



# 同源导入近交系绿色荧光裸小鼠 $Foxn1^{nu}$ . B6-CAG-EGFP/SU 的建立

沈艳华<sup>1</sup>, 王麒龙<sup>2</sup>, 代兴亮<sup>2</sup>, 陈金<sup>2</sup>, 董军<sup>2</sup>, 兰青<sup>2</sup>, 黄强<sup>2</sup>

(1. 苏州大学医学部实验动物中心, 江苏 苏州 215123; 2. 苏州大学附属第二医院神经外科, 江苏 苏州 215123)

**【摘要】目的** 建立一个能稳定表达增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescence protein, EGFP)的裸小鼠近交新品系, 供包括人脑胶质瘤在内的所有人类肿瘤移植实验用。**方法** 将雌性 C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)转基因小鼠和雄性  $Foxn1^{nu}$  裸小鼠, 按同源导入方法进行杂交和回交, 用荧光手电筒和匹配的眼镜、多功能活体成像仪、荧光显微镜对是否表达 EGFP 进行鉴别, 传至 F10 后进行遗传学检测。**结果** 所建品系命名为  $Foxn1^{nu}$ . B6-CAG-EGFP/SU (Soochow University), 14 个遗传生化位点中 13 个表型与 BALB/c ( $Foxn1^{nu}$ ) 吻合, 唯 *Pep3* (肽酶-3) 的电泳为 b 型, 而标准的 BALB/c 近交系为 a 型; 外周血淋巴细胞占全部有核细胞 15%, T 淋巴细胞仅占 0.3%, 与亲本的  $Foxn1^{nu}$  一致。**结论** 成功地建立了一个既与亲本 C57BL/6-TgN(CAG-EGFP) 一样稳定表达 EGFP, 又与  $Foxn1^{nu}$  裸小鼠 (BALB/c 背景) 一样具有 T 细胞缺乏的荧光裸小鼠新品系 -  $Foxn1^{nu}$ . B6-CAG-EGFP/SU, *Pep3* 为 b 型是有别于  $Foxn1^{nu}$  裸小鼠的生化遗传标记位点。

**【关键词】** 绿色荧光蛋白; 转基因小鼠; 裸小鼠; 近交系

**【中图分类号】** R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 01-0055-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.001.010

## Establishment of a new congenic inbred mouse strain named $Foxn1^{nu}$ . B6-CAG-EGFP/SU

SHEN Yan-hua<sup>1</sup>, WANG Qi-long<sup>2</sup>, DAI Xing-liang<sup>2</sup>, CHEN Jin-sheng<sup>2</sup>, DONG Jun<sup>2</sup>, LAN Qing<sup>2</sup>, HUANG Qiang<sup>2</sup>

(1. Laboratory animal center of Soochow University, Jiangsu Suzhou 215123, China;

2. The Second Affiliated Hospital of Soochow University, Jiangsu Suzhou 215123, China)

**【Abstract】Objective** To establish a new congenic inbred mouse strain carrying and expressing *EGFP* and *Foxn1<sup>nu</sup>* gene for cancer research including human glioma as well. **Methods** According to criterion of GB14923 - 2010, the male  $Foxn1^{nu}$  nude mice backcross the female C57BL/6-Tg(CAG-EGFP) transgenic mice for 10 times, Then identify the phenotype using the methods and equipment as below: fluorescent flashlight and matching glasses; multifunction vivo imager; fluorescence microscopy. **Results** The congenic inbred mouse strain named  $Foxn1^{nu}$ . B6-CAG-EGFP/SU (Soochow University). All the 14 biochemical loci are homozygous and same with Balb/c mouse in addition to the *Pep3* loci ("b" type instead of "a" type). Peripheral blood lymphocyte count shows the lymphocytes occupy 15% of nucleated cells; T lymphocytes occupy 0.3%, meet the requirement of inbred strain of EGFP nude mice. **Conclusions** Established a new congenic inbred strain -  $Foxn1^{nu}$ . B6-CAG-EGFP/SU which both express EGFP stably, and own immunodeficiency

**【基金项目】** 国家自然科学基金(81071766、81172400、81272799、81472739); 国家自然科学基金“胶质瘤干细胞重构微环境诱导宿主细胞癌变的相关机制研究”(81472739)。

**【作者简介】** 沈艳华(1981-)女, 助理实验师, 硕士, E-mail: shenyanhua@suda.edu.cn。

**【通讯作者】** 黄强, E-mail: hq1936@163.com。

with lack of T lymphocytes. The phenotype "b" of biochemical loci "Pep3" is the unique characteristic that distinguish SU to *Foxn1*<sup>tm</sup>.

