



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115141889 A

(43) 申请公布日 2022.10.04

(21) 申请号 202210686431.2

C12N 15/11 (2006.01)

(22) 申请日 2021.01.28

(62) 分案原申请数据

202110120752.1 2021.01.28

(71) 申请人 武汉市农业科学院

地址 430000 湖北省武汉市洪山区青菱乡  
张家湾特1号

(72) 发明人 程蕾 刘辰晖 胡修忠 向敏

余婕 周源 王定发 夏瑜

(74) 专利代理机构 武汉智权专利代理事务所

(特殊普通合伙) 42225

专利代理师 马丽娜

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6888 (2018.01)

C12Q 1/6869 (2018.01)

权利要求书2页 说明书8页

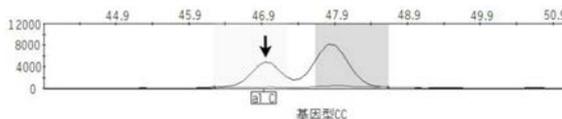
序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

与中国南方荷斯坦奶牛产奶性状相关的SNP标记及其应用

(57) 摘要

本发明提供与中国南方荷斯坦奶牛产奶性状相关的SNP标记及其应用,第一SNP标记位于中国南方荷斯坦奶牛基因组第18号染色体反链上第39037752bp处,碱基为C或T,第一SNP标记的CC基因型个体的305d奶量极显著高于CT基因型个体和TT基因型个体,总奶量和高峰奶均显著高于CT基因型个体和TT基因型个体;第二SNP标记位于中国南方荷斯坦奶牛基因组第18号染色体反链上第39037665bp处,碱基为G或A,第二SNP标记的GG基因型个体总奶量和高峰奶均显著高于GA基因型个体。本发明提供的两个SNP位点丰富了奶牛育种的分子标记遗传资源库,利用其进行分子标记辅助选择有利于提高中国南方荷斯坦奶牛的产奶量,同时也不会影响中国南方荷斯坦奶牛的繁殖性状。



1. 第二SNP标记在辅助鉴定中国南方荷斯坦奶牛产奶性状中的用途,其特征在于:所述第二SNP标记位于中国南方荷斯坦奶牛基因组第18号染色体反链上第39037665bp处,碱基为G或A,第二SNP标记的GG基因型个体总奶量和高峰奶均显著高于GA基因型个体。

2. 用于检测第二SNP标记的试剂盒在辅助鉴定中国南方荷斯坦奶牛产奶性状中的用途,其特征在于:所述用于检测第二SNP标记的试剂盒含有用于检测第二SNP标记的引物对和单碱基延伸引物;

所述第二SNP标记位于中国南方荷斯坦奶牛基因组第18号染色体反链上第39037665bp处,碱基为G或A,第二SNP标记的GG基因型个体总奶量和高峰奶均显著高于GA基因型个体;

所述引物对包括:

正向引物:5' -CCATACTCAGCCACAGCACAGC-3' ,

反向引物:5' -GGGGCGAAATGAAAACCTCAACT-3' ;

所述单碱基延伸引物为:

5' -TTTTTTTGTCGTCTCCYTGTCGTGAAC-3' ;

其中,核苷酸序列中的Y为简并碱基,代表C或T。

3. 一种选育中国南方荷斯坦奶牛的方法,其特征在于:通过对待测中国南方荷斯坦奶牛进行第二SNP标记的检测,评估所述待测中国南方荷斯坦奶牛的产奶性状,选择具有能够提高产奶量的优势等位基因和基因型的个体开展选育工作;所述第二SNP标记位于中国南方荷斯坦奶牛基因组第18号染色体反链上第39037665bp处,碱基为G或A,第二SNP标记的GG基因型个体总奶量和高峰奶均显著高于GA基因型个体。

4. 根据权利要求3所述的选育中国南方荷斯坦奶牛的方法,其特征在于,包括以下步骤:

提取待测中国南方荷斯坦奶牛的基因组DNA;

以待测中国南方荷斯坦奶牛的基因组DNA为模板,利用引物对进行多重PCR扩增反应;所述引物对包括:

正向引物:5' -CCATACTCAGCCACAGCACAGC-3' ,

反向引物:5' -GGGGCGAAATGAAAACCTCAACT-3' ;

利用第二SNP标记的单碱基延伸引物对PCR扩增产物进行单碱基延伸反应,延伸产物测序,确定第二SNP标记基因型,选择目标基因型的个体培育产奶优势品种;所述第二SNP标记的单碱基延伸引物为:

5' -TTTTTTTGTCGTCTCCYTGTCGTGAAC-3' ;

