



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114717332 B

(45) 授权公告日 2024. 07. 02

(21) 申请号 202210434909.2

C12Q 1/6858 (2018.01)

(22) 申请日 2022.04.24

C12N 15/11 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 114717332 A

(56) 对比文件

CN 104593363 A, 2015.05.06

CN 106011273 A, 2016.10.12

(43) 申请公布日 2022.07.08

审查员 吴梦琦

(73) 专利权人 华南农业大学  
地址 510000 广东省广州市天河区五山华南农业大学

(72) 发明人 罗文 张丹璐 张细权 聂庆华  
罗庆斌

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有  
限公司 44205  
专利代理师 朱继超

(51) Int. Cl.  
C12Q 1/6888 (2018.01)

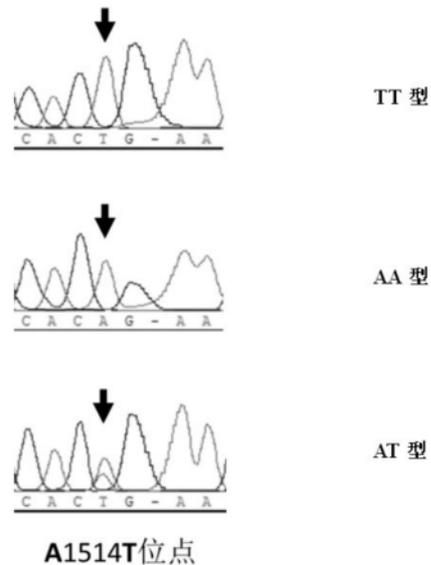
权利要求书1页 说明书7页  
序列表1页 附图1页

(54) 发明名称

与家禽生长和肉质性状相关的SNP分子标记及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种与家禽生长和肉质性状相关的SNP分子标记及其应用。所述SNP分子标记位于GHR基因第十外显子序列,突变位点为A1514T,该SNP位点的基因型为AA、AT和TT。本发明的SNP分子标记与家禽的生长、屠体和肉质等多个性状显著相关,是一个新的分子标记。其中AT基因型个体活体重、胸腿肌重、翅重、头脚重、心肝肌胃腺胃重、小肠长度等生长性状和屠体性状显著高于AA和TT基因型个体,AA基因型个体皮下脂肪厚度显著高于AT和TT基因型个体。TT基因型个体胸肌剪切力和腿肌导电率等肉质性状显著低于AA和AT基因型个体。通过确定该SNP位点的基因型对家禽生长和肉质性状进行早期选择,可以加快家禽体重和肉质性状的遗传进展,提高的家禽生产性能,节省生产成本,提高家禽经济效益。



1. 特异性扩增SNP分子标记的引物对在家禽生长和肉质性状相关育种中的应用,其特征在于,所述家禽为杏花鸡与隐性白洛克鸡杂交后代,所述引物对的核苷酸序列分别如SEQ ID No.1和SEQ ID No.2所示,所述SNP分子标记位于扩增产物核苷酸序列的第116位碱基,突变型为A>T,该SNP分子标记的基因型为AA、AT或TT,其中AT基因型个体体重生长和屠体性状明显强于AA和TT基因型个体,TT基因型个体肉质性状明显低于AA和AT基因型个体。

2. 一种与家禽生长和肉质性状相关的早期选择方法,其特征在于,所述家禽为杏花鸡与隐性白洛克鸡杂交后代,根据SNP分子标记的基因型对家禽生长和肉质性状进行早期选择,包括如下步骤:

1) 提取待测家禽血液的DNA;

2) 以待测家禽的血液DNA为模板,进行PCR扩增获得产物,用于PCR扩增的引物对的核苷酸序列分别如SEQ ID No.1和SEQ ID No.2所示;

3) 采用DNA测序方法检测PCR扩增产物,所述SNP分子标记位于扩增产物核苷酸序列的第116位碱基,突变型为A>T,该SNP分子标记的基因型为AA、AT或TT;

4) 基于步骤3) SNP分子标记的基因型对禽类生长和肉质性状进行早期选择,其中AT基因型个体体重等生长和屠体性状明显强于AA和TT基因型个体,TT基因型个体肉质性状明显低于AA和AT基因型个体。

## 与家禽生长和肉质性状相关的SNP分子标记及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于分子生物技术和分子标记技术领域,特别涉及一种与家禽生长和肉质性状相关的SNP分子标记及其应用。

