

ICS 65.020.30
CCS B 43

DB5117

四川省（达州市）地方标准

DB5117/T 100—2024

DNA 分子标记选育绿壳蛋旧院黑鸡技术规范

Technical specifications for breeding green shell egg Jiuyuan black chickens using
DNA molecular markers

2024-09-30 发布

2024-09-30 实施

达州市市场监督管理局 发布

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。

本文件由达州市农业农村局提出并归口。

本文件起草单位：达州市饲草饲料工作站、达州市畜牧技术推广站、达州职业技术学院、西南大学、万源市畜禽品种改良站、万源市聚源旧院黑鸡养殖专业合作社。

本文件主要起草人：张丹萍、王乙茹、俄广鑫、曾艳、黎纯、蒋旭东、庞金柱、王宇、李祥、何武亮。

DNA分子标记选育绿壳蛋旧院黑鸡技术规范

1 范围

本文件规定了DNA分子标记选育绿壳蛋旧院黑鸡的技术要求。
本文件适用于绿壳蛋旧院黑鸡的DNA分子标记选育。

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。

GB/T 40188 畜禽分子标记辅助育种技术规程
NY/T 823 家禽生产性能名词术语和度量计算方法
NY/T 1673 畜禽微卫星DNA遗传多样性检测技术规程
NY/T 2695 牛遗传缺陷基因检测技术规程
DB5117/T 31 地理标志产品 旧院黑鸡
DB5117/T 99 旧院黑鸡繁育技术规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

DNA分子标记 DNA Molecular Markers

DNA分子标记(DNA Molecular Markers)，是以个体间遗传物质内核苷酸序列变异为基础的遗传标记，是DNA水平遗传多态性的直接的反映。分子标记是生物遗传标记的一种，通过引物设计不同，用PCR的方法在生物的基因组DNA上扩增出相关条带，通过电泳、软件识别、分析，可用作生物遗传信息的研究。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

Bp: base pair, 碱基对;

DNA: deoxyribonucleic acid, 脱氧核糖核酸;

PAGE: polyacrylamide gelelectrophoresis, 聚丙烯酰胺凝胶电泳;

PCR: polymerase chain reaction, 聚合酶链式反应;

Taq 酶: Taq-DNA polymerase, 耐热 DNA 聚合酶;
ddH₂O: 双蒸水 (超纯水)。

5 DNA 分子标记选育绿壳蛋旧院黑鸡技术的适用范围

应符合 DB5117/T 31 规定区域内的旧院黑鸡种公鸡和产绿壳蛋旧院黑鸡种母鸡。

6 要求

6.1 选育技术

6.1.1 组建选育基础群

6.1.1.1 选择 22~30 周龄产绿壳蛋种母鸡和性成熟种公鸡组建选育基础群, 公母比例 1:5~1:8, 群体规模不低于 2000 只。

6.1.1.2 基础群体重、体尺的测定应按照 NY/T 823 的要求执行。

6.1.1.3 基础群产蛋性能应符合 DB5117/T 99 的规定。

6.1.1.4 基础群外貌特征和生产性能应符合 DB5117/T 99 的规定。

6.1.2 基因筛选方法

6.1.2.1 样品采集、制备

对基础群个体翅下静脉采血, 样品标记, 贮存于不高于-20℃容器中送样。

6.1.2.2 样品整理核对

对样品编号进行核对, 录入相关系统。

6.1.2.3 DNA 提取

应采用全血 DNA 提取试剂盒提取基础群个体 DNA, 提取方法应按照 GB/T 40188 的要求执行。

6.1.2.4 DNA 浓度和纯度的检测

用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 浓度和纯度, 检测结果见图 1。选留泳道中的 DNA 样品带型清晰、整齐, 无明显的拖尾现象样品, 并用 ND-10001 紫外分光光度计检测其浓度和纯度, 选 OD_{260/280} 值均在 1.8~2.0 的样品, 置于 -20℃ 保存。

