

ICS 65.020.30

B 44



中国实验动物学会团体标准

T/CALAS 21—2017

实验动物 小鼠、大鼠微卫星 DNA 标记检测方法

Laboratory animal - Methods for microsatellite markers of laboratory mice & rats

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 给出的规则编写。

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：中国食品药品检定研究院、首都医科大学、浙江省医学科学院。

本标准主要起草人：王洪、魏杰、刘月环、陈振文、岳秉飞。

引 言

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。

实验动物 小鼠、大鼠微卫星 DNA 标记检测方法

1 范围

本标准规定了实验动物小鼠、大鼠的 DNA 多态性检测方法。

本标准适用于实验动物小鼠、大鼠遗传组成分析、品系鉴别和质量控制。

2 规范性引用文件

下列文件对于本标准的应用是必不可少的。凡是注明日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本标准。凡是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 14923 《实验动物 哺乳类实验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规程。

微卫星 DNA microsatellite DNA

动物基因组中由 1~6bp 碱基组成一个重复单位，再首尾相连而形成的串联重复序列，简称 STR。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，形成了微卫星 DNA 的多态性。

4 操作程序

4.1 试剂 DNA 提取试剂盒，PCR 反应试剂盒，琼脂糖。

4.2 实验设备和器材

4.2.1 仪器设备：电泳仪，离心机，PCR 仪、遗传分析仪。

4.2.2 器材：剪刀、镊子、移液器、离心管、PCR 管、滤纸。

4.3 微卫星位点的选择

4.3.1 近交系小鼠

在表 1 中选择 20 个微卫星位点，原则上需覆盖小鼠的 20 条染色体。

表 1 30 个实验小鼠微卫星位点的扩增条件和染色体分布

位点	引物序列 (5'-3')	染色体	MgCl ₂ (mmol/L)	退火温度 (°C)
D1Mit365	ATCACCTGCAATAGTACCCCC TTAATCAGTCATCATAGGCTTTTCC	1	1.5	54
D2Mit15	ATGCCTTAGAAGAATTTGTTCCC CTTGAAAAACACATCAAAATCTGC	2	1.5	54
D3Mit29	GATGAGAGATTCTGATGTGGAGG CCAGCCTCAGTATCTCAAAACC	3	1.5	64
D4Mit235	AGGCCAAAGGTTGGATTCT GAGACTTGAAATTGAAGCATTTAGG	4	1.5	55
D5Mit48	GACTATCATCCAAGCCAAGACC AAAAGACACTTTCCTGACATAGC	5	1.5	60
D6Mit102	CCATGTGGATATCTTCCCTTG GTATACCCAGTTGTAAATCTTGTGTG	6	1.5	54
D6Mit8	TGCACAGCAGCTCATTCTCT GGAAGGAAGGAGTGGGGTAG	6	1.5	60
D6Mit15	CACTGACCCTAGCACAGCAG TCCTGGCTTCCACAGGTACT	6	1.5	60
D7Mit281	TTCTCTACCTCCTGAGCCA GCCACAAGGAAGACACCATT	7	1.5	60
D7Mit12	GCTGGGTTTATTCATTGCAA TCCAGCTCATGGGTAGAAGA	7	1.5	58
D8Mit33	TTTGAGCAAAGGACTTGCCT TTATTCTGCCTCAACACCACC	8	1.5	60
D8Mit14	TTTTCACTCACGTGTGCG GTCTCTCCTTCCTGGCGCTG	8	1.5	63
D9Mit23	AAGAAGTTTCCATGACATCATGAA AGAAGAAAATTCTTGACAGCTCTG	9	1.5	65
D9Mit21	CAGTCCCTGGTTAATAACAACAAC TATAGTCCATTGTGGCAGAGGAGT	9	1.5	59
D10Mit12	ATGTCCAAAACACCAGCCAG GGAAGTGATGGAGCTCTGTT	10	1.5	54
D11Mit4	CAGTGGGTCATCAGTACAGCA AAGCCAGCCCAGTCTTCATA	11	1.5	54
D12Mit7	CCGGGGATCTAAACTACAT TCTAATCTCAGCCCAATGGT	12	1.5	60
D12Nds11	CATTTGAGGACAGTCAGGATC GGAACCTTCATGCAGTACTAG	12	1.5	54

