



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4820—2017

牛瓜氨酸血症 PCR-DHPLC 检测方法

Detection method for bovine citrullinemia by PCR-DHPLC

2017-07-21 发布

2018-03-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国广东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：吴晓薇、朱道中、刘志玲、刘中勇、李贺、马保华、段燕瑜、林志雄。

牛瓜氨酸血症 PCR-DHPLC 检测方法

1 范围

本标准规定了牛瓜氨酸血症 PCR-DHPLC 的检测方法。

本标准适用了快速筛查牛群中隐性的牛瓜氨酸血症(参见附录 A)基因携带者。

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 6682—2008 分析实验室用水规格和试验方法

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CN 牛瓜氨酸血症(Citrullinemia)

PCR 聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction)

DHPLC 变性高效液相色谱(Denaturing high-performance liquid chromatography)

PBS 磷酸盐缓冲液(Phosphate buffer solution)

TEAA 三乙基胺醋酸盐(Triethylamine acetate)

SNP 单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism)

4 原理

变性高效液相色谱(DHPLC)是利用目标核酸片段 PCR 扩增产物,部分加热变性后,含有突变碱基的 DNA 序列由于错配碱基与正常碱基不能配对而形成异源双链。因包含错配碱基的杂合异源双链区比完全配对的同源配对区和固定相的亲合力弱,更易被从分离柱上洗脱下来,从而达到分离的目的。SNP 的有无最终表现为色谱峰的峰形或数目差异,依据此原理可很容易从色谱图中判断出突变的碱基片段。

5 仪器设备和试剂耗材

5.1 仪器设备

变性高效液相色谱分析仪。

核酸扩增仪。

Ⅱ级生物安全柜。

恒温水浴锅。

高速台式离心机(转速可以达到 12 000 r/min)。

微量可调移液器(10 μ L、100 μ L、200 μ L、1 000 μ L)。

灭菌配套吸头:10 μL 、100 μL 、200 μL 、1 000 μL 。

肝素钠抗凝管、Eppendorf 管、微量移液器、八联管、移液器、离心管等。

5.2 试剂与耗材

5.2.1 试剂级别:本方法试验用水应符合 GB/T 6682—2008 规定的二级水,所用化学试剂均为分析纯。

5.2.2 DEPC 水:按照附录 B 中 B.1 制备,推荐使用商品化 DEPC 处理的无 DNA 酶和 RNA 酶的水。

5.2.3 0.01 mol/L PBS(pH 7.6),配方见 B.2。

5.2.4 DHPLC 缓冲液,配方 B.3。

5.2.5 75%乙醇,配方见 B.4。

5.2.6 dNTP:dATP、dTTP、dCTP 和 dGTP。

5.2.7 pfu 聚合酶。

5.2.8 酚/氯仿/异戊醇混合液。

5.2.9 10%SDS:配制方法见 B.7。

6 引物与探针序列

上游引物(CN-F)5'-GTG TTC ATT GAG GAC ATC-3'

下游引物(CN-R)5'-CCG TGA GAC ACA TAC TTG-3'

采用无 DNA 酶、无 RNA 酶水将每条引物配制成 100 $\mu\text{mol/L}$ 储存液,置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存;使用时取适量配制成 10 $\mu\text{mol/L}$ 工作液,避免多次冻融。PCR 扩增的片段卡度大约为 176 bp(参见附录 C)。

7 样品采集、保存及运输

采集牛的抗凝血,冷藏储存与运输。

8 DNA 提取

8.1 将血液样品 200 μL ,加入 2 mL 塑料离心管中,加 20 μL 蛋白酶 K,再加 10% SDS 20 μL ,混匀。

8.2 混合液置于 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 2.5 h。

8.3 向匀浆液中按 1:1 比例加酚/三氯甲烷/异戊醇混合液(25:24:1),轻轻震荡 5 min 后 12 000 r/min 离心 5 min。

8.4 吸上层水相 400 μL 于一灭菌塑料离心管中,再次加入等体积酚/三氯甲烷/异戊醇混合液,轻轻震荡混匀 5 min,12 000 r/min 离心 5 min。

