

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20240529001

http://www.yykxjz.cn/

彭家宝, 汪紫嫣, 杨志刚, 陈阿琴. 斑马鱼 *SIRT* 基因家族分析及其在卵泡不同发育时期的表达. 渔业科学进展, 2025, 46(3): 12–26

PENG J B, WANG Z Y, YANG Z G, CHEN A Q. Analysis of the *SIRT* gene family of *Danio rerio* and its expression at different developmental stages of follicles. Progress in Fishery Sciences, 2025, 46(3): 12–26

斑马鱼 *SIRT* 基因家族分析及其 在卵泡不同发育时期的表达*

彭家宝^{1,2} 汪紫嫣^{1,2} 杨志刚^{1,2,3} 陈阿琴^{1,2①}

(1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306; 2. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室 上海 201306; 3. 上海海洋大学 农业农村部鱼类营养与环境生态研究中心 上海 201306)

摘要 Sirtuins (*SIRT*) 是一类 NAD^+ 依赖性 III 类去乙酰化酶家族, 广泛参与生物体各项生理活动, 特别是在卵巢发育方面发挥着重要作用。本研究运用生物信息学方法系统分析斑马鱼 (*Danio rerio*) *SIRT* 家族基因的染色体分布、基因结构、氨基酸序列、蛋白基序和保守结构域、理化性质、二级结构和三级结构及系统进化关系, 并探究在卵泡不同发育时期的表达变化。结果显示, 斑马鱼 8 个 *SIRT* 基因分布于斑马鱼的 8 条染色体上, 序列长短不一, 最长为 *SIRT6* (140 265 bp), 最短为 *SIRT4* (7 101 bp), 编码区为 3~14 个不等。斑马鱼 *SIRT* 氨基酸序列相似度较低, 但都具有 Sir2 保守结构域和保守基序。斑马鱼 *SIRT* 蛋白均为亲水性蛋白, 除 *SIRT3* 外, 均为不稳定蛋白。亚细胞定位预测显示, 斑马鱼 *SIRT* 家族蛋白主要定位于细胞质和细胞核。系统进化分析表明, 斑马鱼 *SIRT1*、*SIRT2*、*SIRT3.2* 和 *SIRT4* 与金鱼 (*Carassius auratus*)、青鳉 (*Oryzias latipes*) 具有共线性关系。蛋白互作网络 (PPI) 预测发现, *SIRT* 蛋白与雌激素受体 (ESR1)、叉头盒转录因子家族 (FOXOs)、热休克蛋白家族 (HSPs)、超氧化物歧化酶家族 (SODs) 等具有相互作用。实时荧光定量 PCR 分析显示, 在卵泡发育过程中, *SIRT1* 和 *SIRT2* 主要在卵黄发生中期 (MV) 表达; *SIRT3* 和 *SIRT4* 主要在充分生长未成熟期 (FG) 表达; *SIRT3.2*、*SIRT5*、*SIRT6* 和 *SIRT7* 主要在成熟期 (GVBD) 表达。本研究阐明了斑马鱼 *SIRT* 基因家族进化发育关系、结构功能特征以及在卵泡发育过程中的表达规律, 可为进一步研究 *SIRT* 家族在鱼类卵泡发育过程中的作用提供参考。

关键词 斑马鱼; *SIRT* 基因家族; 卵泡发育; 生物信息学

中图分类号 Q492.5 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2025)03-0012-15

Sirtuins (*SIRT*) 是一类烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD^+) 依赖性组蛋白去乙酰化酶 (HDACs) 家族, 以首次在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中被发现的 Sir2p (一种组蛋白去乙酰化酶) 命名 (Braunstein *et al.*, 1993; Ivy *et al.*, 1985; Klar *et al.*, 1979)。SIRT 参与修饰

组蛋白或非组蛋白, 除具有去乙酰化酶外, 有些成员还具有 ADP-核糖基化酶等活性, 在调节能量代谢、抵抗氧化应激等方面发挥着重要作用 (Imai *et al.*, 2000; Landry *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2004)。SIRT 家族广泛存在于原核生物和真核生物中, 主要分为 5 类,

* 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系项目 (CARS-48) 资助。彭家宝, Email: 2770213943@qq.com

① 通信作者: 陈阿琴, 副教授, Email: aqchen@shou.edu.cn

收稿日期: 2024-05-29, 收修改稿日期: 2024-06-18

SIRT1~*SIRT3* 为 I 类, *SIRT4* 为 II 类, *SIRT5* 为 III 类, *SIRT6* 和 *SIRT7* 为 IV 类, U 类只存在于古细菌到细菌的 *SIRT* 基因家族(Frye, 2000; Greiss *et al*, 2009)。不同生物的 *SIRT* 基因数和分布不尽相同, 例如酿酒酵母中有 4 个家族成员, 家蚕(*Bombyx mori*)有 5 个家族成员, 西方蜜蜂(*Apis mellifera*)有 6 个家族成员, 哺乳动物中有 7 个家族成员(Frye, 2000; Greiss *et al*, 2009; 宋文菲等, 2023)。而在硬骨鱼类中 *SIRT* 有 8 个家族成员(Pereira *et al*, 2011; Opazo *et al*, 2023), 除 *SIRT1*~*SIRT7* 外, 还包括 *SIRT3.2*。

McBurney 等(2003)研究发现, *Sir2a* 在小鼠(*Mus musculus*)生殖器官中高度表达, 并且首次利用 *Sir2a* 敲除小鼠模型发现其不育的生殖缺陷表型, 自此, *SIRT* 在繁殖方面的作用受到广泛关注。目前, *SIRT* 家族各成员均已被证明在哺乳动物卵巢中表达, 广泛参与调控卵巢发育, 涉及减数分裂调控、能量代谢、线粒体质量控制、维持氧化还原稳态以及激素分泌等多个方面(Ma *et al*, 2018; Cinco *et al*, 2016; Xu *et al*, 2019a, b; Zhang *et al*, 2016)。*SIRT* 家族成员在雌性小鼠产后 23 d 内卵泡中的表达具有显著性差异, 其中, *SIRT1*、*SIRT4* 和 *SIRT6* 表达量随产后天数增加显著降低, *SIRT5* 表达量先显著升高后显著降低, 其他成员无显著变化(Kong *et al*, 2020)。*SIRT* 家族已被发现在斑马鱼(*Danio rerio*)卵巢组织中高度表达(Pereira *et al*, 2011), 但有关其在卵泡生长发育中较为系统的研究尚未报道。

本研究运用生物信息学方法分析斑马鱼 *SIRT* 基因家族 8 个成员的染色体定位、基因结构、氨基酸序列、二级和三级结构以及系统进化特征, 并利用实时荧光定量 PCR 技术研究斑马鱼 *SIRT* 基因家族在卵泡发育不同时期的表达规律, 旨在为 *SIRT* 基因家族在斑马鱼卵泡发育过程中的功能研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 斑马鱼 *SIRT* 基因家族染色体定位及结构分析

根据 Pereira 等(2011)的研究结果, 对斑马鱼 8 个 *SIRT* 基因进行生物信息学分析。从 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库中下载斑马鱼基因组序列和注释文件(GCF_000002035.6), 使用 TBtools (Chen *et al*, 2020)可视化 *SIRT* 基因家族在染色体上的位置、基因结构和保守结构域, 蛋白基序使用 MEME(<http://meme-suite.org/index.html>)预测。使用 Jalview(Waterhouse *et al*, 2009)对斑马鱼 *SIRT* 蛋白家族氨基酸序列进行多重序列比对。使用 SOPMA

(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa%20_sopma.html)分析蛋白二级结构, 三级结构使用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)预测。

1.2 斑马鱼 *SIRT* 基因家族理化性质分析及亚细胞定位预测

使用 ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>)预测斑马鱼 *SIRT* 家族蛋白的理化性质, 通过 Cell-PLoc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 预测 *SIRT* 基因的亚细胞定位。

1.3 *SIRT* 基因家族系统发育分析

挑选 18 个物种的 *SIRT* 蛋白氨基酸序列用于构建系统发育树, 氨基酸序列来自于 NCBI 数据库(表 1)。使用 MEGA 11.0(Tamura *et al*, 2021)软件中的邻接法(Saitou *et al*, 1987)构建系统发育树。采用 iTOL (<https://itol.embl.de/>)在线工具对系统发育树进行美化。

1.4 斑马鱼 *SIRT* 基因家族蛋白互作网络分析

通过 STRING 数据库(<https://string-db.org/>)分析斑马鱼 *SIRT* 家族蛋白相互作用网络(PPI), 使用 Cytoscape 3.10.1 对 PPI 进行分析和美化(Shannon *et al*, 2003)。

