

李 樊,舒嘉傲,李隐侠,等. 湖羊 *SREBP1* 基因编码区序列克隆及表达分析[J].江苏农业学报,2022,38(3):721-729.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2022.03.018

湖羊 *SREBP1* 基因编码区序列克隆及表达分析

李 樊^{1,2}, 舒嘉傲², 李隐侠², 孟春花², 张晨俭², 张 俊², 钱 勇², 曹少先^{1,2}
(1.南京农业大学动物科技学院,江苏 南京 210095; 2.江苏省农业科学院畜牧研究所,江苏 南京 210014)

摘要: *SREBP1* 是一个重要的核转录因子,参与调控胆固醇和脂肪酸等合成和代谢,本研究旨在基于获得湖羊 *SREBP1* 基因序列并分析其组织表达谱和卵巢中的表达定位,了解其在湖羊中可能的生物学功能。本研究利用 RT-PCR 技术对周岁湖羊卵巢组织中 *SREBP1* 基因编码区序列进行克隆和测序,用生物信息学软件对序列进行拼接、同源比对和功能预测分析,荧光定量 PCR 检测其在湖羊组织中的表达模式,免疫组织化学染色法鉴定其在卵巢组织中的定位。结果显示:*SREBP1* 基因在湖羊卵巢组织中有 2 种剪接体,对应编码区长度分别为 3 369 bp 和 3 441 bp,分别编码 1 122 个和 1 146 个氨基酸残基;*SREBP1* 在哺乳动物中相对保守,含有经典的 bHLH-Zip 结构域,通过识别 E-boxes 或者固醇调节元件调控靶基因的表达;组织表达谱分析结果显示,*SREBP1* 在湖羊组织中广泛表达,提示 *SREBP1* 基因可能参与调控湖羊多种生物学过程。免疫组织化学染色法分析结果显示,*SREBP1* 基因在湖羊卵巢腔前卵泡和有腔卵泡中均有表达,主要定位于颗粒细胞、卵泡膜细胞和黄体细胞中,推测 *SREBP1* 可能在湖羊繁殖调控中发挥重要的作用。这些结果为进一步研究湖羊 *SREBP1* 基因的功能提供了基础。

关键词: *SREBP1*; 克隆; 序列特征; 湖羊

中图分类号: S858.26 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2022)03-0721-09

Sequence cloning and expression analysis of *SREBP1* gene in *Hu* sheep

LI Fan^{1,2}, SHU Jia-ao², LI Yin-xia², MENG Chun-hua², ZHANG Chen-jian², ZHANG Jun²,
QIAN Yong², CAO Shao-xian^{1,2}

(1.College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2.Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: *SREBP1* is an important nuclear transcription factor, which is involved in regulating the synthesis and metabolism of cholesterol and fatty acids and other biological functions. The purpose of this study is to understand the possible biological functions of *SREBP1* gene in *Hu* sheep based on its coding sequence, tissue expression profile and location in ovary. In this study, the coding region of *SREBP1* gene in *Hu* sheep ovarian tissue was cloned and sequenced by RT-PCR. Bioinformatics software was used for splicing, homologous alignment and functional prediction analysis. The expression pattern in *Hu* sheep tissue was detected by real-time PCR, and its localization in ovarian tissue was identified by immunohistochemistry. The results showed that *SREBP1* gene had two kinds of spliceosomes in *Hu* sheep ovary, and the length of corresponding coding regions was 3 369 bp and 3 441 bp, and encoding 1 122 and 1 146 amino acid residues, respectively.

SREBP1 was relatively conserved in mammals and contained the classical bHLH-Zip domain. In addition it could regulate the expression of target genes by identifying E-boxes or sterol regulatory elements. The results of tissue expression profile analysis showed that *SREBP1* was widely expressed in *Hu* sheep, suggesting that *SREBP1* gene may be involved in regulating a variety of biological processes

收稿日期:2021-11-25

基金项目:江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(20)3013]; 国家自然科学基金项目(31902155)

作者简介:李 樊(1997-),女,湖北孝感人,硕士研究生,主要从事动物分子生物学研究。(E-mail)lf15205159110@163.com

通讯作者:曹少先,(E-mail)sxcao@jaas.ac.cn

in *Hu* sheep. The results of immunohistochemical staining showed that *SREBP1* gene was expressed in both antral follicles and preantral follicles of *Hu* sheep ovary, mainly located in granulosa cells, theca cells and luteal cells, suggesting that *SREBP1* may play an important role in the reproductive regulation of *Hu* sheep. These results provide a basis for further study on the function of *SREBP1* gene in *Hu* sheep.

Key words: *SREBP1*; clone; sequence characteristics; *Hu* sheep

固醇调节元件结合蛋白 (Sterol regulatory element binding protein, SREBP) 是机体内重要的核转录因子家族,参与调控胆固醇和脂肪酸的合成,对维持动物体内脂质代谢稳态至关重要^[1-3]。SREBP 属于螺旋-茎环-螺旋亮氨酸拉链 (Basic-loop-helix-leucine zipper, bHLH-Zip) 家族,由 3 个结构域组成,分别包含由 1 个反式激活区域、1 个富含脯氨酸的区域和 bHLH-Zip 结构域组成的 NH₂ 端,2 个疏水跨膜片段和 1 个 COOH 末端结构域^[4]。SREBP 一般在内质网合成之后被运输到高尔基体,在高尔基体中依次经过蛋白酶 S₁P 和 S₂P 水解,从膜中释放出 NH₂ 末端结构域然后异位到细胞核,在细胞核内作为转录因子与靶基因的启动子结合从而激活相关基因的转录^[5]。

