

第十五章 T/CALAS 16—2017《实验动物 SPF 鸡遗传质量控制》实施指南

第一节 工 作 简 况

根据中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会下达的 2016 年团体标准制（修）定计划，由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所、中国食品药品检定研究院、北京实验动物研究中心共同开展了团体标准《实验动物 SPF 鸡遗传质量控制》的起草工作。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”的要求撰写，标准是在国家科技支撑计划（项目编号 2015BAI07B02-02）和黑龙江省应用技术与开发计划（项目编号 PC13S08）完成的基础上制定而成，在制定过程中参考了国内外相关文献，对所建立的标准方法进行了应用，建立了可行的 SPF 鸡遗传学检测方法。

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、中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所和北京实验动物研究中心的专家与专业技术人员参加编写小组，按照团体标准研制要求和编写程序，制定了编写方案。

经过资料收集和调查研究工作，在国家科技支撑计划“实验用动物新品种的病原快速检测技术研究与应用”（项目编号 2015BAI07B02-02）和黑龙江省应用技术与开发计划“黑龙江省实验动物管理体系与质量监测技术的优化”（项目编号 PC13S08）课题研究结果的基础上，编写组形成了 SPF 鸡的遗传学检测方法技术资料，于 2016 年 4 月完成了标准草案的起草工作。

2016 年 10 月在南宁召开的第 12 届全国实验动物学术年会上公开征求意见，专家们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进行了修改，结合调研，形成标准征求意见稿。

2016 年 11~12 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，有 6 个单位返回意见，共收集、汇总不同意见 25 条，编制组采纳 20 条，5 条未采纳。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,认为“有大量的实验数据支持,参考了国外相关资料,在结合专家意见的基础上通过实验室验证形成的标准。”会后,编制组根据与会专家提出的修改意见,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。

第三节 编写背景

无特定病原体(specific pathogen free, SPF)鸡是人工培育、遗传背景清晰、经过微生物净化的实验鸡,主要用于生命科学研究和生物制品的生产、质量检定,在如禽流感疫苗的研制、诊断及生产供应方面等禽病学研究中具有不可替代的应用价值。SPF鸡胚是多种人用及兽用生物制品的生产原材料,在我国广泛应用,及时制订并推广SPF鸡质量标准,对禽病防控技术研究和生物制品生产具有深远的影响。多数鸡病的致病性与鸡的遗传背景相关,同一毒株相同接种途径感染不同品种品系的鸡,会导致相差千倍的实验结果。只有保持实验禽类的遗传学稳定,才能保证作为疫苗生产的原材料和检定材料及疫病研究的可重复性和客观性。实验禽类种源相对于畜牧业来源很少,几乎都集中于少数一两家国际垄断公司,引进的种卵只告知品系名称,而对遗传结构和背景一无所知,严重制约了对SPF鸡和鸡胚的条件支撑作用。

主要组织相容性复合体(MHC)是有核生物基因组多态性最高、连锁程度最强、密度最大的基因簇,编码大量免疫相关基因,其多态性不仅与疫病的敏感性相关,而且与繁殖性能有关,是国际上培育近交系或单倍型动物的主要靶向基因。在当前尚不能培育近交程度类似实验小鼠和大鼠(近交系数99.8%)的形势下,率先建立MHC单倍型SPF鸡的遗传学监测标准,将为SPF鸡和鸡胚的生产及使用单位提供优质的条件支撑。

目前我国尚无有关禽类实验动物遗传学质量的国家或行业标准,只有针对哺乳类的GB 14923—2010《实验动物 哺乳类实验动物的遗传质量控制》,其中规定近交系动物的概念为“在一个动物群体中,任何个体基因组中99%以上的等位位点为纯合时定义为近交系。经典近交系经至少连续20代的全同胞兄妹交配培育而成。品系内所有个体都可追溯到起源于第20代或以后代数的一对共同祖先。经连续20代以上亲子交配与全同胞兄妹交配有等同效果。近交系的近交系数应大于99%”。GB/T 14927.1—2008《近交系小鼠、大鼠生化位点检测方法》和GB/T 14927.2—2008《近交系小鼠、大鼠免疫标记检测方法》规定了近交系小鼠和大鼠的生活位点检测方法和免疫标记检测方法。但生化位点的检测判定结果依赖于标准样品,而且受方法的限制,特异性低、敏感度不高、重复性差。而目前国际上SPF鸡还没有近交系,只有以主要组织相容性复合体(MHC)基因组多态性为基础的单倍型,也不适宜做下颌骨测量和毛色移植试验。

