

文章编号:1004 - 616X(2000)03 - 0143 - 03

PCR和限制性内切酶法快速检测 C57BL/6J ob 小鼠基因型

徐培渝¹, Jerlin Walker²

(1. 华西医科大学公共卫生学院毒理教研室, 四川 成都 610044; 2. 美国路易斯安娜州立大学 Pennington 医学研究中心, Baton Rouge LA 70808)

摘要:目的:探讨快速检测 C57BL/6J ob 小鼠基因型方法。C57BL/6J ob 小鼠是一种 ob 基因突变种, ob 基因的点突变导致小鼠遗传性肥胖。该品系广泛用于肥胖及有关疾病研究。方法与结果:本文用 PCR 及限制性内切酶法快速、准确地检测出 C57BL/6J 小鼠同窝仔鼠的三种基因型:野生型(+ / +), 杂合型(ob / +) 和突变型(ob / ob)。结论:该法只需很少的生物材料, 即一小段小鼠尾巴, 适用任何年龄的小鼠, 对于该品系小鼠的育种、肥胖机理和肥胖预防的研究很有实用意义。

关键词:肥胖鼠基因型; PCR; 限制性内切酶

中图分类号: Q355 文献标识码: A

RAPID DETECTION OF ob GENOTYPE BY PCR AND RESTRICTION ENDONUCLEASE

XU Pei-yu¹, Jerlin Walker²

(1. Toxicologic Department, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610044, China 2. Pennington Medical Research Center, Louisiana State University, Baton Rouge, LA 70808, USA)

Abstract: Purpose and Methods: The ob gene point mutant in C57BL/6J ob mice cause genetic obesity in all life. To improve the speed and efficiency of ob genotyping, we developed a method with PCR and restriction endonuclease by property primer. **Results and Conclusion:** Three genotype (ob / ob, ob / +, + / +) of the mouse are rapidly, differentiated with this assay. Since only a small biopsy specimen (tail end) is needed to genotype, the ob mouse at any age is typable and can be used in subsequent breeding or research.

Key words: ob mice genotype; PCR; restriction endonuclease

C57BL/6J 小鼠是一种 ob 基因突变种系, 广泛用于肥胖及有关疾病研究。1994 年 Zhang 等¹ 利用突变基因的克隆技术克隆了小鼠和人的 ob 基因, 使肥胖的医学研究有了突破性的进展, 成为目前最为活跃并取得迅速进展的领域之一。一般认为, ob 基因是一种隐性基因, 纯合子小鼠 (ob / ob) 表现不可逆转的遗传性肥胖。按遗传学规律, 同一窝仔鼠有三种基因型: 野生型 (+ / +), 突变型 (ob / ob) 和杂合子型 (ob / +)。及时、快速、准确地鉴定小鼠的基因型便于进行

育种和有关医学研究。这里, 我们介绍一种用 PCR 和限制性内切酶检测 C57BL/6J ob 小鼠基因型。

材料与amp;方法

1 实验材料

1.1 实验动物: C57BL/6J ob 种鼠由密西根州立大学动物科学系提供, 置于美国路易斯安娜州立大学医学研究中心实验动物中心饲养和繁殖。

1.2 试剂和仪器: 引物及限制性内切酶由美国路易

收稿日期: 1999 - 07 - 20; 修订日期: 1999 - 10 - 28

作者简介: 徐培渝 (1963 -), 女, 重庆人, 讲师, 硕士, 主要研究方向: 分子毒理学。

斯安娜州立大学医学研究中心提供, PTC-100 多功能型 PCR 仪 (MJ Research 美国), 紫外凝胶成像仪 (UNP, 美国)

2 方法

2.1 实验动物繁殖及处理: 4 对 C57BL/6J 种鼠杂合体交配繁殖, 检测其子代 (F1) 的基因型, 继续饲养至性成熟 8 周, 选择 4 对优良的 F1 代杂合体鼠 (ob/+) 再次交配繁殖, 同样方法检测子代 (F2) 基因型。共检测 F1 和 F2 代小鼠 61 只。

