**农业行业标准《牛蜘蛛腿综合征检测 PCR方法》**

**（公开征求意见稿）编制说明**

一、标准制定背景及任务来源

**（一）标准制定的背景**

牛蜘蛛腿综合征（arachnomelia syndrome，AS）是一种牛先天性骨骼系统畸形的隐性遗传病，由常染色体单基因控制，因患病犊牛外观像蜘蛛而得名（图1）。据报道，AS在西门塔尔牛、瑞士褐牛、意大利褐牛等群体中都发现了患病个体。自2009年开始，中国农业大学动物科技学院分子数量遗传学研究团队就开始对牛蜘蛛腿综合征开展了系列的研究，并取得了阶段性成果。

注：A为褐牛AS患病犊牛，B为西门塔尔牛AS患病犊牛。

**图1 蜘蛛腿综合征患病犊牛**

2010年，据文献报道：在褐牛群体中，AS是由位于牛5号染色体上亚硫酸盐氧化酶（sulfite oxidase，*SUOX*）基因外显子4上363-364 bp之间的1个G碱基插入，即c.363-364insG位点突变所致。2011年，起草组成员焦士会发现我国引入的德系西门塔尔牛冻精中有一头名为ROMEL的AS携带者，并检测到了12头该公牛的携带者女儿；通过深入挖掘，我们明确了AS在西门塔尔牛中的遗传致病机理：AS是由位于牛23号染色体上钼辅因子合成蛋白1（molybdenum cofactor synthesis 1，*MOCS1*）基因外显子11上1224-1225 bp处的CA碱基缺失，即c.1224-1225 del CA位点突变引起的。2012-2013年，起草组针对*SUOX*和*MOCS1*基因中两个AS致因突变位点，建立了稳定的荧光引物PCR扩增及毛细管电泳分型方法，具有准确性高、检测成本低的特点，可满足AS致病位点的高通量检测，并将该研发成果在学术期刊予以公开发表。

**（二）任务来源**

2017年11月，中国农业大学完成了标准草案、项目建议书和起草说明等书面材料，向全国畜牧业标准化技术委员会提出《兼用牛蜘蛛腿综合征检测方法》标准立项。

2018年，农业农村部以农财发【2018】46号文件下达本标准制定任务，项目编号为201810，该标准是牛遗传缺陷基因检测方法之一，由中华人民共和国农业农村部畜牧兽医局提出，全国畜牧业标准化技术委员会归口，中国农业大学和新疆农业大学联合起草，中国农业大学王雅春教授任标准起草组首席专家。

二、主要工作过程

**（一）成立标准起草组**

中国农业大学和新疆农业大学在前期开展的牛蜘蛛腿综合征相关基础研究和应用的基础上，成立了专门的标准起草组。同时，对标准起草组工作进行了明确分工，确保标准编写工作的顺利实施和完成，具体见表1。

**表1 起草组成员一览表**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **姓名** | **单位** | **职称/职务** | **项目任务分工** |
| 王雅春 | 中国农业大学 | 教授 | 主持标准制定、协调样品采集及检测 |
| 初芹 | 北京市农林科学院畜牧兽医研究所 | 副研究员 | 参与起草标准、致病位点筛选及检测 |
| 焦士会 | 中国农业大学 | 博士 | 致病位点筛选及检测 |
| 黄锡霞 | 新疆农业大学 | 教授 | 参与致病位点检测、标准起草 |
| 谢振全 | 鞍山恒利奶牛场 | 高级畜牧师 | 参与起草标准、采集样品 |
| 田月珍 | 新疆畜牧科学院畜牧研究所 | 副研究员 | 参与起草标准、采集样品、致病位点检测 |
| 马毅 | 天津市农业科学院畜牧兽医研究所 | 研究员 | 参与起草标准、采集样品 |
| 俞英 | 中国农业大学 | 教授 | 参与起草标准、采集样品、致病位点检测 |
| 张毅 | 中国农业大学 | 副教授 | 参与起草标准、采集样品 |
| 王丹 | 新疆农业大学 | 博士研究生 | 参与起草标准、标准文献收集 |
| 胡丽蓉 | 中国农业大学 | 博士研究生 | 参与起草标准、验证样品制备 |

**（二）标准起草**

2018年1月至6月，标准起草组成员以中国农业大学和新疆农业大学前期对牛蜘蛛腿综合征遗传学研究为基础，结合发表的系列科研论文，同时，综合考虑在遗传物质引进、新品种培育、种畜推广等过程中避免有害基因传入和传播的技术需求，从降低检测成本、提高检测效率等角度出发，提出了一次性同时完成两个突变位点检测的方法，组织编写了本标准的初稿。通过文献查阅、现场调研、电话咨询等方式，起草组收集、整理国内外目前关于牛蜘蛛腿综合征各种检测方法和技术体系的文本、相关法律法规及相关标准文献，对本标准的初稿进行了二次完善，形成了标准草案。

2018年6月，按照《关于启动2018年畜牧业和饲料工业行业标准制修订工作的通知》（牧站（标）[2018]123号）文件要求，标准起草组首席专家签订了本标准的计划项目任务书。

2018年9月，起草组召开标准讨论会，对主要技术内容进行讨论，依据我国现行的标准编写规则，对标准草案进行了修改完善，形成了征求意见稿。

**(三) 定向征求意见**

2018年10月至12月，起草组向国内科研、教学、生产、经营、推广和质检等25家单位28位专家发出征求意见函，征求对《兼用牛蜘蛛腿综合征检测方法》标准草案的意见，共收到回复28份。具体意见征求情况如表2。

**表2 征求意见单位名称、属性和数量**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **序号** | **单位属性** | **发函数量** | **反馈数量** | **单位名称** |
| 1 | 高校 | 4 | 4 | 中国农业大学、华中农业大学、宁夏大学、南京农业大学 |
| 2 | 科研院所 | 6 | 6 | 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所、山东省农业科学院奶牛研究中心、天津市畜牧兽医研究所、新疆畜牧科学院畜牧研究所 |
| 3 | 协会 | 1 | 1 | 上海市奶业行业协会 |
| 4 | 推广单位 | 3 | 3 | 黑龙江省家畜遗传资源保护中心、北京市畜牧总站、河北省畜牧良种工作站 |
| 5 | 质检机构 | 3 | 3 | 农业农村部牛冷冻精液质量监督检验测试中心（北京）、[农业农村部牛冷冻精液质量监督检验测试中心](https://www.so.com/link?m=bXkuzFzMGVWFeU6QSZtMbI1VswqwGYbSPT+kLLe1wrdjv5aFPAWdnGBQvzzAjVt40YBDoaBDMJkvTN96SIOxOqAMVu66bmTbb84aCMfnJfI3pZinKxgic7oeA9CDqg5gZXpmNlq2gJahvUJSzcYj0/pWgbeWcBWzEAt/spDzKEiQDrSE7KXanasmEdqOiC6GnhKRlRS5VJmMJlQRPVSc8fHe8shccpAWiUaU+LeCx4Nq6uNIXUNa0SIgxv3FYmSzcescmFe4AcNLkFkYuogQ0cFV5SQcj9Ji12pIazfTMFOY10zwcI9cF5LSeD9sZj8pgcxL4Wx8fyYyMOzz4reFgxPRFycoDFfvh8r0hMlw7g/wL+a6JNIeIYNBcgIXq+cm/lDBGqeEduvZvDJFoOMXrSg==)（南京）、河南省奶牛生产性能测定中心 |
| 6 | 企业单位 | 11 | 11 | 北京奶牛中心、天津市奶牛发展中心、北京首农畜牧发展有限公司、光明牧业有限公司、先马士（上海）有限公司、河南鼎元种牛育种有限公司、新疆天山畜牧生物工程股份有限公司、亚达艾格威畜牧技术有限公司、安博（北京）国际贸易有限责任公司、海拉尔农牧场管理局谢尔塔拉农牧场 |
| 合计 |  | 28 | 28 |  |

2018年11月至12月，起草组对反馈意见表进行了汇总整理，累计得到96条意见。起草组对反馈意见逐条进行研究和讨论，查阅、搜集相关内容的科学依据，对有争议的问题通过微信和电子邮件等联系方式向有关单位的专家请教。起草组通过讨论，统一意见后作出处理，并提出相应的依据、理由及修改结果，其中，共采纳意见69条，部分采纳9条，不采纳18条。意见汇总处理表见附件。

2019年1月，结合征求意见，起草组对标准草案内容再一次进行了讨论、修改、完善。

2019年5月初，按照全畜标[2019]7号文件要求，起草组安排专人参加了在西安举办的标准编制培训班，对标准编制工作的流程和规范进行了系统学习。根据最新版标准编制规范与要求，起草组进一步讨论并完善了标准草案，形成了标准预审稿。