续表

位点	引物序列 (5'-3')	染色体	MgCl ₂ (mmol/L)	退火温度 (℃)
D13Mit3	TCAGGCTCATCCCAGATACC TTTTGCAGAGAACACACACC	13	1.5	60
D14Mit3	GCAATTACACCTCCTCGGAG CACAAGGGCATATGGTACCC	14	1.5	54
D15Mit5	CTTCCTAATTCCTGTCAAGCAAAT GTTTCATTGGTCAATGGAAACTTA	15	1.5	54
D15Mit15	AGCATACACTCTCTTGTTCCTGCT AATAAATACCAGAGAAGCACCGTG	15	1.5	60
D16Mit9	TCTTGCTCTGGTATCAACTACAGG CCTCCTTGCCCAGCTAAAC	16	1.5	55
D17Mit11	TGAATTTATGAGGGGGGTCA TGCCCATATCTCTTTATACACA	17	1.5	54
D17Nds3	TTCCTGTGGCGGCCTTATCAG AGACAATGGGTAACAGAGGCA	17	1.5	58
D18Mit19	ATTGGGTGTTCAAGGTGCAG ATGCACAATAGCTCATAGCTTCT	18	1.5	55
D18Mit9	AGAGGCATTGCACACACAAG GCCCCTTGGAGAGTTGGT	18	1.5	60
D19Mit16	TCTTAGGTAATCTCCCTTAGGGG TGGTAAATGTAAAACGAAGCATG	19	1.5	54
D19Mit3	CTTCCCCTACTGCAGTGCTC TTGCATAGTTGGCCAAAGTG	19	1.5	60
DXMit16	CTGCAATGCCTGCTGTTTA CCGGAGTACAAAGGGAGTCA	20	1.5	58

4.3.2 封闭群小鼠

在表 1 中选择 25 个微卫星位点, 原则上需覆盖小鼠的 20 条染色体。

4.3.3 近交系大鼠

用表 2 的微卫星标记进行扩增, 应用 6 个位点区分不同近交系。

表 2 6 个近交系大鼠微卫星引物序列及常见品系带型

引物名称	序列 (5'-3')	常用品系带型		
		Lewis	BN	F344
D3Wox9 (F)	TTCAGGTATGATTCGGGAAC ATTGGCGATATCATTTCACTAAC	b	b	a
APOC3 (F)	GATTTGAAGCGATTGTCCAT GTCTAGCTGCCCACAGGAG	b	a	b

续表

引物名称	序列 (5'-3')	常用品系带型		
		Lewis	BN	F344
D11mgh3 (F)	GGAGCTGAAATACGAGAGAAATAA GTCCTGCTGGCTGTGCAT	a	c	b
D12Mit2 (F)	GTGGCTCTTTTCCTTAGGGA TCGGCTTCTGAATGTATTGG	b	b	a
RATIL6G (F)	ACTCTACAAGGACCAGAAAGTG GCATCTTAGCTGGGCTGACC	a	a	b
PA2S (F)	AGTGTGGCCCTCCTATGCATAC AGAACATGCTGTTGTCAGGCTC	a	b	b

注: 按泳动快慢将条带依次命名为 a、b、c……带, 泳动最快的命名为 a 带。

4.3.4 封闭群大鼠

利用表 3 的 25 个微卫星位点进行扩增, 原则上需覆盖大鼠的 21 条染色体。

表 3 25 个封闭群大鼠微卫星位点序列和染色体分布

位点	引物序列 (5'-3')	染色体	片段大小	退火温度 (℃)
D1Rat345	TTCACACAAATGCCACCACT CAAAGAGATAGGGCGACAGG	1	120~129	55
D1Mgh14	CCGCACTGAGCTCTCAGAG CCCAACCATTGAGCTAGTAAGG	1	125~159	59
D2Wox15	GGTGCTAGTAGACAATAAGATAGAT TTCATGAGTTTTCACTGTTTGC	2	137~159	53
D2Mgh26	ATTGGTGATCAGATTTTTTCTCC CCCAACCATTGAGCTAGTAAGG	2	133~145	55
D3Wox9	TTCAGGTATGATTCGGGAAC ATTGGCGATATCATTTCACTAAC	3	115~125	53
D4Arb10	ACTCATCTTCTGAGGAGTAGCG TTCACAGTCTATTTGGTAGGGC	4	370~416	57
D4Mit15	CCTAATGACAGCAATAGAAACTACG TTTTGGTACTGGAGAAAGTTGG	4	181~218	55
D5Hmge2	ATGTTCCCTGATGTCCCTTC AAACCATGCCACGTGAAC	5	215~225	54
D6Mit1	TTAGGAGAGAACTGAAAGTTGTCC ATGGTGCACTATGGTGGTCA	6	113~149	56
D7Mgh3	CGGCATGTGTCTCTGTGTG	7	232~246	57

