

睾丸注射法制备携带猪 *PID1* 基因的转基因兔

祝洪磊, 石元, 曾勇庆, 陈伟, 徐正刚, 张哲, 杨云, 张天阳

(山东农业大学动物科技学院, 山东 泰安 271018)

【摘要】 目的 研究磷酸酪氨酸互作结构域 1 (*PID1*) 基因与肌肉脂肪含量的关系, 探究睾丸注射法在转基因动物制备中的可行性。**方法** 将携带猪 *PID1* 基因的重组质粒 pIRES2-acGFP-*PID1* 与转染试剂共孵育后, 对新西兰兔进行了睾丸打点注射试验。对繁殖的 F1 代个体进行了活体荧光检测、PCR 和 western blotting 检测, 以及抽样屠宰进行肌肉脂肪含量等检测; 将 F1 代阳性个体互交, 繁殖了 F2 代兔, 对其进行了阳性率检测以及肌肉脂肪含量检测。**结果** 外源 *PID1* 基因和荧光蛋白基因在后代中均成功表达, 其中, F1 代阳性率为 35.88%, F2 代阳性率为 34.33%; 转基因阳性兔与阴性和空白对照兔相比, *PID1* 蛋白表达水平有所增加, 肌肉脂肪含量有显著提高 ($P < 0.05$)。**结论** *PID1* 基因与肌肉脂肪沉积密切相关, 同时, 进一步证明了睾丸注射法可以用于制备转基因动物, 且外源基因可以稳定遗传。

【关键词】 睾丸注射法; *PID1* 基因; 转基因兔; 肌肉脂肪

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 02-0006-07

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.02.002

Generation of transgenic rabbits expressing swine *PID1* by testicular injection

ZHU Hong-lei, SHI Yuan, ZENG Yong-qing, CHEN Wei, XU Zheng-gang, ZHANG Zhe, YANG Yun, ZHANG Tian-yang

(College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

【Abstract】 Objective The aim of this study was to investigate the relationship between phosphotyrosine interaction domain containing 1 (*PID1*) gene and variation in intramuscular fat (IMF) content and the possibility to generate transgenic animals by testicular injection. **Methods** Expression vector pIRES2-acGFP-*PID1* carrying pig *PID1* gene was incubated with transfection reagents and injected into the testes of male New Zealand rabbits. We examined the F1 generation by fluorescence detection, PCR, Western blotting and measuring the IMF content. The F1 generation gave birth to the F2 generation. Then we examined the F2 generation through detecting the positive rate and the IMF content. **Results** The exogenous *PID1* gene and fluorescent protein gene were expressed at different levels both in the F1 generation and the F2 generation, and the positive rates were 35.88% and 34.33%, respectively. The IMF content was significantly elevated ($P < 0.05$) in the transgenic positive individuals compared with the negative ones and the control group, and the *PID1* protein expression was similarly higher. **Conclusions** The results of this study demonstrate that *PID1* gene affects intramuscular fat content significantly. Moreover, the results of our analysis provide further evidence that transgenic animals can be generated by testicular injection, and the exogenous gene can be inherited steadily.

【Key words】 Intratesticular injection; *PID1* gene; Transgenic rabbit; Intramuscular fat

【基金项目】 国家转基因重大专项 (编号: 2011ZX08006-002, 2013ZX08006-002), 国家高技术研究发展计划“863”重点项目 (编号: 2008AA101008), 山东省现代农业 (生猪) 产业技术体系建设专项 (编号: SDAIT-06-011-02), 山东省农业良种工程重大项目 (编号: 2011LZ013-03)。

【作者简介】 祝洪磊 (1984 -), 男, 硕士研究生, 研究方向: 动物遗传育种。E-mail: zhuhonglei666@163.com

【通讯作者】 曾勇庆教授。E-mail: yqzeng@sdau.edu.cn

睾丸注射法作为精子载体法的一种,是用人工注射的方法将外源基因注入动物睾丸内,使外源基因与睾丸内不同阶段的精子细胞进行转染,最后通过自然交配、人工授精等途径获得转基因动物的过程^[1,2]。1994 年 Sat 等^[3]率先使用该方法制备转基因小鼠。Farre 等^[4]用脂质体包裹目的基因后,通过睾丸注射法对猪睾丸进行注射,获得精子阳性率为 47%、胚胎阳性率为 22%。Giuli 等^[5]通过睾丸注射使外源基因在小鼠精子中获得高表达。为了进一步研究睾丸注射法在转基因技术中的作用,将带有外源基因和荧光蛋白的真核表达载体,通过睾丸注射法转染到新西兰兔的精子细胞中,探讨外源基因在转基因兔中的表达情况。

