

# 影响细菌人工染色体转基因小鼠制备效率的因素分析

王芊芊<sup>1</sup>, 王伟<sup>2</sup>, 刘睿<sup>2</sup>, 卫振<sup>1</sup>, 刘冲<sup>2</sup>

(1. 浙江大学实验动物中心, 杭州 310058; 2. 浙江大学医学院, 杭州 310058)

**[摘要]** **目的** 比较细菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome, BAC) 转基因小鼠研制中的几个关键因素如实验小鼠遗传背景、BAC 质粒注射浓度、BAC 质粒片段大小和 BAC 注射液存放时间等, 优化 BAC 转基因小鼠研制技术。**方法** 采用相同的 BAC DNA 制备方法, 分别选取 C57BL/6J (B6) 和 FVB/N 两种实验小鼠, 用质量浓度分别为 0.75、1.0、1.5 和 2.0 ng/ $\mu$ L 的 BAC 注射液进行胚胎显微注射, 分析不同 BAC DNA 片段大小和 BAC 载体 DNA 制备后至注射前的时间长度, 比较小鼠出生率、转基因小鼠阳性率。**结果** 用 FVB/N 为背景的转基因小鼠阳性率较用 C57BL/6J 高 ( $P<0.05$ )。4 个 BAC 质粒注射质量浓度对应的 C57BL/6J 和 FVB/N 仔鼠出生率由高到低排序依次为 0.75 ng/ $\mu$ L 组 > 1.5 ng/ $\mu$ L 组 > 1.0 ng/ $\mu$ L 组 > 2.0 ng/ $\mu$ L 组。4 个 BAC 质粒质量浓度注射时, C57BL/6J 转基因小鼠阳性率由高到低排序依次为 1.5 ng/ $\mu$ L > 1.0 ng/ $\mu$ L > 2.0 ng/ $\mu$ L = 0.75 ng/ $\mu$ L, FVB/N 转基因小鼠阳性率由高到低排序依次为 1.5 ng/ $\mu$ L > 1.0 ng/ $\mu$ L > 2.0 ng/ $\mu$ L > 0.75 ng/ $\mu$ L。当 BAC 片段大小为 197 kb 时, 仔鼠出生率最高, 为 (22.49 $\pm$ 9.41)%; 片段大小为 99 kb 时仔鼠出生率最低, 为 (13.61 $\pm$ 15.65)%; 当 BAC 片段为 197 kb 时, 转基因小鼠阳性率最高, 为 (13.56 $\pm$ 12.88)%, 极显著高于 114 kb ( $P<0.01$ ), 显著高于 99 kb ( $P<0.05$ )。BAC 注射液的存放时间与转基因小鼠阳性率并不呈线性关系。**结论** 相较于 C57BL/6J, FVB/N 背景更适于 BAC 转基因小鼠的研制。BAC 注射液质量浓度为 1.5 ng/ $\mu$ L 时, 阳性转基因小鼠的制备效率最高。BAC 片段大小并非阳性转基因小鼠的限制因素。BAC 载体 DNA 制备后 1 周内完成注射的效果最佳。

**[关键词]** 细菌人工染色体; 转基因小鼠; 胚胎显微注射

**[中图分类号]** Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)06-0535-08

## Factors Affecting Production Efficiency of Bacterial Artificial Chromosome Transgenic Mice

WANG Qianqian<sup>1</sup>, WANG Wei<sup>2</sup>, LIU Rui<sup>2</sup>, WEI Zhen<sup>1</sup>, LIU Chong<sup>2</sup>

(1. Laboratory Animal Center of Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China)

Correspondence to: LIU Chong, E-mail: chongliu77@zju.edu.cn

**[Abstract]** **Objective** By comparing some key factors in generating bacterial artificial chromosome (BAC) transgenic mice, such as the background of strains, the concentration of the BAC DNA used for injection, the size of the BAC DNA, and the storage time of the BAC DNA injection, to optimize the generation of BAC transgenic mice. **Methods** The same procedure of BAC DNA preparation was used with two mouse strains, i.e. C57BL/6J and FVB/N to produce embryos; four concentrations of DNA for injection (0.75, 1.0, 1.5, and 2.0 ng/ $\mu$ L, respectively) were utilized to microinject into the embryos. The size of BAC DNA fragment and the time from BAC preparation to injection were recorded, and the birth rate and positive

