

ICS 65.020.30
CCS B44



中国实验动物学会团体标准

T/CALAS xxx—202x

实验动物 中国地鼠生物学数据采集 及测定技术规范

Laboratory animal—Technical specification for biological
data collection and determination of Chinese hamsters

（征求意见稿）

202x-xx-xx 发布

202x-xx-xx 实施

中国实验动物学会 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国实验动物学会归口。

本文件由全国实验动物标准化技术委员会（SAC/TC281）技术审查。

本文件由中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会提出并组织起草。

本文件起草单位：山西医科大学、中国医学科学院医学实验动物研究所、首都医科大学。

本文件主要起草人：高继萍、宋国华、孙腾、陈朝阳、高苒、杜小燕、梁宇翔、张锐虎、轩瑞晶、杨钧婷。

实验动物 中国地鼠生物学数据采集及测定技术规范

1 范围

本文件规定了中国地鼠生物学数据采集及测定的总体要求、遗传数据、生理数据、生化数据、解剖数据、组学数据等 5 类生物学数据采集、测定的方法。

本文件适用于中国地鼠生物学数据采集以及生物学特性数据的质量控制。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 8978 污水综合排放标准

GB 14923 实验动物 遗传质量控制

GB/T 18773 医疗废弃物焚烧环境卫生标准

GB 19489 实验室生物安全通用要求

GB/T 35892 实验动物 福利伦理审查指南

GB/T 42011 实验动物 福利通则

GB/Z 44314 生物技术 生物样本保藏 动物生物样本保藏要求

T/CALAS 54-2018 实验动物 中国地鼠微卫星 DNA 检测方法

T/CVMA 324—2025 实验动物生物样本采集规范

3 术语和定义

以下术语和定义适用于本文件。

3.1

地鼠 hamster

来源于野生仓鼠，经过长期人工饲养和培育而成的一类小型啮齿类实验动物。

3.2

中国地鼠 Chinese hamster

经人工饲育，对其携带的病原微生物和寄生虫实行控制，遗传背景明确或来源清楚，用于科学研究、教学、生产、检定及其他科学实验的中国地鼠。

3.3

数据采集 data collection

为反映实验动物品种品系的生物学特征而进行的数据收集。

3.4

数据测定 data determination

对采集到的生物样本进行系统性检测、统计、整理、记录的过程。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ALB: 白蛋白 (Albumin)

ALT: 丙氨酸氨基转移酶 (Alanine Aminotransferase)

BUN: 尿素 (Blood Urea Nitrogen)

CRE: 肌酐 (Creatinine)

GLU: 血糖 (Glucose)

GRAN: 中性粒细胞 (Granulocytes)

HCT: 红细胞压积 (Hematocrit)

HGB: 血红蛋白 (Hemoglobin)

LYM: 淋巴细胞 (Lymphocytes)

MCH: 平均红细胞血红蛋白量 (Mean Corpuscular Hemoglobin)

MCHC: 平均红细胞血红蛋白浓度 (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration)

MON: 单核细胞 (Monocytes)

MPV: 平均血小板体积 (Mean Platelet Volume)

PLT: 血小板 (Platelets)

PCT: 降钙素原 (Procalcitonin)

RBC: 红细胞计数 (Red Blood Cell Count)

TG: 甘油三酯 (Triglycerides)

TP: 总蛋白 (Total Protein)

WBC: 白细胞计数 (White Blood Cell Count)

5 总体要求

5.1 动物数量

中国地鼠数量应保证用于获取生物学特性数据的准确、可靠，有统计学意义。

5.2 动物年龄: 选择中国地鼠 4 周龄和 8 周龄。

5.3 动物性别：选择同一年龄段的中国地鼠雌雄各半。

5.4 称重要求：用误差为 $\pm 0.01\text{g}$ 的天平称中国地鼠体重，应用 0.0001g 的天平称中国地鼠小器官的重量。

5.5 数字表达方式：数字表达方式分为数值范围和百分数。数值范围用平均值 $\pm$ 标准差表示；百分数表示方法则根据不同的描述项，所用数量单位有所不同。

5.6 时间：时间一般用小时、天、月表示。（特殊情况除外）

5.7 照片：所用照片均为JPG文件，至少300万像素。

5 生物样本采集准备

5.1 样本采集方案制定

在样本采集前，明确中国地鼠的基本信息（年龄、性别、重量），制定详细的样本采集方案，包括采集类型（全血、血清、血浆或细胞、尿液、组织等）、样本采集数量、采集时间等。根据采血方式选择麻醉方式和麻醉药物。

