

遗传性角膜基质变性小鼠及其突变基因的定位

邵义祥^{1,2}, 吴宝金¹, 薛整风¹, 陈兵¹, 茅慧华¹, 赵明¹, 李厚达¹

(1. 扬州大学比较医学中心, 江苏 扬州 225009)

(2. 南通大学实验动物中心, 江苏 南通 226001)

[摘要] 以 ENU 诱导 C57BL/6 小鼠获得的角膜浑浊突变系小鼠(B6-Cd)为研究对象, 遗传试验及病理切片证实为单基因显性遗传的角膜基质变性; 采用连锁分析法, 用 39 个微卫星对角膜基质变性小鼠的 150 只 F₂ 代个体[(B6 × D2)F₁ × D2]进行基因组扫描, 发现突变基因与 D13Mit262(距着丝粒 42.6 cM)的 LOD 值为 40.54, 与 D13Mit76(距着丝粒 47 cM)的 LOD 值为 38.77, 突变基因初步定位于 13 号染色体距着丝粒 45.24 cM 处. 本研究提供了一种人类遗传性角膜基质变性的极好模型, 为该病发生机制、药物开发及突变基因的克隆提供了新型材料.

[关键词] 角膜基质变性, 突变, 基因, 定位, 小鼠

[中图分类号] Q952.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2006)02-0099-04

The New Mutation Mouse with Heritable Disease of Cornea Matrix Denaturalization and the Mapping of Mutation Gene

Shao Yixiang^{1,2}, Wu Baojin¹, Xue Zhengfeng¹, Chen Bing¹, Mao Huihua¹, Zhao Ming¹, Li Houda¹

(1. Comparative Medicine Center, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

(2. Laboratory Animal Center, Nantong University, Nantong 226001, China)

Abstract: B6-Cd, a new mutant with corneal opacities obtained from C57BL/6 mice using ENU-induced mutagenesis by our lab, are the materials in this study. Histological sections and heredity test indicate that the pathological changes are of cornea matrix denaturalization controlled by single dominant gene. Chain analysis method is used, and in order to map the mutation gene, 39 microsatellites are selected to scan the genome after having bred 150 F₂ mutation mice [(B6 × D2) F₁ × D2]. It is found that, 1 case of recombinant between mutation gene and D13Mit262(47 cM from the centromere) appears in 32 F₂ mice and the LODS of 6.38 confirms their relationship of linkage. Then, detected by D13Mit262 and D13Mit76(42.6 cM from the centromere), with the number of F₂ mice going up to 150, the mutant gene is found to lie on chromosome 13 between D13Mit262 and D13Mit76, about 45.24 cM from the centromere. B6-Cd can serve as an excellent model for heritable disease of human cornea matrix denaturalization. Such new materials can be used in studying the mechanism of cornea matrix denaturalization, exploiting drug and cloning the mutation gene.

Key words: cornea matrix denaturalization, mutation, gene, mapping, mouse

0 引言

随着人类基因组计划的完成, 基因功能的研究成为生命科学的主战场之一, 克隆新基因尤其是与人类疾病相关的基因得到空前重视^[1,2]. 许多新基因的克隆必须通过模式生物实现, 而最理想的模式生物当属小鼠^[3]. 在先前的研究中, 我们通过 ENU(乙基亚硝基脲)诱导突变的手段, 获得了一种先天性角膜浑浊的突变系小鼠^[4,5]. 本文初步确定这是一种先天性角膜基质变性, 呈单基因显性遗传, 并采用微卫星标记成

收稿日期: 2005-04-18.

基金项目: 国家十五科技攻关计划(2001BA710B)、江苏省动物预防医学重点实验室开放基金、南通市社会发展基金资助项目(S5037).

作者简介: 邵义祥, 1956—, 博士, 副教授, 主要从事人类疾病动物模型的教学与研究. E-mail: shaoyx@ntu.edu.cn

功定位了突变基因,为该小鼠的模型开发及突变基因的克隆打下了基础.

1 材料与方法

1.1 实验动物和设施

研究对象为本实验室诱导 C57BL/6(B6)小鼠突变,在近万只小鼠中筛查获得的新的突变系之一,暂定名 B6-Cd. 保种繁殖使用 B6 雌雄各 20 只,定位使用 DBA/2(D2)雌雄各 20 只. 实验小鼠均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:SCXK(苏)2002-0045. 动物饲养在屏障环境的动物房内,饲喂 Co^{60} 辐照灭菌的双狮牌饲料,自由采食和饮水,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 12:12 h 明暗交替.