**[基金项目]** 浙江省公益技术应用研究实验动物项目(2017C37148)

**[作者简介]** 王芊芊(1983—), 女, 实验师, 研究方向: 实验动物学。E-mail: angelawang@zju.edu.cn

**[通信作者]** 刘冲(1977—), 男, 博士, 研究员, 主要研究方向: 疾病动物模型研制等。E-mail: chongliu77@zju.edu.cn

rate of transgenic mice were compared. **Results** The positive rate of transgenic mice with FVB/N background was higher than that of C57BL/6J background ( $P < 0.05$ ). When different concentrations of BAC DNA were adopted, the birth rates of C57BL/6J and FVB/N mice from high to low were 0.75 ng/ $\mu$ L > 1.5 ng/ $\mu$ L > 1.0 ng/ $\mu$ L > 2.0 ng/ $\mu$ L. When the injection concentration was 1.5 ng/ $\mu$ L, the positive rates transgenic mice in C57BL/6J and FVB/N newborns were the highest, while the positive rate was 0 in C57BL/6J newborns when the injection concentration was 0.75 ng/ $\mu$ L and 2.0 ng/ $\mu$ L. When different concentrations of BAC DNA were adopted, the positive rate of transgenic mice in FVB/N newborns from high to low was 1.5 ng/ $\mu$ L > 1.0 ng/ $\mu$ L > 2.0 ng/ $\mu$ L > 0.75 ng/ $\mu$ L. When the BAC fragment size was 197 kb, the mice birth rate was highest at (22.49 $\pm$ 9.41)%, and when the fragment size was 99 kb, the birth rate was lowest at (13.61 $\pm$ 15.65)%. When the BAC fragment was 197 kb, the transgenic mice had the highest positive rate of (13.56 $\pm$ 12.88)%, extremely significantly higher than that for 114 kb ( $P < 0.01$ ) and significantly higher than that for 99 kb ( $P < 0.05$ ). The storage time of BAC injection was not linearly associated with the positive rate of transgenic mice. **Conclusion** Compared with C57BL/6J, mice with FVB/N background appear more suitable for the generation of BAC transgenic mice. When the concentration of BAC DAN injection is 1.5 ng/ $\mu$ L, the positive rate of transgenic mice is the highest. BAC fragment size is not a constraining factor for positive transgenic mice. The highest efficiency is expected when the BAC DNA is injected within one week after preparation.

**[Key words]** Bacterial artificial chromosome; Transgenic mice; Embryo microinjection

转基因小鼠现已广泛应用于基因功能研究、肿瘤学研究、发育生物学研究和基因治疗等众多生物学和医学领域。用于DNA片段构建的载体(vector)系统是转基因小鼠构建过程中的重要工具。其中,细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC)相较于质粒(plasmid)的系统容量大,相较于黏粒(cosmid)和酵母人工染色体等则有稳定性较好和便于通过商业途径购买等优点<sup>[1-6]</sup>。但是由于BAC载体承载大片段基因组DNA(>80 kb),与普通小片段DNA(<20 kb)转基因小鼠相比整合率较低<sup>[7-8]</sup>,且BAC注射液易存在胚胎发育阻滞和大片段易降解等不足<sup>[9-12]</sup>,国内鲜有研究机构能稳定制备BAC转基因小鼠。

转基因小鼠研制过程中各个实验参数的微小差异都可直接影响最终的实验结果。本文通过对本中心历时两年的BAC转基因小鼠研制数据进行分析,比较了实验小鼠背景、BAC质粒注射浓度、BAC质粒的片段大小和BAC注射液存放时间等因素,以期选出最佳的实验参数,从而获得最高的BAC阳性转基因小鼠效率。

## 1 材料与方法

### 1.1 BAC DNA的纯化与制备

将BAC DNA克隆载体(本实验室保存)通过离子柱层析法分离,再利用限制性内切酶将克隆载体从骨架上分离出来,获得线性的BAC DNA分子。制备Polyamine(PA)缓冲液,成分为:10 mmol/L Tris-HCl(pH值7.5)、0.1 mmol/L EDTA、30  $\mu$ mol/L 精胺、70 mmol/L 亚精胺、100 mmol/L NaCl<sup>[13]</sup>。将线性的BAC DNA溶于经0.02  $\mu$ m孔径的无机滤膜过滤的PA缓冲液中,注意在操作过程中避免涡旋和剧烈震荡。将重悬好的BAC溶液存放于4  $^{\circ}$ C。在准备显微注射之前,用NanoDrop分光光度计(美国Thermo公司产品)将BAC溶液在260 nm的吸光度下进行浓度测定并校准。用脉冲场电泳(美国Bio-Rad公司产品,型号CHEF-DR)测定BAC DNA的完整性。BAC注射液共配制4种质量浓度,包含17种BAC质粒,其中BAC DNA长度共7种。

### 1.2 实验小鼠的准备

用于收集显微注射的受精卵的小鼠共有两种背景:C57BL/6J(B6)和FVB/N,均购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[SCXK(沪)