其中,核苷酸序列中的Y为简并碱基,代表C或T。

5. 根据权利要求4所述的选育中国南方荷斯坦奶牛的方法,其特征在于:用于杂交育种的亲本之一至少符合以下条件:第二SNP标记含有等位基因G。

6. 根据权利要求5所述的选育中国南方荷斯坦奶牛的方法,其特征在于:选择第一SNP标记为CC基因型且第二SNP标记为GG基因型的个体作为产奶性状的优势个体;所述第一SNP标记位于中国南方荷斯坦奶牛基因组第18号染色体反链上第39037752bp处,碱基为C或T,第一SNP标记的CC基因型个体的305d奶量极显著高于CT基因型个体和TT基因型个体,总奶量和高峰奶均显著高于CT基因型个体和TT基因型个体。

7. 根据权利要求3~6任一项所述的选育中国南方荷斯坦奶牛的方法,其特征在于:所

述中国南方荷斯坦奶牛为武汉地区荷斯坦奶牛。

## 与中国南方荷斯坦奶牛产奶性状相关的SNP标记及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学领域,特别涉及两个与中国南方荷斯坦奶牛产奶性状相关的SNP标记及其应用。

### 背景技术

[0002] 相较于北方地区,我国南方地区具有地形地貌复杂、气候高温高湿、人口相对密集等地理气候特征,这些特征在资金、土地、气候和人工等多个方面制约着通过扩大饲养规模来提高产奶总量的发展模式。此外,我国南方地区长期以来对奶牛选育种工作的重度不够,奶牛总体上存在着良种数量少、单产水平不高、种群资源复杂、遗传素质较差等问题。因此,通过改良奶牛品种,培育本土的高产奶牛群体来提高产奶量,是帮助奶企提高收益,进而推进我国奶牛产业发展的关键途径。

[0003] 随着分子生物学技术的飞速发展,分子遗传标记和标记辅助选择在畜禽育种中得到了越来越广泛的研究。目前,应用较广泛的分子遗传标记有:限制性片段长度多态性标记(Restriction Fragment Length Polymorphism,RFLP)、随机引物扩增多态性DNA标记(Random Amplified Polymorphism DNA,RAPD)、扩增片段长度多态性标记(Amplified Fragment Length Polymorphism,AFLP)、单核苷酸多态性标记(Single Nucleotide Polymorphism,SNP)等。其中,SNP标记具有遗传稳定、突变率低、便于自动化检测等优点,因此开发与奶牛产奶性状相关的SNP遗传标记将有力推进高产奶牛品种(系)的培育工作。

[0004] Snapshot技术是一种新型的测序技术。该技术基于荧光标记单碱基延伸原理,使用引物扩增目标SNPs所在的片段,扩增产物经纯化后作为单碱基延伸的模板,使用测序酶、四种具有荧光标记的ddNTP和5' -端紧靠SNP位点的延伸引物进行PCR反应,引物延伸一个碱基即终止,经测序仪检测后,根据峰的移动位置确定该延伸产物对应的SNP位点,根据峰的颜色可得知掺入的碱基种类,从而确定该样本的基因型。该技术具有分型准确、通量高、检测速度快、不受SNP位点多态性特性限制和样本个数限制等优点。

[0005] 在奶牛育种的过程中,通过寻找与奶牛产奶量相关的关键基因,并筛选到与提高产奶量密切相关的SNP标记进行育种,可以实现早期选种和提高育种准确性,从而加快遗传育种进程,从根本上提高奶牛的产奶性能,促进我国奶牛产业持续健康发展,然而,目前与中国南方荷斯坦奶牛产奶性状相关的SNP标记较少,基因库匮乏。

### 发明内容

[0006] 本发明实施例提供两个与中国南方荷斯坦奶牛产奶性状相关的SNP标记及其应用,以解决相关技术中缺乏与中国南方荷斯坦奶牛产奶性状相关的SNP标记的问题。

[0007] 第一方面,本发明提供了两个与中国南方荷斯坦奶牛产奶性状相关的SNP标记,第一SNP标记位于中国南方荷斯坦奶牛基因组第18号染色体反链上39037752bp处,碱基为C或T,第一SNP标记的CC基因型个体的305d奶量极显著高于CT基因型个体和TT基因型个体,总奶量和高峰奶均显著高于CT基因型个体和TT基因型个体;第二SNP标记位于中国南方荷斯

坦奶牛基因组第18号染色体反链上39037665bp处,碱基为G或A,第二SNP标记的GG基因型个体总奶量和高峰奶均显著高于GA基因型个体。

[0008] 第二方面,本发明提供了用于检测上述SNP标记的引物对:

[0009] 正向引物:5'-CCATACTCAGCCACAGCACAGC-3',如SEQ ID NO:1所示;

[0010] 反向引物:5'-GGGGCGAAATGAAAACCTTCAACT-3',如SEQ ID NO:2所示。

[0011] 第三方面,本发明提供一种用于检测上述SNP标记的试剂盒,该试剂盒含有上述引物对,还含有以下单碱基延伸引物中的至少一种:

[0012] 第一SNP标记的单碱基延伸引物:

[0013] 5'-TTTTTTTTTTTTTTGAAGGTGTTCTCATTTCAGTATGGG-3',如SEQ ID NO:3所示;

[0014] 第二SNP标记的单碱基延伸引物:

[0015] 5'-TTTTTTTGTCTGCTTCCYTGTCTGTAAC-3',如SEQ ID NO:4所示,其中,核苷酸序列中的Y为简并碱基,代表C或T。

[0016] 第四方面,本发明提供上述SNP标记、上述引物对、上述试剂盒在辅助鉴定中国南方荷斯坦奶牛产奶性状中的用途。

[0017] 第五方面,本发明提供一种选育中国南方荷斯坦奶牛的方法,通过对待测中国南方荷斯坦奶牛进行上述SNP标记的检测,评估待测中国南方荷斯坦奶牛的产奶性状。

[0018] 选育中国南方荷斯坦奶牛的方法具体包括以下步骤:

[0019] 提取待测中国南方荷斯坦奶牛的基因组DNA;

[0020] 以待测中国南方荷斯坦奶牛的基因组DNA为模板,利用上述引物对进行多重PCR扩增反应;

[0021] 利用上述单碱基延伸引物对PCR扩增产物进行单碱基延伸反应,延伸产物测序,确定第一SNP标记和第二SNP标记基因型,根据基因型选育产奶性状优势品种。

[0022] 在上述技术方案的基础上,用于杂交育种的亲本之一至少符合以下条件中的一种:(i)第一SNP标记含有等位基因C,(ii)第二SNP标记含有等位基因G。从而使优势等位基因在群体中快速扩散,加快培育产奶性状优势后代的进程。优选地,选择至少符合以下条件中的一种的个体作为产奶性状优势个体:(i)第一SNP标记为CC基因型,(ii)第二SNP标记为GG基因型。更优选地,选择第一SNP标记为CC基因型且第二SNP标记为GG基因型的个体作为产奶性状优势个体。优选地,中国南方荷斯坦奶牛为武汉地区荷斯坦奶牛。

[0023] 本发明提供的技术方案带来的有益效果包括:

[0024] (1)本发明提供的两个与中国南方荷斯坦奶牛总奶量和高峰奶显著相关的SNP标记,第一SNP标记所在的rs41871650位点和第二SNP标记所在的rs209034260位点均位于HP基因上,同时rs41871650位点与奶牛305d奶量极显著相关。这两个SNP标记丰富了奶牛育种的分子标记遗传资源库,利用其进行分子标记辅助选择有利于提高中国南方荷斯坦奶牛的产奶量,同时也不会影响中国南方荷斯坦奶牛的繁殖性状。

[0025] (2)本发明通过联合rs41871650位点和rs209034260位点进行标记辅助选择,能够使提高奶牛产奶性状(305d奶量、总奶量和高峰奶)的优势基因型在群体内快速扩散,从而从根本上提高后代群体的泌乳性能,对提高奶牛生产性能、改善奶牛遗传素质具有极大的推动作用,有利于培育本土的高产奶牛群体。同时优势基因型的选择也不会对群体的繁殖水平尤其是初产日龄以及产犊间隔造成不利的影

经济性状的平衡育种。

[0026] (3) 本发明通过两个SNP标记优势基因型的联合选择,大大增加了选择的准确性,有助于实现奶牛的早期选育和精准育种。另外,rs41871650位点以及rs209034260位点均与多个产奶性状显著相关,通过对305d奶量、总奶量以及高峰奶性状的联合选择,提高了产奶性状优良势个体的选择效率。

### 附图说明

[0027] 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简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅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他的附图。

[0028] 图1~图3为rs41871650位点分型结果图;

[0029] 图4~图6为rs209034260位点分型结果图。

### 具体实施方式

[0030] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合具体实施例对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例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,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动的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。

[0031] 本发明通过现代分子生物学技术以及统计学的方法,寻找到两个与提高产奶量密切相关的SNP标记,这两个SNP标记位于触珠蛋白(haptoglobin,HP)基因上。HP基因位于奶牛第18号染色体反链(reversestrand)上的39037402-39043531bp区间内,是肝脏合成的一种 $\alpha$ 2球蛋白,约占血浆总蛋白的1%,分子量达到1000~2000kDa。由于血红蛋白(hemoglobin,Hb)具有过氧化物酶活性,HP通过与之结合,可保护机体组织免受氧化损伤;HP一旦与Hb结合,Hb中的铁离子就不能被嗜铁性细菌所利用。因此,HP具有一定的间接抑菌活性。同时HP还具有促血管生成、调节脂类代谢和免疫调节等作用。HP可作为奶牛乳房炎、子宫内膜炎、口蹄疫以及肺炎等疾病发生、严重程度和判断预后的有效标记分子,另外,该分子也可间接反映出乳成分和牛乳品质的改变,作为评价乳品质的一个候选指标。但是,目前关于HP基因的多态性位点以及遗传变异对奶牛产奶性状的影响还没有报道。

