

实验鸡和鸭 第5部分：遗传质量控制

Laboratory chicken and duck—Part 5: Genetic quality control

2022-10-28 发布

2023-02-01 实施

上海市市场监督管理局 发布

目 次

前言	Ⅲ
引言	Ⅳ
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 封闭群鸡和鸭的引种及繁殖方式	1
5 封闭群的遗传质量监测	2
5.1 抽样	2
5.2 检测方法	2
5.3 监测频率	2
6 结果判定	2
6.1 计算	2
6.2 位点分析	2
6.3 判定	2
附录 A (规范性) 实验鸡微卫星 DNA 标记检测方法	3
附录 B (规范性) 实验鸭微卫星 DNA 标记检测方法	6
参考文献	8

前 言

本文件按照 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》的规定起草。

本文件是 DB31/T 1377《实验鸡和鸭》的第5部分。DB31/T 1377 已经发布了以下部分：

- 第1部分：微生物学监测；
- 第2部分：寄生虫监测；
- 第3部分：配合饲料营养成分；
- 第4部分：设施及环境；
- 第5部分：遗传质量控制。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由上海市科学技术委员会提出并组织实施。

本文件由上海市实验动物标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：上海实验动物研究中心、北京维通利华实验动物技术有限公司、上海交通大学、中国农业科学院上海兽医研究所、上海市农业科学院畜牧兽医研究所。

本文件主要起草人：赵勇、韩凌霞、孟和、魏晓锋、陈鸿军、孙竹筠、范春、陈国强、胡建华、孙彤、俞赵荣、陈永军、刘惠莉。

引 言

实验动物标准化是实验动物科学研究高质量发展的基础工作,只有实现实验动物标准化,动物实验结果才具有均一性、可重复性及可比性。标准的研究、制定与发布实施是开展实验动物标准化管理的重要依据,也是促进实验动物资源整合优化、开放共享的基础保障。禽类实验动物中最常用的是鸡和鸭。DB31/T 1377《实验鸡和鸭》是指导上海市禽类实验动物标准化的基础性和通用性标准,由5个部分构成。

- 第1部分:微生物学监测。规范了实验鸡和鸭需要监测的微生物种类及相应微生物的检测方法。
- 第2部分:寄生虫学监测。规范了实验鸡和鸭的寄生虫学监测的检测要求、检测项目、检测程序、检测方法、检测内容和结果判定。
- 第3部分:配合饲料营养成分。规范了实验鸡和鸭配合饲料的质量要求、卫生要求、营养成分、营养成分测定要求、检测规则、标签、包装、贮存和运输要求。
- 第4部分:设施及环境。规范了实验鸡和鸭的环境及设施条件的建筑、工艺布局、饲养条件、废物处理、运输及检测等要求。
- 第5部分:遗传质量控制。规范了实验鸡和鸭的繁殖方法、遗传质量监测和结果判定。

DB31/T 1377《实验鸡和鸭》细化了实验动物国家标准原有内容,补充了关键性技术标准,为实验鸡和鸭质量全面评价提供了基本参数,推动实验动物质量标准化和新资源共享服务,有利于保证动物实验结果的可靠性和医用生物材料的安全性验证,并为进一步完善我国实验动物标准体系等方面发挥作用。

实验鸡和鸭 第5部分：遗传质量控制

1 范围

本文件规定了实验鸡和鸭的繁殖方法、遗传质量监测和结果判定。

本文件适用于上海市封闭群实验鸡和鸭的遗传质量控制。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 14923 实验动物 哺乳类实验动物的遗传质量控制

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 术语和定义

GB 14923 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

封闭群 closed colony

以非近亲交配方式进行繁殖生产的，在不从外部引入新个体的条件下，至少连续繁殖4代的种群。

[来源：GB 14923—2010，2.12，有修改]

3.2

杂合度 heterozygosity

h

某一基因座上的等位基因是杂合体的频率。

3.3

基因频率 gene frequency

特定位点上一种等位基因占该位点全部等位基因的比率。

3.4

近交系数 inbreeding coefficient

个体的等位基因来自共同的祖先基因的概率。

4 封闭群鸡和鸭的引种及繁殖方式

4.1 种禽的遗传背景应明确或来源清楚，资料完整，包括但不限于：来源、品系名称、引种日期、世代及主要生物学特征。

4.2 应保持基因多态性，避免近交系数随繁殖代数增加而过快上升。

4.3 采用最佳避免近交法、循环交配或随机交配法。

4.4 种群的雄雌个体比例宜为1:8~1:10。

5 封闭群的遗传质量监测

5.1 抽样

5.1.1 种群规模不大于 100 羽的,随机抽取不少于 25 羽,雌雄不限。

5.1.2 种群规模大于 100 羽的,选取 15% 的比例,随机抽取,雌雄不限。

5.2 检测方法

5.2.1 采用微卫星分子标记方法检测鸡,按照附录 A 执行。

5.2.2 采用微卫星分子标记方法检测鸭,按照附录 B 执行。

5.3 监测频率

每个世代每个种群至少利用微卫星 DNA 标记方法进行 1 次监测。

6 结果判定

6.1 计算

利用群体遗传学软件计算,实验鸡计算公式按照 A.5 执行,实验鸭计算公式按照 B.5 执行。

6.2 位点分析

当所用微卫星标记位点对被检群体的多态信息含量大于 0.5,则该位点可继续用于判定,否则应增加或更换标记位点。

6.3 判定

6.3.1 群体的平均近交系数为负值,判为封闭群。

6.3.2 杂合度大于 0.5,判为封闭群。

附录 A

(规范性)

