

S100A16 基因敲除小鼠模型的构建与鉴定

童佩, 奚玲, 杨洁, 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: S100A16 在肥胖以及多种恶性肿瘤发生发展中发挥了重要作用, 本研究拟构建 S100A16 基因敲除小鼠模型。方法: 利用基因表达调控系统(即 Cre/lox P 系统)构建全身敲除小鼠。采用聚合酶链式反应(PCR)鉴定小鼠的基因型, 采用实时定量 PCR(QRT-PCR)、Western blot 方法验证其转录及翻译水平的表达。结果: 成功建立了 S100A16 全身敲除小鼠模型, 基因敲除杂合子小鼠成功饲养繁殖, 目前为止未出现纯合子小鼠。S100A16 敲除小鼠主要代谢器官, 如脂肪、肌肉、肝脏中 S100A16 蛋白表达量显著下降。结论: S100A16 基因敲除小鼠模型的构建为研究肥胖及胰岛素抵抗中的作用及机制提供了动物模型。

[关键词] S100A16; 基因敲除; 动物模型

[中图分类号] Q789

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)05-0549-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20170506

Establishment and identification of S100A16 gene knockout mouse model

Tong Pei, Xi Ling, Yang Jie, Liu Yun*

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

[Abstract] **Objective:** To establish the S100A16 gene knockout mouse model, which can be used for the study on its biologic function. **Methods:** To establish the S100A16 gene knockout mouse model via Cre/loxP system. PCR was used to identify the genotype of the offspring, the expression level of S100A16 mRNA was detected by qRT-PCR, and expression of S100A16 protein was detected by Western blot. **Results:** S100A16 gene knockout mouse model has been successfully established. Heterozygous mice were successfully bred and reproduced. So far, gene knockout homozygous mice were not found. **Conclusion:** The S100A16 mouse could be a useful model for the researches on its function, especially in obesity and insulin resistance.

[Key words] S100A16; gene knockout; animal model

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(05): 549-553]

S100A16 钙结合蛋白 (S100 calcium binding protein A16) 属于 S100 家族成员, 正常情况下广泛表达于脂肪、肌肉、肝脏、心肌、肺脏等多种组织。S100A16 蛋白与家族其他成员相比结构具有一定的特异性, 其 N 端缺少谷氨酸残基而丧失了一个 Ca^{2+} 结合功能, 只有 C 端可以结合一个 Ca^{2+} [1-2]。国内外研究发现 S100A16 与多种肿瘤(如乳腺癌、肺癌和前列腺癌等)相关, 因而被认为是一种潜在的肿瘤生物学标志物 [3-5]。同时, S100A16 在糖脂代谢中也发挥着重要的生理作用, 我们的前期研究表明 S100A16 促进前体脂肪细胞分化为成熟脂肪细胞 [6-8]; 此外,

也有研究表明, S100A16 可能参与炎症反应 [9-10]。因此 S100A16 在人体各个系统组织中发挥了广泛而重要的生物学作用, 为了进一步研究 S100A16 的生物学功能, 本课题组构建了 S100A16 基因条件性敲除小鼠 (conditional knockout, CKO) 模型, 通过与可特异性表达 Cre 基因重组酶 (E II a-Cre) 转基因工具小鼠的杂交进一步得到了 S100A16 基因全身敲除小鼠 (CE 小鼠), 为研究 S100A16 的生物学功能提供了良好的动物模型。

1 材料和方法

1.1 材料

C57BL/6J 与 E II a-Cre 小鼠购自南京大学模式动物研究所。

所用各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA

[基金项目] 国家自然科学基金 (81270952)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: liuyun_1853@sina.com

聚合酶、Taq 酶及其 PCR 相关试剂、SYBR Premix (TaKaRa 公司, 日本); TRIzol(15596-026, 上海 Invitrogen 公司); 蛋白酶 K(上海生工生物工程技术有限公司); DNA Marker DL2000、RIPA 蛋白裂解液、PMSF 蛋白酶抑制剂、5× SDS 电泳上样缓冲液、HRP 标记羊抗兔 IgG 抗体 (碧云天公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒、蛋白预染 marker(Thermo 公司, 美国); β-actin 抗体 (60008, Proteintech 公司); S100A16 抗体(130419, Abcam 公司, 美国); PVDF 膜(Millipore 公司, 美国)。引物由上海 Invitrogen 公司合成(表1)。

