

网络出版时间:2012-07-18 11:11

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120718.1111.028.html>

红鳍东方鲀 *Sirt1* 基因的克隆及其原核表达

张 伟^{1,2,3}, 杨志军³, 王 群¹, 渡部终五²

(1 华东师范大学 生命科学学院, 上海 200062; 2 东京大学 农学部 水产化学研究室, 东京 113-8657;

3 新乡医学院 基础医学院, 河南 新乡 453003)

【摘 要】 【目的】克隆红鳍东方鲀 *Sirtuin1* (*Sirt1*) 基因编码阅读框(ORF), 并对其进行原核表达。【方法】采集红鳍东方鲀脂肪组织, 提取其总 RNA, 采用 RT-PCR 方法扩增和克隆红鳍东方鲀 *Sirt1* 基因的 ORF, 构建其原核表达载体 pET32a/*Sirt1*, 并在大肠杆菌 Rosetta (DE3) 中进行表达。【结果】红鳍东方鲀 *Sirt1* 基因 ORF 区由 2 070 个核苷酸组成, 编码 689 个氨基酸。根据红鳍东方鲀 *Sirt1* ORF 核苷酸序列推测的氨基酸序列与其他物种进行比对, 发现其与罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)、非洲齿鲤 (*Nothobranchius furzeri*)、科恩氏假鳃鲷 (*Nothobranchius kuhntae*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、人 (*Homo sapiens*) 和小鼠 (*Mus musculus*) 的同源性分别为 82%, 82%, 81%, 66%, 72% 和 69%; 成功构建了重组质粒 pET32a/*Sirt1*, 用 IPTG 进行诱导表达, SDS-PAGE 电泳结果显示, 在约 105 ku 处有特异性的蛋白条带出现。【结论】克隆得到红鳍东方鲀 *Sirt1* 基因的 ORF 序列, 并成功对其进行了原核表达。

【关键词】红鳍东方鲀; *Sirt1*; 基因表达; cDNA 克隆; 原核表达

【中图分类号】S917; Q786

【文献标识码】A

【文章编号】1671-9387(2012)08-0054-06

Cloning and prokaryotic expression of *Sirt1* gene from torafugu *Takifugu rubripes*

ZHANG Wei^{1,2,3}, YANG Zhi-jun³, WANG Qun¹, WATABE Shugo²

(1 School of Life Science, East China Normal University, Shanghai, 200062, China; 2 Department of Aquatic Bioscience, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, 113-8657, Japan;

3 School of Basic Medical Science, Xinxiang Medical University, Xinxiang, He'nan 453003, China)

Abstract: 【Objective】The study aimed to clone and analyse *Sirtuin1* (*Sirt1*) gene in torafugu, then to study the prokaryotic expression of *Sirt1*. 【Method】The ORF of torafugu *Takifugu rubripes* *Sirt1* gene was amplified from total RNA of torafugu adipose tissue by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The prokaryotic expression vector pET32a/*Sirt1* was constructed and expressed in *E. coli* Rosetta (DE3). 【Result】The full-length open reading frame of torafugu *Sirt1* cDNA consisted of 2 070 bp and encoded a polypeptide of 689 amino acids. The amino acid identities of *Takifugu rubripes* *Sirt1* to *Oreochromis niloticus* *Sirt1*, *Nothobranchius furzeri* *Sirt1*, *Nothobranchius kuhntae* *Sirt1*, *Danio rerio* *Sirt1*, *Homo sapiens* *Sirt1* and *Mus musculus* *Sirt1* were 82%, 82%, 81%, 66%, 72% and 69%, respectively. The prokaryotic expression system of recombinant vector pET32a/*Sirt1* was constructed successfully. SDS-PAGE analysis showed that the expressed protein accumulated as inclusion bodies and the molecular weight of expressed fusion protein was 105 ku. 【Conclusion】The ORF of torafugu *Takifugu rubripes* *Sirt1* gene was cloned and expressed in *E. coli* successfully.

