

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

朱鹮种群遗传档案建立技术规程

Technical regulation for crested ibis population genetic archives

(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 3

2 规范性引用文件 3

3 术语和定义 3

4 样品收集与储存 4

5 样品 DNA 提取 4

6 遗传标记的选择和应用 5

7 实验流程 5

8 种群遗传档案编制 7

附录 A（资料性） 主要试剂和仪器设备..... 8

附录 B（资料性） 样品 DNA 预处理方法..... 10

附录 C（资料性） 朱鹮微卫星标记..... 11

附录 D（资料性） 朱鹮遗传学样品采集记录表..... 12

参考文献 13

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、榆林市横山区林业局。

本文件主要起草人：王晓宇、咎林森、张军风、罗晓斌、高文、李安宁、成功、梅楚刚、邱菊、游珊珊、刘功炜、徐光岚、侯佳、董荣、李艳、杜战锋、李虎铖。

朱鹮种群遗传档案建立技术规程

1 范围

本文件规定了朱鹮遗传学样品的收集、存储，DNA提取，遗传标记的应用，性别鉴定，个体识别，亲缘关系鉴定，种群遗传多样性评估，以及种群遗传档案建立的技术要求和操作流程。

本文件适用于人工繁育及野生朱鹮种群遗传档案的建立与管理。

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 5458 液氮生物容器

GB/T 43650-2024 野生动物及其制品DNA物种鉴定技术规程

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

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

遗传多样性 genetic diversity

一个群体内所有生物所携带的遗传信息的总和，反映物种或种群内部个体之间的遗传差异。

3.2

遗传标记 morphological markers

遗传标记是指能够用以区别生物个体或群体及其特定基因，并能稳定遗传的物质标志。

3.3

DNA 样品 DNA samples

利用朱鹮组织（如毛发、血液、肌肉组织等）或粪便提取的朱鹮基因组脱氧核糖核酸（DNA）样品。

3.4

微卫星标记 microsatelliter marker

微卫星是指以几个核苷酸（2 ~6 bp）为单位，多次串联的重复序列，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，可作为微卫星标记使用。

3.5

个体识别 individual identification

采用微卫星多态技术，判断前后两次或多次出现的生物学检材是否属于同一个体，从而确认个体身份。

4 样品收集与储存

4.1 样品收集

样品收集时应佩戴一次性手套，并消毒采样工具，不同个体或不同类型样品应分别采集和包装，防止交叉污染。

4.1.1 羽毛样品收集

带毛囊羽毛：采集背、翅的羽毛放入无菌样品袋中。

不带毛囊羽毛：采集自然脱落的羽毛应先明确来自于某一特定个体，收集于无菌样品袋中。

4.1.2 粪便样品收集

将无菌塑料膜覆盖在长2 m，宽1.5 m，高3 cm的收集盘上，放在栖架或者巢下方，待朱鹮排便后，将收集盘取出，并迅速将粪便转移至冻存管中，并投入液氮罐中储存。每次采集粪便前需更换无菌塑料膜。

4.1.3 血液样品收集

对采血部位进行局部消毒后，用采血针沿静脉缓慢刺入血管，待血液流出后收集在采血管内，低温储存。

4.1.4 其他样本收集

除羽毛、粪便、血液样本外，根据可得性，选择口腔拭子、胚胎、组织（病亡个体）样品，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。

4.1.5 样品收集频次

样品收集频次与时间应结合朱鹮繁殖季节和野外巡护周期进行，建议每年繁殖季后进行一次全面采样，重大种群事件（引入、放归、疾病暴发等）前后需额外采样。

4.2 样品标记

规范化标记样品编号，详细记录样品信息，确保样品可追溯。

4.3 样品保存

4.3.1 采集的样品应注明样品来源地点、类型、编号、物种信息、采样日期、采集经手人姓名等。

4.3.2 低温条件下保存的样品，使用液氮罐进行运输，应符合 GB/T 5458《液氮生物容器》要求。

4.3.3 样品采集完成后应尽快送到相关实验室保存，并完成 DNA 提取工作。

5 样品 DNA 提取与保存

5.1 样品 DNA 提取

对不同的样品类型采取针对性的预处理方法和提取方法。提取流程参照GB/T 43650—2024 《野生动物及其制品DNA物种鉴定技术规程》，主要试剂和仪器设备见附录A，DNA提取步骤见附录B。

5.2 样品 DNA 保存

一个月内使用的DNA样品，可保存于-20℃冰箱中。长期保存的DNA样品，应保存于-80℃超低温冰箱中。

6 遗传标记的选择和应用

对朱鹮进行种群遗传管理时，建议统一使用本标准规定的遗传标记。

6.1 线粒体标记

朱鹮线粒体细胞色素b（Cyt b）基因序列PCR扩增引物如下，扩增序列长度为308 bp。

mtDNA Cytb L14841: 5'-AAAAAGCTTCCATCCAACATCAGCATGATGAAA-3'

mtDNA Cytb H15149: 5'-AAACTGCAGCCCTCAGAATGATATTTGGTCCTCA-3'