随着生活水平的不断提高,人们对猪肉品质的要求也越来越高,肌内脂肪是影响肉质风味的重要指标之一。2010 年钱源等^[6]研究发现, *PID1* (磷酸酪氨酸互作结构域 1) 基因与肌内脂肪的沉积显著相关,并且发现其在高肌内脂肪的莱芜猪中的表达显著高于大白猪。*PID1* 基因是通过抑制性消减杂交技术筛选正常人群和肥胖人群腹膜后脂肪组织时发现的差异表达基因^[7],并且在肥胖人群脂肪组织中的表达显著高于正常人群^[8]。Liao 等^[9]发现 *PID1* 基因包含一个磷酸酪氨酸作用位点,与细胞增殖有关。本研究采用睾丸注射法将猪 *PID1* 基因转入新西兰兔中,建立转基因兔模型,旨在研究并验证 *PID1* 基因对肌内脂肪等肉质性状影响的重要功能和育种价值,为进一步制备肌内脂肪显著提高的转基因猪等育种新材料奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

选择 SPF 级成年新西兰公兔 8 只(体重 4.2 ~ 5.0 kg)、母兔 48 只(体重 4.5 ~ 5.0 kg),其中的公兔 6 只为实验组、2 只为空白对照组。实验兔来源于山东鲁抗医药股份有限公司【SCXK(鲁)2013-0001】;实验兔的饲养及测定在山东泰山种兔场和山东农业大学 SPF 级屏障动物实验设施进行【SYXK(鲁)2007-0073】,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

重组质粒 pIRES2-acGFP-*PID1* 由本实验室构建;各种限制性内切酶、连接酶等购自 Fermentas 公司(加拿大);I 抗(*PID1* 抗体、actin 抗体)购自 Abcam 公司(英国),II 抗(HRP 抗体)购自 Sigma 公司

(美国);转染试剂为 Roche 的 X-treme GENE HP(瑞士);其余试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 重组表达载体 pIRES2-acGFP-*PID1* 的制备及鉴定

从莱芜猪背最长肌中提取总 RNA,并反转录成 cDNA。根据 GenBank 公布的猪 *PID1* 基因序列,利用 Primer 5 软件设计特异性引物,扩增目的基因 CDS 区序列。上游引物 MQPID1-F: GGCTG-GAAGATGTGGCAG,下游引物 MQPID1-R: TCAGC-CATCATCGGATTCT。目的基因测序正确后,在引物 5'端分别加入 Bgl II 和 EcoR I 酶切位点及保护碱基。对加入酶切位点的目的基因和 pIRES2-acGFP 质粒分别酶切回收后,用 T4 连接酶连接。

用连接成功的质粒转化大肠杆菌感受态 DH5 α 菌株,并接种卡那霉素(50 μ g/mL)抗性的琼脂平板筛选阳性菌落,LB 培养基扩大培养后,用 Qiagen 的无内毒素质粒大提试剂盒提取质粒。重组质粒通过酶切鉴定和测序鉴定。

1.2.2 睾丸注射重组质粒及后代的出生

注射液用 Roche 的 X-treme GENE HP 转染试剂(μ L)与质粒(μ g)按照 4:1 的比例混合,37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min,添加适当 DMEM 配成。将公兔麻醉后,对其睾丸组织分 3~4 点进行注射。对照组注射等量生理盐水。每周注射一次,共注射 3 次。在相同且适宜的条件下饲养 30 d^[1,10]后,按照公母比例 1:6 进行配种。通过自然交配、重复配种的方法保证受胎率。待母兔产下 F1 代,经过精心饲养,到达性成熟之后,避免近交的前提下,实验组选择健康状况最好、性欲最强的阳性公兔 5 只和阳性母兔 10 只进行互交,繁殖 F2 代个体;F2 代空白对照组选择 F1 代空白对照个体中的 2 只公兔和 5 只母兔繁殖 F2 代。

