

ICS 65.020.30

B 44



中国实验动物学会团体标准

T/CALAS 84—2020

实验动物 猪母系遗传结构检测方法

Laboratory animal-Detection method of swine maternal genetic structure

2020-12-01 发布

2021-01-01 实施

中国实验动物学会 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020 给出的规则起草。

本文件由中国实验动物学会归口。

本文件由全国实验动物标准化技术委员会（SAC/TC281）技术审查。

本文件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。

本文件起草单位：中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

本文件主要起草人：高彩霞、陈洪岩、李昌文。

实验动物 猪母系遗传结构检测方法

1 范围

本文件规定了实验猪母系遗传结构检测方法的原理、仪器设备、样品采集、样品 DNA 的提取、引物序列、PCR 扩增、数据处理和结果判定。

本文件适用于实验猪母系遗传结构的检测与分析。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。凡是注明日期的引用文件，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/T 35892 《实验动物 福利伦理审查指南》

NY/T 541 《动物疫病实验室检验采样方法》

NY/T 1673 《畜禽微卫星 DNA 遗传多样性检测技术规程》

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

实验猪 **experimental pig**

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，用于科学研究、教学、生产、检定及其他科学实验的猪。

3.2

线粒体 DNA **mitochondrial DNA**

线粒体 DNA 是核外唯一的遗传物质，约 16.5 kb，包括 37 个基因、13 种多肽、22 种 tRNA 和 2 种 rRNA，为共价双链闭合环状；遗传上具有自主性，基因结构简单，进化速率高，碱基突变率高，呈严格的母系遗传，能记载母系基因的遗传史。

3.3

D-loop 区 **displacement-loop region**

线粒体 DNA 由编码区和非编码区组成，非编码区又叫做控制区（D-loop 区），是线粒体 DNA 的遗传高变区，具有自我复制、转录和编码功能。

3.4

单倍型多样性 **haplotype diversity**

单倍型多样性是衡量一个群体变异程度的重要指标，是指样本中随机抽取到两个不同单倍型的频率。单倍型多样性高的群体说明其遗传多样性高，遗传背景较为复杂。

4 原理

采集实验猪的耳或尾组织，提取基因组 DNA。合成一对特异性引物对线粒体 DNA D-loop 区进行 PCR 扩增，核酸凝胶电泳检测目的条带，对扩增产物进行直接测序，分析单倍型多样性和遗传多样性，从而确定实验猪群的母系遗传结构。

5 仪器设备

- a) PCR 仪
- b) 常压电泳仪
- c) 紫外分光光度计
- d) 凝胶成像系统

6 样品采集

采样个体应具备该猪品种的典型特征，每个品种采集要求三代内无血缘关系的猪个体不少于 40 头。按照 NY/T 541 采集实验猪的耳或尾组织，动物福利应遵循 GB/T 35892 规定。样品的采集及保存应满足提取 DNA 的要求。详细记录材料名称、来源、系谱、采集时间和地点、保存条件。

7 样品 DNA 的提取

根据 NY/T 1673 中的苯酚-氯仿法，或商品化试剂盒提取样品 DNA，紫外分光光度计测定 DNA 浓度和纯度，浓度 $> 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，纯度 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}=1.6\sim 1.8$ 。

8 引物序列

D-loop F: 5'-CCA AGA CTC AAG GAA GGA GA-3'

D-loop R: 5'-GGC GCG GAT ACT TGC ATG TG-3'

9 PCR 扩增

9.1 PCR 扩增体系

PCR 反应体系 $50 \mu\text{L}$ ，体系中各成分用量见表 1。同时设立空白对照。

表 1 PCR 反应体系

成分	体积/ μL
Taq 酶 (5 U/ μL)	0.25
10×Taq 缓冲液 (含 Mg^{2+})	5
dNTP mix (2.5 mmol/L)	4
上游引物 (10 pmol/ μL)	1
下游引物 (10 pmol/ μL)	1
DNA 模板	2.5 (约 350 ng/ μL)
ddH ₂ O	36.3

9.2 PCR 扩增程序

扩增程序见表 2。

表 2 PCR 扩增程序

阶段	温度/℃	时间
1	94	4 min
2	94	30 s
	60	30 s
	72	1 min
	30 次循环	
3	72	4 min

9.3 PCR 产物检测

以 1% 的琼脂糖凝胶检测 PCR 产物的扩增效率。凝胶成像系统记录检测结果，扩增条带大小约 1.5 kb 且条带单一清晰，对照无条带。

10 数据处理

对 PCR 产物进行直接测序，重复测序三次，应用生物信息学软件分析序列。核对编辑原始序列，编辑后的序列建立数据库，去除重复片段、插入或缺失碱基，进行同源序列比对，构建系统进化树，进行中介网络关系分析和遗传多样性分析。

11 结果判定

所有检测猪序列分析中只要出现碱基变异就判定为一个单倍型，分析单倍型多样度和群体遗传多样性，从而确定猪群母系遗传结构。通过中介网络关系图和系统进化树分析本猪群与其他品种猪的亲缘关系。