

山羊 *PTHrP* 基因 CDs 区克隆及其融合蛋白的表达

杨振宇, 郑惠玲, 邢瑞芳, 祝珍珍, 安俊辉

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] **【目的】**克隆山羊甲状旁腺相关肽(Parathyroid hormone related protein, PTHrP)基因, 并进行原核表达, 获得具有生物学活性的融合蛋白。**【方法】**无菌采集山羊乳腺组织, 采用 TRIZOL 法提取总 RNA, RT-PCR 克隆山羊 *PTHrP* 基因全 CDs 区。将山羊 *PTHrP* 基因全 CDs 区插入 pET-32a(+) 表达质粒构建 pET-PTHrP 质粒, 经酶切和测序鉴定后, 将其转化 *E. coli* BL21(DE3) 菌株, 经 2 mmol/L IPTG, 37 °C 诱导表达 8 h 后, 进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析。**【结果】**获得了山羊 *PTHrP* 基因全 CDs 区, 长 534 bp (GenBank 登录号 GU573787); 酶切和测序显示, 原核表达载体 pET-PTHrP 构建成功; SDS-PAGE 和 Western blotting 分析表明, 在 *E. coli* BL21(DE3) 中成功诱导表达了 pET-PTHrP 融合蛋白。**【结论】**克隆了山羊 *PTHrP* 基因, 获得了 PTHrP 融合蛋白。

[关键词] *PTHrP* 基因; 原核表达; 蛋白纯化; 山羊

[中图分类号] S827; Q786

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)10-0045-06

Cloning of *Capra hircus* *PTHrP* and its prokaryotic expression in *Escherichia coli*

YANG Zhen-yu, ZHENG Hui-ling, XING Rui-fang, ZHU Zhen-zhen, AN Jun-hui

(Key Laboratory for Molecule Biology of Agriculture, College of Animal Science and Technology,
Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** This experiment was conducted to study *Capra hircus* parathyroid hormone related protein *PTHrP* gene expression in *E. coli* under the condition of cloning *PTHrP* gene complete CDs sequence. **【Method】** Total RNA was isolated from *C. hircus* mammary gland tissues. The CDs sequence of *PTHrP* gene were amplified by RT-PCR. CDs of *PTHrP* was inserted to the prokaryotic expression vector pET-32a(+) and expressed (2 mmol/L IPTG for 8 h at 37 °C) in *E. coli* BL21(DE3) host cells. The results were analysed by SDS-PAGE and Western blotting. **【Result】** The *C. hircus* *PTHrP* gene complete CDs was 534 bp. Restriction enzyme mapping and sequencing showed that prokaryotic expression vector was constructed successfully. SDS-PAGE and Western blotting showed that fusion protein (36.5 ku) was induced in *E. coli* BL21(DE3) and purified. **【Conclusion】** *C. hircus* *PTHrP* gene was cloned and expressed in this study, which laid a foundation for preparing polyclonal antibody and further studying on its function.

Key words: *PTHrP* gene; prokaryotic expression; protein purification; *Capra hircus*

甲状旁腺相关肽(Parathyroid hormone related protein, PTHrP)因其基因结构和蛋白组成与甲状旁腺素(Parathyroid hormone, PTH)类似而得

名^[1]。PTHrP 具有多种生物学功能, 如通过促进肾脏对钙的重吸收来延缓骨质疏松的发生^[2]、促进骨细胞分化及骨骼的形成^[3]、增强细胞在恶劣环境下

* [收稿日期] 2010-03-29

[基金项目] 西北农林科技大学科研启动基金项目(08080112); 农业部公益性行业科研专项(3-45)

[作者简介] 杨振宇(1984—), 男, 贵州凯里人, 在读硕士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究。

[通信作者] 郑惠玲(1969—), 女, 陕西西乡人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事生物技术与动物遗传育种研究。

