

啮齿类实验动物 生物学特性数据测定技术规程

(讨论稿-4)

2007 年 4 月

目 录

1. 适用范围	
2. 规范性引用文件	
3. 术语和定义	
4. 数据测定的总体说明	
5. 仪器设备	
6. 各类数据测定技术	
6.1 遗传数据	
6.1.1 染色体数测定	
6.1.2 生化标记基因检测	
6.1.3 小鼠 H-2 免疫学标记基因检测	
6.1.4 其他	
6.2 生理数据	
6.2.1 样品采集	
6.2.2 分析仪器性能检查	
6.2.3 血液生理指标（必须数据）测定	
6.2.4 生殖生理参数测定	
6.2.5 免疫生理参数测定	
6.2.6 生长发育生理参数	
6.3 生化数据	
6.3.1 样品采集	
6.3.2 分析仪器性能检查	
6.3.3 血液生化指标（必须数据）测定	
6.3.4 尿液生化指标（必须数据）测定	
6.4 解剖数据	
6.4.1 基本要求	
6.4.2 脏器重量	
6.4.3 肠道长度的测量	

啮齿类实验动物生物学特性数据测定技术规程

1. 适用范围

本技术规程规定了啮齿类实验动物生物学特性数据化的技术要求。

本技术规程适用于啮齿类实验动物生物学特性数据化的获取和整理，数据质量的控制以及数据库和信息网络系统的建设。

2. 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规程的引用而成为本规程的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规程，然而，鼓励根据本规程达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本规程。

GB 14923-2001 实验动物 哺乳类实验动物的遗传质量控制

GB 14922.2-2001 实验动物 微生物学等级及监测

GB 14925-2001 实验动物 环境及设施

《实验动物资源共性描述规范》（试行）

《实验动物生物学特性采集、加工技术规范》（草案）

全国临床检验操作规程（第3版），中华人民共和国卫生部医政司，2006年

3. 术语和定义

下列术语和定义适用于本规程

数据采集 data collection

为了反映实验动物品种品系的生物学特征，进行各种数据的测定及标准化工作。

4. 数据测定的总体说明

4.1 本技术规程规定了4类数据（遗传数据、生理数据、生化数据、解剖数据）

的测定技术要求。

4.2 根据实验动物生物学特性数据的应用情况以及对实验动物生物学特性描述的科学性，将实验动物生物学特性数据分为 2 类：一类数据为“必须数据”，即对一个品系（种）动物生物学特性描述所不可缺少的数据，用“●”表示；另一类数据为“丰富性数据”，即此类数据在上报数据库时可暂时没有，但随着工作的不断深入，应该不断予以完善，用“○”表示。

本技术规程主要对“必须数据”的测定技术进行描述。

4.3 本技术规程是啮齿类实验动物生物学特性数据化测定工作应遵循的技术要求，是数据库建设的重要文件。

4.4 本技术规程与“实验动物资源共性描述规范（试行）”、“实验动物生物学特性数据采集、加工技术规范”互为补充完善，共同构成采集、整理实验动物生物学特性数据的技术文件。

4.5 要将某种动物的生物学数据录入数据库，除数据测定报告外，还应提交全部实验原始记录。应填写“实验动物生物学特性数据测定基本情况说明”，对实验动物生物学数据测定人员、测定单位、试剂、仪器设备名称和技术参数以及其他实验条件等背景资料进行说明，另外，应注明实验室认可和计量认证等情况。

4.6 基本信息共计 34 项，多数是对实验动物资源整体状态以及保存和共享方面的描述，不需要进行测定。其中微生物等级和保存设施是 2 个“必须数据”。这两方面工作基础比较好，已有较为完善的用于保证数据科学规范准确的质量检测 SOP，故在本技术规程中不再列出。

5. 仪器设备

5.1 电泳仪：电压 0~600V，电流 0~100mA，稳压稳流定时电泳仪。

5.2 离心机：500~4000r/min 离心机；15000~20000 r/min 低温高速离心机。

5.3 匀浆机：宁波产 DY89-1 玻璃匀浆机（1500r/min）。

5.4 紫外检测仪：RT-A 型紫外检测仪，波长 254~440nm。

5.5 全自动或半自动生化分析仪。

5.6 全自动或半自动血液分析仪。

5.7 倒置显微镜

5.8 天平（精确度： $\pm 0.01\text{g}$ ）。

5.9 尺子（精确度： $\pm 0.1\text{cm}$ ，测量体长等）。

6. 各类数据测定技术

6.1 遗传数据

遗传数据共包括 11 组数据。本技术规程仅对其中涉及啮齿类实验动物的“必需数据”的测定技术进行描述。

6.1.1 染色体数测定

6.1.1.1 器具

注射器（1mL、5mL 各一只）、5 号针头、解剖盘、解剖剪、镊子、玻璃吸管、10mL 刻度离心管、离心机、载玻片、盖玻片、显微镜、滤纸、擦镜纸、白纱布小块、量筒、玻璃板。

6.1.1.2 药品

0.02%秋水仙素、Giemsa 染液。

6.1.1.3 试剂

① 0.075mol/L 氯化钾溶液

准确称取 559.13g 氯化钾溶于 80mL 蒸馏水中，定容至 100mL。

② 固定液

量取甲醇 60mL、冰醋酸 20mL 混合均匀备用。

③ 2%柠檬酸钠溶液

准确称取 2g 柠檬酸钠，溶于 80mL 蒸馏水中，定容至 100mL。

④ 0.85%生理盐水

准确称取 0.85g 氯化钠溶于 80mL 蒸馏水中，定容至 100mL。

⑤ 0.02mol/L 磷酸缓冲液（pH 6.8）

准确称取磷酸氢二钠 8.63g，磷酸二氢钾 3.77g 溶于 900mL 蒸馏水中定容至 1000 mL。

6.1.1.4 操作

①预处理 实验前 3~4h, 取健康动物一只按每克体重 2~4 μ g 秋水仙素的量将秋水仙素溶液注入腹腔(切勿损伤内脏)。

②取股骨 用CO₂气体麻醉法处死动物。处死后立即用剪刀剪开后腿上的皮毛, 取出动物的股骨, 剔掉股骨上的肌肉, 并将一小块白纱布包在股骨上手反复搓动, 以除净股骨上肌肉碎渣和结缔组织。

③取骨髓细胞 用剪刀剪开股骨的两端使骨髓露出。将装有 2%柠檬酸钠溶液的 5mL 注射器插入股骨的上端, 缓慢注射冲洗骨髓腔, 冲洗的溶液一滴滴从股骨下端渗入到离心管中, 反复冲洗直至股骨变灰白色, 经 1000r/min 离心 10min 后弃去上清液。

④低渗 在离心管中加入 0.075mol/L KCl 溶液 5mL, 用吸管将骨髓细胞吹打成细胞悬液, 37℃恒温水浴锅低渗 30 min。1000r/min 离心 10min 后弃去上清液。在离心前加入 1mL 固定液并用吸管吹匀进行预固定。

⑤固定 I 沿离心管管壁慢慢加入固定液 5mL, 用吸管吹打成细胞悬液后在室温下静置 30min。1000r/min 离心 10min 后弃去上清液。

⑥固定 II 重复操作中第⑤步。离心弃去上清液后沿离心管壁加入 0.3~0.5mL 新配制的固定液, 用吸管轻轻吹打成细胞悬液。

⑦滴片 用镊子从冰水中取出预冷的载玻片, 甩掉载玻片的冰水后迅速用吸管吸取细胞悬液滴在载玻片上 2~3 滴(滴片的高度 30~35cm, 滴面不要重复), 立即用嘴向同一方向吹, 使细胞染色体散开, 然后置于酒精灯上微微加热干燥或放在玻片架上室温下晾干。

⑧烤片 将滴片置于 70℃烤箱烘烤 30min。

⑨染色 将烤干的玻片放在玻片板上, 将 Giemsa 染液(0.5mL Giemsa 原液加 9.5mL 的 0.01mol/L 磷酸缓冲液)滴加在玻片上染色 20~30min, 用蒸馏水或自来水冲去玻片上的染液。滤纸吸干或晾干后待镜检。

⑩镜检 将制备好的玻片置于显微镜下, 首先在低倍视野下寻找细胞和中期分裂相, 然后用中倍镜和油镜观察染色体的形态, 统计染色体的数目。

6.1.2 生化标记基因检测

6.1.2.1 小鼠碳酸酐酶-2(Carbonic anhydrase-2 *Car2*)

A 样品溶血素

溶血素的制备 用抗凝毛细管从小鼠眼眶静脉取血 100 μ L，置离心机中，3500~4000r/min 离心 2min，分离红细胞。将红细胞加入蒸馏水（1:4 体积分数）振荡 1min，成为红色透明液体，即为溶血素。

B 主要试剂

1 EDTA-乙酸钠缓冲液 pH 5.4（用时 1: 4 稀释）

准确量取乙酸钠 10.60g，EDTA2.48g，溶于 900mL 蒸馏水中，用浓盐酸调节 pH 至 5.4，定容至 1000mL。

2 显色液

准确称取丽春红-S 0.40g，三氯乙酸 6.0g，溶于 180mL 蒸馏水中，定容至 200mL。

3 漂洗液

准确量取冰醋酸 25mL，加入蒸馏水定容至 500mL。

4 电泳支持物

醋酸纤维素膜（浙江台州路桥四青生化材料厂）。

C 操作

1 浸膜 将醋酸纤维素膜轻轻浸入缓冲液中，浸入时应避免膜上出现气泡。

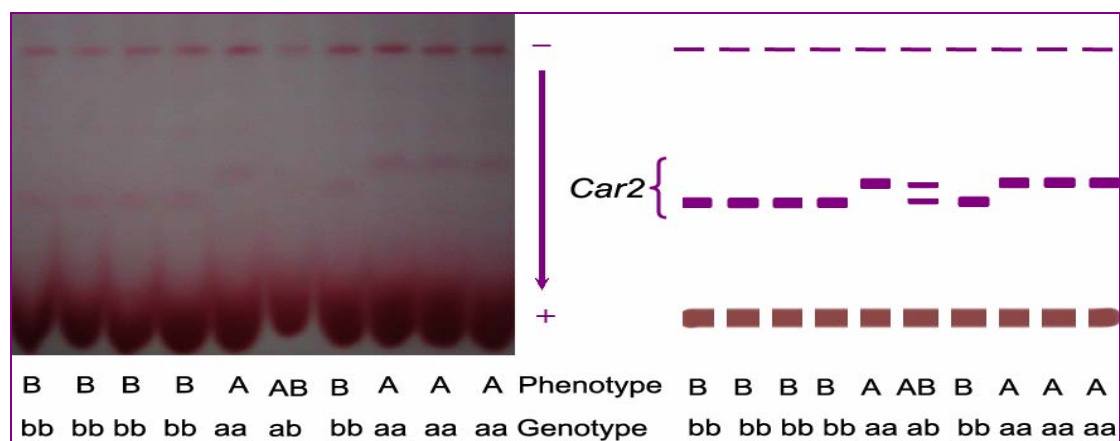
2 点样 将浸透的膜（指膜上没有白色斑点）取出用滤纸吸去多余的缓冲液，醋酸纤维素膜粗糙面朝上平置在点样板上，用点样器取预置在样品槽内的编号样品，在膜上点样，一次点样约需 0.3 μ L。

3 电泳条件 电压 240V，时间 40min，移动方向由正极至负极。

4 染色方法 电泳后将膜浸入丽春红-S 染色液中，5min 后取出，在漂洗液中漂洗两次（每次约 5~10min）。

D 结果

1 电泳结果及模式图见图 1。



2 判断方法 参照电泳图并对照附录 A 对检测结果作出判定。

6.1.2.2 小鼠葡萄糖磷酸异构酶-1 (Glucosephosphate Isomerase-1 *Gpi1*)

A 样品 溶血素

同 6.1.2.1 中 A 样品溶血素制备。

B 主要试剂

1 Tris-甘氨酸缓冲液 pH 8.5

准确称取 Tris 3.00g, 甘氨酸 14.40g, 溶于 900mL 蒸馏水中, 定容至 1000mL。

2 显色液

依次准确称取果糖-6-磷酸 15mg, 醋酸镁 10mg, TPN 2mg, PMS 1mg, MTT 2mg, 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 0.1mg, 溶于 2.0mL 的 Tris-HCl (pH 8.0) 中, 定容至 3.0mL。

