

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1672—2008

绵羊多胎主效基因Fec^B 分子检测技术规程

Technical specification of molecular detection
for prolificacy major gene Fec^B in sheep

2008-08-28 发布

2008-10-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

Booroola(Fec^b)基因是在绵羊中识别出的第一个高繁殖力主效基因。Fec^b基因的遗传效应是增加排卵数和产羔数。Booroola 绵羊骨形态发生蛋白受体 1B 基因高度保守的胞内激酶信号区域发生了 A746G 突变,导致所编码的 249 位氨基酸由谷氨酰胺(Q)变成了精氨酸(R)。研究表明,该突变与 Booroola 母羊的高繁殖力密切相关。通过检测绵羊是否携带高繁殖力主效基因 Fec^b,可以加速我国绵羊多胎品系的选育步伐。特制定本标准。

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:中国农业科学院北京畜牧兽医研究所。

本标准起草人:储明星、叶素成、方丽、刘忠慧、彭志兰、张跟喜、贾立华、孙洁、冯涛。

绵羊多胎主效基因 Fec^B 分子检测技术规程

1 范围

本标准规定了绵羊多胎主效基因 Fec^B 的分子检测方法。

本标准适用于绵羊多胎主效基因 Fec^B 的分子检测。

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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 19915.9 猪链球菌 2 型溶血素基因 PCR 检测方法

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

3 术语、定义和缩略语

下列术语、定义和缩略语适用于本标准。

3.1

多胎 *prolificacy*

指一次分娩产出两个或两个以上胎儿。

3.2

Fec^B

Fec^B 是在布鲁拉美利奴(Booroola Merino)绵羊中发现的能增加排卵数和产羔数的一个常染色体突变基因,是在绵羊中识别出的第一个高繁殖力主效基因,该主效基因已被绵羊和山羊遗传命名委员会定名为 Fec^B (即 $Fec=fecundity, B=Booroola$)。高繁殖力 Fec^B 基因被定位到绵羊 6 号染色体上对应于人染色体 4q22~23 的区间,骨形态发生蛋白受体 IB(bone morphogenetic protein receptor IB, BMPR-IB)基因位于该区间。Booroola 绵羊 BMPR-IB 基因高度保守的胞内激酶信号区域发生了 A746G 突变,导致所编码的 249 位氨基酸由谷氨酰胺(Q)变成了精氨酸(R)。研究表明,该突变与 Booroola 母羊的高繁殖力密切相关。 Fec^B 即 BMPR-IB 基因的 746G 或 249R, Fec^+ 即 BMPR-IB 基因的 746A 或 249Q。两个 Fec^B 拷贝的携带者用 $Fec^B Fec^B$ 表示,简记为 BB,一个 Fec^B 拷贝的携带者用 $Fec^B Fec^+$ 表示,简记为 B+,非携带者用 $Fec^+ Fec^+$ 表示,简记为 ++。一个 Fec^B 拷贝增加排卵数 1.3 枚~1.6 枚,两个 Fec^B 拷贝增加 2.7 枚~3.0 枚;携带一个 Fec^B 拷贝的母羊产羔数增加 0.9 只~1.2 只,携带两个 Fec^B 拷贝的母羊产羔数增加 1.1 只~1.7 只。

3.3

主效基因 *major gene*

主效基因是指对某一数量性状(或阈值性状)的表型值产生较大效应的单个基因或基因座。

3.4

限制性内切酶 *restriction endonuclease*

限制性内切酶是一类能识别双链 DNA 分子中特定核苷酸序列,并由此切割 DNA 双链的核酸内切酶。

3.5

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

限制性片段长度多态性是根据基因组上限制性内切酶的酶切位点核苷酸发生突变,或酶切位点之间发生核苷酸的插入、缺失而导致酶切片段长度发生变化,对基因突变进行检测的一种方法。

3.6

单链构象多态性 single strand conformation polymorphism (SSCP)

