

LP 小鼠突变基因的定位及鉴定

张粉丽¹, 陈 兵², 薛整风², 李 怡²

(1. 南京师范大学生命科学学院, 南京, 江苏 210046; 2. 扬州大学比较医学中心, 扬州, 江苏 225009)

【摘要】 目的 以卷尾突变 C57BL/6J 小鼠为研究对象, 通过微卫星定位以及候选基因测序分析确定突变基因位点。方法 将 LP 小鼠与正常 C57BL/6J 及 C3H 小鼠交配, 记录了后代中卷尾与正常小鼠的数目, 确定卷尾突变表型的遗传模式。微卫星 D1Mit113 和 D1Mit149 对突变基因进行了精确定位, 确定候选基因。PCR 扩增候选基因片段直接测序并进行序列分析。用 FspBI (BfaI) 内切酶鉴定 LP 小鼠杂交后代的基因型。结果 LP 突变呈单基因不完全显性遗传, 在不同的遗传背景中存在表型差异; Vangl2 基因编码区 1345bp 处碱基由 C→T。结论 Vangl2 基因 C→T 的突变是一种无义突变, 导致蛋白编码提前终止, 是引起卷尾突变的原因; 杂交 LP 小鼠后代中未出现纯合子小鼠, 证明 Vangl2 基因突变纯合子致死。

【关键词】 C57BL/6J 小鼠; LP; Vangl2 基因; 无义突变

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 12-0020-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.012.004

Localization and identification of the mutant gene in the loop-tail mouse

ZHANG Fen-li¹, CHEN Bing², XUE Zheng-feng², LI Yi¹

(1. School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China;

2. Comparative Medicine Center, Yangzhou University, Yangzhou 225009)

【Abstract】 Objective To define the loci of the mutant gene in the loop-tail mouse. **Methods** To study the heredity pattern, loop-tail mice were mated with normal C57BL/6J and C3H mice. Their offsprings with loop-tail or normal phenotype were registered respectively. Microsatellite marker D1Mit113 and D1Mit149 were used to locate the mutant gene. Based on fine mapping, the candidate gene Vangl2 was found. Vangl2 gene from the loop-tail mice was amplified by PCR followed by sequencing. Incision enzyme FspBI (BfaI) identified the genotype of offspring from loop-tail mice intercrossing. **Results** Heredity test indicated that the loop-tail phenotype was controlled by a single dominant gene not with 100% penetrance but was affected by genetic background. A C-to-T transversion was at the 1345bp in Vangl2 gene of the loop-tail mice. **Conclusions** The C-to-T transversion introduces a pre-termination codon of amino acids and causes the phenotype of loop-tail phenotype. None homozygous mice were found in the offsprings, suggesting that the homozygous mice are lethal.

【Key words】 C57BL/6J mice; Loop tail mouse; Vangl2 gene; Nonsense mutation

ENU 是目前公认的最强的小鼠诱变剂, 其诱导的突变分为显性、隐性或沉默突变, 显性突变的筛

查比较简单, G0 代雄性小鼠精原细胞中所携带的突变就可以在 G1 代小鼠中出现对应表型; 隐性突变

的筛查十分复杂,因为碱基的突变在 G1 小鼠中不出现相应的表型,研究者需要对 G1 小鼠采取一定的交配手段,使得可能存在的(无突变表型)突变基因纯合,才能发现新的表型。ENU 诱变剂诱导突变作为一种表型驱动法可以通过筛选获得并建立人类疾病相似的动物模型,同时也可以进行基因功能的分析^[1,2]。

2003 年,通过 ENU 诱变小鼠扬州大学比较医学中心筛选到 6 种白斑突变小鼠,其中一种 C57BL/6J 小鼠的腹部、爪子以及尾部出现白斑突变,被命名为 Wbct^[3](white belly, claws and tails)。在 Wbct 小鼠保种过程中出现了一种新表型突变小鼠——卷尾白斑突变小鼠,但是这种突变小鼠与正常 B6 小鼠回交后,白斑表型消失,卷尾表型能够遗传下去。因此我们获得了一例只有卷尾(loop-tail, LP)而无白斑的 B6 突变小鼠。

