

网络出版时间:2022-8-16 13:18 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220816.0832.013.html

◇基础医学研究◇

Tnfrsf11a^{Cre} 介导黄色荧光素蛋白有效标记脑小胶质细胞

杨凤娇¹, 黄紫薇¹, 赵殿元^{2,3}, 徐 龙¹, 唐 丽¹

摘要 目的 构建 *Tnfrsf11a*^{Cre} *Rosa26*^{YFP} 报告基因小鼠, 检测 *Tnfrsf11a*^{Cre} 介导黄色荧光素蛋白 YFP 标记组织巨噬细胞的效率。方法 将 *Tnfrsf11a*^{Cre} 小鼠与 *Rosa26*^{YFP} 小鼠交配, 通过 PCR 筛选出 *Tnfrsf11a*^{Cre} *Rosa26*^{YFP} 报告基因小鼠。分离成年 *Tnfrsf11a*^{Cre} *Rosa26*^{YFP} 小鼠脑小胶质细胞、肝脏巨噬细胞、肾脏巨噬细胞、肺泡巨噬细胞、脾脏巨噬细胞, 标记流式抗体, 通过流式细胞术分析 *Tnfrsf11a*^{Cre} 介导黄色荧光素蛋白 YFP 标记组织巨噬细胞的效率。结果 *Tnfrsf11a*^{Cre} 介导黄色荧光素蛋白 YFP 对脑小胶质细胞具有约 91.27% 的标记效率, 但对肝脏、脾脏、肺泡巨噬细胞细胞的标记效率分别只有约 63.60%、69.66%、32.76%。结论 *Tnfrsf11a*^{Cre} 可以介导 YFP 对脑小胶质细胞进行示踪。同时, *Tnfrsf11a*^{Cre} 可用做脑小胶质细胞基因条件性敲除的工具鼠。

关键词 *Tnfrsf11a*^{Cre}; *Rosa26*^{YFP}; 组织巨噬细胞; 脑小胶质细胞; Cre 重组酶; 报告基因小鼠; 流式细胞术

中图分类号 R 392-33; R 329.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)09-1345-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.001

巨噬细胞是一种广泛分布于全身组织的免疫细胞, 在机体的免疫防御、免疫自稳和免疫监视中发挥重要作用^[1]。研究^[2]表明, 脑小胶质细胞来源于卵黄囊巨噬细胞, 其他大部分组织定居巨噬细胞主要来源于卵黄囊巨噬细胞和胎肝单核细胞。这些前体细胞进入组织器官后, 逐渐分化为成熟的组织定居巨噬细胞。生理状态下, 大部分的组织定居巨噬细胞可以通过自我更新维持其稳态^[3]。脑小胶质细

胞是一种存在于脑与脊髓中的巨噬细胞, 约占脑细胞数量的 10%~15%, 对维持中枢神经系统的正常功能起重要作用, 它们能清除中枢神经系统中的神经炎症斑、病原体以及损伤后无功能的神经元与轴突。为了对脑小胶质细胞的发育、稳态维持及功能进行进一步探索, 该研究致力于构建有效的脑小胶质细胞条件性敲除小鼠模型。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 *Tnfrsf11a*^{Cre} 小鼠购自北京百奥赛图基因生物技术有限公司, *Rosa26*^{YFP} 小鼠购自美国 Jackson 实验室。小鼠均饲养于军事医学研究院生命组学研究所 SPF 级动物房。

1.1.2 主要仪器 LSRFortessa SORP 流式细胞分析仪(美国 BD 公司), 2720 Thermal Cycler PCR 仪、PowerPac™ HC 凝胶电泳仪、凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司), 留置针(美国 BD 公司)。

1.1.3 主要试剂 0.05 mol EGTA 贮存液(美国 Amersco 公司)、0.5 mol CaCl₂ 贮存液(北京索莱宝科技有限公司)、肝素钠(广州赛博生物科技有限公司)、RPMI-1640 培养基(美国 Hyclone 公司)、Collagenase IV(德国 Sigma 公司)、脱氧核糖核酸酶 I(德国 Sigma 公司)、Optiprep™(德国 Serumwerk Bernburg AG 公司)、Percoll(美国 GE Healthcare 公司)、红细胞裂解液(美国 BD 公司)、基因组提取试剂(成都福际生物技术有限公司); PCR 引物(北京六合华大基因科技有限公司), 序列见表 1。CD45(30-F11, 美国 Tonbo 公司)、Ly6C(HK1.4, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、F4/80(BM8, 美国 Thermo

