR。PCR 反应体系为 20  $\mu$ L: SYBR® Premix Ex Taq™ (2  $\times$ ) 10  $\mu$ L, PCR Forward Primer(10  $\mu$ mol/L)0.4  $\mu$ L, PCR Reverse Primer(10  $\mu$ mol/L)0.4  $\mu$ L, ROX Reference Dye II (50  $\times$ )0.4  $\mu$ L, cDNA 模板 1  $\mu$ L, 加无菌水至总体积为 20  $\mu$ L。PCR 程序采用两步法:95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 共 40 个循环。反应结束后进行溶解曲线分析,以验证产物特异性。每个样品 3 个平行,反应结束后进行数值分析。

由扩增曲线得出各样品 qRT-PCR 扩增的  $C_t$  值,相对表达量参照 Livark 等<sup>[14]</sup>提出的  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  算

法计算出样品中 *SREBP-1* 基因 mRNA 相对表达丰度,然后采用 SPSS Statistics 17.0 进行 One-Way ANOVA 分析和 LSD 与 Duncan 比较,结果以平均数  $\pm$  标准差(mean  $\pm$  SD)表示。

### 1.5 糖对草鱼肝脏 *SREBP-1* 表达影响

选取 270 尾平均体质量为(40.15  $\pm$  0.18)g 的草鱼,随机分为 3 组:根据草鱼对糖的营养需求量设计对照组(糖含量 31%)、低糖组(糖含量 24%)和高糖组(糖含量 42%)<sup>[15]</sup>,每组 3 个重复,每个重复 30 尾鱼,养殖条件同 1.2,实验周期为 60 d,实验饲料组成及成分分析见表 2。每组取 6 尾草鱼,麻醉后无菌条件下分离肝脏,液氮速冻后 -80 °C 保存备用。采用 qRT-PCR 技术,检测每个实验组 *SREBP-1* 基因的相对表达量,检测方法同“1.4”,正反向引物和内参引物同“1.4”(表 1)。

表 2 实验饲料组成及成分分析  
Tab. 2 Formulation and proximate composition of the experimental diets %

成分 ingredients	对照组 control	低糖组 L-CHO	高糖组 H-CHO
<b>配方 formulation</b>			
鱼粉 fish meal	2	2	2
豆粕 soybean meal	25	25	21.9
棉粕 cottonseed meal	10	10	9
菜粕 rapeseed meal	25	30	22
小麦次粉 wheat middle	20	8	40
大豆油 soybean oil	1.8	2	1.4
磷酸二氢钙 Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	2	2	2
氯化胆碱 choline chloride	0.2	0.2	0.2
矿物质预混料 mineral mix	1	1	1
维生素预混料 vitamin mix	0.5	0.5	0.5
纤维素 cellulose	10.5	17.3	0
羧甲基纤维素 CMC	2	2	0
<b>营养组成 proximate analysis</b>			
碳水化合物 carbohydrates	30.94	23.93	42.31
粗蛋白 crude protein	30.6	30.7	30.6
粗脂肪 crude lipid	3.1	3.1	3.0

