



## SPF 巴马小型猪的培育及应用

姜 骞, 韩凌霞, 司昌德, 林 欢, 高彩霞, 郭东春, 张 伟, 刘家森, 曲连东\*

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 哈尔滨 150069)

**【摘要】** 利用我国自有资源巴马小型猪群, 完成了疫病净化, 建立了无特定病原体巴马小型猪实验猪群。制定了饲养标准、实验猪遗传学检测标准和微生物质量控制技术标准, 制订了黑龙江省地方标准《无特定病原体猪微生物监测技术规范》, 对建立的猪群进行了遗传学和微生物质量控制。建立了猪瘟病毒(CSFV)和高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)感染巴马小型猪感染模型。扩增了巴马小型猪重要细胞因子及固有免疫相关的重要分子, 从分子水平进一步证明巴马小型猪可以代替家猪进行猪病感染实验。目前建立的猪群已广泛应用在猪瘟病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪传染性胃肠炎病毒、猪圆环病毒等猪重要疫病防控及致病机理的研究, 实现了共享利用。本项目的完成解决了实验用猪瓶颈问题, 提升了动物疫病研究水平, 提供了新型实验动物, 实现了优质种质资源共享利用, 加速了生命科学研究和生物制品产业发展, 推动了农业实验动物的行业进步。

**【关键词】** 巴马小型猪; 无特定病原体; 培育; 感染模型

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 05-0001-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.05.001

## Breeding and application of SPF Bama miniature pig

JIANG Qian, HAN Ling-xia, SI Chang-de, LIN Huan, GAO Cai-xia,  
GUO Dong-chun, ZHANG Wei, LIU Jia-sen, QU Lian-dong\*

(State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150069, China)

**【Abstract】** In this study, a Specific Pathogen-Free (SPF) Bama miniature pig herd was established. The standards for breeding experimental pigs, genetic test and microbiological quality control had been drafted. The local standards of Heilongjiang province "SPF" technical specifications for microbiological monitoring of pigs had been formulated. The genetic and microbiological quality criterion had been used to control of the SPF pig herd. Classical swine fever virus (CSFV) and highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection models of Bama miniature pigs were established, especially the infection miniature pig model of PRRSV was used to evaluated commercially vaccine. The comparison of the cytokine homology between Bama miniature pigs and domestic pigs showed that the Bama miniature pigs can be used to instead of domestic pigs as an ideal experiential animal. At present the SPF Bama miniature pig colonies have been widely used to study the mechanism of prevention and pathogenic in the classical swine fever virus, porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine transmissible gastroenteritis virus and porcine circovirus and so on. The completion of the project solved the bottleneck problem of the experimental pig usage which provided a new ideal experimental animal for animal disease and life science research.

**【Key words】** Bama miniature pig; Specific Pathogen-Free; Breeding; Infection model

[基金项目] 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2008-04, 2009-15); 黑龙江省地方标准项目(2014-38); 黑龙江省科技攻关(PC08S01)。

[作者简介] 姜骞(1975-), 女, 助理研究员, 研究方向: 实验动物病毒学。E-mail: jiangqian623@sina.com.cn

[通讯作者] 曲连东(1964-), 男, 研究员, 研究方向: 预防兽医学、实验动物学。E-mail: qld@hvri.ac.cn

## 1 研究背景

无特定病原体(SPF)猪是指经过人工培育,对其携带的微生物和寄生虫实行控制,遗传背景明确或者来源清楚的用于科学研究的特定猪,是生命科学研究、生物制品生产的重要实验材料和原材料。我国尽管是养猪大国,但在猪只微生物质量控制等方面仍然落后发达国家。国际上发达国家早在上世纪 50 年代就开始了 SPF 猪的培育,目前少数国家已具备成熟的繁育技术,建立了标准的质量控制技术,大量应用于生命科学研究,并形成市场化。

尽管我国的实验动物资源及其标准化取得了长足进步,但是还远远不能满足现代农业科学技术发展的需要,尤其是缺少优质实验用猪资源,成为制约畜牧业养殖业及科学研究的瓶颈。在实际科研实践中,用普通农场生产猪,甚至用小农户散养的猪代替实验用猪的问题相当普遍,不仅遗传背景杂乱、携带病原体和寄生虫质量参差不齐,而且来源混乱,随意性很大,导致实验结果重复性差,离散度高,实验失败的几率增大,既造成人力财力的浪费,又严重滞后了畜牧业发展和疫病防控,限制了猪病防控的科学研究进程。

