

第十八章 T/CALAS 19—2017《实验动物 SPF 猪遗传质量控制》实施指南

第一节 工作简况

针对国内实验动物行业缺乏“SPF 猪遗传质量控制”的具体情况，本研究提出了《实验动物 SPF 猪遗传质量控制》团体标准的制定。通过本标准，可以对封闭群 SPF 猪群进行群体遗传质量检测 and 评估，对于实验动物猪群体遗传质量的改善和提高具有指导性意义。该项目由全国实验动物标准化技术委员会（SAC/TC281）技术审查，由中国实验动物学会归口管理。

本标准的编制工作是按照《中华人民共和国国家标准 GB/T1.1 2009 标准化工作导则》第 1 部分“标准的结构和编写规则”的要求进行编写的。在制定过程中参考了国内外相关文献，对所涉及的微卫星位点进行了研究，并在长白猪、大白猪群体中进行了验证，证明了提出的 SPF 猪遗传质量控制标准的适用性。

根据中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会（以下简称专委会）有关文件及 GB/T 16733《国家标准制定程序的阶段划分及代码》和《采用快速程序制定国家标准的管理规定》的要求，结合实验动物专业具体情况，特制定本工作程序。由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所和中国食品药品检定研究院负责起草，主要起草人有韩凌霞、陆涛峰、高彩霞、陈洪岩、贺争鸣。

第二节 工作过程

本标准由中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会提出，中国农业科学院哈尔滨兽医研究所按照团体标准研制要求和编写工作的程序，组成了由单位专家和专业技术人员参加的编写小组，制定了编写方案，并就编写工作进行了任务分工。

编制小组根据任务分工进行了资料收集和调查研究工作，在已有研究基础上，组织编写 SPF 猪遗传质量控制的技术资料，于 2016 年 2 月完成了标准草案的起草工作。

标准草案首先征求中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会的意见，2016 年 10 月在南宁召开的第 12 届全国实验动物学术交流会上公开征求了意见，参会专家对标准稿提出了系列修订建议和意见。根据提出的意见编制组对《实验动物 SPF 猪遗传质量控制》标准草案进行修改。结合调研、试验验证，形成本标准征求意见稿。

2016 年 11 月至 12 月，标准征求意见稿在中国实验动物学会网站公开征求意见，共

收集意见或建议 30 个, 编制组根据专家提出的修改意见和建议, 采纳 28 个, 未采纳 2 个。经对《实验动物 SPF 猪遗传质量控制》团体标准整理修改后, 形成标准送审稿、标准送审稿编制说明和征求意见汇总处理表。

2017 年 2 月 21 日, 全国实验动物标准化技术委员会在北京召开了标准送审稿专家审查会。会议由全国实验动物标准化技术委员会的委员组成审查组, 认真讨论了标准送审稿编制说明、征求意见汇总处理表, 提出了修改意见和建议。与会专家针对本标准一致同意通过审查, 并提出了进一步完善的意见。会后, 编制组根据与会专家提出的修改意见, 经对《实验动物 SPF 猪遗传质量控制》团体标准修改完善后, 形成标准报批稿、标准报批稿编制说明和征求意见处理汇总表。

2017 年 5 月, 本标准经中国实验动物学会第六届理事会常务理事会第八次会议审议通过, 批准发布, 于 2017 年 5 月 19 日起正式实施。

第三节 编写背景

猪在解剖学、生理学、疾病发生机理等方面与人极其相似, 在生命科学研究中具有重要的实用价值。大白猪和长白猪是最重要的商业品系肉用猪, 尤其以生长速度快、繁殖力高、适应性强和瘦肉率高的特点而被人们所熟知, 是世界上最著名, 分布最广的主导瘦肉型猪, 在我国乃至全世界范围内均在饲养 (Molina et al., 2008; Drew et al., 2011; Lunney et al., 2009)。据调查, 国内外很多特有小型猪, 如广西巴马小型猪、甘肃蕨麻猪、Yucatan 小型猪等, 作为实验动物模型广泛应用于动物医学, 科学研究, 器官移植等诸多方面 (张德福等, 2009; Smith et al., 2009); 而长白猪, 杜洛克和大白猪等为重要的肉用型品种多用于经济性状的选育和保种 (潘晚平等, 2003), 用于 SPF 级实验动物模型研究更是鲜有报道。而中国农业科学院哈尔滨兽医研究所从加拿大引进 100 头无猪瘟, 猪繁殖与呼吸综合征、猪传染性胃肠炎、猪流感等病原体的 SPF 猪, 其中大白猪和长白猪各 50 头, 大白猪共 32 窝, 长白猪共 28 窝, 进行封闭环境饲养繁育, 并运用微卫星标记技术检测两个种群的遗传多样性明确其遗传背景, 拟向哈尔滨市及周边多个猪场, 科研机构 and 生物制药企业, 研究猪病致病机理和疫苗研制, 提供标准的实验动物素材。尽可能地明确实验动物的遗传背景, 以便减少个体免疫遗传之间的差异而导致的试验结果偏差。

