

瘦素(Leptin)受体基因敲除小鼠繁育及子代小鼠基因型鉴定

季爱兵, 严亮, 彭文书, 刘聪, 龚婉莹, 王桥美
(普洱茶研究院, 云南 普洱 665000)

摘要: 将瘦素(Leptin, LP)受体基因杂合型小鼠按 4 种方式进行配对, 从子鼠鼠尾中提取基因组 DNA, 用 PCR 方法扩增 LP 受体基因片段, 琼脂糖凝胶电泳后观察。结果表明, LP^{+/+}、LP^{+/-}、LP^{-/-}各表型小鼠互交繁殖结果基本符合孟德尔遗传规律, 且雌、雄性 LP^{-/-}小鼠(即 DB/DB 小鼠)无繁殖能力。雌、雄性 LP^{+/-}小鼠交配能高效地繁殖 LP^{+/-}小鼠; PCR 方法能够精确地鉴定 LP^{+/-}小鼠。

关键词: 瘦素(Leptin, LP); DB/DB 小鼠; 基因型

中图分类号: Q953, R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1463(2015)01-0009-03

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2015.01.004

Breeding of Leptin Receptor Gene Knockout Mice and Genotype Identification of Their Filial Generation

JI Ai-bing, YAN Liang, PENG Wen-shu, LIU Cong, GONG Wan-ying, WANG Qiao-mei
(Puer Institute of Pu-erh Tea, Pu'er Yunnan 665000, China)

Abstract: The leptin receptor gene heterozygous mice were mated in four ways. Genomic DNA was isolated from tails and analyzed by PCR. The result showed that the ratio of the offspring genotypes fit the Mendel's laws. The male and female LP^{-/-} mice were infertile. It was efficient to breed leptin receptor gene knockout homozygote mice by inbreeding of the heterozygotes. PCR methods could be used to identify the genotype of the LP^{+/-} mice precisely.

Key words: Leptin; DB/DB mouse; Genotype

瘦素(Leptin, LP)是一种由脂肪组织分泌的肽类激素, 人们之前普遍认为它进入血液循环后会

收稿日期: 2014-12-09

作者简介: 季爱兵(1980—), 男, 安徽无为, 助理研究员, 硕士, 主要从事普洱茶功效研究工作。联系电话: (0879)2886111。E-mail: 42883876@qq.com。

629.3 g/kg、湿面筋 240.8 g/kg、沉降值 37.6 mL。2011 年经甘肃省农业科学院植物保护研究所进行分小种接种鉴定, 苗期对条中 33 号和混合菌免疫, 对条中 32 号表现中抗; 成株期对条中 33 号、条中 32 号、CH42、HY8、水 4、水 5 和混合菌全部免疫, 总体表现高抗小麦条锈病, 叶功能期长, 落黄性好。

4 适种区域

兰天 30 号主要适宜在陇南和天水的川水地、浅山区和地膜种植。

5 栽培技术要点

适宜播种期为 9 月上旬至 10 月中旬。该品种植株低矮, 株型紧凑, 适合密植, 播量以 675 万~750 万粒/hm²为宜, 下种量 225~300 kg/hm²。基肥一般在施有机肥 45 000 kg/hm²左右的基础上, 施用尿素 300 kg/hm²左右、过磷酸钙 600 kg/hm²左

右, 使 N、P 比达到 1:0.7~0.8。拔节期趁降水或结合灌水追施尿素 150 kg/hm²左右。抽穗后及时喷药防治蚜虫, 同时可用 3 g/kg 磷酸二氢钾溶液进行叶面追肥。

参考文献:

- [1] 邓怀义, 鲁振超, 邹亚暄. 19 个小麦品种(系)对小麦条锈病的抗性评价[J]. 甘肃农业科技, 2010(8): 17-19.
- [2] 高都平. 2011 年平凉市小麦条锈病发生情况分析及其防控建议[J]. 甘肃农业科技, 2012(5): 39-40.
- [3] 高都平. 平凉市小麦条锈病发生流行特点及监测预报浅议[J]. 甘肃农业科技, 2012(12): 45-46.
- [4] 陈万权, 康振生, 马占鸿. 中国小麦条锈病综合治理理论与实践[J]. 中国农业科学, 2013, 46(20): 4 254-4 262.
- [5] 周祥禧, 杜久元, 尚勋武. 甘肃省小麦品种的现状及对今后育种工作的思考[J]. 甘肃农业科技, 2000(2): 4-8.