表 1 S100A16 基因敲除小鼠鉴定引物序列

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

引物名称	引物序列(5'→3')
CKO-tF1	ACTACCTTAGAGCCTATGCAAGG
CKO-tR1	GCTCCTGTGAGGAGAGGAAGC
GKO-tF2	ACTACCTTAGAGCCTATGCAAGG
GKO-tR2	GAGAGCTAGGAGGAGTGGATG
Cre-tF	CTAGGCCACAGAATTGAAAAGATCT
Cre-tR	GTAGGTGGAATTCTAGCATCATCC
S100a16-F	ACCACATGCTGACGGACACA
S100a16-R	GTCCAGTATTCGTCAAAGCAGATG
GAPDH-F	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA
GAPDH-R	CCTGCTTACCACCTTCTTGAT

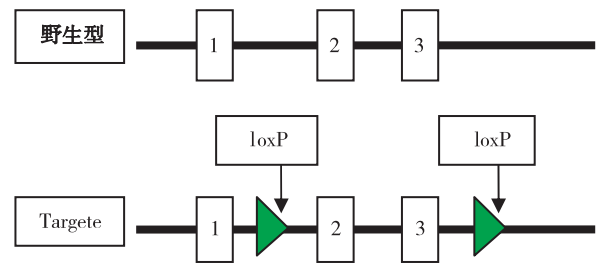
1.2 方法

1.2.1 CKO 小鼠的获得

首先, 根据小鼠 S100A16 基因组序列设计基因敲除方案, 将 2 个 loxP(Cre 酶特异识别位点)位点分别插在外显子 2 和 3 两侧, 构建载体采用电穿孔法将其打靶载体转入 C57BL/6J 小鼠胚胎干细胞(ES 细胞), 经 G418 筛选得到阳性克隆的 ES 细胞, 并将此 ES 细胞植入假孕的 C57BL/6J 小鼠子宫内, 得到带 loxP 位点的杂合子 S100A16 基因 CKO 小鼠 (图 1、2)。所有小鼠均饲养在南京模式动物研究所的屏障系统(SPF)小鼠饲养室。其次, 通过杂合子小鼠回交, 得到 CKO 纯合子。进行 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定小鼠基因型, 判断标准为: 野生型(WT)型, DNA 经 PCR 扩增后于 246 bp 处出现单一条带; 纯合子, CKO 于 364 bp 处出现单一条带; 杂合子, CKO 于 246 bp 和 364 bp 处同时出现 2 个条带。

1.2.2 CE 小鼠的获得

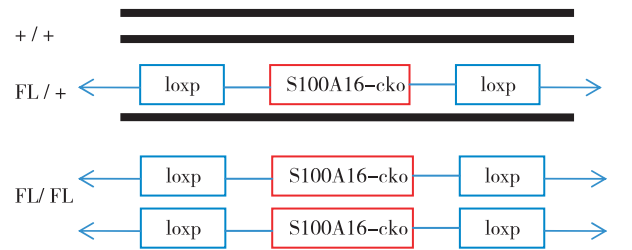
E II a-Cre 小鼠是能识别 loxP 位点并表达 Cre 重组酶的工具鼠。CKO 小鼠进一步与 E II a-Cre 小鼠杂交, 生产子代小鼠, 于 2 周龄时剪脚趾编号并鉴



Targete: 靶目标 1, 2, 3 指外显子编号

图 1 敲除模式图

Figure 1 A schematic diagram of gene knockout



+ / +: 野生型(未标记 loxP); FL / +: CKO 杂合子(即 1 条等位基因上插入 loxP 位点); FL / FL: CKO 纯合子(即 2 条等位基因上都插入 loxP 位点)。