**【Key words】** Green fluorescent protein; Transgenic nude mice; Nude mouse; Inbred strain

绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 转基因小鼠 (C57BL/6J-EGFP) 具备绿色荧光的示踪特性, 是肿瘤研究中重要的工具小鼠, 我国在 2007 年才有报告<sup>[1]</sup>。裸小鼠 (*Foxn1*<sup>tm</sup>) 由于先天性胸腺缺陷、T 细胞免疫功能缺乏, 是进行人癌异种移植实验的良好宿主<sup>[2]</sup>。绿色荧光裸小鼠用于肿瘤移植实验, 国际上主要见于美国加利福尼亚大学 (University of California) 的报告, 但未明确所用绿色荧光裸小鼠的培育过程。在中国, 闫寒等<sup>[3]</sup> 2012 年报告, 对绿色裸小鼠用人癌移植实验验证其具有表达绿色荧光的同时还有免疫缺陷特征, 但未对其遗传性状进行检测, 不知是否达到近交系建系标准。张立波等<sup>[4]</sup> 于 2013 年初步报告了绿色荧光裸小鼠的选育, 按 GB/T14927.1-2001 检测 13 个生化位点表明, 相关表型与 BALB/c 小鼠的遗传概貌一致。本研究根据 GB/T14927.1-2008 对同源导入的第 10 代小鼠进行了 14 个生化遗传位点检测, 非但达到了建立 BALB/c 背景的同源导入近交系的建系标准, 而且还以 *Pep3* 位点是 b 型而不是 a 型, 有别于亲本 *Foxn1*<sup>tm</sup> 裸小鼠的遗传标志, 因而命名为 *Foxn1*<sup>tm</sup>. B6-CAG-EGFP/SU (Soochow University), 现报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

雌性 C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) 转基因小鼠和雄性 *Foxn1*<sup>tm</sup> 小鼠均购于南京大学模式动物研究所【SCXK (苏) 2010-0001】; 独立通风笼架 (苏州冯氏); 生物安全柜 (新加坡 ESCO); 小动物多模式活体成像仪 (Kodak); 荧光手电筒和眼镜 (Nightsea), Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒 (上海生工生物有限公司), PCR 仪 (AB 公司), 流式细胞仪 (BD 公司), Anti-Mouse CD19 PE-Cyanine7, Anti-Mouse CD3 APC (eBioscience); 小鼠<sup>60</sup>Co 灭菌饲料和垫料购于苏州双狮实验动物饲料科技有限公司 (许可证号: 苏饲申 (2009) 05032)。

### 1.2 繁育方法

种鼠饲养于本校实验动物中心小鼠独立送风 (IVC) 系统内【SYXK (苏) 2012-0045】。雌性 C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) 小鼠与雄性 *Foxn1*<sup>tm</sup> 小鼠

杂交得 F1 子代均为有毛荧光小鼠, 筛选其中的雌性小鼠, 待其性成熟 (> 8 周龄) 后与亲代雄性 *Foxn1*<sup>tm</sup> 交配 (回交) 得 F2, 产生 F2 子代性状分离, 筛选其中雌性有毛荧光鼠与亲代雄性 *Foxn1*<sup>tm</sup> 回交, 完成一个回交循环。此回交过程一共进行 10 代, 在 F10 子代中雌性有毛荧光鼠与雄性荧光裸小鼠杂交, 筛选其中荧光亮度高的子代建立血缘扩大群及生产群, 作为近交系 BALB/c 背景荧光裸小鼠供相关实验用。

