

• 技术与方法 •

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.20.031

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200924.1524.009.html\(2020-09-24\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200924.1524.009.html(2020-09-24))

db/db 小鼠基因型鉴定方法的比较研究*

赵长英¹, 廖媛², 杨洁珂², 林晓², 王丽^{2△}

(西南医科大学附属中医医院:1. 内分泌科;2. 中西医结合研究中心, 四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 比较不同方法鉴定 db/db 小鼠基因型的特点。**方法** 采用酶切法、测序法和高分辨率溶解曲线(HRM)对 db/db 小鼠基因型进行鉴定,并对不同方法的特点进行比较研究。**结果** 3 种方法都能稳定、可靠地鉴定 db/db 小鼠基因型,其中测序法准确性高,操作简单,但费用相对偏高。酶切法操作烦琐,耗时长,存在一定假阳性。HRM 节约成本,更简便、快速,尤其适用于大批量鉴定。**结论** 酶切法、测序法和 HRM 各有特点,可结合现有条件选择适当方法进行鉴定。

[关键词] db/db 小鼠;酶切;多位点测序分型;高分辨率溶解曲线;遗传关联研究

[中图法分类号] R394 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)20-3451-05

Comparative study on identification methods of db/db mice genotypes*

ZHAO Changying¹, LIAO Yuan², YANG Jieke², LIN Xiao², WANG Li^{2△}

(1. Department of Endocrinology; 2. Research Center for Integrated Chinese and Western Medicine, Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Southwestern Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To compare the characteristics of different methods to identify the genotypes of db/db mice. **Methods** The enzyme digestion, sequencing method and high-resolution melting curve (HRM) were used to identify the genotypes of db/db mice, and the characteristics of different methods were compared. **Results** Most of the three methods could stably and reliably identify the genotypes of db/db mice. Among them, the sequencing method had high accuracy and simple operation, but the cost was relatively high. The enzyme digestion was cumbersome and time-consuming, and there were certain false positives. HRM saved the cost, it was simpler and faster, and especially suitable for a large scale of identification. **Conclusion** The enzyme digestion method, sequencing method and HRM have their own characteristics, and suitable methods could be selected for conducting the identification based on existing conditions.

[Key words] db/db mouse; enzyme digestion; multilocus sequence typing; high-resolution melting; genetic association studies

随着人们生活水平的提高,糖尿病患病率呈现明显上升趋势,对其发病机制和治疗研究已成为目前的热点和难点^[1]。其中,db/db 糖尿病小鼠的使用在糖尿病相关研究中逐渐扩大,该小鼠是自发突变(Lepr db)纯合的小鼠,由于其瘦素受体基因 108 号密码子发生 G>T 点突变,导致瘦素受体蛋白缺失,从而引起病态肥胖、慢性高血糖、胰腺 β 细胞萎缩,并出现低胰岛素血症,可用于模拟Ⅱ型糖尿病和肥胖症的Ⅰ~Ⅲ期^[2-4]。但对于子代早期纯合子、杂合子和野生型小鼠的表型无法区分,常需要通过基因型鉴定,特别是在运用 db/db 小鼠进行早期糖尿病发病机制和预防

治疗研究时,4~6 周龄的各基因型需要通过基因鉴定手段加以区分,其中酶切法^[5]和测序法是现阶段运用较广泛的 db/db 小鼠鉴定方法,然而近年来出现的高分辨率溶解曲线(HRM),由于其操作简便、可大批量鉴定,以及高效性和高性价比等特点,已逐步成为鉴定基因突变动物基因型的热门方法。本文在建立 HRM 鉴定 db/db 小鼠基因型方法的基础上,同时与常规的酶切法与测序法进行比较,为鉴定 db/db 小鼠提供参考,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

* 基金项目:四川省泸州市人民政府-西南医科大学高层次人才(陈晨团队)引进专项资助项目;四川省卫生厅项目(川卫办发[2011]717 号);四川省泸州市科技局项目(泸市科[2011]108 号)。 作者简介:赵长英(1973—),副主任医师,硕士,主要从事内分泌疾病研究。 △ 通信作者, E-mail:1999wangli@163.com。

