

周艳红, 付言峰, 赵为民, 等. 胚胎附植期梅山猪 *EphrinA1* 全编码区克隆及生物信息学分析[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(2): 350-356.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.02.020

胚胎附植期梅山猪 *EphrinA1* 全编码区克隆及生物信息学分析

周艳红^{1,2}, 付言峰², 赵为民², 刘红林¹, 任守文^{1,2}

(1. 南京农业大学动物科技学院, 江苏 南京 210095; 2. 江苏省农业科学院畜牧研究所/动物品种改良和繁育重点实验室, 江苏 南京 210014)

摘要: 为了研究促红细胞生成素产生肝细胞配体 A1 (*EphrinA1*) 对梅山猪胚胎附植期胚胎在子宫内膜间迁移和对子宫内黏附活动的影响, 利用克隆测序、生物信息学和 qRT-PCR 方法, 克隆了 *EphrinA1* 基因的全长编码序列, 对其表达的蛋白结构和功能进行了预测, 并检测了其 mRNA 表达变化。梅山猪 *EphrinA1* 基因编码区有 5 个 cSNPs 变异, 其中 2 个导致氨基酸突变, 分别为 Glu29Asn 和 Trp33Arg, 位于 *EphrinA1* 外显子 1 和外显子 2 上。 *EphrinA1* 编码序列中含 5 个外显子, 编码 205 个氨基酸。 *EphrinA1* 为不稳定的亲水性蛋白, 有 1 个信号肽和一个保守区域, 无跨膜区。另外, *EphrinA1* 在梅山猪胚胎附植期有较强的 mRNA 表达。表明 *EphrinA1* 基因可能参与梅山猪的胚胎附植调控, 其 cSNPs 有望成为影响猪产仔数基因的潜在分子标记。

关键词: 梅山猪; 胚胎附植; *EphrinA1*; 克隆; 生物信息学

中图分类号: **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)02-0350-07

Coding sequence cloning and bioinformatics analysis of *EphrinA1* during embryo implantation in Meishan swine

ZHOU Yan-hong^{1,2}, FU Yan-feng², ZHAO Wei-min², LIU Hong-lin¹, REN Shou-wen^{1,2}

(1. College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Laboratory of Animal Improvement and Reproduction, Nanjing 210014, China)

Abstract: In order to analyze the role of *EphrinA1* in the migration and adhesion of embryo along the endometrium during embryo implantation in Meishan swine, *EphrinA1* coding sequence was cloned, protein structure and function were predicted and mRNA expression was detected by cloning, sequencing, bioinformatics and qRT-PCR method. Five cSNPs in

EphrinA1 coding sequence were detected, two of which caused two amino acids changes which were Glu29Asn in exon 1 and Trp33Arg in exon 2. *EphrinA1* coding sequence contains five exons and encodes 205 amino acids. Protein *EphrinA1* is hydrophilic and instable, and has a signal peptide and a conservative region and no transmembrane region. *EphrinA1* mRNA showed a strong expression in Meishan swine during embryo implantation period. The results suggested that *EphrinA1* might play a role in the regulation of embryo implantation in Meishan swine, and

收稿日期: 2014-07-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201767); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(13)5042]; 国家生猪现代产业技术体系南京综合试验站项目(nycytx-009); 江苏省科技支撑计划项目(BE2012333)

作者简介: 周艳红(1987-), 女, 甘肃白银人, 硕士研究生, 研究方向为动物遗传育种与繁殖。(Tel) 025-84391941; (E-mail) 954268869@qq.com。付言峰为共同第一作者。

通讯作者: 刘红林, (E-mail) liuhonglin@njau.edu.cn; 任守文, (Tel) 025-84390349; (E-mail) shouwenren@163.com

the cSNP is a potential molecular marker affecting swine litter size.

