

中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXXX—XXXX

牦牛无角性状基因型检测 PCR 法

Detectio of polled trait genotype in yak—PCR method

公开征求意见稿

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

## 前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国畜牧业标准化技术委员会(SAC/TC 274)归口。

本文件起草单位：XXXX、XXXX。

本文件主要起草人：XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX。

# 牦牛无角性状基因型检测 PCR 法

## 1 范围

本文件描述了牦牛无角性状基因位点检测的PCR法。  
本文件适用于牦牛无角性状基因型的检测。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 19495.2 转基因产品检测 实验室技术要求

GB/T 27642 牛个体及亲子鉴定微卫星DNA法

## 3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

## 4 原理

针对牦牛无角性状基因位点P219ID和P11ID分别设计特异性引物进行PCR扩增，使用限制性内切酶消化P11ID位点PCR扩增产物，电泳检测P11ID酶切产物及P219ID PCR扩增产物，根据P11ID酶切产物和P219ID PCR片段大小判断牦牛无角性状基因型。序列见附录A。

**注：**P219ID和P11ID是位于牦牛1号染色体上调控无角性状的两个变异位点。其中，P219ID是在36 387 490 nt处插入219个碱基，P11ID是在36 388 111 nt处缺失7个碱基并插入6个碱基（基因组版本：Bosgru\_v3.0, NCBI版本号：GCA\_005887515.1）。

## 5 试剂或材料

除非另有说明，下列试剂均为分析纯。所有试剂溶液均用无DNA酶和RNA酶污染容器分装。

5.1 水：应符合GB/T 6682中的规定，一级水。

5.2 DNA提取试剂盒

5.3 *Taq* PCR Mix预混液

5.4 *Apo I*内切酶

5.5 DNA分子量标记

5.6 核酸染料

5.7 50×TAE缓冲液：三羟甲基氨基甲烷（Tris-base）242 g，冰乙酸57.1 mL，0.5 mol/L 乙二胺四乙酸（EDTA）（pH 8.0）100 mL，加水定容至1000 mL，室温保存。

5.8 1%的琼脂糖凝胶：称取1 g琼脂糖，加100 mL TAE煮沸，温度降至50℃～60℃时，加入核酸染料后混匀。

5.9 2.5%的琼脂糖凝胶：称取2.5 g琼脂糖，加100 mL TAE煮沸，温度降至50℃～60℃时，加入核酸染料后混匀。

5.10 引物

5.10.1 P219ID PCR引物

上游引物：5'-TTCCGTGATGGTACAGG-3'；  
下游引物：5'-TCCATTGAAAGGTCGCTAT-3'。

#### 5.10.2 P11D PCR引物

上游引物：5'-ATCCTCAGCAGTGATGGGCA-3'；  
下游引物：5'-GATGTTGGCTTGGAAGGGAA-3'。

### 6 仪器设备

- 6.1 分析天平：量感0.1 mg。
- 6.2 PCR扩增仪。
- 6.3 紫外分光光度计。
- 6.4 离心机：离心力12 000 g及以上。
- 6.5 电泳装置。
- 6.6 凝胶成像分析系统。

### 7 试验步骤

#### 7.1 样本采集

收集牦牛血液（不少于 2 mL）或带毛囊的牛毛（不少于 10 根）或组织（耳组织和皮肤）（不少于 0.3 g）等试验材料。血液用抗凝剂处理，带毛囊的牛毛浸入 75%乙醇，样品-20℃及以下低温保存备用。

