

# 应用 TaqMan 探针荧光定量 PCR 技术鉴定 *Lepr<sup>db/+</sup>* 小鼠子代基因型

赵英政, 彭强, 闫婷婷, 张旭旭, 翟晓楠, 吴卫东, 易宪文, 徐光翠\*

(新乡医学院公共卫生学院, 河南 新乡 453003)

**【摘要】** 目的 建立一种高效的应用 TaqMan 探针荧光定量 PCR 技术对 *Lepr<sup>db/+</sup>* 小鼠子代基因分型的方法。方法 提取 228 例 *Lepr<sup>db/+</sup>* 小鼠子代鼠尾 DNA, 针对 *Lepr* 基因的突变位点(rs1801133)设计 1 对 PCR 引物和 2 条 TaqMan 探针。设定条件进行实时荧光 PCR 扩增, 用 SDS 软件对 SNP 位点进行分型。通过 2 月龄动物的肥胖表现型验证并进行 Hardy-Weinberg 平衡检验。结果 用建立的 TaqMan 探针荧光定量 PCR 方法对 228 份样本进行检测, 其中 GG 基因型 64 份, 基因型频率为 0.1929; GT 基因型 123 份, 基因型频率为 0.5395; TT 基因型 41 份, 基因型频率为 0.2807。TaqMan 探针荧光定量 PCR 方法分型结果与通过肥胖表现型分型结果比较, 灵敏度为 97.56%, 特异度为 99.47%。结论 应用 TaqMan 探针荧光定量 PCR 技术可实现对 *Lepr<sup>db/+</sup>* 小鼠子代基因位点的早期分型检测, 方法简便, 高效。

**【关键词】** Taqman 探针; *Lepr<sup>db/+</sup>* 小鼠; 基因分型

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 02-0207-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.02.011

## Genotyping of the offsprings of *Lepr<sup>db/+</sup>* mice by TaqMan probe fluorescence quantitative PCR

ZHAO Yingzheng, PENG Qiang, YAN Tingting, ZHANG Xuxu, ZHAI Xiaonan, WU Weidong,  
YI Xianwen, XU Guangcui\*

(Department of Public Health, Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453003, China)

Corresponding author: XU Guangcui. E-mail: xugc166@163.com

**【Abstract】 Objective** To establish an efficient method of genotyping for *Lepr<sup>db/+</sup>* mouse offsprings by TaqMan probe quantitative fluorescence PCR. **Methods** Genome DNA was extracted from tails of 228 *Lepr<sup>db/+</sup>* mouse offsprings. PCR primers and TaqMan probes were designed according to the mutation sites of *Lepr* gene (rs1801133). Real time PCR assay was applied and SNP loci were typed with SDS software. The genotyping of 2-month old *Lepr<sup>db/db</sup>* mice was validated by the phenotype and Hardy-Weinberg equilibrium test was performed. **Results** 228 samples were detected by the established TaqMan fluorescence quantitative PCR assay. 64 mice were of GG genotype, with a genotype frequency of 0.1929. 123 mice were of GT genotype, with a genotype frequency of 0.5395. 41 mice were of TT genotype, with a genotype frequency of 0.2807. Compared with the phenotype typing, the sensitivity of the TaqMan fluorescence quantitative PCR was 97.56% and the specificity was 99.47%. **Conclusions** TaqMan probe quantitative fluorescence PCR assay is a simple and efficient method, and can be used to detect the genotype of *Lepr<sup>db/+</sup>* mouse offsprings.

**【Key words】** TaqMan probe; *Lepr<sup>db/+</sup>* mice; genotype

**【基金项目】** 国家自然科学基金面上项目 (No. 81370916, No. 81773399), 新乡医学院科研培育基金 (No. 2014QN110)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (No. 81370916, No. 81773399), Scientific Research Cultivation Fund of Xinxiang Medical University (No. 2014QN110).

