

# RNA 干扰沉默 *PID1* 基因肉兔模型的构建

徐正刚, 杨 伦, 曾勇庆\*, 张 哲, 陈 伟, 杨 云, 房国锋, 王守栋

(山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018)

**摘 要:** 为进一步研究 *PID1* 基因的功能, 本试验在前期构建并筛选得到的高效 *PID1* RNA 干扰表达载体 pGPU6/GFP/Neo-*PID1*-2 的基础上, 利用精子介导法制备 RNA 干扰 *PID1* 转基因肉兔模型。对繁殖的 F<sub>1</sub> 代肉兔个体进行活体荧光检测、PCR、RT-PCR 和 Western blot 检测, 并对不同组别(阳性组、阴性组和空白对照组)体重达 3.0 kg 左右的 F<sub>1</sub> 代肉兔抽样屠宰进行肌内脂肪的测定。研究表明: 外源基因和绿色荧光蛋白基因(*GFP*)在转基因兔后代中可成功表达, 试验组得到 F<sub>1</sub> 代个体 106 只, 其中阳性兔 7 只, 转基因阳性率为 6.60%。*PID1* 基因 RNAi 阳性兔与阴性兔、空白对照兔相比, RT-PCR 检测 *PID1* 基因 mRNA 表达量显著降低( $P < 0.05$ ), Western blot 测得 *PID1* 蛋白表达水平呈下降趋势, 肌内脂肪的含量显著降低( $P < 0.05$ ); 综上所述, *PID1* 基因与肌内脂肪沉积密切相关。本研究从 RNAi 肉兔模型构建的角度进一步验证了 *PID1* 基因对肌内脂肪沉积影响的功能, 也为下一步研究制备高肌内脂肪优质 *PID1* 转基因猪奠定了基础。

**关键词:** 新西兰肉兔; *PID1* 基因; RNA 干扰; 肌内脂肪

中图分类号: S829.1; S813.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)05-0750-07

## Construction of Transgenic Rabbit Model by RNA Interferencing *PID1* Gene

XU Zheng-gang, YANG Lun, ZENG Yong-qing\*, ZHANG Zhe, CHEN Wei,

YANG Yun, FANG Guo-feng, WANG Shou-dong

(College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

**Abstract:** For the further research of *PID1* gene function, transgenic rabbit model was constructed by use of sperm-mediated gene transfer on the basis of the *PID1*-shRNA expression vector pGPU6/GFP/Neo-*PID1*-2 preliminarily built and screened. Offsprings were detected by fluorescence detection *in vivo*, PCR, RT-PCR and Western blot. Individuals from different groups (positive group, negative group and blank group) were selected at the weight of about 3.0 kg and slaughtered to determine their intramuscular fat contents. The results showed that exogenous gene and green fluorescent protein (*GFP*) gene can be successfully expressed in transgenic offspring rabbits with transgenic positive rate 6.60% (7/106). Compared with the negative and blank groups, the mRNA expression level of the positive rabbits decreased significantly which was detected by RT-PCR ( $P < 0.05$ ). Western blot detection indicated that protein expression level showed a downward trend. Intramuscular fat content also decreased significantly ( $P < 0.05$ ). The results indicated that *PID1* gene was closely related to the intramuscular fat deposition. The study further validated the function of *PID1* gene in intramuscular fat deposition from the perspective of RNA interference model. What's more, the study laid the foundation for preparation of high quality *PID1* transgenic pigs with high intramuscular fat content.

