

ICS 64.020.30

B 44



# 中国实验动物学会团体标准

T/CALAS 37—2017

---

## 实验动物 SPF 鸭遗传学质量监测

Laboratory animal - Population genetics surveillance of specific pathogen-free ducks

2017-12-29 发布

2018-01-01 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。

本标准参考世界粮农组织推荐的鸭多态性微卫星 DNA 标记位点，确定了无特定病原体（SPF）鸭的群体遗传学质量监测方法。

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 鸭遗传学质量监测

## 1 范围

本标准规定了无特定病原体（SPF）鸭的遗传学质量监测方法。

本标准适用于封闭群鸭和 MHC 单倍型鸭的遗传学质量控制。

## 2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 2.1

**SPF 鸭 specific pathogen-free duck**

无特定病原体鸭是指人工繁育，对其携带的病原微生物及寄生虫进行控制，遗传背景明确或来源清楚，用于科学研究、教学、生产、检测、检定及其他科学实验的实验鸭。

### 2.2

**单倍型 haplotype**

单倍型是单倍体基因型的简称，遗传学上是指在同一条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基因构成的基因型。

### 2.3

**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，编码主要组织相容性抗原，其编码产物与免疫识别、排斥和免疫应答有关，在一定程度上决定动物个体对疫病的易感性或抗性。

### 2.4

**基因频率 genotype frequency**

基因频率是指一个种群基因库中某个基因占全部等位基因数的比率。

### 2.5

**封闭群 closed colony**

以非近亲交配方式进行繁殖生产的 SPF 鸭种群，在不从其外部引入新个体的条件下，至少连续繁殖 4 代以上，群体的基因频率达到稳定，每代近交系数增加量不超过 1%。

## 3 繁殖方法

### 3.1 封闭群

3.1.1 种鸭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）。

3.1.2 繁殖原则为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。

3.1.3 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%。

### 3.2 MHC 单倍型鸭

3.2.1 鸭群的 MHC 核心区域保持单倍型纯合。

3.2.2 以全同胞或半同胞兄妹交配方式进行繁殖。

3.2.3 雌雄个体比例一般为 1 : 8~1 : 10。

## 4 遗传质量监测

### 4.1 封闭群的遗传质量检测

#### 4.1.1 抽样比例

全群检测。

#### 4.1.2 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。

#### 4.1.3 检测频率

每个世代进行 1 次遗传质量检测。

#### 4.1.4 结果判定

根据基因频率评价，基因频率保持稳定，判为合格。

### 4.2 MHC 单倍型鸭的监测

#### 4.2.1 抽样比例

全群检测。

#### 4.2.2 检测方法

检测 MHC 区域核心基因的高变区分型。具体方法见附录 B。

#### 4.2.3 检测频率

每个世代至少进行 1 次遗传质量检测。

#### 4.2.4 结果判断

分型结果与标准序列完全一致，判为合格。

## 附录 A

(规范性附录)

### 封闭群 SPF 鸭的微卫星 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。常规酚-氯仿抽提法提取基因组 DNA。

#### A.2 PCR 反应程序 (附表 A.1)

附表 A.1 封闭群 SPF 鸭 PCR 反应程序

| 组分                     | 用量/ $\mu\text{L}$ | 终浓度                     |
|------------------------|-------------------|-------------------------|
| 10 $\times$ Taq Buffer | 1.5               | 1.5 mm                  |
| dNTP                   | 1.5               | 2.5mmol/L each          |
| Primer Mix             | 0.25              | 10 pmol / $\mu\text{L}$ |
| Taq Polymerase         | 0.3               | 2.5 U/ $\mu\text{L}$    |
| DNA Template           | 1.5               | 100 ng/ $\mu\text{L}$   |
| ddH <sub>2</sub> O     | 10                |                         |
| 总体积                    | 15                |                         |

