

## 技术方法

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2012.04.010

# 一管酒精法提取转基因小鼠胚胎组织基因组的实验方法及应用

翁敏杰,杜建霖,蒲荻,张进,李晓群,刘亚杰,余强

(重庆医科大学附属第二医院心血管内科,重庆 400010)

**【摘要】**目的:优化提取基因组的方法,建立高效、简便、快速提取基因组 DNA 的方法,用于大批量转基因小鼠鉴定。方法:用一管酒精基因组 DNA 抽提法抽提基因组 DNA。结果:经过分光光度法检测基因组 DNA 浓度、纯度及电泳分析 DNA 质量,显示一管酒精抽提法提取的基因组与经典酚/氯仿提取法提取的基因组产量、纯度及质量没有明显差别;酶切全基因组后,2 种方法获得的基因组都可以被酶完全切开;两者模板都能成功应用 PCR 扩增来鉴定基因敲入小鼠并可应用于基因组测序及 Real-time PCR 检测基因敲入小鼠中外源基因并鉴定其相对拷贝数。结论:一管酒精基因组抽提法得到的 DNA 质量可靠,可高效、简便、快速鉴定转基因小鼠及进行基因组 DNA 酶切、测序、Real-time PCR 等后续实验。

【关键词】T 盒转录因子 18; 基因敲入; 基因组 DNA

【中国图书分类法分类号】R394.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-02-11

## Protocol and application of ethanol method to extract genomic DNA from transgenic mouse embryos

WENG Minjie, DU Jianlin, PU Di, ZHANG Jin, LI Xiaoqun, LIU Yajie, SHE Qiang

(Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

**【Abstract】***Objective:* To optimize the method of genome extraction and to establish an effective, convenient and fast research platform which could identify and screen the transgenic mice on a large scale. *Methods:* The Genomic DNA was extracted by using the ethanol method. *Results:* The results of spectrophotometry and gel electrophoresis revealed that the concentration, purity and quality of the genomic DNA extracted through the ethanol method had no obvious difference compared with that extracted through the classical phenol/chloroform method. The genomic DNA obtained by the two extraction protocols could both be digested completely and able to identify the knock-in mice by PCR amplification. Both the templates were well used in gene sequencing and Real-time PCR to detect the exogenous gene and the relative copy numbers. *Conclusion:* The DNA extracted through the ethanol method was superior in quality and had stable and reliable test results in transgenic mice identifying, digestion, gene sequencing and Real-time PCR amplification.

【Key words】T-box transcription factor 18; knock-in; genomic DNA

目前,基因工程小鼠在认识基因的功能、建立人类遗传性疾病的动物模型方面被认为是最佳动物模型<sup>[1]</sup>。小鼠的基因组改造技术已非常成熟,并已广泛应用<sup>[2~6]</sup>;小鼠生理及发育过程与人类相似,小鼠基因组和人类具有 90% 同源性,所以复制人类疾病的小鼠模型基本上可真实模拟人类的生理现象和疾

病的病理过程。在整体动物表型水平,研究胚胎心脏发育和心肌损伤修复过程的研究中,基因工程小鼠是目前最流行和有效功能基因组研究手段<sup>[7~12]</sup>。应用基因谱系示踪技术研究心脏祖细胞的分化命运,更是关键技术手段<sup>[13,14]</sup>。但是,基因工程小鼠的品系繁殖及基因型鉴定需要成熟的技术平台。如何快速大批量的鉴定筛选出 Tbx18-Cre 基因敲入杂合子小鼠,是建立双杂合基因谱系示踪模型的关键技术和保障。经典酚/氯仿抽提基因组 DNA 法<sup>[15]</sup>,具有毒性、操作时间长,更换 EP 管等缺点,不利于大样本的转基因小鼠的筛选和鉴定。2006 年 Daniel R. Storm 等报道一种更简便、高效的

作者介绍:翁敏杰(1987-),男,硕士,

研究方向:心肌再生。

通信作者:余强,男,教授,Email:qshe98@hotmail.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81100088,30971213);

重庆市卫生局重点资助项目(编号:20090113);重庆医科大学校级重点资助项目(编号:XBZD.201010)。

鉴定转基因小鼠的方法<sup>[16]</sup>，但是该方法是否能应用于转基因胚胎组织的鉴定，目前还未见文献报道。本研究将该方法应用于转基因小鼠胚胎组织基因组的提取及鉴定，并对其部分条件进行了优化。

