

ICS 65.020.30

B 44



中国实验动物学会团体标准

T/CALAS 59—2018

实验动物 长爪沙鼠遗传质量控制

Laboratory animal - Mongolian gerbil genetic quality control

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。

本标准附录 A 为规范性附录。

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：首都医科大学、中国食品药品检定研究院、浙江省医学科学院。

本标准主要起草人：陈振文、杜小燕、李长龙、岳秉飞、贺争鸣、萨晓婴、巩薇、郭红刚。

实验动物 长爪沙鼠遗传质量控制

1 范围

本部分规定了长爪沙鼠的繁育和繁殖种群的遗传监测。

本部分适用于长爪沙鼠的繁育和遗传控制。

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》

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

封闭群 closed colony

以非近亲交配方式进行繁殖生产的长爪沙鼠种群，在不从外部引入新个体的条件下，至少连续繁殖4代以上，称为封闭群，亦称远交群。

4 遗传分类及命名

4.1 遗传分类

根据遗传结构特点，长爪沙鼠为封闭群。

4.2 命名

4.2.1 封闭群命名

封闭群命名由2~4个大写英文字母命名，种群名称前标明保持者的英文缩写名称，第一个字母须大写，后面的字母小写，一般不超过4个字母。保持者与种群名称之间用冒号分开。

示例：

Cmu: CMU表示由首都医科大学（Cmu）保持的CMU长爪沙鼠封闭群。

Z: ZLAC表示由浙江省医学科学院（Z）保持的ZLAC长爪沙鼠封闭群。

5 长爪沙鼠的繁育方法

5.1 原则

封闭群长爪沙鼠繁殖方法应以保持封闭群动物的遗传概貌和生理特征、避免近交繁殖为原则。

5.2 引种

繁殖用长爪沙鼠应遗传背景明确或来源清楚,有较完整的资料(包括种群名称、来源、遗传基因特点及主要生物学特性等)。

保持封闭群长爪沙鼠的遗传异质性及基因多态性,引种动物数量要足够多。为控制引种数量,可以根据后代繁殖方式,在保证每代近交系数增量不大于 1%的前提下,决定引种群规模,引种数目参照 GB 14923 执行。长爪沙鼠最小引种群规模为 25 对,种用动物应三代以内无共同祖先。

5.3 繁殖

保持封闭群长爪沙鼠遗传基因的稳定,种群应足够大,并尽量避免近亲交配。
具体繁殖方法参照 GB 14923 执行。

6 长爪沙鼠封闭群的遗传质量监测

6.1 长爪沙鼠封闭群的遗传质量要求

封闭群长爪沙鼠应符合以下要求。

a) 具有明确的遗传背景资料或来源清楚,有完整的资料(包括种群名称、来源、遗传基因特点及主要生物学特性等);能充分表明新培育的或引种的封闭群长爪沙鼠符合封闭群定义的规定。

b) 用于封闭群保种及生产的繁殖记录卡应清楚完整,繁殖方法科学合理。

c) 经遗传检测(微卫星 DNA 检测方法等)质量合格。

6.2 长爪沙鼠封闭群的遗传质量检测方法及实施

6.2.1 检测方法

采用微卫星 DNA 标记检测方法进行,具体方法见附录 A。

6.2.2 抽样

从每个封闭群中随机抽取非同窝成年长爪沙鼠,雌、雄各半。随机取长爪沙鼠的血液或其他组织,采样数量按表 1 进行。

表 1 封闭群长爪沙鼠遗传检测采样数量 (单位:只)

群体大小	抽样数量
少于 100	应不少于 15
不少于 100	应不少于 30

6.2.3 群体评价

群体内遗传变异采用平均杂合度或群体平衡状态方法进行评价,按附录 A.6 执行。

6.2.4 检测频率

封闭群长爪沙鼠群体至少 12 个月进行一次遗传质量检测。

附 录 A

(规范性附录)

封闭群长爪沙鼠微卫星 DNA 标记检测方法

A.1 仪器设备

遗传分析仪, 4℃、-20℃冰箱, 低温高速离心机, 水浴锅, 感量为 0.0001 g 的分析天平, pH 计, 紫外分光光度仪。

A.2 基因组 DNA 的提取

用酚-氯仿萃取法或试剂盒提取基因组 DNA。

A.3 微卫星位点

用于检测长爪沙鼠的微卫星位点为 28 个, 各微卫星位点的名称、引物序列、等位基因数、PCR 反应的 T_m 值见表 A.1。

A.4 PCR 扩增

A.4.1 PCR 扩增的体系

PCR 总反应体积为 15 μL 。其中, 含 10 $\times$ PCR Buffer: 1.5 μL , 上、下游引物(100 pmol/ μL) 各 1 μL , 4 $\times$ dNTP (100 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , *Taq* 酶(1 U) 1 μL , 50~100 ng 基因组 DNA 1 μL , 纯水(ddH₂O) 8.5 μL 。

PCR 反应程序为: 95℃预变性, 4 min; 94℃变性, 30 s; 退火温度(各位点序列、PCR 反应条件参见表 A.1), 30 s; 72℃延伸, 30 s; 35 个循环; 72℃继续延伸 7 min; 扩增产物 4℃保存。

