



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111154891 B

(45) 授权公告日 2023. 07. 25

(21) 申请号 202010083871.X

C12Q 1/6858 (2018.01)

(22) 申请日 2020.02.10

C12N 15/11 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111154891 A

(56) 对比文件

CN 110468218 A, 2019.11.19

US 2011070245 A1, 2011.03.24

(43) 申请公布日 2020.05.15

ACCESSION:NC_019468.1.genbank.2015, 第1-2页.

(73) 专利权人 天津奥群牧业有限公司
地址 301600 天津市滨海新区大港油田团泊洼生活基地

审查员 姜紫耀

(72) 发明人 张清峰 潘传英 刘洪飞 白洋洋
林春建 佐建明 卢小芳 蓝贤勇

(74) 专利代理机构 天津盛理知识产权代理有限公司 12209
专利代理师 李晶

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6888 (2018.01)

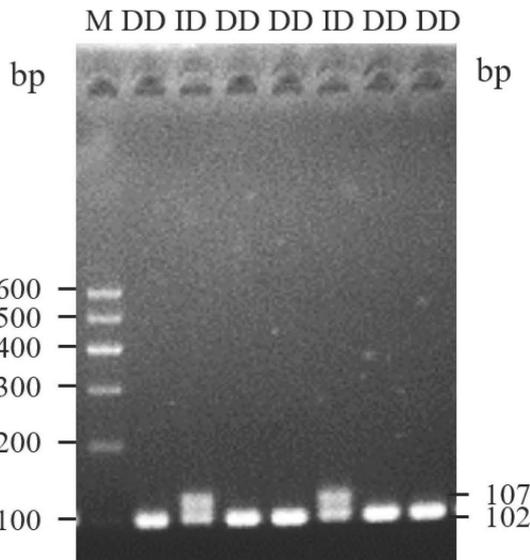
权利要求书1页 说明书8页
序列表1页 附图1页

(54) 发明名称

绵羊IGF2BP1基因插入/缺失多态性的检测引物对、试剂盒、方法和应用

(57) 摘要

本发明涉及一种检测绵羊IGF2BP1基因插入/缺失多态性的方法,步骤如下:以待测绵羊全基因组DNA为模板,以引物对为扩增引物,利用PCR扩增包含绵羊IGF2BP1基因下游区域插入/缺失多态性位点的片段,对PCR扩增产物进行电泳,根据电泳结果鉴定待测绵羊个体在所述插入/缺失多态性位点的基因型。本发明检测的插入/缺失多态性位点能够作为绵羊产羔性状的分子遗传标记,从而加快建立具有优良产羔性状的绵羊种群,提高良种选育速度。



1. 绵羊IGF2BP1基因插入/缺失多态性的检测引物对在绵羊分子标记辅助选择育种方面中的应用;

所述引物对为:

上游引物:SEQNO.1;

下游引物:SEQNO.2;

所述检测引物对能够通过PCR扩增包含绵羊IGF2BP1基因内含子区插入/缺失多态性位点的片段;

所述插入/缺失多态性位点为绵羊IGF2BP1基因NC_019468.1:g.37056439&37056440位5-bp插入/缺失多态性位点;

所述绵羊分子标记为绵羊产羔性状的分子遗传标记。

2. 一种利用检测引物对检测绵羊IGF2BP1基因插入/缺失多态性的方法在绵羊分子标记辅助选择育种方面中的应用,其特征在于:所述检测方法的步骤如下:

以待测绵羊全基因组DNA为模板,以引物对为扩增引物,利用PCR扩增包含绵羊IGF2BP1基因下游区域插入/缺失多态性位点的片段,对PCR扩增产物进行电泳,根据电泳结果鉴定待测绵羊个体在所述插入/缺失多态性位点的基因型;

所述引物对为:

上游引物:SEQNO.1;

下游引物:SEQNO.2;

所述检测引物对能够通过PCR扩增包含绵羊IGF2BP1基因内含子区插入/缺失多态性位点的片段;

所述插入/缺失多态性位点为绵羊IGF2BP1基因NC_019468.1:g.37056439&37056440位5-bp插入/缺失多态性位点;

所述绵羊分子标记为绵羊产羔性状的分子遗传标记。

3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于:所述PCR采用的反应程序为:95℃预变性5min;94℃变性30s,60℃退火30s,72℃延伸12s,14个循环,每循环后退火温度减1℃;50℃退火30s,72℃延伸12s,34个循环;72℃延伸10min。

4. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于:所述电泳时采用质量浓度为3.0%的琼脂糖凝胶。

5. 根据权利要求2至4任一项所述的应用,其特征在于:根据电泳结果,所述插入/缺失多态性位点的插入/插入基因型II表现为107bp一条带纹,插入/缺失基因型ID表现为107bp和102bp两条带纹,缺失/缺失基因型DD表现为102bp一条带纹;

其中,所述插入/缺失多态性位点的插入/缺失ID基因型能够作为提高绵羊在第二胎产羔性状的DNA标记。

绵羊IGF2BP1基因插入/缺失多态性的检测引物对、试剂盒、方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术与家畜育种技术领域,尤其是一种绵羊IGF2BP1基因插入/缺失多态性的检测引物对、试剂盒、方法和应用。

背景技术

[0002] 随着经济的发展和人民生活水平的体高,人们更加倾向于具有高营养、高质量的肉质食物。绵羊作为一种重要的肉用食物的来源,其肉质鲜美、高蛋白、低脂肪等特点愈来愈被受人们欢迎。因此,为了提高绵羊的繁殖率和数量,最重要的就是要选育出能够多产的优良绵羊品种。现如今,尽管动物的遗传育种仍然以传统育种方法为主,然而随着各物种的遗传图谱的进一步完善和基因组的测序工作的完成以及分子生物学的飞速发展,分子育种方式将会和传统育种方法相结合,共同解决动物的遗传育种问题。其中,通过对相关基因的多态性研究而筛选出一种有效的遗传标记来辅助选择育种的方法逐渐得到人们的广泛认可。

[0003] 尽管现如今,动物的遗传选育仍是以基于数量遗传学为主的杂交育种,然而随着测序技术的不断完善与发展,一种新的分子育种方式——标记辅助选择(Marker-assisted Selection, MAS)技术涌现出来。该技术可以通过对某一个遗传标记进行分子水平上的检测而快速准确地分析个体的遗传组成,从而实现对基因型的直接选择,大大缩短了育种年限并且极大地提高了选育的准确度。随着测序技术的出现,人们发现了两种新的遗传标记,即单核苷酸多态性(SNP)和插入/缺失(InDel),由于其通常存在两个等位基因,因而也称为双等位基因遗传标记。由于DNA片段的插入或缺失,InDel遗传标记表现出其DNA片段长度多态性,且广泛分布于整个基因组中,其突变频率仅次于SNP。InDel遗传标记数量众多,具有STR和SNP遗传标记的特点,已在遗传学、分类诊断以及遗传图谱构建等领域得到广泛应用。

[0004] 随着全基因组学的深入研究,已经有大量的InDel位点被发现,其为理论研究和遗传选育应用研究提供了大量的生物信息。其作为遗传标记,多集中在人类和各种农作物(如水稻和玉米等)的基因组研究中,然而对家畜的功能性基因,尤其是与反刍动物生长、繁殖性状相关的选育方面的InDel标记的研究和应用甚少。因此,在培育产羔性状优良的绵羊育种目标上,通过对在DNA水平上筛查与绵羊产羔性状密切相关的DNA标记进行基因多态性的检测,以及基因多态性与产羔性状的关联分析,从而利用MAS加快建立具有优良产羔性状的绵羊种群。

[0005] 作为IGF2的结合蛋白基因之一(IGF2BPs),绵羊IGF2BP1基因位于11号染色体上,具有15个外显子和14个内含子,长度约为39.9kb,其可以编码三种蛋白亚型。该IGF2BP1基因(又称IMP1、CRD-BP)是IGF2BP家族的重要一员,其编码一种RNA结合蛋白,对于IGF2BP1的结构研究发现,其含有六个典型的RNA结合域,包括四个KH(K同源)结构域和两个RRMs(RNA识别基序)。其IGF2BP1可通过KH结构域,结合经m⁶A修饰的IGF2、PTEN、ACTB、MAPK4、MKI67、c-MYC和CD44等的mRNA分子而维持其稳定性,进而影响细胞的生长和增殖。此外,已有研究