## 2 结果与分析

### 2.1 草鱼 *SREBP-1* cDNA 序列分析和氨基酸序列的一级结构

将测序获得的中间片段和 3'-UTR 序列进行拼接,得到了 *SREBP-1* 的部分 cDNA 序列,共 4 760 bp(GenBank 中的登录号为 KJ162572)。其中 3'非编码区 1 279 bp,编码区 3 426 bp,共编码 1 141 个氨基酸(图 1)。*SREBP-1* 属于碱性螺旋-环-螺旋亮氨酸拉链(bHLH-zip)转录因子家族,其中氨基酸序列 354~432 为 bHLH-zip 区域。

```

1      tgagtgctgggacttgaacttttgaagtcagcttgaanaagcatttaaggacaATGAA
1      M N
61     TCTGCTTTTACGACCCGCTCAGTGGCAACTTGGACTCCAGTTTGTCTTACATGATCC
21     L S F D D P S L D N L D S S L S L H D P
121    GAGTGATTTGACACGGCTCTGCTCAGTACATTGATGATATGCTCCAGCTTATCAACAA
41     S D I D T A L L S D I D D M L Q L I N N
181    CCAGGACATGGAGTTTGGTGGGCTTGTATCACACTTCATTTCTGCTCCCGCAGCGCC
61     Q D M E F G G L F D H T S F P A P A A P
241    CACGACGAGCTCTCAGCCCTGCCTCCTCAACCTTCTCTCTCCACCCACTTCTC
81     T Q E L S A L P H S N P S S P P T S S
301    TACGCCACCAACACTCTCTCATCCTCAGCAGCAGCCACCTGGATGCCCTGCTGGG
101    T P T N T S S I L S S S P H L D A L L G
361    TCCCCCATCACCGCAGTTCTCCATCCCGGACAAAGTCTTCCACCTCCCACTTTCCA
121    P P I T R S S S I P D K V F H P P T F Q
421    GCAGTCTCTTGGCACAGGTGACCTCCACCCCTGCCAACCTGCCACACTGCAGACCAC
141    Q S P L A Q V T S T P A N P A T L Q T T
481    GCAGCCAAAGCTCAGCCGCTCCATCTCCAGCCTCCACCTTCCACCCCGCGGCCCA
161    Q P K A Q P A P S P S L H P S T P A A Q
541    GAGCCAACTGCCCGGCTGTGAAGACCTCTGTGTTGGCAGCCCGCAGCAGGTCT
181    S Q P A P A V K S P P V F G T A Q Q V L
601    CTTAGCTCACCACACCCCAACCCAGCAGCAGCAGCAGCAGCTGTGCTACTTCCCAT
201    F S S P T P Q P P Q Q Q Q P V V T Y P I
661    CCAGACGGTTATACAGTGTACTCAGCAGAGCTCTCTCAGCCAACTCCGAACTTCCC
221    Q N G Y T A V T Q Q S S P Q P I P N L P
721    CGCTCCCAACAGATGTCAGCAATGGCCATCAAGCCAGGTGCATAGCTCTCGAC
241    A S P Q N V Q P M A I Q A Q V H S L S T
781    TTCACCACTTCCAGCCTCTCCAGCCCAACACAGCAATCTCCCTCAGTTCA
261    S P I L T T S S S P P T Q T I S P Q V Q
841    GCAGTTCTGTTTGTGGCAGCGAGTTCATTAAGCAGACTCTCTTGTCTCAAC
281    Q V P V L L Q P Q F I K A D S L L L T T
901    TCTGAAGCTGATGTAACCATGTAACACAGTAGCCTGACCTTGCATCAGCTCGCTGGC
301    L K P D V T M V T T V A S P C I T S L A
961    TACATCCACTGCCAGTCCGAACACCTCAGCGCGCTGATGAGTGGAGGCCACT
321    T S T A P V Q N T S L Q A L M S G G T I
1021   CCTGACCACCTTCCAGTGGTGACACAGAAAGTCCCATCAATCCGATCGCCAT
341    L T T V P L M V D T E K L P I N R I A I
1081   CAGCGGAAACAGGAGGACAGCCACATAAAGCGGAGAAACCGCACCAGCCATAAGCGCAT
361    S G K P G G Q P H K G E K R T A H N A I
1141   TGA AAAACCTACCGCTCCTCCATCAACGCAAGATTATTGAGCTCAAAAGCCTGGTGGC
381    E K R Y R S S I N D K I E L K D L V A
1201   TGGGACGGAAGCTAAGCTCAATAAGTCGGCAGTGTGGGAAAGCCATGACTACATTGC
401    G T E A K L N K S A V L R K A I D Y I R
1261   CTACCTTCAGCAATCCAAACCAAACTAAAGCAGGAGAATGGCACTCAAAATGTCAT
421    Y L Q Q S N Q K L K Q E N M A L K M S I
1321   CCAGAAACAAGTCTCTGAAGACCTGTGACCATGGAGGTGGACCTGAAACAGCAAT
441    Q K N K S L K D L V T M E V D V K P E I
1381   CCCCACCCCTCCAGCATCAGATGTCGGCTCACTCAATCCAGCGGCGCTACTCCACCA
461    P T P P A S D V G S P Q S S G A Y S H H
1441   CGGTAGGACTCGGAGCCGACAGCCCAATGGTAGAAGACAGCAAGCTGTGGTGGAG
481    G S D S E P D S P M V E D S K P V V E R
1501   GGCTGGAGAACTGGATCGCTCTCGCATGGCTCTGTGTGCATCACCATGCTCTTCT
501    A G G M L D R S R M A L C A F T M L F L
561    GTCCTTAAACCGTGTGCTCTCTGCTGTGTGGCGCTGGAGTAGCTCTGGGCATCTGT
521    S F N P L A S L L C G G W S S S G A S V
1621   GTCTGGACACAGGAGGATGCTGGCAATCGAGAAACAGCCGAGCTTGGGGTGG
541    S G H T G R S M L A M Q E T A E S W G W
1681   GATGGATTGGATGTTGCCACTTCTGCTGTGTGTAACCGGTGTTCTGGCTGG
561    M D W M L P T L L V W L L N G V L V A G
1741   AGTTTTGATCCGACTGCTGTGATGGAGAACTGTGACCACTCCTCAGAACTAC
581    V L I R L L V Y G E P V T R P H S E S
1801   TGCTCTTCTGGAGACCCGACAGCCAGCCGACCTGGATAGCCAGGGAGACTTTC
601    V L F W R H R K Q A D L D L A R G D F A
1861   TCAGGCTTCTCAGAACTCTGGAGCTGTCTAAAGCTCTCGGTGACCTCTGCCACTTC
621    Q A S Q N L W T C L K A L G R P L P T S
1921   TCAACTGGACTGACCTGTGCTATGTTGGTCCGCTGCGCCTGTGCTGACAGACT
641    Q L D L T C A M L W S A L R L C L Q R
1981   GTGGTGGCCGCTGGCTAGCCAGCGTGGCCGCTTGGTCCAAACCCGCCCTACA
661    W V G R W L A S R A G A L R S N R P L Q
2041   GGAAGATGCCCAAGAGCTGCCGTGATGCCCTGGTCTACCCGCTACACCAACT
681    E D A R K S C R D A A L V Y H R L H Q L
2101   CCACATGACCGGTAAGCTCGGAGGTAGCCACCTCTGCCATCCACATGGCCTGAGCGC
701   H M T G K L G G S H L S A I H M A L S A
2161   TCTTAACTGGCCGAGTGTGACGAGGACTGTCTCCCTGTTGCCACTGGCAAAATCTA
721   L N L A E C A G D C L P V A T L A E I Y
2221   TGTGCTGACGCCCTGAGGGTAAACCAGCCTACCCGCTGCTTCACTTCACTACTCG
741   V S A A L R V K T S L P R L L H F T T R
2281   AGTGTCTTGGACGCGCTCGCAGGCTGTCTCTCGCCAGCGCAGCGTCCCTCTG
761   V F L S S A R Q A C L S P S G S V P P A
2341   CATGCAGTGGTGTGACCCCTTGGGTCATGTTCTTTGGATGAAGACTGGTCCAT
781   M Q W L C H P L G H R F F V D E S I
2401   ACGCAGCACCCTAAAGAGACTCTACAGCCAGCGGAAACTCAGTGGACCCGCTGGC
801   R S T P K E S I Y S Q A G N S V D P L A
2461   TCAGTGACGAGCGTCCGGGAGCCTGTGTAAGAAAGCCCTACTGTGTGGCACA
821   Q V T Q A F R E H L L E K A L Y C V A Q
2521   GCCTCGAGGACAGACCCCTCAGCGGGATGGGAATCTCAGCGCTCTGGAGTA
841   P R G D K T L T D G D G E Y S D A L E Y
2581   CCTGCAGTTACTCAGCGGCTCAGCAGCAGGAGCCACACAGCAGCTCTGGCAT
861   L Q L L T S A S D A A G A T T Q S F A I
2641   CGGATCAAACTGGCAGCTGTGACGGCTGTGACCTCCTCAAAATGGTGGTGTGCT
881   G S N M A T V T G C D P H S K W W S S V
2701   GGCCGTGGTATAATAATGGCTCCAGGGGATGATGGCAGCAGAGAGATGTACCC
901   A V V I I N W L Q G D D V A A E R L Y P
2761   AGCGTGGAACTTGGCCGAGCCTCAGTGTGAGAGTGGTGGCCAAAGCCGCTG
921   A V E H L P R S L Q S A E S P L P K A C
2821   TCTGAACACTTTAAAGCGGTGGCTCCCTGCTGGCCAACTGAGAACTACAGCTCAG
941   L N T F K A V R S L L A K P E N Y Q L S
2881   CCTCAGTACTGTGAGAAAGCCGCGGCTTTCAGACAGCAGCTCAACTCGGCCACA
961   L S Y C E K A S G L F R D S L N L G P H
2941   CTGACCAACCAACTAGACAAAGTGGTGGTGTGCTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
981   C T T N T L D K L V Q L L L C D L L V
3001   GACCGCCTAAGCTGTGGAGGAGCAGGAGTGGCTGCGCAGCAGCTCGCCGAGCGC
1001   T R T N V W R E Q Q V A S Q Q S S P T A
3061   CGCCTCAGTGCAGGCTGAGGGCTTTCAGCAGGAGCTGAGCTCCCTCCGCAACTCCG
1021   A S P A E L Q G F Q Q D L S S L R K L A
3121   TCAGAGTTCAGACGGCCATGGCAGGTTGTTCTGATGAAGCCACAGCTCGGCTGAT
1041   Q S F R P A M R R L F L H E A T A R L M
3181   GGCGGAGCCAGTCCAAACAGCAGCAGCTTGGACCCGAGTCTGGCCCGCGCCG
1061   A G A S P T R T H Q L L D R S L R R R A
3241   CACGCTGGAAGCAGAGGAGTGGAGATGCTCCAGCCAGCCGAGCAGCCAG
1081   T P G S R T E E C E M R P G Q A E
3301   GGCCGTGATGCTGGCGTGTGCTATCTGCCCTTCTCTGCTCGCCCGCGCCAAAG
1101   A V M L A C R Y L P P S F L S A P G Q R
3361   GGTGGCATGCTGGTGCAGCCGCGGAGCTGGAGAGCTAGGCGCAACAGCCACT
1121   V G M L V D A A R T L E K L G D K R T L
3421   CCAGACTGCCAAGATGATCATCAAACTAGGACGCGGAAACAGCCGCTCAGCTCCACT
1141   H D C Q Q M I I K L G S G T T V T S *
3481   Gccactacacacacacacacactaaagagcacttttacacacacacacacacac
3541   atctctccacagagaatcaacacgctctctgtttcaggcctcagtcagtcatcagcaga
3601   acgcaaatgttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt
3661   caagatgcagggcgataacgggaccctatccttgatattttgatagaaatgaatt
3721   ttaactatttatagcctacacaaagatgaacggaaggtatttttttttttttttttt
3781   ttgtgaaatggctttgtgaagcgatgactgtcagtgctgactttggccacaagatggg
3841   tttggggataaacggattctgttcccaagggtgcttgaattggagacatatgtag
3901   agcattgcttactattagcactttgaaagaagaacattacgatagagaaacaa
3961   ccgtgagtaaatgattctacttactctgtatctgtgagatgaatttcatatgtga
4021   ttgaaaaattgagctttataaaagttcttctgtatatttttaactaaagtgtat
4081   ttatgattgtctgacgtgtagtgagcagattttgaaggggctgagtgctgatttt
4141   gtcgtctgctgaaatttaaccagttgaaatgattgaagattcatcagaaaaaa
4201   acggtttctactgcagccacagatgactgttctgctgagttgtgtcattttgact
4261   atttagtgggtggctgcagctcactacagccacgctttgcccattgaatcactgtt
4321   taattgtatttcaaccagtttgggtgtaagcttccattggagttatataatccaa
4381   taattcactgcaatgcaatgcaatgcaatgcaatgcaatgcaatgcaatgcaatgcaat
4441   taatactttatacaagataagattgtcactgcagctctgttagggagagaactat
4501   atttatattcatttctagccagcttatgtacgaattctgatttagtagcaacatttat
4561   atccgagtaaccgtgagatttgcattgacatttactgtacgtaacttttctgt
4621   agtgctgtgacgagctcaagatgaacggttttaactgcagacacacacatag
4681   atactctattgtcttctattgtattttcttaagattgaaataaagctttttgt
4741   aatgaaaaa

