

猪 *HGD* 基因第 14 外显子单核苷酸多态性与胴体和肉质性状的关系

李建华¹, 杨明生¹, 徐宁迎²

(1 孝感学院 生命科学技术学院, 湖北 孝感 432003; 2 浙江大学 动物科学学院, 浙江 杭州 310029)

[摘要] **【目的】**研究猪 *HGD* 基因第 14 外显子单核苷酸多态性对猪胴体和肉质性状的遗传效应。**【方法】**以金华×皮特兰资源家系 F₂ 代猪为研究材料, 用 PCR-SSCP 方法检测猪 *HGD* 基因第 14 外显子的多态片段, 并分析了猪 *HGD* 基因型间胴体和肉质性状的差异。**【结果】**发现了 3 种基因型(CC、CT 和 TT)。对纯合子个体测序检测发现, 在猪 *HGD* 基因第 14 外显子序列 EF011080 143 bp 处存在 C→T 的单核苷酸变异, 这一变异导致相应的蛋白质序列中脯氨酸(Pro)到丝氨酸(Ser)的替换。在试验猪群中, 等位基因 C 的频率比等位基因 T 高, 为 78.3%; CC 基因型个体占多数, 达 67.3%; 适合性 χ^2 检验表明, 该座位在金华×皮特兰资源家系 F₂ 代猪群体中处于非遗传平衡状态。CT 基因型猪腿臀重分别较 CC 和 TT 基因型猪高 0.33 和 0.45 kg ($P < 0.05$); CT 基因型猪臀背膘厚、眼肌面积、肌肉粗蛋白含量和眼肌电导率分别较 CC 基因型猪高 0.31 cm, 3.29 cm², 0.73% 和 1.38 ($P < 0.05$); CT 基因型猪的眼肌 pH₄₅、腿臀肌肉 pH₄₅ 和腿臀肌温度分别较 CC 基因型猪低 0.26, 0.23 和 1.21 °C ($P < 0.05$)。**【结论】***HGD* 基因可能是影响猪胴体、肉质性状的主效基因或与主效基因紧密连锁的标记基因。

[关键词] 猪; *HGD* 基因; PCR-SSCP; 肉质性状; 胴体性状

[中图分类号] S828.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2008)04-0022-05

Single nucleotide polymorphism of porcine *HGD* gene exon 14 and its association with carcass and meat quality traits

LI Jian-hua¹, YANG Ming-sheng¹, XU Ning-ying²

(1 College of Life Science and Technology, Xiaogan University, Xiaogan, Hubei 432003, China;

2 College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310029, China)

Abstract: **【Objective】**The objective of the present study was to study the genetic effects on porcine carcass and meat quality traits of *HGD* gene exon 14 SNPs. **【Method】***HGD* gene exon 14 polymorphic fragments were detected by PCR-SSCP technique using F₂ generation from the Jinhua×Pietrain resource family. Association analysis of *HGD* gene polymorphism with meat quality and carcass traits was conducted. **【Result】**Three genotypes (CC, CT and TT) were found. The homozygotes were sequenced and one new polymorphic locus (C→T) was found in *HGD* gene exon 14 (EF011080, 143 bp) which changed the amino acid from Pro to Ser. Allele C (78.3%) was higher than allele T and the individuals of genotype CC was in the majority (67.3%) in the experimental pig populations. The polymorphic site of *HGD* gene was not in balance in individuals from the F₂ generation of Jianhua×Pietrain resource family by Chi-square analysis. Ham joint weight of CT genotype pigs was higher than that of CC and TT genotype pigs by 0.33

* [收稿日期] 2007-04-24

[基金项目] 湖北省教育厅优秀中青年人才项目(Q200626001)

[作者简介] 李建华(1969—), 男, 湖北孝感人, 副教授, 博士, 主要从事动物遗传及分子生物学研究。

E-mail: zmkmcn2001@yahoo.com.cn

[通讯作者] 徐宁迎(1956—), 男, 浙江湖州人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物遗传育种研究。

and 0.45 kg respectively ($P<0.05$). Buttocks fat thickness, area of eye muscle, content of crude protein in muscle and eye muscle conductivity of CT genotype pigs were higher than those of CC genotype pigs by 0.31 cm, 3.29 cm², 0.73% and 1.38 respectively ($P<0.05$). Eye muscle pH₄₅ value, ham joint muscle pH₄₅ value and ham joint muscle temperature of CT genotype pigs were lower than those of CC genotype pigs by 0.26, 0.23 and 1.21 °C respectively ($P<0.05$). 【Conclusion】 These results indicate that *HGD* gene may be a candidate gene or a linked marker to a major gene that affects the porcine carcass and meat quality traits significantly.