1.1.1 实验动物

db/db 小鼠 (BKS. Cg-Dock7^m +/+ Leprddb/J, Jax Lab, NO. 000642) 购于美国 JAX 实验室, 饲养于西南医科大学实验动物中心无特殊病原体 (SPF) 级动物房, 在饲养期间每日给予小鼠足够的 SPF 级饲料和新鲜的饮用水, 室温 20~23 ℃, 相对湿度 60%~70%, 光照 12 h 明暗交替。出生后 3 周的小鼠剪尾, 用于提取 DNA 鉴定小鼠基因型。

1.1.2 试剂

2×Super EvaGreen Master Mix for HRM 购于美国 Everbright 公司, Afa I 内切酶购于日本 Takara 公司, PCR 试剂 Taq polymerase 购于北京全式金生物技术有限公司, 乙醇、异戊醇、异丙醇、氯仿等试剂均为国产分析纯市售商品。

1.1.3 主要仪器

Roche Light Cycler 480 II 荧光定量 PCR 仪、Applied Biosystems Veriti DNA 扩增仪、Thermo Nano Drop 2000 微量紫外分光光度计。

1.2 方法

1.2.1 小鼠基因组 DNA 提取 (氯仿抽提法)

剪取出生后 3 周小鼠尾部 0.1~0.3 cm, 放入 1.5 mL 离心管, 加入 190 μL 鼠尾裂解液和 10 μL 蛋白酶 K (10 mg/mL), 55 ℃ 振荡过夜; 加入 10 μL RNA 酶 (20 mg/mL), 混匀, 37 ℃ 恒温箱中放置 1 h 后, 10 000 r/min 离心 5 min 去除鼠尾残渣, 将上清液小心转移至新的 1.5 mL 的离心管中, 加入等体积 (200 μL) 的酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1), 密闭管口, 反复颠倒离心管 20 次后室温放置 5 min。室温下 10 000 r/min 离心 5 min, 转移上层水相 (约 200 μL) 至新的 1.5 mL 离心管中, 加入等体积 (200 μL) 的异丙醇沉淀 DNA, 轻轻反复颠倒 DNA, 13 000 r/min 15 min 收集沉淀的 DNA。70% 乙醇清洗 DNA, 开盖在室温下空气中干燥沉淀约 15~20 min; 加入 50 μL DDH₂O, 轻微震荡使 DNA 沉淀溶解, -20 ℃ 保存备用。

1.2.2 引物设计

酶切引物, 正向: 5'-AGA ACG GAC ACT CTT TGA AGT CTC-3'; 反向: 5'-CAT TCA AAC CAT AGT TTA GGT TTG TGT-3'。测序引物, 正向: 5'-ACC AAC TTC CCA ACA GTC CA-3'; 反向: 5'-TGA TGC CCT GAA AAT CAA GC-3'; HRM 引物同测序引物, 合成采用高效液相色谱法纯化级别。

1.2.3 酶切法

PCR 反应体系: 10×Buffer 2.0 μL、Primer 正向引物 0.5 μL、Primer 反向引物 0.5 μL、dNTP 1.0 μL、Taq polymerase 0.2 μL、DNA 1.0 μL、DDH₂O 补加至总反应体系 20.0 μL; PCR 反应条件: 95 ℃ 2 min, 1 个循环; 95 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 35

个循环; 72 ℃ 7 min, 4 ℃ 保存, 1 个循环。db 基因突变目的片段为 135 bp, PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 在有此大小条带前提下继续开展酶切鉴定: Afa I 酶切, 酶切反应体系 (10.0 μL 体系): 10×Buffer 1.0 μL、AfaI 1.0 μL、0.1% BSA 4.0 μL、PCR product 4.0 μL, 37 ℃ 过夜酶切后, 3% 琼脂糖凝胶电泳, 基因型判断标准: 野生型 135 bp, 杂合子 135 bp/108 bp/26 bp, 纯合子 108 bp/26 bp。

