

## IACUC Approval

All procedure involving animals were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Jiangnan University (IACUC protocol number: No. 8/2014/JU).

## 动物福利与伦理审查表

填写日期: 2017 年 7 月 10 日

申请人姓名	齐策	申请人单位	食品营养与功能因子中心
导师姓名	孙进	导师联系方式	13585087054
课题名称	人肠道 IgA 包裹乳酸菌的分离鉴定及功能研究		
课题性质	纵向课题, 中国博士后基金, 5 万元		
实验人员	姓名	职称	实验动物上岗证号
	李亚	硕士	联系电话
	王盼盼	硕士	18801457542
	齐策	博士	17765995594
使用动物情况	品种品系	C57BL/6	动物来源
	等级	SPF 级	规格
	数量 (只)	10	♀ (只)
			♂ (只)
	饲养设施	IVC	笼位数
	计划进驻日期: 2014 年 8 月 15 日		计划结束日期: 2014 年 11 月 15 日
有毒有害器材、试剂使用情况	来源/型号	戊巴比妥钠 (江大后勤处提供)	
	来源/批号		
	危害性	安眠剂量的戊巴比妥类可致眩晕和困倦, 精细运动不协调。偶可致剥脱性皮炎等严重过敏反应。中等量即可轻度抑制呼吸中枢, 严重肺功能不全和颅脑损伤致呼吸抑制者禁用。其药酶诱导作用可加速其他药物的代谢, 影响药效。	
	使用数量	1 瓶 (5g)	
	计划使用日期: 2014 年 8 月 15 日		计划结束日期: 2014 年 11 月 15 日
<b>研究背景:</b> <p>大量研究显示一些细菌 DNA 含有 CpG 基序, 具有免疫刺激性或免疫抑制作用。但目前关于肠道菌群总 DNA 免疫调节活性的研究处于初期阶段。仅有的研究是 Hall 等在 2008 年开展的[1], 他们发现从正常 C57BL/6J 小鼠结肠和盲肠菌群提取的基因组 DNA 混合物具有免疫佐剂作用, 可以抑制调节性 T 细胞转化。另外一项关于混合细菌 DNA 的研究显示[2], 混合益生菌制剂 VSL3 的 DNA 具有抗炎活性。这两项研究说明, 肠道菌群是复杂生物体系, 菌群 DNA 中包含的 CpG 基序序列复杂多样, 而不同菌群的 DNA 分子又千差万别, 因此菌群构成与其 DNA 的免疫调节活性密切相关。</p> <p>不同肠道组织中的菌群 DNA 维持免疫平衡的方式也存在差别。在盲肠和结肠, 无菌环境下致密固有层与上皮细胞紧密结合, 保护其免受细菌和机械刺激的伤害, 而疏松层存在细菌生物膜, 可能释放 DNA, 具有结合上皮细胞顶端的潜能[1]。而小肠粘液层稀薄, 细菌 DNA 有机会迁移穿过粘液层, 进入隐窝。隐窝杯状细胞产生的抗菌肽可以抑制革兰氏阳性菌 (G+) 和阴性菌 (G-), 调节其在小肠中的分布, 并避免细菌和小肠上皮发生接触, 从而对小肠起到保护作用[3]。猜测细菌 DNA 进入隐窝有可能参与调节免疫活性。</p> <p>本研究旨在观察小鼠小肠和结肠细菌细胞外 DNA (eDNA) 的存在情况, 并建立 eDNA</p>			

的提取方法和构成情况分析方式。

**动物处理（详细每日对动物的处理方法）：**

1、预饲：动物饲养于 23 °C 和 50%湿度恒温/湿动物房, 12h/12h 昼夜交替，自由饮食，给予普通动物饲料，预饲 10 周。

**2、样品采集和测定指标**

将小鼠乙醚麻醉，脱颈处死。于超净台进行解剖，称取 0.2 g 回肠组织，纵向剖开，用载玻片轻轻刮取粘液，以提取粘液细菌细胞外 DNA（eDNA）。建立和优化末端酶切方法（T-RFLP）和 illumina 高通量测序方法分析其构成。

用 Carnoy's 试剂固定部分小肠和结肠，分别进行碘酸雪夫氏（PAS）染色液和 TOTO-1 染色。前者可现实粘液层位置，后者作为一种荧光染料分子，它本身带有的阳离子可与粘液层细菌 DNA 稳定结合，在 514 nm 激发光下发出绿色荧光，有助于观察粘液层存在的 eDNA。

