

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3446—2019

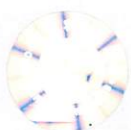
奶牛短脊椎畸形综合征检测 PCR法

Detection of brachyspina syndrome in dairy
cattle—PCR method

行业标准信息服务平台

2019-08-01 发布

2019-11-01 实施



中华人民共和国农业农村部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由农业农村部畜牧兽医局提出。

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:农业农村部牛冷冻精液质量监督检验测试中心(北京)、北京奶牛中心、中国农业大学、农业农村部种畜品质监督检验测试中心、农业农村部牛冷冻精液质量监督检验测试中心(南京)、全国畜牧总站。

本标准起草人:张晓霞、李艳华、麻柱、刘林、张胜利、房灵昭、韩广文、薛建华、钟代彬、刘丑生、陆汉希、李姣。

行业标准信息平台

奶牛短脊椎畸形综合征检测 PCR 法

1 范围

本标准规定了奶牛短脊椎畸形综合征的 PCR 检测方法。

本标准适用于奶牛短脊椎畸形综合征基因型的分子检测与诊断。

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 27642 牛个体及亲子鉴定微卫星 DNA 法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

短脊椎综合征 brachyspina syndrome, BS

在荷斯坦牛群中发现的隐性遗传缺陷疾病,当缺陷等位基因纯合时才会发病,表现出脊椎畸形、明显缩短,胎儿在妊娠后期流产、死亡等临床症状。该遗传缺陷是由 21 号染色体上 FANCI(fanconi anemia complementation-group 1) 基因 25~27 外显子缺失引起的,缺失长度 3 329 bp(BTA21:21184870-21188198)。

4 原理

针对 FANCI 基因缺失的 25~27 外显子,在缺失片段两侧设计特异性 PCR 引物,进行长片段 PCR 扩增,根据 PCR 产物大小判定个体基因型。

5 PCR 引物

上游引物 BSF: 5'-CCTCAAGTAGTTAGTTGCTCCACTG-3', 下游引物 BSR: 5'-ATAAATA-AATAAAGCAGGATGCTGAAA-3'; 预期扩增片段长度: 3 738 bp/409 bp。引物位置参见附录 A 中的图 A.1。

6 试剂和材料

除非另有说明,在试验中仅使用确认为分析纯的试剂或蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

6.1 长片段 Taq DNA 聚合酶

6.2 10×PCR 缓冲液(含 Mg^{2+})

6.3 dNTPs (dATP、dCTP、dGTP、dTTP 4 种溶液的等比例混合液)

6.4 DNA 分子量标记

6.5 核酸染料

6.6 琼脂糖

6.7 75% 乙醇

6.8 50×TAE 缓冲液

取 Tris 碱 242 g,冰乙酸 57.1 mL,0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)100 mL,加水定容至 1 000 mL,室温保存。

7 仪器设备

- 7.1 PCR 扩增仪
- 7.2 凝胶成像分析系统
- 7.3 电泳仪
- 7.4 水平电泳槽
- 7.5 可调移液器
- 7.6 离心机
- 7.7 干式加热器(或水浴锅)
- 7.8 电子天平

8 样品

8.1 样品准备

收集牛血液(新鲜或抗凝血)、组织(耳组织、肌肉、尾组织、皮肤等)、带毛囊的牛毛、精液等试验材料。血液、精液、组织样品-20℃及以下低温保存备用;带毛囊的毛发浸入 75%乙醇中-20℃及以下低温保存备用。

8.2 DNA 提取

按 GB/T 27642 规定的方法执行。

9 试验步骤

9.1 PCR 扩增

9.1.1 PCR 反应体系

10×PCR 缓冲液(含 Mg^{2+}) 2.5 μ L, dNTPs(2.5 mmol/L) 4.0 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, DNA 模板 50 ng~100 ng, 长片段 *Taq* DNA 聚合酶 1.5 U, 加水至 25 μ L。

9.1.2 PCR 反应程序

94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 58℃退火 1 min, 72℃延伸 2.5 min, 35 个循环; 72℃聚合延伸 10 min, 4℃保存。

9.2 电泳检测

9.2.1 2.0%琼脂糖凝胶制备

称取 2 g 琼脂糖, 加 100 mL 1×TAE 煮沸, 等温度降至 50℃~60℃时, 加入核酸染料或其他替代物。

9.2.2 上样电泳

取 5 μ L PCR 扩增产物, 上样于 2.0%琼脂糖凝胶中进行电泳(3 V/cm~5 V/cm, 电泳 1.0 h~1.5 h), 在凝胶成像系统中观察电泳条带。

