

АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК СССР

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ

ПРАВИЛА РАЗВЕДЕНИЯ ИНБРЕДНЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

(методическое указание)

Москва — 1979

Методическое указание разработано З. К. Бландовой, А. М. Малащенко, В. П. Крышкиной, Х. Х. Семеновым, Е. Ф. Шмидт.

Рекомендовано к изданию Ученым советом Научно-исследовательской Лаборатории экспериментально-биологических моделей АМН СССР.

«УТВЕРЖДАЮ»
Руководитель НИЛ
экспериментально-биологических
моделей АМН СССР
(В. ДУШКИН)
5 октября 1979 г.

Инбредные (линейные) животные используются в настоящее время во всех областях медико-биологических исследований, их производство постоянно увеличивается. Главным достоинством линейных животных является генетическая однородность, которая обеспечивает воспроизводимость результатов выполняемых на них экспериментов. Гомозиготность инбредных животных позволяет успешно трансплантировать любые ткани в пределах данной линии. Большинство линий обладает ценными характеристиками. Инбредные линии — продукт тщательной генетико-селекционной работы, направленной на сохранение уникальных свойств линии. Разведение линейных животных должно производиться строго по правилам.

Инбредной линией называют совокупность близко-родственных животных, размножаемых спариванием сестер и братьев (инбридингом) не менее 20-ти поколений. Однако, достигнутая таким путем гомозиготность, может нарушаться вследствие естественного мутационного процесса, поэтому инбридинг в племенных ядрах линий необходимо поддерживать постоянно. Работа по разведению линейных животных в питомниках состоит из двух этапов:

1. Ведение линии, работа с племенным ядром.
2. Расширенное воспроизводство линейных животных для использования в экспериментах.

Вся генетико-селекционная работа выполняется только с животными племенного ядра линии. Правила работы с племенным ядром едины для всех видов лабораторных животных.

I. Ведение линии, работа с племенным ядром

Племенное ядро линии представляет собой группу животных, состоящую из размножающихся пар родных братьев и сестер. При разведении животных племенного ядра следует придерживаться следующих правил:

1. К работе с племенными ядрами инбредных линий допускаются лица, имеющие биологическое или зоотехническое образование и прошедшие стажировку на рабочем месте в НИЛЭБМ АМН СССР.

2. Для закладки племенного ядра линии следует получить животных одного—двух пометов (3—5 пар) из надежного источника, сотрудники которого обладают опытом длительного разведения инбредных линий: НИЛЭБМ АМН СССР или зарубежного Центра по производству инбредных (линейных) животных. Передача племенных животных из источников сопровождается, помимо ветеринарного свидетельства, соответствующими документами. В документах должны быть указаны следующие сведения:

- а) название линии, поколение;
- б) количество самок и самцов;
- в) дата рождения данного помета;
- г) номер родителей этого помета;
- д) номер данного помета по племенному журналу поставляющей организации (последний иногда не указывают).

3. Размеры племенного ядра (количество одновременно размножающихся пар) в значительной степени зависят от спроса на животных данной линии:

- а) для сохранения линии в коллекции достаточно иметь 8—12 пар;
- б) в питомниках по производству животных инбредных линий на эксперимент число племенных пар может колебаться от 20 до 40, в зависимости от потребностей. Одновременно в племенном ядре могут размножаться животные трех поколений, причем максимально в одном поколении допускается размножение не более 20-ти пар.

4. Обязательным условием ведения инбредной линии является документация племенной работы. Эта работа отражается в следующих документах:

- а) племенном журнале (форма № 1);
- б) этикетках на каждую пару (форма № 2);
- в) родословной карте (форма № 4);
- г) журнале выдачи животных на племя (в племенном хозяйстве или коллекционном фонде);
- д) журнале регистрации поступления животных на племя.

а) **Племенной журнал** (форма № 1) может быть общим для всех инбредных линий в тех случаях, когда племенные ядра состоят из 8—12-ти пар и животные разных линий содержатся в помещениях, не изолированных друг от друга. Если же размер племенного ядра превышает 20 пар, целесообразно иметь отдельный журнал для каждой линии (первые записи в журнале обычно делают в момент формирования пар из однопометных самок и самцов племенных животных, поступивших из надежного источника). Запись производится в хронологическом порядке, причем каждому помету присваивается порядковый номер, начиная с № 1. В журнал следует переписать все данные из сопроводительного документа: коли-

чество самок и самцов, дата рождения помета, мать, название линии, поколение-F (инбредный возраст), номер родителей.

