

鸡 pATGL 基因的电子克隆及比较基因组分析

聂庆华, 方梅霞, 李伟民, 谢 亮, 张细权

(华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要:利用生物信息学和比较基因组学方法对鸡 pATGL(predicted adipose triglyceride lipase) 基因的结构、表达和功能进行了分析,结果表明:(1)电子克隆获得的鸡 pATGL 基因 cDNA 全长 1 788 bp,包括 1 452 bp 的编码区和 5'UTR (70 bp)、3'UTR(266 bp),编码合成 483 个氨基酸的多肽;(2)鸡 pATGL 基因全长在 30 kb 以上,包含 9 个外显子和 8 个内含子,其中内含子 1(约 20 kb)远远长于其他区域;(3)鸡 pATGL 蛋白的相对分子质量为 53 600,不含信号肽,具有 GX SXG(氨基乙酸-X-丝氨酸-X-氨基乙酸)脂肪酶活性结构和 Patatin 结构域,可能存在 5 个 N 端朝内的跨膜螺旋结构;(4)基于 cDNA 及 EST 数据库的检索显示,鸡 pATGL 基因在腹脂、胸腺、黏液囊、脾、骨髓、垂体、下丘脑和松果腺、心脏、软骨组织、小脑、卵巢乃至胚胎等组织中表达;(5)鸡 pATGL 基因与 *CD151*、*RPLP2* 位于 5 号染色体的紧密连锁群,这种连锁关系与人、小鼠以及狗紧密一致。

关键词:鸡; ATGL 基因; pATGL 基因; 比较基因组

中图分类号:S831.2

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2008)02-0094-05

Electronic Cloning and Comparative Analysis of the Chicken pATGL Gene

NIE Qing-hua, FANG Mei-xia, LI Wei-min, XIE Liang, ZHANG Xi-quan

(College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Using bioinformatic and comparative genomic methods, the structure, expression and function of the chicken pATGL (predicted adipose triglyceride lipase) gene was analyzed in this study. Results showed that: (1) The obtained pATGL gene cDNA by electronic cloning was 1 788 bp long and contained 70 bp of 5'UTR, 266 bp of 3'UTR as well as 1 452 bp of open reading frame that encoded a 483 amino acid peptide. (2) The chicken pATGL gene was 30 kb in full length and comprised 9 exons and 8 introns, in which intron 1 (20 kb) was far longer than others. (3) Bioinformatic analysis showed that chicken pATGL, with the relative molecular mass of 53 600, had a "GX SXG" (Glycine-X-Serine-X-Glycine) lipase-containing box, a patatin-like region and five possible transmembrane helix structure, however no signal peptide was found. (4) Based on cDNA and EST library, the chicken pATGL gene was expressed in abdominal fat pad, thymus, bursa, spleen, PBL, bone marrow, embryo, head, pituitary gland, hypothalamus, pineal gland, heart, growth plate cartilage, brain and ovary. (5) The close linkage of pATGL gene with *CD151* and *RPLP2* was observed in chicken, which was conserved in other species, such as human, mouse and dog.

Key words: chicken; ATGL gene; pATGL gene; comparative genomic

动物脂肪的主要存在形式是甘油三酯,甘油三酯在激素敏感脂肪酶(hormone sensitive lipase, HSL)的作用下逐级分解为甘油二酯、单酰甘油酯,并最终分解为甘油和游离脂肪酸, HSL 也因此被认为是脂

肪分解的唯一关键酶^[1]. 此后以 *HSL* 基因敲除小鼠为模型的研究表明有其他基因参与动物甘油三酯的水解^[2]. 2004 年 Zimmermann 等^[3]报道了人和小鼠的脂肪甘油三酯脂酶(adipose triglyceride lipase, AT-

收稿日期:2007-08-30

作者简介:聂庆华(1975—),男,副教授,博士; 通讯作者:张细权(1963—),男,教授,博士, E-mail: xqzhang@scau.edu.cn

基金项目:“863”计划项目(2006AA10A120);国家自然科学基金(30600429)