**【作者简介】** 赵英政 (1979—), 讲师, 主要从事遗传毒理学研究。E-mail: zyz@xxmu.edu.cn

**【通信作者】** 徐光翠 (1977—), 副教授, 主要从事遗传毒理学研究。E-mail: xugc166@163.com

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

*Lepr<sup>db/db</sup>* 小鼠是研究肥胖、糖尿病等疾病常用的动物模型,其具有高血糖、高血脂、胰岛素抵抗等特性<sup>[1]</sup>。与采用化学药物刺激建立的糖尿病模型相比,其发病与人 2 型糖尿病发病过程更为相似<sup>[2-3]</sup>。其发病机制是 *Lepr<sup>db/db</sup>* 小鼠的瘦素受体 (leptin receptor, LR) 基因胞内外显子区发生一个 G-T 的点突变,而造成瘦素受体变短失功能,不能将信号传至胞内<sup>[4]</sup>。由于纯合 *Lepr<sup>db/db</sup>* 小鼠不育,需通过杂合子交配进行繁殖。本研究采用 TaqMan 荧光定量探针技术,在常规 PCR 的基础上加入荧光标记探针来对杂合子 *Lepr<sup>db/+</sup>* 小鼠子代进行早期、快速基因分型。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

SPF 级 *Lepr<sup>db/+</sup>* 动物购自 Jackson 实验室 (北卡罗来纳大学易宪文教授赠送),于 IVC 动物房常规饲养【SYXK(豫)2014-0005】,饲养期间给予 SPF 级啮齿类动物标准颗粒饲料(上海斯莱康提供);室温 20~22℃,明暗周期 12 h/12 h,相对湿度 60%~70%。按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀,自由摄食、进水。

#### 1.1.2 试剂与仪器

TRIS 购自北京索莱宝,NaOH 购自天津德恩,HCL 购自郑州派尼,EDTA 购自 Sigma 公司,Hot Start Fluorescent PCR Core Kit 购自上海生工;荧光定量 PCR 仪(罗氏 Light Cycler 480)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 小鼠 DNA 提取

将 8 周龄 *Lepr<sup>db/+</sup>* 小鼠按雌雄比为 1:1 进行合笼。参考 Truett GE 的方法<sup>[5]</sup>,取待鉴定子代小鼠约 0.5 mm 鼠尾放入 PCR 管中,在提取 DNA 前一直低温保存。加入 75 μL 碱性溶液(25 mmol/L NaOH, 0.2 mmol/L EDTA, pH 12);将 PCR 管放入金属恒温气浴器中,95℃,30 min,冷却至室温后加入 75 μL 中和液(40 mmol/L TRIS-HCl, pH 5),震荡混匀;取 2 μL 混合液用于 PCR 反应。

#### 1.2.2 探针和引物的设计

从 NCBI SNP 数据库网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) 获得 *Lepr* 基因序列及待测 SNP 位点信息(基因序列号 rs1801133)。用 Premier 6.0

软件设计常规 PCR 扩增引物,采用 Primer Express 3.0 设计 TaqMan 探针和引物。TaqMan 探针分别采用 FAM 和 HEX 荧光素进行标记。样本为等位基因 1(GG)纯合子时,PCR 扩增过程中仅能检测到 FAM 荧光,为蓝色荧光;样本为等位基因 2(TT)的纯合子时,PCR 扩增过程中仅能检测到 HEX 荧光,为绿色荧光;样本为杂合子(GT)时,PCR 扩增过程中可同时检测到 FAM 和 HEX 两种荧光,表现为红色荧光。探针和引物由上海生工生物技术有限公司合成。上游引物为 5'-ACC AAC TTC CCA ACA GTC CA-3',下游引物为 5'-TGA TGC CCT GAA AAT CAA GC-3';野生型探针为 HEX-5'-TTT GAT GGA GGG AAA CAA ACC TA-BHQ-X-3',突变型探针为 FAM-5'-TTT TGA TGG AGG TAA ACA AAC CTA A -BHQ-X-3'。

#### 1.2.3 PCR 反应体系及反应条件

使用 TaqMan 探针的 20 μL 反应体系中基因组 DNA 2 μL (60 ng),上下游引物各 0.5 μL (0.25 μmol/L),TaqMan 探针 0.8 μL (0.25 μmol/L),2 × Hotstart Fluo-PCR mix (ABI 公司) 10 μL,双蒸水 6.2 μL。完成上述步骤后,把加好样品的 384 孔板放在 LightCycler 480 Software Setup (Roche 罗氏)荧光定量 PCR 仪进行反应。PCR 扩增循环条件:95℃ 4 min,其后的 40 个循环为 95℃ 15 s、40℃ 60 s、40℃ 1 min 复性和延伸时收集荧光信号。PCR 扩增完成仪器终点读板读取数据,SDS 软件自动进行基因分型。

