

眼科实验动物学

YANKE SHIYAN DONGWUXUE

主 编 / 魏世辉 王志军



人民军医出版社

PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS

眼科实验动物学

YANKE SHIYAN DONGWUXUE



人民军医出版社

PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS

北 京

图书在版编目(CIP)数据

眼科实验动物学/魏世辉,王志军主编. —北京:人民军医出版社,2010.5
ISBN 978-7-5091-3751-2

I. ①眼… II. ①魏…②王… III. ①眼科学-实验动物学 IV. ①R77-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 076919 号

策划编辑:郝文娜 文字编辑:杨善芝 责任审读:张之生

出版人:齐学进

出版发行:人民军医出版社 经销:新华书店

通信地址:北京市 100036 信箱 188 分箱 邮编:100036

质量反馈电话:(010)51927290;(010)51927283

邮购电话:(010)51927252

策划编辑电话:(010)51927282

网址:www.pmmp.com.cn

印、装:北京国马印刷厂

开本:787mm×1092mm 1/16

印张:10 字数:241 千字

版、印次:2010 年 5 月第 1 版第 1 次印刷

印数:0001~3000

定价:35.00 元

版权所有 侵权必究

购买本社图书,凡有缺、倒、脱页者,本社负责调换

内 容 提 要

本书由临床经验丰富的专家编写,重点介绍了实验动物遗传学控制及分类、实验动物的微生物学及寄生虫学控制、常用眼科实验动物及生理正常值、实验动物的选择、动物实验基本技术、实验“动物福利”、结膜炎动物模型、角膜疾病动物模型、眼表疾病动物模型制作、白内障动物模型、青光眼动物模型、实验性近视动物模型、弱视动物模型、葡萄膜炎动物模型、神经眼科疾病动物模型等。本书内容丰富,科学实用,具有很强的指导性,适用于眼科研究生和临床医师在科学实验中参考使用。

前 言

近些年在生命科学研究领域里,几乎每项重大科研成果都与实验动物有关。实验动物学已发展为一门独立的综合性基础学科,其发展水平成为衡量一个国家生命科学发展水平的重要标志,因而受到世界各国政府和科学家的重视。眼科学作为生命科学的一个重要分支,在国内却没有一本实验动物学,在科学研究中,特别是医学院校研究生在做科学实验中没有一本实用的参考书。基于此我们组织编者,参考了大量相关文献并结合自己的实践体会编写了此书。

本书以实验动物,动物实验技术,动物模型在生物医学研究中的应用为主线,力求实验动物学与医学,实验动物与动物实验相结合,以达到提高实验动物科技水平,加强实验动物管理,提高实验动物质量的目的。本书内容系统而实用,全书共 15 章,内容包括实验动物遗传学控制及分类、实验动物的微生物学及寄生虫学控制、常用眼科实验动物及生理正常值、实验动物的选择、动物实验基本技术、实验“动物福利”、结膜炎动物模型、角膜疾病动物模型、眼表疾病动物模型制作、白内障动物模型、青光眼动物模型、实验性近视动物模型、弱视动物模型、葡萄膜炎动物模型、神经眼科疾病动物模型。

本书主要作为医学院校研究生的实验动物学教学用书,也可作为实验动物和动物实验从业人员的培训教材,以及实验动物科技人员和动物实验人员的实用参考书。

本书的出版是集体劳动的结果,包括编写本书中所参考的文献的作者。为有机会再版时能有所提高和改进,恳请各位读者不吝赐教。

编 者

2010 年 1 月

目 录

第 1 章 实验动物遗传学控制及分类	(1)
第一节 实验动物的遗传学分类	(1)
第二节 近交系动物	(2)
第三节 封闭群动物	(8)
第四节 杂交一代动物	(10)
第五节 实验动物的遗传质量监测	(11)
第 2 章 实验动物的微生物学及寄生虫学控制	(15)
第一节 前言	(15)
第二节 无菌动物	(16)
第三节 悉生动物	(20)
第四节 无特定病原体动物	(21)
第五节 清洁动物和普通动物	(26)
第六节 实验动物微生物学及寄生虫学质量监测	(26)
第 3 章 常用眼科实验动物及生理正常值	(31)
脊椎动物的眼	(33)
第 4 章 实验动物的选择	(61)
第一节 实验动物的选择原则	(61)
第二节 实验动物选择时应注意的问题	(63)
第 5 章 动物实验基本技术	(65)
第一节 动物编号标记与随机分组	(65)
第二节 动物麻醉	(66)
第 6 章 实验动物福利	(70)
第一节 动物福利的概念	(70)
第二节 动物福利发展的历史及立法	(71)