2.2 实验方法

2.2.1 分离 DNA: 采用经典的等比例的酚和氯仿抽提 DNA²。小鼠出生后 3-4 天, 剪取一小段尾巴约 3-4 mm, 置于预先加有下列混合液的小试管中: 30 μ l 10mmol Tris/10mmol EDTA/2% SDS 和 0.75 μ l 蛋白酶 K, 65 $^{\circ}$ C 消化 2h, 加入已平衡 pH8.0 的酚, 混匀, 注入 0.3ml 的 Dow 真空油脂, 以便分离水相和有机相, 14000r/min 离心 2min, 依次加入等量 150 μ l 酚和氯仿, 充分混匀, 离心 2min, 再加入 300 μ l 的氯仿后混匀, 离心 2min, 小心将水相移入另外加有 60 μ l 醋酸胺和 300 μ l 异丙醇的微量离心试管, 在摇摆器上缓慢摇动 10min, 直至有白色絮状的 DNA 沉淀出; 75% 的乙醇洗涤 DNA, 最后转移至有 100 μ l 10mmol Tris 缓冲液的微量管保存备用。

2.2.2 PCR 扩增靶 DNA: 将充分溶解的 DNA 原液适当稀释后, 作为 PCR 的模板。同时设三管标准对照: 野生型 (+/+), 突变型 (ob/ob), 杂合子型 (ob/+)。根据 ob 基因核苷酸序列设计引物, 正向引物序列为 (ob264+) TGA GTTTGTCCAA GATGGAC, 反向引物 (ob455-) GCCA TCCA GGCTCTCTGG。浓度各为 200nmol。PCR 反应混合液的组成如下: 1.5 mmol 的 MgCl₂, 50mmol KCl, 10mmol Tris 液 (pH8.3), 以及 dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP 各 0.2mmol, 0.2 μ l 的 taq 聚合酶, 以及 10 μ gDNA 原液, 每反应管的总体积控制在 25 μ l。在 PCR 循环仪进行。循环程序为: 96 $^{\circ}$ C, 变性 20sec, 退火及延长 40sec, 40 次循环后, 结束反应。保存于 4 $^{\circ}$ C, 经微型水平凝胶电泳证实 PCR 产物为 191bp 的 DNA 片段。

2.2.3 限制性内切酶消化 PCR 产物 用 Dde 消化 PCR 产物。1.5 μ l 的 Dde 缓冲液及 10 μ l 的 PCR 产物, 加水至 15 μ l, 在 37 $^{\circ}$ C 水浴消化 2h。

2.2.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离消化过的 PCR 产物。首先制备 5% 聚丙烯酰胺凝胶: 3ml 的 30:1 的丙烯酰胺和二丙烯酰胺, 1.5ml 的 10 \times TBE 缓冲液, 加

水至 20ml, 充分混匀, 然后加入 5 μ l 的 TEMED 和 50 μ l 的过硫酸胺, 混匀, 注入微型垂直电泳槽。加样 12 μ l, 同时制备一管未消化过的 PCR 产物做对照, 电压 12v/cm, 电泳 3h。溴化乙锭染色 30min。

2.2.5 ob 基因型观察与统计分析, 在紫外凝胶成像计算机系统及 Ambis 软件的支持下, 摄取、观察 DNA 条带分型, 确定小鼠的 ob 基因型。

结 果

C57BL/6J ob 新生鼠基因型 取出生 3-4d 小鼠的尾巴约 4mm, 用 PCR 和限制性内切酶法检测基因型, 未消化过的 PCR 产物, 只有一条 191bp DNA 带。限制性内切酶消化过的 PCR 产物表现三种类型, 即三种基因型: 野生型 (+/+) 有一条明亮的 DNA 带 (175bp), 突变型 (ob/ob) 有一亮一弱二条 DNA 带 (约 120bp, 50bp) 杂合子型 (ob/+) 表现兼有野生型和突变型的三条带, 但其中代表野生型的条带较代表突变型条带要亮得多, 所以杂合子型 (ob/+) 小鼠与野生型 (+/+) 在表型上难以区分。检测了 F1 代和 F2 代共 61 只鼠, 野生型 (+/+), 杂合子型 ob/+, 突变型 (ob/ob) 种基因型各占的比例分别为 15/61 (24.5%), 31/61 (50.8%), 15/61 (24.5%), 完全符合遗传学规律。

讨 论

C57BL/6J 小鼠的 ob 基因能编码 4.5Kb 的 mRNA, 其表达产物 Leptin (瘦蛋白) 由 167 个氨基酸残基组成, 具有调节体内脂肪储量, 能量代谢及体重的作用³⁵。分析 ob 基因核苷酸序列得知人和小鼠 ob 基因编码序列同源性高达 84%, 提示 ob 基因及其表达产物功能的高度保守性^{1,6}。研究表明, ob 基因编码序列的 105 个密码子处有单碱基突变, 碱基从 C T, 使 DNA 序列从 CGA 变成 TGA, 即由编码精氨酸的密码子变成终止密码子。ob/ob 小鼠因 ob 基因表达产物 Leptin (瘦蛋白) 功能异常而导致肥胖^{1,3}。