```

图 1 草鱼 SREBP-1 的 cDNA 序列与推测的氨基酸序列

5'和3'端非编码区核苷酸用小写字母表示,编码区核苷酸用大写字母表示。左端数字分别表示核苷酸和氨基酸序列编号。bHLH-zip 区域用黑框标出

Fig.1 cDNA and deduced protein sequences of the grass carp SREBP-1

5' and 3' UTR nucleotide lowercase letter indicates, coding region nucleotide uppercase letter indicates. Left end figures represent the number of nucleotide and amino acid sequences. bHLH-zip area marked with a black frame

草鱼的 *SREBP-1* 氨基酸序列分别与斑马鱼、大西洋鲑、青鳉 (*Oryzias latipes*)、斑马宫丽鱼 (*Maylandia zebra*)、罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)、伯氏朴丽鱼 (*Haplochromis burtoni*)、黄斑篮子鱼 (*Siganus canaliculatus*) 的氨基酸序列进行了同源性比较,发现草鱼与斑马鱼的同源性最高,达到 88%。与黄斑篮子鱼、大西洋鲑、青鳉、斑马宫丽鱼、罗非鱼和伯氏朴丽鱼的同源性分别为 79.5%、77.8%、76.2%、78.2%、78.3% 和 78.3% (图 2)。草鱼 *SREBP-1* 的碱性螺旋-环

-螺旋亮氨酸拉链 (bHLH-zip) 区域与斑马鱼、黄斑篮子鱼、罗非鱼、伯氏朴丽鱼、斑马宫丽鱼、青鳉和大西洋鲑相比较,具有较高的保守性,相似度分别为 96.2%、96.2%、93.7%、93.7%、92.4%、92.4%、92.4%。

