【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。

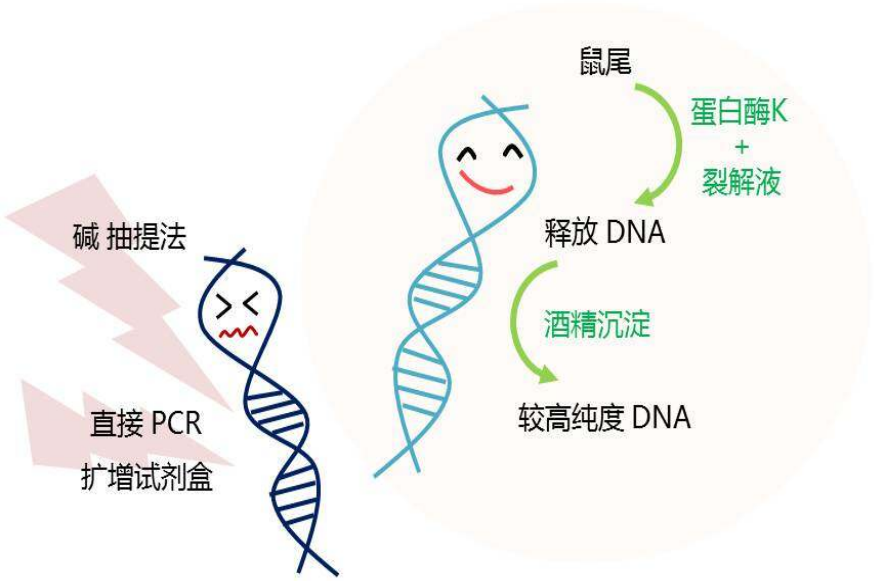
虽然这个工作很基础，但真的常常会遇到问题，并不是几个字——鼠尾DNA PCR——就简单搞定了。究其原因往往在于不曾注意的细节。

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 结果不理想的状况，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50μl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℃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80~100μl 灭菌水，盖好后置室温或37℃一小时充分溶解。在室温中放置数小时，待DNA全部溶解后-20℃保存，或直接进行PCR或杂交等实验。如DNA溶解不完全,在37℃水浴中放置30~60min，但不可过夜。DNA样品的OD260/280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/μl 进行 PCR 扩增。

PCR 酶不合适

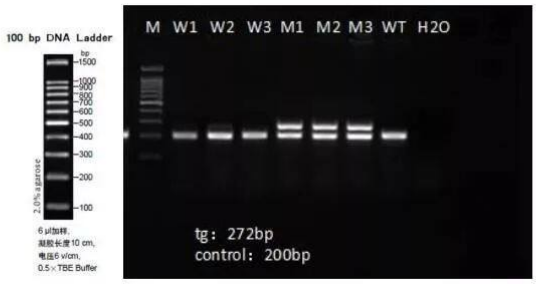
DNA 质量很好，浓度也控制在标准浓度，PCR 还是做不出来，原因可能是 PCR 酶没有选择好，不同的 PCR 产物 GC 含量不一样，遇见 GC 含量很高的产物往往常规的 PCR 酶没法做出很好的结果。一般在定制的基因工程小鼠鉴定方案中会指出适合的 PCR 酶的货号，按照已验证的方案以及推荐的酶体系，一般不会出错。看一看基因工程小鼠的鉴定方案一般长什么样子：

Biomodel Organism | 上海南方模式生物科技股份有限公司

cre小鼠鉴定方法

Primer	Sequence (5'→3')		Primer Type	
P3	AGCGATGGATTTCCGTCTCTGG		Cre Forward	
P4	AGCTTGCATGATCTCCGGTATTGAA		Cre Reverse	
P5	CAAATGTTGCTTGTCTGGTG		Internal Positive Control Forward	
P6	GTCAGTCGAGTGCACAGTTT		Internal Positive Control Reverse	
PCR Reaction System	Reaction Component		Volume (μl)	
	ddH_2O		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_2O 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 H2O，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：

