

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1670—2008

猪雌激素受体和卵泡刺激素 β 亚基 单倍体型检测技术规程

Detection procedures for haplotypes of estrogen receptor &
follicular stimulating hormone beta subunit gene in pigs

2008-08-28 发布

2008-10-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准的附录 A 为规范性附录,附录 B、附录 C 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部畜牧业司提出。

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:全国畜牧总站、中国农业大学。

本标准主要起草人:李宁、王志刚、刘丑生、张桂香、于福清、韩旭、孙秀柱。

猪雌激素受体和卵泡刺激素 β 亚基单倍体型检测技术规程

1 范围

本标准规定了猪雌激素受体(ESR)和卵泡刺激素 β 亚基(FSHβ)基因单倍体型检测规程。
本标准适用于猪 ESR 基因型和 FSHβ 基因型的单独或合并定性检测。

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。

GA/T 383 法庭科学 DNA 实验室检验规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

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

以限制性内切酶处理 DNA 产生的片段长度变化为依据的一种遗传标记。

4 原理

雌激素受体基因是控制猪产仔数的主效基因之一,ESR BB 基因型与产仔性状呈正相关,AA 和 AB 基因型个体的产仔性状次之。ESR 基因座等位基因的差异是由于 B 等位基因发生点突变,从而产生一个 *Pvu* II 限制性酶切位点。卵泡刺激素 β 亚基(FSHβ)基因也是控制猪产仔数的主效基因之一,FSHβBB 基因型与产仔性状呈正相关,AA 和 AB 基因型个体的产仔性状次之。猪 FSHβ 基因等位基因的差异是由于 A 等位基因在 FSHβ 基因的第 1 个内含子中存在 1 个 292 bp 的逆转座子插入突变(A 等位基因扩增片段为 500 bp,B 等位基因为 218 bp)。ESR 和 FSHβBB - BB 单倍体型与产仔性状呈正相关,其他基因型个体的产仔性状次之。为了同时选择同效应基因型,针对 ESR 基因和 FSHβ 基因的侧翼设计引物,进行扩增,通过检测带型分布鉴别猪个体 ESR 和 FSHβ 单倍型。

5 试剂和仪器设备

5.1 试剂

以下试剂无特殊标注均为分析纯。

- 5.1.1 血液裂解液、组织 DNA 提取液和精子裂解液。
- 5.1.2 Tris 饱和酚:重蒸。
- 5.1.3 三氯甲烷。
- 5.1.4 异戊醇。
- 5.1.5 无水乙醇。
- 5.1.6 溴化乙锭(10 mg/mL)。

- 5.1.7 TBE 或 TAE 电泳缓冲液。
- 5.1.8 6×上样缓冲液。
- 5.1.9 琼脂糖。
- 5.1.10 RNA 酶(10 mg/mL)。
- 5.1.11 蛋白酶 K(20 mg/mL)。
- 5.1.12 无水碳酸钠。
- 5.1.13 dNTPs; dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP。
- 5.1.14 Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)。
- 5.1.15 限制性内切酶 *Pvu* II (10 U/μL)。
- 5.1.16 DNA 分子量标记。
- 5.1.17 试剂的配方和配制见附录 A。

5.2 仪器设备

- 5.2.1 凝胶成像分析系统。
- 5.2.2 PCR 扩增仪。
- 5.2.3 水平电泳槽。
- 5.2.4 离心机。
- 5.2.5 涡旋震荡器。
- 5.2.6 可调移液器。
- 5.2.7 稳压稳流电泳仪。
- 5.2.8 超净工作台。
- 5.2.9 超纯水器。
- 5.2.10 高压灭菌器。

6 检测方法

6.1 样品的收集与保存

- 6.1.1 采样个体应具备该品种的典型特征,每品种采集要求三代内无血缘关系的个体不少于 60 头,其中雄性数量不少于 10%。
- 6.1.2 样品的采集及保存应满足提取 DNA 的要求,并详细记录材料名称、来源、系谱、采集时间、地点及保存条件。
- 6.1.3 DNA 样品的制备与检测参见附录 B。