Key words: Meishan swine; embryo implantation; *EphrinA1*; cloning; bioinformatics

猪产仔数是代表养殖水平和经济效益的重要指标。因此,在动物遗传育种的过程中,定位影响母猪产仔数性状的相关基因成为全世界科学家研究的热点之一^[1-2]。从遗传学和经济效益的角度出发,猪繁殖性状是一个非常复杂的性状,而产仔数又是其中最重要的性状^[3-4]。与猪产仔数的关联基因有雌激素受体基因(*ESR*)^[5]、催乳素受体基因(*PRLR*)^[6]、视黄醇结合蛋白4基因(*RBP4*)^[7]、白血病因子(*LIF*)^[8]等。但由于产仔性状遗传力低(10%~15%)^[9],使用传统育种方法并不能很有效地提高产仔数。随着分子生物学技术的发展,标记辅助选择法(Marker-assisted selection, MAS)为分子育种提供了机遇,只要能发现影响重要繁殖性状候选基因的分子标记,就能通过辅助育种有效改良猪的繁殖性状^[10]。

胚胎附植是妊娠建立过程中的重要步骤,因为有很多的胚胎会在这个过程中死亡^[11],而早期胚胎(妊娠第10~30 d)的死亡是导致产仔数下降的一个重要原因^[12],所以胚胎附植期非常重要,研究影响胚胎附植的基因表达十分重要。有研究表明 Eph-Ephrin 系统在人^[13-15]和小鼠^[16]的胚胎附植过程中发挥着重要作用。促红细胞生成素产生肝细胞配体 A1 基因(*EphrinA1*)是 Eph-Ephrin 家族中非常重要的基因,是一个编码多效性细胞的因子,通常在子宫内膜上表达 mRNA 直至产生 *EphrinA1* 蛋白质^[17]。

梅山猪是太湖猪的一个类群,在全球猪种中繁殖率和产仔率最高^[18]。原产于上海嘉定和江苏太仓的梅山猪是最具代表性的种群,具有产仔数多、泌乳能力强、肉质鲜美等优点^[19]。梅山猪每窝产仔数比欧洲母猪多3~5头^[20]。目前,对该猪种的研究主要集中于乳头数、乳房发育、泌乳、断奶时间、卵泡发育、排卵等形态学的观察,以及激素水平对产仔数的影响等。分子水平的研究主要集中于对激素编码基因、激素受体基因及基因的 SNP、QTL 定位等的研究。

本研究拟通过对梅山猪 *EphrinA1* 基因全编码区克隆测序及功能位点的分析,了解其在胚胎附植期对梅山猪产仔率的影响,以期利用梅山猪改良猪种提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试验动物

试验动物来自江苏农林职业技术学院梅山猪保种场,包含9头母猪的卵巢、输卵管、子宫体、子宫内膜等组织。试验猪在同一条件下饲喂,分别在妊娠第13 d、18 d、24 d进行屠宰,屠宰时遵循江苏省农业科学院实验动物操作规定。组织样采集后放于液氮中保存。

1.2 总 RNA 提取与反转录

利用 Trizol 法^[21]提取梅山猪各组织总 RNA,提取步骤严格按照试剂盒(TaKaRa)说明书操作,以2.2%甲醛变性凝胶电泳和紫外分光光度仪检测总 RNA 的纯度和浓度,-70℃保存备用。

cDNA 合成体系:20 μl,反应操作步骤:在冰浴试管中加入反应混合物 Oligo(dT)(0.5 μg/μl)1 μl,总 RNA 3 μg, RNase-free ddH₂O 定容至 12 μl;轻轻混匀后离心 3~5 s,反应混合物在 65℃温浴 5 min 后,冰浴 30 s,然后离心 3~5 s;将试管冰浴,再加 5×Reaction buffer 4 μl, RNase inhibitor (20 U/μl)1 μl, dNTP mix (10 mmol/L) 2 μl, M-MuLVRT (200 U/μl)1 μl;轻轻混匀后离心 3~5 s;在 PCR 仪上 42℃反应 30~60 min 完成 cDNA 合成,终止反应 70℃处理后,置于-20℃冰箱保存。

1.3 引物设计、PCR 扩增及测序

参照 GenBank 中猪 *EphrinA1* 基因(GenBank accession no. NM_001123110)设计引物(F:5'-GCTATGGAGTTCCTCTGGGC-3', R:5'-CTTCACGAGGTCTG-GAGCAG-3')由上海英俊生物公司合成,扩增片段长度 623 bp,PCR 扩增反应条件(94℃、5 min, 94℃、30 s, 60℃、30 s, 72℃、45 s)35 个循环,72℃、7 min, 20℃保持。PCR 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,PCR 产物送往上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.4 克隆

