



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113136439 B

(45) 授权公告日 2022.04.08

(21) 申请号 202110588040.2

C12N 15/11 (2006.01)

(22) 申请日 2021.05.28

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 106244569 A, 2016.12.21

申请公布号 CN 113136439 A

EP 3066204 A1, 2016.09.14

(43) 申请公布日 2021.07.20

US 2003190636 A1, 2003.10.09

(73) 专利权人 兰州大学

US 2004048265 A1, 2004.03.11

地址 730000 甘肃省兰州市城关区天水南路222号

NCBI. "rs424366301". 《Ensembl》. 2021,

刘星. "羊肉品质评价指标及重要候选基因研究进展". 《农业生物技术学报》. 2020, 第28卷(第10期),

(72) 发明人 乐祥鹏 孔园园 李发弟 秦芳 刘星

刘星. "湖羊肌内脂肪含量特征及相关分子标记筛选". 《中国优秀硕士学位论文全文数据库农业科技辑》. 2021, (第09期),

(74) 专利代理机构 西安通大专利代理有限责任公司 61200

审查员 夏士博

代理人 范巍

(51) Int. Cl.

权利要求书1页 说明书5页

C12Q 1/6888 (2018.01)

序列表1页 附图1页

(54) 发明名称

一种检测绵羊LIPE基因单核苷酸多态性的方法及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种检测绵羊LIPE基因单核苷酸多态性的方法及其应用,包括以下步骤:提取湖羊组织DNA样品、LIPE基因突变位点g.4819A>G的单核苷酸多态性分型;通过对湖羊LIPE基因单核苷酸多态性与肌内脂肪含量的关联分析,表明对湖羊LIPE基因单核苷酸多态性位点的分型检测可以获得作为提高湖羊肌内脂肪含量的分子标记,可用于选育肉质良好的绵羊品种。

1. 一种检测绵羊*LIPF*基因单核苷酸多态性的方法在绵羊标记辅助选择中的应用,其特征在于:

检测绵羊*LIPF*基因单核苷酸多态性的方法,包括以下步骤:

提取绵羊基因组DNA进行分析,确定*LIPF*基因单核苷酸多态性位点的基因型,所述单核苷酸多态性位点包括*LIPF*基因突变位点NC_040265.1 g.54064878 A>G;

*LIPF*基因突变位点NC_040265.1 g.54064878 A>G的基因型为GG的绵羊个体在肉质性状上较优;

所述肉质性状较优是指肌内脂肪含量高;

所述绵羊选自湖羊。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於:所述*LIPF*基因单核苷酸多态性位点的基因型采用DNA测序法或imLDR技术分析确定。

3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於:所述*LIPF*基因突变位点是通过将提取自不同绵羊个体的DNA混合,并对混合形成的DNA池进行目的片段扩增和测序而确定的。

4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在於:所述DNA的提取方法为高盐法。

5. 根据权利要求3所述的应用,其特征在於:所述目的片段扩增采用的引物为引物对P1,所述引物对P1为:

上游引物F:5' -TCACCGAGATCCAGGTGCTA-3'

下游引物R:5' -TCACTCCTCCGAGAGACGG-3'。

6. 绵羊*LIPF*基因突变位点NC_040265.1 g.54064878 A>G在绵羊标记辅助选择中的应用,其特征在於:*LIPF*基因突变位点NC_040265.1 g.54064878 A>G的基因型为GG的绵羊个体在肉质性状上较优;

所述肉质性状较优是指肌内脂肪含量高;

所述绵羊选自湖羊。

一种检测绵羊LIPE基因单核苷酸多态性的方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于分子遗传学检测领域,涉及一种利用DNA混池测序结合imLDR技术检测绵羊LIPE基因单核苷酸多态性的方法及其应用。

背景技术

[0002] 单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)指在基因组水平上由于单个碱基的转换、颠换、插入、缺失而引起的变异。SNP广泛存在于基因组中,在遗传图谱构建、基因精确定位、遗传育种等方面应用广泛。SNP根据突变所在位置可分为基因编码区的SNP(coding SNP, cSNP)和非编码区的SNP, cSNP分为同义cSNP和非同义cSNP。同义cSNP指碱基突变后没有引起蛋白质的氨基酸序列发生改变。非同义cSNP指碱基突变后引起蛋白质的氨基酸序列发生改变,例如,内含子区的SNP通常不会改变基因编码的蛋白质氨基酸序列,但这些SNP可使剪切位点发生改变而产生不同的转录本,从而对表型产生影响。荧光多重酶连接反应(improved multiplex ligation detection reaction, imLDR)技术是基于LDR技术原理的改良检测分型技术,具有准确性高、检测速度快等优点,可以提高SNP分型的通量,降低分型成本。