有关SPF鸡的遗传标准还有1994年公布的广东省地方标准DB44/60-94《实验动物啮齿类和鸡的遗传》,指出“鸡的近交系是指兄妹连续交配11代以上育成的品系,近交系数90%以上……鸡近交系动物的繁殖方法参照啮齿类近交系的繁殖方法进行。与啮齿类相比,鸡在近交过程中更易出现生殖能力下降造成世代延续困难,所以多采用半同胞交配为主的近交繁育体系。鸡的取样范围与方法、监测间隔、监测项目和取样数量,要求参照

大、小鼠进行……鸡远交群产生变异的原理也与大、小鼠相类似,其遗传监测,也应从繁殖和生长数据的检查、毛色和血型基因位点的分析多方面进行,并做出相应的判定和处理。”然而,禽类的繁殖特性和生长周期与小鼠、大鼠截然不同,为卵生繁殖,且若连续以一对全同胞兄妹或母子、父女组成基础群传代,不仅传代周期长(20周龄左右性成熟)、近交退化的风险大,且违背了培育 SPF 鸡必须保持较高程度的生产性能的培育目的。所以上述标准都不适用于 SPF 禽的质量控制,为此专门制订指导 SPF 鸡群遗传质量监测的团体标准,作为实验动物遗传学质量标准的补充。

一、封闭群 SPF 鸡

微卫星 DNA 具有以下特点:基因组中分布广泛、种类多和呈孟德尔共显性遗传方式;高度多态和遗传连锁不平衡现象,作为最有价值的一种遗传标记,广泛应用于群体遗传学结构分析。家鸡微卫星标记的应用相对较广泛,微卫星标记因具有许多优点,成为构建动物遗传图谱的首选标记。1992 年, Bumstead 等报道了鸡的第一个连锁图谱,由 100 个 RFLP 标记组成,随着鸡的微卫星标记的不断完善,进一步发展了鸡的染色体连锁遗传图谱。2005 年, McElroy 等鉴定了商用蛋鸡对 MDV (Marek's disease virus, MDV) 有抗性的数量性状基因座 (quantitative trait locus, QTL); 因而筛选与 MD 抗性有关的微卫星标记成为研究热点。禽微卫星标记由于其特有的优势,在禽群体内和群体间的遗传分析中得到了广泛应用, Wimmer 等利用 22 对微卫星标记对非洲、亚洲和南美洲地方鸡的遗传变异进行了分析; 张细权等利用 5 对微卫星标记对广东地方品种惠阳胡须鸡、杏花鸡和清远麻鸡进行了品种的遗传结构及遗传关系的分析,证明能更好地反映群体内的变异; 朱庆等利用 10 对微卫星标记对四川境内不同地方乌骨鸡 11 个种群的遗传多样性进行了分析,表明各乌骨鸡群的遗传多样性较为丰富。

二、MHC 单倍型 SPF 鸡

MHC 是由一组紧密连锁、高度多态的编码主要组织相容性抗原的基因组成。MHC 广泛存在于脊椎动物中,主要负责与免疫有关的细胞间的相互识别和抗原呈递。鸡 MHC 包含 *B* 基因座和 *Rf-Y* 基因座两个基因座,它们均被定位于 16 号染色体上,但二者在遗传上不连锁。*B* 基因座结构简单、紧凑,在 92kb 的基因组 DNA 中仅包含 19 个基因,后来以红原鸡单倍型为研究对象,将核心区扩展到 242kb,包含 46 个基因。其中, 32 个表达基因, 9 个候选基因, 4 个编码 tRNA 基因, 1 个假基因。鸡 MHC 单倍型也称为 MHC-*B* 复合体,简称 B 单倍型。

BF 基因位于 MHC 区域,包含两个倒向互补的拷贝, *BF1* 和 *BF2* 基因,分别含有 8 个外显子。外显子 1 编码疏水性前导多肽; 外显子 2、3 和 4 分别编码 α 链的 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$ 结构域, $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域构成内源性抗原肽的结合槽, $\alpha 3$ 结构域连接跨膜区。 $\alpha 3$ 结构域高度保守,与免疫球蛋白的恒定区基因相似,含有被 T 细胞 CD8 分子识别的序列; 外显子 5~8 分别编码 α 链的跨膜区和胞浆区。比较已公布的 14 种 MHC-B 单倍型氨基酸序列,可知各单倍型的变化主要存在于 α 链 N 端的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域的范围,即第 2 和 3 外显子,其余部分较为保守。因此本标准分别采用 *BF* 基因的第 2 和 3 外显子作为 MHC 单倍型的监测标准。

