

第二十三章 T/CALAS 51—2017《实验动物 豚鼠微卫星 DNA 检测方法》实施指南

第一节 工 作 简 况

2015 年，中国实验动物学会成为团体标准改革的试点单位。2016 年底，我们结合行业的实际需求，提出了该标准的起草和撰写，由浙江大学和浙江省医学科学院共同完成。

第二节 工 作 过 程

DHP 豚鼠是浙江大学实验动物中心保种的封闭群，Zmu-1：DHP 是该中心花费 20 余年选育保存的豚鼠近交系。从 20 世纪 80 年代始，浙江大学实验动物中心就展开了豚鼠品系特点及其在实验动物模型应用中的研究。研究发现，中心保存的不同品系在速发型哮喘模型、口蹄疫病毒抵抗性、视觉发育方面存在很大的差异。从 20 世纪 90 年代起，相继采用生化标记方法（一代）、RAPD、小卫星 DNA 指纹技术（二代）、SSR 技术（三代）对两个品系进行遗传研究，这同时也是豚鼠封闭群和近交系质量控制方法的探索。由于第三代遗传标记技术 STR 标记具有方法简便、通量高、便于自动化检测的优点，我们采用磁珠富集法、豚鼠 short-gun 草图序列大规模筛选验证，筛选了大量（400 多个）的多态性微卫星（STR）位点，并应用这些差异性的 STR 位点进行群体遗传结构评价、基因多态性与疾病模型的相关性分析。相关研究受到浙江省科技厅和卫生厅项目的资助。经过 20 余年的研究与积累，以及在浙江省实验动物公共服务平台豚鼠繁育基地（覆盖杭州、嘉兴、湖州、宁波、绍兴、温州、金华、衢州）和温州医科大学眼视光学重点学科的科学研究实际运用后进行了总结。

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，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,制订出豚鼠遗传检测方法,用于遗传质量控制、遗传组成分析和品系鉴别。

国内尚无豚鼠近交系的公开报道,全国有多个封闭群豚鼠,但没有分子遗传质量控制标准。随着行业的快速发展,采用先进的技术进行实验动物的遗传质量控制,是行业发展的必然趋势。

国家标准 GB 14923—2010《实验动物 哺乳类实验动物的遗传质量控制》中,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。国家标准 GB/T 14927.1—2008《实验动物 近交系小鼠、大鼠生化标记检测法》对小鼠、大鼠进行遗传检测,但尚无豚鼠的生化和 DNA 检测方法。本标准的制定可以作为豚鼠的 DNA 检测方法用于豚鼠的遗传检测。

国际标准既采用生化标记方法,也采用 DNA 多态性方法,该标准的制定有助于促进我国实验豚鼠团体标准达到国外先进标准。

本单位 Zmu-1: DHP 近交系豚鼠已达到 21 代,保有 8 个支系,远交系也出现了性状分化。考虑到这些近交系和远交系在培育过程中可能发生遗传漂变,需要设法最大限度地减少优良基因的丢失。因此,引入 SSR 进行这些支系/品系的遗传评价,使其标准化,将为以后的研究和应用提供技术支持。

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—2009 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。

本标准为中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会下达的编制任务,由中国实验动物学会归口管理。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。

第五节 内容解读

1. 豚鼠 SSR 位点选择

采用磁珠富集法、short-gun 基因组测序草图筛选验证,获得了 400 余个 SSR 位点,应用这些 SSR 位点进行了豚鼠群体遗传结构评价、基因多态性与疾病模型相关性分析。相关研究得到浙江省科技厅和卫生厅项目的资助。本标准在上述工作基础上总结提出。

(1) 近交系豚鼠:在附表 A 中选择 15 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 号。

(2) 封闭群豚鼠:在附表 A 中选择 43 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、17、18、19、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、32、33、36、37、38、39、41、42、43、44、46、47、49、50、51 号。

