

ENU 诱导获得一种短尾小鼠及其突变基因的初步定位

邵义祥^{①②} 陈兵^① 张成香^① 陈春波^① 薛整风^① 李厚达^①

(^①扬州大学比较医学中心 扬州 225009 ;^②南通医学院 南通 226001)

摘要 :用一种化学诱变剂 ENU(乙酰基亚硝基脲)腹腔注射 30 只 8~10 周龄 C57BL/6J 简称 B6) 雄鼠(G_0 代) 6 周后与同品系正常母鼠配种繁殖后代(G_1 代) 小鼠 351 只。对其后代进行筛选获得一种可遗传的显性短尾突变小鼠。为了定位该突变基因,运用平均分布于 B6 和 DBA/2J 简称 D2) 小鼠常染色体而在这两者间又有差异的 39 个微卫星对突变小鼠的 $D2 \times B6 F_1$ 代短尾突变小鼠回交 D2 得到的有短尾表型的 [$B6 \times D2 F_1 \times D2$] F_2 代小鼠进行基因组扫描。反向运用经典的位置候选基因法,将短尾突变基因定位于 17 号染色体,与 D17Mit33 的 LOD 值为 9.08。选用该染色体上与短尾表型相关基因 *Brachyury* (*T*) 最近的微卫星 D17Mit143 引物扩增,在 109 只 F_2 代短尾小鼠中未发生一例交换,表明 *Brachyury* 基因是本例短尾突变强有力的候选基因。

关键词 :ENU; 微卫星; 基因定位; *Brachyury* (*T*); 小鼠

中图分类号 :Q812 文献标识码 :A 文章编号 :0250-3263(2005)01-08-06

Generating a Tail-short Mouse Using ENU Mutagenesis and Mapping of the Mutant Gene

SHAO Yi-Xiang^{①②} CHEN Bing^① ZHANG Cheng-Xiang^① CHEN Chun-Bo^①
XUE Zheng-Feng^① LI Hou-Da^①

(^①Comparative Medicine Center of Yangzhou University, Yangzhou 225009 ;

^②Nantong Medical College, Nantong 226001, China)

Abstract :Thirty male C57BL/6J (B6) mice (G_0) were injected intraperitoneally with the chemical mutagen, N-ethyl-N-nitrosourea (ENU), and then let them mate with normal (non-mutagenized) B6 female mice to reproduce three hundred and fifty-one G_1 mice. An inherited dominant tail-short phenotype mouse was found among the G_1 mice. To determine the position of the mutant gene on the chromosome, 39 microsatellite markers, which were equally distributed throughout the autosome and were polymorphic between B6 and DBA/2J (D2), were used to scan genome of the F_2 tail-short mice, which were obtained by back crossbreeding F_1 ($B6 \times D2$) with D2. By conversely using the classical method of positional candidate gene, results of linkage analysis showed that the tail-short mutant gene was on mouse chromosome 17 and the log odds score (LODS) between the mutant gene and D17mit33 was 9.08. After selectively amplifying the marker D17mit143 that was most proximal to *Brachyury* (*T*) gene that related to the tail-short phenotype on the chromosome 17, no exchange was found among one hundred and nine F_2 generation mice. The

基金项目 “十五” 国家科技攻关计划 (No. 2001BA710B);

第一作者介绍 邵义祥,男,博士研究生,副教授,研究方向:人类疾病的动物模型;E-mail:shaoyx@ntmc.edu.cn.

收稿日期 2004-08-09, 修回日期 2004-11-01

result shows that *Brachyury* is a strong candidate gene of the tail-short phenotype.

Key words :ENU ; Microsatellite ; Gene mapping ; *Brachyury* (*T*) ; Mouse

随着人类基因组序列草图的完成,2002 年 12 月小鼠 (*Mus musculus*) 基因组草图也已完成,人类开始进入一个大规模地、系统地研究基因功能的后基因组时代。进行基因功能分析的策略可分为基因驱动法和表型驱动法。单基因剔除是典型的基因驱动的研究方法,用放射线导致缺失和突变以及用各种化学诱变剂(如 ENU)诱导点突变等属于表型驱动法。表型驱动研究方法的出发点不是任何特定的基因,而是从大量的随机突变中通过表型筛选研究感兴趣的表型及其突变的分子机制。表型驱动研究的优点在于可以在相对短的时间内产生大量的突变动物,可能通过表型筛选获得与人类疾病临床症状相似的模型动物^[1-5]。因此,本实验室开展了以 ENU 诱导小鼠基因突变以及突变基因功能的研究,获得一种短尾小鼠并利用微卫星标记成功将其突变基因初步定位。