本研究确定了 LP 小鼠的遗传模式,并对突变位点进行了精确定位,筛选到了卷尾突变表型的强力候选基因—Vangl2。通过对 Vangl2 部分基因序列的测序,发现了该基因的一个新突变位点,为 Vangl2 基因功能的深入研究及建立相应的动物模型打下了基础^[4]。

1 材料和方法

1.1 实验动物及饲养环境

正常 C57BL/6J (B6)、C3He/J (C3H) 小鼠,卷尾突变小鼠由扬州大学比较医学中心提供,实验动物生产许可证:SCXK(苏)2012-0004,动物饲养在屏障环境的动物房内,饲料(江苏协同医药公司生产)采用⁶⁰Co 照射,自由采食和饮水,室内温度控制在(23±2)℃,湿度控制在(55±5)%,室内照明采用 12 h:12 h 明暗交替。实验动物使用许可证:SYXK(苏)2012-0029

1.2 试剂及仪器

蛋白酶 K,动物组织消化液,TRIzol reagent, Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit, LA Taq, QIA quick Gel Exaction Kit, PCR 仪,电泳仪,凝胶成像系统,常温离心机,冷冻离心机,超净工作台,电热恒温水槽。

1.3 方法

1.3.1 确定 LP 小鼠的遗传模式:将 B6 背景的 LP 雄鼠与正常 B6, C3H 雌鼠各 12 只交配,记录 G1 代中 LP 小鼠与正常小鼠的数目。

1.3.2 N2 代 LP 小鼠的获得及 N2 代小鼠基因组 DNA 提取:将 B6 背景的 LP 小鼠与正常 C3H 小鼠交配,获得 F1 代 LP 小鼠,再将 F1 代小鼠与正常 B6 小鼠交配获得[(B6×C3H)F1×B6]N2 代 LP 小鼠。剪取 N2 代 LP 小鼠尾尖 0.5 cm 左右,常规蛋白酶 K 消化,酚氯仿方法提取基因组 DNA^[5]。

1.3.3 连锁分析:通过微卫星引物 D1Mit113 和 D1Mit149 PCR 扩增 N2 代 LP 小鼠基因组 DNA。记录并计算突变基因与微卫星之间的重组率,采用基因连锁分析以确定突变基因在 1 号染色体上的位置。

1.3.4 候选基因 Vangl2 序列分析:提取 LP 小鼠及正常 B6 小鼠尾 DNA,PCR 扩增 Vangl2 基因的外显子以及侧翼区,胶回收后测序。用 DNASTAR 软件将 LP 小鼠测序结果与数据库中及正常 B6 小鼠的 Vangl2 序列比对,或者分析 LP 小鼠测序峰图中是否出现明显重叠波并选择不同突变个体重复测序 1 次验证结果的准确性。引物序列为:

Vangl2-452 Forward: 5'-AAACACCCTAGCTATCTTAGAAAGC-3'

Vangl2-452 Reverse: 5'-GGAAGTAGGACTGGCAGAAATGTG-3';

Vangl2-324 Forward: 5'-TAGGATGAGCAGTGGCACCTGCG-3'

Vangl2-324 Reverse: 5'-GACAAGAAGCTGGACAGAGAGGAC-3';

Vangl2-908 Forward: 5'-ACCTGCCCTGATGTGTCCCTTC-3'

Vangl2-908 Reverse: 5'-GCTTTCTCAGCCCAGTTCATCC-3'。

1.3.5 胚胎总 RNA 提取及 RT-PCR:LP 小鼠互交后检栓, E12.5 d 脱颈椎处死,取胚胎头部于 1000μL Trizol 变性液中研磨,氯仿、异丙醇抽提获得总 RNA,立即用 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit 逆转录。以 cDNA 模板进行 RT-PCR,PCR 产物回收并测序。最适宜退火温度为 61℃,引物序列 Forward: 5'-TACTACGAGGAAGCCGAGCATGA-3'; Reverse: 5'-GCAGCCGCATGACGAACCTATGT-3'。

