

# BALB/C 小鼠的白内障突变与大片段小卫星 DNA 多态性的变化<sup>△</sup>

张小为 王津栋\* 孟艳\*\* 薄侃\*\*\* 蔡有余\*\*

(北京医科大学第三医院妇产科 北京 100083)

**摘 要** 为了探讨 BALB/C 小鼠白内障突变品系与 BALB/C 小鼠保种品系二者间小卫星 DNA 多态性的变化,为进一步研究变异小卫星位点与白内障突变基因的关系最终找到导致这种白内障形成的基因奠定基础,采用  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP 标记的人类小卫星 DNA 探针 Myo, 通过 Southern 杂交比较了正常 BALB/C 和 BALB/C 白内障突变体小卫星 DNA 多态性的变化。结果: BALB/C 白内障小鼠种内 DNA 多态性带纹分布高度一致, 雌雄间无差别, 表明白内障小鼠已纯种化; 与正常 BALB/C 小鼠对比, 白内障小鼠 DNA 在 20kb 和 9kb 有 2 个位点出现大片段的小卫星 DNA 插入。该动物模型的形成和突变 DNA 片段的发现将对遗传性白内障基因水平的病因学研究和产前诊断方法的建立具有重要意义。

**关键词** BALB/C 小鼠 遗传性白内障 小卫星 DNA 突变

遗传性白内障是重要的先天性眼科疾患, 是婴幼儿失明重要的先天性因素。多年来, 国内外曾对此疾病作了大量的研究, 但对其真正的发病机制仍不清楚, 也无法做到产前诊断。本项研究中的白内障小鼠是由于在对 BALB/C 小鼠进行繁育中偶然有两只小鼠发生了白内障突变, 经同胞间杂交、传代而得, 成为研究人类白内障极有价值的动物模型。本文使用人类小卫星 DNA 探针 Myo(英文肌红蛋白的前三个字母)分析了这一自发白内障突变品系小鼠与 BALB/C 小鼠小卫星 DNA 多态性的差别, 发现了两条突变的小卫星 DNA 片段, 为下一步白内障基因水平的研究以及产前诊断提供了极有价值的线索和资料。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验动物** 保种的 BALB/C、AKR、CBA 和昆明小鼠由中国医学科学院实验动物研究所提供, BALB/C 白内障小鼠由解放军南京第八一医院提供。

**1.2 主要试剂** Myo 探针来自日本人本间正充教授, 内切酶 Hinf I 购自美国 Biolabs 公司,  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP( $\alpha$  位 <sup>32</sup>P 脱氧三磷酸胞苷)购自北

京福瑞公司。

**1.3 方 法** 鼠 DNA 的提取 将小鼠脱臼处死, 解剖提取脾脏, 将脾脏的一半放入玻璃匀浆器中, 加入 0.5ml TNE [15mmol/L Tris-Cl (三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲液), 100mmol/L NaCl, 50mmol/L EDTA(乙二胺四乙酸二钠), pH7.5], 冰浴中研磨匀浆, 取出 0.5ml 放入 1.5ml 离心管中, 加入 SDS(十二烷基硫酸钠)和蛋白酶 K(终浓度分别为 0.5% 和 100 $\mu$ g/ml), 56 $^{\circ}$ C 中消化 3 小时, 饱和酚、氯仿抽提去蛋白, 乙醇沉淀 DNA, 干燥后用 TE(含 10mmol/L Tris 和 1mmol/L EDTA, PH7.5)溶解。

DNA 的限制性内切酶消化、电泳和 Southern 吸印<sup>[1]</sup>。

**探针制备** Myo 片段大小约 0.5kb(千碱基对), 两端分别为 BamH I 和 EcoR I 酶切断端。将其克隆入 PBR322 的 BamH I 和 EcoR

\* 北京医科大学生物化学系 北京 100083; \*\* 解放军南京第八一医院中心实验科 南京 210002; \*\*\* 中国医学科学院实验动物研究所 北京 100730;

