

网络出版时间: 2024-07-04 09:29:26 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240702.1448.010>

# 基于 Cre/Loxp 系统的 Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP</sup> 报告基因小鼠的构建及效率检测

朱向玲, 吴旭铭, 王卉卉, 周园园, 王安琪, 张慧茹, 刘崇, 涂佳杰

**摘要** 目的 构建报告基因小鼠, 评价 Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> 介导增强黄色荧光素蛋白 EYFP 标记组织 CD45<sup>+</sup> 细胞 CSF1R 的效率。方法 Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> 小鼠与 R26R<sup>EYFP</sup> 小鼠繁育, 他莫昔芬诱导、PCR 筛选 Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP</sup> 小鼠, 流式细胞术和 Western blot 分析 EYFP 对不同组织以及不同组织 CD45<sup>+</sup> 细胞中 CSF1R 的标记效率。结果 获得 Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP</sup> 报告基因小鼠。此外, Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> 小鼠介导 EYFP 可有效标记小鼠组织 CSF1R 以及不同部位中 CD45<sup>+</sup> 细胞。与 R26R<sup>EYFP</sup> 组比较, Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> 小鼠介导 EYFP 标记效率最高的是脑组织 ( $P < 0.001$ ), 最低的是胸腺组织 ( $P < 0.05$ ), 脾脏组织则差异无统计学意义。结论 成年 Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> 小鼠与 R26R<sup>EYFP</sup> 小鼠是获得 Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP</sup> 诱导型条件性荧光小鼠的有效途径。Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> 介导 EYFP 可对小鼠不同部位 CSF1R 以及 CD45<sup>+</sup> 细胞中 CSF1R 进行有效示踪。关键词 Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup>; R26R<sup>EYFP</sup>; Cre/Loxp 系统; CD45; 流式细胞术

中图分类号 R 394.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)07-1175-06  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.07.010

细胞谱系示踪技术是利用各种方式对细胞进行标记, 其中基因打靶和转基因技术广泛应用于对外源性标志物基因导入靶细胞的示踪, 该技术虽然克服了传统物理标记中的细胞损伤及标记稀释等问题, 但需利用基因组中的位点特异性重组酶序列<sup>[1]</sup>。其中诱导型 Cre/Loxp 系统可实现对该时间点被标记细胞的增殖、迁移等活动的观察<sup>[2]</sup>。ERT2-Cre 是目前应用较广泛的诱导型基因敲除系统, ERT2-Cre 融合蛋白可与人工合成的雌激素受体——4-羟基他莫昔芬 (4-hydroxytamoxifen, 4-OHT) 发生特异性结合最终实现对目的基因的敲除<sup>[3]</sup>。R26R<sup>EYFP</sup> 荧光报告基因小鼠, Cre 介导的 loxp 位点重组可在去除 EYFP 基因前终止子序列开启 EYFP

表达。Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> 小鼠的骨髓源性巨噬细胞和卵黄囊巨噬细胞中有 4-OHT 诱导的 Cre 活性。该研究利用 EYFP 对 Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> 小鼠组织特异性表达 Cre 的细胞的标记特性, 构建了 Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP</sup> 报告基因小鼠, 旨在为示踪小鼠组织及细胞中 CSF1R 的相关研究提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 实验动物** 50 只 7 周龄 Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> 小鼠 (JAX#019098) 与 R26R<sup>EYFP</sup> (JAX#006148) 小鼠各 25 只, 分别 10 只雄鼠、15 只雌鼠, 体质量 ( $20 \pm 2$ ) g, 购自美国 Jackson 实验室。小鼠均饲养于安徽医科大学临床药理研究所 SPF 级动物房。

**1.1.2 主要仪器与设备** T400 PCR 扩增仪由上海伯乐生命医学产品有限公司提供, DYY-7C 型电泳仪由北京六一生物科技有限公司提供, Tanon-1600 全自动数码凝胶图像分析系统由上海天能科技有限公司提供, CytoFLEX 流式细胞仪由美国贝克曼库尔特有限公司提供, Sorvall™ ST8 小型台式高速冷冻离心机由中国赛默飞世尔科技有限公司提供。

