



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3586—2013

---

## 羊痒病抗性基因型检测方法

Quarantine protocol for scrapie resistance gene genotyping

2013-08-30 发布

2014-03-01 实施

---

中 华 人 民 共 和 国  
国家质量监督检验检疫总局 发 布

## 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：中华人民共和国天津出入境检验检疫局、中华人民共和国烟台出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：董志珍、肖妍、栾慎顺、陈本龙、方绍庆。

# 羊痒病抗性基因型检测方法

## 1 范围

本标准规定了羊痒病抗性基因型检测方法。

本标准适用于绵羊血液样本的羊痒病朊蛋白编码基因的分型。

## 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。

PRNP:1 朊蛋白编码基因(prion protein)

Real-Time PCR:Real-Time Polymerase Chain Reaction 实时荧光定量 PCR

DNA:deoxyribonucleic acid 脱氧核糖核酸

EDTA 二钾盐: $C_{10}H_{14}K_2N_2O_8 \cdot 2H_2O$  乙二胺四乙酸二钾盐

## 4 试验原理

羊痒病概述参见附录 A。

引起羊痒病的病原朊蛋白是一种正常的唾液酸糖蛋白(PrP<sup>c</sup>)在二级结构发生改变后形成的异常蛋白(PrP<sup>sc</sup>)。该病的发生与绵羊朊蛋白编码基因 PRNP 遗传多样性密切相关,主要表现在 PRNP 第 136、154 和 171 位密码子组成的 PRNP 基因型与绵羊对痒病的抗病性的联系。根据 GenBank 报道的 PRNP 序列,设计合成了 3 套特异性的引物和 Taqman 探针,借助实时荧光定量 PCR 检测体系及其之后的终点读板模式,对 PRNP 的第 136、154 和 171 位密码子进行检测,用来判定被检测羊是否含有传染性羊痒病抗性基因。

## 5 试验材料

### 5.1 试剂

5.1.1 各型绵羊 PRNP 标准品:136 纯合子、154 纯合子、171-1 纯合子、171-2 纯合子。

5.1.2 基因扩增预混液:Taqman Universal PCR MasterMix 或其他基因扩增预混液。

5.1.3 基因组 DNA 提取试剂盒。

5.1.4 50 mg/mL 的 EDTA。

5.1.5 双蒸水。符合 GB/T 6682 的要求。

5.1.6 注射用水。

5.1.7 检测引物和探针,见表 1。

表 1 检测引物和探针

类别	引物和探针序列
136 位密码子检测用	上游引物:136-1;5'-CTGCAGCTGGAGCAGTGGTA-3'
	下游引物:136-2;5'-ACTTGTTGGGGTAACGGTAC-3'
	A 型检测探针:136-A;5'-FAM-TCATGGCACTTCC-MGB-3'
	V 型检测探针 136-A;5'-VIC-CTCATGACACTTCC-MGB-3'
154 位密码子检测用	上游引物:154-1;5'-GGCAATGACTATGAGGACCG-3'
	下游引物:154-2;5'-GCACAAAGTTGTTCTGGTTAC-3'
	R 型检测探针:154-R;5'-FAM-ACTATCGTGAAAACAT-MGB-3'
	H 型检测探针:154-H;5'-VIC-TACTATCATGAAAACATG-MGB-3'
171 位密码子检测用	上游引物:171-1;5'-CCCAACCAAGTGTAAC-3'
	下游引物:171-2;5'-TGACTGTGTGTTGCTTGACTG-3'
	R 型检测探针:171-R;5'-FAM-CCAGTGGATCGGTATA-MGB-3'
	H 型检测探针:171-H;5'-VIC-ACCAGTGGATCATTAT-MGB-3'
	Q 型检测探针:171-Q;5'-VIC-ACCAGTGGATCAGTATA-MGB-3'

