

DB 62

甘 肃 省 地 方 标 准

DB 62/T 4074—2019

实验用合作小型猪 遗传质量控制

Genetic quality control of experiment Hezuo minipig

地方标准信息服务平台

2019 - 11 - 28 发布

2020 - 01 - 01 实施

甘肃省市场监督管理局 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 遗传分类与命名 1

5 繁殖方法 2

6 遗传质量控制要求 2

7 遗传质量监测方法 2

8 判定结论 3

9 报告 3

附录 A（规范性附录） 近交系实验用合作小型猪的微卫星 DNA 标记检测方法..... 4

附录 B（规范性附录） 封闭群实验用合作小型猪的微卫星 DNA 标记检测方法..... 6

地方标准信息服务平台

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由甘肃省科技厅提出、归口和监督实施。

本标准起草单位：中国农业科学院兰州兽医研究所。

本标准主要起草人：景志忠、房永祥、贾怀杰、陈国华、何小兵、曾爽、曹健民、杨帆。

地方标准信息服务平台

实验用合作小型猪 遗传质量控制

1 范围

本标准规定了实验用合作小型猪的术语和定义、遗传分类与命名、繁殖方法以及遗传质量控制要求、遗传监测方法和判定结论等。

本标准适用于近交系和封闭群合作小型猪的培育和生产过程中的质量控制以及遗传特性鉴定。

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。

NY/T 1673 畜禽微卫星DNA遗传多样性检测技术规程

DB62/T 2897 实验用合作小型猪繁育技术规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

实验用合作小型猪 experimental Hezuo minipig

经人工饲养，对其携带的病原微生物和寄生虫实行控制，遗传背景明确或者来源清楚，12月龄体重不超过40kg，用于科学研究、教学、生产和质量检验以及其他科学实验的合作猪。

3.2

近交系合作小型猪 inbred strain of Hezuo minipig

合作猪经连续15代以上的全同胞兄妹或亲代与子代交配繁殖培育而成的小型猪品系，品系内所有个体均可追溯到起源于第15代或以后代数的一对共同祖先的合作小型猪，近交系数达到96%以上。

3.3

封闭群合作小型猪 closed colony stock of Hezuo minipig

在不从外部引入新个体的条件下，合作猪以非近亲交配方式至少连续繁殖4代以上而生产的合作小型猪种群。

4 遗传分类与命名

4.1 遗传分类

根据实验动物学遗传控制原则和要求，将实验用合作小型猪分为近交系和封闭群两类，其中在近交系品系内又分为家系和亚家系，在封闭群内又分为不同的遗传特性群。

4.2 命名

近交系一般以大写英文字母或加阿拉伯数字命名,如HZP等。近交代数一般用大写英文字母F表示。如当近交代数为15代时,可写成F15。近交系家系、亚系以及封闭群的命名按照DB62/T 2897执行。

5 繁殖方法

5.1 近交系的繁殖

5.1.1 原则

保持同基因型及基因纯合性是近交系合作小型猪繁殖的原则。

5.1.2 引种

近交系繁殖用种子应来自于近交系的基础群,遗传背景明确,有完整的档案资料(包括近交代数、遗传基因特点和主要生物学特征)。

5.1.3 方法

近交系小型猪的繁殖一般分为基础群(foundation stock)、血缘扩大群(pedigree expansion stock)和生产群(production stock)三种繁殖方式,其具体繁殖方法按照DB62/T 2897执行。

5.2 封闭群繁殖

5.2.1 原则

保持遗传异质性和基因多态性,避免近交系数随繁殖代数增加而过快上升是封闭群合作小型猪繁殖的原则。

5.2.2 引种

作为繁殖用种子的封闭群小型猪应遗传背景明确或来源清楚,有完整的档案资料(包括近交代数、遗传基因特点和主要生物学特征)。如采用循环交配方式,最小引种规模为13对,若为1头公猪多头母猪交配比例则需增加动物群体总数。

5.2.3 方法

封闭群应足够大(按公母1:1~1:2不少于26头),采用随机交配或循环交配方式繁殖,防止近交系数过快增加,以保持封闭群小型猪遗传基因的稳定和异质性。具体繁殖方法按照DB62/T 2897执行。

