

研究报告

不同启动子对于牛催乳素表达的调控作用

丁志良^{1,2}, 曾凡一^{1,3}

- 1 上海交通大学医学遗传研究所, 上海 200040
2 上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240
3 上海交通大学医学科学研究所, 上海 200025

摘要: 在细胞水平上比较不同启动子对于牛催乳素(*bPRL*)表达的调控作用。分别构建了以 CMV 启动子、牛催乳素基因启动子和山羊β-酪蛋白基因启动子作为调控元件的 *bPRL* 真核细胞表达载体, 分别命名为 pCMV、pPRLP 和 pP1A3。将 3 种载体分别转染小鼠垂体瘤细胞和小鼠乳腺上皮细胞, 使用 RT-PCR 和定量 RT-PCR 分析 3 种启动子启动 *bPRL* 在 2 种细胞系中的表达效果。pCMV 在 2 种细胞中有效表达 *bPRL*; pPRLP 在 2 种细胞中的表达效果与 pCMV 接近; pP1A3 不在垂体细胞中表达, 在乳腺细胞中表达。pP1A3 具有乳腺表达特异性; pPRLP 能够在垂体和乳腺中高表达, 在其他组织的表达特异性有待进一步研究。

关键词: 牛催乳素, 牛催乳素基因启动子, 山羊β-酪蛋白基因启动子, 表达载体

Regulation on the Expression of Bovine Prolactin Gene by Different Promoters

Zhiliang Ding^{1,2}, and Fanyi Zeng^{1,3}

- 1 Shanghai Institute of Medical Genetics, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200040, China
2 School of Life Science & Bio-Technology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China
3 Institute of Medical Science, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China

Abstract: To compare the regulation effects by different promoters on bovine prolactin gene expression in different cell lines, three recombinant bovine prolactin expression vectors were constructed using different promoters, *i.e.*, CMV promoter, bovine prolactin gene promoter and goat β-casein gene promoter, respectively named pCMV, pPRLP and pP1A3, which were transfected into two cell lines, mouse pituitary tumor cell strain (AtT20) and mouse mammary epithelial cell strain (HC11), respectively. RT-PCR and real-time RT-PCR were used to investigate the expression level of the above three vectors in both cell lines. pCMV vector was effectively expressed in both cell lines, pPRLP vector had a similar expression level to that of pCMV in both cell lines, pP1A3 was expressed in HC11 but not in AtT20. pP1A3 was tissue-specific to mammary gland. pPRLP was able to express with a significant level in pituitary and mammary glands, while its tissue-specific characteristics in other tissues need further investigation.

Keywords: bovine prolactin, bovine prolactin promoter, goat β-casein gene promoter, expression vector

Received: March 3, 2008; **Accepted:** July 2, 2008

Supported by: the High Technology Research and Development of China (863 Program) (No. 2007AA100502), Shanghai Leading Academic Discipline Project (No. B204).

Corresponding author: Fanyi Zeng. Tel: +86-21-62472308; E-mail: fzen@shtu.edu.cn

国家高技术研究发展计划项目(“863 计划” No. 2007AA100502), 上海市重点学科项目(No. B204)资助。

催乳素(Prolactin, PRL)存在于所有已知的脊椎动物中(包括非哺乳动物), 主要由垂体的催乳素细胞(Lactotroph)分泌产生^[1], 在垂体外的其他组织, 如生殖系统、乳腺、免疫系统和脑等也有表达^[2-4]。PRL能通过信号传导通路刺激乳蛋白启动子下游基因的表达^[5]。我们先前的研究曾构建了2种牛催乳素(*bPRL*)和外源基因(人乳铁蛋白或人血小板生成素)的共表达载体, 分别转染 COS7(非洲绿毛猴肾细胞)和 HC11(小鼠乳腺上皮细胞)细胞株。RT-PCR 和 ELISA 的结果显示外源基因的表达得到提高, 证明 *bPRL* 可以有效增加外源基因在哺乳动物细胞中的表达^[6]。

本研究使用先前克隆的全长 9.4 kb 的 *bPRL* 基因组序列(GenBank Accession No. AF426315)^[7]作为目的基因, 分别构建了 CMV 启动子、牛催乳素基因启动子(PRLP)和山羊 β -酪蛋白基因启动子(P1A3)3种不同启动子启动的 *bPRL* 真核细胞表达载体, 并在小鼠垂体瘤细胞(AtT20 细胞株)和小鼠乳腺上皮细胞(HC11 细胞株)瞬时表达, 研究其表达效率。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和载体

