



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114164262 B

(45) 授权公告日 2023. 07. 28

(21) 申请号 202111473160.4

CN 101675729 A, 2010.03.24

(22) 申请日 2021.12.06

CN 101429557 A, 2009.05.13

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114164262 A

张俊杰 等. 白斑狗鱼雌、雄基因组混池重测序研究.《淡水渔业》.2020,第50卷(第3期),第17-25页.

(43) 申请公布日 2022.03.11

赵瑞阳. 白斑狗鱼性别特异分子标记筛选.《中国学位论文全文数据库》.2021,第1-75页.

(73) 专利权人 新疆农业大学
地址 830000 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市沙依巴克区农大东路311号

John M. Casselman. External Sex Determination of Northern Pike, *Esox lucius* Linnaeus.《Transactions of the American Fisheries Society》.2011,第103卷(第2期),第343-347页.

(72) 发明人 张俊杰 刘璿慧 刘祎 王顺哲
杨倩 汪泳昌

Qiaowei Pan 等. Identification of the master sex determining gene in Northern pike (*Esox lucius*) reveals restricted sex chromosome differentiation.《PLoS Genet》.2019,第15卷(第8期),第1-31页.

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6879 (2018.01)

C12Q 1/6888 (2018.01)

C12Q 1/6858 (2018.01)

C12Q 1/6806 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

Qiaowei Pan 等. The rise and fall of the ancient northern pike master sex-determining gene.《eLife》.2021,第10卷第1-30页.

(56) 对比文件

CN 103283644 A, 2013.09.11

WO 2013054107 A1, 2013.04.18

CN 111593055 A, 2020.08.28

CN 110004235 A, 2019.07.12

审查员 贾星航

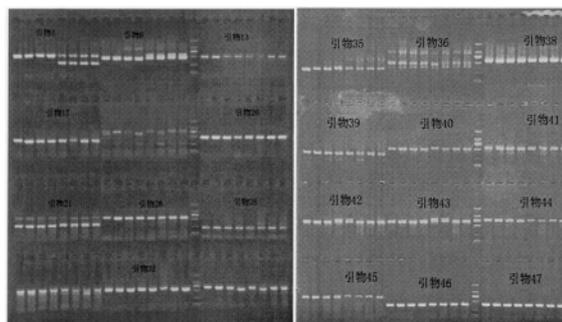
权利要求书2页 说明书4页 附图3页

(54) 发明名称

一种基于分子技术的白斑狗鱼性别鉴定方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于分子技术的白斑狗鱼性别鉴定方法,本发明要求保护一种白斑狗鱼遗传性别的特异分子标记,其在白斑狗鱼X染色体和Y染色体中存在差异,可将此差异用于鉴别白斑狗鱼的遗传性别。本发明克服现有技术的不足,提供一种基于性别连锁的特异分子标记,可以简单快速地实现遗传性别,大大节省人力物力。



CN 114164262 B

1. 一种基于分子技术的白斑狗鱼性别鉴定方法,其特征在于,提取白斑狗鱼鳍条DNA,将4#引物合成和溶解,用PCR扩增反应进行鉴别,

4#引物的序列分别为:

引物1:GGACTTTTTCCTACATACCTCAC和引物2:TCAGCCACTATATCTATCTTACCG;4#引物在雌雄鱼之间扩增出来的不同的条带,雌鱼DNA扩增产物电泳得到单一的条带,扩增产物大小为606bp,雄鱼DNA扩增产物电泳得到两个条带,其中一个是大小为606bp,另外一个大小为320bp。

2. 根据权利要求1所述的一种基于分子技术的白斑狗鱼性别鉴定方法,其特征在于,白斑狗鱼鳍条DNA提取步骤如下:

(a) 30mg的经过无水乙醇保存的鳍条样品组织,风干1h;

(b) 加入600 μ L裂解液,10 μ L 20mg/ml蛋白酶K,混匀56 $^{\circ}$ C水浴,裂解细胞2h;

(c) 8000rpm 5min离心,取上清液550 μ L;