(本文责编: 杨杰)

参与糖、脂肪及能量代谢的调节,促使机体减少摄食,增加能量释放,抑制脂肪细胞的合成,进而使体重减轻^[1-2]。LP 受体基因可以通过旁分泌与自分泌方式作用于脂肪、胰腺等多种组织,还可通过各种内分泌机制作用下丘脑特异性受体;不但可以调节机体的性生殖功能,而且是摄食反馈通路中的传入饱食信号,可直接作用于脑的摄食和饱食中枢,抑制食物摄取,减少能量摄入,增加能量消耗,调控体内的脂肪组织消长^[3],以保证机体不发生过度肥胖或消瘦^[4-5]。同时还可直接或间接调节体内的胰岛素水平与活性,从而在机体摄食、能量代谢、神经内分泌调控及性生殖等方面均有着非常重要的作用^[6-8]。LP 受体基因敲除小鼠会表现为饮食无节制,长期暴饮暴食后导致肥胖并引发糖尿病,这种模型与 II 型糖尿病症状吻合,且该小鼠终身高血糖,所以 DB/DB (LP^{-/-}) 小鼠是用来研究糖尿病和肥胖症等疾病的理想动物模型。我们从美国杰克逊实验室(Jackson Laboratory)引入 LP 受体基因杂合型小鼠,在 SPF 级(无特定病原体动物)动物房中饲养、繁殖,鉴定出一批 DB/DB 纯合子小鼠,为糖尿病和肥胖症的研究提供了理想的动物模型。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物 LP 受体基因敲除杂合子(LP^{+/-})小鼠从美国 Jackson Laboratory 购买,雄鼠 5 只,雌鼠 10 只,品系为 C57BL/KsJ。使该品系小鼠在特异性基因位点发生基因变异,从而得到基因背景为 LP 受体基因敲除杂合子(LP^{+/-})。

1.1.2 主要试剂 KOD FX 酶购自东洋纺生物科技有限公司;DNA marker DL 2000 购自大连宝生物工程有限公司;PCR 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成;其他试剂 NaOH、Tris、HCl 均为分析纯。

1.1.3 仪器与设备 PCR 仪(英国基因公司),凝胶成像仪(英国基因公司),电流仪(北京六一仪器厂),离心机(美国贝克曼库尔特有限公司),微量移液器[大龙兴创实验仪器(北京)有限公司],独立通气笼(IVC,苏杭科技器材有限公司),超净工作台(苏州净化设备有限公司)。

1.2 小鼠的繁殖方式

1.2.1 配对情况 将小鼠按下列 4 种方式 2:1 配对:LP^{+/-} 雌性与 LP^{+/-} 雄性,LP^{-/-} 雌性与 LP^{+/-} 雄

性,LP^{+/-} 雌性与 LP^{-/-} 雄性,LP^{+/+} 雌性与 LP^{+/-} 雄性,每组配对 4 对,均交配 2 个月。

1.2.2 饲养条件 在动物实验室的 IVC 中饲养,在超净工作台中操作,喂以 SPF 级饲料,保证试验在 SPF 级条件下进行。室温恒定为 24 ℃,空气湿度保持在 45%~65%,白天给予 12 h 光照。

1.3 子代小鼠基因型的鉴定

1.3.1 小鼠 DNA 模板的提取 剪 1~3 mm 鼠尾于 PCR 管中,将其剪碎后加入 180 μL 50 mmol/L NaOH 溶液,充分振荡,用 PCR 仪 95 ℃ 孵育 10 min,再加入 20 μL pH 8.0 的 Tris-HCl 溶液,充分振荡后,12 000 r/min 离心 5 min。上清即粗 DNA 模板。

