

抗山羊 $\Delta fosB$ 基因表达产物抗体的制备及应用

郑惠玲, 祝珍珍, 安俊辉, 杨振宇, 邢瑞芳, 闫林慧

西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100

摘要: $\Delta fosB$ 是 $fosB$ 基因的自然截短型, 稳定存在于许多组织中, 在脂肪细胞和成骨细胞的形成和分化中起到重要作用。 $\Delta FosB$ 蛋白可能与钙在骨和乳腺中的代谢有关, 并且调控钙从骨向乳腺转移的信号通路。将奶山羊的 $\Delta fosB$ 基因亚克隆到 pET32a 载体得到 pET32a- $\Delta fosB$ 原核表达载体, IPTG 诱导其在大肠杆菌中表达, 纯化融合蛋白免疫兔子制备多克隆抗体。ELISA 检测显示抗体效价达 1:51 200, Western blotting 结果显示制备的抗体能特异性检测原核表达的 $\Delta FosB$ 蛋白以及在 HEK-293 细胞中表达的 $\Delta FosB$ 蛋白。进一步的组织差异表达检测表明 $\Delta FosB$ 在山羊的乳腺、骨髓、脑髓、肌肉、心脏、肝和肺组织中均有表达。

关键词: 山羊, $\Delta FosB$, 原核表达, 多克隆抗体, 组织差异表达

Preparation and application of goat $\Delta fosB$ gene expression product antibody

Huiling Zheng, Zhenzhen Zhu, Junhui An, Zhenyu Yang, Ruifang Xing, and Linhui Yan

College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

Abstract: $\Delta fosB$, a naturally occurring truncated isform of $fosB$ gene, existed in many tissues stably and played an important role in formation and differentiation of adipocyte and osteoblast. $\Delta FosB$ may be related to the metabolism of calcium in bone and mammary gland and regulate the signal pathway of calcium transfer from bone to mammary gland. We first sub-cloned $\Delta fosB$ gene of goat into the vector pET32a to construct prokaryotic expression vector pET32a- $\Delta fosB$. Then we induced for $\Delta fosB$ gene expression efficiently by IPTG. Finally we immunized the adult rabbits with purified recombinant $\Delta FosB$ to prepare rabbit anti-goat $\Delta FosB$ polyclonal antibody. iELISA analysis showed the antibody with the titer of 1:51 200, and Western blotting result showed that the antibody could specifically detect the $\Delta FosB$ protein expressed in prokaryotic cell and HEK-293 cell, respectively. Further Western blotting assay showed that $\Delta FosB$ expressed in various tissues of goat *in vivo*.

Keywords: goat, $\Delta FosB$, prokaryotic expression, polyclonal antibody, tissue differential expression

小鼠骨肉瘤基因 B (Finkel-Biskis-Jinkins murine osteosarcoma B, $fosB$) 是转录因子 AP-1 家族成员之一, 有 3 种表达产物: FosB、 $\Delta FosB$ 和 $\Delta 2\Delta FosB$,

都是细胞增殖与分化的重要调节因子^[1]。 $fosB$ 基因是一种典型的早期即刻基因, 在多种刺激物的作用下瞬时诱导表达^[2]。 $\Delta FosB$ 由于磷酸化作用能够作

Received: March 30, 2010; **Accepted:** May 17, 2010

Supported by: Basic Research Fund of Northwest A&F University (No. Z109021002), Research and Development Special Fund for Public Welfare Industry (Agriculture) (No. 3-45).

Corresponding author: Huiling Zheng. Tel/Fax: +86-29-87092164; E-mail: Zheng.huiling@yahoo.com

西北农林科技大学基本科研业务费 (No. Z109021002), 农业部公益性行业科研专项 (农业) 经费 (No. 3-45) 资助。

为一种分子开关稳定存在^[3-4]。研究表明 Δ FosB 在小鼠中可能参与脂肪细胞和成骨细胞的形成与分化^[5-8]。钙是骨的重要组成部分, Δ FosB 调控骨的形成及骨密度, 故 Δ FosB 可能与钙在骨骼中的积累有关。Yoshinori 等^[9]建立了表达各种 *fosB* 基因转录本的突变的小鼠胚胎干细胞系, 发现在只表达 Δ FosB 的突变细胞系中有 7 种钙结合蛋白上调, 1 种下调, 同时有 3 种在乳腺中高表达的蛋白上调, 1 种下调。在妊娠期的母体中, 大量钙通过一些钙受体蛋白从骨骼向乳腺转运^[10]。通过这些结果我们推测, Δ FosB 在骨骼和乳腺的钙代谢中起重要作用, 它可能参与调节钙从骨向乳腺转运的信号通路。

