

研究资源

Resources

鸡肝脏胆汁酸结合蛋白(L-BABP)抗血清制备及组织表达特性分析

张庆秋 石慧 丁宁 王宇祥 李辉 王启贵*

东北农业大学动物科学技术学院 哈尔滨 150030

* 通讯作者 wangqigui@hotmail.com

摘要 制备鸡(*Gallus gallus*)肝脏胆汁酸结合蛋白(L-BABP)的多克隆抗血清,并分析 L-BABP 的组织表达特性。利用 RT-PCR 扩增 *L-BABP* 基因的 CDS 区,构建鸡 *L-BABP* 基因的 GST 融合蛋白表达质粒 pGEX-4T/*L-BABP*。将重组表达质粒转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*)BL21 中,经 IPTG 诱导后产生 GST/*L-BABP* 融合蛋白,利用 Glutathione Sepharose 4B 亲和层析纯化目的蛋白,将纯化的 GST/*L-BABP* 融合蛋白免疫家兔制备多克隆抗血清。诱导得到了 1 个 38 kD(12 kD *L-BABP*+ 26 kD GST)的融合蛋白,经间接 ELISA 方法测定制备的抗血清效价为 1:100 000。利用此抗血清分析鸡 *L-BABP* 的组织表达特性,结果表明该基因仅在肝脏组织中特异性表达,在肾、肺、腿肌、腺胃、胸肌、心脏、脂肪、脾、回肠、肌胃、空肠和十二指肠等 12 种组织中没有检测到表达信号。本研究制备的高效价、高特异性的鸡 *L-BABP* 抗血清,为从蛋白水平上深入研究 *L-BABP* 的生物学功能提供了良好的基础。

关键词 鸡 肝脏胆汁酸结合蛋白(L-BABP) 抗血清 表达特性

Antiserums Preparation and Tissue Expression Analyses of Chicken Liver Bile Acid Binding Protein(L-BABP)

Zhang Qingqiu Shi Hui Ding Ning Wang Yuxiang Li Hui Wang Qigui*

College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

* Corresponding author, wangqigui@hotmail.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7968.2011.03.025

Abstract The aim of this study is to prepare the antiserums against chicken liver bile acid binding protein (L-BABP) and analyze expression characteristics of L-BABP. Specific primers were designed to amplify the coding region of chicken *L-BABP* by RT-PCR. And the *L-BABP* gene was then inserted into pGEX-4T-1 vector and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) with IPTG induction. Then the fusion protein was purified by Glutathione Sepharose 4B affinity chromatography and the antiserums against L-BABP was produced by immunizing rabbits. The results showed that a 38 kD (12 kD *L-BABP*+26 kD GST) fusion protein was induced. And the titer of the antiserum against GST/*L-BABP* was 1:100 000 detected by indirect ELISA. Analysis of tissue expression showed that *L-BABP* specifically expressed in liver, and there were no detectable signal in kidney, lung, crureus, glandular stomach, pectorales, heart, fat, spleen, ileum, muscle stomach, jejunum and duodenum, respectively. In the current study, preparation of high titer and high specificity of the chicken *L-BABP* antiserum provides a good foundation for studying the biological function of *L-BABP* in the protein level.

Keywords Chicken, Liver bile acid binding protein (L-BABP), Antiserums, Expression characteristics

禽类的脂质(胆固醇、中性脂肪、磷脂质和游离脂肪酸)合成主要是在肝脏中进行 (O'Hea and

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7968.2011.03.025

基金项目 本研究由国家自然科学基金(No.30972087)、黑龙江省普通高等学校青年学术骨干支持计划项目(No.1152G005)和博士后研究人员落户黑龙江科研启动金(No.LBH-Q08131)共同资助