SREBP 主要包括 *SREBP1* 和 *SREBP2* 2 个基因,其中 *SREBP1* 在哺乳动物中有 2 种亚型: *SREBP1A* 和 *SREBP1C*^[6]。研究结果显示, *SREBP1A* 主要参与调控胆固醇、脂肪酸和甘油三酯合成,而 *SREBP1C* 更能促进与脂肪酸相关基因的转录^[7]。截至目前,人、小鼠、山羊和鸡中的 *SREBP1A* 和 *SREBP1C* 2 个基因亚型的序列及功能差异已有报道^[8-11],但在绵羊中鲜见研究。本研究以江苏省特色绵羊品种——湖羊为研究对象,扩增湖羊卵巢组织中 *SREBP1* 基因编码区序列并进行序列特征分析,鉴定其在湖羊各个组织中的表达模式和在卵巢组织中的定位,为进一步研究该基因在绵羊中的功能及调控机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

试验羊为 3 只健康状况良好的周岁湖羊母羊,来自江苏西来生态农业有限公司,体质量 (33.0±1.6) kg,屠宰后立即采集心、肝、脾、肾、大肠、小肠、卵巢、子宫和肌肉等,样品分成 2 份,1 份置液氮中带回实验室,存放于 -80 °C 备用,1 份放入 4% 多聚甲醛中固定备用。

1.2 RNA 提取和逆转录

参照动物组织总 RNA 提取试剂盒 (百泰克生物技术有限公司产品,北京) 说明书提取湖羊各组织样品 RNA, Nandrop 分光光度计测定 RNA 质量和浓度, 逆转录试剂盒 (诺唯赞生物科技有限公司产品,南京) 将 mRNA 逆转录为 cDNA, 反应体系: 1 000 ng RNA, 4 μl 4×g DNA wiper Mix, 加 RNase Free ddH₂O 至 16 μl, 混合均匀, 置于 PCR 仪上进行基因组 DNA 去除, 程序为 42 °C 2 min, 随后加入 5×HiScript II qRT SuperMix II 4 μl 吹打混匀, 50 °C 15 min, 85 °C 5 s, 将 RNA 逆转录为 cDNA, 置 -20 °C 保存备用。

1.3 引物合成与 PCR 扩增

根据 NCBI 上绵羊 *SREBP1* 预测序列 (XM_027974784.2 和 XM_027974786.2), 采用 Primer Premier 5.0 软件设计 4 对特异性引物 P1~P4, 用于分段扩增湖羊 *SREBP1* 基因编码区序列; 设计 *SREBP1* Real-time PCR 引物, 以 β -actin 为内参基因进行湖羊各组织 *SREBP1* 基因表达谱的鉴定。引物由南京擎科公司合成, 引物序列见表 1。

RT-PCR 反应体系为 25.0 μl, 其中含 12.5 μl 2×Taq master Mix, 1.0 μl cDNA, 上游和下游引物各 1.0 μl, 9.5 μl ddH₂O。反应条件为: 预变性 95 °C 3 min; 95 °C 15 s 变性, 退火 15 s (具体退火温度见表 1), 72 °C 90 s, 共 35 个循环; 72 °C 5 min。

1.4 克隆测序

RT-PCR 扩增获得的片段经过胶回收试剂盒获得纯化的目的片段, 将目的片段与 pMD-19T 载体充分混合, 16 °C 连接 30 min, 连接液转化 DH5 α 感受态, 涂布在 LB 板上, 37 °C 过夜。挑取单克隆培养菌, PCR 鉴定阳性的菌液送南京擎科公司测序。

1.5 湖羊 *SREBP1* 基因生物信息学分析

分段扩增、克隆测序得到的 *SREBP1* 序列用 Lasergene 和 DNAMAN 6.0 软件比对、拼接和翻译。*SREBP1* 基因开放阅读框的预测采用 NCBI 的 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf>) 在线软件进行。使用 ExPASy 数据库在线工具 (<http://www.expasy.org>)

tp://web. expasy. org/cgi-bin/protparam/protparam) 进行 *SREBP1* 氨基酸序列特征及蛋白质理化性质分

析,采用 SMART 网站在线工具(<http://smart.embl-heidelberg.de>) 进行蛋白质功能域预测分析。

表 1 引物序列及 PCR 反应参数和用途

Table 1 Primer sequences, PCR reaction parameters and usage

引物名称	引物序列 (5'→3')	退火温度 (°C)	产物长度 (bp)	用途
P1	F: ATGCGGAGACACCATCAAGC R: CGTAGGGCGGGTCAAACA	57.0	356	CDS 扩增
P2	F: GTGAATTCTGTGCTCGGAGA R: GCTCCACATCTGTTTTCAT	54.5	786	CDS 扩增
P3	F: ACAGCCATAGCCACCCCC R: GCCACGGACACAGCATCT	58.0	1 496	CDS 扩增
P4	F: GATGCGGCCCTCGTCTAC R: GCCGCTGATACGGAGACC	58.5	1 488	CDS 扩增
P5	F: TCAACGAAGCGGCCTTGGAGCTG R: CCACCTTCTATGTCGGTCAGCA		80	<i>SREBP1</i> Real-time PCR
P6	F: ATCACCATCGGCAATGAG R: CCGTGTGGCGTAGAGGT		151	β -actin Real-time PCR

1.6 湖羊各组织中 *SREBP1* 基因的实时荧光定量 PCR

以 β -actin 为内参基因,Real-time PCR 检测湖羊心、肝、脾、肾、大肠、小肠、卵巢、子宫和肌肉组织中 *SREBP1* 基因的表达水平。每 20.0 μ l 反应体系中含 2.0 μ l cDNA, 10.0 μ l 2 \times ChamQ SYBR qPCR Master Mix, 上游引物和下游引物各 0.4 μ l, 7.2 μ l ddH₂O。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环; 最后 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s, 95 $^{\circ}$ C 15 s。每个样本重复 3 次。

