

安徽实验动物信息

ANHUI LABORATORY ANIMAL INFORMATION

2023 年第 2 期总 52 期

安徽省实验动物学会

2023 年 3 月 28 日

目 录

[工作动态]

生物安全实验室建设与装备技术发展研讨会在合肥成功举办..... 1

[业界动态]

国家重点研发计划“灵长类实验动物育种、繁育、SPF 猴培育及资源保护研究”项目启动会召开..... 3

[热点关注]

主动延长 3 年试验周期！中国科学家获重要突破..... 5

[综合资讯]

写在《实验动物管理条例》发布实施三十周年系列篇之二十六—小型猪近交系培育及利用..... 10

责任编辑：田军 刘骅 周宁

电话：0551-63368779

地址：合肥市梅山路 81 号

邮编：230031

E-mail:945651787@qq.com ahmulh@163.com 632333919@qq.com

工作动态

生物安全实验室建设与装备技术发展研讨会 在合肥成功举办

2023 年 3 月 22 日，由安徽省实验动物学会主办、青岛丞拾实验室技术有限公司和艾利特生物科技（上海）有限公司承办的生物安全实验室建设与装备技术发展研讨会在合肥成功举办，来自省内生物医药企业和高校科研机构生物安全实验室的相关工作人员约 70 余人参加了本次研讨会。



研讨会现场

研讨会由安徽省实验动物学会副理事长李庆林、黄德武主持，秘书长周宁做大会总结发言。会议围绕生物安全实验室体系建设、风险评估及运行管理主题，安徽医科大学基础医学院微生物学教研室主任柳燕教授、中国科学技术大学生物安全三级实验室副主任朱峰老师分别作了“动物生物安全实验室管理”和“高级别生物安全实验室建设”主旨报告。研讨部分，青岛丞拾实验室技术有限公司张晓华经理和滕飞经理分别就“生物安全实验室、动物室（含 GLP）建设及认证实施要点”、“基于生物安全实验室、动物房使用痛点的系统解决方案”进行了交流，他们结合近几年承接的大型实

验室建设案例，在高等级实验室建设和废弃物处理系统方面提出了解决方案；艾利特生物科技（上海）有限公司的王英经理和景璐璐经理分别就“生物安全实验室废弃物灭菌失败原因分析及灭菌柜的选型”、“Castor 高通量智能细胞分析平台在类器官领域的应用”进行了交流，受到了与会代表的热烈欢迎。



柳燕教授 作报告



朱峰老师 作报告





研讨会交流

此次研讨会恰逢《中华人民共和国生物安全法》实施二周年。在党的二十大报告中，习近平总书记指出，要推进国家安全体系和能力现代化，坚决维护国家安全和社会稳定。安全是发展的前提，发展是安全的保障。此次研讨会的举办对我省生物医药从业人员进一步贯彻落实、参与实施生命科学与医药生物技术领域的可持续创新发展起到了积极的推动作用，并坚定了奉行生物安全实验室管理理念，将发展建立在更加安全、更为可靠的基础之上。



全体代表合影

(安徽省实验动物学会秘书处 供稿)

业界动态

国家重点研发计划“灵长类实验动物育种、繁育、SPF 猴培育及资源保护研究”项目启动会召开

3 月 14 日,由中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心研究员孙强主持、中国科学院昆明动物研究所参与的国家重点研发计划“灵长类实验动物育种、繁育、SPF 猴培育及资源保护研究”项目启动暨实施方案论证会在昆明动物所举行。

会议以线上线下结合的方式进行。中国 21 世纪议程管理中心、中科院科技促进发展局、中国食品药品检定研究院、北京市实验动物管理办公室、中国农业科学院哈尔滨兽医研究所、昆明理工大学、中科院深圳先进技术研究院、中国医学科学院医学生物学研究所、莫泰科生物技术咨询(北京)有限公司、昆明动物研究所各相关课题负责人及骨干成员等 40 多人参加了会议。启动会开幕式由昆明动物所副所长毛炳宇主持。

昆明动物所所长姚永刚在致辞中对参会的领导、专家表示了欢迎与感谢,他强调研究所相关部门应全力做好项目实施的支撑保障与过程管理,并希望项目组能够团结协作、勇于创新,争取多出成果,出好成果。相关部门领导对项目的实施与管理也提出了具体要求,希望项目在基础研究、关键技术、人才队伍、平台搭建等方面取得进步。孙强汇报了项目的总体情况,课题负责人吕龙宝、杨玲焰分别对项目各课

题实施方案做了汇报，参会人员进行了热烈的讨论，明确了下一步的任务目标。

灵长类动物是人类的近亲，在探知人类生命奥秘、解析疾病机理、新药研发等方面具有不可替代性，是跨越基础研究与临床医学鸿沟的桥梁。昆明动物研究所在灵长类研究领域具有长期的积累，并承担了国家模式动物（灵长类）表型与遗传研究设施、国家非人灵长类实验动物资源库等重大平台的建设，将为项目的实施提供有力保障。本次启动的专项项目聚焦于“灵长类实验动物育种、繁育、SPF 猴培育及资源保护研究”，具有重要的科学意义与潜在的应用价值。项目组将按照会议意见和建议，完善优化实施方案，联合各合作单位，确保项目保质高效完成，进一步推动我国在灵长类实验动物高品质猴培育及资源保护研究，为非人灵长类资源的国家战略储备和可持续利用发挥重要作用。

（转自《中国实验动物信息网》）

热点关注

主动延长 3 年试验周期！中国科学家获重要突破

2017 年 10 月，昆明理工大学实验员李俊把一种特殊的细胞注射进患有帕金森病的恒河猴体内。两周后，这只本已经肌肉僵直、整天趴在笼子里的猴子竟然逐渐挺起身子，能自己抓东西吃了。

