

第十章 T/CALAS 37—2017《实验动物 SPF 鸭遗传学质量监测》实施指南

第一节 工作简况

根据国家标准化管理委员会下达的《2009 年第二批国家标准制修订计划的通知》中的要求,全国实验动物标准化技术委员会(SAC/TC281)负责组织专家制定《实验动物 SPF 鸭遗传学质量监测》团体标准。

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,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和北京实验动物研究中心按照团体标准制定要求与程序组成编写小组,制定了编写方案。在本课题组多年来对 SPF 鸡和 SPF 鸭遗传学检测技术的研究基础上,结合国内公开发表的鸭群体遗传学检测的相关研究结果,提出了本标准研究稿。本标准涉及的技术和定义,符合国家禽类实验动物种子中心培育及保存的 SPF 鸭封闭群和单倍体型遗传学特征。

2016 年 3 月,向全国从事实验动物遗传学和 SPF 禽类实验动物育种单位的专家征求意见。之后,根据专家返回的修改意见和建议,完成专家意见的汇总处理。2016 年 10 月,按照团体标准的要求,修改征求意见稿和编制说明的格式及内容。发送《征求意见稿》的单位数 12 个,提出意见单位 3 个,提出意见数量 4 条,全部采纳。2016 年 10 月,在中国实验动物学会广西年会上公开征求意见。

2017 年 8 月,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。与会专家认为本标准规范可行,是国标的有力补充,一致同意通过审查。会后,收到委员会秘书处发送的专家意见汇总,共归纳出 7 个问题,编制组采纳了 6 条,未采纳 1 条,全部都做出了详细说明。2017 年 10 月,形成了标准报批稿、报批稿编制说明、征求意见汇总处理表和实施指南。

2017 年 12 月 29 日,中国实验动物学会第七届理事会常务理事会第一次会议批准发布包括本标准在内的《实验动物 教学用动物使用指南》等 23 项团体标准,并于 2018 年 1 月 1 日起正式实施。

第三节 编写背景

无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 鸭是人工培育、遗传背景清晰、经过微生物净化的实验鸭, 主要用于生命科学研究和生物制品的生产、检定。SPF 鸭胚是多种人用及兽用生物制品的生产原材料, 目前全国已有多家 SPF 鸭生产厂家, 尤其在禽流感疫苗的研制、诊断及生产供应等研究中发挥不可替代的应用作用, 是除 SPF 鸡外又一重要的禽类实验动物, 而且是唯一的水禽类实验动物。

遗传质量是实验动物的重要特性之一, SPF 鸭的质量直接影响研究结果的可靠性。但目前成熟的实验动物遗传质量标准只有啮齿类实验动物遗传标准, 数以千计的各种近交系和封闭群动物因各自的遗传特性而被特异地应用于生物学、医学、科研和检定中。最初国际上提出近交系 (1953 年) 和封闭群 (1972 年) 的定义时, 是基于并针对小鼠的, 后来才推广到大鼠、地鼠、豚鼠等其他哺乳类实验动物。

SPF 鸭已经排除了高致病性禽流感病毒、新城疫病毒和禽腺病毒 III 群等特定病原体, 全部生命周期都饲养于正压隔离器中。细胞遗传学、微卫星标记等研究结果, 已表明国家禽类实验动物种子中心存在 HBK-Q、HBK-B、HBK-W 及金定鸭等多个 SPF 鸭品系。为了规范 SPF 鸭的交配方式, 以利于利用遗传控制手段, 有目的地培育适合应用的品系, 特制定本标准。

目前我国只有针对哺乳类实验动物的强制标准 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%”。根据《实验动物质量控制》, “封闭群的关键是不从外部引进新的基因, 同时进行随机交配……, 从群体遗传学的角度看, 动物群体的基因频率达 15 代后才趋于稳定, 动物群体的基因频率稳定后才称得上封闭群”。HBK-SPF 鸭群从 2008 年引进, 迄今为止始终未混入外来血缘, 虽不足 15 代, 但远超过封闭群小鼠种群要求的 4 个世代。HBK-W 单倍型鸭从 2012 年起开始采用全同胞或半同胞交配方式饲养至今, 已繁育 5 个世代, 分子遗传标记位点稳定, 从理论上已满足实验动物封闭群和近交系的要求。