1.5 样品采集

实验斑马鱼在斑马鱼自动循环水养殖系统中养殖, 水温为(28.0±0.5)℃, 光照周期为 14 h 光照: 10 h 黑暗循环, 每天用鲜活的卤虫投喂 2 次。取同一繁殖周期健康、性成熟的斑马鱼, 置于冰上冷冻麻醉, 断头处死后将卵巢移除, 置于 60% Leibovitz-15 培养液(Gibco)中, 将 8~10 条雌鱼的卵泡小心地用眼科镊子分离, 解剖显微镜下用目镜测微尺测定卵泡细胞直径。根据不同发育时期卵泡直径, 将卵泡分为初级生长期(PG, <0.15 mm); 卵黄发生前期(PV, ~0.25 mm); 卵黄发生早期(EV, ~0.35 mm); 卵黄发生中期(MV, ~0.45 mm); 充分生长未成熟期(FG, ~0.65 mm); 成熟期(GVBD, >0.65 mm)(Wang *et al*, 2004)。采集获得以上 6 个时期卵泡($n=3$, 每个生物学重复至少含有 50 个卵泡)。置于-80℃冰箱保存用于 RNA 提取。

1.6 实时荧光定量 PCR

使用 AG RNAex Pro RNA 提取试剂盒(艾科瑞)提取不同发育时期卵泡总 RNA。使用微量分光光度计 NanoDrop 1000 检测 RNA 浓度与纯度, 并通过琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。取 1 μg 总 RNA 为模

表 1 系统发育树构建中使用的 SIRT 氨基酸序列
Tab.1 SIRT amino acid sequences used in phylogenetic tree construction

基因 Gene	物种 Species	GenBank 登录号 GenBank accession No.	基因 Gene	物种 Species	GenBank 登录号 GenBank accession No.
SIRT1	<i>Danio rerio</i>	XP_001334440.4	SIRT1	<i>Homo sapiens</i>	NP_036370.2
SIRT1	<i>Mus musculus</i>	NP_062786.1	SIRT1	<i>Sus scrofa</i>	NP_001139222.1
SIRT1	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	XP_034518489.1	SIRT1	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_005473903.1
SIRT1	<i>Oryzias latipes</i>	XP_004077552.1	SIRT1	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	XP_021462709.2
SIRT1	<i>Larimichthys crocea</i>	TMS04897.1	SIRT1	<i>Monopterus albus</i>	XP_020457563.1
SIRT1	<i>Paralichthys olivaceus</i>	XP_019949929.1	SIRT1	<i>Electrophorus electricus</i>	XP_026851348.2
SIRT1	<i>Tachysurus fulvidraco</i>	XP_027021653.2	SIRT1	<i>Xiphophorus hellerii</i>	XP_032409560.1
SIRT1	<i>Ictalurus punctatus</i>	XP_017317361.1	SIRT2	<i>Danio rerio</i>	NP_955890.1
SIRT2	<i>Homo sapiens</i>	NP_036369.2	SIRT2	<i>Mus musculus</i>	NP_071877.3
SIRT2	<i>Sus scrofa</i>	ACP18880.1	SIRT2	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	XP_002927438.3
SIRT2	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003449312.1	SIRT2	<i>Oryzias latipes</i>	XP_023817244.1
SIRT2	<i>Larimichthys crocea</i>	UFQ91282.1	SIRT2	<i>Ictalurus punctatus</i>	XP_017351444.1
SIRT2	<i>Paralichthys olivaceus</i>	XP_019950822.1	SIRT2	<i>Monopterus albus</i>	XP_020443356.1
SIRT2	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	XP_021443327.2	SIRT2	<i>Carassius auratus</i>	XP_026138652.1
SIRT2	<i>Tachysurus fulvidraco</i>	XP_027017961.1	SIRT2	<i>Electrophorus electricus</i>	XP_026877503.1
SIRT3	<i>Danio rerio</i>	NP_001073643.1	SIRT3	<i>Homo sapiens</i>	NP_001357239.1
SIRT3	<i>Mus musculus</i>	AAH25878.1	SIRT3	<i>Sus scrofa</i>	ACK38354.1
SIRT3	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	XP_034501791.1	SIRT3	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_005457428.1
SIRT3	<i>Oryzias latipes</i>	XP_023807517.1	SIRT3	<i>Ictalurus punctatus</i>	XP_017333446.1
SIRT3	<i>Lates calcarifer</i>	XP_018548213.1	SIRT3	<i>Larimichthys crocea</i>	XP_019123585.1
SIRT3	<i>Monopterus albus</i>	XP_020475558.1	SIRT3	<i>Carassius auratus</i>	XP_026124003.1
SIRT3	<i>Xiphophorus hellerii</i>	XP_032417667.1	SIRT3	<i>Electrophorus electricus</i>	XP_035383201.1
SIRT3	<i>Tachysurus fulvidraco</i>	XP_027008855.2	SIRT3.2	<i>Danio rerio</i>	NP_001038173.1
SIRT3.2	<i>Oryzias latipes</i>	XP_004069760.1	SIRT3.2	<i>Carassius auratus</i>	XP_026143105.1
SIRT3.2	<i>Electrophorus electricus</i>	XP_026885647.2	SIRT3.2	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_005470975.1
SIRT3.2	<i>Paralichthys olivaceus</i>	XP_019934239.1	SIRT3.2	<i>Larimichthys crocea</i>	XP_019129197.1
SIRT3.2	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	XP_021429870.2	SIRT3.2	<i>Ictalurus punctatus</i>	XP_017321896.1
SIRT3.2	<i>Lates calcarifer</i>	XP_050929405.1	SIRT4	<i>Danio rerio</i>	NP_001005988.1
SIRT4	<i>Homo sapiens</i>	NP_001372662.1	SIRT4	<i>Mus musculus</i>	XP_036021467.1
SIRT4	<i>Sus scrofa</i>	ABY65334.1	SIRT4	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	XP_019648358.1
SIRT4	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_025763051.1	SIRT4	<i>Oryzias latipes</i>	XP_004086174.1
SIRT4	<i>Ictalurus punctatus</i>	XP_017335733.1	SIRT4	<i>Lates calcarifer</i>	XP_018541287.1
SIRT4	<i>Paralichthys olivaceus</i>	XP_019964043.1	SIRT4	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	XP_021424526.1
SIRT4	<i>Sparus aurata</i>	AHX56276.1	SIRT4	<i>Carassius auratus</i>	XP_026116541.1
SIRT4	<i>Electrophorus electricus</i>	XP_026863638.2	SIRT4	<i>Larimichthys crocea</i>	XP_027134801.1
SIRT5	<i>Danio rerio</i>	NP_001002605.1	SIRT5	<i>Homo sapiens</i>	NP_001363732.1
SIRT5	<i>Mus musculus</i>	XP_006517014.1	SIRT5	<i>Sus scrofa</i>	ABY65335.1
SIRT5	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	XP_034516196.1	SIRT5	<i>Ictalurus punctatus</i>	NP_001187449.1
SIRT5	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_005462095.1	SIRT5	<i>Oryzias latipes</i>	XP_004068175.1
SIRT5	<i>Larimichthys crocea</i>	KAE8290866.1	SIRT5	<i>Monopterus albus</i>	XP_020457630.1
SIRT5	<i>Carassius auratus</i>	XP_026147105.1	SIRT5	<i>Electrophorus electricus</i>	XP_026883727.2
SIRT5	<i>Paralichthys olivaceus</i>	XP_019958140.1	SIRT5	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	XP_036824882.1
SIRT5	<i>Tachysurus fulvidraco</i>	XP_047657850.1	SIRT6	<i>Danio rerio</i>	NP_001002071.1

续表 1

基因 Gene	物种 Species	GenBank 登录号 GenBank accession number	基因 Gene	物种 Species	GenBank 登录号 GenBank accession number
<i>SIRT6</i>	<i>Homo sapiens</i>	CAG33481.1	<i>SIRT6</i>	<i>Mus musculus</i>	NP_001365873.1
<i>SIRT6</i>	<i>Sus scrofa</i>	ADZ44547.1	<i>SIRT6</i>	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	NP_001401780.1
<i>SIRT6</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003438026.1	<i>SIRT6</i>	<i>Oryzias latipes</i>	XP_004079352.1
<i>SIRT6</i>	<i>Larimichthys crocea</i>	XP_010742523.2	<i>SIRT6</i>	<i>Ictalurus punctatus</i>	XP_017351821.1
<i>SIRT6</i>	<i>Carassius auratus</i>	XP_026107325.1	<i>SIRT6</i>	<i>Paralichthys olivaceus</i>	XP_019955800.1
<i>SIRT6</i>	<i>Monopterus albus</i>	XP_020471906.1	<i>SIRT6</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	XP_021444620.2
<i>SIRT6</i>	<i>Electrophorus electricus</i>	XP_026887213.2	<i>SIRT6</i>	<i>Tachysurus fulvidraco</i>	XP_027006580.2
<i>SIRT7</i>	<i>Danio rerio</i>	XP_001336438.3	<i>SIRT7</i>	<i>Homo sapiens</i>	NP_057622.1
<i>SIRT7</i>	<i>Mus musculus</i>	AAP83960.1	<i>SIRT7</i>	<i>Sus scrofa</i>	ABY65337.1
<i>SIRT7</i>	<i>Oryzias latipes</i>	XP_023815574.1	<i>SIRT7</i>	<i>Larimichthys crocea</i>	XP_019115743.1
<i>SIRT7</i>	<i>Ictalurus punctatus</i>	XP_017333401.1	<i>SIRT7</i>	<i>Monopterus albus</i>	XP_020451984.1
<i>SIRT7</i>	<i>Paralichthys olivaceus</i>	XP_019939225.1	<i>SIRT7</i>	<i>Carassius auratus</i>	XP_026053535.1
<i>SIRT7</i>	<i>Electrophorus electricus</i>	XP_026866433.2	<i>SIRT7</i>	<i>Sparus aurata</i>	QKG31878.1
<i>SIRT7</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003455858.1	<i>SIRT7</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	XP_036804000.1
<i>SIRT7</i>	<i>Tachysurus fulvidraco</i>	XP_047659051.1			

