

长爪沙鼠不同 willis 血管类型全基因组文库构建

张 贺¹, 陈振文², 王承利¹, 孙 倩¹, 陆 娜¹, 王 洋¹

(1. 沈阳军区总医院实验动物科, 沈阳 110015; 2. 首都医科大学实验动物部, 北京 100669)

【摘要】 目的 为了找到并克隆出影响长爪沙鼠不同 willis 血管类型表达的基因, 建立包含各种血管类型的全基因组文库。**方法** 选取清洁级长爪沙鼠 96 只, 解剖后剥离不同 willis 血管类型, 分别提取 DNA 后混合。选用 Copy Control Fosmid Library Kit 和 pCC1FOS 载体构建文库, 并对文库进行拷贝数、重组片段长度及重组率进行鉴定。**结果** 成功建立了长爪沙鼠不同 willis 血管类型的全基因组文库, 文库容量为 1700 个拷贝数, 插入重组片段长度约为 36 kb, 重组率为 93%。**结论** 建立了不同 willis 血管类型的长爪沙鼠全基因组文库, 为后续基因克隆及筛选等研究打下良好基础。

【关键词】 长爪沙鼠; 脑底动脉环; 全基因组; 文库

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 11-0027-06

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.011.006

Genomic library construction of different willis circle in *Meriones unguiculatus*

ZHANG He¹, CHEN Zhen-wen², WANG Cheng-li¹, SUN Qian¹, LU Na¹, WANG Yang¹

(1. Department of Laboratory Animal in the General Hospital of Shenyang Military Region, Shenyang 110015, China;

2. Department of Laboratory Animal in the Capital Medical University, Beijing 100669, China)

【Abstract】 Objective To find out and clone the genes that can influence different willis circle in *Meriones unguiculatus*, the genomic library has been made. **Methods** 96 clean *Meriones unguiculatus* were dissected according to observe the differences of willis circle, and the mixed DNA was extracted from different blood vessels. The genomic library construction has been done by using pCC1FOS vector, following by CopyControl Fosmid Lib manual. The copy numbers, recombined segment size and recombination fraction of the library were measured. **Results** Genomic library of different Willis circle in *Meriones unguiculatus* was successfully made. The capacity of the library was 1700 copies. The segment size was 36kb, and the recombination fraction was 93%. **Conclusion** The library was the good beginning for the following steps which were gene cloning and genescreen.

【Key words】 *Meriones unguiculatus*; Willis circle; Genomewide; Library

脑卒中, 又称脑血管意外 (cerebrovascular accident, CVA), 俗称“中风”, 是由向大脑供血的动脉血管缺血引起的一种急性疾病^[1]。脑卒中给人类健康和生命造成极大威胁, 给患者带来极大痛苦, 家庭及社会负担沉重^[2]。因此, 为提高预防与

治疗水平, 研究脑卒中的发病机制, 找到合适的脑动脉缺血动物模型成为当务之急^[3]。

长爪沙鼠 (*Meriones unguiculatus*, Mongolian Gerbil) 是一种具有独特生物学特性实验动物资源^[5-6], 其脑底动脉环 (Willis circle) 前后交通支血

[基金项目] 国家科技支撑计划 (2009BAI83B02-41); 辽宁省科技攻关项目 (2012408002)。

[作者简介] 张贺 (1981 -), 男, 主治医师, 研究方向: 人类疾病动物模型制作, E-mail: alwayszh@163.com。

[通讯作者] 王洋 (1970 -), 男, 主管技师, 研究方向: 实验动物管理, E-mail: wangyang_0418@sina.com。

管缺失的遗传特征,成为研究人类脑缺血的天然动物模型^[7-8],通过简单的结扎方法即可获得比大鼠、小鼠更加典型的人类脑缺血动物模型^[9-11]。为了进一步研究不同 Willis 环与基因表达差异的关系,建立包含全部 Willis 血管类型的全基因组文库,为后续研究打下坚实基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

成年长爪沙鼠 96 只,雌雄各半,体重 50 ~ 70 g 之间,清洁级,由首都医科大学实验动物学部提供【SCXK(京)2010-0020】。实验在沈阳军区总医院进行【SYXK(军)2012-002】,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 实验器材及主要试剂

手术器械,多功能实验动物解剖台 莱尔(北京)净化设备有限公司; Library Production Kit 和 pCC1FOS Vector 均由 EPICENTRE Biotechnologies 公司提供;基因组 DNA 小量制备试剂盒由 AxyPrep 公司提供。

