



# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1898—2010

## 畜禽线粒体DNA遗传多样性 检测技术规程

Protocol of detection for mitochondrial DNA genetic diversity  
of domestic animals

2010-07-08 发布

2010-09-01 实施



中华人民共和国农业部 发布

## 前 言

本标准遵照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部畜牧业司提出。

本标准由全国畜牧业标准化技术委员会(SAC/TC274)归口。

本标准起草单位：全国畜牧总站。

本标准主要起草人：王志刚、刘丑生、邱小田、张桂香、韩旭、于福清、孙飞舟。

# 畜禽线粒体 DNA 遗传多样性检测技术规程

## 1 范围

本标准规定了畜禽线粒体 DNA 遗传多样性检测的技术规程。  
本标准适用于畜禽线粒体 DNA 遗传多样性检测。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文本的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅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。

GA/T 383 法庭科学 DNA 实验室检验规范

NY/T 1673 畜禽微卫星 DNA 遗传多样性检测技术规程

## 3 术语和定义

下列术语、定义和缩略语适用于本文件。

### 3.1

**线粒体 DNA** mitochondrial DNA, mtDNA

动物细胞核外唯一具有半自主能力的双链环状 DNA。

### 3.2

**线粒体 DNA D-loop 区** mt DNA D-loop

动物线粒体 DNA 翻译和转录的调控区和唯一的非编码区,当线粒体 DNA 开始复制时,此区外形呈 D 形。

## 4 检测方法

### 4.1 样品的采集和保存

4.1.1 在中心产区采样,个体应具备该种群的典型特征,样品的采集及保存应满足提取 DNA 的要求,并详细记录材料名称、来源、系谱、采集时间、地点及保存条件。

4.1.2 每种群采集畜禽个体一般不少于 60 头(只),其中雄性数量不少于 10%,要求个体间三代内无血缘关系。

### 4.2 DNA 的制备

制备 DNA 的方法按 NY/T 1673 的规定执行。

### 4.3 引物制备

#### 4.3.1 引物合成

根据相关畜禽线粒体基因组序列设计引物,并合成。

#### 4.3.2 工作液配制

将合成的引物瞬时离心,加入灭菌超纯水充分震荡,配成浓度为 100 pmol/ $\mu$ L 的储液,室温溶解 30 min,分装, -20℃ 保存,储液稀释 10 倍即为工作液。

其中加入灭菌超纯水的体积 V( $\mu$ L)按式(1)计算:

$$V = \frac{33 \times OD \times 10^6}{MW} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

MW——引物分子量;

OD——DNA<sub>260 nm</sub> 吸收的光密度。

#### 4.4 PCR 反应体系

PCR 反应体系见附录 A. 1。

#### 4.5 PCR 反应程序

PCR 反应程序见附录 A. 2。

#### 4.6 扩增产物的检测与回收

凝胶电泳法检测 PCR 产物,扩增效果良好的样品按附录 B 纯化回收,按附录 C 测序。

### 5 数据分析

序列比对、单倍型统计、系统发生树构建等数据分析参见附录 D。

### 6 防污染措施

按 GA/T 383 规定的方法执行。

### 7 对照实验

设立阳性对照、阴性对照和空白对照,阳性对照为线粒体 DNA 样品,阴性对照为不具有细胞核 DNA 样品,空白对照为等量双蒸水。

附 录 A  
(规范性附录)  
PCR 反应体系和程序

A.1 PCR 反应体系见表 A.1

表 A.1 PCR 反应体系

组分及浓度	使用量
Buffer(10×)	5.0 μL
MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/L)	1 μL~4 μL
引物 P1A(10 pmol/μL)	2.0 μL
引物 P1B(10 pmol/μL)	2.0 μL
dNTPs(10 mmol/L)	1 μL
Taq E(5 U/μL)	0.2 μL
DNA 样品	50 ng~100 ng
ddH <sub>2</sub> O	加至 50 μL

