

# KO First 小鼠交配策略介绍

## 1. 关于 KO First 打靶策略

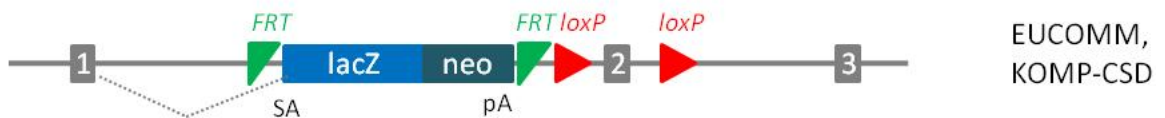
### Knockout First (Conditional Ready)

'KO First'等位基因的最初状态是一个不表达的状态（即基因敲除），但可以通过 FLP 重组酶介导的重组转变为条件性打靶等位基因。

Knockout-first (promoter)



Knockout-first (promoterless)



## 2. ES 细胞背景信息

QSOX1 B12:

ES 细胞系: JM8.N4, 来源于 C57BL/6N 小鼠;

毛色: 黑色。

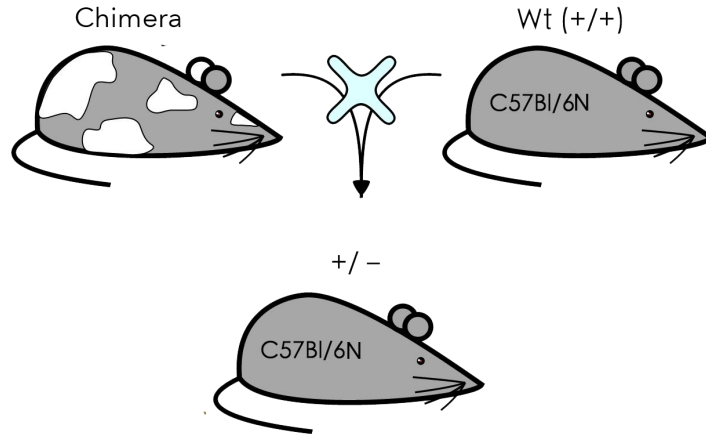
## 3. 基因型鉴定方法

- (1) LacZ
- (2) Neo
- (3) 1st LoxP
- (4) 2nd LoxP
- (5) 3rd LoxP

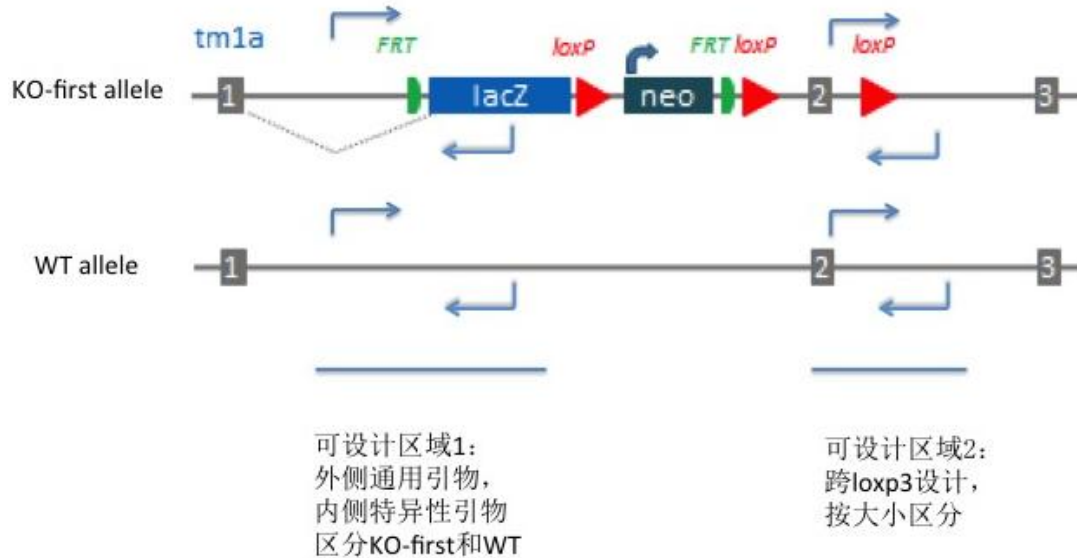
## 4. 获得嵌合鼠之后的交配策略

### 获得敲除小鼠的交配方法:

'KO First'等位基因的初始状态是个不表达的状态（即基因敲除），因此可以将嵌合鼠与野生型 C57BL/6N 小鼠交配直接获得基因敲除的杂合子 (+/-)。根据 ES 细胞的来源背景，这样交配所获得的后代小鼠的背景将是纯的 C57BL/6N。



