

## S100A16 转基因小鼠的构建与鉴定

杜新丽, 薛 一, 张媛媛, 张日华, 刘 云\*

(南京医科大学第一附属医院老年医学内分泌科, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:构建系统表达 S100A16 基因型小鼠,为研究 S100A16 基因的生物学功能提供模型动物。方法:将 S100A16 cDNA 插入 CMV 启动子下游,构建转基因表达载体,通过显微注射方法建立转基因小鼠。PCR 鉴定转基因小鼠的基因型,采用定量 PCR(QPCR)方法筛选高表达品系。结果:成功构建 S100A16 转基因载体,建立了 S100A16 转基因小鼠,通过 PCR 及 QPCR 方法筛选出两个高表达品系(line A, line B)。结论:建立了系统表达 S100A16 的转基因小鼠,转入的 S100A16 基因在脂肪、肝脏、肌肉、肺等组织高表达,为研究 S100A16 的生物学功能特别是在肥胖中的作用及机制提供了动物模型。

**[关键词]** S100A16 基因;转基因小鼠;肥胖;胰岛素抵抗

**[中图分类号]** Q813

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)03-325-04

## Establishment and identification of S100A16 transgenic mice

DU Xin-li, XUE Yi, ZHANG Yuan-yuan, ZHANG Ri-hua, LIU Yun\*

(Department of Geriatrics Endocrinology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a transgenic mouse model systemic expression S100A16, which can be used for the study of its biologic function. **Methods:** The plasmid was generated by inserting the murine S100A16 cDNA into a vector with CMV promoter. The transgenic mice were produced by the method of microinjection. The genotype of transgenic lines was identified by PCR and the expression level of the gene was determined by QPCR. **Results:** S100A16 cDNA transgenic vector was successfully constructed and S100A16 transgenic mice were created. Two high expression lines were determined by QPCR. **Conclusion:** The transgenic mouse systemic expressing S100A16 was successfully established, and the S100A16 gene was highly expressed in many tissues, such as adipose tissue, liver, muscles, and lung. The S100A16 mouse could be a useful model for the researches of its function, especially in obesity and insulin resistance.

**[Key words]** S100A16 gene; transgenic mice; obesity; insulin resistance

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(3): 325-328]

S100A16 基因是前期肥胖相关研究中获得的差异表达基因,是钙调蛋白 S100 家族的新成员,是具有钙结合能力的钙结合蛋白,但它具有一些不同于该家族基因的特征<sup>[1-3]</sup>。其生物学功能尚不是很清楚,本课题组先前的研究发现 S100A16 在小鼠前脂肪细胞 3T3-L1 分化过程中表达升高,能够促进 3T3-L1 细胞分化过程中脂滴的形成,促进 3T3-L1 细胞的增生,可明显上调 aP2、adiponectin、leptin、

PPAR $\gamma$  及 C/EBP $\alpha$  的表达,在 3T3-L1 细胞分化后期抑制葡萄糖的摄取<sup>[4-6]</sup>,但其具体机制及其他生物学功能目前尚未见报道,为此,为深入研究 S100A16 基因的作用及机制本文构建了 S100A16 转基因小鼠。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

C57BL/6 小鼠购自南京大学模式动物研究所。Taq 酶、DNA Marker DL2000、酚氯仿、TRIzol、Prime-Script<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> RT reagent kit Perfect Real time、Premix Ex Taq<sup>™</sup> 购自大连宝生物工程有限公司。小鼠鉴定引物 S100A16-tF1 和 S100A16-tR1、小鼠 QRT-PCR

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81070684),江苏省科技支撑计划(BE2011802),江苏省“六大人才高峰”项目,南京医科大学第一附属医院创新团队工程资助

\*通讯作者, E-mail: liuyun@njmu.edu.cn

引物 S100a16-R 和 S100a16-F、 $\beta$ -actin-R、 $\beta$ -actin-F 由上海 Invitrogen 公司合成(表 1)。

表 1 S100A16 转基因小鼠鉴定引物序列

Table 1 The primer sequences specific for the identification of S100A16 transgenic mouse

引物名称	引物序列(5'→3')
S100A16-tF1	TTGTGCTGTCTCATCATTTTGG
S100A16-tR1	ACCAGCCACCACCTTCTGATA
S100a16-R	GTCCAGTATTCGTCAAAGCAGATG
S100a16-F	ACCACATGCTGACGGACACA
$\beta$ -actin-R	GGGCCGGACTCATCGTACT
$\beta$ -actin-F	GCTCTGGCTCCTAGCACCAT

