



南模生物
S H A N G H A I
M O D E L O R G A N I S M S

基因工程小鼠定制与繁育

常见问题解答

FAQ



常见问题 Q&A

什么是基因工程小鼠？	3
需要多长时间才能获得资源库中的基因工程小鼠模型？	3
委托公司定制基因工程小鼠需要什么材料？	3
什么是 AAALAC 认证？	3
什么是 SPF？	3
什么是近交系？	3
什么是远交系 (封闭群)？	3

基因工程小鼠繁育专题

如何获知小鼠繁育情况？	5
一般需要几对小鼠用于品系繁育？	5
如果小鼠繁殖遇到困难，该怎么办？	5
为什么要使用哨兵鼠？	5
获得转基因首建鼠后如何建系？	6
获得普通基因敲除或基因突变小鼠后如何进行下一步繁殖？如何选择实验对照小鼠？	7
获得条件性基因敲除小鼠后如何进行下一步繁殖？如何选择实验对照小鼠？	8
什么是 CreERT2？	11
Cre 品系只在特定的细胞或组织中有切割活性？	11
所有 Cre 品系的敲除效率均可预测？	11
无论是从父本还是母本遗传的 Cre 基因，Cre 重组效率都是一样的吗？	11
仅表达 Cre 基因的小鼠有不良表型吗？	11

基因工程小鼠鉴定专题

如何鉴定基因工程小鼠的基因型？	12
为什么在进行基因型鉴定时没有条带或有非特异性条带？	12
对普通基因敲除小鼠如何设计基因型鉴定引物？	12
对条件性基因敲除小鼠如何设计基因型鉴定引物？	13
CRISPR/Cas9 Knockout 小鼠基因型鉴定方法	14
CRISPR/Cas9 点突变小鼠基因型鉴定方法	15

常见问题 Q&A

Q 什么是基因工程小鼠？

基因工程小鼠，也叫遗传工程小鼠（Genetically Engineered Mouse Models），是指通过基因工程技术手段，对小鼠基因组进行一定的人为修饰，由此产生具有特定表型或特征的小鼠。是研究基因功能、人类疾病的最主要的动物模型。

常见基因工程小鼠有：基因敲除、条件性基因敲除、基因敲入（点突变或片段敲入）、转基因、定点转基因（过表达）等。可根据您的不同需求定制基因工程小鼠模型。

Q 需要多长时间才能获得资源库中的基因工程小鼠模型？

若该品系有“活体库存”，则表示该品系目前有可直接用于繁殖的活体小鼠。可根据客户需求直接提供或繁殖后提供。若该品系为“胚胎冻存”状态，则表示该品系小鼠需要复苏，一般复苏周期为 3 个月。

Q 委托公司定制基因工程小鼠需要提供什么材料？

您只需要提供您要敲除或修饰的基因名以及特殊要求。我们将根据您的要求初步设计定制方案，在双方认可后签订技术服务合同。您可以将基因名及具体要求通过邮件发送到 info@shmo.com.cn；或拨打免费热线：400-728-0660，我们的技术顾问将竭诚为您服务。

Q 什么是 AAALAC 认证？

AAALAC 全称是 Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care，中文名为国际实验动物评估和认可委员会（国际实验动物饲养评估认证协会）。AAALAC International 认证是实验动物质量和生物安全水准的象征，也是国际前沿医学研究的质量标志，表明对人道护理动物的真正承诺，是动物使用及生产单位参与国际交流和竞争的重要基础条件。

Q 什么是 SPF？

SPF 是 Specific-pathogen-free 无特定病原体的缩写，指不携带可能干扰实验的特定病原体 and 寄生虫的动物，需饲养于屏障系统中，实施严格的微生物和寄生虫控制。SPF 级动物作为国际公认的标准实验动物，可广泛应用于生命科学与医学科研实验。

Q 什么是近交系？

经连续 20 代（或以上）的全同胞兄妹交配（或者亲代与子代交配）培育而成，近交系数应大于 99%，品系内所有个体都可追溯到一对共同祖先。特点：遗传背景均一，实验结果一致性好；近交系由于近交衰退，生活力弱，对饲养环境要求高，产仔少，营养要求高。常用的 C57BL/6、Balb/c、FVB 都属于近交系。

Q 什么是远交系（封闭群）？

在一定群体内，以非近亲交配方式育成的动物品系，且连续 15 代不从外部引入新的动物种群。特点：遗传背景具有群体均一性，但个体各异，实验能够反映特定群体遗传背景下的情况；繁殖能力强，环境适应能力强。



基因工程小鼠繁育专题

Q 如何获知小鼠繁育情况？

小鼠资源库中的繁育代数信息说明如下：

N：表示小鼠回交代数。例如：N1 表示回交第 1 代；N2 表示回交第 2 代。

F：表示子代数或近交代数（同窝交配）。例如：F1 表示子一代；F2 表示子二代。

p：表示所示代数为胚胎保存时的代数。例如：F3p 表示该品系在子三代时冻存了胚胎。

Q 一般需要几对小鼠用于品系繁育？

一般来说，至少需要 2-4 对育龄小鼠用来进行品系的繁育。若特殊品系的小鼠有生育缺陷或需要加快繁育速度，那么可以扩大交配数量。或采用 IVF 快速繁育方法，则只需要提供 2-3 只有生育能力的雄鼠即可。

Q 如果小鼠繁殖遇到困难，该怎么办？

当小鼠繁殖过程出现子代数数量减少、甚至不产仔的情况，可考虑是否有以下几个方面的问题：

- **饲养环境噪音过大**：在小鼠的繁殖饲养过程中，应尽量减少噪音，保证小鼠在安静的环境中生活
- **孕鼠受到外界压力刺激**：母鼠在怀孕后应尽量减少对孕鼠的操作和环境改变，孕鼠及哺乳期的母鼠在受到外界刺激后可能出现食仔或弃养幼仔的情况
- **雄鼠与雌鼠合笼时间过短**：应尽量保证雄鼠雌鼠的合笼时间，以增加交配几率。另外，孕鼠临产时不要从笼中取出交配雄鼠，也不要子代小鼠未断奶前将雄鼠重新放入繁殖笼内
- **增加环境暗度**：避免在夜晚节律中有不必要的亮光，影响小鼠的昼夜节律
- **无法筑巢**：在笼中提供柔软的纤维材料，如：棉絮、纸巾或软木絮等，有助于提供安全舒适的生产环境，提高产量
- **营养缺陷**：小鼠饮食中若脂类成分过高或过低、蛋白质摄入不足或过剩都会影响小鼠生育。另外，可适当提供生育酚的来源，如：瓜子、坚果等

