

提高利用C57BL/6胚胎干细胞系制作 基因打靶小鼠效率的研究

周舒雅¹ 左 琴¹ 刘甦苏¹ 王辰飞² 李保文¹ 贺争鸣¹ 范昌发^{1*}

(¹中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所, 国家啮齿类实验动物种子中心, 北京 100050;

²北京百奥赛图基因生物技术有限公司, 北京 101111)

摘要 为了提高通过C57BL/6(B6)胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES cells)获得基因打靶小鼠的效率, 该研究利用经过体外和体内多能性验证的C57BL/6 ES细胞系B6-1-6, 开展了37组平行的制作基因打靶小鼠的实验。首先, 对不同的囊胚获取的方式进行对比; 其次, 统计37组实验中的嵌合鼠表观嵌合度与种系遗传效率, 并对二者相关性进行分析。对于BALB/c小鼠, 自然排卵相较于激素超排能够得到更多囊胚(2.91个囊胚/只 vs 0.82个囊胚/只); 对于最佳注射个数的探索, 利用C57BL/6 ES细胞系B6-1-6进行基因修饰并注射囊胚, 注射65~97个胚胎获得阳性打靶动物的可能性为95%; 嵌合鼠毛色嵌合率与种系遗传率有一定相关性($r=0.316$, $P=0.057$), 而嵌合鼠眼睛颜色与种系遗传效率显著正相关($r=0.328$, $P<0.05$)。该研究探索了用于C57BL/6 ES细胞注射的BALB/c囊胚获取方式的优化和最佳的注射数量, 以及嵌合鼠表观嵌合度与种系遗传效率相关性等方面, 以期为相关的研究提供有益的参考。

关键词 C57BL/6胚胎干细胞; 基因打靶; BALB/c囊胚; 嵌合鼠表观嵌合度; 种系遗传

Efficiency Improvement in Generation of Gene Targeted Mice with C57BL/6 Embryonic Stem Cells

Zhou Shuya¹, Zuo Qin¹, Liu Susu¹, Wang Chenfei², Li Baowen¹, He Zhengming¹, Fan Changfa^{1*}

(¹Laboratory Animal Resource Center, Institute for Laboratory Animal Resources, National Institute of Food and Drug Control, Beijing 100050, China; ²Beijing Biocytogen Co., Ltd., Beijing 101111, China)

Abstract Pluripotency of a C57BL/6 embryonic stem (ES) cell line, which was named as B6-1-6, was identified *in vitro* and *in vivo*. To improve efficiency of generating gene targeted mice, 37 different gene targeted mice were generated with B6-1-6. Different ways of inducing BALB/c mice ovulation were compared, and the correlation between the apparent chimerism and germline transmission efficiency was analyzed. Based on our data, we found that natural ovulation with estrus induction was superior to hormone superovulation for BALB/c mice (2.91 blasto./mouse vs 0.82 blasto./mouse). For C57BL/6 ES cell line B6-1-6, 65~97 blastocysts should be injected to generate positive gene targeted mice with 95% success rate. In addition, we also found that the germline transmission efficiency was positively correlated with coat color chimerism level to a certain extent ($r=0.316$, $P=0.057$); and it was positively correlated with eye color chimerism level significantly ($r=0.328$, $P<0.05$). In this study, we

收稿日期: 2015-02-16 接受日期: 2015-03-23

国家自然科学基金青年科学基金项目(批准号: 81401661)和中国食品药品检定研究院中青年发展基金课题(批准号: 2012B5)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-67678484, E-mail: fancf@nifdc.org.cn

Received: February 16, 2015 Accepted: March 23, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81401661) and Science Foundation for Middle-aged and Young Scientist of National Institutes for Food and Drug Control (Grant No.2012B5)

*Corresponding author. Tel: +86-10-67678484, E-mail: fancf@nifdc.org.cn

网络出版时间: 2015-06-02 18:12

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150602.1812.003.html>

explored a superior way to obtain BALB/c blastocysts and optimum number for microinjection. What's more, the correlation between apparent chimerism level and germline transmission was discussed. Therefore, it will be helpful to improve the efficiency of generating gene targeted mice with C57BL/6 ES cells in future application.