单链构象多态性是根据单链 DNA 片段在非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳中所呈现的不同带型来检测基因突变的一种方法。DNA 片段中的一个核苷酸发生改变可能会影响其单链的空间构象。空间构象有差异的单链 DNA 分子在聚丙烯酰胺凝胶中呈现不同的带型,据此可分辨不同的基因型。

3.7

缩略语

3.7.1 PCR: polymerase chain reaction, 聚合酶链式反应

3.7.2 DNA: deoxyribonucleic acid, 脱氧核糖核酸

3.7.3 dNTP: deoxyribonucleoside triphosphate, 脱氧核苷三磷酸

3.7.4 bp: base pair, 碱基对

3.7.5 Q: glutamine, 谷氨酰胺

3.7.6 R: arginine, 精氨酸

4 原理

高繁殖力 Fec^b 基因定位于绵羊 6 号染色体上对应于人染色体 4q22~23 的区间,该区间包含 BM-PR-IB 基因。绵羊 BM-PR-IB 基因高度保守的胞内激酶信号区域发生 A746G 突变,可导致所编码的 249 位氨基酸由谷氨酰胺(Q)变成精氨酸(R)。研究表明,该突变与绵羊高繁殖力密切相关。基于这个点突变设计引物对该区域进行 PCR 扩增以及 RFLP 或 SSCP 分析,根据在凝胶中呈现带型的不同来判断被检测个体的基因型。

5 主要试剂配制

除另有规定,所用试剂均为分析纯,水为符合 GB/T 6682 的双蒸水(二级);高压灭菌条件为 1.034×10^5 Pa 压力,蒸汽灭菌 20 min。

5.1 抗凝剂 ACD

在 700 mL 水中溶解柠檬酸 4.8 g、柠檬酸钠 13.2 g、葡萄糖 14.7 g,加水定容至 1 L,高压灭菌。

5.2 Tris · Cl, 1 mol/L

在 800 mL 水中溶解 Tris 碱 121.1 g,用浓 HCl 调节 pH 至 8.0,加水定容至 1 L,分装后高压灭菌。

5.3 EDTA(pH 8.0), 0.5 mol/L

在 70 mL 水中加入乙二胺四乙酸二钠(EDTA- $Na_2 \cdot 2H_2O$) 18.6 g,加热剧烈搅拌,用 NaOH 调节溶液的 pH 至 8.0(约需要 2 g NaOH),加水定容至 100 mL,高压灭菌。

5.4 血液 DNA 抽提液

取 1 mol/L Tris · Cl 2.5 mL、0.5 mol/L EDTA(pH 8.0) 50 mL、10% SDS 12.5 mL 加水定容至 250 mL,高压灭菌,室温保存。

5.5 蛋白酶 K, 20 mg/mL

取蛋白酶 K 20 mg 溶于 1 mL 灭菌双蒸水, -20°C 冻存。

5.6 TE 缓冲液(pH 8.0)

取 1 mol/L Tris · Cl (pH 8.0) 10 mL、0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 2 mL 加水定容至 1 L, 高压灭菌, 室温保存。

5.7 磷酸缓冲盐溶液 (PBS)

在 700 mL 水中溶解 NaCl 8.0 g、KCl 0.2 g、 Na_2HPO_4 1.44 g、 KH_2PO_4 0.24 g, 用 HCl 调节 pH 至 7.4, 加水定容至 1 L, 高压灭菌, 室温保存。

5.8 Tris 饱和酚 (pH 8.0)

新蒸苯酚, 加入 8-羟基喹啉至终浓度 0.1%, 加入等体积 0.5 mol/L Tris · Cl (pH 8.0) 混合搅拌 15 min, 两相分开后移去上层, 用等体积 0.1 mol/L Tris · Cl (pH 8.0) 重复抽提至酚相 pH 大于 7.8, 加入 0.1 体积含有 0.2% β -巯基乙醇的 0.1 mol/L Tris · Cl (pH 8.0), 保存于 4℃ 棕色瓶中并处于 10 mmol/L Tris · Cl (pH 8.0) 覆盖之下。

