

秦川牛 *SREBP1* 基因重组腺病毒载体的构建与病毒包装

付常振¹, 咎林森^{1,2,*}, 王虹¹, 姜碧杰¹, 成功^{1,2}, 王洪宝^{1,2}, 朱光星¹,
李耀坤¹, 王洪程¹

(1. 西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100; 2. 国家肉牛改良中心, 杨凌 712100)

摘要: 克隆秦川牛的 *SREBP1* 基因并构建重组腺病毒表达载体, 包装扩繁获得高滴度病毒, 拟为在细胞水平上开展基因功能的研究奠定基础。本试验以秦川牛脂肪组织为试验材料, 提取总 RNA 并反转得到 cDNA, 以 GenBank 收录的牛的 *SREBP1* 基因 mRNA 序列设计引物, PCR 扩增 *SREBP1* 基因与克隆载体 pMD19-T Simple 连接并测序鉴定。挑选测序正确的 *SREBP1* 基因酶切后连接到腺病毒穿梭载体上构建 pAdTrack-CMV-*SREBP1* 表达载体, 用 *Pme* I 限制酶酶切线性化, 然后转染到含有骨架载体 pAdEasy-1 的 *E. coli* BJ5183 感受态进行同源重组, 得到腺病毒重组载体 pAd-*SREBP1*。用 *Pac* I 限制酶酶切线性化 pAd-*SREBP1* 载体并回收质粒大片段, 转染 293A 细胞包装病毒并扩繁提高病毒滴度, 绿色荧光蛋白(GFP)标记法测定腺病毒的滴度。本试验成功克隆了秦川牛的 *SREBP1* 基因, 测序结果与 GenBank 收录的牛的基因序列比较有 2 处位点突变, 均已排除扩增酶的保真性不高等外界因素造成的。将 *SREBP1* 基因与穿梭载体连接构建了 pAdTrack-CMV-*SREBP1* 表达载体, 并与骨架载体重组得到重组腺病毒载体 pAd-*SREBP1*, 用 *Pac* I 酶切线性化包装病毒, 扩繁得到病毒滴度为 1.5×10^9 GFU \cdot mL⁻¹ 高滴度病毒。本研究成功克隆秦川牛 *SREBP1* 基因并重组成病毒重组子, 包装扩繁得到高滴度腺病毒。

关键词: 秦川牛; *SREBP1*; 腺病毒

中图分类号: S823

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)08-1323-07

Construction of Recombinant Adenovirus Vector Specific to *SREBP1* Gene of Qinchuan Cattle and the Packaging and Amplifying of the Corresponding Adenovirus

FU Chang-zhen¹, ZAN Lin-sen^{1,2,*}, WANG Hong¹, JIANG Bi-jie¹, CHENG Gong^{1,2},
WANG Hong-bao^{1,2}, ZHU Guang-xing¹, LI Yao-kun¹, WANG Hong-cheng¹

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 2. National Beef Cattle Improvement Center of Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: The objective of this research was to construct recombinant adenovirus vector specific to *SREBP1* gene of Qinchuan cattle and further package and amplify recombinant adenovirus carrying *SREBP1* gene, aimed at studying *SREBP1* gene function at cellular level. A pair of exclusive primers was designed according to the GenBank sequence information of *SREBP1* gene to amplify the complete CDS area of *SREBP1* gene via polymerase chain reaction (PCR). The obtained PCR

收稿日期: 2013-01-22

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08007-002); 国家肉牛牦牛产业技术体系(CARS-38); 国家自然科学基金(31272411); “十二五”国家 863 计划(2011AA100307-02); 教育部“长江学者和创新团队发展计划”(IRT0940); “十二五”国家科技支撑计划(2011BAD28B04-03)

作者简介: 付常振(1986-), 男, 黑龙江克山县人, 博士生, 主要从事动物生理调控方面的研究, E-mail: fcz200801@yahoo.com.cn, Tel: 029-87040326

