

ICS 65.020.30

CCS B43

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXX-XXXX

奶牛 A2 型 β -酪蛋白基因测定

PCR 方法

Detection of A2 type of β -casein gene in dairy cattle

PCR method

(公开征求意见稿)

202X- - 发布

202X- - 实施

中华人民共和国农业农村部 发布

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。

本文件由中华人民共和国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：XXX。

本文件主要起草人：XXX。

奶牛 A2 型 β -酪蛋白基因测定 PCR 方法

1 范围

本文件描述了奶牛 A2 型 β -酪蛋白基因检测的 PCR 方法。
本文件适用于奶牛 A2 型 β -酪蛋白基因的检测与基因型判别。

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 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测
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

β -酪蛋白基因 β -casein gene, *CSN2* gene

β -酪蛋白（casein beta）基因，位于牛第 6 号染色体上，在基因序列数据库（GenBank）中的基因编号为 281099，基因全长 8522 bp。*CSN2* 基因（XM_010806178.3）包含 9 个外显子，编码区长度为 675 bp，编码 224 个氨基酸。

3.2

A2 型 β -酪蛋白 A2 β -casein, A2 *CSN2*

奶牛 β -酪蛋白含有多种变体型（A1、A2、A3、B、C、D、E、F、G 等）。 β -酪蛋白不同变体型之间的区别在于 β -酪蛋白基因（*CSN2*）编码区一个或几个碱基的变化，导致相应氨基酸的改变。其中，当 *CSN2* 基因编码区的 8 个 SNPs 位点，即 c.245 C>A、c.259 C>G、c.307 C>A、c.322 A>C、c.363 C>A、c.411 C>G、c.458 C>T 和 c.500 C>T，对应的基因型分别为 c.245 (CC)、c.259 (CC)、c.307 (CC)、c.322 (AA)、c.363 (CC)、c.411 (CC)、c.458 (CC) 和 c.500 (CC) 时，其编码的蛋白称为 A2 型 β -酪蛋白。

3.3

A2 奶牛 A2 Dairy Cattle

拥有 A2 型 β -酪蛋白基因的奶牛。

注：简称为 A2 奶牛。

4 原理

利用特异性 PCR 引物, 扩增涵盖 8 个 SNPs 位点的 β -酪蛋白基因片段, 利用 DNA 测序仪对 PCR 产物测序, 依据 8 个 SNP 位点的基因型组合信息, 确定奶牛 β -酪蛋白基因的基因型, 鉴定出 A2 奶牛。

5 试剂或材料

- 5.1 除非另有说明, 仅使用分析纯试剂。所有试剂溶液均用无DNA酶和RNA酶污染的容器分装。
- 5.2 水: GB/T 6682, 一级。
- 5.3 10×PCR 缓冲液 (含 Mg^{2+})。
- 5.4 dNTP 溶液 (含 dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP 各 2.5 mmol/L)。
- 5.5 上游引物 F。
- 5.6 下游引物 R。
- 5.7 Taq DNA 聚合酶。
- 5.8 阳性对照样品: A2 型样品基因组 DNA
- 5.9 核酸染料。
- 5.10 50×TAE 缓冲液: 三羟甲基氨基甲烷 242.0 g, 乙二胺四乙酸二钠二水合物 37.2 g, 冰乙酸 57.1 mL, 定容至 1 L。
- 5.11 1%琼脂糖凝胶: 称取 1 g 琼脂糖于 250 mL 锥形瓶中, 加入 100 mL 1×TAE 溶液, 加热 3 min 至琼脂糖完全熔化。待琼脂糖溶液冷却至 50 °C~60 °C 后加入核酸染料, 摇匀, 向预制胶槽中灌胶。
- 5.12 PBS缓冲液: 称取氯化钠8.0 g、氯化钾0.2 g、磷酸氢二钠1.44 g和磷酸二氢钾0.24 g溶于800 mL 水中, 用盐酸调节pH至7.4, 最后用水定容至1 L。

6 仪器设备

- 6.1 分析天平: 感量 0.001 g。
- 6.2 PCR 扩增仪。
- 6.3 DNA 测序仪。
- 6.4 电泳装置。
- 6.5 凝胶成像分析系统。
- 6.6 离心机: 离心力不低于 12,000 g。
- 6.7 恒温水浴锅: 0~100 °C, 精度为 ± 1 °C。

