

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.003462

基于 DNA 提取方法优化转基因小鼠基因分型研究

夏雨¹, 余静¹, 康露¹, 张欣², 马妮¹, 严军¹

(1. 陆军军医大学大坪医院野战外科研究所, 创伤与化学中毒全国重点实验室, 重庆 400042;

2. 重庆医科大学附属第二医院康复医学科, 重庆 400010)

【摘要】目的:探讨 DNA 提取方法优化后对转基因小鼠基因分型结果的影响, 并比较分析与业内常用试剂盒基因型鉴定结果的差异。**方法:**在团队前期专利基础上, 改进了 DNA 裂解液的配方和实验流程, 并以新型转录因子 Musculin 和增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 转基因小鼠为例, 对基因分型结果进行了比较研究和验证。**结果:**DNA 提取时现配裂解液配方为 100 μ L 0.025 N NaOH 工作液、160 μ L 0.5 M EDTA 工作液和 40 mL 超纯水; 每个样本加入 180 μ L 裂解液, 100 $^{\circ}$ C 30 min。与相关领域常用的基因分型试剂盒相比, 该 DNA 提取优化方案能够在确保鉴定准确的前提下有效缩短基因分型时间, 而且裂解液配置方法简单, 反应次数多, 步骤更简便, 可大幅降低试剂成本和工作量。**结论:**本研究提供 1 种适用于转基因小鼠基因分型的经济、简单、可靠的 DNA 提取技术, 具有较好的应用和推广价值。

【关键词】转基因小鼠; DNA 提取; 基因分型; 优化**【中图分类号】**R-332**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2023-10-12

Optimization of DNA extraction method for genotyping in transgenic mice

Xia Yu¹, Yu Jing¹, Kang Lu¹, Zhang Xin², Ma Wei¹, Yan Jun¹

(1. State Key Laboratory of Trauma and Chemical Poisoning, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Army Medical University; 2. Department of Rehabilitation Medicine, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the influence of optimized DNA extraction on genotyping of transgenic mice, and to compare it with commonly used reagent kits in the field of scientific research. **Methods:** Based on our previous patent, we modified the DNA lysis buffer formula and experimental protocol. Genotyping and validation were carried out using musculin (a novel transcription factor) -transgenic mice and enhanced green fluorescent protein-transgenic mice. **Results:** The DNA lysis solution was prepared immediately before use, and was composed of 100 μ L 0.025 N NaOH, 160 μ L 0.5 M EDTA, and 40 mL ultrapure water. Each sample was mixed with 180 μ L DNA lysis solution, at 100 $^{\circ}$ C for 30 min. Compared with the commonly used genotyping kits in relevant fields, the optimized DNA extraction method effectively shortened the genotyping time while ensuring the accuracy of identification, and moreover, the DNA lysis buffer preparation was simple and convenient, enabling more reaction times, and reducing reagent costs and workload considerably. **Conclusion:** This study provides an economical, simple, and reliable DNA extraction technique for genotyping in transgenic mice, which deserves application and promotion.

【Key words】transgenic mice; DNA extraction; genotyping; optimization

作为分子机制探讨和研究水平提升的重要工具, 转基因动物尤其是转基因小鼠已广泛应用于医学和生命科学研究领域^[1-2]。由于转基因小鼠研发

周期相对较长, 价格昂贵, 大多数实验室选择自行繁育的方式维护种群 (特别是条件性敲除基因小鼠), 这使得转基因小鼠基因型鉴定即基因分型成为长期、大量并频繁的常态化工作。因此, 采用经济可靠、快速便捷、操作简便的基因分型技术将有效降低工作负荷, 提升工作效率, 是业内实验人员面临的重要应用课题, 实用价值明显^[3-5]。

转基因小鼠基因分型的实验流程由 DNA 提取、聚合酶链式反应 (poly-enzyme chain reaction, PCR)

作者介绍: 夏雨, Email: 1561992727@qq.com,

研究方向: 医学微生物学。

通信作者: 严军, Email: 13883092250@163.com。

基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目 (编号: CSTB2023NSCQ-MSX0014)。

优先出版: <https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20240418.1441.004>

(2024-04-22)

和琼脂糖凝胶电泳等 3 个步骤组成^[6]。由于 PCR 参数和时间基本固定,相对而言,DNA 提取方法的优化可能是降低基因分型成本和时长的关键途径。目前常用的 DNA 提取方法包括苯酚-氯仿提取、醇沉法、以前 2 种方法为基础的试剂盒法和煮沸法。前 3 种方法虽然能够得到较高纯度的样本 DNA,但步骤繁琐,试剂过多,成本偏高,不适于长期、大量、高频的基因分型工作;煮沸法虽然简单,但针对裂解液配方改进并获得有效结果的研究还少有报道^[7-8]。

