



实验红鲫 C1HD 系遗传质量控制地方标准的研究

吴端生^{1#}, 刘娟^{2#}, 张朝晖^{3*}

(1. 南华大学实验动物学部, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学药学与生物科学学院, 湖南 衡阳 421001;
3. 南华大学公共卫生学院, 湖南 衡阳 421001)

【摘要】 实验红鲫是我国本土实验鱼类。实验红鲫 C1HD 系是已经培育成功的一种近交系鱼类。基于实验红鲫标准化研究和验证性试验, 湖南省质量技术监督局编制发布了《实验鱼类 实验红鲫 C1HD 系遗传质量控制》的湖南省地方标准。该标准包括前言、范围、规范性引用文件、术语和定义、主要生物学特性、繁殖方法、养殖环境、遗传学质量检测及附录 A、B、C 等内容。

【关键词】 实验红鲫 C1HD 系; 遗传质量控制; 地方标准

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 02-0124-05

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2018. 02. 022

Standards for genetic quality control for the laboratory red crucian Carp C1HD strain

WU Duansheng^{1#}, LIU Juan^{2#}, ZHANG Zhaohui^{3*}

(1. Department of Laboratory Animal Science, University of South China, Hengyang 421001, China;
2. College of Pharmacy and Biological Sciences, University of South China, Hengyang 421001;
3. School of Public Health, University of South China, Hengyang 421001)

【Abstract】 Laboratory red crucian carp is a native fish in China. It has been an established inbred fish strain, the laboratory red crucian carp C1HD strain. Based on the standardization research and verification test of laboratory red crucian carp, the local standard of Hunan Province, the called “Laboratory Fish Genetic Quality Control of Laboratory Red Crucian Carp C1HD Strain”, has been established. This standard includes preface, scope, normative reference documents, terms and definitions, major biological characteristics, mating and breeding method, breeding environment, genetic quality testing and appendix A, B, C and so on.

【Key words】 laboratory red crucian carp C1HD strain; genetic quality control; local standard

目前,国际上常用的实验鱼类有斑马鱼、青鳉、虹鳟、剑尾鱼等 10 余种^[1-7],国内科技工作者还常使用稀有鮡鲫、鲤鱼、金鱼、鲫鱼(红鲫)等 10 余种^[1-5]。然而,具有中国本土特色的标准的实验鱼

类却非常缺乏。目前,称得上中国本土“准标准”实验鱼类的只有实验稀有鮡鲫和实验红鲫。

实验红鲫是由红鲫驯化而来,红鲫是鲫的变种,分布于我国长江流域,属于我国的本土鱼类。

【基金项目】 “十二五”国家科技支撑计划课题(2015BAI09B05-03);湖南省地方标准修制定项目(湘质监函[2012]291 号);湖南省教育厅科学研究项目(12A122)。

【作者简介】 吴端生(1956—),男,教授,研究方向:实验动物标准化。E-mail: wuduansheng@aliyun.com。

刘娟(1992—),女,硕士研究生,专业:生物学。E-mail: 1124363351@qq.com。#共同第一作者

【通信作者】 张朝晖(1971—),男,教授,研究方向:环境与遗传毒理学。E-mail: zhaohuizh@126.com

吴端生等^[8-10]经过多年研究,发现红鲫作为实验动物具有体型较小、繁殖力强、杂食性、红体色等优点,并成功培育出实验红鲫近交品系,命名为实验红鲫 C1HD 系。2016 年 12 月湖南省质量技术监督局^[11]发布了《实验鱼类 实验红鲫 C1HD 系遗传质量控制》湖南省地方标准(以下简称本标准)。本文报道本标准的研究与编制发布的过程。

