

第三章 T/CALAS 54—2018《实验动物 中国地鼠微卫星 DNA 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，由山西医科大学实验动物中心负责团体标准《实验动物 中国地鼠微卫星 DNA 检测方法》起草工作。主要起草人为宋国华、陈朝阳、刘田福、续国强、高继萍、张锐虎。

该项目由全国实验动物标准化技术委员会技术审查，由中国实验动物学会归口管理。

本标准的编制工作按照中华人民共和国国家标准 GB/T1.1—2009《标准化工作导则》第1部分“标准的结构和编写规则”要求进行编写。本标准是在国家科技支撑计划（2012BAI39B05）、科技基础性工作专项资金（2002DEA10010）、山西省实验动物专项资金（2005K01）等课题基础上制定完成的，在编制过程中参考了国内外相关文献，对方法的敏感性、特异性、重复性进行了研究，对所建立的标准方法进行了应用研究，建立了可行、稳定的中国地鼠微卫星 DNA 检测方法。

第二节 工作过程

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，山西医科大学按照团体标准研制要求和编写工作程序组成了由单位专家和专业技术人员参加的编写小组，制定了编写方案，并就编写工作进行了任务分工。编写小组根据任务分工进行了资料收集和研究工作，在多项科研课题研究的基础上，组织编写实验动物中国地鼠微卫星 DNA 检测方法技术资料，通过起草组成员的努力，经多次修改、补充和完善，2017 年 10 月形成了标准和编制说明初稿。

2018 年 3~4 月，标准征求意见稿在中国实验动物学会网站公开征求意见。

2018 年 5 月 24 日，中国实验动物学会组织专家《实验动物 中国地鼠微卫星 DNA 检测方法》团体标准进行讨论形成修改意见和建议。

2018 年 5 月 31 日，根据反馈意见和专家意见，编写组对《实验动物 中国地鼠微卫星 DNA 检测方法》团体标准整理修改后，形成标准送审稿、标准送审编制说明和征求意见汇总处理表。

2018年6月11日,全国实验动物标准化技术委员会在北京召开了标准送审稿审查会议。会议由全国实验动物标准化技术委员会的委员组成审查组,认真讨论了标准送审稿编制说明、征求意见汇总处理,提出了修改意见和建议。

2018年6月16日,编写组就6月11日的专家意见进行了讨论修改,形成了报批稿。

2018年6月29日,中国实验动物学会第七届理事会常务理事会第三次会议批准发布包括本标准在内的《实验动物 动物实验方案审查方法》等12项团体标准,并于7月1日起正式实施。

第三节 编写背景

20世纪80年代初,山西医科大学薄家璐教授等从北京郊区捕捉野生地鼠在国内首次成功培育中国地鼠近交群体。山西医科大学实验动物中心保存的中国地鼠近交系对黑热病,以及许多致病性细菌和病毒都有高度感受性,且具有自发性糖尿病的遗传倾向。我们相继采用基因肽谱技术、随机扩增多态性对培育的中国地鼠两个品系进行遗传研究,这同时也是对中国地鼠封闭群和近交系质量控制方法的探索。

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又称为短串联重复(short tandem repeat, STR)、简单重复序列(simple sequence repeat, SSR),广泛地分布于真核生物的基因组中,每个简单重复DNA片段中一般重复单位仅1~6个碱基,重复次数为10~20次,构成了微卫星DNA多态性的基础,动物中尤以二核苷酸重复如CA、GT最为丰富。根据微卫星DNA核心序列两端的保守序列设计引物,并对基因组DNA进行扩增就可找到相应的微卫星DNA标记,微卫星DNA能被特异定位在染色体的特定位置上。微卫星多态信息含量高、共显性好,特异性PCR扩增突变率高、引物通用性好,且具有分析简便、适于自动化和半自动化检测等优点。