本研究立足前期获得的授权发明专利^[9],通过 10 年不同类型转基因小鼠的基因分型实践,进一步对裂解液的配置和实验流程进行了优化,并以新型转录因子 Musculin 敲除(knock out, KO, -/-)和增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)敲入(knock in, KI, +/+)小鼠为例,采用相关领域常用的 2 种试剂盒法为对照,对基因分型结果进行比较研究,旨在为转基因小鼠基因分型提供 1 种更经济、便捷、准确的实用方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 所用转基因小鼠皆为 C57BL/6 背景: Musculin 杂合子(heterozygote, +/-)小鼠由美国 Antagen Pharmaceuticals 高闻达教授设计,委托北京百奥赛图基因生物技术有限公司研发;EGFP^{+/+}小鼠购自江苏华创信诺医药科技有限公司。所有小鼠均在无特定病原(specific pathogen free, SPF)级环境饲养。室内温度控制在 20~26 °C,湿度在 50%~60%,照明采取 12 h 昼夜交替方式。将成年 Musculin^{+/+}小鼠雌雄同笼交配(雌雄比例为 1:1 或 1:2),正常繁育获得 Musculin 野生型(wild type, WT, +/+)、Musculin^{+/+}和 Musculin^{-/-}小鼠;EGFP^{+/+}成年小鼠同样雌雄配对,正常繁育。所有仔鼠出生 21 d 后离乳,种鼠继续交配繁殖。另外,验证实验中作为对照的 C57BL/6 小鼠购自陆军军医大学大坪医院实验动物中心。本研究获陆军军医大学实验动物福利伦理委员会批准,动物伦理审批编号:AMUWEC20237369。

1.1.2 主要试剂 本研究所用 DNA 提取试剂来自上海生物工程公司,比较用 DNA 提取试剂盒购自北京天根公司和南京诺唯赞公司,PCR 试剂盒系美国 Promega 公司产品,PCR 引物由重庆柯柏公司合成,Musculin 一抗来自美国 Novus 公司,蛋白质印迹法(western blot, WB)相关试剂购自上海碧云天公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验设计 分别采集 Musculin^{+/+}、Musculin^{+/+}、Musculin^{-/-}、EGFP^{+/+}和 EGFP^{-/-}基因型小鼠各 5 只脚趾,长度约

3 mm,置于 1.5 mL 干净 EP 管内作为检测样本。利用本研究优化方案获得总 DNA,最终通过 PCR 验证样本对应基因型。将上述小鼠样本分别用北京天根公司和南京诺唯赞公司相关试剂盒进行基因分型,比较本研究优化方案与常用试剂盒法的异同;选择基因分型获得的 Musculin^{+/+}和 -/- 小鼠,常规取脾脏和肌肉组织,采用 WB 验证 Musculin^{-/-}小鼠中 Musculin 的表达;选择 EGFP 转基因小鼠和作为对照的 C57BL/6 野生型小鼠,常规取脾脏,采用荧光激活细胞分选(fluorescence activated cell sorting, FACS)法(即流式细胞分析)验证 EGFP 转基因小鼠中的荧光信号,最终确定本研究优化方案是否具有准确性和便捷性。

1.2.2 DNA 提取优化方案 预先配制 10 N NaOH 储存液和 0.5 M EDTA (2 mmol/L)工作液,4 °C 保存;DNA 提取时现配裂解液(工作液),配方为 100 μ L 0.025 N NaOH 工作液、160 μ L 0.5 M EDTA 工作液和 40 mL 超纯水;每个样本加入 180 μ L 裂解液,100 °C 30 min。降至室温后,置于 4 °C 保存。

