

转人组织蛋白酶 K 基因鼠系的 PCR 检测

祝梅香¹, 邹 星², 徐 凤¹, 沈 洁¹, 王 嫣¹, 郭金微¹, 张 晶², 李亦平³

(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 PCR 技术检测转人组织蛋白酶 K 基因鼠系, 筛选携带目的基因的阳性小鼠。方法 用 PCR 技术, 对显微注射后出生的转人组织蛋白酶 K 基因小鼠、首建鼠的 F₁、F₂、F₃ 及 F₂ 代与野生型 ICR 小鼠的回交后代进行检测。结果 共检测显微注射后出生的小鼠 25 只, 阳性为 1 只, 阳性率为 4%; 检测 F₁、F₂、F₃ 代小鼠分别为 60、77 和 69 只, 阳性仔鼠数为 35、56 和 63 只, 阳性率分别为 55.0%、72.7% 和 91.3%; 对回交后代进行检测, 未见纯合的 F₂ 代小鼠。结论 外源基因(人组织蛋白酶 K 基因)已经整合到小鼠的染色体上, 并且按孟德尔遗传定律中的分离定律进行遗传。

【关键词】 组织蛋白酶 K; 小鼠, 转基因; 聚合酶链反应

【中图分类号】 Q78 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2004)06-0325-04

Detection of Transgenic Mice Line of Cathepsin K by PCR

ZHU Mei-xiang¹, ZOU Xing², XU Feng¹, SHEN Jie¹, WANG Yan¹, GUO Jin-wei¹, ZHANG Jing², LI Yi-ping³

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

【Abstract】 Objective To detect transgenic mice of human Cathepsin-K gene by using PCR. **Methods** The founder transgenic mouse and wild ICR mice were intercrossed to obtain F₁ generation. The F₁, F₂, F₃ generations and the backcross offspring between F₂ and wild ICR were detected by PCR. **Results** 25 transgenic mice were obtained through microinjection, one was detected to be positive, the positive ratio was 4%; 60 F₁ generation, 77 F₂ generation and 69 F₃ generation were detected. The positive mice and ratio were 35(55.0%) in F₁; 56(72.7%) in F₂; 63(91.3%) in F₃, respectively. The backcross offspring of F₂ were detected and there wasn't any homozygote yet in F₂ generation. **Conclusion** The foreign gene (human Cathepsin K gene) has already integrated into mouse chromosome, and it can inherit in accordance with Mendelian inheritance.

【Key words】 Cathepsin K; Mice, transgenic; Polymerase chain reaction

骨骼石化症及骨质疏松症成为严重影响人类健康的两大骨骼疾病, 有必要对骨再造机制进行研究。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 是一种溶酶体含有的半胱氨酸蛋白酶, 在破骨细胞介导的骨吸收中起特殊的作用^[1-3]。人组织蛋

白酶 K 基因位于 1q21 处^[4], 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, 内含子大小介于 85~4 326 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^[5]。Kiviranta 等通过在重组体中引入沉默突变的方法, 建立了携带有小鼠 Cathepsin K 基因多个拷贝的转基因小鼠。Northern 杂交分析表明, 在 3 个转基

[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。

因鼠系中,颅盖骨和长骨中 Cathepsin K 基因 mRNA 的表达量增加了 6 倍。免疫组化分析确定转基因鼠系中 Cathepsin K 的表达仅限于破骨细胞及软骨细胞^[6]。

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疾病的病因、药物筛选、治疗策略、组织蛋白酶 K 基因的功能等提供了很好的动物模型。目前用于检测转基因小鼠中外源基因整合的方法主要有分子杂交和 PCR 技术。PCR 技术因其操作简便,耗时少,灵敏度较高,是首选方法。本研究即采用 PCR 技术检测转人 Cathepsin K 基因鼠系中外源基因的整合情况,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

1.1.1 F1 代的产生:本研究中采用显微注射法制作转基因小鼠。共获得 25 只转基因小鼠(F0 代),经 PCR 和 Southern 杂交鉴定为阳性的为 1 只雄鼠;将该首建鼠与野生型 ICR 小鼠交配,共产下 F1 代小鼠 60 只。

