

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2695—2015

牛遗传缺陷基因检测技术规程

Code of practice for molecular detecting for genetic defects in
cattle

2015-02-09 发布

2015-05-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由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/TC 274)归口。

本标准起草单位:全国畜牧总站,中国农业科学院北京畜牧兽医研究所。

本标准主要起草人:刘丑生、刘刚、朱化彬、韩旭、王皓、冯海永、赵俊金、孟飞、邱小田。

牛遗传缺陷基因检测技术规程

1 范围

本标准规定了牛遗传缺陷基因的检测方法和结果判定。

本标准适用于奶牛和肉牛白细胞黏附缺陷症、瓜氨酸血症、牛尿苷酸合酶缺乏症、牛脊椎畸形综合征、牛凝血因子Ⅺ缺乏症、牛并趾征、牛蜘蛛腿综合征基因的检测。

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。

GB/T 25887 奶牛脊椎畸形综合征检测 PCR-RFLP 法

GB/T 27642—2011 牛个体及亲子鉴定微卫星 DNA 法

GA/T 383 法庭科学 DNA 实验室检验规范

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

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 2497.15 进出口危险化学品安全试验方法 第 15 部分:PCR-SSCP 实验

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

遗传缺陷 genetic defects

家畜生殖细胞或受精卵中的遗传物质在结构或功能上发生了改变,从而使发育个体表现缺陷,具有垂直遗传和终生性特征。

3.2

单基因遗传缺陷 monogenic genetic defects

单个基因变异而引起的遗传缺陷,其遗传方式符合孟德尔遗传定律。

3.3

牛白细胞黏附缺陷症 bovine leukocyte adhesion deficiency, BLAD

由嗜中性粒细胞表面糖蛋白细胞黏附分子整合素的 $\beta 2$ 亚单位基因 *CD18*($\beta 2$ integrin subunit, also called *CD18*)第 2 外显子第 55 位碱基发生(A→G)突变引起的一种牛隐性遗传缺陷。其典型临床症状为重复性感染,鼻镜肿胀,颌下淋巴结肿大,常发生口腔、舌和肠道黏膜溃疡,并导致早期死亡。

3.4

瓜氨酸血症 citrullinemia, CN

由精氨酸琥珀酸合酶基因 *ASS*(argininosuccinate synthase)的第 5 外显子第 256 位碱基发生(C→T)突变引起的一种牛隐性遗传缺陷。其典型临床症状为犊牛第 1 d~第 2 d 出现精神沉郁、步态紊乱、惊厥、失明等。

3.5

牛脊椎畸形综合征 complex vertebral malformation, CVM

由编码 UDP-N-乙酰葡萄糖胺载体的基因 *SLC35A3*(solute carrier family 35 member A3)的第 4 外

显子第 73 位碱基突变(G→T)引起的一种牛隐性遗传缺陷。其典型临床症状表现为胚胎或胎儿死亡,或犊牛脊椎弯曲畸形、肋骨畸形、心脏畸形、颈短、两前腿筋腱缩短等。

3.6

牛尿苷酸合酶缺乏症 deficiency of uridine monophosphate synthase, DUMPS

由尿苷酸合酶基因 *UMPS* (uridine monophosphate synthase) 的 C-末端 405 处的密码子存在一个点突变导致密码子 CGA 转变为终止子 TGA 引起的一种牛隐性遗传缺陷。其典型临床症状为胚胎或胎儿期死亡,死亡率达 100%。

3.7

牛凝血因子Ⅺ缺乏症 factor Ⅺ deficiency, F Ⅺ

由凝血因子Ⅺ基因 *F Ⅺ* (factor Ⅺ) 外显子 12 上插入了一个大小为 76bp 的 DNA 片段引起的一种牛隐性遗传缺陷。其典型临床症状为 *F Ⅺ* 携带者一般不表现症状,部分携带者和纯合个体表现为凝血紊乱、造成犊牛成活率降低和繁殖性能下降以及免疫力降低。

3.8

牛并趾征 syndactyly

牛骡蹄症 mulefoot, MF

由低密度脂蛋白受体结合蛋白基因 *LPR4* (low density lipoprotein receptor related protein 4) 第 33 外显子发生了两个碱基的突变(C4863A, G4864T)引起一种牛遗传缺陷。其典型临床症状为在不同品种中杂合个体表现不同的外显率,缺陷个体一般一只或多只蹄子均可表现骡蹄。牛骡蹄症个体行走不稳,生产性能下降。

3.9

牛蜘蛛腿综合征 spiderleg of arachnomelia and arthrogryposis, syndrome of arachnomelia and arthrogryposis, SAA; arachnomelia syndrome, AS

在瑞士褐牛中由 *SOUX* (sulfite oxidase) 基因第 4 外显子第 363 位插入一个碱基(c. 363 - 364insG)而引起,在西门塔尔牛中由 *MOCS1* (molybdenum cofactor synthesis step 1) 基因位于第 11 外显子第 1 224~1 225 位 CA 两个碱基的缺失而引起的一种牛隐性遗传缺陷。其典型临床症状为在瑞士褐牛和西门塔尔牛中出现,AS 个体表现为犊牛先天性骨骼畸形、体重较轻,造成死胎或出生后不久死亡。

3.10

系谱 pedigree

在调查某种遗传病畜禽各个个体的发病情况后,采用特定的符号和格式绘制成反映该群体各个个体相互关系和发病情况的图解。

4 原理

4.1 牛白细胞黏附缺陷症的检测

利用 *CD18* 基因的 DNA 序列特异性引物,扩增 *CD18* 基因片段,采用 PCR - SSCP 或 PCR - RFLP 方法确定个体基因型。

4.2 瓜氨酸血症的检测

利用 *ASS* 基因的 DNA 序列特异性引物,扩增 *ASS* 基因片段,采用 PCR - SSCP 或 PCR - RFLP 方法确定个体基因型。

4.3 牛脊椎畸形综合征的检测

利用 *SLC35A3* 基因的 DNA 序列特异性引物,扩增 *SLC35A3* 基因片段,采用 PCR - SSCP 或错配 PCR 突变分析确定个体基因型。