б) **Этикетка на половозрелых животных племенного ядра:** (форма № 2) заполняется при рассадке помета по парам. До рассадки самки и самцы одного помета содержатся вместе. Рассадку помета по парам у мышей производят в возрасте 1,5—2 месяца, у крыс — 2,5—3 м-ца. Число пар формируется в зависимости от количества самок и самцов в данном помете. Каждая пара животных снабжается отдельной этикеткой, закрепленной на клетке. Данные, записанные в племенном журнале дублируются на этикетке, кроме того, к номеру помета на этикетке через косую черту добавляется порядковый номер пары (который выбирается произвольно). Так, например, если в племенном журнале за № 1 записан помет из 3-х самок и 3-х самцов, то могут быть сформированы 3-и пары за номерами: 1/1, 1/2, 1/3. На этикетке отмечается дата скрещивания или дата рассадки по парам. На этикетке подробно фиксируется весь репродуктивный период племенной пары, дата рождения первого и последующих пометов, число животных при рождении, количество животных при отсадке с указанием числа самок и самцов. Если приплод предназначается для воспроизводства или расширения племенного ядра, то на этикетке записывают его номер по племенному журналу. При разведении раковых инбредных линий на этикетке следует отмечать время обнаружения опухоли. Необходимо указывать точную дату выбраковки самца или самки (или же пары животных), так как эти данные нужны для подсчета коэффициента плодовитости.

в) **Этикетка для племенного молодняка** (форма № 3) заполняется при его отсадке от родителей (возраст молодняка при отсадке 21—30 дней). Этикетка для молодняка обычно меньше по размеру, чем для племенных пар. На ней указывают название линии, поколение — F, количество самок и самцов, дата их рождения и номер родителей. Эти же данные заносятся в племенной журнал под очередным порядковым номером, который присваивается отсаженному помету. Номер записывается на заполненную этикетку племенного молодняка, она прикрепляется к клетке с животными. После достижения молодняком половой зрелости, при рассадке его по парам, данная этикетка заменяется этикетками для каждой племенной пары (форма № 2).

г) **Родословная карта** (форма № 4) представляет собой графическое изображение родства животных разных поколений. На карте в правом верхнем углу записывается название линии, откуда и когда поступила и на каком поколении. С левой стороны по вертикали сверху вниз отмечается поколение инбридинга (F). Полученные пары животных заносятся на родословную под номером из племенного журнала, с соответствующим обозначением F. Племенная пара обозначается на родословной прямоугольником, в

прямоугольник вписывают номер помета по журналу; кроме того каждый прямоугольник (каждая пара) помечается дополнительной цифрой через косую черту. Таким образом число прямоугольников с одинаковым номером (до косой черты) означает число племенных пар, сформированных из данного помета. В дальнейшем при рассадке животных на размножение (одновременно с заполнением этикеток размножающихся пар) их номер заносят на родословную карту и стрелками указывают от какой родительской пары они оставлены. В начальном этапе при закладке племенного ядра от первых полученных пар можно оставлять все пометы на племя. При последующем разведении одна из пар (как правило, лучшая по плодовитости) должна стать родоначальницей родословного дерева. Для облегчения селекционной работы на родословную карту следует заносить коэффициент плодовитости — каждой пары. Если линия имеет наследственную патологию (рак, лейкоз, дистрофия) проявление ее также следует указывать на родословной отмечают пары, проверенные по потомству. Родословная карта необходима для селекционной работы и контроля родственных связей между отдельными парами мышей, находящихся на размножении.

5. Племенной молодняк для ремонта племенного ядра отбирают среди 2-х—4-х пометов от здоровых животных, обладающих хорошей плодовитостью. Для оценки плодовитости пар вычисляют

коэффициент плодовитости $Q = \frac{n}{t}$, где n — количество отса-

женного от данной пары молодняка, t — продолжительность репродуктивного периода. Коэффициент плодовитости вычисляют после завершения репродуктивного периода и заносят на родословную карту.