#### 7.2 DNA 提取

按GB/T 27642规定的方法执行或使用商业化DNA提取试剂盒。

#### 7.3 试验设置

##### 7.3.1 阳性对照

用携带P2191D和P11D位点无角基因型序列片段的阳性质粒等量混合后的样品作为阳性对照；

##### 7.3.2 阴性对照

用携带P2191D和P11D位点有角基因型序列片段的阳性质粒等量混合后的样品作为阴性对照；

##### 7.3.3 空白对照

用水作为空白对照。

#### 7.4 PCR 扩增

##### 7.4.1 PCR 反应体系

每个对照和试样做 3 个平行 PCR。

PCR 反应体系：Taq PCR Mix 预混液（含 400 $\mu$ mol/L dNTP）12.5  $\mu$ L，上、下游引物（10  $\mu$ mol/L）各 1  $\mu$ L，DNA 模板 $\geq$ 50 ng，加水至 25  $\mu$ L。可根据需要调整反应体系。

注：空白对照模板使用水。

##### 7.4.2 PCR 反应程序

###### 7.4.2.1 P2191D PCR扩增

95℃预变性 2 min；95℃变性 30 s，55.3℃退火 30 s，72℃延伸 1 min，30 个循环；72℃延伸 5 min。

###### 7.4.2.2 P11D PCR 扩增

95℃预变性 2 min；95℃变性 15 s，58.7℃退火 30 s，72℃延伸 15 s，30 个循环；72℃延伸 5 min。

#### 7.5 扩增产物分析

##### 7.5.1 P2191D 产物电泳检测

取5  $\mu\text{L}$  PCR扩增产物，上样于1%的琼脂糖凝胶中进行电泳（3 V/cm~5 V/cm，电泳0.5 h），在凝胶成像系统中观察电泳条带。

### 7.5.2 P11D 产物电泳检测

#### 7.5.2.1 PCR 产物酶切

取15  $\mu\text{L}$  P11D 位点 PCR产物，加入1  $\mu\text{L}$  限制内切酶 *Apo I* 和5  $\mu\text{L}$  酶切缓冲液，加水至50  $\mu\text{L}$ ，反应条件参照产品说明书。

#### 7.5.2.2 酶切产物电泳检测

取15  $\mu\text{L}$  酶切产物，上样于2.5%的琼脂糖凝胶中进行电泳（3 V/cm~5 V/cm，电泳50 min），在凝胶成像系统中观察电泳条带。

## 8 结果判定

### 8.1 对照结果

P219ID阳性对照出现836bp的条带，阴性对照出现617bp的条带，P11D阳性对照酶切后出现205bp的条带，阴性对照酶切后出现273bp的条带，两个位点的空白对照均无条带，试验体系成立，否则试验不成立。

### 8.2 试样结果

#### 8.2.1 无角性状纯合基因型

试样中在P219ID PCR产物中检测出一条836 bp的电泳条带，且在P11D PCR酶切产物中检测出一条205 bp的电泳条带，基因型分别为P219ID（+/+）和P11D（-/-），判定为无角性状纯合基因型。电泳检测结果判断见附录B中的图B. 1和图B. 2。

#### 8.2.2 无角性状杂合基因型

试样中在P219ID PCR产物中同时检测出一条617 bp和一条836 bp的电泳条带，且在P11D位点同时检测出一条205 bp和一条273 bp的电泳条带，基因型分别命名为P219ID（+/-）和P11D（+/-），判定为无角性状杂合基因型。电泳检测结果判断见附录B中的图B. 1和图B. 2。

#### 8.2.3 有角性状纯合基因型

试样中在P219ID PCR产物中检测出一条617 bp的电泳条带，且在P11D位点检测出一条273 bp的电泳条带，基因型分别命名为P219ID（-/-）和P11D（+/+），判定为有角性状纯合基因型。电泳检测结果判断见附录B中的图B. 1和图B. 2。

## 9 废弃物处理和污染防控

按GB/T 19495.2的规定执行。

## 附 录 A

(资料性)