第三节 动物福利对动物实验的要求	(72)
第四节 我国动物福利发展及立法的现状与展望	(74)
第7章 结膜炎动物模型	(76)
第8章 角膜疾病动物模型	(83)
第一节 角膜炎动物模型	(83)
第二节 角膜新生血管模型	(87)
第三节 角膜移植排斥反应动物模型	(88)
第9章 眼表疾病动物模型制作	(92)
第10章 白内障动物模型	(101)
第11章 青光眼动物模型	(113)
第12章 实验性近视动物模型	(120)
第13章 弱视动物模型	(125)
第14章 葡萄膜炎动物模型	(130)
第15章 神经眼科疾病动物模型	(138)
第一节 视神经炎动物模型	(138)
第二节 视神经损伤动物模型	(142)
附录A 实验动物管理条例	(149)
附录B 北京市实验动物管理条例	(152)

减少或避免遗传因素对实验结果的干扰,通过改变实验动物的遗传结构,使某些特定实验能顺利开展是保证动物实验准确性和科学性的前提。保证实验动物群体在遗传上的稳定性,使实验动物来源清楚,遗传背景明确是实验动物遗传控制工作的主要内容。

第一节 实验动物的遗传学分类

一、分类方法

实验动物按遗传学可分为相同基因型和不同基因型两类。相同基因型动物又可分为普通近交系(inbred strain)、同源导入近交系(congenic inbred strain)、同源突变近交系(coisogenic inbred strain)、重组近交系(recombinant inbred strain)、分离近交系(segregating inbred strain)、杂交 F1 代动物(hybrid strain)等。不同基因动物一般是指封闭群(closed colony)动物。每种动物在遗传学、生物学特性上和应用上都各具特点。

二、品种、品系的概念

在动物分类学中,种(species)是生物学分类的最基本单位,是指一群形态相似,能相互交配的自然群体,它们在生殖上与其他群体相隔离。品种(stock)是种以下可以进一步分类,一般指具有一些容易识别的特征,可以稳定遗传的动物群体,如新西兰兔、青紫蓝兔、Wistar 大鼠、KM 小鼠等。而品系(strain)则是指实验动物学中基因高度纯合的动物。作为一个品种、品系,应该具备以下条件。

1. 相似的外貌特征 同一品种或品系动物具有相同的外貌特征,如毛色、体型大小等。但不同的品种品系动物也可能具有相似的外貌特征。

2. 独特的生物学特性 独特的生物学特征是 1 个品种、品系存在的基础。例如 AKR 系小鼠自发淋巴细胞白血病,ICR 小鼠繁殖能力强等。

3. 稳定的遗传性能 作为 1 个品种、品系,不仅要有相似的外貌特征,独特的生物学特征,更重要的是要有稳定的遗传性能,即在品种、品系自群繁殖时,能将其特征稳定地传给后代。

4. 具有共同遗传来源和遗传结构 任何品种、品系都可追溯到其共同的祖先,并由此分支选育而成,其遗传结构也应是独特的。例如昆明(KM)小鼠 Glo-1 位点为 a 基因单一型,而 NIH 小鼠在该位点基因呈多态性分布,a 型、b 型基因频率分别为 67% 和 33%。如果将上述

两个品种建立遗传概貌就发现它们在遗传概貌上的差异,而品种内这种差异是有限的。

第二节 近交系动物

一、基本概念

近交系动物是指具有亲缘关系的动物个体之间,按照一定的交配方法(如父女、母子、亲兄妹、堂兄妹等)繁殖若干代而形成的一群动物,其最终结果是该群动物之间的各条染色体上的基因趋于纯合,品系内个体差异趋于零,近交系数大于 98.6%。这在动物自然界并不存在,是人工专门培育的实验动物。

我国制定的《哺乳类实验动物的遗传质量控制》国家标准,对近交系动物定义为“经至少连续 20 代的全同胞兄妹交配培育而成,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,该品系称为近交系,经连续 20 代以上亲代和子代交配与全同胞兄妹交配有等效果,近交系的近交系数应大于 99%”。

以上定义对于小鼠是非常严格的,但对于其他物种的动物有时需要加以区别。在某些情况下“近交系”的名称仅仅说明了该品系内的遗传差异性降低了,这种情况出现在:品系的近交代数在各繁殖线上少于 20 代。但是,该系的某一条繁殖线上所有个体间的异体植皮获得成功。两代之间间隔时间特别长的动物也许只要通过几代的兄妹交配繁殖就能使用“近交系”这个名称。

