

PLC ϵ 基因敲除小鼠微卫星 DNA 遗传监测分析

崔 智¹, 李晓娟², 白云峰², 侯 俊², 戴广海¹, 李瑞生²

(1. 解放军总医院肿瘤综合治疗科, 北京 100853; 2. 解放军第 302 医院实验技术保障中心, 北京 100039)

【摘要】 目的 利用多态性微卫星 DNA 位点分析 PLC ϵ 基因敲除小鼠的遗传特性。**方法** 用所筛选的 15 个微卫星 DNA 位点对 28 只 PLC ϵ 基因敲除小鼠的 DNA 进行了 PCR 扩增, 通过基因片段大小来分析群体的遗传多样性。**结果** 13 个微卫星 DNA 位点中 (D1Mit365、D3Mit51、D4Mit235、D6Mit102、D7Mit281、D8Mit113、D9Mit23、D10Mit180、D13Mit88、D16Mit145、D17Mit36、D18Mit94、D19Mit97) 每个位点的 28 只小鼠 DNA 片段泳动距离一致, 呈现单态性, 表明该群体符合近交系的遗传特性; 而利用 Dq (敲基因型) 和 Dy (野生型) 两个位点对 28 只小鼠的 PCR 扩增结果进行了鉴别分析, 其中敲除基因型小鼠为 6 只; 野生型为 7 只; 杂合型为 15 只。**结论** 利用微卫星标记技术可以对群体进行遗传质量监测, 并能有效地鉴别不同的基因型, 为小鼠的遗传质量监测提供了一种可行的方法。

【关键词】 微卫星 DNA; PLC ϵ 基因敲除小鼠; 遗传监测

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)10-0019-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.010.005

Genetic Monitoring of PLC ϵ Knockout Mice by Microsatellite DNA Analysis

CUI Zhi¹, LI Xiao-juan², BAI Yun-feng², HOU Jun², DAI Guang-hai¹, LI Rui-sheng²

(1. Chinese PLA General Hospital Comprehensive Cancer Treatment Branch, Beijing 100853, China;

2. Experimental Research Support Center, No. 302 Hospital of PLA, Beijing 100039)

【Abstract】 Objective To determine the genetic characteristics of PLC ϵ knockout mice by polymorphic microsatellite DNA loci analysis. **Methods** Genome DNA of 28 PLC ϵ gene knockout mice were amplified by PCR using screening 15 microsatellite DNA loci, and population genetic diversity was identified by gene fragments. **Results** Among 13 microsatellite DNA loci (D1Mit365, D3Mit51, D4Mit235, D6Mit102, D7Mit281, D8Mit113, D9Mit23, D10Mit180, D13Mit88, D16Mit145, D17Mit36, D18Mit94, D19Mit97), each locus of electrophoresis distance of DNA fragments in the 28 PLC ϵ gene knockout mice kept consistent and presented monomorphism, indicating the genetic stability. However the two loci Dq (knock genotype) and Dy (wild-type) were used to discriminate 28 PLC ϵ gene knockout mice by PCR amplification. Among them, 6 mice were of gene knock mice, 7 mice were of wild-type mice, and 15 mice were of heterozygous type. **Conclusions** The method of microsatellite marker analysis can be used to monitor population genetic quality and accurately distinguish different genotypes of mice, providing a feasible method for the detection of genetic quality in mice.

【Key words】 Microsatellite DNA; PLC ϵ gene knockout mouse; Genetic Monitoring.

