



精准动物模型服务于特色科研

王鼎玉 Ph.D.

北京药康生物科技有限公司 副总经理
集萃药康生物科技股份有限公司



- 小鼠疾病模型能否用于阐明人类真实世界的疾病?
- 如何选择合适的背景?
- 什么叫人源化疾病模型?
- 写国自然素材、做动物实验的资源在哪里?
- 实验动物伦理的注意事项
- 下期预告：活体荧光示踪的应用前景



小鼠疾病模型能否用于阐明 人类真实世界的疾病？

人类基因组计划完成后第一个完成全基因组测序的实验动物



nature

[View all journals](#)

[Search](#)

[My Account](#)

[Explore content](#)

[About the journal](#)

[Publish with us](#)

[Sign up for alerts](#)

[RSS feed](#)

[nature](#) > [articles](#) > [article](#) > [figure](#)

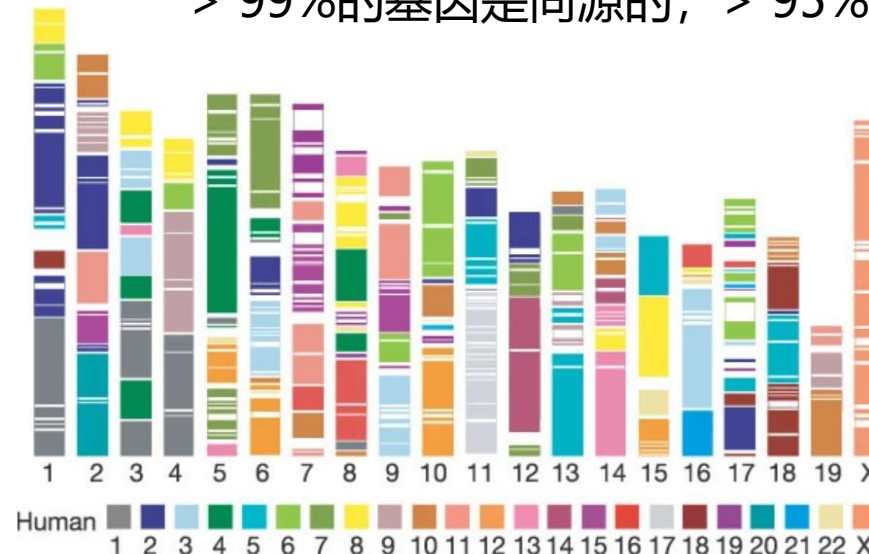
Figure 3: Segments and blocks >300 kb in size with conserved synteny in human are superimposed on the mouse genome.

female mice of the C57BL/6J

From: [Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome](#)



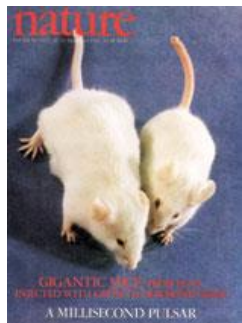
> 99%的基因是同源的, > 95%基因组是 “syntenic”



Each colour corresponds to a particular human chromosome. The 342 segments are separated from each other by thin, white lines within the 217 blocks of consistent colour.

Nature **420**, 520–562 (2002).

基因编辑技术里程碑事件



(1982) Palmiter & Brinster
前核酸酶时代



Emmanuelle Charpentier
Jennifer Doudna

CRISPR/Cas9
(2012)



1953

1963

1973

1983

1993

2003

2013

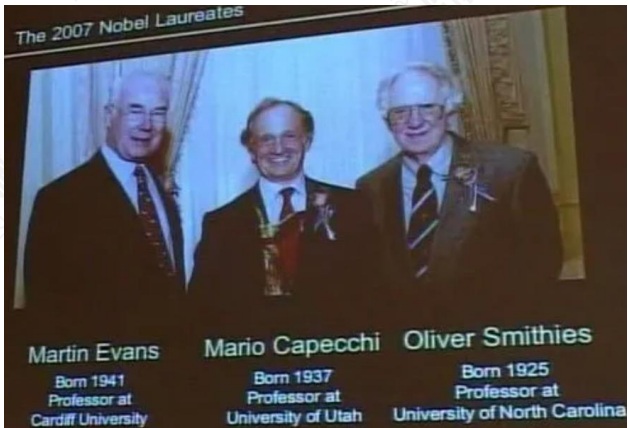
发现DNA双螺旋
(1953)



基因同源重组（基
于胚胎干细胞打靶）
(1982)



ZFN
(1998)



TALEN
(2010)

ABE

显微注射



ES:囊胚ES细胞注射



CRISPR:受精卵显微注射

IKMC: KO ALL GENES (2006)

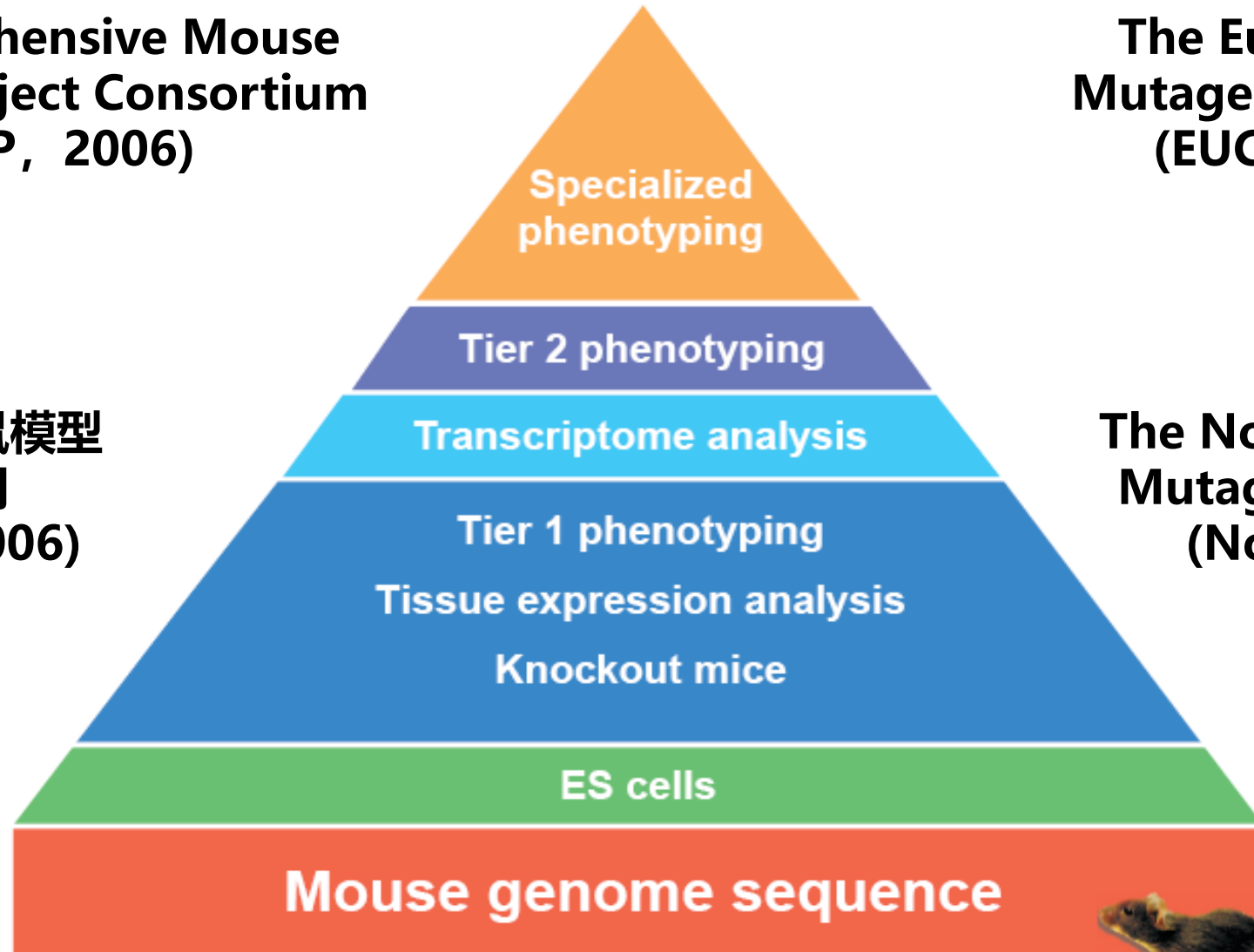


**The Comprehensive Mouse
Knockout Project Consortium
(KOMP, 2006)**

**The European Mouse
Mutagenesis Consortium
(EUCOMM, 2006)**

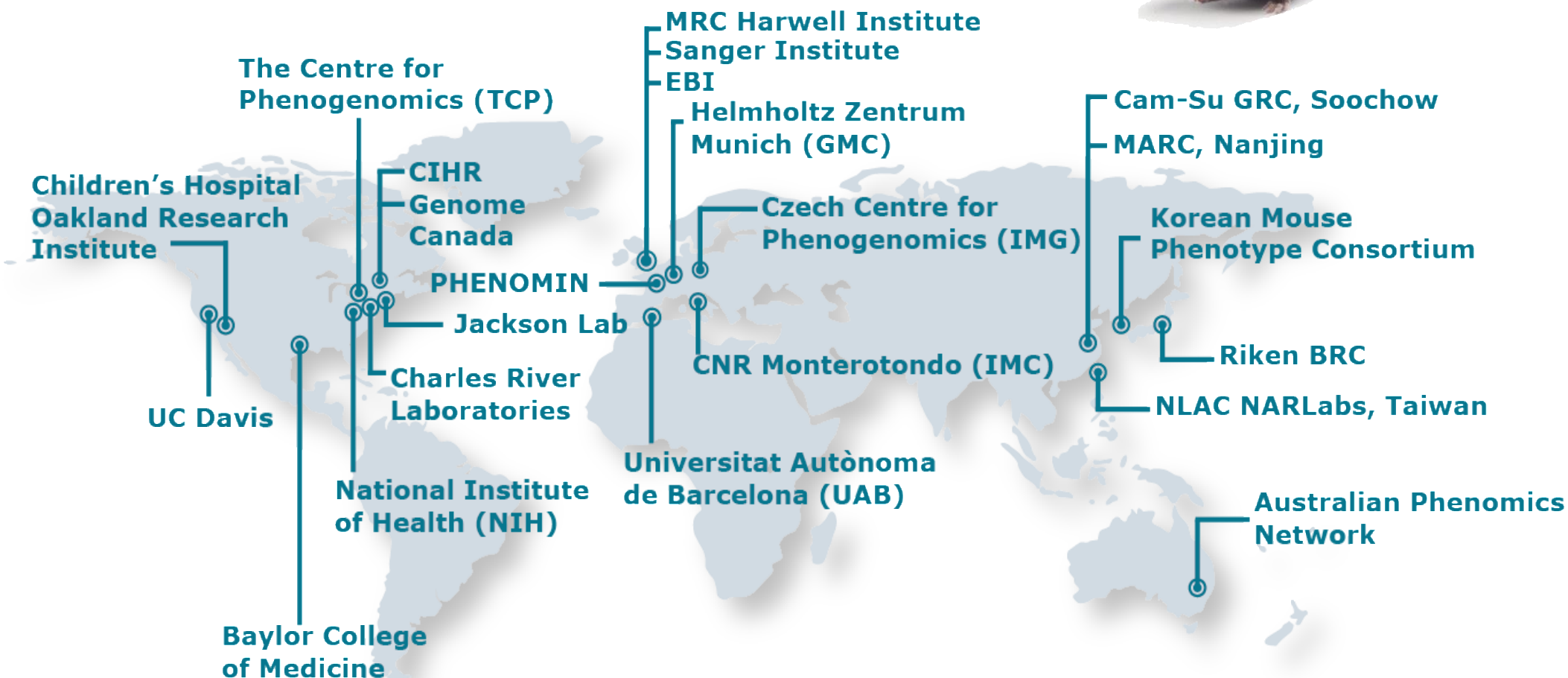
**人类重大疾病小鼠模型
的建立与应用
(ChCOMM, 2006)**

**The North-America Mouse
Mutagenesis Consortium
(NorCOMM, 2006)**



从IKMC到IMPC

International Mouse Phenotype Consortium

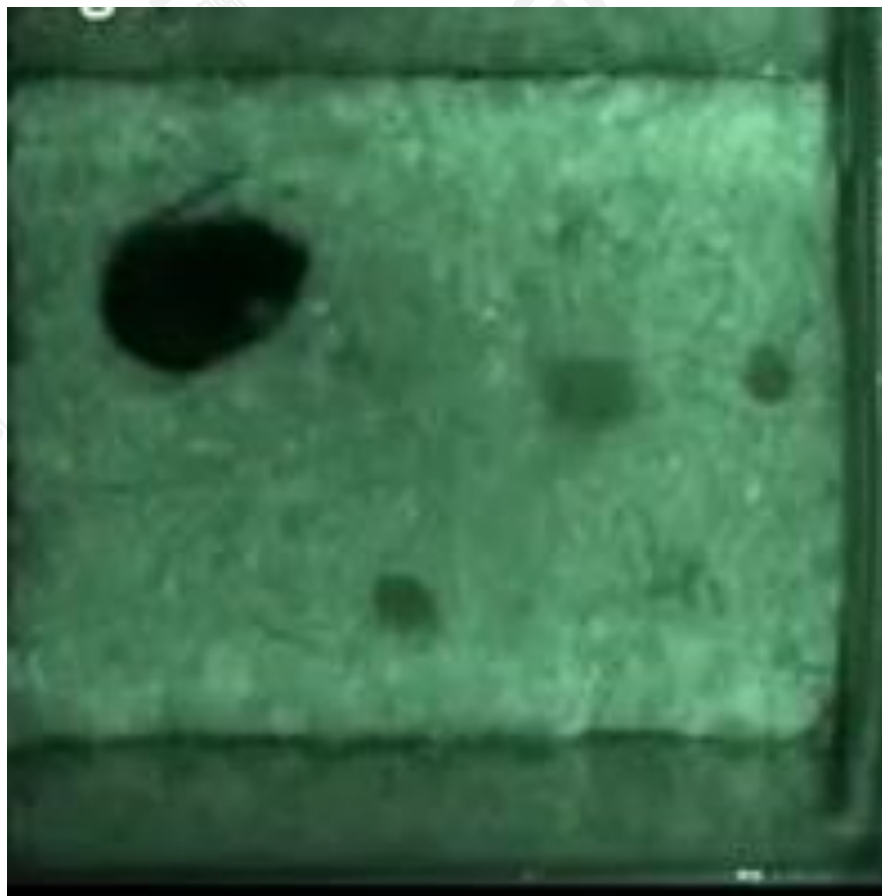


制备基因突变体小鼠并分析表型，进而推断人类基因的功能是后基因组时代研究的金标准。

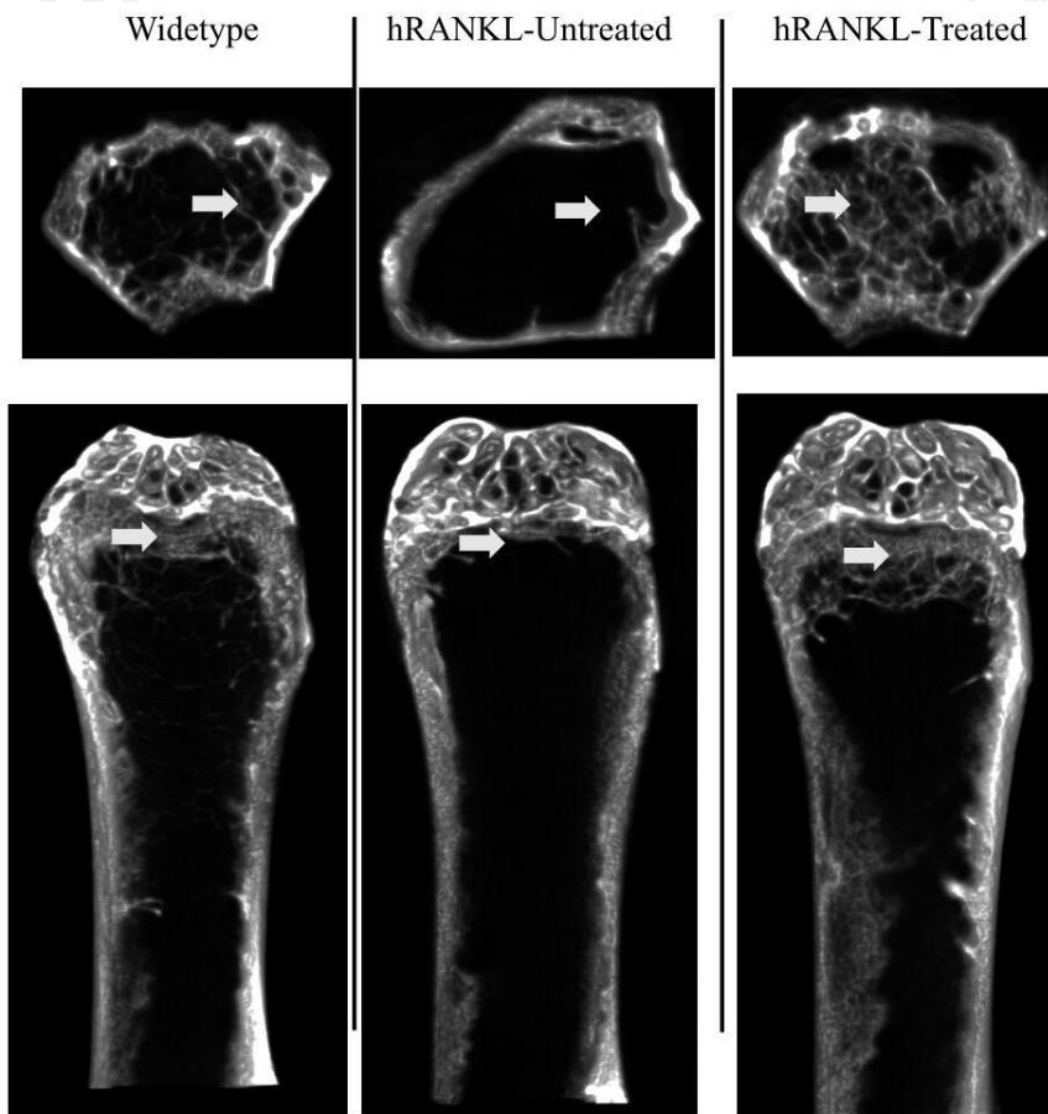


斑驳病是一种罕见的常染色体显性遗传疾病，新生儿出现额头，胸腹部和四肢的白化区域并终生携带。病因是位于人类4号染色体上的KIT基因出现突变，色素细胞无法正常增殖。临床已发现28种不同KIT突变与斑驳病症状密切相关。小鼠Kit基因与人类KIT基因同源，突变后也会表现出和人类极度相似的症状。

临床筛查SNP筛选出点突变癫痫模型

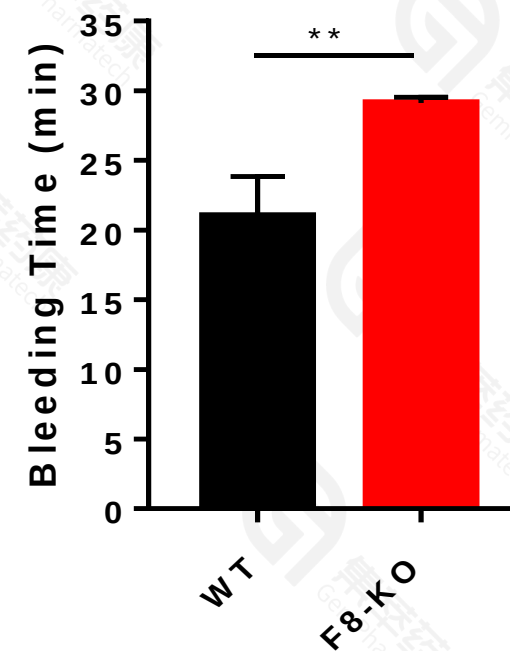
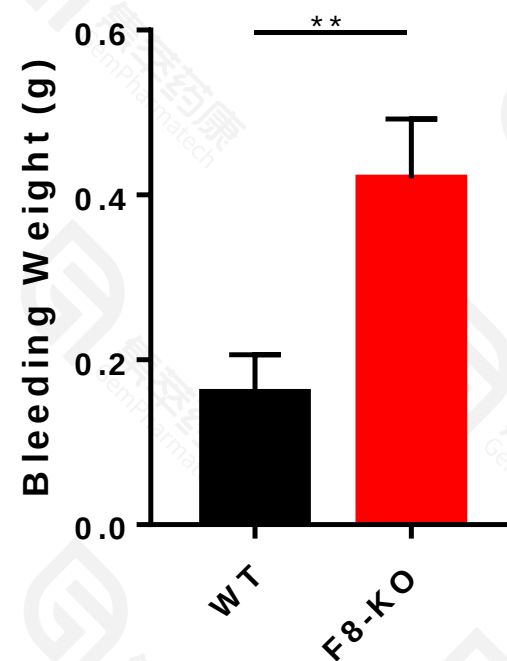
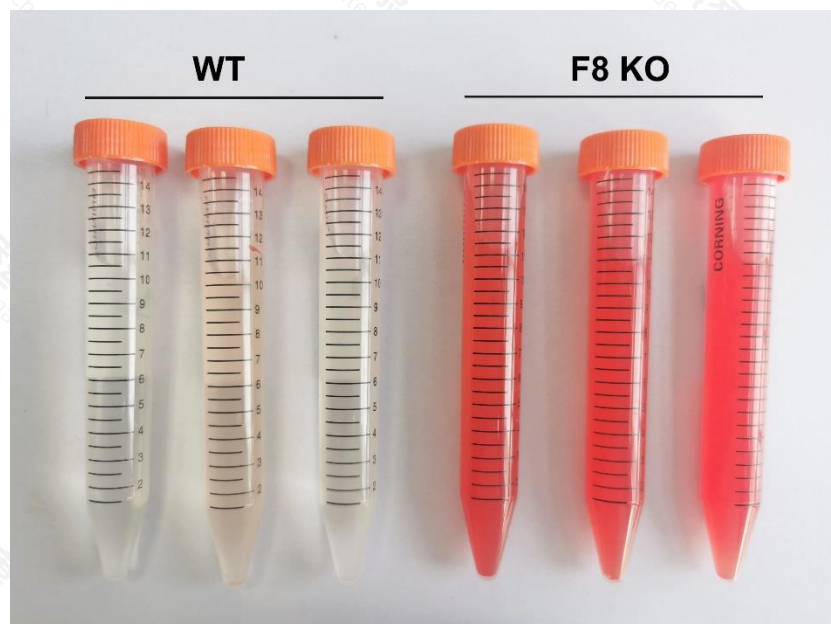


