

# 硅湖职业技术学院毕业论文（设计）

题目           NGF转基因小鼠基因型鉴定          

年级                           2010                          

专业                           生物技术及应用                          

姓名                           赵雨薇                          

学号                           100000452                          

指导老师                           郭文霞                          

2013年4月13日

# 目录

<b>1 引言</b>	<b>1</b>
1.1 研究背景	1
1.2 研究目的	2
1.3 研究内容	2
<b>2 材料与amp;方法</b>	<b>3</b>
2.1 实验材料、仪器及试剂	3
2.1.1 实验材料	3
2.1.2 实验仪器（见表1）	3
表1	3
2.1.2 实验试剂（盒）（见表2）	3
表2	3
<b>2.2 实验步骤及方法</b>	<b>4</b>
2.2.1 小鼠的饲养与管理	4
2.2.2 转基因小鼠繁殖	5
2.2.3 制作小鼠编号记录表	7
2.2.4 样品采集	8
2.2.5 组织样品裂解	8
2.2.6 基因组DNA提取	8
2.2.7 PCR扩增	8
2.2.8 电泳鉴定及拍胶	10

<b>3 结果与分析</b> .....	11
3.1 数据处理与结果分析 .....	11
3.2 颌下腺取法及保存 .....	15
<b>4. 总结</b> .....	15
<b>致谢</b> .....	15
<b>【参考文献】</b> .....	16

# NGF 转基因小鼠基因型鉴定

赵雨薇

**【摘要】**目的：通过繁殖 NGF 转基因鼠，生产纯合子小鼠，经基因鉴定有无突变。方法：DNA 提取和 PCR 检测其基因型，凝胶电泳鉴定法测试基因型。结果：样品条带与对照组纯合子条带相同并对齐。结论：NGF 转基因鼠封闭群繁殖 10 代，动物遗传稳定，每代均为纯合子，再利用蛋白提纯技术从小鼠颌下腺中提取 NGF，将原药按一定比例添加辅料磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、人血白蛋白、甘露醇做成注射用鼠神经生长因子，具有促进神经损伤恢复的作用，可用于治疗视神经损伤。

**【关键词】** NGF 转基因 颌下腺

**Abstract:** Objective: To distinguish if gene mutation occurred in the homozygous mice, which were the descendants of the NGF transgenic mouse, we adopt the method of gene identification. **Method:** DNA extraction, PCR Test and Gel electrophoresis assay method were used to detect the genotype. **Result:** The sample brand and the brand of homozygous control group were both in the same alignment. **Conclusion:** The genetic stability of NGF transgenic mouse was high, even in the tenth descendants of the NGF transgenic mouse breed in the closed colony and all the descendants were pure zygotes. In addition, we extracted the NGF from the submaxillary gland of homozygous mice by protein purification technology, and then prepared the mouse nerve growth factor for injection by in proportion to add some auxiliary materials to the NGF, such as sodium dihydrogen phosphate, sodium hydrogen phosphate, human serum albumin and mannitol. We studied that such mouse nerve growth factor for injection could be used to promote the recovery of nerve injury as well as the treatment of optic nerve injury.

**Keywords:** NGF(Nerve Growth Factor); Transgene; Submaxillary gland

## 1 引言

### 1.1 研究背景

神经因子(NGF, Nerve growth factor)是一种分子量为 26.5KD 的神经细胞生长调节因子，具有神经元和促突变生长的双重生物学功能，它对中枢及周围神经元的发育、分化、生长、再生和功能特性的表达均具有重要的调控作用。NGF 包含  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  三个亚单位，活性区是  $\beta$  亚单位，是由两个 118 个氨基酸组成的单链通过非共价键结合而成的二聚体。神经生长因子不但对中枢和周围神经系统的某些交感神经元和感觉神经元的存活及发育是必需的，而且可以支持中枢神经系统类胆碱能神经元的生长、分化和存活<sup>[1]</sup>。2003 年 1 月 SFDA 已正式批准从雄性小鼠颌下腺提取的 NGF 在

我国上市。该制品在临床上主要用于治疗正己烷中毒性周围神经病，与人NGF有90%同源性。由于动物来源的蛋白含量相对较低，并存在潜在的病毒危险以及伦理学的问题，而利用大肠杆菌或酵母等表达系统开发的重组NGF在表达量和生物学活性方面不尽如人意，而构建含人NGF基因的质粒DNA，不仅能够使蛋白在机体内高水平持续表达，而且更加安全，同时，通过优化目的基因和采用分泌表达策略可以提高DNA质粒的免疫效果。通过基因改造技术将野生型小鼠的NGF基因进行修饰，使修饰后的NGF基因在颌下腺表达的NGF更接近人类NGF，再利用蛋白提纯技术从小鼠颌下腺中提取NGF，将原药按一定比例添加辅料磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、人血白蛋白、甘露醇做成注射用鼠神经生长因子，具有促进神经损伤恢复的作用，用于治疗视神经损伤<sup>[2]</sup>。

## 1.2 研究目的

生产纯合子小鼠。经转基因小鼠繁殖形成一定的产量，按照规定一年要达到10000只纯合子雄性小鼠，按照每笼生5只纯合子雄性小鼠，一年达到10000只，大概需要220笼，经基因型鉴定有无突变。本实验的主要目的是繁殖NCF转基因鼠，并PCR检测其基因型，确定是否为纯合子转基因小鼠，生产纯合NCF转基因鼠颌下腺。

