

文章编号:1000 - 0615(2005)05 - 0585 - 06

## 金鱼 DEAD - box 家族基因 p68 和 p110 在配子发生中的表达特征

吕道远<sup>1</sup>, 叶 鼎<sup>1</sup>, 宋 平<sup>1</sup>, 陈云贵<sup>1</sup>, 桂建芳<sup>2</sup>

(1. 武汉大学生命科学院发育生物学教育部重点实验室,湖北 武汉 430072;

2. 中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室,湖北 武汉 430072)

**摘要:**利用组织原位杂交技术,以地高辛标记的反义 RNA 为探针,检测了金鱼 (*Carassius auratus*) DEAD-box 家族基因 p68 和 p110 在卵子发生及精子发生中的表达分布特点。结果表明:在金鱼配子发生中,p68 基因在各个时期的卵母细胞均有表达,、期卵母细胞中的表达水平较、期卵母细胞中更高。p68 基因的表达只限于精原细胞和初级精母细胞中。p110 基因在金鱼精子发生各阶段持续表达,其中精原细胞和初级精母细胞中表达水平较高;在卵子发生中,期卵母细胞中没有 p110 RNA 阳性信号,期卵母细胞中信号较为强烈,但在、期卵母细胞中杂交信号明显减弱。

**关键词:**金鱼;原位杂交;DEAD-box;p68 基因;p110 基因;卵子发生;精子发生

**中图分类号:**S917 **文献标识码:**A

## Expression pattern of *Carassius auratus* DEAD-box family genes p68 and p110 during gametogenesis

LV Dao-yuan<sup>1</sup>, YE Ding<sup>1</sup>, SONG Ping<sup>1</sup>, CHEN Yun-gui<sup>1</sup>, GUI Jian-fang<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of the Ministry of Education for Developmental Biology,  
College of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China;

2. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology,  
Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

**Abstract:** In order to study the potential functions of DEAD-box family genes p68 and p110 in germ cell proliferation and differentiation, using *in situ* hybridization on tissue sections with DIG labeled antisense RNA probe, we detected the location of goldfish (*Carassius auratus*) DEAD-box family genes p68 and p110 RNA during gametogenesis. The results are as follows: during goldfish oogenesis, the expression of p68 RNA was observed in oocytes at all stages, and its expression was higher in stage , oocytes than in stage , oocytes. The expression of p110 RNA could not be found in stage oocytes and strong signals could be detected in stage oocytes, but the signals became much weaker in stage , oocytes. During goldfish spermatogenesis, the expression of p68 RNA could only be detected in spermatogonia and primary spermatocytes. The expression of p110 RNA was visible throughout spermatogenesis, and its expression was much higher in spermatogonia and primary spermatocytes than in spermatids. Based on the active expression of p68 and p110 during goldfish gametogenesis, we speculated that they may play potentially important roles in germ cell development of both sexes.

**Key words:** *Carassius auratus*; *in situ* hybridization; DEAD-box; p68 gene; p110 gene; oogenesis; spermatogenesis

DEAD-box 家族基因编码依赖 ATP 的 RNA 解旋酶,广泛存在于从细菌到哺乳类的许多物种中,因其蛋白具有一个高度保守的序列 DEAD

(Asp-Glu-Ala-Asp), 故而得名<sup>[1]</sup>。DEAD-box 家族蛋白在细胞的 RNA 代谢中具有重要作用,涉及转录调控、pre-mRNA 剪接、核糖体组装、RNA 运输、

收稿日期:2004-10-14

资助项目:国家“863”项目(2001AA222071);国家自然科学基金资助项目(30270675)