3 漂洗液

同 6.2.1.1 B 主要试剂 3。

4 电泳支持物

同 6.1.2.1 B 主要试剂 4。

C 操作

1、2、3 步同 6.1.2.1 C 操作中的浸膜、点样、电泳条件。

4 染色方法 酶显色板法, 适用于醋酸纤维素膜。

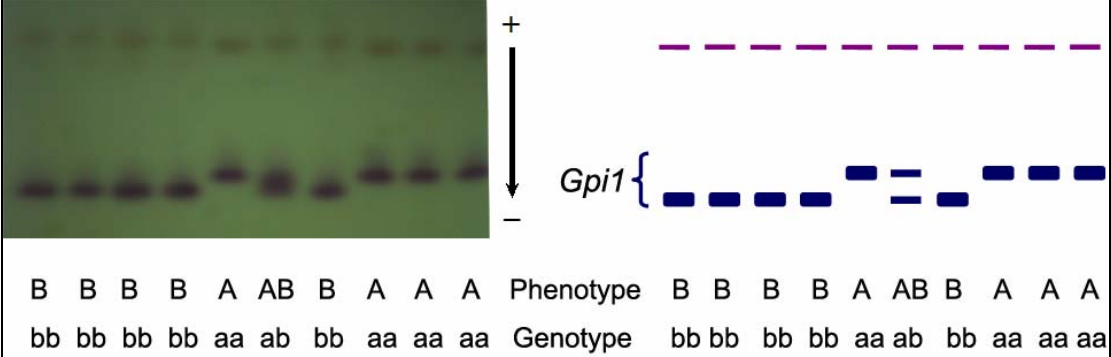
5 将新配制的显色液混合, 加入 2%热琼脂 (40~50℃) 3~4mL, 迅速混匀, 均匀倒置在 6×8cm 的玻璃板上, 制成酶显色板。电泳结束后取出膜, 将点样面贴在酶显色板上。注意将膜与酶显色板间的气泡排尽, 但不可移动膜的位置。

6 将带膜显色板移至 37℃温箱保温, 直至酶区带清晰显现, 取出已显色的膜浸

入漂洗液中，终止反应。

D 结果

1 电泳结果及模式图见图 2。



2 判断方法 参照电泳图并对照附录 A，对检测结果作出判定。

6.1.2.3 小鼠血红蛋白β链 (Hemoglobinβ-chain *Hbb*)

A 样品

同 6.1.2.1 中 A 样品溶血素制备。使用时在所制备的溶血素内加入 1/4 体积的烷化剂。

B 主要试剂

1 Tris-甘氨酸缓冲液 pH 8.5

同 6.1.2.2 B 主要试剂 1。

2 烷化剂

准确称取脘胺 225mg，二硫苏糖醇 3mg，溶于 1mL 蒸馏水中，加入 50uL 氢氧化铵，定容至 2mL。

3 显色液

同 6.1.2.1 B 主要试剂 2。

4 漂洗液

同 6.1.2.1 B 主要试剂 3。

5 电泳支持物

同 6.1.2.1 B 主要试剂 4。

C 操作

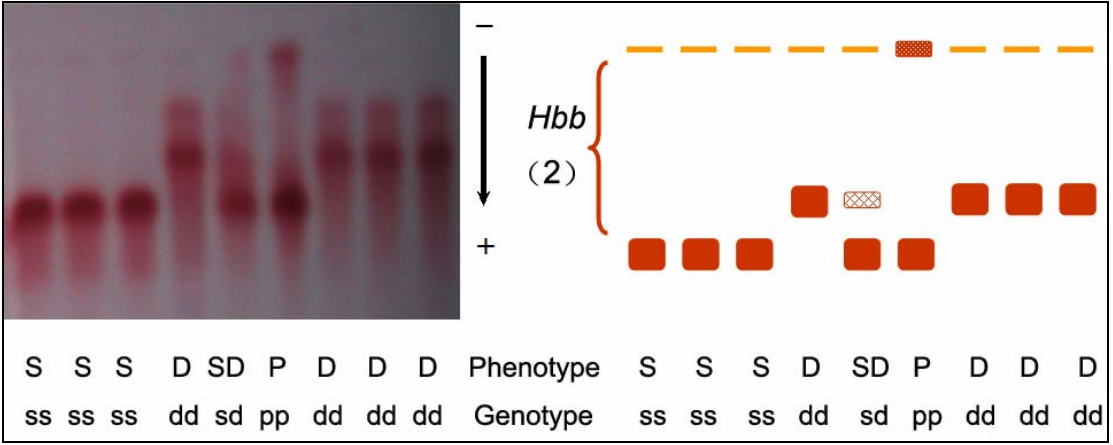
1、2、步同 6.1.2.1 C 操作中的浸膜、点样。

3 电泳条件 电压 200V，时间 30min，移动方向由负极至正极。

4 电泳后将膜浸入丽春红-S 染色液中，5min 后取出，在漂洗液中漂洗两次（每次 5~10min）。

D 结果

1 电泳结果及模式图见图 3。



2 判断方法 参照电泳图并对照附录 A，对检测结果作出判定。

6.1.2.4 小鼠酯酶-1 (Esterase-1 *Es1*)

A 样品 血清

血清的制备 用抗凝毛细管从小鼠眼眶静脉取血 100 μ L，置离心机中，3500~4000r/min 离心 2min，分离血清。

B 主要试剂

1 磷酸缓冲液 pH6.8

准确称取磷酸氢二钠 8.63g，磷酸二氢钾 3.77g 溶于 900mL 蒸馏水中定容至 1000 mL。

2 显色液

准确称取 β -乙酸萘酯 10mg，坚固蓝 RR 盐 50mg，加入丙酮 0.5ml，加入磷酸缓冲液 8mL，定容至 10mL，溶解过滤后使用。

3 漂洗液

同 6.1.2.1 B 主要试剂 3。

4 电泳支持物

同 6.1.2.1 B 主要试剂 4。

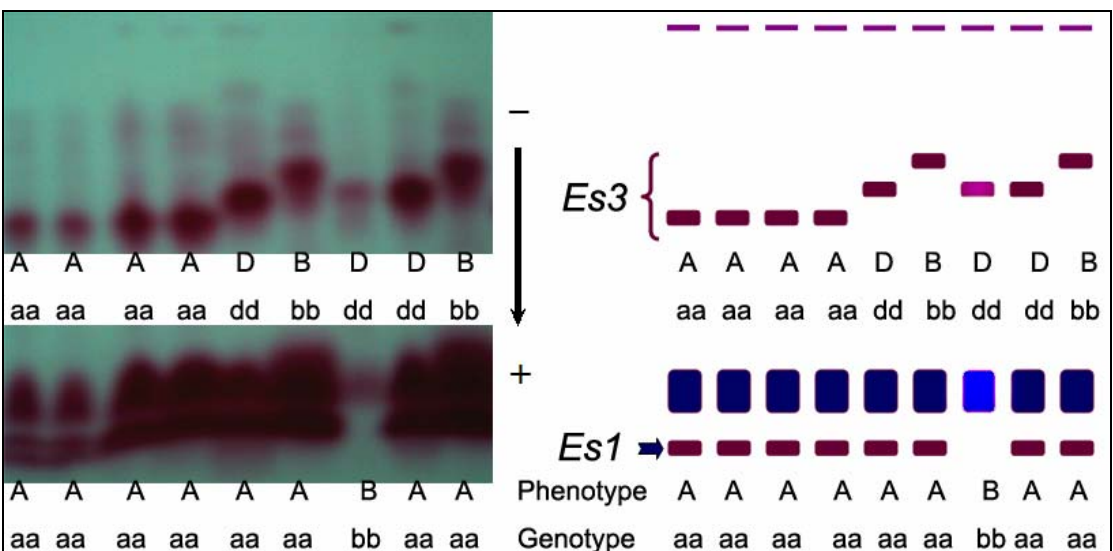
C 操作

1、2 步同 6.1.2.1 C 操作中的浸膜、点样。

- 3 电泳条件 电压 140V，时间 30min，移动方向由负极至正极。
- 4 显色方法 酶显色板法，适用于醋酸纤维素膜。
- 5 在新混合的显色液中，加入 2%热琼脂（40~50℃）3~4mL，迅速混匀，均匀倒在 6×8cm 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。）
- 6 将膜显色板移至 37℃温箱保温，直至酶区带清晰显现，取出已显色的膜浸入漂洗液中 2~3min，终止反应。

D 结果

1 电泳结果及模式图见图 4。



2 判定方法 参照电泳图并对照附录 A，对检测结果作出判定。

6.1.2.5 小鼠转铁蛋白（Transferrin *Trf*）

A 样品 血清

同 6.1.2.4 中 A 样品血清制备。

B 主要试剂

1 Tris-甘氨酸缓冲液 pH 8.5

同 6.1.2.2 B 主要试剂 1。

2 染色液

同 6.1.2.1 B 主要试剂 2。

3 漂洗液

同 6.1.2.1 B 主要试剂 3。

4 电泳支持物

同 6.1.2.1 B 主要试剂 4。

C 操作

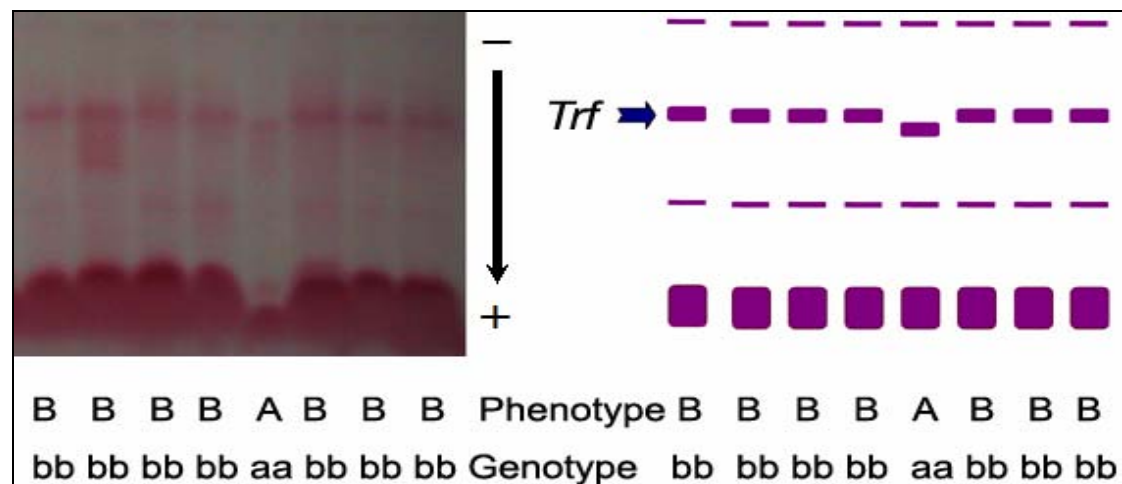
1、2 步同 6.1.2.1 C 操作中的浸膜、点样。

3 电泳条件 电压 140V，时间 30min，移动方向由负极至正极。

4 电泳后将膜浸入丽春红-S 染色液中，5min 后取出，在漂洗液中漂洗两次（每次 5~10min）。

D 结果

1 电泳结果及模式图见图 5。



2 判断方法 参照电泳图并对照附录 A，对检测结果作出判定。

6.1.2.6 小鼠过氧化氢酶-2 (Kidney Catelase Ce2)

A 样品 肾匀浆

肾匀浆的制备CO₂气体麻醉法处死动物，解剖取肾脏 1 个。按蒸馏水与肾组织 2 : 1 (v/w) 的比例，加入预冷蒸馏水，用组织匀浆器匀浆，置 4℃离心机中，16000r/min，离心 30min。用吸管吸取上清液移至小试管中备用。

B 主要试剂

1 Tris-柠檬酸缓冲液 pH7.6 (用时 1: 5 稀释)

准确称取柠檬酸 10.00g，溶于 90mL 蒸馏水，定容至 100mL，再称取 Tris 12.10g，溶于 800mL 蒸馏水中，加入 10%柠檬酸溶液调节 pH 至 7.6，定容至 1000mL。