二、近交后引起的变化

近交可以降低杂合性,可以将群体分离为不同的品系,然而近交的结果也必将出现近交衰退。

1. 近交可以增多纯合性 动物的遗传纯度取决于交配动物之间遗传关系的远近。近交系动物通过长期近亲交配,动物的杂合性逐渐降低,因而纯度逐渐增高,使基因位点变为纯合子,使它们的表现型趋向一致性。

2. 近交可将群体分离为不同基因型的品系 原始种群经过近交分为若干近交系,在不同等位基因的不同位点上变为纯合子。如原始种群的小鼠兄妹连续交配 20 代后分离出两支等位基因 A 和 a 的近交品系:AA 品系只生产野鼠色后代,aa 品系只生产黑色后代。

3. 近交可引起近交衰退 在近亲繁殖的实践中,通常伴随着遗传缺陷的出现。表现为生命早亡较多、动物体质普遍较差并且容易感染疾病、生育能力减退及隐性基因暴露增多等特点,这种现象称为近亲衰退。近交衰退发生的原因是多方面的,从遗传学的角度主要归结为有害的隐性基因的暴露及多基因平衡的破坏两方面。如何克服和解决近交衰退问题,是培育近交系动物的关键所在。

三、亚系和支系

育成的近交系可能由于突变和残余杂合基因而导致部分遗传组成的改变,从而形成亚系。近交系的亚系分化是指 1 个近交系内各个分支的动物之间,已经发现或十分可能存在遗传差异。通常下属 3 种情况会发生亚系分化。

1. 在兄妹交配代数达 40 代以前形成的分支。

2. 1 个分支与其他分支分开繁殖超过 100 代。

3. 已发现 1 个分支与其他分支存在遗传差异。产生这种差异的原因可能是残留杂合、突变或遗传污染(即 1 个近交系与非本品系动物之间杂交引起遗传改变)。由于遗传污染形成的亚系通常与原品系之间遗传差异较大,因此对这样形成的亚系应重新命名。

由于饲养环境的改变,或对动物进行人为的技术处置,可能对动物的某些生物学特性产生影响(这些特性可能是遗传性的也可能是非遗传性的),产生了不同的支系。支系产生的具体情况主要有:经人为技术处置如卵子移植、人工喂养、代乳、卵巢移植或胚胎冷冻等;种群转移到新的保持者。

四、命名

1. 近交系的命名

(1)一般均用 1 个或几个大写英文字母表示,如 A、AE、BA、AKR、DBA、NZB、STAR、NMRT、NYLR、NZBR 等。

(2)有些品系可在大写英文字母间加入一些阿拉伯数字来表示,如 C3H、C57BL、C57BR、C57L、CC57W、CC57BR 等。

(3)非正规的命名,如果已广泛为国际所共知者,则可保留沿用,如“129”“101”“615”等。

(4)近交代数表示,一般是在品系符号后括号里写上代数,并在代数前加写“F”(Filial 的缩写),例如 A(F78)。如果由于资料不全,可以写上已知代数,在代数前面加问号,如 AKR(F? 78)。如系从其他实验室引入的近交系或亚系,又经自己实验室若干代的繁殖,其近交代数的表示方法是在 F 符号后,先标明引入时的子代数,再加上自己实验室繁殖的代数,如 C57BL/Jnga(F73+26),即表示此亚系是 73 代时引入的,又经自己培育了 26 代。

(5)书写品系命名符号要写全,应使用公布的全称,不能随便缩写(这里指的是写论文报告,在材料方法一栏里一定要把品系命名符号写全。这样才能说明所指的是哪个品系或亚系)。例如,C57 这个缩写可意味着七八个特征不同的品系(如 C57BL 及其亚系 6 个,C57BR/cdJ,C57L)。只写 C57BL 就包括有几个特征不同的亚系(如 C57BL/1,C57BL/6J、C57BL/6N、C57BL/10J 等)。所以,若只写 C57 或 C57BL 都是品系名称未书写完全。同样,只写 CBA 亦为不确切的书写法,因为它也有若干个特性不同的亚系,如 CBA/J 是有视网膜退变基因的,而 CAB/ca 则没有这种基因,二者对放射线的敏感性不一样,组织相容性也不同,至少有 5 个位点是不同的。

(6)国际上公认的品系缩写。已公布的品系缩写有 AKR-AK,BALB/c-C,CBA-CB,C3H-C3,C57BL-B,C57BL/6-B6,C57BL/10-B10,C57BR-BR,C57L-L,DBA/1-D1,DBA/2-D2,HRS/J-HR,RⅢ-R3。