8.5 吸上层水相 500 μL 于一塑料离心管中,加入两倍体积的无水乙醇, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 2 h;12 000 r/min 离心 5 min,倾去上清液。

8.6 向 DNA 沉淀中加入 75%乙醇溶液 500 μL ,轻轻混匀后 12 000 r/min 离心 5 min,倾去上清液,室温凉干。

8.7 向 DNA 沉淀中加 100 μL TE 缓冲液,溶解沉淀 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

注:DNA 提取也可以采用等效组织 DNA 提取试剂盒,按照说明书进行。

9 PCR 扩增

采用 50 μL 反应体系,分别取 5 μL 基因组 DNA 作为模板,依次加入 $10\times$ Reaction Buffer 5 μL ,

d NTP 4 μL ,上下游引物各 1 μL ,pfu 聚合酶 2.5 μL ,加无菌双蒸水至 50 μL 。扩增循环条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,退火温度为 57 $^{\circ}\text{C}$ 进行 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,进行 35 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

10 异源双链的形成

分别取纯合型、野生型的 PCR 产物各 5 μL 以 1:1 的比例混匀,制备成杂合子模型。将制备好的杂合子模型置于 PCR 仪中在 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min,然后以 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率缓慢降温到 4 $^{\circ}\text{C}$,保存 15 min。制备的杂合子模型,在变性缓慢复性的过程中就会形成异源双链以及同源双链,如果不及时用于 DHPLC 分析,可先置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

11 DHPLC 分析

11.1 将扩增的野生型的 PCR 产物序列,导入 WAVE Navigator software 的 DNA 界面进行分析,对序列的描述为突变,填写和选择序列的突变类型、突变检测的方式。在 DNA 界面的 method 选项处设置温度 64.5 $^{\circ}\text{C}$ 建立 CN-DHPLC 分析方法。

11.2 设置最佳流动相,其中 A 液为 55.7% 和 B 液为 44.3%。取 8 μL 变性缓慢复性后的 PCR 产物放置在 DHPLC 金属板的微孔直接用于结果的分析。

12 设立对照

检测过程中应分别设 CN 野生型(C/C 型)、CN 杂合子(C/T 型)作为分型对照。

13 结果及判定

13.1 质控标准

阴性对照:无特异吸收峰出现;

CN 野生型(C/C 型)阳性对照:单一峰形;

CN 杂合子(C/T 型)阳性对照:有肩峰且比野生型多出 1 个~2 个峰形;

CN 野生型(C/C 型)和 CN 杂合子(C/T 型)阳性对照不出现上述的色谱峰视为实验无效。

13.2 结果判定

当 DHPLC 分析色谱图中仅单一峰则判断为 CN 野生型(C/C 型)阳性。

当 DHPLC 分析的色谱图中,与野生型色谱图进行鉴别比较,出现峰个数和峰的对称性改变则判断为 CN 杂合子(C/T 型)阳性。

当 DHPLC 分析的色谱图中,吸收峰值小于 2 mV 时,建议对样品重做。重做结果的峰吸收值仍小于 2 mV 则判为阴性,应重新采集样品进行检测。

附 录 A
(资料性附录)
牛瓜氨酸血症概述

瓜氨酸血症(Citrullinemia, CN)又称精氨酸琥珀酸合成酶缺失症(Bovine argininosuccinate synthetase deficiency),该病最早于 1986 年在澳大利亚的荷斯坦牛群中发现。

CN 的遗传学基础是奶牛第 11 号染色体的编码精氨酸合成酶的 ASS 基因第 5 外显子的第 86 号氨基酸发生单碱基突变(C→T),第 86 位氨基酸突变为终止密码子,从而其翻译产物精氨酸琥珀酸合成酶变成了截短了的 85 个氨基酸的短蛋白(正常为 412 个氨基酸)而失去活性。同时,ASS 基因也丧失了 Ava II 酶切位点。