### F1 鉴定方案



### 区分 KO-first allele 与 WT allele (+/-)

可设计区域 1: 外侧设计一条通用引物, 位于 construct B1 Gateway 外侧, 原先基因组的序列上, 另一侧设计为 KO 和 WT 特异性的引物, KO 特异性引物位于 B1 Gateway 右侧载体区域, WT 引物位于 LOA 区域或者是 Critical Region, 有条

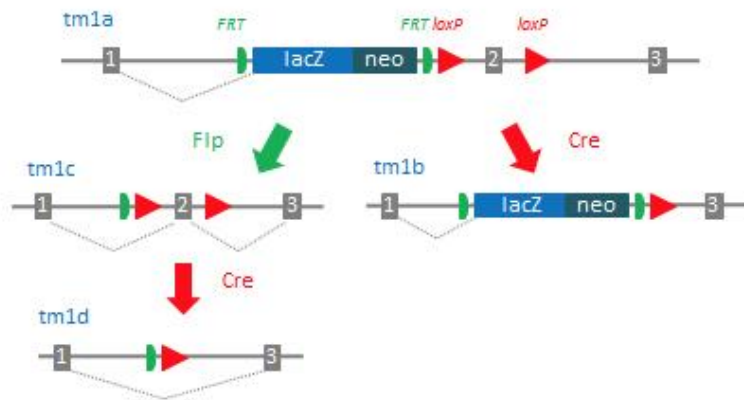
件可以设计成产物长度有区分度的，做成一个反应体系。

可设计区域 2：针对 loxp3 进行设计，一对引物跨 loxp3，左侧在 Critical Region，右侧在 3'arm 上，产物扩增需能够成功分离 WT 和 KO 扩增产物。也可以设计类似区域 1 的方案，WT 特异性产物置于 loxp3 替换区域，KO 特异产物置于 Synthesis loxp Region 上。

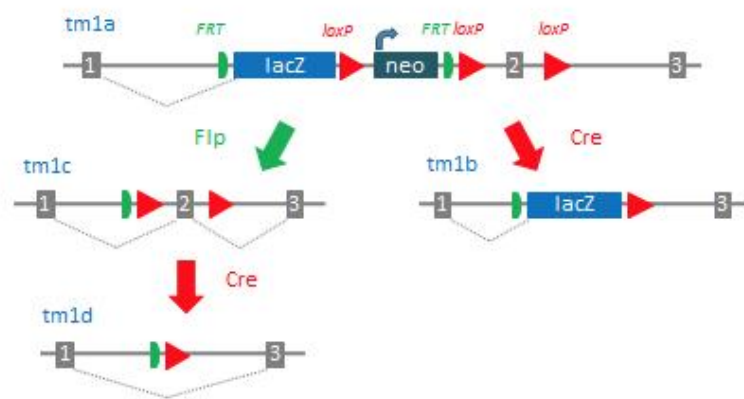
### 获得条件性打靶的小鼠

'KO First'等位基因能够通过 FLP 介导的重组转变为条件性打靶，重组过程中将去除两个 FRT 位点之间的 lacZ 和 Neo 区域。

#### Knockout-first allele: Promoterless selection cassette



#### Knockout-first allele: Promoter-driven selection cassette



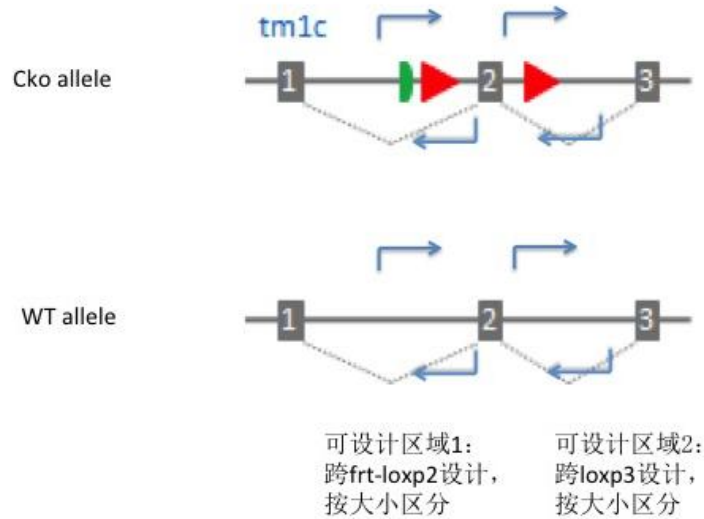
### 所需的工具鼠：

FLPeR (J003946, [129S4/SvJaeSor-Gt\(ROSA\)26Sor<sup>tm1\(FLP1\)Dym/J</sup>](#))

