

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.01347

猪 *ATF4* 基因多态性与生产性状的关联及基因表达分析

陈超, 吴望军, 熊远著

华中农业大学农业部猪遗传育种重点开放实验室, 武汉 430070

摘要: 为进一步了解和认识 *ATF4* 基因的功能, 揭示 *ATF4* 对猪脂肪代谢的影响, 寻找与肉质性状相关联的分子标记, 文章采用 PCR 方法扩增了 *ATF4* 基因部分序列, 通过序列比对发现在翻译起始密码子 ATG 下游 159 bp 处存在 A159G 转换, 通过 PCR-*Alu* I-RFLP 对大白猪、长白猪、梅山猪和通城猪进行酶切分型, 发现在大白猪和长白猪中均为 AA 基因型, 在梅山猪和通城猪中均为 GG 基因型。进一步对大白猪×梅山 F₂ 群体资源家系进行了酶切分型, 并分析该位点的多态性与生产性状的关系。结果表明, *ATF4* 的多态性与臀部平均膘厚存在极显著相关 ($P<0.01$), 与胸腰椎间膘厚、平均膘厚、眼肌高、眼肌面积存在显著相关 ($P<0.05$)。采用 Real-time PCR 分析了 *ATF4* 基因在大白猪与梅山猪背最长肌不同发育阶段的表达模式。结果表明, *ATF4* 基因在大白猪和梅山猪胚胎期 65 d 和出生后 3 d 中的表达水平相对都比较低, 且在两品种间无明显差异; 而在出生后 60 d 和 120 d, *ATF4* 基因在大白猪中与梅山猪均出现了上调表达, 并且在梅山猪中的相对表达水平要显著高于大白猪。研究结果为进一步深入研究猪 *ATF4* 基因在脂肪代谢中的分子机理奠定了基础。

关键词: 猪; *ATF4*; PCR-RFLP; 关联分析; 表达模式分析

Association of porcine *ATF4* gene polymorphism and production traits and analysis of gene expression

CHEN Chao, WU Wang-Jun, XIONG Yuan-Zhu

Key Laboratory of Swine Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract: In order to understand the function of gene *ATF4* and identify new DNA markers involved in pig production traits, the cDNA fragment of porcine *ATF4* was cloned and sequenced. Sequence comparison revealed an A159G substitution downstream of the initiation codon (ATG). We then carried out PCR-*Alu* I-RFLP analysis in Large white, Landrace, Tongcheng and Meishan pigs, followed by association analysis in F₂ "Large white × Meishan" resource family. In all the individuals tested, Large White and Landrace pigs possessed the AA genotype, while Meishan and Tongcheng pigs possessed the GG genotype. Association analysis in F₂ resource family showed that this site was highly associated with buttock fat thickness (*BFT*) ($P<0.01$) and had significant effect on thorax-waist fat thickness (*TFT*), average backfat thickness (*ABT*), loin eye height (*LEH*), and loin eye area (*LEA*) ($P<0.05$). Real-time PCR was used to analyze the expression patterns of

收稿日期: 2011-01-20; 修回日期: 2011-03-30

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973 计划)项目(编号: 2006CB102102)资助

作者简介: 陈超, 硕士, 专业方向: 分子生物学与分子育种。E-mail: chenchaos341@webmail.hzau.edu.cn

通讯作者: 熊远著, 中国工程院院士, 教授, 研究方向: 动物遗传育种。E-mail: xiongyzh@mail.hzau.edu.cn

网络出版时间: 2011-10-11 9:23:41

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20111011.0923.008.html>

porcine *ATF4* gene in *longissimus dorsi* at different development stages of Large White and Meishan pigs. The results showed that the gene expression levels of *ATF4* were low 65 days after conception and 3 days after birth, but no significant differences were observed in both breeds. Meanwhile, the expression levels of porcine *ATF4* gene were up-regulated 60 days and 120 days after birth in both breeds and the expression level in Meishan pigs was obviously higher than that in Large White pigs. These data could lay the foundation for further study on the molecular mechanism of porcine *ATF4* gene in lipid metabolism.

Keywords: porcine; *ATF4*; PCR-RFLP; association analysis; expression pattern analysis.

