

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00982

绵羊 *FGF5* 基因的克隆、表达及 RNA 干扰

刘伍限¹, 贾斌¹, 石国庆^{1,3}, 任建功², 刘卡², 马润林²

1. 石河子大学动物科技学院, 石河子 832000;
2. 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101;
3. 新疆农垦科学院畜牧兽医研究所, 石河子 832000

摘要: 根据牛的成纤维细胞内生长因子 5(Fibroblast growth factor 5, *FGF5*) 基因 cDNA 序列设计引物, PCR 扩增得到绵羊 *FGF5* 基因 cDNA 的开放阅读框序列, 并比较和其他 6 种高等哺乳动物的序列同源性; 同时研究该基因在绵羊多种组织的表达情况, 以及研究以细胞模型 RNA 干扰下的表达情况。结果表明, 绵羊 *FGF5* 基因 ORF 全长为 813 bp, 编码 270 个氨基酸, 分子量约为 29.58 kDa, 理论等电点 10.59。绵羊 *FGF5* 基因 cDNA 序列与牛、人、小鼠、大鼠、犬和猫的对应该序列同源性高度保守, 预测氨基酸序列同源性同样具有高度保守性。RT-PCR 分析表明 *FGF5* 在绵羊皮肤、小肠、肾脏、心脏、肝脏、脾脏、胰脏和肺中均有表达, 皮肤中表达量最高。构建该基因的原核表达载体和 RNAi 载体, IPTG 诱导在大肠杆菌中融合表达获得 55 kDa 的蛋白条带, 设计的 RNA 干扰片段能显著抑制 *FGF5* 基因的表达。文章为进一步阐明绵羊 *FGF5* 的功能尤其是在羊毛生长发育中的作用提供了理论和实验基础。

关键词: 绵羊; *FGF5*; 基因克隆; 表达; RNAi

Cloning, expression analysis and RNA interference of *FGF5* gene in sheep

LIU Wu-Xian¹, JIA Bin¹, SHI Guo-Qing^{1,3}, REN Jian-Gong², LIU Ka², MA Run-Lin²

1. College of Animal Science, Shihezi University, Shihezi 832000, China;
2. Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;
3. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Xinjiang Academy of Agricultural and Reclamation Science, Shihezi 832000, China

Abstract: The cDNA of fibroblast growth factor 5 (*FGF5*) gene in sheep was cloned, and the nucleotides sequence homology of *FGF5* was compared with other six mammal. In addition, the expression of *FGF5* in different tissues was analysed. Gene *FGF5* was then recombined into prokaryotic expression vector (pGEX-4T-2) and RNA interference vector (pSilencer 5.1 H1) to study its expression in fibroblast cell lines. Results showed that the open reading frame (ORF) of cDNA in sheep consisted of 813 nucleotide acids encoding 270 amino acids, with the molecular mass of 29.58 kDa and theoretical pI of 10.59. The amino acids sequence of *FGF5* gene in sheep shared high identity with those in cow, human, mouse, rat,

收稿日期: 2010-12-03; 修回日期: 2011-01-12

基金项目: 优质转基因细毛羊新品种培育(编号: 2009ZX08008-001B)

作者简介: 刘伍限, 硕士研究生, 专业方向: 动物生理学与生物化学。Tel: 13579749706; E-mail: lwx_666@sina.com

通讯作者: 贾斌, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物分子遗传学和动物生长调控的神经内分泌学。E-mail: jiabin65@sina.com

马润林, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 功能基因组学。E-mail: rlma@genetics.ac.cn

网络出版时间: 2011-6-27 14:27:35

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20110627.1427.004.html>

dog, cat and rabbit. In addition, analysis on tissue expression showed that *FGF5* expressed in skin, heart, kidney, liver, pancreas, spleen, lung, and small intestine, especially presenting high levels in skin. The expression of *FGF5* in *E. coli* was induced with IPTG, which produced a protein band with the expected size of 56 kDa on SDS-PAGE, while the expression of *FGF5* in sheep fibroblast cell line was knocked down remarkably with the help of integrated RNAi vector.