发现诸多miRNA和lncRNA也可以通过结合IGF2BP1来间接调控靶mRNA分子的稳定性、翻译能力和分布区域。IGF2BP1广泛表达于胎儿组织和16种以上的肿瘤组织中,但仅在少数正常成人组织中表达。由于其不仅能够影响细胞的生长和增殖,而且还能促进胚胎的发育,因而在对人类以及动物的早期胚胎发育过程的机制研究也具有重要的意义。然而,目前尚未发现关于IGF2BP1基因InDel位点与绵羊产羔性状存在显著相关的公开专利文献报道。

发明内容

[0006] 本发明目的在于克服现有技术中的不足之处,提供一种绵羊IGF2BP1基因插入/缺失多态性的检测引物对、试剂盒、方法和应用,本发明检测的插入/缺失多态性位点能够作为绵羊产羔性状的分子遗传标记,从而加快建立具有优良产羔性状的绵羊种群,提高良种选育速度。

[0007] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:

[0008] 一种绵羊IGF2BP1基因插入/缺失多态性的检测引物对,所述检测引物对能够通过PCR扩增包含绵羊IGF2BP1基因内含子区插入/缺失多态性位点的片段。

[0009] 而且,所述插入/缺失多态性位点为绵羊IGF2BP1基因NC_019468.1:g.37056439&37056440位5-bp插入/缺失多态性位点。

[0010] 而且,所述引物对为:

[0011] 上游引物:SEQ NO.1;

[0012] 下游引物:SEQ NO.2。

[0013] 如上所述的绵羊IGF2BP1基因插入/缺失多态性的检测引物对在绵羊分子标记辅助选择育种方面中的应用。

[0014] 利用如上所述的检测引物对的绵羊IGF2BP1基因插入/缺失多态性的专用检测试剂盒。

[0015] 而且,所述试剂盒能够以待测绵羊基因组DNA为模板,以引物对为扩增引物,利用PCR扩增包含绵羊IGF2BP1基因内含子区插入/缺失多态性位点的片段,对扩增产物进行电泳,根据电泳结果鉴定所述插入/缺失多态性位点的基因型。

[0016] 一种利用如上所述的检测引物对检测绵羊IGF2BP1基因插入/缺失多态性的方法,步骤如下:

[0017] 以待测绵羊全基因组DNA为模板,以引物对为扩增引物,利用PCR扩增包含绵羊IGF2BP1基因下游区域插入/缺失多态性位点的片段,对PCR扩增产物进行电泳,根据电泳结果鉴定待测绵羊个体在所述插入/缺失多态性位点的基因型。

[0018] 而且,所述PCR采用的反应程序为:95℃预变性5min;94℃变性30s,60℃退火30s,72℃延伸12s,14个循环,每循环后退火温度减1℃;50℃退火30s,72℃延伸12s,34个循环;72℃延伸10min;

[0019] 或者,所述电泳时采用质量浓度为3.0%的琼脂糖凝胶。

[0020] 而且,根据电泳结果,所述插入/缺失多态性位点的插入/插入基因型II表现为107bp一条带纹,插入/缺失基因型ID表现为107bp和102bp两条带纹,缺失/缺失基因型DD表现为102bp一条带纹;

[0021] 其中,所述插入/缺失多态性位点的插入/缺失ID基因型能够作为提高绵羊在第二

胎产羔性状的DNA标记。

[0022] 如上所述的检测绵羊IGF2BP1基因插入/缺失多态性的方法在绵羊分子标记辅助选择育种方面中的应用。

[0023] 本发明取得的优点和积极效果为：

[0024] 1、本发明根据绵羊IGF2BP1基因下游区域插入/缺失多态性位点(参考序列NC_019468.1:g.37056439&37056440)设计引物,以绵羊基因组DNA为模板,通过序列扩增、电泳鉴定,能够简单、快速、低成本、精确地检测所述插入/缺失多态性位点的基因型。

[0025] 2、本发明对绵羊(例如,澳洲白绵羊)IGF2BP1基因插入/缺失多态性位点(参考序列NC_019468.1:g.37056439&37056440)进行基因型的鉴定和基因频率的分析,对该插入/缺失多态性位点的基因型与绵羊产羔性状进行关联分析,结果表明本发明检测的插入/缺失多态性位点能够作为绵羊产羔性状的分子遗传标记,从而加快建立具有优良产羔性状的绵羊种群,提高良种选育速度。