[0032] 本发明获得的两个SNP标记的信息如表1所示。

[0033] 表1用于进行关联分析的2个SNP标记的信息

	SNP	位置	所处基因	等位基因	密码子
[0034]	rs41871650	18:39037752	HP	T/C	CAA/CAG
	rs209034260	18:39037665	HP	G/A	GTC/GTT

[0035] 注:用“所处染色体号:在染色体上的位置”的形式对SNP所处的位置进行标注。

[0036] 实施例1:两个与提高产奶量密切相关的SNP标记的获取与鉴定

## [0037] 1.1血液样品和表型数据的收集

[0038] 以湖北武汉地区某规模化奶牛场785头中国南方荷斯坦奶牛为实验对象,尾静脉采血,EDTA抗凝,-20℃保存。监测这些奶牛的产奶性状(泌乳天数、305d产奶量、总奶量、高峰奶、高峰日、乳脂率和乳蛋白率)、繁殖性状(初产日龄、产犊间隔)以及健康性状(体细胞数),共获得完整的一胎牛数据777个,二胎牛数据386个,三胎牛数据92个。

## [0039] 1.2总DNA的提取和检测

[0040] 用TIA Namp Blood DNA Kit血液基因组DNA提取试剂盒从785头中国南方荷斯坦奶牛的血液样品中提取全基因组DNA。在200μL全血中加入200μL缓冲液GB和20μL蛋白酶K后充分颠倒混匀,56℃充分静置后加入350μL缓冲液BD,充分颠倒混匀后过吸附柱。向吸附柱中分别加入500μL缓冲液GDB和600μL漂洗液PWB离心后,室温晾干吸附柱中残余的漂洗液。最后将吸附柱转入离心管,滴加洗脱缓冲液TB,室温静置离心后收集溶液。1μL的DNA样品用1%的琼脂糖凝胶电泳检测其纯度和浓度,然后将其稀释到工作浓度5-10ng/μL。

## [0041] 1.3PCR反应

[0042] 根据NCBI提供的参考序列,用Primer3.0在线软件设计PCR扩增引物,rs41871650位点和rs209034260位点两个SNP标记共用一对PCR扩增引物:

[0043] 正向引物:5'-CCATACTCAGCCACAGCACAGC-3' ;

[0044] 反向引物:5'-GGGCGAAATGAAAACCTTCAACT-3' 。

[0045] PCR反应体系(20μL)包含1×GC-I缓冲液(购于Takara公司),3.0mM Mg<sup>2+</sup>,0.3mM dNTP,1U热启动Taq酶(购于Qiagen公司),1μL样本DNA和正、反向引物各0.5μL,引物浓度为1.5μM。反应过程为:(1)95℃2min;(2)依次进行94℃20s、65℃40s(-0.5℃/循环)、72℃1.5min,三步共11个循环;(3)依次进行94℃20s、59℃30s、72℃1.5min,三步共24个循环;(4)72℃2min。扩增产物的核苷酸序列如SEQ ID NO:5所示,长度为309bp:

CCATACTCAGCCACAGCACAGCTCTTGTCAAAGCTCAGGATCCCG

GCCGCATACCAGGTGTCGTCTTCCTTGTCGTGAAC**G(rs209034260)**

[0046] ACGAAGGCGCTGCCGGCGTCGCCATAGCAGGTGTCGTCCTGGTA

CTTGGACAGGCCGACGCAGAAGGTGTTCTCATTTCAGTATGGG**T(rs**

**41871650)**TGCACCCCTACAGGGCTCTTAGCTGTCTTATTTTATAG

GTGCGTCGACGCCCTCATAGTGTTCACACACTTGTCTTGGTCAG

[0047] CCACAGGTAGCATGACATACTTCAGATGCTCCGTAAAGTTGAAGT

TTTCATTTGCCCC。

## [0048] 1.4PCR产物纯化

[0049] 在10μLPCR产物中加入5U SAP酶和2U Exonuclease I酶,37℃温浴1h,然后75℃灭活15min。

## [0050] 1.5Snapshot单碱基延伸反应

- [0051] 纯化后的PCR产物用ABI公司的Snapshot Multiplex kit进行单碱基延伸反应。
- [0052] rs41871650位点的单碱基延伸引物(SF)为:
- [0053] 5'-TTTTTTTTTTTTTTGAAGGTGTTCTCATTTCAGTATGGG-3' ;
- [0054] rs209034260位点的单碱基延伸引物(SF)为:
- [0055] 5'-TTTTTTTGTCGTCTTCCYGTGTCGTGAAC-3' 。
- [0056] 其中,Y为简并碱基,代表C或T。
- [0057] 延伸反应体系(10 $\mu$ L)包括5 $\mu$ L Snapshot Multiplex kit(购于ABI公司),2 $\mu$ L纯化后多重PCR产物,2 $\mu$ L超纯水,1 $\mu$ L延伸引物混合物,其中rs41871650位点的引物浓度为1.6 $\mu$ M,rs209034260位点的引物浓度为0.8 $\mu$ M。反应过程为:(1)96 $^{\circ}$ C 1min;(2)96 $^{\circ}$ C 10s、55 $^{\circ}$ C 5s、60 $^{\circ}$ C 30s,三步共28个循环。
- [0058] 1.6延伸产物纯化
- [0059] 在10 $\mu$ L延伸产物中加入1U SAP酶,先37 $^{\circ}$ C温浴1h,再75 $^{\circ}$ C灭活15min。
- [0060] 1.7延伸产物测序
- [0061] 取0.5 $\mu$ L纯化后的延伸产物,与0.5 $\mu$ L Liz 120SIZE STANDARD,9 $\mu$ L Hi-Di混匀,95 $^{\circ}$ C变性5分钟后上ABI3730XL测序仪,获得的原始数据用Gene Mapper4.1(美国应用生物系统公司,USA)来分析。用Excel分别计算两个位点的基因型频率和等位基因频率,用卡方检验分析两个位点的哈代-温伯格平衡情况。
- [0062] 实施例2:SNP与生产性状的关联分析
- [0063] 用Excel计算每个位点的基因型频率和等位基因频率,利用卡方检验分析每个位点的哈代-温伯格平衡情况。用SAS在线程序(<https://welcome.oda.sas.com/>)的univariate过程对乳脂率、乳蛋白率和体细胞数进行正态性检验,用BOX-COX法进行数据转化,用“平均值 $\pm$ 3倍标准差”剔除异常值。用GLM过程检验基因型对校正后的各项性状的影响,检验模型为 $Y=\mu+P+S+G+e$ ,对初产日龄的检验模型为 $Y=\mu+G+e$ ;其中Y为个体性状表型值, $\mu$ 为群体均值,P为胎次的固定效应,S为产犊季节的固定效应,G为基因型的固定效应,e为随机误差效应。用DUNCAN法对不同基因型的个体性状表型值进行多重比较。
- [0064] 2.1基因和基因型频率
- [0065] 奶牛血液DNA经1%琼脂糖凝胶电泳检测,条带明亮,无蛋白污染。采用NanoDrop2000核酸浓度仪测定,95%以上样本质量浓度大于10ng/ $\mu$ L,浓度和纯度可以满足Snapshot分型实验要求。
- [0066] 经检测,rs41871650位点和rs209034260位点的基因频率和基因型频率如表2所示,两个基因均处于哈代温伯格平衡状态( $P>0.05$ )。
- [0067] 表2两个SNP位点的基因型频率和基因频率

SNP	基因型	基因型 频率(%)	等位基因	等位基因频率	$\chi^2$	P 值
[0068] rs41871650	C/C(114)	0.15	C	0.39	0.276	0.871
	C/T(385)	0.49	T	0.61		
	T/T(286)	0.36				
rs209034260	A/A(52)	0.06	A	0.27	0.594	0.743
	G/A(319)	0.41	G	0.73		
	G/G(414)	0.53				

[0069] 2.2表型数据统计

[0070] 试验选用的中国南方荷斯坦奶牛群体的10个产奶性状指标(泌乳天数、305d奶量、总奶量、高峰奶、高峰日、乳脂率、乳蛋白率、体细胞数、初产日龄以及产犊间隔)的统计结果如表3所示。实验群体总体生产水平较高,但个体间差异也比较大,存在较大的选育空间。

[0071] 表3产奶性状的统计结果

项目	平均值	标准差	最大值	最小值
泌乳天数(d)	330.28	77.47	637.00	121.00
305d 奶量(kg)	9677.33	1821.55	14935.00	3375.00
总奶量(kg)	10382.77	3090.74	29361.00	716.00
高峰奶(kg)	41.63	8.38	81.60	11.70
[0072] 高峰日(d)	104.66	58.58	304.00	13.00
乳脂率(%)	4.37	0.51	6.25	3.14
乳蛋白率(%)	3.29	0.22	3.92	2.55
体细胞数(万/ml)	11.72	13.53	92.60	1.00
初产日龄(d)	754.95	60.65	1153.00	652.00
产犊间隔(d)	410.31	85.98	845.00	235.00

