(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 118166115 B
(45)授权公告日 2024.12.27

(21)申请号 202410345478.1
(22)申请日 2024.03.25
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 118166115 A
(43)申请公布日 2024.06.11
(73)专利权人 河北农业大学
地址 071000 河北省保定市灵雨寺街289号
(72)发明人 王文君 白一凡 王洪洋 张家郡 李美成 刘榜 周翔
(74)专利代理机构 北京云嘉湃富知识产权代理有限公司 11678
专利代理师 刘士畅
(51)Int.Cl.
C12Q 1/6888(2018.01)
C12Q 1/6858(2018.01)
C12N 15/11(2006.01)

(56)对比文件
unknown.Sus scrofa isolate TJ Tabasco breed Duroc chromosome 7, Sscrofa11.1, whole genome shotgun sequence,NCBI Reference Sequence: NC_010449.5.《GenBank》.2018,第1-2页.

审查员 王碧燕

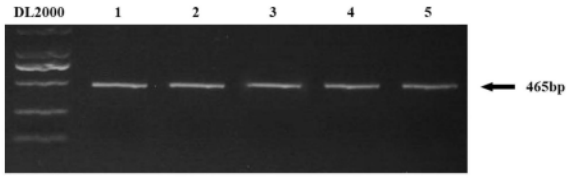
权利要求书1页 说明书7页
序列表（电子公布） 附图1页

(54)发明名称

一种与猪精子耐冻性关联的ILRUN基因上游SNP遗传标记及其应用

(57)摘要

本发明提供了一种与猪精子耐冻性关联的ILRUN基因上游SNP遗传标记,属于猪遗传标记检测技术领域,所述SNP遗传标记命名为NC_010449.5:g.30668857C>G,位于国际猪基因组11.1版本参考序列猪7号染色体30668857bp核苷酸位点,该位点的碱基为C或G,所述SNP遗传标记位于ILRUN基因上游区域,对应于SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列中的第115bp处。该SNP遗传标记与猪精子耐冻性关联,该SNP遗传标记能够从基因层面辅助提高种公猪冻精质量,为种公猪的辅助选择提供新的标记资源。



CN 118166115 B

1.猪精子耐冻性性状的早期选择方法,其特征在于,所述早期选择方法包括基于SNP遗传标记NC_010449.5:g.30668857C>G的基因型对猪精子耐冻性性状进行早期选择,所述NC_010449.5:g.30668857C>G位于国际猪基因组11.1版本参考序列猪7号染色体30668857bp核苷酸位点,该位点的碱基为C或G,所述SNP遗传标记位于ILRUN基因上游区域,对应于SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列中的第115bp处;

所述早期选择方法具体包括:

检测待测猪SNP遗传标记NC_010449.5:g.30668857C>G的基因型;

基于所述NC_010449.5:g.30668857C>G的基因型对待测猪的精子耐冻性性状进行早期选择;

其中,所述NC_010449.5:g.30668857C>G的GG基因型个体的精子耐冻性高于CG基因型个体;所述NC_010449.5:g.30668857C>G的CG基因型个体的精子耐冻性高于CC基因型个体;

所述猪的品种包括杜洛克猪、长白猪和大白猪中的至少一种。

2.根据权利要求1所述的猪精子耐冻性性状的早期选择方法,其特征在于,所述检测待测猪SNP遗传标记NC_010449.5:g.30668857C>G的基因型,具体包括:

以正向引物F1和反向引物R1为引物,对待测猪的基因组DNA进行PCR扩增;

对PCR扩增产物进行测序,获得待测猪7号染色体30668857bp核苷酸位点的基因型;

其中,所述正向引物F1的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示;所述反向引物R1的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

3.检测与猪精子耐冻性关联的ILRUN基因上游SNP遗传标记的引物在猪遗传育种中的应用,其特征在于,所述与猪精子耐冻性关联的ILRUN基因上游SNP遗传标记命名为NC_010449.5:g.30668857C>G,位于国际猪基因组11.1版本参考序列猪7号染色体30668857bp核苷酸位点,该位点的碱基为C或G,所述SNP遗传标记位于ILRUN基因上游区域,对应于SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列中的第115bp处;