1.3 Copy Control Fosmid 文库的构建

1.3.1 基因组 DNA 的提取

安乐死术处死动物后,快速剪下头部,剪去颅骨,小心剥离脑组织,用生理盐水洗去血污,置于解剖台下观察脑底动脉环前交通支(anterior communication arteries, ACA)和后交通支(posterior communication arteries, PCoA)的类型,剥离脑组织与血管,用苯酚氯仿法^[12]从不同 willis 血管类型的组织中提取 DNA,混合后将其溶解在 TE 溶液中,浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

1.3.2 基因组 DNA 的剪切

取 DNA 溶液,至少包含 2.5 μgDNA 。用 200 μL 枪头反复吹吸 DNA 100 次,使基因组 DNA 充分剪切。

1.3.3 基因组 DNA 的末端修复

反应体系: 无菌水, 2 μL ; 10 $\times$ Buffer, 8 μL ; dNTP Mix, 8 μL ; ATP, 8 μL ; DNA, 50 μL ; End-repair enzyme Mix, 4 μL ; 一共 80 μL 。

室温下放置培养 45 min, 然后加入 TE 缓冲液, 70 $^{\circ}\text{C}$ 培养 10 min, 使 End-repair enzyme Mix 失活。通过末端修复, 可以得到平末端、5'-磷酸化的 DNA。

1.3.4 连接反应

反应体系: 无菌水, 1 μL ; Fast-Link 10 $\times$ ligation Buffer, 1 μL ; PCC2Fos Cloning-ready Vector, 1 μL ; ATP, 1 μL ; DNA, 5 μL ; Fast-Link DNA Ligase, 1 μL ; 一共 10 μL 。

室温培养 2 h, 然后将反应体系转移到 70 $^{\circ}\text{C}$ 培养 10 min, 使 Fast-Link DNA Ligase 失活。

1.3.5 Copy Control Fosmid 克隆的包装

在包装反应前, 将过夜培养的宿主菌 EPI300-TIR Plating Strain 接种到含有 10 mmol/L MgSO_4 的 50 mL 的 LB 培养液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养。10 μL 连接反应加入 25 μL 已经融化的 packaging Extracts 中; 用移液器混匀, 30 $^{\circ}\text{C}$ 包装 90 min, 加入剩余的 25 μL packaging Extracts 至管中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 下包装 90 min。

1.3.6 Copy Control Fosmid 文库的涂布和筛选

按照每 100 $\mu\text{LEPI300-TIR}$ 宿主菌溶液中加入 10 μL 稀释后噬菌体微粒的比例将两者混合; 37 $^{\circ}\text{C}$ 噬菌体吸附 20 min; 将感染了噬菌体的细菌涂布到含有 12.5 mg/mL 的 LB 平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养, 挑选 Copy Control Fosmid 克隆。

1.4 基因组 DNA 文库的鉴定

1.4.1 总克隆数 CFU 的鉴定:

取包装产物 10 μL 感染细菌 (EPI300-TIR) 100 μL 后, 涂布 LB 平板(含氯霉素), 第二天计数。

总克隆数 CFU = 平板上的克隆数/0.01 mL $\times$ N mL

1.4.2 平均插入片段及重组率的鉴定:

随机挑取 15 个克隆分别接 LB 液体培养基(含氯霉素), 摇菌后抽质粒, 并与阳性对照质粒(约 36 kb)同时跑电泳后(1% Agarose; 1.3V/cm; 约 12 ~ 16 h), 鉴定插入片段大小和重组率。

2 结果

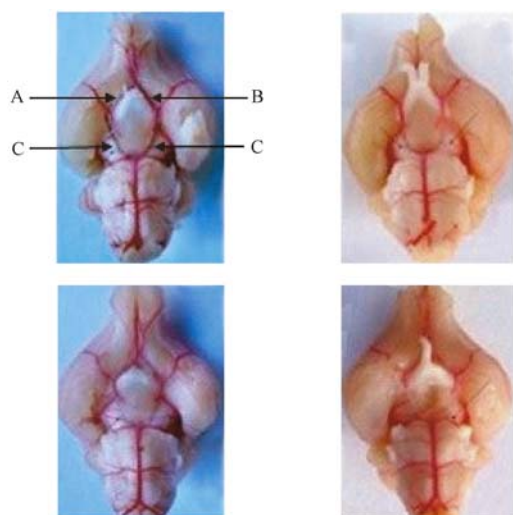
2.1 不同 willis 血管类型

通过解剖, 发现不同类型的 willis 环缺失(图 1 和图 2)。

如图所示, 根据 willis 环不同程度、不同位置的缺失, 共可分为前交完整, 后交完整(TO4 组), 前交右缺, 后交完整(NO2 组), 前交右缺, 后交缺失(NP1 组), 前交左缺, 后交缺失(TO3 组), 前交完整, 后交缺失(CJ1 组), 前交左缺, 后交完整(NK 组)。