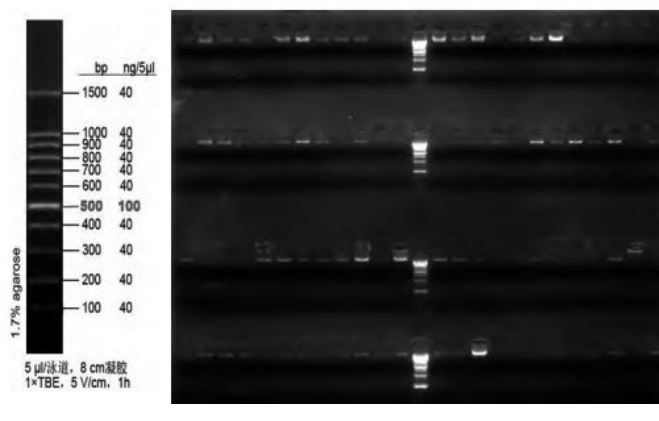


图1 鸡基因组DNA的0.8%琼脂糖凝胶电泳结果

6.1.2.5 目标片段筛选

6.1.2.5.1 引物序列设计

宜采用 Primer Premier 5.0 分析设计引物，用引物筛选目标片段应符合表 1 的要求，扩增片段长度为 364bp 和/或 190bp。

表 1 扩增 EAV-HP 的引物序列信息

| | 引物名称 | 引物序列 (5' →3') |
|-----|---------------|--------------------------|
| PCR | C26830-ins-F | GCATTTCAAAAACGGGTGTA |
| | C26830-ins1-R | CCCAGCAGTAAGCCCTACAT |
| | C26830-ins2-R | CAAAACCACAAAAGGTAATGTTCA |

6.1.2.5.2 扩增目标片段

采用 PCR 扩增，PCR 采用 10 μL 体系：上游引物 0.2 μL，DNA 模板 1 μL，下游引物各 0.1 μL，2 × Easy Taq PCR Super Mix (+ dye) 5 μL，ddH₂O 补足 10 μL。PCR 扩增程序：95℃预变性 5 min；95℃变性 30 s，56℃退火 30 s，72℃延伸 30 s，共 30 个循环；72℃延伸 5min；4℃保存。参照 NY/T 1673 和 NY/T 2695 规定的程序执行。

6.1.2.5.3 目标片段 PCR 产物电泳鉴定

用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。检测目的片段基因型。目的片段大小分别是 345 bp 和 190 bp。根据产物条带情况可记录为 N/N、LC/N、LC/LC 3 种基因型。其中 LC/N 基因型为 345 bp 和 190 bp 的双条带，N/N 基因型为 345 bp 的单条带，LC/LC 基因型为 190 bp 的单条带，见图 2。

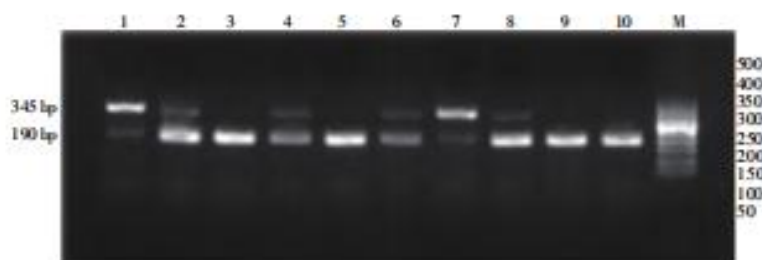


图 2 双重 PCR 产物凝胶电泳图

6.1.3 获取绿壳蛋旧院黑鸡种鸡样品

将样品编号与检测到的基因型归档，获得 LC/LC 基因型个体为纯系绿壳蛋旧院黑鸡种鸡。

6.2 分子标记档案建立

分析世代间的分子遗传结构差异，编写基因选育水平监测报告。

6.3 纯系绿壳蛋旧院黑鸡育种

6.3.1 核心群组建和繁育

根据筛选出的纯系绿壳蛋旧院黑鸡种鸡组建核心群，母鸡不少于 800 只，家系不少于 80 个，每个家系公母比例为 1:10。

核心群繁育应按照 DB5117/T 99 的要求执行。

6.3.2 扩繁群组建与繁育

扩繁群母鸡不少于 2400 只、公鸡不少于 120 只。

扩繁群的繁育应按照 DB5117/T 99 的要求执行。

参 考 文 献

- [1] 《中华人民共和国畜牧法》 中华人民共和国主席令〔2005〕第四十五号
 - [2] 《中华人民共和国动物防疫法》 中华人民共和国主席令〔2007〕第七十一号
 - [3] 《畜禽遗传资源保种场保护区和基因库管理办法》 农业部令〔2006〕第64号
 - [4] NY/T 2123-2012 蛋鸡生产性能测定技术规范
 - [5] NY/T 4199-2022 甜瓜品种真实性鉴定 SSR 分子标记法
-