

网络出版时间:2024-04-12 13:52:17 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240410.1008.006

T 细胞条件性敲除 Spi1 基因小鼠的繁育及鉴定

王卉卉,朱向玲,吴旭铭,张慧茹,周园园,王安琪,刘 崇,涂佳杰

摘要 **目的** 繁育 T 细胞条件性敲除 Spi1 基因的小鼠并对其进行鉴定,为进一步探索 Spi1 编码蛋白 PU.1 的作用提供研究基础。**方法** 将 Lck-Cre 小鼠与 Spi1^{flox/flox} 小鼠进行杂交繁育,通过聚合酶链式反应(PCR)和琼脂糖凝胶电泳鉴定小鼠基因型,筛选出基因型为 Lck-Cre × Spi1^{flox/flox} 的小鼠即为 T 细胞条件性敲除 Spi1 基因的纯合子小鼠。使用磁珠分选脾脏 T 淋巴细胞,并应用 Western blot、实时荧光定量 PCR(qPCR)及流式细胞术检测 PU.1 在 T 细胞中的敲除效率。**结果** Lck-Cre × Spi1^{flox/flox} 小鼠基因稳定遗传。与 Spi1^{flox/flox} 小鼠相比,Lck-Cre × Spi1^{flox/flox} 小鼠脾脏 T 细胞中的 PU.1 表

达水平显著降低。**结论** 该研究应用 Cre/LoxP 系统和 CRISPR/Cas9 技术成功构建了 T 细胞条件性敲除 Spi1 基因小鼠,为后续研究 PU.1 在 T 细胞相关疾病中的具体作用提供了可靠的动物模型。

关键词 Spi1; Cre/LoxP 系统; CRISPR/Cas9 技术; T 细胞; PU.1; 条件性敲除

中图分类号 R-332

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)04-0595-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.04.006

2024-02-02 接收

基金项目:安徽省高校杰出青年科研项目(编号:2022AH020052)

作者单位:安徽医科大学临床药理研究所,抗炎免疫药物教育部重点实验室,抗炎免疫药物安徽协同创新中心,合肥 230032

作者简介:王卉卉,女,硕士研究生;

涂佳杰,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:tujiajie@ahmu.edu.cn

PU.1 作为 E26 transformation-specific (ETS) 转录因子家族的成员之一,由 Spi1 基因编码,重要的功能区域包括羧基端高度保守的 DNA 结合区,也就是 ETS 结构域,可以识别拥有 GGA(A/T) 序列的 DNA 结合位点^[1]。PU.1 主要在造血细胞中表达,能够调控多种免疫细胞的分化和功能,从而影响一些自身免疫性疾病的病程,比如类风湿关节炎

Fabrication and performance evaluation of high-modulus and high-strength silk fibroin guided bone regeneration membrane

Liao Xiaoyu¹, Fang Hui¹, Yang Feiyu¹, Zou Duohong^{1,2}

(¹College & Hospital of Stomatology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032; ²Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai JiaoTong University School of Medicine, Shanghai JiaoTong University School of Stomatology, Shanghai Key Laboratory of Stomatology, Shanghai 200011)

Abstract **Objective** To develop a high modulus and high strength biodegradable silk fibroin GBR membrane to address the issue of maintaining the space for bone regeneration in the repair of osseous defects. **Methods** After purifying silk fibroin protein, membrane materials were prepared using evaporation-hot pressing method. The physical and chemical properties and biological performance of the membranes were evaluated using stretching tests, *in vitro* simulations, and cell co-culturing methods. **Results** A silk fibroin GBR membrane was successfully fabricated, resulting in a simulated degradation rate of 35.3% after 12 h *in vitro*. The wet-state elastic modulus reached 45 MPa, while the tensile strength reached 8.39 MPa. Furthermore, the cell survival rate was nearly 100% after 7 days. **Conclusion** The biodegradable GBR membrane produced in this study possesses high modulus and strength, as well as excellent biocompatibility, offering a promise as a foundation for addressing the bone defect repair and bone space maintenance.