1.3.6 基因型分析:提取 LP 小鼠互交后 E12.5 d 胚胎 DNA,PCR 扩增 Vangl2 基因中包含点突变的基因片段(452bp),引物序列 Vangl2-452 Forward: 5'-AAACACCCTAGCTATCTTAGAAAGC-3'; Vangl2-

452 Reverse: 5'-GGAAGTAGGACTGGCAGAAATGTG-3'。FspBI (BfaI) 内切酶将 PCR 产物 37°C 酶切 12h, 酶切产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳。野生型正常小鼠, 显示一条带(452 bp); 突变杂合子小鼠, 显示三条带(分别为 452 bp、319 bp、133 bp); 突变纯合子小鼠, 显示两条带(分别为 319 bp、133 bp)。

2 结果

2.1 LP 小鼠遗传模式及表现型分析

LP 小鼠与正常 B6 小鼠回交获得 103 只小鼠, 出现 LP 表型的后代 32 只。LP 与正常 C3H 小鼠杂交获得后代 36 只, 有 LP 表型的仅 1 只。提示该突变基因表型与背景品系有关, 同时表明 LP 小鼠的遗传模式为单基因不完全显性遗传, 外显率不完全。

2.2 LP 小鼠突变基因的定位及候选基因的确定

用微卫星 D1Mit113 (距着丝粒 79.54 cM) 和 D1Mit149 (距着丝粒 80.13 cM) 对 42 个 N2 代小鼠 DNA 样品进行连锁分析, 结果显示 D1Mit113 与突变基因重组 0 例, 重组率为 0; D1Mit149 与突变基因重组 0 例, 重组率为 0。对附近逐个基因功能分析发现距着丝粒 79.54 cM 的 Vangl2 基因突变表型^[6]与本例小鼠表型极为相似, 因此 Vangl2 基因为 LP 突变表型的强力候选基因(图 1)。

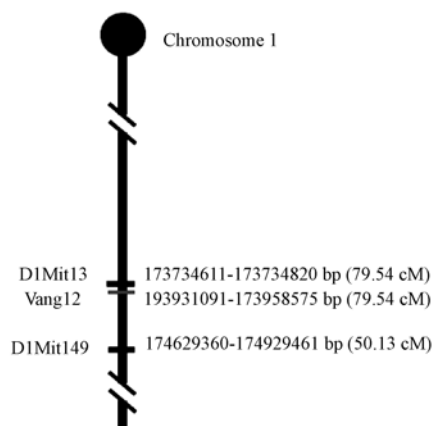


图 1 突变基因在小鼠第 1 号染色体上的位置

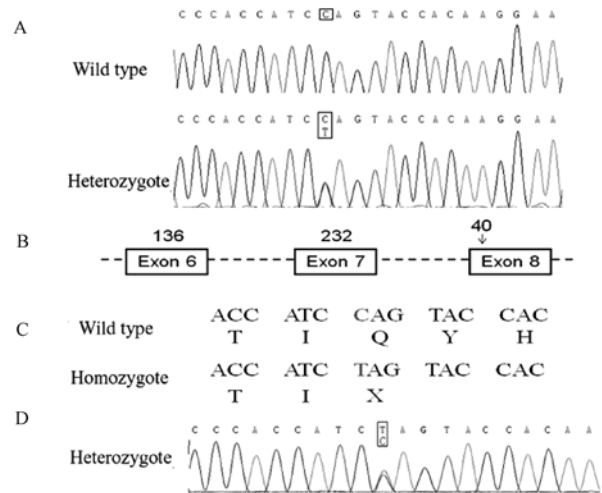
Fig. 1 Location of mutant genes on chr1 of the mice

2.3 Vangl2 基因的测序结果及蛋白预测

PCR 产物测序结果表明, 与正常 B6 小鼠 Vangl2 基因序列相比, LP 小鼠的 Vangl2 基因第 8 外显子出现单碱基突变, 即在 Vangl2 基因编码区 1345bp 处碱基由 C→T(图 2A, B)。该突变导致纯合子小鼠编码的蛋白 449 位点出现无义突变 CAG→TAG(图 2C), 同时 C→T 碱基突变在此产生了一个

