

ENU 诱变获得一种多趾小鼠及其突变基因的鉴定

陈兵^{①②} 李柯^② 陈德洋^② 糜婷^② 薛整风^{①②*}

① 扬州大学比较医学中心 扬州 225009; ② 扬州大学兽医学院 扬州 225009

摘要:采用化学诱变剂乙酰基亚硝基脲(N-ethyl-N-nitrosourea, ENU)获得一种常染色体显性遗传多趾突变小鼠(*Mus musculus*),该突变小鼠在后趾内侧(即轴前部)多出一个脚趾,且严重程度不一,部分小鼠双侧后足都有多趾表型。阿尔新蓝-茜素红染色结果表明,多趾突变杂合子小鼠除多趾异常发育外,其余骨骼无明显异常。为定位该突变基因,利用微卫星标记对(C57BL/6J×DBA/2J)F1代多趾突变小鼠回交C57BL/6J得到的[(C57BL/6J×DBA/2J)F1×C57BL/6J]N2代多趾小鼠进行全基因组扫描,最终将本例多趾突变基因定位于小鼠第2号染色体微卫星D2mit45与D2mit184之间,并初步确定*Alx4*为该突变候选基因。在此基础上对*Alx4*进行测序分析,测序结果发现突变小鼠*Alx4*基因编码区第433位碱基处发生A到T的颠换,导致编码区第145位密码子AAA(编码赖氨酸)变为终止密码子TAA,引起蛋白编码提前终止,是引起多趾表型的原因。

关键词:乙酰基亚硝基脲;多趾突变;阿尔新蓝-茜素红染色;微卫星;*Alx4*基因

中图分类号:Q953 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2012)05-32-09

Generation of Polydactylous Mice Using ENU Mutagenesis and Identification of the Mutant Gene

CHEN Bing^{①②} LI Ke^② CHEN De-Yang^② MI Ting^② XUE Zheng-Feng^{①②*}

①Comparative Medicine Center, Yangzhou University, Yangzhou 225009;

②College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

Abstract:Inherited dominant polydactylous mice (*Mus musculus*) was obtained by N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) mutagenesis. The mutant mice showed an extra digit on the anterior aspect of one hindlimb that varied in phenotypic severity, and some mice had polydactyly phenotype in both hindlimbs. Alcian blue and alizarin red staining indicated that there was no obvious abnormality of other skeletons in polydactylous heterozygotes except an extra toe in the preaxial of hindlimbs. To determine the position of the mutant gene on the chromosome, microsatellite markers were used to scan the whole genome of the N2 polydactylous mice, which were obtained by back crossbreeding F1 (C57BL/6J × DBA/2J) with C57BL/6J. Finally, the mutant gene was located between D2mit45 and D2mit184, and *Alx4* gene was regarded as the candidate gene of the polydactyly phenotype. Sequence analysis of *Alx4* gene for polydactylous heterozygotes revealed an A/T transversion mutation that resulted in an amino acid substitution at position 145 in the protein of a lysine codon (K) by a stop (nonsense) codon.

Key words: N-ethyl-N-nitrosourea; Polydactyly; Alcian blue and alizarin red staining; Microsatellite; *Alx4* gene

基金项目 国家自然科学基金项目(No. 31000987),江苏高校优势学科建设工程资助项目;

* 通讯作者, E-mail: xuezfyz@yahoo.com.cn;

第一作者介绍 陈兵,男,博士,讲师;研究方向:人类疾病的动物模型;E-mail: xhbingchen@yahoo.com.cn。

收稿日期:2012-04-18,修回日期:2012-07-04

乙酰基亚硝基脲 (N-ethyl-N-nitrosourea, ENU) 诱变可导致生物体发生随机或者单碱基突变, 突变可以是显性、隐性或沉默突变, 在后代中会出现各种突变表型。通过对突变表型的深入研究, 有利于了解基因相关功能及突变机制, 并可能发现新的基因^[1-3]。

本实验室从 2002 年开始进行 ENU 诱变工作, 目前已成功将 6 种白斑突变小鼠 (*Mus musculus*)、1 种瞳孔异位突变小鼠、1 种瞳孔散大突变小鼠、1 种角膜浑浊突变小鼠、1 种短尾突变小鼠、1 种卷尾突变小鼠和 1 种稀毛小鼠的突变基因定位于相应的染色体, 采用位置候选法成功鉴定出部分突变的分子基础, 并对部分突变小鼠生物学功能进行了相关研究^[4-14]。近期, 本中心通过 ENU 诱变筛选获得一种多趾突变系小鼠, 采用阿尔新蓝-茜素红染色法对初生多趾仔鼠进行了骨骼和软骨染色观察。通过以微卫星为连锁标记, 成功将该突变基因进行染色体定位, 在此基础上确定 *Alx4* 基因突变是引起多趾表型的原因。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及饲养条件 ENU 诱变选用 8~10 周龄的 C57BL/6J (B6) 清洁级雄鼠 40 只, B6 雌鼠 120 只; 定位用 B6 及 DBA/2J (D2) 小鼠若干只, 由扬州大学比较医学中心提供。实验动物生产许可证: SCXK (苏) 2007-0001, 使用许可证: SYXK (苏) 2007-0005。小鼠饲养在屏障动物房内, 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。饲料购于江苏省协同医药生物工程有限责任公司, 经过 ^{60}Co 照射, 自由采食和饮水, 定期更换笼具、垫料 (均经高温消毒)。