【基金项目】 北京市自然科学基金面上项目(7102144)。

【作者简介】 崔智(1980-), 女, 研究生, E-mail: cuizhi1@sohu.com; 李晓娟(1980-), 女, 技师, E-mail: sxlily55@163.com。

【通讯作者】 李瑞生(1969-), 男, 副研究员, 博士, 研究方向: 实验动物遗传监测与模型研究, E-mail: lrsheng@sohu.com; 戴广海(1966-), 男, 主任医师, 博士, 研究方向: 人类肿瘤治疗研究, E-mail: daigh60@sohu.com。

随着生命科学的不断发展,越来越多的模型动物被广泛地应用于临床实验研究中。2001 年 Song C 等^[1]在哺乳动物中克隆出与 PLC210 同源序列的 PLC,由于与其他已知的 PLC 不同,因而被命名为 PLC ϵ ,2003 年采用基因打靶法成功建立了 PLC ϵ 基因敲除小鼠。该模型小鼠其繁殖后代中有敲基因型、杂合型和野生型等三种混合类型,但从外观表型上很难鉴别其各自不同的基因类型。微卫星 DNA 标记技术是采用多态性微卫星 DNA 位点来对遗传物质 DNA 直接进行监测,以分析其遗传特性,该技术在大小鼠遗传监测中得到了广泛应用,并验证了它的准确性和可靠性^[2]。因此,本研究应用所筛选的 13 个具有高度多态性的微卫星 DNA 位点和 2 个通过敲除基因序列自行设计的引物,对 PLC ϵ 基因敲除小鼠群体的遗传背景进行有效地遗传质量监测,旨在分析其遗传背景特性和鉴别所生产繁殖的三种(敲基因型、杂合型和野生型)不同基因类型小鼠,为今后进行模型动物的研究和开发利用提供可靠的理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

PLC ϵ 基因敲除小鼠来源于日本神户大学,由解放军第 302 医院动物实验中心生产繁殖,随机选取 6~8 周龄小鼠 28 只,雌雄各半,编号 1~14 号为雌性,15~28 号为雄性,单鼠体质量为 20 g~25 g,动物实验室饲养条件为 SPF 级,实验动物使用许可证号:SYXK(军)-2007-010。剪小鼠尾巴,-20℃ 冰箱内保存。

1.2 药品与生化试剂

硝酸银、冰醋酸、三羟甲基胺基甲烷、过硫酸铵、无水碳酸钠、甲醛、无水乙醇,DNA 提取缓冲液,Taq DNA 聚合酶和 10× buffer(宝生物公司),dNTP (Sangon 公司),TEMED(Sigma 公司)。

1.3 引物合成

选择具有高度多态性的微卫星 DNA 位点:D1Mit365、D3Mit51、D4Mit235、D6Mit102、D7Mit281、D8Mit113、D9Mit23、D10Mit180、D13Mit88、D16Mit145、D17Mit36、D18Mit94、D19Mit97、D_q(敲基因型)和 D_y(野生型)等 15 个微卫星基因座位点,这些位点引物序列均来自参考文献[3,4],由上海

生物工程有限公司合成。

1.4 方法

1.4.1 基因组 DNA 的提取:将 28 只小鼠尾巴各剪取 1 cm 左右,剪细碎后放于 2.0 mL EP 管内,加入 30 μL~35 μL 蛋白 K 及 470 μL DNA 提取缓冲液,将其上下颠倒充分混匀后,置于 37℃ 水浴锅内过夜,待其全部消化溶解后,用等体积的 Tris 饱和酚和三氯甲烷分 3 次进行抽提 DNA,用冰无水乙醇析出基因组 DNA,干燥后用(50~200)μL TE 全部溶解,然后用紫外分光光度计测其样品的纯度和浓度,配制成 100 ng/μL 左右,置于 4℃ 保存备用。

1.4.2 PCR 的扩增:每个 PCR 扩增体系为 50 μL,缓冲液 buffer 5 μL,上下游引物各 0.2 μmol/L,dNTP 200 μmol/L,Taq 酶 1U,DNA 模板为 1 μL。反应条件:95℃ 预变性 3 min,95℃ 变性 30 s,48℃~65℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,循环 25~30 次,最后一个循环延伸 7 min,扩增产物于 4℃ 冰箱内保存。