5.2 福利伦理审查

样本采集方案应通过福利伦理审查机构的审查，样本采集活动应接受监督检查和项目结束时的终结审查。在动物使用过程中应符合GB/T 42011和GB/T 35892的要求。动物安乐死应按照GB/T 39760执行。

5.3 设备与耗材确认

根据采集方案、样本类型和规格等提前准备试剂和耗材。设备及耗材应符合GB/Z 44314要求。

5.4 样本储存条件确认

应根据采集后的样本的类型确认是否满足相应的储存条件。根据所需样本数据类型选择不同的储存条件。

5.5 个人防护准备

应根据采集对象的潜在风险，正确使用适当的个体防护装备，如手套、护目镜、防护服、口罩、帽子、鞋等。存在空气传播的生物安全风险时应进行呼吸防护，呼吸防护面具、呼吸防护装置、正压服等在使用前要进行适配性测试。

5.6 场地、人员要求

场地有紫外和其他消毒设施，开展样本采集的实验室应符合GB 19489中生物安全相关的要求。操作人员应为经过相应培训的专业人员。

6 遗传数据

6.1 染色体

按照 GB 14923 中的规定采集样品。实验中国地鼠染色体数目为 $2n=22$ 。染色体测定方法见附录 A。

6.2 微卫星 DNA 检测

中国地鼠微卫星 DNA 检测方法按照 T/CALAS 54-2018 执行。

7 生理数据

7.1 血液样本

7.1.1 采血前一般要求禁食 12h。

7.1.2 中国地鼠采血方法一般包括腹主动脉采血、眼眶静脉丛采血和心脏采血，由于中国地鼠尾巴短小，不宜进行尾静脉采血。采血方法按照 T/CVMA 324—2025 要求进行操作。

7.1.3 血液样本 3000r/min 离心 5~10 min 得到的上清液，无溶血。血清样本放 4℃ 保存，当天测完；否则，应放 -20℃ ~ -70℃ 保存，一个月内测完。为了保证酶活性，减少其他指标的降解，应避免反复冻融。

7.1.4 检测指标主要有 RBC、HCT、PLT、MPV、WBC、HGB、LYM、MON、GRAN、PCT、MCH、MCHC，其余指标可根据实验需要测定。

7.2 精子

7.2.1 采集方法

精子采集方法参照 T/CVMA 324—2025 要求进行操作。

7.2.2 精子活力

用玻璃棒蘸取新鲜精液用 0.9%氯化钠稀释，滴在玻片上，加盖玻片，暗视野显微镜下观察，统计直线前进运动、旋转运动和振摆运动三种活动精子情况，计算直线前进运动精子数与精子总数的比值。

7.2.3 精子计数

用 0.5%重碳酸钠等倍数稀释精液，4%甲醛固定，混匀后滴入计数池，显微镜下计数。

7.3 卵子采集

用于取卵的雌性中国地鼠第 1 天 16: 00 注射 PMSG 0.15 mL（剂量 15 IU），第 4 天 9: 00 注射 PMSG 0.15 mL（剂量 15 IU），16: 00 注射 LHRH 0.15 mL（剂量 0.6 μg），第 5 天 13:00-15:00 从输卵管中收集卵子，将卵子置于 30~50ul M2 培养基（矿物油覆盖）培养。