2. 检测方法的确立

1) 样品 DNA 的提取

- (1) 观察动物外观, 核对编号。
- (2) 豚鼠心脏采血 2 mL, 或采用安乐死处死动物, 取组织样品。−20℃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。

2) PCR

(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 (10 pmol/ μ L) 各 1 μ L, dNTP 100 μ mol/L 1.2 μ L, *Taq* 酶 5 U/ μ L 1 μ L, 50~100 ng 基因组 DNA 取 1 μ L, 镁离子终浓度 1.5 mmol/L, 纯水补齐至 20 μ L。

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

3) 电泳

- (1) 制胶: 制备 10%聚丙烯酰胺凝胶。
 - (2) 点样: 取 PCR 扩增结果 10 μ L, 用移液器在凝胶上点样。
 - (3) 凝胶成像系统记录检测结果。
- 4) PCR 产物的变性: 凝胶电泳, 硝酸银染色, 成像仪拍照。

3. 检测结果的判定

(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。

(2) 杂合度分析和 Hardy-Weinberg 平衡: 根据基因和基因型的结果, 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。

第六节 分析报告

1. 近交系与远交系的建立

2002 年从 Zmu-1: DHP 远交系豚鼠种群中随机挑选雌雄各 4 只豚鼠, 要求身体健康有活力, 全身白色, 耳朵及脚爪粉色。按雌: 雄=1:1 配对同居, 连续同胞兄妹近亲繁殖, 当时采取单线平行法传代。第 5~6 代后, 2 条支线出现不育、体质差及耳朵和脚爪呈黑色的豚鼠, 随即淘汰, 剩余豚鼠采取优选法传代, 选择繁殖性能高、全身呈纯白色的 2 条支线继续繁殖。突破 10 代繁殖瓶颈效应后, 两支豚鼠后代逐渐增多, 分离出多个支系。至第 15 代时, 改为家族优势法选择, 即保持优质支系, 淘汰质劣支系。因豚鼠多种优势性状与毛色连锁, 所以为了方便, 主要选择毛色纯白及生活力强为表型的豚鼠作为种鼠繁殖。一般情况下为了加快繁殖时间, 采用第 1 胎作为种鼠, 个别采用第 2~3 胎留种。某些情况下, 个别豚鼠生产性能较差, 为防止断种, 只得采取亲子代回交繁殖, 但其下一代不能晋级。等下一代繁殖性能回复正常, 再继续采取同胞兄妹近亲繁殖晋级。育种过程中记录个体繁殖性能, 进行个体编号, 严格代数记录, 编制家族系谱。



图1 近交系豚鼠品系培育路线

2. 微卫星 SSR 引物的筛选与确定

从加州大学圣克鲁兹学院 Genome Browser Home (<http://genome.ucsc.edu/>) 网站的数据库内随机查找核心为 AC、GT 重复序列的豚鼠微卫星 DNA, 用软件设计引物。通过 PCR 对 10 份豚鼠全基因组 DNA 进行初次扩增, 用凝胶电泳从 400 个位点中筛选出 110 对具多态性位点的引物。根据引物在不同豚鼠品系种的检测验证, 最终筛选了 51 个位点, 用于标准 (表 1)。