这是李俊从事科研工作几年来，感到最兴奋的一刻。

他们后来又陆续为另外 8 只猴子进行了注射。无一例外，这些猴子原有的帕金森病症状都得到了改善，而且随着时间推移，与健康猴的差异越来越小。更值得一提的是，经过漫长的 5 年（相当于人类寿命的 22 年左右）后，这些猴子依然保持着显著的治疗效果。

近日，这篇由昆明理工大学灵长类转化医学研究院李天晴教授、季维智院士团队完成的论文，发表在帕金森病领域的重要期刊 npj Parkinsons Disease 上。



第一作者：李俊（左一），栗楠（左二），魏景宽（左三）；
通讯作者：李天晴（右一）

在大脑里“种”下能治病的细胞

帕金森病是继肿瘤、心脑血管病之后中老年健康的“第三杀手”，其发病率和死亡率都非常高，6 年内的死亡率高达 66%。

帕金森病是由中脑黑质多巴胺能神经元死亡，导致纹状体多巴胺分泌减少所引起的。因此缺啥补啥，当前临床上采用的药物治疗方法，主要是口服 L-左旋多巴胺。但口服该物质几乎有 99% 都会在血液系统里代谢掉，只有约 1% 能进入大脑发挥作用。这样的药物不仅利用率低，长期使用还容易导致一系列副作用，如运动障碍，认知障碍，睡眠障碍等。

李天晴/季唯智团队长期致力于灵长类动物干细胞研究。他们想，可不可以制造一种基因工程化的细胞，把它定

点移植到纹状体，让它在脑内直接表达多巴胺神经递质。如果这种细胞可以在体内存活，就可以持续释放多巴胺神经递质。这比经常吃药更加方便，而且长期下来，成本也更低。

“这个想法最初诞生于 2014 年。”李天晴对《中国科学报》说，当时他恰好承担了科技部一个关于帕金森干细胞治疗的项目。他的团队把 3 个特定基因：TH、GCH 和 AADC，转入一个细胞系里，让这个细胞系可以表达多巴胺神经递质。经过大量的安全性评估工作后，他们先把这种基因工程化间充质干细胞注射进患有帕金森病的大鼠体内。一两周之后，这些大鼠的症状就得到了显著缓解。

“这个现象让我们非常振奋，我几乎有两个晚上完全没有睡着。”李天晴说，“我们立刻决定，在这个基础上开展灵长类动物实验。”

如果在与人类最为接近的灵长类动物身上，这种疗法也能安全地产生疗效，那无疑将是一个重大突破。

与此同时，每个人都清楚，做灵长类实验，意味着多么漫长的研究周期。



李天晴

看到希望了，就多坚持一下

李俊是读硕士研究生期间接手这个课题的。当时就有师兄师姐提醒他：这个课题周期太长了，有可能影响毕业，不如做点别的。

但李俊的想法不一样。他的爷爷患有严重帕金森病，在短短几年内，就从每天早晨能出去遛弯的生活状态，一步步恶化到手脚不由自主地震颤，生活逐渐难以自理。正因如此，他对这个课题怀有一份别样的感情。

“特别是细胞注射进大鼠和猴子体内，看到这些动物有了显著的好转，我就觉得，既然看到希望了，为什么不多坚持一下？”他说。

研究过程充满挑战。他们是从帕金森病恒河猴模型构建开始做起的。最初猴子出现了类似帕金森病的症状，大家以为模型制作成功了。但是跟临床医生一交流，又发现猴子的症状还没有那么典型。

为了更加深刻地理解这种疾病，李俊等人还加入了帕金森病的病友群，像做采访一样，咨询他们的切身体验。他们还和相关领域的研究人员交流，总结各方经验，终于在 2016 年的 12 月 12 日，成功建立了第一只稳定的帕金森病模型猴。

凭借成功建模的工作，李俊并没像很多人预期的那样遭遇延期，顺利拿到了硕士毕业证。毕业后，他没有继续攻读博士，而是根据自己的特点和所长，留在这里做一名实验员，继续和猴子们打交道。

2017 年后，他亲眼看到接受过基因工程化间充质干细胞注射的猴子们，开始恢复运动，恢复食量，体重逐渐回升到与患病前接近的水平。而那些对照组的猴子，身体状态则每况愈下。

最初，他们只打算观察两年。然而两年过去了，这些猴子的状态越来越好，在这期间，除了两次间充质干细胞移植外，没有其他特殊处理。这让研究人员们意外又惊喜，于是决定继续观察，这一观察就是整整 5 年。

所有治疗组的猴子，包括那些一度完全失去自我运动和进食功能的重症猴，都在这 5 年间保持了良好的治疗效果。



团队合影

什么时候能走向临床？

2022 年 8 月，研究团队把这项工作投稿到帕金森病领域的知名刊物 npj Parkinsons Disease 上，审稿过程非常顺利，论文于 2022 年 12 月 22 日在线发表。

“你们的研究文章报道了有趣的结果……结果令人信服地支持结论，显示移植多巴胺间充质干细胞后，动物们表现出运动行为的改善，以及与纹状体多巴胺水平有关的认知恢复。这篇论文对帕金森病的细胞替代治疗领域做出了重要贡献。”审稿人这样写道。

论文发表后，李天晴收到很多帕金森病患者发来的信息。他们问：你们什么时候能把这项成果运用到临床呢？

“从目前的动物试验来看，我们这套疗法具有操作简便、见效快、能在较长时间内稳定维持疗效的优点。特别是与其他细胞药物，如 120 万元一针的 CAR-T 抗癌药物相比，这种工程化的细胞很容易扩增，因此治疗成本也不会很高。”李天晴说。

目前他们正在与企业联系合作，希望能够实现这种细胞的标准化的规模化制备，经过大量安全性和有效性评估后，进一步推向临床试验。

“我只是一个科研工作者，并不是很擅长后续临床试验和商业合作的事情。因此我很希望相关领域的专业人士能够参与进来，和我们一起努力推进。”李天晴说，“如果未来这项成果能够真正应用于临床，造福广大帕金森病患者，那将是我们最荣幸的事情。”

