



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4822—2017

牛尿苷酸合酶缺乏症 荧光定量 PCR 检测方法

Detection method of deficiency of uridine monophosphate synthase by RT-PCR

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：李红权、孙良娟、张娜、刘中勇、谢艳辉、吴晓薇、李家侨、周广彪、朱事康、朱道中、马保华、刘志玲、林志雄、鱼海琼。

牛尿苷酸合酶缺乏症 荧光定量 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了牛尿苷酸合酶缺乏症荧光定量 PCR 检测的操作方法。
本标准适用于牛尿苷酸合酶缺乏症(参见附录 A)的监测、诊断和鉴定。

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 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。

Ct 值	每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数(cycle threshold)
DUMPS	尿苷酸合酶缺乏症(deficiency of uridine monophosphate synthase)
RT-PCR	实时荧光定量 PCR(realtime fluorescence quantitative PCR)
SNP	单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism)

4 试剂和与材料

- 4.1 苯酚(C₆H₆O)。
- 4.2 三氯甲烷(CHCl₃)。
- 4.3 异戊醇[(CH₃)₂CHCH₂CH₂OH]。
- 4.4 苯酚-三氯甲烷-异戊醇:饱和过的重蒸酚:三氯甲烷:异戊醇按 25:24:1 的比例混合。
- 4.5 蛋白酶 K 裂解液(10 mg/mL):将 100 mg 蛋白酶 K 溶解于 10 mL 灭菌蒸馏水中,保存在-20 ℃待用,避免反复冻融。
- 4.6 SDS 溶液:用 900 mL 水溶解 200 g 电泳级 SDS,加热至 68 ℃助溶,加浓盐酸调节 pH 值至 7.2,加水定容到 1 000 mL,室温保存。
- 4.7 DNA 提取纯化试剂盒。
- 4.8 荧光定量 PCR 试剂盒(Realtime PCR Master Mix),购于试剂公司或其他等效试剂盒。
- 4.9 灭菌 ddH₂O。
- 4.10 引物和探针(浓度均为 10 μmol/L)。
 - Fl: 5'-ttctgaatttgattggttttat-3'
 - Rl:5'-cctcctgcttetaactgaactc-3'
 - probe-W:5'-VIC-ctggctcCgagtaagca-BHQ-3'
 - probe-M:5'-FAM-ctggctcTgagtaagca-BHQ-3'

5 仪器与设备

- 5.1 荧光定量 PCR 仪。
- 5.2 高速台式冷冻离心机(离心速度 12 000 r/min 以上)。
- 5.3 普通台式离心机(离心速度 3 000 r/min)。
- 5.4 1.5 mL Eppendorf 管。
- 5.5 微量移液器(0.5 μ L~10 μ L、5 μ L~20 μ L、0 μ L~200 μ L、100 μ L~1 000 μ L)。
- 5.6 肝素钠抗凝管。
- 5.7 生物安全柜。
- 5.8 冰箱: 4 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C, -20 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C。

6 操作方法

6.1 样品采集和基因组的提取

6.1.1 血液采集

采用 5 mL 真空肝素钠抗凝管,采集到血液后摇匀,使血液和抗凝剂混合均匀,以防血凝块的形成。

6.1.2 质控设置

阴性对照:以不含 DUMPS 基因的正常牛血样本 DNA 模板为阴性对照。

阳性对照:以含有目的基因序列的牛血 DNA 为 PCR 反应的模板,或采用含有目的基因的质粒为阳性对照。

空白对照:包含除了测试样品 DNA 模板以外所有的反应试剂,在 PCR 反应体系中用相同体积的灭菌 ddH₂O 代替模板 DNA。

6.2 DNA 模板的提取

6.2.1 酚-三氯甲烷-异戊醇法

取采集的血液 100 μ L,加入 400 μ L 的 0.01 mol/L 的 PBS(见附录 B),然后加入蛋白酶 K 至终浓度 100 μ g/mL 和 20%SDS 至终浓度 10 g/L,55 $^{\circ}$ C 水浴 2 h,用苯酚、苯酚-三氯甲烷-异戊醇混合液(体积比为 25 : 24 : 1)、三氯甲烷各抽提 1 次,吸取上层水相,加入 1/10 体积 3 mol/L 的醋酸钠和 2.5 倍体积的无水乙醇,轻轻混匀后置 -20 $^{\circ}$ C 沉淀 1 h,4 $^{\circ}$ C 条件下 12 000 r/min 离心 15 min,弃掉上清液,沉淀挥干后溶解于灭菌 ddH₂O 中,4 $^{\circ}$ C 保存备用。

