

广西巴马小型猪克隆胚的构建及胚胎移植

卢晟盛[#] 吕培茹[#] 刘红波[#] 何若钢 潘天彪 罗龙兴 黄敏瑞 卢克焕^{*}

(广西亚热带生物资源保护利用重点实验室 广西大学动物科技学院 南宁 530004;
广西畜牧研究所 南宁 530001)

摘要:通过胚胎移植验证构建的广西巴马小型猪克隆胚是否可以发育到期。利用刺入式手术胚胎移植法,将0.5~1.5日龄巴马小型猪克隆胚移植到2头巴马小型猪和2头陆川猪的输卵管壶腹部。其中2头巴马小型猪和1头陆川猪返情,另外一头陆川猪于2007年10月13日产下1头克隆雄性巴马小型猪。说明巴马小型猪克隆胚能够在受体猪体内发育到期并产仔。

关键词: 广西巴马小型猪;体细胞核移植;睾丸成纤维细胞;胚胎移植

中图分类号: Q492 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2008)06-147-07

Construction and Transfer of Guangxi Bama Mini-pig Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos

LU Sheng-Sheng L Ü Pei-Ru LIU Hong-Bo HE Ruo-Gang PAN Tian-Biao
LUO Long-Xing HUANG Min-Rui LU Ke-Huan^{*}

(*Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bioresource Conservation and Utilization, College of Animal Science and Technology, Nanning 530004;*
Guangxi Institute of Animal Husbandry, Nanning 530001, China)

Abstract: The objective of this study was to examine if Guangxi Bama Mini-pig somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos can develop to term after embryo transfer. Bama Mini-pig cloned embryos of 0.5 - 1.5 days old were surgically transferred to the oviductal ampulla of two female Bama Mini-pigs and two female Guangxi Luchuan pigs, of which the two female mini-pigs and one Luchuan pig returned to estrus, and one female Luchuan pig gave birth of one male cloned Bama mini-piglet. It is concluded that Guangxi Bama Mini-pig SCNT embryos can develop to term after embryo transfer.

Key words: Guangxi Bama Mini-pig; Somatic cell nuclear transfer; Testicle fibroblast cells; Embryo transfer

体细胞克隆猪在培育抗病猪、优良地方品种猪保种、人动物疾病模型建立和人类器官移植方面^[1]应用前景广阔。起初体细胞克隆猪的研究集中在常见的大型猪,但小型猪有很多大型猪无可比拟的优点,如个体适宜、占地少、容易饲养等,更为关键的是其器官大小与人体器官极为相似,因此小型猪日益成为非人灵长类以外最为合适的人类疾病模式动物和人类异种器官最佳供体动物。颇为遗憾的是,在所有动物中,猪被公认为是较难核移植的动物之一,进

展也相对较为缓慢。直到2000年,体细胞核移

基金项目 国家自然科学基金项目(No. 30660127),广西科学基金项目(桂科青0640002),广西亚热带生物资源保护利用重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地开放课题(SB0701);

*通讯作者, E-mail: khlu@gxu.edu.cn;

第一作者介绍 卢晟盛,男,副研究员;研究方向:胚胎工程、胚胎分子生物学;E-mail: sslu@gxu.edu.cn.

同等贡献作者

收稿日期:2008-04-15,修回日期:2008-09-02

植猪才终于有了突破^[2-4]。小型猪在 2005 年被成功克隆^[5],并且到目前为止,体细胞克隆猪的效率依然非常低,少于 1% 的克隆胚胎能够发育到期^[6]。

巴马香猪(*Sus scrofa*)源产于广西巴马瑶族自治县,性野、耐粗饲、适应性和抗病力极强,成年最大个体仅 45 kg,是一个具有稳定的遗传基因、品质优良而珍贵稀有的优良地方小型猪品种,于 1987 年载入《广西家畜家禽品种志》时正式命名为“巴马香猪”^[7]。

