

DB43

湖 南 省 地 方 标 准

DB43/T 1191—2016

实验鱼类 实验红鲫C1HD系遗传质量控制

Laboratory Fish ☒

Genetic Quality Control of Laboratory Red Crucian Carp C1HD Strain

2016-12-29发布

2017-02-28实施

湖南省质量技术监督局 发布

目 次

前言..... II

1 范围..... 1

2 规范性引用文件..... 1

3 术语和定义..... 1

4 主要生物学特性..... 2

5 繁殖方法..... 5

6 养殖环境..... 6

7 遗传学质量检测..... 6

附录 A (资料性附录) 实验红鲫人工繁殖方法..... 8

附录 B (资料性附录) 实验红鲫血清蛋白的聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳方法..... 10

附录 C (资料性附录) 实验红鲫微卫星 (SSR) 分子标记检测方法..... 12

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本文件的某些内容可能涉及专利,本标准起草单位、起草人和发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由湖南省实验动物管理办公室提出并归口。

本标准起草单位:南华大学、湖南师范大学、湖南省疾病预防控制中心。

本标准主要起草人:吴端生、张朝晖、刘少军、刘建高。

实验鱼类 实验红鲫 C1HD 系遗传质量控制

1 范围

本标准规定了实验红鲫 C1HD 系的名称、主要生物学特性、养殖环境、繁殖方法、遗传标记和遗传质量检测方法。

本标准适用于实验红鲫 C1HD 系的遗传质量控制。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。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 11607 渔业水质标准

GB 14923 实验动物 哺乳类实验动物的遗传质量控制

GB/T 18654.1 养殖鱼类种质检验 第1部分：检验规则

GB/T 18654.2 养殖鱼类种质检验 第2部分：抽样方法

GB/T 18654.3 养殖鱼类种质检验 第3部分：性状测定

GB/T 18654.12 养殖鱼类种质检验 第12部分：染色体组型分析

GB/T 18654.13 养殖鱼类种质检验 第13部分：同工酶电泳分析

GB/T 18654.15 养殖鱼类种质检验 第15部分：RAPD 分析

NY 5051 无公害食品 淡水养殖用水水质

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

实验红鲫 (Laboratory Red Crucian Carp)

经人工繁育，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、检定及其他科学实验的红鲫，称为实验红鲫。

实验红鲫 C1HD 系 (Laboratory Red Crucian Carp C1HD Strain)，属于近交系品系。

学名：红鲫 (*Carassius auratus red variety*)。

分类地位：硬骨鱼纲 (*Osteichthyes*)、鲤形目 (*Cypriniiformes*)、鲤科 (*Cyprinidae*)、鲤亚科 (*Cyprininae*)、鲫属 (*Carassius*)、鲫 (*Carassius auratus*)。

3.2

近交系 (Inbred Strain)

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。近交系的近交系数 (Inbreeding coefficient) 应大于 99%。

3.3

基础群 (Foundation Stock)

指以一个相对较少且恒定的数量为基础进行繁殖生产的某动物种群，即基础种群，源于祖系，具备该种群遗传基础，用于该种群保持（种），并为繁殖生产提供种动物。

3.4

普通环境（Conventional Environment）

符合实验动物生长繁殖基本要求，且有基本病原控制措施的环境。

4 主要生物学特性

4.1 分类形态学特性

4.1.1 外形

体色全红，身体侧扁，全鳞，口端位，无须，单尾（图 1）。3 月龄以下的个体体色为青灰色，3 月龄以上的个体体色逐渐转为红色。雄性个体鳃盖骨表面具有追星，胸鳍第 1 根硬鳍条上缘具有锯状齿，在繁殖季节用手触摸均有明显的粗糙感。雌性个体鳃盖和胸鳍则均光滑。



图 1 实验红鲫 C1HD 系

4.1.2 可数性状

背鳍鳍式为 D. i ~ ii -16~19；臀鳍鳍式为 A. i -5~7；胸鳍鳍式为 P. i -14~17；腹鳍鳍式为 V. i -7~8；侧线鳞鳞式为 $26 \frac{5 \sim 6}{5 \sim 7} 28$ 。