[0003] 肌内脂肪(intramuscular fat, IMF)是挥发性化合物的主要来源,是物种专一的风味前体物质。IMF存在于肌肉纤维上,可使肌肉纤维束分离,从而改善肉的嫩度,是影响肉质的最重要因素之一。IMF含量过低使肉质干硬乏味。IMF含量受营养、遗传、性别、日龄、饲养方式等因素的影响。研究表明,IMF含量在4%至5%的羊肉品质最佳,因此适宜的IMF含量是推进肉质改良的重要指标之一。

[0004] Liu等人研究表明,PPAR信号通路中的脂解基因下调可增加鸡胸大肌组织中的IMF含量。Schenkel等对Leptin基因5个SNP的基因分型与背最长肌脂肪含量进行相关性分析。Jing等对西门塔尔杂交牛Leptin基因编码区2个SNP与肉质性状(背膘厚度、IMF含量、多不饱和脂肪酸含量)进行相关性分析。何俊对鸭L-FABP基因第二外显子SNP与IMF含量进行相关性分析。因此,基于影响IMF含量的候选基因,通过遗传选择(例如,标记辅助选择)可以改善肉质(风味、多汁性和嫩度),从而满足人们的消费需求。

[0005] 激素敏感脂酶(hormone-sensitive lipase, HSL)基因,又名LIPE基因,位于羊的14号染色体,全长12799bp, HSL是参与动物体内脂肪分解代谢的限速酶,其作用是在脂肪分解代谢过程中将甘油三酯水解成甘油和脂肪酸,为动物机体代谢提供能量。研究发现,LIPE基因在湖羊羔羊股二头肌、背最长肌、腰大肌的表达水平与IMF含量均存在正相关关系,哈萨克羊LIPE基因的mRNA表达量与IMF含量呈负相关关系,而新疆细毛羊LIPE基因mRNA的表达量与IMF含量无明显相关性,这些研究说明LIPE基因在不同绵羊品种间的表达水平存在一定差异。因此,目前尚未见到与绵羊IMF含量显著相关的LIPE基因分子标记位点的报道,同时,利用分子标记对具有肉质性状优势的绵羊个体进行早期筛选仍属于技术难题。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种检测绵羊LIPE基因单核苷酸多态性的方法及其应用，可以加快对肉质良好的绵羊品种的选育。

[0007] 为达到上述目的，本发明采用了以下技术方案：

[0008] 一种检测绵羊LIPE基因单核苷酸多态性的方法，包括以下步骤：

[0009] 提取绵羊个体基因组DNA作为核酸样品，通过对提取的核酸样品进行分析，确定个体LIPE基因单核苷酸多态性位点的基因型，所述单核苷酸多态性位点为LIPE基因突变位点g.4819A>G(参考序列为NC_040265.1)。

[0010] 优选的，所述核酸样品的分析采用DNA测序法，或者核酸样品的分析采用imLDR技术。

[0011] 优选的，所述LIPE基因突变位点是通过将提取自不同绵羊(例如，湖羊)个体睾丸组织的DNA混合，并对混合形成的DNA池进行目的片段扩增和测序而确定。

[0012] 优选的，所述睾丸组织的DNA的提取方法为高盐法，高盐法提取睾丸组织DNA的操作简单、耗时较短，所提取的DNA(基因组DNA)完整性好，OD=260/280均在1.6~1.8之间，同时能满足imLDR技术分型要求。

[0013] 优选的，所述目的片段扩增采用的引物为引物对P1(扩增产物包含突变位点g.4819A>G，即扩增LIPE基因单核苷酸多态性位点)，所述引物对P1具体为：

[0014] 上游引物F:5'-TCACCGAGATCCAGGTGCTA-3'

[0015] 下游引物R:5'-TCACTCCTCCGAGAGACGG-3'。

[0016] 上述检测绵羊LIPE基因单核苷酸多态性的方法在绵羊标记辅助选择中的应用。

[0017] 绵羊LIPE基因突变位点g.4819A>G(参考序列为NC_040265.1)在绵羊标记辅助选择中的应用。

[0018] 优选的，在绵羊(例如，湖羊)群体中，LIPE基因突变位点g.4819A>G(参考序列为NC_040265.1)基因型为GG的个体在肉质性状上较优。

[0019] 优选的，所述肉质性状选自肌内脂肪(IMF)含量。

[0020] 一种检测绵羊LIPE基因单核苷酸多态性的试剂盒，该试剂盒包括用于完成上述核酸样品的分析的必要试剂。

[0021] 优选的，所述必要试剂具体包括上述引物对P1。

[0022] 本发明的有益效果体现在：

[0023] 本发明通过对新发现的LIPE基因SNP位点(具体为g.4819A>G)进行分型检测，为绵羊优良肉质性状早期筛选提供了候选分子标记，从而为利用标记辅助选择进行肉质优良的绵羊品种选育提供了理论研究和实践的基础。

