

上海市地方标准

DB31/T 1278—2021

实验裸鼯鼠 遗传质量控制

Laboratory naked mole-rat—Genetic quality control

地方标准信息服务平台

2021-01-04 发布

2021-04-01 实施

上海市市场监督管理局 发布



地方标准信息服务平台

目 次

前言	III
引言	IV
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 遗传命名	1
5 繁殖	1
5.1 原则	1
5.2 引种	1
5.3 方法	2
6 封闭群裸鼯鼠的遗传质量监测	2
6.1 封闭群裸鼯鼠的遗传质量	2
6.2 抽样	2
6.3 检测方法	2
6.4 结果判定	2
6.5 检测频率	2
附录 A (规范性) 封闭群裸鼯鼠的微卫星 DNA 标记检测方法	3

地方标准信息服务平台

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。

本文件由上海市科学技术委员会提出并组织实施。

本文件由上海市实验动物标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：中国人民解放军海军军医大学。

本文件主要起草人：崔淑芳、林丽芳、孙伟、陈超、赵善民、丛薇、杨文静、张静远、李煜、冯延、张倩倩。

地方标准信息服务平台

引 言

本文件的发布机构提请注意,声明符合本文件时,可能涉及附录 A 的“封闭群裸鼯鼠的微卫星 DNA 标记检测方法”与“裸鼯鼠微卫星标记位点、引物及其应用”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法获得:

专利持有人姓名:崔淑芳,林丽芳,程继帅,杨文静,肖邦,丛薇,赵善民,余琛琳。

地址:上海市杨浦区翔殷路 800 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。

地方标准信息服务平台

实验裸鼯鼠 遗传质量控制

1 范围

本文件规定了实验裸鼯鼠(简称:裸鼯鼠)的遗传命名、繁殖和封闭群裸鼯鼠的遗传质量标准及检测方法的要求。

本文件适用于实验裸鼯鼠的遗传质量控制。

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 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

实验裸鼯鼠 laboratory naked mole-rat

裸鼯鼠

经人工培育,对其携带的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裸鼯鼠。

3.2

封闭群裸鼯鼠 closed colony

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

4 遗传命名

封闭群的命名按照 GB 14923 执行。

5 繁殖

5.1 原则

保持封闭群裸鼯鼠的遗传概貌及生理特性,避免近交繁殖。

5.2 引种

5.2.1 封闭群裸鼯鼠种子应遗传背景明确,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)。

5.2.2 裸鼯鼠引种数量要求:在保证每代近交系数增量不大于1%的前提下,决定最小引种规模。

5.3 方法

封闭群应足够大,采用循环交配方式,引种数量不应少于25对无血缘关系(三代以内无共同祖先)的雌雄裸鼯鼠。以保持封闭群裸鼯鼠的遗传基因的稳定,并尽量避免近亲交配。具体繁殖方法按照GB 14923执行。

6 封闭群裸鼯鼠的遗传质量监测

6.1 封闭群裸鼯鼠的遗传质量

封闭群裸鼯鼠应符合以下要求:

- a) 具有明确的遗传背景资料,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);
- b) 用于保种及生产的繁殖系谱及记录卡应清楚完整,繁殖方法科学合理;
- c) 封闭繁殖,保持动物的基因异质性及多态性,避免近交系数随繁殖代数增加而过快上升。

6.2 抽样

按表1要求从每个封闭群中随机抽取非同窝成年裸鼯鼠,雌雄各半。

表1 封闭群裸鼯鼠遗传检测采样要求

群体数量/只	采样数量
≤100	不少于16只
>100	不少于30只

6.3 检测方法

采用微卫星DNA标记检测方法。具体方法执行附录A。

6.4 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。当平均杂合度在0.5~0.7,且期望杂合度与观测杂合度经卡方检验无明显差异时,群体为裸鼯鼠封闭群。或通过群体所有位点哈代温伯格指数(Hardy-Weinberg, HWE) χ^2 的P值进行判断,若P值均大于0.05,判定为裸鼯鼠封闭群。若有任何一个位点的P值小于或等于0.05,则不能判定为裸鼯鼠封闭群。