1 标准编制的目的与意义

随着社会经济发展与科技进步,实验鱼类在生物医药、水生态毒理学、水产动物疾病防治、水产药物研制等领域的应用越来越多^[1-7],尤其在化学品、农药、除草剂、化肥及工业排污的环境安全性评价中显得特别重要^[12-14]。加强实验鱼类标准化研究、建立实验鱼类质量标准是进一步完善实验鱼类法制化、标准化管理体系的需要,有助于提升实验鱼类的科技水平和对科技创新的支撑能力与服务水平,并依法为实验鱼类行政许可、行政执法管理提供技术保障和科学依据^[15]。目前,我国还没有本土实验鱼类的国家标准,编制发布的本标准是我国本土实验鱼类的第一个地方标准,为规范实验红鲫 C1HD 系的保种及生产,开展遗传质量监测提供了技术规范和法规依据,并为实验红鲫 C1HD 系的应用提供了标准参数。

2 标准编制的依据和原则

本标准编制的依据是国家和湖南省的实验动物管理法规。《实验动物管理条例》第七条规定:“实验动物遗传学、微生物学、营养学和饲养环境等方面的国家标准由国家技术监督局制定”;《湖南省实施〈实验动物管理条例〉办法》第二十四条规定:“实验动物质量监测应当执行国家标准;尚未制定国家标准的,执行相应的行业标准或者地方标准”。本标准的主要技术参数取自于作者多年来对实验红鲫标准化研究的成果和本标准研究的验证性试验^[10,16]。

本标准的编制遵循科学性、先进性和可操作性原则,力求内容及表述的简明和准确,并充分考虑我国和我省的实情,适应我国科学技术发展水平。标准文本格式按照《标准的结构和编写》(GB/T 1.1—2009)^[17]给出的规则起草,内容的编写参照了国内同类标准^[18-20]。

3 标准编制与发布的过程

本标准的编制工作于 2012 年获得湖南省质量技术监督局的立项(湘质监发[2012]531 号)。随即,成立了标准“编制委员会”和“起草小组”。然后经过验证性试验、文献调研、同行专家咨询等过程,起草了本标准征求意见稿和编制说明,分别征求省内外同行专家提出修改意见。再根据专家修改意见,形成本标准的送审稿。湖南省质量技术监督局标准化处组织召开专家审查会,对本标准送审稿逐条地进行了审查。再根据专家审查会的综合意见,形成本标准报批稿。最后,经湖南省实验动物管理办公室推荐,报湖南省质量技术监督局批准,于 2016 年 12 月发布本标准,即《实验鱼类 实验红鲫 C1HD 系质量控制》(DB43/T 1191—2016)^[11]。

4 本标准的内容及主要技术参数

本标准的内容包括前言、范围、规范性引用文件、术语和定义、主要生物学特性、繁殖方法、养殖环境、遗传学质量检测及附录 A、B、C 等。其中,主要生物学特性部分对外形、可数性状、可量性状、解剖特征、生长发育、繁殖生理特性、染色体数目与核型、体色标记、生化遗传标记、DNA 分子标记等内容进行了表述。繁殖方法部分对育种繁殖方法、保种繁殖方法、生产繁殖方法等内容进行了规定。养殖环境部分对水环境指标、饲养密度等内容进行了规定。遗传学质量检测部分对抽样方法和检测频率、性状测定、体色分析、染色体核型检测、生化遗传标记检测、DNA 分子标记检测、结果判断等内容进行了规定。

按照遗传学原理,并参考哺乳类实验动物遗传质量控制标准和养殖鱼类种质系列标准^[18-28],本标准在实验红鲫标准化研究和验证性试验的基础上,分别采纳了分类形态学、细胞遗传学、同工酶、血液生化、DNA 分子标记等方面的技术参数。

4.1 分类形态学特性

体色全红,身体侧扁,全鳞,口端位,无须,单尾。3 月龄以下的个体体色为青灰色,3 月龄以上的个体体色逐渐转为红色。

背鳍鳍式为 D. i ~ ii - 16 ~ 19;臀鳍鳍式为 A. i - 5 ~ 7;胸鳍鳍式为 P. i - 14 ~ 17;腹鳍鳍式为 V. i - 7 ~ 8;侧线鳞鳞式为 $26 \frac{5 \sim 6}{5 \sim 7}$ 28。

