

应用荧光定量 PCR 方法研究 *RPL29* 基因在通城猪和长白猪不同时期胚胎骨骼肌中的表达

唐中林, 邓宏, 李勇, 张兴举, 杨述林, 牟玉莲, 储明星, 马月辉, 李奎*

(中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

摘要: 为了研究蛋白合成相关基因 *RPL29* 在骨骼肌发育中的作用, 采用 SYBR Green 染料建立该基因的实时荧光定量 PCR(QPCR)分析方法, 并分析该基因在猪胚胎骨骼肌中的表达变化。以不同浓度稀释样本为标准品, 建立标准曲线方程: $Y = -3.303X + 43.077$ (决定系数 $R^2 = 0.999$)。分析表明: 该方法具有较大的检验范围 (PCR 扩增 C_t 值 13~35), 很好的扩增效率为 100%, 熔解曲线显示产物特异的单峰, 其 T_m 值为 86.5 °C。本研究以 *H3F3A* 基因为内参, 用所建立的实时定量 PCR 方法, 分析 *RPL29* 在妊娠 33、65 和 90 d 的通城猪和长白猪胚胎骨骼肌中的表达变化。研究发现: *RPL29* 基因在通城猪和长白猪胚胎骨骼肌发育过程中分别呈现下调和上调表达模式; 妊娠 33 d 时, 通城猪中的表达水平高于长白, 而妊娠 90 d 时在长白猪中高表达; 妊娠 65 d 时两品种间无显著差异。结果显示 *RPL29* 基因可能与猪骨骼肌的生长发育有关, 并可能影响产肉性状。

关键词: 猪; *RPL29* 基因; 荧光定量 PCR; 骨骼肌; 表达分析

中图分类号: S828.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)08-1007-06

Expression Analysis of *RPL29* Gene in Embryo Skeletal Muscle at Different Stages from Tongcheng and Landrace Pigs Using Real-time PCR Method

TANG Zhong-lin, DENG Hong, LI Yong, ZHANG Xing-ju, YANG Shu-lin,
MU Yu-lian, CHU Ming-xing, MA Yue-hui, LI Kui*

(Institute of Animal Science, Chinese Academy of
Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: In order to investigate effect of *RPL29* gene associated with protein synthesis on skeletal muscle development, the SYBR-Green quantitative real-time PCR (QPCR) method was established to analyze *RPL29* gene. The expression change of *RPL29* gene was analyzed in pig embryo skeletal muscle using the QPCR method. Based on standard samples with different concentrations, the standard curve " $Y = -3.303X + 43.077$ (determination coefficient, $R^2 = 0.999$)" was established. The results indicated the method had large test extension (C_t arranged from 13 to 35 cycle number), high amplification efficiency (100%) and single peak with unique PCR product in the melt curve. The T_m value was 86.5 °C. In this study, the *H3F3A* gene was used for internal control, the expression change of *RPL29* gene was analyzed in embryo skeletal muscle at 33, 65 and 90 days post coitus (dpc) from Tongcheng and Landrace using the QPCR method. We found that *RPL29* exhibited the down- and up-regulation pattern in Tongcheng and Landrace pigs, respectively. There was higher expression in Tongcheng than that in Landrace at 33 dpc, and opposite result between two breeds at 90 dpc. No significant difference was found between two breeds

收稿日期: 2007-08-20

基金项目: 国家 863 计划 (20060110Z1039); 国家 973 计划 (2006CB102105); 欧盟第六框架合作项目 (036245-2); 国家自然科学基金 (30571300); 国家自然资源平台项目 (2005DKA21101); 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所“家畜种质资源研究和创新”科技创新团队项目资助

作者简介: 唐中林 (1974-), 男, 湖南人, 博士后, 主要从事猪的功能基因组和生物技术研究, E-mail: zhonglinqy_99@sina.com

* 通讯作者: 李奎, 教授, 博导, 主要从事动物生物技术与育种研究, E-mail: kuili@iasscaas.net.cn

at 65 dpc. These results indicated that *RPL29* gene have potential association with skeletal muscle development and effect on meat production traits in pigs.