Keywords C57BL/6 embryonic stem cells; gene targeting; BALB/c blastocysts; apparent chimerism level in chimeras; germline transmission

1987年, Capecchi领导的研究小组根据同源重组的原理实现了哺乳动物细胞中导入基因的定点整合^[1], 即基因打靶技术。近三十年来, 如何提高基因打靶的特异性和效率是这一技术不断发展的目标。近年来, 随着锌指酶(ZFN)^[2]、TALENs^[3]和CRISPR/Cas^[4-5]等基因打靶技术的出现, 哺乳动物基因打靶技术的效率获得了大幅提高。然而, 由于这些新技术尚未成熟, 不易获得大片段的插入, 并且存在脱靶现象等, 因而利用胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)同源重组的传统基因打靶技术仍然不可替代^[6]。

在基于ES细胞和同源重组的基因打靶技术中, 由于129品系背景的ES细胞具有稳定和易于种系嵌合等原因而被广泛使用。然而, 129品系小鼠各亚系之间基因背景不一致^[7], 并且高频自发畸胎瘤, 很难确定表型是由突变的基因还是由小鼠的基因背景引起的^[8], 因此, 在对打靶动物分析之前, 大多需要将其回交到其他近交品系。然而无论回交多少代, 都仅仅是无限接近于所选品系, 并且回交这一过程十分耗时耗力。而C57BL/6(B6)近交系小鼠具有背景信息丰富且清楚的优势, 广泛用于生物学和医学研究^[9-11]。因此, 虽然相较于129品系, C57BL/6品系的ES细胞建系效率低且较难种系嵌合^[12], 但是, C57BL/6近交系的ES细胞^[13-14]可以避免诸多由ES细胞遗传背景造成的不便因而拥有更大的应用空间。

本研究耗时近四年, 对具有不同基因修饰的37个C57BL/6的ES细胞系的种系嵌合实验进行了分析, 并针对囊胚供体品系BALB/c难以超数排卵、BALB/c囊胚成熟率低等问题总结了解决方法, 为利用C57BL/6 ES细胞制作基因打靶小鼠提供了参考。

1 材料与方法

1.1 胚胎干细胞

C57BL/6 ES细胞系B6-1-6由北京百奥赛图生物技术有限公司建立。根据不同目的基因构建的打靶质粒经酶切及测序鉴定后, 用于ES细胞电转染。随后, 经G418筛选的ES细胞, 在基因组PCR检测、

Southern blot鉴定以及核型检测后, 用于囊胚注射。

1.2 实验动物

本研究所需C57BL/6小鼠(体重16~18 g, 6周龄)、KM小鼠(体重20~22 g, 6周龄)以及BALB/c小鼠(体重16~18 g, 6周龄)等品系均为SPF级, 由国家啮齿类实验动物种子中心[SCXK(京)2009-0017]提供并饲养。本实验在中国食品药品检定研究院实验动物伦理委员会监督下进行。

1.3 试剂与仪器

M2(M7167-100ML, Sigma公司), KSOM(MR-121-D, Millipore公司), 0.7%戊巴比妥钠溶液(Sigma公司), 孕马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotropin, PMSG, 宁波激素二厂), 人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG, 宁波激素二厂), 石蜡油(M8410, Sigma公司)。

显微操作仪(1X71, Olympus公司), 体式显微镜(SMZ645, 尼康公司), CO₂培养箱(8000DH, Thermo公司), 持卵针(5175240006, Eppendorf公司)和注射针(930001040, Eppendorf公司)。

1.4 囊胚受体BALB/c小鼠超数排卵及其自然发情诱导

超数排卵: 每只4~8周龄BALB/c小鼠在第1 d 15:00注射激素PMSG 10 IU, 并且第3 d 15:00注射激素hCG 10 IU。hCG注射后立即与同品系性成熟雄鼠1:1合笼, 次日检栓后单独饲养, 在见栓3.5 d冲取囊胚。