本课题组采用 RT-PCR 方法从山羊的乳腺组织克隆得到了 *AfosB* 基因^[11], 证明了 Δ FosB 在乳腺中有表达。本实验进一步构建了山羊 *AfosB* 的原核表达载体, 并在大肠杆菌中表达纯化了 Δ FosB 蛋白, 制备了兔抗羊 Δ FosB 多克隆抗体, 为从蛋白质水平研究山羊 Δ FosB 的功能提供了特异性工具。

1 材料与方法

1.1 材料

携带 His 标签的 pET32a(+)载体、*E. coli* BL21 (DE3)菌株、pMD-*AfosB* 质粒、pAdTrack-CMV-*AfosB* 质粒、DH5 α 菌株、HEK-293 细胞由本实验室保存。琼脂糖购自 Biowest 公司。T4 DNA 连接酶、LA *Taq* DNA 聚合酶、pMD18-T Vector、限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sal* I 以及低蛋白质分子量标准为 TaKaRa 公司产品。IPTG 购自 Inalc 公司。DNA marker、预染蛋白质 marker III、琼脂糖凝胶 DNA 片段回收试剂盒及 Pro-light HRP 化学发光检测试剂购自天根生化科技 (北京) 有限公司。弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂购自 Sigma 公司。质粒回收试剂盒购自北京博大泰克/博大泰恒生物技术集团公司。辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG 以及 Anti- β -Actin 抗体均购自北京博奥森生物技术有限公司。PVDF 膜购自美国 Millipore 公司。引物合成及测序工作由上海生工生物工程有限公司完成。DMEM 高糖及胎牛血清购自美国 Hyclone 公司。Lipofectamine 2000 Reagent 购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 原核表达载体的构建及鉴定

根据山羊的 *AfosB* 基因 cDNA 序列 (GenBank Accession No. FJ455501), 设计 1 对特异性引物, 上游: 5'-GGAGGATCCATGTTTCAAGCTTCCCCGGAG-3' (下划线为 *Bam*H I 酶切位点); 下游: 5'-TCCGTCTCACTCCGCCAGCGGGCCCCG-3' (下划线为 *Sal* I 酶切位点)。以 pMD-*AfosB* 质粒为模板进行 PCR 反应, 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 62 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。将回收的 *AfosB* 基因克隆到 pMD18-T 载体得到 pMD-*AfosB*, 转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 挑取阳性克隆, 进行菌液 PCR 检测, 然后送上海生工生物工程有限公司测序。

将 pMD-*AfosB* 质粒和 pET32a 载体分别用 *Bam*H I 和 *Sal* I 进行双酶切, 琼脂糖凝胶电泳纯化回收 *AfosB* 片段及载体片段, 按照摩尔比为 8:1 的比例混合 *AfosB* 和 pET32a 载体, 用 T4 DNA 连接酶于 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 挑选阳性克隆进行菌液 PCR 鉴定, 鉴定后的阳性克隆再进行质粒双酶切鉴定。鉴定正确的质粒命名为 pET32a-*AfosB*, 并送上海生工生物工程有限公司测序。

1.2.2 pET32a-*AfosB* 的诱导表达及 SDS-PAGE 分析

将质粒 pET32a-*AfosB* 转化感受态大肠杆菌菌株 BL21(DE3), 挑取阳性单克隆接种到含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养, 摇菌至 $OD_{600} \approx 0.6$ 时, 加 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L, 37 $^{\circ}$ C 诱导表达 6 h, 同时用载有空质粒 pET32a 的大肠杆菌 BL21(DE3) 和未诱导的重组质粒 pET32a-*AfosB* 作为空白对照及阴性对照。

