

技术与方法

筛选转基因动物的新方法
——PCR 及其产物测序法*

何 泉 李 鹏 姜立群 陈兰英

(中国医学科学院阜外心血管病医院 北京 100037)
(中国协和医科大学心血管病研究所, 北京 100037)

摘要 用特异性引物对肌球蛋白轻链 2 启动子 (myosin light chain 2, MLC₂) - 糜酶融合基因的转基因新生鼠尾 DNA 进行 PCR 筛选, 低熔点琼脂糖凝胶电泳回收阳性样品 PCR 所扩出的 DNA 条带, 纯化后用同一对引物中的一个进行单引物 PCR 测序, 与所转外源基因序列比较, 进一步确定整合有外源基因的阳性鼠。PCR 及 PCR 产物测序法检测转基因动物具有操作方便, 灵敏度高及特异性强等优点。

关键词 PCR, 转基因动物筛选, PCR 测序

筛选转基因鼠的传统方法是通过鼠尾 DNA 的 DNA 印迹分析^[1], 但该方法不仅费时、工作量大, 而且大量新生鼠的饲养花费极大, 寻找一种理想的转基因整合检测方法一直是急待解决的问题。本文报道了一种通过 PCR 及其产物测序法筛选转基因动物的新方法。首先利用计算机对所转入的肌球蛋白轻链 2 启动子 (MLC₂) - 糜酶融合基因设计一对特异性引物, 对新生鼠尾 DNA 进行 PCR 扩增, 能扩增出条带者为初选阳性鼠。通过低熔点琼脂糖凝胶电泳回收阳性鼠 PCR 扩增产物, 对回收的 PCR 产物进行单引物 PCR 测序, 测序结果和转入基因序列比较即可确定整合有外源基因的转基因动物。

1 材料与方法

1.1 材料

蛋白酶 K 为 Merck 公司产品, Taq DNA 聚合酶为华美公司产品, dNTP 为宝灵曼公司产品, 低熔点琼脂糖为 FMC 公司产品, fmolTM DNA Sequencing System 为 Promega 产品, γ -³²P-ATP 为北京亚辉生物工程公司产

品, 引物 I (MLC₂ 启动子区) 5'-CTG-TGC-CTC-ACC-TAG-AAG-TG-3' 和引物 II (糜酶结构基因区) 5'-CTC-CAT-AGC-TCT-TGA-GCA-TG-3' 均为北京赛百盛 (美国) 生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 鼠尾 DNA 提取: 按文献 [2] 提取鼠尾 DNA。

1.2.2 新生鼠的 PCR 筛选 (按每批检测 40 个样品计算): a. 在 0.2 ml 的薄壁离心管中加入模板 DNA (待检测鼠尾 DNA, 阴性对照, 阳性对照) 0.5 μ g 左右, 加水稀释到 20 μ l, 100 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 冰浴中骤冷待用。b. 在另一离心管中依次加入引物 2.4 μ mol, 四种 dNTP 到终浓度 0.1 mmol/L, 10 $\times$ PCR 缓冲液 123 μ l, Taq DNA 聚合酶 40 U, 用去离子水定容至 410 μ l, 混合均匀, 分别取 10 μ l 混合物加到步骤 a 的各样品管, 继续置于冰浴中。c. 设定 PE-9600 热循环仪程序, 预加热 96 $^{\circ}$ C 时放

* 国家自然科学基金 (39570297) 和中国医学科学院基金资助课题。

收稿日期: 1996-10-15, 修回日期: 1997-01-06

入样品管, 96℃预变性 2 min 进入循环, 循环采取 96℃变性 25 s, 55℃退火 40 s, 72℃延伸 50 s. 进行 30 个循环后, 72℃温育 10 min 结束 PCR. 取 5 μl PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳.

1.2.3 按文献 [3] 回收 PCR 产物.