2 显色液

2 磷酸缓冲液 pH 6.8

同 6.1.2.4 B 主要试剂 1。

3 显色液

准确称取 β -乙酸萘酯 10mg，坚固蓝 RR 盐 50mg，加入丙酮 0.5ml，加入磷酸缓冲液 8mL，定容至 10mL，溶解过滤后使用。

4 漂洗液

同 6.1.2.1 B 主要试剂 3。

5 电泳支持物

同 6.1.2.1 B 主要试剂 4。

C 操作

1、2 步同 6.1.2.1 C 操作中的浸膜、点样。

3 电泳条件 电压 280V，时间 28min，移动方向由负极至正极。

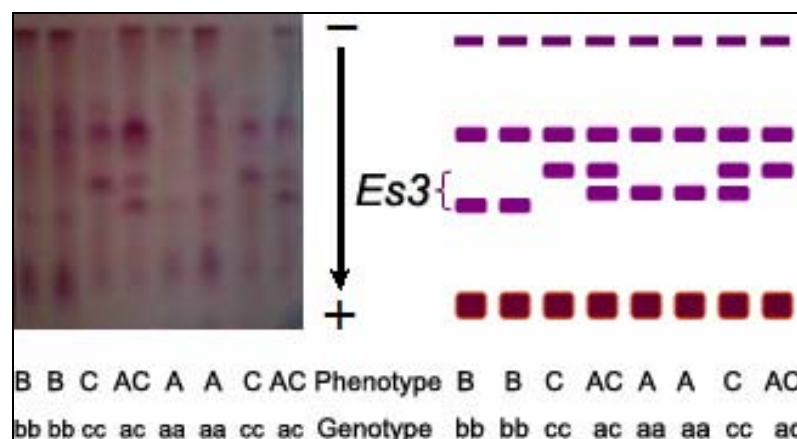
4 显色方法 酶显色板法，适用于醋酸纤维素膜。

5 在新配制的显色液中，加入 2%热琼脂（40~50℃）3~4mL，迅速混匀，均匀倒在 6×8cm 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。

6 将膜显色板移至 37℃温箱保温，直至酶区带清晰显现，取出已显色的膜浸入漂洗液中 2~3min，终止反应。

D 结果

1 电泳结果及模式图见图 7。



2 判断方法 参照电泳图并对照附录 A，对检测结果作出判定。

6.1.2.8 小鼠酯酶-10 (Esterase-10 *Es10*)

A 样品 肾匀浆

同 6.1.2.6 中 A 样品肾匀浆制备。

B 主要试剂

1 Tris—甘氨酸 pH8.9

同 6.1.2.7 B 主要试剂 1。

2 磷酸缓冲液 pH6.8

同 6.1.2.4 B 主要试剂 1。

3 显色液

4-甲基伞形乙酸盐 3mg，丙酮 0.2mL，加入磷酸缓冲液, 定容至 5mL。

4 电泳支持物

醋酸纤维素硬膜（进口 6×8cm）或国产硬膜（7×9cm）。

C 操作

1、2 步同 6.1.2.1 C 操作中的浸膜、点样。3 电泳条件 电压 280V，时间 28min，移动方向由负极至正极。

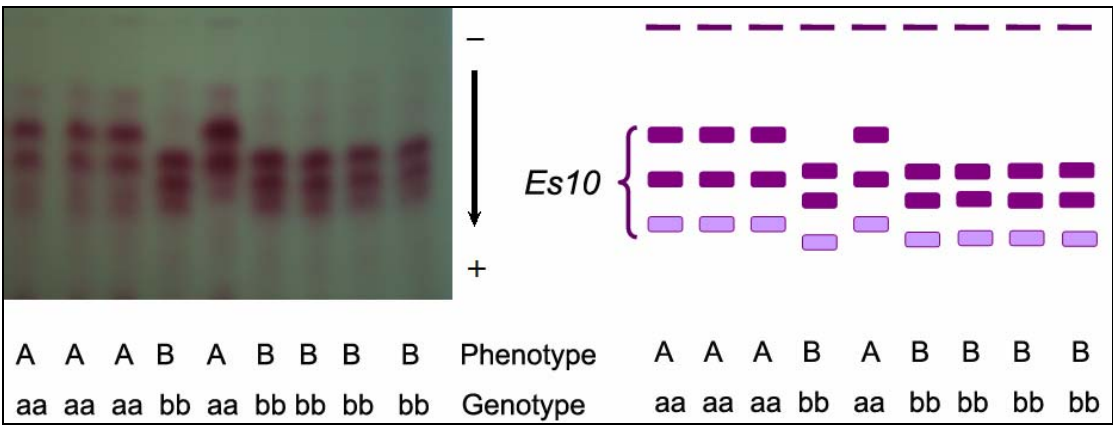
4 染色方法 琼脂覆盖法，适用于醋酸纤维素硬膜。

5 电泳结束后取出醋酸纤维素板。将新配制的显色液迅速与 5mL 2%琼脂混匀，均匀倒在水平放置的醋酸纤维素板上。

6 将带膜显色板移至 37℃温箱保温 5min，移至紫外检测仪下观察酶区带显色情况，直至清晰显现为止。

D 结果

1 电泳结果及模式图见图 8。



2 判断方法 参照电泳图并对照附录 A，对检测结果作出判定。

6.1.2.9 小鼠葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-1 (Glucose-6-phosphate dehydrogenase-1 *Gpd1*)

A 样品肾匀浆

同 6.1.2.6 中 A 样品肾匀浆制备。

B 主要试剂

1 Tris-甘氨酸缓冲液 pH 8.9

同 6.1.2.7 B 主要试剂 1。

2 漂洗液

同 6.1.2.1 B 主要试剂 3。

3 显色液

同 6.1.2.2 B 主要试剂 2。

4 电泳支持物

醋酸纤维素硬膜（进口 6×8cm）或国产硬膜（7×9cm）。

C 操作

1 浸硬膜 将醋酸纤维素硬膜轻轻浸入缓冲液中，浸入时应避免板上出现气泡。

2 点样 将浸透的硬膜（指硬膜上没有白色斑点）取出，用滤纸吸干多余缓冲液，醋酸纤维素硬膜面朝上平置在点样板上，以点样器取预置在样品槽内的编号样品，在板上点样，一次点样 0.3 μL。可重复点样，最适点样量为 0.6 μL。

3 电泳条件 电压 200V，时间 40min，移动方向由负极至正极。

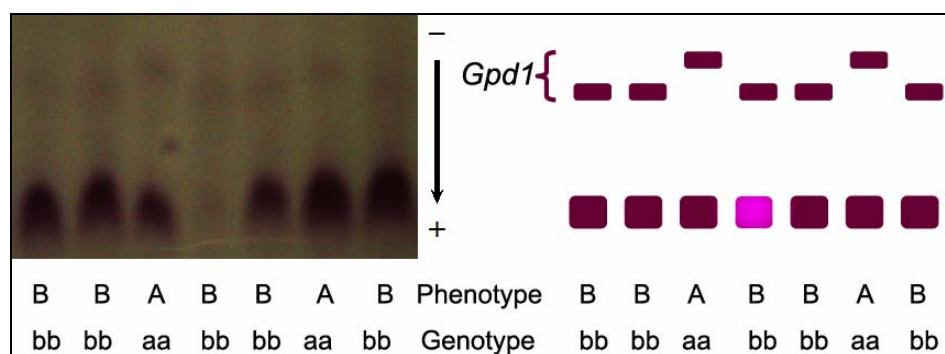
4 染色方法 琼脂覆盖法，适用于醋酸纤维素硬膜。

5 电泳结束后取出醋酸纤维素硬膜。将新配制的显色液迅速与 5mL 2%琼脂（40～50℃）混匀，均匀倒放在水平放置的醋酸纤维素硬膜上。

6 将带膜显色板移至 37℃温箱保温直至酶区带清晰显现，取出已显色的硬膜浸漂洗液中，终止反应。

D 结果

1 电泳结果及模式图见图 9。



2 判断方法 参照电泳图并对照附录 A，对检测结果作出判定。

6.1.2.10 异柠檬酸脱氢酶-1 和苹果酸酶-1

(Isocitrate dehydrogenase-1, Malic enzyme-1 *Idh1* 和 *Mod1*)

A 样品

同 6.1.2.6 中 A 样品肾匀浆制备。使用时肾匀浆 1: 4 稀释。

B 主要试剂

1 Tris-柠檬酸缓冲液

准确称取柠檬酸 10.00g，溶于 90mL 蒸馏水，定容至 100mL，再称取 Tris 12.10g，溶于 800mL 蒸馏水中，加入 10% 柠檬酸溶液调节 pH 至 7.6，定容至 1000mL。用时 1: 5 稀释。

2 Tris-盐酸缓冲液

准确称取 Tris 12.11g，溶于 800mL 蒸馏水中，定容至 1000mL，配制成 0.1mol/L 的 Tris 溶液，准确量取 1mL 浓盐酸(10mol/L)，用蒸馏水稀释至 100mL，配制成 0.1mol/L 的盐酸溶液。量取 50mL 0.1mol/L Tris 溶液，29.2mL 0.1mol/L 盐酸溶液混合均匀。

3 苹果酸溶液

准确称取苹果酸 6.70g，用 0.2mol/L 的 NaOH 调 pH 至 8.0，定容至 100mL 冷冻保存。

4 漂洗液

同 6.1.2.1 B 主要试剂 3。

5 显色液

准确称取 PMS 1mg，MTT 2mg，TPN 2mg，加入苹果酸溶液 0.5mL，Tris- HCl 3.0mL。

6 电泳支持物

同 6.1.2.1 B 主要试剂 4。

C 操作

1、2 步同 6.1.2.1 C 操作中的浸膜、点样。

4 电泳条件 电压 200V，时间 30min，移动方向由负极至正极。

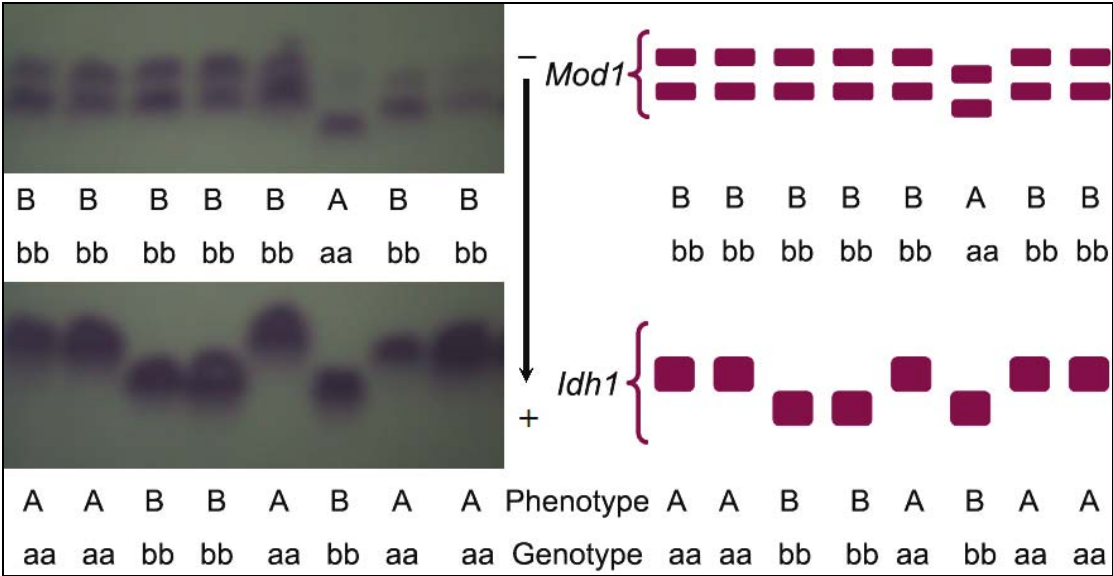
5 染色方法 酶显色板法，适用于醋酸纤维素膜。

6 将新配制的显色液混合，加入 2%热琼脂（40~50℃）3~4mL，迅速混匀，均匀倒在 6×8cm 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。

7 将带膜显色板移至 37℃温箱保温，直至酶区带清晰显现，取出已显色的膜浸入漂洗液中，终止反应。

D 结果

1 电泳结果及模式图见图 10。



2 判断方法 参照电泳图并对照附录 A，对检测结果作出判定。

6.1.2.11 小鼠磷酸葡萄糖转位酶-1 (Phosphoglcomulase-1 *Pgm1*)

A 样品肾匀浆

同 6.1.2.6 中 A 样品肾匀浆制备。

B 主要试剂

1 Tris-甘氨酸缓冲液—Glycine pH 8.5

同 6.1.2.2 B 主要试剂 1。

2 漂洗液

同 6.1.2.1 B 主要试剂 3。

3 显色液

准确称取葡萄糖-6-磷酸 15mg，醋酸镁 10mg，TPN 2mg，PMS 1mg，MTT 2mg，葡萄糖-1,6-二磷酸 5mg，葡萄糖-6 磷酸脱氢酶 70 μg，加入 Tris-HCl(pH 8.0) 3.0mL。