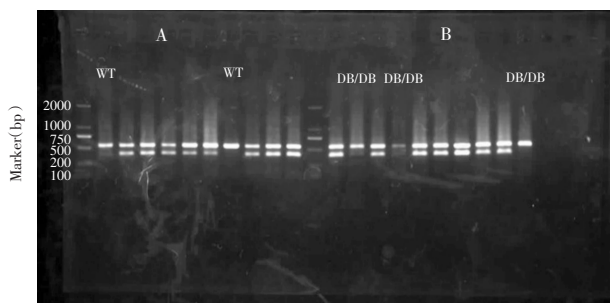
1.3.2 PCR 反应 ①引物。引物共有 3 对,小鼠通用引物序列为 CTRL-R: 5'-CAGAAATCGAG-GAAGAAATG-3', CTRL-F: 5'-CAGAAATCGAG-GAAGAAATG-3',正常 PCR 条件下,得到 549 bp;LP⁻ 基因特异性引物, DB-SCRN-R: 5'-CTAATATGGAAGCTTTCACA-3', DB-SCRN-F: 5'-GTTTACTTTTGATGGAGGT-3',在同样条件下能得到 394 bp;LP⁺ 基因特异性引物,序列为 DB-SCRN-R: 5'-CTAATATGGAAGCTTTCACA-3', DB-SCRN-F-N: 5'-GTTTACTTTTGATGGAGGG-3',在同样条件下能得到 394 bp。②PCR 体系。H₂O 12 μL, 2 mmol/L dNTP 10 μL, 2 × PCR buffer 25 μL, 引物 1 μL, DNA 模板 1 μL, KOD-FX 酶 1 μL。③PCR 反应条件。预变性: 94 ℃ 5 min;变性: 94 ℃ 30 s;退火: 60 ℃ 60 s;延伸: 72 ℃ 50 s, 40 个循环;最后延伸: 72 ℃ 10 min, 4 ℃ 保存。

1.3.3 1%琼脂糖凝胶电泳 0.35 g 琼脂糖, 1 × TBE 35 mL, Goldview I 2 μL, 用 5 μL 产物与 1 μL 5 × loading buffer 混合上样,电泳电压 110 V, 时间 30 min。

2 结果与分析

8 对亲本均为杂合体的小鼠交配后,2 个月得到 45 只小鼠。通过 PCR 基因鉴定,其中有 9 只 DB/DB 小鼠(LP^{-/-} 基因纯合子),占总数的 20%;50 只为 LP^{+/-} 基因杂合小鼠,占总数的 56.7%;野生型(WT)C57 小鼠有 22 只,占总数的 23.3%。而亲本中有任何一方为 LP⁺ 基因纯合子的小鼠组均表现出不育,这与 DB/DB 小鼠是不育的报道相一致^[1]。8 对亲本中有野生型(WT)C57 小鼠组中得

到了 60 只小鼠，其中杂合体小鼠为 33 只，占总数的 55%；野生型(WT)C57 小鼠为 27 只，占总数的 45%。PCR 电泳结果见图 1。



A 为 CTRL-R、CTRL-F 和 DB-SCRN-R、DB-SCRN-F 2 对引物 PCR 结果；B 为 CTRL-R、CTRL-F 和 DB-SCRN-R、DB-SCRN-F-N 2 对引物 PCR 结果。

图 1 PCR 方法进行小鼠基因型鉴定的结果

由 CTRL-R、CTRL-F 和 DB-SCRN-R、DB-SCRN-F 2 对引物只扩增到 549 bp 条带的基因型为野生型(WT)C57 小鼠，因其引物未扩增到 LP⁻ 基因；而由 CTRL-R、CTRL-F 和 DB-SCRN-R、DB-SCRN-F-N 2 对引物只扩增到 549 bp 条带的基因型为 LP^{+/+} 基因纯合子 (DB/DB) 小鼠，因其引物未扩增到 LP⁺ 基因。而当由上述 2 对引物分别 2 次扩增都得到 549 bp 条带和 394 bp 条带时，该小鼠基因型为 LP^{+/-} 基因杂合小鼠。