## 1.3 研究内容

本实验利用基因工程技术获得转基因小鼠，小鼠原始NGF基因命名a，修饰后NGF基因命名A，则转基因小鼠纯合子NGF基因型：AA，野生型老鼠NGF基因型：aa，杂合子老鼠NGF基因型：Aa。由于A与a的片段长度不同，故选择PCR技术从样品模板上扩增出A或a，在琼脂糖凝胶电泳中使片段A与片段a由于运动速率不同而分离，最后借助凝胶成像分析系统观察显色条带运动距离，判断A或a，从而鉴定出动物基因型AA，Aa，aa。同时采集纯合NCF转基因鼠颌下腺。

## 2 材料与方 法

### 2.1 实验材料、仪器及试剂

#### 2.1.1 实验材料

NGF 转基因小鼠种属：以人保 NGF 转基因小鼠为实验材料，由昭衍（苏州）新药研究中心有限公司提供。

#### 2.1.2 实验仪器（见表 1）

**表 1**

名称	型号	生产厂家
PCR 仪	Mycycler	Bio-rad
定量 PCR 仪	Realplex2	Eppendorf
水浴摇床	ZHWY-110X50	上海智成分析仪器制造有限公司
离心机	5810R	Eppendorf
离心机	CT15RT	Techcomp
自动加样器	EzMate401	BioTech
恒温箱	DNP9126	上海精宏
电子天平	AL204-IC	Mettler Toledo
热封仪	-	Eppendorf
微量移液器	P10、P100、P200、P1000	Gilson、Eppendorf、Thermo
电泳仪	EPS300	Tanon
凝胶成像仪	JS-680D	培清科技

#### 2.1.2 实验试剂（盒）（见表 2）

**表 2**

试剂名称	生产厂家
N96 基因组 DNA 提取试剂盒	天根

PCR Mix	Takara
试剂名称	生产厂家
琼脂糖	Invitrogen
DL15000 DNA Marker	Takara
DL2000 DNA Marker	Takara
无水乙醇（AR）	江苏强盛化学股份有限公司
尿素（AR）	广东光华科技股份有限公司
乙二胺四乙酸二钠（AR）	江苏强盛化学股份有限公司
十二烷基肌氨酸钠（AR）	SIGMA
TrisBase	NOVON
灭菌注射用水	山东齐都药业有限公司
氯化钠（AR）	江苏强盛化学股份有限公司

TAE缓冲液配制<sup>[3]</sup>：称量Tris242g、EDTA-2Na-2H<sub>2</sub>O 37.2g于1L的烧杯中，向烧杯中加入约800ml灭菌注射用水，充分搅拌均匀。向配制烧杯中滴加冰乙酸57.1ml，充分溶解，加灭菌注射用水定容至1L，室温保存。

Tris-PH8.0 溶液配制：称量Tris60.5g于500ml的烧杯中，向烧杯中加入约400ml的灭菌注射用水，充分搅拌均匀，加入HCl调节PH值至8.0。加灭菌注射用水定容至500ml，2-8℃保存。

裂解液配制<sup>[4]</sup>：称量尿素240.24g、EDTA-2Na-2H<sub>2</sub>O 3.722g、十二烷基肌氨酸钠5g，氯化钠11.688g于1L烧杯中，向烧杯中加入约800ml的灭菌注射用水，充分搅拌均匀，向配制烧杯中滴加Tris100ml，充分溶解，加灭菌注射用水定容至1L，2-8℃保存。

## 2.2 实验步骤及方法

### 2.2.1 小鼠的饲养与管理

小鼠饲养于SPF级动物房聚丙烯塑料盒，盒内装有高压灭菌杨木刨花垫料，饲养盒规格为长×宽×高=485mm×350mm×200mm，用打耳签的方法为小

鼠编号。动物喂饲鼠繁殖料，引用纯化水，自由摄食、摄水。

动物房室温为 20℃到 26℃，湿度 40%到 70%，光照 12 小时明暗交替。动物房地面至少每天消毒 1 次，笼架、动物房墙面至少每周消毒 1 次，用 0.5% 的 84 消毒液擦拭消毒。

### 2.2.2 转基因小鼠繁殖

委托方转移至本公司的 54 笼种鼠，每笼雄性小鼠以 1:3 的比例交配繁殖，小鼠出生后 21 天离乳，离乳后雌雄分开饲养，分笼时标明父代，子代剪尾时打耳签做标记。

扩大繁殖小鼠生到第五胎，就淘汰，雄性小鼠 CO<sub>2</sub> 安乐死取颌下腺，待第五胎的小鼠离乳后，再把雌性小鼠 CO<sub>2</sub> 安乐死（此时，再重新交配进行过大繁殖）。

挑选第 2 胎和第 3 胎身体健康且精神状态好的纯合子小鼠留种，留种时，每笼只留一个性别（留雄不留雌或留雌不留雄），列如：扩大繁殖群一共有 20 笼，若其中 10 笼留雄性小鼠，则另外 10 笼应该留雌性小鼠。

小鼠交配繁殖表，具体见表 3：

表 3

笼号	父代	母代	笼号	父代	母代	笼号	父代	母代
1	599	422	20	542	003	39	558	689
		054			011			688
		127			107			853
2	893	687	21	067	060	40	672	663
		581			043			882
		504			213			000
3	065	148	22	037	044	41	156	731
		125			063			322
		188			077			256