## PCR 扩增产物核苷酸序列

## A.1 P219ID位点特异性扩增核苷酸序列。

1 TTCCGTGATG GTACAGGACA GATGAACACA GGCCGCATTC CGGTTGTGAT ATCAAGATCC  
 61 GCTGGTCTTC ATGGTCCAAG GCCTCTCATT CCTGTGTCTC CTCGTGAGTC CCATCTATTG  
 121 TCCACTTTGA TTCCAGGCAT GCCCTGGAAT TTTGCTTCTT TGATATCTGT GCCTGGAGTC  
 181 TTACTIONTTGT GTATTTTGAC ATCCTTCATT TCCAACAGCT GTGGGATAAA CACTTGCAGG  
 241 CAGCGAGTGG TTTCATTCTG CAAGCTGCCA AAAGTTTCAT GC[ATAGTTTT CTGTTTTCTC  
 301 ATCCATAAGG TAAAGAGTTA CATATGTTGT AACTGGAAAT TTGCTTTGAT TCCAGGCATG  
 361 CCCTGGAATT TTGCTTCTTT CATATCTGTG CCTGGAGTCT TACTTTTGTG TATTTTGACA  
 421 TCCTTCATTT CCAACAGCTG TGGGATAAAC ACTTGCAGGC AGCGAGTGGT TTCATTCTGC  
 481 GAGCTGCCAA AAGTTTCATG C]TTGCCAAAA GTTTCATGTT TTCTTACCCT ATATAGAAAG  
 541 CCTTTAAAAA TGCTTAGTTT TCTTTTCTCT TATTCCTAAC AGTCTTCTCC TCTGTTTCAG  
 601 GAGACATGGC TGGTGAATCT GGATGTCATG TTGGAACATT GTTTTTTCAC GGGGTTAAT  
 661 TCTTTTCTAA AAAAGTTGAT TGTACACTAC TTTCTTCTGT CTTTGTAATC AGTGAAGTTG  
 721 ACTCATATTT GTAATTCCTA CACTCATCAA ATTATGTCAA CAGAGCATTT GTTCAACATC  
 781 TTCGATGCTA ATCAAGTGGT TTCTTAGAAT TGTTAAAATA GCGAACTTTC AATGGA

注 1：序列方向为 5'—3'。

注 2：5' 端下划线部分为 P219ID 位点特异性扩增上游引物序列，3' 端下划线部分为 P219ID 位点特异性扩增引物的下游引物序列。

注 3：[]内序列表示 P219ID 位点的变异序列。

## A.2 P219ID位点有角基因型特异性扩增核苷酸序列。

1 ATCCTCAGCA GTGATGGGCA CATACTAGGC ACTCAGTAAA TATTTGTAGA ATGAATGAAT  
 61 GAGGGAATCC AATAATAAAG AGTTACATAT GTTGAATAAT TCAGTGAAGT GGTGATTCAA  
 121 ATACTTTTTTC TCATTCTCTC ATTGACTTTT AAGTGAATGA AAGCTCTGTG ACTCTGTCAA  
 181 GTGTCTCTGT CAAGA[GATTCAG/TTCAGA]ATTTTCTG AATCTCTGTT TTCTCATCCA TAAGGTAAG  
 241 ACTTAACTGA AAATTCCTT CCAAGCCAAC ATC