1.2 病变角膜的组织学研究

取 B6 背景的 2 月龄突变小鼠雌雄各 4 各,取眼球,常规固定、脱水、包埋、切片、HE 染色. 光镜观察. 设背景 B6 小鼠作对照.

1.3 B6-Cd 遗传模式的确定

将 B6 背景的突变杂合子与 B6 正常小鼠交配,计算后代小鼠当中突变小鼠与正常小鼠的数目,将其与单基因显性遗传模式的理论数值进行卡方检验,确定遗传模式.

1.4 定位突变基因

繁殖定位用 F_2 小鼠 $[(B6 \times D2)F_1 \times D2]$,区分是否具有突变表型,剪取突变小鼠的尾尖 0.5 cm 左右,采用蛋白酶 K 消化、酚氯仿法提取基因组 DNA,选择本实验室建立的 39 个微卫星定位标记体系进行连锁分析^[6]. 采用计算 LOD 值方法将突变基因定位于小鼠的特定染色体^[5].

2 结果

2.1 B6-Cd 角膜的病变特点

B6-Cd 突变基因杂合子小鼠眼部位置、外形基本正常,角膜整体浑浊,呈均质云雾状,不透明,虹膜及瞳孔不可见. 病理切片证实为角膜基质变性(图 1). 虹膜、晶状体、玻璃体及视网膜无明显异常. 突变基因纯合子小鼠的表型特征,尚不能确定.

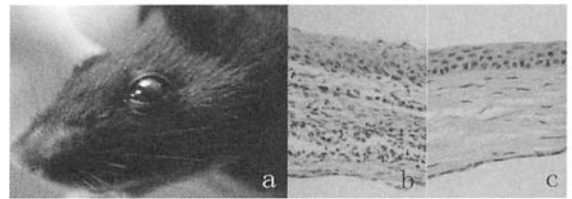
2.2 B6-Cd 为单基因显性遗传

B6-Cd 角膜浑浊小鼠已传 5 代,突变表型稳定,突变杂合子小鼠($m/+$)与正常 B6 背景品系小鼠($+/+$)配种共繁殖后代 257 只,其中

131 只出现角膜浑浊的突变表型,呈单基因显性遗传, $\chi^2 = 0.05, 0.75 < P < 0.90$,外显率 100%. 但是在不同遗传背景中,突变基因的外显率不同,一共繁殖 F_2 小鼠 $[(B6 \times D2)F_1 \times D2]$ 307 只,其中 135 只显示突变表型,外显率约 88%.

2.3 突变基因在染色体上的定位

将角膜基质变性小鼠杂合子与 D2 交配获得 F_1 角膜基质变性小鼠 10 只,然后将 F_1 角膜基质变性小鼠回交 D2 得到 33 只 F_2 角膜基质变性小鼠(由于突变基因在 F_2 小鼠中的外显率低,为了减小携带突变基因而表型正常的 F_2 小鼠对试验结果的干扰,本研究全部采用有突变表型的 F_2 用于定位工作);提取 F_2 角膜基质变性小鼠尾尖的 DNA 样本,用 39 个微卫星引物依次扩增 F_2 鼠尾的 DNA 样本,表型为角膜基质变性同时伴 B6 微卫星标记者记为连锁,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. 各微卫星与突变基因连锁分析结果(见表 1)表明突变基因与 D13Mit262 和 D13Mit76 连锁. D13Mit262 和 D13Mit76 间有 5 例交换,交换率为 $3.33\% \pm 2.85\%$;突变基因与 D13Mit262 有 2 例交换(图 2),交换率为 $1.33\% \pm 1.83\%$,与 D13Mit76 间有 3 例交换,交换率为 $2.0\% \pm 2.24\%$;故突变基因位于 13 号染色体距着丝点 45.24 cM 附近(图 3).



a:角膜变性鼠,角膜浑浊; b:角膜变性鼠的角膜切片,上皮细胞层细胞形态基本正常,排列紊乱,细胞层次增多. 基质层显著细胞浸润,伴有少量新生血管(HE \times 100); c:正常鼠角膜切片(HE \times 100)