7.4 生产指数

在同一胎次，统计一定数量（至少 10 窝）的雌性动物生产的每窝产仔数，求出每窝平均产仔数。

7.5 初生体重

用电子天平称量幼体出生后 24h 内的体重。

7.6 断奶体重

用电子天平称量幼体哺乳期结束时的体重。

7.7 成年体重

用电子天平称量实验中国地鼠成年期的体重（雄鼠成年期体重为 35 g~45 g，雌鼠 25 g~35 g）。

7.8 生长曲线

用电子天平称量实验中国地鼠自出生至 3 月龄（每周 1 次）的体重，以时间（天）为横坐标，体重（g）为纵坐标，绘制生长曲线。

7.9 免疫球蛋白 G（IgG）测定

实验中国地鼠血浆中 IgG 含量测定按照附录 B 规定执行。

8 生化数据

8.1 血液样本

8.1.1 血液样本采集

血液样本采集参照 7.1。

8.1.2 检测指标

主要检测指标为 ALB、ALT、BUN、CRE、GLU、TG、TP，其余指标可根据实验需要测定。

8.2 尿液样本

8.2.1 尿液样本采集

中国地鼠尿液样本采集方法按照 T/CVMA 324—2025 要求进行操作。

8.2.2 检测指标

测定尿酸、尿比重、尿糖和尿蛋白水平。

9 解剖数据

9.1 采集前准备

实验中国地鼠解剖前应禁食 8h~12h，不禁水，在采血后采集内脏器官。

9.2 脏器解剖

称量体重后按照 GB/T 39769 要求安乐死后，解剖采集颊囊、心、肺、肝、脾、胃、胰腺、肠、肾、肾上腺、睾丸/卵巢、脑等；还可根据实验需要采集其他脏器。有左右之分的动物脏器应分别测定。

9.3 脏器测量

称重前应将脏器周围脂肪、结缔组织剔除，用滤纸吸去脏器表面的体液，迅速称重。根据脏器大小选用适宜精度的天平进行称重。

肠道长度测量：从胃幽门处至肛门处剖取所有肠段，将肠道自然平铺（不拉伸、不去除内容物），分别测量小肠、结肠、盲肠、直肠的长度，计量单位采用 mm。

10 组学数据

10.1 基本要求

10.1.1 同批次不同组别中国地鼠日龄、性别、体重、麻醉方式、取材时段、环境温湿度完全统一；组织取材位点、离体处理时长保持一致，消除非实验变量干扰。

10.1.2 所有组学样本应全程低温采集处理。

10.1.3 组织剪、镊子、冻存管、研磨耗材一次性专用；血液、粪便、脏器样本分区取材，操作台面分区隔离。

10.1.4 取样环境应洁净、无 RNase 污染风险。取样工具，如切割用的手术刀，盛放容器尽量选用干净的 RNase-free 的一次性工具；若是循环利用的工具，建议进行 RNase 灭活处理。操作过程符合实验动物福利伦理要求。

10.1.5 所有样本应全程溯源，完整记录动物编号、采样时间、采样部位、处理方式、操作人员及储存信息。

10.2 样本采集与质控

10.2.1 基因组样本

采用中国地鼠尾尖、肝、肾等组织或 EDTA 抗凝外周血作为检测样本，离体后快速液氮速冻，置于-80℃条件下保存。提取 DNA 的 OD_{260/280} 值应控制在 1.8~2.0，核酸完整性良好、无明显降解、无外源污染。

10.2.2 转录组学样本

转录组学样本处理按照以下步骤执行。

a) 活体取下新鲜组织，迅速用预冷的 PBS 溶液（RNase free）或 RNase-free 的 0.9% 生理盐水冲洗并剔除结缔组织、脂肪组织和毛发等非研究所需的组织类型；

b) 样品离开活体/或者原来的生长环境后, 样品中的内源酶即会开始降解 RNA, 操作时间过长会导致 RNA 降解, 取样时间不超过 2 min;

c) 样品采集时建议将样品按照一次提取的量进行分管保存, 避免提取时由于二次分管和并管引起样品降解; 如果组织体积较大, 应尽量将组织切成黄豆大小的小块, 长宽高均 ≤ 0.5 cm 的小块;

d) 将处理好的组织样本保存于 1.5 mL 或 2 mL 的 RNase-free 螺纹冻存管中; 迅速置于液氮中冷冻 0.5 h, 然后转移至 -80°C 或液氮中长期保存(保存时间 < 3 个月)。