FspBI (BfaI) 内切酶位点。

LP 杂合子小鼠 RT-PCR 扩增产物测序结果显示, 突变等位基因能够被转录、拼接, 而不是无义降解, 但是可能会导致编码蛋白的部分功能丧失(图 2D)。



(A) 局部 Vangl2 基因组 DNA 测序结果 (B) Vangl2 基因部分外显子与内含子结构图 (C) 蛋白预测结果 (红色字体为碱基突变位点) (D) LP 杂合子小鼠 RT-PCR 产物测序结果

图 2 LP 小鼠突变基因鉴定

(A) Sequence analysis of the Vangl2 gene in loop-tail heterozygous mice by ABI-PRISM 3730. (B) Partial exon and intron structure of the mouse Vangl2 gene. The arrow shows the position of abase substitution. (C) Translation of wild-type and homozygous mutant alleles. The base mutated is highlighted in red. (D) Sequence analysis of reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) products of Vangl2 in the loop-tail heterozygous mice.

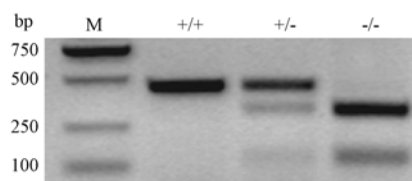
Fig. 2 Identification of mutant genes in the loop-tail mice

2.4 LP 小鼠基因型分析结果

3 对 LP 小鼠互交后获得 28 只 E12.5d 胎鼠, 胎鼠基因组 DNA 经 FspBI (BfaI) 酶切、电泳后出现三种不同大小的条带, 由电泳条带可以鉴定出互交后代的基因型(图 3)。

3 讨论

ENU 诱变小鼠是分子遗传学、基因组学及实验动物学间的交叉。ENU 诱变能够获得功能基因研究的新材料, 即获得人类遗传性疾病的动物模型^[7-9], 在定位克隆突变基因的基础上, 研究突变基因的功能, 并用于研究疾病的发生机制及进行治疗药物的开发。通过模式小鼠研究功能基因或人类疾病, 有可能会成为一种最有前景的手段和途径^[10]。本研究中利用 ENU 诱变获得的 1 例卷尾突



注: +/+ 为野生型正常小鼠,显示一条带(452bp); +/- 为突变杂合子小鼠,显示三条带(分别为 452bp,319bp,133bp); -/- 为突变纯合子小鼠,显示两条带(分别为 319bp,133bp)

图 3 小鼠基因型分析

Note. Remarks: +/+ wild type mice, 452 bp; +/- heterozygotes, 452 bp, 133 bp, and 319 bp; and -/- homozygous mice, 133 bp and 319 bp.

Fig. 3 Genotyping of mice

变小鼠,在先前初步定位工作的基础上对突变基因精确定位,最终确定该卷尾突变表型是由 Vangl2 基因无义突变引起。

本研究中发 LP 纯合子胚胎从后脑到尾端的神经管都是开放的,引起严重的神经管缺陷(neural tube defects, NTD)——颅脊柱裂(craniorachischisis)^[11-13]。在鉴定 LP 小鼠杂交后代基因型中发现没有纯合子出生,纯合子在胚胎期出现颅脊柱裂,并且死于子宫中。因此我们发现的 LP 突变纯合子小鼠可以作为研究人类 NTDs 疾病的模型。

目前已报道的卷尾小鼠突变表型有三种:自然突变的 LP 和化学诱变的 Lp^{m1Jus}, Lp^{m2Jus} 三种突变位点分别是 Vangl2^{S464N}、Vangl2^{E255D}、Vangl2^{R259L}^[14-16]。本研究发现的是一种由 ENU 诱导的新的 LP 突变,突变发生在 Vangl2 基因编码蛋白的 449 位点,是一种无义突变,引起蛋白编码的提前终止,是导致卷尾突变表型的原因。若 Vangl2 突变基因可以转录,将产生一种损伤的、只含有 448 个氨基酸的蛋白,而 Vangl2 基因编码后的蛋白共有 521 个氨基酸。我们预测这种无义突变可能导致编码后蛋白的某些功能丧失,因此该突变是深入研究 Vangl2 基因功能良好的材料。