1 材料与方法

1.1 实验动物与设施 选用 8~10 周龄雄性 C57BL/6J (B6) 小鼠 30 只, B6 雌鼠 60 只, DBA/2 (D2) 小鼠若干只,全部符合清洁级标准,由扬州大学比较医学中心提供。实验动物生产许可证: SCXK(苏)2002-0009,使用许可证: SYXK(苏)2002-0045。所有小鼠都饲养在屏障环境的动物房内,室内温度控制在 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$,湿度控制在 $55\% \pm 5\%$,室内照明采用 12 h:12 h 明暗交替,饲喂苏州双狮牌辐照灭菌饲料,自由饮用无菌水。

1.2 仪器与试剂 PCR 仪为 Biometra 公司生产的 T Gradient Thermocycler;电泳仪为北京东方仪器厂生产的 DYY-III2 型;凝胶成像系统是天能科技(上海)有限公司产品, GIS-2008 型; ENU 为 SIGMA 公司产品,引物由上海生工公司合成, *Taq* polymease 购于宝生物公司。

1.3 ENU 处理与突变小鼠的繁殖 将 B6 小鼠 (G_0) 腹腔注射 ENU(100 mg/kg 体重),每周 1

次,共 4 次; ENU 用 pH 6.0 的磷酸缓冲液稀释成 2 mg/ml 溶液,现配现用。雄鼠在最后一次 ENU 处理后 6 周与同品系母鼠配种,每只 B6 雄鼠 (G_0) 配同品系的雌鼠 2~3 只,待确定怀孕后,雌鼠单独分笼饲养,子鼠 (G_1) 断奶分窝后,雌鼠再与原配雄鼠同居。

1.4 异常小鼠的筛查及遗传力检测 在 G_1 代小鼠 21 d 和 8 周龄时分别进行筛查,主要针对小鼠一般状况、神经行为、毛发、眼、耳、尾、骨骼、口腔等肉眼可见的性状进行。对有异常表型的小鼠 (G_1) 均进行了异常表型的遗传力试验,即将 G_1 与正常的 B6 小鼠配种,观察后代 (G_2) 小鼠中是否有亲代的异常表型,如果在 10 只以上的 G_2 小鼠中无一例出现亲代异常表型,则认为该异常表型不可遗传或可能外显率极低,则将该异常表型小鼠淘汰。

1.5 DNA 样品及 PCR 反应条件 剪取 (B6 \times D2) $F_1 \times$ D2 F_2 短尾小鼠尾尖 1 cm 左右,采用蛋白酶 K 消化、酚氯仿法提取基因组 DNA^[6]。PCR 反应体系为 25 μl (1) 10 \times buffer 2.5 μl (2) dNTP(10 mmol/L) 0.5 μl (3) 引物 I (50 $\mu\text{mol/L}$) 0.25 μl (4) 引物 II (50 $\mu\text{mol/L}$) 0.25 μl (5) DNA 样 0.5 μl (6) *Taq* polymease(5U/ μl) 1~1.5 U 加双蒸水至 25 μl ,采用吴宝金等提出的热循环条件进行扩增^[7]。

1.6 突变基因的连锁分析 选择基本平均分布在小鼠基因组的 19 条常染色体,遗传距离在 30~55 cM 之间,并且在 B6 及 D2 之间的差异至少在 4 bp 以上的 39 个微卫星: D1Mit372、D1Mit84、D1Mit273、D2Mit6、D2Mit17、D2Mit528、D3Mit268、D3Mit15、D4Mit17、D4Mit54、D5Mit352、D5Mit168、D6Mit274、D6Mit339、D7Mit246、D7Mit333、D8Mit4、D8Mit320、D9Mit325、D9Mit243、D10Mit3、D10Mit73、D11Mit163、D11Mit258、D12Mit136、D12Mit17、D13Mit18、D13Mit262、D14Mit50、D14Mit205、D15Mit226、D15Mit34、D16Mit189、D16Mit100、

