

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00169

荷斯坦牛 *HSP70-1* 基因遗传多态性与乳腺炎抗性关系

程维杰^{1,2}, 李秋玲¹, 王长法¹, 王洪梅¹, 李建斌¹, 孙延鸣², 仲跻峰¹

1. 山东省农业科学院奶牛研究中心, 济南 250100;

2. 新疆石河子大学动物科技学院, 石河子 832000

摘要: 以 253 头中国荷斯坦奶牛为研究对象, 检测 *HSP70-1* 基因的多态性, 并分析其多态性与中国荷斯坦牛体细胞评分(Somatic cell score, SCS)的相关性。首先以 PCR-SSCP 法寻找 *HSP70-1* 基因编码区的突变, 并通过测序确定突变的类型, 根据突变类型寻找合适的内切酶, 最终采用 PCR-RFLP 方法鉴定实验牛基因型; 然后分析基因多态性与中国荷斯坦牛 SCS 的相关性。结果表明 *HSP70-1* 基因的 1 623 bp 处产生 G→A→C 突变, 2 409 bp 处产生 G→A 突变, 两位点都是沉默突变, 未引起氨基酸序列的改变; 经 χ^2 适合性检验, 中国荷斯坦牛在两个位点均未达到 Hardy-Weinberg 平衡状态; 同时, 群体基因座不同基因型与 SCS 相关分析的结果表明, 2409 位点基因型与 SCS 相关性不显著($P>0.05$), 1623 位点基因型与 SCS 相关性显著($P<0.05$), CC 型 SCS 显著低于 AG、GG 型($P<0.05$), CC 基因型为乳腺炎抗性基因型。在中国荷斯坦奶牛群体中, *HSP70-1* 基因 CC 基因型可作为改良奶牛乳腺炎抗性性状的分子遗传标记。

关键词: 热休克蛋白 70; 限制性片段长度多态性; 单链构象多态性; 体细胞评分; 乳腺炎抗性

Genetic polymorphism of *HSP70-1* gene and its correlation with resistance to mastitis in Chinese Holstein

CHENG Wei-Jie^{1,2}, LI Qiu-Ling¹, WANG Chang-Fa¹, WANG Hong-Mei¹, LI Jian-Bin¹, SUN Yan-Ming², ZHONG Ji-Feng¹

1. Dairy Cattle Research Center, Shandong Academy of Agricultural Science, Ji'nan 250100, China;

2. College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832000, China

Abstract: The polymorphisms of *HSP70-1* gene in 253 Chinese Holstein dairy cows were studied, and the association between the polymorphisms and somatic cell score (SCS) were analyzed. PCR-SSCP, PCR-RFLP and DNA sequencing were used to investigate mutations in the coding region of *HSP70-1* gene. The G→A→C mutation at 1 623 bp and G→A mutation at 2 409 bp were found and both of them were silence mutations that caused no alteration in amino acid sequence. Chi-square test showed both loci weren't at Hardy-Weinberg disequilibrium in Chinese Holstein. In the meanwhile, the

收稿日期: 2008-04-17; 修回日期: 2008-06-27

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(编号: 2006AA10Z1D9, 2007AA10Z169), 山东省农业科学院高新技术创新基金项目(编号: 2006YCX028)资助

作者简介: 程维杰(1979-), 男, 硕士, 研究方向: 动物分子遗传。E-mail: taijichi@126.com

通讯作者: 仲跻峰(1964-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 动物繁育。E-mail: sdox2@163.com

孙延鸣(1965-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 临床兽医学。E-mail: sym@shzu.edu.cn

association of 2 409 locus and SCS was not significant. However, the polymorphism at 1623 locus affected SCS significantly ($P < 0.05$). The SCS of genotype CC was significantly lower than that of genotype AG and GG ($P < 0.05$), so genotype CC was mastitis resistant. These results suggest that genotype CC of *HSP70-1* gene may be used as a molecular and genetic marker to improve the phenotype of anti-mastitis in Chinese Holstein dairy cows.