Key words: pig; *HGD* gene; PCR-SSCP; meat quality trait; carcass trait

猪胴体和肉质性状一直是消费者和生猪生产者共同关心的问题,对养猪业的经济效益有重大影响。大量研究表明,猪胴体和肉质性状受众多基因的影响^[1-3],因此,运用基因定位、生理及生化等资料确定候选基因^[4],并分析这些基因的单核苷酸多态性(SNPs)与猪胴体和肉质性状的关系,对于发现影响猪胴体和肉质性状的遗传标记,实现猪育种的标记辅助选择具有重要意义。

尿黑酸酶(homogentisate oxidase)又名 2,5-二羟苯乙酸 1,2-双加氧酸酶(homogentisate 1,2-dioxygenase, *HGD* 或 *HGO*),主要在肝和肾脏中发挥生理作用,是降解苯丙氨酸(phenylalanine)和酪氨酸(tyrosine)酶中的一种。而这 2 种氨基酸在合成一些蛋白质、激素、色素和神经递质中具有重要作用^[5]。

尿黑酸酶是降解苯丙氨酸和酪氨酸分子的一个关键酶,当苯丙氨酸和酪氨酸被氧化成尿黑酸后,尿黑酸酶可将尿黑酸分解为乙酰乙酸和延胡索酸^[6]。乙酰乙酸和延胡索酸参与酮体和糖的代谢,它们可以被分解成小分子用以产生能量或作为合成机体需要的其他物质的原材料。

尿黑酸酶是由 *HGD* 基因编码的,定位于猪染色体 13 q46-49^[7]。据研究,在猪 13 号染色体的这一区域,有 5 个对猪胴体和肉质有显著影响的数量性状位点(QTL),分别是背脂肪重(BFW)^[8]、屠宰后 24 h 肌电导率(CON24HR)^[2]、屠宰后 45 min 肌电导率(CON45MIN)^[2]、脂肪百分比(FP)^[2]和胴体重(CWT)^[9]。这表明,可将 *HGD* 基因作为候选基因,通过 SNPs 分析揭示该基因与猪胴体和肉质性状的关系。目前,有关 *HGD* 基因单核苷酸多态性与猪胴体和肉质性状的关系研究较少,国内尚未见报道。本研究运用 PCR-SSCP 技术,研究猪 *HGD* 基因第 14 外显子及 3' 端非翻译区部分序列单核苷酸多态性对猪胴体和肉质性状的遗传关系,以期在该片段找到与猪胴体和肉质性状有关的 SNPs 遗传

标记。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 150 头金华×皮特兰资源家系 F₂ 代猪来自浙江大学试验牧场。按饲养标准饲养 160 d 后屠宰。

1.1.2 试剂及仪器 试剂:蛋白酶 K、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP、MgCl₂ (25 mmol/L)、琼脂糖 (Agarose)、去离子甲酰胺、丙烯酰胺(BBI)、甲叉二丙烯酰胺等(用于 DNA 提取、PCR 扩增反应及 SSCP 检测的试剂),均购自上海生物工程有限公司。主要仪器:PCR 扩增仪(Tgradient,德国 Biometra 公司),凝胶成像系统(美国 Alpha innotech 公司),台式高速冷冻离心机(Centrifuge 5804R,德国 Eppendorf 公司),Ultraspec 2000 紫外可见光蛋白核酸分析仪(瑞典 Amersham pharmacia Biotech 公司),电泳仪(Power Pac 1000,美国 Bio-Rad 公司),水平电泳槽(DYY-33A,北京六一仪器厂),垂直电泳槽(DYGZ-28D,北京六一仪器厂),Antaris 傅立叶变换近红外光谱仪(美国尼高力),KP-90 数字式求积仪(KP-90,日本),SP60 积分球式分光光度彩色色差仪(X-Rite,美国),HI98185 便携式防水 pH/mV/ISE/°C 测定仪(意大利)。

1.2 猪血样的采集

屠宰时采集血样,EDTA 抗凝,用常规酚-氯仿抽提法提取样本总基因组 DNA,经 Ultraspec 2000 紫外可见光蛋白核酸分析仪(瑞典 Amersham pharmacia Biotech 公司)进行纯度及浓度检测合格后,贮于-20 °C 冰箱备用。

