

实验动物 繁育与遗传监测 第4部分:实验用狨猴

Laboratory animal Breeding and genetic control
Part 5: Experimental marmoset

地方标准信息服务平台

2018-09-29 发布

2019-01-01 实施

北京市质量技术监督局 发布

目 次

前言..... II

1 范围..... 1

2 规范性引用文件..... 1

3 术语和定义..... 1

4 繁育..... 1

5 繁殖种群的遗传质量监测..... 2

附录 A（规范性附录） 封闭群实验用狨猴微卫星 DNA 标记检测方法 3

地方标准信息服务平台

前 言

DB11/T 1461《实验动物 繁育与遗传监测》拟分为以下部分：

- 第 1 部分：实验用猪；
- 第 2 部分：实验用牛；
- 第 3 部分：实验用羊；
- 第 4 部分：实验用狨猴；

.....

本部分为DB11/T 1461的第4部分。

本部分按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本部分由北京市科学技术委员会提出并归口。

本部分由北京市科学技术委员会组织实施。

本部分起草单位：中国医学科学院医学实验动物研究所。

本部分主要起草人：刘云波、刘先菊、向志光、滕永康。

地方标准信息服务平台

实验动物 繁育与遗传监测

第4部分:实验用狨猴

1 范围

本部分规定了实验用狨猴的繁育与繁殖种群的遗传质量监测。
本部分适用于实验用狨猴的繁育与遗传监测。

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

实验用狨猴 experimental marmoset

经人工饲养,对其携带的病原微生物和寄生虫实行控制,遗传背景明确或者来源清楚,用于科学研究、教学、生产和检定以及其他科学实验的狨猴。

3.2

繁殖种群 breeding stock

以非近亲交配方式进行繁殖生产的实验用狨猴种群,种猴数量应不少于25对。

4 繁育

4.1 原则

参考封闭群实验动物繁殖方法保持繁殖种群动物的遗传概貌和生理特征,避免近交系数随繁殖代数增加而过快上升。

4.2 引种

作为繁殖用原种的实验用狨猴必须遗传背景明确,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)。

为保持繁殖种群动物的遗传异质性及基因多态性,引种动物数量要足够多。参照GB 14923规定,实验用狨猴最小引种群规模为25对无血缘关系(三代以内无共同祖先)动物。

4.3 繁殖

为保持封闭群动物遗传基因的稳定，封闭群应足够大，并尽量避免近亲交配。

5 繁殖种群的遗传质量监测

5.1 遗传质量要求

实验用狨猴应符合以下要求：

- a) 具有明确的遗传背景资料，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）；并能充分表明新培育的或引种的繁殖种群符合要求。
- b) 保种及生产的繁殖记录卡应清楚完整，繁殖方法科学合理。

5.2 检测方法及实施

5.2.1 检测方法

采用微卫星DNA标记检测方法进行，具体检测方法见附录A。

5.2.2 抽样

随机采取实验用狨猴的血液或其他组织，按表1要求从每个繁殖种群中随机抽取非同窝成年动物，雌雄各半。抽样数量按表1进行。

表1 封闭群实验用狨猴遗传检测抽样数量

数量为只

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

5.2.3 结果判定

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价。按附录A中A.6进行遗传判定。

5.2.4 检测时间间隔

实验用狨猴繁殖种群每年至少进行一次遗传质量检测。

附 录 A (规范性附录)

封闭群实验用狢猴微卫星 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0.0001g的分析天平, pH计, 紫外分光光度仪。

A.2 基因组DNA的提取PCR仪

用酚-氯仿萃取法或试剂盒提取基因组DNA。

A.3 微卫星位点

用于检测狢猴微卫星位点分别为30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1。

A.4 PCR扩增

A.4.1 PCR扩增的体系

PCR总反应体积为15 μ l, 其中含10 $\times$ PCR buffer:1.5 μ l, 上下游引物(100 pmol/ μ L) 各1 μ L, 4 $\times$ dNTP 100 μ mol/L :1 μ L, Taq 酶1U:1 μ L, 50 ng~100 ng 基因组DNA:1 μ L, 纯水(ddH₂O) :8.5 μ L。PCR反应程序为: 95℃预变性, 4min; 94℃变性, 30s; 退火温度(各位点序列、PCR反应条件参见附表1), 30s; 72℃延伸, 30s; 35个循环; 72℃继续延伸7min; 扩增产物4℃保存。

