

重组 Maxadilan 的制备与鉴定

易天红, 洪岸, 谢珊珊, 张玲, 谢秋玲, 戴云, 余榕捷

暨南大学生物工程研究所, 广州 510632

摘要: 为利用基因工程技术获得重组 Maxadilan(RMMAX), 根据 Maxadilan 的氨基酸序列, 设计并人工合成了在原核表达的基因。克隆到表达载体 pKYB, 重组质粒 pKYB-MAX 转化表达宿主菌 *Escherichia coli* strain ER2566, 构建表达工程菌。用诱导剂 IPTG 诱导由目的多肽、内含肽和几丁质结合域(Chitin binding domain, CBD)组成的“三元”融合蛋白表达; 用几丁质亲和层析纯化了裂解液中的融合蛋白, 用 β -巯基乙醇切割融合蛋白, 获得目的蛋白。所得的多肽经激光飞行质谱测定分子量结果与理论值相符, 生物活性分析表明, 重组 Maxadilan 有显著的提升血糖的作用。

关键词: 重组 Maxadilan, 基因合成, 内含肽, 纯化与鉴定

Preparation and Identification of Recombinant Maxadilan

Tianhong Yi, An Hong, Shanshan Xie, Ling Zhang, Qiuling Xie, Yun Dai, and Rongjie Yu

Bio-engineering Institute of Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract: To produce recombinant Maxadilan using gene engineering technology, the gene of recombinant Maxadilan which expressed in protocaryon were designed and synthesized according to the amino acid sequences of Maxadilan. The recombinant plasmid pKYB-MAX was constructed and transformed into host bacteria *Escherichia coli* strain ER2566. After the MAX-intein-CBD fusion protein was purified by chintin-affinity chromatography, the self-cleavage activity of the intein was induced by β -mercaptoethanol and the recombinant Maxadilan was released from the chitin-bound intein tag. The molecular weight of peptides was determined by the laser flight mass spectrometry and the results was conformity with the theoretical value. The biological activity analysis showed that recombinant Maxadilan significantly enhanced the concentration of serum glucose.

Keywords: recombinant Maxadilan, gene synthesis, intein, purification and identification

PACAP (Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide) 是 1989 年发现的, 由脑垂体分泌的或目的组织自分泌和旁分泌的具有重要生物学功能的神经多肽^[1], 是促胰液素/胰高血糖素/血管活性肠肽(VIP)家族中的新成员^[2,3]。PACAP 具有 3 个受体: PAC1 是 PACAP 的特异受体; VPAC1 和 VPAC2 是

PACAP 和 VIP 的共同受体; PACAP 对 3 个受体具有相同的激动功能^[4]。其中 PAC1 受体主要分布于中枢神经系统、周围神经系统以及睾丸、卵巢、呼吸道、肺、胰腺等非神经组织内等^[5-8]。目前已证实由 PAC1 介导的 PACAP 生物学功能有: 神经递质^[9]/调质^[3], 保护神经细胞^[10-11]; 神经损伤修复^[12]; 调节血管^[13];

Received: April 10, 2008; **Accepted:** September 18, 2008

Supported by: Guangdong Provincial Nature Science Foundation of China (No. 06300579), Science Technology Research Key Project of the Educational Department of China (No. 207141), National High-tech R&D Program of China (863 Program) (No. 2006AA02Z125).

Corresponding author: Rongjie Yu. Tel: +86-20-85220220; Fax: +86-20-85221983; E-mail: rongjie_yu1123@163.com

广东省自然科学基金项目(No. 06300579), 教育部科学技术研究重点项目(No. 207141), 国家高技术研究发展计划(863计划)(No. 2006AA02Z125)资助。

促进激素分泌, 调节内分泌平衡^[14]; 调节性腺功能和生殖细胞的产生^[15]; 参与消化活动, 调节能量代谢平衡^[16]; 参与调节免疫系统^[17]; 与学习和记忆有关^[18]; 与某些心理感受有关^[19]; 与动物的生物钟有关^[20]等。