收稿日期: 2013-12-12

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

作者简介: 徐正刚(1986-), 男, 山东烟台人, 硕士生, 主要从事动物遗传育种学研究, E-mail: 346125802@qq.com

\* 通信作者: 曾勇庆, 教授, 博士生导师, 主要从事动物遗传育种学研究, E-mail: yqzeng@sdau.edu.cn

**Key words:** New Zealand rabbit; *PID1* gene; RNA interference; intramuscular fat

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是指细胞中导入与内源性 mRNA 编码区某段序列同源的双链 RNA (Double-stranded RNA, dsRNA), 可致该 mRNA 发生特异性降解从而导致基因表达沉默的现象<sup>[1]</sup>。RNAi 属于转录后水平的基因沉默 (Post-transcript gene silencing, PTGS)<sup>[2]</sup>。RNAi 技术能使基因沉默不表达或以极低水平表达, 而且操作相对简便快捷, 费用也比传统的基因敲除低廉, 是一种快速有效的研究基因功能的新方法, 因此, RNAi 在畜牧兽医领域也得到了广泛的应用。在转基因技术方面, 精子介导法是利用精子头部正电荷可捕获外源 DNA 的特性, 将外源目的基因与精子混合孵育, 这种精子在受精过程中可将外源 DNA 导入受精卵, 它是动物转基因研究中外源基因导入的一种重要方式, 已在小鼠、猪、鸡等多种动物中应用<sup>[3-5]</sup>。

磷酸酪氨酸互作结构域 1 (Phosphotyrosine interaction domain containing 1, *PID1*) 是以抑制性消减杂交 (SSH) 技术筛选得到的与脂肪沉积相关的基因<sup>[6]</sup>。*PID1* 基因在肥胖儿童脂肪组织中的表达明显高于正常儿童<sup>[7]</sup>。研究发现, *PID1* 基因在所有受检肥胖人类患者脂肪组织中的表达均显著上调, 且该基因过表达能显著促进脂肪细胞的增殖<sup>[8]</sup>。在动物育种中, 肌肉脂肪 (Intramuscular fat, IMF) 是猪肉品质的重要指标, 直接影响肉品的嫩度、多汁性, 特别是风味<sup>[9]</sup>。近年来, 对影响 IMF 沉积的主效基因及其分子遗传机制一直是该领域研究的热点, 目前对于肌肉脂肪的主效基因和候选基因的研究还处于初级阶段<sup>[10]</sup>。曾勇庆等<sup>[11]</sup>研究发现莱芜猪、鲁莱黑猪肌肉脂肪含量明显高于大白猪。本实验室前期研究了 *PID1* 基因在莱芜猪、鲁莱黑猪、大白猪 3 个猪种的背膘、背最长肌和肝中的表达差异以及与 IMF 的关系, 提示 *PID1* 基因可能与 IMF 的沉积密切相关<sup>[12]</sup>。在动物的相关研究表明 *PID1* 基因的表达对动物组织的脂肪沉积存在关系, 说明 *PID1* 基因对动物遗传育种具有重要的研究价值<sup>[13]</sup>。本研究通过构建 RNA 干扰 *PID1* 基因肉兔模型的方式, 旨在进一步研究验证 *PID1* 基因对肌肉脂肪沉积影响的功能。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料和试验动物

PCR 引物由上海生工合成, Anti-*PID1*、Anti-

$\beta$ -Actin 购于 Abcam 公司, II 抗购于 Sigma 公司。PCR 和 RT-PCR 相关试剂、酶类购于大连宝生物工程公司。转染试剂为 Roche 的 X-treme GENE HP。组织基因组提取试剂盒购于北京天根生物技术有限公司。其他试剂为国产或进口分析纯。

成年新西兰肉兔由泰安市高新区泰山种兔场提供, 预备试验兔包括健康成年公兔 8 只、成年母兔 48 只, 分为试验组和空白对照组, 经相应处理并配种, 繁殖的 F1 代在相同条件下进行舍内笼养, 30 日龄时取耳组织样用于 PCR 检测, 110 日龄体重达 3.0 kg 左右时抽样屠宰, 取背最长肌, 一部分液氮保存, 用于荧光定量 PCR 和 Western blot 检测, 另一部分用于肌肉脂肪的测定。

### 1.2 试验方法

1.2.1 高效抑制表达载体的制备和筛选 根据 NCBI 上靶基因 mRNA 序列, 应用 siRNA 设计软件, 通过计算机网络辅助设计 siRNA, 经对比分析最终筛选出 4 条理论上最佳的 siRNA 序列, 同时设计 1 条阴性对照, 作为阴性对照的 siRNA 应与选中的 siRNA 序列有相同的组成, 但与 mRNA 没有明显的同源性, 与 pGPU6/GFP/Neo 载体连接, 构建 pGPU6/GFP/Neo-*PID1* 干扰表达载体, 并转染 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 在细胞水平上进行验证。pGPU6/GFP/Neo-*PID1* 真核表达载体的重组质粒的制备与鉴定, 本实验室前期已完成<sup>[14]</sup>。制备了 4 个干扰载体, 经筛选后选择 1 个高效干扰载体 pGPU6/GFP/Neo-*PID1*-2 进行试验。

