

doi:10.3969/j.issn.1672-5565.2013.03.08

# 猪卵泡抑素基因接拼形式克隆、表达及分析

谢雨琇, 宋成义\*, 何庆玲, 周家庆, 冯晓军,  
李庆平, 高波, 王霄燕

(江苏省动物遗传繁育与分子设计重点实验室, 扬州大学动物科学与技术学院, 江苏扬州, 225009)

**摘要:**猪卵泡抑素基因(Follistatin, FS)具有调控动物生殖活动和肌肉生长的生物功能,但对猪的研究报道很少。本研究克隆了猪卵泡抑素基因两种接拼形式、比较分析其蛋白结构特征、进化关系和组织表达特性。研究表明,通过两对引物成功克隆了猪卵泡抑素基因的1045bp(FS-L)和964bp(FS-S)的两种接拼形式;与Genbank中的序列比对表明FS-L和FS-S的CDS序列与人、牛、家鼠、沟鼠、斑马鱼的卵泡抑素基因序列相似性在80%以上。对两种蛋白质结构域的比较发现,FS-S蛋白相比FS-L蛋白而言缺失了一个FS结构域。同源性分析表明,猪与牛的亲缘关系较近,与人、小鼠、沟鼠和斑马鱼的关系相对较远。组织表达分析表明,两种拼接形式在梅山猪不同组织中的表达存在差异,FS-L基因在梅山猪肌肉及生殖系统等组织中均有表达,而FS-S基因则主要在生殖系统中表达。表明FS-L在肌肉生长中发挥作用,而FS-S主要调控动物的生殖功能。

**关键词:**猪, 卵泡抑素; 克隆; 表达; 生物信息学

**中图分类号:**Q518.2   **文献标识码:**A   **文章编号:**1672-5565(2013)-03-201-08

## Cloning, expression and bioinformatics analysis of two spliced forms of porcine follistatin gene

XIE Yu-xiu, SONG Cheng-yi\*, HE Qing-ling, ZHOU Jia-qing, FENG Xiao-jun, LI Qing-ping,  
GAO Bo, WANG Xiao-yan

(Key Laboratory of Jiangsu Province Animal Genetic - Breeding and Molecular Design, College of Animal Science & Technology,  
Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** Porcine follistatin gene (Follistatin, FS) plays roles in regulation of animal reproductive activities and muscle growth, however very few studies on the swine FS are available. In this study, two spliced forms of porcine FS gene were cloned, and the domain and protein structure, evolutionary relationship and tissue expression pattern were investigated. The results showed that two spliced forms (1 045bp, FS-L and 964bp, FS-S) were cloned successfully with tow pairs of primers; the sequences were aligned with sequences of human, mouse, rat, and zebra fish deposited in Genbank and the identity was higher than 80%. Based on the comparison of the two protein domains, FS-S protein is missing one FS domain compared to FS-L protein. The homology analysis showed that pigs and cattle share closer relationship but the relationships between pig and human, mouse, rat, and zebra fish are relatively distant. The tissue expression analysis showed that the two splice forms display different patterns among Meishan pig tissues, the FS-L form was expressed in muscle and reproductive system and others, but FS-S form was mainly expressed in reproductive system. It implies that FS-L may play a role in muscle growth, while the FS-S may mainly regulates animal reproductive function.

**Key words:** Pigs; Follistatin; Cloning; Expression; Bioinformatics

收稿日期:2012-05-14;修回日期:2012-10-26.

基金项目:国家转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08010-019B、2008ZX08006-005),江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD),江苏省自然科学基金(BK2010317)。

作者简介:谢雨琇,女,南京市,研究生,研究方向:动物遗传育种与繁殖;E-mail:717114547@qq.com.

\* 通讯作者:宋成义,男,江苏灌南,副教授,研究方向为动物遗传育种与繁殖;E-mail:cysong@yzu.edu.cn.