## 1 材料与方法

### 1.1 一管酒精基因组提取法

参考及改进 Daniel 等提取小鼠尾巴组织基因组的方法（在 1.5 ml EP 管中加 2 mm 小鼠尾巴，用 300  $\mu$ l 消化液及 0.4 mg 蛋白酶 K 55 ℃ 消化过夜；加入 1 ml 无水乙醇，充分混匀；16 000  $\times$  g 离心 30 min，倒去上清；加入 1 ml 75% 乙醇，充分洗涤，16 000  $\times$  g 离心 20 min；倒去乙醇，干燥后立即加入 300  $\mu$ l TE 溶液溶解 DNA，55 ℃ 开盖蒸发乙醇 2 h，将 DNA 储存在 4 ℃ 或 -20 ℃）<sup>[16]</sup>，在体视显微镜下解剖分离小鼠胚胎，取 1 ~ 2 mm 尾巴或卵黄囊组织，按以下步骤提取基因组 DNA：用 1.5 ml EP 管保存样本，标记编号；在 EP 管中加入 500  $\mu$ l 消化液（5 mmol/L EDTA pH 8.0, 200 mmol/L NaCl, 100 mmol/L Tris pH 8.0, 0.2% SDS）和 0.2 ~ 0.3 mg 的蛋白酶 K (Roche) 55 ℃ 过夜消化；加入 1 ml 无水乙醇，混匀，13 000  $\times$  g 离心 30 min；弃上清，加入 1 ml 75% 乙醇，漩涡震荡 15 s，充分洗涤，13 000  $\times$  g 离心 20 min；弃上清，加入 300  $\mu$ l TE 溶液溶解 DNA，55 ℃ 开盖蒸发乙醇 1 ~ 2 h，提取的 DNA 储存于 4 ℃ 或 -20 ℃。

### 1.2 经典酚/氯仿基因组提取法，基因组测序及 Real-time PCR

酚/氯仿抽提基因组法参考相关文献<sup>[15]</sup>；基因组 DNA 测序由 Invitrogen 公司完成；Real-time PCR 使用 Fast start universal SYBR green master (roche)，按照厂家说明完成。

## 2 结果

### 2.1 一管酒精基因组提取法和经典酚/氯仿提取法基因组产量及纯度相同

在体式显微镜下解剖分离小鼠胚胎，每只胚胎小鼠均取相同长度的尾巴组织 2 段装入 2 管，其中一管用一管酒精法提取基因组，另一管则用经典酚/氯仿提取法提取基因组，分别用紫外分光光度计检测 2 管基因组的浓度，随机抽取一管酒精法与经典酚/氯仿提取法提取的基因组样本各 100 个，测取其浓度，显示两法所得基因组产量无明显差异 ( $P = 0.1163$ ，即  $P > 0.05$ )。DNA OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比率是判定 DNA 纯度的常用方法，一般为 1.8 ~ 2.2，若小于 1.6，表明有蛋白质、酚等污染。随机抽取一管酒精法与经典酚/氯仿提取法提取的基因组样本各 100 个，检测 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比率  $< 1.6$  的比例。酚/氯仿提取法 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比率  $< 1.6$  的比例为 8% (8 例/100 例)，一管酒精法 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比率  $< 1.6$  的比例为 6% (6 例/100 例)，两者纯度没有明显差别 ( $P = 0.4938$ )。

### 2.2 凝胶电泳鉴定基因组 DNA 的质量

图 1 显示一管酒精抽提法提取的基因组与经典酚/氯仿提取法提取的基因组质量没有明显差别，图 1(a) 1 ~ 6 为用酚/氯仿提取法提取的基因组，9 ~ 17 为用酒精抽提法提取的基因组。图 1(b) 示一管酒精抽提法提取的基因组与经典酚/氯仿提取法提取的基因组模板用于 PCR 反应后所得结果相同，图 1(b) 1、7、11、15 为一管酒精抽提法提取的基因组的 PCR 结果，图 1(b) 2、8、12、16 为经典酚/氯仿提取法提取的基因组 PCR 结果，两者模板用于 PCR 结果完全一致，说明一管酒精抽提法提取的基因组用于 PCR 鉴定转基因小鼠胚胎，结果可靠，其中图 1(b) 中最下方的条带为 PCR 试剂中的染料所致，对实验结果无影响。

### 2.3 酶切鉴定基因组 DNA 的质量

图 1(c) 显示，用 EcoR I + BamH I 限制性核酸内切酶酶切全基因组后，2 种方法获得的基因组都可以被完全切开。说明一管酒精抽提法提取的基因组还可以用于相关后续实验，如酶切电泳、Southern 杂交等。因此，一管酒精抽提法与经典酚/氯仿提取法提取的基因组质量基本一致。