[0026] 3、本发明涉及绵羊中与早期胚胎发育以及细胞生长、增殖有关的IGF2相关基因IGF2BP1的NC_019468.1:g.37056439&37056440位5-bp插入/缺失多态性(InDel)位点的快速、准确分型检测及其在分子标记辅助选择(MAS)育种中的应用,本发明通过IGF2BP1基因辅助检测绵羊产羔数的DNA检测方法及专用试剂盒,可以快速建立具有优良产羔性状的绵羊遗传资源群体。

附图说明

[0027] 图1为本发明中绵羊IGF2BP1基因扩增产物(引物对P1)的琼脂糖凝胶电泳结果;M表示Marker;

[0028] 图2为本发明中绵羊IGF2BP1基因PCR扩增产物测序图;其中:黑色方框标出的部分表示5-bp插入序列的互补序列(GGAGA):NC_019468.1:g.37056439&37056440insTCTCC;rs594668996。

具体实施方式

[0029] 下面详细叙述本发明的实施例,需要说明的是,本实施例是叙述性的,不是限定性的,不能以此限定本发明的保护范围。

[0030] 本发明中所使用的原料,如无特殊说明,均为常规的市售产品;本发明中所使用的方法,如无特殊说明,均为本领域的常规方法。

[0031] 一种绵羊IGF2BP1基因插入/缺失多态性的检测引物对,所述检测引物对能够通过PCR扩增包含绵羊IGF2BP1基因内含子区插入/缺失多态性位点的片段。

[0032] 较优地,所述插入/缺失多态性位点为绵羊IGF2BP1基因NC_019468.1:g.37056439&37056440位5-bp插入/缺失多态性位点。

[0033] 较优地,所述引物对为:

[0034] 上游引物:SEQ NO.1 5'-TTTTTCGGTTTGGGTCGTGGA-3'(21nt);

[0035] 下游引物:SEQ NO.2 5'-CGCAGGAAAGAGCAGAAGGTG-3'(21nt)。

[0036] 如上所述的绵羊IGF2BP1基因插入/缺失多态性的检测引物对在绵羊分子标记辅助选择育种方面中的应用。

[0037] 利用如上所述的检测引物对的绵羊IGF2BP1基因插入/缺失多态性的专用检测试剂盒。

[0038] 较优地,所述试剂盒能够以待测绵羊基因组DNA为模板,以引物对为扩增引物,利用PCR扩增包含绵羊IGF2BP1基因内含子区插入/缺失多态性位点的片段,对扩增产物进行电泳,根据电泳结果鉴定所述插入/缺失多态性位点的基因型。

[0039] 一种利用如上所述的检测引物对检测绵羊IGF2BP1基因插入/缺失多态性的方法,步骤如下:

[0040] 以待测绵羊全基因组DNA为模板,以引物对为扩增引物,利用PCR扩增包含绵羊IGF2BP1基因下游区域插入/缺失多态性位点的片段,对PCR扩增产物进行电泳,根据电泳结果鉴定待测绵羊个体在所述插入/缺失多态性位点的基因型。

[0041] 较优地,所述PCR采用的反应程序为:95℃预变性5min;94℃变性30s,60℃退火30s,72℃延伸12s,14个循环,每循环后退火温度减1℃;50℃退火30s,72℃延伸12s,34个循环;72℃延伸10min;

[0042] 或者,所述电泳时采用质量浓度为3.0%的琼脂糖凝胶。

[0043] 较优地,根据电泳结果,所述插入/缺失多态性位点的插入/插入基因型II表现为107bp一条带纹,插入/缺失基因型ID表现为107bp和102bp两条带纹,缺失/缺失基因型DD表现为102bp一条带纹;

[0044] 其中,所述插入/缺失多态性位点的插入/缺失ID基因型能够作为提高绵羊在二胎产羔性状的DNA标记。

[0045] 如上所述的检测绵羊IGF2BP1基因插入/缺失多态性的方法在绵羊分子标记辅助选择育种方面中的应用。

[0046] 更具体地,相关制备及检测如下:

[0047] 本发明利用PCR方法对所发现的绵羊IGF2BP1基因下游区域(参考序列:NC_019468.1)突变可能产生的插入/缺失多态性进行检测,并将其与绵羊产羔性状进行关联分析,验证其是否存在可以作为绵羊分子育种中辅助选择的分子标记。

[0048] 1. 实验药品与试剂

[0049] 1.1生化试剂与生物学试剂:①Taq DNA聚合酶(购自Fermantas即MBI公司);②蛋白酶K(购自华美生物工程公司);③Marker I(购自天根生化科技(北京)有限公司)。

