

杜晓鹏,郭亚茜,朱华. 人工哺乳技术在啮齿无菌动物培育中的应用[J]. 中国实验动物学报,2025,33(3):457-466.  
DU X P, GUO Y X, ZHU H. Application of artificial rearing technology in cultivating gnotobiotic rodents [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(3): 457-466.  
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.03.014

# 人工哺乳技术在啮齿无菌动物培育中的应用

杜晓鹏,郭亚茜,朱华\*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,国家动物模型技术创新中心,  
国家卫生健康委比较医学重点实验室,国家人类疾病动物模型资源库,北京 100021)

**【摘要】** 近年来,无菌大鼠、小鼠在生物医学研究中,尤其是在肠道微生物领域内得到了广泛的关注与应用。开展无菌啮齿动物实验的需求与日俱增,建立合格的无菌动物种群是相关动物生产设施将要面临的问题。在培育第一代种用无菌动物的过程中,利用人工哺乳技术饲喂啮齿动物幼崽是一项专业性强、技术难度较高的工作。本文将对哺乳方法、人工乳的配制及灭菌方法等人工哺乳技术的关键环节进行综述,回顾与总结技术要点,并在此基础上展望人工哺乳技术的进一步应用。

**【关键词】** 无菌动物;人工哺乳;人工乳

**【中图分类号】** **【文献标志码】** **【文章编号】** 1005-4847(2025)03-0457-10

## Application of artificial rearing technology in cultivating gnotobiotic rodents

DU Xiaopeng, GUO Yaxi, ZHU Hua\*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, CAMS & PUMC, National Center of Technology Innovation for Animal Model, NHC Key Laboratory of Comparative Medicine, National Human Diseases Animal Model Resource Center, Beijing 100021, China)

Corresponding author: ZHU Hua. E-mail: zhuh@cnilas.org

**【Abstract】** In recent years, germ-free rats and mice have received extensive attention and application in the field of biomedical research, particularly in gut microbiota studies. The demand for germ-free rodents has been increasing, requiring many research institutions to establish quality germ-free animal populations. The process of breeding first-generation germ-free animals involves highly specialized and technically challenging work, such as using artificial rearing techniques to feed rodent pups. This review article provides an overview of key aspects of artificial rearing techniques, including nursing method, preparation of artificial milk, and sterilization method. It retrospectively summarizes the key technical points and, based on this foundation, offers prospects for further applications of artificial rearing techniques.

**【Keywords】** germ-free animal; artificial rearing; milk substitute

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

无菌动物是指通过现代技术手段在其体内外的任何部位均检测不出细菌、真菌、放线菌、支原体、衣原体、螺旋体、立克次体、病毒、原生动物

和寄生虫的动物<sup>[1]</sup>。根据这一特点,可在无菌动物体内定殖特定的单菌或菌群用以研究宿主与微生物和微生物之间的相互作用。多种无菌啮

**【基金项目】** 国家重点研发计划项目(2022YFF071060001)。

Funded by the National Key Research and Development Program of China(2022YFF071060001).

**【作者简介】** 杜晓鹏,男,本科,主管技师,研究方向:无菌动物技术。Email:du\_xiaopeng@163.com

**【通信作者】** 朱华,女,硕士,主任技师,研究方向:疾病与肠道微生态。Email:zhuh@cnilas.org

齿动物已被应用于消化系统、免疫系统、内分泌系统、神经系统疾病的研究并根据实验需求创制多种与老年性疾病、心脑血管疾病相关的动物模型<sup>[2-4]</sup>。无菌动物来源于剖腹产和胚胎移植,通过人工饲养,维护在正压无菌隔离器中<sup>[5]</sup>。除以上两种常规方法外,也有研究者利用抗生素鸡尾酒法制备伪无菌鼠用于肠道微生物研究<sup>[6]</sup>。

培育无菌啮齿动物的工作可以追溯到十九世纪末。研究者在柏林大学通过剖腹产手术并饲喂灭菌牛奶获得无菌豚鼠<sup>[7]</sup>。二十世纪中期,许多机构致力于无菌动物的研究。在此期间,有诸如鸡、兔、非人灵长类等多种动物被成功无菌化的报道。但由于人工饲喂啮齿类幼崽十分困难,直到 1946 年, GUSTAFSSON<sup>[8]</sup>才首次通过人工哺乳成功离乳无菌大鼠。在此之后的数年间,随着隔离设备、人工哺乳技术及消毒灭菌技术的不断完善,多种无菌啮齿动物种群被建立起来<sup>[8-11]</sup>。培育无菌啮齿动物的流程(如图 1)。从无菌啮齿动物的发展历程来看,人工哺乳技术是培育无菌动物的支撑技术之一。人工哺乳技术主要包括人工哺乳、人工乳的配制和灭菌方法 3

个部分。本文将从这 3 个方面出发,对人工哺乳技术进行回顾与总结。

## 1 人工哺乳

通过剖腹产手术进入隔离器中的新生无菌啮齿动物,没有自主摄食能力,需要人工饲喂才能维持生存。人工哺乳的主要目的是将脆弱的新生动物饲养到能独立生活的阶段。在合理运用哺乳技术的同时,也要对幼龄动物进行悉心照料。目前,在无菌动物领域,人工哺乳方法主要有 3 种,分别是强饲法、吮吸法和自动哺乳法。

### 1.1 强饲法

强饲法是最早用于哺育无菌大鼠并建立动物种群的方法。其操作难度低装置简单仅由自制灌胃针头和注射器组成。由于需求特殊,早期研究者会根据动物的体质量,在考虑材质软硬度与灌胃针管径、长度等因素后进行自制<sup>[12-13]</sup>。随着技术的发展,有研究者开始使用商品化的灌胃针替代自制针头<sup>[14-15]</sup>。