4 电泳支持物

同 6.1.2.1 B 主要试剂 4。

C 操作

1、2 步同 6.1.2.1 C 操作中的浸膜、点样。

3 电泳条件 电压 200V，时间 35min，移动方向负极至正极。

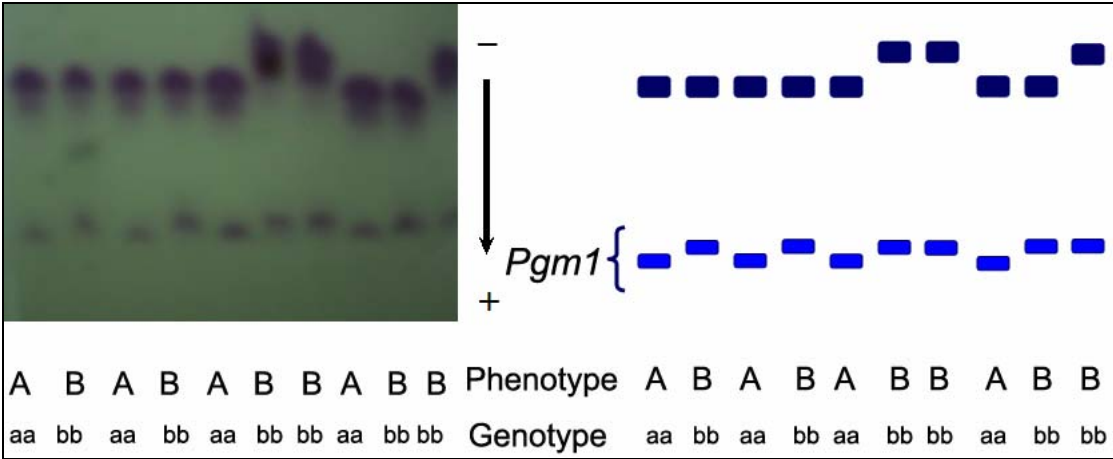
4 染色方法 酶显色板法，适用于醋酸纤维素膜。

5 将新配制的显色液混合，加入 2%热琼脂（40~50℃）3~4mL，迅速混匀，均匀倒在 6×8cm 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。

6 将带膜显色板移至 37℃温箱保温，直至酶区带清晰显现，取出已显色的膜浸入漂洗液中，终止反应。

D 结果

1 电泳结果及模式图见图 11。



2 判断方法 参照电泳图并对照附录 A，对检测结果作出判定。

6.1.2.12 小鼠碱性磷酸酶-1 (Alkaline phosphatase-1 *Akp1*)

A 样品肾匀浆

同 6.1.2.6 中 A 样品肾匀浆制备。

B 主要试剂

1 Tris-柠檬酸缓冲液

准确称取柠檬酸 4.20g，溶于 90mL 蒸馏水，定容至 100mL，再称取 Tris 16.64g，溶于 800mL 蒸馏水中，加入 10%柠檬酸溶液调节 pH 至 8.3，定容至 1000mL。

2 漂洗液

同 6.1.2.1 B 主要试剂 3。

3 显色液

准确称取 β -乙酸萘酯 10mg，坚固蓝 RR 盐 20mg，硫酸镁 20mg，氯化锰 10mg，加入 4.0mL 蒸馏水。

4 电泳支持物

同 6.1.2.1 B 主要试剂 4。

C 操作

1、2 步同 6.1.2.1 C 操作中的浸膜、点样。

3 电泳条件 电压 200V，时间 35min，移动方向由负极至正极。

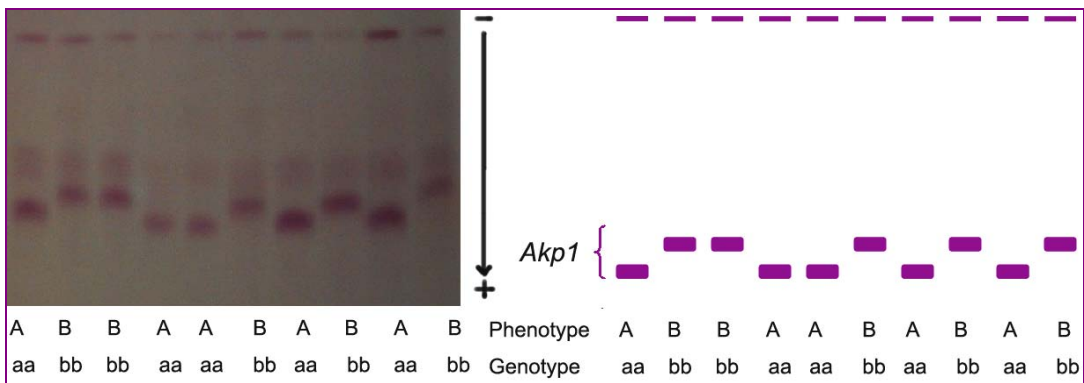
4 染色方法 酶显色板法，适用于醋酸纤维素膜。

5 将新配制的显色液混合，加 2%热琼脂（40~50℃）3~4mL，迅速混匀，均匀倒在 6×8cm 的玻璃板上，制成酶显色板。

6 将带膜显色板移至 37℃温箱保温，直至酶区带清晰显现，取出已显色的膜浸入漂洗液中，终止反应。

D 结果

1 电泳结果及模式图见图 12。



2 判断方法 参照电泳图并对照附录 A，对检测结果作出判定。

6.1.2.13 大鼠碱性磷酸酶-1 (Alkaline Phosphatase-1 *Akp1*)

A 样品肾匀浆

同 6.1.2.6 中 A 样品肾匀浆制备。

B 主要试剂

1 Tris-硼酸缓冲液 pH 7.6

准确称取 Tris 1.81g, Na₂EDTA 1.86g, 硼酸 0.33g, 氯化镁 2.03g, 加入 8000mL 蒸馏水，定容至 1000mL。

2 Tris-盐酸缓冲液

同 6.1.2.10 B 主要试剂 2。

3 0.2mol/L 氯化锰溶液

准确称取氯化锰 2.52g，溶于 80mL 蒸馏水中，定容至 100mL。

4 漂洗液

同 6.1.2.1 B 主要试剂 3。

5 显色液

准确称取 β 磷酸萘酯 10mg，坚固蓝 RR 盐 10mg，加入 0.2mol/L 氯化锰溶液 0.1mL，加入 Tris-HCl (pH8.0) 3mL。

6 电泳支持物

同 6.1.2.1 B 主要试剂 4。

C 操作

1、2 步同 6.1.2.1 C 操作中的浸膜、点样。

3 电泳条件 电压 200V，时间 35min，移动方向由负极至正极。

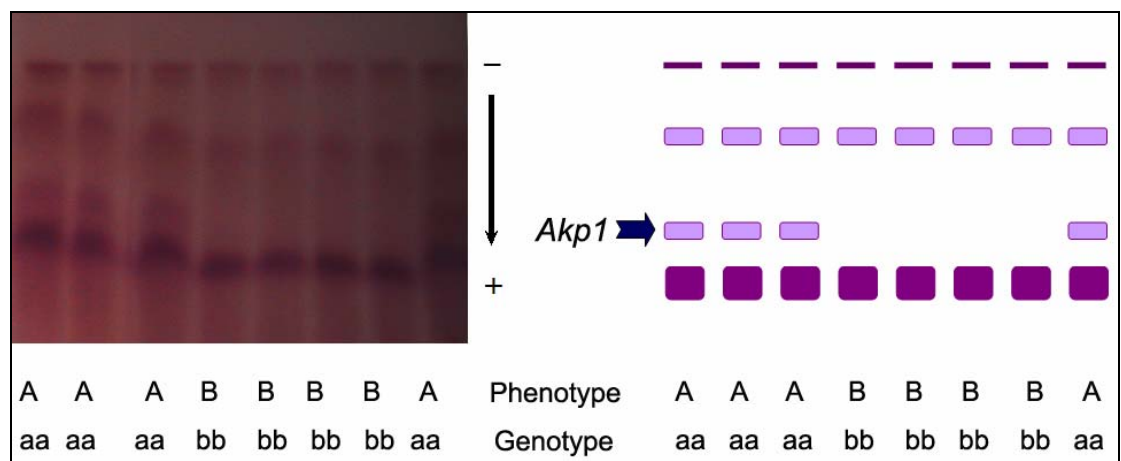
4 染色方法 酶显色板法，适用于醋酸纤维素膜。

5 将新配制的显色液混合，加入 2%热琼脂（40~50℃）3~4mL，迅速混匀，均匀倒在 6×8cm 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。

6 将带膜显色板移至 37℃温箱保温，直至酶区带清晰显现，取出已显色的膜浸入漂洗液中（每次 5~10min），终止反应。

D 结果

1 电泳结果及模式图见图 13。



2 判断方法 参照电泳图并对照附录 B，对检测结果作出判定。

6. 1. 2. 14 大鼠过氧化氢酶 (Catalase Cs)

A 样品溶血素

同 6. 1. 2. 1 中 A 样品溶血素制备。

B 主要试剂

1 Tris-硼酸缓冲液 pH 8.4

准确称取 Tris 10.90g, EDTA 0.60g, 硼酸 3.10g, 溶于 800ml 蒸馏水中, 定容至 1000mL。

2 显色液

准确称取三氯化铁 1.00g, 溶于 90mL 蒸馏水中, 定容至 100mL, 制成 1%三氯化铁溶液; 称取 1.00g 铁氰化钾溶于 90mL 蒸馏水中, 定容至 100mL, 配制成 1%铁氰化钾溶液, 显色前各取 4mL 混合后使用。

3 电泳支持物

同 6. 1. 2. 1 B 主要试剂 4。

C 操作

1、2 步同 6. 1. 2. 1 C 操作中的浸膜、点样。

3 电泳条件 电压 200V, 时间 30min, 移动方向由负极至正极。

4 染色方法 酶显色板法, 适用于醋酸纤维素膜。

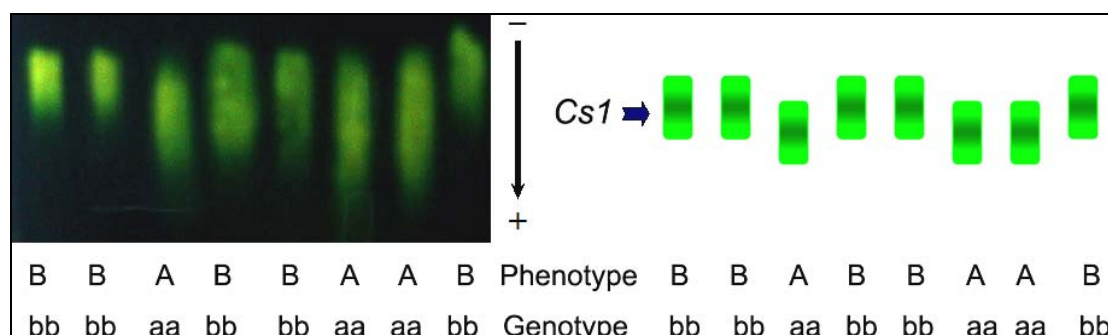
5 电泳后将膜浸入 3%的双氧水中 1min, 再用蒸馏水漂洗一次, 贴在酶显色板上, 酶带立即显现, 带型呈黄色, 底面为绿色。此时可以读出结果。

6 将新配制的显色液混合, 加 2%热 (40~50℃) 琼脂 3~4mL, 迅速混匀、均匀

倒在 6×8cm 的玻璃板上，制成酶显色板。

D 结果

1 电泳结果及模式图见图 14。



2 判断方法 参照电泳图并对照附录 B，对检测结果作出判定。

6.1.2.15 大鼠酯酶-3 (Esterase-3 *Es3*)

A 样品小肠组织匀浆

小肠匀浆的制备CO₂气体麻醉法处死动物，解剖取小肠一段（8~10cm）。按蒸馏水与肠组织 3: 1（v/w）的比例。加入预冷蒸馏水，以组织匀浆器匀浆，置低温高速离心机中，16000r/min，30min。以吸管吸取上清液存入小试管中备用。