E-mail: zheng_huiling@yahoo.com

的耐受性^[4]等。

目前, PTHrP 已被证实与动物泌乳期乳钙的沉积有关。Kocabagl 等^[5]研究发现, 奶牛初乳中 PTHrP 水平随泌乳期变化有增长趋势, 且经产奶牛乳汁中 PTHrP 水平与钙离子水平呈正相关。Stemart 等^[6]进一步研究发现, 荷斯坦奶牛乳汁中的钙离子水平由产仔前 772 mg/L 增长为产仔后 1 200 mg/L; 同时, 乳汁中 PTHrP 水平由产仔前 14.9 nmol/L 增长为产仔后 41.2 nmol/L, 两者呈正相关。由此可推测, 产仔前后乳钙含量变化的原因可能是 PTHrP 参与了乳腺钙离子的转运, 但目前这种机制尚未定论。为此, 本研究从山羊乳腺组织中克隆出 *PTHrP* 基因全 CDs 区, 并原核表达 PTHrP 融合蛋白, 以期为进一步研究 PTHrP 在泌乳期乳钙沉积中的分子作用机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 12 月龄健康雌性关中奶山羊, 由陕西杨凌示范区姚安村屠宰场提供, 屠宰后 5 min 内取乳腺组织样 1 g 左右, 立即投入液氮中保存备用。

1.1.2 载体和菌株 大肠杆菌(*Escherichia coli*) 菌株 BL21(DE3)、DH5 α 菌株、携带 His 标签的原核表达载体 pET-32a(+), 均由西北农林科技大学动物科技学院奶山羊研究室保存; pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司。

1.1.3 主要试剂 T4 DNA Ligase、LA Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Bgl* II 和 *Xho* I, 均为 TaKaRa 生物公司(日本)产品; 反转录试剂盒、ECL-Plus 化学发光试剂, 均购自天根生化科技(北京)有限公司; 质粒回收试剂盒, 购自北京博大泰克/博大泰恒生物技术集团公司; Anti-His 单克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG, 均购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 *PTHrP* 基因的克隆 TRIZOL 法提取山羊乳腺组织总 RNA, 紫外分光光度计检测其 OD₂₃₀、OD₂₆₀、OD₂₈₀, 再经电泳检测后, 按试剂盒说明进行反转录合成 cDNA 第一链。参照牛 cDNA 序列(GenBank 登录号: BC149411.1)设计 1 对引物, 上游引物: 5'-GAAGATCTGCGAGAGGATACGATGCT-3', 下游引物: 5'-CCGCTCGAGTGAAGGTCTCTGCTGAAAAAT-3'(上、下游引物中下划

线部分分别为 *Bgl* II 和 *Xho* I 酶切位点)。以反转录合成的 cDNA 第一链为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 40 μ L: 10 $\times$ LA Buffer II (含 Mg²⁺) 4 μ L, dNTPs(2.5 mmol/L) 8 μ L, 上、下游引物各 2 μ L, LA Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 1 μ L, cDNA 第一链模板(50 ng/ μ L) 6 μ L, 双蒸灭菌水 17 μ L。PCR 反应程序如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 48 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物经纯化、TA 克隆、*Bgl* II 和 *Xho* I 双酶切鉴定后送金斯瑞科技(南京)有限公司测序, 测序正确的克隆命名为 pMD-PTHrP。

1.2.2 重组表达载体的构建及鉴定 用 *Bgl* II 和 *Xho* I 双酶切 pET-32a(+) 载体和 pMD-PTHrP 质粒, 分别回收纯化后, 用 T4 DNA Ligase 于 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 获得重组质粒, 将其转化大肠杆菌后涂布于 LB(含 100 mg/mL Amp) 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑选阳性克隆进行酶切鉴定, 鉴定正确后送金斯瑞科技(南京)有限公司测序, 测序正确的克隆命名为 pET-PTHrP。

1.2.3 重组子的诱导表达及融合蛋白的纯化 将 pET-PTHrP 质粒转化 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞, 涂布培养于 LB(含 100 mg/mL Amp) 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养 10 h 后挑选阳性克隆进行 PCR 鉴定。将鉴定正确的单克隆接种于 LB(含 100 mg/mL Amp) 中培养至 OD₆₀₀ = 0.5~0.6 后, 37 $^{\circ}$ C 下用不同 IPTG 浓度(终浓度分别为 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mmol/L) 诱导表达, 8 h 后取样, 进行 SDS-PAGE 电泳检测, 以诱导的 pET-32a(+) 空载体和未诱导的重组 BL21(DE3) 为对照, 确定最佳 IPTG 浓度。