6. Основным принцип для выбора племенного молодняка заключается в стремлении свести к минимуму различия между парами мышей, находящимися на размножении. Для этого, выбрав одну пару в качестве основной, отсекают расходящиеся сублинии — выводят из размножения так, чтобы в каждом поколении n все мыши были потомками одной пары в поколении $n-3$. Одновременно в племенном ядре находятся на размножении мыши двух—трех сублиний.

7. Для формирования и поддержания племенного ядра необходимо использовать животных разного возраста и разных поколений. Каждая выбраковка пар по возрасту должна возмещаться равным количеством пар, начинающих размножаться. Это обстоятельство важно учитывать при работе как с небольшими, так и с племенными ядрами при расширенном воспроизводстве.

8. Продолжительность репродуктивного периода определяется в зависимости от специфики линии и условий содержания. В обычных условиях мышей выбраковывают в возрасте 7—8 месяцев, крыс — в 9—10 месяцев.

9. При разведении линий с предрасположенностью к онкологическому заболеванию следует определять частоту возникновения этого заболевания для получения характеристики новой колонии и вести отбор на его раннее или более частое проявление. Для этого организуют дожитие животных — после окончания репродуктивного периода самок и самцов рассаживают в клетки по 10 голов и содержат до их естественной смерти. Перед отсадкой животных маркируют, ставя им соответствующие ушные номера. Эти животные должны находиться под квалифицированным наблюдением для своевременной регистрации и точной диагностики заболеваний, а также установления причины смерти.

10. Маркировка производится при помощи щипцов, которыми делают на ушах круглые отверстия диаметром около 1,5 мм. На рисунке (рис. 1) приводится ключ, применяющийся для маркировки мышей в НИЛЭБМ и питомнике «Столбовая».

II. Расширенное воспроизводство инбредных животных

1. Весь молодняк, родившийся в племенном ядре и не нужный для его воспроизводства, может быть использован либо для племенных целей — передачи в другие учреждения, либо для получения животных на эксперимент, путем размножения его в течение трех поколений.

2. Для получения максимально возможного количества экспериментальных животных применяют следующую схему ступенчатого воспроизводства. Подобная схема используется в питомниках нашей страны и за рубежом и обеспечивает достаточную степень генетической однородности животных, используемых в экспериментальной работе.

	Соотношение самок и самцов	Использование молодняка
племенное ядро	1 : 1	для племенных целей
↓		
линейное стадо	2 : 1	для племенных целей и на эксперимент
↓		
стадо I	2 : 1	для племенных целей и на эксперимент
↓		
стадо II	2 : 1	для племенных целей и на эксперимент
↓		
стадо III	2 : 1	только на эксперимент

При разведении животных в ограниченном количестве (например, в институте) количество производственных стад может быть сокращено до 3-х, 2-х или 1-го в зависимости от необходимого количества экспериментальных животных.

Линейное стадо формируется из животных, отсаженных из племенного ядра, но не оставленных на его воспроизводство. Как правило, при отсадке такой молодняк рассаживают по полу по 10 или более голов в зависимости от площади клетки. На каждой клетке закрепляется этикетка, где указано название линии, количество и пол животных, дата рождения (декада и месяц) и, обязательно помечено: из линии, на скрещивание. Разведение осуществляется по методу случайного скрещивания при соотношении 2:1. На клетке с размножающимися животными закрепляется этикетка по форме № 5. Все животные из линейного стада представляют собой первое поколение от случайного скрещивания. Молодняк из линейного стада рассаживают, отдельно самцов и самок, на этикетке указывают: из линейного стада. Этих животных передают для формирования стада 1, излишки реализуют на эксперимент.

Стадо 1. Организация стада 1 обусловлена необходимостью производства линейных животных в больших количествах. Оно формируется из приплода линейного стада. Разведение осуществляется методом случайного скрещивания. Весь приплод, за исключением небольшого количества, идет на формирование стада 2. При отсадке на этикетке для молодняка указывается: из стада 1. К каждой клетке с размножающимися животными прикрепляется этикетка.

Стадо 2. В тех случаях, когда наблюдается недостаток линейных животных, следует сформировать стадо 2. Его организация осуществляется за счет потомков стада 1. Применяется метод случайного скрещивания. Приплод используется на формирование стада 3 и реализуется на эксперимент. Каждая клетка снабжается этикеткой.