巴马小型猪是以巴马香猪作为原始材料选育而来的,其染色体核型和国内猪种的差异不大,尤其与贵州香猪接近^[8],是我国特有的实验用小型猪。从 20 世纪 80 年代中期开始到 2003 年已近交选育 14 世代,在遗传表现上比普通香猪(包括巴马香猪)更纯合稳定,遗传相似性更高,逐渐成为生物医学实验的重要实验动物。目前已经应用于肿瘤、心血管病、糖尿病、外科、牙科、皮肤烧伤、血液病、遗传病、营养代谢病、新药安全性评价等多方面,此外,在人的血型改造、人的血液干细胞研究、猪皮改造以及人类疾病模型的建立等研究开发都有一定进展。到目前为止,国内进行猪体细胞克隆的研究相对较少,以新生猪睾丸成纤维细胞为供体,以及选用高度近交选育的巴马小型猪(不同于巴马香猪)为克隆对象,进行猪体细胞克隆的研究,在国际上均未见报道。

为建立服务于人类异种器官移植的转基因体细胞克隆猪的实验技术平台,同时也为保护我国优良的地方品种猪,我们开展了巴马小型猪的体细胞核移植工作。本研究即是探讨适于小型猪的胚胎移植策略,并验证广西巴马小型猪克隆胚是否可以在体内发育到期。

1 材料与方法

1.1 药品及溶液配制 培养板和培养皿购自美国 BD 公司,TCM-199 粉剂、DMEM 粉剂(高糖)和 DPBS 粉剂(无钙离子)购自美国 Gibco 公司,胎牛血清 FBS 为杭州四季青产品。其他化学药品和试剂除特别注明外,均购于 Sigma 公

司(St. Louis, MO, USA)。

DMEM 培养液:DMEM 基础液添加 0.11 g/L 丙酮酸钠、66 mg/L 青霉素和 100 mg/L 的硫酸链霉素,调节 pH 至 7.2~7.4。使用前添加 15% 的 FBS 及 1% 非必需氨基酸 NEAA,构成细胞完全培养基。胰蛋白酶消化液为 0.25% 胰酶 + 0.02% EDTA。0.9% 生理盐水:0.85% NaCl, 0.02% KCl, 0.02% CaCl₂·2H₂O, 0.01% MgCl₂·6H₂O, 75 μg/ml 青霉素, 50 μg/ml 链霉素。洗卵液为改良 TL-Hepes-PVA 液。成熟培养液为改良 TCM-199 液,其中添加了 10% 卵泡液、10 μg/ml 促卵泡素 FSH, 10 μg/ml 促黄体素 LH, 3.05 mmol/L D-葡萄糖、0.91 mmol/L 丙酮酸钠、0.57 mmol/L 半胱氨酸、10 ng/ml 表皮生长因子、75 μg/ml 青霉素, 50 μg/ml 链霉素。显微操作液为添加 10% FBS 和 7.5 μg/ml 细胞松弛素 B(CB)的洗卵液。融合/激活液为 0.25 mol/L 甘露醇 + 0.1 mmol/L CaCl₂ + 0.1 mmol/ml MgSO₄ + 0.5 mmol/L Hepes + 0.01% PVA。

1.2 猪克隆胚的生产

1.2.1 猪卵母细胞的收集和体外成熟 从当地屠宰场收集普通商品猪卵巢,置于 30~37 的 0.9% 生理盐水中 5 h 内运回实验室,并用生理盐水冲洗 3~5 次。用带 12 号针头的 10 ml 注射器抽取卵巢表面上直径 2~6 ml 卵泡的卵母细胞,在实体显微镜下用玻璃吸管吸取带有 2 层卵丘细胞以上、胞质均匀的卵母细胞(COCs),在洗卵液中洗 3 次,再在成熟液中洗 2 次。将卵母细胞移入在培养箱平衡至少 4 h 的成熟液滴中,用胚胎级矿物油覆盖,培养 24 h,然后转移到无 FSH 和 LH 的成熟液滴中继续培养 18~20 h。培养箱条件为:5% CO₂ 的空气、最大相对饱和湿度、39℃。然后用 0.1% 透明质酸酶除去卵丘细胞,挑选排出第一极体的卵

王爱德. 展望我国实验小型猪发展前景. 第三届实验动物科学继续教育研讨会暨第二届广东省实验动物学会与日本九州实验动物研究会学术交流会, 中国广州, 2004 年 9 月, 553~555.

王爱德. 广西巴马小型猪封闭群、近交系培育及探讨. 第三届实验动物科学继续教育研讨会暨第二届广东省实验动物学会与日本九州实验动物研究会学术交流会, 中国广州, 2004 年 9 月, 85~87.