笼号	父代	母代	笼号	父代	母代	笼号	父代	母代
4	015	167	23	048	673	42	038	823
		099			695			879
		211			676			889
5	870	725	24	882	553	43	129	988
		056			554			986
		016			552			887
6	667	340	25	668	698	44	852	696
		195			772			880
		012			700			890
7	170	775	26	541	538	45	169	166
		457			540			171
		711			194			010
8	878	004	27	839	046	46	691	190
		630			104			699
		730			053			341
9	543	674	28	892	172	47	840	675
		883			042			891
		884			061			677
10	040	535	29	687	062	48	888	663
		665			159			664
		560			013			537
11	039	515	30	155	843	49	139	085
		561			458			026
		519			774			008
12	555	680	31	884	002	50	548	856
		426			773			850
		020			028			842

笼号	父代	母代	笼号	父代	母代	笼号	父代	母代
13	894	189	32	176	681	51	047	898
		025			679			066
		066			778			662
14	895	454	33	684	001	52	544	024
		848			045			103
		779			022			153
15	025	021	34	015	897	53	546	885
		539			123			992
		027			849			886
16	141	517	35	545	427	54	683	149
		556			160			057
		666			180			147
17	029	124	36	896	137			
		138			838			
		776			837			
18	203	505	37	550	851			
		874			847			
		551			845			
19	150	516	38	547	536			
		841			846			
		880			467			

### 2.2.3 制作小鼠编号记录表

小鼠编号记录是按架次，父代，胎次，切尾日期，性别而记录的，所以可根据配种表制作小鼠编号记录表，打开小鼠编号记录电子表格，制作封页，封页为架次（如A架），然后逐个输入父代编号并在编号前加上架次和换架次数，在每页输入索引编号，即为父代编号的后3位。做好小鼠

记录表将配种表原件保存，小鼠编号记录表送至动物房以备记录使用。

#### 2.2.4 样品采集

从小鼠尾端取 4-6mm 的尾组织作为样品采集孔里，同时把小鼠编号按照架次，父代，胎次，切尾，性别而记录在小鼠编号记录表中。

#### 2.2.5 组织样品裂解

200ml 裂解液加入 8ml 蛋白酶 k，混匀。每个样品中加入 520u1 的混合裂解液。封板膜封口，56℃ 孵育过夜。

#### 2.2.6 基因组DNA提取<sup>[5][6]</sup>

用天根 XX 试剂盒提取鼠尾 DNA, 方法如下:

取出过夜后的鼠尾震荡然后每个孔加入200u1GB, 再震荡。

每个孔加入200u1无水乙醇, 然后震荡, 封板, 再离心5分钟, 离心温度设在4℃, 转速调到4000rpm。

将离心后的样品溶液转移到硅胶膜吸附孔内, 注意避免交叉污染, 封板, 离心10分钟。

倒废液, 每个孔加入500u1GD, 封板, 离心10分钟。

倒废液, 每个孔加入600u1PW, 封板, 离心10分钟。

倒废液, 每个孔加入600u1PW, 封板, 离心10分钟。

倒废液, 空离10分钟。

取出, 放到通风橱里, 通风挥发10分钟。

换96深孔板, 每个吸附孔加入70u1TB, 离心10分钟。

取出封板, 放到2-8℃冰箱保存。

#### 2.2.7 PCR 扩增

PCR 反应体系（见表 4）

表 4

试剂	体积 (ul)	终浓度
引物	2	300nm
PCR Mix	12	1X
模板	2	-
去离子水	12	-

PCR反应条件<sup>[7]</sup>:

原理：PCR仪是一台控制温度循环的仪器，在PCR循环过程中主要包括三个温度循环。高温、退火、延伸。高温：DNA模板受高温作用，双链解旋，H键断裂，变成单链。退火：温度降低，引物与模板结合。延伸：在DNA聚合酶和引物诱导及dN TP的原料供应下，DNA模板开始复制。高温选择95℃、30秒，退火温度选择63℃、30秒，延伸选择72℃、3Min, 循环数为：30。循环前加一个预热稳定过程，开机预热稳定选择95℃、5Min, 循环结束后加一个充分延伸过程，充分延伸选择72℃、10Min。充分延伸后是温度控制在4℃保存，待取出。

引物信息（见表5）

表5

引物	名称	长度 (bp)	序列
上游引物1	P10	23	GCTTGCTCCGGTGAGTCCTGTTG
下游引物1	Pw	29	CATTCAGGGTGCAGGCACCATCACCATGC
上游引物2	NGFB-H0-UP	23	TGGACGTAAACTCCTCTTCAGAC
下游引物2	NGFB-WH-DOWN	20	GATTTGGCAGACTTGGCTCT
上游引物2	NGFB-W-UP	28	TGCCTGTAGGTTGGTTCCTTGTGGATTG

在 PCR 扩增之前，我们需要配制引物和反应体系。

引物 1 配制:取出在-20℃冰箱保存的PW、P10,然后 12000 转离心 3MIN, 用去离子水按照商品信息 nmole 数 100 倍稀释，涡旋备用。

反应体系1配制<sup>[8]</sup>:按照所要扩增的样品量计算出反应体系量,然后取出适量PCR混合、去离子水解冻及模板、适量数目的洁净EP管,每个EP管中先后加入一定量的去离子水、混合、引物1,涡旋备用。