表 1 *Tnfrsf11a*^{Cre} 基因和 *Rosa26*^{YFP} 基因 PCR 序列

引物名称	引物序列 5'→3'
<i>Tnfrsf11a</i> ^{Cre}	F: CCTGTGCAGGAGGACGCT R: TGGTGCACAGTCAGCAGGTTG
<i>Rosa26</i> ^{YFP} -1	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT
<i>Rosa26</i> ^{YFP} -2	GCGAAGAGTTTCTCCTCAACC
<i>Rosa26</i> ^{YFP} -3	GGAGCGGGAGAAATGGATATG

2021-12-06 接收

基金项目: 国家自然科学基金重大研究计划培育项目(编号: 91842101)

作者单位: ¹安徽医科大学基础医学院免疫教研室, 合肥 230032

²军事科学院军事医学研究院生命组学研究所, 北京 102206

³蛋白质组学国家重点实验室, 北京蛋白质组研究中心, 国家蛋白质科学中心, 北京 102206

作者简介: 杨凤娇, 女, 硕士研究生;

徐 龙, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: xulong@ahmu.edu.cn;

唐 丽, 女, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: tangli731

@163.com

Fisher Scientific 公司)、CD64 (x54-5/7.1, 美国 Biolegend 公司)、CD11b (M1/70, 美国 Tonbo 公司)、CD11c (N418, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、SiglecF (E50-2440, 美国 BD 公司)、DAPI (美国 Tonbo 公司)。

1.2 方法

1.2.1 *Tnfrsf11a^{Cre} Rosa26^{YFP}* 小鼠的繁殖分笼与鉴定

Tnfrsf11a^{Cre} 小鼠与 *Rosa26^{YFP}* 小鼠交配, 得到的子代在 2 周龄时剪脚趾编号, 加入 50 μ l 基因组提取试剂, 混匀, 55 $^{\circ}$ C 烘箱过夜, 提取基因组。PCR 鉴定小鼠基因型, 反应体系: 2 μ l 引物、2 μ l 蒸馏水、2 μ l 鼠尾 DNA 模板、6 μ l Mix; 反应条件: *Tnfrsf11a^{Cre}* 反应条件为 94 $^{\circ}$ C、2 min; 94 $^{\circ}$ C、20 s, 65 $^{\circ}$ C (每循环数降 0.5 $^{\circ}$ C)、15 s, 68 $^{\circ}$ C、20 s, 11 个循环数; 94 $^{\circ}$ C、15 s, 60 $^{\circ}$ C、15 s, 72 $^{\circ}$ C、30 s, 28 个循环数; 72 $^{\circ}$ C、2 min。*Rosa26^{YFP}* 反应条件为 94 $^{\circ}$ C、2 min; 94 $^{\circ}$ C、20 s, 65 $^{\circ}$ C、80 s, 72 $^{\circ}$ C、1 min; 94 $^{\circ}$ C、30 s, 60 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、1 min, 35 个循环数; 72 $^{\circ}$ C、2 min。配制 2.5% 的琼脂糖凝胶, 待 PCR 反应结束后, 将得到的 PCR 产物点样置于 2.5% 琼脂糖凝胶进行电泳, 并用凝胶成像仪进行拍照记录。将 PCR 鉴定得到的 *Tnfrsf11a^{Cre} Rosa26^{YFP}* 小鼠及其同窝对照 *Tnfrsf11a^{Cre}* 小鼠与 *Rosa26^{YFP}* 小鼠留下, 3 周龄时分笼处理, 8 周龄时即可用作实验。