Q 为什么要使用哨兵鼠？

哨兵鼠主要是指将背景健康的外源小鼠引入重要的繁殖饲养群体，通过直接接触目的鼠或间接接触脏垫料的方式对饲养区域进行病原微生物的检测，并替代重要饲养群体进行健康体检的一类小鼠。通常未受特定病原污染的大于 4w 以上健康小鼠（免疫缺陷鼠除外）可选作哨兵鼠。哨兵鼠的品系可根据需要选择，如：ICR（CD1）、BALB/c、FVB、C57BL/6 等等。哨兵鼠一般 2-3 只一笼，放置于所在笼架的最后一个回风位。一般一笼哨兵动物监控 60-100 笼的饲养架。哨兵鼠所用的垫料为这些饲养笼中其它小鼠生活过的脏垫料大约每笼 30-50 g，且必须在脏垫料内至少持续生活 4 周以上。一般国标规定三个月为一个检测周期，通过对哨兵鼠的检测，可以在不影响实验动物的情况下，实时监控环境中病原体的状况，保证实验动物健康和质量标准化，保障实验研究获得可重复的结果。哨兵动物检测也有局限性对于通过空气传播的，非接触性传播的病原微生物会漏检。如仙台病毒，嗜肺巴斯德杆菌等。因此建议对于随机动物也要进行检测。

Q 获得转基因首建鼠后如何建系？

在获得转基因首建鼠之后，可以根据以下流程来建立转基因品系。

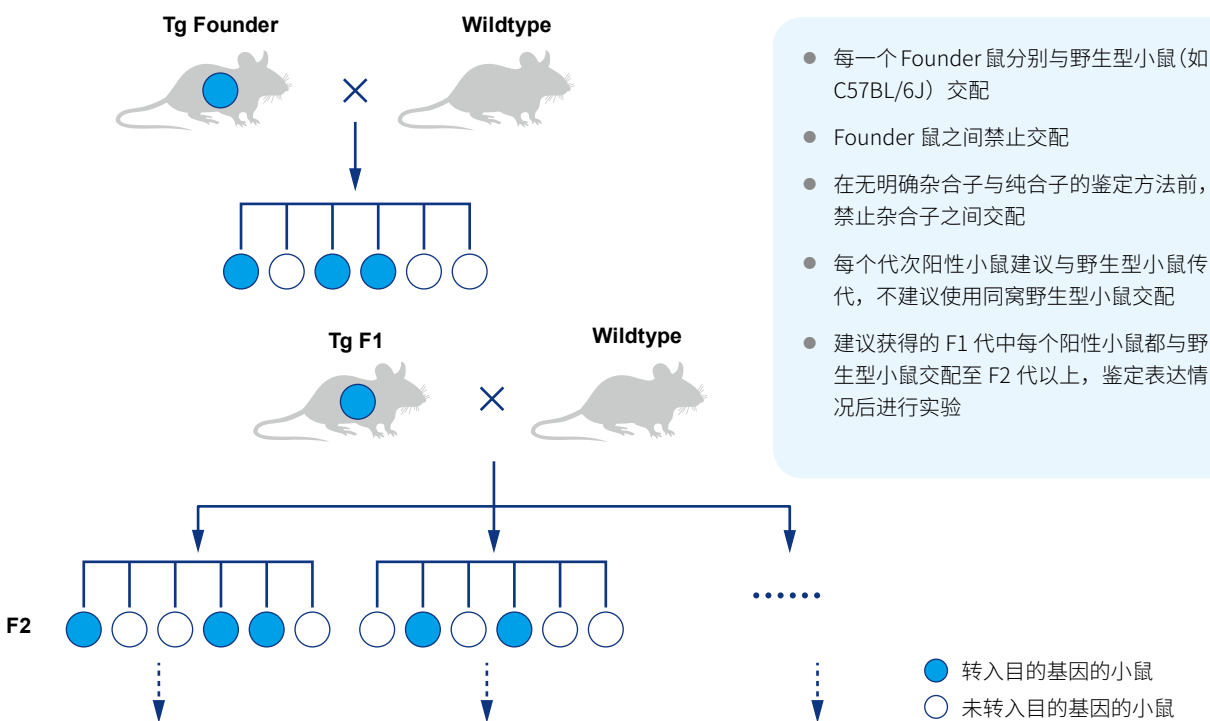


图 1. 随机插入转基因小鼠建系过程。

Piggybac 转座酶系统介导的转基因需注意

Piggybac 转座酶倾向于将目的片段插入到转录活跃的区域，大大提高了获得目的基因表达阳性 Founder 鼠的概率，但 Piggybac 转座酶系统介导的基因插入存在多位点整合的可能。由于多位点整合的存在，在 Founder 鼠后续传代繁育的过程中，伴随多整合位点的分离，会出现以下现象：**1.** 基因型鉴定阳性小鼠比例高于单位点插入；**2.** 后代阳性小鼠目的基因表达量较 Founder 鼠低（表达降低的量依赖于 Founder 鼠中整合位点的数量和整合位置），且相互之间不一致。故建议：每个 Founder 鼠与野生型小鼠至少回交繁殖 2-3 代以获得外源基因单位点整合，且稳定表达的转基因小鼠。

Q 获得普通基因敲除或基因突变小鼠后如何进行下一步繁殖？如何选择实验对照小鼠？

对于近交系背景的基因敲除或基因突变小鼠而言，一般采用杂合子与杂合子交配的方式获得纯合子基因敲除或突变小鼠。此时，一般选择同窝出生的野生型或杂合子小鼠作为实验对照组。