2017-0005]。雄鼠为同背景3~6月龄,单笼饲养;雌鼠每笼5只饲养。代孕母鼠为ICR,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。ICR雄鼠6~8周时在SPF屏障系统内进行结扎手术,ICR雌鼠为12~20周。所有实验小鼠均为SPF级,饲养在本实验动物中心屏障设施[SYXK(浙)2018-0016]的独立通风饲养笼盒内,自由取食及饮水。饲养间内温度为22~24℃,12h/12h明暗交替。研究中涉及的动物实验方案已通过浙江大学实验动物伦理委员会审批(批准号为ZJU20200140)。

### 1.3 超数排卵和受精卵收集

实验前1周购买3~4周的供卵雌鼠(C57BL/6J和FVB/N),在实验动物饲养屏障系统内饲养1周后,注射10U孕马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotropin, PMSG),46~50h后注射10U人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotrophin, hCG)。注射hCG后将雌鼠与单笼饲养的同品系雄鼠合笼,合笼后第2天早上检查雌鼠的见栓情况。供卵的C57BL/6J和FVB/N雌鼠均采用同样的促排卵药物剂量和注射间隔时间。

将见栓的供卵雌鼠挑出,安乐死后,剪下双侧的输卵管,在M2胚胎培养液(美国Sigma公司产品,货号M7167)中漂洗后,置于15mg/mL M2的透明质酸酶液滴内,用显微镊子刺破输卵管的膨大部释放受精卵团,约3min后将消化掉卵丘细胞的卵子用口吸管转移至M2微滴中,多次漂洗后置于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱内培养待用。

### 1.4 受精卵原核显微注射

用于原核显微注射的持卵针为自制(外径120μm,内径50μm),注射针为购买的商品化注射针(美国Eppendorf公司产品,型号Femtotips® II)。显微操作系统工作站包括荧光倒置显微镜(日本Olympus公司产品,型号IX71)、显微操作臂和显微注射泵(均为美国Eppendorf公司产品)等。

每次实验前将制备好的BAC DNA溶液通过微量加样吸头(美国Eppendorf Microloader™产品,0.5~20μL)灌入显微注射针内,再将持卵针和注射针固定于显微操作臂上。将盛有受精卵

的培养皿置于显微镜下,调整好持卵针与注射针的位置,选取有清晰雄原核和雌原核的受精卵,将BAC DNA注入其中一个原核中(看到核膜有明显膨胀即停止注射)。注射后的胚胎放入M2微滴中,转移至37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱内,0.5h后移植或者放入KSOM(美国Millipore公司产品,货号M-107-D)微滴中,转移至37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱内,过夜培养至第2天发育到2细胞期后移植。

### 1.5 注射后胚胎移植

称取戊巴比妥钠粉剂,用无菌水配制成1%戊巴比妥钠麻醉剂,充分溶解后,用0.22μm的滤器(购自美国Millipore公司)过滤待用。见栓0.5d的受体ICR(ICR雌鼠与结扎雄鼠合笼,第2天早上见栓,记为见栓0.5d)按40~50mg/kg的剂量腹腔注射1%戊巴比妥钠麻醉后,置于体式显微镜(Olympus)下剪去体背一侧小面积的被毛,用75%乙醇溶液消毒皮肤。然后在背部相当于最后一根肋骨的位置剪开一个纵向切口,用小镊子小心夹住脂肪垫,牵引出卵巢、输卵管和子宫,用脂肪夹夹住脂肪垫,固定好卵巢和输卵管。在解剖镜下找到输卵管的伞口,用维纳斯剪在卵巢囊膜上避开大血管剪开一个小口。用移植针小心吸取当天注射受精卵或注射后发育至2细胞的胚胎25~28枚,插入单侧输卵管的伞口,吹入胚胎。将脂肪垫、卵巢和输卵管一起放回腹腔中,分别缝合肌肉层和皮肤。

### 1.6 基因型鉴定

待仔鼠出生7~10d,剪取脚趾编号,剪脚趾过程中对仔鼠辅以异氟烷气麻。并用脚趾组织提取DNA。针对不同的BAC片段至少设计两对引物,用PCR的方法鉴定目的基因是否整合至小鼠基因组。对鉴定为阳性的小鼠采用免疫荧光染色的方法复核。

### 1.7 数据分析和统计说明

胚胎发育率是小鼠胚胎经原核显微注射,转移至KSOM(Millipore)培养液滴中,放置于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中过夜培养后,于显微注射实验第2天统计发育至2细胞期的胚胎数占注射后形态完整的胚胎总数的比例。仔鼠出生率为出生的仔鼠数量与移植胚胎数量的比例。转基因

