ICS 65.020.30
B 43

中华人民共和国国家标准

GB/T 25887—2010

奶牛脊椎畸形综合征检测　PCR-RFLP 法

Method of PCR-RFLP for detecting complex vertebral malformation in dairy cattle

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
中国国家标准化管理委员会　发布

前　言

本标准的附录B为规范性附录，附录A、附录C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、胡修忠、刘文举、宋利军。

奶牛脊椎畸形综合征检测 PCR-RFLP 法

1 范围

本标准规定了奶牛脊椎畸形综合征的 PCR-RFLP 检测技术。

本标准适用于奶牛脊椎畸形综合征的检测与诊断。

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

奶牛脊椎畸形综合征 complex vertebral malformation in dairy cattle;CVM

奶牛的一种常染色体隐性遗传病，主要表现为母牛流产、胎儿早期死亡、出生后不久死亡，患病犊牛主要症状表现为：颈短、脊椎畸形、心脏畸形、腿部畸形、系部呈现对称的内向僵直等。

3.2

SLC35A3 基因 SLC35A3 gene

定位于牛第 3 号染色体上，在基因序列数据库(GenBank)中的登录号为 AY160683，全长 14901bp，mRNA 为 981bp，由 7 个外显子和 6 个内含子组成，该基因编码核糖转运蛋白，与脊柱发育有关，是奶牛脊椎畸形综合征的致病基因。

3.3

限制性片段长度多态性 restriction fragment length polymorphism，RFLP

检测 DNA 用限制性内切酶酶切后形成的特定 DNA 片段的大小。因此凡是可以引起酶切位点变异的突变如点突变(新产生和去除酶切位点)和一段 DNA 的重新组织(如插入和缺失造成酶切位点间的长度发生变化)等均可导致 RFLP 的产生。

4 原理

SLC35A3 基因第四外显子中第 559 位碱基由 G 突变为 T 时，其对应编码的氨基酸由缬氨酸改变为苯丙氨酸，导致奶牛脊椎畸形综合征的发生。采用 PCR-RFLP 技术检测牛样本基因组 DNA 变异，即采用 PCR 技术扩增 SLC35A3 基因片段，限制性内切酶消化 PCR 扩增产物，电泳检测酶切产物，对 SLC35A3 基因进行分型，根据基因型判定奶牛是否携带脊椎畸形综合征的致病基因。

5 扩增 SLC35A3 基因片段的引入酶切位点 PCR 引物

5′CCACTGGAAAAACATGCTGTGAGTA 3′

5′GCTCTCCTCTGTAATCCCCA 3′

预期扩增长度为 225 bp。

6 试剂和仪器

6.1 主要试剂

水应符合 GB/T 6682 的灭菌双蒸水。

Taq DNA 聚合酶及 PCR 缓冲液、*Rsa* Ⅰ限制内切酶及 10×酶切缓冲液、蛋白酶 K、DNA 分子质量标记购自试剂公司。

TE 缓冲液、TAE 缓冲液、TBE 缓冲液、PBS 缓冲液、加样缓冲液、10%过硫酸铵、30%丙烯酰胺、10%聚丙烯酰胺、溴化乙锭、10%SDS、1 mol/L Tris-HCl、0.5 mol/L EDTA (pH8.0)、三氯甲烷/异戊醇(24∶1)、3 mol/L 乙酸钠、固定液、脱色液、染色液、显影液、停显液等。具体配制方法参见附录 A。

6.2 主要仪器

冷冻离心机、核酸蛋白浓度测定仪、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 检测步骤

7.1 牛基因组 DNA 制备

采用常规的酚仿抽提法提取牛样本基因组 DNA。4 ℃冰箱中保存备用。

7.2 PCR 扩增及其产物检测

20 μL PCR 反应体系:0.4 μmol/L 引物、0.2 mmol/L dNTP、待测 DNA 85 ng～100 ng、1 U *Taq* DNA 聚合酶、10×PCR 缓冲液,加适量双蒸水。可根据需要调整反应体系。

PCR 反应条件:94 ℃变性 3 min,35 个循环(94 ℃ 30 s,65 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s),72 ℃延伸 10 min,4 ℃保温 2 min～10 min。

取 2 μL PCR 产物,2%～3%琼脂糖凝胶电泳(3 V/cm～5 V/cm,电泳 20 min～30 min),溴化乙锭(EB)染色后,在凝胶成像系统观察条带。PCR 扩增结果示意图见附录 B 中的图 B.1。

7.3 酶切及其产物检测

取 16 μL PCR 扩增产物,加入 5 U 限制内切酶 *Rsa* Ⅰ和 2 μL 10×酶切缓冲液,加水至 20 μL,反应条件参见产品说明书。

10%～12%聚丙烯酰胺凝胶电泳(3 V/cm～5 V/cm,电泳 3 h～4 h),银染(染色方法参见附录 C)。酶切图谱见附录 B 中的图 B.2。

7.4 结果判定

由于 24 bp 的条带太小,以致在 10%～12%聚丙烯酰胺凝胶电泳检测时显示不出来,但可根据 225 bp、201 bp 条带进行样本基因型判定。

健康奶牛:基因型为 GG 型,即出现 201 bp 一条电泳带;