作者简介:吕道远(1979-),男,湖南长沙人,硕士研究生,从事鱼类分子遗传学研究。Tel:027-87663175

通讯作者:宋 平,E-mail:pingsongps@yahoo.com.cn

翻译起始调控、细胞器基因表达以及 RNA 降解等生命活动<sup>[2]</sup>。p68 和 p110 基因编码的蛋白均具有高度保守的序列 DEAD, 因此同属 DEAD-box 基因家族。p68 蛋白是 20 世纪 80 年代初由 Lane 和 Hoeffler<sup>[3]</sup>在研究 SV40 病毒 T 蛋白的不同单抗时发现的, 它具有依赖 RNA 的 ATP 酶活性和 RNA 解旋酶活性<sup>[4,5]</sup>。p68 蛋白在进化上高度保守, 广泛存在于从酵母到人的真核细胞中, 在 mRNA 转录起始、pre-mRNA 剪接及 rRNA 的转录和加工以及细胞增殖与器官分化等方面有着重要功能<sup>[6-10]</sup>。p110 基因编码真核生物翻译起始因子 3(eIF-3) 的 110 kD 的亚基<sup>[11]</sup>。已有几种与 p110 同源性较高的 DEAD-box 家族成员被鉴定出来, 包括小鼠 (*Mus musculus*) 的 PL10 蛋白<sup>[12]</sup>, 非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 的 An3 蛋白<sup>[13]</sup>, 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的 Ded1 蛋白<sup>[14]</sup>。酵母 Ded1 蛋白涉及 pre-RNA 剪接及蛋白质翻译起始<sup>[14,15]</sup>; 非洲爪蟾的 An3 基因编码一个母源的 RNA, 为卵子发生所必需的<sup>[16]</sup>; PL10 蛋白在小鼠中涉及精子发生的调控<sup>[17]</sup>。

为探讨 p68 和 p110 基因在金鱼配子发生中, 尤其是在其细胞增殖和分化中的功能。本研究以金鱼的精巢和卵巢为材料, 以 DIG (地高辛) 标记的 p68、p110 基因的反义 RNA 为探针, 利用组织切片原位杂交方法, 对这两个基因在卵子发生和精子发生过程中的表达特征及功能进行分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验用鱼

成熟金鱼购于武昌中北路花鸟虫鱼市场。

### 1.2 重组质粒

金鱼 p68 和 p110 基因的 cDNA 均由本实验室克隆。以上基因的 cDNA 均克隆于 pGEM-T 载体 (Promega, USA) 中, 作为合成探针的模板。

### 1.3 主要试剂与药品

NTP Set, SP6/T7 RNA polymerase 均为 MBI 公司产品。DIG-11-UTP 和 sheep anti-DIG-AP Fab fragments 为 Roche 公司产品。NBT/BCIP 检测试剂盒为华美公司产品。

### 1.4 实验方法

质粒载体的转化、扩增与抽提 按参考文献<sup>[18]</sup>的方法操作。

质粒载体的酶切线性化 在 60  $\mu\text{L}$  的总反

应体系中, 带有目的基因核糖探针模板的重组质粒均为 1  $\mu\text{g}$ 。对于 Nsi 的酶切反应, 含有 4U Nsi (华美公司); 对于 Sph 的酶切反应, 含有 4.5 U Sph (华美公司)。酶切反应在 37  $^{\circ}\text{C}$  保温 4 h 后, 异丙醇沉淀过夜。经 70% 乙醇洗涤, 空气干燥后, 溶于 20  $\mu\text{L}$  DEPC-H<sub>2</sub>O, 经琼脂糖凝胶电泳检测其浓度。

地高辛标记核糖探针的体外转录合成 体外转录地高辛标记核糖探针按文献<sup>[19]</sup>并稍加修改进行。

性腺组织切片的原位杂交 (1) 冰冻切片的制备: 在 -25  $^{\circ}\text{C}$ , 将性腺切成厚 10~12  $\mu\text{m}$ , 贴于载玻片上; (2) 性腺组织切片的预杂交和原位杂交: 在预杂交液 (50% 甲酰胺的 4  $\times$ SSC) 中 37  $^{\circ}\text{C}$  预杂交 15 min 以上。滴加 30~40  $\mu\text{L}$  含 5~10 ng 探针的杂交液, 盖上盖玻片。60  $^{\circ}\text{C}$  温盒杂交过夜。

杂交后漂洗 2  $\times$ SSC 和 1  $\times$ SSC 各漂洗 3 次, 每次 10 min。再用 RNaseA 在 37  $^{\circ}\text{C}$  消化未杂交 RNA 探针 30 min。然后用 0.1  $\times$ SSC 漂洗 4 次, 每次 10 min。