1.4.1 PCR 产物的电泳鉴定、回收纯化及浓度测定 用 1% 琼脂糖凝胶进行鉴定,将目的片段用回收纯化试剂盒(离心柱型)进行回收,按说明书检测回收 DNA 质量,回收产物置于-20℃保存。

1.4.2 连接反应 将回收纯化的 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体上。10 μ l 连接反应体系为 Solution I 5.0 μ l, pMD18-T vector 1 μ l, 纯化的 PCR 产物 3 μ l, 加双蒸水至 10 μ l。混匀, 微离心, 16 $^{\circ}$ C 连接 2 h。

1.4.3 转化 从 -70 $^{\circ}$ C 取出感受态细胞 100 μ l, 置于冰上解冻。向感受态细胞中加入 10 μ l 连接产物, 冰浴 30 min。在 42 $^{\circ}$ C 水浴中放置 45 s, 使用 1.5 ml 离心管延长 60 s, 重新置于冰中静放 2 min, 在上述体系中加入 37 $^{\circ}$ C 预热的 SOC 1 ml, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 1 h, 取 100 ~ 200 μ l 涂布于选择培养基 (一般直径 9 cm 的培养板涂布量不超过 100 μ l)。在 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中过夜培养 16 ~ 24 h。

1.4.4 重组质粒的筛选 将平板中培养 16 ~ 24 h 的大肠杆菌, 选单个菌落挑至玻璃管中的 250 ml 液体培养基中 (含 1 ml 氨苄), 200 r/min 振荡, 37 $^{\circ}$ C 培养 12 ~ 36 h 后进行菌液 PCR, 用琼脂糖凝胶电泳检测, 将 1 ml 合格的菌液送 Invitrogen 公司测序。

1.5 EphrinA1 蛋白质的生物信息学分析

利用 DNAMAN 软件将克隆出来梅山猪 *EphrinA1* 基因的 cDNA 序列与 GenBank 公布的标准序列进行比对, 确定梅山猪该基因的变异位点。利用 GenBank 公布的蛋白序列 (登录号 ABI97191) 进行蛋白功能位点和区域分析 (表 1), 从而筛选引起蛋白重要功能区域变化的变异位点。

利用克隆出来的梅山猪 *EphrinA1* 基因的 cDNA 序列推导出氨基酸序列进行生物信息学分析, 主要分析其信号肽 (SignalP4.0 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 及跨膜区 (TMHMM <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) (表 2)。

表 1 蛋白功能位点和区域预测方法及相关网址

Table 1 The prediction of protein functional sites or domains and related web sites

蛋白结构	预测软件及相关网址
保守功能位点	PROSITE (http://prosite.expasy.org/)
O-糖基化	NetOGlyc (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/)
N-糖基化	NetNGlyc (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/)
磷酸化位点	NetPhos (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/)
蛋白激酶位点	NetPhosK (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/)

表 2 蛋白结构预测及相关网址

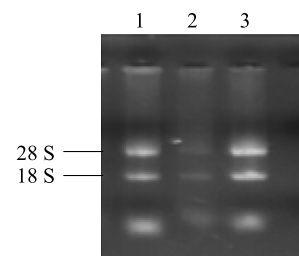
Table 2 The prediction of protein structure and related web sites

蛋白结构	预测软件及相关网址
蛋白质的理化性质	ProtParam (http://web.expasy.org/protparam/)
疏水性	ProtScale (http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl)
信号肽	SignalP4.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)
跨膜区	TMHMM (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/)
保守功能域	CDD (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi)

2 结果与分析

2.1 RNA 提取

组织样中提取的总 RNA 其 OD_{260}/OD_{280} 分别为 2.01、2.00、1.98, 说明提取的 RNA 浓度很高。2.2% 甲醛变性凝胶电泳显示 RNA 质量很好, 可以进行后续的反转录试验 (图 1)。



