

邝良德,任永军,谢晓红,等. 家兔 *DGAT1* 基因的克隆及其组织表达谱分析[J]. 江苏农业科学,2015,43(10):41-44.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.10.011

家兔 *DGAT1* 基因的克隆及其组织表达谱分析

邝良德,任永军,谢晓红,雷 岷,李丛艳,郑 洁,郭志强,张翔宇,张翠霞,杨 超,李 勤,陈天宝
(四川省畜牧科学研究院,四川成都 610066)

摘要:采用 RT-PCR 技术克隆家兔 *DGAT1* 部分基因片段,并采用半定量 RT-PCR 技术研究其在齐兴肉兔不同组织中的表达谱。研究结果获得了 *DGAT1* 基因 960 bp 的编码序列,共编码 320 个氨基酸。通过核苷酸和氨基酸序列比对分析发现,家兔 *DGAT1* 基因与其他物种的相似性在 81.7%~89.2% 之间;遗传距离分析表明,家兔与人的亲缘关系最近,与牛的最远。组织表达谱分析表明,*DGAT1* 基因在心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、胃、盲肠、淋巴结、背最长肌、皮下脂肪等多种组织中均有表达,且皮下脂肪中表达量最高,肺脏组织中表达量最低。研究结果为进一步研究 *DGAT1* 基因在家兔脂肪代谢中的生理功能提供依据。

关键词:家兔;二酰基甘油转酰基酶 1(*DGAT1*);半定量 RT-PCR;组织表达;基因序列;遗传距离

中图分类号:S829.12 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)10-0041-03

二酰基甘油酰基转移酶(diacylglycerolacyltransferase, *DGAT*)是脂肪细胞中甘油三脂合成过程中最后一步反应的关键酶,在细胞甘油脂类的代谢中起重要作用,其作用机制是使二酰基甘油(diacylglycerol, DAG)作用于脂肪酸酰基形成三酰甘油(triacylglycerol, TAG)^[1]。研究表明,*DGAT* 基因对动物肌肉和乳汁中脂肪含量以及脂肪酸组成有显著影响,敲除 *DGAT1* 基因的小鼠虽然在肠内能继续合成甘油三酯,但不能在组织中沉积,也不能泌乳^[2-6]。*DGAT* 有 2 种类型:*DGAT1* 和 *DGAT2*,两者有 54% 的同源性,但是分属于不同的基因家族。*DGAT1* 属于包括酰基辅酶 A、胆固醇酰基转移酶 ACAT1 和 ACAT2 在内的蛋白家族,在很多组织中都有表达,特别是在小肠、睾丸、脂肪、乳腺和皮肤中的表达量最高^[7]。在小鼠上研究表明 *DGAT1* 的表达量与小鼠的肥胖程度及脂肪组织和骨骼肌中脂肪酸的含量及成分有关^[8-9]。在牛上研究发现 *DGAT1* 基因的 K232A 突变对奶牛产奶性状,尤其是乳脂量具有显著影响^[10,11]。Wu 等研究结果表明,*DGAT1* 基因对牛的皮下脂肪有加性效应^[12]。猪上的研究表明,*DGAT1* 基因定位在 SSC4p15,在这一区域内存在可能影响猪生长速度、肌肉脂肪含量和脂肪酸组成的 QTL^[13-14]。

关于 *DGAT1* 基因的定位和结构,国内外学者在许多物种上进行了深入细致的研究。人的 *DGAT1* 基因定位在 HSA8q24.3, DNA 总长度 10 588 bp,含有 17 个外显子和 16 个内含子。小鼠的 *DGAT1* 基因位于 15 号染色体 D3 区,遗传位置是 46.9 cM,含有 17 个外显子,16 个内含子。牛 *DGAT1* 基因