小鼠阳性率为阳性 BAC 转基因小鼠数量与出生小鼠数量的比例。

本研究采用 SPSS 16.0 和 Graphpad 软件对实验数据进行统计分析并制图。计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。两组间比较用 *t* 检验分析；多组间比较用方差分析，组内两两比较用 LSD-*t* 检验；方差齐性检测后发现不适合方差分析的数据，则采用卡方检验。以 *P* 值 < 0.05 认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 BAC 注射液浓度与仔鼠出生率和转基因小鼠阳性率的关系

用 C57BL/6J 作为实验背景鼠时，选取了 4 种质量浓度的 BAC 注射液，分别为 0.75、1.0、1.5 和 2.0 ng/μL。BAC 注射液质量浓度为 0.75 ng/μL 时，仔鼠出生率最高为 (16.52±0.79)% (*n*=2)，但阳性率为 0。当 BAC 注射液质量浓度为 2 ng/μL 时，仔鼠出生率最低为 (14.08±6.01)% (*n*=4)，且阳性率为 0。当 BAC 注射液质量浓度为 1.5 ng/μL 时，转基因小鼠阳性率最高，为 (6.85±1.71)% (*n*=23)。

用 FVB/N 作为实验背景鼠时，同样选取了 0.75、1.0、1.5 和 2.0 ng/μL 共 4 种质量浓度的 BAC 注射液。BAC 注射液质量浓度为 0.75 ng/μL 时，仔鼠出生率最高为 (21.80±4.07)% (*n*=4)，但阳性率仅为 (1.67±1.67)% (*n*=4)。当

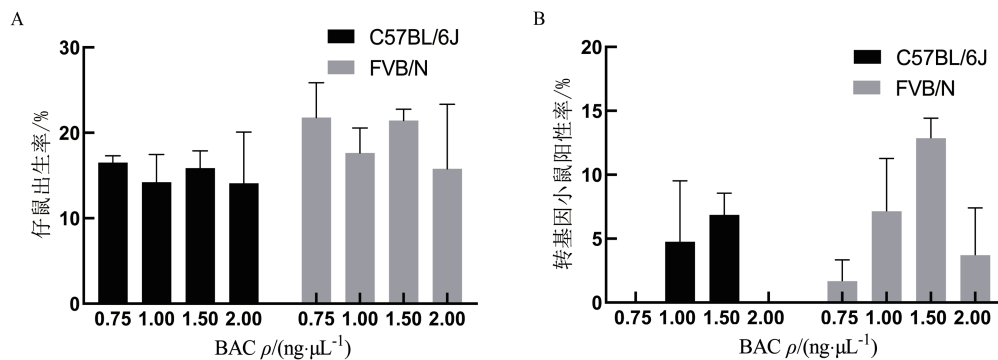
质量浓度为 1.0 ng/μL 和 2.0 ng/μL 时，仔鼠出生率分别为 (17.65±2.92)% (*n*=4) 和 (15.80±7.53)% (*n*=3)，阳性率为 (7.15±4.13)% (*n*=4) 和 (3.70±3.70)% (*n*=3)。BAC 注射液质量浓度为 1.5 ng/μL 时，仔鼠出生率为 (21.44±1.31)% (*n*=58)，阳性率达到最高值为 (12.86±1.57)% (*n*=58)。

统计学分析 C57BL/6J 和 FVB/N 两种实验小鼠在 4 种质量浓度的 BAC 注射液下的仔鼠出生率，结果显示不同浓度之间差异无统计学意义 (*P*=0.305，图 1A)；而转基因小鼠阳性率在不同浓度之间差异有统计学意义 (*P*=0.028，图 1B)。

### 2.2 实验小鼠的背景与转基因小鼠阳性率的关系

本实验选取 C57BL/6J 和 FVB/N 两种背景的实验小鼠作为供卵鼠。注射所用的 BAC 制备方法与受体小鼠相同。共注射了 17 种不同的 BAC DNA 溶液，其中 8 种 BAC 质粒以 C57BL/6J 小鼠为背景，另 9 种 BAC 质粒以 FVB/N 为背景。分别统计了 C57BL/6J 和 FVB/N 两种小鼠在 4 种注射液浓度下的胚胎发育率、仔鼠出生率、转基因小鼠阳性率差异。

C57BL/6J 小鼠的胚胎发育率为 (81.76±2.55)% (*n*=35)，FVB/N 小鼠的胚胎发育率为 (84.62±3.18)% (*n*=21)，略高于 C57BL/6J 小鼠，但两者之间并没有显著差异 (*P*=0.488，图 2A)。