Keywords: HSP70; restriction fragment length polymorphism; single-strand conformation polymorphism; somatic cell score; mastitis resistance

乳腺炎是奶牛常见病、多发病之一,严重危害了世界奶业的发展。长期以来奶业发达国家对奶牛乳腺炎的防制进行了大量研究,虽然取得了一定的成果,但仍未能从根本上解决问题。研究表明,同一环境下的不同个体对乳腺炎的易感性及抗性差异显著^[1]。因此,有必要从遗传水平上研究乳腺炎的有效控制机制。乳腺炎本身是遗传力很低的数量性状,常规育种效果不明显,而以分子标记辅助育种和转基因育种为代表的分子育种,就成为控制乳腺炎的新突破点。体细胞评分(Somatic cell score, SCS)是由体细胞数(Somatic cell count, SCC)计算得来,与乳房炎有较高的遗传相关,是目前对奶牛乳房炎进行监测的有效方法之一^[2]。

热休克蛋白 70(Heat shock protein 70, HSP70)通过其分子伴侣作用参与新生蛋白质折叠、转运、损伤蛋白质的修复、异常聚集蛋白质的降解,抗原呈递等许多重要体内过程,从而在生物体正常和应激条件下发挥重要作用。研究表明, HSP70 的表达能够减少一氧化氮的合成释放,减轻促炎因子对组织细胞的损伤;可抑制巨噬细胞合成及释放 IL21、TGF2 α 等细胞因子,增加超氧化物歧化酶(SOD)活性,减少氧自由基的形成,减轻炎症反应。这提示我们 *HSP70* 基因表达或许与奶牛乳腺炎的发生和发展有一定关系,可以作为奶牛乳腺炎抗性育种的候选基因。

牛的 *HSP70* 由两个基因编码(*HSP70-1*、*HSP70-2*),这两个基因定位于染色体 23q13,无内含子,编码 641 个氨基酸。通过 GenBank 公布的荷兰牛基因序列比对发现 *HSP70-1* 和 *HSP70-2* 基因的编码区仅有 2 处核苷酸差异,它们的不同在于 3'非翻译区。

本研究以中国荷斯坦牛 *HSP70-1* 基因为候选基因,综合利用 PCR-RFLP 和 PCR-SSCP 技术,分析该基因编码区的遗传多态性及其与中国荷斯坦牛 SCS 的相关性,以期找到与中国荷斯坦牛乳腺炎抗性相

关的分子标记,为奶牛标记辅助育种、提高中国荷斯坦牛的乳腺炎抗性提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验样本

实验样本来自天津 5 个现代化奶牛场,随机选取产奶牛 253 头,颈静脉采血,3.8%柠檬酸钠抗凝,-20℃ 冷冻保存备用。实验牛具备齐全的系谱资料、完整的生产性能数据。

1.1.2 主要试剂

Taq DNA 聚合酶等购自上海生工生物工程技术服务有限公司;限制性内切酶 *EcoR*、*Bgl*、*Fok* 购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取

用酚-氯仿抽提法从牛血样中提取基因组 DNA。

1.2.2 引物设计和 PCR 扩增

根据 NCBI 登陆号为 AY149618 的荷兰牛 *HSP70-1* 基因序列(19 526 bp)设计 9 对引物。由于 *HSP70-1* 基因和 *HSP70-2* 基因编码同一产物,在编码区仅有两处核苷酸差异,不同之处在于它们的 3 非翻译区,为了避免对 *HSP70-2* 基因的错误扩增,先设计一对引物覆盖 *HSP70-1* 基因全长并跨到其 3 非翻译区。以此 PCR 产物 2 000 倍稀释做为模板,再设计 8 对引物扩增出 *HSP70-1* 基因的整个编码区,为适应 PCR-SSCP 的需要,产物长度在 200~450 bp 之间。

引物序列、扩增的基因范围、片段大小及复性温度见表 1。反应总体系为 25 μ L,包括:模板 50 ng、10 mmol/L dNTP 1 μ L、10 \times PCR buffer 2.5 μ L、

