

二倍体和四倍体泥鳅 *IGFBP-1* 基因的表达 及其与 DNA 甲基化的相关性

张曼曼 高泽霞 冯 兵 罗双双 曹文怡 周小云

华中农业大学水产学院/农业动物遗传育种与繁育教育部重点实验室, 武汉 430070

摘要 为探讨胰岛素样生长因子结合蛋白-1(*IGFBP-1*)基因在二倍体和四倍体泥鳅之间的表达差异及其与DNA甲基化的相关性,克隆二倍体、四倍体泥鳅的CDS序列和启动子序列,并分别采用qRT-PCR和亚硫酸氢盐测序技术(BSP)分析*IGFBP-1*在二倍体、四倍体泥鳅中的表达水平及启动子区和第一外显子区的甲基化水平。结果显示,泥鳅的*IGFBP-1*基因CDS序列长789 bp,编码262个氨基酸,二倍体、四倍体泥鳅间有5 bp的差异,但氨基酸序列完全相同。在二倍体、四倍体中分别克隆得到2 341 bp和2 331 bp的启动子序列,倍性间的序列相似度达99%,启动子序列中包含典型元件TATA-box,以及SP1、CREB、C/EBP、POU2F2、GATA-2/3/4和SRY等转录因子结合位点。泥鳅的*IGFBP-1*基因主要在肝脏中表达,且四倍体泥鳅肝脏中*IGFBP-1*的表达水平显著高于二倍体($P<0.01$)。四倍体泥鳅*IGFBP-1*基因启动子及第一外显子区的甲基化水平均比二倍体低,其中四倍体肝脏中的甲基化水平显著低于二倍体($P<0.01$)。综合分析研究结果表明,在*IGFBP-1*基因主要表达的肝脏组织中,其mRNA表达水平与DNA甲基化水平呈负相关,启动子区较高的甲基化可能抑制了二倍体泥鳅*IGFBP-1*基因的表达。

关键词 泥鳅; 二倍体; 四倍体; *IGFBP-1*; DNA甲基化; 生物多倍化; 多倍体鱼类; 表型变异; 基因表达变异

中图分类号 Q 959.46⁺8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)05-0009-08

胰岛素样生长因子结合蛋白1(insulin-like growth factors binding protein-1, *IGFBP-1*)是胰岛素样生长因子结合蛋白家族(*IGFBPs*)的重要成员之一。*IGFBPs*是一系列与胰岛素样生长因子(insulin-like growth factors, *IGFs*)结合的分泌蛋白,它们不仅可以通过其内分泌功能来控制*IGFs*的半衰期,而且可以调节*IGFs*的可用性和生物活性^[1]。目前,在哺乳动物中已发现7种*IGFBPs*,分别命名为*IGFBP-1*~*IGFBP-7*,其中,*IGFBP-1*~*IGFBP-6*高度保守^[2],而*IGFBP-7*与*IGFBP-1*~*IGFBP-6*的结构相似性仅限于N端的保守结构域^[3]。大多数*IGFBPs*在各个组织中都有不同程度的表达,且大部分的动物细胞中都有不止一种的*IGFBPs*表达^[1]。

*IGFBP-1*是最早发现的*IGFBPs*家族成员,主要由肝脏、肾脏等器官分泌,对分泌细胞本身、邻近组织细胞或通过血液循环对远处靶器官产生作用^[4],其主要功能是运载和调节IGF-1与受体结合,延长IGF-1的半衰期,并进行组织和细胞识别定位,

对动物的生长、发育、生殖及血糖调节等生理过程起着重要的调控作用^[5-6]。此外,在低氧胁迫下,*IGFBP-1*还可以通过降低胚胎和成体生长,而使机体细胞适应低氧环境^[7]。迄今为止,对鱼类*IGFBP-1*基因的研究主要集中在序列和生理功能方面,而对其表达调控机制的研究却鲜有报道。

多倍化是自然界中普遍存在的一种生物学现象,也是推动生物进化和物种形成的重要驱动力。大量的研究显示,生物多倍化中往往伴随着广泛而快速的DNA甲基化变异^[8-9],而DNA甲基化与基因表达之间存在密切相关性,通常认为,DNA甲基化水平的提高会抑制基因的表达,而去甲基化则会激活某些基因的表达^[8]。然而,目前相关的研究主要集中在植物中,而在鱼类中的研究却非常有限。