第四节 编制原则

本标准规定了无特定病原体（SPF）鸡的遗传质量控制方法，适用于封闭群鸭和 MHC 单倍型鸡的遗传学质量控制。部分内容引用 GB 14923—2010《实验动物 哺乳类动物的遗传质量控制》和 GB 14925—2010《实验动物 环境及设施》国家标准。

本标准的编制主要遵循以下原则：①科学性原则。在尊重科学、实际检测的基础上，针对 SPF 鸡群的遗传学制定本标准。②可操作性原则。利用微卫星 DNA 标记位点，通过血液采集、基因组提取、PCR 扩增、商业化序列测定和分析，都已试剂盒化，一般 SPF 鸡生产单位均可完成。③协调性原则。以切实规范我国 SPF 鸡种群和生产群的遗传学质量，符合我国现行有关法律、法规和相关的标准要求。

第五节 内容解读

本标准由范围、规范性引用文件、缩略语、检测方法原理、主要设备和材料、试剂、检测方法、结果判定和附录共九章构成。主要技术内容如下。

一、范围

本标准规定了 SPF 鸡的繁殖和遗传质量监测方法。

本标准适用于封闭群 SPF 鸡群和 MHC 单倍型 SPF 鸡群的遗传质量控制。

二、规范性引用文件

下列文件中的条款通过本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单位（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本部分，然而，鼓励根据本部分达成协议的各方研究可以使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本部分。

GB 14923—2010 《实验动物 哺乳类动物的遗传质量控制》

GB 14925—2010 《实验动物 环境及设施》

GB/T 17999.1—2008 《SPF 鸡 微生物学监测 第1部分：SPF 鸡 微生物学监测总则》

三、术语和定义

下列术语和定义适用于本部分。

（一）无特定病原体鸡（specific pathogen-free chicken）

是指在符合国家标准《实验动物 环境及设施》GB 14925—2010 中规定的屏障环境或隔离环境的饲养条件下，微生物学质量符合国家标准《SPF 鸡 微生物学监测》GB/T 17999.1—2008 的规定的鸡群。

（二）单倍型（haplotype）

是单倍体基因型的简称，在遗传学上是指在同一染色体上进行共同遗传的多个基因座

上等位基因的组合,即若干个决定同一性状的紧密连锁的基因构成的基因型。

(三) 主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC)

MHC 是一组紧密连锁高度多态的染色体基因群,编码重要的免疫相关细胞 MHC 抗原,广泛存在于有颌脊椎动物的有核细胞表面,与宿主的抗病性或敏感性密切相关。

(四) 杂合度 (heterozygosity)

杂合度指样本中两个等位基因不相同的概率。期望杂合度 (H_e) 主要是根据种群内当前优势等位基因的分布频率来推算,观测杂合度 (H_o) 是随机抽取的两个样本的等位基因不相同的概率,即观察到的杂合子比例。

