

ICS 11.220
B 41
备案号: 49640-2016

DB21

辽宁省地方标准

DB21/T 2549—2015

仔猪乳糖酶基因检测技术规程

Method of detecting lactase gene in piglets



2015—12—15 发布

2016—02—15 实施

辽宁省质量技术监督局 发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009标准给出的规则制定。

附录A、附录B和附录C均为规范性附录。

本标准由辽宁医学院提出。

本标准由锦州市质量技术监督局归口。

本标准起草单位：辽宁医学院。

本标准主要起草人：田玉民、苏玉虹、朱弘焱、陶晓丽、王 希。



仔猪乳糖酶基因检测技术规程

1 范围

本标准规定了仔猪乳糖酶基因启动子和增强子多态性的检测条件、检测步骤和结果判定的技术要求。

本标准适用于仔猪乳糖酶基因检测。

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，仅所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 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 19495.2-2004 转基因产品检测实验室技术要求

GB/T 27476.1-2014 检测实验室安全 第1部分：总则

3 术语和定义

3.1

乳糖酶基因 Lactase gene, LCT

乳糖酶（LCT）又称 β -半乳糖苷酶，在特定条件下将乳糖水解为葡萄糖和半乳糖，进而被消化道吸收。仔猪的乳糖酶基因位于染色体15q13，预测CDS全长为5 793 bp，在基因序列数据库(GenBank)中的登录号为XM_003359430。

4 防污染措施

检测过程中防止交叉污染的措施按照GB/T 19495.2第七章规定执行。

5 安全防护

实验室安全防护按GB/T 27476.1第五章规定执行。

6 检测条件

6.1 实验室条件

按GB/T19495.2中的规定执行。

6.2 扩增仔猪乳糖酶基因片段的 PCR 引物

扩增启动子 SNP G-308C 和 A-301G 片段的 PCR 引物:

——上游引物F: 5'-AAA AAG TTT GGT AAG GAC CT-3';

——下游引物R: 5'-GGA ACT GTT AGG AGG TAT GTG-3'

扩增增强子 SNP G-797A 片段的 PCR 引物:

——上游引物F: 5'-TAA ACA AAG CCA AGG ACA TT-3';

——下游引物R: 5'-CTG GGG TGT ATG TGC TTG TGG-3'

6.3 主要试剂

用水应符合GB/T 6682的灭菌双蒸水。

裂解液、10% SDS、饱和酚、TE缓冲液、2 × Pfu PCR Master Mix、蛋白酶K、凝胶回收纯化试剂盒、测序试剂盒等。具体配制方法参见附录 A。

6.4 主要仪器

微量移液器、高速冷冻离心机、核酸蛋白测定仪、PCR热循环仪、pH计、精度0.1 g分析天平、涡旋混合仪、电泳仪、全自动DNA测序仪等。

7 检测步骤

7.1 样品的采集

用猪耳号钳子夹取仔猪耳部边缘组织0.5 cm³，立即置于装有75%乙醇的1.5 mL Ep白色塑料管中，-20℃保存备用。

7.2 仔猪基因组 DNA 提取

采用常规的酚-三氯甲烷法提取，并测定DNA溶液浓度。具体方法参见附录 B。

7.3 乳糖酶基因 5'UTR 区启动子 SNP G-308C 和 A-301G 的检测

15 μL反应体系: DNA模板50 ng、10 μmol/L 上下游引物各1 μL、2 × Pfu PCR Master Mix 7.5 μL、加灭菌双蒸水至15 μL。可根据需要调整反应体系(注:为保证实验准确性,需设置以灭菌双蒸水为模板的PCR反应作为阴性对照)。PCR扩增产物长度为318 bp。

PCR反应循环参数: 94℃预变性5 min; 94℃变性30 s, 52℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 30个循环; 72℃延伸10 min, 4℃保存。

用TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0凝胶回收纯化试剂盒对PCR产物纯化。用TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0测序试剂盒对PCR产物测序反应。然后在ABI 3730XL全自动DNA测序仪进行毛细管电泳和序列测定,获得序列色谱图ABI文件。通过Sequencing Analysis 和Sequencher软件包进行测序峰图的多重比对和对多态性位点的判读。

