

[文章编号] 1007-385X(2007)03-0220-05

人乳头状瘤病毒 18 型阳性肿瘤疫苗的构建及体外活性鉴定

廖书杰,王世宣*,马 丁*,邓东锐,徐 茜,王 丽,王 薇,程艳香,白向阳,卢运萍(华中科技大学 同济医学院附属同济医院 妇产科,武汉 430030)

[摘 要] **目的:** 制备人乳头状瘤病毒(human papilloma virus, HPV)18 型阳性的肿瘤疫苗,并观察其体外活性。**方法:** 利用昆虫杆状病毒(简称 Bac to Bac)表达系统,将 *HPV18L1* 基因重组入穿梭质粒 pFastBac-Htb,构建 HPV18 L1-Htb,通过转座反应,将目的基因片段重组入杆状病毒基因组,分离重组的 Bacmid DNA,并转染 Sf-9 昆虫细胞进行表达;透射电镜观察病毒样颗粒(virus-like particle, VLP)的形成;用 Ni-NTA 系统纯化表达蛋白;以小鼠红细胞凝集试验鉴定蛋白生物活性。**结果:** 收集被转染的 Sf-9 细胞,提取细胞蛋白,SDS-PAGE 检测在相对分子质量大约 63 000 处可出现一新生蛋白条带,Western blotting 证实为 HPV18L1 蛋白;透射电镜观察证实 L1 蛋白可自我组装成 VLP,且主要定位于细胞核;小鼠红细胞凝集试验证实纯化的蛋白在 0.5 ~ 4 ng/ μ l 范围可介导小鼠红细胞凝集。**结论:** Bac to Bac 表达系统可高效地制备 HPV VLP,并具有体外生物活性;Ni-NTA 系统能高效简便地纯化带有 6 \times His 短肽的 HPV18L1 蛋白。

[关键词] 人乳头状瘤病毒 18 型; 昆虫杆状病毒表达系统; 肿瘤疫苗

[中图分类号] R392.7 [文献标志码] A

Construction of human papilloma virus type 18-positive tumor vaccine by Bac to Bac baculovirus expression system and examination of its *in vitro* activity

LIAO Shu-jie, WANG Shi-xuan*, MA Ding*, DENG Dong-rui, XU Qian, WANG Li, WANG Wei, CHENG Yan-xiang, BAI Xiang-yang, LU Yun-ping (Department of Obstetrics and Gynecology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

[**Abstract**] **Objective:** To prepare human papilloma virus type 18 (HPV 18)-positive tumor vaccine and to examine its *in vitro* activity. **Methods:** A Bac to Bac expression system was employed in the present study. *HPV18L1* gene was inserted into shuttle plasmid pFastBac-Htb to construct HPV18 L1-Htb; the latter was used to transform DH10Bac cells to construct a recombinant baculovirus to infect Sf-9 insect cells. The protein of interest was identified by observing self-assemble into VLPs under transmission electron microscope and was purified by Ni-NTA purification system. The bioactivity of the purified protein was analyzed by mouse erythrocyte hemagglutination assay. **Results:** The infected Sf-9 cells were collected and total cellular proteins were extracted. SDS-PAGE assay revealed a roughly 63 000 D protein, which was confirmed to be HPV18 L1 by Western blotting. Transmission electron microscope showed that the proteins formed into VLP by self-assemble *in vitro* and located mainly in the nuclei. It was found that the protein induced mouse erythrocyte hemagglutination. **Conclusion:** Bac to Bac expression system can effectively prepare HPV VLP with *in vitro* bioactivity. The Ni-NTA purification system can purify the protein with 6 \times His tag efficiently.

