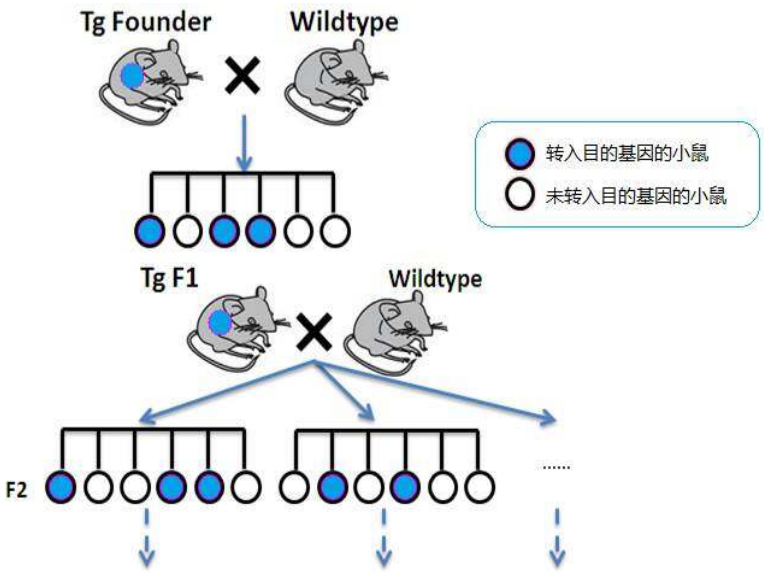
【小鼠大学问】养小鼠你要知道的那些事（三）：基因工程小鼠繁育方案

转基因

重点：转基因阳性小鼠与野生型小鼠交配 TG × WT

这里说的转基因，并非广义上的所有的基因修饰，而是特指外源基因随机地整合到小鼠染色体上获得的随机插入转基因小鼠。

通过受精卵显微注射的方式，通常我们会获得很多个带有外源基因插入的首建鼠（Founder）。每一个首建鼠，外源基因插入的位置或次数都是不同的。所以每个首建鼠都应该自成一系，也就是我们说的建系。



每一个 Founder 鼠分别与野生型（WT）小鼠（比如，常用的C57BL/6J）交配，获得的 F1子代；经过鼠尾基因型鉴定后，F1代中的阳性小鼠保留并再与野生型小鼠交配，获得 F2子代；F2代阳性小鼠保留再与野生型小鼠交配，获得 F3子代；以此类推。一个 Founder 鼠产生的子代，称为一个系。一般以 Founder 鼠的编号命名，比如：3号 Founder 获得的后代阳性小鼠，称为 3系。

F1代中可能出现一窝小鼠没有一只是阳性的情况。这是由于外源基因的整合可能发生在多细胞期，导致 Founder 小鼠中并不是所有细胞（包括生殖细胞）都有外源基因的整合，而是呈嵌合状态。先别急着扔掉这个 Founder 鼠，因为它仍然有可能是个阳性的 Founder，可以再试着多配几窝。除非你的 Founder 鼠多到用不完... Lucky you！

