

大熊猫酸性核糖体磷酸蛋白 P1 基因 cDNA 克隆及序列分析

杜玉杰 侯万儒* 彭正松 周材权

(西华师范大学生命科学学院, 南充 637002)

摘要: 运用 RT-PCR 技术, 从大熊猫的肌肉组织总 RNA 中成功克隆了酸性核糖体磷酸蛋白 P1 (RPLP1) 基因的表达序列, 并对其进行了测序及初步分析。结果表明: 大熊猫 RPLP1 基因的表达序列全长为 448 bp, 开放阅读框 (ORF) 为 344 bp, 编码 114 个氨基酸的蛋白质, 该蛋白的分子量为 11.566 kDa, pI 为 4.4, 含有 3 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点和 2 个 N-酰基化位点。进一步分析发现, 大熊猫 RPLP1 基因的表达序列及其编码的氨基酸序列与已报道的部分哺乳动物具有很高的相似性。

关键词: 大熊猫; RT-PCR; RPLP1; 克隆; 序列分析

中图分类号: Q785

文献标识码: A

文章编号: 1000-1050 (2008) 01-0075-06

cDNA cloning and sequences analysis of acidic ribosomal phosphoprotein P1 (RPLP1) from giant panda

DU Yujie, HOU Wanru*, PENG Zhengsong, ZHOU Caiquan

(College of Life Science, China West Normal University, Nanchong 637002, China)

Abstract: The cDNA of acidic ribosomal phosphoprotein P1 (RPLP1) was cloned successfully from the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) using RT-PCR technology, which was also sequenced, analyzed preliminarily. The result shows that the cDNA fragment cloned is 449 bp in size, and it contains an open reading frame of 344 bp encoding 114 amino acids. The deduced protein sequence shows that the protein is composed of 114 amino acids and its estimated molecular weight is 11.566 kDa with a pI of 4.4. Alignment analysis indicated that the nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence are highly conserved to other five species studied, including *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Bos Taurus* and *Sus scrofa*. The homologies for nucleotide sequences of giant panda PPLP1 to that of these species are 92.4%, 89.8%, 89.0%, 91.3% and 87.5%, while the homologies for amino acid sequences are 96.5%, 94.7%, 95.6%, 96.5% and 88.6%. Topology prediction showed there are three Casein kinase II phosphorylation sites and two N-myristoylation sites in the RPLP1 protein of the giant panda.

Key words: Cloning; Giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*); RT-PCR; RPLP1; Sequences analysis

大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*) 是我国特有的珍稀大型野生动物, 属国家一级濒危保护动物, 主要分布于四川西部和北部、甘肃南部、西藏东部及陕西西南部, 主要取食箭竹类植物, 具有特殊的科学研究价值和观赏价值。多年来, 大熊猫的相关研究主要集中于饲养繁殖、生态、形态、分类、疾病及生理生化等领域 (王平等, 1980; 仇秉兴, 1984; 胡锦涛, 1988; 侯万儒, 2000; 冯文和和李光汉, 2000); 近年, 已开展了部分分子生物学及

遗传学等方面的研究 (张亚平等, 1995; 林峰等, 1997; 周荣家等, 1998; 张安居和张志和, 1998; 汪晓晶等, 2001, 2002); 目前, 大熊猫的遗传学研究正由细胞水平 (主要是染色体水平) 向分子生物学水平发展, 但其分子生物学研究多集中在遗传多样性、亲子关系鉴定以及系统发育等方面, 对于大熊猫基因功能的研究在国内外仅有少数相关报道 (Wu Z A, 1990; Mather *et al.*, 1997; Rao G, 2004; Wan-ru Hou *et al.*, 2007; 王亚军等, 1998;

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30570275); 四川省应用技术项目 (2006J13-057); 四川省教育厅重点科研项目 (2004A101); 四川省重点学科建设项目 (SZD0420); 四川省教育厅重点项目 (07ZA120)

作者简介: 杜玉杰 (1982-), 女, 硕士研究生, 主要从事生物化学和分子生物学研究。

收稿日期: 2007-05-06; **修回日期:** 2007-11-24

* 通讯作者, correspondence author, E-mail: hwr168@yahoo.com.cn.