(转自《中国实验动物信息网》)

综合资讯

写在《实验动物管理条例》发布实施三十周年 系列篇之二十六— 小型猪近交系培育及利用

摘要：1988 年《实验动物管理条例》发布实施，在实验动物工作规范化、法制化管理，保障实验动物和动物实验的质量，推动我国科技发展和民生保障等方面发挥了重要作用。特别是在实验动物资源标准化、新品种/品系开发和动物模型创制方面，取得了令人瞩目的成果。为此，借“科技

资讯”之窗，陆续推出我国实验动物专家在此领域所作的工作及取得的应用成果。

编者：资源增量是实验动物科技发展的核心任务，是实验动物对生命科学研究提供支撑和服务的基础和保障。自上世纪 80 年代以来，我国老一辈实验动物科学家苦心孤诣，在实验动物资源研发工作中取得的多项开创新成果。

1988 年《实验动物管理条例》发布实施，在实验动物工作规范化、法制化管理，保障实验动物和动物实验的质量，推动我国科技发展和民生保障等方面发挥了重要作用。特别是在实验动物资源标准化、新品种/品系开发和动物模型创制方面，取得了令人瞩目的成果。

为此，借“科技资讯”之窗，陆续推出我国实验动物专家在此领域所作的工作及取得的应用成果。

小型猪近交系培育及利用

一记五指山小型猪的标准化与应用成果三十年

冯书堂 北京盖兰德生物科技有限公司

众所周知，由于近交系鼠类动物遗传稳定、反应灵敏、生物学特性一致性好，同物理学精密仪器和化学分析纯试剂一样能提供更为精确、科学的检测结果，已广泛应用于生命科学众多领域，如单克隆抗体制备等，近代生命科学诺贝尔奖获得者的研究成果，几乎所有的试验均是在近交系鼠类动物模型上完成的。并由此创建了多项具有划时代意义的理论学说，带来了年收益达上亿元的生物医药价值。所以，自 Clarence C.Little 于 1909 年研究小鼠毛色基因、通过全同胞交配的方法建立了第一个近交系鼠以来，目前已培育出数百

个近交系鼠、兔、鸡等动物。近交系动物已成为解决人类疑难病症和生命基础科学领域研究中不可或缺的技术平台之一[1]。猪在生殖生理、营养代谢等种质特异性与鼠类有本质的差异,较鼠类更接近人类。培育近交系猪前人已奋斗多年,据报道,1920 年以后美国开始利用商品肉猪进行大规模的近交系培育研究。1936 年,美国农业部组织协作组对由不同品种产生的 110 个实验群进行测试,其近交系数分别为 0.3、0.6。第二次世界大战结束以后,英国等欧洲多国单位和公司,也相继利用商品肉猪进行大规模的近交系培育研究,但由于近交繁育导致大批仔猪死亡,繁殖力衰退严重,不得不改用半同胞或远亲交配,以维护其生产性能。截至 20 世纪 70 年代,美国 Lasley 于 1978 年曾报道猪的最高近交系数仅达到 0.75。同时日本学者 Mezrich 等报道,利用连续的相继的兄妹或者亲代与子代交配的方法已获得 F7~F9,其近交系数仅达到 0.75。所以培育近交系猪十分困难,是人类为之奋斗半个多世纪的梦想[1]。

上世纪八十年代,在我国改革开放政策阳光指引下,我国实验动物同其他行业一样,迎来发展大好局面,我国 1989 年《实验动物管理条例》发布实施孕育而生,我们认真学习、贯彻执行《条例》精神、付诸于实际行动,自 1989 年至 2018 年,在农业部、科技部、北京市科委、国家自然科学基金委等 20 多个项目先后资助下,累计先后投资约 2000 万元,以 1 公 1 母五指山小型猪(*Sus scrofa*)(Wuzhishan inbreeding mini-pig,WZSP)为系祖,开始了实验化近交系培育,育成了

国际首个经异体皮肤移植等多方法鉴定的近交系新品种。使我国在大型哺乳动物近交系猪资源创新研究中处于国际领先地位，在国内外产生了较大的影响，美国、日本、以色列、德国、韩国等纷纷要求合作研究或引种，其主要原因在于近交系猪至今未见育成报道，是特殊的动物遗传资源，具有很高的使用价值和潜在的研究意义[1、2]。

WZSP 近交系培育历经近 30 年，如今恰逢《条例》发表三十周年之际，回忆整个 WZSP 近交系标准化培育过程，感逐颇深：我们经历了冒雨产地山区寻找的困苦、白云山机场托运的磨难；屡配不孕的困惑、卧息猪圈等待产仔的艰辛；近交繁育带来“三高一低”不良影响的焦虑；因保种负债累累、惨淡经营；确保宝贵资源不流失、而限制发展的无奈；异地保种的成功、近交培育初获结果的自信；国家农业部、科技部等领导的重视、获多方资助、标准化研究近交系育成、创建了近交系鉴定方法与标准、建立了标准化实验猪场、促进了北京地标研发与颁布，提高了北京市乃至全国实验用猪标准化水平。标准化成果开发应用，证实了该近交系种质的先进性及优势，促进近交系成果的转让成功，促进了 PERV 无传染性种群的建立，促进了近交系猪-猴角膜异种产品移植研发，促进医药生物材料研发与利用，如战地抗凝血制剂、用于新药鉴定、转基因水稻食品安全检测等方面研发，培育出人源化基因猪，猪-猴肝脏异种移植等取得重大进展。尤其是完成近交系培育与鉴定的获奖的喜悦；转让成功看到的希望，再次冲击、登入国家异种移植研究殿堂“实现梦想”更

