第十一章　T/CALAS 11—2017《实验动物树鼩遗传质量控制》实施指南

第一节　工 作 简 况

编制任务来自国家科技部资助的以下三个国家科技支撑项目：

（1）野生动物人工种群的生物净化及相关疾病动物模型的建立与评价（2009BAI83B02）；

（2）实验动物新品种的种群建立与质量标准化研究（2011BAI15B01）；

（3）实验用树鼩的标准化研究和人类重大疾病树鼩模型创建与应用集成示范（2014BAI101B01）。

本部分的编制为这些课题的研究成果之一。

本标准起草单位：中国医学科学院医学生物学研究所、首都医科大学、中国食品药品检定研究院。

本标准主要起草人：王文广、代解杰、陈振文、岳秉飞、孙晓梅、冯育芳、张媛、李娜、罕园园、陆彩霞、匡德宣、仝品芬。

第二节　工 作 过 程

本标准先后在 3 个国家科技支撑计划项目资助下逐步形成。

2009 年，为完成“野生动物人工种群的生物净化及相关疾病动物模型的建立与评价（2009BAI83B02）”中的任务内容，在收集、整理相关文献和大量研究的基础上，开始建立封闭群树鼩遗传质量检测方法和控制标准（研究稿）；

2011 年，随着“实验动物新品种的种群建立与质量标准化研究（2011BAI15B01）”项目的实施，进一步开展了树鼩质量标准和技术规范研究，初步制定了封闭群树鼩遗传质量控制标准。

2014 年在“实验用树鼩的标准化研究和人类重大疾病树鼩模型创建与应用集成示范（2014BAI101B01）”项目中得到了持续研究和完善。

2014 年 4 月 14~16 日，在北京召开了课题（2011BAI15B01）中期检查会。会议汇报了树鼩的质量标准和相关条件控制标准（微生物、寄生虫、遗传、病理、饲料、环境），以及技术规范（饲养管理技术规范、生物学特性描述规范、数据测定技术规范）的讨论稿，分别得到了与会专家的指导意见，并做了修改。

2015年3月27~29日，在昆明召开课题（2011BAI15B01）第四次研讨和专家咨询会。在标准整体框架基本不变的基础上，课题组围绕修改的内容，特别是针对专家意见所做的修改，对本标准的编制情况进行了汇报。与会专家对课题组研究制定的标准和技术规范的内容逐条进行了讨论，起草单位根据专家意见进行修改。

2015年6月10日，起草单位向全国实验动物标准化委员会提交了“国家标准制修订计划项目提案表”；6月17日，在全国实验动物标准化技术委员会举办的工作会议上获得通过，进行了备案。

2015年11月11日，起草单位在项目中期检查会上将本标准申报稿通过会议和通讯的方式，向来自国内实验动物领域的18位知名专家征求了意见，起草小组对照反馈意见进行了修改、补充和完善。

2016年上半年，起草小组又反复进行了多次修改和完善，形成《实验动物　封闭群树鼩遗传质量控制》征求意见稿。

2017年1月，起草小组整理汇总专家对本标准征求意见稿提出的问题，共收到了5个单位的回函，征得12条意见，采纳意见9条，未采纳3条，同时对标准格式进行了规范，最终形成《实验动物　树鼩遗传质量控制》送审稿。

2017年2月21日，中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会邀请全国的31名知名专家，组织召开了“全国实验动物标准化委员会年会暨标准审查会议”，起草单位在审查会上详细汇报了本标准（送审稿），现场专家们肯定了本标准的重要性和必要性，同时提出了一些意见或建议，起草小组对照征求意见进行了修改说明、补充和完善，形成本标准的报批稿。

