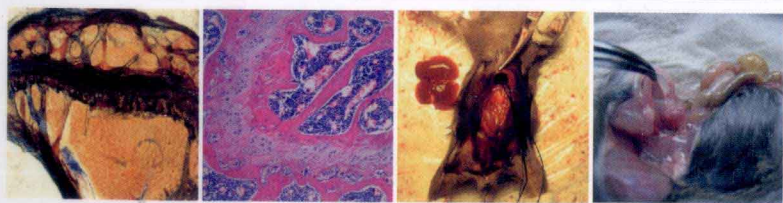


基

验 | 技 | 术 | 系 | 列 | 丛 | 书

遗传修饰小鼠 实用实验技术

主 编 秦鸿雁 郑敏化 韩 骅

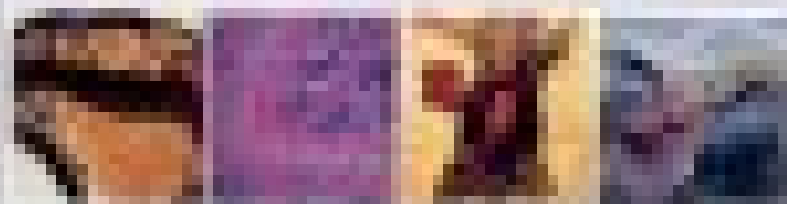


第四军医大学出版社

第 2 版

遗传修饰小鼠 实用实验技术

主 编 郭海强 副主编 陈 刚



清华大学出版社

基础医学实验技术系

遗传修饰小鼠实用实验技术

主 编 秦鸿雁 郑敏化 韩 骅

编 者 (以姓氏笔画排序)

于恒超 马 静 田登梅

付 伟 冯 蕾 刘 栋

刘向东 何 飞 邹 海

郑敏化 屈朔瑶 秦鸿雁

赵星成 胡映暘 高 方

郭丰成 曹秀丽 梁 亮

梁世倩 韩 骅 谢 娟

窦国睿 魏亚宁

第四军医大学出版社·西安

图书在版编目 (CIP) 数据

遗传修饰小鼠实用实验技术 / 秦鸿雁, 郑敏化, 韩
骅主编. —西安: 第四军医大学出版社, 2012. 7

基础医学实验技术系列丛书

ISBN 978 - 7 - 5662 - 0240 - 6

I. ①遗… II. ①秦… ②郑… ③韩… III. ①小
鼠 - 动物遗传学 - 实验 IV. ①Q959. 837. 03 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 152890 号

Yichuan Xiushi Xiaoshu Shiyong Shiyuan Jishu

遗传修饰小鼠实用实验技术

主 编 秦鸿雁 郑敏化 韩 骅

责任编辑 相国庆

出版发行 第四军医大学出版社

地 址 西安市长乐西路 17 号 (邮编: 710032)

电 话 029 - 84776765

传 真 029 - 84776764

网 址 <http://press.fmmu.sn.cn>

印 刷 西安永惠印务有限公司

版 次 2012 年 7 月第 1 版 2012 年 7 月第 1 次印刷

开 本 889 × 1194 1/32

印 张 6.25

字 数 140 千字

书 号 ISBN 978 - 7 - 5662 - 0240 - 6/R · 1062

定 价 20.00 元

版权所有 侵权必究

购买本社图书, 凡有缺、倒、脱页者, 本社负责调换

前 言

在生命科学研究的历程中，获得、制作和分析突变体一直占据着重要的地位。随着分子生物学理论和技术的日趋成熟，在动物整体水平对特定基因进行定位突变，然后分析突变体的表型变化，成为了解基因功能的重要思路。此外，由于大部分人类疾病的病因都可以追溯到某个或某些遗传因素，建立特定的突变体并进行表型分析，在此基础上探索发病机制、诊断和治疗，也已经成为疾病研究的主流模式之一。作为哺乳类动物的小鼠，由于其遗传和发育上与人类的相似性，是研究人类基因功能和建立人类疾病模型的最佳模式生物。尤其是 20 世纪 80 年代以来，分子生物学、胚胎学和发育生物学的快速发展，成就了转基因小鼠和基因剔除小鼠技术的建立和不断成熟。目前，以转基因小鼠和基因剔除小鼠为主的大量遗传修饰小鼠已经建立 (<http://www.komp.org>)；分析各种转基因小鼠和基因剔除小鼠已经成为生命科学研究，尤其是医学研究的重要手段。

