

ICS 65.020.30

B44

中华人民共和国国家质量监督
检验检疫总局备案号：29192-2010

DB53

云南省地方标准

DB53/T 328.3—2010

实验树鼯 第3部分：遗传质量控制

2010 - 11 - 16 发布

2011- 03- 01 实施

云南省质量技术监督局 发布

前 言

DB53/T 328分为五个部分：

——第1部分：微生物学等级及监测；

——第2部分：寄生虫学等级及监测；

——第3部分：遗传质量控制；

——第4部分：配合饲料；

——第5部分：环境及设施。

本部分为DB53/T 328的第3部分。

本部分由云南省科学技术厅提出并归口。

本部分起草单位：昆明医学院。

本部分主要起草人：杨芳、何保丽、郑红、角建林、沈培清。

实验树鼩 第3部分：遗传质量控制

1 范围

本部分规定了实验树鼩的遗传分类、封闭群的繁殖方法、遗传质量监测。
本部分适用于封闭群实验树鼩的遗传质量控制和管理。

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

GB 14927.1 实验动物 近交系小鼠大鼠生化标记检测方法

3 实验树鼩的遗传分类

3.1 近交系 inbred strain

经至少连续20代的全同胞兄妹或亲子交配培育而成，品系内所有个体都可追溯到起源于第20代或以后代数的一对共同祖先，近交系数应大于99%。

3.2 封闭群 closed colony or outbred stock

以非近亲方式进行繁殖的实验树鼩群体，在不从外部引入新的个体的条件下，至少连续繁殖4代以上，封闭群亦称远交群。

3.3 杂交群 hybrids

由不同品系或种群之间杂交产生的后代。

4 封闭群实验树鼩的繁殖方法

参照GB 14923封闭群动物的繁殖方法进行。

5 封闭群实验树鼩的遗传质量监测

5.1 遗传质量要求

5.1.1 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）。

5.1.2 用于保种及生产的繁殖系谱应清楚完整，繁殖方法科学合理。

5.1.3 保持树鼩的基因异质性和多态性，避免近交系数随繁殖代数增加而过快上升。

5.1.4 经遗传检测（微卫星分子标记、生化标记等）证明基因频率稳定，为相同种群。

5.2 遗传检测方法

5.2.1 生化标记检测

5.2.1.1 抽样

对基础群，凡在子代中有留种的双亲动物都进行检测。对生产群，按表1要求从每个封闭群中随机抽取成年动物，雌雄各半。

表1 抽样数量

| 生产群总种树鼯数量 | 抽样数目 |
|-----------|------|
| 100 只以下 | 6 只 |
| 100 只以上 | ≥6% |

5.2.1.2 生化标记的选择

生化标记检测法所称的生化标记，是指表明遗传特征并可采用生化方法识别的标识，在大、小鼠中多为一些同工酶和同种异构蛋白。这些记号反映了遗传表型，表明了不同品系动物的遗传特征。选择代表种群特点的生化标记基因，参考GB 14927.1中近交系小鼠位于10个染色体上的13个生化位点，即碱性磷酸酶-1 (Akp1)、碳酸酐酶-2 (Car2)、肾过氧化氢酶-2 (Ce2)、酯酶-1 (Es1)、酯酶-3 (Es3)、酯酶-10 (Es10)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-1 (Gpd1)、葡萄糖磷酸异构酶-1 (Gpi 1)、血红蛋白β链 (Hbb)、异柠檬酸脱氢酶-1 (Idh1)、苹果酸酶-1 (Mod1)、磷酸葡萄糖转位酶-1 (Pgm1)、转铁蛋白 (Trf)。

5.2.1.3 生化标记检测程序

生化标记检测程序见图1。

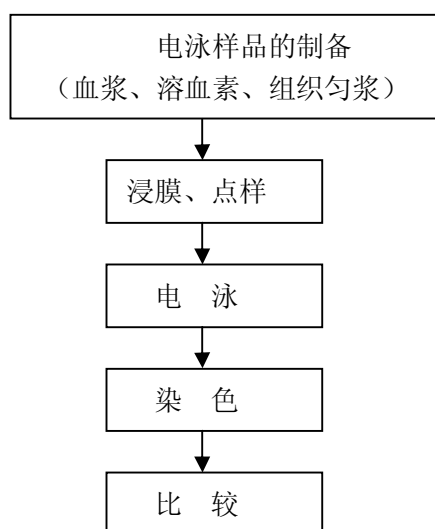


图1 生化标记检测程序

5.2.1.4 检测方法

见附录A。

5.2.2 微卫星分子标记检测

5.2.2.1 抽样

按表1要求执行。

5.2.2.2 微卫星分子标记的选择

选择树鼯9个具有高度多态的位点作为遗传检测的微卫星分子标记。检测方法见附录B。

5.2.2.3 群体评价

5.2.2.3.1 群体内遗传变异采用平均有效杂合度指标或群体平衡状态进行度量。所用分子标记或生化标记应能反映群体基因多态性。

5.2.2.3.2 当平均有效杂合度在0.5~0.7时，群体为合格的封闭群实验树鼯群体。或用群体是否达到平衡状态来判定，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，该封闭群判为不合格。