表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/℃	序号	引物序列 (5'→3')	退火温度/℃
1	aagggatgtgtgactgtagg	60	13	acatgtgaggttagccctgc	
	atctcgaaggatgttgagct			ttgcctttgttcacgaa	62
2	gctgaaacttagctctcagactg	58		gctccagggttgactgc	
	agagagatgttggttgcttacc		14	gttagcatggcttcacagag	58
3	tggcaaagttgcttcaatgga	60		tgtaattccagcagttggca	
	ccttgcatagaatactctgggca		15	tgaaaatgtccaggaagcct	62
4	gtctgtgtaatacaggacacc	59		ttgcaagcacacagtccta	
	gaatgggtcctggagcatgtctc		16	aagccagatcccacactcac	60
5	gcactttctaaccgaatgagg	59		agatctgctgtccagtgac	
	gctgtcatggagaaggtcttg		17	tcatggccaccatagcaggga	60
6	tgtctaaacgtaggaaactgcac	60		cttggtgccccagctaatacgagg	
	gatatggctcactccaaggctc		18	gatgcaggacattgaaccagg	59
7	tcaaggtcagcctgaacat	58		gctacagagtgagaccccgctc	
	acacagatgttctgagtcgga		19	tgggtgcaaatccagcctg	58
8	cagcttgaacaaggagagta	58		actgagccacaaatctgct	
	gtgtgaagttcttgcgatgg		20	tctaaccagggggcactgtg	58
9	tctttgcttcagcaggtg	60		ttctgctgagtcagggtgg	
	ccctgatgaagcacttagg		21	tgtgtaaaacctggccat	59
10	ctagtgcccttgtatctgg	60		aggaggattgcagatcagta	
	gtcaactgaacctcagcac		22	gtcctcgaagaccctgtg	58
11	ctgctcttgccctgaagtgc	62		ttcagcacactccactggga	
	tttgtaccgtggcacaagg		23	ctcgctctcctcagcgatcc	61
12	gctgtgaaagctcttggtgg	62		gaagcctccatctcacgct	

续表

序号	引物序列 (5'→3')	退火温度/℃	序号	引物序列 (5'→3')	退火温度/℃
24	aatagccaggcaccgaagac aggggaaacactggccctcat	57	38	caagactcatgctcagccca ctagactctggccctcag	62
25	ttatgaccagcacactgtg tttaagggatggtcacctc	59	39	agttccaaggtgaccacgc tctgtgtctctctctctc	62
26	ctaaagattcgtccacagcca gcaaccagaggttcattcc	59	40	tcattctggctgaaggcag tatgtcaccggctccctaacg	58
27	ttccacttgggaatcaagca tacttgccaagcagactccct	58	41	cagggcatttgggtggcct actgtgaatctgagggcagc	58
28	agctacgctgagtgatgtt caaccacacaggagcatgg	58	42	agtcattgtctaaagagaa tttgtccctctactaggt	58
29	tgagaaggcagctgaactt atccatgctactaccaagac	57	43	acacattctgagacacca cactcaaatgggagtcacat	62
30	ctgccaagggtccacagt gggtgctactgcaacggaa	62	44	aagctccctctccctctctc tagaggcatgcaccaccata	60
31	tcgggatactgcaactcat taaagggggtcttcaagtc	62	45	gggttgtaaaaggcatgtgct aagctggcttccctgtgagg	60
32	aaggggagaagcctgagta tggagttcaggtctccac	58	46	ctcattctggctgacacctc gacacgactgatggaacagagc	60
33	caatgctgcagtttgggtt tgtgtggatcttggccctc	62	47	tggtgtgtacattctccaggac tagcgtgtgtacctggcaagg	60
34	atgatggcgcagcctgta gccattctgggaactgtgtgc	62	48	gattgtgagttcaatccctggt ctcttgcgttaacattgagggt	60
35	gacagacatgcctagattcag cacctccagtgacttggga	58	49	attggttcttctaccaagagc ccagtttgaactgcataggga	58
36	tgggccttgtccttcatccaaa cagtcctccacattgtg	62	50	gctgagctaaatcccagca gccctgactaagcactgtctc	58
37	agctaaccagggcactttgc tgatcagaccctaaggccca	62	51	actggatagggaaccacca tcagcatcctgacactctcc	61

3. 电泳结果判定 (图 2、图 3)