* 【收稿日期】2012-04-10

【基金项目】国家留学基金委“国家建设高水平大学公派研究生项目”(2008614045)

【作者简介】张 伟(1977—), 男, 河南长垣人, 讲师, 博士, 主要从事鱼类脂质代谢的机制研究。E-mail: zhangwei0920@163.com

Key words: *Takifugu rubripes*; *Sirt1*; gene expression; cDNA cloning; prokaryotic expression

脂质是生物体的主要构成成分,与能量的贮存和细胞内信号传导途径等许多生理功能密切相关。鱼类的主要脂质沉积部位是肝脏与肌肉,但在这2种组织中,脂质存在的比例随着鱼种的不同而有很大差异,红鳍东方鲀和比目鱼等鱼种的脂质主要沉积在肝脏,其他鱼种如真鲷和鳗鱼等的脂质在肝脏和肌肉沉积^[1]。肌肉的脂质含量对鱼肉的风味、口感、贮藏特性及生产加工有很大影响。因此,阐明组织特异的脂质沉积分子机制,对鱼类的基础研究和生产应用具有非常重要的意义。

Sirtuin1 (*Sirt1*) 是一种保守的 NAD⁺ (烟酰胺腺嘌呤二核苷酸) 依赖的组蛋白/非组蛋白去乙酰基酶,为酵母染色质沉默因子 Sir2 (silent information regulator 2) 的同源基因^[2-3],在细胞分化^[4]、细胞凋亡^[5-7]、信号传导^[8]、情绪与行为调节^[9]及代谢^[10-11]等方面起着非常重要的作用。*Sirt1* 在哺乳动物组织中广泛表达,在处于禁食或限制热量摄入的状态下,脑、脂肪组织、肝脏、肾脏和肌肉中 *Sirt1* 的表达量增加^[12]。在脂肪组织中,*Sirt1* 与转录共抑制子 NCoR 相互作用,负调控白色脂肪细胞中的过氧化物酶增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferators activated receptors, PPAR γ),促进脂肪分解^[13]。在哺乳动物脂肪细胞中,*Sirt1* 可能是通过胰岛素 (INS)/胰岛素样生长因子 (IGF-1) 通路发挥作用,*Sirt1* 影响 INS/IGF-1 信号通路下游的 FOXO,促进脂肪细胞中脂联素的表达,影响脂肪代谢^[14-15]。

目前关于鱼类 *Sirt1* 基因的研究在国内外鲜见报道。为此,本研究运用 RT-PCR 方法对红鳍东方鲀 *Sirt1* 基因的 ORF 序列进行克隆,并构建其原核表达载体,以期为进一步研究 *Sirt1* 基因的生物学特性及其调控脂质代谢的机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试鱼和样品的制备

试验用健康红鳍东方鲀体质量约 100 g,购自东京水产品批发市场,试验前在东京大学水产实验中心至少暂养 1 周。用刀解剖后取其脂肪组织用液氮速冻保存,然后置于一 80 °C 冰箱中备用。

1.2 *Sirt1* 基因的鉴定

利用斑马鱼 *Sirt1* 的核苷酸序列作为查询序列,在河豚的基因组数据库 (<http://genome.jgi-psf.org/Takru4/Takru4.home.html>) 中进行

BLAST 搜索,用 GeneScan 进行基因预测,在 SwissProt 数据库中逐一对预测的基因进行 BLAST 比对分析,以搜索到与已知 *Sirt1* 存在相似性的片段,作为河豚 *Sirt1* 的预测基因,并用作下一步克隆基因时设计引物的参考序列。

