

Fam172a基因敲除小鼠的制备与基因型鉴定

张一帆¹, 王建文², 杨琪¹, 郝晓花³, 黄玉波³, 魏红山^{1,2} (1.北京大学地坛医院教学医院 消化科, 北京 100015; 2.首都医科大学附属北京地坛医院 消化科, 北京 100015; 3.首都医科大学附属北京地坛医院 肝病中心, 北京 100015)

摘要: 目的 建立稳定的Fam172a基因敲除C57/B6J小鼠模型, 观察基因敲除对小鼠生长发育的影响以及该基因在小鼠体内的生物学的作用。方法 采用基因打靶敲除技术, 获得杂合子(Fam172a^{+/-})小鼠。将所得Fam172a^{+/-}小鼠饲养于屏障环境中杂交获得纯合子(Fam172a^{-/-})小鼠。利用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术对小鼠基因型进行鉴定, 称量出生后20天、40天以及60天野生型(wild type, WT)小鼠及Fam172a^{-/-}小鼠的体重。随机处死8周龄WT小鼠和Fam172a^{-/-}小鼠, 取心、肝、脾、肺及肾组织, 采用Western blot检测Fam172a基因的组织表达特异性。结果 PCR及Western blot结果均证明Fam172a基因在Fam172a^{-/-}小鼠体内完全删除。Fam172a^{-/-}小鼠与WT小鼠20天、40天以及60天体重的差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。FAM172A蛋白在WT小鼠中的表达有组织特异性。Fam172a^{-/-}小鼠每胎产仔数略低于WT小鼠, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。各小鼠外观、行为和繁殖力无显著差异。结论 Fam172a基因敲除C57/B6J小鼠模型已成功构建, 并繁育出足够数量的Fam172a^{-/-}小鼠进行下一步实验。Fam172a基因对小鼠体重和生长发育具有重要作用。

关键词: Fam172a; 基因敲除; 小鼠

Preparation and genotype identification of Fam172a gene knockout mice

ZHANG Yi-fan¹, WANG Jian-wen², YANG Qi¹, HAO Xiao-hua³, HUANG Yu-bo³, WEI Hong-shan^{1,2} (1. Department of Gastroenterology, Peking University Ditan Teaching Hospital, Beijing 100015, China; 2. Department of Gastroenterology, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China 3. Center of Hepatology, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China)

Abstract: **Objective** A Fam172a gene knockout C57/B6J mice model was generated to explore the functions of Fam172a gene and examine mechanisms of its growth and development *in vivo*. **Methods** Total of six Fam172a^{+/-} mouse were got by gene targeting. The Fam172a^{+/-} mouse were successfully produced by hybridization of Fam172a^{+/-} mice and bred in a barrier environment. The mouse genotypes were identified by PCR. The body weights of WT and Fam172a^{-/-} mouse were measured at 20, 40 and 60 days after birth. Eight-week-old male WT and Fam172a gene knockout mouse were randomly selected and sacrificed, and their heart, liver, spleen, lung and renal were removed and used for Western blot to analyze the expression of Fam172a gene at indicated tissues. **Results** The results of PCR and Western blot showed that Fam172a gene was totally knocked out in Fam172a^{-/-} mice. The body weights of WT and Fam172a^{-/-} mouse were significantly different at 20, 40 and 60 days after birth ($P < 0.05$). The expression of FAM172A protein in WT mice had tissue specificity. Litter sizes of Fam172a^{-/-} mouse were slightly lower than those of WT mouse, and had no statistical difference ($P > 0.05$). There was no significant difference on the appearances, behaviors and reproductive performance. **Conclusion** Fam172a^{-/-} mouse were prepared. This approach allows breeding of a sufficient number of Fam172a gene knockout C57/B6J mouse as the animal models for studying the role of Fam172a gene. The data revealed that Fam172a gene is critically required for body weight, growth and development of mouse.

Key words: Fam172a; Gene targeting; Mouse

Fam172a基因位于5q15^[1], 最早由李连喜等研究

发现并从人主动脉组织中克隆表达。Fam172a基因在人主动脉组织中存在5种基因剪切体, 其中两种剪切体的开放阅读框(open reading frame, ORF)完全一致, 故其共有4个同分异构体^[2]。小鼠的

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2017.02.007

基金项目: 国家自然科学基金项目(81271901); 北京市自然科学基金项目(7152073)