反应体系1分装:每管PCR反应体系1可手动分装进入1条八连排,即每个八连排孔加入一定量的反应体系1。每两个八连排为一组,下一步借助自动移液器进行再次分装,加入模板链。

引物2配制:取出在-20℃冰箱保存的Hup、Wup、Wdown,然后12000转离心3min,用去离子水按照商品信息nmol数约100倍稀释,涡旋备用。

反应体系2配制与反应体系1配制方法一样,反应体系2分装于反应体系1分装方法也一样。

PCR仪扩增<sup>[9]</sup>:将加完反应体系2的PCR板封口,放入PCR仪内,关闭机盖,打开电源开关standby,待稳定后,选择程序protocol library,默认JY,点击enter,默认run protocol,点击enter,样品体积输入25ul,然后点击begin,开始运行,扩增结束后关闭仪器,取出样品。

## 2.2.8电泳鉴定及拍胶

凝胶配制:选择在玻璃锥形瓶中配制,在1%的琼脂糖,2%的琼脂糖中各加入100ml稀释50倍的TAE缓冲液,放入微波炉加热,温度调到最高,时间调到5分钟。加热2分钟后,戴上高温防护手套拿出摇晃,取出锥形瓶,然后继续加热,等到沸腾时再拿出摇晃,继续加热,沸腾3-4次即可。关闭微波炉,每个锥形瓶中加入7ulDNA染液,摇匀,倒胶,插上梳子,待冷却。

电泳条件:电泳液必须是稀释50倍的TAE缓冲液,保证电解质的均一,导电均一。

由于DNA的电负性,在电极作用下向正极移动,大小不同的片段在琼脂糖凝胶中运动速率不仅与电压有关,还与DNA分子量成反比,分子量越大,受的阻力越大,运动的速率越慢,反之越快。则A和a在相同电压,相同时间,同一块琼脂糖凝胶内运动的距离就不同,使A与a分离。通过凝胶成像分析系统内显色,可以判断扩增后样品的基因型。对于琼脂糖凝胶,