* 通信作者: 咎林森(1963-), 男, 陕西扶风人, 教授, 博士生导师, 主要从事肉牛、奶牛遗传改良与种质创新等方面的研究, E-mail: zanlinsen@163.com

products were then sub-cloned into pMD19-T simple vector. The confirmed fragments containing CDS area of *SREBP1* gene were first digested from clone vector and then insert into the shuttle vector to construct the pAd-Track-CMV-*SREBP1* plasmid. The resultant plasmid was linearized by digesting with restriction endonuclease *Pme* I and subsequently transformed into BJ5183 containing pAdEasy-1 to obtain the expression vector pAd-*SREBP1*. Overall, the confirmed recombinant adenovirus plasmid pAd-*SREBP1* was digested with *Pac* I and transfected into 293A cell line to package and amplify the recombinant adenovirus. The viral titer was determined by GFP labeled method. *SREBP1* gene was cloned from Qinchuan cattle with two mutations in the DNA fragments. The two mutations were proved to be caused probably by the varietal difference, not by external factors. Recombinant plasmid pAdTrack-CMV-*SREBP1* and pAd-*SREBP1* were successfully constructed to the package and amplify the recombinant adenovirus with 1.5×10^9 GFU \cdot mL⁻¹ as its titer.

Key words: Qinchuan cattle; *SREBP1*; adenovirus

牛肉肉质鲜美,具有高蛋白低脂肪等特点,同时含有多种必需氨基酸,享有“肉中骄子”的美称^[1]。牛肉的大理石花纹是衡量牛肉品质的重要指标,它主要是由肌内脂肪含量和分布决定的^[2]。固醇调节元件结合蛋白(sterol regulatory element binding proteins, SREBPs)是一种膜结合蛋白,属于碱性螺旋-环-螺旋亮氨酸拉链转录因子家族,它能够通过与下游基因启动子中的 SRE(5'-TCACNCCAC-3')序列结合来调控基因表达^[3],是负责脂肪酸和胆固醇代谢相关一些关键酶的主要催化剂^[4-10],与脂肪酸和胆固醇代谢相关诸多疾病有密切关系^[11-17]。*SREBP*s 基因家族在脊椎动物中包含 *SREBP1* 和 *SREBP2* 两个基因,*SREBP1* 主要负责激活脂肪酸的合成,*SREBP2* 则优先激活胆固醇的合成和摄取^[18-21]。在人和小鼠,*SREBP1* 通过第一外显子的一个可变剪接转录翻译 2 个亚型蛋白 *SREBP-1a* 和 *SREBP-1c*^[22]。而在牛,*SREBP1* 可能仅以一种形式存在^[23]。*SREBP-1c* 能够促进过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ)和内生性 PPAR γ 的产生,并与 PPAR γ 和 CCAAT 增强子结合蛋白(CCAAT enhancer binding protein, C/EBPs)协同调控脂肪细胞分化^[24]。在 3T3-L1 前体脂肪细胞中过表达 *SREBP-1c* 基因促进了脂肪酸合酶(fatty acid synthase, FAS)和乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl CoA carboxylase, ACCase)等脂肪沉积相关基因的表达^[25]。在正常饲喂条件下的 *SREBP-1c*(-/-)小鼠,肝脏中 FAS 和 ACC 的含量显著减少^[26]。在培养的牛乳腺上皮细胞中干扰 *SREBP1* 基因后 ACC、

FAS、异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase)等基因的表达量同样出现不同程度的减少^[4],并且能够恢复脂肪变性^[13],通过加强运动降低 *SREBP-1c* 蛋白水平也同样能够恢复脂肪变性^[27]。综上,*SREBP1* 基因在脂肪酸的代谢过程中起关键作用,因此研究秦川牛 *SREBP1* 基因在前体脂肪细胞分化与脂肪酸代谢过程中的调控作用,对阐明牛肉肌内脂肪形成过程,增加肌内脂肪含量,提高牛肉质量具有重要的意义。

