

基因突变动物模型在《医学遗传学》实验教学中的应用

唐佐青, 霍学云, 韩玉英, 王 晶, 叶海虹, 赵 天, 李振坤, 陈振文*

(首都医科大学, 基础医学院医学遗传学与发育生物学学系, 北京 100069)

【摘要】 目的 在《医学遗传学》实验教学中引入基因突变动物模型, 并调查其在分子遗传诊断课程中的应用价值, 以期促进医学生对基因突变检测原理与技术的理解, 并有效提高医学生解决实际遗传诊断问题的能力。**方法** 对首都医科大学2011级和2012级基础医学专业80名本科生开设分子遗传诊断实验, 以无毛突变小鼠为实验对象, 通过动物组织提取基因组DNA, 并以提取的DNA作为模板, 采用PCR方法对目的片段进行扩增, 电泳鉴定PCR产物及应用凝胶成像系统对结果进行分析, 观察基因突变动物模型—无毛小鼠表型特征与其基因型的内在联系。针对实验效果, 设计调查问卷, 分析学生反馈。**结果** 问卷调查各项指标满意率均达到90%以上, 98.7%的学生认为新的实验教学模式有助于对专业实验技能的掌握, 96%的学生认为该实验课程有效提高了他们解决问题的能力。**结论** 应用基因突变动物模型开展分子遗传诊断实验能够切实提高学生的学习效果, 培养学生的综合素质。同时也为医学院校在教学中如何充分利用实验动物模型拓展教学内容和教学手段提供了借鉴。

【关键词】 基因突变动物模型; 实验课教学; 分子遗传诊断

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 10-0123-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.10.024

Application of mutated inbred animal models in the experimental teaching of medical genetics

TANG Zuo-qing, HUO Xue-yun, HAN Yu-ying, WANG Jing, YE Hai-hong, ZHAO Tian, LI Zhen-kun,
CHEN Zhen-wen*

(Department of Medical Genetics and Developmental Biology, School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

【Abstract】 Objective Mutated inbred animal model is introduced to the practical course of genetic diagnosis in the hope that medical students are able to apply what they have learned to clinical cases, based on a deep understanding of principle and technology on gene mutation detection. **Methods** We integrated DNA extraction, polymerase chain reaction, agarose gel electrophoresis, and gel imaging analysis into a comprehensive experiment and arranged 4-year-programme undergraduates majoring in preclinical medical sciences to conduct it with the purpose of investigating the internal relations between phenotype and genotype in a hairless Uncv mouse model. Subsequently, the questionnaire aimed at evaluating learning effect on the part of students was handed out and their feedbacks were analyzed. **Results** More than

[基金项目] 2016年度首都医科大学校长基金(2016JYY01)。

[作者简介] 唐佐青(1975-), 女, 讲师, 研究方向: 表观遗传学。E-mail: tangzq@ccmu.edu.cn

[通讯作者] 陈振文(1959-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 分子遗传学。E-mail: czwen@ccmu.edu.cn

90% of respondents are satisfied with the general learning effect. Especially, 98.7% of students support the enhancing effect of the new teaching mode on their research skills and 96% consider the practical course helpful to their problem-solving ability. **Conclusions** The introduction of mutated inbred animal model to the practical system of molecular diagnostics proves beneficial to boost students' learning effect and scientific research quality. Our practice also provokes thoughts on the further utilization of animal models in teaching system of medical sciences.

【Key words】 Mutated animal model; Experimental teaching; Molecular genetic diagnostics

医学遗传学是遗传学与临床医学相互渗透的一门学科,主要研究疾病产生的遗传机制、遗传方式及其诊治和预防的策略与措施。基因突变检测是目前遗传病诊断的最可靠的手段,也是目前和今后一定时期的研究热点。因此,医学生学习和掌握遗传病基因检测的原理和方法就成了培养创新型人才的实验课教学内容之一。但可用于医学生实验的人类遗传病病料的来源十分有限,加之受到相关伦理学的制约,使该实验课程一直没有开设起来。自然突变的实验动物模型具有基因突变明确、表型特征显著、来源充裕,以及与人的基因突变在发生原理和检测方法等方面相同的诸多优点。因此,在恪守动物福利原则的前提下,可以作为替代人类遗传病病料的生物材料^[1]。除此之外,学生还可以亲自观察基因突变动物的表型特征,比较不同基因型动物性状的差异,这有利于学生透彻理解遗传病中,单一基因座上的基因突变与可见表型改变的内在联系。所以,我们在医学遗传学实验课程体系中,引入基因突变动物模型,新增分子遗传诊断的综合实验内容。通过 2 个基础医学专业班次的教学实践,以及学生调查问卷的反馈分析,该课程收到满意的教学效果。希望本文为医学、药学和生物学教学中应用模型动物材料提供有益参考。

