

ICS 65.020.30

B 44

备案号:

DB11

北京市地方标准

DB11/T 828.3—2011

实验用小型猪 第3部分：遗传质量控制

Experimental minipig
Part 3: Genetic quality control

2011 - 11 - 10 发布

2012 - 03 - 01 实施

北京市质量技术监督局 发布

目 次

前言..... 11

1 范围..... 1

2 规范性引用文件..... 1

3 术语和定义..... 1

4 遗传分类及命名..... 1

5 繁殖..... 2

6 近交系实验用小型猪的遗传质量监测..... 3

7 封闭群实验用小型猪的遗传质量监测..... 3

附录 A（规范性附录） 近交系实验用小型猪的微卫星 DNA 标记检测方法 5

附录 B（规范性附录） 封闭群实验用小型猪的微卫星 DNA 标记检测方法 9

前 言

DB11/T 828 的本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

DB11/T 828《实验用小型猪》分为六个部分：

- 第 1 部分：微生物学等级及监测；
- 第 2 部分：寄生虫学等级及监测；
- 第 3 部分：遗传质量控制；
- 第 4 部分：病理学诊断规范；
- 第 5 部分：配合饲料；
- 第 6 部分：环境及设施。

本部分为 DB11/T 828 的第 3 部分。

本部分由北京市科学技术委员会提出并归口。

本部分由北京市科学技术委员会组织实施。

本部分起草单位：中国农业科学院北京畜牧兽医研究所、首都医科大学、中国人民解放军军事医学科学院、吉林大学。

本部分主要起草人：李奎、陈振文、杨述林、吴艳花、冯书堂、杜小燕、牟玉莲、董罡、公维华、任文陟、张宁波、徐玲玲。

实验用小型猪

第3部分：遗传质量控制

1 范围

DB11/T 828 的本部分规定了实验用小型猪的遗传分类、繁殖方法和近交系及封闭群的遗传质量标准。

本部分适用于实验用小型猪的遗传质量控制。

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 14923 实验动物 哺乳类动物的遗传质量控制

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

实验用小型猪 experimental minipig

经人工饲育，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 35kg，用于科学研究、教学、生产和检定以及其他科学实验的小型猪。

3.2

近交系 inbred strain

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 代以上亲代与子代交配和全同胞兄妹交配有等同效果。

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

3.3

封闭群（远交群） closed colony （outbred stock）

以非近亲交配方式进行繁殖生产的实验用小型猪种群，在不从外部引入新个体的条件下，至少连续繁殖 4 代以上。

4 遗传分类及命名

4.1 遗传分类

根据遗传特点的不同，实验用小型猪分为近交系和封闭群。

4.2 命名

4.2.1 近交系命名

近交系一般以大写英文字母命名，亦可以用大写英文字母加阿拉伯数字命名，符号应尽量简短。如WZSP等。

4.2.2 近交代数

近交系的近交代数用大写英文字母F表示。例如当一个近交系的近交代数为30代时，写成（F30）。

4.2.3 其它近交系

亚系，重组近交系，同源突变近交系，同源导入近交系的定义和命名按照GB 14923执行。

4.2.4 封闭群命名

封闭群的命名按照GB 14923执行。

5 繁殖

5.1 近交系的繁殖

5.1.1 原则

选择近交系实验用小型猪繁殖方法的原则是保持近交系小型猪的同基因性及基因纯合性。

5.1.2 引种

作为繁殖用种子的近交系实验用小型猪，应来自于近交系的基础群或血缘扩大群，遗传背景明确，有完整的资料（包括品系名称、近交代数、遗传基因特点及主要生物学特征等）。

5.1.3 方法

可分为基础群(foundation stock)、血缘扩大群(pedigree expansion stock)和生产群(production stock)。当近交系小型猪生产供应数量不是很大时，一般不设血缘扩大群，仅设基础群和生产群。基础群、血缘扩大群和生产群的具体繁殖方式按照GB 14923执行。

5.2 封闭群的繁殖

5.2.1 原则

选择封闭群实验用小型猪繁殖方法的原则是保持封闭群小型猪的遗传异质性及基因多态性，避免近交系数随繁殖代数增加而过快上升。

5.2.2 引种

5.2.2.1 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，有完整的资料（包括种群名称、来源、遗传基因特点及主要生物学特性等）。