(d) 加入550 μ L酚-氯仿异戊醇手动轻轻混匀10min,13000rpm、4 $^{\circ}$ C离心10min;

(e) 小心吸取400 μ L上清液于新的EP管;

(f) 加入800 μ L经过-20 $^{\circ}$ C预冷的无水乙醇,-20 $^{\circ}$ C放置30min,4 $^{\circ}$ C、13000rpm离心10min;

(g) 弃上清液,DNA是在EP管壁和底部的白色沉淀,加入70%乙醇,轻轻吹打后13000rpm离心5min;

(h) 重复操作步骤(g);

(i) 加入70 μ L ddH₂O溶解;

(j) 1.5%琼脂糖凝胶电泳,检验DNA提取效果可用全波长酶标仪测定浓度和纯度,根据酶标仪测定的DNA浓度,将各个DNA样品的浓度稀释调整到50-100ng/ μ L。

3. 根据权利要求1所述的一种基于分子技术的白斑狗鱼性别鉴定方法,其特征在于,PCR扩增反应:操作步骤如下:

(a1) PCR反应体系:采用PCR反应预混液mix,每个反应12.5 μ L;

2*PCR 反应预混液 mix	6.25 μ L
引物 1	0.5 μ L
引物 2	0.5 μ L
DNA 样品	1.0 μ L
ddH ₂ O	4.25 μ L

(b1) PCR反应程序如下:

首先是94 $^{\circ}$ C变性10min,然后进行35个循环的反应,具体包括94 $^{\circ}$ C变性30s,然后进行57 $^{\circ}$ C退火30s,退火后72 $^{\circ}$ C延伸1min,反应结束再72 $^{\circ}$ C延伸10min,最后4 $^{\circ}$ C进行保存。

4. 根据权利要求1所述的一种基于分子技术的白斑狗鱼性别鉴定方法,其特征在于,所述PCR扩增反应进行鉴别包括琼脂糖凝胶电泳检测和性别鉴定。

5. 根据权利要求4所述的一种基于分子技术的白斑狗鱼性别鉴定方法,其特征在于,所述琼脂糖凝胶电泳检测和性别鉴定步骤如下:

(a2) 琼脂糖凝胶电泳：

利用琼脂糖水平电泳仪在150V的电压下进行2%的琼脂糖凝胶电泳，检测PCR扩增产物，采用DL2000作为电泳maker；

(b2) 性别鉴定：

4#引物在雌雄鱼之间扩增出来的不同的条带，雌鱼DNA扩增产物电泳得到单一的条带，扩增产物大小为606bp，雄鱼DNA扩增产物电泳得到两个条带，其中一个是大小为606bp，另外一个大小为320bp。

一种基于分子技术的白斑狗鱼性别鉴定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及属于水产生物技术领域中的鱼类遗传性别鉴定和性别控制技术领域，具体涉及一种基于分子技术的白斑狗鱼性别鉴定方法。

背景技术

[0002] 在雌性生长速度显著快于雄性的鱼类养殖中，通过性别控制技术实现全雌化养殖是提高其养殖产量的关键技术之一，白斑狗鱼就是这样具有经济价值二态性的鱼类。所以，白斑狗鱼性别相关的基因研究与日俱增。国内外学者也对白斑狗鱼的性别控制开展了一系列的试验研究。Luczynski等人诱导白斑狗鱼进行雌核发育，获得了全雌白斑狗鱼的雌核发育鱼苗，并确定了白斑狗鱼的雄性配子异型(XY)的染色体性别决定类。Demska-Zakes等人对白斑狗鱼鱼苗喂食11 β -羟雄烯二酮后发现可以将其全部转化为雄性或间性。近来研究鱼类性别的决定机理和基因的研究取得了显著成效，张俊杰等人也做了许多相关的研究。

[0003] 开展白斑狗鱼的遗传性别鉴定技术研究既有重要的科学意义，又有广阔的应用前景。传统的鱼类性别控制育种需要通过测交，来判断亲本基因型是否为XX伪雄鱼，耗时耗力。而基于该性别鉴定技术，可以简单快速地实现性别鉴定，大大节省人力物力。因此，本领域技术人员提供了一种基于分子技术的白斑狗鱼性别鉴定方法，以解决上述背景技术中提出的问题。

