

刘磊, 褚钊琛, 李瑞, 等. 牛妊娠相关糖蛋白 20 真核表达及其结构与功能预测 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (10): 32-38.

LIU L, ZHU C C, LI R, et al. Eukaryotic expression, structure and function prediction of pregnancy associated glycoprotein 20 in cows [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (10): 32-38.

牛妊娠相关糖蛋白 20 真核表达及其结构与功能预测

刘磊¹, 褚钊琛², 李瑞², 丁凡², 石雨鹭²,
王哲¹, 尹茉莉¹, 王会岩^{1*}

(1. 吉林医药学院/吉林省抗体工程科技协同创新中心, 吉林 吉林 132013;

2. 吉林医药学院检验学院, 吉林 吉林 132013)

摘要: 旨在真核表达牛妊娠相关糖蛋白 20 (bovine pregnancy associated glycoproteins 20, BoPAG20), 并对蛋白质结构与功能进行预测。参考 GenBank 中 *BoPAG20* 基因密码子进行优化并合成, 构建真核表达载体 pcMV3-*BoPAG20*, 转染至 293F 细胞中进行瞬时表达。SDS-PAGE 和 Western blot 检测表达效果, Ni²⁺ 亲和磁珠纯化蛋白, 用纯化后的蛋白免疫小鼠验证免疫原性, 并对 BoPAG20 结构与功能进行预测分析。结果: 优化后的 BoPAG20 基因长度为 1 143 bp, 编码 380 个氨基酸残基, 密码子适用指数 (CAI) 由原来的 0.77 提高到 0.96, GC 含量由 48.91% 提高到 55.29%; 成功构建了 pcMV3-BoPAG20 真核表达载体, 转染至 293F 细胞中成功表达, 获得 BoPAG20 蛋白相对分子量约为 58 kDa; 纯化后 BoPAG20 蛋白免疫小鼠, 34 d 后测定血清效价达到 1 : 10⁵; BoPAG20 蛋白无跨膜螺旋区, 为分泌性蛋白, 信号肽是 N 端 15 个氨基酸, 存在 6 个糖基化位点 (Ser³⁶、Ser⁵⁶、Ser⁵⁷、Ser⁷⁶、Ser⁸⁰、Thr¹¹⁵) 和 8 个 B 细胞抗原表位, 二级结构由 α -螺旋 (18.68%)、无规则卷曲 (45%) 和延伸链 (30.79%), 无 β -转角; 与 BoPAG20 互作蛋白包括 β -淀粉样蛋白 (APP) 和 β -淀粉样前体蛋白 2 (APLP2)。本研究成功表达并纯化出 BoPAG20 蛋白, 证实其具有良好的免疫原性, 并进行了结构和功能预测, 为该蛋白的结构和功能研究奠定基础。

关键词: 真核表达; 牛妊娠相关糖蛋白; 密码子; 结构与功能预测

中图分类号: Q786 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)10-0032-07

Eukaryotic expression, structure and function prediction of pregnancy associated glycoprotein 20 in cows

LIU Lei¹, ZHU Chuanchen², LI Rui², DING Fan², SHI Yulu²,
WANG Zhe¹, YIN Moli¹, WANG Huiyan^{1*}

(1. Jilin Medical University/Jilin Collaborative Innovation Center for Antibody Engineering, Jilin 132013, China;

2. College of Medicine Laboratory, Jilin Medical University, Jilin 132013, China)

Abstract: In order to expression BoPAG20 (bovine pregnancy associated glycoprotein 20) and to predict its structure and function, the codon of the original BoPAG20 gene in GeneBank was redesigned, optimized and synthesized by bioinformatics techniques. A pcMV3-*BoPAG20* expression vector was constructed and was transfected into 293F cells. SDS-PAGE and Western blot were performed to detect the expression of BoPAG20. Then, BoPAG20 was by Ni²⁺ and its immunogenicity was analyzed by immunological test on mice. Finally, the structure and function of the *BoPAG20* protein were predicted. The results showed that, after codon optimization, the BoPAG20 gene was 1 143 bp long, encoding 380 amino acid residues, that its codon adaptation index (CAI) raised from 0.77 to 0.96 and its G+C content increased from 48.91% to 55.29%. The eukaryotic expression vector pcMV3-*BoPAG20* was constructed successfully and expressed in 293F cell, and the protein size was 58 kDa. The purified BoPAG20 protein had good immunogenicity and its antibody titer was as high as 1 : 10⁵ in mice for 34 days. BoPAG20 was a secretory protein, with no transmembrane helix. The protein had a signal peptide composed of 15 amino acids, six glycosylation sites (Ser³⁶, Ser⁵⁶, Ser⁵⁷, Ser⁷⁶, Ser⁸⁰, and Thr¹¹⁵) and eight B cell epitopes. The secondary structure consisted of