1.2.3 后代中检测目的基因的表达情况

将存活的刚出生的 F1 代和 F2 代个体在 IVIS Lumina II 成像系统中,观察其体表绿色荧光蛋白的表达情况。

将 F1 代和 F2 代个体,打耳号、采耳组织样,用于提取基因组。根据目的基因 *PID1* 和重组质粒设计两对特异性引物(表 1),以提取的基因组为模板,用特异性引物进行 PCR 扩增,将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,检测子代个体的阳性率。

根据阳性率检测结果,分别提取 F1 代阳性个体、阴性个体、空白对照个体背最长肌组织的蛋白,

进行 SDS-PAGE 电泳,通过 Western blotting 检测蛋白表达情况。I 抗用封闭液稀释 300 倍,II 抗稀释

3000 倍,最后用 TMB 显色剂检测。

表 1 检测目标基因的特异性引物

Tab. 1 Specific primers used to detect the target gene

引物名称 Names	目的片段长度/bp Lengths	引物序列 Primer sequences	退火温度/℃ T _m
PID1	247	F: 5'- TGGCTCGCATCGCCTACT -3' R: 5'- AACTCCTGGGACACCTCTT -3'	58
CMV	271	F: 5'-CCCATAGTAACGCCAATA -3' R: 5'-AGTCAAACCGCTATCCAC -3'	57

1.2.4 后代肌内脂肪含量测定

F1 代个体在同样的饲养管理条件下饲养至 110 d,平均体重达(2.97 ± 0.15) kg 时进行屠宰;F2 代个体在同样的饲养管理条件下饲养至 90d,平均体重达(2.63 ± 0.24) kg 时进行屠宰。根据检测结果,F1 代个体选择 10 只阳性兔、10 只阴性兔、8 只空白对照兔,F2 代个体选择 6 只阳性兔、6 只阴性兔、6 只空白对照兔,进行屠宰并采集相关样品。利用索氏抽提法测定肌内脂肪含量,并用 SPSS 软件对测定数据进行单因素方差分析处理,分析各组肌内脂肪含量的差异。

2 结果

2.1 重组质粒及其鉴定结果

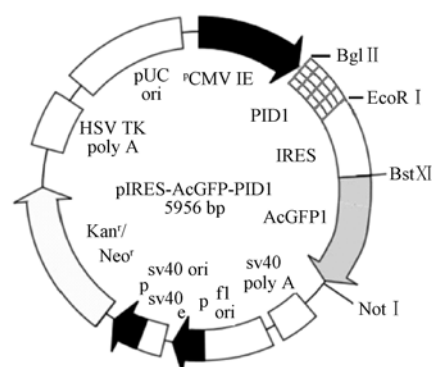
将含有保护碱基和酶切位点的目的基因和 pIRES2-acGFP 空质粒分别双酶切,用 T4 连接酶连接构建重组质粒 pIRES2-acGFP-PID1(图 1)。

重组质粒通过克隆转化,用卡那抗性的 LB 培养基大量扩增,提取重组质粒。一部分用内切酶 Bgl II、EcoR I 进行酶切鉴定,一部分送上海生工测序部测序(图 2)。

2.2 仔代兔荧光、基因组水平和蛋白水平的检测

F1 代和 F2 代仔兔出生后,用 IVIS Lumina II 成像系统对实验组和空白组的试验仔兔进行活体荧光检测。检测结果如图 3 中柱状标尺显示的光强度范围是 531 ~ 1143,两只实验兔光强度范围是 -12 ~ 1238。图中显示,左侧仔兔为转基因阳性兔,其体表尤其是四肢和尾部有荧光表达,右侧仔兔无荧光表达为空白对照组(见图 3)。

根据重组质粒设计两对特异性引物,提取 F1 代和 F2 代个体基因组并作为模板,进行 PCR 扩增,结果显示实验组中部分个体有目的条带呈阳性,部分个体无条带呈阴性,部分测定结果如图 4。F1 代实验组共获得 170 只个体,在饲养过程中死亡 12 只,



注:外源基因连接在 pIRES2-acGFP 载体启动子 CMV 后面,PID1 基因和载体都用限制性内切酶 Bgl II 和 EcoR I 酶切,然后用 T4 DNA 酶连接。

图 1 构建成功的重组质粒示意图

Note: The exogenous gene was inserted behind the CMV, the promoter of the pIRES2-acGFP vector. The PID1 gene and the vector were both digested by Bgl II/EcoR I, and then they were linked by the T4 DNA ligase.