### 背景技术

[0002] 在家禽的生长轴上,GH基因是调节动物生长的重要激素,具有促进生长的功能。当GH起作用时,第一步是结合靶细胞表面的GH受体,然后通过GHR传导信号进入细胞,促进细胞内生长相关通路的活性。生长激素受体(GHR)是GH调节细胞生长的关键基因。据报道,生长激素受体(GHR)基因还与鸡体内的脂肪沉积有关。在动物的生长发育过程中,生长激素要发挥作用必须与生长激素受体结合。对于牛来说,当GHR基因碱基序列发生突变,将导致GH正常功能的发挥受到影响,进而影响到产奶、产肉等诸多性状。研究表明,当生长激素分泌增多时会提高肉鸡的生长性能,促进动物体物质与能量代谢,促进生长和发育过程。同时,GH基因对于禽类也是一种重要的功能基因,对于禽类的生长发育起着关键性作用。

[0003] GHR是GH能够正常发挥作用的基础,和动物的生长发育有密切关系。GHR是一种重要的跨膜糖蛋白,是由单一基因所编码,含有620个氨基酸,当动物体内器官含有足够的GHR才能使促乳素、细胞因子、生长激素、促红细胞生成素等正常发挥作用。GHR存在于机体的大多数细胞之内,起到与GH结合发挥GH生理作用的功能,在肝脏中尤为突出,在对鸡的GHR研究发现,肝脏是鸡GHR表达最多的器官。除了肝脏之外,GHR基因在皮肤、心脏、肌肉、肺、肾、睾丸、卵巢、肾上腺、脑和淋巴组织等都有表达。但是在不同的器官之中,GHR基因的不同位置也能发挥不同的功能,有不同的调节方法。有研究表明GH基因的表达可对牛出生体重、断奶体重和1年体重产生影响。鸡的GHR受体的跨膜结构位于第238-261的24个氨基酸残基,GHR基因含有592个氨基酸残基,在其N末端发现有16个氨基酸信号肽。鸡的GHR氨基酸残基顺序相比于哺乳动物有着比较低的同源性,例如鸡和兔的同源性为53%,和鼠的同源性为58%。相反的是,GHR的同源性在哺乳动物之间比较高,例如人与鼠和兔的同源性分别达到了70%和84%,三者虽然同源性不高,但是它们的GHR的结构都比较相似,都是由胞外结构、胞内结构和跨膜结构这三个部分组成。其中,胞外结构负责与膜外配体结合,存在于胞外结构的7个半胱氨酸所形成的二硫键能够使GHR在胞外保持特定的空间结构而不会变形。

[0004] 随着分子标记技术及分子数量遗传学的不断发展,应用分子遗传标记进行标记辅助选择可以大大缩短选育的世代间隔,加速选育的遗传进展。单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphisms,SNPs)主要是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的DNA序列多态性,其具有易于统计、分布广、遗传稳定性好等特性,为当前应用最广泛的遗传标记技术,在动物遗传育种研究领域发挥着重要作用。我国地方品种资源丰富,大多数地方品种家禽具有抗逆性强、就巢性弱等优良性状。而随着生活水平的提高和膳食观念的改变,人们对家禽的肉品质具有更高的要求。地方品种由于其肉质优良、风味独特,深受消费者喜爱,具有较大的市场需求量,但是最近几十年,养殖业对家禽的体重和生长速度的选择过度关注,导致家禽体内脂肪沉积过多,影响家禽肉质性状。家禽GHR基因位于5号染色体

上,基因长度为87kb,包含10个外显子,寻找与家禽生长和肉质性状相关的SNPs,并在分子育种中加以运用,可加快遗传进展并节省生产成本,为家禽育种提供有价值的信息。

### 发明内容

[0005] 为了解决现有技术的不足,本发明的目的在于提供了一种与家禽生长和肉质性状相关的SNP分子标记,并建立标记基因型检测方法,将其应用于家禽的选育中,提高家禽屠体性状。

[0006] 本发明的第一方面在于提供了一种与家禽生长和肉质性状相关的SNP分子标记,所述SNP分子标记位于galGal16版基因组Z染色体中,对应于GHR基因第十外显子序列中的突变位点为A1514T,该SNP位点的基因型为AA、AT和TT。

[0007] 本发明的第二方面在于提供一种与家禽生长和肉质性状相关的早期选择方法。根据待测家禽GHR基因第十外显子区域中的突变位点A1514T的基因型进行家禽的早期选择,获取预期屠体性状符合预期目标的个体进行饲养,降低总体饲养成本和提高产出价值。