1.3 *Sirt1* ORF 的克隆及序列分析

利用 ISOGEN (Nippon Gene, Toyama, 日本) 抽取脂肪组织总 RNA,以总 RNA 为模板,利用 SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, 美国) 合成 cDNA 第 1 链。同时,根据预测的 *Sirt1* 基因序列,在 ORF 区两端设计引物 (上游: 5'-ATGGCGGATGGAGAGAA CAG-3', 下游: 5'-TTAAAGATGCATGGTGCTCT CTG-3')。RT-PCR 条件为: 94 °C 变性 40 s, 58 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 2 min, 总计 35 个循环,最后 72 °C 充分延伸 10 min。利用 T-A 克隆的策略,将 PCR 产物连接于 pGEM T-easy 载体 (Promega Corp, Madison, WI, USA) 上,连接产物转化 *Escherichia coli* JM109 感受态细胞,在含 Amp、X-gal 和 IPTG 的 LB 平板上初步筛选阳性克隆。利用菌落 PCR 鉴定阳性克隆,选择 3 个阳性克隆在 ABI 3100 DNA 测序仪 (Applied Biosystems) 上进行测序。利用 NCBI 中的 CDD (Conserved Domain Database) 软件进行保守结构域分析。从 GenBank 中选择 13 种动物的 *Sirt1* 氨基酸序列,采用 BioEdit 7.1.3 和 MEGA 5.05 软件进行分析,建立系统进化树。

1.4 重组表达质粒的构建及鉴定

根据克隆得到的红鳍东方鲀 cDNA *Sirt1* 的 ORF 序列,设计特异引物 Tr-*Sirt1*-PF: 5'-CG GAATTCATGGCGGATGGAGAGAACAG-3'; Tr-*Sirt1*-PR: 5'-CCGCTCGAGCGGTAAAGATGCA TGGTGCTCTCTG-3', 其中上、下游引物分别带有 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点。以 cDNA 为模板,PCR 扩增获得 *Sirt1* 基因的 ORF 序列,利用凝胶回收试剂盒进行 PCR 产物的回收,再连接到 pGEM T-easy 载体,转化到大肠杆菌 JM109 中;在转化的平板上随机挑取白斑进行菌落 PCR 检测,对阳性克隆接菌,提取质粒;对得到的 *Sirt1* 基因克隆质粒与 pET32a 质粒同时用 *EcoR* I 和 *Xho* I 进行 3 h 的双酶切,然后进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,切胶回收目的片段和载体,并利用 T₄ DNA 连接酶进行连接后转化到大肠杆菌 JM109;随机挑选克隆,进行菌

落 PCR 和双酶切鉴定,并对阳性克隆进行增菌培养抽提质粒,在 ABI 3100 DNA 测序仪(Applied Biosystems)上对提取的重组质粒进一步测序验证。

1.5 重组质粒 pET32a/Sirt1 的诱导表达

将测序鉴定读框正确的 pET32a/Sirt1 质粒转化于大肠杆菌 Rosetta(DE3)中,随机挑取克隆鉴定为阳性后,接种于含氨苄青霉素的液体 LB 培养基中,在 37 ℃ 过夜振荡培养;第 2 天按 1:50 的体积比转接到 10 mL 同样的培养基中,然后振荡培养至 OD 值为 0.8 时,取出 2 mL 菌液作为未诱导对照,其他加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,27 ℃ 诱导 4 h;4 ℃ 下 12 000 r/min 离心 10 min 后收集菌体,进行超声波破碎,再 4 ℃ 下 12 000 r/min 离心 15 min,分别取上清和沉淀,并在沉淀组分中加入 PBS 缓冲液进行悬浮,浓度测定后在上清和沉淀中分别加入 5× 上样缓冲液,并煮沸裂解 5 min。然后进行 SDS-PAGE(浓缩胶 5%,分离胶 8%)电泳,检测目的蛋白的表达情况。以未转化质粒的 Rosetta(DE3)空白菌体与含 pET32a 空质粒的 Rosetta(DE3)菌体作为对照,处理条件与试验组一致。

2 结果与分析

2.1 Sirt1 基因的序列测定和分析

从红鳍东方鲀脂肪组织中提取的总 RNA 经 RT-PCR 扩增后,可获得大小约 2 070 bp 的条带,符合预期大小(图略)。测序结果显示,此序列长 2 070 bp。根据得到的红鳍东方鲀 *Sirt1* 基因 ORF 区的核苷酸序列推测其氨基酸序列,结果(图 1)显示,该基因开放阅读框长 2 070 bp,编码 689 个氨基酸。