鉴于 PAC1 介导了 PACAP 的多种生物学功能, 因此开发 PAC1 的特异激动剂具有巨大的药用开发的價值。例如 PAC1 受体在眼部三叉神经特异高表达, 而重组 Maxadilan 通过 PAC1 有效促进角膜手术后角膜敏感性的恢复及眼部三叉神经细胞突起的形成(神经产生); 因此在眼睛角膜修复、神经修复及保护方面具有极大的应用价值^[21]。PAC1 受体特异激动剂具有显著的升糖作用, 因此显示其在调节能量代谢方面具有应用价值。

目前已发现的 PAC1 特异激动剂 Maxadilan 是从白蛉唾液腺中分离的由 61 个氨基酸组成的多肽^[22]。对于这样的多肽, 国外往往采用蛋白化学合成, 但由于肽段较长, 合成效率低, 成本高; 本研究尝试利用基因工程的原理和方法制备。试验利用基因工程的原理和技术克隆的重组 Maxadilan, 由 73 个氨基酸组成, 与 Maxadilan 有 80% 同源性。重组 Maxadilan 与 PACAP 基本没有同源性, 但能有效激活 PACAP 的特异受体 PAC1, 发挥相应的生物学功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细菌菌株和质粒载体等

菌株 *E. coli* strain ER2566 和质粒 pKYB 均购自美国 New England Biolabs(NEB)公司, 菌株 DH5 α 为本实验室保存, 引物由 Invitrogen 公司合成。

1.1.2 酶及其它试剂

限制酶 *Nde* I 和 *Xho* I 购自美国 New England Biolabs(NEB)公司, *Taq* 酶和 T4 DNA 连接酶购自大连 TaKaRa 公司; PCR Purification Kit、Gel Extraction Kit 和 Plasmid Miniprep Kit 购自 QIAGEN 公司。IPTG 为 Promega 产品。OneTouch Ultra 血糖自动分析仪购自美国 Johnson 公司。几丁质珠购自美国 NEB 公司。

1.1.3 实验动物

雄性 NIH 小鼠购自广东省医学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 人工合成重组 Maxadilan 基因

按照大肠杆菌的密码偏好性设计编码重组 Maxadilan 的基因; 设计 6 条引物, 采用三步法获得重组 Maxadilan 的基因(图 1): 1) 链延伸反应: 引物 F3(0.1 A/ μ L) 5 μ L, F4(0.1 A/ μ L) 5 μ L, 10 \times LA Buffer(含有 4 mmol/L MgCl₂) 10 μ L, dNTP 16 μ L, H₂O 63 μ L, 94 $^{\circ}$ C, 10 min; 降至 55 $^{\circ}$ C 时, 加 LA *Taq* 酶 1 μ L, 保温 5 min; 72 $^{\circ}$ C, 5 min; 所得为延伸反应液。2) PCR 反应: 引物 F2(0.01 A/ μ L) 1 μ L, F5(0.01 A/ μ L) 1 μ L, 1) 中所得延伸反应液 1 μ L, dNTP 10 μ L, 10 \times Ex Buffer 10 μ L, Ex *Taq* 酶 1 μ L, H₂O 76 μ L, 94 $^{\circ}$ C, 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 3) 以第 2) 步 PCR 反应产物为模板, 引物 F1(0.01 A/ μ L) 1 μ L, F6(0.01 A/ μ L) 1 μ L, 延伸反应液 1 μ L, dNTP 10 μ L, 10 \times Ex Buffer 10 μ L, Ex *Taq* 酶 1 μ L, H₂O 76 μ L, 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

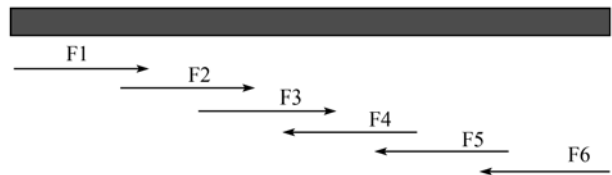


图 1 重组 Maxadilan 的基因合成图

Fig. 1 Strategy for syntheses of recombinant Maxadilan gene

合成重组 Maxadilan 基因的 6 条引物如下:

- F1: 5'-NNNNNNCATATGAGCAACGTGCTGCAGACCAGCGTGCAGACCACCGCGACCTTTACC-3'
 F2: 5'-CGGCAGCTGGCTGGTATCCATGCTGGTAAAGGTCGCGGTGGTCTG-3'
 F3: 5'-TGCCAGTTTCGTAAAGCGATTGATGATTGCCAGAAACAGGCGCATCATAGCAACGTG-3'
 F4: 5'-TTTCTGTTTCATGCATTCTTTAAACACGCTGTTGCCCGGCAGCTGGTATCCAT-3'
 F5: 5'-GGTGGTGTTCATATGGCAGCATTCTGTGCGATGCGACCTGCCAGTTTCGTAAAGCGATT-3'
 F6: 5'-NNNNNNNCTCGAGTTTGCCCGCTTTAAATTCTTTTTTTTTTCTGTTTCATGCATTCTTT-3'

其中, N 代表保护碱基, CAT ATG 为 *Nde* I 酶切位点, CTC GAG 为 *Xho* I 酶切位点。

1.2.2 表达质粒的构建与鉴定

用 *Nde* I 和 *Xho* I 分别对重组 Maxadilan 基因和质粒 pKYB 进行双酶切, 将酶切后的重组 Maxadilan 基因克隆到质粒 pKYB 的 *Nde* I 和 *Xho* I 位点间, 构

建重组质粒 pKYB-MAX(图 2), 将重组质粒转化 *E. coli* DH5 α , 用菌落 PCR 对重组子进行初步鉴定, 并通过基因测序鉴定正确的阳性克隆。

1.2.3 融合蛋白的诱导表达

重组质粒 pKYB-MAX 转化表达宿主菌 *E. coli* strain ER2566, 构建表达工程菌 pKYB-MAX-ER; 挑取单克隆于 5 mL 含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中, 摇菌培养过夜, 以 1:20 接种于 1 L 含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 摇菌至 OD₆₀₀ 为 0.5~0.8, 加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 30 $^{\circ}$ C 诱导 3 h。离心收集菌体, 重悬于 60 mL 的溶液 A (20 mmol/L Tris · HCl, 500 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 中, 然后超声破碎, 离心收集上清。

1.2.4 融合蛋白的诱导切割和纯化

取 10 mL 几丁质珠装填 2.5 cm \times 10 cm 层析柱, 不少于 10 倍体积的溶液 A (20 mmol/L Tris·HCl, 0.5 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 洗柱; 以 0.5 mL/min

的流速上破碎上清; 大于 10 倍体积的溶液 A 以 2 mL/min 的流速洗去杂蛋白, 30 mL 溶液 B (20 mmol/L Tris·HCl, 0.5 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 50 mmol/L β -巯基乙醇, pH 8.0) 快速过柱, 使 β -巯基乙醇均匀分布并浸泡柱内填料, 4 $^{\circ}$ C 诱导内含肽切割 16 h。溶液 A 洗脱目的多肽, 分管收集, 每 2 mL 为一管, 目的多肽大多存在于前 10 管中。4 $^{\circ}$ C 透析过夜除去 β -巯基乙醇。采用滤过分子量为 10 kD 的超滤管滤除大分子杂蛋白。

1.2.5 重组多肽 Maxadilan 的鉴定

用 15% 的 SDS-PAGE 对融合蛋白的表达和目的蛋白的纯度进行初步鉴定。用 Bradford 法^[23]测定蛋白的浓度, 以牛血清白蛋白做标准品, 利用 ChemilnagerV5.5 图像采集及分析软件对电泳图进行扫描和分析, 并计算制备过程中目的蛋白的纯度及回收率。将目的蛋白冻干后送北京军事医学科学院进行激光飞行质谱检测, 测定其分子量。