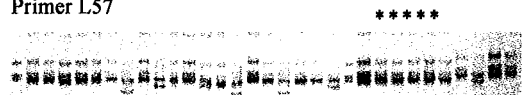
近交系与封闭群的基因型

引物L148:
Primer L148

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32

引物L74:
Primer L74

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32

引物L57:
Primer L57

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32

引物D117:
Primer L117

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32

图 2 三个品系豚鼠微卫星位点扩增产物电泳图

1~22 孔为 M, 2-21 孔为 Zmu-1; DHP 远交系, 23 孔为 Zmu-1; DHP 近交系 1 系,
24~28 孔为 Zmu-1; DHP 近交系 2 系 (*), 29~32 孔为 Zmu-2; DHP 部分近交系

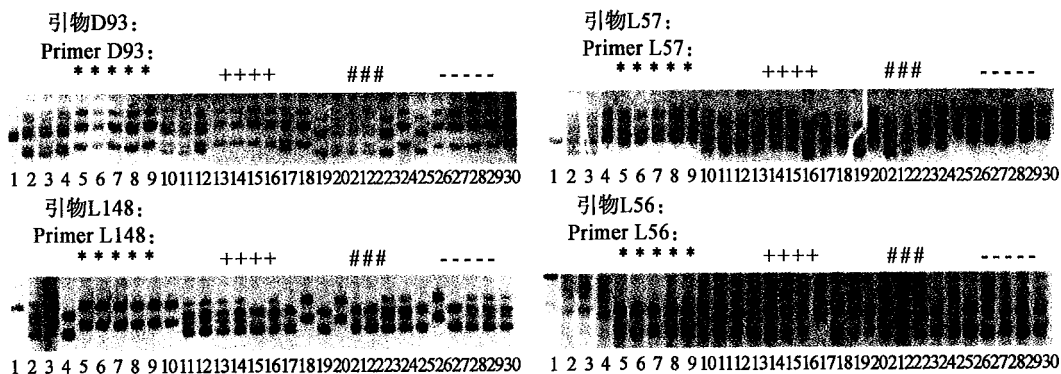


图3 Zmu-1: DHP近交系各支系豚鼠微卫星位点电泳图

1 孔为 M; 2~4 孔为第 1 支系; 5~9 孔为第 2 支系; 10~12 孔为第 3 支系; 13~16 孔为第 4 支系;
17~19 孔为第 5 支系; 20~22 孔为第 6 支系; 23~25 孔为第 7 支系; 26~30 孔为第 8 支系

4. 基因频率和基因型频率的计算

序号	位点	基因型频率			备注
		Zmu-1: DHP	DHP	Zmu-2: DHP	
1	L70	11/20a, 9/20b 4/20a, 10/20b,	3/15a, 12/15b	15/15b	白与花 黑比
2	L53	6/20c 1/20a, 9/20ab,	10/15b, 5/15c	7/15b, 8/15c	
3	L148	10/20b 10/20a, 5/20b,	7/15a, 3/15ab, 5/15b	5/15a, 7/15ab, 3/15b	
4	L74	4/20c, 1/20d 1/20a, 3/20ab,	6/15b, 9/15d	5/15b, 10/15d	白与花 黑比
5	L45	16/20b	2/15a, 8/15ab, 5/15b	2/15ab, 13/15b	
6	D77	18/20ab, 2/20b 1/20a, 3/20ab,	13/15ab, 2/15a	11/15ab, 4/15a	
7	L56	16/20b 3/20a, 3/20b,	3/15a, 3/15b, 9/15ab	13/15b, 2/15ab 1/15a, 1/15b, 4/15c,	
8	L57	14/20c	10/15c, 2/15d, 3/15cd	2/15d, 7/15cd,	
9	L85	17/20a, 3/20b 1/20a, 8/20ab,	10/15a, 5/15b	5/15a, 10/15b	白与花 黑比
10	D93	11/20b	9/15b, 6/15ab	13/15b, 2/15ab	
11	D86	16/20a, 4/20b	5/15a, 10/15b	8/15a, 7/15b	白与花比
12	D117	8/20a, 12/20b	5/15a, 10/15b	1/15a, 14/15b	