10 μmol/L 上下游引物各 1 μL、25 mmol/L Mg²⁺ 1.5 μL、*Taq* 酶 2 U, 加水至 25 μL。PCR 条件: 94 变性 2 min; 94 变性 30 s, 52~58 复性 30 s, 72 延伸 30 s, 30 个循环; 最后再 72 延伸 5 min。

1.2.3 PCR-SSCP

PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳, 鉴定产物是否有目的条带, 目的条带清晰的加入变性缓冲液, 95 变性 5 min, 立即冰浴 5 min, 8%聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳条件为 1×TBE、150 V、12 h。电泳结束后硝酸银染色、拍照, 并分析基因的多态性。

1.2.4 PCR-RFLP

由于 PCR-SSCP 的结果受环境影响较大, 重复性不好, 容易造成误判, 因此 SSCP 方法找到多态片段后将该片段具有不同带型的 PCR 产物回收测序并进行序列比较, 再根据突变的性质选择合适的内切酶, 采用 PCR-RFLP 法鉴定实验牛群 *HSP70-1* 基因的基因型。

酶切步骤按生产商提供的产品说明书操作。12% PAGE 电泳条件为: 1×TBE、120 V、5 h。电泳结束后硝酸银染色、拍照, 并分析基因型。

1.2.5 数据处理

由于 SCC 是计量性状, 其分布频率是偏态的。因此, 本实验将 SCC 转换成 SCS, 遵循正态分布,

以克服统计分析中的不足^[3]。公式为: $SCS = \log_2 (SCC/10000)+3$ 。

对测得的基因型进行统计, 计算基因频率和基因型频率, 并进行 Hardy-Weinberg 平衡检验, 计算多态信息含量、有效等位基因数、杂合度。

采用 SAS 8.2 软件的一般线性模型, 分析各基因型对乳腺炎性状的影响。依据 Liu^[4]所述方法, 并结合本实验实际建立最小二乘法拟合线性模型, 分析 *HSP70-1* 基因型效应。四因素方差分析的模型为: $Y_{ijklm} = \mu + T_j + C_k + G_l + S_m + e_{ijklm}$

式中: Y_{ijklm} 为个体性状表型值; μ 为群体平均值; T_j 为胎次效应; C_k 为场际效应; G_l 为标记基因型效应; S_m 为季节效应; e_{ijklm} 为随机误差。

2 结果与分析

2.1 *HSP70-1* 基因多态性分析

PCR-SSCP 分析发现引物 P1、P2 和 P4 的 PCR 产物具有多态性, 其他几对引物的 PCR 产物未见多态。回收测序后发现 P4 产物存在 G→A 的突变, 形成 3 种基因型: AA、GA、GG。该突变位于 *HSP70-1* 基因的 2409 位点, 该位点可以被 *EcoR* II 识别, 当位点为 G 时能切开, 为 A 时不能切开, 因该产物还存在其他非多态的酶切位点, 该片段酶切后 3 种基因型形成 3 种带型: AA(106 bp, 65 bp, 50 bp, 13 bp,

表 1 根据 *HSP70-1* 基因编码区设计的 9 对引物

引物	引物序列(5'→3')	扩增位置	片段大小 (bp)	复性温度()
P0	F: GCGGCTTAGTCCGTGAGAACA R: ATCCCAACAGTCTCCATAACAAACA	1324~3440	2 117	59
P1	F: GGGCCGTTTTTCAGGA R: GGGTCTCCGAAGTTGC	1414~1709	296	57
P2	F: GAACCCGCAGAACACG R: CGAGTCGTTGAAGTAGGC	1650~1926	277	57
P3	F: ATCAACGAGCCACG R: GCTGGACGACAAGGTTC	1984~2298	315	57
P4	F: TGTCGTCCAGCACCCA R: GCCCGTTGAAGAAGTCC	2288~2536	249	57
P5	F: CGCATCCCCAAGGTG R: GGCTGGTTGTCCGGATA	2491~2774	284	57
P6	F: CACCTACTCGGACAACC R: TCACCTCCTGGCACTT	2754~3199	446	57
P7	F: CGGACAAGAAGAAGGTGC R: ATCCCAACAGTCTCCATAA	3161~3440	280	57
P8	F: TACCGAGCGCCTCATC R: AACGCCTTGGTCTCCC	1605~1808	204	54