续表

位点	引物序列 (5'-3')	染色体	片段大小	退火温度 (℃)
D8Rat14	TGACTTCTGGTGTCTCCTCACG	8	157~177	55
	GGCCGGTCTAATTATTTCTTCA			
D9Mit2	GCCCATACGTTGCATCAAGT	9	175~199	57
	TGACCAGTTAGCCCTTTCCA			
D10Wox12	GGGAGCAGGGTTCTACACAG	10	91~99	56
	CGCTGGGAGGAAAGAGAG			
D11Mgh3	AGGCTTGCACTCTGTGTTTG	11	148~190	56
	GGAGCTGAAATACGAGAGAAATAA			
D11Wox3	GTCCTGCTGGCTGTGCAT	11	183~198	53
	CACTTTGAGGCCATTCTGAA			
D12Mit2	CCTTCTCTTTGTGAAAAATAAAGTC	12	189~219	54
	GTGGCTCTTTTCCTTAGGGA			
LCA	TCGGCTTCTGAATGTATTGG	13	154~170	56
	TACAGAGCAAGCTCCAGGAC			
ALB	TGTTTCTAATCCATAGGAAGTGC	14	123~141	53
	TTTTCGTAGTAACGGAAGCC			
D15Mit3	TAAGGATTCTCAGATGCAAATG	15	184~211	58
	GACCTGACCTGTTGTGGGAT			
MBPA	GTTGCTCTCTGGCCTCCTC	16	137~159	56
	ACCTACACGGACACATGGTG			
ACRM	GTTGTACTTCCTGATTTCCCTTT	17	116~130	54
	AGGAAATTAAGAGAAGTTGGGACT			
TILP	TATGCTCTTTGGGCAGCTTA	18	224~259	55
	AATCACTGGATGCTGGAAGA			
D19Rat58	AGGGAGCAGAACTACTAAAGATACA	19	105~141	54
	TCTTATTTTCAGCAGGCACCA			
TNF	TCTCCTTTTCTTTGACTTGGG	20	117~130	54
	AGGAAATGGGTTTCAGTTCC			
PRPS2	CAGGATTCTGTGGCAATCTG	X	139~172	55
	GTTTTCCCGCTTCACCAG			
	AGAAGGAGAAAGCGACCG			

4.4 操作步骤

4.4.1 采样

近交系采样原则参照 GB14923 中 5.2.1.1, 封闭群采样原则参照 GB14923 中 6.2.1.1 的相关规定。具体操作如下。

(1) 观察动物外观, 核对编号;

(2) 实验大鼠、小鼠行眼底静脉采血 200 μ L, 或取 0.5cm 尾尖, 或采用安乐死处死动物, 取肾脏 1 个。-20 $^{\circ}$ C 低温保存。

(3) 提取基因组 DNA: 用苯酚氯仿法或试剂盒提取基因组 DNA。

4.4.2 PCR

4.4.2.1 PCR 扩增体系:

PCR 总反应体积为 20 μ L, 其中含 10 $\times$ PCR buffer: 2 μ L, 上下游引物 (10pmol/ μ L) 各 1 μ L, 4 $\times$ dNTP 100 μ mol/L: 1.2 μ L, *Taq* 酶 5U/ μ L: 1 μ L, 50~100ng 基因组 DNA: 1 μ L, 镁离子终浓度 1.5mmol/L, 纯水补齐 20 μ L。