发明内容

[0004] 为解决上述技术问题，本发明提供一种基于分子技术的白斑狗鱼性别鉴定方法，提取白斑狗鱼鳍条DNA，采用4#引物(reseqSNP381)，

[0005] 将4#引物(reseqSNP381)合成和溶解，用PCR扩增反应进行鉴别，

[0006] 4#引物的序列分别为：

[0007] GGACTTTTTCCTACATACCTCAC和TCAGCCACTATATCTATCTTACCG。

[0008] 优选的：白斑狗鱼鳍条DNA提取步骤如下：

[0009] (a) 30mg的经过无水乙醇保存的鳍条样品组织尽可能地剪碎，风干1h；

[0010] (b) 加入600 μ L裂解液，10 μ L蛋白酶K(20mg/ml)，混匀56 $^{\circ}$ C水浴，裂解细胞2h；

[0011] (c) 8000rpm 5min离心，取上清液550 μ L；

[0012] (d) 加入550 μ L酚-氯仿异戊醇手动轻轻混匀10min，13000rpm、4 $^{\circ}$ C离心10min；

[0013] (e) 小心吸取400 μ L上清液(不要吸到中间的蛋白质)于新的EP管；

[0014] (f) 加入800 μ L经过-20 $^{\circ}$ C预冷的无水乙醇，-20 $^{\circ}$ C放置30min，4 $^{\circ}$ C、13000rpm离心10min；

[0015] (g) 弃上清液，DNA是在EP管壁和底部的白色沉淀。加入70%乙醇，轻轻吹打后13000rpm离心5min；

[0016] (h) 重复操作步骤g；

[0017] (i) 加入70 μ L ddH₂O溶解；

[0018] (j) 1.5%琼脂糖凝胶电泳,检验DNA提取效果可用全波长酶标仪测定浓度和纯度,根据酶标仪测定的DNA浓度,将各个DNA样品的浓度稀释调整到50-100ng/ μ L。

[0019] 优选的:所述PCR扩增反应:操作步骤如下:

[0020] (a1) PCR反应体系:采用PCR反应预混液(mix),每个反应12.5 μ L;

[0021] (b1) PCR反应程序如下:

[0022] 首先是94 $^{\circ}$ C变性10min,然后进行35个循环的反应,具体包括94 $^{\circ}$ C变性30s,然后进行57 $^{\circ}$ C退火30s,退火后72 $^{\circ}$ C延伸1min,反应结束再72 $^{\circ}$ C延伸10min,最后4 $^{\circ}$ C进行保存。

[0023] 优选的:所述PCR扩增反应进行鉴别包括琼脂糖凝胶电泳检测和性别鉴定。

[0024] 优选的:所述琼脂糖凝胶电泳检测和性别鉴定步骤如下:

[0025] (a2) 琼脂糖凝胶电泳:

[0026] 利用琼脂糖水平电泳仪在150V的电压下进行2%的琼脂糖凝胶电泳,检测PCR扩增产物,采用DL2000作为电泳maker(其条带其条带由上至下是2000bp、1000bp、750bp、500bp、250bp、100bp);

[0027] (b2) 性别鉴定:

[0028] 4#引物(reseqSNP381)在雌雄鱼之间扩增出来的不同的条带。雌鱼DNA扩增产物电泳得到单一的条带,扩增产物大小为606bp。雄鱼DNA扩增产物电泳得到两个非常明显的条带,其中一个大小为606bp,另外一条是一个大小320bp左右的条带。

[0029] 优选的:所述测序结果采用Chromas进行测序质量的判定,用DNAMAN进行序列的拼接与比对分析。

[0030] 优选的:所述4#引物(reseqSNP381)雄性特异条带双末端测序与雌雄共有条带单末端测序结果进行序列比对。

[0031] 本发明的技术效果和优点:

[0032] 本发明要求保护一种白斑狗鱼遗传性别的特异分子标记,其在白斑狗鱼X染色体和Y染色体中存在差异,可将此差异用于鉴别白斑狗鱼的遗传性别。本发明克服现有技术的不足,提供一种基于性别连锁的特异分子标记,可以简单快速地实现遗传性别,大大节省人力物力。

附图说明

[0033] 图1是本申请实施例提供的白斑狗鱼性别鉴定的方法中4尾雌鱼和4尾雄鱼的DNA对有条带的24对引物扩增结果图;

[0034] 图2是本申请实施例提供的白斑狗鱼性别鉴定的方法中4#引物(reseqSNP381)雄性特异条带双末端测序拼接结果图;

[0035] 图3是本申请实施例提供的白斑狗鱼性别鉴定的方法中4#引物(reseqSNP381)的PCR扩增得到的雌、雄共有条带进行测序结果图;

[0036] 图4是本申请实施例提供的白斑狗鱼性别鉴定的方法中4#引物(reseqSNP381)对45尾雌鱼和66尾雄鱼进行PCR扩增结果图;

具体实施方式

[0037] 下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步详细的说明。本发明的实施例是

为了示例和描述起见而给出的,而并不是无遗漏的或者将本发明限于所公开的形式。很多修改和变化对于本领域的普通技术人员而言是显而易见的。选择和描述实施例是为了更好说明本发明的原理和实际应用,并且使本领域的普通技术人员能够理解本发明从而设计适于特定用途的带有各种修改的各种实施例。

[0038] 在本实施例中提供一种白斑狗鱼性别鉴定的方法,

[0039] (1)提取白斑狗鱼鳍条DNA,采用4#引物(reseqSNP381),

[0040] 将4#引物(reseqSNP381)合成和溶解,用PCR扩增反应进行鉴别,

[0041] 4#引物的序列分别为:

[0042] GGACTTTTTCCTACATACCTCAC和TCAGCCACTATATCTATCTTACCG。

[0043] (2)、白斑狗鱼鳍条DNA的提取步骤如下:

[0044] (a)约30mg的经过无水乙醇保存的鳍条样品组织尽可能地剪碎,风干1h;

[0045] (b)加入600 μ L裂解液,10 μ L蛋白酶K(20mg/ml),混匀56 $^{\circ}$ C水浴,裂解细胞2h;

[0046] (c)离心(8000rpm 5min),取上清液约550 μ L;

[0047] (d)加入550 μ L酚-氯仿异戊醇手动轻轻混匀10min,13000rpm、4 $^{\circ}$ C离心10min;

[0048] (e)小心吸取400 μ L上清液(不要吸到中间的蛋白质)于新的EP管;

[0049] (f)加入800 μ L经过-20 $^{\circ}$ C预冷的无水乙醇,-20 $^{\circ}$ C放置30min,4 $^{\circ}$ C、13000rpm离心10min;

[0050] (g)弃上清液,DNA是在EP管壁和底部的白色沉淀。加入70%乙醇,轻轻吹打后13000rpm离心5min;

[0051] (h)重复操作步骤g;

[0052] (i)加入70 μ L ddH₂O溶解;

[0053] (j)1.5%琼脂糖凝胶电泳,检验DNA提取效果可用全波长酶标仪测定浓度和纯度,根据酶标仪测定的DNA浓度,将各个DNA样品的浓度稀释调整到50-100ng/ μ L。

[0054] 实施例1

[0055] PCR反应试验操作步骤如下:

[0056] (a1)、PCR反应采用天根生化科技北京有限公司的PCR反应预混液(mix),每个反应12.5 μ L,具体的反应体系见表1。

	2*PCR 反应预混液 (mix)	6.25 μ L
	引物 1	0.5 μ L
[0057]	引物 2	0.5 μ L
	DNA 样品	1.0 μ L
	ddH ₂ O	4.25 μ L

[0058] (b1)、PCR反应程序如下:首先是94 $^{\circ}$ C变性10min,然后进行35个循环的反应,具体包括94 $^{\circ}$ C变性30s,然后进行57 $^{\circ}$ C退火30s,退火后72 $^{\circ}$ C延伸1min,反应结束再72 $^{\circ}$ C延伸10min,最后4 $^{\circ}$ C进行保存。