1 分子遗传诊断实验课内容设计

1.1 设计原则

综合性实验是将具有紧密联系的几个实验综合成一个大实验,每一个具体实验之间既独立又相互连贯,前一个实验的结果是下一个实验的材料^[2]。通过此类实验的设置,让学生找出相关实验之间的内在联系,从而让单个的独立实验变成系统性、连贯性的综合技能训练,既方便了学生的理解和掌握,又提高了学生的实验兴趣,激发了学生在实验中的主观能动性。

1.2 基因突变动物模型材料

无毛小鼠是一种全身无毛的裸小鼠,由于基因自发突变而引起皮肤和毛囊结构发生异常。无

毛小鼠的皮肤更接近于人的皮肤,适合于皮肤和毛发育异常等方面的研究,是一种非常珍贵的实验材料。无毛小鼠是军事医学科学院在 BALB/c 小鼠繁殖群中偶然发现并培育的突变品系,命名为 Uncovered(简称 Uncy)^[3]。研究表明,Uncy 小鼠是由单基因突变引起的,该突变基因为 *iRhom2* (C57BL/6J; chromosome 11; 28854 bp),其蛋白产物 N 端 167 个氨基酸缺失。当 *iRhom2* 基因突变后,影响毛基质细胞的增殖、毛囊内根鞘和毛干分化,最终导致小鼠无毛性状的出现^[4]。

1.3 分子遗传诊断实验内容

1.3.1 无毛鼠、杂合鼠和野生鼠基因组 DNA 提取纯化

在决定小鼠毛囊分化中发挥关键作用的 *iRhom2* 基因如果发生片段缺失,会导致小鼠无毛性状的出现^[3,4]。我们采用无毛鼠、杂合鼠和野生鼠为实验材料,分别研磨肝组织,应用 DNA 提取试剂盒提取全基因组 DNA。

1.3.2 *iRhom2* 基因片段的聚合酶链反应(PCR)

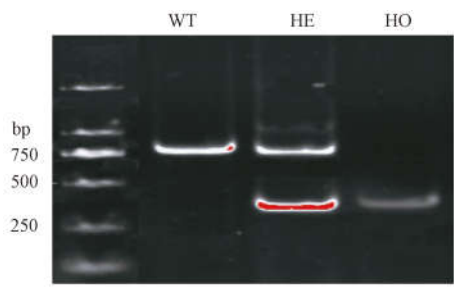
通过课前讨论和师生互动,明确实验试剂的用途、PCR 技术原理、电泳结果分析等。同时,向学生演示如何从美国国立生物技术信息中心(NCBI)的基因库中检索基因序列,讲解 PCR 引物的设计原则,利用引物设计软件设计并优化突变基因片段的特异性引物,预测扩增产物。

1.3.3 PCR 产物的电泳检测

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳,通过凝胶成像系统观察是否获得清晰特异的电泳条带,并比较无毛鼠、杂合鼠和野生鼠三者电泳图带(见图 1)。

1.3.4 实验结果讨论分析

在教师的组织引导下,学生根据实验结果进行讨论,明确每一条带分别代表的是哪一个基因类型和形成该图带的原理。同时,将 3 种基因型小鼠的表型特征(无毛-基因突变纯合子,稀毛-杂合子,全毛-野生型纯合子)与图带对应分析,加深对单一基因座上的基因突变导致可见表型改变的理性认识。



注:取用 BALB/c 小鼠肝脏组织,提取全基因组 DNA, *iRhom2* 基因片段的聚合酶链反应(PCR)之后,琼脂糖电泳鉴定小鼠基因型。WT:野生纯合子;HE:杂合子;HO:突变纯合子。

图 1 BALB/c 小鼠 *iRhom2* 基因 PCR 产物电泳结果
Note. Genome DNA was extracted from liver tissue and then was subject to PCR. Amplified *iRhom2* fragments were isolated and identified by agarose gel electrophoresis. WT: wild-type homozygote; HE: heterozygote; HO: mutated homozygote.