1.2.2 肝脏、脑、脾脏、肺泡、肾脏巨噬细胞的分离

500 μ l/只 1.2% 三溴乙醇 (德国 Sigma), 腹腔注射麻醉小鼠。小鼠麻醉后, 乙醇消毒, 并将小鼠固定于解剖台, 打开腹腔, 轻轻拨动内脏, 使小鼠肝门静脉暴露, 留置针穿刺肝门静脉, 从肝门静脉依次灌注含有 0.25 mmol EDTA、5 mmol D-glucose、0.665 mmol 肝素钠的 I 灌液 (NaCl 0.137 μ mol、Na₂HPO₄ · 2H₂O 438.226 μ mol、Na₂HPO₄ · 7H₂O 753.733 μ mol、KCl 5.298 mmol、Hepes 9.059 mmol、NaHCO₃ 4.199 mmol, pH 7.3); 含有 20 U Collagenase IV、0.4 U 脱氧核糖核酸酶的 II 灌液灌注结束后, 用眼科镊取下消化后的肝脏, 放入含有 RPMI-1640 培养基的 100 mm 皿中, 70 μ m 细胞筛网过滤, 制成单细胞悬液。4 $^{\circ}$ C、53 r/min 离心去除沉淀细胞, 4 $^{\circ}$ C、530 r/min 离心取沉淀细胞, 加入 2 ml OPtiPrep™, RPMI-1640 培养基定量至 5 ml, 与细胞沉淀混匀后, 在上层加入 3 ml RPMI-1640 培养基; 4 $^{\circ}$ C、1 166 r/min 离心 25 min (升降速 0), 吸出中间层细胞, 4 $^{\circ}$ C、530 r/min 离心取沉淀细胞, 加入红细胞裂解液, 1 min 后加入 PBE 终止红裂, 4 $^{\circ}$ C、530 r/min 离心取沉淀

细胞, 加入流式 Stain Buffer 将沉淀细胞冲悬为单细胞悬液。取脑、肾脏、肺脏, 用手术剪碎, 加入 II 灌注液, 37 $^{\circ}$ C 体外消化 45 min 后, 70 μ m 细胞筛网过滤, 制成单细胞悬液; 取脾脏用眼科镊轻轻撕扯, 70 μ m 细胞筛网过滤; 将获得的脾脏、肾脏、肺脏单细胞悬液 4 $^{\circ}$ C、530 r/min 离心 5 min 取沉淀细胞, 红裂 3 min 后加入 PBE 终止红裂, 4 $^{\circ}$ C、530 r/min 离心取沉淀细胞, 加入适量流式 Stain Buffer 将沉淀细胞冲悬为单细胞悬液。过滤后的脑组织单细胞悬液 4 $^{\circ}$ C、636 r/min 离心 5 min 取沉淀细胞, 加入 37% Percoll 定量细胞沉淀至 5 ml 并混匀, 在混匀的细胞沉淀下方加入 5 ml 70% Percoll, 室温、636 r/min 离心 25 min (升降速 0), 吸出中间透明细胞层, 4 $^{\circ}$ C、636 r/min 离心取沉淀细胞, 加入红细胞裂解液, 1 min 后加入 PBE 终止红裂, 4 $^{\circ}$ C、636 r/min 离心取沉淀细胞, 加入适量流式 Stain Buffer 将沉淀细胞冲悬为单细胞悬液。

1.2.3 标记流式抗体并进行流式细胞分析仪检测

取所获得各组织单细胞悬液各 100 μ l, 并加入 1 μ l Fc Black 封闭 5 min。不同组织巨噬细胞标记流式抗体: 肝脏巨噬细胞和肾脏巨噬细胞 CD45 AF700、Ly6C Pcy7、F4/80 PE、CD64 Bv421; 脑小胶质细胞和脾脏巨噬细胞 CD45 AF700、Ly6C Bv421、F4/80 PE、CD11b-Pcy7; 肺泡巨噬细胞 CD45 AF700、CD11c Pcy7、SiglecF Bv421。冰上避光标记 30 min 后, Stain Buffer 洗涤 2 次; 向洗涤后的细胞悬液中加入 DAPI 染料, 冰上避光标记 45 min 后, Stain Buffer 洗涤后冲悬细胞沉淀。流式检测 YFP 标记组织巨噬细胞效率。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 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, $P < 0.05$ 示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验组与对照组小鼠的基因型鉴定结果 *Tnfrsf11a^{Cre}* 小鼠与 *Rosa26^{YFP}* 小鼠交配获得的子代小鼠共 20 只, 在子代小鼠 2 周龄时剪下鼠尾, 提取基因组 DNA, 经 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳后, 鉴定出 *Tnfrsf11a^{Cre} Rosa26^{YFP}* 小鼠 9 只 (2、3、4、5、7、11、12、16、18), 同窝对照小鼠 *Tnfrsf11a^{Cre}* 小鼠 4 只 (8、9、17、20), *Rosa26^{YFP}* 小鼠 7 只 (1、6、10、13、14、15、19)。 *Tnfrsf11a^{Cre}* 琼脂糖凝胶电泳结果见图 1, 已知 *Tnfrsf11a^{Cre}* PCR 扩增条带分子量为 285 bp; *Rosa26^{YFP}* 琼

