

秦川牛 FABP4 基因重组腺病毒载体的构建与鉴定

魏胜娟¹, 咎林森^{1,2}, 王洪宝^{1,2}, 成 功^{1,2}, 季舒涵¹, 王 虹¹, 付常振¹, 姜碧杰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】旨在通过构建秦川牛 FABP4 基因的重组腺病毒载体, 为在细胞水平研究 FABP4 基因的功能和作用机制做准备。【方法】根据 GenBank 收录的牛 FABP4 基因 mRNA 序列设计引物, PCR 扩增并克隆测序。将目的基因连接到穿梭载体 pAdTrack-CMV 上并用 *Pme* 线性化后, 转化含有腺病毒骨架载体 pAdEasy-1 的 *E. coli* BJ5183 感受态细胞进行同源重组, 得到重组质粒 pAd-FABP4, 并用 *Pac* 酶切鉴定。将经过 *Pac* 线性化的 pAd-FABP4 转染 HEK 293A 细胞进行病毒包装和扩增, TCID₅₀ 法测定病毒滴度。【结果】经测序鉴定本次克隆的 FABP4 序列与 GenBank 收录的一致。酶切鉴定、绿色荧光观察、PCR 及测序检测均证明, 重组腺病毒载体构建成功并获得重组腺病毒 AD-FABP4, 病毒滴度为 1.58×10^9 PFU·mL⁻¹。【结论】成功构建了秦川牛 FABP4 基因重组腺病毒载体并获得高滴度的重组腺病毒。

关键词: 秦川牛; FABP4 基因; pAdTrack-CMV; pAdEasy-1; 腺病毒

Construction of the Recombinant Adenovirus of FABP4 Gene of Qinchuan Cattle

WEI Sheng-juan¹, ZAN Lin-sen^{1,2}, WANG Hong-bao^{1,2}, CHENG Gong^{1,2}, JI Shu-han¹,
WANG Hong¹, FU Chang-zhen¹, JIANG Bi-jie¹

(¹College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi; ²National Beef Cattle Improvement Center in China, Yangling 712100, Shaanxi)

Abstract: 【Objective】The aim of this study was to construct the recombinant adenovirus vector with FABP4 gene of Chinese Qinchuan cattle, so as to provide a basis for studying FABP4 gene functions and mechanisms at cell level. 【Method】The primers were designed according to the FABP4 mRNA sequence in GenBank, and the gene was cloned by RT-PCR and then sequenced. The bovine gene fragments containing both FABP4 gene and restriction enzyme were inserted into a shuttle vector pAdTrack-CMV to construct the recombinant shuttle vector pAdTrack-CMV-FABP4. After identifying by digestion and sequencing, pAdTrack-CMV-FABP4 plasmid was linearized by *Pme*, and then it was transformed into *E. coli* BJ5183 competent cells containing backbone vector pAdEasy-1 to obtain recombinant vector by homologous recombination. Then the positive plasmid was linearized by *Pac*, and transfected into HEK 293A cells for virus packing, amplification and titer testing by TCID₅₀. 【Result】The results of enzyme digestion, sequencing and regular PCR detection showed that the recombinant overexpression vector containing FABP4 CDS region was successfully constructed. The infectious titer of the virus AD-FABP4 was 1.58×10^9 PFU·mL⁻¹. 【Conclusion】In this experiment, the recombinant adenovirus vector carrying FABP4 gene was constructed successfully and high titer adenovirus was acquired.

Key words: Qinchuan cattle; FABP4 gene; pAdTrack-CMV; pAdEasy-1; recombinant adenovirus

收稿日期: 2012-10-16; 接受日期: 2013-01-30

基金项目: 国家“863”计划项目(2011AA100307-02, 2013AA102505)、国家自然科学基金项目(31272411, 31000998)、国家“十二五”科技支撑计划(2011BAD28B04-03)、国家转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08007-002)、国家肉牛牦牛产业技术体系(CARS-38)、长江学者和创新团队项目(IRT0940)、陕西省科技统筹创新工程计划(2011KTCL02-07)

联系方式: 魏胜娟, E-mail: 919juan@163.com. 通信作者咎林森, Tel: 029-87091148; Fax: 029-87091148; E-mail: zanlinsen@163.com