(7)品系符号的优先权。任何品系或亚系命名均应参照国际命名委员会的规则命名,如果出现两品系命名符号相同,则保留先正式公布者,并以发表《Mouse News Letter》(小鼠新闻通讯)或《Inbred Strains of Mice》(近交系小鼠)两个刊物上的品系为准。但一些著名的、国际广泛使用的品系则不在此限。

2. 亚系的命名 亚系的命名方法是在原品系的名称后加一道斜线,斜线后标明亚系的符号。亚系的符号可以是以下 4 种。

(1) 数字, 如 DBA/1、DBA/2 等。

(2) 培育与产生亚系的单位或人的缩写英文名称, 第 1 个字母用大写, 以后的字母用小写。使用缩写英文名称时应注意不要和已公布过的名称重复。例如 A/He 表示 A 近交系的 Heston 亚系, CBA/J 表示由美国杰克逊研究所保持的 CBA 近交系的亚系。

(3) 当 1 个保持者保持的 1 个近交系具有 2 个以上的亚系时, 可用在数字后再加保持者的缩写英文名称来表示亚系, 如 C57BL/6J、C57BL/10J 分别表示由美国杰克逊研究所保持的 C57BL 近交系的 2 个亚系。

(4) 作为以上命名方法的例外情况是一些建立及命名较早, 并为人们所熟知的近交系, 亚系名称可用小写英文字母表示, 如 BALB/c、C57BR/cd 等。

3. 支系的命名

(1) 经人为技术处置形成的支系, 应在原品系名称后附加 1 个小写英文字母标明处理方式, 具体符号是: 卵子移植——e, 人工喂养——h, 奶母代乳——f, 卵巢移植——o, 冷冻胚胎——p, 人工喂养加奶母代乳——fh。代乳的奶母动物或接受移植卵子、卵巢的受体动物在上述符号后标明品系名称或缩写的品系名称。如 C3Hf、C3HfC57BL、C3HfB 都是表示由 C57BL 品系代乳的 C3H 近交系。C3HeB 表示 C3H 近交系的受精卵移植于 C57BL 品系雌鼠。

(2) 用代乳等人为技术处置的目的之一是去除或置入垂直感染的病毒。当去除或置入的病毒十分明确时, 用下面的方法表示: 在品系名称后加一横线, 以大写英文字母标明病毒名称, 最后加上 1 个“+”或“-”的符号, 分别表示置入或去除。例如, C3H/HeN-MTV+, 表示将纯化的小鼠胸腺病毒接种于剖宫手术取得的 C3H/HeN 品系的幼鼠。

(3) 1 个近交系引种到另 1 个单位时, 由于环境条件的改变, 随着繁殖代数的增加, 也可能产生遗传上的差异。由引种形成的支系用下法表示: 原品系或亚系名称后加一斜线, 如 C57BL/6J/Lac 表示由英国实验动物中心(Lac)保持的 C57BL/6J 近交系的支系。

经过数次引种的支系, 一般只在品系或亚系名称后标明现在保持单位的名称, 而不累计式地依次标明各中间引种单位的名称。

五、近交系动物的特征

1. 基因纯合性 在 1 个近交系内的所有动物的基因位点都应当是纯合子, 即基因型一致, 遗传特性相同。

2. 遗传稳定性 近交系被确认后, 只要坚持近交, 并不断监测, 基因变异的概率是很低的。

3. 反应敏感性 近交系动物的遗传基因是高度纯合的, 对外部各种因素(包括试验因子)的影响, 反应高度敏感。这类动物有如高精密度的天平, 外界微小的变化, 天平就会摆动。

4. 遗传物质同源性 是指同一近交系中的所有个体在遗传上是同源的, 均可追溯到 1 对共同的祖先。同一品系内具有基本相同的遗传组成和基因位点。这种遗传物质的同源性可采用组织移植方法来检测, 也可用 1 只动物检测群体的基因型。如能应用生化或免疫学的方法检测个体在各染色体上的基因标记, 同一品系内不同个体间的基因标记完全一致。

5. 表现型的均一性 表现型是基因在环境因素作用下表现出来的、可被直接观察到的亲代性状。在相同环境因素下, 由于近交系遗传的稳定性, 其表现型是均一的。近交品系动物的

性状如肿瘤治疗发病率、形态学特点(体重、毛色等)、血型和组织型、对药物的反应、甚至行为的类型等都可高度遗传,均衡一致。

6. 个体性 由于不同品系具有不同的遗传组成和生物学特性,所以不同品系各有其不同的特性。有些品系可能自发某些疾病,成为研究人类疾病理想的动物模型,如自身免疫风湿鼠、白内障鼠、脑积水鼠、多尿症鼠、缺乏免疫风湿球蛋白 M 鼠、对胰岛素敏感鼠等。

