

网络出版时间:2013-08-26 17:51

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20130826.1751.014.html>

秦川牛 *PYGM* 基因的表达及其遗传变异 对胴体和体尺性状的影响

牛富彪,王丽君,杨菁,陈玲,王洪亮,贺花,刘小林

(西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100)

【摘要】 **【目的】**以秦川牛糖原磷酸化酶基因 *PYGM* 为候选基因,研究其在秦川牛生长和胴体性状形成中的作用。**【方法】**以 300 头(24±2)月龄纯种秦川牛为试验材料,通过 DNA 测序和 PCR-RFLP 技术,研究 *PYGM* 基因的多态性对秦川牛个体宰前活体质量、胴体质量、体高、体斜长和屠宰率共 5 个性状的影响;运用 RT-PCR 技术分析 *PYGM* 基因在秦川牛成体和 4~5 月龄胎牛 2 个阶段的肺脏、心脏、肝脏、舌、背最长肌及脾脏 6 种组织中的表达情况。**【结果】**半定量 RT-PCR 检测结果显示,*PYGM* 基因在秦川牛胎儿和成年时期的心脏、舌及背最长肌组织中的表达量均显著高于其他组织。并在该基因中筛查到了 2 个新的单核苷酸变异(SNP)位点,分别为 *PYGM* 内含子 1 上的 C→T 突变和内含子 6 中的 C→G 突变。群体多态性分析结果表明,秦川牛群体在这 2 个位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态,并且处于中度多态。2 个 SNP 位点中 A 和 C 等位基因为优势等位基因,SNP 1 位点上 AA 和 AB 基因型个体的宰前活体质量和胴体质量显著高于纯合的 BB 基因型个体;SNP 2 位点上 CC 基因型个体的体高显著高于 DD 基因型个体。**【结论】***PYGM* 基因可以作为秦川牛品种改良中与肌肉生长相关的候选基因。

【关键词】 秦川牛;*PYGM*;多态性;生长性状;组织表达

【中图分类号】 S823.12

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2013)09-0001-07

Expression of *PYGM* gene and relationship between polymorphism of *PYGM* gene and carcass

NIU Fu-biao, WANG Li-jun, YANG Jing, CHEN Ling,

WANG Hong-liang, HE Hua, LIU Xiao-lin

(College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** This study studied the role of *PYGM* gene in growth and carcass traits of Qinchuan cattle. **【Method】** DNA sequencing and PCR-RFLP technology were used to detect the polymorphism and analyze the relationship between SNPs and slaughter weight, carcass weight, height, slaughter length, and dressing percentage. The expression pattern of *PYGM* in lung, heart, liver, tongue, back muscle, and spleen of adults and 4—5 months embryos of Qinchuan cattle was investigated using semi-quantitative RT-PCR technology. **【Result】** Semi-quantitative RT-PCR showed that the expression of *PYGM* gene in heart, tongue and back muscle tissues was higher than other tissues during both embryo stage and adult phase. Two new SNPs loci were detected; SNP 1 in intron 1 C→T mutation and SNP 2 in intron 6 C→G mutation of *PYGM*. Group polymorphism analysis showed that the two SNP loci in the group were under Hardy-Weinberg equilibrium and medium polymorphism. Alleles A and C were protogenes on the two SNPs re-

【收稿日期】 2012-11-08

【基金项目】 国家“863”科技计划重大项目(2011AA100307, 2008AA101010); 陕西省“13115”科技创新工程项目(2008ZDKG-11)

【作者简介】 牛富彪(1986—), 男, 河北保定人, 在读硕士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail: niufubiao@163.com

【通信作者】 刘小林(1961—), 男, 陕西城固人, 教授, 博士, 主要从事动物遗传育种研究。E-mail: liuxiaolin@nwsuaf.edu.cn

spectively. The slaughter weights and carcass weights of individuals with genotype AA and AB were significantly higher than the individuals with genotype BB on SNP 1. The heights of individuals with CC genotype were significantly higher than the individuals with DD genotype on SNP 2. 【Conclusion】 *PYGM* gene can be used as a candidate gene relating to muscle development in breeding improvement of Qinchuan cattle.