1.3 猪胴体和肉质性状的测定

屠宰测定根据《种猪测定原理及方法》进行^[10]。所测定的性状包括:胴体重(Carcass weigh, CW)、腿臀重(Ham weigh, HW1)、腿臀肌肉重(Ham muscle weigh, HMW)、腿臀脂肪重(Ham fat

weigh,HFW)、蹄重(Hoof weight,HW2)、胴体长(Carcass length,CL)、肩部背膘厚(Shoulder backfat thickness,SBT)、6~7 肋处背膘厚(6-7 rib backfat thickness,RBT)、胸腰椎间背膘厚(Thorax-waist backfat thickness,TBT)、臀背膘厚(Ham backfat thickness,HBT)、眼肌面积(Longissimus dorsi area,LDA)等 11 个胴体性状和亮度(Lightness, L^*)、红色指数(Redness index, a^*)、黄色指数(Yellowness index, b^*)、色饱和度(Chroma, C^*)、色调(Hue, H^*)、眼肌 pH₄₅(pH₄₅ of longissimus muscle,pH₄₅(LD))、腿臀肌肉 pH₄₅(pH₄₅ of ham,pH₄₅(H))、眼肌温度(Temperature of longissimus muscle,TL)、腿臀肌温度(Temperature of ham,TH)、眼肌电导率(Conductivity of longissimus muscle,CL)、腿臀肌电导率(Conductivity of ham,CH)、系水力(Water holding capacity,WHC)、肌肉脂肪含量(Intramuscular fat,IMF)、肌肉粗蛋白含量(Intramuscular crude protein,ICP)、肌肉水分含量(Intramuscular water,IW)等 15 个肉质性状。

1.4 猪 DNA 样品的 PCR 扩增

1.4.1 引物设计与合成 依照猪 mRNA 序列^[5](GenBank Accession No: BE232117)设计 1 对引物,对包含猪 *HGD* 基因第 14 外显子及 3' 端非翻译区的部分片段进行特异扩增。该引物对为 F(5'-GGCATTATGTTTGAGTCTT-3')和 R(5'-GTGAGTTCTCATTTTAACCA-3')。引物由上海生物工程有限公司合成。

1.4.2 PCR 扩增 以猪基因组 DNA 为模板,用引物 F 和 R 进行 PCR 扩增。PCR 反应总体积为 10 μ L,其中 10 $\times$ Buffer 1.0 μ L,25 mmol/L MgCl₂ 0.7 μ L,10 mmol/L dNTP 0.2 μ L,上、下游引物(浓度为 10 pmol/L)各 0.8 μ L,5 U/ μ L *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μ L,模板 DNA 0.6 μ L (25 ng),加 ddH₂O 至 10.0 μ L。

PCR 扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;然后 94 $^{\circ}$ C 1 min,57 $^{\circ}$ C 40 s,72 $^{\circ}$ C 50 s,循环 35 次;再 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。扩增产物用 2% 琼脂糖电泳检测(100 V,电泳 40 min)。

1.5 猪 *HGD* 基因的 PCR-SSCP 检测

取 5 μ L PCR 扩增产物,加入 7 μ L 变性上样缓冲液(每 100 mL 缓冲液含 95 mL 去离子甲酰胺,0.2 mmol/L EDTA,0.05 g 二甲苯青,0.05 g 溴酚蓝)混匀,于 98 $^{\circ}$ C 变性 8 min,立即冰浴 5 min,取 10 μ L 上样,在质量浓度为 0.12 g/mL 的非变性聚丙烯

酰胺(29:1)凝胶中,恒压 400 V,循环水泵控温至 25 $^{\circ}$ C 以下电泳 8 h,剥胶银染^[11]。银染后用扫描仪将凝胶上的电泳带谱扫描进电脑中保存。

1.6 数据统计分析

用适合性 χ^2 检验检测猪群是否处于哈迪-温伯格平衡状态,用 SAS (9.1)的 GLM 程序对金华 $\times$ 皮特兰资源家系 F₂ 代个体的基因型与肉质性状进行最小二乘法分析^[12],模型如下:

$$y_{ij} = \mu + s_i + g_j + e_{ij}。$$

式中: y_{ij} 表示性状观察值, μ 表示分析性状的群体均值, s_i 表示性别效应, g_j 表示 SNPs 位点的基因型效应, e_{ij} 表示随机残差效应。