**1.1.3 主要试剂** NaOH 固体、pH = 8.0 Tris-HCl 溶液由北京索莱宝科技有限公司提供; 蛋白上样缓冲液、pH = 8.0 EDTA 溶液由上海碧云天生物技术有限公司提供; PCR 引物由上海生工生物工程公司合成; 核酸染料、DNA maker、2 × Taq Mix、50 × TAE 电泳缓冲液由北京博迈德基因技术有限公司提供; 琼脂糖由广州赛国生物科技有限责任公司提供; PBS 缓冲液由上海源培生物科技股份有限公司提供; 4-OHT 和 ECL 化学发光试剂盒由美国 Merck Millipore 公司提供; 小鼠 CD45 流式抗体由德国美天旎生物技术有限公司提供; EYFP 抗体、辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 由美国 Affinity Biosciences 公司提供。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP</sup> 小鼠的繁殖分笼与鉴定

2024-02-22 接收

基金项目: 安徽省教育厅高校科学研究项目 (编号: 2022AH020052)

作者单位: 安徽医科大学临床药理研究所, 合肥 230032

作者简介: 朱向玲, 女, 硕士研究生;

涂佳杰, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: tujiajie@ahmu.edu.cn

**1.2.1.1 饲养繁殖** Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> 转基因小鼠与 R26R<sup>EYFP</sup> 报告基因小鼠,均饲养于安徽医科大学临床药理研究所的 SPF 级动物实验室。饲养条件严格控制,保持温度在 18 ~ 22 °C、湿度在 40% ~ 70%。昼夜交替时间为 12 h,确保小鼠饲料、饮用水、笼盒等物品均经过高温和高压消毒灭菌。每日定期更换饲料和饮水,每隔 3 d 更换 1 次小鼠垫料,并记录小鼠体质量及生长状况。繁殖过程如下:将 Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> 小鼠与 R26R-Stop-EYFP 突变等位基因纯合子的 R26R<sup>EYFP</sup> 小鼠杂交得到 Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP(flox+/+)</sup> 报告基因小鼠,即 F1 代。繁殖出 F1 代基因鼠之后,将 F1 代成年 Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP(flox+/+)</sup> 小鼠与 R26R<sup>EYFP</sup> 小鼠雌、雄交配,进一步 PCR 筛选得到 Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP</sup> F2 代报告基因小鼠。

**1.2.1.2 小鼠尾部组织基因组 DNA 的提取** 待 F1 代小鼠 2 周龄时,剪取小鼠尾尖部约 0.3 cm,放入 1.5 ml EP 管中,加入 50 μl 鼠尾裂解液 A (配方:10 ml 蒸馏水中含 50 μl 5 mol/L NaOH,4 μl 0.5 mol/L pH = 8.0 EDTA 溶液),确保鼠尾沉至管底。提前预热金属浴,将含有鼠尾的 EP 管放入 95 °C 金属浴中孵育 30 min 充分裂解鼠尾,加入 50 μl B 液 (配方:10 ml 蒸馏水中加入 400 μl 1 mol/L pH = 8.0 Tris-HCl 溶液)后,在涡旋混合器上剧烈振荡,充分混匀。随后,将样本置于离心机 3 000 r/min,离心 5 min。最后取上清液作为 DNA 模板,进行 PCR 检测。

**1.2.1.3 PCR 扩增反应** 小鼠基因型鉴定 PCR 反应所需引物均由上海生工生物工程有限公司合成。引物序列见表 1。制备 PCR 体系:12.5 μl 2 × Taq Mix,0.8 μl 引物,2 μl 鼠尾 DNA 模板,加 DEPC 水至 25 μl。PCR 条件如下:① 94 °C 预变性 3 min,② 94 °C 变性 30 s,③ 65 °C 退火 15 s,④ 68 °C 延伸 10 s,⑤ 94 °C 变性 15 s,⑥ 60 °C 退火 15 s,⑦ 72 °C 延

伸 10 s,⑧ 72 °C 延伸 2 min。② ~ ④ 重复 10 个循环数,每个循环退火温度降低 0.5 °C,⑤ ~ ⑦ 重复 25 个循环数。

**1.2.1.4 琼脂糖凝胶电泳进行基因型鉴定** 配制 1 × TAE 缓冲液 60 ml,加入琼脂糖 1.20 g,充分混匀后置于微波炉煮沸,拿出摇匀后再次置于微波炉煮沸,待琼脂糖完全溶解后将其冷却至室温,加 10 μl 的核酸染料,将溶液倒至插有梳子的制胶器。等待胶凝固后,DNA maker 上样 5 μl 以及上述所得 PCR 扩增产物 10 μl,设置电压为 110 V、电泳时间为 40 min。电泳结束后将凝胶置于 Tanon-1600 全自动数码凝胶图像分析系统中拍照观察。