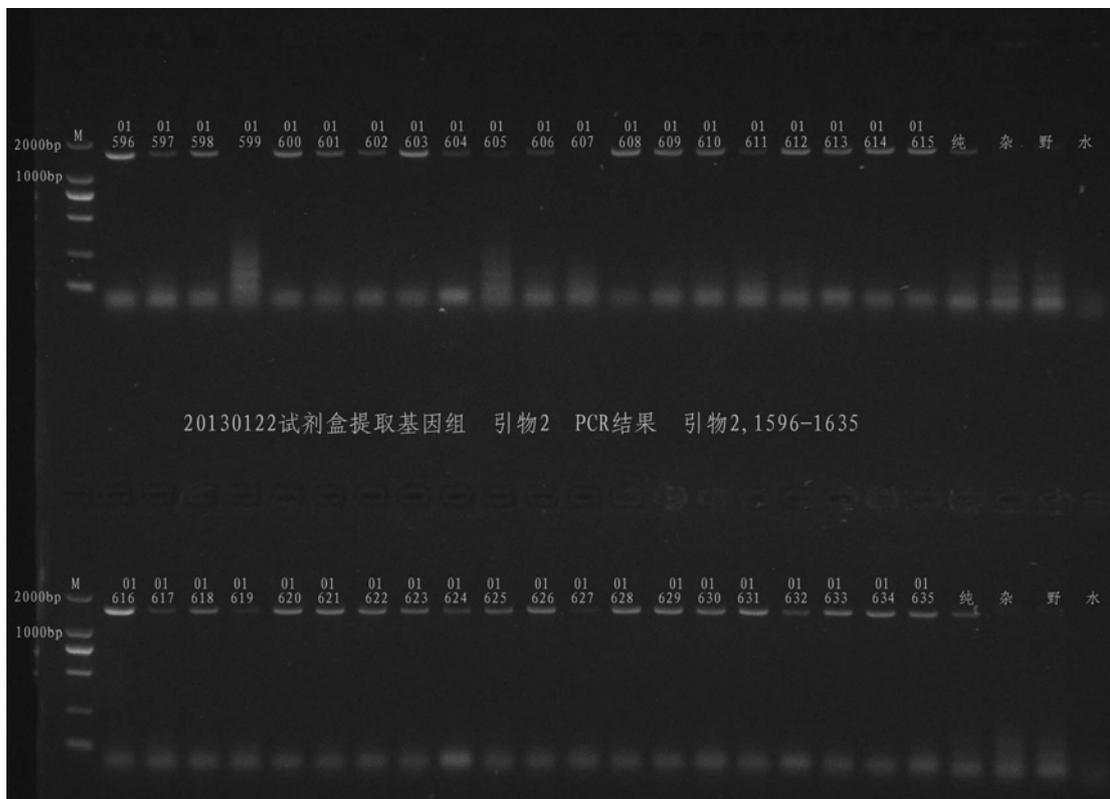
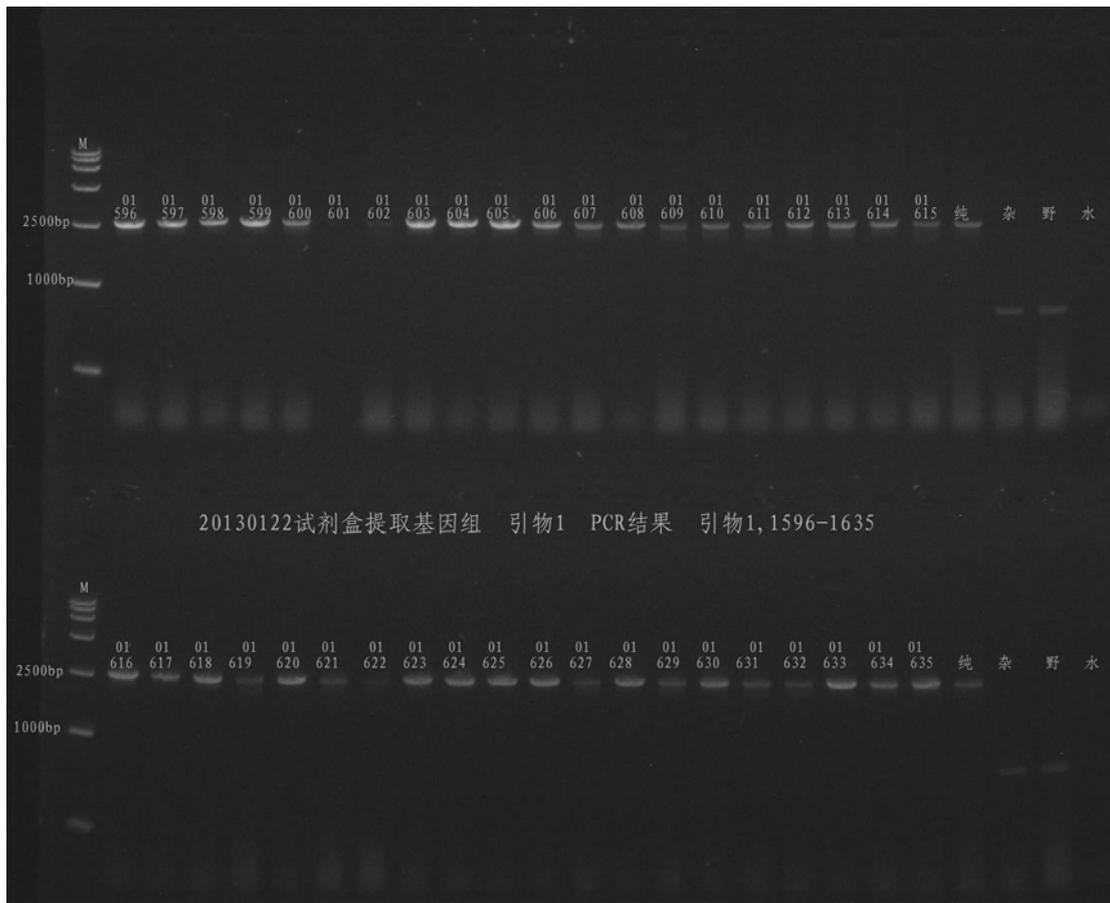
浓度通常在 0.5~2%之间，低浓度的用来进行大片段核酸的电泳，高浓度的用来进行小片段分析。低浓度胶易碎，小心操作和使用质量好的琼脂糖是解决办法。注意高浓度的胶可能使分子大小相近的DNA带不易分辨，造成条带缺失现象。引物 1 扩增出来的片段较大，故而选择 1%的琼脂糖凝胶，引物 2 扩增出的片段较小，故而选择 2%的琼脂糖凝胶。DNA marker 的选择<sup>[10]</sup>：引物 1 扩增出的样品选择DL15000 的DNAMarker做指示。引物 2 扩增出的样品选择DL2000 的DNA marker做指示。