1.2.3 北京天根公司试剂盒 DNA 提取方法 将离心管内小鼠脚趾剪碎制成细胞悬液,10 000 r/min 离心 1 min,弃上清,加入 200 μ L 缓冲液 GA,振荡至彻底悬浮;加入 20 μ L Proteinase K 溶液,混匀,56 °C 水浴振荡放置过夜,直至组织溶解;加入 200 μ L 缓冲液 GB,颠倒混匀,70 °C 放置 10 min,溶液变澄清,短暂离心去除管盖内壁水珠;加入 200 μ L 无水乙醇,充分震荡 15 s,可能出现絮状沉淀,简短离心去除管壁水珠;将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入 1 个吸附柱 CB3 (吸附柱放置收集管内),12 000 r/min 离心 30 s,倒掉废液,将吸附柱 CB3 放回收集管;向吸附柱 CB3 中加入 500 μ L 缓冲液 GD,12 000 r/min 离心 30 s,倒废液,吸附柱放回收集管;向吸附柱中加入 600 μ L 漂洗液 PW,12 000 r/min 离心 30 s,倒废液,吸附柱放回收集管;重复上一步操作,离心 2 min,将吸附柱置于室温放置数分钟,以晾干残余漂洗液;将吸附柱转入一个干净离心管中,向吸附膜的中间部位悬空滴加 50~200 μ L 洗脱缓冲液 TE,室温放置 2~5 min,12 000 r/min 离心 2 min,将溶液收集至离心管中;弃掉吸附柱,将 DNA 保存于 4 °C。

1.2.4 南京诺唯赞公司试剂盒 DNA 提取方法 该公司试剂盒 DNA 提取步骤与北京天根公司类似,只是所用溶剂与剂量有所区别:剪碎 1.5 mL 离心管内的小鼠脚趾,加入 230 μ L Buffer GA 和 20 μ L Proteinase K,混匀置 55 °C 水浴过夜至组织完全酶解;加入 250 μ L Buffer GB,涡旋混匀,70 °C 水浴 10 min;加入 180 μ L 无水乙醇吹打混匀;转移混合液至吸附柱内,12 000 r/min 离心 1 min;弃废液,加入 500 μ L Washing Buffer A 至吸附柱,12 000 r/min 离心 1 min;弃废液,加入 650 μ L Washing Buffer B 至吸附柱,12 000 r/min 离心 1 min;重复上一步操作;弃废液,空管离心 12 000 r/min,2 min;将吸附柱置于新的 EP 管,加入预热的 30~100 μ L 的 Elution Buffer 至吸附柱的膜中央,室温放置 3 min,12 000 r/min 离心 1 min;弃掉吸附柱,将 DNA 保存于 4 °C。

1.2.5 PCR 引物和目的条带 本研究根据前期工作基础^[10],采用野生型引物 P1、普通型引物 P2 和突变型引物 P3 鉴定

Musculin^{+/+}亲本后代,P1、P2置于同一PCR反应体系,P2、P3置于另一PCR反应体系,以获得更为清晰的基因分型结果。虽然EGFP^{+/+}亲本后代只有1种基因型(带绿色荧光),但稳妥起见,本研究仍采用EGFP野生型正向引物、EGFP野生型反向引物、EGFP突变型正向引物和EGFP突变型反向引物用于研究,前2种引物置于同一PCR反应体系,后两种引物置于另一PCR反应体系。待测基因引物序列及目的条带,见表1。

表1 待测基因引物序列及目的条带		
待测基因	引物序列	目的条带(bp)
Musculin野生型	上游P1:GGATTCCCTTGGGAAAGTGGTTTC	269
	下游P2:CCTGTCTTGTTACAGGCCCA	
Musculin突变型	上游P3:AGGACGGCACCTTCATCTAC	457
	下游P2:CCTGTCTTGTTACAGGCCCA	
EGFP野生型(无荧光)	上游:CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT	324
	下游:GTAGTGGAATTTCTAGCATCATCC	
EGFP突变型(有荧光)	上游:GCCACAAGTTCAGCGTGCCG	565
	下游:GTTGGGCTCTTGTCTCAGGGCG	

1.2.6 PCR反应体系及参数 Musculin转基因小鼠基因分型所用PCR反应体系为20 μL,包括:样本DNA模板1 μL,2×Taq Master Mix 10 μL,ddH₂O 8 μL,P2 0.5 μL,P1(或P3) 0.5 μL。其中,P1和P2用于鉴定 Musculin野生型条带,P2和P3用于鉴定 Musculin突变型条带。

EGFP转基因小鼠基因分型所用PCR反应体系也为20 μL,包括:样本DNA模板1 μL,2×Taq Master Mix 10 μL,ddH₂O 8 μL,EGFP野生型(或突变型)正向引物0.5 μL,EGFP野生型(或突变型)反向引物0.5 μL。其中EGFP野生型正、反向引物检测无荧光条带,EGFP突变型正、反向引物检测有荧光条带。

采用美国Bio-Rad公司C1 000™ Thermal Cycler型PCR仪完成PCR反应,相关参数,见表2。

1.2.7 琼脂糖凝胶电泳 制备2%琼脂糖凝胶,置于电泳缓冲液中,以Super Gel Red为显影剂,吸取各品系转基因小鼠通过不同方法获得的PCR产物9 μL加入电泳孔中,DNA marker为BM 2 000,电泳仪系北京六一产品,参数为180 V、20 min。电泳结束后,观察各品系转基因小鼠待测基因目的条带。