[**Key words**] human papillomavirus type 18 ; Bac to Bac baculovirus expression system; tumor vaccine

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(3): 220-224]

人乳头状瘤病毒(human papilloma virus, HPV)是一种嗜黏膜和皮肤等上皮组织的双链环状 DNA 病毒,属乳多空病毒科多瘤病毒亚科,感染时显示高度的宿主特异性。低危型的 HPV 可以引起尖锐湿疣、寻常疣、喉及结膜乳头状瘤等良性疾病,而高危型的 HPV 与人类的多种恶性肿瘤有关,如头颈部瘤、口腔癌、鼻窦癌、喉癌、食管癌、肺癌、膀胱癌、子宫颈癌、阴茎癌、肛门癌^[1]等。然而针对 HPV 感染,

[基金项目] 国家重点基础研究发展(973)计划资助项目(No. 2002CB513100);国家自然科学基金资助项目(No. 30672227)。Supported by the Major State Basic Research Development Program of China (No. 2002CB513100); National Natural Science Foundation of China(No. 30672227)。

[作者简介] 廖书杰(1978-),女,云南省昆明市人,博士,主要从事妇科肿瘤防治方面的研究, Liaoshujie2004@163.com

* Corresponding author. E-mail. dma@tjh.tjmu.edu.cn; wang shixuan@yahoo.com.cn

现国内外并无一种确切有效的治疗方法。因此,利用疫苗接种对 HPV 感染进行一级预防,增强相关人群对 HPV 感染的抵抗能力,同时也为根除子宫颈癌及其他相关肿瘤的发生带来了希望。然而,由于 HPV 具有严格的宿主和组织特异性,无法在体外单独培养,只能在人组织中复制;而病变组织中病毒样颗粒含量极微,为 HPV 相关的肿瘤疫苗研究带来了巨大的障碍。1991 年 Zhou^[2]首次证实 HPV16L1 衣壳蛋白在体外相关表达系统中可自行组装为不含病毒 DNA 的病毒样颗粒(virus-like particle, VLP), VLP 结构上拥有天然的病毒衣壳蛋白,即和同型别 HPV 有完全相同的构象抗原表位,在体内可以诱导出针对特异型别 HPV 的免疫反应,并产生保护性中和抗体,小剂量就可引起持久免疫力,热稳定性好、不易失活;加之 VLP 中无病毒 DNA,所以安全性较高。由此,开创了 HPV 疫苗的新局面。

目前针对 HPV6、11、16、18 VLP 的四价宫颈癌疫苗在国外已经进入 III 期临床实验,不久即将上市。而作为宫颈癌高发的中国,疫苗研究也迫在眉睫。因此,本实验室正着力研发以 HPV16、18、58 为基础的 III 价预防性疫苗。本研究成功构建了人乳头状瘤病毒 18 型阳性预防性肿瘤疫苗,并观察其体外凝集活性。

1 材料与方 法

1.1 试剂及质粒

含有 HPV18 型全基因序列的质粒由德国海德堡大学 Hausen 教授馈赠,克隆载体 T-easy 购自 Promega 公司,工具酶均购自 Invitrogen 公司。质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司,Grace 培养液、胎牛血清均购自 Gibco 公司。昆虫杆状病毒(简称 Bac to Bac)表达系统为 Invitrogen 公司提供,Ni-NTA 蛋白纯化系列为 Novagen 公司产品。穿梭质粒 pFastBac-Htb、DH10Bac 菌种及 Sf-9 昆虫细胞由中国科学院病毒研究所馈赠。所有抗体均为 Sant Cruz 公司产品。

1.2 PCR 扩增及 T-HPV18L1 质粒构建

用于扩增 HPV18L1 的 PCR 引物由本实验室自行设计,并由 Invitrogen 公司合成,上游引物:5'-CG-GAATTC AAATGTGCCTGTATACACGGGTC-3';下游引物:5'-CCCAAGCTTCACACATATTACTTCCTGG-3'。引物 5'端分别带有 EcoR I 和 Hind III 位点,以含有 HPV18L1 全序列的质粒 PBR322-HPV18 为模板进行 PCR 反应,扩增条件为 94 °C 30 s、52 °C 45 s、72 °C 60 s,共 35 个循环。PCR 扩增产物经纯