收集诱导后重组菌液 1 mL, 5 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 15 min 后 PBS 重悬, 冰上超声破碎, 4 $^{\circ}$ C、5 000 r/min 离心 10 min, 保存上清。包涵体沉淀用 PBS 洗 2 次, 重悬于 8 mol/L 尿素中, 4 $^{\circ}$ C 放置 2~3 h。4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 20 min, 收集上清。将获得的细胞质上清与包涵体上清与 1 \times SDS 上样缓冲液等体积混合, 100 $^{\circ}$ C 加热 10 min 后进行 12% SDS-PAGE 电泳。

1.2.3 融合蛋白的纯化

裂解后的包涵体进行 SDS-PAGE 电泳, 随后使用 0.25 mol/L KCl 染色 10 min。切下目的条带, 放入预冷研钵中, 加入液氮研磨至粉末状, 加入 PBS 4℃过夜。10 000 r/min、4℃离心 5 min, 收集上清后, 与 1× SDS 上样缓冲液混合, 100℃加热 5 min 后, 取 10 μL 样品进行 12% SDS-PAGE 检测。

1.2.4 多克隆抗体的制备

将 1 mL 纯化后的重组蛋白 ΔFosB (约 0.6 mg/mL) 与弗氏完全佐剂等量混合超声乳化, 皮下多点注射分别免疫 2 只大耳白兔, 免疫前取血作为阴性血清对照。以后每隔 7 天使用重组蛋白与弗氏不完全佐剂混合的乳化液再次进行增强免疫, 28 d 后心脏采血, 37℃静置 12 h 分离血清, 2 000 r/min 离心 10 min 去除血细胞, 收集血清。

1.2.5 多克隆抗体效价检测及特异性分析

用间接酶联免疫吸附法 (Indirect enzyme-linked immunosorbent assay, iELISA) 测定抗体效价。将融合蛋白用包被缓冲液稀释, 取 100 μL 加入酶标板中 4℃包被过夜; PBST 洗涤 3 次, 使用 PBST 配制的 5% 脱脂奶粉 37℃封闭 1 h; PBST 洗涤 3 次, 加入梯度稀释的血清在 37℃孵育 1 h; PBST 洗涤 3 次后, 使用 HRP 标记的羊抗兔 IgG, 37℃孵育 1 h; PBST 洗涤 3 次, 晾干后加入 TMB 显色液显色, 最后用 2 mol/L 硫酸终止反应, 酶标仪测定抗体效价。

采用 Western blotting 检测抗体特异性: 融合蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳后, 60 V 转印约 2 h, 将蛋白电转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭过夜, TBST 洗涤 3 次; 使用血清为一抗 (分别按 1:200, 1:500, 1:1 000 稀释), 37℃孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次; HRP 标记的羊抗兔 IgG 作为二抗 (1:5 000 稀释), 37℃孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次; ECL 显影分析结果。

1.2.6 用自制抗体检测 HEK-293 细胞内外源 ΔFosB 的表达

HEK-293 细胞采用 DMEM 高糖培养基, 37℃、5% CO₂ 的条件进行常规培养, 转染前夜将细胞均匀接种于六孔培养皿中, 次日待细胞融合度达 90% 时, 将已构建好的 pAdTrack-CMV-ΔfosB 超表达载体

转染 HEK-293 细胞, 转染过程按照 Lipofectamine 2000 Reagent 说明书进行。转染试验设立了 pAdTrack-CMV-ΔfosB 转染组以及未转染的空白对照组。

转染 36 h 后, 弃细胞上清液, 胰酶消化后离心收集细胞。PBS 漂洗 2 遍, 加入 100 μL 预冷的 RIPA 裂解液, 冰上放置 30 min, 期间进行振荡使细胞充分裂解。4℃、12 000 r/min 离心 30 min, 收集上清。将上清进行 SDS-PAGE 电泳, 60 V 转膜 2 h, 5% 的脱脂奶粉封闭过夜。用自制的 ΔFosB 多克隆抗体为一抗, 37℃孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次; HRP 标记的羊抗兔 IgG 作为二抗, 37℃孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次; ECL 显影分析结果。