1.2.2 RNAi *PID1* 基因肉兔的制备 选择健康成年新西兰公兔 8 只, 其中, 试验组 6 只, 空白对照组 2 只。用 Roche 的 X-treme GENE HP 转染试剂 ( $\mu$ L) 与重组质粒 ( $\mu$ g) 按照 4 : 1 的比例混合 37 °C 孵育 15 min, 添加适量 DMEM 配成注射液。将公兔麻醉后, 对试验组公兔睾丸进行多点注射 (3~4 点), 对照组注射等量生理盐水, 每周注射 1 次, 共注射 3 次。在相同且适宜的条件下饲养 30 d 后, 试验组和对照组分别按照公母比例 1 : 6 和 1 : 4 进行配种, 通过自然交配、重复配种的方法保证受孕率。

1.2.3 PCR 检测 用组织基因组提取试剂盒提取 F1 代仔兔耳组织的基因组, 以其为模板检测仔兔的阳性率。为提高检测的准确性, 用 Primer5 设计 2 对引物进行检测, 引物信息见表 1。第 1 对引物名

称为 GFP-1F 和 GFP-1R, PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 25 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。第 2 对引物为 GFP-2F 和 GFP-2R, PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 25 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.2.4 RT-PCR 检测 *PID1* 基因的表达 用 Trizol 试剂提取背最长肌的总 RNA, 用 TaKaRa 反

转录试剂盒反转录成 cDNA。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 15 s, 57 °C 20 s, 72 °C 20 s, 35 个循环, 72 °C 5 min。引物名称为 *PID1-F*、*PID1-R* 和 *GAPDH-F*、*GAPDH-R*, 引物信息见表 1。根据熔解曲线来判断 PCR 反应的特异性, 根据 RT-PCR 所给出的 CT 值和标准曲线中的扩增效率计算出定量试验结果。相对定量结果采用 J. S. Yuan 等<sup>[15]</sup> 提出的  $2^{-\Delta\Delta CT}$  进行分析。

表 1 PCR 引物信息

Table 1 The information of PCR primer

| 引物 Primer | 引物序列(5'-3') Primer sequence | 产物大小/ bp Products size |     |
|-----------|-----------------------------|------------------------|-----|
| PCR       | GFP-1F                      | CACATGAAGCAGCAGCACTT   |     |
|           | GFP-1R                      | TGCTCAGGTAGTGGTTGTCG   | 379 |
|           | GFP-2F                      | ACGTAAACGGCCACAAGTTC   |     |
|           | GFP-2R                      | CCAATGTGTCCGTCGTGGAT   | 735 |
| RT-PCR    | <i>PID1-F</i>               | TCCATCACCTTGACCACAAA   |     |
|           | <i>PID1-R</i>               | ATGGCAGTCCATTTGGTAGG   | 161 |
|           | <i>GAPDH-F</i>              | CCAATGTGTCCGTCGTGGAT   |     |
|           | <i>GAPDH-R</i>              | TGCTGTTGAAGTCGCAGGAG   | 153 |

1.2.5 Western blot 检测 *PID1* 蛋白的表达 裂解背最长肌提取总蛋白, 用 10% 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 分离的蛋白电泳转移至 PVDF 膜, 5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 h 后加入抗 *PID1* 的 I 抗, 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, HRP 标记的 II 抗, 室温孵育 2 h, TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min, 底物显色分析并拍照, 图像条带灰度值用 ImageJ 软件进行分析。

1.2.6 试验兔的屠宰及脂肪沉积的测定  $F_1$  代仔兔在相同适宜条件下饲养至 110 d 体重达 3.0 kg 左右时抽样屠宰, 阳性组 7 只, 阴性组 8 只, 空白对照组 8 只, 取背最长肌, 利用索氏醚浸提法测定背最长肌的肌内脂肪含量; 同时测定不同组别肉兔的腹脂沉积率。

