

1.申请人与项目基本信息

申请类别	<input type="checkbox"/> 初次申请 <input checked="" type="checkbox"/> 更新申请 (原申请编号:13527)				
申请目的	<input checked="" type="checkbox"/> 基金申报 <input type="checkbox"/> 文章发表 <input type="checkbox"/> 成果奖励申报 <input type="checkbox"/> 实验方案				
项目名称	5-羟甲基胞嘧啶修饰介导的DNA去甲基化对星形胶质细胞功能的调控作用和分子机制研究				
任务来源	国家自然科学基金委员				
资助类别	<input checked="" type="checkbox"/> 纵向 <input type="checkbox"/> 横向				
资助等级	<input checked="" type="checkbox"/> 国家级 <input type="checkbox"/> 省部级 <input type="checkbox"/> 厅局级 <input type="checkbox"/> 其他				
实验种类	<input type="checkbox"/> 医学研究 <input type="checkbox"/> 药物疫苗类 <input checked="" type="checkbox"/> 生物类 <input type="checkbox"/> 农业研究 <input type="checkbox"/> 健康食品 <input type="checkbox"/> 其他				
申请部门	浙江大学医学院				
项目负责人	李学坤	电话	13588851583	电子邮箱	
联系人	李学坤	电话	13588851583	电子邮箱	xuekun_li@zju.edu.cn
合作单位		合作者			

2.动物实验操作人员信息

实验者姓名	动物实验相关资质（资格证编号，相关经验、培训和能力描述）	研究课题中的职责
曹宇航	2155；有动物操作经验并完成动物中心的相关培训。	动物饲养和行为学实验
程雪军	30162；有动物操作经验并完成动物中心的相关培训。	动物饲养和行为学实验
高慧	30110；有动物操作经验并完成动物中心的相关培训。	动物饲养和新生小鼠的细胞分离
李倩	4660；有动物操作经验并完成动物中心的相关培训。	动物饲养和新生小鼠的细胞分离

董晓雪	4353; 有动物操作经验并完成动物中心的相关培训。	动物饲养和行为学实验
寿逸凯	30293; 有动物操作经验并完成动物中心的相关培训。	动物饲养和新生小鼠的细胞分离
黄晓莉	30320; 有动物操作经验并完成动物中心的相关培训。	动物饲养和新生小鼠的细胞分离
郭红枫	30319; 有动物操作经验并完成动物中心的相关培训。	动物饲养和行为学实验

3.研究目的和必要性

3.1.以一般非生物医学背景人员为对象，描述研究目的，以及对人类或动物的健康与解决的科学问题。一般只需要以非科学术语描述做什么以及做这个实验的必要性

本研究采用小鼠为研究对象，研究小鼠大脑特定细胞中DNA修饰的作用，因为小鼠的神经系统与人有比较高的相似度，并且可以适度繁殖，价格便宜。通过本研究，可以为认识大脑中相关DNA修饰提供科学数据。

4.拟使用实验动物信息

4.1.动物信息

种类	品种/品系	等级	雌性数量	雄性数量	总数量	年龄(日/周)	体重(g)
	C57背景的野生型小鼠和转基因小鼠	SPF	50	250	300	新生鼠（出生后一天）；成年鼠（6-8w）	新生鼠（4-5g）；成年鼠（19-24g）

4.2.动物来源

- ☒ 学校动物中心平台统一采购:
- ☐ 国内其他饲养繁殖单位（单位名称与生产许可证编号）
- ☐ 国外引进（单位名称与相应资格证明）

4.3.动物饲养与实验设施

- ☒ 本校实验动物中心
- ☐ 其它设施（单位名称与实验动物使用许可证编号）

4.4.请以实验动物“3Rs”中“替代”为考虑重点，说明进行动物实验的必要性，包括非动物模型不合适性及选择该动物品种的理由

4.4.1.使用动物的理由

- ☒ 一些生物学过程和机理不能在体外研究
- ☐ 已进行体外实验，现必须进行体内实验
- ☐ 体外实验需要动物组织
- ☐ 其它，请具体说明

4.4.2.使用某品种动物的理由

- ☐ 该品种的生理学、解剖学、身体大小等特点最适于本研究
- ☐ 该品种是本实验公认的理想动物模型
- ☒ 利用该品种已获得大量的相关数据，本研究进一步扩展该品种相关数据
- ☐ 从其它品种动物扩展相关数据到该品种
- ☐ 其它,请具体说明