e) 将样品管用封口膜封口, 再放置于封口袋中, 干冰运输。

10.2.3 蛋白质组学样本

蛋白质组学样本包括组织、血清、血浆, 不同的样本处理按照以下步骤执行。

a) 组织样本: PBS 洗涤去除残留血液和污染物, 迅速剥去脂肪和筋皮等结缔组织, 冲洗干净。用组织剪或手术刀将组织分离成 $0.01\sim 0.03\text{ cm}^3$ 左右的小块。液氮速冻, 保存在 -80°C ;

b) 血清样本: 收集好的全血室温静置 30 min, 3000 g 离心 10 min, 取上清, 液氮速冻, -80°C 保存;

c) 血浆样本: 收集好的全血加入抗凝剂, 立即于 4°C 下 $1300\text{ g}\sim 2000\text{ g}$ 离心 $10\sim 15$ min, 取上清, 液氮速冻, -80°C 保存;

d) 根据试验需求添加蛋白酶、磷酸酶抑制剂, 避光分装冻存。溶血、脂血及变质样本应废弃, 不得用于蛋白质组数据检测。

10.2.4 代谢组学样本

代谢组学样本包括组织、尿液、粪便、肠道内容物和血清, 不同样本处理方法按照以下执行。

a) 动物组织样本: 准确切除所需组织, 迅速剥去非必需的脂肪和结缔组织等非研究所需的组织类型, 分割成小块; 用预冷的 PBS 缓冲液或生理盐水清洗干净, 以去除血液残留和污物; 用干净的无尘吸水纸吸干水分, 将组织样本装入冻存管; 管子上做好标记后迅速放入液氮中冷冻处理 15 min, 于 -80°C 下保存;

b) 尿液样本: 收集晨间中国地鼠 1 小时内的新鲜尿液样本直接分装到离心管中; 添加质量体积为 $0.5/1000$ (w/v) 的叠氮化钠(若叠氮化钠获取困难可用 1000 rpm 4 度离心 5 分钟, $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤方法代替); 处理完后, 管子上做好标记, 于 -80°C 下保存;

c) 粪便样本：中国地鼠置于代谢笼中饲养，一笼一只，粪便样本不能有尿液污染。取样有两种方式，采用逼迫法或按摩腹部法应激排便，直接将粪便样本采集在无菌管中。同一只鼠收集的样本混合均匀后分装到 2 mL 进口无菌离心管，称重记录，采集量达到样本量要求。每个样本取多管备份。液氮速冻后-80℃保存；直接收集排在笼子里的粪便，去掉外层污染物，粪便样本暴露在环境中的时间不宜过长，超过 1 小时建议重新收集。同一只鼠收集的样本混合均匀后分装到 2 mL 进口无菌离心管。每管装量 1 mL 左右的体积，称重记录，采集足量达到样本量要求。每个样本取多管备份。液氮速冻后-80℃保存；

d) 肠道内容物样本：安乐死中国地鼠后，用无菌解剖刀在无菌手术台上剖开腹腔，取出整个肠道，切取所需肠段的内容物，用无菌手术刀刮取内容物，混合均匀，采用 2 mL 进口无菌离心管，称重记录，采集足量达到样本量要求，每个样本可取多管备份。液氮速冻后-80℃保存；

e) 血清样本：用不含抗凝剂的样本收集管采集血样，或将采好血样的采血管室温静置（注意：不能振摇采血管）；静置 30 min~60 min 使其凝结后，再将采血管放入冷冻离心机内，4℃条件下 3000 rpm，离心 10 min~15 min，吸取上清液（即血清）分装于合适的已编号的 EP 管中；避免反复冻融，尽快将血清保存于-80℃冰箱中。