表 2 用于 qPCR 的引物序列
Tab.2 Sequence of primers used for qPCR

引物名称 Primer name	GenBank ID	序列 Sequence (5'~3')
β-actin	BC045846.1	F GAGGCTCCCCTGAACCCCAAAG
		R ACCAGAGTCCATCACGATACCA
SIRT1	XM_001334404.6	F CAGCTCTGCTACAATTCATCGCGTC
		R AATCTCTGTAGAGTCCAGCGCGTGTG
SIRT2	NM_199596.1	F TTTACTACACTCTGGCCTGC
		R CATAAGAGCCGTCCCCCAAG
SIRT3	NM_001080174.1	F CATTAATGTGGTGAACAAGAGGCCTG
		R TGTGGTGAAGTACTCCTCGTGCTGAGC
SIRT3.2	NM_001044708.1	F CGGCAGGCTGATGAAGCTTGGTCG
		R TAGCTTGCTTGGCTTCTCTGCAGG
SIRT4	NM_001005988.1	F CAGGTCTGTAGATGCTGTTGTC
		R TCCGGCACCGCTTATTACAA
SIRT5	NM_001002605.1	F CCACGGTAGTCTGTTAAAACCCGCTG
		R AGTGATATTTGAAGCGTTGGGTAGCAGG
SIRT6	NM_001002071.1	F GGACTGGGAGGACTCTCTGCCCCGAC
		R GCCCGGCCCACTCCGGAACG
SIRT7	XM_001336402.6	F GCATTTTGAGAACGTGGCACTTTGG
		R GTTTAGCCATGCTGAAGATGGGGTCC

板, 按照 Evo M-MLV 反转录试剂盒(艾科瑞)说明书进行反转录获得 cDNA。使用 Primer-blast 软件设计引物(表 2), 以 β-actin 为内参基因, 参照 SYBR Green Premix Pro Taq HS qPCR 试剂盒(艾科瑞)说明书, 使用 ABI 7500 Real Time PCR 仪进行实时荧光定量 PCR (qPCR)分析, 使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法(Livak *et al*, 2001)计

算斑马鱼不同发育时期卵泡中 *SIRT* 基因家族的相对表达量, 结果用平均值±标准差(Mean±SD)表示。

1.7 数据分析

使用 SPSS 26.0 对数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 采用 LSD 法进行多重比较, $P<0.05$ 表

示具有显著性差异。使用 GraphPad Prism 9 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 斑马鱼 *SIRT* 基因家族的染色体分布

斑马鱼 *SIRT* 基因家族 8 个成员分别位于斑马鱼的 2、6、7、13、15、18、20 及 22 号染色体上(图 1)。

2.2 斑马鱼 *SIRT* 家族基因结构分析

基因结构分析显示(图 2), *SIRT* 家族成员基因结构差异很大, 序列最长的是 *SIRT6* (140 265 bp), 最短的是 *SIRT4* (7 101 bp)。 *SIRT2* 具有最多的外显子数 (17 个), *SIRT4* 的外显子数最少(5 个)。此外, 蛋白质

编码区最少的是 *SIRT4* (3 个), 最多的是 *SIRT2* (14 个)。虽然 *SIRT2* 和 *SIRT6* 的 5'UTR 分布在 2 个外显子上, 但长度明显短于 3'UTR。

2.3 斑马鱼 *SIRT* 基因家族氨基酸序列分析

氨基酸序列比对发现, 斑马鱼 *SIRT* 基因家族的氨基酸序列相似度仅为 20.29% (图 3), 相似序列集中在特有的保守基序上, 例如 GAGxSx、xxPxxR、PxxxH、QNxDxL、xxHGxx 和 GxSxxx。通过预测得到斑马鱼 *SIRT* 蛋白最保守的 10 个基序(图 4), 处于同一分支的旁系同源基因存在近乎相同的 motif 组成, 而各分支之间基序的数量存在差异。10 个 motif 中, motif 2、

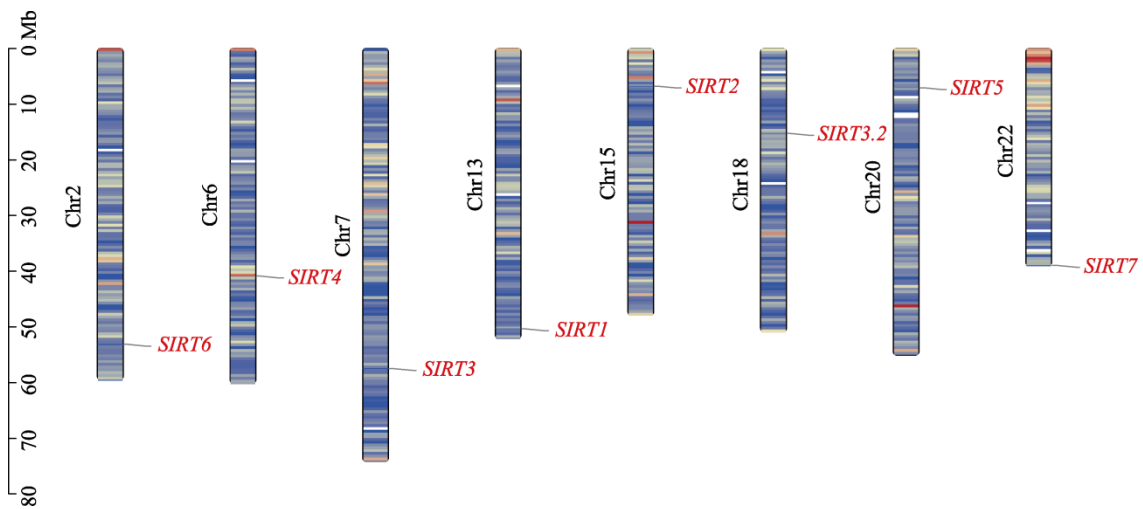


图 1 *SIRT* 家族基因在斑马鱼染色体的分布

Fig.1 Distribution of *SIRT* family genes in chromosome of *D. rerio*

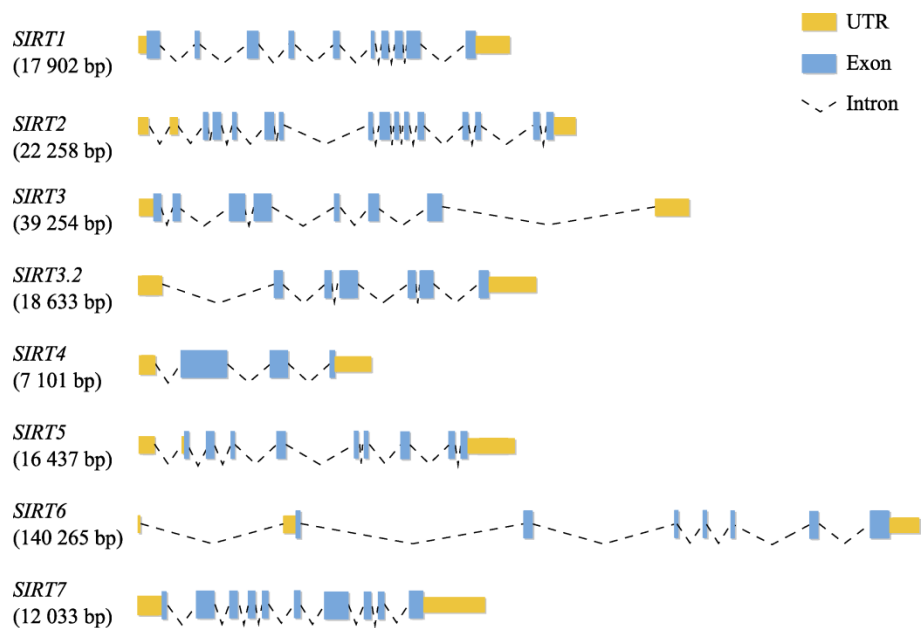


图 2 斑马鱼 *SIRT* 家族基因结构

Fig.2 Structure of *SIRT* family genes in *D. rerio*

利用 SOPMA 网站对斑马鱼 SIRT 家族 8 个蛋白的二级结构进行分析(表 4)。分析结果表明 SIRT 家族蛋白二级结构相似, α -螺旋和无规则卷曲是蛋白质二级结构的主要组成部分。

