

农业行业标准
《牦牛无角性状基因型检测 PCR 法》
编制说明
(公开征求意见稿)

XXXX

2024 年 8 月

一、工作简况，包括任务来源、制定背景、起草过程等

1. 任务来源

2021年12月，XXXX上报《牦牛无角基因检测技术规程》行业标准项目建议书及标准草案；2022年12月，XXXX上报2023农业国家标准和行业标准制订项目《牦牛无角基因检测技术规程》申请书；2023年3月16日，农业农村部下达《农业农村部农产品质量安全监管局关于下达2023年农业国家和行业标准制修订项目计划的通知》（农质标函〔2023〕51号），由XXXX承担制定《牦牛无角基因检测技术规程》标准工作，项目编号NYB-23057。本标准项目承担单位为XXXX，标准起草协作单位为XXXX，标准技术归口单位为全国畜牧业标准化技术委员会。起草小组成员包括XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX和XXX。

2. 制定背景

（1）牛无角性状位点检测的重要性

牛角是牛科动物特有的组织结构，也是有效自卫和争夺交配权的有利武器。然而，在当前规模化和集约化饲养模式下，牛角的存在不仅给饲养员和牲畜带来安全隐患，而且在饲养空间问题上给养殖场带来了许多困扰，因此，幼年时去角在现代化养牛业中已经成为一种公认的管理方式。但是这种方法会引起犊牛的应激反应，处理不当还可能会引起病菌感染，不利于牲畜健康，而且是违背动物福利的行为。动物福利问题已经在发达国家引起高度重视，欧盟已启动了关于禁止动物阉割和去角的ALCASDE工程。随着我国经济水平发展和人们生活水平的提高，动物福利问题也开始受到国家和社会的广泛关注，通过检测无角性状位点对角性状进行早期选择已成为解决经济利益与动物福利冲突的最佳方法。

（2）制定牦牛无角性状位点检测技术规程的必要性

牦牛是以我国青藏高原为起源地的特产家畜，为当地牧民提供奶、肉、毛、役力、燃料等生产生活必需品，是青藏高原牧民的重要生活和经济来源，也是我国畜牧业经济中不可缺少的重要畜种。中国是世界上繁育牦牛历史悠久、拥有牦牛数量最多的国家，存栏量约占世界牦牛总数的92%。我国牦牛主要分布于青海、西藏、四川、甘肃、新疆、云南等六省区的高寒草原地区。2015年以来，全国牦牛存栏量呈总体上升趋势，从2015年的1506万头逐步增加到2019年的1621万头，年均增长1.5%；牦牛肉产量也由2015年的45万吨增加到2019年的53

万吨，年均增长 3.6%。随着国家对生态文明建设的重视和科学养殖技术的大力推广，牦牛养殖也逐步朝着集约化与标准化养殖方向发展。而牦牛角大于黄牛角和奶牛角，在集约化生产中，存在较大的安全隐患，已成为制约牦牛产业化生产的性状。在规模化饲养条件下，无角牦牛不容易打斗、易饲养管理，在自然减少受伤率的同时可以增加饲养密度，便于进行舍饲，提高生产性能。在全球日益重视动物福利的背景下，牦牛选育和繁育过程中对角性状进行早期选择势在必行。随着分子生物技术的快速发展，育种学家开始对牦牛无角性状的遗传机制开展了系列的研究。2017 年慕尼黑大学 Medugorac 教授团队发现位于 1 号染色体上两个插入缺失突变位点（P1ID 和 P219ID）为牦牛无角性状的因果变异，这两个位点位于 OLIG2 基因和 C1H21orf62 基因之间，其遗传方式完全符合孟德尔遗传定律，这两个变异位点与已报道的黄牛和奶牛无角性状位点均不相同（图 1），将其命名为牦牛无角性状位点。通过鉴定无角性状位点对牦牛角性状进行早期选择，可达到无角牦牛早期鉴定和牦牛无角性状快速选择的目的。因此，根据现行《畜牧法》对动物福利的要求和牦牛集约化生产的需要，有必要制定《牦牛无角基因检测技术规程》，对牦牛选育过程中无角性状位点检测的方法进行规范，解决当前检测标准不统一，检测结果准确性不一致等问题，进一步促进牦牛多元化饲养模式及产业发展，提高养殖效益。

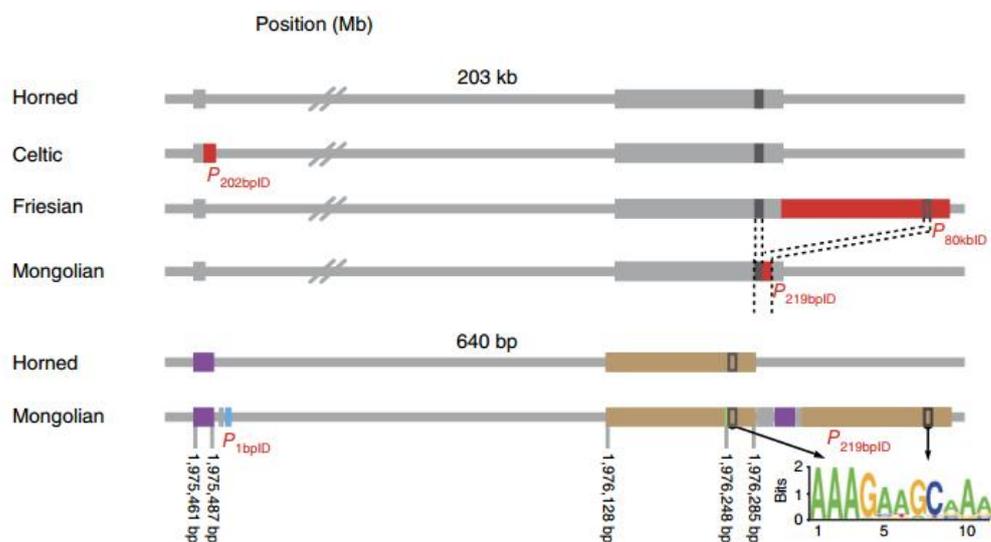


图1 牦牛无角性状位点染色体位置

P219ID位点无角基因型序列

```
CGAGTGGTTTCATTCTGCAAGCTGCCAAAAGTTTCATGC[ATAGTTTTCTGTTTTCTC
ATCCATAAGGTAAGAGTTACATATGTTGTAAGTGGAAATTTGCTTTGATTCCAG
GCATGCCCTGGAATTTTGCTTCTTCATATCTGTGCCTGGAGTCTTACTTTTGTG
```

TATTTTGACATCCTTCATTTCCAACAGCTGTGGGATAAACTTGCAGGCAGCGA
GTGGTTTCATTCTGCGAGCTGCCAAAAGTTTCATGC]TTGCCAAAAGTTTCATGTT
TCTTACCCTATATAGAAAGCCTTTAAAAAT

P219ID位点有角基因型序列

CGAGTGGTTTCATTCTGCAAGCTGCCAAAAGTTTCATGCTTGCCAAAAGTTTCATGTT
TTCTTACCCTATATAGAAAGCCTTTAAAAAT

P11D位点无角基因型序列

TCTGTCAAGA[TTCAGA]ATTTTCTGAATCTCTGTTTTCTCATCCATAAGGTAAAGACTT
AAC

P11D位点有角基因型序列

TCTGTCAAGA[GATTCAG]ATTTTCTGAATCTCTGTTTTCTCATCCATAAGGTAAAGACTT
AA

3. 起草过程

(1) 成立标准起草小组

农业行业标准《牦牛无角基因检测技术规程》制定任务下达后，项目承担单位立即成立由 XXXX 和 XXXX 相关专家组成的标准制定起草小组，主要负责开展调查研究，收集整理相关数据，起草《牦牛无角基因检测技术规程》征求意见稿。标准起草小组人员分工如表 1 所示。

表1 起草人员一览表

序号	姓名	单位	任务分工
1	XXX	XXXX	标准内容的起草
2	XXX	XXXX	标准内容的测定
3	XXX	XXXX	全面负责标准制定
4	XXX	XXXX	资料收集与整理
5	XXX	XXXX	标准内容的测定
6	XXX	XXXX	标准内容的测定
7	XXX	XXXX	标准内容的测定
8	XXX	XXXX	标准内容的测定
9	XXX	XXXX	样品采集
10	XXX	XXXX	样品采集
11	XXX	XXXX	标准内容的测定

表 1（续表）

12	XXX	XXXX	标准内容的测定
13	XXX	XXXX	标准内容的测定

14	XXX	XXXX	牦牛表型鉴定
15	XXX	XXXX	牦牛表型鉴定
16	XXX	XXXX	牦牛表型鉴定

(2) 召开专题会议起草标准

2023年4月12日，标准首席专家XXX研究员主持召开专题会议，研究确定标准制定重点。决定以现行标准编写格式要求、相关国家标准、行业标准和法律法规为准则，以前期相关的科研项目为基础，建立了牦牛无角性状位点的检测方法。

(3) 收集和分析相关数据

标准起草小组积累了大量的牦牛无角性状基因型检测经验，2017-2019年在青海省大通种牛场和甘肃牦牛产区完成了阿什旦牦牛和其他无角牦牛的血样采集和表型鉴定；参考NCBI(National Center for Biotechnology Information)数据库中牦牛无角因果变异位点的序列设计引物，并进行PCR反应体系的优化、引物特异性检测、电泳条件的优化、样本基因型的鉴定，建立了牦牛无角性状基因型的检测方法。共完成了650头有角牦牛和580头无角牦牛的表型鉴定和基因型判定。将所有资料进行统计、分析、整理和验证，2022年5月完成标准初稿。

(4) 形成标准草案

自初稿完成后，首席专家XXX研究员和标准编制小组成员先后邀请科研、教学和生产等单位的同行专家通过线上、线下会议讨论牦牛无角基因检测技术规程的制定建议，按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》给出的规则，7月形成标准征求意见稿。

(5) 发函征求意见

征求意见稿完成后，2022年8月底开始函审，向牦牛相关主管部门、质检部门、科研、教学、生产单位的专家和技术人员广泛征求意见，共发出征求意见28份，2022年9月15日收回修改意见24份（表2和表3），其中5份完全同意，19份提出了修改意见。标准制定小组对专家们提出的宝贵意见和建议进行了认真汇总和讨论，最后采纳接受了绝大部分的意见和建议，对个别不宜采纳的意见与有关单位的专家进行了沟通，并在意见汇总处理表中做了详细的说明。标准制定小组经过充分讨论、修改形成《牦牛无角性状位点检测技术规程》标准预审稿。

表2 征求意见单位属性和数量

序号	单位属性	发函数量	反馈数量
1	科研院所	6	6
2	大专院校	8	8
3	畜牧主管部门	12	10
4	生产企业	2	0
5	合计	28	24

表3 反馈意见专家名单

序号	姓名	单位	所属省区
1	胡江	甘肃农业大学	甘肃省
2	艾德强	青海省畜禽遗传资源保护利用中心	青海省
3	郑新宝	新疆畜牧科学院畜牧研究所	新疆维吾尔自治区
4	李积友	甘肃省畜牧技术推广总站	甘肃省
5	高雪	中国农业科学院北京畜牧兽医研究所	北京市
6	毛进彬	甘孜藏族自治州畜牧站	四川省
7	孙东晓	中国农业大学	北京市
8	王雅春	中国农业大学	北京市
9	咎林森	西北农林科技大学	陕西省
10	杨树猛	甘南藏族自治州畜牧工作站	甘肃省
11	胡广卫	青海省牦牛繁育推广服务中心	青海省
12	裴成芳	天祝藏族自治县畜牧技术推广站	甘肃省
13	兰道亮	西南民族大学	四川省
14	文勇立	西南民族大学	四川省
15	赵玉民	吉林省农业科学院	吉林省
16	石红梅	甘南藏族自治州畜牧工作站	甘肃省
17	吕文发	吉林农业大学	吉林省
18	宋恩亮	山东省农业科学院	山东省
19	蓝贤勇	西北农林科技大学	陕西省
20	罗晓林	四川省草原科学研究院	四川省
21	付昌秀	四川省畜牧总站	四川省
22	杨其恩	中国科学院西北高原生物研究所	青海省
23	孔祥颖	海北藏族自治州农牧综合服务中心	青海省
24	宋仁德	青海省玉树州动物疫病预防控制中心	青海省