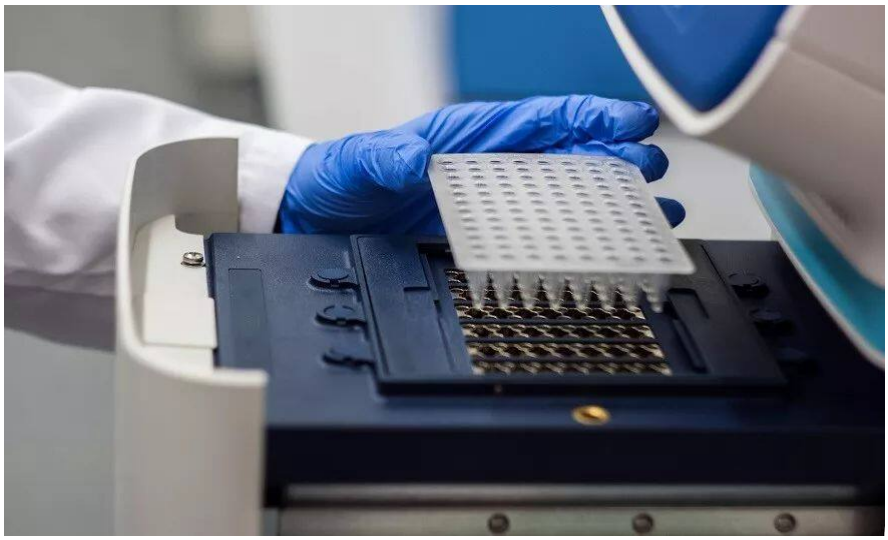
H2O 对照主要是用来质控 PCR 体系是否发生了污染。如果 H2O 对照都有条带，说明整个 PCR 体系存在污染的问题，这个 PCR 结果不可信。

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

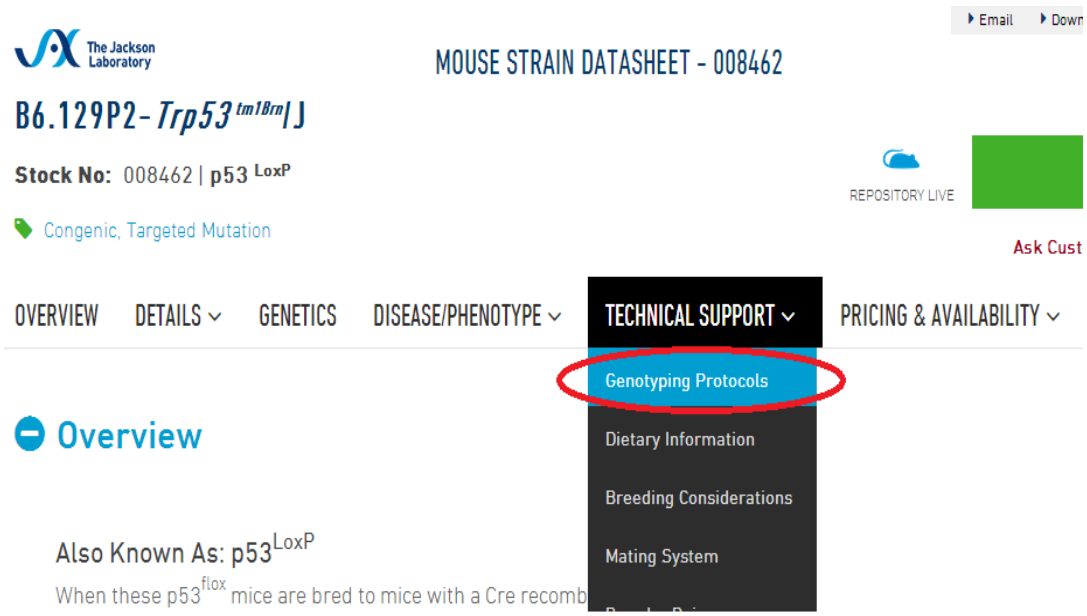
如果 PCR 仪长期未做温度校准，那么仪器显示的温度和实际温度就存在差异。即使拿到定制小鼠的鉴定方案，还是建议在自己常用的PCR仪上摸一个退火温度的温度梯度，找到最合适的PCR退火温度再进行整体 PCR 鉴定。



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”



跳转到下方链接处，点击即可查看

Genotyping Protocols

Standard PCR: Trp53^{tm1Brn}

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

Reaction Component	Final Concentration	Unit
ddH2O	up to final volume	
Kapa 2G HS buffer	1.3	X
MgCl2	2.6	mM
dNTPS-kapa	.26	mM
olMR8543	.5	uM
olMR8544	.5	uM
Glycerol	6.5	%
Dye	1	X
Kapa 2G HS taq polymerase	.03	U/ul
DNA	50-200	ng

Cycling

Step #	Temp °C	Time	Note
1	94	2 min	
2	94	20sec	
3	65	15sec	-0.5 C per cycle decrease
4	68	10sec	
5			repeat steps 2-4 for 10 cycles (Touchdown)
6	94	15sec	
7	60	15sec	
8	72	10sec	
9			repeat steps 6-8 for 28 cycles
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。