Key words: pigs; *RPL29* gene; real-time PCR; skeletal muscle; expression analysis

中国地方猪种与西方瘦肉型猪种在产肉性状方面存在极大差异。研究表明,出生前骨骼肌的生长发育程序性地决定着出生后性能的表现。产肉量的高低取决于肌纤维的数量和横截面积,中国地方猪种和西方瘦肉型猪种肌纤维的差异主要是数量,而不是横截面积。肌纤维的数目在出生前就已经固定^[1-2],因此出生前骨骼肌的生长发育就是产肉数量和肌肉品质的重要决定因素^[3]。基于此,为了揭示中国地方猪和西方瘦肉型猪产肉性状差异的分子遗传基础,Tang 等^[4]用长标签基因表达系列分析法(Long serial analysis of gene expression, Long-SAGE)对通城猪和长白猪胚胎骨骼肌进行比较转录谱研究。研究发现,蛋白质合成相关的核糖体基因在两品种间差异表达,*RPL29* 基因即属其中之一。*RPL29* 基因编码的蛋白是构成核糖体大亚基 S60 的一个成员。为了进一步研究 *RPL29* 基因在猪胚胎骨骼肌中的表达变化以及其在品种间的表达差异,本研究建立 *RPL29* 基因的实时荧光定量 PCR 方法,并用其分析该基因在通城猪(Tongcheng,简称 T)和长白猪(Landrace,简称 L)不同发育时期(妊娠 33、65 和 90 d)胚胎骨骼肌中的表达规律,以便进一步研究其与猪骨骼肌生长发育和产肉性状的关系。

1 材料与方 法

1.1 试验动物与样品采集

选取通城和长白母猪各 9 头,并用相应品种的公猪配种,分别于妊娠 33、65 和 90 d 屠宰(每个时期 3 头母猪),取出子宫收集所有胚胎,迅速采集胚胎骨骼肌样放于 DEPC 水处理的 1.5 mL EP 管中,并立即投入液氮中冷冻,随后保存于-80 °C 冰箱备用。

1.2 主要仪器与试剂

PTC-225 Peltier Thermal cycler PCR 仪(MJ Research 公司)、iCyclerIQ™ 荧光定量 PCR 仪器(Bio-Rad,美国)。

Ribolock™ Ribonuclease Inhibitor、RevertAid™ MMLV Reverse Transcriptase、RT 反应试剂盒(Fermentans 公司)、RevertAid™ First strand cDNA Synthesisei Kit、TaKaRa *Taq*、SYBR Premix

Ex *Taq*、Real-time PCR 试剂盒(TOYOBO 公司)。

1.3 RNA 提取

胚胎骨骼肌组织样匀浆后,用 Trizol 试剂盒提取各时期骨骼肌的总 RNA。具体操作步骤如下:(1)称取组织 0.1 g 放入装有 1 mL Trizol 的 10 mL 离心管中,在冰浴条件下匀浆组织至完全呈粉末状,然后转移至 1.5 mL 离心管内;(2)加入 200 μL 氯仿,用力颠倒混匀,室温静置 10 min;(3)4 °C 条件下 13 000 r/min 离心 30 min;(4)从每管中吸取上清至另一 1.5 mL 离心管中,加入等体积异丙醇,混匀后-20 °C 沉淀 1 h;(5)4 °C 条件下 13 000 r/min 离心 20 min,弃上清;(6)加入 500 μL 的 75% 乙醇,洗涤沉淀;(7)4 °C 条件下 13 000 r/min 离心 10 min,弃上清;(8)加入 10 μL 的 DEPC 处理水至完全溶解。并用分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度,凝胶电泳检测 RNA 的完整性。符合要求的 RNA 样品保存于-80 °C 冰箱备用。

1.4 反转录合成 cDNA

利用 RevertAid™ First strand cDNA Synthese Kit(Fermentans 公司)试剂盒进行反转录得到第一链 cDNA。具体步骤:首先取总 RNA 约 4 μg 加入到 0.2 mL 的 PCR 管中,加入 Oligo(dt) 1 μL 用 DEPC 水补充体积至 12 μL,混匀后 70 °C 5 min 孵育,依次加入 4 μL 的 5×reaction buffer,1 μL 的 Ribolock™ Ribonuclease Inhibitor,2 μL 的 10 mmol/L dNTP mix,混匀后 37 °C 5 min。然后加入 1 μL 的 RevertAid™-MULV Reverse Transcriptase,使终体积为 20 μL。混匀后 42 °C 孵育 60 min,然后 70 °C 孵育 10 min。