2017年5月，本标准经中国实验动物学会第六届理事会常务理事会第八次会议审议通过，批准发布，于2017年5月19日起正式实施。

第三节　编写背景

树鼩（Tree shrew，*Tupaia belangeri*）是我国正在开发的具有自主知识产权的实验动物新品种，由于其亲缘关系与灵长类最接近（Fan et al.，2013），在生理解剖、生化代谢、神经发育、病毒感染特性、心理应激模式等方面与灵长类甚至人类之间都存在高度的相似性；同时，由于其具有体型小、繁殖周期短、易于操作、饲养成本低，比高等灵长类动物更适合大规模应用等独特优势，作为非人灵长类动物模型的补充，目前已经被用于更多重要疾病，如乙型肝炎（Yan et al.，2012）、丙型肝炎（Amako et al.，2010）、手足口病（王文广等，2012）等病毒感染，以及自发性肿瘤、代谢性疾病、抑郁症等动物模型的创建。随着相关研究的不断深入，树鼩得到越来越广泛的关注，树鼩的标准化也就显得迫切而重要，而树鼩质量标准的制定将在很大程度上保证科研数据的可靠性、一致性和可重复性，对提升我国实验动物科学自主创新的研究水平，从而提高我国在实验动物领域的国际地位亦具有重要的科学意义。

实验动物的遗传质量直接决定着实验的可重复性、稳定性，因此遗传质量控制也是树鼩标准化的重要组成部分。目前，国内外使用的树鼩多源于中缅树鼩滇西亚种的野生型，虽然已被广泛应用于各种人类疾病模型的建立，但其遗传背景不清晰一直是制约树鼩实验

动物标准化的一大瓶颈。虽然国内外有部分关于树鼩遗传背景的报道，但远没有形成系统的检测体系和标准，而关于封闭群的相关标准更是一片空白。目前，国内提出的实验用树鼩遗传质量标准仅有云南省技术监督局颁布的 DB 53/T 328.3—2010《实验树鼩 第 3 部分 遗传质量控制》，但由于颁发时间较早，前期研究数据不足，所列内容已不够科学严谨，非常需要进一步补充完善和提高，这也正是制定本遗传控制标准的必要性和意义所在。

本研究以群体遗传学理论为依据，在汇集国内外文献资料的基础上，结合当前树鼩暂无近交系的具体国情，重点围绕封闭群树鼩，通过微卫星位点进行筛选、组合与优化，建立了适用于封闭群树鼩遗传检测的方法，制定了封闭群树鼩遗传质量标准。本标准经过课题的系统研究并广泛地征求了有关专家意见，通过了实验动物行业主管部门、科研机构和标准化等领域专家的反复论证和审定，为封闭群树鼩的保种、性状控制和生产管理提供了依据；对促进我国树鼩从资源优势转化为科研优势和商品优势，实现我国树鼩的标准化，对引导和规范行业发展都具有重要意义。

第四节 编 制 原 则

本标准在制定中遵循以下基本原则：

（1）本标准编写格式应符合 GB/T 1.1—2000 的规定；

（2）本标准规定的技术内容及要求应科学、合理，具有适用性和可操作性；

（3）本标准的水平应达到国内领先水平。

本标准是在参考国内外实验动物遗传质量控制和树鼩遗传多样性检测文献资源后，对目前应用最为广泛的滇西亚种封闭群树鼩进行遗传质量控制研究的基础上制定的。本标准的制定，以 GB 14923—2010《实验动物 哺乳类实验动物的遗传质量控制》为依据，参考了云南省地方标准 DB 53/T 328.3—2010《实验树鼩 第 3 部分 遗传质量控制》，在大量实验证实的基础上进行科学的修正和完善，使本标准遗传检测方法既符合国家标准的要求，又能切合实际具有很好的可操作性。

第五节 内 容 解 读

一、封闭群树鼩的定义、命名的确定

根据封闭群的遗传学理论和参考 GB 14923—2010《实验动物 哺乳类实验动物的遗传质量控制》的制定。

普通级树鼩：经人工培育，遗传背景明确或者来源清楚，对其携带的微生物和寄生虫实行控制，不携带所规定的人兽共患病病原和烈性传染病病原，用于科学研究、教学、生产和检定以及其他科学实验的树鼩。简称普通树鼩。