[0059] 琼脂糖凝胶电泳检测和性别鉴定:

[0060] (a2)琼脂糖凝胶电泳:

[0061] 利用琼脂糖水平电泳仪(北京六一,DYCP-31DN)在150V的电压下进行2%的琼脂糖凝胶电泳,检测PCR扩增产物,采用DL2000作为电泳maker(其条带其条带由上至下是2000bp、1000bp、750bp、500bp、250bp、100bp)。

[0062] (b2)性别鉴定:

[0063] 4#引物(reseqSNP381)在雌雄鱼之间扩增出来的不同的条带。雌鱼DNA扩增产物电泳得到单一的条带,扩增产物大小为606bp。雄鱼DNA扩增产物电泳得到两个非常明显的条带,其中一个大小为606bp,另外一条是一个大小320bp左右的条带。

[0064] PCR扩增产物的测序与分析

[0065] PCR扩增产物进行测序,其中对引物扩增出来的雌、雄共有条带进行单末端测序,对引物扩增出来的性别特异条带进行双末端测序。测序结果采用Chromas进行测序质量的判定,用DNAMAN进行序列的拼接与比对分析。

[0066] 4#引物(reseqSNP381)雄性特异条带双末端测序拼接结果如图2所示。该雄性特异条带长度为338bp,序列一端有51个碱基与参考基因组相匹配(2个碱基除外),另一端有284个碱基与参考基因组相匹配(12个碱基除外)(如图3所示)。

[0067] 将该序列与雌雄共有条带单末端测序结果进行序列比对,结果如图3所示。图中在24号染色体(NC_025991.4)的734304bp-735909bp位置多扩增出来的这个片段是引物设计序列的剪短版本,自51bp-324bp为缺失片段,缺失了273bp。

[0068] 图4显示的是4#引物(reseqSNP381)对45尾雌鱼和66尾雄鱼DNA进行PCR扩增结果,该引物是位于24号染色体(NC_025991.4)的734587bp位置的一个性别特异SNP位点的侧翼序列。从图中可以看出,雌鱼与雄鱼之间表现出非常明显不同的扩增结果,45尾雌鱼中,有42尾扩增得到单一的条带,扩增产物大小与引物设计时预定产物大小(606bp)基本一致。66尾雄鱼中,有64尾扩增得到两个非常明显的条带,其中一个大小与预定产物大小(606bp)一致的条带,另外一条是一个大小320bp左右的条带。除此之外,在45尾雌鱼中有3尾的扩增结果与雄鱼相同,有两个条带,而在66尾雄鱼中有2尾的扩增结果与雌鱼相同,只有一个与预定产物(606bp)一致的条带。其中:上面两行是45个雌鱼,下面三行是66个雄鱼。每个图的中央是DL2000maker,其条带其条带由上至下是2000bp、1000bp、750bp、500bp、250bp、100bp。

[0069] 显然,所描述的实施例仅仅是本发明的一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域及相关领域的普通技术人员在没有作出创造性劳动的前提下所获得的所有其他实施例,都应属于本发明保护的范围。本发明中未具体描述和解释说明的结构、装置以及操作方法,如无特别说明和限定,均按照本领域的常规手段进行实施。