图 1 病变角膜的大体及病理切片照片

表1 各微卫星与突变基因的连锁分析结果

微卫星名称	微卫星位置 (所在染色体,距着丝粒距离/cM)	成功检测的 F ₂ 数量	重组比值*	LOD 值	是否连锁
D11Mit258	11,65.6	32	16/32 = 0.5	0	
D12 Mit136	12,9.8	32	13/32 = 0.406	0.25	
D 15Mit226	15,9.8	32	19/32 = 0.594	0.25	
D4Mit17	4,29.4	32	9/32 = 0.284	1.38	
D4Mit54	4,68.9	33	15/33 = 0.456	0.059	
D4 Mit101	4,5.5	31	13/31 = 0.419	0.176	
D5Mit352	5,15.3	33	20/33 = 0.606	0.32	
D 10Mit73	10,62.3	33	13/33 = 0.394	0.325	
D 11Mit163	11,13.1	33	14/33 = 0.424	0.165	
D 14Mit50	14,9.8	32	14/32 = 0.438	0.109	
D17 Mit33	17,9.8	33	19/33 = 0.576	0.17	
D 19Mit128	19,10.9	32	15/32 = 0.469	0.027	
D1 Mit84	1,56.8	33	20/33 = 0.606	0.32	
D2 Mit17	2,56.8	33	19/33 = 0.576	0.17	
D2 Mit6	2,12	33	17/33 = 0.515	0.01	
D6 Mit339	6,54.6	33	18/33 = 0.545	0.13	
D7 Mit246	7,12	32	16/32 = 0.5	0	
D 8Mit4	8,12	33	22/33 = 0.667	0.81	
D 16Mit100	16,8.7	33	17/33 = 0.515	0.01	
D 3Mit268	3,12	33	19/33 = 0.576	0.17	
D5 Mit168	5,66.7	17	10/17 = 0.588	0.12	
D2Mit528	2,87.4	33	19/33 = 0.576	0.25	
D6 Mit274	6,10.9	32	13/32 = 0.406	0.246	
D8Mit320	8,61.2	33	18/33 = 0.545	0.13	
D12Mit17	12,51.4	33	15/33 = 0.456	0.059	
D 1Mit300	1,32.8	31	20/31 = 0.645	0.58	
D7 Mit333	7,62.3	33	17/33 = 0.515	0.01	
D 9Mit325	9,10.9	17	8/17 = 0.471	0.0124	
D9 Mit243	9,60.1	17	7/17 = 0.412	0.167	
D13Mit262	13,47	150	2/150 = 0.0133	40.54	连锁
D13 Mit76	13,42.6	150	3/150 = 0.02	38.77	连锁

注:(a)亲组合与重组组合的计算方法,以突变基因与 D13Mit262 连锁分析为例,见表2.

表2 突变基因与 D13Mit262 的连锁分析

基因型	互交亲本		测交亲本		突变型 F ₂		重组值
	突变型 B6	D2	突变型 F ₁	D2	亲组合	重组组合	
	$\frac{m}{+} \frac{b6}{b6}$	$\frac{+}{+} \frac{d2}{d2}$	$\frac{m}{+} \frac{b6}{d2}$	$\frac{+}{+} \frac{d2}{d2}$	$\frac{m}{+} \frac{b6}{d2}$	$\frac{m}{+} \frac{d2}{d2}$	
	—	—	—	—	148	2	2/150

注:m为突变基因,+为野生型,b6为 B6 型 D13Mit262,d2 为 D2 型 D13Mit262.



图2 D13Mit262 对 B6-Cd 部分突变杂合子 F₂ 检测结果

3 讨论

3.1 研究背景

ENU 诱变是近年来研究功能基因的一种方法.研究者通过诱变获得突变系小鼠,在定位克隆突变基

因的基础上,研究突变基因的功能.这一方法在研究基因功能的同时,会得到新型的人类疾病的小鼠模型,用于研究疾病的发生机制及进行治疗药物的开发^[7,8].这方面研究开始于上个世纪 90 年代,King 等通过 ENU 诱导突变的手段,在小鼠中发现了生活周期异常的突变并建立了突变系,通过精确定位,最终在 1997 年克隆了 clock 基因^[9].德国的 Graw 等通过 ENU 诱导突变的手段获得 1 例白内障小鼠模型,突变基因被定位于 1 号染色体^[10].本研究正是利用 ENU 诱变过程中发现的角膜浑浊突变系小鼠,进行人类相关疾病的类比研究.国内在人类疾病基因的克隆上已经接近发达国家的水平,上海、湖南及四川等科研机构已经成功克隆了如短指基因、视网膜色素变性基因等^[4],而利用小鼠基因组研究的成果进行疾病相关基因的功能研究尚为空白,这一领域的研究不仅是研究思路 and 实验方法的创新,也是生物医学研究中材料和工具的创新^[11].

