**中国畜牧业协会团体标准**

**T/CAAA XXXX-2018**

2018××-××实施

2018××-××发布

中国畜牧业协会 发布

T/CAAA

德州驴DNA亲子鉴定技术规程

Technical Specification for DNA Parentage Identification in DEZHOU Donkey

DB65

ICS

中国标准文献分类号

前 言

本标准根据GB/T 1.1—2000《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》相关要求制定。

本标准由中国畜牧业协会提出。

本标准由 全国畜牧业标准化技术委员会 归口。

本标准主要起草单位：东阿阿胶股份有限公司、中国农业大学、中国农业科学院北京畜牧兽医研究所、山东农业科学院奶牛研究中心、山东东阿黑毛驴牧业科技有限公司。

本标准主要起草人：张新浩、赵春江、李海静、嵇传良、周祥山、杨莉、张莉、王长法、王敏、吕鑫、刘宇、崔冉、韩思勇、胡元岭、赵志超。

德州驴DNA亲子鉴定技术规程

1 范围

本标准规定了德州驴DNA亲子鉴定的技术方法及结果分析等内容。

本标准适用于德州驴亲子鉴定。

1. 规范性引用文件

下列文件中的条款对于本标准是必不可少的。凡是标注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本标准。凡是不标注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法

GA/T 383 法庭科学DNA实验室检验规范

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

SN/T 1119-2002 进口动物源性饲料中牛羊源性成分检测方法PCR方法

1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

亲子鉴定 parentage identification

利用分子遗传学、生物学及医学的理论和技术判断亲代与子代是否具有血缘关系。

3.2

微卫星DNA标记 DNA microsatellite

又称为短串联重复序列(short tandem repeats, STRs)或简单重复序列（simple sequence repeats），是分布于真核生物基因组中的简单重复序列，由2～6个核苷酸的串联重复片段构成。重复单位的重复次数在个体间呈高度变异性并且数量丰富。

1. 鉴定原理

根据微卫星DNA的侧翼保守序列设计荧光标记引物，通过多重PCR技术扩增不同个体的微卫星DNA位点。通过分型技术检测微卫星DNA标记的遗传多态性。分析亲代个体和子代个体各微卫星标记的基因型是否相符，以达到鉴定亲子关系的目的。

1. 主要试剂配置及器材

5.1试剂

5.1.1 乙二胺四乙酸二纳（EDTA），分析纯

5.1.2 乙醇（Ethanol），分析纯

5.1.3 异丙醇（Isopropanol），分析纯

5.1.4 氢氧化钠（NaOH），分析纯

5.1.5 冰醋酸（CH3COOH），分析纯

5.1.6 十二烷基硫酸钠（SDS），分析纯

5.1.7 氯化钠（NaCl），分析纯

5.1.8 乙酸钾（CH3COOK），分析纯

5.1.9 琼脂糖（Agarose）

5.1.10 盐酸（HCl），分析纯

5.1.11 溴酚蓝（BPB），分析纯

5.1.12 二甲苯（FF），分析纯

5.1.13 蔗糖（Sucrose），分析纯

5.1.14 缓冲液

a、血液裂解缓冲液（Buffer A）：100 mM Tris-Hcl（PH 7.5），100 mM EDTA，100 mM氯化钠，0.5 % SDS；

b、蛋白沉淀缓冲液（Buffer B）：200 ml 5 M CH3COOH，500 ml 6 M LiCl；

c、DNA溶解缓冲液（TE）：10 M Tris-HCl，

d、电泳缓冲液 50×TAE：2 M Tris-base，1 M 冰乙酸，0.1 M EDTA（PH 8.0）；

除另有规定外，标准中所使用试剂均为分析纯，水为参见GB/T 6682的双蒸水；高压灭菌条件为：1.034×105 Pa、121 ℃、20 min。

e、琼脂糖电泳缓冲液：0.25 %溴酚蓝，0.25 %二甲苯菁FF，40 %的蔗糖水溶液。

5.2 器材

5.2.1 单道可调移液器 2.5 μl，10 μl，100 μl，200 μl，1000 μl，5 ml

5.2.2 离心机，最高转数14000 r/min

5.2.3 电子天平，可精确到0.001 g

5.2.4 旋转混匀器

5.2.5 PCR扩增仪 0.2 ml×96 孔

5.2.6 恒温水浴锅

5.2.7 蛋白质核酸分析仪

5.2.11 微波炉

5.2.12 冰箱

5.2.13 高压灭菌锅，温度范围45℃~135 ℃，最大压力0.255 Mpa

1. 亲子鉴定规程

6.1 样本采集

使用EDTA抗凝管静脉采集血样2 ml~5 ml或带有毛囊的毛发，4 ℃或-20 ℃保存。

6.2 DNA提取

采用试剂盒法从全血中提取基因组DNA。具体方法参见附录A。DNA提取操作的注意事项参见SN/T 1193-2002。

6.3 引物序列

本标准中采用微卫星位点均采用国际动物遗传协会（ISAG）推荐及在德州驴上已被证实存在多态性的位点，包括13个位点：AHT4、HMS6、ASB23、HTG10、HMS3、HMS2、HTG7、HMS7、HMS18、TKY343、TKY312、TKY337、TKY297，引物序列及标记参见附录B。

6.4 微卫星标记扩增

6.4.1 多重PCR反应体系

采用多重PCR的方法扩增上述位点，分3次PCR反应。25 μl反应体系：SuperMix10 μl、10 μmol/L引物（扩增组合）各1 μl、待测个体DNA模板1 μl，加双蒸水至25 μl反应体系。