0 引言

【研究意义】近年来, FABP4 (fatty acid binding protein 4) 基因对于动物肉质的影响受到了广泛关注。大量研究表明, FABP4 基因与牛肉大理石花纹^[1-8]、皮下脂肪沉积^[1]及胴体重量^[4]等重要经济性性状密切相关。此外, 利用秦川牛为研究材料, 仅在脂肪组织中特异性表达的 FABP4 基因的第 4 外显子的基因型与个体的背膘厚、大理石花纹和嫩度均显著相关^[2,9]。FABP4 基因可能是影响牛肉大理石花纹及含水率的主效基因。秦川牛 FABP4 基因重组腺病毒载体的构建对进一步在细胞水平研究该基因的功能及作用机制具有重要意义。【前人研究进展】FABP4, 即脂肪酸结合蛋白 4, 又名 A-FABP、ALBP 或 ap2, 是组织特异性脂肪酸结合蛋白家族 FABPs (fatty acid binding proteins) 的重要成员之一, 参与脂类代谢和脂肪沉积的调控^[10-11]。FABP4 最早于 1983 年由 Spiegelman 等^[12]在脂肪细胞中发现, 与脂肪酸有高度亲和性, 并参与脂肪细胞长链脂肪酸在细胞内的转运。体外研究表明, 脂肪细胞内 FABP4 基因 mRNA 的表达受脂肪酸、PPAR γ 激动剂及胰岛素的调控^[13-14]。与单纯饮食性或遗传性肥胖小鼠相比, FABP4 基因敲除后肥胖小鼠的血浆葡萄糖和胰岛素水平明显降低, 且胰岛素敏感性增强^[15-16]。FABP4 基因敲除能有效降低小鼠血浆甘油三酯和胆固醇水平, 保护胰腺 β 细胞, 改善脂质代谢^[16]。此外, 与野生型小鼠相比, FABP4 基因敲除小鼠的脂肪细胞脂肪酸流入率及酯化作用没有明显改变, 但基础脂质代谢降低了 40%, 非酯化脂肪酸含量增加了 2 倍^[17]。脂肪细胞中一系列基因和蛋白的表达及脂质的合成, 与动物肉质和脂肪沉积密切相关^[18-20]。【本研究切入点】目前, 关于 FABP4 基因的多态性及关联分析等方面的研究较多, 但是通过过表达技术研究该基因的功能尚未见到报道。【拟解决的关键问题】本研究采用秦川牛脂肪组织为试验材料, 在克隆秦川牛 FABP4 基因的基础上, 利用 AdEasy-1 系统构建该基因的重组腺病毒表达载体, 并包装为高滴度的腺病毒, 为下一步在细胞水平研究该基因的功能及作用机制奠定基础。

1 材料与方法

试验于 2010—2012 年在中国国家肉牛改良中心分子生物学实验室、细胞工程实验室及生理生化实验室完成。

1.1 试验材料

腺病毒穿梭载体 pAdTrack-CMV 和骨架载体 pAdEasy-1 的构建系统由罗军教授惠赠; 脂质体 LipofectaminTM 2000 和 Trizol 均购自 Invitrogen 公司; 琼脂糖、pGM-T 载体、大肠杆菌 Top10、Marker、Marker 和高纯度质粒小提中量试剂盒均购自北京天根公司; λ -Hind digest marker、LA Taq 酶、DNA T4 连接酶、限制性内切酶 *Bgl* 和限制性内切酶 *Xho* 均购自大连宝生物公司; DMEM 购自北京钮因华信科技发展有限公司; 胎牛血清购自杭州四季青公司; 限制性内切酶 *Pac* 和 *Pme* 均购自 NEB 公司; PCR 引物由南京金斯瑞有限公司合成; 固相 RNase 清除剂购自北京天恩泽基因科技有限公司; 反转录试剂盒购自 Fermentas 公司; 小量质粒提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒及病毒 DNA 抽提试剂盒均购自 Axygen 公司。

1.2 组织样采取

以陕西省秦川肉牛良种繁育中心的纯种 8 月龄秦川公牛为试验材料。在屠宰场被屠宰后, 立即用经过灭菌处理的手术刀片切取适量皮下脂肪, 用纱布包裹系上标签, 迅速置于液氮中保存用于总 RNA 的提取。

1.3 FABP4 基因的克隆

1.3.1 总 RNA 的提取及 cDNA 模板的合成 利用 Trizol 法提取秦川牛脂肪组织总 RNA, 并用 1% 的琼脂糖凝胶电泳初步检测 RNA 的完整性, -80 保存备用。第 1 链 cDNA 的合成按照 Fermentas 公司 cDNA 合成试剂盒说明书操作。