Keywords: sheep; *FGF5*; gene cloning; expression; RNAi

羊毛作为纺织工业的重要原料,它不仅具有优良的保暖性能,而且具有良好的吸湿保湿效果,羊毛纤维柔软而富有弹性,可用于制作呢绒、绒线、毛毯、毡呢等纺织品,深受广大人民群众喜爱,成为编织轻、柔、滑、爽、暖、薄的天然保健贴身衣服的最好动物纤维之一^[1]。但是,一直以来,我国高品质的羊毛产量较少,难以满足国内需求,整个毛纺织业的发展主要依赖于国外高品质的羊毛的供应^[2]。因此,提高羊毛品质有利于推进我国羊毛产业的发展,满足人们对纺织品舒适性能的要求,而对羊毛性状的研究是改善羊毛品质和提高羊毛产量的重要手段。因而,对绵羊产毛性状相关基因的研究有着重要的意义。研究发现成纤维细胞内生长因子 5 (Fibroblast growth factor 5, *FGF5*)是影响毛发长度的重要影响因子^[3~6],参与调控毛囊从兴盛期向休眠期转化,其蛋白直接或间接诱导退行期的启动,对毛发生长具有抑制作用^[7]。

近年来,在人、小鼠、牛和大鼠中,都分离到了 *FGF5* 基因 cDNA 序列^[8~11],而且都具有高度的保守性。因此,本研究以绵羊耳组织成纤维细胞为材料,克隆绵羊 *FGF5* 基因,并对其进行了表达分析和 RNAi 研究,为进一步研究并阐明绵羊 *FGF5* 蛋白的生物学功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用绵羊包括小尾寒羊和中国美利奴羊,取皮肤、肺脏、肝脏、脾脏、肾脏、心脏、胰脏和小肠组织,液氮保存;绵羊耳组织成纤维细胞由本实验原代培养并保存。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取和第一链 cDNA 合成

按照 Trizol 和 M-MLV RT 试剂盒操作步骤进行。

总 RNA 提出后进行琼脂糖凝胶电泳检测,同时测定 OD_{260}/OD_{280} 值,并调整浓度在 $1\sim 2\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$,然后再进行第一链 cDNA 合成, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 *FGF5* 基因 cDNA 的克隆

参照牛的同源保守区域,并运用软件 Primer 2.0 在其保守区设计引物,本实验设计 3 对引物(表 1),分别为 F1/R813、F1/R485、F285/R813,引物由北京擎科生物技术有限公司合成。以绵羊皮肤组织 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,克隆目的基因。PCR 扩增程序如下:94 预变性 5 min,94 变性 30 s,60 复性 30 s,72 延伸 30 s,35 个循环;最后 72 延伸 10 min。PCR 扩增产物经纯化连接到 pMD18-T 载体上测序,由北京擎科生物技术有限公司完成。

表 1 绵羊 *FGF5* 基因引物序列

引物	扩增长度 (bp)	序列(5' 3')
F1/R813	813	F1:ATGAGCTTGTCCTTCCTCCT R813:TTAACCAGCGAACTTGA
F1/R468	485	F1:ATGAGCTTGTCCTTCCTCCT R468:GGCACTTGCATGGAGTTTC
F285/R813	525	F285:CAGAGTGGGCATCGGTTTC R813:TTAACCAGCGAACTTGA
β -actin-F/R	285	F:CGCAGACAGGATGCAGAAAGA R:GCTGATCCACATCTGCTGGAA

1.2.3 序列生物信息学分析

应用 ORF Finder 程序确定正确的开放阅读框;采用 ProtParam 程序,预测 *FGF5* 蛋白分子量、等电点等理化性质;通过 BLAST 数据库搜索、分析 *FGF5* 基因核苷酸和氨基酸序列的相似性;并应用 MEGA4.1 软件,以绵羊 *FGF5* 基因预测的氨基酸序列与其他物种 *FGF5* 基因的氨基酸序列构建系统进化树。

1.2.4 组织表达分析

取绵羊皮肤、肺脏、肝脏、脾脏、肾脏、心脏、

胰脏和小肠组织,按照 Trizol RNA 提取试剂盒使用说明,提取总 RNA 并逆转录合成 cDNA 第一链。以绵羊 β -actin 基因(NM_001009784)为内参,使用绵羊 *FGF5* 基因特异引物(F285/R813)进行 PCR 扩增,比较 *FGF5* 基因在绵羊各组织中的表达。内参基因特异引物为 F(5'-CGCAGACAGGATGCAGAAAG A-3')和 R(5'-GCTGATCCACATCTGCTGGAA-3')。反应条件: *FGF5* 基因扩增程序为 95 预变性 5 min; 94 变性 30 s, 60 复性 30 s, 72 延伸 50 s; 35 个循环,最后 72 延伸 10 min。内参 β -actin 基因 PCR 反应时复性温度是 60 , 循环数为 24 个。RT-PCR 实验重复 3 遍。