1.2 仪器和试剂 动物饲养设备由苏杭实验动物设备厂生产; PCR 仪是德国 Eppendorf 公司的 5331 型和美国 ABI 公司的 Thermal Cycler 2720 型; 电泳仪为北京六一仪器厂生产的 DYY-6D 型; 凝胶成像系统为法国 VL 公司的 INFINITY 凝胶成像系统; ENU 购于 SIGMA 公

司, 产品号 N3385; 引物及 PCR 试剂购于上海生工生物工程有限公司。蛋白酶 K 购于 TaKaRa (大连) 有限公司; 消化液: 10 mmol/L Tris-Cl (pH 8.0), 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA (pH 8.0), 0.5% SDS, 室温保存。阿尔新蓝和茜素红购于 Amresco, 其他试剂均为分析纯级。

1.3 ENU 诱变处理和繁殖突变小鼠 (G1)

雄性 B6 小鼠腹腔注射 ENU (100 mg/kg), 每周一次, 连续 3 周共 3 次。ENU 用 pH 6.0 的磷酸盐缓冲液稀释成 5 g/L 溶液, 现配现用。雄鼠在最后一次 ENU 处理后 9 周与同品系母鼠配种, 每只雄鼠配同品系的雌鼠 3 只, 待确定怀孕后将雌鼠单独分笼饲养, 至后代小鼠断奶分窝。

1.4 突变表型筛查及遗传模式的检测 针对肉眼可见的被毛、皮肤、体格发育、神经行为等外观表型, 在断奶时筛查突变小鼠 (G1), 做好相应记录。将获得的突变杂合子小鼠与野生型 B6 小鼠配种, 观察并记录后代小鼠出现同样表型的严重程度及比率。

1.5 阿尔新蓝-茜素红染色 选取多趾突变小鼠和野生型 B6 小鼠进行阿尔新蓝-茜素红染色。染色方法参考文献^[15], 略作改进: 选取初生 1~2 d 的仔鼠, 置 100% 乙醇中处死, 去除内脏, 70°C 水浴 30 s 后去皮, 再置于 100% 乙醇浸泡 3 d, 阿尔新蓝 (15 mg 加入 80 ml 乙醇和 20 ml 冰醋酸) 染色 12 h, 100% 乙醇浸洗过夜后置 2% KOH 中 6~8 h (样品下沉即可)。茜素红 (50 mg/L, 用 2% KOH 配制) 染色 3~5 h, 置 2% KOH 中透明 3 h, 甘油保存。

1.6 样品 DNA 的提取及 PCR 反应 将 B6 突变小鼠与野生型 D2 小鼠配种得到 F1 代, 再将 F1 代突变鼠回交 B6 亲本品系得到 [(B6 × D2) F1 × B6] N2 代, 提取每个具有突变表型 N2 代小鼠的鼠尾 DNA, 采用蛋白酶 K 消化、酚氯仿法提取^[16]。PCR 反应体系为 25 μl: 10 × buffer (含 Mg^{2+}) 2.5 μl, dNTP (10 mmol/L) 0.5 μl, 引物 F (50 μmol/L) 0.3 μl, 引物 R (50 μmol/L) 0.3 μl, DNA 样 0.5 μl, *Taq* 酶 (5 U/μl) 1.0 ~

1.5 U,加高压过的双蒸水至 25 μ l。经梯度 PCR 摸索后选择适合的退火温度用于后续实验。

1.7 微卫星标记选择 选择平均分布在小鼠基因组 19 对常染色体及 X 染色体上,在同一染色体上的平均遗传距离不超过 40 厘摩 (centimorgan, cM),且在 B6 和 D2 小鼠间差异在 10 bp 以上的 44 个微卫星标记。分别为 D1mit373、D1mit309、D1mit511、D2mit369、D2mit58、D2mit456、D3mit268、D3mit49、D3mit147、D4mit214、D4mit42、D5mit233、D5mit168、D6mit274、D6mit230、D6mit201、D7mit270、D7mit281、D8mit4、D8mit211、D9mit191、D9mit212、D10mit213、D10mit70、D11mit20、D11mit333、D12mit285、D12mit99、D13mit3、D13mit9、D14mit259、D14mit165、D15mit111、D15mit245、D16mit165、D16mit70、D17mit66、D17mit123、D18mit53、D18mit187、D19mit41、D19mit137、DXmit166、DXmit130。