母细胞待用。

1.2.2 供体细胞准备 将新生广西巴马小型猪的睾丸与普通猪胎儿用含 66 mg/L 青霉素和 100 mg/L 硫酸链霉素的 DPBS 及 75 % 酒精各清洗 3~5 遍,然后 75 % 酒精浸泡 1 min,再用含青霉素、链霉素的 DPBS 清洗。将睾丸和胎儿组织碎块用眼科剪将其剪碎,加入 DPBS 离心洗涤 2 遍。睾丸组织用胰蛋白酶消化液 4 消化 12 h,再在 0.25 % 的胶原酶中 37 消化 30 min,然后加入少许 DMEM 培养液,转入 5 % CO₂ 培养箱(37 和最大相对湿度)培养 5 h,过夜,第 2 d 加入 2~3 ml DMEM 培养液。胎儿组织不进行酶消化,直接按相似的程序进行原代培养。2~3 d 后成纤维细胞溢出,以后每 3 d 换液,待细胞长到 70%~80% 汇合时,进行传代培养或冷冻保存^[9]。使用前进行接触抑制(1~3 d)或血清饥饿处理(1~3 d)。

1.2.3 重构胚的构建 将排出第一极体的卵母细胞移入显微操作液静置 15 min。在显微操作仪下用固定针固定卵母细胞,用外径为 20~25 μm 的去核针吸取第一极体及其周围的少量

细胞质,然后用去核针点击透明带切口再挤出少量胞质,进一步保证去核完整性。吸取中等大小圆形、细胞膜折光度较好的供体细胞通过透明带切口注射到透明带下方,并轻点透明带使供体与卵母细胞膜接触良好。

将融合液置于安装在显微操作仪上的两根自制直径 150 μm 的可活动铂金丝电极间,将重构卵移到的融合滴中,用其中一根铂金丝轻轻拨动重构卵,使供体与卵母细胞膜接触面与电场方向垂直,用 ECM-2001 电融合仪进行融合/激活(场强为 100 V/mm,3 次脉冲,脉冲时间为 30 μs)(图 1A)。另一方面,将排出第一极体的卵母细胞移到融合滴中,置于两电极之间,逐个进行电激活(场强为 100 V/mm,3 次脉冲,脉冲时间为 10 μs)。

将融合后的重构胚或孤雌激活胚转移到添加 0.4 % BSA 和 7.5 μg/ml CB 的 NCSU-23 中培养 3~5 h,然后移到添加 0.4 % BSA 的 NCSU-23 中培养,等待胚胎移植(图 1B)。培养箱条件为 39 ,5 % CO₂,100 % 湿度。

1.3 胚胎移植 选用经产的广西巴马小型猪

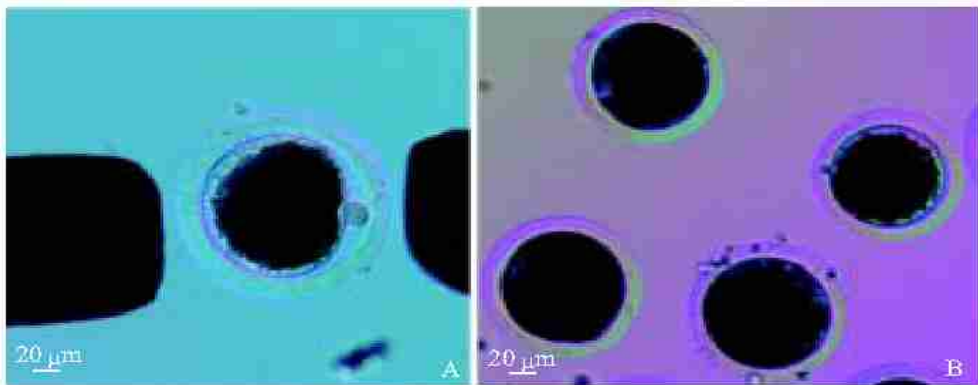


图 1 体细胞克隆胚胎(×100)