我国的野生泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)中不仅有二倍体,在长江流域,人们还发现有大量的四倍体。泥鳅的这种四倍体与二倍体共存的现象,使之成为研究多倍体鱼类表型变异和基因表达

收稿日期: 2019-05-10

基金项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项(2018YFD0900205)

张曼曼,硕士研究生,研究方向: 鱼类表观遗传学, E-mail: 1527050643@qq.com

通信作者: 周小云,博士,副教授,研究方向: 鱼类表观遗传学、鱼类遗传育种学, E-mail: zhouxy@mail.hzau.edu.cn

变异的理想模式生物。研究发现,与二倍体泥鳅相比,四倍体泥鳅具有生长快、体型大等优势^[10],但这种生长优势的潜在分子机制目前尚不清楚。笔者在前期工作^[11]的基础上,克隆了泥鳅 *IGFBP-1* 基因的 CDS 序列和启动子序列,分析了其在二倍体、四倍体泥鳅中的表达差异;并采用亚硫酸氢盐测序技术(BSP)研究了二倍体、四倍体泥鳅 *IGFBP-1* 基因的甲基化水平差异,探讨了其与表达差异的相关性,旨在为阐明泥鳅 *IGFBP-1* 基因的表达调控机制提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究所用二倍体、四倍体泥鳅均为笔者所在实验室的人工繁殖 1 龄个体,2 种倍性的泥鳅养殖条件相同。随机选取二倍体、四倍体泥鳅各 6 尾,MS-222(100 mg/L)麻醉鱼体后,尾静脉抽血、解剖取肝脏和肌肉。每种组织各取 2 份,1 份保存于无水乙醇中,用于 DNA 的提取;另 1 份在液氮中速冻 30 min 后,置于-80 ℃冰箱中保存,用于 RNA 的提取。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

采用 Trizol 法提取各样品的总 RNA,用 Nano-

Drop2000 分光光度计检测其浓度和纯度,用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。选择高质量的 RNA,用 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒(TaKaRa)将其反转录为 cDNA,用泥鳅的 18S rRNA(FJ710863.1)基因设计引物,对反转录结果进行检测。

1.3 *IGFBP-1* 基因 CDS 序列的克隆及分析

基于实验室前期测序得到的泥鳅转录组数据(SRP127013),经生物信息学分析后得到 *IGFBP-1* 基因的部分序列,用 Primer Premier 5.0 软件设计引物(表 1),以二倍体、四倍体泥鳅的肝脏 cDNA 为模板,进行 ORF 的扩增与测序验证。

用 BioXM 2.6 分析 *IGFBP-1* 基因的氨基酸序列组成、编码蛋白的相对分子质量、等电点等。用 SignalP 3.0 对蛋白序列中的信号肽进行预测,用 SMART 软件对蛋白结构域进行分析。

1.4 *IGFBP-1* 基因启动子的克隆及序列分析

用酚-氯仿法提取各样品的基因组 DNA,用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。用 hiTAIL-PCR 技术^[12]扩增二倍体、四倍体泥鳅 *IGFBP-1* 的启动子序列。用 NNPP 和 FPROM 在线软件预测启动子的核心转录元件,用 JASPAR 和 PROMO 预测启动子上潜在的转录因子结合位点。

表 1 本研究所用 PCR 引物
Table 1 PCR primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')	用途 Usage
18S rRNA	F:TCGTGATCGGGACTGGGGATTGCA R:AATCGGTAGTAGCGACGGCGGTGT	CDS PCR
IGFBP-1	F: GAGAGAGCGAAGAGAACGG R: CTTAAAAGGCAGAGGTAGGAA	CDS PCR
IGFBP-1	F: AGCGAAGAGAACGGTGTC R: GCAAGGTGCGGTGTAGAT	exon1 PCR
IGFBP-1-SP1	TCTCTGAGCACCTCCTCGCA	hiTAIL-PCR
IGFBP-1-SP2	ACGATGGACTCCAGTCCGGCCTGAATGCTGCCACCCAGACAACTT	
IGFBP-1-SP3	TCGGGTGGACACCGTTCTCTTCGCT	
IGFBP-1-2SP1	CAGGATGTGACACTTTGGGGAA	hiTAIL-PCR
IGFBP-1-2SP2	ACGATGGACTCCAGTCCGGCCGGGCACTTGCATGTCTTCGAGATCG	
IGFBP-1-2SP3	GCACTTGCATGTCTTCGAGATCGCAT	
IGFBP-1	F:ACGCCATACGCAAGAAACTCG R: TCCAGGATGCCACACACCAAC	qRT-PCR
IGFBP-1	F1:GAGTATTGTTGTTATTTATTTTAGTATGTCRT R1: AAAAACTATACAACCATTAAAAACCAAT F2: TTTATTTRGTGAGGRGTAGTAGTGA	1CpG PCR
IGFBP-1	F1: TAGTTATTTTGGAGAGAGCGAAGAGA R1: CTACTCGAAATTTAAATTRTCCGTAC F2: TATTTATTCGGATTTTGTGTTTGG	2CpG PCR