化回收后连至 T-easy 载体,构成重组质粒 T-L1;经双酶切及 PCR 鉴定后进行测序鉴定,测序由 Invitrogen 公司完成。

1.3 重组质粒 Htb- HPV18L1 的构建及重组杆状病毒的获得

以 EcoR I 和 Hind III 双酶切 T-HPV18L1 质粒,并纯化回收 HPV18L1 基因,连接至杆状病毒表达系统的 pFastBac-Htb 穿梭载体,构建成重组质粒 Htb-HPV18L1。用 Htb-HPV18L1 和含有杆状病毒基因组 Bacmid 和辅助质粒的 DH10Bac 细胞进行转座反应,涂板后,经相应的抗性筛选挑取阳性克隆,摇菌,按 Qiagen 公司产品说明提取重组的 Bacmid DNA。

1.4 细胞培养和转染 Sf-9 昆虫细胞

昆虫细胞 Sf-9 在含 10% 的优质胎牛血清的 Grace's 培养液中 27 °C 培养。转染 Sf-9 细胞按 Bac to Bac 操作说明书进行,转染后继续培养 72 ~ 96 h。

1.5 表达产物 SDS-PAGE 及 Western blotting 分析

表达产物分别行 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测。检测按常规方法进行,即提取细胞总蛋白并加热沸腾使之变性,上样于 10% 的 PAGE 胶,电泳。用考马斯亮蓝固定液处理后,考马斯亮蓝染色。同时将相应分子量处的 PAGE 胶转于硝酸纤维膜上,用脱脂奶封闭 37 °C 1 h,一抗(1:500)4 °C 封闭过夜;次日再用相应二抗封闭 37 °C 1 h,最后用辣根过氧化物酶显色系统显色。

1.6 HPV18L1 蛋白的纯化

用 Ni-NTA 树脂纯化系统(Novagen 公司产品),采用非变性条件对 HPV18L1 蛋白进行纯化。其方法详见 Ni-NTA 纯化系统说明书。

1.7 电镜观察转染重组杆状病毒的 Sf-9 细胞中病毒样颗粒

将转染重组 Bacmid DNA 72 h 的 Sf-9 细胞以戊二醛固定、制片,用透射电镜观察。

1.8 小鼠红细胞凝集试验

C57BL /6 小鼠眼球后取血,肝素钠抗凝,0.1% BSA PBS 洗细胞至少 5 次以后,再按 1:100 体积比制成细胞悬液;取纯化的 HPV18L1 蛋白 50 μl (含蛋白 400 ng)加入 96 孔圆底板中,然后进行对比稀释,再加入 50 μl 指示细胞悬液,4 °C 共育 3 h,以 0.1% BSA PBS 为阴性对照,不加任何处理的为空白对照,观察结果。

2 结 果

2.1 HPV18L1 基因克隆及重组质粒 T-HPV18L1 及 Htb-HPV18L1 的构建

以 *EcoR* I + *Hind* III 双酶切 T-HPV18L1 质粒及 pFastBac-Htb 载体质粒, 将 HPV18L1 片段连接至线性化的 pFastBac-Htb, 经 *EcoR* I + *Hind* III 双酶切鉴定所插入的 L1 片段大小为 1 700 bp, 与 L1 基因预期大小一致方向正确(图 1)。测序结果与 GenBank X050155430-7136 HPV18L1 比对, 共发生 2 处核苷酸变异, 6 337 bp T→G, 6 646 bp T→C, 均导致氨基酸同义突变, 氨基酸未发生变异。

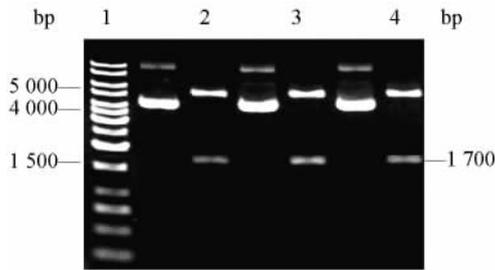


图 1 重组质粒 Htb-HPV18L1 的酶切鉴定
Fig.1 Identification of recombinant plasmid Htb-HPV18 L1 by *EcoR* I /*Hind* III digestion

