

ICS

CCS 点击此处添加 CCS 号

DB 61 XX

陕 西 省 地 方 标 准

DB XX/T XXXX—XXXX

川金丝猴个体识别分子技术规程

Technical regulation for molecular techniques of individual
identification for *Rhinopithecus roxellana*

（征求意见稿）

— XX — XX 发布

XXXX — XX — XX 实施

陕西省市场监督管理局 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 样品的采集、保存与运输 1

5 分子标记的选择和应用 2

6 操作程序 2

7 个体识别判定 4

8 数据追溯与质量控制 4

9 污染防控与安全 4

附录 A（资料性） 川金丝猴微卫星标记..... 6

附录 B（资料性） DNA 提取主要试剂和设备 8

附录 C（资料性） 不同类型样品 DNA 提取预处理方法..... 9

附录 D（资料性） PCR 反应体系和程序 10

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由陕西省林业局提出并归口。

本文件起草单位：秦岭大熊猫研究中心（陕西省珍稀野生动物救护基地）、西北农林科技大学、陕西佛坪自然保护区管理局。

本文件主要起草人：王晓宇、咎林森、罗晓斌、高文、李安宁、成功、梅楚刚、马军权、贾康胜、游珊珊、何祥博、陈亮、徐光岚、侯佳、杜战锋、潘广林、李虎钺。

川金丝猴个体识别分子技术规程

1 范围

本文件规定了利用分子技术对川金丝猴（*Rhinopithecus roxellana*）的个体识别进行标准化操作的技术规程。

本文件适用于川金丝猴圈养种群管理及野外监测工作，可用于粪便、毛发、血液及组织等样品的分子水平个体识别与遗传多样性研究。

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。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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。

- SN/T 2123 出入境动物检疫实验样品采集、运输和保存规范
- GB/T 34796-2017 水溶液中核酸的浓度和纯度检测 紫外分光光度法
- GA/T 2157-2024 毛细管电泳遗传分析仪
- LY/T 2501-2015 野生动物及其产品的物种鉴定规范
- GB 19489-2008 实验室 生物安全通用要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

微卫星标记 **microsatellite marker**

基因组中由1~6个核苷酸为基本重复单元组成的DNA串联重复序列，也称短串联重复序列（Short Tandem Repeats, STR）或简单重复序列（Simple Sequences Repeats, SSR）。在个体间重复次数发生变化的多态性微卫星序列，可以作为微卫星标记，用于个体识别和遗传多样性分析。

3.2

遗传多样性 **genetic diversity**

种内的多样性，即种内个体之间或一个群体内不同个体的遗传变异总和。

3.3

基因分型 **genotyping**

利用分子生物学技术确定个体在一个或多个遗传标记位点上等位基因组成的过程。

4 样品的采集、保存与运输

样品的采集、运输和保存按照SN/T 2123《出入境动物检疫实验样品采集、运输和保存规范》执行。采集时应佩戴一次性PE手套并及时更换，以避免样品间的交叉污染。

4.1 样品采集保存

4.1.1 毛发样品采集保存

采集毛发需带毛囊，采集完成后置于冻存管并迅速放入液氮中储存。

4.1.2 粪便样品采集保存

粪便应采集新鲜的样品，对于圈养样品需先将目标个体转移到单间；对于野外样品需识别单元和个体，避免与其他个体混肴。收集到的粪便置于冻存管后迅速放入液氮中储存；或者将粪便置于离心管后加入无水乙醇，使其得到充分浸润。同一堆粪便可以采集3~5份样品。

4.1.3 血液样品采集保存

将川金丝猴保定，对采血部位进行局部消毒，使用一次性采血针沿静脉缓慢刺入血管，待血液流出后收集于不同需求的采血管内，0~4℃暂存。

4.2 样品运输方式

野外样品采集完成后应于3 d内送到实验室进行保存，并尽快进行DNA提取工作。

由于无水乙醇是易燃易爆的化学药品，相关样品运送过程中应注意防火，保持车内通风，避免挤压和撞击，防止溶液倾洒。

4.3 样品保存条件

无水乙醇中的样品可以室内常温保存；长期保存的DNA样品，应存于-80℃超低温冰箱中。

5 分子标记的选择和应用

对川金丝猴进行个体识别时，建议统一使用本文件推荐的已经过验证的分子标记。

5.1 线粒体标记

川金丝猴线粒体基因控制区部分序列PCR扩增引物如下，扩增序列长度为401 bp。

GH: 5' - AACTGGCATTCTATTAACTAC -3'

GL: 5' - ATTGATTTACGAGGATGGT -3'