GL)基因,它们分别编码 504 和 486 个氨基酸的多肽,这 2 种多肽均具有 GX SXG (氨基乙酸-X-丝氨酸-X-氨基乙酸)结构和中间一个与活性相关的丝氨酸位点,N 端含有一个 α/β 折叠区域(COG1752)和一个 Patatin 结构域(Pfam01734),这些结构被认为是与脂肪水解酶活性密切相关的保守性区域;试验进一步证实 ATGL 在甘油三酯的第一步分解中发挥生物学作用,是除 HSL 之外第 2 个被发现的脂肪水解酶;人和小鼠的 ATGL 基因腹脂中高量表达,在睾丸、心肌和骨骼肌中表达量稍低。Smirnova 等^[4]发现 ATGL 在非脂肪细胞中依然发挥作用,ATGL 基因高量表达时会导致脂滴明显减小,利用 RNA 干涉(RNAi)技术抑制 ATGL 基因表达时,则会引起体内脂滴体积显著增大,说明 ATGL 在哺乳动物脂滴降解过程中发挥重要作用。

迄今为止,有关 ATGL 基因的研究主要集中于人和模式动物小鼠,针对其他动物 ATGL 基因的研究极为欠缺。杨红文^[5]对猪 ATGL 基因开展研究,利用半定量 RT-PCR 分析方法研究该基因的组织表达规律。本文通过生物信息学和比较基因组学方法,对鸡的 ATGL 基因开展研究,证实该基因的存在,并初步揭示该基因的结构、表达和生物学功能。

1 材料与方法

1.1 蛋白质及 cDNA 序列获取

从 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中获取人等 9 个动物种 ATGL 基因的蛋白质序列及其相应 cDNA 编码序列,具体做法如下:(1)先在 NCBI 蛋白质数据库中查询人 ATGL 蛋白质序列,利用 NCBI 上的蛋白质 BLAST 分析,得到众多相似序列;(2)从中挑选所需要的目的序列,这些目的序列必须为完整的蛋白质序列,当同一物种有多条序列时,只取同源性最高的那条;(3)将获得的不同动物 ATGL 蛋白质序列以 FASTA 格式保存为文本文件;(4)从蛋白质序列的链接得到 cDNA 序列,包含起始密码子的第 1 个碱基到终止密码子的最后 1 个碱基,同样以 FASTA 格式保存;(5)所获得的蛋白质及 cDNA 序列用于下一步分析,它们分别为人的 ATGL(蛋白质序列号为 AAW81962;cDNA 序列号为 AY894804)、小鼠的 ATGL(AAW81963;AY894805)、大鼠的“similar to transport-secretion protein”(XP_341961;XM_341960)、牛的“hypothetical protein LOC508493”(NP_001039470;NM_001046005)、狗的“similar to patatin-like phospholipase domain containing 2”(XP_854164;XM_849071)、鸡的“hypothetical protein”(XP_428618;XM_428618)、爪蟾的“MGC86401 protein”(AAH79804;BC079804)和斑马鱼的“hypo-

thetical protein LOC436610”(NP_001002338;NM_001002338)。

可见,在所获得的高同源序列中,除了人和小鼠已经明确命名为 ATGL 基因外,其他 6 个动物种均为假定蛋白质,在本文中初步称其为“预测 ATGL(predicted ATGL,pATGL)”基因。

1.2 鸡 pATGL 基因 cDNA 的电子延伸及基因组结构分析

基于 NCBI 网站,利用鸡 pATGL 基因 cDNA 编码区序列对鸡 EST 文库进行 BLAST 分析,分别向 5' 和 3' 端延伸,以尽可能获得全长 cDNA,并对其阅读框进行分析。BLAST 分析获得众多高度同源(重叠区的同源性在 95% 以上)的 *Gallus gallus* cDNA clone,主要包括 603667911F1 (NCBI 序列号:BU414017)、pgn1c. pk001. f21 (BG625047)、604158047F1 (BU201217)、603489402F1 (BU325805)、nax44h11. y1 (DR431540)、pgp2n. pk005. i20 (BM491148)、603540005F1 (BU308698)、603233522F1 (BU427065)。利用 DNASTar(www.dnastar.com/)的 MegAlign 程序分析鸡 pATGL 编码区碱基序列及氨基酸序列与人和小鼠的同源性(percentage of identities)。