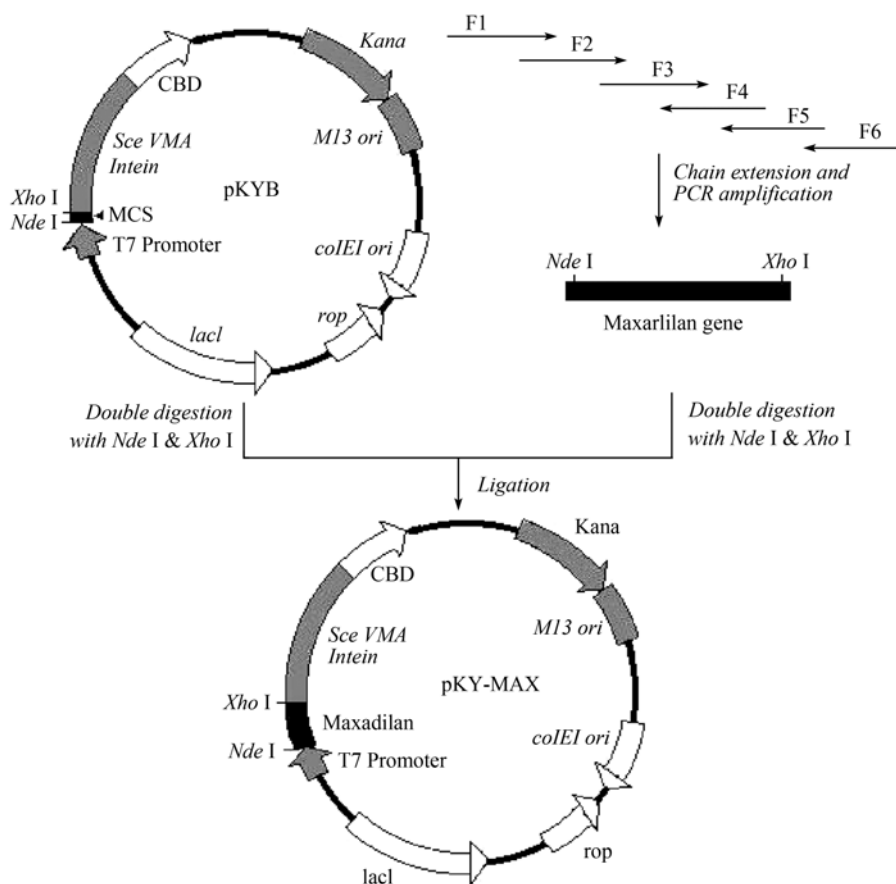


图 2 pKYB-MAX 的表达质粒构建图

Fig. 2 Construction of expression plasmids pKYB-MAX

```

1   TAATTTTGT TAACTTTA AGAAGGAGATAT ACATATGGGC AGCATTCTGT
51  GCGATGCGAC CTGCCAGTTTCGTAAAAGCGA TTGATGATTG CCAAGAAACAG
101 GCGCATCATA GCAACGTGCT GCAGACCAGC GTGCAGACCA CCGCGACCTT
151 TACCAGCATG GATACCAAGCC AGCTGCCGGG CAAACA GCGTGT TTTAAAGAAT
201 GCATGAAACA GAAAAAAAAA GAATTTAA AGCGGGCAA ACTCGAGGGCTCT
251 TCCTGCTTTG CCAA GGGTAC CAATGTTTTA ATGGC GGATG

```

图3 pKYB-MAX 的 DNA 测序图
Fig. 3 Sequencing result of pKYB-MAX

1.2.6 重组多肽重 Maxadilan 的活性测定

清洁级(SPF 级)NIH 雄性小鼠(使用许可证号: SCXK(粤)2003-0002; 粤监证字 2007A004)体重(20±5)g, 按体重随机分组, 每组 8 只。一共分为 2 组, RMMAX 组和空白对照组。重组蛋白的终浓度为 20 nmol/kg 小鼠, 以生理盐水为溶媒, 空白对照为生理盐水。将小鼠禁食 24 h, 20 nmol/kg 的重组蛋白腹腔注射 NIH 小鼠, 注射生理盐水作为空白对照。注射前(0 min)及注射 10、20、30、60、90 min 后, 尾部采血, 用 OneTouch Ultra 血糖自动分析仪测定 90 min 内血糖的变化。

2 结果

2.1 重组表达载体 pKYB-MAX 的鉴定

按方法 1.2.1 合成了重组基因 Maxadilan 以后, 克隆到载体 pKYB, 构建得到重组表达质粒 pKYB-MAX。用菌落 PCR 的方法对重组质粒进行初步鉴定后(图略), 测序发现, 所得序列结果与天然的 Maxadilan 完全一致, 测序结果见图 3。