D17Mit33、D17Mit39、D18Mit52、D19Mit128、D19Mit33。优先选用其中与已报道短尾相关基因所在的染色体上的微卫星引物,对制备的 F_2 短尾突变小鼠 DNA 进行扩增,12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,EB 染色,凝胶成像系统拍照记录,并分析突变表型与多态微卫星的关系(连锁或交换)。采用计算 LOD 值方法将突变基因定位于小鼠的某一染色体上,计算公式为:

$$\begin{aligned} LOD &= \lg \frac{\frac{n!}{(n-x)!x!} \theta^x (1-\theta)^{n-x}}{\frac{n!}{(n-x)!x!} 0.5^n} \\ &= \lg \frac{\theta^x (1-\theta)^{n-x}}{0.5^n} \end{aligned}$$

n 表示检测数目, x 发生交换例数, θ 可以取 0~0.5 间的任何数值,以最大 LOD 值为准,但 $\theta = x/n$ 时的 LOD 值往往接近最大值。本实验只计算 $\theta = x/n$ 时的 LOD 值,LOD 值 > 1 时,有可能连锁;LOD 值 > 3 时,则肯定连锁;LOD

值 < -2 可以否定连锁。

2 结果

2.1 获得一种短尾突变小鼠 第一批用 ENU 处理的 30 只 8~10 周龄雄性 B6 小鼠,获得 G_1 代小鼠 351 只,在 351 只 G_1 代小鼠中发现异常小鼠 12 只,其中短尾雄性一例,能够遗传;有一例眼睛异常者需进一步遗传验证,其他的异常小鼠均未能稳定遗传。短尾突变小鼠表现为肛门上部只有约 1 cm 的尾芽,故称之为短尾;在其后代中除出现与亲代相同短尾表型外,还偶尔出现了呈现中尾的表型,其尾长基本介于短尾与正常尾之间但尾梢出现明显刀削样畸形(图 1),因而将这两种表型均视为短尾突变表型合并计算。在 228 只 $[(B6 \times D2)F_1 \times D2]F_2$ 小鼠中得到 109 只短尾鼠,经卡方检验,该突变基因符合单基因显性遗传的特征 ($\chi^2 = 0.438$, $0.50 < P < 0.75$)。

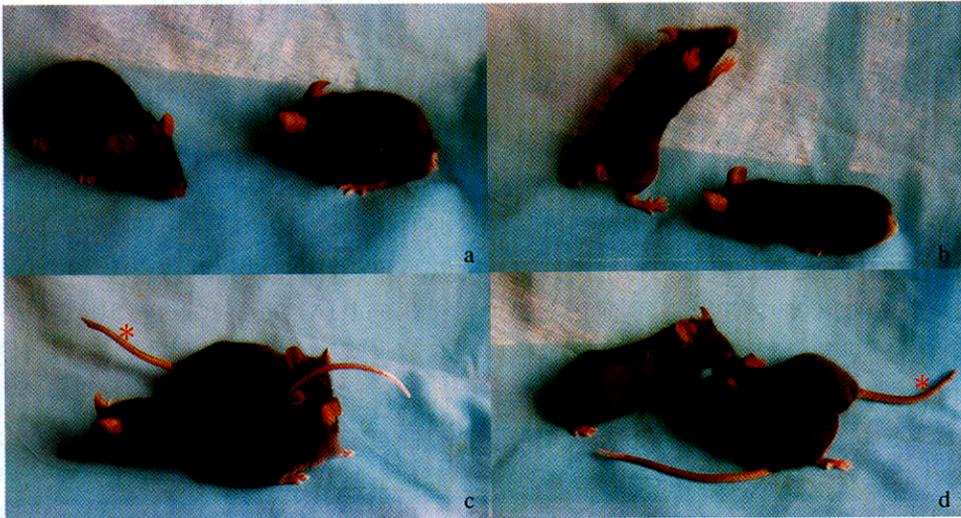


图 1 短尾、中尾、正常尾小鼠

Fig.1 Short tail, middle tail and normal tail mice

(a)(b)各为二只短尾;(c)(d)加*为中尾,未标记者为同胞正常尾小鼠

a and b showed short tail mice; c and d were middle tail mice tagged with * and normal tail mice not tagged as a comparison.