6.2.2 等效核酸提取法

市场提供的符合相应质量要求的试剂盒和仪器以及配套的试剂均可用于本标准中样品核酸的提取,提取步骤按照产品提供的操作程序进行。

6.3 荧光定量 PCR 反应

6.3.1 荧光定量 PCR 反应体系配制

荧光定量 PCR 反应体系(30 μ L)见表 1,每个样品设置 2 个平行。

表 1 实时荧光 PCR 反应体系

成分	体积/ μ L
2× Mix buffer	15
上游引物(F)	0.5
下游引物(R)	0.5
探针	1+1
模板 DNA	1
ddH ₂ O	11

6.3.2 荧光定量 PCR 扩增

将加样后的 PCR 管放入荧光 PCR 检测仪内,记录样本摆放顺序。
第一阶段,预变性 94 ℃ 3 min;
第二阶段,扩增 94 ℃/30 s,55 ℃/30 s,72 ℃/30 s,40 个循环。
Report Dye 设置为 FAM 和 VIC,Quench Dye 都设定为 BHQ,Reference Dye 设定为 None。
荧光收集设置在第二阶段每次循环的退火延伸时进行。试验检测结束后,根据收集的荧光曲线和 Ct 值判定结果。

7 结果判定

7.1 结果分析条件设定

直接读取检测结果。阈值设定原则根据仪器的噪声情况进行调整,以阈值线刚好超过正常阴性对照样品扩增曲线的最高点为准。具体根据仪器的噪音情况进行调整,选择 FAM 和 VIC 通道进行分析。

7.2 质控标准

选择 FAM 和 VIC 通道进行分析,对照样品有对数扩增曲线,而且 Ct 值 ≤ 30 ,并且出现典型的扩增曲线。野生型对照出现一条扩增曲线,为 VIC 的典型扩增曲线;突变型质粒(T/T 型)对照出现一条扩增曲线,为 FAM 的典型扩增曲线;杂合型对照出现两条典型扩增曲线,为 FAM 和 VIC 的扩增曲线;阴性对照不出现扩增曲线,不符合上述对照质控标准的结果视为无效。

7.3 样品结果判定

若检测样品出现一条 VIC 探针扩增曲线,Ct 值 ≤ 30 ,并且出现特定的扩增曲线,则判定样品为 DUMPS 的野生型,被检测的牛为正常个体。
若检测样品出现一条 FAM 探针扩增曲线,Ct 值 ≤ 30 ,并且出现特定的扩增曲线,则判定样品为 DUMPS 突变型,被检测的牛为纯合子个体。
若检测样品两个探针出现两条扩增曲线,为 FAM 探针和 VIC 探针扩增曲线,Ct 值 ≤ 30 ,并且出现特定的扩增曲线,则判定样品为 DUMPS 的杂合子,是 DUMPS 疾病的携带者。
若待检样品扩增曲线 Ct 值介于 30 和 35 之间时,应重新进行实时荧光 PCR 检测。若重新检测的 Ct 值 ≥ 35 时,则判断探针扩增阴性。若重新检测的 Ct 值仍介于 30 和 35 之间,则判断探针扩增阳性,再依据不同探针进行 DUMPS 野生型和突变型区分。

附 录 A
(资料性附录)
疾 病 概 述

尿苷酸合酶综合症(DUMPS)是荷斯坦奶牛群中较常见的一种常染色体单基因突变的隐形遗传疾病,可导致隐形纯合的后代胚胎早期死亡,病因是由于牛 1 号染色体(BTA1)上的 DUMPS 基因 C-末端密码子 405 处存在着一个 C→T 点突变造成的隐性缺陷遗传病。利用新型荧光定量 PCR 检测 SNP 的技术,PCR 扩增时,在加入一对引物的同时加入一条特异性的荧光探针,该探针为一寡核苷酸,两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团。探针完整时,报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收;PCR 扩增时,Taq 酶 5'-3'端外切酶活性将探针酶切降解,使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离,从而荧光监测系统可接收到荧光信号,即每扩增一条 DNA 链,就有一个荧光分子形成,实现了荧光信号的累积与 PCR 产物形成的完全同步。进行 SNP(single nucleotide polymorphism)检测时,针对 SNP 位点不同的碱基序列设计不同的 Taqman 探针,在扩增过程中,只有与靶序列完全匹配的探针才能被切割,释放荧光信号。依据隐性缺陷遗传病 C→T 点突变序列分别设计两个探针,标记不同的荧光吸收信号,随着 PCR 反应的扩增,PCR 产物和荧光信号的增长呈现出正向对应关系。

附 录 B
(规范性附录)
试 剂 配 制

磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)配方

以下所用试剂均为分析纯,试验用水应符合 GB/T 6682 要求。

A 液(0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液):

磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)27.6 g,溶于蒸馏水中,最后稀释至 1 000 mL。

B 液(0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液):

磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)53.6 g(或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.6 g 或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 35.6 g),加蒸馏水溶解,最后稀释至 1 000 mL。

0.01 mol/L、pH 7.2 磷酸盐缓冲生理盐水的配制:

0.2 mol/L A 液 14 mL

0.2 mol/L B 液 36 mL

氯化钠(NaCl) 8.5 g

用蒸馏水稀释至 1 000 mL。