[0024] 进一步的，本发明中，LIPE基因SNP位点(具体为g.4819A>G)可以通过采用imLDR技术进行有效的基因分型，可以快速建立肉质性状优良的绵羊种群，从而加快绵羊良种选育进程。

附图说明

[0025] 图1为湖羊LIPE基因目的片段(含第五外显子、部分第四内含子和部分第五内含子)的PCR扩增产物(483bp片段)的电泳图。

[0026] 图2为湖羊不同个体DNA池扩增产物测序峰图；图中箭头所指位置为LIPE基因第4819位突变位点。

具体实施方式

[0027] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步详细描述。所述实施例仅用于解释本发明的技术方案,而非对本发明的保护范围的限制。

[0028] (一)通过DNA池测序筛选新的湖羊LIPE基因单核苷酸突变位点

[0029] S1样品选取:

[0030] 于2018年8月~2020年1月共采取来自于民勤德福农业科技有限公司相同饲养条件下的921只(四批)6月龄健康湖羊的睾丸组织及背最长肌组织,并测定个体背最长肌的肌内脂肪含量。

[0031] S2 DNA池的构建:

[0032] a)使用高盐法提取921只湖羊个体睾丸组织DNA(基因组DNA),具体步骤为:

[0033] I)液氮下研磨组织样后,取0.1g组织粉末至离心管中;

[0034] II)加入20%的SDS(100 μ L)和DNA抽提液(400 μ L)作为裂解液,静置5min,漩涡使沉淀(组织粉末)完全溶解于裂解液中,然后加入20 μ L的蛋白酶K,颠倒混匀;

[0035] III)将混匀的样品置于56 $^{\circ}$ C水浴锅中,消化过夜;

[0036] IV)将饱和食盐水(300 μ L)加入到消化好的样品中,颠倒3min,4 $^{\circ}$ C静置10min;

[0037] V)12000r离心10min,转移上清液至新的离心管中;

[0038] VI)加入预冷的无水乙醇(1mL)后颠倒混匀1min,12000r离心2min,弃上清,保留DNA沉淀;

[0039] VII)加入75%乙醇(500 μ L)至离心管中,轻摇混匀,12000r离心1min,弃上清,保留DNA沉淀,再次加入75%乙醇(500 μ L)至离心管中,轻摇混匀,12000r离心1min,弃上清,保留DNA沉淀,开盖静置5h,使剩余乙醇完全挥发;

[0040] VIII)加入56 $^{\circ}$ C TE缓冲液(200 μ L)至离心管中,56 $^{\circ}$ C开盖10min(使乙醇挥发沉淀溶解),4 $^{\circ}$ C过夜溶解DNA。

[0041] b)将提取出的DNA样品(溶解于TE缓冲液的DNA)经琼脂糖凝胶电泳检测完整性,并用核酸蛋白浓度测定仪Nanodrop 2000测260/280nmOD值及DNA浓度,将浓度大于50ng/ μ L,且OD=260/280在1.6~1.8之间的DNA样品判断为合格样品。

[0042] c)921只湖羊的DNA样品经质量检测合格后,随机选择100个DNA样品,统一稀释至50ng/ μ L,每10个稀释后的DNA样品构建1个DNA混池(即由10个个体的基因组DNA组成的DNA池),共构建10个DNA混池。

[0043] S3 PCR扩增:

[0044] 以NCBI公布的绵羊LIPE基因DNA序列(NC_040265.1)为参考,利用Primer-Blast软件设计扩增LIPE基因片段(第五外显子及部分第四内含子和部分第五内含子)的引物对P1:

[0045] 上游引物F:5'-TCACCGAGATCCAGGTGCTA-3'

[0046] 下游引物R:5'-TCACTCCTCCGAGAGACGG-3'

[0047] 以DNA混池为模板进行PCR扩增;

[0048] 反应体系为25 μ L:12.5 μ L Mix、10.5 μ L灭菌蒸馏水、0.5 μ L上游引物(10pmol/ μ L)、

0.5 μ L下游引物(10pmol/ μ L),以及1 μ L DNA模板(50ng/ μ L)。

[0049] 反应程序为:95 $^{\circ}$ C预变性5min;95 $^{\circ}$ C变性30s,62.7 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸40s,共34个循环;72 $^{\circ}$ C再延伸5min。