[0073] 2.3关联分析

[0074] 关联分析显示了HP基因不同位点的不同基因型对产奶性状的影响,结果如表4所示。

[0075] HP基因的rs41871650位点对305d奶量、总奶量、高峰奶以及初产日龄的效应达到显著水平( $P < 0.05$ ),对其它性状无显著相关。多重比较结果表明:HP基因rs41871650位点CC基因型个体305d奶量极显著高于CT基因型和TT基因型( $P < 0.01$ ),平均增幅度为4.54%(CT型)和3.84%(TT型);CC基因型个体总奶量显著高于CT基因型和TT基因型( $P < 0.05$ ),平均增幅度为7.32%(CT型)和6.46%(TT型);CC基因型个体高峰奶显著高于CT基因型和TT基因型( $P < 0.05$ ),平均增幅度为3.28%(CT型)和2.98%(TT型)。rs41871650位点CC基因型个体初产日龄与CT基因型和TT基因型个体无显著差异( $P > 0.05$ ),但CT基因型和TT基因型个体间存

在显著差异 ( $P < 0.05$ )。

[0076] HP基因的rs209034260位点对总奶量和高峰奶达到显著水平 ( $P < 0.05$ ), 对其它性状无显著相关。多重比较结果表明:rs209034260位点GG基因型个体总奶量极显著高于GA基因型 ( $P < 0.05$ ), 平均增幅度约3.66%;rs209034260位点GG基因型个体高峰奶显著高于GA基因型 ( $P < 0.05$ ), 平均增幅度约2.51%。

[0077] 表4HP基因SNP位点与奶牛产奶性状的关联分析 (LSM  $\pm$  sE)

SNP	rs41871650			rs209034260		
	CC	CT	TT	AA	GA	GG
泌乳天数(d)	322.37 $\pm$ 6.29 <sup>a</sup>	322.59 $\pm$ 4.16 <sup>a</sup>	322.23 $\pm$ 4.44 <sup>a</sup>	312.48 $\pm$ 8.53 <sup>a</sup>	321.03 $\pm$ 4.45 <sup>a</sup>	324.71 $\pm$ 3.95 <sup>a</sup>
305d 奶量(kg)	10404.46 $\pm$ 139.97 <sup>B</sup>	9952.51 $\pm$ 93.70 <sup>A</sup>	10019.59 $\pm$ 100.09 <sup>A</sup>	9945.32 $\pm$ 193.36 <sup>a</sup>	9963.43 $\pm$ 100.86 <sup>a</sup>	10119.79 $\pm$ 89.24 <sup>a</sup>
总奶量(kg)	11024.60 $\pm$ 250.08 <sup>b</sup>	10273.04 $\pm$ 166.13 <sup>a</sup>	10355.96 $\pm$ 176.33 <sup>a</sup>	9980.81 $\pm$ 342.48 <sup>ab</sup>	10233.31 $\pm$ 177.23 <sup>a</sup>	10607.66 $\pm$ 157.97 <sup>b</sup>
高峰奶(kg)	46.01 $\pm$ 0.56 <sup>b</sup>	44.55 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	44.68 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>	44.99 $\pm$ 0.77 <sup>ab</sup>	44.14 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	45.25 $\pm$ 0.35 <sup>b</sup>
[0078] 高峰日(d)	93.19 $\pm$ 4.30 <sup>a</sup>	92.68 $\pm$ 2.84 <sup>a</sup>	92.95 $\pm$ 3.02 <sup>a</sup>	95.98 $\pm$ 5.90 <sup>a</sup>	95.64 $\pm$ 3.03 <sup>a</sup>	90.57 $\pm$ 2.70 <sup>a</sup>
乳脂率(%)	4.41 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	4.44 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	4.45 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	4.42 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	4.45 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	4.44 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
乳蛋白率(%)	3.28 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	3.29 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	3.29 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	3.29 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	3.30 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	3.28 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
体细胞数 (万/ml)	12.27 $\pm$ 1.08 <sup>a</sup>	12.47 $\pm$ 0.72 <sup>a</sup>	11.97 $\pm$ 0.77 <sup>a</sup>	11.08 $\pm$ 1.48 <sup>a</sup>	12.21 $\pm$ 0.77 <sup>a</sup>	12.44 $\pm$ 0.68 <sup>a</sup>
初产日龄(d)	749.03 $\pm$ 5.74 <sup>ab</sup>	751.25 $\pm$ 3.09 <sup>a</sup>	762.27 $\pm$ 3.59 <sup>b</sup>	768.37 $\pm$ 8.39 <sup>a</sup>	757.92 $\pm$ 3.39 <sup>a</sup>	750.93 $\pm$ 2.99 <sup>a</sup>
产犊间隔(d)	432.81 $\pm$ 10.74 <sup>a</sup>	409.58 $\pm$ 6.87 <sup>a</sup>	411.71 $\pm$ 7.17 <sup>a</sup>	409.11 $\pm$ 13.93 <sup>a</sup>	406.91 $\pm$ 7.47 <sup>a</sup>	419.30 $\pm$ 6.37 <sup>a</sup>