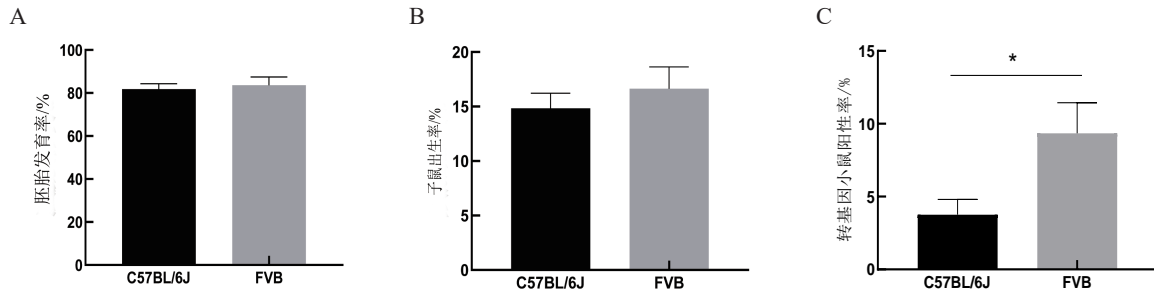
注：BAC 为细菌人工染色体。一般每轮实验促排卵雌鼠 10 只左右，获取足量受精卵后进行胚胎显微注射，并将注射后存活胚胎移植，直至仔鼠出生，随后进行基因型鉴定，计为一轮实验。

图 1 BAC 注射液质量浓度与 C57BL/6J、FVB/N 仔鼠出生率 (A) 和转基因小鼠阳性率 (B) 的关系

Figure 1 The relationships of BAC DNA concentration with birth rate (A) and transgene positive rate (B) of C57BL/6J and FVB/N mice

C57BL/6J的仔鼠出生率为(14.85±1.38)% ( $n=55$ )。FVB/N的仔鼠出生率为(17.39±1.62)% ( $n=33$ )，略高于C57BL/6J小鼠。两者之间并没有显著差异( $P=0.245$ ，图2B)。

C57BL/6J的转基因小鼠阳性率为(3.75±1.05)% ( $n=49$ )，FVB/N的转基因小鼠阳性率为(9.34±2.11)% ( $n=31$ )。C57BL/6J的转基因小鼠阳性率显著低于FVB/N( $P=0.011$ ，图2C)。



注：A，胚胎发育率=显微注射后发育至2细胞的胚胎数/显微注射后存活的胚胎总数；B，仔鼠出生率=出生仔鼠数量/移植胚胎数量；C，转基因小鼠阳性率=阳性转基因小鼠数量/出生小鼠数量。\* $P<0.05$ 。

图2 两种实验小鼠背景与胚胎显微注射后胚胎发育率、仔鼠出生率和转基因小鼠阳性率的关系

Figure 2 The relationships of two backgrounds with embryo development rate, birth rate, and transgene positive rate after embryo microinjection

### 2.3 BAC注射液制备后存放时间与转基因小鼠阳性率的关系

17种BAC注射液制备至显微注射当天最短为1 d，最长为43 d，其中有部分实验为同种BAC溶液分别放置了不同的时间来进行显微注射。储存条件：PA缓冲液中，存于4℃。阳性率最高(50%)的一次实验是BAC注射液制备距注射2 d，阳性率最低(0%)的在2~43 d均有分布。从图3看，BAC注射液的存放时间与转基因小鼠阳性率并不呈线性关系。

### 2.4 BAC质粒大小与转基因小鼠阳性率的关系

所有注射的17种BAC注射液中包含的BAC DNA片段大小范围为99~197 kb，共有7个不同的片段，分别为99 kb、114 kb、126 kb、137 kb、177 kb、180 kb和197 kb。以这7种不同大小的BAC片段进行胚胎显微注射，统计注射后胚胎存活率、注射后胚胎发育率(胚胎发育率)、注射胚胎移植后仔鼠出生率(仔鼠出生率)和BAC转基因小鼠阳性率，结果如表1和图4所示。

通过SPSS16软件对数据进行分析，BAC DNA片段大小对注射后胚胎存活率和胚胎发育率的影响极显著( $P=0$ )，对转基因小鼠阳性率

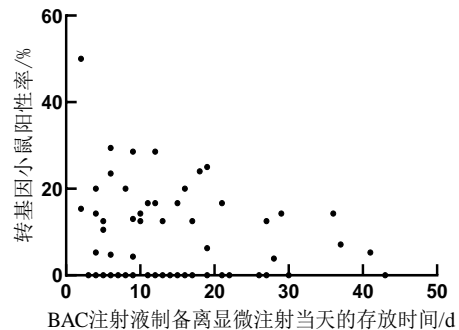


图3 BAC注射液的存放时间与转基因小鼠阳性率之间的关系

Figure 3 The relationships between the storage time of BAC DNA injection and the positive rate of transgenic mice