### 1.3 鉴定

1.3.1 表型 孕鼠生产后, 利用有无鼻毛的特征来辨认新生仔鼠是否为裸小鼠、肛门与生殖器的距离辨别性别、荧光手电筒和眼镜辨别是否发绿色荧光。

1.3.2 基因型 出生 10 d 前后剪尾 (< 0.5 cm), 在 56℃ 热水浴应用蛋白酶 K 消化 6 h, 基因组 DNA 抽提试剂盒提取 DNA, 紫外分光光度计测 OD 值, 稀释为 100 ng/μL 作为 DNA 模板; PCR 反应体系为 20 μL, 其中 PCR mix 10 μL, 上下游引物各 1 μL, 模板 DNA 1 μL, 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 30 s, 55℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 30 个循环, 末次循环后 72℃ 延伸 7 min。

1.3.3 外周血淋巴细胞检测 心脏抽血, 用流式细胞仪对 Anti-Mouse CD19 PE-Cyanine7, Anti-Mouse CD3 APC 进行评估。

1.3.4 微生物和遗传学检测 按 GB14922.1-2011、GB14922.2-2011 和 GB/T14927.1-2008 标准分别进行, 其中遗传生化位点委托中国食品药品检定研究院完成。

## 2 结果

育成的 *Foxn1*<sup>tm</sup>. B6-CAG-EGFP/SU 小鼠具有如下特性: ①检测的 14 个生化遗传位点基因表型均为纯合, 有 13 个位点与 BALB/c 小鼠吻合, 唯 *Pep3* 为 b 型, 有别于 *Foxn1*<sup>tm</sup> 裸小鼠的生化遗传标记位点 a 型 (表 1); ②外周血常规检测和流式细胞仪分型结果表明, T 淋巴细胞明显不足, 符合 T 淋巴细胞缺乏的裸小鼠表型 (表 2, 图 1); ③鼠尾组织 RT-PCR、荧光手电配合眼镜所见的幼体和成体鼠都能证明其高表达 EGFP 和发强烈的绿色荧光 (图 2, 彩插 6 图 3), 两种检测方法的结果对鉴别是否表达 EGFP 或

发绿色荧光是一致的,基于 RT-PCR 需要剪鼠尾组织,是一种创伤性检测,已被荧光手电检测替代而不作为常规检测方法;④繁殖能力, *Foxn1<sup>tm</sup>*. B6-CAG-EGFP/SU 小鼠饲育在 IVC 内,按 SPF 级别管理,定期抽哨兵鼠作微生物检测进行监控。平均产仔数 6~8 只,离乳率 100%,子代中裸鼠(*Nu<sup>+/+</sup>*)和有毛鼠(*Nu<sup>+/-</sup>*)比例基本为 1:1;毛发和外周血红

细胞以外的所有器官组织和细胞都发绿色荧光;6~8 周龄成鼠体重 22~30 g(彩插 6 图 4)。

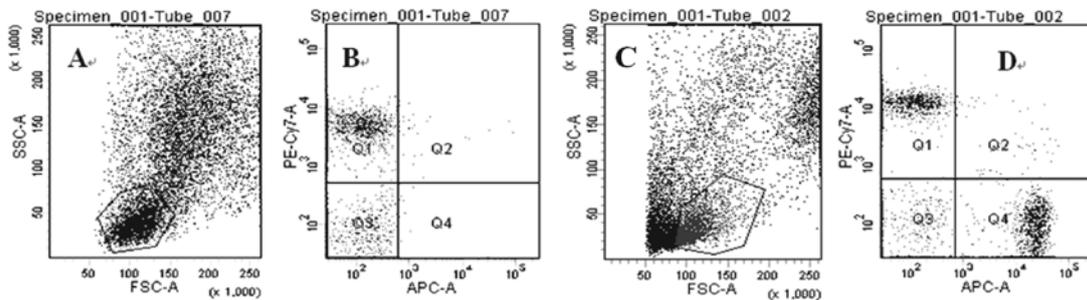
培育的 *Foxn1<sup>tm</sup>*. B6-CAG-EGFP/SU 小鼠能稳定高表达亲本 C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)转基因小鼠一样的 EGFP,同时又表现为亲本 *Foxn1<sup>tm</sup>* 小鼠所特有的 T 淋巴细胞严重缺乏特征,适合做人类肿瘤移植的小鼠。

表 1 *Foxn1<sup>tm</sup>*. B6-CAG-EGFP/SU 生化位点  
Tab.1 Biochemical loci of *Foxn1<sup>tm</sup>*. B6-CAG-EGFP/SU