Fig.1 The somatic cell nuclear transfer embryos

A. 融合过程中的重构胚(其两侧的黑色物体为自制电极); B. 等待移植的融合胚胎。

A. Reconstructed embryos being fused(the black objects are self-made electrodes);

B. Fused embryos to be transferred.

和陆川猪作为受体母猪,自然发情第 2 d 进行手术,胚胎移植,手术前一天下午停喂饲料。将手术前一天(记为 -1 d)和当天(记为 0 d)构建

的 0.5~1.5 日龄优质克隆胚胎和孤雌激活胚胎及少量洗卵液一起吸入移植管(带针头,自制),置入 37 的便携式培养箱中 1~2 h 内带

入猪场。手术前,利用 0.025 g/ml 戊巴比妥钠(用无菌生理盐水配制)按 20 ~ 25 mg/kg (猪体重)将受体猪进行麻醉后侧卧式绑定在手术架上,清除手术部位污垢和毛发,并分别利用 3% 碘酊及 75% 酒精消毒(脱碘),盖上创布,准备手术。手术时,利用手术刀在侧腹部表皮做 5 ~ 7 cm 左右切口,然后切开皮下肌肉,用刀柄钝性分离脂肪和腹膜。将手放入腹腔,找出输卵管和卵巢,适当拉出,观察单个卵巢上的排卵点,暴露输卵管,准备移植。整个过程尽量避开血管,如有出血,及时清除血污,并用 37 °C 生理盐水冲洗,防止血污进入腹腔以发生粘连。整个过程不断用保温生理盐水淋浴暴露在体外的猪内脏以保持其湿度。采用刺入式胚胎移植法进行胚胎移植,具体操作如下:从便携式培养箱中取出移植管,沿输卵管伞部查找第 2 个弯曲,

绕过弯曲处并固定输卵管,将连在移植管上的针头刺入输卵管,然后将胚胎缓缓地输入其中,再打入少许空气,撤出输卵管并小心放回腹腔,然后逐层缝合创口。术后连续 5 d 注射青霉素、链霉素防止炎症发生,单独隔离受体雌猪,注意观察愈后和返情情况。

2 结果

广西巴马小型猪体细胞克隆胚胎体内发育情况见表 1。利用刺入式胚胎移植法共移植两头巴马小型猪和两头陆川猪。两头巴马小型猪分别在约一个月和两个月时返情,一头陆川猪在 210 d 后返情。另一头陆川猪在 2007 年 10 月 13 日(移植后 114 d)产下一头健康的雄性巴马小型猪克隆猪(图 2)。

表 1 体细胞克隆胚胎体内发育情况

Table 1 In vivo development of somatic cell nuclear transfer embryos

实验批次 Trial batches	SCNT 胚胎 SCNT embryos	孤雌激活胚胎 Parthenogenetic embryos	胚胎总数 Total embryos	胚龄(d) Embryo age	受体猪 Surrogates	结果 Results
1	59	85	144	0.5 ~ 1.5	巴马小型猪	手术后 30 d 返情
2	40	81	121	0.5 ~ 1.5	巴马小型猪	手术后 55 d 返情
3	125	156	281	0.5 ~ 1.5	陆川猪	手术后 210 d 返情
4	104	105	209	0.5 ~ 1.5	陆川猪	怀孕到期,产下一头雄性克隆巴马小型猪

3 讨论

胚胎移植是影响体细胞克隆猪生产的关键因素之一,也是目前检查克隆胚胎发育能否到期的惟一途径。胚胎移植方法、受体母猪的选择、移植克隆胚胎的数目和类型在胚胎移植过程中起到很关键的作用。

大动物如牛等的胚胎移植多采用非手术法,而猪个体较小且具有多皱褶而深的子宫、屈曲盘绕的子宫角,是非手术法难以逾越的屏障,一般用手术法。非手术法简单易行,对动物损伤小,不易感染,恢复快;而手术法则较为复杂,需要对实验动物进行麻醉,实验个体对麻醉的反应性往往不同,麻醉过浅影响操作,麻醉过深

则导致死亡,对动物损伤也大,易感染,恢复慢,手术技术水平要求高。对于猪,传统的做法是,用输胚管从输卵管伞部将早期胚胎移入动物生殖管道^[10,11]。此种方法不但操作时间长而且输胚管的穿入很容易损伤输卵管黏膜,发生炎症、堵塞输卵管,甚至发生输卵管伞、卵巢和子宫等相互粘连的现象。我们在最初进行的试管猪胚胎移植实验中也沿用此法,移植受体猪 10 多头均未产仔,有的受体猪甚至内脏发生粘连(数据未列出)。针对出现的问题,我们对胚胎移植的方法进行了改进,采用刺入式胚胎移植法:沿输卵管伞部查找第 2 个弯曲,绕过弯曲处并固定输卵管,将自制的带针头的输胚管刺入输卵管,然后将胚胎缓缓地输入其中。整个操作过程安