本实验根据 ob 基因核苷酸序列及突变位点设计引物, 正向引物从第 264 个碱基开始, 反向引物止于第 455 个碱基, 成功地扩增 ob 基因, 经梯度标准 DNA 比较, 得到 191bp 的 DNA 片段。限制性内切酶 Dde 的消化位点是 NCC TNAG, 因此能切断 ob/ob 小鼠的 ob 基因 C T 突变碱基, 但不能作用野生型 (+/+) 小鼠的 ob 基因。经 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳酶消化过的 PCR 产物, 迅速检测出 C57BL/6J 小

文章编号:1004 - 616X(2000)03 - 0145 - 04

环磷酰胺对全胚胎培养小鼠胚胎的细胞学影响

管孝鞠¹,王治乔²,王爱平²,廖明阳²

(1. 第三军医大学免疫学研究所, 重庆 400038;2. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要:目的与方法:本实验采用全胚胎培养方法,建立了环磷酰胺致畸作用模型,并在此基础上利用流式细胞分析术对培养所得胚胎进行了细胞学观察与分析。结果与结论:发现环磷酰胺所致胚胎畸形可能与其所引起的细胞周期改变及细胞凋亡有关。

关键词:环磷酰胺;全胚胎培养;细胞周期;细胞凋亡

中图分类号:R968 文献标识码:A

CELLULAR EFFECTS OF CYCLOPHOSPHAMIDE ON MOUSE EMBRYOS FROM WHOLE EMBRYO CULTURE SYSTEM

GUAN Xiao - ju, et al

鼠基因多态性,确定小鼠基因型。有趣的是杂合子型(ob/+)表现兼有野生型和突变型的三条带,但其中代表野生型的条带较代表突变型条带要亮得多,所以杂合子型(ob/+)小鼠表型与野生型(+/+)难以区分。本实验检测 F1 代和 F2 共 61 只鼠,+/+,ob/+,ob/ob 三种基因型各占的比例分别为 15/61 (24.5%),31/61 (50.8%),15/61 (24.5%),完全符合遗传学规律。

关于方法的准确性进行几方面的实验验证。ob 基因是隐性基因,ob/ob 小鼠表现肥胖。经该法检出 F1 代和 F2 代纯合体 ob/ob 小鼠 15 只,在相同饲养条件下,表现为明显的进行性肥胖,为非常典型的肥胖表型。作者用 F1 杂合子型(ob/+)小鼠交配繁殖,其子代亦表现三种基因型,证明其亲代确系杂合体型 ob/+。这些结果说明该法对检测 C57BL/6J ob 小鼠准确率达 100%。

虽然本实验只采用了新生 C57BL/6J ob 仔鼠作检测对象,但该法只需很少的生物材料,即 2 - 3mm 的小鼠尾巴,所以对任何年龄小鼠均适用。整个实验

从取材到观察结果能在一个半工作日完成。该法操作简单,手段先进,结果可靠,对肥胖鼠育种、肥胖机理和肥胖预防研究均有实用意义。

参考文献:

- 1 Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue J. *Nature*, 1994, 372:425 - 432.
- 2 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆(金冬雁等译) M. 科学出版社,1993.320 - 335.
- 3 Trayhurn P, Rayner DV. Hormones and ob gene product (leptin) in the control of energy balance J. *Biochem Soc Trans*, 1996, 24:565 - 569.
- 4 张继峰. 肥胖基因的研究进展 J. *生理科学进展*, 1998, 29:24 - 28.
- 5 Pellemounter MA, Cullen MJ, Baker MB, et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob Mice J. *Science*, 1995, 269:540 - 543.
- 6 Masuzkio H, Ogawa Y, Isse N, et al. Human obese gene expression and regional differences in the adipose tissue J. *Diabetes*, 1995, 44(7):855 - 858.

收稿日期:1999 - 07 - 25 修订日期:2000 - 01 - 13

作者简介:管孝鞠(1970 -),女,安徽马鞍山市人,博士后,讲师,研究方向:生殖毒理和免疫毒理。