Vangl2 基因(也被称为 LPP1、Stbm)编码膜蛋白,它的蛋白结构包括 4 个跨膜蛋白(TM)区域和 C 末端 PDZ 结构域,PDZ 结构域参与蛋白间的相互作用(Torban et al., 2004)。本研究中 Vangl2 基因 1345bp 处碱基 C→T 的突变,可能引起编码后蛋白 C 末端 PDZ 结构域的缺失,从而导致卷尾表型的发生。Vangl2 基因编码的蛋白属于一类高度保守的平面细胞极化蛋白(planar cell polarity, PCP)^[17-18],参与非经典 Wnt 信号通路^[19-20],该信号通路的紊乱将会导致癌细胞的侵袭以及 NTDs 的发生。人与

小鼠的 Vangl2 基因在核苷酸水平有近 89% 的同源性,在氨基酸水平有 99% 的同源性。因此了解 Vangl2 基因的各种作用机理将会为未来治疗人类 NTDs 奠定坚实的基础。

参考文献:

- [1] Balling R. ENU mutagenesis: analyzing gene function in mice [J]. Annu Rev Genom Human Genet, 2001, 2: 463-492.
- [2] 傅继梁. 值得关注的小鼠 ENU 诱变研究[J]. 科学通报, 2003, 48(22): 2299-2300.
- [3] 徐向明,王琳,翟国琴,等. Pax3 基因无义突变导致 Wbct 小鼠显性白斑形成[J]. 江苏农业学报, 2008, 24(6): 857-861.
- [4] Montcouquiol M, Rachel RA, Lanford PJ, et al. Identification of Vangl2 and Scrib1 as planar polarity genes in mammals [J]. Nature, 2003, 423: 173-177.
- [5] Joseph S, Russell W. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 479-483.
- [6] Kibar Z, Underhill DA, Canonne-Hergaux F, et al. Identification of a new chemically induced allele (Lpm1Jus) at the loop-tail locus: morphology, histology and genetic mapping [J]. Genomics, 2001, 72(3): 331-337.
- [7] Keays DA, larkTG, Flint J. Estimating the number of coding mutations in genotypic- and phenotypic-driven N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) screens [J]. Mammalian Genome, 2006, 17(3): 230-238.
- [8] Enders A, Bergmann H, Yabas M, et al. Finding new immune regulatory genes by ENU mutagenesis [J]. J Transl Med, 2012, 10(Suppl 3): 16.
- [9] Sabrautski S, Rubio-Aliaga I, Hans W, et al. Erratum to: New mouse models for metabolic bone diseases generated by genome-wide ENU mutagenesis [J]. Mamm Genome, 2012, 23: 416-430.
- [10] Clark AT, Goldowitz D, Takahashi JS, et al. Implementing large-scale ENU mutagenesis screens in North America [J]. Genetica, 2004, 122: 51-64.
- [11] Nakouzi GA, Nadeau JH. Does dietary folic acid supplementation in mouse NTD models affect neural tube development or gamete preference at fertilization? [J]. BMC Genetics, 2014, 15: 91.
- [12] Quan HY, Ma T, Zhao XX, et al. Vinyl chloride monomer (VCM) induces high occurrence of neural tube defects in embryonic mouse brain during neurulation [J]. Cell Mol Neurobiol, 2014, 34: 619-630.
- [13] Bassuk AG, Kibar Z. Genetic basis of neural tube defects [J]. Semin Pediatr Neurol, 2009, 16: 101-110.
- [14] Strong LC, Hollander WF. Hereditary loop-tail in the house mouse accompanied by imperforate vagina and with lethal craniorachischisis when homozygous [J]. J. Hered, 1949, 40: 329-334.