7.4 乳糖酶基因5'UTR区增强子SNP G-797A的检测

15 μL 反应体系：DNA模板50 ng、10 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各1 μL 、 $2 \times Pfu$ PCR Master Mix 7.5 μL 、加灭菌双蒸水至15 μL 。可根据需要调整反应体系（注：为保证实验准确性，需设置以灭菌双蒸水为模板的PCR反应作为阴性对照）。PCR扩增产物长度为147 bp。

PCR反应循环参数：94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min；94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s，52 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 S，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s，30个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min；4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

用TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0凝胶回收纯化试剂盒对PCR产物纯化。用TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0测序试剂盒对PCR产物测序反应。然后在ABI 3730XL全自动DNA测序仪进行毛细管电泳和序列测定，获得序列色谱图ABI文件。通过Sequencing Analysis 和Sequencher软件包进行测序峰图的多重比对和对多态性位点的判读。

8 结果判定

8.1 启动子SNP G-308C和A-301G基因型判定

启动子G-308C和A-301G呈完全连锁，因此仅有2个等位基因：GA和CG。如果测序结果仅有等位基因GA，基因型为纯合子GAGA；如果测序结果仅有等位基因CG，基因型为纯合子CGCG；如果测序结果有两种等位基因：GA和CG，基因型为杂合子GACG。测序结果参考附录 C中图 C.1判定。

8.2 增强子SNP G-797A基因型判定

增强子SNP G-797A仅有2个等位基因：G和A。如果测序结果仅有等位基因G，基因型为纯合子GG；如果测序结果仅有等位基因A，基因型为纯合子AA；如果测序结果有两种等位基因：G和A，基因型为杂合子GA。参考附录 C中图 C.2判定。

9 废弃物处理

实验过程中所产生的废弃物按 GB/T 27476.1 中的规定执行。

附录 A
(规范性附录)
主要试剂及配制方法

表 A.1 主要试剂及配制方法

试 剂	配 制 方 法
裂解液 (pH 8.0)	50 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L Na ₂ EDTA, SDS 30 g/L, 使用 HCl 或 NaOH 调节 pH
蛋白酶 K 溶液	20 mg/mL 蛋白酶 K, 无菌水溶解, -20 °C 保存, 避免反复冻融
10% SDS (pH 7.2)	100 g/L SDS, 37°C 去离子水加热溶解, 使用 HCl 调节 pH, 室温保存
饱和酚: 三氯甲烷: 异戊醇	25:24:1 (体积比)
三氯甲烷: 异戊醇	24:1 (体积比)
TE 缓冲液 (pH 8.0)	10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L Na ₂ EDTA, 使用 HCl 或 NaOH 调节 pH
2 × Pfu PCR Master Mix	0.05 U/μL Pfu DNA Polymerase, 0.4mmol/L dNTPs, 4mmol/L MgCl ₂

辽宁省地方标准全文公开
DB21

附录 B

(规范性附录)

仔猪基因组 DNA 提取方法

B.1 组织消化

将需要提取 DNA 的耳组织剪碎（无肉眼可见颗粒状组织）置于 1.5 mL EP 管中，加入 400 μL 裂解液、10% SDS 200 μL ，蛋白酶 K 10 μL ，混匀置于 56 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴过夜。

B.2 DNA 提取

DNA 提取方法：

- a) 取出金属浴内的样品管，凉至室温，4 $^{\circ}\text{C}$ ，12 000 r/min，离心 10 min；
- b) 取上清液至新的 EP 管中，加入等体积的饱和酚，颠倒混匀 10 min；
- c) 4 $^{\circ}\text{C}$ ，12 000 r/min，离心 10 min；
- d) 取上清液至新的 EP 管中，加入等体积的饱和酚：氯仿：异戊醇(25:24:1)，颠倒混匀 10 min；
- e) 4 $^{\circ}\text{C}$ ，12 000 r/min，离心 10 min；
- f) 取上清液至新的 EP 管中，加入等体积的氯仿：异戊醇(24:1)，颠倒混匀 10 min；
- g) 4 $^{\circ}\text{C}$ ，12 000 r/min，离心 10 min；
- h) 取上清液至新的 EP 管中，加入 2.5 倍体积的冰无水乙醇，轻柔混匀，置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中放置 30 min。
- i) 4 $^{\circ}\text{C}$ ，12 000 r/min，离心 20 min；
- j) 弃上清液，加入 1 mL 75% 酒精漂洗，4 $^{\circ}\text{C}$ ，12 000 r/min，离心 10 min（此步骤重复 2 次）；
- k) 4 $^{\circ}\text{C}$ ，12 000 r/min，离心 20 min；
- l) 弃上清液，使管内酒精挥发干净；根据沉淀情况加入适量（建议 40 μL ）TE 缓冲液溶解，-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