2.2 基因组 DNA 鉴定

以 36 k 标准质粒为对照组, 对剪切后各组样品基因组 DNA 进行鉴定(图 3)。



注:A:左前交通支;B:右前交通支;C:后交通支。

图1 长爪沙鼠 willis 环解剖图

Note: A: left ACA, B: right ACA, C: PCoA.

Fig.1 Dissection of *Meriones unguiculatus*' willis circle

2.3 总克隆数 CFU 的鉴定

库容鉴定瓶皿上平均克隆数为 17 个,平板上的 $CFU/ml = 17/0.01 \text{ mL}$ 。总克隆 $CFU = \text{平板上的}$

$CFU/ml \times mL = 1700 \times 1 = 1700$ (图 4)。

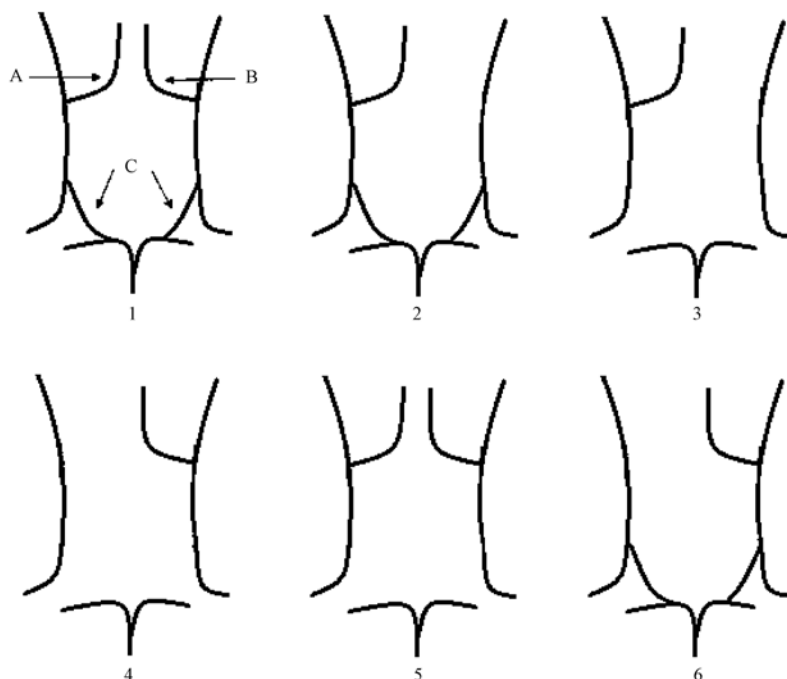
2.4 鉴定平均插入片段及重组率

以 36K 标准质粒为对照,进行电泳。平均插入片段 $>30 \text{ kb}$,约 36 kb 左右。随机挑选 15 个克隆株,其中 14 个含有重组片段,重组率约 93% (图 5)。

3 讨论

3.1 长爪沙鼠 willis circle 的特点

长爪沙鼠是我国特有的一种小型草原动物,易于获得,大小适宜,具有独特的脑血管遗传特征,是一种很好的人类脑缺血疾病模型动物。^[1, 13-14]与小鼠等啮齿类动物脑底动脉分布不同,长爪沙鼠小脑上动脉与大脑后动脉之间缺少明显的后交通动脉,不能构成完整的 Willis 环,并有 1/3 以上缺失前交通动脉或前交通动脉一个组成根很细,利用此解剖学特征,结扎动物的一侧颈动脉,可导致该侧大脑半球缺血,从而获得典型的人类脑缺血动物模型,其依据即为联系大脑两个半球的脑底动脉前交通支和沟通基底动脉和大脑后动脉的后交通支均存在着不同程度的缺失,结扎单侧或双侧颈总动脉