1.5 PCR 引物设计和普通 PCR 扩增条件

从美国国立生物技术信息中心(NCBI)数据库下载猪的 *RPL29*(NM_213950)和 *H3F3A*(NM_213930)基因的 mRNA 序列,利用软件 primer premier 5.0 设计引物。

RPL29 正向引物:5'-GGTGCAGACATG-GCGAAG-3',反向引物:5'-CTTCTTGTTGT-GCTTCTTGGC-3'(预期产物大小为 165 bp);

H3F3A 正向引物:5'-AAGTAAGGAGG-TCTCTATAC-3',反向引物:5'-AGTGGACT-

TCTGATAACG-3'(预期产物大小为 198 bp)。

首先用普通 PCR 分析引物的特异性和反应条件。反应体系为:RT-PCR 反转录产物 1 μL , 0.13 μL TaKaRa *Taq*(5 U/ μL), 2.5 μL 10 \times PCR Buffer, 1.5 μL MgCl₂, 2 μL dNTP, 上下游引物各 0.5 μL (20 $\mu\text{mol/L}$), 加 ddH₂O 至 25 μL 。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s; 重复上一步骤, 40 个循环。

1.6 标准曲线生成

将 cDNA 样本以 10 倍浓度梯度进行稀释, 选择 1/10 000、1/100 000、1/1 000 000、1/10 000 000 浓度的稀释产物作为标准品模板, 进行荧光定量 PCR 反应, 同时在荧光定量 PCR 仪中输入以上 4 个浓度梯度的浓度数值。通过这 4 个标准品生成的反应数据, 软件 Rotor-Gene 6.0 根据反应的荧光实时监控数据和标准品的浓度关系, 生成标准曲线。通过此标准曲线来计算在标准曲线所划定的 C_t 值。

1.7 实时荧光定量 PCR 条件优化

应用 Bio-Rad 荧光定量 PCR 仪进行表达分析。每组(不同品种与不同时期)样品都使用了 6 个生物学重复(即来自 6 个不同胚胎的骨骼肌), 每个生物学样品都至少进行 6 次重复试验。以 *H3F3A* 基因作为内参^[4], 检测 *RPL29* 在通城猪和长白猪不同发育时期胚胎骨骼肌中的表达。PCR 反应选用大连宝生物(TakaRa)公司的 DR001AM 试剂盒, PCR 反应体系:取 RT 产物 1 μL , 10.0 μL SYBR Premix Ex *Taq*, 上游和下游引物各 0.2 μL , 8.6 μL ddH₂O。PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 7 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s, 45 个循环。

1.8 数据统计分析

反应结束后, 由溶解曲线判断 PCR 反应的特异性, 根据荧光曲线的 C_t 值以及标准曲线计算定量结果。所得结果利用 IQ5 软件和 EXCEL7.0 进行分析。

相对定量分析之计算公式:

$$\begin{aligned} \text{Rel. Quantity} &= \frac{GOI_{\text{sample}}/GOI_{\text{control}}}{\text{Norm}_{\text{sample}}/\text{Norm}_{\text{control}}} \\ &= \frac{(1 + \text{Eff})^{(C_t)_{\text{control}} - C_t_{\text{sample}}}}{(1 + \text{Eff})^{(C_t)_{\text{Norm}} - C_t_{\text{sample}}}} \end{aligned}$$

其中, Rel Quantity: 目的基因在检测样品与对照品间表达差异的倍数; GOI: 目的基因 (Gene of Interest); Norm: 内参基因 (Normalizer, House Keeping Gene); Eff: PCR 扩增效率, 分子部分为目的基因扩增效率, 分母部分为内参基因的扩增效率;

$C_{t_{\text{control}}}$ 为对照样品的 C_t 值; $C_{t_{\text{sample}}}$ 为被处理样品的 C_t 值。本研究中, 将妊娠 33 d 通城猪胚胎骨骼肌定义为对照样品, 其它为检测样品。

使用该公式时, 先通过试验分别确定目的基因与内参基因的扩增效率, 然后代入公式进行计算; 如果目的基因与内参基因的扩增效率都接近于 100% 且相差小于 5%, 也可将 PCR 扩增效率默认为 100%, 这样公式就简化为 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