9 bp, 6 bp); *GG*(65 bp, 60 bp, 50 bp, 46 bp, 13 bp, 9 bp, 6 bp); *GA*(106 bp, 65 bp, 60 bp, 50 bp, 46 bp, 13 bp, 9 bp, 6 bp)。13 bp 及以下片段在电泳图上不显示, 65 bp 和 60 bp 的条带在电泳图上连在一起, 在图像上仅见一条比单一的 65 bp 条带稍宽的条带, 该片段酶切图谱如图 1。

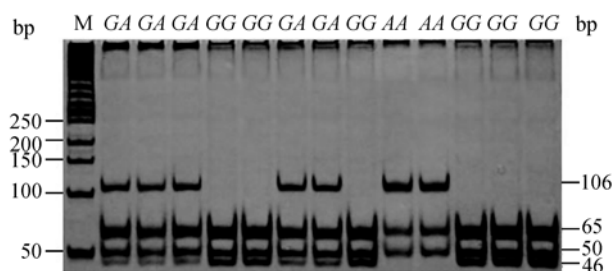


图 1 2409 位点 *EcoR* II 酶切图谱(12%聚丙烯酰胺凝胶电泳, 硝酸银染色)

M: 50 bp DNA ladder marker.

引物 P1、P2 也出现多态, 经过测序发现多态性由一个突变点引起, 该位点位于两个 PCR 产物的重叠处, 在 *HSP70-1* 基因的 1623 位点, 为 $G \rightarrow A \rightarrow C$ 的复等位多态位点。由于突变位点存在 3 个等位基因, 只找到一个内切酶 *Fok* 可以识别其中的碱基 G, *Fok* 酶切的结果只能判定完全切开的为 *GG* 基因型, 不能判定切不开和不完全切开的基因型, 于是又根据位点突变的性质采用创造酶切位点的办法^[5], 重新设计引物, 在引物中引入一个错配碱基, 把基因原序列中 1614 位点的 G 变为 C, 该错配碱基和 1623 位点的 C 形成一个 *Bgl* 的识别位点, 可以切开突变的 C, 酶切后形成的 189 bp 和 15 bp 两个片段; *Fok* 该酶切该片段形成 172 bp 和 32 bp 的两个片段。两个酶未切开的为 204 bp、15 bp 和 32 bp 的条带在图上看不到。重新设计的引物为 P8, 在 1 605~1 808 bp 处扩增长度为 204 bp 的产物(表 1)。

1623 位点具体基因型的判定要结合两次酶切结果, 具体判定方法: *AA*(两个酶均不能切开), *GG*(*Fok* 完全切开), *CC*(*Bgl* 完全切开), *AG*(*Fok* 杂合, *Bgl* 未切开), *AC*(*Bgl* 杂合, *Fok* 未切开), *GC*(两次酶切均呈杂合)。酶切图谱见图 2。

2.2 基因座位在群体中的遗传特性

253 头荷斯坦牛进行基因座位的群体遗传特析, 结果见表 2~4。由表可见, 2409 位点多态信息含量为 0.267, 属于中度多态; 1623 位点多态信息含量

为 0.557, 属于高度多态, 符合作为分子遗传标记的要求。经过 χ^2 适合性检验, 中国荷斯坦牛 1623 位点 χ^2 值为 179.843($P < 0.01$)、2409 位点 χ^2 值为 31.333($P < 0.01$), 两位点突变均未达到 Hardy-Weinberg 平衡状态。