[0050] 1.2普通试剂:Tris、EDTA、NaCl、HCl、NaOH、Tris饱和酚、氯仿、无水乙醇、十二烷基磺酸钠(SDS)、溴化乙锭(EB)、溴酚蓝、二甲基苯氧FF、硼酸、琼脂糖等,普通试剂从华美生物工程公司购买,为进口分装产品。

[0051] 1.3溶液与缓冲液:所有溶液与缓冲液均采用去离子超纯水配制。高压灭菌条件为15bf/in(1.034×10^2 KPa)、25min。试剂配制方法均参考Sambrook等编著的《分子克隆实验指南》;

[0052] 1) 提取组织样DNA所用溶液

[0053] ①2mol/LNaCl:11.688g溶于水,定容至100mL,高压灭菌;

[0054] ②组织DNA提取液(100mL):1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)1 mL、0.5mol/L EDTA(pH 8.0)20mL,及2mol/LNaCl 5mL,定容至100mL;

[0055] 2) 琼脂糖凝胶电泳分析所用溶液

[0056] ①0.5×TBE缓冲液:取10×TBE 50mL定容至1000mL;

[0057] ②上样缓冲液:含质量终浓度0.25%溴酚蓝以及质量终浓度0.25%二甲基苯青FF,溶剂为40.0% (w/v) 蔗糖水溶液。

[0058] 2. 设计绵羊IGF2BP1基因InDel位点扩增引物

[0059] 在NCBI上检索绵羊IGF2BP1基因的序列(NC_019468.1),并利用Primer 5.0设计能够扩增IGF2BP1基因多个候选InDel位点DNA片段的引物,其中能够扩增绵羊IGF2BP1基因下游区域InDel位点的PCR引物对为P1(引物设计完成时间2019年9月)。引物对P1序列见表1。

[0060] 表1. 绵羊IGF2BP1基因InDel位点扩增引物表

	引物序列 (5'到3')	Tm(°C)	扩增产物大小(bp)
[0061]	F: TTTTTCGGTTTGGGTCGTGGA	TD	107/102
P1	R: CGCAGGAAAGAGCAGAAGGTG		

[0062] 上述引物对P1对绵羊基因组扩增,能够扩增包含绵羊IGF2BP1基因下游区域的候选In Del位点(NC_019468.1:g.37056439&37056440)的片段。理论上,当IGF2BP1基因下游区域g.37056439&37056440之间的序列TCTCC缺失时,利用引物对P1进行PCR扩增所得到的的是102bp大小的带纹;当序列TCTCC存在(插入)时,利用引物对P1进行PCR扩增所得到的的是107bp大小的带纹;当序列TCTCC在一个等位基因上出现插入,在另一个等位基因上出现缺失时,利用引物对P1进行PCR扩增所得到的的是大小分别为107bp和102bp的带纹。

[0063] 3. 以引物对P1 PCR扩增待测绵羊IGF2BP1基因片段

[0064] 3.1 绵羊组织样品的采集

[0065] 实验所用的动物共计916个样本,具体信息见表2。产羔性状数据由原种场工作人员测量,采取个体组织样品,样品用70%乙醇保存,冰盒低温带回实验室后置于-80℃冻存。

[0066] 表2. 采样信息

	品种	数量	采样地点	时间
[0067]	澳洲白绵羊(AUW)	916	天津奥群牧业有限公司国家肉羊核心育种场	2019年8月26日

[0068] 3.2 组织样品基因组DNA的提取与分离

[0069] 参考Sambrook等编著的《分子克隆实验指南》(2002)和参考以下文献:蓝贤勇.山羊重要功能基因遗传变异及其与经济性状的关系[D.]西北农林科技大学博士学位论文,2007,陕西杨凌。

[0070] 3.3 琼脂糖凝胶电泳检测DNA

[0071] 参考Sambrook等编著的《分子克隆实验指南》(2002)。

[0072] 3.4 DNA的纯化

[0073] 参考Sambrook等编著的《分子克隆实验指南》(2002)。

[0074] 3.5 分光光度法检测DNA

[0075] 用紫外分光光度计测定DNA样品在260nm、280nm处的OD值。计算DNA含量和OD₂₆₀/OD₂₈₀的比值。如OD₂₆₀/OD₂₈₀比值小于1.6,说明样品中含有较多的蛋白质或酚,则应进行纯化;若比值大于1.8,则应该考虑去除RNA纯化。