林峰等, 1998; 郑旭等, 2004; 廖鸣娟等, 2005; 侯万儒等, 2007)。

核糖体是一个致密的核糖核蛋白颗粒, 可离解为两个亚基, 两亚基的形态结构具有不规则性和不对称性 (朱玉贤和李毅, 2002)。大亚基有一个称为“柄”的长形的突起结构, 这是真核和原核细胞中大亚基直接作用于延长因子、参与蛋白质合成过程所必需的一个重要结构 (Rodriguez-Gbriel *et al.*, 1999), 它是由一组酸性蛋白结合到 rRNA 上组成的五聚体复合物, 称为酸性核糖体磷酸蛋白 P1 (Acidic Ribosomal Phosphoprotein P1, RPLP1), 是组成核糖体大亚基的蛋白成分之一。研究表明, 在原核生物中只有一种酸性蛋白, 在真核生物中存在 P1、P2 两种可能具有不同功能的酸性蛋白 (即 RPLP1 和 RPLP2)。研究表明, RPLP1 蛋白位于“柄”结构的内部, RPLP2 位于“柄”结构的外部, 二者相互作用是形成“柄”结构的必要条件 (Rodriguez-Gbriel *et al.*, 2000; Zurdo *et al.*, 2000; Guarinos *et al.*, 2001; Tchorzewski *et al.*, 2003; Perez-Fernandez *et al.*, 2005; Ayub *et al.*, 2005; Dawid Krokowski *et al.*, 2006; Qiu *et al.*, 2006)。此外, 该蛋白与 RPLP0、RPLP2 及 28S rRNA 保守区相互作用, 组成了核糖体 GTP 酶活性中心的主要部分 (Shimizu *et al.*, 2000; Hagiya *et al.*, 2000); RPLP1 蛋白还可与泛素共价结合成融合蛋白, 参与调节细胞凋亡及转录等重要活动 (John *et al.*, 2003)。

本研究以大熊猫骨骼肌为材料, 运用 RT-PCR 技术从大熊猫骨骼肌组织的总 RNA 中扩增出了 RPLP1 基因表达序列 cDNA, 分析了该表达序列所编码蛋白的序列特征, 并与部分哺乳动物物种进行了相似性比较。为更有效地深入开展大熊猫保护活动、制定基因保护对策提供了科学依据, 并为进一步探讨大熊猫基因遗传特点及进行大熊猫分子生物学研究积累了基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料及试剂

大熊猫骨骼肌组织取自四川卧龙中国保护大熊猫中心死亡的大熊猫, 所取组织立即冻存于液氮中, 以防 RNA 降解。

T 载体试剂盒 (PUC18 Vector Systems)、限制性内切酶 *Pst* I、*Sca* II 均购于宝生物 (大连) 有限公司; PCR 引物由上海生工生物工程技术服务有

限公司合成; 总 RNA 抽提试剂盒 Total Tissue/cell RNA Extractiob Kits 购于 Waton 公司; 逆转录试剂盒 Reverse Transcription System 购自 Promega 公司; 胶回收试剂盒购于 OMEGA 公司; Taq plus 聚合酶购自上海生物工程公司。其它试剂均为国产分析纯。宿主菌 *E. coli* JM109 由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取

取 400 mg 左右的肌肉组织, 于液氮中充分研磨, 按 Total Tissue/cell RNA Extractiob Kits 说明书的推荐方法提取总 RNA, 所提经琼脂糖凝胶电泳显示有 18S RNA 和 28S RNA 两条清晰明亮的条带, 表明所提 RNA 质量良好, 可用于反转录。将所得总 RNA 溶解于经 DEPC 处理过的水中, -70°C 保存备用。

1.2.2 引物设计及 RT-PCR

从 Genbank 数据库中检索到人 (*Homo sapiens*) (BC003369)、原牛 (*Bos taurus*) (BC102695)、猪 (*Sus scrofa*) (DQ629169)、褐家鼠 (*Rattus norvegicus*) (BC058151) 及小家鼠 (*Mus musculus*) (BC058685) 5 个哺乳动物物种 RPLP1 的编码区全序列, 根据其同源性, 利用 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计, 引物编号及序列如下:

上游引物 RPLP1 - F: 5' - CTTCCGAG-GAAGCTAAGGCCGCGTT - 3';

下游引物 RPLP1 - R: 5' - AGAGGTTTAGT-CAAAAAGACCAAAG - 3'

以肌肉总 RNA 为模板, Oligo dT 为反转录引物, 按照 Promega 公司逆转录试剂盒操作手册进行 cDNA 第一链的合成: 反应体积为 20 μl , 其中含 1 μg 左右的总 RNA, 5mM MgCl_2 , 1mM dNTPs, 0.5 μg Oiligo (dT)₁₅, 10 U/ μl RNA 酶抑制剂, 15 U AMV 反转录酶; 反转录条件为 42°C 60 min。再取适量第一链产物为模板, 分别以 RPLP1-F 和 RPLP1-R 为引物进行 PCR 扩增: PCR 反应体积为 25 μl , 含 1.5 mM MgCl_2 , 200 μM dNTP, 上下游引物各 0.3 μM , 5U Taq plus 聚合酶; 反应条件: 94°C , 4 min; 94°C , 1 min; 50°C , 30 s; 72°C , 1.5 min, 30 个循环, 72°C , 10 min。1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RT-PCR 反应产物, 并用 GEL Doc™ EQ 全自动凝胶成像分析系统记录结果。

1.2.3 cDNA 的克隆及鉴定

按照 E. Z. N. A^R Gel Extraction Kit 说明书, 对 PCR 产物进行回收纯化, 将回收产物与经 *Sma* I 限

制性内切酶酶切并平端化的质粒 pUC18 片段连接, 22℃ 12 h 连接。常规方法转化 *E. coli* JM109 感受态细胞, 再于含 50 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素, 200 mg/ml IPTG 及 20 mg/ml X-gal 的 LB 平板上培养过夜, 挑取数个白色菌落, 煮沸法提取质粒, 双酶切 (*Pst* I 和 *Sca* II) 和 PCR 鉴定获得具有大小相符的插入片段的重组子。选取 3 个经鉴定的阳性重组质粒送北京华大生科技发展有限公司进行测序。

1.2.4 数据处理

利用 Dnastar 软件, 按脊椎动物基因组遗传密码, 对所克隆的基因序列进行氨基酸序列推定; 采用 ORF finder 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/html>) 进行 DNA 序列的 ORF 查找; 利用 DNA-MAN Version 6 进行基因序列和氨基酸序列同源性比较; 利用 ExPASy Proteomics Server 软件 (<http://au.expasy.org>) 进行蛋白质功能位点和生化特性预测分析。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 产物

RT-PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳显示有一条 450 bp 左右的清晰明亮的区带 (图 1), 对重组质粒进行测序, 结果显示该克隆片段全长为 448 bp, 与预期长度一致, 将该序列登录于 GenBank, 得到登录号为 EF631972。

2.2 序列分析

在 NCBI 数据库中利用 Blast 进行基因同源性检索, 结果发现该序列与其他动物 RPLP1 的 cDNA 序列具有很高的同源性, 证明所克隆的序列为大熊猫 RPLP1 的 cDNA 序列, ORF 为 344 bp, 编码 114

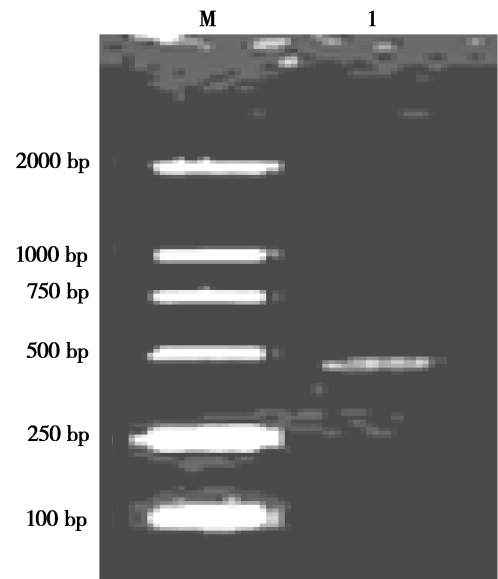


图 1 大熊猫 RPLP1 基因表达序列 RT-PCR 结果 (M: Marker 2000; 1: RPLP1 扩增结果)