收稿日期: 2023-09-13; 修回日期: 2024-08-11

基金项目: 吉林省科技发展计划项目 (20230203099SF, 20210204186YY); 吉林省教育厅科学技术研究规划项目 (JJKH20210504KJ, JJKH20230535KJ); 吉林市科技创新发展计划项目 (201830853); 吉林医药学院博士启动基金项目 (JYBS2021001LK); 吉林省大学生创新创业训练计划项目 (S202113706038)

第一作者: 刘磊, 男, 博士, 副教授

* 通信作者: 王会岩, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为蛋白质工程, E-mail: jimpewhy@163.com.

α -helix (18.68%), random coil (45%), extended strand (30.79%), respectively, but no β -turn. The proteins that interacted with BoPAG20 were APP and APLP2. In this study, BoPAG20 protein was successfully expressed and purified, with good immunogenicity, and its structure and function were predicted; which laid a foundation for further research on the structure and function of the protein.

Keywords: eukaryotic expression; pregnancy associated glycoproteins; codon; structure and function

牛妊娠相关糖蛋白 (Bovine pregnancy associated glycoproteins, BoPAGs) 是母牛授精怀孕后胎盘组织中的滋养层细胞合成的一类糖蛋白, 属于天冬氨酸蛋白酶家族^[1], 具有至少 22 个不同的转录本以及变异体, 且孕期持续存在, 对维持牛妊娠具有重要作用^[2]。在怀孕早期的母牛外周血中可以检测到妊娠相关糖蛋白 (pregnancy associated glycoproteins, PAGs), 因此, 常作为牛早期妊娠诊断的一种标志物^[3-5]。根据系统发育, PAGs 可以分为: “古代” 和 “现代” 组, 而大多数 PAGs 属于 “现代” 组, 相关研究表明, “现代” PAGs 组的成员可以作为牛血清或牛奶中的生化妊娠指标^[6-7]。BoPAG20 属于 “现代” 组, 基因全长为 1 140 bp 有 1 个 CDS 区, 编码 380 个氨基酸。在国内, 已有学者对 BoPAG1、BoPAG4、BoPAG6、BoPAG7、BoPAG8、BoPAG9、BoPAG16 和 BoPAG19 等进行蛋白的表达研究^[8-14], 而对 BoPAG20 在 293F 细胞中表达纯化以及结构功能预测未见报道。通过化学方法从组织中提取天然的分 PAG20 蛋白非常困难, 但可以通过基因合成并在细胞中表达的方法获得。因此, 本研究主要是通过密码子偏好性优化 *BoPAG20* 基因序列并合成, 构建出真核表达载体 *pcMV3-BoPAG20*, 并成功在 293F 细胞中进行表达并纯化; 通过免疫小鼠测定蛋白的免疫原性, 通过在线软件对其蛋白结构和功能进行预测, 为其结构功能研究以及建立牛早孕快速检测方法提供帮助。

1 材料与方法

1.1 试验材料

凝胶回收和小提试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 蛋白彩虹 Marker 购自武汉赛维尔生物科技有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒购自莱尔生物; DH5 α 感受态细胞、*Taq* DNA 聚合酶和 2000 DNA Marker 购自上海源叶科技有限公司; 限制性内切酶 *Kpn* I、*Xba* I 和 *T4* DNA 连接酶购自北京全式金生物公司; Anti-6 \times His-Tag antibody 和 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 购自武汉菲恩生物科技有限公司; PureLinkTM HiPure Plasmid Midiprep Kit 购自 Thermo Fisher Scientific 公司; Super ECL Detection Reagent 购自翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司; 转染试剂购自北京义翘神州科技股份有限公司; *pcMV3* 真核