[0076] DNA浓度($\text{ng}/\mu\text{L}$) = $50 \times \text{OD}_{260}$ 值 \times 稀释倍数。

[0077] DNA检测完毕后,取出一定的量稀释至 $10\text{ng}/\mu\text{L}$,存于 -20°C 备用,其余的存放于 -80°C 。

[0078] 3.6 PCR扩增

[0079] PCR反应体系采用混合加样法,即根据每一个反应体系所需的各种组分的数量和1次反应所需的PCR反应的个数,算出各种反应组分的总量,加入到1个 1.5mL 离心管中,充分混匀后瞬时离心,再分装到每个 0.2mL Eppendorf PCR管中,然后加入模板DNA,再瞬时离心后进行PCR扩增;PCR反应体系包括 $2 \times \text{Taq PCR SuperMix}$ (包括Taq DNA聚合酶、dNTPs和反应缓冲液) $6.5\mu\text{L}$;上游引物 $0.5\mu\text{L}$;下游引物 $0.5\mu\text{L}$ (上下游引物浓度为 $10\text{pmol}/\mu\text{L}$);基因组DNA(浓度为 $10\text{ng}/\mu\text{L}$ 绵羊基因组DNA) $0.6\mu\text{L}$;去离子水 $4.9\mu\text{L}$;共 $13\mu\text{L}$ 。

[0080] 3.7 PCR反应的程序

[0081] 95°C 预变性 5min ; 94°C 变性 30s , 60°C 退火 30s , 72°C 延伸 12s , 14个循环,每循环后退火温度减 1°C ; 50°C 退火 30s , 72°C 延伸 12s , 34个循环; 72°C 延伸 10min 。

[0082] 4. 扩增PCR产物的琼脂糖凝胶电泳检测分析

[0083] 琼脂糖凝胶电泳检测分3步:1)制作3%的琼脂糖凝胶,使用核酸染料染色,点样 $6\mu\text{L}$,点样后 120V 电压电泳 $40\sim 50\text{min}$;2)待分子量不同的DNA片段分离清晰时,在BIO-RAD Gel Doc 2000凝胶成像系统成像;3)根据琼脂糖凝胶电泳结果分析位点多态性;

[0084] 对于澳洲白绵羊IGF2BP1基因下游区域存在的5-bp插入/缺失多态性(5-bp InDel)位点(NC_019468.1:g.37056439&37056440),其在不同绵羊个体中的多态性分析结果参见图1,PCR的扩增产物(引物对P1)经琼脂糖凝胶电泳检测之后,所扩增的对应插入/缺失多态性位点的插入/插入基因型(II)表现为 107bp 一条带纹,插入/缺失基因型(ID)表现为 107bp 和 102bp 两条带纹,缺失/缺失基因型(DD)表现为 102bp 一条带纹。分析结果经测序进行了验证(参见图2)。

[0085] 5. 绵羊IGF2BP1基因InDel位点的频率统计分析

[0086] 1) 基因和基因型频率

[0087] 基因型频率是指一个群体中某一性状的某种基因型个体数占总个体数的比率。 $P_{YY} = N_{YY}/N$,其中 P_{YY} 代表某一位点的YY基因型频率; N_{YY} 表示群体中具有YY基因型的个体数; N 为检测群体的总数量。

[0088] 基因频率是指一个群体中某一基因数对其等位基因总数的相对比率。计算的公式可以写成: $P_Y = (2N_{YY} + N_{Ya1} + N_{Ya2} + N_{Ya3} + N_{Ya4} + \dots + N_{Yan}) / 2N$

[0089] 式中, P_Y 表示等位基因Y频率, N_{YY} 表示群体中具有YY基因型的个体数量, N_{Yai} 表示群体中具有Yai基因型个体数量, $a1 \sim an$ 为等位基因Y的n个互不相同的复等位基因。

[0090] 2) 统计结果

[0091] 澳洲白绵羊样本IGF2BP1基因5-bp插入/缺失多态性位点的基因型频率及等位基因频率如表3所示。

[0092] 表3. 绵羊IGF2BP1基因InDel位点基因频率分布表

[0093]	品种	样本 N	基因型频率			等位基因频率		哈代-温伯格平衡
			II	ID	DD	I	D	P values
	澳洲白绵羊 (AUW)	916	0.004 (n=4)	0.136 (n=125)	0.860 (n=787)	0.072	0.928	P=0.004