随着人们生活水平的提高,国内市场对猪肉品质有了更高的要求,虽然经过数十年选育,猪的生长速度和瘦肉率得到了明显的提高,但是肌内脂肪(Intramuscular fat, IMF)作为影响猪肉感官特性的重要因素^[1],其含量已降低到 1%~1.5%,低于最佳范围 2%~3%^[2],因此如何减少背膘厚的同时增加肌内脂肪含量生产出高品质的猪肉,成为长期以来困扰动物遗传育种学家的一大难题。随着生命科学技术和方法的不断发展,在传统育种方法的基础上结合分子生物学和基因工程方面的技术,给育种工作者提供了一条可行的解决方案。

ATF4(Activating transcription factor 4)亦称 CREB2、C/ATF,属于碱性亮氨酸拉链蛋白家族^[3]。ATF4 调节氨基酸代谢,细胞的氧化还原反应和抗应激反应。在肿瘤细胞中研究发现,在缺氧的情况下,其表达量上升,可能与肿瘤细胞适应缺氧环境有关^[4]。在小鼠中研究发现,ATF4 被作为一种新的软骨细胞 *Ihh* 信号的转录调节因子,通过控制生长板软骨细胞增殖和分化来引导纵骨的生长^[5]。

最近的研究表明,ATF4 在调节肥胖、糖代谢、能量代谢等方面具有重要的作用^[6]。在对 *ATF4* 基因敲除转基因小鼠的研究中发现,通过对脂肪酸 β 氧化代谢通路相关基因表达的检测,增加了脂肪的分解,同时减少了脂肪的合成量,能量代谢相关基因的表达也相应的发生变化^[7],这些现象都暗示着 *ATF4* 基因的缺失对脂肪代谢和能量代谢影响的重要性。目前 *ATF4* 在猪的研究中较少,因此本研究将其作为影响猪脂肪性状的重要候选基因,对该基因进行了 SNP 扫描,并进行了遗传多样性与遗传效应分析,旨在探索其有用的分子标记。同时利用 Real-time PCR 方法对其在大白猪与梅山猪背最长肌

中的表达模式进行了分析。本研究所获得的信息可为进一步开展猪分子育种奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

大白猪、长白猪、大白猪 \times 梅山猪 F_2 均采自华中农业大学精品猪场;用于性状相关性分析的大白猪 \times 梅山猪 F_2 群体的性状测定方法根据《种猪测定原理与方法》的要求进行测定^[8],梅山猪采自上海市嘉定区及华中农业大学精品猪场;通城猪采自湖北省通城县原种猪场;采集大白猪与梅山猪 4 个时期(胚胎 65 d、出生后 3 d、60 d、120 d)背最长肌样,每个时期各 3 头。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取、总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

从猪血液白细胞中提取基因组 DNA,采用常规的酚/氯仿法抽提, -20°C 储存备用。采用 TRIzol 法提取猪背最长肌组织总 RNA,为避免基因组 DNA 对定量结果的影响,将提取的总 RNA 用 DnaseI (Promega 公司)进行去 DNA 处理。10 μL 体系如下:总 RNA 2 μg , DNaseI 2 μL , 5 \times RT buffer 1 μL , DEPC 水补足 10 μL 。反应条件: 37°C 30 min, 然后加入 RQ1 终止液 1 μL , 65°C 10 min, 去除 DNaseI 活性,将处理过的 RNA 用反转录试剂盒(Fermentas 公司)反转录合成 cDNA。

1.2.2 引物设计

根据 NCBI 网站中 *ATF4* 的 mRNA 序列并结合猪全基因组测序公布的序列,利用 Primer5.0 设计引

物。引物 *ATF4*-1230 用于基因序列扩增, 引物 *ATF4*-332 用于基因分型, 引物 *ATF4*-137 和 β -actin-158 分别用于基因定量分析。所有引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成, 引物序列和复性温度见表 1。

1.2.3 PCR 扩增及序列分析

PCR 扩增体系: cDNA 模板 50 ng; *ATF4*-1230 引物(10 μ mol/L)1 μ L; dNTP(10 mmol/L) 0.5 μ L; 10 \times PCR buffer 2.5 μ L; MgCl₂ (25 mmol/L)2 μ L 和 *Taq* DNA 聚合酶 1 U, 加水补足 25 μ L。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 60 $^{\circ}$ C 复性 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 80 s, 40 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 25 $^{\circ}$ C 常温保存。PCR 产物连接到 pMD18-T 载体, 并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取白色单菌落扩大培养后, 菌液 PCR 检测, 进行序列测定(北京六合华大基因科技股份技术有限公司)。