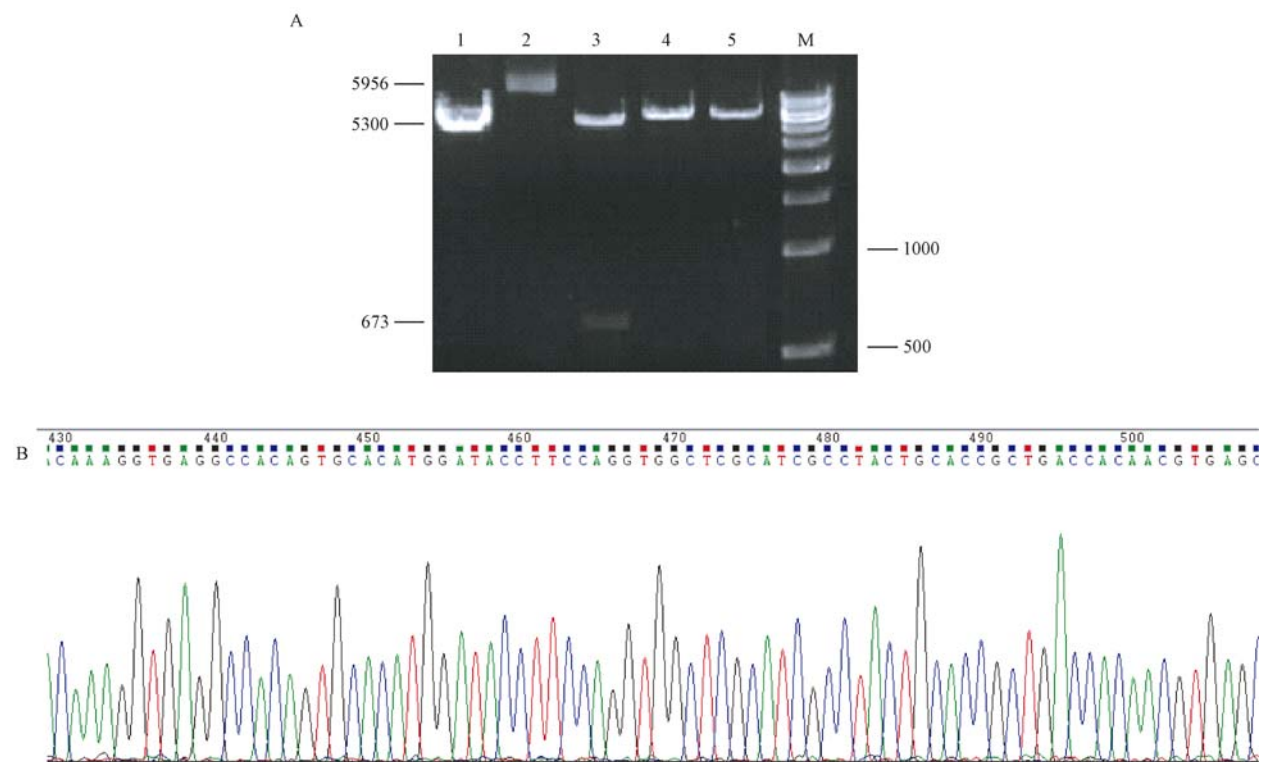
Fig. 1 Schematic diagram of the successfully constructed recombinant plasmids

170 只个体中有阳性个体 61 只,阴性个体 109 只,阳性率为 35.88%;F2 代个体实验组共获得 67 只个体,在饲养过程中死亡 6 只,67 只个体中有阳性个体 23 只,阴性个体 44 只,阳性率为 34.33%(表 2)。

用 F1 代阳性个体、阴性个体、空白对照个体的背最长肌提取组织蛋白,进行 Western blot 检测,结果显示转基因阳性个体的 PID1 蛋白表达增加(图 5)。

