

ICS 65.020.30

B 44



中国实验动物学会团体标准

T/CALAS 16—2017

实验动物 SPF 鸡遗传质量控制

Laboratory animal - Population genetics quality control of SPF chicken breed

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。

本标准中的附录 A、附录 B 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。

本团体标准起草单位：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、北京实验动物研究中心。

本标准主要起草人：韩凌霞、陈洪岩、岳秉飞、卢胜明。

实验动物 SPF 鸡遗传质量控制

1 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。

2 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

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本部分。

3.1

无特定病原体鸡 specific pathogen-free chicken

在符合国家标准 GB 14925—2010《实验动物 环境及设施》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 GB/T 17999.1—2008《SPF 鸡 微生物学监测》的规定的鸡群。

3.2

单倍型 haplotype

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，即若干个决定同一性状的紧密连锁的基因构成的基因型。

3.3

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

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。

3.4

杂合度 heterozygosity

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。

4 繁殖方法

4.1 封闭群鸡

4.1.1 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。

4.1.2 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)。

4.1.3 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%。

4.1.4 种鸡群的雄雌个体比例一般为1:8~1:10。

4.2 MHC单倍型鸡

4.2.1 种鸡的MHC核心区域保持单倍型纯合。

4.2.2 繁殖原则是保持MHC核心区域的基因纯合性。

4.2.3 严格以全同胞或半同胞兄妹交配方式进行繁殖。

4.2.4 雄雌个体比例一般为1:8~1:10。

5 遗传质量监测

5.1 封闭群鸡的检测

5.1.1 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。规模大于100只的,随机选取15%的比例,最大不超过30只。

5.1.2 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。

5.1.3 群体评价

群体内遗传变异采用期望杂合度进行评价。

5.1.4 检测频率

封闭群鸡每个世代至少进行1次遗传质量检测

5.2 MHC单倍型鸡的检测

5.2.1 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。

5.2.2 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。

5.2.3 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。

5.2.4 检测频率

单倍型鸡每个世代至少进行一次遗传质量检测。

5.2.5 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。

附 录 A

(规范性附录)

封闭群 SPF 鸡的微卫星 DNA 标记检测方法

A.1 基因组 DNA 提取

翅静脉采集柠檬酸钠抗凝血，采用常规的酚-氯仿抽提法提取基因组 DNA。

A.2 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 A.1。

表 A.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	CTC CAC CCC TCT CAG AAC TA	112~116	FAM	60
		CAA CTT CCC ATC TAC CTA CT			
	ADL0278	CCA GCA GTC TAC CTYT CCT AT	112~122	HEX	60
		TGT CAT CCA AGA ACA GTG TG			
	LEI0094	GAT CTC ACC AGT ATG AGC TGC	246~262	FAM	58
		TCT CAC ACT GTA ACA CAG TGC			
B	MCW0216	GGG TTT TAC AGG ATG GGA CG	146~148	FAM	60
		AGT TTC ACT CCC AGG GCT CG			
	MCW0248	GTT GTT CAA AAG AAG ATG CAT G	214~218	FAM	61
		TTG CAT TAA CTG GGC ACT TTC			
	MCW0069	GCA CTC GAG AAA ACT TCC TGC G	156~170	HEX	59
		ATT GCT TCAGCA AGC ATG GGA GGA			
B	MCW0081	GTT GCT GAG AGC CTG GTG CAG	114~134	FAM	58
		CCT GTA TGT GGA ATT ACT TCT C			
	MCW0222	GCA GTT ACA TTG AAA TGA TTC C	219~221	FAM	58
		TTC TCA AAA CAC CTA GAA GAC			
	MCW0295	ATC ACT ACA GAA CAC CCT CTC	88~100	FAM	62
		TAT GTA TGC ACG CAG ATA TCC			

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)
	LEI0166	CTC CTG CCC TTA GCT ACG CA TAT CCC CTG GCT GGG AGT TT	345~355	FAM	60
	LEI0234	ATG CAT CAG ATT GGT ATT CAA CGT GGC TGT GAA CAA ATA TG	217~299	HEX	58
	MCW0037	ACC GGT GCC ATC AAT TAC CTA TTA GAA AGC TCA CAT GAC ACT GGG AAA	151~155	FAM	59
	MCW0111	GCT CCA TGT GAA GTG GTT TA ATG TCC ACT TGT CAA TGA TG	99~107	FAM	55
	MCW0016	ATG GCG CAG AAG GCA AAG CGA TAT TGG CTT CTG AAG CAG TTG CTA TGG	143~147	HEX	57
C	LEI0258	TCGGGAAAAGATCTGAGTCATTG TGATTTTCAGATCGCGTTCCTC	206~555	FAM	58