5.9 氯仿: 异戊醇 (24:1)

氯仿和异戊醇按照体积比 24:1 混合, 室温封口贮存。

5.10 酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1)

酚、氯仿和异戊醇按照体积比 25:24:1 混合, 保存于 4℃ 棕色瓶中, 并处于 0.1 mol/L Tris · Cl (pH 8.0) 覆盖之下。

5.11 乙醇, 70%

取 70 mL 无水乙醇加水定容至 100 mL, -20℃ 保存。

5.12 TBE 缓冲液, 10×

在 700 mL 水中溶解 Tris 碱 108 g、硼酸 55 g, 加入 0.5 mol/L EDTA 40 mL, 加水定容至 1 L。

5.13 TBE 缓冲液, 1×

取 10×TBE 缓冲液 100 mL, 加水定容至 1 L。

5.14 TBE 缓冲液, 0.5×

取 10×TBE 缓冲液 50 mL, 加水定容至 1 L。

5.15 溴化乙锭, 10 mg/mL

在 10 mL 水中溶解溴化乙锭 100 mg, 按每 1 mL 分装, 4℃ 保存。

注意: 溴化乙锭是强诱变剂并有中度毒性, 使用含有这种染料的溶液时应戴上手套, 称量时应戴口罩。

5.16 聚丙烯酰胺凝胶, 50% (丙烯酰胺: 甲叉双丙烯酰胺 = 49:1)

在 800 mL 水中加入丙烯酰胺 490 g、甲叉双丙烯酰胺 10 g, 定容至 1 L。

注意: 丙烯酰胺有毒性, 配置和使用丙烯酰胺溶液时应戴上手套, 称量丙烯酰胺固体时应戴口罩。

5.17 过硫酸铵, 10%

在 80 mL 水中溶解过硫酸铵 10 g, 定容至 100 mL。

5.18 变性缓冲液

在 9.8 mL 去离子甲酰胺溶液中加入溴酚蓝 2.5 mg、二甲苯酚 FF 2.5 mg、甘油 200 μL 、0.01 mol/L EDTA 200 μL , 混匀分装, 4℃ 保存。

5.19 乙醇, 20%

取 20 mL 无水乙醇, 加水定容至 100 mL。

5.20 HNO_3 , 1%

取 1 mL HNO_3 , 加水定容至 100 mL。

5.21 AgNO_3 , 0.1%

取 0.1 g AgNO_3 , 加水定容至 100 mL。

5.22 显色液

300 mL 水中加入无水碳酸钠 6 g、240 μL 甲醛, 混匀, 用时现配。

5.23 乙酸,4%

取 4 mL 乙酸,加水定容至 100 mL。

6 主要仪器设备

6.1 凝胶成像分析系统

6.2 基因扩增仪

6.3 高速离心机:12 000 r/min

6.4 稳压稳流电泳仪

6.5 单道可调移液器:2 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1 000 μ L

6.6 电子天平:量程 0.001 g~100 g,感量 0.001 g

6.7 紫外分光光度计

6.8 恒温振荡器:0 r/min~200 r/min,0℃~60℃

6.9 电泳槽

6.10 旋涡混合器

6.11 水平、垂直电泳槽

6.12 高压灭菌锅:1.4×10⁵ Pa~1.6×10⁵ Pa

6.13 干燥箱:60℃

6.14 摇床:0 r/min~200 r/min

7 检测方法

7.1 样本采集

每只绵羊颈静脉采血量为 2 mL~5 mL,ACD(每 6 mL 新鲜血液中加入 1 mL ACD)或肝素钠(1%)等抗凝。采血后,颠倒混匀以防止血液凝固,-20℃冻存不超过 2 年。亦可采用其他方法收集样本。