2 结果

2.1 RNA 的纯度与完整性

所提取的 RNA 样本用分光光度计测定, 所有样本的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 均为 1.7~1.9, 经凝胶变性电泳鉴定, 28S、18S 条带清晰可见, 无明显降解, RNA 质量符合定量 PCR 试验要求(图略)。

2.2 荧光定量 PCR 检测的灵敏性

以梯度稀释的标准品为阳性模板进行实时荧光定量 PCR 反应得到的扩增曲线见图 1。图中反映了模板循环数与荧光强度关系, 其中横坐标代表 PCR 反应的循环数 (Cycle number), 纵坐标代表 DNA 双链与 SYBR Green 荧光染料结合后的荧光强度。图中显示不同拷贝数的检测范围较广, 循环阈值 (Cycle threshold, C_t) 范围为 13~35, 扩增前期, 曲线重合性好且未出现杂峰, 扩增曲线呈现典型的 S 型荧光定量动力学曲线, 为理想扩增曲线。结果表明: 荧光定量动力学曲线基线平整, 无引物二聚体等引起的杂峰; 指数区较明显, 斜率大且固定 (平行线); 线性范围广, 说明该实时荧光定量 PCR 检测 *RPL29* 具有较好的敏感性。

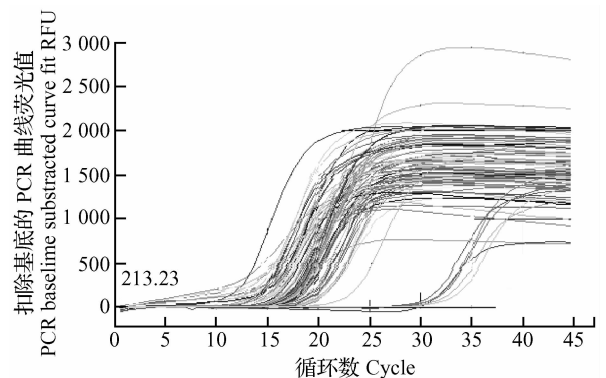


图 1 S 型荧光定量动力学曲线

Fig. 1 Real-time fluorescence quantitative amplification curve with flat baseline, distinct exponential area, large and stable slope

2.3 荧光定量 PCR 的标准曲线

系列浓度稀释的 cDNA 标准模板与 C_t 值的关系曲线见图 2。RPL29 的标准曲线方程为： $Y = -3.303X + 43.077$ ，斜率为 -3.303 ，X 轴的截距为 43.077 ，决定系数 (R^2) 为 0.999 ，扩增效率为 100% 。其中 Y 代表 C_t 值，X 代表模板量的对数值。结果显示，本试验扩增效果好，结果具有很好的可靠性。

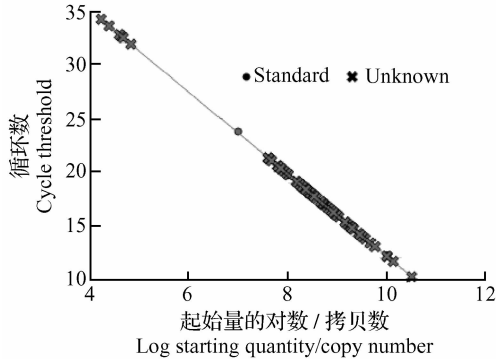


图 2 RPL29 的标准曲线

Fig. 2 Standard curves for RPL29 gene

2.4 溶解曲线与假阳性

阳性模板在实时荧光定量 PCR 反应的后期，产物经融解、冷却后得到溶解曲线，可见溶解曲线成单峰，说明扩增产物单一，与 SYBR-Green 荧光染料结合的为目标 DNA 片段，较好地避免了定量检测过程中假阳性结果的出现。溶解曲线显示，扩增产物特异性很好，荧光曲线能够准确反映目的产物的扩增结果变化(图 3)。