1.2.7 山羊 ΔFosB 组织差异表达分析

采集关中山羊的乳腺、骨髓、脑髓、垂体、肌肉、心脏、肺、胃和肾组织样, 各剪取约 0.1 g, 液氮中研碎, 加入 500 μL RIPA 裂解液 (50 mmol/L Tris, 0.5% 脱氧胆酸钠, 0.1% SDS, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 1% Triton X-100。使用前加 0.5 mmol/L PMSF), 4℃裂解过夜, 4℃、10 000 r/min 离心 20 min, 收集上清。将上清进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 60 V 转膜 2 h, 5% 脱脂奶粉封闭过夜; 分别用自制的 anti-ΔFosB 多克隆抗体和 anti-β-actin 抗体 (1:500 稀释) 作为一抗, 37℃孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次; HRP 标记的羊抗兔 IgG 作为二抗 (1:5 000 稀释), 37℃孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次; ECL 显影分析结果。

2 结果

2.1 原核表达载体的构建及鉴定

构建的 pET32a-ΔfosB 原核表达载体酶切后可见 pET32a 载体条带和所插入的 ΔfosB 条带 (图 1)。测序结果显示, 山羊 ΔfosB 基因成功插入 pET32a 载体, 原核表达载体 pET-ΔfosB 构建成功。

2.2 重组蛋白 ΔFosB 的表达

pET32a-ΔfosB 经诱导表达后, 收集菌体进行 SDS-PAGE 分析, 发现诱导后的蛋白在 55 kDa 处出现一条带, 其大小与所推测的融合蛋白相对分子量一致 (35 kDa 的 ΔFosB 和 20 kDa 的标签蛋白)。根据 SDS-PAGE 分析, IPTG 的最佳诱导浓度为 0.5 mmol/L,

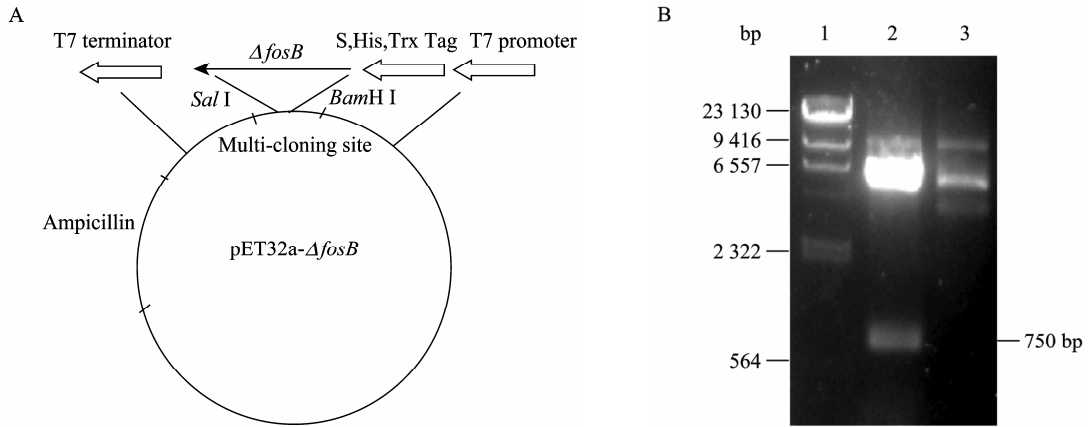


图 1 原核表达载体 pET32a-*AfosB* 的构建及鉴定

Fig. 1 Construction and identification of prokaryotic expression vector pET32a-*AfosB*. (A) Construction of prokaryotic expression vector pET32a-*AfosB*. (B) Agarose gel analysis for restriction enzyme treatment of pET32a-*AfosB* vector. 1: λ DNA/*Hind* III marker; 2: pET32a-*AfosB* digested with *Bam*H I and *Sal* I produced the long fragment of pET32a vector and 750 bp *AfosB* gene; 3: pET32a-*AfosB* plasmid.

最佳诱导时间为 6 h，再增加 IPTG 浓度和诱导时间并不能提高表达量。超声破碎细菌，分别取上清液和沉淀悬浮液进行 SDS-PAGE 分析，结果表明：重组蛋白 Δ FosB 的表达产物主要以包涵体形式存在，上清液中融合蛋白的表达量极其微小（图 2）。

2.3 重组蛋白的纯化

诱导表达产物经 SDS-PAGE 分析后，使用 0.25 mol/L KCl 染色，切胶纯化，SDS-PAGE 检测纯化结果。结果在 55 kDa 处显示一条带（图 3），与预期目的蛋白大小一致，所获得的融合蛋白纯度较高，可用于抗体制备。