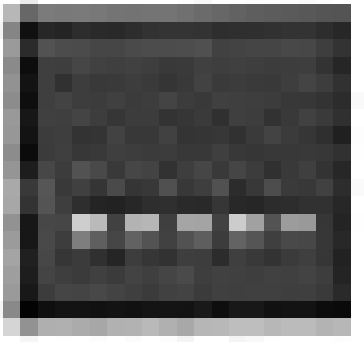
隐性携带者:基因型为 GT 型,即出现 225 bp、201 bp 两条电泳带;

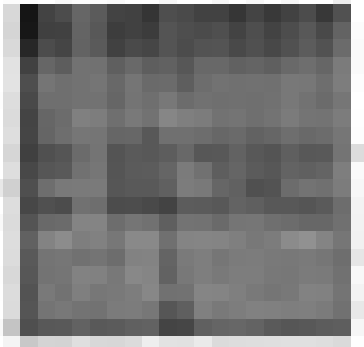
CVM 患者:基因型为 TT 型,即出现 225 bp 一条电泳带。

附 录 A
（资料性附录）
主要试剂及配制方法

表 A.1 主要试剂及配制方法

试 剂	配 制 方 法
TE 缓冲液	10 mmol/L Tris-HCl(pH8.0),1 mmol/L EDTA(pH8.0)
50×TAE 缓冲液	242 g Tris 碱,57 mL 冰乙酸,100 mL 0.5 mol/L EDTA(pH8.0),加双蒸水定容至 1 000 mL,使用时 50 倍稀释
10%过硫酸铵	称取 1 g 过硫酸铵溶于 8 mL 双蒸水,定容至 10 mL
5×TBE 缓冲液	54.0 g Tris 碱,27.5 g 硼酸,20 mL 0.5 mmol/L EDTA(pH8.0),加双蒸水定容至 1 000 mL,使用时 5 倍稀释
30%丙烯酰胺(丙烯酰胺:甲叉双丙烯酰胺=29∶1)	300 mL 双蒸水中溶解 145 g 丙烯酰胺,5 g 甲叉双丙烯酰胺,用双蒸水定容至 500 mL
10%聚丙烯酰胺	量取 9.3 mL 30%丙烯酰胺,18.5 mL 双蒸水,7 mL 5×TBE,0.23 mL 10%过硫酸铵,0.02 mL TEMED
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(EB)	100 mL 双蒸水中加入 0.1 g EB(10 mg/mL),搅拌使完全溶解,转入棕色试剂瓶,锡箔包裹
PBS 缓冲液	氯化钠 8 g,磷酸氢二钠 1.44 g,氯化钾 0.2 g,磷酸二氢钾 0.24 g 加双蒸水定容至 1 000 mL,调 pH 值至 7.0,高压灭菌,室温保存
10%SDS	称取 50 g SDS 加热溶于 400 mL 双蒸水中,定容至 500 mL,高压灭菌,室温保存
1 mol/L Tris-HCl	称取 121.4 g Tris 碱溶于 800 mL 双蒸水中,加浓盐酸调至 pH8.0,定容到 1 000 mL,高压灭菌,室温保存
0.5 mol/L EDTA(pH8.0)	称取 186.1 g 二水乙二胺四乙酸二钠溶于 800 mL 双蒸水中,加入氢氧化钠(约 20 g)调至 pH8.0,定容到 1 000 mL,高压灭菌,室温保存
三氯甲烷/异戊醇(24∶1)	量取 480 mL 三氯甲烷,加入 20 mL 异戊醇,混匀
3 mol/L 乙酸钠	称取 408.1 g 三水乙酸钠溶于 800 mL 双蒸水中,用乙酸调至 pH5.2,加水定容至 1 000 mL,高压灭菌,室温保存
固定液	450 mL 双蒸水中加入 50 mL 乙醇
脱色液	492.5 mL 双蒸水中加入 7.5 mL 浓硝酸
染色液	500 mL 双蒸水中溶解 1 g 硝酸银,置棕色瓶中保存
显影液	500 mL 双蒸水中溶解 15 g 无水碳酸钠,加入 1.32 mL 甲醛(0.046%),用双蒸水定容至 1 000 mL
停显液	485 mL 双蒸水中加入 15 mL 冰乙酸





附 录 C
（资料性附录）
凝胶染色方法

C.1 电泳完毕，取下玻璃板，小心地将凝胶从玻璃板上剥离下来，放入双蒸水中漂洗一次，然后浸入10%乙醇溶液固定5 min～10 min。

C.2 用1%硝酸脱色3 min～8 min，然后双蒸水迅速漂洗一次。

C.3 0.2%硝酸银晃动闭光染胶15 min～25 min；染色结束后用双蒸水快速冲洗凝胶两次（每次10 s），洗去凝胶表面残留的硝酸银溶液。

C.4 在染胶盒中倒入含3%碳酸钠和微量甲醛的显色液，立即快速地晃动胶盒，避免析出的黑色银颗粒在凝胶表面沉积。显色液颜色变暗时立即更换新鲜的显色液。

C.5 注意观察显色情况，目的条带显现清晰后立刻将凝胶转入3%的乙酸溶液，浸泡10 min停显。