鉴于 *SREBP1* 基因的重要功能,但应用病毒介导的过表达技术,包装获得过表达病毒,以实现多种原代细胞的高效侵染及持续高过表达来研究该基因的功能尚未见报道。因此本试验以秦川牛脂肪组织为试验材料,克隆秦川牛 *SREBP1* 基因,插入 pAdTrack-CMV 穿梭载体,然后与 pAdEasy-1 腺病毒骨架载体重组,构建重组腺病毒表达载体,并包装出高滴度病毒,为基因功能的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验组织样 以国家肉牛改良中心良繁场 24 月龄秦川牛公牛为试验材料,屠宰后立即取适量皮下脂肪组织于无 RNase 和 DNase 的 1.5 mL 离心管中,迅速置于液氮,运回实验室于 -80 °C 保存备用。

1.1.2 试剂 腺病毒穿梭载体 pAdTrack-CMV、含有骨架载体 pAdEasy-1 的 *E. coli* BJ5183 菌株、293A 细胞系均由西北农林科技大学国家肉牛改良中心保存;DH5 α 感受态、T4 DNA 连接酶购自

天根生化科技(北京)有限公司;质粒小量提取试剂盒、无内毒素质粒小量提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒均购自 OMEGA 公司; *Hind* III、*Eco*R V、*Pac* I、*Pme* I 限制酶购自 NEB 公司, pMD[®]19-T Simple Vector, 500 bp DNA Marker 购自大连 TaKaRa 公司; 1 kb DNA Marker 购自中科瑞泰(北京)生物科技有限公司; KOD-Plus-Ver. 2 高保真聚合酶购自东洋纺(上海)生物科技有限公司; RevertAid[™] First Strand cDNA Synthesis Kit 与 TurboFect[™] in vitro Transfection Reagent 均购自 Fermentas 公司; Trizol、琼脂糖购自美国 Invitrogen 公司; 固相 RNase 去除剂购自北京天恩泽基因科技有限公司; 胎牛血清、DMEM 高糖培养基购自 Hyclone 公司; PCR 引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成; 细胞培养耗材均购自 Corning 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 *SREBP1* 基因的克隆

1.2.1.1 PCR 引物的设计、合成: 根据 GenBank 收录的牛的 *SREBP1* 基因序列 (Accession No. NM_001113302) 用 Primer 5.0 软件设计 PCR 扩增引物, 并在上游引物引入 *Hind* III 酶切位点, 下游引物引入 *Eco*R V 酶切位点, 引物序列如下, *SREBP1-Hind* III: CCCaagcttGCCACCATGGACGAGC-CACCCTTCAACG; *SREBP1-Eco*R V: CCGgatatc-CTAGCTGGAGGTCACAGTGGTC (小写字母为引入的酶切位点), PCR 产物大小是 3 516 bp, 将设计好的引物送英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

1.2.1.2 总 RNA 的提取与 cDNA 模板的合成: 利用 Trizol 法提取秦川牛皮下脂肪组织总 RNA, 并将提取的总 RNA 按照 Fermentas 公司 RevertAid[™] First Strand cDNA Synthesis Kit 的说明反转成 cDNA, -80 °C 保存备用。

1.2.1.3 *SREBP1* 基因的克隆和鉴定: 用 KOD-Plus-Ver. 2 高保真聚合酶 PCR 扩增 *SREBP1* 基因, PCR 反应体系: cDNA 模板 1.2 μL, 上下游引物各 0.6 μL, 25 mmol · L⁻¹ MgSO₄ 1.2 μL, 2 mmol · L⁻¹ dNTP 2 μL, 10 × PCR Buffer 2 μL, ddH₂O 12 μL, KOD-Plus-(1 U · μL⁻¹) 0.4 μL 总反应体系 20 μL; PCR 反应条件: 95 °C 预变性 3 min; 33 个 PCR 循环反应 (95 °C 变性 30 s, 66 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 210 s), 72 °C 最后延伸 5 min; 取 3 μL PCR 产物琼脂糖凝胶电泳检测。胶回收符合目的大小的