1.2.5 原核表达载体的构建与表达

根据已获得的绵羊 *FGF5* 基因的开放阅读框序列,设计原核表达引物,上游引物为 5'-GGATCCA-TGAGCTTGTCTTCCTCCT-3'(划线为 *Bam*H 酶切位点),下游引物为 5'-CTCGAGTTAACCAAG-CGAAACTTGA-3'(划线为 *Xho*I 酶切位点)。用 PCR 方法引入带酶切位点的 *FGF5* 基因,并与 pGEX-4T-2 载体用 *Bam*H 和 *Xho*I 双酶切,回收片段,然后用 T4 连接酶连接。连接产物转化入 100 μ L 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,提取质粒、酶切、PCR 扩增、测序鉴定。

将正确的重合质粒 pGEX-FGF5 转化入 50 μ L 大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,提取质粒、酶切验证后测序。将含有测序正确的质粒的菌液涂布于含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上,与 37 培养过夜。次日,挑单个菌落培养,当 OD_{600} 0.6 时加入 0.12 mmol/L、0.16 mmol/L 和 0.18 mmol/L 浓度不同的 IPTG 诱导表达 6 h, 收菌。用 1 \times 加样缓冲液裂解,沸水煮 10 min, 12 000 r/min 离心 1 min, 收集上层菌液裂解液进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.6 干扰载体的构建

针对已得到的绵羊 *FGF5* 基因 CDS 序列,根据所用 Ambion 公司的 pSilencer 5.1-H1 载体,在其公司网站利用其提供的在线工具设计 RNA 干扰片段,结合 RNA 干扰片段设计原则选择 3 段序列为靶序列。干扰片段的 5'端加入 *Bam*H 酶切位点,3'端加入 *Hind* III 位点,其序列见表 2。合成的寡核苷酸 DNA 单链,经复性连接形成双链,然后与目的质粒连接,获得的重组质粒命名为 pSilencer-shRNA。随后转化感受态细菌 DH5 α , 在含 AMP 抗性(终浓度为 100 mg/L)的 LB 培养液中培养过夜,用质粒提取试剂盒提取质粒,将提取得到的重组阳性克隆质粒用 *Bam*H 和 *Hind* III 进行酶切分析并测序鉴定。

1.2.7 细胞转染及干扰效果检测分析

取绵羊耳组织成纤维细胞,于 37 、5% CO₂ 条件下培养。次日接种 24 孔板,每孔细胞计数 2×10^4 加入 DMEM 进行常规培养。24 h 后,弃培养基并加入浓度分别为 200 ng/mL、500 ng/mL、800 ng/mL、1 000 ng/mL、1 200 ng/mL、1 500 ng/mL 嘌呤霉素完全培养基,每 3 d 换液,直至两周后细胞死亡最小浓度为最优嘌呤霉素筛选浓度。在此基础上进行细胞转染实验: DMEM 培养基常规培养绵羊耳组织成纤维细胞,按 VigoFect 转染试剂和 pSilencer 5.1 Retro Kit 说明书使用说明分别转染空白对照组、pSilencer 空载体质粒、pSilencer-shRNA371、pSilencer-shRNA469、pSilencer-shRNA511 重组质粒,嘌呤霉素筛选至空白对照组细胞全部死亡,转染组单克隆细胞形成,再进行常规培养,建立稳定转染细胞系。

收集转染成功不同载体的细胞,同时与绵羊成纤维细胞对照,提取细胞总 RNA,按试剂盒说明反转录 cDNA,并对 cDNA 进行荧光定量检测,反应条件为: 95 预变性 10 s, 95 变性 5 s, 60 复性 20 s、