1.2.4 PCR 产物测序: 参照 Promega fmol™ DNA Sequencing System Technical Manual 进行. a. 引物标记 (按 3 份样品计算): 引物 5 pmol, T4 多聚核苷酸激酶 2.5 U 及其 10× 缓冲液 1 μl, γ-³²P-ATP 5 pmol, 加水至 10 μl. 37℃作用 0.5 h, 90℃灭活多聚核苷酸激酶 2 min. - 20℃冻存备用或直接使用. b. PCR 扩增: 每个样品的一套 PCR 测序反应准备 4 个 0.2 ml 离心管, 依次标名 T, C, G, A, 加入相应的 d/ ddNTP 混合物 2 μl, 保存于冰浴或 4℃. 每套 PCR 测序反应在另一离心管内混合模板 DNA (回收 PCR 产物) 0.5~ 5 ng, 5× 测序缓冲液 5 μl, 标记引物 3 μl, 以去离子水定容至 16 μl, 加 1 μl 测序级 Taq DNA 聚合酶, 混合均匀. 分别取该模板酶混合物 4 μl, 依次加到 d/ ddNTP 混合物的管内, 混匀后进行 PCR. 95℃预变性 2 min 后进入循环, 95℃ 30 s, 51℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环后 72℃ 继续温育 10 min. c. 聚丙烯酰胺凝胶电泳及放射自显影: PCR 结束后每管加终止液 3 μl, 80℃变性 2 min, 冰浴中骤冷, 进行 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 放射自显影.

2 结果与讨论

2.1 转基因新生鼠鼠尾 DNA PCR 检测

整合有 MLC₂ 糜酶融合基因的转基因鼠鼠尾 DNA 用 MLC2 区和糜酶结构基因区的一对引物能扩增出 525 bp 的 DNA 片段 (图 1).

2.2 转基因阳性鼠 PCR 测序

将上述经 PCR 筛选出整合有 MLC₂ 糜酶基因的阳性鼠鼠尾 DNA 样品的 PCR 扩增产物, 用低熔点琼脂糖回收后进行 PCR 测序, 结果表明用引物 I 测出了 MLC₂ 糜酶拼接区序列, 用引物 II 测出了人糜酶结构基因区序列 (图 2).

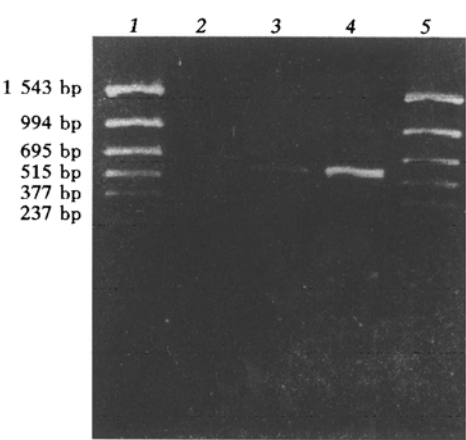


图 1 转基因新生鼠鼠尾 DNA PCR 扩增产物电泳图谱

1, 5: DNA 分子质量标准; 2: 阴性对照系非转基因鼠鼠尾 DNA; 3: 6 号转基因阳性鼠能扩出 525 bp 的 DNA 片段; 4: 阳性对照为 MLC₂- 糜酶融合基因克隆质粒 DNA, 能扩增出 525 bp 的 DNA 片段.

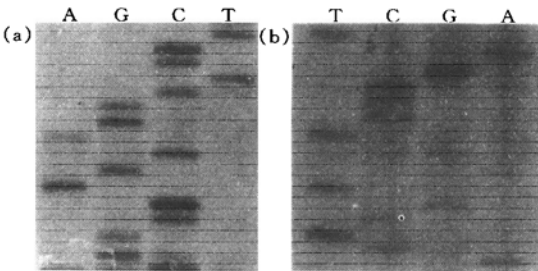


图 2 6 号转基因阳性鼠 PCR 产物测序结果

(a) GGC-CAG-CAG-GCT-CCT 为 MLC₂ 启动子和糜酶结构基因拼接区序列; (b) ACT-CGT-AGT-CCC-GAT 为糜酶结构基因区序列.