Fig.1 Electrophoresis analysis of *iRhom2* fragments after PCR

2 教学效果调查分析

2.1 调查方法

经过实验课教学实践后,我们对首都医科大学 2011 级和 2012 级基础医学专业 80 名本科生,进行问卷调查。问卷选取了“教学方法”、“教学条件”、“学生收获情况”等 3 个一级指标。每个指标包含若

干个二级指标,全卷共计 11 个二级指标。问卷要求调查对象就每一个项目指标给出程度级别的选择,程度分为 4 档,1 为很满意;2 为满意;3 为一般;4 为不满意。在每个调查指标后设原因项目,即选择该等级的原因,为开放性问题,由调查对象自由填写。

2.2 调查结果

调查共发放问卷 80 份,回收 76 份,有效问卷 76 份,回收率占 95%,有效问卷占 100%。调查结果应用 Excel 软件统计处理。问卷调查各项指标满意率均达到 90% 以上,多数学生认为实验课教学内容和教学方法的全面更新,给大家新的学习视角和对实验课的重新认识,学习实验的动力大幅提高。学生特别对“掌握专业实验技能”这一指标满意率高达 98.7% (结果见表 1)。

学生反映通过核酸系列实验(包括动物组织基因组 DNA 的提取,以提取的基因组 DNA 作为模板,采用 PCR 技术对目的片段进行扩增,电泳鉴定 PCR 产物及应用凝胶成像系统对结果进行分析),不但掌握了核酸制备分析的基本实验技术、实验设计思路,学会了 PCR 仪、电泳仪及电泳槽、凝胶成像系统等仪器设备的使用方法,而且对遗传病的基因诊断技术和原理有了更加深入的理解。

表 1 对分子遗传诊断综合实验的调查结果
Tab.1 Questionnaire analysis

调查项目 Investigation areas	学生评价 Feedback			
	很满意/% Excellent	满意/% Satisfactory	一般/% Fair	不满意 Not good
教学方法总体印象 General impression	32(42.1)	37(48.7)	7(9.2)	0
培养学生实验动手能力 Operation skills	35(46.1)	35(46.1)	6(7.8)	0
教学时间安排 Schedule arrangement	31(40.8)	38(50.0)	7(9.2)	0
教师能及时解决学生问题 Teachers' assistance	42(55.3)	33(43.4)	1(1.3)	0
培养学生在实验中的团结协作能力 Team spirit	34(44.7)	37(48.7)	5(6.6)	0
实验设备情况 Equipment conditions	31(40.8)	38(50.0)	7(9.2)	0
实验条件能满足教学需求 Lab hardware	35(46.1)	37(48.7)	4(5.2)	0
学生通过该课能很好地掌握专业实验技能 Research skills	39(51.3)	35(46.1)	2(2.6)	0
学生通过该课能有效提高解决问题的能力 Problem-solving ability	41(53.9)	32(42.1)	3(3.9)	0
实验能培养学生创新思维 Creative thinking	37(48.7)	35(46.1)	5(6.6)	0
对指导教师教学效果是否满意 Teaching effect	52(68.4)	24(31.6)	0	0
学生评价之平均值 Average value	37.2(48.9)	34.6(45.5)	4.3(5.6)	0

3 讨论

3.1 动物模型更适于用作遗传实验课的教学材料

动物模型基因突变明确,而且在尊重动物生命,遵守动物福利伦理原则的基础上,可以确保实验材料的来源。目前人类遗传病病料收集受到了

严格限定,1998 年由中国科学技术部和卫生部联合下发的《人类遗传资源管理暂行办法》要求所有遗传资源提供者及其亲属必须知情同意,而且不能随意将遗传资源及信息提供给与基因诊断无关的实验室。同时,《暂行办法》建议开展基因诊断的机构在使用这些标本或信息时应接受遗传资源管理办

公室的指导,并对遗传资源的安全性负责,违者必究。因此,动物模型材料应用在《医学遗传学—分子诊断综合实验》的优势十分突显。

在人类遗传病的研究中,适当的动物模型对研究基因突变在遗传病发病中的作用必不可少。由于小鼠与人类基因同源性高,小鼠的许多遗传病模型与人类相应的疾病具有可比性;加之目前实验用小鼠具有明确的遗传背景,易于饲养与繁殖,使基因突变小鼠被广泛应用于医学研究中^[5]。*ob* 基因突变所致的肥胖小鼠(C57BL/6J *ob* 小鼠)就是学生理解点突变的理想材料。由于肥胖小鼠模型中 *ob* 基因第 105 密码子处的单碱基突变(C→T),使编码精氨酸的密码子变为终止密码子,这一突变改变了限制性内切酶 Dde I 对该片段的识别位点,因而用 PCR 及限制性片段长度多态技术可以准确分析 C57BL/6J *ob* 小鼠 3 种 *ob* 基因型^[6]。