**1.2.2 4-OHT 诱导 Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP</sup> 小鼠及组织分离** 根据基因鉴定结果,筛选出 F2 代中基因型为 Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP</sup> 的小鼠,于小鼠 6 周龄的时候连续 5 d 腹腔注射 70% 乙醇溶解的 4-OHT。其中 4-OHT 的量按照小鼠体质量 75 mg/kg 的量来注射。随后,分离对照组 R26R<sup>EYFP</sup> 小鼠和 4-OHT 诱导的、基因型为 Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP</sup> 成年小鼠的肝脏、肺、胸腺、脾脏及脑组织。

**1.2.3 Western blot 检测 EYFP 的表达** 将“1.2.2”所分离的肝脏组织和脑组织取部分剪碎置于 1.5 ml EP 管中,提取组织总蛋白,进行标准蛋白定量。上样,采用 10% SDS-PAGE 电泳,转移至 PVDF 膜,TBST 溶解 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入 EYFP 一抗(1 : 5 000)4 °C 孵育过夜,次日用 TBST 洗 3 次,每次 8 min,加入对应山羊抗小鼠 IgG (1 : 10 000)室温摇床孵育 2 h,TBST 洗 3 次,每次 12 min。PBS 洗 10 min,化学发光成像分析仪扫描膜,采集图像显影。ImageJ 软件分析目的条带灰度值。

**1.2.4 标记流式抗体与流式细胞分析仪检测** CD45 是一种白细胞特异性跨膜糖蛋白和受体样蛋白酪氨酸磷酸酶,是免疫系统细胞表面的必需蛋白质,其通过调节淋巴细胞存活、细胞因子反应和 TCR 信号传导来控制免疫功能<sup>[4]</sup>。研究<sup>[5]</sup>发现,CSF1R 参与免疫相关的信号通路,其表达与几种浸润性免疫细胞相关。所以,选择用小鼠各个组织 CD45<sup>+</sup> 细胞作为检验 Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> 介导 EYFP 标记组织细胞中 CSF1R 表达效率的对象。

将“1.2.2”所分离的组织取部分剪碎置于 1.5 ml EP 管中,用 IV 型胶原酶 37 °C 消化 30 min,滤网过滤留细胞悬液,2 000 r/min 离心 5 min,弃上清液制备成单细胞悬液,100 μl 0.9% 氯化钠溶液重悬细

表 1 小鼠基因型鉴定 PCR 反应引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')
R26R <sup>EYFP</sup>	F: CTGGCTTCTGAGGACCG R: CAGGACAACGCCACACA
R26R <sup>EYFP</sup> -GFP	F: AGGCGCAGGAGCTGTTCA R: TGAAGTCGATGCCCTTCAG
Csf1r-Cre <sup>ERT2</sup>	F: CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT R: GTAGGTGAAATTCTAGCATCATCC
Csf1r-Cre <sup>ERT2</sup> -Cre	F: AGATGCCAGGACATCAGGAACCTG R: ATCAGCCACACCAGACACAGAGATC

胞标记 CD45 流式抗体,冰上孵育 30 min 后用 PBS 缓冲液洗涤 2 次,进一步用 PBS 缓冲液重悬细胞沉淀,透过纱网将细胞转移至流式管内。最后,流式检测 EYFP 标记滑膜 CD45<sup>+</sup> 细胞的效率。

**1.3 统计学处理** 采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行数据分析及图表的制作,计量数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较使用独立样本 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 获得 Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP</sup> 报告基因小鼠

Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> 小鼠的骨髓源性巨噬细胞和卵黄囊巨噬细胞中有 4-OHT 诱导的 Cre 活性。当这些小鼠与含有 loxP 侧翼序列的小鼠 R26R<sup>EYFP</sup> 杂交时,4-OHT 诱导的 Cre 介导的重组将导致表达 CSF1R 的细胞中侧翼序列的缺失,可以观察到 EYFP 的表达。本研究运用相对高效的繁殖策略并用 4-OHT 诱导获得所需 Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP</sup> 小鼠,具体见图 1。