表达载体和 293F 悬浮细胞由本中心 -80 $^{\circ}$ C 冻存。

1.2 目的基因密码子的优化和合成

利用在线软件 MaxCodonTM 对 *BoPAG20* 基因密码子 (NCBI: NM_176629.1) 进行优化, 提高密码子适用指数 (CAI), 降低序列中碱基重复结构, 优化后的 *BoPAG20* 基因 5' 端插入 *Kpn* I 酶切位点和 6 \times His 标签序列, 3' 端插入 *Xba* I 酶切位点, 并进行基因合成。

1.3 真核表达载体的构建

提取 *pMD18-T-BoPAG20* 和 *pCMV3* 质粒, 加入各 0.5 μ L *Kpn* I 和 *Xba* I 限制性内切酶进行双酶切, 琼脂糖凝胶电泳切胶回收目的片段, 用 *T4* 连接酶将载体与目的基因连接。总反应体积 10 μ L: 载体 0.2 μ L, 目的基因 0.5 μ L, *T4* 连接酶 1 μ L, 10 \times 连接酶 buffer 1 μ L, H₂O 7.3 μ L。16 $^{\circ}$ C 反应 12 h。吸取连接后产物加入到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中进行 42 $^{\circ}$ C 热激转化, 培养 4 h 后离心将菌液涂于氨苄抗性的固体平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h, 挑取平板上的单个菌落接入液体 LB 培养基中培养并进行菌液 PCR 鉴定, 小提质粒后采用双酶切鉴定。鉴定后进行质粒的大量制备, 并分装 -20 $^{\circ}$ C 冻存。

1.4 质粒瞬时转染和目的基因表达

在 37 $^{\circ}$ C 水浴中快速融化冻存的 293F 细胞, 加入到 250 mL 细胞培养瓶中含有预热的 50 mL Transpro CD01 培养基, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂, 115 r/min 培养, 每天计数并观察活率, 4 d 后当细胞浓度达到 2 \times 10⁶ cells/mL 以上时进行传代。连续传代 4 次, 当活率 > 95% 时, 以 2 \times 10⁶ cells/mL 密度传代, 第 2 天细胞密度达到 4.0 \times 10⁶ cells/mL 时进行瞬时转染。将 50 μ g 质粒和 300 μ L 转染试剂分别加入 1 mL PBS 中, 5 min 后进行混合, 室温静止 5 min 后缓慢滴加到细胞中, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂, 115 r/min 培养, 18 h 后加入 Transpro feed 1 补料 2.5 mL, 4 d 后进行活细胞计数, 当活细胞 < 60% 时停止培养, 离心收集上清液, 并进行 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定。

1.5 重组蛋白的纯化

取 4~6 mL 亲和纯化磁珠, 用磁力架将磁珠和上清液分离, 用平衡液 (50 mmol/L Tris HCl, 50 mmol/L NaCl, pH = 7.4) 洗涤磁珠 2 次, 然后将磁珠加入到细胞上清液中, 室温晃动结合 4 h, 分离磁珠, 加平衡液洗涤磁珠 2 次, 然后加入 1 mL 洗脱液

(50 mmol/L Tris HCl, 50 mmol/L NaCl, 200 mmol/L 咪唑, pH=7.4) 洗涤磁珠, 收集洗涤液, 进行 SDS-PAGE 检测。

1.6 目的蛋白 Western blot 鉴定

先按照凝胶大小裁剪好 PVDF 膜, 并用甲醇活化 1 min, 然后按照 BIO-RAD 半干式电转仪转印说明书进行转印。转印后 PVDF 膜用 5% BSA 室温封闭 2 h 后, 加入 1 μ L 抗 6 \times His 标签小鼠单克隆抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 第 2 天用 1 \times PBST 漂洗 3 次, 每次 5 min, 二抗用 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG, 最后用 ECL 化学发光液在凝胶成像仪上进行显色。

1.7 小鼠免疫及抗体效价测定

选择 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠 4 只, 体重 (20 \pm 2) g, 用弗氏完全佐剂与蛋白等体积混合并乳化, 一免进行腹腔注射 (100 μ g/只), 21 d 改用与弗氏不完全佐剂混合乳化进行二免, 31 d 进行三免。三免后 3 d 采小鼠尾静脉血, 并用 ELISA 方法测定抗体效价。