通讯作者: 魏红山 Email: drwei@ccmu.edu.cn

Fam172a基因位于13号染色体,和人Fam172a基因同属于Fam172基因家族,其序列直系同源。目前国内有关Fam172a基因的研究大都集中在细胞系,其功能涉及糖尿病大血管病变的发病^[2]、胚胎肾细胞的增殖凋亡^[3]以及调控肿瘤细胞生长^[4]等。Fam172a基因及其编码蛋白的作用机制仍未阐明。前期扩增所得Fam172a(异构体1、3)的基因片段测序结果与GenBank已公开的基因序列一致,并成功表达FAM172A(异构体1、3)的重组蛋白,发现该基因对体外培养的肝细胞增殖有一定的影响,提示这一基因表达蛋白可能参与肝细胞的生长调控。因此,本研究制备了Fam172a基因敲除小鼠模型,试图探究Fam172a基因的具体生物学功能。

1 材料与方法

1.1 Fam172a基因敲除小鼠的制备 利用经典的基因打靶敲除技术,委托南京大学-南京生物医药研究院模式生物所制备Fam172a基因敲除C57/B6J杂合子(Fam172a^{+/-})小鼠。获得6周龄Fam172a^{+/-}小鼠6只,其中雄性3只,雌性3只。

1.2 饲养与繁殖 所有的小鼠均为无特定病原体(SPF级)C57/B6J小鼠,饲养于北京大学医学部实验动物中心。屏障环境内温度为20~25℃,湿度为40%~70%,照明时间每天明暗循环12小时。小鼠鼠笼、饲料、垫料和饮水均经高温高压消毒灭菌处理,小鼠自由摄食饮水,垫料每周定期更换3次。幼鼠由母鼠母乳喂养,产后20天离乳,雌雄分笼。繁殖初期,1只Fam172a^{+/-}雄鼠和1只Fam172a^{+/-}雌鼠合笼。繁殖出F2代小鼠后,为扩大繁育量,1只Fam172a^{+/-}雄鼠与2只Fam172a^{+/-}雌鼠合笼。

1.3 Fam172a基因敲除小鼠的基因型鉴定

1.3.1 基因组DNA的提取 将Fam172a^{+/-}小鼠配笼后繁殖,当子代小鼠母乳喂养满15天时取0.5 cm左右鼠尾置于无菌1.5 ml EP管中并编号。加入蛋白酶(Omega, E.Z.N.A.T[®] issue DNA Kit) 55℃孵育鼠尾至完全溶解,8000转/分钟(离心半径为50 mm)离心10分钟后取上清液,加入等体积的异丙醇,反复离心过柱后加入70%无水乙醇,最后使用洗脱缓冲液溶解DNA。

1.3.2 PCR扩增与琼脂糖凝胶电泳鉴定基因型 不同Fam172a基因型(Fam172a^{-/-}, Fam172a^{+/-}, WT)小鼠的鉴定采用的引物序列如下:①引物1:上游引物序列为5'-ATGAGGGAGAAACAAATAGC-3',下游引物序列为3'-GATTTCACTGGGCAAAGATA-5';②引物2:上游引物序列为5'-ATGAGGGAGAAACAAATAGC-3',下游引物序列为3'-AAGGGTTATTGTATGATCGGA-5'。PCR反应体系25 μl,构成如下:DNA模板2.5 μl,上游引

物2.5 μl(10 μmol/ml),下游引物2.5 μl(10 μmol/ml),蒸馏水5.5 μl,DNA聚合酶(Promega)12.5 μl。采用PCR仪进行循环扩增,扩增条件如下:①变性:95℃30秒;②退火:54℃30秒、72℃30秒,40个循环;③延伸:72℃5分钟。配置1.5%琼脂糖凝胶(Biowes),分别取DNA DL marker 1000(TaKaRa)和PCR扩增产物10 μl点样,150 V电泳10分钟后于凝胶成像仪中拍照分析。

1.4 Fam172a基因敲除小鼠蛋白水平的鉴定

1.4.1 组织总蛋白的提取 随机处死6~8周龄的C57/B6J WT小鼠和C57/B6J Fam172a^{-/-}小鼠,留取小鼠的心、肝、脾、肺和肾,置于液氮中保存。取0.3 g组织样本于无菌EP管中,按1 g:1 ml比例加入蛋白酶抑制剂(Solarbio)和组织细胞快速裂解液(Solarbio),超声震荡裂解15分钟,冰上裂解30分钟,离心后取上清液于-80℃长期保存。