微卫星标记 (microsatellite), 又称为短串联重复 (short tandem repeats, STR) 或简单重复序列 (simple sequence repeats, SSR), 由 2~6 个核苷酸的串联重复片段构成, 由于重复单位的重复次数在个体和品种间呈高度变异而产生数量丰富的基因型。微卫星 DNA 标记技术在动物亲缘关系的鉴定、群体遗传结构的分析、特定基因定位、物种的进化和系统发生以及遗传基因连锁图谱的构建等方面具有广泛的应用前景。目前, 微卫星 DNA 标记已经在猪群体遗传结构评估 (包劲松等, 2000; 樊斌等, 1999; 刘永祥等, 2008)、亲缘关系鉴定 (吴继法和吴登俊, 2001; 钱林东等, 2010; 张春雷等, 2010) 等方面广泛应用。

本标准参考联合国粮农组织 (FAO) 和国际动物遗传学会 (ISAG) 推荐的猪遗传多样性分析的微卫星 DNA 标记位点, 结合 NY/T 1673—2008 畜禽微卫星 DNA 遗传多样性检测规程, 提出了用于 SPF 猪检测的 30 个微卫星位点作为遗传多样性检测标记。具体的,

首先合成荧光素标记引物进行 PCR 扩增, PCR 产物经 STR 扫描、分型, 然后运用群体遗传分析软件对数据进行处理, 计算出样品在各微卫星位点上的基因频率、平均观察等位基因数、平均有效等位基因数、平均杂合度等, 为群体遗传多样性评估、品种(系)建立和鉴别提供依据。

第四节 编写原则

本标准参考联合国粮农组织 (FAO) 和国际动物遗传学会 (ISAG) 推荐的猪遗传多样性分析的微卫星 DNA 标记位点, 建立以封闭群 SPF 猪外周血为样品来源的微卫星 DNA 标记检测方法, 为建立相应的分子遗传学监测标准, 以及猪种群的遗传背景监测提供依据。

第五节 内容解读

一、SPF 猪排除病原体种类的确

本标准起草单位主持了“畜禽重大疫病防控与高效安全养殖综合技术研发”国家重点研发专项中“畜禽疫病防控专用实验动物开发”的课题, 该课题旨在培育出 SPF 猪和 SPF 犬。在该课题论证阶段, 起草单位反复征求了各方面专家的意见, 根据国内猪病的流行和发病情况、OIE 公布的猪的病原、《中华人民共和国兽药典》等资料, 最终确定了 SPF 猪需要排除病原体种类, 包括如下: 口蹄疫病毒 A/O 亚型、猪圆环病毒 2 型、猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪伪狂犬病病毒、猪瘟病毒、猪细小病毒、猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒、猪流感病毒、猪布鲁氏杆菌、猪痢疾杆菌、猪沙门氏杆菌、猪多杀性巴氏杆菌、猪链球菌 2 型、猪皮肤病原真菌、弓形虫和体外寄生虫。

二、SPF 猪遗传检测微卫星位点的确定

本标准参考联合国粮农组织 (FAO) 和国际动物遗传学会 (ISAG) 推荐的猪遗传多样性分析的微卫星 DNA 标记位点, 结合 NY/T 1673—2008 畜禽微卫星 DNA 遗传多样性检测规程, 提出了将表 1 中的 30 个微卫星位点作为 SPF 猪的遗传质量控制的检测位点。所涉及的 30 个微卫星位点为经典的猪遗传多样性检测的位点, 是经过实验验证过的。由于猪的品种繁多, 不同品种的微卫星位点可能存在较大差异, 具体操作中, 建议根据猪群遗传背景, 选择具有多态性的位点进行遗传质量检测。