感受态细胞 TOP10 F'由本所保存。真核细胞表达质粒 pcDNA3.1(+)购自 Invitrogen 公司。将该载体用 *Bgl* II 和 *Nhe* I 酶切后补平自连, 去除了载体原有的 CMV 启动子, 命名为 Δ pcDNA3.1(+).pcDNA3.1-BP₁₋₄(包括 CMV 启动子和 *bPRL* 基因组序列)和 pcDNA3.1-P1A3-BP₁₋₄(包括 P1A3 启动子和 *bPRL* 基因组序列)由本所保存, 具体见参考文献[7]。

1.1.2 细胞

AtT20 细胞株购自中科院细胞库, HC11 细胞株由本所保存。

1.1.3 主要试剂和试剂盒

各种限制性内切酶和工具酶分别购自 New England Biolabs 公司和宝生物工程(大连)有限公司, Pure Link 购自宝生物工程(大连)有限公司, HiPure Plasmid Purification kit 购自 Invitrogen 公司。RPMI 1640 培养基购自玉森生物工程(上海)分公司, DMEM 培养基购自 Gibco BRL 公司, 胎牛血清(FBS)购自兰州民海生物工程有限公司, 胰酶购自 Sigma 公司, Lipo2000 脂质体购自 Invitrogen 公司,

人胰岛素和人表皮生长因子(EGF)购自 Sigma 公司。反转录试剂购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 真核细胞表达载体的构建

1.2.1 pcDNA3.1-BP1-4(pCMV)真核细胞表达载体的扩增

取本所保存的 pcDNA3.1-BP₁₋₄质粒转化感受态细胞 TOP 10F'后铺至含氨苄青霉素(终浓度 100 μ g/mL)的琼脂平板上, 挑选菌落于含氨苄青霉素(终浓度 100 μ g/mL)的 LB 培养液中, 抽提质粒, 将酶切正确的真核表达载体, 命名为 pcDNA3.1-BP₁₋₄(即 pCMV)。

1.2.2 Δ pcDNA3.1-PRLP-BP1-4(pPRLP)真核细胞表达载体的构建

使用下列引物以牛基因组为模板扩增 *bPRL* 上游 2.2 kb 的启动子序列。

上游引物 PRLP1(5'-3'): AATTAAGGTAGATAG GCAGTG,

下游引物 PRLP2(5'-3'): CTTGTGCATTGTAGT ATGCTTA。

将扩增得到的 *bPRLP* 片段接入 pMD-18T 得到中间载体 T-*bPRLP*, 用 *Hind* III 和 *Bam* H I 双酶切 T-*bPRLP* 和 Δ pcDNA3.1(+)载体, 分别得到 *Hind* III/*bPRLP*/*Bam* H I 和 *Hind* III/ Δ pcDNA3.1(+)/*Bam* H I, 连接后获得中间载体 Δ 3.1-*bPRLP*。用 *Apa* I 和 *Mfe* I 先后酶切 Δ 3.1-*bPRLP* 和 pcDNA3.1-BP₁₋₄载体, 分别得到 *Mfe* I/ Δ 3.1-*bPRLP*/*Apa* I 和 *Mfe* I/ BP₁₋₄/*Apa* I, 连接后挑选正确接入真核表达载体, 命名为 Δ pcDNA3.1-PRLP-BP₁₋₄(即 pPRLP)。构建流程见图 1。

1.2.3 pcDNA3.1-P1A3-BP1-4(pP1A3)真核细胞表达载体的扩增

同 1.2.1 方法。将酶切正确的真核表达载体, 命名为 pcDNA3.1-P1A3-BP₁₋₄(即 pP1A3)。

1.3 酶切鉴定

pCMV、pPRLP 和 pP1A3 分别选用 *Eco*R V、*Hind* III 和 *Afl* II 酶切鉴定。

1.4 测序鉴定

选用酶切结果完全正确的 pPRLP 质粒送往英骏生物公司测序鉴定。

1.5 载体的纯化

利用 PureLink HiPure Plasmid Purification Kit 纯化 pCMV、pPRLP 和 pP1A3 质粒, 具体方法参见 Invitrogen 公司产品说明书。

