

# 【小鼠大学问】别让这些细节毁了你的Genotyping!

基因型鉴定是应用基因工程小鼠的过程中必不可少的步骤。

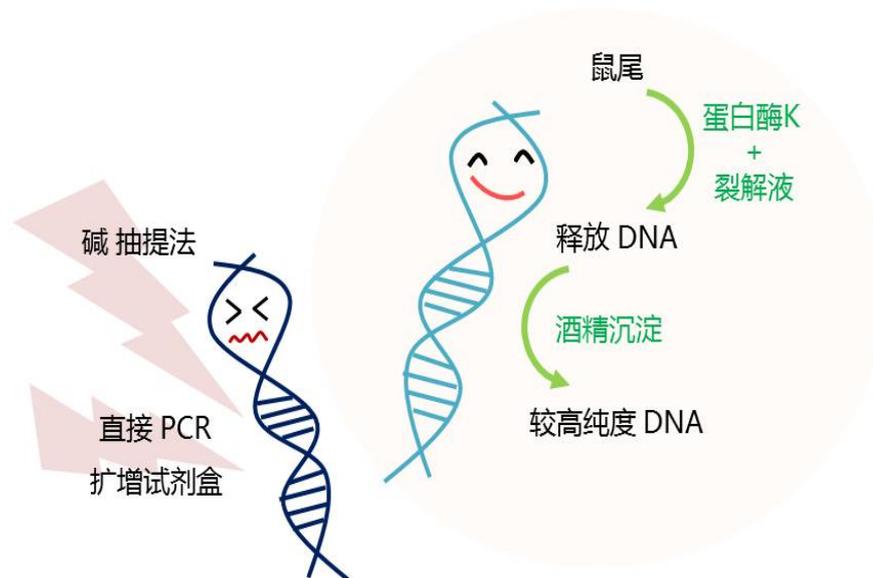
虽然这个工作很基础，但真的常常会遇到问题，并不是几个字——鼠尾DNA PCR——就简单搞定了。究其原因往往在于不曾注意的细节。

也许很多人觉得整个基因型鉴定过程就只是 PCR 反应。出了问题就拼命回想 PCR 过程中的操作：有没有忘加引物、忘加 DNA 模板、忘加酶，这一类“一不留神”的失误……发现都OK的啊，然后就一脸茫然了……

其实，基因型鉴定中，小鼠基因组 DNA 的制备也直接决定结果的好坏。[南模生物可提供小鼠基因型鉴定服务](#)

## DNA 质量不高

为了能快速得到基因型结果，采用碱变性快速抽提 DNA 的方法，虽然过程很简单，但这样制备的 DNA 质量较差，很容易发生做不出结果的情况；或者使用直接 PCR 扩增试剂盒（将鼠尾在试剂中浸泡20分钟后取上清直接作为模板），由于试剂盒选择的种类比较多，不是所有的基因型鉴定方案都适合这种方式，特别是不同厂家的试剂盒扩增效率也不一样，如果发生 PCR 结果不理想的情况，还是建议用传统的 DNA 提取方法，先获得高纯度 DNA 模板，再进行 PCR 反应。



综合时间成本与成功率两大因素，利用裂解液加蛋白酶K配方裂解鼠尾，释放 DNA，并通过酒精沉淀的方法得到纯度较高的DNA，是高效简便的小鼠基因组 DNA 制备方法。