(6) 标准预审

2024年7月11日，全国畜牧业标准化技术委员会牛业及奶业标准化工作组组织专家对XXXX等单位修订的农业行业标准《牦牛无角性状位点检测技术规

程》(预审稿)进行了认真审查。专家组由刘榜、付昌秀、王雅春、万靛军、吴克选、秦立红、胡江、武玉花、刘伟、刘慧敏 10 人组成。在听取标准修订单位汇报的基础上,专家组审查了标准文本及编制说明,提出将标准名称改为“牦牛无角性状基因型检测 PCR 法”;删除牦牛无角性状位点的定义;将 PCR 引物信息合并至试剂和材料章节,并做相应调整;在附录中补充不同基因型序列信息;进一步按专家意见和建议完善标准编制说明;按 GB/T1.1-2020 的要求进一步规范标准文本。专家组一致同意审查通过,建议标准修订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。标准制定小组对预审专家们提出的宝贵意见和建议进行了认真汇总和讨论,对标准文本和编制说明进一步修改形成了《牦牛无角性状基因型检测 PCR 法》标准公开征求意见稿。

二、国家标准编制原则、主要内容及其确定依据,修订国家标准时,还包括修订前后技术内容的对比

(一) 国家标准编制原则

1. 行业通用性原则

标准的制定满足牦牛产业的通用性原则,标准适用于牦牛品种无角性状位点检测的需要,符合牦牛育种和生产通用性原则。不仅可以指导牦牛选育工作中表型的测定,也适合已有品种的选育和新品种的培育,有利于推动行业不断提升牦牛选育水平,提高牦牛的生产性能。

2. 科学性、适用性和可操作性原则

在标准制定过程中,以行业发展规划、法律法规为依据,行业发展需求和科技发展为导向,重点突出、科学合理。本文件参考国内畜禽基因检测的最新研究进展,借鉴先进的技术和成熟的经验,保证标准的科学性和先进性。根据标准的可操作性,牦牛无角基因检测的技术确定以已有标准为主要参考依据,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。

3. 规范性原则

遵循《中华人民共和国标准化法》和《标准化实施条例》《畜牧法》,按照中华人民共和国国家标准 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分:标准化文

件的结构和起草原则》的规则起草。本标准中的技术内容与畜牧行业的基础通用知识相协调，与现行家畜基因检测标准的技术内容相协调，与国家现行法律法规如《中华人民共和国畜牧法》等法律法规保持高度一致。

（二）确定标准主要内容的依据

1. 标准范围

根据文献报道，牦牛无角性状存在明确的因果突变位点。因此本规程适用于牦牛无角性状位点检测的操作指导，用于进一步规范牦牛选育过程中无角性状位点检测的方法，确保检测结果的准确性。本标准还对牦牛无角性状位点的检测方法和结果判定进行了统一要求，牦牛行业相关科研单位和核心育种场应按照本标准有关要求进行操作。

2. 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

3. 原理

本节描述了本标准所采用 PCR 和限制性片段长度多态性（RFLP）方法对样品中两个因果突变位点检测的依据。P219ID 位点是位于牦牛 1 号染色体上 36,387,490 nt 处 219 个碱基的插入位点，根据 P219ID 位点侧翼序列分别设计特异性引物，PCR 产物电泳后可根据片段长度判定基因型。P11D 位点是位于牦牛 1 号染色体上 36,388,111 nt 处 7 个碱基的缺失和 6 个碱基的插入位点，该变异可产生 *Apo I* 的酶切位点，根据 P11D 位点侧翼序列分别设计特异性引物，利用限制性内切酶 *Apo I* 对 PCR 产物进行酶切，酶切产物经电泳后可根据片段长度判定基因型。综合 P219ID 和 P11D 位点的基因型检测结果，可确定待检样品中是否携带无角性状基因型。

4. 牦牛 DNA 样品的准备

根据目前国内牦牛科研单位和核心育种场常用的样本采集方法，推荐采集牦牛血液、带毛囊的牛毛和组织（耳组织和皮肤）作为试验材料，尽可能的降低对待测牦牛的伤害。为保证基因组 DNA 提取质量，通过查阅国内外生物样本保存和基因组 DNA 提取方法的文献，推荐采集血液时进行抗凝剂处理，抗凝血、组织可保存在-20℃及以下的冰箱里；由于毛囊中携带的 DNA 较少，带毛囊的牛毛应先浸入 75%乙醇，75%乙醇可有效抑制 DNA 酶活性，保证基因组 DNA 的完

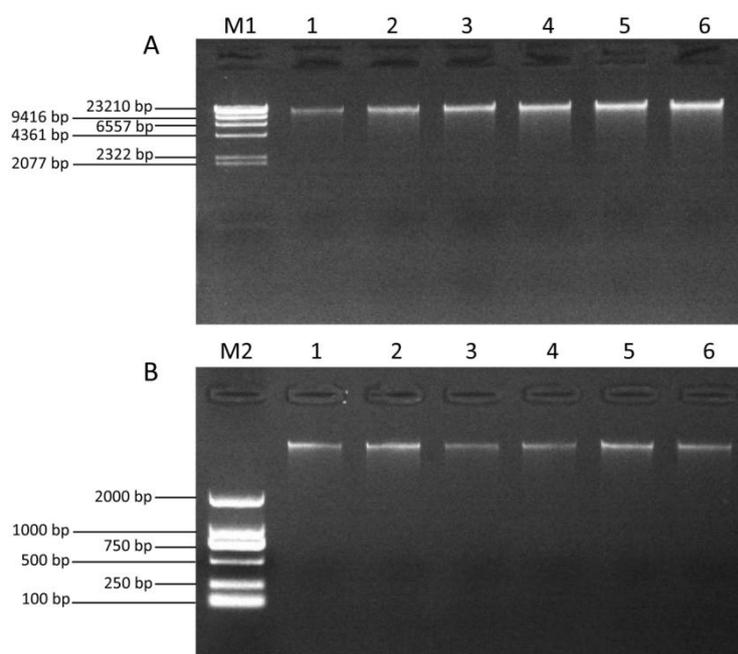
完整性。本条款参考国内外文献规定了不同类型样品的最小取样量（牦牛血液不少于 2 mL、带毛囊的牛毛不少于 10 根、组织不少于 0.3 g），保证基因组 DNA 获得总量满足检测要求。

DNA 提取和浓度检测参考国家标准 GB/T 27642 《牛个体及亲子鉴定微卫星 DNA 法》制定。近年来，各生物试剂公司也逐步开发出针对不同类型样品的 DNA 提取试剂盒，这些试剂盒操作简单快捷，可获得纯度较高的 DNA，本标准也推荐检测单位根据实验条件使用商业化 DNA 提取试剂盒。

待测 DNA 样品质量检测：

(1) 取 2-5 μL DNA 样品与 0.5 μL 上样缓冲液混合，用 1% 琼脂糖凝胶电泳，在凝胶成像系统下检测 DNA 的完整性。DNA 电泳条带整齐，且为清晰的单一条带，表示 DNA 未降解，可用于牦牛无角性状位点检测。

(2) 使用微量紫外\可见分光光度计测定 DNA 样品的浓度、 A_{260}/A_{280} 及 A_{260}/A_{230} 。检测时应选择浓度大于 $50 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ， A_{260}/A_{280} 的比值接近 1.8， A_{260}/A_{230} 的比值大于 2 的样本。



注：A.血液中提取基因组 DNA；b.皮肤组织中提取基因组 DNA；M1 为 λ DNA/HindIII ladder，M2：2000 bp ladder

图2 血液和皮肤组织提取基因组DNA电泳检测结果

5. PCR 引物设计、合成

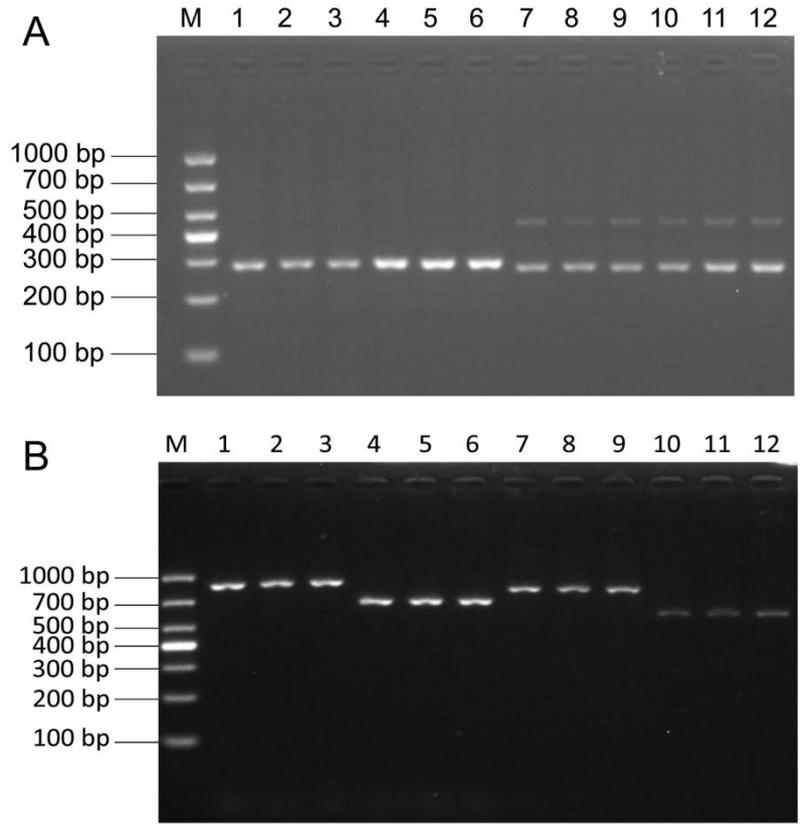
在整个PCR体系中，引物的设计是十分重要的环节。PCR的特异性要求引物与靶DNA特异性结合，不与其他非目的DNA结合，PCR的灵敏性要求DNA聚合酶能与引物进行有效的延伸。PCR引物设计要遵循以下原则：1) 引物最好在核酸序列的保守区内设计；2) 引物长度一般在15-30 bp之间，不应大于38 bp；3) 引物GC含量在40%~60%之间；4) 引物3'端不应出现3个以上的连续碱基；5) 碱基要随机分布，且引物自身和引物之间不能有连续4个碱基的互补；6) 引物的 ΔG 值最好呈正弦曲线形状，即3'端 ΔG 值较低，而5'端和中间 ΔG 值相对较高。遵循以上引物设计的原则，根据牦牛基因组DNA序列，利用Primer 5.0和Oligo 6软件针对两个插入缺失位点（P219ID和P1ID）分别设计两对特异性扩增的引物。具体引物序列如表4所示。

表 4 牦牛无角基因检测引物序列

位点信息	引物名称	引物序列 (5'-3')	PCR 产物大小(bp)
P1ID	P1	F: ATCCTCAGCAGTGATGGGCA R: GATGTTGGCTTGGGAAGGGAA	273/272
	P2	F: GGCACATACTAGGCACTC R: ATGTTGGCTTGGGAAGGG	255/254
P219ID	P3	F: TTCCGTGATGGTACAGG R: TCCATTGAAAGTTCGCTAT	836/617
	P4	F: TGAGTCCCATCTATTGTC R: CATTGAAAGTTCGCTAT	730/511