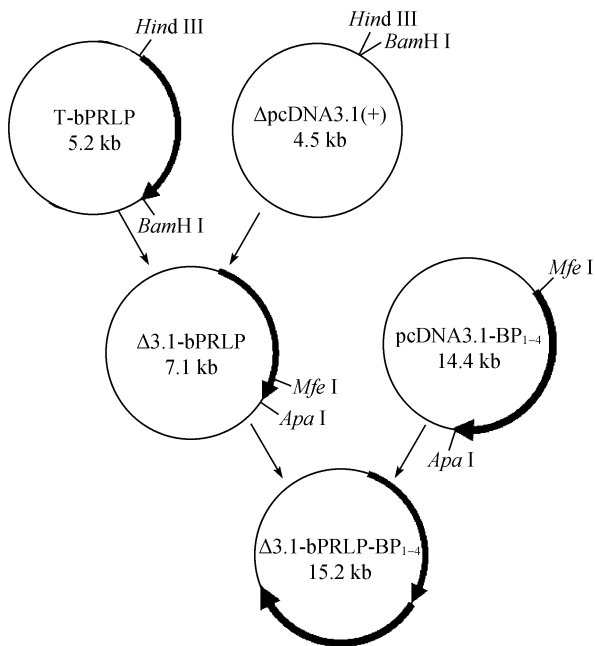


图1 pPRLP 表达载体构建示意图

Fig. 1 Representation of the construction of pPRLP expression vector

1.6 细胞培养

1.6.1 AtT20 细胞的培养

悬浮细胞, 培养条件为 DMEM + 10% FBS。

1.6.2 HC11 细胞的培养

贴壁细胞, 采用激素诱导培养, 培养条件为 RPMI 1640+10% FBS+胰岛素(5 μg/mL)+EGF(10 ng/mL)。

1.7 细胞转染

1.7.1 AtT20 细胞的转染

将 AtT20 细胞用少量 Lipo Optimum 液重悬, 均匀接种至 6 孔板, 共 4 孔, 每孔细胞密度为 5.0×10^5 个细胞。其中 3 孔为试验组, 分别转染 3 种不同质粒; 1 孔作为对照组, 转染空质粒。将配制好的 Lipo2000 和 DNA 转染混合液(按说明书进行)缓慢加入培养板中, 继续培养 6 h 后收集培养液。1600 r/min 离心 10 min 使细胞沉淀, 弃培养液。细胞在含有 10% FBS 的 DMEM 培养液连续培养 72 h 后, 收集细胞, 加入 Trizol 裂解, 抽提总 RNA。

1.7.2 HC11 细胞的转染

将 HC11 细胞均匀接种至 6 孔板, 共 4 孔。其中 3 孔为试验组, 分别转染 3 种不同质粒; 1 孔作为对照组, 转染空质粒。待细胞长至 90% 单层后, 弃培养液, 用无血清 RPMI 1640 培养液洗 2 次, 将配制好的 Lipo2000 和 DNA 转染混合液(按说明书进行)缓慢

加入培养板中, 继续培养 6 h 后弃培养液, 加入含有 10% FBS、人胰岛素和 EGF 的 RPMI 1640 培养液连续培养 72 h。弃培养液, 加入 Trizol 裂解细胞, 抽提总 RNA。

1.8 RT-PCR 鉴定 bPRL 基因的转录

取转染后的细胞, Trizol 法提取总 RNA, 分光光度计测定浓度。取 2 μg RNA, 以 oligo dT 为引物反转录合成 cDNA 第一链, 取 1 μL 反转录 cDNA 产物用 bPRL 引物扩增。

上游引物 BPs5(5'-3'): CTCAACAGCTGCCAT ACCTC;

下游引物 BPs3(5'-3'): CTCCATGCCTTCCAG AAGTC。

扩增条件为 94°C 预变性 5 min, 进入循环。循环条件为 94°C 变性 20 s, 65.5°C 退火和延伸 5 s, 共 40 个循环。然后 72°C 延伸 10 min。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像仪 GE IQ3000 成像, 观察产物条带。

1.9 定量 RT-PCR 鉴定不同载体在两种细胞中的表达效果

1.9.1 定量 RT-PCR 测定 bPRL 的拷贝数

将 BPs5 和 BPs3 扩增产物回收, 连入 pMD-18T 载体, 得到 T-BPs 质粒。根据质粒 DNA 浓度计算拷贝数, 稀释后制成标准品。分别取样品 cDNA 和标准品 1 μL, 使用 BPs5 和 BPs3 引物, 加入 SYBR Green 染料, 根据上述条件进行定量 PCR, 每一份样品做 3 复管。得到样品 cDNA 中 bPRL 的拷贝数, 取 3 次的平均值作为该质粒在该次转染的拷贝数。