感到历史赋予的重大责任。现将 WZSP 近交系标准化研究成果分述如下：

1、WZSP 濒临灭绝与异地保种历史机遇（1975-1989）

为什么搞小型猪，为什么要搞五指山小型猪？还要追索到我国改革开放初期，1983-1984 年研究者在西德学习时，有幸参观西德哥廷根小型猪（Gottengen Miniature Pig）育种中心，了解到西方国家已将小型猪大量应用于人类疾病动物模型，同时又是猪胚胎工程极好的研究对象，哥廷根小型猪已销售到多个国家和地区，于是产生了引回中国开发应用的念头。由于种种原因未能实现，在此期间，国内经历了大规模的家畜品种资源调查，发现了众多特异性畜禽品种，WZSP 就是其中一例，但已濒临灭绝[2、3]。1987 年为保护这一宝贵资源，立即购买发现的 8 头纯种猪，在原通什农业专科学校定点保存和观测，由于种种原因，1989 年再次处于濒灭境地。从资料上分析，五指山猪的小型化特征、遗传稳定性要远远好于西德哥廷根小型猪，将会具有较好的应用前景。基于这种思考，1989 年为保护这一宝贵资源，克服种种困难，将仅存留的 2 头小母猪（后其中一头肠胃疾病死亡）和 1 头小公猪运至北京，开始了漫长的保种和近交繁育[2]。

2、WZSP 异地保种成功，为标准化培育奠定基础（1989-1995）

在农业部畜牧总局：小型猪繁殖特性研究（09）；农业部行业重点攻关：五指山小型猪选育研究（85 牧—07—03）、近交系五指山小型猪培育及开发利用研究（95 牧—02-08—

03)；国家自然科学基金重点项目：实验用五指山猪近交系建系研究(39830190)等项目资助下开展了成果 1：《实验用五指山小型猪种质特性及开发应用研究》。

2.1 遇到的难题

1989 年 5 月 28 号 WZSP 运至北京首先遇到第一个问题，是五指山猪是否具有小型特征？是关系到 WZSP 有无开发应用价值的大问题！也是同行关注的焦点，当时我们也难以肯定回答，为解决此“心头雾团”，首先采取“自由采食、不限量”。两年后发现原引种猪胸围增大、但腿不增高，两年未打任何疫苗、未发生传染性疾病。表现 WZSP 确具有体型小、适应能力强的特点，见图 1。

异地保种遇到第二个问题，是发情不排卵、配不上种。我们采用 PMSG+HCG 外源激素处理的办法解决、以及定时观测，逐步掌握了其生物特性和饲繁规律。获得妊娠并产仔，迈出了异地保种成功的第一步。

异地保种遇到第三个问题，是由于近交后代仔猪畸形率、弱仔率高，招致死亡率高、不足 20%(见图 2)，及时采用提高营养水平、加强运动、草场自由采食，以及改善生态环境修改暖房等措施，逐步掌握了其生物特性和饲繁规律。迈出了异地保种成功的第一步，1994 年基础母猪 30 余头。

2.2 研究初步发现

WZSP 在生长激素位点特异性，即：生长激素在动物的生长发育过程中起着十分重要的调控作用,为此对 WZSP 的生长激素位点进行了初步的研究。以猪的生长激素

(GH)cDNA 为探针,利用 BamHI、DraI、EcoRV、HindIII、KpnI、PstI、SacI、SmaI、XbaI 等酶切基因组 DNA 进行了 RFLP 分析,结果发现酶切杂交图谱上出现差异,特异的深色带可能与 WZSP 在 GH 位点上的所代表的等位基因的结构和功能有关、尚待进一步研究。为此,利用国际合作机会,在美国耶鲁大学、佐治亚医学院对 WZSP 生长激素基因序列及其结构分别进行了三次测定,均具有相同的特异性。即:WZSP 的 GH 基因序列与 Vize 发表的普通猪的 GH 基因序列有所不同处,并导致部分氨基酸的改变。这种改变对 WZSP 生长激素基因的结构及基因表达都可能会产生一定的影响,为后来进一步深入研究其矮小型指明方向。

2.3 WZSP 具有特异性遗传标记

在 WZSP 特异性遗传标记研究中,对长白猪、WZSP 和枫泾猪三品种的肝组织总 RNA 进行 DDRT-PCR 分析,经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳共产生 24 条多态性 cDNA 片段。在其扩增、标记和克隆后,经 Northern 杂交鉴定,证明一个长 221bp 的片段为 WZSP 特有的,以克隆的特异性片段,调出其全基因进行分析和比较,为探索不品种表型差异的分子遗传基础提供一条线索、为后来进一步研究 WZSP 的遗传标记奠定了基础和信心。

2.4 近交繁育推进十个世代[2、3]

利用采用“仔配母”、“全同胞”交配等措施(见图 3),继续获得 F8、F9 等仔猪部分个体,提供共同参加国家自然科学基金重大项目的华西医科大学,进行适宜异种器官移植

猪的筛选研究。李幼平等（2000）在研究近交系西双版纳小耳猪和 WZSP DNA 指纹图谱相似系数和近交系数的相互关系中证实：WZSP 近交 8 代的 DNA 指纹图谱相似系数，等同于近交系西双版纳小耳猪的第 12 代。表明 WZSP 实际已近亲繁殖第 18 代，基因高度纯合，近交系数已达 0.98。培育出我国乃至世界上第一批实验用近交系猪群，具国际领先水平。

2.5 近交繁育佐证原引 2 头种猪已是近交个体[2、3]