杂交信号的免疫检测 (染色) Buffer I (100 mmol  $\text{L}^{-1}$  Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol  $\text{L}^{-1}$  NaCl) 漂洗 2 次, 每次 10 min。接着在抗体封闭液 (Buffer I + 0.1% Triton X-100 + 2% 羊血清) 中浸泡 30 min。然后进行免疫结合: anti-DIG-AP 按 1:500 稀释于稀释于封闭液中, 滴加于切片上, 湿盒中孵育 2 h。接下来以 Buffer I 洗 3 次, 每次 10 min。然后, 在 Buffer (100 mmol  $\text{L}^{-1}$  Tris-HCl, pH 9.5, 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  NaCl, 50 mmol  $\text{L}^{-1}$  MgCl<sub>2</sub>) 中浸泡 10 min。每片覆盖 50  $\mu\text{L}$  显色液, 湿盒中暗处显色 0.5~4 min。终止反应: 用 Buffer (10 mmol  $\text{L}^{-1}$  Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol  $\text{L}^{-1}$  EDTA) 浸洗 2 次, 每次 5 min。最后以系列乙醇—二甲苯脱水透明; 中性树脂封片, 显微镜检。

## 2 结果

### 2.1 金鱼卵子发生中 p68、p110 基因的原位杂交检测

金鱼 p68 RNA 在各个时期卵母细胞的胞质中均能检测到, 但不存在于细胞核中 (图 1-A)。其杂交信号均匀地分布于 I、II 期卵母细胞的胞质中, 且非常强烈 (图 1-A、图 2-A); 而在 III、IV 期卵母细胞的胞质中则明显减弱, 但分布仍然是均匀的 (图 1-A、图 2-C)。在滤泡细胞中也能检测到 p68 RNA 的阳性信号 (图 2-C)。

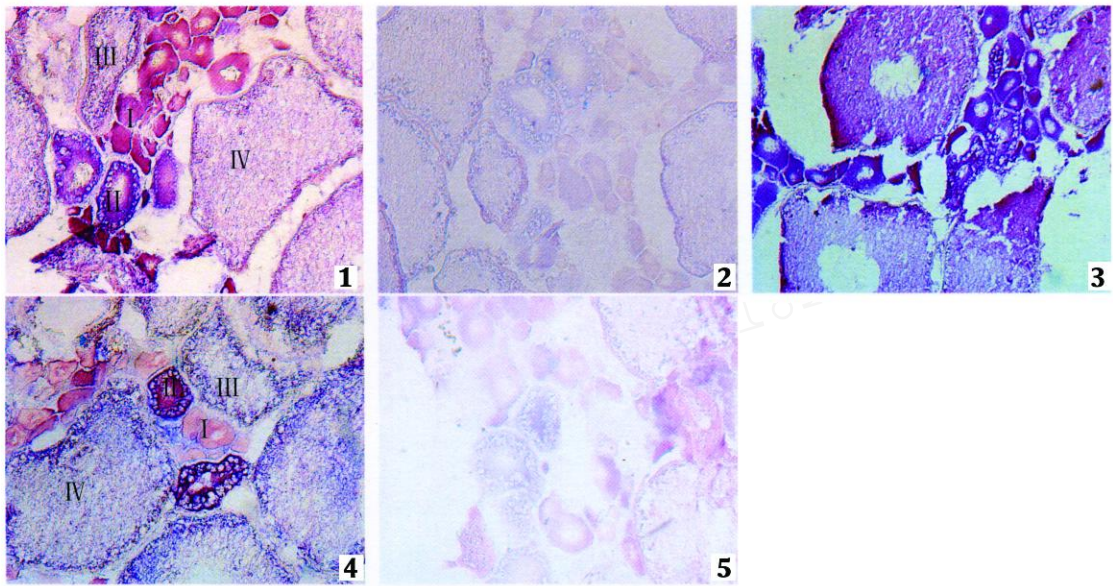


图 1 金鱼 p68、p110 基因在卵子发生中的原位杂交分析

Fig.1 Detection of goldfish p68 ,p110 gene expression during oogenesis by *in situ* hybridization