5.2 仪器和耗材

- 5.2.1 实时荧光定量 PCR 仪。
- 5.2.2 高速台式冷冻离心机。
- 5.2.3 恒温水浴锅。
- 5.2.4 生物安全柜。
- 5.2.5 涡旋振荡器。
- 5.2.6 微量可调移液器及配套带滤芯吸头。
- 5.2.7 冰箱(2℃~8℃,-20℃,-70℃三种)。
- 5.2.8 荧光 PCR 管(板)及管盖(封口膜)。
- 5.2.9 1.5 mL Eppendorf 管。
- 5.2.10 10 mL 真空灭菌采血管。

6 操作方法

6.1 样品采集

使用含有 2 mg/mL 注入 EDTA 抗凝剂的采血管,颈静脉采绵羊血 2 mL~5 mL,密封后贴上标签,于保温箱中加冰、密封后以最快的方式运送到实验室。采集的样品在 2℃~8℃条件下保存不应超过 24 h;若需长期保存,应放置于-70℃冰箱,冻融不超过 3 次。

6.2 绵羊基因组 DNA 的提取

按照 DNA 抽提试剂盒操作说明要求提取基因组 DNA 作为模板。



6.3 荧光定量 PCR 反应体系

在反应混合物配置区进行。以各型绵羊 PRNP 标准品为阳性对照,以水为阴性对照。设  $n$  为被检样品总数,反应体系配制见表 2。并将总样品反应组份涡旋,充分混匀,向每个荧光 PCR 管中各分装 18  $\mu\text{L}$ ,转移至样本处理区。

表 2 荧光定量 PCR 反应体系

成分	贮存液浓度	每个样品反应组分用量/ $\mu\text{L}$	总样本反应组分用量/ $\mu\text{L}$
基因扩增预混液	2×	10	$10 \times (n+2)$
上游引物	10 $\mu\text{mol/L}$	2	$2 \times (n+2)$
下游引物	10 $\mu\text{mol/L}$	2	$2 \times (n+2)$
FAM 标记的探针	10 $\mu\text{mol/L}$	0.5	$0.5 \times (n+2)$
VIC 标记的探针	10 $\mu\text{mol/L}$	0.5	$0.5 \times (n+2)$
双蒸水	—	3	$3 \times (n+2)$
反应体系体积	—	18 $\mu\text{L}$	—

6.4 加样

在样本处理区进行,在各设定的荧光 PCR 管中分别加入 6.2 中制备的 DNA 溶液 2  $\mu\text{L}$ ,反应体系总体积为 20  $\mu\text{L}$ ,盖紧管盖,500 r/min 离心 30 s。

6.5 循环条件设置

样品放入荧光定量 PCR 扩增仪进行检测,其实时荧光定量 PCR 扩增程序如下:50  $^{\circ}\text{C}$  2 min;95  $^{\circ}\text{C}$  10 min;95  $^{\circ}\text{C}$  15 s,60  $^{\circ}\text{C}$  1 min,共 35 个~40 个循环,每个循环延伸末期采集数据。