DNA 片段, 回收产物加“A”后与 pMD[®]19-T Simple Vector 连接, 连接产物转化感受态 DH5α, 然后在 LB 琼脂平板培养基上过夜培养, 挑取单克隆菌落于含有氨苄霉素的 LB 液体培养基中过夜振荡培养, 菌液 PCR 鉴定, 取 5 mL 菌液提取质粒用 *Hind* III 和 *Eco*R V 双酶切鉴定并测序, 得到 *SREBP1* 基因的克隆载体 pMD[®]19-T-SREBP1。

1.2.2 pAd-SREBP1 病毒重组子重组与鉴定

1.2.2.1 pAdTrack-CMV-SREBP1 载体的构建与鉴定: 用 *Hind* III 和 *Eco*R V 分别双酶切克隆载体 pMD[®]19-T-SREBP1 和腺病毒穿梭载体 pAdTrack-CMV, 电泳检测并回收目的片段, 回收产物用 T4 DNA 连接酶连接, 连接产物转化 DH5α 感受态。挑单克隆菌落于含有氨苄霉素的 LB 液体培养基过夜振荡培养, 取 5 mL 菌液提取质粒, 取 5 μL 质粒用 *Hind* III 和 *Eco*R V 双酶切鉴定并测序, 构建成 pAdTrack-CMV-SREBP1 载体。

1.2.2.2 pAd-SREBP1 重组腺病毒载体的构建与鉴定: 用 *Pme* I 酶切线性化 pAdTrack-CMV-SREBP1 载体, 酶切产物转化含有腺病毒骨架载体 pAdEasy-1 的 *E. coli* BJ5183 感受态, 涂布在含有氨苄霉素的 LB 琼脂培养基中过夜培养, 挑取单克隆菌落过夜振荡培养, 取 5 mL 菌液提取质粒, 用 *Pac* I 限制酶对重组质粒酶切鉴定并测序, 然后将重组质粒 pAd-SREBP1 转化感受态 DH5α 扩繁、保菌。

1.2.2.3 腺病毒的包装、扩增与滴度测定: 用无内毒素质粒小量提取试剂盒抽提重组质粒 pAd-SREBP1, 测量质粒浓度并取 5 μg 重组质粒用 *Pac* I 酶切然后胶回收大片段, 用 TurboFect[™] in vitro Transfection Reagent 以 2 μg 每孔 (6 孔板) 转染融合度为 80%~90% 的 293A 细胞包装病毒。转染后 24 h, 在荧光显微镜下观察绿色荧光数量与分布情况, 以跟踪腺病毒的包装与增殖过程; 转染 6~8 d, 局部出现绿色荧光葡萄串样聚集现象; 转染 10~12 d 大量细胞病变变圆脱壁, 出现明显的空斑, 待约 50% 细胞从培养容器底部脱落时收集全部培养液与细胞至离心管中, 将细胞悬液于 -80/37 °C 反复冻融并涡旋振荡 2 次, 3 000 r · min⁻¹ 离心 5 min, 收集上清液, 即为第 1 代病毒悬液。

用第 1 代病毒悬液侵染融合度约 90% 的 293A 细胞, 2~3 d 后, 细胞出现病变, 开始变圆脱落, 待脱落 50% 左右, 收集细胞按前述方法收集上清液,

即为第 2 代病毒悬液。用第 2 代病毒悬液再次感染 293A 细胞,重复“侵染—冻融—收集”,以大量扩繁病毒和提高病毒滴度。将收集的高滴度病毒悬液用绿色荧光蛋白(GFP)标记法测定病毒滴度,具体步骤参考 L. Lybarger 等^[28]及 D. C. Hitt 等^[29]的方法。