生化位点 Loci	对应基因名 Gene	检测结果 Result	染色体号 Chromosome	BALB/c 品系 BALB/c
<i>Akp1</i>	碱性磷酸酶-1	b	1	b
<i>Car2</i>	碳酸酐酶-2	b	3	b
<i>Ce2</i>	过氧化氢酶-2	a	17	a
<i>Es1</i>	酯酶-1	b	8	b
<i>Es3</i>	酯酶-3	a	11	a
<i>Es10</i>	酯酶-10	a	14	a
<i>Gpd1</i>	葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-1	b	4	b
<i>Gpi1</i>	葡萄糖磷酸异构酶-1	a	7	a
<i>Hbb</i>	血红蛋白 β 链	d	7	d
<i>Idh1</i>	异柠檬酸脱氢酶-1	a	1	a
<i>Mod1</i>	苹果酸酶-1	a	9	a
<i>Pgm1</i>	磷酸葡萄糖变位酶-1	a	5	a
<i>Pep3</i>	肽酶-3	b	1	a
<i>Trf</i>	转铁蛋白	b	9	b

表 2 *Foxn1<sup>tm</sup>*. B6-CAG-EGFP/SU 与 BALB/c 外周血血常规比较  
Tab.2 Comparison of peripheral blood between *Foxn1<sup>tm</sup>*. B6-CAG-EGFP/SU and BALB/c

	红细胞 RBC (10 <sup>12</sup> /L)	血红蛋白 HGB (g/L)	血小板 PLT (10 <sup>9</sup> /L)	白细胞总数 WBC (10 <sup>9</sup> /L)	白细胞分类 WBC (%)				
					L	N	M	E	B
SU-	9.23	154	854	3.8	14.5	41.2	44.0	0.5	0.8
BALB/c	10.37	156	711	4.2	59.2	35.4	3.6	0.4	1.4



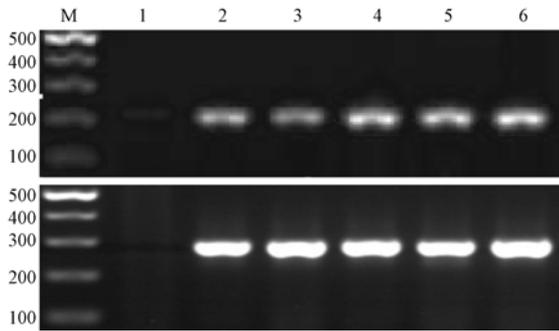
注:Q1 为 B 淋巴细胞群,前者比例为 59.1%;后者比例为 43.8%;Q4 为 T 淋巴细胞,前者比例仅为 0.3%;后者比例为 43.2%。

图 1 *Foxn1<sup>tm</sup>*. B6-CAG-EGFP/SU (A, B) 与 BALB/c (C, D) 外周血淋巴细胞分选

Note: Q1: B lymphocytes (*Foxn1<sup>tm</sup>*. B6-CAG-EGFP/SU 59.1% and BALB/c 43.8%);

Q4: T lymphocytes (*Foxn1<sup>tm</sup>*. B6-CAG-EGFP/SU 0.3% and BALB/c 43.2%).

Fig.1 The comparison of peripheral blood lymphocyte between *Foxn1<sup>tm</sup>*. B6-CAG-EGFP/SU (A, B) and BALB/c (C, D)



注: M 为标志分子量, 1 号为阴性对照, 2-5 号为绿色荧光鼠, 上排为 EGFP (~200bp), 下排为  $\beta$ -actin。

图 2 鼠尾组织 EGFP 的 RT-PCR 电泳图

Note: M: Marker; 1: Negative control; 2-5: EGFP mice; Upper row: EGFP gene; The lower row:  $\beta$ -actin.