5.2.2.2 根据繁殖方式，在保证每代近交系数增量不大于 1%的前提下，决定最小引种规模。如采用循环交配方式，引种数量不得少于 13 对无血缘关系（三代以内无共同祖先）的公母猪；若采用随机交配方式，引种数量不得少于 25 对无血缘关系的公母猪。

5.2.3 方法

封闭群应足够大，以保持封闭群实验用小型猪的遗传基因的稳定，并尽量避免近亲交配。具体繁殖方法按照 GB 14923 执行。

6 近交系实验用小型猪的遗传质量监测

6.1 检测方法

采用微卫星DNA标记检测方法。具体方法执行附录A。

6.2 抽样

对基础群，凡在子代留有种猪的双亲动物都应进行检测。
对生产群，按表1要求从每个近交系中随机抽取非同窝成年猪，公母各半。

表1 近交系实验用小型猪遗传检测抽样要求

生产群中种母猪数量	抽样数量
少于 100 头	6 头
大于 100 头	不少于 6%

6.3 结果判定

近交系实验用小型猪遗传检测结果的判定按表2执行。

表2 近交系实验用小型猪遗传检测结果判定

检测结果	判定
与标准遗传概貌完全一致	未发现遗传变异
有一个位点的标记基因与标准遗传概貌不一致	遗传发生变异

6.4 判定结论

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。

6.5 检测时间间隔

近交系实验用小型猪生产群每年至少进行一次遗传质量检测。

7 封闭群实验用小型猪的遗传质量监测

7.1 检测方法

采用微卫星DNA标记检测方法。具体方法执行附录B。

7.2 抽样

按表3要求从每个封闭群中随机抽取非同窝成年猪，公母各半。

表3 封闭群实验用小型猪遗传检测抽样要求

群体数量	抽样数量
少于100头	不少于15头
大于100头	不少于30头

7.3 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估。

当平均杂合度在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。或用群体是否达到平衡状态来判定，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。具体方法执行附录B。

7.4 检测时间间隔

封闭群实验用小型猪生产群每两年至少进行一次遗传质量检测。

附 录 A (规范性附录)

近交系实验用小型猪的微卫星 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

- A.2.1 常压电泳仪。
- A.2.2 4℃、-20℃冰箱。
- A.2.3 低温高速离心机。
- A.2.4 水浴锅。
- A.2.5 感量为0.0001g的分析天平。
- A.2.6 pH计。
- A.2.7 紫外分光光度仪。
- A.2.8 PCR仪。
- A.2.9 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℃, 4min; 94℃, 30s; 退火, 30s; 72℃, 30s, 30个循环，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1ul 混合，加到每孔含8.5ul 的甲酰胺和内标的96孔板上（860ul 甲酰胺加10ul 内标，混匀，分装到96孔板上），95℃变性5分钟，迅速放在冰上。待96孔板降温后，用铝箔纸包好，4℃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(见表A.2)，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、等位基因片段范围、荧光标记、两侧引物序列（左侧：F，右侧：R）、退火温度和镁离子浓度

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'	T _m /°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

表A.2 五指山小型猪近交系、广西巴马小型猪和贵州小型猪近交系培育过程中，遗传质量控制的微卫星座位及优势等位基因

群体	等位 基因	座位 CGA	等位 基因	座位 SW769	等位 基因	座位 SW857	等位 基因	座位 S0005	等位 基因	座位 SW240	等位 基因	座位 S0355	等位 基因	座位 SW72	等位 基因	座位 S0090	等位 基因	座位 S0218	等位 基因	座位 SW24
五指山小型猪近交系	189	0.023	105	0.093	150	0.163	238	0.671	116	0.171	258	0.750	106	0.588	241	0.756	173	0.012	104	0.631
	199	0.872	129	0.907	158	0.837			124	0.537	266	0.138	114	0.238	247	0.012	179	0.547		
	203	0.023															181	0.419		
	293	0.081																		
等位基因频率合计		1.000		0.907		1.000		0.671		0.707		0.888		0.825		0.756		0.547		0.631
广西巴马小型猪	271	0.490	123	0.194	146	0.146	216	0.223	94	0.531	258	0.083	110	0.698	241	0.032	167	0.115	102	0.750
	277	0.281	127	0.806	154	0.573	226	0.660	98	0.333	260	0.427	120	0.083	243	0.117	173	0.740	104	0.021
	297	0.229							104	0.115	262	0.427			247	0.489	179	0.125		
															249	0.117	187	0.021		
等位基因频率合计		1.000		1.000		0.719		0.883		0.979		0.854		0.781		0.606		0.854		0.750
贵州小型猪	271	0.011	105	0.291	156	0.167	202	0.558	96	0.227	252	0.183	102	0.170	247	0.045	181	0.151	100	0.114
	283	0.136	121	0.267	160	0.452	204	0.244	102	0.182	254	0.098			249	0.580	187	0.186	104	0.114
	285	0.364	129	0.093	166	0.202	214	0.186			272	0.110	112	0.625	253	0.375	195	0.023	108	0.216
	305	0.295	133	0.151							274	0.341	118	0.045			197	0.500	112	0.136
			139	0.081																
			145	0.116																
等位基因频率合计		0.795		0.907		0.821		0.988		0.409		0.732		0.841		0.955		0.709		0.466