为挽救这一濒临灭绝的猪种，我所从 1987 年起就开始主持原地保种、定点观察等一系列工作。本项目培育的近交系，就是从原产地定点观察后、最终存留的同窝的 1 公 1 母近交繁育而成的。但原地保种、定点观察的几头纯种的五指山猪究竟近亲繁殖了多少代已无从考证，也是 WZSP 在近交繁育、近交系的建立过程中要研究，而且必需回答的问题之一。原北京农业大学孟安明教授研究报告（1995），利用鸡的小微卫星 cMS18 探针对原引 2 头种猪及长白猪和枫泾猪 DNA 指纹图相似系数比较分析，发现原引 2 头种猪 DNA 指纹图相似系数为 0.632，极显著的高于一般国内外品种猪长白猪（0.481）和枫泾猪（0.473）。按近交系小鼠每近交推进 1 个世代，其 DNA 指纹图相似系数平均提高 0.02 的相互关系来计算，原引种猪已是近交 F7 世代个体。这一结果后来华西医科大学也得到验证（移植免疫生物学，科学出版社，2000）；不仅为该近交培育准确建系奠定科学基础，也为其耐近交特性提供了科学依据。因此，依此近交基础建立该近

交系是科学的。

2.6 DNA 指纹图相似系数监测[2]

协作单位原北京农业大学孟安明教授研究报告（1995）采用 33.6 和 33.15 微卫星探针对 F8、F9、F10 群体监测，结果显示近交 F8 个体间 DNA 指纹图相似系数为 0.678，F8 与 F9 间的数值为 0.785，F9 与 F10 间的数值为 0.855，F10 个体间的数值为 0.906，其步进值略大于近交系小鼠的测定报道的平均值（0.02）。另利用 9 对微卫星探针对其 F14、F15、F16 群体（不分家系）检测，其基因座位杂合度（H）和多态信息含量（PIC）分别为 0.4201、0.4035、0.3259 和 0.3442、0.3353、0.3008，呈现递减，即 $H_{14} \geq H_{15} \geq H_{16}$ 和 $PIC_{14} \geq PIC_{15} \geq PIC_{16}$ 。表明随着近交世代的递增，群体的遗传变异降低，其基因的纯合度越来越高；进一步分析还发现家系 II 的 H 及 PIC 分别为 0.2075 和 0.1588，其值小于 0.25，表明该家系基因已高度纯合。

2.7 分子遗传基础与种质特异性研究[2]

通过分子遗传学特性研究，首次发现：WZSP DNA 指纹图谱具有特异性；生长激素基因 FRLP 具有特异性位点；MHSn（应激反应）基因频率为 0（0/44）；221bp 片段为其具有的特异性遗传标记；WZSP 生长激素基因序列与普通猪有很大差异，即：内含子区有 14 个碱基缺失、6 个碱基错位，外显子区有 3 个碱基发生变化并造成了 3 个氨基酸残基变化；有关小型猪分子遗传学特异性研究国际尚未见报道。在国内、外首次开展小型猪分子遗传学特异性研究。首次发现：

1) WZSP DNA 指纹图谱具有特异性。

2) WZSP MHSn 基因频率为 0 (0/44)。

3) 分离、克隆的 221bp 片段 (长白猪、枫泾猪无) 为其分子遗传特异性标记。

4) WZSP 生长激素基因序列分离、克隆、序列测定和分析证实,与普通猪有很大差异 (Vize.1990),内含子区有 14 个碱基缺失、6 个碱基错位,外显子区有 3 个碱基发生变化并造成了 3 个氨基酸残基变化,其中有 2 个处于生长激素氨基酸序列的高度保守区。初步揭示了其分子遗传学特异性。为其分子遗传学鉴定标准提供了科学依据。

5) 通过生长发育规律、血液生理生化值测定、实验化培育、发现具有诸多特异性,体型小、体重轻、生长发育极为缓慢 (6 月龄 $13.43 \pm 3.27\text{kg}$; 24 月龄 $36.65 \pm 9.17\text{kg}$)、性成熟早、遗传稳定;并首次发现 WZSP 50 多种血液生理生化值近似人类、心冠状动脉前降支分布与中国人第二型 (占总人数 90%) 相似。但白血球分类中淋巴细胞含量 (75%) 显著高于普通猪 (52%) 和人类 (25-35%),可能与其有较强的伤口愈合能力有关。李幼平等在研究选择适宜猪-人异种器官移植近交系猪中还发现:培育的近交系 WZSP 生理功能、药物清除功能、肝脏和心脏的生化及合成功能、药物代谢功能等与人类相近,未发现功能明显不匹配之处[4]。

6) 通过白细胞抗原血清学 (SLA) 研究,首次发现其 C 位点出现 W2 抗原、B 位点出现 W6 抗原。这种组成在其它品种猪中未曾发现:通过 50 多种影响肉质及风味特异性物

质研究，其奎啉酸和丙二酸乙基戊基脂含量分别高于普通猪肉 8 倍和 20 倍[2]。

2.8 研究成果创新点[3]

将濒灭的、珍稀品种 WZSP 异地保种获得成功，对我国畜禽品种资源保存是一个贡献；在国内首次对 WZSP 进行了多方位、深层次的种质特异性研究，为今后开发利用提供了科学依据。发现：WZSP 体型小、体重轻、生长发育极为缓慢、性成熟早、耐近亲繁殖、遗传稳定；其血液生理生化值 50 多指标近似人类；WZSP 肉中奎啉酸和丙二酸乙基戊基脂含量，分别高于普通猪肉 8 倍和 20 倍。并证实应激反应基因（MHSn）频率为 0（0/44）；培育出我国乃至世界上近交系数最高、实验用近交系种猪群；在国内、外首次开展小型猪分子遗传学特异性研究。达国际领先水平。

首次发现：

- 1) WZSP DNA 指纹图谱具有特异性。
- 2) WZSP MHSn 基因频率为 0（0/44）。
- 3) 221bp 为其特有片段（长白猪、枫泾猪无）。

4) WZSP 生长激素基因序列与普通猪有很大差异：内含子区有 14 个碱基缺失、6 个碱基错位，外显子区有 3 个碱基发生变化并造成了 3 个氨基酸残基变化，其中有 2 个处于生长激素氨基酸序列的高度保守区。