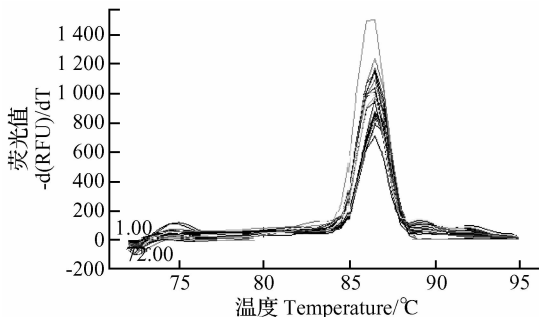


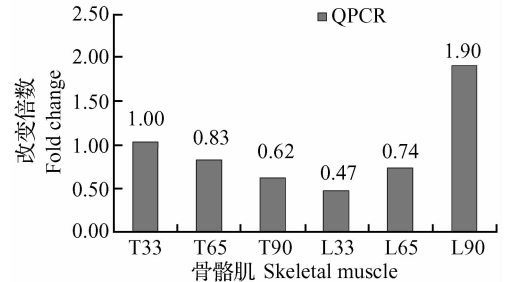
图 3 溶解曲线峰图

Fig. 3 Melt curve peak chart

2.5 RPL29 基因的表达变化

采用以上建立的 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 方法，检测 RPL29 基因在通城猪和长白猪不同妊娠阶段(33、65 和 90 d)胚胎骨骼肌中的表达变化。用 H3F3A 基因对表达水平进行均一化，并定义 RPL29 基因在妊娠 33 d 通城猪的胚胎骨骼肌中

表达水平为 1，以对该基因在其它骨骼肌样中的表达水平进行相对定量。分析结果如图 4 所示，可见 RPL29 基因在两品种胚胎骨骼肌中的表达模式截然相反。通城猪胚胎骨骼肌中的表达呈现下调表达模式，但变化较平缓；在长白猪中成上调表达模式，后期变化急剧。从品种间相同发育时间点来看，在妊娠 33 d，通城猪中的表达水平高于长白猪；妊娠 65 d 两品种间无明显差异；妊娠 90 d 时，长白猪中的表达水平为通城猪的 3.0 倍。



T 代表通城猪 (Tongcheng pigs), L 代表长白猪 (Landrace pigs); 33、65 和 90 分别反映妊娠天数 (dpc)

T indicate Tongcheng pigs, L indicate Landrace pigs; 33, 65 and 90 indicate days post coitus (dpc)

图 4 RPL29 基因在通城猪和长白猪胎儿骨骼肌中表达

Fig. 4 Expression of RPL29 gene in embryo skeletal muscle from Tongcheng and Landrace pigs

3 讨论

荧光定量 PCR 技术是 1996 年由美国 Bio-Rad 公司发明，随着该技术的不断完善和成本的降低，目前已在动物、植物、微生物和医学等生命科学领域得到非常广泛的应用。在 PCR 扩增过程中，扩增产物并不是理想状态下的指数增加，随着引物、酶等的消耗和 PCR 产物的积累，会在后期进入一个平台期，其扩增动力学曲线呈现出 S 型。传统的半定量 PCR 将其视为恒定的指数增长过程，并以扩增终产物来判断起始模板量的多少。因此，其并不能真实反映基因表达情况；荧光定量 PCR 考虑到 PCR 过程的动力学变化规律，通过应用荧光标记对 PCR 过程的产物扩增进行实时监测，并以荧光信号由本底开始进入指数增长阶段的拐点所需要的最少循环数(称为循环阈值, C_t)建立标准曲线，反映荧光信号与模板浓度对数间的线性关系^[5]。因此，相对于传统的半定量 PCR 技术而言，荧光定量 PCR 方法具有

快捷、简单、灵敏和准确等优点。定量 PCR 使用普遍的标记有 SYBR Green I 荧光染料和 Taq Man 水解探针两类,二者在原理上不同。从检测效果来看,前者易受线性扩增产物(由单侧引物延伸到底)和引物二聚体等的影响,其定量的准确性和灵敏度相对后者要低^[6]。但是能满足一般的相对定量要求,因其成本相对较低而在相对定量中被广泛应用。

在研究基因的不同组织、生理、病理或发育阶段中的表达变化,主要想了解其相对变化情况。因此,选用荧光染料 SYBR Green I 进行荧光定量 PCR 试验,在达到试验目的的前提下可以大大降低试验成本和技术难度。本研究主要目的在于了解 *RPL29* 基因在猪胚胎骨骼肌发育过程中的表达变化,并比较两品种的差异,为此建立了 *RPL29* 基因的实时荧光定量 PCR 方法。从试验的灵敏性、有效性和特异性来看,其具有灵敏度高、检测范围广(循环阈值 *Ct* 范围为 13~35)、扩增效率高达 100%、标准曲线的斜率为 -3.303,决定系数(R^2)为 0.999,溶解曲线成单峰,无非特异性扩增和二聚体等的影响,建立的标准曲线为 $Y = -3.303X + 43.077$ 。荧光定量 PCR 在理想状态下建立方程的斜率为 -3.322^[7]。可见,本研究所建立 *RPL29* 基因实时荧光定量 PCR 方法具有很好灵敏性、特异性和可靠性。