Fig. 1 RT-PCR amplification result of RPLP1 of *Ailuropoda melanoleuca* (M: Molecular ladder DL2000; 1: The amplified RPLP1)

个氨基酸残基, 起始密码子为 ATG, 终止密码子为不完全终止密码子 TA (图 2)。该序列碱基的平均含量分别为: A, 20.5%; C, 30.7%; G, 28.1%; T, 20.7%。利用 Proteomics Server 软件对大熊猫 RPLP1 蛋白预测分析发现: 大熊猫 RPLP1 蛋白的分子量为 11 566.0 kDa, pI 为 4.4, 含 7 个带正电荷的氨基酸残基 (Arg 精氨酸和 Lys 赖氨酸), 17 个带负电荷的氨基酸残基 (Asp 天冬氨酸和 Glu 谷氨酸), 其余氨基酸均为中性; 该蛋白含有 3 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点及 2 个 N-酰基化位点。

1	CTTCCGAGGAAGCTAAGGCCGCGTTGGGGTGAGGCCCTCACTTCATCCGCGGACTAGCACCGCGCCCGGCAGCGTCCGCT
81	CAGCTCTCGCCCGCACCATG GCC TCC GTC TCG GAG CTC GCT TGC ATC TAC TCG GCC CTC ATC CTG
1	M A S V S E L A C I Y S A L I L
146	CAC GAC GAT GAG GTG ACG GTC ACC GAG GAT AAG ATC AAT GCC CTC ATT AAA GCA GCG GGT
17	H D D E V T V T E D K I N A L I K A A G
206	GTG AAT GTT GAA CCT TTC TGG CCT GGC TTG TTT GCA AAG GCC CTG GCC AAC ATC AAC ATT
37	V N V E P F W P G L F A K A L A N I N I
266	GGG AGC CTC ATC TGC AAT GTA GGA GCT GGT GGA CCC GCC CCA GCA GCT GGC GCT GCG CCA
57	G S L I C N V G A G G P A P A A G A A P
326	GCA GGA GGT CCT GCT CCT TCC ACC ACT GCT GCC CCA GCT GAG GAG AAG AAA GTG GAA GCC
77	A G G P A P S T T A A P A E E K K V E A
386	AAG AAA GAA GAC TCT GAG GAG TCT CAT GAT GAC ATG GGC TTT GGT CTT TTT GAC TA AACC
97	K K E D S E E S H D D M G F G L F D *
446	TCT

图 2 大熊猫 RPLP1 基因 cDNA 序列及其预测氨基酸序列 (*: 终止密码子)

Fig. 2 Nucleotide sequence and putative amino acid sequence of RPLP1 cDNA from *Ailuropoda melanoleuca* (*: termination codon)

3 讨论

利用 DNAMAN Version 6, 将大熊猫分别与人、原牛、褐家鼠和小家鼠等 4 个哺乳动物物种的 RPLP1 基因的编码序列及其所编码的氨基酸序列进行同源性比较, 结果显示具有较高的同源性, 编码序列同源性分别为 92.17%、91.01%、88.70% 和 89.57%; 氨基酸序列同源性分别为 96.49%、96.49%、95.61% 和 94.74%。在所比对的哺乳动物物种中, 与大熊猫的编码序列及氨基酸序列同源性最高的哺乳动物分别为 92.17% (人) 和 96.49% (人和原牛)。进一步对所编码的蛋白分子量及等电点进行预测分析比较发现各分子量和等电点的差异都不大 (表 1)。

用 PredictProtein 软件对这 5 个哺乳动物物种的 RPLP1 基因所编码蛋白的功能位点进行预测并分析 (图 3), 结果发现大熊猫与人、原牛和褐家鼠具有相同位置、相同种类和相同数量的功能位点, 即均含有 3 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点及 2 个 N-酰基化位点; 但以上 4 个哺乳动物物种在 79~84 位氨基酸残基上都比小家鼠少了一个 N-酰基化位点, 而在 57~62 位氨基酸残基上都比猪多了一个 N-