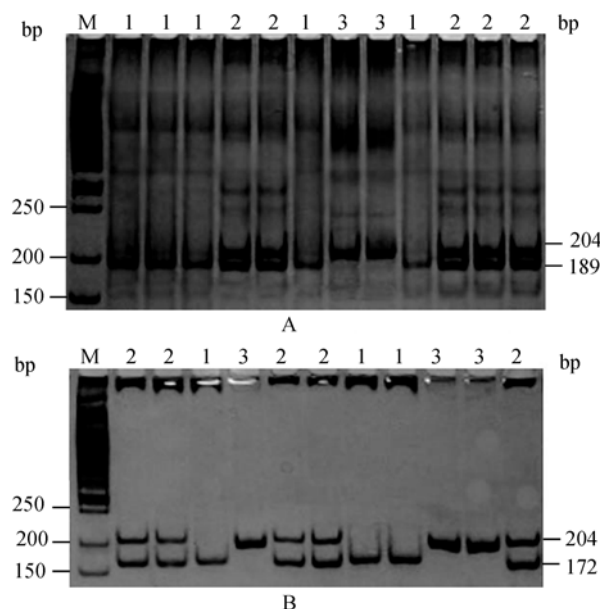


图 2 1623 位点酶切图谱(12%聚丙烯酰胺凝胶电泳, 硝酸银染色)

A: *Bgl* 酶切图谱, 1: *CC* 基因型; 2: 杂合型; 3: 未切开。B: *Fok* 酶切图谱, 1: *GG* 基因型; 2: 杂合型; 3: 未切开。M: 50 bp DNA Ladder Marker。

2.3 *HSP70-1* 基因多态性与群体的 SCS 的方差分析

用标记效应组成的固定模型, 对 SCS 进行方差分析, 综合 1~6 胎次的数据进行拟合模型发现, 场次和胎次对 SCS 影响极显著($P < 0.01$), 产犊季节对 SCS 影响显著($P < 0.05$), 1623 位点基因型对 SCS 影响显著($P < 0.05$), 2409 位点基因型对 SCS 影响不显著($P > 0.05$)(表 5)。1623 位点 *CC* 基因型 SCS 显著低于 *GA*、*GG* 基因型, 其他基因型之间差异不显著, 1623 位点 *CC* 基因型为乳腺炎抗性基因型(表 6)。

3 讨论

3.1 奶牛乳腺炎抗性分子遗传研究

迄今为止, 研究奶牛乳腺炎抗性的分子主要有以下几个基因: (1)乳铁蛋白基因: 乳铁蛋白基因表达的乳铁蛋白具有抗菌、抗病毒以及作为生长、

表 2 中国荷斯坦牛 2409 突变位点基因频率和基因型频率

个体数	基因型频率			等位基因频率	
	AA	GA	GG	A	G
253	0.095(24)	0.205(52)	0.70(177)	0.198	0.802

表 3 中国荷斯坦牛 1623 突变位点基因频率和基因型频率

个体数	基因型频率						等位基因频率		
	AA	CA	CC	GA	GC	GG	A	C	G
253	0.032 (8)	0.047 (12)	0.403 (102)	0.277 (70)	0.043 (11)	0.198 (50)	0.194	0.448	0.358

表 4 基因座位在群体中的多态信息含量、杂合度、有效等位基因数及 χ^2 检验

品种	突变点	多态信息含量(PIC)	杂合度(He)	有效等位基因数(Ne)	χ^2
中国荷斯坦牛	1623	0.557	0.633	2.727	179.843**
	2409	0.267	0.317	1.464	31.333**

**: $P < 0.01$ 。

表 5 各因素对中国荷斯坦奶牛群的体细胞评分的影响

因素	场次	胎次	产犊季节	2409 位点基因型	1623 位点基因型
F 值(1~6 胎次)	9.20**	9.40**	6.06*	0.76	2.47*

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。表 6 *HSP70-1* 基因 1623 位点不同基因型在群体中的最小二乘均值(LSM) 及标准误(SE)

基因型	AA	CA	CC	GA	GC	GG
最小二乘均值±标准误	6.1610±0.5305 ^{ac}	5.2696±0.5022 ^{ac}	5.1780±0.2552 ^a	5.8592±0.2875 ^{bc}	5.6349±0.4886 ^{bc}	5.8340±0.2969 ^{ac}