表 2 针对 *FGF5* mRNA 不同区域的干扰片段

干扰区域	正向序列	反向序列
371~390 bp 区域(I) pSilencer-shRNA371	5'-GATCCATATTTGCTGTGTCTCAGGTTCAAGAG ACCTGAGACACAGCAATATTTTTTGGAAA-3'	5'-AGCTTTTCCAAAAAATATTTGCTGTGTCTC AGGTCTCTTGAACCTGAGACACAGCAATATG-3'
469~488 bp 区域(II) pSilencer-shRNA371	5'-GATCCATTACAGATGACTGCAAGTTCAAGAGA CTTGACATCTGTAAATTTTTTGGAAA-3'	5'-AGCTTTTCCAAAAAATTTACAGATGACTGCAA GTCTCTTGAACCTGCAGTCATCTGTAAATG-3'
371~390 bp 区域(III) pSilencer-shRNA371	5'-GATCCGCAGCTATAATACCTATGCCTTCAAGA GAGGCATAGGTATTATAGCTGTTTTTGGAAA-3'	5'-AGCTTTTCCAAAAACAGCTATAATACCTATGCC TCTCTTGAAGGCATAGGTATTATAGCTGCG-3'

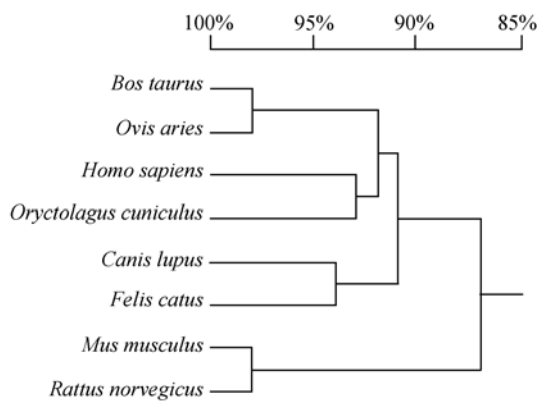


图 3 部分物种 FGF5 氨基酸序列构建的系统进化树

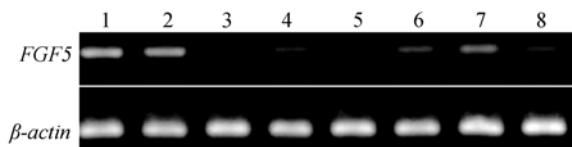


图 4 RT-PCR 检测 FGF5 在不同组织中表达

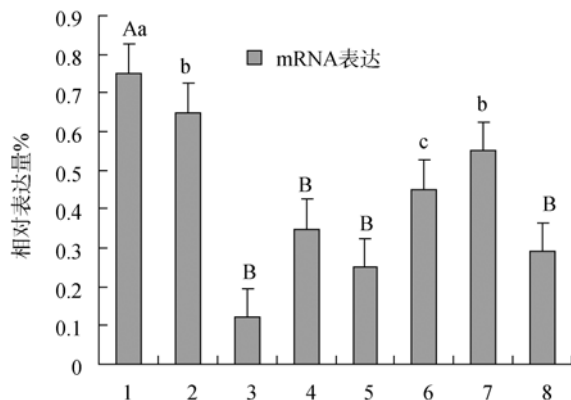


图 5 FGF5 mRNA 在不同组织中的半定量表达

1: 皮肤; 2: 小肠; 3: 肝脏; 4: 肺脏; 5: 脾脏; 6: 胰脏; 7: 心脏; 8: 肾脏。不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$); 不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$); 相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.4 融合蛋白 GST-FGF5 的表达与 SDS-PAGE 检测

实验结果显示, IPTG 最佳诱导浓度为 0.12 mmol/L, 菌液诱导表达蛋白经裂解, 进行 SDS-PAGE 电泳, 诱导 6 h 显示 1 条较浓的约 55 kDa 的蛋白条带, 与预期结果(26 kDa 的 GST 融合蛋白 + 29.58 kDa 的 FGF5 蛋白)相符, 而未诱导对照组未出现该蛋白条带(图 6)。菌液超声处理后, 沉淀在 55 kDa 处有条带, 上清在相应位置没有条带, 证明表达蛋白以包涵体的形式存在(图 7)。