卵泡抑素是一种广泛存在的单链糖蛋白,研究表明 FS 在垂体、卵巢、睾丸、骨髓、肾、骨骼肌等多种组织中表达,FS 通过中和卵丘上的颗粒细胞产生的激活素(activin)可对卵母细胞的成熟和卵泡的发育起作用<sup>[1]</sup>。成熟的 FS 是一条多肽单链,前体经蛋白酶和糖基化酶作用后,才具有生物活性<sup>[2-3]</sup>。人的 FS 基因由 5 个外显子和 4 个内含子组成,位于第 5 号染色体上,并且具有两种拼接形式:分别命名为 FS-315 和 FS-288<sup>[4-5]</sup>。最初人们认为 FS 只是作为激活素(Activin,ACT)的结合蛋白,通过 Activin / Follistatin 系统来调节动物的生殖活动。但近年来的实验表明,FS 是 TGF- $\beta$  超家族中许多成员,如 myostatin、activin、inhibin、BMP 等的抑制蛋白<sup>[6]</sup>。研究结果发现其对动物的肌肉生长具有重要的调节作用,FS 可与肌肉生长抑制素(myostatin)的 C 端结合,抑制 myostatin 跟受体结合,从而促进骨骼肌发育<sup>[7]</sup>。Lee 等在 2001 年的研究表明,通过基因敲除或增加的 FS 的量抑制 myostatin 可以有效增加肌肉量<sup>[8-9]</sup>。2009 年,对猕猴的研究表明,通过基因治疗调节 FS 的量也可加强肌肉的生长并可提高肌肉强度,这项研究为人体临床试验奠定了基础。Rose 等在 2008 年的研究表明,提高 FS 表达水平可提高肌肉质量,并可延长脊髓性肌萎缩症(SMA)的动物的寿命<sup>[10]</sup>。目前也有研究探寻 FS 是否与多囊卵巢综合征(PCOS)有关,但关于 FS 对这种不孕不育疾病是否有直接作用尚有争议<sup>[11]</sup>。

2007 年,李胜杰等从鲈鱼卵巢中克隆了 Follistatin 基因全长 cDNA,通过序列分析表明其 cDNA 全长 1 444 bp,包括开放阅读框 966 bp,5 非编码区 82 bp,3 非编码区 359 bp<sup>[12]</sup>。2011 年,罗艳梅等从羊卵巢组织中克隆了 follistatin 的全长 cDNA,并进行了序列分析和组织表达分析,表明在心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、卵巢和垂体中表达<sup>[13]</sup>。2007 年,郭亚芬等克隆了猪的 Follistatin 全长 cDNA,并进行了原核表达分析<sup>[14]</sup>。然而,目前尚没有关于猪 FS 拼接形式鉴定、克隆和表达等的研究报道,本研究进行了猪 FS 两种拼接形式的克隆、鉴定、生物信息学分析和时空表达研究,为深入研究猪 FS 蛋白的结构和功能提供参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 试验动物

成年梅山母猪和成年梅山公猪。屠宰后采集公母猪各系统组织,包括大脑、小脑、垂体、下丘脑、海

马体、心、肝、脾、肺、肾、小肠、背最长肌、腿肌、腰大肌、背脂、睾丸、睾丸网、附睾头、附睾体、附睾尾、尿道球腺、前列腺、精球囊、卵巢、子宫、输卵管、和子宫角。

#### 1.1.2 受体菌

DH5 $\alpha$  大肠杆菌菌株(*E. coli*)由本实验室保存。

#### 1.1.3 试剂(盒)及工具酶

各种限制性内切酶、dNTP、Pyrobest DNA 聚合酶等购自 TaKaRa 公司;Taq plus DNA 聚合酶购自鼎国生物技术公司;Oligo(dT)、pGEM-T 载体购自 Promega 公司;Superscript II 反转录试剂盒系 Invitrogen 公司产品;氨苄青霉素、 $\beta$ -巯基乙醇及其它常规试剂均为国产试剂;DNA maker 为宝生物及天为时代公司产品。PCR 引物合成与测序:PCR 引物由上海生工生物工程服务有限公司合成;测序由上海 Invitrogen 公司完成。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 引物的设计与合成

根据 Genbank 中猪卵泡抑制素序列设计了两对引物(Follistatin F 和 Follistatin long-R;Follistatin F 和 Follistatin short-R),在设计的两对引物 F 端和 R 端分别加上限制性内切酶 EcoR I 和 NcoI 的识别位点序列,由上海基康公司合成。上游 Follistatin F:ttGAATTCtgaccccaagaatggctcg(EcoRI),下游引物 1:Follistatin-long R ggCCATGGttaccactctagaataagaatata(NcoI),下游引物 2:Follistatin-short R: tgCCATGGtcagttgcaagatccagagt(NcoI)。