强饲法的最大优势在于精确控制授乳剂量。目前的标准是以动物体质量的 20% 为每日授乳

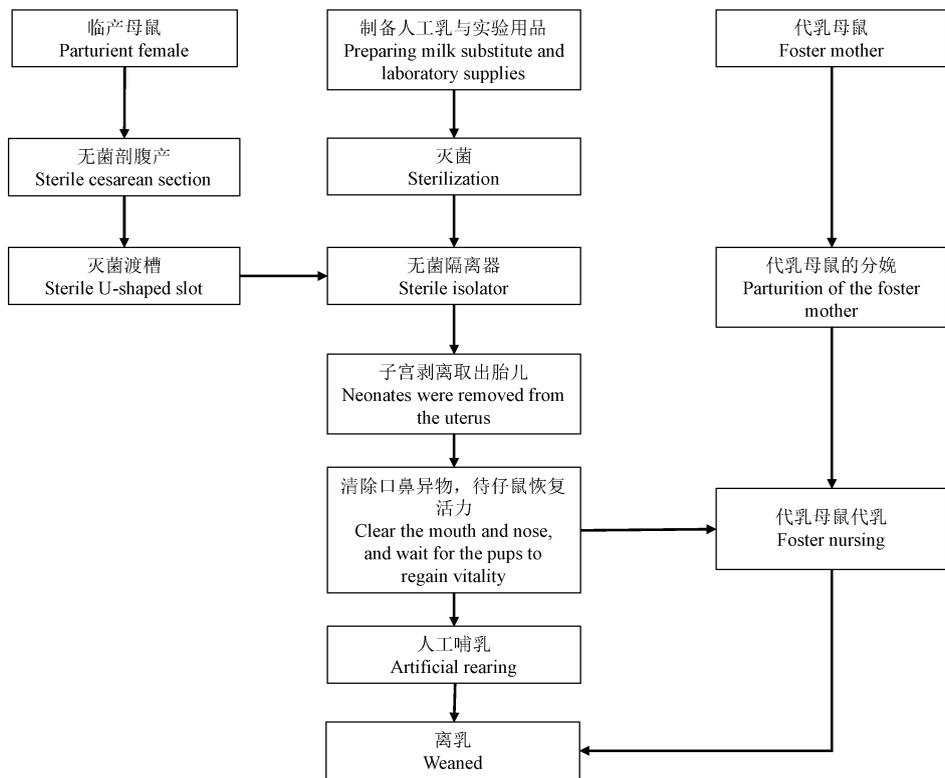


图 1 培育无菌啮齿动物的技术路线

Figure 1 Technical route for rearing germ-free rodents

总量<sup>[16]</sup>。不合适的授乳量可能引起幼鼠肠胃胀气,影响其生长发育甚至导致死亡<sup>[12,17]</sup>。在工作中,除了参考文献还应重视动物实际的消化情况,根据经验对剂量进行灵活调整。有研究者在人工哺乳过程中发现幼鼠胃中出现质地坚硬的凝乳块。这种凝乳块会占据动物胃内大量空间引起幼鼠消化不良,甚至会导致死亡<sup>[9,17]</sup>。AUESTAD 等<sup>[18]</sup>在研究中发现,与母乳喂养组相比,酪蛋白与乳清蛋白比例较低(67:33)的人工哺乳组中幼鼠胃内容物更柔软。虽然暂时没有进一步的研究表明酪蛋白与乳清蛋白比例是影响凝乳块形成的主要因素,但这种现象提示研究人员应该重视人工乳成分对乳鼠消化状态的影响。

### 1.2 吮吸法

我国最早的无菌大鼠是利用吮吸法培育而成的<sup>[19]</sup>。相比于强饲法动物被动授乳的方式,吮吸法是利用动物自然吮吸乳头的本能通过人工乳头引导动物进食完成人工哺乳。随着日龄的增长,动物吮吸乳头的力度会不断加强,因此研究人员需要制作硬度与大小不同的人工乳头<sup>[20]</sup>。

吮吸法的特点是动物自主采食,所以很难精确控制人工乳的摄入量。HOSHIBA<sup>[21]</sup>报道了一种能准确控制哺乳剂量的小鼠饲喂装置。在一项应用该装置的实验中,小鼠从 2 日龄开始人工哺乳直至 21 日龄离乳。通过实验数据对比,人工哺乳组与母乳喂养组小鼠体质量无明显差异,说明这是一种良好的人工哺育方法<sup>[22]</sup>。

### 1.3 自动哺乳法

自动哺乳法的装置包括恒温箱、水浴锅,注射泵、泡沫塑料杯及聚乙烯(polyethylene gastrostomy tubes, PE)胃管。将水浴锅放入恒温箱中,水温维持在 40 °C 形成动物生活的控温环境,保证动物体温控制在 32 ~ 36 °C 之间。之后将插入 PE 胃管的动物置于漂浮在水中的泡沫塑料杯中。最后将胃管与注射泵相连,通过后者定时定量注入乳液<sup>[15]</sup>。曾本华<sup>[23]</sup>利用这一方法成功培育出能正常繁殖的无菌小鼠,自动哺乳的无菌小鼠在离乳前体质量增长速度明显低于母乳喂养组,然而,当乳鼠离乳开始进食固体饲料后,体质量与母乳喂养小鼠无明显差异,这表明用自动哺乳法培育无菌小鼠是高效、可行的。