四、繁殖方法

(一) 封闭群鸡

1. 封闭群实验禽繁殖的原则是尽量保持基因异质性及多态性,避免近交系数随繁殖代数增加而过快上升。

2. 种鸡必须遗传背景明确或来源清楚,有较完整的资料(包括来源、品系名称、日期及主要生物学特征等)。

3. 各家系之间采用最佳避免近交法、循环交配或随机交配法,每代近交系数上升不超过 1%。

4. 种鸡群的雄雌个体比例一般为 1 : 8~1 : 10。

(二) MHC 单倍型鸡

1. 种鸡的 MHC 核心区域保持单倍型纯合。

2. 繁殖原则是保持 MHC 核心区域的基因纯合性。

3. 严格以全同胞或半同胞兄妹交配方式进行繁殖。

4. 雄雌个体比例一般为 1 : 8~1 : 10。

(三) 遗传质量监测

1. 封闭群鸡的检测

(1) 抽样

规模不大于 100 只的,随机抽取 25 个个体,雌雄不限,进行检测。规模超过 100 只的,随机选取 15% 的比例,最大不超过 30 只。

(2) 检测方法

采用微卫星分子标记检测方法。具体方法执行附录 A。

(3) 群体评价

群体内遗传变异采用期望杂合度进行评价。

(4) 检测频率

封闭群鸡每个世代至少进行 1 次遗传质量检测。

2. MHC 单倍型鸡的检测

(1) 抽样

种群规模不大于 100 只的,按 10% 的比例抽样;种群规模大于 100 只的,按 25% 的比例抽样,雌雄、日龄不限。

(2) 检测方法

采用聚合酶链式反应(PCR)进行检测,目的片段为MHC核心区域的2个片段。具体方法执行附录B。

(3) 结果判断

所有样本序列与国际标准序列比对,同源性达100%,判为合格。

(4) 检测频率

单倍型鸡每个世代至少进行一次遗传质量检测。

(5) 结果判定

测序结果是2个拷贝基因的序列,只要存在符合附录B所列出的对应单倍型的标准序列,即判为该MHC单倍型纯合。

第六节 分析报告

封闭群SPF鸡的微卫星DNA标记检测方法

应用本标准推荐的14个微卫星标记分析了国家禽类种子中心培育保存的BWEL-SPF鸡在F16世代群体内的遗传变异,结果表明长期的近交已经使相当一部分位点(35.7%; 5/14)的基因型趋于纯合(> 0.90)而被固定下来,群体内等位基因的变异程度显著降低。但在F16代改变传代方式后,多数家系(7/8)的 F_{IS} 估计值为负值,其中有4个达到了显著水平($P < 0.05$),这表明经过长期垂直传代的家系内的近交在一定程度上得到了缓解。F统计量检验表明,各家系间的遗传分化达到了极显著水平($P < 0.001$),来自群体间的变异为12.9%,表明群体内家系之间的遗传分化曾经达到过较高的水平。通过比较SPF鸡与不同品种鸡在等位基因分布上的差异,我们发现SPF鸡在高度近交传代14世代以后,除了部分位点的基因型趋于纯合外,有较多位点(64.3%; 9/14)仅保留了二个或三个优势等位基因,这说明微卫星标记某种程度上反映了特定祖先群体在遗传背景上的固有差异。

(一) 基因组DNA提取

翅静脉采集血液,用柠檬酸钠抗凝血,采用常规的酚氯仿抽提法提取基因组DNA。

(二) 微卫星DNA标记

根据联合国粮农组织(FAO)推荐的用于鸡遗传多样分析的15对微卫星标记,引物进行荧光素标记,依据荧光素将所有引物分成3个组合,同组合内的位点可同时检测。引物信息见表1。

表1 封闭群SPF鸡遗传学检测的微卫星标记信息

组合	标记	引物序列(5'-3')	片段大小(bp)	荧光素标记	退火温度(℃)
A	ADL0268	CTCCACCCCTCTCAGAACTA	112~116	FAM	60
		CAACTTCCCATCTACCTA CT			
	ADL0278	CCAGCAGTCTACCTYTCCTAT	112~122	HEX	60

续表

组合	标记	引物序列 (5'-3')	片段大小 (bp)	荧光素标记	退火温度 (°C)
		TGTCATCCAAGAACAGTGTG			
	LEI0094	GATCTCACCAGTATGAGCTGC	246~262	FAM	58
		TCTCACA CTGTAA CACAGTGC			
	MCW0216	GGGTTTACAGGATGGGACG	146~148	FAM	60
		AGTTTCACTCCCAGGGCTCG			
	MCW0248	GTTGTTCAAAAGAAGATGCATG	214~218	FAM	61
		TTGCATTAACTGGGCACTTTC			
	MCW0069	GCACTCGAGAAAACCTCCTGCG	156~170	HEX	59
		ATTGCTTCAGCAAGCATGGGAGGA			
B	MCW0081	GTTGCTGAGAGCCTGGTGCAG	114~134	FAM	58
		CCTGTATGTGGAATTACTTCTC			
	MCW0222	GCAGTTACATTGAAATGATTCC	219~221	FAM	58
		TTCTCAAAACACCTAGAAGAC			
	MCW0295	ATCACTACAGAACACCCTCTC	88~100	FAM	62
		TATGTATGCACGCAGATATCC			
	LEI0166	CTCCTGCCCTTAGCTACGCA	345~355	FAM	60
		TATCCCCTGGCTGGGAGTTT			
	LEI0234	ATGCATCAGATTGGTATTCAA	217~299	HEX	58
		CGTGGCTGTGAACAAATATG			
	MCW0037	ACCGGTGCCATCAATTACCTATTA	151~155	FAM	59
		GAAAGCTCACATGACACTGGGAAA			
	MCW0111	GCTCCATGTGAAGTGTTTA	99~107	FAM	55
		ATGTCCACTTGTCAATGATG			
	MCW0016	ATGGCGCAGAAGGCAAAGCGATAT	143~147	HEX	57
		TGGCTTCTGAAGCAGTTGCTATGG			
C	LEI0258	TCGGGAAAAGATCTGAGTCATTG	206~555	FAM	58
		TGATTTTCAGATCGCGTTCCTC			