1.7 湖羊卵巢组织的免疫组织化学染色

采用免疫组织化学检测 *SREBP1* 在湖羊卵巢组织中的表达情况, 具体操作如下: 取 4% 多聚甲醛中固定 36 h 的湖羊卵巢组织, 依次置于 70%、80%、90%、95%、100% (体积比) 颐乙醇中脱水, 置于二甲苯中进行透明后, 用石蜡包埋并切片 (厚 4 μ m)。石蜡切片用二甲苯脱蜡, 依次在逐步降低浓度的乙醇中水化处理, 然后在柠檬酸三钠溶液中高火热修复 10 min, 自然冷却, 随后 3% 的双氧水敷育 30 min, 阻断内源性过氧化氢酶, PBS 充分漂洗 3 次, 1 次 5 min, 用 10% BSA 封闭 1 h 后, 兔源抗 *SREBP1* 抗体 (稀释浓度: 1: 100, 体积比) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 充分漂洗 3 次, 1 次 5 min, 二抗 (Abcam; 稀释浓度:

1: 500) 室温孵育 60 min, PBS 充分漂洗 3 次, 1 次 5 min, DAB (Sigma-Aldrich) 显色剂显色 5 min, 自来水冲洗终止染色, 用苏木精复染, 用乙醇脱水并置于二甲苯中透明, 中性树胶封片。将切片置于显微镜下观察, 采集图像, 用 imageJ 软件进行光密度值分析。

2 结果与分析

2.1 湖羊 *SREBP1* 基因克隆

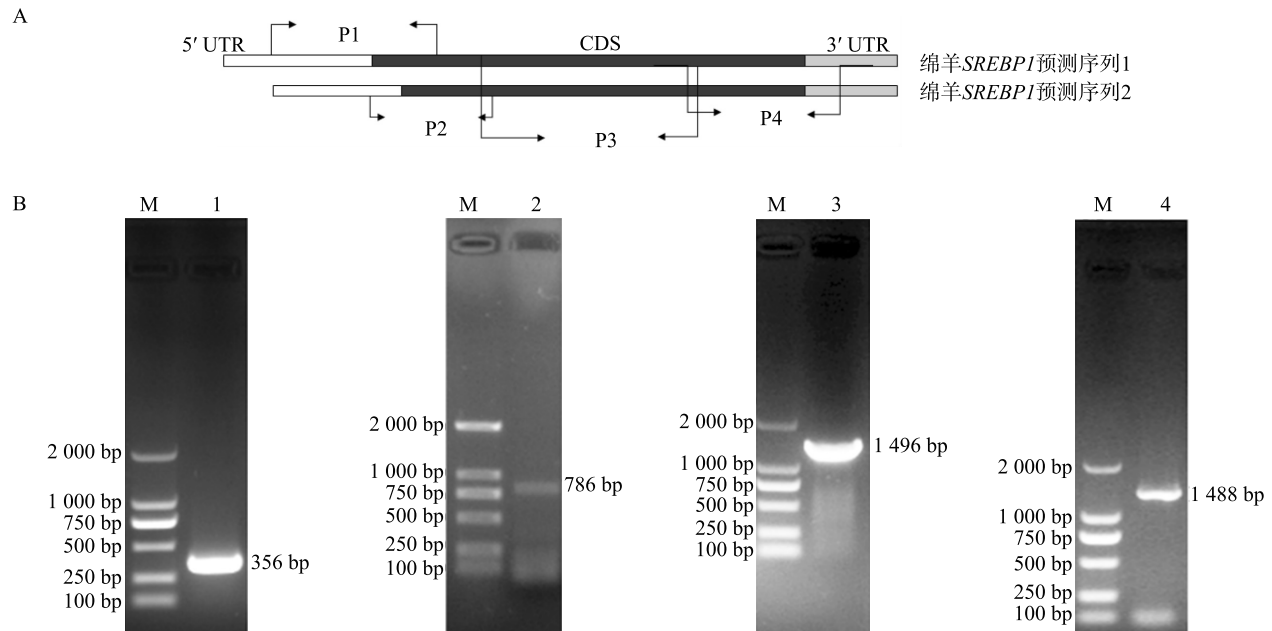
根据 NCBI 上绵羊 *SREBP1* 预测序列, 分段设计 4 对引物 (图 1A), 以湖羊卵巢组织 cDNA 为模板, 扩增湖羊 *SREBP1* 基因编码区全序列 (图 1B), 目的条带清晰, 片段大小与预测结果一致。回收扩增的目的条带测序, 发现与预测序列高度同源, 说明获得的序列为湖羊 *SREBP1* 编码区序列。

2.2 湖羊 *SREBP1* 基因序列特征分析

将 PCR 扩增获得的 *SREBP1* 分段序列进行拼接, 得到 *SREBP1* 在湖羊卵巢组织中的 2 个剪接体, 拼接好的 2 个序列用 ORF Finder 在线软件分析 *SREBP1* 基因的开放阅读框, 预测对应编码区长度分别为 3 441 bp 和 3 369 bp, 命名为 *SREBP1L* 和 *SREBP1S*。DNAMAN 比对结果显示, 扩增获得的湖羊 *SREBP1L* 核苷酸序列与 NCBI 上绵羊预测 *SREBP1* 的剪接体 X1 (XM_027974784.2)、X2 (XM

_042255744.1)、X3 (XM_042255745.1) 和 X4 (XM_027974786.2) 编码区的同源性分别为 99.91%、96.89%、96.48% 和 96.81%, 其中与 X1 编码区的同源性最高, 仅在 c. 1855T>C、c. 2365A>C 和 c. 2799A>

C 有 3 个突变, 没有插入和缺失; *SREBP1S* 核苷酸序列与 NCBI 绵羊预测剪接体 X1、X2、X3 和 X4 编码区的同源性分别为 96.89%、100.00%、99.29% 和 94.05%, 与 X2 编码区序列完全一致。