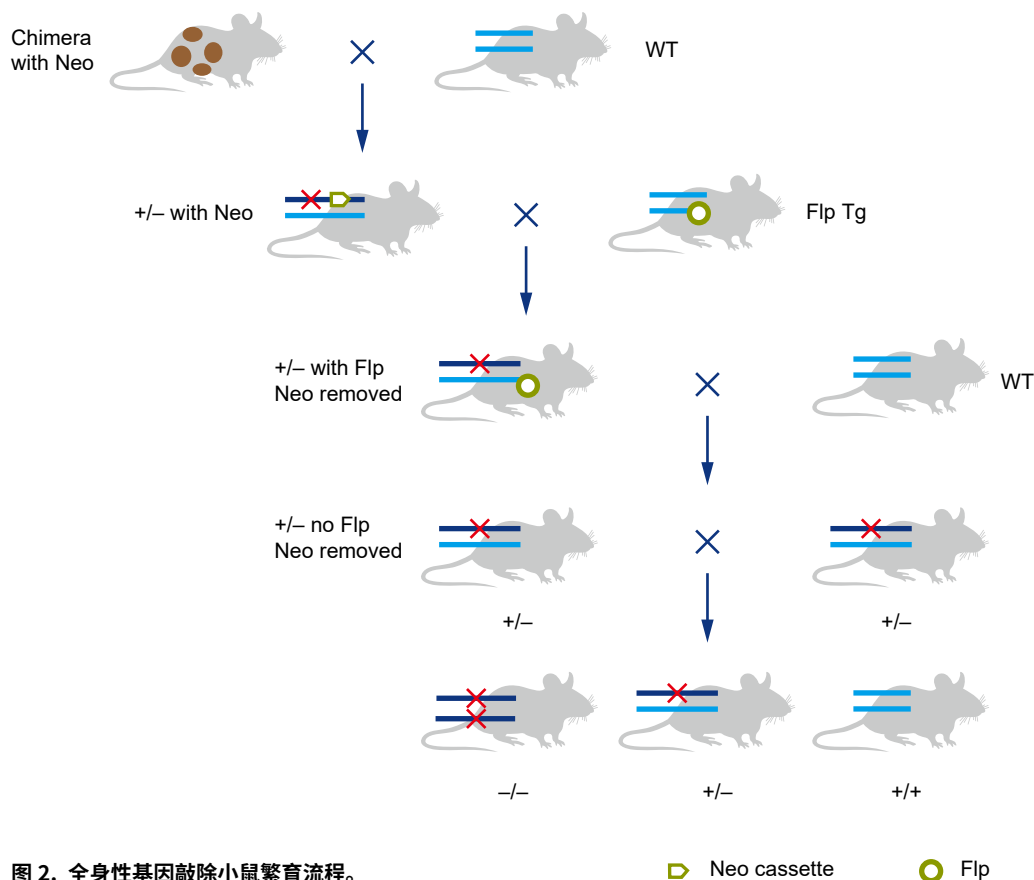


图 2. 全身性基因敲除小鼠繁育流程。

基因敲除小鼠去 neo

如果基因功能可能完全丧失且基因组周边无紧邻的其他基因，可以选择不去 neo；如果只是敲除某个功能域，可能有部分功能的蛋白出现，或者敲除基因周边有其他基因存在，建议必须去 neo，以免出现并不是该基因敲除的表型。在时间充裕的情况下，为避免 neo 引发的其他表型，建议去除 neo 基因。

Q 获得条件性基因敲除小鼠后如何进行下一步繁殖？如何选择实验对照小鼠？

条件性基因敲除小鼠（也叫 Flox 小鼠）是指在目的基因中含有成对的 loxp 位点的小鼠，与 Cre 工具小鼠交配后可在特定的组织或细胞中敲除目的基因。

方案一

若 Flox 小鼠与广泛表达或生殖细胞特异 Cre 小鼠交配，则可以获得全身基因敲除的 KO 小鼠，繁育流程如图所示。ES 打靶载体中筛选基因 neo 在两个 loxp 之间，不需要单独去 neo，结构为 5' arm-loxp-flox-frt-neo-frt-loxp-3' arm，直接配生殖腺表达的 Cre 可同时去除 neo 基因。

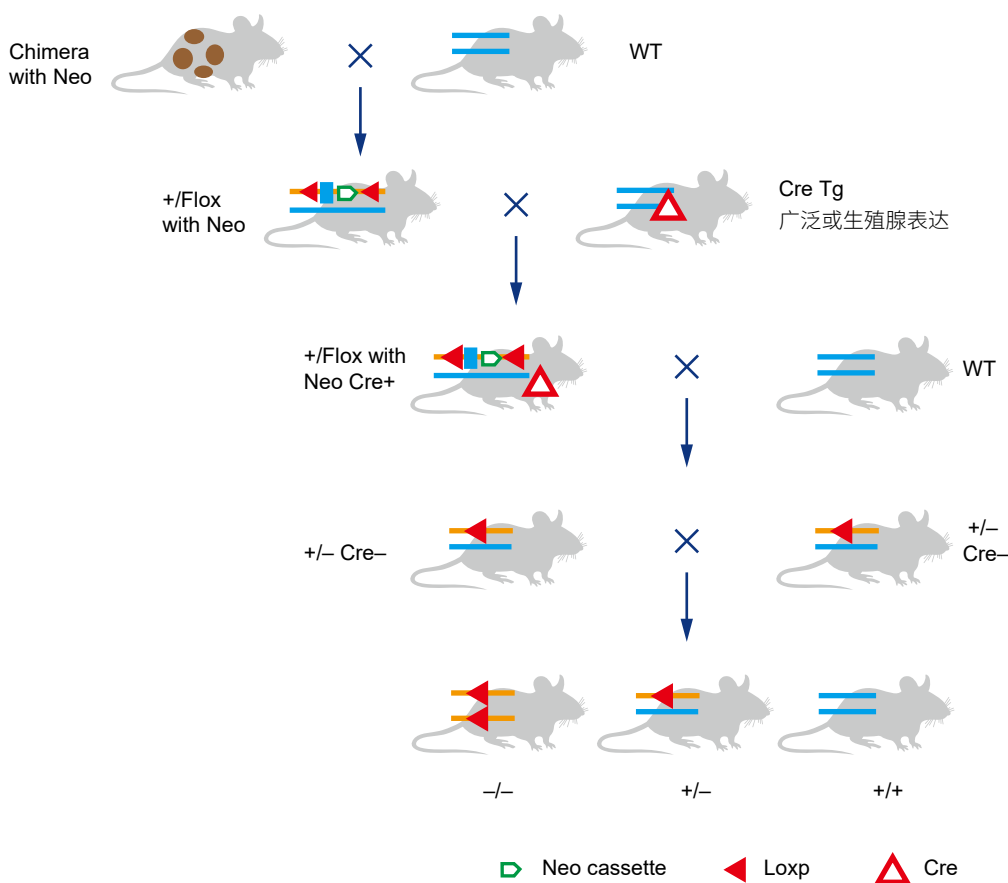


图 3. 由条件性基因敲除小鼠获得全身性基因敲除纯合子小鼠繁育流程。

方案二

若与组织特异性 Cre 小鼠交配，则可以按照图 4 所示流程进行繁殖，一般采用转入 Cre 重组酶的 flox 杂合子小鼠与 flox 杂合子小鼠交配的方式获得 Cre 酶整合的 flox 纯合子条件基因敲除小鼠。此时，一般选择同窝出生的 Cre 酶未整合的 flox 纯合子小鼠作为实验对照组。