2.3 仔代兔肌内脂肪含量检测

对 F1 代和 F2 代阳性兔、阴性兔、空白对照兔的背最长肌中肌内脂肪含量进行测定,结果显示,F1 代和 F2 代阳性兔的肌内脂肪含量相对于阴性兔和空白对照兔有显著提高($P < 0.05$),阴性兔和空白兔差异无显著性(图 6)。



注: A: 重组质粒 pIRES2-acGFP-PID1 用 Bgl II 和 EcoR I 酶切后的凝胶电泳图谱, 1: pIRES2-acGFP 载体, 2: 重组质粒 pIRES2-acGFP-PID1, 3: 重组质粒 Bgl II/EcoR I 酶切反应泳道, 4: Bgl II 酶切反应泳道, 5: EcoR I 酶切反应泳道, M: DNA 分子标准。B: 重组质粒中 PID1 基因的测序鉴定。

图 2 重组质粒 pIRES2-acGFP-PID1 的鉴定

Note: A: 0.8% agarose gel electrophoresis for identification of pIRES2-acGFP-PID1 by Bgl II/EcoR I digestion. “1”: The vector pIRES2-acGFP; “2”: The recombinant plasmids pIRES2-acGFP-PID1; “3”: Bgl II/EcoR I digestion; “4”: Bgl II digestion; “5”: EcoR I digestion; M: DNA marker; B: Sequencing of PID1 in pIRES2-acGFP-PID1 plasmid.

Fig. 2 Identification of the recombinant plasmid pIRES2-acGFP-PID1



注: 用 IVIS Lumina II 成像系统进行荧光检测。左侧是转基因阳性兔, 荧光主要集中在四肢和尾部。右侧是空白对照, 不发荧光。柱状图表示的荧光强度范围是 531 ~ 1143。两只仔兔发出的荧光强度范围是 -12 ~ 1238。

图 3 后代的荧光检测

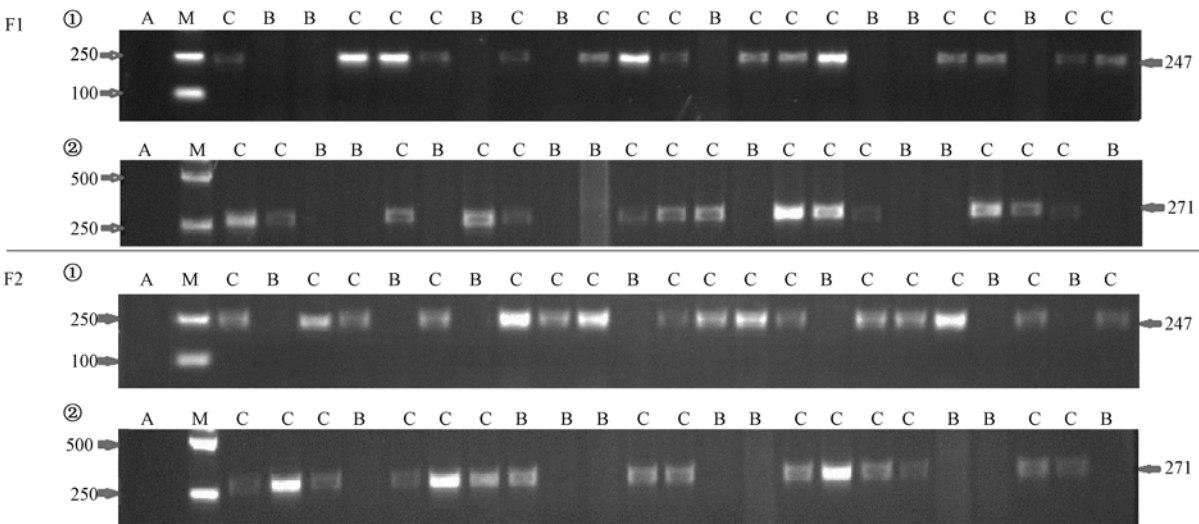
Note: Fluorescence was detected by Caliper IVIS Lumina II. The rabbit on the left is transgenic positive, it fluoresces especially in the limbs and tail. The right one is from the blank control, fluorescence-negative. The column shows a fluorescence intensity range from 531 to 1143. The two rabbits show a fluorescence intensity range from -12 to 1238.