酰基化位点。

进一步分析发现, 与检索到的 5 个哺乳动物物种相比, 大熊猫 RPLP1 蛋白的氨基酸序列中共有 4 个变异位点。各变异位点如下: 在第 54 位氨基酸残基上, 人、原牛、猪、小家鼠和褐家鼠都为脯氨酸 (Pro), 而大熊猫的氨基酸残基为异亮氨酸 (Ile); 在第 85 位氨基酸残基上, 人、原牛、小家鼠和褐家鼠都为丙氨酸 (Ala), 而大熊猫的氨基酸残基为苏氨酸 (Thr); 在第 100 位氨基酸残基上, 人、原牛、猪、小家鼠和褐家鼠都为谷氨酸 (Glu), 而大熊猫的氨基酸残基为天冬氨酸 (Asp); 在第 105 位氨基酸残基上, 人、猪、和原牛为天冬氨酸 (Asp), 小家鼠和褐家鼠为谷氨酸 (Glu), 大熊猫的氨基酸残基为组氨酸 (His)。这 4 个位点的变异都是由密码子碱基的转换或颠换造成的, 但没有任何碱基缺失和增加事件的发生。其中, 第 105 位变异位于酪蛋白激酶 II 磷酸化位点内, 该变异没有引起蛋白功能位点的差别, 这说明该位点虽然存在变异, 但并不影响 RPLP1 蛋白的结构和功能; 而其他位点的变异会导致其结构和功能上有何变化尚需进一步研究。

表 1 大熊猫与另外 5 个哺乳动物物种的 RPLP1 蛋白分子量及等电点

Table 1 Molecular weight (MW) and isoelectric point (pI) of RPLP1 protein of panda and other 5 mammals

	大熊猫 <i>Ailuropoda melanoleuca</i>	牛 <i>Bos taurus</i>	人 <i>Homo sapiens</i>	褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	小家鼠 <i>Mus musculus</i>	猪 <i>Sus scrofa</i>
分子量 (MW)	11566.0	11513.9	11513.9	11497.9	11474.9	11748.2
等电点 (pI)	4.40	4.26	4.26	4.28	4.28	4.26

sus	MASVSELACI	YSALILHDDE	VTVPEDKINA	LIKAAGVNVE	PFWPGFFAKA	LANVNIGSLI
bos	MASVSELACI	YSALILHDDE	VTVTEDKINA	LIKAAGVNVE	PFWPGLFAKA	LANVNIGSLI
homo	MASVSELACI	YSALILHDDE	VTVTEDKINA	LIKAAGVNVE	PFWPGLFAKA	LANVNIGSLI
mus	MASVSELACI	YSALILHDDE	VTVTEDKINA	LIKAAGVSVE	PFWPGLFAKA	LANVNIGSLI
panda	MASVSELACI	YSALILHDDE	VTVTEDKINA	LIKAAGVNVE	PFWPGLFAKA	LANINIGSLI
rat	MASVSELACI	YSALILHDDE	VTVTEDKINA	LIKAAGVNVE	PFWPGLFAKA	LANVNIGSLI
sus	CNVGAGGPPP	PAGAAPPGGP	APPPAAPAE	EKKVEAKKEE	FEESDDDMGF	GFFD
bos	CNVGAGGPAP	AAGAAPAGGP	APSTAAAPAE	EKKVEAKKEE	SEESDDDMGF	GLFD
homo	CNVGAGGPAP	AAGAAPAGGP	APSTAAAPAE	EKKVEAKKEE	SEESDDDMGF	GLFD
mus	CNVGAGGPAP	AAGAAPAGGA	APSTAAAPAE	EKKVEAKKEE	SESEDDMGF	GLFD
panda	CNVGAGGPAP	AAGAAPAGGP	APSTTAAPAE	EKKVEAKKED	SEESHDDMGF	GLFD
rat	CNVGAGGPAP	AAGAAPAGGP	APSAAAAAPAE	EKKVEAKKEE	SESEDDMGF	GLFD