2 结果与分析

2.1 猪 *HGD* 基因第 14 外显子的 PCR 扩增结果

猪 *HGD* 基因第 14 外显子 PCR 扩增片段长度为 260 bp,2% 琼脂糖电泳检测表明,扩增条带特异性好,可直接用于 SSCP 检测。

2.2 猪 *HGD* 基因第 14 外显子多态性片段的 PCR-SSCP 分型结果

在 PCR-SSCP 电泳图谱中(图 1),发现有 3 种带型,取其 PCR 产物片段分别进行纯化测序,发现在 *HGD* 基因第 14 外显子(序列 EF011080 143 bp 处)存在 C $\rightarrow$ T 的单核苷酸变异,这一变异导致相应蛋白质序列中的氨基酸发生了脯氨酸(Pro)和丝氨酸(Ser)替换。根据实际测序结果将图 1 中靠上面的两条带型定义为 CC 基因型,靠下面的带型定义为 TT 基因型,同时具有 3 条带的带型(中间的两条带位置重叠)定义为 CT 基因型。

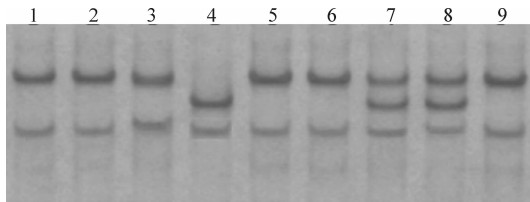


图 1 猪 *HGD* 基因多态片段的 PCR-SSCP 检测结果
1~3,5,6,9. CC 基因型;4. TT 基因型;7~8. CT 基因型

Fig.1 PCR-SSCP test of porcine *HGD* gene polymorphism fragment

1—3,5,6,9. CC genotype;4. TT genotype;7—8. CT genotype

2.3 猪 *HGD* 基因第 14 外显子多态位点等位基因频率及基因型频率

猪 *HGD* 基因第 14 外显子多态位点等位基因频率及基因型频率见表 1。在本试验猪群中,该多态位点等位基因 C 的频率较高,为 78.3%,是等位

基因 T 的 3 倍以上,两者差异极显著($P<0.01$);
CC 基因型个体占多数(67.3%),而 CT 和 TT 基因
型个体较少,经适合性 χ^2 检验, $\chi^2=7.634>\chi^2_{0.01(1)}$
($P<0.01$),差异极显著,表明这 3 种基因型不符合
1:2:1 的比例,该座位在金华×皮特兰资源家系
F₂ 代猪群体中处于非遗传平衡状态。

表 1 猪 *HGD* 基因第 14 外显子等位基因频率和基因型频率

Table 1 Allele frequencies and genotype frequencies for porcine <i>HGD</i> gene exon 14				
基因型 Genotype	检出数 Number	基因型频率/% Genotype Frequency	等位基因 Allele	等位基因频率/% Allele Frequency
CC	101	67.3 A	C	78.3 A
CT	33	22.0 B		
TT	16	10.7 B	T	21.7 B

注:同列数据后不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)。
Note: Values in each line with different superscript capital letters are very significantly different at ($P<0.01$).

2.4 猪 *HGD* 基因第 14 外显子多态位点对胴体和肉质性状的影响

用最小二乘法分析了 150 头金华×皮特兰资源家系 F₂ 代个体 *HGD* 基因第 14 外显子多态位点的基因型与肉质性状的关系,结果见表 2。

由表 2 可以看出,该多态位点形成的 3 种基因型与猪的部分胴体和肉质性状有密切关系。在 11 个胴体性状方面,除胴体长和 6~7 肋处背膘厚外,CT 基因型猪其余 9 个胴体性状的最小二乘均数均大于 CC 和 TT 基因型猪,其中,CT 基因型猪腿臀

重的最小二乘均数显著大于 CC 和 TT 基因型猪($P<0.05$),CT 基因型猪臀背膘厚和眼肌面积的最小二乘均数显著大于 CC 基因型猪($P<0.05$);在肉质性状方面,CT 基因型猪的肌肉粗蛋白含量和眼肌电导率的最小二乘均数显著大于 CC 基因型猪($P<0.05$),CT 基因型猪的眼肌 pH₄₅、腿臀肌肉 pH₄₅ 和腿臀肌温度的最小二乘均数显著小于 CC 基因型猪($P<0.05$),但 CT 及 CC 基因型猪所有肉质性状的最小二乘均数与 TT 基因型猪差异均不显著。

