

秦川牛 *A-FABP* 基因的生物信息学分析

季舒涵¹, 咎林森^{1,2}, 王洪宝^{1,2}, 刘艳妍¹

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

[摘要] 【目的】克隆秦川牛脂肪型脂肪酸结合蛋白(*A-FABP*)基因,并对其进行生物信息学分析,为深入研究 *A-FABP* 基因与秦川牛肉质性状的关系奠定基础。【方法】以秦川牛脂肪组织为材料,采用 RT-PCR 方法对牛 *A-FABP* 基因进行克隆。使用 DNAMAN、NCBI 等一系列在线软件及工具,对所得到的序列及其编码蛋白质的结构和特性等进行生物信息学分析。【结果】秦川牛 *A-FABP* 基因含有 15 个酶切位点,编码的蛋白分子质量为 14.7 ku,二级结构主要以 α -螺旋、不规则盘绕和延伸链为结构元件,含 132 个氨基酸,其中强碱性氨基酸 18 个,强酸性氨基酸 19 个,疏水氨基酸 45 个,不带电荷的极性氨基酸 32 个;含有 6 个蛋白激酶 C 磷酸化位点,1 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点,3 个肉豆蔻酰基化位点,1 个 FABP 结合域;含有 4 个 Ser、6 个 Thr 和 1 个 Tyres,这 11 个氨基酸均可能成为蛋白激酶磷酸化位点。【结论】秦川牛 *A-FABP* 基因编码的氨基酸序列与人、鸡、小鼠、大鼠、野猪的氨基酸序列同源性分别为 84.09%, 85.61%, 71.97%, 88.33%, 81.82%, 表明在进化关系上, *A-FABP* 氨基酸序列有较好的保守性;此蛋白序列具有脂钙蛋白结合域,没有信号肽;无明显跨膜区,不含有二硫键。

[关键词] *A-FABP* 基因;生物信息学;秦川牛

[中图分类号] S823.9⁺2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)06-0077-06

Biological information analysis of *A-FABP* gene in Qinchuan cattle

Ji Shu-han¹, ZAN Lin-sen^{1,2}, WANG Hong-bao^{1,2}, LIU Yan-yan¹

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 National Beef Cattle Improvement Center, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】*A-FABP* gene in Qinchuan cattle was cloned and its biological information was analyzed, which might provide more information to the further study of *A-FABP* gene. 【Method】This experiment extracted the total RNA from Qinchuan cattle fat tissue, and *A-FABP* gene CDS region was cloned by RT-PCR in pMD18-T vector, and then sequenced. The sequence was analyzed by DNAMAN, NCBI, and some other software and online tools in biological information. 【Result】The analysis of amino acid sequence indicated that Qinchuan cattle *A-FABP* gene included 15 restriction enzyme cutting sites and coded 132 amino acids, molecular weight 14.7 ku, main elements of its secondary structure being α -helix, random coil and extended strand, including 6 protein kinase C phosphorylation sites, 1 casein kinase phosphorylation site, 3 N-myristoylation sites and 1 cytosolic fatty-acid binding protein signature as well as 4 Ser, 6 Thr and 1 Tyr, which could be protein kinase phosphorylation site. 【Conclusion】Homologous comparison with some animals indicated that Qinchuan cattle *A-FABP* shares 84.09%, 85.61%, 71.97%, 88.33%, 81.82% similarity in nucleic acid sequence with man, chicken, mouse, rats, and swines. Bioinformatics analysis indicated that *A-FABP* gene has high conservatism.