7.2 DNA 提取

冷冻血液在室温融化后,取 700 μ L 移至 1.5 mL 离心管中,加入等体积 PBS,充分混匀,12 000 r/min 离心 15 min,弃去上清液;再取 700 μ L 血液移至同一离心管中,加入等体积 PBS,充分混匀,12 000 r/min 离心 15 min,弃去上清液;再加入 600 μ L DNA 抽提液,重悬沉淀物,加入蛋白酶 K 至终浓度为 100 μ g/mL,混匀,封口膜封口 55℃过夜;将溶液冷却至室温,加入等体积苯酚,缓慢地颠倒离心管 10 min,直至两相混合形成乳浊液,12 000 r/min 离心 10 min;取上清,加入等体积 Tris 饱和酚,缓慢地颠倒离心管 10 min,12 000 r/min 离心 10 min;取上清,加入等体积酚:氯仿:异戊醇,缓慢地颠倒离心管 10 min,12 000 r/min 离心 10 min;取上清,加入等体积氯仿:异戊醇,缓慢地颠倒离心管 10 min,12 000 r/min 离心 10 min;取上清,加入 2 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA,缓慢地转动离心管,可见白色 DNA 沉淀;12 000 r/min 短暂离心后除去无水乙醇,加 4℃预冷的 70%乙醇洗 2 次,小心倾出乙醇;将装有 DNA 的 1.5 mL 离心管室温放置,让多余的乙醇挥发,再加 150 μ L TE 缓冲液溶解,24 h 后置于 -20℃保存。也可用相应市售 DNA 提取试剂盒提取 DNA,亦可采用其他方法提取 DNA。

7.3 DNA 检测

取 2 μ L DNA 溶液置入微量离心管中,用水稀释 100 倍。在紫外分光光度计 260 nm 和 280 nm 测定 OD 值。DNA 浓度(μ g/ μ L)=OD₂₆₀值×10;DNA 纯度=OD₂₆₀值/OD₂₈₀值。纯 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀比值应为 1.8。若比值大于 1.8,说明有 RNA 存在,应用 RNA 酶处理样品;若小于 1.8,说明样品中含有蛋白质和酚,应再用酚:氯仿抽提,以乙醇沉淀纯化 DNA。

7.4 引物序列

7.4.1 引物 1 序列

引物 1 用于 RFLP 检测,其预期扩增产物大小为 140 bp。序列为:上游引物为 5'-GTCGCTAT-GGGGAAGTTTGGATG-3';下游引物为 5'-CAAGATGTTTTTCATGCCTCATCAACACGGTC-3'。

7.4.2 引物 2 序列

引物 2 用于 SSCP 检测,其预期扩增产物大小为 187 bp。序列为:上游引物为 5'-AGATTG-GAAAAGGTCGCTATG-3';下游引物为 5'-ACCCTGAACATCGCTAATACA-3'。

7.5 PCR 扩增

7.5.1 PCR 扩增体系

引物 1 和引物 2 的 PCR 扩增体系相同。PCR 扩增反应总体积为 25 μ L,其中 10 $\times$ 缓冲液 2.5 μ L(不含 Mg^{2+}),10 μ mol/L 上下游引物各 1.0 μ L,2.5 mmol/L dNTPs 2.5 μ L,25 mmol/L $MgCl_2$ 1.5 μ L,50 ng/ μ L DNA 模板 3.0 μ L,2.5 U/ μ L Taq DNA 聚合酶 1 μ L,去离子水 12.5 μ L。

7.5.2 PCR 扩增循环参数

引物 1 和引物 2 的 PCR 扩增条件相同。PCR 扩增条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,33 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,4 $^{\circ}$ C 保存。也可根据不同的基因扩增仪对 PCR 扩增循环参数做适当调整。