2.2 红鳍东方鲀 Sirt1 与其他物种的比较

根据红鳍东方鲀 *Sirt1* 基因 ORF 区推测的氨基酸序列与其他物种进行比对分析,红鳍东方鲀 *Sirt1* 与罗非鱼、非洲齿鲤、科恩氏假鳃鲙、斑马鱼、人和小鼠的同源性分别为 82%,82%,81%,66%,72%和 69%。不同物种氨基酸序列构建的分子系统进化树(图 2)表明,鱼类、哺乳类及两栖类的 *Sirt1* 源于共同的祖先,但处于进化上不同的分支。红鳍东方鲀与罗非鱼的亲缘关系最近,与非洲齿鲤、科恩氏假鳃鲙的亲缘关系次之,与斑马鱼的亲缘关系较远,与两栖类的非洲爪蟾、非洲蛙及哺乳类动物人、小鼠等的亲缘关系最远。

2.3 红鳍东方鲀 Sirt1 基因重组表达质粒的鉴定

重组质粒 pET32a/Sirt1 经双酶切后的电泳结果(图 3)显示,有 1 条约 5 kb 的载体片段和 1 条

2 070 bp 的目的片段,与预期大小相符。测序结果表明阅读框架正确,说明红鳍东方鲀 *Sirt1* 基因已成功插入到 pET32a 载体上。SDS-PAGE 结果(图 4)说明,重组菌在约 105 ku 处出现 1 条特异性蛋白条带,对照组则没有。表达的目的蛋白主要以可溶蛋白形式存在,在沉淀中含有部分目的蛋白。初步证实 *Sirt1* 已在大肠杆菌中获得成功表达。该试验重复 3 次,SDS-PAGE 电泳结果基本一致。

3 讨论

脂肪组织生物学是近年来人们广泛探索的领域之一,细胞分化的本质是基因表达模式的转变。伴随着脂肪生成而发生的脂肪细胞积累和形态学上的改变等,是由于细胞在分化中特定基因的诱导表达所致。从这个意义上来说,转录因子的表达和活性变化决定了分化的过程。研究发现,*Sir2* 有 7 个同源基因,分别命名为 *Sirtuin1* (*Sirt1*)—*Sirtuin7* (*Sirt7*),其中 *Sirt1* 是与 *Sir2* 同源性最高且目前研究最多的^[16-17]。*Sirt1* 蛋白常与很多关键的转录因子以及转录共调控因子发生相互作用,调节基因的转录通过 *Sirt1* 的去乙酰化作用,从而参与调控代谢、衰老等一系列生理过程。PPAR γ 是一种很关键的脂肪合成调节因子,*Sirt1* 蛋白可以通过与 PPAR γ 上的 2 个辅阻遏蛋白(NcoR)和视黄酸及甲状腺激素受体沉默中介蛋白(SMRT)发生相互作用,抑制 PPAR γ 的活性,从而加强体内脂肪的分解,减少脂肪的沉积^[18-19]。

本试验克隆得到了红鳍东方鲀 *Sirt1* 基因的 ORF 序列,进一步推测其氨基酸序列并与罗非鱼、非洲齿鲤、科恩氏假鳃鲙、斑马鱼、人和小鼠的 *Sirt1* 进行比对分析,结果显示其同源性分别为 82%,82%,81%,66%,72%和 69%,表明 *Sirt1* 在进化上较为保守,在不同物种中可能具有相似的生物学功能。进一步对 *Sirt1* 推测的氨基酸序列进行系统进化树分析,结果表明,红鳍东方鲀 *Sirt1* 与其他鱼类如罗非鱼、非洲齿鲤、科恩氏假鳃鲙首先聚为一支,两栖类的非洲爪蟾、非洲蛙及哺乳类的人、小鼠等哺乳动物的 *Sirt1* 聚为另外一支,但其具有共同的起源。据此推测,红鳍东方鲀的 *Sirt1* 与其他物种的 *Sirt1* 一样,在脂质代谢和肌肉发育等方面具有非常重要的作用。诱导表达重组蛋白分析结果表明,在诱导剂为 IPTG(1 mmol/L)和 27 ℃ 诱导条件下,重组菌经超声破碎后离心,在上清和沉淀中均发现重组蛋白,但在上清中的表达量较高。说明重组菌诱