利用 Chicken BLAT Search 网站(<http://mgc.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>),输入鸡 pATGL 基因全长 cDNA 序列,对 2006 年更新的鸡完整基因组进行 BLAST 分析,获取鸡 pATGL 基因全序列,确定其基因组结构、功能区域划分情况及 5'UTR、3'UTR 及各外显子和内含子的大小。

1.3 8 个动物种 ATGL 或 pATGL 基因的系统进化分析

利用 MEGA3.1 程序对不同动物 ATGL 或 pATGL 的蛋白质序列进行 BLAST 分析,初步计算各序列之间的同源性。同时,根据蛋白质序列 BLAST 分析结果,再运行各动物种 cDNA 序列的 BLAST 分析,以保证在 BLAST 过程中 cDNA 的各密码子 3 个碱基不被打散,及插入、缺失的碱基均为 3 的整数倍。根据 cDNA 的 BLAST 结果,利用 MEGA3.1 程序计算物种间的遗传距离,并通过邻近归并法(neighbor-joining)构建种间系统发生树。

1.4 鸡 pATGL 蛋白质结构及功能预测

利用位于 ExPASy 的 ProtScale 程序(<http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>)和生物信息学网站(http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)分别分析鸡 pATGL 蛋白质的疏水性图谱并预测其跨膜区结构;利用信号肽预测网站(<http://genome.cbs.dtu.dk/services/signalP-2.0>)分析鸡 pATGL 基因可能的信号肽结构;将 pATGL 基因编码的蛋白质序列

输入 NCBI/BLAST 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 的序列输入框内,选择“BLASTP”程序分析 pATGL 的蛋白质功能属性;基于 EBI 开发的 Inter-ProScan 数据库 (www.ebi.ac.uk/interpro/scan.html) 和 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/> 生物学网站分析 pATGL 的结构域和高级结构。

1.5 鸡 pATGL 基因的组织表达规律

进入 NCBI 的 BLAST 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>),选择鸡 EST 文库进行 BLAST 分析,基于前人研究结果,综合分析 pATGL 基因在鸡不同组织中的表达规律。

1.6 鸡 pATGL 基因的染色体定位及连锁群分析

基于 Chicken BLAT Search 网站的 BLAST 结果及 NCBI 上公布的鸡全基因组物理图谱,进行鸡 pATGL 基因的染色体定位,分析其前后紧密连

锁的基因。与鸡一样,人、小鼠和狗的全基因组测序已经完成,全基因组物理图谱也可获得,本文同时对它们的 ATGL 或 pATGL 基因进行染色体定位和基因连锁群分析,并与鸡的结果进行比较。

2 结果与分析

2.1 鸡 pATGL 基因全长 cDNA 序列及阅读框分析

基于鸡 EST 文库的电子延伸得到全长 1 788 bp 的 pATGL 基因 cDNA 序列,包括 70 bp 的 5' UTR,266 bp 的 3'UTR 区域和 1 452 bp 的编码区,该 cDNA 编码合成由 483 个氨基酸组成的多肽链,即 pATGL(图 1)。该编码区的 cDNA 序列(CDS)与人和小鼠的同源性分别为 61.0% 和 62.5%,编码合成的鸡 pATGL 与人和小鼠的同源性分别为 65.4% 和 66.7%。