利用 DNAMEN 软件对 3 头梅山猪和 3 头大白猪的测序结果进行序列比对, 寻找有价值的 SNP 位点。

表 1 引物序列

引物名称	序列(5'→3')	复性温度 ($^{\circ}$ C)
<i>ATF4</i> -1230	F: AGTTTCGCCCTCGACATA	60
	R: CTGACCAACCCATCCACA	
<i>ATF4</i> -332	F: CTTAGGGCTCTTAGACGAAT	59
	R: GCATGGTTCCAGGTCA	
<i>ATF4</i> -137	F: ATACAGGGTGAAGTGAAAT	60
	R: GAGTCAGGGCTCATAAGAT	
β -actin-158	F: CCAGGTCATCACCATCGG	60
	R: CCGTGTGGCGTAGAGGT	

1.2.4 PCR-RFLP 分型

PCR 扩增体系: 基因组 DNA 50 ng; *ATF4*-332 引物(10 μ mol/L)1 μ L; dNTP(10 mmol/L) 0.5 μ L; 10 \times PCR buffer 2.5 μ L; MgCl₂(25 mmol/L)2 μ L 和 *Taq* DNA 聚合酶 1 U, 加水补足 25 μ L。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 59 $^{\circ}$ C 复性 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

酶切体系: 6.5 μ L PCR 产物加入 *Alu* I 0.3 μ L (10 U/ μ L) 和 1 \times buffer Tango 1 μ L, 加水补足 10 μ L, 于 37 $^{\circ}$ C 恒温酶切 5 h, 酶切产物用 1.5% 琼脂糖跑胶分型, 记录分型结果。

1.2.5 数据统计分析

依据 Liu^[9]所述方法建立单标记回归统计分析模型, 实验数据运用 SAS(8. 0) 软件的 GLM 程序进行单标记方差的统计分析, 同时运用 REG 程序进行加性效应和显性效应的分析。所选用的模型如下:

$$Y_{ijkl} = \mu + G_i + F_j + S_k + Y_l + b_{ijkl}X_{ijkl} + e_{ijkl}$$

其中, Y_{ijkl} 为性状表型值, μ 为平均值, G_i 为基因型效应; F_j , S_k , Y_l 为固定效应, 分别为性别、年度、家系效应, b_{ijkl} 为屠宰体重或屠宰日龄的回归系数, e_{ijkl} 为残差效应^[10]。

1.2.6 表达谱分析

采用荧光定量 PCR 技术对猪 *ATF4* 基因在大白猪与梅山猪不同发育时期背最长肌中的表达模式进行相对定量分析, 荧光染料为 SYBR Green I (TOYOBO 公司), 以 β -actin 作为内参, 荧光定量 PCR 反应体系为: 引物 F 0.3 μ L (10 μ mol/L), 引物 R 0.3 μ L (10 μ mol/L), SYBR[®] Green Real time PCR Master Mix 10 μ L, 模板 cDNA 1 μ L, 加水补足 20 μ L。配制反应体系过程中注意避光。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 然后 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 复性 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 共 45 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。所得结果用 Light Cycler 480 分析软件 (Roche 公司) 进行分析, 每个待测样品 cDNA 设置 3 个重复, 对得到的 3 个 Ct 值取平均值, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算^[11]。

2 结果与分析

2.1 猪 *ATF4* 基因的克隆及序列分析

以大白猪和梅山猪肌肉组织的总 RNA 为模板, 用引物 *ATF4*-1230 扩增 *ATF4* 基因, 包含部分 CDS 序列和部分 5'UTR 序列。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 扩增片段大小符合预期结果, 扩增产物回收纯化后克隆测序, 测序结果显示片段长度为 1 230 bp。

2.2 猪 *ATF4* 基因的 SNP 研究

运用序列分析软件 DNAMAN 对所获得的大白猪、梅山猪 *ATF4* 基因序列进行比对, 发现了部分潜在 SNP 位点。在起始密码子 ATG 下游 159 bp 处存在 A159G 转换, 引起 *Alu* I 酶切位点 (AG↓CT) 多态性,