由于遗传修饰小鼠的建立需要从分子生物学到细胞生物学，再到动物学的全套理论知识和实验技能，而遗传修饰小鼠的表型分析犹如给一位无法交流的患者看病，是非常困难的。其中不仅涉及全面的医学知识，还需要在实验科学领域有良好的训练背景。这对于研究生，尤其是医学背景的研究生常常很困难。针对这一问题，我们受第四军医大学生物化学与分子生物学教研室的一批年轻的教师和博士生基于自身的学习历程编写《分子生物学实用实验技术》的启发，编写了这本《遗传修饰小鼠实用实验技

术》。我们要求参与编写的研究生和青年教师站在初学者的角度，从自己的实验过程中整理出每一项实验的具体操作、注意事项及个人体会，集结成为这本用于指导小鼠建立和分析实验操作的口袋书，供初入门的研究人员使用。

《遗传修饰小鼠实用实验技术》是《基础医学实验技术系列丛书》的第二分册。本书分为六章，即小鼠的胚胎发育简介，实验室小鼠的饲养、管理及一般操作，转基因小鼠的建立，基因剔除小鼠的建立，转基因和基因剔除小鼠的分析以及常用小鼠疾病模型建立。希望这本小书能够给读者和使用者从事相关实验研究提供成熟、全面的实验操作指导与参考。

韩 骅

2012 年 7 月

目 录

第一章 小鼠的胚胎发育简介	(1)
第一节 实验室小鼠概述	(1)
第二节 生殖细胞的发生和受精	(6)
第三节 卵裂和小鼠胚胎的早期分化	(12)
第四节 原肠胚发生	(19)
第五节 早期器官发生	(23)
第六节 胚外组织的发育	(37)
第二章 实验室小鼠的饲养、管理及一般操作	(42)
第一节 实验室小鼠的饲养条件和注意事项	(42)
第二节 遗传修饰小鼠的品系特征	(44)
第三节 小鼠的交配	(45)
第四节 遗传修饰小鼠实验中常用的几种手术	(49)
第三章 转基因小鼠的建立	(59)
第一节 转基因载体的构建	(59)
第二节 受精卵的采集和培养	(63)
第三节 受精卵的显微注射	(68)
第四章 基因剔除小鼠的建立	(76)
第一节 小鼠基因剔除概述	(76)
第二节 基因剔除载体的设计与构建	(77)
第三节 ES 细胞的培养与建株	(84)
第四节 在小鼠胚胎干细胞中进行基因打靶	(98)
第五节 小鼠囊胚的显微注射	(107)

第五章 转基因和基因剔除小鼠的分析	(120)
第一节 小鼠基因型的判定	(120)
第二节 常用的基因表达检测方法	(128)
第三节 组织切片的制作和染色	(134)
第四节 特殊组织的表型分析	(144)
第六章 常用小鼠疾病模型建立	(166)
第一节 荷瘤小鼠模型	(166)
第二节 哮喘小鼠模型	(168)
第三节 小鼠肝脏部分切除模型	(169)
第四节 小鼠肝脏缺血再灌注损伤模型	(171)
第五节 小鼠纤维化模型的建立	(173)
第六节 视网膜病变模型	(175)

第一章 小鼠的胚胎发育简介

第一节 实验室小鼠概述

小鼠属啮齿类动物,易于饲养、培育、交配和进行实验操作,其胚胎发育期相对较短(18~21d),而生殖期相对较长(2个月至14个月龄)。根据小鼠的品系不同,一只雌鼠在生殖期内可出产约10次,共生出上百只仔鼠。因此小鼠是研究哺乳类胚胎发育的基本模式生物。另一方面,哺乳类的胚胎发育主要是在子宫内完成的。就目前的实验技术水平,尚不能直接观察这一动态的过程以及各个基因在这一过程中的作用。所以研究小鼠的胚胎发育十分依赖于对小鼠进行人工遗传修饰,包括转基因和基因剔除。

不同的实验室小鼠具有不同的生物学特征,在研究中应根据研究的目的选用。一般欧洲家鼠(*Mus musculus*)的基本特征见表1-1。

表 1-1 欧洲家鼠的特征

基因组	
染色体数	40
二倍体 DNA 含量	6 pg(3×10^9 bp)
重组单位	1600 cM(2000kb/cM)
五个高重复序列家族占基因组的百分比	8%~10% (B1, B2, R, MIF-1, EC1)
生殖生物学	
妊娠期	19~20d
哺乳期	3 周
性成熟年龄	~6 周



