

网络出版时间:2016-06-08 16:20

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2016.07.002

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20160608.1620.004.html>

来航鸡 *FOXL2* 基因的真核表达及纯化

刘 静, 韩 丽, 李任峰, 徐 萍, 鲁 毅, 杨 猛, 王三虎

(河南科技学院 动物科学学院, 河南 新乡 453003)

[摘 要] **【目的】**对来航鸡 *FOXL2* 基因进行真核表达及纯化, 为其生物学功能研究奠定基础。**【方法】**根据 GenBank 已发表的来航鸡 *FOXL2* 基因序列(GenBank 登录号: JF_708868.1)设计引物, 以来航鸡全血 DNA 为模板, PCR 扩增 *FOXL2* 基因, 经 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切后定向克隆于 pPICZαA 中, 获得 pPICZαA-*FOXL2* 真核表达载体。将 pPICZαA-*FOXL2* 转化毕赤酵母菌 GS115, 用甲醇进行诱导表达, 对表达产物进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测。**【结果】**克隆了 918 bp 的 *FOXL2* 基因; 成功构建了 pPICZαA-*FOXL2* 真核表达载体; 实现了 *FOXL2* 基因在毕赤酵母菌 GS115 中的融合表达, 获得了分子质量约为 37 ku 的重组蛋白 *FOXL2*, 经 Western blotting 检测其具有较好的生物学活性。**【结论】**成功地在毕赤酵母中表达了来航鸡 *FOXL2* 基因。

[关键词] 来航鸡; *FOXL2* 基因; 真核表达

[中图分类号] S832.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2016)07-0010-06

Eukaryotic expression and purification of *FOXL2* gene in leghorn

LIU Jing, HAN Li, LI Renfeng, XU Ping, LU Yi, YANG Meng, WANG Sanhu

(College of Animal Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003, China)

Abstract: **【Objective】**Eukaryotic expression and purification of leghorn *FOXL2* gene were conducted to understand its biological function. **【Method】**A pair of primers were designed based on the published nudeotide sequence of leghorn *FOXL2* gene (GenBank accession number: JF_708868.1). The full-length coding sequence of the gene was amplified by PCR using the whole blood DNA as template. The product was double-digested by *EcoR* I and *Xba* I before being directionally cloned into the pPICZαA vector to obtain the eukaryotic expression vector pPICZαA-*FOXL2*. The recombinant expression vector was induced with methanol in GS115 and SDS-PAGE and Western blotting were used to detect the expressed protein. **【Result】**The *FOXL2* gene of 918 bp was cloned and its eukaryotic expression vector pPICZαA-*FOXL2* was successfully obtained. The *FOXL2* gene fusion expression in yeast GS115 was conducted and the 37 ku *FOXL2* protein was obtained, which had good biological activities as shown by Western blotting detection. **【Conclusion】**The leghorn *FOXL2* gene was successfully expressed.

Key words: leghorn; *FOXL2* gene; eukaryotic expression

叉头框转录因子 L2 基因(Winged helix fork-head transcription factor gene 2, *FOXL2*)存在于细胞核内, 是一个长度为 2.7 kb 的单外显子基因, 位

于 3q23(3 号染色体 2 区 3 带)区域, 包含一个特有的 forkhead DNA 结构域(该结构域含有 101 个氨基酸, 位于第 54—148 残基区域之间)和一个多聚丙

[收稿日期] 2014-12-11

[基金项目] 河南省基础与前沿项目(082300430020); 河南省科技厅科技成果转化项目(00202011002)