1.4.2 BCA法检测蛋白浓度 配置10 μl蛋白标准品,取等量组织蛋白稀释5倍,分别加入BCA蛋白浓度测定试剂(Thermo)于96孔板,37℃孵育30分钟后于450 nm波长下用分光光度计测定蛋白浓度。

1.4.3 Western blot分析 将蛋白示踪上样缓冲液(Cwbio)与组织总蛋白按1:4的比例稀释,混匀后99℃煮沸10分钟。使用SDS-PAGE凝胶配置试剂盒(Cwbio)配置浓缩胶及分离胶,进行SDS-PAGE电泳,转印至pvd膜(Bio-rad),4℃孵育过夜。其中一抗为抗-Fam172a(Abcam, 1:200),内参为GAPDH(Santa, 1:1000)。而后使用二抗辣根酶标记抗兔IgG(Zsgb-bio, 1:5000)孵育1小时,磷酸盐缓冲液洗膜3次后用发光液(Bio-rad)曝光显影。

1.5 Fam172a基因敲除小鼠的繁殖 饲养条件保持不变,观察WT小鼠和Fam172a^{-/-}小鼠的进食和活动情况,记录小鼠合笼后的窝产仔数。

2 结果

2.1 小鼠基因型的鉴定 各基因型小鼠基因PCR产物的琼脂糖凝胶电泳结果见图1。小鼠DNA电泳图中共出现442 bp和551 bp两条条带,Fam172a^{-/-}小鼠只出现442 bp条带,Fam172a^{+/-}小鼠同时出现442 bp和551 bp条带,WT小鼠只出现551 bp条带。

2.2 Fam172a基因敲除小鼠的生长发育 Fam172a^{-/-}小鼠和WT小鼠生长发育过程中进食和活动等表型无显著性差异。WT小鼠和Fam172a^{-/-}小鼠出生后20天、40天、60天体重的差异均有统计学意义,见表1。

2.3 Fam172a基因在各组织中的表达 Fam172a^{-/-}小鼠各组织中均不表达FAM172A蛋白,而WT小鼠各组织均表达FAM172A蛋白,脾内的表达水平最高,

肺其次,肾脏和肝脏的表达量相似,心脏内少量表达,其分子量为43 kDa。

2.4 Fam172a基因敲除小鼠的繁殖 观察记录Fam172a^{-/-}小鼠合笼后30胎窝产仔数,每胎子代小鼠平均6.1只。

3 讨论

基因敲除可通过同源重组将外源基因定点整合入靶细胞基因组上某一确定的位点,定点修饰改造

染色体上某一基因。通过条件基因打靶还可实现在特定时间和特定基因位点不表达目的基因,为生物医学和临床遗传疾病的研究提供了全新的手段^[5,6]。

Fam172a基因敲除小鼠的饲养和繁殖严格按照SPF级动物饲养标准进行^[7]。本研究针对Fam172a基因设计了2对双向引物,利用灵敏度高、快速、简便的PCR技术^[6]对提取的DNA进行扩增,Fam172a^{-/-}小鼠仅在442 bp出现条带。以上结果提示Fam172a基因敲除小鼠符合进行下一步实验的要求。

在生长发育的不同时间点统计小鼠体重,发现Fam172a^{-/-}小鼠在20天、40天和60天的体重均低于WT小鼠。由于小鼠体重与糖脂代谢密切相关^[8,9],且小鼠生长发育进程高度依赖糖脂代谢两大途径^[10,11],潘晓华等^[12]发现基因敲除小鼠也有体重降低的现象,因此提示Fam172a基因的敲除可能对小鼠的糖代谢和脂代谢产生影响,从而影响了基因敲除小鼠的体重。在繁殖能力方面,WT小鼠每胎产仔数6~12只,平均窝产仔7只^[13],Fam172a^{-/-}小鼠每胎产仔数略低,但差异无统计学意义。由于不同发育时期小鼠胚胎增殖分化及形态的变化会导致胚胎停止发育或

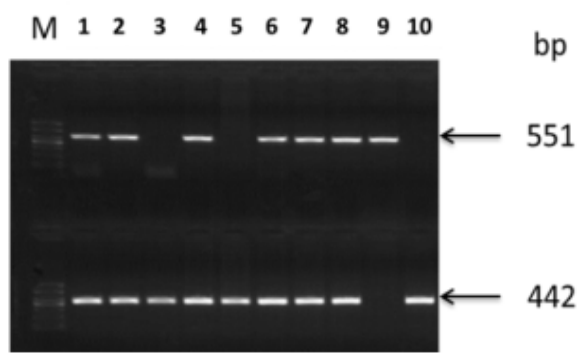


图1 不同基因型小鼠 DNA 电泳图

注: M: 1000 bp 分子量标准; 9号为WT小鼠; 1、2、4、6、7、8号为杂合子(Fam172a^{+/-})小鼠; 3、5、10号为纯合子(Fam172a^{-/-})小鼠

