ICS 65.020.30
CCS B 41

DB53

云 南 省 地 方 标 准

DB53/T 1058—2021

滇金丝猴个体识别分子技术规程

Regulation of molecular techniques of individual identification for *Rhinopithecus bieti*

2021－09－30 发布　　2021－10－14 实施

云南省市场监督管理局　发布

目　　次

前言……III
1　范围……1
2　规范性引用文件……1
3　术语和定义……1
4　原理……2
5　操作程序……2
5.1　样品制备及 DNA 提取……2
5.2　DNA 质量检测……2
5.3　DNA 保存……2
5.4　微卫星标记……2
5.5　微卫星标记 PCR……2
5.6　微卫星基因分型……3
6　个体识别……3
附录 A　（规范性）　滇金丝猴个体识别微卫星标记信息表……4
附录 B　（规范性）　主要试剂及仪器设备……5
附录 C　（规范性）　脱氧核糖核酸样品（DNA）样品的提取……7
附录 D　（规范性）　PCR 反应……9

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。

本文件由云南省林业与草原局、云南省市场监督管理局共同提出。

本文件由云南省林业标准化技术委员会（YNTC02）归口。

本文件主要起草单位：云南大学、云南省标准化研究院。

本文件主要起草人：于黎、黄艳梅、李依恬、朱勋程、徐志茹、李迅、胡靖扬、吴宏、匡卫民。

滇金丝猴个体识别分子技术规程

1 范围

本文件规定了滇金丝猴（*Rhinopithecus bieti*）个体识别分子技术的原理、操作程序、个体识别。

本文件适用于滇金丝猴个体识别、遗传多样性评估、群体历史评估和遗传档案建立。

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。

本文件没有规范性引用文件。

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

基因组中的简单串联重复脱氧核糖核酸（DNA）片段，含短串联重复序列（Short tandem repeats，STR）和简单重复序列（Simple sequence repeats， SSR）。在个体间重复次数发生变化的多态性微卫星位点，可以作为微卫星标记使用。

3.2

微卫星序列 microsatellite sequence

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，也称为短串联重复序列或简单重复序列。

3.3

脱氧核糖核酸样品 DNA samples

利用滇金丝猴组织（如毛发、血液、肌肉组织等）或新鲜粪便提取的滇金丝猴基因组脱氧核糖核酸（DNA）样品。

3.4

聚合酶链式反应 polymerase chain reaction（PCR）

以一对寡核苷酸引物、四种脱氧核糖核苷酸(dNTPs)为原料，在合适的温度、离子条件和耐热DNA聚合酶催化下，在体外人工合成特异的DNA片段的过程。

3.5

微卫星基因分型 microsatellite genotyping

对样品进行微卫星位点PCR扩增后，利用自动化毛细血管电泳技术测定个体基因型。

3.6

微卫星个体识别 microsatellite individual identification

采用微卫星多态性技术，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。采用微卫星多态性技术进行个体识别，以确认个体身份。

3.7

微卫星特异性引物 microsatellite specific primers

用于滇金丝猴微卫星分子鉴定选用的一套微卫星引物，具有多态性、稳定性和重复性。

4 原理

微卫星广泛分布于动物基因组的不同位置，微卫星位点具有高度的遗传多态性，微卫星标记具有高度的物种特异性和良好的扩增重现性，是动物个体识别的首选标记。在检验过程中，可将不同的样品作为待检样品，待检样品之间的基因型差异作为判定不同个体的依据。本文件用了10对高多态性的微卫星标记，用于滇金丝猴个体识别（见附录A）。

5 操作程序

5.1 样品制备及 DNA 提取

收集滇金丝猴的血液、肌肉、皮肤、毛发、粪便等样品，样品采集应符合实验动物的福利和伦理的相关要求。使用针对不同样品形式对应的专用商品试剂盒或传统分子生物学技术手段进行DNA提取。主要试剂、仪器设备见附录B，样品的DNA提取具体步骤见附录C。

5.2 DNA 质量检测

使用微量分光光度计和1%琼脂糖凝胶电泳对每个DNA样品进行浓度分析，260/280在1.7～2.1之间，浓度超过40 ng/μL的DNA样品合格。琼脂糖凝胶电泳检测及成像方法见附录C。