10.2.5 肠道微生物组学样本

肠道微生物组学样本包括粪便和肠道内容，样本处理方式按照以下步骤执行。

a) 粪便样本：中国地鼠送样量至少 3-5 粒，尽量避免尿液污染粪便，可以事先排尿，粪便尽可能排入洁净干燥容器内，用采样管中无菌勺挖取粪便中段没有接触空气和地面的部分，挖取一满勺。将挖取的粪便连同小勺一同放入采样管中，盖紧盖子。样品立即进行液氮速冻，置于-80℃保存，或置于干冰寄送；

b) 肠道内容物样本：送样量约 0.5-2 g，动物处死后在无菌操作台或灭菌环境下用无菌解剖刀取出整个肠道，切取所需肠段，用无菌手术刀挖取内容物，分装至无菌离心管中，整个操作在冰上完成，分装好后立即进行液氮速冻，置于-80℃保存，或置于干冰寄送。

10.3 样本及数据管理

10.3.1 所有组学样本分类分装备份，统一标识样品信息，严格禁止反复冻融，分类分区低温储存。

10.3.2 组学原始测序数据、质谱数据及质控数据应与中国地鼠基础生物学数据对应归档，完善试验记录、样本质控台账，保证数据可追溯、可比对、可共享复用。

11 中国地鼠生物样本的采集后处理

采集完成后应按照国家相关法规对样本采集过程中产生的医疗废物进行分类处理。对采集区域设备进行清洁消毒，生物样本进行物理隔离及保存。整理资料，包括样品编号、采集时间、采集部位、采集人员、样本数量和质量等信息或数据。

12 废弃物及尸体处理

废弃物无害化处理按照 GB 8978 的规定执行；尸体应按照 GB/T 18773 的规定进行焚烧处理；废弃的污水处理按照 GB 8978 的规定执行。

附录 A
(资料性)
染色体数测定方法

A.1 器具

注射器、4号针头、解剖盘、解剖剪、镊子、玻璃吸管、10 mL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。

A.2 药品

0.02%秋水仙素、Giemsa染液。

A.3 试剂

A.3.1 0.075 mol/L 氯化钾溶液

准确称取0.559 g氯化钾，溶于80 mL蒸馏水中，定容至100 mL。

A.3.2 固定液

准确量取3份甲醇、1份冰醋酸，混合均匀配制而成。

A.3.3 2%柠檬酸钠溶液

准确称取2 g柠檬酸钠，溶于80 mL 蒸馏水中，定容至100 mL。

A.3.4 0.85%氯化钠溶液

准确称取0.85 g氯化钠溶于80 mL蒸馏水中,定容至100 mL。

A.3.5 磷酸缓冲液 (pH 6.8)

取甲液49.5 mL，乙液50.5 mL，混匀即可。

甲液：1/15 mol/L磷酸氢二钠溶液，称取磷酸氢二钠9.48 g，溶于900 mL蒸馏水中，定容至1000 mL。

乙液：1/15 mol/L磷酸二氢钾溶液，称取磷酸二氢钾9.07 g，溶于900 mL蒸馏水中，定容至1000 mL。

注：若磷酸氢二钠或磷酸二氢钾含有结晶水，则应根据结晶水的含量重新计算称取量。

A.3.6 Giemsa 原液

称取Giemsa粉剂0.50 g，量取丙三醇33 mL，甲醇33 mL。将Giemsa粉溶于少量丙三醇，在研钵内研磨（30 min）无颗粒为止，再将全部剩余丙三醇倒入。于56℃温箱内2 h后，加入甲醇，将配好Giemsa原液置于棕色瓶中。

A.4 操作

A. 4. 1 预处理

实验前3 h~4 h, 取健康实验中国地鼠一只, 按每克体重4 μg 秋水仙素(浓度为0.16 mg/mL生理盐水)腹腔注射。

A. 4. 2 取股骨

安乐死实验中国地鼠后, 立即剪开后腿皮毛, 取出股骨, 剔除肌肉, 用白纱布包住股骨搓动除净肌肉碎渣和结缔组织。

A. 4. 3 取骨髓细胞

将4 mL生理盐水通过4号针头注入骨髓腔, 冲洗入10 mL锥形离心管内, 1000 r/min离心5 min。小心吸去大部分上清液, 留0.5 mL与沉淀物混匀。