Key words: *A-FABP* gene; bioinformatics; Qinchuan cattle

* [收稿日期] 2010-03-08

[基金项目] 国家“863”高新技术研究与发展计划项目(2006AA1021A1);国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD01A10-3);陕西省“13115”科技创新计划项目(2007ZDCY-01)

[作者简介] 季舒涵(1984—),女,辽宁沈阳人,在读硕士,主要从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail: lamb_jishuhan@163.com

[通信作者] 咎林森(1963—),男,陕西扶风人,教授,博士生导师,主要从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail: zanls@yahoo.com.cn

脂肪型脂肪酸结合蛋白(A-FABP)属于脂肪酸结合蛋白(fatty acid binding proteins, FABPs)家族,该家族是在 1972 年由美国加利福尼亚大学的 Ockner 等^[1]在大鼠的小肠黏膜中首次发现的,是脂结合蛋白超家族的成员。哺乳动物的 A-FABP 不仅作为甘油三酯的贮存库在甘油三酯的形成及溶解过程中储存或释放大 量脂肪酸,还参与细胞内脂肪酸的运输,结合进入细胞内的脂肪酸,并将其运输到氧化或酯化的相应位置^[2]。与野生型小鼠相比,A-FABP 基因敲除小鼠脂肪组织内的脂肪酸流速或脂化作用没有改变,但是基础脂解作用降低了大约 40%。对肥胖小鼠而言,敲除 A-FABP 基因则起到了改善其外围胰岛素抵抗以及维护胰腺 β -细胞正常功能的作用^[3-6]。

鉴于 A-FABP 基因在机体脂类代谢以及畜禽肉质改良上的重要作用,人们对其进行了大量研究。目前,许多关于小鼠、猪、鸡、鸭的研究表明,A-FABP 基因有利于增加肌内脂肪含量,只在脂肪组织中表达^[7-8]。牛 A-FABP 基因被定位在牛的 14 号染色体上,全长 4 391 bp,有 4 个外显子,mRNA 长度 625 bp,CDS 序列长 399 bp^[9],其在牛上的作用还有待进一步研究。为了深入探讨牛 A-FABP 基因的功能,本试验以秦川牛脂肪组织为材料,对该基因进行了克隆和生物信息学分析,以期为进一步在蛋白水平上研究此基因的功能、阐释牛脂类代谢的分子机制以及改良牛肉品质奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

试验所用脂肪组织采自陕西省秦川肉牛良种繁育中心。3 头 4 岁秦川公牛在屠宰场屠宰后,立即用经过灭菌处理的手术刀片切取适量脂肪组织,用纱布包裹并系上标签,迅速投入液氮中,备用。

1.2 秦川牛脂肪组织总 RNA 的提取

用 Trizol 法^[10]提取秦川牛脂肪组织总 RNA,检测并调整浓度后分装保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

1.3 秦川牛 A-FABP 基因的 RT-PCR

1.3.1 cDNA 的合成 按照 Fermentas 公司反转录试剂盒的要求进行反转录反应,合成秦川牛脂肪组织 cDNA。

1.3.2 引物设计与合成 根据 GenBank 公布的牛 A-FABP 基因的序列(NM_174314),设计引物用于以秦川牛脂肪组织 cDNA 为模板的 PCR 扩增,上

游引物为:5' ATG TGT GAT GCA TTT GTA GGT AC 3';下游引物为:5' ATG TGT GAT GCA TTT GTA GGT AC 3'。引物均由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3.3 PCR 扩增 PCR 扩增反应体系共 15 μL : 10 $\times$ Buffer (含 15 mmol/L Mg^{2+}) 1.5 μL , 2 mmol/L dNTPs 1.5 μL , 2 U/ μL Taq DNA 聚合酶 0.25 μL , 5 mol/L 混合引物(上、下游引物均为 5 mol/ μL)0.6 μL ,模板 DNA (50 ng/ μL) 1.0 μL , ddH₂O 10.15 μL 。反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,62 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,35 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。取 2 μL PCR 产物,与 0.5 μL 溴酚蓝上样缓冲液混匀,点样于 10 g/L 琼脂糖凝胶,电泳 25 min 后,紫外灯下观察其扩增结果并拍照。

1.3.4 克隆载体的构建 使用爱思进公司 Axyprep DNA 凝胶回收试剂盒,按照说明书回收目的片段。将回收片段进行琼脂糖凝胶电泳检测后,与 pMD18-T 载体连接,并转化到感受态细胞中,挑取阳性菌落进行 PCR 鉴定,并接种于 LB 液体培养基中摇菌培养。