6.2 引物合成和配制

6.2.1 引物序列

ESR 引物序列

上游引物 F1 5'- CCTGTTTTTACAGTGACTTTTACAGAG - 3'

下游引物 R1 5'- CACTTCGAGGGTCAGTCCAATTAG - 3'

FSHβ 引物序列

上游引物 F2 5'- ACTGGTCTATTCATCCTCTC - 3'

下游引物 R2 5'- CCTTTAAGACAGTCAATGGC - 3'

将引物管进行瞬时离心,加入灭菌双蒸水充分震荡 5 min~10 min,室温充分溶解 30 min,分装, -20℃冻存。

6.2.2 灭菌双蒸水的加入量

灭菌双蒸水加入量的计算按式(1)计算:

$$V = \frac{OD \times 33}{C \times MW} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

V ——加入双蒸水的体积,单位为微升(μL);

OD ——引物 DNA 的浓度,即 A_{260}/A_{280} 比值,由合成引物的公司提供;

C ——引物浓度,单位为 $100 \text{ pmol}/\mu\text{L}$,一般配成 $100 \text{ pmol}/\mu\text{L}$ 贮存液;

MW ——合成引物的分子量。

6.3 PCR 反应程序

94°C 预变性 4 min, 然后进行 30 个~35 个循环的扩增反应, 每个循环包括 94°C 变性 30 s~60 s, 55°C ~ 60°C 退火 30 s~45 s, 72°C 聚合 30 s~60 s, 72°C 聚合延伸 10 min, 4°C 保存。

6.4 PCR 反应体系

PCR 反应总体积均为 $25 \mu\text{L}$, 体系中各成分的用量见表 1。

表 1 PCR 反应体系

组分及浓度	使用量
$10\times$ buffer	$2.50 \mu\text{L}$
MgCl_2 (25 mmol/L)	$1.5 \mu\text{L}$ ~ $2.5 \mu\text{L}$
dNTPs (2.5 mmol/L)	$1.5 \mu\text{L}$ ~ $2.5 \mu\text{L}$
上游引物 F1 ($10 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$)	$0.4 \mu\text{L}$ ~ $1.25 \mu\text{L}$
上游引物 F2 ($10 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$)	$0.5 \mu\text{L}$ ~ $1.25 \mu\text{L}$
下游引物 R1 ($10 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$)	$0.4 \mu\text{L}$ ~ $1.25 \mu\text{L}$
下游引物 R2 ($10 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$)	$0.5 \mu\text{L}$ ~ $1.25 \mu\text{L}$
DNA 模板	50 ng ~ 100 ng
Taq DNA 聚合酶	1.0 U ~ 2.0 U
灭菌双蒸水加至	$25 \mu\text{L}$

6.5 电泳检测 PCR 扩增产物

制备 1%~3% 琼脂糖/TBE(或 TAE)凝胶。取 $5 \mu\text{L}$ 扩增产物, 与上样缓冲液混合后电泳, 检测 PCR 扩增目的基因片段是否成功以及产物长度。PCR 扩增产物长度应为 120 bp 和/或 218 bp、500 bp。

6.6 RFLP 检测

6.6.1 扩增产物的 RFLP 反应体系见表 2。

表 2 扩增产物的 RFLP 反应体系

酶切组分及浓度	使用量, μL
$10\times$ buffer	2.0
<i>Pvu</i> II 限制性内切酶 ($10 \text{ U}/\mu\text{L}$)	0.5
PCR 产物	10
灭菌双蒸水加至	20

6.6.2 反应体系中可加入适量乙酰化 BSA。反应体系混合均匀后, 37°C 消化 4 h 以上。

6.7 对照实验

每次实验必须设置阴性对照、阳性对照和空白对照。

7 单体型检测与判定

7.1 单体型检测

制备 2%~4% 琼脂糖/TBE(或 TAE)凝胶,凝胶含 $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 溴化乙锭(EB)。取适量上样缓冲液和酶切产物混合后电泳。电泳结束后,将凝胶置于凝胶成像仪上,拍照带型分布。