表 1 微卫星位点的相关信息

序号	位点	引物序列 (5'-3')	等位基因分布范围 (bp)	等位基因数	退火温度 (°C)
1	S0026	AACCTTCCCTTCCCAATCAC CACAGACTGCTTTTACTCC	156~178	1	55
2	S0155	TGTTCTCTGTTTCTCCTCTGTTTG AAAGTGGAAGAGTCAATGGCTAT	116~158	1	55

续表

序号	位点	引物序列 (5'-3')	等位基因分布范围 (bp)	等位基因数	退火温度 (°C)
3	S0005	TCCTTCCCTCCTGGTAACTA GCACTTCCTGATTCTGGGTA	134~168	1	55
4	Sw2410	ATTTGCCCCCAAGGTATTTC CAGGGTGTGGAGGGTAGAAG	81~119	2	50
5	Sw830	AAGTACCATGGAGAGGGAAATG ACATGGTTCCAAAGACCTGTG	149~173	2	50
6	S0355	TCTGGCTCCTACACTCCTTCTTGATG TTGGGTGGGTGCTGAAAAATAGGA	196~215	2	50
7	Sw24	CTTTGGGTGGAGTGTGTGC ATCCAAATGCTGCAAGCG	99~135	3	55
8	Sw632	TGGGTGTAAAGATTTCCTCAA GGAGTCAGTACTTTGGCTTGA	115~138	3	55
9	Sw1941	AGAAAGCAATTGTATTGCATAATC ACAAGGACCTACTGTATAGCACAGG	215~255	3	55
10	Sw936	TCTGGAGCTAGCATAAGTGCC GTGCAAGTACACATGCAGGG	134~158	4	55
11	S0218	GTGTAGGCTGGCGGTTGT CCCTGAAACCTAAAGCAAAG	234~256	4	55
12	S0228	GGCATAGGCTGGCAGCAACA AGCCCACCTCATCTTATCTACACT	93~112	4	55
13	Sw122	TTGTCTTTTATTTTGTCTTTGG CAAAAAAGGCAAAAGATTGACA	220~247	5	55
14	Sw857	TGAGAGGTCAGTTACAGAAGACC GATCCTCCTCCAAATCCCAT	165~187	5	55
15	S0097	GACCTATCTAATGTCAATTATAGT TTCTCCTAGAGTTGACAAACTT	135~155	5	55
16	Sw240	AGAAATTAGTGCCTCAAATTGG AAACCATTAAGTCCCTAGCAAA	164~186	6	55
17	IGF1	GCTTGGATGGACCATGTTG CATATTTTCTGCATAACTTGAACCT	256~294	6	55
18	Sw2406	AATGTCACCTTTAAGACGTGGG AATGCGAAACTCCTGAATTAGC	117~131	6	55
19	Sw72	ATCAGAACAGTGCGCCGT TTTGAAAATGGGGTGTTC	172~218	7	55
20	S0226	GCACTTTTAACTTTCATGATACTCC GGTTAAACTTTTNCCTCAATACA	172~198	7	55
21	S0090	CCAAGACTGCCTTGTAGGTGAATA GCTATCAAGTATTGTACCATTAGG	227~253	7	55

续表

序号	位点	引物序列 (5'-3')	等位基因分布范围 (bp)	等位基因数	退火温度 (℃)
22	Sw2008	CAGGCCAGAGTAGCGTGC CAGTCCTCCCAAAAATAACATG	148~170	8	55
23	Sw1067	TGCTGGCCAGTGACTCTG CCGGGGGATTAACA AAAAG	126~160	8	55
24	S0101	GAATGCAAAGAGTTCAAGTGTAGG GTCTCCCTCACACTTACCGCAG	200~210	8	55
25	Sw1828	AATGCATTGTCTTCATTCAACC TTAACCGGGGCACTTGTG	100~104	9	55
26	S0143	ACTCACAGCTTGTCTGGGTGT CAGTCAGCAGGCTGACAAAAAC	261~289	9	55
27	S0068	AGTGGTCTCTCTCCCTCTTGCT CCTTCAACCTTTGAGCAAGAAC	118~200	9	55
28	S0178	TAGCCTGGGAACCTCCACACGCTG GGCACCAGGAATCTGCAATCCAGT	160~196	10	60
29	Sw911	CTCAGTTCTTTGGGACTGAACC CATCTGTGGAAAAAAAAGCC	217~255	10	60
30	S0002	GAAGCCAAAGAGACAACTGC GTTCTTTACCCACTGAGCCA	195~229	10	60