所述检测与猪精子耐冻性关联的ILRUN基因上游SNP遗传标记的引物包括正向引物F1和反向引物R1,所述正向引物F1的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示;所述反向引物R1的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示;

所述猪的品种包括杜洛克猪、长白猪和大白猪中的至少一种;

所述遗传育种为筛选精子耐冻性高的种公猪个体。

4.一种试剂盒在猪遗传育种中的应用,其特征在于,所述试剂盒包含检测与猪精子耐冻性关联的ILRUN基因上游SNP遗传标记的引物,所述检测与猪精子耐冻性关联的ILRUN基因上游SNP遗传标记的引物包括正向引物F1和反向引物R1,所述正向引物F1的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示;所述反向引物R1的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示;

所述与猪精子耐冻性关联的ILRUN基因上游SNP遗传标记命名为NC_010449.5:g.30668857C>G,位于国际猪基因组11.1版本参考序列猪7号染色体30668857bp核苷酸位点,该位点的碱基为C或G,所述SNP遗传标记位于ILRUN基因上游区域,对应于SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列中的第115bp处;

所述猪的品种包括杜洛克猪、长白猪和大白猪中的至少一种;

所述遗传育种为筛选精子耐冻性高的种公猪个体。

一种与猪精子耐冻性关联的ILRUN基因上游SNP遗传标记及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于猪遗传标记检测技术领域,特别涉及一种与猪精子耐冻性关联的ILRUN基因上游SNP遗传标记及其应用。

背景技术

[0002] 精液冷冻保存技术推动了优良种畜的全球推广,为优良种质资源提供保障的同时也降低了疾病传播风险。对于经过长期选育的、繁殖性状优良的种公猪,利用精液冷冻保存技术对其精液进行超低温冷冻保存,可以极大提高优良公畜的利用率,进而提升猪场的经济效益。在精液冷冻保存过程中,温度变化会损伤精子的超微结构,使精子质膜、顶体受损、运动能力降低,导致解冻后精液品质下降,严重限制其在生产实践和种质资源保护中的应用,制约了猪冻精产业和育种产业的发展。

[0003] 猪精液冻融后质量受个体年龄、营养水平、采精季节和冻存过程等多种因素影响。已有研究通过改善日粮营养水平、优化冷冻保护剂成分和调整精液冻存程序等手段提供猪精液冻存后的质量。但在相同的饲养环境和冻存条件下,不同猪个体的精子冻融后活力仍存在显著差异,称为精子耐冻性差异。目前已有研究从转录组、代谢组和蛋白组水平对精子耐冻性差异进行探究,鉴定到一些与其相关的蛋白和代谢物,但是目前关于精子耐冻性遗传差异的研究甚少。因此,从种公猪个体遗传选育的角度,从基因层面挖掘并鉴定影响猪精子耐冻性的关键基因与位点,提供标记辅助选择技术,利用SNP遗传标记筛选精子耐冻性好的优良种公猪,这将从本质上提高猪精子冻融后质量。

[0004] 目前,大多数发明均围绕种公猪鲜精活力关联的SNP遗传标记展开技术方法研究,包括鲜精中精子的密度、活力、直线运动率、畸形率等。而关于种公猪精子耐冻性关联的SNP,提高种公猪冻精质量,则未有相关发明技术。

发明内容

[0005] 为了解决种公猪冻精质量差的问题,本发明提供了一种与猪精子耐冻性关联的ILRUN基因上游SNP遗传标记,该SNP遗传标记与猪精子耐冻性关联,位于ILRUN基因上游区域,该SNP遗传标记能够从基因层面辅助提高种公猪冻精质量,为种公猪的辅助选择提供新的标记资源。