[0008] 进一步,所述早期选择方法包括如下步骤:

[0009] 1) 提取待测家禽血液的DNA;

[0010] 2) 以待测家禽的血液DNA为模板,进行PCR扩增获得含GHR基因目的片段的PCR产物;

[0011] 3) 采用DNA测序方法检测PCR产物的突变位点A1514T的基因型;

[0012] 4) 基于步骤3) SNP位点的基因型对禽类生长和肉质性状进行早期选择,其中AT基因型个体体重等生长和屠体性状明显强于AA和TT基因型个体,TT基因型个体肉质性状明显低于AA和AT基因型个体。育种时选择保留AT基因型的个体,从而提高家禽的生长和肉质性状。

[0013] 进一步,步骤3) 所述PCR扩增所使用的引物的核苷酸序列为:

[0014] 上游引物PCR-F:5'-CCCTGACAAACACTGAC-3'(SEQ ID NO.1);

[0015] 下游引物PCR-R:5'-ACACCCACAAGAACAAG-3'(SEQ ID NO.2)。

[0016] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0017] 本发明提供的SNP分子标记,即家禽GHR基因外显子10序列中的突变位点A1514T与家禽的生长和肉质性状相关,是一个新的分子标记。通过确定该SNP位点的基因型对家禽的生长和肉质性状进行早期选择,可以提高肉家禽生长和肉质性状,节省生产成本并加快遗传进展,更好地应用于家禽选育中,具有很大的经济应用价值和科研价值。

### 附图说明

[0018] 图1是GHR基因中突变位点A1514T的基因分型结果图。

### 具体实施方式

[0019] 下面将结合具体实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0020] 实施例1,提取杏花鸡×隐性白洛克鸡F2代资源群全同胞家系待测血液DNA

[0021] DNA样品为本实验室保存的杏花鸡与隐性白洛克鸡全同胞F2资源群体DNA样品。隐性白洛克鸡是一种快大型肉鸡,而杏花鸡是中国本土的品种肉鸡。由杏花鸡和隐性白洛克鸡杂交出来的第二代肉鸡采用平养的饲养方式,饲喂符合国际配方标准的玉米大豆饲料。在90日龄时被屠宰取样,然后记录它们的胫长、头宽、胸宽、胸深、体长、胸角宽、屠宰重量、皮质厚度、去内脏重、膛重、胸肌重、腿肌重、羽重、腹脂重、头颈重、心脏重、肝重、胃重和小肠长。其中胫长、头宽、胸宽、胸深、体长用游标卡尺测量;胸角用胸角器测量;皮下脂肪厚在靠近尾的背部测量,脂肪宽测量腿和胸肌之间宽度,这两性状用游标卡尺测量。

[0022] 所有个体的基因组DNA根据DNeasy® Plant Mini Kit(Qiagen,Hilden,CA;Cat# 69104)试剂盒说明书步骤抽提血液DNA,检测质量和浓度后稀释至50ng/ $\mu$ L,4°C保存备用。

[0023] 实施例2,SNP检测及DNA混池测序

[0024] 1、引物设计及特异性检测:

[0025] 根据GeneBank上所公布的GHR基因序列,设计出用于扩增GHR基因的引物序列,如表1所示。将设计的引物对序列发往生工生物公司(上海)合成,并用该引物对对GHR基因标准品进行PCR扩增,测试引物的特异性。SNP位点位于所扩增689bp片段序列的第116位碱基。

[0026] 表1 GHR的SNP筛选的引物信息

基因	引物序列	SED ID NO	产物长度	退火温度(°C)
GHR	F: CCCTGACAAACACTGAC	1	689bp	52
	R: ACACCCACAAGAACAAG	2		

[0028] 2、DNA混池测序:

[0029] 从提取的DNA总样品中随机挑选10个DNA样品构建混池,将混池样品进行PCR扩增,所用引物与上述SNP检测中所用的引物对相同,反应体系见表2。

[0030] 表2 PCR反应体系

成份	体积( $\mu$ L)
模板 DNA	1
2×Taq PCR MasterMix	25
上游引物	1
下游引物	1
ddH <sub>2</sub> O	22
总体积	50

[0032] PCR反应程序:94°C预变性2min;94°C变性30s,52°C退火30s,72°C延伸1min,37个循环;72°C后延伸10min;4°C保存。