7. 分布的广泛性 近交系动物个体具备品系的全能性,任何个体均可携带该品系全部基因库,引种非常方便,仅需 1~2 对动物。

8. 背景资料和数据较为完善 由于近交系动物在培育和保种的过程中都有详细记录,加之这些动物分布广泛,经常使用,已有相当数量的文献记载着各个品系的生物学特征,这些基本数据对于设计新的实验和解释实验结果提供了便利条件。

9. 遗传特征的可辨别性 由于每个近交品系都具有自己独特的标志基因,研究者可定期进行检测,以识别所使用的近交品系动物是否可靠。常用的方法有生化位点法、皮肤移植法、毛色基因法和下颌骨测量法等。

六、近交系动物在生物医学研究中的应用

使用实验动物进行科学研究的 1 个关键问题是怎样使动物实验的结果正确、可靠、有规律性、重复性好。一般的实验动物是采用任意交配的方法繁殖,动物个体差异较大,必然影响实验结果的均一性,有时甚至难以判定实验结果。近交系具有良好的、适合实验要求的遗传特性,能够克服这些缺点,满足实验研究的需要。近交系动物首先应用于遗传学研究,以后又为肿瘤和免疫学家所重视。在肿瘤的研究工作中应用最广泛,培育的品系也最多,对肿瘤的病因学、发病学、实验治疗和新抗肿瘤药物的研究等都发挥了重要作用。

随着医学科学研究的飞速发展,近交系动物的培育及应用愈来愈被人们所重视,为适合不同课题研究需要而培育的近交系动物品系也愈来愈多。在医学、生物学、药理学等各个领域内的应用也日益广泛。生物制品、药品、食品等产品检测和疾病诊断、生理、病理、遗传、肿瘤、免疫、放射、白血病、内分泌等学科的研究工作中都需要使用近交系动物进行各种实验。它们是胚胎学、生理学、遗传学研究的理想材料,也用于药效试验、安全评价等的动物实验。进行组织或肿瘤移植实验时,制作某些有遗传因素的人类疾病的动物模型时,近交系是必不可少的材料。

七、特殊近交系类型

近交系育成后,由于基因突变、环境因素的改变或人工有目的的培育,可形成近交系中的亚系和支系。为了建立各种人类疾病的动物模型,为了适应各种科学实验的特殊需要,人们用近交系的培育方法,培育出特殊类型的近交品系。目前,已育成众多特殊类型的近交系。

1. 同源突变近交系 2 个近交系除了在 1 个指明位点等位基因不同外,其他遗传基因全部相同,称为同源突变近交系,简称同源突变系。同源突变系一般由近交系发生突变而成。譬如近交系小鼠 129 的种群中,某些个体发生了“肌萎缩症”的隐性遗传突变,由 dy 基因控制这个性状。这个突变育成了 dy 的突变品系,称为 129-dy。这样 129 与 129-dy 便互交成为同类系,因为它们两系除 dy 1 对等位基因之外,其他基因都基本是一致的。

同源突变近交系名称的书写方式是由发生突变的近交系名称后加突变基因符号(用英文

斜体印刷体)组成,二者之间以连接号分开,如果这个基因是隐性的则字母全用小写,如果是显性的则第1个字母用大写,如 DBA/Ha-D,129-dy 等。

2. 同源导入近交系 通过杂交-互交或回交等方式将1个基因导入到近交系中,由此形成的1个新的近交系与原来的近交系只是在1个很小的染色体片段上的基因不同,称为同源导入近交系,简称同源导入系。同源导入近交系动物的名称由以下3部分组成。

(1)接受导入基因的近交系名称。

(2)提供导入基因的近交系缩写名称,并与(1)之间用英文句号分开。

(3)导入基因的符号(用英文斜体字母),与(2)之间以连字符分开。例如:B10.129-H-12b,表示该同源导入近交系的遗传背景为 C57BL/10sn(=B10),导入 B10 的基因为 H-12b,基因提供者 129/J 近交系。

3. 分离近交系 是在培养近交系的同时,采取一定的交配方法,迫使个别基因位点上的基因处于杂合状态。这样培育出来的近交系个别基因位点上的基因保持杂合状态,能分离出该基因位点上带有不同等位基因的2个近交系亚系。