Стадо 3 — формируется из приплода стада 2, по тем же правилам. Приплод идет только на эксперимент. В производственных стадах используют одинаковые этикетки (форма 5), но с указанием соответствующей ступени разведения (линейные, стадо 1, 2 или 3). Животные, направляемые из питомника в институты должны сопровождаться этикетками с указанием названия линии, количества животных, пола, возраста (декада и месяц рождения) и веса.

Архив: В архиве рекомендуется постоянно хранить:

1. родословные карты.
2. журнал и этикетки поступления животных из других источников.
3. этикетки тех пар, из потомства которых сформированы следующие поколения.

III. Правила обозначения линий

Каждая линия имеет стандартное обозначение, которое необходимо использовать при разведении животных, указывать при передачах на племя или на эксперименты, а также в научной документации и публикациях. Международным комитетом по стандартизации генетической номенклатуры регулярно публикуются списки линий мышей и крыс. Названия линиям выбираются произвольно исследователями, которые эти линии вывели. В соответствии с международными правилами полное обозначение линии состоит из символа линии, состоящего из набора цифр и латинских заглавных букв (3—5 знаков), написанных в строку без снижений или повышений и символа сублинии, отделенного от символа линии косой чертой. Символ сублинии состоит из одной цифры или заглавной буквы или заглавной буквы и одной-двух строчных букв, обозначающих институт или исследователей, поддерживающих линию.

Пример обозначения линии мышей: CBA/Lac Y, здесь CBA — символ линии, Lac и Y — символы сублиний. Некоторые сублинейные символы, зарегистрированные в международной литературе приведены ниже:

Lac — Центр лабораторных животных, Англия;

H — Харвелл, Англия;

Mv — Н. Н. Медведев;

N — Национальный институт здоровья, США;

Rap — питомник «Рапполово»;

Sto — питомник «Столбовая»;

Sn — Г. Д. Снел (американский генетик);

J — Джексонская лаборатория, США;

Y — НИ Лаборатория экспериментально-биологических моделей АМН СССР.

В полном обозначении линии последовательно пишут все сублинейные символы лаборатории, из которых линия передавалась. В приведенном примере — CBA/Lac Y означает, что линия CBA получена из Lac и поддерживается в Y.

В статьях линия должна быть обозначена полностью хотя бы один раз (в «Материале и методах»), а затем может обозначаться сокращенным символом. Для наиболее употребительных линий мышей рекомендуются следующие сокращения:

AKR — AK,

BALB/c — C,

C3H — C3,

C57BL — B,

C57BL/6 — B6,

C57BL/10 — B10,

C57BR — BR,

CC57BR — CBR,

CC57W — W,

C57L — L,
 DBA/1 — D1,
 DBA/2 — D2.

Эти сокращенные символы используют для обозначения гибридов; так, гибриды F1 (AKR×DBA/2) могут быть записаны как F1 AKD2. Следует во всех записях скрещиваний или обозначениях гибридов на первом месте писать символ линии самки. В названиях некоторых линий входят символы генов, которые записываются через дефис: C57BL/6-+W^Y, или символы некоторых манипуляций, выполняемых с линией: выкармливание детенышей под кормилицей (f), пересадка яйцеклеток (e) или яичников (o); хранение эмбрионов в замороженном состоянии (P). Порядок элементов в полном обозначении линии должен соответствовать истории линии, последовательным передачам животных и выполняемым с ними манипуляциям.

IV. Племенные документы для регистрации работы с линейными животными.

Форма № 1

ПЛЕМЕННОЙ ЖУРНАЛ

Дата регистрации помета	№	Дата рожден. помета	Кол-во самок + самцов =	Масть	Основные генеалогические сведения			Примечание
					линия	поколение (F)	№ семьи родителей	
21.4.78	103/1-3	1.3.78	3+5=8	агути	C3H/Sp	97	102	

Образец записи в племенном журнале. Молодняк регистрируется в момент рассадки помета на пары для размножения. Во второй графе № — порядковый номер записи в журнале (предыдущий помет имел № 102). Цифры 1—3 за косой чертой показывают количество пар мышей.