4.1.3 可量性状

主要可量性状的比例值见表 1。

表 1 实验红鲫 C1HD 系主要可量性状的比例值

测量指标	平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)	95%的可信区间
全长/体长	1.31±0.12	1.30~1.37
体长/体高	2.90±0.39	2.82~3.04
体长/头长	3.39±0.35	3.29~3.41
头长/眶间距	2.54±0.32	2.45~2.58
体长/尾柄长	8.77±1.71	8.37~9.25
尾柄长/尾柄高	0.86±0.21	0.80~0.91
体长/尾柄高	7.18±1.15	6.96~7.60
头长/尾柄长	2.60±0.59	2.54~2.76
头长/尾柄高	2.25±0.25	2.15~2.24
体高/头高	1.21±0.14	1.18~1.26

4.1.4 解剖特征

第一鳃弓外侧鳃耙数为 42~48 个；鳔为 2 室；下咽齿 2 行，齿式为 4.4/4.4；脊椎骨总数为 28 枚，肋骨 13 对。

4.2 生长与繁殖特性

4.2.1 生长发育

在普通环境条件下饲养，1 年龄的实验红鲫 C1HD 系平均体长约 66 mm，平均体重约 12 g；2 年龄的实验红鲫 C1HD 系平均体长约 113 mm，平均体重约 34 g。

4.2.2 繁殖生理特性

1 年龄即达性成熟，属于一年多次产卵类型，性成熟的雌性红鲫，在生殖季节里卵巢系数达 16%~21%。繁殖方式为卵生。发育类型为体外受精，体外发育。

4.3 遗传学特性与标记

4.3.1 染色体数目与核型

体细胞染色体数 $2n=100$ (图 2A)。核型：中部着丝粒染色体 (m 组) 11 对，亚中部着丝粒染色体 (sm 组) 15 对，亚端部着丝粒染色体 (st 组) 12 对，端部着丝粒染色体 (t 组) 12 对，染色体臂数 (NF) 152 (图 2B)。

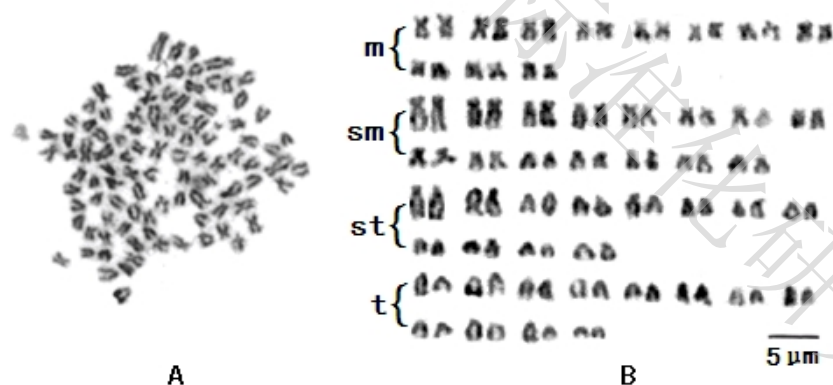


图 2 实验红鲫 C1HD 系肾细胞中期染色体分裂相 (A) 及核型 (B)

4.3.2 遗传标记

4.3.2.1 体色标记

红体色为实验红鲫 C1HD 系体色基因纯合时的形态学标记。

4.3.2.2 生化遗传标记

血清蛋白标记：血清蛋白聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳图谱具有 SP-A1、SP-B7 和 SP-B8 特征带 (图 3)，此为实验红鲫 C1HD 系的血清蛋白标记。