**（四）标准预审**

2020年7月24日，根据全国畜牧业标准化技术委员会的要求，中国农业大学组织召开了农业行业标准《兼用牛蜘蛛腿综合征检测方法》预审会。专家组由刘榜(组长)、方美英、王永、李存、武玉花、肖炜、黄金明、徐青共9人组成。会上，专家组在听取了标准制定项目首席专家王雅春对标准编制说明及其主要技术内容汇报的基础上，对标准征求意见稿进行了认真的讨论，并提出修改意见。专家组一致认为：1、该行业标准的制定，符合我国牛产业发展需求；2、该标准采用的检测方法科学、合理；3、标准名称修改为《牛蜘蛛腿综合征检测 PCR方法》，在“范围”中明确检测方法所适用的品种；4、编制说明对必要环节的阐述不充分，缺少该检测方法的验证报告；5、标准文本的表述及格式存在不足。建议标准起草组根据专家组意见进行修改、补充，完善标准材料后再次组织召开预审会，推进该标准的制定工作。

2020年7月至8月，根据初次预审会专家组意见，标准起草组联系了3家有资质的检验机构，对本标准中涉及的检测方法进行技术和生物学重复验证，并获得了相关检测报告；完善编制说明中检测方法内容确定的依据；补充了牛蜘蛛腿综合征检测方法中阳性、阴性及空白对照的设置；参照GB/T 1.1-2020和GB/T 20001.4，对标准文本的表述及格式进一步完善。

2021年4月7日，再次组织专家召开《牛蜘蛛腿综合征检测 PCR方法》标准预审会，专家组一致同意审查通过并形成预审意见，建议标准起草单位按照上述意见进一步修改后形成公开征求意见稿，报全国畜牧业标准化技术委员会秘书处。

2021年8月，标准起草单位根据预审意见修改了标准材料，并提交至全国畜牧业标准化技术委员会秘书处进行公开挂网征求意见。

三、标准编制原则和确定标准主要内容的依据

**（一）制定标准遵循的原则和依据**

**1、科学性和实用性原则**

本标准的制定，立足于牛群遗传改良目前普遍使用人工授精技术的实际情况，牛遗传缺陷病可导致巨大经济损失。通过我们的科学研究、验证与调研，牛蜘蛛腿综合征这一遗传缺陷病的分子遗传机制已经清楚阐明，通过本标准中检测方法的实施，能够准确实现我国牛蜘蛛腿综合征阳性个体快速有效的检出，对携带致病基因的个体标记或淘汰，有助于避免AS在牛群中的传播与蔓延。本标准可广泛用于西门塔尔牛、褐牛、中国西门塔尔牛、新疆褐牛、三河牛、蜀宣花牛及其他含有西门塔尔牛和/或褐牛血缘个体的低成本、大规模、快速检测。

**2、规范性和可操作性原则**

本标准起草过程中，考虑到该检测方法涉及科学实验操作，因此起草组对标准中实验操作内容定量，并制定了有关结果判定的规范定性识别，在全面性、可操作性、可重复性等方面的综合考虑，尽可能给出实施检测各步骤的详实要求与可操作方法，确保本标准发布实施后的可操作性，力争保证标准在实施过程中检测流程最优、耗时最少、成本最低、结果最准确。

**（二）确定标准主要内容的依据**

**1、标准范围**

根据文献追踪查阅，牛蜘蛛腿综合征在褐牛和西门塔尔牛中存在明确的致因突变位点。我国自主培育的中国西门塔尔牛、新疆褐牛、三河牛及蜀宣花牛含有上述品种的血液。因此，本标准适用于西门塔尔牛、褐牛、中国西门塔尔牛、新疆褐牛、三河牛、蜀宣花牛及其他含有西门塔尔牛和/或褐牛血缘个体的蜘蛛腿综合征的遗传检测。

**2、术语和定义**

本节明确界定了本标准中所采用的术语，并给出理解这些术语所必须的定义。由于标准中涉及专业性较强的牛蜘蛛腿综合征及其相关基因和致因突变位点，因此，在编制过程中对三个相关术语“牛蜘蛛腿综合征”、“褐牛AS致因突变位点”和“西门塔尔牛AS致因突变位点”进行了明确定义，以确保标准实施时的正确理解，有效增强标准在实践中的科学性和可操作性。

“牛蜘蛛腿综合征”的定义参考了《牛遗传缺陷基因检测技术规程》（NY/T 2695—2015）及相关文献，对NY/T 2695—2015中的定义进行了修改，删除了原定义中关于瑞士褐牛和西门塔尔牛AS的详细致病分子机理内容；补充了牛蜘蛛腿综合征的症状，阐述了该遗传缺陷的命名依据，将牛蜘蛛腿综合征定义为：“一种牛的先天性、致死性骨骼系统畸形遗传病。患病犊牛头部畸形，包括下颌骨短，上颌骨向下凹陷，上颌前端呈圆锥形，并向上微微翘起；脊柱向背侧弯曲，明显“蜷缩驼背”状态，但肋骨和肩胛骨正常；四肢僵直，骨骼畸形，后肢畸形尤为严重，掌骨和跖骨向内侧弯曲与身体平行或呈一定角度，长骨骨端正常，长骨骨干比正常犊牛细而脆弱，外径和内径偏小但骨密质部分的宽度未发生改变，四肢外观像“蜘蛛腿”。”同时，在定义之后增加了“患病犊牛常伴有自发性骨折，在分娩过程中可能会伤害母牛产道；可能伴有脑积水等其他病征。”的注释，以便更清楚、准确的理解牛蜘蛛腿综合征可能伴行的并发症及产生的额外损失。

“褐牛AS致因突变位点”的定义参考了 2010年发表于PLoS Genetic杂志的 《Identification of the Bovine Arachnomelia Mutation by Massively Parallel Sequencing Implicates Sulfite Oxidase (*SUOX*) in Bone Development》一文，牛*SUOX* 基因外显子 4 上 363-364 bp之间的 1 个 G 碱基插入与褐牛AS有明确的因果关系。考虑到该术语是准确理解本标准技术内涵，实施褐牛AS检测的关键信息，因此，对其进行了定义：“牛 5 号染色体上亚硫酸盐氧化酶（sulfite oxidase，*SUOX*）基因外显子 4 上 363-364 bp之间的 1 个 G 碱基插入，即c.363-364insG位点。”

“西门塔尔牛AS致因突变位点”的定义参考了2011年发表于BMC Genetics杂志上的《Arachnomelia syndrome in Simmental cattle is caused by a homozygous 2-bp deletion in the molybdenum cofactor synthesis step 1 gene (*MOCS1*)》和2013年发表于PLoS ONE期刊上的《Identification of the causative gene for Simmental arachnomelia syndrome using a network-based disease gene prioritization approach》，牛*MOCS1*基因外显子 11 上1224-1225 bp处的 CA 碱基缺失与西门塔尔牛AS有明确的因果关系。考虑到该术语是准确理解本标准技术内涵，实施西门塔尔牛AS检测的关键信息，因此，对其进行了定义：“牛 23 号染色体上钼辅因子合成蛋白 1（molybdenum cofactor synthesis 1，*MOCS1*）基因外显子 11 上1224-1225 bp处的 CA 碱基缺失，即c.1224-1225 del CA 位点。”

对“褐牛AS致因突变位点”和“西门塔尔牛AS致因突变位点”进行定义，能更清楚的表述不同品种AS致因突变位点的信息，有利于更充分的理解本标准检测方法的原理，有助于本标准的实施和样品个体基因型的判定。

**3、原理**

本节描述了本标准采用PCR方法对样品中AS两个致因突变位点可同时检测的依据。牛蜘蛛腿综合征是由常染色体单基因控制的隐性遗传缺陷，在褐牛和西门塔尔牛中分别由*SUOX*基因的c.363-364 ins G位点和*MOCS1*基因的c.1224-1225 del CA位点所致。根据褐牛和西门塔尔牛 AS 致因突变位点的侧翼序列分别设计特异性引物，在上游引物 5’端分别引入HEX 和FAM 荧光标记，对样品DNA 进行 PCR 扩增，获得与预期片段大小一致的 PCR 产物。PCR 产物变性解链后，经毛细管电泳技术进行片段分离，依据荧光吸收峰图鉴定片段长度，判定基因型，确定待检样品为携带者还是正常个体。