A.3 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 A.2。

表 A.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 template	2	50ng/μL
Taq polymerase	0.25	2.5U/μL
ddH ₂ O	9.8	
共计	15	

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 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。

A.5 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), 主要是根据种群内当前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 r 为位点数, P_i 为每个位点第 i 个等位基因的频率, n_i 为第 k 个位点的等位基因数目。

附录 B

(规范性附录)

MHC 单倍型 SPF 鸡群的 PCR 检测方法

B.1 鸡群血样基因组 DNA 的提取

常规苯酚-氯仿法提取基因组 DNA。

B.2 引物序列

片段 (1): 2-F 5'-CCGTGGGATCCTCAGACC-3'

2-R 5'-CGGCACTGCGCCATGGAG-3'

扩增片段 384bp。

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

3-R 5'-GCAGGACAAGGTCAGGATC-3'

扩增长度为 442bp。

B.3 PCR 扩增

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

PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 5min, 35 个循环 (94 $^{\circ}$ C 30s, 56.4 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s), 72 $^{\circ}$ C 7min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

B.4 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。

B.5 不同 MHC 单倍型 SPF 鸡的标准序列

B2 单倍型

片段 (1)

CGTGGGATCCTCAGACC CACACCCGCGGCTCACGGCCCCGCTGCGCTCCGTCCC
CGCAGAGCTCCATACCCTGCGGTACATCTCTACGGCGATGACGGATCCCGGCCCCGGG
CAGCCGTGGTACGTGGACGTGGGGTACGTGGACGGGGAACCTTTCACGCACTACAAC
AGCACCGCTCGGAGGGCTGTGCCCCGACCGAGTGGATAGCGGCCAACACGGACCA
GCAGTACTGGGACAGAGAGACGCAGATCGCACAGGGCAATGAGCAGATTGACCGCG
AGAACCTGGACATACGGCAGCAGCGCCACAACCAGACCGGCGGTGAGCACGGCCGG
GGCCGCGGCTCCGTGGGTGTGGGATGGA CTCCATGGCGCAGTGCCG

片段 (2)

CTGTGTTTCAGGGTCTCACAC GGCGCAGTGGATGTACGGCTGTGACATCCTCGA
GGACGGCACCATCCGGGGGTATCATCAGATGGCCTGCGATGGGAGAGACTTCATTGC
CCTCGCTGAAGACATGAAGACGTTCACTGCAGCAGTTCAGAGGCAGTTCCCACCAA
GAGGAAATGGGAGGAAGGAGGTATGCTGAGAGGAAGAAGCAGTACC-TGGAGGAA
ACCTGCGTGGAGGGGCTGCGGAGATACGTGGAATACGGGAAGGCTGAGCTGGGCAG
GAGAGGTGAGCAGGGT-----GGGGGGGGGGC-----CGCAGTGTGGGGCTGGACGTGG
GCCGGGGGCTCAGTGTGGGGAGCTCAGCCCGGCCCTCATTGCCACCCGCCT-GCAGAG
CGGCCTGAGGTGCGAGTGTGGGGGAAGGAGGCCGACGG GATCCTGACCTTGTCCTGC

B5 单倍型鸡的标准序列

片段 (1)

CCGTGGGATCCTCAGACC CCCACCCGCGGCTCACGGCCCCGCTGCGCTCCGCCCC
CGCAGAGCTCCATACCCTGCGGTACATCCATACGGCGATGACGGATCCCGGCCCCGGG
CAGCCGTGGTACGTGGACGTGGGGTATGTGGACGGGGAACCTTTCGTGCACTACAAC
AGCACCGCGCGGAGGTACGTGCCCCGACCGAGTGGATGGCGGCCAAGGCGGACCA
GCAGTACTGGGATGAACAGACGCAGATCGCACAGGGCAATGAGCGGAGTGTGAAAG
TGAGCCTGGACACACTGCAGGAACGATACAACCAGACCGGCGGTGAGCACGGCCGG
GGCCGCGGCTCCGTGGGTGTGGGATGGG CTCCATGGCGCAGTGCCG

片段 (2)