5.3 DNA 保存

近期（一个月内）使用的DNA，装有DNA的离心管保存于−20 ℃冰箱中。长期保存的DNA，装有DNA的离心管保存于−80 ℃超低温冰箱中。

5.4 微卫星标记

使用10个微卫星标记进行滇金丝猴个体识别。微卫星标记信息见附录A。

5.5 微卫星标记 PCR

5.5.1 微卫星标记 PCR 引物合成与荧光标记

根据10个微卫星遗传标记的序列合成引物，并对正向引物的5’端进行荧光标记，每个微卫星标记有一条引物带有荧光标记。在试验过程中，应避光操作，以免影响引物的荧光标记效果。

5.5.2 PCR 反应体系

可选用多种PCR扩增酶进行微卫星PCR，PCR反应体系见附录D，表D.1。

5.5.3 PCR 反应程序

样品DNA在PCR仪上进行PCR扩增的反应程序，反应程序见附录D，表D.2。

5.5.4 PCR 反应最适退火温度

10对微卫星引物退火温度见附录D，表D.2。

5.5.5 PCR 产物质量检测

PCR扩增完成后，取PCR产物2 μL，经2%琼脂糖凝胶电泳检测，如电泳条带清楚片段大小正确，参考长度应符合附录C所示，符合微卫星扩增大小，表明PCR扩增成功，成为符合质量要求的PCR产物。将符合质量要求的PCR产物使用锡箔纸盒避光存放于4 ℃冰箱，用于后续测序仪检测，进行基因分型；对于不符合质量要求的样品，要进行PCR条件优化，改变PCR反应体系和反应时间，重新进行PCR扩增和质量检测。

5.6 微卫星基因分型

5.6.1 将符合质量要求的 PCR 产物采用遗传分析仪进行基因扫描分型。

5.6.2 不同颜色标记引物的 PCR 产物可以混合后进行基因扫描分型，获取微卫星分型峰图和数值。为消除系统误差，所有样品使用同一型号分型设备进行基因分型，所有批次都选用相同分子内标，并且使用同一数据判读软件进行数据判读。

5.6.3 获取的微卫星分型峰图和数值，对各微卫星位点重复单元碱基数对测序结果进行人工校正。在校正中，根据分型峰图和数值，参考片段大小，判断分型数据的奇偶性。根据分型数值，将偏差小于等于 1 的基因型校正为碱基重复数的整数倍数值，偏差大于 1 重新进行 PCR，以确保数据真实可靠。

6 个体识别

用生物学软件对微卫星位点的分型数据进行个体识别：

a) 当两个或两个以上的样品微卫星标记分型结果完全一致时，判定样品来自同一个体；
b) 当两个样品的微卫星标记分型结果中有 2 个及以上标记分型结果不同时，判定样品来自不同个体；
c) 当两个样品的微卫星标记分型结果中只有 1 个标记差异时，认为两个样品来自相同个体。