#### 1.2.2 梅山猪总 RNA 的抽提及 cDNA 的合成

采用 Trizol 法提取梅山猪各组织总 RNA。用紫外分光光度计测定样品浓度及纯度。

取 1 $\mu$ L 各组织 RNA 与 1 $\mu$ l Oligo(dT) primer (0.5 $\mu$ g/ $\mu$ L),混合,加 DEPC-treated water 至 12 $\mu$ l。混匀后 70 $^{\circ}$ C 下 5 min,冰浴 30s,离心 3~5s。加入 4 $\mu$ L 5 $\times$  reaction Buffer, 2 $\mu$ l dNTP Mix (10mM), 1 $\mu$ L Ribonuclease inhibitor (20 U/ $\mu$ l)。混匀离心 3~5s 加入 1 $\mu$ L M-MuLV Reverse Transcriptase(200 U/ $\mu$ l)混匀后置 PCR 仪中:42 $^{\circ}$ C、60 min, 70 $^{\circ}$ C、10 min,反应结束后 -20 $^{\circ}$ C 保存。

#### 1.2.3 克隆及测序验证克隆片段

分别用两对引物 PCR 扩增 FS 基因。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 3min;94 $^{\circ}$ C 变性 30s,复性 1min (Follistatin F 和 Follistatin long-R 的退火温度为 55 $^{\circ}$ C;Follistatin F 和 Follistatin short-R 的退火温度为 58 $^{\circ}$ C),72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5min,(Follistatin F 和 Follistatin long-R 的循环数为 40;Follistatin F 和 Fol-

listatin short-R 的循环数为 50); 然后 72℃ 延伸 10min, 最后 4℃ 保存。然后将 PCR 产物分别用 DNA Fragment Purification Kit 进行纯化, 然后将纯化后的目的片断与 pMD19-T 载体连接, 转化, 提取质粒, 经 PCR 再扩增和酶切鉴定, 筛选出阳性的重组质粒。对含正确插入片断的重组质粒测序, 并将所获序列用 DNASTar 程序与 GenBank 中已发表的序列进行比较。

#### 1.2.4 组织表达谱分析

以 Follistatin F 和 Follistatin long-R; Follistatin F 和 Follistatin short-R) 两对引物 PCR 扩增猪不同组织中的相应基因, 并电泳检测结果。

#### 1.2.5 序列的生物信息学分析

结合生物信息学的手段对克隆的 FS 进行序列分析。以克隆的 FS 为基序列进行多重比对并制作蛋白质氨基酸分子进化树; 并利用 NCBI 的 CDD 软件分析其蛋白质的功能结构域。

## 2 试验结果分析

### 2.1 FS 的克隆及酶切鉴定结果

以梅山猪基因组 DNA 为模板, 利用高保真 Tag 酶扩增大小分别为 1 045bp 和 964bp 的 FS-L 和 FS-S 基因上, PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳显示条带清晰、特异性高、片段大小正确(如图 1); 将目的片段纯化后与 T 载体连接, 进行转化培养, 用 PCR 再扩增和引物中引入的限制性酶切位点酶切鉴定重组质粒, 并对阳性重组质粒进行测序验证, 利用 DNASTar 将测结果分别与 Genebank 中发表的序列

进行对比分析, 同源性分别为 97.63% 和 94.01%, 证明克隆的序列正确。FS-L 的 CDS 序列全长 1 023bp, FS-S 的 CDS 序列全长 708bp, 都包括完整的 ORF。FS-L 基因可编码 341 个氨基酸得蛋白质, 推测该蛋白质的分子量约为 3.771kD, 等电点约为 5.53。FS-S 基因可编码 235 个氨基酸得蛋白质, 推测该蛋白质的分子量约为 3.418kD, 等电点约为 7.88。

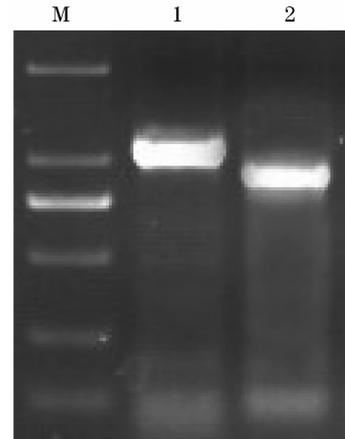


图 1 FS-L 和 FS-S PCR 产物电泳结果

1:FS-L PCR 产物, 2:FS-S PCR 产物, M:DL2000TM Marker

Fig. 1 electrophoresis results of the FS-and FS-S PCR products

1:FS-L PCR, 2:FS-S PCR, M:DL2000TM Marker

### 2.2 FS 的组织表达谱

组织表达分析显示, FS 基因的两种拼接形式在梅山猪不同组织中的呈现不同的组织表达谱(如图 2)。FS-L 基因在梅山猪的垂体、下丘脑、海马体、肝、肺、腿肌、腰大肌、附睾头、附睾尾、尿道球腺、前列腺、精球囊、卵巢、输卵管中都有转录表达。而 FS-S 基因只在附睾尾、前列腺、卵巢中有转录表达。