表 2 不同基因型对猪胴体和肉质性状的影响

Table 2 Phenotype value of carcass traits and meat quality traits with different genotype														
基因型 Genotype	胴体性状 Carcass quality traits											肉质性状		
	CW/kg	HW1/kg	HMW/kg	HFW/kg	HW2/kg	CL/cm	SBT/cm	RBT/cm	TBT/cm	HBT/cm	LDA/cm ²	L*	a*	b*
CC	54.06±0.36	7.43±0.06 a	5.53±0.06	1.93±0.45	1.66±0.03	72.17±0.28	4.58±0.10	3.34±0.09	2.32±0.07	2.24±0.08 a	32.7±0.82 a	48.05±0.51	0.39±0.19	9.89±0.20
CT	55.04±0.61	7.76±0.11 b	5.74±0.10	2.10±0.79	1.70±0.06	72.17±0.48	4.92±0.17	3.25±0.14	2.51±0.11	2.55±0.13 b	36.0±1.40 b	49.28±0.88	0.08±0.34	9.83±0.35
TT	53.46±0.91	7.31±0.16 a	5.44±0.15	1.87±0.11	1.52±0.08	72.79±0.71	4.49±0.26	3.32±0.22	2.23±0.17	2.27±0.19 ab	33.5±2.08 ab	48.69±1.31	-0.61±0.50	10.21±0.52

肉质性状 Meat quality traits												
基因型 Genotype	C*	H*	pH ₄₅ (LD)	pH ₄₅ (H)	TL/℃	TH/℃	CL	CH	WHC/%	IMF/%	ICP/%	IW/%
CC	11.29±1.16	88.00±1.22	6.23±0.04 a	6.35±0.04 a	38.91±0.18	39.38±0.30 a	2.83±0.35 a	4.05±0.15	0.59±0.01	2.86±0.18	23.99±0.14 a	72.57±0.22
CT	9.97±2.01	89.78±2.11	5.97±0.07 b	6.12±0.07 b	38.40±0.31	38.17±0.52 b	4.21±0.53 b	4.15±0.23	0.58±0.02	2.61±0.30	24.72±0.24 b	71.97±0.37
TT	10.18±2.99	91.76±3.15	6.30±0.11 ab	6.29±0.10 ab	38.64±0.46	39.65±0.77 ab	2.88±0.87 ab	3.98±0.38	0.53±0.03	2.23±0.49	23.95±0.39 ab	73.11±0.59

注:同列标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。
Note: Values in each line with different superscripts are significantly different at $P<0.05$.

3 结论与讨论

HGD 基因单核苷酸多态性丰富,它的改变有可能会引起尿黑酸酶活性的改变,从而引起动物生理生化等方面的改变。在人 *HGD* 基因中,已发现有 40 多个突变与人的尿黑酸酶活性有关,这些突变大多发生在被称为“突变热点”的 CCC 或 GGG 三联体上^[13-14]。本研究在猪 *HGD* 基因第 14 外显子上

发现的单核苷酸变异,导致了所编码氨基酸的改变,但突变位点并不在上述“突变热点”之中。

经对比分析发现,本试验在猪 *HGD* 基因第 14 外显子上发现的 SNPs 与 Ponsuksili 等^[15] 在猪 *HGD* 基因上发现的 SNPs 相同。在本研究中,该 SNPs 所产生的基因型对猪腿臀重、臀背膘厚、眼肌面积、眼肌 pH₄₅、腿臀肌肉 pH₄₅ 和腿臀肌温度等胴体和肉质性状有显著影响,与 Ponsuksili 等^[15] 的研

究结果一致。*HGD* 基因该位点的多态性影响猪胴体和肉质性状的原因可能有二:其一是该多态位点碱基改变造成的氨基酸变化影响了 *HGD* 基因表达产物尿黑酸酶的活性,改变了动物体内苯丙氨酸和酪氨酸的代谢速度和路径,并进而影响了猪某些胴体和肉质性状;其二是该多态位点与其他影响猪肉质和胴体性状的主效基因紧密连锁,该多态位点可作作为这些主效基因的标记位点。

哈迪-温伯格定律又被称为遗传平衡定律或基因平衡定律,是群体遗传学和数量遗传学理论的基石。群体大小、突变、选择、迁移和遗传漂变等是决定群体是否处于遗传平衡状态的原因。与 *HGD* 基因密切相关性状受到过较高压力的选择,可能是该多态位点在金华×皮特兰资源家系 F_2 代猪群处于非遗传平衡状态的重要原因。