(三) PCR 反应体系

反应程序为: 95℃ 5min; 94℃ 30s, 50~64℃ 30s, 72℃ 30s, 30~35 个循环; 72℃ 10min; 4℃ 保存。PCR 反应体系见表 2。

表2 封闭群 SPF 鸡遗传质量检测 PCR 反应体系

试剂	数量 (μL)	单位
10 × buffer	1.5	1.5mmol/L
dNTP	1.2	2.5mmol/μL
Primer mix	0.25	10pmol/μL
DNA 模板	2	50ng/μL
Taq polymerase	0.25	2.5U/μL
ddH ₂ O	9.8	
总计	15	

(四) 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 2μL 和含分子量标准的上样缓冲液 8μL 混合, 95℃变性 5min, 立即置于冰上。5min 后, 在 ABI3130DNA 测序仪选择 Data Collection 程序, 电泳, 收集荧光信号, 形成胶图。应用 GeneMapper 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, 判定基因型。或者将 PCR 产物直接送商业化公司测序。

(五) 数据分析

采用 Excel Microsatellite Toolkit (version 3.1) 软件计算群体内的期望杂合度 (H_e), 主要是根据种群内优势等位基因的分布频率来推算。

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$$

式中 n 表示该位点的等位基因数, P_i 为第 i 个等位基因在群体中的基因频率。

二、MHC 单倍型 SPF 鸡群的 PCR 检测方法

本标准分别采用 BF 基因的第 2 和 3 外显子作为 MHC 单倍型的监测标准。利用本标准设计的引物, 已成功用于国家禽类实验动物种子中心选育 MHC 单倍型鸡 B2、B19、B5、B13、B15 和 B21 等 6 个品系, 比较已公布的 14 种 MHC-B 单倍型氨基酸序列, 可知各单倍型的变化主要存在于 α 链 N 端的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域的范围, 即第 2 和第 3 外显子, 其余部分较为保守, 成为世代遗传学监测的主要手段。鸡群血样基因组 DNA 的提取常用苯酚-氯仿法。

(一) 鸡群血样基因组 DNA 的提取

常规苯酚-氯仿法提取基因组 DNA。

(二) 引物序列

片段 (1): 2-F 5'-CCGTGGGATCCTCAGACC-3'

2-R 5'-CGGCACTGCGCCATGGAG-3'

扩增片段 384 bp。

片段 (2): 3-F 5'-CTGTGTTTCAGGGTCTCACAC-3'

3-R 5'-GCAGGACAAGGTCAGGATC-3'

扩增长度为 442bp。

(三) PCR 扩增

扩增体系均为 30μL, 其中模板基因组 DNA (50ng/μL) 2μL, 上下游引物 (10pmol/μL) 各 0.6μL, 2×GC Buffer II (Mg²⁺ Plus) 15μL, dNTP Mixture (2.5mmol/L each) 3μL, LA Taq (2.5U/μL) 0.5μL, ddH₂O 补足 30μL。

PCR 反应程序为: 94℃ 5min, 35 个循环 (94℃ 30s, 56.4℃ 30s, 72℃ 30s), 72℃ 7min, 4℃ 保存。

(四) PCR 产物的直接测序及序列分析

PCR 反应结束后, 用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 将检测合格的 PCR 产物直接测序。序列分析软件为 Chromas 2.0、MEGA 4.0 和 Lasergene DNASTar 7.0。Chromas 2.0 用于查看和编辑序列, MEGA 4.0 用于序列比对, DNASTar 7.0 用于比对序列和序列相似性分析。