1.2.8 WB验证 Musculin^{-/-}小鼠 Musculin表达 选取通过本研究DNA提取优化方案获得的 Musculin^{+/+}和 Musculin^{-/-}小鼠,常规处死后取适量脾脏和肌肉组织,按WB试剂盒要求制备蛋白样品,完成十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳

(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)电泳、转膜、封闭、Musculin一抗孵育、二抗孵育、显影等步骤。明确本研究优化方案获得的基因分型结果能否得到WB实验验证。

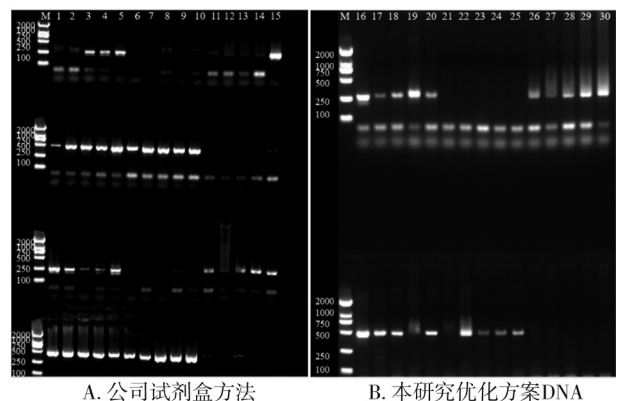
1.2.9 FACS验证EGFP^{+/+}小鼠荧光信号 选取通过本研究DNA提取优化方案获得的EGFP突变型小鼠和作为对照的C57BL/6野生型小鼠,常规处死后取适量脾脏组织,磨碎制备细胞悬液,裂解红细胞后离心去上清,PBS清洗1~2次,离心,重悬,最后通过美国ACEA NovoCyte流式细胞仪(选择FITC通道)检测样本是否带有EGFP信号,以此验证本研究优化方案获得的基因分型结果。

2 结果

2.1 Musculin转基因小鼠基因分型

结果显示,DNA样本上样量相同的条件下,针对 Musculin转基因小鼠+/+、+/-和-/-基因分型的各种方法得到的结果一致,而且条带清晰,易于分辨(图1)。图1A:上两排1~15号使用北京天根公司试剂盒,下两排1~5号使用南京诺唯赞试剂盒;图1B:16~30号使用本研究优化方案; Musculin^{+/+}:11~15号、26~30号, Musculin^{+/-}:1~5号、16~20号, Musculin^{-/-}:6~10号、21~25号。

其中,作为阳性对照的各公司试剂盒方法获得的目的条带(图1A)都比本研究优化方案(图1B)略亮,杂带也相对较多。



注:marker为BM2000

图1 不同方法鉴定 Musculin转基因小鼠基因型

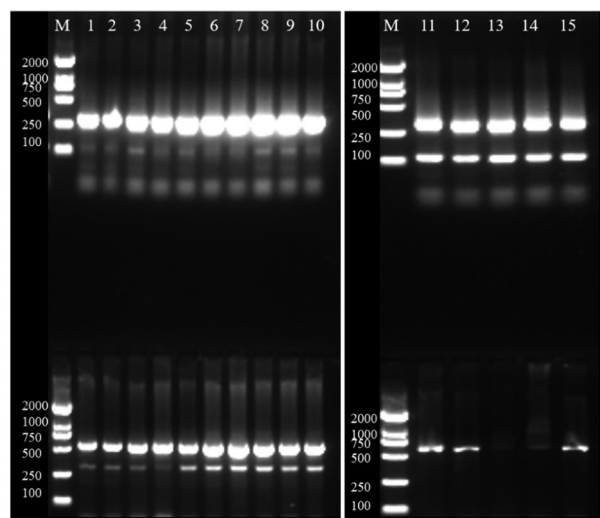
2.2 EGFP转基因小鼠基因分型

与 Musculin转基因小鼠基因分型结果相似,各种方法获得的目的条带清晰可辨,基因型鉴定准确(图2)。图2A:1~5号使用北京天根公司试剂盒,6~10号使用南京诺唯赞试剂盒;图2B:11~15号使用本研究优化方案。其中,各公司试剂