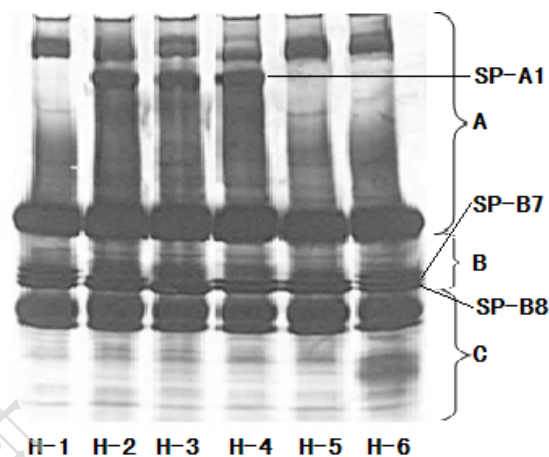


图3 实验红鲫 C1HD 系 (H1-H3) 血清蛋白电泳图谱

注：图中 A、B、C 分别代表 3 个区段，SP-A1、SP-B7 和 SP-B8 为实验红鲫 C1HD 系特征带

同工酶标记：红细胞酯酶同工酶 (EST) 和超氧化物歧化酶同工酶 (SOD) 的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱中，EST-1、EST-3 酶带(图 4)和 SOD-3、SOD-8 酶带 (图 5) 分别为实验红鲫 C1HD 系特有的酯酶同工酶标记和超氧化物歧化酶同工酶标记。

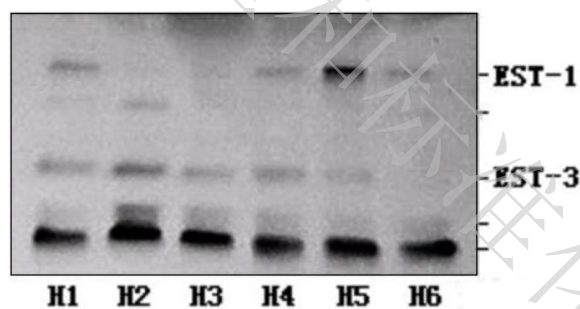


图4 实验红鲫 C1HD 系 (H1-H6) EST 同工酶电泳图谱

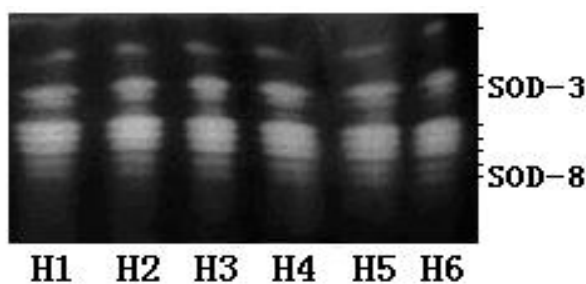


图5 实验红鲫 C1HD 系 (H1-H6) SOD 同工酶电泳图谱

4.3.2.3 DNA 分子标记

随机扩增多态性 (RAPD) 分子标记：序列为“GACTAAGCCC”的随机引物的 PCR 扩增产物中，大小为 2100 bp 的 DNA 电泳条带，为实验红鲫 C1HD 系 RAPD 标记 (图 6)。

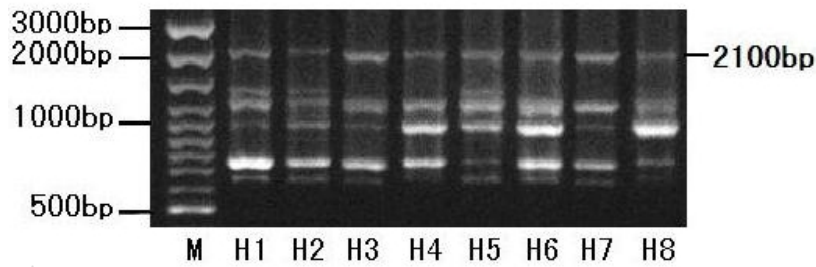


图6 实验红鲫 C1HD 系 (H1-H8) RAPD 标记

微卫星 (SSR) 标记: 序列为 “3’ ATTGTGAAGCATCGGTAATGC 和 5’ TACTTGATTGCTATTGGAC” 引物的 PCR 扩增产物中, 大小为 67bp 的 DNA 电泳条带, 为实验红鲫 C1HD 系 SSR 标记 (图 7)。

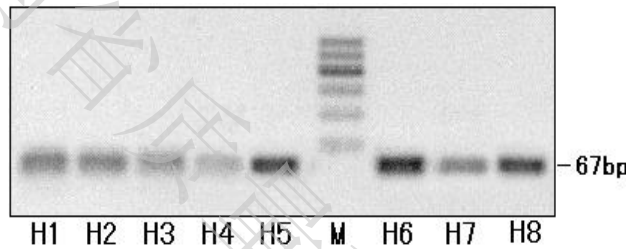


图7 实验红鲫 C1HD 系(H1-H8)SSR 标记 (67bp)