测序图谱如图 1 所示。针对该位点设计引物 *ATF4*-332 进行 *Alu* I-RFLP 多态分析。PCR 扩增产物长度为 332 bp, 该位点为 A 时, *Alu* I 酶切后将产生两条带, 长度分别为 260 bp 和 72 bp (A 等位基因); 当该位点为 G 时, 不能被 *Alu* I 酶切, 只有一条片带, 长度为 332 bp (G 等位基因)。猪 *ATF4* 基因的 *Alu* I-RFLP 酶切分型结果见图 2 所示。对扩增的 30 头大白猪和 28 头长白猪进行酶切发现均为 AA 型, 而对扩增的 47 头梅山猪和 10 头通城猪进行酶切的结果均为 GG 型。对大白猪×梅山猪的 F₂ 群体 195 头个体酶切检测发现 AA 基因型 46 头, AG 基因型 88 头, GG 基因型 61 头。

2.3 猪 *ATF4* 基因 *Alu* I-RFLP 基因型与生产性状的相关性分析

利用 SAS 软件 GLM 和 REG 程序, 对大白猪×梅山猪的 F₂ 群体 195 个体与生产性状进行相关性分析,

结果见表 2 所示。*ATF4* 基因多态性与臀部平均膘厚的效应存在极显著相关 ($P < 0.01$), 与胸腰椎间膘厚、平均膘厚、眼肌高、眼肌面积的效应存在显著相关 ($P < 0.05$)。

2.4 猪 *ATF4* 基因在大白猪和梅山猪背最长肌中的表达模式分析

为进一步研究 *ATF4* 基因在大白猪与梅山猪不同发育阶段骨骼肌中的表达情况, 本研究利用引物 *ATF4*-137 和 β -actin-158 进行荧光定量 PCR 分析该基因在中外猪种的表达情况, 结果如图 3 所示。在胚胎期 65 d 和出生后 3 d, *ATF4* 基因在大白猪和梅山猪中表达量都比较低, 两个品种间也无明显差异。在 60 d 和 120 d 时期, 大白猪的表达量相对增加, 而梅山猪表达量极显著的增加, 大白猪与梅山猪在 60 d 和 120 d 时期该基因表达存在明显的差异。

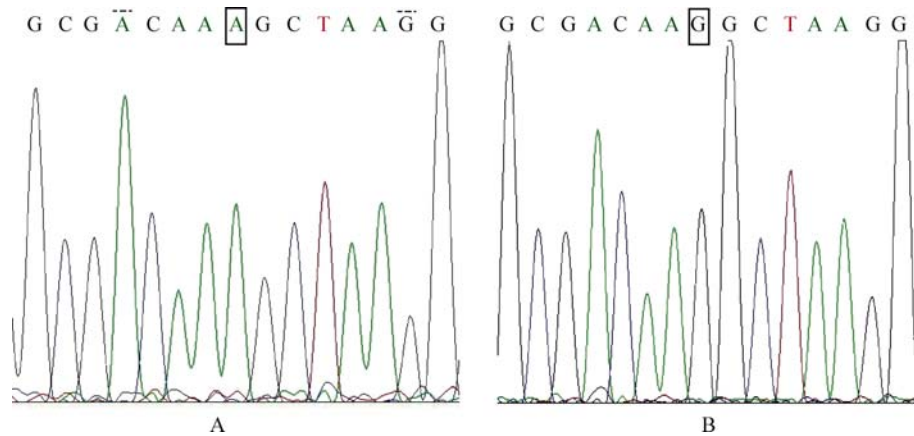


图 1 *ATF4* 基因部分测序结果(正向测序峰图)