[0033] 将获得的PCR产物送往生工生物公司测序,测序结果检测得到家禽GHR基因第十外显子序列中的突变位点为A1514T,其测序结果分析如附图1所示。

[0034] 实施例3,确定GHR突变位点A1514T的基因型

[0035] 使用实施例2中步骤1的引物对,对实施例1所得血液DNA全部进行PCR特异性扩增,获得GHR基因目的片段的PCR产物。分别对PCR产物进行测序,对每一个测序结果的基因型进行分析,分型结果如图1所示。在本实验例中成功分型199个个体,接着对各个基因型进行统计分析以得到该位点的基因型频率和等位基因频率。该SNP突变位点A1514T的基因及基因型频率统计结构如下表2所示。

[0036] 表3 GHR基因突变位点A1514T的基因型频率等位基频率

[0037]	基因型频率 (个体数)			等位基因频率	
	AA (103)	AT (54)	TT (42)	A	T
	51.8%	27.1%	21.1%	65.35%	34.65%

[0038] 其中:

[0039] (1) 基因型频率是指群体中某一基因型个体数占基因型总数的比值:

[0040] 基因型频率 = 某基因型总数 / 该群体总数 × 100% ;

[0041] (2) 基因频率是指群体中某一基因占其同一位点全部基因的比值:

[0042] 基因频率 = 某基因个数 / 群体中同一位点基因总数 × 100% 。

[0043] 由表3结构可以看出,AA基因型为待测鸡群体优势基因型。

[0044] 实施例4,SNP突变位点A1514T与家禽生长和肉质性状的关联分析

[0045] 使用SPSS软件对GHR基因不同基因型与该F2群体生长、屠体性状进行关联分析,结果以(平均数±标准误差)表示。以t检验进行显著性分析,P<0.05表示差异显著,P<0.01表示差异极显著。关联分析结果如下表4所示。

[0046] 表4GHR基因突变位点A1514T与家禽生长、屠体和肉质性状关联分析

性状	P	最小二乘均数±标准误		
		AA;103	AT;54	TT;42
活重(kg)	0.006	1.40±0.03 <sup>B</sup>	1.55±0.04 <sup>A</sup>	1.43±0.04 <sup>B</sup>
胸肉重(g)	0.049	83.58±1.8 <sup>B</sup>	89.30±2.49 <sup>AB</sup>	90.86±2.88 <sup>A</sup>
腿肉重(g)	0.011	112.14±2.71 <sup>B</sup>	125.87±3.73 <sup>A</sup>	113.78±4.31 <sup>B</sup>
翅膀重(g)	<0.0001	58.94±1.25 <sup>B</sup>	67.43±1.72 <sup>A</sup>	62.29±1.99 <sup>AB</sup>
腹脂重(g)	0.156	24.73±2.13 <sup>A</sup>	22.00±2.93 <sup>A</sup>	30.56±3.38 <sup>A</sup>
头颈重(g)	0.008	121.06±3.06 <sup>B</sup>	136.67±4.20 <sup>A</sup>	121.67±4.85 <sup>AB</sup>
脚重(g)	0.028	26.61±1.31 <sup>B</sup>	32.43±1.81 <sup>A</sup>	27.02±2.08 <sup>AB</sup>
[0047] 心肝肌胃腺胃重(g)	0.012	59.27±1.35 <sup>B</sup>	66.22±1.86 <sup>A</sup>	61.85±2.15 <sup>AB</sup>
小肠长度(cm)	0.013	128.39±1.90 <sup>B</sup>	137.37±2.60 <sup>A</sup>	135.04±3.01 <sup>AB</sup>
屠体重(g)	0.001	1218.53±25.11 <sup>B</sup>	1380.03±34.46 <sup>A</sup>	1274.53±39.80 <sup>B</sup>
胸角(°)	0.036	57.88±0.62 <sup>B</sup>	58.33±0.85 <sup>B</sup>	60.87±0.99 <sup>A</sup>
皮下脂肪厚(mm)	0.131	4.02±0.15 <sup>A</sup>	3.53±0.20 <sup>B</sup>	3.97±0.23 <sup>AB</sup>
脂肪带宽(mm)	0.112	12.33±0.71 <sup>A</sup>	9.79±0.98 <sup>B</sup>	11.223±1.13 <sup>AB</sup>
全净膛重(g)	0.004	1132.15±23.68 <sup>B</sup>	1267.54±32.54 <sup>A</sup>	1169.98±37.54 <sup>AB</sup>
半净膛重(g)	0.007	980.32±21.07 <sup>B</sup>	1095.08±28.92 <sup>A</sup>	1012.76±33.40 <sup>B</sup>
胸肌剪切力	0.016	52.45±2.47 <sup>A</sup>	52.30±3.41 <sup>A</sup>	39.77±3.87 <sup>B</sup>
腿肌电导率	0.037	5.49±0.41 <sup>A</sup>	4.27±0.54 <sup>AB</sup>	3.76±0.63 <sup>B</sup>
体重 28(g)	0.040	254.33±7.61 <sup>B</sup>	272.68±10.60 <sup>AB</sup>	289.01±11.73 <sup>A</sup>
体重 35(g)	0.026	350.04±11.18 <sup>B</sup>	384.28±15.57 <sup>AB</sup>	401.72±17.23 <sup>A</sup>
体重 42(g)	0.009	456.39±13.9 <sup>B</sup>	509.40±19.28 <sup>A</sup>	527.57±21.66 <sup>A</sup>
[0048] 体重 49(g)	0.048	575.36±23.30 <sup>B</sup>	646.29±36.10 <sup>AB</sup>	675.79±40.36 <sup>A</sup>
胫长 42(mm)	0.001	54.86±0.64 <sup>B</sup>	57.94±0.89 <sup>A</sup>	58.92±1.00 <sup>A</sup>
胫长 49(mm)	0.003	60.27±0.91 <sup>B</sup>	64.34±1.40 <sup>A</sup>	65.79±1.57 <sup>A</sup>
胫直径 42(mm)	0.005	7.28±0.08 <sup>B</sup>	7.62±0.11 <sup>A</sup>	7.71±0.13 <sup>A</sup>
胫直径 49(mm)	0.016	7.79±0.12 <sup>B</sup>	8.25±0.18 <sup>A</sup>	8.36±0.20 <sup>A</sup>

