

ICS 65.020.30

B 41



中国实验动物学会团体标准

T/CALAS 19—2017

实验动物 SPF 猪遗传质量控制

Laboratory animal - Genetic monitor for SPF pig

2017-05-18 发布

2017-05-18 实施

中国实验动物学会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则编写。

本标准附录为规范性附录。

本标准由中国实验动物学会归口。

本标准由全国实验动物标准化技术委员会（SAC/TC281）技术审查。

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并组织起草。

本标准起草单位：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。

本标准主要起草人：韩凌霞、陆涛峰、陈洪岩、岳秉飞。

实验动物 SPF 猪遗传质量控制

1 范围

本标准规定了实验动物 SPF 猪的繁殖和遗传质量控制方法。

本标准适用于实验动物 SPF 猪的遗传质量控制。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用必不可少。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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—2010 《实验动物 哺乳类动物的遗传质量控制》

3 术语和定义

本标准采用下列术语和定义。

3.1

无特定病原体猪 specific pathogen free pig

在屏障环境或隔离环境的饲养条件下，排除口蹄疫病毒 A/O、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，遗传背景清晰，来源清楚，可以应用于科学研究、教学、生产和检定以及其他科学实验的高等级实验动物猪。SPF 猪在繁育过程中推荐按照封闭群动物的管理模式进行繁育管理。

3.2

封闭群（远交群）closed colony（outbred stock）

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

4 SPF 猪的繁殖

4.1 原则

SPF 猪在繁殖应按照封闭群动物的繁殖方式实施。选择封闭群猪繁殖方法的原则是保持封闭群 SPF 猪群体的遗传异质性及基因多态性，避免近交系数随繁殖代数增加而过快上升。

4.2 引种

4.2.1 作为繁殖用种子的封闭群 SPF 猪应遗传背景明确或来源清楚，有完整的资料（包括种群名称、来源、遗传基因特点及主要生物学特性等）。

4.2.2 根据繁殖方式,在保证每代近交系数增量不大于1%的前提下,引种数量不得少于30对无血缘关系(三代以内无共同祖先)的雌雄猪。

4.3 方法 封闭群应足够大,以保持封闭群SPF猪的遗传基因的稳定,并尽量避免近亲交配。具体繁殖方法按照GB 14923—2010执行。

5 封闭群SPF猪的遗传质量检测

5.1 检测方法

具体方法执行附录A。采用猪30个具有高度多态的位点作为遗传检测的微卫星DNA标记。

5.2 抽样

按表1要求从每个封闭群中随机抽取非同窝成年SPF猪,雌雄各半。

表1 封闭群SPF猪遗传检测抽样要求

群体数量	抽样数量
少于100只	≥15只
大于100只	≥30只

5.3 结果判定

群体内遗传变异采用平均杂合度指标或群体平衡状态方法进行评价。当平均杂合度在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。或用群体是否达到平衡状态来判定,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。具体方法执行附录A。

5.4 检测频率

封闭群SPF猪生产群每世代至少进行一次遗传质量检测。

附录A

(规范性附录)

封闭群SPF猪的微卫星DNA标记检测方法

A.1 基因组DNA的提取

用苯酚-氯仿法或试剂盒提取基因组DNA。

A.2 微卫星位点

用30个猪微卫星位点检测封闭群猪的遗传概貌。各微卫星位点的名称、引物序列、等位基因数、PCR反应的退火温度见附表A。

A.3 PCR扩增

A.3.1 PCR扩增的体系 PCR总反应体积为50μL,其中10×PCR buffer、dNTP、Taq酶

按照不同试剂盒的推荐量加入，上下游引物（100pmol/μL）各 1μL，基因组 DNA 1μL，用纯水（ddH₂O）补足体系到 50μL。

PCR 反应程序为：94℃预变性，3min；94℃变性，40s；退火（各位点退火温度参见附表 1），40s；72℃延伸，40s；30 个循环；72℃继续延伸 5min；扩增产物 4℃保存。

A.3.2 PCR 产物的检测 PCR 产物，经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳以及凝胶成像系统拍照检测扩增结果。

A.3.3 扩增产物的 STR 扫描 扩增产物经过琼脂糖凝胶电泳检测确保扩增出目的片段后，选择分别以 FAM、HEX、TAMRA 标记的三个位点的扩增产物，以 1:1.5:1.5 体积比混合，取 1μl 上样进行 STR 扫描。

A.4 STR 扫描结果的判读与统计分析

A.4.1 STR 扫描结果的判读 扫描结果出现两种波形：一种为纯合基因型，只有一个主波；另一种为杂合基因型，有两个主波。同时，根据软件读出波峰处的扩增产物的片段长度大小。