1.8 突变基因的连锁分析 采用位置候选法和全基因组扫描法,分别用不同的微卫星引物扩增 DNA 样品,电泳分析突变基因与微卫星是否连锁,把有突变表型同时只伴有来源于 B6 微卫星标记的样本算为亲本组合,把有突变表型但同时有来源于 B6 与 D2 微卫星标记的样本算为重组。采用计算最大 LOD 值(优势对数值)的方法将突变基因定位于小鼠的某一染色体上,本研究只计算重组率小于 50% 的 LOD 值,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 为发生交换例数, 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。

1.9 *Alx4* 基因序列分析 设计以下 4 对引物,ALX4-1, Forward: 5'- CGT CGC CCG CGC AGG CCA-3', Reverse: 5'- GGT CTC GCA CGT GCA CTC-3'; ALX4-2, Forward: 5'- CTT GAG TCT CTT GGC CTG GCA-3', Reverse: 5'- GGT ACA TTG AGT TGT GCT GTC C-3'; ALX4-3, Forward: 5'- CCT GAC TTG TGG TGT CAC TGC-3', Reverse: 5'- GGG ACA AAA TGG GCA AGG AGA-3'; ALX4-4, Forward: 5'- TCT CTC CCT TCA CTG TCC CCA G-3', Reverse: 5'- GGA GTT GCA GGA GGG GTT CTG-3'。PCR 分别扩增多趾杂合子小鼠及正常 B6 小鼠 *Alx4* 基因 4 个外显子序列,胶回收后测序。测序结果分析采用以下两种方法:(1)用 DNAsar 软件将突变杂合子 *Alx4* 测序结果与数据库中及本中心正常 B6 小鼠的 *Alx4* 序列比对;(2)分析测序峰图中是否出现明显的重叠信号,并使用不同突变个体多次测序验证结果的正确性。

1.10 氨基酸序列预测 将突变序列用 DNAsar 软件分析,预测在蛋白水平上氨基酸序列可能引起的变化。

2 结果

2.1 多趾小鼠的获得 ENU 处理后,在 G1 代小鼠中筛查发现有白斑、眼睛异常、多趾等突变表型,其中一例多趾小鼠引起了我们浓厚的兴趣。将其与野生型 B6 小鼠配种,在记录的 36 只后代小鼠中,有 7 只后代小鼠出现多趾表型。将后代正常表型小鼠进一步与 B6 野生型交配,部分小鼠后代存在多趾表型,以上结果说明该突变表型属于一种呈不完全外显率的显性遗传。B6 多趾小鼠与野生型 D2 小鼠配种获得的 19 只后代小鼠中,有 4 只多趾突变。(B6 \times D2) F1 代多趾突变小鼠回交 B6 得到的 218 只 [(B6 \times D2) F1 \times B6] N2 代小鼠中,有 50 只多趾突变。突变小鼠在后趾内侧(即轴前部)比正常小鼠多出一个脚趾,呈 6 趾形态,且严重程度不一,有的多趾短小,有的长且弯曲,严重的小鼠双侧后趾都有多趾现象(图 1:A~C)。