6.4.2 扩增条件

95 ℃预变性10 min，95 ℃变性30 s，55 ℃~60 ℃退火30 s（详见附录B），72 ℃延伸30 s，30个循环，72 ℃延伸10 min。

6.4 基因型检测

采用全自动DNA分析仪扫描电泳结果，根据荧光标记产物的大小确定上述13个微卫星位点的基因型。分析中设置基因型已知的对照样本。

6.5 基因型表示方法

基因型采用字母法表示，在检测的微卫星位点中，等位基因为奇数的，片段长度居中的基因型标记为“M”；如果等位基因数为偶数，居中的两个基因型中片段较小的定义为“M”，其他片段的基因型按长度对照“M”左右排列。

6.6 亲子关系判定

根据两亲代及子代的基因型判断其是否存在亲子关系，对于亲代和子代基因型不符的个案，重新采样鉴定，两次结果一致可排除亲子关系。

6.7 结果对比表

参见附录C

1. 检测过程中防止交叉污染的措施

按照SN/T 1193-2002的规定执行。

附录A

（资料性附录）

从血液或精液中提取DNA

A.1 规定了血液基因组DNA提取

血液基因组DNA提取步骤

A.1.1 用移液器吸取100 μl EDTA抗凝血转入1.5 ml离心管中并做好标号。

A.1.2 加入400 μl血液裂解缓冲液（Buffer A）充分混匀。

A.1.3 将离心管用封口膜封口后，65 ℃水浴4 h，期间每隔0.5 h颠倒混匀一次。

A.1.4 加入800 μl 蛋白沉淀缓冲液（Buffer B），颠倒混合后置于冰上10 min。

A.1.4 用高速离心机在室温条件下12000 r/min离心15 min。

A.1.5 吸取上清液于新的1.5 ml离心管中，注意不能吸到沉淀层。

A.1.6 加入600 μl异丙醇，颠倒混匀。

A.1.7 常温12000 r/min离心15 min。

A.1.8 弃上清液，用70 %乙醇清洗2次，室温静置5 min。

A.1.9 加入100 μl TE缓冲液，溶解30 min。

A.1.10 采用1 %琼脂糖凝胶电泳检测提取DNA质量；采用蛋白质核酸分析仪测定DNA浓度。

A.1.11 短期内使用可4 ℃保存。-20 ℃可保存6个月以上。

附录B

（资料性附录）

微卫星基因座及其引物序列

B.1 规定微卫星基因座及其引物序列

表B.1 微卫星基因座及其引物序列表

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 基因座 | 引物序列（5'-3'） | 退火温度（℃） | 片段范围（bp） |
| AHT4 | AACCGCCTGAGCAAGGAAGTGCTCCCAGAGAGTTTACCCT | 60 ℃ | 140 bp~160 bp |
| HMS7 | CAGGAAACTCATGTTGATACCATCTGTTGTTGAAACATACCTTGACTGT | 60 ℃ | 167 bp~187 bp |
| HMS6 | GAAGCTGCCAGTATTCAACCATTGCTCCATCTTGTGAAGTGTAACTCA | 60 ℃ | 154 bp~170 bp |
| ASB23 | CTGGTGGGTTAGATGAGAAGTCGCAAGGATGAAGAGGGCAGC | 60 ℃ | 176 bp~212 bp |
| HTG10 | CAATTCCCCCCCCACCCCCGGCATTTTTATTCTGATCTGTCACATTT | 60 ℃ | 83 bp~110 bp |
| HTG7 | CCTGAAGCAGAACATCCCTCCTTGATAAAGTGTCTGGGCAGAGCTGCT | 60 ℃ | 114 bp~128 bp |
| HMS3 | CCAACTCTTTGTCACATAACAAGACCATCCTCACTTTTTCACTTTGTT | 60 ℃ | 146 bp~170 bp |
| HMS2 | ACGGTGGCAACTGCCAAGGAAGCTTGCAGTCGAATGTGTATTAAATG | 60 ℃ | 215 bp~236 bp |
| TKY343 | TAGTCCCTATTTCTCCTGAGAAACCCACAGATACTCTAGA | 55 ℃ | 140 bp~160 bp |
| HM18 | CAACAATGAAAATTTGTCCTGTGCGTAAATGAGTAGACAATCATGAGG | 55 ℃ | 170 bp~200 bp |
| TKY312 | AACCTGGGTTTCTGTTGTTGGATCCTTCTTTTTATGGCTG | 55 ℃ | 100 bp~110 bp |
| TKY337 | AGCAGGGTTTAATTACCGAGTAGATGCTAATGCAGCACAG | 55 ℃ | 160 bp~170 bp |
| TKY297 | GTCTTTTTGTGCCTCTGGTGTCAGGGGACAGTGGCAGCAG | 55 ℃ | 210 bp~240 bp |

附录C

亲自关系对比图

C.1规定德州驴亲子关系对比图

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 驴号 | AHT4 | HMS6 | ASB23 | HTG10 | HMS3 | HMS2 | HTG7 | HMS7 | HMS18 | TKY343 | TKY312 | TKY337 | TKY297 | 鉴定结果 |
| 189(父) | E/N | J/K | R/S | N | P/Q | K/M | I/L | I/J | Q/S | K/L | J | H | L/P |  |
| 324（母） | J/M | J | N | M/O | N/P | R | I/L | I | Q/W | K/M | J/K | H | G/O |  |
| 324（驹） | E/J | J | N/R | N/O | P | M/R | I/L | I/J | Q | K/M | J | H | O/P | 亲子关系相符 |