附　录　A
（规范性）
滇金丝猴个体识别微卫星标记信息表

滇金丝猴个体识别微卫星标记信息表见表A.1。

表 A.1　滇金丝猴个体识别微卫星标记信息表

编号	标记名称	引物序列 5’- 3’	核心序列	参考长度（bp）
1	RB1	F: GCAAAGACACACACATAGGCTCA	(AAAG)n	195～227
		R: ATGCCTTCTTTGTCTCTTGATCTT		
2	RB2	F: AGAGAGAATCCCCCTGAGCAT	(AGGA)n	219～251
		R: GAGCAAGACTCCATCTCAAAACA		
3	RB3	F: TTCCAACTAACACTAAAAGGAGGG	(TTCC)n	210～230
		R: CACAGGGGTGAAAATATTCAAGA		
4	RB4	F: GACAACCCAGAGCCATCTATGTA	(TCTTT)n	204～229
		R: TGGGTGACAGAGTAAGACTCGGT		
5	RB5	F: CTGTGGAATCTGCCCATCAA	(TTCC)n	237～261
		R: GCCTGGACAACAGAGTAAGACAC		
6	RB6	F: GCTTCTGAATTCTTCCAATGTCC	(AGAT)n	220～236
		R: CCCTGAATTCCAAGAATGTCAA		
7	RB7	F: GTCTACTGTGGGTGAACCTGGA	(CCTT)n	208～228
		R: TGGGCCTAGAAGGTTGTGGT		
8	RB8	F: AGAGGTTGCAGTGAGCCAAGA	(TAGA)n	196～220
		R: GGACTACTGCTAAGCAAGGTATCG		
9	RB9	F: GGGTATCAGTCTGCTTTGGAATC	(TACAA)n	218～238
		R: GCACAAGTTCCCATTGCCATA		
10	RB10	F: GCCCTCCACTGCTCAATTTT	(ATTGT)n	289～314
		R: GGTAGGAGAACTGCTTGATCCC		

附　录　B
（规范性）
主要试剂及仪器设备

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　50×TAE缓冲液(TAE Buffer)：Tris碱242 g和冰醋酸57.1 mL，用双蒸水定容到1 L。
B.1.3　GeneFinder核酸染料，用于凝胶成像显示条带。
B.1.4　6×上样缓冲液（Loading Buffer），含有溴酚蓝，用于电泳和凝胶成像。
B.1.5　2.5 mM dNTP试剂：dATP、dCTP、dGTP和dTTP的预混溶液。
B.1.6　5×PCR Buffer。
B.1.7　GoldStar 酶。
B.1.8　无菌水：ddH_2O。
B.1.9　琼脂糖（纯度100%）。
B.1.10　1%琼脂糖凝胶（用于检测DNA）：1 g琼脂糖与100 mL 1×TAE缓冲液，加热融化均匀，60 ℃时，倒入胶槽，插上样品梳。室温下待凝胶凝固后，垂直向上拔出固定在凝胶中的样品梳。
B.1.11　2%琼脂糖凝胶（用于检测PCR产物）：2 g琼脂糖与100 mL 1×TAE缓冲液，加热融化均匀，60 ℃时，倒入胶槽，插上样品梳。室温下待凝胶凝固后，垂直向上拔出固定在凝胶中的样品梳。
B.1.12　STE 缓冲液：30 mM Tris-HCL，200 mM EDTA，50 mM NaCl，pH 8.0。
B.1.13　Tris饱和酚。
B.1.14　水饱和酚。
B.1.15　异戊醇（$C_5H_{12}O$）。
B.1.16　异丙醇（$CH_3CH(OH)CH_3$）。
B.1.17　氯仿（$CHCl_3$）。
B.1.18　TE：10 mM Tris-HCL，1mM EDTA，pH=8.0。
B.1.19　苯酚（C_6H_5OH）。
B.1.20　蛋白酶K。
B.1.21　十二烷基硫酸钠：SDS。
B.1.22　DNA提取试剂盒可选用QIAamp Fast DNA Stool（51604），使用试剂盒中的相关试剂。试剂盒可进行自由选择。

B.2　仪器设备

B.2.1　PCR仪。
B.2.2　低温高速离心机。
B.2.3　单道可调移液器（2 μL，10 μL，200 μL，1 000 μL）。
B.2.4　电子天平（量程0.01 mg～10 000 mg）。
B.2.5　水浴恒温振荡器。
B.2.6　普通离心机。
B.2.7　超纯水器。
B.2.8　高压灭菌器。

B.2.9　电泳仪。

B.2.10　凝胶成像系统。

B.2.11　磁力搅拌器。

B.2.12　遗传分析仪。

B.2.13　超低温冰箱（−80 ℃）。

B.2.14　低温冰箱（−20 ℃）。

B.2.15　DNA混合仪。

云南省政府标准化行政主管部门
DB53
地方标准

附　录　C
（规范性）
脱氧核糖核酸样品（DNA）样品的提取

C.1　说明

DNA提取可用多种方式进行，可使用不同试剂盒等方法，本文件给出粪便样品DNA的试剂盒提取法、组织血液样品DNA的传统提取方法。

C.2　粪便样品的DNA提取

C.2.1　试剂盒

本标准采用的试剂盒为QIAamp Fast DNA Stool（51604），所有离心步骤，在室温下（15 ℃～25 ℃），14 000 rpm/min进行。如果不能提供14 000 rpm/min离心速度，则增加离心时间比例。