分离近交系的命名是在品系名称后面加连字号和杂合基因的符号,如 DW-dw/+ 表示 DW 品系在 dw 位点是杂合的,有时习惯上也写成 DW。分离近交系的代数可在名称后面的括号内加 FH 和数字表述,如 DW-dw/+(FH27)表示保持 dw 位点是杂合的兄妹交配 27 代。

同源导入近交系、同源突变近交系和分离近交系动物具有很多独特的应用价值。

(1)在同一遗传背景下比较某基因位点上不同等位基因的遗传效应。

(2)在不同遗传背景中研究同一基因与遗传背景及其他基因的关系,消除杂合遗传背景对某些突变基因表达的影响,以获得更为稳定的实验动物模型。

(3)对复杂的多基因性状进行遗传分析。

4. 重组近交系 由2个近交系杂交后,经连续20代以上兄妹交配育成的近交系,称为重组近交系。

重组近交系名称的书写方法是在2个亲本品系名称之间加1个“X”符号(居中而不留空间)来表达,品系名称用缩写形式。如 BALB/cByXC57BL/6By,记为 CXB;C57BL/6JXDDBA/2J,记为 BXD;C57BL/6JXC3H/HeJ,记为 BXH;C57BL/6JXSJL/J,记为 BXJ。由相同双亲交配育成的1组近交系,应用阿拉伯数字加一横线加以区别。如 BXD-5, BXD-30; BXH-19, BXH-2; BXJ-1, BXI-2 等。

重组近交系的发展和利用,是哺乳类动物遗传学中的最重要的发展。该品系动物既具有其双亲品系的特性,又具有重组后1组内和每个重组近交系的特征,因此已广泛应用于新的多态基因位点和新的组织相容性位点的鉴定、多态基因位点的多效性和多态基因位点的连锁关系的研究和探测,以及临界特性的遗传分析。

5. 遗传工程动物 是一种高度遗传限定的实验动物。用分子生物学等方法在实验室内对动物进行遗传改造,以满足人们的各种研究需要。

(1)转基因动物(transgenic animals):转基因动物是用实验室方法将人们需要的目的基因导入其基因组,使外源基因与动物本身的基因整合在一起,并随细胞的分裂而增殖,在动物体内得到表达,并能稳定地遗传给后代的动物。整合到动物基因组上的外来结构基因称为转基因,由转基因编码的蛋白质称为转基因产品,通过转基因产品影响动物性状。如果转基因能够

遗传给子代,就会形成转基因动物系或群体。

(2)基因剔除动物:利用同源重组原理,使胚胎干细胞内的目的基因进行定点突变,将定点突变的胚胎干细胞注射到宿主胚胎中,再将胚胎植入假孕母体的子宫内,使其发育成目的基因缺陷的嵌合体,经过一定方式的交配繁殖后,筛选出目的基因缺陷型的纯合子即基因剔除动物。以基因剔除动物作为实验动物模型,为研究基因的功能、寻找人类的遗传疾病的致病基因提供了技术手段。

(3)克隆动物:利用核转移等技术,得到遗传上与亲本动物完全相同的无性繁殖系,称为克隆动物。

八、近交系动物的育种繁殖

1. 培育目标 培育目标分定向、不定向2种。定向培育是预先确定好要获得什么样的品种,然后有计划地进行培育,这种方法能在较短的时间里获得优良的品种。不定向培育预先没有想要培育具有哪些特点的新品种,只是人们自然把比较有价值的留下,让它繁殖,去掉价值不大的品种,这样无意中起了选择的作用,这种选择过程是比较缓慢的,待纯化后回过头来做实验,测定其特性。

2. 近交系动物的培育方法 培育近品系的重要手段,一是交配繁殖,二是人工选择,二者经常是同时进行的。交配繁殖的目的在于使存在于基代双亲(即用于培育近交系的最初1对小鼠)中的不同遗传位点的不同基因通过连续许多代的重新组合达到纯合的程度,并保持足够数量的后裔可供交配时选择。人工选择的目的是挑选符合培养需要(有繁殖能力或其他的特殊性状)和淘汰不需要的个体。

3. 近交系动物的繁殖方法 选择近交系动物繁殖方法的原则是保持近交系动物的同基因性及其基因纯合性。近交系的动物的繁殖可分为基础群、血缘扩大群和生产群。当近交系动物生产供应数量不是很大时,一般不设血缘扩大群,仅设基础群和生产群。设基础群的目的一是保持近交系自身的传代繁殖,二是扩大繁殖提供种动物。生产群的目的是生产供应实验用近交系动物。生产群种动物来自基础群或血缘扩大群。作为繁殖用的近交系动物必须遗传背景明确,来源清楚,有较完整的资料(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)。引种动物应来自近交系的基础群。近交系动物一般采用以下3种方式进行繁殖。