收稿日期 2010-05-10 接受日期 2010-08-16

Leveille, 1968; Griffin et al., 1992)。胆固醇在肝脏中可以被分解为胆汁酸,胆汁酸对日粮中脂肪的消化和吸收有重要的影响(Kramer et al., 1998)。它主要存在于肝肠循环系统中,由肝细胞分泌,经肝左右管-肝总管-胆总管,进入十二指肠,参加消化,小肠中的胆汁酸可被重吸收,经肝门静脉进入肝脏完成循环。胆汁酸的运输过程受到3个关键部分的调控,即受体系统,在细胞表面调解并运输胆汁酸进入细胞;细胞内的运输系统,在细胞内转运胆汁酸;外排系统,使胆汁酸顺利通过细胞表面进入循环系统(Guariento et al., 2008)。目前,对于胆汁酸进出肝细胞和小肠上皮细胞的受体系统和外排系统的分子机理较为清楚,而胆汁酸在肝脏和小肠细胞中的运输机制仍不是非常清晰。胆汁酸结合蛋白(bile acid binding protein, BABP)是细胞内运输胆汁酸的主要蛋白,研究其在肝脏和小肠中的功能,对阐明胆汁酸在肝肠循环中的运输机制具有重要意义。

脂肪酸结合蛋白(fatty acid binding protein, FABP)属于脂质结合蛋白超家族成员,是一类分子量较小而对脂肪酸有高亲和力的可溶性蛋白质(姜延志等, 2006)。FABP分子量约为14~16 kD,包含126~134个氨基酸序列。迄今为止,已发现至少存在9种类型的FABP,各种不同类型脂肪酸结合蛋白在组织中分布具有组织特异性(Denovan-Wright et al., 2000)。在鸡肝脏细胞质中分离出两种FABPs,一种与哺乳动物的L-FABP(liver fatty acid binding protein, L-FABP)在结构上高度相似,对脂肪酸具有较强的亲和力,被命名为鸡L-FABP;另一种与哺乳动物肝脏来源的FABP不同,被命名为肝脏基础型脂肪酸结合蛋白(liver basic fatty acid binding protein, Lb-FABP)(Scapin et al., 1988; Sewell et al., 1989b; Sams et al., 1991; Ceciliani et al., 1994)。迄今为止,在哺乳动物的肝脏中仍没有发现Lb-FABP的表达,然而在一些鱼类、两栖类、爬行类(Sarropoulou et al., 2005; Jordal et al., 2006; Di Pietro et al., 1996; Córdoba et al., 1999; Di Pietro et al., 1999; Denovan-Wright et al., 2000; Di Pietro et al., 2003)和禽类(Ceciliani et al., 1994; Ko et al., 2004)等非哺乳动物的肝脏中却陆续发现Lb-FABP的表达。近年来,通过X衍射、核磁共振等技术对Lb-FABP的结构和配基进行了研究(Lücke et al., 1996; Kramer et al., 2001; Tochtrop et al., 2002; Kurz et al., 2003; Tochtrop et al., 2003)结果表明Lb-FABP的氨基酸序列与哺乳动物的I-BABP(leum bile acid binding protein)高度

同源,其对游离脂肪酸的结合能力较弱,且只能结合一个分子的游离脂肪酸(Schievano et al., 1994; Beringhelli et al., 2001),而对胆汁酸却具有较强的亲和力(Guariento et al., 2008),并能结合两分子的胆汁酸。因此Lb-FABP也被称为肝脏胆汁酸结合蛋白(liver bile acid binding protein, L-BABP)(Nichesola et al., 2004; Capaldi et al., 2006)。

目前,尚无对禽类L-BABP功能研究的报道。随着后基因组计划的提出,展开了功能基因组学的研究工作,对某一基因的生物功能需要从转录水平延伸到蛋白水平,而制备目的蛋白的抗血清是从蛋白质水平上研究基因功能不可或缺的部分。因此,本研究成功构建了鸡L-BABP原核表达载体且经诱导后表达出L-BABP的融合蛋白,获取了较高特异性的鸡L-BABP抗血清,同时利用高特异性的抗血清对鸡L-BABP的组织表达分布进行了研究,这些工作作为继续研究鸡L-BABP的功能提供基础材料。