1.9.2 定量 RT-PCR 测定小鼠 β-肌动蛋白(β-actin) 的拷贝数

取 1 μL 反转录 cDNA 产物用小鼠 β-actin 引物扩增。

上游引物 MACT5(5'-3'): CTACAATGAGCT GCGTGTTGG;

下游引物 MACT3(5'-3'): CAGGTCCAGACG CAGGATGGC。

扩增条件为 94°C 预变性 5 min, 进入循环。循环条件为 94°C 变性 15 s, 63°C 退火 15 s, 72°C 延伸 15 s, 共 30 个循环。然后 72°C 延伸 10 min。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像仪成像, 观察产物条带。将扩增产物回收, 连入 pMD-18T 载体, 得到 T-actin 质粒。根据质粒 DNA 浓度计算拷

贝数, 稀释后制成标准品。分别取样品 cDNA 和标准品 1 μ L, 使用 MACT5 和 MACT3 引物, 加入 SYBR Green 染料, 根据上述条件进行定量 PCR, 每一份样品做 3 复管。得到样品 cDNA 中 β -actin 的拷贝数, 取 3 次的平均值作为该质粒在该次转染的拷贝数。

1.9.3 计算不同载体在两种细胞中的表达效率

将同一样品在同一次转染的 *bPRL* 拷贝数除以 β -actin 拷贝数, 得到的比例系数代表在相同转染效

率下, 不同启动子的 *bPRL* 载体在该种细胞中的表达效率。系数越大, 表达效率越高。

2 结果

2.1 表达载体的鉴定

pCMV、pPRLP 和 pP1A3 载体构建完成后进行酶切鉴定, 如图 2 所示的图谱, 与预期相符合。同时对 pPRLP 载体进行了测序, 结果显示 PRLP 片段、*bPRL* 片段和连接接头处的序列都正确。

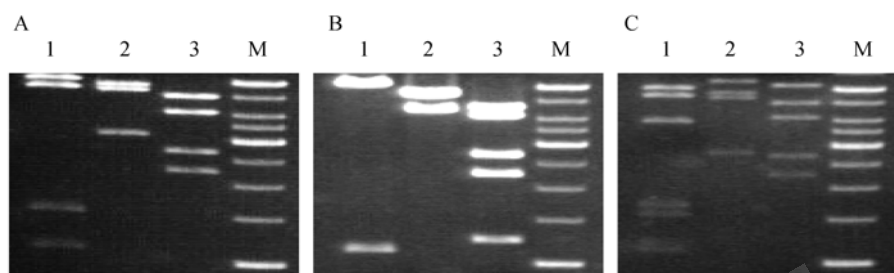


图 2 *bPRL* 表达载体的酶切鉴定图谱

Fig. 2 Identification of the *bPRL* expression vectors with restriction enzyme digestions

(A) electrophoresis map of pCMV with restriction enzyme digestions; (B) electrophoresis map of pPRLP with restriction enzyme digestions; (C) electrophoresis map of pP1A3 with restriction enzyme digestions; 1: *EcoR* V; 2: *Hind* III; 3: *Afl* II; M: 1 kb marker

2.2 RT-PCR 结果

3 个载体同时瞬时转染 AtT20 和 HC11 细胞, 抽提总 RNA 并反转录后, 进行 RT-PCR。 *bPRL* 的 RT-PCR 产物长度为 231 bp, 作为内参的小鼠 β -actin 的 RT-PCR 产物长度为 271 bp。如图 3 和图 4 所示, 2 种细胞中内参的条带清晰正确, 证明 cDNA 样品的可靠性。在 AtT20 细胞中, *bPRL* 仅在 CMV 和 PRLP 启动下转录, 且扩增条带亮度相近, 而 P1A3 启动子在 AtT20 细胞中不能启动 *bPRL* 的转录。在 HC11 细胞中, 3 种启动子均能指导 *bPRL* 的转录。

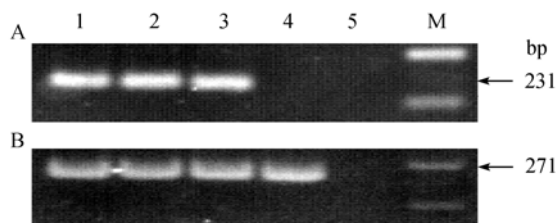


图 3 AtT20 细胞转染 *bPRL* 表达载体后 RT-PCR 结果
Fig. 3 RT-PCR analysis of AtT20 cell strain transfected with *bPRL* expression vectors