Fig. 3 Fluorescence detection of the offsprings

表 2 后代的出生和检测结果

Tab. 2 The births and testing results of the offsprings

后代 Offspring		F1 代 F1 generation	F2 代 F2 generation
对照组 Control group		48	29
实验组 Test group	阳性兔 Positive rabbit	61	23
	阴性兔 Negative rabbit	109	44
	总数 Total	10	67
	阳性率 Positive rate (%)	35.88	34.33

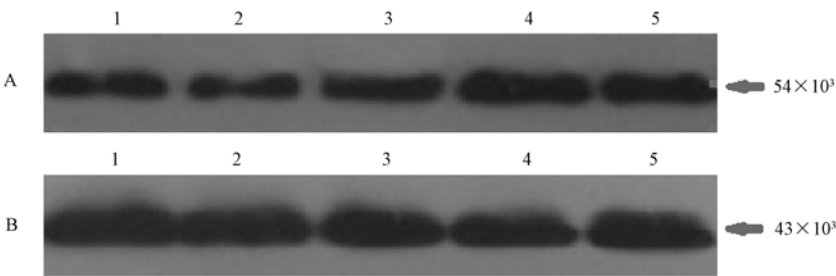


注: F1: F1代, F2: F2代。①PID1 基因 PCR 扩增产物 0.8% 凝胶电泳图谱; ②CMV 基因 PCR 扩增产物 0.8% 凝胶电泳图谱。A: 空白对照, B: 阴性个体, C: 阳性个体, M: DNA 分子标准。

图 4 F1 代和 F2 代的 DNA 水平检测

Note: F1: The F1 generation, F2: The F2 generation. ①0.8% agarose gel electrophoresis for PCR amplification of the primer PID1; ②0.8% agarose gel electrophoresis for PCR amplification of the primer CMV. A: Blank control, B: Transgenic negative individual, C: Transgenic positive individual, M: DNA marker.

Fig. 4 The DNA detection of the F1 and F2 generations

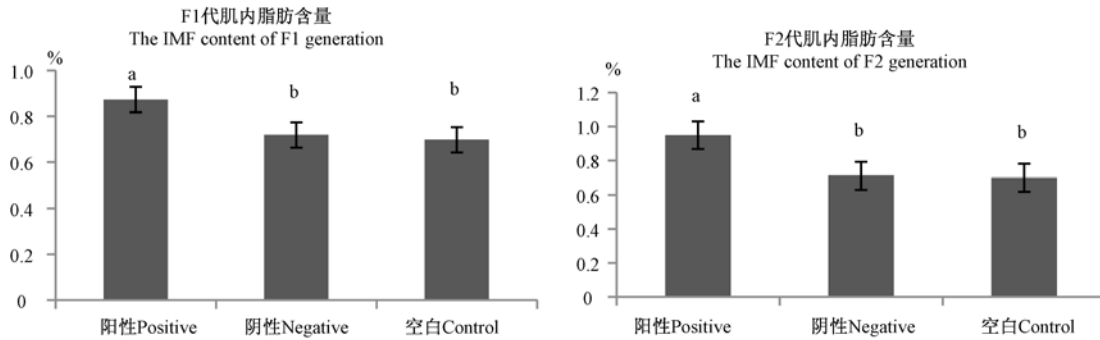


注: A: SDS-PAGE 检测的 PID1 基因的灰度值, 目的片段是 54×10^3 。B: SDS-PAGE 检测的持家基因的灰度值, 参照片段是 43×10^3 。1, 2: 空白对照, 3: 阴性个体, 4, 5: 阳性个体。

图 5 F1 代的 western blotting 检测

Note: A: Gray value of PID1 gene obtained from SDS-PAGE, the target fragment was 54×10^3 . B: Gray value of housekeeping gene obtained from SDS-PAGE, the reference fragment was 43×10^3 . "1" and "2": Blank control, "3": Negative individual, "4" and "5": Positive individual.

Fig. 5 Western blotting detection of the F1 generation



注:同一图片中用不同字母标注的组差异有显著性($P < 0.05$),图中显示了标准误。F1代和F2代的变化趋势相同。与阴性个体和对照组相比,阳性个体的肌内脂肪显著升高,但是阴性个体与对照组差异无显著性。

图6 不同组后代肌内脂肪含量的变化

Note: Different group with a different superscript letter in the same figure differs significantly ($P < 0.05$). Figure shows standard error. The variation tendency of both the F1 and F2 generations is similar. The IMF content is significantly elevated ($P < 0.05$) in the transgenic positive individuals compared to the negative ones and the control group, while there are no significant changes between the negative ones and the control group.