将重组表达菌接种于 LB(含 100 mg/mL Amp) 中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD₆₀₀ = 0.5~0.6, 用确定的最佳浓度 IPTG 诱导 8 h。5 000 g、4 $^{\circ}$ C 离心 15 min, 收集菌体, 用 PBS 重悬, 4 $^{\circ}$ C 冰浴超声破碎(破碎 3 s 间隔 3 s, 共 5 min), PBS 洗涤 3 次后加入 8 mol/L 尿素, 于 37 $^{\circ}$ C 裂解包涵体 10 min, 完毕后 10 000 g、4 $^{\circ}$ C 离心 20 min, 收集上清, 进行 SDS-PAGE 电泳, 最后用 0.25 mol/L KCl 染色 10 min。切下目的条带, 放入预冷研钵中, 加入液氮研磨至粉末状, 加入 PBS, 于 4 $^{\circ}$ C 过夜。第 2 天 10 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 5 min, 进行上清液的 SDS-PAGE 检测。

1.2.4 融合蛋白的 Western blotting 检测 将待检测样品 SDS-PAGE 完毕后, 60 V、2 h 电转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1.5 h; 使用 Anti-His

单克隆抗体为一抗(1 : 1 000 稀释),4 ℃ 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次;HRP 标记的羊抗兔 IgG 作为二抗 (1 : 4 000 稀释),37 ℃ 孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次; 曝光后分析结果。

2 结果与分析

2.1 山羊乳腺组织总 RNA 的检测

紫外分光光度计检测结果显示,提取的山羊乳 腺组织总 RNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 2.00,OD₂₆₀/OD₂₃₀ 为 2.02,表明山羊乳腺组织总 RNA 提取效果良好。 电泳检测可见 3 条清晰电泳带,分别为 28 S、18 S 和 5 S rRNA(图 1),表明所提山羊乳腺组织总 RNA 完整,符合试验要求。

2.2 山羊 *PTHrP* 基因 CDs 区的扩增

以山羊乳腺组织总 RNA 为模板,RT-PCR 扩 增山羊 *PTHrP* 基因全 CDs 区,电泳检测可见 534

bp 的目的条带(图 2)。

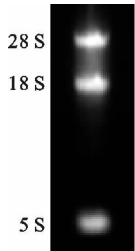


图 1 山羊乳腺组织总 RNA 的电泳检测
Fig.1 Agarose gel electrophoresis of *C. hircus* mammary gland total RNA

2.3 山羊 *PTHrP* 基因 CDs 区的克隆

将山羊 *PTHrP* 基因与 pMD18-T 载体连接,提 取 pMD-PTHrP 质粒进行 *Bgl* II 和 *Xho* I 双酶切鉴定, 结果可见 2 692 bp 的 T 载体条带与 534 bp 的目的 条带(图 3),表明山羊 *PTHrP* 基因被成功克隆。

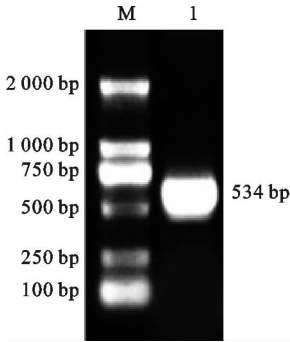


图 2 山羊 *PTHrP* 基因 PCR 扩增产物的检测
M. DNA Marker (DL2000);1. *PTHrP* PCR 产物

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of *C. hircus* *PTHrP* PCR product

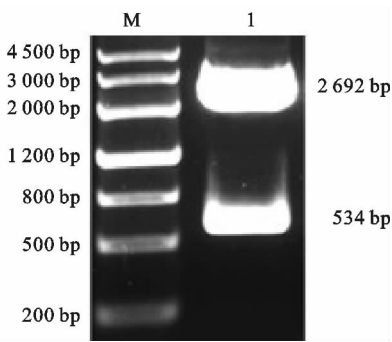


图 3 山羊 *PTHrP* 基因的克隆
M. DNA Marker(Marker III);1. *Bgl* II 和 *Xho* I 双酶切后的 pMD-PTHrP