[作者简介] 刘 静(1988—), 女, 河南南阳人, 在读硕士, 主要从事分子免疫学研究。E-mail: 771065523@qq.com

[通信作者] 王三虎(1962—), 男, 河南武陟人, 教授, 博士, 主要从事分子免疫学研究。E-mail: wangsanhu2012@126.com

氨基酸肽段,但该肽段的功能尚不确定。许多人类发育性、免疫性疾病及肿瘤的发生均与个体的基因突变有关,这些基因突变可引起循环系统、免疫系统和骨骼系统的缺陷。此外,*FOXL2* 是最早被发现的一个在人类卵巢功能维持方面起重要作用的常染色体基因,也是在脊椎动物中首先被认定作为卵巢分化的性别二态性标记物^[1]。*FOXL2* 是单外显子转录因子,位于常染色体上,是卵巢分化过程中最早的影响因子,在不同性别决定机制的脊椎动物中呈现高度保守性和高表达性^[2]。鸡 *FOXL2* 基因位于 9 号常染色体上,包含 1 130 个碱基,可编码 305 个氨基酸,是早期卵泡发育的调控因子。在鸡胚胎发育早期,*FOXL2* 可与芳香化酶共同影响其卵巢髓质的发育,且 *FOXL2* 的表达先于芳香化酶,但芳香化酶可抑制 *FOXL2* 的表达^[3]。*FOXL2* 可能参与调节芳香化酶的合成,对雌激素分泌进行间接调节,且与卵巢上的启动子 2 共同激活 *CYP19* 基因的表达,从而影响雌性性腺的分化^[4]。另外,*FOXL2* 可能具有抗卵泡衰亡的作用,*FOXL2* 表达量低可使卵泡衰亡加快,进而导致卵巢内卵泡数目的减少,卵巢储备功能下降^[5-7]。综上可知,*FOXL2* 很可能与鸡的卵巢发育及产蛋性能有重要关系。

来航鸡是一种世界闻名的高产蛋鸡品种,也是我国养鸡业中重要蛋鸡品种,多年来为养殖业带来了巨大的经济效益。本研究对来航鸡 *FOXL2* 基因进行了克隆,并在毕赤酵母中进行了真核融合表达,以期为进一步分析来航鸡 *FOXL2* 基因的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 血样、细菌菌株及载体 纯系 SPF 来航鸡 (Leghorn),购自北京梅里亚维通试验动物技术有限公司;大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,购自北京全式金生物技术有限公司;毕赤酵母菌 GS115,购自 Invitrogen 公司;质粒载体 pMD18-T、pPICZ α A 均为河南科技学院中心实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒,购自 OMEGA 公司;普通琼脂糖凝胶回收纯化试剂盒和质粒提取试剂盒,均购自 TaKaRa 公司;2 $\times$ Taq Master Mix,购自康为世纪公司;氨苄青霉素 (Amp)、博来霉素 (ZeocinTM)、 β -半乳糖苷酶 (X-gal)、甲醇、山梨醇和琼脂糖,均购自 Sigma 公司;T4 DNA 连接酶及 *EcoR* I、*Xba* I 和

Sca I 限制性内切酶,均为 Fermentas 公司产品;一抗 His-Tag(2AS)Mouse mAb,购自 Abmart 公司;二抗辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG,购自中杉金桥公司;酵母粉和蛋白胨均购自 OXOID 公司;电穿孔仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 引物的设计与合成

根据 GenBank 已发表的来航鸡 *FOXL2* 基因序列 (GenBank 登录号: JF_708868.1) 以及真核表达载体 pPICZ α A 序列上的多克隆酶切位点,用 Primer 5.0 软件设计引物:

P1. 5'-CG GAATTC ATGATGAGCGGCTACGCGGAC-3' (方框部分为 *EcoR* I 酶切位点);

P2. 5'-TGC TCTAGA CAGATGTCAATGCGGGAGTG-3' (方框部分为 *Xba* I 酶切位点)。

P1 和 P2 在酶切位点外侧分别设有酶切保护碱基 G、C,引物由 Invitrogen(上海)贸易有限公司合成。

1.3 *FOXL2* 基因的克隆及序列测定

1.3.1 基因组 DNA 的提取 采集来航鸡血液样品,按照 OMEGA 公司的血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒操作步骤提取基因组 DNA。

