

ICS 65.020.30
CCS B44



中国实验动物学会团体标准

T/CALAS xxx-202x

实验动物 猫遗传质量控制

Laboratory animal - Genetic quality control in cats

(征求意见稿)

202x-xx-xx 发布

202x-xx-xx 实施

中国实验动物学会 发布

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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国实验动物学会归口。

本文件由全国实验动物标准化技术委员会（SAC/TC281）技术审查。

本文件由中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会提出并组织起草。

本文件起草单位：河北医科大学（河北省实验动物中心）、首都医科大学、猫本源生物科技河北有限公司、山西萌泰贝格生物科技有限公司、华北制药股份有限公司、河北省实验动物学会、中国医学科学院医学实验动物研究所。

本文件主要起草人：杜小燕，连伟光，霍学云，苏利波，刘晓阳，王国梁，郭新苗，徐倩，齐飞虎，陈振文，孔琪。

实验动物 猫遗传质量控制

1 范围

本文件规定了猫的遗传命名、繁育方法，以及远交群、封闭群猫的遗传质量检测方法。

本文件适用于远交群、封闭群猫的繁育和遗传质量控制。

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

GB/Z 34792 实验动物 引种技术规程

3 术语和定义

以下术语和定义适用于本文件。

3.1

实验猫 laboratory cat

经人工饲养，对其携带的微生物和寄生虫实行控制，遗传背景明确或来源清楚，用于科学研究、教学、生产、检定以及其他科学实验的猫科猫属家猫种动物，简称猫。

3.2

品种 stock

经多代人工选育，外观、生理、行为、性状稳定，且可稳定遗传的实验动物群体。

3.3

远交群 outbred stock

为了维持群体的最大杂合度、以非近亲交配方式进行繁殖生产的实验动物种群。

3.4

封闭群 closed colony

不引进外部动物、在群体内随机选择种动物进行繁殖，以维持有限杂合度的实验动物种群。

4 命名

4.1 远交群命名

命名由2~4个大写英文字母命名,品种名称前标明繁育机构或保持者的英文缩写名称,第一个字母须大写,后面的字母小写,一般不超过4个字母。繁育机构或保持者与品种名称之间用冒号分开。

品种名称应使用能代表其显著特征的精准名称。如英国短毛蓝猫(British Shorthair Blue, 缩写为 BSHa), 避免直接使用英国短毛猫(British Shorthair, 缩写为 BSH)。例如,猫本源生物科技河北有限公司繁育的远交群英国短毛猫银渐层,可以命名为 Mby: BSH Silver Shaded。

4.2 封闭群命名

封闭群猫命名规则依据 GB 14923 命名要求。品种名称应使用能代表其显著特征的精准名称。

5 远交群和封闭群的繁殖方法

具体繁殖方法依据 GB 14923 执行。

5.1 原则

远交群和封闭群的繁殖方法原则上应保持动物的遗传异质性及基因多态性,避免近交系数随繁殖代数增加而过快上升。封闭群还需保持群体遗传平衡。

5.2 种源选择

5.2.1 远交群和封闭群猫种源选择应依据 GB/Z 34792 通用要求执行。

5.2.2 具有清晰的谱系记录,遗传质量检测结果合格。

5.2.3 为保持远交群和封闭群猫的遗传异质性及基因多态性,引种数量不低于25对。

5.3 繁殖

保持远交群和封闭群猫遗传基因的稳定,种群数量应足够大(雄种猫大于或等于25只),须避免近亲交配。具体繁殖方法依据 GB 14923 远交群和封闭群的繁殖方法执行。

6 遗传质量监测

6.1 遗传质量要求

遗传质量要求包括:

- a) 品种明确;
- b) 体貌符合品种特征;
- c) 谱系记录清楚;
- d) 繁殖方法科学;
- e) 群体遗传符合品种特征;

f) 遗传质量检测合格。

6.2 遗传检测

6.2.1 检测频率

每年进行一次遗传质量检测，或每两代检测一次。

6.2.2 抽样方法

从每个远交群或封闭群中随机抽取非同窝成年猫，雌、雄各半。取猫的血液或其他组织，采样数量参考表 1 执行。

表 1 远交群和封闭群猫遗传质量检测采样数量（单位：只）

群体大小	抽样数量
<100	≥15
≥100	≥30

6.2.3 检测方法

采用微卫星 DNA 标记检测方法进行，具体按附录 A 执行。

6.2.4 群体评价

远交群和封闭群采用平均杂合度或群体平衡状态进行评价，具体按附录 A.6 执行。

6.2.5 报告

根据监测结果，出具报告。

附录 A

（规范性）

猫微卫星 DNA 标记检测方法

A.1 仪器设备

PCR 仪、电泳仪、凝胶成像系统、低温冰箱、低温高速离心机、水浴锅、分析天平和超微量分光光度计等。

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

用于检测猫的微卫星位点为 29 个，各微卫星位点的名称、染色体位置、引物序列、PCR 反应的 T_m 值见表 A.1。

A.4 PCR 扩增

A.4.1 PCR 扩增体系

PCR 总反应体积为 20 μL 。其中 2 $\times$ Rapid Mix: 10 μL ，上下游引物（100 pmol/ μL ）各 1 μL ，50~100 ng 基因组 DNA 1 μL ，纯水（ddH₂O）7 μL 。

PCR 反应程序为：95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性，5 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 变性，15 s；退火温度（各位点序列、PCR 反应条件参见表 A.1），15 s；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸，15 s；35 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 继续延伸 5 min；扩增产物 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