6.5 检测频率

封闭群裸鼯鼠生产群12个月至少进行一次遗传质量检测。

附录 A

(规范性)

封闭群裸鼯鼠的微卫星 DNA 标记检测方法

A.1 原理

采集封闭群裸鼯鼠的血液或组织,提取基因组 DNA。对特定的微卫星标记座位进行 PCR 扩增,通过遗传分析仪检测各座位基因的峰形和大小,确定各微卫星标记的遗传概貌。

A.2 仪器设备

应用到的仪器设备包括但不限于:

- a) 常压电泳仪;
- b) 4℃冰箱、-20℃冰箱;
- c) 低温高速离心机;
- d) 水浴锅;
- e) 分析天平;
- f) pH 计;
- g) 紫外分光光度仪;
- h) PCR 仪;
- i) 毛细管电泳仪(STR)。

A.3 检测方法

A.3.1 样本的采集

采集约 0.1 g 组织或 0.5 mL 血液,放入 75%乙醇保存。

A.3.2 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.3.3 微卫星位点

采用 25 个微卫星位点检测封闭群裸鼯鼠的遗传概貌。各微卫星位点的名称、引物序列、等位基因数、镁离子浓度及等位基因分布范围见表 A.1。

表 A.1 微卫星位点的引物序列、最佳退火温度、镁离子浓度及等位基因数分布范围

编号	等位基因数	引物(5'-3')	最佳退火温度	Mg ²⁺ 浓度 mmol/L	核心序列	范围
SMMU2016001	4	ATACCCTGGTTTCCTGAT GAATGGTTTTATTGCATAG	54	2	(TAA) ₁₃	284~299
SMMU2016003	4	GGGTAGCAGGGCCAAGTT GGTAAAGGTCCTCGCATC	56	1.5	(TAA) ₁₁	171~189
SMMU2016005	3	ACCCAGCAGCCAGAATAA AAGCCAGGAGGATCAAAA	56	1.5	(TTA) ₁₃	219~228
SMMU2016008	4	GCCTGGGATAAGCACTCA CTTTCCTTTGTTACCCTC	56	2	(TAA) ₁₁	251~263

表 A.1 微卫星位点的引物序列、最佳退火温度、镁离子浓度及等位基因数分布范围 (续)

编号	等位基因数	引物(5'-3')	最佳退火温度	Mg ²⁺ 浓度 mmol/L	核心序列	范围
SMMU2016009	5	TCCCTTTGCATATCAACA AAGCAGGCAGAATACCAT	56	2	(TAA) ₁₅	227~242
SMMU2016010	4	GCCCAGCTAAAGCACAGT AAGCCAGCCCTACAAATA	56	2	(TTA) ₁₄	202~223
SMMU2016012	4	TCAGAGGCTCCAGTTCAT GGTCTTGGGATCTGTC	56	1.5	(ATT) ₁₆	186~201
SMMU2016013	4	TGAAATGGGCTTAGGTTT ATTACGGGGATATGGTAG	56	1.5	(TTA) ₁₉	248~263
SMMU2016016	6	TTCCATTTGGCTACACTT CTCTGCTGGGTTTCTACTA	56	2	(TTA) ₁₁	282~300
SMMU2016021	6	AGCAACAGATTCTTAAA GAGGTGGAGAAAATAACA	56	2	(TAA) ₁₆	240~261
SMMU2016022	6	GGACCCAAATTCAATCC GTGCGTGCTGCTGATAG	56	2	(AAGG) ₃₄	206~262
SMMU2016023	3	GCAAAGTAAAAGGATTC ACATTGAAGATGCTGAA	54	2	(GAGAA) ₉	284~294
SMMU2016024	4	CCAGAAGAAGCCCAAAG ACAGGAGGATCGCCAAG	56	2	(CTCTT) ₉	186~216
SMMU2016026	4	TCTGCATTTAATACTGG GATGGAGACAAACAAGG	56	2	(CTCTT) ₁₀	207~222
SMMU2016028	6	TCCATGCAACTGTTTGGAG CTTCCTGGTGACATCTACTG	56	2	(CA) ₂₄	258~272
SMMU2016029	5	AACTGAAGAACTGCCTAA AAGAGGTCCAAGTGAGG	56	2	(TG) ₂₄	259~269
SMMU2016030	4	CTCAGGGAACCCCAAAT GGGAAGTTTTTCAGCCAC	56	2	(CA) ₂₆	178~188
SMMU2016031	4	CCAACTGCCTTTGCTGC GCCCTTCTGGCTTCCTC	56	2	(CA) ₂₈	235~255
SMMU2016032	4	TGAAGGTGGGAAGAAGT AAGCCATTAGCATTGTC	56	2	(TG) ₂₉	259~269
SMMU2016036	6	TGAACTCTGGTCCTTG T AACCTCATTAAGCAGATAG	56	2	(CA) ₂₆	264~292
SMMU2016037	8	GTTCTGTGCAGGACTCGG ATTCCGGTGGTGAATGAGAT	56	2	(TG) ₂₂	183~215
SMMU2016038	6	ACAGTTAAATGGCCTTAG TGTTCTGACAGCATCCC	56	2	(TG) ₁₇	262~280
SMMU2016041	5	AGGTGAATCTGGAAGGA GGTGGGATTTAGGAATAG	56	2	(GT) ₂₃	247~257
SMMU2016043	8	TGTGACCTCCGAATAGC TGACTTAGAAAGACCCTGT	56	2	(TG) ₂₃	206~238
SMMU2016045	5	CTCCTCCTGACTTTTCA ACTGCTTCACTTTCCTC	56	2	(TG) ₂₆	244~256