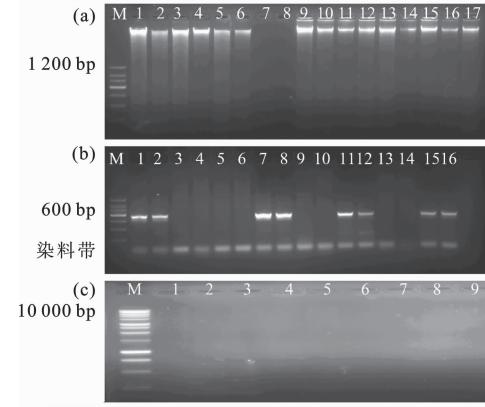


图 1 基因组 DNA、PCR 产物、酶切凝胶电泳图

Fig. 1 Gelelectrophoresis of genomic DNA, PCR amplification and enzyme digestion

### 2.4 一管酒精抽提基因组用于 PCR 鉴定转基因小鼠

应用一管酒精抽提基因组法，成功在子代小鼠中筛选、鉴定出 Tbx18-Cre 基因敲入杂合子小鼠和 Rosa26-EYFP、Rosa26-LacZ 杂合子条件性 Cre 报告系统小鼠。Tbx18-Cre、Rosa26-EYFP、Rosa26-LacZ 阳性小鼠 PCR 分别扩增出约 400、320、340 bp 的目的条带；图 2(a) 中 1、7、11、15 及 2、8、12、16 分别为用一管酒精基因组抽提法及经典酚/氯仿提取法所得基因组鉴定得到的 Tbx18-Cre 杂合子小鼠 PCR 凝胶电泳图，图 2(b) 中 1、5、11、15 及 2、6、12、16 分别为用一管酒精基因组抽提法及经典酚/氯仿提取法所得基因组鉴定得到的 Rosa26-EYFP 杂合子小鼠 PCR 电泳鉴定图，图 2(c) 中 1、5、11、13 及 2、6、12、14 分别为前法及后法鉴定所得的 Rosa26-LacZ 杂合子小鼠 PCR 电泳图。其中图 2(a)、2(b) 及 2(c) 中最下方的电泳条带为 PCR 试剂中的染料所致，对实验结果无影

响。一管酒精基因组抽提法所得的样本可以有效地用于转基因小鼠的鉴定，并与经典酚/氯仿提取法所得基因组鉴定结果一致。

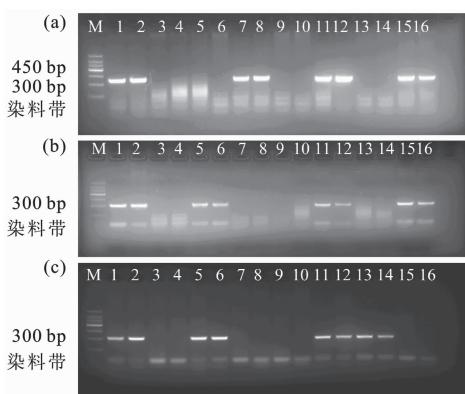
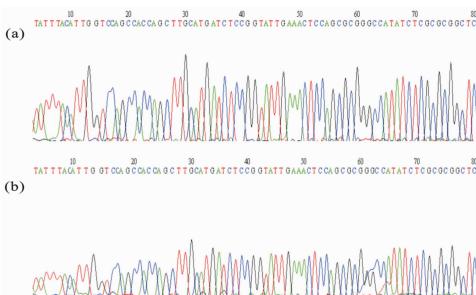


图 2 Tbx18-Cre、Rosa26-EYFP、Rosa26-LacZ 小鼠 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of Tbx18-Cre, Rosa26-EYFP and Rosa26-LacZ mice by PCR

## 2.5 一管酒精抽提基因组用于基因组测序

一管酒精抽提基因组法所提取的基因组可进一步用于基因组测序。2 法各自抽提 Tbx18-Cre 基因敲入小鼠基因组 DNA, 由 Invitrogen 公司完成测序。图 3(a)为用一管酒精抽提基因组法所得基因组 DNA 测序所得的部分 Cre 序列, 图 3(b)为用经典酚/氯仿提取法所得的基因组 DNA 测序所得的相同部分 Cre 序列, 两者结果完全一致。因此一管酒精基因组抽提法所得的样本可以准确地应用于基因组测序。