A: 大白猪的测序图谱; B: 梅山猪的测序图谱。大白猪和梅山猪中发生转换的碱基用方框标出。

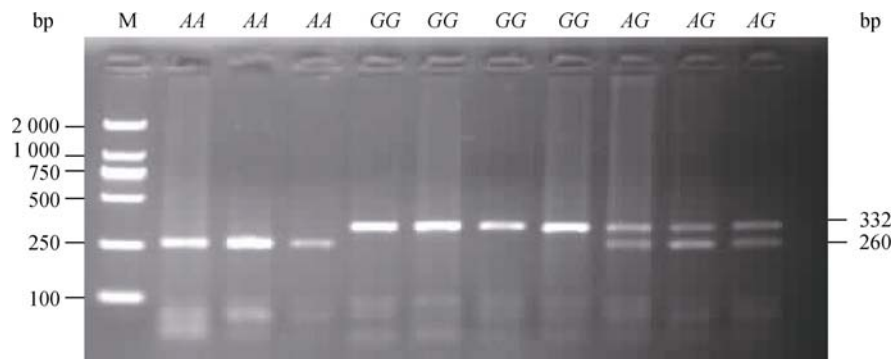


图 2 猪 *ATF4* 基因 *Alu* I-RFLP 多态分型结果

M: DL 2000 Marker。

表 2 猪 *ATF4* 基因 *Alu I*-RFLP 多态性与生产性状的相关性分析

性状	基因型值(最小二乘均值±标准误)			基因效应值(最小二乘均值±标准误)	
	AA	AG	GG	加性效应	显性效应
屠宰率(%)	72.023±0.581	72.894±0.409	73.467±0.506	0.722±0.388	-0.074±0.282
内脂率(%)	2.827±0.1092	3.068±0.077	3.076±0.095	0.125±0.073	-0.058±0.053
至第一颈椎	91.908±0.672	91.782±0.473	91.992±0.585	0.042±0.449	0.084±0.326
至第一肋胸	78.991±0.594	77.592±0.418	78.595±0.517	-0.198±0.397	0.600±0.288
肩部背膘厚	3.416±0.110	3.595±0.077	3.651±0.095	0.117±0.073	-0.031±0.053
6~7 腰椎间背膘厚	2.643±0.088	2.769±0.062	2.834±0.077	0.096±0.059	-0.015±0.043
胸腰椎间背膘厚	1.843±0.087 ^a	2.083±0.061 ^b	2.103±0.075 ^b	0.130±0.058	-0.055±0.042
臀部背膘厚	1.690±0.1046 ^A	2.0273±0.074 ^B	2.057±0.091 ^B	0.183±0.070	-0.077±0.051
平均背膘厚	2.331±0.085 ^a	2.587±0.060 ^b	2.604±0.074 ^b	0.137±0.057	-0.060±0.041
眼肌高(cm)	8.297±0.174 ^a	8.0567±0.123	7.788±0.152 ^b	-0.254±0.117	-0.007±0.084
眼肌宽(cm)	5.755±0.143	5.810±0.101	5.775±0.125	0.010±0.096	-0.022±0.069
眼肌面积(cm ²)	30.911±0.744 ^a	30.244±0.524	28.729±0.647 ^b	-1.091±0.497	-0.212±0.360
皮率(%)	9.096±0.272	9.186±0.192	9.524±0.237	0.214±0.182	0.062±0.132
骨率(%)	12.598±0.349	12.198±0.246	12.350±0.304	-0.124±0.233	0.138±0.169
肥肉率(%)	22.727±0.722	23.769±0.508	23.633±0.628	0.453±0.482	-0.294±0.350
瘦肉率(%)	55.577±0.545	54.845±0.384	54.491±0.474	-0.543±0.364	0.095±0.264
瘦肥肉比例	2.588±0.110	2.439±0.077	2.508±0.096	-0.040±0.073	0.054±0.053

注: 数值上标字母相同表示无显著差异, 字母不同时, 小写字母表示差异显著, 即 $P<0.05$, 大写字母表示差异极显著, 即 $P<0.01$ 。

至第一颈椎: 指耻骨联合前沿至第一颈椎前沿的直线长度, 单位为厘米, 表示胴体直长; 至第一肋胸: 指耻骨联合前沿至第一肋骨与胸骨结合处的直线长度, 单位为厘米, 表示胴体斜长。