7.2 单体型判定

ESR - FSH β 单体型判定见表 3,参考图片参见附录 C。

表 3 ESR - FSH β 单体型判定

产物长度, bp					ESR 单体型	FSH β 单体型	ESR - FSH β 单体型
ESR 单体型			FSH β 单体型				
120	—	—	—	500	AA	AA	AA - AA
120				218	AA	BB	AA - BB
120			218	500	AA	AB	AA - AB
65	55	—	—	500	BB	AA	BB - AA
65	55			218	BB	BB	BB - BB
65	55	—	218	500	BB	AB	BB - AB
120	65	55	—	500	AB	AA	AB - AA
120	65	55	—	218	AB	BB	AB - BB
120	65	55	218	500	AB	AB	AB - AB

8 注意事项

限制性内切酶的活性要高,每次反应加入的酶量要充足;否则,会导致 PCR 产物的不完全消化,进而误判基因型。

9 结果表述

×××猪 ESR 单倍体型为 AA 型;
 ×××猪 ESR 单倍体型为 AB 型;
 ×××猪 ESR 单倍体型为 BB 型;
 ×××猪 FSH β 单倍体型为 AA 型;
 ×××猪 FSH β 单倍体型为 AB 型;
 ×××猪 FSH β 单倍体型为 BB 型;
 ×××猪 ESR - FSH β 单倍体型为 BB - BB 型;
 ×××猪 ESR - FSH β 单倍体型为 BB - AB 型;
 ×××猪 ESR - FSH β 单倍体型为 BB - AA 型;
 ×××猪 ESR - FSH β 单倍体型为 AB - BB 型;
 ×××猪 ESR - FSH β 单倍体型为 AB - AB 型;
 ×××猪 ESR - FSH β 单倍体型为 AB - AA 型;
 ×××猪 ESR - FSH β 单倍体型为 AA - BB 型;
 ×××猪 ESR - FSH β 单倍体型为 AA - AB 型;
 ×××猪 ESR - FSH β 单倍体型为 AA - AA 型。

10 防污染措施

参照 GA/T 383 规定的方法执行。

附 录 A
(规范性附录)
试剂的配方和配制

A. 1 试剂的配方

A. 1.1 血液裂解液配方见表 A. 1。

表 A. 1 血液裂解液配方

贮存液浓度	体积, mL	使用浓度
1 mol/L Tris - HCl(pH8.0)	1	10 mmol/L
0.5 mol/L EDTA(pH8.0)	20	100 mmol/L
10% SDS	20	2%
灭菌双蒸水加至	100	

A. 1.2 组织 DNA 提取液配方见表 A. 2。

表 A. 2 组织 DNA 提取液配方

贮存液浓度	体积, mL	使用浓度
1 mol/L Tris - HCl(pH8.0)	5	50 mmol/L
0.5 mol/L EDTA(pH8.0)	20	100 mmol/L
0.5 mol/L NaCl	20	100 mmol/L
10% SDS	20	2%
灭菌双蒸水加至	100	

A. 1.3 精子裂解液配方见表 A. 3。

表 A. 3 精子裂解液配方

贮存液浓度	体积, mL	使用浓度
1 mol/L Tris - HCl(pH8.0)	1	10 mmol/L
0.5 mol/L EDTA(pH8.0)	2	10 mmol/L
0.5 mol/L NaCl	20	100 mmol/L
10% SDS	20	2%
1 mol/L DTT	0.003 9	39 μ mol/L
灭菌双蒸水加至	100	