图 3 大熊猫与 5 个哺乳动物物种 RPLP1 蛋白的氨基酸序列。Sus: 野猪; rat: 褐家鼠; bos: 原牛; homo: 人; mus: 小家鼠; panda: 大熊猫; —, 酪蛋白激酶 II 磷酸化位点; —, N-酰基化位点

Fig. 3 Comparison of the RPLP1 amino acid sequences among the five kinds of mammals. sus: *Sus scrofa*; rat: *Rattus norvegicus*; bos: *Bos taurus*; homo: *Homo sapiens*; mus: *Mus musculus*; panda: the Giant panda; —: casein kinase II phosphorylation site; —: N-myristoylation site

迄今为止, 已报道的哺乳动物 RPLP1 基因的全编码序列仅见于人、原牛、猪、褐家鼠和小家鼠, 本实验运用分子生物学原理与相应的技术手段, 首次成功地扩增出大熊猫 RPLP1 基因的表达序列并对其编码蛋白进行了初步分析, 丰富和完善了哺乳动物 RPLP1 基因资料库, 并为进一步运用分子生物学原理及技术研究大熊猫提供了相关的基础资料。

参考文献:

- Ayub M J, Barroso J A, Levin M J, Aguilar C F. 2005. Preliminary structure studies of the hydrophobic ribosomal P0 protein from *Trypanosoma cruzi*, a part of the P0/P1/P2 complex. *Protein Pept Lett*, **12** (6): 521 - 525.
- Dawid Krokowski, Aleksandra Bogueszewska, Dariusz Abramczyk, Marek Tchorzewski, Nikodem Grangowski. 2006. Yeast ribosomal P0 protein has two separate binding site for P1/P2 proteins. *Mol microbiol*, **60** (2): 386.
- Guarinos E, Remacha M, Ballesta J P. 2001. Asymmetric interactions between the acidic P1 and P2 proteins in the *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk. *J Biol Chem*, **276** (35): 32474 - 32479.
- Hagiya A, Naganuma T, Maki Y, Ohta J, Tohtairin Y, Shimizu T, Nomura T, Hachimori A, Uchiumi T. 2005. A mode of assembly of P0, P1 and P2 proteins at the GTPase-associated center in animal ribosomal; in vitro analyses with P0 truncation mutants. *J Biol Chem*, **280** (47): 39193 - 39399.
- Hou W R, Chen Y, Peng Z S, Wu X, Tang Z X. 2007. cDNA cloning and sequences analysis of ubiquinol-cytochrome C reductase complex ubiquinone-binding protein (QP-C) from giant panda. *Acta Theriologica Sinica*, **27** (2): 190 - 194. (in Chinese)
- Hou W R. 2000. Amendment on the life table and relevant datum indicators of giant panda. *Zoology Research*, **21** (5): 361 - 366. (in Chinese)
- Hu J C. 1988. Progenitive efficiency of the giant panda. *Wild Animal*, (5): 32. (in Chinese)
- John M Archibald, Evelyn M The, Patrick J Keeling. 2003. Novel ubiquitin fusion proteins: ribosomal protein P1 and actin. *J Mol Biol*, **328** (4): 771 - 778.
- Lin F, Yang Y H, Zhang Y Z, Chen H W, Fei L S, Song Y F, He G X, Zhang A J. 1998. Molecular cloning and heterologous expression of the brain derived neurotrophic factor (BDNF) gene from giant panda. *Acta Theriologica Sinica*, **18** (2): 95 - 98. (in Chinese)
- Lin F, Yang Y H, Zhang Y Z, Chen H W, Fei L S, Song Y F, He G X, Zhang A J. 1997. A preliminary study on the taxonomy position of giant panda. *Acta Theriologica Sinica*, **17** (3): 161 - 164. (in Chinese)
- Liao M J, Zhang Z H, Zhang A J, Zhu M Y. 2005. cDNA cloning and sequence analysis of growth hormone receptor (GHR) from giant panda. *Acta Theriologica Sinica*, **25** (1): 24 - 31. (in Chinese)
- Mather J P, Moore A, Li R H. 1997. Activins, inhibins, and follistatins: further thoughts on a growing family of regulator. *Proc Soc Exp Biol Med*, **215**: 209 - 222.