2.2 工程菌的检测及目的多肽的纯化与鉴定

工程菌 pKYB-MAX-ER 构建成功, 经过 IPTG 诱导后, 由重组 Maxadilan、intein 和 CBD 组成的融合蛋白能够进行可溶表达(图 4, 泳道 3、4), 经扫描分析, 约占可溶性总蛋白的 18.5%(表 1)。当破碎上清上样流过几丁质柱填料以后, 大部分融合蛋白能通过几丁质结合域与几丁质珠结合(图 4, 泳道 5)。用溶液 A 洗柱, 可将许多非特异性结合的杂蛋白洗脱下来, 而融合蛋白不会被洗脱下来(图 4, 泳道 6)。用β-巯基乙醇在 4°C 切割 24 h 以后, 目的蛋白从融合蛋白上切割下来, 用溶液 A 过柱以后, 目的蛋白被洗脱下来(图 4, 泳道 8), 而 intein 和 CBD 仍结合在几丁质珠上(图 4, 泳道 10)。目的蛋白用生理盐水透析去掉β-巯基乙醇以后, 用激光飞行质谱检测其

分子量为: 8056.78(图 5), 与理论值相符, 凝胶高效液相色谱(HPLC)检测结果显示, 重组 Maxadilan 的纯度达到 95%以上(图 6)。

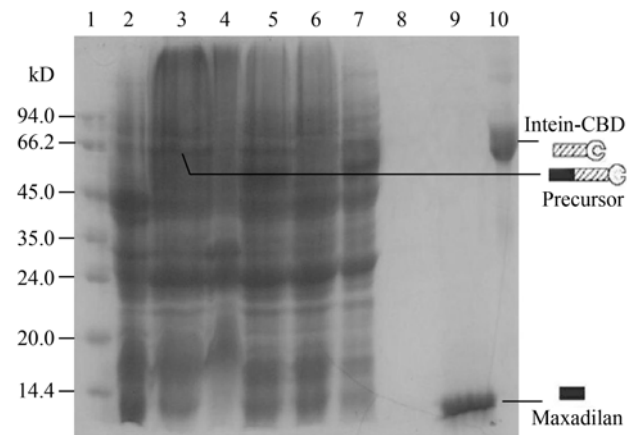


图4 RMMAX-intein-CBD 融合蛋白表达和纯化电泳图
Fig. 4 Identification of the expression of RMMAX-intein-CBD precursor and purification of the recombinant Maxadilan

1: protein marker; 2: uninduced bacteria; 3: induced bacteria; 4: deposit of ultrasonicated bacteria; 5: supernatant of ultrasonicated bacteria; 6: chitin column flow through; 7: chitin column wash; 8: cleavage buffer flow through; 9: fractions of eluted recombinant maxadilan after self-cleavage reaction; 10: SDS stripping of remaining proteins bound to chitin column

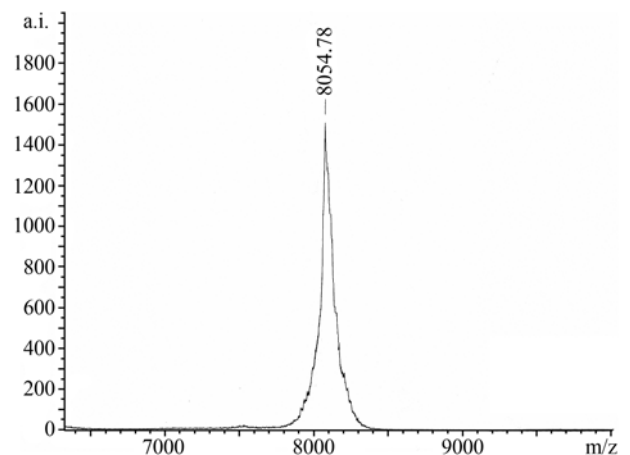


图5 重组 Maxadilan 的激光飞行质谱鉴定图
Fig. 5 Laser flight mass spectrometry of recombinant Maxadilan