第一作者简介: 张小为, 男, 38 岁, 医学博士;

收稿日期: 1997-10-21, 修回日期: 1997-12-01。

I 双酶切位点, 转化 DH5 $\alpha$  并扩增, 提取和鉴定重组质粒。探针标记在 20 $\mu$ l 反应体系中进行, 其中含有用 EcoR I 位点测序引物 4ng、1U Taq DNA 聚合酶、50 $\mu$ ci  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP、500ng BamH I 线性化的 PBR322-Myo DNA、50mmol/L KCl、10mmol/L Tris (PH8.9) 和 1.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 95 $^{\circ}$ C 加热 3 分钟, 55 $^{\circ}$ C 反应 15min, 用葡聚糖凝胶 G-50 分离第一个放射峰(>10<sup>9</sup>cpm/ $\mu$ g DNA)。

预杂交和杂交<sup>[1]</sup>。

## 2 结果

**2.1 BALB/C 白内障小鼠的 DNA 多态性(见图 1)** 图 1 中 1~3 为雌性, 4~5 为雄性, 在 23~9kb、9~6kb 和 6~2kb 间的带纹数都分别为 4、3 和 9, 而且雌雄间的 DNA 多态性带纹分布完全一致, 表明此白内障小鼠已经纯种化。

**2.2 BALB/C 白内障小鼠和 BALB/C 纯种小鼠 DNA 多态性的比较** BALB/C 纯种小鼠(图中的 B)在 23~9kb、9~6kb 和 6~2kb 间的带纹数分别为 3、2 和 9, 白内障小鼠在上述分子量区的带纹数为 4、3 和 9, 在 6kb 以下两种小鼠的 DNA 带纹分布毫无差别, 但在 23~

6kb 间白内障小鼠比 BALB/C 小鼠多两条带纹, 即在 20kb 和 9kb 处各多了一条。9kb 处多出的带纹密度较高, 表明 DNA 片段的核心序列拷贝数多, 而 20kb 处多出的片段的密度很低, 表明其核心序列拷贝数较低, 侧翼序列较长, 或者是片段本身拷贝数低。

**2.3 AKR、CBA 和昆明小鼠(图中的 A、C 和 K)的 DNA 多态性** 三者间的带纹分布差异明显, 表明不同品系间 DNA 多态性的不同, 而且与 BALB/C 白内障小鼠和 BALB/C 纯种小鼠的差异十分明显。本研究中采用这三种小鼠的目的是用作对照, 说明不同品系间 DNA 多态性是有明显差异的。

## 3 讨论

生物的自然进化具有进步的意义, 它是生物在长期的生命过程中由于环境的刺激导致了生物体基因的转变——突变的积累。突变并不都是有进步意义的, 有很多突变是无意义的甚至是有害的。有害的突变导致生物体发生遗传性疾病甚至死亡, 目前人类的遗传性疾病多达 3000 种以上, 预防和治疗这些遗传病是人类面临的重大挑战, 而研究这些遗传性疾病的基因