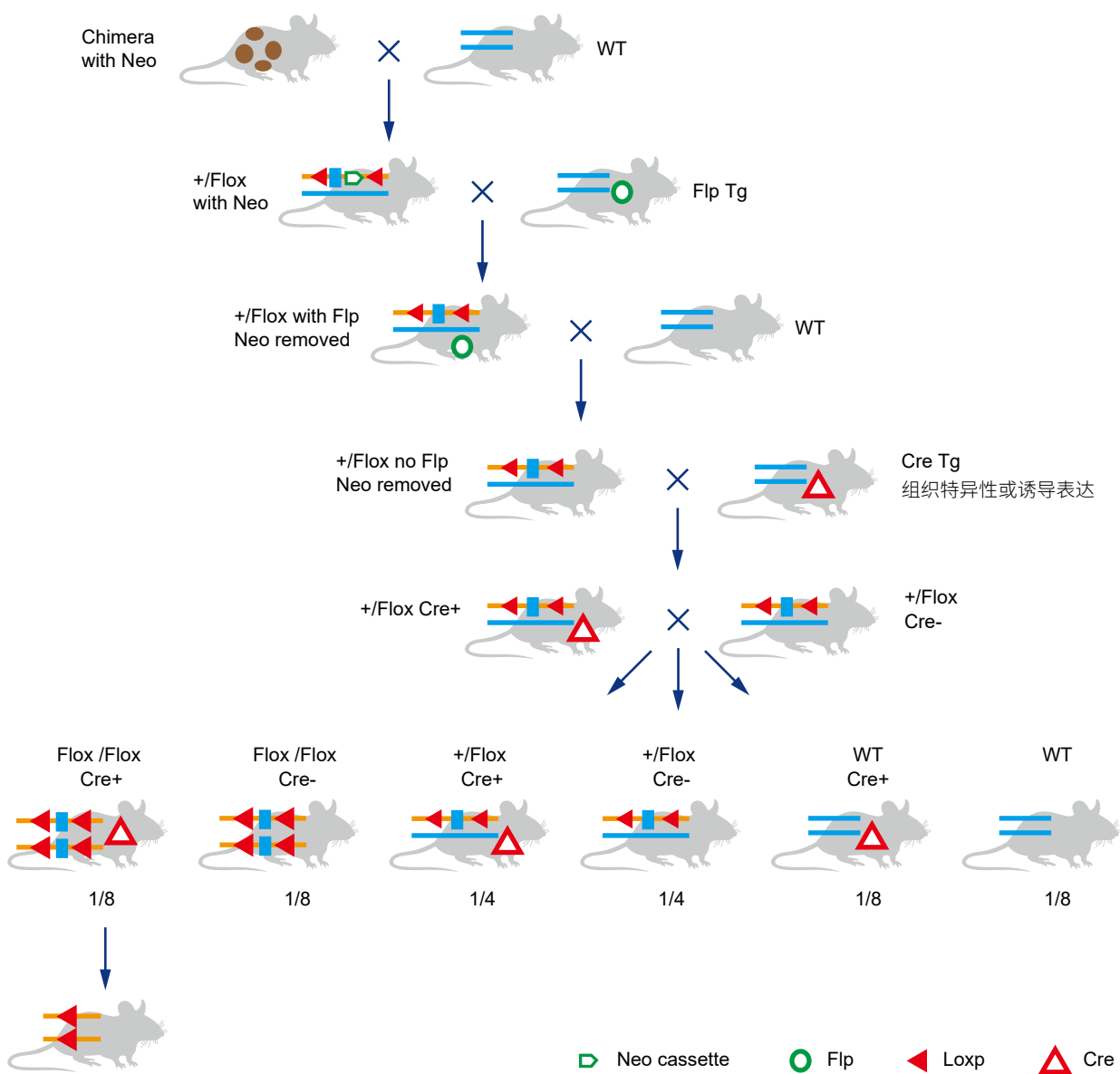


图 4. 组织特异性基因敲除小鼠繁育流程 1。

方案三

也可以采用图 5 的方案提高实验组小鼠比例。

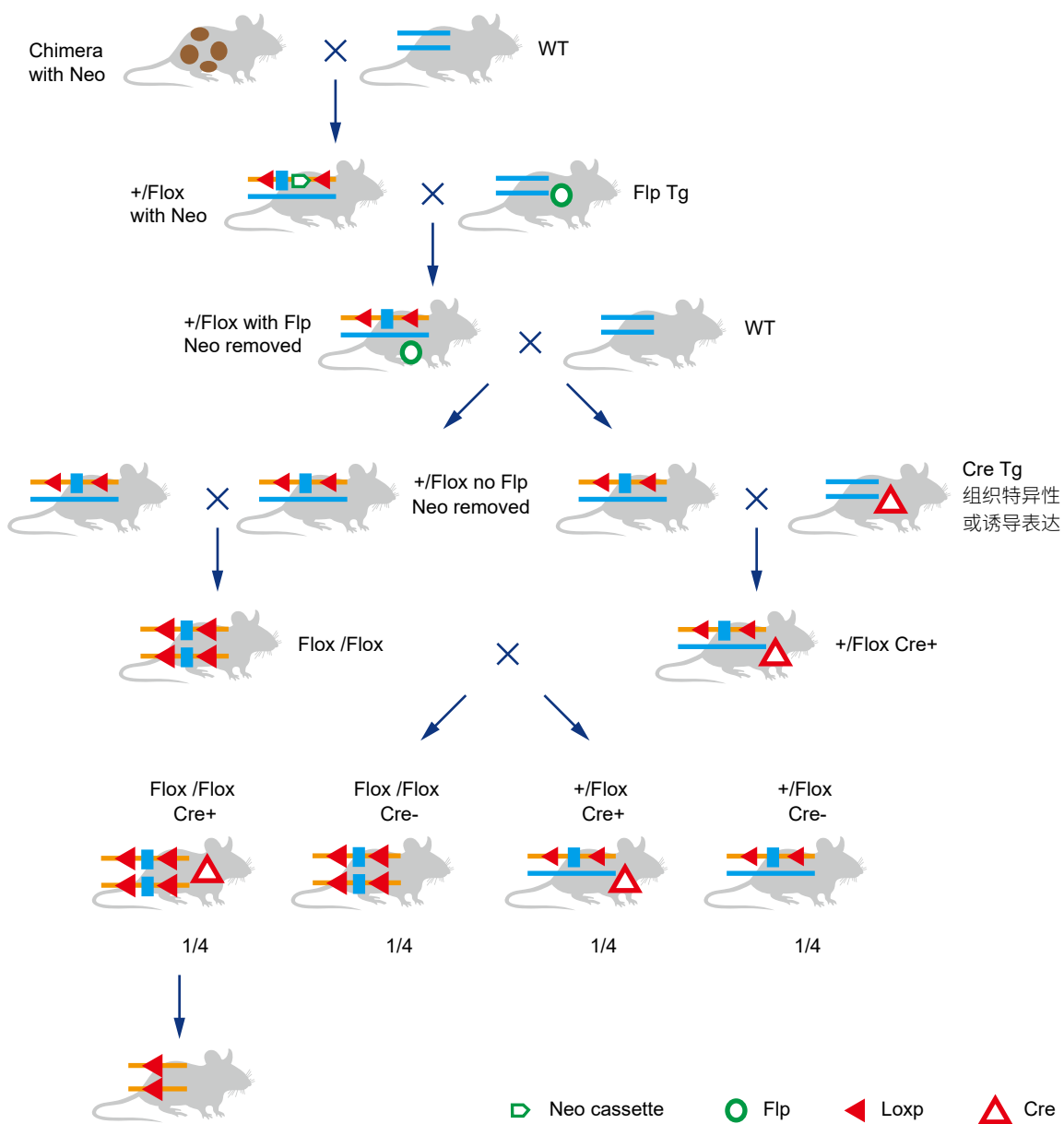


图 5. 组织特异性基因敲除小鼠繁育流程 2。

Q 什么是 CreERT2 ?

将人雌激素受体 (estrogen receptor, 简称 ER) 的配体结合区 (LBD) 与 Cre 重组酶相融合, 形成定位于胞浆中的融合蛋白 (Cre-ER)。只有在雌激素诱导后, 融合的 Cre 蛋白才会通过构象变化从锚定蛋白 HSP90 上解离下来, 进入细胞核, 识别 loxP 位点并发生重组。这样就通过控制雌激素的注射时间, 可以实现对基因重组时间特异性的调控。

为了避免内源雌激素的干扰, 在配体结合区做一个点突变 (G521R) 就可以使 Cre-ER 只响应外源的人工合成雌激素 (比如: Tamoxifen、4-OHT) 的诱导, 命名为 Cre-ERT。而另一种 LBD 突变体融合蛋白被证明对 4-OHT 具有远高于 Cre-ERT 的敏感性, 这种突变体就是大名鼎鼎的 Cre-ERT2。它带有人 ER LBD 中的 3 个点突变: C400V/M453A/L544A。

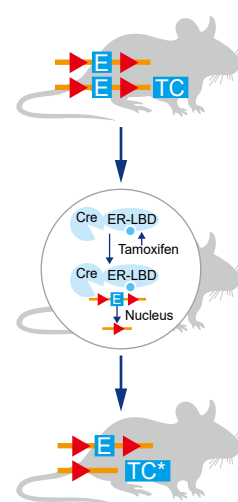


图 6. Tamoxifen 诱导 Cre 作用示意图。(图片来自 Inducible Cre Mice. Methods in Molecular Biology 530:343-63 February 2009)。