7 样品

7.1 静脉血样

采集静脉血样 2 mL~5 mL, 注入EDTA抗凝采血管, -20 °C 保存, 备用。

7.2 组织

采集组织 (耳组织等) 0.1 g~0.3 g, 浸入75%的酒精, -20 °C 保存, 备用。

7.3 毛囊

采集带毛囊的牛毛20根~30根, 浸入75%的酒精或置于毛囊卡, -20 °C 保存, 备用。

7.4 精液

采集鲜精0.2 mL~0.5 mL或细管冷冻精液1支~2支，液氮保存，备用。

7.5 生牛乳

采集新鲜生牛乳 2 mL~10 mL，4 °C离心 30 min；去掉上层乳脂，用吸管将中间层的乳蛋白去掉；向离心管加入 600 μ L PBS，悬浮沉淀，转移至新的 1.5 mL 离心管中，10,000 g，4 °C离心 10 min，弃去上层液体；加 540 μ L 的 PBS 悬浮沉淀，再加入 60 μ L 乳化剂，于 40 °C 恒温水浴处理 10 min 脱去体细胞周围的乳脂，10,000 g，4 °C离心 10 min，弃上清；加 500 μ L PBS 悬浮沉淀，10,000 g，4 °C离心 10 min 使体细胞沉淀富集，弃上清，-20 °C 保存，备用。

8 试验步骤

8.1 基因组 DNA 提取

上述样品任选其一，按 GB/T 27642 规定提取 DNA。

8.2 PCR 扩增

8.2.1 引物

上游引物F：5'-ACCCCAATTCTTAACCAAACCA-3'；

下游引物R：5'-ACATCAGAAGTTAAACAGCACAGT-3'。

扩增涵盖8个SNPs位点的目的DNA片段，片段长度为684 bp，A2型CSN2基因的目的片段序列见附录A。

8.2.2 扩增体系

8.2.2.1 试样扩增体系

扩增体系如表1所示。

表1 PCR扩增反应体系

组分	体积 (μ L)	终浓度
10 \times PCR 缓冲液 (含 Mg^{2+})	2.0	1 \times
dNTP 溶液 (含 dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP 各 2.5 mmol/L)	2.0	各 0.25 mmol/L
上游引物 F (10 μ mol/L)	1.0	0.5 μ mol/L
下游引物 R (10 μ mol/L)	1.0	0.5 μ mol/L
<i>Taq</i> DNA 聚合酶 (5 U/ μ L)	0.1	0.025 U/ μ L
试样 DNA (10 ng/ μ L~500 ng/ μ L)	1.0	0.5 ng/ μ L~25 ng/ μ L
水	12.9	-
总体积	20	-

8.2.2.2 对照样扩增体系

在试样 PCR 扩增的同时，应设置阳性对照和空白对照。

以已知的A2型样品基因组DNA作为阳性对照；以水作为空白对照。对照样 PCR 扩增反应体系如表1所示。

8.2.3 扩增条件

94 °C 4 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共35个循环; 72 °C 10 min。

8.2.4 扩增产物

8.2.4.1 扩增产物电泳检测

分别取2 μL试样和对照样的PCR扩增产物, 进行1%琼脂糖凝胶电泳, 然后用凝胶成像分析系统进行成像检测。

8.2.4.2 扩增产物结果分析

阳性对照和试样的 PCR 反应产物中, 可清晰检测到684 bp大小的特异性DNA条带, 而空白对照中无预期的DNA条带, 表明PCR反应体系正常工作, 见附录B的图B. 1。否则, 重新扩增。

8.3 扩增产物测序

检测合格的样品, 利用 DNA 测序仪进行 PCR 扩增产物的测序, 获取对应目的 DNA 序列的 ABI 文件, 见附录 C 的图 C. 1。

9. 结果判定

9.1 软件安装

9.1.1 在Windows系统, 或Linux系统, 或MacOS系统上安装Perl解释器。

9.1.2 从网站<https://github.com/JINPENG-WANG/SAGPEK>上下载SAGPEK软件包, 解压后生成SAGPEK文件夹。

9.2. 测序结果判读

9.2.1 测序获取ABI格式文件, 将其保存在SAGPEK文件夹下的ABI文件夹中。使用SAGPEK软件分析ABI文件, 运行完成后, 基因型的判读结果将保存在Genotype文件夹A2.Genotype.txt文件中, 操作说明见附录D。结果文件包含9列, 第1列为样本名称, 第2-9列分别为8个SNPs位点的基因型。示例见附录E的表E. 1