[0079] 注:不同小写字母表示同一位点同一性状的不同基因型相比,差异显著 ( $P < 0.05$ ), 不同大写字母表示同一位点同一性状的不同基因型相比,差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 下同。

[0080] 本发明研究结果显示HP基因上存在能够影响奶牛产奶性状的SNP位点,可以利用HP基因上的rs41871650位点和rs209034260位点对奶牛群体的产奶性状进行标记辅助选择。

[0081] rs41871650位点CC基因型个体305d奶量极显著高于CT基因型和TT基因型,CC基因型个体总奶量和高峰奶显著高于CT基因型和TT基因型,同时CC基因型个体初产日龄与CT基因型和TT基因型个体无显著差异。高峰奶是指产后150d之前测定日的最高奶量,高峰奶与整个胎次产奶量正相关,据统计高峰奶每增加1kg,整个胎次产奶量可增加200-250kg。初产日龄为奶牛首次产犊日期与出生日期之间的间隔天数,可以同时反应母牛个体的性成熟早晚以及其受孕能力,是重要的繁殖性状之一。研究证实初产日龄对牛奶乳脂率、乳蛋白以及生产寿命都有显著的影响,并且随着初产日龄的减小产奶性状得到改善。总体而言,本发明试验结果显示rs41871650位点CC基因型个体的综合产奶性状(305d奶量、总奶量和高峰奶)优于TT基因型个体,同时也对初产日龄以及产犊间隔无显著影响。rs209034260位点GG基因型个体总奶量和高峰奶显著高于GA基因型,同时GG基因型个体的其它生产性状与其它基因型间无显著差异。

[0082] 在生产实践中,可以通过选择第一SNP标记含有等位基因T和/或第二SNP标记含有等位基因G的个体作为亲本之一,通过杂交育种的方法使两个位点的优势等位基因在群体中快速扩散,加快产奶性状优势新品种的培育进程。也可以通过选择rs41871650位点为CC基因型和rs209034260位点为GG基因型的个体作为最优势个体,用于培育产奶性状优势新品种,同时也不会对个体的繁殖性状造成负面影响。

[0083] 将本发明提供的两个SNP标记应用于选种,可以实现早期选种和提高育种准确性,

从而加快遗传育种进程,从根本上提高奶牛的产奶性能,促进我国奶牛产业持续健康发展。

[0084] 以上所述仅是本发明的具体实施方式,使本领域技术人员能够理解或实现本发明。对这些实施例的多种修改对本领域的技术人员来说将是显而易见的,本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下,在其它实施例中实现。因此,本发明将不会被限制于本文所示的这些实施例,而是要符合与本文所申请的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

## 序列表

<110>	武汉市农业科学院	
<120>	与中国南方荷斯坦奶牛产奶性状相关的SNP标记及其应用	
<160>	5	
<170>	SIPOSequenceListing 1.0	
<210>	1	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	1	
	cctactcagc cacagcacag c	21
<210>	2	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	2	
	ggggcgaaat gaaaacttca act	23
<210>	3	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	3	
	tttttttttt ttttgaaggt gttctcattc agtatggg	38
<210>	4	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	4	
	tttttttgtc gtcttccytg tcgtgaac	28
<210>	5	
<211>	309	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	5	
	ccatactcag ccacagcaca gctcttgtca aagctcagga tcccggccgc ataccaggtg	60
	tcgtcttctt tgctgtgaac gacgaaggcg ctgccggcgt cgccatagca ggtgtcgtcc	120
	tggtacttgg acaggccgac gcagaaggtg ttctcattca gtatgggttg caccctaca	180
	gggctcttag ctgtcttatt tttaggtgcg tcgacgcct catagtgttt cacacacttg	240

---

tcttggtcag ccacaggtag catgacatac ttcagatgct ccgtaaagtt gaagttttca	300
tttcgcccc	309