1.1.2 F2 代的产生:挑选 F1 代中经 Southern 杂交检测为阳性的小鼠 20 只互交(雌、雄不同窝),产生 F2 代,共 77 只。

1.1.3 回交后代的产生:将 F2 代中经 PCR 检测为阳性,且电泳分离条带较亮的小鼠与野生型 ICR 小鼠交配,产生后代共 106 只。

1.1.4 F3 代的产生:将 F2 代中经 PCR 检测为阳性,且回交后代阳性仔鼠多者互交(雌、雄不同窝),共配 6 对,产生 F3 代小鼠 69 只。

1.2 仪器

低温高速离心机:美国 Beckman 公司生产;PCR 仪:Perkin Elmer 公司生产;电泳仪:Bio-Rad;电泳槽:北京六一仪器厂生产;天能凝胶成像系统:上海天能科技有限公司生产。

1.3 试剂

lysis buffer: 50 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 100 mmol/L EDTA (pH8.0), 100 mmol/L NaCl, 1% SDS; 蛋白酶 K:由北京赛泰克生物科技有限公司提供,配制成浓度为 20 mg/ml,分装备用;dNTPs 及 Taq DNA 聚合酶(5U/μl):由上海生工生物工程公司提供;引物:正义链 5' TGTACCTATAACCAAGCCGTTCA GC 3', 反义链 5' GTAATTCATTAAGCATTTCTGCCGAC 3',由

上海生工生物工程公司合成, PAGE(聚丙烯酰胺)凝胶纯化;引物的溶解:引物干粉溶于 109 μl 双蒸水中,充分溶解,使其浓度为 100 μmol/L; Cathepsin K-pG3CATF 质粒:由邹星提供。

1.4 方法

1.4.1 基因组 DNA 的提取^[7]:剪断乳小鼠鼠尾约 1 cm,加入 500 μl 裂解液及 15 μl 蛋白酶 K,在摇床中 55, 150 r/min 消化过夜。用 Solution 变性,酚氯仿(1:1)和氯仿-异戊醇(24:1)抽提,异丙醇沉淀 DNA, 1 ml 80%乙醇洗涤 DNA, 去掉乙醇,待 DNA 干燥后,溶于适量 TE。

1.4.2 PCR 扩增:反应体系:10×buffer 2 μl; dNTP 0.4 μl; 引物 0.1 μl; Taq 酶 0.2 μl; MgCl₂ (25 mmol/L) 2 μl; H₂O 15 μl; DNA 0.3 μl; 反应总体积 20 μl; 反应条件:94 5 min; 94 1 min → 60 1 min → 72 1 min, 30 个循环; 72 10 min。

1.4.3 电泳分离目的条带:取 PCR 产物 5 μl 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,电压 85 V, 时间 1 h。将凝胶置溴化乙锭中染色,于紫外灯下观察结果,用天能凝胶成像系统拍照。

2 结果

2.1 转基因首建鼠的 PCR 结果

当阳性对照出现 535 bp 的特异性条带,阴性对照没有特异性扩增时,样品中出现 535 bp 特异性条带所对应的即为转基因阳性小鼠。结果应重复 2~3 次,以确保可靠。从图 1 可以看出,仅有第 6 泳道转基因小鼠出现阳性,将该小鼠经 Southern 杂交鉴定,仍呈阳性。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

535bp →

1. 阳性对照: EcoRI 酶切的 Cathepsin K-pG3CATF 质粒;
2. Marker: DL2 000, 其相对分子质量标准为: 100, 250, 500, 750, 1 000, 2 000 bp; 3~12: 显微注射后出生的转基因小鼠; 13: 阴性对照(水);

图 1 显微注射后出生的转基因鼠的 PCR 结果

1. Positive control: Cathepsin K-pG3CATF plasmid by EcoRI digestion.
2. Marker: DL2 000. 3-12: Transgenic mice obtained by microinjection. 13: Negative control (H₂O).