(五) 不同 MHC 单倍型 SPF 鸡的标准序列

1. B2 单倍型

片段 (1)

CGTGGGATCCTCAGACCCACACCCGCGGCTCACGGCCCCGCTGCGCTCCGTCCCC
GCAGAGCTCCATACCCTGCGGTACATCTCTACGGCGATGACGGATCCCGGCCCGGGC
AGCCGTGGTACGTGGACGTGGGGTACGTGGACGGGGAAGTCTTCACGCACTACAACA
GCACCGCTCGGAGGGCTGTGCCCCGCACCGAGTGGATAGCGGCCAACACGGACCAG
CAGTACTGGGACAGAGAGACGCAGATCGCACAGGGCAATGAGCAGATTGACCGCGA
GAACCTGGACATACGGCAGCAGCGCCACAACCAGACCGGCGGTGAGCACGGCCGGG
GCCGCGGCTCCGTGGGTGTGGGATGGACTCCATGGCGCAGTGCCG

片段 (2)

CTGTGTTTCAGGGTCTCACACGGCGCAGTGGATGTACGGCTGTGACATCCTCGAGG
ACGGCACCATCCGGGGGTATCATCAGATGGCCTGCGATGGGAGAGACTTCATTGCCCT
CGCTGAAGACATGAAGACGTTCACTGCAGCAGTTCAGAGGCAGTTCACCAAGA
GGAAATGGGAGGAAGGAGGTTATGCTGAGAGGAAGAAGCAGTACC-TGGAGGAAAC
CTGCGTGGAGGGGCTGCGGAGATACGTGGAATACGGGAAGGCTGAGCTGGGCAGGA
GAGGTGAGCAGGGT-----GGGGGGGGGGC-----CGCAGTGTGGGGCTGGACGTGGGC
CGGGGGCTCAGTGTGGGGAGCTCAGCCCGGCCCTCATTGCCACCCGCCT-GCAGAGC
GGCCTGAGGTGCGAGTGTGGGGGAAGGAGGCCGACGGGATCCTGACCTTGTCCTGC

2. B5 单倍型鸡的标准序列

片段 (1)

CCGTGGGATCCTCAGACCCCCACCCGCGGCTCACGGCCCCGCTGCGCTCCGCCCC
CGCAGAGCTCCATACCCTGCGGTACATCCATACGGCGATGACGGATCCCGGCCCGGG
CAGCCGTGGTACGTGGACGTGGGGTATGTGGACGGGGAAGTCTTCGTGCACTACAAC
AGCACCGCGCGGAGGTACGTGCCCCGCACCGAGTGGATGGCGGCCAAGGCGGACCA
GCAGTACTGGGATGAACAGACGCAGATCGCACAGGGCAATGAGCGGAGTGTGAAAG
TGAGCCTGGACACACTGCAGGAACGATACAACCAGACCGGCGGTGAGCACGGCCGG

GGCCGCGGCTCCGTGGGTGTGGGATGGGCTCCATGGCGCAGTGCCG

片段(2)

CTGTGTTTCAGGGTCTCACACGGCGCAGTGGATGTACGGCTGTGACATCCTCGAGG
ACGGCACCATCCGGGGGTATCATCAGGAGGCCCTACGATGGGAGAGACTTCATTGCCTT
CGACAAAGGCACGATGACGTTCACTGCGGCAGTTCAGAGGCAGTTCACCAAGA
GGAAATGGGAGGAAGGAGGTGTTGCTGAGGGGCGGAAGCAGTACCTGGAGGAAACC
TGTGTGGAGTGGCTGCGGAGATACGTGGAATATGGGAAGGCTGAGCTGGGCAGGAGA
GGTGAGTGGGGTGGAGGGGGGGCCACGGTGTGGGGCTGGACATGGGGCGGGGGCTC
AGCGTGGGGATCTCAGCCCGGCCCTCACTGCCACCCGCCCGCAGAGCGGCCCGAGGT
GCGAGTGTGGGGGAAGGAGGCCGACGGGATCCTGACCTTGTCCTGC

3. B13 单倍型鸡的标准序列

片段(1)