表达 FLP 重组酶，可从南京大学模式动物研究所获取 (已经回交到 B6J 背景)。

为了获得条件性打靶的小鼠，可以将第一代杂合子 (+/-) 与 FLPeR 小鼠交配。

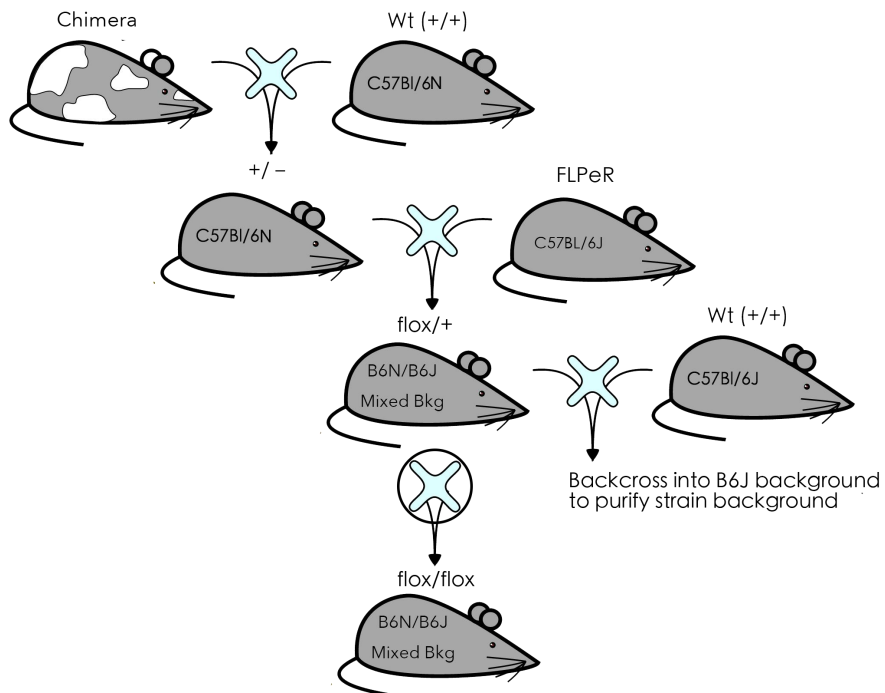
### Flox 鼠鉴定方案



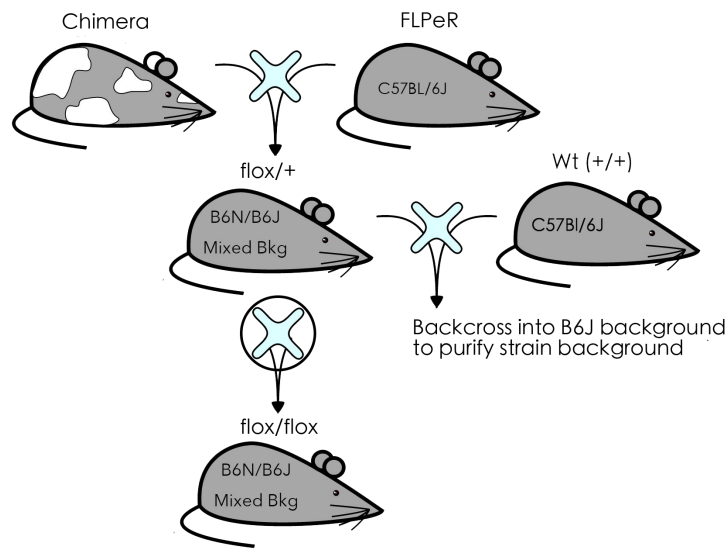
### 区分 Cko allele 与 WT allele (flox/+)

可设计区域 1: 针对 FLP 删除 lacZ 及 Neo 后的序列进行设计，引物可以设计为跨该区域，需注意条带是否能够区分。如果没有区分度，一侧设计为通用引物，另一侧设计 Cko 特异性引物，WT 特异性引物设计在 LOA 区域。