1.5 二倍体、四倍体泥鳅 *IGFBP-1* 基因的表达

基于 *IGFBP-1* 的 cDNA 序列设计 qRT-PCR 引物(表 1),分别以各样品的 cDNA 为模板,以泥鳅的 18S rRNA 为内参,用 LightCycler® 480 实时荧光定量 PCR 系统分析 *IGFBP-1* 基因在二倍体、四倍体泥鳅的血液、肌肉和肝脏中的表达水平。反应体系为 20 μ L,包括:2 $\times$ SYBR Green Mix(TaKa-Ra)10 μ L,上下游引物(10 μ mol/L)各 0.8 μ L, cDNA 1 μ L,ddH₂O 7.4 μ L。反应程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 s;95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,58~60 $^{\circ}$ C 退火 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,40 个循环。每个样品设置 3 个重复,表达水平用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t}法进行分析。

1.6 用 BSP 技术分析 *IGFBP-1* 基因的甲基化水平

样品 DNA 检测合格后,用 EZ DNA Methylation-Gold Kit™ 甲基化试剂盒对基因组 DNA 进行亚硫酸氢盐转化。用 Methprimer 软件预测启动子及第一外显子区的 CpG 岛,用 Primer Premier 5.0 软件在 CpG 岛两侧设计 2 对巢式引物(表 1),通过 2 轮巢式 PCR 反应扩增 CpG 岛片段。第 1 轮采用 Touch-down PCR 技术,程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;95 $^{\circ}$ C 变性 20 s,退火 45 s(首个循环温度 65 $^{\circ}$ C,后面每个循环依次降低 0.5 $^{\circ}$ C),72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,21 个循环;95 $^{\circ}$ C 变性 20 s,55 $^{\circ}$ C 退火 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,20 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min。第 2 轮采用普通 PCR 法,反应模板为首轮 PCR 产物的

10 倍稀释物。PCR 产物克隆后,随机选取 5 个阳性克隆送武汉擎科伟业生物科技有限公司测序。

根据测序结果,将目的序列转化为 multi-fasta 格式,经 QUMA 在线软件处理后,甲基化的分析结果以棒棒糖格式输出,并自动计算出每个样品甲基化百分比。用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理,用配对样本 *t* 检验法比较同类组织不同倍性间的甲基化水平差异。

2 结果与分析

2.1 泥鳅 *IGFBP-1* 基因的 CDS 序列特征

泥鳅 *IGFBP-1* 基因的 CDS 序列全长 789 bp,二倍体、四倍体之间有 5 bp 的碱基差异,但其氨基酸序列完全相同,均编码 262 个氨基酸,其中,前 25 个氨基酸残基为信号肽,蛋白分子质量约 28.4 ku,等电点约 7.6。Clustal W 2.0 和 SMART 软件分析结果显示,泥鳅 *IGFBP-1* 的氨基酸序列与哺乳动物基本一致,其 N 端有 GCGCCXXC 基序、12 个保守的半胱氨酸残基位点(Cys)和 *IGFBP* 同源结构域(*IGFBP* homologues,IB);C 端有 CWCV 基序、I 型甲状腺球蛋白域(thyroglobulin type I repeats,TY)和 6 个保守的 Cys;但哺乳动物中 *IGFBP-1* 基因 C 端的 Arg-Gly-Asp(RGD)基序在泥鳅中没有检测到,取而代之的是 PAD 基序(图 1)。



图 1 泥鳅 *IGFBP-1* 基因 CDS 序列特征

Fig.1 Profile of the CDS sequence of *IGFBP-1* gene of *M. anguillicaudatus*

2.2 泥鳅 IGFBP-1 基因启动子序列特征

用 hiTAIL-PCR 技术扩增了二倍体、四倍体泥鳅 *IGFBP-1* 基因的启动子序列,其长度分别为 2 341 bp 和 2 331 bp,倍性间的序列相似度达 99%,其差异主要是由碱基替代和四倍体中的序列缺失引起的。用 NNPP 和 FPROM 软件预测了启动子的核心序列(promoter core element,PCE)(图 2 灰色