Key words: Qinchuan cattle; *PYGM*; polymorphism; growth traits; tissue expression

秦川牛是中国著名的大型役肉兼用牛品种,是中国五大优良黄牛品种之一,具有耐粗饲、抗逆性强、肉质鲜美、性情温顺等优良特性。秦川牛体格高大,肌肉丰满,体质强健,但是后躯不发达,而且生长缓慢,屠宰率低,这些缺点严重影响了秦川牛的经济效益^[1-2],因此迫切需要向肉用型品种选育^[3-4]方向发展。

牛的肌糖原磷酸化酶(*PYGM*)基因位于第 29 号染色体,由 20 个外显子构成,编码 842 个氨基酸。目前对于 *PYGM* 基因的研究,主要集中在猪的生产性状和人麦卡德尔病的致病机理方面。糖原是存在于动物体各个组织中的重要能源储备物质,在肝脏和肌肉中含量较多。糖原的代谢是根据机体的需要来调节的,磷酸化酶是糖原代谢调节的节点之一。通过磷酸化和去磷酸化,糖原的代谢才得以进行。糖原磷酸化酶通常是以去磷酸化状态存在,此状态下没有活性。在磷酸化酶激酶(PHK)和 Ca^{2+} 存在时,糖原磷酸化酶被磷酸化获得生物活性,催化糖原降解为 1-磷酸葡萄糖,然后转化为 6-磷酸葡萄糖^[5]。研究表明,糖原磷酸化酶的磷酸化位点在第 14 位的丝氨酸上,此位点的磷酸化和去磷酸化精确地调节着酶的活性。

谢红涛等^[5]研究发现,*PYGM* 是组成型基因,但在猪的不同组织中仍然存在表达差异。*PYGM* 基因的 3'非翻译区(3'UTR)125 bp 处的多态位点造成了不同品种猪胴体性状的表观差异。目前有关牛 *PYGM* 基因的研究尚未见相关的报道。为此,本试验研究了 *PYGM* 基因多态性与秦川牛生长性状和屠体性状间的关系,以期为进一步研究秦川牛遗传品质的改良和候选基因的选择提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物及材料 本试验供试动物为 300 头(24±2)月龄的纯种秦川牛,由陕西秦宝牧业有限公司秦川牛养殖场提供,所有试验用牛均在相同的条件下饲养,饲料主要由青贮料、精料补充料组成。在屠宰前和屠宰后参照国家肉牛屠宰分割标准

GB/T 17238—1998 测定所有个体的宰前活体质量、胴体质量、体高、体斜长、屠宰率等相关数据。在屠宰过程中用加入抗凝剂的 50 mL 采血管收集静脉血,并迅速置于冰盒中保存待用。屠宰分割时测定个体的胴体质量,并剖取其中 3 头个体的肺脏、心脏、舌、肝脏、脾脏和背最长肌 6 种组织样本,分装入 2 mL 离心管后保存于液氮中备用。于西安秦川肉牛屠宰车间选择 3 头 4~5 月龄胎牛,分别解剖取肺脏、心脏、舌、肝脏、脾脏和背最长肌 6 种组织样本,分装于 2 mL 离心管中,在液氮中保存备用。

1.1.2 主要仪器及试剂 恒温振荡仪、DYY-6C 型电泳仪、PTC-240 型 PCR 扩增仪、CFX96 型实时 PCR 检测系统、NanoDrop 1000 型紫外分光光度仪、紫外凝胶成像系统、Thermo 公司低温离心机。

无水乙醇、TRIS 饱和酚、氯仿、核酸内切酶(*Hpa* II 和 *Pvu* II),购自 TaKaRa 公司;ACD 抗凝剂(每 100 mL 中含柠檬酸 0.48 g,柠檬酸钠 1.32 g,葡萄糖 1.47 g,加超纯水配制)、Trizol,购自 Invitrogen 公司;DRR047A 型反转录试剂盒,购自 TaKaRa 公司。

1.2 引物设计与合成

参照 GenBank 中已公布的牛 *PYGM* 基因序列(GenBank 登录号为:NC_007330),用 Primer Version 5.0 软件针对其外显子和内含子分别设计引物。参照 GenBank 中已公布的牛 *PYGM* 基因的 cDNA 序列(GenBank 登录号为:NM_175786.2 GI:31442872),设计半定量引物 P-3。引物由深圳华大基因公司合成。内含子 1 的引物 P-1、内含子 6 的引物 P-2 和半定量引物 P-3 的序列见表 1,其余经检测未发现多态性位点的引物序列略。

