文章编号:1000-5404(2014)16-1761-03

技术方法

利用改进的聚合酶链反应方法鉴定芳香烃受体敲除小鼠

唐婉琦,杨 雪,张 醇,范 霞,严 军,梁华平 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所第一研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室)

[摘要] **目的** 改进常规的基因分型技术,以更准确、直观地鉴定芳香烃受体敲除(aryl hydrocarbon receptor knockout,AhR KO,AhR-/-)小鼠。**方法** 剪取AhR杂合子(heterozygous,+/-)后代仔鼠脚趾,常规提取基因组脱氧核糖核酸,分别采用传统和改进的PCR方法对其基因型进行鉴定,并对结果进行比较,同时分析在试剂总量不变的情况下两种方法获得的基因分型结果的准确性和直观性。**结果** 在反应体系调整为10 μL、退火温度和时间改为65.5 ℃ 40 s、其余PCR参数(预变性温度和时间为94 ℃ 3 min;变性和延伸温度及时间分别为94 ℃ 30 s,72 ℃1 min,该步骤循环35次;最后一步延伸温度和时间为72 ℃ 5 min;样本保存温度为4 ℃)不变的情况下,采用双体系运转的改进PCR法结果比传统PCR法直观,而且总的试剂用量与传统PCR法相等。**结论** 改进的PCR法可以更好地鉴定AhR KO小鼠表型,适合在基因分型工作中推广。

[关键词] 芳香烃受体敲除小鼠;基因分型
[中图法分类号] R394-33 [文献标志码] B

新近发现,创伤感染过程中芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor,AhR)在T细胞、单核细胞以及树突状细胞(dendritic cell,DC)的分化和功能调节方面均扮演重要角色[1-3]。AhR介导机体免疫功能变化的机制研究已成为阐明创伤感染后患者病情发展和预后的关键问题之一,而AhR敲除(knockout,KO,-/-)小鼠的引进和研究则是其机理探讨的重要手段和工具。基因分型是在提取动物组织基因组DNA的基础上,利用目的基因特异性引物并通过聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)完成的[4-5]。传统PCR鉴定方法往往将代表野生型和突变型的引物与共同引物置于同一反应体系中,以求结果可以直接通过同一块琼脂糖凝胶电泳来体现。但由于野生型引物和突变型引物的反应条件并不均一,将其置于同一反应体系中可能造成鉴定结果模糊不清,甚至造成假阳性,从而影响基因分型的准确性。目前少见针对这种问题解决方案的文献报道,因此,本研究围绕AhR-/-小鼠的基因分型流程,采用一种简便实用的改进PCR方法对AhR-/-小鼠进行表型鉴定,并与传统的PCR鉴定方法进行对比,以求获得更准确直观的基因分型方法。

1 材料与方法

1.1 AhR杂合子小鼠的引进、饲养与繁殖

AhR杂合子(AhR+/-)小鼠从美国Jackson实验室引进,获取方式为胚胎复苏。小鼠按照无特定病原(specific pathogen free,SPF)级动物饲养标准在层流隔离环境饲养,室内温度控制在20~26 ℃,湿度50%~60%,照明采取12 h昼夜交替方式。将成年AhR+/-小鼠雌雄合笼交配(每笼可按雄雌比例1∶2或1∶3配对),正常繁殖出AhR野生型(wild type,WT,+/+)、AhR+/-及AhR-/-小鼠,仔鼠出生21 d后离乳,种鼠继续同笼交配。

1.2 基因组DNA的提取和引物信息

仔鼠出生7 d即完整剪取小鼠脚趾并标号,利用基因组DNA提取试剂盒(专利号:ZL 201110294538.4)获取小鼠基因组DNA。基因分型所需引物共3条,分别命名为P1、P2和P3,其中P1属于野生型引物,P2属于普通型引物,P3属于突变型引物,即P1和P2用于鉴定AhR+/+,P3和P2用于鉴定AhR-/-,均由上海捷瑞生物工程有限公司合成。引物序列及产物长度见表1。

表1 基因分型引物序列与产物大小

鉴定内容	引物序列	PCR产物长度(bp)
野生型Ahr	上游P1:GGATTTGACTTAATTCCTTCAGCGG	
	下游P2:TCTTGGGCTCGATCTTGTGTCAGGAACAGG	699
突变型Ahr	上游P3:TGGATGTGGAATGTGTGCGAG	
	下游P2:TCTTGGGCTCGATCTTGTGTCAGGAACAGG	450