Key words bone defect repair; maintaining the space for bone regeneration; guided bone regeneration membrane; silk fibroin; evaporation-heat pressing method; osteogenic differentiation; tensile strength

(rheumatoid arthritis, RA)、系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)和实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephakmyelitis, EAE)等^[2]。课题组前期研究^[3]已证实, PU. 1 可以通过直接靶向巨噬细胞和成纤维样滑膜细胞中的 FMS 样酪氨酸激酶 3 (FMS-like tyrosine kinase, FLT3)来促进类风湿关节炎的发展。同时,许多研究也表明 PU. 1 在 T 细胞的发育及相关疾病中也发挥了重要作用, PU. 1 对于 T 细胞的调控有望在未来成为 RA 新的药物靶点^[4]。因此该研究利用 Cre/LoxP 系统和 CRISPR/Cas9 技术,构建出 T 细胞条件性敲除 Spi1 基因的小鼠,并对其进行繁育及基因型鉴定,为进一步探索 PU. 1 在 T 细胞相关疾病中的具体作用和潜在机制提供可靠的模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物 所有小鼠的遗传背景均为 C57BL/6,由赛业(苏州)生物科技有限公司提供,生产许可证号:SCXK(苏)2018-0003。实验动物均饲养于 SPF 级动物房,并且所有实验均通过了安徽医科大学临床药理研究所动物实验伦理委员会批准,批准号为 PZ-2022-024。

1.2 主要试剂 核酸染料、100bp Ladder DNA Marker 和 2 × HotStrat Taq PCR Master Mix (北京博迈德基因技术有限公司); Agarose (德国 BioFroxx 公司); 淋巴细胞分离液 (北京达科为生物科技有限公司); CD4 MicroBeads mouse (德国 Miltenyi Biotec 公司); 山羊抗鼠 IgG (美国 Proteintech 公司); TRIzol、固定/破膜液 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); BCA 试剂盒、qPCR 试剂 (南京诺唯赞生物科技有限

公司); PU. 1 抗体 (美国 GeneTex 公司, 货号: GTX17997); PE 抗 PU. 1 流式抗体 (美国 BioLegend 公司, 货号: 681307)。

1.3 主要仪器 荧光定量 PCR 仪 (上海伯乐生命医学产品有限公司); 通用型电泳仪 DYY-7C 型 (北京六一生物科技有限公司); Tanon-1600 全自动数码凝胶图像分析系统、Tanon-5200 成像系统 (上海天能科技有限公司); QuantStudio 3 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Cytotflex 十色流式细胞仪 (美国 Bectman Coulter 公司)。

1.4 方法

1.4.1 T 细胞 Spi1 条件性敲除小鼠的建立与繁育

利用 CRISPR/Cas9 系统中的 Cas9 酶识别 gRNA 切割 Spi1 基因第 2 外显子的两侧, 随后将两个 LoxP 分别置于切割位点, 在淋巴细胞蛋白酪氨酸激酶 (lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase, Lck) 启动子的控制下表达 Cre, 使用 Cre 重组酶特异性地切除 T 细胞中被 LoxP 位点标记的序列, 构建策略示意图见图 1。将 Lck-Cre 小鼠与 Spi1^{fllox/fllox} 小鼠杂交获得 Lck-Cre × Spi1^{fllox/+} 基因型的 F1 代杂合子小鼠, 再将 F1 代小鼠进行交配, 筛选后得到 Lck-Cre × Spi1^{fllox/fllox} 基因型的小鼠。

1.4.2 小鼠的基因型鉴定

1.4.2.1 小鼠尾部 DNA 的提取 小鼠 3 周龄时, 剪取 3 mm 左右的鼠尾, 向 EP 管中加入 50 μl A 液 (50 μl 5 mol/L 氢氧化钠与 4 μl 0.5 mol/L pH 8.0 EDTA 溶于 10 ml ddH₂O 所得), 使鼠尾沉至管底, 置于 95 °C 电热恒温水箱中进行裂解, 30 min 后取出加入 50 μl B 液 (400 μl 1 mol/L pH 8.0 Tris-HCl 溶于 10 ml ddH₂O 所得), 于涡旋振荡器上震荡并充分