[0094] 6. 绵羊IGF2BP1基因InDel位点基因效应的关联分析

[0095] 基因型数据:PCR扩增后琼脂糖凝胶电泳识别的基因型;

[0096] 生产数据:澳洲白绵羊的产羔数据。

[0097] 关联分析模型:利用SPSS (23.0) 软件来分析该品种中基因型与产羔性状的相关性。首先要对所得数据描述性的统计分析,来确定是不是存在离群值。然后根据数据的特性,利用方差分析、多元线性模型或者卡方分析进而来分析基因型的效应。在数据处理的过程中,考虑到个体的效应,基因之间的互作以及基因型的效应,采用固定的模型来进行相关分析。此外,根据实际条件来进行取舍,完整模型: $Y_{ijklm} = \mu + S_i + HYS_j + G_l + e_{ijklm}$;其中, Y_{ijklm} :个体的产羔数记录; μ :总体均值; S_i :后代类型不同的群体均值; HYS_j :胎次效应; G_l :基因型的固定效应; e_{ijklm} :随机误差。第二胎次的结果由于II基因型个数很少(n<5),因而进行t检验,其关联分析结果如表4所示。

[0098] 表4. 绵羊IGF2BP1基因InDel位点与澳洲白的产羔数性状关联分析(方差分析)

[0099]	胎次/性状	基因型 (平均值±标准误)		
		ID	DD	P 值
	第二胎			
	产羔数	^A 1.71±0.13 (n=14)	^B 1.32±0.04 (n=140)	0.004

[0100] 注:平均值肩字母不同表示差异显著;注意:II=0,N<<3,故不作分析。

[0101] 与此同时,将其第二胎的产羔数与该位点的基因型使用了独立卡方(χ^2) 检验,其结果如表5所示。

[0102] 表5. 绵羊IGF2BP1基因InDel位点与澳洲白的产羔数关联分析(卡方检验)

[0103]	基因型 (平均值 ±标准误)	ID	DD	χ^2	df	P 值
	多胎 (N>=2)	10	44			

[0104] 注意:II=0,N<<3,故不作分析。

[0105] 由表4和表5可以看出,在对澳洲白绵羊的产羔性状研究中,IGF2BP1基因5-bp InDel多态性在澳洲白绵羊的第二胎中对产羔数有极显著影响(P<0.01)。其中,ID基因型个体产羔性状优于DD基因型个体。因此,绵羊IGF2BP1基因5-bp插入/缺失多态性位点(NC_019468.1:g.37056439&37056440)的ID基因型可作为绵羊在第二胎产羔数的DNA分子标记。

[0106] 总之,本发明利用PCR扩增方法检测绵羊IGF2BP1基因5-bp插入/缺失多态性位点

(NC_019468.1:g.37056439&37056440)的基因型,并将其与澳洲白绵羊的产羔性状进行关联分析,发现了可以作为绵羊分子育种中辅助选择的分子标记,从而加快良种选育速度。本发明所建立的绵羊IGF2BP1基因插入/缺失多态性的检测方法,为利用InDel实现绵羊产羔性状的标记辅助选择(MAS)应用提供理论和实践依据。

[0107] 本发明相关序列如下:

[0108] 1、人工合成SEQ NO.1

[0109] tttttcggtt tgggtcgtgg a 21

[0110] 2、人工合成SEQ NO.2

[0111] cgcaggaaag agcagaaggt g 21

[0112] 3、NC_019468.1:g.37056439&37056440位插入序列

[0113] tctcc 5

[0114] 尽管为说明目的公开了本发明的实施例,但是本领域的技术人员可以理解:在不脱离本发明及所附权利要求的精神和范围内,各种替换、变化和修改都是可能的,因此,本发明的范围不局限于实施例所公开的内容。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 天津奥群牧业有限公司
- [0003] <120> 绵羊IGF2BP1基因插入/缺失多态性的检测引物对、试剂盒、方法和应用
- [0004] <160> 3
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 21
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 上游引物(Unknown)
- [0010] <400> 1
- [0011] tttttcggtt tgggtcgtgg a 21
- [0012] <210> 2
- [0013] <211> 21
- [0014] <212> DNA
- [0015] <213> 下游引物(Unknown)
- [0016] <400> 2
- [0017] cgcagaaaag agcagaaggt g 21
- [0018] <210> 3
- [0019] <211> 5
- [0020] <212> DNA
- [0021] <213> NC_019468.1: g.37056439 & 37056440位插入序列(Unknown)
- [0022] <400> 3
- [0023] tctcc 5