续表

基因组	
体重	出生时 1g, 哺乳期完 8 ~ 12g, 成年 30 ~ 40g(雄性 > 雌性)
生命期(实验室中)	1.5 ~ 2.5 年
平均产仔数	6 ~ 8 只
平均雌鼠产仔胎数	4 ~ 8 胎

小鼠的胚胎发育与其他多细胞生物一样,分为受精(fertilization)、卵裂(cleavage)、原肠胚发生(gastrulation)和器官发生(organogenesis)四个基本阶段。小鼠的早期胚胎发育远远慢于其他一些模式生物,如海胆、果蝇、蟾蜍等。在受精后的 24h,小鼠胚胎还处于两细胞状态,并且维持着缓慢的分裂速度。因此在从受精到穿越输卵管进入子宫,然后植入的整个过程中(4.5d),小鼠胚胎的细胞数和体积都未发生明显的变化。这种缓慢的发育给母体子宫组织预留出充足的时间做好准备接受胚胎的植入。胚胎在这个过程中首先产生出两种组织类型(滋养外胚层, trophoctoderm; 原始内胚层 primitive endoderm),用于形成胎盘的大部分及胚胎外的卵黄囊。受精卵着床后胚胎生长加速,其中由一小群多潜能细胞构成的上胚层(epiblast)或原始外胚层(primitive ectoderm)成为胎儿发育的起始点。受精后的第 5 ~ 10 天,通过原肠胚发生(gastrulation)而形成三个基本胚层(germ layer),即外胚层(ectoderm)、中胚层(mesoderm)及内胚层(endoderm),并逐渐建立起未来小鼠的基本身体模式(body plan)和器官原基(organ premordia)。这一过程基本包括沿着前后轴中线建立起脊索,脊索两侧的中胚层(轴旁中胚层, paraxial mesoderm)被分割成重复成对的体节(somite),形成明显的节段,而侧板中胚层(lateral plate mesoderm)未分节。神经板被诱导并蜷曲成为神经管,随后分割成为前脑、中脑和后脑及脊髓。在外胚层的表面形成鼻、耳、角膜的基板。神经嵴细胞开始迁移,心脏、循环系统及肢芽也开始确立。同时,众多控制分化和成年器官形态发生的基因逐渐开始发挥作用。

根据小鼠品系不同,其胚胎期长短略有差异,通常为 19 ~ 20d。
表 1-2 是 C57BL/6 雌性小鼠与 CBA 雄性小鼠交配的 F1 发育过程的不同分化时期。图 1-1 是小鼠胚胎发育的组织来源图。

表 1-2 小鼠的胚胎发育

阶段	天数 (dpc)	特征	胚胎外组织	循环系统	肠道	神经/感觉器官	泌尿生殖系统
1	0 ~ 1	单细胞受精卵					
2	1	二细胞受精卵					
3	2	桑葚胚, 4 ~ 16 个细胞					
4	3	桑葚胚 - 囊胚	滋养外胚层形成				
5	4	游离的囊胚, 无透明带					
6	4.5	囊胚着床	原始内胚层				
7	5	卵圆柱					
8	6	胚胎外胚层中形成前羊膜腔	Reichert 膜的形成	胎盘外椎充满母体血液			
9	6.5	胚胎轴系确定					
10	7	早 - 中期原条	羊膜腔形成				
11	7.5	晚期原条	尿囊出现	脏卵黄囊出现血岛	前肠袋	神经板	
12	8	1 ~ 7 体节	尿囊与绒毛膜接触	第一主动脉弓	后肠袋	神经板蜷曲/听基板	原始生殖细胞靠近尿囊基底