1.2.4 测序法

测序引物, PCR 反应体系: 10×Buffer 2.0 μL、Primer 正向+反向引物 1.0 μL、dNTP 1.0 μL、Taq polymerase 0.2 μL、DNA 1.0 μL、DDH₂O 14.8 μL, PCR 反应条件同酶切法, PCR 扩增产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 将有条带的阳性样本送上海生物工程有限公司测序。

1.2.5 HRM

PCR 反应体系: 基因组 DNA 10 ng、正反向引物 2 μL、2×Super EvaGreen Master Mix for HRM 10 μL, 补 RNase-free 水至 20 μL, 设 3 复孔; Roche Light Cycler 480 II 荧光定量 PCR 仪上设置反应条件, 孵育: 2 min 95 ℃, 1 个循环; 扩增: 95 ℃ 10 s, 58 ℃ 10 s, 72 ℃ 10 s, 45 个循环; HRM, 95 ℃ 1 min, 40 ℃ 1 min, 65 ℃ 1 s, 恢复到 95 ℃, 1 个循环; 冷却, 1 个循环; 标本分析设置包括选中标本、添加标本、标本编辑、分析、选择分析、基因类型 (选择 db/db 模式)、设置标本种类、确定标本种类、曲线基本情况、溶解温度的统一化、统计、温度转化、不同的定位表现。

2 结果

2.1 酶切法鉴定结果

酶切法鉴定结果显示, 从上至下理论上应依次为 26、108 和 135 bp, 其中野生型为 135 bp, 杂合子 135 bp/108 bp/26 bp, 纯合子 108 bp/26 bp。由于 26 bp 太小, 条带一般不可见, 故可忽略。DNA maker 从下至上依次为 100、200、300、400、500、600 和 700 bp, 与另外两种鉴定法比较, 酶切法也可有效地鉴定 db/db 小鼠的野生型、杂合子和纯合子 3 种基因型, 见图 1。

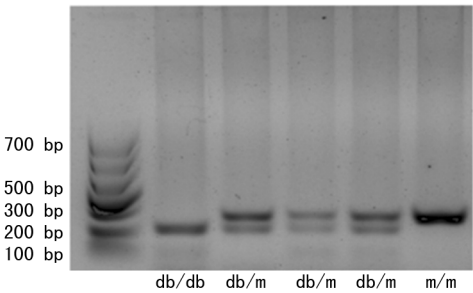
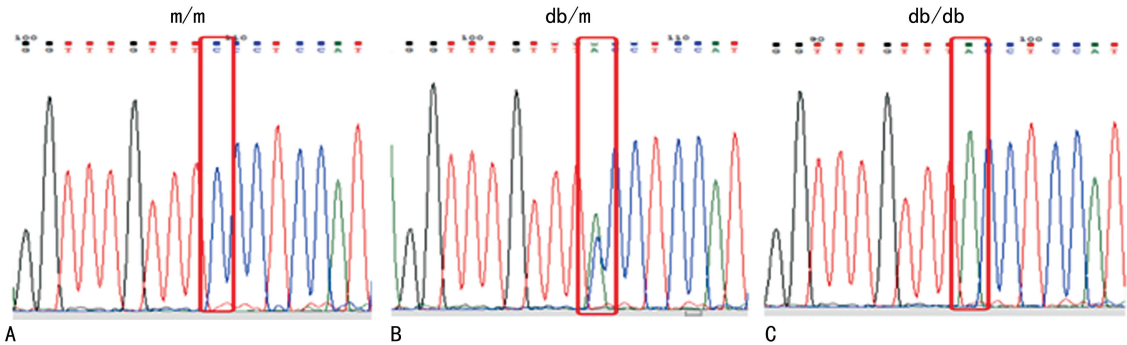