C.2.2　预处理

C.2.2.1　为尽可能多的获得滇金丝猴肠道脱落细胞，最大限度去除粪便样品中的多糖、色素等阻抑物，需要对样品进行预处理。

C.2.2.2　利用研磨仪将粪便样品磨碎，使得脱落下来的肠道细胞充分存在于样品保存液中。

C.2.2.3　通过离心法富集样品中的肠道细胞以备DNA提取。

C.2.2.4　使用预冷的无水乙醇和无菌水对富集物进行洗涤离心，以去除样品中的阻抑物成分。

C.2.3　准备工作

C.2.3.1　确保缓冲AW1和缓冲AW2已经按照试剂盒标签上的说明准备。

C.2.3.2　使用前将缓冲液混合均匀。

C.2.3.3　如果在Buffer ASL或 Buffer AL 中有沉淀形成，在70 ℃水浴锅内加热至溶解。

C.2.3.4　准备70 ℃水浴在C.2.4.7使用。

C.2.4　DNA提取

C.2.4.1　称取180 mg～220 mg粪便于2 mL离心管置于冰上做预处理。

C.2.4.2　向样品中加入1 mL缓冲液InhibitEX Buffer，间歇振荡涡旋1min～2min至样品完全同质化。

C.2.4.3　全速离心1.5min，使粪便均质化。

C.2.4.4　取25 μL蛋白酶K进入一个新的2 mL微离心管。

C.2.4.5　从第3步中吸取600 μL上清于有蛋白酶K的2 mL离心管中。

C.2.4.6　加600 μL Buffer AL 涡旋15s。

C.2.4.7　70 ℃孵育10min，中途颠倒混匀1～2次。简短离心收集管盖上的液滴。

C.2.4.8　在裂解液中加600 μL无水乙醇，涡旋混匀。简短离心收集管盖上的液滴。

C.2.4.9　将上一步所得溶液取600 μL加入到一个吸附柱中（吸附柱放入2 mL收集管）。全速14 000 rpm/min离心1.5min，倒掉废液，将吸附柱放入新的收集管中。

C.2.4.10　打开柱子的盖子，加入另外600 μL的裂解液，全速14 000 rpm/min离心1.5min，倒掉废液，将吸附柱放入新的收集管中。

C.2.4.11　重复C.2.4.10 将第三份600 μL的裂解液负载到柱子上。全速14 000 rpm/min离心1.5min，倒掉废液，将吸附柱放入新的收集管中。

C.2.4.12　加入500 μL Buffer AW1到柱子中。盖紧离心管盖，全速14 000 rpm/min离心1.5min。将离心管取出，放入一新的2 mL收集管中。丢弃旧收集管及其中液体。

C.2.4.13　加入500 μL Buffer AW2到柱子中。盖紧离心管盖，以全速14 000 rpm/min离心3min。将离心管取出，放入新的2 mL收集管中（试剂盒提供）。丢弃旧收集管及其中液体。

C.2.4.14　将离心管取出，放入新的2 mL收集管中后以全速14 000 rpm/min离心2min。

C.2.4.15　将柱子转移到新的1.5 mL离心管中，小心加入无菌水，室温下静置2min，全速14 000 rpm/min离心2min，把DNA洗脱下来。

C.2.4.16　准备0.2 mL的PCR小管，吸取4 μL用于胶检测和定量，将1.5 mL离心管中的DNA样品迅速放于−20 ℃冰箱。

C.3　组织、血液样品DNA的提取

C.3.1　取1.5 mL全血或少许组织样品0.03 g，加入450 μL STE 缓冲液（30 mM Tris-HCL，200 mM EDTA，50 mM NaCl， pH 8.0）和终浓度分别为10%的SDS 75 μL和200 mg/mL的蛋白酶K 25 μL；充分混匀后置于57 ℃温箱中消化8 h～12 h至澄清，其间摇匀数次。