图 2 CKO 模式图

Figure 2 A schematic diagram of conditional knockout

定基因型。

1.2.3 PCR 鉴定小鼠的基因型

DNA 的提取: 剪取小鼠脚趾, 通过酚氯仿裂解法提取基因组 DNA, ddH₂O 溶解, 4℃ 保存。普通 PCR 及琼脂糖凝胶电泳鉴定其基因型。PCR 3 对引物为: CKO、GKO、Cre。反应体系(20 μL): Premix Taq 10 μL, 上游及下游引物各 0.8 μL, 模板 DNA 2 μL, 加 ddH₂O 补足体积。反应条件: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 7 min, 最后 4℃ 保存备用。PCR 反应终产物 10 μL 进行 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定小鼠基因型, 判断标准为野生型(WT)型: CKO(246 bp)、GKO(-)、Cre(-)。KO(-/-)型: CKO(-)、GKO(388 bp)、Cre(321 bp)。CE 杂合子(+/-): CKO(246 bp)、GKO(388 bp)、Cre(321 bp)。

1.2.4 qRT-PCR 检测 S100A16 基因的转录水平 mRNA 的表达

随机选取的 8 周龄 S100A16 PCR 鉴定阳性小鼠及同窝阴性对照 C57BL/6J 小鼠, 通过颈椎脱臼法处死后, 取其肝脏、心、肺、肌肉、脂肪组织, 做好标记, 立即于液氮冻存。每种基因型随机取 2 只(雌、雄各 1 只)采用 TRIzol 法提取总 RNA, 后逆转录合成 cDNA。逆转录体系(10 μL): 5×Prime Script™ Buffer 2 μL, Prime Script™ RT Enzyme Mix I 0.5 μL,

Oligo dT Primer (50 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , Random 6 mers (100 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , Total RNA 1 000 ng, RNase Free H₂O 补足体积。逆转录反应条件: 37 $^{\circ}\text{C}$, 15 min; 85 $^{\circ}\text{C}$, 5 s; cDNA 放于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。qRT-PCR 反应体系 (20 μL): SYBR GREEN 10 μL , 上、下游引物各 1 μL , 模板 cDNA 2 μL , ddH₂O 6 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 40 个循环。反应结束后得到 Ct 值。以内参 GAPDH 标化后计算 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 定量结果。

1.2.5 Western blot 检测阳性小鼠蛋白水平的表达

采用 Western blot 法, 提取经鉴定的 CE 小鼠及 WT 小鼠多种组织蛋白质, BCA 法测定总蛋白浓度。后以 4:1 比例与 Buffer 混合, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min, 常规行 15% SDS-PAGE 凝胶电泳后转膜 (95 V, 70 min), 用 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温振荡封闭 2 h。分别加入一抗 S100A16、 β -actin, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。TBST 洗涤, 10 min \times 3 次, 孵育相应的二抗, 室温振荡封闭 2 h, TBST 洗涤, 10 min \times 3 次。ECL 化学发光法曝光显色。

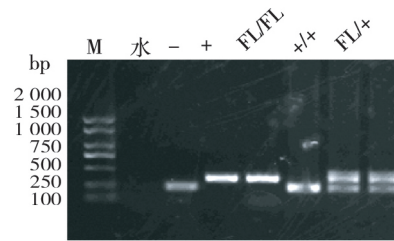
1.3 统计学方法

采用 SPSS22.0 软件进行数据分析。输入 GraphPad Prism 5 软件进行作图。组间比较采用独立样本 *t* 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CKO 小鼠基因型的鉴定

选取部分鉴定结果见图 3。



M: Marker; -: 阴性对照为 C57BL/6J, 是 B6 基因组 DNA; +: 阳性对照。+/+: 野生型(未标记 loxP); FL/+ : CKO 杂合子(标记 loxP); FL/FL: CKO 纯合子(标记 loxP)。