Fig. 1 PCR result of transgenic mice by microinjection

2.2 互交后代的 PCR 检测结果 见图 2。

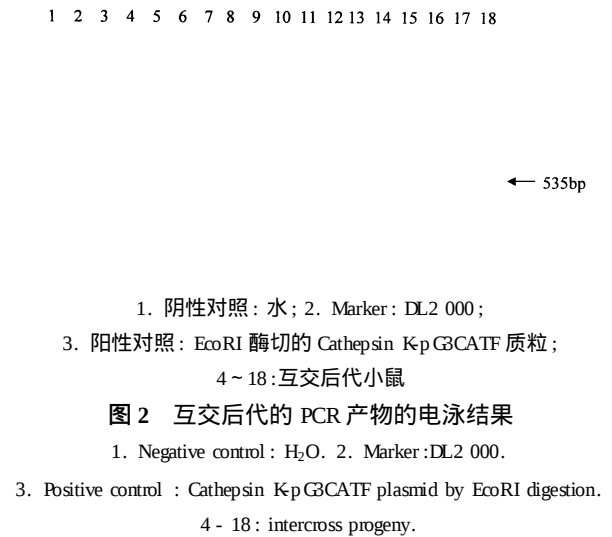


Fig. 2 Banding patterns of PCR products for intercross progeny

2.3 回交后代的 PCR 检测结果

在 F2 代与野生型 ICR 小鼠的回交后代中,未发现有 PCR 结果全部为阳性的情况。说明外源基因在 F2 代小鼠中尚未达到纯合,还需进一步互交传代。将阳性仔鼠比例少的 F2 代小鼠剔除,选择阳性仔鼠比例多的 F2 代小鼠互交以产生 F3 代,要求互交双方不能同窝(图 3)。

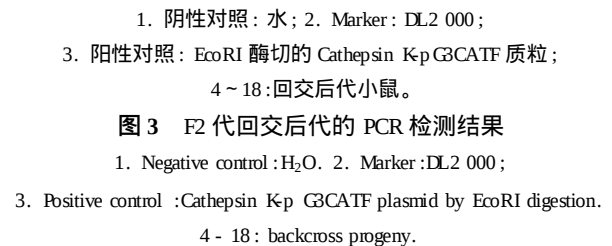


Fig. 3 PCR detection results of backcross progeny of F2

2.4 外源基因在 F1、F2 和 F3 代中的遗传情况

经卡方检验结果显示,表 1 中各代的阳性与阴性之比与预期值基本相符,说明外源基因是融合在小鼠的染色体基因组中,在各代中是按孟德尔遗传规律中的分离定律稳定遗传的。

表 1 外源基因在 F1、F2 和 F3 代中的遗传情况

Tab. 1 Inheritance of the foreign fusion gene in the progeny of the transgenic founder mice

后代 Generation	产仔数 Number	阳性数 Positive	阴性数 Negative	阳性与阴性 之比 Ratio of positive to negative	预期的阳性 与阴性之比 Expected ratio
F1 代	60	35	25	1.4 1	1 1
F2 代	77	56	21	2.7 1	3 1
F3 代	69	63	6	10.5 1	9 1

3 讨论

(1)在 F3 代中,阳性仔鼠数高于预期值。这是由于我们在传代时,选取了回交后代阳性数量多的 F2 代小鼠互交,从而人为增加了 F3 代阳性小鼠的数量。另外,由于转基因随机整合到小鼠的基因组,外源基因的插入可能会影响一些基因的表达与调控,扰乱了进化过程中形成的稳定、平衡、优化的内环境。所以转基因动物普遍表现为繁殖能力低,抗病能力差。这一点对需要保种、育种的转基因动物尤其重要。

(2)在 PCR 反应的各种成分中,模板 DNA 是一个重要因素,不能混有任何蛋白酶、核酸酶及 Taq 酶抑制剂,否则杂质过多将会造成扩增效率低或根本无法引发 PCR 反应^[8];引物是决定 PCR 结果的关键,引物浓度一般为 0.1~0.5 μmol/L^[8]。引物浓度偏高会引起错配和非特异性反应扩增,并且可增加引物之间形成二聚体的概率。本研究中所用引物终浓度为 0.5 μmol/L。

(3)由于 PCR 技术灵敏度高,极其微量的污染即可造成假阳性的产生。加样器污染是一个值得注意的问题。由于操作时不慎将样品或模板 DNA 吸入加样器内或粘在加样器头上是一个严重的污染源,因而加样或吸取模板 DNA 时要十分小心,吸样要慢,吸样时尽量一次性完成,以免交叉污染或产生气溶胶污染;最可能造成 PCR 产物污染的形式是气溶胶污染,因此,应选择质量好的 Eppendorf 管,以避免样品外溢及外来 DNA 的进入,开管前应离心,开管动作要轻,以防管内液体溅出。设立适当的阳性对照和阴性对照,既可验证 PCR 反应的可靠性,又可协助判断扩增系统的可信性。另外,应重复实验 2~3 次,以验证结果是否可靠。