在本研究一定样本量的群体试验中,*HGD* 基因第 14 外显子多态导致猪胴体和肉质性状呈现不同程度的差异,结合猪 *HGD* 基因定位区域的 QTL 分布情况^[7-9],本研究可以得出以下结论:*HGD* 基因可能是影响猪胴体、肉质性状的主效基因或与主效基因紧密连锁的标记基因,可作为分子标记,用于猪胴体、肉质性状的辅助选择。

[参考文献]

- [1] Stearns T M, Beever J E, Southey B R, et al. Evaluation of approaches to detect quantitative trait loci for growth, carcass, and meat quality on swine chromosomes 2, 6, 13, and 18. I. Univariate outbred F_2 and sib-pair analyses [J]. *J Anim Sci*, 2005, 83(7): 1481-1493.
- [2] Band G O, Guimarães S E F, Lopes P S, et al. Relationship between the Porcine Stress Syndrome gene and pork quality traits of F_2 pigs resulting from divergent crosses [J]. *Genetics and Molecular Biology*, 2005, 28(1): 88-91.
- [3] Mullen A M, Stapleton P C, Corcoran D, et al. Understanding meat quality through the application of genomic and proteomic approaches [J]. *Meat Science*, 2006, 74(1): 3-16.
- [4] 姚 毅, 雷承志, 尹君亮, 等. 新疆细毛羊和陕北细毛羊毛细度候选基因的 PCR-SSCP 分析 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2006, 34(12): 14-18.
Yao Y, Lei C Z, Yin J L, et al. The PCR-SSCP analysis about the candidate gene of the fineness of wool in the fine-wool

- sheep breeds of Xinjiang and Shaanbei [J]. *Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition*, 2006, 34(12): 14-18. (in Chinese)
- [5] Edwin J A, Veldhuizen, Frederic H, et al. Steady-state kinetics and inhibition of anaerobically purified human homogentisate 1,2-dioxygenase [J]. *Biochem J*, 2005, 386: 305-314.
- [6] Borowski T, Georgiev V, Siegbahn P E M. Catalytic reaction mechanism of homogentisate dioxygenase: a hybrid DFT study [J]. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 17303-17314.
- [7] Wimmers K, Ponsuksili S, Blaser U, et al. Chromosomal assignments for porcine genes encoding enzymes in hepatic metabolic pathways [J]. *Animal Genetics*, 2002, 33: 255-263.
- [8] Yue G, Russo V, Davoli R, et al. Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* chromosome 13 [J]. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 2003, 120(1): 103-110.
- [9] Malek M, Dekkers J C, Lee H K, et al. A molecular genome scans analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. I. Growth and body composition [J]. *Mammalian Genome*, 2001, 12(8): 630-636.
- [10] 熊远著. 种猪测定原理及方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1999.
Xiong Y Z. Principles and methods of breeding-swine testing [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1999. (in Chinese)
- [11] 许绍斌, 陶玉芬, 杨昭庆, 等. 简单快速的 DNA 银染和胶保存方法 [J]. *遗传*, 2002, 24(3): 335-336.
Xu S B, Tao Y F, Yang Z Q, et al. A simple and rapid methods used for silver staining and gel preservation [J]. *Hereditas (Beijing)*, 2002, 24(3): 335-336. (in Chinese)
- [12] 黄 燕, 吴 平, 汪 安, 等. SAS 统计分析及应用 [M]. 北京: 机械工业出版社, 2006: 106-185.
Huang Y, Wu P, Wang A, et al. Statistical analysis and application of SAS [M]. Beijing: Machinery Industry Press, 2006: 106-185. (in Chinese)
- [13] Andrea Z, Daniel B, Valero D B, et al. High frequency of Alkaptonuria in slovakia; evidence for the appearance of multiple mutations in HGO involving different mutational hot spots [J]. *Am J Hum Genet*, 2000, 67: 1333-1339.
- [14] Ladjouze R A, Rodriguez de C S, Aquaron R. Ochronotic rheumatism in Algeria; clinical, radiological, biological and molecular studies-a case study of 14 patients in 11 families [J]. *Joint Bone Spine*, 2006, 73: 284-292.
- [15] Ponsuksili S, Chomdej S, Murani E, et al. SNP detection and genetic mapping of porcine genes encoding enzymes in hepatic metabolic pathways and evaluation of linkage with carcass traits [J]. *Animal Genetics*, 2005, 36: 477-483.