5.2 性别鉴定标记

川金丝猴性别鉴定PCR扩增引物如下，雌性样品扩增得到211 bp一个片段，雄性样品扩增得到140 bp和211 bp两个片段。

ZFX: 5' - TTATGGTGAAAGCCAAGAA -3'

ZFY: 5' - GCAATTTTCAGCAACATCTAAG -3'

5.3 微卫星标记

进行川金丝猴个体识别工作时，在附录A 中的20个微卫星标记中选择使用。

6 操作程序

川金丝猴个体识别的实验流程图如图1所示。

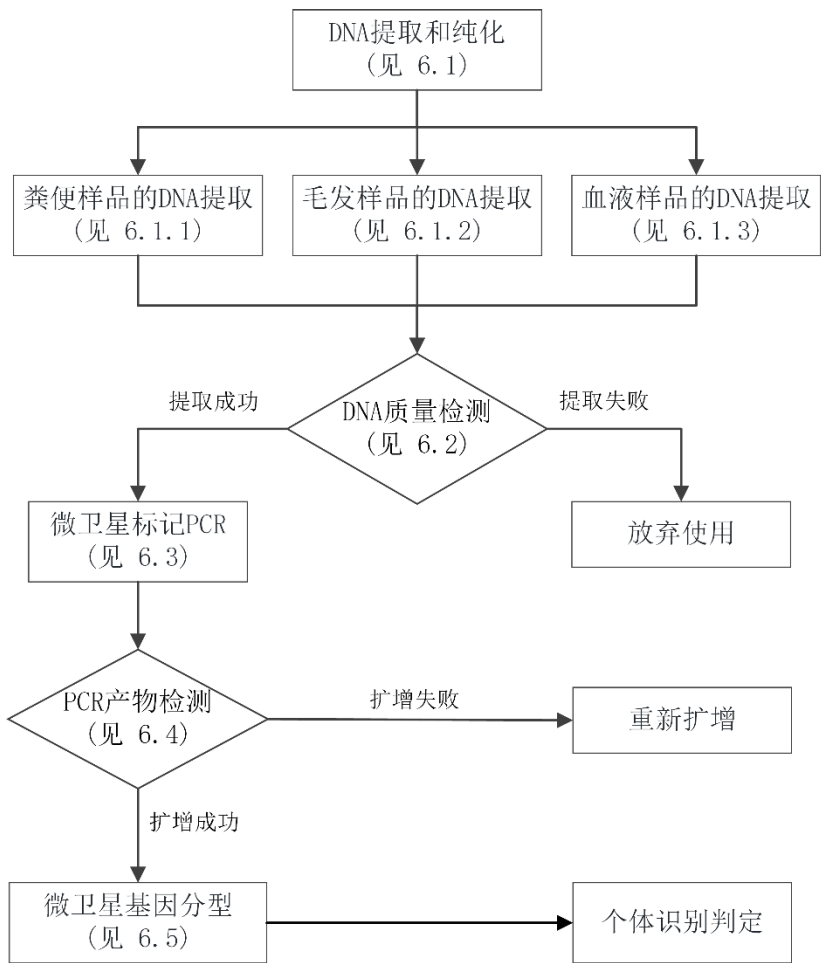


图1 川金丝猴个体识别的实验流程图

6.1 DNA 提取和纯化

DNA提取和纯化所需的主要试剂、设备见附录B。对于不同样品类型，建议采取针对性的预处理和提取方法（附录C）。

6.2 DNA 质量检测

DNA提取后，应对提取质量进行严格检测，以确保所有下游分析基于合格的DNA样品。

6.2.1 按照 GB/T 34796-2017《水溶液中核酸的浓度和纯度检测 紫外分光光度法》方法，使用微量分光光度计测定 DNA 浓度，并判定 DNA 纯度(OD260/OD280 比值应介于 1.7~2.0)。

6.2.2 使用 5.1 规定的线粒体标记引物和 5.3 规定的 1 号引物对每份提取获得的 DNA 样品进行扩增，两对引物均能扩增出目的片段的样品可以进行下一步分析。若两次 DNA 提取、两次 PCR 扩增均不成功的样品，说明该样品质量不合格，放弃后续使用。

6.3 微卫星标记 PCR

使用附录D提供的反应体系和扩增程序进行PCR实验。推荐粪便样品至少 5 管重复扩增，毛发/组织 3 管重复，对于异常位点须进行复检。

6.4 PCR 产物检测

取PCR产物3 μL,使用浓度为1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。如电泳条带清晰,片段大小符合预期,表明扩增成功,可用于基因分型;如PCR产物不符合要求,需重新进行扩增或放弃。

6.5 微卫星基因分型

参照GA/T 2157-2024《毛细管电泳遗传分析仪》要求,使用毛细管电泳遗传分析仪对扩增成功的微卫星PCR产物进行基因扫描分型,利用软件判读毛细管电泳结果,获取微卫星分型峰图和数值。