(1)单线法:从近交系原种选出3~5对兄妹进行交配,从中选出生产能力最好的1对进行繁殖。从子代中再选出3~5对进行繁殖。然后从中选出1对作为下一代的双亲,依此类推。此法个体均一性好,缺点是选择范围太小,易发生断代的危险,在实践中一般不予采用。

(2)平行线法:从原种选出3~5对兄妹进行交配,每对生产的子代中都要选留下一代种鼠,平行向下延续。此法优点是选择范围大,有利于种的维持。其缺点是个体不太均一,易发生分化,长期下去可使动物分成不同的亚系。

(3)优选法:这种方法保留了上述2种的优点,克服了2个方法的缺点,是个好的保种方法,如果每代选6对,每对都选自同一双亲的子代同胞兄妹,在繁殖过程中,每一代均保持6对,当某对不怀孕或生产能力低时,则可以从另1对所生的后代中选择优良者加以代替。这种代替,可以是1对,也可以从雌、雄中选1只。

第三节 封闭群动物

一、基本概念

定义:1个群体连续4代以上不从外部引进新种,仅在固定场所的一定群体中保持以非近亲交配的方式繁殖的动物群,可称之为封闭群动物。

培育封闭群实验动物的关键是不从外部引入任何新的基因,同时群体内做随机交配,防止群体内原有基因丢失,在保持群体内一定杂合性的同时使群体的遗传性相对稳定。

国际动物实验科学委员会(ICLAS)规定:“非近亲交配方式进行繁殖生产的1个群体,在不从外部引进新的血缘条件下,至少连续繁殖4代以上称封闭群”。我国制定的《实验动物哺乳类动物的遗传质量控制》国家标准对封闭群动物作如下定义:“以非近亲交配方式进行繁殖生产的1个实验动物群体,在不从其外部引进新个体的条件下,至少连续繁殖4代以上,称为1个封闭群”。日本实验动物研究会于1973年规定:“5年以上不从外部引种,只在一定的群体中进行繁殖,为经常提供实验动物而进行生产的群体叫做封闭群”。

二、分类

封闭群按其来源和遗传背景不同,可分为以下2大类。

1. 来源于近交系的繁殖群及其子代,不用兄弟姐妹交配方式保种进行生产的实验动物。
2. 来源于非近交系动物,不是以培育近交系为目的而生产的实验动物群。

封闭群动物个体间差异的大小,取决于祖代的来源。来源于近交系的繁殖群,个体间差异小。来源于非近交系的动物群体,个体间差异大。

三、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者的英文缩写名称,第1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。例如,N:NIH表示由美国国立卫生研究院(N)保持的封闭群小鼠。Lac:LACA表示由英国国家实验动物中心(Lac)保持的LACA封闭小鼠。把保持者的缩写名称放在种群名称的前面,而二者之间用冒号分开,是封闭群动物与近交系动物命名中最显著的区别。

某些命名较早,已广为人知的封闭群动物,名称与上述规则不一致时,仍可沿用其原来的名称。如Wistar大鼠封闭群、日本的ddy封闭群小鼠等。

除此之外,近交系命名中的规则及符号也适用于封闭群动物的命名。

四、特征及其应用

1. 封闭群动物的遗传组成具有很高的杂合性,因此实验的可重复性及反应的一致性就不如近交系动物。但是,封闭群动物在实验中,却有比近交系更接近自然种群反应的特点。封闭群动物在遗传中可作为选择实验的基础群体,用于对某些性状遗传的研究。封闭群类似于人类群体遗传异质性的遗传组成,在人类遗传研究、药物筛选和毒性试验、安全性评价试验方面

起着不可替代的作用。

2. 封闭群可携带大量的隐性有害突变基因,可用于估计群体对自发或诱发突变的遗传负荷能力。

3. 封闭群具有较强的繁殖力和适应能力,容易生产,成本低,可大量供应,因而广泛用于预试验、学生教学和一般实验。

目前国内外实验动物的使用大部分是近交系和封闭群。而从使用量上来看封闭群远远超过近交系。然而,对于封闭群的研究,无论在理论上还是实践上,无论在国内或国外,都落后于近交系。其原因在于封闭群是属于群体遗传学理论范畴,不仅群体遗传学本身产生较晚,而且该理论又不能机械地套用于封闭群。到目前为止,对封闭群动物所进行的研究工作几乎都只限于小鼠和大鼠,而且报道也甚少。