B6-人源RANKL过表达造骨质疏松模型

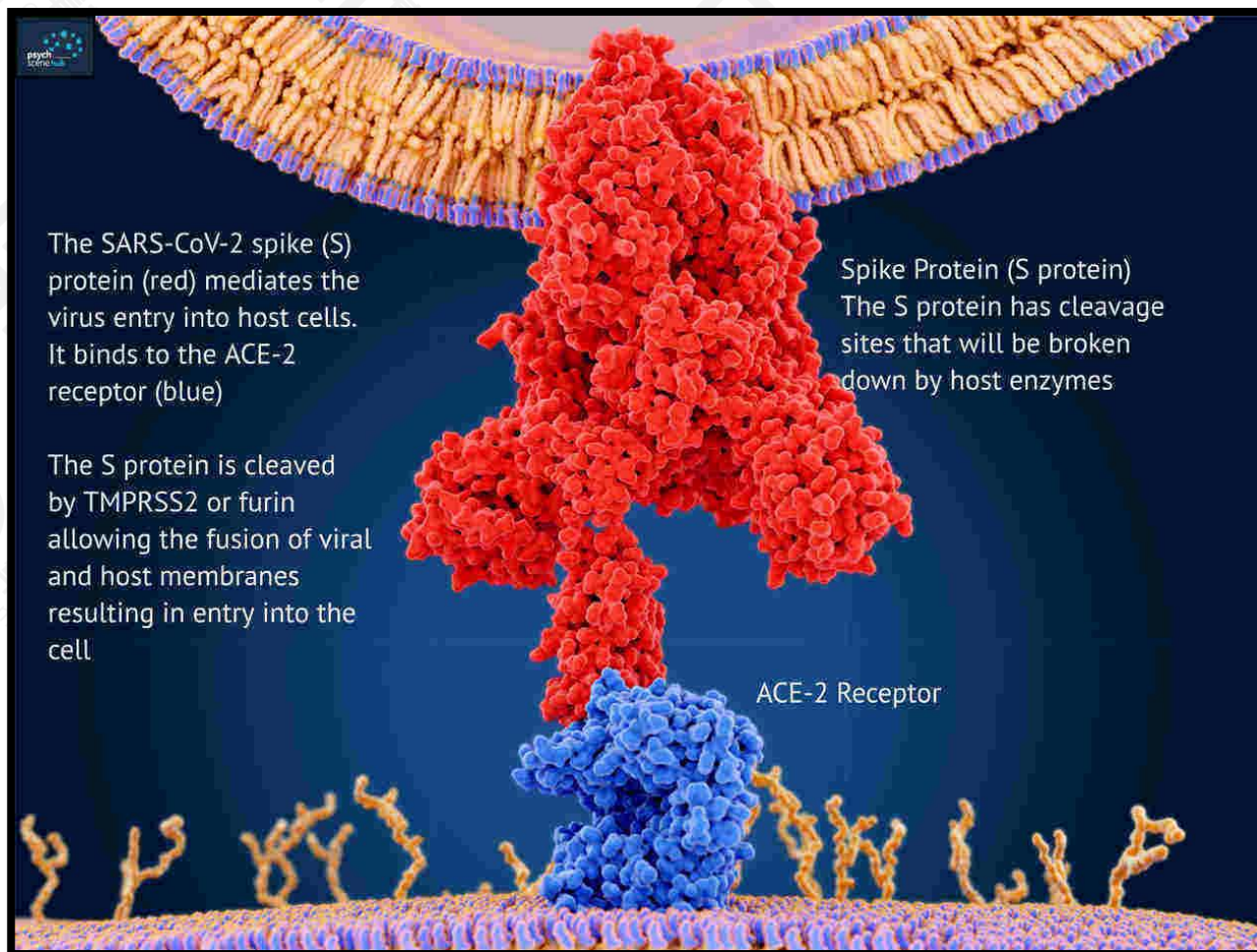


- 模型组出现骨质疏松病理特征（骨密度降低，骨量减少，骨小梁分离度增大）
- 抗人类RANKL抗体（Denosumab）可治疗。

F8凝血因子KO造血友病模型



Humanized ACE2 Mice for SARS-Cov-2 Research



Picture from psychscenehub

C57BL/6

- Chimeric hACE2 KI mouse
- Full length hACE2 KI mouse
- H11-K18-hACE2 KI mouse

BALB/c

- Full length hACE2 KI mouse

NCG

- Full length hACE2 KI mouse



如何选择合适的背景？

实验小鼠的起源



1900年 退休小学教师 Abbie E.C. Lathrop
养大小鼠作为宠物销售



William E.
Castle

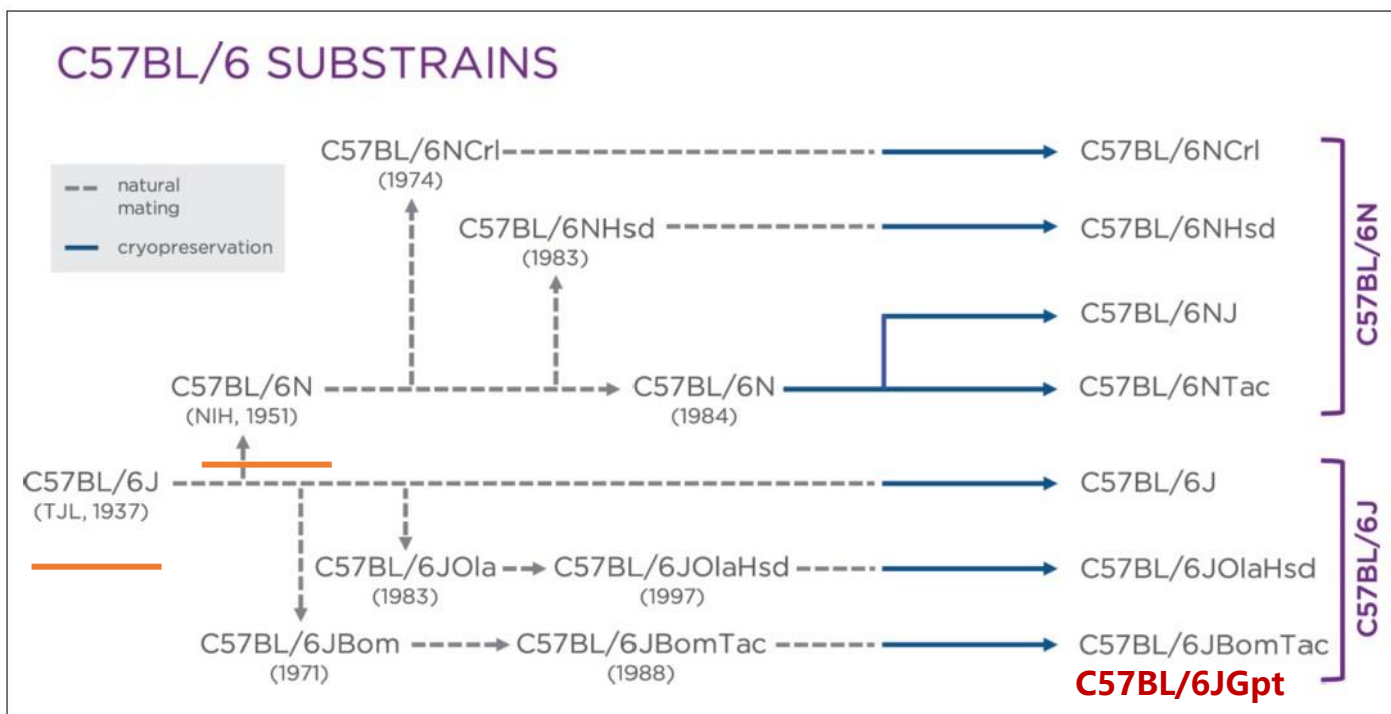


Clarence C.
Little



是采用兄妹交配或亲子交配交配)，连续繁殖20代以上而培育出来的纯品系动物。

C57BL/6 小鼠谱系



The C57BL/6 family tree diagram shows the history and relationship between major B6 substrains

- 1921 年C.C.Little 培育成C57BL(Black)
- 1937 年Little 将维持的C57BL 第六组亚系定名为C57BL/6，将第十组亚系定名为C57BL/10
- 1948 年Jackson Lab从Hall 引入形成C57BL/6J
- 1951 年从Jackson Lab引到NIH形成C57BL/6N

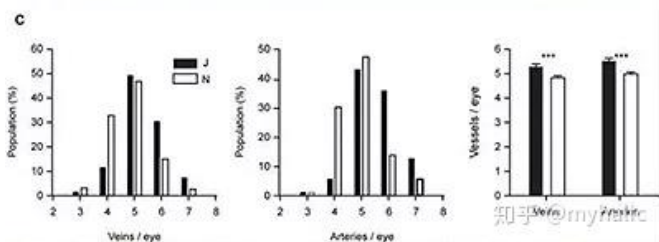
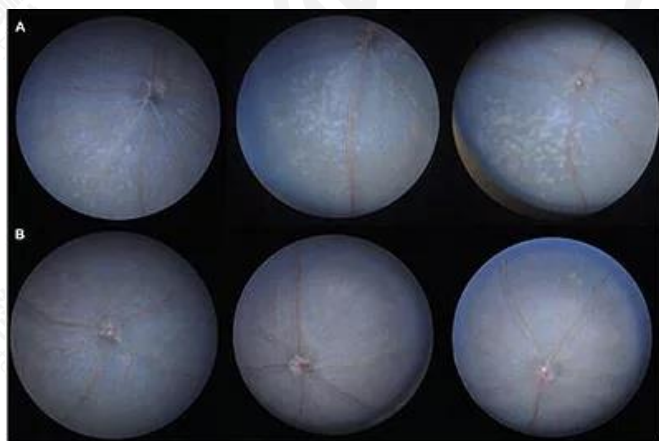
C57BL/6J 和 C57BL/6N区别

序列差异

编码基因: 34个SNP, 2个缺失突变,
非编码基因: 146个SNP, 54个缺失突变

表型差异

6N-视力减退, 眼底病变 Crb1rd8基因突变



心血管: 6N-脉搏高, 收缩压低

代谢:

6N 代谢比6J 低

6J 糖耐受减低 (Nnt外显子7-11缺失)

6N 耗氧量高, 葡萄糖耐受量低

神经, 行为和感觉:

6N 运动协调性受损 Adcy5基因突变

自发性突变

封闭群



ICR



昆明鼠



Wistar大鼠

是指一个动物种群在五年以上不从外部引进其他任何品种的新血缘，由同一血缘品种的动物进行随意交配（避免兄妹交配，也要避免亲子、表兄妹、侄伯之间相互交配）在固定场所保持繁殖的动物群，保持其一定的遗传差异。

BALB/c vs C57BL/6 Which background to choose?

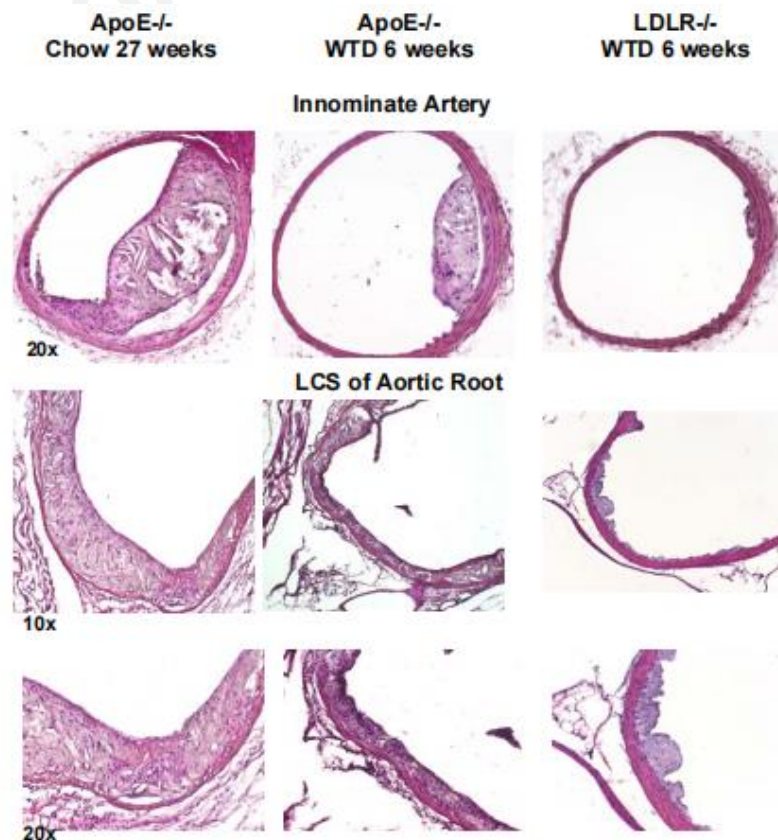
	Haplotype (MHC H-2)	NK1.1	Th	Treg	Immune system	Applications
BALB/c	H-2d	+	Th2	More	Higher volume density of T zone in spleen and production of IL2, IL3, IL4, IL10, and TNF- α	Autoimmune diseases and pathogen-driven immune response
C57BL/6	H-2b	-	Th1	Less	Higher IL12 production and characterized by higher cytostatic activity of splenic NK cells	The most commonly-used inbred mouse; generation of congenics carrying modified genes and/or transgenes

CD4/CD25 Treg : (DOI [10.1189/jlb.0604341](https://doi.org/10.1189/jlb.0604341))
Immune system: (DOI [10.1007%2Fs10517-011-1268-1](https://doi.org/10.1007%2Fs10517-011-1268-1))

肥胖/II型糖尿病各模型特点

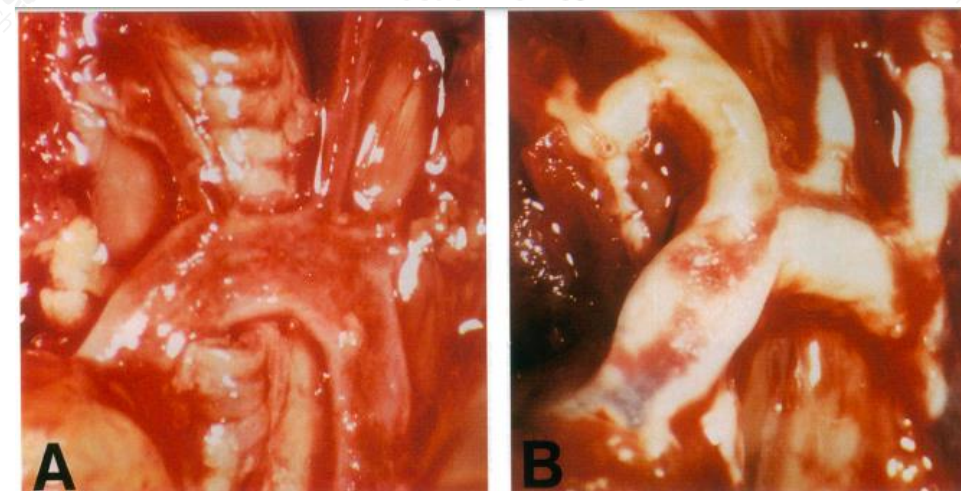
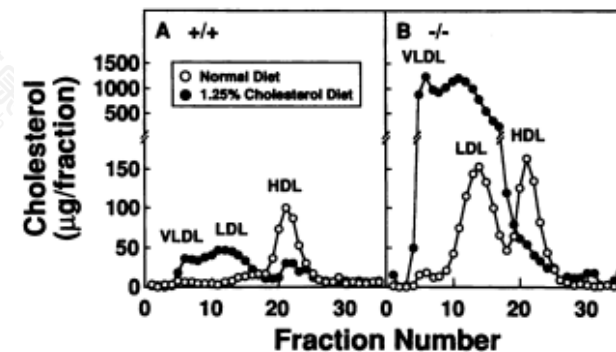
模型	DIO	HFHS/STZ	B6-ob	BKS-db
模型构建策略	饮食诱导	饮食配合化学毒素	单基因突变, Lep KO	单基因突变, Lepr KO
肥胖	中重度	无	重度	重度
高血糖症	轻中度, 持续	中度, 持续	轻度升, 一过性	重度, 持续
高胆固醇血症	有	无	有	有
糖耐量	受损	受损	受损	受损
其他并发症	肝脏脂肪变性	N/A	肝脏脂肪变性	肝脏脂肪变性、早期糖肾
适用研究领域	肥胖/II型糖尿病	II型糖尿病	肥胖	II型糖尿病
模型构建周期 (动物采购后)	> 12W	~4W	~1W	~1W

动脉粥样硬化模型



WTD喂养的Ldlr^{-/-}和ApoE^{-/-}小鼠的病变中富含巨噬细胞泡沫细胞

Getz GS, Reardon CA., 2012



1.25%胆固醇饲喂Ldlr^{-/-}，可形成主动脉斑块

Ishibashi et al., 1994



埃赫那吞



裕仁天皇家族

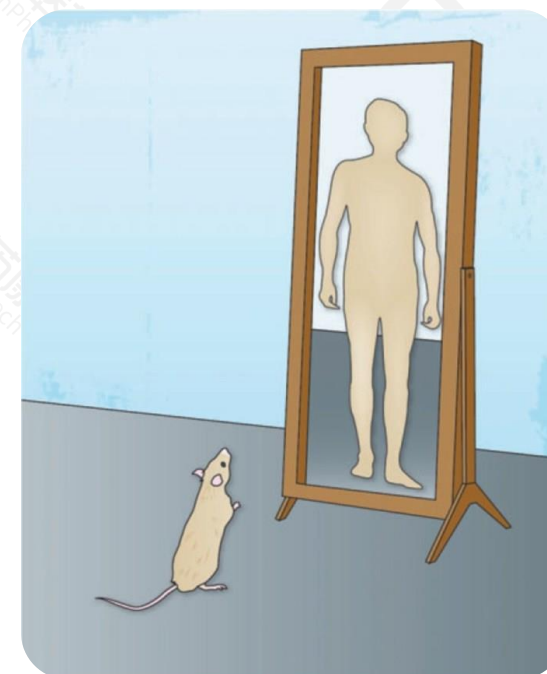
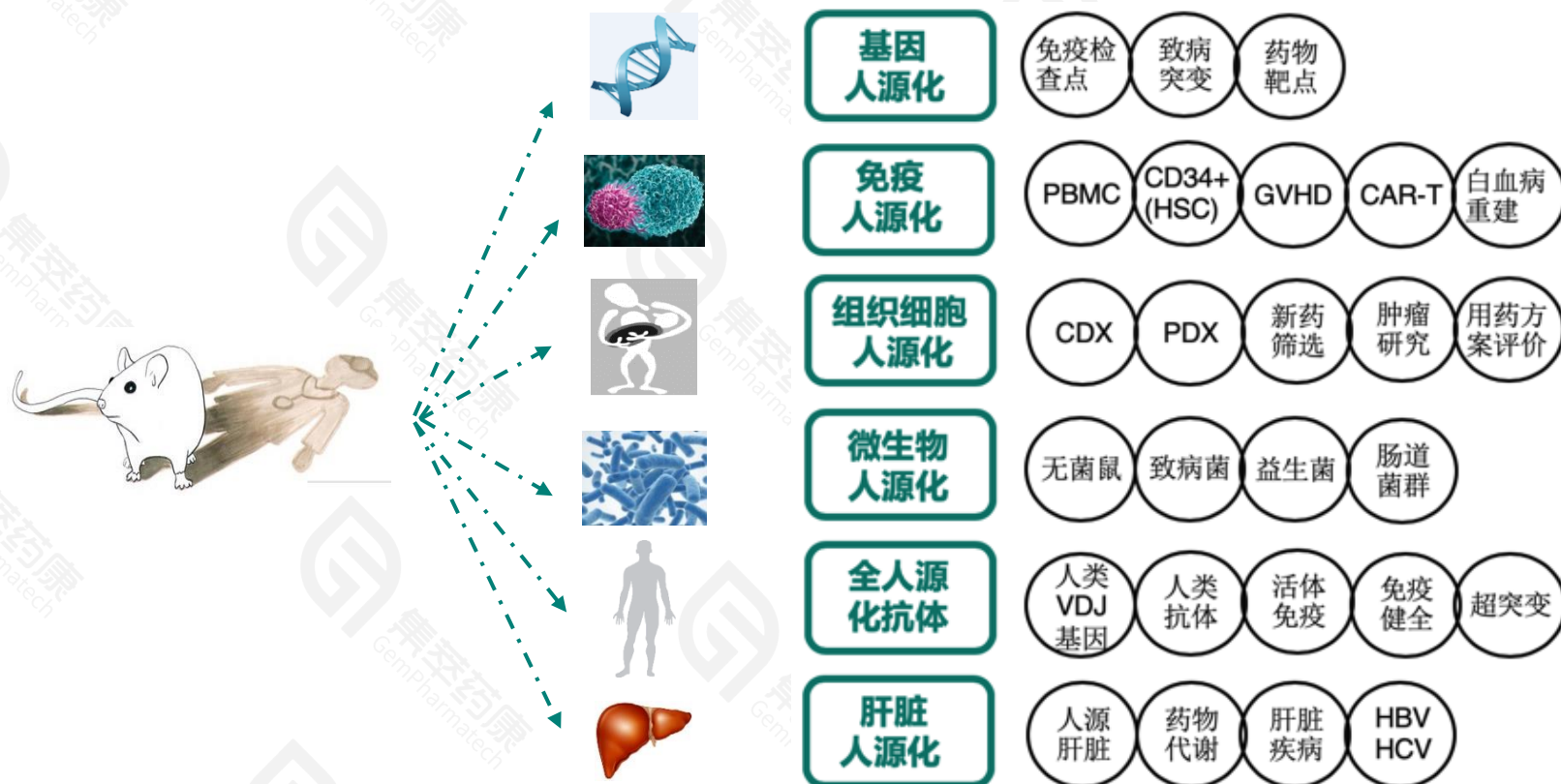


维多利亚家族

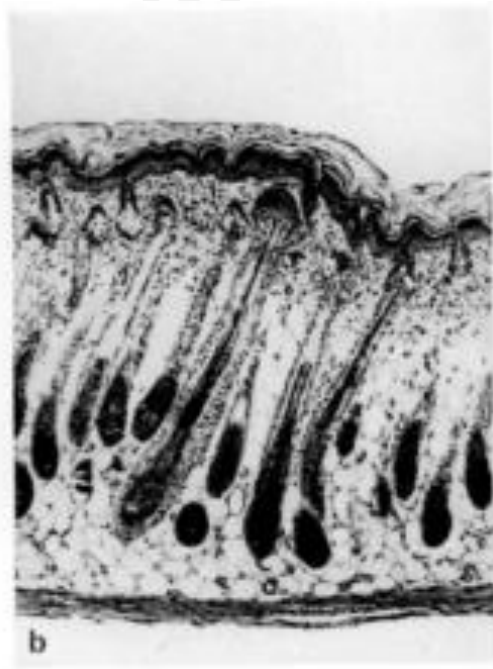
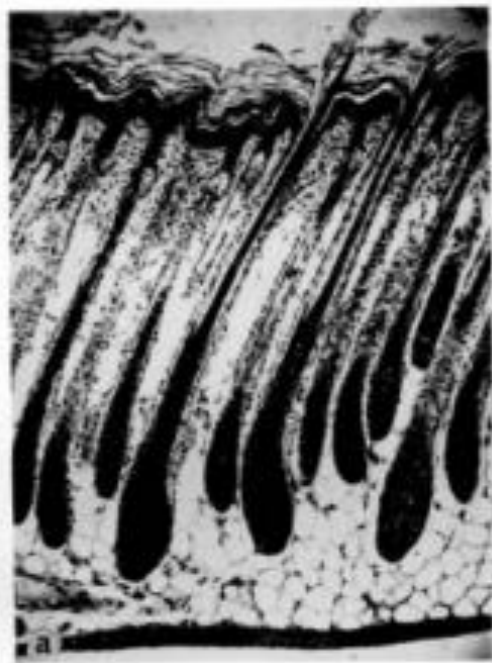


什么叫人源化疾病模型？

人源化模型的概念



无胸腺裸鼠 (Nude Mouse) 的发现



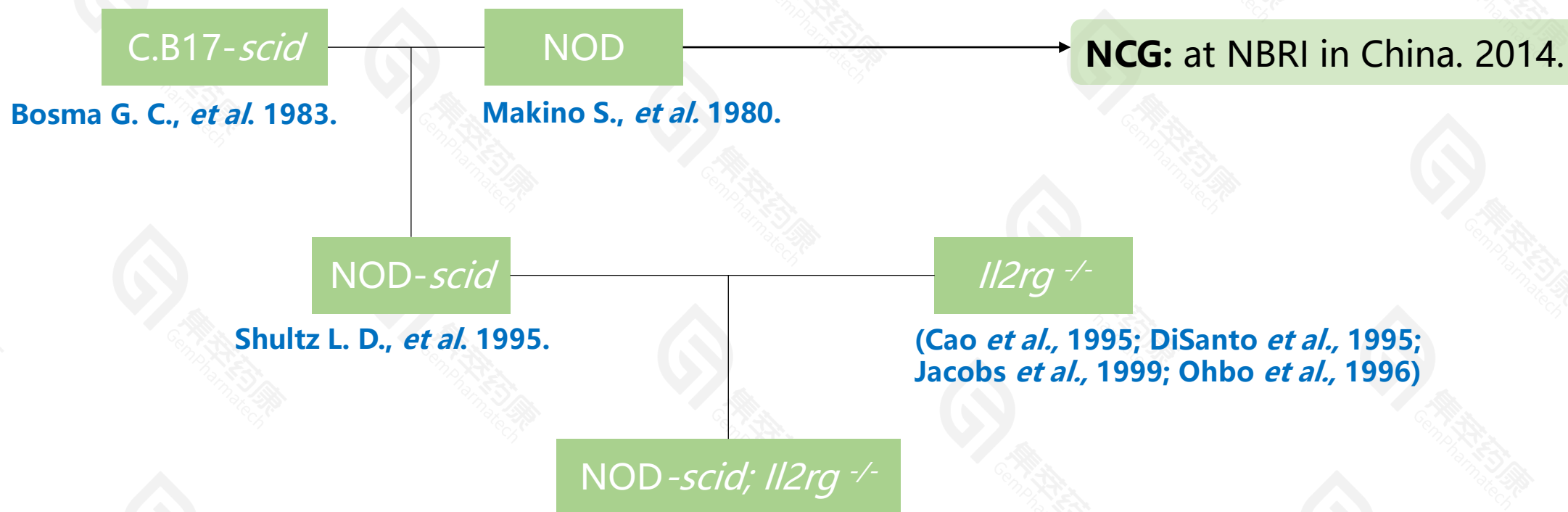
左图为正常小鼠6天大时背部皮肤纵向切片，显示毛囊有完全角化的毛发；右图为6日龄裸鼠皮肤切片显示毛囊有不正常的角化毛发，在真皮上部弯曲。

裸鼠1966年被南加利福尼亚大学首次报道，由编码叉头蛋白N1 (Foxn1) 的基因突变导致毛发生长异常和胸腺基质发育缺陷，导致其不会产生成熟CD4⁺和CD8⁺ T细胞；同时由于缺乏与T细胞的密切接触，裸鼠的B细胞的发育也严重受影响。

缺陷：体内仍残留的一些有功能的免疫细胞

Flanagan, S. P., *et al.* 1966. Genetical Research.

