



中华人民共和国林业行业标准

LY/T 2896—2017

大熊猫种群遗传档案建立技术规程

A regulation for giant panda population genetic archives

2017-10-27 发布

2018-01-01 实施

国家林业局 发布

目 次

前言	III
1 范围	1
2 术语和定义	1
3 采样频次、时间和路线	1
3.1 采样频次与时间	1
3.2 采样路线	1
4 样品的采集和保存方法	1
4.1 采样工具	1
4.2 粪便新鲜程度的判定	2
4.3 粪便样品的选取原则	2
4.4 样品采集方法	2
4.5 样品记录与编号	2
4.6 样品的临时保存	2
4.7 样品的运输和实验室保存	3
5 样品 DNA 的提取和保存方法	3
5.1 粪便样品的 DNA 提取	3
5.2 DNA 的保存	3
6 遗传标记选用原则	3
6.1 线粒体标记	3
6.2 性别鉴定分子标记	3
6.3 微卫星标记	3
7 实验流程	4
7.1 DNA 质量检测和线粒体标记 PCR 扩增	4
7.2 个体识别	4
7.3 性别鉴定	4
7.4 遗传多样性评估	4
8 线粒体标记 PCR 扩增方法	4
8.1 引物合成	4
8.2 PCR 扩增体系及程序	4
9 大熊猫性别鉴定 PCR 方法	5
9.1 PCR 扩增引物的合成	5
9.2 PCR 扩增体系及程序	5
9.3 电泳检测	5
9.4 性别判读	5
10 微卫星标记 PCR 扩增方法	5

10.1	PCR 引物的设计、合成与荧光标记	5
10.2	PCR 扩增的反应体系和扩增程序	5
10.3	PCR 产物的质量检测	6
10.4	微卫星分型	6
10.5	微卫星分型数据的应用	6
11	种群遗传档案的内容	6
11.1	采样数据	6
11.2	线粒体标记测序数据	6
11.3	性别鉴定数据	6
11.4	微卫星标记分型数据	6
11.5	研究报告	6
12	遗传档案数据的管理和使用	7
附录 A (规范性附录)	大熊猫粪便样品采集记录表	8
附录 B (规范性附录)	大熊猫微卫星标记编号、名称、核心序列及来源	9
附录 C (规范性附录)	大熊猫微卫星标记名称、PCR 扩增引物及扩增长度	10

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家林业局保护司提出并归口。

本标准起草单位：四川大学、中国科学院动物研究所、中国大熊猫保护研究中心、成都大熊猫繁育研究基地、四川省野生动物资源调查保护管理站。

本标准主要起草人：岳碧松、魏辅文、李德生、沈富军、杨旭煜、古晓东、张玲、陈浩。

大熊猫种群遗传档案建立技术规程

1 范围

本标准规定了大熊猫样品采集保存、DNA 提取、性别鉴定、个体识别、遗传多样性评估和种群遗传档案建立的技术和方法。

本标准适用于圈养大熊猫和野生大熊猫。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

微卫星序列 **microsatellite sequence**

基因组中由 1 个~6 个核苷酸为基本重复单元组成的 DNA 串联重复序列,例如(AC)_n、(ACG)_n、(ATTT)_n 等,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位序列,可以作为微卫星标记使用。

2.2

DNA 样品 **DNA samples**

利用大熊猫组织(如毛发、血液、精液、肌肉组织等)或新鲜粪便提取的大熊猫基因组 DNA。

3 采样频次、时间和路线

3.1 采样频次与时间

野生大熊猫样品的采集可结合保护区监测和巡护等日常工作常年进行。

野生大熊猫样品大规模集中采样可在春季化雪后(繁殖季节)和冬季积雪前(非繁殖季节)开展;对于交通比较方便的大熊猫分布密集区,可以根据具体情况和工作目标增加采样次数。各地可根据当地大熊猫的习性以及当地的物候、气候、大熊猫主食竹发笋规律、野外工作条件和后勤保障等因素,确定具体采样时间。野外采样工作应尽量在最短时间内完成,一般为 10 d~20 d。

圈养大熊猫样品可以结合日常工作随时采集。

3.2 采样路线

样品的大规模集中采集路线以全国第四次大熊猫调查方法为依据,将保护区大熊猫栖息地划分为若干个面积为 2 km²的网格,每个网格作为 1 个采样小区,并编号。在单个小区内,根据地形地貌、道路、河流、植被、大熊猫主食竹等因素布设实际采样路线。

样品的日常采集可根据监测巡护路线确定。

4 样品的采集和保存方法

4.1 采样工具

手持终端设备、卫星定位仪、地形图、记录表格、一次性 PE 手套、500 mL 塑料样品瓶、分析纯无水