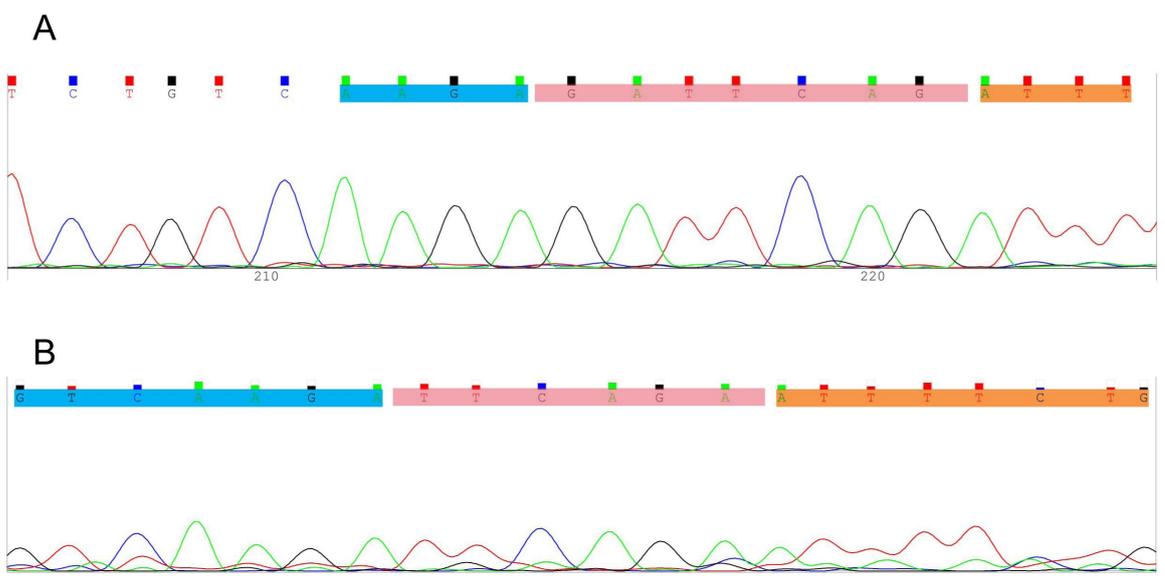
对设计好的四对引物进行PCR扩增预实验，PCR产物经琼脂糖凝胶电泳进行引物特异性和扩增效率检测。如图3所示，随机抽取6个样品对引物的扩增效果进行比较，P1ID位点的P1和P2引物均能够扩增每一个样品，但是P2引物的扩增产物中均出现非特异性扩增条带；P219ID位点的P3和P4引物可扩增每一个样品，扩增产物中无非特异性扩增，但是P4引物扩增产物电泳条带亮度比P3引物弱，扩增效率偏低。综合各项因素，在本标准中最终选用引物P1和P3作为最终的PCR扩增引物。

为进一步验证引物的特异性，我们分别用引物 P1 和 P3 对无角性状位点纯合个体和有角性状位点纯合个体的基因组 DNA 进行 PCR 扩增，扩增产物测序结果峰图如图 4 和图 5 所示，测序结果与已知参考序列一致。



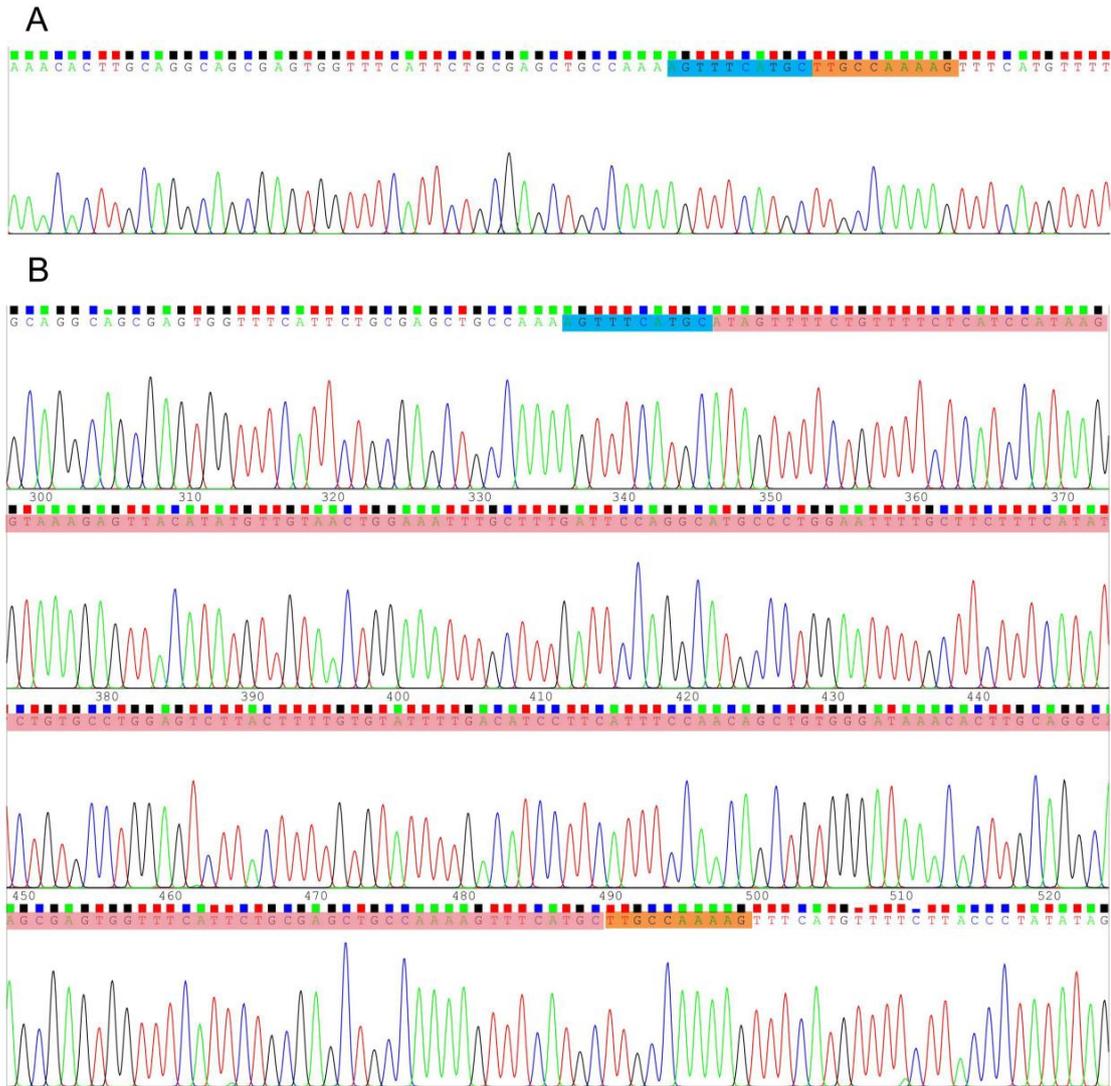
注：A 泳道 1-6 为引物 P1 的扩增产物，扩增片段大小为 273bp；泳道 7-12 为引物 P2 的扩增产物，扩增片段大小为 255bp；B 泳道 1-6 为引物 P3 的扩增产物，扩增片段大小为 836 或 617bp；泳道 7-12 为引物 P4 的扩增产物，扩增片段大小为 730 或 511bp；M 为 1000 bp ladder。

图 3 不同引物、相同样品 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶检测结果



注：A 有角纯合基因型个体，蓝色标注为 P1ID 上游序列，红色标注为 P1ID 位点序列，橙色标注为 P1ID 下游序列；B 无角纯合基因型个体，蓝色标注为 P1ID 上游序列，红色标注为 P1ID 位点序列，橙色标注为 P1ID 下游序列。

图4 P1ID位点的测序结果



注：A 有角纯合基因型个体，蓝色标注为 P219ID 上游序列，橙色标注为 P219ID 下游序列；
 B 无角纯合基因型个体，蓝色标注为 P219ID 上游序列，红色标注为 P219ID 位点序列，橙色标注为 219ID 下游序列。

图5 P219ID位点的测序结果

6. 样品的准备

参考国外内基因检测的标准，我们设计了对照组，以保证了检测结果的准确性。

阳性对照：P219ID和P1ID位点无角基因型序列片段的阳性质粒等量混合后的样品；

阴性对照：P219ID和P1ID位点有角基因型序列片段的阳性质粒等量混合后的样品；

空白对照：灭菌双蒸水。

6.1 P219ID和P11D位点序列的人工合成

委托西安擎科泽西生物科技有限责任公司合成含有牦牛P219ID和P11D位点无角基因型和有角基因型的序列，分别命名为P219ID位点无角基因型、P219ID位点有角基因型、P11D位点无角基因型和P11D位点有角基因型，具体序列如下。

P219ID位点无角基因型人工合成序列

TTCCGTGATGGTACAGGACAGATGAACACAGGCCGCATTCCGGTTGTGATATCAAGA
TCCGCTGGTCTTCATGGTCCAAGGCCTCTCATTCCCTGTGTCTCCTCGTGAGTCCCATCT
ATTGTCCACTTTGATTCCAGGCATGCCCTGGAATTTTGCTTCTTTGATATCTGTGCCTG
GAGTCTTACTTTTGTGTATTTTGACATCCTTCATTTC AACAGCTGTGGGATAAACACT
TGCAGGCAGCGAGTGGTTTTATTCTGCAAGCTGCCAAAAGTTTCATGCATAGTTTTC
TGTTTTCTCATCCATAAGGTAAAGAGTTACATATGTTGTAACTGGAAATTTGCTT
TGATTCAGGCATGCCCTGGAATTTGCTTCTTTCATATCTGTGCCTGGAGTCTT
ACTTTTGTGTATTTGACATCCTTCATTTC AACAGCTGTGGGATAAACACTTGC
AGGCAGCGAGTGGTTTCATTCTGCGAGCTGCCAAAAGTTTCATGCTGCCAAAAG
TTTCATGTTTTCTTACCCTATATAGAAAGCCTTTAAAAATGCTTAGTTTTCTTTCTCTT
ATTCCTAACAGTCTTCTCCTCTGTTTCAGGAGACATGGCTGGTGAATCTGGATGTCAT
GTTGGAACATTGTTTTTTCACGGGGTTTAATTCTTTTCTAAAAAAGTTGATTGTACACT
ACTTTCTTCTGTCTTTGTAATCAGTGAAGTTGACTCATATTTGTAATTCCTACACTCAT
CAAATTATGTCAACAGAGCATTGTTCAACATCTTCGATGCTAATCAAGTGGTTTCTT
AGAATTGTTAAAAATAGCGAACTTTCAATGGA

P219ID位点有角基因型人工合成序列

TTCCGTGATGGTACAGGACAGATGAACACAGGCCGCATTCCGGTTGTGATATCAAGA
TCCGCTGGTCTTCATGGTCCAAGGCCTCTCATTCCCTGTGTCTCCTCGTGAGTCCCATCT
ATTGTCCACTTTGATTCCAGGCATGCCCTGGAATTTTGCTTCTTTGATATCTGTGCCTG
GAGTCTTACTTTTGTGTATTTTGACATCCTTCATTTC AACAGCTGTGGGATAAACACT
TGCAGGCAGCGAGTGGTTTTATTCTGCAAGCTGCCAAAAGTTTCATGCCTGCCAAAAG
TTTCATGTTTTCTTACCCTATATAGAAAGCCTTTAAAAATGCTTAGTTTTCTTTCTCTT
ATTCCTAACAGTCTTCTCCTCTGTTTCAGGAGACATGGCTGGTGAATCTGGATGTCAT
GTTGGAACATTGTTTTTTCACGGGGTTTAATTCTTTTCTAAAAAAGTTGATTGTACACT
ACTTTCTTCTGTCTTTGTAATCAGTGAAGTTGACTCATATTTGTAATTCCTACACTCAT
CAAATTATGTCAACAGAGCATTGTTCAACATCTTCGATGCTAATCAAGTGGTTTCTT
AGAATTGTTAAAAATAGCGAACTTTCAATGGA