免疫缺陷小鼠模型的发展历史



NOG: at CIEA Inc. in Japan, Ito, M., *et al.* 2002. (Taconic)

NSG: at JAX lab in the USA, Shultz, L. D., *et al.* 2005.

Comparison of Different Mouse model

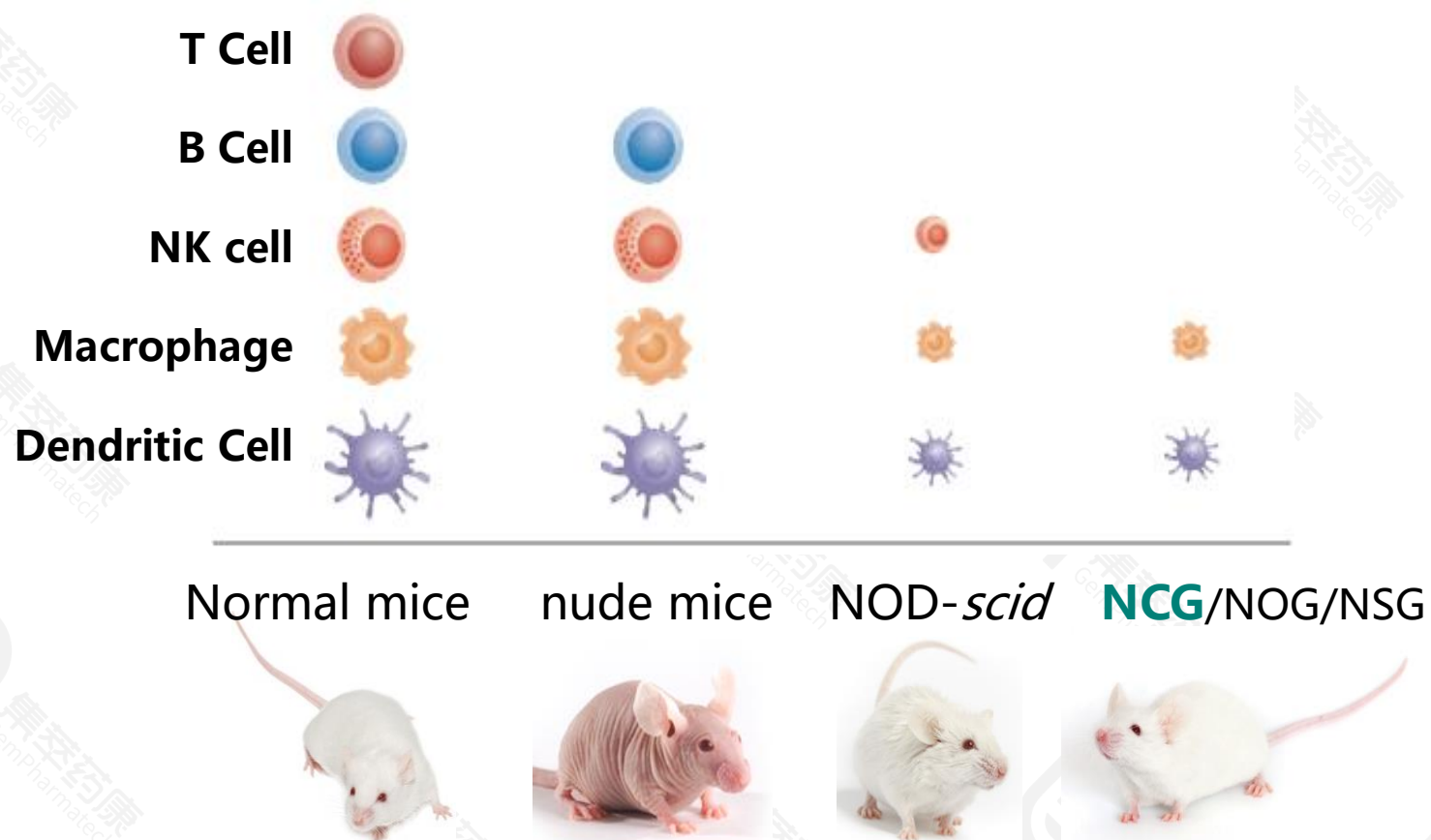


Image modified from: <https://pansci.asia/archives/88098>

NCG能用来干啥

- 造血及免疫系统研究（细胞亚群，细胞因子）
- 感染性疾病机制研究及治疗策略等（HIV病毒、EB 病毒）
- 肿瘤的免疫疗法（人源化抗体、CDX、PDX）
- CAR-T评价
- GvHD评价体系

NCG and CDX Resources

Cancer Type	Cell Line
bladder tumor	UM-UC-3*
glioblastoma	U87*
duodenal cancer	HuTu80*
head-neck cancer	Cal27*
breast cancer	MDA-MB-231* MCF7* BT-474*
colorectal cancer	HT29 * HCT-116* Lovo* Colo205* LS174T*
leukemia	HL-60* K562* MV-4-11* MOLT-4* Nalm-6* THP-1* Raji*
lung cancer (NSCLC)	A549* H460* HCC-827 * NCI-H1975* NCI-647 NCI-H1703 NCI-H727 NCI-H2122
lung cancer (SCLC)	NCI-H226
pancreatic cancer	NCI-H526 SHP-77
ovarian cancer	BxPC-3* SW1990* PANC-1* CAPAN-1* AsPC-1*
prostate cancer	SK-OV-3* OVCAR-3*
renal-cell carcinoma	PC-3* LNCaP*
sarcoma	ACHN* 786-0*
liver cancer	HT1080* SJSA-1*
epidermoid carcinoma	HepG2* Huh7
multiple myeloma	A431*
melanoma	RPMI8226*
gastric cancer	A375*
	NCI-N87

PDX资源库



胰腺癌



胆管癌



卵巢癌



肺癌



淋巴瘤



肝癌



胃癌



(骨) 肉瘤



乳腺癌



输尿管癌



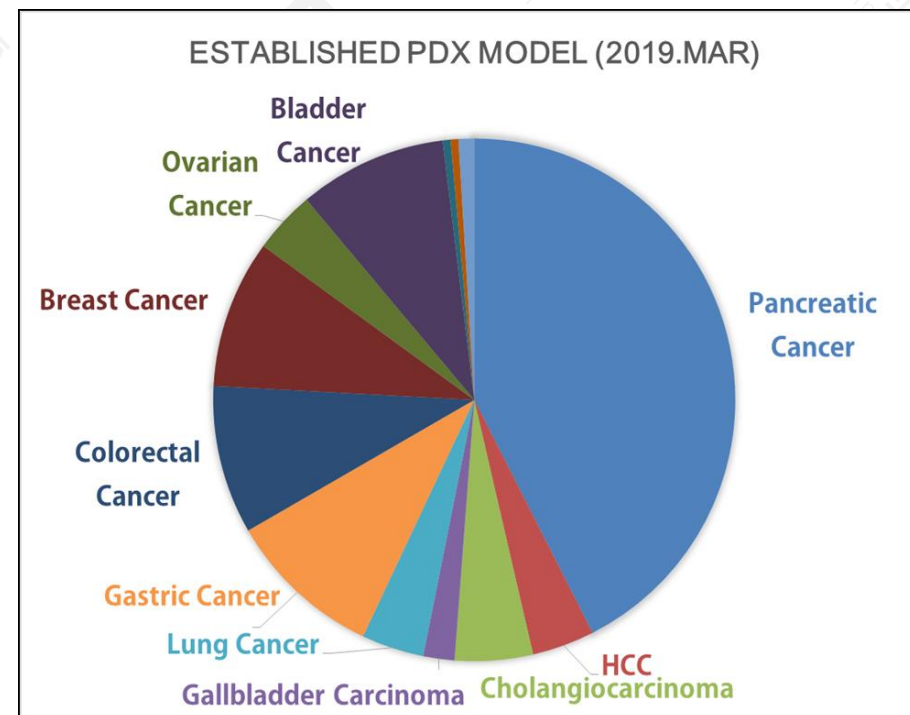
膀胱癌



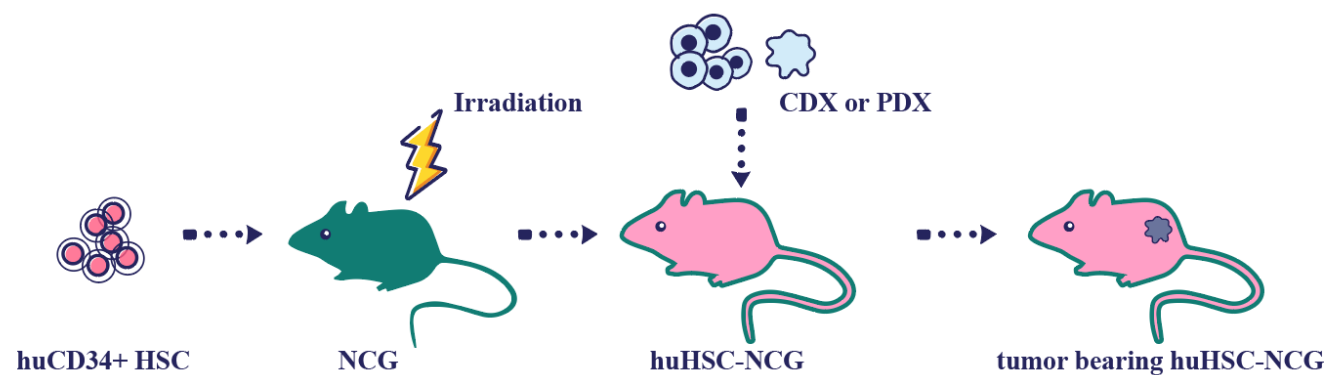
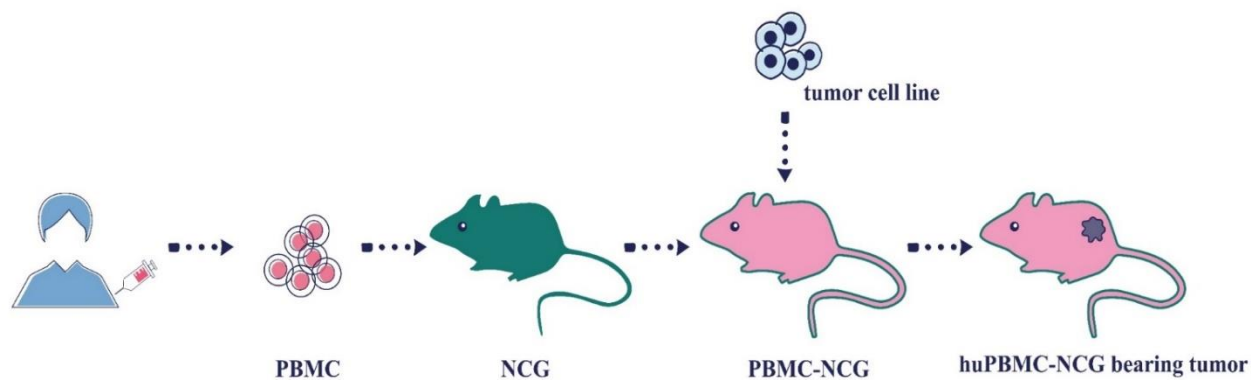
肠癌