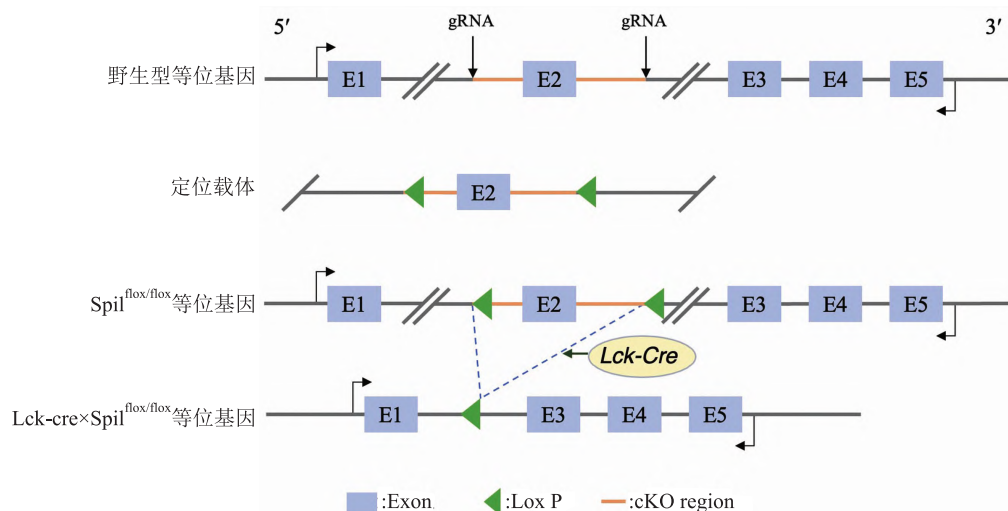


图1 Lck-Cre × Spi1^{fllox/fllox}小鼠的构建策略示意图

混匀,以 3 000 r/min 的速度离心 5 min,取上清液作为 DNA 模板。

1.4.2.2 PCR 扩增反应及琼脂糖凝胶电泳 首先分别进行两次 PCR 扩增反应。小鼠 $\text{Spi1}^{\text{flox/flox}}$ 基因型的 PCR 引物为 $\text{flox} \times \text{F}$ 和 $\text{flox} \times \text{R}$, Lck-Cre 基因型的引物为 Primer-1 和 Primer-2,具体引物序列见表 1。PCR 反应体系为:总体积 25 μl ; ddH_2O 9 μl , $2 \times \text{HotStrat Taq PCR Master Mix}$ 12.5 μl ,正反向引物均为 1 μl ,DNA 1.5 μl 。PCR 扩增程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 35 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 35 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 终止反应。其次取 10 μl PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,120 V 电泳 30 min,用全自动数码凝胶图像系统分析成像并保存。

表 1 PCR 扩增反应引物序列

引物名称	序列	大小(bp)
$\text{flox} \times \text{F}$	5'-GTGTGGACATGTGAGACTGAGTCT-3'	220
$\text{flox} \times \text{R}$	5'-TCTCTTATTATCCACTGCACCGTT-3'	
Primer-1	5'-AAGTGTGTGTGATGCTCTCCAGGTAG-3'	460
Primer-2	5'-CCAGGTATGCTCAGAAACGCCTG-3'	

1.4.3 磁珠分选小鼠脾脏 CD4^+ T 细胞 将小鼠颈椎脱臼处死后,分离脾脏,用 PBS 清洗 2 次后包裹于 200 目细胞筛网中,加入 4 ml 淋巴细胞分离液,将脾脏充分碾碎,收集组织悬液,在液面上添加 1 ml RPMI 1640 培养基,2 000 r/min 离心 30 min,收集中间薄膜层于新的 15 ml 离心管中,用 PBS 洗涤 1 次。加入 80 μl PBS 和 20 μl CD4^+ T 细胞磁珠,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min。添加 PBS 洗涤 1 次后,用 1 ml PBS 重悬,加到已安装在磁分选器上的分选柱中,待液体自然流尽后,再用 PBS 洗脱 1 次,最后取下分选柱,冲出 CD4^+ T 细胞。

1.4.4 Western blot 检测小鼠 PU.1 表达水平 提取脾脏 CD4^+ T 细胞总蛋白,应用 BCA 法进行定量后,按一定比例加入上样缓冲液,100 $^{\circ}\text{C}$ 恒温煮沸 10 min 使其变性。采用 10% SDS-PAGE 电泳后,转移至 PVDF 膜,快速封闭液室温封闭 15 min,加入 PU.1 一抗(1:1 000),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, TBST 洗 3 次,6 min/次,加入山羊抗鼠 IgG(1:10 000),室温孵育 2 h,TPBS 洗 3 次,6 min/次,PBS 洗 3 min,化学发光成像分析仪进行曝光拍照并保存。Image J 软件分析目的条带灰度值。

1.4.5 qPCR 检测小鼠 Spi1 表达水平 应用 TRIzol 法抽提脾脏 CD4^+ T 细胞的 RNA,将其定量后进行逆转录,得到的 cDNA 再进行实时荧光定量 PCR。

逆转录扩增程序为:50 $^{\circ}\text{C}$ 15 min;85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s;4 $^{\circ}\text{C}$ ∞ 。设计 Spi1 基因的 qPCR 引物为 Left Primer: ACT-TCACAGAGCTGCAGAGT; Right Primer: TCACCCTC-CTCCTCATCTGA;内参 GAPDH 基因的引物为 Left Primer: CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG; Right Primer: GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG。qPCR 反应体系为: $2 \times \text{AceQ qPCR SYBP Green Master Mix}$ 10 μl , 50 $\times$ ROX Reference Dye 2 0.4 μl ,正反向引物均为 0.4 μl ,cDNA 2 μl , ddH_2O 补至 20 μl 。qPCR 反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,40 个循环;95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。