7.5.3 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳检测

引物 1 和引物 2 的 PCR 产物都用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

7.5.3.1 1.5% 琼脂糖凝胶制备

琼脂糖凝胶制备需要的装置有胶板、隔板、一次性手套、微波炉、三角瓶和多齿梳子等。先用水清洗制胶板,再用 0.5 $\times$ TBE 冲洗一次,水平放置;称取琼脂糖 0.6 g,溶解于 40 mL 0.5 $\times$ TBE 中;微波炉加热煮沸,取出后室温放置降温,待温度降至约 55 $^{\circ}$ C 时加入 15 μ L 溴化乙锭并混匀;将混合液缓慢倒入制胶板中,排除气泡,插入多齿梳子;约 20 min 后胶液凝固,拔出梳子后将凝胶转移至水平电泳槽中;往电泳槽中加入电泳缓冲液,使液面刚刚没过凝胶。

7.5.3.2 PCR 产物检测

5 μ L 扩增产物加 1 μ L 上样缓冲液(6 $\times$ DNA Loading Buffer),DNA Marker I(0.05 mg DNA/mL)用量为 4 μ L。3 V/cm $\sim$ 5 V/cm 恒压,电泳 20 min $\sim$ 30 min;用凝胶成像仪观察,并分析记录。

7.6 RFLP 分析

7.6.1 RFLP 酶切体系

引物 1 的 PCR 扩增产物用 *Ava* II 限制性内切酶进行酶切,酶切反应总体积为 15 μ L,其中 PCR 产物 5 μ L,10 $\times$ 缓冲液 1.5 μ L,10 U/ μ L *Ava* II 限制性内切酶 1.0 μ L,去离子水 7.5 μ L。振荡、短暂离心(转速达 12 000 r/min 即可),酶切反应条件为 37 $^{\circ}$ C 水浴 4 h。

7.6.2 RFLP 产物琼脂糖凝胶电泳检测

酶切产物用 3.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

7.6.2.1 3.0% 琼脂糖凝胶制备

3.0% 琼脂糖凝胶制备时,应称取琼脂糖 1.2 g,溶解于 40 mL 0.5 $\times$ TBE 中。凝胶制备步骤与 7.5.3.1 相同。

7.6.2.2 RFLP 产物检测

5 μ L 酶切产物加 1 μ L 上样缓冲液(6 $\times$ DNA Loading Buffer),DNA Marker I(0.05 mg DNA/mL)用量为 4 μ L。3 V/cm $\sim$ 5 V/cm 恒压,电泳 25 min $\sim$ 35 min;用凝胶成像仪观察,并分析记录。

7.7 SSCP 分析

7.7.1 聚丙烯酰胺凝胶制备

聚丙烯酰胺凝胶制备需要的装置有弹簧夹、试管架、玻璃胶板(平口和凹口)、一次性手套、多齿梳子、隔板(厚度一致或者边缘较窄)、烧杯和玻璃棒等。

用水或洗涤剂将玻璃胶板清洗干净后,用去离子水漂洗,置于室温下晾干(应洗净玻璃板,以确保灌胶时不会产生气泡);把平口玻璃胶板放在空的试管架上,隔板放置在玻璃板的左、右两边和下边,确保隔板接触部位无缝隙;再将带凹口的玻璃胶板在间隔片上放置妥当,对齐隔板,用弹簧夹将三边夹住;将准备好的胶模斜靠在试管架上,呈 45° 角,胶膜开口向上。量取50%(49:1)的聚丙烯酰胺凝胶溶液7.2 mL、10×TBE缓冲液3.0 mL、10%过硫酸铵0.21 mL、TEMED 10.5 μ L、水19.59 mL,共30 mL混匀;将凝胶液缓慢灌注到胶模中,确保凝胶中没有气泡,立即将多齿梳子的齿侧插入凝胶溶液中,梳子保持水平;将胶板平放在试管架上,约1 h凝胶凝固成型。慢慢地从凝胶上移走梳子、弹簧夹以及底部的隔板;安装到下槽盛有1×TBE电泳缓冲液的垂直电泳槽上,用弹簧夹夹紧胶模,确保凝胶底部全部接触液面;在上槽中加1×TBE电泳缓冲液适量,以液面超过凝胶顶部0.5 cm为宜;用注射器冲洗胶孔的底部,以除去多余的聚丙烯酰胺;连接垂直电泳槽和电泳仪的正负极,接通电源,15 V/cm恒定电压下电泳5 min~10 min。

