



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4823—2017

## 牛凝血因子Ⅺ缺失症巢式 PCR 检测方法

Detection method for bovine factor Ⅺ deficiency by nested 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。

请注意本文件的某些内容有可能涉及专利。本文件的发布机构不应承担识别这些专利的责任。

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：马保华、刘中勇、李贺、贾广乐、吴晓薇、邱索平、朱事康、朱道中、刘志玲、林志雄。

# 牛凝血因子Ⅺ缺失症巢式 PCR 检测方法

## 1 范围

本标准规定了牛凝血因子Ⅺ缺失症的巢式 PCR 检测方法。  
本标准适用于牛凝血因子Ⅺ缺失症(参见附录 A)的筛查。

## 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 18088 出入境动物检疫采样

## 3 缩略语

以下缩略语适用于本文件。

- FXID 凝血因子Ⅺ缺失症(Factor Ⅺ deficiency)
- nPCR 巢式聚合酶链式反应(Nested polymerase chain reaction)
- ACD 酸性柠檬酸葡萄糖溶液
- PBS 磷酸盐缓冲液
- DNA 脱氧核糖核酸
- dNTP 脱氧核糖核苷三磷酸
- TAE 核酸电泳缓冲液

## 4 试剂

- 4.1 ACD(配制见附录 B)。
- 4.2 蛋白酶 K。
- 4.3 10%SDS。
- 4.4 酚:三氯甲烷:异戊醇(25 : 24 : 1)混合液。
- 4.5 无水乙醇。
- 4.6 Tris 饱和酚。
- 4.7 75%乙醇。
- 4.8 TE 缓冲液。
- 4.9 Pfu DNA Polymerase 酶或 Taq DNA 聚合酶。
- 4.10 PCR Buffer。
- 4.11 dNTP。
- 4.12 2%的琼脂糖溶液。
- 4.13 DNA 分子量标记物(Marker)。



5 仪器与设备

- 5.1 高速离心机。
- 5.2 恒温水浴锅:保持水温 37℃±1℃。
- 5.3 微量移液器:1 μL~10 μL,10 μL~100 μL,20 μL~200 μL,100 μL~1 000 μL。
- 5.4 振荡器。
- 5.5 pH 计。
- 5.6 PCR 仪。
- 5.7 电泳仪。
- 5.8 凝胶成像仪或紫外透射仪。

6 样品采集、处理、核酸提取

6.1 样品采集与预处理

按照 GB/T 18088 进行。采血 500 μL,采集的血样立即与 ACD 混和均匀,冷藏运输与保存。若血样很快(一个月之内)提取 DNA,可将其放于-20℃保存,如果长期保存,可将其放在-80℃。样品避免反复冻融。

6.2 核酸提取

- 6.2.1 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 SDS 至终浓度为 1%,上下颠倒混匀。
- 6.2.2 混合液置于 55℃,水浴 2.5 h。
- 6.2.3 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),轻轻震荡混匀 5 min,12 000 r/min 离心 5 min。
- 6.2.4 吸上层水相 800 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。
- 6.2.5 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℃放置 2 h 或液氮中放置 5 min;12 000 r/min 离心 5 min,沉淀 DNA,倾去上清液。
- 6.2.6 向沉淀中加入 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。
- 6.2.7 向 DNA 沉淀中加 100 μL TE 缓冲液,溶解沉淀-20℃保存备用。

注:DNA 提取也可采用等效组织 DNA 提取试剂盒,按照说明书进行。

7 巢式 PCR

7.1 巢式 PCR 扩增引物

- P1:5'-GTG TTG AAG GGT GGA AAA AGT ATT CAT TG-3'
- P2:5'-CTT TGC AGC CCT TCT CCC TTT TTA ATG-3'
- P3:5'-GTC GAG TCA CCT AAT GTG TTG-3'
- P4:5'-CCG TAC CTG TGT AAT TCA TTG TC-3'

引物储存浓度 10 μmol/L,使用时终浓度为 0.2 μmol/L。外部引物对(P1、P2)扩增产物长度为 540 bp(616 bp);内部引物对(P3、P4)扩增产物长度为 181 bp(257 bp)。