图 2 胚胎移植及克隆猪的出生

Fig. 2 Embryo transfer and the birth of cloned piglet

- a. 查看受体雌猪排卵情况; b. 刺入式胚胎移植法进行胚胎移植; c. 刚出生的广西巴马小型猪;
d. 受体广西陆川猪及刚出生的广西巴马小型猪。
- a. Checking ovulation of the surrogate pig; b. Embryo transfer by a punching method;
c. Cloned Guangxi Bama Mini-pig (born on Oct. 13, 2007);
d. Guangxi Luchuan pig and cloned Guangxi Bama Mini-pig.

全、快捷,在不超过 30 s 的时间即可完成,而且可以基本保证不出血。本实验利用此法,成功地产下一头健康的巴马小型猪克隆猪,体细胞克隆动物健康出生率达到 25 %。

小型猪克隆胚胎的受体母猪目前主要有两种选择:以小型猪为受体和大型猪为受体。Hoshino 等^[5]以大肚皮小型猪(Potbelly Miniature Pig)成纤维细胞为供体构建克隆胚胎,分别移植到 14 头哥廷根小型猪(Göttingen Miniature Pig)和 4 头中国梅山猪(Meishan Pig)(大型猪)。结果所有哥廷根小型猪在 20 ~ 31 d 返情,仅 2 头中国梅山猪产下 5 头大肚皮小型猪。2006 年,Miyoshi 等^[12]以 Claw Miniature Pig 胎儿成纤维细胞为供体融合构建重构胚胎,然后将用超声波进行激活的胚胎移植到 4 头长白 × 大白 ×

杜洛克杂交猪受体雌猪,一头雌猪产仔两头,其中一头健康出生,而另一头死亡。中国农业大学李宁研究组以贵州小型猪的胎儿成纤维细胞为供体构建克隆胚胎,移植给二元母猪(长白 × 大白、大白 × 长白),产仔两头。这是我国大陆首例体细胞克隆猪,也是首例体细胞克隆小型猪^[10]。戴建军等采用 Spindle-view 法对卵母细胞进行去核构建重构胚,并移植给 12 头上海白猪,结果有一头猪顺利怀孕到终期,经剖腹产产下一头健康的克隆巴马小型猪^[11]。这提示我们,大型猪似乎更适合作为小型猪克隆胚胎的移植受体。在我们的移植实验中对此进行了比较,结果两头巴马小型猪全部返情,而陆川猪一头返情,一头怀孕到期。分析原因,我们认为,这主要是由于手术操作的难易程度不同造成

的。巴马小型猪个体较小,器官、组织也相对较小,不易观察,手术操作易造成出血,尤其是输卵管较细,不易找到,造成操作时间大为延长,易造成粘连,失败率较高。而陆川猪不同,其个体较大,整个腹腔相对较大(通常情况下,腹部甚至拖地),器官、组织相对松弛,容易进行手术操作。实验证明,以陆川猪为受体相对于巴马小型猪更为适合。

关于移植克隆胚胎的数目和类型,猪为多胎动物,需要至少4个以上体内生产的优质胚胎存在才可以建立和维持妊娠^[13]。一般认为克隆胚胎的质量不如体内胚胎,故胚胎移植时常常将大量的猪克隆胚胎移入子宫或输卵管内。克隆胚胎的个数往往在几十枚和上百枚之间。Yin等将180~341枚克隆胚胎移植给6头受体猪,其中有2头受体猪共产下8头健康的小猪^[14]。Harrison等将51~110枚融合胚胎移植给10头受体猪,其中4头受体猪共产下多达18头健康小猪^[15]。Hoshino等认为,其中2头梅山猪代孕雌猪产仔是因为当初移植的克隆胚胎数目较为合适,分别移植了15和29枚克隆胚胎^[5]。可见,究竟移植多少枚克隆胚胎给受体雌猪尚无定论。此外,关于克隆胚胎,还有利用其他类型的胚胎一起移植以加强妊娠的报道。De Sousa等将孤雌激活的胚胎和体细胞克隆胚胎一起移植,以促进妊娠信号^[16]。King等将体内生产的正常胚胎、孤雌激活胚胎同时移植,也取得较好的效果^[17]。我们也是沿用类此策略,将40~125枚体细胞克隆胚胎与81~156枚孤雌激活胚胎共移植,也获得了健康的克隆动物。