1.8 结构和功能预测分析

通过在线软件进行蛋白结构与功能预测分析, 详见表 1。

表 1 蛋白质结构功能预测软件

预测	在线软件	网址
理化性质	ProtParam	https://web.expasy.org/protparam/
跨膜结构	TMHMM Server v. 2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/
信号肽	SignalP 5.0 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
糖基化位点	YinOYang 1.2 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/
B 细胞线性表位	IEDB	http://www.iedb.org/
二级结构	PSIPRED	http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/
三级结构	Phyre 2	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/ht-ml/page.cgi?id=index
蛋白质互作	STRING	https://cn.string-db.org/

2 结果

2.1 *BoPAG20* 基因的序列优化合成

利用在线优化软件 MaxCodonTM 对 *BoPAG20* 基因密码子进行优化, 优化后 *BoPAG20* 基因密码子 CAI 由 0.80 提高到 0.96, G+C 含量由 48.91% 提高到 55.29%。优化前后 *BoPAG20* 基因的核苷酸序列全长 1 143 bp, 共编码 380 个氨基酸残基。

2.2 pcMV3-*BoPAG20* 载体鉴定

将提取的质粒进行 PCR 鉴定和 *Kpn* I 和 *Xba* I 双酶切鉴定, 如图 1 所示, 质粒 PCR 后获得 1 143 bp 目的片段, 酶切后载体片段大小为 3 300 bp, 目的基因片段为 1 143 bp, 大小正确, 表明成功构建了真核表达质粒 pcMV3-*BoPAG20*。

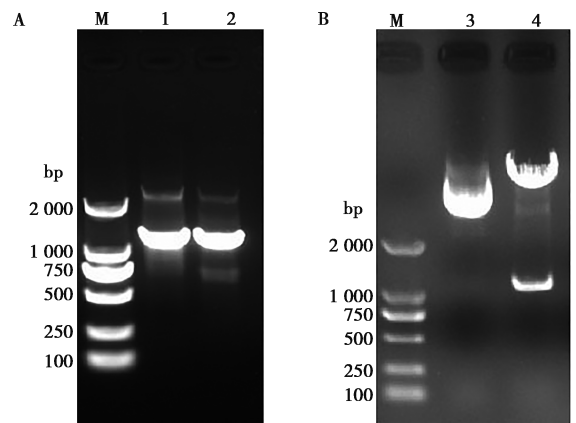
2.3 pcMV3-*BoPAG20* 的瞬时转染

转染后收集细胞上清液, 然后进行 SDS-PAGE 分析, 结果如图 2 所示, 出现大小为 58.0 kDa 的目标蛋白条带。

2.4 目的蛋白的纯化

将磁珠纯化后的蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,

在 58.0 kDa 处出现目标条带, 大小正确, 表明纯化出目的蛋白 (图 3)。



M. DL2000 Marker; 1~2: PCR 扩增产物; 3. pcMV3-*BoPAG20*; 4. pcMV3-*BoPAG20* 双酶切产物。

图 1 重组质粒 PCR (A) 和双酶切鉴定 (B)