1.4 秦川牛 A-FABP 基因的生物信息学分析

将经过鉴定的阳性菌液送上海生工生物工程有限公司进行测序,使用 DNAMAN、NCBI、BI-OEDIT、SMART、CBS、EXPASY、PREDICTPROTEIN、WOLFP SORT 等软件和信息库,对测序结果进行蛋白结构与特性分析^[11-14]。

2 结果与分析

2.1 秦川牛 A-FABP 基因的 RT-PCR 扩增

PCR 扩增产物用 10 g/L 的琼脂糖凝胶进行电泳检测,结果无杂带,特异性好,扩增片段长度为 399 bp(图 1),与预期结果相符,可以进行后期的回收及克隆。

2.2 秦川牛 A-FABP 基因的测序及序列分析

2.2.1 目的片段的测序 秦川牛 A-FABP 序列测序结果为:ATGTGTGATGCATTTGTAGGTACCTGGAACTTGTCTCCAGTGAAAACCTTTGATGATTACATGAAAGAAGTGGGCGTGGGCTTTGCTACCAGGAAAGTGGCTGGCATGGCCAAACCACTTTGATCATCAGTTTGAATGGGGGTGTGGTCACCATTAAATCAGAAAGCACCTTTAAAATACTGAGATTTTCCTTCAAATTGGGCCAGGAATTTGATGAAATCACTCCAGATGACA

GGAAAGTCAAGAGCATCGTAAACTTAGATG
AAGGTGCTCTGGTACAAGTACAAAAC TGGG
ATGGA AATCAACCACCATAAAGAGAAAAC
TCATGGATGATAAGATGGTGTCTGGAATGTG
TCATGAATGGTGTCTACTGCCACCAGAGTTTA
TGAGAGAGCATAA,此结果与 GenBank 所提供的序列一致。

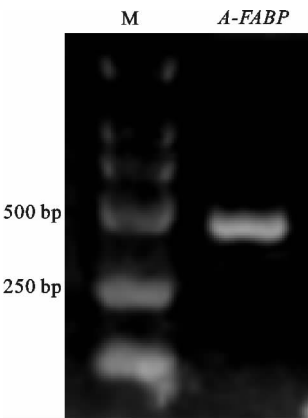


图 1 秦川牛 *A-FABP* 基因的 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 RT-PCR products of *A-FABP* gene in Qinchuan cattle

2.2.2 序列分析 使用 DNAMAN 软件分析得知,*A-FABP* 序列 mRNA 长 625 bp,CDS 区长 399 bp,A、C、G、T 4 种碱基的组成百分比分别为 32%,17%,22%和 29%。

运用 DNAMAN 软件自带的 117 种酶谱对 *A-FABP* 作酶切谱分析,找到了 15 个酶切位点,分别为:位于 40 bp 的 *Eco*R I,44 bp 的 *Xba* I,72 bp 的 *Nsi* I,79 bp 的 *Asp*718 I 和 *Acc*65 I,83 bp 的 *Kpn* I,156 bp 的 *Bst*X I,169 bp 的 *Msc* I 和 *Bal* I,182 bp 的 *Bcl* I,207 bp 的 *Bst*E II,234 bp 的 *Dra* I 和 *Aha* III,298 bp 的 *Drd* I,416 bp 的 *Bsp*H I。

使用 NCBI 的 ORF FINDER 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/orfig.cgi>) 对秦川牛 *A-FABP* 进行开放性阅读框分析,得知此序列含有一个长度为 399 bp 的开放阅读框,编码 132 个氨基酸,起始密码子为 ATG,终止密码子为 TAA,编码区左侧有 60 bp 的 5'非翻译区。

2.2.3 同源性分析 使用 NCBI 信息库的 BLAST 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 对秦川牛 *A-FABP* 进行碱基同源性分析,得知秦川牛的 *A-FABP* 基因与其他物种的相似性很高,尤其是与牦牛、绵羊、赤鹿和家山羊的相似性分别达到了