1.3 牛 *PYGM* 基因的多态性检测

1.3.1 PCR 扩增 采用常规的酚氯仿抽提法^[6]提取牛血样基因组 DNA。DNA 提取完全以后用 NanoDrop 1000 型紫外分光光度仪测定浓度,再用无菌蒸馏水稀释至 70 ng/μL,然后置于-80℃冰箱中保存备用。

PCR 反应体系 10 μL:10×Buffer(不含 Mg^{2+}) 1.0 μL, 20 nmol/L MgCl_2 0.6 μL, 2.5 nmol/L

dNTPs 0.8 μL, *Taq* DNA 聚合酶 0.75 U,模板(秦川牛血液 DNA)0.4 μL,上游引物 0.1 μL,下游引物 0.1 μL,无菌蒸馏水补足。PCR 程序为:95 ℃预变性 2 min;94 ℃ 30 s,退火(温度依引物不同而定)30 s,72 ℃ 45 s,37 个循环;72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃ 保存。

表 1 试验所用部分引物的信息

Table 1 Primer information in the experiment

引物名称 Primer	引物序列(5'→3') Sequence of primers(5'→3')	退火温度/℃ Annealing temperature	扩增片段长度/bp Length
P-1	F:CCTCCGCTCACCCAAAATA R:TCGTCCAACCTCAGGAACCC	58.0	579
P-2	F:GGTTGCTTGTTGGTCCG R:TGGTCTAACGCTGCTGTG	51.2	773
P-3	F:CGCTGGTTGGTGATGTGTAA R:GCAGAGTGAGTTGGGGTTGAT	56.6	222

1.3.2 片段扩增和多态性检测 1)扩增和产物检测。以 P-1 和 P-2 为模板扩增其对应的 DNA 片段,然后取扩增的各片段产物 5 μL,进行 15 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测,电泳电压 120 V。电泳结束后,用紫外凝胶成像系统进行分析。

2)产物测序。运用 DNA 池技术进行 PCR 扩增(以 30 头牛的血液 DNA 为模板,PCR 扩增体系参考 1.3.1),将扩增产物送至上海生工生物公司进行测序,检测片段的多态位点。

3)RFLP 分析。对扩增产物分别进行 *Hpa* II 和 *Pvu* II 酶切,酶切体系总体积 10 μL:PCR 产物 5 μL,10×Buffer 1 μL,内切酶 0.2 μL(*Fermentas*,10 U/μL),加超纯水补充至 10 μL。混合均匀后,放入 37 ℃ 恒温振荡培养箱中消化 10~16 h。酶切结束后,用 15 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳检测,然后在 Bio-Rad 凝胶成像系统中进行凝胶成像。

1.3.3 数据统计与分析 群体遗传多样性指标(纯合度、杂合度、有效等位基因数、多态信息含量 PIC、Hardy-Weinberg 平衡等)的计算采用分析软件 POPGENE 32;运用 SPSS 20 对数据进行分析,根据最小二乘线性模型分析 *PYGM* 基因型效应;多态性与秦川牛生长和胴体性状的关联分析运用单因素方差分析模型: $Y_{ij} = \mu + A_i + G_j + (AG)_{ij} + E_{ij}$ (式中: Y_{ij} 为测得的各性状表型值, μ 为群体平均值, A_i 为年龄效应, G_j 为基因型效应, $(AG)_{ij}$ 为年龄与基因型之间的互作效应, E_{ij} 为随机误差)。

1.4 牛 PYGM 基因的组织表达谱

采用 Trizol 一步法^[7]提取 3 头成年牛和 3 头 4~5 月龄胎牛 6 种组织样本的 RNA,测定 RNA 浓度后分别稀释至 500 ng/μL,保存于-80 ℃ 冰箱中备用。采用 TaKaRa 公司 DRR047A 型反转录试剂盒反转录,分别获得秦川牛成体和 4~5 月龄胎牛 6 种组织的 cDNA。以 P-3 为引物,采用 RT-PCR 方法分析 *PYGM* 基因在不同组织中的相对表达情况。

2 结果与分析

2.1 牛 PYGM 基因的 PCR 扩增

以秦川牛的基因组 DNA 为模板,以引物 P-1 和 P-2 进行 PCR 扩增,产物用 15 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳检测,结果(图 1)显示,扩增片段 1 和片段 2 条带清晰,无杂带,片段长度与预期一致,可以直接进行 RFLP 酶切分析。其中片段 1 可用内切酶 *Hpa* II 进行酶切分型,片段 2 可用内切酶 *Pvu* II 进行酶切分型。