## 2 结果

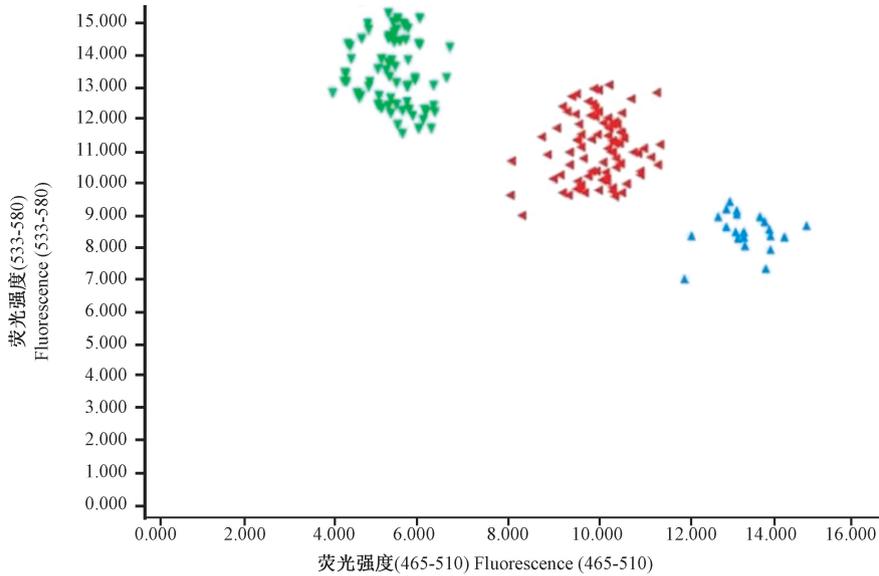
### 2.1 *Lepr<sup>db/+</sup>* 小鼠子代分型情况及基因频率 Hardy-Weinberg 平衡检验

共采集样本 228 例,采用 TaqMan 探针荧光定量 PCR 技术终板读数结果见图 1。结果在 228 份样品中 *Lepr<sup>db/db</sup>* 41 例,基因型频率为 0.1929;*Lepr<sup>db/+</sup>* 123 例,基因型频率为 0.5395;*Lepr<sup>+/+</sup>* 64 例,基因型频率为 0.2807。经 HW (Hardy-Weinberg) 平衡检验,计算  $\chi^2$  值为 5.42,  $P$  值大于 0.05,符合 HW 群体遗传平衡法则。G 等位基因频率为 0.5504, T 等位基因频率为 0.4496,经 Hardy-Weinberg 平衡检验,计算  $\chi^2$  值为 2.32,  $P$  值大于 0.05,符合 HW 群体遗传平衡法则。

### 2.2 TaqMan 探针荧光定量 PCR 反应终点荧光检测结果

采用 TaqMan 探针实时荧光分型法获得明确的分型结果。rs1801133 位点基因型检测结果如下:蓝

色荧光样本为等位基因 1(GG)纯合子;绿色荧光样本为等位基因 2(TT)的纯合子,红色荧光样本为等位基因 3(GT)杂合子(见图 1)。



注:横坐标:FAM 信号强度值;纵坐标:VIC 信号强度值;蓝色点:Allele X 纯合子;绿色点:Allele Y 纯合子;红色点:杂合子。

图 1 TaqMan 探针荧光定量 PCR 反应终点荧光散点图

Note. Abscissa: FAM signal intensity value. Ordinate: VIC signal intensity value. Blue dot: Allele X homozygote. Green dot: Allele Y homozygote. Red dot: heterozygote.