实验鸡微卫星 DNA 标记检测方法

A.1 原理

微卫星标记(microsatellite)又被称为短串联重复序列(short tandem repeats, STR)或简单重复序列(simple sequence repeats, SSR),是均匀分布于真核生物基因组中的简单重复序列,由 2 个~6 个核苷酸的串联重复片段构成。重复单位的重复次数在个体间呈高度变异性并且数量丰富,常用于群体遗传学结构分析。通常通过 PCR 扩增,利用特定软件对扩增产物的分子量大小作为等位基因进行检测。

A.2 试剂

基因组 DNA 提取试剂盒,商品化 PCR 扩增试剂盒,PCR 引物和荧光素 HEX 和 FAM 标记探针。

A.3 步骤

A.3.1 基因组 DNA 提取

按照 NY/T 541 的规定,从鸡翅静脉采集被检实验鸡的抗凝血提取基因组 DNA。

A.3.2 引物信息及分组

将联合国粮食及农业组织(FAO)推荐的用于鸡遗传多样性分析的 14 对微卫星标记,依据扩增产物的分子量大小,分成 2 个组,分别标记荧光素 HEX 和 FAM,同组内的位点可同时进行基因型检测。位点信息见表 A.1。

表 A.1 实验鸡遗传检测微卫星位点信息及分组

组合	标记	引物序列 (5'→3')	片段大小 bp	荧光标记	退火温度 ℃
A	ADL0268	CTC CAC CCC TCT CAG AACTA CAA CTT CCC ATC TAC CTA CT	112~116	FAM	60
	ADL0278	CCA GCA GTC TAC CTYT CCTAT TGT CAT CCA AGA ACA GTGTG	112~122	HEX	60
	LEI0094	GAT CTC ACC AGT ATG AGC TGCTCT CAC ACT GTAACA CAG TGC	246~262	FAM	58
	MCW0216	GGG TTT TAC AGG ATG GGACG AGT TTC ACT CCC AGG GCT CG	146~148	FAM	60
	MCW0248	GTT GTT CAA AAG AAG ATG CAT GTTG CAT TAA CTG GGC ACT TTC	214~218	FAM	61
	MCW0069	GCA CTC GAG AAA ACT TCC TGC GATT GCT TCAGCA AGC ATG GGA GGA	156~170	HEX	59

表 A.1 实验鸡遗传检测微卫星位点信息及分组（续）

组合	标记	引物序列 (5'→3')	片段大小 bp	荧光标记	退火温度 ℃
B	MCW0081	GTT GCT GAG AGC CTG GTG CAGCCT GTA TGT GGA ATT ACT TCT C	114~134	FAM	58
	MCW0222	GCA GTT ACA TTG AAA TGA TTC CTTC TCAAAA CAC CTA GAA GAC	219~221	FAM	58
	MCW0295	ATC ACT ACA GAA CAC CCT CTCTAT GTA TGC ACG CAG ATA TCC	88~100	FAM	62
	LEI0166	CTC CTG CCC TTA GCT ACG CA TAT CCC CTG GCT GGG AGTTT	345~355	FAM	60
	LEI0234	ATG CAT CAG ATT GGT ATT CAA CGT GGC TGT GAA CAAATATG	217~299	HEX	58
	MCW0037	ACC GGT GCC ATC AAT TAC CTA TTA GAAAGC TCA CAT GAC ACT GGG AAA	151~155	FAM	59
	MCW0111	GCT CCA TGT GAA GTG GTTTA ATG TCC ACT TGT CAA TGATG	99~107	FAM	55
	MCW0016	ATG GCG CAGAAG GCAAAG CGATAT TGG CTT CTG AAG CAG TTG CTA TGG	143~147	HEX	57

A.3.3 PCR 反应

反应程序:95 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,退火 30 s,72 ℃ 30 s,30 个~35 个循环;72 ℃再延伸 10 min;2 ℃~8 ℃ 保存。

A.4 PCR 产物的检测

用灭菌去离子水将 PCR 扩增产物适量稀释。取稀释产物 2 μL 和含分子量标准的缓冲液 8 μL 混合,95 ℃变性 5 min,立即置于冰上,5 min 后电泳。在测序仪上完成 PCR 产物的电泳检测,利用软件收集电泳结果,进行 PCR 产物分子量分析和基因型的判定。