表2 各品系转基因小鼠基因分型PCR参数

转基因小鼠品系	预变性温度及时间	变性/退火/延伸温度、时间及循环数	最后延伸温度及时间	产物保存温度
Musculin	94 ℃ 3 min	94 ℃ 30 s, 65.5 ℃ 40 s, 72 ℃ 1 min, 35次	72 ℃ 5 min	4 ℃
EGFP	95 ℃ 5 min	95 ℃ 30 s, 58 ℃ 35 s, 72 ℃ 45 s, 35次	72 ℃ 3 min	4 ℃

盒方法获得的 2 条目的条带都比较宽亮,突变型均有杂带(图 2A);本研究优化方案获得的 2 条目的条带清晰且无杂带,突变型条带亮度略弱于野生型(图 2B)。



A. 公司试剂盒方法

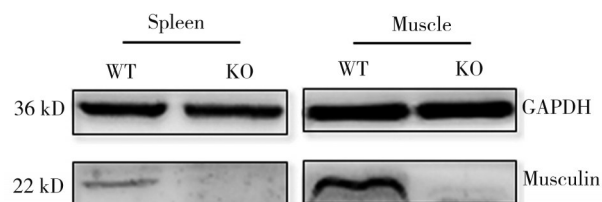
B. 本研究优化方案DNA

注:marker为BM2000

图2 不同方法鉴定EGFP转基因小鼠基因型

2.3 Musculin蛋白水平在 Musculin 转基因小鼠中的表达

WB 结果显示, Musculin^{-/-}小鼠脾脏和肌肉组织中无 Musculin 蛋白表达,而 Musculin^{+/+}小鼠表达 Musculin 正常(图 3)。GAPDH 在上述基因型小鼠中均有表达,说明 WB 实验体系稳定。