1.3.2 PCR 引物的设计及合成 根据 GenBank 收录的 FABP4 基因序列 (Accession No. NM_174314) 用 Primer 5.0 和 Oligo 6.0 设计并合成引物。引物序列为 FABP4-F: 5'-GGAagatctATGTGTGATGCATTTGTAGGTAC-3'; FABP4-R: 5'-CCGctcgagTTATGCTCTCTCATAAACTCTGG-3' (产物大小 417 bp, 小写字母分别标注外加酶切位点 *Bgl* 和 *Xho*)。

1.3.3 目的片段的克隆和鉴定 以反转录所得 cDNA 为模板, FABP4-F 及 FABP4-R 为引物扩增 FABP4 基因 CDS 区序列。PCR 总反应体系为 15 μ L: 模板 1 μ L, 上、下游引物 (20 μ mol $\cdot$ L⁻¹) 各 0.3 μ L, LA Taq 0.15 μ L, dNTP Mixture 2.4 μ L, 10 $\times$ LA Buffer 1.5 μ L, ddH₂O 9.35 μ L。反应条件为: 95 预变性 5 min; 94 变性 30 s; 62 退火 30 s; 72 延伸 40 s, 共 33 个循环; 72 终止反应 10 min。PCR 产物进行

琼脂糖凝胶电泳检测。将符合目的片段大小的 PCR 产物用 DNA 片段回收试剂盒纯化后连接 pGM-T 载体, 并转化 Top10 感受态细胞。挑取 pGM-FABP4 阳性克隆扩繁获取菌液。取 3 mL 菌液提取质粒并用 *Bgl* 和 *Xho* 进行双酶切鉴定, 将鉴定正确的质粒测序。

1.4 腺病毒 Ad-FABP4 的构建及鉴定

1.4.1 pAdTrack-CMV-FABP4 质粒的构建及鉴定 用 *Bgl* 和 *Xho* 对构建的 pGM-FABP4 重组质粒和腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV 分别进行双酶切, 电泳检测并回收, 用 DNA T4 连接酶进行连接, 获得 pAdTrack-CMV-FABP4 重组质粒, 并转化 Top10 感受态细胞。挑单克隆摇菌后, 取 3 mL 菌液提取质粒。用 *Bgl* 和 *Xho* 进行双酶切鉴定, 将鉴定正确的质粒测序。

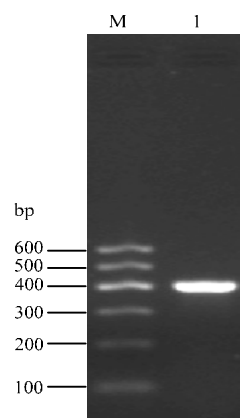
1.4.2 重组腺病毒质粒 pAdEasy-FABP4 的构建及鉴定 将鉴定正确的 pAdTrack-CMV-FABP4 质粒用 *Pme* 线性化后, 转化含有腺病毒骨架载体 pAdEasy-1 的 *E. coli* BJ5183 感受态细胞。挑取 pAdEasy-FABP4 阳性单克隆菌落摇菌后提取质粒并电泳检测。用 *Pac* 对重组腺病毒质粒 DNA 进行酶切鉴定后, 将重组质粒转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞, 并涂板挑取单克隆菌落进行摇菌, 同时送菌液进行测序。

1.4.3 腺病毒的包装、扩增及滴度测定 取上述鉴定正确的菌液进行扩繁, 提取质粒, 取 5 μ g 的重组质粒用 *Pac* 酶切, 乙醇沉淀法纯化回收后按脂质体 LipofectaminTM 2000 说明书转染 6 孔板中生长汇合度为 70%—80% 的 HEK 293A 细胞, 进行重组腺病毒包装。荧光显微镜检测 GFP (绿色荧光蛋白) 的表达。转染 10—14 d 后, 当出现明显的细胞病变反应, 且有 50% 以上细胞从培养瓶底部脱落时, 收集全部培养液及细胞于离心管中, 3 000 r/min 离心 5 min, 留 2 mL 上清于离心管内, 将细胞重悬后经液氮/37 $^{\circ}$ C 水浴反复冻融 3 次, 每次冻融后在微量振荡器中振荡 15 s, 使细胞破裂释放出病毒。将冻融液于 3 000 r/min 离心 5 min, 收集含病毒的上清液, 用于再次感染 HEK 293A 细胞。通过重复“感染-冻融-收集”, 大量扩增重组腺病毒。取 200 μ L 病毒液提取病毒基因组 DNA, 常规 PCR 鉴定 FABP4 的表达。病毒滴度通过 TCID₅₀ (组织半数感染量法) 测定。