CCGTGGGATCCTCAGACCCCCACCCGCGGCTCACGGCCCCGCTGCGCTCCGCCCC
CGCAGAGCTCCATACCCTGCGGTACATCCATACGGCGATGACGGATCCCGGCCCGGG
CAGCCGTGGTACGTGGACGTGGGGTATGTGGACGGGGAACCTCTTCGTGCACTACAAC
AGCACCGCGCGGAGGTACGTGCCCCGCACCGAGTGGATGGCGGCCAAGGCGGACCA
GCAGTACTGGGATGGACAGACGCAGATCGGACAGCGCAATGAGCGGAGTGTGAAAG
TGAGCCTGGACACACTGCAGGAACGATAACAACCAGACCGGCGGTGAGCACGGCCGG
GGCCGCGGCTCCGTGGGTGTGGGATGGGCTCCATGGCGCAGTGCCG

片段(2)

CTGTGTTTCAGGGTCTCACACGGTGCAGTGGATGTTTCGGCTGTGACATCCTCGAGG
ATGGCACCATCCGGGGGTATCGTCAGGTGGCCTACGATGGGAAAGACTTCATTGCCTT
CGACAAAGACATGAAGACGTTCACTGCGGCAGTTCAGAGGCAGTTCACCAAGA
GGAAATGGGAGGAAGGAGGTGTTGCTGAGGGGTGGAAGAGTTACCTGGAGGAAACC
TGCGTGGAGTGGCTGCGGAGATACGTGGAATACGGGAAGGCTGAGCTGGGCAGGAG
AGGTGAGTGGGGTGGGGGGGGGGCCGCGGTGTGGGGCTGGACGTGGGGCGGGGGC
TCAGCGTGGGGAGCTCAGCCCGGCCCTCATTGCCACCTGCCTGCAGAGCGGCCTGAG
GTGCGAGTGTGGGGGAAGGAGGCCGACGGGATCCTGACCTTGTCCTGC

4. B15 单倍型鸡的标准序列

片段(1)

CGTGGGATCCTCAGACCCCCACCCGCGGCTCACGGCCCCGCTGCGCTCCGCCCC
GCAGAGCTCCATACCCTGCGGTACATCCATACGGCGATGACGGATCCCGGCCCGGGC
AGCCGTGGTACGTGGACGTGGGGTATGTGGACGGGGAACCTCTTCGTGCACTACAACA
GCACCGCGCGGAGGTACGTGCCCCGCACCGAGTGGATGGCGGCCAAGGCGGACCAG
CAGTACTGGGATGGACAGACGCAGATCGGACAGCGCAATGAGCGGAGTGTGAAAGT
GAGCCTGGACACACTGCAGGAACGATAACAACCAGACCGGCGGTGAGCACGGCCGGG
GCCGCGGCTCCGTGGGTGTGGGATGGGCTCCATGGCGCAGTGCCG

片段(2)

CTGTGTTTCAGGGTCTCACACGGTGCAGTGGATGTTTCGGCTGTGACATCCTCGAGG
ATGGCACCATCCGGGGGTATCGTCAGGTGGCCTACGATGGGAAAGACTTCATTGCCTT
CGACAAAGACATGAAGACGTTCACTGCGGCAGTTCAGAGGCAGTTCACCAAGA
GGAAATGGGAGGAAGGAGGTGTTGCTGAGGGGTGGAAGAGTTACC-TGGAGGAAAC
CTGCGTGGAGTGGCTGCGGAGATACGTGGAATACGGGAAGGCTGAGCTGGGCAGGA
GAGGTGAGTGGGGT-----GGGGGGGGGGC-----CGCGGTGTGGGGCTGGACGTGGGG
CGGGGGCTCAGCGTGGGGAGCTCAGCCCGGCCCTCATTGCCACCTGCCT-GCAGAGC
GGCCCGAGGTGCGAGTGTGGGGGAAGGAGGCCGACGGGATCCTGACCTTGTCCTGC

5. B19 单倍型鸡的标准序列

片段(1)

CCGTGGGATCCTCAGACCCCCACCCGCGGCTCACGGCCCCGCTGCGCTCCGCCCC
CGCAGAGCTCCATTCCCTGCGGTACGTCCATACGGCGATGACGGATCCCGGCCCGGG
CTGCCGTGGTTCGTGGACGTGGGGTACGTGGACGGGGAACCTCTTCGTGCACTACAAC
AGCACCGCGCGGAGGTACGTGCCCCGCACCGAGTGGATGGCGGCCAACACGGACCA
GCAGTACTGGGATGGACAGACGCAGATCGGACAGGGCAATGAGCGGAGTGTGAAAG
TGAGCTTGAACACACTGCAGGAACGATACAACCAGACCGGCGGTGAGCACGGCCGG
GGCCGCGGCTCCGTGGGTGTGGGATGGGCTCCATGGCGCAGTGCCG