5 繁殖方法

5.1 育种繁殖方法

近交系实验红鲫育种采用人工诱导雌核发育繁殖技术 (附录 A) 进行繁殖。育种繁殖过程中设置繁殖记录卡和繁殖系谱。

第一代红鲫雌核发育二倍体的繁殖方法: 挑选健壮且符合以上性状特征的 2 年龄雌性红鲫 1 尾, 采用人工诱导雌核发育繁殖技术 (附录 A), 获得第一代红鲫雌核发育二倍体群体。

第二代红鲫雌核发育二倍体的繁殖方法: 从上述第一代红鲫雌核发育二倍体群体中, 挑选健壮且符合以上性状特征的 2 年龄雌性红鲫 1 尾, 采用人工诱导雌核发育繁殖技术 (附录 A), 获得第二代雌核发育二倍体群体。

实验红鲫 C1HD 系基础群的构建: 从上述第二代红鲫雌核发育二倍体群体中, 选择符合以上性状特征, 且体色全红、体型一致、健壮的个体组成实验红鲫 C1HD 系基础群, 基础群大小不少于 100 尾, 且具备完整的遗传背景资料 (包括品系名称、近交代数及主要生物学特性等)。

5.2 保种繁殖方法

保种繁殖的原则是保持实验红鲫 C1HD 系的同基因性及其基因纯合性。

作为保种繁殖用的种动物必须是基础群中遗传背景明确, 主要生物学特性符合本标准的实验红鲫 C1HD 系。

从基础群中, 挑选符合以上性状特征且健壮的 2 年龄雌性实验红鲫 C1HD 系 1 尾, 采用人工诱导雌核发育繁殖技术 (附录 A) 进行繁殖, 繁殖生产的子代用于构建实验红鲫 C1HD 系基础群, 以保持种源和传代。

保种繁殖过程中设置繁殖记录卡和繁殖系谱。

5.3 生产繁殖方法

从基础群中挑选符合以上性状特征且健壮的性成熟雌、雄性实验红鲫若干尾，采用人工授精方法进行随机交配繁殖（附录 A），繁殖代数不超过 3 代，繁殖生产的子代只供应实验用。

6 养殖环境

6.1 水环境指标

普通环境条件下，实验红鲫饲养水质应符合 GB 11607 的要求，水环境指标应符合表 2 的要求。

表 2 实验红鲫水环境指标

指标		水簇箱	水池
项目	单位		
水温	℃	18~24	自然水温
日温差	℃	≤4.0	自然日温差
瞬时温差	℃	≤3.0	≤3.0
酸碱度	pH	7.5~8.5	7.5~8.5
溶解氧	mg/L	≥6	≥4
硬度（以 CaCO ₃ 计）	mg / L	95~105	95~105
亚硝酸盐浓度	mg/L	≤0.4	≤0.4
水面照度	lx	54~324	自然光照
昼夜明暗交替时间	h	14/10 或 12/12	自然昼夜交替时间

6.2 饲养密度

水族箱饲养实验红鲫，密度不宜大于表 3 的要求。

表 3 水族箱放养实验红鲫的规格与密度

规格（体长，cm）	密度（尾/ m ³ ）	水容积为 0.20m ³ 水族箱放养数量
5	180	36
6	165	33
7	150	30
8	120	24
9	100	20
10	80	15

7 遗传学质量检测

7.1 抽样方法和检测频率

抽样方法按 GB/T 18654.2 的规定执行。

实验红鲫 C1HD 系遗传质量检测频率，每 1 世代的每 1 繁殖批次检测 1 次。

7.2 性状测定

按 GB/T 18654.3 的规定执行。

7.3 体色分析

红色体色为红鲫隐性遗传标记，其控制基因为 **a**。根据基因分离规律，当体色基因型为 **aa**（隐性纯合）时，个体体色为红色；当体色基因型为 **Aa**（杂合）时，则个体体色为灰色。因此，按照上述育种繁殖方法所获得的实验红鲫子代，如果体色是红色的，则可初步判定为纯合的（雌核发育二倍体）实验红鲫 C1HD 系个体。