ATCGCGGATGGAGAGAACCGTCTCCGGATTGGCTTTCACCTGGCGCTTCGATATGGACCGAGCCTGTGTA AAAAGGCCCAAATGAGTCCG	90
M A D G E N S L G M A F T G A S D M D E P V V K R A K M S P	
CTGAAACCATTACGGATTTCAGCCACCAAAGCAGACCAAGTTTCCATGGCTGGCGGTGCTACTGAGAGCTGGAGACGCGCGTGAATTGT	180
L N H Y G F L A T K A D Q F P C V A G A T E S W E T A V N C	
GCGCACCACGACGGGAAGGAAGCGAAGCGCGATGGCGGTAGAACAGGCCCGAGTAGCGCTAGGCGGAGACAACAATGGACTGGGAATG	270
A H P A G K E A K P A M A V E Q A P V A L G G D N N G L G M	
CTGGTCTCTGAGCCACAAACAGTTATGAACGAGAAGACAGCGATGAACCTGGGGCGATTGAGGAGAGTGCTGCTTTTCTGGAGCAT	360
L V S E P H K T V M K R E D S D E L G A I E E S A A F L E H	
GGAGATCTGTCTGTAAACGGCCTGGCCGTACACCGGAGCACATCATGAAGACATGACAGATCCTACATGCGAGCTCCAGTGACTGG	450
G D L S C N G L A V T P E H I H E D D D R S S H A S S S D W	
ACCCTCAACCCACAGATAGTTCTCTACAGTTTCATCCAGCAGCACATCAGAGAGACCGATCCAGGGCGATTCTGAGGGACTTGCTCCCC	540
T P Q P Q I G S Y S F I Q Q H I R E T D P R A I L R D L L P	
GACACCGTGCTCCCAACGGATTATGACGACATGACCTGTGGCAGATCATCATCAATATCTCAGAACTCCGAAAAGGAAGAAACGAAAA	630
D T V L P P D L D D M T L W Q I I I N I S E P P K R K K R K	
GATGTCACACACTTTAGAAGATGTAGTCAAGCTGCTAAAGGAAGCGAGAGGATCTTGTCTGACTGGTGTGGGGTGCTTTTCTTGT	720
D V N T L E D V V K L L K E S K R I L V L T G A G V S V S C	
GGCATCCCGGATTTTTGTCTAGAGATGAATTTATGACGCGCTTCTGTAGATTTCCTGTATCTTCCAGACCTCAAGCCATGTTTTCAC	810
G I P D F R S R D G I Y A R L A V D F P D L P D P Q A M F D	
ATCGAATACTTCGAGAGGGACCCAGACACATTCTTCAAGTTGCGCAGGAAATCTACCCCTGGTCAGTTCCAACTTCGCTCTGTCATAAA	900
I E Y F R R D P R P F F K F A K E I Y P G Q F Q P S L C H K	
TTCATATCCATGCTGGATAAGCAAGGGAGCTGCTGGGAATTACGCCAAACATCGACACATTAGAACAAGTAGCTGGAGTTACGCGG	990
F I S M L D K Q G K L L R N Y T Q N I D T L E Q V A G V Q R	
ATTATCCAGTGTCACGGTTCTTTGCAACTGCGTCTCTTGTCTGTAAACACAAGTAGATTGAGGTCTAAGAGAGACATCTTT	1080