瓜氨酸血症是使得荷斯坦奶牛尿循环发生代谢紊乱的一种常染色体单基因隐性遗传缺陷病。病牛体内由于缺乏尿素代谢过程中的关键酶精氨酸琥珀酸合成酶,导致瓜氨酸不能转变为精氨酸琥珀酸而大量积蓄于组织及血液中,引起机体内尿代谢紊乱。这一代谢紊乱的发生使体内代谢生成的瓜氨酸前体氨无法转变为尿素排出体外,从而使对机体有毒的氨大量积蓄于组织及血液中,引起机体发病。

患牛的临床症状表现为:底物瓜氨酸在体液和组织中贮积,造成高氨血症、高瓜氨酸血症、低精氨酸血症,脑实质尤其是大脑皮质充血和水肿,神经元变性、坏死以及脂肪肝等损害。由于母体可以排出胎儿代谢产生的氨,发病个体在胎儿期间或刚出生时表现正常,但出生后不久便表现出一系列临床症状,如精神沉郁、步态紊乱、抽搐、惊厥、失明、虚脱等。

CN 野生型(C/C 型):正常牛基因型。

CN 杂合型(C/T 型):CN 基因携带者杂合子。

附 录 B
(资料性附录)
DHPLC 所用试剂的配方

B.1 DEPC 处理的灭菌双蒸水配制

灭菌双蒸水 100 mL,加入 DEPC 50 μ L,室温过夜,121 $^{\circ}$ C 高压 15 min,分装到 1.5 mL 的无 RNA 酶的 1.5 mL 离心管中。

B.2 0.01 mol/LPBS (pH 7.6)

先配制 A 液、B 液。

A 液(0.2 mol/L NaH_2PO_4 溶液):称取一水合磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)27.6 g,或二水合磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)31.2 g,溶于蒸馏水中,定容至 1 L。

B 液(0.2 mol/L Na_2HPO_4 溶液):称取十二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)71.6 g,或二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)35.6 g,溶于蒸馏水中,定容至 1 L。

称取 17 g 氯化钠,用适量蒸馏水溶解,量取 13 mL A 液和 87 mL B 液,混合,用蒸馏水定容至 2 L。

B.3 DHPLC 缓冲液

A 液:50 mL TEAA 和 250 μ L 乙腈混合,加双蒸水定容至 1 000 mL;

B 液:50 mL TEAA 和 250 mL 乙腈混合,加双蒸水定容至 1 000 mL;

D 液:750 mL 乙腈和 250 mL 双蒸水混合。

B.4 75%乙醇

量取无水酒精 75 mL,RNase Free dH_2O 25 mL,混匀,室温保存。

B.5 10 \times TAE 缓冲液

用水溶解 10 \times Tris-Acetate-EDTA Buffer(TAE)的干粉试剂。

Tris 48.4 g

冰乙酸 11.4 g

0.5 mol/L EDTA 20 mL 或 EDTA 3.72 g

加灭菌双蒸水或去离子水定容至 1 L。使用时,用蒸馏水稀释 10 倍即为 1 \times TAE 电泳缓冲液。

B.6 2%琼脂糖凝胶

称取琼脂糖 2 g,加入 1 \times TAE 缓冲液 100 mL,煮沸,等不烫手时,加入 Goldview 或其他核酸染料 5 μ L,放置凝固备用。

B.7 10%SDS

称取 100 g SDS 慢慢转移到约含 0.9 L 水的烧杯中,用磁力搅拌器搅拌直至完全溶解。用水定容至 1 L。

附 录 C
(资料性附录)

牛瓜氨酸血症 PCR-DHPLC 方法扩增序列

GTGTTTCATTGAGGACATC AGCAAGGAGTTTGTGGAGGAGTTCATCTGGCCGGCC
ATCCAGTCCAGCGCACTGTACGAGGACC/TGATACCTCCTGGGCACCTCTCTCGCCAG-
GCCCTGCATCGCCCGCAAGCAGGTGGAGATCGCCCAGCGAGAAGGAGC CAAGTATGTGTCTCACGG

阴影部分为引物序列。