Fig. 2 The RT-PCR results of mice tissue

### 3 讨论

同源导入近交系是通过杂交、自交和回交的方式形成一个与亲本在一个很小的染色体片段上有所不同的新近交系, 要求至少回交 10 代后的供体品系鼠基因只占受体品系鼠基因组总量的 1% 以下<sup>[5]</sup>。本文培育的同源导入近交系 Foxn1<sup>tm</sup>. B6-CAG-EGFP/SU 的供体是 C57BL/6-Tg (CAG-EGFP), 繁育至 F10 时委托中国食品药品检定研究院随机抽样检测, 经检测, 国家规定的 14 个生化位点的表型均为纯合, 其中有 13 个位点的基因表型与 BALB/c 背景完全一致, 也与张立波等在 2013 年初的报告<sup>[4]</sup>吻合, 然而在 *Pep3* (肽酶-3) 位点有 b 型与 a 型的区别(表 1)。根据建立近交系小鼠的纯合性 (homozygosity), 同基因性 (isogenicity) 和个体性 (individuality) 要求来衡量这一结果, 笔者认为 Foxn1<sup>tm</sup>. B6-CAG-EGFP/SU 在纯合性方面属于 BALB/c 来源, 在同基因性方面, 因 *Pep3* b 型有别于 BALB/c 的 a 型, 可把这一特征视作 Foxn1<sup>tm</sup>. B6-CAG-EGFP/SU 的特异性基因, 并作为一个新品系独特的遗传概貌。这一特征的来源有可能是导入 CAG-EGFP 基因产生的, 由于 *Pep3* 所定位的基因位于小鼠 1 号染色体, 新导入的 EGFP 基因是否也定位于此, 有待今后验证。诚然, 这一假设还与 C57BL/6-Tg(CAG-EGFP) 鼠育种是将 EGFP 基因导入到第 14 号染色体相矛盾, 是否在本文同源导入时 EGFP 基因是随机插入到 1 号染色体上了, 也需要进一步研究。

绿色荧光蛋白是从维多利亚发光水母中分离

纯化出来的一种能自主催化形成生色团, 并在紫外或蓝光激发下发出绿色荧光的蛋白<sup>[5]</sup>。经过修饰的增强型绿色荧光蛋白具有高度稳定、荧光明亮、对活细胞无伤害等优点, 现已成为生物学各领域研究中应用最广泛的分子标记工具之一<sup>[6]</sup>。自 1997 年 Okabe 等<sup>[7]</sup>采用慢病毒感染构建出  $\beta$ -actin-EGFP 转基因小鼠以来, 该小鼠在利用胚胎干细胞、骨髓间充质细胞、类胚胎干细胞等进行的细胞移植研究中称其具有“无所不在”的示踪价值<sup>[8-10]</sup>。随后, 进一步研究发现除了心脏和骨骼肌几乎都表达 EGFP 外, 在大多数组织中 EGFP “无所不在”的表达模式却并不明显, 甚至在不同器官以及同一器官不同细胞之间都是广泛多变的, 其中脑就是 EGFP 阴性表达的器官之一<sup>[11-12]</sup>。这一不足, 本文通过同源近交导入的 EGFP 基因, 在选育过程中依靠荧光手电筒配合眼镜方便地将发绿色荧光最强者纳入育种, 经长达 3 年余的筛选, 终于得到包括脑在内的全身各个脏器都表达 EGFP 的 Foxn1<sup>tm</sup>. B6-CAG-EGFP/SU, 被重点观察的脑在荧光显微镜下, 无论是组织还是细胞水平都有 EGFP 的表达, 仅是表达强度有所不同而已, 特别要指出的是富集神经干细胞的海马(彩插 6 图 4, 6 号)和富有造血与免疫系统干祖细胞的骨髓(彩插 6 图 4, 7 号)都是高表达 EGFP 细胞的发源地, 将为与其相关的示踪研究提供方便, 本实验室利用该小鼠已完成了双色荧光示踪的人脑胶质瘤血管来源、肿瘤微环境和间质细胞恶性转化等等系列研究<sup>[13-16]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] 冯娟, 高蓓, 全雄志, 等. 红色荧光和绿色荧光转基因小鼠模型的建立[J]. 中国实验动物学报, 2007, 15(4): 267-270.
- [2] 黄强, 徐庚达, 杜子威, 等. NC 系裸小鼠的饲养与应用[J]. 上海实验动物科学, 1987, 7(3): 153-155.
- [3] 闫寒, 贺晓玉, 秦超, 等. 绿色荧光裸鼠的建立和验证[J]. 中国比较医学杂志, 2012, 12(6): 62-64.
- [4] 张立波, 刘彪, 田小芸, 等. 绿色荧光裸小鼠的选育初报[J]. 实验动物与比较医学, 2013, 34(4): 306-309.
- [5] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression [J]. Science, 1994, 263(5148): 802-805.
- [6] Stauber R, Horie K, Carney P, et al. Development and applications of enhanced green fluorescent protein mutants [J]. Biotechniques, 1998, 24(3): 462-471.
- [7] Yee KK, Li Y, Redding KM, et al. Lgr5 - EGFP Marks Taste Bud Stem/Progenitor Cells in Posterior Tongue [J]. Stem Cells, 2013, 31(5): 992-1000.