9.2.2 阳性对照A2型样品第2-9列8个SNPs位点的基因型分别为c. 245 (CC)、c. 259 (CC)、c. 307 (CC)、c. 322 (AA)、c. 363 (CC)、c. 411 (CC)、c. 458 (CC) 和c. 500 (CC)。当检测样品β-酪蛋白基因的8个SNPs位点对应的基因型与阳性对照一致时, 检测的个体为A2奶牛。

10 废弃物管理

按GB/T 27403规定执行。

11 实验室污染的预防和处理

按GB/T 27403规定执行。

附 录 A
(资料性)
PCR 扩增产物核苷酸序列

A.1 PCR 扩增产物的核苷酸序列 (GenBank: 281099)

1 ACCCCAATTT CTTAACCAAA CCAAATGGAA GATTTTCTTT CTCTCTCTTC ACTGAATTAT
61 GTTTTAAAAA GAGGAGGATA ATTCATCATG AATAACAATT ATAACTGGAT TATGGACTCA
121 AAGATTTGTT TTCCTTCTTT CCAGGATGAA CTCCAGGATA AAATCCACCC CTTTGCCAG
181 ACACAGTCTC TAGTCTATCC CTTCCCTGGG CCCATCCCTA ACAGCCTCCC ACAAAAACATC
241 CCTCCTCTTA CTCAAACCCC TGTGGTGGTG CCGCCTTTC TTCAGCCTGA AGTAATGGGA
301 GTCTCCAAAG TGAAGGAGGC TATGGCTCCT AAGCACAAAG AAATGCCCTT CCCTAAATAT
361 CCAGTTGAGC CCTTTACTGA AAGCCAGAGC CTGACTCTCA CTGATGTTGA AAATCTGCAC
421 CTTCTCTGC CTCTGCTCCA GTCTTGATG CACCAGCCTC ACCAGCCTCT TCCTCCAAC
481 GTCATGTTTC CTCCTCAGTC CGTGCTGTCC CTTTCTCAGT CCAAAGTCCT GCCTGTTC
541 CAGAAAGCAG TGCCCTATCC CCAGAGAGAT ATGCCATTC AGGCCTTCT GCTGTACCAG
601 GAGCCTGTAC TCGGTCCTGT CCGGGACCC TTCCCTATTA TTGTAAGTCT AAATTTACTA
661 ACTGTGCTGT TTAACTTCTG ATGT

注1：序列方向为5'-3'。

注2：5'端下划线部分为 *CSN2* 基因特异性扩增上游引物序列，3'端下划线部分为 *CSN2* 基因特异性扩增引物的下游引物序列。

注3：此序列为A2变体型对应的DNA序列，下划线粗体标记处为对应的8个SNPs位点，依次为：c. 245 C>A、c. 259 C>G、c. 307 C>A、c. 322 A>C、c. 363 C>A、c. 411 C>G、c. 458 C>T和c. 500 C>T。

附录 B
(资料性)