注: 肩注字母有相同者差异不显著($P > 0.05$)。

分化因子和血小板凝集抑制子的生物学作用, 奶牛乳汁中乳铁蛋白浓度的升高可以降低乳腺炎的发生。乳铁蛋白基因为奶牛抗乳腺炎育种中重要的候选基因; (2)MHC: 即主要组织相容性复合物, 在动物机体的免疫系统中发挥着极其重要的作用, 因而也就成为了疾病抗性和易感性的候选标记基因; (3) β -防御素基因: 研究表明 β -防御素基因可在乳腺等组织中受病原的诱导表达^[6]。牛 β -防御素 TAP、LAP、BNBD1-13 等对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、克雷伯肺炎杆菌、绿脓杆菌等乳腺炎病原菌有抗菌活性^[7]。因此, β -防御素基因已作为抗乳腺炎的重要候选基因。

3.2 *HSP70-1* 基因作为乳腺炎抗性候选基因研究的意义

HSP70-1 基因与奶牛乳腺炎的关系在国内外尚未见报道, 但研究表明 HSP70 表达与多种炎症性疾病有关, HSP70 通过抑制多种有致炎作用的细胞因子, 及促进抗炎因子 IL-10 的表达而参与炎症反应过程。

Schmidt^[8]等研究发现, 热休克蛋白可以明显抑制多种细胞的前炎症反应及前炎症细胞因子 IL-1 β 与 TNF- α 的表达, HSP 含量与细胞因子 IL-1 β 与 TNF- α 表达呈明显负相关关系。Merz 等^[9]的研究表明, HSP70 表达增加有明显的抗炎作用, HSP70 的抗炎作用与其减少炎症介质、细胞因子的产生, 以及增加抗炎细胞因子 IL-10 的表达有关。郭辉等^[10]利用 ELISA 对慢性细菌性前列腺炎以及慢性非细菌性前列腺炎患者精浆中的 HSP70 进行了检测, 研究结果发现患者精浆 HSP70 含量越高, 症状评分越低, 二者存在明显的负相关关系。Liew 等^[11]用热处理加限制饲养的办法处理幼龄鸡, 和对照组相比处理组 HSP70 表达增加, 同时通过十倍于常用量的法氏囊活苗注射以引起轻微的法氏囊炎症, 发现处理组法氏囊病症状评分显著低于对照组; HSP70 表达量和法氏囊病症状评分呈负相关; 而处理组的特异抗体并未增加, 说明处理组对法氏囊炎症的抵抗力来自 HSP70 的非特异抗炎作用而不是特异抗体。

奶牛乳腺炎和其他类型的炎症反应有着相似的病理机制, 以上研究提示我们, HSP70 或许在乳腺炎的发生和发展过程中起一定作用, 分析 HSP70 基因与乳腺炎发生的关系有一定的实际意义。

3.3 HSP70-1 基因座位群体遗传特性分析

群体在某个座位上的遗传平衡主要受突变、迁移、漂变和选择等因素的影响。在畜牧生产中, 人工选择是影响群体基因平衡的一个重要因素, 当对某个数量性状进行定向的人工选择时, 其结果必然是导致该数量性状的主基因以及与之相连锁的其它基因或遗传标记的遗传平衡被打破。本研究结果表明, 在供试荷斯坦奶牛群体中 HSP70-1 基因座位未达到平衡状态, 而 1623 座位与荷斯坦奶牛的 SCS 指标存在显著相关, 说明荷斯坦奶牛在乳腺炎抗性数量性状上受到选择的影响。两个位点的突变都没有引起多肽链氨基酸的变化(2409 位点仍为亮氨酸, 1623 位点仍为甘氨酸), 由此也再次证明了 HSP70 基因确实在进化中的保守性以及它对动物机体的重要性。

2409 位点多态信息含量处于 0.25 和 0.50 之间, 属于中度多态; 1623 位点多态信息含量大于 0.50 属于高度多态, 均符合作为分子遗传标记的要求, 经过选择可望获得更多遗传进展。