自然发情诱导: 将同一批BALB/c雌鼠300只分为三组, 第一组采用大盒饲养, 每盒25只雌鼠, 作为空白对照; 第二组采用大盒饲养, 每盒25只雌鼠, 挑发情前2~3 d每盒均放入雄鼠垫料; 第三组采用小盒饲养, 每盒5只雌鼠。两周后, 分别对三组雌鼠挑发情并交配, 次日检栓后单独饲养, 在第3.5 d冲取囊胚并记录数据。以上实验重复3次, 进行数据统计。

1.5 ES细胞准备和受体胚胎的采集

经鉴定的阳性打靶ES细胞复苏并传代后, 用0.25%的胰酶消化成单细胞悬液置于冰盒, 用于囊胚显微注射。

交配后第3.5 d的BALB/c雌鼠作为囊胚供体鼠。9:00 am~10:00 am, 颈椎脱臼处死后取子宫, 用M2培养液冲洗子宫回收囊胚, 并移入覆盖石蜡油的KSOM液滴中, 置37℃、5% CO₂培养箱中培养备用。

1.6 显微注射

13:00 pm~16:00 pm进行囊胚显微注射。在培养皿中央做M2注射液滴并覆盖石蜡油, 将ES细胞悬液及囊胚分别移入注射液滴, 以斜口注射针吸取10~15个形态良好的ES细胞, 沿滋养层细胞间隙注射到囊胚腔中, 用KSOM溶液洗涤后移入KSOM培养液滴中, 置37℃、5% CO₂培养箱中恢复1~2 h后进行胚胎移植^[15]。

1.7 胚胎移植及嵌合鼠出生

选用KM小鼠做假孕母鼠, 挑选发情前期和发情期雌鼠, 1:1与结扎雄鼠交配, 次日检栓, 单笼饲养备用, 见栓当天为0.5 d, 子宫移植用2.5 d假孕鼠。用0.7%戊巴比妥钠溶液麻醉假孕鼠后, 行背部手术将显微注射恢复后的囊胚10~16个单侧移植到假孕2.5 d的小鼠子宫, 单笼饲养至妊娠第20 d分娩。在小鼠出生7~10 d后可由毛色判定是否为嵌合鼠, 白色被毛来自于供体白化小鼠, 黑色被毛来自于提供ES细胞的C57BL/6小鼠。

1.8 嵌合鼠交配及打靶小鼠的获得

雄性嵌合鼠饲养至6~8周龄, 与野生型C57BL/6雌鼠交配, 如果ES细胞进入嵌合鼠种系分化为生殖细胞, 即可遗传给子代小鼠, 并表现为全黑的毛色。对黑色小鼠进行基因型检测, 以确定阳性打靶小鼠。