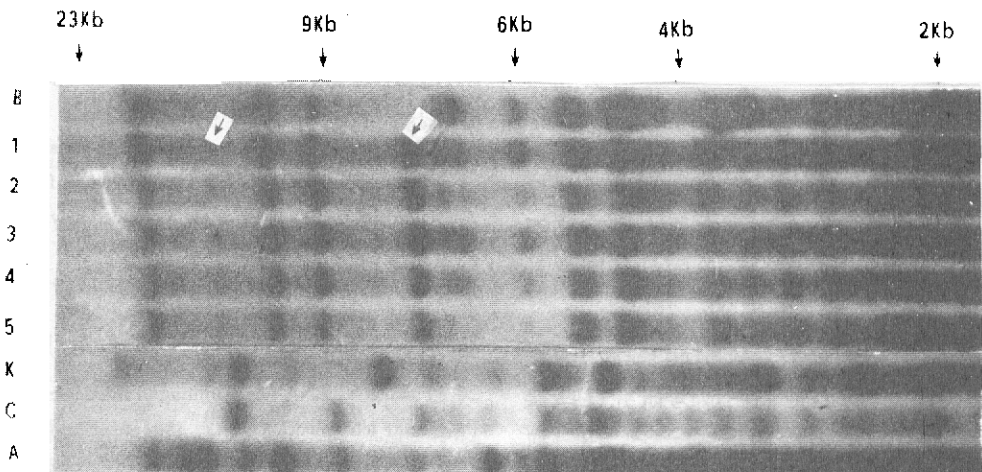


图 1 BALB/C 突变致白内障小鼠大片段小卫星 DNA 多态性的变化

(The Variations of large fragment minisatellite DNA of cataract inbred mouse mutating from BALB/C)

B: BALB/C 小鼠(BALB/C mouse); 1~3: 为雌性白内障小鼠(female cataract mice); 4~5: 为雄性白内障小鼠(male cataract mice); K: 昆明小鼠(Kunming mouse); C: CBA 小鼠(CBA mouse); A: 为 AKR 小鼠(AKR mouse)。箭头指示的为白内障小鼠插入突变形成的带纹(The arrows show mutation bands of cataract mice)。

机制是人们面临的重大课题。实验动物学在遗传病的研究中具有特殊的作用。有害突变发生于实验动物身上所形成的遗传病是研究人类遗传病最好的模型,有时人们在动物或动物细胞培养过程中特意施加一些能导致突变的因素,人为地制造遗传病的动物模型用于人类遗传病的研究。Paquette B 等在 1992 年发表文章介绍应用 X 线和紫外线照射小鼠体细胞诱导突变,并采用 DNA 指纹加以检验的报道<sup>[2]</sup>。

本研究中采用的 BALB/C 白内障小鼠是在保种繁育中自发突变形成的,经杂交和回交证明导致白内障的基因为显性遗传,遗传方式和病理改变与人类遗传性白内障的特点很相似。由于目前人类白内障形成的基因机制尚不清楚,有价值的人体材料又难以获得,所以,这一白内障小鼠纯系的建立将为人类白内障的研究提供极有价值的模型。

本研究中采用的人类小卫星 DNA 探针为来自人类肌红蛋白基因第一内含子的重复序列 5'-G ACCGAGGTCTAAAGCTGGAGGTG G-GCAGGAAG-3' 的多聚体,已被证明在人类基因组中有广泛的同源分布,能够检测的多态性位点多达上百个,有高度多态性的位点也在 20 个以上,蕴含着大量的遗传信息<sup>[3]</sup>。小卫星 DNA 的种类很多,在基因组中的分布极其广泛,而且很多小卫星 DNA 在不同种类的生物甚至微生物中都有广泛的分布<sup>[4]</sup>。张小为等曾用 Myo 探针分析了 6 种近交系小鼠,意外地发现 Myo 这一人类 DNA 序列在鼠中亦有广泛的分布,而且品系间差异显著,不同品系间意外相同的机率为  $10^{-8}$  (另文发表)。

很多基因的突变都会连锁引起某些小卫星 DNA 长度的改变,所以他们已成为研究某些疾病基因突变最有效的遗传标记之一<sup>[5]</sup>。在白血病中可用小卫星 DNA 的变化来检测是否治愈<sup>[6-7]</sup>,在骨髓移植中可用于移植是否成功的判定<sup>[8]</sup>。另外,在动物学中有关育种和种系污染监测的应用也有实际意义<sup>[9]</sup>。本研究中采用的 5 只 BALB/C 白内障小鼠的小卫星 DNA 多态性带纹完全一致,与 BALB/C 相比,有两条