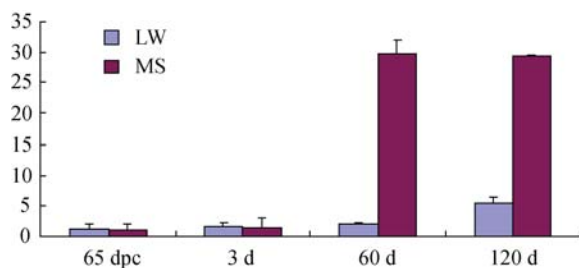


图 3 *ATF4* 基因在大白猪和梅山猪不同发育阶段背最长肌中的表达模式图

3 讨论

ATF 基因家族是真核生物中广泛存在的一类基础转录因子, *ATF4* 作为其中重要的一员, 过去的研究发现 *ATF4* 能够抑制长期记忆、参与内网的应激和细胞的增殖与分化^[12]。近年来, 发现其在调节肥胖、糖代谢、能量代谢等方面具有重要的作用^[6], 尤其是 *ATF4* 敲除的转基因小鼠, 在个体水平上表明 *ATF4* 基因与脂肪代谢和能量代谢有着密切的联系^[7]。虽然现在关于其调控机制还不是很清楚, 但是在不久的

将来随着研究的不断深入, 其调控机制必将水落石出。

脂肪性状作为影响猪肉品质的重要性状之一, 关于调控猪脂肪沉积的机理目前还不清楚, 主效基因还没有确定, 目前可能与脂肪沉积有关的候选基因主要有: *H-FABP*^[13], *LPL*^[14], *PPAR*^[15,16], *DGAT*^[17] 等, 而猪的 *ATF4* 基因位于 5 号染色体 5062591-5064668 位置, 通过对猪的 QTL 数据库进行比对发现, *ATF4* 基因定位于第十肋间背膘厚和采食量相关的 QTL 区域^[18], 与报道的 *PPARα* 基因类似^[19]。因此我们把 *ATF4* 作为影响猪肉品质的候选基因进行研究。

有趣的是在对纯种的大白猪、长白猪、梅山猪和通城猪酶切分析发现, 在大白猪和长白猪中全为 *AA* 基因型而梅山和同城猪中全为 *GG* 基因型, 在大白猪×梅山猪的 F_2 群体 195 个中, *AA* 基因型 46 头, *AG* 基因型 88 头, *GG* 基因型 61 头, 其基因型比值接近孟德尔遗传定律 1 : 2 : 1 的趋势^[20], 符合质量性状的规律, 对于该位点是否在大白猪和长白猪外国种猪

中均为AA型, 梅山猪和通城猪中国地方猪种均为GG型需要进一步扩大群体做进一步验证。在进行的相关性分析中发现, 该位点确实与一些脂肪性状相关。在瘦肉型的大白猪种中A等位基因占优势, 在脂肪型的梅山猪种中G等位基因占优势, 而不同基因型与猪脂肪沉积性状的关联分析却表明GG基因型比AA基因型有更高的胸腰椎间膘厚、臀部背膘厚和平均背膘厚。

在对ATF4不同发育阶段的表达情况研究发现, 在大白猪和梅山猪胚胎期和出生后表达量没有发生明显的变化, 可能是由于在这一时期主要是机体的生长阶段, 肌肉中脂肪沉积相对较少, 而在60 d和120 d时, 梅山猪中该基因的表达量明显高于大白猪, 推测可能是由于作为脂肪型的梅山猪, 其在60 d以后其体重和背膘厚度都呈现明显的上升趋势, 脂肪大量合成^[21], ATF4可能在脂肪合成和沉积中发挥着重要作用, 其基因的表达量在这一时期也是明显的上升, 而作为瘦肉型的大白猪来讲, 其脂肪合成量相对较少, 因此ATF4基因的表达量相对梅山猪较低, 也反映了ATF4在脂肪代谢中的作用。

参考文献(References):