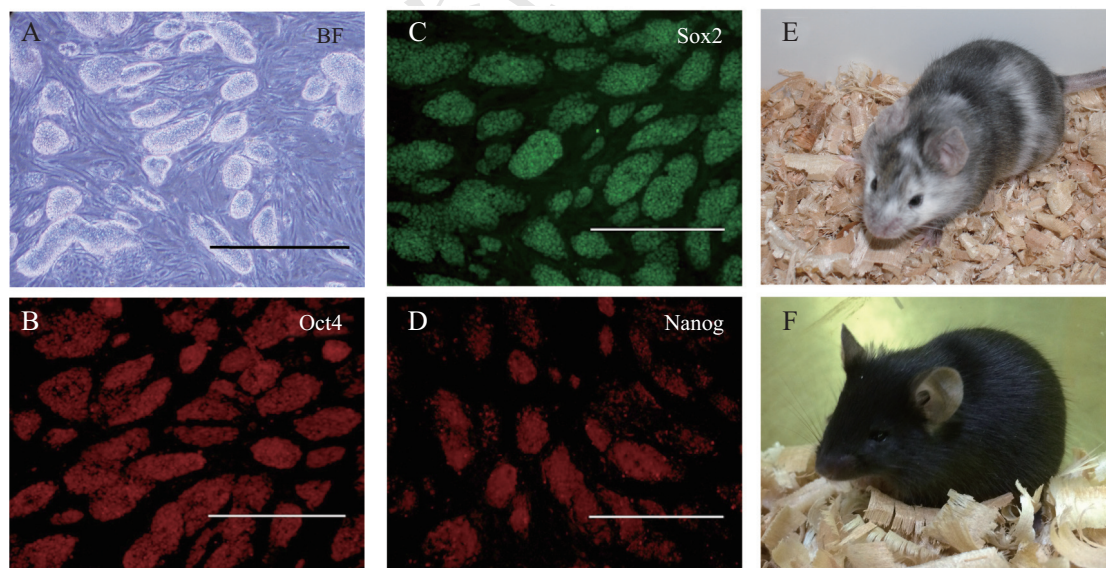
1.9 数据统计

本研究中两个数据间差异分析采用卡方检验(χ^2), 两组数据间的相关性采用SPSS 19.0软件和Graphpad Prism 5.02软件进行Pearson线性相关性分析, 频数直方图及正态分布曲线采用Office Excel软件进行统计分析。 $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 基因打靶胚胎干细胞多能性验证

本研究采用的C57BL/6背景的ES细胞B6-1-6(图1A)经过免疫荧光染色验证了ES细胞多能性表面标记分子的表达(图1B~图1D), 并且通过囊胚注射可以体内分化为各种细胞, 包括生殖细胞(germ cells), 进而种系遗传获得完全来源于ES细胞的个体(图1F), 从而证明了其多能性水平。在此基础上, 我们利用同源重组的方法在此ES细胞系中敲除/敲入特定的



A: C57BL/6背景ES细胞系B6-1-6在明视野下的形态。BF: 明视野; B~D: ES细胞多能性表面标记物免疫荧光染色, Oct4(B)、Sox2(C)和Nanog(D); E: B6-1-6注射BALB/c囊胚后所得嵌合鼠; F: B6-1-6种系遗传小鼠。标尺=400 μm。

A: morphology of C57BL/6 ES cell line B6-1-6 under bright-field (BF) microscopy; B~D: immunofluorescence staining of ES cell pluripotency markers, Oct4 (B), Sox2 (C) and Nanog (D); E: chimera derived from microinjection of B6-1-6 into BALB/c blastocysts; F: black mice derived from germline transmission of B6-1-6. Scale bars=400 μm.

图1 C57BL/6 ES细胞的多能性验证

Fig.1 Pluripotency identification of C57BL/6 ES cells

表1 比较BALB/c小鼠超数排卵和自然排卵效率

Table 1 Comparison of superovulation and natural ovulation in BALB/c mice

排卵方式 Ovulation	交配小鼠数量(只) Mice mated (No.)	成功交配数(%) Mice mated successfully (%)	胚胎总数(个) Total embryos (No.)	胚胎数/只(个) Embryos per mouse (No.)	囊胚数(个) Blastocysts (No.)	囊胚数/只(个) Blastocysts per mouse (No.)
Superovulation	190	117 (61.58%)	415	3.55	95	0.82
Natural ovulation	260	116 (44.62%)	813	7.01	338	2.91

表2 BALB/c小鼠自然发情诱导见栓率比较

Table 2 Comparison among different ways of inducing BALB/c mice ovulation

处理方法 Treatment	小鼠总数(只) Total female mice (No.)	交配小鼠数(只) Female mice mated (No.)	成功交配数(%) Mice mated successfully (%)
No treatment (I)	300	119	28 (23.52%) ^a
Add male bedding (II)	300	112	46 (41.07%) ^b
Smaller box feeding (III)	300	113	59 (52.21%) ^c

同一列中上标字母不同表示通过卡方检验差异显著($P<0.05$)。

Different superscripts indicated significant difference ($P<0.05$) within one column. Data were analyzed by χ^2 tests.