1 结果与分析

1.1 鸡L-BABP基因的扩增结果

根据NCBI提供的鸡L-BABP基因序列(Accession No: AF380998)设计特异性引物扩增鸡的肝脏组织cDNA,扩增得到约为428 bp的特异性条带,将PCR扩增产物进行回收纯化,用限制性内切酶BamH I/Not I对原核载体pGEX-4T-1和PCR回收产物进行双酶切后,进行连接,获得重组质粒pGEX4T-1/L-BABP。原核重组质粒经过双酶切和测序鉴定,确定L-BABP基因是以正确的方向插入到原核表达载体中的,且和GST阅读框方向相同。

1.2 GST/L-BABP融合蛋白的诱导表达及纯化

含有L-BABP基因的重组质粒pGEX-4T/L-BABP转化到大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞中,当阳性菌37℃培养至OD₆₀₀达到0.4时,加IPTG至终浓度1.0 mmol/L,37℃继续培养,在诱导4 h后离心收集菌体,超声波破碎,离心,分别取上清和沉淀蛋白进行SDS-PAGE电泳,结果显示表达的外源性蛋白主要存在于裂解液上清中,这表明本研究诱导表达的外源性蛋白为可溶性蛋白(图1)。由于该可溶性蛋白带有GST(glutathione-S-transferase)标签,因此在大量诱导融合蛋白后将细菌超声破碎,进而利用Glutathione Sepharose 4B亲和层析获得了大量纯化的融合蛋白。L-BABP基因的编码区长度为381 bp,

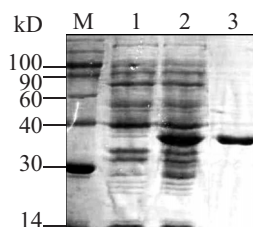


图1 鸡 L-BABP 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

M: 蛋白质分子量标准; 1: 未诱导的菌液上清; 2: IPTG 诱导 4 h 菌液上清; 3: 纯化的融合蛋白 GST/L-BABP

Figure 1 SDS-PAGE analysis of L-BABP fusion protein

M: Protein marker; 1: Total supernatant proteins of pGEX-4T/L-BABP without induced; 2: Total supernatant proteins of pGEX-4T/L-BABP induced by IPTG for 4 h; 3: Purified recombinant GST/L-BABP fusion protein

经软件(DNAMAN)分析其表达出的蛋白大小约为 12 kD, 而其带有 26 kD 的 GST 标签, 所以 GST/L-BABP 融合蛋白的大小应为 12 kD + 26 kD = 38 kD, 这与 SDS-PAGE 电泳结果显示的外源性蛋白大小一致(图 1)。

1.3 间接 ELISA 法检测抗血清效价

用间接 ELISA 法检测获得的抗血清效价, 根据《免疫学实验指南》提供的判断标准(样本的吸光度 (A_{450}) 值与阴性样本吸光度 (A_{450}) 值的均值之比即为 P/N 比值, 若样本的 P/N 值 ≥ 2 , 即判断为阳性), 本研究所制备的 GST/L-BABP 多克隆抗血清效价为 1:100 000(表 1)。

1.4 检测鸡 L-BABP 多克隆抗血清的特异性

经 Western blot 方法检测, 本研究所获取的特异性抗血清与 GST/L-BABP 融合蛋白在约 38 kD 处显示出杂交信号; 与从肉鸡肝脏组织中获取的蛋白, 以及经转染后过表达 L-BABP 基因的成纤维细胞蛋白, 均在 20 kD 以下处(大约 12 kD)杂交出特异性条

表 1 ELISA 检测抗血清的效价

Table 1 Detection potency of antiserums by ELISA

稀释倍数	阴性样本(A_{450})值	阳性样本(A_{450})值	P/N
Dilution ratio	Negative samples	Positive samples	
1:1 600	0.959	2.734	8.16
1:3 200	0.943	2.799	8.49
1:6 400	0.526	2.645	14.8
1:12 800	0.281	2.305	6.23
1:25 600	0.246	1.688	5.13
1:51 200	0.138	0.667	3.55
1:102 400	0.160	0.388	2.08