5. 平均杂合度的计算和 Hardy-weinberg 平衡检验

• Locus	k	N	Hets	Homs	H(O)	H(E)	PIC	Excl(1)	Excl(2)	HW	Null freq
• L70	2	20	0	20	0.000	0.508	0.372	0.123	0.186	NA	+0.9995
• L53	3	20	0	20	0.000	0.636	0.548	0.192	0.336	**	+1.0000
• L148	2	20	9	11	0.450	0.409	0.319	0.080	0.160	NA	-0.0604
• L74	4	20	0	20	0.000	0.662	0.587	0.223	0.384	**	+1.0000
• L45	2	20	3	17	0.150	0.224	0.195	0.024	0.097	NA	+0.1864
• D77	2	20	18	2	0.900	0.508	0.372	0.123	0.186	NA	-0.2902
• L56	2	20	3	17	0.150	0.224	0.195	0.024	0.097	NA	+0.1864
• L57	3	20	0	20	0.000	0.477	0.420	0.108	0.246	NA	+0.9989
• L85	2	20	0	20	0.000	0.262	0.222	0.033	0.111	NA	+0.9662
• D93	2	20	8	12	0.400	0.385	0.305	0.070	0.152	NA	-0.0323

第七节 本标准常见知识问答

1. 什么是标记微卫星？

答：微卫星标记 (microsatellite) 又被称为短串联重复序列 (short tandem repeat, STR) 或简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR), 是均匀分布于真核生物基因组中的简单重复序列, 由 2~6 个核苷酸的串联重复片段构成, 重复单位的重复次数在个体间呈高度变异性并且数量丰富。

2. 微卫星位点的选择依据？

答：操作方便, 多态性丰富, 尽可能多地覆盖染色体组。

3. 什么是等位基因？

答：等位基因 (allele) 一般是指位于一对同源染色体的相同位置上控制着相对性状的一对基因。

4. 什么是基因频率？

答：基因频率 (gene frequency) 是指在群体中某一个基因占同一位点全部基因的比率。
基因频率=某基因个数/群体中同一位点基因总数

5. 什么是基因型频率？

答：基因型频率 (genotype frequency) 是指在二倍体生物群体中, 某一基因型个体占群体总数的比率。

基因型频率=某一基因型个体数/群体总数

6. 什么是杂合度？

答：基因座位所有杂合子所占的群体频率, 是衡量群体在某一作为遗传变异的指标。
杂合度=群体中杂合数/群体总数

7. 什么是哈代-温伯格定律 (Hardy-Weinberg law) ？

答：如果一个群体符合哈代-温伯格定律, 那么这个群体各代之间的等位基因频率应该没有变化; 如果一个群体一开始处在不平衡状态, 那么经过一代的随机交配就足以使其达

到遗传平衡(等位基因的频率不变),而且只要符合这个规则依据的条件,该群体就会保持遗传平衡状态。

第八节 其他说明

一、国内外同类标准分析

本标准在制定时,充分借鉴了《国家自然资源资源共性描述规范》和《实验动物共性描述规范》的基本内容与总体要求,在此基础上,结合近交系 Zmu-1: DHP 与封闭群 DHP 这两个大的生产群目前的遗传状况,同时还考虑到国内外目前关于各类豚鼠遗传质量控制的现有水平和发展趋势,基本上代表了我国自行培育的豚鼠近交系与封闭群质量控制、保种繁育的要求和水平。

二、与法律法规、标准关系

《实验动物管理条例》《实验动物质量管理办法》《关于善待实验动物的指导性意见》中的有关条款与本标准内容无冲突。

三、重大分歧的处理和依据

无。

四、标准实施要求和措施

由于本标准是首次制定,因此还需要经过实践的检验逐步完善,建议中国实验动物学会组织宣传贯彻和培训。