我们采用Short-gun、链霉亲和素偶联磁珠亲和捕捉法构建了中国地鼠微卫星富集文库,大规模筛选微卫星位点,筛选出多态性较好的微卫星位点,并应用这些差异性的微卫星位点进行群体遗传结构评价和基因多态性的相关性分析。PCR产物经STR扫描、分型,然后运用群体遗传分析软件对数据进行处理,计算出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、平均杂合度等,为群体遗传多样性评估、品种(系)建立和鉴别提供依据,建立不同品种实验动物中国地鼠遗传质量检测的通用标准。根据研究结果,制定出中国地鼠遗传检测方法,用于遗传质量控制、遗传能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。国家标准GB/T14927.1—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,但尚无中国地鼠的生化 and DNA检测方法。本标准的制定可以作为中国地鼠的DNA检测方法用于中国地鼠的遗传检测。

目前国际通用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中国地鼠的团体标准达到国外先进标准。

第四节 编制原则

本标准在制定中遵循以下原则:

(1) 科学性原则: 本标准以山西医科大学实验动物中心培育保存的近交系及封闭群中国地鼠的遗传学研究所获的基础研究数据为基础。

(2) 普适性原则: 本标准所涉及的技术方法均为常规的分子生物学技术, 无须特异性的生物学试剂, 正规的分子生物学实验室均具备检测条件。

第五节 内容解读

本标准主要由范围、规范性引用文件、术语和定义、操作程序和附录共 5 部分组成, 现将《实验动物 中国地鼠微卫星 DNA 检测方法》主要内容说明如下。

一、范围

本标准规定了实验动物中国地鼠 DNA 多态性检测方法。

本标准适用于实验动物中国地鼠品系鉴别、质量控制及遗传组成分析。

二、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》

三、术语和定义

微卫星 DNA (microsatellite DNA)

又称为短串联重复 (short tandem repeat, STR)、简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR), 广泛地分布于真核生物的基因组中, 每 50~150 kb 左右就会出现一次, 尤以二核苷酸重复如 CA、GT 最为丰富。

四、微卫星位点的选择

微卫星位点的选择, 参照团体标准《实验动物小鼠、大鼠微卫星 DNA 标记检测方法》位点数量的选择方法, 近交系大鼠选择 6 个微卫星位点, 封闭群大鼠选择 25 个微卫星位点, 原则上覆盖大鼠的 21 条染色体。近交系小鼠选择 20 个微卫星位点, 封闭群小鼠选择 25 个微卫星位点、中国地鼠染色体的数量为 11 对, 因此我们对近交系中国地鼠的检测选

择 10 个微卫星位点、封闭群中国地鼠选择 15 个微卫星位点,原则上覆盖中国地鼠的 10 条染色体。

五、检测方法的确定

1. PCR 扩增体系

PCR 扩增总体积为 10 μL , 其中 DNA (20 ng/ μL) 0.8 μL , $10\times\text{Buffer}$ 1.0 μL , Mg^{2+} (25 mmol/L) 0.8 μL , dNTP (2.5 mmol/L) 0.8 μL , 上、下游引物 (1 pmol/L) 各 0.1 μL , Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μL) 0.1 μL , ddH₂O 6.3 μL 。

PCR 扩增程序: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 退火(退火温度见表 1) 30 s, 72℃延伸 45 s, 35 个循环; 72℃延伸 20 min。扩增产物 4℃保存。

2. PCR 产物的检测

经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳及凝胶成像系统拍照检测扩增结果。扩增产物经过琼脂糖凝胶电泳检测确保扩增出目的片段后, 选择以 FAM 蓝色荧光标记的扩增产物, 取 1 μL 上样进行 STR 扫描。

3. 检测结果的判定

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。

封闭群中国地鼠: 群体平衡状态方法进行评价, 若达到平衡状态, 封闭群中国地鼠群体判为合格; 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。

第六节 分析报告

一、近交系与封闭群的建立

1980 年春, 山西医科大学薄家璐教授等从北京郊区购回捕获的中国地鼠 60 只, 在山西医科大学实验动物中心驯养繁殖, 将其称为 A 家系。1981 年 4 月, 又从北京购买回 74 只中国地鼠驯养繁殖, 将其称为 B 家系。1993 年后, 将 B 家系改为 E 家系。引入野生种鼠后, 驯养工作经历了两个阶段, 模拟自然环境和笼养。

