QB

斯贝福生物技术有限公司企业标准

Q/BZ 2023-0003

实验动物 近交系棉鼠遗传质量控制

Laboratory Animal - Genetic quality control of Inbred Cotton Rat

2023-01-06 发布 2023-03-01 实施

斯贝福生物技术有限公司 发 布

前言

本部分按照 GB/T 1.1—2020 给出的规则起草。

本部分由斯贝福生物技术有限公司提出。

本部分由斯贝福生物技术有限公司组织实施。

本部分起草单位：斯贝福生物技术有限公司。

本部分主要起草人：战大伟，王妍，张晓晴，陈红，谢飞，张桐，陈振文

Q/BZ 2023-0003

实验动物　近交系棉鼠遗传质量控制

1 范围

本本标准规定了近交系棉鼠的命名、繁殖方法和遗传质量的检测方法。本标准适用于近交系棉鼠的遗传质量监测。

2 规范性引用文件

下列标准所包含的条文，通过在本部分中引用而构成为本部分的条文。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本部分。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本部分。

GB 14923-2022　实验动物　哺乳类实验动物的遗传质量控制

3 术语与定义

下列术语和定义适用于本部分。

3.1 棉鼠　cotton rat

来源于野生棉鼠，动物分类学上属于哺乳纲、啮齿目、仓鼠科、棉鼠属，经过人工饲养和培育而成的一种小型哺乳类实验动物。体型与大鼠相似，背部灰褐、腹部浅灰，有白化变种。

3.2 近交系棉鼠　inbred cotton rat

一个棉鼠群体中，任何个体基因组中 98.6%以上的座位为纯合时定义为近交系棉鼠。

4 命名

命名按照 GB 14923 执行。

5 繁殖

选择近交系棉鼠繁殖方法的原则，是保持近交系棉鼠的同基因性及其基因纯合性。

5.1 引种

作为繁殖用引种的近交系棉鼠必须遗传背景明确，来源清楚，较完整的资料（包括品系名称、近交代数、遗传基因特点及主要生物学特征等），引种棉鼠质量和数量按照 GB 14923 执行。

5.2 繁殖方法

近交系棉鼠的繁殖分为基础群（foundation stock）、血缘扩大群（pedigree expansion stock）和生产群（production stock）。当近交系棉鼠生产供应数量不是很大时，不设血缘扩大群，仅设基础群和生产群。基础群、血缘扩大群和生产群的繁育方式按照 GB 14923 执行。

6 近交系棉鼠的遗传监测

6.1 检测方法

采用微卫星 DNA 标记（Short Tandem Repeats，STR）检测方法。具体方法执行附录 A。用 30 个 STR 位点检测棉鼠的遗传概貌。

6.2 近交系遗传监测 6.2.1 检测频率

近交系棉鼠每年至少进行一次遗传质量检测。

6.2.2 抽样

随机采取棉鼠的血液/鼠尾或其他组织。

基础群留种动物的双亲均应进行遗传检测，各生产群体采取随机抽取非同窝成年动物雌雄各半，抽样数量按照表 1 规定执行。

表 1 近交系棉鼠遗传检测采样数量

雌鼠种群数量（只）	抽样数目（只）
<100	≥6
≥100	群体数量×6%

6.2.3 结果判定

近交系棉鼠采用 STR 分子标记位点特征进行评价，当品系内所有遗传检测个体的 STR 位点与标准参考位点完全一致时，该群体未发生遗传变异，遗传质量合格；当有 1 个位点的分子与标准参考位点不一致时，增加检测位点数目和增加检测方法后复检，当只有 1 个标记基因改变且检测个体均一致时，可命名为同源突变系；2 个或 2 个以上位点的标记基因与标准参考位点不一致或为多态/杂合子时，近交系群体判为不合格。

附 录 A

(规范性附录)