1.3 传统基因分型

反应体系为20 μL,包括基因组DNA模板1 μL,2×*Taq* Master Mix(美国Promega公司产品)10 μL,P1 1 μL,P2 2 μL,P3 1 μL,双蒸水(ddH_2O)5 μL。按上述比例将样品和试剂混匀后进行PCR(美国Bio-Rad公司C1 000™ Thermal Cycler型PCR仪)。PCR参数如下:预变性温度和时间为94 ℃ 3 min;变性、退火和延伸温度及时间分别为94 ℃ 30 s、68 ℃ 40 s、72 ℃ 1 min,该步骤循环35次;最后一步延伸温度和时间为72 ℃

[基金项目] 国家自然科学基金(81201497,81273227);重庆市自然科学基金(CSTC2011BB5034,CSTC2012jjA0171)
[通信作者] 严 军,电话:(023)68757413,E-mail:13883092250@163.com
梁华平,电话:(023)68757411,E-mail:13638356728@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140621.0850.007.html(2014-06-21)

5 min;样本保存温度为4 ℃。对获取的PCR产物进行2%琼脂糖凝胶电泳并按条带类型进行小鼠基因型鉴定。

1.4 改进基因分型

1.4.1 双体系PCR反应最佳退火温度的确定 根据传统基因分型结果,选取AhR +/ - 小鼠的基因组DNA样本,分为3组:第1组加入P1、P2和P3;第2组加入P1和P2;第3组加入P3和P2。各组均采用8个退火温度:68.0、67.1、65.5、63.1、59.8、57.5、56.0 ℃和55.0 ℃。反应体系仍为20 μL,各类引物分别为1 μL,其他试剂用量同1.3,不足用ddH_2O补充。采用梯度PCR(美国Bio-Rad公司iCycler™ Optical Module 584BR型定量PCR仪)确定P1和P2、P2和P3在同一反应条件下的退火温度。PCR参数和电泳条件同1.3。

1.4.2 双体系基因分型 分别将P1和P2、P3和P2置于各自的反应体系中,通过同一反应条件来完成各自的基因分型。在确定最佳退火温度后,按照上述设计分别准备模板、引物和试剂(剂量同1.4.1),然后完成各自的PCR。PCR参数除退火温度外,其余条件不变。比较该鉴定结果与传统方法的差别。

1.4.3 试剂用量减半条件下的双体系基因分型 使用P1和P2、P3和P2各自体系进行的PCR的方式,但采用原有试剂用量一半的方式来进行基因分型:即反应体系为10 μL,其中基因组DNA模板0.5μL,2 × *Taq* Master Mix(美国Promega公司产品)5μL,P1 0.5 μL(或P3 0.5 μL),P2 0.5 μL,ddH_2O 3.5μL。PCR参数同1.4.2。

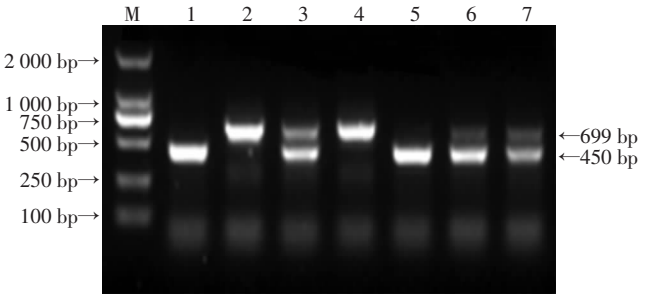
2 结果

2.1 传统基因分型结果

在以传统基因分型方法鉴定的7例仔鼠中,AhR +/ + 表型2例,AhR +/ - 3例,AhR-/-2例,基本符合孟德尔分离定律结果(图1)。但突变带型(450 bp)和野生带型(699 bp)的亮度并不均一。因此部分样本在判断表型(特别是AhR +/ - 和AhR-/-表型)时有一定难度,最终需结合形态学观察和重复多次实验后方能确定。