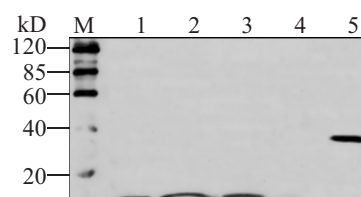


图2 L-BABP 抗血清特异性检测

M: 蛋白质分子量标准; 1: 鸡肝脏组织; 2、3: 转染 L-BABP 真核表达质粒的成纤维细胞; 4: 未转染 L-BABP 真核表达质粒的成纤维细胞; 5: 纯化的 GST/L-BABP 融合蛋白

Figure 2 The specificity analysis of antiserum

M: Protein marker; 1: Chicken liver proteins; 2, 3: Total protein of transfected fibroblasts; 4: Total protein of normal fibroblasts; 5: Purified GST/L-BABP fusion protein

带(图 2)。这些结果表明本研究所制的兔抗鸡血清可以特异性识别鸡 L-BABP 蛋白。

1.5 鸡 L-BABP 基因组织特异性分析

定量肉鸡的 13 种组织样蛋白, 采用 Western blot 的方法检测鸡 L-BABP 的组织表达特性, 以鸡 GAPDH 为内参, 结果表明鸡 L-BABP 仅表达在肝脏组织中, 而在其他 12 种检测组织没有表达。与 GAPDH 相比, 鸡 L-BABP 在肝脏组织中具有较高丰度的表达(图 3)。

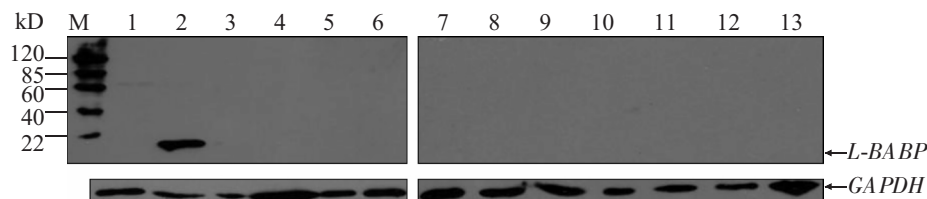


图3 鸡 L-BABP 组织表达特性分析

M: 蛋白质分子量标准; 1: 肾; 2: 肝脏; 3: 肺; 4: 腿肌; 5: 腺胃; 6: 胸肌; 7: 心脏; 8: 脂肪; 9: 脾; 10: 回肠; 11: 肌胃; 12: 空肠; 13: 十二指肠

Figure 3 Expression characteristics of L-BABP

M: Protein marker; 1: Kidney; 2: Liver; 3: Lung; 4: Crureus; 5: Glandular stomach; 6: Pectorales; 7: Heart; 8: Fat; 9: Spleen; 10: Ileum; 11: Muscle stomach; 12: Jejunum; 13: Duodenum

2 讨论

鸡 L-BABP 蛋白属于分子量较小的蛋白(12 kD),一般来说,蛋白越小越容易被降解,可以考虑加入融合标签 GST、Trx、MBP 或者其它较大的促进融合的蛋白标签,使蛋白正确折叠,以融合形式表达并易于纯化,所以本研究选择了带有 GST 标签蛋白的 pGEX-4T-1 载体。实验结果证实此载体能够高效表达出可溶性的融合蛋白 GST/L-BABP。

