



中华人民共和国国家标准

GB/T 45350—2025

实验动物 近交系小鼠、大鼠 SNP 标记检测法

Laboratory animal—Single nucleotide polymorphisms marker methods for
inbred mice and rats

2025-02-28 发布

2025-02-28 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由全国实验动物标准化技术委员会(SAC/TC 281)归口。

本文件起草单位：中国食品药品检定研究院、上海实验动物研究中心、陕西省中医药研究院、山西医科大学、广东省实验动物监测所。

本文件主要起草人：魏杰、王洪、岳秉飞、赵莹、李欢、周佳琪、赵丽亚、汤建平、姚养正、宋国华、王静、范春、陈国强。

引 言

0.1 本文件的发布机构提请注意,声明符合本文件时,可能涉及到 6.2 近交系大鼠检测(LDR 法)与大鼠 SNP 位点检测近交系大鼠相关的专利的使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构承诺,他愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下就专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得:

专利持有人姓名:赵莹、汤建平、赵丽亚、聂艳艳、姜珊、范春、陈国强、顾晓雪、沈淼、冯艳。

地址:上海市浦东新区金科路 3577 号。

请注意除上述专利外,本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

0.2 遗传背景明确是近交系小鼠、大鼠能够应用于生产、检定、研发等各领域的先决条件。为了提升实验小鼠、大鼠的遗传质量与标准化水平,我国已发布实施了 GB/T 14927.1《实验动物 近交系小鼠、大鼠生化标记检测法》和 GB/T 14927.2《实验动物 近交系小鼠、大鼠免疫标记检测法》,这两项标准的检测方法限于蛋白水平,难以实现近交系小鼠、大鼠多品系尤其是亚系的鉴别评价。GB 14923《实验动物 遗传质量控制》推荐了使用分子生物学方法进行遗传质量监测,但没有相应的技术方法。因此,本文件通过相关 SNP 标记的测定进行近交系小鼠、大鼠的遗传质量评价,能够更好地提升近交系小鼠、大鼠的遗传质量,促进其标准化水平和应用价值的提升。

实验动物 近交系小鼠、大鼠 SNP 标记检测法

1 范围

本文件描述了实验动物近交系小鼠、大鼠单核苷酸多态性(SNP)标记检测方法及其判断标准。
本文件适用于实验动物近交系小鼠、大鼠遗传组成分析、品系鉴别和质量控制。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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—2022 实验动物 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

单核苷酸多态性 single nucleotide polymorphisms; SNP

在基因组水平上由单个核苷酸在位置上发生转换、颠换、插入或缺失等引起的 DNA 序列多态性。

3.2

连接酶检测反应 ligase detective reaction; LDR

利用高温连接酶实现对基因多态性位点的识别的方法。

注:高温连接酶一旦检测到 DNA 与互补的两条寡聚核苷酸接头对应处存在着基因点突变类型的碱基错配,则连接反应就不能进行。

3.3

纯合性 homozygosity

同源染色体的相对位置上具有相同等位基因的状态。

注:近交系动物通过连续的近亲交配绝大部分的位点都具有纯合性。一个品系内任何个体间进行交配产生的后代也具有纯合性。

4 试剂与仪器

4.1 试剂

DNA 提取试剂盒、PCR 反应及产物纯化试剂盒、测序反应试剂盒、琼脂糖。

4.2 实验设备和器材

4.2.1 仪器设备:电泳仪、离心机、PCR 仪、紫外凝胶成像系统、遗传分析仪、水浴锅、微波炉、混匀振荡器。

4.2.2 器材:剪刀、镊子、采血管、移液器、离心管、PCR 管、琼脂糖制胶板。

5 方法原理

小鼠和大鼠基因组内均存在数量极为丰富的 SNP 位点。通过筛选品系特异性的 SNP 标记位点,并在该位点上下游设计引物,通过 PCR 扩增、连接酶反应、测序、毛细管电泳等分子生物学方法分析,得到各近交系的遗传概貌,定期进行遗传质量监测。

6 位点选择

6.1 近交系小鼠检测(直接测序法)

常规近交系小鼠选取表 1 中前 27 个 SNP 标记进行 PCR 扩增,使用直接测序法进行检测。

除表 1 前 27 个标记外,C57BL/6 亚系需要加测表 1 中 28 号~32 号 SNP 标记,BALB/c 亚系需要加测表 1 中 33 号~35 号 SNP 标记。