3 讨论

基因敲除技术是借助分子生物学、细胞生物学和动物胚胎学的方法，将小鼠体内的某种基因的功能缺失，用以揭示基因功能最直接的手段之一，因此成为现代生物技术的重要研究方法和内容^[9-10]。为了更好地进行 LP 受体基因的功能和糖尿病药物的研究，我们引进了 LP 受体基因敲除小鼠。由于使用 LP^{+/-} 基因杂合小鼠，其子代中常出现 LP^{+/-}、LP^{+/+}、LP^{-/-} 3 种基因型，该研究是将这 3 种基因型小鼠分开，从结果看，大致还是符合孟德尔遗传定律，亲代中有 LP^{-/-} 基因纯合小鼠均不能受孕，而用野生型小鼠参与繁殖则得不到 LP^{-/-} 基因纯合(DB/DB)小鼠。因此只能通过 LP^{+/-} 基因杂合小鼠进行交配，由于 LP^{+/-} 和 LP^{+/+} 在表现型上是一致的，而且小鼠的生长周期较短，如果不及时将子代小鼠的基因型区分开来，将造成资源的极大浪费，而且还不容易得到相应能用于试验的小鼠。我们目前通过合理安排动物生产，能得到相应的 DB/DB 小鼠，以满足实验室的试验需求。

要想得到用来做试验的大量相近出生日期的 DB/DB 小鼠，只有通过扩大繁殖来实现。试验结果也表明，LP^{+/-} 基因杂合小鼠交配繁殖得到的小鼠数量不多，有时 1 只雌鼠 1 次分娩才产下 4~6 只小鼠，而野生型小鼠交配时，1 只雌鼠 1 次分娩能得到 6 只以上小鼠，对此还需要深入研究。带有 LP⁻ 基因对小鼠生育是否有影响尚不清楚，还需要进一步的研究。总之，掌握对小鼠基因型的鉴定能合理地利用有限的资源，来繁殖我们所需要的试验小鼠。

参考文献：

- [1] ISRAEL D, CHUA S JR. Leptin receptor modulation of adiposity and fertility[J]. Trends Endocrinol Metab, 2010, 21(1): 10.
- [2] DENVER RJ, BONETT RM, BOORSE GC. Evolution of leptin structure and function[J]. Neuroendocrinology, 2011, 94(1): 21-38.
- [3] SILVA BA, BJOTHAEEK C, UOTANI S, *et al.* Functional properties of leptin receptor isoforms containing the Gln→Pro extracellular domain mutation of the fatty rat [J]. Endocrinology, 1998, 139(9): 3681-3690.
- [4] GHILARDI N, ZIEGLER S, WIESTUER A, *et al.* Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(13): 6231-6235.
- [5] YMASHITA T, MURUKAMI T, OTANI S, *et al.* Leptin receptor signal transduction: OBRa and OBRb of fa type [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 246(3): 752-759.
- [6] MCCOWEN KC, CHOW JC, SMITH RJ. Leptin signaling in the hypothalamus of normal rats in vivo[J]. Endocrinology, 1998, 139(11): 4 442-4 447.
- [7] CARPENTER LR, FARRUGGELLA TJ, SYMES A, *et al.* Enhancing leptin response by preventing SH2-containing phosphatase 2 interaction with Ob receptor[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(11): 6061-6066.
- [8] CHUNG CD, LIAO J, LIU B, *et al.* Specific inhibition of STAT-3 signal transduction by PIAS[J]. Science, 1997, 278: 1 803-1 805.
- [9] GUAN C, YE C, YANG X, *et al.* A review of current large-scale mouse knockout efforts[J]. Genesis, 2010, 48: 73-85.
- [10] 王 强, 钱文溢, 刘景丽, 等. ERα 基因敲除小鼠的繁育及子代小鼠基因型的鉴定 [J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(2): 100-102.

(本文责编：郑丹丹)