续表

阶段	天数 (dpc)	特征	胚胎外组织	循环系统	肠道	神经/感觉器官	泌尿生殖系统
13	8.5	8 ~ 12 体节 胚胎 转位		成对的心脏原基在前部融合	甲状腺原基/第二咽囊/肝膨大	神经皱折在 4 ~ 5 体节闭合	前肾
14	9	13 ~ 20 体节	脏卵黄囊出现血液循环	心脏开始跳动/三对主动脉弓	口腔板破裂	前神经孔闭合/嗅觉基板	前肾管仍闭合
15	9.5	21 ~ 29 体节/在 8 ~ 12 体节处出现前肢芽		共同心房和心室/背主动脉闭合	肺原基/胰腺出现/卵黄管闭合	后神经孔闭合/视基板	
16	10	30 ~ 34 体节/23 ~ 28 体节处出现后肢芽			原始支气管	晶状体基板	Walfian 管与泄殖腔接触
17	10.5	35 ~ 39 体节/尾突起		第六主动脉弓	脐带环/泄殖腔膜	深部晶状体凹陷	中肾管
18	11	40 ~ 44 体节		脾脏原基		晶状体囊闭合/嗅基板边缘闭合	明确的生殖嵴
19	11.5	6 ~ 7mm/前足板		心房分开/单心室	颊咽膜	晶状体囊脱离	输尿管芽
20	12	7 ~ 9mm/后足板		主动脉干分开	舌、胸腺及甲状旁腺原基	松果体出现	性别分化
21	13	9 ~ 10mm/胡须原基		主动脉和肺动脉干分开	腭突发育/牙板	晶状体固化	泄殖腔分割
22	14	11 ~ 12mm		室间隔闭锁		视网膜节细胞	开放的输尿管分成尿生殖窦

续表

阶段	天数	特征	胚胎外组织	循环系统	肠道	神经/感觉器官	泌尿生殖系统
23	15	12 ~ 14mm		冠状血管	腭突融合		
24	16	14 ~ 17mm	Reichert膜破坏		脐疝位置改变	眼睑融合	肾脏中出现的大的中央肾小球
25	17	17 ~ 20mm			肺泡管	睫状体出现	
26	18	19.5 ~ 22.5mm			胰岛出现	虹膜和睫状体	前列腺细胞索
27	19	23 ~ 27mm	出生				睾丸索仍闭合