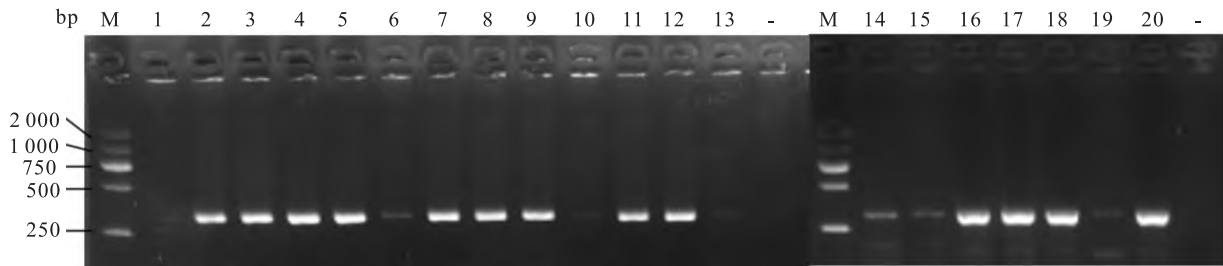


图1 *Tnfrsf11a^{Cre}*小鼠与 *Rosa26^{yfp}*小鼠交配的子代小鼠 *Tnfrsf11a^{Cre}*基因 PCR 琼脂糖凝胶结果
M: Marker; 1~20: 实验小鼠编号

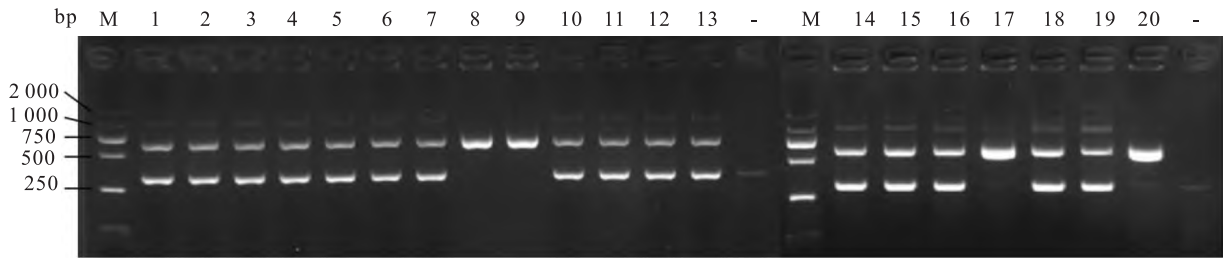


图2 *Tnfrsf11a^{Cre}*小鼠与 *Rosa26^{yfp}*小鼠交配的子代小鼠 *Rosa26^{yfp}*基因 PCR 琼脂糖凝胶结果
M: Marker; 1~20: 实验小鼠编号