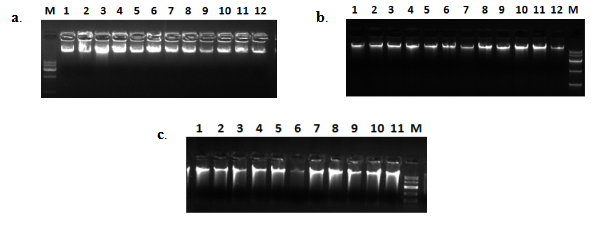
**4、牛DNA样品的准备**

采集牛血液、精液、组织、带毛囊的牛毛等样品，按照GB/T 27642 规定的方法执行，提取基因组DNA样品。

待测DNA样品质量检测：

1）各取2 µL待测DNA样品采用1%琼脂糖凝胶电泳（0.5 × TBE电泳缓冲液，100 V，15 min），然后置于凝胶成像系统或紫外灯下，通过电泳带型检测其完整性（图2）。当待测样品呈一条清晰电泳带，则样品未降解可用于后续实验；若待测样品呈一条主带和拖尾带，则样品部分降解，需进一步检测其纯度和浓度后确定可否用于后续实验；若待测样品呈一道弥散的拖尾带，则样品完全降解不可用于后续实验。

2）各取1 µL待测DNA样品使用NanoDrop2000紫外分光光度计测定其浓度、OD260/OD280及OD260/OD230，将浓度大于50 ng﹒µL-1 ，OD260/OD280读数约1.8，OD260/OD230读数大于2.0的样品用于后续实验，4℃或-20℃保存。若OD260/OD280读数远低于或高于1.8，则样品中含有较多杂质，需要进一步纯化；若OD260/A230读数低于2.0，则样品去盐分不充分，需再次沉淀和75%乙醇洗涤。如图2所示，待测样品质量较好，均可用于后续检测。



注：a.精液提取基因组DNA；b.血液提取基因组DNA；c.耳组织提取基因组DNA。1-12：分别是12个不同的待测样品；M：100 bp ladder。

**图2 不同组织提取基因组DNA 1%琼脂糖检测结果**

**5、PCR引物设计、合成与稀释**

引物设计的目的是找到一对合适的核苷酸片段，使其能够有效地扩增DNA模板序列。引物在核酸序列保守区内设计并具有特异性，设计需遵循以下原则：1）引物长度一般为15-30 bp，常用的为18-27 bp，但不能大于38 bp；2）引物GC含量一般为40%-60%，以45%-55%为宜，上下游引物GC含量和Tm值要保持接近；3）引物所对应的模板序列的Tm值最好在72℃左右，至少要在55-80℃之间，Tm值曲线以选取72℃附近为佳，5’到 3’的下降形状也有利于引物与模板的结合；4）ΔG值（自由能）反应了引物与模板结合的强弱程度，3’端的ΔG值相对要低，且绝对值不要超过9，否则不利于正确引发反应；5）错配率一般不超过100，否则会出现非目的条带；6）5’端可修饰，3’端不可修饰。

引物的优劣直接关系到PCR的特异性和成功与否，我们的研究参考《分子克隆实验指南》第三版，遵照以上引物设计的原则和注意要点，使用Oligo v6.0和Primer 3 online反复比对优化，最终合成了4对引物，并经过UCSC genome browser In Silico PCR分析验证其特异性和理论PCR产物片段长度。设计的4对引物具体信息如表3所示。

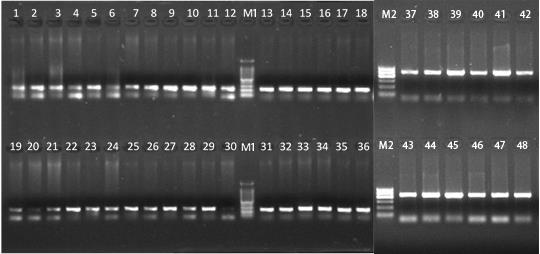
**表3 牛AS 致因突变位点的侧翼序列设计特异性引物信息**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **引物名称** | **引物序列** | **预期产物大小（**bp**）** |
| *MOCS1-1* | F:CTGAGTCTCCTCTTCTGTTTTCA  R:GTTGGCATCTGAGTCCAGGT | 250 |
| *MOCS1-2* | F: ATGAAGGGACAGAGTGGTCGT  R: CGTGGGTCAGTTGGTCAGAGT | 629 |
| *SUOX-1* | F-1:CTCAAGAGTCACCACGCAGAT  R-1:GCTCCCCAATCTTGTACT | 246 |
| *SUOX-2* | F-2:CTCAAGAGTCACCACGCAGAT  R-2:ATGGAGGGTGCCTTGTCGTC | 274 |

注：F为正向（上游）引物，R为反向（下游）引物，引物序列均为5’-3’端。

将设计好的引物序列送到生工生物工程（上海）股份有限公司进行人工合成。引物合成后，先在离心机内短暂离心（12000 rpm，2 min），然后开盖，并使用超纯水将引物稀释成终浓度为10 μmol﹒L-1的工作液，4℃或-20℃保存、备用。

对以上设计好的3对引物进行PCR扩增预实验，获得的PCR产物经2%的琼脂糖凝胶电泳进行引物特异性和扩增效率检测。如图3所示，随机抽取12个样品对引物的扩增效果进行比较，引物*MOCS1-1、MOCS1-2*和*SUOX-2*均能够扩增每一个样品，而引物*SUOX-1*的扩增产物中有2个样品（图3中泳道20、30）未能成功扩增。预试验表明，引物*SUOX-2*特异性好、扩增效率高，而引物*SUOX-1*不能特异、高效地扩增；*MOCS1-1*和*MOCS1-2*均能高效扩增MOCS1基因片段，考虑到与*SUOX*基因片段进行组合时，二者相差100 bp以内读取片段长度试验操作更加简易，因此保留*MOCS1-1*引物。综合各项因素，在本标准中最终选用引物*MOCS1-1*和*SUOX-2*作为最终的PCR扩增引物。



注：泳道1-12为引物*MOCS1-1*扩增产物，扩增片段250 bp；泳道19-30为引物*SUOX-1*扩增产物，扩增片段246 bp；泳道13-18、31-36为引物*SUOX-2*扩增产物，扩增片段274 bp；泳道37-48为引物*MOCS1-2*扩增产物，扩增片段629 bp；M1、M2为100 bp ladder。

**图3不同引物、相同样品PCR扩增产物2%琼脂糖凝胶检测结果**

**6、样品的准备**

阳性样品：AS致病位点携带者个体DNA样品。

阴性样品：正常个体DNA样品。

空白样品：灭菌双蒸水。

待测样品：参考①牛DNA样品的准备。

**1）*MOCS1*基因和*SUOX*基因序列的人工合成**

截止目前，在我们检测的所有牛群体中，仅检测到*MOCS1*基因突变携带者个体，并未检出存在*SUOX*基因致病突变携带者个体。因此，我们分别设计并合成了含有褐牛和西门塔尔牛AS突变位点和野生型的基因序列，作为阳性对照（携带者）、阴性对照（正常个体）。委托生工生物工程（上海）股份有限公司，共合成4条序列，分别为*MOCS1*\_wild（野生型），*MOCS1*\_mut（突变型），*SUOX*\_wild（野生型）和*SUOX*\_mut（突变型），具体序列如下。

***MOCS1*\_wild （野生型）人工合成序列**

TCGAGGTGGGATGGGGAGAGAGTTGGGGGAGGAGGTGGTTTTGCAAAAGACCCTTTTGGACTGAGTCTCCTCTTCTGTTTTCATTCTAGAGTTATTTTTGATGCGCCAAGATTCCCCACCAGCCCTTCCAAGCACTTTCAGGAACTCTCTCCGTGTTCAGGTTCTGAGACAGAGTGAGTTTCTCCAGCCAGATGGTGACTTTATGGAAAGGAGGCGGGGTCCCCCAGGCCCCTCTTGTTGCCCAGCGGTGGCTGGGGTCCAGCCTCCCTCAGAGACACTTCAGTTCCCACCTGGACTCAGATGCCAACCCAAAGTGCCTTAGCCCAACAGAACCCCAGGCTCCTGCCGCCTCCTCAGGACCTCTGCCA

***MOCS1\_*mut（突变型）人工合成序列**

TCGAGGTGGGATGGGGAGAGAGTTGGGGGAGGAGGTGGTTTTGCAAAAGACCCTTTTGGACTGAGTCTCCTCTTCTGTTTTCATTCTAGAGTTATTTTTGATGCGCCAAGATTCCCCACCAGCCCTTCCAAGCACTTTCAGGAACTCTCTCCGTGTTCAGGTTCTGAGACA【**CA】**GAGTGAGTTTCTCCAGCCAGATGGTGACTTTATGGAAAGGAGGCGGGGTCCCCCAGGCCCCTCTTGTTGCCCAGCGGTGGCTGGGGTCCAGCCTCCCTCAGAGACACTTCAGTTCCCACCTGGACTCAGATGCCAACCCAAAGTGCCTTAGCCCAACAGAACCCCAGGCTCCTGCCGCCTCCTCAGGACCTCTGCCA