棉鼠微卫星 DNA 标记检测方法

A.1 微卫星分子标记检测的原理

采集棉鼠的血液或尾组织，提取基因组 DNA。对特定的微卫星标记位点进行 PCR 扩增，通过遗传分析仪检测各位点基因的峰形和大小，确定微卫星标记的遗传概貌。

A.2 仪器设备

4℃和-20℃冰箱，低温高速离心机，水浴锅，感量为 0.0001g 的分析天平，Nanodrop，PCR 仪，电泳仪和电泳槽，震荡仪，组织匀浆器，微波炉，凝胶成像仪等。

A.3 微卫星 DNA 遗传标记检测方法

A.3.1 样本的采集

A.3.1.1 静脉采血 0.2 mL，加等量的血液裂解液。

A.3.1.2 采集大小 2~5 mm 的尾组织样，-20℃保存。

A.4 基因组 DNA 的提取

A.4.1 用苯酚氯仿法或试剂盒提取基因组 DNA。

A.4.2 微卫星标记位点

选择 30 个棉鼠 STR 位点用于近交系棉鼠遗传检测的 STR 标记。

棉鼠 STR 分子标记的名称、引物序列、产物长度和核心序列见表 A1。

表 A1 近交系棉鼠 STR 遗传检测位点信息

编号	核心序列	长度/bp	上游引物（5’→3’）*		下游引物（5’→3’）	
			名称	序列	名称	序列
SPF 104	A	320	SPF 104F	CCTAAAGGGCAGCCAGTGTT	SPF 104R	AGGTGGAGCTCTGCATTTGA
SPF 105	T	291	SPF 105F	ACCTGCTCAGACCCATTACAC	SPF 105R	TAGGGTTGGTGCCTGTTGTG
SPF 108	A	257	SPF 108F	CCAGGTGGAGATCAAACCCG	SPF 108R	ATTCATGAGGGCAGCAGCATC
SPF 109	G	287	SPF 109F	AGTACCATGTGCTCTACTGGC	SPF 109R	GCCAGAGTCTGAGCAAGTCAT
SPF 111	C	264	SPF 111F	AGTCCCCATGGGTAAGCCAA	SPF 111R	GGACACTGCCCACATGTAGTA
SPF 112	C	210	SPF 112F	AGAGAAAGCTGCTCCCTTGAC	SPF 112R	TACTAAGGCCGTCACTCAGC
SPF 001	TC	349	SPF 001F	CAATGGTTGCCTGTTGCCTAC	SPF 001R	GCCTCTTCCCTGTGCTATCTG
SPF 014	TG	345	SPF 014F	ACTGGCCCCAAATCAAGGTA	SPF 014R	AAGCCGAATAATGGGGGAGG
SPF 023	AC	317	SPF 023F	CACAAGGCTCCTCCCTTAGC	SPF 023R	CCCGACCTAGTGGAGCTTTC
SPF	AC	199	SPF	CCAGTCAGTACGAAAGGT	SPF	GCTAGGGATTTACAGCC