6 遗传质量控制要求

6.1 个体外貌特征符合品种、品系要求,谱系记录清楚,繁殖方法科学,具体按DB62/T 2897执行。

6.2 群体遗传特性均符合品种、品系特征,具体按DB62/T 2897执行。

6.3 遗传检测结果符合相应遗传类群要求。

7 遗传质量监测方法

7.1 近交系合作小型猪的遗传质量监测

7.1.1 检测方法

采用微卫星DNA标记检测方法监测，具体按NY/T 1673和附录A进行检测。

7.1.2 抽样数量与检测时间间隔

对于基础群，凡在子代留有种猪的双亲动物都应进行检测。

对于生产群，从每个近交系中随机抽取非同窝成年猪，公母各半，抽样数量按生产群母猪的规模而定，少于50头，抽样6头；大于50头少于100头，抽样8头；大于100头，抽样不少于10%。每年至少进行一次遗传质量检测。

7.1.3 结果判定

若检测结果与标准遗传概貌完全一致，则判定为未发现遗传变异，结论为合格。

若检测结果有一个位点的标记基因与标准遗传概貌不一致，则判定为遗传发生变异，结论为不合格。具体按NY/T 1673执行。

7.2 封闭群合作小型猪的遗传质量监测

7.2.1 检测方法

采用微卫星DNA标记检测方法监测，具体按NY/T 1673和附录B进行检测。

7.2.2 抽样数量与检测时间间隔

从每个封闭群中随机抽取非同窝成年猪，公母各半，抽样数量按生产群母猪的规模而定，少于50头，抽样6头；大于50头少于100头，抽样8头；大于100头，抽样不少于10%。每两年至少进行一次遗传质量检测。

7.2.3 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，具体按NY/T 1673执行。

8 判定结论

所有项目的检测结果均合格，判为符合相应类群的遗传标准，否则判为不符合相应类群的遗传标准。

9 报告

应根据检测结果，出具报告。

附录 A

(规范性附录)

近交系实验用合作小型猪的微卫星 DNA 标记检测方法

A.1 微卫星分子标记检测的原理

采集近交系实验用小型猪的血液或耳组织，提取基因组DNA。对特定的微卫星标记座位进行PCR扩增，通过遗传分析仪检测各座位基因的峰形和大小，确定各近交系的微卫星标记的遗传概貌。

A.2 仪器设备

常压电泳仪，4℃、-20℃冰箱，低温高速离心机，水浴锅，感量为0.0001g的分析天平，pH计，紫外分光光度仪，PCR仪，遗传分析仪。

A.3 微卫星DNA标记检测方法

A.3.1 样本的采集

A.3.1.1 耳静脉或前腔静脉采血2mL，加等量的血液裂解液。

A.3.1.2 采集大小>0.5g的耳组织样，放入75%乙醇保存。

A.3.2 基因组DNA的提取

用苯酚氯仿法或试剂盒提取基因组DNA。

A.3.3 微卫星标记位点

用10个分布于猪单倍体10条主要染色体上的微卫星位点检测近交系小型猪的遗传概貌。各微卫星位点的染色体位置、等位基因数、引物序列及荧光标记、PCR反应的T_m值、镁离子浓度见表A.1。

A.3.4 PCR扩增

A.3.4.1 PCR扩增的体系

PCR 总反应体积为15μL，其中含1×PCR buffer，200μM dNTPs，各400pM的上下游引物，MgCl₂（浓度见表A.1），0.1μL（5U/μL）的 TaqTM，100ng 的基因组 DNA。PCR 反应程序为 94℃预变性4min；94℃变性30s，55℃退火30s，72℃延伸30s，30 个循环；再72℃ 延伸 7min。

A.3.4.2 PCR产物的检测

PCR产物，以 2%的琼脂糖检测扩增效率，凝胶成像系统记录检测结果。

A.3.5 个体基因型的判定

A.3.5.1 PCR产物的变性

根据琼脂糖检测的结果,对PCR产物进行稀释。若2%的琼脂糖检测的条带亮度基本相同,即PCR的扩增效率基本相同,则FAM、HEX、TAMRA三种标记的三个位点的PCR产物分别取1 μ L混合,加到每孔含8.5 μ L的甲酰胺和内标的96孔板上(860 μ L甲酰胺加10 μ L内标,混匀,分装到96孔板上),95 $^{\circ}$ C变性5min,迅速放在冰上。待96孔板降温后,用铝箔纸包好,4 $^{\circ}$ C保存备用。