4.2 生长与繁殖特性

在普通环境条件下饲养,1 年龄的实验红鲫 C1HD 系平均体长约 66 mm,平均体重约 12 g。2 年龄的实验红鲫 C1HD 系平均体长约 113 mm,平均体重约 34 g。

1 年龄即达性成熟,属于一年多产卵类型,性成熟的雌性红鲫在生殖季节里卵巢系数达 16%~21%。

4.3 染色体数目与核型

体细胞染色体数 $2n = 100$ 。核型:中部着丝粒染色体(m 组)11 对,亚中部着丝粒染色体(sm 组)15 对,亚端部着丝粒染色体(st 组)12 对,端部着丝粒染色体(t 组)12 对,染色体臂数(NF)152。

4.4 遗传标记

4.4.1 体色标记

红体色为实验红鲫 C1HD 系体色基因纯合时的形态学标记。

4.4.2 生化遗传标记

血清蛋白聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳图谱具有 SP-A1、SP-B7 和 SP-B8 特征带,此为实验红鲫 C1HD 系的血清蛋白标记。

红细胞酯酶同工酶(EST)和超氧化物歧化酶同工酶(SOD)的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱中,EST-1、EST-3 酶带和 SOD-3、SOD-8 酶带分别为实验红鲫 C1HD 系特有的酯酶同工酶标记和超氧化物歧化酶同工酶标记。

4.4.3 DNA 分子标记

序列为“GACTAAGCCC”的随机引物的 PCR 扩增产物中,长度为 2100 bp 的 DNA 电泳条带,为实验红鲫 C1HD 系的随机扩增多态性标记(RAPD)。

序列为“3' ATTGTGAAGCATCGGTAATGC 和 5' TACTTGATTGCTATTGGAC”引物的 PCR 扩增产物中,长度为 67 bp 的 DNA 电泳条带,为实验红鲫 C1HD 系的微卫星标记(SSR)。

5 遗传质量控制方法

按照实验动物标准化管理要求,本标准从保种繁殖和种群遗传质量两方面规定了实验红鲫 C1HD 系的遗传质量控制方法。

5.1 种子保存方法

根据遗传学原理,应选择科学的保种繁殖方法来保持实验红鲫 C1HD 系的同基因性及其基因纯合性。因此,本标准规定,将实验红鲫 C1HD 系设立为

基础群和生产群,以基础群保种。从基础群中挑选健壮的 2 年龄雌性实验红鲫 C1HD 系,采用人工诱导雌核发育技术进行繁殖生产,其子代用于构建实验红鲫 C1HD 系下一代的基础群,如此传代。

5.2 繁殖生产

本标准规定,生产群用于繁殖生产。生产群的实验红鲫 C1HD 系以人工授精方法进行随机交配繁殖,且繁殖代数不得超过 3 代。

5.3 遗传质量监测

5.3.1 保种繁殖的监控

本标准规定,每一世代均采用人工诱导雌核发育技术进行保种繁殖。繁殖生产过程中设置繁殖记录(卡)、繁殖系谱和繁殖生产台账,并有完整的记录。

5.3.2 遗传质量检测

本标准规定,对每 1 世代的每 1 繁殖批次的实验红鲫 C1HD 系进行 1 次遗传质量检测。

首先对实验红鲫 C1HD 系体色进行检测。如果体色是灰色或不全部是红色,则判定为不合格。对体色全部为红色的个体,再进行可数性状检测。当体色检测结果和可数性状检测结果均符合本标准时,可初步判定为合格。可数性状检测结果可疑或必要时,再进行生化遗传标记或 DNA 标记的检测,必要时进行染色体核型的检测。对被检个体的体色、可数性状、生化遗传标记或 DNA 标记等项目的检测结果均符合本标准规定的,则判定为合格。

6 讨论

6.1 国内外同类标准研究现状

国内,对实验鱼类标准的研究始于本世纪初,主要集中在剑尾鱼、斑马鱼、实验红鲫、虾虎鱼、稀有鮰鲫等。

2000 年左右,中国水产科学院珠江水产研究所吴淑勤等就开始了剑尾鱼标准的研究。中华人民共和国农业部^[19]于 2012 年 3 月 1 日发布了《剑尾鱼 RR-B 系》中华人民共和国水产行业标准(SC/T1115-2012),2012 年 6 月 1 日实施。