7.4 染色体核型检测

按照 GB/T 18654.12 执行。

7.5 生化遗传标记检测

血清蛋白标记的检测，按照附录 B 执行。

超氧化物歧化酶同工酶（SOD）标记的检测，按照 GB/T 18654.13 执行。

酯酶同工酶（EST）标记的检测，按照 GB/T 18654.13 执行。

7.6 DNA 分子标记检测

RAPD 标记的检测按照 GB/T 18654.15 执行。

SSR 标记的检测按照附录 C 执行。

7.7 结果判断

首先对体色检测结果进行判断，如果体色是灰色或不全部是红色，则判定为不合格，对体色全部为红色的个体，再进行可数性状检测。当体色检测结果和可数性状检测结果均合格时，可初步判定为合格。可数性状检测结果可疑或有必要时，则进一步进行生化遗传标记或 DNA 标记的检测。必要时进行染色体核型检测。

对被检个体的体色、可数性状、生化遗传标记或 DNA 标记等项目的检测结果均符合本标准规定的，则判定为合格。

生化遗传标记或 DNA 标记检测结果的判断按 GB/T 18654.1 的规定执行。

SSR 标记检测结果的判断，按所有样本平均期望纯合度（Hom）均在 99%以上判为合格。

附录 A
(资料性附录)
实验红鲫人工繁殖方法

A.1 性别鉴别和亲鱼选择

在繁殖季节，很容易鉴别红鲫雌雄。根据雄性红鲫鳃盖表面和胸鳍第 1 根硬鳍条均粗糙，轻压腹部有乳白色精液流出，雌性红鲫鳃盖与胸鳍光滑，腹部膨大，肛门红肿，轻压腹部有淡黄色卵粒流出等特征，选择体质健壮、无伤病、繁殖力较强的 2 年龄成熟红鲫做亲本。雌雄比例为 1：1。

A.2 人工催产

可选择使用鲤鱼脑垂体 (PG)、鱼用促性腺激素 (LRH-A2) 和绒毛膜促性腺激素 (HCG) 对红鲫进行催产。根据表 A.1 于先天下午 16:00~17:00 时段注射催产。

表 A.1 实验红鲫人工催产激素及其剂量效应

水温 (°C)	催产激素及剂量 (每 kg 体重)	效应时间 (h)
18~24	LRH-A2 2 μg + HCG 500 IU	9~10
18~24	LRH-A2 2 μg + PG 2 mg	10~12

A.3 产卵与受精

一般采用干法授精。即先取一个洁净的搪瓷盘，将鱼体上的水擦干，用手指轻压腹部使卵子流入盘中，接着将雄鱼的精液直接滴在鱼卵上，立即用羽毛轻搅均匀，再添加洁净水，立即均匀地撒播在事先准备好的纱网（鱼巢）上进行孵化。

A.4 孵化

一般采用静水孵化。即将粘有受精卵的纱网徐徐放入水中，置于水下 20~30cm 处，让其自然孵化。为防止水霉发生，可用 6.0 ppm~8.0 ppm 的孔雀石绿浸泡鱼巢 15 min~30 min 进行消毒。

在水温 18 °C~22 °C 的条件下，约孵化 3d 左右，鱼苗开始出膜，再经 24h 全部孵化完毕。刚孵出的仔鱼全长约为 3~5 mm，常侧卧水簇箱底面。孵出 2~3 d 后开始摄食，这时可投喂熟蛋黄。

A.5 人工雌核发育

以体色全红的 2 龄红鲫作为母体，以湘江野鲤或三角鲂的精子作为激活源。用紫外线处理精子，用冷休克进行卵子染色体数目加倍。具体操作如下：

在生殖季节（4~5 月）按常规方法以注射催产激素获得红鲫卵子和鲤鱼或三角鲂的精液。鲤鱼或三角鲂的精液用 2 倍体积的 Hank' s 液稀释。被稀释的鲤鱼或三角鲂精液置于干净的培养皿中，其厚度为 0.1~0.2mm，移于 2 支 15W 的紫外灯下，灯管与精液面的垂直距离为 12cm，开启紫外灯照射 30min。照射过程中，盛精液的培养皿放在冰盘上，冰盘又放在小摇床上，不停地缓慢摇动，以便精液在低温下被均匀照射。经照射的精液立即置于 4 °C 冰箱中备用，并涂片镜检精子活动能力。红鲫卵子置于干净的培养皿中，立即用经紫外线照射的鲤鱼或三角鲂精子进行人工授精，以激活卵子发育。在精卵相