另外,在哺乳动物体细胞克隆研究中,一般认为胎儿成纤维细胞为供体细胞构建的克隆胚胎发育能力最高,其次为新生猪成纤维细胞,再其次为成年猪成纤维细胞。所以大多数的研究是以猪胎儿成纤维细胞为供体细胞构建克隆胚胎进行胚胎移植。我们实验以新生巴马小型猪睾丸成纤维细胞为供体细胞,同样得到了健康的克隆猪。而以胎儿成纤维细胞构建的克隆胚胎未发育到期,可能是因为重复次数较少,还有

待进一步验证。

总之,在本实验室条件下,成功地解决了广西巴马小型猪体细胞克隆中胚胎移植这一关键问题,其中刺入式胚胎移植法的在猪中的使用,在国内尚属首次,同时利用这种方法进行胚胎移植成功地产下一头健康的高度近交培育的巴马小型猪的克隆后代。这无疑为广西地方优良品种巴马香猪的保种、培育抗病猪、人动物疾病模型建立和人类异种器官移植方面等奠定了坚实的基础。

参 考 文 献

- [1] Lai L, Prather R S. Progress in producing knockout models for xenotransplantation by nuclear transfer. *Ann Med*, 2002, **34**(7-8): 501~506.
- [2] Betthausen J, Forsberg E, Augenstein M, et al. Production of cloned pigs from *in vitro* systems. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**: 1 055~1 059.
- [3] Onishi A, Iwamoto M, Akita T, et al. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, 2000, **289**: 1 188~1 190.
- [4] Pblejaeva I A, Chen S H, Vaught T D, et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 2000, **407**: 86~90.
- [5] Hoshino Y, Uchida M, Shimatsu Y, et al. Developmental competence of somatic cell nuclear transfer embryos reconstructed from oocytes matured *in vitro* with follicle shells in miniature pig. *Cloning Stem Cells*, 2005, **7**: 17~26.
- [6] Walker S C, Shin T, Zaunbrecher GM, et al. A highly efficient method for porcine cloning by nuclear transfer using *in vitro* matured oocytes. *Cloning Stem Cells*, 2002, **4**(2): 105~112.
- [7] 广西家畜家禽品种志编辑委员会编著. 广西家畜家禽品种志. 南宁: 广西人民出版社, 1987, 62~65
- [8] 郭亚芬, 王爱德, 兰干球等. 巴马小型猪染色体核型. 上海实验动物科学, 1994, **14**(1): 21~23.
- [9] 卢晟盛, 刘红波, 吕培茹等. 猪胎儿肾脏成纤维细胞体外培养体系的建立. 动物学报, 2007, **53**(6): 1 054~1 062.
- [10] 李旭阳, 邳明伟, 孙慧敏等. 克隆猪的胚胎移植技术及其应用. 猪业科学, 2006, **2**: 10~11.
- [11] 戴建军, 吴华莉, 张廷宇等. 猪体细胞克隆胚的胚胎移植研究. 上海农业学报, 2007, **23**(4): 1~4.
- [12] Miyoshi K, Sato K, Yoshida M, et al. *In vitro* development of cloned embryos derived from miniature pig somatic cells after activation by ultrasound stimulation. *Cloning Stem Cells*, 2006,

- 8: 159 ~ 165.
- [13] Betthausen J, Forsberg E, Augenstein M, *et al.* Production of cloned pigs from *in vitro* systems. *Nat Biotechnol*, 2000, **18** (10): 1 055 ~ 1 059.
- [14] Yin XJ, Tani T, Yonemura I, *et al.* Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes. *Biol Reprod*, 2002, **67**: 442 ~ 446.
- [15] Harrison S, Boquest A, Grupen C, *et al.* An efficient method for producing alpha (1,3)-galactosyltransferase gene knockout pigs. *Cloning Stem Cells*, 2004, **6**(4): 327 ~ 331.
- [16] De Sousa P A, Dobrinsky J R, Zhu J, *et al.* Somatic cell nuclear transfer in the pig: control of pronuclear formation and integration with improved methods for activation and maintenance of pregnancy. *Biol Reprod*, 2002, **66**: 642 ~ 650.
- [17] King T J. Embryo development and establishment of pregnancy after embryo transfer in pigs: coping with limitations in the availability of viable embryos. *Reproduction*, 2002, **123** (4): 507 ~ 515.