图 3 CKO 小鼠基因型鉴定

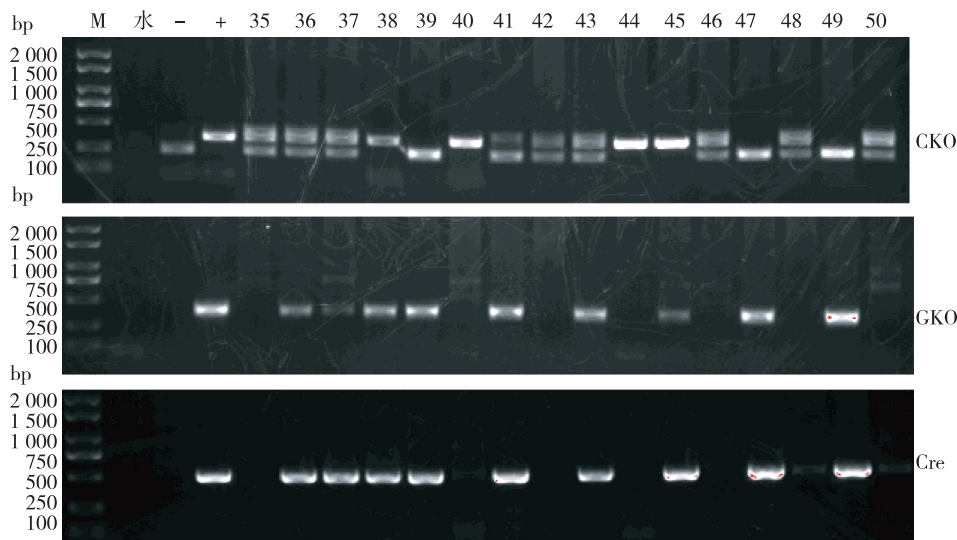
Figure 3 Identification of genotype of CKO mouse, genotype

2.2 CE 小鼠基因型的鉴定

目前获得子代 127 只, 其中 CE 杂合子小鼠雌雄比例无差异 (26:27), 能正常繁殖。目前未检测到 KO 纯合子小鼠。选取部分小鼠 2 周龄时剪脚趾, 提取基因组 DNA, 鉴定结果见图 4。

2.3 qRT-PCR 和 Western blot 检测 PCR 阳性小鼠 S100A16 基因的转录和蛋白水平的表达

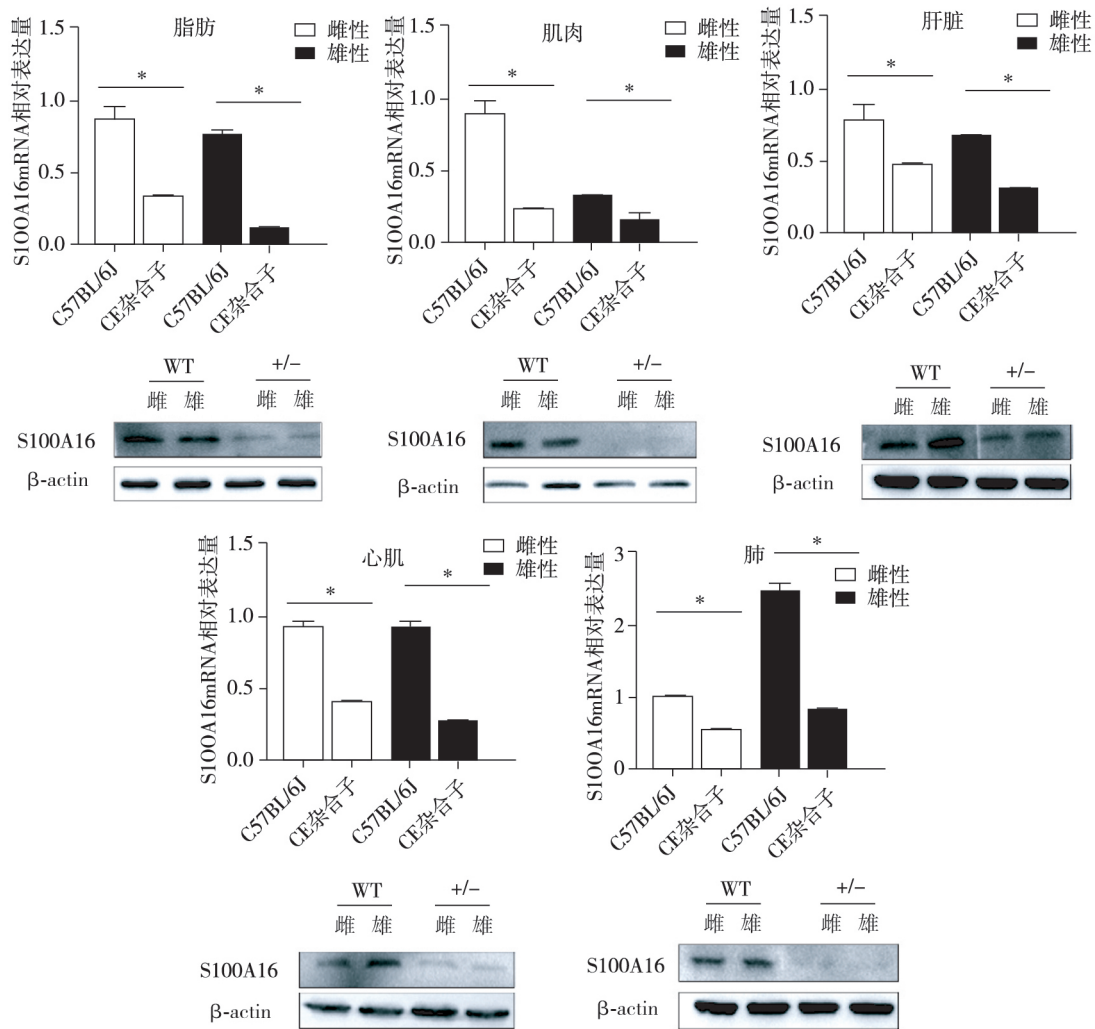
分别提取各个系别小鼠不同组织的总 RNA (肝脏、心、肺、肌肉、脂肪组织), 通过 QRT-PCR 鉴定不同组织中 S100A16 的表达情况。结果显示, S100A16 基因敲除小鼠在多个组织的表达量低于对照组 ($P < 0.05$, 图 5)。用 β -actin 做内参, Western blot 的检测结果与上述结果一致。