注 1：序列方向为 5'—3'。

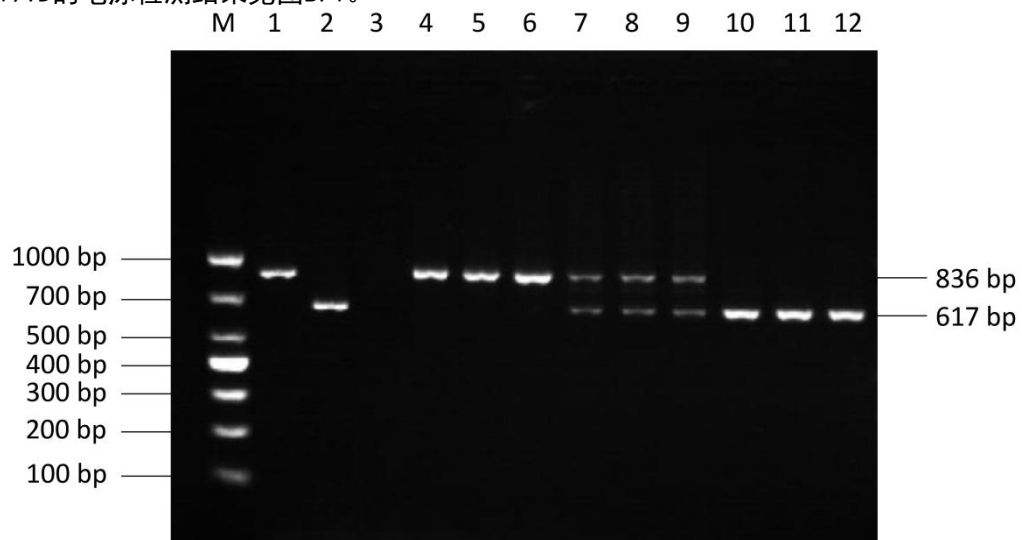
注 2：5' 端下划线部分为 P1ID 位点特异性扩增上游引物序列，3' 端下划线部分为 P1ID 位点特异性扩增引物的下游引物序列。

注 3：[]内序列表示 P1ID 位点的变异序列。

附 录 B  
(资料性)

P2191D 位点和 P111D 位点检测结果示意图

B.1 P2191D的电泳检测结果见图B.1。



标引序号说明：

M—DNA分子质量标记；

1—阳性对照；

2—阴性对照；

3—空白对照；

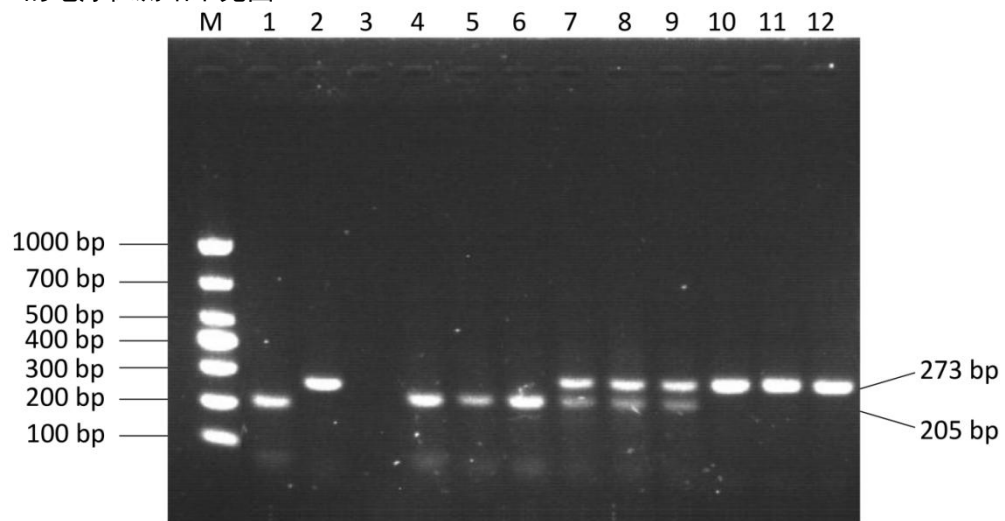
4,5,6—无角性状位点纯合个体（+/+）；

7,8,9—无角性状位点杂合个体（+/-）；

10,11,12—有角性状位点纯合个体（-/-）。

图B.1 P2191D电泳检测结果示意图

B.2 P11D的电泳检测结果见图B.2。



标引序号说明：

M—DNA分子质量标记；

1—阳性对照；

2—阴性对照；

3—空白对照；

4,5,6—无角性状位点纯合个体（-/-）；

7,8,9—无角性状位点杂合个体（+/-）；

10,11,12—有角性状位点纯合个体（+/+）。

图B.2 P2191D电泳检测结果示意图