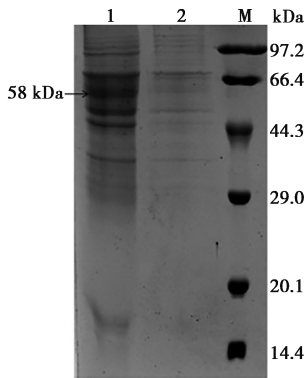


图2 M. 标准蛋白 Marker; 1. pcMV3-BoPAG20 转染后细胞上清液; 2. 空载体转染后细胞上清液。

图2 pcMV3-BoPAG20 瞬时转染结果

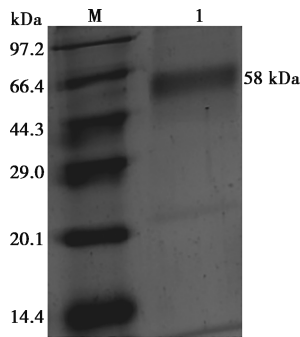


图3 M. 蛋白质 Marker; 1. 纯化后 BoPAG20 蛋白。

图3 BoPAG20 蛋白纯化结果

2.5 Western blot 鉴定

Western blot 鉴定结果显示, 纯化后 BoPAG20 蛋白在 58.0 kDa, 与预期大小相符 (图 4)。

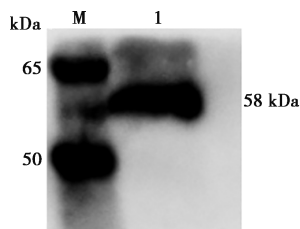


图4 M. 预染蛋白标准; 1. 纯化后蛋白。

图4 Western blot 鉴定

2.6 抗体水平检测

重组蛋白免疫小鼠后采集血清, ELISA 检测结果表明, 在免疫后 35 d 抗体水平达到峰值, 达到 10^5 以上, 抗体水平较高 (图 5)。表明纯化后的 BoPAG20 重组蛋白免疫原性较好。