A.3.4 PCR 扩增

A.3.4.1 PCR 扩增的体系

A.3.4.1.1 PCR 总反应体积为 30 μL , 其中含 10 \times PCR 缓冲液 3 μL , 各组分的终浓度为 0.05 U Taq Polymerase/ μL , 250 μM dNTP, 50 mM KCl, 特异性引物(R 链, F 链) 0.2 μM , 0.5 μL DNA 模板 (30 ng~60 ng), 纯水补齐反应体积。

A.3.4.1.2 PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性, 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性, 30 s; 退火温度(各位点退火温度参见表 A.1), 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸, 30 s; 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 继续延伸 5 min; 扩增产物 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

A.3.4.2 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.3.4.3 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 标记的两个位点的扩增产物, 以 1 : 1.5 体积比混合, 取 1 μL 上样进行 STR 扫描。

A.3.5 STR 扫描结果的判读与统计分析

A.3.5.1 STR 扫描结果的判读

A.3.5.1.1 扫描结果出现两种波形: 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。同时, 根据软件读出波峰处的扩增产物的 bp 数。

A.3.5.1.2 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。

A.3.5.2 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 等形式输入群体遗传分析软件的数据文件, 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.3.6 结果判定

平均杂合度在 0.5~0.7, 且期望杂合度与观测杂合度经卡方检验无明显差异时, 判定为裸鼯鼠封闭群。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, 通过群体所有位点哈代温伯格指数(Hardy-Weinberg, HWE) χ^2 的 P 值进行判断, 若 P 值均大于 0.05, 判定为裸鼯鼠封闭群。若有任何一个位点的 P 值小于或等于 0.05, 则不能判定为裸鼯鼠封闭群。

上海市地方标准
实验裸鼯鼠 遗传质量控制
DB31/T 1278—2021

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址 www.spc.net.cn

总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238

读者服务部:(010)68523946

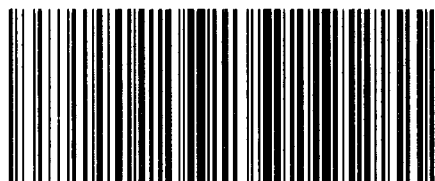
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 12 千字
2021年4月第一版 2021年4月第一次印刷

*

书号: 155066·5-2931 定价 16.00 元



DB31/T 1278-2021



码上扫一扫 正版服务到

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107