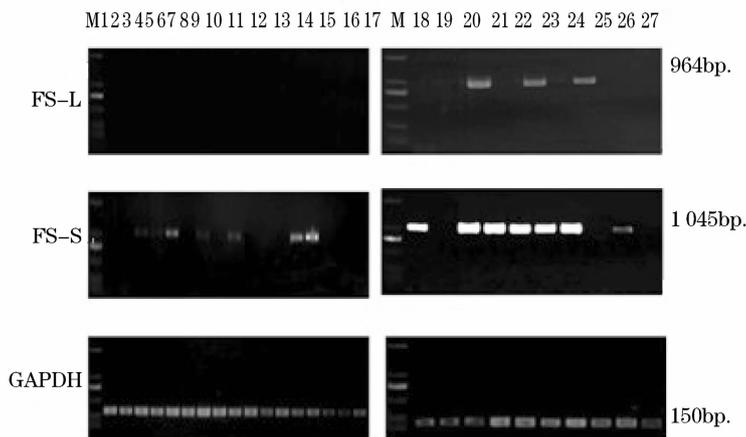


图 2 FS-S 和 FS-L 基因的组织表达谱

Fig. 2 Tissue expression profile of FS-S and FS-L

注: M 道: DNA 标记 2 000bp, 1~27 道分别为: 大脑、小脑、垂体、下丘脑、海马体、心、肝、脾、肺、肾、小肠、背最长肌、腿肌、腰大肌、背脂、辜丸、辜丸网、附睾头、附睾体、附睾尾、尿道球腺、前列腺、精球囊、卵巢、子宫、输卵管、和子宫角。

Notes: Lane M is 2 000bp DNA Maker, lane from 1 to 27 are Cerebrum, cerebellum, pituitary, hypothalamus, hippocampus, heart, liver, spleen, lung, kidney, small intestine, back dorsi muscle, leg muscle, the psoas muscle, back fat, testis, rete testis, epididymal head, epididymal bodycaudal epididymides, bulbourethral gland, prostate, fine balloon, ovary, uterus, fallopian tubes and uterine horn organizations

## 2.3 序列的生物信息学分析

### 2.3.1 蛋白质的理化性质分析

利用 <http://web.expasy.org/protparam/> 网站对 FS-L 和 FS-S 编码的蛋白质进行理化性质分析。结果表明, FS-L 编码的多肽组成为 C1588H2515N455O520S44, 并含有 20 种氨基酸, 其中 Cys(10.67%), Glu(10.61%), Lys(9.18%) 含量较多, 在 280nm 的吸光度值为 0.66mg/ml。该蛋白脂肪系数为 55.65, 总平均亲水系数为 -0.555, 证明该蛋白亲水性较强, 不稳定系数为 48.50, 证明该蛋白是不稳定蛋白。FS-S 编码的多肽组成为 C1104H1780N326O340S31, 并含由 20 种氨基酸, 其中 Cys(10.69%), Leu(9.56%), Lys(9.35%) 含量较多, 在 280nm 的吸光度值为 0.77mg/ml。该蛋白脂肪系数为 64.72, 总平均亲水系数为 -0.428, 证明该蛋白亲水性较强, 不稳定系数为 37.95, 证明该蛋白是稳定蛋白。

利用 DNAMAN 软件对 FS-L 和 FS-S 的亲水性进行进一步分析(如图 3, 图 4), 发现该蛋白亲水区域较多, 综合脂肪系数和平均亲水系数, 可以认为 FS-L 和 FS-S 蛋白是亲水性蛋白。

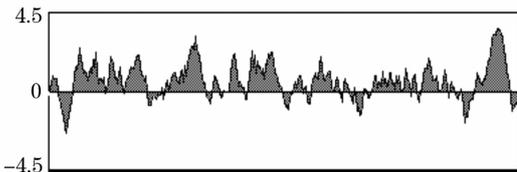


图 3 FS-L 的疏水性曲线

Fig. 3 Hydrophobicity curve of FS-L

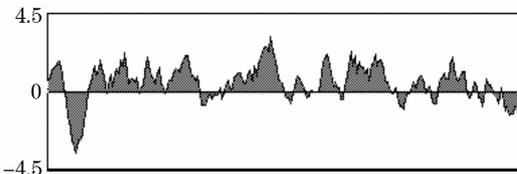


图 4 FS-S 的疏水性曲线

Fig. 4 Hydrophobicity curve of FS-S

### 2.3.2 蛋白质的二级结构预测

利用 DNASTar 对 FS-L 和 FS-S 的二级结构进行预测, 结果表明 FS-L 蛋白可能含有 8 个  $\alpha$ -螺旋和 16 个  $\beta$ -折叠, 而 FS-S 蛋白则含有 7 个  $\alpha$ -螺旋和 20 个  $\beta$ -折叠。