肾癌



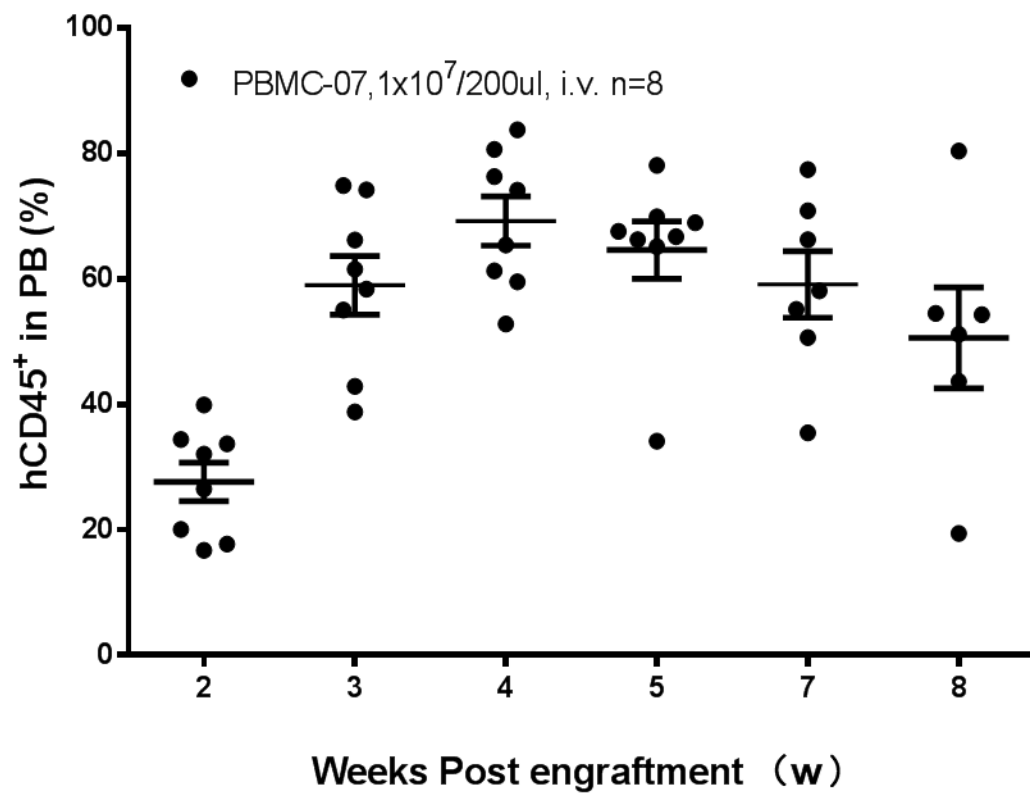
NCG and huPBMNC Reconstitution



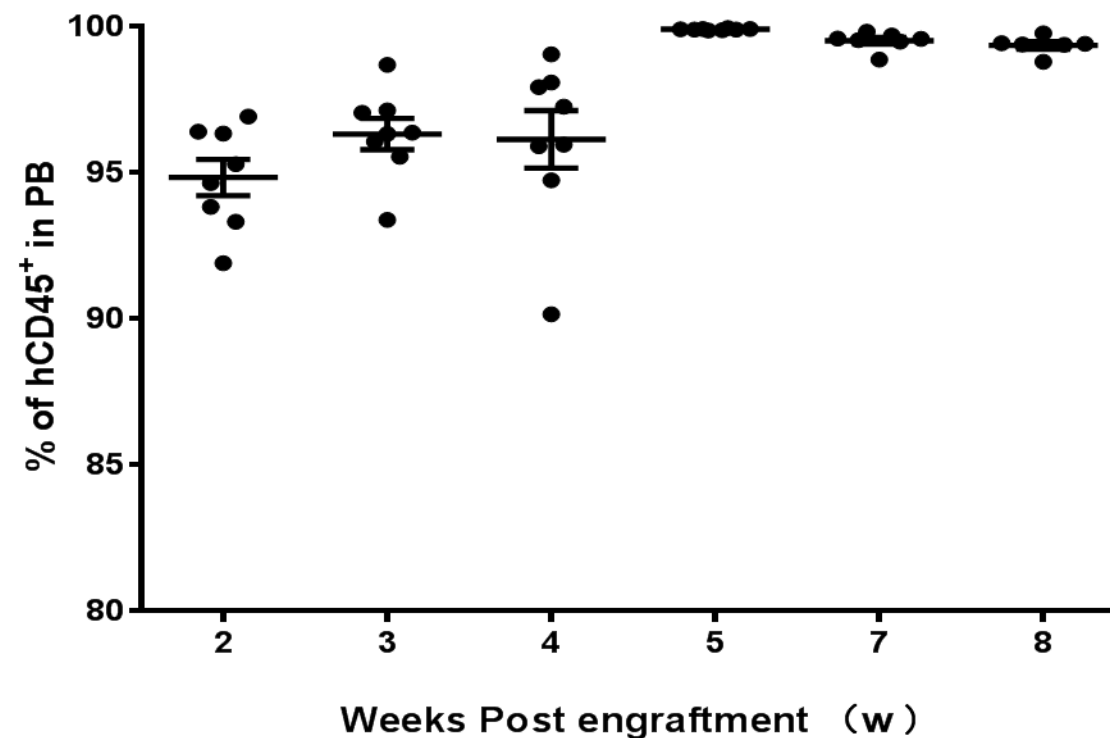
NCG and huPBMC reconstitution



hCD45⁺ cells in huPBMC-NCG



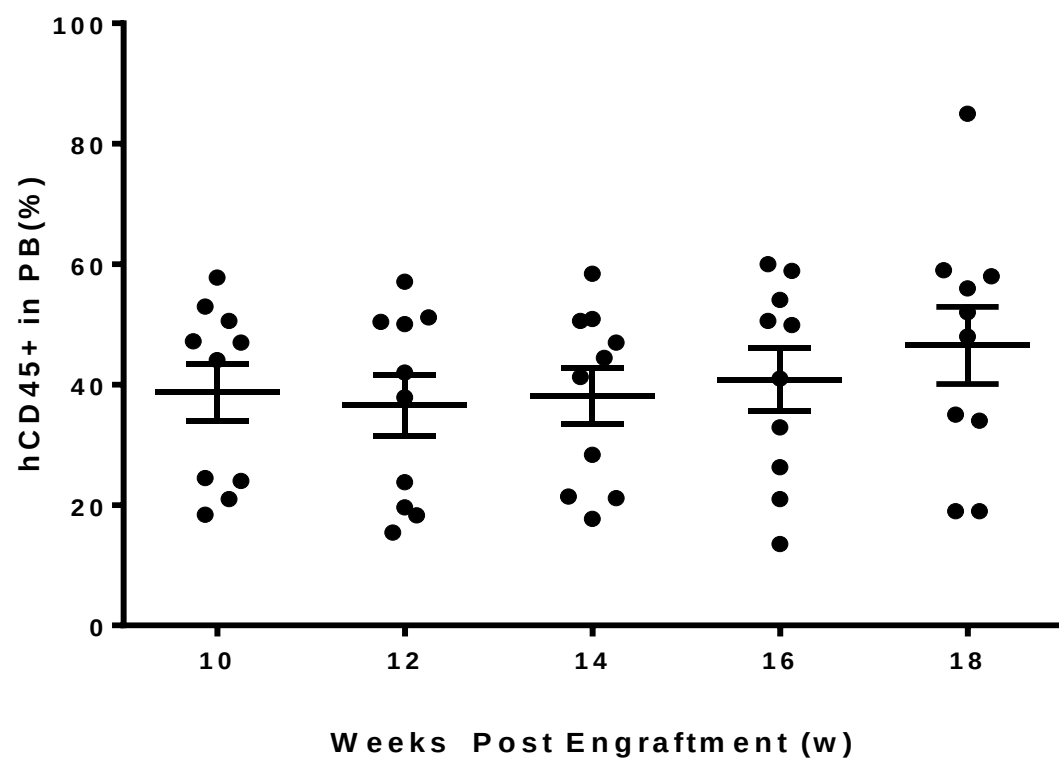
hCD3⁺ cells in huPBMC-NCG



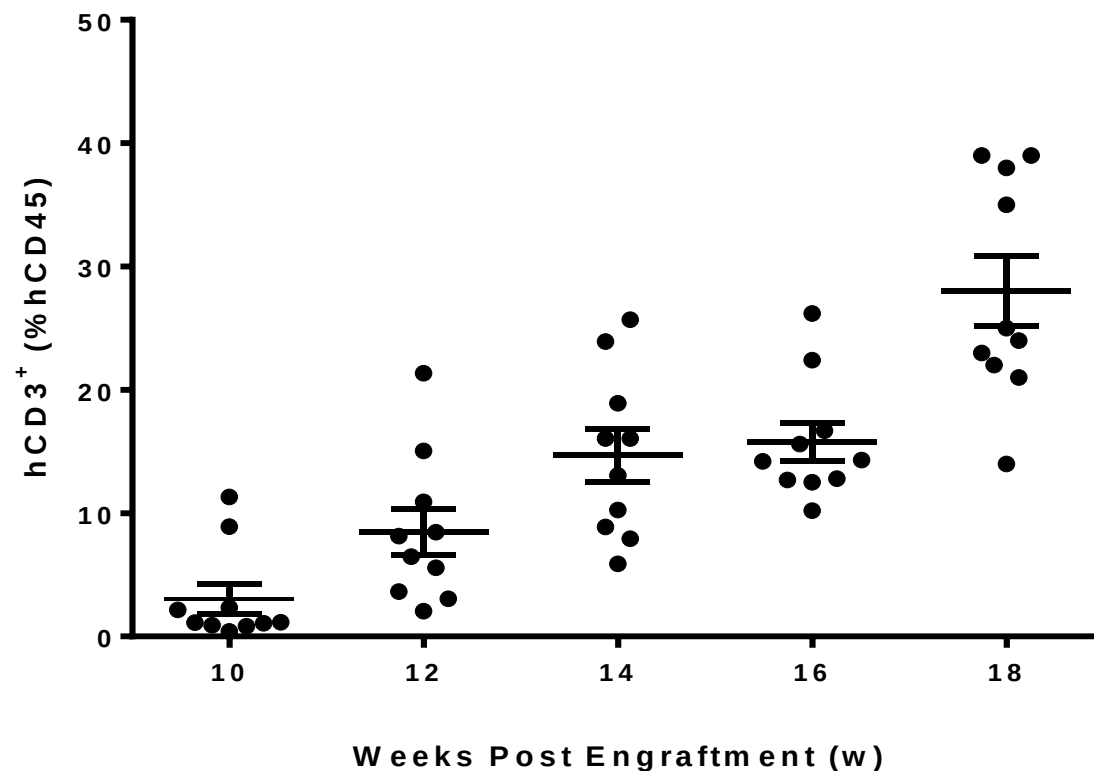
NCG and huHSC reconstitution



hCD45+



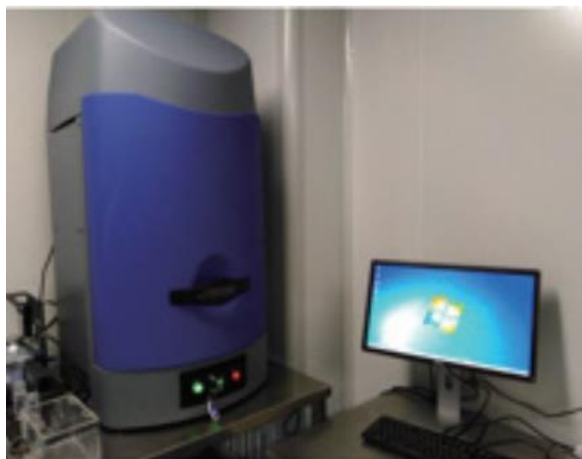
hCD3+



NCG-huHSC小鼠交付标准为注射HSC 8-16周后hCD45+在外周血中的比例 $\geq 20\%$

In Vivo Imaging System for CAR-T therapy

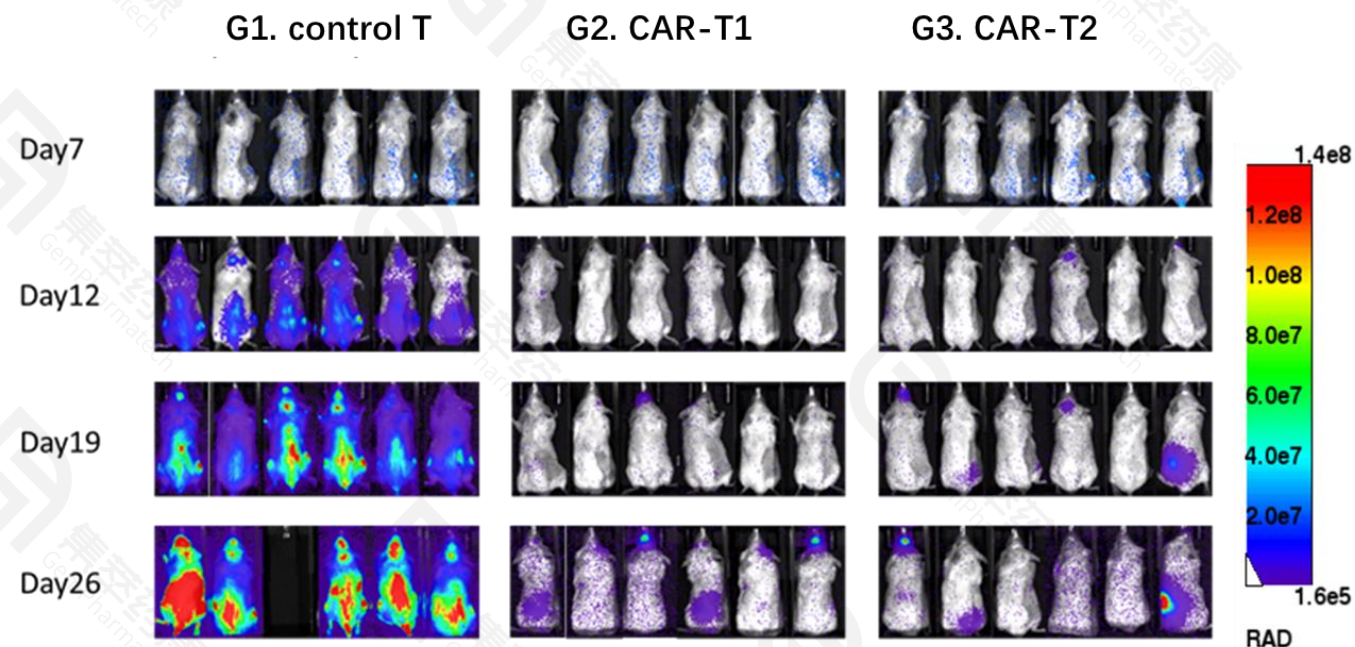
In vivo imaging system



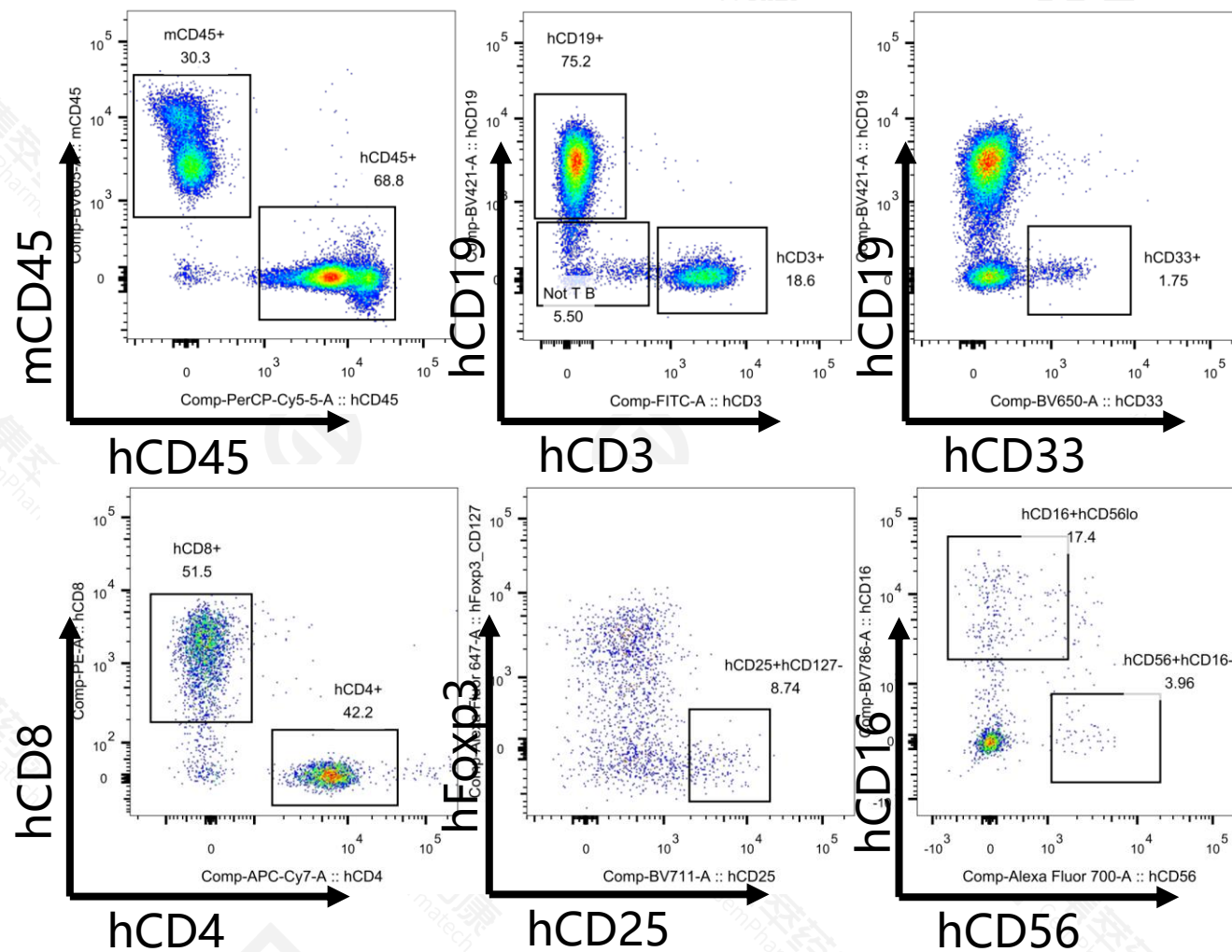
SI AmX1

Cancer Type	Cell line
Leukemia	Nalm6-luciferase, Raji-luciferase
Colon cancer	HCT116-luciferase HT29-luciferase RKO-luciferase
Glioblastoma	U251-luciferase
Liver cancer	Huh7-luciferase

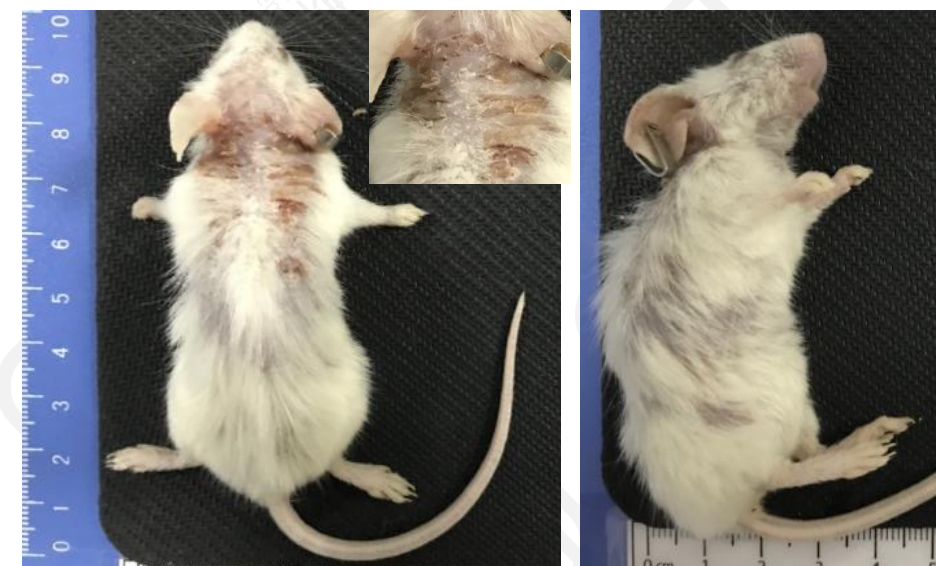
Efficacy of CAR-T cell in Nalm6-luciferase tumor bearing mice



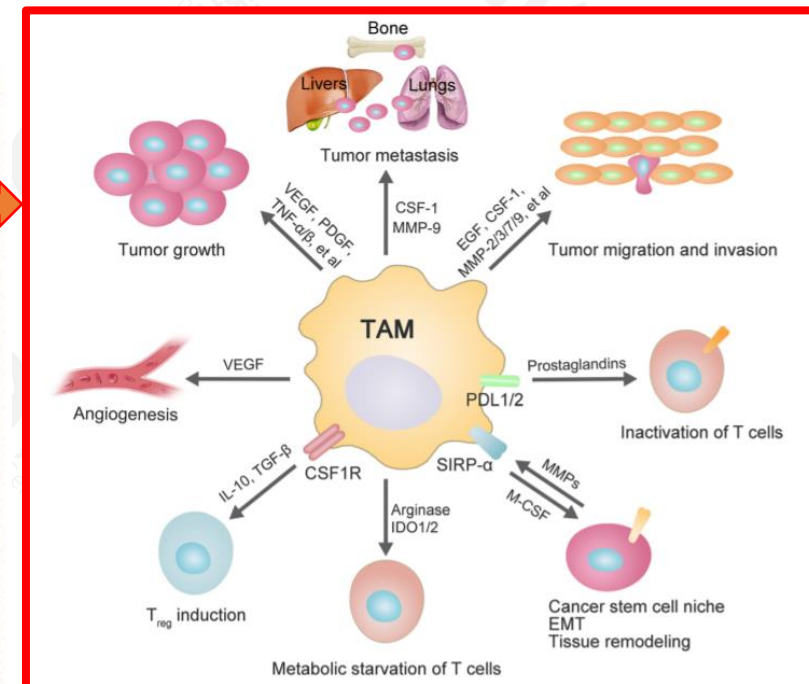
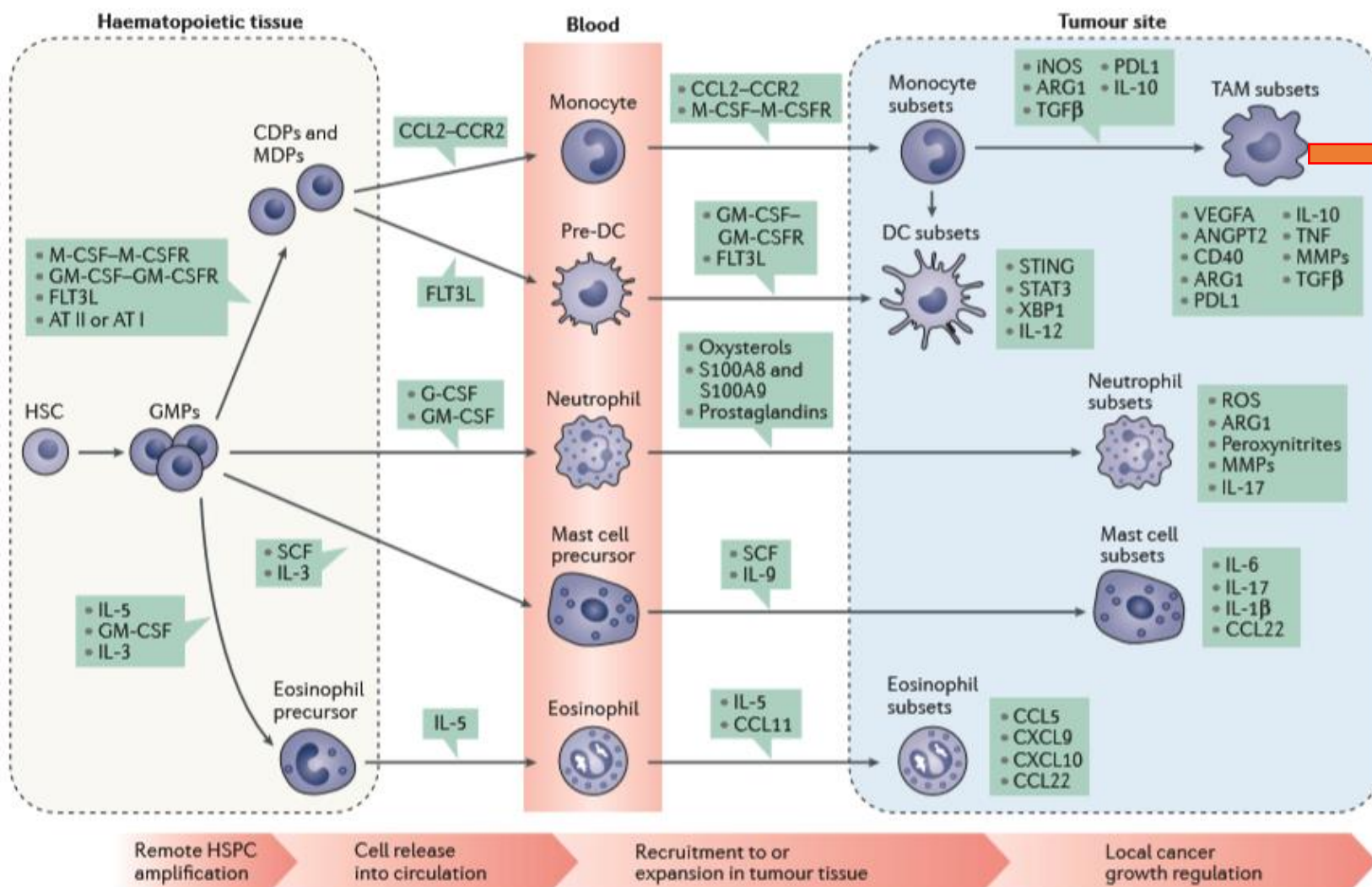
NCG免疫重建的局限性



Mice with GVHD



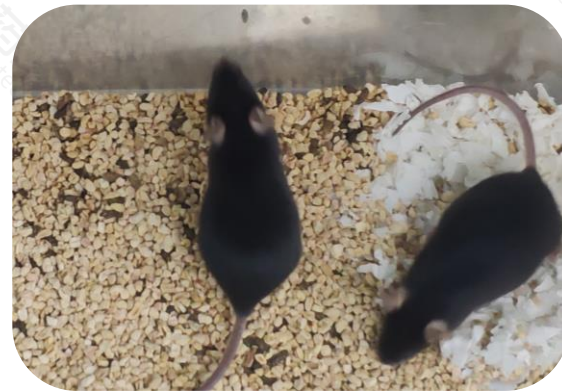
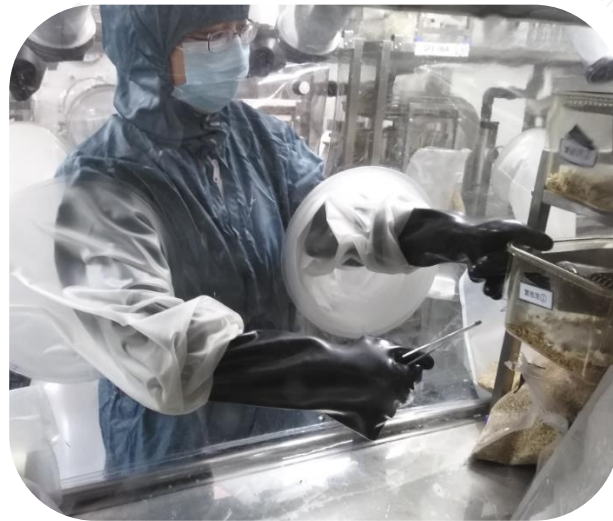
肿瘤微环境中髓系细胞起重要调节作用



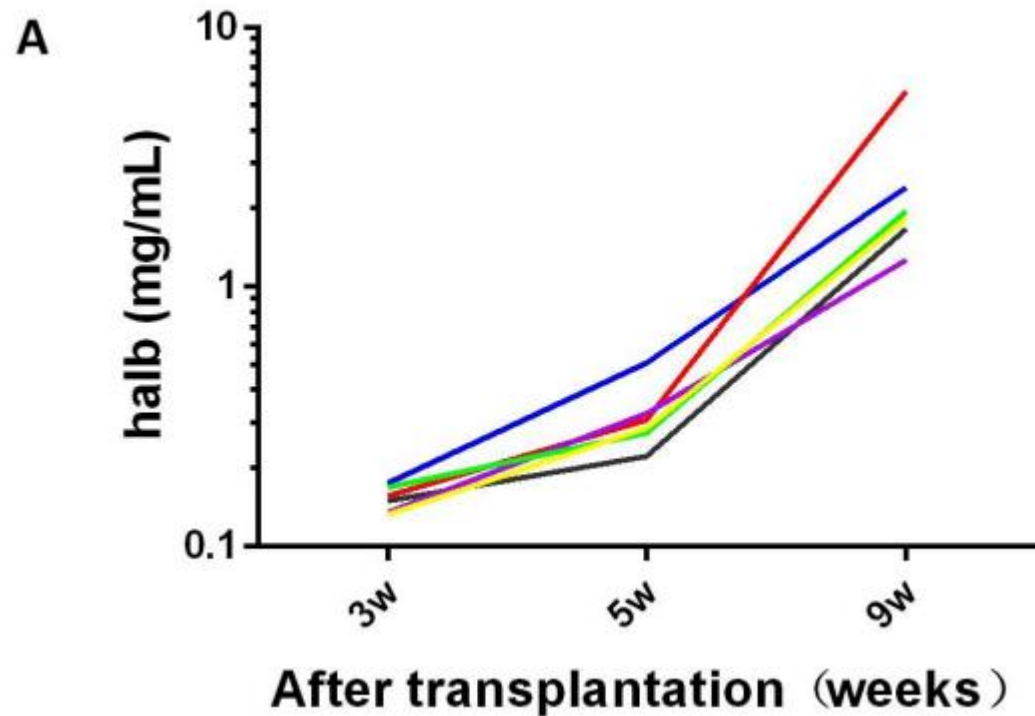
二代NCG品系

Strain Name	Type
NCG-SGM3	Promote the development of myeloid lineages and lymphoid cells
NCG-hIL15	Promote the development of NK cells
NCG-mTSLP	Restore Lymph node (LN) development and T, B cells development
NCG-hIL6	Enriched CD14+ Monocyte and macrophage differentiation
NCG-hIL7	Promote the development of T cells and B cells
NCG-hBAFF	Promote the development of B cells
NCG-GM3	Promote the development of myeloid lineages and lymphoid cells
NCG-hIL2	Promote the development of T cells and NK cells
NCG-HLA-A2.1	Maturation of CD8+ T cells
NCG-B2M-KO	relatively resistant to graft versus host disease (GVHD)

全品系无菌净化



肝脏人源化

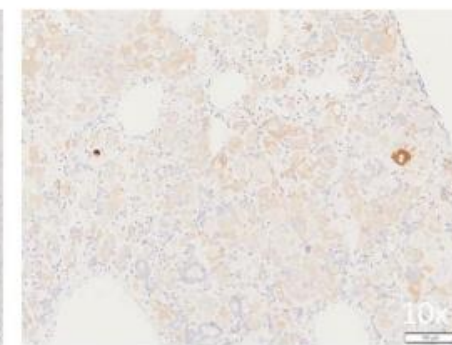
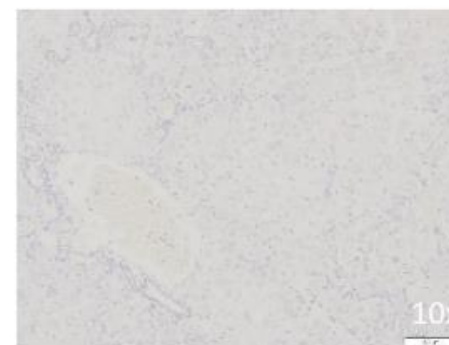


B

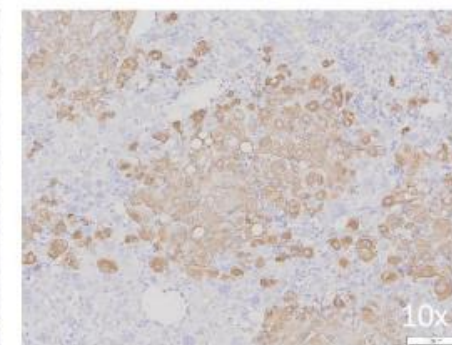
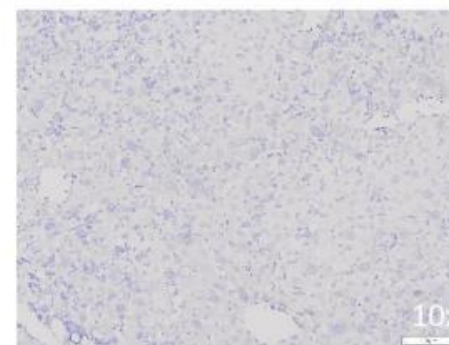
Negative

hHeps- NCG

hALB



hCK8/18





基因人源化小鼠资源



More target coverage

More tumor choices

Macro/Small molecule

Single/combo



C57BL/6

Dual genetic
background



BALB/c (推荐)



写自然素材、做动物实验的资源在哪里？



Company History



集萃药康
GemPharmatech



Gao Xiang President

国内首批且连续五次通过AAALAC认证
大陆唯一的国际小鼠表型分析联盟成员
中国首个条件性基因敲除模型(cell,2011)
中国首个单基因多基因Cas9 KO小鼠模型
中国首个Cas9 CKO小鼠模型
中国首个Cas9 CKO大鼠模型
全球首例Cas9 KO犬
全球首例Cas9 KO猴
拥有疾病模型品系全球第一