位于 14 号染色体 19 cM 处,与微卫星 CSSM66 紧密连锁,基因全长 14 117 bp,含有 17 个外显子和 16 个内含子。猪 *DGAT1* 基因定位在 SSC4p15,与微卫星 SW2404 紧密连锁, cDNA 全长 1 935 bp^[15-16]。目前,在家兔(*Oryctolagus cuniculus*) *DGAT1* 基因研究方面,仅见 GenBank 上其基因预测序列的公布,有关家兔该基因的表达尚属空白。本研究旨在通过 RT-PCR 技术对齐兴肉兔 *DGAT1* 基因的 cDNA 进行克隆,并利用半定量 RT-PCR 技术分析 *DGAT1* 基因在不同组织中的表达规律,为该基因在家兔肌肉组织脂质代谢中的功能研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物及组织样本采集 选取成年健康齐兴肉兔公兔 5 只,来自四川省畜牧科学研究院种兔场。屠宰后立即采集心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、胃、盲肠、淋巴结、背最长肌、皮下脂肪等组织样品置于液氮中速冻, -80℃ 保存备用。

1.1.2 主要仪器及试剂 电动匀浆器(瑞士 Polytron PT1200E)、Power Pac 3000 电泳仪(Bio-Rad)、日本日立 CR22g 高速冷冻离心机、英国 Biochrom 公司的 WPA Biowave 核酸蛋白检测仪、Versa Doc 1000 凝胶成像系统(Bio-Rad)。主要试剂包括 Trizol 试剂(Invitrogen)、反转录试剂盒(Ferments)、pMD19-T 质粒(TaKaRa)等。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 中家兔 *DGAT1* 预测序列以及 GAPDH mRNA 序列,并采用 Primer Premier 5.0 软件设计针对 *DGAT1* 基因的特异性克隆引物以及半定量 RT-PCR 引物(表 1),引物均由上海生物工程有限公司合成。

1.2.2 总 RNA 提取与 cDNA 模板合成 采用 Trizol 试剂法提取 10 种组织中的总 RNA,用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量和完整性,质量合格的 RNA 置于 -80℃ 冰箱冻存备用。RNA 反转录成 cDNA 模板参照 TaKaRa 公司 PrimeScript™ RT reagent Kit 试剂盒说明,反转录产物 -20℃ 保存备用。

收稿日期:2014-10-09

基金项目:国家兔产业技术体系专项(编号:CARS-44-B-4);四川省公益性科研院所基本科研业务费项目(编号:SASA2013A07);畜禽优质高效配套系(新品种)选育(编号:2012NZ0008);四川省畜禽良种繁育专项(编号:SASA2009YZ005);动物遗传育种四川省重点实验室运行补助项目。

作者简介:邝良德(1983—),男,湖南郴州人,硕士,助理研究员,主要从事家兔遗传育种研究。Tel:(028)84526166;E-mail:happyboy5851258@163.com。

表 1 DGAT1 和 GAPDH 基因引物信息

基因名称	用途	引物序列 (5'→3')	产物长度 (bp)	退火温度 (℃)
DGAT1	克隆	Forward: CGTGCCTGGTCATTGTGG; Reverse: CTGCGTTGCCGTAGTTGC	962	62
	半定量	Forward: TCTACTGGCTCTTCCATTCT; Reverse: CCTCGTGGTTGAGCACATAG	435	60
GAPDH	内参	Forward: AGAGCACCAGAGGAGGACG; Reverse: TGGGATGGAAGCTGTGAAGAG	105	59

1.2.3 DGAT1 基因的部分 cDNA 片段克隆 以冻存的肌肉组织 cDNA 为模板,PCR 扩增 DGAT1 基因部分 cDNA 片段。25 μL PCR 反应体系:灭菌超纯水 15.375 μL、2.5 mmol/L dNTP Mix 2 μL、PCR buffer 2.5 μL、25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL、cDNA 1.5 μL、10 μmol/L 正反向引物各 1 μL、5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.125 μL。PCR 反应程序:95℃ 预变性 10 min;95℃ 变性 30 s,退火 30 s(退火温度见表 1),72℃ 延伸 30 s,共 34 个循环;最后 72℃ 充分延伸 10 min,10℃ 保存。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,并用 DNA 回收试剂盒回收目的条带。回收产物连接于 PMD19-T 载体,转化后筛选阳性克隆,提取质粒并进行测序。DNA 测序由上海生物工程有限公司完成。