### 1.4 人工哺乳方法的比较

在培育无菌啮齿动物的历程中,上述三种方法均有成功的报道。它们各有特点(表 1),需根据实际情况进行取舍。

### 1.5 幼龄动物照料

新生幼龄无菌动物十分脆弱,既没有自理能力也不具备对恶劣环境的抵抗能力。因此为动物提供稳定舒适的环境和精心的照料是动物能否健康成长发育的关键因素之一。

由于新生动物没有毛发,维持自身温度恒定的能力很差,环境温度是动物体温影响的决定因素。不同研究者在培育无菌啮齿动物选用的温度(如表 2),虽然不是所有的文献都明确记录了培育过程中的湿度,但为了阅读方便还是将所涉及的数据一并列入表中。

除了无法维持体温,仔畜在早期发育阶段(0 ~ 12 日龄)还无法自主排便排尿,只能通过人工刺激会阴部引导排泄。缺少这项工作会导致膀胱破裂而引起死亡。由于皮肤柔嫩只能使用柔软棉签进行操作,不然会导致排泄部位红肿破溃<sup>[12]</sup>。

垫料是动物直接接触的生活环境,具有保温、吸附排泄物等功能。在垫料的选择问题上,CHAPTER<sup>[12]</sup>认为去除粉尘的大片锯末是最佳选择。不应使用纱布或纸制品,纱布的纤维可能会缠绕住动物四肢导致损伤,而纸制品则易被动物误食引起肠道疾病。

## 2 人工乳的配制

在人工哺乳的前中期,人工乳是幼龄动物唯一食物来源。其营养成分能否满足新生动物早期生长发育的需求是影响幼龄动物成活率以及成年后有无限繁殖能力的决定性因素。

### 2.1 啮齿类实验动物母乳的营养成分

在人工哺乳领域,研究者们通过分析不同动物的母乳成分,为人工乳的配制提供了重要依据。为便于比较与分析,表 3 总结了相关文献中与营养成分相关的数据<sup>[24-29]</sup>。AUESTAD 等<sup>[18]</sup>学者致力于利用牛奶制品模拟大鼠母乳的营养成分,其关于大鼠母乳成分的分析与总结为后续相关研究提供了重要的数据参考。YAJIMA 等<sup>[24]</sup>进一步解析并对比了 ICR、BALB/c 和 FVB/N

表 1 人工哺乳方法的比较

Table 1 Comparison of artificial rearing methods

| 特点<br>Trait               | 强饲法<br>Force feeding  | 吮吸法<br>Hand feeding  | 自动哺乳法<br>Artificial feeding   |
|---------------------------|---|--|---|
| 操作方法<br>Operation process | 与大小鼠灌胃相似<br>Similar to gavage in rats and mouse   | 让动物自主吮吸人工乳头<br>Animals autonomously suck artificial nipples  | 使用手术方法将 PE 胃管固定在动物胃中<br>Surgically secure the PE tube in the animal's stomach   |
| 实验装置<br>Apparatus         | 使用模具进行自制灌胃针或购买商品化成品<br>Make gavage needles with molds or purchase commercially available products   | 使用模具进行自制人工乳头,无商品化成品<br>Make artificial nipples with molds, no commercially available products                            | PE 胃管、注射泵、水浴锅<br>PE tubes, infusion pumps, water bath   |
| 适用动物<br>Suitable animals  | 大鼠、小鼠<br>Rat, mouse   | 大鼠<br>Rat  | 小鼠<br>Mouse   |
| 对动物的损伤<br>Harm to animals | 操作会对动物食道黏膜造成损伤<br>Procedure will cause damage to the animal's esophageal mucosa   | 操作正确则对动物没有损伤<br>If the procedure is done correctly, there will be no harm to the animal                                  | 手术损伤<br>Surgical injury   |
| 优点<br>Advantages          | 装置简单、操作省时、授乳剂量准确可控<br>Device is simple, operation is time-saving, and the milk feeding dosage is accurate and controllable                  | 动物自主进食,一般不会出现摄食过多的情况<br>Animals usually do not overeat when they feed voluntarily  | 授乳剂量由机器精确控制,省时省力<br>Milk feeding dosage is precisely controlled by the machine, saving time and effort                                    |
| 缺点<br>Disadvantages       | 灌胃剂量选择不当会导致乳液溢出食道,引起异物性肺炎<br>Improper selection of gavage dosage can lead to milk overflow into the esophagus, causing aspiration pneumonia | 操作时间较长;动物容易吸入空气导致肠胃胀气<br>Operation time is long; animals are prone to inhaling air, leading to gastrointestinal bloating | 对设施设备要求高,前期需要对动物进行手术操作<br>High requirements for facilities and equipment; surgical procedures on animals are necessary in the early stage |

表 2 无菌啮齿动物培育温湿度

Table 2 Breeding temperature and humidity for germ-free rodents

| 环境温度<br>Temperature   | 湿度<br>Humidity   | 动物种类<br>Animal species | 参考文献 |
|---|--|------------------------|------|
| 0 ~ 4 d 35 °C (± 2 °C), 4 ~ 25 d 每 4 d 降低 1 °C。<br>0 ~ 4 d 35 °C (± 2 °C), 4 ~ 25 d every 4 d dropped by 1 °C             | 利用浸湿的布条提供湿度<br>Additional moisture was provided by strips of wet cloth | 小鼠<br>Mouse            | [9]  |
| 水浴锅 35 °C。<br>Water bath 35 °C  | -  | 小鼠<br>Mouse            | [23] |
| 0 ~ 21 d 31 ~ 33 °C   | 50% ~ 65%  | 大鼠<br>Rat              | [14] |
| 第 1 天 37 °C, 2 ~ 14 d 35 ~ 32 °C, 15 ~ 21 d 31~22 °C<br>In the first day 37 °C, 2 ~ 14 d 35 ~ 32 °C, 15 ~ 21 d 31 ~ 22 °C | 70% ~ 80%  | 大鼠<br>Rat              | [12] |
| 31 ± 1 °C   | -  | 豚鼠<br>Guinea pig       | [11] |