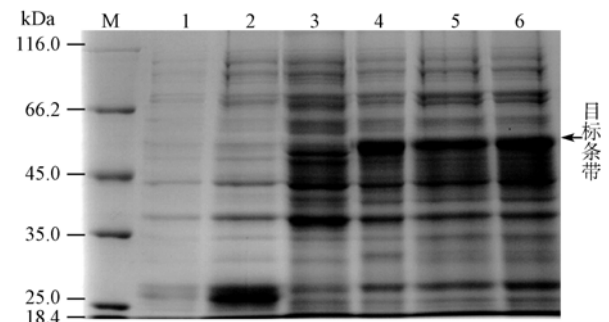


图 6 原核表达融合蛋白 GST-FGF5 的 SDS-PAGE 检测
M: 非预染 Marker; 1: 无 IPTG 诱导的 pGEX-4T-2; 2: 20 μ g IPTG 诱导的 pGEX-4T-2; 3: 无 IPTG 诱导的 pGEX-4T-FGF5; 4: 20 μ g IPTG 诱导的 pGEX-4T-FGF5 的全蛋白; 5: 100 μ g IPTG 诱导 pGEX-4T-FGF5 全蛋白; 6: 200 μ g IPTG 诱导 pGEX-4T-FGF5 全蛋白; 目标条带: GST-FGF5 融合蛋白。

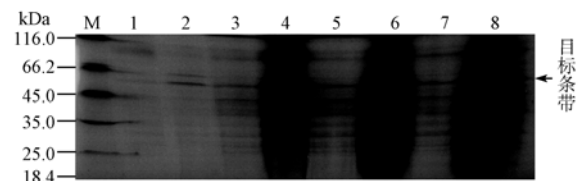


图 7 原核表达的融合蛋白 GST-FGF5 的 SDS-PAGE 检测
M: 非预染 marker; 1: 没有 IPTG 诱导的 pGEX-4T-FGF5 上清; 2: 没有 IPTG 诱导的 pGEX-4T-FGF5 沉淀; 3: 20 μ g IPTG 诱导的 pGEX-4T-FGF5 上清; 4: 20 μ g IPTG 诱导的 pGEX-4T-FGF5 沉淀; 5: 100 μ g IPTG 诱导的 pGEX-4T-FGF5 上清; 6: 100 μ g IPTG 诱导的 pGEX-4T-FGF5 沉淀; 7: 200 μ g IPTG 诱导的 pGEX-4T-FGF5 上清; 8: 200 μ g IPTG 诱导的 pGEX-4T-FGF5 沉淀; 目标条带: GST-FGF5 融合蛋白。

2.5 RNA 干扰载体构建、细胞转染和 FGF5 干扰效果

如材料方法中所述, 将化学合成的干扰片段复性延伸补齐后连接到小干扰 RNA 表达载体 pSilencer 5.1 H1 上, 获得质粒 pSilencer-siRNA, 酶切和测序结果表明其序列与设计的相符, 重合质粒构建成功, 该质粒将表达针对 FGF5 基因的 siRNA。

嘌呤霉素最适浓度筛选结果显示, 1 000 ng/mL 为最适浓度。将各组重组质粒转染细胞 24 h 后, 用含有 1 000 ng/mL 浓度的嘌呤霉素完全培养基筛选细胞, 观察对照组细胞(未转染组)完全死亡后, 获得稳定表达 siRNA 及非特异性对照 siRNA 的转染细胞系。

用 SYBR GREEN 染料法对转染了不同干扰载体的细胞 cDNA 进行定量 PCR 检测, 比较它们的 FGF5 表达量。其中对对照组细胞的 cDNA 进行定量 PCR 检测, 即为绵羊耳组织成纤维细胞 FGF5 表达背景分析。运用 CT 法计算后, 以对照组细胞的 cDNA 作为对样品, 转染阴性对照质粒 pSilencer

表 3 以绵羊耳组织成纤维细胞 cDNA 作为对照样品的干扰结果

	<i>FGF5</i> avCt	β -actin av Ct	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	变化倍数 $2^{-\Delta\Delta Ct}$
绵羊耳组织成纤维细胞	28.07	27.83	0.14	0	1
空载质粒细胞	27.6	19.57	8.03	7.89	0.0042(降低了 237.2 倍)**
pSilencer-siRNA371 细胞	31.7	15.83	15.87	15.73	0.000018(降低 54350.3 倍)**
pSilencer-siRNA469 细胞	23.43	11.23	12.2	11.08	0.00046(降低了 2164.8 倍)**
pSilencer-siRNA511 细胞	27.03	11.13	15.9	15.86	0.000017(降低 59475.2 倍)**

