

# 转人组织蛋白酶 K 基因小鼠的 Southern 杂交鉴定

祝梅香<sup>1</sup>, 邹星<sup>2</sup>, 沈洁<sup>1</sup>, 王嫣<sup>1</sup>, 徐凤<sup>1</sup>, 郭金微<sup>1</sup>, 张晶<sup>2</sup>, 李亦平<sup>3</sup>

(1. 中国医学科学院 中国协和医科大学实验动物研究所, 北京 100021;  
2. 北京师范大学; 3. 美国哈佛大学)

**【摘要】** 目的 用地高辛标记探针的方法进行 Southern 杂交, 以检测转人组织蛋白酶 K 基因小鼠外源 DNA 的整合情况, 筛选携带目的基因的阳性小鼠。方法 用地高辛标记探针的方法, 对转人组织蛋白酶 K 基因小鼠 (F0 代) 及首建阳性鼠与野生型 ICR 小鼠交配产生的 F1 代进行 Southern 杂交, 对 F0 代和 F1 代进行筛选。结果 经显微注射法, 共获得 25 只转基因小鼠, 通过 Southern 杂交鉴定, 1 只为阳性, 阳性率为 4%; 对 PCR 阳性的 F1 代小鼠 35 只进行 Southern 杂交, 结果全部为阳性。结论 外源基因 (人 Cathepsin K 基因) 已整合到小鼠的染色体上, 并且能够遗传。

**【关键词】** 组织蛋白酶 K; 小鼠, 转基因; Southern 杂交

**【中图分类号】** Q782 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1671-7856(2005)01-0040-03

## Identification of Transgenic Mice of Cathepsin- K by Southern Blot Hybridization

Zhu Mei-xiang<sup>1</sup>, Zou Xing<sup>2</sup>, Shen Jie<sup>1</sup>, Wang Yan<sup>1</sup>, Xu Feng<sup>1</sup>, Guo Jin-wei<sup>1</sup>, Zhang Jing<sup>2</sup>, Li Yi-ping<sup>3</sup>

(1. Institute of Laboratory Animal Science, CAMS & PUMC, Beijing 100021, China;  
2. Beijing Normal University; 3. Harvard University of U. S. A.)

**【Abstract】 Objective** Southern blot hybridization with DIG labeling probe was used to identify whether transgenic mice of human Cathepsin- K gene were positive. **Methods** Transgenic mice and the intercrossed progeny between the founder mice of human Cathepsin- K gene and wild ICR were detected by Southern blot hybridization with DIG labeling probe. **Results** 25 transgenic mice were obtained through microinjection, one was detected to be positive by Southern blot hybridization. The positive rate is 4%. Positive F1 generation via PCR was all positive by Southern blot. **Conclusion** The foreign gene (human Cathepsin K gene) has already integrated into mice chromosome and can inherit to the F1 generation.

**【Key words】** Cathepsin- K; Transgenic mouse; Southern blot hybridization

破骨细胞是一个高度分化的多核巨细胞, 直接参与骨吸收, 是骨组织吸收的主要功能细胞。组织蛋白酶 K (Cathepsin K) 是一种溶酶体含有的半胱氨酸蛋白酶, 它有选择性的在破骨细胞引起的骨吸收中起特殊的作用<sup>[1,2]</sup>。人组织蛋白酶 K 基因位于 1q 21 处<sup>[3]</sup>, 全长 12.1 kb, 包含 8 个外显子和 7 个内含

子, 外显子大小介于 48 ~ 219 bp 之间, 内含子大小介于 85 ~ 4326 bp。侧翼区分析表明该基因缺乏 TATA 和 CAAT 盒, 含有多个潜在的转录调控位点。通过基因组 DNA 和 cDNA 的序列比较, 表明这一侧翼区很可能是破骨细胞中主要的启动子<sup>[4]</sup>。Laznef 建立了组织蛋白酶 K 基因敲除小鼠模型, 该小鼠患有骨密质发育不全症。骨密质发育不全症是一种罕见的骨软骨发育异常性疾病, 为常染色体隐性遗传, 由组织蛋白酶 K 基因突变引起, 表现为身材矮小、

[作者简介] 祝梅香 (1971 - ), 女, 助理研究员, 研究方向: 分子遗传学、转基因。

骨硬化、骨脆、骨及牙齿的发育异常等<sup>[5]</sup>。

本实验室建立了转人组织蛋白酶 K 基因小鼠模型, 这为研究人类骨质疏松病的病因、药物筛选、组织蛋白酶 K 基因的功能等提供了很好的动物模型。本研究采用地高辛标记探针的方法来进行 Southern 杂交, 以检测转人 Cathepsin K 基因小鼠中外源 DNA 的整合情况, 筛选携带目的基因的阳性小鼠。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验动物