遇后 1 min, 开始进行冷休克处理, 即将培养皿移入冰箱后, 用 3 min 时间使激活卵子由环境温度降低到冷休克温度 (0~4 ℃), 再经过冷休克 (0~4 ℃) 处理 30 min 后, 从冰箱中取出, 使其回升到环境温度。激活卵或受精卵均置于解剖盘中静水孵化, 每日换水 2~4 次。

湖南省质量和标准化研究院

附录 B (资料性附录)

实验红鲫血清蛋白的聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳方法

B.1 仪器与材料

低温冰箱, 温箱、离心机、PH 计, 分析天平, 制胶模具, 浓度梯度混合器, 磁力搅拌机, 微量加样注射器, 电泳仪, 电泳槽, 凝胶成像系统、培养皿、EP 管等耗材。

B.2 试剂与溶液

B.2.1 试剂

丙烯酰胺 (Arc), N',N'-亚甲基双丙烯酰胺或甲叉双丙烯酰胺 (Bis), 三羟甲基氨基甲烷(tris), 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA), N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED), 过硫酸铵, 三氯醋酸, 琼脂糖, 溴酚蓝, 考马斯亮蓝 R250, 乙醇, 肝素, 氯化钠, 蒸馏水

B.2.2 溶液

- ① 1%琼脂糖 琼脂糖适量, 用电极缓冲液配制。
- ② 30%凝胶液 Arc 57.6g, Bis 2.4g, 用蒸馏水配制成 100mL。
- ③ 4%凝胶液 用 30%凝胶液稀释 7.5 倍配制而成。
- ④ 0.3%过硫酸铵 过硫酸铵 0.3g, 用蒸馏水配制成 100mL (仅适用于 1W)。
- ⑤ 凝胶缓冲液 tris 21.55g, EDTA 1.85g, 硼酸 11.0g, 用蒸馏水配制成 1000mL, 调至 pH8.4。再按 100 mL 此缓冲液中加入 TEMED 0.5mL~1.0mL 配制而成。
- ⑥ 电极缓冲液 tris 21.55g, EDTA 1.85g, 硼酸 11.0g, 用蒸馏水配制成 1000mL, 调至 pH8.4。再用蒸馏水稀释一倍。
- ⑦ 20%蔗糖溶液 蔗糖 2g, 用蒸馏水配制成 10mL。
- ⑧ 12.0%三氯醋酸 三氯醋酸 12.0mL, 用蒸馏水配制成 100mL。
- ⑨ 1.0%考马斯亮蓝 R250 考马斯亮蓝 R250 1.0g, 用乙醇配制成 100mL。
- ⑩ 显色液 12.0%三氯醋酸 100 mL, 加入 1.0%考马斯亮蓝 R250 4.0mL。
- ⑪ 7%醋酸 醋酸 7.0mL, 用蒸馏水配制成 100mL。
- ⑫ 0.85%氯化钠溶液 氯化钠 0.85g, 用蒸馏水配制成 100mL。

B.3 样品制备

用一次性注射器从鱼尾静脉取血约 0.5mL, 以 1000rpm 离心 10min, 取上层血清置 -10℃冰箱保存备用。

B.4 凝胶制备

使用浓度梯度混合器制备 4%~30%梯度凝胶, 用 1%琼脂糖密封制胶模具, 凝胶制成后在胶面上加蒸馏水封顶, 20℃下聚合 20min。其中:

- A 管液 4%凝胶液 10.0mL+凝胶缓冲液 5.0mL+3%过硫酸铵 5.0mL。
B 管液 30%凝胶液 10.0mL+凝胶缓冲液 5.0mL+3%过硫酸铵 5.0mL。

B.5 电泳

将血清样品加入到等量的 20%蔗糖溶液中，加微量溴酚蓝作为指示剂，再混合，然后用微量加样器将血清样品加入到凝胶上端的样品槽中，再小心加入电极缓冲液盖在血清样品上面，注意勿将血清样品冲出样品槽。