(4)早期的转基因研究中,一直将 Southern 杂交结果作为阳性鼠的最终结论。实践证明,通过严谨、

合理的设计,PCR 鉴定与 Southern 杂交结果是一致的。在本研究所建的转基因鼠系中,经 PCR 筛选出的首建鼠及 F1 代阳性小鼠再经 Southern 杂交确定,未出现有假阳性;所以 F2 代及以后各代的小鼠未经 Southern 杂交,只经 PCR 筛选,挑选出较亮的条带即可,这大大地节省了时间及成本。

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] Saftig P, Hunziker E, Wehmeyer O, et al. Impaired osteoclastic bone

resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K deficient mice [J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998, 95 (23):13 453 - 13 458.

- [4] Gelb BD, Shi GP, Heller M, et al. Structure and chromosomal assignment of the human Cathepsin K gene[J]. Genomics, 1997, 41(2):258 - 262.
- [5] 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.
- [6] Kiviranta R, Morko J, Uusitalo H, et al. Accelerated turnover of metaphyseal trabecular bone in mice overexpressing Cathepsin K[J]. J Bone Miner Res, 2001, 16(8):1 444 - 1 452.
- [7] 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. 458 - 466.
- [8] 美 Sambrook J. 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. 597 - 611.

(收稿日期 2004-03-24)

动物福利

我院实验动物福利工作简介

恽时锋,胡玉红,田小芸,周森妹

(南京军区南京总医院动物实验科,南京 210002)

21 世纪是生命科学的时代,而实验动物则是生物医学乃至整个生命科学发展的基础和条件,它总是作为人类的替身在科学研究中去探索生命起源,揭示遗传奥秘,攻克癌症堡垒,研究各种疾病与生物体衰老的机理,监测公害与环境污染,承担新药、新技术的安全评价和效果试验。可以说实验动物是人类的替难者,是生命科学发展的先驱和基石,是人类健康的阶梯,在道德和情义上应该受到人类的关爱。重视并保障实验动物福利即是自然科学发展的趋势,也是社会科学发展的必然结果,是我国生命科学研究走向世界的必然趋势,同时也是建设人类精神家园的需要,是全人类共同的责任和义务,是人类文明和进步的标志。

欧美一些发达国家非常重视实验动物的福利和保护,在我国,由于实验动物科学发展起步较晚,对实验动物的关爱和福利才刚刚引起大家的关注。南京军区南京总医院是一所现代化大型综合性医院,“医、教、研”发展水平较高,医学研究中实验动物应用面广,使用量大。长期以来,医院领导十分重视科技人员人文素养的培养和提高,重视实验动物科学知识的普及和伦理教育,重视实验动物的福利,并注重生物医学研究与实验动物福利协调发展。具体落

实在投资新建和改建了多种符合国家标准实验动物生产和使用设施,购置了适合不同种类实验动物使用的标准化笼具和动物实验设备,在屏障环境内为实验动物专门设置了定时自动播放的背景轻音乐及缓控动物照明系统,自行设计研制了一台内环境符合国家标准的多功能大型 SPF 级大小鼠实验(手术)台及 U 型台面的大动物手术台,建立和完善了详细的实验动物生产、防(检)疫、质控及实验动物使用标准化操作规程(SOP),提出建立实验动物体系突发事件的各项应急预案,加强实验动物科学知识培训,实行实验动物生产、管理、实验上岗证制度,积极开展动物实验“3R”研究,建立了一项用细胞学方法替代实验动物进行细菌致病性试验的方法;建造了既具有浓郁的人文气息,又饱含深刻的警示及教育意义实验动物纪念碑;设计制作了具有重要科普教育意义的实验动物对人类贡献的大型喷绘展板,图文并茂,通俗易懂,具有重要的科普及伦理教育意义。

实验动物福利工作的好坏,不仅反映了实验动物学科建设的成就,而且影响着生物医学研究成果的准确性、社会性及公众的认可程度,将动物福利融入生物医学研究中,不仅是对知识工程的构建,也是对人才工程的贡献。

[作者简介]恽时锋(1965-),男,副教授,博士,从事医学实验动物学专业。

(收稿日期 2004-05-31)