025			025F	GGT	025R	CACA
SPF 035	CA	317	SPF 035F	AGGGCAGGGAACAGCTAATG	SPF 035R	ATTGCCGGGGGTAGAATGTG
SPF 036	AC	348	SPF 036F	CCACACCACAACTAGGAACAGA	SPF 036R	CAGCCAGTCTTCTGTTGGAAT
SPF 037	AT	302	SPF 037F	AGTCCATAAGCCCACCTCTCT	SPF 037R	TTGTGACCAAGTGGAACTTACCT
SPF 040	AG	347	SPF 040F	ACATAGTGAGCATAGTGAGTTCCAT	SPF 040R	TCTGGGAACTAAGCCCTGGT
SPF 048	GT	295	SPF 048F	CAGTGGAACCCACTCATCCAG	SPF 048R	GGGTGGGAAGGACACTAAAGA
SPF 049	AC	343	SPF 049F	CACCCTGAGGTGCTAAAAGC	SPF 049R	ACTGGAACAGGGCTTAGGTG
SPF 051	GA	320	SPF 051F	ACCACTCTCTCTTTCGGGTG	SPF 051R	CCAAGACAGGCCTTCTGAGAT
SPF 060	GA	293	SPF 060F	CTTTAGCTTCATGGCCTTGTCA	SPF 060R	TGAGCCAGGAGCTTTCTCATC
SPF 064	TG	342	SPF 064F	TGGCCCTGCTTTTACATCCAT	SPF 064R	TATCAAAGGACTAACCAGTTGGC
SPF 069	AC	314	SPF 069F	TGCTAAGTACTTGCTGGCCC	SPF 069R	GGGGACTTTGGGAAGGCAAT
SPF 073	CA	311	SPF 073F	ACAGTACACACCTGTGAGGC	SPF 073R	CTTTGGCTGGCTTGAGTCCT
SPF 076	GT	328	SPF 076F	GGGAGAGAGGGGAGGGTAGT	SPF 076R	ATGGCTTGAAAGGTGAGTGGA
SPF 077	GT	292	SPF 077F	TAGGTGTCATCCCAGGCAAC	SPF 077R	TCCACCAAATGAGAGGTGGAG
SPF 080	TG	342	SPF 080F	ACAGCACTTAAGCAGAATCCCT	SPF 080R	CAAGCCAGACTGTGTAGCCA
SPF 084	AC	272	SPF 084F	GGCTGGTGGAGCATGTATGT	SPF 084R	TGGACCTCGTTACTTTGCAGT
SPF 030	TG	330	SPF 030F	AGGTTTCTTATGCATTTCTCCCTC	SPF 030R	CCGCACAGAAGCTTTGCTTA
SPF 082	GCA	381	SPF 082F	AGGCCTTCAGCTATTGGTGC	SPF 082R	GGTCACCCCACTGCTAAGAG
SPF 072	ATA	271	SPF 072F	GCCAGGAGTGGAGACTGAAC	SPF 072R	GCCTTTAGAGGGAATGTGGC
SPF 078	AGAT	335	SPF 078F	ACTGGCTAACAGTACGGCAC	SPF 078R	GGGTGGCTATGGGCAAGTTT
SPF 092	ATAA	292	SPF 092F	AGGACTGTGACAACCACAAGG	SPF 092R	CTTCCAACAAGGCCTCACCT

注：* 上游引物 5’端加 FAM 荧光基团。

A.5 PCR 扩增

A.5.1 PCR 扩增体系

PCR 总反应体积为 20 μL，其中含 2×PCR Mix：2 μL，上下游引物（100 pmol/μL）各 1 μL，基因组 DNA：1 μL，纯水（ddH2O）：7 μL。PCR 反应程序为：95 ℃预变性，5 min；95 ℃变性，30 s；退火温度 60 ℃，30 s；72 ℃延伸，45 s；30 个循环；72 ℃继续延伸 7 min；扩增产物铝箔纸包好 4 ℃保存。

A.5.2 PCR 产物的检测

5 μL PCR 产物，经 2.0%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.5.3 扩增产物 STR 扫描

剩余 PCR 产物进行 STR 扫描。

A.6 STR 结果的判读与统计分析

对原始峰图进行分析，确定特定位点每个个体的峰形和大小，判定个体的基因型。

A.7 结果判定

近交系棉鼠采用 STR 分子标记位点特征进行评价，当品系内所有遗传检测个体的 STR 位点标准参考位点完全一致时，该群体未发生遗传变异，遗传质量合格；当有 1 个位点的分子与标准参考位点不一致时，增加检测位点数目和增加检测方法后复检，当只有 1 个标记基因改变且检测个体均一致时，可命名为同源突变系；2 个或 2 个以上位点的标记基因与标准参考位点不一致或为多态/杂合时，判为不合格。

A.8 结果报告

根据判定结果对被检测近交系棉鼠出具检测报告。