表3 C57BL/6 ES细胞的嵌合鼠获得率及其种系遗传效率

Table 3 Chimerism and germline transmission efficiency of C57BL/6 ES cells

编 号 No.	细胞系 ES cell	注射囊胚数(个) Blasto. injected (No.)	出生鼠数(只) Newborns (No.)	嵌合鼠数(%) Chimeras (%)	种系遗传效率	
					Germline transmission efficiency	
					F1代小鼠数(只) F1 mice (No.)	F1代黑鼠数(%) Black mice in F1 (%)
1	Ai3D	215	31	10 (32%)	56	26 (46%)
2	Ai3K	37	11	5 (45%)	188	30 (16%)
3	Ai3P	27	2	1 (50%)	92	4 (4%)
4	Ai3R	95	5	4 (80%)	85	31 (36%)
5	Ai3V	19	4	2 (50%)	40	13 (33%)
6	AK	34	10	7 (70%)	109	2 (2%)
7	AS	120	16	8 (50%)	113	9 (8%)
8	BC	68	6	1 (17%)	20	3 (15%)
9	BCKO	36	9	2 (22%)	156	39 (25%)
10	CDK	54	18	4 (22%)	123	1 (1%)
11	CH	107	18	11 (61%)	97	31 (32%)
12	CL	62	13	5 (38%)	33	2 (6%)
13	DO	37	14	8 (57%)	107	10 (9%)
14	EM	166	18	8 (44%)	62	22 (35%)
15	FB	92	25	4 (16%)	101	7 (7%)
16	FBX	61	13	10 (77%)	136	5 (4%)
17	GO	72	17	6 (35%)	200	53 (27%)
18	IC	59	24	16 (67%)	82	44 (54%)
19	ID	126	12	8 (67%)	135	6 (4%)
20	IL	98	16	7 (44%)	152	16 (11%)
21	KC	61	7	5 (71%)	56	17 (30%)
22	MI	106	29	12 (41%)	196	43 (22%)
23	NS	67	6	2 (33%)	126	1 (1%)
24	NU	17	8	3 (38%)	35	10 (29%)
25	OD	182	17	6 (35%)	235	12 (5%)
26	P53	67	10	3 (30%)	159	37 (23%)
27	RN	120	20	9 (45%)	86	10 (12%)
28	SC	61	7	4 (57%)	65	19 (29%)
29	SH-1	53	20	18 (90%)	184	48 (26%)
30	SH-2	111	14	5 (36%)	66	20 (30%)
31	SL	33	12	5 (42%)	123	12 (10%)
32	ST	34	5	4 (80%)	143	4 (3%)
33	TA	131	5	5 (100%)	78	2 (3%)
34	TB	60	11	7 (64%)	129	16 (12%)
35	TL	164	13	6 (46%)	413	179 (43%)
36	TM	81	9	7 (78%)	74	21 (28%)
37	WD	62	7	3 (43%)	161	2 (1%)

目的基因, 并通过囊胚注射和种系遗传获得基因打靶小鼠。

2.2 BALB/c小鼠囊胚获得的优化

据报道, BALB/c小鼠对超数排卵不敏感。因此, 我们对两种排卵方式进行了对比, 发现自然排卵平均每只能获得可用胚胎2.91个, 而超数排卵仅0.82个/只(表1), 激素超排效果尚不如自然排卵。因此, 本研究认为, 在使用BALB/c囊胚作为C57BL/6 ES细胞注射受体的情况下, 自然排卵是更好的获取囊胚的方式。

为了进一步提高BALB/c自然排卵的效率, 我们尝试了加公鼠垫料和小盒饲养两种方式诱导小鼠发情。通过比较交配后见栓小鼠的数量和栓栓率来判断不同方式的诱导效果。如表2所示, III组栓栓率最高, 其次是II组, I组最低, 三组之间差异显著($P<0.05$)。结果显示, 两种方法都能促使BALB/c小鼠发情。在实际操作过程中, 可以采取小盒饲养、公鼠垫料诱导相结合的方法以得到更好的效果。

2.3 C57BL/6 ES细胞嵌合体的获得与筛选标准

我们利用此C57BL/6 ES细胞系B6-1-6进行了37组平行的基因打靶实验, 均获得了基因打靶动物。表3记录了每组实验中得到种系遗传动物所需注射的囊胚数、所获得的嵌合鼠数量以及ES细胞种系遗传效率。