的影响显著( $P=0.015$ )，对仔鼠出生率影响不显著( $P=0.488$ )。

多重比较显示，当BAC片段为114 kb时，注射后胚胎存活率最高，明显高于137 kb、177 kb和180 kb片段( $P<0.01$ )，也高于197 kb片段( $P<0.05$ )。BAC片段为177 kb时，注射后胚胎存活率最低，为(56.17±10.14)%，明显低于99 kb和114 kb片段( $P<0.01$ )。

表1 注射7种片段大小的BAC DNA所对应的胚胎存活率、胚胎发育率、仔鼠出生率和转基因小鼠阳性率  
Table 1 Survival embryo rate, embryo development rate, birth rate, and the positive rate of transgenic mice injected with seven different BAC DNA sizes

BAC 片段大小/kb	数量	注射后胚胎存活率/%	胚胎发育率/%	仔鼠出生率/%	转基因小鼠阳性率/%
99	9	67.81±13.62	68.06±14.08	13.61±15.65	3.24±6.52
114	17	74.97±7.76	92.30±5.48 <sup>△△</sup>	16.02±7.46	0.74±3.03
126	4	66.72±9.05	91.40±4.26 <sup>△△</sup>	15.24±10.64	13.30±9.78**
137	9	63.17±8.60**	90.78±2.65 <sup>△△</sup>	19.26±8.76	12.88±17.36
177	11	56.17±10.14 <sup>**△</sup>	78.92±13.01*	16.07±10.92	9.63±9.44*
180	17	57.06±6.41 <sup>**△</sup>	88.27±10.41 <sup>△△</sup>	19.63±8.31	7.32±9.57
197	9	66.79±10.17*	92.62±1.01 <sup>△△</sup>	22.49±9.41	13.56±12.88*

( $\bar{x} \pm s$ )

注：\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , vs BAC 片段大小为 114 kb 组；<sup>△</sup> $P < 0.05$ , <sup>△△</sup> $P < 0.01$ , vs BAC 片段大小为 99 kb 组。注射后胚胎存活率=胚胎经显微注射 0.5 h 后仍存活的数量/显微注射的胚胎总数；胚胎发育率=显微注射后发育至 2 细胞的胚胎数/显微注射后存活的胚胎总数；仔鼠出生率=出生仔鼠数量/移植胚胎数量；转基因小鼠阳性率=阳性转基因小鼠数量/出生小鼠数量。

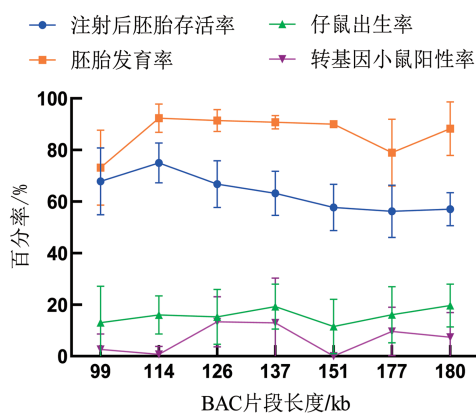


图4 BAC 片段大小与胚胎存活率、胚胎发育率、仔鼠出生率和转基因小鼠阳性率的关系

Figure 4 Correlations of the size of BAC DNA with survival embryo rate, embryo development rate, birth rate, and the positive rate of transgenic mice

多重比较显示，当 BAC 片段为 197 kb 时，胚胎发育率最高，为 (92.62±1.01) %，明显高于 99 kb 片段 ( $P < 0.01$ )，也高于 177 kb 片段 ( $P < 0.05$ )。BAC 为 99 kb 时，胚胎发育率最低，略低于 177 kb 片段 ( $P > 0.05$ )，极显著低于其他各组 ( $P < 0.01$ )。

当 BAC 片段为 197 kb 时，仔鼠出生率最高，为 (22.49±9.41) %。BAC 为 99 kb 时，仔鼠出生

率最低，为 (13.61±15.65) %，但组间差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

多重比较显示，当 BAC 片段为 197 kb 时，转基因小鼠阳性率最高，为 (13.56±12.88) %，明显高于 114 kb ( $P < 0.01$ )，也高于 99 kb ( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

影响 BAC 转基因小鼠研制效率的因素有很多，最关键的一些因素包括 BAC DNA 的制备方法<sup>[14-15]</sup>、BAC DNA 的纯化及储存条件和储存时间<sup>[16]</sup>、BAC 注射液的浓度<sup>[17]</sup>、供体小鼠的背景等<sup>[18-20]</sup>。本文首先采用同一种 BAC DNA，以同一种注射液浓度 (1.5 ng/μL) 分别注射 C57BL/6J 和 FVB/N 两种不同背景小鼠的受精卵并移植，比较了仔鼠出生率和转基因小鼠阳性率，结果显示 FVB/N 均略高于 C57BL/6J。但因为 C57BL/6J 的数据相对较少，没有统计学意义，故未单独列出。随后在选用固定的 BAC DNA 制备方法的前提下，分别比较了 BAC 注射液浓度、实验小鼠背景、BAC DNA 片段大小、BAC 注射液制备后存放时间与转基因小鼠阳性率的关系。