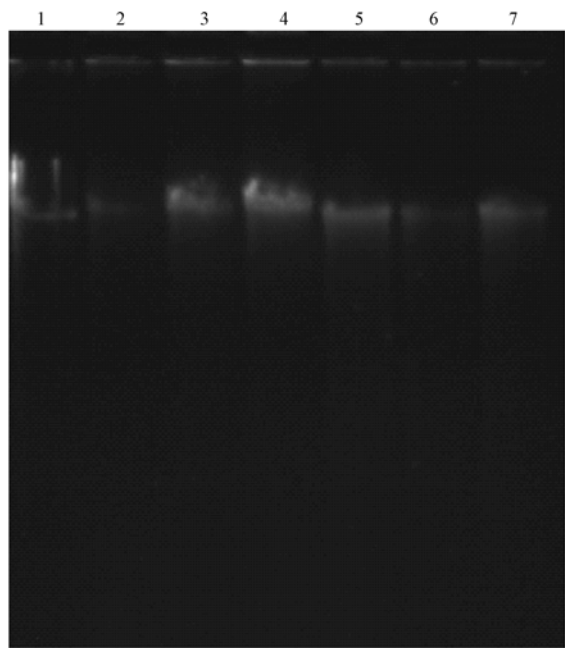


注:A:左前交通支;B:右前交通支;C:后交通支。1:TO4 组 前交完整,后交完整;2:NO2 组 前交右缺,后交完整;3:NP1 组 前交右缺,后交缺失;4:TO3 组 前交左缺,后交缺失;5:CJ1 组 前交完整,后交缺失;6:NK 组 前交左缺,后交完整。

图2 长爪沙鼠 willis 环缺失示意图

Note: A: left ACA, B: right ACA, C: PCoA. 1: sample TO4 complete ACA and PCoA; 2: sample NO2 absence of right ACA, complete PCoA; 3: sample NP1 absence of right ACA and PCoA; 4: TO3 absence of left ACA and PCoA; PCoA5: sample CJ1 complete ACA, absence of PCoA; 6: sample NK absence of left ACA and complete PCoA.

Fig.2 Schematic diagram of different absence of *Meriones unguiculatus*' willis circle



注:1:36K 对照;2:NO2 组;3:CJ1 组;
4:NK 组;5:T04 组;6:T03 组。

图 3 基因组 DNA 鉴定结果

Note: 1: 36K control; 2: sample NO2; 3: sample CJ1;
4: sample NK;5: sample T04;6: sample T03.

Fig. 3 Result of genome DNA qualification

均能造成不同程度的脑缺血,而不像用其他动物制备该模型时必须同时切断颈总和基底动脉两个系统的供血途径,才能制备出有效的脑缺血模型^[15]。用单侧结扎的方法更有诸多好处,首先是可以进行自体对照,即同一个脑的两个半球(一侧缺血,另一侧不缺血)进行组织学比较,比使用不同个体做对照更准确和方便;其次,移开动脉夹就可以逆转脑缺血或进行再灌注,即使不用进行再灌注动物也可以存活较长的时间,从而使这种模型与人实际发生的脑缺血更吻合,有利于治疗试验和药物评价试验的进行^[16]。而它的缺点在于长爪沙鼠的前后交通支缺失的类型较多,从理论上来说,只有前后交通支同时缺损才能用单侧结扎的方法制备模型。

3.2 基因组 DNA 文库的特点

所谓基因组 DNA 文库是指将某生物体的全部基因组 DNA 用限制性内切酶或机械力量切割成一定长度范围的 DNA 片段,与合适的载体体外重组并转化相应的宿主细胞获得的所有阳性菌落,具有十分广泛的用途,如用于分析、分离特定的基因片段,用以基因表达调控、人类及动植物基因组工程的研究。