4.5.请以实验动物3Rs中“减少”为考虑重点，说明使用动物数量的充分理由

所需新生鼠用于多批次的细胞分离和培养，对照组（野生型小鼠）和实验组（模型小鼠）。每次分离各需要5-8只，一次完整实验大概需要15-25只。需要重复6次，共需要90-150只左右，按照150只计算。成年对照组（野生型小鼠）和实验组（模型小鼠）用于行为学（每种基因型需要10只左右，需要进行水迷宫、旷场和恐惧实验）。水迷宫和旷场实验可以用同一批次小鼠，总共需要30只左右。由于刺激性较大，恐惧实验需要单独一批小鼠，也分为对照组和模型小鼠组，总共需要30只左右。小鼠组织分离（用于分子实验，需要重复多次）等实验。对照组（野生型小鼠）和实验组（模型小鼠）每组需要15只左右，各种基因型总共需要30只左右。小鼠繁殖每种基因型需要多笼，预计需要60只左右小鼠。

5.拟开展动物实验详细信息

5.1.拟动物实验时间

2019-02-01 -- 2020-01-12

5.2.描述所有的动物实验方案过程（如有手术，请同时描述手术的操作过程）

分析细胞用的新生鼠用冰低温麻醉，用剪刀快速断头。成年动物进行灌流时，用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后，在动物失去四肢反射后，先后用PBS和4%多聚甲醛进行灌流。

5.3.动物保定和/或麻醉方案

- ☐ 否
- ☒ 是

（1）如动物需要保定/麻醉，请说明动物保定/麻醉的理由和方法（包括设备和药物）

手持保定或戊巴比妥钠麻醉。手持保定适用于动物的颈椎脱臼处死，急性分离脑组织。戊巴比妥钠麻醉适用于小鼠灌流，进行大脑的冰冻切片和免疫染色。

(2) 请描述为使动物适应保定须采取的预措施

按动物操作规范进行，对动物轻柔操作。

(3) 动物保定/麻醉的持续时间及在保定/麻醉期间是否有专人监护

是，具体的实验操作人员。

(4) 在动物保定/麻醉过程中，用何种方式方法来减少动物痛苦和照护动物以保证动物福利？

轻柔操作

5.4.本实验中动物实验所需的特殊条件（包括任何非标准条件等）

- ☒ 无需特殊条件
- ☐ 群居动物单笼饲养（单独饲养）
- ☐ 非标准笼具
- ☐ 非标准饲养密度
- ☐ 非标准温度和/或湿度
- ☐ 非标准光照循环
- ☐ 非标准氨浓度
- ☐ 非标准噪音
- ☐ 限食或禁食
- ☐ 限水或禁水
- ☐ 特殊饲料成分
- ☐ 特殊饮水成分（如药饮等）
- ☐ 其它,请具体说明

请具体说明所选特殊条件的内容、持续时间和科学性理由

5.5.动物实验涉及的药物/物质

5.5.1.给予动物的药物/物质种类

- ☒ 治疗性药物
- ☐ 测试性药物

☐ 组织细胞

☒ 生物性物质

☐ 有毒性物质

☐ 传染性物质

☐ 放射性物质

☐ 致癌物质

☐ 人胚胎干细胞（hESC）

☐ 重组遗传物质（如质粒）

☐ 人源性物质

☐ 其它,请具体说明

如选择有毒性、传染性、放射性物质时，应得到有关部门的批准。请说明对实验人员和动物饲养人员的具体防护措施，以及已污染的动物笼具和实验设备处理方法。

如给药方案可诱导肿瘤的发生，请说明肿瘤诱导物的性质（即肿瘤组织、细胞、病毒、致癌物、基因改造物质等），肿瘤预期生长点和转移靶点，肿瘤生长预期所需时间，判断肿瘤生长的方法等。

如选择人源性物质或人胚胎干细胞时， 请提供相关人类伦理证明。

5.5.2.说明所选药物/物质的施加方案

物质名称	给药剂量与频率	给药途径	给药部位	备注
BrdU	每天1次,连续5天	腹腔注射	腹腔	

5.6.标本采集方案

拟采集组织或体液	采集方法	数量/体积（单位）	采集频率	持续时间/最大采集量（单位）
大脑	动物颈椎脱臼或戊巴比妥钠麻醉	1个完整大脑	一次性	每只动物的操作大约需要5分钟

5.7.动物标志

☐ 笼卡

☐ 耳标

☐ 染色

☒ 剪趾

- ☐ 剪耳
- ☐ 戴项圈
- ☐ 纹身
- ☐ 缠绷带
- ☐ 二维码/条形码
- ☐ 其他

6.动物疼痛、痛苦的评估和管理

6.1.实验方案中可能对动物产生的不良反应和伤害

一过性疼痛

6.2.疼痛或应激反应的级别评价

- ☒ USDA C类：仅有一过性或轻微的疼痛或应激反应，且不使用减缓疼痛的药物：
- ☐ USDA D类：可使用麻醉剂、镇痛剂和/或镇静剂或其他方法适当地减轻疼痛或应激反应
- ☐ USDA E类：麻醉剂/镇痛剂/镇静剂或其他方法均无法缓解动物的疼痛或应激反应，或因实验方案所需不能使用麻醉剂/镇痛剂/镇静剂或其他缓解疼痛的方法