4.4.2.2 PCR 反应程序:

95 $^{\circ}$ C 预变性, 5min; 94 $^{\circ}$ C 变性, 30s; 退火温度 (各位点退火温度参见附表 1), 30s; 72 $^{\circ}$ C 延伸, 30s; 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 8min; 扩增产物 4 $^{\circ}$ C 保存。

4.4.3 电泳

4.4.3.1 制胶

1 $\times$ TAE 制备 2.5% 琼脂糖凝胶。

4.4.3.2 点样: 取 PCR 扩增结果 5 μ L, 用移液器在凝胶上点样。

4.4.4 凝胶成像系统记录检测结果。

4.4.5 PCR 产物的变性

根据琼脂糖检测的结果, 对 PCR 产物进行稀释。若 2.5% 的琼脂糖检测的条带亮度基本相同, 即 PCR 的扩增效率基本相同, 则荧光染料 FAM、HEX、TAMRA 三种标记的三个位点的 PCR 产物分别取 1 μ L 混合, 加到每孔含 8.5 μ L 的甲酰胺和内标的 96 孔板上 (860 μ L 甲酰胺加 10 μ L 内标, 混匀, 分装到 96 孔板上), 95 $^{\circ}$ C 变性 5min, 迅速放在冰上。待 96 孔板降温后, 用铝箔纸包好, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

4.4.6 基因型的判定

含变性后的 PCR 产物的 96 孔板放入遗传分析仪内进行分析, 原始峰图用基因分型软件进行分析, 确定特定位点各个体的峰形和大小, 判定个体的基因型。

5 结果判定

5.1 近交系大鼠、小鼠 所有样品检测位点的等位基因都符合品系的特征, 没有新的等位基因出现为合格的近交系实验小鼠, 否则判为不合格。表 2、表 4 给出了常用大鼠、小鼠近交系微卫星位点, 可用于判定。

表 4 常见近交系小鼠在 30 各微卫星位点的片段大小

位点	片段大小 (bp)						
	C57BL/6J	BALB/cJ	T739	SCID	DBA/2	FVB	NCPC/2
D1Mit365	92	92	104-108	104	104	92	92
D2Mit15	140	140	158	140	140	170	160
D3Mit29	144	196	144	144-202	180	144	144
D4Mit235	112	96	96	96	96	96	96

续表

位点	片段大小 (bp)						
	C57BL/6J	BALB/cJ	T739	SCID	DBA/2	FVB	NCPC/2
D5Mit48	202	196	208	198	204	198	196
D6Mit102	141	131	139	131	121	171	135
D7Mit281	110	136	136	136	136	136	136
D8Mit33	224	222	222	226	216	224	224
D9Mit23	206	204	208	204	204	208	204
D10Mit12	237	237	237	237	237	215	237
D11Mit4	251	245	251	245	285	251	295
D12Mit7	106	122	106~122	106	106~120	106	106~122
D13Mit3	162	188	172	188	196	188	196
D15Mit5	95	95	111	95	111	111	111
D16Mit9	143	123	131	123	123	123	111~131
D17Mit11	169	145	169	145	145	173	169
D18Mit19	154	160	154	152	156	158	158
D19Mit16	132	132	132~135	132	114	128	132
DXMit16	111	89	93	93	107	93	93
D6Mit8	163	185	173	185	143~185	143~185	149~185
D6Mit15	252	194	152	194	152	152	252
D7Mit12	201	201	233	201	207	201	211
D8Mit14	138	162	138	138~162	162	134	134
D9Mit21	193	193	193	193	179	179	193
D12Nds11	169~174	179	179	174~179	179	179	179
D14Mit3	226	226	226	226	226	226	226
D15Mit15	158	158	158	158	144	144	150
D17Nds3	136	114	156~158	118	122	114	132
D18Mit9	166	156	164	156	156	166	156
D19Mit3	197~201	197~201	197	197~201	197~207	197~201	215

5.2 封闭群大鼠、小鼠

将分型结果用遗传分析软件进行处理, 计算各位点的等位基因数、有效等位基因数、观测杂合度、期望杂合度以及基因频率。由上述指标计算群体的平均杂合度、卡方值、 P 值。根据平均杂合度、卡方值、 P 值, 分析封闭群实验小鼠的遗传结构, 进而评价封闭群实验小鼠的遗传质量。

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，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，该封闭群群体判为不合格。