第六节 分析报告

为了验证本标准所选择微卫星位点的有效性和标准执行的可操作性,开展了大白猪和长白猪群体遗传质量监测实验。

一、材料与方 法

(一) 样品采集

研究所用 98 份猪耳组织样本,引自加拿大,均来自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所牧场。其中大白猪和长白猪各 49 头,所采组织样品均置于无菌的 1.5mL EP 管中带回实验室, -20℃冰箱保存备用。

(二) 试验试剂

2 × Taq PCR Starmix 聚合酶购自 GenStar, 小剂量基因组 DNA 提取试剂盒购自 Axygen 公司,引物根据联合国粮农组织 (FAO) 和国际动物遗传学会 (ISAG) 联合推荐的 30 对微卫星引物中,依据等位基因数的丰富程度、分布在不同染色体的原则,选取了其中的 19 个微卫星位点,实际试验扩增过程中部分位点退火温度和扩增后分析范围进行微调详细信息见表 2,由北京金唯智公司合成,其他试剂均为进口或国产分析纯。

表 2 19 对微卫星引物详细信息

分组	位点	序列 (5'-3')	大小 (bp)	染色体	荧光标记	退火温度 (℃)
1	S0005	TCCTTCCTCCTGGTAACTA GCACTTCCTGATTCTGGGTA	203~278	5	HEX	65
	S0178	TAGCCTGGGAACCTCCACACGCTG GGCACCAGGAATCTGCAATCCAGT	101~128	8	6FAM	60
	S0218	GTGTAGGCTGGCGGTTGT CCCTGAAACCTAAAGCAAAG	158~205	X	TAMRA	58
2	S0068	CCTTCAACCTTTGAGCAAGAAC AGTGGTCTCTCTCCCTCTTGCT	211~262	13	TAMRA	57
	Sw2410	ATTTGCCCCAAGGTATTTT CAGGGTGTGGAGGGTAGAAG	90~131	8	6FAM	58
	Sw830	AAGTACCATGGAGAGGGAAATG ACATGGTTCCAAAGACCTGTG	168~230	10	HEX	60
3	S0097	GACCTATCTAATGTCATTATAGT TTCCTCCTAGAGTTGACAAACTT	209~250	4	6FAM	55
	S0143	ACTCACAGCTTGCTCGGGTGT CAGTCAGCAGGCTGACAAAAAC	150~168	12	TAMRA	57
	Sw122	CAAAAAAGGCAAAAGATTGACA TTGTCTTTTTATTTTGCTTTTGG	106~128	6	HEX	56
4	IGF1	GCTTGGATGGACCATGTTG CATATTTTCTGCATAACTTGAACCT	193~209	5	TAMRA	58
	Sw2406	AATGTCACCTTTAAGACGTGGG AATGCGAAACTCCTGAATTAGC	221~262	6	HEX	65
	Sw857	TGAGAGGTCAGTTACAGAAGACC GATCCTCCTCCAAATCCCAT	140~159	14	6FAM	58
5	S0155	TGTTCTCTGTTTCTCCTCTGTTTG AAAGTGGAAGAGTCAATGGCTAT	142~162	1	6FAM	55
	Sw936	TCTGGAGCTAGCATAAGTGCC GTGCAAGTACACATGCAGGG	90~118	15	TAMRA	60
	Swr1941	AGAAAGCAATTTGATTGCATAATC ACAAGGACCTACTGTATAGCACAGG	202~224	13	HEX	58
6	S0226	GCACTTTTAACTTTCATGATACTCC GGTTAAACTTTTNNCCCAATACA	180~214	2	ROX	61
	S0228	GGCATAGGCTGGCAGCAACA AGCCACCTCATCTTATCTACACT	220~230	6	TAMRA	57
	S0355	TCTGGCTCCTACACTCCTTCTTGATG TTGGGTGGGTGCTGAAAAATAGGA	242~271	15	HEX	65
	Sw1067	TGCTGGCCAGTGACTCTG CCGGGGGATTAAACAAAAAG	136~176	6	6FAM	62

(三) 基因组 DNA 的提取

按照 Axygen 小剂量基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取猪耳组织基因组 DNA。将 DNA 溶于去离子水, 用 NenoDrop-100 紫外分光光度计测定浓度和纯度, 然后再用去离子水稀释至 20ng/μL, 置于 -80℃ 冰箱冻存备用。