A. 4. 4 低渗

加入0.075 mol/L氯化钾溶液6 mL, 吹打成细胞悬液, 37°C水浴低渗23 min(10 min时吹打4~5下), 立即加固定液。1000 r/min离心10 min后弃上清液。离心前加入1 mL固定液吹匀进行预固定。

A. 4. 5 预固定

低渗结束后立即加固定液进行预固定。加入1 mL新配制的固定液, 轻吹4~5下混匀, 5 min后再轻吹15次, 立即以1000 r/min离心10 min, 吸去全部上清液, 轻弹离心管底部使沉淀呈糊状。

A. 4. 6 固定

第一次固定: 加入固定液1 mL打碎沉淀, 再加至4 mL, 吹打15次, 37°C水浴20 min(10 min时吹打100次, 管壁冲净)。离心, 吸出上清液, 加2 mL固定液吹打, 室温固定20 min。

第二次固定、第三次固定方法同第一次固定。

A. 4. 7 滴片

用镊子取出预冷载玻片(提前置-20°C冰箱预冷), 迅速用吸管吸取细胞悬液滴在载玻片上2~3滴(滴片高度30 cm~35 cm), 立即向同一方向吹气使细胞染色体散开, 然后微加热干燥或室温晾干。

A. 4. 8 烤片

将滴片置于70°C烤箱烘烤30 min。

A. 4. 9 染色

将烤干玻片放在玻片板上，滴加Giemsa染液染色15 min，用蒸馏水或自来水冲去染液，滤纸吸干或晾干。

A. 4. 10 镜检

将制备好的玻片置于显微镜下观察染色体的形态，统计染色体的数目。

A. 5 结果判定

实验中国地鼠染色体数目为 $2n=22$ 。

附录 B
(规范性)
免疫球蛋白 G (IgG) 测定方法

B. 1 材料

鼠抗实验中国地鼠IgG的单克隆抗体；2% BSA封闭液；纯化的实验中国地鼠IgG；兔抗实验中国地鼠IgG的多克隆抗体；酶标羊抗兔抗体（HRP标记）；TMB溶液。

B. 2 主要仪器

酶标仪、恒温水浴锅。

B. 3 标准曲线制作

B. 3. 1 包被

用含1:400鼠抗实验中国地鼠IgG单克隆抗体包被酶标板，100 μL /孔，37°C温育2 h，4°C过夜，PBST洗涤3次，拍干。

B. 3. 2 封闭

2% BSA封闭，200 μL /孔，37°C温育2 h，PBST洗涤3次，拍干。

B. 3. 3 加标准品

加不同稀释浓度（0.25 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、2.0 $\mu\text{g/mL}$ 、3.0 $\mu\text{g/mL}$ ）的标准品实验中国地鼠IgG，同时设阴性对照和空白对照孔，37°C温育1 h，PBST洗涤3次，拍干。

B. 3. 4 加抗体

加1:2000兔抗实验中国地鼠IgG多克隆抗体，100 μL /孔，37°C温育1 h，PBST洗涤3次，拍干。

B. 3. 5 加酶标抗体

加1:8000 HRP标记抗体，100 μL /孔，37°C温育1h，PBST洗涤3次，拍干。

B. 3. 6 显色、终止及读数

加入TMB底物溶液，100 μL /孔，37°C避光温育15 min。加入2M H_2SO_4 终止反应，100 μL /孔，用酶标仪测定OD450值。

B. 3. 7 回归方程

以不同稀释浓度的标准品中国地鼠IgG含量为横坐标，以相应的OD值为纵坐标绘制标准曲线，计算回归方程。

B. 4 实验中国地鼠血浆中 IgG 含量检测

B. 4. 1 包被、封闭（同 B. 3. 1、B. 3. 2）

B. 4. 2 加样

加1:5000待检实验中国地鼠血清/血浆，100 μ L/孔，同时设阴性对照和空白对照，37℃温育1 h，PBST洗涤3次，拍干。

B. 4. 3 加抗体、加酶标抗体（同 B. 3. 4、B. 3. 5）

B. 4. 4 显色、终止及读数（同 B. 3. 6）

B. 5 结果判定

根据标准曲线确定待测实验中国地鼠血清中IgG的含量。