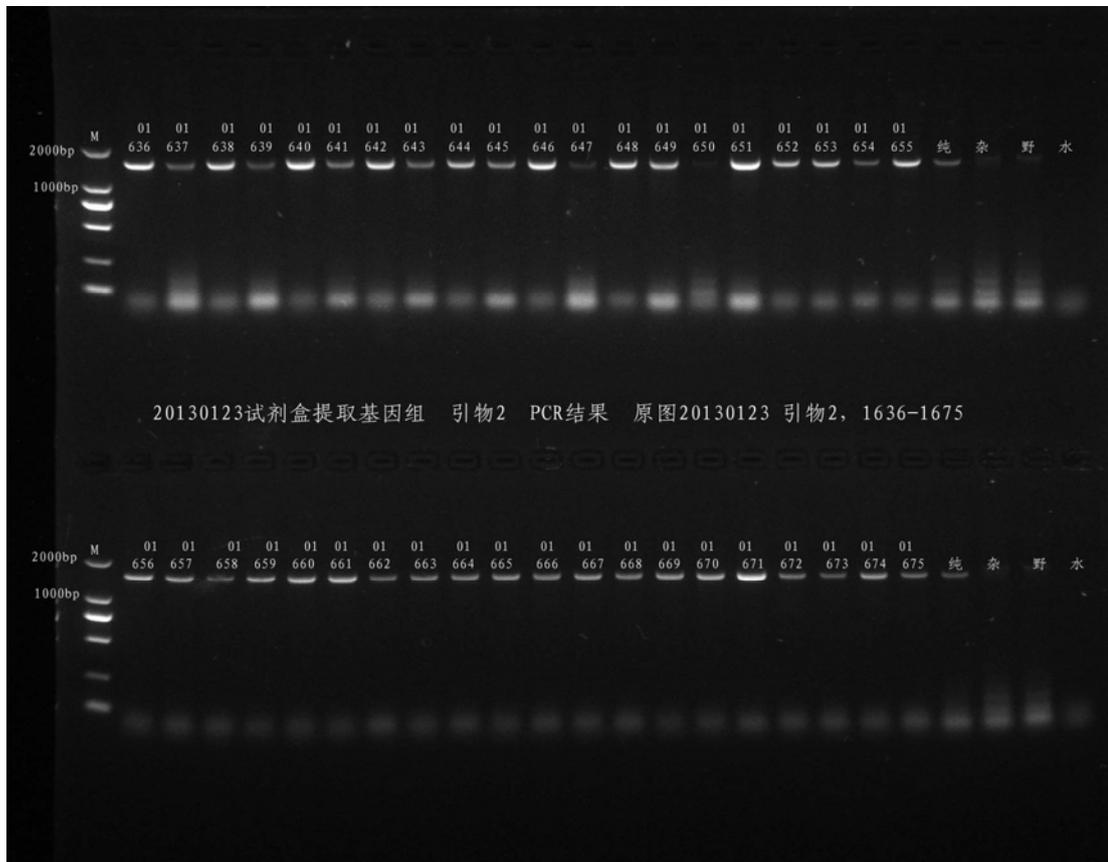
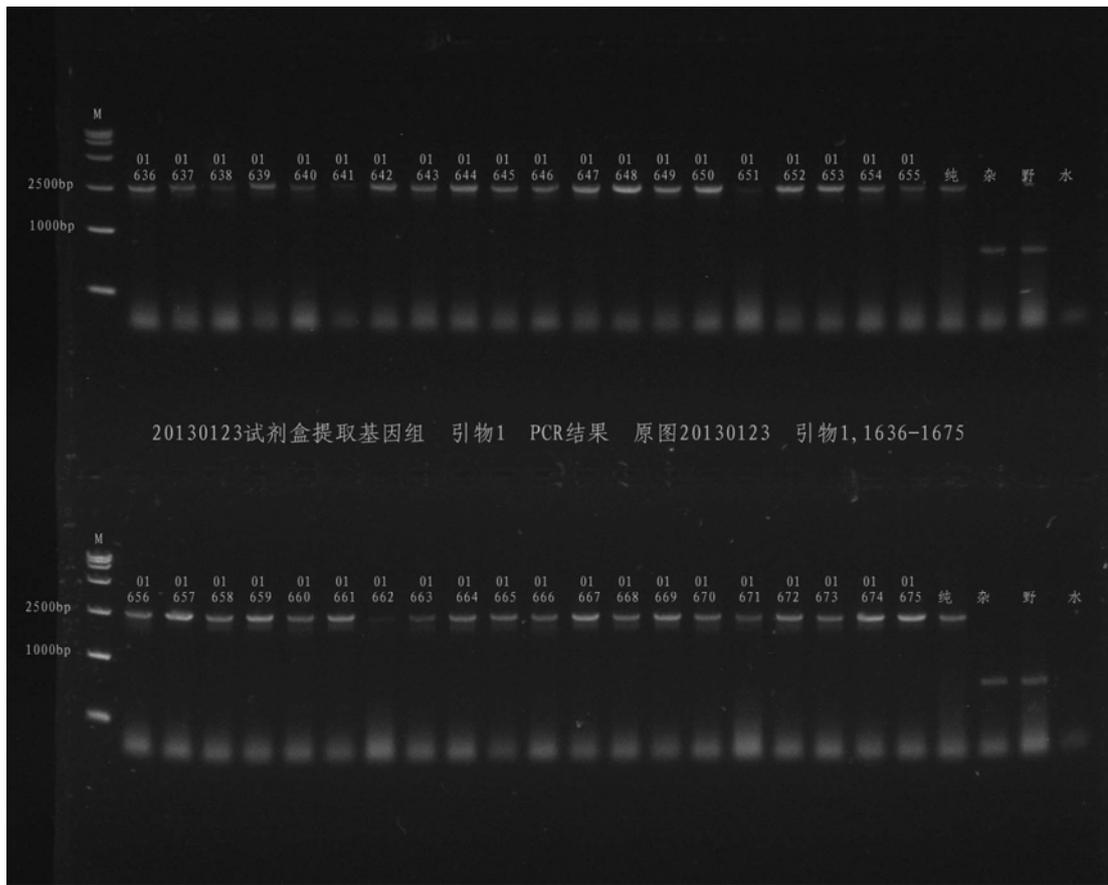
拍胶：打开电脑，双击 SensiCapture 拍胶软件，顺次点击打开、电源开、U1 开。此时可以看到胶图，调节适当曝光时间、对比度、亮度。使条带及胶孔可以清晰看到，然后点击拍摄、保存，命名（按照日期、引物、样品编号命名），保存类型为.jpg。