(四) PCR 扩增与检验

根据扩增片段的理论值大小每组位点中的片段大小相差至少 10~25bp 并且标记的荧光颜色不发生重叠, 将 19 对微卫星引物分为 6 组。PCR 反应体系为 20μL: 上、下游引物各 1μL (10mmol/L), 2×Taq PCR Starmix 聚合酶 10μL, 模板 DNA 1μL, ddH₂O 7μL。反应条件为: 94℃ 预变性 5min; 94℃ 变性 30s, 55~65℃ (分组及不同引物的 T_m 值见表 2) 30s, 72℃ 延伸 30s, 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 7min, 10℃ 保存。扩增产物按组混合加样进行毛细管电泳, 并用 GeneMapper V4.0 软件进行数据提取、分子量标准设定和 PCR 产物片段大小的计算, 最后根据核心碱基数完成基因型的判定。

(五) 统计分析

采用 Excel Microsatellite Toolkit V3.1 软件, 计算大白猪和长白猪在 19 个微卫星位点上的等位基因数、杂合度、多态信息含量。利用 GENEPOP V1.2 软件进行群体间的遗传分化和基因型差异的分析^[14]。利用 FSTAT V2.9.3 进行 F- 检验 (Weir and Cockerham, 1984)。利用 Structure V2.3 软件分析大白猪和长白猪的遗传分化结构图, 所设参数“Burnin Period”和“After Burnin”均为 50 000 次, K 值为 2~5, 然后利用 distructure 软件显示图形。

二、结果与分析

(一) 扩增结果

PCR 产物经 2% 的琼脂糖凝胶检测, 扩增片段大小与预期结果相符。大白猪和长白猪在 19 个微卫星位点分别检测到 84 和 89 个等位基因, 每个猪群平均有 4.42 和 4.68 个等位基因, 两群体共享 57 个等位基因。19 个位点中 S0005 位点等位基因最多有 14 个; Sw2406 和 S0218 位点等位基因最少各 3 个 (表 3)。

表 3 大白猪和长白猪两个群体在 19 个微卫星位点上的杂合度和多态信息含量

位点	大白猪				长白猪			
	等位 基因数	有效等位 基因数	杂合度	多态 信息含量	等位 基因数	有效等位 基因数	杂合度	多态 信息含量
S0005	10.0000	6.2305	0.8395	0.8102	9.0000	4.0355	0.7522	0.7033
S0178	2.0000	1.1786	0.1515	0.1387	7.0000	4.1152	0.7570	0.7078
S0218	3.0000	2.3669	0.5775	0.5071	2.0000	1.0208	0.0204	0.2000
S0068	5.0000	2.1151	0.5272	0.4784	3.0000	1.7109	0.4155	0.3732
Sw2410	2.0000	1.9904	0.4976	0.3712	4.0000	3.5842	0.7210	0.6613
Sw830	5.0000	2.4056	0.5843	0.5055	5.0000	3.7481	0.7332	0.6811
S0097	8.0000	2.2046	0.7099	0.6728	5.0000	1.3548	0.6863	0.6219
S0143	2.0000	2.2578	0.2897	0.2456	3.0000	3.9064	0.6205	0.5452

续表

位点	大白猪				长白猪			
	等位 基因数	有效等位 基因数	杂合度	多态 信息含量	等位 基因数	有效等位 基因数	杂合度	多态 信息含量
Sw122	4.0000	3.0048	0.6547	0.6003	4.0000	3.2873	0.5571	0.5114
IGF1	4.0000	3.4638	0.6808	0.6052	5.0000	3.5791	0.7423	0.6866
Sw2406	3.0000	2.4301	0.5464	0.4399	2.0000	3.0221	0.2619	0.2257
Sw857	5.0000	2.5471	0.5571	0.5214	6.0000	3.1066	0.7440	0.6942
S0155	3.0000	2.8225	0.6672	0.5862	6.0000	2.8944	0.6958	0.6389
Sw936	4.0000	3.8580	0.7113	0.6483	5.0000	1.8409	0.7206	0.6627
Swr1941	6.0000	2.4372	0.5885	0.5584	4.0000	2.7732	0.6691	0.6067
S0226	6.0000	3.4471	0.6074	0.5412	5.0000	3.1878	0.6781	0.6279
S0228	4.0000	1.4079	0.6457	0.5722	4.0000	2.6350	0.6545	0.5807
S0355	4.0000	2.8960	0.7408	0.6842	5.0000	2.2578	0.4568	0.4277
Sw1067	4.0000	3.1328	0.5897	0.5281	5.0000	3.8805	0.6394	0.5818
平均值	4.4211	2.7472	0.5877	0.5271	4.6842	2.9442	0.6066	0.5652