3 种品系小鼠的母乳成分,并基于此成功开发出一种化学衍生的小鼠人工乳。GÖRS 等<sup>[25]</sup>开发了微量方法(仅需 ≤ 200 μL 样本)分析小鼠乳汁中的干物质、脂肪、蛋白质和乳糖,解决了传统方法因样本量小和脂肪含量高导致的技术难题,

为研究啮齿动物母乳提供了可靠工具。此外,我国研究者夏爽等<sup>[28]</sup>对 SPF 金黄地鼠乳汁进行了全面分析,结果表明其具有高蛋白、低脂肪和低乳糖的特点,为无菌金黄地鼠的人工哺乳及配方乳配制工作提供了科学依据。由于啮齿类动物

表 3 常见啮齿实验动物母乳主要营养成分含量  
**Table 3** Nutrient composition of common rodent experimental animal's milk

| 营养素种类<br>Types of nutrients                    | 大鼠<br>Rat               | 小鼠<br>Mouse           | 金黄地鼠<br>Golden hamster |
|--|-------------------------|-----------------------|------------------------|
| 宏营养素<br>Macronutrients                         | -                       | -                     | -                      |
| 脂肪<br>Fat                                      | 93 ~ 175/(g/L)          | 21.3 ± 1.3/(g/100 mL) | 2.4/(g/100 g)          |
| 蛋白质(总含量)<br>Protein(total)                     | 69 ~ 118/(g/L)          | 10.8 ± 0.5/(g/100 mL) | 6.95/(g/100 g)         |
| 酪蛋白<br>Casein                                  | 64 ~ 80/(g/L)           | 78.5 ± 3.8/%          | -                      |
| 乳清蛋白<br>Whey                                   | 9.2 ~ 25/(g/L)          | 12.2 ± 0.2/%          | -                      |
| 碳水化合物(总含量)<br>Carbohydrate(total)              | 28 ~ 37/(g/L)           | -                     | -                      |
| 乳糖<br>Lactose                                  | 11.3 ~ 41/(g/L)         | 2.43 ± 0.25/%         | 2.61/(g/100 g)         |
| 灰分<br>Ash                                      | 13 ~ 15/(g/L)           | -                     | 0.83/(g/100 g)         |
| 矿物质<br>Minerals                                | -                       | -                     | -                      |
| 钙<br>Calcium                                   | 970 ~ 6200/(mg/L)       | 360.00/(mg/100 mL)    | 116/(mg/100 g)         |
| 磷<br>Phosphorus                                | 1600 ~ 2720/(mg/L)      | 216.00/(mg/100 mL)    | 78.1/(mg/100 g)        |
| 钠<br>Sodium                                    | 660 ~ 1400/(mg/L)       | 84.23/(mg/100 mL)     | 71.2/(mg/100 g)        |
| 钾<br>Potassium                                 | 1080 ~ 1700/(mg/L)      | 109.00/(mg/100 mL)    | 211(mg/100 g)          |
| 氯<br>Chloride                                  | 1170 ~ 1760/(mg/L)      | 147/(mg/100 mL)       | 未检出 Not detected       |
| 镁<br>Magnesium                                 | 0.1 ~ 310/(mg/L)        | 24/(mg/100 mL)        | 19.5/(mg/100 g)        |
| 锌<br>Zinc                                      | 9 ~ 55/(mg/L)           | 1.12/(mg/100 mL)      | 1.6/(mg/100 g)         |
| 碘<br>Iodine                                    | 4 ~ 7/(mg/L)            | -                     | 未检出 Not detected       |
| 铜<br>Copper                                    | 1.7 ~ 7.0/(mg/L)        | 0.26/(mg/100 mL)      | 191/(mg/100 g)         |
| 维生素<br>Vitamin                                 | -                       | -                     | -                      |
| 维生素 B <sub>1</sub><br>Vitamin B <sub>1</sub>   | 0.2040 ± 0.0082/(μg/mL) | -                     | 未检出 Not detected       |
| 维生素 B <sub>2</sub><br>Vitamin B <sub>2</sub>   | 4.67 ± 0.78/(μg/mL)     | -                     | 0.239/(mg/100 g)       |
| 维生素 B <sub>6</sub><br>Vitamin B <sub>6</sub>   | 1.49 ± 0.23/(μg/mL)     | -                     | 0.0958/(mg/100 g)      |
| 维生素 B <sub>12</sub><br>Vitamin B <sub>12</sub> | 0.032 ± 0.008/(μg/mL)   | -                     | 未检测 Not detected       |
| 烟酸<br>Niacin                                   | 7.02 ± 2.28/(μg/mL)     | -                     | 未检出 Not detected       |
| 泛酸<br>Pantothenic acid                         | 15.2 ± 6.6/(μg/mL)      | -                     | 未检出 Not detected       |