注: **为差异极显著($P < 0.01$)。

表 4 以转染空载载体 pSilencer 的细胞 cDNA 作为对照样品的干扰结果

	<i>FGF5</i> avCt	β -actin avCt	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	变化倍数 $2^{-\Delta\Delta Ct}$
空载质粒细胞	27.6	19.57	8.03	0	1
pSilencer-siRNA371 细胞	31.7	15.83	15.87	7.84	0.0044(降低了 229.1 倍)**
pSilencer-siRNA469 细胞	23.43	11.23	12.2	4.17	0.056(降低了 18 倍)**
pSilencer-siRNA511 细胞	27.03	11.13	15.9	7.87	0.0043(降低了 233.9 倍)**

注: **为差异极显著($P < 0.01$)。

的细胞中 *FGF5* 表达下降了 237.2 倍; 转染 pSilencer-siRNA371 质粒的细胞中 *FGF5* 表达下降了 54 350.3 倍; 转染 pSilencer-siRNA469 质粒的细胞中 *FGF5* 表达下降了 2 164.8 倍; 转染 pSilencer-siRNA511 质粒的细胞中 *FGF5* 表达下降了 59 475.2 倍, 数据见表 3。以转染空载载体 pSilencer 的细胞 cDNA 作为对照样品, 转染 pSilencer-siRNA371 质粒的细胞中 *FGF5* 表达下降了 229.1 倍; 转染 pSilencer-siRNA469 质粒的细胞中 *FGF5* 表达下降了 18 倍; 转染 pSilencer-siRNA511 质粒的细胞中 *FGF5* 表达下降了 233.9 倍, 数据见表 4。

3 讨论

研究发现, 已知 *FGF5* 基因参与毛囊周期调控, 控制毛囊从兴盛期向休眠期转化, 其分泌蛋白直接或间接地诱导退行期的开始, 对毛发的生长起到抑制作用^[7]。推测 *FGF5* 基因对绵羊的羊毛长度也具有重要的影响, 因此我们参照牛的同源保守区域设计引物, 克隆得到 *FGF5* 基因 CDS 序列, 并将其成功构建到表达载体和干扰载体上, 成功诱导表达 GST-*FGF5* 融合蛋白, 大小与预测序列一致, 这为后续的抗体制备奠定了实验条件和基础。同时检测了其在绵羊不同组织的表达情况, 结果显示, 在皮肤、心脏、小肠、肝脏、肺脏、脾脏和胰脏组织均有表达, 而在皮肤组织中表达明显高于其他实验组织, 以此作者认为, *FGF5* 基因在皮肤中的表达, 对毛发

的生长发育起着重要的调节作用, 是调节毛发生长的重要基因。同时, 我们利用 RNAi 技术对绵羊耳组织成纤维细胞进行了 *FGF5* 基因的干扰研究。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是近年发展起来的一项新的分子生物学技术^[12], 是研究基因功能的一种有力工具, 主要基于由双链 RNA (Double-stranded RNA, dsRNA)引发的转录后基因沉默机制, 发挥显著的基因下调作用^[13,14]。本文首次运用该技术对绵羊 *FGF5* 基因进行干扰研究。结果 *FGF5* 表达量显著下降, 证明外源性 H1 启动子能够使 siRNA 干扰载体发挥作用。在我们设计的干扰绵羊 *FGF5* mRNA 的 3 个不同区域中, I、II 和 III 干扰载体转染到细胞后, *FGF5* 的表达量均显著下降, 其中, I 和 III 干扰载体干扰效果极为显著。所以在绵羊 *FGF5* mRNA 中, 第 371~390 bp 区域、第 469~488 bp 区域和第 511~540 bp 区域均是有效干扰区域, 其中第 371~390 bp 区域和第 511~540 bp 区域是最合适的干扰区域。因此本实验结果为今后针对绵羊 *FGF5* 基因功能研究提供了研究基础, 并为培育转基因绵羊创造了条件。

参考文献(References):

- [1] 杨建青. 国际羊毛市场状况与中国细毛羊发展分析. 农业展望, 2009, 5(2): 28-31.
- [2] 黄立新. Optim 纤维及产品的开发与应用. 纺织学报, 2004, 25(2): 101-102.