(二) 等位基因和杂合度分析

19个微卫星位点的平均杂合度相对较高,其中长白猪略高于大白猪分别为0.6066和0.5877(见表2)。大白猪S0005位点的杂合度最高 $He=0.8395$,S0178位点的杂合度最低 $He=0.1515$ 。Sw2406位点共检测到221bp、233bp、251bp3个等位基因,而251bp等位基因仅存在与大白猪群中在长白猪群中没有检测到该等位基因,表明251bp等位基因为大白猪特有的等位基因;长白猪S0178位点的杂合度最高为0.7570,S0218位点的杂合度最低为0.0204。长白猪群S0218位点只检测到167bp和169bp两个等位基因而169bp等位基因仅检测到一次。此外,Sw857 144bp;Sw936 117bp;S0143 168bp;S0155 152bp和S0178 109bp这5个位点在两群体中的分布和含量差异极显著。结果表明两群相同位点间的等位基因含量差异极显著,群体内不同位点的杂合度差异较大。

(三) 多态信息含量

两个群体中S0005位点的多态信息含量最高为0.8102,S0178位点多态信息含量最低0.1387,大白猪和长白猪的平均多态信息含量分别为0.5271和0.5652,差异较小,S0005、S0218、S0068、Sw2410、S0097、Sw122、Sw2406和S0355的多态信息含量在大白猪群普遍高于长白猪群,而其他位点反之(见表3)。19个微卫星位点中S0005位点的多态性信息含量最高为0.8696,Sw2406位点多态信息含量最低为0.3328,平均多态信息含量为0.6388(见表4)。结果表明大白猪和长白猪两个群体的种群内和种群间的多态信息含量差异也很大,且没有表现明显的线性关系。

表 4 19 个微卫星座位的杂合度, 多态信息含量和 F -统计

位点	等位基因数	杂合度	多态信息含量	Fis	Fit	Fst	Nm
S0005	14.0000	0.8856	0.8696	-0.0131	0.1727	0.1834	1.1131
S0178	8.0000	0.7144	0.6791	0.0954	0.5674	0.5218	0.2291
S0218	3.0000	0.3607	0.3292	0.1136	0.3710	0.2904	0.6109
S0068	6.0000	0.4778	0.4463	-0.1052	-0.0751	0.0273	8.9075
Sw2410	5.0000	0.7020	0.6570	-0.1914	0.0874	0.2340	0.8184
Sw830	5.0000	0.7400	0.6958	-0.0069	0.1915	0.1970	1.0190
S0097	9.0000	0.7349	0.6933	-0.0087	0.0871	0.0949	2.3844
S0143	4.0000	0.5128	0.4764	-0.0998	0.1226	0.2022	0.9864
Sw122	5.0000	0.7059	0.6496	-0.0105	0.2393	0.2473	0.7609
IGF1	6.0000	0.7421	0.6918	0.0974	0.1677	0.0778	2.9634
Sw2406	3.0000	0.4847	0.3880	-0.0611	0.2407	0.2844	0.6290
Sw857	8.0000	0.7961	0.7627	-0.0039	0.3054	0.3081	0.5614
S0155	6.0000	0.7616	0.7203	-0.0638	0.1384	0.1901	1.0651
Sw936	5.0000	0.7529	0.7082	-0.0408	0.0563	0.0934	2.4267
Swr1941	7.0000	0.7129	0.6682	-0.1048	0.1285	0.2112	0.9337
S0226	6.0000	0.7756	0.7345	-0.0162	0.2801	0.2916	0.6073
S0228	5.0000	0.7467	0.6997	0.1843	0.3694	0.2269	0.8518
S0355	5.0000	0.6495	0.6025	0.0461	0.1833	0.1438	1.4885
Sw1067	6.0000	0.7175	0.6643	0.0373	0.2777	0.2497	0.7512
平均值	6.1052	0.6828	0.6388	0.0080	0.2059	0.2145	1.5320