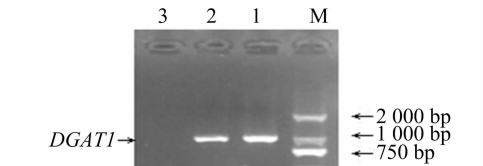
1.2.4 DGAT1 基因在齐兴肉兔不同组织中的表达谱 利用冻存的齐兴肉兔各组织 cDNA 为模板,进行半定量 RT-PCR 扩增。经过对 DGAT1 基因、GAPDH 基因的半定量 PCR 体系及条件优化后,25 μL PCR 反应体系:其中灭菌超纯水 15.8 μL、PCR buffer 2.5 μL、2.5 mmol/L dNTP Mix 2.0 μL、25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL、cDNA 1.0 μL、10 μmol/L 正反向引物各 1.0 μL、5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.2 μL。PCR 扩增条件:95℃ 预变性 10 min;95℃ 变性 30 s,退火 30 s(退火温度见表 1),72℃ 延伸 30 s,共 33 个循环;最后 72℃ 充分延伸 10 min,10℃ 保存。产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离,用 Bio-Rad 凝胶成像系统拍照,并用 Quantity one 软件分析,数据用 DGAT1 与 GAPDH 条带的光密度比值表示。

1.2.5 数据分析 利用 BioXM 2.6、DNAMAN 等软件进行核苷酸及氨基酸同源性比对分析;利用 MEGA 5.1 构建分子系统进化树;定量结果以平均值±标准差表示,统计分析软件为 SPSS 17.0。

2 结果与分析

2.1 DGAT1 基因片段扩增以及重组质粒的 PCR 检验

采用 RT-PCR 方法对齐兴肉兔 DGAT1 基因片段进行扩增,得到 1 条长度约为 962 bp 的特异性扩增区带,与预期片段大小一致(图 1)。扩增片段经连接、转化、培养后,挑取重组子,对阳性克隆进行 PCR 鉴定(图 2),结果得到 1 条与设计片段一致的条带,表明目的基因已经成功转入大肠杆菌中。



M—DNA marker; 1~2—DGAT1 基因; 3—阴性对照
图 1 DGAT1 基因的菌液 PCR 鉴定

1	TGCGTGGTCA	TTGTGGCCAA	TGCTTTTGCC	GTGGCTGCGT	TCCAGGTGA
51	GAAACGCGCT	GCAGTGGGTG	COCTGACGGA	GCCCGTGGGG	CTGCTGCTGC
101	ACGTGGCCAA	CGTGCCACCC	GTTCTCTGCT	TCCTGCGCGC	TGTGGCCTTA
151	CTGGTGGAGT	CCATCACCCC	GGTGGGCTCC	GTGCTGGCGC	TGTCGGTGCA
201	CACCATCTCT	TTCTCAAGC	TCTTCTCTTA	CCGAGATGTG	AACCTGTGGT
251	GCCGCCACGG	CAGGGCCAAG	GCTGTCTCTG	CAGGGAAGGC	CATTGGGGGC
301	GCAGGCCAGT	GCACCGTGAG	CTACCCCGAG	AACCTGACCT	ACCGTGATCT
351	CTACTACTTC	CTTTTGCCCC	CCACTCTGTG	TTATGAGCTC	AACTTCCCCC
401	GCTCCCCACG	CATCCGGAAG	CGCTTCTCTG	TGGCGCGGCT	CCTGGAGATG
451	CTCTTTCTTA	CGCAGCTGCA	GGTGGGGCTG	ATCCAGCAGT	GGATGGTGCC
501	CACCATCCAG	AACCTCATGA	AGCCCTTCAA	GGAGATGGAT	TACTCCCGCA
551	TGCTTGAACG	GCTGCTGAAG	CTGGCGGTCC	CCAACCATCT	CATCTGGGTC
601	ATCTTCTTCT	ACTGGCTCTT	CCATTCTCTG	CTCAACGCGC	TGGGGGAGCT
651	CATGCGATTG	GGAGACCGAC	AGTTTACTCG	GGACTGGTGG	AACTCGGAGT
701	CTGTCAACCTA	CTTCTGGCAG	AATTGTGACA	TCCCTGTGCA	CAGTGGTGTG
751	AGCAGGACCT	TCTACAAACC	AATGCTGCGG	CGGGGACGCA	GCAGGTGGGT
801	GGCCAGGACG	GGGGTGTTC	TGGCTCGGCG	CTTCTTCCAC	GAGTACCTGG
851	TGAGCATCCC	CCTGCGCATG	TTCCGCTCTT	GGGCGTTTAC	CGGCATGATG
901	GCACAGGTGC	CGCTGGCCTG	GATCGTGGGC	CGTTTCTTCC	GGGGCAACTA
951	CGGCAACGCA				