***SUOX*\_wild（野生型）人工合成序列**

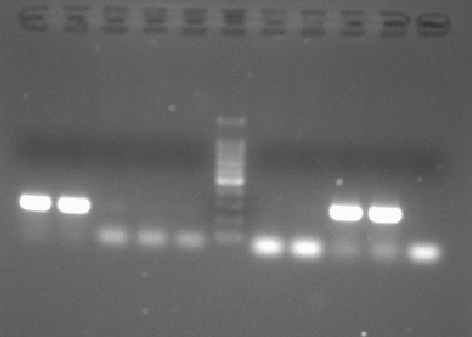
GGGTCAGAGTGAGGTAGAGTGATTTCTTCTTAACATTCTGTTCCCTTTTGCCTCAGGCTTCTCAAGAGTCACCACGCAGATATACCAGGGAGGAAGTGAAATCCCACAGCAGCCCTGAGACTGGGGTCTGGGTAACTTTGGGCTGTGAGGTTTTTGATATCACAGAATTTGTGGACATACACCCAGGGGGGGCATCAAAGCTGATGCTAGCAGCCGGGGGTCCTTTAGAGCCCTTCTGGGCCCTCTATGCTGTTCACAACCAGCCCCACGTGCGAGAGATACTAGCTCAGTACAAGATTGGGGAGCTGAGCCCTGACGACAAGGCACCCTCCATCTTGAAGACCTCTGATCCTTATGCGGATGATCCTATACGTCACTCAGCTCTGAAGGTCAA

***SUOX\_*mut（突变型）人工合成序列**

GGGTCAGAGTGAGGTAGAGTGATTTCTTCTTAACATTCTGTTCCCTTTTGCCTCAGGCTTCTCAAGAGTCACCACGCAGATATACCAGGGAGGAAGTGAAATCCCACAGCAGCCCTGAGACTGGGGTCTGGGTAACTTTGGGCTGTGAGGTTTTTGATATCACAGAATTTGTGGACATACACCCAGGGGGGG【**G】**CATCAAAGCTGATGCTAGCAGCCGGGGGTCCTTTAGAGCCCTTCTGGGCCCTCTATGCTGTTCACAACCAGCCCCACGTGCGAGAGATACTAGCTCAGTACAAGATTGGGGAGCTGAGCCCTGACGACAAGGCACCCTCCATCTTGAAGACCTCTGATCCTTATGCGGATGATCCTATACGTCACTCAGCTCTGAAGGTCAA

序列合成后，连接PUC57载体质粒，并进一步转化到大肠杆菌感受态细胞中备用。用接种环取少许菌液，采用划痕接种法接种到培养皿上，37℃培养8-12 h，进行菌种复苏。随后，用无菌接种环挑取单菌落，送入液体培养液中，37℃摇床180 rpm培养12 h，菌液浓度可达到1×109个·mL-1。菌液95℃加热10 min灭活后，可直接用于PCR扩增。

四种序列质粒的菌液各取1 μL作为DNA模板，PCR扩增，2%琼脂糖凝胶检测结果如图4所示。可以看出含*SUOX*\_mut和*SUOX*\_wild序列的菌液不能扩增出*MOCS1*基因但能够扩增出*SUOX*基因并得到预期片段，而含*MOCS1*\_wild和*MOCS1*\_mut序列的菌液则不能扩增出*SUOX*基因而能够扩增出*MOCS1*基因并得到预期片段，表明基因序列的合成非常成功。



**6 7 8 9 10**

**1 2 3 4 5**

**M**

注：泳道1-5样品使用*MOCS1*引物，泳道6-10样品使用*SUOX*引物；泳道1、6为模板含*MOCS1*\_wild菌液，泳道2、7为模板含*MOCS1*\_mut菌液，泳道3、8为模板含*SUOX*\_mut菌液，泳道4、9为模板含*SUOX*\_wild菌液，泳道5、10为空白对照；M为100 bp ladder。

**图4 四种序列质粒的菌液PCR扩增**

**2）AS不同基因型组合样品的构建**

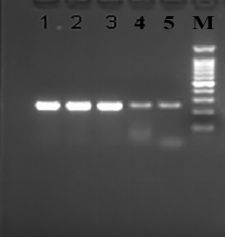
将含不同基因序列的菌液进行等量混合，构建AS不同基因型组合样品9种（表4）。

**表4 AS不同基因型组合样品的构建**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **样品号** | ***MOCS1*\_wild** | ***MOCS1*\_mut** | ***SUOX*\_wild** | ***SUOX*\_mut** | **备注** |
| 1 | √ | √ | √ | √ | 双携带者 |
| 2 | √ | √ | √√ |  | 西门塔尔牛AS携带者 |
| 3 | √√ |  | √ | √ | 褐牛AS携带者 |
| 4 | √√ |  | √√ |  | 阴性对照 |
| 5 |  | √√ |  | √√ | 纯合致死型 |
| 6 |  | √√ | √ | √ | 纯合致死型 |
| 7 |  | √√ | √√ |  | 纯合致死型 |
| 8 | √ | √ |  | √√ | 纯合致死型 |
| 9 | √√ |  |  | √√ | 纯合致死型 |

注：√表示加一倍量溶液；√√表示加两倍量溶液。

将菌液组合样品1-3号，以及2头牛基因组（DNA浓度50-100 ng﹒µL-1），共5个样品各取1 µL作为模板，选用*SUOX*基因引物进行PCR扩增，图5可以看出菌液组合样品PCR扩增产物的浓度远远高于牛基因组，非常不利于后续检测。因此，需要对菌液组合样品模板进行稀释。



**M**

**5**

**4**

**3**

**2**

**1**

注：泳道1-3为菌液组合样品*SUOX*基因PCR扩增产物，泳道4-5为牛基因组样品*SUOX*基因PCR扩增产物，M为100 bp ladder。

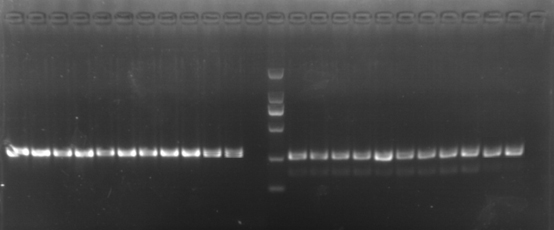
**图5 菌液组合样品和牛基因组DNA用*SUOX*基因引物进行PCR效果对比**

将菌液组合样品使用双蒸水进行10倍稀释后，使用NanoDrop2000紫外分光光度计测定菌液组合样品质量和DNA浓度，结果如表5所示。

**表5 菌液组合样品DNA浓度检测**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **样品号** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** | **8** | **9** |
| **DNA浓度**  **（ng﹒µL-1）** | 103.5 | 96.7 | 100.4 | 90.2 | 98.3 | 127.5 | 73.4 | 100 | 103.5 |
| **A260/280** | 1.67 | 1.66 | 1.67 | 1.63 | 1.71 | 1.67 | 1.67 | 1.69 | 1.71 |

进一步对菌液组合样品的DNA浓度进行调整，调整至终浓度50 ng﹒µL-1。再次将9个菌液组合样品与牛的基因组同时PCR扩增，PCR产物琼脂糖检测结果显示菌液组合样品与牛基因组扩增效率基本一致。图6给出了9个菌液组合样品（1-9号样品）以及2个牛基因组（10号为正常个体，11号为西门塔尔牛AS携带者）对*MOCS1*基因和*SUOX*基因PCR扩增产物经2%琼脂糖凝胶检测的结果。

****

1

2

3

4

5

6

7

8

9

22

21

20

19

18

17

16

15

14

13

24

23

11

12

10

**M**

注：泳道1-12样品使用*MOCS1*引物，扩增目的片段大小均为274 bp；泳道13-24样品使用*SUOX*引物，扩增目的片段大小均为250 bp；泳道1-9、13-21号样品模板为菌液组合样品，泳道10-11、22-23模板为牛基因组DNA，泳道12、24为空白对照；M为DL2000 ladder。