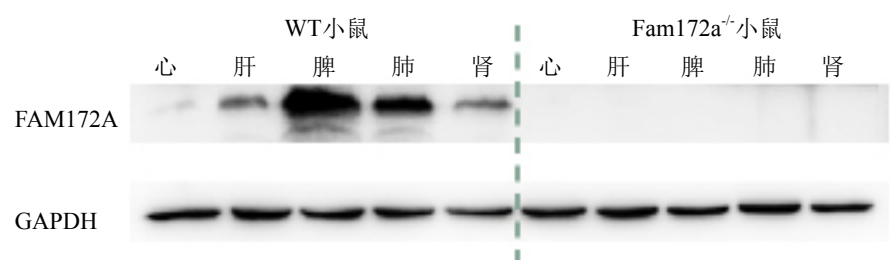


图2 小鼠各组织中 FAM172A 蛋白的表达

注: GAPDH 作为内参,其分子量为 36 kDa

表1 不同 Fam172a 基因型小鼠体重差异 ($\bar{x} \pm s$, g)

基因型	出生20天	出生40天	出生60天
WT小鼠	10.32 ± 0.334	18.16 ± 0.585	22.68 ± 0.43
Fam172a ^{-/-} 小鼠	7.421 ± 0.087	15.94 ± 0.265	19.59 ± 0.624
F值	19.89	4.87	0.004
P值	< 0.001	0.004	< 0.001

表2 Fam172a^{-/-} 小鼠胎产仔数 (只)

Fam172a ^{-/-} 合笼编号	胎产仔数	Fam172a ^{-/-} 合笼编号	胎产仔数	Fam172a ^{-/-} 合笼编号	胎产仔数	Fam172a ^{-/-} 合笼编号	胎产仔数	Fam172a ^{-/-} 合笼编号	胎产仔数
1	7	7	9	13	4	19	4	25	5
2	6	8	9	14	5	20	7	26	7
3	10	9	6	15	6	21	6	27	3
4	7	10	3	16	3	22	7	28	4
5	5	11	6	17	3	23	2	29	14
6	4	12	8	18	9	24	7	30	7

者畸形,最终死亡而降低胎产仔数^[14,15],且在繁殖过程中的难产、食仔以及其他外界因素如季节、光照、温度、湿度、噪音及营养等因素均对小鼠的生育能力有影响^[16],因此只能初步认为Fam172a基因对小鼠的繁殖力无特殊影响。Fam172a基因在野生型小鼠的心、肝、脾、肺及肾实质器官广泛表达,但是Fam172a^{-/-}小鼠各器官均不表达FAM172A蛋白,证明了Fam172a基因在Fam172a^{-/-}小鼠体内的完全敲除,并对基因型鉴定结果进行确认。

在既往的研究中,李梅芳等^[17]发现Fam172a基因在甲状腺癌及癌旁组织高表达,通过P38 MAPK信号通路上调Fam172a蛋白水平,促进甲状腺乳头状癌细胞的增殖而参与甲状腺乳头状癌的发病,并利用裸鼠成瘤的方法进行了验证。李连喜等^[18]用Fam172a基因慢病毒载体和病毒包装质粒共转染FT293细胞进一步证明Fam172a基因在高糖环境下表达增加,并在糖尿病致动脉粥样硬化中发挥直接作用。但钱凯等^[19]研究发现Fam172a基因在结肠癌组织中低表达,对癌细胞的增殖起抑制作用。

本课题组也对Fam172a基因进行了一系列深入研究。结合近期国内的报道,该基因编码蛋白对其他细胞的增殖作用以及本研究结果提示的该基因蛋白在增殖力不同的细胞中存在表达差异可能具有一定的普遍性。本课题组随后进行的Western blot分析显示,该蛋白在肝脏间质细胞和实质细胞均有一定程度的表达。利用基因芯片和差异蛋白质组技术对临床慢性乙型肝炎、肝硬化和肝癌患者血清FAM172A蛋白水平进行检测,发现FAM172A蛋白存在于HBV感染的各个阶段。慢性乙型肝炎和肝癌组患者血清中FAM172A蛋白水平均低于正常组,而肝硬化组蛋白水平则高于正常组,差异均有统计学意义。既往研究显示,Fam172a定位于HepG2内质网,在正常肝组织中适度表达,在慢性HBV感染者中表达显著下降^[20],这与临床血清学结果基本一致。因此,进一步推测Fam172a基因可能与肝细胞损伤、肝纤维化以及肝细胞再生等发生机制有关。因此,本课题组为明确Fam172a基因在体内编码基因的调控作用以及介导细胞学作用的信号途径,通过国际公认的研究基因功能的“金标准”——基因敲除技术^[21,22]制备了Fam172a基因敲除小鼠模型。后期将通过Fam172a^{-/-}小鼠和WT小鼠的表型对照分析阐述Fam172a基因可能的生物学作用,将更有助于进一步明确Fam172a基因在肝脏疾病中可能的分子生物学作用。