显示),其中包含典型元件 TATA-box(-23 至-32),但不包含 CAAT-box、GC-box 等元件。此外,在启动子上还预测到了 SP1、CREB、C/EBP、POU2F2、GATA-2/3/4 和 SRY 等转录因子结合位点。二倍体、四倍体启动子比对发现,碱基替代并没有引起倍性间转录因子结合位点的差异,但四倍体启动子的部分序列缺失导致了转录因子 EGR1 和 NFIC 结合



黄色底纹表示二倍体、四倍体泥鳅 *IGFBP-1* 启动子序列的差异碱基。The yellow shading indicates the differential bases between diploid and tetraploid *M. anguillicaudatus*.

图 2 *IGFBP-1* 基因启动子区顺式作用元件分析

Fig.2 Cis-Elements prediction of the *IGFBP-1* promoter sequence

位点的缺失。

2.3 二倍体、四倍体泥鳅 IGFBP-1 基因的表达差异分析

通过 qRT-PCR 检测发现,*IGFBP-1* 基因在肝脏、肌肉和血液中均有表达(图 3)。在肝脏中,四倍体泥鳅 *IGFBP-1* 的表达水平显著高于二倍体 ($P<0.01$),而在血液中,*IGFBP-1* 在四倍体泥鳅中的表达水平显著低于二倍体 ($P<0.05$),在肌肉中的表达水平没有显著差异 ($P>0.05$)。

2.4 二倍体、四倍体泥鳅 IGFBP-1 基因甲基化分析

用 MethPrimer 软件在泥鳅 *IGFBP-1* 基因的启动子及第一外显子区进行 CpG 岛预测,发现泥鳅的 *IGFBP-1* 基因含有 2 个 CpG 岛,第 1 个 CpG 岛

位于-1 106 bp 至-752 bp 之间,长 354 bp,包含 26 个 CpG 位点;第 2 个 CpG 岛位于+111 bp 至+426 bp 处,长 315 bp,包含 35 个 CpG 位点(图 4A)。二倍体和四倍体的预测结果完全相同,序列差异并没有改变 CpG 岛的数量和位置。用巢式 PCR 技术,分别对 2 个 CpG 岛进行扩增,PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示扩增片段大小与预期相符(图 4B)。

用 BSP 技术检测了二倍体、四倍体泥鳅 *IGFBP-1* 基因在启动子区(1st CpG Island)和第一外显子区(2nd CpG Island)的甲基化水平,结果如图 5 所示。在启动子区,二倍体泥鳅肝脏中 *IGFBP-1* 的甲基化水平显著高于四倍体 ($P<0.05$);而血液和肌肉中,二倍体、四倍体泥鳅 *IGFBP-1* 的甲基化

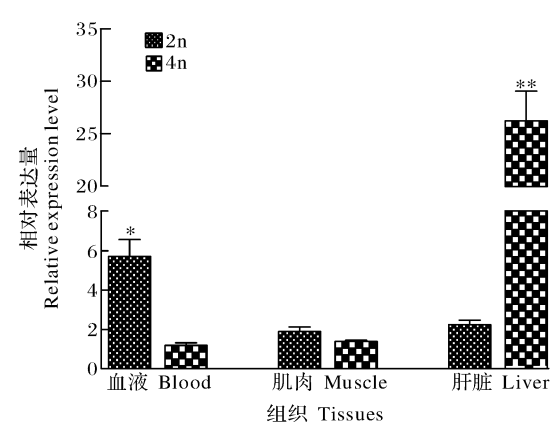


图 3 *IGFBP-1* 基因在二倍体、四倍体泥鳅各组织中的相对表达量

Fig.3 Relative expression of *IGFBP-1* in tissues of diploid and tetraploid *M. anguillicaudatus*

水平没有显著性差异($P>0.05$) (表 2)。在第一外显子区,四倍体泥鳅肝脏、血液和肌肉中 *IGFBP-1* 均未检测到甲基化,而二倍体的 *IGFBP-1* 在这些组织中发生了部分甲基化,但倍性间没有显著性差异($P>0.05$)。此外,在整体水平上,二倍体泥鳅在肝脏和血液中的甲基化水平比四倍体高,且具有显著性差异($P<0.05$),而在肌肉中没有显著性差异($P>0.05$)。