## 2.2 *SREBP-1* 3'-UTR 区 miRNA 作用靶位点的预测

预测结果显示,在 *SREBP-1* 的 3'-UTR 区存在两种与糖脂代谢相关的 miRNA, miRNA-33a 和 miRNA-16 (表 3)。

<i>Maylandia zebra</i>	MNSLSFDDHSLDNLDPDPTLSLNDPSDIDTALLSDIDDMLQLISNQDMEFGGLFDVPPYTT-	59
<i>Haplochromis burtoni</i>	MNSLSFDDHSLDNLDPDPTLSLNDPSDIDTALLSDIDDMLQLISNQDMEFGGLFDAPPYTT-	59
<i>Oreochromis niloticus</i>	MNSLSFDDHSLDNLDPDPTLSLNDPSDIDTALLSDIDDMLQLINQDMEFGGLFDAPPYTT-	59
<i>Siganus canaliculatus</i>	MNSLAFDDPSLDNLDPDPTLSLNDPSDIDTALLSDIDDMLQLINQDMEFGGLFDNPPYTG-	59
<i>Oryzias latipes</i>	MNRLSFDDASLDNLDPDPTLSLNDPSDIDTALLNDIDDMLQLINQDMEFGGLFDTHPFG-	59
<i>Salmo salar</i>	MN-LSFDDQSLDNLDPDPTLSLNDPSDIDTALLNDIDDMLQLINQDMDMAGLFDPPQFTG-	58
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	MN-LSFDDPSLDNLDSLSLHDPDSDIDTALLSDIDDMLQLINQDMEFGGLFDHTSFPAP	59
<i>Danio rerio</i>	MN-LSFDDTSLDNLDSLSLHDPDSDIDTALLNDIDDMLQLINTQDMEFG-LFDQASFPAP	58
	** *:*** ***, **: :*:*****, *****. *:*: : **	:
<i>Maylandia zebra</i>	TFLTTPVPMVDAEKLPIINRIAISGKPAQPHKG <b>EKRTAHNAIEKRYRSSINDKIMELKDL</b>	388
<i>Haplochromis burtoni</i>	TFLTTPVPMVDAEKLPIINRIAISGKPAQPHKG <b>EKRTAHNAIEKRYRSSINDKIMELKDL</b>	388
<i>Oreochromis niloticus</i>	TILTTPVPMVDAEKLPIINRIAISGKPTGQPHKG <b>EKRTAHNAIEKRYRSSINDKIVELKDL</b>	391
<i>Siganus canaliculatus</i>	TILTTPVPMVDTKLPIINRIAISGKPAQPHKG <b>EKRTAHNAIEKRYRSSINDKIVELKDL</b>	383
<i>Oryzias latipes</i>	TILTTPVPMMDTEKLPIINRIAISGKPLGPHKG <b>EKRTAHNAIEKRYRSSINDKIVELKDL</b>	388
<i>Salmo salar</i>	TFLTTPVPMMSDKLPIINRITISSKPMGLPPKG <b>EKRTAHNAIEKRYRPSINDKILELKDL</b>	397
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	TILTTPVPLMVDTEKLPIINRIAISGKPGQPHKG <b>EKRTAHNAIEKRYRSSINDKIVELKDL</b>	380
<i>Danio rerio</i>	TILTTPVPLVVDTEKLPIINRIAISGKPGCQPHKG <b>EKRTAHNAIEKRYRSSINDKIVELKDL</b>	343
	*:*****: :*:*****:*. ** * *****. *****:*****	
<i>Maylandia zebra</i>	VAGTDAKLNKSAVLRKAIDYIRYLQQTNQKLKQENMTLKMAAQKNKSLKDLVAMEVDG-Q	447
<i>Haplochromis burtoni</i>	VAGTDAKLNKSAVLRKAIDYIRYLQQTNQKLKQENMALKMAAQKNKSLKDLVAMEVDG-Q	447
<i>Oreochromis niloticus</i>	VAGTDAKLNKSAVLRKAIDYIRYLQQTNQKLKQENMALKMAAQKNKSLKDLVAMEVDG-Q	450
<i>Siganus canaliculatus</i>	VAGTEAKLNKSAVLRKAIDYIRYLQQTNQKLKQENMALKMAAQKNKSLKDLVAMEVDG-P	442
<i>Oryzias latipes</i>	VAGTEAKLNKSAVLRKAIDYIRYLQQTNQKLKQENMALKMAAQKNKSLKDLVAMEVVE-Q	447
<i>Salmo salar</i>	VAGTEAKLNKSAILKKAIDYIRYLQQTNQKLKQENMALKMSAQKNKSLKDLVAMEVDGPQ	457
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	VAGTEAKLNKSAVLRKAIDYIRYLQQTNQKLKQENMALKMSIQKNKSLKDLVTMEVDV--	438
<i>Danio rerio</i>	VAGTEAKLNKSAVLRKAIDYIRYLQQTNQKLKQENMALKMNIQKNKSLKDLVTMEVDV--	401
	****:*****:*:*:***** *****:***:*** *****:***:***	
<i>Maylandia zebra</i>	IIKLGSGETVTNS	1174
<i>Haplochromis burtoni</i>	IIKLGSGETVTNS	1174
<i>Oreochromis niloticus</i>	IIKLGSGETVTNS	1177
<i>Siganus canaliculatus</i>	IIKLGSGETVTNS	1170
<i>Oryzias latipes</i>	IIKLGSGETVTNS	1159
<i>Salmo salar</i>	IIKLGSGETVTNSA	1172
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	IIKLGSGETVTNST	1141
<i>Danio rerio</i>	IIKLGSGETVTNST	1105
	*****. :	

图 2 草鱼 *SREBP-1* 与其他鱼类同源分子的氨基酸比对

ClustalX 进行序列比较时相同氨基酸用 (\*) 表示,理化性质相似的氨基酸用(.或:)表示。bHLH-zip 区域用灰底表示

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of *SREBP-1* within grass carp with other fishes

When using ClustalX sequence comparison same amino acid with (\*) indicates, Similar amino acid with (. or :) indicates. bHLH-zip area is represented by a gray background

表 3 miRNA 作用靶位点预测  
Tab.3 Prediction of miRNA target site

miRNA 名称 miRNA ID	位点 location	长度 length	杂交反应 hybridization	最低自由能 minimum free energy	分值 score
hsa-miR-33a	433 ~ 463	31	miRNA: 3' cacuaCGUG--ACAC-----CUUUGUAAc 5'                 Target:5' tattaGCACCTTTTGAAGAAAGAAACATTa 3'	-8.5	147
hsa-miR-16	650 ~ 671	22	miRNA: 3' gcGGUUAUAAAUGCACGACGAu 5' : :            Target:5' ggTCGATTTGTCTGCTGCTg 3'	-22.9	168

### 2.3 bHLH-zip 结构域的二级结构及理化性质分析

利用 <http://swissmodel.expasy.org/> 中 Workspace Tools 工具的 Domain Annotation 分析草鱼 SREBP-1 的 bHLH-zip 结构域的二级结构(图 3)。从图中可以看出,该区域形成一个典型的

“螺旋-环-螺旋”结构,在碱性区前七个氨基酸既有形成螺旋的趋势,也有成环的趋势;亮氨酸拉链并入第二个螺旋,可以看作是第二个螺旋延长的螺旋-环-螺旋结构,其中环的部分为 28-VAGTEAKLN-36(在 SREBP-1 中的为第 381 ~ 389 位),起着连接两个螺旋的作用。