A :p68 反义链探针杂交结果;B :p68 正义链探针杂交结果;C:成熟卵巢 H. E 染色;D :p110 反义链探针杂交结果;E :p110 正义链探针杂交结果 A、D 中 、 、 、 分别代表各时期的卵母细胞,放大倍数均为 100 倍

A : The expression of p68 gene can be detected in stage , , , oocytes by anti-sense RNA probe (100 ×);B : Detection of p68 gene expression by sense RNA probe (100 ×);C: H. E staining on mature ovary section (100 ×);D: The expression of p110 gene can be detected in stage , , , oocytes by anti-sense RNA probe (100 ×) ;E: Detection of p110 gene expression by sense RNA probe (100 ×) ; , , , in A and D indicate stage , , , oocytes respectively

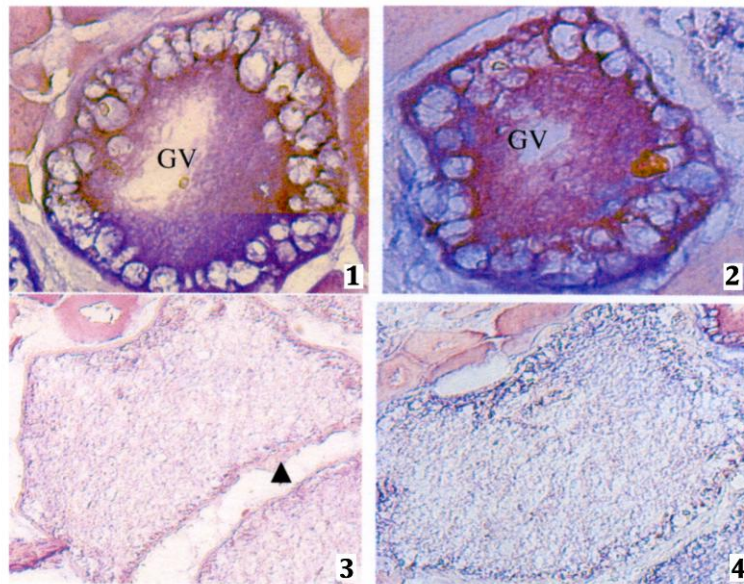


图 2 金鱼 p68、p110 RNA 在 I、II 期卵母细胞中的表达模式

Fig.2 Expression pattern of goldfish p68 ,p110 RNA in stage I , II oocyte

A :p68 RNA 在 I 期卵母细胞的胞质中均匀地分布;B :p110 RNA 在 I 期卵母细胞的胞质中均匀地分布;C:p68 RNA 在 I 期卵母细胞的整个胞质中均匀地分布,在滤泡细胞中也有表达(如短箭头所示);D :p110 RNA 在 I 期卵母细胞的整个胞质中均匀地分布 GV 生发泡; A、B 放大倍数 400 倍 ; C、D 放大倍数 100 倍

A : In stage I oocyte , positive signal of p68 RNA is strong and p68 RNA is uniformly distributed throughout the cytoplasm(400 ×);B : In stage I oocyte , positive signal of p110 RNA is intense and p110 RNA is dispersed throughout the cytoplasm. (400 ×); C: p68 RNA is distributed ubiquitously throughout the cytoplasm of stage I oocyte and positive signal can be detected in follicle too (arrowhead). (100 ×); D: p110 RNA is dispersed uniformly throughout the cytoplasm of stage I oocyte. (100 ×). GV indicate germinal vesicle

在金鱼 期卵母细胞中几乎检测不到 p110 RNA 的杂交信号;但在 期卵母细胞中能检测到强烈的、均匀分布于胞质中的阳性信号(图 1-D、图 2-B)。 、 期卵母细胞胞质中的杂交信号仍然呈现均匀地分布的特征,但却急剧地减弱(图 1-D、图 2-D)。与 p68 一样,p110 RNA 在各个时期卵母细胞的细胞核中均无阳性信号。

