

# 从0到1：手把手教你设计繁育方案

制定一份有效的繁育方案显得尤为重要。怎么才能用最快速度、最高效率、最少成本来获得自己想要的新品系呢？今天，我们就来详细分解。

基因敲除、条件性基因敲除、点突变、条件性点突变、基因敲入、点突变等等，各种类型的小鼠模型越来越多地被应用到生物医学研究中。同时，获得新的基因修饰小鼠也变得越来越大容易。这让我们能够**组合出更多全新的小鼠模型，让多种功能或多种遗传改变能最终在同一只小鼠上实现**。比如，在一个A基因点突变的小鼠上敲除B基因、同时还带有另一种细胞示踪的荧光标记。

听上去很酷！仔细想想，这意味着需要将3种甚至4种小鼠品系交配到一起。真的繁育起来可就不是那么简单了，很可能会弄得手忙脚乱。

**因此，制定一份有效的繁育方案显得尤为重要。怎么才能用最快速度、最高效率、最少成本来获得自己想要的新品系呢？今天，我们就来详细分解。**



## 基础：孟德尔定律与旁氏表

旁氏表（Punnett square），也叫棋盘法，是用于预测特定杂交或育种实验结果的一种图表，可以预测后代中拥有特定基因型的概率。

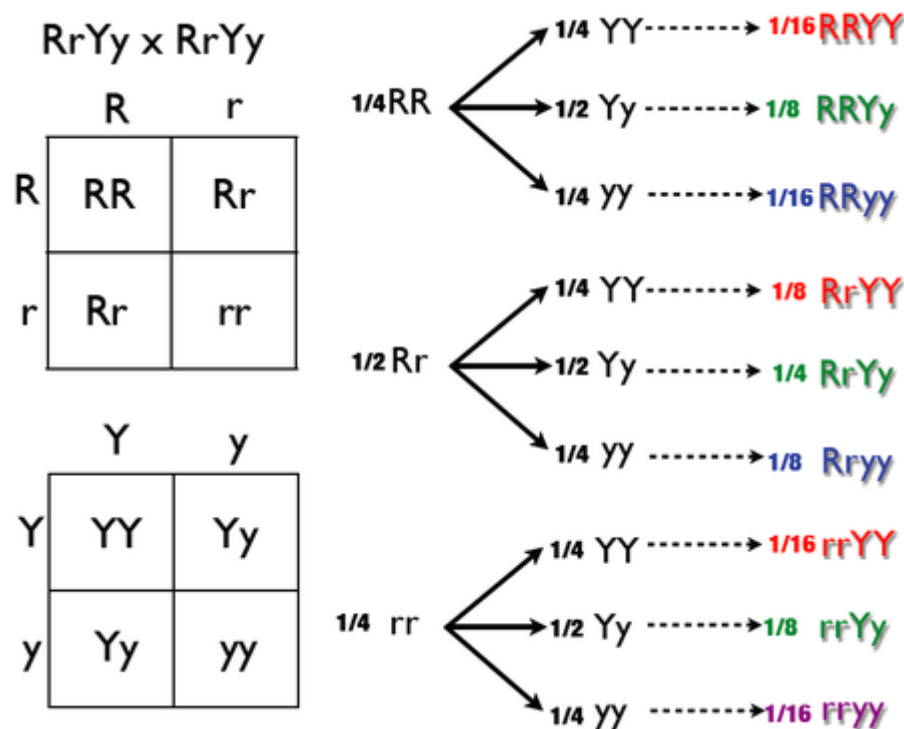
		母系	
		B	b
父系	B	BB	Bb
	b	Bb	bb

单基因杂交旁氏表示例，每个后代个体拥有基因型BB、Bb及bb的概率分别为25%、50%及25%。

	RY	Ry	rY	ry
RY	RRYY	RRYy	RrYY	RrYy
Ry	RRYy	RRyy	RrYy	Rryy
rY	RrYY	RrYy	rrYY	rrYy
ry	RrYy	Rryy	rrYy	rryy

双基因旁氏表示例。

推荐使用树形图，因为树形图对于双/多基因杂交的情况会更为直观、方便。



## 第一步：确定基因型

确定繁育方案的第一步，也是最关键的一步，是确定实验和对照组所需要的小鼠基因型。无论是只有单基因突变或者转基因，还是涉及到多个基因，都需要在开始繁殖之前清楚地明确自己的最终目标。

“在目标设定不明确时就匆忙开始进行繁育”这是非常不正确的做法，却又是很多同学容易犯的错误。这会导致很多后续的问题，比如：产生所需小鼠的比例过低、没有产生适合的对照小鼠等等。