Fig. 6 Variation of intramuscular fat content of the offsprings in different groups

3 讨论

在本研究中,将重组质粒 pIRES2-acGFP-PID1 和转染试剂共孵育后,加入适量的 DMEM 配制成注射液,用 1 mL 注射器直接注射到新西兰兔的睾丸内,通过自然交配获得转基因后代。与传统的睾丸注射法相比,该方法首先将目的基因和转染试剂共孵育,之后再行睾丸注射,从而使目的基因更容易进入精子细胞内,提高了转染效率,保证了后代阳性率^[3,11]。传统的睾丸注射法,是通过手术将睾丸暴露出来,然后进行睾丸注射,之后进行缝合。该研究避免了这一缺点,无需进行手术,直接进行睾丸注射,这是一种改进,降低了感染率,增加了成活率,同时保证了处理公兔繁殖能力的完好。Kim 等^[12]最早用该方法制备转基因猪,并获得成功。Xiang 等^[13]用该方法制备转基因小鼠,在 F1 出生的 52 只小鼠中,有 38.46% 的阳性率;F1 代阳性个体互交,获得 F2 代,阳性率为 36.36%。Farre 等^[4]用该法制备转基因猪,获得 47% 的阳性精子和 22% 的阳性胚胎。高华颖等^[14]获得 85% 的阳性仔兔。李福兵等^[1]获得 66.7% 的阳性山羊胚胎。通过与其他研究结果比较发现,睾丸注射法制备转基因动物具有很高的阳性率,但是也存在明显差异。首先阳性率从 36.36% 到 85% 大小不等,同时胚胎阳性率也存在较大差异。这种差异可能与外源基因的类型和浓度^[1,2],以及实验动物的种类^[1,15]等原因存在一定的关系。

猪肉品质性状的评定指标主要包括肌内脂肪、嫩

度、失水率、滴水损失、pH 值、干物质、肉色等^[16]。肌内脂肪作为影响肉质的关键指标之一,其影响因素很多,有营养因素和遗传因素^[17]。营养因素主要指日粮水平;遗传因素主要是品种间的差异及遗传基因的影响。我国地方猪种相对于引进品种最重要的特性之一在于肌内脂肪含量丰富,尤其以莱芜猪为代表,肌内脂肪平均含量在 10% 以上^[18]。肌内脂肪的沉积与多种基因的相互作用有关,近年来相关研究发现 PID1^[6]、A-FABP^[19]、H-FABP^[20,21]、ADD1^[22]等基因可能与肌内脂肪的沉积密切相关。钱源等^[6]对莱芜猪、鲁莱黑猪和大白猪的研究发现 PID1 基因 mRNA 表达水平与肌内脂肪含量呈显著正相关。

在本研究中,首次通过建立动物模型的方法,研究 PID1 基因与肌内脂肪的关系。在研究中采用睾丸注射法,将重组质粒 pIRES2-acGFP-PID1 与脂质体共孵育后,分多点随机注射到新西兰兔的睾丸中,F1 代获得 35.88% 的阳性率,F2 代获得 34.33% 的阳性率。测定结果表明,转基因阳性个体的肌内脂肪含量相对于阴性个体和空白对照个体有显著提高($P < 0.05$)。本研究不仅进一步证明了睾丸注射法可以用于制备转基因动物,且外源基因可以稳定遗传;而且通过制备转基因动物模型的方式,研究并验证了 PID1 基因对肌内脂肪等肉质性状影响的重要功能和育种价值,并为进一步制备肌内脂肪显著提高的转基因猪等育种新材料奠定了基础。