### 1.2 方法

#### 1.2.1 重组质粒的构建

使用高保真 *Taq* 酶(PrimeSTAR<sup>®</sup>, 日本 TaKaRa 公司)扩增 S100A16 cDNA, 采用 *Kpn* I + *Sac* I 进行双酶切, 1%琼脂糖凝胶电泳, 回收、纯化目的片段(375 bp)后克隆到 pCAGGS 载体中, 转化感受态大肠杆菌 XL1-Blue 后, 用碱裂解法抽提质粒。连接成功的质粒用 *Sph* I + *Bam*H I 酶切释放出 CAG promoter-S100A16-polyA 部分, 回收后与 *Sph* I + *Bam*H I 酶切过的 pInsulator 进行连接。连接成功后用 *I-Ceu* I 将 insulator-CAG promoter-S100A16-polyA-insulator 切下用作注射。

#### 1.2.2 转基因质粒的鉴定

根据相应的酶切图谱, 构建好的转基因质粒分别采用 *Bgl* II + *Sph* I 进行酶切鉴定, 将阳性重组子命名为 pInsulator-CAG-S100A16, 并送上海 Invitrogen 公司进行序列测定。

#### 1.2.3 转基因小鼠的获得

用 *I-Ceu* I 酶切转基因载体后, 回收 5 405 bp 大小的条带, 使用 Elutrap Electroelution System(美国 Whatman 公司)进行纯化, 采用显微注射方法将上述片段注射到 C57BL/6 小鼠受精卵内, 并将受精卵移植到假孕受体鼠的输卵管中, 产出 F0 代转基因小鼠。

#### 1.2.4 PCR 鉴定 S100A16 转基因小鼠的基因型

F0 代转基因小鼠与 C57BL/6 小鼠杂交获得 F1 代小鼠, 用 F1 代 2 周龄小鼠尾尖通过酚氯仿裂解法提取基因组 DNA, PCR 鉴定基因型。PCR 上游引物为: S100A16-tF1; 下游引物为: S100A16-tR1。反应体系为 20  $\mu$ l, 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。目的片段长度为 489 bp。

#### 1.2.5 QPCR 检测 S100A16 基因的表达

来自不同 founder 的 8 周龄 S100A16 PCR 鉴定阳性小鼠及同窝阴性对照 C57BL/6 小鼠通过颈椎脱臼法处死后, 取其肝脏、肺、肌肉、脂肪组织, 立即冻存与 -80 $^{\circ}$ C 保存, 并做好标记, 每个 founder 取 2 只(雌性、雄性各 1 只)提取 RNA 后反转录, QRT-PCR 检测不同组织中 S100A16 基因的表达情况。QRT-PCR 程序: 变性: 95 $^{\circ}$ C, 15 s; 退火: 58 $^{\circ}$ C, 30 s; 延伸: 72 $^{\circ}$ C, 30 s; 20  $\mu$ l 体系 40 个循环。

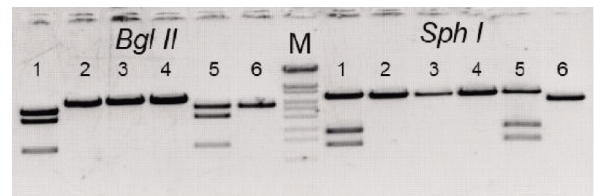
#### 1.3 统计学方法

反应结束后通过分析 Ct 值, 计算定量结果。所得值以内参  $\beta$ -actin 标化后输入 Excel 软件进行分析。

## 2 结果

#### 2.1 重组质粒 pInsulator-CAG-S100A16 的鉴定

将重组质粒 pInsulator-CAG-S100A16 分别用 *Bgl* II + *Sph* I 进行酶切鉴定, *Bgl* II 酶切产物分别为: 3 908、2 859、1 313 bp; *Sph* I 酶切产物分别为 5 076、1 745、1 259 bp, 与预期大小一致, 将此重组质粒送上海 Invitrogen 公司测序结果正确(图 1)。



酶切结果显示 1、5 为酶切鉴定正确的重组质粒。

图 1 重组质粒酶切鉴定结果

Figure 1 Identification of recombinant plasmid by *Bgl* II and *Sph* I

#### 2.2 S100A16 转基因小鼠的获得及 F0 代转基因小鼠基因型的鉴定

将 S100A16 质粒用酶切后回收纯化的片段显微注射到小鼠受精卵中, 共注射受精卵 990 枚, 将受精卵移植到 37 只假母, 共产子鼠 72 只, 鼠尾 DNA 行 PCR 鉴定阳性 8 只, 即为 F0 代(部分鉴定结果见图 2)。