Fig. 1 TaqMan fluorescence quantitative PCR reaction end point fluorescence scatter plot

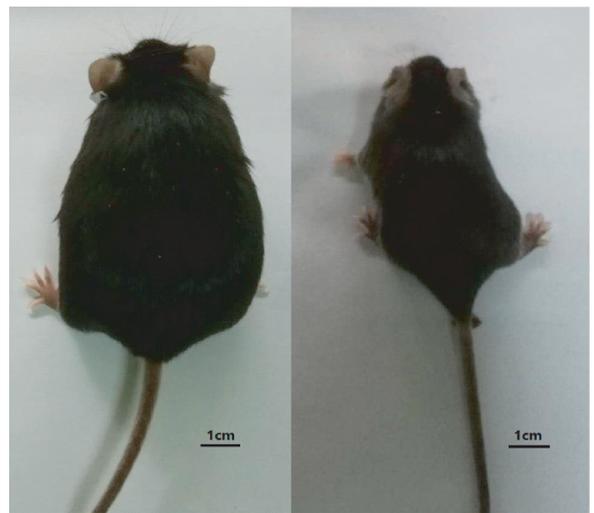
### 2.3 TaqMan 探针法 *Lepr<sup>db/+</sup>* 小鼠子代分型结果与小鼠肥胖表现型判断结果

比较 *Lepr<sup>db/db</sup>* 纯合子小鼠在 2 个月时表现为肥胖,可通过表现型进行判断基因型(见图 2)。与 TaqMan 探针法分型 *Lepr<sup>db/db</sup>* 小鼠结果进行比较分析,结果见表 1。根据计算公式,灵敏度 = 真阳性数 / (真阳性数 + 假阴性数) × 100%, 特异度 = 真阴性数 / (真阴性数 + 假阳性数) × 100%, Taqman 探针法分型 *Lepr<sup>db/db</sup>* 小鼠灵敏度为 97.56%, 特异度为 99.47%。

表 1 TaqMan 探针法 *Lepr<sup>db/db</sup>* 分型结果与小鼠表现型比较

Tab. 1 Result of genotyping using TaqMan probe in *Lepr<sup>db/db</sup>* mice compared with the mouse phenotype

| 肥胖<br>Obesity | Taqman 探针法<br>Genotyping using TaqMan probe |       | 总计<br>Total |
|---------------|---|-------|-------------|
|               | 阳性(+)                                       | 阴性(-) |             |
| 阳性(+)         | 40  | 1     | 41          |
| 阴性(-)         | 1   | 186   | 187         |
| 总计 Total      | 41  | 187   | 228         |



2月龄 *Lepr<sup>db/db</sup>* 2-months old *Lepr<sup>db/db</sup>* mouse 2月龄 *Lepr<sup>db/+</sup>* 2-months old *Lepr<sup>db/+</sup>* mouse

图 2 2月龄 *Lepr<sup>db/db</sup>* 肥胖小鼠和 *Lepr<sup>db/+</sup>* 瘦小鼠肥胖表现型比较

Fig. 2 Comparison of obesity phenotype between a 2-months old *Lepr<sup>db/db</sup>* obese mouse and *Lepr<sup>db/+</sup>* lean mouse

### 3 讨论

培育和建立疾病动物模型是深入研究疾病发生发展机制的重要基础,通过对模型动物的研究有助于认识疾病发生发展规律以及进行干预效果评价<sup>[6]</sup>。瘦素受体缺陷的 *Lepr<sup>db/db</sup>* 小鼠模型具有糖脂代谢紊乱的特性,有助于研究肥胖、糖尿病等疾病,是国内外常用疾病动物模型之一。纯合 *Lepr<sup>db/db</sup>* 小鼠的瘦素受体基因发生了单位点的突变,因此,可借助与新发展的单核苷酸多态性(SNP)技术对其进行基因分型。

TaqMan 探针荧光 PCR 技术是一种通过检测 PCR 过程中及结束后产生的荧光信号,来区分等位基因类型的 SNP 检测技术<sup>[7]</sup>。TaqMan 技术进行基因分型的原理是在荧光探针的两端分别标记有不同的荧光基团和荧光淬灭基团,在反应进行过程中,探针特异的在两条引物之间的位置与模板特异性结合,不能在其他位置结合。如果探针完整,荧光基团所发出的荧光能量可以被荧光淬灭基团所吸收,仪器就不能检测到荧光信号。当探针和模板结合后,荧光基团游离出来,产生荧光信号而被仪器所检测到。不同的目的基因片段位点的碱基不同,所呈现的荧光也不一样。