Q Cre 品系只在特定的细胞或组织中有切割活性?

Cre 由脑特异性的启动子驱动, 那 Cre 只在脑中表达吗? 事实并非如此。研究发现大部分品系在其它组织中也有 Cre 活性。举个例子, Emx1-Cre 小鼠除了大脑外, 在肾脏和胸腺中也表达 Cre。

Q 所有 Cre 品系的敲除效率均可预测?

并非所有品系均如此。一些表达 Cre 的品系即使在同窝小鼠中, Cre 表达也有可能相差甚远。另外 Cre 表达呈现镶嵌模式的品系也值得注意。使用这些小鼠你可能发现很大的实验差异, 也很难重复实验结果。为了获得有价值的实验结论, 可能需要分析更多小鼠的表型。

Q 无论是从父本还是母本遗传的 Cre 基因, Cre 重组效率都是一样的吗?

已研究的大部分品系中, Cre 表达与从哪个亲本遗传的 Cre 基因无关。但对某些品系而言, 从母本遗传 Cre 基因的小鼠相较于从父本获得 Cre 基因的小鼠, 其 Cre 重组效率更高, 例如 Ella-Cre 品系。

Q 仅表达 Cre 基因的小鼠有不良表型吗?

研究表明小鼠模型中 Cre 表达也会有毒副作用, 例如不育和存活力降低。某些品系的 Cre 纯合子小鼠尤其是这样。Cre 活性过高可能引起在基因组中未知的 loxP 位点重组, 从而引发敲除或移位进而影响小鼠存活。另外, 在通过显微注射获得的 Cre 转基因品系中, Cre 基因插入可能干扰某些重要内源基因的功能。

基因工程小鼠鉴定专题

Q 如何鉴定基因工程小鼠的基因型？

基因工程小鼠基因型 PCR 鉴定的基本原则是利用基因工程小鼠基因组与野生型小鼠基因组的序列差异，以小鼠基因组 DNA 为模板进行 PCR，并以凝胶电泳对比不同基因型特异产物的大小，根据条带大小来区分小鼠的不同基因型。