附录 B (规范性附录)

封闭群实验用小型猪的微卫星 DNA 标记检测方法

B.1 基因组DNA的提取

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。

B.3 PCR扩增

B.3.1 PCR扩增的体系

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

扩增产物经过琼脂糖凝胶电泳检测确保扩增出目的片断后，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 $1\mu\text{L}$ 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断大小。每个位点的等位基因根据扩增片断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)、相称指数、平均杂合度 (H) 等。

B.5 结果判定

平均杂合度在 $0.5\sim 0.7$ 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 各微卫星座位的引物序列、染色体位置、最佳扩增条件、等位基因数及等位基因分布范围

位点	引物序列(5' -3')	所在染色体	镁离子浓 (mmol/L)	退火温 度 (℃)	等位基 因数	等位基因 范围
SW974	GGTGAAGTTTTGCTTTGAACC GAAAGAAATCCAAATCCAAACC	1	2.0	58	17	129-175
S0091	TCTACTCCAGGAGATAAGCCAGAT CAGTGACTCCATGCACAGTTATGA	2	1.5	55	14	96-174
SW240	AGAAATTAGTGCCTCAAATTGG AAACCATTAAGTCCCTAGCAAA	2	1.5	58	11	92-114
SW1066	GCAGGATGAACCAACCTG CTCTTGAGGCAACCTGCTG	3	2.0	60	19	166-214
SW1089	TTTCCCCTTCACTACCC GATCAAAGTCCCTTACTCCGG	4	1.5	58	10	142-190
S0005	TCCTTCCCTCCTGGTAAC TA GCACTTCTGATTCTGGGTA	5	2.0	54	11	204-244
SW1057	TCCCCTGTTGTACAGATTGATG TCCAATCCAAGTCCACTAGC	6	2.0	58	14	142-191
SW632	TGGGTGAAAGATTTCCCAA GGAGTCAGTACTTTGGCA	7	2.0	54	9	148-173
OPN	CCAATCTATTACGAAAAAGC CAACCCACTTGCTCCAC	8	2.0	59	12	138-170
SW29	AGGGTGGCTAAAAAGAAAGG ATCAAATCCTTACCTCTGCAGC	8	2.0	61	12	133-187
SW911	CTCAGTTCTTTGGGACTGAACC CATCTGTGGAAGAAAAAGCC	9	2.0	60	14	151-178
SW511	AAGCAGGAATCCCTGCATC CCCAGCCACCACTGAC	9	1.5	62	12	161-196
SWr158	TCCAATTCACTCCTGGCTC GAATGTGCACATACCACATGC	10	2.0	60	18	158-200
SW951	TTTCACTCTGGCACCAG GATCGTGCCCAAATGGAC	10	1.5	58	14	108-142
SW271	TTCCAGTGGCTTTCTGTGC CATTCATTCCCAGTGAACTTG	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	ACAGCCACCAACAGTGTGTTG GAACTTCCATATGCTGCAAGTG	13	2.0	62	16	98-256
S0007	TTACTTCTTGATCATGTC GTCCCTCCTCATAATTTCTG	14	2.0	54	15	142-192
SW857	TGAGAGGTACAGTTACAGAAGACC GATCCTCCTCCAAATCCCAT	14	2.0	58	16	129-173
SWr312	ATCCGTGCGTGTGTCAT CTGGTGGCTACAGTCCGAT	15	1.5	64	11	116-136
SW81	gatctggtcctgcacaggg GGGGCTCTCAGGAAGGAG	16	1.5	60	8	128-144
SWr1120	CAAAATGGAACCCATTACAGTCC ACTCCTAGCCAGGAGCTTC	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