从实验结果来看，在一定范围内，BAC 注射

液质量浓度与转基因小鼠阳性率呈正相关。随着浓度升高, 阳性仔鼠在出生仔鼠中的占比逐渐升高。但BAC注射液质量浓度与仔鼠出生率基本呈负相关, 即注射液浓度越高, 存活下来的仔鼠数量越少, 特别是当注射液质量浓度达到 $2.0\text{ ng}/\mu\text{L}$ 时, C57BL/6J和FVB/N的仔鼠出生率均为最低, 从而导致最终获得的阳性转基因小鼠数量反而下降。这个结果也与文献[14]的结果吻合。而且由于BAC注射液对于小鼠早期胚胎本身就具有一定的毒性, 且BAC片段普遍大于 $100\text{ kb}$ , 相对于普通转基因片段大得多, 因此, 获得BAC转基因阳性小鼠相对更困难。相对于小片段的质粒, BAC转基因小鼠研制中适于注射的浓度范围非常小。实验中需要找到最佳的BAC注射液浓度, 让仔鼠出生率与转基因阳性率之间达到平衡。本实验结果显示, 当BAC注射液质量浓度为 $1.5\text{ ng}/\mu\text{L}$ 时, C57BL/6J和FVB/N的仔鼠出生率分别为 $(15.87\pm 2.02)\%$ 和 $(21.44\pm 1.31)\%$ , 转基因小鼠阳性率分别为 $(6.85\pm 1.71)\%$ 和 $(12.86\pm 1.57)\%$ , 说明此浓度为最佳注射浓度。

通过比较C57BL/6J和FVB/N两种背景的实验小鼠作为供卵小鼠的效果, 结果显示C57BL/6J的仔鼠出生率略低于FVB/N, 没有显著差异, 但C57BL/6J的转基因小鼠阳性率显著低于FVB/N, 提示FVB/N小鼠更有利于作为BAC转基因小鼠研制的供卵小鼠。推测其主要因素有两个: 一是FVB/N小鼠受精卵中雄原核与雌原核的体积较C57BL/6J的明显更大<sup>[20]</sup>, 在注射过程中, 注射针尖更容易到达细胞核内的准确位置; 而C57BL/6J小鼠的受精卵在注射过程中, 由于原核体积相对较小, 且核内还有极具黏性的核仁, 注射针尖需到达原核内且避开核仁, 显微注射操作具有较大的难度, 例如实际操作中经常因为注射针尖到达C57BL/6J小鼠受精卵的原核中后粘到核仁, 并在出针时牵拉出核仁, 导致胚胎死亡。二是C57BL/6J小鼠受精卵相对FVB/N的有更多的色素颗粒。在高倍镜下观察时, C57BL/6J

小鼠的受精卵常常因为色素颗粒遮挡而导致原核边界看不清楚, 从而影响显微注射的准确性, 而FVB/N小鼠的受精卵在显微镜下非常透亮, 原核大且边界很清晰更有利于显微注射。

本实验统计了7种不同的BAC DNA片段大小与注射后胚胎存活率、注射后胚胎发育率、注射胚胎移植后仔鼠出生率和BAC转基因小鼠阳性率的数据, 分析后发现, 当BAC片段达到 $197\text{ kb}$ 时, 胚胎发育率和转基因小鼠阳性率均为组间最高, 提示转基因小鼠阳性率并不与BAC片段大小呈反比, 即随着注射的BAC片段不断增大, 转基因阳性小鼠并不比片段较小时更难获得。因此, 只要采取合适的方式制备BAC注射液并稀释至最优的注射浓度, 同时选取FVB背景小鼠, 那么BAC片段的大小并不是获得转基因阳性小鼠的限制因素。在上述实验中, BAC注射液制备后的存放时间为 $1\sim 43\text{ d}$ , 通过对比存放时间与转基因小鼠阳性率的关系发现, 这两者间并不呈线性关系。因此, 只要保存条件得当, BAC注射液自制备之日起后的近1个月时间内均可用于注射, 但建议越早注射越好。所有实验中, 阳性率最高(50%)的一次实验是BAC注射液制备距注射 $2\text{ d}$ , 而当注射液存放超过 $30\text{ d}$ 后, 阳性率明显下降。

#### 参考文献:

- [1] BEIL J, BUCH T. Generation of bacterial artificial chromosome (BAC) transgenic mice[M]. //SINGH S, COPPOLA V. Mouse genetics. Methods in molecular biology (Methods and protocols), vol 1194. New York: Humana Press, 2014-07-03. DOI: 10.1007/978-1-4939-1215-5\_8.
- [2] GONG S, YANG X W. Modification of bacterial artificial chromosomes (BACs) and preparation of intact BAC DNA for generation of transgenic mice[J]. Curr Protoc Neurosci, 2005, Chapter 5: Unit 5.21. DOI: 10.1002/0471142301.ns0521s31.
- [3] COPELAND N G, JENKINS N A, COURT D L. Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics[J]. Nat Rev Genet, 2001, 2(10): 769-779. DOI:10.1038/35093556.