表 3 斑马鱼 SIRT 蛋白理化性质和亚细胞定位
Tab.3 Physicochemical properties and subcellular localization of SIRT protein family in *D. rerio*

蛋白 Protein	氨基酸数量 Number of amino acid/aa	分子质量 Molecular weight/u	等电点 Isoelectric point	亲水性平均值 Average of hydropathicity	不稳定指数 Instability index	亚细胞定位 Subcellular localization
SIRT1	710	79 477.51	4.88	-0.779	50.83	细胞质/细胞核
SIRT2	379	42 314.97	4.96	-0.373	47.13	细胞质/细胞骨架
SIRT3	357	40 146.32	8.34	-0.179	36.94	细胞质/线粒体
SIRT3.2	373	41 052.81	7.17	-0.266	52.51	细胞质
SIRT4	310	34 098.86	8.63	-0.117	45.59	细胞质/细胞核
SIRT5	305	33 928.93	8.71	-0.306	54.28	细胞质/细胞核
SIRT6	354	39 685.03	6.29	-0.612	42.16	细胞核
SIRT7	405	45 806.69	9.60	-0.621	57.83	细胞质/细胞核

利用 SWISS-MODEL 在线网站预测三级结构的结果表明(图 5), SIRT 蛋白家族均具有锌指结构和 Rossmann 折叠结构。拉氏图结果显示,除 SIRT1 外,其他 SIRT 家族成员三级结构 90%以上的氨基酸位于核心区,说明 SWISS-MODEL 构建的三级结构模型良好。

表 4 斑马鱼 SIRT 蛋白家族的二级结构预测
Tab.4 Prediction analysis of secondary structure of SIRT protein family in *D. rerio*

蛋白 Protein	α -螺旋 Alpha helix/%	β -折叠 Beta turn/%	无规卷曲 Random coil/%	延伸链 Extended strand/%
SIRT1	34.79	4.08	52.25	8.87
SIRT2	43.27	6.33	39.58	10.82
SIRT3	35.85	6.72	42.02	15.41
SIRT3.2	34.32	5.36	49.60	10.72
SIRT4	36.13	8.06	38.39	17.42
SIRT5	31.80	5.57	45.57	17.05
SIRT6	30.51	9.04	45.76	14.69
SIRT7	37.53	5.93	44.20	12.35

2.6 SIRT 基因家族系统发育和共线性分析

系统发育进化树分析发现(图 6), 鱼类 SIRT 家族可以划分为 3 大分支, 第一大分支包含 3 个小分支, 其中, SIRT1 和 SIRT2 分别单独一支, SIRT3 和 SIRT3.2 聚为一支; 第二大分支包括 SIRT4 和 SIRT5, 二者分别单独聚为一支; 第三分支包括 SIRT6 和 SIRT7, 二者分别单独为一支。斑马鱼 8 个 SIRT 蛋白同源性较低, 在进化树上分布较远。与其他物种比较而言, 斑马鱼 SIRT1 与虹鳉(*Oncorhynchus mykiss*)SIRT1 在进化关系上较近, 而其他家族成员均与金鱼(*Carassius auratus*)和电鳗(*Electrophorus electricus*) SIRT 进化关

系最近。

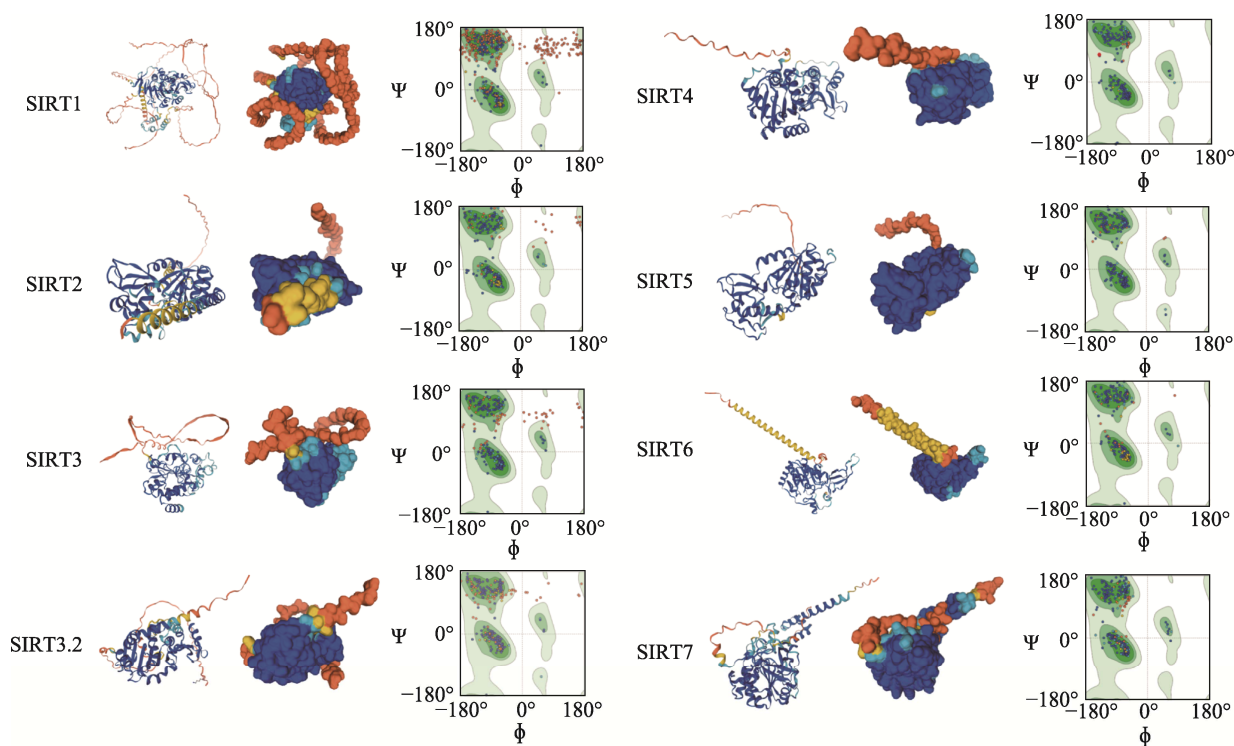
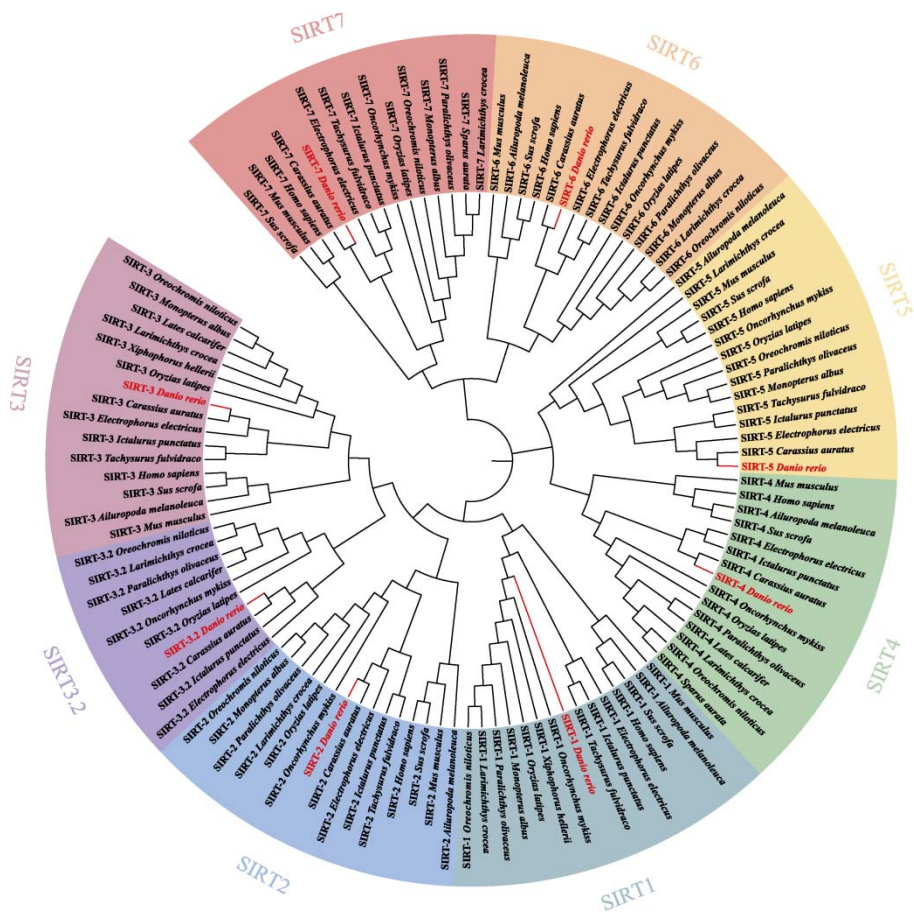
进一步研究 SIRT 蛋白家族的进化关系, 选择金鱼和青鳉(*Oryzias latipes*)与斑马鱼进行物种间共线性分析。结果显示, 青鳉与斑马鱼之间有 4 个家族成员(SIRT1、SIRT2、SIRT3.2 和 SIRT4)具有共线性, 而金鱼和斑马鱼之间除 SIRT6 外, 其他家族成员均具有共线性, 斑马鱼 SIRT4 和 SIRT5 分别与金鱼的 2 个基因具有共线性(图 7)。