## 2 研究目的

小型猪在体型、大小、生理学及疾病发展等方面与人有较大的相似性,是理想的实验动物模型,在探索人的生命活动规律以及研究人类疾病的致病机制治疗、预防、药物筛选等方面均显示出独特的优势。美国在 50 年代初开始了小型猪的培育开发研究,我国对小型猪的研究开始于 20 世纪 80 年代初,虽然起步较晚,但是我国小型猪原始资源十分丰富,目前我国的小型猪品种主要有:五指山小型猪 贵州小型香猪,藏猪版纳微型猪,广西巴马小型猪等;其中,广西巴马小型猪则具有国内其他品种小型猪的绝大部分优点。我国目前缺少病原微生物学和寄生虫学质量控制、遗传学背景清晰的 SPF 猪种群,缺少质量控制标准。巴马小型猪在分类学上与普通家猪相同,属于哺乳纲,偶蹄目,野猪科,猪属动物。小型猪由于它体型矮小、性成熟早、遗传性稳定、繁殖性能强、性情温驯、部分生理生化指标与人类相似等这些特有的生物学特性,易于实验操作,适合实验动物模型的建立。作为实验动物,巴马小型猪在人用猪源生物活性材料生产以及

胚胎移植等研究中起着重要作用,实验用巴马小型猪有望取代猴、犬等成为被大量使用的新型实验动物。微生物学质量控制是实验动物标准化的重要内容之一,由于微生物感染实验动物可不同程度地干扰试验结果,污染试验材料,影响实验动物生产,甚至威胁人类健康。巴马小型猪的微生物学质量在一定程度上限制了其推广应用,培育 SPF 巴马小型猪基础群及核心群已迫在眉睫。

因此,本项目开展了 SPF 巴马小型猪的培育及应用研究,解决实验用猪瓶颈问题,提升我国动物疫病防控能力,实现种质资源共享利用。

## 3 创新点

本项目通过阻断外界病原体的再感染、猪病的净化等措施,净化了猪瘟等 15 种猪病,微生物学质量可控,成功培育了无特定病原体巴马小型猪。提出了猪微生物学质量控制监测技术,首次制定了无特定病原体猪微生物学监测技术规范(地方标准),已颁布实施。建立了遗传学微卫星位点监测技术,遗传学分析表明培育的无特定病原体猪符合遗传学封闭群特征。建立了高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)感染巴马小型猪模型和猪瘟病毒(CSFV)感染巴马小型猪模型。进行了重要细胞因子及固有免疫相关的重要分子比较分析,巴马小型猪与家猪具有较高的同源性。确定了猪群的 SLA 单倍型并获得了 ISAG SLA 命名委员会的官方命名。开发了新型猪用隔离器,解决了猪粪便经常堵塞排污管的问题,降低了粪尿混合滋生细菌的风险,获得了实用新型专利。

## 4 讨论

本项目主要以我国自有巴马小型猪为基础猪群,采用自繁自养封闭交配的方式繁育,饲养在正压隔离环境及屏障环境条件下,通过控制饲料和饮水质量,以及人员流动和物品流动等措施,阻断外界病原体的再感染;通过灭活疫苗免疫,抗生素治疗和疫病监测,净化了主要病原体,成功培育了无特定病原体巴马小型猪核心群;制定了适合我国自身的巴马小型猪的饲养标准,用于猪群的饲养;制定了黑龙江省地方标准《无特定病原体猪微生物学监测技术规范》,并颁布实施;制定了巴马小型猪遗传学检测标准,建立了遗传学微卫星位点监测技术,对猪群进行了遗传学监测,符合猪封闭群遗传