A: *SREBP1* CDS 区分段扩增引物设计位置; B: 4 对引物扩增电泳图。M: 2 000 DNA marker; 1、2、3、4 分别对应 P1、P2、P3、P4 引物对扩增片段。P1、P2、P3、P4 见表 1。

图 1 湖羊 *SREBP1* CDS 区分段扩增电泳图

Fig.1 Segmented amplification electrophoresis of *SREBP1* gene CDS in *Hu* sheep by PCR

以扩增获得的湖羊 *SREBP1L* 序列为对象, 与其他物种序列的同源性比对后发现, 与人类 (XM_024450894.1)、猪 (NM_214157.1)、小鼠 (NM_011480.4)、牛 (NM_001113302.1)、山羊 (NM_001285755.1) 和鸡 (NM_204126.2) 编码区的同源性分别为 83.79%、87.79%、78.88%、96.48%、98.88% 和 67.94%, 与反刍动物牛和山羊的同源性较高, 与禽类的同源性较低。

2.3 湖羊 *SREBP1* 蛋白氨基酸序列和结构分析

扩增获得的湖羊 *SREBP1* 2 个剪接体序列分别编码 146 和 122 个氨基酸残基 (*SREBP1L* 和 *SREBP1S*) (图 2)。氨基酸序列比对结果显示, *SREBP1L*、*SREBP1S* 氨基酸序列分别与小鼠 *SREBP1A* (NP_035610)、*SREBP1C* (NP_001345243) 的氨基酸序列同源性为 79.40%、79.76%; 与人的 *SREBP1A* (NP_001375318)、*SREBP1C* (NP_001308025) 的氨基酸序列同源性为 85.03%、85.24%; *SREBP1S* 氨基酸序列与 *SREBP1L* 氨基酸序列相比, 仅在 N 端缺失了 24 个氨基

酸残基, 这与小鼠、人 *SREBP1C* 相对于 *SREBP1A* 的 N 末端缺失 24 个氨基酸残基类似, 且在 N 端 24 个氨基酸残基中, 湖羊与小鼠的同源性为 70.8%, 与人类的同源性为 83.3% (图 3)。

湖羊 *SREBP1L* 和 *SREBP1S* 编码的蛋白质氨基酸序列中亮氨酸 (Leu, L) 的比例最高, 分别为 14.0% 和 13.8%, 其次为丙氨酸 (Ala, A), 比例分别为 12.6% 和 12.3%, 二者均不含吡咯赖氨酸 (Pyl, O) 和硒半胱氨酸 (Sec, U) (图 4)。

2.4 湖羊 *SREBP1* 蛋白理化性质

湖羊 *SREBP1* 基因编码的 2 个蛋白质 (*SREBP1L* 和 *SREBP1S*) 预测相对分子质量分别为 121 050.78 和 118 550.99, 理论等电点分别为 8.81 和 9.16。预测正电荷氨基酸残基数均为 104 个, 负电荷氨基酸残基数分别为 93 个和 86 个, 体外半衰期均为 30 h。*SREBP1* 蛋白是一个疏水性蛋白, 湖羊 *SREBP1* 基因编码的 2 个蛋白质亲/疏水性总和 (*GRAVY*) 分别为 -0.099 和 -0.106。此蛋白质不存在

信号肽,与其他物种的 *SREBP1* 蛋白一样,湖羊 *SREBP1* 编码的 2 个不同蛋白质均在 *N* 端有一段脯氨酸富集区域及典型的 bHLH 结构域(图 2)。