## 小鼠基因组抽提Protocol

蛋白酶K贮存液的配制：

用超纯水彻底溶解蛋白酶K粉剂，使终浓度为10mg/ml，分装成1ml/vial，-20度保存。

裂解液的主要成分：

SDS、EDTA、Tris/HCl、NaCl。

小鼠尾基因组DNA提取步骤：

(1) 剪取小鼠尾端约0.5厘米（视鼠龄及鼠尾粗细可调整, 尽量使鼠尾体积相互接近），将鼠尾放入已编号1.5ml离心管中并盖好盖子。

(2) 每管加0.5ml裂解液和50 $\mu$ l蛋白酶K贮存液并将盖盖紧。

(3) 将离心管置于杂交管中并用纸团稍加固定。

(4) 将离心管置杂交炉中，56 $^{\circ}$ C转动过夜。

(5) 次日将样本于室温，12000rpm离心 10分钟。

(6) 上清倒入1.5ml离心管中，加1ml无水乙醇（约2倍上清体积），盖紧盖子后轻摇，可见絮状沉淀。13000rpm, 15min, 弃上清。

(7) 加70%乙醇1ml，洗涤，13000rpm离心10~15min，弃上清，收集沉淀，室温晾10~15min。

(8) 每管加80~100 $\mu$ l 灭菌水，盖好后置室温或37 $^{\circ}$ C一小时充分溶解。在室温中放置数小时，待DNA全部溶解后-20 $^{\circ}$ C保存，或直接进行PCR或杂交等实验。如DNA溶解不完全,在37 $^{\circ}$ C水浴中放置30~60min，但不可过夜。DNA样品的OD<sub>260</sub>/280在1.8-2.0之间。

注意：

裂解鼠尾一定要充分，有条件尽量使用杂交炉。因为如果裂解过程中组织与裂解液始终保持静止，而没有翻转的过程，这会导致DNA和鼠毛之类的杂质没有完全分开。离心去除杂质的过程中，DNA就会随着这些杂质一起被抛弃了。

## DNA 模板浓度过高

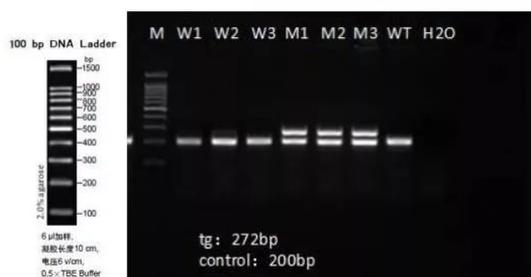
做人不能太贪心。DNA 模板不是越多越好的。一般建议将模板浓度控制在50-100ng/ $\mu$ l 进行 PCR 扩增。

## PCR 酶不合适

DNA 质量很好，浓度也控制在标准浓度，PCR 还是做不出来，原因可能是 PCR 酶没有选择好，不同的 PCR 产物 GC 含量不一样，遇见 GC 含量很高的产物往常规 PCR 酶没法做出很好的结果。一般在定制的基因工程小鼠鉴定方案中会指出适合的 PCR 酶的货号，按照已验证的方案以及推荐的酶体系，一般不会出错。看一看基因工程小鼠的鉴定方案一般长什么样子：

**cre小鼠鉴定方法**

Primer	Sequence (5'→3')	Primer Type		
P3	AGCGATGGATTCCGTCCTGG	Cre Forward		
P4	AGCTTGCATGATCTCCGGTATTGAA	Cre Reverse		
P5	CAAATGTTGCTTGCTGGTG	Internal Positive Control Forward		
P6	GTCAATCGAGTGACAGT	Internal Positive Control Reverse		
PCR Reaction System	Reaction Component	Volume (μl)		
	ddH <sub>2</sub> O	6.0		
	2x Premix Tag	10.0		
	P3 (10pmol/μl)	0.5		
	P4 (10pmol/μl)	0.5		
	P5 (10pmol/μl)	0.5		
	P6 (10pmol/μl)	0.5		
	Genomic DNA	2		
Total	20			
2 x Premix Tag from Takara (Code number:RR902Q )				
Cycling Reaction	Step	Temp	Time	Note
	1	94 °C	3 min	
	2	94 °C	30 sec	
	3	58 °C	30sec	
	4	72 °C	30sec	35 repeats to 2
	5	72 °C	10 min	
6	12°C	Hold		
Genotype	Tg:275bp control: 200bp			

**PCR 产物电泳结果**


WT 为野生型小鼠基因组，H<sub>2</sub>O 为阴性水对照，Marker 为 100bp DNA marker from Takara (3422A)

**Tips:**

上面的电泳图中你是不是发现了什么？为什么转基因 Cre 小鼠的鉴定结果会有两条带？除了待检测的样品以外，还有两个 Control 对照孔？

没错！这里小编要提醒大家，对照 Control 的设置非常重要！这恰恰是很多同学所忽略的。在一般的 Genotyping 里面，每一次鉴定至少要设置一个 WT Control 和一个 H<sub>2</sub>O，也就是 Blank Control。