2.2 短尾突变基因在染色体上的初步定位 首先选择 D4mit17, D4mit54, D11mit258, D17mit33 四个微卫星引物,扩增了 48 例 F_2 短尾鼠的 DNA 样本,并进行电泳分析,表型短尾同时伴 B6 微卫星

标记者为连锁,反之作为重组计数。计算各个微卫星与突变基因在实际重组率的情况下的 LOD 值(表 1),结果显示 D17mit33 与突变表型重组率为 $6.25\% \pm 3.49\%$ 。因此又用 D17mit33 扩当

表 1 短尾突变基因与各微卫星的连锁分析

Table 1 Linkage analysis of different makers and short tail mutant

微卫星名称 Microsatellite	检测的 F ₂ 数量 Number of F ₂ tested	重组比值 Recombination ratio	LOD 值 LODs	是否连锁 Linkage or not
D4mit17	48	17/48 = 0.354	0.90	
D4mit54	48	20/48 = 0.417	0.29	
D11mit258	48	23/48 = 0.479	0.018	
D17mit33	58	6/58 = 0.103	9.08	连锁(linkage)
D17mit143	109	0		连锁(linkage)

时仅有的另 10 个 F₂ 短尾鼠的 DNA 样本,与前 48 样合并计算。结果表明该微卫星与突变基因在实际重组率情况下的 LOD 值为 9.08,重组率为 10.03% ± 4.00%,从而把该突变基因初步定位于 17 号染色体。在该染色体上报道有一个与短尾相关的 *Brachyury*(*T*) 基因,该基因遗传距离距着丝粒 4.02 cM,而 D17mit33 距着丝粒

18.8 cM。数据表明所获得的短尾小鼠有可能是 *Brachyury* 基因座发生突变。于是再选用距着丝粒 5.0 cM, *Brachyury* 基因下游几百 bp 处的微卫星 D17mit143 来扩增,在所扩增的 109 个 F₂ 样中未发生一例交换(图 2),此结果证实突变基因就在 D17mit143 附近,提示该突变基因有可能为 *Brachyury*(*T*) 基因(图 3)。

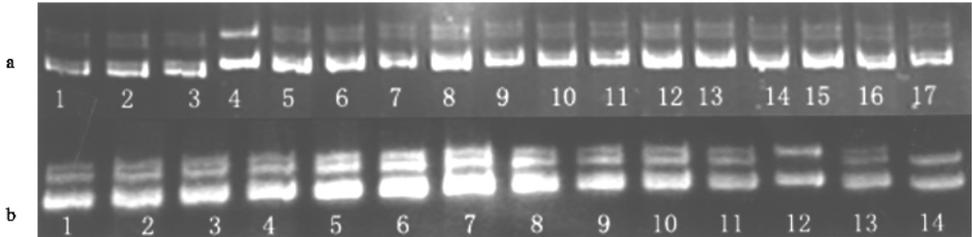


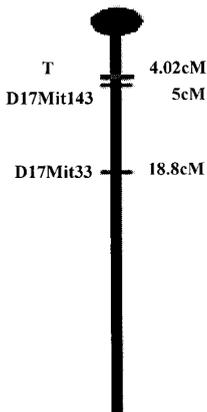
图 2 D17Mit33 与 D17Mit143 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig 2 Electrophoresis photographs tested by D17mit33 and D17mit143

a. 为 D17Mit33 对部分短尾 F₂ 检测结果,第 4 泳道发生重组,其余连锁;b. 为 D17Mit143 对部分短尾 F₂ 检测结果,1~11 泳道全为短尾 F₂ 无一发生重组,12、13、14 分别为 D2、F₁、B6 对照。

(a) D17mit33: Lane 4 showed recombination, others showed linkage. They were all from F₂ short tail mice.

(b) D17mit143: Lanes 1-11 were all from F₂ short tail mice. Lanes 12-14 were from D2, F₁, B6 mice respectively.

图 3 提出 *Brachyury*(*T*) 基因为候选基因的示意图Fig.3 The fig showing that *T* was a candidate gene

3 讨论

3.1 ENU 诱变的意义 用 ENU(乙基亚硝基脲)在较短时期内诱导小鼠产生大量随机突变表型,通过筛选获得并建立与人类疾病相似的模型动物,再鉴定随机突变小鼠的遗传基础,是近十多年来兴起的一种新的建立人类疾病动物模型的新的实验手段。过去研究遗传性疾病主要依赖自然突变获得的模型动物,发生率低,周期长,可遇而不可求;ENU 诱变则为一种主动获取突变的手段。本试验中 G₁ 代小鼠的直观表型突变率达到 3.4%,无疑极具潜力和优势。本文以同样手段筛查了本实验室正常繁殖的