图 2 家兔 DGAT1 基因的部分核苷酸序列

2.2 DGAT1 基因序列的同源性分析

将克隆测序得到的齐兴肉兔 DGAT1 基因序列片段(图 2)与 GenBank 中收录的人(NM_012079)、牛(NM_174693)、小家鼠(NM_010046)、猪(NM_214051)、犬(NM_214051)、绵羊(NM_214051)和黑猩猩(NM_010046)等物种 DGAT1 基因相应序列相比较,发现 DGAT1 基因在常见物种间存在较高的相似性,其核苷酸相似性分别为 89.1%、89.2%、81.7%、88.7%、87.9%、89.0% 和 89.1%。结果表明:哺乳动物的 DGAT1 基因编码区序列比较保守。

2.3 基于系统进化树的 DGAT1 基因亲缘关系分析

将本试验克隆测序所获得的 DGAT1 基因片段序列与 NCBI 数据库中收录的人(NM_012079)、牛(NM_174693)、小家鼠(NM_010046)、猪(NM_214051)、犬(NM_214051)、绵羊(NM_214051)和黑猩猩(NM_010046)等物种 DGAT1 基因相应序列用 BioXM 2.6 生物信息软件翻译成氨基酸序列,再利用 MEGA 5.1 软件对所得到的氨基酸序列进行多序列比对,采用邻接法构建系统进化树(图 3)。树枝长度表示亲缘关系的远近,由图可见,家兔与人具有最近的亲缘关系,与牛的亲缘关系最远。

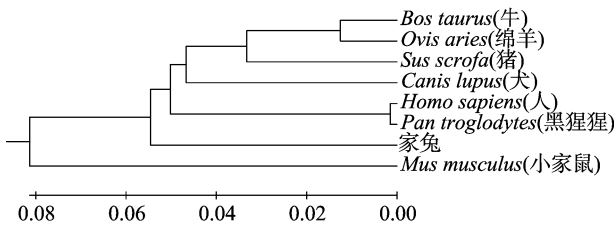


图 3 不同动物 DGAT1 部分氨基酸序列系统进化树

2.4 DGAT1 基因在齐兴肉兔不同组织的表达分析

采用 GAPDH 作为参照基因,采用半定量 RT-PCR 方法分别检测了 DGAT1 基因 mRNA 在成年齐兴肉兔不同组织中的表达情况,包括脂肪、心脏、肝脏、脾脏、肺脏、回肠、胃、肾脏、大脑和肌肉共 10 个组织,结果(图 4)各组织中均表达 DGAT1, DGAT1 在脂肪组织中表达量最高,并且脂肪、肝脏以