Fig.3 Cloning of *C. hircus* *PTHrP* gene

M. DNA Marker(Marker III);1. pMD-PTHrP digested by *Bgl* II and *Xho* I

2.4 山羊 *PTHrP* 基因 CDs 区的生物信息学分析

对重组质粒 pMD-PTHrP 测序,结果显示重组 质粒含有长 534 bp 的山羊 *PTHrP* 基因全 CDs 区 (图 4)。用 DNAMAN 软件进行序列比对,结果(表 1)显示:山羊 PTHrP 氨基酸序列与兔、马、小鼠、 牛、人氨基酸序列同源性分别为 86.9%,88.6%, 85.6%,97.2%和 89.7%,与牛的氨基酸序列同源性 最高(97.2%),与人的氨基酸序列同源性次之 (89.7%);山羊 *PTHrP* 基因核苷酸序列(登录号 GU573787)与兔、马、小鼠、牛、人核苷酸序列同源性 分别为 83.1%,90.1%,84.3%,98.1%和 88.4%,与 牛的核苷酸序列同源性最高(98.1%)。

2.5 重组原核表达载体 pET-PTHrP 的构建

重组质粒转化大肠杆菌感受态细胞后,提取质

粒进行酶切鉴定,结果可见 5 900 bp 的 pET- 32a(+)载体条带和 534 bp 的 *PTHrP* 条带(图 5)。 对重组质粒测序,结果显示,山羊 *PTHrP* 基因成功 插入 pET-32a(+)载体,原核表达载体 pET-PTHrP 构建完成。

2.6 PTHrP 重组蛋白的诱导表达及纯化

用 pET-PTHrP 质粒转化 *E. coli* BL21(DE3) 表达菌株,诱导表达后 SDS-PAGE 检测结果(图 6) 显示,在约 36.5 ku 处有特异蛋白带出现,与预测融 合蛋白分子质量大小相符;同时可以看到 IPTG 终 浓度为 2.0 mmol/L 时,产生的特异蛋白量最高。

重组蛋白纯化后 SDS-PAGE 检测结果(图 7)显 示,切胶产物在约 36.5 ku 处有 1 条蛋白带,与融合 蛋白 pET-PTHrP 分子质量一致,且纯度较高。

1 ATGCTGTGGAAGCTAGTTCAAGCAATGGAGCGTCGCGGTGTTCTGCTGAGCTACTCGGTG
1 M L W K L V Q Q W S V A V F L L S Y S V
61 CCCTCCTGCGGGCGCTCCGTGGAGGAGCTCGGCCGCCGACTCAAAGGGCTGTGTCTGAG
21 P S C G R S V E E L G R R L K R A V S E
121 CACCAGTCTCTCCATGACAAGGGGAAGTCCATCCAAGACTTACGGCGTCGGTTCCTCCTC
41 H Q L L H D K G K S I Q D L R R R F F L
181 CACCATCTGATCGCGGAAATCCACACAGCCGAAATCAGAGCTACCTCGGAGGTGTCCCCC
61 H H L I A E I H T A E I R A T S E V S P
241 AACTCCAAGCCTGCTCCCAACACCAAGAACCACCCCGTCCGATTGGGTCTGATGATGAG
81 N S K P A P N T K N H P V R F G S D D E
301 GGCAAATACCTGACTCAGGAAACTAACAAGGTGGAGACATACAAAGAGCAGCAGCTGAAG
101 G K Y L T Q E T N K V E T Y K E Q P L K
361 ACGCCCGGCAAGAAAAAGAAAAAGCAAGCCTGGAAAAACGCAAGGAGCAGGAGAAGAAGAAA
121 T P G K K K K S K P G K R K E Q E K K K
421 CGGCGAACTCGGTCTGCCTGGCTGACCTCGGGCGTGCCTGGGACTGGGCTGGAAGAGGAC
141 R R T R S A W L T S G V P G T G L E E D
481 TACCTATCTGACATCTCCGCAACAACGCTGGAGCTCAACTCACGGAGGCATTGA
161 Y L S D I S A T T L E L N S R R H

