



QB

斯贝福生物技术有限公司企业标准

Q/BZ 2022-0003

封闭群大鼠 繁育与遗传质量控制

Closed colony rat - Breeding and genetic quality control

2021-12-31 发布

2022-01-01 实施

斯贝福生物技术有限公司 发 布

目录

前言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 缩略语.....	1
5 命名原则	1
6 封闭群的繁殖方法.....	1
7 封闭群大鼠的遗传质量监测.....	2
附录 A 封闭群大鼠的繁殖方法.....	3
附录 B 封闭群大鼠的 SNP 遗传检测方法.....	5



Q/BZ 2021-0002

前言

为保障本公司生产和销售的封闭群大鼠遗传质量，参照中国《实验动物 哺乳类实验动物的遗传质量控制》标准，结合国内外文献和自主研发制定本标准，作为本公司规模化生产的封闭群大鼠遗传标准，其中的检测技术和方法将随企业的技术进步及产品质量的提升而做相应的改进。

.....

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，谢飞，陈红，陈振文

封闭群大鼠 繁育与遗传质量控制

1 范围

本标准规定封闭群大鼠的遗传命名原则、繁殖方法和遗传质量标准。

本部分适用于封闭群大鼠的遗传质量控制。

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 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 封闭群（远交群）closed colony or outbred stock

以非近交亲交配方式进行繁殖生产的一个大鼠种群，在不从其外部引入新个体的条件下，至少连续繁殖4代以上。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文本。

PCR：聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction）

SNP：单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphism)

5 命名原则

封闭群（远交群）命名，封闭群由2~4个大写英文字母命名，种群名称前标明保持单位斯贝福公司的英文缩写名称（Spf），第一个字母须大写，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：

Spf: SD 表示由斯贝福公司（Spf）保持的SD大鼠封闭群。

6 封闭群的繁殖方法

选择封闭群大鼠繁殖方法的原则，是尽量保持封闭群大鼠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。

6.1 引种

6.1.1 作为繁殖用原种的封闭群动物必须遗传背景明确，来源清楚（由国家实验动物种质资源中心引种），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）。

6.1.2 为保持封闭群大鼠的遗传异质性及基因多态性，引种动物数量要足够多，封闭群大鼠引种数目一般不能少于25对无血缘关系（三代以内无共同祖先）的大鼠。

Q/BZ 2021-0002

6.2 繁殖方法

为保持封闭群大鼠的遗传基因的稳定,封闭群应足够大,并尽量避免近交交配。根据封闭群的大小,选用最佳避免近交法、随机交配法或循环交配法方法进行繁殖。具体繁殖方法按照附录 A 执行。

7 封闭群大鼠的遗传质量监测

7.1 封闭群大鼠的遗传质量标准

封闭群大鼠的遗传质量必须符合以下要求:

7.1.1 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大鼠符合封闭群定义的规定。

7.1.2 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。

7.1.3 经遗传检测(SNP 标记检测方法)质量合格。

7.2 封闭群大鼠遗传质量监测方法

7.2.1 抽样

随机采取大鼠的血液、鼠尾或其他组织。

按表 1 要求从每个封闭群中随机抽取非同窝成年大鼠,雌雄各半。采样数量按表 1 进行。

表1 封闭群大鼠遗传检测采样数量

雌鼠种群数量(只)	抽样数目(只)
<100	≥15
≥100	≥30

7.2.2 检测方法

采用 SNP 遗传检测方法进行。具体方法按本标准附录 B 进行。

7.2.3 结果判定

用群体平均杂合度或是否达到平衡状态来判定封闭群群体是否合格。群体观测的平均杂合度在 0.4~0.6 之间,则判定该封闭群合格,平均杂合度<0.4,则该封闭群群体判为不合格;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。

7.2.4 不合格群体处理方法

发现不合格群体后要查找原因进行纠正或重新引种。

7.2.6 检测频率

封闭群每年至少进行一次遗传质量检测。

7.2.7 出具报告

依据检测结果,出具检测报告。

附录 A (资料性) 封闭群大鼠的繁殖方法

A.1 基本要求

保持封闭群条件，无选择、以非近交交配方式进行繁殖，每代近交系数上升不超过百分之一。

A.2 方法的选择

封闭群的种群大小、选种方法及交配方法是影响封闭群的繁殖过程中近交系数上升的主要因素，应根据种群的大小，选择适宜的繁殖交配方法。

A.2.1 当封闭群中每代交配的雄种动物数目为 10~25 只时，一般采用最佳避免近交法，也可采用循环交配法。

A.2.2 当封闭群中每代交配的雄种动物数目为 26~100 只时，一般采用循环交配法。也可采用最佳避免近交法。

A.2.3 当封闭群中每代交配的雄种动物数目多于 100 只时，一般采用随选交配法，也可采用循环交配法。

A.3 交配方法

A.3.1 最佳避免近交法 maximum avoidance of inbreeding system

A.3.1.1 留种

每只雄种动物和每只雌种动物分别从子代各留一只雄性动物和雌性动物，作为繁殖下一代的种动物。

A.3.1.2 交配

动物交配时，尽量使亲缘关系较近的动物不配对繁殖，编排方法尽量简单易行。

大鼠生殖周期较短，易于集中安排交配，可按下述方法编排配对进行繁殖：假设一个封闭群有 16 对种动物，分别标以笼号 1、2、3、……16。设 n 为繁殖代数（ n 为自 1 开始的自然数）。 n 代所生动物于 $n+1$ 代交配编排见表 A1。