1: Marker; 2, 3, 4: 4 600 bp fragment was linearization Htb; 1 700 bp fragment was HPV18 L1, indicating that the recombinant transfer plasmids were correct

2.2 重组杆状病毒的获得及细胞转染结果

以 Htb-HPV18L1 质粒转座于 DH10Bac 细胞, 24 ~ 48 h 后可见选择性平皿上有大量单菌落生长, 将随机挑选的克隆提取重组的 HPV18L1 Bacmid DNA 用杆状病毒 特有引物 M13F 5'-GTTTTTCCAGTCACGAC-3' M13R 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3', 进行 PCR 扩增。如果转位成功, 根据 Invitrogen 操作说明书 PCR 产物大小应该是 2 300 bp + 插入片段的大小, 即为 4 000 bp 左右。电泳结果在大约 4 000 bp 处出现特异性扩增条带, 进一步证实了重组杆状病毒 HPV18L1 形成。重复筛选挑取转座成功含有外源基因 HPV18L1 的 Bacmid DNA 转染 Sf-9 细胞。27 °C 培养 48 ~ 72 h 后被转染细胞变圆, 肿大, 折光性增强, 细胞逐渐脱落, 与正常对照细胞形成明显对比。收获转染 72 h 的细胞, 以该细胞 DNA 为模板行 PCR 扩增, 琼脂糖电泳在大约 1 700 bp 处可见特异性条带, 与 HPV18L1 基因大小一致。说明转染的细胞中含有重组杆状病毒 HPV18 L1, 同时重组病毒基因组中整合了 L1 基因(图 2)。

2.3 Western blotting 分析及 HPV18L1 蛋白的纯化

将适量重组杆状病毒感染昆虫细胞, 72 h 后收集细胞, 提取细胞蛋白行 SDS-PAGE。与对照细胞

相比, 可见重组病毒感染的 Sf-9 细胞在相对分子质量大约 63 000 处出现一特异性条带, 与 HPV18L1 蛋白的分子量一致。经 Western blotting 证实该条带可与抗 HPV18L1 抗体特异性反应(图 3), 说明所建立的重组杆状病毒可表达目的蛋白, 而且所表达的 L1 蛋白具有良好的抗原性。

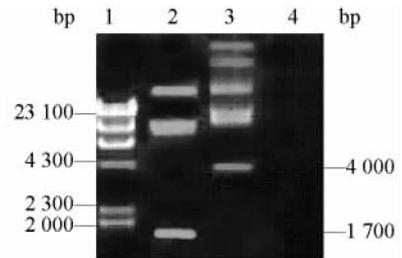


图 2 PCR 鉴定重组 Bacmid-HPV18L1

Fig.2 PCR analysis of recombinant Bacmid HPV18L1
1: Marker; 2: Bacmid-HPV18 L1 P3 viral stock-infected Sf-9 cells; the target fragments of 1 700 bp were obtained using primers of HPV18L1; 3: PCR products with primers PUC/M13 corresponded to the size of the target gene 4 000 bp, indicating successful transpositions; 4: Negative control



图 3 Western blotting 分析 HPV18L1 蛋白在 Sf-9 细胞中的表达

Fig. 3 Expression of HPV18L1 in Sf-9 cells analyzed by Western blotting
1: Marker ; 2, 4: Sf-9 cells infected with recombinant Baculovirus HPV18L1. Positive band located at around 63 000; 3, 5 : Sf-9 cells uninfected saved as negative control