6.2 性别鉴定标记

朱鹮性别鉴定PCR扩增引物如下，雌性样品扩增得到552 bp和353 bp两个片段，雄性样品扩增得到552 bp一个片段。

2467F: 5'-CGTCAGTTTCCCTTTCAG-3'

2530R: 5'-CCAGTGCTTGTTTCCTCA-3'

6.3 微卫星标记

使用朱鹮微卫星开展遗传管理相关工作时，建议在已验证的18个微卫星标记中选择使用（附录C）。

7 实验流程

朱鹮种群遗传档案建立的实验流程如图1所示。

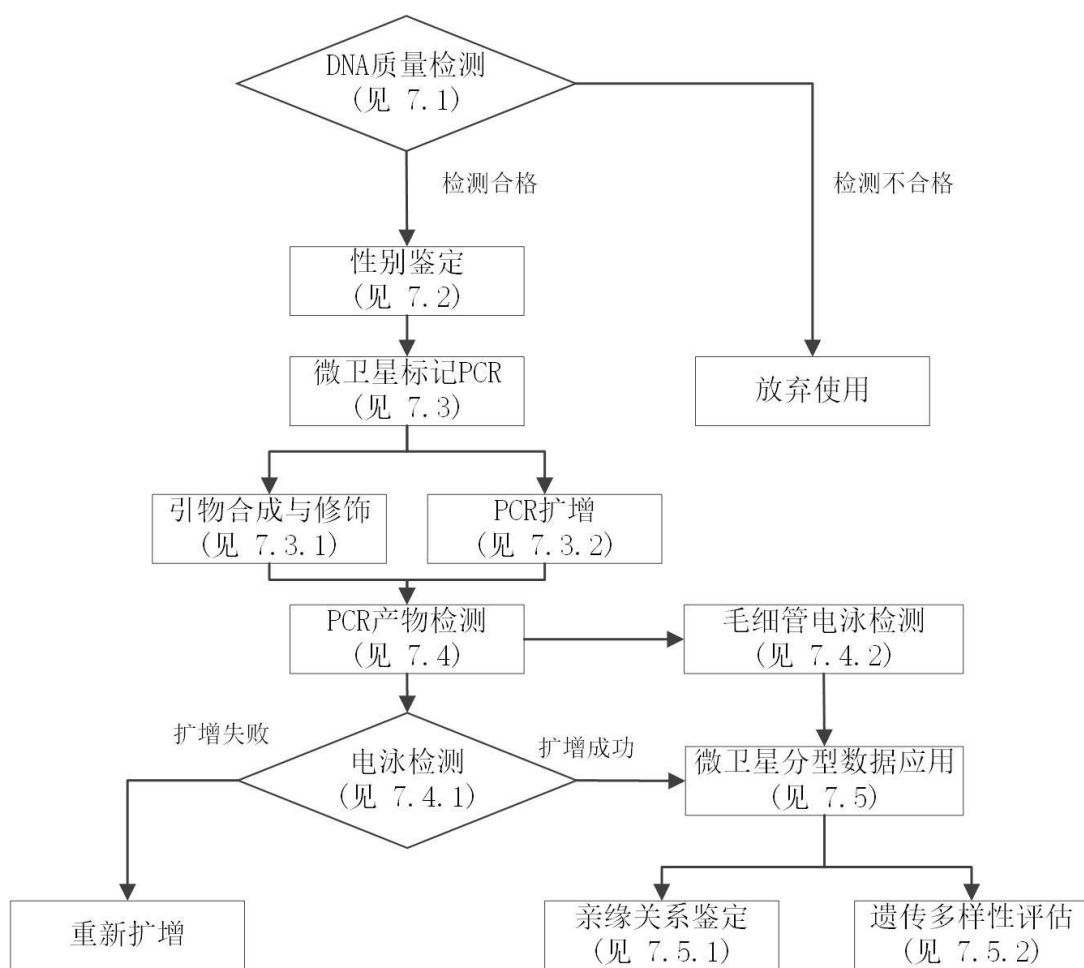


图1 朱鹮种群遗传档案建立的实验流程图

7.1 DNA 质量检测

7.1.1 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。

7.1.2 使用 6.1 规定的线粒体标记引物和 6.3 规定的 1 号引物对提取获得的每个 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,应放弃使用。