1.3.2 基因扩增及纯化 以来航鸡基因组 DNA 为模板,P1 和 P2 分别作为上、下游引物,对 *FOXL2* 基因进行 PCR 扩增。PCR 扩增反应体系为:2 $\times$ Taq Master Mix 25 μ L,P1 2 μ L,P2 2 μ L,ddH₂O 19 μ L,模板 DNA 2 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 10 min;94 $^{\circ}$ C 1 min,61.5 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 90 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,用普通琼脂糖凝胶回收纯化试剂盒回收纯化 PCR 产物,并再次进行电泳检测。

1.3.3 重组质粒 pMD18-T-*FOXL2* 的构建 将回收纯化的 *FOXL2* 基因和 pMD18-T 载体分别用 *EcoR* I 和 *Xba* I 进行双酶切后,用 T4 DNA 连接酶进行连接,构建重组质粒 pMD18-T-*FOXL2*。将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 。挑取转化平板上生长的 5 个单菌落分别进行过夜培养,取过夜培养菌液各 1 μ L 作为模板,PCR 扩增 *FOXL2* 基因,对扩增产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。用碱裂解法小量提取 PCR 检测阳性菌重组质粒 pMD18-T-*FOXL2*,进行 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切鉴定,筛选含 *FOXL2* 基因的阳性重组质粒,试验同时设经同样双酶切的空载体 pMD18-T 对照;并将重组质粒 pMD18-T-*FOXL2* 送北京英骏生物技术有限公司测序。

1.4 FOXL2 基因在毕赤酵母中的表达

1.4.1 真核表达载体 pPICZαA-FOXL2 的构建

FOXL2 基因重组真核表达载体的构建策略如图 1 所示。通过 *EcoR* I 和 *Xba* I 2 个限制性酶切位点,将正向连接的重组质粒 pMD18-T-FOXL2 中的 FOXL2 亚克隆到表达载体 pPICZαA 中,构建真核

表达载体 pPICZαA-FOXL2。连接产物转化大肠杆菌 DH5α,扩大培养后提取 pPICZαA-FOXL2,进行 PCR 鉴定及 *EcoR* I、*Xba* I 双酶切鉴定,试验同时设经同样双酶切的空载体 pPICZαA 对照。将初步鉴定正确的阳性菌种送北京英骏生物技术有限公司测序,并进行序列分析。