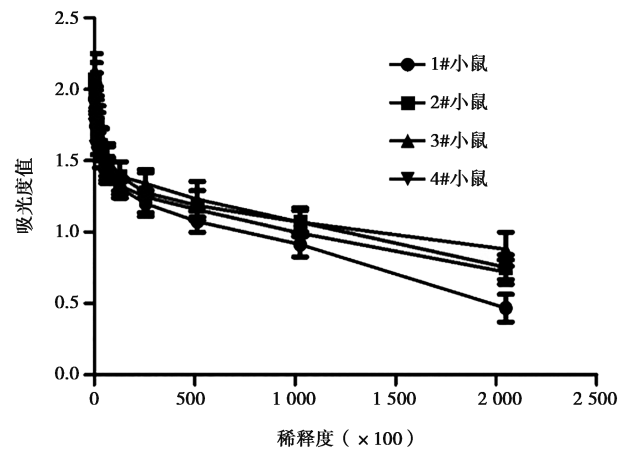


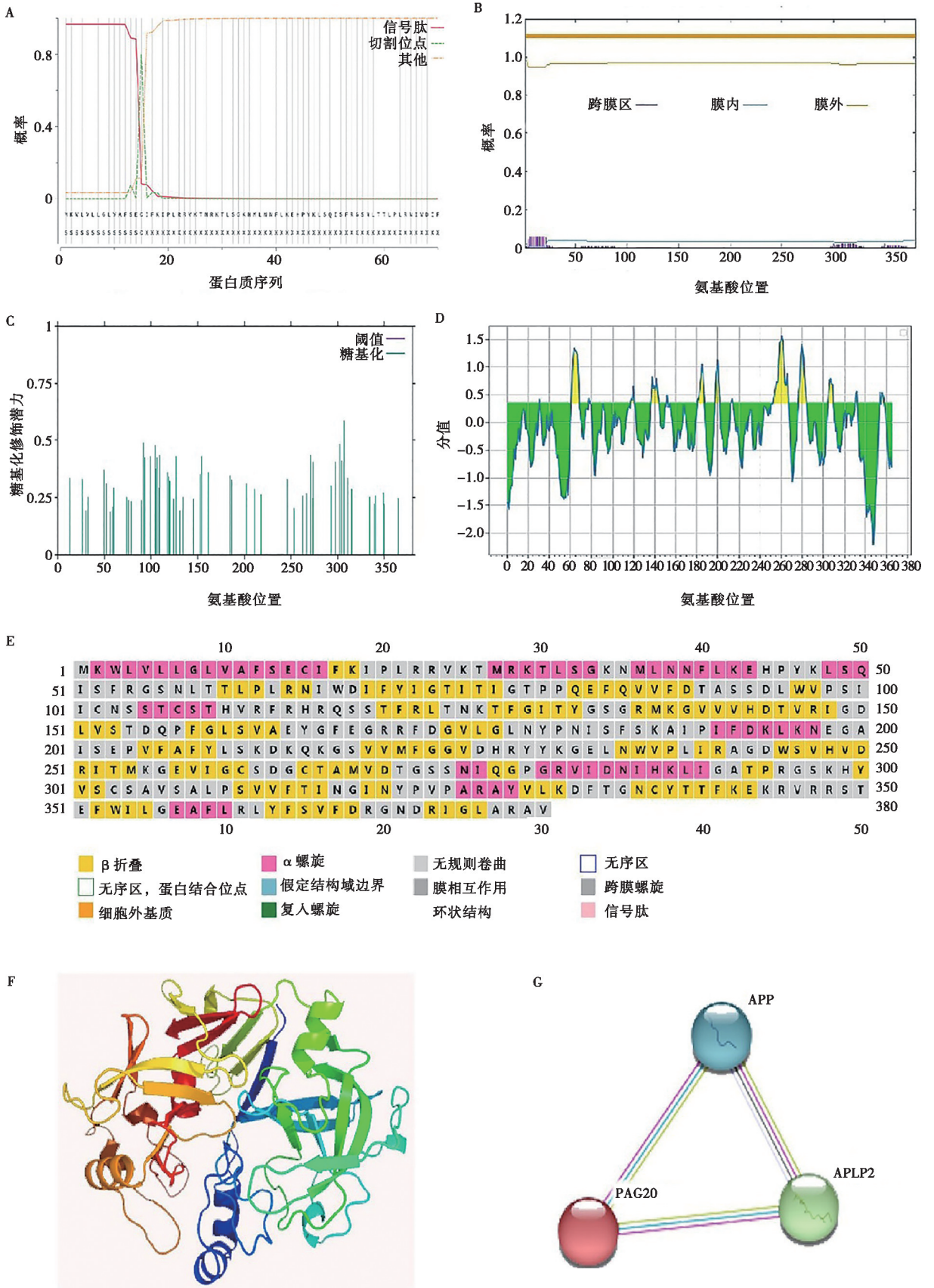
图5 小鼠血清中抗 BoPAG20 蛋白抗体滴度检测

2.7 BoPAG20 蛋白理化性质预测

通过 ProtParam 软件在线分析表明, BoPAG20 蛋白分子量为 42 605.27, 等电点为 9.67, 不稳定性指数计算为 39.89, 脂肪族指数为 86.87, 消光系数为 52 745 L/(mol·cm), 体外半衰期为 30 h。

2.8 BoPAG20 蛋白结构和功能预测

通过 SignalP 5.0 Server 和 TMHMM Server v. 2.0 预测信号肽和跨膜结构域, 结果 N 端 15 个氨基酸序列为信号肽 (图 6A), 没有跨膜结构区 (图 6B)。糖基化位点分析结果表明, BoPAG20 蛋白有 6 处糖基化位点, 分别是 Ser³⁶、Ser⁵⁶、Ser⁵⁷、Ser⁷⁶、Ser⁸⁰ 和 Thr¹¹⁵ 位点 (图 6C)。发现 8 段优势表位多肽为 B 细胞抗原表位 (图 6D)。通过 PSIPRED 和 Phyre 2 软件进行二级结构和三级结构预测, 结果显示, α -螺旋占 18.68%, 无规则卷曲占 45%, 延伸链占 30.79%, 无 β -转角 (图 6E)。蛋白的三级结构预测结果如图 6F。在 STRING 软件中输入蛋白的氨基酸序列, 选择物种, 进行蛋白-蛋白互作预测, 结果显示, β -淀粉样蛋白 (APP) 和 β -淀粉样前体样蛋白 2 (APLP2) 与 BoPAG20 互作 (图 6G)。



A. 信号肽预测; B. 跨膜预测; C. 糖基化位点预测; D. B细胞表位预测; E. 二级结构预测; F. 三级结构预测; G. 互作蛋白预测。

图 6 BoPAG20 蛋白结构和功能预测

3 讨论

目前,在母牛妊娠诊断方面,直肠触诊和超声诊断是比较常用的方法,但是需要有成熟的技术人员,并且仪器设备价格昂贵,限制了在牛场中的广泛应用^[15]。而以 PAGs 为检测标志物的进口试剂盒已经大规模推广应用,并具有较高的准确率^[16],但其价格较高,使大多数牛场望而却步。而在国内 PAGs 的研究起步较晚,在 PAGs 蛋白和抗体相关方面研究较少,从而限制了其在国内的发展。因此,如何才能获取高纯度 PAGs 蛋白,制备出用于检测用单克隆抗体,建立快速的检测方法迫在眉睫。