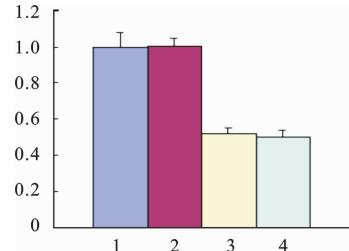
(a) 一管酒精抽提基因组法所得基因组 DNA 测序所得的部分 Cre 序列; (b) 经典酚/氯仿提取法所得的基因组 DNA 测序所得的部分 Cre 序列

Fig. 3 Sequencing of part of Cre in Tbx18-Cre knock-in mice

## 2.6 一管酒精抽提基因组可用于进一步完成 Real-time PCR 的研究

一管酒精基因组抽提法所得的基因组 DNA 可进一步用于 Real-time PCR, 设计内参基因及目的基因的引物序列, 按照 BioRad C1000 仪器说明, 进行 Real-time PCR 反应。Tbx18-Cre 基因敲入雌雄鼠近亲交配后将得到 3 种基因型小鼠: Tbx18-Cre 基因敲入小鼠, Tbx18 Cre-Cre 基因敲入小鼠, 野生型小鼠。图 4 为 2 法抽提所得基因组 DNA 用于 Real-time PCR 后所得

的 Cre 基因相对拷贝数结果, 其中 1、3 为一管酒精基因组抽提法所得, 2、4 为经典酚/氯仿提取法所得。2 法所得的 Cre 基因相对拷贝数基本一致, 且不同基因型小鼠中 Cre 基因拷贝数存在确切差异, Tbx18 Cre-Cre 基因敲入小鼠中 Cre 的相对拷贝数近似于 Tbx18-Cre 基因敲入小鼠的 2 倍, 2 法所得基因组样本扩增曲线均一, 引物融解曲线均为单峰(图略)。因此, 一管酒精抽提基因组法可用于进一步完成 Real-time PCR, 并与经典酚/氯仿提取法所得实验结果一致。



1、3. 一管酒精基因组抽提法所得基因组 Cre 基因相对拷贝数;

2、4. 经典酚/氯仿提取法所得基因组 Cre 基因相对拷贝数

图 4 不同基因型小鼠 Cre 基因相对拷贝数差异

Fig. 4 Difference of relative copy numbers of Cre in mice with different genotypes

## 3 讨 论

经典酚/氯仿抽提基因组 PCR 鉴定法, 具有以下缺点: 多次更换 EP 管、枪头; 应用酚/氯仿等对人体有害物质, 操作时间较长等。这些缺点不利于大样本转基因小鼠的筛选、鉴定。有研究者尝试建立 HotSHOT<sup>[17]</sup> 小鼠基因组抽提法, 可以快速、高效、大样本的进行转基因小鼠的鉴定, 但是该方法所提取的基因组浓度较低、纯度不高, 且不能做酶切及 Southern 杂交等后续实验。我们的研究需要建立大样本转基因小鼠的鉴定平台, 才能保证后续实验的进行。

因此, 借鉴 Daniel 等的抽提基因组的方法, 建立一管酒精抽提基因组法, 经过大样本转基因小鼠鉴定结果证实, 该方法相比经典酚/氯仿抽提基因组 PCR 鉴定法, 具有以下优点: 中途不更换 EP 管, 避免样品处理错误; 抽提过程不用酚/氯仿, 避免其对人体的伤害; 操作过程简单, 操作时间短, 特别适用于大样本的转基因小鼠的鉴定。总之, 一管酒精抽提基因组简便、便宜、快速, 同时可以操作大样本转基因小鼠的鉴定工作, 且基因组质量可靠, 与经典基因组提取法提取基因组质量相同, 并可进一步满足酶切、测序、Real-time PCR 等后续实验要求, 是一种值得推广的实验方法。主要改良为: (1) 将原应用