99%,98%,97%和 97%。

使用 DNAMAN 软件,对秦川牛 *A-FABP* 基因编码的氨基酸序列与 GenBank 提供的牛、人、鸡、小鼠、大鼠、野猪的 *A-FABP* 基因编码的氨基酸序列进行同源性比较,其相似性分别为 100%,84.09%,85.61%,71.97%,88.33%和 81.82%。由 *A-FABP* 的系统进化树(图 2)可知,人的 *A-FABP* 与小鼠、大鼠的最为相似,可以归为一类,随后这三者与牛聚为一类,之后与野猪聚为一类,最后再与鸡聚为一大类。

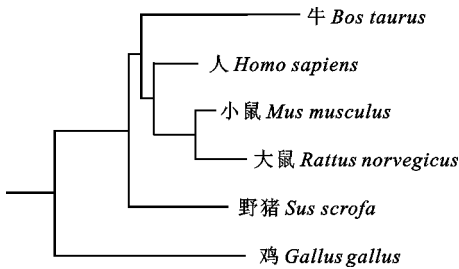


图 2 *A-FABP* 的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *A-FABP*

2.2.4 蛋白质序列的结构功能域分析 运用 BIOEDIT 软件,对 ORF 翻译蛋白的基本性质(包括分子量、氨基酸组成等)进行分析后可知,秦川牛 *A-FABP* 的分子质量为 14.7 ku。*A-FABP* 所含的 132 个氨基酸中强碱性氨基酸(K,R)有 18 个,强酸性氨基酸(D,E)有 19 个,疏水氨基酸(A,I,L,F,W,V)有 45 个,不带电荷的极性氨基酸(N,C,Q,S,T,Y)有 32 个。具体结果如表 1 所示。

运用简单模块构架搜索工具 SMART(Simple Modular Architecture Research Tool,该数据库由 EMBL 建立,其中集成了大部分目前已知的蛋白质结构功能域的数据,网址是 <http://smart.embl-heidelberg.de/>)和丹麦科技大学(DTU)的 CBS 服务器 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>),共同对 ORF 处的秦川牛 *A-FABP* 进行蛋白质结构功能域分析,得知此蛋白的氨基酸序列在 6~132 位处具有脂钙蛋白结合域,没有信号肽。

运用瑞士生物信息学研究所(Swiss Institute of Bioinformatics, SIB, <http://us.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>)的 EXPASY 服务器上的 PROTSKALE 程序,对 ORF 翻译后的氨基酸序列进行亲疏水性分析后可知,秦川牛 *A-FABP* 的亲水性较强,最小值达到-2.244,最大值为 1.789。

表 1 秦川牛 A-FABP 的氨基酸组成

Table 1 Amino acid composition of A-FABP in Qinchuan cattle

氨基酸 Aa	数量 Number	比例/% Percentage	氨基酸 Aa	数量 Number	比例/% Percentage	氨基酸 Aa	数量 Number	比例/% Percentage
Ala	7	5.30	Cys	2	1.52	Asp	10	7.58
Glu	9	6.82	Phe	6	4.55	Gly	10	7.58
His	0	0.00	Ile	7	5.30	Lys	13	9.85
Leu	8	6.06	Met	6	4.55	Asn	6	4.55
Pro	2	1.52	Gln	3	2.27	Arg	5	3.79
Ser	8	6.06	Thr	11	8.33	Val	15	11.36
Trp	2	1.52	Tyr	2	1.52			

运用美国哥伦比亚大学(Columbia University)的 PREDICT PROTEIN 服务器(http://cubic.bioc.columbia.edu/pp/submit_def.html)对 ORF 翻译后的氨基酸序列进行蛋白质溶解能力和 PRO-SITE MOTIF SEARCH 分析,可知秦川牛 A-FABP 有 22.73% 的残基暴露于蛋白质表面,77.27% 的残基位于蛋白质内部;A-FABP 含有 6 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(分别位于 8,30,51,57,64,104 位处),1 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(位于 75