2.2 阿尔新蓝-茜素红染色 将新生多趾突变

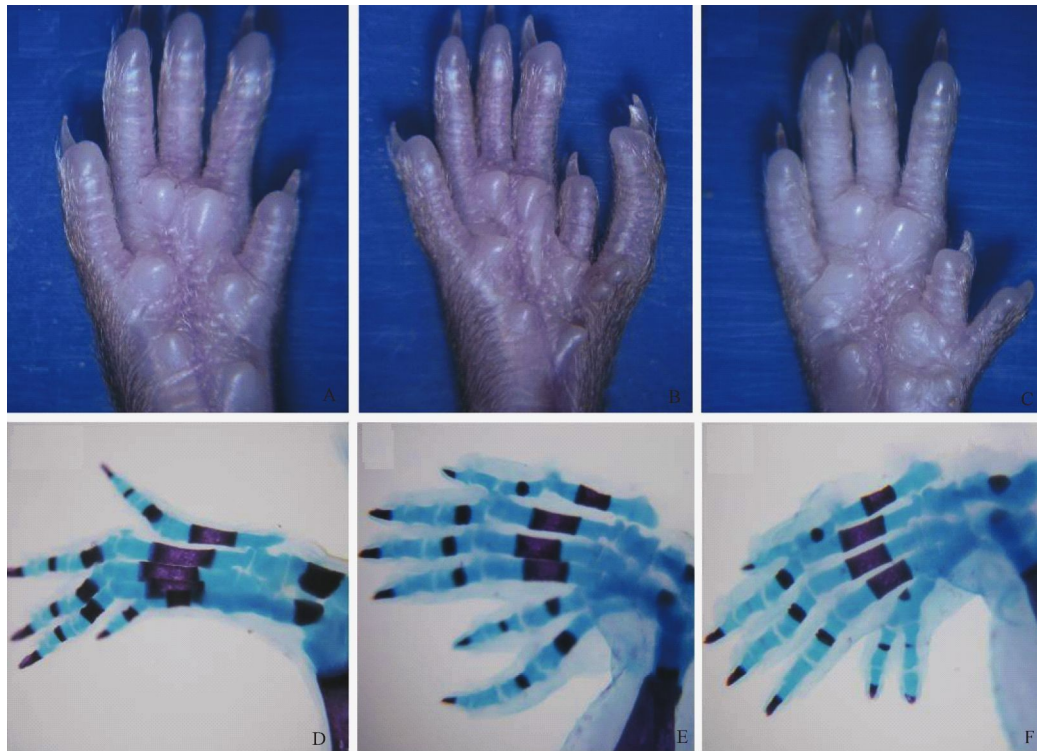


图 1 小鼠多趾表型

Fig. 1 Polydactylous phenotype of mice

A: 正常小鼠; B, C: 多趾小鼠; D: 正常小鼠染色; E, F: 多趾小鼠染色。

A: Normal mouse; B, C: Polydactylous mice; D: Staining of normal mouse; E, F: Staining of polydactylous mice.

小鼠和野生型 B6 小鼠进行阿尔新蓝-茜素红染色,阿尔新蓝可以将软骨组织染成蓝色,而茜素红则是将骨骼染成紫红色。结果显示突变杂合子小鼠与野生型相比,在后趾部轴前明显多出一趾。多趾严重程度不一,有的是与正常趾并行长出,而有的多趾则在原来的脚趾上长出一个分支(图 1: D ~ F),其他骨骼及软骨与正常相比未见明显异常。

2.3 多趾突变基因的定位 由于多趾表型外显率较低,可能存在多基因影响,本实验决定采用本实验室建立的微卫星体系对小鼠 19 对常染色体和 X 染色体进行扫描。经过一轮筛选发现突变基因与 2 号染色体上的微卫星 D2mit58 在 28 个中交换 5 例,LOD 值为 2.71,存在连锁可能最大,另外使用微卫星 D8mit211 及 D9mit191 检测的 LOD 值大于 1,但使用这两种微卫星两侧的微卫星标记进一步连锁分析后

排除突变基因在对应染色体上的可能,而其余微卫星均无明显连锁倾向(表 1)。在初步扫描基础上,在第 2 号染色体微卫星 D2mit58 附近继续采用 4 个高密度微卫星标记,同时扩大 N2 代突变小鼠样品的数目。进一步定位结果表明,在 60 个样品中突变基因分别与微卫星 D2mit184 (53.07 cM) 交换 5 例,LOD 值为 10.59;与 D2mit45 (50.63 cM) 交换 4 例,LOD 值为 11.68(图 2),突变基因与 D2mit45 的连锁分析过程见表 2。与 D2mit436 和 D2mit126 连锁比较分析后,最终将突变基因定位于微卫星 D2mit184 与 D2mit45 之间(图 3)。通过对局部区域基因功能分析,初步判定 *Alx4* 基因为本突变候选基因。

2.4 *Alx4* 基因序列分析 PCR 产物测序结果表明,多趾杂合子小鼠 *Alx4* 基因第 2 号外显子测序峰图上出现明显的重叠波(A-T),而 B6 小

表 1 微卫星与多趾突变基因的连锁分析结果

Table 1 Linkage analysis between microsatellites and polydactyly mutant gene

微卫星名称 Microsatellite	染色体号 Chromosome	距着丝粒距离(厘摩) Distance (cM)	重组比值 Recombination ratio	LOD 值 LODs	是否连锁 Linkage or not
D1mit373	1	10.92	11/25 = 0.44	0.078	否
D2mit369	2	24.51	9/28 = 0.32	0.810	否
D2mit58	2	56.21	5/28 = 0.18	2.710	可能连锁
D2mit456	2	88.99	11/28 = 0.39	0.320	否
D3mit49	3	39.02	13/28 = 0.46	0.083	否
D4mit214	4	24.16	18/28 = 0.64		否
D5mit233	5	28.55	13/28 = 0.46	0.083	否
D6mit201	6	77.70	13/28 = 0.46	0.083	否
D7mit281	7	58.74	11/28 = 0.39	0.320	否
D8mit4	8	18.89	10/28 = 0.36	0.470	否
D8mit211	8	52.00	7/28 = 0.25	1.590	可能连锁
D9mit191	9	25.52	8/28 = 0.29	1.100	可能连锁
D9mit212	9	59.58	14/28 = 0.50		否
D10mit213	10	9.75	12/28 = 0.43	0.110	否
D11mit333	11	71.83	11/28 = 0.39	0.320	否
D12mit285	12	23.46	15/28 = 0.54		否
D13mit9	13	42.19	18/28 = 0.64		否
D14mit259	14	19.50	20/28 = 0.71		否
D15mit111	15	13.02	13/26 = 0.50		否
D16mit165	16	9.66	13/28 = 0.46	0.083	否
D17mit66	17	23.97	16/27 = 0.59		否
D18mit187	18	50.99	15/28 = 0.54		否
D19mit41	19	13.18	14/28 = 0.50		否
DXmit166	X	28.26	9/28 = 0.32	0.810	否
D2mit436	2	47.87	6/60 = 0.10	9.590	连锁
D2mit126	2	49.35	5/60 = 0.08	10.590	连锁
D2mit45	2	50.63	4/60 = 0.07	11.680	连锁
D2mit184	2	53.07	5/60 = 0.08	10.590	连锁
D2mit58	2	56.21	6/60 = 0.10	9.590	连锁