Q 为什么在进行基因型鉴定时没有条带或有非特异性条带？

在进行基因型鉴定 PCR 时通常采用粗抽提的方法从鼠尾组织中提取基因组 DNA，这类抽提方法获得的基因组 DNA 含有较多杂质，可能会影响后续 PCR 的效率。可以考虑优化抽提方法，保证基因组 DNA 质量。在 PCR 反应体系中，基因组 DNA 的浓度也会影响 PCR 的效率。基因组 DNA 过多或过少都有可能导致 PCR 扩增失败。可以考虑调整 PCR 反应体系。若 PCR 鉴定出现非特异性条带，可以考虑提高退火温度，以提高引物的特异性结合。

Q 对普通基因敲除小鼠如何设计基因型鉴定引物？

引物设计可参考以下图示方案。

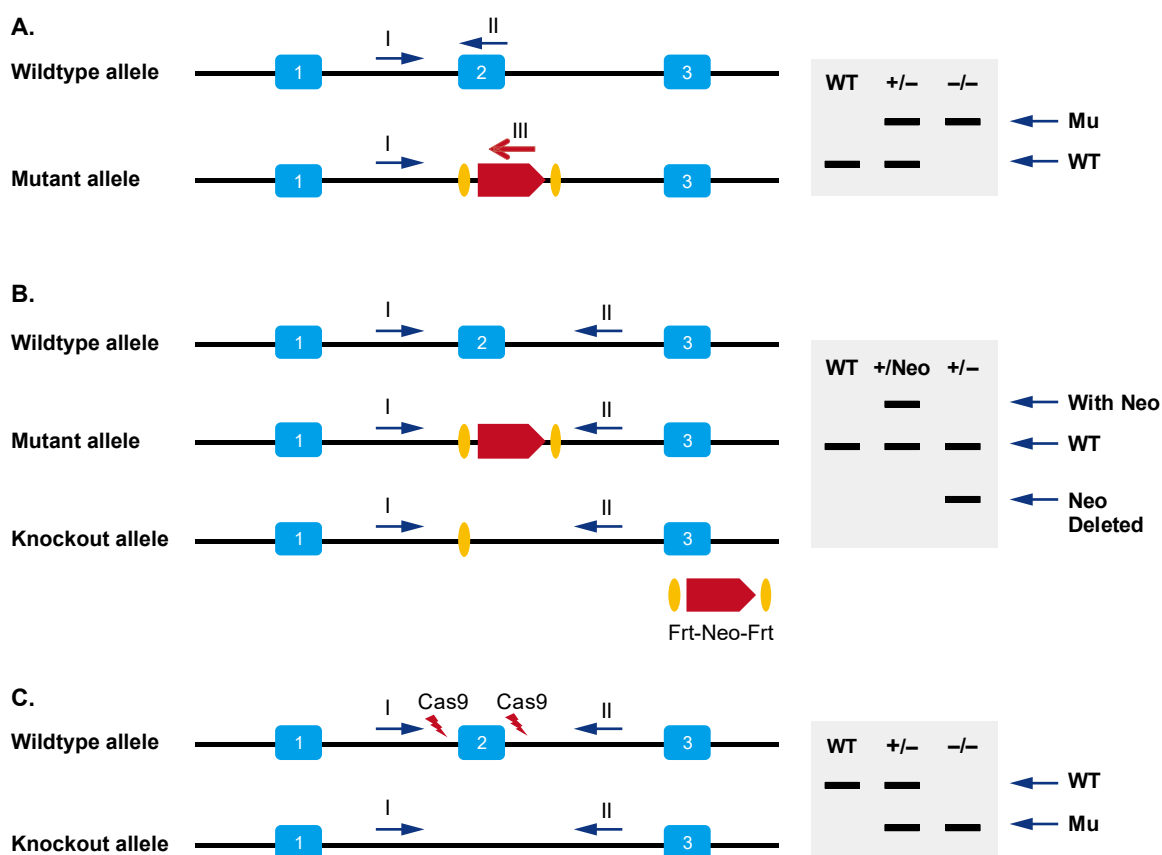


图 7. A. 基于 ESC 打靶的三引物鉴定方案；B. 基于 ESC 打靶的二引物鉴定方案；C. 基于 CRISPR/Cas9 的鉴定方案。

Q 对条件性基因敲除小鼠如何设计基因型鉴定引物？

引物设计可参考以下图示方案。

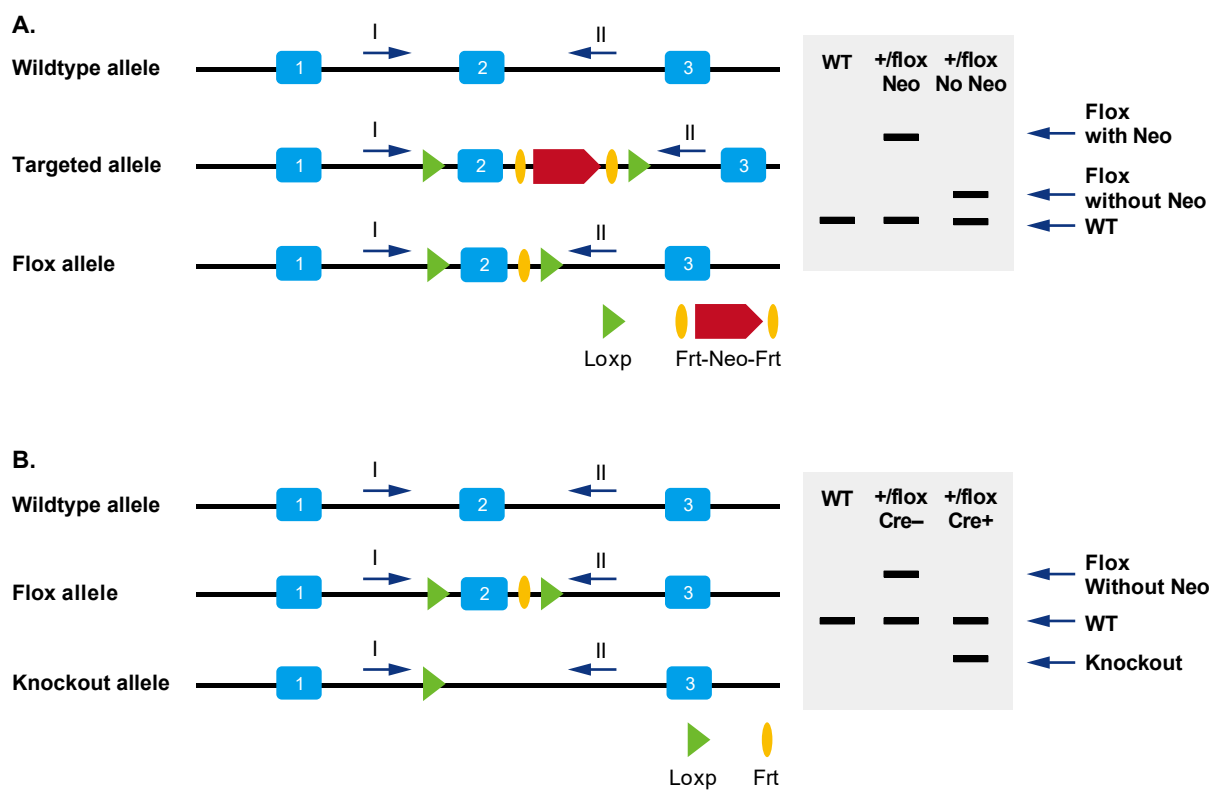


图 8. A. 鉴定 Flox 小鼠中 Neo 基于是否去除；B. 鉴定在特定组织中目的基因是否被敲除。