已知 Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> 小鼠的目的条带为 236 bp, R26R<sup>EYFP</sup> 小鼠野生型条带为 142 bp,纯合型条带为 384 bp。F0 代 Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> 小鼠与 F0 代 R26R<sup>EYFP</sup> 小鼠基因型鉴定结果如图 2A 所示,F0 代 Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> 小鼠均为 Cre 阳性小鼠,条带位于 236 bp。F0 代 R26R<sup>EYFP</sup> 小鼠有 4 只为纯合型小鼠,条带位于 384 bp。分别取 F0 代纯合型小鼠进行交配,子代小鼠共 4 只。在子代出生 2 周龄后剪取小鼠尾尖并提取 DNA,进一步通过 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳鉴定小鼠的基因型,鉴定结果如图 2B 所示。结果显示,子代小鼠均为 Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP(flox+/+)</sup> F1 代报告基因小鼠,Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> 引物所得 PCR 琼脂糖凝胶电泳条带位于 236 bp,R26R<sup>EYFP</sup> 引物所得 PCR 琼脂糖凝胶电泳条带位于 384 bp、142 bp。进一步将所得成年雌性小鼠与 R26R<sup>EYFP</sup> 小鼠雄性小鼠进行配对,F2 代共有 15 只小鼠,鉴定结果如图 2C 所示,编号 1~15。其中,编号为 1、3、4、5、6、7、8、12 和 14 的小鼠为 Cre 阳性小鼠,条带位于 236 bp;2、

