

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1903—2010

牛胚胎性别鉴定技术方法 PCR法

Procedures for sex identification of bovine embryos-PCR techniques

2010-07-08 发布

2010-09-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准遵照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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(SAC/TC274)归口。

本标准起草单位:全国畜牧总站。

本标准主要起草人:王志刚、刘丑生、于福清、赵俊金、邱小田、史建民、孟飞、韩旭。

牛胚胎性别鉴定技术方法 PCR 法

1 范围

本标准规定了聚合酶链式反应(PCR)方法鉴定胚胎性别的方法。

本标准适用于普通牛(*Bos taurus*)胚胎性别鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GA/T 383 法庭科学 DNA 实验室检验规范

SN/T 1119 进口动物源性饲料中牛羊源性成分检测方法 PCR 方法

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

3 原理

从被检胚胎中取出部分细胞,提取 DNA,利用 Y 染色体上的特异序列设计引物进行扩增和检测,根据扩增结果鉴定性别。

4 取样

4.1 胚胎预处理

冷冻胚胎在室温下停留 10 s,然后 32℃温育 20 s,用胚胎清洗液将附着在胚胎周围的细胞与碎片彻底洗除,待用;新鲜胚胎直接用胚胎清洗液将附着在胚胎周围的细胞与碎片彻底洗除,待用。

4.2 胚胎细胞取样

4.2.1 显微分割法

应用显微操作仪切开透明带,取出 4 个~8 个胚胎细胞。

4.2.2 徒手分割法

先用 0.1%~0.2%链霉菌蛋白酶软化透明带,在实体显微镜下,用切割针切割胚胎,取出 4 个~8 个细胞胚胎细胞。

5 鉴定

5.1 试剂和仪器设备

试剂和仪器参见附录 A。

5.2 鉴定过程

5.2.1 DNA 提取

5.2.1.1 蛋白酶 K 消化法

将胚胎细胞移入 PCR 管中,加入 200 μL ~500 μL 胚胎裂解液,55℃消化 15 min~30 min,95℃~98℃灭活蛋白酶 K 5 min~10 min,10 000 $\times g$ 离心 30 s~45 s,取上清液作为 PCR 反应模板。

5.2.1.2 加热释出法

将胚胎细胞移入 PCR 管中,加入 200 μL ~500 μL 灭菌双蒸水,100℃煮沸 10 min,10 000 $\times g$ 离心 30 s~45 s,取上清液作为 PCR 反应模板。

5.2.1.3 液氮反复冻融法

将胚胎细胞移入 PCR 管中,加入 200 μL ~500 μL 灭菌双蒸水,用液氮反复冻融几次,10 000 $\times g$ 离心 30 s~45 s,取上清液作为 PCR 反应模板。

5.2.2 目的基因片段 PCR 扩增

5.2.2.1 引物制备

引物 1 序列(牛 Y 染色体重复序列引物):

引物 1F 5'-GAT,CAC,TAT,ACA,TAC,ACC,ACT-3';

引物 1R 5'-GCT,ATG,CTA,ACA,CAA,ATT,CTG-3'。

引物 2 序列(牛特异性 DNA 序列的引物):

引物 2F 5'-TGG,AAG,CAA,AGA,ACC,CCG,CT-3';

引物 2R 5'-TCG,TCA,GAA,ACC,GCA,CAC,TG-3'。

将合成的引物瞬时离心,加入灭菌双蒸水,室温溶解 30 min,分装,-20℃冷冻保存。其中,加入灭菌超纯水的体积 $V(\mu\text{L})$,按式(1)计算:

$$V = \frac{33 \times OD \times 10^6}{MW} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

MW ——引物分子量;

OD ——DNA260 nm 吸收的光密度。

5.2.2.2 PCR 反应体系

PCR 反应体系见表 1。

表 1 PCR 反应体系

组分及浓度	使用量
10 $\times$ buffer	1.5 μL
MgCl ₂ (25 mmol/L)	0.9 μL ~1.5 μL
dNTPs(25 mmol/L)	0.9 μL ~1.2 μL
引物 1(10 pmol/ μL)	0.15 μL ~0.75 μL
引物 2(10 pmol/ μL)	0.15 μL ~0.75 μL
DNA 模板	1 μL
Taq DNA 聚合酶(5U/ μL)	0.75 U~1.0 U
ddH ₂ O	加至 15 μL

5.2.2.3 PCR 反应条件

94℃预变性 4 min,然后进行 10 个~15 个循环的扩增反应,每个循环包括 94℃变性 20 s~30 s,52℃~58℃退火 30 s~45 s,72℃聚合 30 s~45 s;再进行 20 个~25 个循环的扩增反应,每个循环包括 94℃变性 20 s~30 s,52℃~58℃退火 30 s~45 s,72℃聚合 30 s~45 s;72℃延伸 10 min,4℃保存。首先加入引物 1,扩增 10 个~15 个循环后再加入引物 2。

5.2.3 结果判定

将扩增产物电泳检测,产生 141 bp 和 216 bp 两条带,判定该胚胎为雄性;产生 216 bp 一条带,判定该胚胎为雌性。

5.2.4 实验对照

阳性对照为公牛样品,阴性对照为母牛样品,空白对照为加等量双蒸水。

6 结果表述

XXX 胚胎的性别为雌性(或雄性)。

7 防污染措施

按 SN/T 1193、SN/T 1119 和 GA/T 383 方法执行。

附录 A
(资料性附录)
试剂和仪器

A.1 试剂

A.1.1 胚胎清洗液

含 1 mg/mL 聚乙醇的杜氏磷酸盐缓冲液(PBS 液)。

A.1.2 胚胎裂解液

含蛋白酶 K 的 1×PCR 缓冲液(500 mmol/L KCl, 100 mmol/L Tris-HCl pH 9.0, 1% Triton X-100)(蛋白酶 K 现用现加)。

A.1.3 电泳缓冲液

1×Tris-乙酸(TAE): 0.04 mol/L Tris-乙酸, 0.01 mol/L EDTA。

0.5×Tris-硼酸(TBE): 0.045 mol/L Tris-硼酸, 0.01 mol/L EDTA。

A.1.4 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。

A.1.5 6×上样缓冲液

0.05%溴酚蓝, 0.05%二甲苯青 FF, 40%(W/V)蔗糖溶液或 0.05%溴酚蓝, 0.05%二甲苯青 FF, 30%甘油溶液。

A.1.6 蛋白酶 K(20 mg/mL): 分析纯

A.1.7 Taq DNA 聚合酶

A.1.8 dNTPs: dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP

A.1.9 DNA Marker

A.2 仪器设备

A.2.1 凝胶成像分析系统

A.2.2 体视显微镜

A.2.3 PCR 扩增仪

A.2.4 离心机

A.2.5 涡旋震荡器

A.2.6 可调移液器

A.2.7 稳压稳流电泳仪

A.2.8 水平电泳槽

A.2.9 超纯水器

A.2.10 高压灭菌器