B6 小鼠 350 只,未发现一例异常,说明所获得的突变小鼠是 ENU 诱变的结果。因此,ENU 诱变被认为是最有潜力的能够快速产生、大规模筛选、稳定建立突变型动物的有效途径,新的动物模型的建立有可能导致新的疾病基因的发现和克隆,对开发具有自主知识产权的药物标靶和相应药物至关重要。

获得不同突变表型的小鼠是开展遗传性疾病研究和基因功能研究的需要,也是必不可少的实验手段。这些模型可为研究者提供一个处于生长、发育、病变、衰老动态过程中,可从不同时间点对不同组织器官进行干预(包括基因矫正治疗)的实验系统,有望建立起哺乳动物基因功能研究中解析能力较高的技术平台^[8]。

3.2 遗传标志及基因定位方法 以连锁图谱为工具利用突变基因与遗传标记的连锁分析进行基因定位,进而进行基因克隆是一种非常经典而有效的定位与克隆方法。第二代标记微卫星由于在基因组内含量丰富,多态性理想,呈共显性遗传且突变率低,因而可以为连锁分析提供足够多遗传信息,利用 PCR 及电泳进行检测相对容易而成为目前应用最广泛的遗传标记,其应用也大大推动了利用表型驱动法研究基因功能的进程^[9]。Martha 等利用微卫星标记成功定位了 *clock* 基因^[10],Caroline 等利用微卫星定位了 ENU 诱变获得的 25 例与眼睛相关的突变基因^[11]。李善如等利用微卫星定位了自然突变的小鼠无毛突变基因,赵晓娟等用 75 个标记(包括 61 个微卫星),成功定位了在昆明小鼠中发现的突变。吴宝金等利用平均分布于 19 条常染色体的 39 个微卫星标记成功定位了 4 种白斑小鼠的突变基因^[12]。

位置候选基因法是利用连锁图谱与连锁分析将突变基因定位于染色体的一小段区域,然后从该区域中找出已知的与突变表型相关的基因。本文借助位置候选基因法反向操作,其策略是 a) 首先收集了已报道的所有与短尾相关的基因在各染色体上的位置,结合已有的 39 对微卫星引物,优先选用短尾相关基因附近的几个微卫星引物扩增; b) 如果突变基因是新基因

则继续使用其余微卫星引物定位。结果只选用了 5 个位点就完成了短尾突变基因的初步定位,事实证明此种定位方法简便、快捷而有效,特别是对一个目前已知的遗传异质性相对弱的性状。在定位过程中,之所以将中尾和短尾表型合并计算,是因为中尾小鼠是短尾小鼠与正常小鼠交配后,其后代中除出现短尾和正常尾表型外,还偶尔出现中尾;将中尾小鼠与正常尾小鼠交配,其后代同样为短尾和正常尾表型,也偶尔出现中尾,即通过观察,短尾和中尾的遗传效应几乎是相同的。至于为何会出现中尾表型,是短尾基因的显性不完全?还是在发育过程中受到了其他基因的作用?则有待于该基因的克隆测序和表达的进一步分析研究。

3.3 关于 *Brachyury* (*T*) 基因 反向运用经典的位置候选基因法路线,精确快速地定位了短尾突变基因,并提出 *Brachyury* 基因为强有力的候选基因。*Brachyury* 为 T-box 家族第一个被发现的成员,T-box 家族基因的功能是作为转录因子调控胚胎生长发育过程,其家族基因均具有保守片段,该基因家族还有 *Tbx1-6* 与 *Tbr-1* 等成员。人类 *TBX3* 与 *TBX5* 与 *Brachyury* 具有高度同源性,其突变可分别引起 ulnar-mammary 与 Holt-Oram 综合症(心-手综合症),导致心脏、肢体的畸形。*Brachyury* 基因在小鼠胚胎发生过程中起着非常重要的作用,尤其影响中胚层的发育。*Brachyury* 基因突变小鼠首先于 1927 年报道,该杂合子小鼠表现为短尾、并稍微弯曲,纯合子小鼠由于不能形成尿囊而死于胚胎期 10 d 左右。该基因于 1990 年被克隆,研究表明该基因编码 436 个氨基酸的序列特异的 DNA 结合蛋白,DNA 结合区存在此蛋白的前 229 氨基酸中,靶序列为含 20 个碱基的部分回文的 T [G/C]ACACCTAGGTGTGAAATT 单元。该基因同源基因也于果蝇、线虫、海胆、斑马鱼等生物体中发现^[13~16]。本实验研究获得的突变基因也有可能为 *Brachyury* 基因的一个新的等位基因。