M: Marker; -: C57BL/6J 为阴性对照, 是 B6 基因组 DNA; +: 阳性对照。图片上方序号为子代小鼠编号。S100A16 全身敲除 (CE) 小鼠基因型鉴定需要 3 对引物, CE 杂合子: CKO (246bp)、GKO (388bp)、Cre (321bp), 图中 39、47、49 号 3 只均为 CE 杂合子。

图 4 CE 小鼠基因型鉴定

Figure 4 Identification of CE mouse, genotype



两组比较, * $P < 0.05$ 。

图 5 不同基因型小鼠多种组织 S100A16 mRNA 和蛋白表达情况

Figure 5 The relative expression of S100A16 mRNA and protein in multiple tissues of different mice

3 讨论

基因敲除技术是上世纪 80 年代左右发展起来的,是针对某个序列已知但功能未知的基因,利用基因同源重组技术以及胚胎干细胞技术,令其功能全部或部分丧失的一种分子生物学与遗传工程技术。可进一步对生物体造成影响,进而推测出该基因的生物学功能。基因敲除为科学工作者们在活体以及整体水平的研究提供了有力手段。本实验以 S100A16 为靶基因,通过显微注射技术成功构建了 S100A16 全身敲除小鼠,上述结果可以看出,基因敲除小鼠 S100A16 在多个组织的表达量明显低于对照组,可以应用于 S100A16 的生物学功能研究。目前为止,没有纯合子的出生,提示小鼠体内 S100A16 表达的完全缺失可能影响了小鼠的生殖功能或胚胎发育,目前机制尚不清楚,有待后期验证。

S100A16 属钙调蛋白 S100 家族的新成员,在多种组织中均有表达^[1]。目前国内外对 S100A16 基因功能的研究报道很少,主要是发现与肿瘤、代谢有关^[3-8,11-12]。本课题组研究发现它是一个新的脂肪细胞分化促进因子,并参与了糖脂代谢^[14],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 敲除小鼠为后期的功能研究提供了良好的实验模型基础。

[参考文献]

- [1] Sturchler E, Cox JA, Durussel I, et al. S100A16, a novel calcium-binding protein of the EF-hand superfamily [J]. *Biol Chem*, 2006, 281(50): 38905-38917
- [2] Babini E, Bertini I, Borsi V, et al. Structural characterization of human S100A16, a low-affinity calcium binder [J]. *Biol Inorg Chem*. 2011, 16(2): 243-256

