

第二十一章 T/CALAS 21—2017《实验动物小鼠、大鼠微卫星 DNA 标记检测方法》实施指南

第一节 工作简况

中国实验动物学会作为团体标准改革的试点单位，结合实际需求，提出了该标准的研究和撰写，由中国食品药品检定研究院主持起草，首都医科大学、浙江省医学科学院协作完成。

第二节 工作过程

2015 年 12 月编写组提出框架，2016 年上半年完成标准草案的编写。2016 年 10 月 10 日在广西召开的第十二届中国实验动物学会学术年会上征求与会专家意见，经修改成为征求意见稿。公开征求意见，提出意见单位 5 个，提出意见数量 25 个，采纳 24 个，不采纳 1 条。经修改成为送审稿。

2017 年 2 月 21 日经过标准审查会议讨论，与会专家未提出新的修改意见，形成标准报批稿。

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

DNA 多态性是实验动物遗传检测的重要手段，在动物的基因组中都发现了许多简单重复序列，因为其重复单位比小卫星 DNA 短，故称为微卫星 DNA (microsatellite)。微卫星 DNA 重复单位以二核苷酸重复单位 AC/TG 最为多见，重复单位的重复次数是可变的，一般为 10~20 次左右，这就构成了微卫星 DNA 多态性的基础。微卫星 DNA 两端的侧翼序列是较保守的单拷贝序列，因此，微卫星 DNA 能被特异地定位在染色体的特定位置上。根据研究结果，制定出小鼠、大鼠遗传检测法，用于遗传质量控制、遗传组成分析和品系鉴别。

国家标准 GB 14923—2010《哺乳类实验动物的遗传质量控制》，要求进行封闭群动物的遗传质量监测，具体检测方法推荐使用 DNA 多态性方法。在国家标准 GB/T 14927.1—2008《近交系小鼠、大鼠生化标记检测法》中仅有对生化标记方法的描述，并未提及 DNA 多态性方法。本标准的制定可以作为 GB 14927.1—2008《近交系小鼠、大鼠生化标记检测法》的补充，无须废止现行有关标准。

该标准的制定有助于促进我国国家标准尽快达到国外先进标准。实验动物遗传质量控制要求每年进行至少一次遗传质量检测,自本标准实施之日起,遗传质量监测应采用生化标记方法和 DNA 多态性方法进行检测。

第四节 编制原则

本标准在制定中应遵循以下基本原则:

- (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。

第五节 内容解读

标准包括范围、规范性引用文献、术语和定义、操作程序、结果判定等几部分,重点是具体操作和结果判定,从 DNA 样品制备、PCR 反应体系、电泳、基因型判定进行了描述。结果判定分为近交系和封闭群如何判定,给出了判定标准,供实际操作时参照。这些判定标准是根据实验数据整理而成,经过了不同保种单位和动物种群的验证,详见发表论文。对封闭群的判定,通过平均杂合度和利用哈代-温伯格定律进行平衡状态检验,也是当前的通行做法。

描述为:当平均杂合度在 0.5~0.7 时,且期望杂合度与观测杂合度经卡方检验无明显差异时,群体为合格的封闭群群体。或者利用哈代-温伯格定律,通过基因频率的卡方检验,判定是否处于平衡状态。

第六节 分析报告

本实验参考相关文献从 GenBank 中共挑选出 53 个小鼠微卫星位点进行引物合成。首先摸索并进一步优化这些位点的 PCR 扩增条件;53 个微卫星位点中经过条件优化后,获得 36 个扩增条带清晰明亮、少或无杂带的位点。在多态性筛选方面,本实验选用 1.5% 的琼脂糖电泳筛选初步确定等位基因数目。根据位点的等位基因数、多态性和分布情况,进一步筛选这些位点,30 个均匀分布在小鼠的 20 对染色体上,等位基因数多,多态性丰富,能够客观、真实地反映封闭群小鼠种群的遗传结构。

实验大鼠同样参照文献从 GenBank 中 50 对覆盖全染色体组的微卫星标记中,筛选了 31 对条带清晰的微卫星引物。其中 6 对在常用近交系大鼠同品系内表现为单态性而在品系间表现为多态性,用于近交系大鼠的微卫星标记检测。25 对在封闭群中多态性丰富的覆盖大鼠的全部 19 对染色体的标记用于封闭群遗传参数的测定和群遗传质量评价。

第七节 国内外同类标准分析

国际上对微卫星 DNA 检测没有统一的标准,主要生产机构采用的位点也不一致,如

Jackson Lab. (JAX)、Charles River、Taconic、Harlan 等均提出了遗传监测标准,所采用的位点数量不同。如 Charles River 用 6~9 个 STR 位点进行近交系检测;Taconic 采用 2 个 STR 区分有差别的近交系。

国内尚未有相关标准出台。

第八节 与法律法规、标准关系

本标准作为 GB14923—2010 的补充检验方法,是对 GB14923—2010 标准的支撑。

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

建议作为推荐标准。

第十一节 标准实施要求和措施

发布后即可实施,因为多个实验室已经具备实施能力。同时,应加强宣传和培训,让更多的实验室能够使用该标准,发挥该标准在遗传检测方面的作用。

第十二节 本标准常见知识问答

问:本标准与 GB14927.1—2008 各有何特点?

答:GB14927.1—2008 采用的是实验动物遗传质量检测经典的生化标记方法,依靠同工酶分型技术从蛋白质水平对大小鼠进行遗传质量评价。标准方法的优点在于经济易操作。但仍有费时、需要处死动物等不足。

本标准采用了 DNA 标记法及二代测序分型技术,能够实现快速高通量的动物遗传质量检测,并且不需要处死实验动物,更符合实验动物福利伦理准则。但有时也会出现 PCR 污染、假阳性等问题,需要做好空白对照,必要时进行重复验证。

在实际应用中,可以根据各地的具体条件,选择采用。

问:可以用于哪些品系的大小鼠检测?

答:本标准适用于常用近交系大小鼠及所有封闭群实验用大小鼠的遗传质量评价。