开展了应用：在国内与解放军 304 医院、北京口腔医科大学、北京中医医科大学、同仁医院、北医三院、中国医科大学、中国兽药监察所、中国农业大学生物学院、兽医学院、

南京农业大学等十余个单位合作,对 **WZSP** 首次进行人类烧伤修复、口腔、牙齿病理、心血管疾病模型、胰腺等细胞移植以及畜牧、兽医上的营养代谢、细菌、猪瘟病毒敏感性试验、胚胎工程等全方位、十余项内容的开发应用研究。解决了心脏血管易破裂、血管上皮细胞转染 **CD59** 基因,体外培养获得成功、人类烧伤修复药物的研制、人类口腔牙齿动力学等临床应用难题,在国内对 **WZSP** 首次进行大量的人类烧伤修复、口腔、牙齿病理以及畜牧、兽医等十余项开发应用研究,对其开发应用价值作出了全面的评估。为今后开发利用提供了科学依据。

在此期间,完成 **WZSP** 近交系标准化研究成果 1:《实验用五指山小型猪特异性与开发利用》,1996 年通过农业部组织专家的成果鉴定(1996-1975)(见图 4)。

1996 年 11 月 29 日《科技日报》报道 **WZSP** 实验化培育异地保种成功。

1999 年荣获农业部科技进步三等奖。

3、近交系培育标准化研究取得重大突破(1996-2005)

近十年 **WZSP** 近交系培育与开发利用,证明培育出的近交系及其分子遗传学特异性,是人类比较医学研究的较佳素材,并具有打入国际实验动物市场的能力。已引起国内、外有专家的兴趣和关注,纷纷要求引种或合作研究。也引起我国政府部门重视。为此,实验用 **WZSP** 标准化研究得到科技部获多项资助:中国实验用小型猪资源开发与研究应用(2004BA717B)、用于异种器官移植五指山小型猪 **SLA** 及 **EG**

细胞建系研究(2003AA215103)、五指山猪近交系及油鸡资源保存和利用研究(2003DEB6J078)、我国小型猪实验化培育与生物安全性研究(2001DIA40036),农业部五指山猪遗传资源保护项目和国家自然科学基金委五指山猪实验用近交系的建立(39830190)、国家自然科学基金重大项目:异种器官移植基础研究(No.39993430)等项目资助,为近交系培育与研究奠定了坚实基础。首先制订了 WZSP 近交系培育总体思路,如下图 5 示。

3.1 建立了近交繁育技术规程、标准化取得重大进展

采用“仔配母”、“全同胞交配”+分子遗传标记最大限度的提高近交速度,最大限度提高群体基因的纯合度、淘汰有害基因。通过 500 头次数据分析表明近交对繁殖力影响很大,F8~F9 仔猪成活率极低、仔猪成活率分别为 19.05%、22.22%、并伴有发情不排卵、屡配不孕、断代现象发生。为解决这一难题,采取 PMSG+HCG 的“诱导发情”、提高饲料营养水平(即:由原来的 13%的蛋白水平提高到 16%)、定期舍外运动(即:效仿原生环境,每周放牧 2—3 次,每次在草丛的场地中 4—6 小时)等措施(见图 6),逐步克服近交对其繁殖力的不良影响,即木乃伊率高、弱仔率高、死亡率高、断代率高等。但随着近交代数的增加,其仔猪成活率逐渐提高,其死胎、木乃伊比例逐渐降低,其窝产仔数亦有增加的趋势。如 F14 窝产仔数为 5.75 ± 1.00 ($n=6$),仔猪成活率为 66.67% (22/33),死胎、木乃伊 6.06% (2/33) 等。已组建 WZSP 实验用近交系 F14-F17 基础母猪群 100 头、公

猪 15 头及系谱；培育的近交系较之原始种猪群具有性情温顺、遗传背景清楚、基因高度纯合、体色为黑白花、体型和毛色一致性好，较之国内外品种更具有体型小、遗传稳定等优势（见图 6-11）；其近交系数高达 0.974；近交系培育方法研究已获国家发明专利（ZL 02149030.9）[3、4]。

掌握了 WZSP 近交系生长发育规律，窝产仔 5-7 头，出生体均重 $0.33 \pm 0.083 \text{Kg}$ ($n=29$)、1 月龄为 $2.94 \pm 0.55 \text{Kg}$ 、2 月龄为 $5.55 \pm 1.30 \text{Kg}$ 、6 月龄为 $13.43 \pm 3.27 \text{Kg}$ 、24 月龄为 $36.65 \pm 9.17 \text{Kg}$ ；依据 F12、F13、F14F16 的初生重至 6 月龄体增重记录和指数曲线、logistic 曲线、compertz 曲线，求出其三个曲线生长公式模式，比较其拟合度、选出最佳曲线、生长拟合公式。即：拟合公式： $W=4594.15e^{0.0063t}$ ，W 为体重，t 为日龄，e 为常数、拟合度：0.7782、可估测其体重。表 1 研究结果证明，依据该公式推算出的近交系体重与实测体重大致相近，表明该近交系生长发育稳定，具有生长发育规律一致性强的特性，与原海南非近交系 WZSP 不仅毛色不一，而且体型也分大、中、小之分，具有显著不同(王兴龙，2005)。

3.2 建立了近交系系谱

F15 前配种方式按照全同胞交配、父女交配和祖孙三代内近交繁育。F15 代后按照全同胞交配和父女二代内交配的方式进行近交繁育。依据近交效应据资料记录统计与实际达到的理论数指结果，依据试验记录，继续完善近交系系谱(见图 12)。另：其中 F0 世代至 F15 世代窝产仔等数字均