B 主要试剂

1 Tris-硼酸缓冲液 pH 8.4

同 6.1.2.14 B 主要试剂 1。

2 0.02mol/L 磷酸缓冲液（pH 6.8）

准确称取磷酸氢二钠 8.63g，磷酸二氢钾 3.77g 溶于 900mL 蒸馏水中定容至 1000 mL。

3 漂洗液

准确量取 25mL 冰醋酸，加入蒸馏水定容至 500mL。

4 显色液

准确称取 β-乙酸萘酯 10mg，坚固蓝 RR 盐 50mg，加入丙酮 05.ml，加入 0.02mol/L 磷酸缓冲液（pH 6.8）10mL，过滤后使用。

5 电泳支持物

醋酸纤维素膜或硬膜。

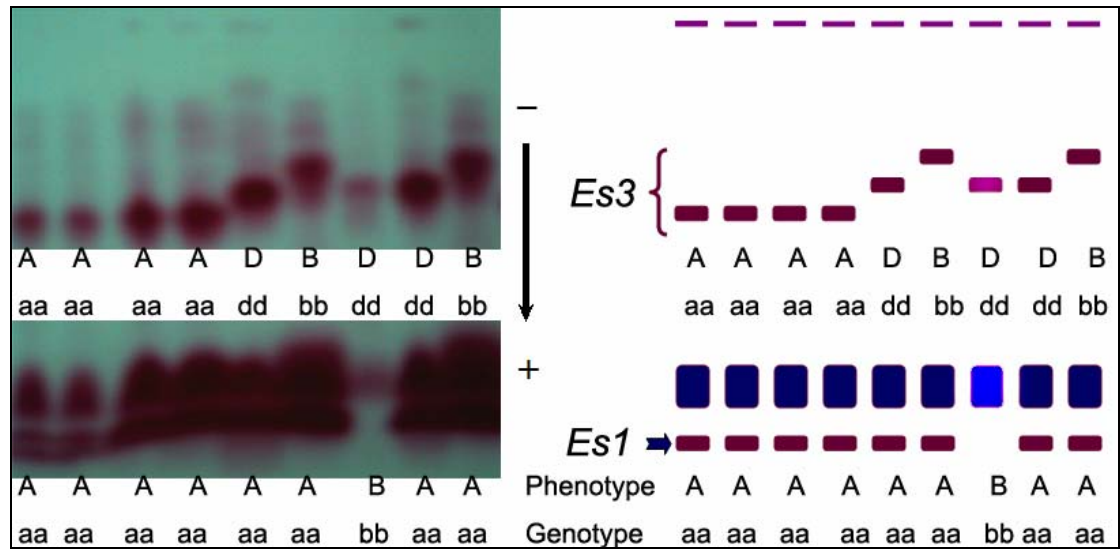
C 操作

1、2 步同 6.1.2.1 C 操作中的浸膜、点样。

- 3 电泳条件 电压 200V，时间 35min，移动方向由负极至正极。
- 4 染色方法 酶显色板法，适用于醋酸纤维素膜。
- 5 将新配制的显色液鲜混合，加入 2%热琼脂（40~50℃）3~4mL，迅速混匀，均匀倒在 6×8cm 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。
- 6 将带膜显色板移至 37℃温箱保温，直至酶区带清晰显现，取入已显色的膜浸入漂洗液中，终止反应。

D 结果

- 1 电泳结果及模式图见图 15。



- 2 判断方法 参照电泳图并对照附录 B，对检测结果作出判定。

6.1.2.16 大鼠酯酶-1 (Esterase-1 *Es1*)

A 样品小肠匀浆或血清

- 同 6.1.2.15 中小肠匀浆制备。
- 血清制备 用抗凝毛细管进行眼眶静脉取血 100 μL，置离心机，3500~4000r/min，离心 2min，分离血清。

B 主要试剂

- 1 0.02mol/L 磷酸缓冲液 pH 6.8
同 6.1.2.4 B 主要试剂 1。
- 2 漂洗液

同 6.1.2.1 B 主要试剂 3。

3 显色液

同 6.1.2.7 B 主要试剂 3。

4 电泳支持物

同 6.1.2.1 B 主要试剂 4。

C 操作

1、2 步同 6.1.2.1 C 操作中的浸膜、点样。

3 电泳条件 电压 140V，时间 30min，移动方向由负极至正极。

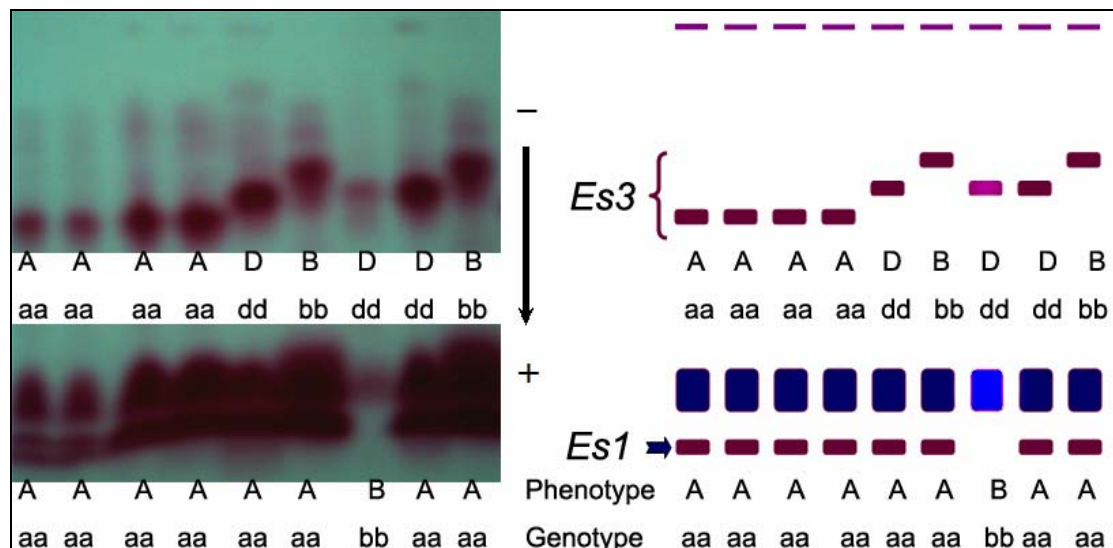
4 染色方法 酶显色板法，适用于醋酸纤维素膜。

5 将新配制的显色液鲜混合，加入 2%热琼脂（40~50℃）3~4mL，迅速混匀，倒在 6×8cm 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。

6 将带膜显色板移至 37℃温箱保温，直至酶区带清晰显现，取出已显色的膜浸入漂洗液中，终止反应。

D 结果

1 电泳结果及模式图见图 16。



2 判断方法 参照电泳图并对照附录 B，对检测结果作出判定。

6.1.2.17 大鼠酯酶-4 (Esterase-4 *Es4*)

A 样品肾匀浆

同 6.1.2.6 中 A 样品肾匀浆制备。

B 主要试剂

1 Tris-硼酸缓冲液 pH 8.4

同 6.1.2.14 B 主要试剂 1。

2 0.02mol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.8)

同 6.1.2.4 B 主要试剂 1。

3 漂洗液

同 6.1.2.1 B 主要试剂 3。

4 显色液

同 6.1.2.7 B 主要试剂 3。

5 电泳支持物

同 6.1.2.15 B 主要试剂 5。

C 操作

1、2 步同 6.1.2.1 C 操作中的浸膜、点样。

3 电泳条件 电压 200V，时间 35min，移动方向由负极至正极。

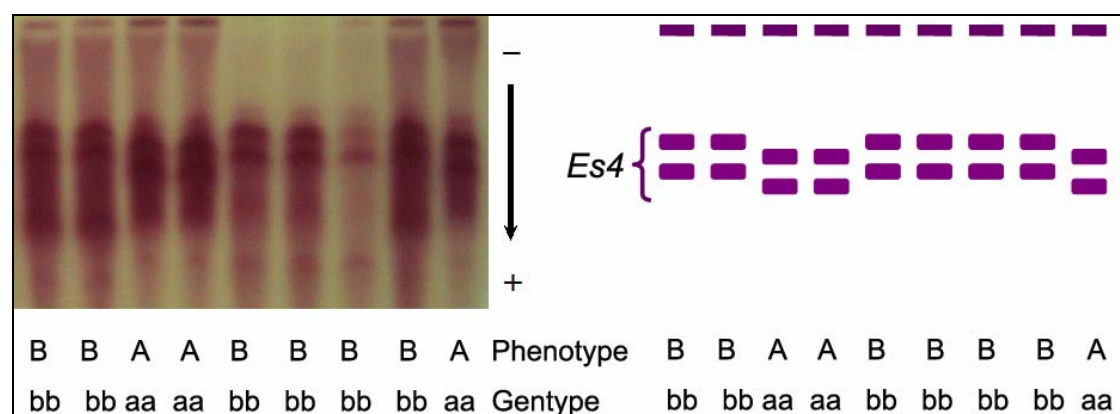
4 染色方法 酶显色板法，适用于醋酸纤维素膜。

5 将新配制的显色液鲜混合，加入 2%热琼脂（40~50℃）3~4mL，迅速混匀，均匀倒置在 6×8cm 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。

6 将带膜显色板移至 37℃温箱保温，直至酶区带清晰显现，取出已显色的膜浸入漂洗液中，终止反应。

D 结果

1 电泳结果及模式图见图 17。



2 判断方法 参照电泳图并对照附录 B，对检测结果作出判定。

6.1.2.18 大鼠酯酶-6.8.9 (Esterase-6.8.9 *Es6.8.9*)

A 样品睾丸匀浆的制备

CO₂麻醉法处死动物，解剖取睾丸1个。按蒸馏水与睾丸组织2:1 (v/w) 的比例。加入预冷蒸馏水，用组织匀浆器匀浆，置低温高速离心机中，16000r/min，30min。以吸管吸取上清液存入小试管中备用。

B 主要试剂

1 Tris-硼酸缓冲液 pH 8.4

同 6.1.2.14 B 主要试剂 1。

2 0.02mol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.8)

同 6.1.2.4 B 主要试剂 1。

3 漂洗液

同 6.1.2.1 B 主要试剂 3。

4 显色液

同 6.1.2.7 B 主要试剂 3。

5 电泳支持物

同 6.1.2.15 B 主要试剂 5。

C 操作

1、2 步同 6.1.2.1 C 操作中的浸膜、点样。

3 电泳条件 电压 200V，时间 35min，移动方向由负极至正极。

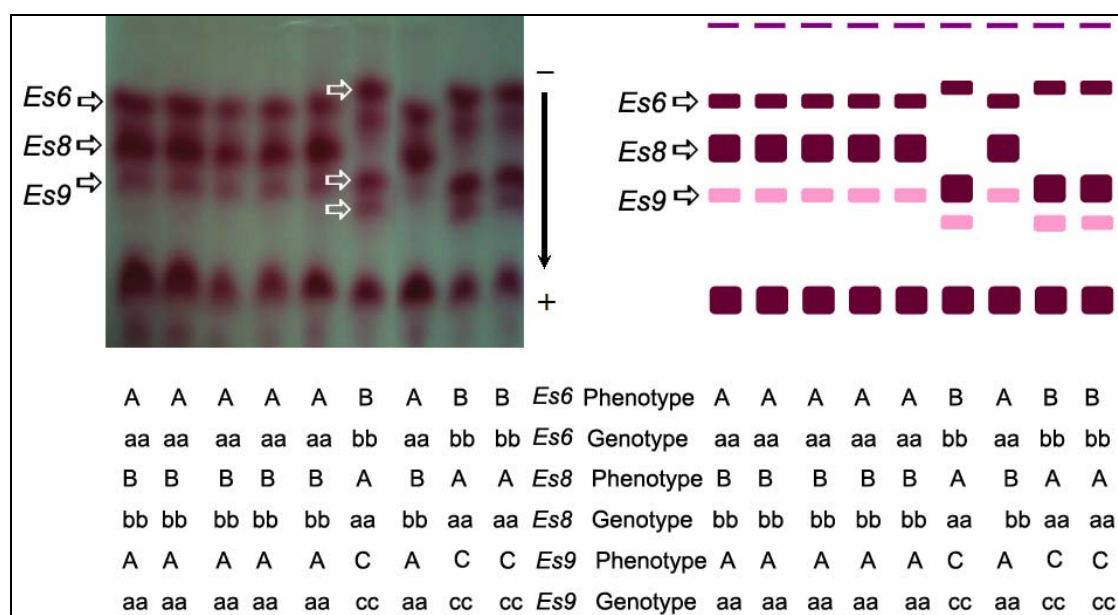
4 染色方法 琼脂覆盖法，适用于醋酸纤维素板。

5 将新配制的显色液鲜混合，加入 2%热琼脂 (40~50℃) 3~4mL，迅速混匀，均匀倒在 6×8cm 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。