本表只显示部分微卫星连锁分析结果,加粗部分为精确定位结果。

Data in this table show the results of part of linkage analysis, bold part shows the results of fine mapping.

表 2 多趾突变基因与 D2mit45 的连锁分析过程

Table 2 Detailed linkage analysis between the polydactyly mutant gene and D2mit45

	互交亲本 Intercrossing parents (Mutant B6 × D2)		测交亲本 Testcrossing parents (Mutant F1 × B6)		突变 [(B6 × D2) F1 × B6] N2 Mutant [(B6 × D2) F1 × B6] N2	
	突变 B6	D2	突变 F1	B6	亲组合	重组组合
	m b6	+ d2	m b6	+ b6	m b6	m d2
基因型 Genotype	$\frac{+}{+} \frac{+}{b6}$	$\frac{+}{+} \frac{+}{d2}$	$\frac{+}{+} \frac{+}{d2}$	$\frac{+}{+} \frac{+}{b6}$	$\frac{+}{+} \frac{+}{b6}$	$\frac{+}{+} \frac{+}{b6}$
小鼠数 Number of mice					56	4
重组值 Recombination score						4/60

m: 突变基因型; +: 野生基因型; b6: B6 型 D2mit45; d2: D2 型 D2mit45。

m: Mutation gene; +: Wild type; b6: D2mit45 of B6; d2: D2mit45 of D2.

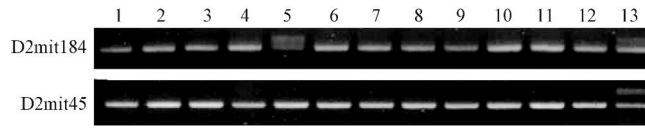


图 2 D2mit184 和 D2mit45 对多趾表型的部分 N2 小鼠电泳检测结果

Fig. 2 Electrophoresis results of some N2 polydactyly mice by D2mit184 and D2mit45

D2mit184 检测结果: B6 为 135 bp, D2 为 145 bp; 泳道 12 为 B6 阴性对照(只出现源于 B6 微卫星单个扩增片段), 泳道 13 为 BDF1 对照(同时出现源于 B6 及 D2 微卫星 2 个扩增片段), 除第 5 泳道交换外(同时出现源于 B6 及 D2 微卫星 2 个扩增片段), 其余泳道均无交换(只出现源于 B6 微卫星单个扩增片段)。D2mit45 检测结果: B6 为 120 bp, D2 为 148 bp; 泳道 12 为 B6 阴性对照(只出现源于 B6 微卫星单个扩增片段), 泳道 13 为 BDF1 对照(同时出现源于 B6 及 D2 微卫星 2 个扩增片段), 泳道 1~11 为样品, 均无交换(只出现源于 B6 微卫星单个扩增片段)。

D2mit184(B6: 135 bp, D2: 145 bp), Lane 13: BDF1; Lane 12: B6; Lane 5 showed recombination and others showed linkage; Other lanes no recombination. D2mit45(B6: 120 bp, D2: 148 bp), Lane 13: BDF1; Lane 12: B6; Lane 1 - 11: No recombination.

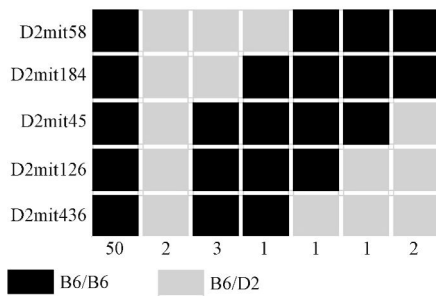


图 3 突变基因精确定位结果

Fig. 3 Fine mapping of the mutant gene

图左侧(纵坐标)显示微卫星标记, 图底部(横坐标)显示两种基因型对应的小鼠数目。

Microsatellite markers used to refine the map position are listed on the left, and the number of animals in each genotypic class is shown at the bottom.