Q CRISPR/Cas9 Knockout 小鼠基因型鉴定方法

对于 NHEJ 随机修复获得的基因敲除小鼠，一般可通过 PCR+ 测序方法进行基因型鉴定。示意图如下：

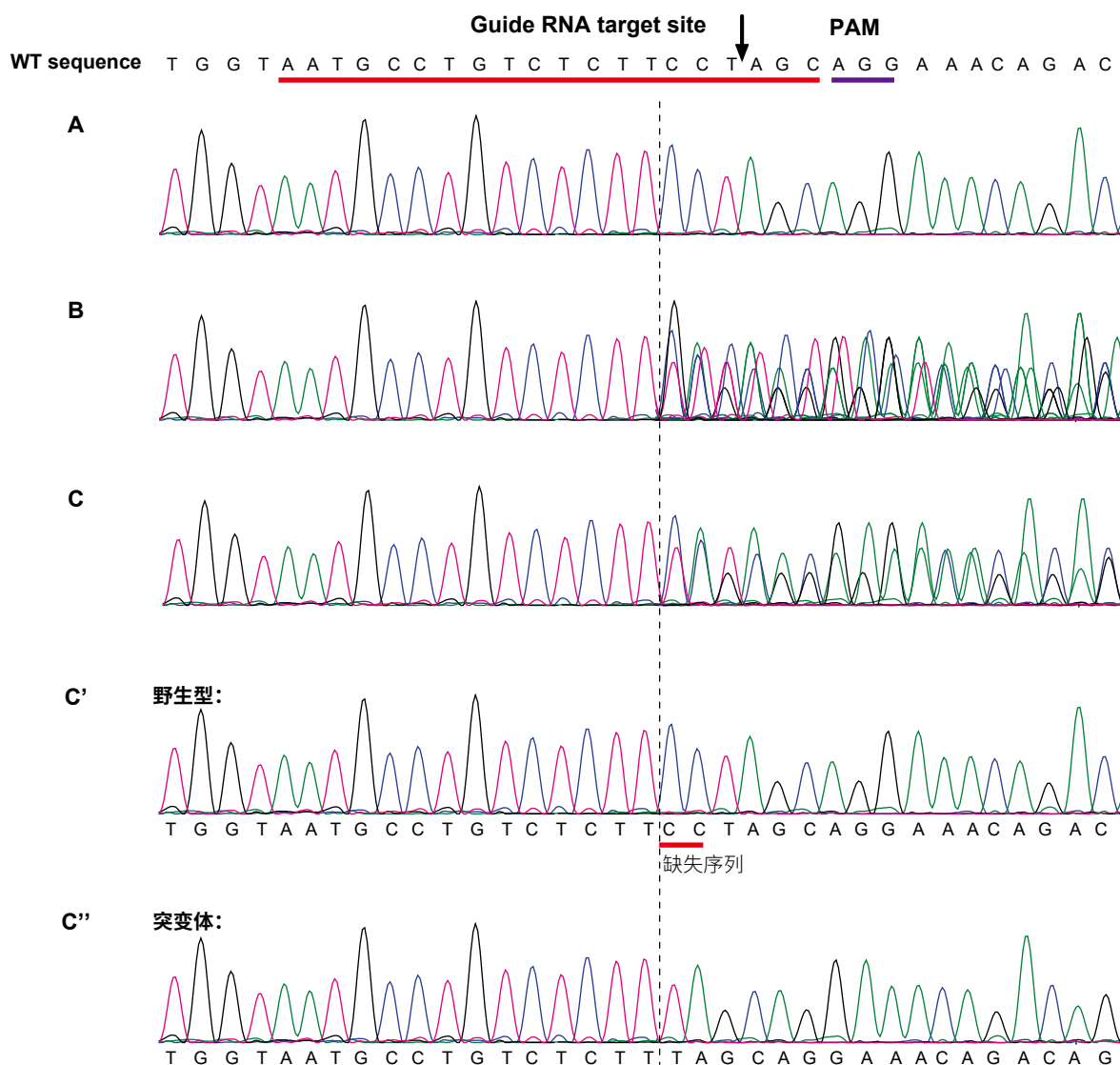


图 9. A. 野生型小鼠 PCR 产物测序峰图。**B.** 阳性 F0 代小鼠基因型鉴定 PCR 产物测序峰图。CRISPR/Cas9 作用后，由于发生 NHEJ 随机修复，产生多种基因型，在 Cas9 切点附近出现杂峰现象。**C.** 阳性 F1 代小鼠基因型鉴定 PCR 产物测序峰图。阳性 F1 小鼠基因组一个拷贝是野生型，一个拷贝是突变体，在 Cas9 作用位点附近区域测序有后双峰现象（两种基因型产生了两种峰型）。**C'** 和 **C''** 为 **C.** 图测序 PCR 产物连接 T-vector 后，单克隆测序结果。其中，**C'** 为野生型，**C''** 为突变体。峰型对比可以发现 **C''** 较 **C'** 缺失了两个碱基 CC。**C'** 和 **C''** 峰型结果可以和 **C** 图峰型结果向吻合。