由基因分型软件读出每个样本在每个微卫星位点的扩增片段大小。每个位点的等位基因根据扩增片段从小到大顺序排列记录为 a、b、c、d 等。

A.4.2 运用群体遗传分析软件对数据进行统计分析 将所有样本的每个微卫星位点的基因型以 ab、bb 等形式输入群体遗传分析软件的数据文件，计算待测群体在各微卫星位点上的基因频率（P）、有效等位基因数（Ne）、观测杂合度（Ho）、期望杂合度（He）和平均杂合度。

A.5 结果判定

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。

A.6 结果报告

根据判定结果对被检测的封闭群 SPF 猪群体做出检测报告。

附表 1 各微卫星座位的引物序列、最佳扩增温度、等位基因数及等位基因分布范围

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（℃）
S0026	AACCTTCCCTTCCCAATCAC	156~178	1	55
	CACAGACTGCCTTTTACTCC			
S0155	TGTTCTCTGTTTCTCCTCTGTTTG	116~158	1	55
	AAAGTGGAAGAGTCAATGGCTAT			
S0005	TCCTTCCCTCCTGGTAACTA	134~168	1	55
	GCACTTCCTGATTCTGGGTA			

续表

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 (℃)
Sw2410	ATTTGCCCCAAGGTATTC CAGGGTGTGGAGGGTAGAAG	81~119	2	50
Sw830	AAGTACCATGGAGAGGGAAATG ACATGGTTCCAAAGACCTGTG	149~173	2	50
S0355	TCTGGCTCCTACACTCCTTCTTGATG TTGGGTGGGTGCTGAAAAATAGGA	196~215	2	50
Sw24	CTTTGGGTGGAGTGTGTGC ATCCAAATGCTGCAAGCG	99~135	3	55
Sw632	TGGGTGAAAGATTTCCTCAA GGAGTCAGTACTTTGGCTTGA	115~138	3	55
Swr1941	AGAAAGCAATTGATTGCATAATC ACAAGGACCTACTGTATAGCACAGG	215~255	3	55
Sw936	TCTGGAGCTAGCATAAGTGCC GTGCAAGTACACATGCAGGG	134~158	4	55
S0218	GTGTAGGCTGGCGGTTGT CCCTGAAACCTAAAGCAAAG	234~256	4	55
S0228	GGCATAGGCTGGCAGCAACA AGCCACCTCATCTTATCTACACT	93~112	4	55
Sw122	TTGTCTTTTATTTTGCTTTTGG CAAAAAAGGCAAAAGATTGACA	220~247	5	55
Sw857	TGAGAGGTCAGTTACAGAAGACC GATCCTCCTCCAAATCCCAT	165~187	5	55
S0097	GACCTATCTAATGTCATTATAGT TTCCTCCTAGAGTTGACAAACTT	135~155	5	55
Sw240	AGAAATTAGTGCCCTCAAATTGG AAACCATTAAGTCCCTAGCAAA	164~186	6	55
IGF1	GCTTGGATGGACCATGTTG CATATTTTCTGCATAACTGAACCT	256~294	6	55
Sw2406	AATGTCACCTTTAAGACGTGGG AATGCGAAACTCCTGAATTAGC	117~131	6	55
Sw72	ATCAGAACAGTGCGCCGT TTTGAAAATGGGGTGTTC	172~218	7	55
S0226	GCACTTTTAACTTTTCATGATACTCC GGTTAAACTTTTNCCTCAATACA	172~198	7	55
S0090	CCAAGACTGCCTTGTAAGTGAATA GCTATCAAGTATTGTACCATIAGG	227~253	7	55
Sw2008	CAGGCCAGAGTAGCGTGC CAGTCCTCCAAAAATAACATG	148~170	8	55

续表

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)
Sw1067	TGCTGGCCAGTGACTCTG CCGGGGGATTAAACAAAAAG	126~160	8	55
S0101	GAATGCAAAGAGTTCAGTGTAGG GTCTCCCTCACACTTACCGCAG	200~210	8	55
Sw1828	AATGCATTGTCTTCATTCAACC TTAACCGGGGCACTTGTG	100~104	9	55
S0143	ACTCACAGCTTGTCTGGGTGT CAGTCAGCAGGCTGACAAAAAC	261~289	9	55
S0068	AGTGGTCTCTCTCCCTCTTGCT CCTTCAACCTTTGAGCAAGAAC	118~200	9	55
S0178	TAGCCTGGGAACCTCCACACGCTG GGCACCAGGAATCTGCAATCCAGT	160~196	10	60
Sw911	CTCAGTTCTTTGGGACTGAACC CATCTGTGGAAAAAAAAGCC	217~255	10	60
S0002	GAAGCCAAAGAGACAACCTGC GTTCTTTACCCACTGAGCCA	195~229	10	60

参 考 文 献

- 包劲松, 舒庆尧, 吴殿星, 等. 2000. 水稻 *Wx* 基因 (CT)_n 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.
- 巩元芳, 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.
-