今天，我们以常见的条件性基因敲除Cre-lox系统为例：

- 实验组小鼠：flox（带有loxP位点的基因）纯合子，以及Cre杂合子

- 对照组小鼠：flox（带有loxP位点的基因）纯合子，以及Cre阴性（野生型）

## 第二步：倒推法上溯繁育路线

确定了最终的小鼠基因型后，就可以倒推一代，找到一种最高效的终端交配方式，能够最大程度同时获得实验组与同窝对照组小鼠。

你可以这样考虑：

- 1) 找到实验组与对照组之间的共有目标等位基因。如果可以的话，把这个共有目标等位基因变成纯合子。
- 2) 分别对每个等位基因进行杂交，然后把它们合并起来。

### 以常见的条件性基因敲除Cre-lox系统为例：

实验组和对照组都是flox（带有loxP位点的基因）纯合子，因此flox就是共有等位基因。由于两组都需要flox纯合子，因此最高效的方式是通过flox纯合子来繁育flox纯合子。对于Cre基因，我们需要Cre杂合子和不带Cre（阴性）的野生型。如果通过Cre杂合子与野生型交配，那么预期产生50%杂合子和50%野生型。

也就是，

flox纯合子 X flox纯合子

	flox	flox
flox	flox / flox	flox / flox
flox	flox / flox	flox / flox

Cre 杂合子 X Cre阴性野生型

	Cre <sup>+</sup>	Cre <sup>-</sup>
Cre <sup>-</sup>	Cre +/-	Cre -/-
Cre <sup>-</sup>	Cre +/-	Cre -/-

如此，最高效的终端交配方式就是：

### flox纯合子； Cre 杂合子 X flox纯合子； Cre阴性野生型

这样我们可以获得50%实验组基因型小鼠和50%对照组基因型小鼠（这里没有考虑小鼠性别）。

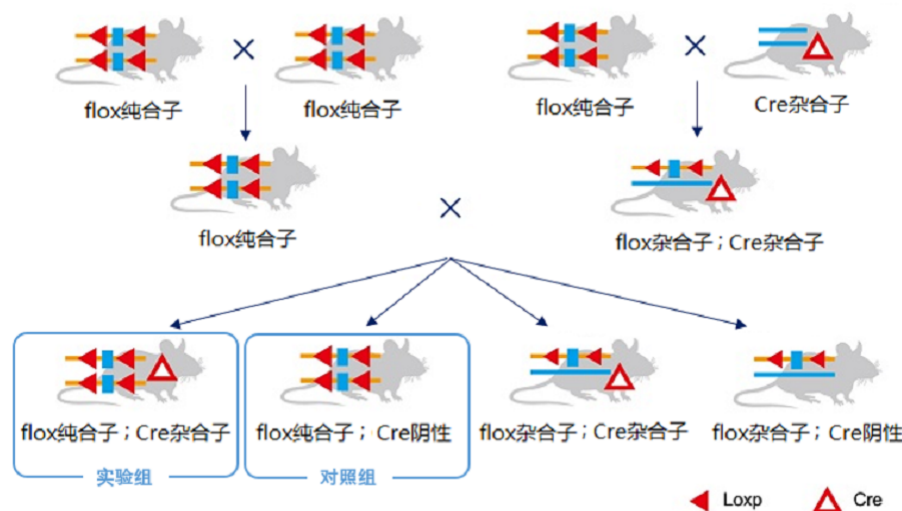
如果看过我们的繁育手册的童鞋们可能要问了，为什么手册上没有直接画出这个高比例的方式呢？

原因是，这里flox纯合子；Cre杂合子基因型的小鼠既是我们最终目标的实验组，又是终端交配的亲代。而flox的基因在Cre重组酶作用后被敲除，可能已经产生了一些表型影响到生殖或发育，因此并不是每一种flox纯合子；Cre杂合子都适合用于作为繁育的亲代。

接下来继续向上反溯亲代的杂交方式，直到现有小鼠的基因型。通常来说，可以的话尽量获得并使用纯合子。这样既能高比例的获得带有突变的子代，又能减少繁育中使用小鼠的数量。

### 再次以Cre-lox系统为例：

- 1) 将flox纯合子与Cre杂合子杂交，可产生50% flox杂合子；Cre杂合子。
- 2) 将flox杂合子；Cre杂合子与flox纯合子杂交，可产生25% flox纯合子；Cre杂合子小鼠和25% flox纯合子；Cre阴性小鼠。