Q CRISPR/Cas9 点突变小鼠基因型鉴定方法

一般可通过 PCR+ 测序方法进行基因型鉴定。示意图如下：

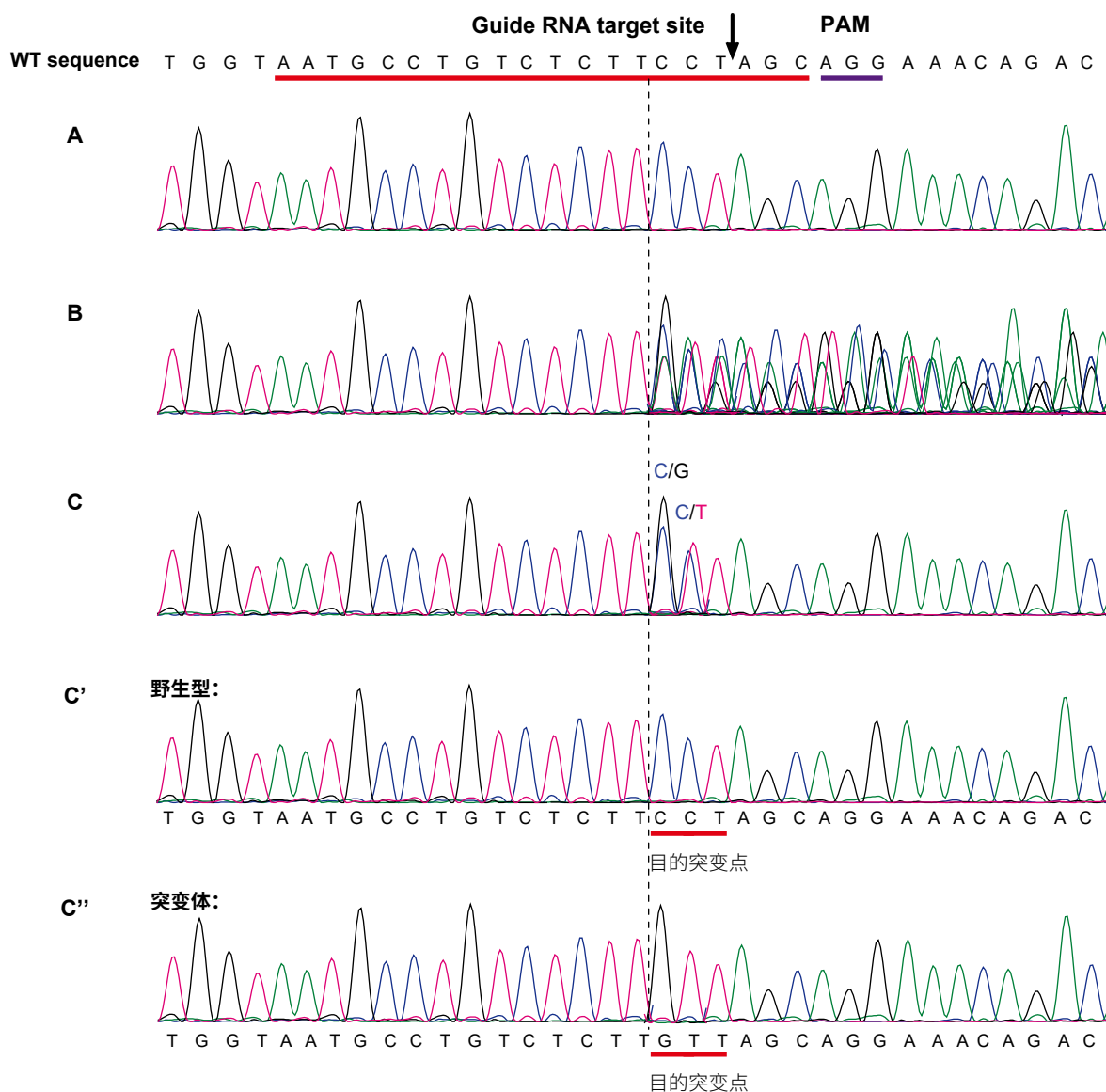


图 10. **A.** 野生型小鼠 PCR 产物测序峰图。 **B.** 阳性 F0 代小鼠基因型鉴定 PCR 产物测序峰图。CRISPR/Cas9 作用后，由于发生同源重组修复 (HR) 的同时，也可能发生非同源重组修复 (NHEJ)。因此，切点附件可能出现杂峰现象。 **C.** 阳性 F1 代小鼠基因型鉴定 PCR 产物测序峰图。阳性 F1 小鼠基因组一个拷贝是野生型，一个拷贝是突变体，在 Cas9 作用位点附近区域测序，突变点位置有双峰现象（野生型和突变体，两种基因型产生了两种峰型）。 **C'** 和 **C''** 为 C 图测序 PCR 产物链接 T-vector 后，单克隆测序结果。其中， **C'** 为野生型， **C''** 为突变体。峰型对比可以发现 **C''** 较 **C'** 的目的突变点 CCT 突变为 GTT， **C'** 和 **C''** 峰型结果可以和 C 图峰型结果相吻合。



上海张江生物医学服务联盟

Shanghai ZJ Biomedical Service Alliance



- 模型定制
- 药物筛选
- 饲养繁育



- I-Sanger生信云
- 微生态研究
- 基因组测序



- 三代测序
- 基因芯片
- 酵母文库



- 抗体芯片
- 蛋白芯片
- 蛋白质谱



- GCBI云平台
- 生信分析
- 二代测序

享受结果 把过程交给我们

模型定制、成品模型、饲养繁育、表型分析、药物筛选等全方位服务

- 专业研发团队为你度身打造模型定制方案，所想即所得
- 上百种成品模型，有效缩短实验周期
- 一站式服务大大提高实验效率，节省宝贵时间，避免实验延期
- 饲养繁育交给我们，再也不用担心动物房没笼位和病原体污染
- 小鼠、大鼠、斑马鱼、线虫、更多选择满足不同实验所需

没找到你要的答案？

欢迎通过微信、网页、电话、邮件各种渠道与我们联系，我们随时为你提供帮助！

上海南方模式生物科技股份有限公司

上海 · 北京 · 天津 · 广州 · 重庆 · 旧金山

上海总部：上海市浦东新区半夏路 178 号 2 号楼
400-728-0660 · www.modelorg.com · info@modelorg.com