统计采用 SPSS 13.0 软件分析, 对试验数据进行单因素方差分析, 所得数值均以“平均数±标准差”表示,  $P < 0.05$  为差异显著, 有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 试验兔繁殖结果

试验组 1 只公兔转基因处理后意外死亡, 其余 5 只公兔正常并按 1:6 的比例与母兔交配, 结果是 27 只母兔成功受胎, 3 只未受胎, 试验组母兔受胎率

为 90%; 妊娠期结束试验组共分娩活仔兔 106 只, 试验组母兔平均窝产活仔数  $3.93 \pm 0.92$  只。空白对照组 2 只公兔按 1:4 的比例与母兔交配, 8 只母兔成功受胎, 受胎率为 100%; 共分娩活仔兔 42 只, 空白对照组母兔平均窝产活仔数  $5.25 \pm 1.03$  只。

### 2.2 $F_1$ 代仔兔 PCR、活体荧光检测

$F_1$  代个体, 阳性与空白兔在 IVIS Lumina II 成像系统中进行活体荧光检测, 图像采集结果如图 1。

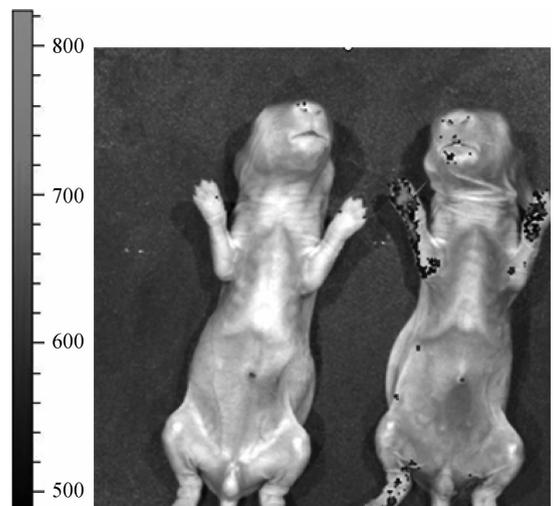


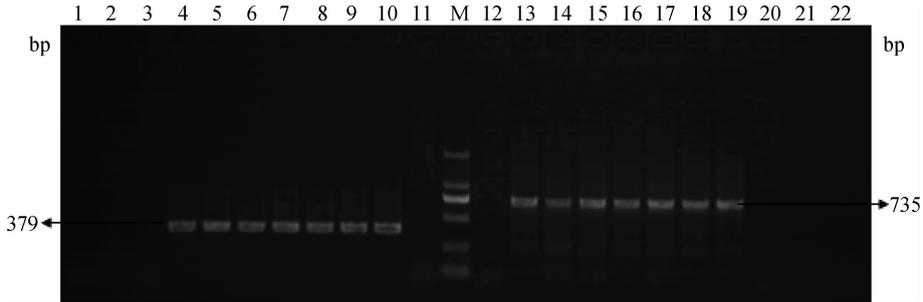
图 1  $F_1$  代仔兔活体荧光检测

Fig 1  $F_1$  generation fluorescence detection *in vivo*

图 1 中右侧仔兔为 *PID1* RNAi 转基因阳性兔,四肢和嘴部有荧光表达,光强度大,左侧仔兔为空白对照兔,无荧光表达。

本研究试验组共繁殖获得 F<sub>1</sub> 代仔兔 106 只,空白对照组共繁殖获得 F<sub>1</sub> 代仔兔 42 只,对试验组繁

殖的 F<sub>1</sub> 代仔兔分别提取基因组 DNA。以基因组 DNA 为模版进行 PCR,2 对引物都扩增出现目的条带的为阳性,检测结果如图 2。试验组繁殖的 106 只 F<sub>1</sub> 代仔兔中,阳性兔为 7 只,阴性兔为 99 只,阳性率为 6.60%。



1~11, 以 *GFP1* 为引物;12~22, 以 *GFP2* 为引物。M. DNA 相对分子质量标准;1~3、20~22. 阴性;4~10、13~19. 阳性;11、12. 空白对照