续表 3

| 营养素种类<br>Types of nutrients                  | 大鼠<br>Rat             | 小鼠<br>Mouse | 金黄地鼠<br>Golden hamster |
|--|-----------------------|-------------|------------------------|
| 叶酸<br>Folic acid                             | 2.91 ± 0.38/(μg/mL)   | -           | 未检出 Not detected       |
| 生物素<br>Biotin                                | 0.154 ± 0.047/(μg/mL) | -           | 未检测 Not detected       |
| 维生素 E<br>Vitamin E                           | 15.3 ± 0.55/(μg/mL)   | -           | 1.11/(mg/100 g)        |
| 维生素 K <sub>1</sub><br>Vitamin K <sub>1</sub> | -                     | -           | 9.81/(μg/100 g)        |
| 维生素 A<br>Vitamin A                           | -                     | -           | 1390/(μg/100 g)        |
| 能量含量<br>Energy content                       | 5120 ~ 9200/(kJ/L)    | -           | -                      |
| 渗透压<br>Osmolarity                            | 352/(mosm/L)          | -           | -                      |
| 酸碱度 pH                                       | 5.7 ~ 6.8             | -           | 6.61                   |

母乳的各种营养成分会随着哺乳日期的增加而发生变化。例如,SD 大鼠母乳在哺乳前期(0 ~ 4 d),蛋白和脂肪含量分别为(8.85 ± 0.24) g/100 mL 和(14.66 ± 1.07) g/100 mL。而到了哺乳末期(20 ~ 24 d),蛋白含量提高到(12.05 ± 0.33) g/100 mL,脂肪含量下降至(12.15 ± 0.83) g/100 mL<sup>[29]</sup>。因此在设计人工乳配方时,研究者需考虑上述因素,根据实验目的选择某一哺乳时期的母乳营养成分作为人工乳的配制模板<sup>[18,25]</sup>。

## 2.2 人工乳的配制

在早期实验中,国外研究者会使用啮齿动物母乳作为主要营养物质,再添加维生素、矿物质等补足缺失的营养素来配制人工乳。例如,前岛一淑<sup>[16]</sup>使用大鼠母乳、无糖炼乳、水和维生素混合物制作小鼠人工乳。由于大鼠乳不易获取,我国研究者采用兔乳替代大鼠乳<sup>[17,20]</sup>。但不论大鼠乳还是兔乳,除了不易收集,其本身的营养成份会因个体差异、饲养环境、采集时动物自身的生理状态等原因而发生改,导致无法准确计算人工乳中的营养成分。为排除这一干扰因素,成分固定的商业化奶制品(如婴儿配方奶粉)被用于配制人工乳<sup>[9,13]</sup>。这种方法配制流程简单,在普通实验室就可完成。但其营养成分一般只有蛋白质与脂肪含量能与动物母乳相近,但维生素、矿物质等微量营养素的含量与母乳差异较大。

在营养学领域,研究者使用一种在无菌条件

下利用乳制品和非乳制品合成剂配制的啮齿动物替代乳(rodent milk substitute, RMS)进行幼龄动物营养代谢的研究<sup>[15]</sup>。RMS 与上述人工乳相比最大的特点是各营养素含量与动物母乳高度相似,弥补了前者微量元素与母乳差异较大的缺点。在实验应用中,新生动物生长良好,根据文献报道饲喂 RMS 的动物的生长曲线与母乳喂养组差异不明显<sup>[18,25]</sup>。RMS 在应用中的良好表现得益于研究者在设计配方时致力于更细致地模拟动物母乳的营养构成。例如,大鼠母乳脂肪中,中链脂肪酸含量较高约为总量的 33%<sup>[30]</sup>。AUESTAD 等<sup>[18]</sup>报道的大鼠替代乳使用玉米油、大豆油、棕榈油、椰子油及中链脂肪酸混合物等 5 种油脂来模拟大鼠母乳的这种脂肪酸构成。此外,RMS 的物理性质稳定,经伽马辐照灭菌或在储存中反复冻融均不会对使用造成影响<sup>[25]</sup>。鉴于以上两个优点,RMS 在无菌啮齿动物培育领域表现同样良好。李文霞<sup>[31]</sup>以改良的大鼠替代乳为基础,利用强饲法成功建立无菌小鼠种群,人工哺乳组的小鼠生长发育良好与正常对照组无显著性差异。虽然 RMS 有诸多优点,但其制作过程复杂。以李文霞<sup>[31]</sup>的配方为例,涉及的试剂及材料多达五十余种,需要制作 3 种不同的预混液,每种预混液都要经过溶解、搅拌、均质、灭菌等步骤,最后再将预混液混合才能得到成品。制作过程需要搅拌机、匀质器、高压灭菌锅等多种专业

设备,对实验条件要求较高。

### 3 灭菌方法

灭菌是人工哺乳技术中的重要环节。成功培育无菌动物的前提条件就是要保证动物生活环境和环境中的所有物品中没有细菌、病毒、真菌或其他活的微生物。任何灭菌方法的效果都要与这一标准相适应。简而言之,灭菌一定要彻底。常用的灭菌方法有 4 种,分别是化学灭菌、高压蒸汽灭菌、环氧乙烷灭菌和辐照灭菌。在工作中要依据物品的材质(例如是否耐受高温、腐蚀,有无电器元件等)选择适合的灭菌方法。

化学灭菌用于灭菌隔离器内环境及一切放入隔离器中的物品、笼具和架子。常用的灭菌剂有过氧乙酸、二氧化氯和过氧化氢等。过氧乙酸是最早用于无菌动物工作中的灭菌剂,其效果好但具有腐蚀性和毒性,不能灭菌金属物品或灵敏装置并且对动物及环境有潜在危害。二氧化氯腐蚀性低、灭菌效果稳定。从对实验用品和环境的安全性考虑,是一种更好的灭菌剂<sup>[32]</sup>。高压蒸汽灭菌是在高温高压的条件下,利用水蒸气杀灭一切活的微生物的方法。一般用于饲料、高压桶、隔离器金属配件、盛装动物饮用水的玻璃瓶等耐热物品的灭菌。蒸汽灭菌法的灭菌效果取决于蒸汽能否穿透灭菌物品。在灭菌饲料时,应