鼠只出现单一波形。对测序结果分析显示, 突变杂合子一条染色体上 *Alx4* 基因编码区第 145

位密码子由 AAA 变为终止密码子 TAA(图 4), 导致蛋白编码提前终止。

3 讨论

3.1 ENU 诱变机理及筛查方法 ENU 是一种人工合成的能够导致多种生物体产生随机或者单碱基突变的化合物^[1]。ENU 进入体内, 不依赖于任何代谢过程, 因其含有一个乙烷基和亚硝基, 故产生作用的机制是通过烷基化反应将其乙烷基转移到 DNA 碱基的 O 原子或 N 原子上, 导致碱基错配或碱基置换。碱基上容易作用的位点包括腺嘌呤上的 N1、N3 和 N7; 鸟嘌呤上的 O6、N3 和 N7; 胸腺嘧啶上的 O2、O4 和 N3 以及胞嘧啶上的 O2 和 N3。由 ENU 转移来的乙烷基并不直接导致突变, 但是这种整合了乙烷基的碱基在下次 DNA 复制中会被细胞

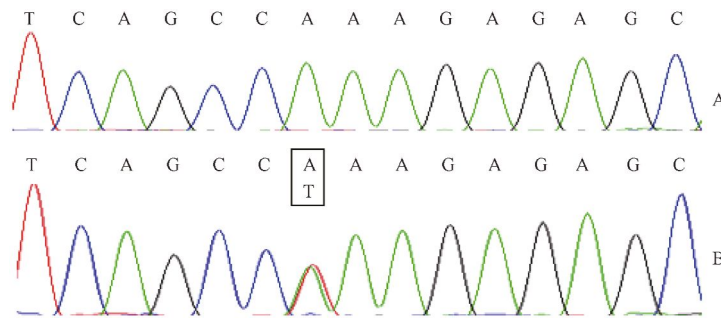


图 4 *Alx4* 基因序列分析

Fig. 4 Sequence analysis of *Alx4* gene

A: 正常小鼠; B: 多趾小鼠。A: Normal mouse; B: Polydactylous mouse.

复制系统错误地鉴定,进而导致碱基错配。经过 2 轮的复制后,就形成了不能被细胞自身修复系统有效识别的单碱基突变^[17-18]。

目前 ENU 诱变筛选有显性突变筛选、隐性突变筛选、借助工具鼠的片段缺失、平衡染色体及敏感化筛选等方法。其中显性突变的筛选操作相对简单,其筛选的基本方案是给选定品系成年雄性 G0 代小鼠腹腔注射适合剂量 ENU,数周后(待雄性小鼠恢复生殖能力)将雄性小鼠与野生型雌性配种,这样 G0 代雄性小鼠精原细胞中所携带的突变就可以传递到子代(G1 代)。如果该突变为显性突变,就可以直接对 G1 代小鼠进行形态学、行为学、血液学、生理生化等指标的检测筛选。一旦确定了 G1 代小鼠具有异常表型,下一步工作是检验这种异常表型是否可以稳定遗传给子代。如果 G2 代小鼠具有与 G1 相同表型,表明该突变可以遗传,通过遗传分析可以基本确定突变表型是否由单基因引起^[1]。本研究仅限于对显性突变的筛查。ENU 处理 40 个雄鼠后筛查了 640 只左右的后代小鼠,发现眼睛角膜混浊 53 例,目前确定能遗传的为 2 例,不能遗传的为 34 例,其他角膜混浊小鼠仍在进行遗传试验;腹部白斑表型 8 例,目前确定能遗传的为 3 例,不能遗传的为 5 例;多趾表型 1 例,能够遗传,这例多趾小鼠引起我们浓厚的兴趣。

3.2 肢芽的发育和多趾产生的原因 脊椎动物四肢发育有 3 个轴,分别为背腹轴、远近轴和前后轴。肢芽发育中有 3 个重要的信号中心,分别是顶端外胚层嵴(apical ectodermal ridge, AER)、极化活性区(zone of polarizing activity, ZPA)和背部外胚层(dorsal ectoderm, DE)。肢体的发育依赖于 3 个信号区域中细胞发出的信号分子来进行维系和调节,这些信号分子之间存在着复杂的联系,形成多种调控机制^[19-21]。多趾形成的因素有很多,撇开环境和营养等外在的原因,多趾的发生大多都与肢芽的 AER 和 ZPA 这 2 个区域有关,其根本原因在于肢芽发育过程中前后轴的发生出现紊乱,调控失去平衡,最终导致多趾发生或四肢异常(卷曲、并趾