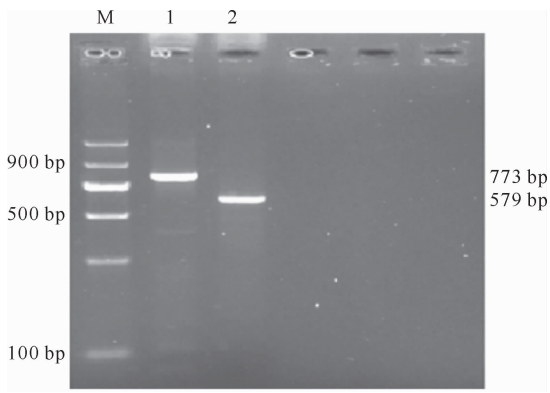


图 1 秦川牛 PYGM 基因的 PCR 扩增
M. DNA Marker II ;1. 片段 1;2. 片段 2

Fig. 1 PCR fragments of PYGM gene of Qinchuan cattle
M. DNA Marker II ;1. Fragment 1;2. Fragment 2

2.2 牛 PYGM 基因的测序和 RFLP

对利用 DNA 池技术获得的扩增产物进行测序,结果显示,秦川牛的 *PYGM* 基因存在 2 个单核苷酸变异(SNP)位点,分别是位于内含子 1 中的 C→T 突变(SNP 1)和内含子 6 中的 C→G 突变(SNP 2)。对 300 头秦川牛的 2 个位点扩增后进行 RFLP 分析,结果在内含子 1 和 6 的 SNP 位点均发现 3 种不同的基因型,将其分别命名为 AA、AB、BB 和 CC、CD、DD,其中 BB 和 DD 是突变的纯合基因型(图 2,图 3)。