## 2.2 金鱼精子发生中 p68、p110 基因的原位杂交检测

金鱼 p68 RNA 杂交信号在精原细胞和初级精母细胞中均能检测到,并且较强烈,但在精子细胞中无阳性信号(图 4-A)。用低倍镜观察,p68 RNA 阳性细胞在切片中呈现出网格状的分布特征(图 3-A)。金鱼 p110 RNA 同样在精原细胞和初级精母细胞中有强烈的阳性信号;与 p68 不同的是,在精子细胞中能检测到 p110 RNA 的微弱阳性信号(图 4-B)。低倍镜观察时,p110 阳性细胞也呈现出网格状的分布特征(图 3-D)。

## 3 讨论

### 3.1 金鱼 p68 基因在配子发生中的表达与功能分析

自 20 世纪 80 年代初发现 p68 蛋白以来,大量研究表明,该蛋白不仅具有依赖 RNA 的 ATP 酶活性和 RNA 解旋酶活性<sup>[4,5]</sup>,而且参与多种涉及 RNA 的代谢活动。研究表明,在体内,p68 蛋白与转录辅激活因子的许多区域相互作用,并以其 N 端的 80 个氨基酸与 RNA 聚合酶 Ⅱ 相结合促进转录起始<sup>[6]</sup>。体外与体内的研究共同表明,p68 蛋白是 pre-mRNA 剪接所必需的<sup>[7,8]</sup>。在酿酒酵母中,p68 的同源物 dbp2 基因点突变后,rRNA 加工受阻,多聚核糖体(polyribosome)缺失,导致蛋白合成受阻,细胞生长缓慢<sup>[9]</sup>。Samantha 等还报道在有丝分裂末期的 HeLa 细胞的新生核仁中,p68 蛋白与核纤蛋白(fibrillarlin)相互作用,参与 rRNA 转录和 rRNA 加工,并促进分裂末期核仁的重建<sup>[10]</sup>。

由于卵子负责胚胎发育的启动和指导胚胎早期发育,在卵细胞质中积累和储存大量物质,如酶类、核酸、结构蛋白和蛋白合成前体分子及卵黄以供胚胎早期发育之用,这些物质主要在第一次成

熟分裂前期 中产生和积累<sup>[20]</sup>。本研究显示,p68 RNA 不仅在金鱼各时期卵母细胞的胞质中大量表达,而且在滤泡细胞中也有表达(图 1-A、图 2-A、图 2-C)。

金鱼 p68 基因在金鱼卵子发生过程中的持续高表达,表明其直接或间接参与了卵子发生中有关物质的合成代谢活动。

在人类,p68 蛋白与人类雌激素受体(hER) N-末端的 A/B 域相互作用,尽管它的 RNA 解旋酶活性并不为 hER N-末端激活域(AF-1)的协同作用所必需,但 p68 蛋白与 hER 的 A/B 域的这个作用对 hER AF-1 的完整活性是必需的<sup>[21]</sup>。金鱼 p68 RNA 在各时期卵母细胞及滤泡细胞中都有表达,那么该基因在金鱼卵子发生中是否也具有通过同样的方式,经雌激素-受体信号通路参与对卵子发生调控的作用,这还有待证实。

p68 基因在体外培养处于增殖期的细胞中高表达,且其表达是血清诱导的;相反在静止的细胞中几乎检测不到<sup>[22]</sup>,推测其表达与细胞增殖有关。在体内,p68 蛋白的水平在精巢这种高度增生的组织中比在脑等相对静止的组织中的水平要高得多。在小鼠胎儿中,p68 基因的表达是发育调控的,并且与器官的分化和成熟相关<sup>[23]</sup>。在金鱼精子发生过程中,p68 RNA 在精原细胞和初级精母细胞中有较高表达,但是在精子细胞中不表达(图 3-A、图 4A)。这表明,p68 基因在金鱼精原细胞和初及精母细胞的增殖过程中,可能同样起着重要的作用。