7.7.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳

吸取2 μ L PCR扩增产物与7 μ L变性缓冲液混合;98℃变性10 min,取出后冰浴7 min完成变性;切断电泳槽电源,将已变性的混合液用10 μ L的移液器准确点入每个胶孔中,静置约10 min,使样品全部下沉;然后接通电源,15 V/cm恒定电压下电泳5 min~10 min,观察到溴酚蓝(深蓝色)和二甲苯氰(蓝绿色)两条带分开后,5 V/cm~7 V/cm恒压,电泳16 h。

7.7.3 银染

电泳结束后,将凝胶从电泳槽上卸下,小心将凝胶从玻璃胶板中取出,切去一小角作为标记,置于去离子水中浸泡,开启摇床,准备银染。

7.7.3.1 洗胶

取500 mL水漂洗,60 r/min 30 s。

7.7.3.2 固定

向漂洗过的凝胶中加入500 mL 20%的乙醇,60 r/min 15 min,用水漂洗30 s。

7.7.3.3 氧化

加入500 mL 1% HNO_3 ,60 r/min 3 min,用水漂洗30 s。

7.7.3.4 染色

加入500 mL 0.1%的 AgNO_3 ,60 r/min 30 min,用水漂洗30 s。

7.7.3.5 显色

加入300 mL 2%的碳酸钠显色液,60 r/min 约10 min出现棕色条带,用水漂洗30 s。

7.7.3.6 停显

加入500 mL 4%的乙酸,60 r/min 3 min,用水漂洗30 s。保留条带,水平切去上下多余部分,将凝胶装入自封袋中,置于白板上分辨基因型。

8 结果判定

8.1 PCR扩增产物检测

引物1的扩增产物若仅出现140 bp条带(图1),引物2的扩增产物若仅出现187 bp条带(图2),则表示扩增特异性好,可进行下一步检测。

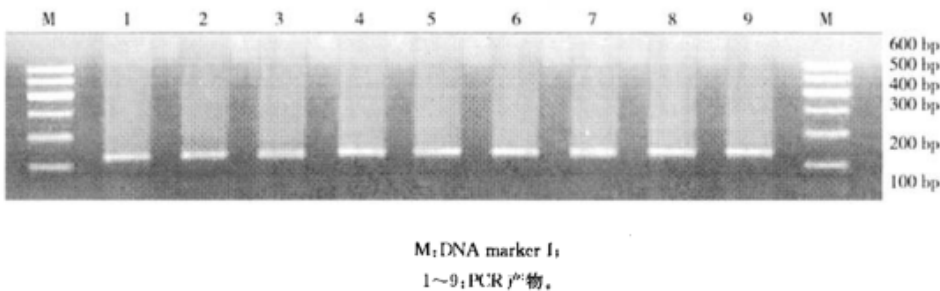


图 1 绵羊 PCR 扩增产物(引物 1)琼脂糖凝胶电泳图谱(示特异性)

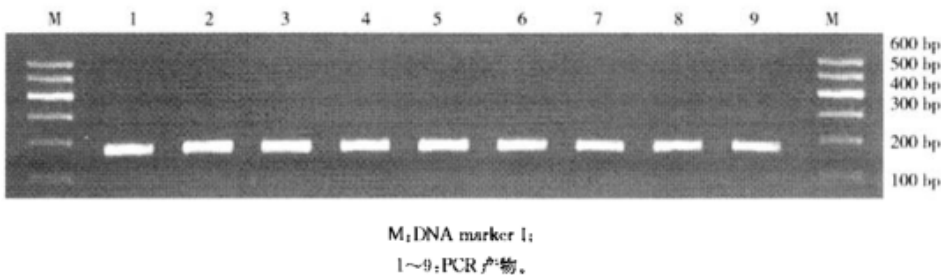


图 2 绵羊 PCR 扩增产物(引物 2)琼脂糖凝胶电泳图谱(示特异性)