于新生及成年小鼠组织的方法更多地应用转基因胚胎组织,结合胚胎组织的相关特点,进行了条件优化。(2)本实验发现胚胎组织胶原较多,如果加入太多组织,会导致组织消化不充分,导致胶原聚合包裹基因组 DNA,影响提取质量。因此,必须减少胚胎组织的量,一般 1~2 mm 的胚胎小鼠尾巴组织已经足够。(3)蛋白酶 K 的浓度调整,对于胚胎组织,由于其胶原含量丰富,因此蛋白酶 K 的量可适当增加,但一般 1~2 mm 的尾巴组织中加入 0.2~0.3 mg 蛋白酶 K 已足够。(4)离心速度和时间,离心速度可适当降低,一般  $13\ 000 \times g$  即可,离心速度第 1 次为 30 min,第 2 次为 20 min。(5)加盖蒸发乙醇时间。乙醇蒸发时间也可适当减少,一般 55 ℃ 环境中,1 h 的蒸发时间已足够,蒸发完全后可短暂漩涡震荡,短暂低速离心后即可应用于后续实验。通过反复大样本的实验验证,一管酒精抽提基因组的方法是一种简便、高效的基因组抽提方法。利用该技术平台鉴定的大批 Tbx18-Cre 基因敲入小鼠和报告系统小鼠,结果符合孟德尔遗传规律,未发现基因突变,为建立 Tbx18-Cre/Rosa26-EYFP/LacZ 双杂合基因敲入小鼠模型,提供了最基本、最关键的实验材料保障。通过反复实践和大样本验证,一管酒精基因组提取法基因组质量良好,具有较多的优点。利用该方法,我们成功建立简便、快速的大样本基因敲入小鼠筛选、鉴定研究平台,并繁殖、鉴定出足够的 Tbx18-Cre 基因敲入小鼠和条件性 Cre 报告系统小鼠 Rosa26-EYFP 和 Rosa26-LacZ,为在体内、外示踪观察 Tbx18<sup>+</sup> 心外膜祖细胞多潜能分化命运提供了实验动物。

## 参 考 文 献

- [1] Soriano P. Generalized LacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain [J]. *Nature Genet*, 1999, 21(1): 70~71.
- [2] Fu Y, Maye P. Engineering BAC reporter gene constructs for mouse transgenesis [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 693(10): 163~179.
- [3] Glaser S, Anastassiadis K, Stewart A F. Current issues in mouse ge-

- nome engineering [J]. *Nat Genet*, 2005, 37(11): 1187~1193.
- [4] Liu C, Szurek P F, Yu Y E. MICER targeting vectors for manipulating the mouse genome [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 693(10): 245~256.
- [5] Ruf S, Symmons O, Uslu V V, et al. Large-scale analysis of the regulatory architecture of the mouse genome with a transposon-associated sensor [J]. *Nat Genet*, 2011, 43(4): 379~386.
- [6] Suzuki E, Nakayama M. VCre/VloxP and SCre/SloxP: new site-specific recombination systems for genome engineering [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(8): e49.
- [7] Bu L, Jiang X, Martin-Puig S, et al. Human ISL1 heart progenitors generate diverse Multipotent cardiovascular cell lineages [J]. *Nature*, 2009, 460(7251): 113~117.
- [8] Zhou B, Ma Q, Hu Y W, et al. Genetic fate mapping demonstrates contribution of epicardium-derived cells to the annulus fibrosis of the mammalian heart [J]. *Developmental Biology*, 2010, 338(2): 251~261.
- [9] Cai C L, Martin J C, Sun Y, et al. A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells [J]. *Nature*, 2008, 454(7200): 104~108.
- [10] Domian I J, Chiravuri M, van der Meer P, et al. Generation of functional ventricular heart muscle from mouse ventricular progenitor cells [J]. *Science*, 2009, 326(5951): 426~429.
- [11] Genta N, Hideki U, Mizue T, et al. Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells [J]. *Circulation*, 2008, 118(5): 498~506.
- [12] Wiese C, Grieskamp T, Airik R, et al. Formation of the sinus node head and differentiation of sinus node myocardium are independently regulated by Tbx18 and Tbx3 [J]. *Circulation Research*, 2009, 104(3): 388~397.
- [13] Christoffels V M, Grieskamp T, Norden J, et al. Tbx18 and the fate of epicardial progenitors [J]. *Nature*, 2009, 458(7240): e8~e9.
- [14] Moretti A, Bellin M, Jung C B, et al. Mouse and human induced pluripotent stem cells as a source for multipotent Isl1<sup>+</sup> cardiovascular progenitors [J]. *FASEB J*, 2010, 24(3): 700~711.
- [15] 高 翔. 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 [J]. 中国细胞生物学学报, 2010, 32(2): 193~194.
- Gao X. Dissertations of gene function research and disease model of mice (second): strain administration and genotype identification of gene engineering mice [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2010, 32(2): 193~194.
- [16] Wang Z S, Daniel R. Extraction of DNA from mouse tails [J]. *Bio-Techniques*, 2006, 41(4): 410~412.
- [17] Truett G E, Heeger P, Mynatt R L, et al. Preparation of PCR quality mouse genomic DNA with Hot Sodium Hydroxide and Tris (HotSHOT) [J]. *BioTechniques*, 2000, 29(1): 52~54.

(责任编辑:冉明会)