1、2、3 分别代表梅山猪胚胎附植 13 d、18 d 和 24 d 的子宫内膜附植点。

图 1 梅山猪组织总 RNA 电泳图

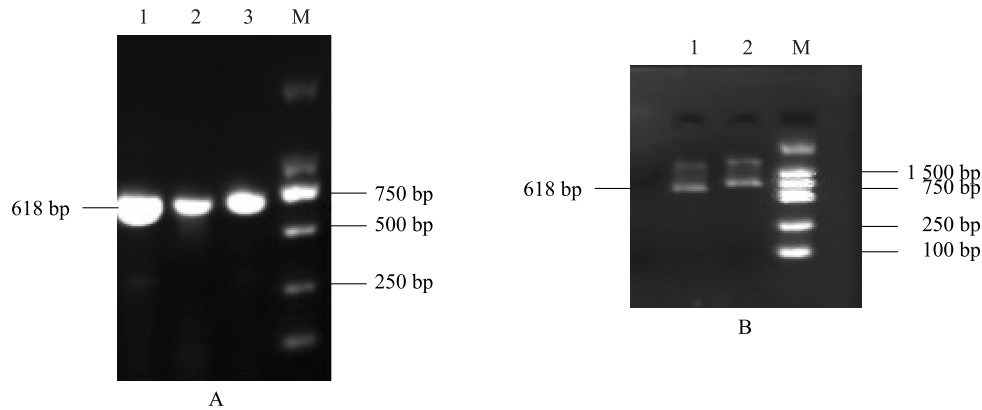
Fig. 1 Electrophoresis profiling of total RNA of Meishan swine

2.2 EphrinA1 基因菌液的 PCR 及 Xho I 和 Not I 双酶切

菌液 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测到一条清晰 618 bp 条带, 与预期的 cDNA 长度一致 (图 2A)。经 Xho I 和 Not I 双酶切得到一条与目的片段相符的片段, 一条与载体片段大小一致的片段 (图 2B), 测序结果与 PMD18-T-EphrinA1 一致。

2.3 梅山猪 EphrinA1 基因 cDNA 扩增

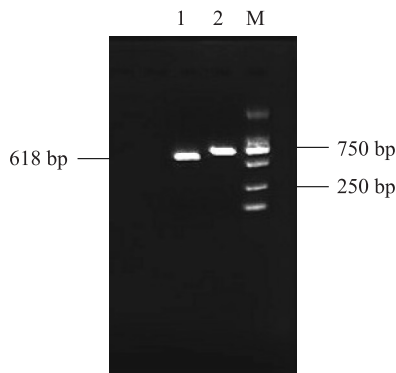
以反转录后得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 得到 1 条特异性较高的目的条带, 大小为 618 bp, 与预期产物相符 (图 3)。



M: Marker; 1~3: 目的基因。

图2 *EphrinA1* 基因菌体 PCR 检测 (A) 和双酶切鉴定 (B)

Fig. 2 Detection of *EphrinA1* gene in bacteria by PCR (A) and double enzyme identification (B)



M: Marker; 1~2: 目的基因。

图3 梅山猪 *EphrinA1* 基因的 PCR 检测

Fig. 3 Detection of *EphrinA1* gene in Meishan swine by PCR

2.4 *EphrinA1* 在胚胎附植期 mRNA 的表达变化

胚胎附植是囊胚后期的胚胎在子宫内经过进一步的发育,迁移,定位于子宫内壁接触附着的过程。猪胚胎附植从第13 d起,到第18 d达到高峰,即滋养层表面形成的微绒毛与子宫内膜进行全面深入的接触,到第24 d基本结束。

从图4可见,在梅山猪子宫内膜附植点,*EphrinA1* 在胚胎附植期(第13~24 d)的 mRNA 表达趋势为先升高后降低,即在胚胎附植早期至中期的过程中表达量持续升高,在胚胎附植中期至晚期的过程中表达量持续降低。妊娠第18 d mRNA 的表达量显著高于其他妊娠日龄($P<0.05$)。表明,*EphrinA1* 的 mRNA 表达在梅山猪胚胎附植调控中可能发挥了一定的作用。

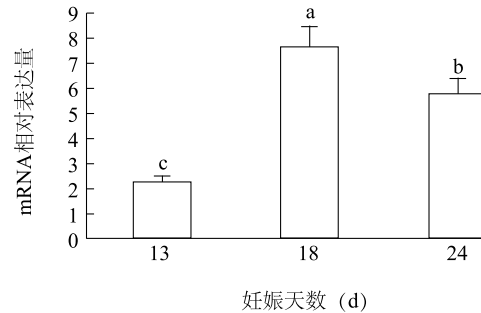


图4 胚胎附植期 *EphrinA1* 的 mRNA 表达

Fig. 4 The expression level of *EphrinA1* mRNA in Meishan swine during embryo implantation