位处),3 个肉豆蔻酰基化位点(位于 25,47,122 位处),1 个 FABP 的结合域(位于 7 位处)。

运用丹麦科技大学(DTU)CBS 服务器上的 NetPhos2.0 程序(NetPhos2.0 Server 程序是基于神经网络算法,对蛋白序列中的 Ser、Thr 和 Tys 3 种氨基酸残基可能成为的磷酸化位点作出预测)进行磷酸化位点分析后可知,秦川牛 A-FABP 含有 4 个 Ser、6 个 Thr 和 1 个 Tyr,这 11 个氨基酸均可能成为蛋白激酶磷酸化位点(图 3)。

132 Sequence

MCDAFVGIWKLVSSENFDYMKEVGVGFATRRVAGMAKPTLIISLNGGVVTIKSESTFKNTEISFKLGQEFDEITPDDRK80

VKSIYNLDEGALVQVQNWDGKSTTIKRKLMDCKMVLCEVMNGVTATRVYERA160

图 3 秦川牛 A-FABP 的磷酸化位点分析

S. Ser; T. Thr; Y. Tyr; 均为可能成为蛋白激酶磷酸化位点的氨基酸

Fig. 3 Analysis of phosphorylation sites of A-FABP in Qinchuan cattle

S. Ser; T. Thr; Y. Tyr; Potential protein kinase phosphorylation sites

运用丹麦科技大学(DTU)CBS 服务器上的 TMHMM Server v. 2.0 程序(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)进行蛋白序列跨膜区分析得知,秦川牛 A-FABP 无明显跨膜区,不可能是膜上的受体或定位于膜上。

运用 SCRATCH PROTEIN PREDICTOR(<http://www.ics.uci.edu/~baldig/scratch/index.html>)对 ORF 翻译后的氨基酸序列进行二硫键分析,得知秦川牛 A-FABP 不含有二硫键。

运用 PBIL LYON-GERLAND 信息库(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hnn.html)对蛋白序列进行二级结构预测得知,秦川牛 A-FABP 二级结构的结构元件为 α -螺旋、不规则盘绕和延伸链。

运用 WOLFPSORT 软件工具(<http://wolfp-sort.seq.cbrc.jp/>)在氨基酸序列的基础上进行蛋白质亚细胞定位点的预测,得知秦川牛 A-FABP 有 24% 的可能性存在于细胞质内,有 4% 的可能性存在于细胞核中,有 3% 的可能性存在于线粒体中。

3 讨论

本研究通过 DNAMAN、NCBI 等在线工具和软件,对秦川牛 A-FABP 基因的蛋白结构和功能进行了分析,结果表明,秦川牛 A-FABP 的分子质量为 14.7 ku,含 132 个氨基酸,这与 FABPs 家族一般含有 126~137 个氨基酸、分子质量在 14~16 ku 相符,其二级结构主要以 α -螺旋、不规则盘绕和延伸链为结构元件,含有 6 个蛋白激酶 C 磷酸化位点,1 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点,3 个肉豆蔻酰基化位点,1 个 FABP 结合域;含有 4 个 Ser、6 个 Thr 和 1 个 Tyr,这 11 个氨基酸均可能成为蛋白激酶磷酸化位点。

蛋白质的糖基化、酰基化和磷酸化都属于化学修饰,具有重要的生物学意义,可提供蛋白质的功能信息,磷酸化和去磷酸化是细胞内信号传导的重要方式。研究表明,秦川牛 A-FABP 具有磷酸化和酰基化位点,此特性很有可能是其具有调节脂类代谢和调控长链脂肪酸的摄入,以及维持机体代谢内

环境平衡的重要原因。

近年来关于 *A-FABP* 基因的研究较多,此基因与脂肪代谢关联密切,在 小鼠、猪、鸡等动物不同组织的 *A-FABP* 表达特性研究中发现,*A-FABP* 基因只在脂肪细胞中表达^[7-8];在牛、鸡、猪上关于 *A-FABP* 基因多态性的研究表明,其多态性与肌肉脂肪的沉积相关^[15-19];但在蛋白水平上的研究较少,故本试验针对秦川牛 *A-FABP* 基因进行了系统的生物信息学分析,希望以此为该基因在蛋白水平上的深入研究提供基础和借鉴。