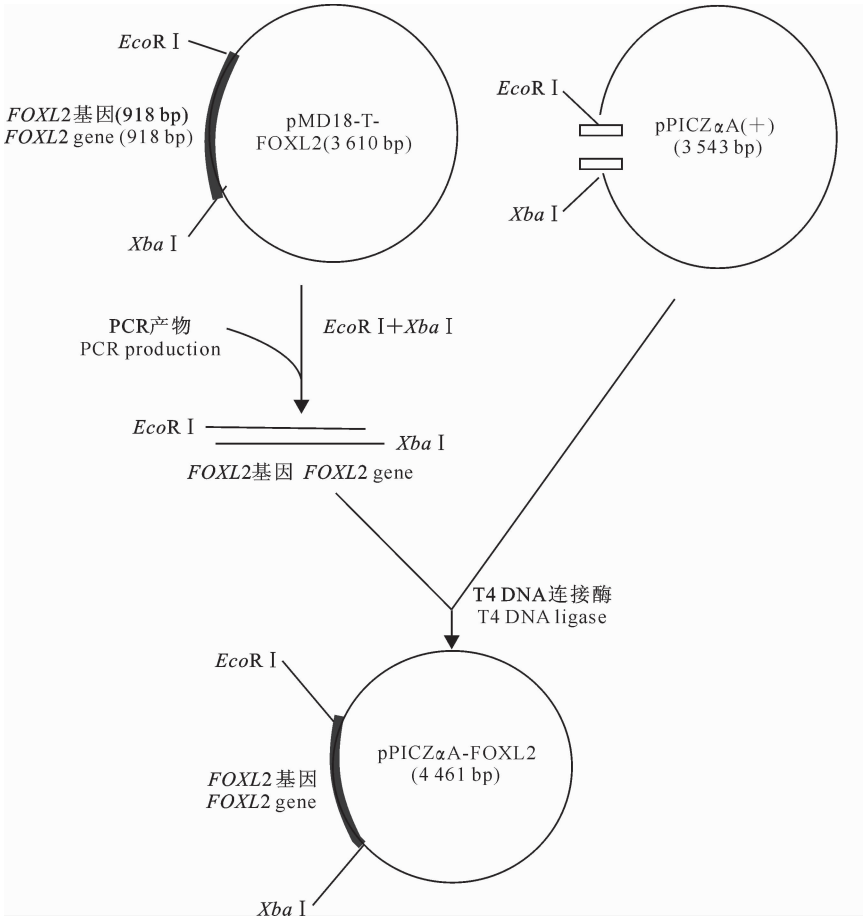


图 1 重组真核表达载体 pPICZαA-FOXL2 的构建示意图

Fig. 1 Establishment of recombinant eukaryotic expression vector pPICZαA-FOXL2

1.4.2 真核表达载体 pPICZαA-FOXL2 的线性化

将测序正确的阳性大肠杆菌 DH5α 按体积分数 1%的量接种至 100 mL 含 ZeocinTM(25 μg/mL) 的 LLB 液体培养基中,37 ℃下 180 r/min 振荡培养过夜,大量提取 pPICZαA-FOXL2 真核表达载体,用 *Sac* I 单酶切使其线性化。

1.4.3 酵母重组子的制备与诱导表达

参照 Invitrogen 公司提供的试剂说明书制备毕赤酵母 GS115 感受态细胞,备用。将 pPICZαA-FOXL2 真核表达载体转化至自制的毕赤酵母菌 GS115 感受态细胞,挑取饱满湿润的菌落接种于 10 mL 含 100 μg/mL ZeocinTM 的 YPDS 液体培养基中,28 ℃下 250 r/min 剧烈振荡培养过夜,第 2 天再以体积分数

1%的量接种于 20 mL BMGY 培养液中,28 ℃下 250 r/min 振荡培养使菌液的 OD₆₀₀ 为 2~7,于 4 000 r/min 离心 5 min,收集菌体,将菌体用 100 mL BMMY 培养液重悬使其 OD₆₀₀ 为 1 时,加甲醇至其体积分数为 0.5%~1%,28 ℃下 250 r/min 诱导培养 8 d,期间每隔 24 h 补加甲醇使其最终体积分数达 0.5%~1%,分别取未诱导样品及诱导 72 h 后的样品,4 ℃下 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,于-20 ℃冻存,备检。

1.4.4 表达产物的 SDS-PAGE 及 Western blotting 检测

将 1.4.3 节所获得的酵母重组子重悬于 25 μL 2×SDS 凝胶加样缓冲液中,煮沸 10 min 后以 12%分离胶、5%浓缩胶进行 SDS-PAGE 检测,

同时以 pPICZ α A 空载体转化的毕赤酵母 GS115 在相同条件下诱导表达的产物作为对照。用电转移法将蛋白质转移到硝酸纤维膜上,用 50 g/L 脱脂奶粉封闭纤维膜;加入均按 1 : 2 500 体积比稀释的鼠抗 His-Tag 单克隆抗体(一抗)和羊抗鼠 IgG(二抗);加入显色液,观察结果。

2 结果与分析

2.1 *FOXL2* 基因的 PCR 扩增

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,在 918 bp 处有 1 条特异性 DNA 条带(图 2),其长度与目的基因片段长度相一致。