本研究对抗血清效价检测采用的是间接 ELISA 方法,检测时包被的抗原是纯化的融合蛋白,既含有 L-BABP 目的蛋白又含有 GST 标签蛋白,所以 ELISA 结果显示的是融合蛋白 GST/L-BABP 的抗血清效价,因此该多克隆抗血清效价里面所含实际的抗 L-BABP 的成分会小于 ELISA 实测的结果。鉴于上述原因,本研究采用 Western blot 方法,以鸡肝脏组织和转染真核表达质粒(pcDNA3/L-BABP)的成纤维细胞为材料,结果显示所制备的抗血清在 1:2000 的稀释后仍能有效地识别组织和细胞中的 L-BABP 蛋白(图 2)。即本研究制备的抗血清可以用于鸡 L-BABP 蛋白水平的功能研究,GST 标签的存在并不影响抗血清与目的蛋白的特异性结合。

Murai 等(2009)研究中利用 Northern blot 方法在 mRNA 水平上分析了鸡 L-BABP 的组织表达特性,研究表明其仅表达在肝脏组织中。本研究在蛋白水平上采用 Western blot 方法得到与其相一致的结果,即该基因仅在肝脏组织中表达。鉴于鸡 L-BABP 仅在肝脏组织中表达,而肝脏又是将胆固醇分解为胆汁酸的场所,同时胆汁酸是 L-BABP 主要的结合配基(Nichesola et al., 2004; Guariento et al., 2008),所以我们推测 L-BABP 对鸡肝脏中的胆固醇代谢和胆汁酸运输起着重要的作用。本研究制备的高效价、高特异性的鸡 L-BABP 抗血清,为从蛋白水平上深入研究 L-BABP 的生物学功能奠定了良好的基础。

3 材料与方法

3.1 实验动物

东北农业大学肉鸡(*Gallus gallus*)高、低腹脂双向选择品系 7 周龄公鸡,重约 3.06 kg 的雄性新西兰大白兔,购自黑龙江省中医药大学。

3.2 主要试剂

SYBR Premix *Ex Taq*TM 和各种限制性内切酶购自宝生物工程(大连)有限公司;原核表达载体

pGEX4T-1 为本实验室所保存;DNA 胶回收和质粒提取试剂盒和均购自 AXYSGEN 生物技术有限公司(浙江省);蛋白纯化柱子 GlutathioneSep harose 4B 购自 Amersham 公司(美国);辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗小鼠的 IgG 和辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;GAPDH 抗体和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)购自江苏省碧云天生物技术研究所;增强型 ECL 显色液购自哈尔滨海基生物技术有限公司。

3.3 重组表达质粒的构建

根据 GenBank 提供的 L-BABP 基因序列(AF380998)设计引物:

LBF 5'-cgggattccgCATAATGGCATTTCAGTGG-3';

LBR 5'-cggcgccgcccgcTCACAAAGAAGGTGATCTG-3'。

将 BamH 作为上游引物的酶切位点,将 Not 作为下游引物的酶切位点。提取鸡肝脏组织中的总 RNA,用 Oligo(dT)₁₈ 为引物经逆转录后形成 cDNA,PCR 扩增以此 cDNA 作为模板。(20 μL 反应体系:50 ng/μL 模板 DNA 0.5 μL、10×PCR buffer 2 μL、10 mmol/L dNTP 2 μL、10 μmol/L 上下游引物各 0.5 μL、5 U/μL TaqDNA 聚合酶 0.4 μL 和 ddH₂O 14 μL)。反应条件为:预变性 94 °C 30 s,变性 59.8 °C 30 s,复性延伸 72 °C 40 s,共 32 个循环。PCR 扩增产物经 DNA 胶回收试剂盒回收纯化。

将 PCR 扩增产物进行回收纯化,用限制性内切酶 BamH 和 Not 对原核/真核表达载体和目的基因的 PCR 回收产物双酶切后,进行连接,获得重组原核表达质粒 pGEX-4T/L-BABP 和真核表达质粒 pcDNA3/L-BABP。重组质粒经双酶切(BamH / Not)和测序鉴定,确保以正确的方向插入。