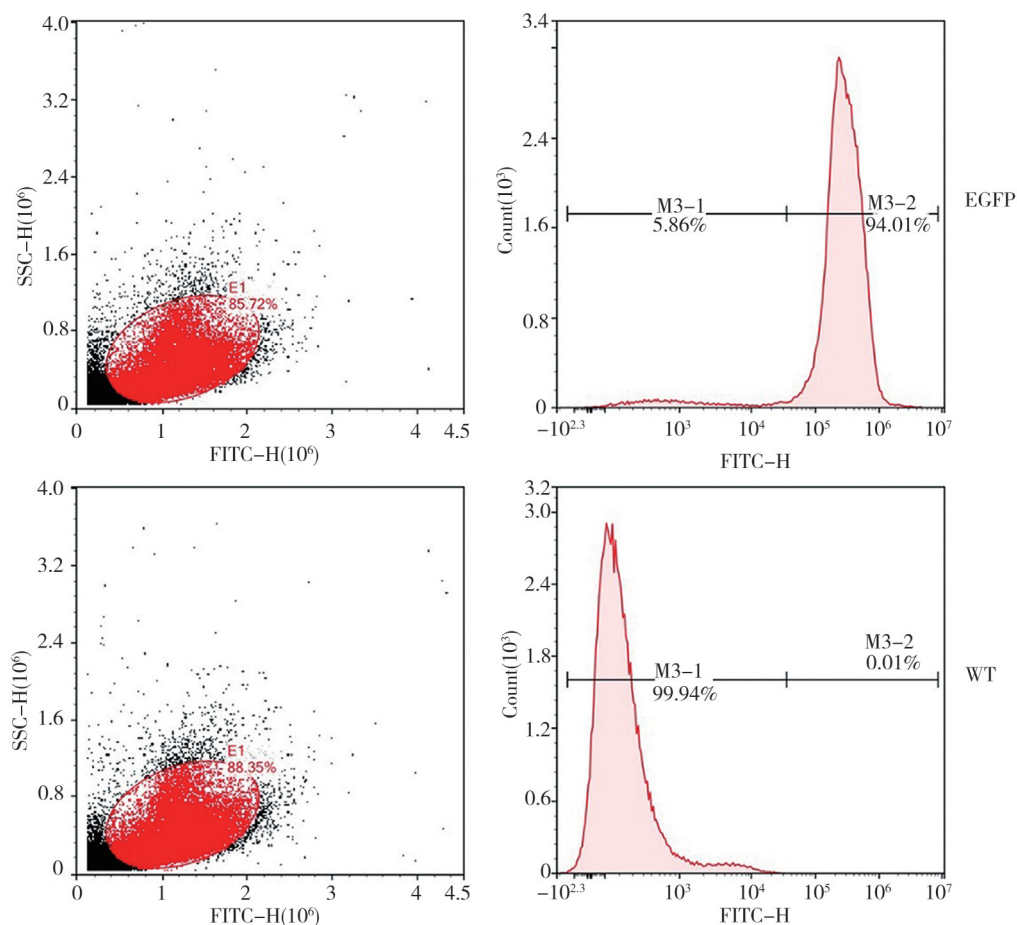


注:WT, Musculin^{+/+}; KO, Musculin^{-/-}; spleen:脾; Muscle:肌肉

图3 Musculin转基因小鼠脾脏和肌肉组织中 Musculin 的蛋白水平

2.4 EGFP 信号在 EGFP 转基因小鼠中的检测

FACS 结果显示,同等条件(主要为脾脏淋巴细胞)圈取目标细胞并设门,EGFP 转基因小鼠脾脏细胞中带有 EGFP 信号细胞比例为 94.01%,而作为对照的 C57BL/6 小鼠相应阳性细胞仅为 0.01%(图 4)。



注:EGFP 转基因小鼠,带荧光;WT, C57BL/6 野生型小鼠,无荧光

图4 EGFP 转基因小鼠脾脏 EGFP 信号检测

3 讨 论

随着医学和生命科学研究的深入,转基因小鼠在探讨分子机制、提升研究水平中的作用日益凸显,已成为高等院校、科研院所和研究型医院不可或缺的研究工具。例如,Musculin 转基因小鼠能够探讨新型转录因子 Musculin 在创伤和疾病中的作用^[11-13],尤其是与炎症和免疫的关系^[14-15],Musculin 敲除或条件性敲除研究能够直观展示 Musculin 在上述生命活动和医学实践中的作用机制,科学性强,EGFP 小鼠则为细胞追踪提供可能,促进组织发育过程和细胞治疗机制的探讨^[16-17]。可见,转基因小鼠品系不断增加、种群日益扩大的发展趋势已经形成。

随之而来的工作就是长期、大量、频繁地转基因小鼠基因分型,这是顺利开展后续科研工作的前提。基于转基因小鼠基因分型的科研需求将长期存在,操作简便、成本低廉、结果可靠的基因型鉴定方法将有效提升工作效率,势必受到广大科研人员的认可,并在科研市场占据明显优势。另一方面,由于基因分型实验涉及的 PCR 和琼脂糖凝胶电泳时长和参数与设备相关,相对固定,因此,基因分型的另一流程—DNA 提取方案的优化则成为实验室提升基因型鉴定效率的主要手段。

传统 DNA 提取法包括前述苯酚-氯仿提取、醇沉法等,步骤多、试剂杂、不安全,对于需长期大量的转基因小鼠基因型的鉴定工作而言,耗时耗力^[18-19]。科研市场上常用的基因分型试剂盒虽然使用方便,但流程偏长、价格偏高,对于经费有限且有转基因小鼠实验需求的实验室而言仍有改进空间。考虑到基因分型对 DNA 纯度要求相对不高,结合本团队前期工作和煮沸法相关报道^[9,20-21],本研究对 DNA 提取法的优先方案重点考虑配置合适的 DNA 裂解液和简化处理时间。

本研究以 Musculin 和 EGFP 转基因小鼠为例,并选取业内普遍使用、来自 2 家公司的基因分型试剂盒作为阳性对照^[22-23],开展基因分型效果对比实验。结果发现,3 种方法都能得到可靠结果:采用 2 种试剂盒的目的条带都比较亮但易有杂带,采用本研究优化方案的目的条带亮度略弱,但无杂带。前者出现杂带的原因可能是提取 DNA 的过程中没有加入 RNase 溶液以去除 RNA 干扰,后者条带暗可能

是由于煮沸法本身提取的纯度低和 DNA 量少的缘故^[24],但并不影响最终结果。另外,在上样量一致的情况下,图 1 中 1~2 泳道条带(试剂盒法)相对弱于 16~17 泳道(本研究优化方案),排除系统误差,可能与试剂盒法和本研究优化方案在总 DNA 获取中采取不同的处理方法有关,但不会影响基因分型结果判读。这主要是因为用于基因分型的常规 PCR 本身属于定性结果,有条带即可证明阳性,而且该结果还反证本研究优化方案更精准、更易判读。图 2 中 11~15 泳道多余明带可能与其样本是 EGFP 转基因小鼠有关。该品系改造过程中,可能存在基因敲入和修饰等操作,有可能发生其他基因错配,而鉴定该品系的阳性条带是图 2 中下排泳道,即代表有荧光条带的 565Kb 条带,因此部分样本上排多余明带不会影响基因型鉴定结果。3 种方法中,采用本研究优化方案的 DNA 提取时间最短,仅仅需 30 min,而采用 2 种试剂盒均需消化过夜。而且,本研究优化方案针对裂解液的配置方法简单,反应次数(检测样本数量)远多于 2 种试剂盒,从而大幅度降低了试剂成本。但是,运用本研究优化方案时要注意试剂配置时间,若长时间未使用(3 个月以上)需重新配置,否则会影响基因分型的准确性。需要说明的是,本研究优化方案在定性鉴定转基因小鼠基因型方面优势明显,但对于样本目的基因丰度有特别要求(例如目的基因丰度特别低的样本)的检测,仍建议采用更精确的定量检测方法,例如实时定量 PCR(real-time quantitative PCR, qPCR)。