本研究中经显微注射法获得 25 只转基因小鼠 (F0 代), 经 PCR 检测有一只雄鼠为阳性, 再经 Southern 杂交鉴定, 仍为阳性; 将该首建鼠与野生型 ICR 雌鼠交配, 共产下 F1 代小鼠 60 只, 经 PCR 检测为阳性的共计 35 只。再对这 35 只阳性小鼠做 Southern 杂交进行鉴定。

### 1.2 主要仪器

低温高速离心机: 美国 Beckman 公司生产。杂交箱: 固液相分子杂交仪, 北京生产。电泳仪: Bio-Rad。电泳槽: 北京六一仪器厂生产。紫外交联柜 (GS Gene Linker UV Chamber): Bio-Rad。天能凝胶成像系统: 上海天能科技有限公司生产。本实验拍照均用该系统。

### 1.3 试剂

脱嘌呤液: 0.2 mol/L HCl; 碱变性液: 1.5 mol/L NaCl, 0.5 mol/L NaOH; 中和液: 1 mol/L Tris · Cl (pH7.4), 1.5 mol/L NaCl; 转移液: 20 ×SSC。限制性内切酶 EcoRI (15U/μl): 美国 Promega 公司产品, 由宝生物公司提供。标记和检测系统: DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit, Roche 公司产品, 由华美公司提供。尼龙膜: hybondN+ (带正电荷), 英国 Amersham Pharmacia biotech 公司生产, 由华美公司提供。Cathepsin K-pG3CATF 质粒: 由邹星提供。

### 1.4 方法

1.4.1 基因组 DNA 的制备<sup>[6]</sup>: 剪四周龄时鼠尾 1 cm, 加入裂解液和蛋白酶 K 消化过夜。经 Solution 变性, 酚与氯仿 (1:1) 和氯仿与异戊醇 (24:1) 抽提, 异丙醇沉淀, 乙醇洗涤, 待 DNA 干燥后, 溶于适量 TE。

1.4.2 基因组 DNA 的酶切消化<sup>[7]</sup>: 以 EcoRI 酶切 10μg 基因组 DNA (约 20μl), 反应体系为 100μl。

将 10 ×H buffer 10μl、高压灭菌 H<sub>2</sub>O 68μl、基因

组 DNA 20μl 混匀, 置 4 °C 孵育 4 h; 向反应体系中加入 1μl EcoRI, 37 °C 酶切消化 1 h; 再次向反应体系中加入 1μl EcoRI, 37 °C 酶切消化过夜。

1.4.3 转膜: 转膜采用向下毛细管转移法进行, 用 20 ×SSC 转移过夜。

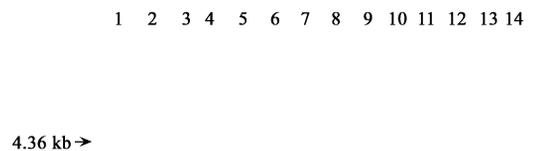
1.4.4 探针的标记: 采用随机引物标记法标记探针。探针为 Cathepsin K-pG3CATF 质粒经 PCR 扩增后的片段, 长度为 535bp。具体操作按照 DIG 说明书进行。

1.4.5 杂交及显色: 均参照 DIG 说明书来进行。杂交温度为 50 °C。

## 2 结果

### 2.1 转膜前电泳结果

取 10μg 酶切的基因组 DNA 进行 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳。电泳时间 6 h, 电压 30V。电泳完毕后, 将凝胶加样孔以上的部分切掉, 然后进行转膜。见图 1。



- 1: marker, DNA/Hind III, 上样量为 10μl。其相对分子质量标准为 2027, 2322, 4361, 6557, 9416, 23130 bp;
- 2: 阳性对照, EcoRI 酶切 Cathepsin K-pG3CATF 质粒, 并且稀释 100 倍, 上样量为 5μl。其长度为 4.0 kb;
- 3~13: F1 代小鼠基因组 DNA;
- 14: 野生型小鼠基因组 DNA

图 1 转膜前电泳结果

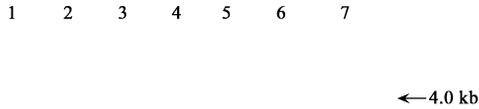
- 1: marker, DNA/Hind III;
- 2: positive control, Cathepsin K-pG3CATF plasmid by EcoRI digestion;
- 3-13: genomic DNA of F1 generation;
- 14: genomic DNA of the wild type.