CGACCCGCCCGCTGACGGGCGGTGGGATGTGACGGGGCCCTCCGGCGTCCCCCGCCTCTGCGTAGGCCatgttccctttggactccgct
M F P L D S A
tggaacatctccttcgcccgtcgggcttcttaggggtctaccacatcggcgtggccagctgtctccaggagcatgctcctttcctcgctc
W N I S F A G C G F L G V Y H I G V A S C L Q E H A P F L V
gccaacgcccgaaggtgtacggggcctcggccggcgcgctcaccgccaccgcccctcgtcacggcgccctgctcggtgaggtgtgccc
A N A R K V Y G A S A G A L T A T A L V S G A C L G E A G A
agcattattcagagtgtccaagaagcacgaagaggttctcctgggtccgcttccacccctctttcaacttggtagaatcattcggctcgtgc
S I I R V S K E A R K R F L G P L H P S F N L V K I I R L C
ctgtccaagactgtgccagagaatgggcatgaggtggcagcaggacgtttgggtatttccctcacacgagtgctgtgatggagaaaacgtc
L S K T V P E N G H E V A A G R L G I S L T R V S D G E N V
atactatcagacttccattccaaggaggagctgatccaggcctgtgtctgcagcacctttatccctgtctactgtgggctgatacctcca
I L S D F H S K E E L I Q A C V C S T F I P V Y C G L I P P
actttgctgtgagtgatgatgtgatggagaaatttctgacaacttgcacgatatgagctgaagaacacaatcacgggtgtctccgttc
T L R G V R Y V D G G I S D N L P R Y E L K N T I T V S P F
tcaggagagagtgtatctgcccacgagacagttccacaacatgcatgagctgagagtcaccaatacaagcatccaattcaaccttcgc
S G E S D I C P R D S S T N M H E L R V T N T S I Q F N L R
aacctctaccgctctcacaaggccctctttctccagagccacaggtgctcgggatgtgcaagcagggtatcggggatcgctgcac
N L Y R L S K A L F P P E P Q V L R D M C K Q G Y R D A L H
ttcctgaagaagaatggtctccttcaccttcagcgtccaatcctgctgtgctccttgcataagaagccctccaggagagaagaaa
F L K K N G L L H L Q R P N P A G P L L A I E A P P G E K K
gaggaagaaaaagaagctgaggaccagatggaggacaacactgoccttgcagttgtggaagaccacatcttgaacacttgcctccaaa
E E E K E A E D Q M E D N T A L A V V E D H I F E H L P P K
ctgaaccaagctcttttgaggcatgtgtcgaagaagaggtctcttgagtggtatttagcaacacgctgcctatacgtgtgcccactgcc
L N Q A C A L L E A C A E R G G L L S G I S N T L P I R V A T A
atggtgtcccttacctgctcctctgagctgtgtgttcttctcactgtcagattgttggaatgttccagatatccctgaggatatt
M M V P Y L L P L E S A V S F T V R L L E W L P D I P E D I
agatggatgaggagcagataattgaaatctgcaactatctgtgaagaagccaagaagaactgggcagtcattttcagccaggcctt
R W M R E Q I I E I C N Y L V K K A K K K L G S H L S A R L
tactatcacctcgagcttggaggggcccgagagcctgccaatttcttcagcatctccttgtggcgaggcaatgcctatgttgatgagaagc
Y Y H L E L G G P Q S L P I S S A S P C G E A M P M W M R S
aacgcttccctgtctgatgtcatgtgaagtgggaggagtaccagcgtcagcttgtgatggccttgccttgcacacgtggacatgcag
N R S L S D V M L K W E E Y Q R Q L V M G L L C I N V D M Q
gcacccctctccttgggaagatttcagatgaaacttccacctgtgactgtgcaaaagagtgccctgccactcttctgaGCCTGCTG
A S L F P W E E G F Q M K L P P L D C A K E C L P L F .
TGCTGGGGGACGGGATGGGTGGGAAGGGGAACAGATACAGAGTGAGACCAGTCTCAATCCCTTGGCAGCAGGCTGCCCTGTGCTGGTG
AATATGCTGCAAAGGGGACTTCCCCAGGATGCAGACTGGTGAATCGTCTGTAGCCATTGGTTGCCCACTGGGCTGGATAAGTAATCTG
TGTTAAGGCACAGAGGTTGATCCCTTACTCTAGTCTTGTGTGGAGGCTTGGCATGGCCCTAGCCATGCTGATGTGACC

小写碱基为密码子序列,大写碱基为两端 UTR 区域;密码子下端大写字母为氨基酸序列,其中方框中的 5 个氨基酸(GASAG)为脂肪酶的特征结构之一,即 GXSEX(氨基乙酸-X-丝氨酸-X-氨基乙酸)模块

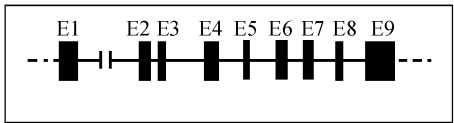
Small nucleotides are coding sequences, and capital nucleotides are 5'UTR and 3'UTR sequences. Capital characters under each codon indicate corresponded amino acids. GASAG in box is specific region of lipase (Glycine-X-Serine-X-Glycine)