- [3] Zhou W, Pan H, Yun L, et al. Up-regulation of S100A16 expression promotes epithelial-mesenchymal transition via Notch1 pathway in breast cancer[J]. *Biomed Sci*, 2014, 21: 97
- [4] Saito K, Kobayashi M, Sato Y, et al. S100A16 is a prognostic marker for lung adenocarcinomas[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(16): 7039-7044
- [5] Zhu W, Xue Y, Li D, et al. S100A16 promotes cell proliferation and metastasis via AKT and ERK cell signaling pathways in human prostate cancer[J]. *Tumor Biol*, 2016, doi: 10.1007/s13277-016-5096-9
- [6] Li D, Zhang R, Liu Y, et al. S100A16 inhibits osteogenesis but stimulates adipogenesis[J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(5): 3465-3473
- [7] Zhang R, Su D, Liu Y, et al. Estrogen suppresses adipogenesis by inhibiting S100A16 expression[J]. *Mol Endocrinol*, 2014, 52(3): 235-244
- [8] Identification of S100A16 as a novel adipogenesis promoting factor in 3T3-L1 cells[J]. *Endocrinology*, 2011, 152(3): 903-911
- [9] Domínguez B, Pardo BG, Noia M, et al. Microarray analysis of the inflammatory and immune responses in head kidney turbot leucocytes treated with resveratrol[J]. *Internat Immunopharmacology*, 2013, 15(3): 588-596
- [10] Fernandez-Becker NQ, Moss AC. In silico analysis of T-bet activity in peripheral blood mononuclear cells in patients with inflammatory bowel disease (IBD)[J]. *In Silico Biol*, 2009, 9(5-6): 355-363
- [11] 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
- [12] 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
- [13] 黄 琼, 刘梦兰, 刘云等. S100A16 在饮食诱导肥胖大鼠中的作用[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2014, 34(1): 7-11

[收稿日期] 2017-01-07

(上接第 531 页)

- 理与临床, 2012, 28(2): 18-20
- [9] 朱章志, 龙新生. 加味真武汤对充血性心衰模型血流动力学及血管紧张素 II 的影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2001, 12(05): 342-344
- [10] Bagshaw SM, Cruz DN. Epidemiology of cardiorenal syndromes [J]. *Contributions to Nephrology*, 2010, 165(1): 68-82
- [11] Andrukonis K, Bell C, Bodine L, et al. Cardiorenal syndrome: Understanding the connections between cardiac and renal disease [J]. *Journal of the American Academy of Physician Assistants*, 2014, 27(2): 12-17
- [12] Leong SC, Sirich TL. Indoxyl sulfate-review of toxicity and therapeutic strategies[J]. *Toxins*, 2016, 8(12): 358
- [13] Deguchi T, Nakamura M, Tsutsumi Y, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of uraemic indoxyl sulphate in rats [J]. *Biopharmaceutics & drug disposition*, 2003, 24(8): 345-355
- [14] Lekawanvijit S, Kompa AR, Manabe M, et al. Chronic kidney disease-induced cardiac fibrosis is ameliorated by reducing circulating levels of a non-dialysable uremic toxin, indoxyl sulfate[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41281
- [15] Enomoto A, Takeda M, Tojo A, et al. Role of organic anion transporters in the tubular transport of indoxyl sulfate and the induction of its nephrotoxicity[J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2002, 13(7): 1711-1720
- [16] Sun C Y, Chang S C, Wu M S. Uremic toxins induce kidney fibrosis by activating intrarenal renin-angiotensin-aldosterone system associated epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e34026
- [17] Sun CY, Chang SC, Wu MS. Suppression of klotho expression by protein-bound uremic toxins is associated with increased DNA methyltransferase expression and DNA hypermethylation[J]. *Kidney International*, 2012, 81(7): 640-650
- [18] Saito S, Shimizu H, Yisireyili M, et al. Indoxyl sulfate-induced activation of (pro)renin receptor is involved in expression of tgf-beta1 and alpha-smooth muscle actin in proximal tubular cells[J]. *Endocrinology*, 2014, 155(5): 1899-1907
- [19] Iida S, Kohno K, Yoshimura J, et al. Carbonic-adsorbent ast-120 reduces overload of indoxyl sulfate and the plasma level of tgf-β1 in patients with chronic renal failure [J]. *Clinical and Experimental Nephrology*, 2006, 10(4): 262-267
- [20] Wang B, Komers R, Carew R, et al. Suppression of microrna-29 expression by tgf-β1 promotes collagen expression and renal fibrosis [J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2012, 23(2): 252-265

[收稿日期] 2016-12-13