表 A.1 长爪沙鼠微卫星位点的引物序列、最佳扩增温度、等位基因数及等位基因分布范围

位点	引物序列 (5'→3')	Mg ²⁺ 浓度/ (mmol/L)	退火温度/℃	等位 基因数	等位基因 分布范围
AF200942	CAGGCACCCCCAGTTT GTCTACACAGGCTGAGGATGT	2.0	54	15	180~215
AF200943	GGCTCCTGATTCTACATTCT CAACCATTTGGCAACTCTC	2.0	57	17	154~181
AF200944	GCTGGGCTTTAATGTTTATTT GGTGGCTCACACTTTCTGT	2.0	54	19	113~134
AF200946	TTTCTGGGGTCTCTTTCTCTC CCATTCTGCAAGACTCCTCT	2.0	57	28	195~242
AF200945	AGTCCCTATTACATCCACAAG TTATCCTGCAAAGCCTAAG	2.0	57	12	166~186
AF200941	TGGGTCCTTTGGAAGA TGGCTTAAAATGAATCACTTA	2.0	55	24	115~153
AF200947	GACAGAGTGGGAGGGGTATGT TGGCAAGTTTGGTTTGTGTTGA	2.0	55	17	188~212

续表

位点	引物序列 (5'→3')	Mg ²⁺ 浓度/ (mmol/L)	退火温度/℃	等位 基因数	等位基因 分布范围
D16Mit7	CTGCCACCCCTGAACCATTA CTACAAGATGTGGGGCATGA	2.0	52.6	15	480~529
D16Mit26	CAGGAATAAAGTATAATGGGGTGC CCCATGATCAGTTGGGTTTT	2.0	49.1	9	207~266
D1Mit362	TGTGTGACTGCTTGGAAGATG CTGAGTCCCTAAAGTTGTCCTTG	1.5	50.0	16	476~504
D8Mit184	GTTTTTCTCAGAAGAATGCAATATACC TGAGAAAGAATGAGGAATTTGTCC	2.0	48.1	11	196~229
D7Mit33	TCTGAAGTTTGAATGGTTGTGG TTTCAAAATCGTGTCAATTTGC	2.0	47.3	15	376~394
D6Mit37	AAAGAATTGCACATCCACTGG TGCCCAGGATGTTTAAGAGG	2.0	47.0	14	246~265
D5Mit31	TCAGGGCTCTCTAAGGGACA ACTATGCAGCCACCAAATCC	2.0	53.1	9	318~350
D12Mit201	CCACTGGATGGCAACAGAC TATGTGTTTCAAAACCACACTCG	2.0	53.1	18	245~283
D2Mit22	GCTCCCTTCTCTTGAACC GGGCCCTTATTCTATCTCCC	2.0	49.1	9	173~192
D15Mit124	AGGAGAGAACCAACTGCTGC GGCCAGTGATGACTTTATAATGC	2.5	59.8	17	232~258
D11Mit36	CCAGAACTTTTGCTGCTTCC GTGAGCCCTAGGTCCAGTGA	2.0	58.7	15	234~256
D7Mit71	CCACCTGGAATACATGTAACCC TAAGATCCAAGAGATGGGTTAAGC	2.0	49.1	11	165~200
D2Mit76	CTCAAGTCTCACTTCTCTGCACA ACACCCAAGGTTGACCTCTG	2.0	47.3	19	281~328
D3Mit130	AACACATGAAACGTGTGCGT TGATAGGCATGCTTAAGCCC	2.0	50.6	11	213~251
D19Mit1	AATCCTTGTTCACTCTATCAAGGC CATGAAGAGTCCAGTAGAAACCTC	2.0	49.1	15	133~165
D11Mit35	AGTAACATGGAACATCGACGG TGCTCAGCTCTGGAGTGCTA	2.0	48.1	13	287~307
D17Mit38	CCTCTGAGGAGTAACCAAGCC CACAGAGTTCTACCTCCAACCC	2.0	52.6	14	195~251
DXMit17	CCTGTTTGGGCACCTAGATT TAATAACCCATGTTTCTGTGGG	2.0	48.1	9	234~251
D8Mit56	ACACTCAGAGACCATGAGTACACC GAGTTCACCTACCCACAAGTCTCC	2.0	50.6	9	100~126
D10Mit66	TCTCCTTGGAATTCACAGCC GACATTCCTTAAGAGAGACAGTCC	2.0	54.7	14	272~298
D13Mit1	TCATTCAACATTCTGTCAATCG CACAACAAGGTTAACCTCTAGACA	2.0	49.0	14	104~132

A.4.2 PCR 产物的凝胶检测

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。

A.4.3 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, 选择分别以 FAM、HEX、TAMRA 标记的三个位点的扩增产物, 以 1 : 3 : 5 体积比混合, 取 1 μ L 上样进行 STR 扫描。

A.5 STR 扫描结果的判读与统计分析

A.5.1 STR 扫描结果的判读

扫描结果可出现两种波形: 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。

由群体遗传分析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记录为 a、b、c、d...

A.5.2 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... 形式运用软件的数据文件, 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)、香农指数、平均杂合度 (H) 等。

A.6 结果判定

群体内遗传变异采用平均杂合度或群体平衡状态方法进行评价。

当用杂合度来判定时, 平均杂合度为 0.5~0.7, 群体为合格的封闭群群体。当用群体是否达到平衡状态来判定时, 按照哈迪-温伯格 (Hardy-Weiberg) 定律, 根据各位点的等位基因数计算封闭群的基因频率, 进行卡方 (chi-square test) 检验。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, 该封闭群群体判为不合格。

A.7 结果报告

根据判定结果对封闭群长爪沙鼠群体出具检测报告。