PCR扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图

B.1 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图

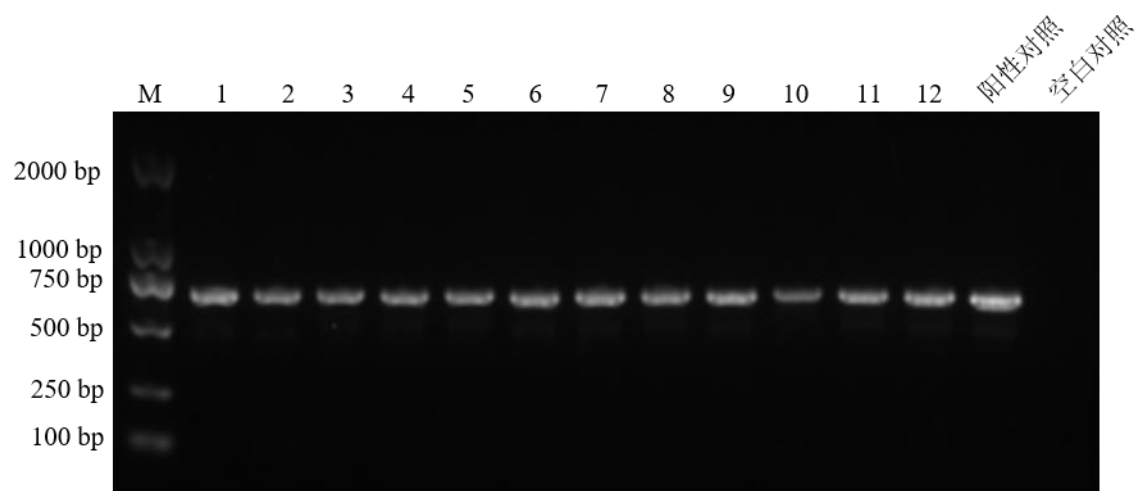
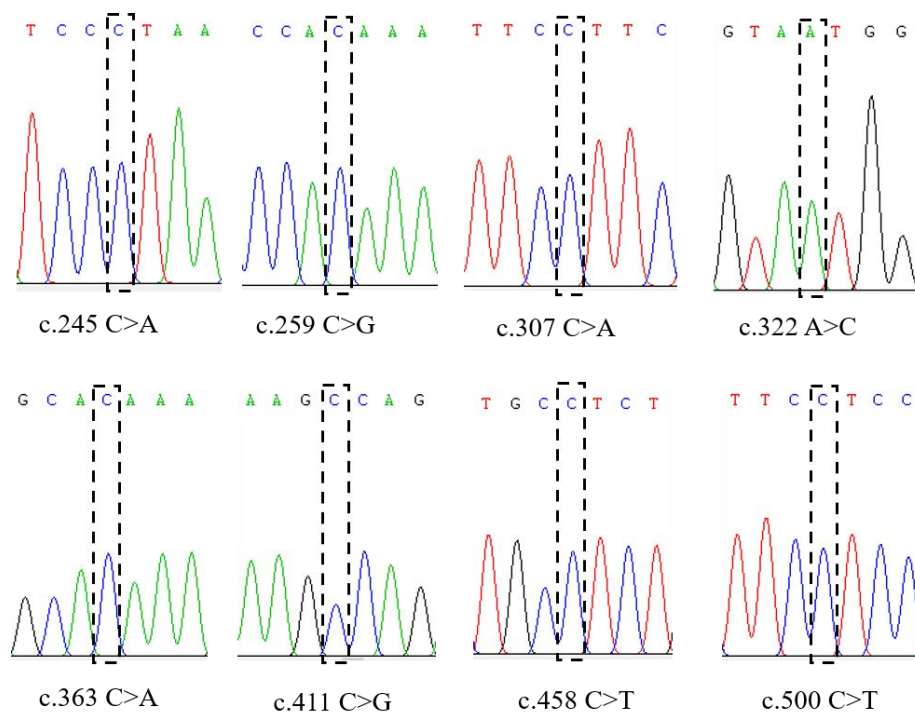


图 B.1 PCR 扩增产物的 1%琼脂糖凝胶电泳图

注：Marker 表示 DNA 分子量标准；1-12 泳道对应样品 1-12。

附录 C

(资料性)

A2 型 β -酪蛋白 SNP 位点 ABI 测序结果C.1 A2 型 β -酪蛋白 SNP 位点 ABI 测序结果图 C.1 A2 型 β -酪蛋白 SNP 位点 ABI 测序结果

附 录 D
(资料性)
SAGPEK 软件操作说明

D.1 SAGPEK 软件操作说明

步骤一：将 Sanger 测序结果的 ABI 格式文件拷贝到 ABI 文件夹。

步骤二：运行 Get.amPeak.bash 脚本。

步骤三：运行 Get.genotypes.bash 脚本。

附 录 E
(资料性)

β-酪蛋白不同 SNP 位点 SAGPEK 软件判读结果

表 E.1 β-酪蛋白不同 SNP 位点 SAGPEK 软件判读结果

SNP Sample ID	c. 245	c. 259	c. 307	c. 322	c. 363	c. 411	c. 458	c. 500	是否为 A2 奶牛
阳性对照	CC	CC	CC	AA	CC	CC	CC	CC	是
空白对照	/	/	/	/	/	/	/	/	/
1	CA	CC	CC	AC	CC	CC	CC	CC	否
2	CC	CC	CC	AA	CC	CC	CC	CC	是
3	CA	CC	CC	AA	CA	CC	CC	CC	否
4	CC	CG	CC	AC	CC	CC	CC	CC	否
5	AA	CC	CC	AA	CC	CC	CT	CC	否
6	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	否
7	CA	CC	CA	AC	CC	CC	CC	CC	否
8	CA	CC	CC	AA	CC	CG	CC	CC	否
9	CC	CC	CC	AA	CC	CC	CC	CC	是
10	CA	CC	CC	AA	CC	CC	CC	CT	否
11	CA	CC	CC	AA	CC	CC	CC	CC	否
12	CC	CC	CC	AA	CC	CC	CC	CC	是
<p>注：Sample ID 表示样品名称；c. 245, c. 259, c. 307, c. 322, c. 363, c. 411, c. 458 和 c. 500 列分别表示 8 个 SNPs 位点的基因型。</p>									