2007 年,国家人口计生委科学技术研究所联合中国食品药品检定研究院、中国科学院水生生物研究所、北京大学等单位,开展了实验用鱼地方标准的系统研究^[15,29-32]。由北京市质量技术监督局^[20,33-37]于 2013 年正式颁布了《实验用鱼》北京市地方系列标准(DB11/T 1053.1-2013~DB11/T

1053.6-2013),并于2014年4月1日开始实施。该标准主要适用于斑马鱼和剑尾鱼,包括微生物学等级及监测、寄生虫学等级及监测、遗传质量控制、配合饲料技术要求、环境条件、病理诊断规范等六个部分的内容。

最近,柯贤福等^[38]在应用斑马鱼的基础上,也开展了斑马鱼的环境设施、养殖用水及饲料标准等研究,以期建立实验用斑马鱼的浙江省地方标准。

2013年,以稀有鮕鲫为标准供试生物的国家标准《GB/T 29763-2013 化学品稀有鮕鲫急性毒性试验》由上海市检测中心联合原环境保护部化学品登记中心、中国科学院水生生物研究所等5家单位共同研制完成,并正式颁布实施^[39-40]。2014年国家标准化管理委员会又批准了由上海市检测中心牵头的六家单位共同参与《化学品稀有鮕鲫幼体生长试验》国家标准编制工作(项目编号20140324-T-469)^[40]。

2009年,广东省实验动物监测所向全国实验动物标准化技术委员会申报《实验动物 鱼类环境与质量控制标准》编制并获得立项(编号20091329-T-469)。2014年底,由广东省实验动物监测所等5家单位起草完成了《实验动物 鱼类环境与质量控制》等5个国家标准送审稿。该标准主要适用于斑马鱼、剑尾鱼和诸氏鲮虾虎鱼。

尚未检索到国外的实验鱼类标准。不过,美国实验动物研究所等编写的《实验动物饲养管理和使用指南》相当于行业标准,它对科研、测试和培训用的实验鱼类在水生小环境和大环境、水质、生命维持系统、温度、湿度和通风、照明、噪音与振动和饲养与管理等方面均有较详细的规定^[41]。类似的还有《欧洲保护用于实验和其他用途的脊椎动物公约》等^[42-44]。

6.2 本标准的实施

本标准于2016年12月29日由湖南省质量技术监督局发布,于2017年2月28日开始实施^[11]。因为实施的时间不久,未见有用户不良反映,政府主管部门也尚未将实验红鲫纳入实验动物许可证管理范围。

6.3 建议与展望

值得注意的是,单一的遗传质量标准不利于实验红鲫的应用和标准的推广,还应该编制完善的实验红鲫标准系列。业内人士指出,实验鱼类疾病的控制和健康状况的维持是实验鱼类标准化研究的核心内容和首要环节^[38,45]。实验红鲫 C1HD 系的

微生物与寄生虫学质量控制和环境质量控制是制约本标准推广的关键因素。所以,要全面实施和推广本标准,还必须相应编制《实验鱼类 实验红鲫 C1HD 系微生物学等级及监测》、《实验鱼类 实验红鲫 C1HD 系环境及控制》和《实验鱼类 实验红鲫 C1HD 系饲料营养及配合技术》等标准系列。目前,这几部标准的研究工作正在进行,预计2年内完成。

实验红鲫 C1HD 系作为一种标准化的实验鱼类,将有望在水生态毒理学、水产动物疾病模型、化学品环境测试、农药与重金属等环境污染检测等方面得到很好的推广应用^[10]。未来,政府主管部门有必要资助建立国家或省级实验红鲫保种繁育中心,并立项编制《实验红鲫》国家系列标准。

参考文献:

- [1] 吴端生,王宗保. 鱼类实验动物开发与应用研究的现状及展望[J]. 中国实验动物学杂志, 2000, 10(2): 103-109.
- [2] 郝智慧,赵厚德,郑海发,等. 鱼类实验动物的研究与应用[J]. 中国实验动物学杂志, 2002, 12(5): 70-71.
- [3] 吴志强,邵燕,袁乐洋. 鱼类实验动物[J]. 生物学通报, 2003, 38(11): 20-22.
- [4] 杨笑波,李建军,刘继芳. 水生动物的实验研究与应用[J]. 中国比较医学杂志, 2005, 15(1): 48-50.
- [5] 陶宏婷,吴端生. 水生动物用于科学实验的最新进展[J]. 实验动物科学, 2013, 30(5): 59-63.
- [6] Scharlt M. Beyond the zebrafish: diverse fish species for modeling human disease[J]. Dis Model Mech, 2014, 7(2): 181-192.
- [7] Harris MP, Henke K, Hawkins MB, et al. Fish is fish: the use of experimental model species to reveal causes of skeletal diversity in evolution and disease[J]. J Appl Ichthyol, 2014, 30(4): 616-629.
- [8] 吴端生,郑家铨,刘冬娥,等. 红鲫实验动物生物学特性的研究[J]. 中国实验动物学杂志, 1997, 7(2): 79-81.
- [9] 吴端生,王宗保,张轩杰,等. 红鲫近交系的建立[J]. 中国实验动物学报, 2001, 9(2): 113-118.
- [10] 吴端生. 实验红鲫标准化研究与应用现状及展望[J]. 实验动物科学, 2016, 33(3): 56-30.
- [11] DB43/T 1191-2016, 实验红鲫 C1HD 系遗传质量控制[S].
- [12] Norrgren L. Fish models for ecotoxicology [J]. Acta Vet Scand, 2012, 54(Suppl 1): S14.
- [13] Padilla S, Cowden J, Hinton DE, et al. Use of medaka in toxicity testing [M]. Curr Protoc Toxicol, 2009. Curr Protoc Toxicol. 2009, Chapter 1: Unit 1.10.
- [14] 沈敏, Coady K, 董晶,等. 化学品生态毒性测试鱼类模式生物的应用与展望[J]. 生态毒理学, 2017, 12(2): 34-43.
- [15] 孙德明,王天奇,朱晓红,等. 实验用鱼遗传质量控制及标准化[J]. 遗传, 2012, 34(9): 1202-1207.
- [16] 陶宏婷. 实验红鲫遗传标准参数及核辐射生物效应的研究[D]. 南华大学, 2015.

- [17] GB/T 1.1-2009, 标准的结构和编写[S].
- [18] GB 14923-2010, 哺乳类实验动物的遗传质量控制[S].
- [19] SC/T 1115-2012, RR-B 系[S].
- [20] DB11/T, 遗传质量控制[S].
- [21] GB 11607-89, 渔业水质标准[S].
- [22] GB/T 18654.1, 检验规则[S].
- [23] GB/T 18654.2, 抽样方法[S].
- [24] GB/T 18654.3, 性状测定[S].
- [25] GB/T 18654.12, 染色体组型分析[S].
- [26] GB/T 18654.13, 同工酶电泳分析[S].
- [27] GB/T 18654.15, RAPD 分析[S].
- [28] NY 5051-2001, 无公害食品淡水养殖用水水质[S].
- [29] 吴思昇, 王箐, 高昌, 等. 实验用斑马鱼主要疾病及其实验动物标准化研究过程面临的主要问题[J]. 实验动物科学, 2009, 26(4): 51-56.
- [30] 祝梅香, 王天奇, 张长勇, 等. 实验用斑马鱼剑尾鱼营养需求及饲料现状分析[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(12): 61-65.
- [31] 孙德明, 穆苑, 高昌, 等. 模型动物斑马鱼及其特定病原净化[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(12): 52-60.
- [32] 王天奇, 孙荣泽, 孙德明. 实验用鱼类的水环境及其标准化[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(12): 44-51.
- [33] DB11/T 1053.1-2013, 微生物学等级及监测[S].
- [34] DB11/T 1053.3-2013, 寄生虫学等级及监测[S].
- [35] DB11/T 1053.4-2013, 病理学诊断规范[S].
- [36] DB11/T 1053.5-2013, 配合饲料技术要求[S].
- [37] DB11/T 1053.6-2013, 环境条件[S].
- [38] 柯贤福, 胡慧颖, 吴立仁, 等. 实验用斑马鱼养殖地方标准的初步探讨[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(8): 75-78.
- [39] GB/T 29763-2013, 化学品稀有鮎鲫急性毒性试验[S].
- [40] 梁艺怀, 张京佶, 石利利, 等. 稀有鮎鲫作为化学品生态毒性测试鱼类模式生物的标准化实践[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(2): 2-10.
- [41] Institute for Laboratory Animal Research. Guide for the care and use of laboratory animals[M]. Washington, D. C. National Academies Press, 2011.
- [42] Guillen J. Special Topic Overview: FELASA Guidelines and Recommendations[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2012, 51(3): 311-321.
- [43] Federation of Animal Science Societies. Guide for the care and use of agricultural animals in research and teaching[M]. Champaign (IL): Federation of Animal Science Societies, 2010.
- [44] Vaughn SE. Review of the third edition of the Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2012, 51(3): 298-300.
- [45] 熊静, 关瑞章, 王艺磊, 等. 鱼类实验动物研究概况及标准化研究过程面临的主要问题[J]. 实验动物与比较医学, 2012, 32(4): 366-370.