I I Q C H G S F A T A S C L V C K H K V D C E V I R E D I F	
AACCAGGTTGTCCTCATGTTTCGGCGCTTCTGGATATCTCTGTGCAATCATGAAGCCGTGATATTGCTTCTTTGGAGAAAATCTTCCA	1170
N Q V V P H C S R C L D I P L A I M K P D I V F F G E N L P	
GAAATGTTCCACAGGGCCCATGAAGCAGGATAAAGACGAGGTGGACTCTGTGATGTCATCGGTTCTTCACTTAAAGTTGCGCCGGTTGCG	1260
E M F H R A M K Q D K D E V D L L I V I G S S L K V R P V A	
CTCATCCCAAACCTCCATTCTTCACGACGTGCTCAGGTCTGTATAAATAGGAGGCAACTTCCCTACCTCACTTCGATGTGGAACTACTC	1350
L I P N S I P H D V P Q V L I N R E Q L P H L N F D V E L L	
GGAGACTGCGACGTCATTGTCAACGAGCTCTGTCATCAGTTGGGCGTGGAAATACAGCAGCTTTGCTCCAACTCTAAGACTCAATGAG	1440
G D C D V I V N E L C H Q L G V E Y E Q L C S N T L R L N E	
ATCAGAGAGAAACCTCTCGGTTAOCAGACAGTCACTTAATGAGGCTTGTCTGCTCCAAAGGATGACGCTCATGTGGAGCAGAAAGCAG	1530
I T E K P P R L P E Q S P N E A L S A P K D A A H V E Q K Q	
CACCGCATAGACTCAGTAACCAAGTCTTACAGGAGGAAGAAACCCCAAGTGTCCTGAGACCGCCACTAAGATTACTACGCTCCGCAG	1620
H R I D S V T K S S Q E E E T P S V P E T A T K I T T P P Q	
CTTGGCCCAATGCTCAGGCTCCAGTGAAGAGACGACCAAGCCAGCAGAGGAGCCACAGAGGCTTCAOACAGAGAGCCCACTGAA	1710
P C P N A Q R P S E E T T K P A E G R T E A S P T E E P T E	
GTGAAGAACCACCTCTAACCTTCACAGACGATACGATGAGTGGATCAGCAGAAGTCCAGTCAGCAAACGCGCTTGAACAGGTCAG	1800
V K N H T S N L H R R Y W M S R I S R S P V S K R L E T G Q	
TACCTGTTTCAGGCAACAAATCAGTACTCTTCCACGGGGCTGAGGTACTCTGAAAGATGACAGCTCCAGCTCCAGGAGCAGC	1890
Y L F Q A P N Q Y I F H G A E V Y S D S E D T S S S R S S	
GACAGCGATGAGTCCGAGAGCAGCGCAGATGGCGTGGAGGACACAGCGACCCAGAGGAGCGGCGACACTACCGAGGAGACAGAGACG	1980
D S D E S E S S A D G V E D D S D P E E A A A L P E D A E T	
ACCCTCAGAGACAGATAAACAGTGATGCCAGCTCGGTGTGACAGACAGACAGTACATCAGAGAAAACAGAGAGCACCATGCATCTTTAA	2070
T L R D T I N S D A T S G V Q T D S T S E K T E S T M H L	