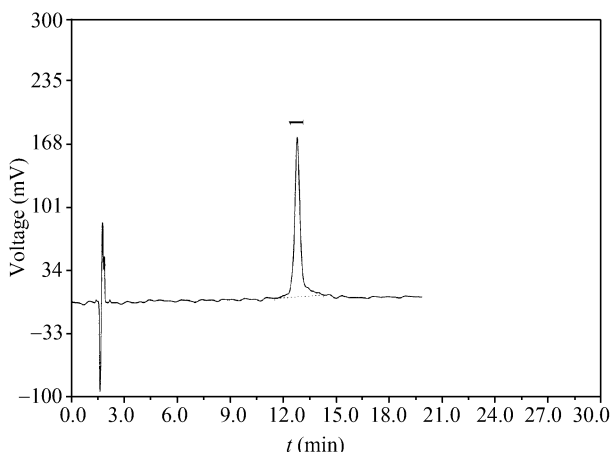


图 6 重组 Maxadilan 的凝胶高效液相色谱检测图
Fig. 6 Gel-exclusion HPLC chromatograms of recombinant Maxadilan

2.3 重组多肽 Maxadilan 的活性测定

按照 1.2.5 中的实验方法, 小鼠在注射了重组蛋

白和生理盐水以后, 测定血糖的实验结果(表 2 和图 7)显示: 注射激动剂重组 Maxadilan 后, 有显著的升糖效果, 在 60 min 以后血糖浓度开始下降; 注射生理盐水没有明显的升糖效果, 血糖基本维持同一水平。

3 讨论

由于 Maxadilan 是公认的 PACAP 特异受体 PAC1 的特异激动剂, 所以 Maxadilan 成为 PAC1 受体功能研究的不可或缺的工具。例如: pg 级的 Maxadilan 可引起胰岛β细胞的胞内 Ca^{2+} 浓度的提高, 显示了 PAC1 参与介导了 PACAP 促进胰岛素分泌的生物学功能^[16]。此外, Maxadilan 还被用于证实 PAC1 受体介导了 PACAP 对神经干细胞的增殖作用^[24]。因此实现重组 Maxadilan 的高效制备对 PAC1 受体功能的研究和开发都具有重要的意义。

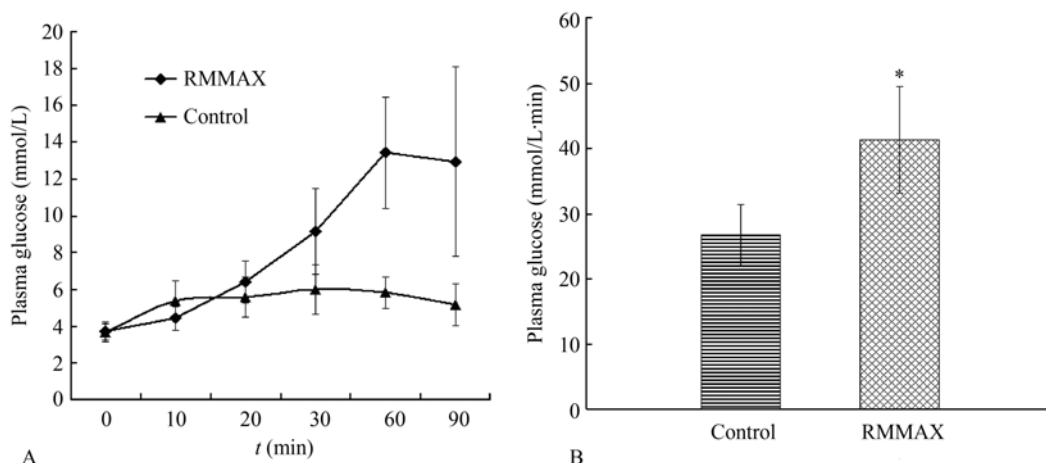


图 7 重组 Maxadilan 诱导下 NIH 小鼠的血糖浓度的变化

Fig. 7 Recombinant Maxadilan-induced changes of plasma glucose in NIH mice

(A) plasma glucose prior to (0 min); and 10, 20, 30, 60 and 90 min after intraperitoneal administration of saline alone (0.9% NaCl, W/V) or in combination with 20 nmol/kg recombinant maxadilan; (B) plasma glucose AUC values for 0-90 min after injection are shown values are means \pm S.E.M. for eight mice. * $P < 0.01$ compared with saline alone

表 1 1 L 培养基中重组 Maxadilan 的纯化效率和回收率

Table 1 Purification and recovery of recombinant Maxadilan from 1 L culture

Purification step	Total protein ^a (mg)	Target protein ^a (mg)	Purity ^b (%)	Recovery ^{c,d} (%)
Total bacterial production	1000.0	200 (RMMAX-intein-CBD)	20.0	100.0
Supernant of ultrasonicated bacteria	800.0	148 (RMMAX-intein-CBD)	18.5	74.0
Chitin column and intein-mediated cleavage	5.0	4.8 (recombinant Maxadilan)	96.0	2.4