P11D位点无角基因型人工合成序列

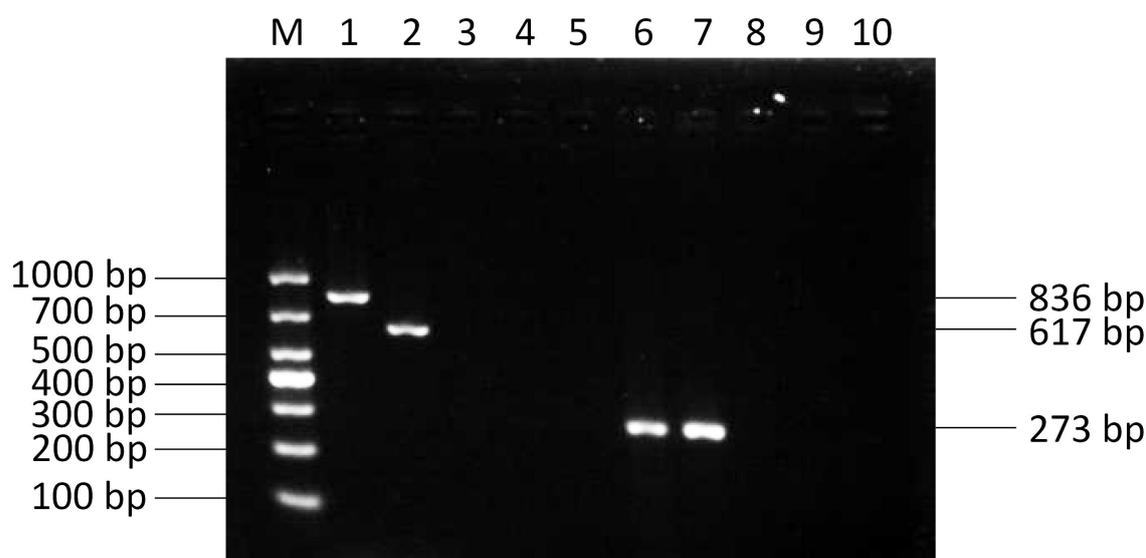
ATCCTCAGCAGTGATGGGCACATACTAGGCACTCAGTAAATATTTGTAGAAT
GAATGAATGAGGGAATCCAATAATAAAGAGTTACATATGTTGAATAATTCAG
TGAAGTGGTGATTCAAATACTTTTTCTCATTCTCTCATTGACTTTTAAAGTGAA
TGAAAGCTCTGTGACTCTGTCAAGTGTCTCTGTCAAGATTTCAGAATTTTCT
GAATCTCTGTTTTCTCATCCATAAGGTAAAGACTTAACTGAAAATTCCTTC
CAAGCCAACATC

P11D位点有角基因型人工合成序列

ATCCTCAGCAGTGATGGGCACATACTAGGCACTCAGTAAATATTTGTAGAAT
GAATGAATGAGGGAATCCAATAATAAAGAGTTACATATGTTGAATAATTCAG

TGAAGTGGTGATTCAAATACTTTTTCTCATTCTCTCATTGACTTTTAAGTGAA
 TGAAAGCTCTGTGACTCTGTCAAGTGTCTCTGTCAAGAGATTCAGATTTTC
 TGAATCTCTGTTTTCTCATCCATAAGGTAAAGACTTAACTGAAAATTCCCTT
 CCAAGCCAACATC

序列合成后，连接至克隆载体，并进一步转化到大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中。用接种工具挑取少许菌体，接入到另一支新的培养基上，37 $^{\circ}$ C培养8-12 h，随后使用无菌枪头挑取单个菌落，送入含有Amp $^{+}$ 的LB液体培养基中，置于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中振荡培养6 h后提取质粒。将4种序列质粒浓度稀释至50 ng $\cdot\mu$ L $^{-1}$ ，取1 μ L作为DNA模板，PCR扩增，2%琼脂糖凝胶检测结果如图4所示。P219ID无角基因型和P219ID有角基因型的质粒不能扩增出P11D位点的序列，但是可扩增出P219ID位点的序列并得到预期长度的电泳条带，而P11D无角基因型和P11D有角基因型的质粒不能扩增出P219ID位点的序列，但可以扩增出P11D位点的序列并得到预期长度的电泳条带（图7），表明P219ID和P11D位点的序列合成准确，质粒构建成功。



注：泳道1-5样品使用P219ID位点引物，泳道6-10样品使用P11D位点引物；泳道1和8模板为P219ID无角基因型质粒，泳道2和9模板为P219ID有角基因型质粒，泳道3和6模板为P11D无角基因型质粒，泳道4和7模板为P11D有角基因型质粒，泳道5和10为空白对照；M为1000 bp ladder。

图7 四种序列的质粒PCR扩增

6.2 P219ID和P11D位点不同基因型组合样品构建

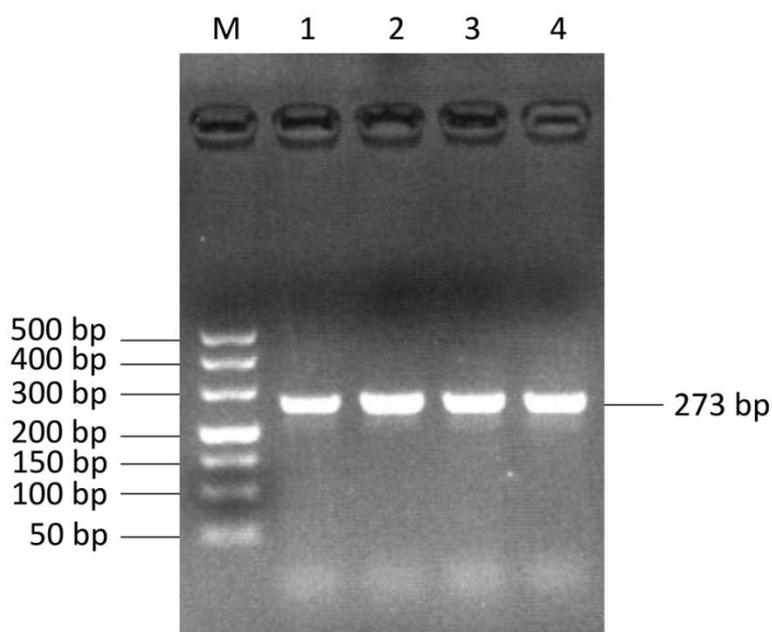
将4种序列质粒浓度稀释至50 ng $\cdot\mu$ L $^{-1}$ ，并将含不同序列的质粒进行等量混合，构建P219ID和P11D位点不同基因型组合样品9种（表5）。

表 5 P219ID 和 P11D 位点不同基因型组合样品构建

样品号	P219ID 位点无角基因型	P219ID 位点有角基因型	P11D 位点无角基因型	P11D 位点有角基因型	备注
1	√ √		√ √		阳性对照
2		√ √		√ √	阴性对照
3	√	√	√	√	P219ID 和 P11D 位点无角基因型杂合个体
4	√ √		√	√	P219ID 无角基因型纯合和 P11D 无角基因型杂合个体
5	√ √			√ √	P219ID 无角基因型纯合和 P11D 有角基因型纯合个体
6		√ √	√	√	P219ID 有角基因型纯合和 P11D 无角基因型杂合个体
7		√ √	√ √		P219ID 有角基因型纯合和 P11D 无角基因型纯合个体
8	√	√		√ √	P219ID 无角基因型杂合和 P11D 有角基因型纯合个体
9	√	√	√ √		P219ID 无角基因型杂合和 P11D 无角基因型纯合个体

注：√表示加一倍量溶液；√√表示加两倍量溶液。

将质粒组合样品1-3号和1头牦牛基因组（DNA浓度50 ng.μL⁻¹）共4个样品各取1 μL作为模板，选用P11D位点引物进行PCR扩增，图8显示质粒样品与牦牛基因组DNA扩增结果中条带大小一致，扩增效率接近，表明制备的阳性对照和阴性对照样品的浓度（50 ng.μL⁻¹）可满足检测的要求。进一步将9个质粒组合样品与2个牦牛基因组DNA样本同时PCR扩增，PCR产物琼脂糖检测结果显示，质粒组合样品与牦牛基因组DNA样本扩增效率接近，且扩增片段大小与预期一致（图9）。



注：1-3 号泳道为质粒组合样品，4 号泳道模板为牦牛基因组 DNA，M 为 500bp DNA leader

图8 稀释后质粒样品与牦牛基因组DNA用P11D位点引物扩增效果对比

7. PCR 反应体系的建立及优化

7.1 PCR 退火温度

PCR Taq 酶预混液操作简单快捷，可提高检测效率。大部分商业化 Taq 酶含 400 μ M/L 的 dNTP，可适用于绝大部分 PCR 实验，本标准 PCR 反应采用的引物适合大多数商业化的 Taq PCR Mix 预混液。

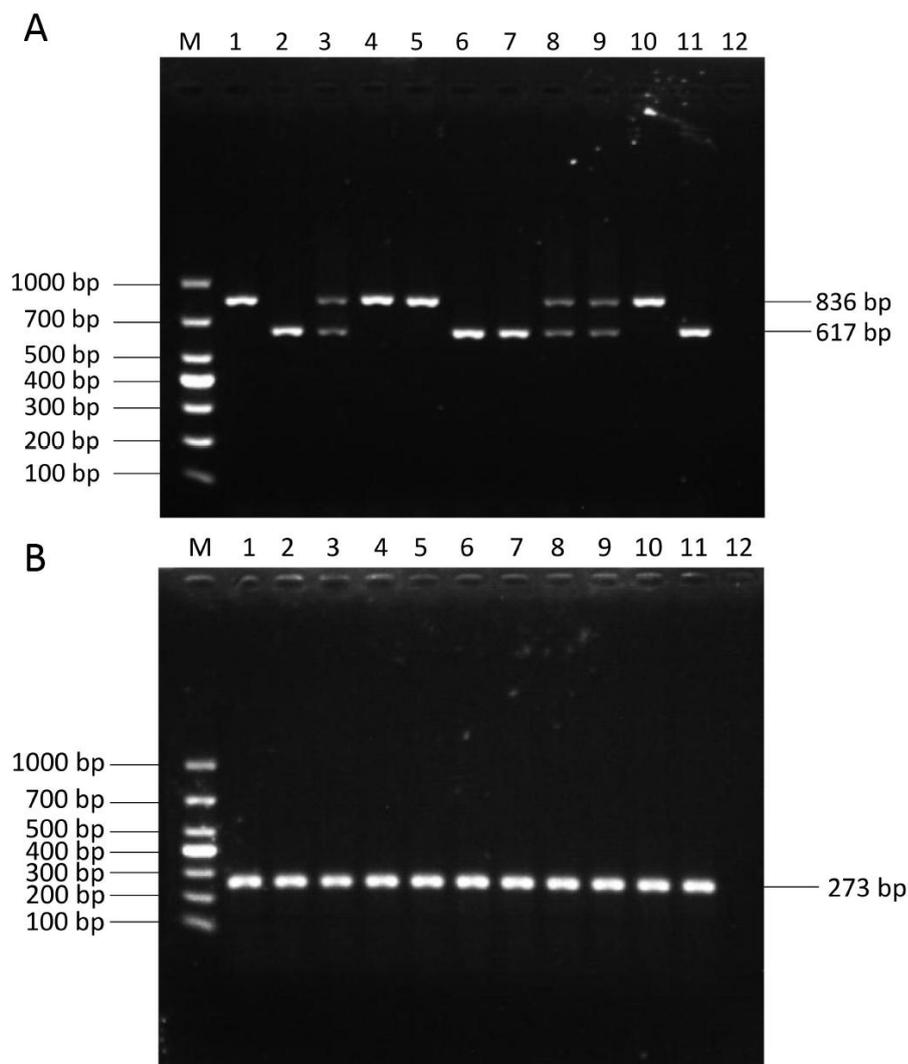
在 PCR 反应过程中需要对退火温度和延伸时间等条件进行优化。退火温度是影响 PCR 反应特异性的重要因素。引物与模板复性所需要的退火温度取决于引物的长度、碱基组成及其浓度。引物长度越短，引物中 G+C 的含量越低，所需的退火温度越低。退火温度高特异性强，但退火温度过高则引物不能与模板牢固结合，DNA 扩增效率下降；退火温度低产量高，但退火温度过低可造成引物与模板错配，非特异性产物增加。引物的退火温度一般在算出的 T_m 值上减去 5 $^{\circ}$ C。根据 PCR 反应程序设置原则，我们设置了不同退火温度的 PCR 反应程序：