Tang 等以通城猪和长白猪为研究材料,选择出生前 3 个重要时间点(妊娠 33、65 和 90 d)的骨骼肌^[4],应用长标签基因表达系列技术比较两品种骨骼肌的转录谱,对差异表达基因进行功能类别分析,发现编码核糖体蛋白的大多数基因在两品种骨骼肌发育过程中差异表达^[4]。核糖体是细胞内细胞器,负责“翻译”过程中的 RNA 解读和蛋白质生成,由 40S 小亚基和 60S 大亚基组成。*RPL29* 基因编码组成 60S 大亚基的细胞质核糖体蛋白,该蛋白属于核糖体蛋白 L29E 家族成员,也是一个在细胞表面表达直接结合肝磷脂的外周膜蛋白。尽管 *RPL29* 是一个典型的编码核糖体蛋白的基因,但基因组中散在地存在这个基因的多个加工过的假基因。*RPL29* 基因编码的蛋白具有多种生物学功能,如:RNA 结合^[8]、肝磷脂结合^[9]、蛋白结合^[10-11]和组成核糖体的结构^[8]等分子功能,参与胚胎附植^[9,12]、翻译^[8]等多个生物学过程。虽然 *RPL29* 基因在人、牛、小鼠、大鼠、鸡、猪等许多物种中被克隆,在其功能研究方面主要认为其与蛋白质合成有关,具体功能却知之甚少。大多数物种中仅知道其基因序列,

对功能研究并不多。近年,在鼠上该基因的功能研究逐渐深入,并取得了重要的新发现。如:Liu 等发现抑制 *RPL29* 基因的表达可诱导癌细胞的分化^[13],Miller 等^[14]发现抑制 *RPL29* 的表达促进成骨细胞分化,他们认为该基因是成骨细胞生长和分化的一个重要调控者。Kirn-Safran 等^[15]在鼠中对 *RPL29* 基因进行敲除,发现敲除鼠能正常存活,但其断奶重较正常鼠轻 50%,并观测到敲除鼠发育延迟始于妊娠中期。他们认为,*RPL29* 通过调节蛋白质合成速率发挥其影响全面生长的重要功能。关于猪的 *RPL29* 基因目前只有其 mRNA 序列报道^[16],还没有功能性方面的研究。本研究发现,猪 *RPL29* 基因在通城猪和长白猪胚胎骨骼肌发育过程中呈现出相反的表达模式,通城猪各时期表达水平都较低并下调表达趋势。在长白猪中,随着骨骼肌的生长发育其表达急剧上调,妊娠 90 d 的表达水平大约是妊娠 33 d 的 4 倍,是通城猪相同发育时期的 3 倍。Tang 等^[4]认为在出生前,通城猪较长白猪有相对较缓慢的生长速度。本研究的发现暗示 *RPL29* 基因的表达可能与两品种胚胎骨骼肌生长发育差异有关。因此,*RPL29* 基因与骨骼肌的生长发育和产肉性状的关系值得进一步研究。

参考文献:

- [1] WIGMORE P M, STICKLAND N C. Muscle development in large and small pig fetuses[J]. Journal of Anatomy, 1983, 137(2): 235-245.
- [2] LEFAUCHEUR L, ECOLAN P. Pattern of muscle fiber formation in Large White and Meishan pigs[J]. Arch Tierz Dummerstorf, 2005, 48: 117-122.
- [3] REHFELDT C, FIEDLER I, STICKLAND N C. Number and size of muscle fibres in relation to meat production[M]// In muscle development of livestock animals: physiology, genetics, and meat quality; Edited by TE PAS M F W, HAAGSMAN H P, EVERTS M E. Wallingford, Oxfordshire: CAB Int, 2004: 1-37.
- [4] TANG Z L, YONG L, WAN P, et al. LongSAGE analysis of skeletal muscle at three prenatal stages in Tongcheng and Landrace pigs [J]. Genome Biology, 2007, 8:R115.
- [5] 陈颖,徐宝梁,苏宁,等.实时荧光定量 PCR 技术检测转基因大豆方法的建立[J].食品与发酵工业, 2003, 29(8): 65-69.
- [6] 陈英剑,胡成进,赵苗青. SYBR Green 实时荧光定量