参 考 文 献

[1] 李福兵,魏泓,孙新民,等. 睾丸内注射 pEGFP-N1 体内转

- 染精子并在山羊早期胚胎成功表达 [J]. 中国实验动物学报, 2005, 13(2):110-113.
- [2] 谢畅, 于明举, 惠楠, 等. 通过睾丸内注射转染外源 DNA 在小鼠精子的表达 [J]. 动物学杂志, 2010, 45(2):151-157.
- [3] Sato M, Iwaseab R, Kasaia K, et al. Direct injection of foreign DNA into mouse testis as a possible alternative of sperm-mediated gene transfer [J]. Anim Biotech, 1994, 5(1):19-31.
- [4] Farre L, Rigau T, Mogas T, et al. Adenovirus-mediated introduction of DNA into pig sperm and offspring [J]. Mol Reprod Dev, 1999, 53(2):149-158.
- [5] Giuli G, Tomljenovic A, Labrecque N, et al. Murine spermatogonial stem cells: targeted transgene expression and purification in an active state [J]. EMBO rep, 2002, 3(8):753-759.
- [6] 钱源, 曾勇庆, 杜金芳, 等. 猪 *PID1* 基因 CDS 区的克隆及其 mRNA 表达与肌肉脂肪沉积关系 [J]. 遗传, 2010, 32(11):1153-1158.
- [7] Qiu J, Ni YH, Gong HX, et al. Identification of differentially expressed genes in omental adipose tissues of obese patients by suppression subtractive hybridization [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 352(2):469-478.
- [8] Wang B, Zhang M, Ni YH, et al. Identification and characterization of NYGGF4, a novel gene containing a phosphotyrosine-binding (PTB) domain that stimulates 3T3-L1 preadipocytes proliferation [J]. Gene, 2006, 379:132-140.
- [9] Liao YC, Si L, White RW, et al. The phosphotyrosine-independent interaction of DLC-1 and the SH2 domain of cten regulates focal adhesion localization and growth suppression activity of DLC-1 [J]. J Cell Biol, 2007, 176(1):43-49.
- [10] 宋天增, 冯静, 曾宪垠, 等. 用注射器直接对睾丸打点注射 EGFP 生产转基因兔的试验研究 [J]. 家畜生态学报, 2010, 31(3):19-23.
- [11] Sato M. Testis-mediated gene transfer (TMGT) in mice: successful transmission of introduced DNA from F0 to F2 generations [J]. Transgenics, 1999, 3:11-22.
- [12] Kim JH, Jung-Ha HS, Lee HT, et al. Development of a positive method for male stem cell-mediated gene transfer in mouse and pig [J]. Mol Reprod Dev, 1997, 46(4):515-526.
- [13] Miao XY, Zhang X. Production of transgenic mice carrying the Thanatin gene by intratesticular injection [J]. BBRC, 2011, 3:429-433.
- [14] 高华颖, 曹阳, 李世辉, 等. 精子介导转基因动物的制备 [J]. 遗传, 2003, 25(3):283-290.
- [15] 阴彦辉, 孙敏, 陈庭锋, 等. 睾丸注射法制备携带山羊 H-FABP 基因的转基因小鼠 [J]. 遗传, 2012, 34(6):727-735.
- [16] 张苏江, 单安山. 猪肉品质的评价指标及其影响因素 [J]. 中国饲料, 2007, 13:30-32.
- [17] 焦传珍. 猪肉质性状影响因素分析 [J]. 广东农业科学, 2009, 9:166-167.
- [18] 李华, 曾勇庆, 魏述东, 等. 猪宰后肌肉 SOD 与 MDA 的变化及其对肉质特性的影响 [J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(3):257-261.
- [19] Gerbens F, de Koning DJ, Harders FL, et al. The effect of adipocyte and heart fatty acid-binding protein genes on intramuscular fat and backfat content in Meishan crossbred pigs [J]. J Anim Sci, 2000, 78(3):552-559.
- [20] 庞卫军, 孙世铎, 李影, 等. 西部地区主要猪种和野猪 H-FABP 基因分子标记与 IMF 含量关系 [J]. 遗传, 2005, 27(3):351-356.
- [21] Zeng YQ, Wang GL, Wang CF, et al. Genetic variation of H-FABP gene and association with intramuscular fat content in Laiwu Black and four western pig breeds [J]. Asian-Aust J Anim Sci, 2005, 18(1):13-16.
- [22] 陈杰, 赵茹茜, 杨晓静, 等. ADD1 基因 PCR-SSCPs 标记与猪肌肉脂肪含量及背膘厚的关系 [J]. 南京农业大学学报, 2004, 27(3):66-69.

[收稿日期] 2013-07-08