P219ID 位点：95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min；95 $^{\circ}$ C 变性 30 s，52 $^{\circ}$ C-60 $^{\circ}$ C 退火 30 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min，30 个循环；72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

P11D 位点：95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min；95 $^{\circ}$ C 变性 30 s，52 $^{\circ}$ C-60 $^{\circ}$ C 退火 30 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s，30 个循环；72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

由图 10 可知，P219ID 位点引物的最优退火温度为 55.3 $^{\circ}$ C，P11D 位点引物

的最优退火温度为 58.7°C。因此，本标准采用 PCR 反应程序中，P219ID 和 P11ID 位点采用的退火温度分别为 55.3°C和 58.7°C。



注：A 1-12 号泳道使用 P219ID 位点引物扩增，泳道 1-9 号样品模板为质粒组合样品，泳道 10-11 号为牦牛基因组 DNA，泳道 12 为空白对照；B 1-12 号泳道使用 P11ID 位点引物扩增，泳道 1-9 号样品模板为质粒组合样品，泳道 10-11 号为牦牛基因组 DNA，泳道 12 为空白对照；M 为 1000bp DNA leader。

图9 质粒组合样品与牦牛基因组DNA PCR扩增效果对比

7.2 PCR 延伸时间

PCR 反应的延伸温度一般选择在 70°C~75°C之间，常用温度为 72°C，过高的延伸温度不利于引物和模板的结合。PCR 反应所需的延伸时间主要取决于 DNA 聚合酶的延伸速率。普通 Taq 酶的延伸速度一般为 1 kb/min。我们根据扩增片段长度的大小，分别设置了不同延伸温度的 PCR 反应程序：

P219ID 位点:

程序 1: 95℃ 预变性 2 min; 95℃ 变性 30 s, 55.3℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 5 min。

程序 2: 95℃ 预变性 2 min; 95℃ 变性 30 s, 55.3℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 5 min。

程序 3: 95℃ 预变性 2 min; 95℃ 变性 30 s, 55.3℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1.5 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 5 min。

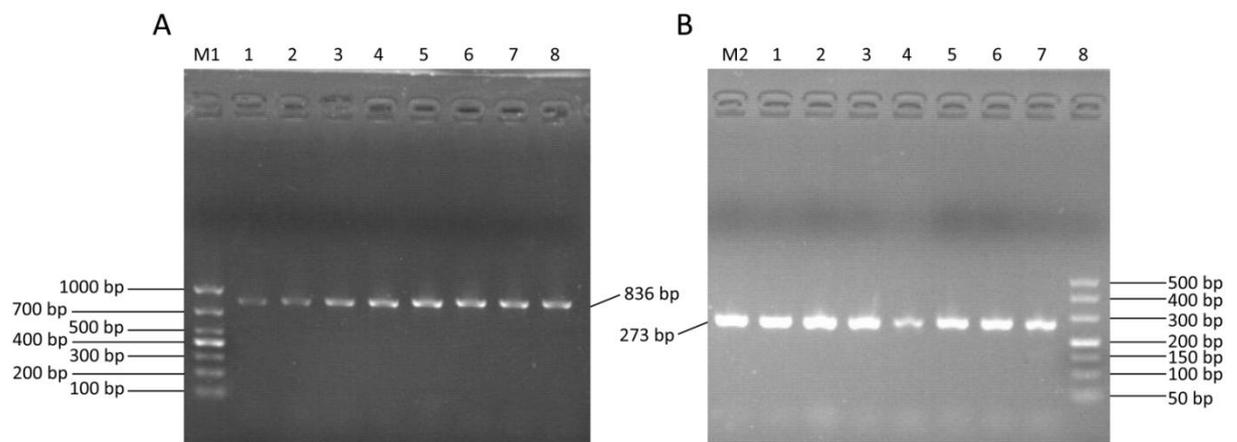
P11D 位点:

程序 1: 95℃ 预变性 2 min; 95℃ 变性 30 s, 58.7℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 15 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 5 min。

程序 2: 95℃ 预变性 2 min; 95℃ 变性 30 s, 58.7℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 5 min。

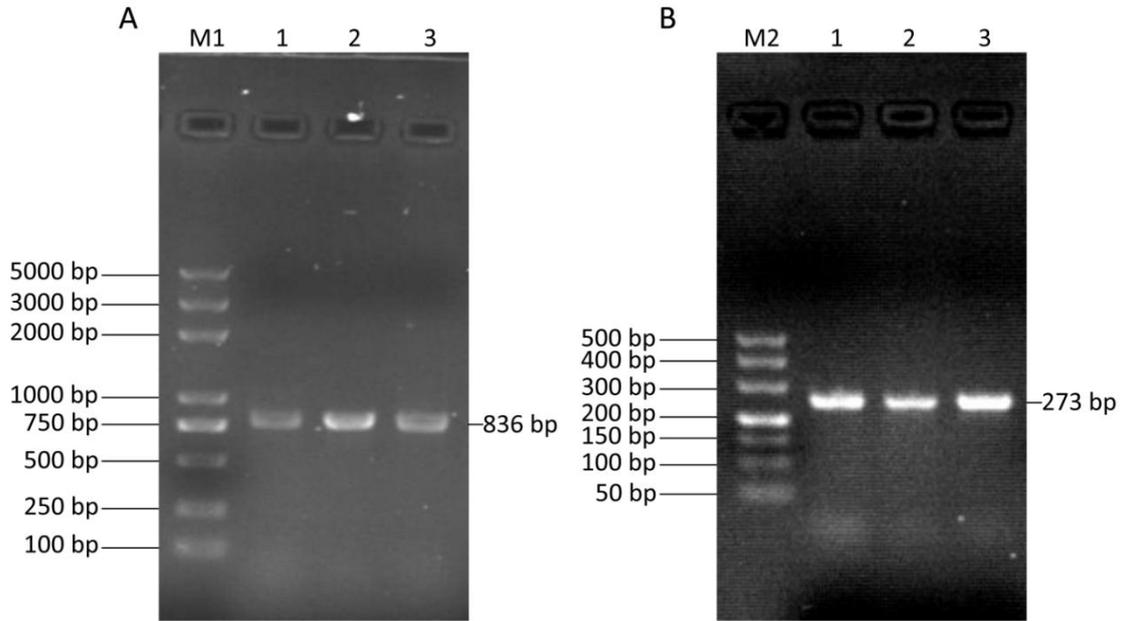
程序 3: 95℃ 预变性 2 min; 95℃ 变性 30 s, 58.7℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 5 min。

由图 11 可知, 不同延伸时间对 P219ID 位点 PCR 产物的浓度有显著的影响, 其中延伸时间为 1 min 时, 条带最亮。不同延伸时间对 P11D 位点 PCR 产物的浓度无影响。因此, 本标准采用的 PCR 反应程序中, P219ID 和 P11D 位点采用的延伸时间分别为 1min 和 15s。



注: A 1 号-8 号泳道的 T_m 值分别为 59.5℃, 59.1℃, 58.7℃, 57.0℃, 55.3℃, 53.9℃, 53.0℃ 和 52.5℃, 扩增目的片段大小均为 836 bp; B.1 号-8 号泳道的 T_m 值分别为 59.5℃, 59.1℃, 58.7℃, 57.0℃, 55.3℃, 53.9℃, 53.0℃ 和 52.5℃, 扩增目的片段大小均为 273 bp; M1 为 1000 bp DNA leader, M2 为 500 bp DNA leader。

图10 P219ID和P11D位点不同退火温度的PCR扩增产物电泳结果

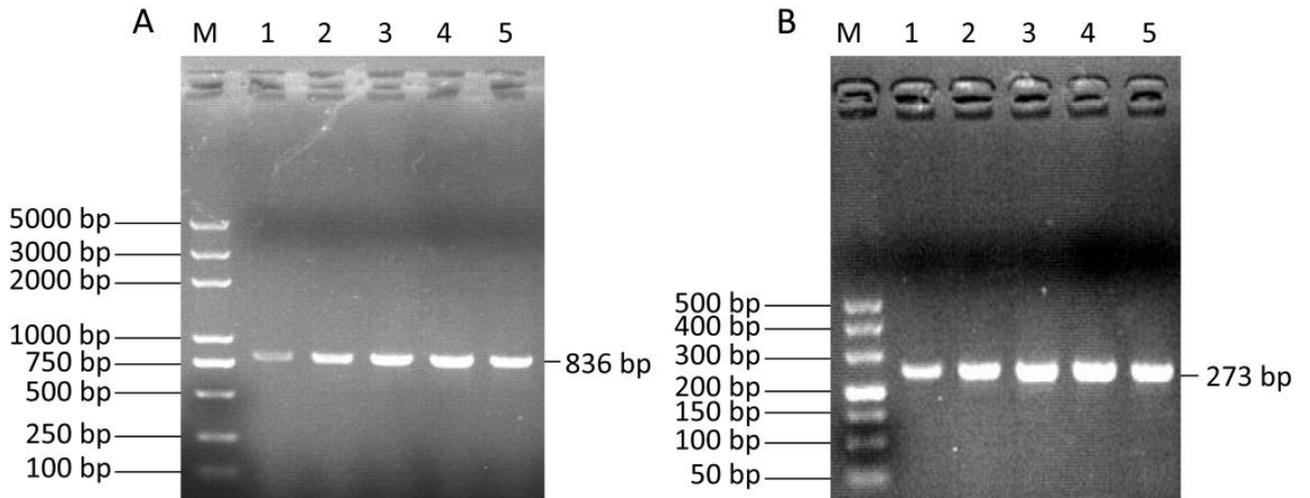


注：A P219ID 位点 1 号-3 号泳道的延伸温度分别为 30s，1min 和 1.5min；B. P11ID 位点 1 号-3 号泳道的延伸温度分别为 15s, 30s 和 1min；M1 为 5000 bp DNA leader, M2 为 500 bp DNA leader。

图11 P219ID和P11ID位点不同延伸时间的PCR扩增产物电泳结果

7.3 PCR 反应模板量

进一步，我们对模板的添加量进行了优化，比较了添加 5ng、12.5ng、25ng、50ng 和 100ng DNA 时 PCR 产物的浓度和特异性。由图 12 可知，模板量大于 50ng 时，P219ID 和 P11ID 位点 PCR 产物的条带最亮，且无非特异性扩增。因此，本标准选择的模板量 ≥ 50 ng。

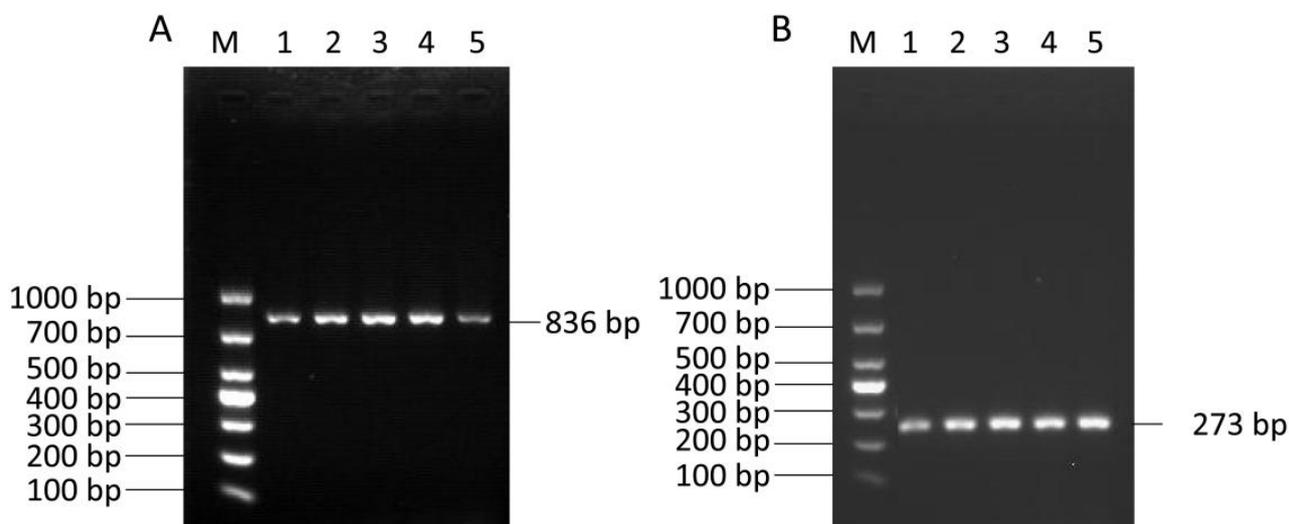


注：A. P219ID 位点；B. P11ID 位点；两张图中 1 号-5 号泳道的模板量分别为 5ng、12.5ng、25ng、50ng 和 100ng；M 为 1000 bp DNA leader。

