

专题介绍

小鼠基因功能研究及疾病模型系列专题(二)

—— 基因工程小鼠的品系管理及基因型鉴定

高翔*

(南京大学模式动物研究所, 南京 210061)

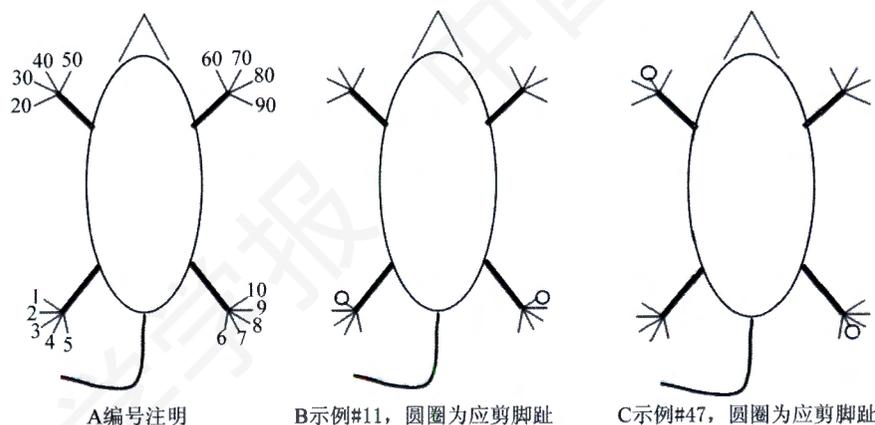
实验室基因工程小鼠品系的保存大多是通过和野生型小鼠交配, 然后不断鉴定、选择携带基因突变或转基因的后代来实现。因此, 维持一个基因工程小鼠品系, 必须要通过分子生物学手段不断的鉴定小鼠的基因型。以基因剔除小鼠为例, 一般我们需要设计两组不同的PCR引物, 分别用于扩增野生型小鼠和突变型小鼠的基因组DNA片段。用于扩增野生型基因组DNA的PCR两个引物至少有一个来自于被剔除的区域DNA序列, 这样对于基因剔除小鼠纯合子个体基因组DNA, 利用这对引物将无法得到扩增产物; 用于扩增突变型小鼠基因组DNA, 我们一般在被剔除片段的两端设计PCR引物。由于被剔除的片段大多有成百上千个碱基, 这样通过PCR产物大小可以明显区分突变型小鼠和野生型小鼠来源的DNA片段(野生型小鼠相应片段常常由于过长而不被扩增)。一般来说, 用于基因型鉴定的PCR产物大多在300~800 bp左右, 最好能将野生型基因鉴定PCR产物大小和突变型基因鉴定PCR产物大小分开, 这样在观察电泳结果时可以一目了然。

值得一提的是, 有些实验室常常使用针对 Neo

(neomycin resistant gene)序列的通用PCR引物鉴定经典基因剔除小鼠。如果该实验室只有一两种基因剔除品系, 这样做是可以的。但是当实验室同时饲养多个品系时, 这种方法很可能会导致品系之间的基因型鉴定结果的交叉污染, 所以我们还是建议使用品系特异的PCR引物对基因剔除小鼠进行基因型鉴定。

遗传工程小鼠品系的个体动物管理和记录也是非常重要的, 因此笼盒标牌上一般要标注至少品系名、小鼠编号、基因型、性别、出生日期和品系管理人等信息。和普通小鼠不同, 每个遗传工程小鼠均有其唯一编号。目前对小鼠编号有许多方法, 如在耳朵和脚趾剪记号等, 大型实验动物设施也可以采用皮下植入条码的方法。基于简单易行的原则, 我们实验室目前还是采用剪脚趾对小鼠进行编号。这个方法可以将编号1到99的小鼠区分开来, 对于编号大于100的小鼠, 我们可以在笼盒的标牌上注明。具体标注见下图(腹面观):

鉴于动物福利管理规范, 我们要求所有的剪趾编号及剪尾(用于提取DNA进行基因型鉴定)操作必须



在小鼠出生后8到12天之内完成(鼠尾剪取长度不得超过0.5厘米),这一方面避免了在幼仔出生一周后打搅带乳母鼠,防止母鼠的吃仔现象,同时这时的小鼠容易抓取,体毛尚未生长,出血也较少,提取的DNA质量较好。更重要的是,在花费1~3天完成基因型鉴定后,我们可以保证在小鼠分笼之前知道各只幼鼠的基因型,从而可以在分笼是按试验设计或传代要求,牺牲不需要的小鼠,避免占用过多笼位。