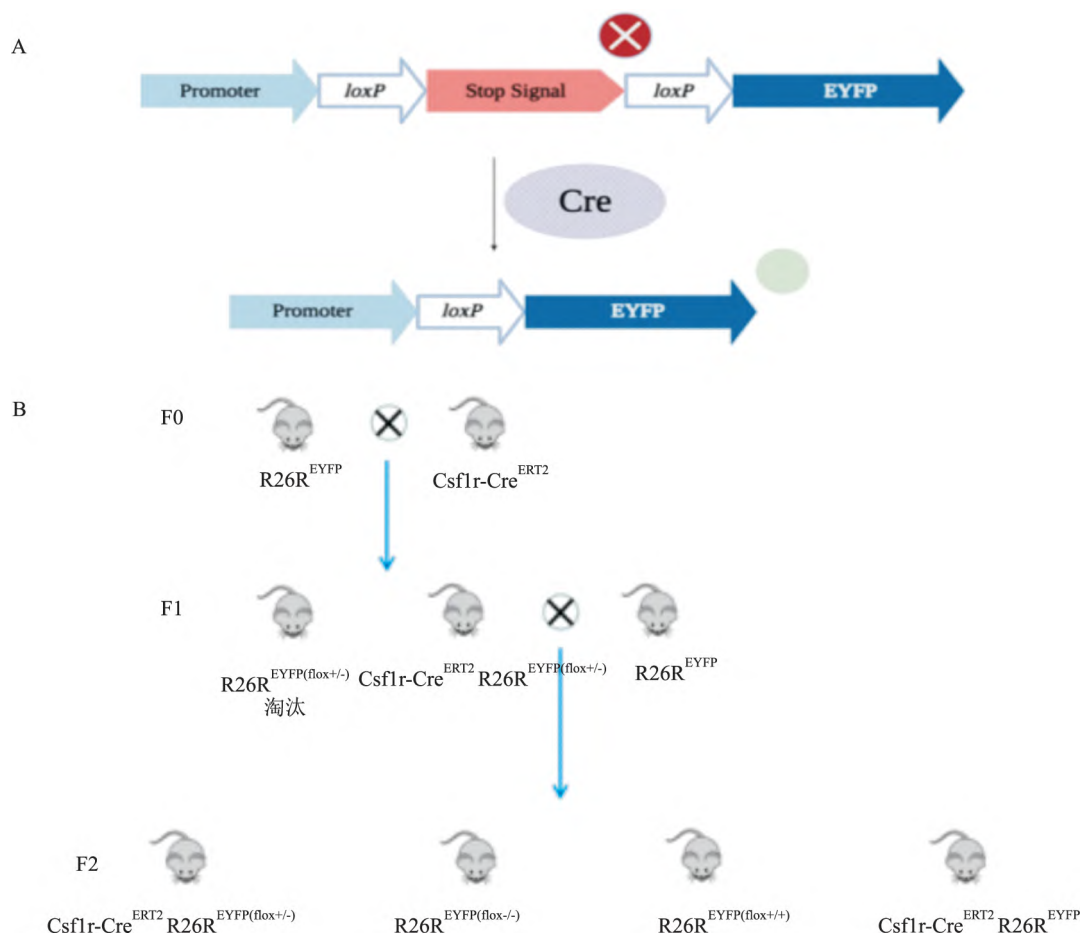


图 1 Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP</sup> 报告基因小鼠繁育原理及策略

A: 繁育原理; B: 繁育策略

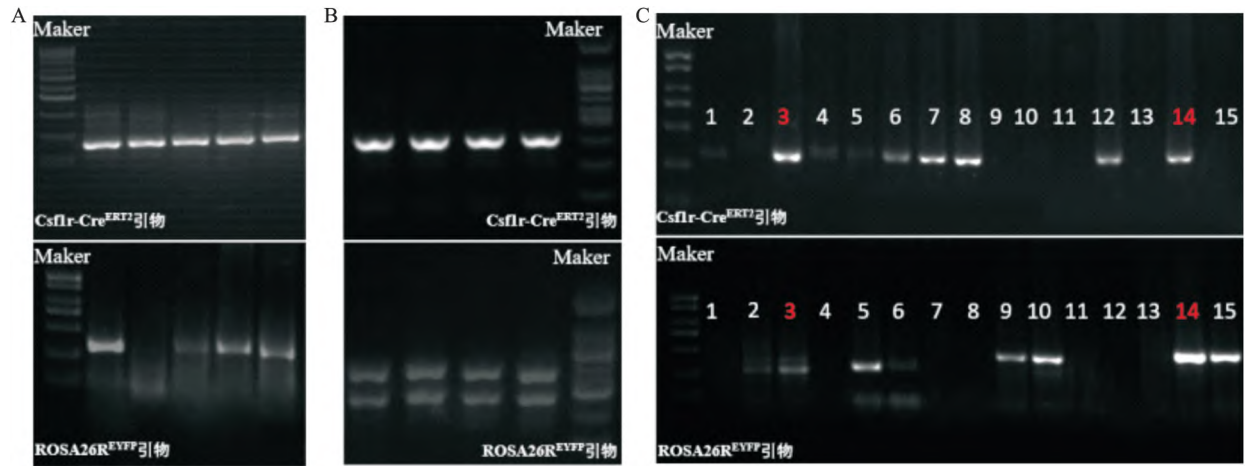


图2 小鼠基因型鉴定结果

A: F0代 Csflr-Cre<sup>ERT2</sup>小鼠(上)与 R26R<sup>EYFP</sup>小鼠(下)基因型鉴定; B: F1代 Csflr-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP(flox+/-)</sup>小鼠 Csflr-Cre<sup>ERT2</sup>基因型鉴定(上)和 R26R<sup>EYFP</sup>基因型鉴定(下); C: F2代 Csflr-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP</sup>小鼠 Csflr-Cre<sup>ERT2</sup>基因型鉴定(上)和 R26R<sup>EYFP</sup>基因型鉴定(下)

3、9、10、14、15 为 R26R<sup>EYFP</sup> 纯合子小鼠,条带位于 384 bp。因此,编号 3 和编号 14 的小鼠为所需 Csflr-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP</sup> 小鼠。

**2.2 Csflr-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP</sup> 小鼠组织 EYFP 蛋白表达** 为了进一步确认 PCR 结果的可靠性以及检测 Csflr-Cre<sup>ERT2</sup> 介导增强荧光素蛋白 EYFP 标记不同组织 CSF1R 的效率。本研究选取经 PCR 鉴定获得的 R26R<sup>EYFP</sup> 小鼠和 Csflr-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP</sup> 小鼠,应用 Western blot 方法检测 EYFP 蛋白在肝脏和脑组织中的表达。野生型小鼠脏器中未见 EYFP 蛋白的表达,Csflr-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP</sup> 小鼠组织显著表达 EYFP 蛋白,结果见图 3,与 PCR 方法鉴定所得的结果