- [1] Fernandez X, Monin G, Talmant A, Mourot J, Lebret B. Influence of intramuscular fat content on the quality of pig meat - 1. Composition of the lipid fraction and sensory characteristics of m. longissimus lumborum. *Meat Sci*, 1999, 53(1): 59-65. DOI
- [2] 姜延志, 刘晓研, 李芳琼, 李学伟. 猪H-FABP基因多态性及其与肌肉脂肪含量的相关研究. *畜牧兽医学报*, 2010, 41(7): 792-796. DOI
- [3] Siu F, Bain PJ, LeBlanc-Chaffin R, Chen H, Kilberg MS. ATF4 is a mediator of the nutrient-sensing response pathway that activates the human asparagine synthetase gene. *J Biol Chem*, 2002, 277(27): 24120-24127. DOI
- [4] Ye J, Koumenis C. ATF4, an ER stress and hypoxia-inducible transcription factor and its potential role in hypoxia tolerance and tumorigenesis. *Curr Mol Med*, 2009, 9(4): 411-416. DOI
- [5] Wang WG, Lian N, Li LZ, Moss HE, Wang WX, Perrien DS, Eleftheriou F, Yang XL. Atf4 regulates chondrocyte proliferation and differentiation during endochondral ossification by activating *Ihh* transcription. *Development*, 2009, 136(24): 4143-4153. DOI
- [6] Seo J, Fortunato ES 3rd, Suh JM, Stenesen D, Tang W, Parks EJ, Adams CM, Townes T, Graff JM. Atf4 regulates obesity, glucose homeostasis, and energy expenditure. *Diabetes*, 2009, 58(1): 2565-2573. DOI
- [7] Wang CX, Huang ZY, Du Y, Cheng Y, Chen SH, Guo FF. ATF4 regulates lipid metabolism and thermogenesis. *Cell Res*, 2010, 20(2): 174-184. DOI
- [8] 熊远著, 邓昌彦. 种猪测定原理与方法. 北京: 中国农业出版社, 1999: 57-118. DOI
- [9] Liu BH. Statistical genomics: linkage, mapping, and QTL analysis. CRC Press, 1998. DOI
- [10] 黄京书, 熊远著. 猪ACTA2基因的克隆、表达分析及其与生产性状的关联. *遗传*, 2009, 31(5): 489-494. DOI
- [11] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408. DOI
- [12] 祁艳梅. 猪CREB家族基因的克隆及表达研究的初步探讨[学位论文]. 武汉: 华中农业大学, 2009. DOI
- [13] Gerbens F, de Koning DJ, Harders FL, Meuwissen TH, Janss LL, Groenen MA, Veerkamp JH, Van Arendonk JA, te Pas MF. The effect of adipocyte and heart fatty acid-binding protein genes on intramuscular fat and backfat content in Meishan crossbred pigs. *J Animal Sci*, 2000, 78(3): 552-559. DOI
- [14] 王刚, 曾勇庆, 武英, 魏述东, 包新见, 刘婵娟, 孙延晓. 猪肌肉组织LPL基因表达的发育性变化及其与肌肉脂肪沉积关系的研究. *畜牧兽医学报*, 2007, 38(3): 253-257. DOI
- [15] Brun RP, Tontonoz P, Forman BM, Ellis R, Chen J, Evans RM, Spiegelman BM. Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. *Genes Dev*, 1996, 10(8): 974-984. DOI
- [16] 柳晓峰, 李辉. PPAR基因与脂肪代谢调控. *遗传*, 2006, 28(2): 243-248. DOI
- [17] 王彦, 许恒勇, 朱庆. 哺乳动物DGAT基因及其生物学功能研究进展. *遗传*, 2007, 29(10): 1167-1172. DOI
- [18] Qi M, Lei T, Zhou L, Chen XD, Long H, Long QQ, Zhang RR, Yang ZQ, Gan L. Cloning, characterization, chromosomal mapping and tissue transcription analysis of porcine CREB2 and CREB3 genes. *Folia Biol*, 2009, 55(4): 137-144. DOI
- [19] Szczerbal I, Lin L, Stachowiak M, Chmurzynska A, Mackowski M, Winter A, Flisikowski K, Fries R, Switoniski M. Cytogenetic mapping of *DGAT1*, *PPARA*, *ADIPOR1* and *CREB* genes in the pig. *J Appl Genet*, 2007, 48(1): 73-76. DOI
- [20] 刘祖洞. 遗传学(第二版). 北京: 高等教育出版社, 1990: 6-17.

- [21] 张 凯, 顾以韧, 刘艾晶, 蒋岸岸, 帅素容, 李明洲, 李学伟. 长白猪和梅山猪脂肪中脂肪沉积相关基因的表
达差异. 畜牧兽医学报, 2010, 41(2): 129-134. [DOI](#)