

DB33

浙江省地方标准

DB 33/T XXXXX.3—XXXX

实验动物 长爪沙鼠 第3部分：遗传质量控制

Laboratory animal Mongolian gerbil

Part 3: Genetic quality control

(报批稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

浙江省质量技术监督局 发布

前 言

《实验动物 长爪沙鼠》分为七个部分：

- 第1部分：微生物控制等级及监测；
- 第2部分：寄生虫控制等级及监测；
- 第3部分：遗传质量控制；
- 第4部分：组织病理检查规程；
- 第5部分：配合饲料营养成分；
- 第6部分：环境及设施；
- 第7部分：饲养管理规程。

本部分为《实验动物 长爪沙鼠》的第3部分。

本部分按GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本部分由浙江省科技厅提出并归口。

本部分起草单位：浙江省医学科学院、杭州师范大学

本部分的主要起草人：褚晓峰、戴方伟、宋晓明、李长龙、陈振文、李巍、卢领群、应华忠、萨晓

晏

本部分为首次发布。

实验动物 长爪沙鼠

第3部分：遗传质量控制

1 范围

本部分规定了封闭群长爪沙鼠（Mongolian gerbil）的繁殖方法和遗传质量要求。
本部分适用于长爪沙鼠的遗传分类、繁育和遗传质量控制。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

长爪沙鼠 Mongolian gerbil (*Meriones unguiculataus*)

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长爪沙鼠。

2.2

封闭群（远交群） closed colony or outbred stock

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。

3 封闭群（远交群）命名

封闭群由2个~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，第一个字母应大写，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1：

Z：ZCLA表示由浙江省医学科学院（Z）保持的ZCLA长爪沙鼠封闭群。

4 封闭群长爪沙鼠的繁殖方法

4.1 封闭群长爪沙鼠的繁殖原则

尽量保持封闭群长爪沙鼠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

4.2.1 作为繁殖用原种的长爪沙鼠应遗传背景明确，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）。

4.2.2 长爪沙鼠的引种数量要求：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。采用循环交配方式时，最小引种群规模为 25 对无血缘关系（三代以内无共同祖先）的雌雄长爪沙鼠。

4.3 繁殖

封闭群应足够大，并尽量避免近亲交配。可根据封闭群的大小，选择采用循环交配或随机交配进行繁殖。具体繁殖方法参照 GB 14923 执行。

5 封闭群长爪沙鼠的遗传质量监测

5.1 封闭群长爪沙鼠的遗传质量标准

封闭群长爪沙鼠应符合以下要求：

- 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封闭群长爪沙鼠符合封闭群定义的规定。
- 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。
- 经遗传检测（微卫星 DNA 标记或生化标记基因检测方法等）质量合格。

5.2 封闭群长爪沙鼠遗传质量检测方法及实施

5.2.1 采样

按表1要求从每个封闭群中随机抽取非同窝成年长爪沙鼠，雌雄各半，采样数量按表1进行。随机采取长爪沙鼠的血液或其他组织。血液样本不少于1 毫升/只，其他等组织样本不少于0.5 克。

表1 遗传检测采样要求

群体数量（单性别种鼠数量）	采样数量
少于 100 只	15 只
100 只及以上	30 只

5.2.2 检测方法

采用微卫星DNA标记或生化标记基因检测方法进行。具体方法按附录A和附录B进行。

5.2.3 结果判断

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。

当用杂合度来判定时,平均杂合度在0.5~0.7的群体,判定为合格的封闭群群体。当用是否达到平衡状态来判定时,按照哈代-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 χ^2 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。

5.2.4 检测时间间隔

封闭群长爪沙鼠生产群每年至少进行一次遗传质量检测。

5.2.5 结论与报告

根据判定结果对被检测的封闭群长爪沙鼠群体做出检测报告。

附 录 A
(规范性附录)
封闭群长爪沙鼠的微卫星标记检测方法

A.1 仪器设备

PCR仪, 遗传分析仪, 4℃冰箱, -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28个分布于长爪沙鼠染色体上的微卫星位点检测封闭群长爪沙鼠的遗传概貌。各微卫星位点的名称、引物序列、等位基因数、PCR反应的T_m值及等位基因分布范围见表A.1。

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

位点	引物序列(5'-3')	镁离子浓度 (mmol/L)	退火温度 (℃)	等位基因 数	等位基因 范围
AF200942	CAGGCACCCCCAGTTT GTCTACACAGGCTGAGGATGT	2.0	54	15	180-215
AF200943	GGCTCCTGATTCTACATTTCT CAACCATTGGCAACTCTC	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
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 TGAGAAGAATGAGGAATTTGTCC	2.0	48.1	11	196-229
D7Mit33	TCTGAAGTTTGAATGGTTGTGG TTTCAAAATCGTGTCAATTTTGC	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 TATGTGTTTCAAACCACACTCG	2.0	53.1	18	245-283
D2Mit22	GCTCCCTTTCCTCTTGAACC 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 TAAGATCCAAGAGATGGGTAAAGC	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 TAATAACCCATGTTTTCTGTGGG	2.0	48.1	9	234-251
D8Mit56	ACACTCAGAGACCATGAGTACACC GAGTTCACTACCCACAAGTCTCC	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 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1U: 1 μL ，50 ng~100 ng 基因组DNA: 1 μL ，纯水(ddH₂O): 8.5 μL 。PCR反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性, 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 延伸, 30 s; 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 继续延伸7 min; 扩增产物4 $^{\circ}\text{C}$ 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 μL 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 结果判断

A. 6.1 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。

当用杂合度来判定时,平均杂合度在0.5~0.7的群体，判定为合格的封闭群群体。当用是否达到平衡状态来判定时，按照哈代-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 χ^2 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。