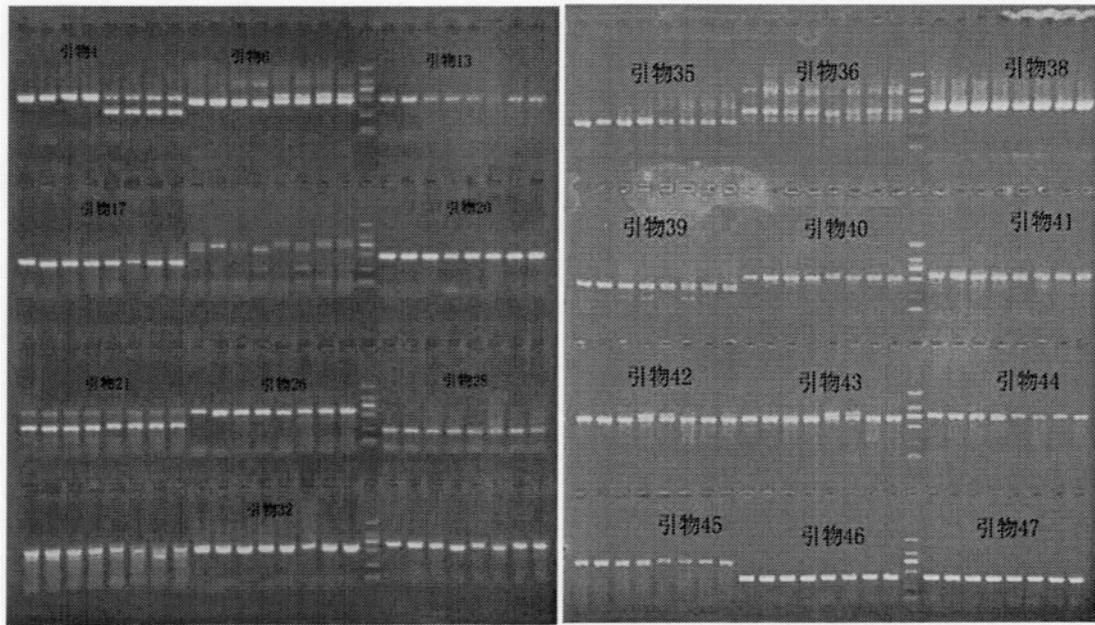


图1

```

>4-11<
TCAGCCACCTTATCTATCTTACCGTGTAATAGGACCCATCCAAGAATCAAACCTTTCTGT 60<
TTACCTTCACGCCCCTGGGCCAGACAGCACCTAATCATAGACCATGCTGTATAGATGAGT 120<
CTTTAGTAGACACTTGAAAGTTTGCACTCAGTCTGCATTTCTAACCTTATTGGCAGATCA 180<
TTCCACAGTAGTGGAGCTCTATGAGAGAAGGCCCTGACTCCGGCTGTTTGTTTAGAAATT 240<
CTAGGTATAATTAAGAGGCCTGCATCTTGCGATCTTAGGTTACATGTAGGTGTGCATGGC 300<
TAGATCATTTTCAGTGAGGTATGTAGGAAAAAGTCC 338<
    
```