10 试验数据处理

10.1 正常个体

仅扩增出一条长 3 738 bp 的 PCR 产物, 基因型命名为 AA 型。

10.2 BS 隐性携带者

同时扩增出长 3 738 bp 和 409 bp 的 PCR 产物, 基因型命名为 AB 型。

10.3 BS 患病牛

仅扩增出一条长 409 bp 的 PCR 产物, 基因型命名为 BB 型。

PCR 检测结果示意图参见图 A. 2。

附录 A
(资料性附录)
PCR 引物位置和 BS 检测结果示意图

A.1 引物位置示意图

见图 A.1。

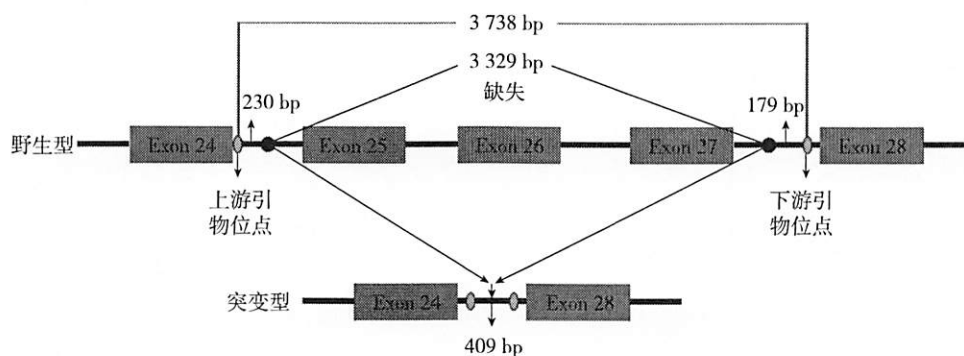
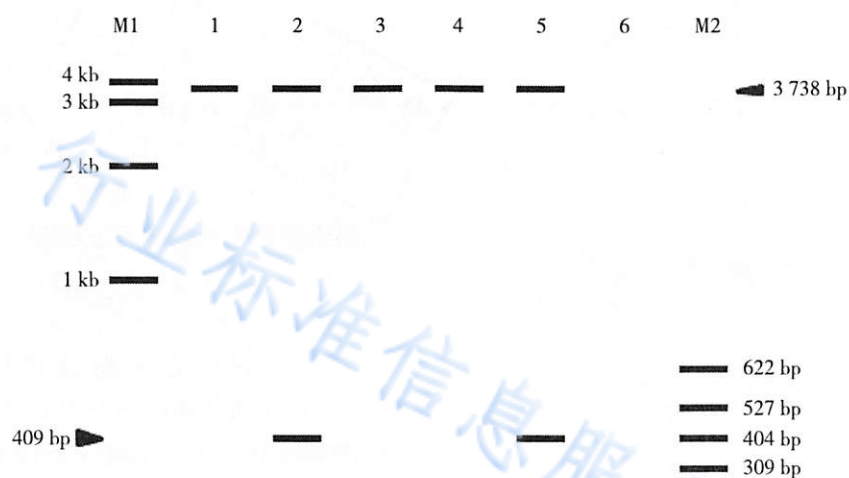


图 A.1 *FANC1* 基因中引物位置示意图

A.2 BS 检测结果示意图

见图 A.2。



说明:

M1 ——1 kb DNA Ladder 分子量标记;

M2 ——pBR322/Msp I DNA Marker 分子量标记;

1、3、4——正常个体基因型(AA型);

2——BS 隐性携带者基因型(AB型);

5——阳性对照;

6——空白对照。

图 A.2 *FANC1* 基因 PCR 检测结果示意图



行业标准信息

中华人民共和国
农业行业标准
奶牛短脊椎畸形综合征检测 PCR 法

NY/T 3446—2019

* * *

中国农业出版社出版
(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)

(邮政编码: 100125 网址: www.ccap.com.cn)

北京印刷一厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

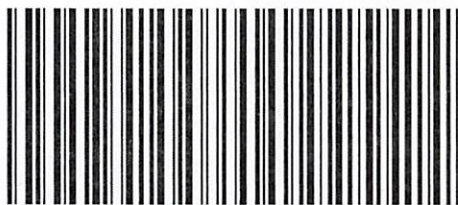
* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 0.5 字数 10 千字

2019 年 10 月第 1 版 2019 年 10 月北京第 1 次印刷

书号: 16109·4872

定价: 12.00 元



NY/T 3446—2019

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261