4.4 牛尿苷酸合酶缺乏症的检测

利用尿苷酸合酶基因的 DNA 特异性引物,扩增尿苷酸合酶基因片段,采用 PCR-RFLP 方法确定个体基因型。

4.5 牛凝血因子Ⅺ缺乏症的检测

利用凝血因子Ⅺ缺乏症 *F* Ⅺ基因特异性引物扩增,采用 PCR 检测确定个体基因型。

4.6 牛并趾征的检测

利用 *LPR4* 基因 DNA 序列设计引物进行扩增,采用测序方法确定个体基因型。

4.7 牛蜘蛛腿综合征的检测

利用 *SOUX* 基因或 *MOCS1* 基因 DNA 序列设计引物进行扩增,采用测序的方法确定个体基因型。

5 仪器设备及试剂

5.1 仪器设备

- 5.1.1 离心机,离心力 10 000 *g*。
- 5.1.2 紫外可见分光光度计。
- 5.1.3 移液器,量程 0.1 μL ~1 000 μL 。
- 5.1.4 PCR 仪,96 孔热循环。
- 5.1.5 水平电泳槽,长度 31 cm。
- 5.1.6 凝胶成像系统。

5.2 试剂

- 5.2.1 *Ava* I 内切酶。
- 5.2.2 *Ava* II 内切酶。
- 5.2.3 *Eco*47 I 内切酶。
- 5.2.4 *Taq* I 内切酶。
- 5.2.5 *Taq* DNA 聚合酶。
- 5.2.6 乙醇(ethanol),分析纯。
- 5.2.7 异丙醇(isopropanol),分析纯。
- 5.2.8 乙二胺四乙酸二钠(EDTA),分析纯。
- 5.2.9 氯化钠(NaCl),分析纯。
- 5.2.10 十二烷基硫酸钠(SDS),分析纯。
- 5.2.11 乙酸,分析纯。
- 5.2.12 溴化乙锭,分析纯。
- 5.2.13 三(羟基甲基)氨基甲烷(Tris Base),分析纯。
- 5.2.14 琼脂糖(分析纯)。
- 5.2.15 Tris-HCl(pH 6.8):将 12.1 g Tris Base 溶于 80 mL 蒸馏水中,用浓 HCl 将 pH 调至 6.8,将体积调至 100 mL,高压除菌,室温储存。
- 5.2.16 缓冲液:
 - a) DNA 溶解缓冲液(TE):取 5 mL 1 mol/L Tris-HCl Buffer(pH=8.0)和 0.5 mol/L EDTA (pH=8.0)加入 400 mL 蒸馏水的烧杯中,将溶液定容到 500 mL 后,高温高压灭菌,室温保存;
 - b) 电泳解缓冲液 50×TAE:称取 242 g Tris Base、37.2 g Na_2EDTA 加入 1 L 烧杯中,然后加入 800 mL 去离子水,充分搅拌溶解,再加入 57.1 mL 醋酸,充分混匀定容至 1 L,室温保存;
 - c) 10×上样缓冲液:用移液器吸取 2 mL EDTA (500 mmol/L, pH 8.0)加入约 40 mL 蒸馏水中,

再称取 250 mg 溴酚蓝,量取 50 mL 丙三醇,定容至 100 mL,4℃ 保存。

5.2.17 1%~3%琼脂糖凝胶:称取 1 g~3 g 琼脂糖,加 100 mL TAE 煮沸,等降至 50℃~60℃时,加入溴化乙锭或其他燃料。

5.2.18 2%~5%琼脂糖凝胶:称取 2 g~5 g 琼脂糖,加 100 mL TAE 煮沸,等降至 50℃~60℃时,加入溴化乙锭或其他燃料。

6 检测步骤

6.1 样品制备

收集牛血液、组织(耳组织、肌肉、尾组织、皮肤等)、带毛囊的毛发或精液等材料。其中,血液用抗凝剂处理,并 4℃ 短期保存,−20℃ 及以下低温保存备用;组织、带毛囊的毛发浸入 75% 的酒精、精液,−20℃ 及以下低温保存备用。

6.2 DNA 的提取

按 GB/T 27642—2011 中附录 B 规定的方法执行。DNA 样品操作注意事项按 SN/T 1119 中规定的方法执行。

6.3 引物配制

引物配制按 NY/T 1670—2008 中 6.2.1 条款的规定执行,引物信息参见附录 A 中 A.1。

6.4 PCR 反应

6.4.1 PCR 反应体系和程序

按附录 A 中 A.2 的要求配制 PCR 反应体系,并按 A.3 的程序进行扩增。PCR 操作中防止污染等注意事项见 GA/T 383。

6.4.2 PCR 产物电泳检测

取 5 μ L~10 μ L PCR 产物,上样于 1%~3%琼脂糖凝胶中进行电泳,结果与标准带(marker)比对,确定是否为预期扩增片段。如果不是预期扩增片段,重复 6.3 和 6.4 步骤,直到确定为预期扩增片段为止。

6.5 分析方法

6.5.1 错配 PCR 突变分析

利用牛基因组的特异性引物 1-3 作为内标引物扩增,重复 6.4 步骤检测 PCR 反应产物;利用致病基因的特异性扩增引物 1-4 筛查致病突变,重复 6.4 步骤检测扩增产物,若存在该条带说明被测个体携带致病基因。

6.5.2 SSCP 分析

按 SN/T 2497.15 规定的方法执行。

6.5.3 RFLP 分析

按 B.1 和 B.2 的要求配制 RFLP 反应体系,在 37℃ 水浴中温浴 4 h,然后酶切产物用 2.0%~5.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。观察和记录,并分析个体基因型。