为传统家养普通猪舍产仔、幼猪饲养培育的资料记录统计结果，而 F16 世代至 F20 世代窝产仔等数字部分为网上产仔、网上幼猪饲养培育的资料记录统计结果，F19 世代窝产仔等数字部分为传统家养普通猪舍产仔结果。

3.3 近交佐证研究取得突破性进展

采用 33.6 和 33.15 微卫星探针对 F8、F9、F10 监测证实：近交 F8 个体间 DNA 指纹图相似系数为 0.678，F8 与 F9 间的数值为 0.785，F9 与 F10 间的数值为 0.855，F10 个体间的数值为 0.906，表明随着近交代数的推进其基因的纯合度越高；利用 9 对微卫星探针对其 F14、F15、F16 群体（不分家系）检测，其基因座位杂合度和多态信息含量分别为 0.4201、0.4035、0.3259 和 0.3442、0.3353、0.3008，呈现递减，即 $H_{14} \geq H_{15} \geq H_{16}$ 和 $PIC_{14} \geq PIC_{15} \geq PIC_{16}$ 。表明：随着近交世代的递增，群体的遗传变异降低。分析发现家系Ⅱ的平均杂合度(H)及平均多态信息含量(PIC)分别为 0.2075 和 0.1588，其值最低小于 0.25，表明基因已高度纯合；不同染色体上 9 个基因位点的 SNP 监测结果进一步证实：该近交群体 F14、F15、F16 中有 6 个纯合，而对照组贵州小型猪、通成猪、长白和大白猪仅有 1-2 个位点纯合；对比研究还发现 F8 群体 33.6 探针 DNA 指纹图相似系数（0.86）等同西双版纳小型猪的 F12（0.86），这一结果将其实际近交代数向前推进了 4 个世代；F14 个体间进行的皮肤交叉移植试验未见排斥反应发生。

3.4 标准化研究开展了血液生理生化指标测定

研究证实：该近交系 42 项血液生理生化指标测定高于人类最大值有 10 项、低于人类有 3 项，其余数值均处于人类参考值范围内（见表 2、3）；其生理解剖、心、肝、肾药物代谢等近似人类（见图 13）；经解放军 309 医院和北京市佑安医院测定证实，该近交系血型类似人类“O”型，较之其它品系猪更近似人类，并在开发利用中得到了验证。将该近交系 20 头用于猪瘟毒株试验，接种后该品系与 SPF 猪相比提前 1-3 小时死亡，与 SPF 猪取得了一致性的结果，表明该品系对猪瘟病毒反应敏感。

3.5 开展了种质特性及品种鉴定方法研究

分子遗传基础蛋白质、SRY、线粒体 DNA、SLA、GH、GHR 等基因的 SNP 研究，提出了实验用猪近交系培育及质量控制建系技术方法，揭示了其遗传稳定性、与人类近似性、矮小性的分子遗传机理。

①依据三个品系的小型猪在 6 个蛋白质标记等位基因频率的分布差异性，发现 AKP 蛋白质标记 AA 型，可作为该近交系与贵州、广西巴马小型猪品系间鉴定方法之一。

②利用 10 个 SNP 位点（PNAS-4(MspI)、PNAS-4(HinI)、Pnas-4(TasI)、Pnas-4(StyI)、HUMMLC2B(Hin1I)、HUMMLC2B(MspI)、HUMMLC2B(BglI)、Calsarcin1(BseLI)、Calsarcin2(BseNI)、ADSSL(BspT)）对三个品系检测，在所检测的 9 个 SNP 位点中，WZSP 近交系（F14~F16 不分家系）有 6 个位点纯合，广西巴马小型猪、贵州小型猪、通城猪、长白猪、大白猪分别有 3、2、2、1、2 个纯合。

③利用美国猪基因组协作计划推荐的第 11 组用于遗传多样性和亲缘鉴定研究的 21 个微卫星标记探针监测证实：用于三个小型猪品种准确分辨的座位有 SW24, SW951, S0005, S0101, SW769, S0355, SW902, SW72, S0218, S0090, CGA。三个小型猪品种中特有等位基因共 96 个，其中贵州小型猪有 49 个，WZSP 近交系有 22 个，广西巴马小型猪有 25 个，这些片段可以用作三个小型猪品种个体的遗传鉴定等 10 个座位上，该近交系有 22 个优势等位基因，可做为与贵州小型猪、广西巴马小型猪品种个体间的遗传鉴定；并发现 SW936 88bp 等位基因为该近交系特有的遗传标记、已申请发明专利（200510008994.2）。

④依据微卫星探针对 F15 个体在 S0036、SW225、SW1377 位点等位基因的纯合度将群体分为三个家系。

⑤近交系 SLA 研究发现：SLAI 类 3 基因有 10 个新等位基因，在第 7 染色体上，分别为 566bp、566bp、565bp、565bp、562bp、562bp、566bp、565bp、570bp、565bp（其中 9 个已经在 GenBank 注册，DQ399654、DQ399655、DQ399656、DQ399657、DQ399658、DQ399659、DQ399660、DQ399661、DQ395123），并导致相应氨基酸改变，其中 9 个等位基因编码的氨基酸序列在 105、112 和 118 等三个关键氨基酸残基与人的完全相同，SLA1 与 HLAI 类基因多态结合区氨基酸序列 50~55% 的同源性；SLAII 中 DRA、DQB 无多态性，DRB、DQA 为多态性、其相应基因的核苷酸序列与我国南方人群同源性达 73% 至 83.7% 左右、氨基酸序列同源性为

77%~80%左右；DRB 分子和 HLA-DRB 分子与 CD4 分子结合的关键氨基酸残基序列完全相同；SLA-I 类和 II 类基因及其氨基酸序列与 NIH 小型猪相比基因同源性较高，DRA 均为高度保守序列、核苷酸和氨基酸水平同源性均为 100%；对其它具有多态性的基因核苷酸水平同源性也高达 90%以上、氨基酸水平同源性达 87%以上。结果初步揭示其与人类、NIH 小型猪近似性的分子遗传机理。