95℃、5 min; 94℃、30 s, 50~64℃、30 s, 72℃、30 s, 30~35 个循环; 72℃、10 min; 4℃保存。

#### A.3 PCR 产物检测

取 5  $\mu\text{L}$  PCR 产物与 1  $\mu\text{L}$  6 $\times$  Loading Buffer 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, 于紫外灯下观察结果并拍照, 然后再利用 ABI3130 XL DNA 测序仪进行分析。上样前用灭菌去离子水将 PCR 的扩增产物根据检测结果稀释适宜倍数后, 取稀释产物 2  $\mu\text{L}$  和含分子质量标准的上样缓冲液 8  $\mu\text{L}$  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, 在 ABI3130 DNA 测序仪上选择 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、分子质量标准设定和 PCR 产物片段大小的计算, 并进行基因型的判定。

#### A.4 数据分析

采用 Excel Microsatellite Toolkit (Version 3.1) 软件或其他类似生物统计学软件计算群体等位基因和基因频率。

#### A.5 结果判定

根据群体遗传学结构分析, 基因频率达到稳定, 并结合饲养管理, 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, 则判为符合封闭群 (附表 A.2)。

附表 A.2 SPF 鸭封闭群遗传检测微卫星位点的相关信息及组合

| 组合 | 标记名称    | 引物序列 (5'→3')                                    | 片段范围/bp | 荧光标记 | 退火温度/℃ |
|----|---------|-------------------------------------------------|---------|------|--------|
| A  | CAUD004 | TCCACTTGGTAGACCTTGAG<br>TGGGATTTCAGTGAGAAGCCT   | 202~222 | HEX  | 62     |
|    | CAUD005 | CTGGGTTTGGTGGAGCATAA<br>TACTGGCTGCTTCATTGCTG    | 248~266 | 6FAM | 61     |
|    | CAUD011 | TGCTATCCACCCAATAAGTG<br>CAAAGTTAGCTGGTATCTGC    | 129~142 | HEX  | 52     |
|    | CAUD013 | ACAATAGATTCCAGATGCTGAA<br>ATGTCTGAGTCCTCGGAGC   | 87~105  | 6FAM | 58     |
|    | CAUD023 | CACATTAACACATTTTCGGTCT<br>CAGCCAAAGAGTTCAACAGG  | 164~167 | 6FAM | 52     |
|    | CAUD026 | ACGTCACATCACCCACAG<br>CTTTGCCTCTGGTGAGGTTC      | 142~152 | 6FAM | 61     |
|    | CAUD035 | GTGCCTAACCCTGATGGATG<br>CTTATCAGATGGGGCTCGGA    | 221~239 | 6FAM | 63     |
| B  | CAUD032 | GAAACCAACTGAAAACGGGC<br>CCTCCTGCGTCCCAATAAG     | 118~126 | 6FAM | 58     |
|    | CAUD027 | AGAAGGCAGGCAAATCAGAG<br>TCCACTCATAAAAAACCCCACA  | 112~122 | HEX  | 64     |
|    | APH08   | AAAGCCCTGTGAAGCGAGCTA<br>TGTGTGTGCATCTGGGTGTGT  | 176~187 | HEX  | 53     |
|    | APH13   | CAACGAGTGACAATGATAAAA<br>CAATGATCTCACTCCCAATAG  | 243~255 | HEX  | 56     |
|    | APH18   | TTCTGGCCTGATAGGTATGAG<br>GAATTGGGTGGTTCATACTGT  | 149~153 | 6FAM | 58     |
|    | APH20   | ACCAGCCTAGCAAGCACTGT<br>GAGGCTTTAGGAGAGATTGAAAA | 166~172 | HEX  | 58     |
|    | APH25   | CCGTCAGACTGTAGGGAAGG<br>AAAGCTCCACAGAGGCAAAG    | 102~114 | 6FAM | 59     |
| C  | APH09   | GGATGTTGCCCCACATATTT<br>TTGCCTTGTTTATGAGCCATTA  | 104~130 | 6FAM | 58     |
|    | APH21   | CTTAAAGCAAAGCGCACGTC<br>AGATGCCCAAAGTCTGTGGT    | 132~139 | 6FAM | 59     |
|    | APH22   | GTTATCTCCCACTGCACACG<br>CGACAGGAGCAAGCTGGAG     | 148~158 | 6FAM | 58     |

## 附录 B

(规范性附录)