图 1 鸡 pATGL 基因的 cDNA 全序列

Fig. 1 Complete cDNA sequence of the chicken pATGL gene

2.2 鸡 pATGL 基因的基因组结构

根据鸡全基因组序列的比对显示,鸡 pATGL 基因 cDNA 序列与 5 号染色体反向链 DNA 序列的 16868631 ~ 16838221 区域高度一致,1 788 bp 的序列中仅有 10 个碱基存在差异,并且均存在于非编码区,即 5'UTR(1 个)和 3'UTR(9 个). BLAST 结果进一步说明鸡 pATGL 基因全长在 30 kb 以上(30 461 bp),包含 9 个外显子和 8 个内含子,外显子 1 ~ 9 长度分别为 257、233、66、210、61、174、133、123、534 bp,内含子 1 ~ 8 长度分别为 21 146、171、3 755、848、886、423、730、710 bp(图 2). 此外,每个内含子起始 - 终止均符合 GT-AG 规则,在内含子 1 中,尚有 2 处 gap 区域,其长度分别为 829 bp 和 1 313 bp(以 n 表示未知碱基).



E1 ~ E9 表示外显子 1 ~ 外显子 9
E1 - E9 indicate exon 1 - exon 9, respectively

图 2 鸡 pATGL 基因组结构

Fig. 2 Genomic structure of the chicken pATGL gene

2.3 动物种间 ATGL 或 pATGL 基因的同源性

基于蛋白质序列的 BLAST 分析得到不同物种间的同源性,其中 5 个哺乳动物种(人、小鼠、大鼠、牛、狗)之间的同源性较高,除了人和牛的同源性为 84.2%,其他均高于 85%,小鼠和大鼠间的同源性更是高达 97.7%;鸡作为家禽的代表物种,与以上 5 个哺乳动物种间的同源性也在 65% 以上;两栖动物非洲爪蟾和斑马鱼之间的同源性仅为 52%,而它们与其他 6 个动物种的同源性均低于 50%. 总体说来,8 个动物种 ATGL 或 pATGL 在 N 端的同源性较高,在 C 端的同源性较低.

聚类分析显示,8 个动物种被划分为界线清晰的 3 个类群,5 个哺乳动物种(人、小鼠、大鼠、牛、狗)紧密聚合为一类,非洲爪蟾和斑马鱼关系相近,为另一类,鸡介于它们之间,与以上 2 个类群均关系较远,自成一类(图 3).

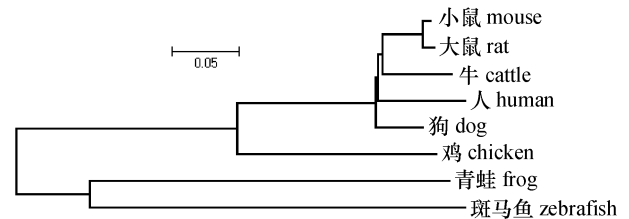


图 3 8 个动物种的系统进化树形图

Fig. 3 Phylogenetic tree constructed with 8 animal species

2.4 鸡 pATGL 的蛋白质信息分析

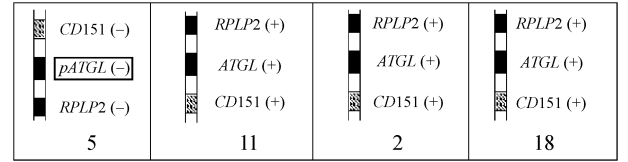
基于生物信息学的软件分析结果显示,pATGL 蛋白质相对分子质量为 53 600,不含信号肽,因此可能是个非分泌性的蛋白. 同鼠和人的 ATGL 蛋白一样,在鸡 ATGL 蛋白的相同部位都含有一个被推断有脂肪酶活性的 GX SXG(氨基乙酸-X-丝氨酸-X-氨基乙酸)结构和一个已知的 α/β 水解酶折叠(图 1); N 端含有一个令人瞩目的 Patatin 结构域(Pfam01734),这些结构域被认为与 ATP 作用有关,并且对磷脂、单酰甘油酯、甘油二酯底物具有不依赖酰基辅酶 A 的转酰基活性. NCBI 的 BLASTP 分析显示,鸡 pATGL 属于“类 patatin 磷脂酶”蛋白质家族(patatin-like phospholipase family),与人 ATGL 的蛋白质分类一致. 疏水性图谱和跨膜区预测显示 pATGL 蛋白可能存在 5 个 N 端朝内的跨膜螺旋结构.