(收稿日期)2017-08-29

(上接第 101 页)

5 结语

本文提出了一种基于计算机和移动互联网应用的实验动物专家咨询系统,勾画了系统的整体架构,介绍了系统的主要功能模块。随着互联网的发展,基于移动网络应用的咨询系统将成为行业内实验动物科技咨询服务的工具。目前,系统实现了用户管理、专家库管理、知识库管理、咨询与解答、支付管理、文章与视频分享的应用等,已基于 PC 端为载体通过 Web 浏览器应用服务,设立了 8 大专家领域分类,8 大类 32 小类知识百科分类,组建领域团队 6 个,用户咨询与专家解答运行正常,为行业专家与用户之间起到桥梁和纽带作用。后期系统将重点以智能手机客户端搭载平台面向行业用户开放应用,充分利用移动式智能设备的受众广、成本低、体积小、易携带等特点^[9],实现实验动物专家咨询系统的便携性、普适性,使实验动物专家咨询系统能够真正应用到行业各个层面,极大地提高系统的使用价值。

参考文献:

- [1] 陈亚兵, 孙济庆. 基于知识库的专家咨询系统设计与实现[J]. 计算机工程, 2007, 33(16): 196-198.
- [2] 邹岩柏, 刘福生, 赵明海, 等. 动物实验管理系统的特点分析[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(8): 72-74.
- [3] 李特. 基于 Web 的远程专家咨询与创新设计服务系统的设计[D]. 东北大学, 2006.
- [4] 秦川. 我国实验动物学科发展现状、存在问题及对策的探讨[A]. 第十二届中国实验动物科学年会(2016·南宁)论文集, 2016.
- [5] 王靖飞, 王洪斌, 刘东明, 等. 基于数据库的动物疾病诊断专家知识库设计及实现[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2005, (12): 3-6.
- [6] 王晓明, 刘万策, 陈梅丽, 等. 实验动物资源数据库数据质量建设的探讨[J]. 实验动物科学, 2013, 30(1): 38-41.
- [7] 张士萍, 张振东. 农业专家智能咨询系统的研究与开发[J]. 辽宁农业职业技术学院学报, 2011, 13(6): 37-39.
- [8] 荆于勤. 基于本体的重庆市信息化专家咨询系统研究[D]. 重庆理工大学, 2013.
- [9] 程曼, 袁洪波, 蔡振江, 等. 基于智能手机的分布协同式农业专家咨询决策系统设计[J]. 广东农业科学, 2012, 39(24): 195-198.

(收稿日期)2017-07-14