图 4 山羊 PTHrP 基因全 CDs 区序列和氨基酸序列

Fig. 4 Complete CDs and amino acid sequence of *C. hircus* PTHrP

表 1 山羊 PTHrP 基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列与其他物种的同源性比较

Table 1 Amino acid and nucleotide homology comprasion of *C. hircus* PTHrP gene among *O. cuniculus*, *Equus caballus*, *Mus musculus*, *Bos taurus* and *Homo sapiens*

物种 Species	山羊 <i>Capra hircus</i>	兔 <i>O. cuniculus</i>	马 <i>Equus caballus</i>	小鼠 <i>Mus musculus</i>	牛 <i>Bos taurus</i>	人 <i>Homo sapiens</i>
山羊 <i>Capara hircus</i>	100	83.1	90.1	84.3	98.1	88.4
兔 <i>O. cuniculus</i>	86.9	100	85.9	80.1	83.1	83.3
马 <i>Equus caballus</i>	88.6	90.4	100	85.0	90.4	89.1
小鼠 <i>Mus musculus</i>	85.6	86.3	88.0	100	84.1	82.9
牛 <i>Bos taurus</i>	97.2	87.6	89.8	86.9	100	88.6
人 <i>Homo sapiens</i>	89.7	89.1	90.9	87.9	89.7	100

注:右上部分为核苷酸序列同源性,左下部分为氨基酸序列同源性。

Note:Right upper region is nucleotide homology,left inferior region is amino acid homology.

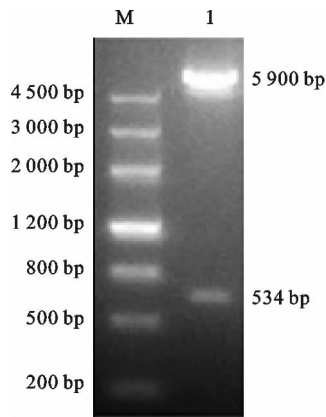


图 5 pET-PTHrP 的酶切鉴定

M. DNA Marker(Marker III);1. *Bgl* II 和 *Xho* I
双酶切后的 pET-PTHrP

Fig. 5 Identification of recombinant plasmid pET-PTHrP
by restrictive enzyme digestion

M. DNA Marker(Marker III);1. pET-PTHrP
digested by *Bgl* II and *Xho* I

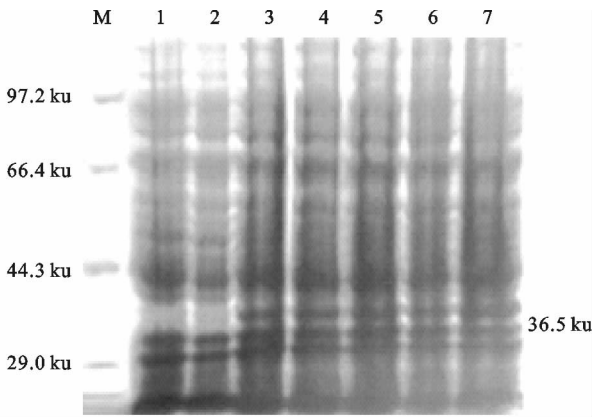


图 6 pET-PTHrP 表达产物的 SDS-PAGE 分析

M. 蛋白质相对分子量标准;1. 诱导的 pET-32a(+)
空载体;2. 未诱导的重组 BL21(DE3);3~7. 分别为 0.1,0.5,
1.0,1.5,2.0 mmol/L IPTG 诱导的表达产物

Fig. 6 SDS-PAGE analysis for expression of pET-PTHrP

M. Protein Marker;1. pET-32a(+) induced by IPTG;
2. Recombinat BL21(DE3) without induction by IPTG;
3—7. Induced pET-PTHrP with different levels of
IPTG(0.1,0.5,1.0,1.5,2.0 mmol/L)