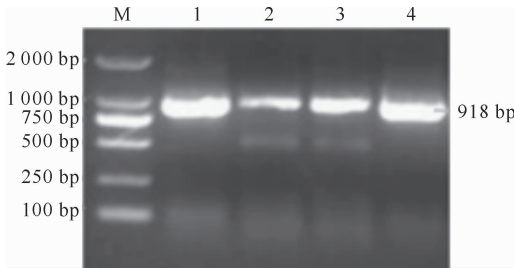


图 2 来航鸡 *FOXL2* 基因的 PCR 扩增

M. DNA Marker DL 2000;1~4. PCR 产物

Fig. 2 PCR amplification of leghorn *FOXL2* gene

M. DNA Marker DL 2000;1-4. PCR products

2.2 重组质粒 PMD18-T-*FOXL2* 的鉴定

PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,在 918 bp 处有 1 条特异性 DNA 条带,可以初步判断相对应的转化子为阳性重组子。克隆质粒 PMD18-T-*FOXL2* 经双酶切,结果(图 3)出现了 2 条带,一条长度约为 2.7 kb,与载体长度(2 692 bp)相近;另一条长度约为 1.0 kb,与外源目的基因长度(918 bp)相符。重组质粒 PMD18-T-*FOXL2* 经测序证实获得了正向插入、无突变表达质粒 pPICZ α A-*FOXL2*。

2.3 重组真核表达载体 pPICZ α A-*FOXL2* 的鉴定

PCR 扩增检测结果显示,在 918 bp 处有 1 条特异性 DNA 条带,可以初步判断相对应的转化子为阳性重组子。真核表达载体 pPICZ α A-*FOXL2* 经双酶切,结果(图 4)出现了 2 条带,一条长度约为 3.6 kb,与载体长度(3.6 kb)相近;另一条长度约为 1.0 kb,与外源目的基因长度(918 bp)相符。

测序结果显示,重组表达载体 pPICZ α A-*FOXL2* 中正向插入了完整的来航鸡 *FOXL2* 基因开放式阅读框,其长度为 918 bp,编码 305 个氨基酸,该序列与 GenBank 中来航鸡 *FOXL2* 基因编码区核苷酸序列(GenBank 登录号:JF_708868.1)同源性为 99.99%,推导的氨基酸序列同源性为 99.9%。

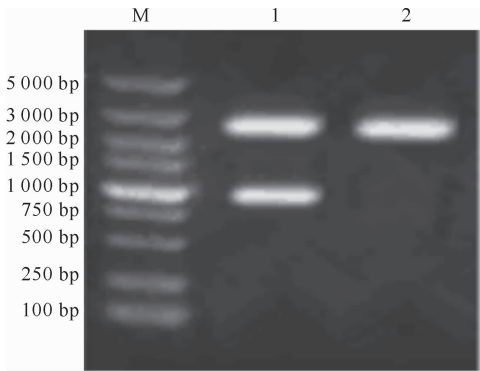


图 3 重组质粒 pMD18-T-*FOXL2* 的 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切鉴定

M. DNA Marker DL 5000;1. 重组质粒 pMD18-T-*FOXL2* 的双酶切产物;2. 空载体 pMD18-T 的双酶切产物

Fig. 3 Identification of recombinant plasmid pMD18-T-*FOXL2* with *EcoR* I and *Xba* I digestion

M. DNA Marker DL 5000;1. Recombinant plasmid pMD18-T-*FOXL2* with *EcoR* I and *Xba* I digestion;

2. Empty carrier pMD18-T with *EcoR* I and *Xba* I digestion

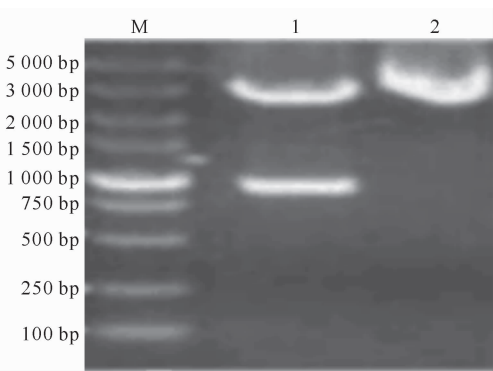


图 4 真核表达载体 pPICZ α A-*FOXL2* 的 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切鉴定