关于检测技术, 目前只有两个针对近交系大鼠、小鼠遗传质量检测技术的国家推荐标准, 即 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》, 规定了生化位点检测方法和免疫标记检测方法。但建立生化位点检测技术的前提是, 先培育国内外公认的近交系品系, 而这对于当前的 SPF 鸭来说, 显然不适用。事实上, 几十年来发达国家的家禽育种公司更多的是根据国际公认的鸡主要组织相容性复合体 (MHC) 基因组基因型进行近交化, 已成功选育上百个 MHC 单倍型 SPF 鸡群。这也为建立国内 MHC 单倍型 SPF 鸭 (国家禽类实验动物种子中心的 HBW 品系), 以及建立和制定 MHC 单倍型鸭检测技术提供了理论依据。

微卫星 DNA 具有以下特点:基因组中分布广泛、种类多且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,其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。鸭微卫星遗传标记的研究相对滞后,Maak 等通过对北京鸭基因组文库进行富集,先后获得了 25 个微卫星标记,大部分标记在北京鸭(Peking duck)、美洲家鸭(Muscovy duck)和绿头鸭(Mallard)中呈现多态性(Maak et al., 2000; 2003)。Huang 等获得 35 对微卫星标记,并对北京鸭进行了多态性分析,其中 28 个位点是多态的,7 个位点呈现单态,在多态位点上共检测到了 117 个等位基因,每个座位平均 4.18 个;进一步利用 115 个多态微卫星标记对 2 个差异较大的北京鸭品系进行遗传连锁图谱分析,结果表明 115 个标记位于 19 个连锁群中(Huang et al., 2006)。

韩凌霞等利用该标准规定的 16 对微卫星标记国家禽类实验动物种子中心培育保存的 HBK-SPF 鸭 Q 和 B 两个品系进行群体遗传多样性分析,结果表明 F_5 代和 F_6 代 HBK-SPF 鸭共检测到 71 个等位基因,每个位点的平均等位基因数为 4.14,与 F_2 代和 F_3 代相比有所下降; F_5 代和 F_6 代鸭群偏离 Hardy-Weinberg 平衡的位点有所减少,分别仅有 2 个和 4 个位点显著偏离平衡状态;多态信息含量(PIC)大于 0.5 的位点数量减少, F_5 代 2 个群体的平均 PIC 分别为 0.511 和 0.512, F_6 代 2 个群体的平均 PIC 分别为 0.48 和 0.505; F_5 代 2 个群体的期望杂合度(H_e)分别为 0.575 和 0.574, F_6 代的 H_e 分别为 0.546 和 0.566。结果表明,经过 6 个世代的繁育,偏离 Hardy-Weinberg 平衡的位点减少,以等位基因数目为标志的群体遗传多样性下降,近交程度呈上升趋势,但群体的杂合度则维持相对稳定;Q 品系从 F_2 ~ F_6 代的遗传背景呈规律性变化,B 品系遗传背景存在一定的交替上升或下降,但总体趋于持续的上升或下降。

主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)是一组紧密连锁高度多态的染色体基因群,编码与免疫相关的一组重要细胞膜糖蛋白,广泛存在于有颌脊椎动物中,与宿主的抗病性和免疫应答水平密切相关。禽类 MHC 基因简单紧凑,形成一个高度连锁的基因群,基因重组概率低,导致鸭具有稳定的单倍型,每一种 MHC 单倍型都与一个特异的 *TAP1*、*TAP2* 和 *BF2* 基因型连锁存在。2005 年, Moon 等利用亚克隆方法获得了全长 36.8 kb 的鸭 MHC I 区域,同 *TAP1*、*TAP2*、*UAA*、*UBA*、*UCA*、*UDA* 和 *UEA* 组成。*UAA*~*UEA* 是鸭 MHC I 基因的 5 个拷贝基因,它们之间的核苷酸同源性达到 87.4%;*UAA* 优势表达,位于 *TAP2* 的侧翼;*UDA* 次要表达;*TAP1* 和 *TAP2* 位于 MHC I 基因上游,转录方向相反。

TAP 分子是 MHC class I 抗原提呈路径中一个关键蛋白分子,它将水解的内源性多肽运送到内质网,并提呈给 MHC class I 分子,与 $CD8^+$ T 细胞结合,引起特异的免疫应答。