⑥研究发现近交系 GH 基因序列与正常猪种不同，信号肽编码区发现两处氨基酸替换，其对成熟 GH 的空间结构没有影响，但可能会影响到 GH 的跨膜转运；其 GHR 基因与普通猪序列比对发现其胞内结构域存在 E381D，A409S，L556V，A580G，V601I 五处突变。这些突变可能对 WZSP GHR 的胞内信号转导产生一定的影响，从而影响生长激素—生长激素受体—胰岛素样生长因子轴的信号级联，削弱生长激素的促生长作用。这同人的 Laron 综合症大部分是由 GHR 的缺陷引起多数突变发生在胞外结构域 GH 结合区，影响了 GH 和 GHR 的结合，导致 GH 信号转导中断取得一致性的结果；也同 GHR 敲除小鼠生长显著迟缓，呈现典型 Laron 综合症症状取得一致性的结果。初步揭示其矮小性分子遗传机理。

3.6 标准化研究成果创新点[3]

提出了实验用猪近交系培育及质量控制建系技术方法；揭示了其遗传稳定性、与人类近似性、矮小性的分子遗传机理，培育出理想的实验用猪，即：

①培育出世界上首批实验用近交系猪，其近交系数高达 0.974。较之原始种猪群、国内、外品种更具有体型小、基因高度纯合、体型和毛色一致性好、遗传稳定等优势；

②该品系经 DNA 指纹图相似系数、SNP、皮肤移植等多方法验证、国内外亦未见报导；

③建立近交猪繁育技术规范和生长发育指标，近交方法研究已获国家发明专利；

④证实：近交后与人类匹配功能好、其血型类同人类 O 型、42 种血液生理生化值、生理解剖、器官大小、代谢等近似人类；

⑤发现其 GH、GHR 基因序列与普通猪不同、类似侏儒人，初步揭示其矮小性分子遗传机理；

⑥不同染色体上 9 个基因位点有 6 个纯合；SRY 基因和线粒体 DNA 序列同源性分别为 99.83%和 99.75%，远远高于其它小型猪，初步揭示其遗传稳定性分子遗传机理；

⑦微卫星标记发现 22 个等位基因可作与其它品系种间的鉴定；AKP 蛋白质标记 AA 型和 SW936 88bp 为近交系特有遗传标记、新的等位基因、并已申报国家专利；

⑧SLAI分析发现 10 个新的等位基因,9 个已在 GenBank 登陆注册；SLAII分型发现与中国南方人群有较高同源性。该结果初步揭示与人类相似性分子遗传机理。

上述各项指标和发现也为该品系的筛选和鉴定，提供了科学依据。该项研究项目整体达到国际先进水平，近交系及相关成果达到国际领先水平。

3.7 与当时国内外同类研究、同类技术的综合比较具有先进性

国外培育的小型猪品系虽多，但多数由多品种杂交选育而成，如格廷根小型猪，因多品种作亲本，体型较大，毛色类型参差不齐，遗传不稳定，近交系数仅为 0.25~0.37，6 月龄 36kg，成年 12 月龄体重 50-60kg 以上，窝产仔 5-6 头。而本研究培育 WZSP 近交系，成年 12 月龄体重 20-35 公斤左右，窝产仔 5-7 头，体色黑白化、生物学特性明显。因此，该近交品系具有体型小、遗传稳定、性成熟早、产仔高等优势；其近交系数高达 0.974，为世界上首批实验用近交系猪。国外 Yucatan 小型猪近交系数仅达到 0.25—0.37。我国已开展近交猪研究，但查新未见更高近交系数的正式报导。该品系与国内外培育的实验小型猪体重比较具有较大优势。

利用分子遗传学手段、皮肤交叉移植验证其准确性，对近交群体进行了蛋白质、微卫星 SLA、GH、GHR、SPY、线粒体 DNA 等基因的 SNP 深入研究，国内、外未见报导。发现多个新的基因、其中 9 个等位基因已注册；初步揭示了近交猪繁育规律、种质特性与人类的近似性、遗传稳定性分子机理、矮小型分子机理、品系鉴定标准及方法和理论依据。利用分子遗传手段对实验用猪相关基因进行如此深入系统的研究国内、外未见报导。

国内 30 多家科研单位和院所累计将该品系 1500 头猪用于医学、药学、畜牧兽医学各类试验研究均取得了满意的效果。因此，本项目具有起点高、创新性强、经济和社会效益

明显等特点。尤其是近交群体成果较国外至少领先 10 年以上，已引起国外的关注、纷纷要求引种或合作研究。如：宁波道格国际有限公司 2000 年一次引种 50 头；我国不同意韩国引种之后，2002 年要出资 500 万元进行合作研究也未得到中方同意，此外德国、丹麦、意大利、日本、以色列、俄罗斯等国均提出引种和合作的要求足，已表明该近交群将在国内、外市场具有较强优势的竞争力。

WZSP 近交系第二次标准化研究成果《五指山小型猪近交系培育及分子遗传基础特异性研究》，2005 年第二次通过农业部成果鉴定，农科果鉴字（2005）第 024 号；附：鉴定意见（见图 14）；该研究成果《科技日报》第二次做了报道；《奇异小猪》在 CCTV10 播出（见图 15、16）。

在此期间，WZSP 近交系标准化研究成果获得省部级科技奖 5 项。

- 1、2009 年中国发明专利优秀奖
- 2、2008 年北京市发明专利一等奖
- 3、2007 年农业部中华农业科技一等奖
- 4、2006 年北京市科技进步三等奖
- 5、2005 年中国农业科学院科学研究一等奖

（待续）

（转自《中国实验动物信息网》）

报：省民政厅、省科协、省科技厅

送：理事长、本会各位领导、常务理事、理事、会员