SREBP1S	1	MD-----CTF-----EDMLQLINNQDSDFPGLFDPYAGGGAGTTDPASPDPASSPGSLSPPTMS	56
SREBP1L	1	MDEPPFNEAALELALAEPCELDAAALLTDIEDMLQLINNQDSDFPGLFDPYAGGGAGTTDPASPDPASSPGSLSPPTMS	80
pro-rich			
SREBP1S	57	SSLEGFLGATKATPPPLSPQPAPTPLKMPYSPVAFSPGPGIKEEPAPLTILQPTPPQPLPGALLPQSVAAATTPPQFSSA	136
SREBP1L	81	SSLEGFLGATKATPPPLSPQPAPTPLKMPYSPVAFSPGPGIKEEPAPLTILQPTPPQPLPGALLPQSVAAATTPPQFSSA	160
pro-rich			
SREBP1S	137	PIVGYPSPGGFSTGTTPGSSSQPLAGPPLASPLGVPVPSLHSQVQSAAPQQLTAIATPTVAPGATAVTSIQVVPVLL	216
SREBP1L	161	PIVGYPSPGGFSTGTTPGSSSQPLAGPPLASPLGVPVPSLHSQVQSAAPQQLTAIATPTVAPGATAVTSIQVVPVLL	240
pro-rich			
SREBP1S	217	QPHFIKADSLLLTMTKTDVGAPLKAAGIRSLGPGTAMQAAPLQTLVSGGAILATVPLVVDTKLPINRLAGGKAPGSAQS	296
SREBP1L	241	QPHFIKADSLLLTMTKTDVGAPLKAAGIRSLGPGTAMQAAPLQTLVSGGAILATVPLVVDTKLPINRLAGGKAPGSAQS	320
pro-rich			
SREBP1S	297	RGEKRTAHNAIEKRYRSSINDKIVELKDLVVGTEAKLNKSAVLKKAIDYIRFLQHSNQKLKQENLSLRTAVHKSKSLKDL	376
SREBP1L	321	RGEKRTAHNAIEKRYRSSINDKIVELKDLVVGTEAKLNKSAVLKKAIDYIRFLQHSNQKLKQENLSLRTAVHKSKSLKDL	400
bHLH			
SREBP1S	377	VSACGSGGSTDVPMEGMKEVVDLSPPPSDAGSPSQSSPLSLGSRGSSSGSGSDSEPDSPVFEDGQVNPPELLPAPHSQ	456
SREBP1L	401	VSACGSGGSTDVPMEGMKEVVDLSPPPSDAGSPSQSSPLSLGSRGSSSGSGSDSEPDSPVFEDGQVNPPELLPAPHSQ	480
bHLH			
SREBP1S	457	GMLDRSLALCALVFLCLSCNPLASLLGSRGPGAGSDTTSINHRPGRSMLGAEGRDGPGWAPWLLPPLVWLMNGLLVLS	536
SREBP1L	481	GMLDRSLALCALVFLCLSCNPLASLLGSRGPGAGSDTTSINHRPGRSMLGAEGRDGPGWAPWLLPPLVWLMNGLLVLS	560
bHLH			
SREBP1S	537	LALLFVYGEPTVRPHSRPAVHFWRHRKQADLDLARGDFAQAAQQLWLALRALGRPLTPHLDLACSLWLSIRHLLQRLW	616
SREBP1L	561	LALLFVYGEPTVRPHSRPAVHFWRHRKQADLDLARGDFAQAAQQLWLALRALGRPLTPHLDLACSLWLSIRHLLQRLW	640
bHLH			
SREBP1S	617	VGRWLAWAGGLRRDRALQADARTSARDAALVYHKLHLQHTMGKYSGGHLAAANLALSALNLAECAGDAVSATLAEIYV	696
SREBP1L	641	VGRWLAWAGGLRRDRALQADARTSARDAALVYHKLHLQHTMGKYSGGHLAAANLALSALNLAECAGDAVSATLAEIYV	720
bHLH			
SREBP1S	697	AAALRVKASLPRALHFLTRFFLSSARQACLAQSGSVPLAMQWLCHPVGHRFFVDGNWALCSAPRDSLYRVAGNPVDPLAQ	776
SREBP1L	721	AAALRVKASLPRALHFLTRFFLSSARQACLAQSGSVPLAMQWLCHPVGHRFFVDGNWALCSAPRDSLYRVAGNPVDPLAQ	800
bHLH			
SREBP1S	777	VTQLFREHLRLALNCVAQSPSPGSAEGDKEFSDALGYLQLLNSCSDMAGAPACSFSSISSMAATPGTDPVAKWWASLT	856
SREBP1L	801	VTQLFREHLRLALNCVAQSPSPGSAEGDKEFSDALGYLQLLNSCSDMAGAPACSFSSISSMAATPGTDPVAKWWASLT	880
bHLH			
SREBP1S	857	AVVTHWLRDEEAAERLYPLVEHLPRALQESEKPLPRAALHSFKAARAILGRGKAESGPASLVMCEKASGYLQDSLATTP	936
SREBP1L	881	AVVTHWLRDEEAAERLYPLVEHLPRALQESEKPLPRAALHSFKAARAILGRGKAESGPASLVMCEKASGYLQDSLATTP	960
bHLH			
SREBP1S	937	ADSSIDKAMQLLLCDLLLVARTSLWQQKLPAPTQASQPGGGAQASALELRGFQRLDLSGLRRLAQNVPRMRRVFLHEA	1 016
SREBP1L	961	ADSSIDKAMQLLLCDLLLVARTSLWQQKLPAPTQASQPGGGAQASALELRGFQRLDLSGLRRLAQNVPRMRRVFLHEA	1 040
bHLH			
SREBP1S	1 017	TARLMAGASPARTHQLDRSLRRRVGPCKGGAVELESRTTRREQAEALLASCYLPPGFSLAPGQVRVGMLEAAARTLEK	1 096
SREBP1L	1 041	TARLMAGASPARTHQLDRSLRRRVGPCKGGAVELESRTTRREQAEALLASCYLPPGFSLAPGQVRVGMLEAAARTLEK	1 120
bHLH			
SREBP1S	1 097	IGDRRLHDCQQLMRLGGGTTVTSS	1 122
SREBP1L	1 121	IGDRRLHDCQQLMRLGGGTTVTSS	1 146

单实线表示脯氨酸富集区域,双实线表示 bHLH 结构域。

图 2 *SREBP1* 基因编码的 2 个蛋白质氨基酸序列比对

Fig.2 Alignment of amino acid sequences of two proteins encoded by *SREBP1* gene in *Hu* sheep

小鼠SREBP1A	ELAFGEAALEQTLAEMCELDIAVLNDIEDMLQLINNQDSDFPGLFDPYAGGGAGTTDPASPDPASSPGSLSPPTMS	60
小鼠SREBP1CCTIEDMLQLINNQDSDFPGLFDPYAGGGAGTTDPASPDPASSPGSLSPPTMS	36
人SREBP1A	EPFFSEAALEQALGEPCLDAAALLTDIEDMLQLINNQDSDFPGLFDPYAGGGAGTTDPASPDPASSPGSLSPPTMS	60
人SREBP1CCTIEDMLQLINNQDSDFPGLFDPYAGGGAGTTDPASPDPASSPGSLSPPTMS	36
湖羊SREBP1L	EPFFNEAALELALAEPCELDAAALLTDIEDMLQLINNQDSDFPGLFDPYAGGGAGTTDPASPDPASSPGSLSPPTMS	60
湖羊SREBP1SCTIEDMLQLINNQDSDFPGLFDPYAGGGAGTTDPASPDPASSPGSLSPPTMS	36
bHLH		
小鼠SREBP1ALLASCYLPPGFSLAPGQVRVGMLEAAARTLEKIGDRRLHDCQQLMRLGGGTTVTSS	1 134
小鼠SREBP1CLLASCYLPPGFSLAPGQVRVGMLEAAARTLEKIGDRRLHDCQQLMRLGGGTTVTSS	1 110
人SREBP1ALLASCYLPPGFSLAPGQVRVGMLEAAARTLEKIGDRRLHDCQQLMRLGGGTTVTSS	1 145
人SREBP1CLLASCYLPPGFSLAPGQVRVGMLEAAARTLEKIGDRRLHDCQQLMRLGGGTTVTSS	1 123
湖羊SREBP1LLLASCYLPPGFSLAPGQVRVGMLEAAARTLEKIGDRRLHDCQQLMRLGGGTTVTSS	1 146
湖羊SREBP1SLLASCYLPPGFSLAPGQVRVGMLEAAARTLEKIGDRRLHDCQQLMRLGGGTTVTSS	1 122