2 结果

2.1 秦川牛 FABP4 基因的克隆及鉴定

FABP4 基因克隆结果如图 1—3 所示。PCR 扩增产物约 400 bp, 条带清晰单一 (图 1), 胶回收后克隆到 pGM-T 载体。*Bgl* 和 *Xho* 双酶切 pGM-FABP4 质粒, 琼脂糖凝胶电泳分别得到约 3 000 和 400 bp 两条片段 (图 2), 与预期结果一致, 初步证明 FABP4 克隆载体构建成功。经测序鉴定, 本试验克隆得到的秦川牛 FABP4 片段与 GenBank 收录的牛的 FABP4 编码区序列完全一致 (图 3), 可进行下一步试验。

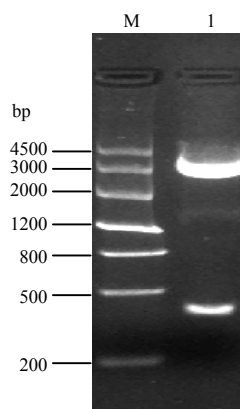


M: Marker DNA 标记; 1: 带限制性酶切位点的 FABP4 基因 CDS 区片段

M: Marker ; 1: FABP4 gene CDS region with restriction enzyme sites

图 1 秦川牛 FABP4 基因 CDS 区的 PCR 产物

Fig. 1 CDS region of FABP4 gene in Qinchuan cattle by PCR



M: Marker DNA 标记; 1: *Bgl* 和 *Xho* 双酶切 pGM-FABP4 质粒

M: Marker ; 1: Dual digestion by *Bgl* and *Xho* of pGM-FABP4

图 2 pGM-FABP4 质粒的 *Bgl* 和 *Xho* 双酶切鉴定

Fig. 2 Dual enzyme digestion by *Bgl* and *Xho* of pGM-FABP4

```

1  GGAAGATCTATGTGTGATGCATTGTAGGTACCTGGAACTTGTCTCCAGTGAAACTTT
1      M C D A F V G T W K L V S S E N F
61  GATGATTACATGAAAGAAGTGGGCGTGGCTTTGCTACCAGGAAAGTGGCTGGCATGGCC
18  D D Y M K E V G V G F A T R K V A G M A
121 AAACCCACTTTGATCATCAGTTTGAATGGGGTGTGGTCACCATTAATCAGAAAGCACC
38  K P T L I I S L N G G V V T I K S E S T
181 TTTAAAAATACTGAGATTTCTTCAAATGGGCCAGGAATTTGATGAAATCACTCCAGAT
58  F K N T E I S F K L G Q E F D E I T P D
241 GACAGGAAAGTCAAGAGCATCGTAACTTAGATGAAGGTGCTCTGGTACAAGTACAAAC
78  D R K V K S I V N L D E G A L V Q V Q N
301 TGGGATGGAAATCAACCAACATAAAGAGAAACTCATGGATGATAAGATGGTCTGGAA
98  W D G K S T T I K R K L M D D K M V L E
361 TGTGTCATGAATGGTGTCACTGCCACCAGAGTTTATGAGAGAGCATAACTCGAGCGG
118 C V M N G V T A T R V Y E R A *

```

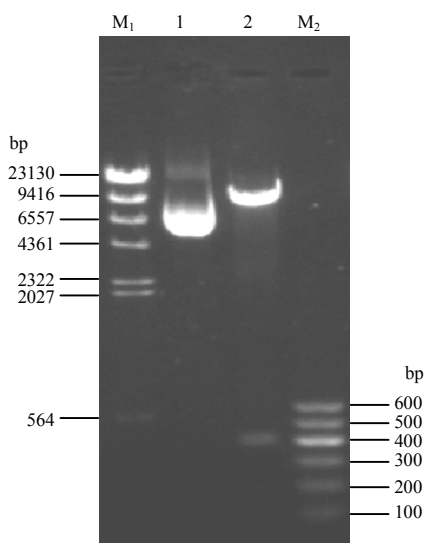
ATG：起始密码；TAA：终止密码；下划线：*Bgl* 和 *Xho* 酶切位点
 ATG: The initiation codon; TAA: The stop codon; Underline: Enzyme sites of *Bgl* and *Xho*