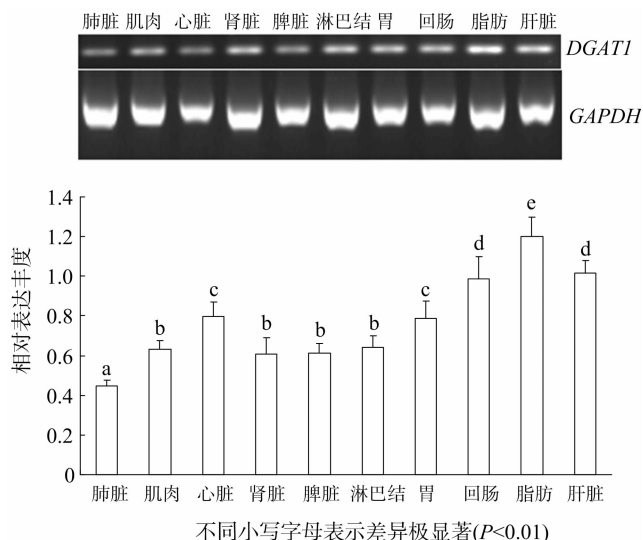


图 4 *DGAT1* 基因在齐兴肉兔不同组织中表达的 RT-PCR(A) 和相对表达丰度(B)

及回肠组织中的表达量极显著高于其他组织 ($P < 0.01$)。

3 讨论与结论

肌内脂肪沉积作为当今研究的热点问题,其内在分子机理尚未完全清楚。国内外研究表明,肌内脂肪的沉积主要是肌肉内脂肪细胞对甘油三酯的合成与分解的综合结果表现,而参与脂肪合成和分解的脂肪代谢酶有许多种,因此,脂肪沉积的调控机制是一个十分复杂的过程^[17-20]。*DGAT1* 在调控脂肪代谢中起到重要作用,是甘油三酯合成过程中唯一的關鍵酶和限速酶,是肌内脂肪沉积过程的重要参与者,其编码基因的表达对肌内脂肪沉积有着重要影响。目前,国内外进行了许多关于 *DGAT1* 基因的研究,但是有关家兔 *DGAT1* 基因的研究还未见报道。本试验通过 RT-PCR 方法从肌肉组织中克隆得到了家兔 *DGAT1* 基因部分 cDNA 序列,此外,将该序列与 NCBI 收录的其他物种 *DGAT1* 基因序列进行同源性比对分析发现,家兔 *DGAT1* 基因序列与其他常见物种间存在高度同源性,与牛、人和猪的 *DGAT1* 基因序列相比,相似性均在 87% 以上,将家兔 *DGAT1* 基因片段编码氨基酸序列与其他常见物种相比,相似性均在 95% 以上,其中与人的核苷酸和氨基酸相似性均很高,与牛、绵羊的相似性较差。通过构建系统进化树发现,家兔与人具有最近的亲缘关系,而其与牛的亲缘关系最远,这与传统分类学的结果基本一致。

本试验中,半定量 RT-PCR 结果表明, *DGAT1* 基因 mRNA 在成年齐兴肉兔脂肪、心脏、肝脏、脾脏、肺脏、回肠、胃、肾脏、大脑和肌肉中都有不同程度的表达,其中在脂肪组织中表达量最高,在肺脏中表达量最低,这与王国富等在牛上的研究结果^[21] 稍有不同,这可能与物种的特异性有关。总之, *DGAT1* 在齐兴肉兔各组织中不同的 mRNA 表达丰度说明其对不同组织中脂肪含量有着不同程度影响,可作为一个影响兔肉品质性状的候选基因。虽然 *DGAT1* 基因的表达对于脂肪沉积有重要影响,但脂肪沉积是受到许多代谢酶调控的一个综合过程,下一步作者将对参与脂肪合成和分解的其他多种酶类编码基因的表达调控及遗传变异进行深入研究,以

便进一步揭示肉兔脂肪沉积的内在机制,为培育新品种提供理论基础。

参考文献:

- [1] Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C[J]. Science, 1992, 258 (5082): 607-614.
- [2] Buhman K K, Smith S J, Stone S J, et al. *DGAT1* is not essential for intestinal triacylglycerol absorption or chylomicron synthesis[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277 (28): 25474-25479.
- [3] Smith S J, Cases S, Jensen D R, et al. Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat[J]. Nature Genetics, 2000, 25 (1): 87-90.
- [4] Conte G, Mele M, Chessa S, et al. Diacylglycerol acyltransferase 1, stearoyl-CoA desaturase 1, and sterol regulatory element binding protein 1 gene polymorphisms and milk fatty acid composition in Italian Brown cattle[J]. Journal of Dairy Science, 2010, 93 (2): 753-763.
- [5] Signorelli F, Orrù L, Napolitano F, et al. Exploring polymorphisms and effects on milk traits of the *DGAT1*, *SCD1* and *GHR* genes in four cattle breeds[J]. Livestock Science, 2009, 125 (1): 74-79.
- [6] Demeter R M, Schopen G C, Lansink A G, et al. Effects of milk fat composition, *DGAT1*, and *SCD1* on fertility traits in Dutch Holstein cattle[J]. Journal of Dairy Science, 2009, 92 (11): 5720-5729.
- [7] Cases S, Smith S J, Zheng Y W, et al. Identification of a gene encoding an acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95 (22): 13018-13023.
- [8] Chen H C, Smith S J, Ladha Z, et al. Increased insulin and leptin sensitivity in mice lacking acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase 1[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2002, 109 (8): 1049-1055.
- [9] Chen H C, Stone S J, Zhou P, et al. Dissociation of obesity and impaired glucose disposal in mice overexpressing acyl coenzyme a: diacylglycerol acyltransferase 1 in white adipose tissue[J]. Diabetes, 2002, 51 (11): 3189-3195.
- [10] Spelman R J, Ford C A, McElhinney P, et al. Characterization of the *DGAT1* gene in the New Zealand dairy population[J]. Journal of Dairy Science, 2002, 85 (12): 3514-3517.
- [11] 徐秀容, 高雪, 许尚忠, 等. 牛 *DGAT1* 基因 K232A 取代对 3 个品种奶牛群体部分经济性性状的影响[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34 (9): 6-10.
- [12] Wu X L, Macneil M D, De S, et al. Evaluation of candidate gene effects for beef backfat via Bayesian model selection[J]. Genetica, 2005, 125 (1): 103-113.
- [13] Pérez-Enciso M, Clöp A, Noguera J L, et al. A QTL on pig chromosome 4 affects fatty acid metabolism: evidence from an Iberian by Landrace intercross[J]. Journal of Animal Science, 2000, 78 (10): 2525-2531.
- [14] De Koning D J, Janss L L, Rattink A P, et al. Detection of quantitative trait loci for backfat thickness and intramuscular fat content in pigs (*Sus scrofa*) [J]. Genetics, 1999, 152 (4): 1679-1690.

危文波,蒋礼玲,吴昆仑,等. 青稞品种肚里黄成熟胚愈伤组织诱导与植株再生[J]. 江苏农业科学,2015,43(10):44-46.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.10.012

青稞品种肚里黄成熟胚愈伤组织诱导与植株再生

危文波,蒋礼玲,吴昆仑,迟德钊

(青海省农林科学院/青海省高原作物种质资源创新与利用国家重点实验室培育基地/
青海省青稞遗传育种重点实验室,青海西宁 810016)

摘要:以青稞品种“肚里黄”成熟胚为外植体,设置不同成熟胚切割方式、不同基础培养基、不同激素及配比、不同碳源,研究对成熟胚愈伤组织诱导及绿苗分化的影响,以期为进一步实现青稞的遗传转化奠定基础。结果表明,将刮碎的成熟胚接种在以麦芽糖为碳源,附加 6 mg/L 的 2,4-D 的 MS 培养基上最为合适,愈伤质量最好;添加 1.5 mg/L 6-BA 和 1.5 mg/L KT 对愈伤组织的分化效果最佳,绿苗率达 44.5%。研究结果表明,通过愈伤诱导和分化的优化,肚里黄的愈伤组织诱导率和分化率均可以达到较高水平,适合于作为遗传转化的受体材料。