利用 SSR Hunter 软件、SSCP 和 PCR 产物测序,发现 MHC I 区域的 DNA 序列存在 4 种由数个 SNP 决定的纯合基因型,它们分别与 $(GT)_n$ 重复结构连锁,命名为 B1、B2、B3 和 B4 单倍型(参照鸡 B 复合体命名方式命名)。以纯合个体分别建群,作为 F_0 代,在正压隔离器内繁育,以 F_1 代个体进一步开展鸭 MHC 的研究。以 4 种 MHC 单倍型鸭为实验材料,测通 MHC I 区域的 *TAP1* 和 *TAP2* 基因,长约 8 kb,与参考序列的核苷酸同源性为 97%。*TAP1* 基因组序列长 4061~4187 bp,4 种单倍型之间及其与参考序列的核苷酸同源性均为 97%,与鸡和鹌鹑的核苷酸同源性分别 66%和 67%~68%。CDS 序列长 1218 bp,编码

406 个氨基酸,与参考序列比较,存在 8 个位点变异。4 种单倍型鸭 *TAP2* 基因组序列全长 3013~3045 bp,它们之间及其与参考序列的核苷酸同源性均为 97%,与鸡和鹌鹑的核苷酸同源性均为 77%。CDS 长 2103 bp,编码 701 个氨基酸,4 个单倍型之间共有 24 个氨基酸差异,与参考序列 *TAP2A* 和 *TAP2B* 分别有 27 个和 26 个氨基酸差异,表明它在蛋白质水平上的多样性要高于 *TAP1* 分子。

据此,我们提出了 SPF 鸭封闭群和 MHC 单倍型鸭的遗传质量监测标准。

第四节 编制原则

本标准的编制主要遵循以下原则。①科学性原则。本标准是以国家禽类实验动物种子中心培育保存的 SPF 鸭群的遗传学研究获得的数据为基础。②普适性原则。本标准涉及的技术方法是常规的分子生物学技术,无需个性化的特异生物学试剂,国内当前正规的实验禽类生产单位和质量监督检验单位都具备完成的技术力量。

第五节 内容解读

本标准主要由范围、术语和定义、交配方式、检测技术和附录共 9 章构成。现将主要技术内容说明如下。

一、范围

本标准适用于封闭群鸭和 MHC 单倍型鸭的遗传学质量控制。

二、术语和定义

以下术语和定义适用于本标准。

1.

无特定病原体鸭 specific pathogen-free, duck

无特定病原体鸭是指人工培育、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.

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。

3.

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

主要组织相容性复合体是一组紧密连锁、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。

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。

5.

封闭群 closed population

封闭群是指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%。

三、交配方式

1. 封闭群

(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)。

(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) 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%。

2. MHC 单倍型鸭

(1) 鸭群的 MHC 核心区域保持单倍型纯合。

(2) 以全同胞或半同胞兄妹交配方式进行繁殖。

(3) 雌雄个体比例一般为 1:8~1:10。

四、检测技术**(一) 封闭群**

1. 抽样比例

全群检测。

2. 采用微卫星分子标记技术

(1) 基因组 DNA 提取:翅静脉采集枸橼酸钠抗凝血。常规酚-氯仿抽提法提取基因组 DNA。

(2) PCR 反应程序:95℃、5 min; 94℃、30 s, 50~64℃、30 s, 72℃、30 s, 30~35 个循环; 72℃、10 min; 4℃保存。

(3) PCR 反应体系见表 1。

表 1 封闭群 SPF 鸭 PCR 反应程序

组分	用量/ μL	终浓度
10× Taq Buffer	1.5	1.5 mmol/L
dNTP	1.5	2.5 mmol/L each
Primer Mix	0.25	10 pmol/ μL

续表

组分	用量/ μL	终浓度
<i>Taq</i> Polymerase	0.3	2.5 U/ μL
DNA 模板	1.5	100 ng/ μL
ddH ₂ O	10	
总体积	15	

(4) PCR 产物检测: 取 5 μL PCR 产物与 1 μL 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 ABI3130XL 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 μL 和含分子质量标准的上样缓冲液 8 μL 混合, 95 $^{\circ}\text{C}$ 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, 用 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。

(5) 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。SPF 鸭封闭群遗传检测卫星位点的相关信息见表 2。