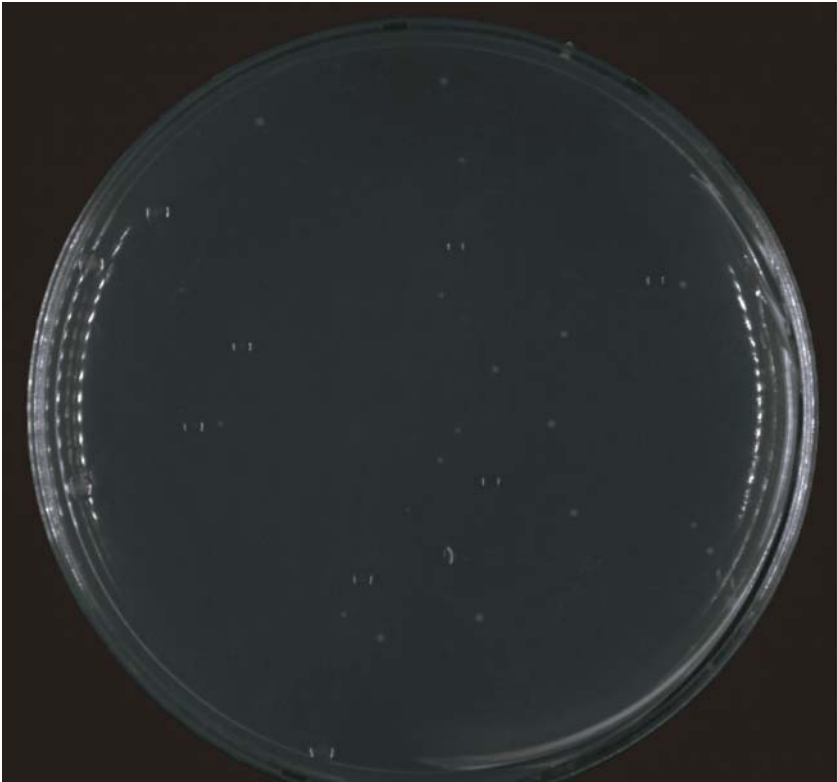
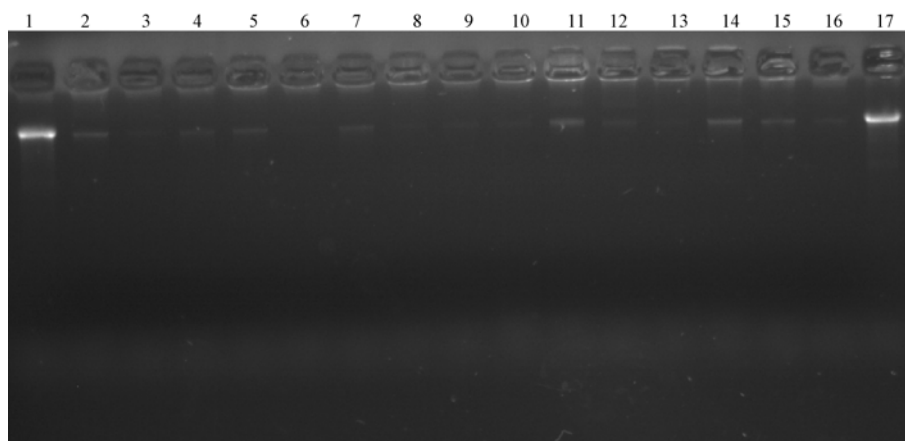


图 4 总克隆数 CFU 的鉴定图

Fig. 4 Qualification of CFU



注:1 和 17:36 kb 对照质粒,2-16:随机挑选的克隆株。

图 5 插入片段及重组率鉴定图

Note:1 and 17: 36kb compared plasmid,2-16:selective clones randomly.

Fig.5 Qualification of insertion elements and recombination fraction

基因组 DNA 文库具有代表性和随机性双重特点。其代表性是指文库中所有克隆所携带的 DNA 片段重新组合起来可以覆盖整个基因组,即可以从该文库中分离任何一段 DNA。代表性是衡量文库质量的一个很重要的指标。其随机性是指文库构建过程中采用物理或化学方法随机切割基因组 DNA,保证克隆的随机性,使每段 DNA 在文库中出现的频率均等。

参考文献:

- [1] Juliana B Casals, Naira CG Pieri, Matheus LT Feitosa, *et al.* The Use of Animal Models for Stroke Research: A Review[J]. *Comp Med.* 2011, 61(4): 305-313.
- [2] Bing Chun Yan, Joon Ha Park, Bich Na Shin, *et al.* Neuroprotective Effect of a New Synthetic Aspirin-decursinol Adduct in Experimental Animal Models of Ischemic Stroke[J]. *PLoS One.* 2013; 8(9): e74886. Published online 2013 September 20. doi: 10.1371/journal.pone.0074886
- [3] Ok Kyu Park, Choong Hyun Lee, In Koo Hwang, *et al.* Effects of repeated restraint stress on platelet endothelial cell adhesion molecule-1 immunoreactivity and protein levels in the gerbil hippocampus after transient cerebral ischemia [J]. *Anat Cell Biol.* 2010 March; 43(1): 54-63.
- [4] 王钊,卢静,陈振文,等.长爪沙鼠血液生理生化正常参考值的研究[J]. *中国实验动物学报*,2004,12(2):108-111.
- [5] Wei Y, Hong Q, Chen D, *et al.* Permissibility of Mongolian gerbil for *Angiostrongylus cantonensis* infection and utility of this animal model for anthelmintic studies [J]. *Parasitol Res*, 2014, 2, Epub ahead of print.
- [6] Shcherbak NS, Galagudza MM, Yukina GY, *et al.* Morpho-functional changes of the pyramidal neurons in various hippocampal areas after the ischemic preconditioning [J]. *Morfologiya*, 2013, 143(3):7-13.
- [7] Michal Malek, Malgorzata Duszczak, *et al.* Hyperbaric oxygen and hyperbaric air treatment result in comparable neuronal death reduction and improved behavioral outcome after transient forebrain ischemia in the gerbil[J]. *Exp Brain Res*, 2013, 224(1):1-14.
- [8] Snežana Rauš Balind, Vesna Selaković, Lidija Radenović, *et al.* Extremely Low Frequency Magnetic Field (50 Hz, 0.5 mT) Reduces Oxidative Stress in the Brain of Gerbils Submitted to Global Cerebral Ischemia [J]. *PLoS One.* 2014; 9(2): e88921. Published online 2014 February 19.
- [9] V. Molina, Y. Ravelo, M. Noa, *et al.* Therapeutic Effects of Policosanol and Atorvastatin against Global Brain Ischaemia-Reperfusion Injury in Gerbils[J]. *Indian J Pharm Sci*, 2013, 75(6): 635-641.
- [10] Heidi L. Lujan, Gurunathan Palani, Jean D, *et al.* Targeted ablation of mesenteric projecting sympathetic neurons reduces the hemodynamic response to pain in conscious, spinal cord-transected rats[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010 May; 298(5): 1358-1365.
- [11] D E Levy, J B Brierley, F Plum. Ischaemic brain damage in the gerbil in the absence of 'no-reflow' [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1975, 38(12): 1197-1205.
- [12] J. 萨姆布鲁克, D W 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M] 科学出版社,2002: 15-17.
- [13] M J Harrison, J Arnold, L Sedal, *et al.* Ischaemic swelling of cerebral hemisphere in the gerbil. [J] *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1975, 38(12): 1194-1196.
- [14] M Fujishima, J Ogata, T SUGI, *et al.* Mortality and cerebral metabolism after bilateral carotid artery ligation in normotensive and spontaneously hypertensive rats [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1976, 39(3): 212-217.
- [15] Aysan Durukan, Turgut Tatlisumak. Preconditioning-induced ischemic tolerance: a window into endogenous gearing for

cerebroprotection[J]. Exp Transl Stroke Med. 2010; 2: 2.
Published online 2010 January 21.

- [16] Iliana Sosa Teste, Yuneidys Mengana Tamos, Yamila Rodríguez
Cruz, *et al.* Dose Effect Evaluation and Therapeutic Window of
the Neuro-EPO Nasal Application for the Treatment of the Focal

Ischemia Model in the Mongolian Gerbil[J]. Scientific World
Journal. 2012; 2012: 607498. Published online 2012 May 22.
doi: 10.1100/2012/607498.

[修回日期]2014-10-21

审理费和版面费调整通知

根据中央有关报刊出版单位体制改革的总体部署和要求,落实报刊编辑部体制改革的精神,实现报刊业转型和升级,增强报刊出版传播能力,推动报刊业又好又快发展。同时也为了方便作者快捷的实现投稿,《中国比较医学杂志》将从 2015 年起免去作者在投稿同时缴纳的 100 元审理费,但授权书仍需下载我刊模板,扫描或拍照后上传。版面费将调整为文字、表格 400 元/版,彩图仍为 1000 元/版。

支付方式仍然采用以下两种方式:

一、邮局汇款

汇款地址:北京市朝阳区潘家园南里 5 号 邮 编:100021

收款人姓名:《中国比较医学杂志》编辑部 收(不要写编辑姓名)

附 言:稿件编号

二、银行汇款或网银转账

开户银行:中国农业银行潘家园分理处

帐 号:11220201040003764

开 户 名:中国实验动物学会

附 言:稿件编号

当您向邮局汇款后,请您登陆我们的网站,把您的汇款时间、汇款单号(通过网银转账务必将转账成功流水号)发票单位、收发票地址等信息登记提交。

发票说明:《中国实验动物学报》《中国比较医学杂志》是由中国实验动物学会主办,并使用中国实验动物学会发票专用章开具发票。

自 2015 年 1 月 1 日以后新投稿件的审理费和版面费将按新标准执行。

望广大作者周知!

《中国比较医学杂志》编辑部