其中, “注射囊胚数”为相应实验组获得阳性动物所需的最少胚胎数。我们对37个实验组的“注射囊胚数”进行了分析, 在0~239的区间内, 以28为分组组距, 分9组统计了37个成功获得阳性打靶小鼠的实验所注射囊胚个数的分布频数, 符合正态分布(图2), 计算其95%置信区间为(65, 97)。因此, 基于对这37

组独立平行实验所需注射囊胚数的分析, 我们可以认为, 利用本C57BL/6 ES细胞系B6-1-6进行基因修饰并注射囊胚, 注射65~97个胚胎就有95%的可能获得阳性打靶动物。

为了考察嵌合鼠表观嵌合度(毛色嵌合率和眼睛颜色)与种系遗传效率的关系, 从而为嵌合鼠的筛选和交配提供参考, 我们对37个实验组中获得种系遗传的嵌合鼠进行统计。(1)按照黑毛(ES细胞来源的C57BL/6为黑毛色)的嵌合率分级, $<25\%$ 为1级, $25\% \sim 50\%$ 为2级, $50\% \sim 75\%$ 为3级, $>75\%$ 为4级。进而把毛色嵌合级别与种系遗传率做相关性分析, 发现二者在 $P=0.057$ 的水平上正相关, $r=0.316$ (图3); (2)按照眼睛颜色分级, 双眼红色(与囊胚来源BALB/c小鼠相同)为1级, 一黑一红为2级, 双眼黑色(与ES细胞来源C57BL/6小鼠相同)为3级, 同样把眼睛颜色

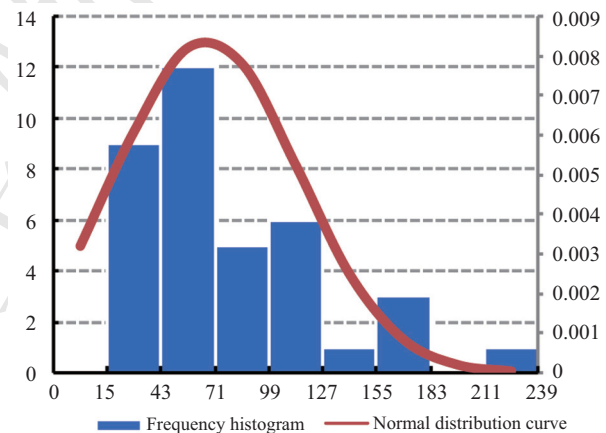
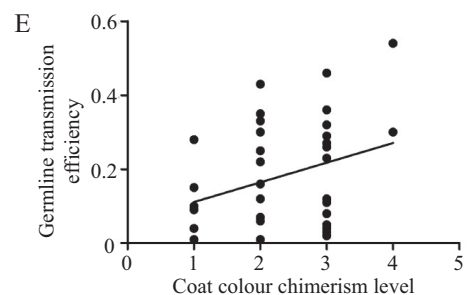
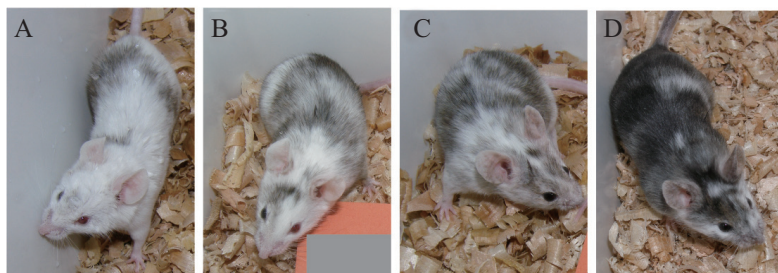


图2 37个实验组所需注射囊胚个数的频数直方图及正态分布曲线

Fig.2 Frequency histogram and normal distribution curve of minimum blastocysts need to be injected in 37 experiment groups