WT Control 的意义：

1) 帮助我们快速判断基因型。在 Flox 小鼠或片段 knockin 小鼠的鉴定中，如果产物条带仅有一条或其中有一条与 WT Control 一致，那么可以判断该样本为 WT 或 杂合子。

2) 帮助我们判断 PCR 体系是否 work。如果 PCR 产物在跑电泳的时候连 WT Control 的样品都没有出条带，那么说明 PCR 体系有问题，需要做相应的调整，比如考虑更换引物或 PCR mix 等。

Blank Control 的意义：

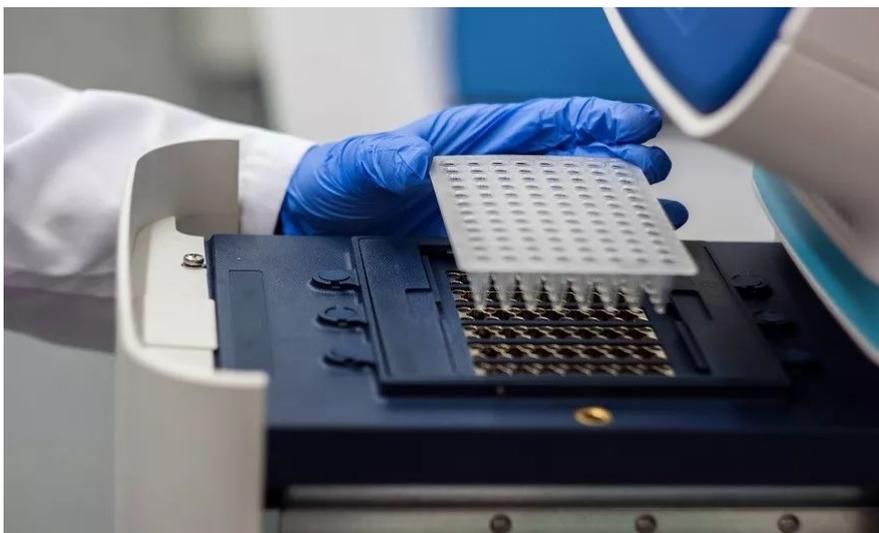
H<sub>2</sub>O 对照主要是用来质控 PCR 体系是否发生了污染。如果 H<sub>2</sub>O 对照都有条带，说明整个 PCR 体系存在污染的问题，这个 PCR 结果不可信。

Internal Positive Control Primers 的意义：

Internal Positive Control 一般用在随机插入转基因小鼠的鉴定中。通常转基因鉴定引物是只针对插入的外源 DNA 序列的，所以没有发生随机整合的小鼠 DNA 模板不会有 PCR 产物产生。这样一来很容易发生假阴性的问题。也就是说电泳没有条带，我们无法判断到底是外源基因未整合的阴性结果，还是由于 PCR 体系本身的问题造成阴性结果。所以需要另一对在所有小鼠中都能获得 PCR 产物的阳性对照引物作为内控，即Internal Positive Control，用于判定 PCR 体系和模板质量是否合适。