五、育种繁殖

如系来源于近交系的封闭群,虽然对繁殖群的大小不作特殊规定,但应采取在群体内不产生隔离状态的方法繁殖。如系来源于非近交系的封闭群,应经常保持“群体的有效大小”,一般为50只以上,同样应采取群内不产生隔离状态的方法繁殖。

封闭群动物的培育方法较为简单,只要不引进新品种,避免近亲繁殖即可。但是长期保持1个封闭群就必须控制各种条件,采取一定的措施。保持封闭群的主要目的是为了减少群体内的遗传变异,使整个群体的性状、特征能持续稳定不变,每代近交系数上升不超过1%,而且不产生性质不同(变异)的个体或小群体。培育时应注意下列规则。

1. 初始群的来源 初始群体必须具有较高程度的遗传杂合性;同时初始群体动物必须遗传背景明确,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征等)。

2. 有效群体的大小 有效群体大小是群体中参与繁殖的实际数量。为保持封闭群动物的异质性和多态性,避免群体内近交系数上升,每代动物数量要足够多,小型啮齿类封闭群动物数目一般不能少于25对。

3. 防止产生群体内的隔离状态 封闭群体,不要在隔离状态下进行繁殖。如果交配不随机(如一封闭群隔离饲养,每处的雌、雄只数都不多),而是兄弟姐妹之间交配,则该封闭群就会分化为许多近交系,从而使该群体的基因型结构发生变化,结果不但破坏了封闭群固有的遗传结构,而且将使封闭群分化成几个近交系。如果近交系之间再进行杂交,虽可提高该群体的繁殖率,可是封闭群原有的特点将因此丢失。

4. 选择 在育种和保种的过程中,除了对不健康的个体和异常个体进行淘汰外,应避免对任何特征进行选择,包括动物繁殖能力的选择。

5. 交配方式 为了避免近交,封闭群动物应采取随机交配的方式进行繁殖,避免循环式的近亲交配方式。

第四节 杂交一代动物

一、定义和概念

两个近交品系动物之间进行有计划交配所获得的第1代动物,称之为杂交群动物或杂交一代动物,简称F1(First filial generation)动物。如C57BL/6J和DBA/2小鼠交配后培育的第1代动物即为BDF1或B6D2F1;C57L/J和A/He交配后的第1代动物为LAF1等。

必须指出,实验动物F1与一般遗传学上的F1不同。一般的F1因为其亲本本身是杂种,所以其个体之间差异很大。而实验动物F1由于它们的2个亲本本身就是纯种,虽然F1遗传型是杂合的,但个体间的遗传型与表现型是一致的。

F1动物的生产是比较简单的。将2个基因型不同的近交品系纯合子作为亲代,互相交配所产生的子一代即可形成F1动物。需要指出的是,实验动物F1不作继续繁殖和近交系的培育,避免在子二代之后,出现遗传性状的分离。同时在F1动物生产中,必须强调的是2个亲本近交系。由于所用的雌、雄不同,将因母体环境的不同或性染色体的不同而产生不同基因型及表现型的F1。

二、命名

杂交群应按以下方式命名:以雌性亲代名称在前,雄性亲代名称居后,二者之间以大写英文字母“X”相连表示杂交。将以上部分用括号括起,再在其后标明杂交的代数,如F1。

对品系或种群的名称可使用通用的缩写名称。例如C3H/HeJ♀×AKR/J♂可记为C3HAKRF1或简称C3AKF1;反之,如AKR/J♀×C3H/HeJ♂,则记为AKC3F1。

三、使用F1动物的优点

1. 具有与近交系相似的遗传均质性,实验的可重复性强。
2. 具有杂交优势,与近交系相比具有生命力强、适应性和抗病力强、繁殖旺盛等优点。
3. 在很大的程度上可以克服因近交繁殖所引起的近交衰退现象。
4. 国内、外广泛采用,便于研究结果的类比和交流。

上述F1动物的特点说明为什么有了近交系动物,还要培育F1动物。一些发达国家在過去对微生物还没有普遍取得人工控制时期,是优先发展F1动物的。鉴于我国当前的物质条件,应当很好发展F1动物,宣传其科学价值。

四、F1动物在生物医学研究中的应用

由于F1动物具有与纯系动物基本相同的遗传均质性,又克服了纯系动物因近交繁殖所引起的近交衰退,因此F1动物被广泛地用作各个领域动物实验的材料。尤其是在生物医学的实验研究中有特别的用途。如:杂交一代小鼠是研究外周血干细胞的重要材料,近交系NZB与NZW的杂交一代是研究自身免疫缺陷的动物模型,用杂交一代小鼠作单克隆抗体的研究,可获得比用近交系动物更好的效果。