2.2 改进基因分型结果

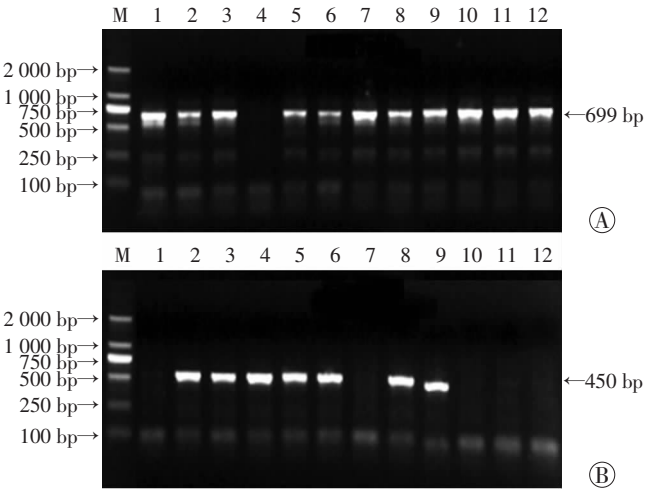
梯度PCR结果显示,在P1和P2、P3和P2体系中,退火温度为65.5 ℃时,突变带型(450 bp)和野生带型(699 bp)最亮,因此可以将65.5 ℃作为双体系PCR的退火温度。而在P1、P2、P3体系中,突变带型和野生带型的亮度仍不均一,大部分突变带型的信号更强,表明传统基因分型方法在一定程度上存在不稳定性。3组的梯度PCR结果见图2。



M:DNA标准(DL2000);1、5:AhR-/-;3、6、7:AhR +/ - ;2、4:AhR +/ +

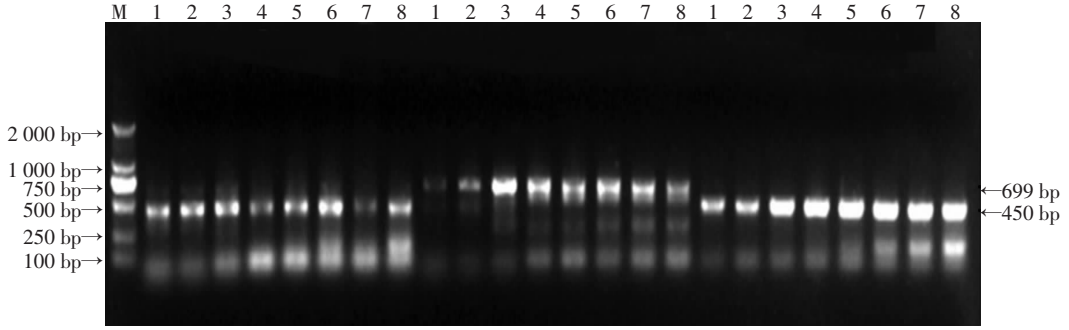
图1 传统基因分型方法鉴定结果

针对P1和P2、P3和P2双体系的改进PCR条件包括:总体系为20 μL,退火温度为65.5 ℃,其余PCR参数同传统基因分型。结果表明,突变带型(450 bp)和野生带型(699 bp)亮度和清晰度相似,易于确定小鼠表型(图3)。与同样本的传统基因分型结果相比,可以进一步明确后者尚不能准确鉴定的基因表型,尤其是AhR +/ - 和AhR-/-小鼠基因型。



M:DNA标准(DL2000);A:P1、P2体系,B:P3、P2体系;1、7、10、11、12:AhR +/ + ;2、3、5、6、8、9:AhR +/ - ;4:AhR-/-

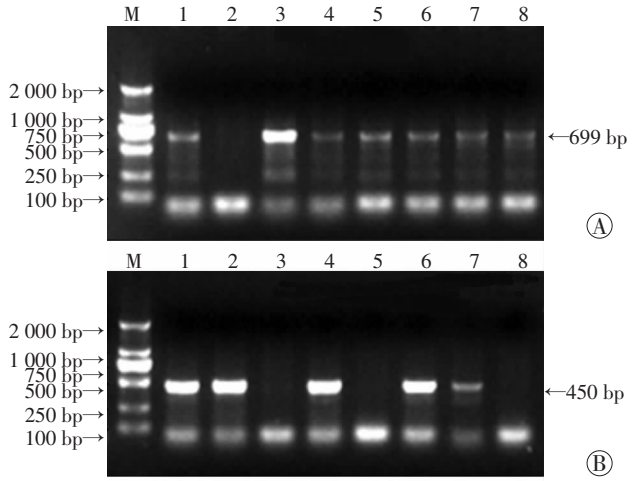
图3 20 μL体系改进PCR结果



M:DNA标准(DL2000);1 ~ 8:退火温度依次为68.0、67.1、65.5、63.1、59.8、57.5、56.0、55.0 ℃;左起第1个1 ~ 8泳道为P1、P2、P3体系;第2个1 ~ 8泳道为P1、P2体系;第3个1 ~ 8泳道为P3、P2体系