以样品端为负极，连接电泳仪电极。调至电压为 200V，连续电泳约 15h。

B.6 显色

取出凝胶片置于盛满显色液的大培养皿中，在 37℃下用考马斯亮蓝 R250 染色 4 h，再用蒸馏水漂洗 2 遍，加入 7%醋酸，室温（25℃）放置 1~2 天后用于凝胶成像系统扫描。

附录 C

(资料性附录)

实验红鲫微卫星 (SSR) 分子标记检测方法

C.1 主要仪器

高速离心机, -20°C 冰箱, -80°C 超低温冰箱, 紫外分光光度计, 水浴箱, 电子天平, 微量移液器, 梯度 PCR 仪, pH 计, 电泳仪, 电泳槽, 凝胶成像系统。

C.2 主要试剂

全血基因组 DNA 纯化系统, $2\times\text{Taq PCR SuperMix}$, GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus, pUC19 DNA/Msp I (Hpa II) Marker, SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒, 琼脂糖, 溴化乙锭。

C.3 溶液配制

C.3.1 8%的非变性聚丙烯酰胺凝胶

①分离胶 $30\%\text{Acr-Bis}(29:1)$, 4.0mL; 1M Tris, PH8.8, 5.7mL; 10%过硫酸铵, 0.15mL; TEMED, 0.009 mL; 三蒸水, 5.0 mL; 配成总体积, 15.0 mL。

②浓缩胶 $30\%\text{Acr-Bis}(29:1)$, 0.67mL; 1M Tris, PH6.8, 0.5mL; 10%过硫酸铵, 0.04mL; TEMED, 0.004mL; 三蒸水, 2.7mL; 配成总体积, 4.0mL。

C.3.2 银染液

①固定液: 无水乙醇, 250mL; 10%冰醋酸, 50mL; 加三蒸水定容至 500mL。

②浸泡液: 无水乙醇, 150mL; 醋酸钠 35g, 戊二醛, 0.625mL; 五水合硫代硫酸钠, 1mL; 加三蒸水定容至 500mL。

③染色液: 硝酸银, 0.5g; 40%甲醛, 0.1mL; 加三蒸水定容至 500mL。

④显色液: 碳酸钠, 12.5g; 40%甲醛, 0.05mL。

⑤终止液: EDTA-2Na $\cdot$ 2H₂O, 7.3g; 加三蒸水定容至 500mL。

C.4 样品准备及其 DNA 提取

用 5mL 注射器从鱼尾静脉抽取全血, 注入枸橼酸钠抗凝管中, 立即置于 -80°C 超低温冰箱保存。基因组 DNA 提取的操作步骤如下:

(1) 取 10 μL 全血于 EP 管中, 加入 30 μL 红细胞裂解液裂解 10min。

(2) 加入 300 μL 核裂解液, 用移液器将其充分混匀。

(3) 置于 55°C 水浴箱 60min。

(4) 静置至室温后加入 100 μL 饱和 NaCl, 剧烈振荡 20s。

(5) 室温 13 000rpm 离心 2min。

(6) 将上清液移入新 EP 管中, 加入 50 μL 饱和 NaCl, 剧烈振荡 20s。

(7) 室温 13 000rpm 离心 2min。

(8) 将上清液移入新 EP 管中, 加入 300 μL 异丙醇, 颠倒混匀 5min, 可见白色絮状沉淀, 即为析出的 DNA。

- (9) 室温 13 000rpm 离心 2min。
- (10) 弃上清，加入 500μL 70%乙醇洗涤。
- (11) 13 000rpm 室温离心 2min。
- (12) 弃上清，干燥后加入 100μL 无菌去离子水。

将提取的基因组 DNA 用紫外分光光度计定量，紫外分光光度仪预热 15min，三蒸水放入仪器中进行双管调零，然后取 1μL DNA 用三蒸水稀释一百倍，混匀，加入检测杯中，分别测定 260nm、280nm 的吸光度值。

DNA 的纯度根据 A260 nm/A280 nm 比值判定，DNA 纯度为 1.9~2.0 方可用于 PCR 扩增。
DNA 样品保存于 4℃冰箱备用。

C.5 PCR 扩增

C.5.1 引物

如表 C.1。

C.5.2 反应体系

PCR 反应总体积为 25 μL，其中 2×Taq PCR SuperMix 12.5 μL，上下游引物各 1 μL，无菌去离子水 9μL，模板 DNA 1.5 μL。