**图6 稀释后菌液组合样品与牛基因组PCR扩增产物对比结果**

**7、 PCR反应体系的建立及优化**

PCR反应体系包括5种基本成分，依次为：引物、DNA聚合酶、dNTP、模板DNA、Mg2+。第一，引物是PCR特异性反应的关键，PCR产物的特异性取决于引物与模板DNA互补的程度。理论上，只要知道任何一段模板DNA序列，就能按其设计互补的寡核苷酸链做引物，利用PCR就可将模板 DNA在体外大量扩增。第二，催化一典型的总反应体积为100 µL的PCR反应时，约需酶量2.5 U，浓度过高可引起非特异性扩增，浓度过低则合成产物量减少。第三，dNTP的质量与浓度和PCR扩增效率有密切关系。在PCR反应中，dNTP应为50-200 µmol﹒L-1，尤其是注意4种dNTP的浓度要相等（等摩尔配制），如其中任何一种浓度不同于其它几种时（偏高或偏低），就会引起错配。浓度过低又会降低PCR产物的产量。dNTP能与Mg2+结合，使游离的Mg2+浓度降低。第四，提取的核酸即可作为模板用于PCR反应。第五，Mg2+对PCR扩增的特异性和产量有显著的影响，在一般的PCR反应中，各种dNTP浓度为200 µmol﹒L-1时，Mg2+浓度为1.5-2.0 mmol﹒L-1为宜。Mg2+浓度过高，反应特异性降低，出现非特异扩增，浓度过低会降低Taq DNA聚合 酶的活性，使反应产物减少。因此，上述5种基本成分的浓度配比必须合理。

我们的研究过程中PCR扩增分别建立3个不同的基本成分的浓度配比反应体系，以期能够筛选出最佳的PCR扩增反应体系。各体系组分添加量如表6所示：

**表6 3个PCR反应体系的基本成分添加量**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **组分及浓度** | **体系1添加量** | **体系2添加量** | **体系3添加量** |
| 10×缓冲液（含Mg2+ 2.0 mM） | 2.0 μL | 2.0 μL | 2.0 μL |
| dNTPs（2.5 mM） | 2.0 μL | 1.6 μL | 1.6 μL |
| 上游引物F（10 μM） | 1.5 μL | 1.0 μL | 0.5 μL |
| 下游引物R（10 μM） | 1.5 μL | 1.0 μL | 0.5 μL |
| DNA模板 | 1.0 μL | 1.0 μL | 1.0 μL |
| Taq DNA聚合酶 | 0.25 U | 0.5 U | 0.25 U |
| 灭菌双蒸水加至 | 20 μL | 20 μL | 20 μL |

将PCR反应所需的基本成分配置完后，在PCR仪上于94-96℃预加热几十秒至几分钟，使模板DNA充分变性，然后进入扩增循环。在每一个循环中，双链DNA在90-95℃变性，再迅速冷却至50-68℃，引物退火并结合到靶序列上，然后快速升温至70-75℃，在Taq DNA 聚合酶的作用下，使引物链沿模板延伸，对于较长靶基因（长度为2-4 kb时），需要延长退火和模板延伸的时间，从而合成DNA，完成一个循环。重复这样的循环30-40次，使扩增的DNA片段大量累积。最后，在72℃保持10 min，使产物延伸完整，4℃保存。

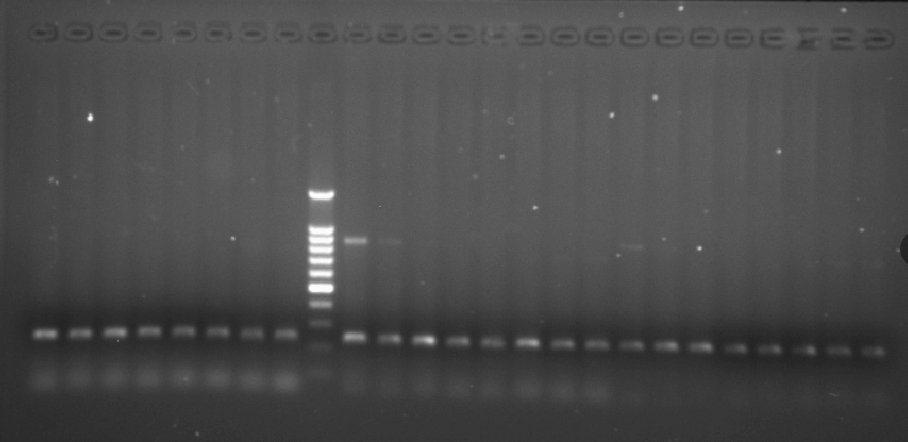
在PCR反应过程中需要对反应温度、时间和循环次数等条件进行优化。第一，通常93-94℃运行l min足以使模板DNA变性，若低于93℃则需延长时间，但温度不能过高，因为高温环境对酶的活性有影响；退火温度是PCR扩增是否顺利的关键因素，通常在50-60℃之间，具体的温度主要由引物的Tm（解链温度）值决定，即退火温度=Tm值-(5-10℃)，在Tm值允许范围内，选择较高的退火温度可大大减少引物和模板间的非特异性结合，提高PCR反应的特异性；延伸温度通常设定为72℃，过高的延伸温度不利于引物和模板的结合。第二，如果模板的G+C含量较高，或直接用细胞做模板，变性时间可适当延长。复性时间一般有30-60 s足够使引物与模板之间完全结合。延伸时间由扩增产物的大小决定，一般1 kb以内的DNA片段，延伸时间1 min是足够的；3-4 kb的靶序列需2-4 min；扩增10 kb需延伸至15 min。第三，循环次数主要与模板的起始数量有关，一般循环数通常为30-40次，循环次数越多，非特异性产物的量亦随之增多。

根据以上PCR反应程序设置原则，我们在研究过程中分别设置了3组PCR反应程序：

程序1：94℃预变性5 min；然后进行35个循环的扩增反应，每个循环包括94℃变性30 s， 57-64℃退火45 s，72℃聚合1.5 min；最后72℃聚合延伸10 min，4℃保存。

程序2：94℃预变性5 min；然后进行35个循环的扩增反应，每个循环包括94℃变性30 s， 57-64℃退火30 s，72℃聚合1 min；最后72℃聚合延伸10 min，4℃保存。

程序3：94℃预变性5 min；然后进行35个循环的扩增反应，每个循环包括94℃变性30 s，57-64℃退火30 s，72℃聚合30 s；最后72℃聚合延伸10 min，4℃保存。

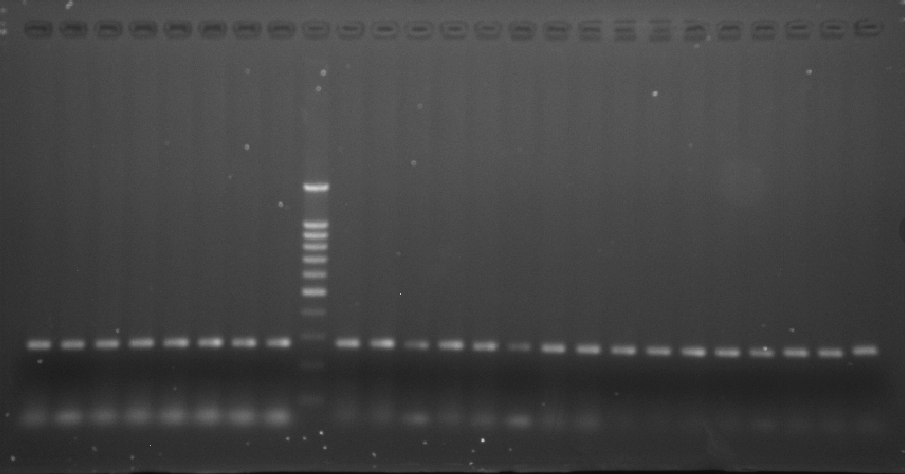


**b.**

**a.**

1 3 5 7 M 10 12 14 16 18 20 22 24

2 4 6 8 9 11 13 15 17 19 21 23



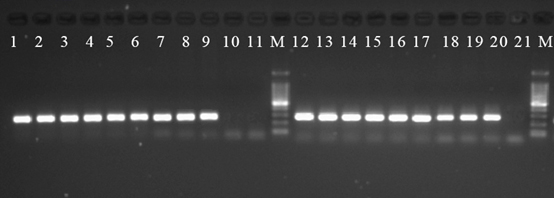
1 3 5 7 M 10 12 14 16 18 20 22 24

2 4 6 8 9 11 13 15 17 19 21 23

注：a：*SUOX*基因不同温度梯度的PCR扩增结果，扩增目的片段大小均为250 bp；b：*MCOS1*基因不同温度梯度的PCR扩增结果，扩增目的片段大小均为274 bp；1-8泳道为体系1不同温度梯度PCR产物；9-16泳道为体系2不同温度梯度PCR产物；17-24泳道为体系3不同温度梯度PCR产物；M为100 bp ladder；退火温度梯度范围介于56-63℃。