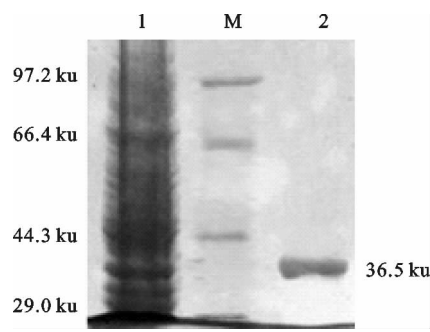


图 7 pET-PTHrP 纯化产物的 SDS-PAGE 分析
M. 蛋白质相对分子量标准;1. 菌体沉淀;2. 纯化产物
Fig. 7 SDS-PAGE analysis of purification of pET-PTHrP
M. Protein Marker;1. The precipitation of bacterium fuild;2. Products of purification

2.7 融合蛋白的 Western blotting 检测

Western blotting 检测结果如图 8 所示,在约 36.5 ku 处可检测到特异条带,与表达结果相符。表明所纯化蛋白正确,为山羊 PTHrP 融合蛋白。



图 8 表达产物的 Western blotting 分析
一抗为:Anti-His 单克隆抗体

Fig. 8 Western blotting analysis of expression products
First antibody:Anti-His monoclonal antibody

3 讨 论

本研究根据 GenBank 中牛 PTHrP 序列(Gen-Bank 登录号:BC149411. 1)设计 1 对引物,使用 RT-PCR 技术从山羊乳腺组织中克隆出长 534 bp 的山羊 *PTHrP* 基因全 CDs 区,并登陆 GenBank (登录号 GU573787),与兔、马、小鼠、牛、人等物种的 *PTHrP* 基因序列进行比对发现,其编码区基本一致,保守性较高,核苷酸序列同源性分别为 83.1%,90.1%,84.3%,98.1%和 88.4%,氨基酸序列同源性分别为 86.9%,88.6%,85.6%,97.2%和 89.7%。氨基酸比对结果显示,PTHrP 功能氨基酸区域保守性非常高,特别是 PTH 结构所在区域完全相同。据此推测,山羊 PTHrP 可能与其他物种 PTHrP 在功能上类似,如促进血管平滑肌细胞的增殖^[7]、促进骨组织分化以及牙齿的生长^[8-9]、抑制成骨细胞作用^[10]等。

PTHrP 参与调控泌乳期乳钙沉积。Van-Houten 等^[11]在泌乳期小鼠上的研究发现,PTHrP 能与钙敏感受体(Calcium-Sensing Receptor,CaSR)

作用,促进乳钙沉积并维持体内钙平衡,后续的研究证实,CaSR 为 PTHrP 的上游调控基因,在泌乳期调节乳腺中 PTHrP 的合成分泌^[12]。乳腺中 PTHrP 的合成和分泌除受 CaSR 影响外,还与其他因素有关,如哺乳期小鼠通过吮吸动作,能够刺激乳腺合成和分泌 PTHrP,增加乳钙沉积量,其原因可能是泌乳期小鼠乳腺在幼鼠的吮吸动作和其他因素的共同作用下,促使催乳素水平上升,引起 PTHrP 合成分泌加强,最后导致乳中钙沉积量增加^[13]。从本研究所获得的山羊 PTHrP 氨基酸序列比对结果可见,小鼠与山羊同源性较高,且在结构上也有相同之处。据此推测,山羊 PTHrP 参与泌乳期乳钙沉积的作用机制与小鼠类似,通过 CaSR 调节自身分泌来影响乳钙沉积。

本研究根据牛 *PTHrP* 基因的 cDNA 序列,从山羊乳腺组织中克隆得到山羊 *PTHrP* 基因全 CDs 区,并在大肠杆菌中成功表达和纯化,为下一步制备山羊 PTHrP 的多克隆抗体,研究该基因在乳钙沉积过程中的分子作用机理奠定了基础。

[参考文献]