The start and stop codon are shown with boxes and the conservative domains are labeled with straight line

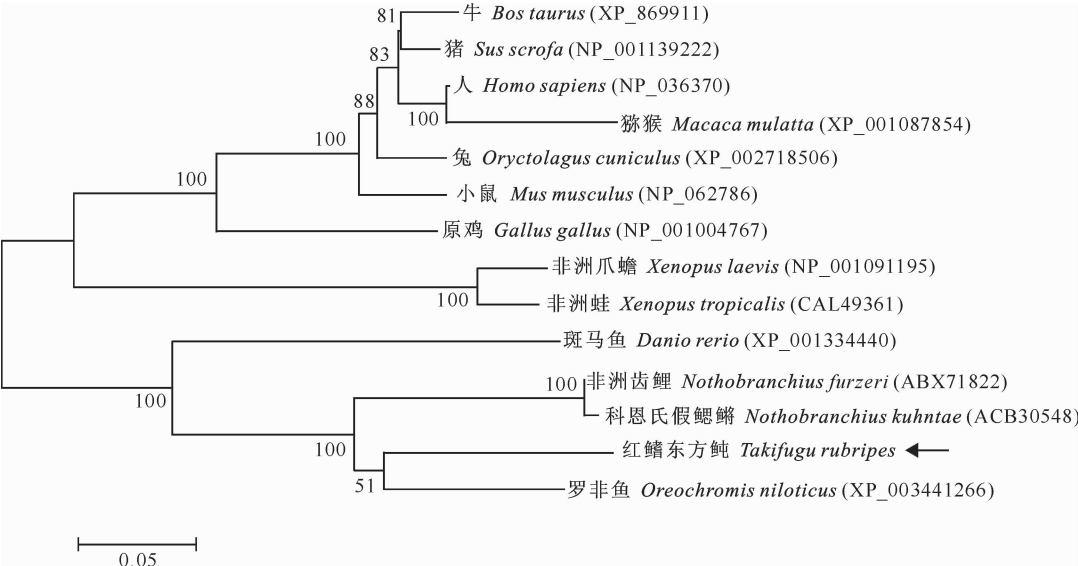


图 2 红鳍东方鲀 Sirt1 与其他生物的系统进化树
括号内数字为各序列的 GenBank 登录号

Fig. 2 Phylogenetic tree depicting the evolutionary relationships between various Sirt1
The number in the bracket denotes the GenBank accession number

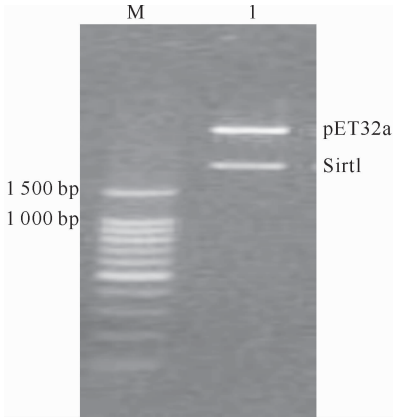


图 3 重组质粒 pET32a/Sirt1 的酶切分析
M. DNA Marker 100;1. pET32a /Sirt1 质粒双酶切
Fig. 3 Restriction analysis of plasmid pET32a/Sirt1
M. DNA Marker 100;1. pET32a/Sirt1 digested
by EcoR I and Xho I

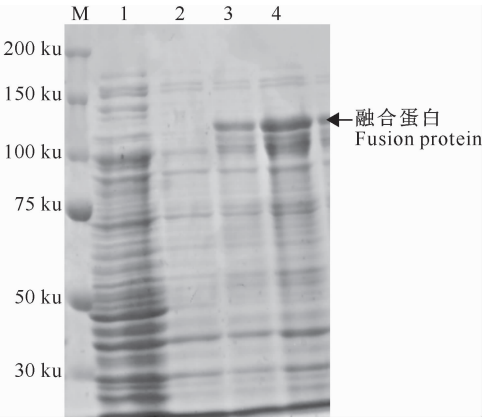


图 4 重组质粒表达产物的 SDS-PAGE 分析
M. 蛋白分子量标准;1. 空质粒;2. 未加诱导剂;
3. 加入 IPTG 诱导裂解后的沉淀;4. 加入 IPTG 诱导裂解后的上清
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of expression of
the Sirt1 in Rosetta (DE3)
M. Protein Marker;1. *E. coli* Rosetta(DE3)/pET32a with 1 mmol/L
IPTG induction;2. Sirt1 protein not induced by IPTG;
3. Sedimentation after lysis by inducement of IPTG;
4. Supernatant liquor after lysis by inducement of IPTG

对于鱼类 *Sirt1* 基因的研究目前鲜有报道,本研究克隆了红鳍东方鲀 *Sirt1* 基因的完整 ORF 序列,并在原核系统中得到了表达产物,便于进一步研究 *Sirt1* 与脂质代谢以及肉质性状的关系,为后续 *Sirt1* 基因调控机制的研究提供了理论基础。基于目前获得的试验结果,还需对红鳍东方鲀 *Sirt1* 蛋白活性及理化性质进行进一步研究,这不仅对改善鱼肉的风味及品质具有重要意义,而且也可为困扰人

[参考文献]

[1] Ando S,Mori Y,Nakamura K,et al. Characteristics of lipid accumulation types in five species of fish [J]. Nippon Suisan Gakkaishi,1993,59(9):1559-1564.
[2] Cheng H L, Mostoslavsky R,Saito S,et al. Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-defi-