National Resource Center
for Mutant Mice



Asian Mouse Mutagenesis
Resource Association



Nanjing Biomedical Research
Institute of Nanjing University

National Laboratory Animal Center



IMPC
International Mouse
Phenotyping Consortium



GemPharmatech
GemPharmatech Co., Ltd



National Resource Center
for Mutant Mice



Model Animal Research Center

2002

2006

2010

2011

2017

已受理
2021-06-30

已问询
2021-12-20

上市委员会
2022-01-06

提交注册
2022-01-14

注册结果
-

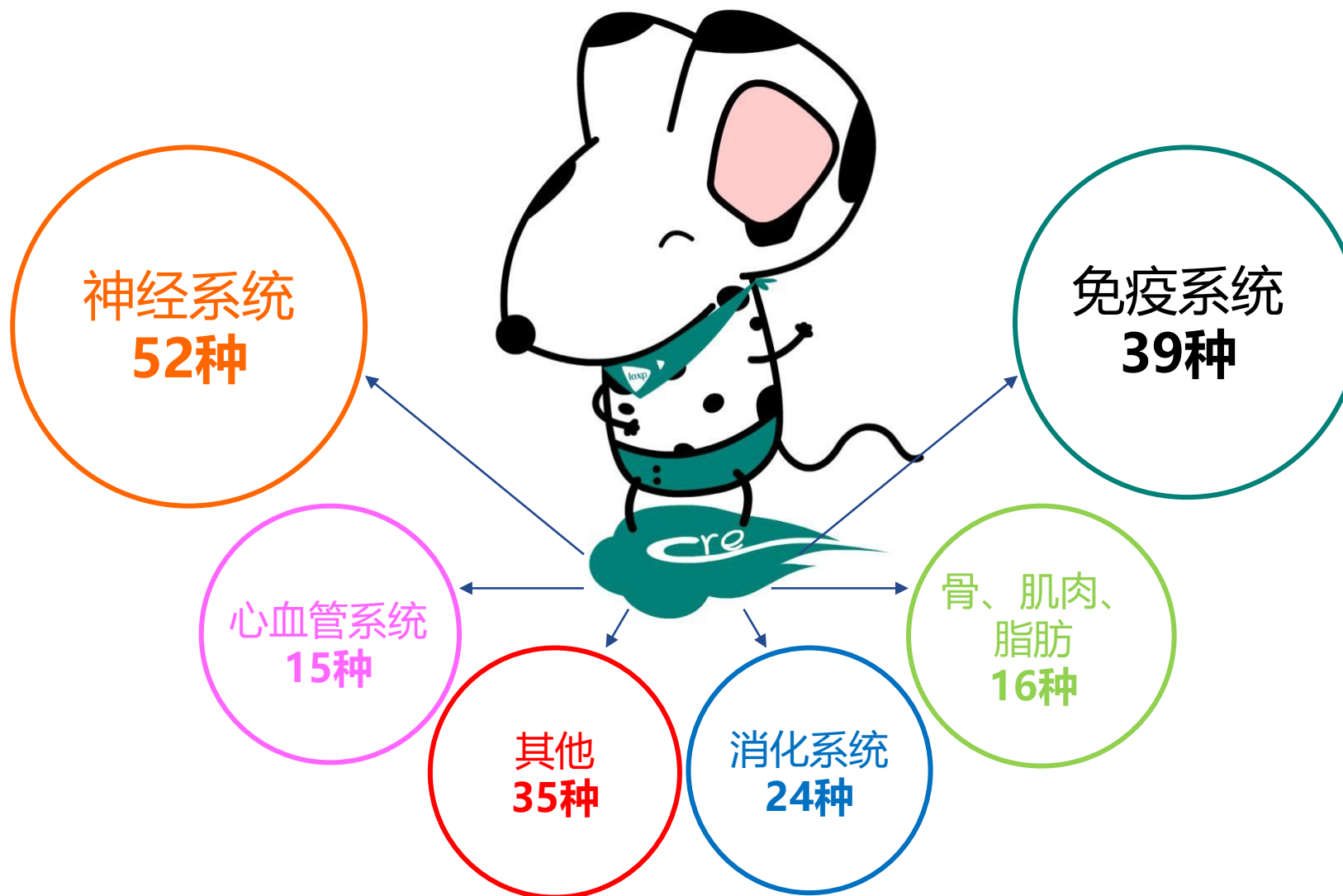
2018年全基因组cKO/KO计划



斑点鼠计划 *Dalmatian Mouse Action*

(2018-2021) 4年完成 22,951 个蛋白编码基因cKO/KO
品系，成为全球最大品系资源库

斑点鼠之剪刀鼠 (Cre工具鼠)



Mice Models for rare diseases



21-Hydroxylase Deficiency	Mitochondrial Encephalomyopathy
Autoimmune Encephalitis	Multifocal Motor Neuropathy
Autoimmune Hypophysitis	Primary Combined Immune Deficiency
Autoimmune Insulin Receptoropathy (Type B insulin resistance)	Severe Congenital Neutropenia
Cardiac Ion Channelopathies	Severe Myoclonic Epilepsy in Infancy (Dravet Syndrome)
Carnitine Deficiency	Sickle Cell Disease
Castleman Disease	Sitosterolemia
Congenital Adrenal Hypoplasia	Spinal and Bulbar Muscular Atrophy (Kennedy Disease)
Congenital Myotonia Syndrome (Non-Dystrophic Myotonia, NDM)	Spinal Muscular Atrophy
Congenital Scoliosis	Systemic Sclerosis
Coronary Artery Ectasia	Tetrahydrobiopterin Deficiency
Gaucher's Disease	Very Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency
Generalized Myasthenia Gravis	Williams Syndrome
IgG4 related Disease	Wiskott-Aldrich Syndrome
Leber Hereditary Optic Neuropathy	X-linked Adrenoleukodystrophy
McCune-Albright Syndrome	More Rare Disease Models under development

>170 publications using KOAP mice



Yang JK, et al. From Hyper- to Hypoinsulinemia and Diabetes: Effect of KCNH6 on Insulin Secretion. **Cell Rep.** 2018 Dec 26;25(13).

Wang H, et al. Impaired Spatial Learning is Associated with Disrupted Integrity of the White Matter in Akt3 Knockout Mice. **CNS Neurosci Ther.** 2017 Jan;23(1):99-102. doi: 10.1111/cns.12647. Epub 2016 Sep 27.

Yu, X., et al. SENP3 maintains the stability and function of regulatory T cells via BACH2 deSUMOylation. **Nat Commun.** 9(1), 3157.

Yang JK, et al. From Hyper-to Hypoinsulinemia and Diabetes: Effect of KCNH6 on Insulin Secretion. **Cell Rep.** 2018 Dec 26;25(13).

Lawei Yang 1,et al. Tetraspanin 1 inhibits TNF α -induced apoptosis via NF- κ B signaling pathway in alveolar epithelial cells. **Inflamm. Res.** 2018 Dec; 67.

Xu M, et al. Generation of conditional Acvr1 knockout mice by CRISPR/Cas9-mediated gene targeting. **Mol Cell Probes.** 2018 Feb;37:32-38.

Wang Y,et al. Integrin β 1D Deficiency-Mediated RyR2 Dysfunction Contributes to Catecholamine-Sensitive Ventricular Tachycardia in ARVC. **Circulation** 2020 Mar 03.

Jun Xiao, et al. Targeting 7-dehydrocholesterol reductase integrates cholesterol metabolism and IRF3 activation to eliminate infection. **Immunity.** 2020 Jan 14;52(1):109-122.e6.

Guo YP, et al. Global Gene Knockout of Enhances Pain Sensitivity and Exacerbates Negative Emotions in Rats. **Front Mol Neurosci** 2019;12.

Hu F, et al. Nogo-A promotes inflammatory heat hyperalgesia by maintaining TRPV-1 function in the rat dorsal root ganglion neuron. **FASEB J.** 2019 Jan; 33(1).

Wang H, et al. Adipose group 1 innate lymphoid cells promote adipose tissue fibrosis and diabetes in obesity. **Nat Commun** 2019 Jul 22;10(1).

Zhu C, et al. Deletion of macrophage migration inhibitory factor ameliorates inflammation in mice model severe acute pancreatitis. **Biomed. Pharmacother.** 2020 May;125.

Di Zhao, et al. Lysine-5 Acetylation Negatively Regulates Lactate Dehydrogenase A and Is Decreased in Pancreatic Cancer. **Cancer Cell.** 2013 April 15; 23(4).

Yi Fu, et al. TSPO deficiency induces mitochondrial dysfunction, leading to hypoxia, angiogenesis, and a growth-promoting metabolic shift toward glycolysis in glioblastoma. **Neuro Oncol.** 2020 Feb 20;22(2):240

Zhang G, et al. p53 pathway is involved in cell competition during mouse embryogenesis. **PNAS.** 2017 01 17;114(3).

Wei Huang, et al. Milk fat globule-EGF factor 8 suppresses the aberrant immune response of systemic lupus erythematosus-derived neutrophils and associated tissue damage. **Cell Death & Differentiation** volume 24, pages263–275(2017).

Xiaoyin Ma, et al. DAPL1, a susceptibility locus for age-related macular degeneration, acts as a novel suppressor of cell proliferation in the retinal pigment epithelium. **Hum Mol Genet.** 2017 May 1;26(9):1612-1621.

Yuhua Tian, et al. MicroRNA-31 Reduces Inflammatory Signaling and Promotes Regeneration in Colon Epithelium, and Delivery of Mimics in Microspheres Reduces Colitis in Mice. **Gastroenterology.** 2019 Jun;156(8):2281-2296.e6.

Jian Xu, et al. Loss of Bmal1 decreases oocyte fertilization, early embryo development and implantation potential in female mice. **Zygote.** 2016 Oct;24(5):760-7.

Yao Wang, et al. Mitochondria-localised ZNFX1 functions as a dsRNA sensor to initiate antiviral responses through MAVS. **Nat Cell Biol.** 2019 Nov;21(11):1346-1356.

Guanjie Sun, et al. Functional Analysis of KIT Gene Structural Mutations Causing the Porcine Dominant White Phenotype Using Genome Edited Mouse Models. **Front Genet.**, 03 March 2020

G Sun, et al. MARCH3 attenuates IL-1 β -triggered inflammation by mediating K48-linked polyubiquitination and degradation of IL-1RI. **PNAS** December 4, 2018 115 (49) 12483-12488

Xiaojin He, et al. Novel homozygous CFAP69 mutations in humans and mice cause severe asthenoteratospermia with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. **J Med Genet.** 2019 Feb;56(2):96-103.

Fengyan Han, et al. GLTSCR1 Negatively Regulates BRD4-Dependent Transcription Elongation and Inhibits CRC Metastasis. **Adv Sci (Weinh).** 2019 Oct 16;6(23):1901114.

Yu Zhang, et al. Histone methyltransferase G9a protects against acute liver injury through GSTP1. **Cell Death & Differentiation** volume 27, pages1243–1258(2020)

Mengxia Li, et al. APE1 deficiency promotes cellular senescence and premature aging features. **Nucleic Acids Res.** 2018 Jun 20;46(11):5664-5677.

Si Zhang, et al. The deubiquitylase OTUD3 stabilizes GRP78 and promotes lung tumorigenesis. **Nat Commun.** 2019 Jul 2;10(1):2914.

Xiaohua Yu, et al. Long non-coding RNA Linc-RAM enhances myogenic differentiation by interacting with MyoD. **Nat Commun.** 2017 Jan 16;8:14016.

Bing Zhao, et al. Znhit1 controls intestinal stem cell maintenance by regulating H2A.Z incorporation. **Nat Commun.** 2019 Mar 6;10(1):1071.

Chang Xu, et al. Claudin-7 gene knockout causes destruction of intestinal structure and animal death in mice. **World J Gastroenterol.** 2019 Feb 7; 25(5): 584–599.

Hui Qian, et al. HDAC6-mediated acetylation of lipid droplet-binding protein CIDEC regulates fat-induced lipid storage. **J Clin Invest.** 2017 Apr 3;127(4):1353-1369.

Jia-Huan Zhou, et al. Ablation of TFR1 in Purkinje Cells Inhibits mGlu1 Trafficking and Impairs Motor Coordination, But Not Autistic-Like Behaviors. **J Neurosci.** 2017 Nov 22;37(47):11335-11352.

Xiaohui Ye, et al. Downregulation of Glt25d1 aggravates carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury through activation of the TGF- β 1/Smad2 signaling pathway. **Mol Med Rep.** 2018 Oct;18(4):3611-3618.

Daojing Li, et al. Upregulation of Microglial ZEB1 Ameliorates Brain Damage after Acute Ischemic Stroke. **Cell Rep.** 2018 Mar 27;22(13):3574-3586.

Ziying Lin, β -8-Oxoguanine DNA Glycosylase Overexpression Reduces Oxidative Stress-Induced Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis Through the JNK Signaling Pathway in Human Bronchial Epithelial Cells. **DNA Cell Biol.** 2017 Dec;36(12):1071-1080.

立足中国，覆盖全球



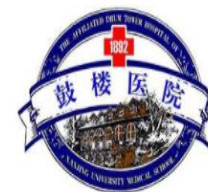
高校及科研院所

> 320



三甲医院

> 280



企业

> 250



国内覆盖

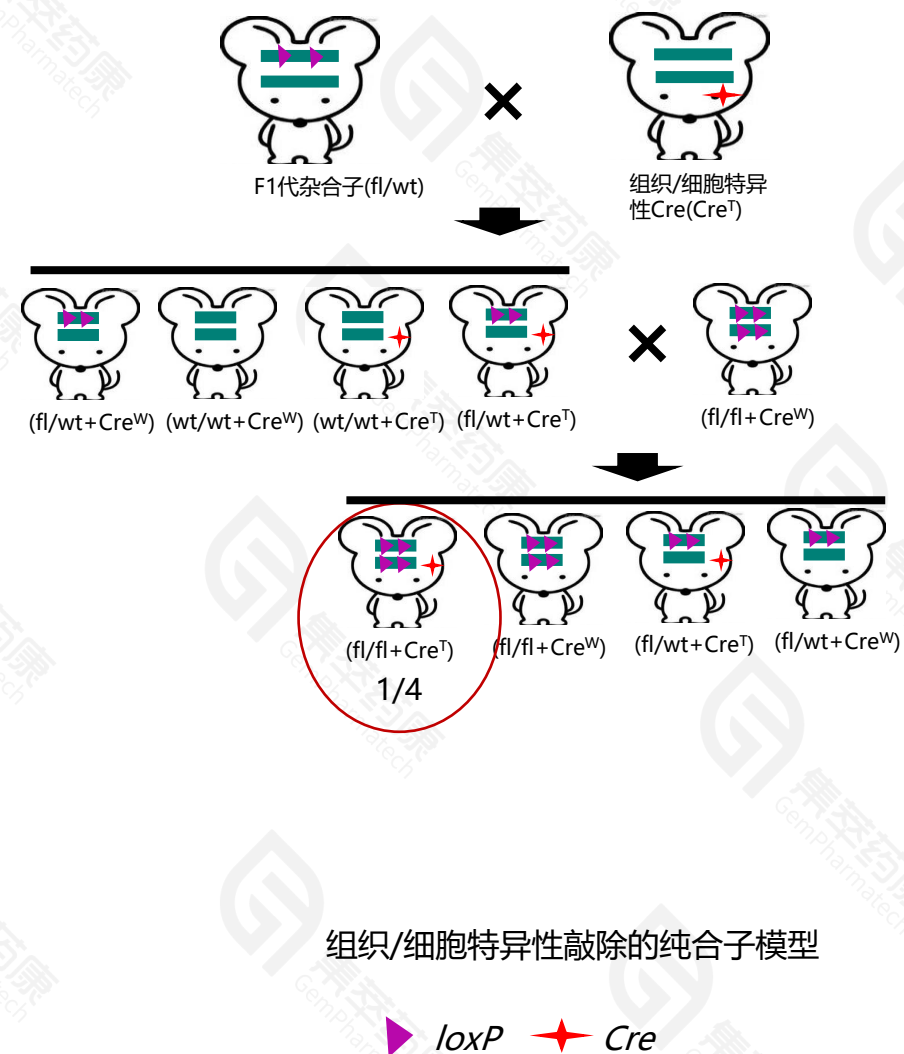
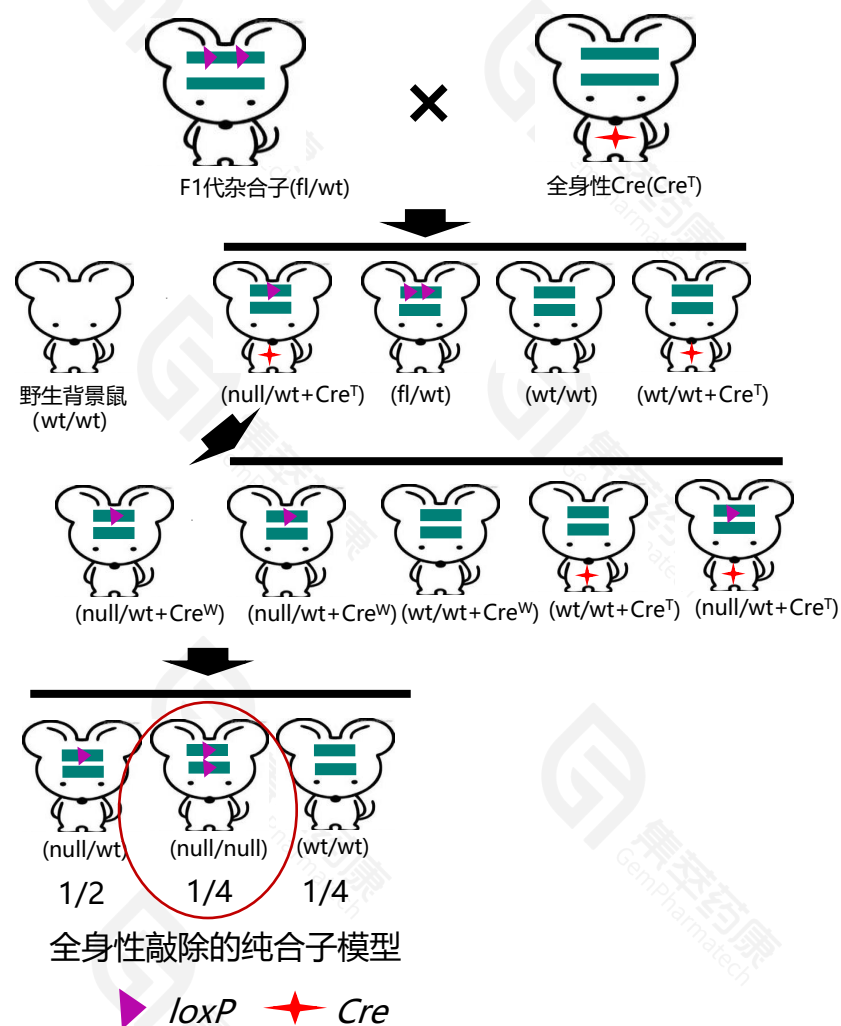
31个省市自治区



境外市场

美国、以色列、英、德、西班牙、芬兰、韩国等10多个国家和地区

cKO繁育



全身基因敲除

Knock out (KO): 全身基因敲除 (先搞掉再说) → 你怎么确定你得到的表型和基因是直接的关系?
基因致死了, 得不到小鼠?



PDK1是一个与肌肉发育很重要的基因

我想知道PDK1在肌腱中的作用

先做一个PDK1的全身敲除, 看看总体表型

但是最后发现得不到阳性鼠

原因是: PDK1参与了心脏的发育, 缺少了PDK1心脏无法发育, 在胚胎阶段小鼠就死了, 无法研究

思考题: 得不到阳性鼠是不是证明项目失败了?

条件性基因敲除

Conditional Knock out (CKO): 条件性基因敲除 (我在某个细胞或者器官中敲除)



PDK1是一个与肌肉发育很重要的基因

我想知道PDK1在肌腱中的作用:

于是我们用PDK1的FLOX (炸弹) 和SCX (肌腱的门牌号) Cre配, 在肌腱组织中敲除掉PDK1的基因, 心脏中得以保存, 小鼠可以发育。

思考题: 一个flox小鼠是不是可以与不同Cre配繁殖使用?

诱导性条件性基因敲除

Inducible Conditional Knock out: 诱导性条件性基因敲除 (我在某个时间将某个细胞或者器官中敲某基因)



PDK1对于心肌发育很重要，在心肌

但是我想知道在心脏成熟期PDK1的作用，但是配 α -MHC-Cre会致死---心脏无法发育

于是我们用PDK1的FLOX (炸弹) 和 α -MHC-CreER配，在心肌组织中埋伏一个PDK1的基因的遥控炸弹。

在心脏发育成熟后，用tamoxifen进行诱导后再进行心肌PDK1敲除。

基因敲入

Gene Knock in (KI): 将某一个基因或者片段插入基因组里面去

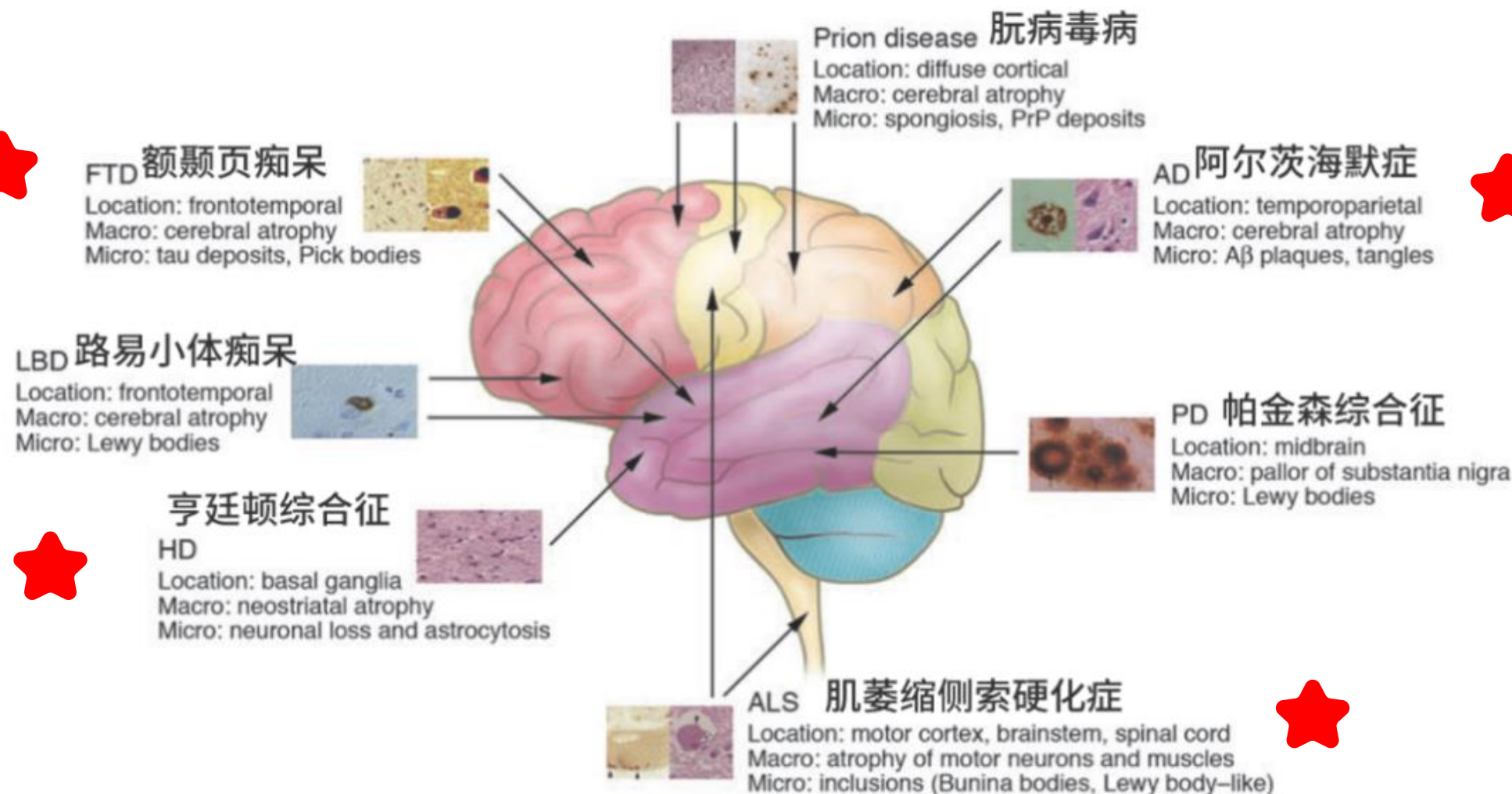


PDK1对于心肌发育很重要，

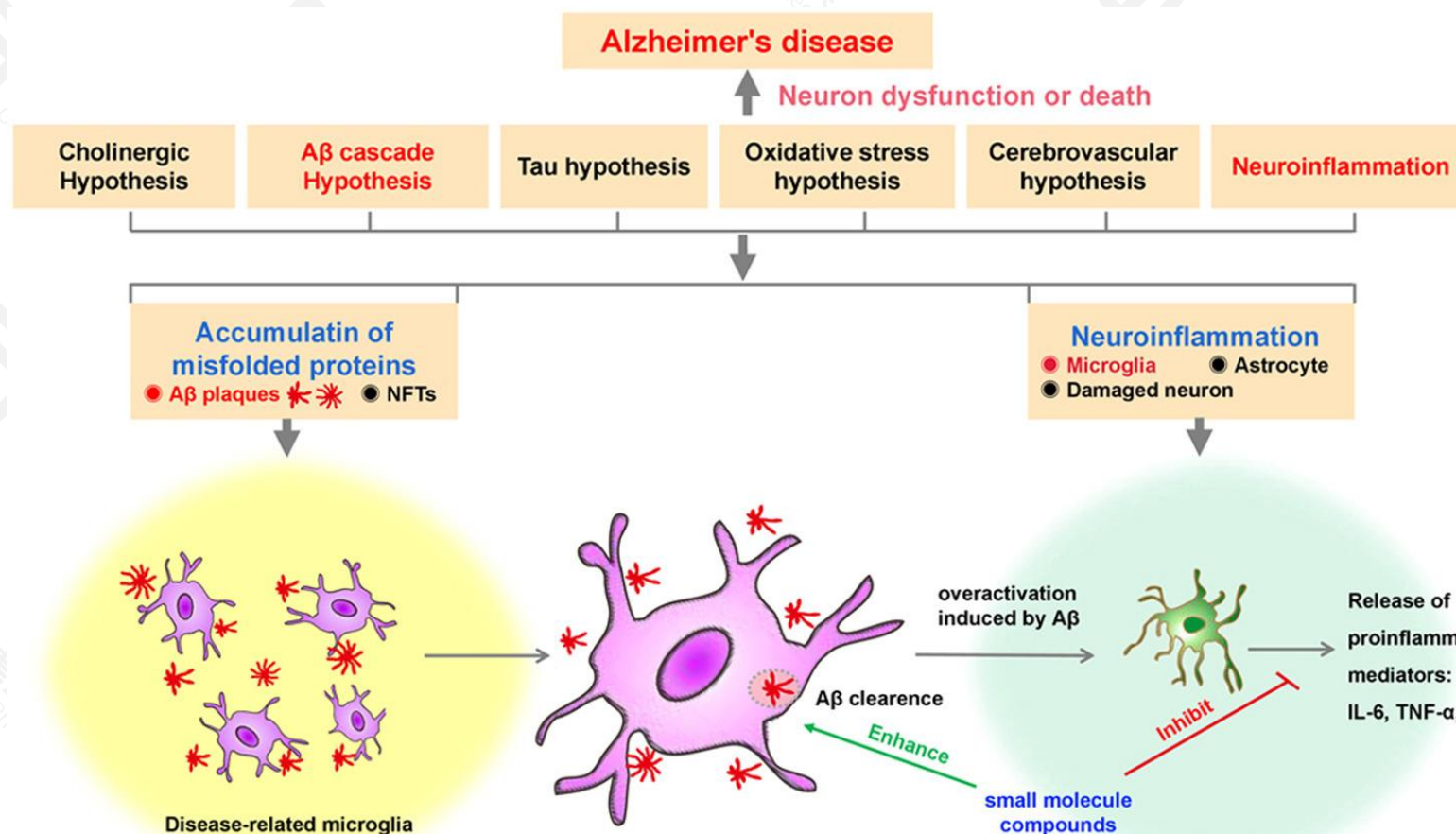
临床上发现一个心脏发育有问题的病人，经过测试之后发现是在PDK1的基因中出现了一个点突变