7.2 性别鉴定

使用 6.2 规定的性别鉴定分子标记引物对不同个体的 DNA 样品进行 PCR 性别鉴定。

7.3 微卫星标记 PCR

7.3.1 引物合成与修饰

使用附录 C 提供的微卫星引物序列进行合成,是否进行荧光标记由所选毛细管电泳仪而定。

7.3.2 PCR 反应体系和反应程序

PCR所需主要试剂和仪器设备见附录A。

反应体系：

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

PCR扩增程序：

95℃预变性15 s后进行35个循环，每个循环为98℃ 10 s，55~65℃ 5 s，72℃ 15 s，循环结束后72℃ 5 min，4℃ 10 min。其中55~65℃为不同引物退火温度不同的可选温度范围。

7.4 PCR 产物检测

7.4.1 电泳检测

取PCR产物3 μL，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。

7.4.2 毛细管电泳检测

使用基因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，检测各样本等位基因数，获取扩增产物片段长度。如毛细管电泳结果信号差，则重新进行PCR扩增后再进行检测。

7.5 微卫星分型数据应用

7.5.1 亲缘关系鉴定

DNA 亲缘关系鉴定中，如果子代的微卫星位点和被测试父母代的位点（至少1个）不一致，那么该子代便100%被排除亲子关系之外。如果子代与其父母代的微卫星位点完全吻合，可得出亲缘关系大于99.99% 的可能性，即证明他们之间存在亲子关系。

7.5.2 遗传多样性评估

利用遗传学分析软件对微卫星分型数据进行分析，揭示种群遗传结构和多样性，并分析个体之间或群体平均亲缘关系值、近亲繁殖系数等。

8 种群遗传档案编制

8.1 档案更新时间

朱鹮种群遗传档案在每年度繁殖季结束后更新，重大种群变更后须重新评估种群遗传结构，并根据需要更新档案中的分析报告。

8.2 档案内容

8.2.1 样品信息及实验数据

包含朱鹮遗传学样品采集信息、性别鉴定数据以及微卫星分型数据。

8.2.2 种群谱系

应包括种群中所有个体的谱系记录，种群规模、种群繁殖率、种群增长率等内容。

8.2.3 种群遗传学分析

应包括等位基因多样性，有效种群大小，杂合度，近亲繁殖系数，种群平均亲缘关系等分析内容。

8.3 遗传档案数据的管理和使用

对笼养朱鹮或野生朱鹮进行个体识别、亲子鉴定、性别鉴定、遗传档案建立和种群遗传多样性评估、种群遗传管理时，应统一使用本标准规定的分子标记；获得的所有数据要汇总建立朱鹮遗传档案数据库。

附 录 A (资料性) 主要试剂和仪器设备

A.1 主要试剂

A.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。

A.1.2 粪便基因组DNA提取试剂盒

A.1.3 血液/细胞/组织基因组DNA提取试剂盒

A.1.4 微量样品基因组 DNA 提取试剂盒

A.1.5 蛋白酶K

A.1.6 RNA酶A

A.1.7 DTT

A.1.8 DNA产物纯化试剂盒

A.1.9 胶回收试剂盒

A.1.10 DNA扩增酶及其预混液

A.1.11 琼脂糖

A.1.12 50×TAE缓冲液

A.1.13 MxSafe核酸染料

A.1.14 10×loading buffer (上样缓冲液)

A.1.15 DNA分子量标准品DL2000 DNA Marker

A.2 仪器设备

A.2.1 单道可调移液器

- A. 2. 2 采血管离心机
- A. 2. 3 涡旋混匀器
- A. 2. 4 低速常温离心机
- A. 2. 5 低温研磨仪
- A. 2. 6 高速冷冻离心机
- A. 2. 7 恒温震荡金属浴
- A. 2. 8 PCR仪
- A. 2. 9 电子天平
- A. 2. 10 电泳仪

附 录 B
(资料性)
样品 DNA 预处理方法

B.1 说明

DNA提取按照样品的不同类型，可选用不同的试剂盒或提取方法，本文件给出粪便样品和羽毛样品的预处理方法。

B.2 粪便样品 DNA 提取

B.2.1 试剂盒

本文件采用的粪便样品DNA提取试剂盒为粪便基因组DNA提取试剂盒，所有离心步骤在室温(15-25℃)下，12 000 rpm进行。如果离心机转速不能达到12 000 rpm，则需增加离心时间。

B.2.2 粪便样品预处理

对于低温保存的样本，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；对于酒精保存的样本，混匀后倒出含有样本DNA的酒精悬浮液，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。

B.3 羽毛样品 DNA 提取

B.3.1 试剂盒

本标准采用的羽毛样品DNA提取试剂盒为微量样品基因组DNA提取试剂盒，所有离心步骤在室温(15-25℃)下，12 000 rpm进行。如果离心机转速不能达到12 000 rpm，则需增加离心时间。