封闭群树鼩：以非近亲交配方式进行繁殖生产的树鼩种群，在不从外部引入新个体的条件下，至少连续繁殖 4 代以上。

封闭群树鼩的命名：封闭群由 2~4 个大写英文字母命名，种群名称前标明保持者的英

文缩写名称，第一个字母需大写，后面的字母小写，一般不超过 4 个字母。保持者和种群名称之间用冒号隔开。

二、封闭群树鼩繁殖方法的确定

原则是保持封闭群树鼩的遗传异质性及基因多态性，以非近亲交配方式进行繁殖，避免近交系数随繁殖代数增加而过快上升。作为繁殖用种子的封闭群树鼩应遗传背景明确或来源清楚，有完整的资料，包括种群名称、来源、遗传基因特点及主要生物学特性等。在保证每代近交系数增量不大于 1% 的前提下，引种树鼩数量不得少于 25 对且无血缘关系（三代以内无共同祖先）。封闭群应足够大，以保持封闭群树鼩遗传基因的稳定，并避免近亲交配。具体繁殖方法按照 GB14923—2010 中附录 B 执行。

三、封闭群树鼩遗传质量监测方法的确定

（一）微卫星标记的确定

微卫星（microsatellite），又称简单序列重复（simple sequence repeats，SSR），是指以少数几个核苷酸（一般为 2~6 个）为重复单位组成的简单多次串联重复序列。微卫星标记由核心序列和两侧保守的侧翼序列构成，保守的侧翼序列使微卫星特异地定位于染色体某一区域，核心序列重复数的差异则形成微卫星的高度多态性。用微卫星 DNA 侧翼序列设计引物进行 PCR 扩增，由于重复次数的不同形成片段长度不同，经电泳分离，成像表现出不同的电泳带型。由于微卫星具有丰富的多态性、位点数量多并且分布广，检测方法简便、快速、稳定性好和结果可靠等优点，被认为是物种遗传多样性评估的最佳分子标记，已广泛地应用于生物群体遗传特性的检测中。

本标准推荐采用微卫星标记检测方法进行封闭群树鼩的遗传检测。首先从树鼩全基因组序列中筛选出约 700 个微卫星位点，择优选出约 100 个位点设计引物，去除有不良因素的，最后保留 33 对引物和文献（李婧潇等，2011；Liu and Yao，2013）报道的 13 对引物对滇西亚种树鼩 DNA 进行 PCR 扩增，根据琼脂糖电泳和聚丙烯酰胺电泳结果筛选保留，最终筛选出树鼩微卫星位点 22 个，这 22 个位点均有清晰条带。

群体内遗传变异采用平均杂合度指标或群体平衡状态方法进行评价。当平均杂合度在 0.5~0.7 时，群体为合格的封闭群树鼩群体。随机选取 15 只 F4 代雄树鼩和 15 只 F4 代雌树鼩作为样本进行验证实验，使用筛选的 22 个新微卫星位点作为检测位点做群体 STR 扫描，软件分析结果显示多态信息平均值为 0.563，大于 0.5，证实这些微卫星标记位点具有较高的多态性信息，适用于滇西亚种树鼩的遗传检测，可作为封闭群树鼩的遗传质量监测提供科学依据。

（二）抽样要求

用于群体遗传分析的采样数量理论上是越多越准确，但考虑实际情况和可操作性，要求从每个封闭群中随机抽取非同窝树鼩，雌雄各半。当种群数量少于 100 只时，抽样数量应不少于 15 只，当种群数量大于 100 只时，抽样数量不少于 30 只。封闭群树鼩种群每世代每年至少进行一次遗传质量检测。

