



中华人民共和国国家标准

GB/T 25876—2010

牛早期胚胎性别的鉴定 巢式 PCR 法

Method of nested PCR for sex identification of early cattle embryo

2011-01-10 发布

2011-06-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准的附录 B 为规范性附录,附录 A 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国畜牧业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:华中农业大学。

本标准主要起草人:张淑君、杨利国、李翔、刘辉、刘文举、胡修忠。

牛早期胚胎性别的鉴定 巢式 PCR 法

1 范围

本标准规定了牛早期胚胎性别鉴定的巢式 PCR 方法。

本标准适用于奶牛和肉牛胚胎或胎儿的性别鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

巢式 PCR nested polymerase chain reaction

利用两套 PCR 引物(巢式 PCR 引物对)进行两轮 PCR 扩增反应,在第一轮扩增中,外引物用以产生扩增产物,此产物在内引物的存在下,作为 DNA 模板,进行第二轮扩增。

3.2

SRY 基因 SRY gene

哺乳动物 Y 染色体上决定雄性性别的基因。

3.3

HBB 基因 HBB gene

β 珠蛋白基因,位于常染色体上。

4 原理

利用巢式 PCR 反应的敏感性高和特异性强的特性,对少量胚胎细胞的 SRY 基因片段进行扩增,以 HBB 基因的扩增作为阳性参照,电泳检测 PCR 扩增产物,根据扩增产物电泳条带鉴定胚胎性别。

5 引物

SRY1	5'CTACTCCCCAACCGTCAGAAC 3'
	5'AGCCCAAACCCATCAACCTA 3'
SRY2	5'CCAGGGAAGTCTTGGGTA 3'
	5'TGCTTCTCCACTTAGGCTCAA 3'
HBB	5'TATCCCACTTACAAGGCAGGTT 3'

5'GCAGACAACAGAGAACAAGAATGA 3'

6 试剂和仪器

6.1 主要试剂

水应符合 GB/T 6682 中灭菌双蒸水的要求。

Taq DNA 聚合酶及 PCR 缓冲液、100 bp 梯度 DNA 标记物。

TE 缓冲液、TAE 缓冲液、加样缓冲液、溴化乙锭等。具体制备方法参见附录 A。

6.2 主要仪器

冷冻离心机、梯度 PCR 仪、电泳仪、凝胶成像系统、pH 计、电子天平、恒温水浴锅、双蒸馏水器、微量移液器。

7 检测方法

7.1 试样的制备与保存

从待检胚胎中分离 4 个(或 4 个以上)细胞,用无菌超纯水冲洗 3 次后,放入 0.5 mL PCR 管中,加入 10 μ L 无菌超纯水,100 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min~15 min,立即置于碎冰中,冷却后 4 $^{\circ}$ C 离心(8 228 *g*)5 min,取上清液保存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

7.2 SRY 基因片段 PCR 扩增

第一次扩增体系为 20 μ L:0.8 mmol/L 的 dNTP、2U 的 *Taq* DNA 聚合酶、0.2 μ mol/L 的 SRY 基因外引物 SRY1 和内参照引物 HBB、10 $\times$ PCR 缓冲液、2.5 mmol/L 的氯化镁,加适量双蒸水;反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,20 个循环结束后,72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保温 2 min~10 min。

取第一次 PCR 扩增产物 8 μ L,作为第二次扩增模板,同时加入 10 $\times$ PCR 缓冲液、2.5 mmol/L 的氯化镁、0.8 mmol/L 的 dNTP 1.6 μ L,2U 的 *Taq* DNA 聚合酶、0.2 μ mol/L 的 SRY 基因内引物 SRY2 和内参照引物 HBB、适量的双蒸水至 20 μ L;反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,34 个循环后,72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保温 2 min~10 min。

7.3 结果判定

取 5 μ L PCR 扩增产物,1.0%~1.5%琼脂糖凝胶电泳(3 V/cm~5 V/cm,电泳 20 min~30 min),溴化乙锭染色,凝胶成像系统检查,电泳图谱见附录 B 中的图 B.1。

电泳图谱中出现 558 bp(*HBB* 扩增产物)和 219 bp(*SRY* 扩增产物)条带,判定为雄性胚胎;电泳图谱中只出现 558 bp 条带,判定为雌性胚胎。

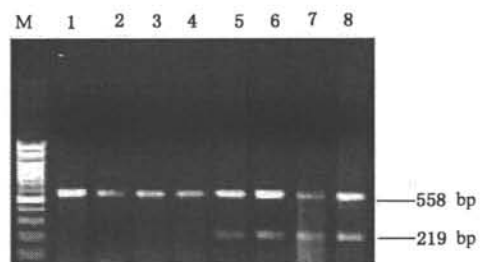
附 录 A
(资料性附录)
试剂和材料

表 A.1 试剂和材料

试剂	配方
TE 缓冲液	10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 1 mmol/L EDTA(pH 8.0)
10×PCR 缓冲液	200 mmol/L Tris-HCl(pH 8.4), 200 mmol/L 氯化钾, 100 mmol/L 硫酸铵, 15 mmol/L 氯化镁
琼脂糖电泳缓冲液	242.28 g Tris 碱, 57.1 mL 冰乙酸, 100 mL 0.5 mol/L EDTA(pH 8.0), 加双蒸水定容至 1 000 mL, 使用时 50 倍稀释
加样缓冲液	0.25% 溴酚蓝(质量浓度), 40% 蔗糖(质量浓度)。
溴化乙锭	100 mL 双蒸水中加入 0.1 g 溴化乙锭, 搅拌使完全溶解, 转入棕色试剂瓶, 锡箔包裹、备用

附 录 B
(规范性附录)

SRY 基因和内参基因巢式 PCR 产物电泳图谱与结果判断示意图



M 为 100 bp 梯度 DNA 标记物；

泳道 1~4 均为雌性胚胎样本，检出 558 bp 条带；

泳道 5~8 均为雄性胚胎样本，检出 558 bp 和 219 bp 两个条带。

图 B.1 SRY 基因和内参基因巢式 PCR 产物电泳图谱与结果判读示意图