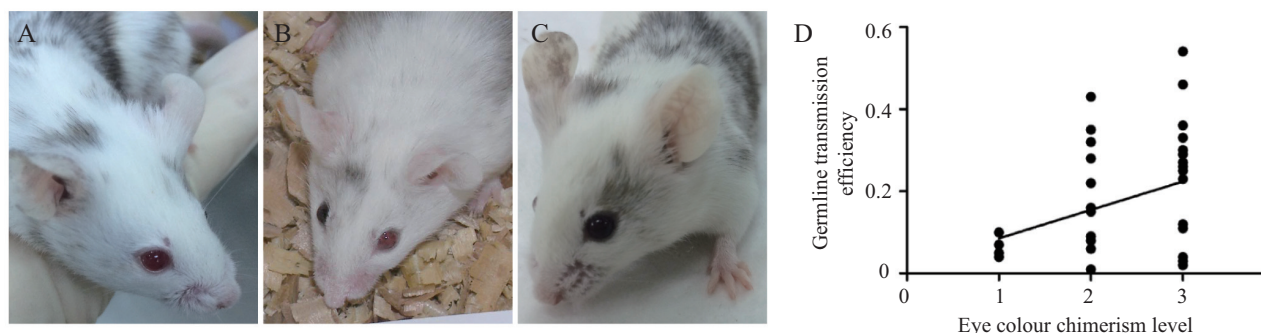


A~D: 嵌合鼠毛色嵌合度分级, 依次为: $<25\%$ 为1级(A), $25\% \sim 50\%$ 为2级(B), $50\% \sim 75\%$ 为3级(C), $>75\%$ 为4级(D); E: 毛色嵌合度与种系遗传效率相关性分析。

A~D: coat color chimerism level grading. Level 1, $<25\%$ (A); level 2, $25\% \sim 50\%$ (B); level 3, $50\% \sim 75\%$ (C); level 4, $>75\%$ (D); E: correlation analysis of coat color chimerism level and germline transmission efficiency.

图3 嵌合鼠毛色嵌合分级及其与种系遗传效率的相关性分析

Fig.3 Coat color chimerism level grading and its correlation with germline transmission efficiency



A~C: 嵌合鼠眼睛颜色分级: 1级, 双眼红色(A); 2级, 一红一黑(B); 3级, 双眼黑色(C); D: 眼睛颜色与种系遗传效率相关性分析。

A~C: eye color chimerism level: level 1, two red eyes (A); level 2, one red eye and one black eye (B); level 3, two black eyes (C); D: correlation analysis of eye color chimerism level and germline transmission efficiency.

图4 嵌合鼠眼睛颜色分级及其与种系遗传效率的相关性分析

Fig.4 Coat color chimerism level grading and its correlation with germline transmission efficiency

级别与种系遗传效率做相关性分析,二者显著相关($P=0.047<0.05$), $r=0.328$ (如图4)。基于以上数据,毛色嵌合率和眼睛颜色可以为嵌合鼠的筛选提供一定的参考,而眼睛颜色与其相关性更高。因此,选择眼睛呈黑色并且毛色嵌合率高的嵌合鼠进行交配,将会提高获得种系遗传的效率。

3 讨论

由于近交系C56BL/6品系背景清楚,因而转基因小鼠模型即使并非B6品系,也需要经过多代回交到B6背景。而利用C57BL/6来源的ES细胞系进行同源重组进而获得基因打靶小鼠,就可以避免诸多由ES细胞遗传背景造成的不便,省时省力^[13]。本研究中, C57BL/6背景的ES细胞系B6-1-6经多能性验证,能够进入种系获得完全来源于ES细胞的小鼠。在此基础上,本研究进行了37组基因打靶实验,并对其中囊胚获得、囊胚注射和嵌合鼠筛选繁育等多个方面进行了条件优化探索。

根据文献, BALB/c较适合作为C56BL/6品系ES细胞的囊胚受体,更易于种系遗传^[9,16],然而BALB/c胚胎发育延迟,胚胎形态差,且对激素超数排卵不敏感,因此本研究探索了更好地获得BALB/c囊胚的方式。通过研究,我们认为采取小盒饲养和加公鼠垫料相结合的方式诱导BALB/c小鼠自然排卵,可以获得更多高质量的囊胚。