1-11, *GFP1* as primer;12-22, *GFP2* as primer;M. DNA 2000 marker;1-3 and 20-22. Negative;4-10 and 13-19. Positive;11 and 12. Blank control

图 2 PCR 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR

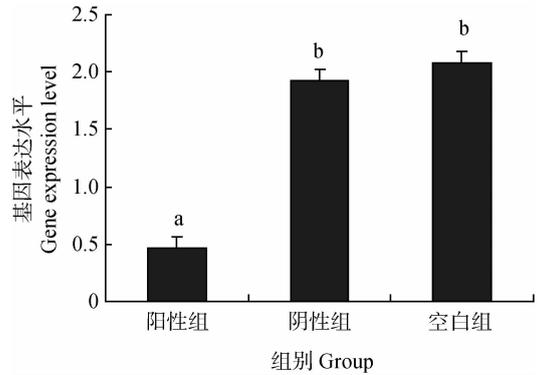
### 2.3 F<sub>1</sub> 代个体 RT-PCR 和 Western blot 检测

2.3.1 RT-PCR 检测结果 采用 RT-PCR 检测 *PID1* 基因 mRNA 相对表达量(图 3)。结果表明, RNA 干扰 *PID1* 基因阳性兔的 mRNA 表达量显著低于阴性兔和空白对照兔 ( $P < 0.05$ ), 阴性兔与空白对照兔差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

2.3.2 Western blot 检测结果 Western blot 检测 *PID1* 蛋白表达的结果见图 4。结果表明,内参照  $\beta$ -Actin 为均一显影的条带,而阳性组、阴性组、空白组 *PID1* 的显影条带密度不同。用 ImageJ 软件分析比较条带灰度值发现,阳性组的 *PID1* 蛋白表达量较阴性组和空白对照组的显著减弱,而阴性组与空白对照组条带密度相当,无显著差异(图 5)。

### 2.4 F<sub>1</sub> 代肉兔肌肉脂肪含量测定结果

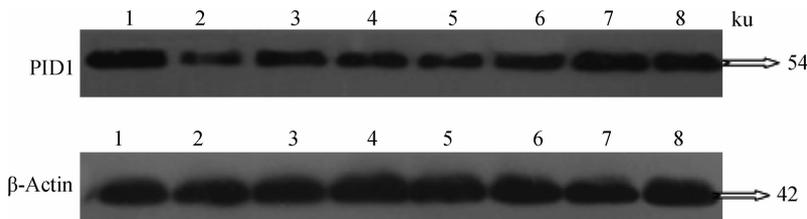
测定 F<sub>1</sub> 代肉兔背最长肌的肌肉脂肪含量,结



字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。下同  
Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).  
The same as below

图 3 阳性兔、阴性兔、空白对照兔 *PID1* mRNA 的相对表达量

Fig. 3 The relative expression levels of *PID1* mRNA in positive, negative and blank group



1. 空白组;2~6. 阳性组;7~8. 阴性组

1. Blank group;2-6. Positive group;7-8. Negative group

图 4 Western blot 检测 *PID1* 蛋白表达电泳图

Fig. 4 Electrophoresis of *PID1* protein expression tested by Western blot

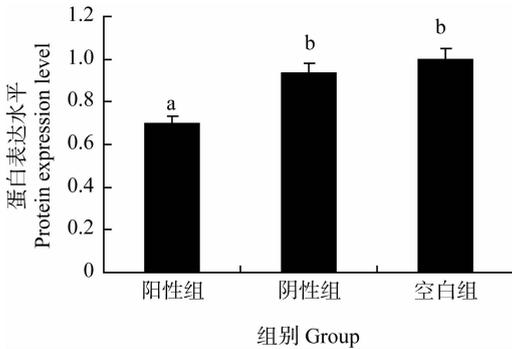


图5 阳性兔、阴性兔、空白对照兔 *P1D1* 蛋白的表达水平  
Fig. 5 Expression levels of *P1D1* protein in positive, negative and blank group