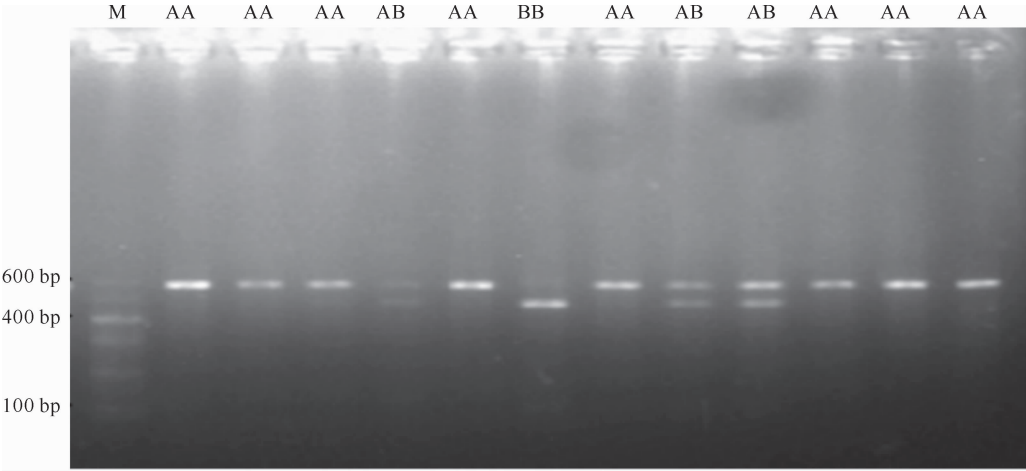


图 2 秦川牛 *PYGM* 基因 SNP 1 突变的酶切结果
M, DNA Marker I

Fig. 2 Enzyme digestion on SNP 1 in *PYGM* gene of Qinchuan cattle

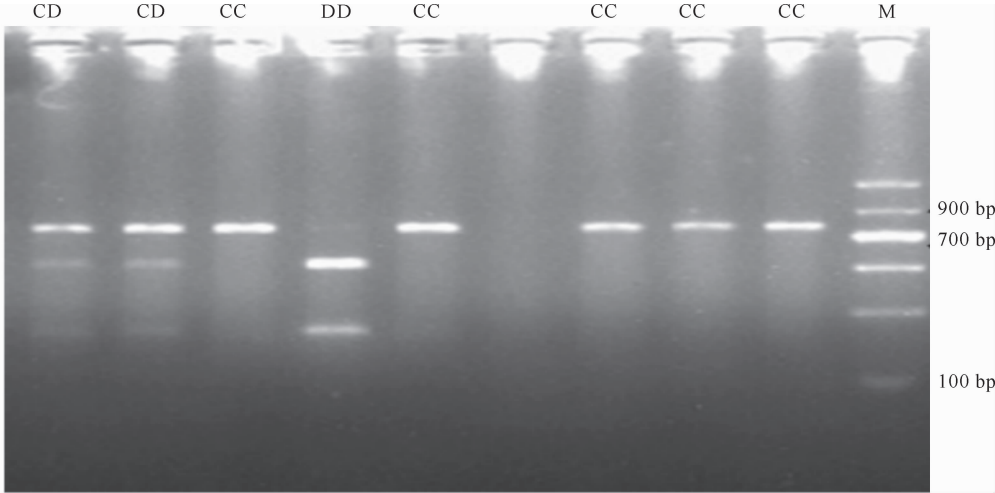


图 3 秦川牛 *PYGM* 基因 SNP 2 突变的酶切结果
M, DNA Marker I

Fig. 3 Enzyme digestion on SNP 2 in *PYGM* gene of Qinchuan cattle

2. 3 牛 *PYGM* 基因多态位点的遗传

秦川牛 *PYGM* 基因 SNP 位点的基因型频率和基因频率见表 2。由表 2 可知,供试秦川牛群体处于 Hardy-Weinberg 平衡状态($P>0.05$),经检测共发现了 SNP 1 位点 AA、AB、BB 和 SNP 2 位点 CC、CD、DD 共 6 种基因型,其中 AA 和 CC 纯合型个体

占绝大多数,杂合型 AB 和 CD 基因型数量次之,BB 和 DD 纯合型个体占极少数,分别为 3.0%和3.4%。PIC 数值显示该群体属于中度多态, $P>0.05$ (表 3)。在供试秦川牛群体中,SNP 1 位点 AA 和 AB 基因型及 SNP 2 位点 CC 和 CD 基因型个体均占 90%以上。

表 2 秦川牛 *PYGM* 基因 SNP 位点的基因型频率和基因频率

座位 Loci	基因型 Genotype	样本数 Number of samples	基因型频率 Genotype frequency	等位基因 Allele	等位基因频率 Allelic frequency
SNP 1	AA	193	0.643 3	A	0.806 7
	AB	98	0.326 7	B	0.193 3
	BB	9	0.030 0		
SNP 2	CC	192	0.640 0	C	0.801 7
	CD	97	0.323 3	D	0.198 3
	DD	11	0.336 7		

表 3 秦川牛 *PYGM* 基因 SNP 位点的遗传多态性分析

Table 3 Genetic polymorphism indexes of SNP loci in *PYGM* gene

座位 Loci	纯合度 Homozygosity	杂合度 Heterozygosity	有效等位基因数 Effective number of alleles	多态信息含量 PIC Polymorphism information content	Hardy-Weinberg 平衡 Hardy-Weinberg equilibrium
SNP 1	0.688 1	0.311 9	1.453 3	0.263 3	$P>0.05$
SNP 2	0.682 0	0.318 0	1.466 2	0.267 5	$P>0.05$

2.4 牛 *PYGM* 基因 SNP 位点与胴体、肉质性状的相关性

根据秦川牛的宰前活体质量、胴体质量、体高、体斜长、屠宰率 5 个性状指标,利用最小二乘线性模型分析 *PYGM* 基因多态位点与秦川牛胴体、肉质等指标的关联性,并对每种基因型群体进行相关性和

显著性检验。结果(表 4)表明,在胴体性状方面,SNP 1 位点 AA 和 AB 型个体的宰前活体质量和胴体质量显著高于 BB 型个体($P<0.05$);SNP 2 位点 CC 型个体的体高显著高于 DD 型个体($P<0.05$);2 个位点的其他基因型个体其他性状之间均无显著性差异($P>0.05$)。

表 4 秦川牛 *PYGM* 基因 SNP 位点多态性与生长性状的相关性分析

Table 4 Analysis of relationship between SNPs of *PYGM* gene and growth traits

性状 Traits	SNP 1			SNP 2		
	AA($n=193$)	AB($n=98$)	BB($n=9$)	CC($n=192$)	CD($n=97$)	DD($n=11$)
宰前活体质量/kg Slaughter weight	471.785±9.976 a	488.263±12.341 a	434.734±15.648 b	472.205±11.524	484.527±10.256	473.416±8.846
胴体质量/kg Carcass weight	256.084±6.323 a	258.943±4.768 a	232.436±8.251 b	257.185±6.342	257.022±6.144	258.415±5.752
体高/cm Height	140.274±0.989	141.354±1.254	139.634±0.657	141.545±1.144 a	132.625±0.843 ab	124.647±1.312 b
体斜长/cm Slaughter length	150.436±1.546	149.642±1.114	151.041±0.977	150.769±1.512	150.634±1.233	151.156±0.972
屠宰率/% Dressing percentage	54.331±0.879	53.035±1.211	54.706±0.957	54.465±1.342	53.098±1.143	54.670±0.619

注:同行数据后标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。
Note:Different lowercase letters indicate significant difference($P<0.05$).