2.5 泥鳅 *IGFBP-1* 基因表达水平与 DNA 甲基化的相关性分析

在肝脏、血液和肌肉中,四倍体泥鳅 *IGFBP-1* 基因的甲基化水平均比二倍体低,其中,肝脏中的甲基化水平在倍性间存在极显著性差异($P<0.01$)。在肝脏中,四倍体泥鳅 *IGFBP-1* 基因的表达水平

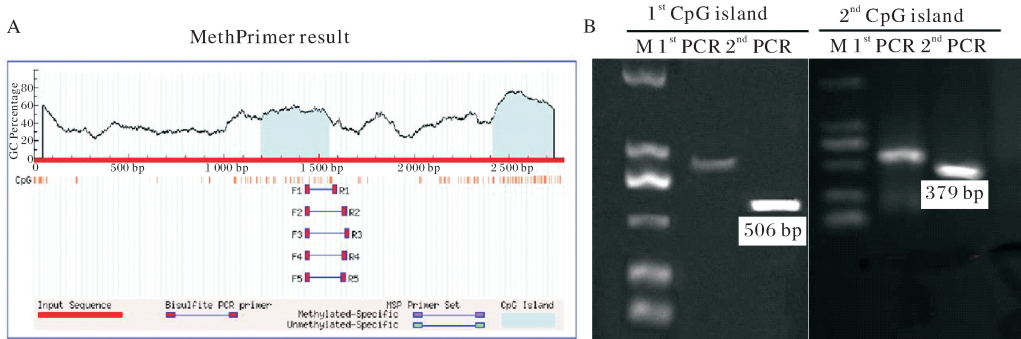


图 4 *IGFBP-1* 基因 CpG 岛预测 (A) 及 PCR 扩增产物电泳图 (B)

Fig.4 Results of CpG island prediction (A) and agarose gel electrophoresis for PCR products(B) for *IGFBP-1* gene

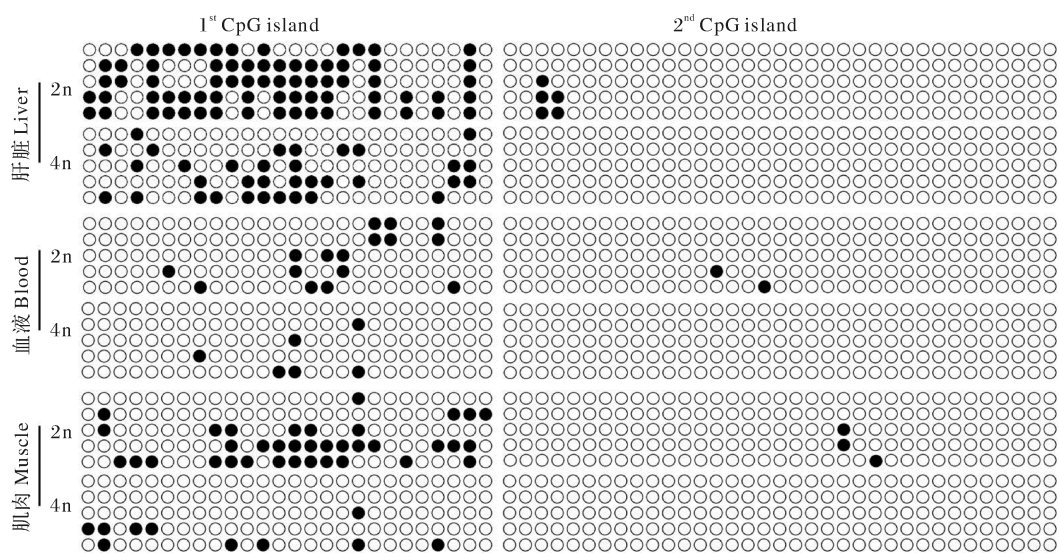


图 5 二倍体、四倍体泥鳅 *IGFBP-1* 基因启动子及第一外显子区的甲基化率

Fig.5 Methylation rate of *IGFBP-1* in promoter and 1st exon of 2n and 4n *M. anguillicaudatus*

表 2 二倍体、四倍体泥鳅 *IGFBP-1* 基因的甲基化水平比较

Table 2 Comparison of DNA methylation in promoter of *IGFBP-1* between diploid and tetraploid *M. anguillicaudatus*