6 将带膜显色板移至 37℃温箱保温，直至酶区带清晰显现，取出已显色的膜浸入漂洗液中，终止反应。

D 结果

1 电泳结果及模式图见图 18。



2 判断方法 参照电泳图并对照附录 B，对检测结果作出判定。

6.1.2.19 大鼠酯酶-10 (Esterase-10 *Es10*)

A 样品肺匀浆

肺匀浆的制备CO₂气体麻醉法处死动物，解剖取肺叶 1 叶。按蒸馏水与肺组织 2 : 1 (v/w) 的比例。加入预冷蒸馏水，以组织匀浆器匀浆，低温高速离心机中，16000r/min，30min。以吸管吸取上清液存入小试管中备用。

B 主要试剂

1 Tris-硼酸缓冲液 pH 8.4

同 6.1.2.14 B 主要试剂 1。

2 漂洗液

同 6.1.2.1 B 主要试剂 3。

3 显色液

同 6.1.2.7 B 主要试剂 3。

4 电泳支持物

同 6.1.2.1 B 主要试剂 4。

C 操作

1、2 步同 6.1.2.1 C 操作中的浸膜、点样。

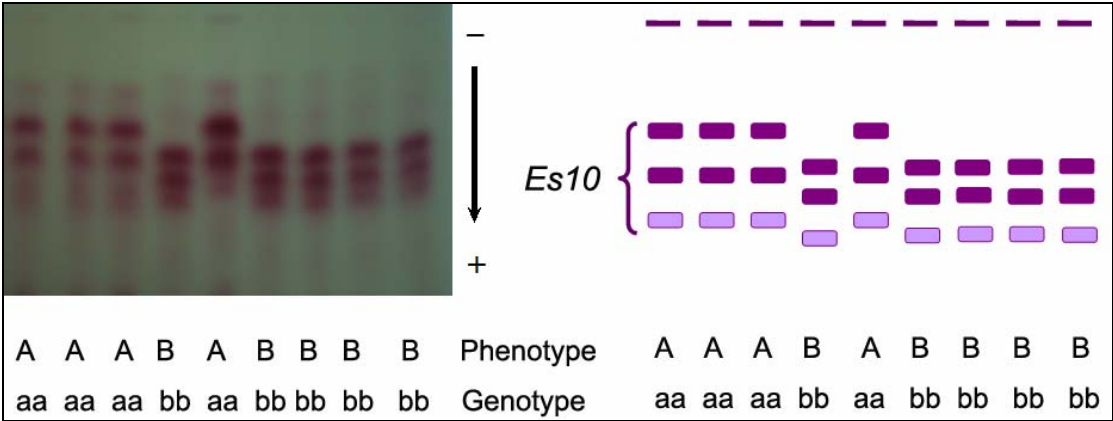
3 电泳条件 电压 200V，时间 35min，移动方向由负极至正极。

4 染色方法 酶显色板法，适用于醋酸纤维素膜。

- 5 将新配制的显色液鲜混合，加入 2%热琼脂（40~50℃）3~4mL，迅速混匀，倒在 6×8cm 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。
- 6 将带膜显色板移至 37℃温箱保温，直至酶区带清晰显现，取出已显色的膜浸入漂洗液中，终止反应。

D 结果

1 电泳结果及模式图见图 19 。



2 判断方法参照电泳图并对照附录 B，对检测结果作出判定。

6.1.3 小鼠 H-2 免疫学标记基因检测方法

6.1.3.1 试剂和仪器

A 单克隆抗体

实验所用的单克隆抗体 H-2Db(27-11-13)、H-2Dd(34-5-8S)、H-2Dk(15-5-5.3)、H-2Kk(16-3.22.4)均由 Southern Biotechnology Associates, Inc 公司生产，由晶美生物工程有限公司北京部订购。

B 补体

取 2~3 周龄新西兰仔兔，取其动脉血，4℃ 冰箱静置 12h，3000r/min 离心 15min 分离血清，筛选不致脾细胞死亡的兔血清，分装，-70℃低温冰箱保存。

C 主要试剂

1 PBS 缓冲液 pH7.2

准确称取磷酸二氢钠 1.27g，磷酸二氢钾 0.21g，氯化钠 3.40g，溶于 300mL 蒸馏水中，定容至 500mL。

2 Hank' s 液（10 倍浓缩）

准确称取氯化钠 8.00g, 硫酸镁 0.41g, 氯化钾 0.40g, 磷酸二氢钾 0.10g, 碳酸氢钠 1.27g, 葡萄糖 2.00g, 溶于 80mL 蒸馏水中, 定容至 100mL。

3 伊红染色液 (6%)

准确称取曙红 B(水溶性) 0.60g, 溶于 8ml 蒸馏水中定容至 10 mL。

4 甲醛溶液(10%)

准确量取甲醛 1 mL, 加入蒸馏水 8mL, 定容至 10mL。

D 仪器

离心机 (500~4000r/min)、倒置显微镜 (低倍)、37℃恒温水浴箱

E 操作

- 1 取待检小鼠脾剥去脂肪等附着物。
- 2 置于盛有 1mL 10% 小牛血清 (9mL PBS, 1mL 小牛血清) 的平皿中, 用小镊子撕碎。
- 3 将此混合物转移至离心管中, 再用 1mL 10% 小牛血清清洗平皿转移至同一离心管中, 静置 15min。
- 4 吸上清于另一离心管中, 弃去沉淀。
- 5 离心上清液, 3000r/min 离心 5min。
- 6 弃掉上清液, 保留沉淀。在沉淀中加入 4.5 mL 蒸馏水用吸管充分吸打搅匀从加入蒸馏水时严格计时, 40s 后加入 0.5 mL Hank's 液, 用吸管充分吸打搅匀, 静置 10min。
- 7 吸上清于另一离心管中, 弃掉下部沉淀团块。
- 8 离心上清液, 3000r/min 离心 5min。
- 9 弃掉上清液, 保留沉淀。在沉淀中加入 0.5mL 20% 小牛血清 (8mL PBS, 2mL 小牛血清)。
- 10 细胞记数, 使细胞终浓度为 $(1\sim5) \times 10^6/\text{mL}$ 。
- 11 采用 2.0mL 离心管, 每一动物品系均设立空白对照和补体对照。
- 12 每管中加入 20 μL 充分摇匀的细胞悬液, 然后加入 20 μL 抗体 (对照管中只加 20% 小牛血清) 充分摇匀, 37℃ 水浴中保温 15min。
- 13 每管加 30 μL 补体 (用 20% 小牛血清 2 倍稀释), 空白对照只加 20% 小牛血清, 37℃ 水浴中反应 30~40min。

14 每管中加入 20 μ L Eosin（伊红）染色液（6%Eosin 用 20%小牛血清等倍稀释）37℃保温 10min。

15 加入 20 μ L 10%甲醛（固定液）以提高实验结果的稳定性。

16 摇匀，从每管中取细胞悬液 10 μ L 加在细胞板上，在倒置显微镜下观察结果。

17 实验结果评定

阳性细胞（死亡细胞）体积较大，伊红着色后失去折光性，阴性细胞（仍存活细胞）不着色，体积较小，而有折光性

死亡细胞（%）	<10%	10%~20%	20%~40%	40~%60%	>60%
反应强度	阴性	可疑阴性	可疑阳性	弱阳性	强阳性
反应级别	0	2（+）	4（+）	6（+）	8（+）

在倒置显微镜下观察，死亡细胞数超过 60%判定为阳性。

6.1.4 其他

6.1.4.1 有明确规定的，按有关规定执行。如命名等。

6.1.4.2 有些生物学特性并非经过测定而是研究者通过观察得到的，如转基因动物和突变动物的异常表型等。

6.1.4.3 有些数据是明确的，如基因修饰动物的遗传背景等，这些数据可直接引用。

6.2 生理数据

生理数据共包括 8 组数据。是实验动物生物学特性描述的主要数据群，也是实际中经常需要参考和使用的背景数据。本技术规程仅对其中涉及啮齿类实验动物生理数据的“必需数据”的测定进行描述。

6.2.1 样品采集

6.2.1.1 血液

①采血前一般要求禁食 12h。

②核对动物的性别、年龄等基本信息。（注：应先测量体重、体长等信息后再行血液采集操作），采血前动物麻醉用巴比妥钠（45mg/kg），腹腔注射或加甲氧氯

烷吸入麻醉。

③采血途径

小鼠、大鼠可通过眼眶后静脉丛、眶动脉或眶静脉取血。

豚鼠、地鼠可通过眼眶后静脉丛、眶动脉、眶静脉或心脏取血。

④尽量避免血液与空气接触，并尽快检测，以保证血液 pH 测定数据的准确。

⑤用注射器采血时，应在采血后将针头取下，再将血液沿容器壁缓慢注入容器内。切勿用力过猛造成溶血。

6.2.1.2 精液

①采用医源性穿刺储精囊法采集精液，采集时的室温应为 37℃。

②动物麻醉用巴比妥钠（45mg/kg），腹腔注射或加甲氧氯烷吸入麻醉。

③在尾根至剑突中线下 10cm（大鼠、豚鼠、地鼠为 20cm）处的 3~4mm，用注射器针头刺入腹腔 30° 角，水平直刺到储精囊抽取。

6.2.1.3 阴道液

①将消毒细棉签用生理盐水润湿，轻轻插入动物阴道内 0.5cm，慢慢转动一下取出。

②把带有阴道内含物的细棉签在载玻片上均匀转动作成涂片。

③然后将涂片在空气中自然干燥。

④用碱性美蓝溶液染色 5min，用蒸馏水冲洗剩余的美蓝溶液，注意：应从涂片边缘慢慢冲洗，切勿把细胞冲掉（碱性美蓝溶液的配制：取美蓝 0.3g，溶于 95%乙醇 30mL 中，再加蒸馏水 100mL 及 10%氢氧化钠水溶液 0.1mL）。

⑤使之干燥。

6.2.2 分析仪器性能检查

无论使用半自动还是全自动血液分析仪，进行测定前按照仪器使用规程进行自检，仪器各项指标正常后方可进行测定。而且，质控标准品数值在正常范围内，测定的数值才能有效。

6.2.3 血液生理指标（必须数据）测定技术

啮齿类动物血液生理指标包括 19 项，其中红血球数（RBC）、平均红细胞体积（MCV）、血红蛋白（Hb）、白细胞计数、嗜中性白细胞（NE）、嗜酸性白细胞（EO）、嗜碱性白细胞（BA）、淋巴细胞（LY）、单核细胞（MO）为必须数据。其他指标为

丰富性数据。下面以使用半自动血液分析仪为例，描述必须数据的测定技术。

6.2.3.1 仪器 以日本光电 MEK-5108K 半自动血液分析仪为例。

6.2.3.2 试剂 日本光电稀释液 DH640、日本光电清洗液 DH520 和日本光电溶血剂 DH651

6.2.3.3 接通电源。

6.2.3.4 开机。

6.2.3.5 机器自动清洗。

6.2.3.6 选择程序：大鼠、小鼠或其他。

6.2.3.7 先将抗凝全血 20 μ L 接入 10mL 稀释液，混匀，此为 500 倍稀释液 A。

6.2.3.8 再取 20 μ L 500 倍稀释液 A 接入 10mL 稀释液，混匀，此为 100000 倍稀释液 B。

6.2.3.9 在 500 倍稀释液 A 中滴入 5 滴溶血剂，立即充分混匀。

6.2.3.10 将 500 倍稀释液 A（已滴加溶血剂）和 10000 倍稀释液 B 同时置于机器上，测定。

具体测定方法根据生理指标测定仪器和所用的试剂有所不同，各实验室应采用标准测定方法，制定详细的操作规程。

6.2.4 生殖生理参数测定

6.2.4.1 精液

A 精子的活力测定 测定时的室温应为 37℃。

1 用玻璃棒蘸取新鲜精液或用 0.9%NaCl 稀释精液，滴在玻片上。

2 加上盖玻片，中间不要有气泡。

3 用暗视野进行观察，统计精子 3 种运动（直线前进运动、旋转运动和振摆运动）的情况。

4 计算直线前进运动精子数与精子总数的比值。

B 精子计数

取重碳酸钠稀释液将精液作等倍数的稀释，破坏其粘稠性并用甲醛固定精子，混匀后滴入计数池，显微镜下计数。

6.2.4.2 阴道液

①在显微镜下观察阴道涂片的组织学变化，确定动情周期的不同阶段。

②发情前期可见大量脱落的有核上皮细胞（多呈卵圆形）。

③发情期可见很多大而扁平边缘不整齐的无核角化鳞状细胞没有白细胞及上皮细胞。

④发情后期角化上皮细胞减少并出现有核上皮细胞和白细胞。发情间期有白细胞及黏液。

6.2.4.3 性成熟

①从动物出生 4 周龄后开始雄鼠采集精液（方法同 6.2.1.2），雌鼠采集阴道液（方法同 6.2.1.3）。

②雄鼠精液内开始出现直线前进运动的精子，即为体成熟，描述为 $\bar{X} \pm S$ 。；雌鼠阴道液中仅有角化上皮细胞或有核上皮细胞和角化上皮细胞混在，阴道口呈白色干燥状态，即为体成熟，描述为 $\bar{X} \pm S$ 。