提取鼠尾DNA的方法有很多种,以下是我们实验室采用的两种方法。其中高盐提取法快捷,但提取的DNA质量有时不能满足特定品系鉴定的需要。这时可以改用酚/氯仿法提取。

(A)酚/氯仿提取法

第一天

1. 剪取0.5 cm鼠尾(同样适用于脚趾,胚胎组织,卵黄膜等),放入1.5 ml离心管。
2. 按500 μ l digestion buffer + 5 μ l 蛋白酶K的比例,配制鼠尾消化液。
3. 将保存液每管500 μ l加入离心管,55 $^{\circ}$ C的水浴中,消化过夜。

第二天

4. 用劲将消化好的组织摇匀。
5. 每管加入500 μ l 酚/氯仿(1:1,事先配好,4 $^{\circ}$ C保存)。
6. 混匀,离心,12 000 r/min, 10 min。
7. 转移400 μ l 上清液至新的标记好的1.5 ml离心管内(注意:吸取上清液时,可将大枪头的尖端剪去,减少吸力可避免将中间蛋白吸起。不能将中间的蛋白层吸起来,否则会对后续的实验造成影响!)
8. 加入800 μ l 无水乙醇(2倍于上清液的体积),上下颠倒混匀,此时应可看到丝状的DNA。
9. 离心,12 000 r/min, 5 min, 弃去上清液。
10. 加入800 μ l 70%乙醇。
11. 离心,12 000 r/min, 5 min, 弃去上清液。
12. 晾干, > 30 min (注意:不能用DNA-Plus真空抽干,这样可能会导致基因组DNA难溶)。
13. 加入200 μ l TE, 可放入37 $^{\circ}$ C助溶。
14. 短期4 $^{\circ}$ C保存,长期-20 $^{\circ}$ C保存。

溶液配方:

Digestion buffer (500 ml):		终浓度
1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)	25 ml	50 mol/L
0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)	100 ml	100 mol/L
NaCl	2.925 g	100 mol/L
10% SDS	50 ml	1%

加水至500 ml,定容。室温保存。

蛋白酶K保存液(10 mg/ml in Milli Q水):

1 ml分装,-20 $^{\circ}$ C保存。

Tris平衡酚(pH 8.0): (1 L)

500 ml 固态酚,60 $^{\circ}$ C水浴融化(内盖打开),转移至大锥形瓶中。

加入等体积(500 ml)的Milli Q水。

加入30 g Tris, 1 g 8-羟基喹啉(终浓度0.1%)。

摇晃,静置分层。

用Tris调上清液至pH 8.0,混匀分装,4 $^{\circ}$ C保存。

酚/氯仿(1:1):

等体积的Tris平衡酚(下层)。

等体积的氯仿。

剧烈摇晃混匀,静置分层。

4 $^{\circ}$ C保存(注意:使用时吸取下层液体!)

(B)高盐提取法

第一天

同酚/氯仿提取法

第二天

1. 用劲将消化好的组织摇匀。
2. 加入250 μ l (1/2 消化液的体积)饱和氯化钠溶液。
3. 混匀,离心,12 000 r/min, 10 min。此时会见到很多白色的沉淀,这些都是蛋白沉淀。
4. 转移400 μ l 上清液至新的标记好的1.5 ml离心管内。
5. 加入800 μ l 无水乙醇(2倍于上清液的体积),上下颠倒混匀,此时应可看到白色丝状的DNA。
6. 离心,12 000 r/min, 5 min, 弃去上清液。
7. 加入800 μ l 70%乙醇。
8. 离心,12 000 r/min, 5 min, 弃去上清液。
9. 晾干, > 30 min (注意:不能用DNA-Plus真空抽干,这样可能会导致基因组DNA难溶)。
10. 加入200 μ l TE, 可放入37 $^{\circ}$ C助溶。
11. 短期4 $^{\circ}$ C保存,长期-20 $^{\circ}$ C保存。