考虑使用密度和厚度相对较小的饲料以达到良好的灭菌效果<sup>[33]</sup>。有些无菌动物设施采用辐照灭菌饲料<sup>[14,34]</sup>。由于灭菌前进行了预包装处理,辐照饲料更方便处理和使用。通过辐照,饲料的营养成分不像高压灭菌那样受影响<sup>[35]</sup>。此外,辐照饲料供应商会提供饲料的无菌检测报告,减少了污染隔离器的风险。然而,由于存在辐射耐受菌污染的风险依然存在<sup>[36]</sup>。环氧乙烷灭菌法是一种低温灭菌法,适用于既不耐热又不适用化学灭菌法的带有电器元件或较为灵敏的设备(例如电子天平)。另外,使用其他灭菌法会致钝的物品也适用于此法<sup>[37]</sup>。

与常规物品不同,人工乳含有丰富的营养物质,灭菌后某些营养物质会发生理化性质的改变。尤其在高压灭菌后因蛋白质变性形成沉淀,不仅造成营养成分流失,而且会在使用中堵塞哺乳装置。有研究报道,辐照灭菌奶粉其常规营养、氨基酸和微量元素的变化明显小于其液体灭菌组<sup>[38]</sup>。从灭菌条件上来看,在高压灭菌中,在 121 °C, 30 min 营养成分损失最小,辐照灭菌 50 kGy 灭菌条件下营养成分损失最小。为了减少人工乳在灭菌中的营养损失,可以将奶粉、蛋白粉等材料采用营养流失少的辐照灭菌,其他耐高温材料使用高压蒸汽灭菌,最后在隔离器中配制人工乳(表 4)。

表 4 人工乳的灭菌条件及方法

Table 4 Sterilization conditions and methods for milk substitute

| 灭菌方法及剂量<br>Sterilization method and dose   | 参考文献<br>References |
|--|--------------------|
| 奶粉 Co <sup>60</sup> 50 kGy; 蒸馏水 121 °C 高压灭菌 1 h<br>Powdered milk irradiated with 50 kGy of Co <sup>60</sup> ; distilled water was autoclaved at 121 °C for 1 h                                     | [31]               |
| 奶粉 Co <sup>60</sup> 50 kGy; 蒸馏水、新生牛血清 121 °C 高压灭菌 30 min<br>Powdered milk irradiated with 50 kGy of Co <sup>60</sup> ; distilled water and newborn calf serum were autoclaved at 121 °C for 30 min | [17]               |
| Co <sup>60</sup> 50 kGy  | [23]               |
| 人工乳高压灭菌 121 °C; 维生素 γ 射线 40 kGy<br>Artificial milk was autoclaved at 121 °C; vitamin irradiated with γ rays at 40 kGy  | [20]               |
| 人工乳 Co <sup>60</sup> 25 kGy<br>Artificial milk irradiated with 25 kGy of Co <sup>60</sup>  | [14]               |
| 人工乳 121 °C 高压灭菌 15 min<br>Artificial milk autoclaved at 121 °C for 15 min  | [9]                |

### 4 展望

近年来,无菌啮齿动物作为研究肠道微生物

与人类健康和疾病关系的重要工具应用愈发广泛<sup>[2,39-40]</sup>。与无菌动物相关的技术与设备也在不断发展<sup>[41-42]</sup>。反观人工哺乳技术,受实验动物的

品种(系)和专业的实验动物设施设备等因素的限制,很难大规模推广应用。基于此,本课题组近期致力于使用无菌大鼠、小鼠乳母通过代乳的方式培育无菌中国地鼠等新型无菌实验动物。虽然人工哺乳技术在上应用上受众多因素影响,但其也是开发在研究领域中的应用广泛但还未无菌化的实验动物的重要方法。金黄地鼠在世界上已育有近交系 38 个,突变系 17 个,封闭群 38 个,在实验啮齿动物中使用量仅次于小鼠、大鼠和豚鼠,常应用于肿瘤学、生殖学、代谢性疾病的研究<sup>[29,43]</sup>。但至今未见使用人工哺乳技术实现无菌化的报道。金黄地鼠的母乳成分与生长发育性能已有研究者进行报道<sup>[29]</sup>。从以往的经验来看,可以参考这些资料利用人工哺乳技术进行无菌化的尝试。一些非啮齿类动物的人工哺乳经验也可以借鉴参考。中国树鼩是一种类似松鼠的哺乳动物,在生物研究中有着多种应用。现已建立流感病毒、疱疹病毒、SARS-CoV-2 等多种病毒模型,在抑郁症、骨坏死、肿瘤等领域也有应用并认为是具有替代非人灵长类进行生物医学实验潜力的实验动物。中国科学院昆明动物研究所从 2013 年开始对人工哺育中国树鼩开展研究,详细报道了中国树鼩人工乳的营养成分、生长发育性能、哺育方法等实验内容<sup>[44]</sup>。与大鼠、小鼠相比,人工饲喂中国树鼩的方法并不复杂,使用医用注射器抽取人工乳,直接经口喂哺即可<sup>[45]</sup>。人工哺乳技术的一个主要应用是开发从未无菌化的实验动物。为了达成这一目标,研究人员应关注目标实验动物(如金黄地鼠、中国地鼠、中国树鼩)的临产征兆、幼龄动物生长发育特点、母乳成份等相关生理指标。在新时代和新趋势的要求下,利用人工哺乳技术发展与创新更多标准化、规模化、符合质量标准的新颖无菌动物。