### 3.2 金鱼 p110 基因在配子发生中的表达与功能分析

p110 基因编码真核生物翻译起始因子 3(eIF-3)的一个 110 kD 的亚基<sup>[11]</sup>。目前已鉴定出几种与 p110 同源性较高的 DEAD-box 家族成员,如酿酒酵母中的 Ded 1 蛋白,它涉及酵母中 pre-mRNA 剪接并且是蛋白质翻译起始所必需的<sup>[14]</sup>。还有非洲爪蟾中的 An3 蛋白<sup>[13]</sup>,研究发现 An3 基因编码的母源 RNA 定位于卵母细胞和早期胚胎的动物半球;在卵子发生的中期,An3 蛋白大量出现在卵母细胞核的附加核仁(extra-nucleoli)中,参与 rRNA 转录、rRNA 加工及核糖体组装等过程<sup>[16]</sup>。

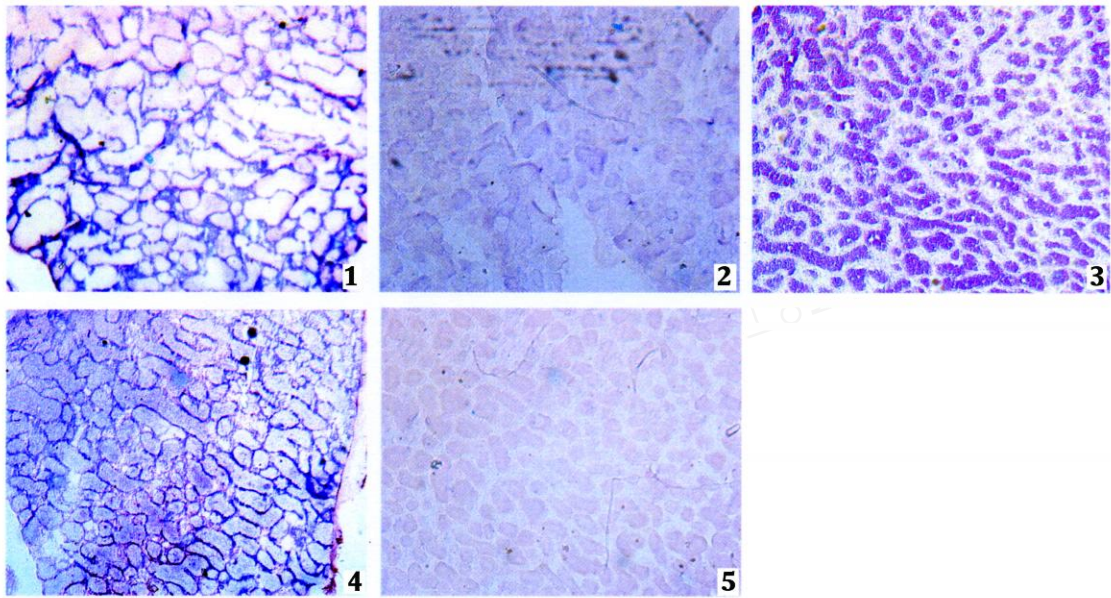


图 3 金鱼 p68、p110 基因在精子发生中的原位杂交分析

Fig. 3 Detection of goldfish p68, p110 gene expression during spermatogenesis by *in situ* hybridization

A: p68 反义链探针杂交结果; B: p68 正义链探针杂交结果; C: 成熟精巢 H. E 染色; D: p110 反义链探针杂交结果; E: p110 正义链探针杂交结果 放大倍数均为 100 倍

A: Detection of p68 gene expression by anti-sense RNA probe (100 ×); B: Detection of p68 gene expression by sense RNA probe (100 ×); C: HE staining on mature testis section (100 ×); D: Detection of p110 gene expression by anti-sense RNA probe (100 ×); E: Detection of p110 gene expression by sense RNA probe (100 ×);