目前,已有学者从多种哺乳动物胎盘胎子叶中分离出 PAGs 天然蛋白^[17-18],但是步骤繁琐并且得到的蛋白纯度不高,不能够满足后续的研究需要,而体外重组蛋白技术可以解决这一问题。因此,本研究通过体外合成 *BoPAG20* 基因,构建真核表达载体,并在 293F 细胞中表达出 PAG20 蛋白。另外相关研究表明,分泌到血清中 PAGs 蛋白存在着糖基化修饰,导致蛋白的分子量增加,本研究是在哺乳动物细胞 293F 中表达 *BoPAG20* 蛋白,得到蛋白的分子量大于其理论分子量,为 58 kDa,发生了糖基化修饰,这与 Patel 等^[19]和刘长彬等^[12]研究发现 N-糖基化位点修饰导致 *BoPAGs* 蛋白的分子量增加结果一致。

本试验得到的 *BoPAG20* 蛋白免疫小鼠后可以引起良好的免疫应答,表明纯化后 *BoPAG20* 蛋白可以作为抗原免疫小鼠进行杂交瘤细胞制备,为 *BoPAG20* 蛋白单克隆抗体的制备奠定基础。对 *BoPAG20* 蛋白进行蛋白互作分析结果显示,与 *BoPAG20* 互作的蛋白有 2 个,分别是 APP 和 APLP2 蛋白,其中 APP 代谢异常与阿尔茨海默疾病等神经退行性疾病的发生密切相关^[20],而另一种 APLP2 蛋白具有促进哺乳动物神经细胞迁移的作用^[21],但是 *BoPAG20* 是否参与早期神经发育,以及能否作为牛早期妊娠诊断标志物还需要进一步的试验研究。

4 结论

本研究通过对 *BoPAG20* 基因密码子进行优化,并成功在 293F 细胞中表达,纯化后蛋白免疫小鼠具有良好的免疫原性。对其蛋白进行结构和功能预测分析,*BoPAG20* 蛋白具有 6 处糖基化位点和 8 个 B 细胞优势表位,N 端 15 个氨基酸序列为信号肽,且无跨膜结构,其互作蛋白为 APP 和 APLP2。

参考文献:

[1] WALLACE R M, POHLER K G, SMITH M F, et al. Placental

PAGs: gene origins, expression patterns, and use as markers of pregnancy [J]. *Reproduction*, 2015, 149 (3): 115-126.

[2] TELUGU B P, WALKER A M, GREEN J A. Characterization of the bovine pregnancy-associated glycoprotein gene family-analysis of gene sequences, regulatory regions within the promoter and expression of selected genes [J]. *BMC Genomics*, 2009, 10: 185.

[3] 王哲, 王会岩. 奶牛早期妊娠诊断及妊娠相关糖蛋白 (PAG) ELISA 检测技术进展 [J]. *畜牧与兽医*, 2022 (3): 131-134.

[4] OLIVEIRA FILFO R V, FRANCO G A, REESE S T, et al. Using pregnancy associated glycoproteins (PAG) for pregnancy detection at day 24 of gestation in beef cattle [J]. *Theriogenology*, 2020, 141 (1): 128-133.

[5] BARBATO O, MENCHETTI L, BRECCIA G, et al. Using pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) to improve reproductive management: from dairy cows to other dairy livestock [J]. *Animals (Basel)*, 2022, 10 (16): 2033.

[6] YADAV M L, PARASHAR A, MAHANANDIA N C, et al. Aptamers based sensing of pregnancy associated glycoproteins (PAG) of bovine for early pregnancy detection [J]. *Scientific Reports*, 2021, 11 (1): 23193-23204.

[7] KREBS T, KILIC I, MUTZE K, et al. Establishment of a Sandwich-ELISA for simultaneous quantification of bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum and milk [J]. *PLoS One*, 2021, 16 (5): e0251414.

[8] 杨亚军, 王震, 张洁, 等. 牛妊娠相关糖蛋白 *BoPAG1* 的制备及生物信息学分析 [J]. *生物技术*, 2019, 29 (1): 29-34.

[9] 祁文婧, 张帅, 赵鑫, 等. 牛妊娠相关糖蛋白基因 *boPAG4* 的原核表达及单克隆抗体的制备 [J]. *河北农业大学学报*, 2019, 42 (6): 103-108.