[1] Philbrick W M, Wysolmerski J J, Galbraith S, et al. Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology [J]. *Physiol Rev*,1996,76(1):127-130.
[2] Svedma, Horwitzmj, Tedeseom, et al. Parathyroid honnone-related protein(1-36) stimulate srenal tubular caleium reab-sorption in normal human volunteers; Implications for the pathogenesis of humoral hypercalcemia of malignancy [J]. *Clin Endoerinol Metab*,2001,86(4):1525-1531.
[3] Strid H,Care A,Jansson T,et al. Parathyroid hormone-related peptide(38-94) amide stimulates ATP-dependent calcium transport in the basal plasma menmbrane of the human syncy-tiotrophoblast [J]. *Endocrinol*,2002,175(2):517-524.
[4] Tovar Sepulveda V A,Shen X L,Falzon M. Intracrine PTHrP protects against serum starvation-induced apoptosis and regu-lates the cell cycle in MCF-7 breast cancer cells [J]. *Endocri-nology*,2002,143(2):596-602.
[5] Kocabagli N,Rioud J L,Spichiger U E,et al. Parathyroid hor-mone-related protein and calcium homeostasis during the perip-arturient period of dairy cows [J]. *Am J Vet Res*,1995,56(3):380-385.
[6] Stemart A F,Cain R L,Burr D B,et al. Six-month daily admin-istration of parathyroid hormone and parathyroid hormone-re-lated protein peptides to adult ovariectomized rats markedly enhances bone mass and biomechanical properties; A compari-son of human parathyroid hormone 1-34, parathyroid hor-mone-related protein 1-36,and SDZ-parathyroid hormone 893 [J]. *Bone Miner Res*,2000,15(8):1517-1525.

[7] Song G J,Fiaschi-Taesch N,Bisello A. Endogenous parathyroid hormone-related protein regulates the expression of PTH type 1 receptor and proliferation of vascular smooth muscle cells [J]. Mol Endocrinol,2009,23(10):1681-1690.

[8] Liu C J,Zhang Y,Xu K,et al. Transcriptional activation of cartilage oligomeric matrix protein by Sox9,Sox5,and Sox6 transcription factors and CBP/p300 coactivators [J]. Front Biogci,2007,1(2):3899-3910.

[9] Yao S,Pan F,Wise G E. Chronological gene expression of parathyroid hormone-related protein(PTHrP) in the stellate reticulum of the rat implications for tooth eruption [J]. Arch Oral Biol,2007,52(3):228-232.

[10] Lozano D,Castro L F,Dapia S,et a. Role of parathyroid hormone-related protein in the decreased osteoblast function in diabetes-related osteopenia [J]. Endocrinology,2009,150(5):2027-2035.

[11] VanHouten J N,Dann P,Stewart A F,et al. Mammary-specific deletion of parathyroid hormone-related protein preserves bone mass during lactation [J]. Clin Invest,2003,112(9):1429-1436.

[12] VanHouten J N. Calcium sensing by the mammary gland [J]. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia,2005,10(2):129-139.

[13] Ramanaiah M,Joshua V H,Walter Z,et al. Switching of G-Protein usage by the calcium sensing receptor reverses its effect on PTHrP secretion in normal versus malignant breast cells [J]. Journal of Biological Chemistry,2008,283:24435-24447.

(上接第 44 页)

[18] 董世山. 中药对仔猪腹泻的防治作用及其机理研究 [D]. 北京:中国农业科学院,2005.

Dong S S. The effects and mechanisms of several Chinese herbal medicine on piglets diarrhea [D]. Beijing:Chinese Academy of Agricultural,2005. (in Chinese)

[19] 陈会良,鲍广刚,蔡汉乔.“兔健散”对兔增重和血液生理生化值的影响 [J]. 中兽医医药杂志,2004(6):51-52.

Chen H L,Bao G G,Cai H Q. The effect of “Tu Jian San” on weight increasing and blood physiological and biochemical values of rabbits [J]. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine,2004(6):51-52. (in Chinese)

[20] 蒋卫,陈来同,胡晓倩,等. 紫外分光光度法测定动物血清 IgG 含量方法的研究 [J]. 中国生化药物杂志,2008,29(2):119-120.

Jiang W,Chen L T,Hu X Q. Study on ultraviolet spectrophotometry for determination the content of IgG in animal serum product [J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics,2008,29(2):119-120. (in Chinese)

[21] 敖长金. 外源性免疫球蛋白对仔猪的作用及其应用 [J]. 饲料工业,2006,27(8):1-6.

Ao C J. The function and application of exogenous immunoglobulin [J]. Feed Industry,2006,27(8):1-6. (in Chinese)