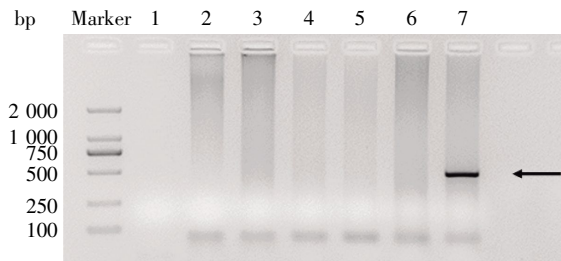
#### 2.3 PCR 鉴定 F1 代 S100A16 阳性小鼠

取繁殖期的 F0 代小鼠与 C57BL/6 小鼠杂交, 待其产仔后 14 d 剪取小仔鼠尾, 通过酚氯仿裂解法提取鼠尾 DNA 进行鉴定(部分结果见图 3)。

#### 2.4 QRT-PCR 检测 PCR 阳性小鼠 S100A16 基因在各组织的表达

分别提取各个系别小鼠不同组织的 RNA (肝脏、脂肪、肺、肌肉组织),通过 QRT-PCR 鉴定不同

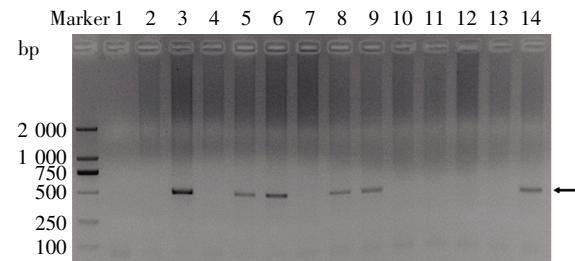
组织中 S100A16 的表达情况,提示 A 系及 B 系为高表达品系(部分鉴定结果见图 4)。



第 7 道为 PCR 鉴定 F0 代转基因阳性鼠。

图 2 S100A16 转基因小鼠 F0 代基因型的鉴定(部分)

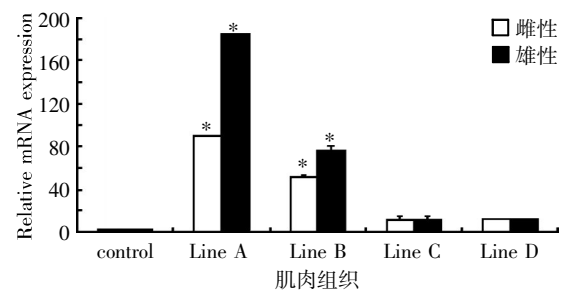
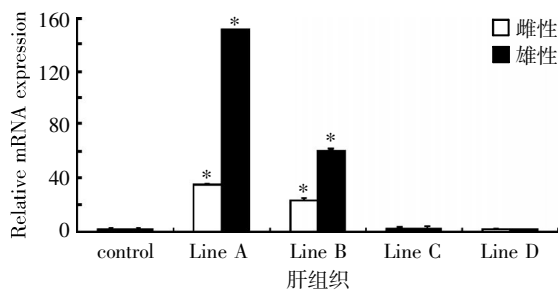
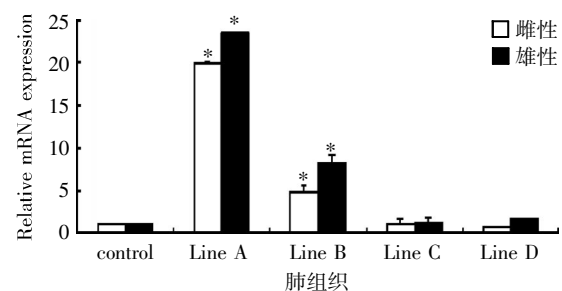
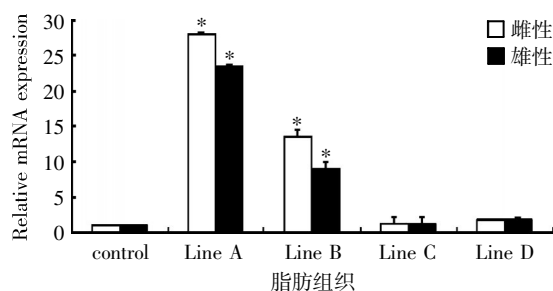
Figure 2 The identification for S100A16 F0 transgenic mouse