#### 参 考 文 献(References)

- [1] YI P, LI L. The germfree murine animal: an important animal model for research on the relationship between gut microbiota and the host [J]. *Vet Microbiol*, 2012, 157(1/2): 1-7.
- [2] 胡雅谦,王珊珊,张童,等. 无菌动物在肠道微生物组研究中的应用与发展 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(7): 946-954.
- HU Y Q, WANG S S, ZHANG T, et al. Application and development of germ-free animals for gut microbiome research [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(7): 946-954.
- [3] 朱华,李卓,苏磊,等. 冠心病病人源肠道菌群小鼠模型的建立及评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(6): 716-724.
- ZHU H, LI Z, SU L, et al. Establishment and evaluation of a mouse model of human gut microbiota transplanted from patients of coronary heart disease [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2019, 27(6): 716-724.
- [4] 朱华,刘小海,李卓,等. 建立阿尔茨海默症人源肠道菌群动物模型 [J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(1): 55-62.
- ZHU H, LIU X H, LI Z, et al. Establishment of a human flora-associated mouse model correlated with Alzheimer's disease [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2021, 29(1): 55-62.
- [5] 李永军,李兰娟. 无菌动物无菌检测的探讨 [J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(1): 110-115.
- LI Y J, LI L J. Discussion on aseptic tests of germ-free animals [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2021, 29(1): 110-115.
- [6] 李建香,王君君,黄天马,等. 无菌鼠模型制作方法与评价 [J]. *实验动物科学*, 2022, 39(3): 67-69, 73.
- LI J X, WANG J J, HUANG T M, et al. Methods and evaluations of making germ-free rats and mice model [J]. *Lab Anim Sci*, 2022, 39(3): 67-69, 73.
- [7] NUTTALL G H F, THIERFELDER H. Thierisches leben ohne bakterien im verdauungskanal [J]. *Biological Chemistry*, 1897, 23(3): 231-235.
- [8] GUSTAFSSON B. Germ-free rearing of rats [J]. *Acta Anat (Basel)*, 1946, 2(3/4): 376-391.
- [9] PLEASANTS J R. Rearing germfree cesarean-born rats, mice, and rabbits through weaning [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1959, 78: 116-126.
- [10] REYNIERS J A, TREXLER P C, EEVIN R F. Rearing germ-free albino rats [M]. Indiana: University of Notre Dame; 1946.
- [11] SYUKUDA Y. Rearing of germfree guinea pigs and establishment of an SPF guinea pig colony [J]. *Jikken Dobutsu*, 1979, 28(1): 49-56.
- [12] CHAPTER V. Feeding and care of the young administration of the milk [J]. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 1948, 25(S73): 74-87.
- [13] 朱祥宇,刘君芳,周淑佩,等. 无菌大鼠培育的技术创新及其繁育探讨 [J]. *实验动物科学*, 2017, 34(1): 57