### 2.3.3 蛋白质的跨膜结构域预测

利用 [http://www.ch.embnet.org/cgi-bin/TMPRED\\_form\\_parser](http://www.ch.embnet.org/cgi-bin/TMPRED_form_parser) 对 FS-L 和 FS-S 蛋白的跨膜结构进行预测, 结果表明 FS-L 蛋白可能并不存在跨膜结构域, 而 FS-S 蛋白可能存在两个跨膜螺旋区域, 由内向外和由外向内的跨膜螺旋区域各一个, 对应的氨基酸位置分别为第 8~28 位和第 4~23 位。进一步对 FS-S 的跨膜拓扑结构进行分析, 结果表明 FS-S 包含跨膜拓扑结构的可能性很低, 综合跨膜区与跨

膜拓扑结构的分析结果认为 FS-L 和 FS-S 可能都不是膜蛋白(见图 5, 6)。

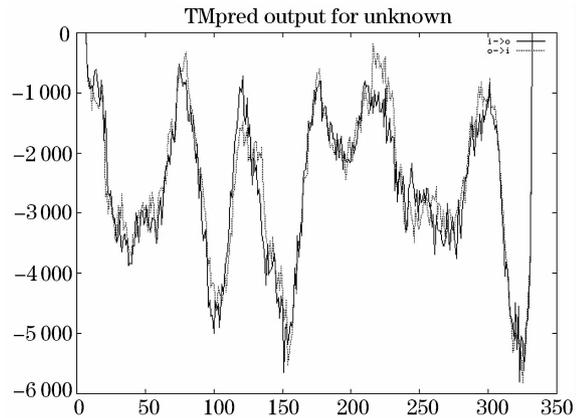


图 5 FS-L 跨膜区域预测

Fig. 5 prediction of FS-L transmembrane region

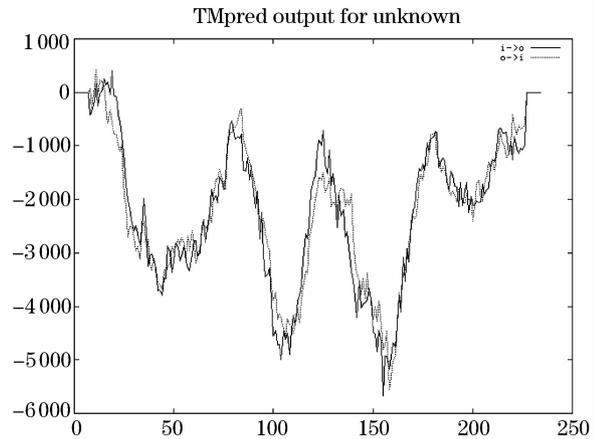


图 6 FS-S 跨膜区域预测

Fig. 6 prediction of FS-S transmembrane region

### 2.3.4 磷酸化位点预测

通过 <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/> 在线预测 FS-L 和 FS-S 蛋白磷酸化位点, 结果表明, FS-L 可能含有丝氨酸磷酸化位点, 6 个苏氨酸磷酸化位点, 4 个酪氨酸激酶磷酸化位点(如图 7); 而 FS-S 可能含有 4 个丝氨酸磷酸化位点, 2 个苏氨酸磷酸化位点, 1 个酪氨酸激酶磷酸化位点(如图 8)。

NetPhos 2.0: predicted phosphorylation sites in Sequence

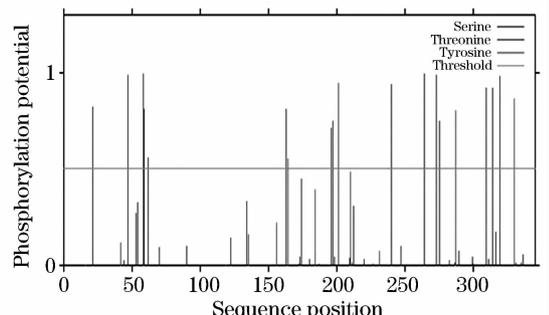


图 7 FS-L 的丝氨酸、苏氨酸与酪氨酸激酶的磷酸化位点分析

Fig. 7 analysis of FS-L serine, threonine and tyrosine kinase phosphorylation sites