7 个体识别判定

用生物学软件对微卫星位点的分型数据进行个体识别。

当两份样品的微卫星标记分型结果完全一致时,判定样品来自同一个体;

当两份样品的微卫星标记分型结果中有两个及以上标记分型结果不同时,判定样品来自不同个体;

当两份样品的微卫星标记分型结果中只有一个标记差异时,对出现差异的位点进行重复PCR扩增和基因分型(2-3次),以进一步确认。重复扩增后,若两份样品的分型结果无差异,则判定样品来自同一个体;若仍存在标记差异,则认为两份样品来自不同个体。

8 数据追溯与质量控制

8.1 流程记录

川金丝猴个体识别分子技术应对全流程进行完整记录。记录内容包括:样品保存与运输条件;采样时间、地点、采样人员姓名、样本编号等采样相关信息;PCR 批次号、引物批次号、分型设备型号、判读软件及其版本等实验室检测信息。

8.2 质量控制要求

8.2.1 每批次检测应设置阳性对照、阴性对照及提取空白,以监控实验准确性与污染风险。

8.2.2 对低质量或稀少 DNA 样品应进行重复检测,对判定存在冲突结果的位点应进行复检确认。

8.2.3 采用统一型号和参数的分型分析平台,确保不同批次检测结果的一致性。

8.2.4 PCR、分型和数据分析等关键步骤应由经培训合格的专业技术人员执行。

9 污染防控与安全

9.1 实验室分区要求

参照LY/T 2501-2015《野生动物及其产品的物种鉴定规范》要求,将实验室分为前处理区、扩增区和分析区,并确保各区域物理隔离,人员、样品及物资不得逆向流动。各区应配备独立的实验用品、耗材及空气净化系统,以减少交叉污染风险。

9.2 生物安全管理

野外采样和实验室操作应符合GB 19489-2008《实验室 生物安全通用要求》中相应生物安全等级的规定，落实个人防护措施，包括佩戴手套、口罩、防护服等，并在样品处理、废弃物处置过程中采取防泄漏、防飞溅等防护手段。

9.3 质量及安全监督

污染防控和生物安全执行情况应纳入日常质量监督范围，出现污染或安全事件时应立即停止相关操作，启动溯源调查和整改程序，并形成书面记录。

附 录 A
(资料性)
川金丝猴微卫星标记

序号	标记名称	引物序列	重复单元	预期长度 (bp)	引物来源
1	RX1	F:CTCATGGGTAGAGCTAGGAAAT R:GTAGAGCGACCCATGTGTATG	AGAT	210	2017. 段燕梅
2	RX2	F:TGAAAGCTAGGGAACTGAGGT R:GCTTCCTGGCCTCTGTAATT	AGAT	215	2017. 段燕梅
3	RX3	F:TTTGGTTTTCGTCCTCGAGTT R:GCAGCAGAATTCACAGTTGC	AGAT	260	2017. 段燕梅
4	RX4	F:GCATTATGGGTCAACTGGCA R:CGTGGCCTTTTACTCCCAAAT	AGAT	217	2017. 段燕梅
5	RX5	F:TGAGGATTCAATGAGACAATGCT R:CTGTCTACCATCTATTCCATCA	GATA	208	2017. 段燕梅
6	RX6	F:TGCAATTTTCTTCAGGGGCT R:ACTGATTGCGGAAATGGTTAC	TCTA	210	2017. 段燕梅
7	RX7	F:CTCATGCCTTTATTCCGTGCA R:CTCACAGCAACCTCTGCCTTCT	ATAG	255	2017. 段燕梅
8	RX8	F:CATGAATTGCAGGATCCAGC R:TCCTCTCCGATGGTCTGTTC	ATAG	250	2017. 段燕梅
9	RX9	F:CAAAGTTGGTGAATTATGGGGAC R:GCATGTATGGTTCATTGATCACT	TCTA	245	2017. 段燕梅
10	RX10	F:ATGCTCTGATAATAGCCCTGCC R:GACTTCTTGGTTTCTCACTTG	GATA	215	2017. 段燕梅
11	RX11	F:ACTCTGATGGCAAGATCTGTATC R:TGGTCTCCAGTTCACAGACAGC	ATAG	215	2017. 段燕梅
12	RX12	F:TTACCTCCCCAAGTCCTTCC R:ATCAACCCTGCCACATCTT	GATA	250	2017. 段燕梅
13	RX13	F:GAGATCCCGCCACTACACTC R:CACTCGAGATCCACCCAAT	ATAG	220	2017. 段燕梅
14	RX14	F:CACACACATGCATACAAACA R:GGGGCTGCAATATTCAATGC	GATA	245	2017. 段燕梅
15	RX15	F:AGCCTCCATATAATGTGAGCCA R:TCATGCTCTGGTGTCTTCA	TCTA	250	2017. 段燕梅
16	RX16	F:GAGACTGTGGTGAGCTGTGA R:ACTGACTGGCTGATTGGAATTT	TAGA	216	2017. 段燕梅
17	RX17	F:GGCATCTCCTCTCTCTTGG R:TGTTGAGATGCACCACACAG	TCTA	228	2017. 段燕梅
18	RX18	F:GGTAAGCCGAGATCACACCA R:ATGCTAACACCATTTGCCCTC	ATAC	250	2017. 段燕梅