2.5 *EphrinA1* 蛋白的生物信息学分析

2.5.1 蛋白质功能位点区域分析 利用蛋白质功能位点数据库 PROSITE 对梅山猪 *EphrinA1* 基因编码的氨基酸进行结构功能域分析,*EphrinA1* 蛋白糖基化位点为22个O-糖基化位点(分别位于第14、22、27、28、38、58、68、84、105、112、115、125、130、146、148、152、154、178、182、188、204、205号氨基酸)和1个N-糖基化位点(位于第26号氨基酸);*EphrinA1* 蛋白磷酸化位点为:5个丝氨酸磷酸化位点(位于第58、105、125、148、154、188号氨基酸)、2个苏氨酸磷酸化位点(位于第68、112号氨基酸)、5个酪氨酸磷酸化位点(位于第37、46、54、67、128号氨基酸);特异蛋白酶的磷酸化位点:PKC 磷酸化位于148号氨基酸的丝氨酸。

2.5.2 重要变异位点的筛选 梅山猪 *EphrinA1* 基因

编码区共出现 5 个 cSNPs 变异,分别是第 1~92 位碱基的外显子 1,第 93~388 位碱基的外显子 2,第 389~454 位碱基的外显子 3,第 455~505 位碱基的外显子 4 和第 506~618 位碱基的外显子 5。在外显子 1 上第 89 位碱基由 G 突变为 A,导致 29 号氨基酸由 Glu 突变成 Asn;第 91 位碱基由 G 突变为 C,没有引起氨基酸的突变。在外显子 2 上第 101 位碱基由 T 突变为 C,导致 33 号氨基酸由 Trp 变成 Arg;第 208 位碱基由 A 突变成 G,但没有导致氨基酸的突变。在外显子 4 上第 526 位碱基 G 突变成 A,同样没有导致氨基酸的突变。因此这 5 个 cSNPs 变异只有位于 *EphrinA1* 外显子 1 和外显子 2 上的 2 个变异位点导致了氨基酸的突变,分别为 Glu29Asn 和 Trp33Arg。

2.5.3 蛋白基本理化性质分析 ProtParam 在线对该 *EphrinA1* 蛋白的理化性质分析结果见表 3。*EphrinA1* 蛋白脂溶系数为 79.95,表明该蛋白是脂溶性蛋白;不稳定系数为 40.28 (>40),表明 *EphrinA1* 蛋白不稳定^[22];总平均亲水性 (GRAVY) 为 -0.520,表明该 *EphrinA1* 蛋白整体呈现亲水性,为可溶性蛋白^[23]。该蛋白分子式为 $C_{1066}H_{1627}N_{293}O_{306}S_8$, 包含 20 种常见的氨基酸,其中 Leu 含量最高 (11.7%), Met 含量最低 (1.0%)。

表 3 梅山猪 *EphrinA1* 蛋白基本理化性质

Table 3 The basic physico-chemical properties of protein *EphrinA1* in Meishan swine

蛋白质基本性质	预测结果
相对分子质量	23 699.9
理论等电点	6.40
半衰期 (h)	30
不稳定系数	40.28
脂溶指数	79.95
总平均亲水性	-0.520

2.5.4 蛋白质结构预测 克隆的 *EphrinA1* 基因序列是一个开放阅读框 (ORF),起始密码子为 ATG,终止密码子为 TGA,共编码 205 个氨基酸。利用 ProtScale 在线分析该 APN 蛋白的疏水性,结果显示:亲水性区域大于疏水性区域 (图 5),表明该蛋白为亲水性蛋白;SignalP4.0 信号肽分析结果显示,C 剪切位置分值的最大值位于 19 号氨基酸,为 0.606,Y 信号肽分值最大值位于 19 号氨基酸,为 0.703,S 综合分值最大值位于 11 号氨基酸,为 0.896,表明该 APN 蛋

白有信号肽序列 (图 6);TMHMM 预测显示该 APN 蛋白无跨膜区;CDD 发现在 19~148 位氨基酸之间有属于 Ephrin-A_Ectodomain,功能区域位于 Cupredoxin superfamily 上的一个保守区域 (图 7)。

利用 SWISS-MODEL 进行同源建模,得到该 *EphrinA1* 蛋白的三维结构 (图 8),蛋白模型残基由 10~205 个氨基酸组成,与 PDB 蛋白质数据库中模版 3czu.1.B (2.65 Å) 的相似性为 88.39%,衡量其机误的校准值为 0。模型质量评分的复合评分函数 QMEAN 的 Z 值为 -0.19,该数值为负值,说明该 *EphrinA1* 蛋白为非跨膜蛋白。