C.6 PCR 产物检测

C.6.1 凝胶制备

C.6.2 电泳

取 10μL 的 PCR 扩增产物加 2μL 上样缓冲液混匀后，在 8%的非变性聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分离，电泳缓冲液为 1×TBE，电压 80V，电泳时间约为 3h 左右。

C.7 PCR 产物检测

C.7.1 凝胶制备

C.7.2 电泳

取 10μL 的 PCR 扩增产物加 2μL 上样缓冲液混匀后，在 8%的非变性聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分离，电泳缓冲液为 1×TBE，电压 80V，电泳时间约为 3h 左右。

表 C.1 9 对微卫星引物序列及其 PCR 反应退火温度

微卫星引物序号 Microsatellites marker number	引物序列 primer sequences	退火温度 (℃) annealing temperature
1	3' CAGAAGCTTCTGGAATCTGAG	58.0
	5' GCGAGAAGATTGATGGACAAC	
2	3' GTCCATTGTGTCAAGATAGAC	55.5
	5' TCTTCATTTCAAGCTGCAAAG	
3	3' GTCCCTGGTAGTGAGTGAGT	52.0
	5' GCGTTGACTTGTTTATAGTAG	

表 C.1 9 对微卫星引物序列及其 PCR 反应退火温度 (续)

微卫星引物序号 Microsatellites marker number	引物序列 primer sequences	退火温度 (°C) annealing temperature
4	3' GCTCCAGATTGCACATTATAG	52.0
	5' CTACACACACGCAGAGCCTTTC	
5	3' ATTGTGAAGCATCGGTAATGC	55.0
	5' TACTTGATTGCTATTGGAC	
6	3' CCCTGAGATAGAAACCACTG	56.0
	5' CACCATGCTTGGATGCAAAAG	
7	3' GATCCCTTTTGAATTTTCTAG	60.5
	5' ACAGTGAGGTCCAGAAGTCG	
8	3' GTTGACCAAGAAACCAACATGC	55.0
	5' GAAGCTTTGCTCTAATCCACG	
9	3' CACTGACAGTTCACAGGCG	54.0
	5' CATTCTCTGCATTGGGAG	

C.7.3 银染与显色

使用硝酸银染色检测电泳结果, 染色方法如下:

- ① 将凝胶从电泳槽中取下后, 用三蒸水漂洗 2 次, 每次 1 min。
- ② 在固定液中固定 20 min, 三蒸水漂洗 2 次, 每次 2 min。
- ③ 在浸泡液中浸泡 20 min。
- ④ 三蒸水漂洗 4 次, 每次 5 min。
- ⑤ 银染液中染色 20 min。
- ⑥ 三蒸水漂洗 3 次, 每次 5 min。
- ⑦ 显色液显色 5 min。
- ⑧ 三蒸水漂洗 2 次, 每次 1 min。
- ⑨ 终止液中浸泡 10 min。

C.7.4 凝胶成像系统扫描

使用凝胶成像系统对显影后的凝胶进行拍照和分析。

C.8 数据分析

按照公式 C-1、公式 C-2 和公式 C-3, 分别计算等位基因频率 (p)、无偏差期望杂合度 (UHe) 和期望纯合度 (Hom)。

$$p_i = \frac{1}{n} f(AA) + \frac{1}{2n} f(AB) \dots \dots \dots (C-1)$$

式中:

p_i —— 样本第 i 个等位基因频率;

$f(AA)$ —— 基因型为纯合子的个数;

$f(AB)$ ——基因型为杂合子的个数；
 n ——样本数量。

$$UHe = \frac{2n}{2n-1} - \frac{2n}{2n-1} \sum_{i=1}^k p_i^2 \dots\dots\dots$$

(C-2)

式中：
 Uhe ——无偏差期望杂合度；
 n ——样本数量；
 k ——等位基因数量；
 pi ——样本第 i 个等位基因频率。

$$Hom = 1 - UHe \dots\dots\dots$$

(C-3)

式中：
 Hom ——期望纯合度；
 Uhe ——无偏差期望杂合度。