2.5 鸡 pATGL 基因的组织表达规律

基于 NCBI 的鸡的 EST 文库,通过 BLAST 分析,发现鸡 pATGL 基因分别在腹脂(克隆子编号: BU414017)、胸腺、黏液囊、脾、骨髓(BG625047)、15 d 胚胎的眼组织及其他胚胎部位(BU201217; DR431540)、头部(BU325805)、垂体、下丘脑和松果腺(BM491148)、心脏(BU308698)、软骨组织(BU427065)、小脑(BU344754)、卵巢(BU447571)等组织中表达.

2.6 鸡 pATGL 基因的染色体定位及比较分析

鸡 pATGL 基因位于 5 号染色体,其前后紧密连锁的基因座分别为 CD151(CD151 antigen, raph blood group)和 RPLP2(ribosomal protein, large, P2),该 3 个基因均位于染色体的反向链上;人、小鼠和狗的 ATGL 基因分别位于 11、7 和 18 号染色体,其前后紧密连锁的基因也分别为 RPLP2 和 CD151,这些基因均位于染色体的正向链上(图 4).



CD151、RPLP2 分别表示 CD151 antigen (Raph blood group) 和 ribosomal protein LP2 (large, P2) 2 个基因座;“+”、“-”分别指示染色体的正向链和反向链;5、11、7 和 18 分别为鸡、人、小鼠和狗的染色体号

CD151 and RPLP2 indicate two loci of CD151 antigen (Raph blood group) and ribosomal protein LP2 (large, P2) gene each; “+” and “-” show positive and negative chromosomal strand each; 5, 11, 7 and 18 are the 5th, 11th, 7th and 18th chromosome of chicken, human, mouse and dog, respectively

图 4 鸡、人、小鼠和狗 ATGL 基因的染色体连锁群

Fig. 4 Chromosomal linkage group containing ATGL gene in chicken, human, mouse and dog

3 讨论与结论

本文利用生物信息学分析方法获得了鸡 pATGL 基因的 cDNA 序列,并对该基因的基因组结构、组织表达规律、生物学功能及染色体定位进行了比较基因组学分析,最终预测所获得的基因即为鸡 ATGL 基因. 首先,所获得的鸡 pATGL 基因的 cDNA 序列与人和小鼠的同源性分别为 61.0% 和 62.5%,编码合成的 pATGL 与人和小鼠的同源性分别为 65.4% 和 66.7%,该结果与其他已知脂肪酶编码基因(如 HSL)在 3 个物种间的同源性比较接近^[6];基于 ATGL 氨基酸序列获得的 8 个动物种的系统进化树也与 4 类动物(哺乳动物、家禽类或鸟类、爬行动物、鱼类)的分类学及人类对于动物进化的认识非常一致^[7-8]. 其次,本文研究结果显示鸡 pATGL 基因结构与人的接近一致,人 ATGL 基因也包含 9 个外显子和 8 个内含子,其中内含子 1 也远远长于其他内含子(<http://mgc.ucsc.edu/cgi-bin> 网站的比对结果). 第 3,生物信息学分析表明 pATGL 具备潜在的脂肪酶活性,其高级结构、理化性质及基因的组织性表达规律与已知的人和小鼠的 ATGL 一致. 第 4,鸡与人、小鼠和狗具有包含 ATGL 基因的相同连锁群,同样证实鸡 pATGL 基因的保守性,至于它们位于不同的染色体上则是由于早期的染色体分化形成. 因此,基于以上分析可以初步证实“Hypothetical protein”(蛋白质序列号 XP_428618;基因序列号 XM_428618)为所需要的鸡 ATGL 序列. 此外,基于本文的分析结果,利用 RT-PCR 和 RACE 技术,本课题组对鸡 pATGL 基因进行了试验验证,在鸡腹脂组织中成功获得该基因 cDNA 全序列,并递交 GenBank 收录(序列

号 EU240627),目前课题组正在进行该基因的组织表达谱分析、多态性检测和遗传效应分析.