C.3.2　加入等体积的水饱和酚或Tris饱和酚550 μL～700 μL，人工缓慢混匀20min或在DNA混合仪上缓慢转动抽提24 h，小心的混合两相。于室温9 000 rpm/min离心10min，将上清液转至另一干净的Eppendorf管中。

C.3.3　加入等体积的苯酚:氯仿:异戊醇（25:24:1）混合液300 μL缓慢混匀抽提20min或在DNA混合仪上缓慢转动抽提24 h，9 000 rpm/min离心10min，上清液转至另一干净的Eppendorf管。

C.3.4　再加入等体积的氯仿：异戊醇（24：1）抽提10 min或在DNA混合仪上缓慢转动抽提24 h，9 000 rpm/min离心10min，上清液转至另一干净的Eppendorf管中。

C.3.5　加入等体积的异丙醇沉淀DNA，于−20 ℃ 静置120min以上沉淀DNA，12 000 rpm/min离心10min后，弃上清。

C.3.6　加入1 000 μL70%乙醇振荡洗涤，除去一些盐分或其他不利于DNA溶解的成分，13 000 rpm/min离心10min后，弃上清（重复两次）。

C.3.7　尽可能彻底除去70%乙醇，于室温将DNA沉淀置于敞开的Eppendorf管内，直至可见痕量乙醇挥发殆尽。

C.3.8　加入150 μL～200 μL TE（10mM Tris-HCL，1mM EDTA，pH=8.0）缓冲液或无菌水溶解，置37 ℃充分溶解，68 ℃加热灭活，待DNA完全溶解后置于4 ℃冰箱或长期保存于−20 ℃待用。

C.4　琼脂糖凝胶电泳检测及成像方法

C.4.1　配制浓度为1%的琼脂糖凝胶（即1×TAE电泳缓冲液100 mL加1 g琼脂糖），加热融化混匀，冷却至60 °C左右，倒入胶槽，插上样品梳。配制2%琼脂糖凝胶需1×TAE电泳缓冲液100 mL加2 g琼脂糖。

C.4.2　室温下待凝胶凝固后，垂直向上拔出固定在凝胶中的样品梳，将琼脂糖凝胶和胶板置于电泳槽中，使样本孔位于电场负极，向电泳槽中加入1×TAE电泳缓冲液。

C.4.3　取2 μL DNA，加2 μL已经加入Genefinder染料的上样缓冲液并混匀，然后依次将DNA分子量标准、检测样品上样到点样孔中。电泳电压为130 V，当上样缓冲液中的溴酚蓝条带迁移至凝胶1/2的位置，停止电泳。

C.4.3.1　取出琼脂糖凝胶，置于凝胶成像仪成像拍照、保存。

附　录　D
（规范性）
PCR 反应

D.1　总则

本标准使用的是GoldStar酶，可使用多种酶进行PCR扩增，根据选择的PCR酶制定相应的反应体系、反应时间以及最适退火温度。

D.2　PCR反应体系

PCR反应体系见表D.1。

表 D.1　PCR 反应体系

组分	用量（μL）
模板（>20 ng/μL）	2.0
引物 F（10 μM）	0.1
引物 R（10 μM）	0.1
dNTP（2.5 mM）	1.2
5×PCR Buffer	2.0
无菌水(ddH$_2$O)	4.5
GoldStar 酶（5U/μL）	0.1
合计	10

D.3　PCR反应程序

PCR反应程序为：95 ℃预变性10min；94 ℃变性30s，touch down温度 40s，72 ℃延伸 40s。设置13个循环反应，touch down温度是指每过一个循环退火温度降0.5 ℃；94 ℃变性30s，最适退火温度40s，72 ℃延伸40s，设置30个循环反应，60 ℃后延伸30min。

D.4　PCR反应最适退火温度

PCR反应最适退火温度见表D.2。

表 D.2　10 对微卫星引物 PCR 反应的最适退火温度

引物	RB1	RB2	RB3	RB4	RB5	RB6	RB7	RB8	RB9	RB10
温度（℃）	49	53	51	56	55	50	58	54	54	55