模拟自然环境阶段: 动物室中砌成几个水泥池, 池的一侧铺以 60 cm 厚的黄土, 将检疫后的野鼠雌雄配对放入池中。每日定时投放食物和水。一个月后翻土查找获得在实验室出生的第一代仔鼠。

笼养阶段: 为了便于掌握妊娠情况, 第二代起改为笼养, 将离乳后的仔鼠分别编号, 单个放入笼中, 定时喂饲和饮水。

1993 年前饲喂的是由中国药品生物制品鉴定所生产的 CM-1 型柱状固体饲料。1994 年至今由山西医科大学实验动物中心自己配制标准的地鼠全价营养饲料。繁殖交配时间第一年为早晨 5: 00~8: 00, 为了工作方便, 将交配时间逐渐改为上午 8: 00~11: 00, 交配时将检出发情的雌鼠放入雄鼠笼中, 观察交配 3~4 次后, 立即将雌鼠取出, 以防凶猛

格斗,造成伤亡。交配方式接近交要求进行。20 世纪 80 年代以来分别育成 A-30、B-7、B-502 和 Y-31 四个家系和 A-30 淡黄毛色突变亚系,由于近亲繁殖衰退,现存活家系有 A-30 家系和 E 家系(1993 年后 B-502 家系改称 E 家系)。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,绘制家族系谱。

二、微卫星引物的筛选与确定

采用 Short-gun、链霉亲和素偶联磁珠亲和捕捉法成功构建了中国地鼠基因组微卫星富集文库,根据微卫星文库阳性克隆的测序结果,用 Phred/Phrep/Consed 等软件进行拼接处理,根据微卫星重复序列两侧的保守侧翼序列用引物设计软件 Primer3.0 批量设计 135 对引物。初步筛选多态性的微卫星引物。先用单个个体 PCR,因为这样可以得到一条单一的条带;如果得到了多条条带,说明是非特异性扩增,弃去。后用混合 DNA 库的 PCR,以观察其多态性。根据 PAGE 结果,选取多态性好的引物并在正向链的 5' 端进行蓝色(FAM)荧光标记。随机选取 48 个个体,提取 DNA 并进行定量,模板浓度稀释为 10 ng/ μ L 进行 PCR。

荧光扫描结果用 GeneMarker V1.6 进行基因型判读,用 Microchecker 检查数据的准确性,以及大等位基因的遗失扩增,用 FASTA 计算等位基因丰富度,进行位点间独立性检验等多种参数, MStools 计算 PIC、Ho、He 等,用 Genepop 计算样本的哈迪-温伯格平衡指数。根据引物在不同中国地鼠品系中的检测验证,最终筛选了 17 个位点用于标准(表 1)。

表 1 中国地鼠微卫星位点引物序列及扩增情况

位点	引物序列	退火温度 / $^{\circ}$ C	片段大小	等位基因数
Chm35	F: AGGCTGCTTCCTAAACCCAT9	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: AACATGGAGGAGCACAACCC			
Chm120	F: GATAGGAGGGAGCAAAAGGG	58	376~432	12
	R: CCTGAGAGCCTCAGAGCAGT			
Chm162	F: TCTTCCCTTCACAACCCAAG	58	167~214	12
	R: AGCAGTGCCCTTTGAAACAT			
Chm10	F: GGCTGGTGATTCAATGGTT	59	217~357	5
	R: GTTCTTAATGGATCTACCCCTGGGACC			
Chm108	F: CAATGGCTGCTAAGAGAGGG	59	392~471	5
	R: GTTCTTTCCCACTCACAATTTCTTG			

续表

位点	引物序列	退火温度 /℃	片段大小	等位基因数
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: GTTCTTTCCCAACCCCTCTTCTGAC			
Chm14	F: GACCCCATTCGTAAACCAGA	59	259~316	4
	R: GTTCTTcccCACAGTCAGCCCTATATT			
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: GTTCTTGTCCTGAGCAAGTCCAGAGC			
Chm91	F: GCAGAAGCACAAACCAACAA	59	104~145	7
	R: GTTCTTAGGCCAAGCTCTTCTCTCC			