图 3 pGM-FABP4 的插入序列测序结果及相应的氨基酸序列

Fig. 3 Sequencing result and the corresponding amino acid sequence of the inserting sequence of plasmid pGM-FABP4

2.2 pAdTrack-CMV-FABP4 穿梭质粒的鉴定

Bgl 和 *Xho* 双酶切 pAdTrack-CMV-FABP4 质粒，琼脂糖凝胶电泳分别得到约 9 000 和 400 bp 的两条条带（图 4），与预期结果一致。说明穿梭质粒构建成功，可进行下一步试验。



M₁: λ -Hind III digest marker DNA 标记；1：空白对照；2：*Bgl* 和 *Xho* 双酶切 pAdTrack-CMV-FABP4 质粒；M₂: Marker

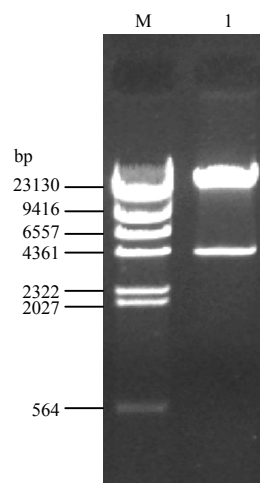
M₁: λ -Hind III digest marker; 1: Blank control; 2: Dual digestion by *Bgl* and *Xho* of pAdTrack-CMV-FABP4; M₂: Marker

图 4 pAdTrack-CMV-FABP4 质粒的 *Bgl* 和 *Xho* 双酶切鉴定

Fig. 4 Dual enzyme digestion by *Bgl* and *Xho* of pAdTrack-CMV-FABP4

2.3 pAdEasy-FABP4 重组质粒的鉴定

将含有目的片段的穿梭质粒 pAdTrack-CMV-FABP4 经 *Pme* 酶切，转化含有 pAdEasy-1 的 *E. coli* BJ5183 感受态细胞，在细菌内同源重组，提取重组质粒经过 *Pac* 酶切。结果显示：酶切片段分别为 30 和 4.5 kb（图 5），初步证明腺病毒重组成功。后经测序表明重组质粒外源插入序列与 FABP4 克隆片段一致，说明 pAdEasy-FABP4 重组成功。经 *Pac* 酶切线性化后的 pAdEasy-FABP4 重组 DNA 可以直接用于转染包装细胞。



M: λ -Hind III digest marker DNA 标记；1：*Pac* 酶切 pAdEasy-FABP4 质粒

M: λ -Hind III digest marker; 1: pAdEasy-FABP4 digestion by *Pac*

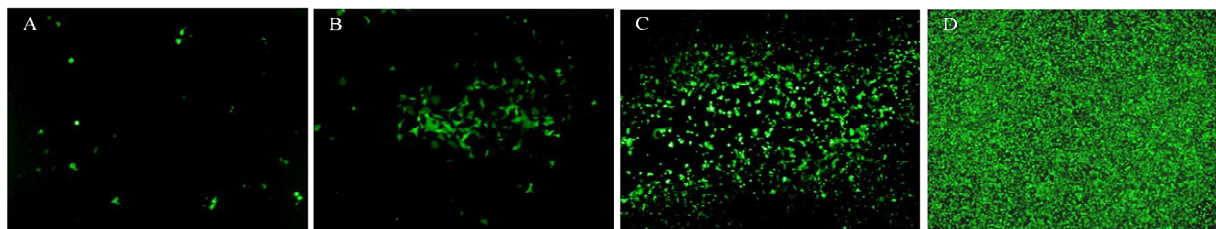
图 5 pAdEasy-FABP4 重组质粒 *Pac* 酶切鉴定

Fig. 5 Identification of pAdEasy-FABP4 by *Pac*

2.4 腺病毒的包装、扩增及滴度测定

pAdEasy-FABP4 腺病毒重组质粒经 *Pac* 酶切线性化后, 转染 HEK 293A 细胞。2 d 后在荧光显微镜下可观察到部分细胞有绿色荧光出现 (图 6-A), 6 d 后绿色荧光表达量增多, 呈彗星状 (图 6-B), 14 d 后 70% 的细胞病变从培养瓶底脱落时收集病毒, 并反复感染 HEK 293A 细胞。第 2 代腺

