

· 基础研究 ·

纤维母细胞生长因子 10 基因在角膜混浊小鼠中的克隆测序与表达研究*

吴刘成¹, 张柳柳², 李 瑶¹, 王胜洁¹, 季 韧², 倪尧尉², 邵义祥^{1△}

(1. 南通大学比较医学研究所, 江苏南通 226001; 2. 南通大学医学院, 江苏南通 226001)

摘要:目的 研究纤维母细胞生长因子 10(Fgf10)基因在角膜混浊小鼠(B6-Co)中的克隆测序及表达。方法 正常小鼠(C57BL/6, B6)和 B6-Co 小鼠交配, 取胚胎 16.5 d B6 和 B6-Co 小鼠皮肤组织, 提取总 RNA 并逆转录, 采用逆转录聚合酶链反应(PCR)技术分段扩增目的基因, 连接 T 载体, 转化感受态细胞, 筛选阳性克隆, 并测序分析; 采用实时荧光 PCR 的方法进一步检测该基因在 B6-Co 小鼠中的表达。结果 测序发现在 Fgf10 基因第三外显子 1 914 bp 和 1 915 bp 之间插入了碱基 A; 实时荧光 PCR 结果显示 Fgf10 在 B6-Co 小鼠中的表达明显下降($P < 0.05$)。结论 Fgf10 与 B6-Co 小鼠出生时眼睑开放(EOB)表型有关, 其表达调控机制有待进一步研究。

关键词: B6-Co 小鼠; 角膜混浊; 纤维母细胞生长因子 10; 基因表达; 突变

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.36.023

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)36-4421-03

The study on clone sequencing and expression of Fgf10 in corneal opacity mouse*Wu Liucheng¹, Zhang Liuli², Li Yao¹, Wang Shengjie¹, Ji Ren², Ni Yaowei², Shao Yixiang^{1△}

(1. Institute of Comparative Medicine, Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China;

2. Medical School, Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China)

Abstract: Objective To study the clone sequencing and expression of fibroblast growth factor 10(Fgf10) gene in corneal opacity (B6-Co) mouse. **Methods** Normal mice mate with B6-Co mice, the skin tissue separation from B6 and B6-Co mice at embryo 16.5 d, total RNA extraction and reverse transcription, the target gene was fragment amplification by RT-PCR, connection with T vector, transformed to competent cells, selection positive clone, sequencing analysis. The gene expression in B6-Co mice was detected by real-time PCR. **Results** The base A inserted between 1 914 and 1 915 in Fgf10 gene by sequencing. The expression of Fgf10 was significant down regulation in B6-Co mice by real-time PCR ($P < 0.05$). **Conclusion** Fgf10 is relevant with phenotype of B6-Co mouse, and the regulation mechanism was expected further study.

Key words: B6-Co mouse; corneal opacity; Fgf10; gene expression; mutatin

在哺乳动物正常发育过程中, 眼睑生长覆盖眼睛、融合, 而后重新开放。小鼠在正常发育过程中, 胚胎期约 11 d 开始出现原始的眼睑即单层细胞上皮, 随着眼睑不断生长发育覆盖了角膜, 约第 16.5 d 眼睑上缘和下缘融合, 完成胚胎期眼睑闭合, 出生后约 14 d 眼睑重新开放^[1-2]。B6-Co(C57BL/6-corneal opacity)小鼠是通过乙基亚硝基脒(ENU)诱变技术获得并建立的出生时眼睑开放(EOB)突变系小鼠, 出生后角膜逐渐混浊, 角膜混浊发生率约为 43.1%^[3], 突变基因定位于 13 号染色体上 60cM 附近^[4]。纤维母细胞生长因子 10 (fibroblast growth factor 10, Fgf10)基因突变小鼠也表现为出生时眼睑开放^[5], 并且该基因位于突变基因定位区间。因此, 本实验对该基因进行克隆测序分析, 并利用实时荧光聚合酶链式反应(PCR)技术检测 Fgf10 基因的表达, 探讨 Fgf10 基因与 B6-Co 小鼠 EOB 表型的关联, 为研究人类遗传性眼睑缺陷形成机制提供理论依据。

1 材料与方

1.1 实验动物 本实验所用 B6 和 B6-Co 小鼠由南通大学实验动物中心提供, 小鼠饲养在清洁级屏障动物房内, 实验动物生产许可证号: SCXK(苏)2008-0010, 使用许可证号: SYXK(苏)2012-0030。用 B6 与 B6-Co 小鼠交配, 次日清晨检栓, 妊娠 16.5 d, 麻醉取胚胎。