还有几点需要引起注意！

Founder 鼠之间不能相互交配。

通常转基因小鼠的基因型鉴定方法只能判断有无外源基因的整合（即阳性或阴性），并不能判断某特定位点的纯合或杂合。

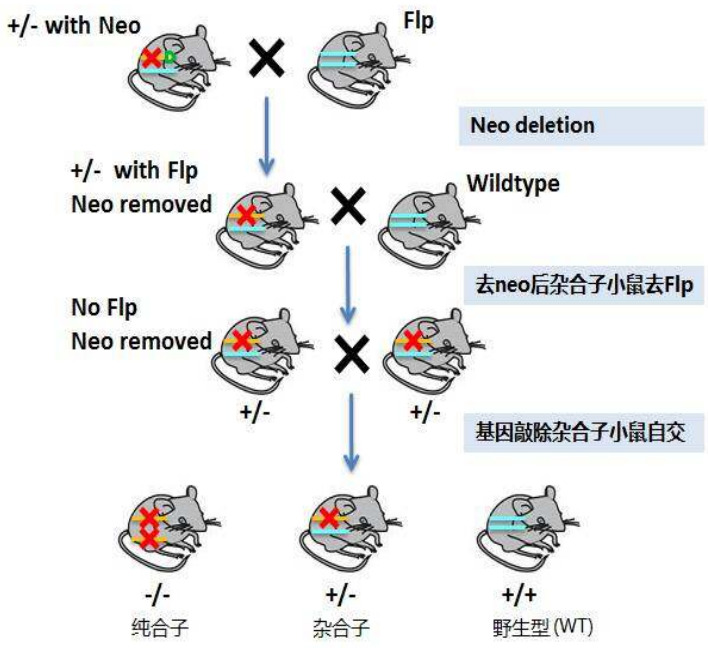
阳性子代小鼠之间也不建议相互交配。

基因型阳性并不等于表达阳性，所以交配到F2代以上，还需要对每个系中的部分小鼠进行外源基因表达的检测，筛选到符合实验要求的转基因系。

基因敲除/敲入

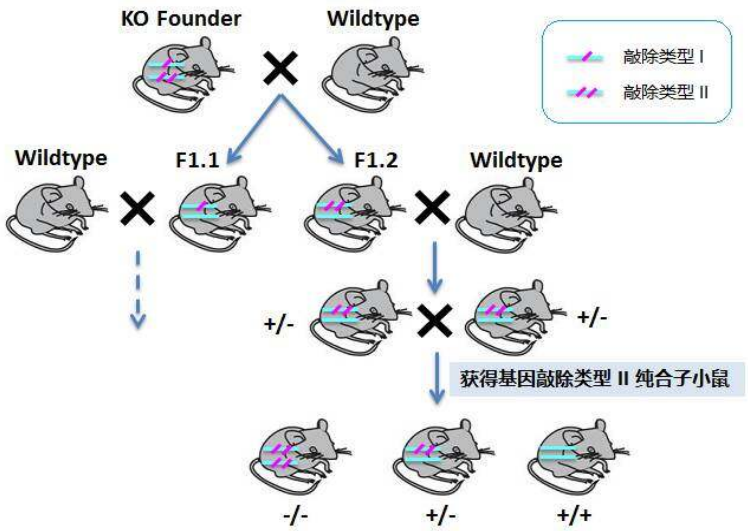
重点：杂合子与杂合子交配，获得纯合子+/- × +/- → -/-

对于采用 ES细胞打靶途径获得的基因敲除（KO）小鼠，在 Flp 重组酶去除 Neo 抗性基因以后，可以通过 KO 杂合子（+/-）之间相互交配的方式获得1/4KO 纯合子小鼠（-/-）、1/2 KO 杂合子小鼠（+/-）以及1/4同窝野生型对照小鼠（WT）。繁育流程如下图所示：



该路径同样也适用于基因敲入（KI）小鼠。

需要指出的是，对于利用 CRISPR/Cas9 介导的 NHEJ 途径获得的 KO 小鼠，情况有所不同，方案类似于转基因小鼠的繁育。由于 NHEJ DNA修复的结果是随机发生的，所以每一只 KO Founder 小鼠、甚至一只 Founder 中每个细胞的基因型都可能是不同的。因此，KO Founder 要与野生型小鼠（比如：C57BL/6J）交配，获得基因型明确的 F1子代 KO 杂合子（+/-）小鼠。随后，才能进行杂合子小鼠的相互交配。



注意事项:

不同的 KO Founder 之间不能相互交配。

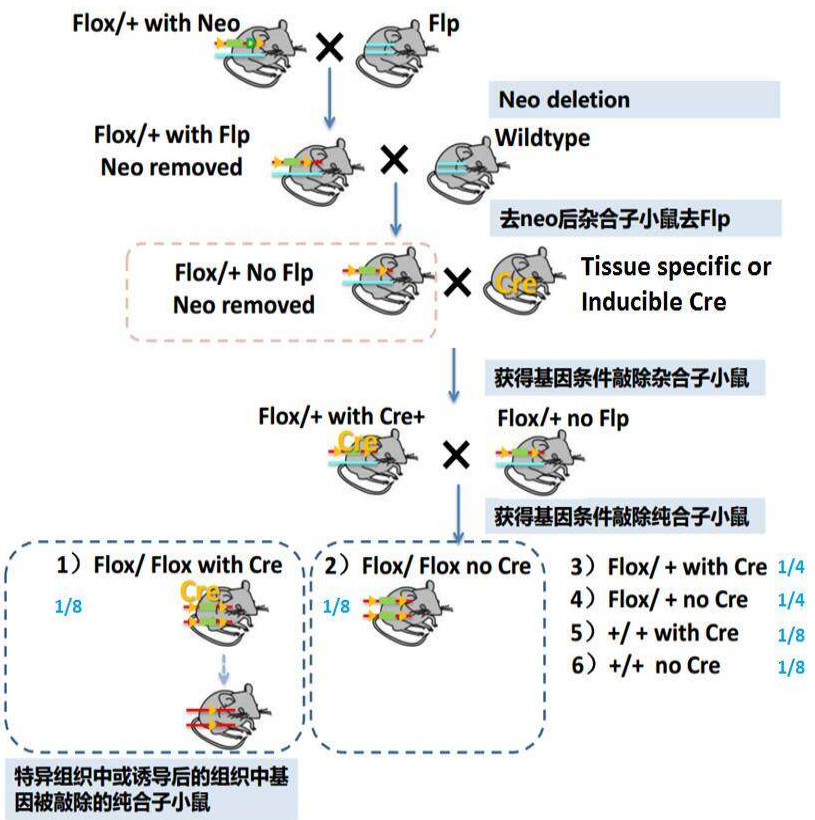
不同的 KO Founder 的子代之间也不建议相互交配。

南模生物可提供小鼠繁育服务，或者直接与我们的应用技术顾问联系，咨询更多服务细节。

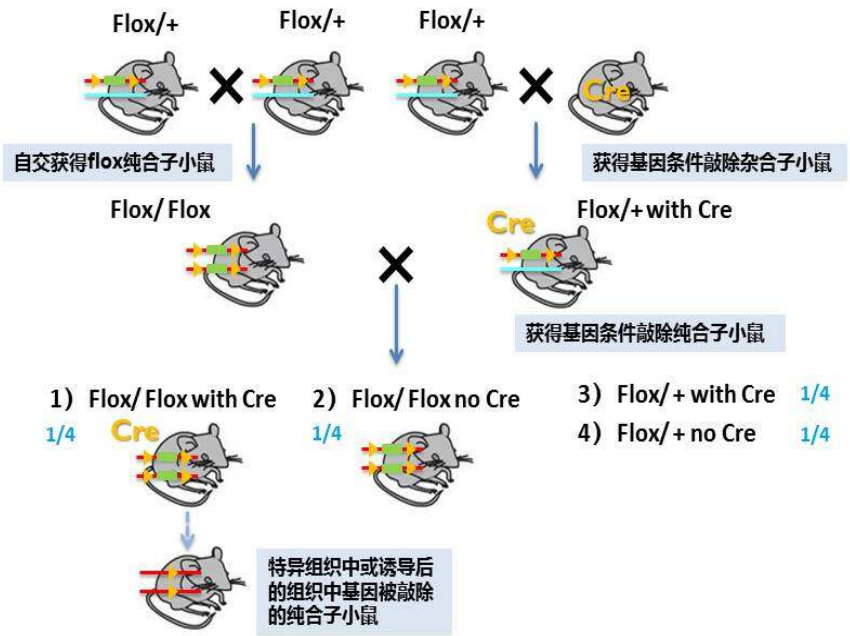
条件性基因敲除

重点：获得 flox 纯合同时 Cre 阳性的小鼠（f/f；Cre-）×（f/+；Cre+）→ f/f；Cre+

Flox 小鼠在去除 Neo 基因以后（CRISPR/Cas9 途径获得的 CKO 小鼠省略此步骤），获得仅含有两个 loxP 位点的 flox 杂合子小鼠（flox/+，可缩写成 f/+）。flox 杂合子（f/+）小鼠与组织特异性或诱导型 Cre 阳性（Cre+）小鼠交配，获得 flox 杂合同时带有 Cre （f/+；Cre+）的小鼠，再与 flox 杂合子（f/+）交配，这样最终可以获得1/8的 flox 纯合且带有 Cre 的条件性基因敲除小鼠（f/f；Cre+）。

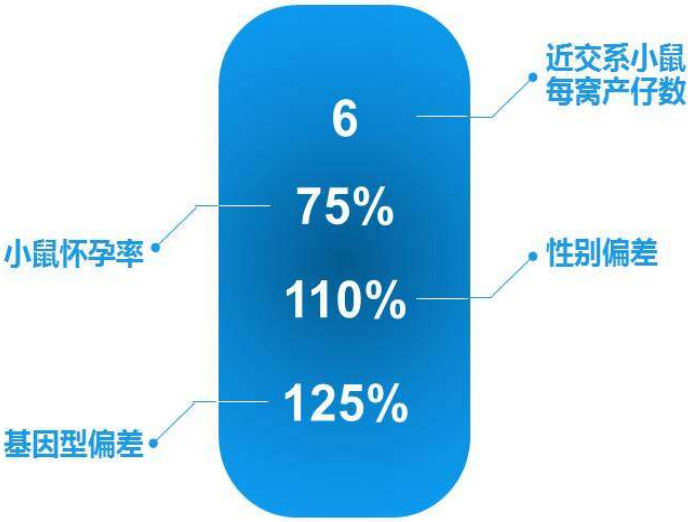


是不是觉得1/8的比例太低了？那可以用下面的方法，轻轻松松将效率提高一倍。很简单，在繁育f/+；Cre+的同时，繁育 flox 纯合子（f/f），再将这两种小鼠相互交配。这样，就可以获得1/4的f/f；Cre+ 敲除小鼠啦。



最后，资深达人才知道的小贴士：

在设计繁育路线、估算繁育规模的时候，有几个系数会帮助你更顺利地获得足够数量的实验组与对照组：



估算公式：

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