一致。说明应用 PCR 方法鉴定小鼠基因型结果快捷、可靠,Csflr-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP</sup> 小鼠构建成功。

**2.3 Csflr-Cre<sup>ERT2</sup> 介导 EYFP 标记 CD45<sup>+</sup> 细胞中 CSF1R 表达的效率** 使用 CytoFLEX 流式细胞分析仪检测由“2.1”所得小鼠的不同组织 CD45<sup>+</sup> 细胞中表达 EYFP 的情况。根据 SSC-A 和 FSC-A 圈出细胞群,FSC-H 和 FSC-A 去除细胞粘连体,圈出 CD45<sup>+</sup> 细胞群,随后进一步检测 CD45<sup>+</sup> 细胞群中 EYFP 表达情况。对所分离的小鼠各组织单细胞悬液进行流式分析后,计算 Csflr-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP</sup> 小鼠及 R26R<sup>EYFP</sup> 组小鼠各 CD45<sup>+</sup> 细胞中表达 EYFP 的比例,结果见图 4。Csflr-Cre<sup>ERT2</sup> 介导 EYFP 对于小鼠肝脏、肺、胸腺以及脑组织 CD45<sup>+</sup> 细胞中 EYFP 的阳性比率显著高于 R26R<sup>EYFP</sup> 组。这表明,Csflr-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP</sup> 报告基因小鼠可有效监测小鼠大部分组织中 CSF1R 的表达情况。

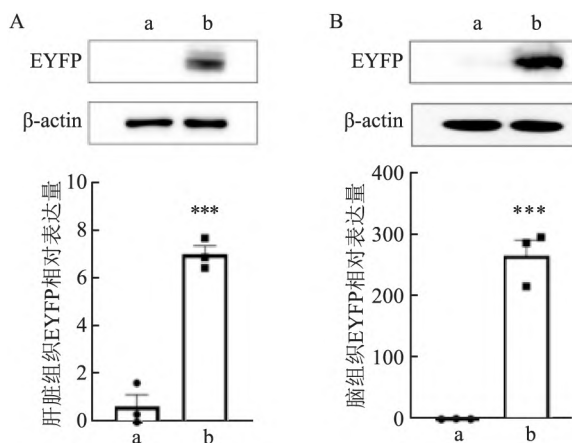


图3 Western blot 法检测 Csflr-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP</sup> 小鼠组织 EYFP 表达(n=3)

A: Csflr-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP</sup> 小鼠肝脏组织 EYFP 蛋白表达及统计图; B: Csflr-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP</sup> 小鼠脑组织 EYFP 蛋白表达及统计图; a: R26R<sup>EYFP</sup> 组; b: Csflr-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP</sup> 组; 与 R26R<sup>EYFP</sup> 组比较: \*\*\* P < 0.001

### 3 讨论

Cre/loxP 系统生成的小鼠提供了了解组织发育、探索细胞命运调控机制以及疾病发展的强大工具。对于 Floxed 小鼠,如果插入的基因编码 EYFP 基因,则在存在特异性 Cre 重组酶时,STOP 元件被删除,使后续基因能够显色或表达荧光,实现对某类细胞或特定组织的示踪目的。

CSF1R 是一种经典的酪氨酸激酶受体,表达于全体的单核髓系细胞,在多种疾病中发挥核心作用。CSF1/CSF1R 信号通路在调控各种炎症和自身免疫性疾病的发展中至关重要<sup>[6-7]</sup>。尽管阻断 CSF1R 具有潜在的免疫介导/炎症性治疗前景,但需要进一