本研究涉及的 DNA 提取优化方案是经过十余年实践、立足前期工作基础并加以改进而获得,可为转基因小鼠基因分型提供 1 种经济、简单、可靠的 DNA 提取技术,具有较好的应用和推广价值。但是,该研究还需在样本例数、转基因品系和动物种类方面加以拓展,以进一步证实其广泛性和实用性。

参 考 文 献

- [1] 张佳慧, 阎 晗, 胡德庆. 利用 CRISPR/Cas9 技术构建 Aff4 基因敲除 B16-F10 细胞系及 AFF4 的多克隆抗体制备[J]. 天津医科大学学报, 2023, 29(4): 372-378.
Zhang JH, Yan H, Hu DQ. Aff4 gene knockout stable B16-F10 cell line generation with CRISPR/Cas9 system and anti-AFF4 polyclonal antibody preparation[J]. J Tianjin Med Univ, 2023, 29(4): 372-378.
- [2] 姚晓倩, 方 媛, 吴继红, 等. 表达视网膜 Müller 细胞的转基因小鼠基因鉴定[J]. 中国眼耳鼻喉科杂志, 2019, 19(5): 321-324.

- Yao XQ, Fang Y, Wu JH, et al. Genetic identification of transgenic mice expressing retinal Müller cells[J]. Chin J Ophthalmol Otorhinolaryngol, 2019, 19(5):321-324.
- [3] Reid AL, Alexander MS. Mouse genotyping in an hour[J]. Muscle Nerve, 2020, 61(6):679-680.
- [4] Vuong S, Delgado-Olguin P. Mouse genotyping[J]. Methods Mol Biol, 2018, 1752:1-9.
- [5] Yang JQ, DeVore AN, Fu DA, et al. Rapid and precise genotyping of transgene zygosity in mice using an allele-specific method[J]. Life Sci Alliance, 2023, 6(6):e202201729.
- [6] 杨继山, 潘庆杰, 董 晓. 转基因动物检测方法的研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2010, 12(3):45-49.
- Yang JS, Pan QJ, Dong X. Research progress in detection technique for transgenic animals[J]. J Agric Sci Technol, 2010, 12(3):45-49.
- [7] 刘魁苏, 王辰飞, 岳秉飞, 等. 遗传修饰小鼠模型基因型鉴定技术要点介绍[J]. 实验动物科学, 2021, 38(1):74-78.
- Liu SS, Wang CF, Yue BF, et al. The key points of genotype identification in genetically modified mice model[J]. Lab Anim Sci, 2021, 38(1):74-78.
- [8] 汤业珍, 张 炜, 马晓霞, 等. 基因敲除小鼠不同部位提取 DNA 方法的比较[J]. 科学技术创新, 2019(11):43-44.
- Tang YZ, Zhang W, Ma XX, et al. Comparison of DNA extraction methods in different parts of knockout mice[J]. Sci Technol Innov, 2019(11):43-44.
- [9] 严 军, 高闻达, 蒋建新, 等. 适用于实验小鼠基因分型的鼠尾 DNA 提取试剂盒及其应用:CN102329791A[P]. 2012-01-25.
- Jun Y, Gao W, Jiang J, et al. Mouse-tail DNA (deoxyribose nucleic acid) extraction kit applicable to the genotype of laboratory mouse and application thereof:CN102329791A[P]. 2012-01-25.
- [10] 唐婉琦, 杨 雪, 张 醇, 等. 利用改进的聚合酶链反应方法鉴定芳香烃受体敲除小鼠[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(16):1761-1763.
- Tang WQ, Yang X, Zhang C, et al. Identification of aromatic hydrocarbon receptor knockout mice by improved polymerase chain reaction method[J]. J Third Mil Med Univ, 2014, 36(16):1761-1763.
- [11] Yan J, Yu J, Liu K, et al. The pathogenic roles of IL-22 in colitis: its transcription regulation by muscudin in T helper subsets and innate lymphoid cells[J]. Front Immunol, 2021, 12:758730.
- [12] Yan J, Yu J, Yuan SZ, et al. Muscudin is highly enriched in Th17 and IL-22-producing ILC3s and restrains pro-inflammatory cytokines in murine colitis[J]. Eur J Immunol, 2021, 51(4):995-998.