1.2 主要试剂与仪器 Trizol、琼脂糖为加拿大 BBI 公司生产; 逆转录试剂盒(RT)、Taq DNA Polymerase 为加拿大 Fermentas 公司生产; 引物合成、UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒为生工生物(上海)股份有限公司生产; T 载体试剂盒为美国 Promega 公司生产; TOP10 感受态细胞、质粒小抽试剂盒为南京天根公司生产; EcoR I 为大连宝生物工程有限公司生产; 荧光染料试剂盒为美国 Biotium 公司生产。超净工作台为苏净集团安泰公司生产; Centifuge 5417R 冷冻离心机、Eppendorf AG 22331 Hamburg PCR 仪为德国 Eppendorf 公司生产; DYY-6B 型稳压稳流电泳仪为北京市六一仪器厂生产; 凝胶成像系统为江苏省捷达科技发展有限公司生产; Step One Real-Time PCR System 为美国 ABI 公司生产。

1.3 方法

1.3.1 引物设计 在 Gene Bank 中查找并下载 Fgf10 mRNA 序列, 以 mRNA 为模板设计部分引物, 引物之间有重叠区域, Fgf10-a 正向引物: 5'-CAC CGT CCT GTC ATC TGT TT-3', 反向引物: 5'-TTC TTC TAT GTT TGG ATC GTC A-3'; Fgf10-3 正向引物: 5'-ATG GAA TCA AGT ATT ATC ACC-3', 反向引物: 5'-AGT GTT TGC CAA GGT TTT-3'; Fgf10-c 正向引物: 5'-GCA CAA CCA AAG GAG C-3', 反向引物: 5'-GAT CTA CAG AGC GAG GG-3'; Fgf10-d 正向引物: 5'-GCA

* 基金项目: 江苏省自然科学基金(BK2010279); 南通大学自然科学基金(11Z052); 南通大学大学生创新训练计划项目(2013093)。作者

简介: 吴刘成(1980~), 硕士, 助教, 主要从事人类疾病动物模型研究。△ 通讯作者, Tel: (0513)85051545; E-mail: shaoyx@ntu.edu.cn。

CAA CCA AAG GAG C-3', 反向引物: 5'-GAT CTA CAG AGC GAG GG-3'; Fgf10-e 正向引物: 5'-GCA CCA CCA AAG GAG C-3', 反向引物: 5'-GAT CTA CAG AGC GAG GG-3'。设计实时荧光 PCR 引物, 引物至少跨 2 个外显子, Fgf10 正向引物: 5'-TCC GCT GGA GAA GGC TGT-3', 反向引物: 5'-CAA CTC CGA TTT CCA CTG ATG T-3'; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参, 正向引物: 5'-GGA GCG AGA CCC CAC TAA C-3', 反向引物: 5'-GGC GGA GAT GAT GAC CCT-3'。

1.3.2 组织总 RNA 的提取和逆转录 剪取胚胎 16.5 d B6 和 B6-Co 小鼠皮肤组织, 放入匀浆器中, 置于冰上, 加入 1 mL TRizol, 充分匀浆, 按照试剂盒说明操作, 最后用焦碳酸二乙(DEPC)处理水溶解获得 RNA, 核酸定量仪测定 RNA 浓度; 按照 RT 试剂盒说明将 RNA 逆转录合成 cDNA。

1.3.3 基因测序 PCR 反应体系, 10×PCR 缓冲液 (buffer, 含 Mg^{2+}) 5.0 μ L, dNTP (10 mmol/L) 1 μ L, 上游引物 (50 μ mol/L) 0.5 μ L, 下游引物 (50 μ mol/L) 0.5 μ L, 模板 cDNA 2.5 ng, Taq DNA polymease (5 U/ μ L) 0.25 μ L, 补灭菌去离子水至 50 μ L。扩增条件, 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 63 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 5 min, 根据引物熔解温度(T_m)值和扩增长度调整退火温度、变性时间及延伸时间。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 成像保存。PCR 产物的纯化(胶回收), 方法参照胶回收试剂盒进行。基因测序、回收产物与相应引物寄送上海生工生物股份有限公司测序。