各实验室可根据自身条件设计或选择引物。表 2 中引物和退火温度可供参考。

表 1 近交系小鼠 35 个 SNP 位点

序号	SNP 位点	序号	SNP 位点	序号	SNP 位点	序号	SNP 位点
1	rs3022796	10	rs3023177	19	rs3023382	28	rs3709624
2	rs3022825	11	rs3023203	20	rs3091048	29	rs3659787
3	rs3022883	12	rs3023226	21	rs3091174	30	rs3722313
4	rs3022953	13	rs3089984	22	rs3023436	31	rs3702158
5	rs3022977	14	rs3089109	23	rs3023442	32	rs3724876
6	rs3023034	15	rs3088673	24	rs3023450	33	rs3712692
7	rs3023039	16	rs3023251	25	rs3089349	34	rs3706082
8	rs3023064	17	rs3023342	26	rs3023481	35	rs3656801
9	rs3023162	18	rs3023381	27	rs3089604	—	—

表 2 近交系小鼠 35 个 SNP 引物及退火温度

序号	引物	引物序列	产物 bp	退火温度 ℃	染色体位置
1	rs3022796-F	GTATGGTGGGGAGAGCACAC	344	61	1
	rs3022796-R	GAGTCAGGTCCAACCAACCC			
2	rs3022825-F	GGCACTGCAGTATTAGCCGA	299	60	1
	rs3022825-R	CCTGGCATGTACTGTGAGGC			
3	rs3022883-F	AGTTTGGGGGAGGAACCCTG	209	60	2
	rs3022883-R	AGGCAGGCATCATACATTGGA			

表 2 近交系小鼠 35 个 SNP 引物及退火温度 (续)

序号	引物	引物序列	产物 bp	退火温度 ℃	染色体位置
4	rs3022953-F	CATTTGACAAGGTATGCAGGGC	198	59	3
	rs3022953-R	GTATTTTGTAGGGGCACCAGA			
5	rs3022977-F	ATGAGAGGAACAACAAGCACGT	385	59	4
	rs3022977-R	CCCCAAGATTTCTACACCAAAG			
6	rs3023034-F	TGAGTTTTCACTCTTGCTGGC	249	60	5
	rs3023034-R	AGCCCTTCTGATAGTTGAACGAC			
7	rs3023039-F	CAGCCATACCACTCTGCTCC	459	61	5
	rs3023039-R	GGTCAGAACCCATGTCCAGG			
8	rs3023064-F	GCCCAGCCAGTGGGTC	153	58	6
	rs3023064-R	TGGCAATAATTGTATCTTGTGCCC			
9	rs3023162-F	TTTTCACTGTGTTCCCGTGAC	262	60	7
	rs3023162-R	AGACCTAACAGGGAACAGGCA			
10	rs3023177-F	TTTGAGTTGCAGGGTTTTCTG	200	59	8
	rs3023177-R	GCCTTTACAGCCAAAGACTTATCA			
11	rs3023203-F	GGTCTCTTGGCATCTGGCAT	183	58	9
	rs3023203-R	GAGCTTGTAGAGAGAACCCCT			
12	rs3023226-F	GTGACAACCCTCCTGGTGTA	185	59	9
	rs3023226-R	AACTCCGTGTGGGGTAGTGA			
13	rs3089984-F	GCCTAACATCACTTTTTGGGAGC	199	60	10
	rs3089984-R	GGAGCAATTAGAATCCCAGGTG			
14	rs3089109-F	TAACAAAGCTCTTCACTCCTCAAG	191	59	10
	rs3089109-R	AATGGGTCTGTCAGAGTTTTCTCA			
15	rs3088673-F	ACCATTCTTCTCAACTAAGTCTGCT	190	59	11
	rs3088673-R	TGGTGATAGTGATGGGCTCT			
16	rs3023251-F	TCAGCATCTCCCTTAACCTTCTT	186	60	11
	rs3023251-R	ACCAGCTCCTAGTGATGACA			
17	rs3023342-F	TGACTGGACCGTAACGAGAG	198	60	12
	rs3023342-R	CAGGCCAGACCGTGCTAATG			
18	rs3023381-F	GAGGTAGAGATGCAGCAGGG	169	59	13
	rs3023381-R	GGAGGGATGGATGGTGGAGA			
19	rs3023382-F	AGGAGCCGCTGGTTCTGATA	189	59	13
	rs3023382-R	ATGTACACATGAGACTCCGGC			