《动物学杂志》投稿注意事项

1 稿件的投寄

稿件通过本刊的电子信箱 (E-mail: journal @ioz. ac. cn) 投寄 (Word 文件作附件), 同时邮寄打印稿。打印稿小四号字单面隔行打印。

2 论文的格式要求

题目 应言简意赅。中文题目字数一般不超过 20 个字; 英文题目不超过 10 个实词, 实词首字母大写。

作者 署名入应是对论文的全部或部分内容做出主要贡献, 并能对文章内容负责的人。

单位 应写作者单位的标准全称及所在地和邮编。

摘要 中文摘要放在文首。内容必须包括: 研究目的、方法、结果 (主要数据) 和结论。用第三人称叙述。英文摘要放在中文摘要下面, 其内容应与中文摘要相对应或略详于中文摘要。

关键词 一般为 3 ~ 5 个, 中英文对应, 分别列在中英文摘要下面。

前言 结合文献阐述国内外相关研究领域的发展状况及本研究的目的和意义。

正文 材料与方法对材料的来源及方法的出处应详细陈述; 结果的数据要完整, 微观形态的稿件应有实验照片作为依据, 文字叙述要简洁明了, 与图表内容相互呼应; 讨论应依据前言的内容、结果的数据、现象展开讨论, 以达到解决问题或得出结论的目的。

全文书写规格 文中请使用国家颁布的法定计量单位和符号及规范化的名词、术语。文中首次出现的英文缩写词, 应先写出中文名称后, 再在括号内写出英文全称和缩写词。物种名称在文中第一次出现时应附拉丁学名 (种属名用斜体, 属名首字母大写)。名词术语的用法文中应前后一致。

小标题: 应简短准确、层次清楚。各级标题一律采用阿拉伯数字连续编码, 左顶格编排, 如“1”(一级标)、“1.1”(二级标)、“1.1.1”(三级标)。

图表: 力求精选, 反应同一数据的图与表不能重复。其序号一律采用阿拉伯数字编码, 在文中引用处注明。线条图应用计算机绘制, 激光打印机打印; 照片图要求反差适中、层次清晰。显微及电镜照片, 应注明长度标尺和放大倍数。

参考文献 应列出与本文直接有关的中外文主要文献, 未公开发表的文献可作脚注处理。本刊文献的著录格式采用顺序编码制, 即以文献在文中出现的先后顺序连续编码, 加方括号标注在文中引用处, 文后文献表的文献要与文中一致, 并按文中的顺序排列, 多名作者须在列出前三名作者后加“等”。具体格式要求为:

期刊: 作者. 题名. 刊名 (外文刊用斜体), 出版年, 卷(期)号: 起止页码. 示例:

[1] 郑光美. 黄腹角雉. *动物学杂志*, 1987, **22**(5): 40 ~ 43.

[2] Wu P, Zhou K Y. General condition of systematics study on Tesudines. *Chinese Journal of Zoology*, 1998, **33**(6): 38 ~ 45.

专著: 作者. 书名. 版本 (第一版不标注). 出版地: 出版者, 出版年, 起止页码. 示例:

[3] 孙儒泳编著. *动物生态学原理* (第二版). 北京: 北京师范大学出版社, 1992, 329 ~ 330.

[4] Jiang Zh Ged. *Conservation Biology*. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press, 1997, 160 ~ 164.

论文集: 作者. 题名. 见 (英文用 In): 编者. 论文集名. 出版地: 出版者, 出版年, 起止页码. 示例:

[5] 陈大元. 动物显微受精与克隆研究. 见: 中国动物学会主编. *中国动物科学研究*. 北京: 中国林业出版社, 1999, 59 ~ 64.

[6] Yang T. On the leeches from Wuling Mountains area in south China. In: Song D X ed. *Invertebrates of Wuling Mountains Area, Southwestern China*. Beijing: Science Press, 1997, 395 ~ 399.