2.7 蛋白相互作用网络预测结果

通过 STRING 数据库构建 SIRT 蛋白的 PPI 网络, 表明 SIRT 蛋白家族内部之间均具有较强的相互作用, SIRT3.2 与 SIRT1、SIRT4、SIRT5、SIRT6 存在明显的相互作用。此外, SIRT 蛋白家族与雌激素受体(ESR1)、叉头盒转录因子家族(FOXOs)、热休克蛋白家族(HSPs)、超氧化物歧化酶家族(SODs)、过氧化物增殖酶体(PPAR γ)、线粒体相关蛋白(MFN1、MFN2、OPA1、TFAM)、肿瘤抑制因子(P53)等之间均有相互作用关系(图 8)。

2.8 SIRT 基因家族在不同卵泡发育时期表达分析

在斑马鱼卵母细胞发育过程中, SIRT 基因家族所有成员在卵泡各发育时期均有表达(图 9)。SIRT1 和 SIRT2 在 PG 期、PV 期和 EV 期表达量较低, 在 MV 期显著增加($P<0.05$), 随后在 FG 期和 GVBD 期减少, 其中, SIRT1 在 MV 期表达量显著高于其他各时期($P<0.05$)。SIRT3 和 SIRT4 在 PG 期、PV 期、EV 期和 MV 期表达量较低, 在 FG 期显著增加($P<0.05$), 随后在 GVBD 期减少, 其中, SIRT3 在 FG 期表达量显著高于其他各时期($P<0.05$)。SIRT3.2、SIRT5、SIRT6 和 SIRT7 呈现出逐渐升高的表达趋势, 都在 GVBD 期表达最高, 其中, SIRT3.2 在 GVBD 期显著高于其

图 5 斑马鱼 *SIRT* 蛋白家族的三级结构预测Fig.5 Prediction of tertiary structure of *SIRT* protein family in *D. rerio*图 6 *SIRT* 蛋白家族系统发育树Fig.6 Phylogenetic tree of *SIRT* protein family

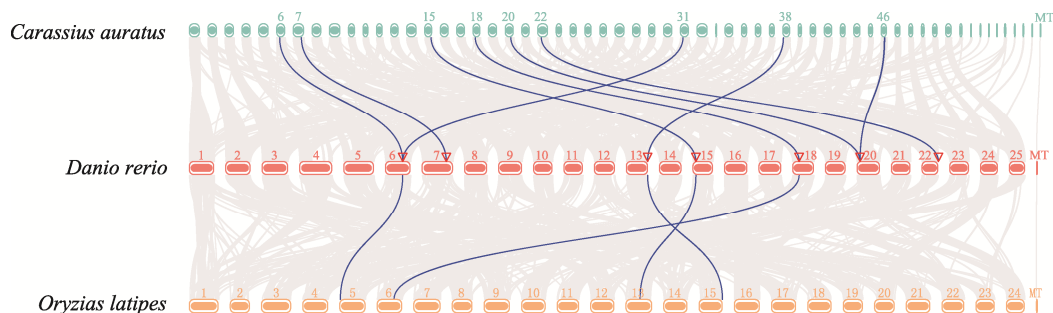


图7 斑马鱼、金鱼和青鳉之间共线性分析

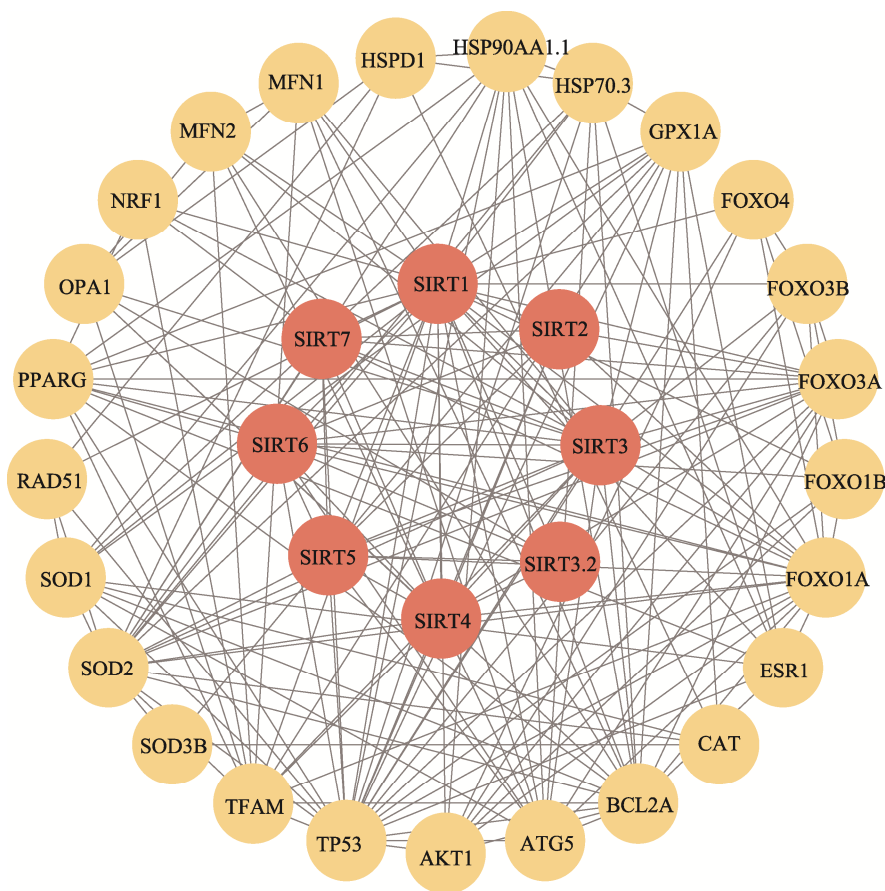
Fig.7 Collinearity analysis between species of *D. rerio*, *C. auratus*, and *O. latipes*