图2

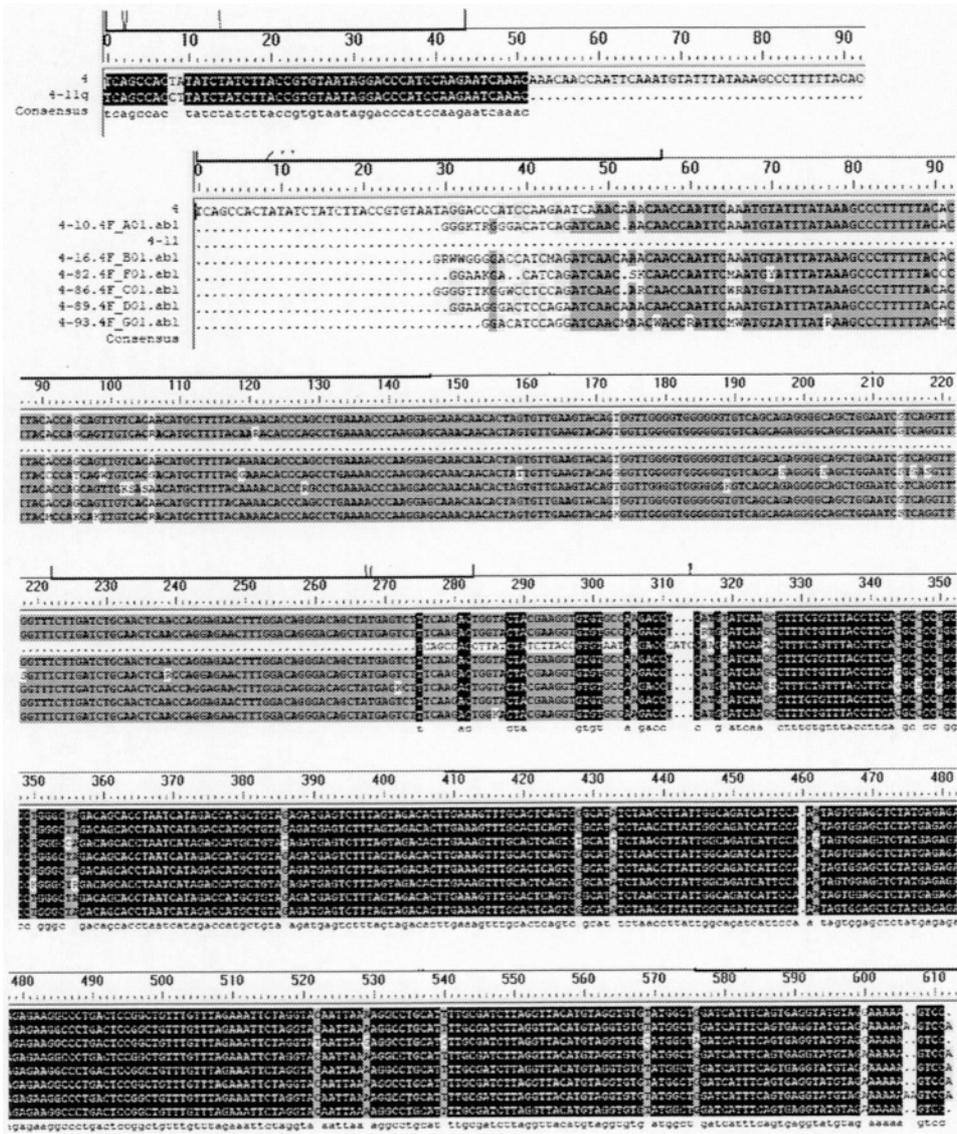


图3

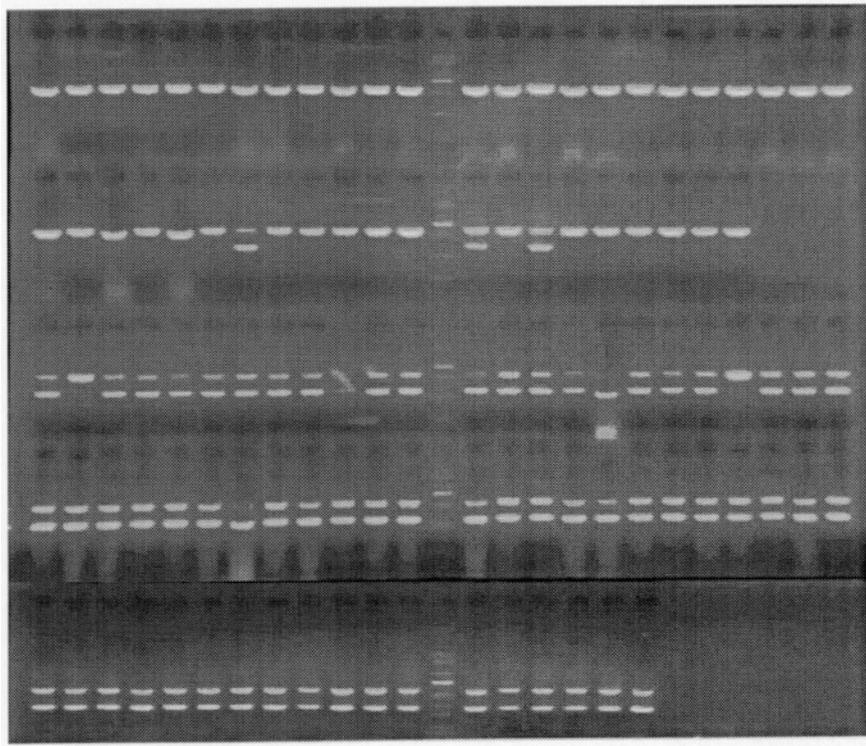


图4