图12 P219ID和P11ID位点添加不同模板量的PCR扩增产物电泳结果

7.4 引物浓度

进一步，我们对引物的浓度进行了优化，比较了添加不同浓度引物时 PCR 产物的浓度和特异性。由图 13 可知，引物浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时，P219ID 和 P11D 位点 PCR 产物的条带最亮，扩增效率最高且无非特异性扩增。因此，本标准选择的引物浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。



注：A. 1-5 号泳道使用 P219ID 位点引物扩增，1 号-5 号泳道的添加引物的浓度分别为 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、15 $\mu\text{mol/L}$ 和 20 $\mu\text{mol/L}$ ；B. 1-5 号泳道使用 P11D 位点引物扩增，1 号-5 号泳道的添加引物的浓度分别为 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、15 $\mu\text{mol/L}$ 和 20 $\mu\text{mol/L}$ ；M 为 1000 bp DNA leader。

图13 P219ID和P11D位点添加不同浓度引物的PCR扩增产物电泳结果

8. 电泳条件优化

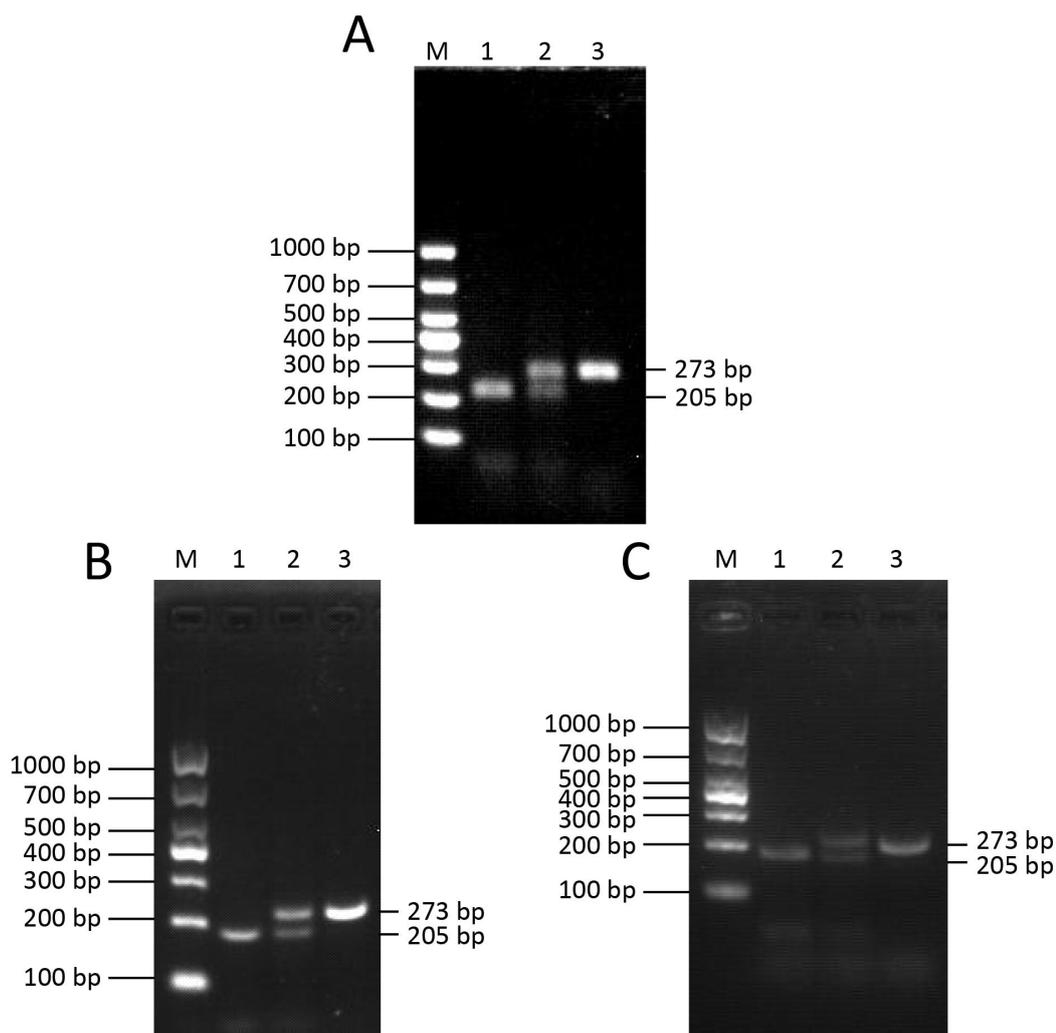
为了更准确判断 P11D 位点基因型，我们对引物琼脂糖凝胶的浓度进行了优化，比较了浓度为 2%、2.5% 和 3% 的琼脂糖凝胶电泳 50min 后的分离效果。由图 14 可知，2.5% 的琼脂糖凝胶可满足 P11D 位点基因分型的要求，因此，本标准对 P11D 位点酶切产物电泳时选择浓度为 2.5% 的琼脂糖凝胶。

9. 结果判定

为规范检测步骤和保证检测结果的准确性，本标准参考国内外分子检测标准，规定了只有阳性、阴性和待测样本的 PCR 产物有特异性扩增条带，且空白对照 PCR 产物无扩增条带的条件下，检测结果方可成立。

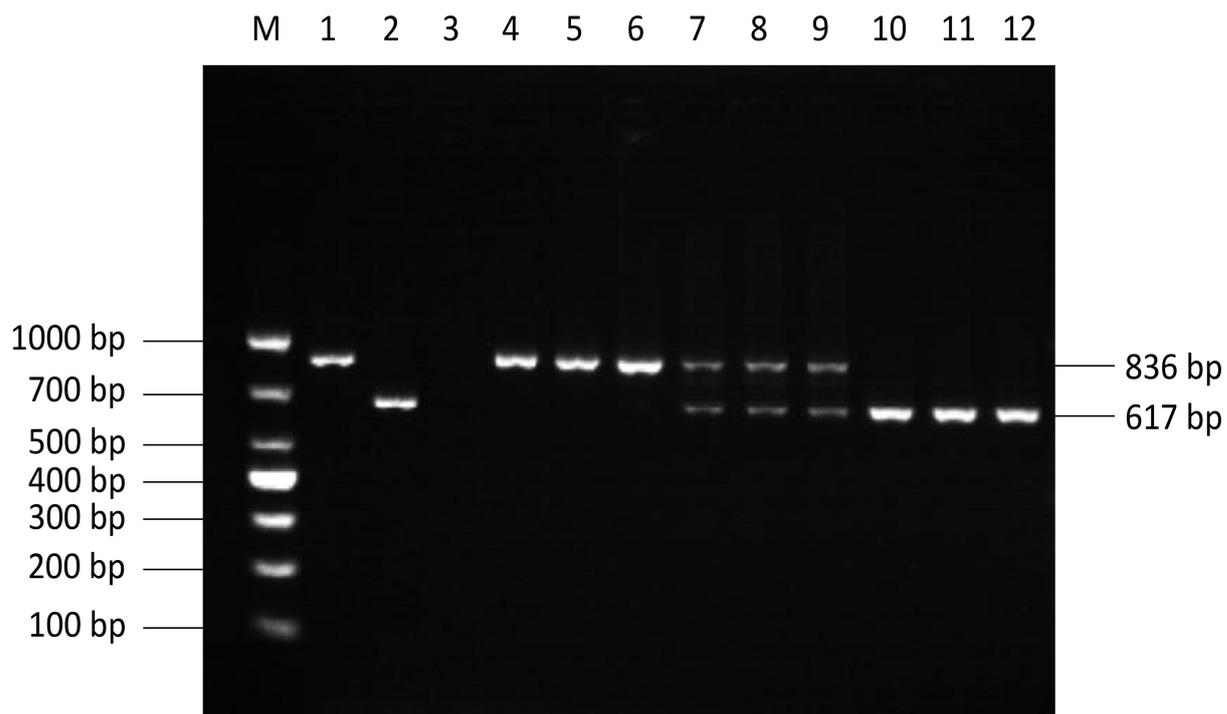
通过分析 1230 头角性状记录明确牦牛的无角性状位点基因型，发现 P219ID 位点的电泳结果显示出 3 种不同的基因型条带，无角纯合个体 (+/+) 表现为 836bp，无角杂合个体 (+/-) 的表现 617bp 和 836bp，有角纯合个体 (-/-) 的表现 617bp。P11D 位点的电泳结果显示出 3 种不同的基因型条带，有

角纯合个体 (+/+) 表现为 273bp，无角杂合个体 (+/-) 的表现 273bp 和 205bp 和 68bp，无角纯合个体 (-/-) 的表现 273bp 和 68bp (图 15 和 16)。两个位点基因型与牦牛 的角性状完全关联，遗传规律符合孟德尔遗传定律。由于 68bp 处条带颜色较浅，故不用于判断基因型。结合两个位点的结果，可准确的判断出待测牦牛所携带的无角位点基因型。



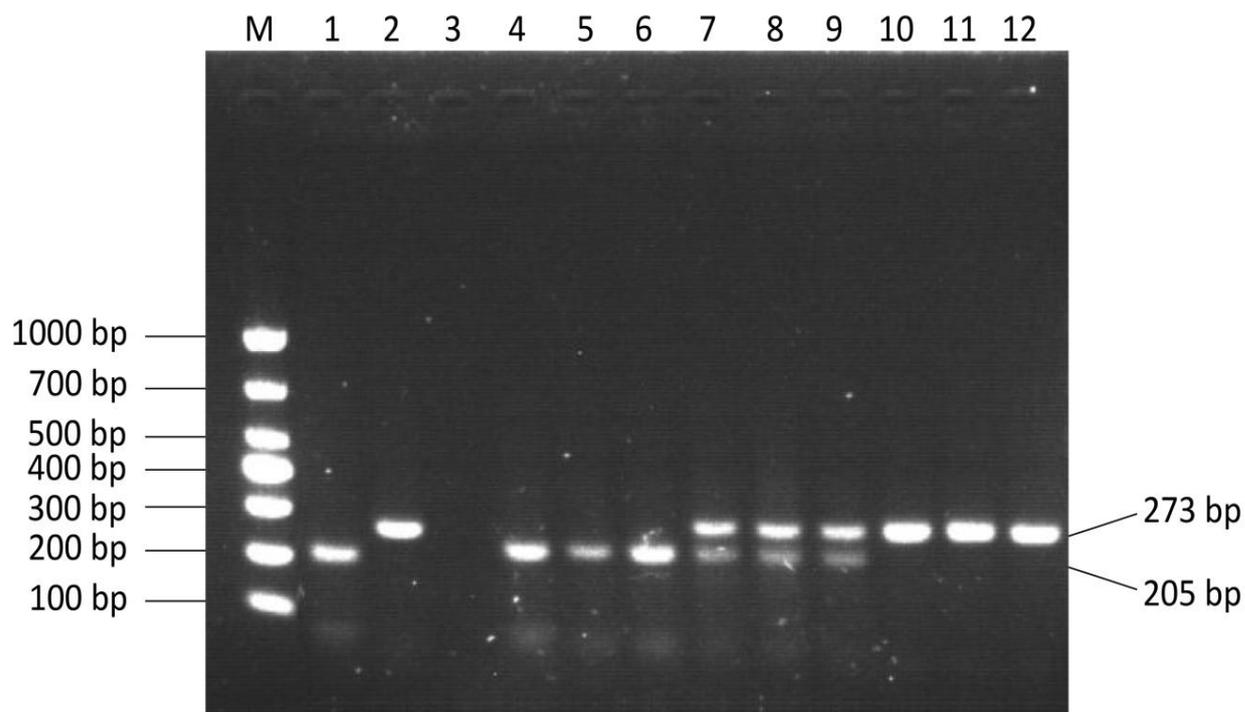
注：A. 1-5 号泳道使用 P219ID 位点引物扩增，号-5 号泳道的添加引物的浓度分别为 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、15 $\mu\text{mol/L}$ 和 20 $\mu\text{mol/L}$ ；B. 1-5 号泳道使用 P11D 位点引物扩增，号-5 号泳道的添加引物的浓度分别为 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、15 $\mu\text{mol/L}$ 和 20 $\mu\text{mol/L}$ ；M 为 1000 bp DNA leader。