于是在小鼠中进行一个KI项目，可以观察小鼠与人的是否存在心脏发育问题，如果是的话可以证明这个点突变有很强的致病性。

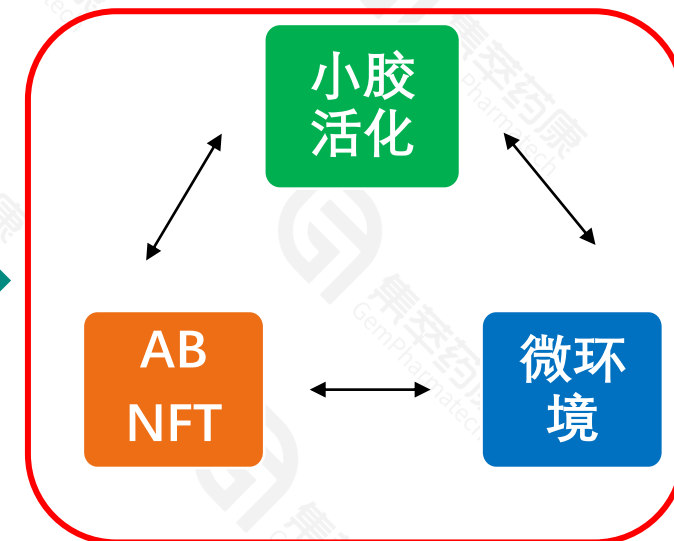
神经退行性疾病



免疫炎症与神经退行性疾病



AD model



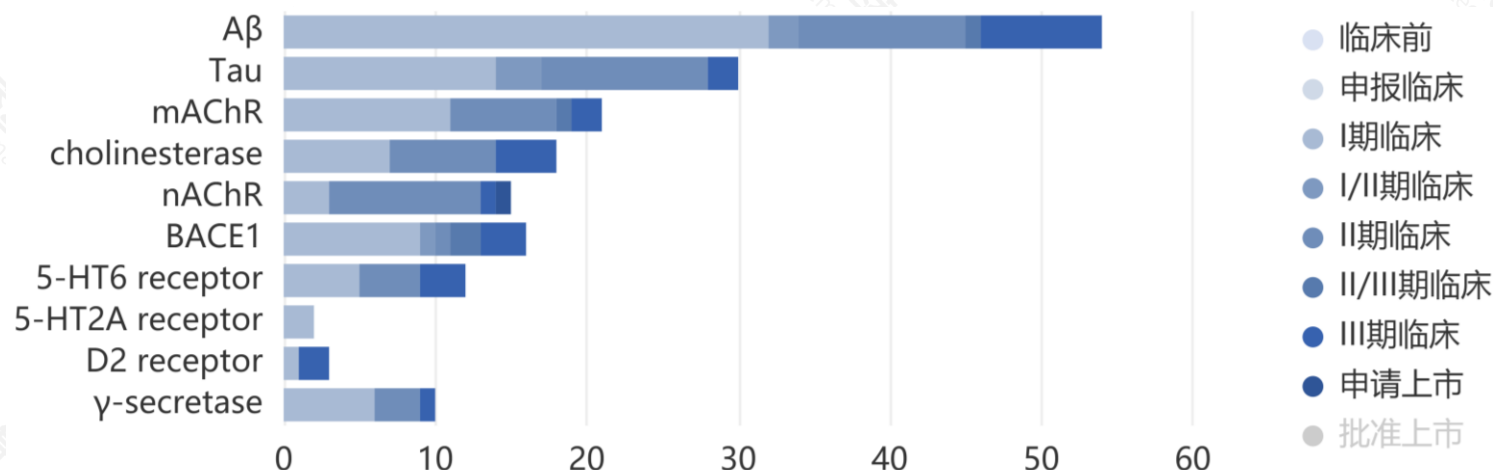
胶质细胞调控网络——脑病理微环境 DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111703

AD药物研发临床进展

1906年首次发现阿尔茨海默症至今，全球能用于临床的针对性药物只有6款，且只能起到有限延缓病情的作用。

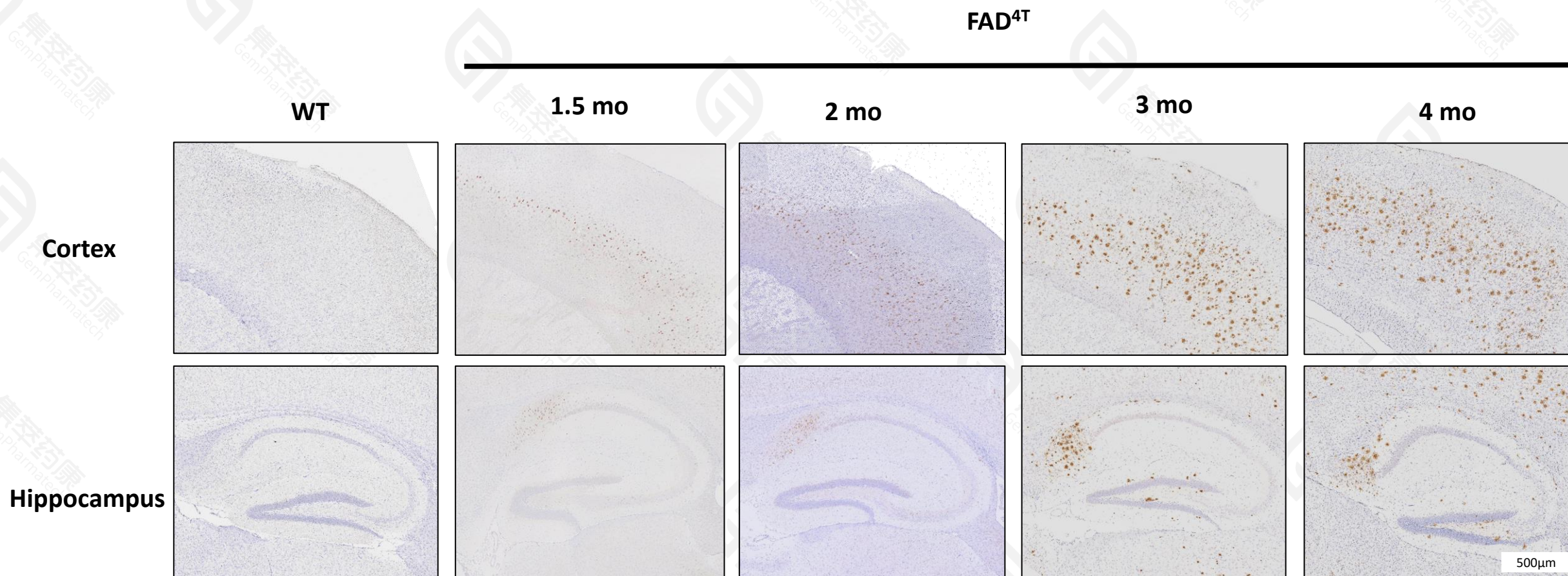
通用名	商用名	原研企业	FDA批准时间	药物原理
他克林	Cognes	盐野义	1993.09	胆碱酯酶抑制剂
多奈哌齐	Aricept	卫材	1996.11	胆碱酯酶抑制剂
卡巴拉汀	Exelon	诺华	1998.05	胆碱酯酶抑制剂
加兰他敏	Razadyne	强生	2001.02	胆碱酯酶抑制剂
美金刚	Namenda	德国麦氏	2003.01	兴奋性氨基酸受体拮抗剂
阿杜那单抗	aducanumab	渤健	2021.7	
甘露特钠	GV-971	绿谷制药	中国药监局，全球临床Ⅲ期	机制不明

AD药物研发临床进展



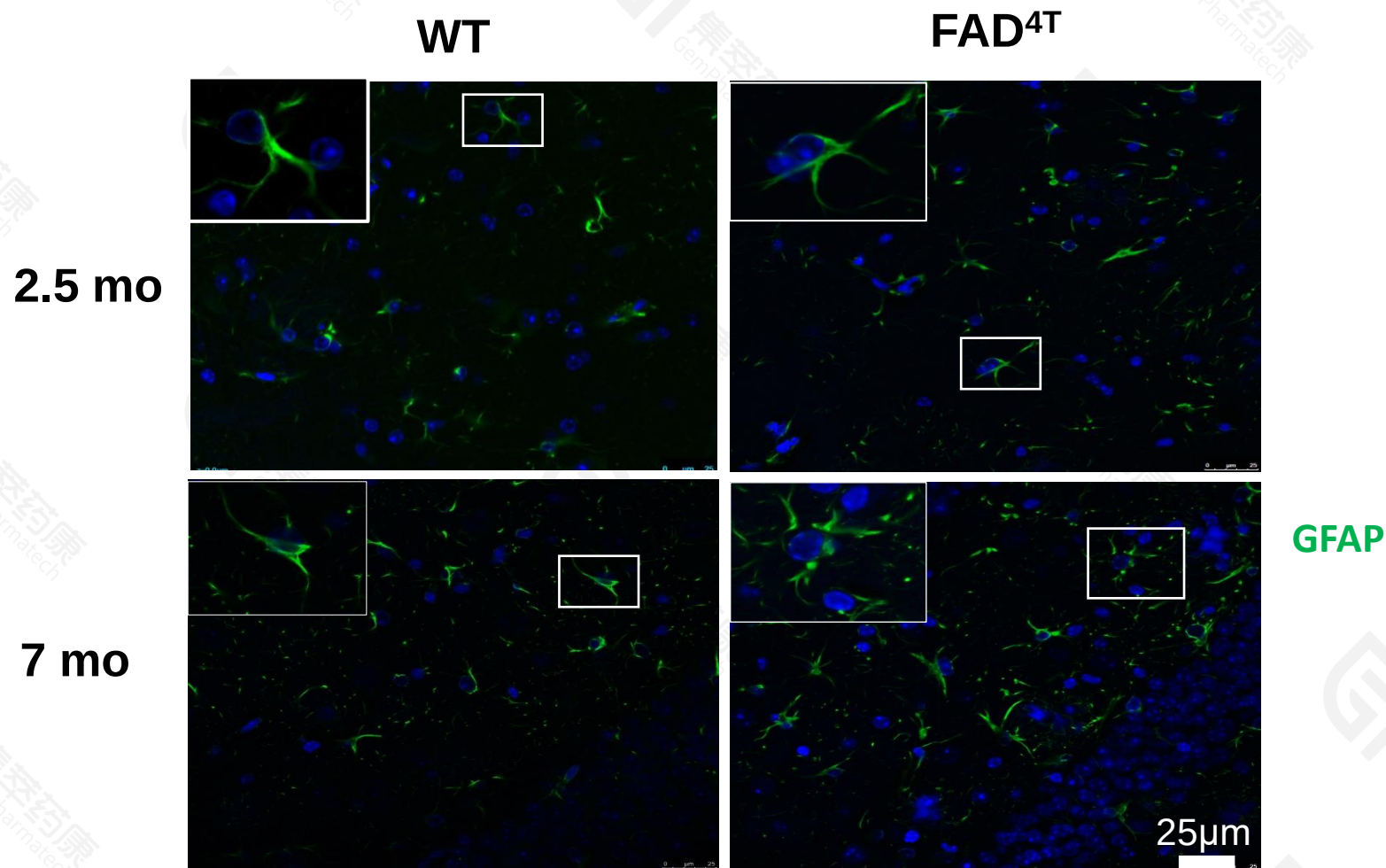
Target mechanism	Aβ	BACE1	γ-secretase	α-secretase
mechanism	Aβ eliminate	BACE1 inhibitor	γ-secretase inhibitor	α-secretase agonist
type	monoclonal antibody/chemicals	chemicals	chemicals	chemicals
status	Most in clinical I, 7 in clinical III	Most in preclinical, 5 in clinical II/III	Most in preclinical, phase I	preclinical
amount	49	20	24	1

FAD^{4T}模型A β 病理检测



1.5mo可检测到A β 斑块，且呈年龄依赖性增多

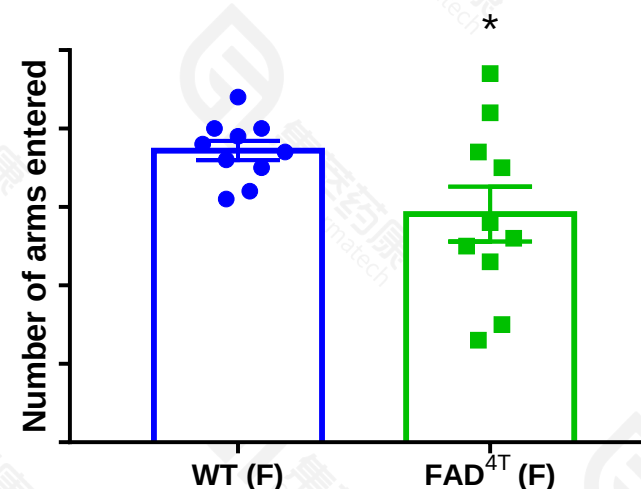
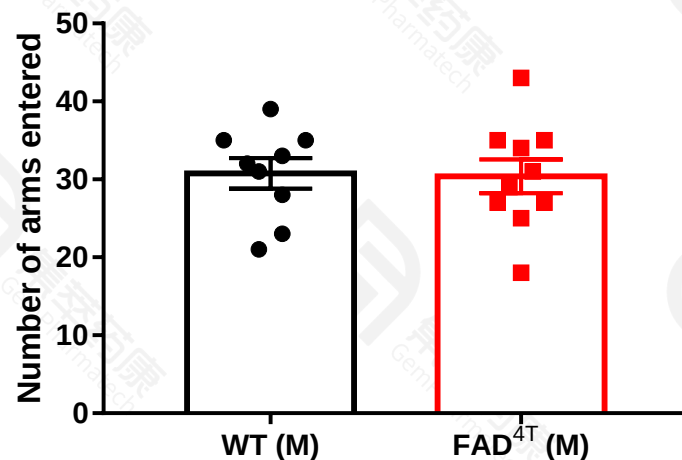
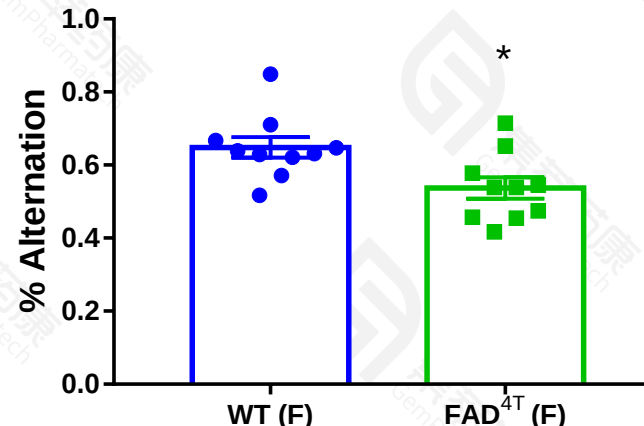
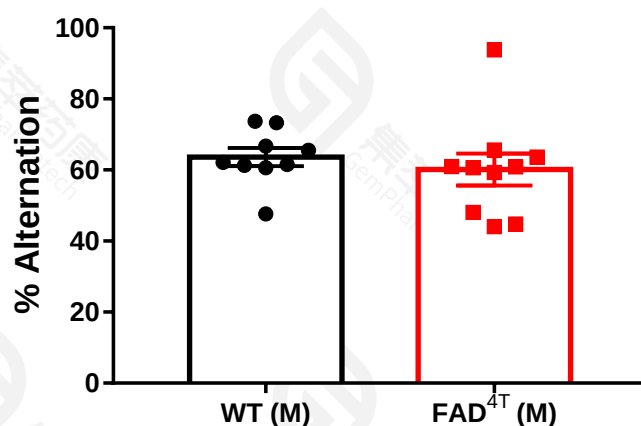
FAD^{4T}模型胶质细胞激活



FAD^{4T}小鼠在2.5月龄出现胶质细胞激活，7mo出现胶质细胞增生

FAD^{4T}模型认知能力检测

8月龄FAD^{4T}小鼠出现空间工作记忆障碍 (Y-Maze)

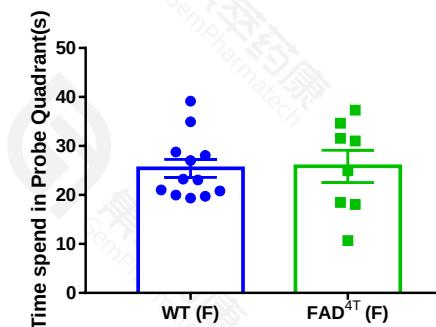
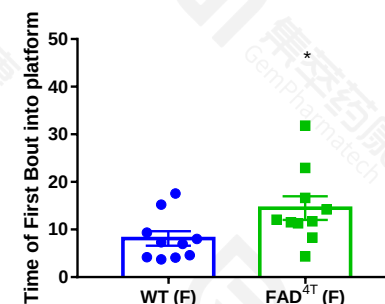
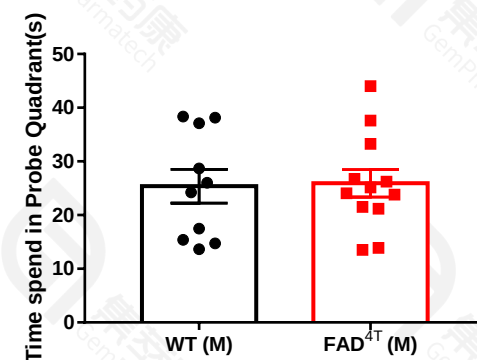
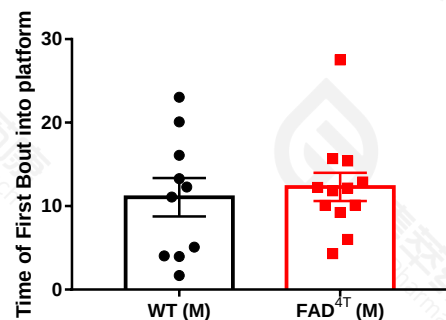
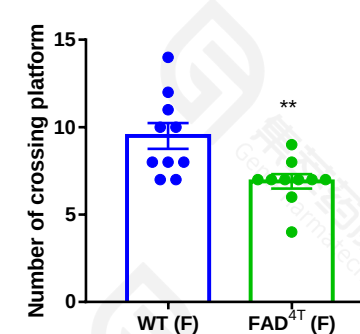
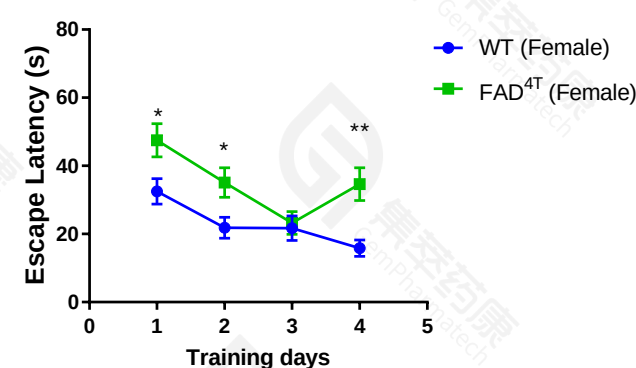
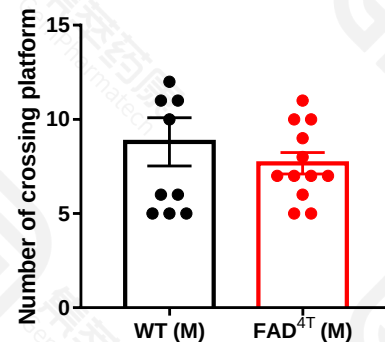
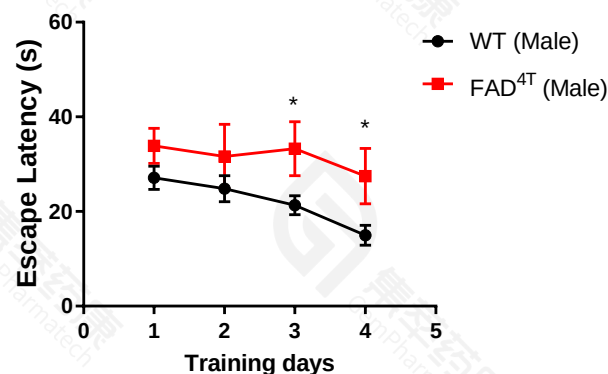


WT (Male) = 9 FAD^{4T} (Male) = 10

WT (Female) = 10 FAD^{4T} (Female) = 10

FAD^{4T}模型认知能力检测

FAD^{4T}8月龄雌鼠出现空间学习记忆障碍，雄鼠出现学习障碍 (Morris Water Maze)



WT (Male) = 10 FAD^{4T} (Male) = 12

WT (Female) = 10

FAD^{4T} (Female) = 10

神经退行性疾病模型资源

Model	Target gene	
	FAD ^{4T}	available
AD		
PD (帕金森)		

研发中，暂不对外公开，有感兴趣的老师开放合作验证

ALS (肌萎缩侧索硬化)

神经退行性疾病模型资源

Model	Target gene	Availability
HD (亨廷顿舞蹈症)	研发中，暂不对外公开，有感兴趣的老师开放合作验证。	
SMA (脊髓性肌萎缩症)		
FTD (额颞叶痴呆)		
HGPS (早衰)		
智力发育障碍		
FXTAS (共济失调综合征)		
FAP (家族性淀粉样多发型神经病变)		
靶点人源化 (AD、PD)		



神经系统Cre工具鼠资源

品系编号	品系名称	主要表达区域
T004857	H11-mGFAP-Cre-PolyA	健康大脑和脊髓组织中的大多数星形胶质细胞，以及中枢神经系的所有星形胶质细胞，有报道某些品系的神经干细胞也有表达
T004861	Pvalb(PV)-Cre	大多数表达 parvalbumin（小清蛋白）的神经元包括脑内的间神经元和背根神经节的本体感受传入感觉神经元
T005675	OTX2-Cre	视网膜
T006187	Cspg4-CreERT2 (Ng2)	少突胶质前体细胞和血管周细胞
T006202	Calb1-Cre	大脑许多部位如皮质、海马、纹状体、丘脑、中脑和小脑中表达
T006768	Cx3cr1-cre	单核吞噬细胞系统和小胶质细胞中
T052793	Drd1(Drd1a)-Cre	在 dopaminoceptive neurons（多巴胺神经元）中表达
T052794	Drd2(D2R)-Cre	多巴胺受体，Drd2 阳性介质刺状神经元中
T050766	Tmem119-P2A-CreERT2	小胶质细胞
T050767	Tmem119-P2A-iCre	小胶质细胞
T052690	Cx3cr1-CreERT2	单核细胞、树突状细胞、NK 细胞和脑小胶质细胞中



实验动物伦理的注意事项



一个国家的伟大和道德进步的程度可视其如何对待动物来衡量。

甘地

The greatness of a nation and its moral progress can be judged by the way its animals are treated.