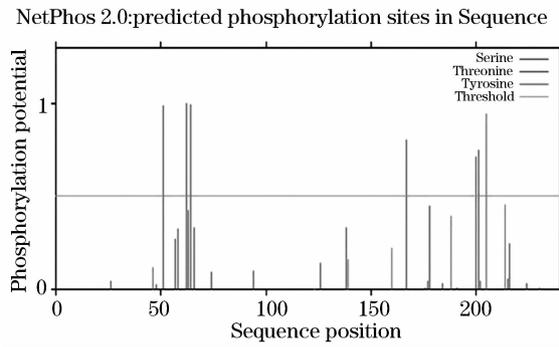


图 8 FS-S 的丝氨酸、苏氨酸与酪氨酸激酶的磷酸化位点分析  
 Fig. 8 analysis of FS-S serine, threonine and tyrosine kinase phosphorylation sites

2.3.5 蛋白质功能结构域预测

利用 NCBI 的 CDD 软件分析 FS-L 和 FS-S 的蛋白保守结构域。通过两种蛋白质结构域的比较发现: FS-L 蛋白质具有 2 个 FS super family 结构域和

1 个 FS 结构域,而 FS-S 蛋白质则只具有 2 个 FS super family 结构域,相比 FS-L 蛋白而言缺失了一个 FS 结构域(见图 9,10)。

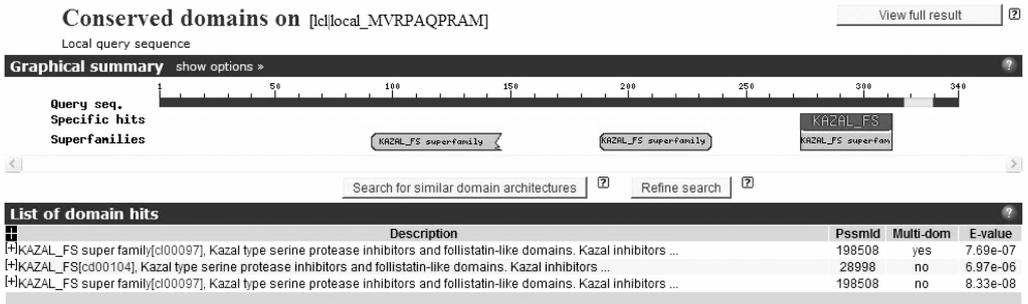


图 9 CDD 程序对猪 FS-L 蛋白质结构域的分析  
 Fig. 9 analysis of pig FS-L protein domain by CDD program

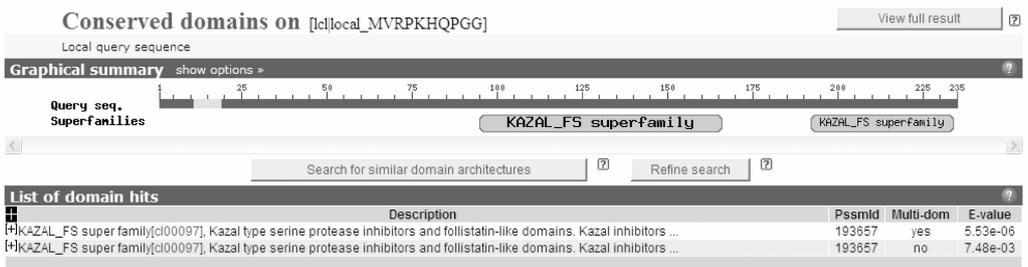


图 10 CDD 程序对猪 FS-S 蛋白质结构域的分析  
 Fig. 10 analysis of pig FS-S protein domain by CDD program

2.4 FS-L 和 FS-S 的同源性分析

在 GenBank 基因组数据库搜索获得人、牛、家鼠、沟鼠、斑马鱼的和 FS-L、FS-S 的蛋白序列,利用 Clustal X 进行序列比对(如图 11),利用 DNAMAN