[0049] 注:同行相同字母表示关联不显著,不同字母表示关联显著(P<0.05)。

[0050] 由表中可以得出该突变位点与家禽的活重、胸肉重、腿肉重、翅膀重、头颈重、脚重、心肝肌胃腺胃重、小肠长度、屠体重、胸角、全净膛重、半净膛重、胸肌剪切力、腿肌电导率、体重28、体重35、体重42、胫长42、胫直径42、体重49、胫长49、胫直径49等多个性状显著相关(P<0.05)。其中AT基因型个体体重等生长和屠体性状明显强于AA和TT基因型个体,TT

基因型个体肉质性状明显低于AA和AT基因型个体。该SNP位点可以作为提高家禽生长和肉质性状的辅助选择和分子遗传育种标记。

[0051] 实施例5,使用该SNP位点对家禽生长和肉质性状进行早期选择

[0052] 购买杏花鸡与隐性白洛克鸡全同胞F2群体100只,在相同的环境下饲喂至1周龄,抽取血液样本,获得DNA样本,根据实施例2设计的特异性引物进行PCR扩增,反应体系如表2所示。对获得的PCR产物送测,对测序结果进行突变位点A1514T的基因分型。本次实验成功对100个个体进行分型,如下表5所示。

[0053] 表5基因型频率和等位基因频率统计表

多态性位点	基因型	频率	个体数
A1514T	AA	54%	54
	AT	26%	26
	TT	20%	20

[0055] 为了验证该SNP位点能在早期对家禽生长和肉质性状进行选择,将不同分型的个体分别圈养,饲养条件保持一致。饲养至6周龄的鸡进行屠宰测定,初定数据如表6所示。