3.4 短尾小鼠的潜在价值 小鼠因其与人类相似的基因组序列、发育和生化途径及生理特

点而成为研究人类疾病的病理过程和遗传基础的理想模式动物,是医学科学研究中用量最大,应用范围最广也是最经济的实验动物。寻找、培育并建立各种人类疾病的小鼠模型,用于生物医学研究,是推动生物医学发展的最佳途径。深入研究短尾形成的分子机理和调控机制,有利于揭示其与其他基因的联系,相互作用和影响。同时,作为功能基因组学研究的实验验证,需要进行动物形态的观测、生理生化指标的测定、组织病理切片的检查,而鼠尾的长短大小是一种易于观测的表型,可减少大量复杂的实验室检测工作,可以作为功能基因组学研究的的良好动物模型。任何突变都是洞察生命奥秘的一个窗户,深入进行短尾鼠的生物学和解剖生理特点的研究,可以丰富人类对基因功能的理解和对生命现象本质的认识,也有可能进一步发现其与人类某个疾病的内在联系,建立起更有价值的疾病动物模型。

致谢 衷心感谢吴宝金博士在实验中给予的指导!

参 考 文 献

- [1] Balling R. ENU mutagenesis: analyzing gene function in mice. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2001, **2**: 463 ~ 492.
- [2] Nolan P M, Peters J, Strivens M, *et al.* A systematic, genome-wide, phenotype-driven mutagenesis programme for gene function studies in the mouse. *Nature Genetics*, 2000, **25**: 440 ~ 443.
- [3] Hrade de Angelis M, Flaswinkel H, Fuchs H, *et al.* Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis. *Nature Genetics*, 2000, **25**: 444 ~ 447.
- [4] Hrade de Angelis M, Balling R. Large scale ENU screens in the mouse: genetics meets genomics. *Mutat Res*, 1998, **400**: 25 ~ 32.
- [5] 孙岩松, 杨晓. ENU 诱导点突变——大规模基因突变和功能研究. *生物工程学报*, 2001, **17**(4): 365 ~ 370.
- [6] Joseph Sambrook, Russell D W. 分子克隆实验指南(第三版). 北京: 科学出版社, 2002: 479 ~ 483.
- [7] 吴宝金, 茅慧华, 朱洪等. 小鼠 39 个微卫星的 PCR 条件及其运用. *中国实验动物学报*, 2003, **11**(3): 216 ~ 220.
- [8] 傅继梁. 值得关注的小鼠 ENU 诱变研究. *科学通报*, 2003, **48**(22): 2299 ~ 2300.
- [9] 贺林. 解码生命. 北京: 科学出版社, 2002: 8 ~ 9.
- [10] Vitaterna M H, King D P, Chang A M, *et al.* Mutagenesis and mapping of a mouse gene, clock, essential for circadian behavior. *Science*, 1994, **264**: 719 ~ 725.
- [11] Thuang C, West K, Clark B J, *et al.* ENU-induced eye mutations in the mouse: models for human eye disease. *Human Molecular Genetics*, 2002, **11**(7): 755 ~ 780.
- [12] 吴宝金, 茅慧华, 邵义祥等. ENU 诱变获得 4 种白斑小鼠及对突变基因的染色体定位. *科学通报*, **48**(22): 2301 ~ 2307.
- [13] Yi C H, Terrett J A, Li Q Y, *et al.* Mapping, and phylogenomic analysis of four new human members of the T-box gene family: EOMES, TBX6, TBX18, and TBX19. *Genomics*, 1999, **55**: 10 ~ 20.
- [14] Smith J. *Brachyury* and the T-box genes. *Curr Opin Genet*, 1997, **7**(4): 474 ~ 480.
- [15] Herrmann B G, Labeit S, Poustka A, *et al.* Cloning of the *T* gene required in mesoderm formation in the mouse. *Nature*, 1990, **343**: 617 ~ 622.
- [16] Smith J. T-box genes: what they do and how they do it. *Trends in Genetics*, 1999, **15**(4): 154 ~ 158.