3.4 HSP70-1 基因多态性与荷斯坦牛乳腺炎抗性系

由表 5、表 6 可见, 2409 位点基因型对荷斯坦奶牛的 SCS 指标无显著影响, 1623 位点的基因型对 SCS 指标影响显著($P < 0.05$), CC 基因型显著低于 GA、GG 基因型。CC 基因型为乳腺炎抗性基因型。其他基因型之间差异不显著, 但是从各基因型的最小二乘均值看, AA 型为 6 种基因型中最高, 而 CA 和 GC 也是较低的, 它们之所以与其他各型统计差异不显著可能是由于数据量较少造成的均值较高但不具有统计学意义。由此可见 CC、CA 和 GC 有低 SCS 的趋势; 而 GG、AA 和 GA 有高 SCS 的趋势; 因此我们可以推测 C 基因为乳腺炎抗性基因, 通过对 C 基因的选择, 可对奶牛的乳腺炎抗性产生良好的作用。C 基因之所以对乳腺炎表现出抗性可能是与其他效基因相连锁的结果, 也可能是这个突变改变了 mRNA 的稳定性, 或者是由于荷斯坦牛特有的密码子使用偏好等原因使 1623 位点不同基因型 HSP70 在组织中表达的改变, Pociot 等^[12]报道编码区内的 HSP70-2(A/G)基因多态性变化虽然没有改变蛋白质中氨基酸的序列, 但能影响 mRNA 表达。

如上所述, 由于本实验中 1623 位点出现了复等位基因, 造成单个基因型数据较少, 本实验结果以及 1623 位点的基因型效应是否由 HSP70 差异表达引起还有待于在大样本实验中, 以及在 HSP70-1 mRNA 和蛋白质表达水平的实验进一步验证。

参考文献(References):

- [1] Heringstad B, Klemetsdal G, Ruane J. Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the Nordic countries. *Livest Prod Sci*, 2000, 64(2): 95–106. [\[DOI\]](#)
- [2] 储明星, 石万海, 邝霞, 过纬, 曹福存, 李建凡. 浅谈奶牛乳腺炎. *中国奶牛*, 2001, (3): 39–40.
- [3] Shook GE. Genetic improvement of mastitis through selection on somatic cell count, veterinary clinics of North America. *Food Anim Pract*, 1993, 9(3): 563–581.
- [4] Liu BH. Statistical Genomics: Linkage, Mapping, and QTL Analysis. LLC: CRC Press, 1998, 404–409.
- [5] 赵春江, 李宁, 邓学梅. 应用创造酶切位点法检测单碱基突变. *遗传*, 2003, 25(3): 327–329.
- [6] Goldammer T, Zerbe H, Molenaar A, Schubert HJ, Brunner RM, Kata SR, Seyfert HM. Mastitis increases mammary mRNA abundance of beta-defensin 5, toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2004, 11(1): 174–185. [\[DOI\]](#)
- [7] Roosen S, Exner K, Paul S, Schroder JM, Kalm E, Looft C. Bovine β -defensins: Identification and characterization of novel bovine β -defensin genes and their expression in mammary-gland tissue. *Mamm Genome*, 2004, 15(10): 834–842. [\[DOI\]](#)
- [8] Schmidt JA, Abdulla E. Down-regulation of IL-1 beta biosynthesis by inducers of the heat-shock response. *Immunol*, 1988, 141(6): 2027–2034.
- [9] Merz U, Kellinghaus M, Hausler M. Partial liquid ventilation with surfactant: effects on gas exchange and lung pathology in surfactant depleted piglets. *Intensive Care Med*, 2000, 26(1): 109–116. [\[DOI\]](#)
- [10] 郭辉, 王少刚, 余建华, 叶章群, 邬堂春. 慢性前列腺炎患者精浆中热休克蛋白的表达及临床意义. *中华泌尿外科杂志*, 2004, 25(6): 411–413.
- [11] Liew PK, Zulkifli I, Hair-Bejo M, Omar AR, Israf DA. Effects of early age feed restriction and heat conditioning on heat shock protein 70 expression, resistance to infectious bursal disease, and growth in male broiler chickens subjected to heat stress. *Poultry Sci*, 2003, 82(12): 1879–1885.
- [12] Pociot F, Ronningen KS, Nerup J. Polymorphic analysis of the human MHC-linked heat shock protein 70 (HSP70-2) and HSP70-hom genes in insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Scand J Immunol*, 1993, 8(5): 491–495. [\[DOI\]](#)