A.5 数据分析

A.5.1 杂合度

杂合度的计算见公式(A.1):

$$h = \frac{n}{n-1} (1 - \sum p_i^2) \dots\dots\dots (A.1)$$

式中:
h 杂合度;
p_i 某个位点的第 i 个等位基因的样本频率;
n 检测样本中序列的数量。

A.5.2 近交系数

近交系数的计算见公式(A.2)：

$$F_x = \sum \left[\left(\frac{1}{2} \right)^{n_1+n_2+1} (1+F_A) \right] \dots\dots\dots (A.2)$$

式中：

- F_x ——个体 x 的近交系数；
 $1/2$ ——各代遗传结构的半数；
 n_1 ——父亲到共同祖先的代数；
 n_2 ——母亲到共同祖先的代数；
 F_A ——共同祖先自身的近交系数；
 $n_1+n_2+1=N$ 亲本相关通径链中的个体数。

附录 B

(规范性)

实验鸭微卫星 DNA 标记检测方法

B.1 基因组 DNA 提取

鸭腿静脉或蹼静脉采集被检实验鸭的抗凝血,提取基因组 DNA。

B.2 PCR 反应体系

反应条件:95 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s,50 ℃~64 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,30 个~35 个循环;72 ℃再延伸 10 min;2 ℃~8 ℃保存。

B.3 PCR 产物检测

取 5 μ L PCR 产物与 1 μ L 6 $\times$ 上样缓冲液混匀,根据其产物片段的大小分别用 2%~2.5%的琼脂糖凝胶,电泳检测,紫外灯下观察结果并拍照。上样前,根据检测结果用灭菌去离子水将 PCR 的扩增产物稀释适宜倍数后,取稀释产物 2 μ L 和含分子质量标准的上样缓冲液 8 μ L 混合,95 ℃变性 5 min,取出后立即置于冰上。5 min 后,将变性的 PCR 产物上样,电泳,收集荧光信号,形成胶图,进行数据提取、分子质量标准设定和 PCR 产物片段大小的计算,以及基因型的判定。

B.4 数据分析

采用生物统计学软件计算群体等位基因和基因频率。其他同 A.5。

B.5 结果判定

结合饲养管理,在未从外部引入新个体的条件下已连续繁殖 4 个世代以上,则判为符合实验用(见表 B.1)。

表 B.1 实验鸭遗传检测微卫星位点信息及分组

组合	标记名称	引物序列(5'→3')	片段大小/ bp	荧光标记	退火温度/ ℃
A	CAUD004	TCCACTTGGTAGACCTTGAG TGGGATTCAGTGAGAAGCCT	202~222	HEX	62
	CAUD005	CTGGGTTTGGTGGAGCATAA TACTGGCTGCTTCATTGCTG	248~266	FAM	61
	CAUD011	TGCTATCCACCCAATAAGTG CAAAGTTAGCTGGTATCTGC	129~142	HEX	52
	CAUD013	ACAATAGATTCCAGATGCTGAA ATGTCTGAGTCCTCGGAGC	87~105	FAM	58
	CAUD023	CACATTAACATATTCGGTCT CAGCCAAAGAGTTCAACAGG	164~167	FAM	52

表 B.1 实验鸭遗传检测微卫星位点信息及分组 (续)

组合	标记名称	引物序列(5'→3')	片段大小/ bp	荧光标记	退火温度/ ℃
A	CAUD026	ACGTCACATCACCCACAG CTTTGCCTCTGGTGAGGTTT	142~152	FAM	61
	CAUD035	GTGCCTAACCCTGATGGATG CTTATCAGATGGGGCTCGGA	221~239	FAM	63
B	CAUD032	GAAACCAACTGAAAACGGGC CCTCCTGCGTCCCAATAAG	118~126	FAM	58
	CAUD027	AGAAGGCAGGCAAAATCAGAG TCCACTCATAAAAAACACCCACA	112~122	HEX	64
	APH08	AAAGCCCTGTGAAGCGAGCTA TGTGTGTGCATCTGGGTGTGT	176~187	HEX	53
	APH13	CAACGAGTGACAATGATAAAA CAATGATCTCACTCCAATAG	243~255	HEX	56
	APH18	TTCTGGCCTGATAGGTATGAG GAATTGGGTGGTTCATACTGT	149~153	FAM	58
	APH20	ACCAGCCTAGCAAGCACTGT GAGGCTTTAGGAGAGATTGAAAA	166~172	HEX	58
C	APH09	GGATGTTGCCCCACATATTT TTGCCTTGTTTATGAGCCATTA	104~130	FAM	58
	APH21	CTTAAAGCAAAGCGCACGTC AGATGCCCAAAGTCCTGTGGT	132~139	HEX	59

参 考 文 献

- [1] NY/T 1673 畜禽微卫星 DNA 遗传多样性检测技术规程
 - [2] 鸡微卫星数据库. <https://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTldb/GG/index>
 - [3] 鸭基因组数据. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/8839>
-