畸形等)。

Riddle 等研究发现极化活性区(ZPA)分泌 Sonic hedgehog(Shh)蛋白,并且浓度从后轴往前轴逐渐减少,若将后部表达 Shh 的细胞异位移植到前部,可以产生同移植整个 ZPA 一样的镜像复制多趾现象,表明了 Shh 可以影响趾的发育,并在建立肢体前后轴的模式化中起着关键作用^[22]。成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)依赖的 *Etv4/5* 基因敲除后导致 Shh 在前部的异位表达,从而使小鼠产生轴前多趾(preaxial polydactyly, PPD)现象,表明了 FGF 的作用不仅可维持 Shh 在轴后部的表达,而且还能抑制其在肢芽前部的异位表达,从而能够更好地调控肢芽的发育^[23-24]。研究发现,多趾 *extra toes (Xt)* 小鼠是由于 *Gli3* 基因突变造成的。*Gli3* 基因编码一个锌指结构的蛋白质,是一种转录因子,通过基因测序和 PCR 分析发现 *Xt¹* 表型小鼠 *Gli3* 序列的 3' 端编码区大量缺失,导致某些锌指结构域缺失,影响了 *Gli3* 基因的正常转录,最终产生多趾表型^[25-26]。总之,肢芽发育需要依靠多个信号分子之间的相互作用和配合,任何一个环节出现问题都会影响正常的发育,从而导致多趾或其他畸形突变表型的出现。

3.3 关于 *Alx4* 基因 *Alx4* 基因位于肢芽前部,可以抑制 Shh 在前部异位表达。研究发现,该基因突变会造成小鼠多趾表型,该表型呈半显性遗传,但外显率具有遗传背景特异性;杂合子小鼠后趾前部多趾明显,纯合子则更为严重,不仅四肢都出现多趾,而且伴有胫骨畸形、颅面缺陷等症状^[27]。Kuijper 等^[28]发现,在 *Alx4*^{-/-} 突变小鼠的肢芽发育早期,前后轴的形成紊乱是由于 FGF4 和 HoxD13 在前部的异位表达导致,并不依赖于 Shh 信号;并且利用报告基因在 *Gli3*^{-/-} 小鼠中证实,肢芽发育中 *Alx4* 表达分别存在依赖和不依赖于 *Gli3* 的 2 种模式,从而导致 2 种不同的功能。*Alx4* 在肢芽前部正常以 2 个相邻的区域表达,即靠近前部近端的 *Alx4* (*Alx4-P*) 表达不依赖于 *Gli3*,而在后端的 *Alx4* (*Alx4-D*) 表达需要 *Gli3* 的调节,*Alx4* 的两个结

构域可能通过互相合作,产生对 FGF4、轴后部的 5' HoxD 和 Shh 的限制作用。

3.4 本工作的意义及该突变小鼠的价值 小鼠因其基因组序列、发育和生化代谢及生理特点与人类相似而成为研究人类疾病的理想模式动物,任何突变都是探索生命奥秘的一把钥匙。本研究利用 ENU 诱变,筛选到一种多趾突变小鼠并将该表型成功地遗传保种下来,且成功鉴定出多趾突变的分子基础。为 *Alx4* 基因功能的深入研究打下了基础,并为相应疾病模型的建立提供了材料。