表 A.1 猫微卫星位点的扩增条件和染色体分布

编号	位点	引物序列（5' ~3'）	染色体	Mg ²⁺ 浓度（mM）	退火温度（ $^{\circ}\text{C}$ ）
1	FCA1014	CTGGCAAGAAGTCCACTGGG CATGGCTCCTGAGGTCATGT	E3	1.5	58
2	FCA1015	CTCCAGTGCCCATACGTTGT TGGCCACAAAGATGGTTGTTC	E3	1.5	57
3	FCA1030	CGCCCGCAAAAAGACTCAAG GGACGCCCACTAGCCAAATA	F1	1.5	58
4	FCA1315	CCTGCATCAGTTGATTCCTTGT GGACCATCAGAATGCAGCTC	F2	1.5	58
5	FCA770	TCAAGAGTCTTTGCTCAAGGG TTACTTAGGACTGACAGGGCA	A1	1.5	56
6	FCA823	AGGGTGTGCTAGAACTAGCTGG CATTTAGAGGTTTCAGGACTGGG	B1	1.5	58
7	FCA1240	TCCTGATGTGGCAGTTAAACC GCATGCCTTGAACCTTTCAT	D2	1.5	58

表 A. 1 猫微卫星位点的扩增条件和染色体分布 (续) (确实没有性染色体后续可以补充, 49 对里也没有)

编号	位点	引物序列 (5' ~3')	染色 体	Mg ²⁺ 浓度(mM)	退火温度 (℃)
8	FCA176	GGAAACTTGGAAGCAAAACC TCCACAGTTGGAGTTCTTAAGG	A1	1.5	58
9	FCA045	TGAAGAAAAGAATCAGGCTGTG GTATGAGCATCTCTGTGTTCTGTG	D4	1.5	58
10	FCA084	TAGGTGAATGTTGGGATTTATGG AACTGAAGACCAAATTGATGAG	A1	1.5	55
11	FCA210	TGAGCCACCTAGGCACTCTT AGAAGCATCCAGTGACAATGG	B4	1.5	59
12	FCA672	AAGTTGCTTGACACACTGC TCCAAGAGCCTTTTCAGTTAGG	F2	1.5	60
13	FCA1239	AAAAGCCCTGACACCCAAG CTTGACCTTAATTGCTCATTGG	D2	1.5	58
14	FCA700	CCCTTAAAATCGCAGCTCTG AATCCAAGGAAAACAGGCCT	B1	1.5	58
15	FCA678	TCCCTCAGCAATCTCCAGAA GAGGGAGCTAGCTGAAATTGTT	A1	1.5	56
16	FCA096	CACGCCAACTCTATGCTGA CAATGTGCCGTCCAAGAAC	E2	1.5	58
17	FCA764	TGAGGGTGAGATGGAAGGAG ACTAACCAATCCTGGTGGTCC	A1	1.5	58
18	FCA220	CGATGGAAATTGTATCCATGG GAATGAAGGCAGTCACAACTG	F2	1.5	58
19	FCA275	TCACTCCTGGACTTAACCATCAG TGCTATTGACGAAGGGGCAG	B2	1.5	57
20	FCA848	CTCCTTCACCAAAGGCTGGAT GGACATTCTGGAAATGCGGAG	B3	1.5	57
21	FCA664	AGAAAAATGACTACCGACATGGTT GAGTGCGGCTACTATCTGGG	C1	1.5	56
22	FCA077	GGCACCTATAACTACCAAGTGTGA ATCTCTGGGGAAATAAATTTTGG	C2	1.5	58
23	FCA954	ATGTTTTAAGTGCCAACGCC CTTGACCGAGGTCAGAATTACC	D2	1.5	54
24	FCA149	CCTATCAAAGTTCTCACCAAATCA GTCTCACCATGTGTGGGATG	B1	1.5	58
25	FCA044	AGGGCCTGAACCAAGAGAAT TATTACAGAGTGACAGAGGAGG	B4	1.5	54
26	FCA69	AATCACTCATGCACGAATGC AATTTAACGTTAGGCTTTTGGC	B4	1.5	56
27	FCA1242	CACCACGGGTAAAGATGCTT AGAAAATCCACACACAGCACC	D2	1.5	56
28	FCA391	GCCTTCTAACTTCCTTGCAGA TTTAGGTAGCCCATTTTCATCA	B3	1.5	58
29	FCA1062	CTTCACACTGCGAGAGGACT TCTGACAGGCTCCAGGTTACT	A1	1.5	58

A. 4. 2 PCR 产物的凝胶检测

PCR 产物，经 1.5%的琼脂糖凝胶电泳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段后，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 μ L 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段大小。每个位点的等位基因根据扩增片段从小到大顺序记录为 a、b、c、d...

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...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（Ne）、香农指数、平均杂合度（H）等。

A. 6 结果判定

群体内遗传变异采用平均杂合度或群体平衡状态方法进行评价。远交群采用群体平均杂合度方法进行评价。当平均杂合度在 0.5~0.8 时，且期望杂合度与观测杂合度经 χ^2 检验无明显差异时，群体为合格。封闭群按照哈代-温伯格（Hardy-Weiberg）定律，根据各位点的基因分型结果计算在封闭群的基因频率，进行卡方（chi-square test）检验。当所检测位点的 95%为哈代-温伯格平衡的位点时，说明该群体达到平衡状态，判为该群体合格，否则判为不合格。

A. 7 结果报告

根据判定结果对所检测种群出具检测报告。