(四) F -统计和遗传结构分析

通过微卫星座位的 F -统计以及 N_m 来检验群体间的遗传分化程度和迁移率, 结果见表 3。群体的固定指数 F_{st} 为 0.0273~0.5218, 均值为 0.2145, 而 F_{is} 和 F_{it} 指数有正有负, 如 S0178、S0218、IGF1、S0228、S0355 和 Sw1067, 此 6 个位点的 F_{is} 值均为正值, 而 F_{it} 除了 S0068 为负值外其他 18 个位点全为正值。 F_{is} 和 F_{it} 出现正值表明群体基因型分化显著。 N_m 为 0.2291~8.9075, 平均值为 1.5320。 N_m 越小表明群体的遗传结构越相似。群体遗传结构分析表明, 两猪群遗传分化结构稳定 (见图 1), 一方面可能因为它们是纯系品种, 另一方面则主要是因为两猪群在 19 个位点的等位基因较少, 共享极为有限的等位基因。

F_{is} 值和 F_{it} 值均有正有负, 表明群体的等位基因和基因型分化显著, 主要表现为相同位点的等位基因在不同品种间的分布差异显著。而 F_{st} 值表示群体间的分化程度, F_{st} 值介

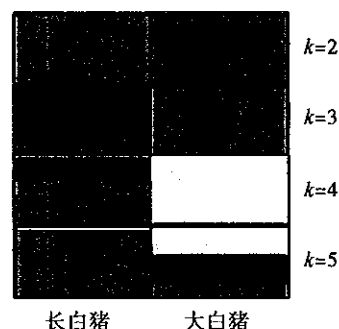


图 1 大白猪和长白猪的遗传结构

于 0.0273 和 0.5218 之间与赵振华等 (2007) 和杨彤彤等 (2008) 相比, 此次引进种群的分化程度显著低于国内部分纯种猪群 (Raymond et al., 1995)。Nm 值越小表示群体间的遗传结构越相似, Nm 的平均值为 1.5320 也显著低于杨彤彤等 (2008) 对我国部分纯系猪的研究。与国内部分保存的纯系猪相比又一次证明了中国农业科学院哈尔滨兽医研究所引进的两种纯系种群群体内分化较小适合用于实验动物材料, 这可能与该种群的长期人工选育有关。

三、讨论

遗传多样性的衡量指标通常为群体的平均杂合度和多态信息含量, 本标准制定过程中采纳的结果判定标准是“平均杂合度在 0.5~0.7 时, 且期望杂合度与观测杂合度经卡方检验无明显差异时, 群体为合格的封闭群猪群体。或者, 首先得到各个位点上各基因频率、基因型频率的实际值, 然后可计算出基因频率和基因型频率的预期值。用实际值和预期值比较, 通过卡方检验, 可知被监测群体是否达到平衡状态。如果没有达到平衡状态, 说明群体的基因频率或基因型频率发生变化, 该封闭群猪群体判为不合格。”

本研究中大白猪和长白猪的平均杂合度分别为 0.5877 和 0.6066, 符合封闭群判定合格的标准。另外, 本研究所涉及的大白猪和长白猪两个品种的平均杂合度与平均多态信息含量与赵振华等 (2007) 和巩元芳等 (2012) 对国内大白猪和长白猪的研究结果相比较低, 表明该种群与国内纯系品种相比人工选育的程度更高, 遗传结构更趋稳定。此外, 19 个微卫星座位的平均杂合度比 Li 等 (2015) 对台湾欧洲纯系品种猪的研究结果略高, 表明他们的选育程度非常相近且遗传结构比较稳定, 更适合选用于标准的实验动物材料。

第七节 国内外同类标准分析

本标准在编制过程中参照了 NY/T 1673—2008 畜禽微卫星 DNA 遗传多样性检测规程, 接受了该规程中所涉及的 30 个微卫星位点, 这 30 个位点也是 FAO-ISAG 推荐的猪遗传多样性分析的微卫星 DNA 标记位点。所以, 本标准中参考标准与国际接轨。

第八节 与法律法规、标准关系

本标准的编写在格式上采用 GB/T 1.1—2009《标准化工作导则》第一部分: “标准的结构和编写规则”的规定。

本标准的编写在内容上充分考虑了 GB 14923—2010《实验动物 哺乳类动物的遗传质量控制》和 NY/T 1673—2008《畜禽微卫星 DNA 遗传多样性检测规程》的规定。