(A) RT-PCR using *bPRL* primers; (B) RT-PCR using mouse β -actin primers; 1: AtT20 transfected with pCMV; 2: AtT20 transfected with pPRLP; 3: AtT20 transfected with pP1A3; 4: transfection blank; 5: PCR blank; M: 100 bp DNA marker

2.3 定量 RT-PCR 结果

AtT20 和 HC11 细胞系各进行了 2 次独立的细胞转染试验, 每份 cDNA 样品做 2 到 3 复管进行定量 PCR 试验。标准品线性拟合良好, 样品大多落于标准品范围内, 保证了拷贝数测量的可信性。将复管的拷贝数取平均值作为该质粒在该次转染的拷贝数结果, 见图 5。根据:

$$\text{表达系数} = \frac{\text{bPRL 拷贝数}}{\beta\text{-actin 拷贝数}} \times 10^4$$

计算得到不同质粒在 2 种细胞中的表达系数(图 6)。在 AtT20 细胞系中, pCMV 和 pPRLP 表达效果

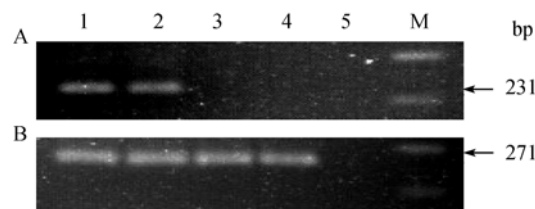


图 4 HC11 细胞转染 *bPRL* 表达载体后 RT-PCR 结果
Fig. 4 RT-PCR analysis of HC11 cell strain transfected with *bPRL* expression vectors

(A) RT-PCR using *bPRL* primers; (B) RT-PCR using mouse β -actin primers; 1: HC11 transfected with pCMV; 2: HC11 transfected with pPRLP; 3: HC11 transfected with pP1A3; 4: transfection blank; 5: PCR blank; M: 100 bp DNA marker

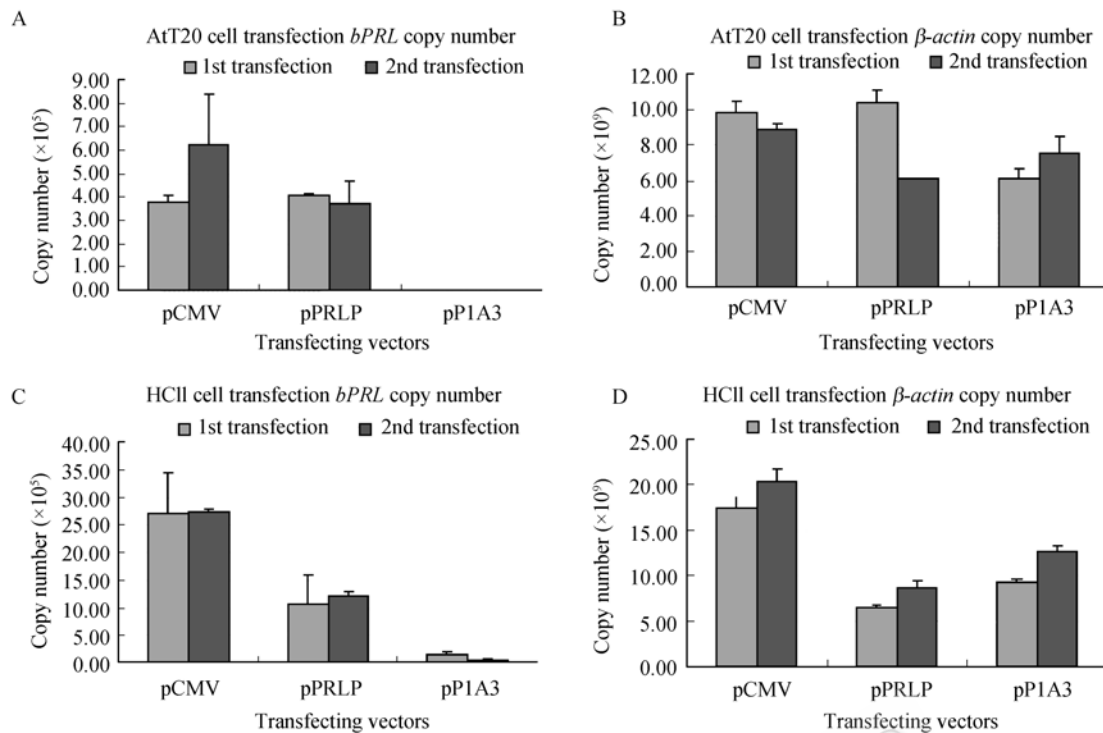


图 5 AtT20 和 HC11 细胞转染 *bPRL* 表达载体后定量 RT-PCR 检测拷贝数的结果

Fig. 5 Real-time RT-PCR analysis of AtT20 and HC11 cell strains transfected with *bPRL* expression vectors