（三）结果判定

群体内遗传变异采用平均杂合度指标或群体平衡状态方法进行评价。当平均杂合度在

0.5~0.7 时，群体为合格的封闭群树鼩群体。或用群体是否达到平衡状态来判定，如果没有达到平衡状态，该封闭群树鼩群体判为不合格。

第六节　分 析 报 告

本标准检测方法主要涉及封闭群树鼩微卫星分子标记的筛选，关键试验内容如下：

一、材料和方法

（一）材料

动物：所用树鼩均来源于医学生物学研究所树鼩种质中心饲养的 F0 代滇西亚种树鼩（生产许可证号：SCXK（滇）K2013-0001），共抽取 30 只，其中雌性、雄性各占一半，分别对 30 只树鼩尾静脉采血各 0.3mL，用血液基因组 DNA 提取试剂盒（天根 DP318-02）提取 DNA 样本，Nanodrop-1000 测定质量和浓度，将 30 份样本 4℃保存备用。

（二）方法

1. 位点和引物的筛选

从 NCBI 中下载树鼩全基因组序列片段，使用 SSRHunter 软件设定单元碱基个数最大值为 5，单元重复次数最小值为 15 进行微卫星筛选，选出了约 700 个位点，从中择优选出重复次数大于 30 次、单元碱基 2~5 个的位点约 100 个，然后使用 Primer5.0 软件设计引物，设计过程中将含有发卡结构、错配、引物二聚体等不良影响因素较多的位点剔除，最后保留 33 对引物作为初筛备选位点，编号 1~33。连同从文献中选取的另外 13 对非滇西亚种树鼩的引物共 46 对引物交由 TaKaRa 公司合成。

2. 梯度 PCR 扩增和产物检测

使用 TaKaRa 公司 PCR 试剂盒（R011）做温度梯度 PCR，PCR 反应总体系为 25μL，10×PCR buffer2.5μL，dNTP2μL，上游引物（25pmol/μL）0.2μL，下游引物（25pmol/μL）0.2μL，*Taq* 酶 0.25μL，DNA 模板 1μL，灭菌双蒸水 18.85μL，PCR 反应条件：94℃预变性 3min，94℃变性 35s，退火 40s（退火温度 50℃~56℃），72℃延伸 40s，30 个循环，72℃充分延伸 5min。

二、结果

（一）电泳结果

电泳 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳（图 1），选取条带明亮清晰的再进行 12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳，电泳后银染显色（图 2），剔除扩增后无产物、产物特异性差的位点，保留条带清晰、特异性强的微卫星位点共 29 个，同时通过引物在不同退火温度的产物电泳图的比较确定各引物的合适退火温度。

（二）STR 扫描结果

有 22 个位点可见典型的 Stutter 峰，如图 3（图 3 为位点 TBC26 的 STR 扫描图）。将筛选保留的新位点编号 TBC15~TBC30。22 个位点的引物和退火温度等见表 1。