图 1 酶切法鉴定结果

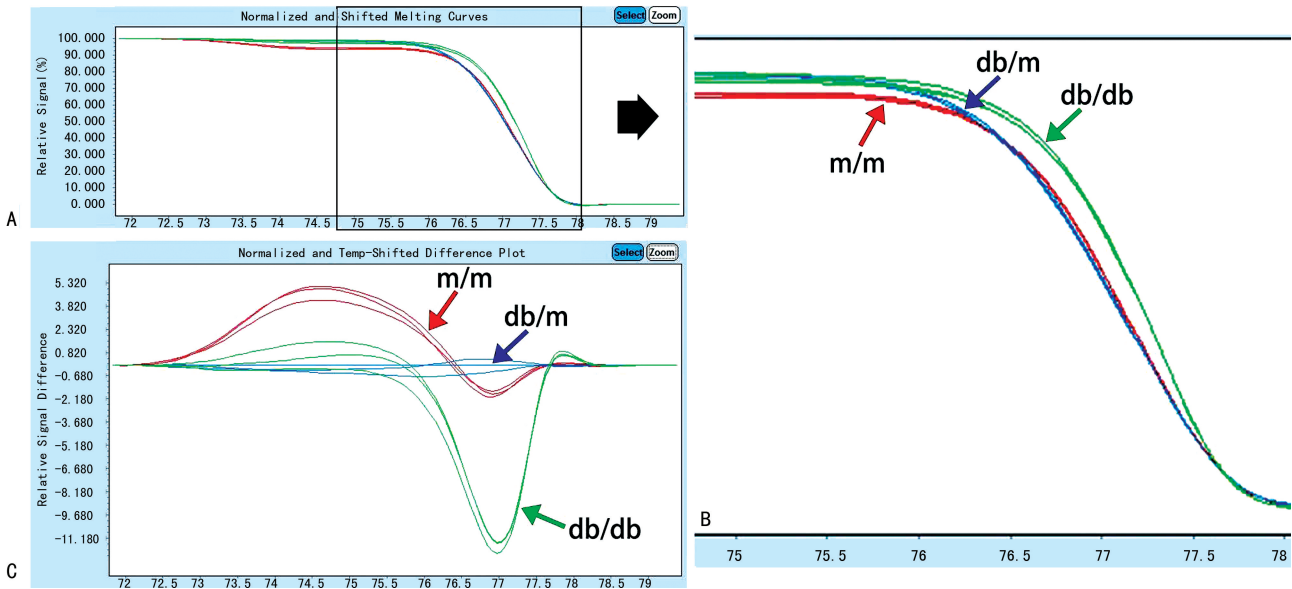
2.2 测序法鉴定结果

采用 Chromas 软件分析 PCR 扩增产物测序图谱, 分析 3 种基因型的单点突变, 其中红色方框标记



A:野生型;B:杂合子;C:纯合子。

图 2 测序法鉴定结果



A:3 种基因型 HRM;B:图 A 放大(温度 75~78 °C);C:坐标轴变换后的 HRM;红色:野生型(m/m);蓝色:杂合子(db/m);绿色:纯合子(db/db)。

图 3 HRM 鉴定结果

为突变位点,野生型为蓝色,杂合子为蓝、绿色,纯合子为绿色,见图 2。

2.3 HRM 鉴定结果

db/db 小鼠瘦素受体基因与野生型小鼠相比有点突变,在 HRM 生成过程中由于有 1 个或多个碱基不同,其解链所消耗的能量不同,其 DNA 的熔解温度(melting temperature, T_m)值就会产生区别。野生型(m/m)为红色曲线、杂合型为(db/m)蓝色曲线、纯合子为(db/db)绿色曲线,见图 3。