(A) *bPRL* copy number in AtT20 cell strain transfected with three different *bPRL* vectors; (B) *β-actin* copy number in AtT20 cell strain transfected with three different *bPRL* vectors; (C) *bPRL* copy number in HC11 cell strain transfected with three different *bPRL* vectors; (D) *β-actin* copy number in HC11 cell strain transfected with three different *bPRL* vectors

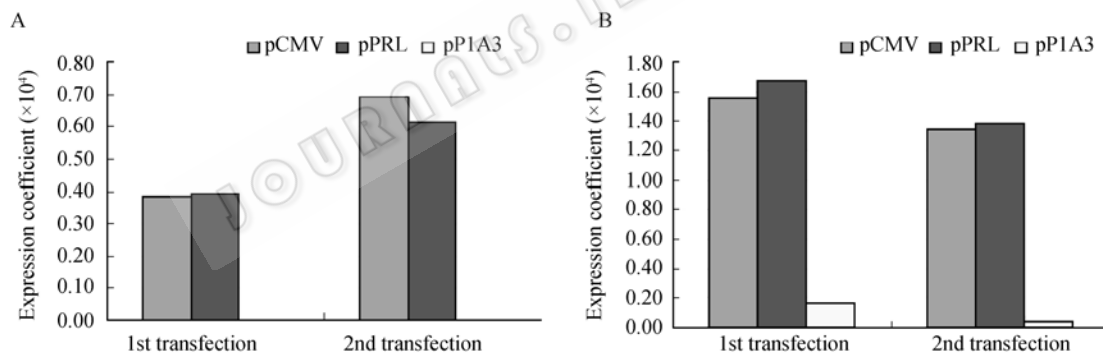


图 6 不同载体的表达系数

Fig. 6 Expression coefficients of three different expression vectors in AtT20 and HC11 cell strains

(A) expression coefficient of three expression vectors in transfected AtT20 cell strain; (B) expression coefficient of three expression vectors in transfected HC11 cell strain

相近; pPIA3 未检测出拷贝数, 与 RT-PCR 结果相符。在 HC11 细胞系中, pCMV 和 pPRLP 表达效果相近, 均比 pPIA3 表达系数高一个数量级。

3 讨论

细胞水平的研究证实, *bPRL* 在糖皮质激素的存在下能够作用于酪蛋白和乳清蛋白启动子, 促进基因的表达^[5]。研究发现, 垂体分泌的 PRL 通过血液

循环到达全身各处, 作用广泛, 涉及 300 多个生化反应^[8]。根据这一性质, 血液中过高的 PRL 浓度可能对不同组织和不同的生理活动产生影响。垂体外组织生成的 PRL 通过自分泌和/或旁分泌的方式作用于分泌细胞及其邻近细胞, 其浓度低、影响范围小, 但具有生理功能^[9]。

本研究中采用了我所首次克隆的牛催乳素启动子, 包含 *bPRL* 转录起始位点 5' 端上游 2.2 kb 的调控

序列, 其中包括了对 *bPRL* 基因高效表达至关重要的-1124 至-985 bp 区域^[10,11], 并构建了与天然牛催乳素基因及上游启动子序列完全相同的表达载体。P1A3 是我所克隆的山羊 β -酪蛋白启动子和上游调控元件, 包括山羊 β -酪蛋白基因转录起始位点 5'端上游-413 kb 和外显子 1、内含子 1 和部分外显子 2 共约 6.5 kb。我们利用该启动子已经获得了高表达人凝血因子 IX、人血清白蛋白以及凝血因子 IX 突变体的转基因小鼠^[12]。CMV 是人巨细胞病毒启动子, 是常用的强启动子, 能指导下游基因在几乎所有的细胞组织中表达。