- Perez-Fernandez J, Remecha M, Ballesta J P. 2005. The acidic protein binding site is partially hidden in the free *saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk P0. *Biochemistry*, **44** (14): 5532 - 5540.
- Qiu D, Parada P, Marcos A G, Cardenas D, Remacha M, Remecha M, Ballesta J P. 2006. Different roles of P1 and P2 *saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk proteins revealed by cross-linking. *Mol Microbil*, **62** (4): 1191 - 1202.
- Rao G, Fang S G, Tsutomu F, Wei F W. 2004. Expression of biologically active neurotrophin -4 of giant panda in *Escherichia coli*. *Acta Theriologica Sinica*, **24** (1): 13 - 18.
- Rodriguez-Gbriel M A, Remecha M, Ballesta J P. 2000. The RNA interaction domain but not the protein interacting domain is highly conserved in ribosomal protein P0. *J Biol Chem*, **275** (3): 2130 - 2136.
- Rodriguez-Gbriel M A, Bou G, Briones E, Zambrano R, Remecha M, Ballesta J P. 1999. Structure and function of the stalk, a putative regulatory element of the yeast ribosome. Role of stalk protein phosphorylation. *Folia Microbio (Praha)*, **44** (2): 153 - 163.
- Shimizu T, Nakagaki M, Nishi Y, Kobayashi Y, Hachimori A, Uchiumi T. 2002. Interaction among silkworm ribosomal proteins P1, P2 and P0 required for functional protein binding to the GTPase-associated domain of 28S rRNA. *Nucleic Acids Res*, **30** (12): 2620 - 2627.
- Tchorzewski M, Krokowski D, Rezeski W, Issinger O G, Grankowski N. 2003. The subcellular distribution of the human ribosomal "stalk" components: P1, P2 and P0 proteins. *Int J Biochem Cell Bio*, **35** (2): 203 - 211.
- Wu Z A, Liu W X, Murphy C, Gall J. 1990. Satellite 1 DNA sequence from genomic DNA of the giant panda. *Nucleic Acids Res*, **18** (4): 1054.
- Hou Wan-ru, Du Yu-jie, Chen Yu, Wu Xia, Peng Zheng-song, Yang Jun, Zhou Cai-quan. 2007. Nucleotide sequence of cDNA encoding the mitochondrial precursor protein of the ATPase inhibitor from the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *DNA and Cell Biology*, **26** (11): 799 - 802.
- Wang Y J, Wang X Z, Yang Y H, Qian Y S, Chen W Y, Wang Z S, Fei L S, Chen H W, He G X, Song Y F. 1998. Studies on replication bands of giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) *Chromosome*. *Acta Genetica Sinica*, **25** (1): 22 - 27. (in Chinese)
- Wang P, Cao Z, Liu W X, Ye J Q. 1980. Histological observations of the newborn giant panda. *Chinese Science Bulletin*, (13): 623. (in Chinese)
- Wang X J, Wang X X, Wang Y J, Wang X Z, He G X, Chen H W, Fei L S. 2002. Molecular cloning of the DNA sequence of the activin β_A subunit gene mature peptides from panda and related species and its applications in the research of phylogeny and taxonomy. *Acta Genetica Sinica*, **29** (9): 782 - 786. (in Chinese)
- Wang X J, Wang X X, Tan Y F, Wang Y J, Wang X Z, Chen H W, He G X, Fei L S. 2001. Studies of the correlations between fragile