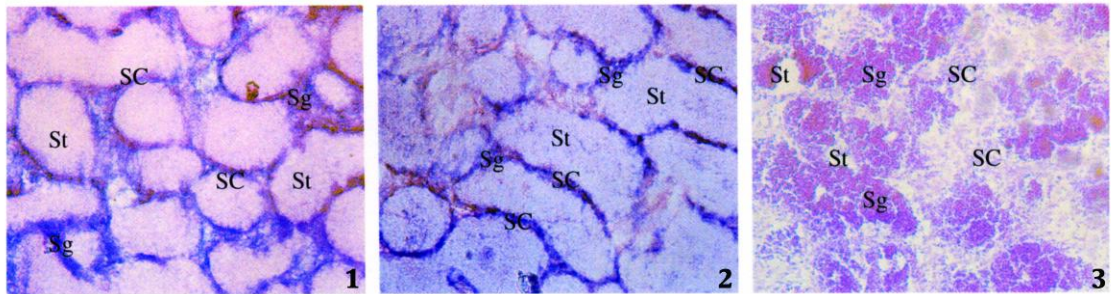


图 4 金鱼 p68、p110 RNA 在各阶段生精细胞中的表达

Fig. 4 Expression pattern of goldfish p68, p110 RNA in spermatogenic cells

A: p68 RNA 杂交信号可在精原细胞和初级精母细胞中检测到, 精子细胞中无阳性信号; B: p110 RNA 杂交信号可在精原细胞和初级精母细胞检测到, 两类细胞中杂交信号均较强烈, 在精子细胞中也有微弱杂交信号; C: 成熟精巢, H. E 染色, Sg 精原细胞; SC 初级精母细胞; St 精子细胞; 放大倍数均为 400 倍

A: Intense positive signal of p68 RNA can be found in spermatogonia and primary spermatocytes while no signals can be detected in spermatids (400 ×); B: Very strong signal of p110 RNA can be detected in spermatogonia and primary spermatocytes and weaker signal can be found in spermatids (400 ×); C: H. E staining on mature testis (400 ×) Sg, SC and St in A, B, C indicate spermatogonia, spermatocytes and spermatids respectively

在 期的金鱼卵母细胞中未能检测到 p110 RNA,但在 、 期的卵母细胞中 p110 RNA 均有较高表达(图 1-D, 图 2-B, 图 2-D)。金鱼 p110 基因的这种表达特征,是同该时期卵母细胞内物质合成代谢由低水平转向活跃相一致的。金鱼卵母细胞的生长期主要集中在 、 期(尤

其是进入双线期后),这一阶段卵母细胞生长迅猛,各种物质合成代谢旺盛。在金鱼卵子发生过程中,p110 基因从不表达的 期卵母细胞到开始并且大量表达的 、 期卵母细胞,间接反映了卵母细胞中物质合成代谢的动态变化,同时也表明了 p110 基因的表达是该时期卵母细胞中物

质合成代谢活动所必需的。

研究表明,p110 基因的同源物小鼠 PL10 基因在精子发生的减数分裂和单倍体细胞时期有高水平转录活性,推测其可能参与精子发生过程中的翻译调控,是精子发生中的关键因子<sup>[17]</sup>。本研究结果显示,金鱼 p110 基因在精原细胞和初级精母细胞中有高水平表达,在精子细胞中有微弱表达(图 3-D、图 4-B)。p110 基因在金鱼精子发生中的这种持续表达,表明该基因可能在精子发生的整个过程中,尤其在精原细胞和初级精母细胞阶段起着重要的作用。

总之,p68 基因在金鱼卵子发生中持续表达,其中在 、 期卵母细胞中较为强烈;在精子发生中,p68 基因的表达仅限于精原细胞和初级精母细胞。p110 基因虽然在精子发生中持续表达,但在精子细胞中较为微弱;在卵子发生中,p110 基因的表达只出现在 、 、 期卵母细胞中,但在 期卵母细胞中最为强烈。p68 和 p110 基因在其它生物中涉及 rRNA 转录、加工和翻译调控等活动,在金鱼配子发生中,它们也可能有着同样的重要功能。