M. DNA Marker DL 5000;1. 重组质粒 pPICZ α A-*FOXL2* 的双酶切产物;2. 空载体 pPICZ α A 的双酶切产物

Fig. 4 Identification of eukaryotic expression vector pPICZ α A-*FOXL2* with *EcoR* I and *Xba* I digestion

M. DNA Marker DL 5000;1. Recombinant plasmid pPICZ α A with *EcoR* I and *Xba* I digestion;

2. Empty carrier pPICZ α A with *EcoR* I and *Xba* I digestion

2.4 真核表达产物的检测

2.4.1 SDS-PAGE 电泳 对经甲醇诱导 72 h 的样品进行 SDS-PAGE 电泳,结果见图 5。从图 5 可以

看出,与空载体 pPICZ α A 对照相比,经过甲醇诱导 72 h 的样品出现了 1 条约 37 ku 的蛋白条带,与预期蛋白分子质量大小相一致。

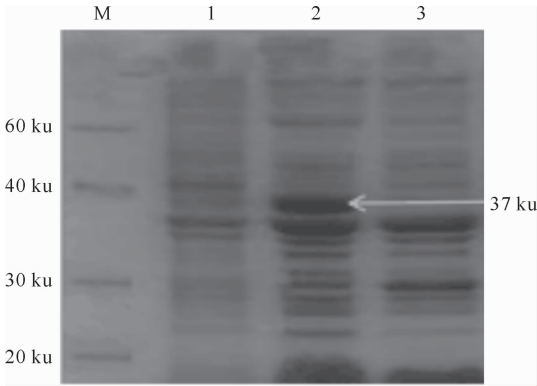


图 5 真核表达载体 pPICZαA-FOXL2 诱导表达产物的 SDS-PAGE 分析

M. 蛋白 Marker;1. 未诱导样品;2. 28 °C 下甲醇诱导 72 h 样品;3. pPICZαA 空载体样品

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of expression products induced by eukaryotic expression vector pPICZαA-FOXL2

M. Protein Marker;1. No induce sample;2. Samples of methanol induction 28 °C for 72 h;3. Empty carrier sample pPICZαA

2. 4. 2 Western blotting 检测 Western blotting 检测结果见图 6。从图 6 可以看出,被检测的样品只出现 1 条特异的条带,其大小与预期结果相一致,说明了重组真核表达载体成功诱导表达出目的蛋白。

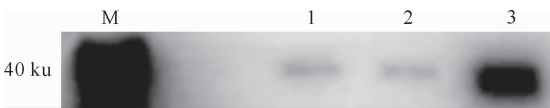


图 6 重组蛋白 FOXL2 的 Western blotting 检测

M. 蛋白质分子量标准;1~3. 重组蛋白 FOXL2

Fig. 6 Western blotting detection of recombinant protein FOXL2

M. Protein Marker;1-3. Recombinant protein FOXL2

3 讨 论

FOXL2 基因是近年来发现的一种转录因子,属翼状螺旋/叉头转录因子超家族成员,其在眼睑、胚胎及成体卵巢颗粒细胞中呈现特异性的表达,与性别决定、卵巢早衰、不孕不育、肿瘤以及小眼睑裂综合征等有关。翼状螺旋/叉头转录因子家族是一种转录调节核蛋白,内含一个特定的 forkhead DNA 结合域,它们在早期胚胎谱系决定,特别是胚外胎膜的形成、内胚层和侧板中胚层的发育及随后器官的形成中起重要作用^[8]。FOXL2 是一个藏在人体内的“变性基因”,可以使人的性别特征得以维持,但如果这个基因出现任何异常,女性则有可能会长出男性所特有的睾丸和胡须,这一发现不仅改变了人们