表 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/ $^{\circ}\text{C}$
A	CAUD004	TCCACTTGGTAGACCTTGAG TGGGATTCAGTGAGAAGCCT	202~222	HEX	62
	CAUD005	CTGGGTTTGGTGGAGCATAA TACTGGCTGCTTCATTGCTG	248~266	6FAM	61
	CAUD011	TGCTATCCACCCAATAAGTG CAAAGTTAGCTGGTATCTGC	129~142	HEX	52
	CAUD013	ACAATAGATTCCAGATGCTGAA ATGTCTGAGTCCTCGGAGC	87~105	6FAM	58
	CAUD023	CACATTAACCTACATTTCGGTCT CAGCCAAAGAGTTCAACAGG	164~167	6FAM	52
	CAUD026	ACGTCACATCACCCACAG CTTTGCCTCTGGTGAGGTTT	142~152	6FAM	61
	CAUD035	GTGCCTAACCTGATGGATG CTTATCAGATGGGGCTCGGA	221~239	6FAM	63
B	CAUD032	GAAACCAACTGAAAACGGGC	118~126	6FAM	58

续表

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/℃
C	CAUD027	CCTCCTGCGTCCCAATAAG	112~122	HEX	64
		AGAAGGCAGGCAAATCAGAG			
	APH08	TCCACTCATAAAAAACCCCACA	176~187	HEX	53
		AAAGCCCTGTGAAGCGAGCTA			
	APH13	TGTGTGTGCATCTGGGTGTGT	243~255	HEX	56
		CAACGAGTGACAATGATAAAA			
	APH18	CAATGATCTCACTCCCAATAG	149~153	6FAM	58
		TTCTGGCCTGATAGGTATGAG			
	APH20	GAATTGGGTGGTTCATACTGT	166~172	HEX	58
		ACCAGCCTAGCAAGCACTGT			
	APH25	GAGGCTTTAGGAGAGATTGAAAA	102~114	6FAM	59
		CCGTCAGACTGTAGGGAAGG			
	APH09	AAAGCTCCACAGAGGCAAAG	104~130	6FAM	58
		GGATGTTGCCCCACATATTT			
	APH21	TTGCCTTGTTTATGAGCCATTA	132~139	6FAM	59
		CTTAAAGCAAAGCGCACGTC			
	APH22	AGATGCCCAAAGTCTGTGGT	148~158	6FAM	58
		GTTATCTCCCACTGCACACG			
		CGACAGGAGCAAGCTGGAG			

3. 检测频率

为每个世代进行 1 次遗传质量检测。

4. 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。

(二) MHC 单倍型鸭的监测

1. 抽样比例

全群检测。

2. 检测频率

每个世代至少进行 1 次遗传质量检测。

3. 检测方法

根据 MHC 区域核心基因的高变区分型。

(1) 基因组 DNA 的提取: 常规苯酚-氯仿法提取基因组 DNA。

(2) 引物序列。D-TAP2-dF: 5' -ATGGAGTTG CTGCCCACCTTGCGCCTG-3' ;
D-TAP2-dR: 5' -TGA AACCCATCAGGCACCATCCCAGGT-3' , 扩增片段为 984 bp。

(3) PCR 扩增。反应体系见表 3。反应条件为: 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。

表 3 MHC 单倍型 SPF 鸭遗传学检测 PCR 反应体系

组分	体积/ μL	浓度
10 $\times$ LA PCR Buffer II(Mg^{2+} plus)	5.0	1.0 mmol/L
dNTP Mixture	8.0	2.5 mmol/ μL
Primer F	2.0	20 pmol/ μL
Primer R	2.0	20 pmol/ μL
DNA Template	5.0	100 ng/ μL
LA <i>Taq</i> Polymerase	0.5	5 U/ μL
ddH ₂ O	27.5	
Total	50	

(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。

4. 结果判定

分型结果与标准序列完全一致, 判为合格。

(1) MHC B1 序列

ATGGAGTTGCTGCCCACCTTGTGCCTGGCCTGTGTCCTGCTCCTGGCTGACCTGGTCG
TGCTGGCAGCACTGGCCCGGTTGGCCCCGGCACTGGCCCAGCTGGGTCTAGTGGCCA
CATGGCTGGAGGCTGGGCTGCGGCTACCACTGCTGGTGGGAGCTGGGAGGCTGTTG
GCCCCGGAGGACCCCGGGGAGCCCCGGCCCTGGTGAGCCTGGCCCCTGCCACCTT
CCTTACCCTGCGGGGCTGCCTGGAGCTGCCTGGGGCTCCACCACTGCTGCTGGCCAT
GGCCACACCGTCCTGGCTGGCATTGGCCTATGGGGCAGTCTTGCTGGCCCTGCTCACC
TGGACCTCCCTGGCACCTGGGGTGGCCCTGGGGACCAAGGAGGTCAAGTACCAGGC
GGCCCTGCACCGGCAGCTGGCCCTGGCCTGGCCTGAGTGGCCCTTCCTCAGCGGAGC
CTTCTTCTTCCTCATGCTGGCTGCATTGGGTGAGACCTCCGTGCCCTACTGCACTGGG
AAGGCCTTGGATGTCCTCCGTCATGGGGATGGCCCCACTGCCTTTGCTACTGCCATCG
GCTTTGTGTGCTCGCCTCTGCCAGCAGGTAGGGACCCCCAGTTCCTCTCCCAGACC
CTGTCCACACCTGGGATGGTGCCTGATGGGTTTCA