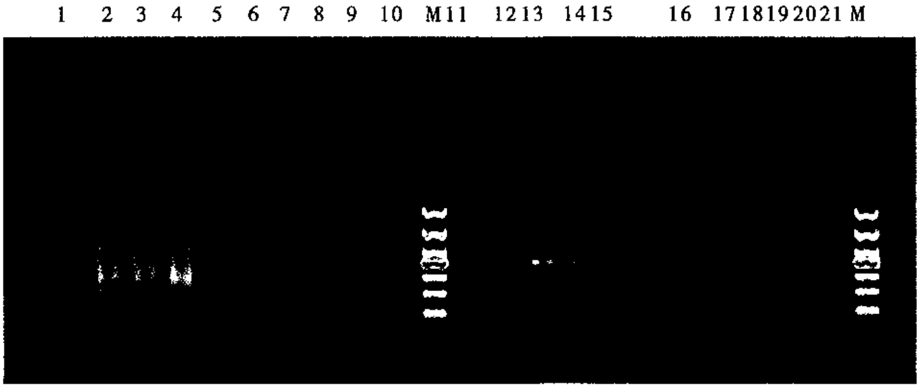

图 1　引物初筛备选位点 4、5、TBC6、TBC7 在树鼩基因中扩增后琼脂糖电泳

M：DL1000marker；1~5 为初筛备选位点 4，6~10 为 TBC17，11~15 为 TBC18，16~21 为除筛备选位点 7

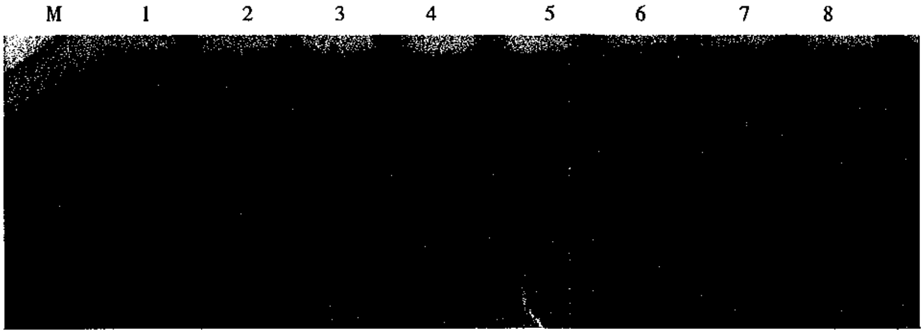

图 2　引物 TBC19、TBC20 在树鼩基因中扩增后聚丙烯酰胺电泳

M：DL1000marker；1~4 为 TBC19，5~8 为 TBC20

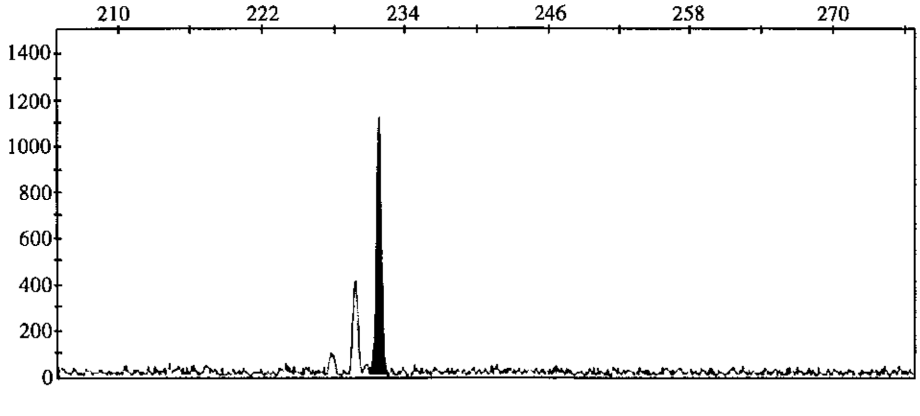

图 3　引物 TBC26 在树鼩基因中扩增后 STR 基因扫描图

表 1 各微卫星座位的引物序列、最佳扩增温度、等位基因数及分布范围

位点	引物序列（5′-3′）	等位基因分布范围（bp）	等位基因数	Mg^{2+} 浓度（mmol/L）	退火温度（℃）
TG 4	F：TGAAAACTGGCAATTCATATGC R：CAATCCTTTTTCGTTAGTTTTGTG	134~152	4	1.5	52
TG 22	F：GTGAGTGCACTTGCCCTGTA R：TCCTGAACCTGGTGGCTAAC	162~198	5	1.5	55
JS188	F：ACACACACAAAACTCATTTTATCC R：TCTACACGAATGTGCCAACC	182~190	5	1.5	57
SKTg22	F：GAGTGCACTTGCCCTGTAAC F：TCCTGAACCTGGTGGCTAAC	160~172	5	1.5	57
TB1	F：ATCAGAATCTGGTTTCAAAGGT R：GCACACCATGATGTAGCTGT	123~129	3	1.5	56
TB6	F：AGACAGAATGCAAGAAATCAC R：ATGTGCAATGTAATAGTTCCAG	418~432	4	1.5	56
TBC15	F：ACTCAACCCGATTCCAAAC R：GAGCTTATGTGCCCAAGA	380~450	6	1.5	54
TBC16	F：AGACAGTGCTGCAATGTG R：CTCCTTTTCTTTATCATACAGT	390~440	7	1.5	53
TBC17	F：AGCAGATAATAACAAACA R：TAAACTGTAAAGGAAAGA	320~340	3	1.5	52
TBC18	F：TTTTGGTATGGATCTCCT R：AGTGAAATCAACAGCCTTC	283~291	3	1.5	52
TBC19	F：AGGGAACCAAATGAACAA R：GTCACCGAAGTCACAACC	196~208	6	1.5	53
TBC20	F：TTTAATTTGACCAGACAC R：TGGCAATATGACATAGAC	178~190	4	1.5	53