表2 近交系小鼠 35 个 SNP 引物及退火温度 (续)

序号	引物	引物序列	产物 bp	退火温度 ℃	染色体位置
20	rs3091048-F	GCTATAGACCAGGAGTTGCCTTT	185	60	14
	rs3091048-R	TGGACAAGCACCCCTCACAATA			
21	rs3091174-F	TAAAATGGTCCTGCATTTTGCCA	198	59	15
	rs3091174-R	TACTCACATACAACCTGAACAAGGCA			
22	rs3023436-F	AACTTACGATGTGGGGTGCAA	198	60	16
	rs3023436-R	AGATGCACGTTACACTGAT			
23	rs3023442-F	AGCGGAGGTGCTTGTTACAT	297	60	17
	rs3023442-R	AACACCCAAATGCCAGCCTA			
24	rs3023450-F	ATGGATCAGGGAAGAGCACC	216	60	17
	rs3023450-R	CTGCCTGCATCCCCTAACTC			
25	rs3089349-F	CCCTGTGCTCATGGTGTAGAAA	299	61	18
	rs3089349-R	TCAGGGTGGATGATGTCCAAAG			
26	rs3023481-F	TCTGGGCCACTACTTTCACCTC	250	60	19
	rs3023481-R	CAGCACTTTCCACAGTTGGG			
27	rs3089604-F	TTTTCAGGGCCAAAGCAGACT	290	60	X
	rs3089604-R	TCCTCCTAACTAAGTCCCCCTTTT			
28	rs3709624-F	ACAGTGCTGGCTTGTGGTAGAG	673	61	8
	rs3709624-R	CGAATTATGACCGAGAAGTTGA			
29	rs3659787-F	CCACAACAAAGAGCCAGACCAA	277	59	11
	rs3659787-R	TAGGCTTGGCCTTCATCTAAGC			
30	rs3722313-F	GTGTCTCTCACCAGGACAGC	272	60	13
	rs3722313-R	AACGGGTCGTAGAACTTGGC			
31	rs3702158-F	ACTCTCCAAAGAGGAACAGCTT	236	59	15
	rs3702158-R	TACAGAGTACCCTAGCACGCC			
32	rs3724876-F	AAGTGTCAAGTTTTATTGTTTCCAGT	177	58	19
	rs3724876-R	CAAGTTCCCTTTTGGCTGGC			
33	rs3712692-F	AGGGCCCGATTGTAGTGTTTA	197	59	1
	rs3712692-R	CCTGTGAAGTGAATGAGCTTGC			
34	rs3706082-F	ACAGCGGGAATTGGATGGTAT	241	60	4
	rs3706082-R	GTGATCACCACACTCTTCCGT			
35	rs3656801-F	ACCCACGAGAACAATGAGGC	163	59	18
	rs3656801-R	GGTAGGGTCAGCACTGGAAC			

6.2 近交系大鼠检测(LDR 法)

21 个 SNP 位点共分为 2 组进行 PCR-LDR 反应,表 3、表 4 分别为 21 个 SNP 位点的引物和探针,覆盖大鼠的 20 条常染色体和 X 染色体。每个位点的通用 modify 探针需 3'荧光标记,5'磷酸化。