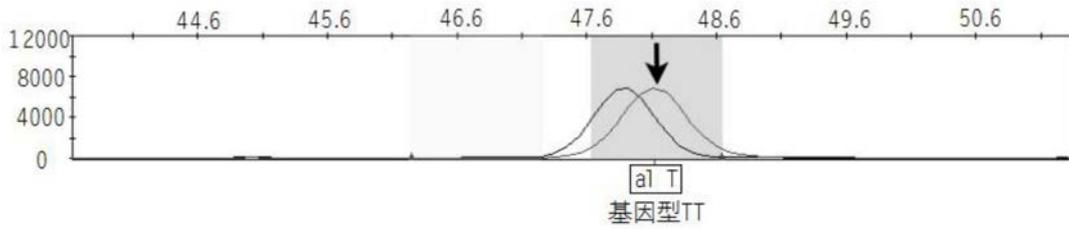


图1

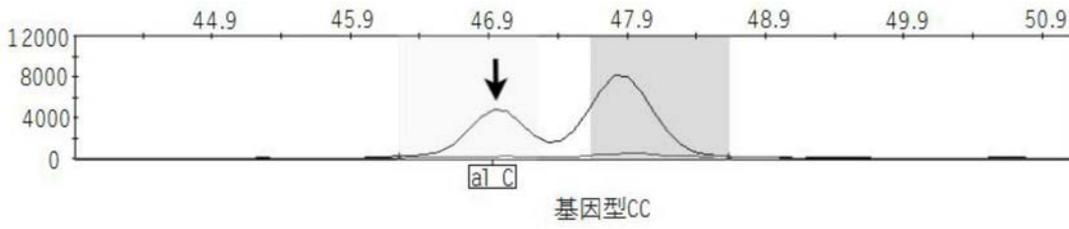


图2

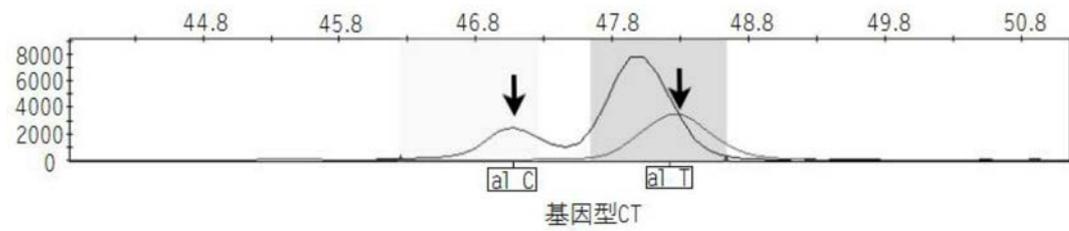


图3

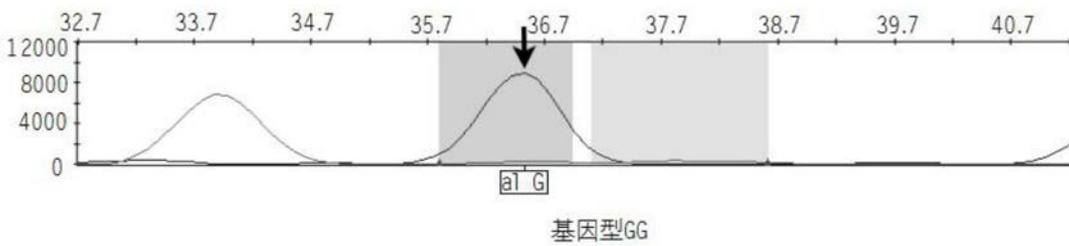


图4

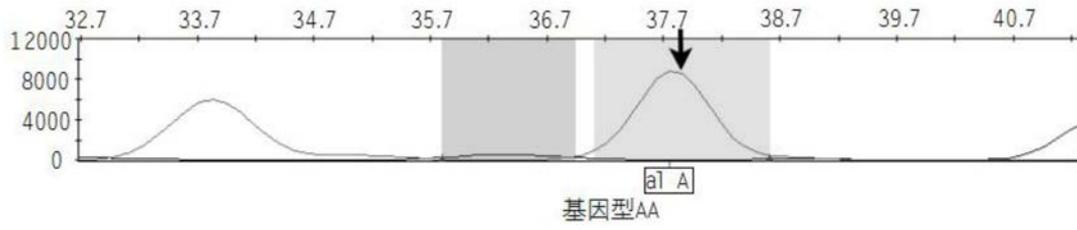


图5

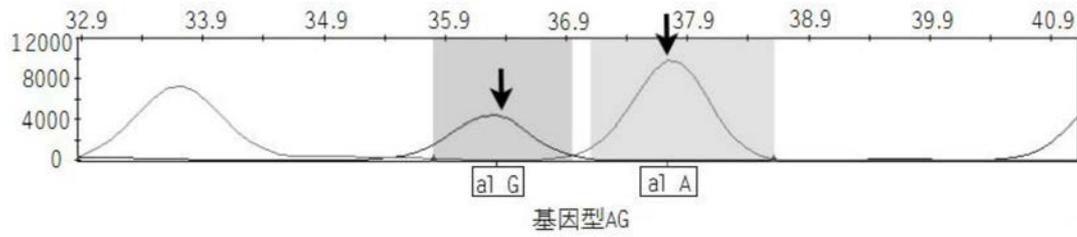


图6