脂糖凝胶电泳结果见图2,已知 *Rosa26^{yfp}* PCR 扩增 Cre 介导的重组片段分子量为 327 bp。

2.2 肝脏、脑、肾脏、脾脏、肺泡巨噬细胞流式分析圈门策略 流式细胞分析仪检测在肝脏、脑、肾脏、脾脏、肺泡巨噬细胞中表达 YFP 的情况。首先根据 FSC-A 和 SSC-A 圈出细胞群,第2步根据 FSC-H 和 FSC-A 去除细胞粘连带,第3步根据 DAPI 标记,去除死细胞,由于巨噬细胞是免疫细胞,均表达 CD45,第4步圈出 CD45 阳性细胞群,接着根据不同组织巨噬细胞特异性表达蛋白,圈出目的细胞群;肝脏巨噬细胞、脑小胶质细胞、肾脏巨噬细胞、脾脏巨噬细胞在 CD45 阳性细胞群的基础上,圈出 Ly6C 阴性细胞群,去除单核细胞干扰,再分别圈出 F4/80⁺ CD64⁺ 的肝脏巨噬细胞(图3A)、F4/80^{int} CD11b⁺ 的脑小胶质细胞(图3B)、F4/80⁺ CD64⁺ 的肾脏巨噬细胞(图3C)、F4/80⁺ CD11b^{low} 的脾脏巨噬细胞(图3D);肺泡巨噬细胞在第4步的基础上,根据其特异性高表达 SiglecF 和 CD11c,圈出 SiglecF⁺ CD11c⁺ 的肺泡巨噬细胞(见图3E)。圈出组织巨噬后,检测 YFP 表达情况。

2.3 *Tnfrsf11a^{Cre}* 介导荧光素蛋白 YFP 标记组织巨噬细胞效率 对分离的组织单细胞悬液进行流式分析后,计算 *Tnfrsf11a^{Cre} Rosa26^{yfp}* 小鼠及其对照 *Tnfrsf11a^{Cre}* 和 *Rosa26^{yfp}* 小鼠肝脏、脑、肾脏、脾脏、肺泡巨噬细胞中表达 YFP 的比例,发现对照组 *Tnfrsf11a^{Cre}* 小鼠和 *Rosa26^{yfp}* 小鼠的脑小胶质细胞、肾

脏、肝脏、脾脏、肺泡巨噬细胞均不表达 YFP,但在实验组 *Tnfrsf11a^{Cre} Rosa26^{yfp}* 小鼠中,脑小胶质细胞表达 YFP 为(91.27 ± 3.70)% (图4A);肾脏巨噬细胞表达 YFP 为(86.00 ± 7.02)% (图4B);肝脏巨噬细胞表达 YFP 为(63.60 ± 10.35)% (图4C);脾脏巨噬细胞表达 YFP 为(69.66 ± 10.22)% (图4D);肺泡巨噬细胞表达 YFP 为(32.76 ± 13.35)% (图4E)。这说明 *Tnfrsf11a^{Cre}* 介导 YFP 对脑小胶质细胞具有较高的标记效率,而对肝脏、肾脏、脾脏、肺泡巨噬细胞的标记效率低。

3 讨论

Cre/Loxp 系统生成的小鼠可提供组织或器官中细胞的信息,是了解组织发育、探索调节细胞命运的机制和疾病发生发展的强有力工具^[4]。巨噬细胞是机体免疫系统的重要组成部分,不同组织巨噬细胞对于维持机体稳态发挥着不同的作用。例如,肝脏巨噬细胞通过清除病原体,维持机体免疫细胞稳态^[5];肺泡巨噬细胞通过清除肺泡表面活性物质,维持肺脏的功能稳态^[6];脾脏红髓巨噬细胞通过吞噬清除衰老的红细胞,维持脾脏功能稳态^[7];小胶质细胞清除凋亡神经元、介导中枢神经系统损伤和疾病的内源性免疫反应,从而调节神经元数量、发挥神经保护或神经毒作用^[8]。因此,探究组织巨噬细胞的发育、稳态维持具有重要的意义。