(2) MHC B2 序列

ATGGAGTTGCTGCCCACCTTGTGCCTGGCCTGTGTCCTGCTCCTGGCTGACCTGGTCG
TGCTGGCAGCACTGGCCCGGTTGGCCCCGGCACTGGCACAGCTGGGTCTGGTGGCCA

CATGGCTGGAGGCTGGGCTGCGGCTACCAGTGCTGGTGGGAGCTGGGAGGCTGTTG
GCCCCGGAGGACCCAGGGAGCCGAGCCCTGGTGAGCCTGGCCCCTGCCACCTT
CCTTACCCTGCGGGGCTGCCTGGAGCTGCCTGGGGCTCCACCAGTGCTGCTGGCCAT
GGCCACACCGTCCTGGCTGGCATTGGCCTATGGGGCAGTCTTGCTGGCCCTGCTCACC
TGGACCTCCCTGGCACCTGGGGTGGCCCTGGGGACCAAGGAGGTCAAGTACCAGGC
GGCCCTGCGCCGGCAGCTGGCCCTGGCCTGGCCTGAGTGGCCCTTCCTCAGCGGAGC
CTTCTTCTGCCTCGTGCTGGCTGCATTGGGTGAGACCTCCGTGCCCTACTGCACTGGG
AAGGCCTTAGATGTCCTCCGCCATGGGGACGGCCCCACTGCCTTTGCCACTGCCATCG
GCTTTGTGTGCCTCGCCTCTGCCAGCAGGTAGGGACCCCCAGTTCCTCTCCCAGAGC
CTGTCCACACCTGGGATGGTGCCTGATGGGTTTCA

(3) MHC B3 序列

ATGGAGTTGCTGCCCCACCTTGCGCCTGGCCTGTGTCCTGCTCCTGGCTGACCTGGTGG
TGCTCGCAGCACTGGCCCCGTTGGCCCCGGCACTGGCCCAGCTGGGTCTAGTGGCCA
CATGGTTGGAGGCTGGGCTGCGGCTACCAGTGCTGGTGGGAGCTGGGATGCTGTTGG
CCCCCGGAGGACCCCGGGGAGCGGCAGCCCTGGTGAGCCTGGCCCCCTGCCACCTTC
CTTACCCTGCGGGGCTGCCTGGAGCTGCCTGGGGCTCCACCAGTGCTGCTGGCCATG
GCCACACCATCCTGGCTGGCATTGGCCTATGGGGCAGTCTTGCTGGCCCTGCTCACCT
GGACCTCCCTGGCACCTGGGGTGGCCCTGGGGACCAAGGAGGTCAAGTACCAGGCG
GCCCTGCGCCGGCAGCTGGCCCTGGCCTGGCCTGAGTGGCCCTTCCTCAGCGGAGCC
TTCTTCTTCCTCGTGCTGGCTGCATTGGGTGAGACCTCCGTGCCCTACTGCACTGGGA
AGGCCTTAGATGTCCTCCGCCATGGGGACGGCCCCACTGCCTTTGCCACTGCCATCGG
CTTTGTGTGCCTTGCCCTCCGCCAGCAGGTAGGGACCTCCAGTTCCTCTCCCAGACCCT
GTCCACACCTGGGATGGTGCCTGATGGGTTTCA