3.2 角膜基质变性小鼠的价值及本项工作意义

人类先天性角膜浑浊是一种常见眼病,许多先天性角膜浑浊的发生与遗传因素有关或存在家族史,在部分家系表现为常染色体显性遗传,但有关其遗传基础尚不明确^[12].角膜浑浊小鼠眼部异常对应于人类角膜营养不良中的先天性角膜基质变性,对突变基因的定位工作更证明了遗传因素在其中发挥着决定性的作用.尽管目前还不能确定人类先天性角膜基质变性有多少种类型,但我们的工作至少为其中的一种找到了遗传因素的证据,解决了其病因是感染、发育异常还是遗传的争论,以此为基础可以进一步研究突变基因在该病发生、发展中的机制. B6-Cd 角膜基质变性小鼠还可以作为一个极好的模型用于相关药物的筛选、基因药物的开发以及对突变基因的克隆.

本研究不仅提供了一种人类先天性角膜变性的模型,为该病发生机制、药物开发与治疗的研究提供了新型材料,对突变基因的定位更为相关基因的克隆及功能研究、深入揭示角膜基质变性的分子机制打下基础.

致谢:衷心感谢南通大学附属医院眼科研究所管怀进教授在角膜基质变性诊断过程中给予的帮助.

[参考文献]

- [1] Lander E S, Linton L M, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome[J]. Nature, 2001, 409(6822): 860-921.
- [2] 陈竺,强伯勤,方德福. 基因组科学与人类疾病[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [3] Sung Y H, Song J, Lee H W. Functional genomics approach using mice[J]. J Biochem Mol Biol, 2004, 37(1): 122-132.
- [4] 吴宝金,茅慧华,薛小萍,等. 乙酰基亚硝基胍诱导小鼠突变的初步研究[J]. 中国实验动物学报, 2003, 11(3): 142-146.
- [5] 吴宝金,茅慧华,邵义祥,等. ENU 诱变获得四种白斑小鼠及对突变基因的染色体定位[J]. 科学通报, 2003, 48(3): 2301-2307.
- [6] 吴宝金,茅慧华,朱洪,等. 小鼠 39 个微卫星的 PCR 条件及其运用[J]. 中国实验动物学报, 2003, 11(4): 216-220.
- [7] Rudi Balling. ENU mutagenesis: analyzing gene function in mice[J]. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2001, 2: 463-492.
- [8] 孙岩松,杨晓. ENU 诱导点突变一大规模基因突变和功能研究[J]. 生物工程学报, 2001, 17(4): 365-370.
- [9] Vitaterna M H, King D P, Chang A M, et al. Mutagenesis and mapping of a mouse gene, clock, essential for circadian behavior[J]. Science, 1994, 264(5159): 719-725.
- [10] Graw J. The genetic and molecular basis of congenital eye defects[J]. Nat Rev Genet, 2003, 4(11): 876-888.
- [11] 傅继梁. 值得关注的小鼠 ENU 诱变研究[J]. 科学通报, 2003, 48(22): 2299-2230.
- [12] 孙为荣. 眼科病理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 120-128.

[责任编辑:孙德泉]

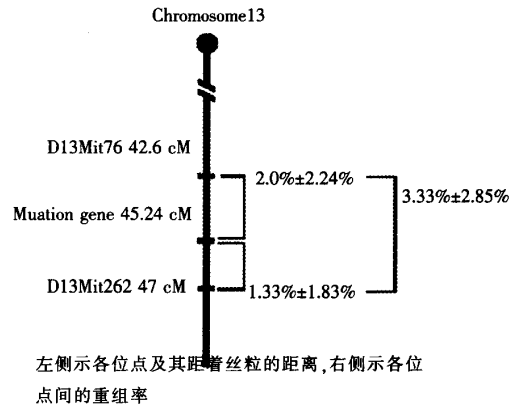


图 3 突变基因位置示意图