A. 2 试剂的配制**A. 2.1 精子洗涤液**

取 37.5 mL 1 mol/L NaCl, 5 mL 0.5 mol/L EDTA, 加双蒸水至 250 mL。高压灭菌 20 min, 备用。

A. 2.2 蛋白酶 K 贮存液(20 mg/mL)

200 mg 蛋白酶 K 溶于 10 mL 灭菌双蒸水中, 分装, 每管 1 mL, -20°C 冻存。

A. 2.3 TE 缓冲液(pH8.0)

10 mmol/L Tris - HCl(pH8.0), 1 mmol/L EDTA(pH8.0)。

A. 2.4 电泳缓冲液

50×Tris-乙酸(TAE,pH8.5):242 g Tris-碱,57.1 mL 冰醋酸,37.2 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,加水至 1 L;

10×Tris-硼酸(TBE,pH8.0):108 g Tris-碱,55 g 硼酸,40 mL 0.5 mol/L EDTA。

A.2.5 溴化乙锭溶液(EB,10 mg/mL)

用少量双蒸水溶解 1 g 溴化乙锭,磁力搅拌数小时以确保其完全溶解,定容至 100 mL,然后转移到棕色瓶或铝箔包裹容器中,室温保存。

注:溴化乙锭是强诱变剂并有中度毒性,使用时溶液务必戴上手套,称量染料时要戴口罩。

A.2.6 6×上样缓冲液

0.05%溴酚蓝,0.05%二甲苯青 FF,40%(W/V)蔗糖水溶液;或 0.05%溴酚蓝,0.05%二甲苯青 FF,30%(V/V)甘油水溶液。

A.2.7 1 mol/L 二硫苏糖醇(DTT)

用 20 mL 0.01 mol/L 乙酸钠溶液(pH5.2)溶解 3.09 g DTT,过滤除菌后分装成 1 mL 贮存于 -20°C 。

注:DTT 或含有 DTT 的溶液不能进行高压处理。

附录 B
(资料性附录)
DNA 样品的制备与检测

B.1 DNA 样品的制备**B.1.1 从血液中提取基因组 DNA**

B.1.1.1 取适量血液加入等体积血液裂解液,加入 RNA 酶至终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,充分混匀,37℃消化 1 h~2 h。

B.1.1.2 加入蛋白酶 K 至终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,混匀,55℃水浴消化 12 h 至不见有黏稠的团块。

B.1.1.3 加入等体积 Tris 饱和酚,反复颠倒离心管,使两相溶液充分混合形成乳浊液,4℃12 000 r/min 离心 15 min;小心吸取上清液转移至另一洁净的离心管中。

B.1.1.4 重复一次 B.1.1.3 的工作。

B.1.1.5 加入等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)混合液,缓慢颠倒离心管,使两相溶液充分混合,4℃12 000 r/min 离心 15 min。

B.1.1.6 加入等体积氯仿:异戊醇(24:1)混合液,缓慢颠倒离心管,使两相溶液充分混合,4℃12 000 r/min 离心 15 min;小心收集上清至另一离心管中。

B.1.1.7 将上清液吸取至较大容量的试管中,加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc 溶液(pH5.2)和 2.5 倍体积的预冷无水乙醇,轻轻摇动试管至出现白色絮状 DNA 沉淀。

B.1.1.8 将 DNA 沉淀转移到 1.5 mL 离心管中,用 75%乙醇洗涤 2 次。

B.1.1.9 将 DNA 干燥后加入适量 TE 或灭菌双蒸水溶解。

B.1.2 从组织中提取基因组 DNA

B.1.2.1 取 0.3 g 组织置于 1.5 mL 离心管中,用眼科手术剪剪碎。

B.1.2.2 加入 500 μL 组织 DNA 提取液,然后加入 RNA 酶至终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,充分混匀,37℃消化 1 h~2 h。

B.1.2.3 加蛋白酶 K 至终浓度为 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$,充分混匀,55℃水浴消化过夜。