(4) MHC B4 序列

ATGGAGTTGCTGCCCCACCTTGCGCCTGGCCTGTGTCCTGCTCCTGGCTGACCTGGTCG
TGCTGGCAGCACTGGCCAGTTGGCCCCGGCACTGGCCCAGCTGGGTCTAGTGGCCA
CATGGCTGGAGGCTGGGCTGCGGCTACCAGTGCTGGTGGGAGCTGGGATGCTGTTGG
CCCCCGGAGGACCCCGGGGAGCCGCGGCCCTGGTGAGCCTGGCCCCCTGCCACCTTTC
TTACCCTGCGGGGCTGCCTGGAGCTGCCTGGGGCTTCACCAGTGCTGCTAGCCATGG
CCACACCGTCCTGGCTGGCATTGGCCTACGGGGCAGTCTTGCTGGCCCTGCTCACCT
GGACCTCCCTGGCACCTGGGGTGGCCCTGGGGACCAAGGAGGTCAAGTACCAGGCG
GCCCTGCGCCGGCAGCTGGCCCTGGCCTGGCCTGAGTGGCCCTTCCTCAGTGGAGCC
TTCTTCTGCCTCGTGCTGGCTGCATTGGGTGAGACCTCCGTGCCCTACTGCACTGGGA
AGGCCTTAGATGTCCTCCGCCATGGGGACGGCCCCACTGCCTTTGCCACTGCCATCGG
CTTTGTGTGCCTTGCCCTCCGCCAGCAGGTAGGGACCCCCAGTTCCTCTCCTAGACCCT
GTCCACACCTGGGATGGTGCCTGATGGGTTTCA

第六节 分析报告

一、封闭群 SPF 鸭的检测

利用本标准提出的针对封闭群 SPF 鸭的遗传学检测技术,对国家禽类实验动物种子中心(国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心)培育的封闭群 HBK-SPF 鸭(包括 HBK-Q 和 HBK-B 品系)进行了检测。结果表明, F_5 代和 F_6 代 HBK-SPF 鸭群中, HBK-SPF 鸭在 16 个位点共检测到 71 个等位基因, 每个位点的平均等位基因数为 4.14, 与 F_2 代和 F_3 代相比有所下降; F_5 代和 F_6 代鸭群偏离 Hardy-Weinberg 平衡的位点有所减少, 分别仅有 2 个和 4 个位点显著偏离平衡状态; 多态信息含量 (PIC) 大于 0.5 的位点数量减少, F_5 代 2 个群体的平均 PIC 分别为 0.511 和 0.512, F_6 代 2 个群体的平均 PIC 分别为 0.48 和 0.505; F_5 代 2 个群体的期望杂合度 (H_e) 分别为 0.575 和 0.574, F_6 代的 H_e 分别为 0.546 和 0.566。结果表明, 经过 6 个世代的繁育, 偏离 Hardy-Weinberg 平衡的位点减少, 以等位基因数目为标志的群体遗传多样性下降, 近交程度呈上升趋势, 但群体的杂合度则维持相对稳定; Q 品系从 F_2 ~ F_6 代的遗传背景呈规律性变化, B 品系遗传背景存在一定的交替上升或下降, 但总体趋于持续的上升或下降。

二、MHC 单倍型 SPF 鸭的检测

利用本标准提出的针对 MHC 单倍型 SPF 鸭的遗传学检测技术, 对国家禽类实验动物种子中心(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心)培育的单倍型 HBW-SPF 鸭(包括 B1、B2、B3 和 B4 品系)进行了检测。结果表明, 在 HBW 鸭群中, 在约 37 kb MHC I 区域存在 1 个适合多态性分析的短序列重复结构位点($(GT)_n$), 根据重复结构的上游 108 nt 和下游 127 nt, 4 种 MHC 单倍型 1、B2、B3 和 B4 品系鸭的基因型具有单倍型结构, 与重复结构连锁。长约 8 kb 的 MHC I 区域的 *TAP1* 和 *TAP2* 基因与参考序列的核苷酸同源性为 97%。*TAP1* 基因组序列长 4061~4187 bp, 4 种单倍型之间及其与参考序列的核苷酸之间同源性均为 97%, 4 种单倍型鸭 *TAP2* 基因组序列全长 3013~3045 bp, 它们之间及其与参考序列的核苷酸之间同源性均为 97%, 与鸡和鹌鹑的核苷酸同源性均为 77.0%。CDS 长 2103 bp, 编码 701 个氨基酸, 4 个单倍型之间共有 24 个氨基酸差异。

上述研究结果表明, 本标准制定的 SPF 鸭封闭群和 MHC 单倍型鸭遗传学质量监测技术, 适合 SPF 鸭育种单位的现地监测。

第七节 国内外同类标准分析

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》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，而且特异性低，敏感度不高，重复性差。下颌骨测量和毛色移植试验也不适于禽类。

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，参照大、小鼠参照进行”。鸭的生殖特性与啮齿类截然不同，所以上述标准都不适用于 SPF 鸭的质量控制。