利用 Ni-NTA 系统在非变性条件对 HPV18 L1 蛋白进行纯化。将含有 HPV18L1 蛋白的细胞裂解上清与结合缓冲液混合上 Ni 柱, 使 L1 蛋白和 Ni 柱结合, 然后用漂洗缓冲液洗去未结合非特异性结合蛋白, 最后用洗脱液洗脱 L1 蛋白, 具体方法详见 Ni-NTA 纯化系统说明书。纯化结果用 SDS-PAGE 显示, 可见纯化后的蛋白在相对分子质量 63 000 处有单一条带(图 4)。

2.4 转染重组 Bacmid DNA 的 Sf-9 细胞中病毒颗粒的电镜观察

透射电镜观察证实, 在转染重组 Bacmid DNA 72 h 后, Sf 9 细胞中可见大量成簇或散在排列的直径约 50 nm 的球形空心颗粒, 即有 VLP 形成, 且 VLP 主要存在于细胞核, 胞质中也有少量表达(图 5)。

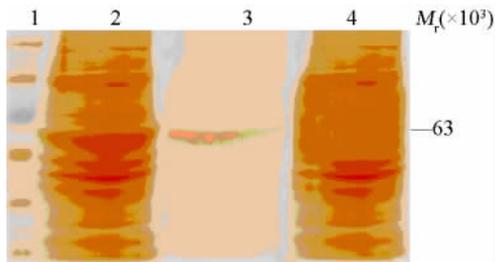


图 4 10%SDS-PAGE 分析 HPV18L1 蛋白纯化
Fig. 4 Expression of purified HPV18L1 proteins analyzed by 10% SDS-PAGE

1: Marker; 2: The unpurified HPV18L1 protein; 3: The purified HPV18L1 protein under the native conditions. The purified protein band is located at 63 000; 4: Sf-9 cells uninfected by HPV18L1 served as negative control

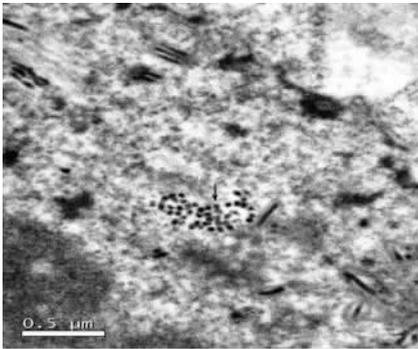


图 5 电镜观察转染重组 Bacmid DNA 的 Sf-9 细胞中的病毒颗粒

Fig. 5 Electron-micrograph of HPV18 VLP in recombinant transferred Sf-9 cells

Arrow indicates that 50 nm hollow spherical particles primarily located at nuclei

2.5 HPV18L1 蛋白的体外促红细胞凝集活性

天然条件下纯化的 HPV18L1 蛋白可引起小鼠红细胞凝集(图 6)。凝集程度随蛋白质量浓度的倍增而加强,蛋白作用的质量浓度依次为 0.25、0.5、1、2、4 ng/μl,蛋白质量浓度从 0.5 ~ 4ng/μl 可以观察到明显凝集效应。

3 讨论

随着免疫学和分子生物学的发展,疫苗的研发为宫颈癌的治疗提供了新方向。当然,针对宫颈癌的疫苗有很多种,从蛋白疫苗、多肽疫苗、核酸疫苗到借助于载体的疫苗如以腺病毒为载体的疫苗等。本课题选择制备以 VLP 为核心的预防性疫苗是因为它的理论背景成熟,大规模制备方法可靠,安全性

较高,免疫效果好,临床应用价值大。

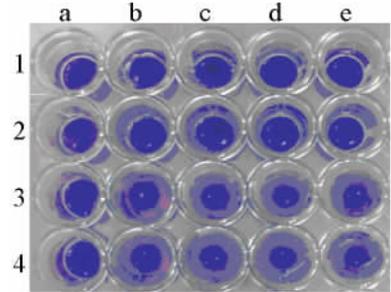


图 6 小鼠红细胞凝集试验分析 HPV18L1 的生物学活性
Fig. 6 Mouse erythrocyte hemagglutination assay of the HPV18L1 protein bioactivity