片段的插入,其余带纹完全相同,表明在基因水平上白内障小鼠已纯种化,是由 BALB/C 变化而来。

这两条片段的插入肯定影响了与晶状体发育相关的基因,其中 20kb 的片段密度很低,其原因可能是小卫星核心序列拷贝数很低,大部分序列都是与小卫星 DNA 无关的结构,也可能是片段本身的拷贝数低,如果是前一个原因,这条片段与白内障突变基因的关系就更密切。总之,对这两条片段(首先是 20kb 的片段)进行分离克隆和序列分析对进一步的白内障基因的筛选具有重要价值,对揭示白内障形成的基因机制研究人类先天性白内障的发生和建立产前诊断的方法实行选择性优生,最终达到提高人口素质具有重大意义。

### 参 考 文 献

- 1 Zhang Xiaowei. Restriction fragment length polymorphism analysis of forensic science casework in the People's Republic of China. *J. Forensic Science*. 1991, 36:531~536.
- 2 Paquette, B., J. B. Little. Genomic rearrangements in mouse C3H/10T1/2 cell transformed by x-rays, UV-C, and 3-methylcholanthrene, detected by a DNA fingerprint assay. *Cancer Res*. 1992, 52:5788~5793.
- 3 Jeffreys, A. J., V. Wilson Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*. 1985, 314:67~73.
- 4 Georges, A. S. DNA fingerprinting in domestic animals using four different minisatellite probes. *Cytogenet Cell Genet*. 1988, 47:127.
- 5 Jeffreys, A. J. Repeat unit sequence variation in minisatellites: a novel source of DNA polymorphism for studying variation and mutation by single molecule analysis. *Cell*, 1990, 9:60.
- 6 王 黛, 辛雅莉, 张小为, 等. 用 DNA 指纹技术检测儿童急性粒细胞白血病基因重排. 北京医科大学学报, 1997, 2, 129~133.
- 7 Pakkala S. DNA fingerprinting in the detection of residual in acute leukemia. *Leukemia*, 1991, 5, 437~440.
- 8 张 萍, 王仲立, 郑 毅, 等. 应用 DNA 指纹图谱分析骨髓移植后的移植状态. 中华血液学杂志, 1991, 10: 509~512.
- 9 Jeffreys, A. J., Wilson, V. and R. Kelly. Mouse DNA 'fingerprints': analysis of chromosome localization and germ-line stability of hypervariable loci in recombinant inbred strains. *Nucleic Acids Res*. 1987, 15:2823~2835.

## THE VARIATIONS OF LARGE FRAGMENT MINISATELLITE DNA OF CATARACT INBRED MOUSE MUTATING FROM BALB/C

ZHANG Xiaowei WANG Jindong\* MENG Yan\*\* Bo Kan\*\*\* CAI Youyu\*\*

(Department of Obstetric and Gynecology, The Third Hospital, Beijing Medical University Beijing 100083)

**ABSTRACT** Objective: To make a distinction between BALB/C and BALB/C-Cataract inbred mice mutating from BALB/C by DNA polymorphism analysis. Methods: The DNA restriction fragments by *Hinf* I were hybridized after Southern Blotting by human minisatellite probe Myo labeled by  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP. Results: The DNA polymorphism patterns of cataract mice are showing no difference. In comparison with normal BALB/C, The BALB/C-Cataract mice add two bands with the length of 20 kb and 9 kb, respectively. Conclusion: The cataract mice mutating from BALB/C, pure bred possessing two mutation bands, are of significance to human being for researching genetic cataract in genic level in the future.

**KEYWORDS** BALB/C mouse Genetic cataract Minisatellite DNA Mutation

\* Department of Biochemistry, Beijing Medical University Beijing 100083;

\*\* The Nanjing Eighty One Hospital Nanjing 210002;

\*\*\* Genetic Department of the Institute of Experimental Animal, Chinese Academy of Medical Science Beijing 100730