Mahatma Gandhi



资质认证等对伦理委员会(IACUC) 设立的硬性要求



✓ 实验动物生产许可证



✓ 实验动物使用许可证



✓ 课题申报, 实验动物相关文章发表.....



✓ GLP认证



✓ CNAS实验动物认证



✓ AAALAC认证

.....

伦理及福利需要 (影响及社会效应)

Nature 撤稿

CORRECTIONS & AMENDMENTS

CORRIGENDUM doi:10.1038/nature15370 **Corrigendum: Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS**

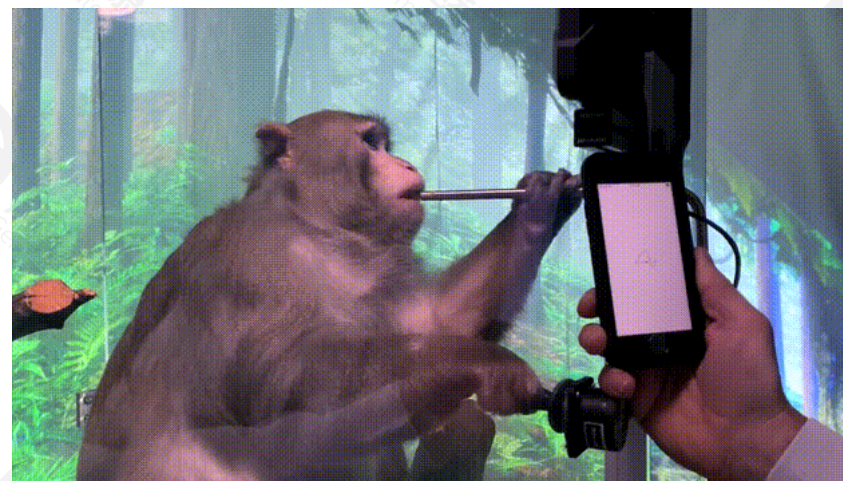
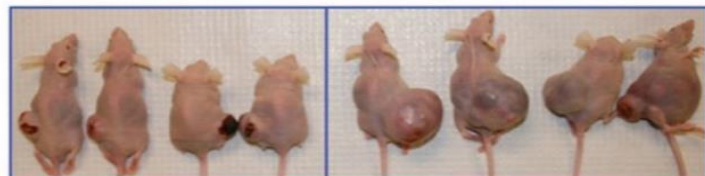
Lakshmi Raj, Takao Ide, Aditi U. Gurkar, Michael Foley, Monica Schenone, Xiaoyu Li, Nicola J. Tolliday, Todd R. Golub, Steven A. Carr, Alykhan F. Shamji, Andrew M. Stern, Anna Mandinova, Stuart L. Schreiber & Sam W. Lee

Nature **475**, 231–234 (2011); doi:10.1038/nature10167
corrigendum Nature **481**, 534 (2012); doi:10.1038/nature10789

animals for clinical signs of distress, and did not require daily measurements of the tumour size. Measurements of tumour sizes were performed at the indicated time points. Consistent with the IACUC-approved guidelines, all animals were euthanized as soon as measurements indicated that the tumours reached the size limit approved in the protocol (15 mm). These mice did not show clinical signs of distress, and thus it only became apparent that the tumours had already exceeded 15 mm when they were measured. Since the completion of this study, the IACUC-approved protocol of the PI was revised, and daily measurements of tumour sizes, in addition to daily observation, are now required. For the xenograft tumour models, measurements were performed on the entire tumour lesion including cases when tumours appeared as aggregates of single nodules (melanoma model in Supplementary Fig. 9e). All measurements are now presented as Supplementary Data.

PL-treated

Vehicle-treated



西安医学院实验用狗弃楼顶事件



USDA惩处抗体巨头SCBT 350万美元



北京奥森公园人为投放实验SD大鼠





基本定义——什么是实验动物福利与伦理？

➤ **实验动物福利：**是指人类保障实验动物健康和快乐的生存权利的理念及其所提供的相应的外部条件的总和。

“动物福利 (Animal Welfare) 是指动物福利指动物身心状况与其生存和死亡条件相关的状态。若动物福利状况符合下列条件即可视为良好：健康、舒适、安全、喂养良好、能够表现本能行为，且无疼痛、恐惧和应激等。良好的动物福利体现如下：疫病防范与治疗、合适的饲养场所、管理和饲养、人道的处置和屠宰或宰杀。“动物福利”一词指动物所处状态，而动物所受的待遇则以动物护理、动物饲养和人道对待等词来描述。”——世界动物卫生组织 (OIE) 《陆生动物卫生法典》2019 (第二十八版)

➤ **实验动物伦理：**

是指人类对待实验动物和开展动物实验所应遵循的社会道德标准和原则理念。

➤ **实验动物3R原则：**

Replacement 替代



ü **生命系统：**低等生物、模式生物

ü **非生命系统：**离体的细胞、器官、组织等

ü **电脑模拟：**数学和计算机模型、机器人

Reduction 减少



ü **提高动物质量：**减少不必要的重复

ü **改进统计学设计：**减少样本量

Refinement 优化



ü **改良仪器设备：**减少创伤，无创

ü **减少对动物的侵扰：**减少应激

ü **进一步控制疼痛：**药物干预

ü **改进保定动物技术**



基本定义——什么是实验动物福利与伦理？

➤ 五大自由

起源：1965年，英国政府为回应社会诉求，委任了Roger Brambell教授对农场动物的福利事宜进行研究。根据研究结果，于1967年成立“农场动物福利咨询委员会”（1979年改组为农场动物福利委员会）。该委员会提出动物都会有渴求“转身、弄干身体、起立、躺下和伸展四肢”的自由，其后更确立动物福利的“五大自由”。

不受饥渴	生活舒适	不受痛苦伤害和疾病威胁	无恐惧和悲伤感	表达天性
随时可以取得清洁的饮水和足够的食物，食物与水不能沾有粪尿，并且饮水放在动物想喝就可以喝得到的地方	动物要有舒适、隐蔽的休息区，以供睡眠、躲藏、及休息用。不允许24小时站在动物面前观察动物，不允许24小时与动物玩耍，否则动物会非常恐惧、紧张、疲劳、无法保证正常休息	动物生病时应由正规的兽医做检查、治疗，禁止为节约成本等原因拒绝给予生病动物相应检查、治疗。	保证动物拥有良好的条件和处置,使动物免受恐惧和精神上的痛苦，不得惊吓或虐待动物	提供足够的空间、适当的设施,使动物能自由表达正常的习性，确保动物有足够的空间及同伴



如何设立IACUC? ——IACUC的成员组成

➤ IACUC组成要求:

1) PHS政策: 若使用AWAR包含的动物种属和基金来自于内部或私人机构, 成员 ≥ 3 人 (科学家+兽医+公众人士)

机构获国家科学基金或国防部基金资助, 成员 ≥ 5 人 (兽医+科学家+非科研人员+公众人士)

2) GUIDE: 兽医+科学家+非科研人员+公众人士, 委员会成员数量由机构大小、研究性质与范围、测试和教育项目决定

3) GB/T35892-2018 实验动物福利伦理审查指南: ≥ 5 人 (实验动物专家+兽医+实验动物管理人员+科研人员+公众代表)

➤ 人数限定: 来自同一分支机构的委员不得超过3人 (AWAR、GUIDE、USDA、GB/T35892-2018)

举例: 药康IACUC成员规模: 1主席+1公众人士+1非科研人员+2兽医+6科学家 (扩大科学家的比例, 符合优势科研项目的专业需要)

IACUC的日常管理与工作职责



IACUC例会

- ✓ 定期组织例会
- ✓ 讨论机构的动物管理和使用计划，评审实验方案，IACUC其他一般事务等



AP审核

- ✓ 实验开展前预审查
- ✓ 所有实验方案需通过IACUC审核后方可开展，未通过的实验项目不予开展



半年审查&PAM审查

- ✓ IACUC机构审查方式
- ✓ 实验中，实验后审查



汇报及培训

- ✓ IACUC向IO汇报
- ✓ 动物福利事件汇报机制
- ✓ 定期组织IACUC相关培训



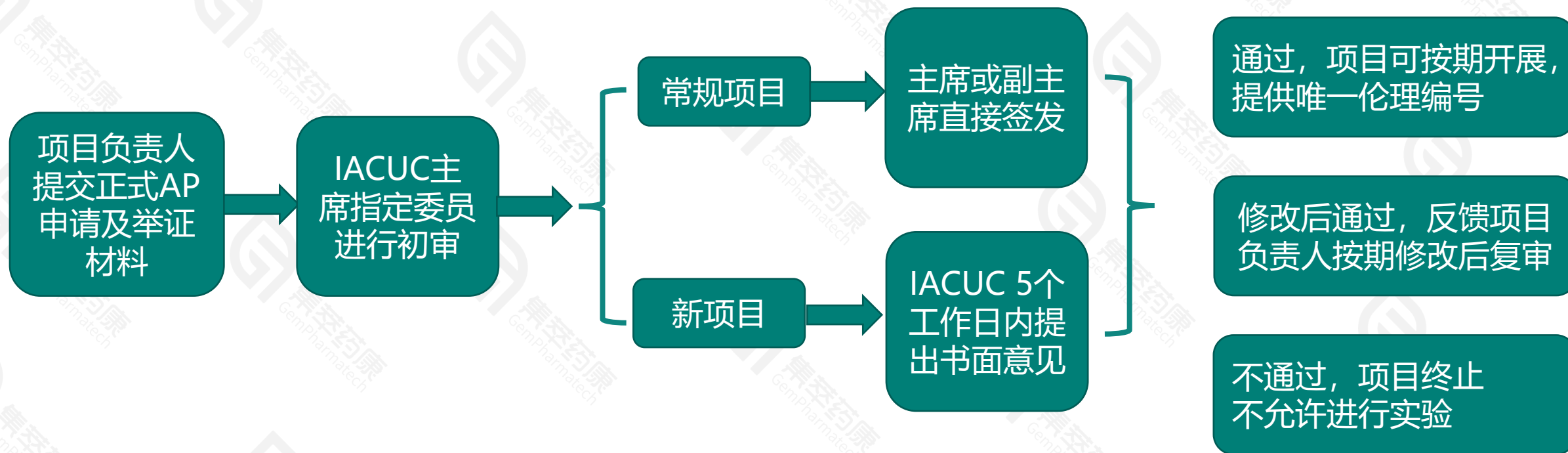
IACUC的日常管理——方案前审核 (AP审核)

➤ AP书写及审核必须包含的内容 (参考GUIDE及IACUC HANDBOOK要求)

- 动物操作
- 使用动物的理由
- 选择动物种属和建议动物使用数量的理由
- 在适当时考虑和采用动物实验替代方法
- 保证开展的研究是必须重复的
- 通过使用麻醉剂、镇静剂和镇痛剂或及时干预来尽量减少动物的痛苦和应激
- 无菌存活外科手术的规定
- 手术后和操作后护理的规定
- 多次重大存活外科手术的适当理由
- 动物适宜生存条件的规定, 包括特殊实验动物的独特要求
- 动物安乐死和处置的方法
- 人员安全工作环境的规定
- 与上述项目与执行方案中参与部门和分配职责相符的员工培训
- 保证或证明确认研究者承担相遵守法规和实施批准方案的全部责任



IACUC的日常管理——AP审核流程（参考GB35892-2018）



- IACUC成员不应审查自己的实验方案
- 参加审查委员不得少于半数
- IACUC应尽可能采取协商一致方法做出决议，如无法协商一致，应根据少数服从多数原则，10个工作日内做出决议，由主席或副主席签发后，3个工作日内送达。
- 具体审核时间周期可根据机构具体需求进行调整

举例：药康IACUC机构 48h内完成审核反馈，推进项目进程。



方案审核相关FAQ

➤ IACUC对缓解疼痛和痛苦的最低期望值是什么？

AWAR：除非满足某些特定条件（如经IACUC批准的科学研究理由阻止使用镇痛剂），否则IACUC必须保证当操作造成的疼痛或痛苦程度超过“轻微”水平时必须适当使用镇静剂、镇痛剂和麻醉剂。实验期间经历过急性或慢性疼痛且没有缓解的动物，必须在实验期内或结束时安乐死。

动物疼痛和痛苦定义及分类参考USDA Pain Level Category。

USDA category B	USDA category C	USDA category D	USDA category E
繁育、保种程序	至多轻微或瞬间的疼痛或窘迫，不需镇痛药物，或无痛苦，例：安乐死，正常情况下观察，Positive reward projects，常规操作，注射和采血（无需麻醉）	可以用麻醉剂、镇痛剂或安定适当缓解的痛苦，或可用其他方式释放的痛苦。	麻醉剂、镇痛剂、安定或其他方式无法缓解的疼痛、痛苦或潜在的痛苦。
	Examples	Examples	Examples
	1.教学或研究中，对动物保温或称重。 2.注射，无需麻醉采血或浅表植入导管。 3.动物纹身。 4.啮齿类打耳洞。 5.常规身体检查。 6.观察动物行为。 7.饲养研究，并不会导致临床健康问题。 8.AVMA批准的人道的安乐死。 9.常规农业畜牧业程序。 10.现场捕获。	1.腹腔镜技术或穿刺活检诊断程序。 2.非存活/存活性外科手术。 3.术后疼痛或痛苦。 5.小鼠眼睛采血，心脏采血。 6.任何造成明显疼痛、不安、窘迫的操作，如食欲或活动力下降，副作用，接触，打开皮肤病灶，脓肿，跛行，结膜炎，角膜水肿或畏光。 8.导管植入的暴露血管。 9.麻醉下驱血。 10.适当麻醉剂和术前术后镇痛下，诱发感染或抗体产生。	1.毒理学或微生物学试验，肿瘤研究或传染病研究，需要继续进行，直到有明显的临床症状或死亡。 2.皮肤或眼睛刺激性试验。 3.限食或限水超出普通手术前的准备程度。 4.对于有害刺激，如电击，若动物不能避免/逃脱，它将受到比瞬间疼痛更严重的伤害。 5.烧伤或创伤。 6.长期监禁/使用麻痹或固定药物的监禁。 7.暴露于异常或极端环境条件下。 8.类似精神病般的痛苦的行为和状态。 9.不遵循AVMA的安乐死。

方案审核相关FAQ

- IACUC能够批准的大鼠禁食或禁水的最长时间是多久？小鼠、犬、非灵长类等实验动物呢？
- AWA: 在经过IACUC审核并制定有效监测程序的动物实验中，允许短期停止供水和饲料。
- GUIDE: 基于研究目的而采取的限制措施应科学合理并制定监测生理或行为指标的程序，包括临时或永久将动物从实验中移除的标准。
- 确定达预期目标所需要的最小禁食周期是很重要的，通常选择16-24h为一个周期。动物的正常生理学特性也应予以考虑（大鼠夜间摄食，若饲料整夜撤掉，可能导致动物禁食48h）——IACUC HANDBOOK





方案审核相关FAQ

- 对同一动物执行导致动物疼痛的操作是否有限制？对同一动物执行多次重大存活性手术是否有限制？
- IACUC在审查动物可能受到多次痛苦过程的研究室应谨慎，不鼓励对一个动物执行多次大的存活性手术。
 - 若研究者的一项研究需动物受到多次疼痛或痛苦操作，应向IACUC说明疼痛的影响、严重程度和持续时间，对实验结果的潜在影响，监测动物适应能力或恢复的方法，以及痛苦为什么不能缓解的原因。

大存活性手术	穿透和暴露体腔，并会对动物的结构功能或生理功能造成重大损伤，或涉及到大范围的组织剥离或切割，如开腹术、开胸术、开颅术、关节改造、截肢等
小存活性手术	不暴露体腔，很少或不会引起结构损伤，如伤口缝合、外周血管套管、去势术、截角、各类脱垂组织的修复。动物不出现显著的术后疼痛信号，不太会由并发症，并能在相对短时间内恢复身体正常功能。
无菌术	1.动物准备，包括去除体毛和手术部位消毒 2.手术者准备，包括手和手臂的擦洗消毒、合适的手术服和无菌手套等 3.使用灭菌的设备器械、耗材和植入材料 4.使用有效技术，减少感染的可能
非存活性手术	必须在动物麻醉苏醒前进行安乐死 不要求对非存活手术使用无菌术，但是手术部位应修剪，手术者应戴手套，设备和周围环境应干净

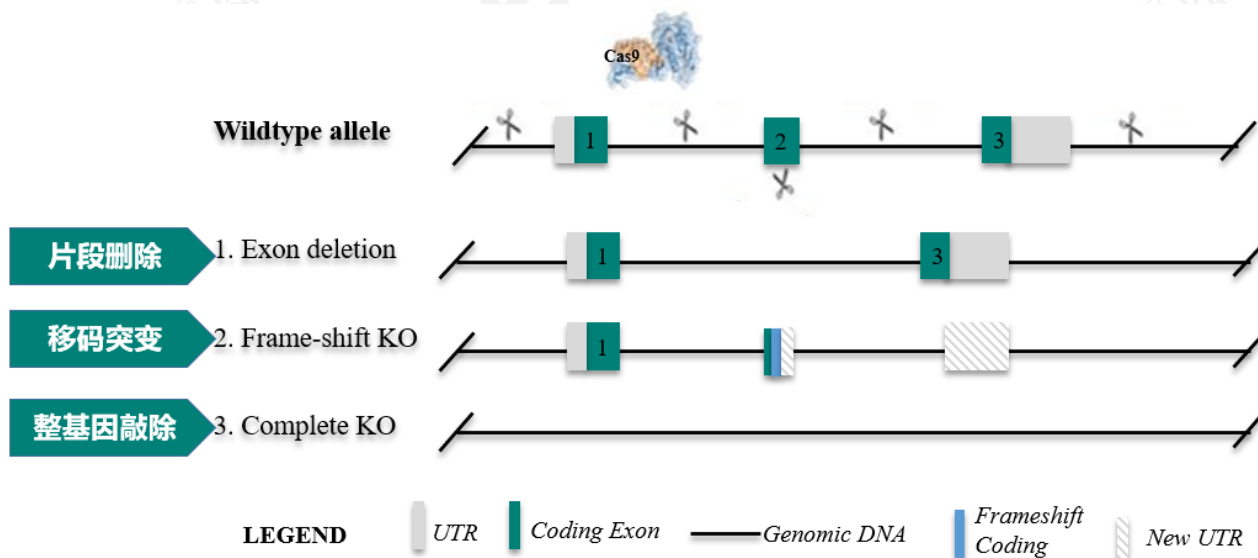


4月24日，世界实验动物日

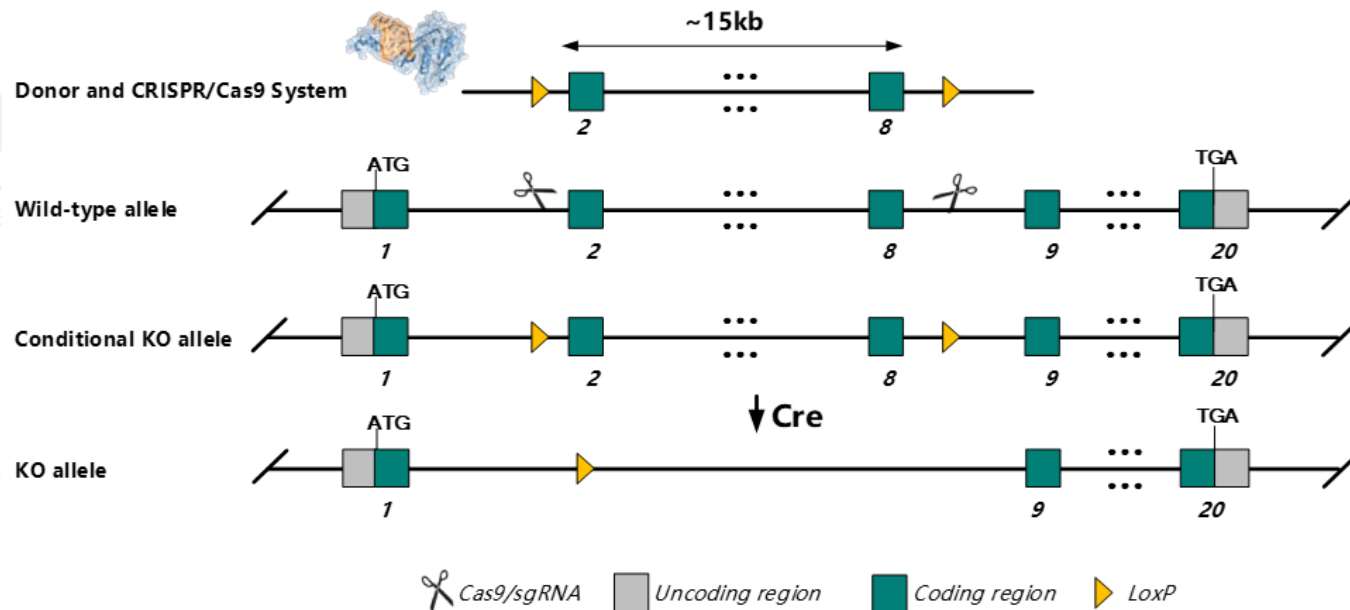


下期预告

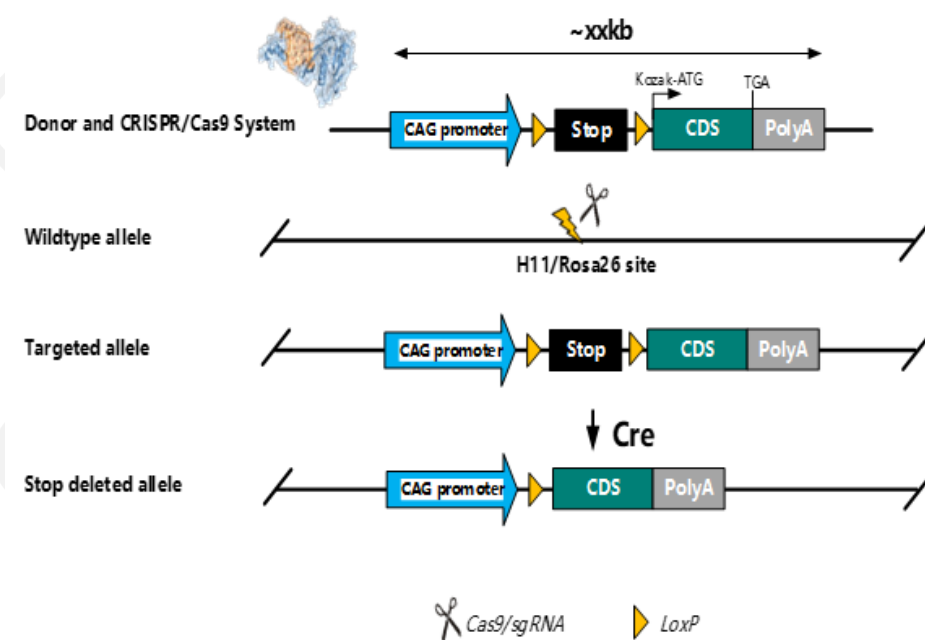
KO



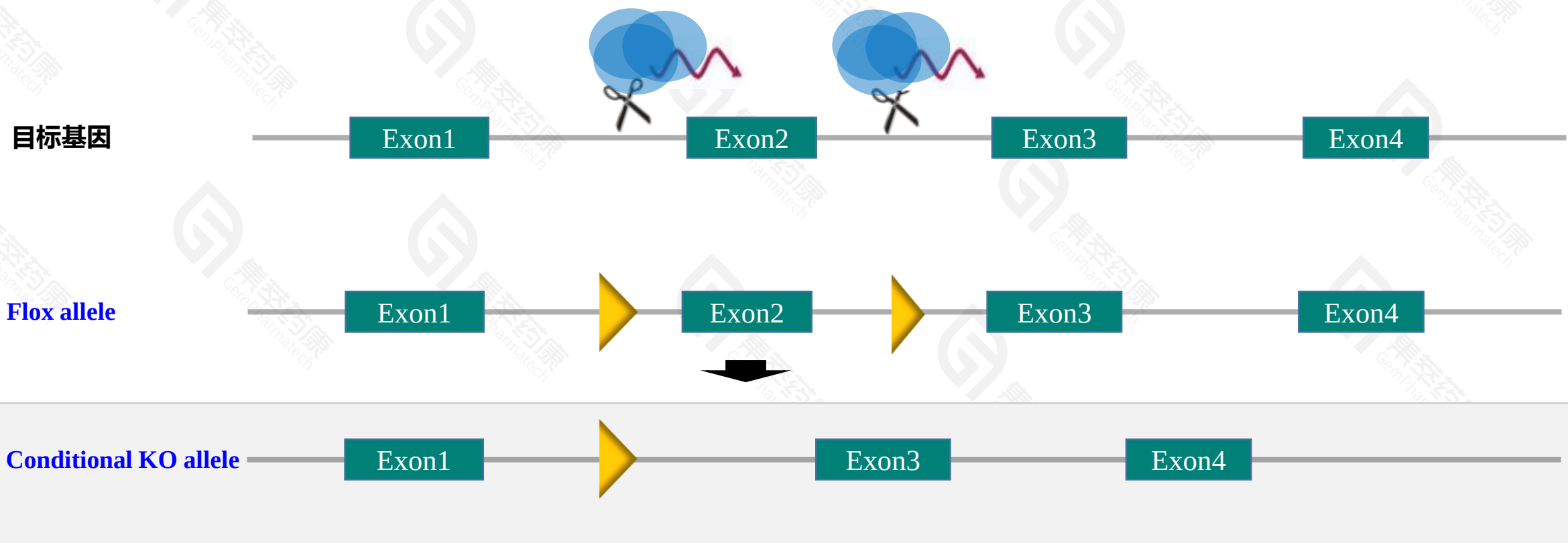
cKO



Cas9-ki (H11/Rosa26)