方框表示每个物种编码 2 种蛋白质 *N* 端差异氨基酸。

图 3 湖羊 *SREBP1L*、*SREBP1S* 与人类和小鼠 *SREBP1A*、*SREBP1C* 氨基酸序列比对

Fig.3 Amino acid sequence alignment between *SREBP1L*, *SREBP1S* of *Hu* sheep and *SREBP1A*, *SREBP1C* of human and mouse

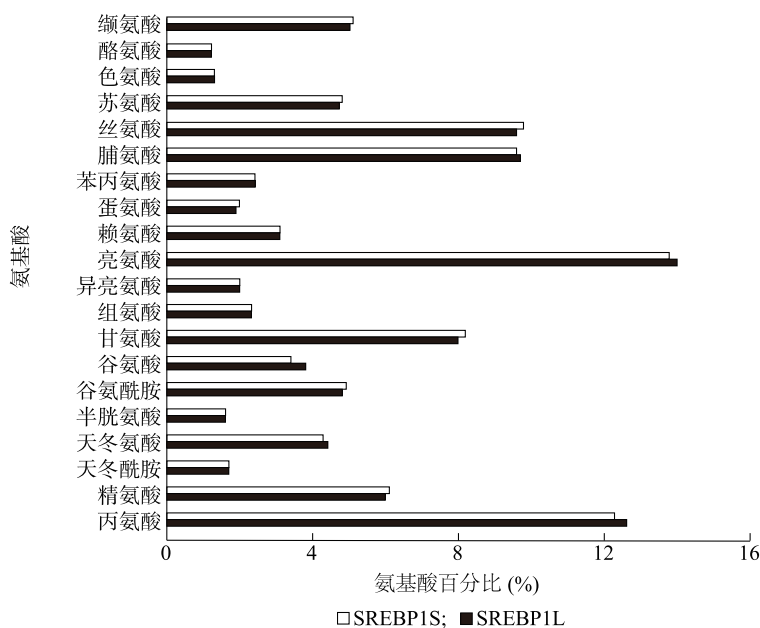


图 4 湖羊 *SREBP1* 基因编码的 2 个蛋白质氨基酸组成

Fig.4 Amino acid composition of two proteins encoded by *SREBP1* gene in *Hu* sheep