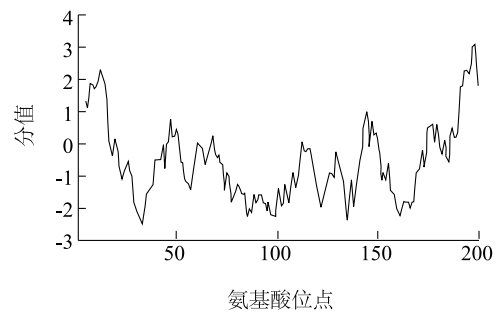
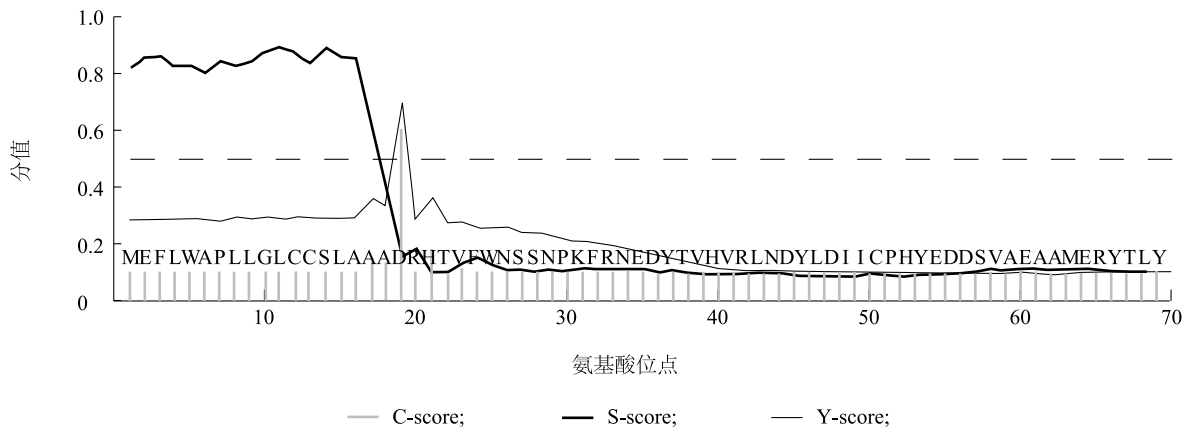
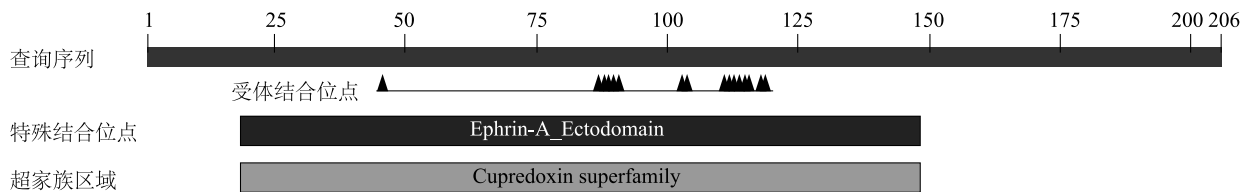


图 5 梅山猪 *EphrinA1* 蛋白疏水性分析

Fig. 5 Hydrophobicity analysis of protein *EphrinA1* in Meishan swine

3 讨论

与野猪相比,梅山猪子宫对胚胎发育有抑制效应且雌激素分泌会控制孕体的大小^[24-25],因此每个孕体所占子宫内膜表面积较小,这可能是其高产仔数性能的重要原因^[26],而孕体本身对子宫的容量不会产生影响^[27]。为了进一步研究影响猪的繁殖性状,本研究通过克隆并分析得到梅山猪 *EphrinA1* 基因有 5 个外显子,编码了 205 个氨基酸,包含有 22 个 O-糖基化位点和 1 个 N-糖基化位点,并且发现有一条信号通路。*EphrinA1* 有 1 个特异蛋白酶的磷酸化位点,PKC 磷酸化位于 148 号氨基酸的丝氨酸及苏氨酸磷酸化位点,可能与这条丝裂原活化蛋白激酶 MAPK 通路有不可分割的关系。因为 MAPK 是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶^[28]。已有研究证实,MAPKs 这条信号转导通路存在于绝大多数细胞内,作用是将细胞外刺激信号转导至细胞及其核内,并且能够引起细胞生物学反应 (如细胞增殖、分化、转化及凋亡等)^[29]。MAPKs 信号转导通