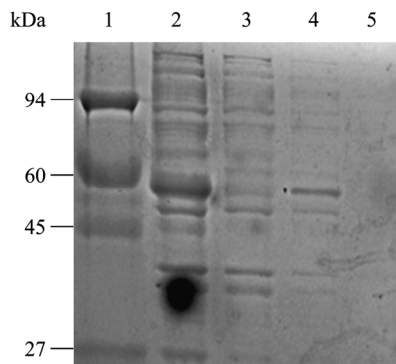


图 2 SDS-PAGE 检测重组蛋白 Δ FosB 的表达

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expression of recombinant protein Δ FosB. 1: pre-stained protein marker III; 2: precipitate of induced pET32a-*AfosB*/BL21 after sonication; 3: supernatant of induced pET32a-*AfosB*/BL21 after sonication; 4: precipitate of uninduced pET32a-*AfosB*/BL21 after sonication; 5: supernatant of uninduced pET32a-*AfosB*/BL21 after sonication.

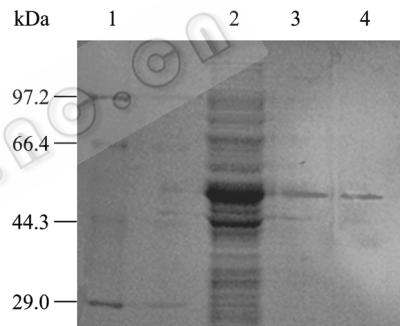


图 3 重组蛋白 Δ FosB 的纯化

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purification of recombinant protein Δ FosB. 1: low molecular weight protein marker; 2: pET32a-*AfosB*/BL21, induced; 3,4: purified recombinant Δ FosB.

2.4 多克隆抗体效价检测和特异性分析

iELISA 技术测定制备的多克隆抗血清效价达到 1 : 51 200 以上（图 4）。Western blotting 印迹结果显示，1 : 1 000 稀释的自制兔抗羊 Δ FosB 血清，能够检测到分子量约 55 kDa 的融合蛋白（图 5），说明所制备的兔抗羊 Δ FosB 抗体对原核表达的 Δ FosB 蛋白具有较好的特异性。

2.5 用自制抗体检测 HEK-293 细胞内外源 Δ FosB 的表达

用 pAdTrack-CMV-*AfosB* 转染 HEK-293 细胞，未转染的细胞作为空白对照，用自制的兔抗羊 Δ FosB 抗体进行 Western blotting 检测。结果如图 6 所示，过表达 Δ FosB 的细胞有条带，而空白对照无阳性反应，说明制备的抗体对细胞内表达的 Δ FosB 有特异性。

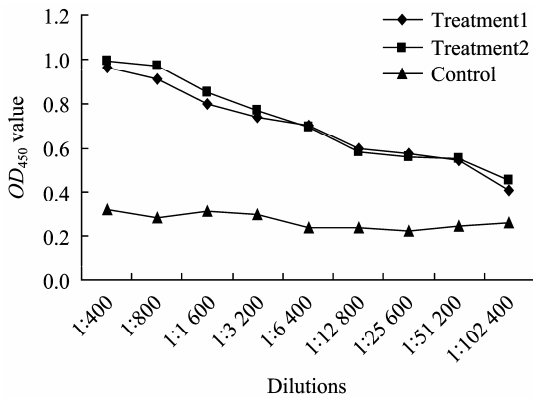


图 4 多克隆抗体效价的测定

Fig. 4 iELISA analysis of anti-ΔFosB antibody with recombinant ΔFosB. ELISA plates were coated with recombinant ΔFosB, anti-ΔFosB antibodies were serially diluted and dispensed, pipetted into the wells. HRP-labeled goat anti-rabbit IgG antibody was used as second antibody.

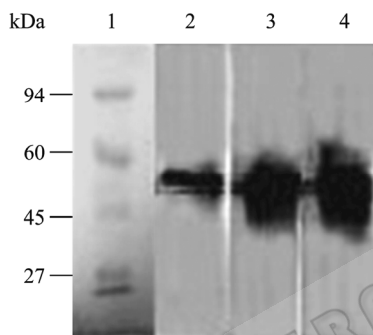


图 5 Western blotting 检测多克隆抗体的特异性

Fig. 5 Identification of the specificity of ΔFosB polyclonal antibody by Western blotting. 1: pre-stained protein marker; 2: 1:1 000 diluted polyclonal antibodies; 3: 1:500 diluted polyclonal antibody; 4: 1:200 diluted polyclonal antibody.