图8 SIRT 蛋白相互作用网络

Fig.8 The network of protein interacted with SIRT protein

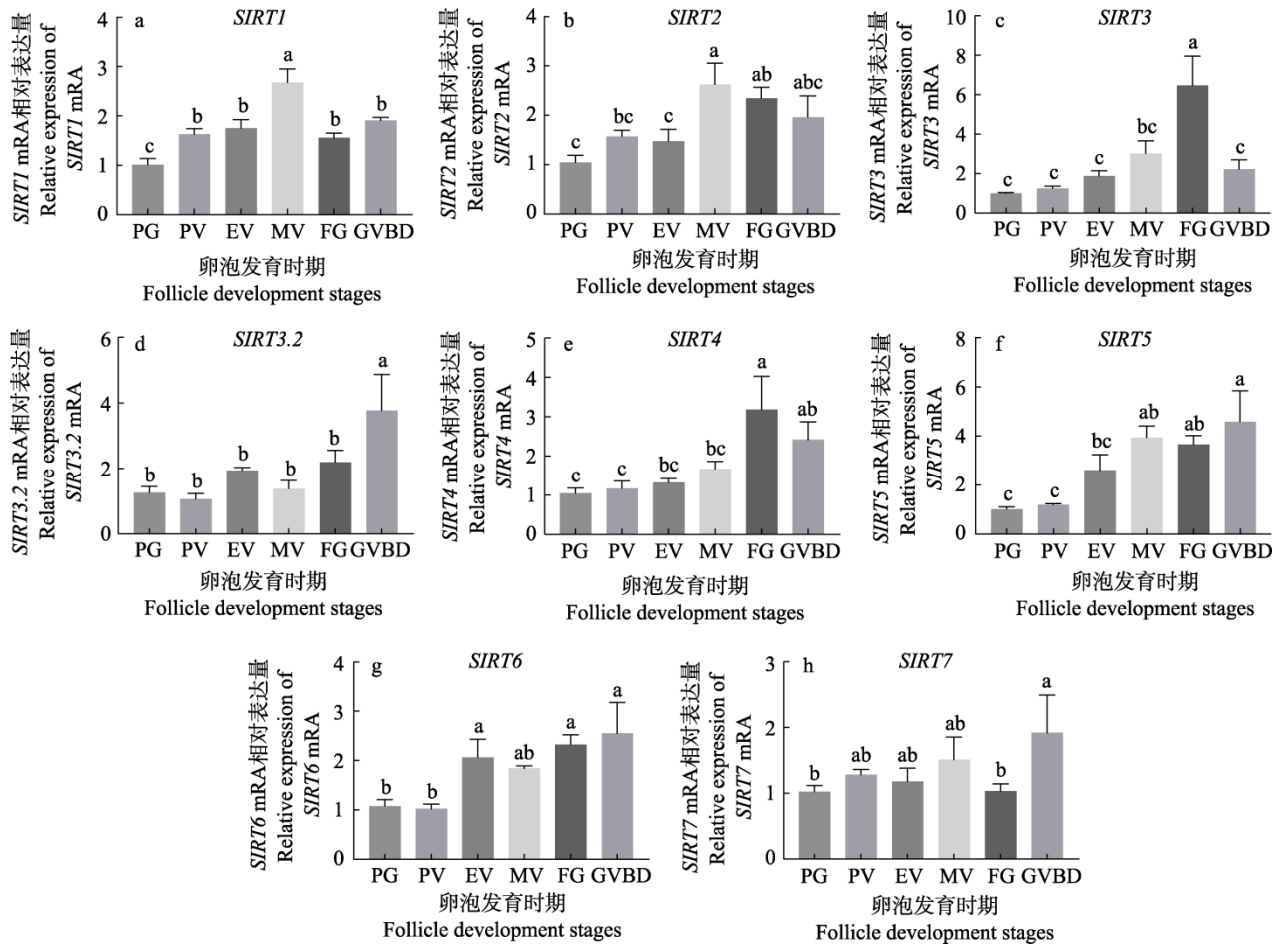
他时期($P<0.05$); *SIRT5* 在 MV 期、FG 期和 GVBD 期显著高于 PG 期和 PV 期($P<0.05$); EV 期、FG 期和 GVBD 期 *SIRT6* 的表达量显著高于 PG 期和 PV 期($P<0.05$); GVBD 期 *SIRT7* 的表达量显著高于 PG 期和 FG 期($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 斑马鱼 *SIRT* 基因家族系统进化特征

SIRT 基因家族广泛存在于几乎所有物种中(Frye,

2000、1999),但在不同物种中其家族成员数目具有差异。例如原核生物的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中仅有 1 种,酿酒酵母中有 4 种,人类中有 7 种(Frye, 1999)。在硬骨鱼类中,花斑裸鲤(*Gymnocypris eckloni*) (倪伟琳等, 2024)和金头鲷(*Sparus aurata*) (Simó-Mirabet *et al*, 2017)被发现有 7 种,而在斑马鱼(Pereira *et al*, 2011)和象鲨(*Callorhynchus milii*) (Opazo *et al*, 2023)中均发现还有 *SIRT3.2*。染色体定位发现,斑马鱼 *SIRT* 基因家族成员均位于不同的染色体上。哺乳动物中, *SIRT* 基因家族在系统进化树中分为 4 个分

图9 斑马鱼 *SIRT* 基因家族在不同卵泡发育时期表达水平Fig.9 Expression levels of *SIRT* gene family of zebrafish at different follicle development stages

不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

支, *SIRT1*、*SIRT2* 和 *SIRT3* 为 Class I, *SIRT4* 为 Class II, *SIRT5* 为 Class III, *SIRT6* 和 *SIRT7* 为 Class IV (Sharma *et al*, 2013)。与哺乳动物略有不同, 斑马鱼 *SIRT4*、*SIRT6* 和 *SIRT7* 为同一支, *SIRT5* 单独为一支, 这一结果与花斑裸鲤 *SIRT* 基因家族进化模式相同 (倪伟琳等, 2024)。此外, 与象鲨 *SIRT3.2* (Opazo *et al*, 2023) 相同的是, 斑马鱼 *SIRT3.2* 与 *SIRT3* 也属于同一分支, 因此也属于 Class I。系统发育分析结果发现, 斑马鱼 *SIRT* 基因家族与金鱼距离最近, 与另一种模式生物青鳉距离较远, 进而选择斑马鱼、金鱼和青鳉进行物种间共线性分析, 发现斑马鱼与金鱼相较于青鳉具有更多的共线性基因对, 进一步证明斑马鱼 *SIRT* 基因家族与金鱼的同源性更高。此外, 共线性分析还发现斑马鱼 *SIRT4* 和 *SIRT5* 分别与金鱼 2 个基因具有共线性, 说明在进化过程中 *SIRT4* 和 *SIRT5* 可能发生复制或融合事件。值得注意的是, Kabiljo 等 (2019) 在弗氏假鳃鲈 (*Nothobranchius furzeri*) 中发现, *SIRT5*

具有 2 个旁系同源基因 (*SIRT5a* 和 *SIRT5b*)。以上结果表明, *SIRT* 基因家族具有高度同源性, 在进化过程可能伴随着复制或融合事件, 提示其家族成员在生物体发育过程中发挥着不同的重要功能, 并且 *SIRT* 基因家族成员在硬骨鱼类中的数量仍然值得进一步探究。

3.2 斑马鱼 *SIRT* 基因家族结构和功能特征

在哺乳动物中, *SIRT1* 的基因结构通常是最长的, 最短的是 *SIRT4* 或者 *SIRT5* (Moniot *et al*, 2012)。硬骨鱼类中, 金头鲷 *SIRT6* 基因最短 (Simó-Mirabet *et al*, 2017)。在本研究中, 斑马鱼 *SIRT4* 基因最短, 而 *SIRT6* 基因长达 140 265 bp, 其内含子序列较长。与其他物种相似, 斑马鱼 *SIRT1* 氨基酸序列最长, *SIRT5* 最短。氨基酸序列比对分析结果表明, 斑马鱼 *SIRT* 与花斑裸鲤 (倪伟琳等, 2024)、西方蜜蜂 (宋文菲等, 2023)、家蚕 (陈聪等, 2014) 的保守结构域十分相似, 都具有 *SIRT* 家族的 Sir2 或 Sir2 超家族保守结构域。Sir2 结

构域的催化核心由 2 个大小不同的结构域组成, 大的结构域由 Rossmann 折叠组成, 是许多 NAD 和 NADP 结合酶的特征结构域; 小的结构域包含 1 个螺旋构件和 1 个锌指结构, 大小 2 个结构域之间形成的裂缝为 NAD⁺ 的结合位点(Finnin *et al.*, 2001; Michishita *et al.*, 2005; Bruzzone *et al.*, 2013)。本研究中, 斑马鱼 SIRT 蛋白家族结构均具有明显的 2 个结构域, 因此, 具有 NAD⁺ 依赖性催化酶活性。以上分析结果说明, 斑马鱼 SIRT 家族各成员序列具有其家族最基本的结构域, 但家族成员之间序列结构具有明显差异性, 推测它们能够结合不同的底物发挥不同的酶活性, 进而行使不同的生物学功能。

哺乳动物中, SIRT 蛋白主要定位于细胞核、细胞质和线粒体(Jin *et al.*, 2007, Guan *et al.*, 2011; 李杰等, 2022)。斑马鱼 SIRT 蛋白家族亚细胞定位预测结果与花斑裸鲤(倪伟琳等, 2024)基本相同, SIRT1、SIRT4、SIRT5 和 SIRT7 定位于细胞质/细胞核, SIRT6 定位于细胞核, SIRT3.2 定位于细胞质, SIRT2 可能定位于细胞骨架, SIRT3 可能定位于线粒体。不同的亚细胞定位结果预示着 SIRT 在不同细胞器中扮演着不同的角色。PPI 分析显示, 斑马鱼 SIRT 蛋白可能与 ESR1、FOXOs、HSPs、SODs、PPAR γ 、P53 以及线粒体相关蛋白(MFN1、MFN2、OPA1 和 TFAM)有相互作用, 也说明 SIRT 可能参与调节雌激素分泌、氧化还原稳态以及线粒体动力学。