### MHC 单倍型 SPF 鸭的遗传学质量监测方法

#### B.1 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

D-TAP2-dF: 5' -ATG GAG TTG CTG CCC ACC TTG CGC CTG-3'

D-TAP2-dR: 5' -TGA AAC CCA TCA GGC ACC ATC CCA GGT-3'

扩增片段为 984 bp。

#### B.3 PCR 扩增

反应条件: 95℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 60℃、30 s, 30 个循环; 最后 72℃延伸 10 min。扩增产物在 1 %的琼脂糖凝胶中电泳, 利用凝胶成像系统进行观察, 并采集图像结果(附表 B.1)。

附表 B.1 MHC 单倍型 SPF 鸭遗传学检测 PCR 反应体系

| 组分                                                   | 体积/ $\mu\text{L}$ | 浓度                      |
|------------------------------------------------------|-------------------|-------------------------|
| 10 $\times$ LA PCR Buffer II( $\text{Mg}^{2+}$ plus) | 5.0               | 1.0 mmol/L              |
| dNTP Mixture                                         | 8.0               | 2.5 mmol/ $\mu\text{L}$ |
| 引物 F                                                 | 2.0               | 20 pmol/ $\mu\text{L}$  |
| 引物 R                                                 | 2.0               | 20 pmol/ $\mu\text{L}$  |
| DNA 模板                                               | 5.0               | 100 ng/ $\mu\text{L}$   |
| LA Taq Polymerase                                    | 0.5               | 5 U/ $\mu\text{L}$      |
| ddH <sub>2</sub> O                                   | 27.5              |                         |
| 总体积                                                  | 50                |                         |

#### B.4 PCR 产物测序

PCR 反应结束后, 将电泳结果合格的 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 鸭的序列

B1:

ATGGAGTTGCTGCCCCACCTTGTGCCTGGCCTGTGTCCTGCTCCTGGCTGACCTGGTCG  
TGCTGGCAGCACTGGCCCGGTTGGCCCCGGCACTGGCCAGCTGGGTCTAGTGGCCA  
CATGGCTGGAGGCTGGGCTGCGGCTACCAGTGCTGGTGGGAGCTGGGAGGCTGTTG  
GCCCCCGGAGGACCCCGGGGAGCCCCGGCCCTGGTGAGCCTGGCCCCTGCCACCTTC  
CTTACCCTGCGGGGCTGCCTGGAGCTGCCTGGGGCTCCACCAGTGCTGCTGGCCATG

GCCACACCGTCCTGGCTGGCATTGGCCTATGGGGCAGTCTTGCTGGCCCTGCTCACC  
TGGACCTCCCTGGCACCTGGGGTGGCCCTGGGGACCAAGGAGGTCAAGTACCAGGC  
GGCCCTGCACCGGCAGCTGGCCCTGGCCTGGCCTGAGTGGCCCTTCCTCAGCGGAGC  
CTTCTTCTTCCTCATGCTGGCTGCATTGGGTGAGACCTCCGTGCCCTACTGCACTGGG  
AAGGCCTTGGATGTCCTCCGTCATGGGGATGGCCCCACTGCCTTTGCTACTGCCATC  
GGCTTTGTGTGCCTCGCCTCTGCCAGCAGGTAGGGACCCCCAGTTCCTCTCCCAGAC  
CCTGTCCACACCTGGGATGGTGCCTGATGGGTTTCA

