

ICS 65.020.30

B 44



中国实验动物学会团体标准

T/CALAS 11—2017

实验动物 树鼩遗传质量控制

Laboratory animal - Genetic quality control of tree shrew

2017-05-18 发布

2017-05-18 实施

中国实验动物学会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则编制。

本标准由中国实验动物学会归口。

本标准由全国实验动物标准化技术委员会（SAC/TC281）技术审查。

本标准由中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会提出并组织起草。

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。

实验动物 树鼩遗传质量控制

1 范围

本标准规定了封闭群树鼩的命名、繁殖方法和遗传质量的检测方法。
本标准适用于封闭群树鼩的遗传质量监测。

2 规范性引用文件

GB 14923—2010 实验动物 哺乳类动物的遗传质量控制

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

普通级树鼩 conventional (CV) tree shrew

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。

3.2

封闭群（远交群） closed colony (outbred stock)

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。

4 封闭群树鼩命名

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。

5 封闭群树鼩繁殖

5.1 原则 选择封闭群树鼩繁殖方法的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。

5.2 引种

5.2.1 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。

5.2.2 根据繁殖方式，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）。

5.3 方法 封闭群应足够大，以保持封闭群树鼩的遗传基因的稳定，并避免近亲交配。具体繁殖方法按照 GB14923--2010 中附录 B 执行。

6 封闭群树鼩的遗传质量监测

6.1 检测方法 具体方法执行附录 A。采用树鼩 22 个具有高度多态位点作为遗传检测的微卫星 DNA 标记。

6.2 抽样 按表 1 要求从每个封闭群中随机抽取非同窝树鼩，雌雄不限。

表 1 封闭群树鼩遗传检测抽样要求

群体数量	抽样数量
少于 100 只	≥ 15 只
大于 100 只	≥ 30 只

6.3 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，该封闭群树鼩群体判为合格。或用群体是否达到平衡状态来判断，如果没有达到平衡状态，该封闭群树鼩群体判为不合格。具体方法执行附录 A。

6.4 检测频率 封闭群树鼩种群每世代至少进行一次遗传质量检测。

附 录 A

(规范性附录)

封闭群树鼩的微卫星 DNA 标记检测方法

A.1 仪器设备

PCR 仪，遗传分析仪，4℃冰箱，-20℃冰箱，高速冷冻离心机，水浴锅，0.0001g 感量的分析天平，pH 计，紫外分光光度计。

A.2 基因组 DNA 的提取

用酚-氯仿萃取法或试剂盒提取树鼩基因组 DNA。

A.3 微卫星位点

用 22 个树鼩微卫星位点检测封闭群树鼩的遗传概貌。微卫星各位点的名称、引物序列、等位基因数、PCR 反应的 T_m 值见附表 1。

A.4 PCR 扩增

A.4.1 PCR 扩增的体系

PCR 总反应体积为 50μL，其中 10×PCR buffer、dNTP、*Taq* 酶按照不同试剂盒的推荐量加入，上下游引物（100pmol/μL）各 1μL，基因组 DNA 1μL，用纯水（ddH₂O）补足体系到 50μL。

PCR 反应程序为：94℃预变性，3min；94℃变性，35s；退火温度（各位点退火温度参见表 A），40s；72℃延伸，40s；30 个循环；72℃继续延伸 5min；扩增产物 4℃保存。

A.4.2 PCR 产物的检测

PCR 产物，经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳以及凝胶成像系统拍照检测扩增结果。

A.4.3 扩增产物的 STR 扫描

扩增产物经过琼脂糖凝胶电泳检测确保扩增出目的片段后，选择分别以 FAM、HEX、TAMRA 标记的三个位点的扩增产物，以 1:1.5:1.5 体积比混合，取 1μL 上样进行 STR 扫描。

A.5 STR 扫描结果的判读与统计分析

A.5.1 STR 扫描结果的判读 扫描结果出现两种波形：一种为纯合基因型，只有一个主波；另一种为杂合基因型，有两个主波。同时，根据软件读出波峰处的扩增产物的碱基（bp）数。

由基因分型软件读出每个样本在每个微卫星位点的扩增片段大小。每个位点的等位基因根据扩增片段从小到大顺序排列记录为 a, b, c, d 等。

A.5.2 运用群体遗传分析软件对数据进行分析 将所有样本的每个微卫星位点的基因型以 ab、bb 等形式输入群体遗传分析软件的数据文件，计算样品在各微卫星位点上的基因频率、平均观察等位基因数、平均有效等位基因数（Ne）、平均杂合度（H）等。

A.6 结果判定

平均杂合度在 0.5~0.7，且期望杂合度与观测杂合度经卡方检验无明显差异时，为合格的封闭群树鼩群体。或者，首先得到各个位点上各基因频率、基因型频率的实际值，然后可计算出基因频率和基因型频率的预期值。用实际值和预期值比较，通过卡方检验，可知被监测群体是否达到平衡状态。如果没有达到平衡状态，说明群体的基因频率或基因型频率发生变化，该封闭群树鼩群体判为不合格。

A.7 结果报告

根据判定结果对被检测的封闭群树鼩群体做出检测报告。

附表 1 各微卫星座位的引物序列、最佳扩增温度、等位基因数及等位基因分布范围

位点	引物序列 (5'-3')	等位基因分布范围 (bp)	等位基因数	Mg ²⁺ (mmol/L) 浓度	退火温度 (℃)
TG4	F: TGAAAACTGGCAATTCATATGC R: CAATCCTTTTTCGTTAGTTTGTG	134~152	4	1.5	52
TG22	F: GTGAGTGCACCTTGCCCTGTA R: TCCTGAACCTGGTGGCTAAC	162~198	5	1.5	55
JS188	F: ACACACACAAAACCTCATTTTATCC R: TCTACACGAATGTGCCAACC	182~190	5	1.5	57
SKTg22	F: GAGTGCACTTGCCCTGTAAC R: TCCTGAACCTGGTGGCTAAC	160~172	5	1.5	57

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⁺ (mmol/L) 浓度	退火温度 (℃)
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: CTCCTTTTCTTTATCATAAGT	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: TGCCTCTGCTGGCTATTTT	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: CACCAGCAAGGTAAGTCC	206~236	6	1.5	53
TBC27	F: GTTAAGGCACTGGACATT R: GTGAACCCACAAATAATCTA	220~246	3	1.5	55
TBC28	F: TGGGCTGGAATACATAA R: GCTGTGAGACCCTGTTGG	173~191	6	1.5	54
TBC29	F: CAAATCAAAATGAGCCAAAA R: TCGGGACTCAAAGTGTGG	123~127	2	1.5	53
TBC30	F: AGCCTGGGCTGGAATAC R: GCTGTGAGACCCTGTTGG	178~194	5	1.5	53

参考文献

- 李婧潇, 王新兴, 王文广, 等. 2011. 中缅树鼯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 可感染幼龄中缅树鼯. 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 Commun, 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.
-