3.3 斑马鱼 SIRT 基因家族在卵泡不同发育时期的表达分析

有研究表明, 在体外培养时, 添加 SIRT 的抑制剂烟酰胺, 会导致小鼠(Riepsamen *et al.*, 2015)和猪(Zhang *et al.*, 2015)的卵母细胞减数分裂异常。而在体外成熟时, 添加 SIRT 激活剂白藜芦醇能显著提高小鼠(Liu *et al.*, 2013)、牛(Khan *et al.*, 2017)和猪(Li *et al.*, 2016)的卵母细胞质量, 说明 SIRT 对雌性动物卵母细胞发育具有调控作用。本研究对斑马鱼卵泡不同发育时期的 SIRT 基因表达量进行分析, 发现其家族成员的表达模式具有差异性。其中, SIRT1 和 SIRT2 在 MV 期表达量最高, 推测其可能参与卵黄发生过程; SIRT3 和 SIRT4 在 FG 期表达量最高, 推测其可能参与调控卵母细胞成熟; 而 SIRT3.2、SIRT5、SIRT6 和 SIRT7 均在 GVBD 期表达作用最高, 推测其可能在成熟期发挥重要作用。研究发现, 适量浓度的白藜芦醇通过增强小鼠卵巢颗粒细胞 SIRT1 的表达, 提高了促黄体生成素受体(LHCGR)、类固醇合成急性调节蛋白(StAR)和芳香化酶的 mRNA 水平, 促进了孕激素(P4)

的分泌(Morita *et al.*, 2012)。敲除 SIRT2(Zhang *et al.*, 2014)、SIRT6(Han *et al.*, 2017)和 SIRT7(Vazquez *et al.*, 2019)均会导致 α -微管蛋白(α -tubulin)和组蛋白的乙酰化水平升高, 进而使得卵母细胞减数分裂异常、卵泡发育受阻。此外, SIRT 家族还能通过调节卵巢储备以及卵泡能量代谢、氧化还原稳态、线粒体动力学、自噬等过程调控卵泡发育(房晓欢等, 2019; 徐德军等, 2022)。以上研究结果均表明, SIRT 家族基因在调控卵泡发育过程中发挥着重要的生物学功能, 而其在硬骨鱼类中的具体功能还有待进一步的探究。

4 结论

综上所述, 本研究首次运用生物信息学方法对斑马鱼 SIRT 基因家族进行了染色体定位、基因结构分析、氨基酸序列分析、理化性质分析、亚细胞定位预测、系统进化分析、PPI 网络预测以及卵泡不同发育时期的表达分析。结果表明, 斑马鱼 8 个 SIRT 家族成员的基因结构和氨基酸序列均存在差异, 但都具有 Sir2 保守结构域, 蛋白结构相似。系统进化分析提示, 不同物种之间 SIRT 基因家族成员可能存在复制或融合事件。SIRT 在斑马鱼卵泡不同发育时期均有表达, 并且呈现不同的表达规律, 推测其在调节卵泡发育过程中发挥重要作用。本研究可为进一步的功能研究及鱼类卵泡发育复杂的分子调控网络研究提供参考。

参 考 文 献

- BRAUNSTEIN M, ROSE A B, HOLMES S G, *et al.* Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation. *Genes & Development*, 1993, 7(4): 592–604
- BRUZZONE S, PARENTI M D, GROZIO A, *et al.* Rejuvenating sirtuins: The rise of a new family of cancer drug targets. *Current Pharmaceutical Design*, 2013, 19(4): 614–623
- CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y, *et al.* TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194–1202
- CHEN C, SONG J B, MENG G, *et al.* Identification, phylogenetic and tissue expression microarray analyses of the sirtuin gene family in silkworm (*Bombyx mori*). *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47(13): 2659–2670 [陈聪, 宋江波, 孟刚, 等. 家蚕 sirtuin 家族基因的鉴定及系统发生与表达芯片分析. *中国农业科学*, 2014, 47(13): 2659–2670]
- CINCO R, DIGMAN M A, GRATTON E, *et al.* Spatial characterization of bioenergetics and metabolism of primordial to preovulatory follicles in whole ex vivo murine ovary. *Biology of Reproduction*, 2016, 95(6): 129

- FANG X H, DU M, LI S, *et al.* Research progress on the effects of sirtuins on female animal reproduction. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2019, 50(12): 2379–2386 [房晓欢, 杜明, 李飒, 等. Sirtuins 对雌性动物生殖的影响研究进展. *畜牧兽医学报*, 2019, 50(12): 2379–2386]
- FINNIN M S, DONIGIAN J R, PAVLETICH N P. Structure of the histone deacetylase SIRT2. *Nature Structural Biology*, 2001, 8(7): 621–625
- FRYE R A. Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999, 260(1): 273–279
- FRYE R A. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 273(2): 793–798
- GREISS S, GARTNER A. Sirtuin/Sir2 phylogeny, evolutionary considerations and structural conservation. *Molecules and Cells*, 2009, 28(5): 407–415
- GUAN K L, XIONG Y. Regulation of intermediary metabolism by protein acetylation. *Trends in Biochemical Sciences*, 2011, 36(2): 108–116
- HAN L S, WANG H C, LI L, *et al.* Melatonin protects against maternal obesity-associated oxidative stress and meiotic defects in oocytes via the SIRT3-SOD2-dependent pathway. *Journal of Pineal Research*, 2017, 63(3): e12431
- IMAI S, ARMSTRONG C M, KAEBERLEIN M, *et al.* Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, 2000, 403(6771): 795–800
- IVY J M, HICKS J B, KLAR A J. Map positions of yeast genes SIR1, SIR3 and SIR4. *Genetics*, 1985, 111(4): 735–744
- JIN Q H, YAN T T, GE X J, *et al.* Cytoplasm-localized SIRT1 enhances apoptosis. *Journal of Cellular Physiology*, 2007, 213(1): 88–97
- KABILJO J, MURKO C, PUSCH O, *et al.* Spatio-temporal expression profile of sirtuins during aging of the annual fish *Nothobranchius furzeri*. *Gene Expression Patterns*, 2019, 33: 11–19
- KHAN I, KIM S W, LEE K L, *et al.* Polydatin improves the developmental competence of bovine embryos *in vitro* via induction of sirtuin 1 (Sirt1). *Reproduction, Fertility, and Development*, 2017, 29(10): 2011–2020
- KLAR A J, FOGEL S, MACLEOD K. MAR1-a regulator of the HMa and HMalphaloci in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 1979, 93(1): 37–50
- KONG D Q, YAO G D, BAI Y C, *et al.* Expression of sirtuins in ovarian follicles of postnatal mice. *Molecular Reproduction and Development*, 2020, 87(10): 1097–1108
- LANDRY J, SUTTON A, TAFROV S T, *et al.* The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(11): 5807–5811
- LI J, MO X Z, WU D, *et al.* Roles of SIRT2 in cell differentiation. *Chemistry of Life*, 2022, 42(10): 1913–1919 [李杰, 莫逊泽, 吴达, 等. SIRT2 在细胞分化中的作用. *生命的化学*, 2022, 42(10): 1913–1919]
- LI Y, WANG J, ZHANG Z Z, *et al.* Resveratrol compares with melatonin in improving *in vitro* porcine oocyte maturation under heat stress. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2016, 7: 33–43
- LIU M Y, YIN Y, YE X Y, *et al.* Resveratrol protects against age-associated infertility in mice. *Human Reproduction*, 2013, 28(3): 707–717
- LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408
- MCBURNEY M W, YANG X F, JARDINE K, *et al.* The mammalian SIR2alpha protein has a role in embryogenesis and gametogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 2003, 23(1): 38–54
- MA R J, LIANG W, SUN Q, *et al.* Sirt1/Nrf2 pathway is involved in oocyte aging by regulating Cyclin B1. *Aging*, 2018, 10(10): 2991–3004
- MICHISHITA E, PARK J Y, BURNESKIS J M, *et al.* Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Molecular Biology of the Cell*, 2005, 16(10): 4623–4635
- MONIOT S, WEYAND M, STEEGBORN C. Structures, substrates, and regulators of Mammalian sirtuins - opportunities and challenges for drug development. *Frontiers in Pharmacology*, 2012, 3: 16
- MORITA Y, WADA-HIRAIKE O, YANO T, *et al.* Resveratrol promotes expression of SIRT1 and StAR in rat ovarian granulosa cells: An implicative role of SIRT1 in the ovary. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2012, 10: 14–24
- NI W L, LIU D, GAO Q, *et al.* Analysis and expression of SIRT gene family in *Gymnocypris eckloni* exposed to low-temperature. *Fisheries Science*, 2024, 43(1): 10–21 [倪伟琳, 刘丹, 高强, 等. 花斑裸鲤 SIRT 基因家族分析及低温适应性表达. *水产科学*, 2024, 43(1): 10–21]
- OPAZO J C, VANDEWEGE M W, HOFFMANN F G, *et al.* How many sirtuin genes are out there? Evolution of sirtuin genes in vertebrates with a description of a new family member. *Molecular Biology and Evolution*, 2023, 40(2): msad014
- PEREIRA T C B, RICO E P, ROSEMBERG D B, *et al.* Zebrafish as a model organism to evaluate drugs potentially able to modulate sirtuin expression. *Zebrafish*, 2011, 8(1): 9–16
- RIEPSAMEN A, WU L, LAU L, *et al.* Nicotinamide impairs entry into and exit from meiosis I in mouse oocytes. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126194

- SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406–425
- SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, *et al.* Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 2003, 13(11): 2498–2504
- SHARMA A, COSTANTINI S, COLONNA G. The protein–protein interaction network of the human Sirtuin family. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 2013, 1834(10): 1998–2009
- SIMÓ-MIRABET P, BERMEJO-NOGALES A, CALDUCH-GINER J A, *et al.* Tissue-specific gene expression and fasting regulation of sirtuin family in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology*, 2017, 187(1): 153–163
- SONG W F, LIU N, MIAO C H, *et al.* Identification and expression analysis of sirtuin protein family genes in *Apis mellifera*. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2023, 32(11): 1686–1696 [宋文菲, 刘娜, 苗春辉, 等. 西方蜜蜂 Sirtuin 蛋白家族基因鉴定及表达分析. *西北农业学报*, 2023, 32(11): 1686–1696]
- TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(7): 3022–3027
- VAZQUEZ B N, BLENGINI C S, HERNANDEZ Y, *et al.* SIRT7 promotes chromosome *Synapsis* during prophase I of female meiosis. *Chromosoma*, 2019, 128(3): 369–383
- WANG Y J, GE W. Developmental profiles of activin β A, β B, and follistatin expression in the zebrafish ovary: Evidence for their differential roles during sexual maturation and ovulatory Cycle1. *Biology of Reproduction*, 2004, 71(6): 2056–2064
- WATERHOUSE A M, PROCTER J B, MARTIN D M A, *et al.* Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 2009, 25(9): 1189–1191
- XU D J, HE H S, JIANG X H, *et al.* SIRT2 plays a novel role on progesterone, estradiol and testosterone synthesis via PPARs/LXR α pathways in bovine ovarian granular cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2019a, 185: 27–38
- XU D J, WU L, JIANG X H, *et al.* SIRT2 inhibition results in meiotic arrest, mitochondrial dysfunction, and disturbance of redox homeostasis during bovine oocyte maturation. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019b, 20(6): 1365–1387
- XU D J, ZHAO Z Q, ZHAO Y J. Molecular mechanism of NAD⁺/SIRT2 pathway regulating mature quality of aged oocytes. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2022, 53(6): 1657–1667 [徐德军, 赵中权, 赵永聚. NAD⁺/SIRT2 途径调节衰老卵母细胞成熟质量的分子机制. *畜牧兽医学报*, 2022, 53(6): 1657–1667]
- ZHANG L, HOU X J, MA R J, *et al.* Sirt2 functions in spindle organization and chromosome alignment in mouse oocyte meiosis. *FASEB Journal*, 2014, 28(3): 1435–1445
- ZHANG L, MA R J, HU J, *et al.* Sirtuin inhibition adversely affects porcine oocyte meiosis. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0132941
- ZHANG T, ZHOU Y, LI L, *et al.* SIRT1, 2, 3 protect mouse oocytes from postovulatory aging. *Aging*, 2016, 8(4): 685–696
- ZHAO K H, HARSHAW R, CHAI X M, *et al.* Structural basis for nicotinamide cleavage and ADP-ribose transfer by NAD⁺-dependent Sir2 histone/protein deacetylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(23): 8563–8568

(编辑 冯小花)

Analysis of the *SIRT* Gene Family of *Danio rerio* and Its Expression at Different Developmental Stages of Follicles

PENG Jiabao^{1,2}, WANG Ziyang^{1,2}, YANG Zhigang^{1,2,3}, CHEN Aqin^{1,2①}

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Center for Research on Environmental Ecology and Fish Nutrition of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract SIRT family is a NAD^+ dependent class III deacetylase family, which is involved in the modification of histone or non-histone proteins. In addition to having deacetylase, some members of the SIRT family also have ADP-ribosylase and other activities, which play an important role in the regulation of energy metabolism and oxidative stress resistance. The SIRT family exists widely in prokaryotes and eukaryotes and is mainly divided into five classes. SIRT1–SIRT3 is class I, SIRT4 is class II, SIRT5 is class III, SIRT6 and SIRT7 are class IV, and class U exists only in the SIRT family from archaea to bacteria. The number and distribution of *SIRT* genes vary among different organisms. All members of the *SIRT* family have been shown to be expressed in mammalian ovaries and are widely involved in the regulation of ovarian development, including meiosis regulation, energy metabolism, mitochondrial quality control, maintenance of redox homeostasis, and hormone secretion. In this study, bioinformatics methods were used to systematically analyze the chromosome distribution, gene structure, amino acid sequence, protein motifs and conserved domains, physical and chemical properties, subcellular localization, secondary and tertiary structures, phylogenetic relationships, and protein interaction networks of zebrafish *SIRT* family genes and to explore their expression changes at different developmental stages of follicles. The results showed that eight *SIRT* genes were distributed on eight chromosomes of Zebrafish, the sequence length was different [the longest was *SIRT6* (140,265 bp) and the shortest was *SIRT4* (7,101bp)], and the coding regions ranged from 3 to 14. The amino acid sequence similarity of zebrafish SIRT protein was low, and the 10 most conserved motifs were predicted. The adjacent homologous genes in the same branch had nearly the same motif composition, with the number of motifs varying among branches. Among the 10 motifs, motif 2, motif 3, and motif 5 were found in all zebrafish SIRT amino acid sequences, indicating that these protein motifs are highly conserved during development. Conserved domain analysis showed that all SIRT1-7 proteins contained the Sir2 domain. Analysis of physical and chemical properties of proteins showed that SIRT1 had the highest molecular weight, encoding 710 amino acids, whereas SIRT5 had the lowest molecular weight, encoding 305 amino acids. The isoelectric points ranged from 4.88 to 9.60, and all of them were hydrophilic proteins. Except SIRT3, the rest were unstable proteins. Subcellular localization prediction showed that SIRT1, SIRT4, SIRT5, and SIRT7 were located in the cytoplasm/nucleus, SIRT3.2 in the cytoplasm, SIRT6 in the nucleus, SIRT2 in the cytoskeleton, and SIRT3 in mitochondria. Secondary structure analysis showed that the SIRT family proteins had similar secondary structure, and α -helix and random curling were the main components of the protein secondary structure. The tertiary structure prediction showed that the SIRT protein family had zinc finger and Rossmann fold structures. Phylogenetic analysis showed that the fish SIRT family could be divided into three branches. The first branch consisted of three subbranches, in

① Corresponding author: CHEN Aqin, Email: aqchen@shou.edu.cn

which SIRT1 and SIRT2 were isolated and SIRT3 and SIRT3.2 were clustered into one branch. The second largest branch consisted of SIRT4 and SIRT5, which were clustered separately into one branch. The third branch consisted of SIRT6 and SIRT7, each of which is a separate branch. The eight SIRT proteins of Zebrafish had low homology and were distributed far in the evolutionary tree. Compared with other species, zebrafish SIRT1 is closely related to rainbow trout SIRT1, whereas other family members are closely related to goldfish and electric eel SIRT. Furthermore, four family members (*SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT3.2*, and *SIRT4*) showed collinearity between blue killifish and zebrafish, while the other family members except *SIRT6* showed collinearity between goldfish and zebrafish. In addition, zebrafish *SIRT4* and *SIRT5* showed collinearity with two genes of goldfish. PPI prediction showed that SIRT proteins interact with ESR1, FOXOs, SOD, HSPs, etc. Real-time fluorescence quantitative PCR analysis showed that *SIRT1* and *SIRT2* were mainly expressed at the midvitellogenic (MV) stage during follicular development. *SIRT3* and *SIRT4* were mainly expressed at the full-grown immature (FG) stage. *SIRT3.2*, *SIRT5*, *SIRT6*, and *SIRT7* were mainly expressed at the germinal vesicle breakdown (GVBD) stage. In summary, this study used bioinformatics methods for the first time to analyze chromosome localization, gene structure, amino acid sequences, physical and chemical properties, subcellular localization prediction, phylogenetic characteristics, PPI network prediction, and follicle expression at different developmental stages of zebrafish *SIRT* gene family. The results showed that the gene structure and amino acid sequences of eight members of the Zebrafish *SIRT* family were different, but all had a Sir2 conserved domain and similar protein structure. Phylogenetic analysis suggested that there may be replication or fusion events among *SIRT* gene family members in different species. *SIRT* is expressed in zebrafish follicles at different developmental stages with different expression patterns, suggesting that the SIRT plays an important role in the regulation of follicle development, providing a reference for further functional studies as well as the study of the complex molecular regulatory network of fish follicle development.

Key words *Danio rerio*; *SIRT* gene family; Follicular development; Bioinformatics