- [4] LEE E C, YU D, MARTINEZ DE VELASCO J, et al. A highly efficient *Escherichia coli*-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA[J]. *Genomics*, 2001, 73(1):56-65. DOI:10.1006/geno.2000.6451.
- [5] SCHEDL A, LARIN Z, MONTOLIU L, et al. A method for the generation of YAC transgenic mice by pronuclear microinjection[J]. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21(20):4783-4787. DOI:10.1093/nar/21.20.4783.
- [6] FU Y, MAYE P. Engineering BAC reporter gene constructs for mouse transgenesis[J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 693: 163-179. DOI: 10.1007/978-1-60761-974-1\_10.
- [7] OSOEGAWA K, TATENO M, WOON P Y, et al. Bacterial artificial chromosome libraries for mouse sequencing and functional analysis[J]. *Genome Res*, 2000, 10(1):116-128.
- [8] SPARWASSER T, GONG S, LI J Y, et al. General method for the modification of different BAC types and the rapid generation of BAC transgenic mice[J]. *Genesis*, 2004, 38(1):39-50. DOI:10.1002/gene.10249.
- [9] NARAYANAN K, CHEN Q. Bacterial artificial chromosome mutagenesis using recombineering[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 2011:971296. DOI:10.1155/2011/971296.
- [10] MRASEK K, WILHELM K, QUINTANA L G, et al. BAC-probes applied for characterization of fragile sites (FS)[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1227:289-298. DOI: 10.1007/978-1-4939-1652-8\_15.
- [11] ZEIDLER M G, VAN KEUREN M L, SAUNDERS T L. BAC transgenes, DNA purification, and transgenic mouse production[M]. // PEASE S, SAUNDERS T. *Advanced protocols for animal transgenesis*. Springer Protocols Handbooks. Berlin, Heidelberg: Springer, 2011. DOI:10.1007/978-3-642-20792-1\_9.
- [12] AUERBACH A B. Production of functional transgenic mice by DNA pronuclear microinjection[J]. *Acta Biochim Pol*, 2004, 51(1):9-31.
- [13] MONTOLIU L, THOMAS BOCK C, SCHÜTZ G, et al. Visualization of large DNA molecules by electron microscopy with polyamines: application to the analysis of yeast endogenous and artificial chromosomes[J]. *J Mol Biol*, 1995, 246(4): 486-492. DOI:10.1006/jmbi.1994.0100.
- [14] VAN KEUREN M L, GAVRILINA G B, FILIPIAK W E, et al. Generating transgenic mice from bacterial artificial chromosomes: transgenesis efficiency, integration and expression outcomes[J]. *Transgenic Res*, 2009, 18(5): 769-785. DOI: 10.1007/s11248-009-9271-2.
- [15] ZEIDLER M G, SAUNDERS T L. Transgene recombineering in bacterial artificial chromosomes[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1874: 43-69. DOI: 10.1007/978-1-4939-8831-0\_3.
- [16] SUSTER M L, SUMIYAMA K, KAWAKAMI K. Transposon-mediated BAC transgenesis in zebrafish and mice[J]. *BMC Genomics*, 2009, 10: 477. DOI: 10.1186/1471-2164-10-477.
- [17] GANGALUM R K, JING Z, NAGAOKA Y, et al. Purification of BAC DNA for high-efficiency transgenesis[J]. *Biotechniques*, 2011, 51(5):335-6,338. DOI:10.2144/000113763.
- [18] LIU C, DU Y, XIE W, et al. Purification of plasmid and BAC transgenic DNA constructs[J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 1027: 203-215. DOI: 10.1007/978-1-60327-369-5\_9.
- [19] AUERBACH A B, NORINSKY R, HO W, et al. Strain-dependent differences in the efficiency of transgenic mouse production[J]. *Transgenic Res*, 2003, 12(1):59-69. DOI:10.1023/a: 1022166921766.
- [20] TAKETO M, SCHROEDER A C, MOBRAATEN L E, et al. FVB/N: an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses[J]. *PNAS*, 1991, 88(6):2065-2069. DOI:10.1073/pnas.88.6.2065.

(收稿日期: 2021-02-08 修回日期: 2021-08-02)