表 3 21 个近交系大鼠 SNP 位点引物染色体分布

组别	SNP 位点	引物序列	染色体	MgCl ₂ mmol/L	退火温度 ℃
1	rs65970293	TGCACATTGGGACTGCTTTA	1	3	59
		ATCTGGCATGGACAGAGCTT			
	rs106996961	ATAGGGCCAAGGTCCCATTTC	2		
		GAAAAGAACGCTAATCACAGGACA			
	rs63860341	CAATGAATCAAAGGCAACCA	3		
		CCACGGTCCCTATGTGAACT			
	rs64750237	CAGGTATGGCTTTGGAGGAA	4		
		GTTTTTCAGCTGGAGCTGTCC			
	rs107261116	CAGCATTGGCAAGTCTTCCT	5		
		TGATAAAAGGAGCAGCAGCA			
	rs64102787	CGGGGATCAAAGAGACAAAA	6		
		ATAGTGCCAAAGCCCAACAC			
	rs105187832	AGACTACTGGGCTGCTCACC	7		
		CATGGCACACCTTTCTTTCA			
rs106114574	GGCCCCCTAATTTCCATAAA	8			
	TCCAAACATCTCTGGTGTGC				
rs64682441	GCTGGAAGTCTCTGGAGTGG	9			
	ACAAGTGGACTGGCTCAGGT				
rs65067166	ATCCCTCTCTTTGCCAGGAT	10			
	GTAGGGTGAGGCTGCTTCTG				
rs8167985	ACCCCTCTTGCTTTCTGTT	11			
	CTGCTCTTGGATGAAAACCA				
2	rs106672258	GCCCTTCCCAAGGTCATACT	12	3	61
		AAAGCACAAAAATGCCATCC			
	rs65921305	AACCTGGTGATTTGTCAGAGC	13		
		GGCAGACTCCAGGAAGATTG			
	rs106335590	ATTAGCCACGGATGAAGTGG	14		
		TTTGCTGTCTGGCTGATGAC			
rs106458396	AGAGCAGCTGCCAAAATAGC	15			
	AAACCTGGCTTTAGCAAGCA				

表 3 21 个近交系大鼠 SNP 位点引物染色体分布（续）

组别	SNP 位点	引物序列	染色体	MgCl ₂ mmol/L	退火温度 ℃
2	rs106888236	TGTGAAGAACACAGGCTCTCC	16	3	61
		TGCCAAACACCATGTAATGAA			
	rs63814610	TAGGACAGGGGGAACAACCTG	17		
		CCCAAGCATCCTTGACTGTT			
	rs8152541	CGTGTCATTCTGACTGTGG	18		
		ACAGGAGCTGGCACTGAATC			
	rs105824121	TTCTGCAATCAAGGGTGGAT	19		
		GGCCACCAAAGATACACAGG			
	rs13453252	TACGCCATTTTGCGACATTA	20		
		GGTTCCCTACGAGGAACGAC			
	rs65108991	CATCCCAGAAGCCCTGTTTA	X		
		GAAGTCAGTGCTGTGCCTCA			

表 4 21 个近交系大鼠 SNP 位点探针的序列

组别	位点名称	探针序列
1	rs65970293_modify	GAAAGCACACATATAAGAAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
	rs65970293_T	TTTTTTTTTTTTTTTTTTAGAAAGCTATCCCAGTGTTATGGACA
	rs65970293_C	TTTTTTTTTTTTTTTTTTAGAAAGCTATCCCAGTGTTATGGACG
	rs106996961_modify	ACTATTTACAGAATGGGACCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
	rs106996961_G	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAAAAATTTATTCACAAAATAAAC
	rs106996961_T	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAAAAATTTATTCACAAAATAAAA
	rs63860341_modify	TGACTGTTGTTCCGAATTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
	rs63860341_C	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCTGGCGACTCAAGCCCTTCACCG
	rs63860341_T	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCTGGCGACTCAAGCCCTTCACCA
	rs64750237_modify	GATAAAACACACTGGGAATGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
	rs64750237_T	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAAGGCTTAAAGAGGATAAAGGA
	rs64750237_C	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAAGGCTTAAAGAGGATAAAGGG
	rs107261116_modify	TAAACCCTTGCTGTTCCACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
	rs107261116_G	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCTTAAGAAAAAAAAAACTGTTCTC
	rs107261116_C	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCTTAAGAAAAAAAAAACTGTTCTG
	rs64102787_modify	CAGTCTAGACCTCTGCCTCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
	rs64102787_C	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTACCCCGCCTGTCAGTCCCAG

表 4 21 个近交系大鼠 SNP 位点探针的序列（续）

组别	位点名称	探针序列
1	rs64102787_A	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTACCCCGCCTGTCAGCTCCCAT
	rs105187832_modify	CCCAAGCGGTGAGCAGCCCAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
	rs105187832_G	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGCTACTTCCGTTTATGAATAAACC
	rs105187832_T	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGCTACTTCCGTTTATGAATAAACA
	rs106114574_modify	AAGCAGTATACAGTCTGGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
	rs106114574_T	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCCACTTCCTTACTATTTGACTCA
	rs106114574_A	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCCACTTCCTTACTATTTGACTCT
	rs64682441_modify	ATTAGCAGAGAGTAAGACAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
	rs64682441_T	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCATATCCCAAATAGCAAGGCTCAGA
	rs64682441_C	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCATATCCCAAATAGCAAGGCTCAGG
	rs65067166_modify	CAAGTCATCTATGCTTCTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
	rs65067166_G	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCAAGCTACCTCCTTCACATCCAGC
	rs65067166_C	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCAAGCTACCTCCTTCACATCCAGG
	rs8167985_modify	CACAAATCCAGAAATTCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
	rs8167985_T	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTAGAAAGGAATAAATGGAGGTTACA
	rs8167985_G	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTAGAAAGGAATAAATGGAGGTTACC
2	rs106672258_modify	TGGGGGTAGGATAATGGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
	rs106672258_T	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGCCATGCCCCAGACACCTCGATA
	rs106672258_C	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGCCATGCCCCAGACACCTCGATG
	rs65921305_modify	GGGAAAAATAGATTTGCAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
	rs65921305_T	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTCAATTGAATGTTGAATTTACA
	rs65921305_G	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTCAATTGAATGTTGAATTTACC
	rs106335590_modify	TGTTAATAAAACAAACATATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
	rs106335590_G	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGAAAGAACAGACTCACTCAATTCC
	rs106335590_T	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGAAAGAACAGACTCACTCAATTCA
	rs106458396_modify	TCCAATTTTATCCCTGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
	rs106458396_T	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAACCTGGCTTTAGCAAGCAATGTA
	rs106458396_C	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAACCTGGCTTTAGCAAGCAATGTG
	rs106888236_modify	GGGATGCTAAAGGTTTCTGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
	rs106888236_C	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGTCTGTACAACAGTATCAACGAAG
	rs106888236_A	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGTCTGTACAACAGTATCAACGAAT
	rs63814610_modify	GTGCTGGGCCTTGTGACCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
	rs63814610_C	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCAGGCACTGAGGTAGGTACCAGGCG

表 4 21 个近交系大鼠 SNP 位点探针的序列（续）

组别	位点名称	探针序列
2	rs63814610_T	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCAGGCACTGAGGTAGGTACCAGGCA
	rs8152541_modify	GTTAGAGGTGACAGGAGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
	rs8152541_G	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCTGAGGACATCTGCATCACACTC
	rs8152541_A	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCTGAGGACATCTGCATCACACTT
	rs105824121_modify	GTGCCTCCCCACCCCTAACATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
	rs105824121_A	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATCAGTTTGATTAGTTAAGAACCTT
	rs105824121_G	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATCAGTTTGATTAGTTAAGAACCTC
	rs13453252_modify	GTAGTGTAACCTGGTAGAAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
	rs13453252_G	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGTTCCTACGAGGAACGACGCTGC
	rs13453252_C	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGTTCCTACGAGGAACGACGCTGG
	rs65108991_modify	TATATAAACAAGCTTGGAATT
	rs65108991_A	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAGTCAGTGCTGTGCCTCAGTCTAT
	rs65108991_C	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAGTCAGTGCTGTGCCTCAGTCTAG

6.3 近交系大鼠检测（直接测序法）

常规近交系大鼠选取表 5 中前 31 个 SNP 标记进行 PCR 扩增,使用直接测序法进行检测。
研究大鼠免疫遗传标记,可加测表 5 中 32 号~38 号 SNP 标记。
各实验室可根据自身条件设计或选择引物。表 6 中引物和退火温度可供参考。

表 5 近交系大鼠 38 个 SNP 标记检测位点

序号	SNP 位点	序号	SNP 位点	序号	SNP 位点
1	rs64750237	14	rs106610489	27	rs13453252
2	rs106888236	15	rs13453115	28	rs64102787
3	rs106458396	16	rs105753760	29	rs106647405
4	rs107038347	17	rs8173311	30	rs65545562
5	rs106672258	18	rs66190198	31	rs105694545
6	rs105466309	19	rs106506161	32	rs13458024
7	rs65921305	20	rs106996961	33	rs8166089
8	rs106795993	21	rs65729677	34	rs8158177
9	rs106891788	22	rs65970293	35	rs13457316
10	rs65801920	23	rs8170947	36	rs13448591
11	rs8164880	24	rs107097763	37	rs13456231
12	rs105008665	25	rs8173257	38	rs8149053
13	rs8152541	26	rs105187832	—	—