果表明, *P1D1* 基因 RNAi 阳性兔、阴性兔和空白对照兔的肌肉脂肪含量分别为  $(0.53 \pm 0.05)\%$ 、 $(0.70 \pm 0.07)\%$  和  $(0.71 \pm 0.03)\%$ , 其中, 阳性兔肌肉脂肪含量显著低于阴性兔和空白对照兔 ( $P < 0.05$ ), 阴性兔与空白对照兔差异不显著 ( $P > 0.05$ ) (图6)。测定阳性兔、阴性兔和空白对照兔的腹脂沉积率分别为  $(0.72 \pm 0.02)\%$ 、 $(0.72 \pm 0.03)\%$  和  $(0.74 \pm 0.03)\%$ , 结果表明, 阳性兔与阴性兔和空白对照兔相比, 3组差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

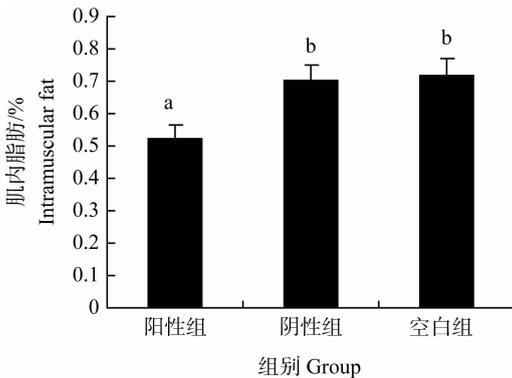


图6 不同组别肌肉脂肪含量  
Fig. 6 Intramuscular fat content of positive, negative and blank group

### 3 讨论

高华颖等<sup>[16]</sup>采用直接注射的方法, 将脂质体包裹的含人乳铁蛋白基因的重组质粒 pLNCXHLF 注入兔睾丸组织, 1个月后分别与正常雌兔交配, 所产仔兔均为活体, 经 PCR 和 Southern 检测, 转基因仔兔阳性率平均为 35%, 这种方法既节省时间又可降低成本, 是一种简便且行之有效的方法, 为利用精子载体制备转基因动物研究提供了很有价值的参考。

在后基因组时代, 需要大规模高通量地研究基因的功能, 由于 RNAi 能高效特异地阻断基因的表达因而成为研究基因功能很好的工具, RNAi 已被成功地用于构建转基因动物模型, 标志着 RNAi 将成为研究基因功能不可或缺的工具<sup>[2]</sup>。几个研究小组已经构建了 RNAi 小鼠, 由 shRNA 介导的胚系转基因小鼠能沉默靶基因, 并证实了稳定整合的 shRNA 表达载体能产生功能上类似敲除的表型<sup>[17-18]</sup>。C. T. Dann 等<sup>[19]</sup>利用 shRNA 表达载体, 产生的转基因 RNAi 大鼠, RNA 干扰效应能够遗传至第 3 代仔鼠。甚至有文献报道<sup>[20]</sup>, 干扰效果可持续到第 6 代。RNAi 小鼠的产生为在大动物上进行基因沉默研究提供了很好的动物模型<sup>[21]</sup>, 为本研究提供了良好的理论和试验基础。

*P1D1* 基因可以通过抑制磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K-PKB) 信号通路, 导致成熟脂肪细胞胰岛素刺激下葡萄糖摄取降低<sup>[22]</sup>。利用基因敲除或 RNA 干扰手段下调 *P1D1* 基因表达量以后, 脂肪细胞中胰岛素敏感的葡萄糖大量摄取, 同时促进 IRS-1/PI3K/AKT 信号通路, 胰岛素敏感的葡萄糖摄取增加, 减少了细胞中 ATP 的浓度, 促进线粒体转膜<sup>[23-24]</sup>, 线粒体转膜的增加使葡萄糖能够被消耗, 降低脂肪葡萄糖的沉积浓度<sup>[13]</sup>。史春梅等<sup>[25]</sup>研究发现, *P1D1* 基因沉默可改善 *P1D1* 过表达引起的损害线粒体代谢相关基因的表达, 改善脂肪细胞线粒体代谢基因的表达, 维持脂肪细胞线粒体代谢平衡。钱源等<sup>[12]</sup>通过对莱芜猪、鲁莱黑猪、大白猪的研究发现, *P1D1* 基因的 mRNA 表达具有组织特异性, 并且与肌肉脂肪含量密切相关。