3.4 L-BABP 在大肠杆菌中的表达和纯化

将阳性重组质粒 pGEX-4T/L-BABP 转化到大肠杆菌(*Escherichia coli*)BL21(DE3)感受态细胞中,涂布于含有 50 μg/mL Amp 的 LB 固体培养基平板上,37 °C 培养 12~16 h。挑取单个菌落接种于含 50 μg/mL Amp 的 LB 液体培养基中,37 °C 振荡培养过夜,取上述过夜培养物以 1%的比例接种于新鲜含 100 μg/mL Amp 的 LB 液体培养基中,37 °C 振荡培养 2-3 h,当菌液 OD₆₀₀ 至 0.4~0.6 时,加 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L,37 °C 继续振荡培养 4 h 后收集菌体。沉淀重悬于细菌裂解缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA、100 mmol/L NaCl 及 10

mmol/L Triton X-100, pH 8.1) 中, 经超声破碎后, 12 000 r/min 离心 10 min, 分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳分析融合蛋白的可溶性 (刘冰等, 2009)。融合蛋白的纯化选用 Glutathione Sepharose 4B 亲和层析柱来进行。提取的蛋白的浓度采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定。

3.5 鸡 L-BABP 多克隆抗血清的制备

初免时, 将纯化的融合蛋白同完全福氏佐剂进行乳化, 对家兔进行皮下多点免疫, 免疫剂量为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 每 3 周, 将融合蛋白同不完全福氏佐剂进行乳化, 加强免疫 1 次, 3 次免疫后 7 d 取血清, 采用间接 ELISA 方法检测抗血清效价, 效价达到要求后, 再加强免疫 1 次, 抗原量为 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 7 d 后进行心脏采血, 收集血清, -80°C 冻存。

3.6 间接 ELISA 法检测抗血清效价

用包被缓冲液将纯化的融合蛋白稀释至蛋白质含量 5 mg/L 的浓度, 在每个酶标板的反应孔中加 0.1 mL 稀释后的蛋白, 4°C 过夜。次日, 弃去孔内溶液, 用洗涤缓冲液洗 3 次, 每次 3 min。封闭液为 5% 的脱脂乳, 在每个酶标板中添加 0.2 mL, 室温孵育 2 h, 经洗涤缓冲液洗涤后备用。在包被好蛋白的每个酶标板的反应孔中加入 0.1 mL 梯度稀释的抗血清 (以为未免疫兔血清作为对照), 室温孵育 1 h, 经洗涤液洗 3 次后, 在每个酶标板的反应孔加入 0.1 mL 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG(1:1 000 稀释), 室温孵育 1 h, 经洗涤液洗 3 次后进行 TMB 显色 30 min, 终止液为 2 mol/L 硫酸, 在每个酶标板的反应孔加入 0.05 mL, 在 ELISA 检测仪上, 在 450 nm 波长下, 以空白对照孔调零后测各孔 OD 值, 若 OD 值大于规定的阴性对照 OD 值的 2 倍, 即为阳性。

3.7 抗体特异性鉴定

将构建的真核表达质粒 pcDNA3/L-BABP 通过脂质体转染法转入成纤维细胞系中(以 6 孔板为例, 2 $\mu\text{g}/\text{孔}$)。在转染后 48 h 收集细胞, 用 Western 细胞裂解液提取总蛋白。同时以未转染真核质粒的细胞总蛋白做阴性对照, 与制备的抗血清进行交叉免疫反应以验证抗血清的特异性。

3.8 组织蛋白的制备

取东北农业大学肉鸡高、低腹脂双向选择品系 7 周龄高脂系肉鸡的肝脏、心脏、脂肪、胸肌、腿肌、肌胃、腺胃、脾、十二指肠、空肠、回肠、肺和肾等 13 种

组织, 在液氮中研磨后, 加入含有 1 mmol/L PMSF 的细胞裂解液, 振荡混匀后室温静置 30 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 用 BCA 方法测定蛋白浓度。 -80°C 保存。