A.2 PCR 反应程序见表 A.2

表 A.2 PCR 反应程序

阶 段	温度,℃	时 间
预变性	95	4 min
25 个~35 个循环	94	20 s~60 s
	50~65	30 s~60 s
	72	30 s~90 s
延 伸	72℃ 10 min~70 min	
保 存	4℃	

**附 录 B**  
**(资料性附录)**  
**扩增产物的纯化回收**

**B.1 材料、试剂和仪器**

**B.1.1 材料**

待回收 DNA 样品。

**B.1.2 试剂**

- a) 1%低熔点胶,琼脂糖;
- b) glassmilk kit:裂解缓冲液,漂洗液,glassmilk;
- c) TE,ddH<sub>2</sub>O;
- d) 酚:分析纯;
- e) 氯仿:分析纯;
- f) 无水乙醇:分析纯;
- g) 70%乙醇:分析纯。

**B.1.3 仪器设备**

- a) 离心机;
- b) 水浴锅;
- c) 电泳仪。

**B.2 纯化回收程序**

**B.2.1 低熔点胶法**

电泳到适当位置后,在目的 DNA 条带的前端挖一长方形槽,向槽中加入融化的低熔点胶,待凝固后进行电泳。当 DNA 进入低熔点胶中心时停止电泳。紫外灯下切下目的条带的低熔点胶。将切下的胶放到离心管中,加入 200  $\mu\text{L}$  的 TE,65℃温浴 3 min 以融化低熔点胶。分别用酚/氯仿和氯仿抽提一次。取上清液,加入 2 倍体积的无水乙醇,-20℃沉淀 DNA 2 h 以上,10 000 $\times g$  离心 15 min,弃上清液,用 70%乙醇洗涤,吹干后溶于 10  $\mu\text{L}$  无菌水中,取 1  $\mu\text{L}$  电泳检测。

**B.2.2 冻融法**

电泳后直接切下凝胶中目的条带后加 200  $\mu\text{L}$  TE,再加 2 倍体积酚,在液氮中冻 2 min,再 65℃水浴中融化 10 min,这样重复数次,10 000 $\times g$  离心 5 min,取上相液加 2 倍体积 100%冰乙醇-20℃沉淀过夜,离心回收 DNA,70%乙醇洗一次后溶于适量的 TE 或无菌水中,电泳检测回收效果。

**B.2.3 Glassmilk 法**

0.8%琼脂糖凝胶电泳 PCR 产物,紫外灯下迅速切下目的条带,放入离心管,在含胶的离心管中加入 3 倍体积的凝胶裂解缓冲液混匀,60℃水浴 5 min,以融化凝胶,加入 10  $\mu\text{L}$  glassmilk 混匀,室温静置 5 min,10 000 $\times g$  离心 1 min 弃上清液,加入 125  $\mu\text{L}$  漂洗液,10 000 $\times g$  离心数秒钟,弃上清,再加入 125  $\mu\text{L}$  漂洗液,如此反复两次,沉淀中加入适量无菌双蒸水混匀。60℃水浴 5 min,500 $\times g$  离心 2 min,回收上清,取 10  $\mu\text{L}$  电泳检测。

### B.3 结果分析

DNA 纯化回收后,电泳检测应为单一的条带。若电泳结果出现两条以上的带,则进行重复纯化回收。

附录 C  
(资料性附录)  
DNA 测序

C.1 PCR 测序反应

C.1.1 取 0.2 mL 的 PCR 管,编号,将管插在颗粒冰中,按表 C.1 加样。

表 C.1 测序反应体系

组 成	用 量
模板 DNA(重组质粒)*	200 ng~500 ng
DigDye 2.0 premix	1.5 $\mu$ L~2.0 $\mu$ L
M13 F/R 通用引物*	10 pmol~30 pmol
5 $\times$ DigDye Reaction Buffer	1.5 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	加至 10 $\mu$ L
* 若用 PCR 扩增产物,需 200 bp~500 bp 10 ng、500 bp~1 000 bp 20 ng,引物为上游或下游单测引物。	