6.5.4 测序分析

利用 PCR 产物测序,分析测序峰图以判定个体基因型。

6.5.5 系谱分析

先对某遗传病家畜群体的发病情况进行详细调查,再按一定方式将调查结果绘成系谱;然后,根据孟德尔定律对各个体的表现型和基因型进行分析,通过分析可以判断某种遗传学是单基因病或者是多基因病,以及确定单基因病的遗传方式。

6.6 结果判定

6.6.1 牛脊椎畸形综合征(CVM)

利用 PCR-SSCP、PCR-RFLP 或错配 PCR 突变分析(PCR-MAMA)3 种方法的结果如下:

- a) PCR-SSCP:
 - 1) 引物 1-1(参见附录 A 中表 A.1)的 PCR 扩增产物长度为 177 bp,出现 2 条带(AA)的判定为正常个体;出现 3 条带或 4 条带(AB)的判定为隐性基因携带个体;出现 2 条带(BB)的判定为患病个体。
 - 2) 引物 1-2(参见附录 A 中表 A.1)的 PCR 扩增产物长度为 249 bp,出现 2 条带(AA)的判定为正常个体;出现 3 条带或 4 条带(AB)的判定为隐性基因携带个体;出现 2 条带(BB)的判定为患病个体。检测结果判定参见附录 C 中图 C.1。
- b) PCR-RFLP:按 GB/T 25887 的规定执行。
- c) 错配 PCR 突变分析(PCR-MAMA):引物 1-3(参见附录 A 中表 A.1)作为内标引物,其产物长度为 216 bp,引物 1-4(参见附录 A 中表 A.1)扩增致病突变,其产物长度为 105 bp。扩增产物出现 216 bp 1 条带,判定为正常个体;扩增产物中同时出现 216 bp 和 105 bp 2 条带,判定为隐性基因携带个体;扩增产物出现 105 bp 1 条带,判定为患病个体。检测结果判定参见附录 C 中图 C.2。

6.6.2 牛白细胞黏附缺陷症(BLAD)

利用 PCR-SSCP 或 PCR-RFLP 2 种方法的结果如下:

- a) PCR-SSCP:引物 2-1(参见附录 A 中表 A.1)的 PCR 扩增产物长度为 187 bp,出现 2 条带(AA)的判定为正常个体;出现 3 条带(AB)的判定为隐性基因携带个体;出现 2 条带(BB)的判定为患病个体。检测结果判定参见附录 C 中图 C.3。
- b) PCR-RFLP:
 - 1) 引物 2-2(参见附录 A 中表 A.1)扩增产物为 136 bp 条带,出现 108 bp 和 28 bp 2 条带的为 AA 基因型,判定为正常个体;出现 136 bp、108 bp 和 28 bp 3 条带的为 AB 基因型,判定为隐性基因携带者;酶切后出现 136 bp 1 条带的为 BB 型,判定为患病个体。检测结果判定参见附录 C 中图 C.4。
 - 2) 引物 2-3(参见附录 A 中表 A.1)扩增产物为 324 bp 条带,出现 193 bp 和 131 bp 2 条带的为 AA 基因型,判定为正常个体,出现 324 bp、193 bp 和 131 bp 3 条带的为 AB 基因型,判定为隐性基因携带者;酶切后出现 324 bp 1 条带的为 BB 型,判定为患病个体。检测结果判定参见附录 C 中图 C.5。

6.6.3 瓜氨酸血症(CN)

利用 PCR-SSCP 或 PCR-RFLP 2 种方法的结果如下:

- a) PCR-SSCP:引物 3-1(参见附录 A 中表 A.1)的 PCR 扩增产物长度为 177 bp,出现 2 条带(AA)的判定为正常个体;出现 3 条带(AB)的判定为隐性基因携带个体;出现 2 条带(BB)的判定为患病个体。检测结果判定参见附录 C 中图 C.6。
- b) PCR-RFLP:
 - 1) 引物 3-2(参见附录 A 中表 A.1)扩增产物为 199 bp 条带,出现 103 bp 和 82 bp 2 条带的为 AA 基因型,判定为正常个体;出现 185 bp、103 bp 和 82 bp 3 条带的为 AB 基因型,判定为隐性携带个体;出现 199 bp 1 条带的为 BB 基因型,判定为患病个体。检测结果判定参见附录 C 中图 C.7。
 - 2) 引物 3-3(参见附录 A 中表 A.1)扩增产物为 282 bp 条带,出现 194 bp 和 88 bp 2 条带的为 AA 基因型,判定为正常个体;出现 282 bp、194 bp 和 88 bp 3 条带的为 AB 基因型,判定为隐性携带个体;出现 282 bp 1 条带的为 BB 型。检测结果判定参见附录 C 中图 C.8。

6.6.4 牛尿苷酸合酶缺乏症(DUMPS)

利用 PCR-RFLP 方法的结果如下:引物 4(参见附录 A 中表 A.1)扩增产物为 108 bp 条带,出现 53 bp、36 bp 和 19 bp 3 条带的为 AA 基因型,判定为正常个体;出现 89 bp、53 bp、36 bp 和 19 bp 4 条带为 AB 基因型,判定为隐性携带个体;酶切后出现 89 bp 和 19 bp 2 条带的为 BB 型,判定为患病个体。检测结果判定参见附录 C 中图 C.9。

6.6.5 牛凝血因子Ⅺ缺乏症(FⅪ)

利用 PCR 方法的结果如下:引物 5(参见附录 A 中表 A.1)扩增产物出现 244 bp 条带,判定为正常个体;扩增产物出现 244 bp 和 320 bp 条带,判定为携带个体;扩增产物出现 320 bp 条带的为患病个体。检测结果判定参见附录 C 中图 C.10。

6.6.6 蜘蛛腿综合征(AS)

利用测序方法的结果如下:

- a) 引物 6-1(参见附录 A 中表 A.1)扩增 *SOUX* 基因产物为 446 bp 条带。扩增产物经 DNA 测序,AS363 位置上(第 4 外显子上)碱基为 C,判定为正常个体;DNA 图中在 363 位置上碱基为 G/C,判定为携带杂合子个体;363 位置为碱基为 G,判定为患病个体。检测结果判定参见附录 C 中图 C.11。
- b) 引物 6-2 和引物 6-3(参见附录 A 中表 A.1)在同一体系扩增 *MOSC1* 基因产物为 208 bp 条带(野生型)和 142 bp(突变型)条带。扩增产物经 DNA 测序,AS1224~1225 位置上(第 11 外显子上)碱基为 CA,则判定为正常个体;扩增产物经 DNA 测序,AS1224~1225 位置上(第 11 外显子上)碱基缺失为 C 或 A,则判定为隐性基因携带个体;扩增产物经 DNA 测序,AS1224~1225 位置上(第 11 外显子上)碱基缺失为 CA,则判定为患病个体。检测结果判定参见附录 C 中图 C.12。

6.6.7 牛并趾征(MF)

利用测序方法的结果如下:引物 7(参见附录 A 中表 A.1)扩增产物为 580 bp 条带。扩增产物经 DNA 测序,*LRP4* 基因第 33 外显子 LPR44863~4864 位置上为 CG,判定为正常个体;扩增产物为 580 bp 条带。扩增产物经 DNA 测序,*LRP4* 基因第 33 外显子 LPR44863~4864 位置上为 C 或 A 和 G 或 T,判定为隐性基因携带个体;扩增产物经 DNA 测序,*LRP4* 基因第 33 外显子 LPR44863~4864 位置上为 AT,判定为患病个体。检测结果判定参见附录 C 中图 C.13,同时结合系谱分析验证测序结果,参见附录 C 中图 C.14。

附录 A
(资料性附录)
引物信息、PCR 反应体系和反应条件

A.1 牛遗传缺陷基因引物信息

牛遗传缺陷基因引物信息见表 A.1。

表 A.1 牛遗传缺陷基因引物信息表

遗传缺陷	基因	方法	引物	引物序列	PCR 产物 长度 bp	退火温度 ℃
牛脊椎畸形 综合征, CVM	SLC35A3 基因	PCR - SSCP	1 - 1	F1 - 1; 5' - TCAGTGGCCCTCAGATTCTC - 3' R1 - 1; 5' - CCAAGTTGAATGTTTCTTATCCA - 3'	177	61
			1 - 2	F1 - 2; 5' - AGCTCTCCTCTGTAAATCC - 3' R1 - 2; 5' - TCTCAAAGTAAACCCAG - 3'	249	58
		PCR - MAMA	1 - 3	F1 - 3; 5' - TGGAAGCAAAGAACCCCGC - 3' R1 - 3; 5' - TCGTCAGAAACCGCACACTG - 3'	216	51
			1 - 4	F1 - 4; 5' - CACAAATTGTAGGTCTCAATG - 3' R1 - 4; 5' - TCCACACTGATGGTTTGCTTCTT - 3'	105	51
牛白细胞黏附缺陷症, BLAD	CD18 基因	PCR - SSCP	2 - 1	F2 - 1; 5' - AGTTGGGTTTCAACGTGACCTTC - 3' R2 - 1; 5' - AACAGGTGCTTCTGGGCTTTGGT - 3'	187	63
		PCR - RFLP	2 - 2	F2 - 2; 5' - AGTTGGGTTTCAACGTGACCTTC - 3' R2 - 2; 5' - AACAGGTGCTTCTGGGCTTTGGT - 3'	136	63
			2 - 3	F2 - 3; 5' - CCTGCATCATATCCACAG - 3' R2 - 3; 5' - GTTTCAGGGGAAGATGGAG - 3'	324	60

表 A.1 (续)

遗传缺陷	基因	方法	引物	引物序列	PCR产物 长度 bp	退火温度 ℃
瓜氨酸血症, CN	ASS 基因	PCR-SSCP	3-1	F3-1: 5'-GGCCAGGGACCGTGTTCATTGAGGACATC-3' R3-1: 5'-TTCTTGGGACCCCGTGAGACACATACTTG-3'	177	56
		PCR-RFLP	3-2	F3-2: 5'-GGCCAGGGACCGTGTTCATTGAGGACATC-3' R3-2: 5'-TTCTTGGGACCCCGTGAGACACATACTTG-3'	199	57
			3-3	F3-3: 5'-TTTTCAAGACCAACCCCTGTT-3' R3-3: 5'-CATACTTGGCTCCTTCTCG-3'	282	60
牛尿苷酸酶 缺乏症, DUMPS	UMPS 基因	PCR-RFLP	4	F4: 5'-GAACATTCTGAATTTGTGATTGGT-3' R4: 5'-GCTTCTAACTGAACCTCTCGAGT-3'	108	58
牛凝血因子 XI 缺乏症, Factor XI	FXI 基因	PCR	5	F5: 5'-CCCCTGGCTAGGAATCGTT-3' R5: 5'-CAAGGCAATGTCATATCCAC-3'	320	65
牛蜘蛛腿综合征, AS	SOUX 基因 (瑞士褐牛)	测序分析	6-1	F6-1: 5'-CGCAGATATACACAGGGAGGA-3' R6-1: 5'-CGATAGGTGCTGGGTCCAC-3'	446	65
	MOSC1 基因 (德系西门塔尔牛)	测序分析	6-2	F6-2: 5'-CCTGACATGAACACAGGGGAAC-3' R6-2: 5'-CCAGGTGGGAACCTGAAGTGT-3'	208	60
			6-3	F6-3: 5'-TGGAGAAACTCACTCTGTGTCTC-3' R6-3: 5'-GTGTTCAAGTCTCTGAGACAGAGT-3'	142	60
牛并趾征, Syndactyly	LRP4 基因	测序分析	7	F7: 5'-AGCGTGTGGACAAGTACTCAG-3' R7: 5'-ACCTCAAGCTCAAAGCTCCTA-3'	580	66