片段(2)

CTGTGTTTCAGGGTCTCACACGGTGCAGCTGATGTACGGCTGTGACATCCTCGAG
GATGGCACCATCCGGGGGTATCATCAGACAGCCTACGATGGGAGAGACTTCATTGCC
TTCGACAAAGGCACGATGACGTTCACTGCGGCAGTTCAGAGGCAGTTCACCAAA
GAGGAAATGGGAGGAAGGAGGTGTTGCTGAGAGGTGGAAGAGTTACC-TGGAGGAA
ACCTGCGTGGAGGGGCTGCGGAGATATGTGGAATACGGGAAGGCTGAGCTGGGCAG
GAGAGGTGAGCGGGGTCGGGGTGGGGGGGGGGGG--CGGACGCAGTGTGGGGCTG
GACGTGGGGCGGGGGCTCATCGTGGGGAGCTCAGCCCGGCCCTCACTGCCGCCAC
CC-ACAGAGCGGCCTGAGGTGCGAGTGTGGGGGAAGGAGGCTGACGGGATCCTGAC
CTTGTCCTGC

6. B21 单倍型鸡的标准序列

片段(1)

CCGTGGGATCCTCAGACCCCCACCCGCGGCTCACGGCCCCGCTGCGCTCCGCCCC
CGCAGAGCTCCATACCCTGCGGTACATCCATACGGCGATGACGGATCCCGGCCCGGG
CAGCCGTGGTACGTGGACGTGGGGTATGTGGACGGGGAACCTCTTCGTGCACTACAAC
AGCACCGCGCGGAGGTACGTGCCCCGCACCGAGTGGATGGCGGCCAAGGCGGACCA
GCAGTACTGGGATGGACAGACGCAGATCGGACAGCGCAATGAGCGGAGTGTGAAAG
TGAGCCTGGACACACTGCAGGAACGATACAACCAGACCGGCGGTGAGCACGGCCGG
GGCCGCGGCTCCGTGGGTGTGGGATGGGCTCCATGGCGCAGTGCCG

片段(2)

CTGTGTTTCAGGGTCTCACACGGTGCAGTGGATGTTTCGGCTGTGACATCCTCGAGG
ATGGCACCATCCGGGGGTATCGTCAGGTGGCCTACGATGGGAAAGACTTCATTGCCTT
CGACAAAGACATGAAGACGTTCACTGCGGCAGTTCCAGAGGCAGTTCACCAAGA
GGAAATGGGAGGAAGGAGGTGTTGCTGAGGGGTGGAAGAGTTACC-TGGAGGAAAC
CTGCGTGGAGTGGCTGCGGAGATACGTGGAATACGGGAAGGCTGAGCTGGGCAGGA
GAGGTGAGTGGGGTGGGGGGGGGGCCGCGGTGTGGGGCTGGACGTGGGGCGGGGG
CTCAGCGTGGGGAGCTCAGCCCGGCCCTCATTGCCACCTGCCT-GCAGAGCGGCCCGA
GGTGCGAGTGTGGGGGAAGGAGGCCGACGGGATCCTGACCTTGTCCTGC

第七节 国内外同类标准分析

本标准推荐的封闭群 SPF 鸡遗传学检测所用微卫星位点, 来自世界粮农组织家畜确定的 MHC 单倍型鸡群采用国际公认的 MHC 核心基因进行检测, 核苷酸序列完全比对国内外学者公认的序列。根据该方法对国家禽类实验动物种子中心培育保存的 BW/G(n) 品系的鉴定结果, 已在国际 SCI 收录期刊发表, 得到了国际同行的认可。

第八节 与法律法规、标准关系

与国内现行法律、法规和强制性标准没有冲突关系。

第九节 重大分歧的处理和依据

在本标准起草、修订和征求意见过程中, 未出现重大意见分歧。

第十节 作为推荐性标准的建议

本标准建议为推荐性标准。

第十一节 标准实施要求和措施

建议由中国实验动物学会会同各省级实验动物质量检测机构, 对全国 SPF 鸡生产单位和使用单位进行宣贯, 并推荐采用本标准。采取技术培训、实验操作的方式, 对相关鸡场和检测机构进行培训。