已有用于研究巨噬细胞的 Cre/Loxp 工具鼠大

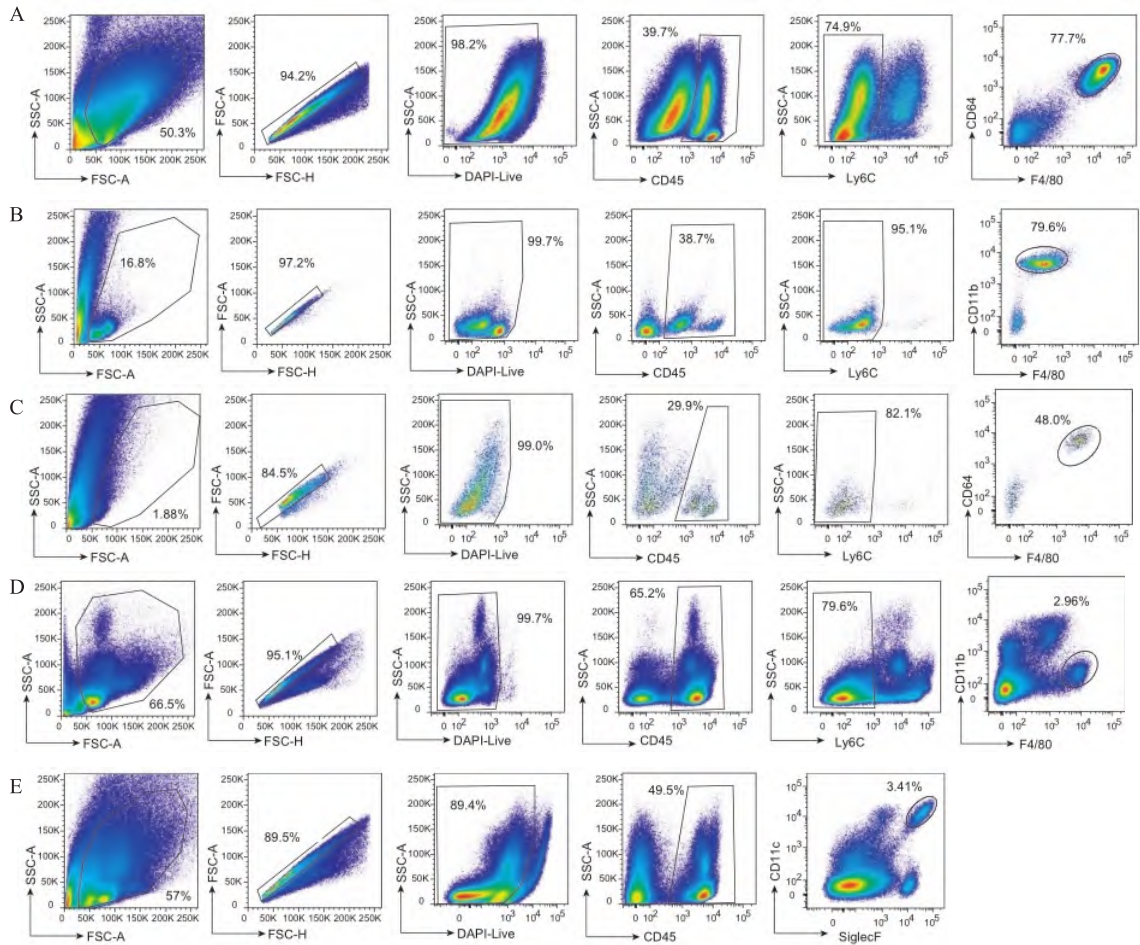


图3 肝脏、脑、肾脏、脾脏、肺泡巨噬细胞流式分析圈门策略

A: 肝脏巨噬细胞; B: 脑小胶质细胞; C: 肾脏巨噬细胞; D: 脾脏巨噬细胞; E: 肺泡巨噬细胞

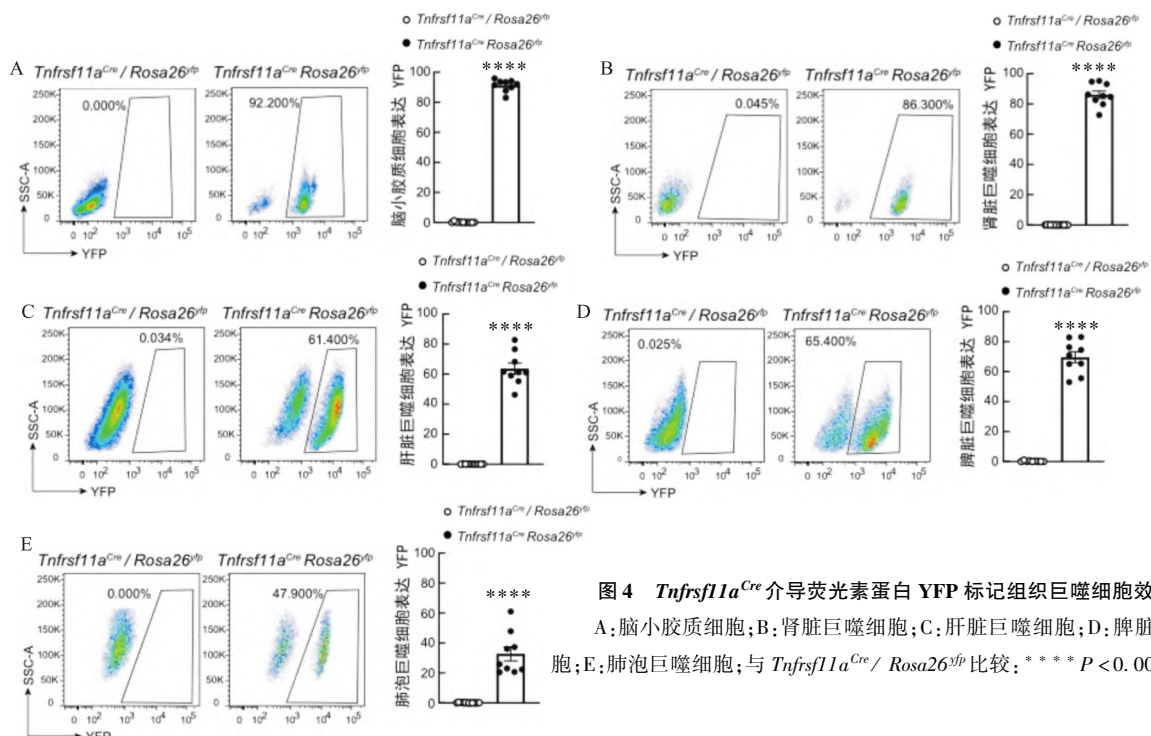


图4 *Tnfrsf11a^{Cre}* 介导荧光素蛋白 YFP 标记组织巨噬细胞效率

A: 脑小胶质细胞; B: 肾脏巨噬细胞; C: 肝脏巨噬细胞; D: 脾脏巨噬细胞; E: 肺泡巨噬细胞; 与 *Tnfrsf11a^{Cre}/Rosa26^{flp}* 比较: *** $P < 0.0001$

都存在一定的缺陷。例如 *Vav1^{Cre}* 小鼠存在敲除范围过于广泛的问题,不仅能够敲除巨噬细胞、粒细胞、单核细胞等免疫细胞,还可以敲除部分内皮细胞^[9]; *Lyz2^{Cre}* 小鼠不仅可以实现肺泡巨噬细胞等组织巨噬细胞的敲除^[10],还可以敲除粒细胞、单核细胞及部分树突状细胞,并且其重组效率不稳定,对脑小胶质细胞的敲除效率很低^[11-12]。