A.4.2 PCR产物的检测

PCR产物, 经1.5%的琼脂糖凝胶电泳以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断后, 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断大小。每个位点的等位基因根据扩增片断从小到大顺序排列记录为a,b,c,d...等。

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...等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)、香隆指数、平均杂合度(H)等。

A.6 结果判定

平均杂合度在0.5~0.7时,群体为合格的实验用狨猴群体,或者首先得到各个位点上各基因频率、基因型频率的实际值,然后可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,可知被监测群体是否达到平衡状态。

A.7 结果报告

根据判定结果对被检测的实验用狨猴群体做出检测报告。

表 A.1 实验用狨猴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⁺ (mM) 浓度	退火温度 (°C)	等位基 因数	等位基因 分布范围
CAJA1	GAAGACGGGGCGTAAATA TGTGGTGGCTCATACCTGAA		55	5	383~391
CAJA6	GAGCACCAAGATTGGCATTT CCAATACACATCGGCTTTGA		53	6	220~230
CAJA10	ACCCTACATTGCCAAATTGC GCCTCTTCTGAGGGAAGTGA		55	9	178~203
CAJA11	CGAAAGTGTGCTCAACAGGA AAGGTGGGATTCTGAAAGCA		54	6	243~258
CAJA14	AGCACATGAACACCCAGGTT AGTGAAAACAGGCTGGGAGA		50	5	201~219
CAJA17	GGGCACTCCAAGGTCAGTAA TTGCCCCCTGCTTATTGTAG		53	9	315~382
CAJA18	ACTTGCAGGCCAGTGTTCTT TGGACAGCTGAGGTTTCCTT		54	7	288~317
D10qham51	CGGGAATTCAAAGGCGTTCT AGGAGGATTTCGCATTGGG		56	10	197
D11ham187	TGGAAGAACTTTCTGCCAAACC GCTTGTTACGGCAGACTGAC		52	4	210
Ham157	CAGCCAACATGCTTCTCAGT GGTGAATAAATCAGGCTACCAG		55	2	181
Ham60	TGCTCTAGAGGTTCCACTCTG GGCATGTTACCTAACCTCTCTG		55	3	135
Ham65	TGAGAACGACTGCTCTAGGT		56	2	163

表 A.1 实验用狢猴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（续）

位点	引物序列（5'-3'）	Mg ²⁺ （mM） 浓度	退火温度 （°C）	等位基 因数	等位基因 分布范围
	TGGAAGTGGCTTCATTCCTG				
Ham181	CAATGAGATGTGTCCAAGTGAG CCAAACACCCAATATGCAGT		52	3	214
Ham184	GGCGCAGCTCATCTCTTCAC CCTCCCCAGCATCTTCAAGAC		53	3	176
Ham125	GTGGGTAAATGCTGCCATCT GTTTCAACTCCTGCGTCTAGTC		54	3	145
Ham101	AGACCAAGCATCTTCTTGGAC CACCTTTAACTGCTGTGGTTG		55	3	282
Ham61	CAAAGATGCTTGGGGATGGA AAGATCTTGCAGGGCGTAAG		52	2	260
Ham32	GCCCAAATCCTGTTTGACAC CCACCTAGATCATCGAGAGTAG		52	3	170
Ham100	GACCAACTCCAAGCTAGCA GGTAACATGCTCTCGACCTT		54	3	229
Ham26	GCAAATTCGTGAAGCATTCC AACAGTTGGATGAGTTCCAG		55	3	166

地方标准信息平台