(下转第 26 页)

长爪沙鼠的远端小管数量多;肾髓质内层发达;输尿管管腔大、肌层壁薄,这些发现有望为长爪沙鼠作为实验动物化提供支持。

参考文献:

- [1] 周云志, 马勇, 李迪强, 等. 大沙鼠在中国的地理分布 [J]. 动物学报, 2000, 46 (2): 130 - 137.
- [2] 王钜, 王晓辉, 卢静, 等. 普通环境和清洁级环境中长爪沙鼠寄生虫感染状况观察 [J]. 中国比较医学杂志, 2004, 14 (3): 132 - 134.
- [3] Port CD, Baxter DW, Richter WR. The Mongolian gerbil as a model for lead toxicity [J]. I. Studies of acute poisoning [J]. Am J Pathol, 1974, 76(1): 79 - 94.
- [4] Sven-Olof Bohman, Jensen PKA. The Interstitial cells in the renal medulla of rat, rabbit, and gerbil in different states of diuresis [J]. Cell Tiss Res, 1978, 189: 1 - 18.
- [5] Wolf DC, Carlton WW, Turek JJ, et al. Experimental renal papillary necrosis in the Mongolian gerbil (Meriones unguiculatus) [J]. Toxicol Pathol, 1992, 20(3): 341 - 349.
- [6] Winkelmann JR, Getz LL. Water balance in the Mongolian gerbil [J]. Mammalogy, 1962, 43: 150 - 154.
- [7] Munkhcsi I, Palkovits, M. Measurements on the kidney and vasa recta of various mammals in relation to urine concentrating capacity [J]. Acta anat (Basel), 1977, 98(4): 456 - 468.
- [8] Schmidt-Nielsen B, O'Dell R. Structure and concentrating mechanism in the mammalian kidney [J]. Am J Physiol, 1961, 200: 1119 - 1124.
- [9] Gottschalk CW. Micropuncture studies in the mammalian kidney [J]. Physiologist, 1961, 4: 35 - 55.
- [10] Gottschalk CW. Osmotic concentration and dilution of the urine [J]. Am J Med, 1964, 36: 670 - 685.
- [11] Schmidt-Nielsen K, Schmidt-Nielsen B. Water metabolism of desert mammals [J]. Physiol Rev, 1952, 32: 135 - 160.
- [12] 韦永芳, 戴丽军, 黄莉, 等. 铅对新生期长爪沙鼠的毒性作用及病理学观察 [J]. 中国职业医学, 2005, 32 (2): 24 - 26.
- [13] 韦永芳, 戴丽军, 黄莉, 等. 新生期长爪沙鼠铅中毒动物模型的建立 [J]. 上海实验动物科学, 2004, 24(4): 207 - 210.
- [14] 刘锋华, 郭红刚, 楼琦, 等. 链脲佐菌素诱导长爪沙鼠 I 型糖尿病模型的实验研究 [J]. 中国实验动物学报, 2010, 18 (6): 489 - 494.
- [15] Nakama K. Studies on diabetic syndrome and influences of long-term tolbutamide administration in Mongolian gerbils (Meriones unguiculatus) [J]. Endocrinol Jpn, 1977, 24(5): 421 - 433.
- [16] 郑海洪, 宋世钧, 杨永良, 等. 驯养后野生长爪沙鼠对饥渴的忍耐力 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2003, (2): 7.

[修回日期] 2014-10-25

(上接第 23 页)

- [15] Guyot MC, Bosoi CM, Kharfallah F, et al. A novel hypomorphic Looptail allele at the planar cell polarity Vangl2 gene [J]. Dev. Dyn, 2011, 240: 839 - 849.
- [16] Murdoch JN, Doudney K, Paternotte C, et al. Severe neural tube defects in the loop-tail mouse result from mutation of Lpp1, a novel gene involved in floor plate specification [J]. HumMolGenet, 2001, 10: 2593 - 2601.
- [17] Warchol ME, Montcouquiol M. Maintained expression of the planar cell polarity molecule Vangl2 and reformation of hair cell orientation in the regenerating inner ear [J]. J Assoc Res Laryngol, 2010, 11: 395 - 406.
- [18] Wu G, Huang XP, Hua YM, et al. Roles of planar cell polarity pathways in the development of neural tube defects [J]. J Biomed Sci, 2011, 18: 66.
- [19] Yang YZ. Wnt signaling in development and disease [J]. Cell & Biosci, 2012, 2: 14.
- [20] May-Simera HL, Kelley MW. Cilia, Wnt signaling, and the cytoskeleton [J]. Cilia, 2012, 1: 7.

[修回日期] 2014-10-11