[0006] 本发明还提供了一种与猪精子耐冻性关联的ILRUN基因上游SNP遗传标记在猪遗传育种中的应用。

[0007] 本发明通过以下技术方案实现:

[0008] 本发明提供一种与猪精子耐冻性关联的ILRUN基因上游SNP遗传标记,所述SNP遗传标记命名为NC_010449.5:g.30668857C>G,位于国际猪基因组11.1版本参考序列猪7号染色体30668857bp核苷酸位点,该位点的碱基为C或G,所述SNP遗传标记位于ILRUN基因上游区域,对应于SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列中的第115bp处。

[0009] 进一步的,所述猪的品种包括杜洛克猪、长白猪和大白猪中的至少一种。

[0010] 进一步的,所述NC_010449.5:g.30668857C>G的优势基因型为GG。

[0011] 基于同一发明构思,本发明提供一种与猪精子耐冻性关联的ILRUN基因上游SNP遗传标记在猪遗传育种中的应用。

[0012] 基于同一发明构思,本发明提供猪精子耐冻性性状的早期选择方法,所述早期选择方法包括基于SNP遗传标记NC_010449.5:g.30668857C>G的基因型对猪精子耐冻性性状进行早期选择。

[0013] 进一步的,所述早期选择方法具体包括:

[0014] 检测待测猪SNP遗传标记NC_010449.5:g.30668857C>G的基因型;

[0015] 基于所述NC_010449.5:g.30668857C>G的基因型对待测猪的精子耐冻性性状进行早期选择;

[0016] 其中,所述NC_010449.5:g.30668857C>G的GG基因型个体的精子耐冻性高于CG基因型个体;所述NC_010449.5:g.30668857C>G的CG基因型个体的精子耐冻性高于CC基因型个体。

[0017] 进一步的,所述检测待测猪SNP遗传标记NC_010449.5:g.30668857C>G的基因型,具体包括:

[0018] 以正向引物F1和反向引物R1为引物,对待测猪的基因组DNA进行PCR扩增;

[0019] 对PCR扩增产物进行测序,获得待测猪7号染色体30668857bp核苷酸位点的基因型;

[0020] 其中,所述正向引物F1的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示;所述反向引物R1的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

[0021] 基于同一发明构思,本发明提供检测一种与猪精子耐冻性关联的ILRUN基因上游SNP遗传标记的引物,所述引物包括正向引物F1和反向引物R1,所述正向引物F1的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示;所述反向引物R1的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

[0022] 基于同一发明构思,本发明还提供上述检测一种与猪精子耐冻性关联的ILRUN基因上游SNP遗传标记的引物在猪遗传育种中的应用。

[0023] 基于同一发明构思,本发明还提供一种试剂盒,所述试剂盒包含正向引物F1和反向引物R1。

[0024] 基于同一发明构思,本发明还提供上述一种试剂盒在猪遗传育种中的应用。

[0025] 本发明实施例中的一个或多个技术方案,至少具有如下技术效果或优点:

[0026] 1.本发明一种与猪精子耐冻性关联的ILRUN基因上游SNP遗传标记,该SNP遗传标记与猪精子耐冻性相关联,位于ILRUN基因上游区域,其优势基因型为GG,经测试,公猪中NC_010449.5:g.30668857C>G位点的GG基因型个体的冻精复苏率显著高于CC基因型个体,这为种公猪的辅助选择提供新的标记资源,将其应用于种公猪的遗传育种,能够辅助筛选精子耐冻性高的种公猪个体,从基因层面上提高种公猪冻精质量,提升优质种公猪的利用率,进而实现养猪企业经济效益最大化。

[0027] 2.本发明一种与猪精子耐冻性关联的ILRUN基因上游SNP遗传标记,该SNP遗传标记为基于50头精子耐冻性高、低的种公猪个体基因组重测序数据分析挖掘出的SNP遗传标记,并在近400头的种公猪群体中进行了进一步验证,增加了本发明ILRUN基因上游SNP遗传