图14 两个位点添加不同模板量的PCR扩增产物电泳结果



注：1号泳道为阳性对照，2号泳道为阴性对照，3号泳道为空白对照，4-5号泳道为无角基因型纯合个体（+/+），7-9号泳道为无角基因型杂合个体（+/-），10-12号泳道为有角基因型纯合个体（-/-），M为1000 bp DNA leader。

图 15 P219ID位点电泳检测结果示意图



注：1号泳道为阳性对照，2号泳道为阴性对照，3号泳道为空白对照，4-5号泳道为无角基因型纯合个体（-/-），7-9号泳道为无角基因型杂合个体（+/-），10-12号泳道为有角基因型纯合个体（+/+），M为1000 bp DNA leader。

图 16 P11D位点电泳检测结果示意图

表6 牦牛无角性状位点 P11D 和 P219ID 的基因型频数与基因型频率(n, %)

表型	P11D			P219ID		
	(+/+)	(+/-)	(-/-)	(+/+)	(+/-)	(-/-)
无角表型	0(0.00)	505(87.07)	75(12.93)	75(12.93)	505(87.07)	0(0.00)
有角表型	650(100.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	650(100.00)

三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益

(一) 试验验证的分析、综述报告

1. 牦牛无角性状位点检测方法的大群检测验证

农业行业标准《牦牛无角基因检测技术规程》起草完成后，标准编制小组于2023年5月—6月在青海省牦牛繁育推广服务中心（青海省大通种牛场）和甘南藏族自治州牦牛专业养殖合作社等生产经营单位对大通牦牛和甘南牦牛等牦牛主导品种的无角性状位点进行了验证，验证结果显示，无角性状位点基因型和表型一致。

表7 验证群体来源

品种	数量（头）	样品采集单位
阿什旦牦牛	329	青海省牦牛繁育推广服务中心（青海省大通种牛场）
甘南牦牛	207	甘南藏族自治州夏河县桑科种畜公司、夏河县牙利吉乡尼玛龙村阳诺尔奶牛养殖农民专业合作社

2、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三家具有检测资质的机构，分别为：武汉菲沙基因信息有限公司、西安浩瑞基因技术有限公司、北京格致博雅生物科技有限公司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8和表9。三家检测机构对同一个样品进行3次重复，试验均获得一致性结果，验证结果表明，本标准建立的检测方法重复性高，符合科学性、实用性、规范性和可操作性的原则，能够实现牦牛无角性状位点的准确检测。四家检测机构的验证报告见附件3。

表8 第三方检测验证样品情况

编号	样品名称	样品类型
1	阳性对照	P219ID 和 P1ID 位点无角基因型序列片段的阳性质粒等量混合后的样品
2	阴性对照	P219ID 和 P1ID 位点有角基因型序列片段的阳性质粒等量混合后的样品
3	空白对照	水（一级）
4	样品 1	无角纯合个体的基因组 DNA
5	样品 2	无角杂合个体的基因组 DNA
6	样品 3	有角纯合个体的基因组 DNA

表 9 第三方检测验证结果汇总

样品	位点	检测机构			结论
		武汉菲沙基因信息有限公司	西安浩瑞基因技术有限公司	北京格致博雅生物科技有限公司	
阳性对照	P219ID	+/+	+/+	+/+	无角纯合个体
	P1ID	-/-	-/-	-/-	
阴性对照	P219ID	-/-	-/-	-/-	有角纯合个体
	P1ID	+/+	+/+	+/+	
空白对照	P219ID	/	/	/	/
	P1ID	/	/	/	
样品 1	P219ID	+/+	+/+	+/+	无角纯合个体
	P1ID	-/-	-/-	-/-	
样品 2	P219ID	+/-	+/-	+/-	无角杂合个体
	P1ID	+/-	+/-	+/-	
样品 3	P219ID	-/-	-/-	-/-	有角纯合个体
	P1ID	+/+	+/+	+/+	

检测机构使用的主要仪器型号和试剂信息：

武汉菲沙基因信息有限公司：仪器：PCR 仪（艾本德，Mastercycler® nexus X2）、电泳仪（CANY，EPS-100）。试剂：Taq 酶（诺唯赞，2 × Taq Master Mix (Dye Plus)）、DNAMarker（宝日医，DL 500 和 DL 1000），限制性内切酶（纽英伦，ApoI-HF）。

西安浩瑞基因技术有限公司：仪器：PCR 仪（Bio-Rad，T1000）、电泳仪（北京六一生物科技有限公司，DYY-6C）。试剂：Taq 酶（天根，2×Taq PCR Mix）、DNAMarker（宝日医，DL 500 和 DL 1000），限制性内切酶（纽英伦，ApoI-HF）。

北京格致博雅生物科技有限公司：仪器：PCR 仪（Thermo Fisher，ProFlex 3 x 32）、电泳槽（Bio-Rad，Bio-Rad Sub-Cell® GT）。试剂：Taq 酶（全式金，2 × EasyTaq® PCR SuperMix）、DNAMarker（宝日医，DL 500 和 DL 1000），限制性内切酶（纽英伦，ApoI-HF）。

（二）技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益

插入缺失变异位点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+琼脂糖凝胶电泳法。该标准采用酶切+琼脂糖凝胶电泳法，与毛细管电泳法和直接测序法相比，该方法具有成本低、灵敏度高、特异性强等特点，且不需要毛细管电泳仪、测序仪等专门化检测设备，可适用于普通科研单位和牦牛核心育种场。

农业行业标准《牦牛无角性状位点检测技术规程》的制定，对指导并规范无角牦牛新品种或品系的选育和生产将起到关键性的作用。制定后的标准不仅有利于我国牦牛新品种的培育和牦牛养殖效益的提高，还可以促进牦牛多元化饲养模式及产业发展，提高养殖效率，助力脱贫致富、支撑乡村振兴，具有显著的经济、社会和生态效益。

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

经查，国际和国外均没有《牦牛无角性状位点检测技术规程》此类标准，无需开展相关试验验证对比工作。

五、以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因

经查，国际和国外均没有《牦牛无角性状位点检测技术规程》此类标准，本标准不存在采标问题。

六、与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系

与我国现行的农业法和畜牧法等一系列法律没有相悖之处。标准部分内容参照《牛个体及亲子鉴定微卫星 DNA 法》（GB/T 27642），与已制定标准没有相悖之处。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

在制定行业标准的过程中起草单位广泛征求了意见，并经过多次多层面反复磋商，未出现重大分歧。

八、涉及专利的有关说明

建议本标准作为推荐性标准，对我国牦牛无角性状位点进行遗传检测。

九、实施标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议

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，建议牦牛核心育种场等位采用本标准实施牦牛无角性状位点的检测，并在系谱中进行标识，根据生产需求进行角性状的选择。

十、其他应予说明的事项

2024年7月12日，《牦牛无角基因检测技术规程》预审会专家组对标准的名称进行讨论，一致认为牦牛无角性状遗传机理明确，存在确定的致因突变，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。针对牦牛无角性状的两个致因突变位点，该方法是基于聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction, PCR）原理建立了一套标准化检测方法的技术规程，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《牦牛无角性状基因型检测 PCR 法》。

附件

第三方检测验证报告

一、武汉菲沙基因信息有限公司

牦牛无角性状位点检测技术 验证报告



委托单位：中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所

测试机构：武汉菲沙基因信息有限公司



验证时间：2023年10月12日-10月13日

受中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所委托, 我公司根据委托单位提供的《牦牛无角性状位点检测技术规程》标准送审稿, 对标准中牦牛无角性状位点检测方法进行了验证。

一、材料与方法

1. 样品

委托单位共提供 6 个样品, 包括: 1 个阳性对照、1 个阴性对照、1 个空白对照以及 3 个待测样品(样品 1-样品 3)。

2. 试剂

2 × Taq Master Mix (Dye Plus) (诺唯赞, 南京), DNAMarker 500bp (宝日医, 北京), DNAMarker 1000bp (宝日医, 北京), ApoI-HF 内切酶 (New England Biolabs, 北京), 琼脂糖 (翌圣, 上海), GoldView™ 核酸染料 I (庄盟, 北京)。

3. 仪器

PCR 仪 (Mastercycler® nexus X2, 艾本德, 德国); 核酸电泳仪 (EPS-100, CANY, 上海); 凝胶成像仪 (Tanon 2500, 天能, 上海)。

4. 方法

依据《牦牛无角性状位点检测技术规程》(标准送审稿)中的方法。

二、验证的内容与结果

1. PCR 产物的琼脂糖核酸电泳

采用符合牦牛无角性状位点检测技术规程的方法进行实验。按照标准用 P219ID 位点引物对 6 个样品进行 PCR 扩增, 每个样品设置 3 个重复, 随后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 琼脂糖凝胶电泳结果见图 1。用 P11ID 位点引物对 6 个样品进行 PCR 扩增, 每个样品设置 3 个重复, 利用 ApoI-HF 内切酶对 PCR 产物进行酶切, 对酶切产物进行 3% 琼脂糖凝胶电泳, 琼脂糖凝胶电泳结果见图 2。

图 1 和图 2 中电泳条带清晰, 大小与预期片段大小一致, 空白对照未出现预期扩增片段, 符合后期检测分析要求。

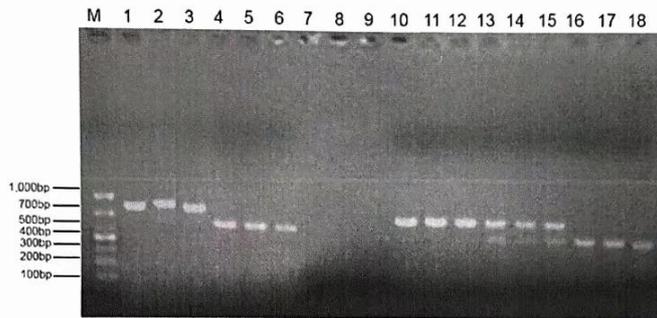


图 1 P219ID 位点 PCR 扩增产物电泳检测图

注：泳道 1-3 为阳性对照的三个重复，泳道 4-6 为阴性对照的三个重复，泳道 7-9 为空白对照的三个重复，泳道 10-12 为样品 1 的三个重复，泳道 13-15 为样品 2 的三个重复，泳道 16-18 为样品 3 的三个重复，M 代表 DNA Marker。



图 2 P11D 位点酶切产物电泳检测图

注：泳道 1-3 为阳性对照的三个重复，泳道 4-6 为阴性对照的三个重复，泳道 7-9 为空白对照的三个重复，泳道 10-12 为样品 1 的三个重复，泳道 13-15 为样品 2 的三个重复，泳道 16-18 为样品 3 的三个重复，M 代表 DNA Marker。

三、结论

根据《牦牛无角性状位点检测技术规程》中检测结果判定方法，本次实验中阳性对照样品在 P219ID 位点处仅有一条 836bp 的条带，P11D 位点处仅有一条 205bp 的条带，判断为无角性状位点纯合个体，与实际情况相符；阴性对照样品在 P219ID 位点处仅有一条 617bp 的条带，P11D 位点处仅有一条 273bp 的条带，判断为有角性状位点纯合个体，与实际情况相符。同理，样品 1 结果与阳性对照一致，判断为无角性状位点纯合个体，样品 2 在 P219ID 位点有 836bp 和 617bp 的两条条带，在 P11D 位点有 273bp 和 205bp 的两条条带，判断为无角杂合个体，样品 3 与阴性对照一致，判断为有角性状位点纯合个体，与实际情况相符。