- cient mice [J]. *Developmental Biology*, 2003, 100(19): 10794-10799.
- [3] Frye R A. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 273(2): 793-798.
- [4] Langley E, Pearson M, Farett M, et al. Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence [J]. *EMBO J*, 2002, 21(10): 2383-2396.
- [5] Luo J, Nikolaev A Y, Lmai S, et al. Negative control of p53 by Sir2 alpha promotes cell survival under stress [J]. *Cell*, 2001, 107(2): 137-148.
- [6] Motta M C, Divecha N, Lemieux M, et al. Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors [J]. *Cell*, 2004, 116(4): 551-563.
- [7] Kitamura Y I, Kitamura T, Kruse J P, et al. FoxO1 protects against pancreatic beta cell failure through NeuroD and MafA induction [J]. *Cell Metab*, 2005, 2(3): 153-163.
- [8] Yang T, Fu M, Pestell R, et al. SIRT1 and endocrine signaling [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2006, 17(5): 186-191.
- [9] Libert S, Pointer K, Bell E L, et al. SIRT1 activates MAO-A in the brain to mediate anxiety and exploratory drive [J]. *Cell*, 2011, 147(7): 1459-1472.
- [10] Gao Z G, Zhang J, Kheterpal I, et al. SIRT1 degradation in response to persistent JNK1 activation contributes to hepatic steatosis in obesity [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(5): 22227-22234.
- [11] Gerhart-Hines Z, Dominy J E, Bltler S M, et al. The cAMP/PKA pathway rapidly activates SIRT1 to promote fatty acid oxidation independently of changes in NAD⁺ [J]. *Mol Cell*, 2011, 44(6): 851-863.
- [12] 何 丹, 杜文婷, 任思冲, 等. 沉默交配型信息调节因子 2 同源蛋白 Sirt1 [J]. *生命的化学*, 2011, 31(4): 577-581.
- He D, Du W T, Ren S C, et al. Research progress of Sirt1 [J]. *Chemistry of Life*, 2011, 31(4): 577-581. (in Chinese)
- [13] Picard F, Kurtev M, Chung N, et al. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- γ [J]. *Nature*, 2004, 429(6993): 771-776.
- [14] 白 亮, 庞卫军, 杨公社. Sirt1: 一种新的脂肪细胞和肌细胞调控因子 [J]. *遗传*, 2006, 28(11): 1462-1466.
- Bai L, Pang W J, Yang G S. Sirt1: A novel adipocyte and myocyte regulatory factor [J]. *Hereditas*, 2006, 28(11): 1462-1466. (in Chinese)
- [15] Qiao L P, Shao J H. SIRT1 regulates adiponectin gene expression through FoxO1-C/enhancer-binding protein alpha transcriptional complex [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(52): 39915-39924.
- [16] Frye R A. Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast Sir2 gene; SIR2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have ADP-ribosyltransferase activity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 260(1): 273-279.
- [17] Wang R H, Sengupta K, Li C, et al. Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice [J]. *Cancer Cell*, 2008, 14(4): 312-323.
- [18] Picard F, Guarente L. Molecular links between aging and adipose tissue [J]. *Int J Obes*, 2005, 29: S36-S39.
- [19] Wolf G. Calorie restriction increases life span: A molecular mechanism [J]. *Nutr Rev*, 2006, 64(2): 89-92.
- [11] Aoyama M, Agari K, Sun-Wada G H, et al. Simple and straightforward construction of a mouse gene targeting vector using *in vitro* transposition reaction [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(5): e52.
- [12] 李军华, 韩翠芹, 邓 捷, 等. 双筛选标记打靶载体的构建及功能鉴定 [J]. *生物工程学报*, 2010, 26(12): 1696-1703.
- Li J H, Han C Q, Deng J, et al. Construction and functional analysis of a common gene targeting vector with double-selection markers [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2010, 26(12): 1696-1703. (in Chinese)
- [13] Li M Z, Elledge S J. Harnessing homologous recombination *in vitro* to generate recombinant DNA via SLIC [J]. *Nat Methods*, 2007, 4(3): 251-256.
- [14] Zhu B, Cai G, Hall E O, et al. In-fusion assembly: Seamless engineering of multidomain fusion proteins, modular vector, and mutations [J]. *Biotechniques*, 2007, 43(3): 354-359.
- [15] Cadinanos J, Bradley A. Generation of an inducible and optimized PiggyBac transposon system [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(12): e87.

(上接第 53 页)