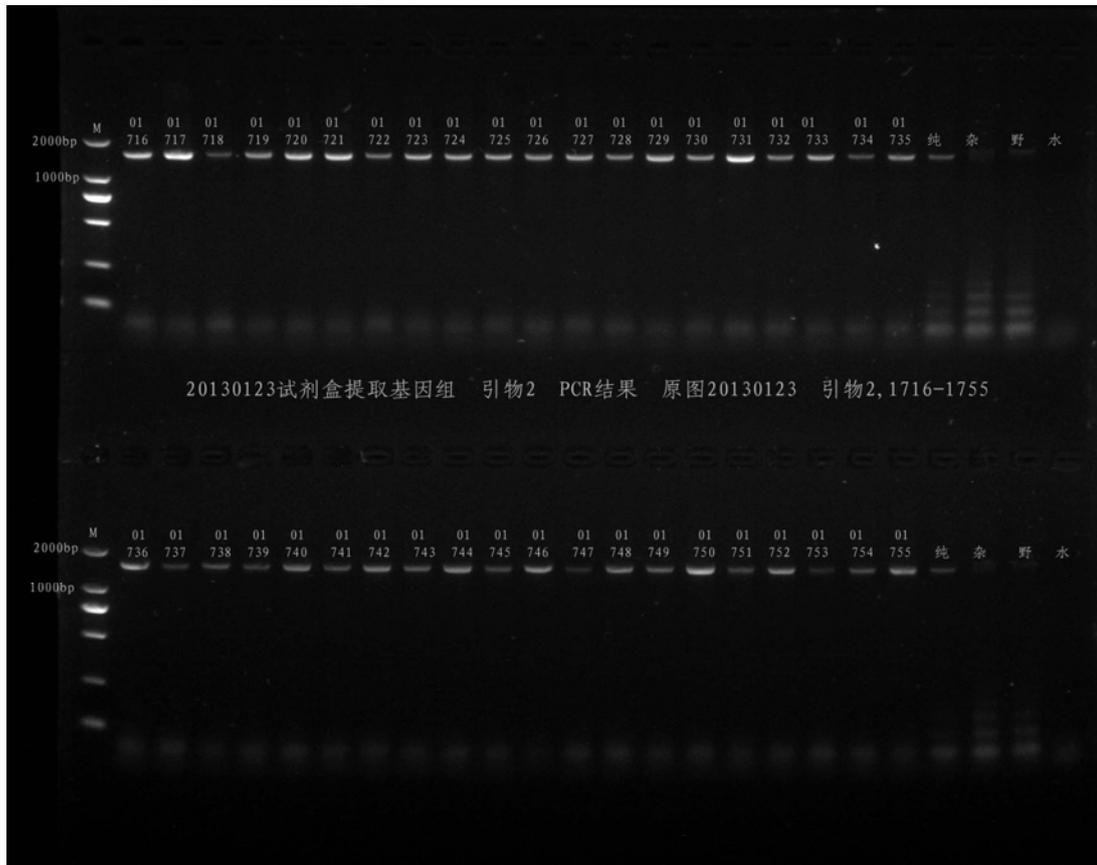
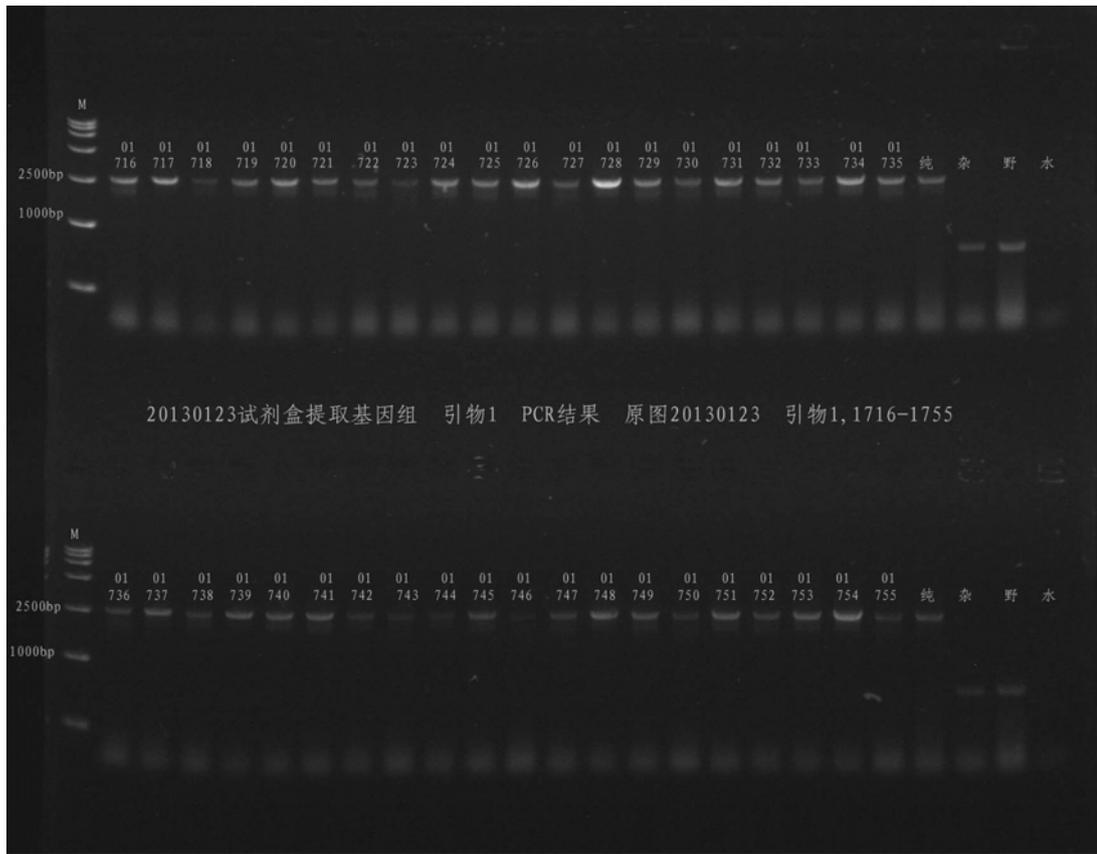
### 3 结果与分析