图6 梅山猪 *EphrinA1* 蛋白的信号肽序列Fig. 6 Signal peptide sequence of protein *EphrinA1* in Meishan swine图7 梅山猪 *EphrinA1* 蛋白的保守区域Fig. 7 Meishan swine protein *EphrinA1* conservative areas图8 梅山猪 *EphrinA1* 蛋白的三维结构Fig. 8 Three-D structure of protein *EphrinA1* in Meishan swine

路在细胞内具有生物进化的高度保守性,在低等原核细胞和高等哺乳类细胞内,目前均已发现存在着多条并行的 MAPKs 信号通路^[29],不同的细胞外刺激可使用不同的 MAPKs 信号通路,由此推断它是通过其相互调控而介导不同的细胞生物学反应。因此分析 *EphrinA1* 基因相关功能和结构,可为今后进一步开展基因表达提供理论研究参考。

本研究通过生物信息学方法分析得到了 *EphrinA1* 蛋白的功能位点和区域,发现在19~148位氨基酸之间有一个保守区域属于 Ephrin A Ectodomain 超家族,功能区域位于 Cupredoxin superfamily 上^[30],由此推断,梅山猪 *EphrinA1* 基因上 Glu29Asn 和 Trp33Arg 突变可能会影响到一些蛋白的特异性结合,从而影响 *EphrinA1* 基因功能,类似的研究结果也出现在 *EphA* 基因上^[30]。

实时荧光定量 PCR 结果表明,在猪胚胎附植前期(妊娠 13 d)、中期(妊娠 18 d)和后期(妊娠 24 d),梅山猪子宫内膜附植点均检测到 *EphrinA1* 的 mRNA 表达,且 mRNA 表达趋势为先升高后降低,其中附植中期的表达量显著高于附植前期($P < 0.05$),这与付言峰在大白猪子宫内膜附植点的 *EphrinA1* 的 mRNA 表达趋势一致^[31],表明 *EphrinA1* 很可能参与了梅山猪的胚胎附植调控。另外,在人和小鼠的子宫内膜上,该基因表达量也很高^[32]。关于 *EphrinA1* 基因确切的功能,还需要在细胞水平上通过基因过量表达和沉默技术进行分析。

参考文献:

- [1] 陈克飞,黄路生,李 宁,等. 猪 FSH β 及 ESR 合并基因型对猪产仔数性状的影响[J]. 科学通报,2000,45(18):1963-1965.
- [2] SHI Q S. The progress of major genes research of livestock and poultry[J]. Journal of Hunan Agricultural University, 1999, 25(1): 81-86.
- [3] LINVILLE R C, POMP D, JOHNSON R K, et al. Candidate gene analysis for loci affecting litter size and ovulation rate in swine[J]. Journal of Animal Science, 2001, 79: 60-67.
- [4] CAMPBELL E M G, NONNEMAN D, ROHRER G A. Fine mapping a quantitative trait locus affecting ovulation rate in swine on chromosome 8[J]. Journal of Animal Science, 2003, 81: 1706-1714.
- [5] JOHNSON R K, NIELSEN M K, CASEY D S. Responses in ovulation rate, embryonic survival, and litter traits in swine to 14 generations of selection to increase litter size[J]. Journal of Animal Science, 1999, 77: 541-557.
- [6] ROTHSCCHILD M, JACOBSON C, VASKE D, et al. The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996, 93(1): 201-205.
- [7] PARK K, INOUE T, UEDA M, et al. CD9 is expressed on human endometrial epithelial cells in association with integrins $\alpha 6$, $\alpha 3$ and $\beta 1$ [J]. Molecular Human Reproduction, 2000(6): 252-257.
- [8] GEISERT R, SCHMITT R. Early embryonic survival in the pig: Can it be improved[J]. Journal of Animal Science, 2002, 80: 54-65.
- [9] FRISEN J, HOLMBERG J, BARBACID M. Ephrins and their Eph receptors: multitasking directors of embryonic development[J]. The EMBO Journal, 1999, 18: 5159-5165.
- [10] FUJIWARA H, YOSHIOKA S, TATSUMI K, et al. Human endometrial epithelial cells express ephrinA1: possible interaction between human blastocysts and endometrium via Eph-ephrin system[J]. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2002, 87: 5801-5807.
- [11] RED-HORSE K, KAPIDZIC M, ZHOU Y, et al. EPHB4 regulate schemokineevoked trophoblast responses: a mechanism for incorporating the human placenta into the maternal circulation[J]. Development, 2005, 132: 4097-4106.
- [12] FUJII H, TATSUMI K, KOSAKA K, et al. Eph-ephrin A system regulates murine blastocyst attachment and spreading[J]. Developmental Dynamics, 2006, 235: 3250-3258.
- [13] 付言峰,王爱国,任守文,等. 猪胚胎附植期 EphA4 的组织表达及其多态性对产仔数的影响[J]. 中国农业大学学报, 2013, 18(3): 128-137.
- [14] 颜孝贤,王起山,潘玉春,等. 影响梅山猪繁殖性能的生理结构及遗传因素研究进展[J]. 畜牧兽医学报, 2012, 43(3): 329-335.
- [15] HALEY C S, LEE G J. Genetic basis of prolificacy in Meishan pigs[J]. J Reprod Fertil SUPPL, 1993, 48: 247-259.
- [16] 黄珊珊,乔玉环,郭瑞霞. 丝裂原活化蛋白激酶信号转导通路与子宫内膜癌[J]. Int Obstet Gynecol, 2009, 36: 56-59.
- [17] CHONG H, VIKIS H G, GUAN K L. Mechanisms of regulating the Raf kinase family[J]. Cell Signal, 2003, 15(5): 463-469.
- [18] 邢 军,郭 苹,笪 浩. 小型梅山猪胴体性状和肉质研究[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(10): 170-172.
- [19] HILGER R A, SCHEULEN M E, STRUMBERG D. The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer[J]. Onkologie, 2002, 25(6): 511-518.
- [20] HUANG J F, LIU C Q. Amino acid residue accessibilities and structural conservativeness of molecules in protein family[J]. Zool Res, 1998, 19(2): 137-142.
- [21] 曹建斌. RNA 的提取及 3 种 RNA 提取试剂盒的比较[J]. 科技情报开发及经济, 2008, 18(10): 206-207.
- [22] FU Y F, FU J L, REN Q, et al. Expression of Eph A molecules during swine embryo implantation[J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(3): 2179-2185.
- [23] FU Y F, FU J L, WANG A G. Association of EphA4 polymorphism with swine reproductive traits and mRNA expression of EphA4 during embryo implantation[J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(3): 2689-2696.
- [24] FUJII H, TATSUMI K, KOSAKA K, et al. Eph-ephrin A system regulates murine blastocyst attachment and spreading[J]. Developmental Dynamics, 2006, 235: 3250-3258.
- [25] ROTHSCCHILD M, JACOBSON C, VASKE D, et al. The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(1): 201-205.
- [26] VINCENT A, EVANS G, SHORT T, et al. The prolactin receptor gene is associated with increased litter size in pigs [M]//University of New England: Proceedings of 6th World Congr GenetAppl Anim Prod, 1998.
- [27] ROTHSCCHILD M, MESSER L, DAY A, et al. Investigation of the retinol-binding protein 4 (RBP4) gene as a candidate gene for increased litter size in pigs[J]. Mammalian Genome, 2000, 11: 75-77.
- [28] LIN H, LIU G, WANG A, et al. Effect of polymorphism in the leukemia inhibitory factor gene on litter size in Large White pigs[J]. Molecular Biology Reports, 2009, 36: 1833-1838.
- [29] PARK I T, UEDA M. CD9 is expressed on human endometrial epithelial cells in association with integrins $\alpha 6$, $\alpha 3$ and $\beta 1$ [J]. Molecular Human Reproduction, 2000(6): 252-257.
- [30] YOUNGS C R, FORD S P, MCGINNIS L K, et al. Investigations into the control of litter size in swine I. comparative studies on *in vitro* development of Meishan and Yorkshire preimplantation embryos[J]. J Anim Sci, 1993, 71(6): 1561-1565.
- [31] YOUNGS C R, CHRISTENSON L K, FORD S P. Investigations into the control of litter size in swine II. A reciprocal embryo transfer study of early conceptus development[J]. J Anim Sci, 1994, 72(3): 725-731.
- [32] VALLET J L, KLEMCKE H G, CHRISTENSON R K. Interrelationships among conceptus size, uterine protein secretion, fetal erythropoiesis, and uterine capacity[J]. J Anim Sci, 2002, 80(30): 729-737.

(责任编辑:孙 宁)