一直以为人类的性别是与生俱来的传统观念,而且有可能会为变性手术带来质的飞跃,并使雌雄同体婴儿的治疗得到改善。

Loffler 等^[9]通过原位杂交技术发现,FOXL2 不仅在小鼠卵巢发育过程中的干细胞和卵母细胞中表达,而且在体细胞中也有表达,并且有微弱的杂交信号在小鼠胚胎的睾丸组织被检测到。Uhlenhaut 等^[10]研究者发现了一个很有趣的现象,即敲除 FOXL2 可使小鼠的雌性生殖器官向雄性转化。Takasawa 等^[11]通过试验得出在小鼠卵巢发育时期,FOXL2 的转录产物可通过对 WT1 的拮抗来抑制 Sf1 的表达。Yang 等^[12]发现了 FOXL2 的另一重要功能,即 FOXL2 可抑制子宫内膜异位症的发生。2012 年,Eozenou 等^[13]通过牛的的体内外试验发现,FOXL2 对牛的发情周期有调控作用,并在牛的子宫内膜中表达,是独立于孕体的派生干扰素。Govoroun 等^[14]成功克隆出鸡 FOXL2 基因的开放读码框(*cFOXL2*),提出 FOXL2 是一种在鸟类卵巢发育中的早期调控因子。FOXL2 通过对目的靶基因的转录调节作用,使其进行转录、蛋白表达,促进颗粒细胞的增殖分化,对卵巢的发育和功能维持都起着不可替代的作用。因此,对 FOXL2 基因功能及其蛋白表达的研究变得意义重大。

pPICZαA 是一个融合表达载体,其 C-端含有 Myc 和 His 标签的序列。目的蛋白的可溶性表达,不仅有利于对表达产物的检测,也为进一步回收和纯化目的蛋白以及研究目的蛋白提供了方便^[15-16]。来航鸡 FOXL2 蛋白有 305 个氨基酸残基(分子质量大约为 33.5 ku),其真核融合表达产物的 N-端总共融合了 34 个氨基酸残基肽(包含 His 标签和 C-端含 Myc 标签,分子质量约为 3.6 ku),因此融合表达产物共有 339 个氨基酸残基(分子质量约 37 ku 左右)。本试验 SDS-PAGE 检测结果显示,表达蛋白条带所处位置的相对分子质量大小约为 37 ku,表明来航鸡 FOXL2 基因在毕赤酵母中成功表达出了 FOXL2 融合蛋白。Western blotting 检测结果显示该蛋白为 His 融合蛋白,表明重组真核表达载体在毕赤酵母中成功表达出了目的融合蛋白。本研究为深入探索鸡 FOXL2 基因的功能奠定了基础。

[参考文献]

[1] Al-Agha O M,Huwait H F,Chow C,et al. FOXL2 is a sensitive and specific marker for sex cord-stromal tumors of the ovary [J]. The American Journal of Surgical Pathology,2011,35