1.4.3 电泳与银染检测:抽取已加入染料的 PCR 扩增产物 10 μL,注入 8% 聚丙烯酰胺凝胶样品孔中,200 V 电泳 1 h~2 h。电泳后的凝胶用 10% 冰醋酸固定,硝酸银染色,碳酸钠显色,待条带清晰后,用终止液停显。然后进行图带拍照保存分析。

1.4.4 结果判读与分析:根据电泳后聚丙烯酰胺凝胶上的 DNA 图带,其泳动距离远近进行判读,按泳动距离远近设定为阿拉伯字母 1、2、3……N,如果 DNA 图带泳动距离一致,可判定为单态性,若有差异可判定为多态性^[5]。对于 D_q和 D_y两个位点的电泳图带,如果只有 D_y位点有图带,而 D_q位点没有图带,可判定为野生型;如果 D_q和 D_y两位点都有扩增图带,可判定为杂合型;若只有 D_q位点有图带,而 D_y位点没有扩增图带,则可判定为敲基因型。

2 结果

2.1 15 个微卫星 DNA 位点 PCR 扩增条件分析

利用 1 号小鼠 DNA 对所筛选的 15 个微卫星 DNA 位点的各种浓度梯度条件进行了 PCR 扩增,通过对凝胶电泳图带的清晰程度、泳动距离进行了对比分析,获得各个微卫星 DNA 位点最佳 Mg²⁺ 浓度、退火温度、扩增片段大小和扩增循环次数等扩增条件(表 1)。

表 1 15 个微卫星 DNA 位点最佳 PCR 扩增条件

Tab. 1 The best conditions of PCR amplification of 15 microsatellite DNA loci

序号 Number	微卫星 DNA 位点 Microsatellite DNA locus	Mg ²⁺ 浓度 Density of Mg ²⁺	退火温度 Annealing temperature	片段大小 (bp) Size (bp)	循环次数 Cycle index
1	D1Mit365	2.5	60	110	30
2	D3Mit51	3.0	55	250	30
3	D4Mit235	2.5	55	125	30
4	D6Mit102	1.5	55	140	30
5	D7Mit281	2.5	60	110	30
6	D8Mit113	3.0	65	130	30
7	D9Mit23	1.5	65	200	30
8	D10Mit180	1.5	65	145	30
9	D13Mit88	2.5	48	160	30
10	D16Mit145	2.5	50	120	30
11	D17Mit36	2.5	55	110	30
12	D18Mit94	2.5	65	140	30
13	D19Mit97	2.5	65	130	30
14	Dq	2.5	53	280	30
15	Dy	2.5	53	290	30

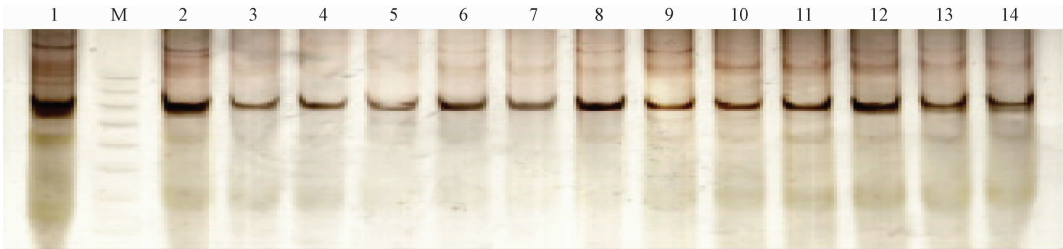


图 1 D3Mit51 位点扩增的 DNA 图谱

注:M:为 marker,1-14:为 1 号-14 号小鼠个体

Fig. 1 DNA mapping of amplification of D3Mit51 locus

Note:M:Marker; 1-14: For 1-14 individuals of mice

2.2 13 个多态性微卫星 DNA 位点 PCR 扩增结果的分析

利用所获得的 13 个多态性微卫星 DNA 位点的最佳 PCR 扩增条件对 28 只小鼠分别进行了扩增,结果每个微卫星 DNA 位点的 28 只小鼠所扩增出来的图带其泳动距离一致,均呈单态性,其中 D3Mit51 位点单态性的扩增图谱结果(图 1)。说明了此小鼠遗传背景呈现一致性,没有发生遗传变异,保持了遗传的稳定性。