2.5 胎牛和成年牛 *PYGM* 基因的组织表达谱

以秦川牛胎牛和成年牛的背最长肌、心脏、肝脏、脾脏、肺脏、舌 6 种组织器官为材料,分析 *PYGM* 基因在不同组织中的相对表达情况,结果见图 4、图 5。由图 4、图 5 可知,*PYGM* 基因在 4~5

月龄的胎牛阶段就已经大量表达,并且在心脏、舌和背最长肌中的表达量明显高于其他组织;在成年牛阶段,*PYGM* 基因在心脏、舌和背最长肌中的表达量仍然很高,且表达稳定,可以得到 *PYGM* 基因组织表达的一个定性的结果。

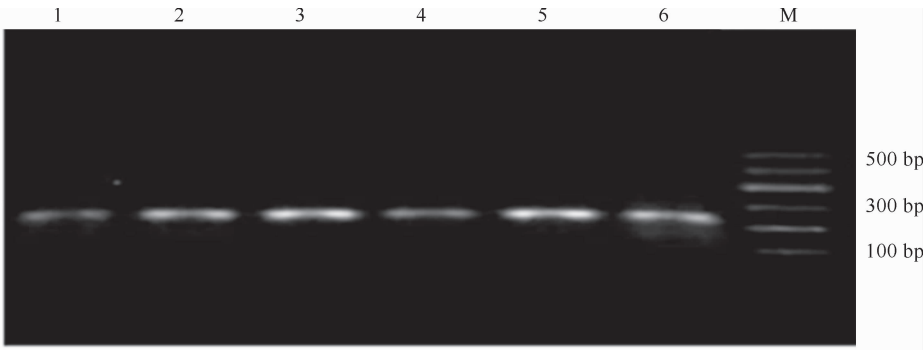


图 4 秦川牛 4~5 月龄胎牛 *PYGM* 基因的组织表达谱

1~6 依次为肺脏、心脏、舌、肝脏、背最长肌、脾脏的表达结果;M: DNA Marker I

Fig. 4 Tissue expression profile of *PYGM* gene in embryo of Qinchuan cattle

Electrophoretic bands from 1 to 6 are lung, heart, tongue, liver, back muscle and spleen; M: DNA Marker I

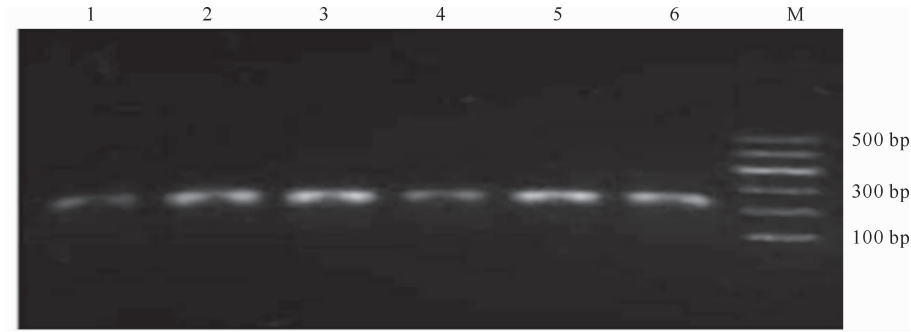


图 5 秦川牛成年牛 *PYGM* 基因的组织表达谱

1~6 依次为肺脏、心脏、舌、肝脏、背最长肌、脾脏的表达结果;M. DNA Marker I

Fig. 5 Tissue expression profile of *PYGM* gene in adult Qinchuan cattle

Electrophoretic bands from 1 to 6 are lung, heart, tongue, liver, back muscle and spleen; M. DNA Marker I

3 讨 论

肌纤维、结缔组织和肌内脂肪是构成肌肉组织的 3 个主要部分,其中肌纤维数量在动物出生前就已经基本稳定,后天的生长主要是肌纤维的体积增大^[8]。肌纤维的体积和质量是决定肉质好坏的关键因素。糖原磷酸化酶在肌糖原和肝糖原的代谢过程中是一个调节点,对肌肉的发育有重要的调控作用^[9]。