CTGTGTTTCAGGGTCTCACAC GGCGCAGTGGATGTACGGCTGTGACATCCTCGAG
GACGGCACCATCCGGGGGTATCATCAGGAGGCCTACGATGGGAGAGACTTCATTGCC
TTCGACAAAGGCACGATGACGTTCACTGCGGCAGTTCAGAGGCAGTTCCCACCAA
GAGGAAATGGGAGGAAGGAGGTGTTGCTGAGGGGCGGAAGCAGTACCTGGAGGAA
ACCTGTGTGGAGTGGCTGCGGAGATACGTGGAATATGGGAAGGCTGAGCTGGGCAGG
AGAGGTGAGTGGGGTGGAGGGGGGGCCACGGTGTGGGGCTGGACATGGGGCGGGG
GCTCAGCGTGGGGATCTCAGCCCGGCCCTCACTGCCACCCGCCCCGAGAGCGGCCCCG
AGGTGCGAGTGTGGGGGAAGGAGGCCGACGG GATCCTGACCTTGTCCTGC

B13 单倍型鸡的标准序列

片段 (1)

CCGTGGGATCCTCAGACC CCCACCCGCGGCTCACGGCCCCGCTGCGCTCCGCCCC
CGCAGAGCTCCATACCCTGCGGTACATCCATACGGCGATGACGGATCCCGGCCCGGG
CAGCCGTGGTACGTGGACGTGGGGTATGTGGACGGGGAAGTCTTCGTGCACTACAAC
AGCACCGCGCGGAGGTACGTGCCCCGCACCGAGTGGATGGCGGCCAAGGCGGACCA
GCAGTACTGGGATGGACAGACGCAGATCGGACAGCGCAATGAGCGGAGTGTGAAAG
TGAGCCTGGACACACTGCAGGAACGATACAACCAGACCGGCGGTGAGCACGGCCGG
GGCCGCGGCTCCGTGGGTGTGGGATGGG CTCCATGGCGCAGTGCCG

片段 (2)

CTGTGTTTCAGGGTCTCACAC GGTGCAGTGGATGTTGCGCTGTGACATCCTCGAG
GATGGCACCATCCGGGGGTATCGTCAGGTGGCCTACGATGGGAAAGACTTCATTGCC
TTCGACAAAGACATGAAGACGTTCACTGCGGCAGTTCAGAGGCAGTTCACACAA
GAGGAAATGGGAGGAAGGAGGTGTTGCTGAGGGGTGGAAGAGTTACCTGGAGGAAA
CCTGCGTGGAGTGGCTGCGGAGATACGTGGAATACGGGAAGGCTGAGCTGGGCAGG
AGAGGTGAGTGGGGTGGGGGGGGGCGCGGTGTGGGGCTGGACGTGGGGCGGGG
GCTCAGCGTGGGGAGCTCAGCCCGGCCCTCATTGCCACCTGCCTGCAGAGCGGCCTG
AGGTGCGAGTGTGGGGGAAGGAGGCCGACGG GATCCTGACCTTGTCCTGC

B15 单倍型鸡的标准序列

片段 (1)

CGTGGGATCCTCAGACC CCCACCCGCGGCTCACGGCCCCGCTGCGCTCCGCCCC
CGCAGAGCTCCATACCCTGCGGTACATCCATACGGCGATGACGGATCCCGGCCCGGG
CAGCCGTGGTACGTGGACGTGGGGTATGTGGACGGGGAAGTCTTCGTGCACTACAAC
AGCACCGCGCGGAGGTACGTGCCCCGCACCGAGTGGATGGCGGCCAAGGCGGACCA
GCAGTACTGGGATGGACAGACGCAGATCGGACAGCGCAATGAGCGGAGTGTGAAAG
TGAGCCTGGACACACTGCAGGAACGATACAACCAGACCGGCGGTGAGCACGGCCGG
GGCCGCGGCTCCGTGGGTGTGGGATGGG CTCCATGGCGCAGTGCCG

片段 (2)

CTGTGTTTCAGGGTCTCACAC GGTGCAGTGGATGTTGCGCTGTGACATCCTCGA
GGATGGCACCATCCGGGGGTATCGTCAGGTGGCCTACGATGGGAAAGACTTCATTGC
CTTCGACAAAGACATGAAGACGTTCACTGCGGCAGTTCAGAGGCAGTTCACCA
AGAGGAAATGGGAGGAAGGAGGTGTTGCTGAGGGGTGGAAGAGTTACC-TGGAGGA
AACCTGCGTGGAGTGGCTGCGGAGATACGTGGAATACGGGAAGGCTGAGCTGGGCA
GGAGAGGTGAGTGGGGT-----GGGGGGGGGGC-----CGCGGTGTGGGGCTGGACGT
GGGGCGGGGGCTCAGCGTGGGGAGCTCAGCCCGGCCCTCATTGCCACCTGCCT-GCA
GAGCGGCCCCGAGGTGCGAGTGTGGGGGAAGGAGGCCGACGG GATCCTGACCTTGTC
CTGC