参 考 文 献

- [1] Balling R. ENU mutagenesis: analyzing gene function in mice. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2001, 2: 463 - 492.
- [2] de Angelis M H, Flaswinkel H, Fuchs H, et al. Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis. *Nature Genetics*, 2000, 25(4): 444 - 447.
- [3] 吴宝金, 茅慧华, 李厚达. ENU 诱变在功能基因组研究中的应用. *癌变·畸变·突变*, 2004, 16(1): 57 - 60.
- [4] 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*, 2003, 48(22): 2301 - 2307.
- [5] 邵义祥, 陈兵, 张成香, 等. ENU 诱导获得一种短尾小鼠及其突变基因的初步定位. *动物学杂志*, 2005, 40(1): 8 - 13.
- [6] 茅慧华, 邵义祥, 吴宝金, 等. 两例新的稀毛小鼠突变基因的染色体定位. *动物学报*, 2005, 51(2): 294 - 298.
- [7] 邵义祥, 吴宝金, 薛整风, 等. 遗传性角膜基质变性小鼠及其突变基因的定位. *南京师大学报: 自然科学版*, 2006, 29(2): 99 - 102.
- [8] 陈兵, 钱晨, 刘春, 等. 遗传性瞳孔异位小鼠及其突变基因的染色体定位. *眼科研究*, 2006, 24(4): 352 - 355.
- [9] 薛整风, 陈兵, 尹媛, 等. Kit 基因无义突变导致 W^{-3Bao} 小鼠显性白斑形成. *动物学报*, 2007, 53(5): 934 - 938.
- [10] Wu B J, Shao Y X, Mao H H, et al. Two kinds of ENU-induced scant hair mice and mapping of the mutant genes. *Journal of Dermatological Science*, 2004, 36(3): 149 - 156.
- [11] 蒋炎梅, 刘春, 吴刘成, 等. SNP 标记对角膜混浊小鼠突变相关基因的精细定位. *遗传*, 2010, 32(5): 486 - 491.
- [12] Wu B J, Yin L J, Yin H P, et al. A mutation in the Kit gene leads to novel gonadal phenotypes in both heterozygous and homozygous mice. *Hereditas*, 2010, 147(2): 62 - 69.
- [13] Wu B J, Shao Y X, Chen B, et al. Identification of a novel mouse brachyury (*T*) allele causing a short tail mutation in mice. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2010, 58(3): 129 - 135.
- [14] Chen B, Li K, Zhang F L, et al. An ENU-Induced Mutation of *Nrg1* Causes Dilated Pupils and a Reduction in Muscarinic Receptors in the Sphincter Pupillae. *PLoS One*, 2011, 6(9): e25176.
- [15] Qu S, Niswender K D, Ji Q, et al. Polydactyly and ectopic ZPA formation in *Alx-4* mutant mice. *Development*, 1997, 124(20): 3999 - 4008.
- [16] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆实验指南. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 479 - 483.
- [17] 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.
- [18] 吴宝金, 茅慧华, 薛小萍, 等. 乙酰基亚硝基脲诱导小鼠突变的初步研究. *实验动物学报*, 2003, 11(3): 142 - 146.
- [19] Twyman R M; 王英典, 曾少举, 刘宁, 译. 发育生物学. 北京: 科学出版社, 2006: 401 - 420.
- [20] Capdevila J, Belmonte J C I. Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2001, 17: 87 - 132.
- [21] Zeller R, López-Ríos J, Zuniga A. Vertebrate limb bud development: moving towards integrative analysis of organogenesis. *Nature Reviews Genetics*, 2009, 10(12): 845 - 858.
- [22] Riddle R D, Johnson R L, Laufer E, et al. *Sonic hedgehog* mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*, 1993, 75(7): 1401 - 1416.
- [23] Mao J H, McGlinn E, Huang P, et al. Fgf-dependent *Etv4/5* activity is required for posterior restriction of *Sonic hedgehog* and promoting outgrowth of the vertebrate limb. *Developmental Cell*, 2009, 16(4): 600 - 606.
- [24] Zhang Z, Verheijden J M, Hassell J A, et al. FGF-regulated *Etv* genes are essential for repressing *Shh* expression in mouse limb buds. *Developmental Cell*, 2009, 16(4): 607 - 613.
- [25] Büscher D, Grotewold L, Rütger U. The *Xt¹* allele generates a *Gli3* fusion transcript. *Mammalian Genome*, 1998, 9(8): 676 - 678.

- [26] Hui C C, Joyner A L. A mouse model of Greig cephalopolysyndactyly syndrome: the extra-toes¹ mutation contains an intragenic deletion of the *Gli3* gene. *Nature Genetics*, 1993, 3(3): 241–246.
- [27] Qu S, Tucker S C, Ehrlich J S, et al. Mutations in mouse *Aristaless-like4* cause Strong's luxoid polydactyly. *Development*, 1998, 125(14): 2711–2721.
- [28] Kuijper S, Feitsma H, Sheth R, et al. Function and regulation of *Alx4* in limb development: complex genetic interactions with *Gli3* and *Shh*. *Developmental Biology*, 2005, 285(2): 533–544.

(上接第 23 页)

①期刊:作者. 题名. 刊名, 出版年, 卷(期)号; 起止页码. 示例:

[1] 郑光美. 黄腹角雉. *动物学杂志*, 1987, 22(5): 40–43.

[2] Wu P, Zhou K Y. General condition of systematics study on Testudines. *Chinese Journal of Zoology*, 1998, 33(6): 38–45.

②专著:作者. 书名. 版本(第一版不标注). 出版地:出版者, 出版年; 起止页码. 示例:

[3] 孙儒泳. *动物生态学原理*. 2 版. 北京:北京师范大学出版社, 1992: 329–330.

[4] Jiang Z G. *Conservation Biology*. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press, 1997: 160–164.

③论文集:作者. 题名//编者. 论文集名. 出版地:出版者, 出版年; 起止页码. 示例:

[5] 陈大元. 动物显微受精与克隆研究//中国动物学会. *中国动物科学研究*. 北京:中国林业出版社, 1999: 59–64.

[6] Yang T. On the leeches from Wuling Mountains area in south China//Song D X. *Invertebrates of Wuling Mountains Area, Southwestern China*. Beijing: Science Press, 1997: 395–399.

④学位论文:作者. 论文题目. 保存单位所在地:保存单位, 保存年; 起止页码. 示例:

[7] 张劲硕. *中国蝙蝠的整合研究*. 北京:中国科学院动物研究所博士学位论文, 2010.

⑤电子文献:主要责任者. 电子文献题名[文献类型标志/文献载体标志]. [引用日期]. 电子文献的出处或可获得的地址, 发表或更新日期. 示例:

[8] IUCN 2010. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010. 4 [BD/OL]. [2010-12-23]. www.iucnredlist.org.