TBC21	F：AGGAAAAGGGACTTACTG R：TTGGGAATCAAATGACTATA	234~246	4	1.5	52
TBC22	F：TGGCTTATCCTACTGGTC R：CTTTGTAGTTGCTGCTTT	266~290	12	1.5	51
TBC23	F：GCTTTGTCACTTTCCTTCCCTA R：TGCGCTCGTGGCTATTTT	166~262	16	1.5	53
TBC24	F：TGGAAATAACAGCCACAA R：ACCTGCCCCAGTAATAAG	480~507	3	1.5	53
TBC25	F：TGTCTCCCTGGTCATATT R：GTGCTCTTCTCAGCGTTT	386~426	8	1.5	54
TBC26	F：CATCCCTGAATCCAAGCC R：CACCAGCAAGGTAACTCC	206~236	6	1.5	53

续表

位点	引物序列（5′-3′）	等位基因分布范围（bp）	等位基因数	Mg^{2+} 浓度（mmol/L）	退火温度（℃）
TBC27	F：GTTAAGGCACTGGACATT R：GTGAACCCACAAATAATCTA	220~246	3	1.5	55
TBC28	F：TGGGCTGGAAATACATAA R：GCTGTGAGACCCTGTTGG	173~191	6	1.5	54
TBC29	F：CAAATCAAAATGAGCCAAAA R：TCGGGACTCAAACTGTGG	123~127	2	1.5	53
TBC30	F：AGCCTGGGCTGGAAATAC R：GCTGTGAGACCCTGTTGG	178~194	5	1.5	53

三、小结

树鼩相关遗传研究较少，没有建立有效的遗传检测方法极大地限制了它的应用。本实验采用的微卫星分子标记技术已被广泛地应用于生物群体遗传特性的检测中，STR 基因扫描技术比琼脂糖凝胶电泳、聚丙烯酰胺电泳技术结果更加准确客观，可以检测到微小片段差异，相对于以电泳技术确定等位基因数，STR 基因扫描可以得到更准确的等位基因数。筛选出的 22 个位点可为封闭群树鼩的遗传质量监测提供科学依据，可以对封闭群繁殖四代以上的树鼩种群，使用微卫星标记扩增检测，计算每世代的有效等位基因数（Ne）、观察杂合度（*Ho*）、期望杂合度（*He*）、遗传分化指数（FST）等，评估种群各个世代的遗传关系。

第七节 国内外同类标准分析

目前尚无相关国际标准，对比云南省地方标准 DB 53/T 328.3—2010《实验树鼩 第 3 部分 遗传质量控制》，根据目前树鼩主要为封闭群的实际情况，取消近交系等目前尚无实际种群的定义和质量控制标准；该地方标准制定较早，所列 9 个微卫星分子标记数量偏少，无法完全反映该群体的遗传概貌，并经重新验证其中仅有 2 个可用。在本标准的制定过程中，通过大量筛选验证试验的不断丰富和完善，最终确定了适合封闭群树鼩滇西亚种的 22 条微卫星分子标记，本标准中应用的封闭群树鼩的定义和命名、繁殖方式引自标准 GB 14923—2010《实验动物 哺乳类实验动物的遗传质量控制》。