3、5、6、8、9、14 为 F1 代阳性小鼠。

图 3 F1 代小鼠 PCR 鉴定结果(部分)

Figure 3 The PCR identification for F1 transgenic mouse



与 control 相比, \* $P < 0.05$ 。

图 4 F1 代小鼠组织 QPCR 鉴定结果

Figure 4 The QPCR identification for F1 transgenic mouse

### 3 讨论

转基因动物是指将外源基因用实验方法插入动物生殖细胞的基因组而获得的具有插入基因特性,并能正常繁衍的动物<sup>[7]</sup>。转基因动物已成为探讨基因调控机制、致癌作用和免疫系统反应的有力工具<sup>[8-10]</sup>。本实验以 S100A16 为靶基因,成功构建了打靶载体,通过显微注射技术建立了 S100A16 转基因小鼠,获得 14 只 F0 代转基因小鼠,将这些小鼠与 C57BL/6 小鼠交配产生 F1 代转基因小鼠,通过对 F1 代转基因小鼠进行 PCR 及 QPCR 鉴定成功筛选出 2 个高表达 S100A16 的转基因小鼠品系,从 QPCR 结果可以看出,转基因小鼠 S100A16 的表达量明显高于阴性对照组。可以应用该转基因小鼠进行 S100A16 的生物学功能研究。

目前对 S100A16 基因功能的研究报道很少,有报道它在食道肿瘤、乳腺癌中高表达可能与肿瘤有关<sup>[11-12]</sup>。本课题组先前的研究发现它可能是一个全新的脂肪细胞分化调节因子,但其在肥胖及胰岛素抵抗中的作用及其机制仍然不清楚,本研究成功构建的 S10A016 转基因小鼠为其功能研究提供了动物模型。

#### [参考文献]

- [1] Marenholz I, Heizmann CW. S100A16, a ubiquitously expressed EF-hand protein which is up-regulated in tumors [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313(2): 237-244
- [2] Liu Y, Liu J, Chen J, et al. Molecular cloning and characterization of a novel-LIM domain-family gene, PINCH 2, in human testis [J]. *Mol Biotechnol*, 2007, 35 (2): 109-

118

[3] Sturchler E, Cox JA, Durussel I, et al. S100A16, a novel calcium-binding protein of the EF-hand super-family [J]. *J Boil Chem*, 2006, 281(50):38905-38917

[4] Zhang RH, Zhu WD, Du XL, et al. S100A16 mediation of weight gain attenuation induced by dietary calcium [J]. *Metabolism*, 2012, 61(2):157-163

[5] Liu Y, Zhang RH, Xin J, et al. Identification of S100A16 as a novel adipogenesis promoting factor in 3T3-L1 cells [J]. *Endocrinology*, 2011, 152(3):903-991

[6] 辛 婧, 张日华, 杜新丽, 等. S100A16 基因 shRNA 真核表达质粒的构建及其干扰效果的初步鉴定 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2011, 31(3):324-327

[7] Miquerol L, Beyer S, Kelly RG. Establishment of the mouse ventricular conduction system [J]. *Cardiovascular Res*, 2011, 91(2):232-242

[8] Asante E, Linehan J, Desbruslais M, et al. BSE prions propagate as either variant CJD-like or sporadic CJD-like prion strains in transgenic mice expressing human prion protein [J]. *EMBO J*, 2002(23), 21:6358-6366

[9] Manson JC, Tuzi NL. Transgenic models of the transmissible spongiform encephalopathies [J]. *Expert Rev Mol Med*, 2001, 2001(3):1-15

[10] 李潇潇, 任 军, 王 隆, 等. HBsAg 阳性转基因小鼠肝脏中昼夜节律基因 dbp 转录水平变化的研究 [J]. *微生物与感染*, 2008, 3(2):75-79

[11] Donato R, Sorci G, Riuzzi F, et al. S100B's double life: Intracellular regulator and extracellular signal [J]. *Biochimica Biophysica Acta*, 2009, 1793(5):1008-1022

[12] Yao R, Lopez-Beltran A, Maclennan GT, et al. Expression of S100 protein family members in the pathogenesis of bladder tumors [J]. *Anticancer Res*, 2007, 27(5A):3051-3058

[收稿日期] 2011-10-01

本刊现已启用网上稿件管理系统，作者登陆  
<http://jnmu.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件  
 审理情况。