本研究中,发现 *Tnfrsf11a^{Cre}* 介导 YFP 可以有效标记脑小胶质细胞,在不同组织巨噬细胞中, *Tnfrsf11a^{Cre}* 介导 YFP 标记的效率不同可能是因为在不同组织巨噬细胞中 *Tnfrsf11a* 的表达丰度不同导致的。

Tnfrsf11a 基因编码的蛋白是 TNF 受体超家族成员 11a, 胚胎 10.25 d 时即在小鼠巨噬细胞前体细胞中表达。鉴于 *Rosa26* 基因表达的普遍性,本研究构建了 *Rosa26* 靶向载体,插入 *Loxp-Stop-Loxp-YFP* 序列。将 *Tnfrsf11a^{Cre}* 小鼠与 *Rosa26^{YFP}* 小鼠交配,获得的 *Tnfrsf11a^{Cre} Rosa26^{YFP}* 小鼠表达 *Tnfrsf11a* 的细胞即表达 Cre 酶, Cre 酶可以识别 Stop 位点两端的 *Loxp* 位点,并进行切割,切割后表达的 *Rosa26* 基因的细胞同时表达 YFP 蛋白,发出黄色荧光。研究证明 *Tnfrsf11a^{Cre}* 介导 YFP 对于脑小胶质细胞具有 90% 以上的标记效率,而对肝脏、脾脏、肺泡巨噬细胞的标记效率分别只有 63.60%、69.66%、32.76%,用来做这些巨噬细胞的报告基因小鼠是远远不够的。因此, *Tnfrsf11a^{Cre}* 小鼠可以用做研究脑