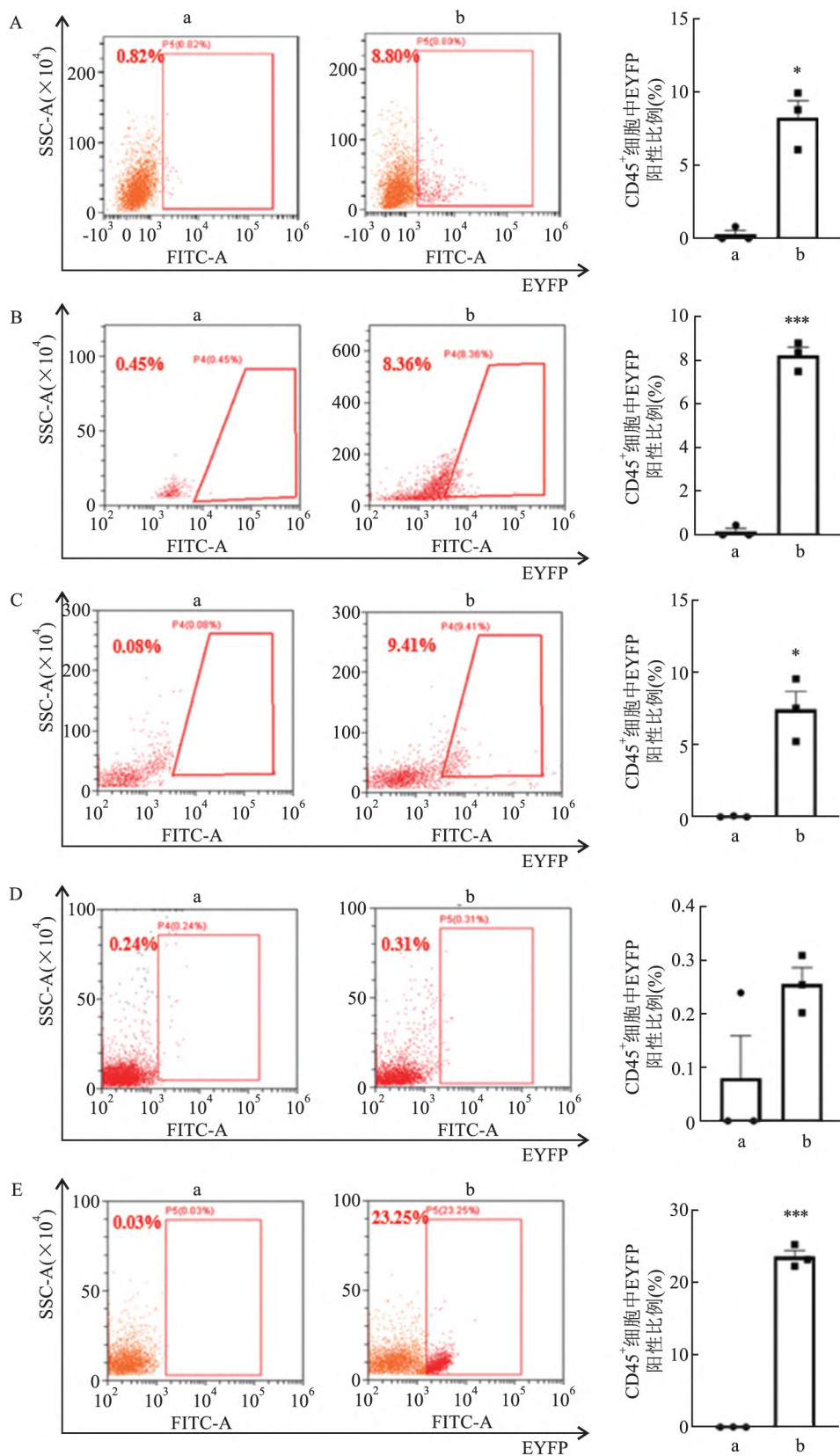


图4 Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup>介导 EYFP 标记组织 CD45<sup>+</sup> 细胞效率 (n = 3)

A: 肝脏组织 CD45<sup>+</sup> 细胞中 EYFP 的阳性比例; B: 肺组织 CD45<sup>+</sup> 细胞中 EYFP 的阳性比例; C: 胸腺组织 CD45<sup>+</sup> 细胞中 EYFP 的阳性比例; D: 脾脏组织 CD45<sup>+</sup> 细胞中 EYFP 的阳性比例; E: 脑组织 CD45<sup>+</sup> 细胞中 EYFP 的阳性比例; a: R26R<sup>EYFP</sup> 组; b: Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP</sup> 组; 与 R26R<sup>EYFP</sup> 组比较: \* P < 0.05, \*\*\* P < 0.001