2 结果

2.1 秦川牛 *SREBP1* 基因的克隆及鉴定

PCR 扩增 *SREBP1* 基因,目的片段长度为 3 516 bp(图 1A),回收符合目的片段大小的 DNA 片段与 pMD[®] 19-T Simple Vector 连接,构建 *SREBP1* 基因克隆载体 pMD[®] 19-T-*SREBP1*,用 *Hind* III 和 *Eco*RV 双酶切检测并测序,双酶切得到 2 条条带,大小分别是 2 692、3 506 bp(图 1B)。测序发现,本试验得到的秦川牛 *SREBP1* 基因序列与 GenBank 收录序列比较,秦川牛 *SREBP1* 基因 CDS 区存在 2 个突变位点,分别位于 1 473 bp (GCGCA/GCTCG,丙氨酸同义突变)和 2 555 bp (GCTCT/CTACCT,亮氨酸到脯氨酸的错义突变)。为排除可能是由 PCR 扩增时聚合酶保真性不高外界因素造成的突变,笔者重新扩增了另外 2 头秦川牛的 *SREBP1* 基因,均有相同的突变位点,因此这 2 个突变位点为秦川牛基因组中固有的突变位点,*SREBP1* 基因克隆成功。

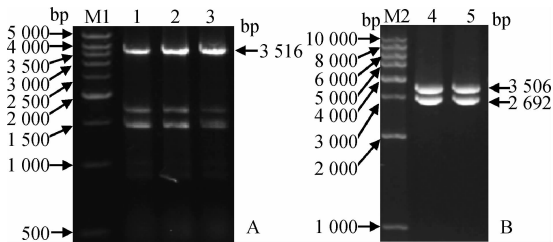


Fig. 1 Cloning of *SREBP1* gene and enzyme identification of pMD[®] 19-T-*SREBP1*

2.2 pAdTrack-CMV-SREBP1 穿梭载体构建与鉴定

用 *Hind* III 和 *Eco*RV 双酶切 pAdTrack-

CMV-SREBP1 质粒,凝胶电泳检测得到 9 220 和 3 506 bp 2 条条带(图 2),与预期结果一致,结合测序结果说明穿梭载体构建成功,可与腺病毒骨架载体重组。

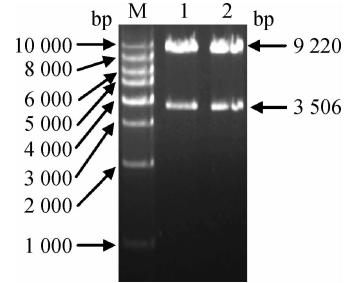


Fig. 2 Digestion identification of pAdTrack-CMV-SREBP1 plasmid by *Hind* III and *Eco*RV

2.3 pAd-SREBP1 重组质粒鉴定

抽提得到的 pAd-SREBP1 重组质粒用 *Pac* I 酶切,电泳检测显示 2 条条带,大小分别约为 30 和 4.5 kb(图 3),初步说明腺病毒重组质粒 pAd-SREBP1 重组成功,结合测序结果说明重组成功,可以进行腺病毒的包装。

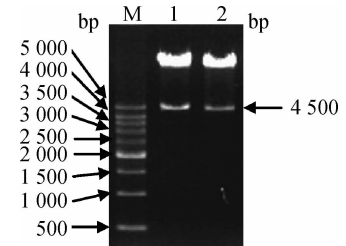
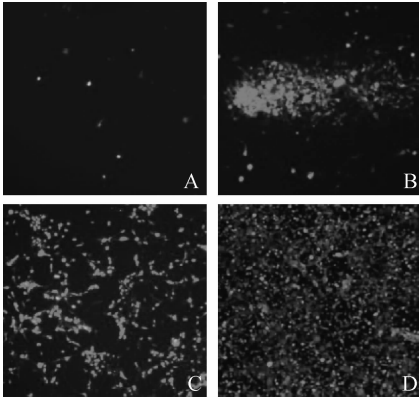


Fig. 3 Digestion identification of pAd-SREBP1 plasmid by *Pac* I

2.4 腺病毒的包装、扩繁及滴度测定

用 *Pac* I 限制酶酶切线性化 pAd-SREBP1 重组腺病毒载体,回收 DNA 大片段并转染 293A 细胞。转染 24 h,荧光倒置显微镜观察,仅有少量的绿色荧光亮点(图 4A);转染 7 d,绿色荧光数明显增多,视野变亮并在局部出现葡萄串样荧光聚集,荧光