- (4):484-494.
- [2] Crispinil L, Deiana M, Loi A. The putative forkhead transcription factor *FOXL2* is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome [J]. *Nat Genet*, 2001 (27): 159-166.
 - [3] Pisarska M D, Barlow G, Kuo F T. Minireview: roles of the forkhead transcription factor *FOXL2* in granulosa cell biology and pathology [J]. *Endocrinology*, 2011, 152(4): 1199-1208.
 - [4] Oshima Y, Naruse K, Nakamura Y, et al. Sox3: a transcription factor for *CYP19* expression in the frog *Rana rugosa* [J]. *Gene*, 2009, 445: 38-48.
 - [5] Cheng J C, Klausen C, Leung P C K. Overexpression of wild-type but not C134W mutant *FOXL2* enhances GnRH-induced cell apoptosis by increasing GnRH receptor expression in human granulosa cell tumors [J]. *PloS one*, 2013, 8(1): e55099.
 - [6] Rosario R, Blenkiron C, Shelling A N. Comparative study of microRNA regulation on *FOXL2* between adult-type and juvenile-type granulosa cell tumours *in vitro* [J]. *Gynecologic Oncology*, 2013, 129(1): 209-215.
 - [7] Nonis D, McTavish K J, Shimasaki S. Essential but differential role of *FOXL2*wt and *FOXL2* C134W in GDF-9 stimulation of follistatin transcription in co-operation with Smad3 in the human granulosa cell line COV434 [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2013, 372(1/2): 42-48.
 - [8] Jonckheere N, Vincent A, Perrais M, et al. The human mucin MUC4 is transcriptionally regulated by caudal-related homeobox, hepatocyte nuclear factors, forkhead box A, and GATA endodermal transcription factors in epithelial cancer cells [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282 (31): 22638-22650.
 - [9] Loffler K A, Zarkower D, Koopman P. Etiology of ovarian failure in blepharophimosis ptosis epicanthus inversus syndrome: *FOXL2* is a conserved, early-acting gene in vertebrate ovarian development [J]. *Endocrinology*, 2003, 144(7): 3237-3243.
 - [10] Uhlenhaut N H, Treier M. *FOXL2* function in ovarian development [J]. *Mol Genet Metab*, 2006; 88(3): 225-234.
 - [11] Takasawa K, Kashimada K, Pelosi E, et al. *FOXL2* transcriptionally represses *Sf1* expression by antagonizing *WT1* during ovarian development in mice [J]. *The FASEB Journal*, 2014, 28(5): 2020-2028.
 - [12] Yang W H, Gutierrez N M. Antagonistic regulation of *StAR* gene expression and synergistic regulation of *Mc2R* gene expression by *FOXL2* and *SF-1* [J]. *Biol Reprod*, 2009, 81: 343.
 - [13] Eozenou C, Carvalho A V, Forde N, et al. *FOXL2* is regulated during the bovine estrous cycle and its expression in the endometrium is independent of conceptus-derived interferon tau [J]. *Biology of Reproduction*, 2012, 87(2): 32.
 - [14] Govoroun M S, Pannetier M, Pailhoux E, et al. Isolation of chicken homolog of the *FOXL2* gene and comparison of its expression patterns with those of aromatase during ovarian development [J]. *Developmental Dynamics*, 2004, 231(4): 859-870.
 - [15] Burrowes O J, Diamond G, Lee T C. Recombinant expression of pleurocidin cDNA using the *Pichia pastoris* expression system [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2005(4): 374-384.
 - [16] 李 青, 周晓宏. 新型生物防腐剂-多聚阳离子抗菌肽在毕赤酵母中的表达 [J]. *食品科学*, 2012(3): 1-8.
 - Li Q, Zhou X H. New biological preservatives-polymer cationic antimicrobial peptide in *Pichia* expression [J]. *Food Science*, 2012(3): 1-8.

(上接第 9 页)

- [24] Nei M, Roychoudhury A K. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance [J]. *Genetics*, 1974, 76(2): 379-390.
- [25] Carling D. AMPK [J]. *Curr Biol*, 2004, 14(6): R220.
- [26] Lavner Y, Kotlar D. Codon bias as a factor in regulating expression via translation rate in the human genome [J]. *Gene*, 2005, 345(1): 127-138.
- [27] Chamary J V, Hurst L D. Evidence for selection on synonymous mutations affecting stability of mRNA secondary structure in mammals [J]. *Genome Biology*, 2005, 6(9): R75. 1-R75. 12.
- [28] Eskesen S T, Eskesen F N, Ruvinsky A. Natural selection affects frequencies of AG and GT dinucleotides at the 5' and 3' ends of exons [J]. *Genetics*, 2004, 167(1): 543-550.
- [29] Purvis I J, Bettany A J E, Santiago T C, et al. The efficiency of folding of some proteins is increased by controlled rates of translation *in vivo*: a hypothesis [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1987, 193(2): 413-417.
- [30] Zhang Q, Zhao S, Chen H, et al. SNP discovery and haplotype analysis in the bovine *PRKAA2* gene [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38: 1551-1556.
- [31] Lin L, Flisikowski K, Schwarzenbacher H, et al. Characterization of the porcine AMPK alpha 2 catalytic subunit gene (*PRKAA2*): genomic structure, polymorphism detection and association study [J]. *Anim Genet*, 2010, 41: 203-207.