参考文献

- [1] LI L, DONG X, Leong MC, et al. Identification of the novel protein FAM172A, and its up-regulation by high glucose in human aortic smooth muscle cells[J]. *Int J Mol Med*, 2010, 26(4): 483-490.
- [2] 李连喜, 陶征, 董雪红, 等. C5orf21基因的分子克隆及在糖尿病大血管病变中的作用[J]. *中华医学杂志*, 2009, 89(36): 2574-2577.
- [3] 李连喜, 周闻白, 陶征, 等. FAM172A蛋白对人胚胎肾细胞凋亡及增殖的影响[J]. *中华医学杂志*, 2010, 90(34): 2424-2427.
- [4] QIAN K, ZHANG J, LU J, et al. FAM172A modulates apoptosis and proliferation of colon cancer cells via STAT1 binding to its promoter[J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(3): 1273-1280.
- [5] 秦智娟, 杨晓清, 张玉泉. 基因敲除在雌性小鼠生殖系统研究中的应用[J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2016, 35(1): 51-55.
- [6] 万亚蕊, 张延平, 张晓强, 等. GJB2基因条件敲除小鼠的繁殖、基因型鉴定及听力检测[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2013, 21(5): 505-508.
- [7] 周聪颖. 定义“SPF”级实验大小鼠和制定健康监测方案时需考虑的因素(英文)[J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(2): 12-21.
- [8] Ramanathan L, Siegel JM. Gender differences between hypocretin/orexin knockout and wild type mice: age, body weight, body composition, metabolic markers, leptin and insulin resistance[J]. *J Neurochem*, 2014, 131(5): 615-624.
- [9] Beauchamp B, Ghosh S, Dysart MW, et al. Low birth weight is associated with adiposity, impaired skeletal muscle energetics and weight loss resistance in mice[J]. *Int J Obes (Lond)*, 2015, 39(4): 702-711.
- [10] Kalucka J, Missiaen R, Georgiadou M, et al. Metabolic control of the cell cycle [J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(21): 3379-3388.
- [11] Takubo K, Nagamatsu G, Kobayashi C I, et al. Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(1): 49-61.
- [12] 潘晓华, 王宇罡, 张戈, 等. ERβ基因敲除小鼠的繁殖、鉴定及检测[J]. *南方医科大学学报*, 2010, 30(1): 153-156.
- [13] 郝荣光. 实验动物学[M]. 2版. 上海: 第二军医大学出版社, 2004: 114.
- [14] ZHANG D, ZHANG J, JIANG X, et al. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor: a hepatic stellate cell proliferation inducer via ErbB receptors[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2014, 29(3): 623-632.
- [15] Panchenko PE, Voisin S, Jouin M, et al. Expression of epigenetic machinery genes is sensitive to maternal obesity and weight loss in relation to fetal growth in mice[J]. *Clin Epigenetics*, 2016, 8: 22.
- [16] 张俭, 伍贤进, 马岚, 等. C57BL/6小鼠繁殖性能的观察与研究[J]. *实验动物科学*, 2006, 23(4): 1-3.
- [17] LI MF, ZHANG R, GUO MG, et al. FAM172A protein promotes the proliferation of human papillary thyroid carcinoma cells via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(1): 353-358.
- [18] 李梅芳, 张蓉, 李连喜, 等. 人FAM172A基因慢病毒载体的构建及其在巨噬细胞中的表达[J]. *医学研究杂志*, 2014, 43(4): 25-29.
- [19] Doyle A, McGarry MP, Lee NA, et al. The construction of transgenic and gene knockout/knockin mouse models of human disease[J]. *Transgenic Res*, 2012, 21(2): 327-349.
- [20] Seki N, Toh U, Kawaguchi K, et al. Tricin inhibits proliferation of human hepatic stellate cells in vitro by blocking tyrosine phosphorylation of PDGF receptor and its signaling pathways[J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(7): 2346-2355.
- [21] Tokunaga A, Anai H, Hanada K. Mechanisms of gene targeting in higher eukaryotes[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(3): 523-533.
- [22] Rocha-Martins M, Cavalheiro GR, Matos-Rodrigues GE, et al. From gene targeting to genome editing: transgenic animals applications and beyond[J]. *An Acad Bras Cienc*, 2015, 87(2): 1323-1348.

收稿日期: 2016-08-31