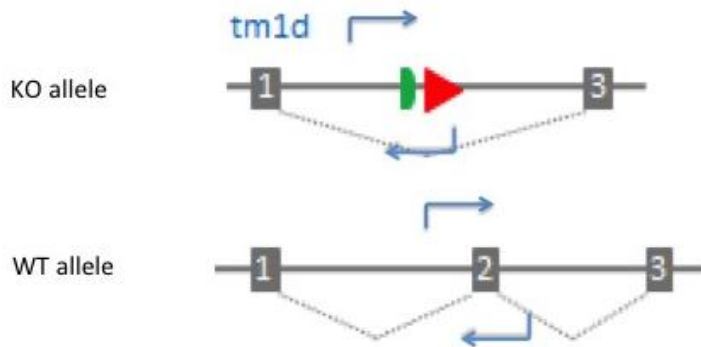
可设计区域 2: 设计方案同上述 KO-first。



或者，在已经确定生殖遗传的情况下，可以直接将嵌合鼠与 FLPeR 交配，这个交配策略可以节约 1 个月左右。



### KO 鼠鉴定方案



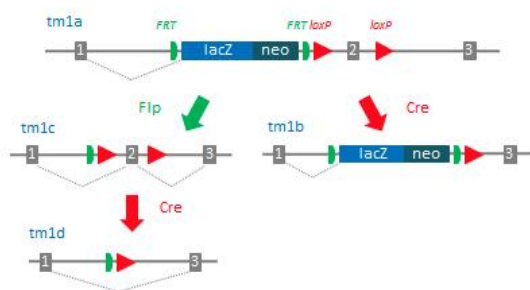
### 区分 KO allele 与 WT allele

由敲除区域大小决定，如果敲除区域较小，可以设计跨敲除区域的一对引物，按产物大小区分 KO 和 WT。如果敲除区域较大，设计一条通用引物，另一侧为 WT（设计在 LOA 区域）和 KO（设计在 frt-loxp 区间内）特异性引物。

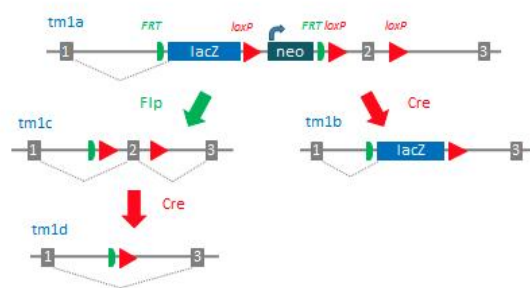
附注:

1. 本合同中，使用的突变小鼠胚胎干细胞来自于 IKMC(International Knockout Mouse Consortium)，打靶策略为 IKMC 定义的 Knockout-first allele。
2. Knockout-first allele 最初是一个敲除的状态 (tm1a allele)，提前引入终止翻译信号造成基因不表达。在 Flp 存在下，可以转化为条件性敲除 (tm1c allele)。在 Cre 存在的情况下，可以删除 loxp 间的关键区域 (Critical Region)，造成移码突变，造成蛋白表达提前终止。根据打靶载体中 neo 是否带有 promoter，载体分为两类: Promoterless selection cassette 和 Promoter-driven selection cassette。

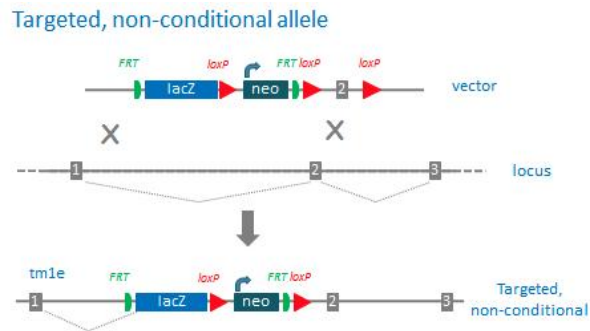
#### Knockout-first allele: Promoterless selection cassette



#### Knockout-first allele: Promoter-driven selection cassette



3. 在打靶载体进行 ES 细胞打靶时，可能出现远端 loxp 未能正确重组进基因组而丢失的情况，将这种情况定义为 Targeted, non-conditional allele，为敲除形式但不再具备转化为条件性敲除的能力。



4. 本项目中 ES 细胞的背景为 C57BL/6N。ES 细胞质量鉴定的各项指标通过仅表示该细胞株可用于后期显微注射及生殖遗传检查的操作，但不表示一定能够获得生殖遗传的突变小鼠。
5. 由注射获得的嵌合鼠与 C57BL/6N 进行交配检测生殖传递, 获得的 F1 小鼠为杂合 (tm1a+/-或 tm1e+/-), 可以通过 F1 代互交获得纯和的敲除小鼠 (tm1a-/-或 tm1e-/-)。
6. Knockout first allele 能够通过 FLP 介导的重组转变为条件性打靶, 重组过程中将去除两个 FRT 位点之间的 lacZ 和 Neo 区域。为了获得条件性打靶的小鼠, 可以将 KO First F1 杂合子 (tm1a+/-) 与 FLPeR 小鼠交配获得条件性敲除小鼠(tm1c+/-)。
7. 由于 Knockout first allele 中 frt 间删除序列较长, 并且 Flp 删除效率的限制, 在第一代获得的条件性敲除小鼠(tm1c+/-, Flp+/-)中, 可能会出现 tm1a allele, 而 tm1a allele 无法用鉴定 tm1c 的引物进行区分, 造成后期繁育及鉴定的问题。建议第一代获得的条件性敲除小鼠先与野生型小鼠交配一代, 获得 tm1c+/- 且不含 FLPeR (Flp wt/wt) 后再进行后续的交配。