3.9 Western blot

每种组织蛋白的上样量为 100 μg , 经 SDS-PAGE 电泳分离后, 电转至 PVDF 膜上。将膜放入脱脂奶粉中, 室温封闭 1 h; 用 PBST 洗涤后加入 1:2 000 稀释的一抗 (本研究制备的鸡 L-BABP 抗血清), 室温振荡孵育 2 h, 洗涤后加入 1:5000 稀释的二抗 (辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG), 室温振荡孵育 1 h; 洗涤后用增强型 ECL 显色液显色 3 min, 暗室曝光。

参考文献

- Beringhelli T., Goldoni L., Capaldi S., Bossi A., Perduca M., and Monaco H. L., 2001, Interaction of chicken liver basic fatty acid-binding protein with fatty acids: A ^{13}C NMR and fluorescence study, *Biochemistry*, 40: 12604~12611
- Capaldi S., Guariento M., Perduca M., Di Pietro S. M., Santomé J.A., and Monaco H.L., 2006, Crystal structure of axolotl (*Ambystoma mexicanum*) liver bile acid-binding protein bound to cholic and oleic acid, *Proteins*, 64(1): 79~88
- Ceciliani F., Monaco H.L., Ronchi S., Faotto L., and Spadon P., 1994, The primary structure of a basic (pI 9.0) fatty acid binding protein from liver of *Gallus domesticus*, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 109B: 261~271
- Córdoba O.L., Sánchez E.I., and Santomé J.A., 1999, The main fatty acid-binding protein in the liver of the shark (*Halaelurus bivius*) belongs to the liver basic type. Isolation, amino acid sequence determination and characterization, *European Journal of Biochemistry*, 265: 832~838
- Denovan-Wright E.M., Pierce M., Sharma M.K., and Wright J.M., 2000, cDNA sequence and tissue-specific expression of a basic liver-type fatty acid binding protein in adult zebra fish (*Danio rerio*), *Biochemical & Biophysical Acta*, 1492: 227~232
- Di Pietro S.M., Córscico B., Perduca M., Monaco H.L., and Santomé J.A., 2003, Structural and biochemical characterization of toad liver fatty acid-binding protein, *Biochemistry*, 42: 8192~8203
- Di Pietro S.M., Dell'Angelica E.C., Schleicher C.H., and Santomé J.A., 1996, Purification and structural characterization of a fatty acid-binding protein from the liver of the catfish *Rhamdia sapo*, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 113(3): 503~509