- 61.
- ZHU X Y, LIU J F, ZHOU S P, et al. Technical innovation and breeding research in germ-free rats [J]. *Lab Anim Sci*, 2017, 34(1): 57-61.
- [14] QV L, YANG Z, YAO M, et al. Methods for establishment and maintenance of germ-free rat models [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 1148.
- [15] IBRAHIM K G, USMAN D, BELLO M B, et al. Rodent models of metabolic disorders: considerations for use in studies of neonatal programming [J]. *Br J Nutr*, 2022, 128(5): 802-827.
- [16] 前岛一淑. 实验动物的无菌技术 [M]. 张静容, 张曙, 译. 北京: 科学出版社; 1983.
- QIANDAO Y S. A manual of germfree techniques for laboratory [M]. ZHANG J R, ZHANG S. Beijing: Science Press; 1983.
- [17] 易萍. 无菌大鼠模型的建立及相关生物学特性研究 [D]. 杭州: 浙江大学; 2013.
- YI P. Establishment of the germfree rat models and its characteristic study [D]. Hangzhou: Zhejiang University; 2013.
- [18] AUESTAD N, KORSAK R A, BERGSTROM J D, et al. Milk-substitutes comparable to rat's milk; their preparation, composition and impact on development and metabolism in the artificially reared rat [J]. *Br J Nutr*, 1989, 61(3): 495-518.
- [19] 王荫槐, 蒋观成, 寿克让. 无菌大鼠的开发与应用研究 [J]. *中国实验动物学杂志*, 1995, 5(2): 119-123.
- WANG Y H, JIANG G C, SHOU K R. Development and application of aseptic rats [J]. *Chin J Comp Med*, 1995, 5(2): 119-123.
- [20] 王建国. 无菌大鼠的人工培育及相关实验研究 [D]. 杭州: 浙江大学; 2006.
- WANG J G. Establishment of germfree rats and their techniques [D]. Hangzhou: Zhejiang University; 2006.
- [21] HOSHIBA J. Method for hand-feeding mouse pups with nursing bottles [J]. *Contemp Top Lab Anim Sci*, 2004, 43(3): 50-53.
- [22] YASUDA H, HARAUMA A, KATO M, et al. Artificially reared mice exhibit anxiety-like behavior in adulthood [J]. *Exp Anim*, 2016, 65(3): 267-274.
- [23] 曾本华. 建立 IHFA 小鼠模型研究阿莫西林对婴儿肠道菌群的影响 [D]. 重庆: 第三军医大学; 2012.
- ZENG B H. Establishment of an IHFA mouse model for evaluating the effect of amoxicillin treatment on infant gut microbiota [D]. Chongqing: Third Military Medical University; 2012.
- [24] YAJIMA M, KANNO T, YAJIMA T. A chemically derived milk substitute that is compatible with mouse milk for artificial rearing of mouse pups [J]. *Exp Anim*, 2006, 55(4): 391-397.
- [25] GÖRS S, KUCIA M, LANGHAMMER M, et al. Technical note: Milk composition in mice-methodological aspects and effects of mouse strain and lactation day [J]. *J Dairy Sci*, 2009, 92(2): 632-637.
- [26] ENDO M, SANO M, FUKUWATARI T, et al. Vitamin contents in rat milk and effects of dietary vitamin intakes of dams on the vitamin contents in their milk [J]. *J Nutr Sci Vitaminol*, 2011, 57(3): 203-208.
- [27] BOUMAHROU N, ANDREI S, MIRANDA G, et al. The major protein fraction of mouse milk revisited using proven proteomic tools [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2009, 60(3): 113-118.
- [28] 夏爽, 范方玲, 甘露, 等. SPF 金黄地鼠乳汁成份分析 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(4): 107-110.
- XIA S, FAN F L, GAN L, et al. Analysis of the components of SPF golden Hamster milk [J]. *Chin J Comp Med*, 2019, 29(4): 107-110.
- [29] KEEN C L, LÖNNERDAL B, CLEGG M, et al. Developmental changes in composition of rat milk: trace elements, minerals, protein, carbohydrate and fat [J]. *J Nutr*, 1981, 111(2): 226-236.
- [30] GLASS R L, TROOLIN H A, JENNESS R. Comparative biochemical studies of milks. IV. Constituent fatty acids of milk fats [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1967, 22(2): 415-425.
- [31] 李文霞. 无菌小鼠营养配方的初步研究 [D]. 重庆: 第三军医大学; 2017.
- LI W X. Preliminary study on nutritional formula of GF mice [D]. Chongqing: Third Military Medical University; 2017.
- [32] MOODY L V, MIYAMOTO Y, ANG J, et al. Evaluation of peroxides and chlorine oxides as disinfectants for chemical sterilization of gnotobiotic rodent isolators [J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2019, 58(5): 558-568.
- [33] National Research Council Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition. Nutrient requirements of laboratory animals [M]. Washington: National Academies Press; 1995.
- [34] ZUCOLOTO A Z, YU I L, MCCOY K D, et al. Generation, maintenance, and monitoring of gnotobiotic mice [J]. *STAR Protoc*, 2021, 2(2): 100536.
- [35] TUŚNIO A, TACIAK M, BARSZCZ M, et al. Thermal

- sterilization affects the content of selected compounds in diets for laboratory animals [J]. *J Anim Feed Sci*, 2014, 23(4): 351-360.
- [36] DALY M J, MINTON K W. Recombination between a resident plasmid and the chromosome following irradiation of the radioresistant bacterium *deinococcus radiodurans* [J]. *Gene*, 1997, 187(2): 225-229.
- [37] CHRISS J V, NATALIE E, KATHRYN A. Gnotobiotic mouse technology [M]. New York: CRC press; 2015.
- [38] 郭亚茜, 刘瑞雪, 杜晓鹏, 等. 不同灭菌方法对猪专用配方奶粉营养成分的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(12): 1588-1597.
- GUO Y Q, LIU R X, DU X P, et al. Effects of different sterilization methods on nutritional composition of pig-specific formula milk powder [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(12): 1588-1597.
- [39] 石伟雄, 李雪, 朱华, 等. 无菌动物及其在微生物与宿主相互作用机制研究中的应用 [J]. *微生物学报*, 2023, 63(10): 3773-3783.
- SHI W X, LI X, ZHU H, et al. Application of germ-free animals in the research on the mechanisms of microorganism-host interactions [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2023, 63(10): 3773-3783.
- [40] 朱茜, 谭向, 武志峰, 等. 无菌动物在肠道微生物组学研究中的应用研究现状 [J]. *实验动物科学*, 2022, 39(5): 79-83.
- ZHU X, TAN X, WU Z F, et al. Application of germ-free animals in gut microbiome research [J]. *Lab Anim Sci*, 2022, 39(5): 79-83.
- [41] 汪雨清. 一种适用于无菌基因工程小鼠制备的隔离器创制与验证 [D]. 武汉: 华中农业大学; 2023.
- WANG Y Q. Creation and validation of an isolator for the rederivation of germ-free genetically engineered mice [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University; 2023.
- [42] 杨亚鹏. 基于无菌动物解析粪菌移植定植影响因素及其干预溃疡性结肠炎效果评价 [D]. 武汉: 华中农业大学; 2022.
- YANG Y P. Influencing factors of fecal microbiota transplantation colonization were analyzed based on germ-free animals and evaluation of FMT intervention effect on ulcerative colitis [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University; 2022.
- [43] 郭亚茜, 杜晓鹏, 朱华. 金黄地鼠生物净化及其应用 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(5): 676-682.
- GUO Y X, DU X P, ZHU H. Biological purification and application of golden hamster [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(5): 676-682.
- [44] CHEN J Q, ZHANG Q, YU D, et al. Optimization of milk substitutes for the artificial rearing of Chinese tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*) [J]. *Animals*, 2022, 12(13): 1655.
- [45] TILLMANN S, WEGENER G. Syringe-feeding as a novel delivery method for accurate individual dosing of probiotics in rats [J]. *Benef Microbes*, 2018, 9(2): 311-315.

[收稿日期] 2024-04-17