组织 Tissues	倍性 Ploidy	1 st CpG		2 nd CpG		平均值 Average	
		甲基化率/% Methylation rate	<i>P</i> 值 <i>P</i> value	甲基化率/% Methylation rate	<i>P</i> 值 <i>P</i> value	甲基化率/% Methylation rate	<i>P</i> 值 <i>P</i> value
肝脏 Liver	二倍体 Diploid	55.38	0.001	2.85	0.180	29.62	0.001
	四倍体 Tetraploid	26.16		0.00		26.16	
血液 Blood	二倍体 Diploid	12.31	0.060	1.71	0.070	6.92	0.005
	四倍体 Tetraploid	4.62		0.00		4.62	
肌肉 Muscle	二倍体 Diploid	27.69	0.075	1.14	0.089	15.00	0.190
	四倍体 Tetraploid	7.69		0.00		7.69	

显著高于二倍体($P<0.01$),而在血液和肌肉中,二倍体、四倍体泥鳅 *IGFBP-1* 基因的表达水平没有显著性差异($P>0.05$)。由于 *IGFBP-1* 基因主要在肝脏中表达,因此,我们认为,*IGFBP-1* 基因在其主要表达组织中的表达水平与 DNA 甲基化呈负相关。

3 讨 论

3.1 泥鳅 *IGFBP-1* 基因的 CDS 及启动子特征

二倍体、四倍体泥鳅 *IGFBP-1* 基因的 CDS 序列长均为 789 bp,编码 262 个氨基酸,在其 N 端和 C 端,均富含保守的 Cys 残基和 GCGCCXXC 等保守基序,这些特征与哺乳动物的 *IGFBP-1* 基因相似^[2]。泥鳅 *IGFBP-1* 基因的启动子核心元件上虽然缺少 CAAT-box、GC-box 等典型元件,但在其 TATA-box 上游存在着多个 SP1 结合位点,这个特征与在猪中的报道类似^[13]。研究人员认为,SP1 可以通过影响转录起始复合物的合成对 *IGFBPs* 基因的表达活性起着重要的促进作用^[14-16]。此外,在泥鳅的 *IGFBP-1* 基因的启动子上,还预测到 CREB、C/EBP、POU2F2、GATA-1/2/3/4 和 SRY 等转录因子结合位点。CREB 是一种胞内转录因子,能通过与效应因子 cAMP 结合而调控 *IGFBP-1/2* 的表达^[17]。此外,*IGFBP-1* 基因上还预测到多个 SRY 转录因子结合位点。SRY 是主导动物性别分化的因子^[18],由泥鳅 *IGFBP-1* 基因的启动子上存在的多个 SRY 转录因子结合位点推测, *IGFBP-1*基因可能与泥鳅的性别分化有关。

四倍体泥鳅 *IGFBP-1* 基因启动子中缺失了部分序列,导致其缺少了 EGR1 和 NFIC 2 个转录因子结合位点,EGR1 为早期生长反应转录因子,其通过促进或抑制基因的表达从而调节细胞的增殖、凋亡、生长和分化等过程^[19]。NFIC 主要参与调控

DNA 的复制与基因的表达^[20],NFIC 在低剂量下能促进 *IGFBPs* 的表达,而在高剂量下则会抑制 *IGFBPs* 的表达^[21]。EGR1 和 NFIC 2 个转录因子结合位点的缺失,是否对四倍体泥鳅 *IGFBP-1* 基因启动子的活性产生影响有待进一步的研究。

3.2 泥鳅倍性间 *IGFBP-1* 基因的表达特点

在前期的研究中,我们发现,与二倍体泥鳅相比,四倍体泥鳅具有生长快、体型大等明显的生长优势^[10]。本研究中,我们发现四倍体泥鳅 *IGFBP-1* 基因在其主要表达组织肝脏中的表达量显著高于二倍体泥鳅($P<0.05$)。我们对 *IGFBPs* 家族的其他成员研究发现,部分成员(*IGFBP-5*、*IGFBP-6b*)在四倍体中的表达水平显著低于二倍体($P<0.05$)。Wood 等^[22]和 Demanbro 等^[23]在研究哺乳动物时发现,*IGFBPs* 家族各成员之间存在着相互补偿的现象,在特定生长阶段或特定组织中,可能是由其中的某个或某几个基因起主导作用。因此,四倍体泥鳅 *IGFBP-1* 基因的表达量显著高于二倍体的现象,可能是由于 1 龄泥鳅中,*IGFBP-1* 基因对生长起着主要的调控作用。