**图7 *SUOX*和*MCOS1*基因不同退火温度梯度的PCR扩增结果**

图7给出了不同反应体系梯度PCR产物经2%琼脂糖凝胶检测结果。通过对实验结果分析，在3个不同的反应体系中，*SUOX*和*MCOS1*基因均是体系3基本成分的添加量为最优，背景比较清晰，引物二聚体最少，故本标准采用了体系3的PCR反应体系。*SUOX*和*MCOS1*基因不同温度梯度的PCR反应结果显示，退火温度63℃为最优。比较3组不同的PCR反应程序，三者在产物浓度和特异性方面无差异，但程序3耗时最短，时间最优，因此，本标准采用PCR反应程序3设置：95℃预变性5 min，然后进行35个循环的扩增反应，每个循环包括95℃变性30 s、63℃退火30s、72℃延伸30 s，最后72℃充分延伸10 min，4℃保存。

进一步，对模板的添加量进行了优化，对比了1 µL、2 µL和3 µL模板添加量时PCR产物的浓度和特异性。选择3个样品（2个菌液组合样品和1个牛基因组DNA样品），分别使用1 µL、2 µL和3 µL的模板量，反应程序和其他组分的添加量如上所述。图8给出了PCR产物2%琼脂糖凝胶检测结果。可以看出，不同模板添加量对PCR产物的浓度和特异性没有影响，因此，最终选定模板添加量1 µL（DNA浓度50-100 ng﹒µL-1）。

注：1-11为*MOCS1*基因扩增，12-21为*SUOX*基因扩增，M为100 bp ladder。1、4、7、12、15、18对应1 µL模板量，2、5、8、13、16、19对应2 µL模板量，3、6、9、14、17、20对应3 µL模板量，10、11、21为空白对照。

**图8 不同模板添加量对*SUOX*和*MCOS1*基因的PCR扩增结果**

**8、5’端荧光报告基团的选择**

根据毛细管电泳技术原理，含有不同荧光染料的PCR产物可在一根[毛细管](https://baike.baidu.com/item/%E6%AF%9B%E7%BB%86%E7%AE%A1/7975630)内电泳，避免了泳道间[迁移率](https://baike.baidu.com/item/%E8%BF%81%E7%A7%BB%E7%8E%87/4668666)差异的影响，可大大提高测序的精确度。由于分子大小不同，在毛细管电泳中的迁移率也不同，当其通过毛细管读数窗口段时，[激光检测器](https://baike.baidu.com/item/%E6%BF%80%E5%85%89%E6%A3%80%E6%B5%8B%E5%99%A8/6244479)窗口中的[ccd](https://baike.baidu.com/item/ccd/362160)（charge-coupled device）摄影机检测器就可对[荧光分子](https://baike.baidu.com/item/%E8%8D%A7%E5%85%89%E5%88%86%E5%AD%90/5269833)逐个进行检测，激发的荧光经光栅分光，以区分代表不同[碱基](https://baike.baidu.com/item/%E7%A2%B1%E5%9F%BA/467389)信息的不同颜色的荧光，并在ccd摄影机上同步成像，分析软件可自动将不同荧光转变为[DNA序列](https://baike.baidu.com/item/dna%E5%BA%8F%E5%88%97/5204718)，从而达到[DNA测序](https://baike.baidu.com/item/dna%E6%B5%8B%E5%BA%8F/5638520)的目的。

在牛AS两个致因突变位点的独立检测实验中FAM、HEX或TET荧光染料均可以使用，含荧光染料的引物需在实验全过程避光进行使用。在我们的研究中，*SUOX*引物扩增产物目的片段长度274 bp，*MOCS1*引物扩增产物目的片段长度为250 bp，二者相差24 bp。本标准中分别在*SUOX*基因上游引物5’端加入HEX荧光标记，*MOCS1*基因上游引物5’端加入FAM荧光标记，实验全程使用锡纸确保避光，即使将两对引物置于同一个体系中检测，也非常容易区分。因此，能够确保不同目的片段在毛细管电泳过程中互不干扰，更有利于个体基因型结果的准确判定。

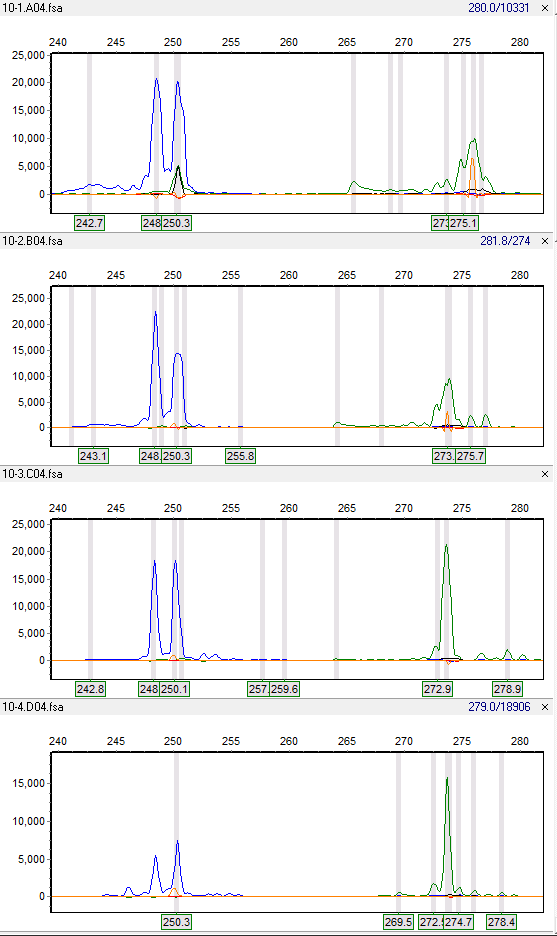
**9、PCR产物电泳稀释倍数的选择**

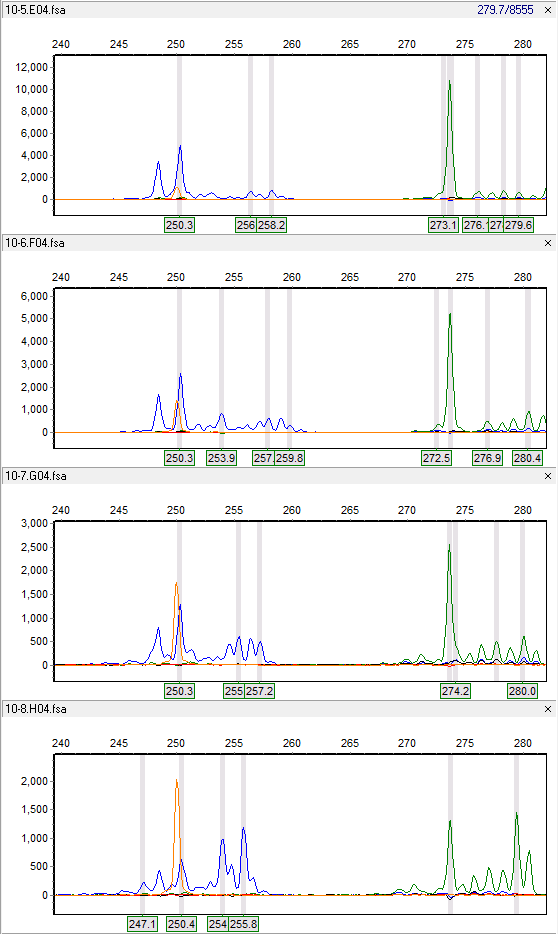
PCR产物倍比稀释浓度变化对电泳结果的判定会产生影响。如果产物量过多、信号强度过强时就会出现信号峰倒转或信号峰过宽；如果产物量过少、信号强度过弱时则易受到杂峰信号的干扰。当PCR产物浓度适当，荧光信号强度在1000-25000 Intensity（a.u.）之间时能够保证读取的结果准确。

为了寻找最佳的稀释倍数，对PCR产物进行了0-1000倍之间不同倍数的稀释（表7），毛细管电泳结果如图9所示。

**表7 PCR产物稀释倍数与其对应的检测峰图**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **样品编号** | **PCR产物稀释倍数** | **对应检测峰图** |
| 1 | 0（原液） | 10-1.A04.fsa |
| 2 | 5 | 10-2.B04.fsa |
| 3 | 10 | 10-3.C04.fsa |
| 4 | 50 | 10-4.D04.fsa |
| 5 | 100 | 10-5.E04.fsa |
| 6 | 200 | 10-6.F04.fsa |
| 7 | 500 | 10-7.G04.fsa |
| 8 | 1000 | 10-8.H04.fsa |





**图9 同一样品PCR产物倍比稀释毛细管电泳峰图效果比较**

通过对图9中同一样品PCR产物倍比稀释后毛细管电泳峰图效果比较，发现原液和稀释5倍的样品（1和2号），出现信号峰倒转，宽度过宽而无法准确判读产物片段长度。荧光信号强度在5000-20000 Intensity（a.u.）之间，信号峰为窄峰，判读准确性最高（3-5号）。稀释倍数继续增加（6-8号），杂峰信号甚至高于产物的信号峰，影响结果的判读。因此，在本标准中明确定量，取50倍稀释后的荧光引物PCR产物和去离子甲酰胺1：9体积混匀，完成变性解链后采用全自动毛细管电泳分析技术分离条带，确定个体基因型。