Foster 等^[20]曾提出,由于 DNA 序列的碱基序列常有突变、缺失等现象,因此对氨基酸序列的系统进化树分析比核苷酸序列分析更为可靠,故本试验进行了秦川牛 *A-FABP* 与其他动物该蛋白氨基酸序列的遗传进化树分析,结果表明,人的 *A-FABP* 与小鼠、大鼠最为相似,可以归为一类,随后这三者与牛聚为一类,之后与猪聚为一类,最后再与鸡聚为一大类。

4 结 论

本研究针对秦川牛 *A-FABP* 基因编码的氨基酸序列进行了克隆测序和生物信息学分析,得知秦川牛 *A-FABP* 与人、鸡、小鼠、大鼠、野猪的氨基酸同源性分别为 84.09%,85.61%,71.97%,88.33%和 81.82%,表明在进化关系上,*A-FABP* 氨基酸序列有较好的保守性;此蛋白序列具有脂钙蛋白结合域,没有信号肽;无明显跨膜区,不含有二硫键。

[参考文献]

[1] Ockner R K, Manning J A, Poppenhausen R B, et al. A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium and other tissue [J]. Science, 1972, 177: 56-58.

[2] Van Nieuwenhoven F A, Van der Vusse C J, Glatz J F. Membrane associated and cytoplasmic fatty acid binding proteins [J]. Lipids, 1996, 31: 223-227.

[3] Uysal K T, Scheja L, Wiesbrock S M, et al. Improved glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2 [J]. Endocrinology, 2000, 141: 3388-3396.

[4] Ann V H, Assumpta, Bennaans-Eiden, et al. Increased lipolysis in transgenic animals overexpressing the epithelial fatty acid binding protein in adipose cells [J]. Journal of Lipid Research, 2002, 43: 2105-2111.

[5] Ann V H, Lisa Ann Smith, Anders H B, et al. Lipid metabolism and adipokine levels in fatty acid-binding protein null and transgenic mice [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005, 290: 814-823.

[6] Coe N R, Simpson M A, Bernlohr D A. Targeted disruption of

the adipocyte lipid-binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid levels [J]. Lipid Res, 1999, 40: 967-972.

[7] Armstrong M K, Bernlohr D A, Storch J, et al. The purification and characterization of a fatty acid binding protein specific to pig adipose tissue [J]. Biochem, 1990, 267(2): 373-378.

[8] 王启贵. 鸡 FABP 基因克隆、表达特性及功能研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2004.

Wang Q G. Cloning, expression and function of chicken FABP genes [D]. Haerbin: Northeast Agricultural University, 2004. (in Chinese)

[9] Wulf D M, Tatum J D, Green R D, et al. Genetic influences on beef longissimus palatability in Charolais and Limousin-sired steers and heifers [J]. J Anim Sci 1996, 74: 2394-2405.

[10] 魏 群, 崔丽华, 杨淑杰, 等. 分子生物学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 施普林格出版社, 2003: 53-58.

Wei Q, Cui L H, Yang S J, et al. Molecular biology lab proc [M]. Beijing: Higher Education Press, Springer Group, 2003: 53-58. (in Chinese)

[11] 唐医亚, 邢晓为, 薛立群, 等. 湖南沙子岭猪 SLA-DR 基因克隆及生物信息学分析 [J]. 遗传, 2007, 29(12): 1491-1496.

Tang Y Y, Xing X W, Xue L Q, et al. Cloning and bioinformatics analysis of SLA-DR genes in Hunan Shaziling pigs [J]. Hereditas, 2007, 29(12): 1491-1496. (in Chinese)

[12] 王功帅, 侯水生, 黄 苇, 等. 北京鸭 β -catenin 基因 cDNA 的克隆和生物信息学分析 [J]. 中国畜牧杂志, 2009, 45(5): 5-9.

Wang G S, Hou S S, Huang W, et al. Cloning and bioinformatics analysis of cDNA of β -catenin gene in Peking duck [J]. Chinese Journal of Animal Science, 2009, 45(5): 5-9. (in Chinese)

[13] 黄 萌, 许尚忠, 胥林森, 等. 牛 RXRG 基因 cDNA 的克隆及生物信息学分析 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2008, 36(11): 1-5.

