

ICS 65.020.30

B 44



# 中国实验动物学会团体标准

T/CALAS 51—2017

---

## 实验动物 豚鼠微卫星DNA检测方法

Laboratory animal - Method for microsatellite markers of Guinea pig

2017-12-29 发布

2018-01-01 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：浙江大学、浙江省医学科学院。

本标准主要起草人：刘迪文、卫振、刘月环、吴旧生。

# 实验动物 豚鼠微卫星 DNA 检测方法

## 1 范围

本标准规定了实验动物豚鼠 DNA 多态性检测方法。  
本标准适用于实验动物豚鼠遗传概貌分析和遗传质量控制。

## 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，仅所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标准。

### 3.1

**微卫星 DNA** **microsatellite DNA**

指动物基因组中由 1~6 bp 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。

## 4 操作程序

### 4.1 试剂

DNA 提取试剂盒、PCR 反应试剂盒、聚丙烯酰胺。

### 4.2 实验设备和器材

4.2.1 仪器设备：电泳仪、离心机、PCR 仪。

4.2.2 器材：剪刀、镊子、注射器、移液器、离心管、PCR 管。

### 4.3 微卫星位点的选择

4.3.1 近交系豚鼠：在附表 A.1 中选择 20 个微卫星位点，推荐选择的位点为 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16。

4.3.2 封闭群豚鼠：在附表 A.1 中选择 25 个微卫星位点。

a) 观察动物外观，核对编号。

b) 豚鼠心脏采血 2mL，或采用安乐死处死动物，取组织样品。-20℃低温保存。

c) 提取基因组 DNA：用苯酚-氯仿法或试剂盒提取基因组 DNA。

#### 4.4 PCR

4.4.1 PCR 扩增体系: PCR 总反应体积为 20  $\mu\text{L}$ , 其中含  $10\times$  PCR Buffer 2  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物 (10 pmol/ $\mu\text{L}$ ) 各 1  $\mu\text{L}$ , dNTP 100  $\mu\text{mol/L}$  1.2  $\mu\text{L}$ , *Taq* 酶 (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 50 ~ 100 ng 基因组 DNA 取 1  $\mu\text{L}$ , 镁离子终浓度 1.5 mmol/L, 纯水补齐至 20  $\mu\text{L}$ 。

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

#### 4.4.3 电泳

4.4.3.1 制胶: 制备 10% 聚丙烯酰胺凝胶。

4.4.3.2 点样: 取 PCR 扩增结果 10  $\mu\text{L}$ , 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: 凝胶电泳, 硝酸银染色, 凝胶成像仪拍照。

#### 4.5 结果判定

##### 4.5.1 豚鼠 SSR 位点等位基因和基因型的判定

对聚丙烯酰胺电泳图, 用基因分型软件进行分析, 确定特定位点各个体的条带和大小, 判定该个体的等位基因数和基因型。

##### 4.5.2 杂合度分析和 Hardy-Weinberg 平衡

根据 4.5.1 的结果, 用遗传分析软件进行处理, 计算各位点的平均杂合度, 并进行 Hardy-Weinberg 平衡检验。

## 附录 A

(资料性附录)

## 豚鼠微卫星位点

附表 A.1 豚鼠微卫星位点引物序列及扩增条件

序号	引物序列 (5'→3')	退火温度/℃
1	aagggatgtgtgctactgtagg atctcgaaggatgttgagct	60
2	gctgaaacttagctctcagactg agagagatgttggttgcttacc	58
3	tggcaaagtgcttcaatgga ccttgcatagaatactctgggca	60
4	gtctgtggtaatcaggacacc gaatgggtcctggagcatgtctc	59
5	gcacttttaacccgaatgagg gctgtcatggagaaaggtcttgg	59
6	tgtctaacgtaggaaactgcac gatatggctcactccaaggtc	60
7	tcaagtcagcctgaacat acacagatgttctgagtccga	58
8	cagcttgaacaaggaggta gtgtgaagttcttgcgatgg	58
9	tcttgcctccagcaggtg ccctgatgaagcacttagg	60
10	ctagtgcccttgatctgg gtcaactgaacctcagcac	60
11	ctgctctgcctgaagtgc tttgtaccgtggcacaagg	62
12	gctgtgaaagcttctgggtgg acatgtgaggttaggccctgc	62
13	ttgcctttgtccagcaa gctccaggttgtactgc	62
14	gttagcatggcttcacagag tgtaatccagcagttggca	58
15	tgaaaatgtccaggaagcct ttgcaagcacacagtccta	62

续表

序号	引物序列 (5' → 3')	退火温度/℃
16	aagccagatcccactcac agatctgctgtccagtgc	60
17	tcatgccaccatagcaggga cttggtgccccagctaatagcagg	60
18	gatgcaggacattgaaccag gctacagagtgagaccccgctc	59
19	tgggtgcaaattccagcctg actgagccaaaatcctgct	58
20	tctaaccagggggcactgtg ttctgctgagtcagggtgg	58
21	tgtgtaaacctggccat aggaggattgcagatcagta	59
22	gtctcgaagaccctgtg ttcagcacactccactggga	58
23	ctgcgtctcctcagcgatecc gaagcctccatctcacgct	61
24	aatagccagcaccgaagac aggggaacactggcctccat	57
25	ttatgaccagcacactgtg tftaaggatggttcacctc	59
26	ctaaagattcgttccacagcca gcaaccagaggttcattcc	59
27	ttccactgggaatcaagca tactgccaagcagactccct	58
28	agctacgctgagtgatggt caaccacacaggagcatgg	58
29	tgagaaggcagctgaactt atccatgctactaccaagagc	57
30	ctgccaaggttccacagtg gggtgtctactgcaacggaa	62
31	tcgggatactgcaaacatcat taaaggggcttctcaagtc	62
32	aaggggagaagcctgagta tggagttcagtgctccac	58
33	caatgctgcagtttgggtt tgtgtggatcttggccctc	62
34	atgatggcgcgatgcctgta	62

续表

序号	引物序列 (5' → 3')	退火温度/°C
35	gccattctggaacatggfgc	58
	gacagacatgcctagattcag	
36	cacctccagtgacttggga	62
	tggcctttgtcctcatccaaa	
37	cagtccccacattgtg	62
	agctaaccagggcactttgc	
38	tgatcagaccctaaggcca	62
	caagactcatgctcagcca	
39	ctagactctggccctcag	62
	agttccaagtgaccacgc	
40	tctgtgtgggaagtccctc	58
	tcacttggctgcaaggcag	
41	tatgtaccggctccctaagc	58
	cagggcatttgggtgacct	
42	actgtgaatctgaggcagc	58
	agtcattggtctaagcgagaa	
43	tttggccctctactaggt	62
	acacattctgagacacca	
44	cactcaaattgggagtcacat	60
	aagctccctctccctctctc	
45	tagaggcatgcaccaccata	60
	gggttgtaaaaggcatgtggct	
46	aagctggcttccctgtgagg	60
	ctcattctggctgacacctc	
47	gacacgactgatggaacagagc	60
	tgggtgtacattctccaggac	
48	tagcgtggtacctggcaagg	60
	gattgtgagttcaatccctggt	
49	ctcttgcggttaacattgagggt	58
	attggttcttaccctaaagagc	
50	ccagttgaactgcataggga	58
	gctgagctaaatcccagca	
51	gccctgactaagcactgtctc	61
	actggatagggaaccacca	
	tcagcatcctgacctctcc	