One liter of high-density culture contained about 4.5 g wet cell weights

a: protein concentration was determined by Bradford method; b: purity was estimated by analyzing images of the (tricine-SDS-PAGE gel stained with Coomassie blue using Chemilnager V5. 5 software; c: recovery was represented by the percentage of the purified target protein in the total target precursor; d: the ultimate recovery of recombinant Maxadilan was low because recombinant Maxadilan of 8056 dal was separated from fusion precursor RMMAX-intein-CBD of 65 kD

表 2 NIH 小鼠的血糖浓度变化
Table 2 Plasma glucose concentration of NIH mice

Group	Number of mice	0 min	10 min	20 min	30 min	60 min	90 min
RM MAX	8	3.7±0.4	4.4±0.7	6.4±1.1	9.2±2.3	13.4±3.0	12.9±5.1
Control	8	3.7±0.5	5.4±1.0	5.6±1.1	6.0±1.3	5.8±0.9	5.2±1.1

本研究利用基因工程的原理和技术, 结合内含肽的可诱导剪切功能实现了重组 Maxdilan 的高效制备。试验中选用的载体是 pKYB, 在多克隆位点的后面是内含肽和几丁质结合域(CBD)构成的纯化标签, 目的多肽克隆进去以后, 以可溶性融合蛋白的形式表达出来; 经亲和层析后利用内含肽的自我切割功能, 使目的多肽切割下来, 而内含肽和 CBD 还结合在几丁质上, 这样可以通过一步纯化步骤, 将目的多肽纯化出来, 且不含任何融合成分。通过一步纯化, 4.5 g 菌体获得 4.8 mg, 纯度达到 95%以上重组 Maxadilan (表 1)。本制备方法纯化步骤简单, 纯化效率较高; 与化学合成相比, 具有表达方法效率高、成本低、应用前景广阔等优点。

本研究制备的重组 Maxadilan 与天然的相比, 在 N 端多了 5 个氨基酸残基, 分别是: Met、Gly、Ser、Ile、Leu; 在 C 端多了 7 个氨基酸残基: Gly、Lys、Leu、Glu、Gly、Ser、Ser; 但这些增加的氨基酸均不在 Maxadilan 结合与激活受体的关键区域^[22], 因此不会影响其生物学活性。对重组 Maxadilan 的生物学活性检测验证了其具有显著升糖的作用: 在注射 60 min 以后血糖浓度达到最高值, 与空白对照有显著差异(图 7), 这显示了重组 Maxadilan 具有作为 PAC1 受体激动剂的性质。重组 Maxadilan 的高效制备为 PAC1 受体功能的研究和开发奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Miyata A, Arimura A, Dahl RR, *et al.* Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, **164**(1): 567–574.
- [2] Arimura A. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP): discovery and current status of research. *Regul Pept*, 1992, **37**(3): 285–303.
- [3] Arimura A, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptors: neuroendocrine and endocrine interaction. *Front Neuroendocrinol*, 1995, **16**(1): 53–88.
- [4] Arimura A. Receptors for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: Comparison with vasoactive intestinal peptide receptors. *Trends Endocrinol Metab*, 1992, **3**(8): 288–294.
- [5] Shioda S, Shuto Y, Somogyvári-Vigh A, *et al.* Localization and gene expression of the receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the rat brain. *Neurosci Res*, 1997, **28**(4): 345–354.
- [6] Wei Y, Mojsov S. Tissue specific expression of different human receptor types for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactiveintestinal polypeptide: implications for their role in human physiology. *J Neuroendocrinol*, 1996, **8**(11): 811–817.
- [7] Qiao LP, Li XL. Resent development of research on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its receptors. *J Modern Clin Med Bioeng*, 2003, **9**(1): 61–63.
- [8] Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, *et al.* Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to function. *Pharmacol Rev*, 2000, **52**(2): 269–324.
- [9] Wakade AR, Guo X, Strong R, *et al.* pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) as a neurotransmitter in rat adrenal medulla. *Regul Pept*, 1992, **37**(3): 331.
- [10] Braas KM, May V. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide directly stimulate sympathetic neuron neuropeptide Y release through PAC1 receptor isoform activation of specific intracellular signaling pathway. *J Biol Chem*, 1999, **274**(39): 27702–27710.
- [11] Dickinson T, Mitchell R, Robberecht P, *et al.* The role of VIP/PACAP receptor subtypes in spinal somatosensory processing in rats with an experimental peripheral mononeuropathy. *Neuropharmacol*, 1999, **38**(1): 167–180.
- [12] Rác B, Gasz B, Borsiczky B, *et al.* Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in endothelial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Gen Comp Endocrinol*, 2007, **153**(1-3): 115–123.
- [13] Chang Q, Deng YP, Liu SH. Morphologic study on PACAP protecting vascular smooth muscle cell from damage by LDL PACAP. *Prog Anatom Sci*, 1999, **5**(4): 347–349.
- [14] Jarry H, Leonhardt S, Schmidt WE, *et al.* Contrasting effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACA P) on *in vivo* and *in vitro* prolactin and growth hormone release in male rats. *Life Sci*, 1992, **51**(11): 823–830.
- [15] Pescel M, Canipari R, Ferri GL, *et al.* Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates adenylate cyclase and promotes proliferation of mouse