**10、结果的判定**

PCR 产物变性解链后，经毛细管电泳技术进行片段分离，依据荧光吸收峰图可以鉴定片段长度，判定基因型，确定待检样品为携带者还是正常个体。

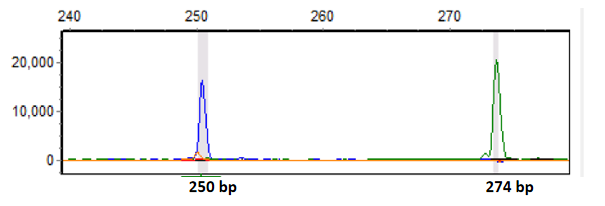
*MOSC1*基因在250 bp片段长度附近出现信号峰，*SUOX*基因在274 bp片段长度附近出现信号峰；二者呈现不同的颜色，前者为蓝色，后者为绿色。

正常个体：250 bp处出现一个蓝色信号峰，且274 bp处出现一个绿色信号峰。

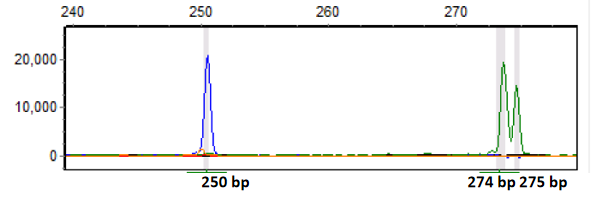
携带者：在248 bp、250 bp处出现两个蓝色信号峰，274 bp处出现一个绿色信号峰，为*MOCS1*基因突变携带者（西门塔尔牛AS致因突变位点携带者）；在250 bp处出现一个蓝色信号峰，274 bp、275 bp处出现两个绿色信号峰，为*SUOX*基因突变携带者（褐牛AS致因突变位点携带者）；在248 bp、250 bp处出现两个蓝色信号峰，274 bp、275 bp处出现两个绿色信号峰，为褐牛AS致因突变位点和西门塔尔牛AS致因突变位点携带者。

不同类型个体PCR产物毛细管电泳分型结果如图10所示。

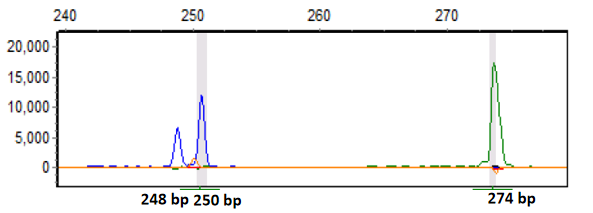
**① 正常个体**



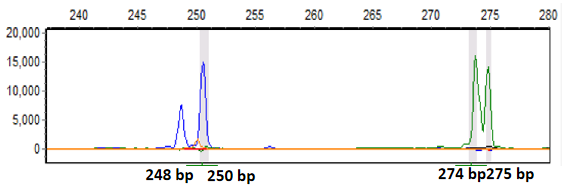
**② 褐牛AS致因突变位点携带者**



**③ 西门塔尔牛AS致因突变位点携带者**



**④ 褐牛AS致因突变位点和西门塔尔牛AS致因突变位点携带者**



注：蓝色峰代表 *SUOX* 基因荧光 PCR 产物检测信号，绿色峰代表*MOCS1*基因荧光 PCR 产物检测信号，橙色峰代表249 bp DNA分子量标记信号。

**图10 牛AS致因突变位点检测结果判定对照图**

四、主要试验（或验证）的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果

**（一）主要验证情况说明**

**1、牛AS致因突变位点PCR方法的大群检测验证**

2018年6月至9月，标准起草组对我国3个兼用牛品种进行了采样，并开展了牛AS致因突变位点的检测，通过进一步扩大样本，验证了本标准中检测方法及结果判定的可行性和准确性。采集的样品包括：1337头西门塔尔牛、303头新疆褐牛、466头三河牛，累计总数为2106份（表8）。结果显示：303头新疆褐牛全部为正常个体。420头纯种三河牛全部为正常个体；46头三河牛导血后代中发现2头西门塔尔牛AS致因突变位点携带者，其余44头均为正常个体。408头西门塔尔种公牛中发现了4头西门塔尔牛AS致因突变位点携带者（来自2个种公牛站），其余404头均为正常个体。929头西门塔尔母牛中发现了11头西门塔尔牛AS致因突变位点携带者，其余918头均为正常个体。结合系谱分析和亲子鉴定发现，这17头西门塔尔牛AS致因突变位点携带者都能追踪到同一头引进德系西门塔尔牛种公牛ROMEL。ROMEL是SEMPER的后代，SEMPER是西门塔尔牛AS的祖先公牛。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **品种** | **类型** | **头数** | **牛群分布** |
| 西门塔尔牛a | 种公牛 | 408 | 北京、新疆、内蒙等全国15个省市种公牛站 |
| 种子母牛 | 929 | 新疆呼图壁种牛场、天山畜牧种公牛站 |
| 新疆褐牛 | 种子母牛 | 303 | 新疆畜禽繁育改良总站 |
| 三河牛b | 种公牛 | 65 | 内蒙古谢尔塔拉农牧场 |
| 核心群母牛 | 355 | 内蒙古谢尔塔拉农牧场 |
| 导血后代 | 46 | 内蒙古谢尔塔拉农牧场 |
| 合计 | — | 2106 | — |

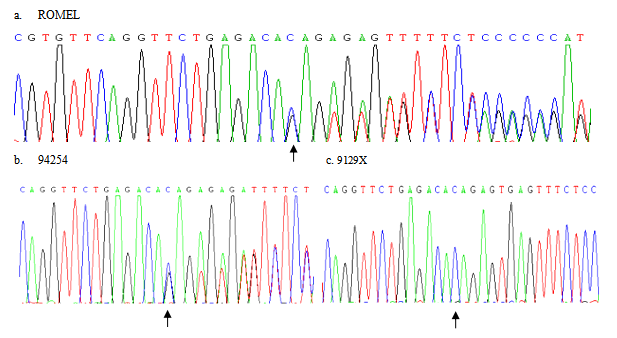
**表8 验证群检测样品类型和来源**

注：a 西门塔尔牛既包括从国外直接引进的种牛，也包括中国西门塔尔牛群体；

b 三河牛包括两个群体一个是纯种三河牛，另一个是导入西门塔尔牛血缘后的群体。

**2、西门塔尔牛AS携带者和正常个体的测序验证**

对携带有AS致因突变位点的引进种公牛ROMEL及其后代的基因组DNA进行PCR扩增后产物进行直接测序，测序峰图如图11所示，结果发现ROMEL在该突变位点为杂合基因型（图11.a），其后代在突变位点处既有杂合型（编号：94254，图11.b）又有纯合型（编号：9129x，图11.c）。测序结果与已知参考序列相符。

注：黑色箭头表示西门塔尔AS致因突变位点。

**图11 西门塔尔牛AS携带者ROMEL及其两个后代的测序结果**

**3、第三方检测验证**

为了验证和进一步完善本标准的检测方法，标准起草组分别委托3家国家级或省级有资质的实验室，分别为：农业农村部动物遗传育种与繁殖（家禽）重点实验室、农业农村部奶牛遗传育种与繁殖重点实验室和山东省奶牛繁育工程技术研究中心对标准中的检测方法进行验证，验证试验准备的样品信息及汇总情况见表9、表10。

**表9 第三方检测验证样品情况说明**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **样品来源** | **样品名称（设计）** | **样品类型** |
| 菌液组合样品  （人工合成序列） | 阳性对照 | 利用*MOCS1*基因位点的野生型和突变型及*SUOX*基因的野生型和突变型四种序列等量混合制成的一个样品 |
| 试样1 | *MOCS1*位点杂合型，*SUOX*位点野生纯合型 |
| 试样2 | *MOCS1*位点野生纯合型，*SUOX*位点杂合型 |
| 试样3 | *MOCS1*位点和*SUOX*位点均为野生纯和型 |
| 牛基因组DNA样品 | 试样4 | *MOCS1*位点携带者，*SUOX*位点正常（AS携带者） |
| 阴性对照 | *MOCS1*位点和*SUOX*位点均为野生纯合型（正常个体） |
| 灭菌双蒸水 | 空白对照 | 灭菌双蒸水 |