7.2 对照设立

从样品处理开始,应设置 FXID 野生型对照、FXID 突变型对照和空白对照。



空白对照:在扩增反应阶段设置,以灭菌双蒸水作为模板设置空白对照。

7.3 反应体系

采用 25  $\mu\text{L}$  反应体系,按照表 1 配制。

表 1

引物(浓度为 10 pmol/L)	上下游引物各 0.5 $\mu\text{L}$
10 $\times$ Pfu Buffer	2.5 $\mu\text{L}$
dNTP Mixture(2.5 mmol/L)	2 $\mu\text{L}$
Pfu DNA Polymerase 酶或 Taq DNA 聚合酶(2.5 U/ $\mu\text{L}$ )	0.25 $\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O	18.25 $\mu\text{L}$
模板 DNA	1 $\mu\text{L}$

可采用其他等效商品化 PCR 反应试剂,PCR 缓冲液、Taq 酶等用量按照试剂说明书使用。

7.4 初始 PCR

将 PCR 管放入 PCR 仪,反应条件设定:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,66  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,68  $^{\circ}\text{C}$  延伸 20 s,30 个循环;68  $^{\circ}\text{C}$  10 min。

7.5 巢式 PCR 扩增

以第一次 PCR 产物稀释 100 倍作为第二次 PCR 反应的模板。

将 PCR 管放入 PCR 仪,反应条件设定:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,58.8  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,67  $^{\circ}\text{C}$  延伸 15 s,30 个循环;67  $^{\circ}\text{C}$  10 min。

7.6 电泳检测

使用 2% 琼脂糖凝胶,采用 Goldview 或其他等效核酸染料。设 DNA Marker,5 V/cm $\sim$ 8 V/cm,电泳 1 h,用凝胶成像系统仪或紫外透射仪观察,拍照记录检测结果。

8 结果分析与判定

8.1 对照结果

阴性对照未出现预期大小的扩增条带;空白对照未出现预期大小的扩增条带;阳性对照出现预期大小的扩增条带。以上指标有一项不符合,本次实验无效,需要重做。

8.2 检测结果判定

套式 PCR 后,若只得到 181 bp 左右的条带,则可判断为检测结果阴性,样品不是 FXID 携带者。

若只得到 257 bp 左右的条带,则可判断为 FXID 突变型;若得到 257 bp 和 181 bp 左右的两条带,则可判断为 FXID 杂合型;这两种结果都表明样品是 FXID 携带者。

8.3 巢式 PCR 检测结果的确证

可对巢式 PCR 扩增产物进行测序确证。因突变型序列的 76 bp 插入的核苷酸序列主要由腺嘌呤(A)构成,测序信号较易发生中断,采用 P3、P4 两条引物同时测序,对结果进行拼接,对测序结果运用计算机软件进行分析。将所测得的序列与标准序列(参见附录 C)进行比较,序列吻合(扩增区全序列比对同源性达 95%以上)表明确证为阳性。



附 录 A  
(资料性附录)  
牛凝血因子Ⅺ缺失症

凝血因子Ⅺ是一种丝氨酸蛋白酶原,在肝脏中合成,主要参与内源性凝血途径,凝血因子Ⅺ的缺乏造成凝血障碍。1969年,Kociba等首次报道了美国两例荷斯坦母牛凝血因子Ⅺ缺乏症病例。此后,在多国相继发现荷斯坦奶牛凝血因子Ⅺ缺乏症病例。FXID遗传学基础是由于位于第27号染色体的凝血因子Ⅺ外显子12上发生的一段76 bp序列插入[AT(A)28TAAAG(A)26GGAAATAATAATTCA]所致(Marron et al,2004)。这段插入的核苷酸序列主要由腺嘌呤构成,因此编码区位置形成了强终止子,阻碍了基因表达,从而不能合成具有完整序列的蛋白质,影响凝血酶原激酶的合成,导致凝血因子Ⅺ的活性降低。奶牛凝血因子Ⅺ缺乏症没有明显的症状,部分个体表现为凝血时间延长、牛奶中带血和贫血等。部分患牛的繁殖性能异常,如屡配不孕、发情周期不稳定、卵泡直径小、排卵前血液中雌激素含量峰值降低、卵泡发育不完善和黄体溶解缓慢等。由于患牛抗病力下降,易患乳房炎、子宫炎和肺炎等,嗜中性粒细胞增多,产犊率和犊牛存活率降低,导致严重的经济损失。

附 录 B  
(规范性附录)  
溶液的配制

B.1 ACD(酸性柠檬酸葡萄糖溶液)

柠檬酸 0.48 g,柠檬酸钠 1.32 g,葡萄糖 1.47 g,加水至 100 mL,灭菌后 4 ℃ 保存备用。每 6 mL 新鲜血中加入 1 mL ACD 抗凝剂。