3.3 泥鳅 *IGFBP-1* 基因的表达水平与 DNA 甲基化的相关性

通常认为,启动子及第一外显子区 DNA 甲基化水平的提高会抑制基因的表达,去甲基化会激活某些基因的表达^[24-26]。在泥鳅中,*IGFBP-1* 主要表达的组织为肝脏,在肝脏中,四倍体泥鳅 *IGFBP-1* 的表达水平显著高于二倍体($P<0.05$),而其 DNA 甲基化水平显著低于二倍体 ($P<0.05$),即 *IGFBP-1*基因 mRNA 的表达水平与 DNA 甲基化水平呈负相关,因此推测,在肝脏中,DNA 甲基化对 *IGFBP-1* 的表达可能起着负调控作用。而在血液和肝脏中, *IGFBP-1* 基因 mRNA 的表达水平与

DNA 甲基化水平没有明显的相关性,我们推测,在 *IGFBP-1* 基因的非主要表达组织中,CpG 岛的甲基化状态可能仅为基因转录调控过程提供了一些前提条件,其他调节机制如组蛋白共价修饰可能发挥更直接、更重要的作用。

参 考 文 献

- [1] 钱焜,温海深,迟美丽,等. 海产花鲈 *IGFBP-1、2* 基因的克隆及表达分析[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版),2014,44(9):37-45.
- [2] HWA V,OH Y,ROSENFELD R G. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily[J]. Endocr Rev, 1999,20(6):761-787.
- [3] 李娜,王国栋,王艺磊. *IGFBP7* 基因的结构与功能的研究进展[J]. 生命科学,2012,24(10):1189-1196.
- [4] 魏平,王嘉玺. 胰岛素样生长因子结合蛋白-1(IGFBP-1)研究进展[J]. 国外医学(分子生物学分册),2002,24(5):269-272.
- [5] KATZ L E,DELEÓN D D,ZHAO H,et al. Free and total insulin-like growth factor (IGF)-I levels decline during fasting: relationships with insulin and IGF-binding protein-1[J]. J Clin Endocrinol Metab,2002,87(6):2978-2983.
- [6] 翟万营,张俊玲,施志仪,等. 牙鲆胰岛素样生长因子结合蛋白 IGFBP-1 cDNA 全长的克隆及表达分析[J]. 水产学报,2012,36(2):170-179.
- [7] MCLELLAN K C,HOOOPER S B,BOCKING A D,et al. Prolonged hypoxia induced by the reduction of maternal uterine blood flow alters insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) and *IGFBP-2* gene expression in the ovine fetus [J]. Endocrinology,1992,131(4):1619-1628.
- [8] ZENG Z X,ZHANG T,LI G R,et al. Phenotypic and epigenetic changes occurred during the autopolyploidization of *Aegilops tauschii* [J]. Cereal Res Commun,2012,40(4):476-485.
- [9] XIAO J,SONG C,LIU S J,et al. DNA methylation analysis of allotetraploid hybrids of red crucian carp (*Carassius auratus* var.) and common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J/OL]. PLoS One,2013,8(2):e56409[2019-05-10]. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0056409>.
- [10] FENG B,YI S V,LI R,et al. Comparison of age and growth performance of diploid and tetraploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* in the Yangtze River basin,China[J]. Environ Biol Fish,2017,100(7):815-828.
- [11] 张曼曼,冯兵,罗双双,等. 二倍体和四倍体泥鳅全基因组 DNA 甲基化的比较[J]. 华中农业大学学报,2018,37(5):95-103.
- [12] LIU Y G,CHEN Y. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences[J]. Biotechniques,2007,43(5):649-656.
- [13] ONGERI E M,ZHU Q,VERDERAME M F,et al. Insulin-like growth factor-binding protein-3 in porcine ovarian granulosa cells: gene cloning, promoter mapping, and follicle-stimulating hormone regulation[J]. Endocrinology,2004,145(4):1776-1785.
- [14] BOISCLAIR Y R,BROWN A L,CASOLA S,et al. Three clustered Sp1 sites are required for efficient transcription of the TATA-less promoter of the gene for insulin-like growth factor-binding protein-2 from the rat[J]. J Biol Chem,1993,268(33):24892-24901.
- [15] CHOI H S,LEE J H,PARK J G,et al. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, activates the IGFBP-3 promoter by upregulating Sp1 activity in hepatoma cells: alteration of the Sp1/Sp3/HDAC1 multiprotein complex[J]. Biochem Biophys Res Commun,2002,296(4):1005-1012.
- [16] MIREUTA M,DARNEL A,POLLAK M. IGFBP-2 expression in MCF-7 cells is regulated by the PI3K/AKT/mTOR pathway through Sp1-induced increase in transcription[J]. Growth factors,2010,28(4):243-255.
- [17] CHEN W,LI W,LIN H. Common carp (*Cyprinus carpio*) insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2): molecular cloning, expression profiles, and hormonal regulation in hepatocytes[J]. Gen Comp Endocrinol,2009,161(3):390-399.
- [18] 吴宁.Sry 基因沉默对小鼠胚胎性别决定基因及性腺发育的影响[D].北京:中国农业科学院,2008.
- [19] LU Y,LI T,QURESHI H Y,et al. Early growth response 1 (Egr-1) regulates phosphorylation of microtubule-associated protein tau in mammalian brain[J]. J Biol Chem,2011,286(23):20569-20581.
- [20] KUO Y S,TANG Y B,LU T Y,et al. IGFBP-6 plays a role as an oncosuppressor gene in NPC pathogenesis through regulating EGR-1 expression[J]. J Pathol,2010,222(3):299-309.
- [21] PÉREZ-CASELLAS L A,WANG X,HOWARD K D,et al. Nuclear factor I transcription factors regulate IGF binding protein 5 gene transcription in human osteoblasts[J]. Biochim Biophys Acta,2009,1789(2):78-87.
- [22] WOOD T L,ROGLER L E,CZICK M E,et al. Selective alterations in organ sizes in mice with a targeted disruption of the insulin-like growth factor binding protein-2 gene[J]. Mol Endocrinol,2000,14(9):1472-1482.
- [23] DEMAMBRO V E,CLEMMONS D R,HORTON L G,et al. Gender-specific changes in bone turnover and skeletal architecture in Igfbp-2-null mice[J]. Endocrinology,2008,149(5):2051-2061.
- [24] ANTEQUERA F,BIRD A. CpG islands as genomic footprints of promoters that are associated with replication origins[J]. Curr Biol,1999,9(17):661-667.
- [25] WAKI T,TAMURA G,SATO M,et al. Age-related methylation of tumor suppressor and tumor-related genes: an analysis