A.2 PCR 反应体系和反应程序**A.2.1 PCR 反应体系**

PCR 反应体系见表 A.2。

表 A.2 PCR 反应体系

组 分	单倍反应体系, μL
PCR Buffer(10 $\times$)	2.0
dNTPs	2.0
Taq 酶(5 U/ μL)	0.5
Primer - F(10 pmol/ μL)	1.0
Primer - R(10 pmol/ μL)	1.0
模板 DNA(50 ng/ μL ~100 ng/ μL)	1.0
ddH ₂ O	12.5
总体积	20.0
注:PCR 反应体系可以根据实际情况而调整。	

A.2.2 PCR 反应程序

PCR 反应程序见表 A.3。

表 A.3 PCR 反应程序

预变性	35 个循环			最后延伸	保存
	变 性	退 火	延 伸		
95℃ 5 min	94℃ 45 s	51℃~66℃ 45 s	72℃ 60 s	72℃ 10 min	10℃
注:具体退火温度参照表 A.1。					

附 录 B
(规范性附录)
酶切反应体系及内切酶信息

B.1 酶切反应体系

酶切反应体系见表 B.1。

表 B.1 酶切反应体系

组 分	单倍反应体系, μL
PCR 产物	8.0
10 $\times$ 缓冲液	5.0
限制性酶内切酶	0.5
ddH ₂ O	6.5
总体积	20.0
注:酶切反应体系可以根据实际情况而调整。	

B.2 内切酶信息

引物对应内切酶见表 B.2。

表 B.2 引物对应内切酶信息

引物	内切酶
引物 2-2	Taq I 酶
引物 2-3	Taq I 酶
引物 3-2	Ava II 酶
引物 3-3	Eco47 I 酶
引物 4	Ava I 酶