本研究37个不同基因修饰的ES细胞系均能够种系嵌合,获得了阳性基因打靶小鼠。通过对37组实验中获得打靶动物所需注射的囊胚数的统计分析,我们认为,在基因修饰后的ES细胞核型正确的

前提下,注射65~97个囊胚即能够有95%的可能性获得阳性小鼠。通过对表观嵌合度和种系遗传效率的相关性分析,发现用眼睛颜色来判断嵌合鼠的嵌合程度并筛选出眼睛为黑色的嵌合鼠进行交配,比通过毛色嵌合度来筛选更有利于以较高的效率获得种系遗传的基因打靶动物。

综上所述,本研究探索了用于C57BL/6 ES细胞注射的BALB/c囊胚获取的优化方法和最佳的注射个数,以及嵌合鼠表观嵌合度与种系遗传效率相关性等方面,希望为相关的研究提供有益的参考。

参考文献 (References)

- 1 Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 1987; 51(3): 503-12.
- 2 Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, Zeitler B, Miller JC, Choi VM, *et al.* Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science* 2009; 325(5939): 433.
- 3 Tesson L, Usal C, Menoret S, Leung E, Niles BJ, Remy S, *et al.* Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat Biotechnol* 2011; 29(8): 695-6.
- 4 Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 2013; 8(11): 2281-308.
- 5 马元武, 马婧, 路迎冬, 陈炜, 张旭, 于磊, 等. 利用CRISPR/Cas9敲除大鼠胰岛素受体底物1(Irs1)基因. *中国比较医学杂志* (Ma Yuanwu, Ma Jing, Lu Yingdong, Chen Wei, Zhang Xu, Yu Lei, *et al.* Generating insulin receptor substrate 1 (Irs1) knockout rat using CRISPR/Cas9. *Chinese Journal of Comparative Medicine*) 2014(3): 55-60.
- 6 Menke DB. Engineering subtle targeted mutations into the mouse genome. *Genesis* 2013; 51(9): 605-18.
- 7 Simpson EM, Linder CC, Sargent EE, Davisson MT, Mobraaten LE, Sharp JJ. Genetic variation among 129 substrains and its importance for targeted mutagenesis in mice. *Nat Genet* 1997;

- 16(1): 19-27.
- 8 Gerlai R. Gene-targeting studies of mammalian behavior: Is it the mutation or the background genotype? *Trends Neurosci* 1996; 19(5): 177-81.
- 9 Lemckert FA, Sedgwick JD, Korner H. Gene targeting in C57BL/6 ES cells. Successful germ line transmission using recipient BALB/c blastocysts developmentally matured *in vitro*. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(4): 917-8.
- 10 Ware CB, Siverts LA, Nelson AM, Morton JF, Ladiges WC. Utility of a C57BL/6 ES line versus 129 ES lines for targeted mutations in mice. *Transgenic Res* 2003; 12(6): 743-6.
- 11 柴桂萱, 韩 嵘, 尚克刚. C57BL/6J小鼠ES细胞系的建立及其特性分析. *细胞生物学杂志*(Chai Guixuan, Han Rong, Shang Kegang. Establishment and characteristics of ES cell lines derived from C57BL/6J mice. *Chinese Journal of Cell Biology*) 1996; 18(3): 121-6.
- 12 Schoonjans L, Kreemers V, Danloy S, Moreadith RW, Laroche Y, Collen D. Improved generation of germline-competent embryonic stem cell lines from inbred mouse strains. *Stem Cells* 2003; 21(1): 90-7.
- 13 Pettitt SJ, Liang Q, Rairdan XY, Moran JL, Prosser HM, Beier DR, *et al.* Agouti C57BL/6N embryonic stem cells for mouse genetic resources. *Nat Methods* 2009; 6(7): 493-5.
- 14 Lin CJ, Amano T, Tang Y, Tian X. Improved derivation efficiency and pluripotency of stem cells from the refractory inbred C57BL/6 mouse strain by small molecules. *PLoS One* 2014; 9(9): e106916.
- 15 Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K. *Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003.
- 16 Ledermann B, Burki K. Establishment of a germ-line competent C57BL/6 embryonic stem cell line. *Exp Cell Res* 1991; 197(2): 254-8.