[0050] 参见图1,通过将利用引物对P1扩增的产物进行琼脂糖凝胶电泳,获得了483bp目的片段,电泳结果表明引物对P1具有特异性,并且可以用于通过PCR扩增方便的获得足够数量的目的片段。

[0051] S4扩增产物测序:

[0052] 将步骤S3中利用DNA混池扩增的PCR产物进行双向测序。参见图2,通过对扩增的目的片段进行测序,发现湖羊LIPE基因的第4819位单核苷酸位点为突变位点(g.4819A>G)。

[0053] (二)通过荧光多重酶连接反应(imLDR)技术对候选SNP位点进行分型

[0054] 将质量检测合格的921份湖羊DNA样品统一稀释至50ng/ μ L,并分装到1mL的离心管中,将以上突变位点作为LIPE基因候选单核苷酸多态性位点,取位点上、下游各15bp DNA序列信息提供给深圳天昊科技有限公司,并由该公司利用imLDR技术对稀释的921份DNA样品的候选核苷酸多态性位点进行分型。

[0055] (三)湖羊LIPE基因分型及肌内脂肪含量数据分析

[0056] 3.1湖羊LIPE基因突变位点的频率统计

[0057] 基因频率计算公式:

$$[0058] P_B = (2N_{BB} + N_{Bb1} + N_{Bb2} + N_{Bb3} + N_{Bb4} + \dots + N_{Bbn}) / 2N$$

[0059] 式中, P_B 表示等位基因B频率, N_{BB} 表示群体中具有BB基因型的个体数量, N_{Bbi} 表示群体中具有 B_{bi} 基因型个体数量, $b1 \sim bn$ 为等位基因B的n个互不相同的复等位基因,N为检测群体的总个体数。

[0060] 基因型频率计算公式:

$$[0061] P_{BB} = N_{BB} / N$$

[0062] 式中, P_{BB} 代表某一位点的BB基因型频率, N_{BB} 表示群体中具有BB基因型的个体数,N为检测群体的总个体数;

[0063] 对不同湖羊个体的等位基因和基因型的分析完成后,按以上公式对湖羊群体LIPE基因突变位点的等位基因和基因型的频率进行计算,结果如表1所示:

[0064] 表1.湖羊LIPE基因突变位点g.4819A>G等位基因频率与基因型频率

位点	基因型频率			等位基因频率	
	AA	GA	GG	A	G
g.4819 A>G	74.81%(689)	23.34%(215)	1.85%(17)	86.48%	13.52%

[0066] 根据表1的结果,可以确定湖羊LIPE基因突变位点g.4819A>G(A为优势等位基因)属于SNP位点。

[0067] 3.2湖羊LIPE基因单核苷酸多态性(SNP)位点与肌内脂肪(IMF)含量的关联分析待分析数据:imLDR技术的分型结果;肌内脂肪含量表型数据

[0068] 采用SPSS 25软件分析数据,SNP位点分型结果与肌内脂肪含量表型数据的相关性分析具体采用以下分析模型:

$$[0069] Y_{ijk} = \mu + G_j + E_{ijk}$$

[0070] 式中, Y_{ijk} 为个体表型; μ 为群体均值; G_j 为各位点的基因型效应; E_{ijk} 为随机误差。分析结果如表2所示:

[0071] 表2. 湖羊LIPE基因单核苷酸多态性与肌肉脂肪含量的关联分析

	位点	基因型	数量	IMF 含量 (%)	P 值
[0072]	g.4819 A>G	AA	689	-0.04±1.42 ^a	P<0.01
		GA	215	0.04±1.42 ^a	
		GG	17	1.28±1.7 ^b	

[0073] 注:不同肩标字母表示差异极显著 ($P<0.01$), 相同肩标字母表示差异不显著 ($P>0.05$); IMF含量为使用R3.6.0去除批次效应后的数据, 负号是由去除批次效应造成。

[0074] 关联分析结果显示(表2), 湖羊LIPE基因g.4819A>G位点的单核苷酸多态性可以影响个体IMF含量的表型, g.4819A>G位点为AA基因型和GA基因型的个体, 其IMF含量与GG基因型个体的IMF含量差异极显著 ($P<0.01$)。根据以上分析结果, g.4819A>G位点可以作为提高IMF含量的潜在遗传标记, 通过选择LIPE基因第4819单核苷酸多态性位点为GG基因型的个体, 可以快速建立具有肉质性状优势的湖羊群体, 从而加快优良绵羊品种选育进程。