2.3 Dq 和 Dy 两个位点三种基因型的鉴别分析

利用 D_q 和 D_y 两个位点对 28 只小鼠进行了 PCR 扩增,其电泳图带结果发现 4,6,11,16,19 和 23 号小鼠的 D_q 位点有图带,而 D_y 位点没有图带,则可判定为敲基因型;5,9,14,17,21,22 和 28 号小鼠的 D_y 位点有图带,而 D_q 位点没有图带,则可判定为野生

型;而 1,2,3,7,8,10,12,13,15,18,20,24,25,26 和 27 号小鼠的 D_q 和 D_y 两位点都有扩增图带,则可判定为杂合型。其中 1-8 号小鼠 Dy 和 Dq 两位点的 PCR 扩增图带(图 2 和图 3)。

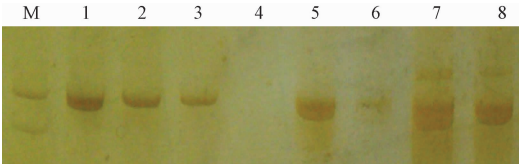


图 2 Dy 位点扩增的 DNA 图谱

注:M:为 Marker,1-8:为 1-8 号小鼠个体

Fig. 2 DNA mapping of amplification of Dy locus

Note:M:Marker; 1-8: For individuals 1-8 of mice

3 讨论

小鼠微卫星基因座位点存在于整个基因组中,

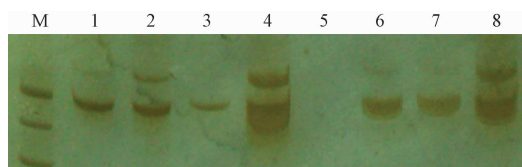


图3 Dq 位点扩增的 DNA 图谱

注:M:为 Marker,1-8:为 1-8 号小鼠个体

Fig. 3 DNA mapping of amplification of D3Mit51 locus

Note:M:Marker; 1-8: For individuals 1-8 of mice

其核心序列为 2~6 bp 的串联重复序列,重复次数达几次甚至几十次,由于其重复次数的不同而呈现出微卫星 DNA 位点的高度多态性。正是利用此特点可以对近交系、封闭群、杂合群及不同品系动物的遗传背景进行有效地监测分析,目前在小鼠基因图谱中包含了 7 377 个微卫星 DNA 位点,其中有 6 580 个显示多态性^[6]。本实验所选取的敲基因小鼠是来源于日本神户大学实验室^[7],由 302 医院动物实验中心保种繁殖,没有引入外来血缘。人们采用基因敲除技术已建立了许多人类疾病动物模型,如敲基因小鼠模型^[8]、膀胱癌动物模型^[9]、皮肤癌动物模型^[10]、前列腺癌动物模型^[11]等,但这些敲基因动物模型的遗传背景是否发生了改变,以及变异的程度还不是很清楚。因此,本实验利用所筛选的 13 个多态性高的微卫星 DNA 位点对所选取的 28 只成年小鼠进行了遗传背景的质量监测,结果显示 13 位点均呈现一条图带且泳动距离一致,说明该位点纯合且呈单态性,从而说明了该群体的遗传背景均一,没有发生遗传污染或遗传变异,符合实验动物近交系的基本要求。因此,应用微卫星 DNA 标记技术可以进行纯合位点的判定,同时也能对位点的变异情况进行分析,适于近交系动物的遗传质量检测^[12]。这些高度多态性的微卫星 DNA 位点曾在不同品系大小鼠的遗传质量监测中得到过有效验证^[13,14]。