附 录 C
(资料性附录)
电泳结果及系谱分析模式图

C.1 CVM 结果模式图

C.1.1 CVM PCR - SSCP 结果(引物 1 - 2)参见图 C.1。

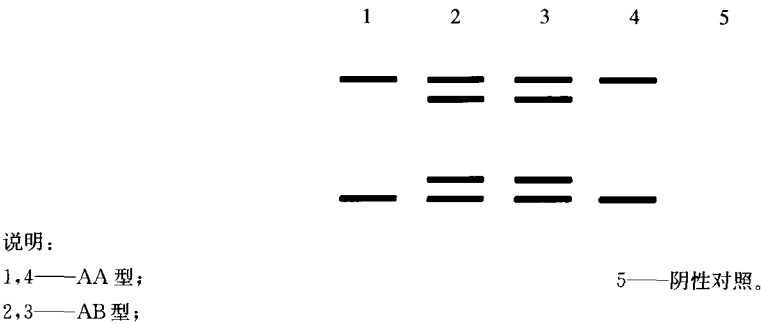


图 C.1 *SLC35A3* 基因的 PCR - SSCP 结果模式图

C.1.2 CVM PCR - MAMA 结果模式图(引物 1 - 3)参见图 C.2。

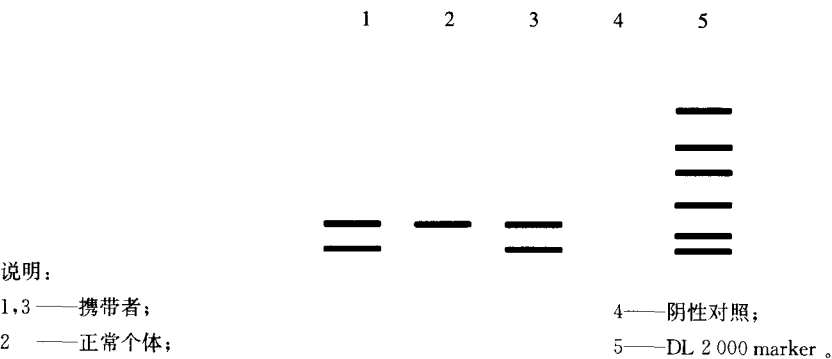


图 C.2 *SLC35A3* 基因的 PCR - MAMA 结果模式图

C.2 BLAD 结果判定图

C.2.1 BLAD PCR - SSCP 结果模式图(引物 2 - 1)参见图 C.3。

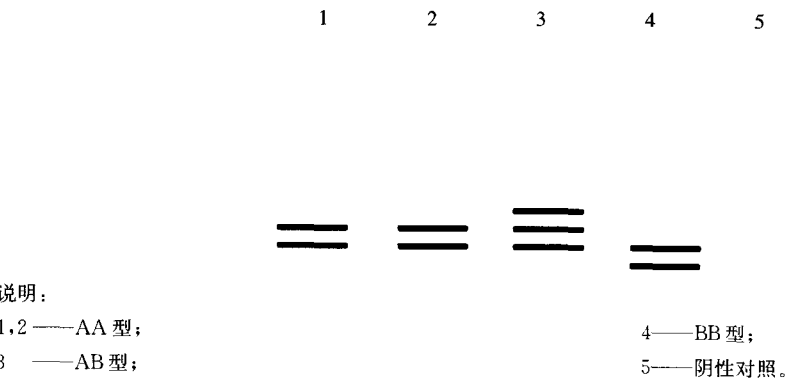


图 C.3 *CD18* 基因的 SSCP 模式图

C.2.2 BLAD *Taq* I 酶切后 RFLP 结果模式图(引物 2-2)参见图 C.4。

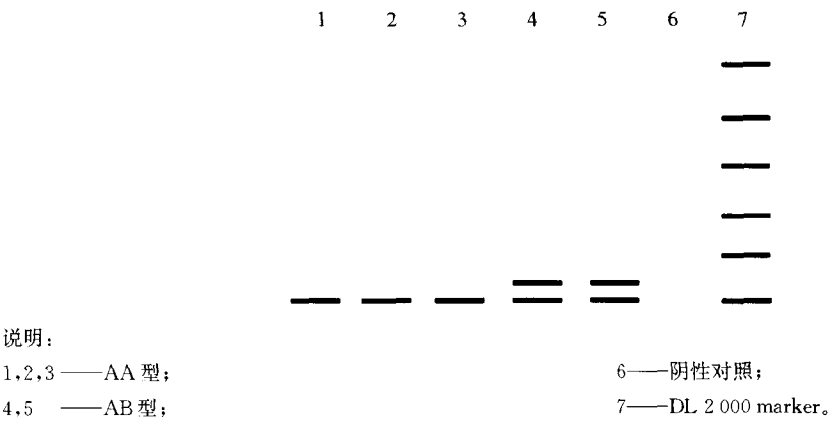


图 C.4 *CD18* 基因的 RFLP 结果模式图

C.2.3 BLAD *Taq* I 酶切后 RFLP 结果模式图(引物 2-3)参见图 C.5。

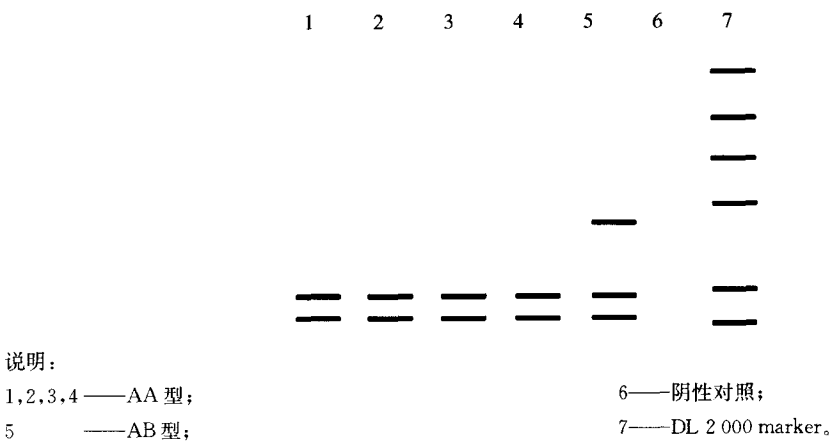


图 C.5 *CD18* 基因的 RFLP 结果模式图

C.3 CN 结果判定图