Xu 等^[10]发现, *PYGM* 基因在猪的各组织中表达量均较高,第 8 外显子中的一个 SNP 位点与瘦肉率显著相关。Nogales-Gadea 等^[11]发现,患有麦卡德尔病的人肌肉组织中 *PYGM* 基因的 p. R771PfsX33 发生点突变,导致肌肉磷酸化酶表达量发生改变。Nam 等^[12]通过对 11 头良种马各组织样品的分析表明, *PYGM* 在骨骼肌中的表达量最高;而且,相对于人类的 *PYGM* 基因,马的 *PYGM* 基因含有比较少的可移动原件,从而使得基因的稳定性和更强,这可能与马的强运动能力具有相关性。Te Pas 等^[13]通过对胎儿期 111 d 仔猪的 *PYGM* 基因的变异研究得出, *PYGM* 基因变异与仔猪的存活率有关。本研究通过 RT-PCR 半定量检测发现, *PYGM* 基因在秦川牛胎牛的心脏、舌和背最长肌组织中的表达量明显高于其他 3 种组织,到成年牛阶段, *PYGM* 基因的表达量仍然在这 3 种组织中大量稳定地表达。由此可知, *PYGM* 基因是肌肉组织代谢中的重要组成型基因,在糖原的转化和代谢过程中具有不可或缺的调节作用,而且作为组成型基因在胎儿阶段就已经在组织中大量表达,对于胚胎肌肉的发育起着非常重要的作用。

本试验分析了秦川牛群体 *PYGM* 基因的 RFLP 多态性,通过构建混合 DNA 池和扩增测序的

方法,成功检测出秦川牛群体在该基因上有 2 个多态位点。测序结果与 GenBank 上牛的 *PYGM* 序列对比后,发现 2 个突变位点,分别位于基因内含子 1 和内含子 6 上。供试牛群体在 2 个位点上处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。2 个位点均处于中度多态($0.25 < PIC < 0.5$),说明秦川牛群体多态性较高,遗传变异较大,具有较大的选择空间。 *PYGM* 基因多态性与秦川牛胴体生产性状的相关性分析表明,在 SNP 1 突变位点的 BB 基因型个体生长性状低于 AA 和 AB 基因型个体,且宰前活体质量显著低于这 2 个基因型的个体($P < 0.05$),表现为 $AB > AA > BB$;在 SNP 2 突变位点的 CC 基因型个体的体高显著高于 DD 基因型个体($P < 0.05$)。据此推测,等位基因 A 和 C 可能对秦川牛的胴体性状等指标有影响。本研究发现的 2 个突变位点均位于非编码区序列,提示非编码区对于编码区的转录和基因表达可能存在着不可或缺的调控机制^[14]。

研究表明,内含子的突变对绵羊肌肉发育相关的 *MSTN* 基因、钙蛋白酶抑制蛋白基因和人乳腺癌相关的 *EGFR* 基因都有显著的影响^[15-17]。本试验在牛 *PYGM* 基因上发现了 2 个位于内含子中的 SNP 位点,这符合 SNP 在基因组中的分布规律,即基因非编码区中多态性位点的发生率要远远高于编码区^[18-19]。虽然发生在动物基因组内含子中的 SNP 不会对编码的氨基酸序列发生影响,但其可能会对顺式作用原件的功能产生影响^[20]或者改变细胞内 mRNA 的可变剪接^[21],从而对基因的功能或表达造成影响。

本试验发现,A 和 C 是供试秦川牛群体中处于优势地位的等位基因,含有 A 和 C 等位基因的个体占群体的 90% 以上。应在选育的过程中减少 BB 和 DD 基因型,以加强 2 个 SNP 位点上 A 和 C 等位基

因的选择力度。由以上研究结果可知,*PYGM* 基因中的 SNP 1 和 SNP 2 会对秦川牛的生产性状产生影响,进而改变秦川牛的生产性能,因此,*PYGM* 基因的多态位点可以作为秦川牛育种改良的辅助标记位点。

[参考文献]

[1] 韩瑞华, 管林森, 杨大鹏, 等. 秦川牛 IGF2 基因 SNPs 检测及其与胴体、肉质性状的相关性 [J]. 遗传, 2008(12): 1579-1581.
Han R H, Zan L S, Yang D P, et al. SNPs detection of IGF2 gene and its relationship with carcass and meat quality traits in Qinchuan cattle [J]. Hereditas, 2008(12): 1579-1581. (in Chinese)

[2] 邱 怀. 试谈中华秦川牛如何走向世界 [J]. 黄牛杂志, 1999, 25(5): 47-48.
Qiu H. How to promote Qinchuan cattle to the world [J]. Journal of Yellow Cattle Science, 1999, 25(5): 47-48. (in Chinese)

[3] An L L. A famous cattle breed used for meat and labour in China: Qinchuan cattle [J]. Ecology of Domestic Animal, 2001, 22(1): 58-59.