6.6 终点读板分型程序设置

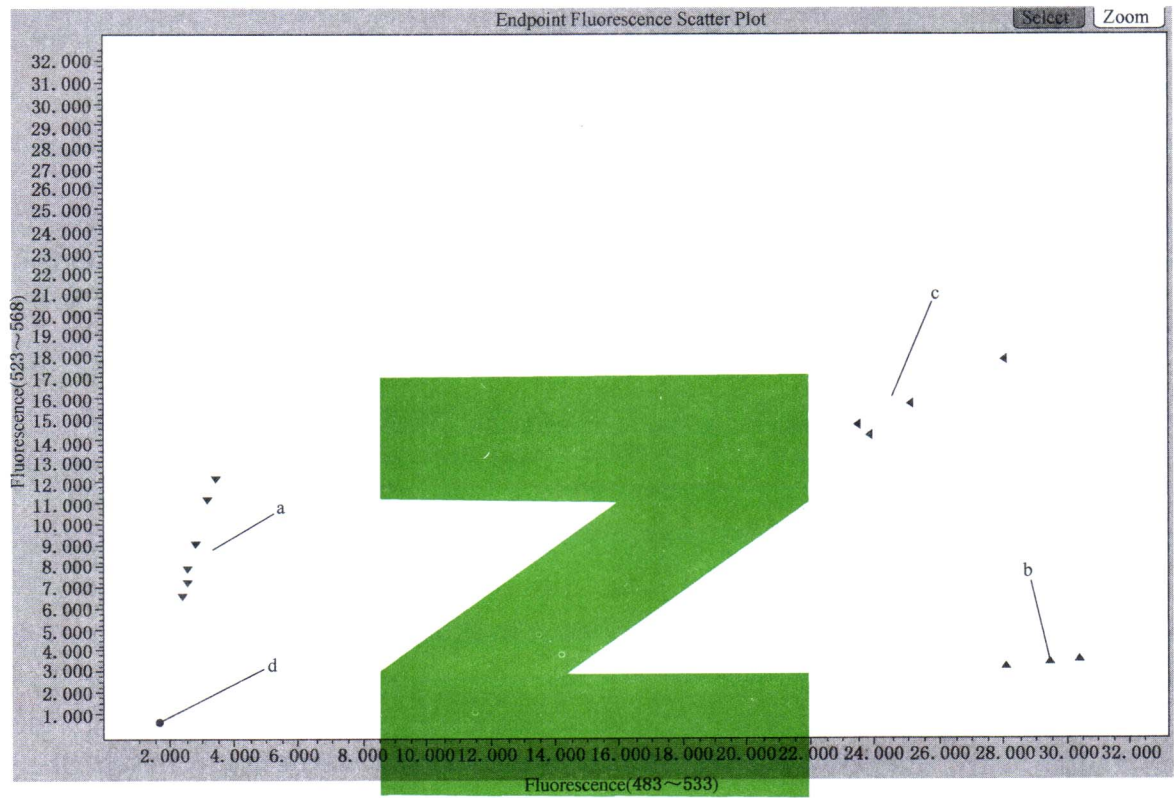
实时荧光定量 PCR 反应结束后立即进行终点读板分型,选择标记探针的两种检测信号 FAM 和 VIC,程序如下:61  $^{\circ}\text{C}$  预热 1 s,60  $^{\circ}\text{C}$  连续读板,同时收集 5 个信号。  
机器将根据记录的数据将两种荧光信号进行比较计算,自动分型。

7 结果描述及判定

7.1 结果描述

荧光定量 PCR 仪采用终点读板基因分型模式(Endpoint Genotyping)检测 483 nm~533 nm 通道(FAM)和 523 nm~568 nm 通道(VIC)的数据,经过计算比较两者的比值,得到基因分型散点图(见图 1)。FAM 标记的纯合子在 483 nm~533nm 通道(FAM)即 X 轴附近聚集(如图 1 中 b 所指点所示),VIC 标记的纯合子在 523 nm~568nm 通道(VIC)即 Y 轴附近聚集(如图 1 中 a 所指点所示),杂合子在中间区域聚集(如图 1 中 c 所指点所示)。

SN/T 3586—2013



说明：  
a——VIC 标记检测物，其对应标准品基因型从上至下依次为 171QQ、136VV、154HH、171HQ、171HQ、171HH；  
b——FAM 标记检测纯合子，其对应标准品基因型从左至右依次为 136AA、154HH、171RR；  
c——杂合子，其对应标准品基因型从上至下依次为 154RH、136VA、171RH、171RQ；  
d——阴性对照。

图 1 各标准品基因分型结果

7.2 样品结果判定

7.2.1 阴性

在 origin 附近聚集，如图 1 中 d 所指点所示。

7.2.2 样品基因型结果判定

样品基因型结果判定见表 3。

表 3 样品基因型结果表

136 位编码的氨基酸	154 位编码的氨基酸	171 位编码的氨基酸	结果
A	R	R	ARR/ARR
A	R	R/H	ARR/ARH
A	R	R/Q	ARR/ARQ
A	H	Q	AHQ/AHQ

表 3 (续)