该群体小鼠是严格按照杂合型自交方式来进行繁殖,按照孟德尔遗传学繁殖规律所产生的繁殖后代均会出现三种不同的基因型^[15],但从外观上很难鉴别。因此,本实验利用 2 个特殊位点对所选取的 28 只成年小鼠进行了遗传背景分析,鉴别出敲基因型小鼠 6 只,野生型小鼠 7 只和杂合型小鼠 15 只,该方法可以有效地鉴别出三种不同基因型小鼠,为今后该小鼠的应用和实验研究提供了可靠的保障^[16]。

参考文献:

- [1] Song C, Hu CD, Masago M, et al. Regulation of a novel human phospholipase C, PLC epsilon, through membrane targeting by Ras [J]. J Biol Chem, 2001, 276(4): 2752-2757.
- [2] 欧阳兆和, 陈振文, 李瑞生, 等. 微卫星 DNA 多态性在十种近交系小鼠遗传监测中的应用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2004, 14(2): 71-74.
- [3] Mouse Genome Database (MGD), Mouse Genome Informatics Project, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME. World Wide Web (URL: <http://www.informatics.jax.org>).
- [4] 李瑞生, 董罡, 陈燕敏, 等. 微卫星 DNA 监控近交系小鼠的重组近交系培育研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(6): 335-338.
- [5] 刘先菊, 王艳荣, 张丽芳, 等. 常用近交系小鼠微卫星 DNA 多态性的分析研究 [J]. 实验动物科学, 2010, 10(5): 1-4.
- [6] Walder RY, Michael R, McClain AM, et al. Short tandem repeat polymorphic markers for the rat genome from marker-selected libraries [J]. Mamm Genome, 1998, 9: 1013-1021.
- [7] Edamatsu H, Satoh T, Kataoka T. Ras and Rap1 activation of PLCε lipase activity [J]. Methods Enzymol, 2006, 407: 99-107.
- [8] 章金涛, 康巧珍, 薛敬礼, 等. 新近交系 HLC 小鼠的遗传监测 [J]. 郑州大学学报(医学版), 2002, 37(4): 450-452.
- [9] 姜泰茂, 杨志军, 白云峰, 等. BBN 诱发 PLCε 基因敲除小鼠膀胱癌发生过程中病变细胞超微结构改变 [J]. 中国医科大学学报, 2009, 38(4): 286-288.
- [10] Bai Y, Edamatsu H, Maeda S, et al. Crucial role of phospholipase Cε in chemical carcinogen-induced skin tumor development [J]. Cancer Res, 2004, 64(24): 8808-8810.
- [11] 王元天, 孙颖浩, 钱松溪. 前列腺癌动物模型的建立和应用 [J]. 临床泌尿外科杂志, 2002, 8(17): 435-437.
- [12] Neuhaus IM, Sommarahl CS, Johnson DK, et al. Microsatellite DNA variants between the FVB/N and C3HeB/FeJLe and C57BL/6J mouse strains [J]. Mamm Genome, 1997, 8(7): 506-509.
- [13] 杨卫红, 王纯耀, 宋国英, 等. 近交系小鼠微卫星位点的多态性观察 [J]. 郑州医学大学学报(医学版), 2007, 42(1): 84-86.
- [14] 陈振文, 欧阳兆和, 董罡, 等. 用微卫星标记技术对国内 BALB/c 小鼠遗传质量的分析 [J]. 遗传, 2004, 26(6): 845-848.
- [15] William F, Miller J, Steen R, et al. A comprehensive genetic map of the mouse genome [J]. Nature, 1996, 380: 149-152.
- [16] 闫熙, 李万波. 利用微卫星遗传标记对恒河猴进行遗传同质性分群的探索 [J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(11): 11-18.