- primordial germ cells. *Development*, 1996, **122**(1): 215–221.
- [16] Yamada H, Watanabe M, Yada T. Cytosolic Ca^{2+} responses to sub-picomolar and nanomolar PACAP in pancreatic h-cells are mediated by VPAC2 and PAC1 receptors. *Regul Pept*, 2004, **123**(1-3): 147–153.
- [17] Leceta J, Gomariz RP, Martinez C. Receptors and transcriptional factors involved in the anti-inflammatory activity of VIP and PACAP. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, **9**(21): 92.
- [18] Hashimoto H, Shintani N, Tanaka K. Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(23): 55–60.
- [19] Jongsma H, Pettersson LM, Zhang YZ. Markedly reduced chronic nociceptive response in mice lacking the PAC1 receptor. *Neuroreport*, 2001, **12**(10): 2215.
- [20] Hannibal J, Jamen F, Nielsen HS. Dissociation between light-induced phase shift of the circadian rhythm and clock gene expression in mice lacking the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type 1 receptor. *J Neuro Sci*, 2001, **21**(13): 4883.
- [21] Fukiage C, Nakajima T, Takayama Y, et al. PACAP induces neurite outgrowth in cultured trigeminal ganglion cells and recovery of corneal sensitivity after flap surgery in rabbits. *Am J Ophthalmol*, 2007, **143**(2): 255–262.
- [22] Lerner EA, Iuga AO, Reddy VB. Maxadilan, a PAC1 receptor agonist from sand flies. *Peptides*, 2007, **28**(9): 1651–1654.
- [23] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**(1-2): 248–254.
- [24] Mercer A, Ronnholm H, Holmberg J, et al. PACAP promotes neural stem cell proliferation in adult mouse brain. *J Neurosci Res*, 2004, **76**(2): 205–215.



科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

烟草种质资源图鉴(上下册, 精装)

许美玲 李永平等 著

978-7-03-021410-2 ¥560.00 2008年11月出版

本书简要阐述了烟草起源、进化、传播、分类和种质资源收集整理、评价鉴定、保存利用等内容, 并全面系统地介绍了各个烟草种质资源的来源、生物学特性、抗病性、烟叶外观质量、内在化学成分、评吸结果、主要栽培技术、调制技术等内容, 编入7个类型的烟草种质资源1477份(含烤烟823份、晒烟376份、晾烟14份、白肋烟67份、香料烟146份、黄花烟30份和野生烟21份), 附有植株、叶片、花序、花朵、蒴果、种子电镜扫描和大田生产照片4500余张。

本书内容全面、丰富, 资料翔实, 图文并茂, 是烟草种质资源研究的重要工具书, 可供烟草农业科研、教学, 特别是育种工作者参考。本书的出版, 将有利于烟草种质资源的创新利用, 充分挖掘其潜在的社会经济价值并促进烟草种质资源研究的发展。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 阮芯 联系电话: 010-64034622(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>