#### 3.1 数据处理与结果分析

实验期间，动物平均传代 9-10 代，经鉴定，除个别动物电泳条带不清晰，所有动物都为纯合子。部分结果见图。







### 3.2 颌下腺取法及保存

雄性小鼠CO<sub>2</sub>安乐死后，取颌下腺。取颌下腺的方法：颈部皮肤剪开，皮毛外翻，将颌下腺取出，放在冰块上，50至100对放入1个自封袋中，袋子上标明取颌下腺的日期及数量，取的所有颌下腺放在-20℃冰柜保存，最终送至委托单位北京，完成颌下腺内提取NGF。

## 4.总结

本实验通过凝胶电泳检测法对 NGF 转基因鼠基因型进行鉴定。实验期间，动物平均传代 9-10 代，所有代次、所有动物均为纯合子，因此，纯合人 NGF 转基因鼠封闭群繁殖 10 代，动物遗传稳定，每代均为纯合子，未见回复突变或变异。本实验产生的转基因鼠可再利用蛋白提纯技术从小鼠颌下腺中提取 NGF, 将原药按一定比例添加辅料磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、人血白蛋白、甘露醇做成注射用鼠神经生长因子，具有促进神经损伤恢复的作用，用于治疗视神经损伤。

## 致谢

感谢苏州昭衍新药研究中心为我提供这样一次难能可贵的实习经验，昭衍为我提供了先进的实验器材和充足的实验试剂，使我的毕业设计实验顺利有序的进行。感谢昭衍各位同事的关心与帮助，他们的悉心指导，热情的帮助，让我学到了许多有用的实验知识，增强了职场人际交往能力。

另外，感谢校方给予我的机会，让我在即将离校的最后一段时间里，能够学到更多的实践应用知识，增强了动手操作能力，并提高了独立思考解决问题的能力，再一次感谢母校。

最后，感谢在整个毕业设计期间给予我帮助的指导老师以及和我密切合作的同学和曾经在各个方面给予过我帮助的伙伴们，在大学生活即将结束的日子里，我们团结合作，把一个个复杂的、从没上手的课题，圆满的

完成了。正是有了你们的帮助，才让我不仅学到了本次课题所涉及的新知识，更让我感觉到了知识以外的东西，那就是浓重的友情。

再次感谢所有在这次毕业设计中给予过我帮助的人。

#### 【参考文献】

- [1] 徐莉, 赵桂仿. 微卫星DNA 标记技术及其在遗传多样性研究中的应用[J]. 西北植物学报, 2002, 22 ( 3 ): 714-722.
- [2] 王义权, 周开亚, 徐珞珊等. 不同固定剂保存动物组织标本对RAPD反应的影响[J]. 动物学杂志, 1999, 34 ( 1 ): 33-37.
- [3] Tibayren cM, Neubauer K, Barnabe C, et a. l Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random- primer typing and m u ltilocus enzyme electrophoresis[ J]. Proc Natl A cad Sci USA, 1993, 90( 4 ): 1335-1339.
- [4] Pan Yuxin, Ma Jun, Zhang Gu iyin, et a. l profiling for th e fib er developm ent stage of secondary cellw all synthes is and transcriptome m app ing in cotton[ J] . Chinese Science B u l letin, 2007, 52( 17 ): 2358-2364.
- [5] 汪永庆, 王新国, 徐来祥等. 一种动物基因组DNA提取方法的改进[J]. 动物学杂志, 2001, 36( 1 ): 32-34.
- [6] 肖波, 李岩, 屈慧歌等. 两种动物基因组DNA提取方法的比较[J]. 烟台师范学院学报 (自然科学版), 2005, 21( 1 ): 56-58.
- [7] Ling Yan, Lu Weifeng, Lu Fan, et a. l PCR-RFLP and AP-PCR of rbcL and ITS of rDNA Show That ×Taxod iom eria peizhong ii ( Taxod ium × Cryp tom eria ) Is not an Intergen ericH yb rid[ J] . Journal of Integrative Plant B iology, 2006, 48( 4 ): 468-472.
- [8] 王义权, 周开亚, 徐珞珊等. 不同固定剂保存动物组织标本对RAPD反应的影响[J]. 动物学杂志, 1999, 34( 1 ): 33-37.
- [9] 许发芝, 吴胜国, 李吕木等. 一种直接用于PCR扩增的山羊瘤胃微生物DNA提取方法的建立[J]. 中国微生物生态学杂志, 2012, 24( 1 ): 63-66.
- [10] Robert F. Weaver. Molec u lar Biology[M]. 科学出版社, 2010:56