2.3 讨论

通过上述两步 PCR 即 PCR 筛选检测和 PCR 产物的 PCR 测序可以确定整合有外源基因的转基因鼠. 在测序过程中我们还发现一只转基因鼠第一步 PCR 能扩出两个 DNA 片段即 312 bp 和 525 bp. 进一步测序发现, 该转基因鼠外源基因整合过程中, 在糜酶结构基因区的第一个内含子丢失 213 bp 的序列 (资料未在文中列出), 说明通过 PCR 测序能获得比 DNA 杂交更多有关整合情况的信息. PCR 及 PCR

产物测序不失为一种检测转基因动物整合的简便、灵敏、特异的理想方法，值得推广。

参 考 文 献

1 Higan B, Costantini F, Lacy E. Manipulating the mouse embryo, a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986. 180~ 182
2 Laird P W, Zijderveld A, Linders K *et al.* Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res*, 1991, **19**: 4293~ 4294
3 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning. a laboratory manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 6. 30~ 6. 31

A New Method of Screening Transgenic Animal: PCR and Its Products Sequencing. HE Quan, LI Peng, JIANG Liqun, CHEN Lanying (*Fu Wai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Cardiovascular Institute, Peking*

Union Medical University, Beijing 100037, China).

Abstract The primary detection of the MLC₂-chymase fusion gene transgenic mice was carried out by means of polymerase chain reaction (PCR) with two specific primers, which span across MLC2 promoter region and chymase structure gene region. The DNA electrophoretic bands of PCR products were recovered and purified, then sequenced by PCR sequencing method with one of the two primers. Final determination of the transgenic mice was conducted through comparing the sequencing results with sequences of transferred gene. This method is convenient, effective and specific.

Key words PCR, screening transgenic animal, PCR sequencing

固相滤纸法测定鼠肝糖原合成酶的活性*

王艳荣¹⁾ 钱荣立

(北京医科大学第一医院, 北京 100034)

贺师鹏 黄天贵

(北京医科大学生物物理系, 北京 100083)

摘要 探求简捷有效的测定鼠肝糖原合成酶活性的方法。固相滤纸法测定该酶活性, 并与文献报告的漂洗法进行比较, 且用此方法观察糖尿病鼠肝糖原合成酶的活性。两种方法所测得放射性计数无明显差异; 糖尿病鼠肝糖原合成酶的活性明显降低。固相滤纸法是一种较简捷, 方便, 不易污染的测定糖原合成酶的方法。

关键词 糖尿病, 滤纸法, 糖原合成酶

糖原合成酶 (GS) 是肝和肌肉糖原合成的限速酶, 是胰岛素作用的主要靶酶, 它对糖代谢的调节和血糖稳态的维持具有重要作用^[1, 2]。糖原合成酶活性的分析测定通常是基于 UDP¹⁴C-G 在 GS 的作用下, 合成具有放射性的糖原, 带放射性的糖原和游离 UDP¹⁴C-G 的分离普遍采用 Thomas 滤纸分析法和柱层析法^[3]。本实验采用了 Whatman No3 滤纸抽滤分离, 而放射性滤纸片直接放入闪烁液测量的方法, 与文献报告的漂洗法相比, 结果表明, 固相滤纸法简单, 快捷, 污染少, 而测定结果

与漂洗法相似^[3]。

1 材料和方法

1.1 材料

UDP¹⁴C-G (英国 Amersham 公司); Whatman No 3 滤纸; 兔肝糖原 III 型, 尿苷二磷酸-葡萄糖 (UDPG), Tris (美国 Sigma 公司); POPOP, PPO (香港), DTT (德国)

* 国家教委回国人员启动基金。
¹⁾ 北京医科大学第三附属医院内分泌科, 北京 100083。
收稿日期: 1996-12-20, 修回日期: 1997-04-30