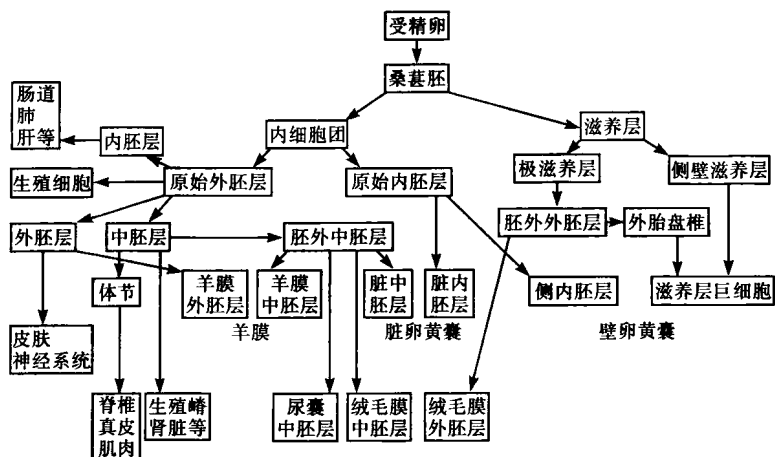


图 1-1 小鼠胚胎各个组织的分化来源

注:点状背景部分为发育成胚胎及胚胎外组织的细胞,阴影部分为胚胎外组织,白色部分为胚胎组织



第二节 生殖细胞的发生和受精

一、生殖细胞的起源和迁移

精子和卵子的形成开始于原始生殖细胞(primordial germ cell, PGC)的分化。PGC 来源于原始外胚层,进入生殖嵴(genital ridge)后再发生一系列复杂的成熟过程。在受精后 4.5d 的囊胚内细胞团中尚不存在已经定向分化的 PGC;而原始外胚层的任何一个细胞都既能生成体细胞又能生成生殖细胞,说明 PGC 的分化是从原始外胚层形成以后开始的。PGC 最初作为单独的细胞系被检测到是在受精后的第 7 天(卵圆柱阶段,egg cylinder),位于胚外中胚层的后羊膜囊褶处。随后,PGC 又迁移到原条的后半部分,并整合成为尿囊基底部的一部分。在胚胎发育的体节前阶段(头褶阶段),PGC 形成约 75 个相互黏附的细胞并构成细胞团。PGC 的形态特点是大而圆,高表达组织非特异性碱性磷酸酶及 Oct-3/4。据此可以监测 PGCs 从尿囊基底部迁移到生殖嵴的复杂过程。在 8dpc 时,聚集成团的 PGCs 开始分散。到早期体节阶段,绝大多数碱性磷酸酶阳性的细胞(共计约 200 个)嵌入到后肠的上皮层中。随后,PGCs 离开后肠的上皮层,向外穿过肠壁,并横穿背侧系膜向体腔角迁移。在 11~11.5dpc 时,第一批细胞到达生殖嵴。在从尿囊基底部开始到生殖嵴的整个迁移过程中,PGCs 约每 16h 分裂 1 次。到 13dpc 时,大约有 25 000 个 PGCs 分别定居于双侧生殖腺原基。生殖嵴起源于靠近中肾的中间中胚层,在大约 10dpc 时,在该部位可见明显的尿生殖嵴,但是直到 12.5dpc 时生殖腺原基才有明显的两性形态区别。PGCs 从肠道到生殖嵴的移动过程是一个主动的迁移过程,可能依赖于适当的基质和趋化信号,以保证大部分细胞集中走向生殖嵴。雌性的生殖细胞迁移至未来的卵巢后停止增殖,进入减数分裂程序并停滞于第一次减数分裂前期。与此相反,雄性的生殖细胞进入未来的睾丸后仍继续增殖,直到 14dpc 时才停止有丝分裂。有时,一小部分 PGCs 可能会停留在生殖嵴附近的中

肾组织,而不能进入正在发育的生殖腺。这些异位的 PGCs 无论其遗传性别如何,均停止于减数分裂期,即采取类似于雌性的发育过程。这说明生殖腺的体细胞组织对 PGCs 选择有丝分裂还是减数分裂有非常重要的影响。

二、性别决定和生殖细胞

生殖腺的遗传性别,即生殖腺局部环境对生殖细胞的分化起重要作用。用桑葚胚凝集或囊胚注射的方法可产生 XX-XY 嵌合体。在 XX-XY 嵌合体中,XX 生殖细胞在以 XX 占优势生殖腺的体细胞环境中,将停止于减数分裂期,呈现典型的雌性分化途径;而在 XY 生殖腺的体细胞环境中则停止于有丝分裂期,表现为典型的精子发生途径。

位于 Y 染色体 (sex-determining region Y) 的 *Sry* 基因促使未分化的生殖腺向着睾丸分化。带有 *Sry* 转基因的雌性 (XX) 小鼠可以发育出睾丸。*Sry* 基因编码一个有 HMG 基序的 DNA 结合蛋白。*Sry* 在 10.5dpc (尿生殖嵴刚刚出现时) 及 11.5 ~ 12.5dpc (未分化的性腺刚开始出现两性特性时) 表达。此外,*Sry* 的表达局限于体细胞,因为在纯合子 W 突变胚胎 (没有生殖细胞到达生殖腺) 中,*Sry* 基因的表达正常。原位杂交显示 11.5dpc 时 *Sry* 的表达局限于生殖嵴,而不扩散到附近的中肾组织。因此这个转录因子样蛋白可能最先启动了睾丸的分化,从而抑制了卵巢的形成。

在决定生殖腺的性别之前,雄性和雌性的生殖道原基 (分别为 Wolffian 管和 Mullerian 管) 均已经存在。随着性别的分化,雌性的 Wolffian 管将变性消失,而雄性的 Mullerian 管则逐渐退化。没有睾丸形成时,Wolffian 管不会生存,但其退化并不依赖于卵巢的存在,说明其退化是一种默认途径 (defaulted pathway)。在雄性,睾丸的 Leydig 细胞分泌的睾酮保证了 Wolffian 管的生存并分化成为输精管、精囊和附睾。同时,抗 Mullerian 激素 (anti-Mullerian hormone, AMH, 又称 Mullerian 抑制因子, MIF) 促使 Mullerian 管发生退化。在慢性表达 AMH 的转基因雌性小鼠, Mullerian 管消失,卵巢