- PCR 技术平台的建立[J]. 实用医药杂志, 2004, 21 (11): 997-999.
- [7] 张 鑫. 荧光实时定量 PCR 技术初探[J]. 生命科学趋势, 2003, 1(4): 1-28.
- [8] LAW P T, TSUI S K, LAM W Y, et al. A novel cDNA encoding a human homologue of ribosomal protein L29 [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1996, 1 305 (3): 105-108.
- [9] LIU S, SMITH S E, JULIAN J, et al. cDNA cloning and expression of HIP, a novel cell surface heparan sulfate/heparin-binding protein of human uterine epithelial cells and cell lines[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(20): 11 817-11 823.
- [10] STELZL U, WORM U, LALOWSKI M, et al. A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome [J]. *Cell*, 2005, 122 (6): 957-968.
- [11] EWING R M, CHU P, ELISMA F, et al. Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry[J]. *Molecular Systems Biology*, 2007, 3: 89.
- [12] ROHDE L H, JULIAN J, BABAKNIA A, et al. Cell surface expression of HIP, a novel heparin/heparan sulfate binding protein, of human uterine epithelial cells and cell lines [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(20): 11 824-11 830.
- [13] LIU J J, HUANG B H, ZHANG J, et al. Repression of HIP/RPL29 expression induces differentiation in colon cancer cells [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2006, 207 (2): 287-292.
- [14] MILLER S A, BROWN A J, FARACH-CARSON M C, et al. HIP/RPL29 down-regulation accompanies terminal chondrocyte differentiation [J]. *Differentiation*, 2003, 71 (6): 322-336.
- [15] KIRN-SAFRAN C B, ORISTIAN D S, FOCHT R J, et al. Global growth deficiencies in mice lacking the ribosomal protein HIP/RPL29 [J]. *Developmental Dynamics*, 2007, 236 (2): 447-460.
- [16] WINTERO A K, FREDHOLM M, DAVIES W. Evaluation and characterization of a porcine small intestine cDNA library: analysis of 839 clones [J]. *Mammalian Genome*, 1996, 7 (7): 509-517.

动物疫情速递

法国发生马传染性贫血

2008年7月17日,法国向OIE报告了马传染性贫血疫情。疫情始于2008年7月1日,于当天确诊。病原是马传染性贫血病毒。疫区位于阿尔代什省 Saint Etienne de Boulogne 地区 Pradal 的养殖场,易感动物是马,共有疑似马2匹,为私人所有的小马,均为病例,已销毁。本次疫情不属于临床发病,在装载前根据实验室检测(基础、高级)作出诊断,法国 AFSSA LERPAZ Alfort(国家实验室)的 Coggin's 检测结果为阳性。目前,正在附近地区对与感染动物有流行病学联系的动物进行流行病学调查。感染来源尚不清楚。法国采取的控制措施:控制节肢动物、扑杀、国内限制移运、筛查和染疫场区消毒,未禁止免疫,也未对动物进行治疗。法国上一次发生马传染性贫血是2008年3月25日。

葡萄牙发生羊痒病

2008年7月16日,葡萄牙向OIE通报了羊痒病疫情。疫情始于3月26日,于4月28日得到确诊。病原是朊病毒。疫区位于布朗库堡区 Idanha-a-aNova 的养殖场,易感动物是羊,其中有疑似山羊244只,未发现病例和死亡;有疑似绵羊2337只,病例2例,未出现死亡,均未予宰杀和销毁。此次疫情不是临床病例,根据实验室检测(基础、高级)作出诊断。Laboratoire national de recherche vétérinaire (LNIV)(国家实验室)的免疫组化检测、Western blotting 和快速检测结果均为阳性。对动物的基因分型正在进行,易感基因型即将被销毁。感染来源尚不清楚。葡萄牙采取的控制措施:检疫、国内限制移运和筛选,即将采取染疫场区消毒和改良扑杀措施,并且禁止免疫,未对动物进行治疗。葡萄牙上一次发生羊痒病是2008年3月13日。