3.2 引入无毛基因突变小鼠模型,激发学生的学习兴趣

无毛小鼠是一种皮肤和毛囊发育异常的基因突变小鼠,其突变基因 *iRhom2* 在小鼠第 11 号染色体上纯合缺失一段核酸序列^[3,4]。该序列的杂合缺失发生在杂合子鼠体内,而野生型鼠中 *iRhom2* 基因未发生变化。利用这 3 种小鼠,可以同时检测出有害基因纯合个体、有害基因携带者,以及家系中正常个体。因而该综合性实验体现出基因诊断方法与传统疾病诊断方法相比更准确,更可靠的特点。为培养学生对动物的关爱^[1],实验前一周的每一个工作日(周一至周五),学生分组轮流进入动物饲养间,为动物加水加料及更换垫料,保证动物受到良好的照料。在实验开始后组织取材的过程中,合理使用麻醉剂,保证动物无痛苦死亡,使学生一方面受到实验动物福利伦理方面的教育,另一方面也使学生近距离观察无毛鼠、杂合鼠和野生型鼠的表型特点,有利于学生深入理解单基因遗传病中,单一基因座上的基因突变即可引起生物体可见表型的显著改变。通过引入基因突变动物模型,学生不仅领悟到了基因的突变是遗传病的基础,而且还对实验动物有了进一步认识,学生的学习兴趣 and 参与精神得以充分调动。

3.3 充分利用课前讨论,提高学生解决实际问题能力

传统的实验教学模式是在实验课前,教师将所有的试剂、器材和设备都准备好,课堂上详细讲解实验原理、方法和操作步骤,学生“照方抓药”式地完成相关操作,这样造成学生对实验目的和实验设计毫不关心,更欠缺对实验的整体把握。基于以上

弊端,我们采用“问题情境式”教学,即创设一个问题情境,提出一个待解决的问题,并让学生自行设计实验方案。

多数学生在实验前对实验动物的观察中已然提出了问题:这 3 种小鼠毛发的差异是由什么因素导致的?如何检测该因素从而尽早预测生物的性状?辅导老师根据学生的问题,给出参考资料出处,让学生查阅文献,了解小鼠无毛性状致病基因 *iRhom2* 的突变类型和相关检测手段。之后,开展课前讨论,让学生成为实验的设计者,提出相应实验方案。讨论中教师除了引导以外,对学生提出的新问题和疑虑进行解答,通过“讨论—思考—再讨论”,确定最终实验方法。通过上述教学方法的实施,有效地调动了学生的潜在学习需求,激发了学生的学习主动性,同时也很好地锻炼了学生的思维,培养了学生发现问题、分析问题和解决问题的能力。

4 展望

动物模型是生命科学研究不可或缺的实验材料,目前人类重要疾病的动物模型已超过 1 万余种,为医学研究和药物开发做出了巨大贡献。这些模型动物也是十分珍贵的遗传资源,它们具有明确的基因改变和显著的表型特征,是医学、药学和生物学教学的良好材料。本文只是将基因突变动物模型引入到分子遗传诊断实验教学中进行尝试,但足以凸显模型动物在医学教学中的优势和巨大潜力。相信随着人们对模型动物认识的提高和普遍应用,将会有越来越多的模型动物应用于医学、药学和生物学的教学实践中,从而促进教学水平的提高。

参考文献:

- [1] 梅志强,王琼,邓莉. 动物福利在研究生实验动物学教学中的应用初探[J]. 中国比较医学杂志,2012,22(3):76-78.
- [2] 齐志广,周春江,赵宝华,等. 生物学实验教学的改革与实践[J]. 实验室科学,2010,13(3):8-11.
- [3] 仇志华,王冬平,李瑞生,等. BALB/c 突变无毛小鼠研究概况[J]. 实验动物科学与管理,2004,21(3):42-46.
- [4] 游颖,马雨楠,曾林,等. *iRhom2* 及其突变基因重组慢病毒的包装和稳定表达细胞系的建立[J]. 中国实验动物学报,2015,23(6):597-601.
- [5] 庞荣清,李自安,阮光萍,等. Duchenne 型肌营养不良小鼠模型鉴定及干细胞移植后 *dystrophin* 的变化[J]. 中国实验动物学报,2014,22(6):81-85.
- [6] Hirasawa T, Ohara T, Makino S. Genetic typing of the mouse *ob* mutation by PCR and restriction enzyme analysis[J]. Exp Anim, 1997, 46:75-77.

[收稿日期]2016-12-16