B.3 DNA 含量的测定

样品中提取的 DNA 含量测定用核酸蛋白测定仪进行测定。

取适量 DNA 溶液加 TE 缓冲液进行稀释，分别检测 260 nm 和 280 nm 处的吸光值 A_{260} 和 A_{280} ，DNA 的浓度按式 (1) 计算：

$$c = A \times N \times 50 / 1\ 000 \quad (1)$$

式中：

c ——DNA 浓度， $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ；

A ——260 nm 处的吸光值；

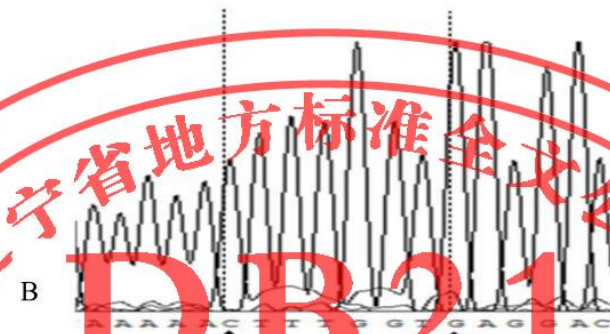
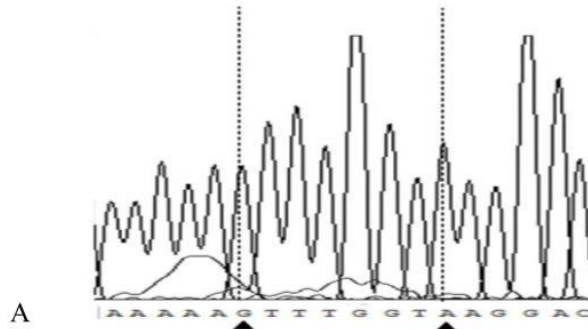
N ——核酸稀释倍数。

当 A_{260}/A_{280} 比值处于在 1.6 ~ 1.9 之间时，即可用于 PCR 扩增。

附录 C

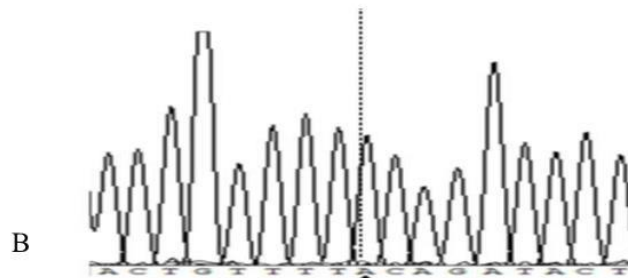
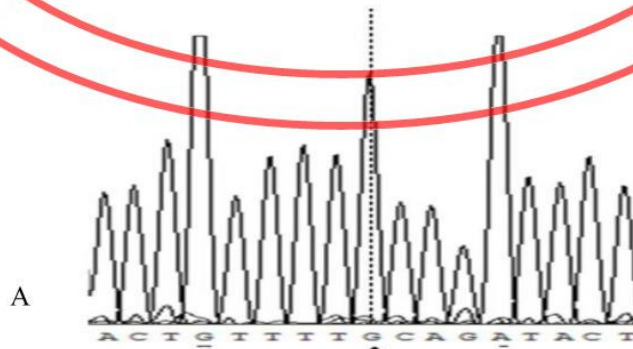
(规范性附录)

仔猪 LCT 基因启动子和增强子测序结果图



图C.1 仔猪乳糖酶基因启动子SNP G-308C和A-301G的序列峰图

图注：A为等位基因GA；B为等位基因CG



图C.2 仔猪乳糖酶基因增强子SNP G-797A的序列比对峰图

图注：A为等位基因G；B为等位基因A