1: Blank control; 2: Negative control; 3,4: Purified HPV18L1 protein under native condition. 3-a, 4-a: 0.25 ng/μl; 3-b, 4-b: 0.5 ng/μl; 3-c, 4-c: 1 ng/μl; 3-d, 4-d: 2 ng/μl; 3-e, 4-e: 4 ng/μl

在众多表达系统中,本实验选择 Bac to Bac 表达系统是由于与其他表达系统相比,Bac to Bac 表达系统具有很多优越性^[3]:(1) 安全性。杆状病毒具有高度的种属特异性,不感染脊椎动物,相对于其他病毒载体,如腺病毒、痘病毒等载体而言,其安全性好。(2) 容量大。杆状病毒基因组较大,具有多个天然启动子,也易于构建新的人工启动子,可实现多基因表达,可容纳大片段外源基因,因此可同时插入多个外源基因,提高疫苗的免疫活性。(3) 表达效率高。与其他真核表达系统相比,杆状病毒系统可以高效地表达外源基因,表达量最高可达所感染细胞总蛋白量的 50%。(4) 表达产物具有生物活性。昆虫细胞对蛋白质表达后修饰加工的方式与哺乳动物细胞接近,能识别并正确地进行信号肽的切除及磷酸化、糖基化等反应,使重组蛋白在结构和功能上更接近天然蛋白,具有很高的生物活性,其抗原性、免疫原性均与天然蛋白相似。正是由于该表达系统具有的优点,目前已有病毒、细菌、真菌、动植物等多种生物基因在昆虫细胞或幼虫体内获得高表达。由于其可以容载大片段外源基因,可以使多个基因共表达,在疫苗研究中更具有优势,被认为是表达 VLP 的最佳系统。

在本实验中也进一步证实了 HPV VLP 可以高效稳定的在 Bac to Bac 表达系统中表达、组装。本实验中将目的 DNA 片段克隆入表达载体 pFastBac HTb,在所表达目的蛋白的氨基端带有 6 个组氨酸标签。由于组氨酸标签与 Ni-NTA 树脂具有很强的亲和力,从而可利用 Ni-NTA 树脂柱进行纯化。省

去了在 HPV VLP 制备中所使用超速离心等步骤,使高效快速大量的纯化目的蛋白成为可能。

本研究中将纯化后的 VLP 进行了小鼠红细胞凝集实验,可引发明显凝集效应,也进一步说明了目的蛋白的体外活性。当然为了证实其特定的免疫效应还将进行更有针对性的动物实验,这也是本研究正在进行的工作。

在临床研究方面,2002 年 Koutsky 等^[5]第一次用相关临床试验证实了 HPV16L1 VLP 免疫人体能有效预防 HPV16 感染及与 HPV16 相关的癌前病变,且没有明显的不良反应。2005 年 Villa 等^[4]用酵母表达系统制备的 HPV6、11、16、18 四价 L1 VLP 采用随机、双盲、多中心、安慰剂对照、大样本的方法进行了 II 期临床试验,结果表明,与安慰剂组相比,试验组患者的 4 种高危型 HPV 感染及相关疾病发生率下降 90% (95% CI 71-97, $P < 0.001$);安全性方面除了有头痛、紧张、注射局部与剂量相关的疼痛外无明显与疫苗相关的不良反应。国内尚无相关报道,这也将是本研究未来努力的方向。

在国内 HPV16 VLP 已有实验室研制成功,本实验室的 HPV16、HPV58 的研究也将接近尾声,联合 HPV18 VLP,中国人自己的三价预防性疫苗即将进入更深层次的实验。宫颈癌疫苗不需要进口的局面,相信就在不远的将来实现。

[参 考 文 献]

- [1] Sanclemente G, Gill DK. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2002, 16 (3):231-240.
- [2] Zhou J, Sun XY, Stenzel DJ, *et al.* Expression of vaccinia recombinant HPV16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles[J]. Virology, 1991, 185(1): 251-257.
- [3] 孙肖红,孙亚洲. 杆状病毒表达系统及其在 HPV 预防疫苗研究中的应用[J]. 国外医学:肿瘤学分册,2001, 28(2): 98 - 100.
- [4] Villa LL, Costa RL, Petta CA, *et al.* Prophylactic quadrivalent

human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 viruslike particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial[J]. Lancet Oncol, 2005, 6(5): 271-278.