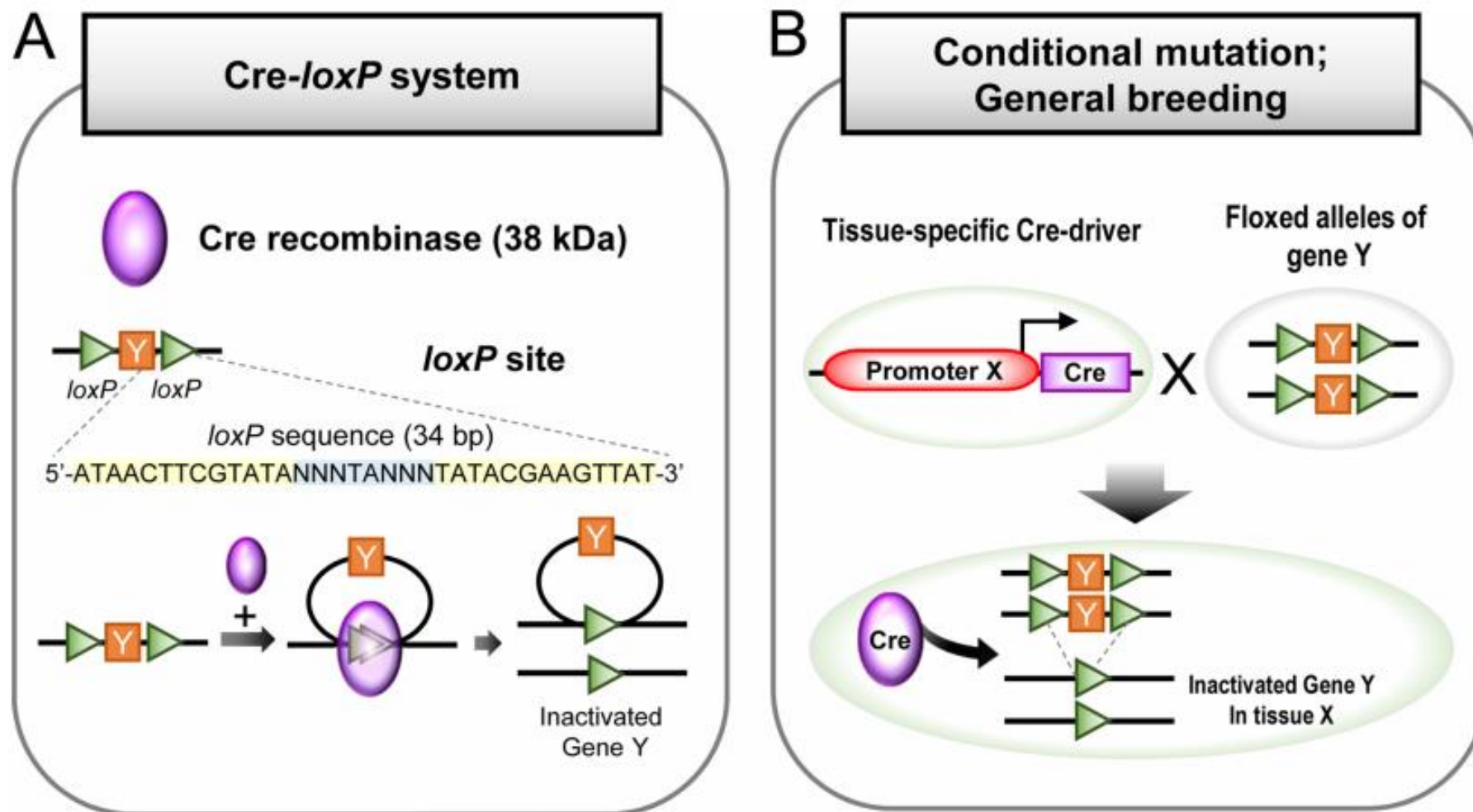


条件性基因敲除



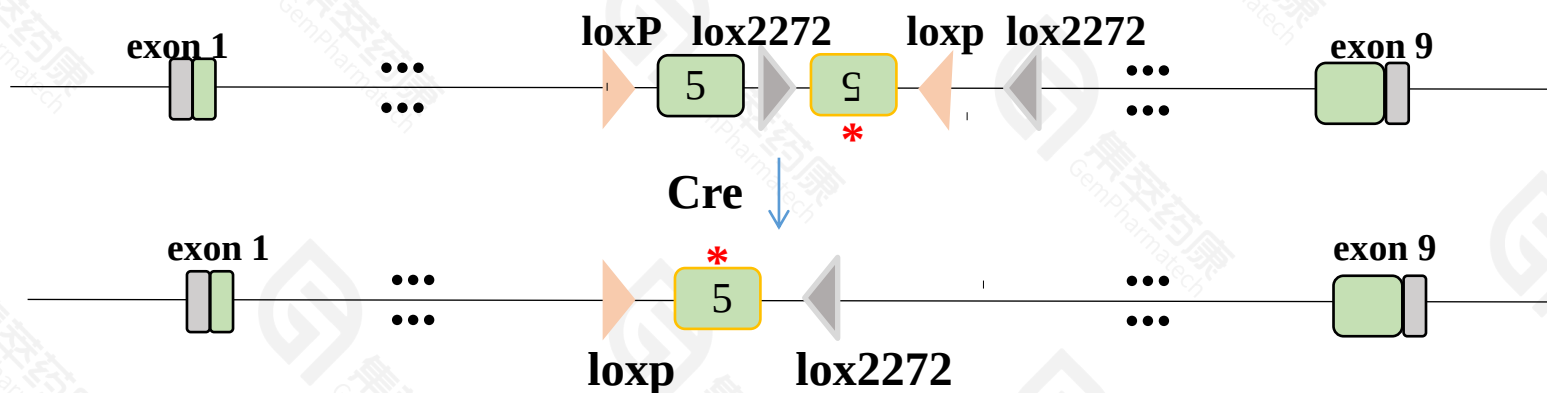
- ❑ 可在特定的细胞、组织及时期敲除靶标基因；
- ❑ 克服靶标基因敲除致死表型对研究的影响；

Cre-*loxP* 系统与条件性敲除：组织特异性



可诱导点突变模型

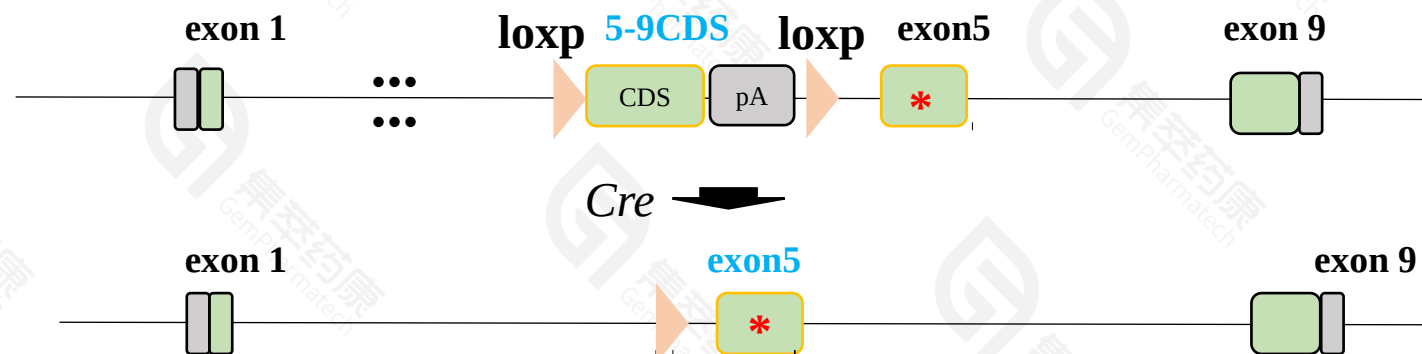
Dual-lox倒置法



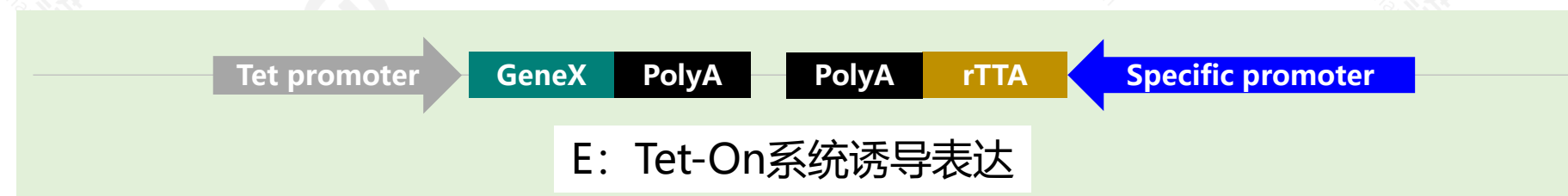
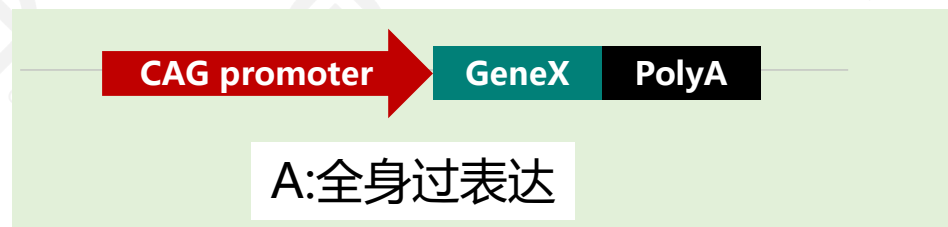
反向重复结构形成的高级结构，使载体构建、基因打靶、基因型鉴定难度大，Cre重组效率打折。

较Dual-lox倒置法，制作难度降低，但诱导后表达模式与内源基因可能存在差异，也存在泄漏表达的风险。

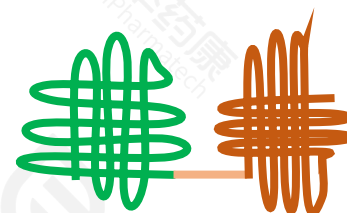
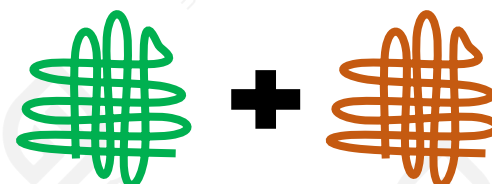
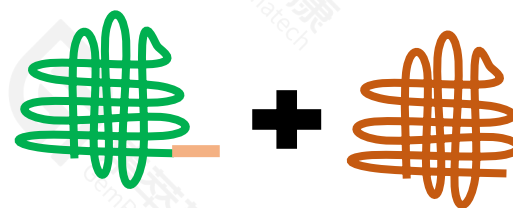
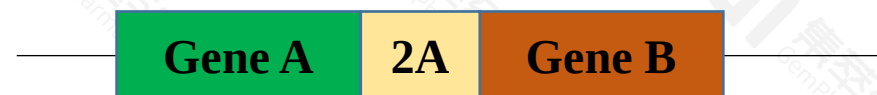
Minigene导入法



转基因模型方案



多基因表达的连接元件



前后两个蛋白一起转录、翻译，翻译后的产物被切分为两个蛋白分子，前面蛋白C端残留2A翻译的多肽。

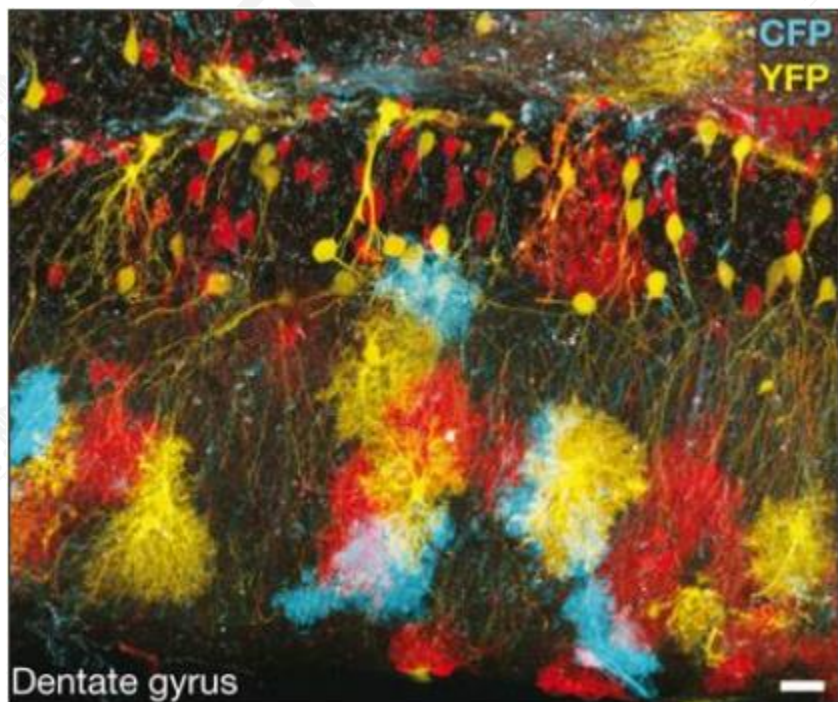
(非融合)

前后两个蛋白一起转录，独立翻译为两个蛋白产物，后面基因表达水平低于前者。

(非融合)

前后两个蛋白以融合形式存在，蛋白的亚定位。

荧光蛋白



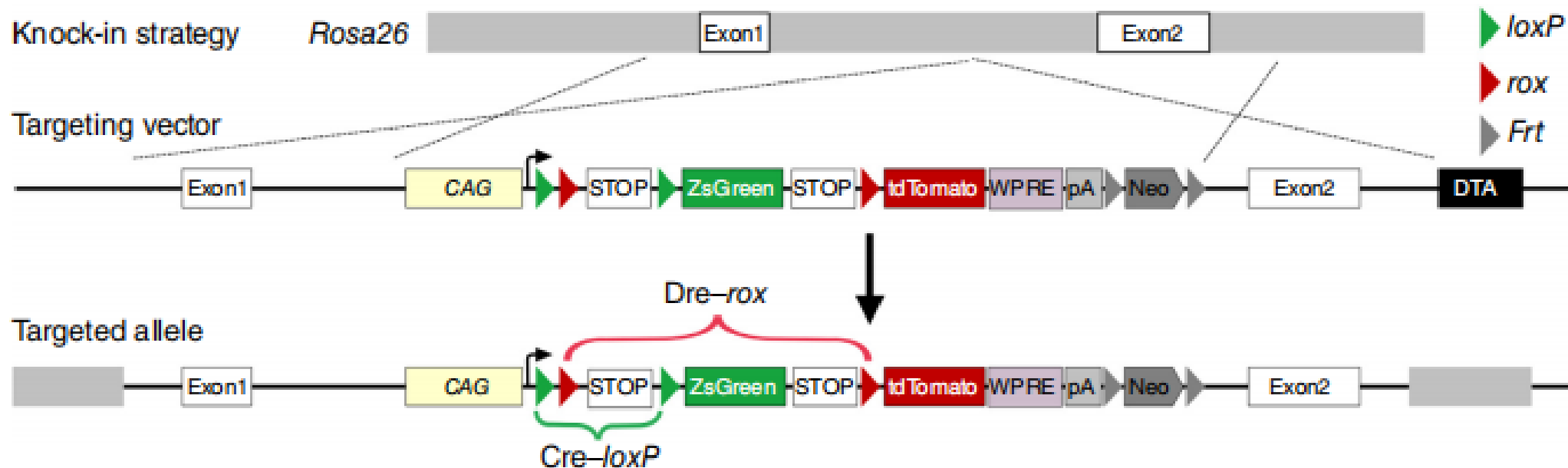
Livet 2007 Nature, DOI: 10.1038/nature06293

三荧光：红黄青RFP+YFP+CFP

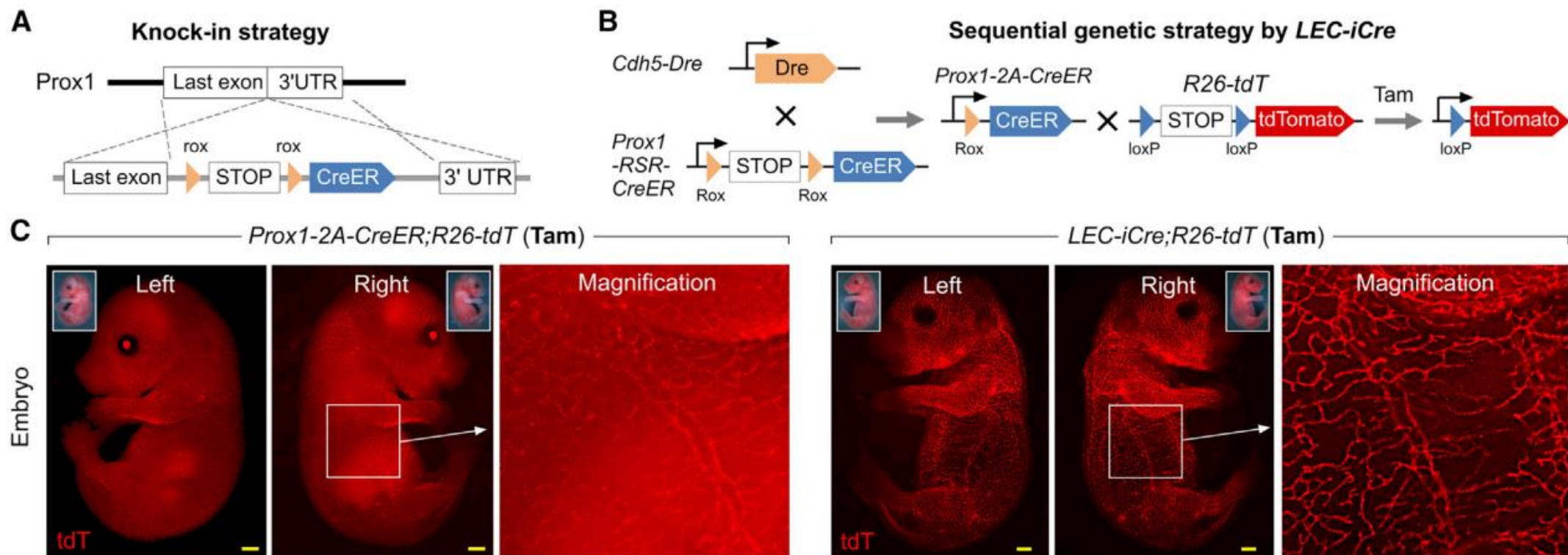
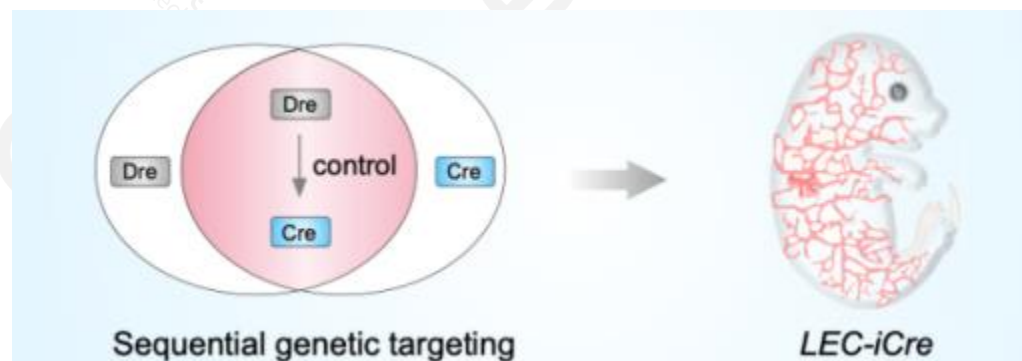
FP	Ex λ	Em λ	Brightness	pKa	Maturation(min)	Lifetime(ns)	Photostability $t_{1/2}$ (s)	Oligomerization
mKate2	588	633	25	5.4	20	2.5	84	Monomer
mCherry	587	610	15.84	4.5	15	1.4	68	Monomer
mStrawberry	574	596	26.1	4.5	50	ND	15	Monomer
mApple	568	592	36.75	6.5	30	2.9	4.8	Monomer
tdTomato	554	581	95.22	4.7	60	ND	70	Tandem dimer
mKO2	551	565	39.56	5.5	108	ND	5	Monomer
mOrange	548	562	48.99	6.5	150	ND	6.4	Monomer
YPet	517	530	80.08	5.63	9.7	ND	34	Weak dimer
Citrine	516	529	58.52	5.7	ND	3.6	49	Weak dimer
mVenus	515	527	66.56	5.5	17.6	2.7	ND	Monomer
Venus	515	528	52.55	6	17.6	3	15	Weak dimer
EYFP	513	527	44.89	6.9	9	3.1	60	Weak dimer
mNeonGreen	506	517	92.8	5.7	10	3.1	158	Monomer
ZsGreen	496	506	22.43	ND	ND	ND	ND	Tetramer
mEGFP	488	507	33.6	6	ND	ND	46	Monomer
EGFP	488	507	33.54	6	25	2.6	50.1	Weak dimer
CyPet	435	477	17.85	5.02	ND	ND	41	Weak dimer
mTurquoise	434	474	25.2	4.5	112.2	3.7	ND	Monomer
Cerulean	433	475	26.66	4.7	ND	3.3	36	Weak dimer
mTagBFP	402	457	32.76	2.7	13	2.6	34	monomer
mTagBFP2	399	454	32.38	2.7	12	2.6	53	monomer

需要关注的参数：发射与激发波长，寡聚度（蛋白的稳定性），亮度。

分子层面：基因表达、分布，蛋白的合成，活性等生理过程；
 有机体层面：组织、器官及细胞的精细结构，细胞分化命运，个体发育的过程。



细胞的间接标记-基于双重组酶诱导系统





谢谢

祝国自然申报顺利