特征;分析了巴马小型猪猪群 SLA 单倍型特征,获得 ISAG SLA 命名委员会官方命名 1 份;进行了巴马小型猪重要细胞因子和主要固有免疫相关分子的同源性序列分析,从分子水平证明了巴马小型猪代替家猪作为理想实验猪的可行性;选择无特定病原体巴马小型猪,通过观察临床症状、观察组织脏器的病理变化、检测血清中抗体及检测组织脏器中病毒载量,评价了巴马小型猪对猪瘟、猪繁殖与呼吸综合征病毒的敏感性,建立了猪瘟和猪繁殖与呼吸综合征病毒巴马小型猪感染模型。建立的无特定病原体巴马小型猪已广泛应用于猪瘟、猪繁殖与呼吸综合征、猪传染性胃肠炎、猪圆环病毒等猪重要疫病的科学研究、疫苗生产及检验。本项目的完成解决了实验用猪瓶颈问题,提升了动物疫病研究水平,提供了新型实验动物,实现了优质实验动物种质资源的共享利用。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Caixia Gao, Qian Jiang, Dongchun Guo, *et al.* Characterization of swine leukocyte antigen (SLA) polymorphism by sequence-based and PCR-SSP methods in Chinese Bama miniature pigs [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2014, 45 (1): 87 - 96.
- [ 2 ] Sun Y, Jiang Q, Tian DY, *et al.* Experimental infection of Bama miniature pigs with a highly virulent classical swine fever virus [J]. *Virology*, 2011, 25 (8): 452.
- [ 3 ] Hu XJ, Li N, Tian ZJ, *et al.* Molecular characterization and phylogenetic analysis of transmissible gastroenteritis virus HX strain isolated from China [J]. *BMC Vet Res*, 2015, 11: 72.
- [ 4 ] 李红,姜骞,林欢,等. 猪瘟病毒感染的小型猪体内病毒的复制情况及淋巴细胞变化 [J]. *中国兽医科学*, 2012, 42 (6): 572 - 576.
- [ 5 ] 李连峰,姜骞,林欢,等. 巴马小型猪主要细胞因子的克隆及序列分析 [J]. *中国畜牧兽医*, 2012, 39 (11): 56 - 61.
- [ 6 ] 武永淑,张海燕,杨柳,等. 实验用巴马小型猪的遗传多样性研究 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2013, (15): 43 - 46, 192.
- [ 7 ] 胡晓亮,姜骞,郭东春,等. 巴马小型猪主要固有免疫分子的克隆及序列分析 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2014, (21): 13 - 16, 21.
- [ 8 ] 曲泽慧,陈佩佩,张爱芹,等. 产肠毒素大肠杆菌多重 PCR 检测方法的建立 [J]. *中国预防兽医学报*, 2012, 34 (12): 980 - 982.
- [ 9 ] 曲泽慧,陈佩佩,张爱芹,等. 产肠毒素大肠杆菌双重 PCR 检测方法的建立 [J]. *中国畜牧兽医*, 2013, 40 (7): 65 - 68.
- [ 10 ] 胡晓亮,姜骞,仇铮,等. 口蹄疫病毒 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. *中国预防兽医学报*, 2014, 36 (12): 948 - 951.
- [ 11 ] 王淑亚,郭东春,李影,等. 多杀性巴氏杆菌 Lon 蛋白酶的原核表达及 ATPase 活性的检测 [J]. *中国预防兽医学报*, 2014, 36 (7): 530 - 533.
- [ 12 ] 李影,郭东春,王淑亚,等. 多杀性巴氏杆菌 *prfA* 基因的序列分析与原核表达 [J]. *中国兽医科学*, 2014, 44 (3): 293 - 297.

[收稿日期] 2016 - 11 - 11

#### 专家问答

#### 问: HET 和 KO 敲除鼠的区别

答: 大多数真核生物拥有两套匹配的染色体组, 通常称为二倍体生物。除了对应同源染色体可能存在的一些序列差异和性染色体 (X 染色体和 Y) 存在差异, 二倍体生物在两套染色体中应具有相同的座位 (称为等位基因, allele)。如果二倍体生物中对应的等位基因一致, 那么这个生物称为纯合子 (homozygous)。如果相应的等位基因不一致, 这个生物称为杂合子 (heterozygous)。HET 是 heterozygous 的简写, 也就是通常我们所说的杂合子。小鼠、大鼠、猪、猴、人等都是二倍体生物。如小鼠中的某个基因进行了基因修饰 (敲除、点突变、碱基序列替换等), 如果其中一个等位基因包含基因修饰, 另外的等位基因未修饰, 我们称为杂合突变小鼠, 一般简称为 HET 小鼠。如果两个等位基因都包含了基因修饰, 我们称为纯合子突变小鼠, 也称为敲除小鼠 (knockout mouse), 简称 KO 小鼠。

(感谢中国医学科学院医学实验动物研究所 马元武 博士的解答)