[0056] 表6 A1514T与鸡生长、屠体和肉质性状的关联分析结果

性状	AA;54	AT;26	TT;20
活重(g)	478.43±11.32 <sup>B</sup>	523.51±20.1 <sup>A</sup>	501.27±18.71 <sup>A</sup>
[0057] 胸肉重(g)	85.20±1.48 <sup>B</sup>	92.86±2.82 <sup>A</sup>	90.11±3.19 <sup>AB</sup>
腿肉重(g)	100.94±2.91 <sup>B</sup>	116.78±4.21 <sup>B</sup>	112.83±3.73 <sup>A</sup>
翅膀重(g)	67.75±1.25 <sup>B</sup>	78.52±1.72 <sup>A</sup>	72.29±1.99 <sup>AB</sup>
腹脂重(g)	17.93±2.33 <sup>A</sup>	15.70±2.84 <sup>A</sup>	22.51±3.55 <sup>B</sup>
头颈重(g)	109.62±3.10 <sup>B</sup>	135.64±4.32 <sup>A</sup>	120.30±4.85 <sup>A</sup>
脚重(g)	30.49±1.17 <sup>B</sup>	36.64±1.86 <sup>A</sup>	33.08±2.04 <sup>AB</sup>
心肝肌胃腺胃重(g)	31.10±1.26 <sup>B</sup>	34.02±1.66 <sup>A</sup>	32.58±2.17 <sup>AB</sup>
屠体重(g)	416.23±8.78 <sup>B</sup>	465.92±12.41 <sup>A</sup>	446.13±10.59 <sup>B</sup>
[0058] 皮下脂肪厚(mm)	3.87±0.15 <sup>A</sup>	3.47±0.20 <sup>B</sup>	3.64±0.23 <sup>AB</sup>
全净膛重(g)	1132.15±23.68 <sup>B</sup>	1267.54±32.54 <sup>A</sup>	1169.98±37.54 <sup>AB</sup>
半净膛重(g)	334.90±10.07 <sup>B</sup>	369.59±12.42 <sup>A</sup>	354.39±11.48 <sup>B</sup>
胸肌剪切力(N)	40.51±2.36 <sup>A</sup>	40.38±3.21 <sup>A</sup>	36.72±3.37 <sup>B</sup>
腿肌电导率(mS/cm)	4.79±0.33 <sup>A</sup>	4.13±0.67 <sup>AB</sup>	3.62±0.75 <sup>B</sup>

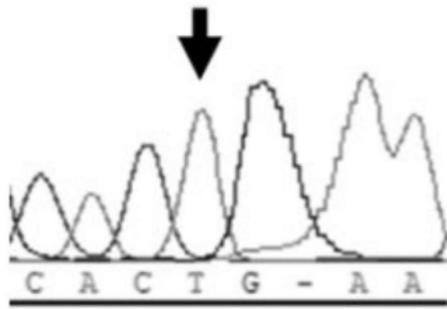
[0059] 注:同行相同字母表示关联不显著,不同字母表示关联显著(P<0.05)。

[0060] 由上表6可知经SNP突变位点A1514T选择区分的个体,AT基因型个体的活重、胸肉重、腿肉重、翅膀重、屠体重等数值明显强于AA和TT基因型个体,腹脂重和皮下脂肪厚也更

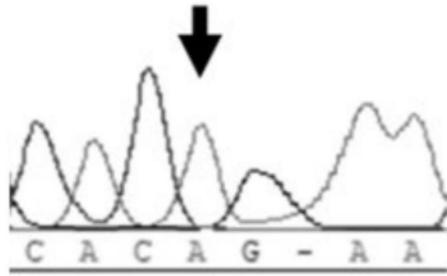
低,适用于培育生长性状更突出的种群;AA基因型个体的胸肌剪切力、腿肌电导率率显著优于AT和TT基因型的个体,适合针对筛选提高肉质口感的种群。实验数据证明SNP突变位点A1514T可以应用在家禽早期选择中帮助挑选生长和屠体性状更优的个体,以实现节省生产成本并加快遗传进展。

[0061] 对于本领域技术人员而言,显然本发明不限于上述示范性实施例的细节,而且在不背离本发明的精神或基本特征的情况下,能够以其他的具体形式实现本发明。因此,无论从哪一点来看,均应将实施例看作是示范性的,而且是非限制性的,本发明的范围由所附权利要求而不是上述说明限定,因此旨在将落在权利要求的等同要件的含义和范围内的所有变化囊括在本发明内。

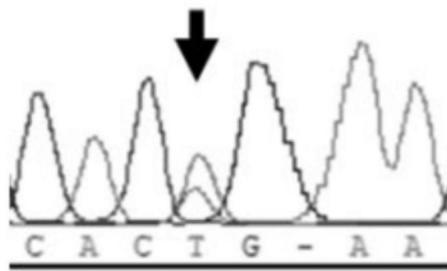
- [0001] SEQUENCE LISTING  
[0002] <110> 华南农业大学  
[0003] <120> 与家禽生长和肉质性状相关的SNP分子标记及其应用  
[0004] <130> 2022  
[0005] <160> 2  
[0006] <170> PatentIn version 3.5  
[0007] <210> 1  
[0008] <211> 17  
[0009] <212> DNA  
[0010] <213> 人工序列  
[0011] <400> 1  
[0012] ccctgacaaa cactgac 17  
[0013] <210> 2  
[0014] <211> 17  
[0015] <212> DNA  
[0016] <213> 人工序列  
[0017] <400> 2  
[0018] acaccacaaa gaacaag 17



TT 型



AA 型



AT 型

A1514T位点

图1