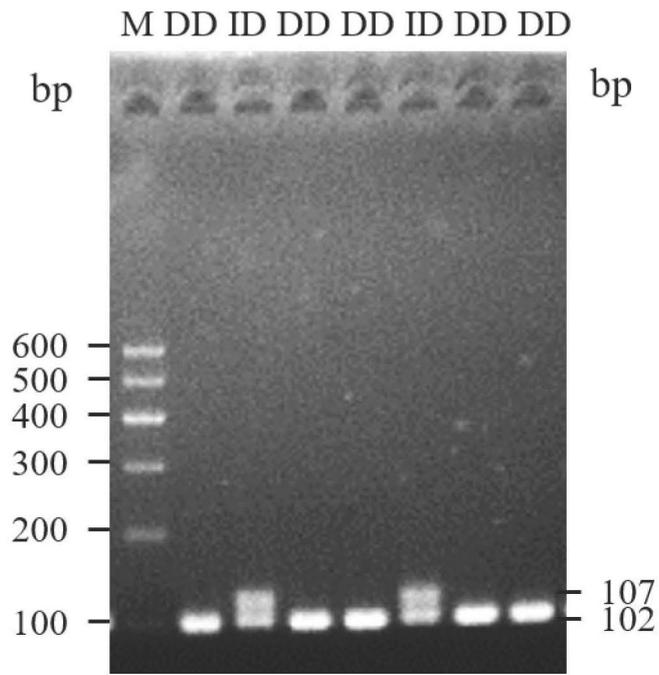


图1

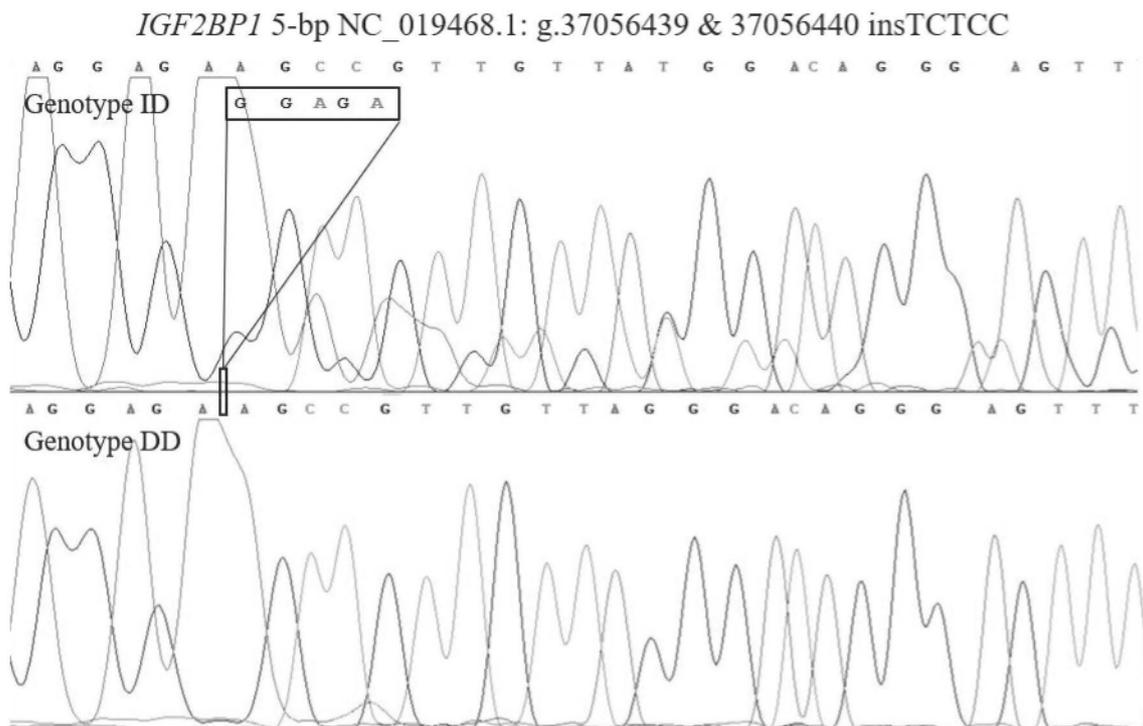


图2