Fig. 1 Electrophoresis before transferring to the hybondN+ membrane

### 2.2 Southern 杂交结果

转移完毕的膜经显色后与转膜前电泳结果做比对。在图 2 中, 经 PCR 检测为阳性的转基因小鼠仍然出现阳性条带, 而其他小鼠未出现阳性; 在图 3 中, F1 代小鼠均呈阳性, 野生型小鼠则为阴性。第 3 泳道小鼠出现 1 条带, 第 6 和 7 泳道出现 4 条带, 其

他阳性小鼠均为两条带,这提示外源基因是以多拷贝形式整合在首建鼠的染色体上,在传代时发生分离或重排,出现不同的拷贝数。经 PCR 检测为阳性的 35 只 F1 代小鼠,再经 Southern 杂交鉴定,结果全部为阳性。挑选 F1 代阳性小鼠进行互交,以产生 F2 代。



- 1: Marker, DNA/Hind ;  
 2: 野生型小鼠;  
 3~5: 显微注射后出生的转基因鼠,PCR 结果阴性;  
 6: PCR 结果阳性的转基因小鼠(F0 代);  
 7: 阳性对照,EcoRI 酶切 Cathepsin K-pGBCATF 质粒

图 2 转基因首建鼠的鉴定结果

- 1: Marker, DNA/Hind ;  
 2: wild type mouse;  
 3-5: negative transgenic mice by PCR;  
 6: positive transgenic mice by PCR;  
 7: positive control, Cathepsin K-pGBCATF plasmid by EcoRI digestion.

Fig. 2 Southern blot result of the transgenic founder

- 1: marker, DNA/Hind ;  
 2: 阳性对照:EcoRI 酶切 Cathepsin K-pGBCATF 质粒;  
 3~13:F1 代小鼠;  
 14: 野生型小鼠;

图 3 F1 代 Southern 杂交结果

- 1: marker, DNA/Hind ;  
 2: positive control, Cathepsin K-pGBCATF plasmid by EcoRI digestion;  
 3-13:F1 generation;  
 14: wild type mouse.

Fig. 3 Southern blot result of F1 generation

### 3 讨论

(1) 酶切消化要进行完全。主要是要保证 DNA 均匀分散,因此在向 DNA 液中加入 buffer 和高压灭菌 H<sub>2</sub>O 之后,置 4 孵育是必要的。置 4 数小时后,分两次加内切酶,每次加 1μl。另外,在加入内切酶之后,应轻弹管壁,以保证将溶液混匀。酶切完毕后,应进行电泳观察酶切结果,如消化不完全,需再加内切酶重新进行消化。

(2) 电泳条件对 Southern 杂交结果也有影响。电压过高,则电泳时间短,很难将酶切消化的 DNA 片段有效分离开,从而影响杂交效果。电压过低,不仅电泳时间长,且易导致条带扩散,也影响杂交效果。电压以 1~5V/cm 合适<sup>[7]</sup>。本实验电压取 2.5V/cm,电泳时间 6h。

(3) 在进行杂交时,探针的变性是关键。充分的变性可以保证特异性的杂交反应。为防止非特异性反应影响实验结果,预杂交和杂交后的充分洗涤是必要的。预杂交可以封闭非特异性杂交位点;杂交后的洗涤,可以洗去未结合的探针,从而避免在显色反应中形成不必要的背景<sup>[6]</sup>。

(4) Southern 杂交仅能证明外源基因是整合在小鼠的染色体上以及整合的拷贝数,但整合位点及外源基因是否表达,表达量如何等,尚需通过原位杂交、Northern 杂交等进行更深的研究。

### 参考文献:

- [1] Li YP, Chen W. Characterization of mouse Cathepsin K gene, the gene promoter and the gene expression[J]. J Bone Miner Res, 1999, 14:487-499.  
 [2] Brubaker KD, Vessella RL, True LD, et al. Cathepsin K mRNA and protein expression in prostate cancer progression[J]. J Bone Miner Res, 2003, 18(2):222.  
 [3] Gelb BD, Shi GP, Heller M, et al. Structure and chromosomal assignment of the human Cathepsin K gene[J]. Genomics, 1997, 15:41(2):258-262.  
 [4] Rood JA, Vans HS, Drake FH, et al. Genomic organization and chromosome localization of the human Cathepsin K gene[J]. Genomics, 1997, 41(2):169-176.  
 [5] Lazner F, Gwenn M, Pavasovic D, et al. Osteopetrosis and osteoporosis: two sides of the same coin[J]. Hum Mol Genet, 1999, (10):1839-1846.  
 [6] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第 2 版. 北京: 高等教育出版社, 1999, 195~199.  
 [7] 美 Sambrook, J. 等著, 黄培堂等译. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 北京. 科学出版社, 2002, 487~499.

(收稿日期 2004-03-24)