A.3.5.2 基因型的判定

含变性后的PCR产物的96孔板放入遗传分析仪内进行分析,原始峰图用基因分型软件进行分析,确定特定位点各个体的峰形和大小,判定个体的基因型。

A.3.6 结果判定

所有样品检测位点的等位基因都符合品系的特征,没有新的等位基因出现为合格实验用小型猪近交系,否则判为不合格。

A.4 结果报告

根据判定结果对被检测的实验用小型猪群体做出检测报告。

表A.1 各微卫星座位的染色体位置、等位基因数、片段大小、荧光标记、引物序列及扩增条件

座位名称	染色体位置	等位基因数	等位基因范围/bp	5'荧光标记	引物序列 5' → 3'	Tm/ $^{\circ}$ C	Mg ²⁺ /mM
CGA	1q	12	250~320	FAM	F-ATA GAC ATT ATG TAA GTT GCT GAT R-GAA CTT TCA CAT CCC TAA GGT CGT	55	2.5
SW240	2P	8	96~115	TAMRA	F-AGA AAT TAG TGC CTC AAA TTG G R-AAA CCA TTA AGT CCC TAG CAA A	55	1.5
SW72	3P	8	100~116	TAMRA	F-ATC AGA ACA GTG CGC CGT R-GTT TGA AAA TGG GGT GTT TCC	55	1.5
S0005	5q	10	205~248	FAM	F-TCC TTC CCT CCT GGT AAC TA R-GCA CTT CCT GAT TCT GGG TA	55	3.0
S0090	12q	4	244~251	TAMRA	F-CCA AGA CTG CCT TGT AGG TGA ATA R-GCT ATC AAG TAT TGT ACC ATT AGG	55	1.5
SW769	13	7	106~140	HEX	F-GGT ATG ACC AAA AGT CCT GGG R-TCT GCT ATG TGG GAA GAA TGC	55	3.0
SW857	14	6	144~160	TAMRA	F-TGA GAG GTC AGT TAC AGA AGA CC R-GAT CCT CCT CCA AAT CCC AT	55	1.5
S0355	15	14	243~277	HEX	F-TCT GGC TCC TAC ACT CCT TCT TGA TG R-GTT TGG GTG GGT GCT GAA AAA TAG GA	55	3.0
SW24	17	8	96~121	FAM	F-CTT TGG GTG GAG TGT GTG C R-ATC CAA ATG CTG CAA GCG	55	1.5
S0218	X	8	164~184	TAMRA	F-GTG TAG GCT GGC GGT TGT R-CCC TGA ACC CTA AAG CAA AG	55	1.5

附 录 B

(规范性附录)

封闭群实验用合作小型猪的微卫星 DNA 标记检测方法

B.1 基因组DNA的提取

采样同近交系合作小型猪的微卫星DNA遗传检测方法。样品用苯酚氯仿法或试剂盒提取基因组DNA。

B.2 微卫星位点

用25个分布于猪17条常染色体和X性染色体上的微卫星位点检测封闭群小型猪的遗传概貌。各微卫星位点的名称、引物序列、在染色体位置、等位基因数、PCR 反应的 T_m 值、镁离子浓度及等位基因分布范围见表B.1。

B.3 PCR扩增

B.3.1 PCR扩增的体系

PCR总反应体积为15 μ l，其中含10 $\times$ PCR buffer:1.5 μ L，上下游引物(100pmol/ μ L) 各 1 μ L，4 $\times$ dNTP 100 μ mol/L:1 μ L，Taq 酶 1U:1 μ L，50 ng~100 ng 基因组DNA:1 μ L，纯水(ddH₂O):8.5 μ L。PCR反应程序为：95 $^{\circ}$ C预变性4min；94 $^{\circ}$ C变性30s；退火（各位点退火温度见表B.1）30s，72 $^{\circ}$ C延伸30s，35个循环；72 $^{\circ}$ C继续延伸7min；扩增产物 4 $^{\circ}$ C保存。

B.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。

B.3.3 扩增产物的STR扫描

扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测，确证扩增出目的片段后，选择分别以FAM、HEX、TAMRA标记的三个位点的扩增产物，以1: 3: 5体积比混合，取1 μ L上样进行STR扫描。

B.4 STR扫描结果的判读与统计分析

B.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bp数。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纪录为 a、b、c、d 等。