## PCR 仪

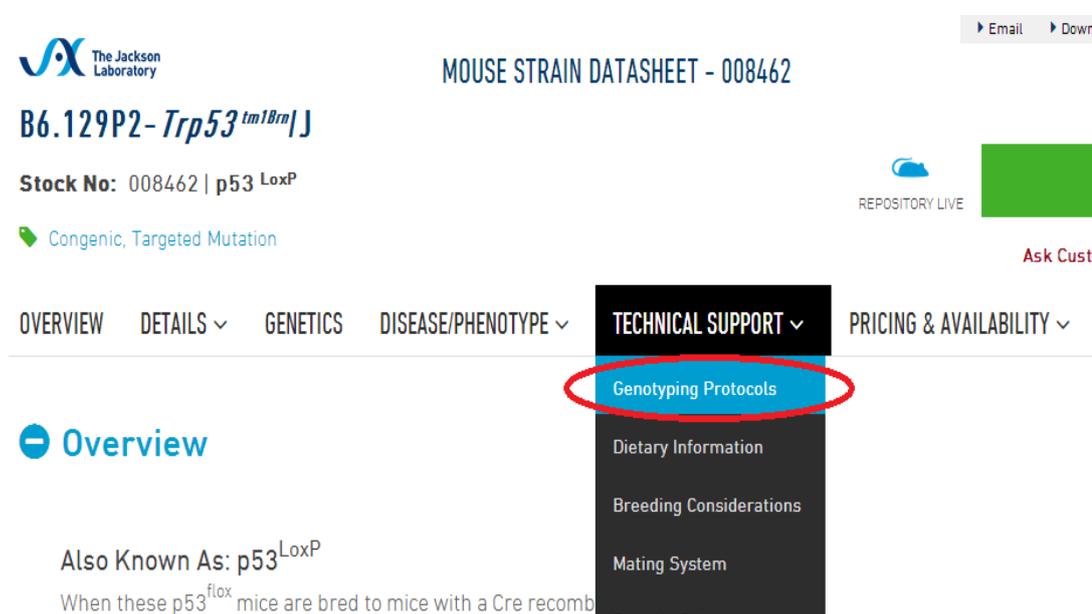
如果 PCR 仪长期未做温度校准，那么仪器显示的温度和实际温度就存在差异。即使拿到定制小鼠的鉴定方案，还是建议在自己常用的PCR仪上摸一个退火温度的温度梯度，找到最合适的PCR退火温度再进行整体 PCR 鉴定。



## 找不到鉴定方案

如果是从jaxlab 购买的小鼠品系，可以从jaxlab 的官网上查找对应的鉴定方案。方法如下：

品系信息页面的 “Technical support” 菜单，下拉第一栏 “Genotyping Portocols”



The screenshot shows the JaxLab website interface for a mouse strain. The main heading is "MOUSE STRAIN DATASHEET - 008462". Below this, the strain name "B6.129P2-Trp53<sup>tm1Brn1J</sup>" and stock number "008462 | p53<sup>LoxP</sup>" are displayed. A navigation menu at the top includes "OVERVIEW", "DETAILS", "GENETICS", "DISEASE/PHENOTYPE", "TECHNICAL SUPPORT", and "PRICING & AVAILABILITY". The "TECHNICAL SUPPORT" menu is open, and the "Genotyping Protocols" option is circled in red. Other options in the menu include "Dietary Information", "Breeding Considerations", and "Mating System".

跳转到下方链接处，点击即可查看

### Genotyping Protocols

Standard PCR: Trp53<sup>tm1Brn</sup>

Genotyping resources and troubleshooting

### Dietary Information

LabDiet® 5K52 formulation (6% fat)

有时候 jaxlab 提供的方法中，退火温度不明确，你会看到一个降落PCR的方法，例如：

Reaction A			Cycling			
Reaction Component	Final Concentration	Unit	Step #	Temp °C	Time	Note
ddH2O	up to final volume		1	94	2 min	
Kapa 2G HS buffer	1.3	X	2	94	20sec	
MgCl2	2.6	mM	3	65	15sec	-0.5 C per cycle decrease
dNTPS-kapa	.26	mM	4	68	10sec	
oIMR8543	.5	uM	5			repeat steps 2-4 for 10 cycles (Touchdown)
oIMR8544	.5	uM	6	94	15sec	
Glycerol	6.5	%	7	60	15sec	
Dye	1	X	8	72	10sec	
Kapa 2G HS taq polymerase	.03	U/ul	9			repeat steps 6-8 for 28 cycles
DNA	50-200	ng	10	72	2 min	
			11	10		hold

如果你觉得降落 PCR 太麻烦，还是想用一个明确的退火温度进行3步法PCR，那么建议还是先摸一个退火温度的温度梯度，找一个合适的退火温度。当然，也会有官方提供的引物不适合单一退火温度的情况，那么就可能需要自己重新设计引物、建立 PCR 鉴定体系了。