构建进化树(如图 12)。同源性分析表明,猪与牛的亲缘关系较近,与人、小鼠、沟鼠和斑马鱼的关系相对较远。



(EGF)序列相似,推测可能来源于同一种基因<sup>[15]</sup>。Michel等,通过RNA探针发现大鼠FS mRNA对应第5外显子后157个核苷酸的和第6外显子的前71个核苷酸,并证明了大鼠FS基因剪接及其在性腺以及性腺外的表达<sup>[16]</sup>。而猪的FS-L具有2个FS super family结构域和1个FS结构域,FS-S具有2个FS super family结构域。FS super family是一种Kazal型丝氨酸蛋白酶抑制因子和follistatin-like结构域。Kazal抑制剂可以抑制丝氨酸蛋白酶,如胰蛋白酶,胰凝乳蛋白酶等。其抑制域有一个肽键活性位点作为同源酶底物。肽键活性中心是一个环形结合域,该结合域是Kazal抑制剂和所有的酶/抑制剂复合物的标志构象<sup>[17]</sup>。这些Kazal结构域(具有3至4个二硫键的 $\alpha/\beta$ 疏水核心)通常出现在串联序列中。类似的结构域还发现于follistatin(FS)和follistatin-like家族成员,在组织特异性调控中起重要作用。而FS结构域由N端 $\beta$ 发夹(FOLN/EGF-like结构域)和Kazal-like结构域和5个二硫键组成。虽然Kazal-like FS下游结构类似Kazal蛋白酶抑制剂,但目前还没有FS结构域被证明是蛋白酶抑制剂。研究发现kazal型抑制剂结构域包含一个21(SLC21)family溶质载体(有机阴离子转运体),可调节特殊阴离子吸收<sup>[18-20]</sup>。

本研究克隆通过对FS-L和FS-S在梅山猪中表达谱的比较发现,FS-L和FS-S蛋白在梅山猪不同组织中表达谱存在差异,FS-L在肌肉和生殖系统均有表达,而FS-S只在生殖系统表达。在山羊中对该基因组织分析发现,该基因能在心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、卵巢和垂体中检测出来,在肾脏中表达量相对较高,在垂体中表达量较低<sup>[13]</sup>。在大鼠中,除卵巢和睾丸之外,在大脑皮层,垂体,肾上腺,胸腺,胰腺,肠道,肾脏,心脏,子宫,骨骼肌和肺中均检测到FS mRNA<sup>[16]</sup>,表明该基因在不同物种的表达并不保守。

通过对两种蛋白保守结构域的分析发现,FS-S蛋白相比FS-L蛋白而言缺失了一个FS结构域,这可能是造成这种功能差异的原因之一。对这两种蛋白理化性质,二级结构,跨膜结构域的分析 and 比较发现,两种蛋白二级结构也存在一定差异,这可能也是造成两种蛋白功能结构域的差异之一。综合两种异构体的结构域和组织表达谱差异分析,提示FS-L和FS-S可能具有不同的功能。FS-L可能在肌肉生长中发挥重要作用,而FS-S只在生殖系统中表达,提示其可能主要调控动物的生殖功能。

对FS-L和FS-S的同源性分析发现猪与牛的亲缘关系较近,与人、小鼠、沟鼠和斑马鱼的关系相对较远,该结果与其他亲缘分析结果相似。

## 4 结论

本文成功克隆了猪FS-S和FS-L基因序列,证实了猪FS基因两种拼接形式的存在。FS-L和FS-S基因mRNA在梅山猪多个组织中的表达,且表达谱存在差异。且FS-L和FS-S蛋白预测结构域存在差异,FS-S蛋白比FS-L蛋白缺少一个FS结构域。表达谱和结构域的差异提示该基因的两种拼接形式的生物功能可能存在差异。