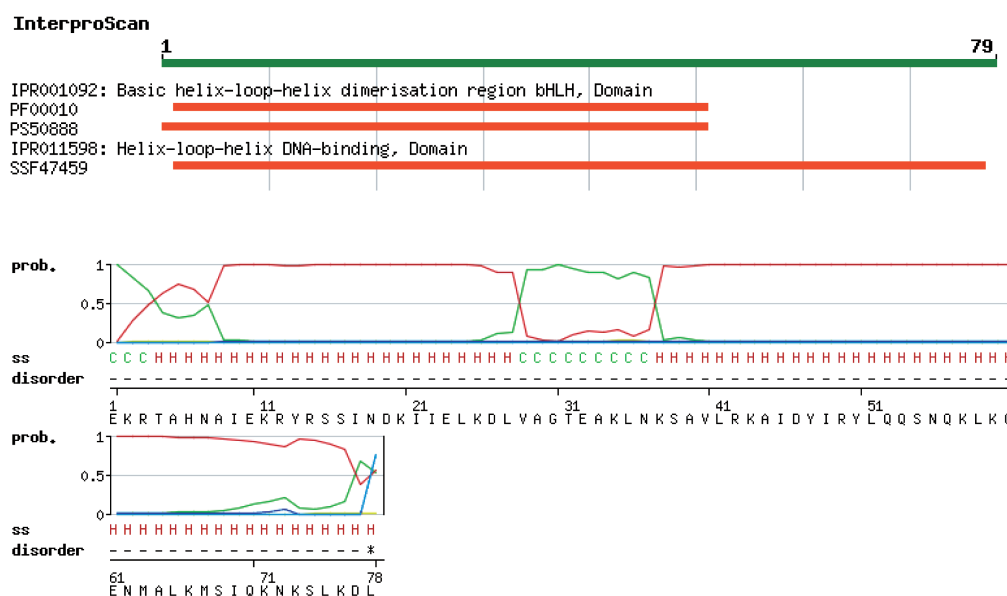


图 3 bHLH-zip 结构域的二级结构

Fig.3 The secondary structure of bHLH-zip domain

### 2.4 氨基酸序列的系统进化树分析

采用 Mega 5.0 软件,以邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建进化树(图 4),从图中可以看出,哺乳类、两栖类、爬行类和鸟类分为一支,鱼类单独一支,其中草鱼与斑马鱼聚在一起,草鱼、斑马鱼同属鲤科鱼类,符合氨基酸同源性比对结果。因此, SREBP-1 的系统进化关系与传统分类学的进化关系相一致。

### 2.5 草鱼 SREBP-1 基因组织表达分析

采用 qRT-PCR 技术检测 SREBP-1 基因在脑、肝脏、肠、肾脏、脾脏等 8 种组织中的相对表达量(图 5),发现在性腺中的 SREBP-1 基因的表达量最低,以此作为基线 1,其他组织显示的是相对于性腺中的 SREBP-1 mRNA 的表达倍数。结果显示,草鱼 SREBP-1 基因在脑中的表达量最高,肝脏和肠次之,在肾脏、脾脏、肌肉、脂肪和性腺中表达量比较低。

## 2.6 糖对草鱼肝脏中 *SREBP-1* 基因转录水平影响分析

采用 qRT-PCR 检测对照组、低糖组和高糖组

*SREBP-1* 基因的表达量。结果显示:高糖组 *SREBP-1* 表达量显著高于对照组和低糖组 ( $P < 0.05$ ),对照组和低糖组差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

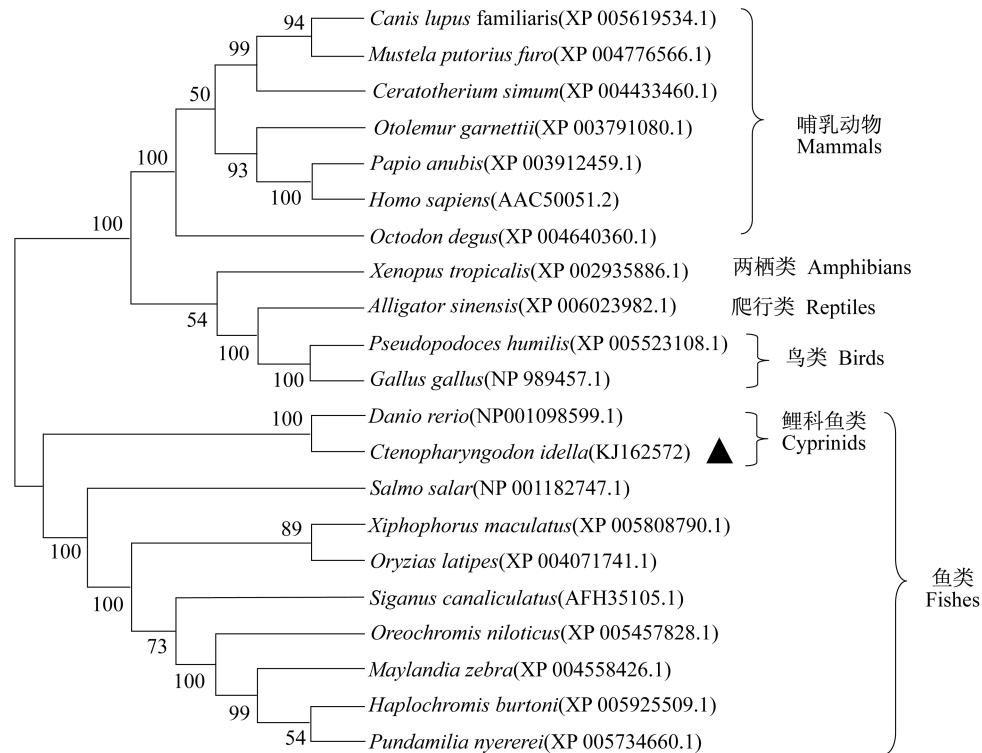


图4 鱼类 *SREBP-1* 氨基酸序列与其他脊椎动物 *SREBP-1* 的系统进化树

线长代表遗传距离,草鱼 *SREBP-1* 用▲标出

Fig.4 Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of *SREBP-1* and the relationship between the fishes and other known vertebrates

The length on the phylogenetic tree indicates the genetic distance, the solid triangle marks the grass carp *SREBP-1*

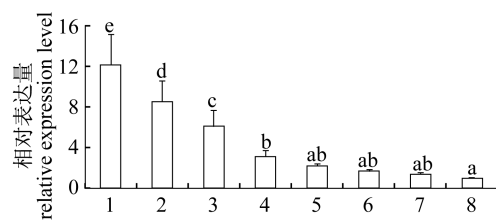


图5 *SREBP-1* mRNA 的各组织

相对表达量

图中数据表示为平均值  $\pm$  标准差 ( $n = 3$ ), 不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。1. 脑; 2. 肝脏; 3. 肠; 4. 肾脏; 5. 脾脏; 6. 肌肉; 7. 脂肪; 8. 性腺