[0075] 本发明所检测的LIPE基因单核苷酸多态性位点为位于绵羊LIPE基因第四内含子的突变位点g.4819A>G, g.4819A>G位点的突变未造成密码子及氨基酸的改变。研究表明, 内含子区的SNP可使剪切位点发生改变而产生不同的转录本, 影响翻译效率, 从而对绵羊(例如, 湖羊)LIPE基因表达量、激素敏感脂酶的蛋白质空间结构等产生影响, 进而影响个体肌肉脂肪含量。

[0076] 总之, IMF含量是推进羊肉品质改良的重要参考指标之一, 通过对LIPE基因单核苷酸多态性位点的分型检测可以获得作为提高绵羊(例如, 湖羊)肌肉脂肪含量的分子标记(SNP标记), 实现对绵羊个体进行早期筛选, 可以用于快速建立肉质性状优良的绵羊种群, 从而加快选育肉质良好的绵羊品种, 对于从分子育种方面改善羊肉品质具有重要意义。

- [0001] <110> 兰州大学
- [0002] <120> 一种检测绵羊LIPE基因单核苷酸多态性的方法及其应用
- [0003] <160> 2
- [0004] <210> 1
- [0005] <211> 20
- [0006] <212> DNA
- [0007] <213> F
- [0008] <400> 1
- [0009] tcaccgagat ccaggtgcta 20
- [0010] <210> 2
- [0011] <211> 20
- [0012] <212> DNA
- [0013] <213> R
- [0014] <400> 2
- [0015] tcactcctcc gagagacgg 19

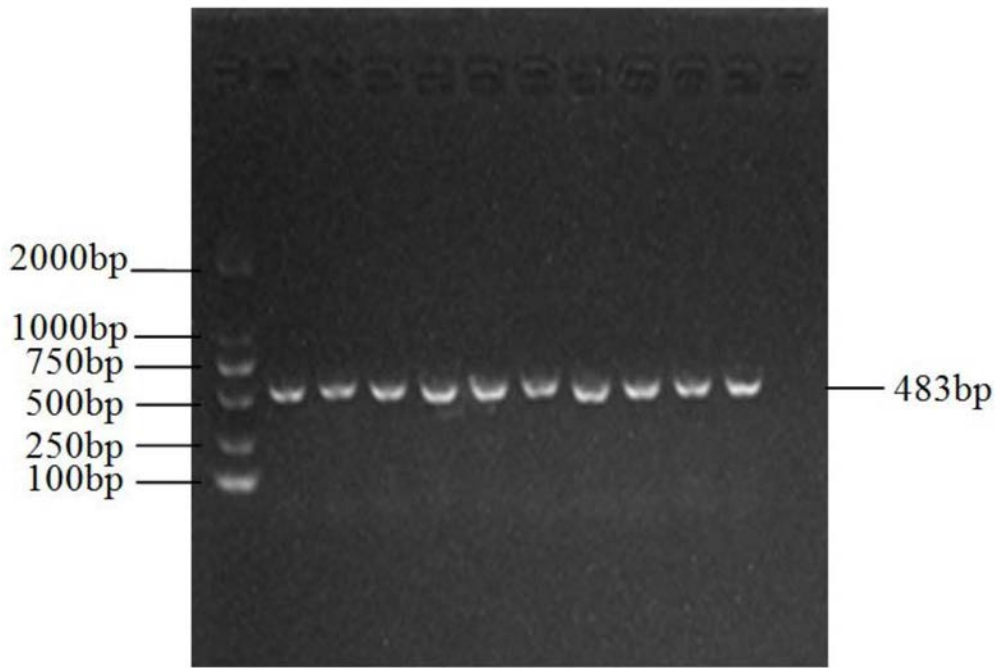


图1

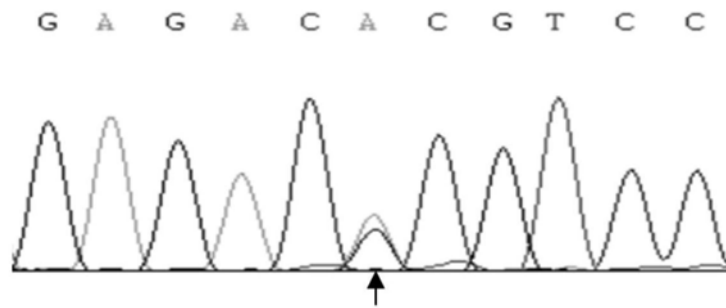


图2