病毒颗粒转染 2 d 后的绿色荧光表达较初次感染明显增强 (图 6-C)。反复感染 4 次后获得高滴度病毒 (图 6-D), -80°C 保存备用。TCID₅₀ 法测定病毒滴度为 1.58×10^9 PFU $\cdot\text{mL}^{-1}$ 。提取重组腺病毒 DNA, 进行 PCR 扩增, 获得单一目的条带 (图 7), 经测序验证与 GenBank 收录的一致, 进一步证明病毒包装成功。

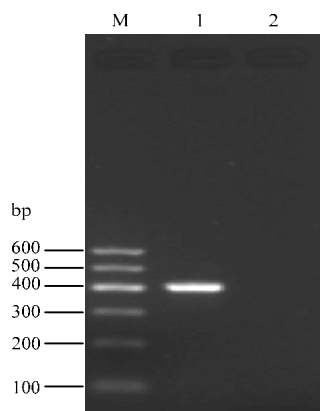


A: pAdEasy-FABP4 转染 HEK 293A 细胞 2 d 后的绿色荧光表达; B: 转染 6 d 后的绿色荧光表达; C: 第 2 代腺病毒转染 HEK 293A 细胞 2 d 后的绿色荧光表达; D: 高滴度的腺病毒 AD-FABP4 感染 HEK 293A 细胞 24 h 后绿色荧光表达

A: Fluorescence microscopic image of HEK 293A cells transfected by pAdEasy-FABP4 after 2 d; B: 6 d after transfection; C: 2 d after transfection by the second generation of AD-FABP4; D: Fluorescence microscopic image of HEK 293A cells infected by high titer virus AD-FABP4 for 24 h

图 6 腺病毒的包装与扩增

Fig. 6 Adenovirus packaging and amplifying (100 $\times$)



M: Marker DNA 标记; 1: 以病毒 AD-FABP4 的 DNA 为模板扩增的 FABP4 基因片段; 2: 空白对照

M: Marker ; 1: FABP4 fragment amplified by PCR with the virus DNA as the model; 2: Blank control

图 7 重组腺病毒 AD-FABP4 的 PCR 鉴定

Fig. 7 Identification of AD-FABP4 by PCR

3 讨论

将外源基因导入真核细胞主要有两类方法: 一是利用携带外源基因的病毒感染宿主细胞^[21-24], 二是通

过脂质体等转染试剂法、电穿孔法等将真核表达载体 (如 pcDNA3.1) 导入到细胞中^[25-27]。然而, DNA 质粒载体对原代培养的细胞转染效率很低, 很难达到试验要求; 化学试剂及物理操作对细胞造成损伤, 影响细胞的正常功能。因此, 本研究选用腺病毒载体系统, 将外源基因插入病毒基因组, 以期利用感染性的病毒颗粒实现外源基因的体外表达。

腺病毒介导的目的基因超表达是目前研究基因功能的重要方法之一。与其它病毒载体系统相比, 腺病毒载体可以感染分裂期、非分裂期、增值缓慢的细胞及体内组织; 获得高滴度的病毒液; 可插入约 10 kb 的外源基因并不改变宿主基因组序列^[18-19]。目前, 腺病毒已用于基因表达研究、转基因、疫苗生产及基因治疗等多个方面。腺病毒 AdEasy 系统是由 He 等^[22]于 1998 年构建的一种简便快捷的腺病毒重组系统, 并被广泛应用于科学研究中。该系统由腺病毒穿梭载体和骨架载体两部分构成, 首先将目的基因插入穿梭载体 (如 pAdTrack-CMV) 上, 之后利用细菌内同源重组产生重组腺病毒, 线性化腺病毒后转化包装细胞^[19-20]。与传统的腺病毒构建系统相比, 将外源基因通过穿梭载体插入腺病毒基因组及细菌内同源重组是该系统的主要优点。

通过 RT-PCR 获得目的基因是研究基因功能的第一步。由于基因多态性或 PCR 引入的突变,可能克隆得到的序列与 GenBank 收录的不一致。这就要求首先了解所选实验动物的目的基因多态性,尽量选用高保真酶,排除人为引入的突变。另外,由于重组腺病毒载体的构建包括多步的酶切和连接步骤,克隆基因时基因两端酶切位点的加入需要综合考虑:目的基因、克隆载体、穿梭载体以及两个酶切位点的酶切效率。本研究克隆得到的秦川牛 FABP4 基因与 GenBank 收录的一致,试验过程中酶切与测序手段相结合,保证了该试验的顺利进行。经酶切鉴定及 PCR 扩增、测序表明, FABP4 基因重组腺病毒载体构建成功。