出现雄性化的特征。这表明 AMH 除了促使 Mullerian 管退化外, 可能在睾丸的分化中也有一定作用。

三、精子发生

在小鼠, 从干细胞(精原细胞, spermatogonium)分化成精子(spermatozoa)大约需要 5 周时间。这一时间基本保持恒定, 所以任何曲细精管的横断面都含有从基底膜到管腔表面整齐、立体排列的, 处于不同分化时期的细胞, 反映出精子发生的持续过程。与卵子的发生不同, 精子的发生起源于一群真正的干细胞, 这些干细胞有自我更新以及向成熟精子分化的潜能, 其直接来源于原始生殖细胞, 胞体较大, 被称为 A 型精原细胞。A 型精原细胞在小鼠出生后的 3 ~ 7d 出现, 定位于围绕着曲细精管的基底膜。分裂后, 一些 A 型精原细胞的子代细胞分化成为中间精原细胞, 并继续分化成为 B 型精原细胞。B 型精原细胞也同样位于基底膜附近, 但胞体较小, 能够分裂产生更多的 B 型精原细胞, 因此可看作是一群过渡态细胞。一般而言, B 型精原细胞的数量要多于 A 型精原细胞。此后, B 型精原细胞逐渐变大, 继而脱离基底膜向曲细精管的管腔侧移动, 同时逐渐分化成为初级精母细胞(spermatocyte)。B 型精原细胞在这个时期开始减数分裂, 于第一次减数分裂前期, 包括 X 和 Y 染色体在内的同源染色体发生配对和交换。第一次减数分裂产生的细胞称为次级精细胞, 其细胞核中含有分别由两个姊妹染色单体构成的 20 条染色体。在第二次减数分裂中, 姊妹染色单体分离, 产生仅含有单倍体基因组的精子细胞(spermatid)。后续的精子细胞的成熟过程发生在管腔的表面, 包括胞浆的排出和进一步的分化。最后, 成熟的精子释放到管腔里, 在管腔表面遗留下多余的胞浆物质, 称为残余小体。

精子发生过程具有同步性, 部分原因是不完全的胞质分离, 以使所有 B 型精原细胞的后代都通过胞浆桥(cytoplasmic bridges)相互连接。只有当成熟的精子释放到曲细精管的管腔时这种连接才消失。这就意味着尽管减数分裂已经发生, 但精子发育所必需的

复杂分化过程仍然在细胞间共有的胞浆中进行,胞浆中也就含有双倍体基因组的绝大多数产物。

睾丸是由排列有序的曲细精管构成的,曲细精管由睾丸索发育而来,在 12.5dpc 时出现于雄性生殖腺。无 Y 染色体的生殖细胞在精子发生过程中处于选择劣势,它们很少能进入减数分裂,即使进入也在第一次减数分裂中期前退化。因此 Y 染色体除了含有性别决定基因外,可能还有正常精子分化所必需的某些基因。

四、卵子的发生

在出生后的第 5 天,所有卵细胞都处于第一次减数分裂前期的双线期。这时细胞是二倍体,但含有 4 倍于单倍体的 DNA 量。在长期的静息状态下,成对的同源染色体充分延伸,卵子的 mRNA (母系来源)开始转录生成。X 染色体活性研究表明,在 XX 型的原始生殖细胞及 11.5dpc 的卵原细胞(oogonUm)中仅有一条 X 染色体有活性;而在 12.5d 时,两条 X 染色体均有活性。此外,与精子细胞的基因组相比,卵细胞的基因组总体呈现低甲基化状态。

每个卵细胞均被包绕于一个由多层颗粒细胞(granulosa cell, 亦称卵泡细胞)构成的卵泡中。颗粒细胞与睾丸 Sertoli 细胞有相同的胚胎组织来源,在卵细胞生长与分化中发挥着多种作用。紧贴着卵细胞的颗粒细胞伸出许多突起与卵子形成特殊的连接。这些连接复合物包括间隙连接,可允许代谢物质穿越。这些连接甚至在颗粒细胞和卵子因透明带(zona pellucida)的沉积而逐渐分开后仍然存在。透明带是生长中的卵子合成并分泌的细胞外基质,主要由三种酸性硫酸糖蛋白(ZP1, Mr 200,000; ZP2, Mr 120,000; ZP3, Mr 83,000)构成,厚度约 7 μ m。有证据表明 ZP3 的功能是作为精子受体,在卵子受精时激发顶体反应。

在生长的卵细胞中除了占总蛋白合成约 10% 的透明带糖蛋白的合成和加工外,还有其他的基因表达。例如,在生长中期,大约 1.3% 的蛋白合成是产生管蛋白,0.9% 为肌动蛋白。用原位杂交和 RT-PCR 在小鼠卵细胞中鉴定了多种其他基因的 mRNA,包括