2.5 湖羊 *SREBP1* 基因组织表达谱鉴定

图 5 显示,湖羊心、肝、脾、肾、大肠、小肠、卵巢、子宫、和肌肉等组织中均有 *SREBP1* 基因的表达,心脏和肝脏中的表达量较高,在肌肉中表达量最低。

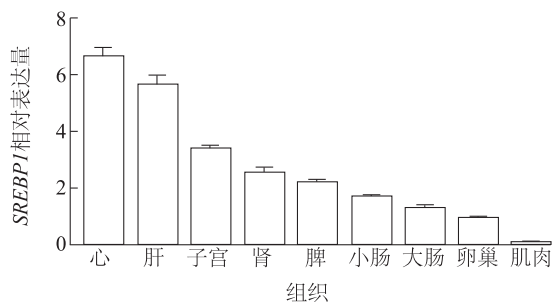


图 5 湖羊 *SREBP1* 基因在各组织中的表达

Fig.5 Expression of *SREBP1* gene in different tissues of *Hu* sheep

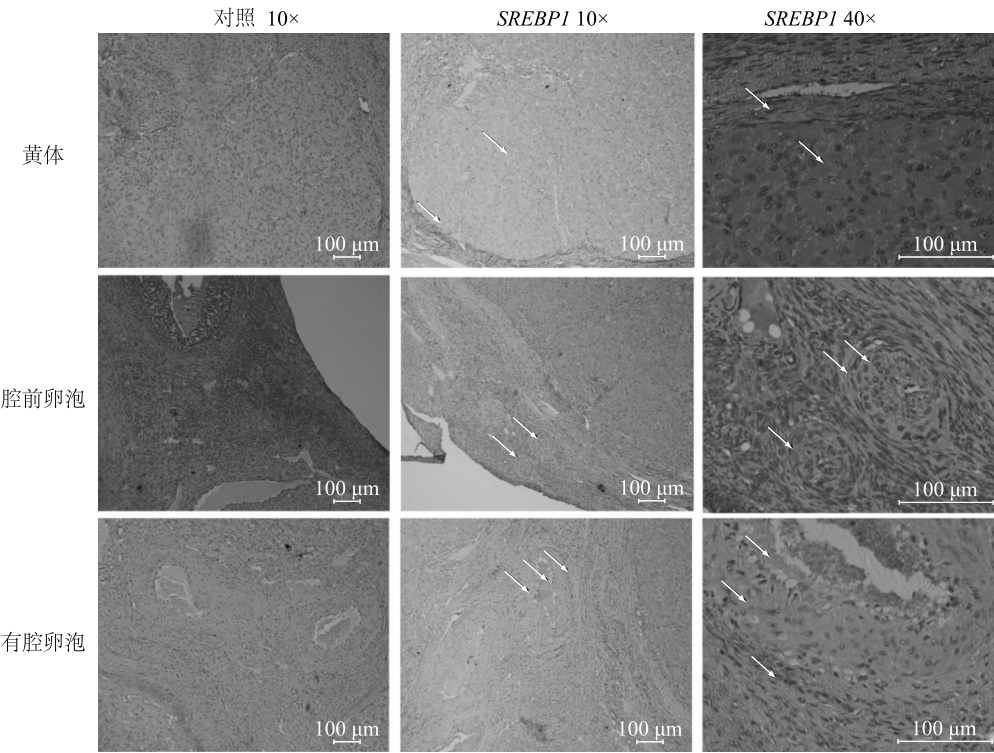
2.6 *SREBP1* 基因在湖羊卵巢组织中的表达

湖羊卵巢组织经免疫组织化学染色后,其不同发育阶段卵泡中均存在棕黄色阳性产物,结果显示 *SREBP1* 在湖羊卵巢腔前卵泡和有腔卵泡中均有表达,主要定位于颗粒细胞、卵泡膜细胞和黄体细胞中(图 6),且 *SREBP1* 蛋白表达量无显著差异(图 7)。

3 讨论

固醇调节元件蛋白 *SREBP1*,1995 年从人 *hela* 细胞核抽提物中分离并鉴定^[8],随后,小鼠^[9]、鸡^[10]和山羊^[11]的 *SREBP* 序列被成功克隆,为后续 *SREBP1* 相关功能的研究提供了重要的基础。*SREBP1* 主要由 2 个亚型组成, *SREBP1A* 和 *SREBP1C*,序列差异主要在 NH_2 末端的 24 个氨基酸残基,其他序列完全一致^[11],其核酸序列差异主要在启动子区和第一外显子区。本试验通过 PCR 分段扩增和序列拼接获得湖羊 *SREBP1* 基因编码区全序列,分析发现扩增后获得的 2 个 *SREBP1* 不同剪接体 *SREBP1L* 和 *SREBP1S*。相对于 *SREBP1L*, *SREBP1S* 的氨基酸序列在 NH_2 端有 24 个氨基酸缺失,其余的氨基酸序列完全一致,推测本研究得到的 *SREBP1L* 和 *SREBP1S* 可能是湖羊 *SREBP1* 的 2 个亚型, *SREBP1A* 和 *SREBP1C*。

研究结果表明, *SREBP1A* 主要参与胆固醇合成,而 *SREBP1C* 参与脂肪酸代谢。当细胞里的胆固醇供应充足时, *SCAP* (*SREBP* 裂解活化蛋白)-*SREBP* 复合物通过固醇原件结合蛋白裂解激活蛋白 *SCAP* 与胰岛素调节蛋白 *INSIG* 结合形成



箭头表示 SREBP1 蛋白在卵巢中的定位。

图 6 *SREBP1* 在湖羊卵巢组织中的表达

Fig.6 The expression of *SREBP1* in ovary of *Hu* sheep

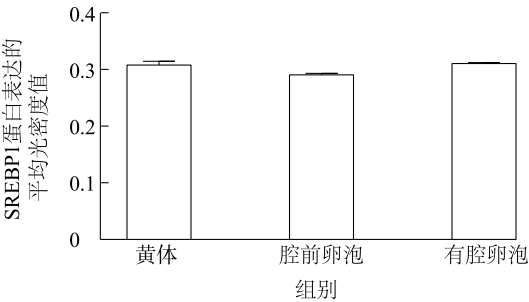


图 7 *SREBP1* 蛋白表达的平均光密度值

Fig.7 The average optical density of *SREBP1* protein expression

SCAP-SREBPs-INSIG 复合物嵌入内质网中^[3,12]。当胆固醇水平变低或者胆固醇的需求变高时, SCAP 与 INSIG 分离, SCAP-SREBP 复合物易位到高尔基体, 被高尔基体中的蛋白水解酶 *SIP* 加工, 使 SREBP 与 SCAP 裂解, 裂解后有活性的 SREBP 转运到细胞核, 激活胆固醇合成通路中关键酶羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (*HMGCR*) 基因或者脂

肪合成关键基因 (*LDLR*)^[3], 增加胆固醇和脂肪合成, 调控机体内胆固醇和脂肪合成的稳态。进一步的研究发现, *SREBP1* 中含有的 bHLH-Zip 结构域能与 E-boxes (5'-CANNTG-3') 和固醇调节元件 (Sterol regulatory element, SRE) (5'-TCACNCCAC-3') 结合, 调控靶基因表达, 进而调控各种生物学过程^[13]。本研究发现, 湖羊 *SREBP1* 基因序列与哺乳动物 *SREBP1* 基因序列同源性较高, 特别是与反刍动物同源性高达 96.48% 以上, 说明 *SREBP1* 是比较保守的转录因子。氨基酸序列分析结果表明, 与其他物种的 *SREBP1* 相似, 湖羊 *SREBP1L* 和 *SREBP1S* 都含有经典的 bHLH-Zip 结构, 与前人的研究结果一致^[13]。

组织表达谱分析结果显示, *SREBP1* 在牛、鸡等动物组织中广泛表达, 可能参与调控各种生物学进程^[14-16]。在 HT29 细胞中过表达 *SREBP1* 导致 *MMP7* 表达量上调、激活 NF-kappa B 信号通路

并促进结肠癌、直肠癌的侵袭^[17]。在肾脏中,*SREBP1* 激活 TGF- β 信号,在肾纤维化中发挥重要的调控作用^[18]; *SREBP1* 与子宫内膜容受性相关^[19]。湖羊组织表达谱显示, *SREBP1* 在湖羊的所有组织中均有表达,提示湖羊 *SREBP1* 参与多种组织生物学过程。但有研究结果显示, *SREBP1* 在牛的背最长肌中高表达,而本研究结果显示其在湖羊肌肉组织中表达量最低,可能是因为背最长肌脂肪含量较高,与样品采集的部位有关^[15]。