分布最密集区域有些细胞开始变圆脱落(图 4B); 转染 10 d, 绿色荧光铺满整个视野, 大量细胞病变脱落, 出现明显的空斑(图 4C), 待约 50% 细胞脱落, 收集细胞与培养液, 得到第一代病毒悬液。重复“侵染—冻融—收集”扩繁得到高滴度病毒, 高滴度病毒侵染 293A 细胞(图 4D)约 28 h 就有 50% 细胞病变变圆脱壁, 收集病毒并测定病毒滴度。高滴度病毒用绿色荧光蛋白(GFP)标记法测定病毒滴度, 测量结果为 1.5×10^9 GFU \cdot mL $^{-1}$ 。



A. 重组腺病毒载体酶切线性化转染 293A 细胞 24 h, 整个视野下仅有数个绿色荧光点; B. 转染 7 d, 绿色荧光数(GFP)明显增多, 局部出现葡萄串样聚集; C. 转染 10 d, 绿色荧光铺满整个视野, 大量细胞病变变圆脱壁; D. 高滴度腺病毒侵染 293A 细胞 24 h 绿色荧光分布情况

A. Fluorescence microscopic image of 293A Cells transfected after 24 h; B. After 7 d, GFP increased and showed a grapes-like gathering; C. After 10 d, GFP covered the entire field of vision, and most cells rounded off the wall; D. 24 h after infection of high titers adenovirus

图 4 腺病毒的包装与扩繁(40 \times)

Fig. 4 Package and propagation of adenovirus (40 \times)

3 讨论

有关 *SREBP1* 基因的研究主要集中在与脂肪代谢相关疾病方面, 而在动物上关于其在肉质改良的方面研究相对较少。在牛, 一些研究表明 *SREBP1* 基因与脂肪代谢和生长发育有着密切的关系, 可以作为提高牛肉品质的候选基因^[4, 23, 30]。

牛的 *SREBP1* 基因定位于 19 号染色体上, mRNA 全长 3 983 bp, CDS 区全长 3 441 bp, 编码 1 146 个氨基酸, 由于基因 CDS 区片段较长, PCR 扩增其全长难度较大, 一般的 PCR 反应聚合酶保真性不高, 在扩增长片段过程中容易引起碱基突变, 并且难以一次性扩增出目的片段全长。高保真酶的使

用在很大程度上提高了 PCR 扩增的保真性和扩增效率, 但为提高试验结果的可靠性, 彻底排除人为引入突变, 因此在本实验中构建的含 *SREBP1* 基因的克隆载体、表达载体、重组腺病毒载体等均需要测序结果正确, 方可进行后续试验。另外, 由于 *SREBP1* 基因与克隆载体、穿梭载体、重组腺病毒载体的构建到病毒包装需要多次的酶切和连接步骤, 再加上基因序列较长, 因此克隆基因时在引物上引入的酶切位点应综合考虑, 在既符合载体多克隆位点的同时又要尽量方便载体的双酶切和提高基因与载体的连接效率。

克隆得到的秦川牛 *SREBP1* 基因序列测序结果与 GenBank 收录序列比对, 发现在 CDS 区 1 473 bp(GCGCA/GCTCG, 丙氨酸同义突变)和 2 555 bp(GCTCT/CTACCT, 亮氨酸到脯氨酸的错义突变)存在突变, 为排除 PCR 扩增时聚合酶保真性不高或者其他人为等外界因素造成的突变, 再次 PCR 扩增了另外 2 头秦川牛的 *SREBP1* 基因, 测序结果显示有相同的突变位点, 因此, 可以排除外界因素的影响, 确定这 2 个突变位点为秦川牛基因组中固有的突变位点。

将外源基因导入真核细胞以实现目的基因的过表达是目前研究基因功能的重要方法之一, 本试验选择了构建 *SREBP1* 基因重组腺病毒表达载体, 将目的基因插入到病毒基因组中, 利用病毒的侵染性实现目的基因在真核细胞的过表达, 与脂质体等介导的化学试剂转染法和应用电转移、核转移等物理方法比较, 它能最大限度的保护细胞不受损伤, 使细胞保持良好的生长状态。