标记的准确性和可靠性,可以实现从分子层面对种公猪的冻精质量进行生物学检测,为种公猪的辅助选择育种提供新的遗传标记,有利于辅助筛选精子耐冻性高的种公猪个体。

附图说明

[0028] 为了更清楚地说明本发明实施例中的技术方案,下面将对实施例描述中所需要使用的附图作一简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其它的附图。

[0029] 图1为本发明实施例4步骤S2中PCR扩增产物的琼脂糖凝胶电泳检测图。

[0030] 图2为本发明实施例4步骤S3中NC_010449.5:g.30668857C>G位点的测序图谱。

具体实施方式

[0031] 下文将结合具体实施方式和实施例,具体阐述本发明,本发明的优点和各种效果将由此更加清楚地呈现。本领域技术人员应理解,这些具体实施方式和实施例是用于说明本发明,而非限制本发明。

[0032] 在整个说明书中,除非另有特别说明,本文使用的术语应理解为如本领域中通常所使用的含义。因此,除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域技术人员的一般理解相同的含义。若存在矛盾,本说明书优先。

[0033] 除非另有特别说明,本发明中用到的各种原材料、试剂、仪器和设备等,均可通过市场购买得到或者可通过现有方法制备得到。

[0034] 本发明整体思路如下:

[0035] 由于目前大部分发明均围绕种公猪鲜精活力关联的SNP遗传标记展开技术方法研究,包括鲜精中精子的密度、活力、直线运动率、畸形率等。而关于种公猪精子耐冻性关联的SNP、提高种公猪冻精质量,则未有相关发明技术。

[0036] 基于此,本发明对种公猪精子耐冻性关联的SNP进行研究和探索。前期,对25头精子耐冻性高(冻精活力≥0.6)和25头精子耐冻性低(冻精活力≤0.4)的种公猪个体分别进行基因组重测序,利用生物信息学分析方法,计算遗传分化指数(Fixation index,Fst),挖掘得到7号染色体30668857bp的C/G突变,在精子耐冻性高低组间的遗传分化较大,Fst为0.43。ILRUN基因编码一种具有N末端泛素相关(UBA)样和BRCA1基因1(NBR1)样结构域的中心邻居的蛋白质。该蛋白质是抗病毒和促炎细胞因子转录的抑制剂,也是肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)的调节剂。ILRUN基因阻断IRF3依赖性细胞因子的产生,如IFNA、IFNB和TNF。目前,关于该突变位点是否与精子耐冻性有关,能否提高种公猪冻精质量,尚未见报道。

[0037] 本发明提供的一种与猪精子耐冻性关联的ILRUN基因上游SNP遗传标记,是基于50头精子耐冻性高、低的种公猪个体基因组重测序数据分析挖掘出的SNP遗传标记,并在近400头的种公猪群体中进行了进一步验证,增加了本发明ILRUN基因上游SNP遗传标记的准确性和可靠性,可以实现从分子层面对种公猪的冻精质量进行生物学检测,为种公猪的辅助选择育种提供新的遗传标记,有利于辅助筛选精子耐冻性高的种公猪个体。有利于从本质上提高种公猪冻精质量,提升优质种公猪的利用率,进而实现养猪企业经济效益最大化。

[0038] 下面将结合实施例及实验数据对本申请一种与猪精子耐冻性关联的ILRUN基因上游SNP遗传标记及其应用进行详细说明。

[0039] 实施例1

[0040] 一种与猪精子耐冻性关联的ILRUN基因上游SNP遗传标记NC_010449.5:g.30668857C>G的获得,包括以下步骤:

[0041] 1、采集公猪精液及提取基因组DNA

[0042] 公猪年龄1—3岁,体格健壮、繁殖性能良好。采精前对采精杯、手套和采精袋等采精工具进行消毒处理,用低浓度的高锰酸钾溶液对阴茎周围进行消毒清洗,同时修剪阴茎周围毛发,并使用人工手握法进行精液采集。采精时需弃去射精初期的胶状精液,待精液呈现乳白色时,利用无菌薄膜滤纸进行过滤,收集到装有采精袋的采精杯中。公猪基因组DNA的提取采用Invitrogen公司生产的动物组织基因组DNA提取试剂盒(PureLinkTMPro96Genomic DNA Purification Kit,K182104A)进行,对提取出的DNA进行浓度和质量检测,置于-20℃下保存备用。共收集402头猪的精液样本及基因组DNA。