- [13] 余 静, 唐婉琦, 杨 雪, 等. Muscudin KO-Foxp3-GFPKI 小鼠模型的制备及在严重创伤介导 Treg-Th17 失衡中的初步应用[J]. 第三军医大学学报, 2018, 40(16):1435-1443.
- Yu J, Tang WQ, Yang X, et al. Establishment of a transgenic mouse model with muscudin knockout and Foxp3-GFP knockin and role of muscudin in severe trauma-induced Treg-Th17 imbalance[J]. J Third Mil Med Univ, 2018, 40(16):1435-1443.
- [14] 张雷廷, 夏 雨, 余 静, 等. Muscudin 影响小鼠骨髓来源树突状细胞生物学功能的初步研究[J]. 陆军军医大学学报, 2023, 45(6):539-546.
- Zhang LT, Xia Y, Yu J, et al. Effect of Muscudin on biological function of mouse bone marrow-derived dendritic cells[J]. J Army Med Univ, 2023, 45(6):539-546.
- [15] Yu J, Liu YJ, Zhang W, et al. Muscudin deficiency aggravates colonic injury and inflammation in mice with inflammatory bowel disease [J]. Inflammation, 2020, 43(4):1455-1463.
- [16] Wang CL, Yu BC, Li MY, et al. Two groups of eGFP-expressing neurons with distinct characteristics in the neocortex of GIN mice[J]. Neuroscience, 2019, 404:268-281.
- [17] Winkler F, Herz K, Rieck S, et al. PECAM/eGFP transgenic mice for monitoring of angiogenesis in health and disease[J]. Sci Rep, 2018, 8(1):17582.
- [18] 何 建, 靳 娟, 辛有全, 等. 青藏高原鼠疫自然疫源地鼠疫菌 CRISPR 基因分型研究[J]. 中华地方病学杂志, 2022, 41(9):703-708.
- He J, Jin J, Xin YQ, et al. CRISPR genotyping of *Yersinia pestis* in the plague natural foci of Qinghai-Tibet Plateau[J]. Chin J Endem, 2022, 41(9):703-708.
- [19] 何霞霞, 徐 莹, 徐 琛. PTP1B 基因敲除小鼠的繁育及基因鉴定[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(24):14907-14908.
- He FX, Xu Y, Xu C. Propagation of *PTP1B* gene knockout mice and its genotype identification[J]. J Anhui Agric Sci, 2011, 39(24):14907-14908.
- [20] 闫清伟. 一种鉴定 APP/PS1 双转基因小鼠基因型的简捷方法研究[J]. 实验室科学, 2018, 21(2):8-10, 14.
- Yan QW. Research of a simplified method for identification of APP/PS1 double transgenic mice[J]. Lab Sci, 2018, 21(2):8-10, 14.
- [21] 于东明, 王思谦, 范媛媛, 等. 煮沸裂解法快速提取 Tg2576 小鼠 DNA[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2011, 14(24):48-50.
- Yu DM, Wang SQ, Fan YY, et al. Rapid extraction of DNA from Tg2576 mice by boiling pyrolysis[J]. Chin J Pract Nerv Dis, 2011, 14(24):48-50.
- [22] 王闽蓉, 张 峰, 鲁利群. Nrf2 敲除小鼠模型的构建与基因型鉴定[J]. 基础医学与临床, 2023, 43(3):415-418.
- Wang MR, Zhang F, Lu LQ. Construction and genotype identification of Nrf2 knockout mouse model[J]. Basic Clin Med, 2023, 43(3):415-418.
- [23] 谭 龙, 李海强, 李宜波, 等. APP/PS1 双转基因小鼠的繁育、鉴定及评价[J]. 中国应用生理学杂志, 2018, 34(2):111-114, 195.
- Tan L, Li HQ, Li YB, et al. Reproduction, genotype identification and evaluation of APP/PS1 transgenic mice[J]. Chin J Appl Physiol, 2018, 34(2):111-114, 195.
- [24] 刘魁苏, 左 琴, 周舒雅, 等. 模式小鼠总 DNA 三种提取方法比较[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(7):45-50.
- Liu SS, Zuo Q, Zhou SY, et al. Comparison of three methods for total DNA extraction from mouse models[J]. Chin J Comp Med, 2014, 24(7):45-50.

(责任编辑:周一青)