关键词:青稞;成熟胚;出愈率;愈伤诱导;植株再生

中图分类号:S512.03 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)10-0044-03

随着生物技术的不断发展,以幼胚、花药、分生组织等为外植体,通过细胞和基因工程技术定向改良大麦品种的研究,已经取得了良好进展^[1-5]。但这些培养方法都受到大麦生长季节的限制,一年中取材时间有限,易受环境影响等不足。利用大麦种子的成熟胚为外植体,则具有取材方便、不受生长季节限制、能够长年大量供应等优点,近年来,受到了越来越多的研究者青睐^[6-8]。青稞(*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook. f.),属禾本科大麦属,在植物学上属于栽培大麦的变种,因其籽粒内外稃与颖果分离,籽粒裸露,故称裸大麦,是青藏高原藏族人民的主粮,然而,青稞在其分子育种基础性工作的青稞成熟胚研究报道较少。

本试验选取青海省种植面积最大的青稞品种肚里黄为材料,以成熟胚为外植体,研究成熟胚不同处理方式以及不同培

养条件对其愈伤组织诱导及其植株再生的影响,从而建立高效的青稞成熟胚再生体系,为青稞的遗传转化和品质改良等分子育种研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试品种

供试品种为肚里黄,是 20 世纪 60 年代从甘肃省甘南州引进的青稞农家品种。目前,肚里黄在青海省青稞种植区均有大面积种植。肚里黄种子由青海省农林科学院作物所青稞研究室提供。

1.2 培养基

愈伤组织诱导分别以 MS、N6 及 B5 大量 + MS 微量的 3 种培养基添加 2 mg/L 2,4-D,分别添加不同浓度的 2,4-D (2、4、6、8、10 mg/L),并设置不同的碳源(蔗糖、葡萄糖、麦芽糖)。继代培养基以 MS 培养基,不添加 2,4-D。分化培养基以 MS 培养基为基础培养基,添加 KT 和 6-BA 的不同组合。所有培养基均添加 6 g/L 植物凝胶,121 ℃下高温灭菌 20 min 后使用。

1.3 种子处理及组织培养方法

1.3.1 种子处理和灭菌 选取当年收获、籽粒饱满、大小一致的青稞种子,置 75% 乙醇中浸泡 2~3 min;无菌水冲洗 3~4 次;再浸于 5% 次氯酸钠中 15 min;无菌水冲洗 3~4 次;无

收稿日期:2015-04-09

基金项目:国家大麦青稞产业技术体系(编号:CARS-05);青海省自然科学基金(编号:2012-Z-916Q);青海省农林科学院创新基金(编号:2012-NKY-01);青海省高原作物种质资源创新与利用重点实验室开放课题(编号:2012-01)。

作者简介:危文波(1990—),男,硕士研究生,从事作物遗传育种。
E-mail:645334022@qq.com。

通信作者:蒋礼玲,博士,副研究员,从事青稞分子育种。E-mail:lilingjiang1015@126.com。

[15] Nonneman D, Rohrer G A. Linkage mapping of porcine *DGAT1* to a region of chromosome 4 that contains QTL for growth and fatness [J]. *Animal Genetics*, 2002, 33(6): 472-473.

[16] 马海明,施启顺,柳小春. DGAT 相关基因研究进展[J]. *遗传学报*, 2005, 32(12): 1327-1332.

[17] 杨海玲,曾勇庆,魏述东,等. 莱芜猪脂肪代谢酶活性的发育性变化及其对肌肉脂肪沉积的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(11): 1150-1154.

[18] Yamazaki T, Sasaki E, Kakinuma C, et al. Increased very low density lipoprotein secretion and gonadal fat mass in mice overexpressing liver *DGAT1* [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280

(22): 21506-21514.

[19] Horton J D, Goldstein J L, Brown M S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2002, 109(9): 1125-1131.

[20] Nakamura M T, Cheon Y, Li Y E, et al. Mechanisms of regulation of gene expression by fatty acids [J]. *Lipids*, 2004, 39(11): 1077-1083.

[21] 王国富,吴慧光,孙国权,等. 中国西门塔尔牛 *DGAT1* 和 *DGAT2* 基因组织表达谱及其在脂肪组织中的表达与背膘厚的关联分析[J]. *华北农学报*, 2012, 27(5): 60-64.