

ICS 65.020.30

B 44



中国实验动物学会团体标准

T/CALAS 54—2018

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

2018-06-30 发布

2018-07-01 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。

本标准中附录 A 为资料性附录。

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：山西医科大学。

本标准主要起草人：宋国华、陈朝阳、刘田福、续国强、高继萍、庞文彪、张锐虎、刘茂林。

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 DNA 多态性检测方法的采样、微卫星位点的选择、PCR 扩增、抽样、结果判定。

本标准适用于实验动物中国地鼠的遗传质量控制及遗传组成分析。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件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文件。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》

GB 14925 《实验动物 环境及设施》

3 术语和定义

3.1

近交系中国地鼠 inbred strain Chinese hamster

以全同胞兄妹或亲子近亲交配方式进行繁殖生产 20 代以上的中国地鼠，近交系数达 98.6%以上。

3.2

封闭群中国地鼠 closed colony Chinese hamster

以非近亲交配方式进行繁殖生产的中国地鼠，在不从外部引入新个体的条件下，至少连续繁殖 4 代以上。

3.3

微卫星 DNA microsatellite DNA

动物基因组中由 1~6 个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，简称短串联重复（short tandem repeat, STR）。微卫星 DNA 重复单位以二核苷酸重复单位 AC/TC 最为常见。重复的次数是可变的，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 采样

4.1.1 观察动物外观确认动物健康，核对编号。

4.1.2 中国地鼠取 0.5 cm 尾尖，或眼眶静脉丛采血，-20℃低温保存。

4.1.3 提取基因组 DNA: 用苯酚-氯仿法或试剂盒提取基因组 DNA。

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 反应的退火温度见附录 A。PCR 引物的 5' 端用 FAM 荧光染料进行标记。

4.2.1 近交系中国地鼠: 在附录 A 中选择 10 个微卫星位点。

4.2.2 封闭群中国地鼠: 在附录 A 中选择 15 个微卫星位点。

4.3 PCR 扩增

4.3.1 PCR 扩增体系

PCR 扩增总体积为 10 μL 。其中, DNA (20 ng/ μL) 0.8 μL , 10 $\times$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 退火 (退火温度见附录 A) 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。

4.3.2 PCR 产物的检测

PCR 产物, 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。

4.3.3 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。

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

纯合基因型: 一个主波; 杂合基因型: 两个主波。

根据软件读出波峰处的扩增产物的碱基数。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段大小。每个位点的等位基因根据扩增片段从小到大顺序排列记录为 a、b、c、d 等, 每个样本的基因型即可记录为 aa、ab、ac 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 GENALEX6 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 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。采样数量按表 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	抽样数量
<100 只	≥ 15 只
≥ 100 只	≥ 30 只

4.6 结果判定

4.6.1 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。

4.6.2 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估。将分型结果用遗传分析软件 GENALEX6 进行处理，计算各引物的等位基因数、卡方值、 P 值。观测杂合度与期望杂合度经卡方检验均为差异显著 ($P < 0.05$)，不符合 Hardy-Weinberg 平衡，判为不合格群体；观测杂合度与期望杂合度经卡方检验均为差异不显著 ($P > 0.05$)，符合 Hardy-Weinberg 平衡，判为合格群体。

附录 A 中国地鼠微卫星位点引物序列及扩增情况

(资料性附录)

位点	引物序列	重复序列	退火温度/°C	片段大小	观测杂合度/ 期望杂合度	多态信息含量	等位 基因数
Chm35	F: AGGCTGCTTCCTAAACCCATG	(GT) ¹⁹	51	354~391	0.456/0.556	0.499	4
	R: CTGGGAAGGCTGAACCTCAAG						
Chm93	F: TCTGTGTGTCTGTGAATGCG	(GT) ⁶ gggggigigigtatgic	58	242~299	0.423/0.367	0.341	7
	R: GGATGTAAAGATGGCTCCGAA	tgggatgatgca (GT) ⁶					
Chm147	F: CATCTGGGCTTTCAATGGAT	(TG) ³⁰	58	233~292	0.822/0.845	0.805	9
	R: GCTCCCTAAATAAACCCCAA						
Chm79	F: AGGGGAGATCTTGGGTCAGT	(GT) ²⁰ ga (GT) ¹⁴	51	270~355	0.652/0.575	0.519	5
	R: AACATGGAGGAGCACAAACC						
Chm120	F: GATAGGAGGAGCAAAAGGG	(TG) ⁶ agtgtgtatga (GT) ¹⁶	58	376~432	0.565/0.752	0.713	12
	R: CCTGAGAGCCTCAGAGCAGT						
Chm162	F: TCTTCCCTTCACAAOCCAAAG	(GT) ²⁴	58	167~214	0.646/0.834	0.807	12
	R: AGCAGTGCCCTTTGAAACAT						
Chm10	F: GGCTGGTGATTTCATGTT	(GT) ³² gcattgacatacagaccagaag	59	217~357	0.546/0.652	0.577	5
	R: GTTCTTAATGGATCTACCCCTGGGACC	tcaatgcagttctctattctctctagg (T) ²					
Chm108	F: CAATGGCTGCTAAGAGAGGG	(TG) ²⁰ (AG) ²⁰	59	392~471	0.745/0.890	0.870	5
	R: GTTCTTCCCACTCACAAATTTCTCTG						
Chm115	F: TACTCTGTCTCCACCTCCC	(GT) ²⁵	59	171~220	0.587/0.812	0.791	6
	R: GTTCTTCTGGGGGATGTATGCTCTC						

续表

位点	引物序列	重复序列	退火温度/°C	片段大小	观测杂合度/ 期望杂合度	多态信息含量	等位 基因数
Chm124	F: CAGATGCCCAAACTCTCTCC R: GTTCTTGTCACCCCATGGACTACACC	(GT) ²⁵	59	355~404	0.822/0.820	0.785	4
Chm134	F: TGCCACATACATGACACAA R: GTTCTTTCCCAACACCCCTCTTCTGAC	(TG) ²³	59	383~428	0.854/0.862	0.839	5
Chm14	F: GACCCCATTCGTAAACCAGA R: GTTCTTcccCACAGTCAGCCCTATATT	(AC) ¹³ gcacacaa (AC) ⁹	59	259~316	0.220/0.714	0.660	4
Chm140	F: GCAGCTGGTTTGTAGCTACC R: GTTCTTTGTTTGATCACTGGAACCCA	(GT) ¹⁹	60	168~205	0.446/0.833	0.804	7
Chm48	F: AAAGGCCTTGAGGTGGAGTT R: GTTCTTGAGGTAGGCAGGGACTGACA	(CT) ¹⁹ (GT) ²¹	60	369~448	0.646/0.659	0.598	10
Chm54	F: AGTTTGATGATCCCCAGCAC R: GTTCTTCTACCCCTCTCAGCAACCTG	(AC) ²¹	59	326~367	0.870/0.871	0.846	6
Chm9	F: GACAGATCCCGACCCATTTA R: GTTCTTGTCCTGAGCAAGTCCAGAGC	(CT) ¹⁴	59	118~145	0.604/0.836	0.806	5
Chm91	F: GCAGAAGCACAAACCAACAA R: GTTCTTAGGCCAAAGCTCTTCTCTCC	(GT) ²¹	59	104~145	0.792/0.761	0.713	7

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.
-