Этикетка для племенного ядра инбредной линии

линия СЗН/Sp		F 97	
дата рождения 1.10.77			
$1_0 + 1_0 = 2$ +	№ 103/1	№ семьи родителей	102
Дата рождения	Количество		Использование
	рожден.	отсаженных	
1.1.78	8	4+4=8	в линейное стадо
5.2.78	7	3+4=7	—»—
1.3.78	8	3+5=8	№ 403/1—3
3.4.78	5	2+3=5	в линейное стадо
Дата выбраковки		Дата скрещивания 1.12.77	

Образец заполнения этикетки для пары мышей племенного ядра

Форма № 3 Этикетка для племенного молодняка

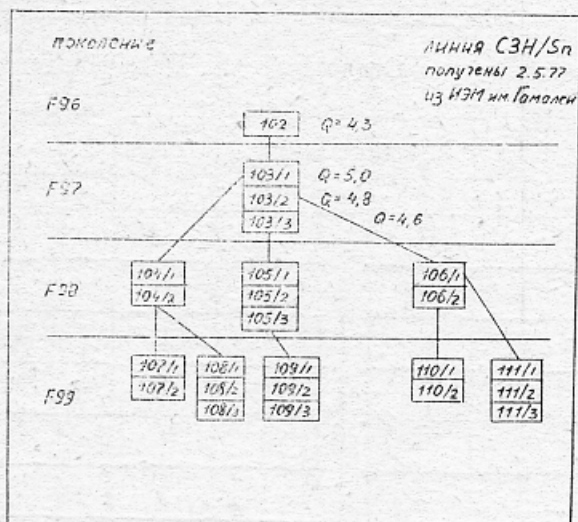
СЗН/Sp

F 97

$$3 + 5 = 8$$

дата рождения 1.3.78

из клетки № 102



Фрагмент родословной линии СЗН/Sp. Коэффициент плодovitости (Q) вычисляется после завершения размножения оцениваемой пары животных.

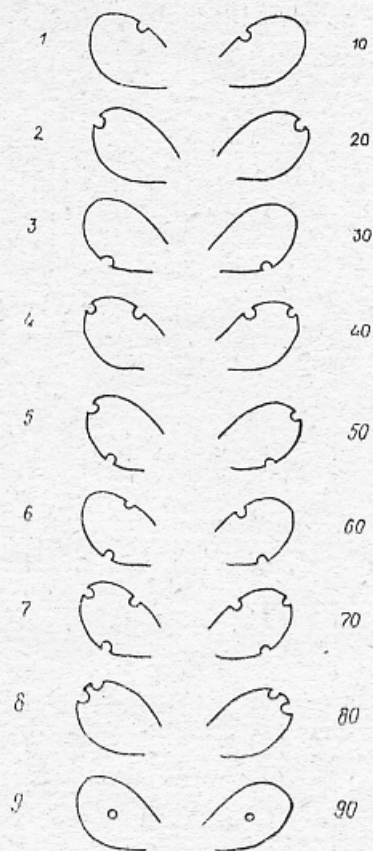
Линия	Стадо I	Дата рождения																				
$\begin{array}{r} 2_0 + 1_0 = 3 \\ + \end{array}$																						
<table border="1"><tbody><tr><td> </td><td> </td></tr><tr><td> </td><td> </td></tr><tr><td> </td><td> </td></tr><tr><td> </td><td> </td></tr><tr><td> </td><td> </td></tr><tr><td> </td><td> </td></tr><tr><td> </td><td> </td></tr><tr><td> </td><td> </td></tr><tr><td> </td><td> </td></tr><tr><td> </td><td> </td></tr></tbody></table>																						
Дата спаривания																						

Журнал регистрации получения племенных линейных животных

Дата получения	Название линии	Кол-во самок+самцов	Дата рождения	Номер по со-проводитель-ным докум.	Покоче-ние	Источник получения	Номер по племенно-му журналу	Примечание
2.5.77	СЭН/Sp	1+1=2	2.3.77	620/1	F 96	Ин-т им. Гамалеи	102	

Журнал регистрации выдачи племенных животных

Дата выдачи	Название линии	Кол-во самок+самцов в помете	Дата рождения	Номер семьи родителей	Поклоение	Куда переданы животные	Фамилия выдавшего животных
16.11.76	101/НУ	3+3=6	13.9.76	3631/1	F?+17	Пуццо. Ин-т Биофизики,	



левое ухо правое ухо

Рисунок 1. Ключ для мечения мышей. Выщипами на левом ухе обозначают единицы, на правом — десятки.