5.3 检测频率

封闭群实验树鼯每年进行一次遗传质量检测。



附 录 A
(规范性附录)
树鼩生化标记的检测方法

A.1 电泳样品的制备

A.1.1 血清

眼眶采血无抗凝剂处理，静置4℃过夜，吸出上清液备用。

A.1.2 血浆

眼眶采血肝素抗凝，3500r/min，离心5min，分离血浆和血球，吸出血浆备用。

A.1.3 溶血素

在去除血浆的红细胞内加入蒸馏水1:4 (V/V)，振荡1min，成为红色透明液体，即为溶血素。EP管分装，-70℃保存备用。

A.1.4 脏器样品制备

麻醉动物，心脏采血处死动物。剖腹，取肾脏一只，按1:2 (W/V)的比例加入蒸馏水，进行冰浴匀浆，16000 r/min 4℃离心30min。细管吸取上清，EP管分装，-70℃保存备用。

A.1.5 样品保存

上述制备样品均宜新鲜使用，在普通冰箱中只能保存一天，在低温冰箱中保存不超过一个月。

A.2 电泳步骤

A.2.1 浸膜

将乙酸纤维素膜（软膜）轻轻地浸入在相应的电泳缓冲液中让其自动润湿，浸入时应避免膜上出现气泡。

A.2.2 点样

将浸透的膜取出后以滤纸吸干，纤维膜面朝上，以盖玻片截面蘸样品，在膜上点样。

A.2.3 电泳

以铅笔在膜上表明原点，泳动方向，迅速将膜搭在事先放入缓冲液的电泳槽纸桥上，纤维膜面朝下，盖上电泳槽，接通电源。所需电压及电泳时间参照GB/T14921.1进行。

A.2.4 染色

A.2.4.1 蛋白染色法

电泳结束后取出膜（板）置入0.2%丽春红染液中，10 min~15 min后以竹镊子取出换以7%乙酸脱色直至电泳区带清晰可见。

A.2.4.2 酶显色板法

适用于乙酸纤维素膜。将酶显色液新鲜混合。加入2%热琼脂3 mL~4 mL，迅速混匀，均匀铺在6 cm×8cm的玻璃板上，制成酶显色板。电泳结束后取出膜将点样面贴在酶显色板上，注意将膜与酶显色板间的气泡排尽，但不可移动膜的位置。将带膜显色板移至37℃温箱保温，直至酶区带清晰显现。取下显色的膜浸入5%~7%乙酸终止反应。

表A.1 不同生化基因位点的电泳条件和染色法

| 位 点 | 条 件 | | | | |
|-------------|-----|--------|------|----------|--------|
| | 样品 | 支持物 | 电压/V | 泳动时间/min | 染(显)色法 |
| <i>Akp1</i> | 肾匀浆 | 乙酸纤维素膜 | 200 | 40 | 酶显色板法 |
| <i>Car2</i> | 溶血素 | 乙酸纤维素膜 | 240 | 40 | 蛋白质染色法 |
| <i>Es1</i> | 血清 | 乙酸纤维素膜 | 140 | 30 | 酶显色板法 |
| <i>Es3</i> | 肾匀浆 | 乙酸纤维素膜 | 280 | 28 | 酶显色板法 |
| <i>Es10</i> | 肾匀浆 | 乙酸纤维素膜 | 280 | 28 | 酶显色板法 |
| <i>Trf</i> | 血清 | 乙酸纤维素膜 | 200 | 25 | 蛋白质染色 |
| <i>Ce2</i> | 肾匀浆 | 乙酸纤维素膜 | 200 | 25 | 酶显色板法 |
| <i>Gpd1</i> | 肾匀浆 | 乙酸纤维素膜 | 200 | 50 | 琼脂覆盖法 |
| <i>Gpi1</i> | 溶血素 | 乙酸纤维素膜 | 200 | 30 | 酶显色板法 |
| <i>Hbb</i> | 溶血素 | 乙酸纤维素膜 | 200 | 30 | 蛋白质染色法 |
| <i>Idh1</i> | 肾匀浆 | 乙酸纤维素膜 | 200 | 35 | 酶显色板法 |
| <i>Mod1</i> | 肾匀浆 | 乙酸纤维素膜 | 200 | 35 | 酶显色板法 |
| <i>Pgm1</i> | 肾匀浆 | 乙酸纤维素膜 | 200 | 40 | 酶显色板法 |

附录 B

(规范性附录)

树鼩微卫星遗传标记的检测方法

B.1 基因组DNA的提取

基因组DNA的提取参照Sukamol Sri kwan 等方法稍加改进。主要步骤:

- B.1.1 冰冻血样室温融化,将750 μL 全血加入1.5 mL离心管中,加入等体积PBS缓冲液,混匀10 min,12000 r/m离心5 min,弃上清;
- B.1.2 加入600 μL SET,混匀5 min~10 min,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴1 h;
- B.1.3 加入蛋白酶K (20 mg/mL)至终浓度为100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,充分混匀,再加入70 μL SDS,于56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴温和振荡,消化过夜至不见粘稠团块;
- B.1.4 加入等体积的Tris饱和酚、盖紧管盖、缓慢地来回颠倒混合至少10 min,12000 r/m、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心10 min;
- B.1.5 将上清转移至一新的灭菌离心管中,用Tris饱和酚重复抽提一次;
- B.1.6 再向上清中加入等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)混合液,缓慢颠倒离心管10 min,使溶液两相充分混匀,12000 r/m、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心10 min;
- B.1.7 转移上清至另一灭菌离心管中,加入等体积氯仿:异戊醇(24:1),同上再抽提一次;
- B.1.8 向上清液中加入2.5倍体积的冰乙醇,加1/10体积的3M NaAc (pH=5.2),盖紧管盖、水平摇晃直到可看到絮状DNA沉淀;
- B.1.9 将DNA沉淀挑出,置于1.5mL灭菌离心管中,加入1 mL 70%的乙醇洗涤DNA沉淀两次;12000 r/m,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心10 min;
- B.1.10 小心倒掉乙醇,将离心管倒扣于纸巾上,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱干燥(15min左右)或自然凉干;
- B.1.11 待乙醇完全挥发尽,加入100-200 μL TE (TE加入量视DNA团的大小而定),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜以溶解DNA。

B.2 PCR扩增

PCR反应体系总体积为25 μL ,反应混和液中10 \times PCR buffer(2.5 μL),dNTP(0.2 mmol/L), MgCl_2 (1.5 mmol/L~2.5 mmol/L),primer1(10 pmol/L),primer2(10 pmol/L),Taq DNA 聚合酶(1U),DNA Template(30 ng~50 ng),加ddH₂O至反应体积为25 μL ,矿物油1~2滴。PCR反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性1 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性50 s,50 $^{\circ}\text{C}$ ~57.5 $^{\circ}\text{C}$ 退火(因引物而异)1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min,30~35个循环,最后于72 $^{\circ}\text{C}$ 下延伸6 min。各位点PCR反应条件见表B.1。

表B.1 对微卫星引物及 PCR 反应条件

| 微卫星座位 Microsatellite locus | 引物序列 Primer sequence (5' -3') | 镁离子浓度 mmol / L MgCl ₂ | 退火温度 ℃ Ann. temp |
|----------------------------------|--|--|------------------------|
| TG1 | F: TTCCTGTTACTCTGTTTTTTTCAGG R: ACATGGCTAACTGTGTGCTTTG | 2.0 | 55 |
| TG 4 | F: TGAAAACCTGGCAATTCATATGC R: CAATCCTTTTTTCGTTAGTTTTGTG | 2.0 | 50 |
| TG 16 | F: AAGTTTAATACCGGGCTGTTGA R: CAAGTCGCTGTATCGGTCAATA | 2.5 | 51.5 |
| TG 21 | F: TTTTAGACGACAAAACCCC R: TAAAAAGACATAAAACACGTCA | 2.2 | 53 |
| TG 22 | F: GTGAGTGCACTTGCCCTGTA R: TCCTGAACCTGGTGGCTAAC | 2.5 | 54 |
| JS22 | F: CAATGTCCTGGTGGTTATGG R: GAAGTGGTCACTCTGCAATCC | 1.8 | 54 |
| JS183 | F: GAAACAATAAGCCAGACTTCAGC R: TCACGAGTAACCTACGATAGCC | 2.5 | 54 |
| JS188 | F: CACACACAAAACCTCATTTTATCC R: TCTACACGAATGTGCCAACC | 2.5 | 56.5 |
| JS196 | F: ACCTCCTGGTGGCTTGC R: TAATTGCAGGATGCTTCAGG | 1.8 | 57.5 |

^a 注: F 表示上游引物, R 表示下游引物

B.3 PCR产物电泳

B.3.1 制胶

8%聚丙烯酰胺凝胶。

B.3.2 电泳

每个产物上样3μL, 同时点Marker, 用1×TBE电泳缓冲液, 恒压电泳。

B.4 PCR产物染色观察

B.4.1 银染

B.4.1.1 用固定液固定10min, 水洗2 min×3次。

B.4.1.2 0.2% AgNO₃ 100 mL 与37%甲醛50 uL混匀, 避光染色30 min~50 min。

B.4.1.3 水洗 20秒×2次。

B.4.1.4 1.5% NaOH 100 mL, 加37%甲醛 0.5 mL, 混匀, 显色3 min~10 min。

B.4.1.5 水洗若干次, 终止显色。

B.4.2 观察:

运用凝胶成像系统扫描, 并拍照, 保存记录。