4 结论

克隆了秦川牛 FABP4 基因,并在 AdEasy 系统的基础上,构建并鉴定了 FABP4 基因重组腺病毒表达载体,TCID₅₀ 法测定病毒滴度为 1.58×10^9 PFU·mL⁻¹。

References

- [1] Michal J J, Zhang Z W, Gaskins C T, Jiang Z. The bovine fatty acid binding protein 4 gene is significantly associated with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu×Limousin F₂ crosses. *Animal Genetics*, 2006, 37(4): 400-402.
- [2] 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]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008.
Wang Z. SNPs in H-FABP, A-FABP and E-FABP genes and their association with some meat traits in Qinchuan breed[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2008. (in Chinese)
- [3] Barendse W, Bunch R J, Thomas M B, Harrison B E. A splice site single nucleotide polymorphism of the fatty acid binding protein 4 gene appears to be associated with intramuscular fat deposition in longissimus muscle in Australian cattle. *Animal Genetics*, 2009, 40(5): 770-773.
- [4] Lee S H, van der Werf J H, Lee S H, Park E W, Oh S J, Gibson J P, Thompson J M. Genetic polymorphisms of the bovine Fatty acid binding protein 4 gene are significantly associated with marbling and carcass weight in Hanwoo (Korean cattle). *Animal Genetics*, 2010, 41(4): 442-444.
- [5] Mannen H. Identification and utilization of genes associated with beef qualities. *Animal Science Journal*, 2011, 82(1): 1-7.
- [6] Narukami T, Sasazaki S, Oyama K, Nogi T, Taniguchi M, Mannen H. Effect of DNA polymorphisms related to fatty acid composition in adipose tissue of Holstein cattle. *Animal Science Journal*, 2011, 82(3): 406-411.
- [7] Zhao C, Tian F, Yu Y, Luo J, Hu Q, Bequette B J, Baldwin V R L, Liu G, Zan L, Scott Updike M, Song J. Muscle transcriptomic analyses in Angus cattle with divergent tenderness. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(4): 4185-4193.
- [8] 邱良德, 林亚秋, 徐亚欧, 李玉萍, 蒋忠荣, 郑玉才. 九龙牦牛脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白基因(A-FABP)的克隆及其表达谱. 农业生物技术学报, 2010, 18(6): 1098-1102.
Kuang L D, Lin Y Q, Xu Y O, Li Y P, Jiang Z R, Zheng Y C. Cloning and expression profiling of adipocyte fatty acid-binding protein gene (A-FABP) of Jiulong yak. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2010, 18(6): 1098-1102. (in Chinese)
- [9] 季舒涵, 咎林森, 王洪宝, 刘艳妍. 秦川牛 A-FABP 基因的生物信息学分析. 西北农林科技大学学报, 2010, 38(6): 77-82.
Ji S H, Zan L S, Wang H B, Liu Y Y. Biological information analysis of A-FABP gene in Qinchuan cattle. *Journal of Northwest A&F University*, 2010, 38(6): 77-82. (in Chinese)
- [10] 秦立红, 刘伟英, 曹阳, 张国良, 赵玉民, 赵志辉. 不同发育阶段草原红牛背最长肌 FABP4 基因表达水平研究. 中国畜牧杂志, 2011, 47(1): 21-24.
Qin L H, Liu W Y, Cao Y, Zhang G L, Zhao Y M, Zhao Z H. Study on the expression of FABP4 gene in longissimus muscle of Red Steppe in different developing stages. *Chinese Journal of Animal Science*, 2011, 47(1): 21-24. (in Chinese)
- [11] 周灵芝, 吴洁. 脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白的研究进展. 国际病理科学与临床杂志, 2008, 28(5): 447-451.
Zhou L Z, Wu J. Progression of adipocyte fatty acid binding protein. *International Journal of Pathology and Clinical Medicine*, 2008, 28(5): 447-451. (in Chinese)
- [12] Spiegelman B M, Frank M, Green H. Molecular cloning of mRNA from 3T3 adipocytes. Regulation of mRNA content for glycerophosphate dehydrogenase and other differentiation-dependent proteins during adipocyte development. *The Journal of Biological Chemistry*, 1983, 258(16): 10083-10089.
- [13] Haunerland N H, Spener F. Fatty acid-binding proteins-insights from genetic manipulations. *Progress in Lipid Research*, 2004, 43(4): 328-349.
- [14] Makowski L, Hotamisligil G S. The role of fatty acid binding proteins in metabolic syndrome and atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology*, 2005, 16(5): 543-548.
- [15] Hotamisligil G S, Johnson R S, Distel R J, Ellis R, Papaioannou V E, Spiegelman B M. Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding

- protein. *Science*, 1996, 274(5291): 1377-1379.
- [16] Uysal K T, Scheja L, Wiesbrock S M, Bonner-Weir S, Hotamisligil G S. Improved glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2. *Endocrinology*, 2000, 141(9): 3388-3396.
- [17] 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. *Journal of Lipid Research*, 1999, 40(5): 967-972.
- [18] Hausman G J, Dodson M V, Ajuwon K, Azain M, Barnes K M, Guan L L, Jiang Z, Poulos S P, Sainz R D, Smith S, Spurlock M, Novakofski J, Fernyhough M E, Bergen W G. Board-invited review: The biology and regulation of preadipocytes and adipocytes in meat animals. *Journal of Animal Science*, 2009, 87(4): 1218-1246.
- [19] Dodson M V, Jiang Z, Chen J, Hausman G J, Guan L L, Novakofski J, Thompson D P, Lorenzen C L, Fernyhough M E, Mir P S, Reecy J M. Allied industry approaches to alter intramuscular fat content and composition in beef animals. *Journal of Food Science*, 2010, 75(1): 1-8.
- [20] Dodson M V, Hausman G J, Guan L, Du M, Rasmussen T P, Poulos S P, Mir P, Bergen W G, Fernyhough M E, McFarland D C, Rhoads R P, Soret B, Reecy J M, Velleman S G, Jiang Z. Lipid metabolism, adipocyte depot physiology and utilization of meat animals as experimental models for metabolic research. *International Journal of Biological Sciences*, 2010, 6(7): 691-699.
- [21] Lee J, Laks H, Drinkwater D C, Blitz A, Lam L, Shiraishi Y, Chang P, Drake T A, Ardehali A. Cardiac gene transfer by intracoronary infusion of adenovirus vector-mediated reporter gene in the transplanted mouse heart. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 1996, 111(1): 246-252.
- [22] He T C, Zhou S, da Costa L T, Yu J, Kinzler K W, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(5): 2509-2514.
- [23] Luo J, Deng Z L, Luo X, Tang N, Song W X, Chen J, Sharff K A, Luu H H, Haydon R C, Kinzler K W, Vogelstein B, He T C. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system. *Nature Protocols*, 2007, 2(5): 1236-1247.
- [24] Chang H L, Liang G M, Wang G R, Yu H K, Guo Y Y, Wu K M. Expression of aminopeptidase N1(APN1), the main receptor protein for *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin from *Helicoverpa armigera* larval midgut in *Trichoplusia ni* cells. *Agricultural Sciences in China*, 2008, 7(3): 329-335.
- [25] Yang D Z, He J, Zhang J C, Wang Z R. Expression of angiostatin cDNA in human gallbladder carcinoma cell line GBC-SD and its effect on endothelial proliferation and growth. *World Journal of Gastroenterology*, 2006, 12(17): 2762-2766.
- [26] 汤展毅, 严云勤, 高学军, 陆黎敏, 朱丹丹, 冀志庚. 牛 myf6 基因真核表达载体的构建及在成肌细胞中的表达. *中国农业科学*, 2010, 43(13): 2793-2799.
- Tang Z Y, Yan Y Q, Gao X J, Lu L M, Zhu D D, Ji Z G. Construction of eukaryotic expression vector of bovine myf6 gene and expression of the gene in myoblasts. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(13): 2793-2799. (in Chinese)
- [27] 郭爱疆, 才学鹏, 贾万忠, 房永祥, 乔军, 刘红霞, 潘小梅, 景志忠. 重叠延伸 PCR 法扩增猪囊尾蚴 AgB 基因及其在 BHK-21 细胞中的表达. *中国农业科学*, 2009, 42(7): 2572-2578.
- Guo A J, Cai X P, Jia W Z, Fang Y X, Qiao J, Liu H X, Pan X M, Jing Z Z. Cloning of cysticercus cellulosae AgB gene by using splicing overlap extension PCR method and expression in BHK cells. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(7): 2572-2578. (in Chinese)

(责任编辑 周晓艳)