C.1.2 将 PCR 管置于 PCR 仪上进行扩增。98℃变性 2 min 后进行 PCR 循环,PCR 循环参数为 96℃ 10 s,50℃ 5 s,60℃ 4 min,25 个循环,扩增结束后设置 4℃保温。

C.2 醋酸钠/乙醇法纯化 PCR 产物

将混合物离心,将扩增产物转移到 1.5 mL 离心管中。加入 25  $\mu$ L 醋酸钠/乙醇混合液,充分振荡,置冰上 10 min 以沉淀 DNA。10 000 $\times g$  于 4℃离心 30 min,小心弃上清。加 70%(V/V)的乙醇 50  $\mu$ L 洗涤沉淀 2 次。10 000 $\times g$  于 4℃离心 5 min,小心弃上清和管壁的液珠,真空干燥沉淀 10 min~15 min。

C.3 电泳前测序 PCR 产物的处理

加入 12  $\mu$ L 的模板抑制试剂于离心管中,剧烈振荡,让其充分溶解 DNA 沉淀,瞬时离心。将溶液转移至盖体分离的 0.2 mL PCR 管中,瞬时离心。在 PCR 仪上进行热变性(95℃ 2 min),冰中骤冷,待上机。

C.4 上机操作

安装毛细管,进行毛细管位置的校正,灌胶并建立运行的测序文件。仪器将自动灌胶至毛细管,1.2 kV 预电泳 5 min,按编程次序自动进样,再预电泳(1.2 kV,20min),在 7.5 kV 下电泳 2 h。电泳结束后,仪器会自动清洗、灌胶、进下一样品、预电泳和电泳。每一个样品电泳总时间为 2.5 h。电泳结束后,仪器会自动分析或打印出彩色测序图谱。

C.5 进行序列分析、序列比较。



附 录 D  
(资料性附录)  
数 据 分 析

#### D.1 序列比对

所得序列首先用序列比对软件进行完全比对,特别是出现碱基缺失或插入的区域,需要人为校对以达到最大的序列相似性。

#### D.2 序列变异性分析及单倍型的识别

利用序列变异分析软件确定多态位点,计算碱基组成、转换/颠换比率( $Ts/Tv$ )。缺失/插入的位点在统计时删除。

#### D.3 单倍型、单倍型频率

在单倍型统计软件中识别单倍型,并计算单倍型频率。

#### D.4 核苷酸多样性、单倍型多样性

用核苷酸多样性、单倍型多样性软件计算核苷酸多样性、单倍型多样性(haplotypic diversity)等多态性统计参数。

#### D.5 系统发生树的构建

在系统发生树构建的软件中基于 Kimura - 2 参数核苷酸替代模型,构建 Neighbour-joining(NJ)系统发生树,计算单倍型间的遗传距离。

#### D.6 网络分析

使用 media-joining network 网络进一步分析不同单倍型间的进化关系。

#### D.7 核苷酸不配对分析和选择中性检验

采用核苷酸不配对分析(mismatch analysis)和  $Fu's$  中性检验两种方法分析检验群体在过去是否发生扩张或经受了瓶颈效应。

中 华 人 民 共 和 国  
农 业 行 业 标 准  
畜禽线粒体 DNA 遗传多样性检测技术规程  
NY/T 1898—2010

\* \* \*

中 国 农 业 出 版 社 出 版  
(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)  
(邮政编码: 100125 网址: [www.ccap.com.cn](http://www.ccap.com.cn))  
北京昌平环球印刷厂印刷  
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

\* \* \*

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 0.75 字数 7 千字  
2010 年 7 月第 1 版 2010 年 7 月北京第 1 次印刷  
书号: 16109·2123



NY/T 1898-2010

版权专有 侵权必究  
举报电话: (010) 65005894