二、西安浩瑞基因技术有限公司

验证报告

委托单位：中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所

测试机构：西安浩瑞基因技术有限公司

验证时间：2023年10月9日-10月12日



受中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所委托，我公司根据其提供的《牦牛无角性状位点检测技术规程》标准送审稿，对标准中牦牛无角性状位点的检测方法进行了验证。

一、验证的方法及材料

1. 方法

《牦牛无角性状位点检测技术规程》(标准送审稿)正文中牦牛无角性状位点的检测方法。

2. 样品

委托单位共提供 6 个样品，包括：1 个阳性对照、1 个阴性对照、1 个空白对照和 3 个待测样品。

表 1 样品说明

编号	样品说明
1	阳性对照
2	阴性对照
3	空白对照
4	样品 1
5	样品 2
6	样品 3

3. 仪器设备品牌及型号

3.1 PCR 仪: Bio-Rad, 型号为 T1000。

3.2 普通核酸电泳仪: 北京六一生物科技有限公司, 型号为 DYY-6C 型。

4. 主要试剂

4.1 Taq 酶: 天根生化科技(北京)有限公司, 2×Taq PCR Mix。

4.2 DNAMarker: 宝日医生物技术(北京)有限公司, DL 500 DNA Marker, DL1,000 DNA Marker。

4.3 灭菌双蒸水: 生工生物工程(上海)股份有限公司。

4.4 限制性内切酶: 纽英伦生物技术(北京)有限公司 Apol-HF。

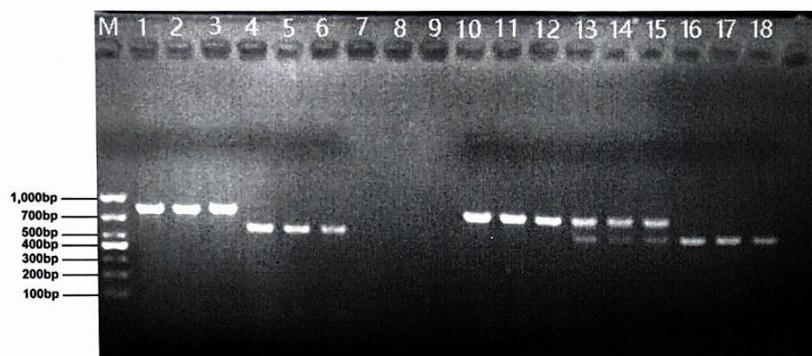
二、验证的内容与结果

1. PCR 产物的琼脂糖核酸电泳

采用符合牦牛无角性状位点检测技术规程的方法进行实验。按照标准分别以 P219ID 位点引物和 P11ID 位点引物对 6 个样品进行 PCR 扩增，每个样品设置 3 个重复，随后对 P11ID 位点的 PCR 产物进行酶切，酶切结束后取 219ID 位点 PCR

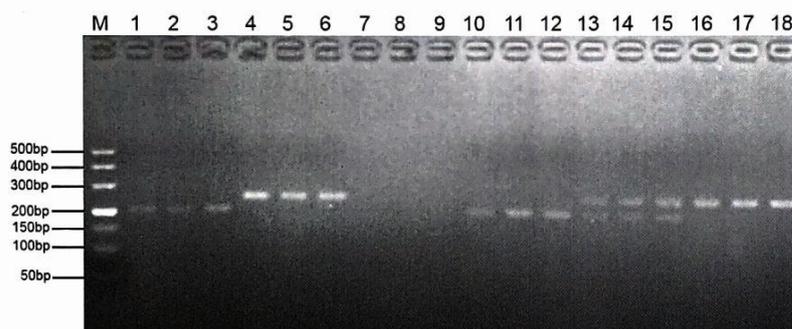


产物和 P11D 引物的酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳，琼脂糖凝胶电泳结果见图 1 和图 2。



注：泳道 1-3 为阳性对照的三个重复，泳道 4-6 为阴性对照的三个重复，泳道 7-9 为空白对照的三个重复，泳道 10-12 为样品 1 的三个重复，泳道 13-15 为样品 2 的三个重复，泳道 16-18 为样品 3 的三个重复，M 代表 DNA Marker。

图 1 P219ID 位点 PCR 扩增产物电泳检测图



注：泳道 1-3 为阳性对照的三个重复，泳道 4-6 为阴性对照的三个重复，泳道 7-9 为空白对照的三个重复，泳道 10-12 为样品 1 的三个重复，泳道 13-15 为样品 2 的三个重复，泳道 16-18 为样品 3 的三个重复，M 代表 DNA Marker。

图 2 P11D 位点酶切产物电泳检测图

从图 1 和图 2 可看出 P219ID 位点 PCR 扩增产物和 P11D 位点酶切产物的条带清晰明亮，且条带大小与预期片段大小一致，空白对照中没有预期扩增片段，表明 PCR 反应体系和检测方法正常，能够满足后续检测分析的要求。

2. 结果判定

根据牦牛无角性状位点检测技术规程中提供的检测结果分析说明，本次验证



实验中阳性对照 P219ID 位点只有一条大小为 836bp 的条带, P1ID 位点只有一条大小为 205bp 的条带, 判断为无角性状位点纯合个体, 与实际情况相符; 阴性对照 P219ID 位点只有一条大小为 617bp 的条带, P1ID 位点只有一条大小为 273bp 的条带, 判断为有角性状位点纯合个体, 与实际情况相符; 同理, 根据图 1 和图 2 可判定样品 1 和样品 3 分别为无角性状位点纯合个体和有角性状位点纯合个体, 样品 2 的 P219ID 位点同时检测到了大小为 836bp 和 617bp 的条带, P1ID 位点同时检测到了大小为 273bp 和 205bp 的条带, 判定为无角性状位点杂合个体, 与实际情况相符。

表 2 样品测试结果汇总

样品	位点	基因型判定结果			结论
		重复 1	重复 2	重复 3	
阳性对照	P219ID	+/+	+/+	+/+	无角纯合个体
	P1ID	-/-	-/-	-/-	
阴性对照	P219ID	-/-	-/-	-/-	有角纯合个体
	P1ID	+/+	+/+	+/+	
空白对照	P219ID	/	/	/	/
	P1ID	/	/	/	
样品 1	P219ID	+/+	+/+	+/+	无角纯合个体
	P1ID	-/-	-/-	-/-	
样品 2	P219ID	+/-	+/-	+/-	无角杂合个体
	P1ID	+/-	+/-	+/-	
样品 3	P219ID	-/-	-/-	-/-	有角纯合个体
	P1ID	+/+	+/+	+/+	

注: “/” 代表无 PCR 扩增产物。

三、北京格致博雅生物科技有限公司

牦牛无角性状位点 检测报告



验证单位：北京格致博雅生物科技有限公司

委托单位：中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所

验证日期：2023年10月10日-10月13日



1. 技术服务的内容

为验证委托单位提供的《牦牛无角性状位点检测技术规程》(标准送审稿)中牦牛无角性状位点检测方法, 本公司对委托单位送的 6 个样品进行检测。

2. 验证方法

《牦牛无角性状位点检测技术规程》(标准送审稿)正文中牦牛无角性状位点的检测方法。

3. 仪器与试剂

(1) 检测仪器

PCR 仪 (ProFlex 3 x 32, Thermo Fisher, 美国), 电泳槽 (Bio-Rad Sub-Cell® GT, 伯乐, 美国), 紫外凝胶成像分析仪 (HD-NC600L, 霍尔德, 山东)。

(2) 检测试剂

2×EasyTaq® PCR SuperMix (全式金, 北京), DNAMarker 500bp (宝日医, 北京), DNAMarker 1000bp (宝日医, 北京), ApoI-HF (New England Biolabs, 北京), Safe Green 核酸染料 (Biosharp, 安徽)。

4. 样品信息

委托单位共提供 6 个样品, 包括: 1 个阳性对照、1 个阴性对照、1 个空白对照以及 3 个待测样品(样品 1-样品 3)。

5. 实验结果

用委托方提供的 P219ID 和 P11ID 位点引物对 6 个样品进行 PCR 扩增, 每个样品设置 3 个重复, 随后按照《牦牛无角性状位点检测技术规程》(标准送审稿)的方法进行基因型检测, P219ID 和 P11ID 位点的电泳结果见图 1 和图 2。图 1 和图 2 中电泳条带清晰, 大小与预期片段大小一致, 空白对照未出现预期扩增片段, 表明本实验检测方法正确, 能够满足后续检测分析的要求。

6. 结果判断

根据牦牛无角性状位点检测技术规程中提供的检测结果分析说明, 对本试验检测样品的基因型进行判断。样品 1 为无角性状位点纯合个体, 样品 2 为无角性状位点杂合个体, 样品 3 为有角性状位点纯合个体, 与实际情况相符。

JOS



附图

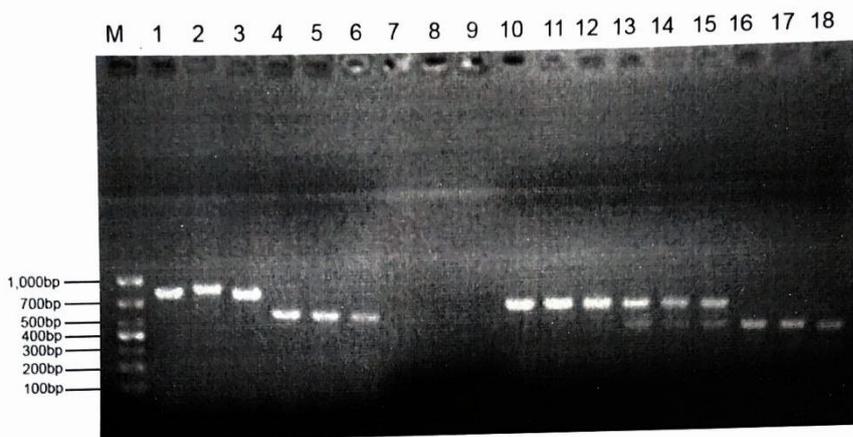


图 1 P219ID 基因 PCR 扩增产物 1%琼脂糖凝胶电泳检测图

注：M 代表 DNA Marker，泳道 1-3 为阳性对照，泳道 4-6 为阴性对照，泳道 7-9 为空白对照，泳道 10-12 为样品 1，泳道 13-15 为样品 2，泳道 16-18 为样品。

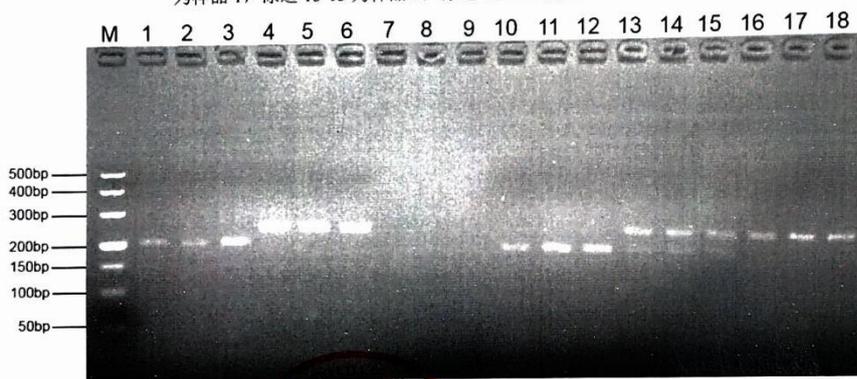


图 2 P11D 基因 PCR 扩增酶切产物 1%琼脂糖凝胶电泳检测图

注：M 代表 DNA Marker，泳道 1-3 为阳性对照，泳道 4-6 为阴性对照，泳道 7-9 为空白对照，泳道 10-12 为样品 1，泳道 13-15 为样品 2，泳道 16-18 为样品。