图2 退火温度梯度PCR结果

PCR 参数不变,减少一半样本和试剂用量的改进 PCR 结果显示,10 μL 体系也能准确分辨小鼠突变带型(450 bp)和野生带型(699 bp),但大部分野生型条带的亮度弱于突变型条带(图 4)。其直观效果介于 20 μL 体系传统方法和改进方法之间,但该反应仍能够准确鉴别小鼠的基因表型,而且鉴定过程中样本和试剂的用量与传统基因分型方法相等。



M:DNA 标准(DL2000);A:P1、P2 体系;B:P3、P2 体系;3、5、8:分别为 AhR +/+;1、4、6、7:分别为 AhR +/-;2:AhR-/-

图 4 10 μL 体系改进 PCR 结果

3 讨论

常规基因敲除小鼠往往都是以杂合子为亲本进行繁育的,这主要是因为以纯合子为亲本的小鼠繁育在大多数情况下难以得到符合实验要求的后代,从而使基因分型的工作量和难度有所增加[4,6-7]。因此,对现有基因分型方法进行优化,获得针对性强、准确直观的方法将有效减少动物维护中的繁琐工作[8]。

当反映 +/+ 和-/-的 PCR 产物片段差别相对较大时,基因分型说明书往往推荐采用将两对引物置于同一体系中进行 PCR。考虑到共同引物将分别与另外 2 条引物发挥作用,相对消耗较多的特点,许多实验室根据经验多采用加入2 倍共同引物剂量的策略。这种方法的优点是能够直观地在一块琼脂糖凝胶上观察到分型结果,而且只使用一个反应体系,从而在实验操作和试剂节省方面拥有一定优势。但是,由于不同引物要求的退火温度并不一致,而且 3 条(2 对)引物在同一反应体系中也存在着结合竞争等不可预料因素,往往导致结果的重复性较差,带型亮度不均一,从而导致研判小鼠基因表型困难甚至失误。因此,本实验采用了将 P1 和 P2、P3 和 P2 分别置于 2 个不同的反应体系中,在明确适用于双体系的退火温度的基础上,采用相同的 PCR 参数对双体系进行了 PCR。结果显示采用改进 PCR 法的基因分型结果在不同体系中均显示了亮度相似且明确清晰的条带,能够准确鉴定小鼠的基因表型。同时,本实验还将 P1 和 P2、P3 和 P2 体系中涉及的所有试剂和样本减半,采用 10 μL 体系(即双体系总共使用 20 μL,与传统 PCR 用量相当)进行双体系 PCR(参数不变)。结果显示,10 μL 体系条件下,P1、P2 和 P3、P2 体系也能够准确检测出小鼠基因表型。

综上所述,相对传统 PCR 基因分型方法而言,本实验采用的改进 PCR 法能够在消耗相似的前提下更清晰、直观、准确地鉴定小鼠基因表型,从而在一定程度上减少 AhR +/+、AhR +/-、AhR-/-小鼠维护中的工作量和试剂/样本浪费,适合在转基因动物的基因分型工作中进行推广。

参考文献:

[1] Wu D, Li W, Lok P, *et al*. AhR deficiency impairs expression of LPS-induced inflammatory genes in mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 410(2): 358-363.

[2] Bankoti J, Rase B, Simones T, *et al*. Functional and phenotypic effects of AhR activation in inflammatory dendritic cells[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2010, 246(1/2): 18-28.

[3] Benson J M, Shepherd D M. Dietary ligands of the aryl hydrocarbon receptor induce anti-inflammatory and immunoregulatory effects on murine dendritic cells[J]. Toxicol Sci, 2011, 124(2): 327-338.

[4] 卢丽, 陈系古, 黄冰. 基因敲除动物的研究和应用[J]. 中国实验动物学报, 2006, 14(2): 152-156.

[5] 金悠, 吴鹏飞, 王芳, 等. PICK1 基因敲除小鼠的繁育及子代基因型的鉴定[J]. 华中科技大学学报:医学版, 2008, 37(3): 380-382.

[6] Cai Y P, Yang Y, Zhu B L, *et al*. Comparison of human papillomavirus detection and genotyping with four different prime sets by PCR-sequencing [J]. Biomed Environ Sci, 2013, 26(1): 40-47.

[7] Milutin-Gasperov N, Sabol I, Matovina M, *et al*. Detection and typing of human papillomaviruses combining different methods: polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism, line probe assay and sequencing[J]. Pathol Oncol Res, 2008, 14(4): 355-363.

[8] 郑静, 李丽梅, 阳泰, 等. 补体 C3 基因敲除小鼠基因型鉴定的 PCR 条件优化[J]. 成都医学院学报, 2010, 5(3): 228-232.

(**收稿**:2014-01-22;**修回**:2014-03-27)

(编辑 汪勤俭)