第八节 与法律法规、标准关系

在本标准的制定过程中，严格遵循国家科委颁发的《实验动物管理条例》和国家科委与国家技术监督局联合颁发的《实验动物质量管理办法》，同时参考国家标准 GB 14923—2010《实验动物 哺乳类实验动物的遗传质量控制》。在封闭群树鼩的遗传质量控制方面迄今无国家层面的相关标准，有地方标准。但是云南省地方标准 DB 53/T 328.3—2010《实

验树鼩第 3 部分　遗传质量控制》，颁发时间较早，前期研究数据不足，所列内容已不够科学严谨，而本标准不只是简单的对其进行补充完善，而是立足实际情况在大量科学实验基础上的提高和创新，更具有科学性和可操作性。

第九节　重大分歧的处理和依据

从标准结构框架和制定原则的确定、标准的引用、有关技术指标和参数的试验验证、主要条款的确定直到标准草稿征求专家意见（通过函寄和会议形式多次咨询和研讨），均未出现重大意见分歧的情况。

第十节　作为推荐性标准的建议

本标准的制定旨在对树鼩的标准化发展起到指导和引领作用，提出的内容主要是树鼩的遗传分类及命名、繁殖方法和封闭群的遗传质量标准，并不直接涉及保障人体健康、人身、财产安全等强制性标准领域，新标准实施的过程也是积累经验、逐步推进的过程。因此，根据《中华人民共和国标准法》第七条的规定，建议将本标准作为推荐性标准发布实施。

第十一节　标准实施要求和措施

本标准在制定时，充分借鉴了国家标准 GB 14923—2010《实验动物　哺乳类实验动物的遗传质量控制》，在此基础上，结合我国目前树鼩的现有水平和发展趋势，基本上代表了我国封闭群树鼩遗传质量控制要求和水平。但是，由于本团体标准是首次制定，还需要经过实践的检验逐步完善，建议作为推荐性标准执行。

建议实验动物管理部门在制定树鼩生产单位审批和检查相关文件时参考此标准，提出具体措施；建议树鼩生产和使用单位在签订相关合同时，参考本标准对树鼩的质量控制提出具体要求。

第十二节　本标准常见知识问答

问：本团体标准与云南省地方标准“实验树鼩　第 3 部分”均涉及遗传质量控制，请问在实际操作中应如何参考？

答：云南省地方标准 DB 53/T 328.3—2010《实验树鼩　第 3 部分　遗传质量控制》，由于颁发时间较早，前期研究数据不足，所列 9 个微卫星分子标记数量偏少，无法完全反映该群体的遗传概貌，本标准共检测 22 个微卫星分子标记，基本可涵盖封闭群树鼩种群的遗传全部信息，建议采用本标准进行封闭群树鼩的遗传质量控制。

参 考 文 献

李婧潇，王新兴，王文广，等. 2011. 中缅树鼩微卫星分子标记的筛选. 中国实验动物学报，19（4）：312-315.

王文广，黄晓燕，徐娟，等. 2012. EV71 可感染幼龄中缅树鼩. 动物学研究，（1）：7-13.

Amako Y，Tsukiyama-Kohara K，Katsume A，et al. 2010. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in Tupaia belangeri. J Virol，84（1）：303-311.

Fan Y，Huang ZY，Cao CC，et al. 2013. Genome of the Chinese tree shrew. Nat Commum，4：1426.

Liu XH，Yao YG. 2013. Characterization of 12 polymorphic microsatellite markers in the Chinese tree shrew（Tupaia）belangeri chinensis. Zool Res，34（2）：62-68.

Yan H，Zhong GC，Xu GW，et al. 2012. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. eLife，1：e00049.