三、电泳结果判定

近交系中国地鼠的判定：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。

封闭群中国地鼠的判定：根据得到各个位点上各基因频率、基因型频率的实际值，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，计算被监测群体是否达到平衡状态。若达到平衡状态，封闭群中国地鼠群体判为合格；若没有达到平衡状态，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。

第七节 其他说明

一、国内外同类标准分析

目前，我国已有针对哺乳类的 GB14923—2010《实验动物 哺乳类实验动物的遗传质量控制》、GB/T 14927.1—2008《近交系小鼠、大鼠生化位点检测方法》和 GB/T 14927.1—

2008《近交系小鼠、大鼠免疫标记检测方法》规定了小鼠大鼠的生化位点检测方法及免疫标记检测方法。但是生化位点的检测判定结果过度依赖于标准样品，并且其特异性低、敏感度不高、重复性差。中国地鼠与大小鼠的亲缘关系较远，其染色体数量、体态特征等均与大小鼠有较大差异，因此，大小鼠的下颌骨测量及毛色移植实验也不适用于中国地鼠。所以，上述标准均不适用于中国地鼠的遗传质量检测。

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，充分考虑国内外目前关于中国地鼠遗传质量的现有水平和发展趋势，基本上代表了我国自行培育的近交系和封闭群中国地鼠的遗传质量控制、保种繁育的要求的先进水平。

二、与法律法规、标准的关系

本标准按 GB/T 1.1—2009 规则和实验动物标准的基本结构编写，与实验动物标准体系协调统一，与《实验动物管理条例》、《实验动物质量管理办法》、《实验动物许可证管理办法》、《实验动物种子中心管理办法》等国家相关法规和实验动物强制性标准的规定和要求协调一致，是我国实验动物标准体系的重要补充。

三、重大分歧意见的处理经过和依据

从标准结构框架和制定原则的制定、标准的引用、主要条款的确定直到标准草稿征求专家意见，均无任何重大意见分歧的情况。

四、作为推荐性标准的建议

本标准在制定时结合我国目前实验动物遗传检测方法的现有水平和发展趋势，需要经过实践的检验逐步完善，建议作为推荐性标准执行。

五、标准实施要求和措施

本标准制定过程中进行了广泛的讨论、交流，使标准具有较强的科学性、先进性和适用性。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系统的培训和宣传。

第八节 本标准常见知识问答

1. 何为微卫星 DNA?

答：微卫星 DNA 是指又称为短串联重复 (short tandem repeat, STR)、简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR)，广泛地分布于真核生物的基因组中，每 50~150 kb 左右就会出现一次，尤以二核苷酸重复如 CA、GT 最为丰富。

2. 微卫星 DNA 检测方法与传统技术相比有何优势?

答：微卫星多态信息含量高、共显性好、特异性 PCR 扩增突变率、引物通用性好且具有分析简便、适于自动化和半自动化检测等优点。

3. 微卫星位点的选择依据是什么?

答: 操作方便、多态性丰富、尽可能多地覆盖染色体组。

4. 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。

5. 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。

6. 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。

7. 什么是杂合度?

答: 杂合度是指随机抽取的样本中其两个等位基因不相同的可能性。期望杂合度主要是根据种群内当前优势等位基因的分布频率来推算的, 稀有基因的贡献极其微弱。

参 考 文 献

- 刘田福. 2003. 中国地鼠山医群体近交系的培育. 实验动物科学, 20 (s1): 232.
- 宋国华, 陈朝阳, 刘田福, 等. 2017. 中国地鼠线粒体基因组与微卫星遗传标记的研究[J]. 中国比较医学杂志, 27 (5): 4-5.
- 宋国华, 耿佳宁, 贾若愚, 等. 2011. 中国地鼠基因组微卫星富集文库的构建与分析[J]. 中国实验动物学报, 19 (4): 345-350.
- 宋国华, 耿佳宁, 贾若愚, 等. 2012. 中国地鼠微卫星 DNA 引物的设计及筛选[J]. 中国畜牧兽医, 39 (12): 128-132.
- Song G H, Geng J N, Jia R Y, et al. 2011, Isolation and characterization of 16 novel microsatellite loci in two inbred strains of the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*) [J]. Genetics & Molecular Research, 10 (3): 2245-2256.