**动物麻醉和处死方法：**

采用浓度为 1%的戊巴比妥钠溶液对小鼠进行腹腔注射，使其麻醉，辅以颈椎脱臼法使其死亡。小鼠器官样品收集：用剪刀在腹正中线稍左侧剪开一个小口，向前至胸骨间突处，再沿肋骨后缘向两侧做横切口，暴露腹腔，取出相应的器官。最后，小鼠尸体暂存于动物中心冰柜内集满后交予专业的固体废物处理公司统一处理。



**其他要说明的事项（过量使用动物的理由，特殊饲料配方提供等）：**

1. 实验动物数量大是为了让实验结果更具有说服力以及使其更具有普遍的意义。
2. 未使用特殊饲料配方

**参考文献：**

- [1] Hall J A, Bouladoux N, Sun C M, et al. Commensal DNA limits regulatory T cell conversion and is a natural adjuvant of intestinal immune responses[J]. Immunity, 2008, 29(4): 637-649.
- [2] Jijon H, Backer J, Diaz H, et al. DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function[J]. Gastroenterology, 2004, 126(5): 1358-1373.
- [3] Loonen L, Stolte E, Jaklofsky M, et al. REG3γ-deficient mice have altered mucus distribution and increased mucosal inflammatory responses to the microbiota and enteric pathogens in the ileum[J]. Mucosal Immunology, 2014, 7(4): 939-47.

附上 3 篇与本实验方案相关的典型参考文献，并标注在对应引用处，且在参考文献全文中用亮色或者划圈等形式标注出具体引用内容。

<div>审查项目</div>	<p>1. 该项目是否必须用实验动物进行实验，即能否用计算机模拟、细胞培养等非生命方法替代动物或用低等动物替代高等动物进行实验。如不能，主要原因是什么？</p> <p>答：该项目必须用实验动物进行实验，本实验研究的是小鼠肠道粘液层细菌 DNA 的存在情况，目前没有任何非生命方法可以代替。</p> <p>2. 表中所填申请人资格和所用动物的品种品系、质量等级、规格是否合适，能否通过改良设计方案或用高质量的动物来减少所用动物的数量。如不能，主要难点是什么？</p> <p>答：实验所用的小鼠品系参考了相关文献而定，是同类研究中最常用的实验动物模型，相比其他动物（大鼠），具有易操作，成本低，实验重复性好的特点。并且考虑到实验需要和动物房实验条件，该小鼠等级是合适的。此外，申请人已参加相关培训，并取得动物实验操作资格。最后所选取的小鼠是最适合我们的实验方案的，可以节省大量的资源和生命。</p> <p>3. 采用了哪些改进的实验方法、改良的处死动物方法以及调整了哪些实验观测指标，来优化实验方案、善待动物？</p> <p>答：在动物取血和解剖之前，采用浓度为 1% 的戊巴比妥钠溶液对小鼠进行腹腔注射对小鼠进行麻醉，以此减轻小鼠的痛苦。</p> <p>4. 拟采用何种措施保证动物福利？</p> <p>答：严格按照实验中心的有关规定操作，保证小鼠的饲养环境和实验环境，尽量避免对小鼠造成不必要的刺激。处理动物有适当的时间间隔，并减少必要的试验处理，尽量不增加动物的痛苦。</p>
<div>申请人所在单位负责人（导师）</div> <div>同意</div> <div>签字</div> <div>  </div> <div>2014 年 7 月 15 日</div>	
<div>实验动物管理与动物福利伦理委员会意见 <u>同意</u></div> <div>批准时间 <u>2014.8.5</u></div> <div>  </div> <div>动物福利伦理委员会主任签字或签章</div>	

## 填表要求

- 1、Animal Protocol 号由办公室工作人员填写。
- 2、申请人为项目的负责人或者主要实验人员。申请人单位写单位及实验室名称。
- 3、动物等级分为 SPF 级、清洁级、普通级。
- 4、动物规格以周龄或质量计。
- 5、具体的引用的参考文献请在表格中标注出，并在对应文献处突出。
- 6、3 篇参考文献与表格一起打包发送到 laboratoryanimal@163.com，供审查。
- 7、每月 15 日和 30 日对前期提交且通过初审的方案进行二审审查，二审通过后由终审审查。
- 8、审查通过后正反打印审查表，签字后后交予实验动物中心。