**表10 第三方检测验证情况汇总表**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **编号** | **样品名称** | **不同实验室重复测定结果** | | |
| 1 | 2 | 3 |
| 1 | 阳性对照 | *MOCS1*＋  *SUOX*＋  AS携带者 | *MOCS1*＋  *SUOX*＋  AS携带者 | *MOCS1*＋  *SUOX*＋  AS携带者 |
| 2 | 阴性对照 | *MOCS1*–  *SUOX*–  正常个体 | *MOCS1*–  *SUOX*–  正常个体 | *MOCS1*–  *SUOX*–  正常个体 |
| 3 | 空白对照 | **/** | **/** | **/** |
| 4 | 试样1 | *MOCS1*＋  *SUOX*＋  AS携带者 | *MOCS1*＋  *SUOX*＋  AS携带者 | *MOCS1*＋  *SUOX*＋  AS携带者 |
| 5 | 试样2 | *MOCS1*–  *SUOX*＋  AS携带者 | *MOCS1*–  *SUOX*＋  AS携带者 | *MOCS1*–  *SUOX*＋  AS携带者 |
| 6 | 试样3 | *MOCS1*–  *SUOX*–  正常个体 | *MOCS1*–  *SUOX*–  正常个体 | *MOCS1*–  *SUOX*–  正常个体 |
| 7 | 试样4 | *MOCS1*＋  *SUOX*–  AS携带者 | *MOCS1*＋  *SUOX*–  AS携带者 | *MOCS1*＋  *SUOX*–  AS携带者 |
| 使用的主要仪器（如PCR仪、毛细管电泳仪等）型号和试剂（如Taq酶等）相关信息：  实验室1、仪器：BIO-RAD PTC-200；ABI3730XL；试剂：Genstar 2×PCR MIX。  实验室2、仪器：BIO-RAD T100 Thermal Cycler；ABI3730XL；试剂：Genstar 2×PCR MIX。  实验室3、仪器：ABI9700；ABI3730XL；试剂：Genstar 2×PCR MIX。 | | | | |

注：“＋”表示阳性结果，“–”表示阴性结果，“**/**”表示无PCR扩增条带。

三家验证实验室对同一个样品进行3次重复，试验均获得一致性结果，详细验证报告见附件。验证结果表明，本标准建立的检测方法具有很好的再现性，符合科学性、实用性、规范性和可操作性的原则，能够实现牛蜘蛛腿综合征PCR方法的准确检测。

**（二）技术经济论证**

目前，对插入和缺失突变的检测主要有三种常用方法：毛细管电泳法、直接测序法和酶切法。表11给出了对三种基于不同技术的PCR方法的研究和比较，我们发现：与直接测序法和酶切法相比较，毛细管电泳法作为牛AS致因突变检测的技术手段，具有成本低、灵敏度高、特异性强、准确性高、高通量和无污染等优势。据大量文献报道，目前毛细管电泳法已广泛应用于分子生物学研究领域，通过全自动毛细管电泳分析系统判定扩增片段的长度，实现核酸的准确分型。

**表11 AS致因突变不同检测方法优缺点的比较**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **项目**  **检测方法** | **检测结果** | | **成本**  **（元/样）** | **耗时**  **（小时/批）** | **检测**  **效率** | **准确性** | **污染性** |
| ***SUOX*** | ***MOCS1*** |
| **直接测序法** | 碱基序列、峰图 | | 35 | 4 | 低通量 | 高 | 无 |
| **PCR-RFLP（酶切法）** | 无内切酶 | 琼脂糖凝胶电泳图 | 15 | 6 | 低通量 | 低 | 有 |
| **毛细管电泳法** | 碱基序列、荧光吸收峰值 | | 10 | 2 | 高通量 | 高 | 无 |

在本标准中采用毛细管电泳检测方法既可以独立完成褐牛*SUOX*基因致病位点、西门塔尔牛*MOCS1*基因致病位点的检测，又能够实现同时对引起AS 的*SUOX*基因和*MOCS1*基因致病位点一次性检测。这一方法对未知品种的牛遗传物质（活牛、胚胎、冻精）检测具有广谱适用性，而且可保证在不增加任何工作量的前提下，实现褐牛和西门塔尔牛种子牛群AS监测工作的检出高效性。

**（三）预期达到的社会效益和对产业发展的作用**

随着牛人工授精繁育体系的建立，优秀种公牛在全群内的推广传播效率越来越高，进而导致群体近交系数升高和有效群体大小减小，这也为隐性有害致病基因在群体中的纯合和遗传缺陷快速传播埋下了潜在的威胁。中国西门塔尔牛、蜀宣花牛、三河牛以及新疆褐牛等主要兼用牛品种在培育和生产性能改良过程中，曾不断引进国外优秀公牛的冻精、公牛或母牛胚胎，引入了西门塔尔牛和瑞士褐牛的血液。

2014年奶牛良补项目数据显示：引入西门塔尔公牛446头，乳用西门塔尔母牛补贴头数达到54.5万头，可见外血导入比例不断升高，而这些牛基本都没有进行过遗传疾病的监测。AS患病犊牛个体出生时或出生不久后死亡，如果AS携带者公牛在群体中广泛使用，势必会造成致病基因在群体内的快速传播，带来巨大的经济损失。据文献报道，瑞士和奥地利的瑞士褐牛群体中AS致病等位基因估计频率为0.16，而该致病突变是否已存在于中国西门塔尔、新疆褐牛、三河牛等群体中尚处于未知状态。另外，“蜀宣花牛”是以宣汉黄牛为母本，选用西门塔尔牛、荷斯坦牛为父本，且含西门塔尔牛血缘更是高达81.25%。那么，一旦存在类似ROMEL这样含不利基因的外血种公牛被引入，就会随着该AS携带者的推广应用将AS致因突变位点引入到我国牛群中的情况，从而造成显著的不利影响。

建立和完善我国牛蜘蛛腿综合征分子检测方法，指导我国牛育种企业对西门塔尔牛、褐牛、中国西门塔尔牛、新疆褐牛、三河牛、蜀宣花牛及其他含有西门塔尔牛和/或褐牛血缘个体开展遗传疾病检测，尽早发现和杜绝牛蜘蛛腿综合征致病基因在中国牛群中的散播，降低该遗传疾病可能带来的经济损失。与此同时，对目前在群种公牛、种子母牛、进口遗传种质（活牛、胚胎、冻精等）开展AS致因突变位点的检测，并进行遗传标识或者淘汰携带者，可有效防止AS致因突变位点在牛群中的传播与蔓延。因此，建议把AS的遗传检测纳入到育种规划之中，实时监控AS致因突变位点在我国牛群中的传播情况，建立完善的检测技术体系，提高牛群健康水平，增强自主制种和供种能力，从而保证我国牛业的健康稳定持续发展。

五、采用国际标准和国内先进标准的程度，以及与国际、国内同类标准水平的对比情况，或与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

本标准在编制过程中没有查询到相应的国际标准，因此没有采标；与国内相关农业行业标准《NY/T 2695 牛遗传缺陷基因检测技术规程》中涉及的牛蜘蛛腿综合征检测方法相比较，比对数据详见表11，本标准中的方法更具技术上的先进性和经济上的合理性。本标准在编制过程中参考了相关最新版本、现行有效的国家（行业）标准。

六、与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系

本标准为首次制定，其编制与有关现行的法律、法规、强制性国家标准及本行业现有其它标准协调，没有冲突。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

无。

八、作为强制性或推荐性标准的建议

建议本标准作为推荐性标准，对我国牛群蜘蛛腿综合征（AS）的遗传检测工作宜符合本标准的规定。

九、贯彻标准的要求和措施建议

本标准发布后，建议通过全国畜牧业标准化技术委员会组织学习，建议种牛培育单位（包括种公牛站、核心育种场等）、种畜禽进口单位采用本标准实施牛蜘蛛腿综合征的检测，并在系谱中进行标识，避免AS导致经济损失。

十、废止现行有关标准的建议

无。

十一、其他应予说明的事项

2020年7月24日，《兼用牛蜘蛛腿综合征检测方法》预审会专家组对标准的名称进行讨论，一致认为牛蜘蛛腿综合征遗传机理明确、存在确定的致因突变，无需在标准名称中特指“兼用牛”，且须在标准名称中直接体现所使用的检测方法，建议对标准的名称进行修改。根据预审会专家组的意见，起草组考虑到本标准针对牛蜘蛛腿综合征这一牛遗传缺陷的两个致因突变位点，建立了一套标准化检测方法的技术规程，该方法是基于聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction，PCR）原理，采用毛细管电泳技术一次性实现牛AS两个致因突变位点同时分型，具有高通量、低成本的优点，为了在标准名称中直接体现所使用的检测方法，经征得专家组同意，故将标准名称修改为《牛蜘蛛腿综合征检测 PCR方法》。