B19 单倍型鸡的标准序列

片段 (1)

CCGTGGGATCCTCAGACC CCCACCCGCGGCTCACGGCCCCGCTGCGCTCCGCCC
CCGCAGAGCTCCATTCCCTGCGGTACGTCCATACGGCGATGACGGATCCCGGCCCGG
GCTGCCGTGGTTTCGTGGACGTGGGGTACGTGGACGGGGAAGTCTTCGTGCACTACAA
CAGCACCGCGCGGAGGTACGTGCCCCGCACCGAGTGGATGGCGGCCAACACGGACC
AGCAGTACTGGGATGGACAGACGCAGATCGGACAGGGCAATGAGCGGAGTGTGAAA
GTGAGCTTGAACACACTGCAGGAACGATACAACCAGACCGGCGGTGAGCACGGCCG
GGGCCGCGGCTCCGTGGGTGTGGGATGGGCTCCATGGCGCAGTGCCG

片段 (2)

CTGTGTTTCAGGGTCTCACAC GGTGCAGCTGATGTACGGCTGTGACATCCTCGA
GGATGGCACCATCCGGGGGTATCATCAGACAGCCTACGATGGGAGAGACTTCATTGC
CTTCGACAAAGGCACGATGACGTTCACTGCGGCAGTTCAGAGGCAGTTCACCA
AGAGGAAATGGGAGGAAGGAGGTGTTGCTGAGAGGTGGAAGAGTTACC-TGGAGGA
AACCTGCGTGGAGGGGCTGCGGAGATATGTGGAATACGGGAAGGCTGAGCTGGGCA
GGAGAGGTGAGCGGGGTCGGGGTGGGGGGGGGGGG--CGGACGCAGTGTGGGGCT
GGACGTGGGGCGGGGGCTCATCGTGGGGAGCTCAGCCCGGCCCTCACTGCCGCCCAC
CC-ACAGAGCGGCCTGAGGTGCGAGTGTGGGGGAAGGAGGCTGACGG GATCCTGAC
CTTGTCCTGC

B21 单倍型鸡的标准序列

片段 (1)

CCGTGGGATCCTCAGACC CCCACCCGCGGCTCACGGCCCCGCTGCGCTCCGCCC
CCGCAGAGCTCCATACCCTGCGGTACATCCATACGGCGATGACGGATCCCGGCCCGG
GCAGCCGTGGTACGTGGACGTGGGGTATGTGGACGGGGAAGTCTTCGTGCACTACAA
CAGCACCGCGCGGAGGTACGTGCCCCGCACCGAGTGGATGGCGGCCAAGGCGGACC
AGCAGTACTGGGATGGACAGACGCAGATCGGACAGCGCAATGAGCGGAGTGTGAAA
GTGAGCCTGGACACACTGCAGGAACGATACAACCAGACCGGCGGTGAGCACGGCCG
GGGCCGCGGCTCCGTGGGTGTGGGATGGG CTCCATGGCGCAGTGCCG

片段 (2)

CTGTGTTTCAGGGTCTCACAC GGTGCAGTGGATGTTCCGGCTGTGACATCCTCGAG
GATGGCACCATCCGGGGGTATCGTCAGGTGGCCTACGATGGGAAAGACTTCATTGCC
TTCGACAAAGACATGAAGACGTTCACTGCGGCAGTTCAGAGGCAGTTCACCAA
GAGGAAATGGGAGGAAGGAGGTGTTGCTGAGGGGTGGAAGAGTTACC-TGGAGGAA
ACCTGCGTGGAGTGGCTGCGGAGATACGTGGAATACGGGAAGGCTGAGCTGGGCAG
GAGAGGTGAGTGGGGTGGGGGGGGGGCCGCGGTGTGGGGCTGGACGTGGGGCGGG
GGCTCAGCGTGGGGAGCTCAGCCCGGCCCTATTGCCACCTGCCT-GCAGAGCGGCC
GAGGTGCGAGTGTGGGGGAAGGAGGCCGACGG GATCCTGACCTTGTCCTGC