小胶质细胞发育分化、稳态维持及功能的工具鼠。

参考文献

- [1] Munro D A D, Hughes J. The origins and functions of tissue-resident macrophages in kidney development[J]. *Front Physiol*, 2017, 8:837.
- [2] Blériot C, Chakarov S, Ginhoux F. Determinants of resident tissue macrophage identity and function[J]. *Immunity*, 2020, 52(6):957-70.
- [3] Ginhoux F, Guilliams M. Tissue-resident macrophage ontogeny and homeostasis[J]. *Immunity*, 2016, 44(3):439-49.
- [4] Kim H, Kim M, Im S K, et al. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes[J]. *Lab Anim Res*, 2018, 34(4):147-59.
- [5] Krenkel O, Tacke F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(5):306-21.
- [6] Hou F, Xiao K, Tang L, et al. Diversity of macrophages in lung homeostasis and diseases[J]. *Front Immunol*, 2021, 12:753940.
- [7] A-Gonzalez N, Castrillo A. Origin and specialization of splenic macrophages[J]. *Cell Immunol*, 2018, 330:151-8.
- [8] Lenz K M, Nelson L H. Microglia and beyond: innate immune cells as regulators of brain development and behavioral function[J]. *Front Immunol*, 2018, 9:698.
- [9] Georgiades P, Ogilvy S, Duval H, et al. Vavcre transgenic mice: a tool for mutagenesis in hematopoietic and endothelial lineages[J]. *Genesis*, 2002, 34(4):251-6.
- [10] 苏丛, 伍婷, 徐方明, 等. 巨噬细胞 *Lamtor2* 基因敲除小鼠对肺炎克雷伯菌易感性的研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(4):505-9.
- [11] Shi J, Hua L, Harmer D, et al. Cre driver mice targeting macrophages[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1784:263-75.
- [12] Orthgiess J, Gericke M, Immig K, et al. Neurons exhibit *Lyz2* promoter activity *in vivo*: implications for using *LysM-Cre* mice in myeloid cell research[J]. *Eur J Immunol*, 2016, 46(6):1529-32.

Tnfrsf11a^{Cre} mediates YFP labeling some of tissue macrophages

Yang Fengjiao¹, Huang Ziwei¹, Zhao Dianyuan^{2,3}, Xu Long¹, Tang Li¹

(¹Dept of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Institute of Lifeomics, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 102206; ³State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, National Center for Protein Sciences, Beijing 102206)

Abstract Objective *Tnfrsf11a^{Cre} Rosa26^{YFP}* reporter gene mice were prepared to determine the efficiency of Cre-mediated recombination using flow cytometry in different tissue-resident macrophages. **Methods** The *Tnfrsf11a^{Cre} Rosa26^{YFP}* reporter mice were generated by crossing *Tnfrsf11a^{Cre}* mice with *Rosa26^{YFP}* mice and identified by PCR. Brain microglia, liver macrophages, kidney macrophages, alveolar macrophages and spleen macrophages were separated from adult *Tnfrsf11a^{Cre} Rosa26^{YFP}* reporter mouse and yellow fluorescent protein (YFP) labeling efficiency was analyzed by flow cytometry. **Results** YFP expression percentage was about 91.27% of brain microglia in *Tnfrsf11a^{Cre} Rosa26^{YFP}* reporter mice, but liver, spleen, and alveolar macrophages were inefficiently targeted (63.60%, 69.66%, 32.76%). **Conclusion** *Tnfrsf11a^{Cre}* mice were qualified as conditional knockout model mice of brain microglia and *Tnfrsf11a^{Cre} Rosa26^{YFP}* reporter mice can be used as a tool for conditional knockout of brain microglia *in vivo*.

Key words *Tnfrsf11a^{Cre}*; *Rosa26^{YFP}*; tissue macrophages; brain microglia; cre recombinase; reporter mouse; flow cytometry