表 6 近交系大鼠 38 个 SNP 引物及退火温度

序号	引物	引物序列	产物 bp	退火温度 ℃	染色体位置
1	rs64750237	CAGTGTAGCTCAGGCAGAT	159	58	4
		CCAGGCACCATCAAGGAA			
2	rs106888236	TGTGAAGAACACAGGCTCTCC	203	58	16
		TGCCAAACACCATGTAATGAA			
3	rs106458396	GAGAATGAGAAGGCCACACT	266	58	15
		CACCAAAGAGATAGCGAAGC			
4	rs107038347	TAGTCACCTAGTCCTTCAGA	303	58	3
		TTACAAGTCAGTGGCAGAA			
5	rs106672258	TCTGGCTGTGATCGGAATA	378	58	12
		CAACGAATGAGCAAGAGAAGAC			
6	rs105466309	AGCAGAGCACCTCACAGAAT	468	58	5
		CCTTGTGTTGCCTATGGATGA			
7	rs65921305	GCTGTGCTTGGCATAATATC	555	58	13
		CCAGGTGATTATAGATTGTGTC			
8	rs106795993	AACAGCAGCCGCTTCTTAG	702	58	11
		CAGTGTCAGATGTGGTGGTATA			
9	rs106891788	GGTGCCTTCCTGACAAAGT	156	58	1
		GGGTTTCCATTGCTATTTGACA			
10	rs65801920	TGGCTCTTGGTCATCATCTGT	196	58	9
		TCTGTTCTTGGTCTGCTGAGT			
11	rs8164880	CGTCTGTGTTAGTAGGTGATGC	261	58	14
		CCTCTGATGCTGTTGGTATGC			
12	rs105008665	CATCTGCCTGCTACAACTGTT	355	58	2
		TCTTGTATTGGTCAGCACTCTC			
13	rs8152541	CAGGTGGTGATGGTGTAAGC	430	58	18
		CCTCATGCAGTAGCGAGTAAC			
14	rs106610489	CGCTGTCCAATCTCCTGAAG	499	58	2
		CTAGAAGCCATTGTCTGGTCAA			
15	rs13453115	CTGACTTGACAGAACGGTAGG	597	58	15
		AGAGCAGTGAAGGTGAGGAG			
16	rs105753760	AGCAGCATCACAATAGCAAGG	788	58	14
		CTTCCCTAACACATCCCTACCA			

表6 近交系大鼠 38 个 SNP 引物及退火温度 (续)

序号	引物	引物序列	产物 bp	退火温度 ℃	染色体位置
17	rs8173311	CCACCGCATTTGACCAGTTT	359	58	19
		GCCCTGTGTTTGATGGAGTAG			
18	rs66190198	GAGTTCCTGAGTGCTTGATTGT	214	58	11
		ATGGGAGTTAAGGCGGTTTCT			
19	rs106506161	GCAGCAGGACACAAGGAAG	268	58	10
		TCTTAGGAGACCAGAGGAGTG			
20	rs106996961	TGTGTCTCTGTAGTTGGTGTG	366	58	2
		GGATATGGTGCAGTCGTCATT			
21	rs65729677	AACCTCAATTCAACAGCCAGAA	480	58	5
		CCACGACTCACCTACATTCAC			
22	rs65970293	CTCTGGTTGGTCTGGTTGGTT	539	58	1
		AGATGCGGATGCCATTAAGTCT			
23	rs8170947	GACACAGTCAGCATGTAAGCC	679	58	2
		AGACAGTCACTCACAACCTCAGA			
24	rs107097763	TGTACGAAGGAATCATTCTGGA	191	58	2
		CAGTCTCCTCCTGAATGTGAAT			
25	rs8173257	AGTGTGACTGACCGAAGAAG	331	58	17
		AACTCCTGCCTCTACTTACCTA			
26	rs105187832	GGCTTTCCCTTCTCCATACTTG	300	58	7
		TTACCTGTGACTCCTGCTTGT			
27	rs13453252	CCTGTAATCAAGATACGCCATT	349	58	20
		GCTAGGACCTTAACCACCATA			
28	rs64102787	GCTGGGCTGTGGTTAGACT	406	58	6
		AGCATGGCTGGCAGTTCA			
29	rs106647405	CCTTCTTCTGGAACCTGCTCTG	469	58	4
		GACCCTGTAATTGGCACCTGTT			
30	rs65545562	TGCTGCTCTAACGATGAGTACA	585	58	21
		GATGTAGGCACCAGGCTTGT			
31	rs105694545	CCTCCTATCCGTGAGTCCTGAG	678	58	8
		TTCTGGTGCCGTCCTGTCTT			
32	rs13458024	GGAGTAACTCTAATGGCGGAAG	172	58	20
		CCTCACAGGAACCAGTAATGC			