#### 参考文献:

- [1] Linder P, Lasko P F, Ashburner M, *et al.* Birth of the DEAD-box [J]. *Nature*, 1989, 337:121 - 122.
- [2] Rocak S, Linder P. DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism [J]. *Nature*, 2004, 5:232 - 241.
- [3] Lane D P, Hoeffler W K. SV40 large T shares an antigenic determinant with a cellular protein of molecular weight 68000[J]. *Nature*, 1980, 288:167 - 170.
- [4] Hirling H, Scheffner M, Restle T, *et al.* RNA helicase activity associated with the human p68 protein [J]. *Nature*, 1989, 339 (6225): 526 - 528.
- [5] Igoe R D, Lane D P. Nuclear protein p68 is an RNA dependent ATPase [J]. *EMBO*, 1989, 8:1827 - 1831.
- [6] Rossow K L, Janknecht R. Synergism between p68 RNA helicase and the transcriptional coactivators CBP and p300 [J]. *Oncogene*, 2003, 9; 22(1): 151 - 156.
- [7] Liu Z R. p68 RNA helicase is an essential human splicing factor that acts at the U1 snRNA-5' splice site duplex [J]. *Molecular and Cell Biology*, 2002: 5443 - 5450.
- [8] Lee C G. RH70, a bi-directional RNA helicase, copurifies with U1snRNP [J]. *Biol Chem*, 2002, 277(42): 39679 - 39683.
- [9] Bond A T, Mangus D A, He F, *et al.* Absence of Dbp2p alters both nonsense-mediated RNA decay and rRNA processing [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21:7366 - 7379.
- [10] Nicol S M, Causevic M, Prescott A R, *et al.* The nuclear DEAD box RNA helicase p68 interacts with then ucleolar protein fibrillarlin and colocalizes specifically in nascent nucleoli during telophase [J]. *Experimental Cell Research*, 2000, 257: 272 - 280.
- [11] Bene R, Hershey S. The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes [J]. *J Biol Chem*, 1978, 253:3078 - 3087.
- [12] Lasko P F, Ashburner M. Posterior localization of vasa protein correlates with, but is not sufficient for, pole cell development [J]. *Genes Dev*, 1990, 4: 905 - 921.
- [13] Gururajan R, Week D L. An3 protein encoded by a localised maternal RNA in *Xenopus laevis*, is an ATPase with substrate-specific RNA helicase activity [J]. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1997, 1350:169 - 182.
- [14] Jamieson D J, Beggs J D. A suppressor of yeast spp81/ ded1 mutations encodes a very similar putative ATP dependent RNA helicase [J]. *Mol Microbiol*, 1991, 5:805 - 812.
- [15] Iost I, Dreyfus M, Linder P. Ded1p, a DEAD-box protein required for translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*, is an RNA helicase [J]. *J Bio Chem*, 1999, 274, 25:17677 - 17683.
- [16] Gururajan R, Mathews L, Longo L J, *et al.* An3 encodes an RNA helicase that colocalise with nucleoli in *Xenopus* oocytes in a stage specific manner [J]. *PNAS*, 1994, 91: 2056 - 2060.
- [17] Leroy P, Alzari P, Sasson D, *et al.* The protein encoded by a murine male germ cell specific transcript is a putative ATP dependent RNA helicase [J]. *Cell*, 1989, 57: 549 - 559.
- [18] 金冬雁,黎孟枫,等(译). 分子克隆实验指南 第二版[M]. 北京:科学出版社,1992. 16 - 34.
- [19] 黄培堂,等(译). 细胞实验指南[M]. 北京:科学出版社, 2001. 1130 - 1131.
- [20] 张红卫,王子仁,张士瑾. 发育生物学[M]. 北京:高等教育出版社,2001.22.
- [21] Endoh H, Maruyama K, Masuhiro Y, *et al.* Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function of human estrogen receptor [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1999, 19(8): 5363 - 5372.
- [22] Ford M J, Anton I A, Lane D P. Nuclear protein with sequence homology to translation initiation factor Eif-4A[J]. *Nature*, 1988, 332(6166):736 - 738.
- [23] Stevenson R J, Hamilton S J, Mac Callum D E, *et al.* Expression of the "DEAD-Box" RNA helicase p68 is developmentally and growth regulated and correlates with organ differentiation/ maturation in the fetus [J]. *J Pathol*, 1998, (184): 351 - 359.