表 A1 最佳避免近交法的交配编排

$n+1$ 代笼号	雌种来自 n 代笼号	雄种来自 n 代笼号
1	1	2
2	3	4
3	5	6
:	:	:
:	:	:
8	15	16
9	2	1
10	4	3
:	:	:
:	:	:
16	16	15

Q/BZ 2021-0002

A.3.2 循环交配法 rotational mating system

A.3.2.1 应用范围

循环交配法广泛适用于中等规模以上的实验动物封闭群，其优点一是可以避免近亲交配，二是可以保证种动物对整个封闭群有比较广泛的代表性。

A.3.2.2 实施办法

a. 将封闭群划分成若干个组，每组包含有多个繁殖单位（一雄一雌单位，一雄二雌单位，一雄多雌单位等）。

b. 安排各组之间以系统方法进行交配。

举例说明如下：

例 1：一封闭群每代有 48 笼繁殖用种动物（一雄种一雌种，或一雄种多雌种）。先将其分成 8 个组，每组有 6 笼，各组内随机选留一定数量的种动物，然后在各组之间按表 A2 中排列方法进行交配。

表 A2 循环交配法组间交配编排

新组编号	雄种动物原组编号	雌种动物原组编号
1	1	2
2	3	4
3	5	6
4	7	8
5	2	1
6	4	3
7	6	5
8	8	7

A.3.3 随选交配法 chance mating system

A.3.3.1 应用范围

当封闭群的动物数量非常多（繁殖种动物在 100 个繁殖单位以上），不易用循环交配法进行繁殖时，可用随选交配法。

A.3.3.2 实施办法

从整个种群中随机选取种动物，然后任选雌雄种动物交配繁殖。

附录 B (规范性) 封闭群大鼠的 SNP 遗传检测方法

B.1 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。

B.2 基因组 DNA 的提取

取动物任意组织 0.1 g 或约 2 mm 鼠尾，用酚-氯仿萃取法或试剂盒提取基因组 DNA。

B.3 SNP 位点

选择位于封闭群大鼠 10 对染色体上的 10 个位点，作为遗传检测的 SNP 标记。

SNP 分子标记的名称及 SNP 基因分型见表 B1。

表 B1 封闭群大鼠 SNP 遗传检测位点信息

位点编号	染色体位置	基因分型	上游引物	下游引物
RGT-6	chr2	C/T	5'-ACAgTCAGCATgTAAgCCCC-3'	5'-AgCTATCCAACAgAAACCCCT-3'
RGT-11	chr4	A/G	5'-AgCCAATTCCTgTgACCCAA-3'	5'-CgATgCAATgTAGCgAgCAG-3'
RGT-13	chr5	C/T	5'-ACAggCAATggggTTgTTCT-3'	5'-TAgTgTgggggACgATCTT-3'
RGT-18	chr7	A/G	5'-gCgggTTgACCATAAACACA-3'	5'-gggggTTAATCTggCTTCACA-3'
RGT-34	chr12	A/G	5'-ggCTTggTTgATgggACTCA-3'	5'-TgTgTgCACCTCggTgATAg-3'
RGT-35	chr13	C/T	5'-CCCCACCCAgTTTggCTTAT-3'	5'-ATTgCAGTCACCCACCCTTT-3'
RGT-43	chr16	C/T	5'-gCCTTAgtCTggATTggCTgT-3'	5'-ggTgCgATgTCCTTgAATgT-3'
RGT-44	chr17	C/T	5'-TgACTgCACAgCACACTgAT-3'	5'-TTgTgCCCCAAAATgAgCgg-3'
RGT-48	chr18	C/T	5'-CATgggAAAACCAAgCgCAG-3'	5'-TCATgCTTTgAgCTgACCGA-3'
RGT-50	chr19	C/T	5'-gCAGAgTCCAgCCACTgTTT-3'	5'-CCACATCAGTCTCTTCCggC-3'

B.4 PCR 扩增

B.4.1 PCR 扩增的体系

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 4℃保存。

B.4.2 PCR 产物的检测

5 μL PCR 产物，经 1% 的琼脂糖凝胶电泳以及凝胶成像系统拍照检测扩增结果。

B.4.3 扩增产物测序

剩余 PCR 产物进行 Sanger 测序或 TA 克隆测序；若采用 TA 克隆测序，则使用 50 μL 的扩增体系

Q/BZ 2021-0002

进行 PCR 产物胶回收。

B.5 SNP 结果的判读与统计分析

B.5.1 PCR 产物 Sanger 测序结果的判读

用 SnapGene 软件读取和比对位点的测序峰图，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，以 AA、BB 和 AB 等形式记录每一个样本每一个位点的 SNP 基因型。

B.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 SNP 位点的基因型以 AA、BB 和 AB 等形式输入 Popgen1.32 软件中分析。利用该软件计算不同个体在各 SNP 位点上的基因频率、等位基因数（Na）、有效等位基因数（Ne）、观察杂合度（Ho）、期望杂合度（Ha）、及香隆信息指数（Shannon's information index）等群体遗传参数。

B.6 结果判定

用群体平均杂合度或是否达到平衡状态来判定封闭群群体是否合格。群体观测的平均杂合度在 0.4~0.6 之间，则判定该封闭群合格，平均杂合度 < 0.4，则该封闭群群体判为不合格；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。

B.7 结果报告

根据判定结果对被检测封闭群大鼠群体出具检测报告。