- [3] Pennycuik PR, Raphael KA. The angora locus (*go*) in the mouse: hair morphology, duration of growth cycle and site of action. *Genet Res*, 1984, 44(3): 283–291.
- [4] Hébert JM, Rosenquist T, Götz J, Martin GR. FGF5 as a regulator of the hair growth cycle: evidence from targeted and spontaneous mutations. *Cell*, 1994, 78(6): 1017–1025.
- [5] Suzuki S, Kato T, Takimoto H, Masui S, Oshima H, Ozawa K, Suzuki S, Imamura T. Localization of rat FGF-5 protein in skin macrophage-like cells and FGF-5s protein in hair follicle: possible involvement of two *Fgf-5* gene products in hair growth cycle regulation. *J Invest Dermatol*, 1998, 111(6): 963–972.
- [6] Ito C, Saitoh Y, Fujita Y, Yamazaki Y, Imamura T, Oka S, Suzuki S. Decapeptide with fibroblast growth factor (FGF)-5 partial sequence inhibits hair growth suppressing activity of FGF-5. *J Cell Physiol*, 2003, 197(2): 272–283.
- [7] 高爱琴, 李宁, 赵兴波, 李金泉. 不同绵羊品种 FGF5 基因的多态性分析. 畜牧兽医学报, 2006, 37(4): 326–330.
- [8] Bates B, Hardin J, Zhan X, Drickamer K, Goldfarb M. Biosynthesis of human fibroblast growth factor 5. *Mol Cell Biol*, 1991, 11(4): 1840–1845.
- [9] Haub O, Drucker B, Goldfarb M. Expression of the murine fibroblast growth factor 5 gene in the adult central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(20): 8022–8026.
- [10] Zimin AV, Delcher AL, Florea L, Kelley DR, Schatz MC, Puiu D, Hanrahan F, Pertea G, van Tassell CP, Sonstegard TS, Marçais G, Roberts M, Subramanian P, Yorke JA, Salzberg SL. A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome Biol*, 2009, 10(4): R42.
- [11] Hébert JM, Basilico C, Goldfarb M, Haub O, Martin GR. Isolation of cDNAs encoding four mouse FGF family members and characterization of their expression patterns during embryogenesis. *Dev Biol*, 1990, 138(2): 454–463.
- [12] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001, 411(6836): 449–498.
- [13] Sui GC, Soohoo C, Affarel B, Gay F, Shi YJ, Forrester WC, Shi Y. A DNA vector based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(8): 5515–5520.
- [14] Brantl S. Antisense-RNA regulation and RNA interference. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1575(1–3): 15–25.

•综合信息•

欢迎订阅 2012 年《中国生态农业学报》

《中国生态农业学报》由中国科学院遗传与发育生物学研究所和中国生态经济学会主办, 中国科学院主管, 科学出版社出版。系中国期刊方阵双效期刊、中国科技核心期刊、中文核心期刊、RCCSE 中国权威学术期刊, 为中国学术期刊综合评价数据库、中国期刊全文数据库、中国学术期刊文摘、中国科学引文数据库、中国科技论文与引文数据库、CNKI 中国期刊全文数据库源刊, 并被国际农业生物学文摘(CABI)、美国化学文摘(CA)、哥白尼索引(IC)、美国乌利希国际期刊指南等国际数据库及检索单位收录。荣获第三届、四届全国农业优秀期刊一等奖和首届北方优秀期刊奖, 被评为 2009 年中国北方优秀期刊, 连续多届获得河北省优秀期刊奖。

《中国生态农业学报》主要报道全球环境变化与农业、农业生态系统与生态农业理论基础、农田生态系统与农业资源、生态农业模式和技术体系、农业生态经济学、农业环境质量及环境保护、农业有害生物的综合防治等领域创新性研究成果。适于从事农业生态学、生态学、生态经济学以及环境保护等领域科技人员、高等院校有关专业师生, 农业及环境管理工作者和基层从事生态农业建设的技术人员阅读与投稿。

《中国生态农业学报》国内外公开发行, 国内刊号 CN13-1315/S, 国际刊号 ISSN1671-3990。月刊, 大 16 开本, 128 页, 每期定价 35 元, 全年 420 元。邮发代号: 82-973, 全国各地邮局均可订阅。漏订者可直接汇款至编辑部补订(需另加邮资 50.00 元)。

地址: (050022) 河北省石家庄市槐中路 286 号 中科院遗传发育所农业资源中心 《中国生态农业学报》编辑部

电话: (0311) 85818007 传真: (0311) 85815093

网址: <http://www.ecoagri.ac.cn> E-mail: editor@sjziam.ac.cn