[10] 刘长彬, 卢春霞, 石国庆, 等. 牛妊娠相关糖蛋白 6 基因密码子优化及其在 HEK293 细胞中的表达 [J]. *南方农业学报*, 2020, 51 (11): 2597-2606.

[11] 杨亚军, 何金科, 宋胜男, 等. 奶牛妊娠相关糖蛋白 *BoPAG7* 和 *BoPAG8* 的表达及其结构与功能预测 [J]. *畜牧与兽医*, 2020, 52 (8): 56-63.

[12] 刘长彬, 石国庆, 卢春霞. 牛妊娠相关糖蛋白 9 (*bPAG9*) 的真核表达及纯化 [J]. *新疆农业科学*, 2019, 56 (8): 1552-1559.

[13] 刘长彬, 卢春霞, 卢守亮, 等. 牛妊娠相关糖蛋白 16 (*bPAG16*) 基因密码子优化及表达 [J]. *福建农业学报*, 2021, 36 (1): 1-8.

[14] 董媛, 于鸿绪, 陈国良, 等. 牛妊娠相关蛋白 19 真核表达载体的构建及生物信息学分析 [J]. *中国畜牧兽医*, 2022, 49 (4): 1233-1243.

[15] 苏银池, 薛永康, 张震, 等. 奶牛场常用早期妊娠诊断技术研究进展 [J]. *中国奶牛*, 2021, 10 (4): 12-15.

[16] DUFOUR S, DUROCHER J, DUBUC J, et al. Bayesian estimation of sensitivity and specificity of a milk pregnancy-associated glycoprotein-based ELISA and of transrectal ultrasonographic exam for diagnosis of pregnancy at 28-45 days following breeding in dairy cows [J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 2017, 140: 122-133.

[17] KLISCH K, SOUSA N M D, BECKERS J F, et al. Pregnancy associated glycoprotein-1, -6, -7, and -17 are major products of bovine binucleate trophoblast giant cells at midpregnancy [J]. *Molecular Reproduction & Development*, 2010, 71 (4): 453-460.

[18] BELLA A, SOUSA N M, DEHIMI M L, et al. Western analyses of pregnancy - associated glycoprotein family (PAG) in placental extracts of various mammals [J]. Theriogenology, 2007, 68 (7): 1055-1066.

[19] PATEL O V, TAKAHASHI T, IMAI K, et al. Generation and purification of recombinant bovine pregnancy associated glycoprotein [J]. Veterinary Journal, 2004, 168 (3): 328-335.

[20] KAZIM S F, SEO J H, BIANCHI R, et al. Neuronal network excitability in Alzheimer's disease: the puzzle of similar versus divergent roles of Amyloid β and tau [J]. eNeuro, 2021, 8 (2): 1-35.

[21] COLLIN R W J, MARTENS G J M. The amyloid- β precursor-like protein APLP2 and its relative APP are differentially regulated during neuroendocrine cell activation [J]. Molecular and Cellular Neuroscience, 2005, 30 (3): 429-436.



北京大學圖書館
PEKING UNIVERSITY LIBRARY

《中文核心期刊要目总览》2023年版入编通知

《畜牧与兽医》主编先生/女士:

我们谨此郑重通知: 依据文献计量学的原理和方法, 经研究人员对相关文献的检索、统计和分析, 以及学科专家评审, 贵刊《畜牧与兽医》入编《中文核心期刊要目总览》2023年版(即第10版)之畜牧、动物医学、狩猎、蚕、蜂(除草学、草原学)类的核心期刊。

《中文核心期刊要目总览》2023年版从2021年10月开始研究, 研究工作由北京大学图书馆主持, 共32个单位的148位专家和工作人员参加了本项研究工作, 全国各地9473位学科专家参加了核心期刊表的评审工作。经过定量筛选和专家定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1987种核心期刊。

评选核心期刊的工作是运用科学方法对各种刊物在一定时期内所刊载论文的学术水平和学术影响力进行综合评价的一种科研活动。该研究成果只是一种参考工具书, 主要是为图书情报界、出版界等需要对期刊进行评价的用户提供参考, 例如为各图书情报部门的中文期刊采购和读者导读服务提供参考帮助等, 不应作为评价标准。谨此说明。

顺颂

撰安

编号: 2023-J2688

《中文核心期刊要目总览》

2023年版编委会

图书馆

1101081604941