B.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，计算样品在各微卫星位点上的基因频率、平均观察等位基因数、平均有效等位基因数（ N_e ）、平均杂合度（ H ）等。

B.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实验用小型猪群体。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，该封闭群实验用小型猪群体判为不合格。

B.6 结果报告

根据判定结果对被检测的封闭群实验用小型猪群体做出检测报告。

表B.1 各微卫星座位的染色体位置、等位基因数、片段大小、引物序列及扩增条件

位点	引物序列(5' -3')	所在染色体	镁离子浓度 (mmol/L)	退火温度 ℃	等位基因数	等位基因范围
SW974	GGTGAAGTTTTTGCTTTGAACC GAAAGAAATCCAAATCCAAACC	1	2.0	58	17	129~175
S0091	TCTACTCCAGGAGATAAGCCAGAT CAGTGACTCCATGCACAGTTATGA	2	1.5	55	14	96~174
SW240	AGAAATTAGTGCCTCAAATTGG AAACCATTAAAGTCCCTAGCAAA	2	1.5	58	11	92~114
SW1066	GCAGGATGAACCACCCTG CTCTTGAGGCAACCTGCTG	3	2.0	60	19	166~214
SW1089	TTTTCCCTTCACTCACCC GATCAAAGTCCCTTACTCCGG	4	1.5	58	10	142~190
S0005	TCCTTCCCTCCTGGTAACTA GCACTTCCTGATTCTGGTA	5	2.0	54	11	204~244
SW1057	TCCCCTGTTGTACAGATTGATG TCCAATTCCAAGTTCCACTAGC	6	2.0	58	14	142~191
SW632	TGGGTTGAAAGATTTCCTCAA GGAGTCAGTACTTTGGCA	7	2.0	54	9	148~173
OPN	CCAATCCTATTACGAAAAAGC CAACCCACTTGCTCCCAC	8	2.0	59	12	138~170
SW29	AGGGTGGCTAAAAAAGAAAAGG ATCAAATCCTTACCTCTGCAGC	8	2.0	61	12	133~187
SW911	CTCAGTTCTTTGGGACTGAACC CATCTGTGGAAAAAAAAGCC	9	2.0	60	14	151~178

表 B.1 各微卫星座位的染色体位置、等位基因数、片段大小、引物序列及扩增条件（续）

位点	引物序列(5' -3')	所在染色体	镁离子浓度 (mmol/L)	退火温度 ℃	等位基 因数	等位基因 范围
SW511	AAGCAGGAATCCCTGCATC CCCAGCCACCAGTCTGAC	9	1.5	62	12	161~196
SWr158	TCCAATTCAACTCCTGGCTC GAATGTGCACATACCACATGC	10	2.0	60	18	158~200
SW951	TTTCACAACCTCTGGCACCAG GATCGTGCCCAAATGGAC	10	1.5	58	14	108~142
SW271	TTCCAGTGGCTTTCTGTGC CATTCATTCCTCAGTGAACTTG	11	1.5	58	13	111~144
S0386	TCCTGGGTCTTATTTTCTA TTTTTATCTCCAACAGTAT	11	2.0	48	12	155~178
S0068	CCTTCAACCTTTGAGCAAGAAC AGTGGTCTCTCTCCCTCTTGCT	13	2.0	62	10	210~256
SWr1008	ACAGCCACCAACAGTGTTTG GAACTTCCATATGCTGCAAGTG	13	2.0	62	16	98~256
S0007	TTACTTCTTGATCATGTC GTCCCTCCTCATAATTTCTG	14	2.0	54	15	142~192
SW857	TGAGAGGTCAGTTACAGAAGACC GATCCTCCTCCAAATCCCAT	14	2.0	58	16	129~173
SWr312	ATCCGTGCGTGTGTGCAT CTGGTGGCTACAGTTCCGAT	15	1.5	64	11	116~136
SW81	GATCTGGTCCTGCACAGGG GGGGCTCTCAGGAAGGAG	16	1.5	60	8	128~144
SWr1120	CAAATGGAACCCATTACAGTCC ACTCCTAGCCCAGGAGCTTC	17	1.5	60	11	147~178
S0062	AAGATCATTTAGTCAAGGTCACAG TCTGATAGGGAACATAGGATAAAT	18	2.0	56	12	144~204
S0218	GTGTAGGCTGGCGGTTGT CCCTGAAACCTAAAGCAAAG	X	1.5	54	11	158~196