## 参考文献(References)

- [1] Arai KY, Ohshima K, Watanabe G, Arai K, Uehara K, Taya K. Dynamics of messenger RNAs encoding inhibin/activin subunits and follistatin in the ovary during the rat estrous cycle[J]. *Biology Reproduction*, 2002, 66(4): 1119-1126.
- [2] Yvonne Y. Hui, Holly A. LaVoie. GATA4 Reduction Enhances 3', 5' - Cyclic Adenosine 5'-Monophosphate-Stimulated Steroidogenic Acute Regulatory Protein Messenger Ribonucleic Acid and Progesterone Production in Luteinized Porcine Granulosa Cells[J]. *Endocrinology*, 2008, 149(11): 5557-5567.
- [3] B. Paige Lawrence, Michael S. Denison, Hermann Novak, B. Activation of the aryl hydrocarbon receptor is essential for mediating the anti-inflammatory effects of a novel low-molecular-weight compound[J]. *Blood*, 2008, 15; 112(4): 1158-1165.
- [4] C. Benjamin Lai, Ying Zhang, Sally L. Rogers, Dixie L. Mager. Creation of the two isoforms of rodent NKG2D was driven by a B1 retrotransposon insertion[J]. *Nucleic Acids Res.*, 2009, 37(9): 3032-3043.
- [5] Patrick S. Corpuz, Lacey L. Lindaman, Pamela L. Mellon, Djurdjica Coss Mol Endocrinol. FoxL2 Is Required for Activin Induction of the Mouse and Human Follicle-Stimulating Hormone  $\beta$  - Subunit[J]. *Genes*, 2010, 24(5): 1037-1051.
- [6] K E Reinert, E Stutter, H Schweiss. Aspects of specific protein-DNA interaction; multi-mode binding of the oligopeptide antibiotic netropsin to (A. T)-rich DNA segments[J]. *Nucleic Acids Res.*, 1979, 7(5): 1375-1392.
- [7] Chen CM, Wang CH, Wu SC, Lin CC, Lin SH, Cheng WT. Temporal and spatial expression of biologically active human factor VIII in the milk of transgenic mice driven by mammary specific bovine alpha lactalbumin regulator sequences[J]. *Transgenic Res.*, 2002, 11(3): 257.
- [8] P D Jackson, G Felsenfeld. A method for mapping intranuclear protein-DNA interactions and its application to a nuclease hypersensitive site[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1985, 82(8): 2296-2300.
- [9] Se-Jin Lee and Alexandra C. McPherron. Regulation of myostatin activity and muscle growth" [J]. *PNAS*, 2001, 98(16): 9306-9311.
- [10] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C)</sup> Method. 2001, 25: 402-8.
- [11] McFarlane AA, Orriss GL, Stetefeld J. The use of coiled-coil proteins in drug delivery systems[J]. *European Journal of Pharma-*

- cology, 2009, 625: 101-7.
- [12] V Lacronique, D Boquet, S Lopez, A Kahn, M Raymondjean. In vitro and in vivo protein-DNA interactions on the rat erythroid - specific L' pyruvate kinase gene promoter [J]. *Nucleic Acids Res.*, 1992, 20(21): 5669-5676.
- [13] 李胜杰, 白俊杰, 叶星, 劳海华, 简清. 加州鲈生长激素和胰岛素样生长因子 I cDNA 的克隆及序列分析[J], *农业生物技术学报*, 2007, 15(5): 783-788.
- [14] 罗艳梅, 张超, 赵中权, 范景胜, 张家骅. 大足黑山羊卵泡抑制素 cDNA 的克隆、序列分析及组织表达[J]. *中国农业科学*, 2011, 44(22): 4700-4705.
- [15] 王世凯, 兰干球, 罗琴, 郭亚芬, 王爱德. 广西巴马小型猪肌肉生长抑制(Myostatin) cDNA 克隆和序列分析[J]. *实验动物科学*, 2007, 24(6): 32-37.
- [16] Ahmad I, Hoessli DC, Walker-Nasir E, Rafik SM, Shakoori A R, Nasir-ud-Din. Oct-2 DNA binding transcription factor: functional consequences of phosphorylation and glycosylation [J]. *Nucleic Acids Res.*, 2006, 34(1): 175-184.
- [17] Michel U, Albiston A, Findlay JK, Rat follistatin: gonadal and extragonadal expression and evidence for alternative splicing[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, 173(1): 401-7.
- [18] Lobley A, Pierron V, Reynolds L, Allen L, Michalovich D. Identification of human and mouse CatSper3 and CatSper4 genes: characterization of a common interaction domain and evidence for expression in testis[J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2003, 1: 53.
- [19] Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. Proc. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, 74, 5463-5467.
- [20] Chirgwin, J., Przybyla, A., MacDonald, J. & Rutter, W. Phenol-chloroform Extraction [J]. *Biochemistry*, 1979, 18, 5294-5299.
- [21] Kozak, M. Ability of tobacco streak virus coat protein to substitute for late functions of alfalfa mosaic virus coat protein[J]. *Nucleic Acids Res*, 1981, 9, 5233-5252.
- [22] Bartelt, D. C., Shapanka, R. & Greene, L. J. Primary structure of the human follistatin precursor and its genomic organization. *Arch. Biochem*[J]. *Biophys*, 1977, 179, 189-199.
- [23] Yamamoto, T., Nakamura Y., Nishide, T., Emi, M., Ogawa, M., Mori, T. & Matsubara, K. Pancreatic secretory trypsin inhibitor in cancer[J]. *Biochem. Biophys, Res. Commun.*, 1985, 132, 605-612.