序号	标记名称	引物序列	重复单元	预期长度 (bp)	引物来源
19	RX19	F:AGAGAAACCGAACCGACAGA R:GTACCAGCTTGCTCATCTGC	TCTA	245	2017. 段燕梅
20	RX20	F:GGCCTAGACTGGAATTTGGT R:CAGTACTGGGAGTTATAAAGGGT	TAGA	250	2017. 段燕梅

附 录 B
(资料性)
DNA 提取主要试剂和设备

B.1 主要试剂

B.1.1 除非另有说明，在分析中所使用的试剂均为分析纯，所使用的水均为无菌水。

B.1.2 粪便基因组DNA提取试剂盒

B.1.3 血液/细胞/组织基因组DNA提取试剂盒

B.1.4 微量样品基因组DNA提取试剂盒

B.1.5 蛋白酶K

B.1.6 RNA酶A

B.1.7 DTT

B.1.8 DNA产物纯化试剂盒

B.1.9 胶回收试剂盒

B.1.10 Ex Premier DNA Polymerase (DNA扩增酶及其预混液)

B.1.11 琼脂糖

B.1.12 50×TAE缓冲液

B.1.13 MxSafe核酸染料

B.2 仪器设备

B.2.1 单道可调移液器

B.2.2 采血管离心机

B.2.3 涡旋混匀器

B.2.4 低速常温离心机

B.2.5 低温研磨仪

B.2.6 高速冷冻离心机

B.2.7 恒温震荡金属浴

B.2.8 PCR仪

B.2.9 电子天平

附 录 C
(资料性)
不同类型样品 DNA 提取

C.1 粪便样品预处理及 DNA 提取

对于低温保存的样品，提取DNA时，须在低温条件下将样品磨碎，加入裂解液后进行提取；对于无水乙醇保存的样品，混匀后倒出含有样品DNA的乙醇悬浮液，离心后弃上清，依次加入乙醇和无酶无菌水进行洗涤，弃上清后收集消化道上皮脱落细胞，加入裂解液后进行提取。

后续流程使用粪便DNA提取专用试剂盒，具体方法参考对应的试剂盒说明书。

C.2 毛发样品预处理及 DNA 提取

对于包含毛囊的毛发，加入组织抽提液(50 mmol/L Tris-Cl (pH 8.0), 100 mmol/L EDTA (pH8.0), 100 mmol/L NaCl, 1% SDS)，蛋白酶K和DTT，充分混匀后，56℃裂解1 h后使用试剂盒进行提取。对于不含毛囊的毛发，使用低温研磨仪60 Hz, 2个循环研磨后再进行裂解步骤。

后续流程使用微量样品基因组DNA提取试剂盒进行提取，具体方法参考对应的试剂盒说明书。

C.3 血液样品 DNA 提取

血液样品使用血液基因组DNA提取试剂盒，具体方法参考对应的试剂盒说明书。

附 录 D
(资料性)
PCR 反应体系和程序

D.1 反应体系:

2× PCR mix	10 μL
引物-F(10 p pmol/μL)	0.5 μL
引物-R(10 pmol/μL)	0.5 μL
模板DNA(50 ng/ μL)	0.4 μL
ddH ₂ O	8.6 μL
合计	20 μL

D.2 PCR 扩增程序:

95℃ 5 min后进行32个循环, 每个循环为94℃ 25 s, 50~58℃ 25 s, 72℃ 35 s, 循环结束后72℃ 10 min, 4 ℃ 10 min。其中50~58℃ 为不同引物退火温度不同的可选温度范围。

参 考 文 献

- [1] 段燕梅. 秦岭金丝猴 (*Rhinopithecus roxellana*) 基因组微卫星位点的筛选及亲子鉴定 [D], 2017.
- [2] 何丽. 川金丝猴 (*Rhinopithecus roxellana*) 遗传学与栖息地分析 [D], 2010.
- [3] 蔡延森. 川金丝猴微卫星标记系统的建立和优化及两种组织的甲基化组分析 [D], 2021.