

# DB14

## 山 西 省 地 方 标 准

DB 14/T 1942—2019

---

### 实验动物 中国地鼠微卫星 DNA 检测方法

Laboratory animal Method for microsatellite markers of Chinese hamster

2019 - 12 - 01 发布

2020 - 02 - 01 实施

---

山西省市场监督管理局

发布



## 目 次

前言 .....	II
1 范围 .....	1
2 术语和定义 .....	1
3 抽样 .....	1
4 方法 .....	2

## 前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则编写。

本标准由山西省科学技术厅提出、归口并监督实施。

本标准起草单位：山西医科大学。

本标准主要起草人：宋国华、刘田福、陈朝阳、高继萍、张锐虎、续国强。

# 实验动物 中国地鼠微卫星 DNA 检测方法

## 1 范围

本标准规定了实验动物 中国地鼠（以下简称实验中国地鼠）遗传检测抽样数量及微卫星 DNA 检测方法。

本标准适用于实验中国地鼠品系鉴别、质量控制及遗传组成分析。

## 2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 2.1

**实验中国地鼠** laboratory Chinese hamster

指经人工饲养，对其携带的微生物和寄生虫实行控制，遗传背景明确或者来源清楚，用于科学研究、教学、生产和检定以及其它科学实验的中国地鼠 (*Cricetulus griseus*)。

### 2.2

**近交系中国地鼠** inbred strain Chinese hamster

以全同胞或亲子交配方式繁殖 20 代以上的中国地鼠，近交系数达 98.6%以上。

### 2.3

**封闭群中国地鼠** closed colony Chinese hamster

以非近亲交配方式繁殖中国地鼠，在不从外部引入新个体的条件下，至少连续繁殖 4 代以上。

### 2.4

**微卫星 DNA** microsatellite DNA

是指基因组中由 1~6 个碱基组成的串联重复序列。不同个体的重复数不同而形成了微卫星 DNA 的多态性。

## 3 抽样

对近交系中国地鼠抽样数量不做要求。每个封闭群随机抽取非同窝成年实验中国地鼠，雌雄各半。抽样数量按表1进行。

表1 封闭群实验中国地鼠遗传检测抽样要求

群体数量（只）	抽样数量（只）
少于 100	≥15
大于 100	≥30

## 4 方法

### 4.1 采样

观察动物外观，核对编号，中国地鼠取 0.5 cm 尾尖组织或眼眶静脉丛采血，-20℃低温保存。

### 4.2 微卫星位点的选择

各微卫星位点的名称、引物序列、等位基因数、PCR 反应的退火温度见表 2。PCR 引物的 5'端用 FAM 荧光染料进行标记。近交系中国地鼠在表 2 中选择 10 个微卫星位点，封闭群中国地鼠在表 2 中选择 15 个微卫星位点。

表2 中国地鼠微卫星位点

位点	引物序列	退火温度（℃）	片段大小	最大等位基因数
Chm35	F: AGGCTGCTTCCTAAACCCAT	51	354-391	4
	R: CTGGGAAGGCTGAACTCAAG			
Chm93	F: TCTGTGTGTCTGTGAATGCG	58	242-299	7
	R: GGATGTAAGATGGCTCCGAA			
Chm147	F: CATCTGGGCTTTCAATGGAT	58	233-292	9
	R: GCTCCCTAAATAACCCCAA			
Chm79	F: AGGGGAGATCTTGGGTCAGT	51	270-355	5
	R: AACATGGAGGAGCACAAACC			
Chm120	F: GATAGGAGGGAGCAAAAGGG	58	376-432	12
	R: CCTGAGAGCCTCAGAGCAGT			
Chm162	F: TCTTCCCTTCACAACCCAAG	58	167-214	12
	R: AGCAGTGCCCTTTGAAACAT			
Chm10	F: GGCTGGTGATTTC AATGGTT	59	217-357	5

	R:GTTCTTAATGGATCTACCCTGGGACC			
Chm108	F: CAATGGCTGCTAAGAGAGGG	59	392-471	5
	R: GTTCTTTCCCACTCACAATTTTCCTTG			
Chm115	F: TACTCCTGTCTCCACCTCCC	59	171-220	6
	R: GTTCTTTCTGGGGGATGTATGCTCTC			
Chm124	F: CAGATGCCCAAACCTCTCTCC	59	355-404	4
	R:GTTCTTGTCACCCCATGGACTACACC			
Chm134	F: TGCCACATACATGACACAA	59	383-428	5
	R: GTTCTTTCCCAACACCCTCTTCTGAC			
Chm14	F: GACCCCATTCGTAACCAGA	59	259-316	4
	R: GTTCTTCCCACAGTCAGCCCTATATT			
Chm140	F: GCAGCTGGTTTTGAGCTACC	60	168-205	7
	R: GTTCTTTGTTTGATCACTGGAACCCA			
Chm48	F:AAAGGCCTTGAGGTGGAGTT	60	369-448	10
	R:GTTCTTGAGGTAGGCAGGGACTGACA			
Chm54	F:AGTTTGATGATCCCCAGCAC	59	326-367	6
	R: GTTCTTCTACCCCTCTCAGCAACCTG			
Chm9	F:GACAGATCCCGACCCATTTA	59	118-145	5
	R:GTTCTTGTCCCTGAGCAAGTCCAGAGC			
Chm91	F:GCAGAAGCACAAACCAACAA	59	104-145	7
	R: GTTCTTAGGCCAAGCTCTTCTCTCC			

### 4.3 PCR 扩增

#### 4.3.1 提取基因组 DNA

用苯酚氯仿法或试剂盒提取基因组 DNA。

#### 4.3.2 PCR 扩增体系

PCR 扩增总体积为 10  $\mu\text{L}$ ，其中 DNA(20 ng /  $\mu\text{L}$ ) 0.8  $\mu\text{L}$ ，10  $\times$  Buffer 1.0  $\mu\text{L}$ ， $\text{Mg}^{2+}$  (25 mmol/L) 0.8  $\mu\text{L}$ ，d NTP (2.5mmol / L) 0.8  $\mu\text{L}$ ，上、下游引物 (1 pmol / L) 各 0.1  $\mu\text{L}$ ，Taq DNA 聚合酶(5 U /  $\mu\text{L}$ ) 0.1  $\mu\text{L}$ ，dd  $\text{H}_2\text{O}$  6.3  $\mu\text{L}$ 。

PCR 扩增程序：94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min；94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s，退火（退火温度见表 2）30 s，72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 45 s，35 个循环；72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 20 min。扩增产物 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。

### 4.3.3 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。

### 4.3.4 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断后，选择以 FAM 蓝色荧光标记的扩增产物，取 1  $\mu$ L 上样进行 STR 扫描。

## 4.4 STR 扫描结果的判读与统计分析

### 4.4.1 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对数。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断大小。每个位点的等位基因根据扩增片断从小到大顺序排列纪录为 a, b, c, d 等。

### 4.4.2 运用群体遗传分析软件对数据进行统计分析

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 ( $N_e$ )、平均杂合度 ( $H$ ) 等。

## 4.5 结果判定

### 4.5.1 近交系中国地鼠

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中国地鼠。否则判为不合格。

### 4.5.2 封闭群中国地鼠

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。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中国地鼠群体。

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，该封闭群中国地鼠群体判为不合格。