本研究通过建立 RNA 干扰 *P1D1* 基因的肉兔动物模型的方式, 来研究 *P1D1* 基因与肌肉脂肪沉积的关系。本实验室前期工作中已构建 4 个干扰载体, 并筛选出 1 个能够高效抑制转染细胞 *P1D1* 基因 mRNA 和蛋白表达的干扰载体 pGPU6/GFP/Neo-*P1D1*-2<sup>[14]</sup>, 本试验利用此高效干扰载体, 通过睾丸打点注射精子介导, 繁殖得到 106 只后代仔兔, 成功获得 7 只转基因阳性兔 (阳性率 6.60%)。试验结果表明, 转基因处理后, 无论是受胎率还是窝产仔数均比对照组降低, 这与前人的研究结果相一致, 因为插入基因突变可能会导致动物发育畸形甚至死亡<sup>[26-27]</sup>, 外源基因插入可能会使动物体内严格的基因表达调控发生变化, 导致异位或异时表达, 从而影响动物健康<sup>[28]</sup>。本试验结果阳性率偏低, 原因可能

是, RNAi 在哺乳动物的研究上起步较晚, 在哺乳动物上的研究技术还不是很成熟; 据报道, 转基因 RNAi 动物技术上存在的主要问题是外源基因在宿主细胞中的整合率较低<sup>[29]</sup>。此外, 本试验设计了 2 对引物, 只有 2 对引物同时检测出目的条带才认为它是阳性, 这样结果也更准确。

深入研究 *PID1* 基因的功能及其影响机制, 将对阐明其与脂肪沉积的确切关系具有重要意义, 也将为今后畜禽肉品质的遗传改良提供新的研究思路<sup>[30]</sup>。本研究对试验所获 F1 代肉兔的检测发现, RNAi 阳性兔的背最长肌 *PID1* 基因 mRNA 表达量和蛋白表达量均表现为下调, 并且 *PID1* 基因 RNAi 阳性肉兔的肌内脂肪含量显著低于阴性兔和空白对照兔。因此, 本研究从 RNAi 肉兔模型构建的角度进一步验证了 *PID1* 基因对肌内脂肪沉积影响的功能, 为进一步认识肌内脂肪这一重要肉质性状的遗传机制奠定基础, 并可为下一步研究制备高肌内脂肪优质 *PID1* 转基因猪提供科学依据。