1.3.4 基因的克隆测序 将发现突变的纯化 PCR 产物与 T 载体连接, 2×buffer 5 μ L, 目的 DNA 1~3 μ L, T 载体 1 μ L, T4 DNA Ligase 1 μ L, 补灭菌去离子水至 10 μ L, 4 $^{\circ}$ C 过夜。取 5 μ L 链接产物和 50~100 μ L 感受态细胞加入预冷的离心管中; 冰浴 5 min; 42 $^{\circ}$ C 热休克 90 s; 冰浴 30 min; 加入 200 μ L Luria-Bertani(LB)培养液, 37 $^{\circ}$ C, 250 r/min, 振荡培养 45 min; 取 120~200 μ L 菌液涂于 1.5% 琼脂 LB 平板(添加氨苄青霉素、 β -半乳糖苷酶和异丙基硫代半乳糖苷); 37 $^{\circ}$ C 培养过夜; 挑取白斑, 扩培摇菌 12~14 h; 提取质粒 DNA 分子; 电泳检测; *Eco*R I 酶切释放目的片段, 电泳检测, 寄送上海生工生物股份有限公司测序。

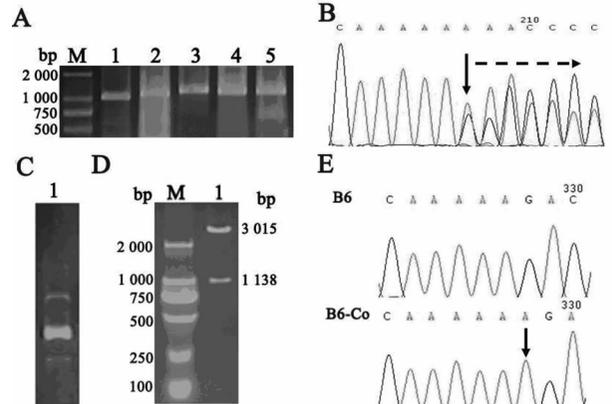
1.3.5 实时荧光 PCR 以 GAPDH 基因为内参, 每个样品设置 3 个重复, 反应体系为荧光染料预混液 10 μ L, 正、反引物各 1 μ L, cDNA 1 μ L, 补灭菌去离子水至 20 μ L。反应条件, 95 $^{\circ}$ C 4 min; 95 $^{\circ}$ C 20 s, 60 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s 并读取荧光值, 45 次循环, 循环后设置 55~90 $^{\circ}$ C 每隔 0.3 $^{\circ}$ C 读荧光值生成溶解曲线。所有设定保存后运行程序。反应完成后, 用相对定量分析方法分析各样品表达量。

1.4 统计学处理 PCR 数据采用 Stata7.0 软件分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

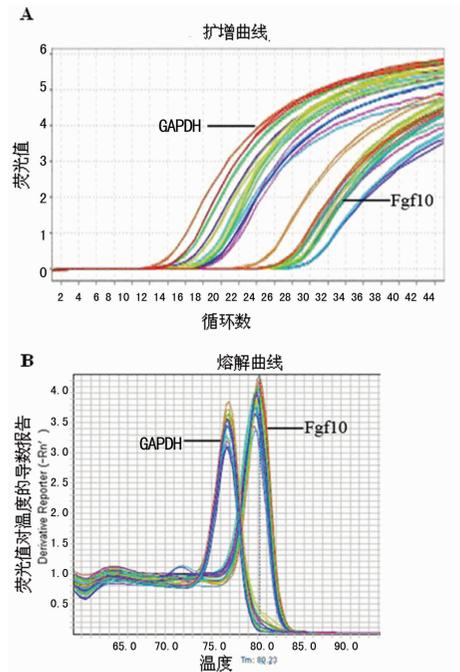
2.1 Fgf10 基因测序及克隆测序结果 分别以表 1 中前 5 对引物对角膜混浊小鼠的基因进行扩增, 从左向右依次电泳, 得到大小不同的 5 个基因片段(图 1A)。对以上 5 个片段割胶回收后分别进行测序, 发现第 4 个片段基因有突变(图 1B)。将第 4 个基因片段用 T 载体连接, 对该基因片段进行克隆。通过蓝白斑筛选出重组质粒、质粒的鉴定, 从上到下分别是开环质粒、环状质粒和超螺旋质粒, 胶回收中间条带的环状条带(图 1C)。重组质粒的 *Eco*R I 酶切片段电泳图。限制性内切酶作