参考文献:

- [1] 张立杰,陈粉粉,杨公社. 启动脂肪细胞脂动员过程的新成员 ATGL [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2007,23(1): 14-19.
- [2] HAEMMERLE G, ZIMMERMANN R, STRAUSS J G, et al. Hormone sensitive lipase deficiency in mice changes the plasma lipid profile by affecting the tissue specific expression pattern of lipoprotein lipase in adipose tissue and muscle [J]. J Biol Chem, 2002, 277(15): 12946-12952.
- [3] ZIMMERMANN R, STRAUSS J G, HAEMMERLE G, et al. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase [J]. Science, 2004, 306(5700): 1383-1386.
- [4] SMIRNOVA E, GOLDBERG E B, MAKAROVA K S, et al. ATGL has a key role in lipid droplet/adiposome degradation in mammalian cells [J]. EMBO Rep, 2006, 7(1): 106-113.
- [5] 杨红文. 猪前脂肪细胞的分离培养与鉴定及猪 SMAF1, ATGL 基因的组织表达规律[D]. 武汉:华中农业大学动物科技学院,2006.
- [6] COOPER D A, STEIN J C, STRIELEMAN P J, et al. Avian adipose lipoprotein lipase: cDNA sequence and reciprocal regulation of mRNA levels in adipose and heart [J]. Biochim Biophys Acta, 1989, 1008(1): 92-101.
- [7] CICCARELLI F D, DOERKS T, VON MERING C, et al. Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life [J]. Science, 2006, 311: 1283-1287.
- [8] KIMURA M. The Neutral Theory of Molecular Evolution [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1983.

【责任编辑 柴 焰】

(上接第 93 页)

- [2] CLAAS E C, OSTERHAUS A D, VAN BEEK R, et al. Human influenza H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus [J]. Lancet, 1998, 35(1): 472-477.
- [3] 王振国,金宁一,马鸣潇,等. 禽流感病毒核蛋白基因的克隆及在大肠杆菌中的表达 [J]. 中国生物制品学杂志, 2004, 17(5): 264-267.
- [4] 多海刚,赵铁柱,田克恭,等. 禽流感病毒 H7N2 血凝素 HA1 基因在大肠杆菌中的表达 [J]. 中国实验动物学报, 2005, 13(3): 7-10.
- [5] 陈全姣,金梅林,陈焕春,等. 禽流感病毒 HA 部分基因的克隆及其表达 [J]. 中国病毒学, 2005, 20(1): 87-88.
- [6] 张瑞华,金梅林,陈焕春,等. 禽流感血凝素基因的原核表达及其在 H9 亚型诊断中的应用 [J]. 生物工程学报, 2005, 21(2): 315-319.
- [7] 郑其升,张晓勇,陈溥言,等. H5N1 亚型禽流感病毒血凝素基因的原核表达及间接 ELISA 方法的初步建立 [J]. 微生物学报, 2005, 45(2): 58-61.
- [8] ALAN R D, DEBI P N, MASAHIRO U, et al. Expression of

antigenic determinants of the hemagglutinin in gene of a human influenza virus in *Escherichia coli* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 78(9): 5376-5380.

- [9] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 2 版. 金冬燕, 黎孟枫, 等译. 北京: 科学出版社, 1998: 46-162.
- [10] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术 [M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999: 34-182.
- [11] 谢海燕, 郭霄峰. 猪 α -干扰素的原核表达 [J]. 华南农业大学学报, 2004, 25(4): 86-88.
- [12] 陈祖欢, 张洪英, 郭瀛军, 等. 口蹄疫病毒融合表位基因在 pET 原核系统的高表达及产物的纯化 [J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(8): 904-905.
- [13] 康彬, 童哲. 一种利于蛋白质回收的快速 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳染色-脱色方法 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(2): 210-211.

【责任编辑 柴 焰】