第九节 重大分歧的处理和依据

从标准结构框架和制定原则的确定、标准的引用、有关技术指标和参数的试验验证、

主要条款的确定直到标准草稿征求专家意见（通过函寄和会议形式多次咨询和研讨），均未出现重大意见分歧的情况。

第十节 作为推荐性标准的建议

由于猪的品种繁多，不同品种的微卫星位点可能存在较大差异。本标准建议，具体操作中，可以从 30 个位点中筛选出多态性好的用于遗传质量检测。

第十一节 标准实施要求和措施

建议由中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会组织本标准的宣传、推广和实施监督。

第十二节 其他说明事项

一、引用标准

本部分的制定引用了以下文件：

GB/T1.1—2009《标准化工作导则》

GB 14923—2010《实验动物 哺乳类动物的遗传质量控制》

NY/T 1673—2008《畜禽微卫星 DNA 遗传多样性检测规程》

二、标准水平（评估）

本标准在制定时，尽可能做到与国际接轨，同时还考虑到我国 SPF 猪现有水平和发展的需要。

三、必检项和抽检项

具体操作中，可以从 30 个位点中筛选出多态性好的用于遗传质量检测。

参考文献

- 包劲松，舒庆尧，吴殿星，等. 2000. 水稻 *Wx* 基因（CT）₀ 微卫星标记与稻米淀粉品质的关系研究. 农业生物技术学报，8（3）：241-244.
- 樊斌，彭中镇，李奎，等. 1999. 微卫星标记及其在猪遗传育种中的应用. 河北农业大学学报，33（2）：161-164.
- 冯元芳，段玲欣，倪静，等. 2012. 长白猪微卫星标记的遗传多样性. 河北科技师范学院学报，4（4）：1672-7983.
- 刘永祥，刘艳丽，朱宽佑，等. 2008. 小尾寒羊微卫星标记的多态性及其与繁殖性能的相关性研究. 安

- 安徽农业科学, 36 (6): 2233-2234.
- 潘晚平, 申祥科, 邱汉华, 等. 2003. 美系长白猪“大白猪”杜洛克猪新品系的选育研究. 养猪, 5: 23-24.
- 钱林东, 张自芳, 田应华, 等. 2010. 利用微卫星 DNA 标记进行黄牛的亲子鉴定. 云南农业大学学报, 25 (1): 69-73.
- 吴继法, 吴登俊. 2001. 微卫星 DNA 在家畜亲子鉴定中的应用及研究进展. 国外畜牧科技, 28 (5): 28-30.
- 杨彤彤, 赵族, 张婷婷, 等. 2008. 大约克和二花脸猪 5 个微卫星座位多态性分析. 畜牧与兽医, 40 (9): 34-37.
- 张春雷, 佟广香, 匡友谊, 等. 2010. 哲罗鱼微卫星亲子鉴定的应用. 动物学研究, 31 (4): 395-400.
- 张德福, 戴建军, 吴彩凤, 等. 2009. 小型猪实验动物化研究现状及其应用前景. 猪业科学, 3: 74-76.
- 赵振华, 贾青, 墨锋涛, 等. 2007. 杜洛克、长白和大约克夏纯种猪微卫星多态性分析. 江苏农业学报, 23 (2): 103-108.
- Drew TW. 2011. The emergence and evolution of swine viral diseases : to what extent have husbandry systems and global trade contributed to their distribution and diversity? Rev Sci Tech, 30 (1), 95-106.
- FAO. 2011. Molecular genetic characterization of animal genetic resources, Commission on genetic resources for food and agriculture.
- Li KY, Li KT, Cheng CC, et al. 2015. A genetic analysis of taoyuan pig and its phylogenetic relationship to Eurasian pig breeds. Asian-Australas Anim Sci, 28 (4): 457-466.
- Lunney JK, Ho CS, Wysocki M, et al. 2009. Molecular genetics of the swine major histocompatibility complex, the SLA complex. Dev Comp Immunol, 33: 362-374.
- Molina RM, Cha SH, Chittick S, et al. 2008. Immune response against porcine reproductive and respiratory syndrome virus during acute and chronic infection. Vet Immunol Immunopathol, 126: 283-292.
- Raymond M, Rousset F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. Heredity, 86: 248-249.
- Smith DM, Martens GW, Ho CS, et al. 2005. Asbury JM. DNA sequence based typing of swine leukocyte antigens in Yucatan Miniature Pigs. Xenotransplantation, 12: 481-488.
- Weir BS, Cockerham CC. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution, 38: 1358-1370.