- Di Pietro S.M., Veerkamp J.H., and Santomé J.A., 1999, Isolation, amino acid sequence determination and binding properties of two fatty-acid binding proteins from axolotl (*Ambistoma mexicanum*) liver, *European Journal of Biochemistry*, 259: 127~134
- Griffith H.D., Guo K., Windsor D., and Butterwith S.C., 1992, Adipose tissue lipogenesis and fat deposition in leaner broiler chickens, *The Journal of Nutrition*, 122: 363~368
- Guariento M., Raimondo D., Assfalg M., Zanzoni S., Pesente P., Ragona L., Tramontano A., and Molinari H., 2008, Identification and functional characterization of the bile acid transport proteins in non-mammalian ileum and mammalian liver, *Proteins*, 70: 462~472
- Jing Y.Z., Li X.W., and Yang G.X., 2006, Sequence characterization, tissue-specific expression and polymorphism of the porcine (*Sus scrofa*) liver-type fatty acid binding protein gene, *Journal of Genetics and Genomics*, 33(7): 598~606
- Jordal A.E., Hordvik I., Pelsers M., Bernlohr D.A., and Torstensen B. E., 2006, FABP3 and FABP10 in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*)—General effects of dietary fatty acid composition and life cycle variations, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 145: 147~158
- Ko Y.H., Cheng C.H., Shen T.F., and Ding S.T., 2004, Cloning and expression of Tsaiya duck liver fatty acid binding protein, *Poultry Science*, 83: 1832~1838
- Kramer W., Corsiero D., Friedrich M., Girbig F., Stengelin S., and Weyland C., 1998, Intestinal absorption of bile acids: Paradoxical behaviour of the 14 kDa ileal lipid-binding protein in differential photoaffinity labelling, *Biochemical Journal*, 333: 335~341
- Kramer W., Sauber K., Baringhaus K-H., Kurz M., Stengelin S., Lange G., Corsiero D., Girbig F., König W., and Weyland C., 2001, Identification of the bile acid-binding site of the ileal lipid-binding protein by photoaffinity labeling, *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 7291~7301
- Kurz M., Brachvogel V., Matter H., Stengelin S., Thuring H., and Kramer W., 2003, Insights into the bile acid transportation system: The human ileal lipid-binding protein-cholyltaurine complex and its comparison with homologous structures, *Proteins*, 50(2): 312~328
- Liu B., Wang Y.X., Shi H., Wang Q.G., and Li H., 2009, Preparation of antiserum against chicken C/EBP α and its expression characteristics in different tissues of chicken, *Journal of Agricultural Biotechnology*, 17(1): 47~51 (刘冰, 王宇祥, 石慧, 王启贵, 李辉, 2009, 鸡 C/EBP α 抗血清制备及组织表达的特性, *农业生物技术学报*, 17(1): 47~51)
- Lücke C., Zhang F.L., Hamilton J. A., Sacchettini J. C., and Ruterjans H., 2000, Solution structure of ileal lipid binding protein in complex with glycocholate, *European Journal of Biochemistry*, 267: 2929~2938
- Lücke C., Zhang F., Ruterjans H., Hamilton J. A., and Sacchettini J. C., 1996, Flexibility is a likely determinant of binding specificity in the case of ileal lipid binding protein, *Structure*, 4(1): 785~800
- Murai A., Furuse M., Kitaguchi K., Kusumoto K., Nakanishi Y., Kobayashi M., and Horio F., 2009, Characterization of critical factors influencing gene expression of two types of fatty acid-binding proteins (L-FABP and Ib-FABP) in the liver of birds, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 154A: 216~223
- Nichesola D., Perduca M., Capaldi S., Carrizo M. E., Righetti P. G., and Monaco H. L., 2004, Crystal structure of chicken liver basic fatty acid-binding protein complexed with cholic acid, *Biochemistry*, 43: 14072~14079
- O'Hea E. K., and Leveille G. A., 1968, Lipogenesis in isolated adipose tissue of the domestic chick (*Gallus domesticus*), *Comparative Biochemistry and Physiology*, 26(1): 111~120
- Sams G. H., Hargis B. M., and Hargis P. S., 1991, Identification of two lipid binding proteins from liver of *Gallus domesticus*, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 99B(1): 213~219
- Sarropoulou E., Power D. M., Magoulas A., Geisler R., and Kotoulas G., 2005, Comparative analysis and characterization of expressed sequence tags in gilthead sea bream liver and embryos, *Aquaculture*, 243:69~81
- Scapin G., Spadon P., Pengo L., Mammi M., Zanotti G., and Monaco H. L., 1988, Chicken liver basic fatty acid-binding protein (pI=9.0). Purification, crystallization and preliminary X-ray data, *FEBS Lett*, 240: 196~200
- Schievano E., Quarzago D., Spadon P., Monaco H. L., Zanotti G., and Peggion E., 1994, Conformational and binding properties of chicken liver basic fatty acid binding protein in solution, *Biopolymers*, 34: 879~887
- Sewell J. E., Davis S. K., and Hargis P. S., 1989, Isolation, characterization, and expression of fatty acid binding protein in the liver of *Gallus domesticus*, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 92B: 509~516
- Tochtrop G. P., Bruns J. L., Tang C., Covey D. F., and Cistola D. P., 2003, Steroid ring hydroxylation patterns govern cooperativity in human bile acid binding protein, *Biochemistry*, 42: 11561~11567
- Tochtrop G. P., Richter K., Tang C.G., Toner J. J., Covey D. F., and Cistola D. P., 2002, Energetics by NMR: Site-specific binding in a positively cooperative system, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 99: 1847~1852