表 6 近交系大鼠 38 个 SNP 引物及退火温度（续）

序号	引物	引物序列	产物 bp	退火温度 ℃	染色体位置
33	rs8166089	TAGGCGAGAGACGGAAGGA	225	58	20
		CAAGGTGCTGAGTGCTGTT			
34	rs8158177	CCATCACCAGCAGCTTAGTTC	483	58	20
		GCGTTGGCTCAGCAATCAA			
35	rs13457316	GAACCAGAAGCAGGATTCAACA	403	58	20
		CCGACACCAGCAATAACAGG			
36	rs13448591	CCTTGTCACGGTTCCTCCAA	474	58	20
		GCAGAGTCCAGCCACTGTT			
37	rs13456231	TTGGAGCATTGGCAGGCA	576	58	20
		CCATCACTAACCAGTTCAGAGG			
38	rs8149053	CGCTCCTCCTCCATGATTGA	775	58	20
		GGCTGGCTCTTGTCACTCA			

7 操作步骤

7.1 采样

近交系采样原则按照 GB 14923—2022 中 5.2.1.1,具体操作如下：

- a) 观察动物外观,核对编号；
- b) 经眼底静脉采血 200 μL,或取 0.5 cm 尾尖,—20 ℃低温保存；
- c) 提取基因组 DNA:用苯酚氯仿法或试剂盒提取基因组 DNA。紫外分光光度计测浓度在 OD260/280 在 1.8~2.0 之间,质量浓度调整为 30 ng/μL~40 ng/μL。

7.2 小鼠 SNP 直接 PCR 测序分型法

7.2.1 PCR 扩增体系

PCR 总反应体积为 30 μL,其中 10× PCR buffer(Mg²⁺)为 3 μL,上下游引物(10 pmol/μL)各 1 μL, dNTP 2.5 mmol/L 为 3 μL,Taq 酶 5 U/μL 为 0.2 μL,30 ng/μL 基因组 DNA 为 1 μL,纯水补齐体积。本体系推荐使用普通 Taq 酶。

7.2.2 PCR 反应程序

95 ℃预变性, 3 min;94 ℃变性,1 min;退火温度(各位点退火温度见表 2),1 min;72 ℃延伸,1 min;35 个循环;72 ℃继续延伸 8 min;扩增产物 4 ℃保存。

7.2.3 电泳检测与产物纯化

制备 1×TAE 制备 1.5%琼脂糖凝胶,取 PCR 扩增结果 5 μL,用移液器在凝胶上点样。凝胶成像系统记录检测结果。

使用 PCR 产物纯化回收试剂盒对目的产物进行纯化回收。

7.2.4 产物测序

7.2.4.1 测序扩增体系及反应程序

纯化 PCR 产物可送交有资质的测序公司进行测序分析,或参照如下步骤进行测序。

总反应体积为 5 μL ,其中 $5\times\text{buffer}$ 为 0.8 μL ,Bigdye 为 0.4 μL ,单向引物(3.2 pmol/ μL)为 1 μL ,纯化 PCR 产物(质量浓度不低于 20 ng/ μL)为 1 μL ,纯水补齐体积。测序扩增反应置于冰上操作。

测序扩增程序:96 $^{\circ}\text{C}$ 预变性,2 min;96 $^{\circ}\text{C}$ 变性,10 s;55 $^{\circ}\text{C}$,5 s;60 $^{\circ}\text{C}$,90 s;25 个循环;4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

使用配套 HIDI 变性纯化试剂盒将测序扩增产物进行纯化及变性解链处理。

7.2.4.2 上机测序与结果输出

按照遗传分析仪操作手册建立并启动测序程序,获得峰图后对其进行命名和分析,判断突变的有无及类别,使用软件分析,得到检测个体的 SNP 位点碱基类型。

7.3 大鼠 SNP 采用 PCR-LDR 分型法

7.3.1 PCR 扩增体系

PCR 总反应体积为 20 μL ,其中 $10\times\text{PCR buffer}$ 为 2 μL ,GC 溶液为 2 μL ,上下游引物(0.5 pmol/ μL)各 2 μL ,dNTP(各 2.5 mmol/L)为 1.6 μL ,镁离子(25 mmol/L)为 2.4 μL ,*Taq* 酶(5 U/ μL)为 0.1 μL ,50 ng~100 ng 基因组 DNA 为 2 μL ,纯水补足 20 μL 。