Fig.5 The relative abundance of *SREBP-1* mRNA expression in different tissues of grass carp

Error bars indicate the mean and standard deviation ( $n = 3$ ). Different letters indicate statistical difference ( $P < 0.05$ ). 1. brain; 2. liver; 3. intestines; 4. kidney; 5. spleen; 6. muscle; 7. fat; 8. gonad

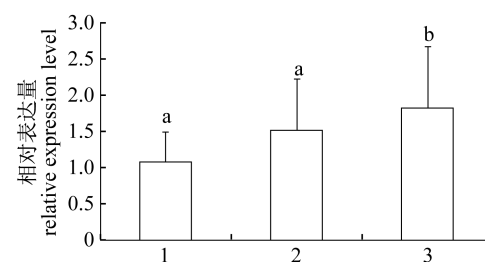


图6 肝脏 *SREBP-1* mRNA 在不同糖浓度下的

相对表达量

图中数据表示为平均值  $\pm$  标准差 ( $n = 6$ ), 不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。1. 对照组; 2. 低糖组; 3. 高糖组

Fig.6 The relative abundance of liver *SREBP-1* mRNA expression in different carbohydrates concentration

Error bars indicate the mean and standard deviation ( $n = 6$ ). Different letters indicate statistical difference ( $P < 0.05$ ). 1. control; 2. low concentration carbohydrates; 3. high concentration carbohydrates

### 3 讨论

SREBP-1 因其在糖脂代谢中的重要作用受到了人们的广泛关注。目前,人、大鼠、小鼠、鸡、猪、山羊、鹅和牛等的 *SREBP-1* 基因均已被克隆,对其功能和作用机制的研究也比较深入。在斑马鱼、大西洋鲑、青鳉、斑马宫丽鱼、罗非鱼、伯氏朴丽鱼、黄斑篮子鱼等鱼类中的氨基酸序列也已被鉴定。本研究获得了 4 760 bp 的草鱼 *SREBP-1* 部分 cDNA 序列,经同源性分析,草鱼与斑马鱼的同源性最高,达 88%,与其他鱼类的同源性为 76%~80%,而 bHLH-zip 区域同源性为 92.4%~96.2%,具有高度的保守性。bHLH-zip 区域是 SREBPs 的 DNA 结合区和发生二聚化作用的区域,SREBPs 与 bHLH-zip 家族其他的转录因子一样,都能够与一种反向重复序列 E-box (5'-CANNTG-3') 结合,但不同的是 SREBPs 能与固醇调节元件 (SRE, 5'-TCACNCCAC-3') 相结合<sup>[16-17]</sup>,而其他的转录因子则不能,这是由于 SREBPs 碱性保守区域中的一个精氨酸位点被酪氨酸所取代的结果。Jones 等<sup>[18]</sup>发现 SREBPs 的 DNA 结合能力和同源二聚化作用对于其调控脂肪代谢是必需的。对于草鱼 bHLH-zip 结构域的二级结构及理化性质分析发现,该区域形成一个典型的“螺旋-环-螺旋”结构,亮氨酸拉链起着连接两个螺旋的作用。

本实验通过 miRNA 预测软件分析发现,在 *SREBP-1* 3'-UTR 区存在稳定性很高的 miRNA,如 miRNA-33a 和 miRNA-16,这在以往鱼类 *SREBP-1* 的调控序列特征分析中未曾被关注。在陆上动物的研究中表明,miRNA-33 是位于 SREBPs 内含子区域<sup>[3]</sup>,其和 *SREBP-1* 共转录调控动物糖脂代谢。Her 等<sup>[19]</sup>在斑马鱼脂肪肝中发现,miRNA-16、miRNA-126、miRNA-122 的表达量上调及 miRNA-27b 的表达量下调,且 *SREBP-1* 表达量显著提高。最新在虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 研究中发现,omy-miRNA-33 和 omy-miRNA-122b 的表达量在饲喂 4 h 后瞬时增加,而同时 *SREBP-1* 的表达也增加<sup>[20-21]</sup>;这说明 *SREBP-1* 在调控鱼类能量代谢中和 miRNAs 关系密切,miRNAs 可能通过和 *SREBP-1* 3'-UTR 结合共同调节鱼类的能量代谢过程。

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。这表明,脑、肝脏和肠组织可能是草鱼 *SREBP-1* 基因发生转录水平调控的主要部位。脑的活动瞬息万变,需要大量能量的及时供应,一般认为脑组织是以葡萄糖的氧化来供能的,脑细胞含有完整的糖酵解 (EMP) 酶系,己糖激酶活性约为其他组织的 20 倍,而 *SREBP-1* 可激活己糖激酶。肝脏是体内代谢最旺盛的器官,尤其在调节体内糖脂代谢平衡中发挥关键作用,这可能是 *SREBP-1* 在脑和肝脏组织中的表达量很高的主要原因。刘芳等<sup>[22]</sup>发现在黄斑篮子鱼中,*SREBP-1* 基因在脑组织中表达量最高,其次是眼和肠,在心脏、脾、肌肉和肝脏中均有表达,但表达量较低。Minghetti 等<sup>[23]</sup>认为大西洋鲑 *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。上述研究显示,*SREBP-1* 基因的组织表达在不同鱼类中有相似性也有一定的差异,这可能与物种间的特异性有关,具体机制有待进一步研究。

研究已证明,*SREBP-1* 是哺乳动物糖脂代谢的重要调节者<sup>[2-5]</sup>,可诱导生脂基因的表达<sup>[6]</sup>,并可以直接调控乙酰辅酶 A 羧化酶 (acetyl-CoA carboxylase, ACC)、脂肪酸合酶 (fatty acid synthase, FAS) 和硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 (stearoyl-CoA desaturase, SCD) 等 3 种酶的活性<sup>[24-25]</sup>,进而调控体内脂肪酸的生物合成过程。同时,在己糖激酶 (HK-II 和 GK) 的启动子区域有 *SREBP-1c* 的结合位点<sup>[26-27]</sup>,*SREBP-1* 通过诱导 *GK* 等糖代谢基因的表达,参与葡萄糖的代谢调控<sup>[28]</sup>。小鼠中的超表达 *SREBP-1a* 基因可以下调糖异生基因 *PEPCK* 和葡萄糖-6-磷酸酶 (glucose-6-phosphatase, G6Pa) 的转录表达,进而负调控糖类的合成<sup>[29]</sup>。在鱼类中,关于 *SREBP-1* 对糖脂代谢的调控研究报道还较少。Passeri 等<sup>[9]</sup>和 Deanna 等<sup>[10]</sup>在斑马鱼的研究中发现,在由酒精诱导的斑马鱼仔鱼急性脂肪肝模型中,缺失 *SREBP* 活性的突变体或者阻断 *SREBP* 的活性,均可抵抗由酒精诱导的脂肪肝的形成。在大西洋鲑的研究中发现,*SREBP-1* 能显著上调脂肪酸合成相关基因的表达<sup>[7]</sup>。在金头鲷的肝脏中发现 *SREBP-1a* 可调节 6-磷酸果糖激酶-2/果糖双磷酸酶-2 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,