2.4 db/db 小鼠和正常小鼠体型、体重和血糖的比较

糖尿病自发突变纯合的小鼠在 4 周龄时变得明显肥胖,体重明显升高,6 周时,纯合子体型逐渐肥胖,体型可达到野生型和杂合型的 1.5~2.0 倍,利用 HRM 鉴定出的 db/db 纯合子小鼠体重明显超过正常小鼠约 2 倍。此外,db/db 小鼠血浆胰岛素在 10~14 d 龄时开始升高,血糖在 4~8 周时开始升高。纯合突变小鼠具有明显的特征:多食、多饮和多尿。利用

HRM 鉴定的 db/db 小鼠血糖明显升高,高于正常小鼠 4 倍以上。观察到 db/db 纯合小鼠周围神经病变和心肌病变,还具有伤口愈合延迟,代谢效率提高的特点,以及雌性纯合子表现出卵泡颗粒和子宫内膜上皮组织层中子宫和卵巢重量减少,卵巢激素产生减少和高血脂异常,这些都与糖尿病小鼠的典型特征相吻合。

2.5 酶切法、测序法和 HRM 比较

取 20 只保存的 3 周龄小鼠 DNA,分别采用 3 种方法进行回顾验证。结果显示:HRM 和测序法均能达到 100%准确性,酶切法则存在个别酶切条带不清晰,需要重复 2~3 次等现象,并因条带跑不开而导致将 db/m 判断为 db/db 的错误。3 种方法鉴定 m/m、db/m、db/db 基因型小鼠在耗时、便利程度、所耗资金、适应标本上各有不同(表 1),其中,HRM 无须过夜酶切,剪取鼠尾当天即可得出结果,耗费时间短,一次可鉴定 96 个标本,适用于大量标本的鉴定;酶切法和测序法是最常用的两种方法,适用于少量标本的

鉴定,但酶切法存在一定的假阳性,操作时要格外注意。

表 1 HRM、酶切法和测序法的比较						
方法	费用	耗时	难易度	准确度	适用范围	综合评定
酶切法	4 元/样	1~2 d	较易	中	少量标本	易假阳性
测序法	18 元/样	2~3 d	易	高	少量标本	费用较高
HRM 法	2 元/样	2~3 h	易	高	大量标本	高效便捷

3 讨 论

随着糖尿病发病机制和治疗研究的深入,db/db 小鼠在使用中逐渐增多。对于如何快速便捷的鉴定单碱基点突变一直以来都是遗传学研究中的重点和难点。常规的基因鉴定方法包括酶切法和测序法,其中酶切法是利用识别双链 DNA 分子特异性核酸序列的 DNA 内切酶来鉴定基因型的方法,多适用于少量标本的鉴定,具有操作方便的优点,但存在一定假阳性;测序法则具有鉴定准确的特点^[7-8],但往往需要相关公司辅助检查,费用较高且等待时间过长。HRM 是在实时荧光定量 PCR 的基础上通过饱和染料监控核酸的熔解曲线变化进行分析的一种新兴分子诊断方法^[9-11],已经用于各种突变单体的筛选与鉴定,该方法省时、省力、经济,能在较短时间内处理大量标本,准确率高,对于具有荧光 PCR 仪同时需要大量标本鉴定的实验室可以作为优先选择。本文以 db/db 小鼠为例,采用 3 种方法进行鉴定,结果显示,3 种方法均可鉴定 db/db 小鼠,但在准确性、所耗时间、成本等方面又有所区别,研究者可根据每种方法的特点,选择其中的 1 种或几种组合使用,如对于大批量鉴定,建议优先采用 HRM,如存在个别鉴定不确定可再单独进行测序,从而提高效率和降低成本。

此外,可根据自己的需求选择方法。第 6 周时,纯合子体型明显增大,此时对 3 种基因型小鼠测量血糖,可发现纯合子 db 小鼠血糖最高,高于正常小鼠 4 倍以上,结果表明 3 种基因鉴定方法分型准确。同时,体重和血糖也可为鉴定基因型提供参考价值。