B.1.2.4 以下步骤同 B.1.1.3~B.1.1.9。

B.1.3 从毛发中提取基因组 DNA

B.1.3.1 用灭菌双蒸水洗涤毛发,然后剪成 0.3 cm~0.5 cm,置于小离心管中。

B.1.3.2 晾干后加入 30 μL ~50 μL 组织 DNA 提取液,然后加入蛋白酶 K 至终浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$,充分混匀,55℃消化至完全溶解。

B.1.3.3 以下步骤同 B.1.1.3~B.1.1.9。

B.1.4 从精液中提取基因组 DNA

B.1.4.1 每个体取冻精 3 支或鲜精 0.4 mL,置于 1.5 mL 离心管中。

B.1.4.2 加等量精子洗涤液,4 500 r/min 离心 6 min,弃上清。

B.1.4.3 重复洗涤精子沉淀两次,去掉其中的卵黄甘油等物质。

B.1.4.4 加 0.4 mL 精子裂解液重悬沉淀。

B. 1.4.5 加入蛋白酶 K 至终浓度为 $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$, 混合后于 55°C 消化过夜至少 12 h。

B. 1.4.6 以下步骤同 B. 1.1.3~B. 1.1.9。

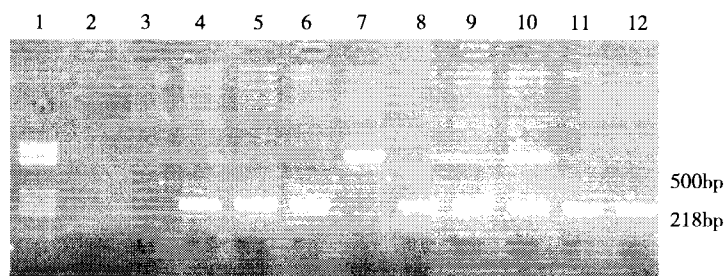
B. 1.5 也可用等效 DNA 提取试剂盒、硅珠法、Chelex 法、CTAB 法(十六烷基三甲基溴化胺)等方法提取基因组 DNA。

B.2 DNA 样品质量和浓度检测

取适量 DNA 溶液, 酌情稀释, 然后检测 DNA 浓度, 根据测定结果再将 DNA 溶液稀释至预定值。较纯 DNA 样品的 A_{260}/A_{280} 比值为 1.8 左右; 若该比值大大低于 1.8, 说明样品中含有较多的蛋白质, 需要进一步纯化。

附 录 C
(资料性附录)
基因型判定参考图

C.1 FSH β 基因 PCR 扩增结果电泳图见图 C.1。



FSH β 基因呈现 PCR 扩增多态,可分三种基因型:AA、AB、BB。

泳道 1:MARKER;

泳道 2:阴性对照;

泳道 3:空白对照;

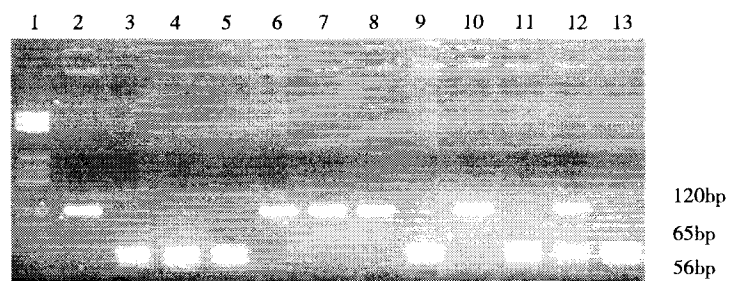
泳道 7:AA(500bp);

泳道 10:AB(500bp+218bp);

泳道 4、5、6、8、9、11、12:BB(218bp)。

图 C.1 FSH β 基因 PCR 扩增结果电泳图

C.2 ESR 基因 PCR 产物酶切结果电泳图见图 C.2。



泳道 1:MARKER;

泳道 12:BB(120bp);

泳道 2、6、7、8、10:AA(120bp+65bp+56bp);

泳道 3、4、5、9、11、13:AB(65bp+56bp)。

图 C.2 ESR 基因 PCR 产物酶切结果电泳图