用于重组质粒后, 将环状重组质粒切成 2 个大小不同的片段, 胶回收目的基因(图 1D)。分离出目的基因, 再对目的基因测序分析, 并通过数据库比对发现在该基因第 3 外显子 1 914 bp 和 1 915 bp 之间插入碱基 A(图 1E)。



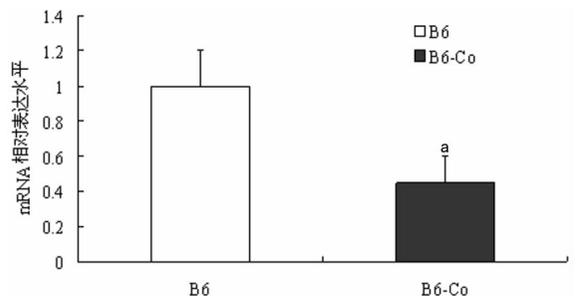
A: 为 5 对引物 PCR 扩增产物电泳图; B: 第 4 个基因片段 PCR 产物突变测序峰图; C: 质粒抽提后电泳图; D: 重组质粒 *Eco*R I 酶切片段电泳图; E: 第 4 个基因片段克隆测序图。

图 1 Fgf10 基因克隆测序流程图



A: 扩增曲线; B: 溶解曲线。

图 2 Fgf10 基因扩增曲线和溶解曲线图



a: $P < 0.05$, 与 B6 组比较。

图 3 实时荧光 PCR 检测 Fgf10 基因在 B6-Co 小鼠中的表达

2.2 荧光定量 PCR 分析结果 由图 2 可知,GAPDH、Fgf10 2 个基因的扩增曲线均接近“S”型曲线,基因扩增效率良好;熔解曲线分析发现 2 个基因的 PCR 产物均呈较为锐利的单峰,无杂峰。Fgf10 基因 mRNA 表达水平在 B6-Co 小鼠中明显低于 B6 小鼠,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。

3 讨论

眼睑是眼的门户,能够保护眼球避免受外伤与强烈光线刺激,协助瞳孔调节进入眼内光线,起到维持眼位及眼功能的作用;眼睑还与其他眼附属器一起共同发挥功能作用,保护角膜免受微生物感染。因此,眼睑发育缺陷将使眼的门户受损,调节和保护功能受限或缺失,导致各种眼部疾病^[6-7]。人类遗传性眼睑缺陷并伴有其他眼部疾病是一种遗传性/先天性疾病,将有可能进一步造成严重的眼科疾病,如角膜炎、角膜感染、角膜混浊,重则致盲,现在临床多采用手术植皮的方法进行眼睑的修复,没有对应的动物模型可供研究。如何做到早期的诊断、预防和治疗,必须首先建立起研究技术平台,进行基础理论和实验技术的研究,建立可利用的动物模型深入进行研究是最佳途径。

小鼠胚胎眼睑闭合,是一个包括细胞增殖和迁移,细胞形态,牵涉许多生理和病理过程的动态发育过程^[8]。绝大多数的哺乳动物的眼睑发育都要经历由融合至再分离的过程,并且这个过程能以相对恒定的程序发生。眼睑覆盖在眼球的前方,起保护眼球的作用,新生小鼠正常情况下眼睑闭合,若眼睑不能闭合,可能由于新生鼠抵抗力低,受外界病原体感染及异物刺激,引起角膜感染及角膜混浊。B6-Co 小鼠眼睑发育缺陷导致角膜发育异常和先天性眼表疾病,该小鼠角膜混浊的病理过程呈典型的炎症反应,与人类角膜炎的病理变化过程相似^[9],值得进一步研究开发其价值。

Fgf10 缺失小鼠在出生时表现出眼睑开放并伴有多器官发育缺陷^[10]。Jin 等^[11]已经证实 Fgf10 通过调节表皮生长因子受体(EGFR)信号通路来促进细胞增殖和迁移以促进眼睑的发育。还有研究表明,Fgf10 的功能可能是调节细胞骨架的活性和基因转录,在小鼠眼睑发育中,可能与 Wnt 信号通路调节有关^[12]。通过分离和培养野生型和 Fgf10 缺陷型胚胎眼睑的角质形成细胞,行体外划痕实验,证明小鼠眼睑上皮细胞的增殖、迁移能力受到严重阻碍,从而导致新生小鼠眼睑上下缘周皮的完整性存在缺陷,Fgf10 信号中断也使得激活素 β B 和 Tgfa 下调,且延迟了声音刺猬(Shh)蛋白的表达^[13]。