包梅等^[20]的研究结果显示, *SREBP1* 蛋白主要分布在牦牛乳腺腺泡上皮细胞、乳腺导管上皮细胞及血管内皮细胞,且 *SREBP1* mRNA 表达量与牦牛泌乳量有关。而本研究的免疫组织化学染色结果发现, *SREBP1* 在湖羊卵巢各级卵泡膜细胞、颗粒细胞和黄体细胞中均有表达,且研究发现 *SREBP1* 在卵巢组织中也发挥功能。多囊卵巢综合征女性和子宫内膜癌女性子宫内膜的 *SREBP1* 基因表达水平与正常女性相比显著增加^[21],且 *SREBP1* 调控人的卵巢颗粒-黄体细胞中 LHCGR (促黄体生成素受体) 表达和孕酮水平^[22]。提示 *SREBP1* 可能参与调控湖羊卵巢发育进而调控繁殖性能。

本研究获得湖羊 *SREBP1* 基因 2 个剪接体,分别编码 SREBP1L 和 SREBP1S,含有经典的 bHLH-Zip 结构域。 *SREBP1* 在湖羊组织中广泛表达,在湖羊卵巢各级卵泡均有表达,主要定位于颗粒细胞和黄体细胞中。这些结果为进一步研究湖羊 *SREBP1* 的生物学功能提供了线索。

参考文献:

- [1] SHIMANO H, SATO R. SREBP-regulated lipid metabolism: convergent physiology-divergent pathophysiology[J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2017, 13(12): 710-730.
- [2] XUE L, QI H, ZHANG H, et al. Targeting SREBP-2-regulated mevalonate metabolism for cancer therapy[J]. *Frontiers in Oncology*, 2020, 10: 1510.
- [3] BROWN M, RADHAKRISHNAN A, GOLDSTEIN J. Retrospective on cholesterol homeostasis: the central role of scap[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2017, 87: 1-25.
- [4] GAO Y, ZHOU Y, GOLDSTEIN J, et al. Cholesterol-induced conformational changes in the sterolsensing domain of the Scap protein suggest feedback mechanism to control cholesterol synthesis[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(21): 8729-8737.
- [5] GOLDSTEIN J, DEBOSE-BOYD R, BROWN M. Protein sensors for membrane sterols[J]. *Cell*, 2006, 124: 35-46.
- [6] LEE S, KANG S, ANG M J, et al. Deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c induces schizophrenia-like behavior in mice[J]. *Genes, Brain and Behavior*, 2018, 18(4): e12540.
- [7] YU X, LIN Q, WU Z, et al. ZHX2 inhibits SREBP1c-mediated de novo lipogenesis in hepatocellular carcinoma via miR-24-3p[J]. *The Journal of Pathology*, 2020, 252(4): 358-370.
- [8] HUA X, WU J, GOLDSTEIN J, 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: 667-673.
- [9] INOUE J, SATO R. A novel splicing isoform of mouse sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1)[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1999, 63: 243-245.
- [10] ASSAF S, HAZARD D, PITEL F, et al. Cloning of cDNA encoding the nuclear form of chicken sterol response element binding protein-2 (SREBP-2), chromosomal localization, and tissue expression of chicken *SREBP-1* and *SREBP-2* genes[J]. *Poult Sci*, 2003, 82(1): 54-61.
- [11] HF X, J L, HP W, et al. Sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) c promoter: characterization and transcriptional regulation by mature SREBP-1 and liver X receptor alpha in goat mammary epithelial cells[J]. *J Dairy Sci*, 2016, 99(2): 1595-1604.
- [12] ADAMS C, REITZ J, BRABANDER J, et al. Cholesterol and 25-hydroxycholesterol inhibit activation of SREBPs by different mechanisms, both involving SCAP and insigs[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 279: 52772-52780.
- [13] KIM J B, SPOTTS G, 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: 2582-2588.
- [14] 张乐,彭燮,刘扬,等.牛 *A-FABP* 与 *SREBP1* 基因的组织表达规律研究[J]. *家畜生态学报*, 2014, 35(11): 18-23.
- [15] 程景,张元庆,王曦,等.晋南牛固醇结合原件蛋白 1 基因在不同组织中表达规律及其与肌肉脂肪含量的相关性研究[J]. *动物营养学报*, 2021, 33(7): 4079-4087.
- [16] ASSAF S, HAZARD D, PITEL F, et al. Cloning of cDNA encoding 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]. *Poult Sci*, 2003, 82(1): 54-61.

- [17] GAO Y, NAN X, SHI X, et al. SREBP1 promotes the invasion of colorectal cancer accompanied upregulation of MMP7 expression and NF- κ B pathway activation[J]. BMC Cancer, 2019, 19:685.
- [18] DOROTEA D, KOYA D, HA H. Recent insights into SREBP as a direct mediator of kidney fibrosis via lipid-independent pathways [J]. Frontiers in Pharmacology, 2020, 11:265.
- [19] TAPIA PIZARRO A, VILOS C, MARIN J, et al. Bioinformatic detection of E47, E2F1 and SREBP1 transcription factors as potential regulators of genes associated to acquisition of endometrial receptivity[J]. Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E, 2011, 9: 14.
- [20] 包 梅,赵生贤,马 悦,等. 不同生理状态下牦牛乳腺组织中 *SREBP1* 的表达[J]. 中国兽医科学,2021,51(5):656-662.
- [21] SHAFIEE M N, MONGAN N, SEEDHOUSE C, et al. Sterol regulatory element binding protein-1 (*SREBP1*) gene expression is similarly increased in polycystic ovary syndrome and endometrial cancer[J]. Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica, 2017, 96 (5):556-562.
- [22] LI Y, GUO X, GULAPPA T, et al. SREBP plays a regulatory role in LH/hCG receptor mRNA expression in human granulosa-lutein cells[J]. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2019, 104 (10):4783-4792.

(责任编辑:陈海霞)