分析瞬时转染 AtT20 和 HC11 细胞的试验结果, 可以得出以下结论: (1)本试验克隆的 PRLP 启动子在小鼠细胞中能正确指导下游 *bPRL* 的转录。(2)本试验所选用的 CMV、PRLP 和 P1A3 调控元件都能启动 *bPRL* 在 AtT20 或 HC11 细胞中转录。其中, CMV 和 PRLP 在 2 种细胞中均具有启动能力, 而 P1A3 仅在 HC11 细胞中具有启动能力。(3)pCMV 的表达效率在两种细胞中均较高, pPRLP 的表达效率与 pCMV 接近。pP1A3 仅在 HC11 细胞中表达, 其表达效率比前两者低一个数量级。

先前的研究表明 *bPRL* 基因上游-1124 bp 至-985 bp 的调控序列能高效启动下游基因在大鼠垂体瘤细胞 (GH3 细胞系) 中表达^[10,11]。本试验克隆了 *bPRL* 基因转录起始位点 5'端上游 2.2 kb 的调控序列, 证实该段序列能有效启动下游 *bPRL* 基因在小鼠 AtT20 细胞系中正确转录。这一结果说明尽管鼠类和牛的 PRLP 序列同源性较低; 并且在小鼠和牛等哺乳动物中, *PRL* 有多个同源基因, 小鼠有 26 个 *PRL* 同源基因、牛有 8 个, 数量上差别明显。但是, 牛 PRLP 能成功地指导下游基因在小鼠细胞中转录。这一现象可能是由于小鼠细胞中的反式作用因子也能与牛 PRLP 上的元件互作。研究显示 *bPRL* 上游-1175 bp 到-996 bp 的序列同人和鼠类的对应区域有很强的相似性^[11]。

以上研究结果显示 CMV 调控序列在 AtT20 和 HC11 细胞中都具有较强的启动能力。这是由于该启动子是一类强启动子, 能指导下游基因在各种细胞中高效表达。在 AtT20 和 HC11 中, PRLP 具有与 CMV 启动子相近的、较强的启动能力。其原理是因为 PRL 主要由垂体前叶的催乳素细胞分泌产生^[1], 垂体

细胞中的因子(如多巴胺、促甲状腺释放激素等)和多种转录因子与 PRLP 上的元件互作^[13], 使 PRLP 具有较强的启动效果。理论上 PRLP 能启动 *bPRL* 在垂体外的其他组织, 如乳腺、生殖系统、免疫系统和脑中特异表达^[2-4], 在妊娠期和哺乳期的乳腺上皮细胞中的表达尤其强烈。本试验使用的 HC11 细胞经过人胰岛素和 EGF 的诱导, 在高密度的培养条件下与哺乳期的乳腺细胞状态较为接近。在这种细胞环境下, PRLP 近端(5'端上游-250 bp 序列)和远端(5'端上游-1175 bp 到-996 bp)两个增强子区域被激活, 启动能力较强。P1A3 调控序列是我所克隆的山羊 β -酪蛋白基因启动子, 除保留原有近端成分外, 还保留了远端长达 4 kb 的上游调控区, 含有 GRE、STAT 等结合位点, 这些结合位点使得下游基因能在乳腺细胞中表达。因此 P1A3 启动子在 HC11 细胞中可以启动下游基因的表达, 但其表达效率较 CMV 和 PRLP 偏低。在 AtT20 细胞中没有相关因子, 导致 P1A3 没有启动能力。

先前的研究显示 PRLP 能指导 *bPRL* 在牛垂体、乳腺和胎盘^[4]等组织表达, 合成的 *bPRL* 与牛的乳腺发育、乳汁发生和泌乳维持息息相关^[3]。除了空间上的组织特异性, PRLP 启动子还具有时间特异性, PRLP 能指导 *bPRL* 在青春期、发情期、孕初期和分娩后特异表达。这些时刻正是乳腺形态和功能发育、乳汁分泌的关键时期^[14]。根据 PRLP 的以上性质, 选用该启动子构建表达载体或能使下游基因在特定的组织和时间表达, 为生产转基因动物提供更多的选择。

致谢 上海交通大学医学遗传研究所曾溢滔院士、任兆瑞教授和颜景斌博士对本工作给予了宝贵的支持和帮助, 特致谢意。

REFERENCES

- [1] Christian HC, Chapman LP, Morris JF. Thyrotrophin-releasing hormone, vasoactive intestinal peptide, prolactin-releasing peptide and dopamine regulation of prolactin secretion by different lactotroph morphological subtypes in the rat. *J Neuroendocrinol*, 2007, **19**(8): 605-613.
- [2] McKee DT, Poletini MO, Bertram R, *et al.* Oxytocin action at the lactotroph is required for prolactin surges in cervically stimulated ovariectomized rats. *Endocrinology*, 2007, **148**(10): 4649-4657.