B.3.2 羽毛样品预处理

对于包含毛囊的羽毛，加入抽提液(50 mmol/L Tris-Cl(pH 8.0), 100 mmol/L EDTA(pH8.0), 100 mmol/L NaCl, 1%十二烷基磺酸钠)，蛋白酶K和DTT，充分混匀后，56℃裂解1小时后使用试剂盒进行提取。对于不包含毛囊的羽毛，使用低温研磨仪60 Hz, 2个循环研磨后再进行裂解步骤。

附 录 C
(资料性)
朱鹮微卫星标记

序号	标记名称	引物序列	重复单元	预期长度 (bp)	引物来源
1	NN5-1	F: GCATTGAATTTGTGCAAAATCACCCA R: TTCTCCATCCTTGGTGCTGAACAG	(ATGAT) 6	108-113	孙力, 2018
2	NN5-3	F: AGCCTGTGTTTAAAGAGGTAGGCA R: AGGTGGAATGAAAAGTAACTGTTTGGA	(AAACA) 5	93-98	孙力, 2018
3	NN4-3	F: ACCCATTCAGTCACATTACATGGGA R: GGAAAAACGTTGCTGTTTCCCCAA	(AAAC) 6	122-126	孙力, 2018
4	NN4-4	F: TCATACCGTTCAATGTTGAGCGT R: AGAAACAATGGAGGTGCAACAGGT	(CCTT) 5	154-158	孙力, 2018
5	NN4-5	F: ACTGCCTTAGAGGGACATGTCAGA R: AGATTCTCTCTTGAGCTGGTTTTGGG	(CAA) 8	145-149	孙力, 2018
6	NN4-8	F: ACCAAATGTGTGTCAAAAATACATGGT R: AGCCAGAATGTTGAAGCCATAAGG	(TATC) 5	218-222	孙力, 2018
7	NN4-12	F: GCGGGGTTTTTCAGCTTCTTTGTTT R: GCCAATTAACCAATCTCCAGGCT	(GTTT) 6	147-151	孙力, 2018
8	NN4-13	F: CAAGCACTGGGGTTTCTTTTGGT R: GTGTGATGTGTGGGTATGCAATGC	(TTTG) 4	151-155	孙力, 2018
9	NN3-2	F: AGCCCAATAAACTCTTTGCGCAG R: GAGGAACCTGAAAAGAATCCATCCTGT	(ATC) 7	109-112	孙力, 2018
10	NN3-3	F: CGGCTGAGTAGGAAGAGGAGGATT R: CTTGGACCACGTAGAGCTGGAAG	(AGG) 4	147-150	孙力, 2018
11	NN3-5	F: CCCTGAAAACCTTTAGGCTGAAAGCT R: TGTGATATCCTTGGTGTGGTGTG	(ACA) 6	120-126	孙力, 2018
12	NN3-7	F: CTGCTTGCAAAGAACGTTTTTGC R: ATTCTGCGGTTTATTGCCAAGGC	(ACA) 5	141-144	孙力, 2018
13	NN25	F: TCCAGCTACTCACTTCTTTCGG R: ATAGATACCCAGGCATTCAGG	(AAAC) 8	166-178	何陆平, 2007
14	NN03	F: GATCAACGAACAACCCAA R: CATACGGAAGAAACCTCA	(CA) 13	297-303	何陆平, 2007
15	NN04	F: GTTCTTCTGTGCCATCC R: ATGCCTTGCATTATTGCTT	(CA) 2TA (CA) 11 C (CA) 2	211-213	何陆平, 2007
16	NN12	F: TTTCTTCTCTGTGAGCTCTTG R: GTGCTCTGCACCTTCACCTTC	(GT) 19	239-243	何陆平, 2007
17	NN17	F: CTGGATGTAGGCTTGCTGGTG R: AAGGGGCTGGTTAGTGATAGGG	(GT) 11	285-289	何陆平, 2007
18	NN21	F: CCAGCCTCCTATCCTAATCTAATCG R: GAGCCAATCTGTTCCAGTCTCCTT	(GA) 12	175-185	何陆平, 2007

附 录 D
(资料性)
朱鹮遗传学样品采集记录表

序号	物种	样本类型	采样编号	环志号	采样日期	采样地点	新鲜程度	数量	采样人	备注
1	朱鹮	粪便	FB-ZH-001	5919	2025. 3. 20	楼观台	1 天	5		

参 考 文 献

- [1] 何陆平. 朱鹮多态性微卫星位点的筛选及物种的遗传多样性研究 [D], 2007.
- [2] 张永德. 朱鹮人工饲养种群的DNA多态性研究 [D], 2004.
- [3] 孙力. 朱鹮配偶选择机制研究 [D], 2019.
- [4] 李婉涛, 赵淑娟, 李春丽. 动物遗传学 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2022.