(下转第 68 页)

- function and the risk of falling[J]. J Am Geriatr Soc, 2012, 60(11): 2127-2136.
- [ 3 ] Parihar R, Mahoney J R, Verghese J. Relationship of Gait and Cognition in the Elderly[J]. Curr Transl Geriatr Exp Gerontol Rep, 2013, 2(3):167-173.
- [ 4 ] 谭涛. 化合物 9714 对血管性痴呆的防治作用及作用机理[D]. 北京中医药大学, 2003.
- [ 5 ] Verghese J, Lipton R B, Hall C B, *et al.* Abnormality of gait as a predictor of non-Alzheimer's dementia[J]. N Engl J Med, 2002, 347(22): 1761-1768.
- [ 6 ] Chui H C, Mack W, Jackson J E, *et al.* Clinical criteria for the diagnosis of vascular dementia: a multicenter study of comparability and interrater reliability[J]. Arch Neurol, 2000, 57(2): 191-196.
- [ 7 ] Annweiler C, Beauchet O, Bartha R, *et al.* Slow gait in MCI is associated with ventricular enlargement; results from the Gait and Brain Study[J]. Journal of Neural Transmission, 2013, 120(7): 1083-1092.
- [ 8 ] Annweiler C, Beauchet O, Bartha R, *et al.* Motor cortex and gait in mild cognitive impairment: a magnetic resonance spectroscopy and volumetric imaging study[J]. Brain, 2013, 136(3): 859-871.

〔修回日期〕2014-09-01

## (上接第 58 页)

- [ 8 ] Maria Cambuli F, Rezza A, Nadjar J, *et al.* Brief report: Musashi1 - eGFP mice, a new tool for differential isolation of the intestinal stem cell populations[J]. Stem Cells, 2013, 31(10): 2273-2278.
- [ 9 ] Okabe M, Ikawa M, Kominami K, *et al.* Green mice as a source of ubiquitous green cells [J]. FEBS Letters, 1997, 407(3): 313-319.
- [ 10 ] Ikawa M, Yamada S, Nakanishi T, *et al.* Green mice and their potential usage in biological research [J]. FEBS letters, 1998, 430(1): 83-87.
- [ 11 ] Biankin SA, Collector MI, Biankin AV, *et al.* A histological survey of green fluorescent protein expression in 'green' mice [J]. Implications for stem cell research. Pathology, 2007, 39(2): 247-251.
- [ 12 ] Ma D-F, Tezuka H, Kondo T, *et al.* Differential tissue expression of enhanced green fluorescent protein in 'green mice' [J]. Histology and histopathology, 2010, 25(6): 749-754.
- [ 13 ] 吴自成, 黄强, 邵义祥, 等. 人脑胶质瘤干细胞移植于表达绿色荧光蛋白裸小鼠的研究[J]. 中华医学杂志, 2008, 88(33): 2317-2320.
- [ 14 ] Dong J, Zhang QB, Huang Q, *et al.* Glioma stem cells involved in tumor tissue remodeling in a xenograft model [J]. J Neurosurg 2010, 113(2): 249-60.
- [ 15 ] Dong J, Zhao YD, Huang Q, *et al.* Glioma Stem/Progenitor Cells Contribute to Neovascularization via Transdifferentiation [J]. Stem Cell Rev and Rep 2011, 7(1): 141-152.
- [ 16 ] Dong J, Dai XI, Lu ZH, *et al.* Incubation and application of transgenic green fluorescence Nude mice in visualization studies on glioma issue remodeling [J]. Chin Med J 2012, 125(24): 4349-4354.

〔修回日期〕2014-12-03