有研究表明,基因的编码区或非编码区发生点突变后,可以使机体产生某种疾病^[14-15]。本实验对该基因进行了 PCR 扩增,通过克隆测序发现在 Fgf10 基因第 3 外显子 1 914 bp 和 1 915 bp 之间插入碱基 A(图 1),位于 3'末端非编码区。为进一步了解该突变基因在 B6-Co 小鼠中的作用,采用实时荧光 PCR 技术检测 Fgf10 基因的表达变化,结果表明该基因在 B6-Co 小鼠胚胎 E 16.5 d 的表达明显下调($P < 0.05$)(图 3),提示该突变位点可能影响了其基因的表达,或直接影响了功能蛋白质的翻译与剪接,是否 B6-Co 小鼠中存在其他突变基因而影响了 Fgf10 基因的表达调控也值得深入探讨。作用于基因表达调控的因素很多,其具体机制需进一步深入研究,从而为人类眼科类疾病的诊断、治疗及预防提供参考依据。

参考文献:

[1] Ohuchi H, Wakayama symposium: epithelial-mesenchymal interactions in eyelid development[J]. Ocul Surf, 2012, 10

(4):212-216.

- [2] Harris MJ, Juriloff DM. Eyelid development and fusion induced by cortisone treatment in mutant, lidgap-Miller, fetal mice. A scanning electron microscope study[J]. Embryol Exp Morphol, 1986(91):1-18.
- [3] 邵义祥, 吴宝金, 薛整风, 等. 遗传性角膜基质变性小鼠及其突变基因的定位[J]. 南京师大学报, 2006, 29(2):99-102.
- [4] 蒋茨梅, 刘春, 吴刘成, 等. SNP 标记对角膜混浊小鼠突变相关基因的精细定位[J]. 遗传, 2010, 32(5):486-491.
- [5] Huang J, Dattilo LK, Rajagopal R, et al. FGF-regulated BMP signaling is required for eyelid closure and to specify conjunctival epithelial cell fate[J]. Development, 2009, 136(10):1741-1750.
- [6] Qu X, Pan Y, Carbe C, et al. Glycosaminoglycan-dependent restriction of FGF diffusion is necessary for lacrimal gland development[J]. Development, 2012, 139(15):2730-2739.
- [7] Puk O, Esposito I, Söker T, et al. A new Fgf10 mutation in the mouse leads to atrophy of the harderian gland and slit-eye phenotype in heterozygotes: a novel model for dry-eye disease? [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50(9):4311-4318.
- [8] Herr DR, Lee CW, Wang W, et al. Sphingosine 1-Phosphate Receptors Are Essential Mediators of Eyelid Closure during Embryonic Development[J]. J Biol Chem, 2013, 288(41):29882-29889.
- [9] 刘春, 袁志云, 杨菲菲, 等. C57BL/6 小鼠葡萄球菌性角膜感染模型的建立及相关研究[J]. 眼科研究, 2010, 28(3):199-202.
- [10] Tsau C, Ito M, Gromova A, et al. Barx2 and Fgf10 regulate ocular glands branching morphogenesis by controlling extracellular matrix remodeling[J]. Development, 2011, 138(15):3307-3317.
- [11] Jin C, Yin F, Lin M, et al. GPR48 regulates epithelial cell proliferation and migration by activating EGFR during eyelid development[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49(10):4245-4253.
- [12] Jin C, Chen J, Meng Q, et al. Deciphering gene expression program of MAP3K1 in mouse eyelid morphogenesis[J]. Dev Biol, 2013, 374(1):96-107.
- [13] Wu CI, Hoffman JA, Shy BR, et al. Function of Wnt/ β -catenin in counteracting Tcf3 repression through the Tcf3- β -catenin interaction [J]. Development, 2012, 139(12):2118-2129.
- [14] 吴伟, 胡锦涛, 鞠海星, 等. 散发性大肠癌 K-ras 基因点突变研究及其临床病理意义[J]. 医学研究杂志, 2010, 39(12):53-57.
- [15] 夏海龙, 陈晓文, 陈歆, 等. 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 PRDM1 基因 5'非编码区突变的研究[J]. 安徽医科大学学报, 2010, 45(1):27-30.