#### 参考文献:

- [1] ASHIHARA E, KAWATA E, MAEKAWA T. Future prospect of RNA interference for cancer therapies[J]. *Curr Drug Targets*, 2010, 11(3): 345-360.
- [2] 李方华, 侯玲玲, 苏晓华, 等. RNA 干扰的研究进展及应用[J]. *生物技术通讯*, 2010, 21(5): 740-745.
- [3] LAVITRANO M, CAMAIONI A, FAZIO V M, et al. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice[J]. *Cell*, 1989, 57(5): 717-723.
- [4] HORAN R, POWELL R, MCQUAID S, et al. Association of foreign DNA with porcine spermatozoa[J]. *Syst Biol Reprod Med*, 1991, 26(2): 83-92.
- [5] NAKANISHI A, IRITANI A. Gene transfer in the chicken by sperm mediated methods[J]. *Mol Reprod Dev*, 1993, 36(2): 258-261.
- [6] QIU J, NI Y H, GONG H X, 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.
- [7] 邱洁, 郭锡熔, 李晓南, 等. 新基因 *NYGGF4* 在肥胖患儿脂肪组织中的表达验证及生物信息学分析[J]. *实用儿科临床杂志*, 2008, 23(7): 495-497.
- [8] WANG B, ZHANG M, NI Y H, 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(1): 132-140.
- [9] HOVENIER R, KANIS E, VAN ASSELDONK T, et al. Breeding for pig meat quality in halothane negative populations—a review[J]. *Pig News Inform*, 1993, 14: 17-25.
- [10] 张宏宇, 单安山, 徐林, 等. 猪肌内脂肪调控研究进展[J]. *东北农业大学学报*, 2010, 41(2): 156-160.
- [11] 曾勇庆, 王根林, 魏述东, 等. 含不同比例莱芜猪血缘杂交猪胴体品质及肉质特性的研究[J]. *遗传*, 2005, 27(1): 65-69.
- [12] 钱源, 曾勇庆, 杜金芳, 等. *PID1* 基因 CDS 区的克隆及其 mRNA 表达与肌内脂肪沉积关系[J]. *遗传*, 2010, 32(11): 1153-1158.
- [13] 徐洪刚, 郑程莉, 徐刚毅. 肥胖相关基因 *PID1* 的研究进展[J]. *中国畜牧杂志*, 2013, 49(9): 92-96.
- [14] 杨伦, 徐正刚, 王慧, 等. RNA 干扰沉默 *PID1* 基因在 C2C12 细胞中表达的研究[J]. *山东大学学报(理学版)*, 2013, 48(1): 36-42.
- [15] YUAN J S, WANG D L, STEWART C N. Statistical methods for efficiency adjusted real-time PCR quantification[J]. *Biotechnol J*, 2008, 3(1): 112-123.
- [16] 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.
- [17] HEMANN M T, FRIDMAN J S, ZILFOU J T, et al. An epi-allelic series of p53 hypomorphs created by stable RNAi produces distinct tumor phenotypes *in vivo*[J]. *Nat Genet*, 2003, 33(3): 396-400.
- [18] CARMELL M A, ZHANG L, CONKLIN D S, et al. Germline transmission of RNAi in mice[J]. *Nat Struct Biol*, 2003, 10(2): 91-92.
- [19] DANN C T, ALVARADO A L, HAMMER R E, et al. Heritable and stable gene knockdown in rats[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(30): 11246-11251.
- [20] JAZAG A, KANAI F, IJICHI H, et al. Single small-interfering RNA expression vector for silencing multiple transforming growth factor-beta pathway components[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(15): e131.
- [21] 鲍永华, 郭永臣, 赵志辉, 等. RNA 干扰技术在动物抗病育种中的应用前景[J]. *中国兽医学报*, 2010, 30(10): 1402-1408.
- [22] ZHAO Y P, ZHANG C M, CHEN X H, et al. Overexpression of *NYGGF4* (*PID1*) induces mitochondrial impairment in 3T3-L1 adipocytes[J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 340(1-2): 41-48

- [23] ZENG X Q, ZHANG C M, TONG M L. Knockdown of *NYGGF4* increases glucose transport in C2C12 mice skeletal myocytes by activation IRS-1/PI3K/AKT insulin pathway [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2012, 44(3): 351-355.
- [24] WANG Y M, LIN X F, SHI C M, et al.  $\alpha$ -Lipoic acid protects 3T3-L1 adipocytes from *NYGGF4* (*PID1*) overexpression-induced insulin resistance through increasing phosphorylation of IRS-1 and Akt [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2012, 44(3): 357-363.
- [25] 史春梅, 季晨博, 张春梅, 等. *NYGGF4* 基因表达沉默对 3T3-L1 脂肪细胞线粒体代谢的影响 [J]. 实用儿科临床杂志, 2012, 27(19): 1480-1484.
- [26] WOYCHIK R P, STEWART T A, DAVIS L G, et al. An inherited limb deformity created by insertional mutagenesis in a transgenic mouse [J]. *Nature*, 1985, 318(6041): 36-40.
- [27] OVERBEEK P A, LAI S P, VAN QUILL K R, et al. Tissue-specific expression in transgenic mice of a fused gene containing RSV terminal sequences [J]. *Science*, 1986, 231(4745): 1574-1577.
- [28] 田小利, 陈兰英. 转基因动物研究中存在的问题 [J]. 生物工程进展, 1995, 15(5): 41-45.
- [29] 时伟丽, 王 健, 施惠娟. 转基因 RNA 干扰动物研究进展 [J]. 生殖与避孕, 2010, 30(2): 114-119.
- [30] 陈小玲, 黄志清, 贾 刚, 等. 磷酸酪氨酸互作结构域 1 基因对肉质性状的调控 [J]. 动物营养学报, 2012, 24(4): 591-594.

(编辑 程金华)