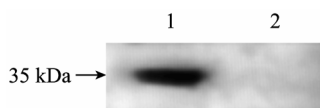


图 6 用自制抗体检测 ΔFosB 在 HEK-293 细胞内的表达

Fig. 6 Expression of ΔFosB in HEK-293 examined by homemade antibody. 1: HEK-293 cell transfected by pAdTrack-CMV-ΔfosB; 2: blank control.

2.6 山羊 ΔFosB 组织差异表达检测

Western blotting 结果显示 ΔFosB 在山羊的乳腺、骨髓、脑髓、肌肉、心脏、肝和肺组织中均有表达,而在垂体、脾脏中没有表达(图 7)。

3 讨论

Fos 家族是一种典型的早期“即刻基因”,能被

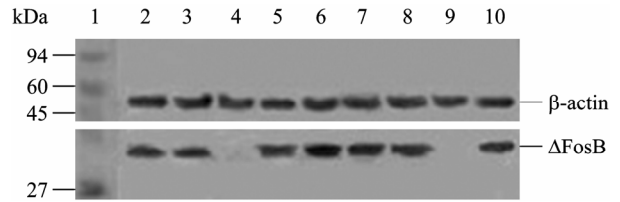


图 7 山羊 ΔFosB 组织差异表达检测

Fig. 7 Tissue distribution of dairy goat ΔFosB. 1: pre-stained protein marker; 2: breast; 3: brain; 4: hypophysis; 5: marrow; 6: muscle; 7: heart; 8: liver; 9: spleen; 10: lung.

多种刺激因子诱导快速瞬时表达,该家族基因编码的亮氨酸拉链蛋白能与 Jun 家族蛋白形成二聚体,参与调控细胞增殖、分化及转化。ΔFosB 作为其稳定存在的成员已备受关注,在小鼠中的研究表明 ΔFosB 参与药物成瘾过程、控制大脑补偿机制^[12-15]以及调控骨形成和脂肪形成。我们采用 RT-PCR 的方法已经从山羊的乳腺组织克隆出了 *AfosB* 基因,证明了 ΔFosB 在乳腺中的表达,为进一步研究 ΔFosB 在乳腺钙代谢中的作用奠定了基础。

本研究将克隆得到的山羊 *AfosB* 基因 CDS 区(Coding sequences)亚克隆到 pET32a 载体上,优化了载体的表达条件,分别在 25℃、30℃和 37℃条件下加入 0.1 mmol/L、0.5 mmol/L、1 mmol/L 和 1.5 mmol/L IPTG 诱导其在大肠杆菌中表达 2 h、4 h、6 h 和 8 h,得到了最佳的表达条件:37℃,0.5 mmol/L 诱导表达 6 h。在优化的条件下,重组蛋白在大肠杆菌中高效表达,由于难以正确折叠而导致蛋白质聚集从而形成包涵体^[16],用 8 mol/L 的尿素裂解包涵体获得重组蛋白,将其与弗氏佐剂混合给兔子皮下多点注射,免疫 5 次后得到效价高达 1:51 200 的兔抗羊 ΔFosB 多克隆抗血清。Western blotting 检测显示所制备的抗体对于原核表达的 ΔFosB 融合蛋白以及 HEK-293 细胞中超表达的 ΔFosB 蛋白具有特异性反应。进一步将制备的抗体用于组织差异表达检测,用来检测体内 ΔFosB 的表达情况,结果表明 ΔFosB 在山羊乳腺、骨髓、脑髓、肌肉、心脏、肝和肺多种组织中有表达,在垂体、脾脏中没有表达。

ΔFosB 蛋白比 FosB 蛋白少了 C 末端转活区(C-terminal transactivation domain 和 TATA-结合蛋白结合区(TATA-binding protein-binding domain),相比 Δ2ΔFosB 多了 N 末端 Fos 同源区(N-terminal