- [5] Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, *et al.* A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine[J]. N Engl J Med, 2002, 347(21):1645-1651.
- [6] Cohen J. Public health. High hopes and dilemmas for a cervical cancer vaccine[J]. Science, 2005, 308(5722):618-621.
- [7] Schiller JT, Davies P. Delivering on the promise: HPV vaccines and cervical cancer[J]. Nat Rev Microbiol, 2004, 2(4): 343-347.
- [8] Mahdavi A, Monk BJ. Vaccines against human papillomavirus and cervical cancer: promises and challenges[J]. Oncologist, 2005, 10(7):528-538.
- [9] Koutsky LA, Harper DM. Chapter 13: Current findings from prophylactic HPV vaccine trials[J]. Vaccine, 2006, 24(Suppl 3): S114-S121.
- [10] zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(5): 342-350.
- [11] Frazer IH. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination[J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4(1): 46-54.
- [12] Jansen KU, Shaw AR. Human papillomavirus vaccines and prevention of cervical cancer[J]. Annu Rev Med, 2004, 55: 319-331.
- [13] 陈宏伟,郑 瑾,杨筱凤,等. 利用 His-杆状病毒表达系统制备 HPV16L1VLP[J]. 西北大学学报:自然科学版, 2005, 35 (1): 67-70.
- [14] 郑 滨,王健伟,姜惠英,等. 利用昆虫-杆状病毒表达系统表达人乳头瘤病毒 16 型 L1 蛋白[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2001, 15(4): 314-316.
- [15] 谢秋玲,张 玲,洪 岸,等. 杆状病毒表达系统在疫苗研究中的应用[J]. 中国公共卫生, 2004, 20(3): 367-369.
- [16] 李文生,郑 瑾,刘红莉,等. 截短型人乳头瘤病毒 58 型 L1 蛋白的表达及其体外生物活性研究[J]. 生物工程学报, 2004, 20(4): 536-539.
- [17] Lowy DR, Schiller JT. Prophylactic human papillomavirus vaccines [J]. J Clin Invest, 2006, 116(5): 1167-1173.
- [18] Villa LL. Prophylactic HPV vaccines: reducing the burden of HPV-related diseases[J]. Vaccine, 2006, 24(Suppl 1): S23-S28.
- [19] Stanley M, Lowy DR, Frazer I, *et al.* Chapter 12: Prophylactic HPV vaccines: underlying mechanisms[J]. Vaccine, 2006, 24 (Suppl 3): S106-S113.

[收稿日期] 2007 - 03 - 15 [修回日期] 2007 - 05 - 15
[本文编辑] 郁晓路

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对论文中实验动物描述的要求

根据国家科学技术部 1988 年颁布的《实验动物管理条例》和卫生部 1998 年颁布的《医学实验动物管理实施细则》,本刊对论文中有关实验动物的描述,要求写清楚以下事项:(1) 品种、品系及亚系的确切名称;(2) 遗传背景或其来源;(3) 微生物检测状况;(4) 性别、年龄、体重;(5) 质量等级及合格证书编号;(6) 饲养环境和实验环境;(7) 健康状况;(8) 对动物实验的处理方式。

医学实验动物分为四级:一级为普通级;二级为清洁级;三级为无特定病原体(SPF)级;四级为无菌级(包括悉生动物)。省部级课题及研究生毕业论文等科研实验必须应用二级以上的实验动物。