C.3.1 CN PCR - SSCP 结果(引物 3-1)参见图 C.6。

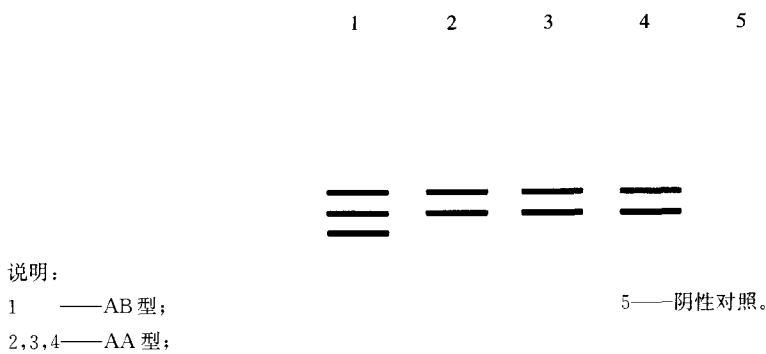


图 C.6 *ASS* 基因的 PCR - SSCP 结果分析

C.3.2 CN *Ava* II 酶切结果模式图(引物 3-2)参见图 C.7。

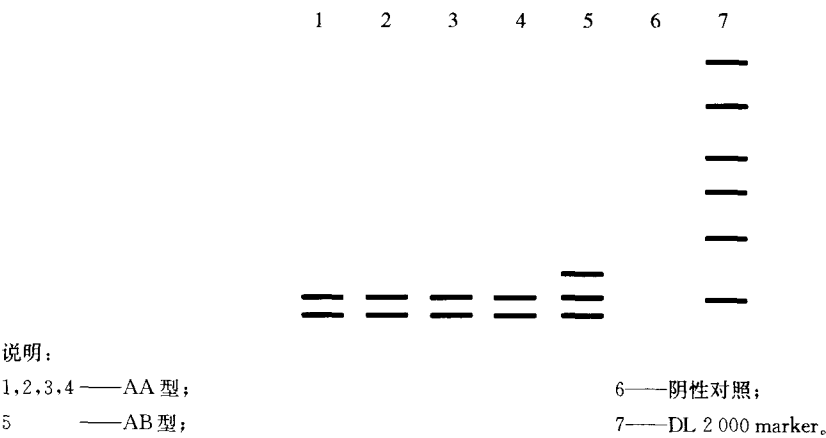


图 C.7 ASS 基因的 RFLP 结果模式图

C.3.3 CN *Eco47* I 酶切结果模式图(引物 3-3)参见图 C.8。

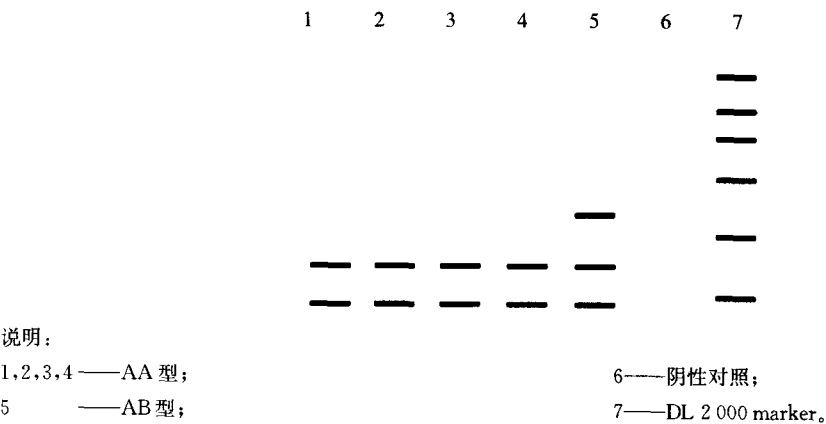


图 C.8 ASS 基因的 RFLP 结果模式图

C.4 DUMPS *Ava* I 酶切结果模式图

DUMPS *Ava* I 酶切结果模式图参见图 C.9。

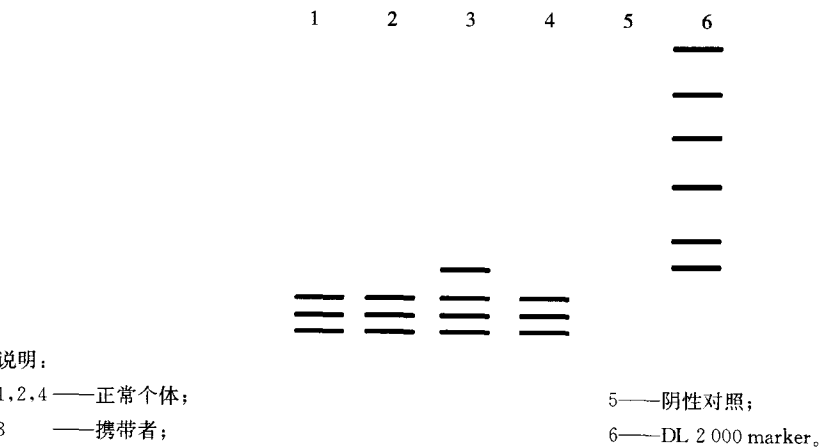


图 C.9 尿苷酸合酶基因酶切分析结果模式图

C.5 FⅪ PCR 检测结果模式图

FⅪ PCR 检测结果模式图参见图 C. 10。

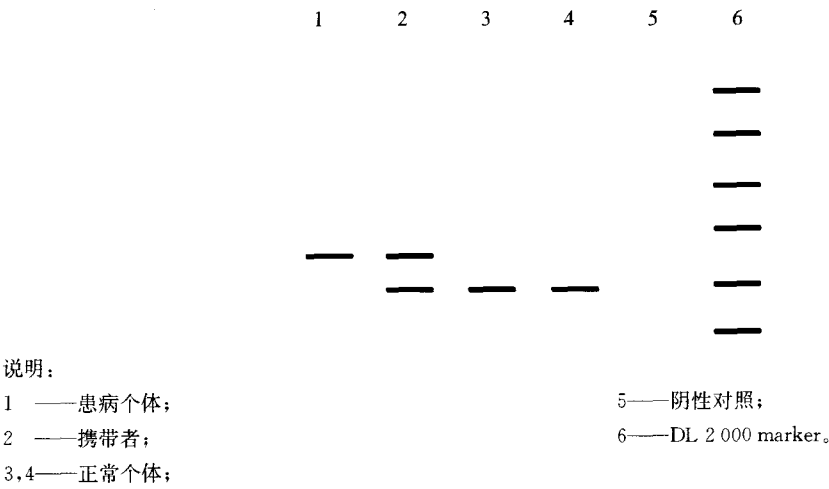


图 C. 10 FⅪ 基因 PCR 结果模式图

C.6 AS PCR 测序结果模式图

C.6.1 AS PCR 测序结果模式图(瑞士褐牛)参见图 C. 11。

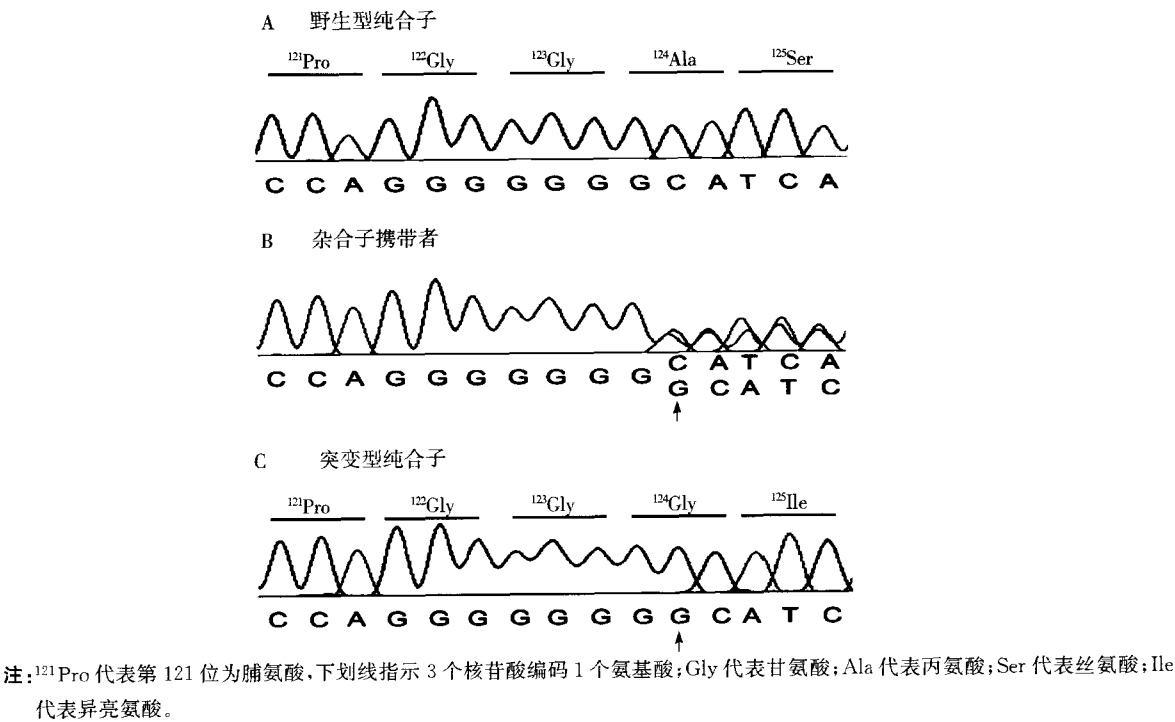
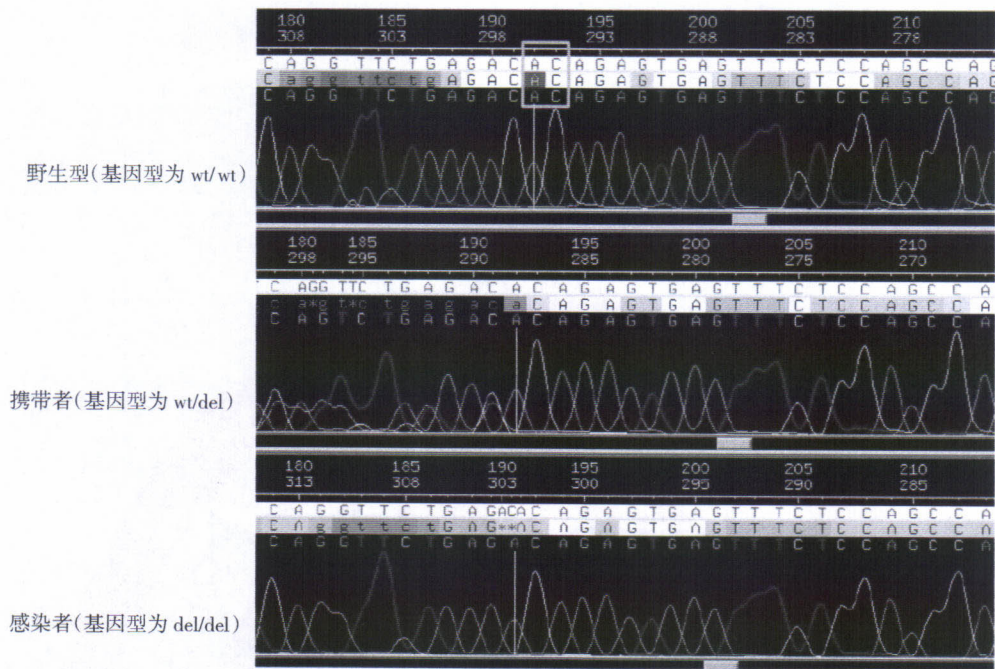