[0043] 2、收集精子耐冻性表型数据

[0044] (1)鲜精活力检测及精液冷冻保存

[0045] 精液稀释所用的烧杯、玻璃棒提前消毒处理,载玻片、盖玻片提前放置于CASA精子辅助分析仪(福州鸿视野)的加热台进行37℃预热,提前配置稀释剂置于水浴锅中进行37℃预热。采集新鲜精液后,利用电子温度计测量精液和冷冻稀释剂温度,待温度一致时,吸取0.1mL新鲜精液加入0.9ml预热的稀释液进行1:9稀释,轻轻颠倒混匀后,吸取5μL滴加在载玻片上,盖上盖玻片,利用上述CASA精子分析仪检测精子密度与活力,此为猪鲜精的精子活力数据,并做好记录。镜检合格后,将剩余精液按照1:1的比例加入37℃预热的冷冻稀释液,轻轻混匀后,25℃常温静置约1h。

[0046] 静置结束后轻轻摇晃精液防止精子假死,然后将精液放入程序降温仪(北京田园奥瑞),设置降温程序,使温度在1—2h内缓慢降温至17℃,降温结束后,在17℃条件下800g/min离心10—15min去掉上清液,用提前17℃预冷的冷冻基础液I(北京田园奥瑞)重悬浮精子,使精子密度达到20亿/mL,然后置于程序降温仪(北京田园奥瑞)中降温平衡,使精液在2.5—3.0h缓慢降温至4℃,并在4℃平衡0.5—1.0h;平衡后,加入冷冻基础液II(北京田园奥瑞),混匀后立即在低温操作柜(德国Minitube)中利用精液罐装一体机(德国Minitube)进行细管罐装操作;随后,按照程序冷冻仪(北京田园奥瑞)的技术要求,启动冷冻仪使腔室降至4—5℃后,放入罐装好的精液细管,调用精液细管冷冻参考程序进行降温,具体程序为:4℃,恒温预冷;1℃,降温1.5min,速率-2℃/min;-26℃,降温2.4min,速率-30℃/min;-140℃,降温6.2min,速率-30℃/min;-140℃,恒温21.2min;随后投入液氮罐。

[0047] (2)精液解冻及冻精活力检测

[0048] 将冷冻细管在50℃水浴锅中解冻16s,剪去细管两端,将精液转移入15mL离心管中,按照1:8的比例加入37℃预热的解冻液进行稀释;37℃恢复15—20min后在CASA显微镜下检测解冻后精子活力。每个个体至少取3支细管进行解冻,每支细管至少进行3次活力检测。

[0049] (3)筛选精子耐冻性极端个体

[0050] 按照上述步骤,完成种公猪鲜精活力和冻精活力的检测,利用冻精复苏率反应精

子耐冻性表型,公式如下:

[0051] $$x_i = \frac{Y_i}{X_i} \times 100\%$$

[0052] 其中,x_i为第i个个体的冻精复苏率,Y_i为第i个个体的冻精活力,X_i为第i个个体的鲜精活力。

[0053] 为消除不同试验批次对精子活力检测结果的影响,使用Z-score方法对精子活力进行标准化,公式如下:

[0054] $$Z_i = \frac{x_i - \mu}{\sigma}$$

[0055] 其中,Z_i表示第i个个体冻精复苏率的标准化得分,x_i表示第i个个体的冻精复苏率,μ表示每个批次所有个体冻精复苏率的均值,σ表示每个批次所有个体冻精复苏率的标准差,σ公式如下:

[0056] $$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}(x_i - \mu)^2}$$

[0057] 其中,σ表示所有个体冻精复苏率的标准差,N为个体数,x_i为第i个个体冻精复苏率,μ表示每个批次所有个体冻精复苏率的均值。

[0058] 根据Z值对种公猪个体进行排序,选取前25头Z值高的个体,表示冻精复苏率高,作为精子耐冻组,选取后25头Z值低的个体,表示冻精复苏率低,作为精子不耐冻组。

[0059] 3、基于基因组重测序挖掘精子耐冻性相关分子标记

[0060] (1)基因组重测序

[0061] 按照Illumina公司的TruSeq DNA PCR-free prep kit试剂的标准建库流程,对精子耐冻组和精子不耐冻组的50头猪的基因组DNA进行基因组重测序文库构建,通过Novaseq-PE150平台进行10×深度重测序,获得测序原始数据。

[0062] (2)原始数据处理

[0063] 利用fastp(v0.20.0)程序对原始数据进行过滤,结果显示,20个个体共获得32亿条高质量read,利用BWA软件将其比对到Sus Scrofa11.1参考基因组,平均比对率为99.31%,平均测序覆盖深度为7.13(6.45—7.90)。

[0064] (3)基因组变异分析及精子耐冻组与不耐冻组间遗传分化指数计算

[0065] 对于50头猪基因组重测序数据,利用samtools软件进行SNP挖掘,共获得26,323,490个高质量SNP。

[0066] 采用θπ(θπ,耐冻组/不耐冻组)和Fst值的分布来检测基因组中受到显著的选择性清除的区域。选取具有极端低或高的θπ比值(1%左尾和1%右尾)和显著高的Fst值的区域(即Fst占前1%的部分)作为受到强烈选择性清除的区域。

[0067] (4)筛选精子耐冻性NC_010449.5:g.30668857C>G遗传标记

[0068] 基于上述分析,共发现15,0217个SNP,注释到5632个基因中,并进一步通过国际小鼠表型协会数据库(IMPC)进行比对、GO分析结果、文献索引和基因单倍型分析,最终确定NC_010449.5:g.30668857C>G遗传标记与精子耐冻性相关。

[0069] 实施例2

[0070] NC_010449.5:g.30668857C>G遗传标记在猪中的多态性分布检测。

[0071] 本实施例在395头公猪中检测NC_010449.5:g.30668857C>G遗传标记的多态性分布规律,检测结果如表1所示。

[0072] 表1 NC_010449.5:g.30668857C>G位点的基因型频率和基因频率

[0073]

多态位点	群体	样本数量	基因型频率（个数）			等位基因频率	
			CC	CG	GG	C	G
NC_010449.5:g.30668857C>G	杜洛克猪、长白猪、大白猪	395	0.53(211)	0.42(163)	0.05(21)	0.74	0.26

[0074] 由表1结果可知,公猪中NC_010449.5:g.30668857C>G位点表现为CC、CG和GG三种基因型,其中CC基因型个体较多,且C等位基因频率为74%。

[0075] 实施例3

[0076] NC_010449.5:g.30668857C>G遗传标记与公猪精子耐冻性的关联分析。

[0077] 本实施例旨在确定NC_010449.5:g.30668857C>G位点与公猪精子耐冻性的关联性,在395个公猪群体中进行多态性检测,并分析此多态位点的不同基因型与冻精复苏率的相关性。采用SPSS统计分析软件(IBM SPSS Statistics 26)GLM程序进行不同SNP基因型组合的方差分析,并进行显著性检验,所采用模型为:

[0078] $y_{ijkl}=\mu+G_i+B_j+T_k+e_{ijkl}$

[0079] 其中,y_{ijkl}为复苏率测定值,μ代表群体均数,G_i代表基因型效应,B_j代表品种效应,T_k代表批次效应,e_{ijkl}代表随机效应。

[0080] 在种公猪中进行不同基因型与公猪冻精复苏率间的关联分析,统计分析结果如表2所示:

[0081] 表2 NC_010449.5:g.30668857C>G位点与公猪冻精复苏率间的关联分析

[0082]

多态位点	性状	基因型			效应值	
		CC	CG	GG	加性效应	显性效应
NC_010449.5:g.30668857C>G	复苏率	64.72±0.61 a	66.19±0.69 a	71.07±2.19 b	-3.18	-1.71

[0083] 其中:表2中性状均值组成均为平均数±标准误,肩标字母不同表示差异显著(P<0.05)

[0084] 由表2结果可知,公猪中NC_010449.5:g.30668857C>G位点的GG基因型个体的冻精复苏率显著高于CC基因型个体(P<0.05)。

[0085] 实施例4

[0086] NC_010449.5:g.30668857C>G遗传标记在精子耐冻性种公猪筛选上的应用,包括以下步骤:

[0087] 步骤S1:采集待检测公猪个体的耳缘组织样品,进行DNA提取及质量检测;

[0088] 步骤S2:用上述正向引物F1和反向引物R1进行PCR扩增得PCR扩增产物并纯化;PCR反应体系40μL,体系中各组分为:基因组DNA 1uL、PCR mix 20μL、上游引物、下游引物各2μL、加ddH_2O补至总体积40μL;PCR的运行程序为:98℃预变性2min;98℃变性10s,60℃退火10s,72℃延伸15s,35个循环;72℃延伸2min;4℃保存。PCR扩增产物的琼脂糖凝胶电泳检测图如图1所示,其中DL2000为Marker,泳道1-5为猪中的扩增片段,片段大小为465bp。

[0089] 步骤S3:取部分PCR纯化产物进行测序,分析该序列第115bp处基因型,优先保留GG基因型的个体,优先淘汰CC基因型的个体,选择保留CG基因型的个体。

[0090] NC_010449.5:g.30668857C>G遗传标记与公猪繁殖性状尤其是公猪冻精复苏率显著相关,GG基因型为优势基因型。因此,在种公猪选育过程中,可以按照步骤S1、步骤S2和步骤S3的操作,通过该SNP遗传标记辅助选择繁殖性能好的GG型个体,有利于提高群体的生产性能,提升优质种公猪的利用率,实现养猪企业经济效益最大化。

[0091] 本发明中,SEQ ID NO:1～3的具体序列如下:

[0092] SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列:

[0093]
GCTCCGTAAGAGCCATTCAAGAAATGGTAACTAGTGTTGTGGCCATAAGCCTGACGAGATGACTGTGGGGTTACTGAT

ACAAGCAGGCAGGGATTACATCTCCTGGTCCCTCTT**C**TACCTTACTTCCCTTACTGGGCCTTTATTAAAATATGAAAT

AGGGAGTTCCCATTGTGGCACAGCGGAAATGAATCCAAGTAGGAACCATGAGGTTGTGGGTTCGTTCCCTGGCCCTAC

TCAGTGGGTTAAGGATCCAGTGTTGCCGTGAGCTATGGTATAGGTCGAGGATGTGGCTCAGATCCCACGTTGCTGTGG

CGTAGGCCAGCAGCTGTAGCTCCAATTAGACCCCTAGCCTGGGAACCTCTGTATGACACAGGTGTAGCCCTAAAAAGC

AAAAAAGAAAAAGAAAAGAAATATCTGCCTTCTTTCTTAATAAGGAACTACCCCTTCTCTATTTATTTTTTCCTC;

[0094] SEQ ID NO:2所示的正向引物F1:GCTCCGTAAGAGCCATTCAAGA;

[0095] SEQ ID NO:3所示的反向引物R1:GAGGAAAAAATAAATAGAGAAGGGG。

[0096] SEQ ID NO:1中,加粗并带下划线的位点即为本发明NC_010449.5:g.30668857C>G位点。

[0097] 最后,还需要说明的是,术语“包括”、“包含”或者其任何其他变体意在涵盖非排他性的包含,从而使得包括一系列要素的过程、方法、物品或者设备不仅包括那些要素,而且还包括没有明确列出的其他要素,或者是还包括为这种过程、方法、物品或者设备所固有的要素。