- sites and giant panda's breeding problem. *Acta Genetica Sinica*, **28** (7): 621 – 627. (in Chinese)
- Zurdo J, Parada P, van den Berg A, Nusspaumer G, Jemenez-Diaz A, Remacha M, Ballesta J P. 2000. Assembly of *saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk: binding of P1 proteins is required for the interaction of P2 proteins. *Biochemistry*, **39** (30): 8929 – 8934.
- Zhang Y P, Wang W, Su B, Ryder O A, Fan Z Y, Zhang H M, He Y M. 1995. Microsatellite DNAs and kinship identification of giant panda. *Zoology Research*, **16** (4): 301 – 306. (in Chinese)
- Zheng X, Zhang Z H, Hu X L, Liao M J, Zhang A J, Zhu M Y. 2004. Cloning and expression of pituitary prolactin gene in *Ailuropoda melanoleuca*. *Acta Genetica Sinica*, **31** (9): 963 – 969. (in Chinese)
- Zhou R J, Chen H H, Yu Q X. 1998. Sox and Zfx genes from the giant panda. *Science in China (Series C)*, **28** (6): 516 – 520. (in Chinese)
- 仇秉兴. 1984. 人工哺育新生大熊猫的难关. 大自然, (4): 20 – 21.
- 王亚军, 王喜忠, 杨玉华, 钱永胜, 陈文元, 王子淑, 费立松, 陈红卫, 何光昕, 宋云芳. 1998. 大熊猫染色体晚复制带研究. 遗传学报, **25** (1): 22 – 27.
- 王平, 曹焯, 刘维新, 叶掬群. 1980. 初生大熊猫的组织学观察. 科学通报, (13): 623.
- 冯文和, 李光汉. 2000. 拯救大熊猫. 成都: 四川科学技术出版社, 124 – 132.
- 朱玉贤, 李毅. 2002. 现代分子生物学 (第二版). 北京: 高等教育出版社, 114 – 116.
- 汪晓晶, 王小行, 谭言飞, 王亚军, 王喜忠, 陈红卫, 何光昕, 费立松. 2001. 大熊猫繁育障碍与染色体脆性位点的相关性研究. 遗传学报, **28** (7): 621 – 627.
- 汪晓晶, 王小行, 王亚军, 王喜忠, 何光昕, 陈红卫, 费立松. 2002. 大熊猫及其近种活化素基因 β_A 亚基成熟肽序列的克隆分析及其在分类地位上的应用. 遗传学报, **29** (9): 782 – 786.
- 张亚平, 王文, 宿兵, Ryder O A, 范志勇, 张和民, 何延美. 1995. 微卫星 DNA 的筛选及其应用. 动物学研究, **16** (4): 301 – 306.
- 张安居, 张志和. 1998. 四川省大熊猫迁地保护示范工程. 97 成都国际大熊猫保护学术研讨会论文集. 成都: 四川科学技术出版社.
- 林峰, 杨玉华, 张义正, 陈红卫, 费立松, 宋云芳, 何光昕, 张安居. 1997. 应用 RAPD 技术对大熊猫分类地位的探讨. 兽类学报, **17** (3): 161 – 164.
- 林峰, 杨玉华, 张义正, 陈红卫, 费立松, 宋云芳, 何光昕, 张安居. 1998. 大熊猫脑源性神经营养因子基因的克隆与表达. 兽类学报, **18** (2): 95 – 98.
- 郑旭, 张志和, 胡细连, 廖鸣娟, 张安居, 朱睦元. 2004. 大熊猫垂体泌乳素 (PRL) cDNA 的克隆与表达. 遗传学报, **31** (9): 963 – 969.
- 周荣家, 程汉华, 余其兴. 1998. 大熊猫 Sox 和 Zfx 基因. 中国科学 (C 辑), **28** (6): 516 – 520.
- 侯万儒. 2000. 大熊猫生命表及相关数据指标的修订. 动物学研究, **21** (5): 361 – 366.
- 侯万儒, 陈瑜, 彭正松, 吴夏, 唐宗祥. 2007. 大熊猫辅酶 Q – 细胞色素 C 氧化还原酶的辅酶 Q 连接蛋白基因 (QP – C) cDNA 的克隆及序列比较. 兽类学报, **27** (2): 190 – 194.
- 胡锦矗. 1988. 大熊猫繁殖的效率. 野生动物, (5): 32.
- 廖鸣娟, 张志和, 张安居, 朱睦元. 2005. 大熊猫生长激素受体 (GHR) cDNA 的克隆与序列分析. 兽类学报, **25** (1): 24 – 31.