6.2.4.4 妊娠期

①第一天，将雌雄鼠同居进行交配。

②第二天早晨观察雌鼠是否出现阴道栓，如果出现即为妊娠期第一天。

③观察至小鼠出生日，即为妊娠期最后一天，计算总天数，即为整个妊娠期。妊娠期描述为 $\bar{X} \pm S$ 。

6.2.4.5 哺乳期

将小鼠（大鼠、地鼠或豚鼠）出生日计为哺乳期第一天，第 21 天，将小鼠（大鼠、地鼠或豚鼠）幼仔与母鼠隔离并喂以鼠粮，此记为哺乳期最后一天。

6.2.4.6 生产指数测定雌性动物第 3 胎所产的全部仔数，至少测 30 窝，求出每窝平均产仔数。

6.2.5 免疫生理参数测定技术（IgG 和 IgM）

6.2.5.1 免疫球蛋白标准曲线制备

①将冻干的标准参考血清用 0.5mL 蒸馏水溶解，再用生理盐水按说明书的要求，稀释成不同浓度，分别滴入相应的抗体琼脂板孔内，每孔 10μL。

②置湿盒内，经 37℃ 扩散 48h 后，测定沉淀直径。

③以不同稀释度标准含量为纵坐标，沉淀环直径为横坐标，在半对数坐标纸上绘制标准曲线。

6.2.5.2 待检血清浓度测定

①单价免疫球蛋白抗血清琼脂板制备：将 8g/L 琼脂糖凝胶水浴加热溶化，待琼脂凉到 56℃左右时，加入适量抗血清（按说明书所标明的稀释度比例加入），轻轻摇匀，立即倒在洁净的玻璃板上，每平方厘米玻板加琼脂约 0.15~0.20mL，凝固后打孔，孔径 3mm，孔距 1.2cm。

②标本稀释：待检血清按所测免疫球蛋白的种类不同，稀释倍数不同。测 IgG 按 1:50 稀释，测 IgM 按 1:4 稀释。稀释待检血清常用生理盐水。

③加样 将稀释之待检血清用微量加样器准确吸入 10μL，加入相应的琼脂板小孔内。

④温浴 将已经加样的琼脂板放在湿盒内，置 37℃温箱孵育 48min。

⑤测量 量取各种免疫球蛋白沉淀环直径（如果条件允许，可在暗室内将照相纸放在琼脂板下，曝光后印成照片，然后量取沉淀环直径）。根据抗原抗体比例适当时出现沉淀环最清晰明显的原则，选择最适的沉淀环。

6.2.5.3 结果判定 根据标本沉淀环直径大小，在相应的标准曲线上查出免疫球蛋白含量单位为（mg/dL），乘以血清稀释倍数即为标准血清 Ig 浓度。

6.2.6 生长发育生理参数

6.2.6.1 出生体重的测定，测定雌性动物第 3 胎所产的全部仔数，至少测 30 窝

①动物出生 2 天内进行测定，测定前后均不换窝。

②称重时用镊子夹取仔鼠在天平上称重。

③统计平均体重。出生体重以天表示，描述为 $\bar{X} \pm S$ 。

6.2.6.2 离乳体重的测定

①对测定出生体重时所选择的动物种群进行离乳体重的测定。

②动物出生 21 天时进行测定。

③称重时用镊子夹取仔鼠在天平上称重。

④统计平均体重。离乳体重以天表示，描述为 $\bar{X} \pm S$

6.2.6.3 成年体重

①对测定出生体重时所选择的动物种群进行成年体重的测定。

②测定 8 周龄大、小鼠和豚鼠体重，4 周龄地鼠体重。

③将动物置于烧杯内，在电子天平上测量。

④统计平均体重。成年体重描述为 $\bar{X} \pm S$ 。

6.2.6.4 生长曲线

①对测定出生体重时所选择的动物种群绘制生长曲线。

②于动物出生后的第 1、3、5、7、14、21、28 天测定体重，28 天以后每周测定一次体重至第 8 周，第 8 周以后每两周测定一次体重至第 12 周

④以时间（天）为横坐标，体重（Kg）为纵坐标绘制生长曲线。

6.3 生化数据

生化数据共包括血液和尿液 2 组数据，是实验动物生物学特性描述的主要数据群，也是实际中经常需要参考和使用的背景数据。本技术规程仅对其中涉及啮齿类实验动物生化数据的“必需数据”的测定技术进行描述。

血液生化指标一般指血清指标，对使用血浆得到的数据应注明使用的抗凝剂。

6.3.1 样品采集

6.3.1.1 血液样品的采集

①采血前一般要求禁食 12h。

②核对动物的性别、年龄等基本信息。（注：应先测量体重、体长等数据后在行血液采集操作）采血前动物麻醉用巴比妥钠（45mg/kg），腹腔注射或加甲氧氯烷吸入麻醉。

③采血途径

小鼠、大鼠可通过眼眶后静脉丛、眶动脉或眶静脉取血。

豚鼠、地鼠可通过眼眶后静脉丛、眶动脉、眶静脉或心脏取血。

④尽量避免血液与空气接触，并尽快检测，以保证血液 pH 测定数据的准确。

⑤用注射器采血时，应在采血后将针头取下，在将血液沿容器壁缓慢注入容器内。切勿用力过猛造成溶血。（注：有些物质如 K^+ 、AST 等在红细胞内的浓度高于血浆，如溶血可引起测定数据的错误）

⑥采血后应尽快分离血清（浆）。采血后在室温下静止 0.5h，然后 3000r/min 离

心 5min 得到血清（浆）。

⑦血清（浆）样本放 4℃ 保存，当天测完；否则，应放-20℃~-70℃ 保存，一个月内测完。

⑧为了保证酶活性，减少其他指标的降解，应避免反复冻融。

6.3.1.2 尿液样品的采集

①动物麻醉 将动物置于一个密闭容器内，通入CO₂气体，观察动物逐渐地由兴奋转为抑制，自动倒下，四肢肌张力下降即可。

②动物固定 用左手拇指和食指抓住已经麻醉的动物的两耳和颈部皮肤。

③采用强制采尿法采集尿液，用右手拇指和食指用力按压动物两侧腰背部或轻轻压迫膀胱，直至流出尿液。

④如不成功可用细小导尿管或塑料管缓慢插入尿道至膀胱进行导尿。

6.3.2 分析仪器性能检查

无论使用手动生化测定仪还是自动生化测定仪，进行测定前按照仪器使用规程进行自检，仪器各项指标正常后方可进行测定。而且，质控标准品数值在正常范围内，测定的数值才能有效。

6.3.3 血液生化指标（必须数据）测定

啮齿类动物血液生化指标 15 项，其中门冬氨酸氨基转氨酶（AST）、丙氨酸氨基转氨酶（ALT）、肌苷（CRE）、尿素氮（BUN）、总胆固醇（TCH）、血清总蛋白（TP）、白蛋白（ALB）、甘油三脂（TG）、血糖（GLU）为必须数据，其他指标为丰富性数据。

注意：由于血糖在全血中降解速度比较快应在采血后 1h 内分离血清，完成测定。

下面以全自动生化分析仪为例，描述必须数据的测定技术。

6.3.3.1 仪器 全自动生化分析仪。

6.3.3.2 试剂 生化指标检测试剂盒。

6.3.3.3 接通电源。

6.3.3.4 开机。

6.3.3.5 仪器自检。

6.3.3.6 选择程序确定测定指标数，门冬氨酸氨基转氨酶（AST）、丙氨酸氨基转氨酶（ALT）、肌苷（CRE）、尿素氮（BUN）、总胆固醇（TCH）、血清总蛋白（TP）、

白蛋白 (ALB)、甘油三脂 (TG)、血糖 (GLU) 等。

6.2.3.7 将血清离心管置于样品孔内，启动检测。

具体测定方法根据生化测定仪器和所用的试剂有所不同，各实验室应采用标准测定方法，制定详细的操作规程。

6.3.4 尿液生化指标（必须数据）测定

啮齿类动物尿生化指标 6 项，其中尿比重和尿蛋白为必须数据，其他为丰富性数据。无论使用半自动还是全自动尿液分析仪，进行测定前按照仪器使用规程进行自检，仪器各项指标正常后方可进行测定。而且，质控标准品数值在正常范围内，测定的数值才能有效。

注意：尿比重和尿蛋白指标是必须数据。尿蛋白的数据应收集 24h 总尿量进行测定，可表示为 mg/24h。

具体测定方法根据生理指标测定仪器和所用的试剂有所不同，各实验室应采用标准测定方法，制定详细的操作规程。

6.4 解剖数据

解剖数据共包括 6 组数据。是一类直接描述动物体征的主要数据群，也是实际中经常需要参考和使用的基础数据。

解剖数据对某些动物来讲具有鉴别意义。本技术规程仅对其中涉及啮齿类实验动物解剖数据的“必须数据”的测定技术进行描述。

6.4.1 基本要求

6.4.1.1 解剖前应禁食 12h 左右（不禁水）。禁食既是取血测定生化指标的需要，也是避免对称重的影响。

6.4.1.2 应在采血后采集内脏器官。用 CO₂ 气体麻醉法处死动物。

6.4.1.3 解剖后脏器要迅速称重，以免水分蒸发造成差异，特别是对肾上腺、卵巢等小器官称重时更应注意。

6.4.2 脏器重量

6.4.2.1 动物解剖前应禁食 12h 左右（不禁水）一方面解剖前常取血测生化指标需要禁食，另一方面禁食后动物体重不受食物的影响。

- 6.4.2.2 准备手术器械和试剂，包括手术剪（备有不同型号）、手术镊、平皿、酒精棉、生理盐水。
- 6.4.2.3 动物处死原则是处死时间短，尽量减少实验动物死亡过程中的挣扎和人为损伤，避免处死方法不当而人为造成脏器及细胞形态改变。
- CO₂气体麻醉法处死动物 将动物置于一个密闭容器内，通入CO₂气体，观察动物逐渐地由兴奋转为抑制，自动倒下，四肢肌张力下降即可。
- 6.4.2.4 将动物仰卧固定于解剖台上，用酒精棉消毒胸腹部。
- 6.4.2.5 用镊子提起动物腹部表皮，用大手术剪沿正中线剪开皮肤和腹壁肌肉，更换小手术剪。
- 6.4.2.6 腹腔器官取出的顺序一般是脾、肝、胃、肠、肾上腺、肾、卵巢/睾丸。
- 6.4.2.7 剪断两侧肋骨和膈肌，暴露胸腔，从喉头以上剪断气管，沿食道后壁分离，剪断食管同胃连接处，将胸腔脏器一并取出，依次剥离胸腺、肺、心。
- 6.4.2.8 解剖后脏器要迅速称重，以免水分蒸发造成差异，特别是对肾上腺、卵巢等小器官称重时更应注意。
- 6.4.2.9 脏器称重前应将周围脂肪、结缔组织除尽，并用滤纸吸去脏器表面的血液及体液，对腔性器官也应除尽腔内液体。
- 6.4.1.10 天平的精度应与动物大小相对应，如小鼠大的脏器用精确度千分之一的天平，小的脏器用万分之一的天平。

6.4.3 肠道长度的测量

- 6.4.3.1 应从胃幽门处至肛门处剖取所有肠段。
- 6.4.3.2 将全部肠段置于盛有生理盐水的平皿中。
- 6.4.3.3 在硫酸纸上用小镊子将肠展开，20个肠段为一组同时测量长度。
- 6.4.3.4 分别测量大鼠、小鼠、豚鼠和地鼠的小肠（兔、犬和猴则将小肠细分为十二指肠、空肠和回肠）、结肠、盲肠、直肠。整个测量过程由一人操作，测量时，应避免人为的过度展开或展开不充分而造成测量数据的不准确。