步阐明其机制以提高疗效和减少不良反应<sup>[8]</sup>。本研究引入了 R26R<sup>EYFP</sup> 小鼠, 并将其与 Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> 小鼠交配, 得到双转基因杂交小鼠, 实现了 EYFP 标记表达 CSF1R 的组织及 CD45<sup>+</sup> 细胞。结果显示, R26R<sup>EYFP</sup> 组小鼠大部分组织 CD45<sup>+</sup> 细胞中 EYFP 的表达比例低于 Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP</sup> 报告基因小鼠组, 其中脑组织的标记效率最高 ( $P < 0.001$ ), 胸腺组织最低 ( $P < 0.05$ ), 可能与组织髓系细胞的表达含量有关。这些结果为标记并追踪 CSF1R 参与的其他重要生物学过程及谱系追踪提供了重要基础, 是实现各种炎症和自身免疫性疾病体内模型研究的重要途径。

### 参考文献

- [1] Hsu Y C. Theory and practice of lineage tracing [J]. *Stem Cells*, 2015, 33(11): 3197–204.
- [2] Kristianto J, Johnson M G, Zastrow R K, et al. Spontaneous recombination activity of Cre-ERT2 *in vivo* [J]. *Transgenic Res* 2017, 26

- (3): 411–7.
- [3] Donocoff R S, Teteloshvili N, Chung H, et al. Optimization of tamoxifen-induced Cre activity and its effect on immune cell populations [J]. *Sci Rep* 2020, 10(1): 15244.
- [4] Ye N, Cai J, Dong Y, et al. A multi-omic approach reveals utility of CD45 expression in prognosis and novel target discovery [J]. *Front Genet* 2022, 13: 928328.
- [5] Chen D, Xiong L, Zhang L, et al. CSF1R is a prognostic biomarker and correlated with immune cell infiltration in the gastric cancer microenvironment [J]. *Pharmacogenomics Pers Med* 2021, 14: 445–7.
- [6] Xiang C, Li H, Tang W. Targeting CSF1R represents an effective strategy in modulating inflammatory diseases [J]. *Pharmacol Res*, 2023, 187: 106566.
- [7] Wen J, Wang S, Guo R, et al. CSF1R inhibitors are emerging immunotherapeutic drugs for cancer treatment [J]. *Eur J Med Chem*, 2023, 245(Pt 1): 114884.
- [8] Ordentlich P. Clinical evaluation of colony-stimulating factor 1 receptor inhibitors [J]. *Semin Immunol* 2021, 54: 101514.

## Construction and efficiency detection of Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP</sup> reporter gene mouse based on Cre/Loxp system

Zhu Xiangling, Wu Xuming, Wang Huihui, Zhou Yuanyuan, Wang Anqi, Zhang Huiru, Liu Chong, Tu Jiajie  
(Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To construct Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP</sup> reporter gene mice and assess the efficacy of Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup>-mediated enhancement of CSF1R in CD45<sup>+</sup> cells labeled with yellow fluorescent protein EYFP. **Methods** Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> mice were crossbred with R26R<sup>EYFP</sup> homozygous mice, and Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP</sup> mice were identified through PCR and Western Blot analyses. Flow cytometry was employed to evaluate CSF1R tag-efficiency in CD45<sup>+</sup> cells across different mouse tissues following tamoxifen induction. **Results** Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP</sup> reporter gene mice were acquired. In addition, it was found that Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup>-mediated EYFP could effectively mark CSF1R in various tissues of mice and CD45<sup>+</sup> cells in different locations. Compared to the R26R<sup>EYFP</sup> group, the highest labeling efficiency was observed in the brain tissue ( $P < 0.001$ ), the lowest in the thymus tissue ( $P < 0.05$ ), and no significant difference was observed in the spleen tissue. **Conclusion** Adult Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> mice and R26R<sup>EYFP</sup> mice are effective ways to obtain Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> R26R<sup>EYFP</sup> induced conditional fluorescence mice. Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup> can mediate EYFP to effectively trace CSF1R in CD45<sup>+</sup> cells in different parts of mice.

**Key words** Csf1r-Cre<sup>ERT2</sup>; R26R<sup>EYFP</sup>; Cre/LoxP system; CD45; flow cytometry