8.2 RFLP 检测

用 *Ava* II 限制性内切酶对引物 1 的 PCR 扩增产物进行酶切,不同个体结果应表现出 3 种基因型(BB、B+、++)之一(图 3)。图 3 中的条带 1~3 表示该绵羊为两个 *Fec*^B 拷贝的携带者(110 bp /110 bp),即 BB 型;条带 4~6 表示该绵羊为一个 *Fec*^B 拷贝的携带者(140 bp /110 bp),即 B+型;条带 7~9 表示该绵羊为 *Fec*^B 拷贝的非携带者(140 bp /140 bp),即 ++型。

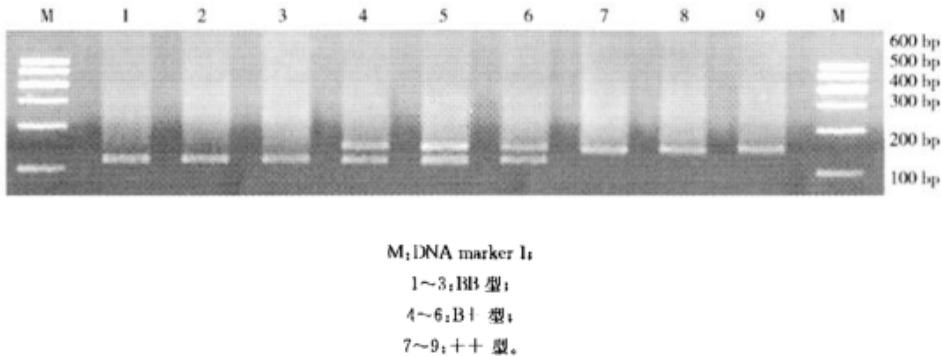


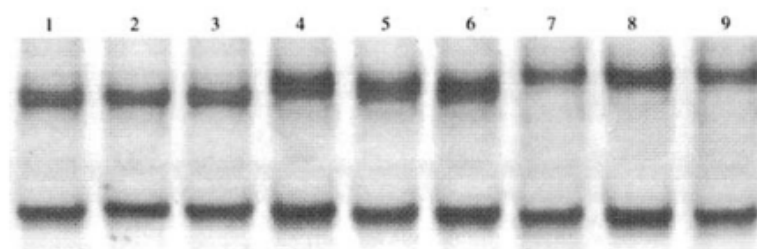
图 3 绵羊 PCR 产物(引物 1)的 *Ava* II 酶切琼脂糖凝胶电泳图谱(示基因型)

8.3 SSCP 检测

对引物 2 的 PCR 扩增产物进行 SSCP 分析,不同个体结果应表现出 3 种基因型(BB、B+、++)之一(图 4);条带 1~3 表示该绵羊为两个 *Fec*^B 拷贝的携带者,即 BB 型;条带 4~6 表示该绵羊为一个 *Fec*^B 拷贝的携带者,即 B+型;条带 7~9 表示该绵羊为 *Fec*^B 拷贝的非携带者,即 ++型。

9 废弃物处理和防止污染的措施

检测过程中的废弃物应高压灭菌后再做处理,有毒有害废弃物应经过除害再做处理,处理应符合环



1~3:BB 型;

4~6:B+ 型;

7~9:++ 型。

图4 绵羊 PCR 产物(引物 2)的 SSCP 电泳图谱(示基因分型)

保要求。

检测过程中人员安全防护和防止交叉污染的措施按照 GB/T 19915.9 和 SN/T 1193 中的规定执行。