of autopsy samples[J]. *Oncogene*,2003,22(26):4128-4133.

[26] SERMAN L,DODIG D. Impact of DNA methylation on troph-
oblast function[J/OL]. *Clin Epigenetics*,2011,3:7 [2019-05-10]. <http://europepmc.org/articles/PMC3303467>.

**Expression of *IGFBP-1* and its correlation with DNA methylation
in diploid and tetraploid *Misgurnus anguillicaudatus***

ZHANG Manman GAO Zexia FENG Bing LUO Shuangshuang CAO Wenyi ZHOU Xiaoyun
*College of Fisheries ,Huazhong Agricultural University/Key Laboratory
of Agricultural Animal Genetics ,
Breeding and Reproduction of Ministry of Education ,Wuhan 430070,China*

Abstract To understand the expression difference of *IGFBP-1* between diploid and tetraploid *Misgurnus anguillicaudatus*, and their relationship with DNA methylation, we cloned the CDS and promoter sequence of the *IGFBP-1* gene, and analyzed the expression level and DNA methylation rate in diploids and tetraploids using qRT-PCR method and bisulfite sequencing technology (BSP), respectively. The results showed that, the CDS of *IGFBP-1* was 789 bp, encoding 262 amino acid, and 5 base-pair difference but no amino acid difference were found between diploids and tetraploids. We cloned 2 341 bp and 2 331 bp promoter sequences in diploids and tetraploids, respectively, with the sequence similarity of 99%. The core transcription element TATA-box, and transcription factor binding sites such as SP1, CREB, C/EBP, POU2F2, GATA-2/3/4 and SRY were observed in the promoter. The *IGFBP-1* gene was mainly expressed in the liver, and the expression level was significantly higher in tetraploids than in diploids ($P<0.01$). The methylation level of promoter and 1st exon were lower in tetraploids than in diploids, especially in the liver ($P<0.01$). In conclusion, in the liver, the major expression tissue of the *IGFBP-1* gene, the mRNA expression level and DNA methylation level were negatively correlated, suggesting that the higher DNA methylation rate in promoter may suppress the expression of *IGFBP-1* in the diploid *M. anguillicaudatus*.

Keywords *Misgurnus anguillicaudatus*; diploid; tetraploid; insulin-like growth factors binding protein-1 (IGFBP-1); DNA methylation; biopolyploid; polyploid fish; phenotypic variation; gene expression variation

(责任编辑:边书京)