**B2:**

ATGGAGTTGCTGCCCACCTTGCGCCTGGCCTGTGTCCTGCTCCTGGCTGACCTGGTCG  
TGCTGGCAGCACTGGCCCGGTTGGCCCCGGCACTGGCACAGCTGGGTCTGGTGGCCA  
CATGGCTGGAGGCTGGGCTGCGGCTACCAAGTGTGCTGGTGGGAGCTGGGAGGCTGTTG  
GCCCCGGAGGACCCAGGGAGCCGCAGCCCTGGTGAGCCTGGCCCCCTGCCACCTTC  
CTTACCCTGCGGGGCTGCCTGGAGCTGCCTGGGGCTCCACCAGTGCTGCTGGCCATG  
GCCACACCGTCCTGGCTGGCATTGGCCTATGGGGCAGTCTTGCTGGCCCTGCTCACC  
TGGACCTCCCTGGCACCTGGGGTGGCCCTGGGGACCAAGGAGGTCAAGTACCAGGC  
GGCCCTGCGCCGGCAGCTGGCCCTGGCCTGGCCTGAGTGGCCCTTCCTCAGCGGAGC  
CTTCTTCTGCCTCGTGCTGGCTGCATTGGGTGAGACCTCCGTGCCCTACTGCACTGGG  
AAGGCCTTAGATGTCCTCCGCCATGGGGACGGCCCCACTGCCTTTGCCACTGCCATC  
GGCTTTGTGTGCCTCGCCTCTGCCAGCAGGTAGGGACCCCCAGTTCCTCTCCCAGAG  
CCTGTCCACACCTGGGATGGTGCCTGATGGGTTTCA

**B3:**

ATGGAGTTGCTGCCCACCTTGCGCCTGGCCTGTGTCCTGCTCCTGGCTGACCTGGTGG  
TGCTCGCAGCACTGGCCCGGTTGGCCCCGGCACTGGCCCAGCTGGGTCTAGTGGCCA  
CATGGTTGGAGGCTGGGCTGCGGCTACCAAGTGTGCTGGTGGGAGCTGGGATGCTGTTGG  
CCCCCGGAGGACCCCGGGGAGCGGCAGCCCTGGTGAGCCTGGCCCCCTGCCACCTTC  
TTACCCTGCGGGGCTGCCTGGAGCTGCCTGGGGCTCCACCAGTGCTGCTGGCCATGG  
CCACACCATCCTGGCTGGCATTGGCCTATGGGGCAGTCTTGCTGGCCCTGCTCACC  
GGACCTCCCTGGCACCTGGGGTGGCCCTGGGGACCAAGGAGGTCAAGTACCAGGCG  
GCCCTGCGCCGGCAGCTGGCCCTGGCCTGGCCTGAGTGGCCCTTCCTCAGCGGAGCC  
TTCTTCTTCCTCGTGCTGGCTGCATTGGGTGAGACCTCCGTGCCCTACTGCACTGGGA  
AGGCCTTAGATGTCCTCCGCCATGGGGACGGCCCCACTGCCTTTGCCACTGCCATCG  
GCTTTGTGTGCCTTGCTCCGCCAGCAGGTAGGGACCTCCAGTTCCTCTCCCAGACCC  
TGTCACACACCTGGGATGGTGCCTGATGGGTTTCA

**B4:**

ATGGAGTTGCTGCCCACCTTGCGCCTGGCCTGTGTCCTGCTCCTGGCTGACCTGGTCG  
TGCTGGCAGCACTGGCCAGTTGGCCCCGGCACTGGCCCAGCTGGGTCTAGTGGCCA  
CATGGCTGGAGGCTGGGCTGCGGCTACCAAGTGTGCTGGTGGGAGCTGGGATGCTGTTGG  
CCCCCGGAGGACCCCGGGGAGCCGCGGCCCTGGTGAGCCTGGCCCCCTGCCACCTTTC

TTACCCTGCGGGGCTGCCTGGAGCTGCCTGGGGCTTCACCAGTGCTGCTAGCCATGG  
CCACACCGTCCTGGCTGGCATTGGCCTACGGGGCAGTCTTGCTGGCCCTGCTCACCT  
GGACCTCCCTGGCACCTGGGGTGGCCCTGGGGACCAAGGAGGTCAAGTACCAGGCG  
GCCCTGCGCCGGCAGCTGGCCCTGGCCTGGCCTGAGTGGCCCTTCCTCAGTGGAGCC  
TTCTTCTGCCTCGTGCTGGCTGCATTGGGTGAGACCTCCGTGCCCTACTGCACTGGGA  
AGGCCTTAGATGTCCTCCGCCATGGGGACGGCCCCACTGCCTTTGCCACTGCCATCG  
GCTTTGTGTGCCTTGCCTCCGCCAGCAGGTAGGGACCCCCAGTTCCTCTCCTAGACCC  
TGTCCACACCTGGGATGGTGCCTGATGGGTTTCA