Huang M, Xu S Z, Zan L S, et al. cDNA cloning and biological information analysis of cattle RXRG gene [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2008, 36(11): 1-5. (in Chinese)

[14] 张巧灵, 姜俊兵, 范瑞文, 等. 羊驼 KIT 基因 exon 10-19 cDNA 的克隆、表达及生物信息学分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(4): 493-499.

Zhang Q L, Jiang J B, Fan R W, et al. Cloning, expression and bioinformatics analysis of KIT gene in alpacas (Lama pacos) [J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2009, 40(4): 493-499. (in Chinese)

[15] 李 桢, 储明星, 曹红鹤, 等. 中外 11 个猪种 *A-FABP* 基因微卫星遗传变异的研究 [J]. 遗传, 2004, 26(4): 473-477.

Li Z, Chu M X, Cao H H, et al. Genetic variation of *A-FABP* microsatellites in eleven pig breeds [J]. Hereditas, 2004, 26(4): 473-477. (in Chinese)

[16] 罗桂芬, 陈继兰, 文 杰, 等. 鸡 *A-FABP* 基因多态性分析及其与脂肪性状的相关研究 [J]. 遗传, 2006, 28(1): 39-42.

Luo G F, Chen J L, Wen J, et al. Study of single nucleotide polymorphism of A-FABP gene and its association with fatness traits in chicken [J]. *Hereditas*, 2006, 28(1): 39-42. (in Chinese)

[17] 叶满红, 文 杰, 曹红鹤, 等. 脂肪型脂肪酸结合蛋白基因多态性与鸡肉品质性状的关系研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 2007, 38(6): 526-532.

Ye M H, Wen J, Cao H H, et al. Study of polymorphisms in adipocyte fatty acid binding protein gene and their relationship with fatness related traits in chick [J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2007, 38(6): 526-532. (in Chinese)

[18] 叶满红. 鸡脂肪酸结合蛋白基因的克隆及其与肌内脂肪的关系 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2003.

Ye M H. Studies on cloning of chicken fatty acid binding protein genes and their relationships with intramuscular fat content [D]. Beijing: The Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2003. (in Chinese)

[19] 王 卓. 秦川牛 H-FABP、A-FABP 和 E-FABP 基因 SNPs 及其与部分肉用性状关联分析 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2005.

Wang Z. SNPs in H-FABP, A-FABP and E-FABP genes and their association with some meat traits in Qinchuan breed [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2005. (in Chinese)

[20] Foster P G, Hickey D A. Compositional bias may affect both DNA-based and protein-based phylogenetic reconstructions [J]. *Molecular Evolution*, 1999, 48: 184-190.

(上接第 76 页)

[10] Joshi M S. Isolation, cell culture and immunocytochemical characterization of oviduct epithelial cells of the cow [J]. *J Reprod Fert*, 1988, 83: 249-261.

[11] Hisao A, Miya K, Shigeru T, et al. Establishment of a ciliated epithelial cell line from human Fallopian tube [J]. *Human Reproduction*, 2000, 15(7): 1597-1603.

[12] Zhong Y, Pan S P, Zhang C, et al. Influences of primary and subcultured human oviduct epithelial cells on development of mouse one-cell embryos [J]. *Chinese Journal of Jinnan Univ-ers Transaction*, 1996(5): 162-165.

[13] 薛庆善. 体外培养的原理与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 103-106.

Xue Q S. Principle and technology of culture *in vitro* [M]. Beijing: Science Press, 2001: 103-106. (in Chinese)

[14] Clare W. Epithelial cell culture protocols [MJ]. London: Humana press, 2002.

[15] Nadia O, Yves M, GeYard B, et al. Culture of epithelial cells derived from the oviduct of different species [J]. *Human Reproduction*, 1989, 4(3): 229-235.

[16] Butent U, Basak B. Is there still a place for co-cultures in the era of sequential media? [J]. *Reproductive Biomedicine On-line*, 2005, 10(4): 492-496.