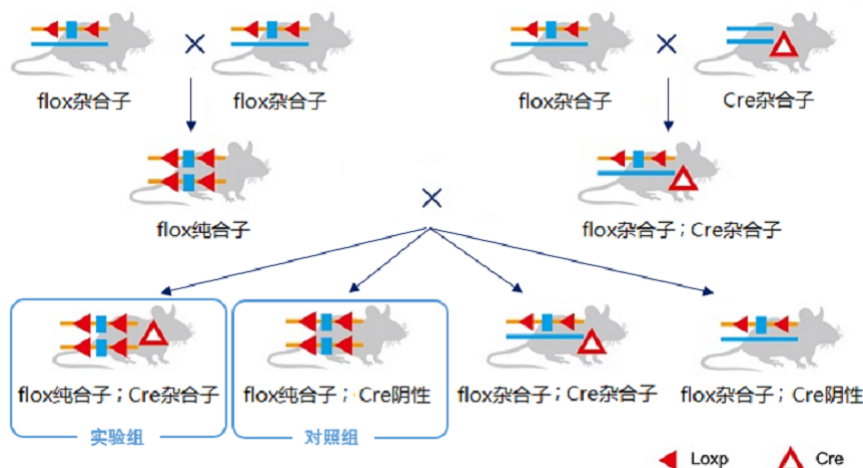


细心的你可能又发现了，这个图好像还是跟繁育手册上的不太一样嘛。为什么呢？

**因为起点不同。**这种最高效的繁育方式的起点是已经获得了足够数量的flox纯合子。flox纯合子又是怎么获得的呢？最初可以通过flox杂合子与flox杂合子交配，概率是25%。

所以，如果以flox杂合子作为繁育的起点，那么flox杂合子；Cre杂合子也可以通过flox杂合子与Cre杂合子交配获得，概率是25%。

我们再顺着捋一捋这个过程，就可以大致得到下面的这张繁育路线图：

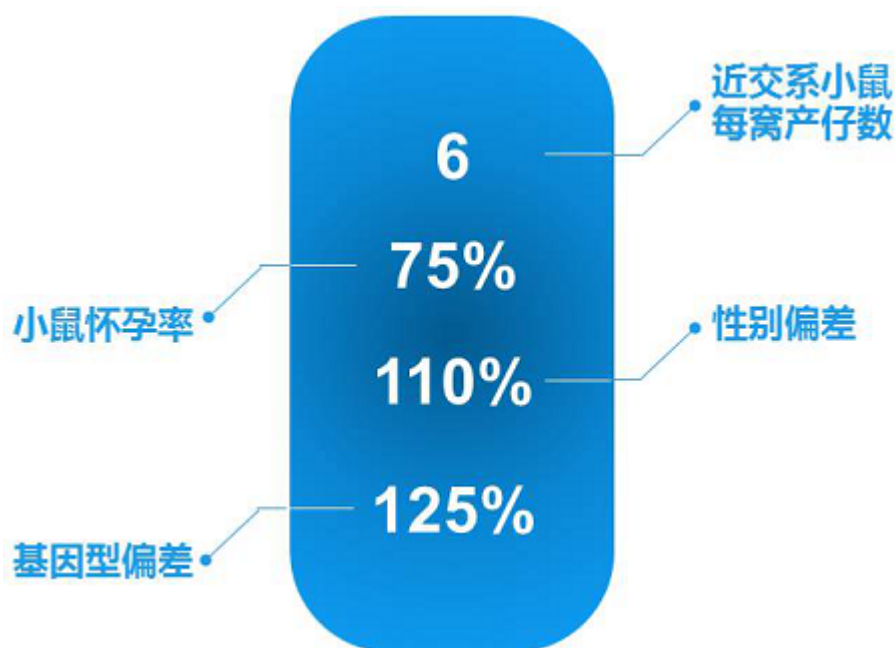


当然这并不是唯一的繁育路线。事实上，繁育路线的选择还受到很多其它因素的影响，例如：

- 在涉及两个以上基因的时候，要考虑到它们是否在不同的染色体上？如果在同一条染色体上，就可能会使繁育计划受限。
- 如果某一种基因型由于突变的基因或插入的基因影响小鼠的生殖或直接引发致死，那么需要相应地调整亲代的基因型来避免繁育的中断。
- 对于条件性过表达（Rosa26-LSL-geneX）这类小鼠模型，一般最终不需要flox纯合子；Cre杂合子，只需要flox杂合子；Cre杂合子即可。因此繁育过程会简单很多。
- 对于利用广泛表达的Cre或生殖细胞表达的Cre与flox小鼠交配来获得全身性基因敲除小鼠，精子和/或卵母细胞中的flox序列会被Cre删除，并将删除后的等位基因传递给它们的后代。一旦证明Cre介导的序列敲除已经传递给下一代，最好通过繁育的方法把Cre基因从子代当中去除。

设计完繁育路线，我们就可以在此基础上大致估算需要使用的小鼠数量与整体规模。成本与预算也就基本心里有数了。

这里有几个系数会帮助我们估算完成整个繁育计划所需小鼠的数量。



估算公式：

$$\text{实际产仔数} = \frac{\text{合笼母鼠数} \times 75\% \times 6}{110\% \times 125\%}$$

如果您没有时间管理或易或难的育种项目，[南模生物繁育服务](#)可以帮您~ 我们的专业饲养与育种团队可以轻松、经济地为您管理您的小鼠，为您繁育新的品系、快速扩大种群规模、大量获得您需要的实验组与对照组。

如果您想了解更为详细的繁育策略，也可以进入资源与支持-产品手册，查看手册[《基因工程小鼠定制与繁育常见问题解答》](#)。