6-bisphosphatase, PFKFB) 的活性<sup>[30]</sup>, 进一步研究发现在金头鲷 *GK* 基因的启动子上有 *SREBP-1a* 的结合位点<sup>[8]</sup>。上述研究提示, 鱼类 *SREBP-1* 可能与哺乳类具有相同或类似的糖脂代谢调控机制。本实验结果显示, 草鱼 *SREBP-1* 基因在高糖诱导下, 表达量显著提高, 说明草鱼体内 *SREBP-1* 基因的表达可响应高糖的应激, 具体机制有待进一步研究。

本研究通过基因克隆技术, 成功获得了草鱼 *SREBP-1* 基因序列, 并且发现在肝脏组织中, 高糖可以诱导 *SREBP-1* 基因的表达。本实验结合陆上动物中的研究成果, 推测 *SREBP-1* 基因在草鱼糖的利用及脂肪合成过程中发挥着重要作用, 鱼类 *SREBP-1* 可能通过抑制糖异生 (*PEPCK* 和 *G6Pa*) 和诱导糖酵解 (*GK*) 基因以及上调脂肪合成中的关键酶活性及其基因的表达 (*ACC*、*FAS* 和 *SCD*) 进而调节机体糖脂类代谢过程。因此, *SREBP-1* 可能是糖、甘油三酯代谢以及脂肪生成之间联系的枢纽<sup>[31]</sup>, 如果此推测成立, 通过调节草鱼体内 *SREBP-1* 的表达即可改善鱼类对糖代谢利用率过低的问题, 研究结果将丰富鱼类糖脂代谢调控机理的研究资料, 并为提高鱼饲料糖、脂利用效率提供理论依据。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Hua X, Wu J, Goldstein J L, *et al.* Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 ( SREBF1 ) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromosomes 17p11.2 and 22q13 [ J ]. *Genomics*, 1995, 25 ( 3 ) : 667 - 673.
- [ 2 ] Goldstein J L, Rawson R B, Brown M S. Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis [ J ]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2002, 397 ( 2 ) : 139 - 148.
- [ 3 ] Brown M S, Ye J, Goldstein J L. HDL miR-ed down by *SREBP* Introns [ J ]. *Science*, 2010, 328 ( 5985 ) : 1495 - 1496.
- [ 4 ] Jeon T I, Osborne T F. *SREBPs*: metabolic integrators in physiology and metabolism [ J ]. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2012, 23 ( 2 ) : 65 - 72.
- [ 5 ] Gosmain Y, Dif N, Berbe V, *et al.* Regulation of *SREBP-1* expression and transcriptional action on *HKII* and *FAS* genes during fasting and refeeding in rat tissues [ J ]. *Journal of Lipid Research*, 2005, 46: 697 - 705.
- [ 6 ] Bécard D, Hainault I, Azzout-Marniche D, *et al.* Adenovirus-mediated over expression of sterol regulatory element binding protein-1c mimics insulin effects on hepatic gene expression and glucose homeostasis in diabetic mice [ J ]. *Diabetes*, 2001, 50 ( 11 ) : 2425 - 2430.
- [ 7 ] Greta C A, Tocher D R, Martinez-Rubio L, *et al.* Conservation of lipid metabolic gene transcriptional regulatory networks in fish and mammals [ J ]. *Gene*, 2014, 534: 1 - 9.
- [ 8 ] Egea M, Metón I, Córdoba M, *et al.* Role of *Spl* and *SREBP-1a* in the insulin-mediated regulation of glucokinase transcription in the liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) [ J ]. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 155 ( 2 ) : 359 - 367.
- [ 9 ] Passeri M J, Cinaroglu A, Gao C, *et al.* Hepatic steatosis in response to acute alcohol exposure in zebrafish requires sterol regulatory element binding protein activation [ J ]. *Hepatology*, 2009, 49 ( 2 ) : 443.
- [ 10 ] Deanna L, Howarth D L, Passeri M, *et al.* Drinks Like a Fish: Using Zebrafish to Understand Alcoholic Liver Disease [ J ]. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 2011, 35 ( 5 ) : 826 - 829.
- [ 11 ] Cao J M, Liu Y J, Lao C L, *et al.* Effect of different dietary fatty acids on tissue lipid content and fatty acid, composition of grass carp [ J ]. *Acta Zoonutrimenta Sinica*, 1997, 9 ( 3 ) : 36 - 44. [ 曹俊明, 刘永坚, 劳彩玲, 等. 饲料中不同脂肪酸对草鱼组织脂质含量和脂肪酸构成的营养. *动物营养学报*, 1997, 9 ( 3 ) : 36 - 44. ]
- [ 12 ] Feng J, Jia G. Studies on the fatty liver diseases resulted from different lipid levels in *Sciaenops ocellatus* diets [ J ]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, 29 ( 1 ) : 61 - 64. [ 冯健, 贾刚. 饵料中不同脂肪水平诱导红姑鱼脂肪肝病的研究. *水生生物学报*, 2005, 29 ( 1 ) : 61 - 64. ]
- [ 13 ] Cheng H L, Xia D Q, Wu T T. Fatty liver and regulation of lipids metabolism in fish [ J ]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2006, 18 ( 4 ) : 294 - 298. [ 程汉良, 夏德全, 吴婷婷. 鱼类脂类代谢调控与脂肪肝. *动物营养学报*, 2006, 18 ( 4 ) : 294 - 298. ]
- [ 14 ] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and