- [3] Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, *et al.* Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev*, 1996, **17**: 639–669.
- [4] Ushizawa K, Hashizume K. Biology of the prolactin family in bovine placenta. II. Bovine prolactin-related proteins: Their expression, structure and proposed roles. *Anim Sci J*, 2006, **77**, 18–27.
- [5] Ben-Jonathan N, Lapensee CR, Lapensee EW. What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev*, 2008, **29**(1): 1–41.
- [6] Liu FT, Yan JB, Ren ZR, *et al.* Mammary gland dual-expression construct containing prolactin and foreign DNAs can promote the expression of foreign proteins in mammary cells. *Yi Chuan*, 2004, **26**(5): 567–573.
刘峰涛, 颜景斌, 任兆瑞, 等. 催乳素和外源基因乳腺共表达载体可提高外源基因在哺乳细胞的表达. 遗传, 2004, **26**(5): 567–573.
- [7] Cao X, Wang Q, Yan JB, *et al.* Molecular cloning and analysis of bovine prolactin full-long genomic as well as cDNA sequences. *Yi Chuan Xue Bao*, 2002, **29**(9): 768–773.
曹新, 王强, 颜景斌, 等. 牛催乳素基因组及其 cDNA 全长序列的分子克隆和分析. 遗传学报, 2002, **29**(9): 768–773.
- [8] Jara LJ, Pacheco-Reyes H, Medina G, *et al.* Prolactin levels are associated with lupus activity, lupus anticoagulant, and poor outcome in pregnancy. *Ann NY Acad Sci*, 2007, **1108**: 218–226.
- [9] Naylor MJ, Lockefeer JA, Horseman ND, *et al.* Prolactin regulates mammary epithelial cell proliferation via autocrine/paracrine mechanism. *Endocrine*, 2003, **20**(1-2): 111–114.
- [10] Wolf JB, David VA, Deutch AH. Identification of a distal regulatory element in the 5' flanking region of the bovine prolactin gene. *Nucl Acids Res*, 1990, **18**(16): 4905–4912.
- [11] Brym P, Malewski T, Starzynski R, *et al.* Effect of new SNP within bovine prolactin gene enhancer region on expression in the pituitary gland. *Biochem Genet*, 2007, **45**: 743–754.
- [12] Huang Z, Yan JB, Huang Y, *et al.* High expression of human FIX(hFIX) in transgenic mice directed by goat beta-casein gene promoter. *Yi Chuan Xue Bao*, 2002, **29**(3): 206–211.
黄赞, 颜景斌, 黄纓, 等. 山羊 β -酪蛋白基因启动子指导的转基因小鼠乳汁高效表达人凝血因子 IX. 遗传学报, 2002, **29**(3): 206–211.
- [13] Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, *et al.* Prolactin, structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev*, 2000, **80**: 1523–1631.
- [14] Knight CH. Overview of prolactin's role in farm animal lactation. *Livest Prod Sci*, 2001, **70**: 87–93.

我单位《生物工程学报》等4种期刊论文数据库制作完成并上网

为提高期刊的显示度, 加强对历史文档的整理、保护和利用, 更好地为科研人员提供信息服务, 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部历时近1年, 将包括《生物工程学报》、《微生物学报》、《菌物学报》、《微生物学通报》等4种期刊自第1卷第1期开始, 全部逐页扫描、分类检索, 进行数字化制作, 建成了回溯文档全文数据库, 共计130卷620余期, 约1万多篇论文。由于年代久远, 很多版本已成孤本, 搜集整理及制作工作耗时半年多, 目前已全部完成, 并已上传至各编辑部网页供所有读者免费浏览下载。读者只要输入题目、关键词、年卷期、作者、单位等信息, 就可以方便地检索出四刊发表过的全部相关文章。

此外, 2008年起, 我所四刊将采用 Open Access(开放存取)模式出版, 各刊当期新发表的文章将先于印刷版在网上全文发布, 以利信息的更快传播, 提高文章的阅读量和被引频次。

欢迎浏览下载, 欢迎投稿。请登录期刊联合编辑部网址: <http://journals.im.ac.cn>