附 录 A

表 2-1 小鼠常用品系生化位点遗传概貌

Strain	Loci						
	<i>Car2</i>	<i>Es1</i>	<i>Es3</i>	<i>Gpd1</i>	<i>Gpi1</i>	<i>Hbb</i>	<i>Idh1</i>
A	b	b	c	b	a	d	a
AKR/J	a	b	c	b	a	d	b
C3H/He	b	b	c	b	b	d	a
C57BL/6	a	a	a	a	b	s	a
CBA/J	b	b	c	b	b	d	b
CBA/Ola	a	b	c	b	b	d	b
BALB/c	b	b	a	b	a	d	a
DBA/1	a	b	c	a	a	d	b
DBA/2	b	b	c	b	a	d	b
615	a	b	c	b	a	s	a
TA1	b	a	a	b	a	s	a
TA2	a	b	c	b	b	d	a

表 2-1 小鼠常用品系生化位点遗传概貌（续）

Strain	Loci						
	<i>Trf</i>	<i>Ce2</i>	<i>Es10</i>	<i>Mod1</i>	<i>Mup1</i>	<i>Pgm1</i>	<i>Akp</i>
A	b	a	a	a	a	a	b
AKR/J	b	b	b	b	a	a	—
C3H/He	b	b	b	a	a	b	b
C57BL/6	b	a	a	b	b	a	a
CBA/J	a	b	b	b	a	a	a
CBA/Ola	a	b	b	b	a	b	—
BALB/c	b	a	a	a	a	a	b
DBA/1	b	b	b	a	a	b	a
DBA/2	b	a	b	a	a	b	a
615	b	b	a	b	b	b	a
TA1	b	b	b	b	b	a	b
TA2	b	b	a	b	b	b	b

附 录 B

表 2-2 大鼠常用品系生化位点遗传概貌

Strain	Loci								
	<i>Akp1</i>	<i>Cs</i>	<i>Es3</i>	<i>Es4</i>	<i>Es6</i>	<i>Es8</i>	<i>Es9</i>	<i>Es10</i>	<i>Es1</i>
F344/N	a	a	a	b	a	b	a	a	a
LOU/c	a	a	a	b	b	b	a	a	a
SHR/Ola	a	b	b	a	a	b	a	a	a
WKY/Ola	b	b	d	b	a	a	c	b	a
LEW/M	a	a	d	b	a	b	c	a	a
ACI	b	a	a	b	b	b	a	a	b

附 录 C

化学试剂英文缩写与中文对照

英文名称（或简写）	中文名称	规 格
Tris	三羟甲基氨基甲烷	A.R.or.C.P.
EDTA	乙二胺四乙酸	A.R.or.C.P.
Boric Acid	硼酸	A.R.or.C.P.
Glycine	甘氨酸	A.R.or.C.P.
HCl	盐酸	A.R.or.C.P.
H ₂ O ₂	双氧水	A.R.or.C.P.
Citrate acid	柠檬酸	A.R.or.C.P.
Na ₂ HPO ₄	磷酸氢二钠	A.R.or.C.P.
KH ₂ PO ₄	磷酸二氢钾	A.R.or.C.P.
NaOH	氢氧化钠	A.R.or.C.P.
NaC ₂ H ₃ O ₂	无水醋酸钠	A.R.or.C.P.
Agar	琼脂粉	A.R.or.C.P.
Mg(C ₂ H ₃ O ₂) ₂	醋酸镁	A.R.or.C.P.
MnCl ₂	氯化锰	A.R.
Ponceau S	丽春红-S	A.R.
CCl ₃ COOH	三氯乙酸	A.R.or.C.P.
Barbital	巴比妥	A.R.or.C.P.
Sodium barbital	巴比妥钠	A.R.or.C.P.
MgCl ₂	氯化镁	A.R.or.C.P.
Na ₂ EDTA	乙二胺四乙酸二钠	A.R.or.C.P.
FeCl ₃	三氯化铁	A.R.or.C.P.
K ₃ [Fe(CN) ₆]	铁氰化钾	A.R.or.C.P.
NH ₄ OH	氨水	A.R.or.C.P.
CH ₃ COOH	醋酸	A.R.or.C.P.
Acetone	丙酮	A.R.or.C.P.
Glucose-1-phosphate	葡萄糖-1-磷酸	进口或国产
Cystamine	胱胺	进口或国产
1,4-Dithiothreitol (DTT)	二巯苏糖醇	进口或国产
β-Naphthyl acetate	β-醋酸萘酚	进口或国产
4-Methyl-Umbelliferyl Acetate	4-甲基伞形乙酸盐	进口或国产
α-Naphthyl Acid Phosphate	α-磷酸萘酚	进口或国产
D-Fructose-6-Phosphate	D-果糖-6-磷酸	进口或国产
Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT)	溴化甲基噻唑蓝	进口或国产
β-Nicotinamide Adenine Dinucleotide (TPN)	辅酶 II	进口或国产
N-Methyl phenazinium methyl sulfate (PMS)	甲硫吩嗪酸酯	进口或国产
DL-Isocitric Acid Trisodium salt	异柠檬酸三钠盐	进口或国产

Glucose-1,6-diphosphate	葡萄糖-1,6-二磷酸	进口或国产
D-Glucose-6-phosphate	葡萄糖-6-磷酸	进口或国产
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	葡萄糖-6-磷酸脱氢酶	进口或国产
Malic acid	苹果酸	进口或国产
Fast blue RR Salt	坚固蓝 RR 盐	进口或国

啮齿类实验动物生物学特性数据测定技术规程（讨论稿-4）

编写说明

一、制定“技术规程”的必要性

实验动物种质资源的数据化以及在数据化的基础上建立的数据库是资源建设的不可或缺的组成部分，是实验动物能够作为科技资源应用的基本条件之一。对实验动物特性数据本身而言，它不仅是实验动物资源本质的客观描述和“身份证明”，同时它也是一种资源，是以一种数据化的特殊形式对原资源和其他资源的建设起着不可替代的作用。开展实验动物种质资源数据化和数据资源的规范化研究，是实验动物种质资源建设、资源信息数据库建设重要内容，是实现实验动物种质资源和数据资源共享的重要先决条件，对自然科技资源平台建设至关重要，也对加速国民经济、科技进步和社会的发展有着重要的战略意义。

动物实验是生命科学研究的常用方法，是进行教学、产品检验等领域科研活动不可缺少的重要手段和工具。通过动物实验要获取可靠和准确的实验数据，就必须了解影响动物实验效果的各种因素，排除各种影响动物实验效果的干扰因素，如动物种属、种系、年龄和体重、性别、生理状态、健康情况、潜在感染等。对药品和食品等直接关系到人民健康和生活质量的产品质量检验，往往是通过动物实验，观察和测定这些产品是否引起动物各种生理状态和生理生化指标的改变，由此做出是否有效或合格的结论，因此，了解不同动物各自具有生理

生化指标、遗传背景、健康状态以及解剖特点等生物学特性，则是实验动物标准化研究的重要内容，更是利用动物进行开展各种实验、并以生物学特性改变作为结果判定依据的前提条件和根本保证。因此，研究制定啮齿类实验动物生物学特性测定技术规程，规范生物学特性测定技术，获得科学准确的生物学特性数据，在此基础上构建实验动物生物学特性数据库，搭建起以数据化和信息化为主要表现形式、网络化为支撑条件的实验动物生物学特性数字化共享平台，推动实验动物资源的整合与共享，并能最大限度的发挥现有资源的潜能。

二、制定“技术规程”的依据

依据实验动物 微生物学等级及监测（GB 14922.2-2001）、实验动物 寄生虫等级及监测（GB 14922.1-2001）、实验动物 哺乳类实验动物的遗传质量控制（GB 14925-2001）等国家标准，按照《国家自然科技资源共性描述规范》和《实验动物资源共性描述规范（试行）》的基本内容和总体要求，并与同期研究编制的《实验动物生物学特性数据采集加工技术规范》（讨论稿）相衔接，提出了啮齿类实验动物生物学特性数据测定技术规程（讨论稿）。

三、制定“技术规程”的指导思想

以规范实验动物生物学特性数据化表达和各类数据测定技术方法为目标，通过对各种实验动物生理数据、生化数据、遗传数据和解剖数据等4类数据测定方法的描述，以期达到统一和规范的目的，保证所获得的数据准确可靠。

四、制定“技术规程”的基本原则

制定啮齿类实验动物生物学特性数据测定技术规程的目的是统一各类数据的描述项，规范生物学特性测定方法，保证数据的准确可靠。基本原则是：

1. 科学性：生物学特性测定是一项科学性很强的工作，技术规程应是在开展科学研究和论证的基础上，提出的科学、严谨的技术文件。

2. 实用性：确定各类数据的表达项，选择公认的、已在实际工作中被广泛应用的测定方法，使该技术规程具有可行性。

五、制定“技术规程”的基本要求

1. 啮齿类实验动物生物学特性数据测定技术规程与“实验动物资源共性描述规范（试行）”、“实验动物生物学特性数据采集、加工技术规范”互为补充完善，共同构成采集、测定和整理实验动物生物学特性数据的技术文件。

2. 本技术规程是啮齿类实验动物生物学特性数据化测定工作应遵循的技术要求，同时也是数据库建设的重要文件。

3. 按照“实验动物资源共性描述规范”的数据分类方法，考虑到实验动物生物学特性数据的应用情况和目前测定技术水平，本技术规程主要对生理数据、生化数据、遗传数据和解剖数据中的“必须数据”测定技术进行描述。

4. 对 34 项基本信息，因其多数是对实验动物资源整体状态以及保存和共享方面的描述，不需要测定。故本规程中不涉及该类内容。其中微生物等级和保存设施是 2 个“必须数据”。这两方面工作基础

比较好,已有较为完善的用于保证数据科学规范准确的质量检测 SOP,故在本技术规程中不再列出。

六、“技术规程”编制过程说明

2006 年 9 月 19~10 月 8 日,在课题组范围内,以电子邮件和函审的形式进行讨论。着重在该技术规程的实用性和可操作性方面征求各方面的意见,并就一些技术细节提出问题,希望提出可行的解决办法。

2006 年 10 月 8~10 月 19 日,以函审的形式征求北京、上海、广东、山东、山西、湖南、湖北、辽宁、云南、浙江、河北、天津、吉林、内蒙、江苏、重庆等省市 28 位专家的意见。征求意见的内容包括:测定技术是否可行?是否有新技术可以代替?操作程序是否正确?测定技术是否需要补充?文字表达是否准确?编写格式是否规范?其他问题?其他建议等。专家在充分肯定的基础上,就有关细节提出了个人意见和修改建议。

2006 年 10 月 20~22 日,召开了专家组成员和有关专家共 18 人的研讨会。根据前期征求的意见,进行讨论,并对规程进行了修改。规范了名词术语和编写格式,丰富了测定技术内容,论证了实验技术的可行性。会后整理专家意见,修改测定技术规程形成了啮齿类实验动物生物学特性数据测定技术规程(讨论稿-4)。

七、“技术规程”主要内容

1、本技术规程共包括 4 类数据,即遗传数据、生理数据、生化数据和解剖数据。仅对其中涉及啮齿类实验动物的“必须数据”的测

定技术进行描述。

2、为保证测定数据的可靠性，对测定所需要的仪器设备进行了说明。

3、遗传数据：遗传监测是通过形态学、免疫学和生物化学等方法来测定动物品系的遗传组成是否发生变化。本规程的测定技术包括了染色体数测定、生化标记基因检测和免疫标记基因检测。运用这些技术可以检测出实验动物在饲养生产等过程中发生的遗传污染、遗传漂变和突变等。

4、生理数据：通过测定获取动物的生理参数的正常值范围。本规程描述了血液生理、生殖生理、免疫生理和生长发育生理参数的测定技术。并对样品采集和测定前分析仪器性能的检查进行了说明。

5、生化数据：通过测定获取动物的生化参数的正常值范围。本规程描述了血液生化、尿液生化参数的测定技术。并对样品采集和测定前分析仪器性能的检查进行了说明。

6、解剖数据：通过测定获取动物的解剖的正常值范围。本规程描述了体尺、脏器重量、肠道长度正常参数的测定技术。并提出样品采集的基本要求。