在常规的实时荧光定量 PCR 中,一般的反应体系可以为 10 μ L,且结果同样可靠。因此考虑可以将整个 HRM 的反应体系体积减半,由 20 μ L 变为 10 μ L,DNA 上样量减少到 5 ng,结果发现此变化对鉴定结果并无影响,也可有效区分 m/m、db/m、db/db 这 3 种基因型,故在以后的鉴定中可将试剂的剂量减半,降低成本,提高效率。实验中常因各种不同的原因而选择不同的鉴定方法,酶切法、测序法较为常用,而使用 HRM 来鉴定 db/db 小鼠基因型的方法,具有较多优势,且分型结果与常规分型结果一致。HRM 只需将反应体系加至 96 孔板,然后设置程序并运行,在封闭系统中直接记录 PCR 荧光数据,分析溶解曲线并

得出不同的曲线分布,最终得到基因型的分型结果,与其他以基因型鉴定为目的的方法相比,操作更简便,成本大幅降低,且适用于大量标本的鉴定,但在目前的应用中还未及酶切法和测序法普遍,需要大范围的推广运用^[12-13]。其中,酶切法适用于小量标本,成本较低,运用较普遍,20 个以下的标本可以选择,但将 PCR 产物扩增以后还需要进行过夜酶切,过程较 HRM 复杂,且在 PCR 过程中容易出现假阳性,导致鉴定不准确。测序法同样适用于少量标本,鉴定准确,但资金昂贵,对准确性要求较高且标本少的时候可选择。相比而言,HRM 是一种用于突变扫描、甲基化、基因分型的技术,具有高灵敏度,已被证明可大批量检测突变等位基因,但对于高通量及复杂的遗传分析还需要进一步进行细化研究,从而为研究者选择提供一种参考^[14-15]。

综上所述,基因型鉴定特别是针对子代鼠中选出作为配种的,其鉴定结果的准确性对于是否能顺利得到足够数量所需子代鼠是研究中的关键环节,本文为此选择提供了实验依据。

参考文献

[1] 顾东风,翁建平,鲁向锋.中国健康生活方式预防心血管代谢疾病指南[J].中国循环杂志,2020,35(3):209-230.

[2] ROH J I,LEE J,PARK S U,et al. CRISPR-Cas9-mediated generation of obese and diabetic mouse models[J]. Exp Anim,2018,67(2):229-237.

[3] 吴静,王华旻,李晶,等. db/db 小鼠的实验室应用[J]. 生理科学进展,2013,44(1):12-18.

[4] 李金凤,李小承,殷小红,等. 小热休克蛋白家族和自噬相关蛋白在自发性 2 型糖尿病 db/db 小鼠海马组织中的表达[J]. 基础医学与临床,2020,40(8):1059-1063.

[5] 曹敏,张晓敏,王培昌,等. Homer1 基因真核表达重组质粒构建及 HT22 细胞转染鉴定[J]. 山东医药,2020,60(22):44-47.

[6] 岳苑,周梦诗,徐娟,等. 基于高分辨率溶解曲线分析鉴别食品中的 3 种李斯特氏菌[J]. 现代食品科技,2020,36(6):285-290.

[7] 张文新,于婷,孙楠,等. 胎儿染色体非整倍体 21 三体、18 三体和 13 三体检测试剂盒(高通量测序法)行业标准的制定[J]. 分子诊断与治疗杂志,2020,12(8):991-994.