B.2 蛋白酶 K(20 mg/mL)

2 g 蛋白酶 K 加入 100 mL 灭菌超纯水,1 mL 分装,-20 ℃ 保存。

B.3 10% SDS(10%十二烷基磺酸钠)

称取 SDS(电泳级纯)2 g,加超纯水 20 mL,加热至 68 ℃ 助溶,加几滴 HCl 将 pH 值调至 7.2。

B.4 酚 : 三氯甲烷 : 异戊醇(25 : 24 : 1)

苯酚 100 mL;三氯甲烷 96 mL;异戊醇 4 mL。

B.5 1 mol/L Tris-HCl 缓冲液

在 800 mL 水中溶解 121.1 g Tris 碱,加入浓 HCl 调节 pH 值至 8.0,加超纯水定容至 1 000 mL,分装后高压灭菌。

B.6 0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)

称取乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na · 2H<sub>2</sub>O)18.61 g,NaOH 约 2 g,加水至 80 mL,在磁力搅拌器上剧烈搅拌,完全溶解后定容至 100 mL,高压灭菌。

B.7 TE 缓冲溶液(Tris-EDTA buffer solution)

量取下列溶液于 500 mL 烧杯中:1 mol/L Tris-HCl Buffer(pH 8.0)5 mL,0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)1 mL,向烧杯中加入约 400 mL ddH<sub>2</sub>O 均匀混合;将溶液定容到 500 mL 后,高温高压灭菌;室温保存。

B.8 50×TAE 缓冲液(pH 8.5)

Tris 碱	242 g
冰醋酸	57.1 mL

0.5 mol/L 的 EDTA(pH 8.0) 100 mL

**B.9 1×TAE 缓冲液(pH 8.5)**

取 20 mL 的 50×TAE 缓冲液(pH 8.5),加灭菌双蒸水或去离子水定容至 1 000 mL。

**B.10 2%琼脂糖凝胶溶液**

称取琼脂糖 2 g、10×TAE 20 mL、Goldview 5  $\mu$ L 和超纯水 100 mL(注意:所配制的琼脂糖凝胶溶液中的缓冲液应与电泳缓冲液的浓度一致)。



附 录 C  
(资料性附录)  
Factor XI 部分序列

C.1 FXI 部分序列,初始 PCR 扩增 540 bp 或 616 bp(Factor XI 缺失症),红色标注为插入序列。

1 GTGTTGAAGG GTGGAAAAAG TATTCATTGA TGTTTTTTGTG TTTAATATAA  
51 GGTAATGAT AGCCCAGGAC CTTCCATAAA AGAGGACTAT GTGACTGAAA  
101 AATCTTAGCA GAAAATCACT TCTTTCCACC TAAAAGCCCC CCACTGGCTA  
151 GGAATCATTA GTTAAATAGC ACTGTATCTC AAAAGGTTGG GAATTACTTG  
201 CTAACGGAAT TCTCTTTTCC TCTCTTGCTT ACTCCTTAGG GTCAAGTCAC  
251 CTAATGTGTT GCGTGTCTAT AGCGGCATTT TGAATCAATC AGAAATAAAA  
301 GAGGATACAT CTTTCTTTGG GGTTC AAGAA ATAATAATTC A(AT(A)28  
372 TAAAG(A)26GGAAATAATAATTCA)TGATCAATA TGAAAAGGCA GAAAGTGGAT  
446 ATGACATTGC CTTGTTGAAA CTAGAAACGG CAATGAATTA TACAGGTACG  
496 GGAAACTTTA AACAGAACGT TGTCTACAGT GATGCCGGGC TTCACACTCC  
546 CAGGTTCCTG GCCTGACCTG GCAGTCCCTC CATGTATTAC TGTCATTAAA  
596 AAGGGAGAA GGGCTGCAAAG

C.2 FXI 部分序列,套式 PCR 扩增 181 bp 或 257 bp(Factor XI 缺失症),红色标注为插入序列。

1 GTCAAGTCAC CTAATGTGTT GCGTGTCTAT AGCGGCATTT TGAATCAATC  
51 AGAAATAAAA GAGGATACAT CTTTCTTTGG GGTTC AAGAA ATAATAATTC  
101 A(AT(A)28TAAAG(A)26GGAAATAATAATTCA)TGATCAATA TGAAAAGGCA  
197 GAAAGTGGAT ATGACATTGC CTTGTTGAAA CTAGAAACGG CAATGAATTA  
247 TACGGGTACGG

---