本研究成功建立了对 *Lepr* 基因 SNP 位点(rs1801133)的 TaqMan 探针荧光定量 PCR 技术分型方法。PCR 反应终点荧光散点图结果表明三种基因型区别明显,未见无法识别样本。经 Hardy-Weinberg (HW)平衡检验和动物表现型比较分析表明,TaqMan 探针荧光 PCR 法用于 *Lepr<sup>db/db</sup>* 基因 SNP 分型结果准确、可靠,具有较高的敏感度和特异度。此方法为培育 *Lepr<sup>db/db</sup>* 模型动物提供快速的方法和手段。传统对 *Lepr<sup>db/db</sup>* 模型动物野生型和突变型等位基因的分型方法主要是用聚合酶链反应限制性内切酶片段长度多态性分析(RFLP),该方法需先完成对靶基因的扩增和鉴定,耗时长,操作步骤复杂,不利于方法的标准化<sup>[8]</sup>。随着荧光定量 PCR 仪的广泛应用,TaqMan 探针荧光 PCR 技术操作便捷,可短时间内完成大量的样品分析,并且成本低廉,满足 SNP 大规模样本检测的需求。该技术结合相应的软件对产物进行分析,达到分析自动化,易于标准化。因此,该技术具有极为广泛的应用前景。

### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] 陆洁,刘静,裴天仙,等. 自发性 2 型糖尿病模型 db/db 小鼠生物学特性研究 [J]. 药物评价研究,2013,36(05): 341-345.  
LU J, LIU J, PEI TX, et al. Study on biological characteristics of spontaneous type 2 diabetic model db/db mice [J]. Drug Eval Res, 2013, 36(05): 341-345.
- [ 2 ] 刘芳,杨华,周文江,等. 诱发性 2 型糖尿病小鼠模型与自发性 db/db 小鼠特性的比较 [J]. 中国实验动物学报,2014,22(06): 54-59.  
Liu F, Yang H, Zhou WJ, et al. Comparison of the characteristics of induced and spontaneous db/db mouse models of type 2 diabetes mellitus [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2014, 22(06): 54-59.
- [ 3 ] 赵英政,郭萍,石超凡,等. 高脂饮食联合链脲佐菌素对小鼠糖脂代谢及炎症的影响 [J]. 四川动物,2016,(01): 109-112.  
Zhao YZ, Guo P, Shi CF, et al. Effect of high-fat diet and streptozotocin on the glucose lipid metabolism and the inflammation in mice [J]. Sichuan J Zool, 2016, 35(01): 109-112.
- [ 4 ] Platt TL, Beckett TL, Kohler K, et al. Obesity, diabetes, and leptin resistance promote Tau pathology in a mouse model of disease [J]. Neuroscience, 2016, 315: 162-174.
- [ 5 ] Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, et al. Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT) [J]. Biotechniques, 2000, 29(1): 52-54.
- [ 6 ] 彭真,张礼标,吴洁,等. 多发性硬化动物模型研究进展 [J]. 动物医学进展,2017,38(04): 108-112.  
Peng Z, Zhang LB, Wu J, et al. Research progress of animal models of multiple sclerosis [J]. Progr Vet Med, 2017, 38(04): 108-112.
- [ 7 ] 刘胜牙,朱玉兰,甄胜西,等. NLRP3 基因单核苷酸多态性 TaqMan 探针实时荧光 PCR 检测方法的建立 [J]. 中国国境卫生检疫杂志,2016,39(05): 310-313.  
Liu SY, Zhu YL, Zhen SX, et al. Development of TaqMan real-time PCR method for the single nucleotide polymorphism detection of NLRP3 gene [J]. Chin Front Health Quarant, 2016, 39(05): 310-313.
- [ 8 ] 胡培丽,王金恒,岳秉飞. 一种快速的 leptin<sup>ob</sup> 和 leptin<sup>db</sup> 等位基因 SNP 分型方法 [J]. 中国比较医学杂志,2010,20(02): 54-57.  
Hu PL, Wang JH, Yue BF. A rapid SNP genotype assay for the leptin<sup>ob</sup> and leptin<sup>db</sup> alleles [J]. Chin J Comp Med, 2010, 20(02): 54-57.