图 C. 11 牛蜘蛛腿病 SOUX 基因变异测序图

C.6.2 AS PCR 测序结果模式图(西门塔尔牛)参见图 C. 12。

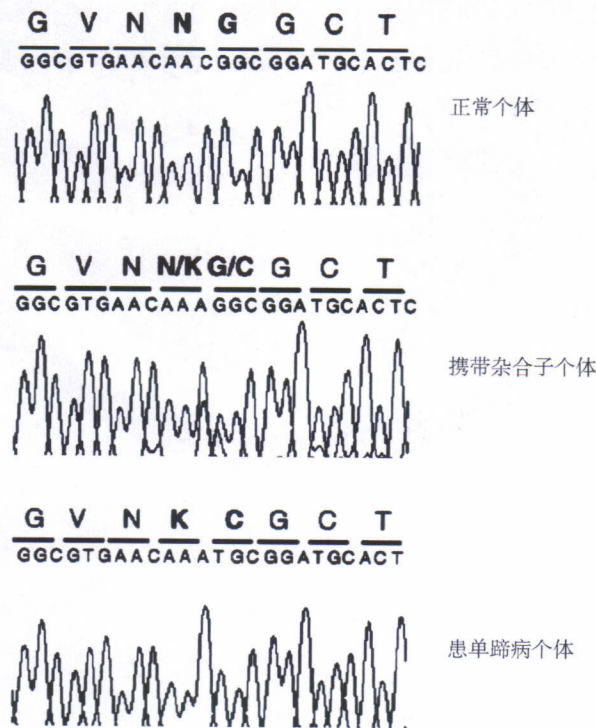


注:图中碱基上面的 3 位数字表示碱基的位数。

图 C. 12 牛蜘蛛腿病 *SOUX* 基因变异测序图

C.7 AS PCR 测序结果模式图

AS PCR 测序结果模式图参见图 C. 13。



注:G 代表甘氨酸;V 代表缬氨酸;N 代表天冬酰胺;K 代表赖氨酸;C 代表半胱氨酸;T 代表苏氨酸;图中下划线指示 3 个核苷酸编码 1 个氨基酸。

图 C. 13 牛单蹄病 *LRP4* 基因变异测序图

C.8 牛隐性遗传病系谱分析模式图

牛隐性遗传病系谱分析模式图见图 C.14。

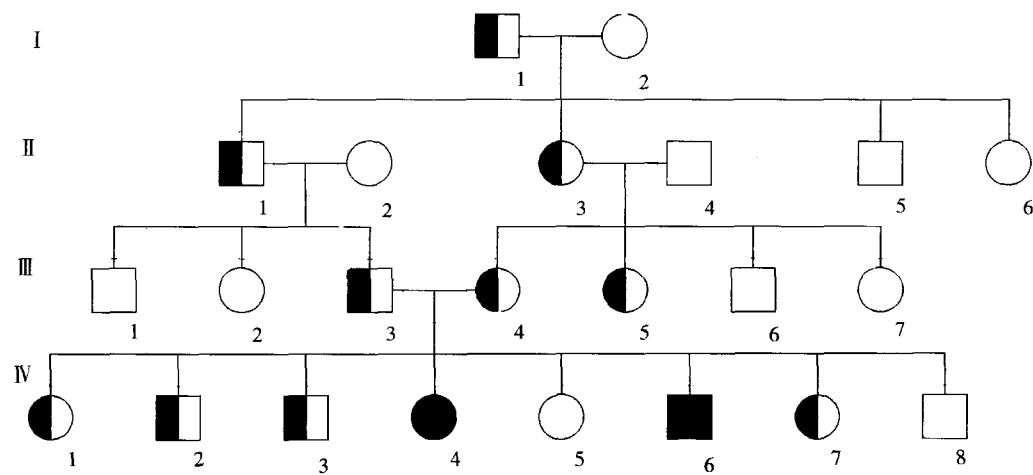


图 C.14 牛隐性遗传病系谱分析模式图