腺病毒载体系统与其他病毒载体系统相比具有如下优势: 靶细胞种类多, 可以侵染分裂期、非分裂期、增殖缓慢的细胞及体内组织; 容易得到高滴度病毒, 侵染效率高; 可以携带大片段外源基因而不与宿主基因组整合等^[31-33]。本试验采用的 pAdEasy-1 系统是由 T. C. He 等构建的^[33], 操作简单, 重组效率高, 病毒纯度高, 并能不同类型细胞中高效表达。笔者首先是将目的基因插入到穿梭载体(pAdTrack-CMV)中, 然后用 *Pme* I 酶切线性化, 线性化产物转染到含有骨架载体 pAdEasy-1 的 *E. coli* BJ5183 大肠杆菌感受态, 在细菌中实现腺病毒载体的重组^[34], 然后提取重组腺病毒载体, 用 *Pac* I 酶切线性化, 回收质粒大片段转染 293A 细胞, 包装扩繁得到高滴度病毒。

4 结 论

本研究克隆了秦川牛的 *SREBP1* 基因,与腺病毒穿梭载体连接构建了 *SREBP1* 基因表达载体 pAdTrack-CMV-*SREBP1*,并与腺病毒骨架载体重组得到重组腺病毒载体 pAd-*SREBP1*,用 *Pac I* 酶切线性化后转染 293A 细胞包装病毒,重复“感染—冻融—收集”扩繁得到滴度为 1.5×10^9 GFU \cdot mL⁻¹ 的高滴度病毒,为在多种类型细胞中研究 *SREBP1* 基因功能奠定了基础。

参考文献:

- [1] 刘 丽,周光宏. 我国优质牛肉生产概况[J]. 黄牛杂志, 1998(4): 34-36.
- [2] KAZALA E C, LOZEMAN F J, MIR P S, et al. Relationship of fatty acid composition to intramuscular fat content in beef from crossbred Wagyu cattle [J]. *J Anim Sci*, 1999, 77(7): 1717-1725.
- [3] SHIMANO H. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes[J]. *Prog Lipid Res*, 2001, 40(6): 439-452.
- [4] MA L, CORL B A. Transcriptional regulation of lipid synthesis in bovine mammary epithelial cells by sterol regulatory element binding protein-1[J]. *J Dairy Sci*, 2012, 95(7): 3743-3755.
- [5] SUZUKI M, DOI T, LEE S J, et al. Effect of meal timing after resistance exercise on hindlimb muscle mass and fat accumulation in trained rats[J]. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 1999, 45(4): 401-409.
- [6] SHIMANO H, YAHAGI N, AMEMIYA-KUDO M, et al. Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(50): 35832-35839.
- [7] LIANG G, YANG J, HORTON J D, et al. Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(11): 9520-9528.
- [8] AMEMIYA-KUDO M, SHIMANO H, HASTY A H, et al. Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterol genes [J]. *J Lipid Res*, 2002, 43(8): 1220-1235.
- [9] RANGWALA S M, LAZAR M A. Transcriptional control of adipogenesis[J]. *Annu Rev Nutr*, 2000, 20: 535-559.
- [10] KIM G H, LEE K J, OH G S, et al. Regulation of hepatic insulin sensitivity by activating signal co-integrator-2[J]. *Biochem J*, 2012, 447(3): 437-447.
- [11] CHU X, LIU L, NA L, et al. Sterol regulatory element-binding protein-1c mediates increase of postprandial stearic acid, potential target for improving insulin resistance, in Hyperlipidemia [J]. *Diabetes*, 2013, 62(2): 561-571.
- [12] MULLER-WIELAND D, KNEBEL B, HAAS J, et al. SREBP-1 and fatty liver. Clinical relevance for diabetes, obesity, dyslipidemia and atherosclerosis[J]. *Herz*, 2012, 37(3): 273-278.
- [13] VITTO M F, LUZ G, LUCIANO T F, et al. Reversion of Steatosis by SREBP-1c Antisense Oligonucleotide did not Improve Hepatic Insulin Action in Diet-induced Obesity Mice[J]. *Horm Metab Res*, 2012.
- [14] ZHANG C, CHEN X, ZHU R M, et al. Endoplasmic reticulum stress is involved in hepatic SREBP-1c activation and lipid accumulation in fructose-fed mice [J]. *Toxicol Lett*, 2012, 212(3): 229-240.
- [15] SOUFI M, RUPPERT V, KURT B, et al. The impact of severe LDL receptor mutations on SREBP-pathway regulation in homozygous familial hypercholesterolemia (FH) [J]. *Gene*, 2012, 499(1): 218-222.
- [16] TAGHIBIGLOU C, LU J, MACKENZIE I R, et al. Sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP1) activation in motor neurons in excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis (ALS): Indip, a potential therapeutic peptide [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 413(2): 159-163.
- [17] 江萃英,曾维琼,陈压西,等. 乙型肝炎病毒对脂肪变患者肝细胞固醇调节元件结合蛋白表达的影响[J]. 中华肝脏病杂志, 2011, 19(8): 608-613.
- [18] SHIMANO H, HORTON J D, HAMMER R E, et al. Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a [J]. *J Clin Invest*, 1996, 98(7): 1575-1584.
- [19] HORTON J D, SHIMOMURA I, BROWN M S, et al. Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2 [J]. *J Clin Invest*, 1998, 101(11): 2331-2339.
- [20] HORTON J D, GOLDSTEIN J L, BROWN M S.

- SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver[J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(9): 1125-1131.
- [21] SHIMANO H, HORTON J D, SHIMOMURA I, et al. Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells[J]. *J Clin Invest*, 1997, 99(5): 846-854.
- [22] EBERLE D, HEGARTY B, BOSSARD P, et al. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis[J]. *Biochimie*, 2004, 86(11): 839-848.
- [23] HOASHI S, ASHIDA N, OHSAKI H, et al. Genotype of bovine sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle[J]. *Mamm Genome*, 2007, 18(12): 880-886.
- [24] KIM J B, WRIGHT H M, WRIGHT M, et al. ADD1/SREBP1 activates PPAR γ through the production of endogenous ligand[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(8): 4333-4337.
- [25] KIM J B, SPIEGELMAN B M. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism[J]. *Genes Dev*, 1996, 10(9): 1096-1107.
- [26] LIANG G, YANG J, HORTON J D, et al. Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(11): 9520-9528.
- [27] CINTRA D E, ROPELLE E R, VITTO M F, et al. Reversion of hepatic steatosis by exercise training in obese mice: The role of sterol regulatory element-binding protein-1c[J]. *Life Sci*, 2012, 91(11-12): 395-401.
- [28] LYBARGER L, DEMPSEY D, FRANEK K J, et al. Rapid generation and flow cytometric analysis of stable GFP-expressing cells[J]. *Cytometry*, 1996, 25(3): 211-220.
- [29] HITT D C, BOOTH J L, DANDAPANI V, et al. A flow cytometric protocol for titrating recombinant adenoviral vectors containing the green fluorescent protein[J]. *Mol Biotechnol*, 2000, 14(3): 197-203.
- [30] HUANG Y Z, HE H, SUN J J, et al. Haplotype combination of SREBP-1c gene sequence variants is associated with growth traits in cattle[J]. *Genome*, 2011, 54(6): 507-516.
- [31] VORBURGER S A, HUNT K K. Adenoviral gene therapy[J]. *Oncologist*, 2002, 7(1): 46-59.
- [32] LEE J, LAKS H, DRINKWATER D C, et al. Cardiac gene transfer by intracoronary infusion of adenovirus vector-mediated reporter gene in the transplanted mouse heart [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1996, 111(1): 246-252.
- [33] HE T C, ZHOU S, DA C L, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(5): 2509-2514.
- [34] LUO J, DENG Z L, LUO X, et al. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system[J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(5): 1236-1247.

(编辑 白永平)