[4] 陈 宏, 张英汉. 秦川牛肉用选育及其技术策略 [J]. 黄牛杂志, 2002, 28(2): 1-4.
Chen H, Zhang Y H. Selection and breeding for beef performance in Qinchuan cattle and technical measures [J]. Journal of Yellow Cattle Science, 2002, 28(2): 1-4. (in Chinese)

[5] 谢红涛, 熊远著, 雷明刚, 等. 猪肌肉糖原磷酸化酶基因的多态性及其与胴体和肉质性状的相关分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(3): 118-123.
Xie H T, Xiong Y Z, Lei M G, et al. The polymorphism of *PYGM* in swine muscle and its relationship with carcass and meat quality [J]. China Animal Husbandry & Veterinary, 2010, 37(3): 118-123. (in Chinese)

[6] Gustincich S, Manfioletti G, Del S G, et al. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood [J]. Biotechniques, 1991, 11(3): 298-300, 302.

[7] Deng M Y, Wang H, Ward G B, et al. Comparison of six RNA extraction methods for the detection of classical swine fever virus by real-time and conventional reverse transcription-PCR [J]. J Vet Diagn Invest, 2005, 17(6): 574-578.

[8] 杨大鹏, 管林森. 秦川牛 CS-1 基因单核苷酸多态性 (SNPs) 检测及其与胴体、肉质性状相关性研究 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(13): 1-4.
Yang D P, Zan L S. SNPs detection of CS-1 gene and its relationship with carcass and meat quality traits in Qinchuan cattle [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2009, 25(13): 1-4. (in Chinese)

[9] Rubio J C, Lucia A, Fernandez-Cadenas I, et al. Novel mutation in the *PYGM* gene resulting in McArdle disease [J]. Archives of Neurology, 2006, 63(12): 1782-1784.

[10] Xu Y J, Yu W M, Feng X T, et al. Molecular characterization, expression patterns, and polymorphism of a differentially expressed porcine gene (*PYGM*) isolated by suppression subtractive hybridization and two-dimensional Gel electrophoresis analysis [J]. DNA and Cell Biology, 2012, 31(1): 98-105.

[11] Nogales-Gadea G, Mormeneo E, Garcia-Consuegra I, et al. Expression of glycogen phosphorylase isoforms in cultured muscle from patients with McArdle's disease carrying the p. R771PfsX33 *PYGM* mutation [J]. PLoS One, 2010, 5(10): e13164.

[12] Nam G H, Ahn K, Bae J H, et al. Genomic structure and expression analysis of the *PYGM* gene in the thoroughbred horse [J]. Zoolog Sci, 2011, 28(4): 276-280.

[13] Te Pas M, Leenhouwers J I, Knol E F, et al. Marker polymorphisms in the porcine genes for muscle glycogen synthase (*GYS1*) and muscle glycogen phosphorylase (*PYGM*) [J]. Anim Genet, 2003, 34(2): 157-158.

[14] Su Y M, Zhu W J, Wu J H, et al. Polymorphism analysis on intron 3 of the *GH* gene in Chinese donkey [J]. Journal of Animal and Veterinary Advances, 2012, 11(10): 1705-1707.

[15] Sjakste T, Paramonova N, Grisli Z, et al. Analysis of the single-nucleotide polymorphism in the 5'UTR and part of intron I of the sheep *MSTN* gene [J]. DNA and Cell Biology, 2011, 30(7): 433-444.

[16] Kharrat N, Al'Fadhli S, Rebai M, et al. (AC) dinucleotide repeat polymorphism in intron 1 of human *EGFR* shows ethnic specificities and high evidence for association with breast cancer [J]. International Journal of Biological Markers, 2007, 22(4): 258-264.

[17] Palmer B R, Su H Y, Roberts N, et al. Single nucleotide polymorphisms in an intron of the ovine calpastatin gene [J]. Animal Biotechnology, 2000, 11(1): 63-67.

[18] Dybus A, Pijanka J, Cheng Y H, et al. Polymorphism within the *LDHA* gene in the homing and non-homing pigeons [J]. J Appl Genet, 2006, 47(1): 63-66.

[19] Konfortov B A, Licence V E, Miller J R. Re-sequencing of DNA from a diverse panel of cattle reveals a high level of polymorphism in both intron and exon [J]. Mamm Genome, 1999, 10(12): 1142-1145.

[20] Bachl J, Olsson C, Chitkara N, et al. The Ig mutator is dependent on the presence, position, and orientation of the large intron enhancer [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(5): 2396-2399.

[21] Nobuyoshi M, Lin X H, Takimoto Y, et al. Transcription regulation of the *PDGF A-chain* gene by first intron elements [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 230(3): 569-572.