[0098] 尽管已描述了本发明的优选实施例,但本领域内的技术人员一旦得知了基本创造性概念,则可对这些实施例作出另外的变更和修改。所以,所附权利要求意欲解释为包括优选实施例以及落入本发明范围的所有变更和修改。

[0099] 显然,本领域的技术人员可以对本发明进行各种改动和变型而不脱离本发明的精神和范围。这样,倘若本发明的这些修改和变型属于本发明权利要求及其等同技术的范围之内,则本发明也意图包含这些改动和变型在内。

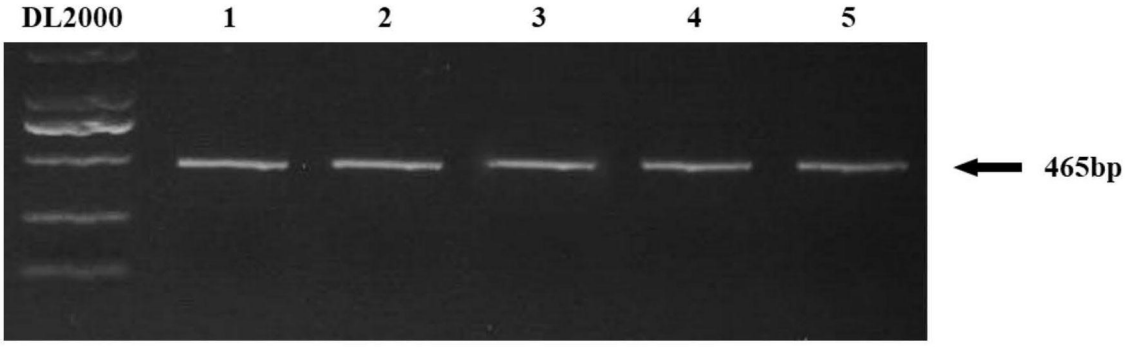

DL2000
1
2
3
4
5
465bp

图1

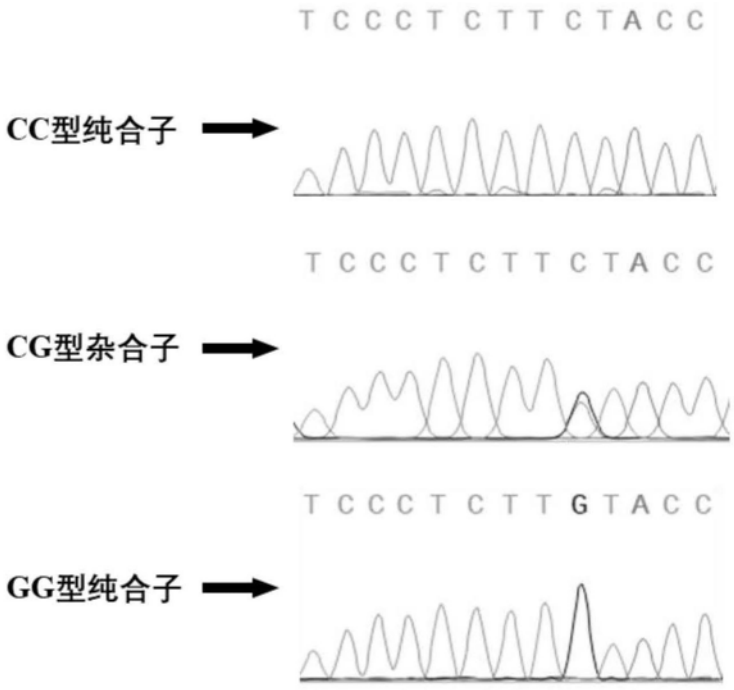

T C C C T C T T C T A C C
CC型纯合子
T C C C T C T T C T A C C
CG型杂合子
T C C C T C T T G T A C C
GG型纯合子

图2