Fos homology domain, FH), 但是它们都具有亮氨酸拉链这个关键功能区^[9]。本研究是以 *AfosB* 基因 CDS 区全序列表达产物作为抗原制备的抗体, 所以理论上也可以和 FosB 以及 $\Delta 2\Delta$ FosB 产生免疫反应。但是在最后的组织差异表达检测中只杂交出了与 Δ FosB 大小一致的一条带, 这很可能是因为 FosB 和 $\Delta 2\Delta$ FosB 不稳定, 在组织中已经降解, 或者因为在这些组织中的表达量过低, Western blotting 检测不到。

综上所述, 本研究成功制备了兔抗羊 Δ FosB 多克隆抗体, 可用于 Δ FosB 蛋白的表达水平检测及功能研究。

REFERENCES

- [1] Dobrzanski P, Noguchi T, Kovary K, *et al.* Both products of the fosB gene, FosB and its short form, FosB/SF, are transcriptional activators in fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 1991, **11**(11): 5470–5478.
- [2] Inoue D, Kido S, Matsumoto T. Transcriptional induction of *FosB*/ Δ *FosB* gene by mechanical stress in osteoblasts. *J Biol Chem*, 2004, **279**(48): 49795–49803.
- [3] Nestler EJ, Barrot M, Self DW. Δ FosB: A sustained molecular switch for addiction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(20): 11042–11046.
- [4] Ulery-Reynolds PG, Castillo MA, Vialou V, *et al.* Phosphorylation of Δ FosB mediates its stability *in vivo*. *Neuroscience*, 2009, **158**(2): 369–372.
- [5] Kveiborg M, Chiusaroli R, Sims NA, *et al.* The increased bone mass in deltaFosb transgenic mice is independent of circulating leptin levels. *Endocrinology*, 2002, **143**(11): 4304–4309.
- [6] Kveiborg M, Sabatakos G, Chiusaroli R, *et al.* Δ FosB induces osteosclerosis and decreases adipogenesis by two independent cell-autonomous mechanisms. *Mol Cell Biol*, 2004, **24**(7): 2820–2830.
- [7] Sims NA, Sabatakos G, Chen JS, *et al.* Regulating Δ FosB expression in adult tet-off- Δ FosB transgenic mice alters bone formation and bone mass. *Bone*, 2002, **30**: 32–39.
- [8] Sabatakos G, Sims NA, Chen J, *et al.* Overexpression of Δ FosB transcription factor(s) increases bone formation and inhibits adipogenesis. *Nat Med*, 2000, **6**(9): 985–990.
- [9] Ohnishi YN, Sakumi K, Yamazaki K, *et al.* Antagonistic regulation of Cell-Matrix adhesion by FosB and Δ FosB/ $\Delta 2\Delta$ FosB encoded by alternatively spliced forms of *fosB* transcripts. *Mol Biol Cell*, 2008, **19**(11): 4717–4729.
- [10] VanHouten JN. Calcium sensing by the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neopla*, 2005, **10**(2): 129–139.
- [11] Zheng HL, Yuan C, Bao LJ. Cloning and bioinformatics analysis of dairy goat Δ fosb cDNA. *Acta Agric Boreali-Occidentalis Sin*, 2009, **18**(5): 12–16.
郑惠玲, 袁超, 包黎娟. 山羊 Δ fosb 基因 cDNA 的克隆及生物信息学分析. 西北农业学报, 2009, **18**(5): 12–16.
- [12] Werme M, Messer C, Olson L, *et al.* Δ FosB regulates wheel running. *J Neurosci*, 2002, **22**(18): 8133–8138.
- [13] McClung CA, Nestler EJ. Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and Δ FosB. *Nat Neurosci*, 2003, **6**(11): 1208–1215.
- [14] Renthall W, Carle TL, Maze I, *et al.* Δ FosB mediates epigenetic desensitization of the *c-fos* gene after chronic amphetamine exposure. *J Neurosci*, 2008, **28**(29): 7344–7349.
- [15] Renthall W, Nestler EJ. Epigenetic mechanisms in drug addiction. *Trends Mol Med*, 2008, **14**(8): 341–350.
- [16] Wang Z, Ma HQ, Zhang W, *et al.* The progress of inclusion body isolation and chromatographic refolding, purification methods. *China Biotechnol*, 2009, **29**(7): 102–107.
王增, 马会勤, 张文, 等. 包涵体蛋白的分离和色谱法体外复性纯化研究进展. 中国生物工程杂志, 2009, **29**(7): 102–107.