136 位编码的氨基酸	154 位编码的氨基酸	171 位编码的氨基酸	结果
A	R	Q/H	ARQ/ARH
A	R/H	H/Q	ARH/AHQ
A	R/H	Q	ARQ/AHQ
A	R	Q	ARQ/ARQ
A/V	R	R/Q	ARR/VRQ
A/V	R	Q	ARQ/VRQ
A/V	H/R	Q	AHQ/VRQ
V	R	Q	VRQ/VRQ

注：A 为丙氨酸 Alanine；V 为缬氨酸 Valine；H 为组氨酸 Histidine；R 为精氨酸 Arginine；Q 为谷氨酰胺 Glutamine。

### 7.2.3 基因型抗性情况

基因型抗性情况见表 4。

表 4 绵羊 PrP 基因型与羊痒病发生的危险性

基因型	发生羊痒病的危险
ARR/ARR	对羊痒病最具抗性
ARR/ARQ	对羊痒病具有抗性,但是后代的易感性依赖于其他父母代的基因型
ARR/ARH	
AHQ/AHQ	此基因型的绵羊及后代对羊痒病有较高的危险性
ARQ/ARH	
AHQ/ARH	
ARQ/AHQ	
ARQ/ARQ	对羊痒病易感,但是可以用做筛选 ARR 抗性基因的品种来源,绵羊及其后代对羊痒病的易感性最高
ARR/VRQ	
ARQ/VRQ	
AHQ/VRQ	
VRQ/VRQ	



附 录 A  
(资料性附录)  
羊痒病概述

羊痒病(Scrapie)俗称“瘙痒病”是由痒病朊病毒引起成年绵羊和山羊的一种慢性进行性的、致死性神经系统疾病。其特征为潜伏期长、剧痒、精神委顿、肌肉震颤、运动失调、衰弱、瘫痪和最终死亡。

羊痒病病原是一种无核酸的蛋白质侵染颗粒(即朊病毒),是由宿主神经细胞表面正常的一种唾液酸糖蛋白(PrP<sup>C</sup>)在三维结构发生改变后形成的异常蛋白(PrP<sup>Sc</sup>)。

研究表明,羊痒病的发生与绵羊朊蛋白编码基因 PRNP 遗传多样性密切相关,主要表现在绵羊 PRNP 第 136、154 和 171 位密码子组成的 PRNP 基因型与绵羊对痒病的抗病性相关。在密码子 136、154 和 171 分别编码不同的氨基酸,用代表特定氨基酸的字母来表示,如一只绵羊的 PRNP 基因型表示为 ARQ/AHQ,表示密码子 136 上编码的 2 个氨基酸是丙氨酸,密码子 154 上编码的 2 个氨基酸分别是精氨酸和组氨酸,密码子 171 上编码的 2 个氨基酸都是谷氨酰胺。患有 TSE 的病羊其基因组中的 3 个等位基因发生了突变,即 136 位点上的 A 突变成了 V、154 位点上的 R 基因突变成了 H 基因,171 位点上的 Q 基因突变成了 R 或 H,研究表明野生基因型 ARR/ARR 或 ARR/ARQ 是抗性基因型,具有此基因型的羊基本上不会感染 Scrapie,VRQ/VRQ 基因型绵羊对羊痒病最易感,但不是所有品种的绵羊都有 VRQ 型 PRNP 等位基因,例如萨福克羊,而 ARQ/ARQ、VRQ/ARQ、AHQ/VRH 等其他基因型羊则为敏感型,易患 Scrapie。

根据 GenBank 报道的朊蛋白编码基因(PRNP)序列,设计并合成了可用于单核苷酸多态性(SNP)快速分析的 3 对引物和 7 条分别标记了 FAM 和 VIC 荧光染料的 MGB 探针,建立了本标准,即一种利用荧光定量 PCR 扩增反应对羊痒病抗性基因进行筛选的方法,采用终点读板基因分型模式,得到基因分型散点图,根据散点图即可判定所检样品的基因型。各基因型与羊痒病发生的危险性如表 4 所示。