6.3.疼痛或术后管理（即针对动物的伤害需要采取防控措施）

6.3.1.当使用麻醉、止疼和消炎、补液措施时，请具体给出所用药物的信息

物质名称	剂量和频率	给药途径	持续时间	作用
戊巴比妥钠	1次性	腹腔	注射药物需要10秒钟	

6.3.2.请说明疼痛管理计划中对动物的其他特殊护理或术后护理(如术部消毒、特殊饮食计划、保温或降温、机械通风等措施)

无

7.人道主义终结动物生命

7.1.人道终点的指标（即动物在实验过程中可能出现如下何种征状，造成动物的健康与福利水平的下降超出可接受范围，必须及时人道地结束动物生命，减少动物痛苦）

- ☒ 体重下降：快速失去原体重的 15-20%、或成长期动物持续无增重、未监测体重但动物呈现恶病质及持续性肌肉消耗时
- ☐ 丧失食欲：小型啮齿类动物完全丧失食欲达24小时或食欲不佳（低于正常量之50%）达3天时。大动物完全丧失食欲达5天或食欲不佳（低于正常量之50%）达7天时

- ☒ 虚弱：无法自行摄食及饮水，长达24小时无法站立或极度勉强才可站立。需先排除是否为麻醉后动物苏醒期，再评估是否因疾病或实验等因素导致动物虚弱
- ☐ 身体器官的感染：呈现物理性指标及异常的血检值，对药物治疗无良好反应且持续演变为全身性疾病时
- ☐ 肿瘤：生长超过动物原体重的10%，平均肿瘤直径在小鼠超过20mm、在大鼠超过40mm，或者肿瘤转移或快速增长至溃烂，造成感染或坏死时
- ☐ 垂死/濒死：动物在没有麻醉或镇静的状态下，表现精神抑郁伴随体温过低（低于37℃）时
- ☐ 器官系统衰竭：出现严重的器官系统功能障碍的临床症状且治疗无效，或经动物中心兽医判断预后不佳时
- ☐ 其它，请具体说明

7.2.动物安乐死处理

- ☐ 二氧化碳窒息
- ☐ 吸入过量麻醉剂致死
- ☐ 注射过量麻醉剂致死
- ☐ 动物深度麻醉后放血致死
- ☐ 动物深度麻醉后静脉注射KCl
- ☐ 动物深度麻醉后断头
- ☒ 动物深度麻醉后颈椎脱臼
- ☐ 动物清醒时直接断头
- ☐ 动物清醒时直接颈椎脱臼
- ☐ 其它，请具体说明

如使用吸入或注射麻醉剂进行安乐死，请说明所用麻醉剂名称、剂量和给药途径

如选择在动物清醒时直接断头或颈椎脱臼，请说明理由和操作者的资质情况

7.3.存活动物的最终处理

- ☒ 对动物实施安乐死
- ☐ 返回生产/育种单位
- ☐ 作其他研究用,请具体说明
- ☐ 动物饲养在动物中心，直至自然死亡
- ☐ 其他，请具体说明

7.4.动物尸体、组织或体液等生物材料的最终处理

- ☐ 制作标本
- ☒ 袋装后冷冻，由学校实验动物中心交给有资质的公司集体回收，作无公害化处理
- ☐ 其他，请具体说明

8.项目负责人承诺书

<p>1. 我承诺该申请表中所填内容真实、详尽和易懂。</p> <p>2. 我同意遵守中华人民共和国国家科学技术委员会制定的《实验动物管理条例》、中华人民共和国科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》、浙江省人民政府发布的《浙江省实验动物管理办法》，并同意接受浙江大学实验动物伦理委员会和实验动物管理者的监督与检查。</p> <p>3. 我同意接受浙江大学实验动物伦理委员会和实验动物管理者的监督与检查。</p> <p>4. 我承诺包括我自己在内的该申请表中提及的与实验动物有接触的人员，已经参加了浙江大学实验动物中心要求的相关培训，掌握了申请表中涉及的动物实验方法，并且深知使用这些活体动物及动物组织所存在的风险。</p> <p>5. 我承诺如果在动物实验设计中使用有传染性、毒性或放射性物质，我已充分获得使用该物质所需的资格许可，并完全清楚使用此类物质的生物安全风险和必须的防护措施，以及已污染的器具和实验设备处理方法，实验动物伦理委员会将不会对我使用此类物质所造成的潜在生物安全风险负责。</p>
是