[8] 胡家,杨颖,李蕾,等. 用于质谱分析的细胞总蛋白 3 种酶切方法比较[J]. 山西医科大学学报,

- 2019,50(6):848-853.
- [9] HU M, YANG D, WU X, et al. A novel high-resolution melting analysis-based method for *Salmonella* genotyping [J/OL]. *J Microbiol Methods*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31837350/>.
- [10] AREFZADEH S, AZIMI T, NASIRI M J, et al. High-resolution melt curve analysis for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a single-centre study in Iran [J/OL]. *New Microbes New Infect*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32257224/>.
- [11] 徐雯洁, 王鑫, 穆方方, 等. 基于 HRM 方法筛选乳腺癌组织 MYBL2 基因突变热点区域[J]. 淮北师范大学学报(自然科学版), 2020, 41(1): 38-42.
- [12] FERREIRA I R, COSTA R A, GOMES L H F, et al. A newborn screening pilot study using methylation-sensitive high resolution melting on dried blood spots to detect Prader-Willi and Angelman syndromes[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 13026.
- [13] 林书祥, 王朝, 张新杰, 等. 应用 PCR-HRM 技术快速筛查 MMACHC 基因热点致病变异 c. 609G>A[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2020, 37(7): 759-763.
- [14] VIEILLE O P, CRUZ C R, ÁLVAREZ D E. Morphological and molecular differentiation by high resolution melting curves (HRMA) and sequencing of the *Trichophyton mentagrophytes* complex in human strains in Valparaíso, Chile[J]. *Rev Argent Microbiol*, 2020, 52(2): 88-95.
- [15] WISITTIPANIT N, PULSRIKARN C, SRISONG S, et al. CRISPR 2 PCR and high resolution melting profiling for identification and characterization of clinically-relevant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* [J]. *Peer J*, 2020, 8: e9113.

(收稿日期: 2020-01-18 修回日期: 2020-06-17)

(上接第 3450 页)

- [3] 张士巧, 乔翠, 杜颖. 预见性护理在重症精神病患者中的应用[J]. *护理实践与研究*, 2019, 16(13): 147-149.
- [4] WANG S X, LI B H, LI J, et al. Middle-term follow-up results of Pipkin type IV femoral head fracture patients treated by reconstruction plate and bioabsorbable screws [J]. *Chin J Traumatol*, 2018, 21(3): 170-175.
- [5] 朱璐晔. 延续性护理对老年慢性支气管炎患者出院后的心理状态及生存质量的影响[J]. *中国乡村医药*, 2019, 26(6): 61-62.
- [6] 韦素惠, 梁云, 陈爱群. 下肢压力系统在预防骨科大手术后下肢静脉血栓形成的效果[J]. *广西医学*, 2011, 33(4): 491-492.
- [7] 刘键, 李明东, 王先安, 等. 老年脊柱结核手术并发症的原因分析及处理[J]. *国际老年医学杂志*, 2018, 39(4): 168-171, 198.
- [8] LAURENCE N, JOHN J C, MICHAEL P L, et al. Ultrasound for lower extremity deep venous thrombosis: multidisciplinary recommendations from the society of radiologists in ultrasound consensus conference[J]. *Circulation*, 2018, 137(14): 1505-1515.
- [9] 杜田文. 逐瘀通脉汤对老年股骨颈骨折全髋关节置换术后下肢深静脉血栓发生率的影响[J]. *中国中医药科技*, 2019, 26(1): 97-99.
- [10] 曹亚青. 围术期预见性护理对复杂性肾结石经皮肾镜术患儿的影响[J]. *国际护理学杂志*, 2019, 38(14): 2222-2224.
- [11] 窦延丽. 预见性护理对预防良性前列腺增生患者术后尿路感染的影响[J]. *国际护理学杂志*, 2019, 38(14): 2272-2275.
- [12] 李玉佳, 窦晨浩, 李昊儒, 等. 骨科下肢深静脉血栓患者预防肺栓塞的护理[J]. *护士进修杂志*, 2019, 34(2): 159-161.
- [13] 刘霞, 杨芬, 陈王丽, 等. 预见性护理对下肢多发骨折患者深静脉血栓的影响[J]. *国际护理学杂志*, 2015, 34(24): 3357-3359.
- [14] 陈海波, 王惠仪, 王婷, 等. 预见性护理对股骨转子间骨折患者 PFNA 术后下肢深静脉血栓形成的影响[J]. *护理实践与研究*, 2019, 16(3): 74-76.
- [15] 高克霞. 预见性护理干预在预防骨科术后下肢深静脉血栓形成中的效果[J]. *河南医学研究*, 2015, 24(6): 160.

(收稿日期: 2020-03-06 修回日期: 2020-06-13)