- the 2 (-Delta DeltaC ( T )) Method [ J ]. Methods, 2001, 25(4) :402 - 408.
- [ 15 ] Guo X Z, Liang X F, Fang L, *et al.* Effects of dietary non-protein energy source levels on growth performance, body composition and lipid metabolism in herbivorous grass carp ( *Ctenopharyngodon idella* Val. ) [ J ]. Aquaculture Research, 2013, 1 - 12.
- [ 16 ] Briggs M R, Yokoyama C, Wang X, *et al.* Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter I . Identification of the protein and delineation of its target nucleotide sequence [ J ]. Journal of Biological Chemistry, 1993, 268( 19 ) :14490 - 14496.
- [ 17 ] Kim J B, Spotts G D, Halvorsen Y D, *et al.* Dual DNA binding specificity of ADD1/SREBP1 controlled by a single amino acid in the basic helix-loop-helix domain [ J ]. Molecular and Cellular Biology, 1995, 15( 5 ) :2582 - 2588.
- [ 18 ] Jones S. An overview of the basic helix-loop-helix proteins [ J ]. Genome Biology, 2004, 5( 6 ) :226.
- [ 19 ] Her G M, Hsu C C, Hong J R, *et al.* Overexpression of gankyrin induces liver steatosis in zebrafish ( *Danio rerio* ) [ J ]. Biochimica et Biophysica Acta, 2011, 1811 :536 - 548.
- [ 20 ] Mennigen J A, Panserat S, Larquier M, *et al.* Postprandial regulation of hepatic microRNAs predicted to target the insulin pathway in rainbow trout [ J ]. PLoS ONE, 2012, 7( 6 ) :e38604.
- [ 21 ] Mennigen J A, Plagnes-Juan E, Figueredo-Silva C A, *et al.* Acute endocrine and nutritional co-regulation of the hepatic omy-miRNA-122b and the lipogenic genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [ J ]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B, 2014, 169:16 - 24.
- [ 22 ] Liu F. Studies on the cloning and expression of sterol regulatory element binding protein-1 gene in *Siganus canaliculatus* [ D ]. Shantou: Shantou University, 2011, 40 - 41. [ 刘芳. 黄斑篮子鱼固醇调节元件结合蛋白-1 基因克隆及表达研究. 汕头: 汕头大学, 2011:40 - 41. ]
- [ 23 ] Minghetti M, Leaver M J, Tocher 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, 2011, 1811 ( 3 ) : 194 - 202.
- [ 24 ] Shimano H. Sterol regulatory element-binding proteins ( SREBPs ) : transcriptional regulators of lipid synthetic genes [ J ]. Progress in Lipid Research, 2001, 40( 6 ) :439 - 452.
- [ 25 ] Fleischmann M, Iynedjian P B. Regulation of sterol regulatory-element binding protein 1 gene expression in liver: role of insulin and protein kinase B/cAkt [ J ]. The Biochemical Journal, 2000, 349 ( 1 ) : 13 - 17.
- [ 26 ] Gosmain Y, Lefai E, Ryser S, *et al.* Sterol regulatory element-binding protein-1 mediates the effect of insulin on hexokinase II gene expression in human muscle cells [ J ]. Diabetes, 2004, 53( 2 ) :321 - 329.
- [ 27 ] Kim S Y, Kim H I, Kim T H, *et al.* SREBP-1c mediates the insulin-dependent hepatic glucokinase expression [ J ]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279( 29 ) :30823 - 30829.
- [ 28 ] Renaud D, Jean G, Catherine P. Carbohydrate responsive element binding protein ( ChREBP ) and sterol regulatory element binding protein-1c ( SREBP-1c ) : two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver [ J ]. Biochimie, 2005, 87( 1 ) : 81 - 86.
- [ 29 ] Yamamoto T, Shimano H, Nakagawa Y, *et al.* SREBP-1 interacts with hepatocyte nuclear factor-4 alpha and interferes with PGC-1 recruitment to suppress hepatic gluconeogenic genes [ J ]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279( 13 ) :12027 - 12035.
- [ 30 ] Metón I, Egea M, Anemaet I G, *et al.* Sterol regulatory element binding protein-1a transactivates 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase gene promoter [ J ]. Endocrinology, 2006, 147 ( 7 ) : 3446 - 3456.
- [ 31 ] Kotzka J, Knebel B, Avci H, *et al.* Phosphorylation of sterol regulatory element-binding protein ( SREBP ) -1a links growth hormone action to lipid metabolism in hepatocytes [ J ]. Atherosclerosis, 2010, 213( 1 ) :156 - 165.

## Molecular cloning of *SREBP-1* gene and effects of carbohydrates on its expression in liver of *Ctenopharyngodon idella*

SUN Junjun<sup>1,2</sup>, LU Ronghua<sup>2</sup>, YANG Feng<sup>2</sup>, QIN Chaobin<sup>2</sup>, YANG Liping<sup>2</sup>,  
WANG Junli<sup>1</sup>, KONG Xianghui<sup>2</sup>, LI Xuejun<sup>2</sup>, NIE Guoxing<sup>2\*</sup>

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

2. College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

**Abstract:** Sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) are nuclear transcription factors critical for regulating the expression of genes related to glucose and lipid metabolism. In order to investigate the molecular regulatory mechanisms of lipid metabolism and liver lipid accumulation in fish, the partial cDNA sequence of sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP-1) from grass carp has been identified by homology cloning and rapid amplification cDNA ends (RACE), and the structural features of the gene and its encoded protein have been analysed by bioinformatics methods. Using the method of real-time PCR, the expression pattern of SREBP-1 in eight different tissues of grass carp has been studied, and the expression levels of SREBP-1 in liver of grass carp under different feeding conditions with low-carbohydrates (carbohydrates content 24%) and high carbohydrates (carbohydrates content of 42%) have been studied. The result revealed that the obtained cDNA of SREBP-1 in grass carp is 4 760 bp in length, which consisted of a 3 426 bp open reading frame (ORF), encoding 1 141 amino acids. The amino acid sequence has a typical basic helix-loop-helix leucine zipper (bHLH-zip). Alignment based on amino acid sequence showed that grass carp SREBP-1 had a homology of 76% – 88% to its counterparts of other fishes. Phylogenetic analysis showed that grass carp SREBP-1 clustered with that of zebrafish. The SREBP-1 mRNA could be detected in all the examined tissues of grass carp. But the expression level in brain was the highest, followed by liver and intestines, and with a little expression in the kidney, spleen, muscle, fat and gonad tissues. Compared with the control, the expression level of SREBP-1 in high carbohydrates (42%) induced group increased significantly ( $P < 0.05$ ). The results showed that SREBP-1 gene may promote the utilization and in version of carbohydrates in grass carp under high carbohydrates loading conditions, which suggested that it may improve the utilization of carbohydrates in grass carp and be involved in its carbohydrates metabolism process. The research data can enrich the glucose metabolism regulation mechanism of fish, and are expected to provide a theoretical basis for improving the utilization efficiency of sugar in fish feed.

**Key words:** *Ctenopharyngodon idella*; SREBP-1; tissue distribution; carbohydrates metabolism; gene expression

**Corresponding author:** NIE Guoxing. E-mail: niegx@htu.cn