7.3.2 PCR 反应程序

反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 15 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,退火温度(各位点退火温度见表 3)90 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 继续延伸 10 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

7.3.3 LDR 反应体系

LDR 总反应体积为 20 μL ,其中 $10\times\text{buffer}$ 为 2 μL ,位点特异探针(0.5 pmol/ μL)各 2 μL ,模板(PCR 产物)为 8 μL ,*Taq* DNA 链接酶(40 U/ μL)为 0.2 μL ,加水补足 20 μL 。

7.3.4 LDR 反应程序

反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 连接 2 min,30 个循环;4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

7.3.5 产物检测



7.3.5.1 产物变性

总体积为 10 μL ,PCR-LDR 产物为 1 μL ,去离子甲酰胺 HIDI 为 8 μL ,内参 ROX 为 1 μL 。

7.3.5.2 变性程序

95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min,迅速放在冰水浴中。5 min 后,可上机检测。

7.3.5.3 产物检测

将变性后的产物放入一代自动测序仪中进行分析,按照一代测序仪操作手册建立并启动检测程

序,获得峰图后对其进行命名和分析,判断突变的有无及类别,使用仪器配套的分型软件,得到检测个体的 SNP 位点碱基类型。

7.4 大鼠 SNP 直接 PCR 测序分型法

7.4.1 PCR 扩增体系

PCR 总反应体积为 40 μL ,其中 $10\times\text{PCR buffer}(\text{Mg}^{2+})$ 为 4 μL ,上下游引物(10 pmol/ μL)各 1 μL , dNTP 2.5 mmol/L 为 3.2 μL ,*Taq* 酶 5 U/ μL 为 0.2 μL ,30 ng/ μL 基因组 DNA 为 1 μL ,纯水补齐体积。本体系推荐使用普通 *Taq* 酶。

7.4.2 PCR 反应程序

95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性, 5 min;96 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 继续延伸 8 min;扩增产物 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

7.4.3 电泳检测与产物纯化

制备 $1\times\text{TAE}$ 制备 1.5%琼脂糖凝胶,取 PCR 扩增结果 5 μL ,用移液器在凝胶上点样。凝胶成像系统记录检测结果。

使用 PCR 产物纯化回收试剂盒对目的产物进行纯化回收。

7.4.4 产物测序

7.4.4.1 测序扩增体系及反应程序

纯化 PCR 产物可送交有资质的测序公司进行测序分析,或按照如下步骤进行测序。

总反应体积为 5 μL ,其中 $5\times\text{buffer}$ 为 0.8 μL ,Bigdye 为 0.4 μL ,单向引物(3.2 pmol/ μL)为 1 μL ,纯化 PCR 产物(质量浓度不低于 20 ng/ μL)为 1 μL ,纯水补齐体积。测序扩增反应置于冰上操作。

测序扩增程序:96 $^{\circ}\text{C}$ 预变性, 2 min;96 $^{\circ}\text{C}$ 变性,10 s;55 $^{\circ}\text{C}$, 5 s;60 $^{\circ}\text{C}$, 90 s;25 个循环;4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

使用配套 HIDi 变性纯化试剂盒将测序扩增产物进行纯化及变性解链处理。

7.4.4.2 上机测序与结果输出

按照遗传分析仪操作手册建立并启动测序程序,获得峰图后对其进行命名和分析,判断突变的有无及类别,使用软件分析,得到检测个体的 SNP 位点碱基类型。

8 结果判定

经检测获得的 SNP 遗传概貌应与原品系的 SNP 遗传概貌相符,没有新的等位基因出现,则判定为合格品系。否则,判为不合格品系。

结果判定基于与种源数据比对给出结论。当出现群体的稳定纯合遗传变异,可判为亚系。如为个体的纯合或杂合变异,需要扩大样本量和检测位点,结果仍为个体纯合或杂合变异,判为不合格。具体品系评价按照 GB 14923—2022 附录 E 执行。