1.4.6 流式细胞术检测小鼠 PU.1 表达水平 对脾脏 CD4^+ T 细胞进行细胞计数和固定破膜后,分成 Blank 组、 $\text{Spi1}^{\text{flox/flox}}$ 及 $\text{Lck-Cre} \times \text{Spi1}^{\text{flox/flox}}$ 组,Blank 组适量 PBS 重悬后直接用十色流式细胞仪进行分析,其余两组用 100 μl PBS 重悬,加入 PU.1 抗体(0.125 $\mu\text{g}/10^6$ 个细胞),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。离心弃上清液,适量 PBS 重悬后,上机分析最终样品细胞。

1.5 统计学处理 所有数据采用 GraphPad Prism 9.5.0 进行统计分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 T 细胞 Spi1 条件性敲除小鼠的鉴定 T 细胞 Spi1 条件性敲除小鼠的基因型鉴定结果见图 2A、2B,可见编号 1、2、3 号在 flox 扩增产物 220 bp 处有阳性条带,Cre 扩增产物 460 bp 处没有条带,为 $\text{Spi1}^{\text{flox/flox}}$ 基因型小鼠;编号 4、5、6 号在 flox 扩增产物 220 bp 处有阳性条带,Cre 扩增产物 460 bp 处有阳性条带,为 $\text{Lck-Cre} \times \text{Spi1}^{\text{flox/flox}}$ 基因型小鼠。以上结果说明初步构建出了 T 细胞条件性敲除 Spi1 基因的小鼠。

2.2 T 细胞 Spi1 条件性敲除小鼠的表型验证 Western blot、qPCR 及流式细胞术检测发现 $\text{Lck-Cre} \times \text{Spi1}^{\text{flox/flox}}$ 小鼠脾脏 CD4^+ T 细胞的 Spi1 表达水平与 $\text{Spi1}^{\text{flox/flox}}$ 小鼠相比显著降低,分析结果见图 3A-3C。此结果验证了条件性敲除小鼠 T 细胞中的 Spi1 已被成功敲除。

3 讨论

CRISPR 是原核生物基因组内的一段重复序列,

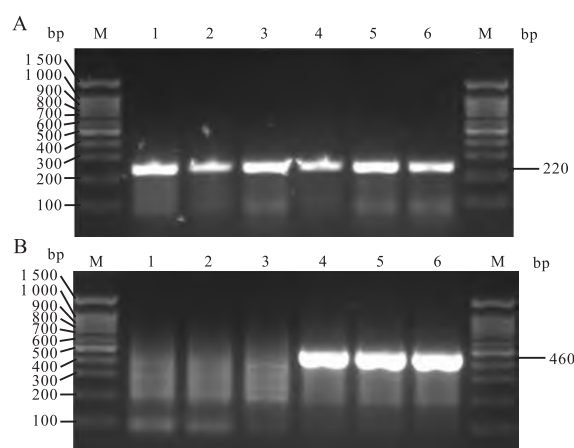


图2 Lck-Cre × Spi1^{flox/flox}小鼠的构建及基因鉴定结果

A:小鼠表达 Spi1^{flox/flox} 基因型的凝胶电泳鉴定结果;B:小鼠表达 Lck-Cre 基因型的凝胶电泳鉴定结果;1-6:小鼠编号;M:DNA marker

CRISPR 相关蛋白 Cas9 是一种内切酶,CRISPR/Cas9 技术就是通过利用单链向导 RNA (small guide RNA, sgRNA) 介导 Cas9 与 DNA 靶序列形成碱基对,对靶位点进行切割,进而造成 DNA 位点特异性

的双链断裂,以此达到对一个或者多个等位基因进行可遗传性修饰的目的。目前,这项技术在一系列基因治疗和生物技术等多个应用领域上都展现出了极大的应用前景^[5]。随着基因敲除技术的广泛应用,基于 Cre/LoxP 系统的条件性敲除小鼠模型得到了越来越多的关注。Cre/LoxP 系统的构建策略是由带有 LoxP 序列的基因突变小鼠和带有 Cre 重组酶基因的转基因小鼠杂交并筛选,得到特异性地删除目的片段的小鼠^[6]。LoxP 位点是由 1 个非回文核和 2 个反向重复序列组成,Cre 是一种可以使 2 个 LoxP 位点之间发生特异性 DNA 重组的酶,Cre-LoxP 系统具有很高的组织及空间特异性,能够准确地控制目的基因在何时何地表达^[7-8]。CRISPR/Cas9 技术与 Cre-LoxP 系统的结合具有容易操作、精确靶向等多种优点^[9],是基因研究领域的重要实验工具。

根据 NCBI 数据库提供的参考序列, Spi1 基因位于小鼠的 2 号染色体上,其中共有 5 个外显子,本模型选择外显子 2 作为条件性基因敲除 (conditional

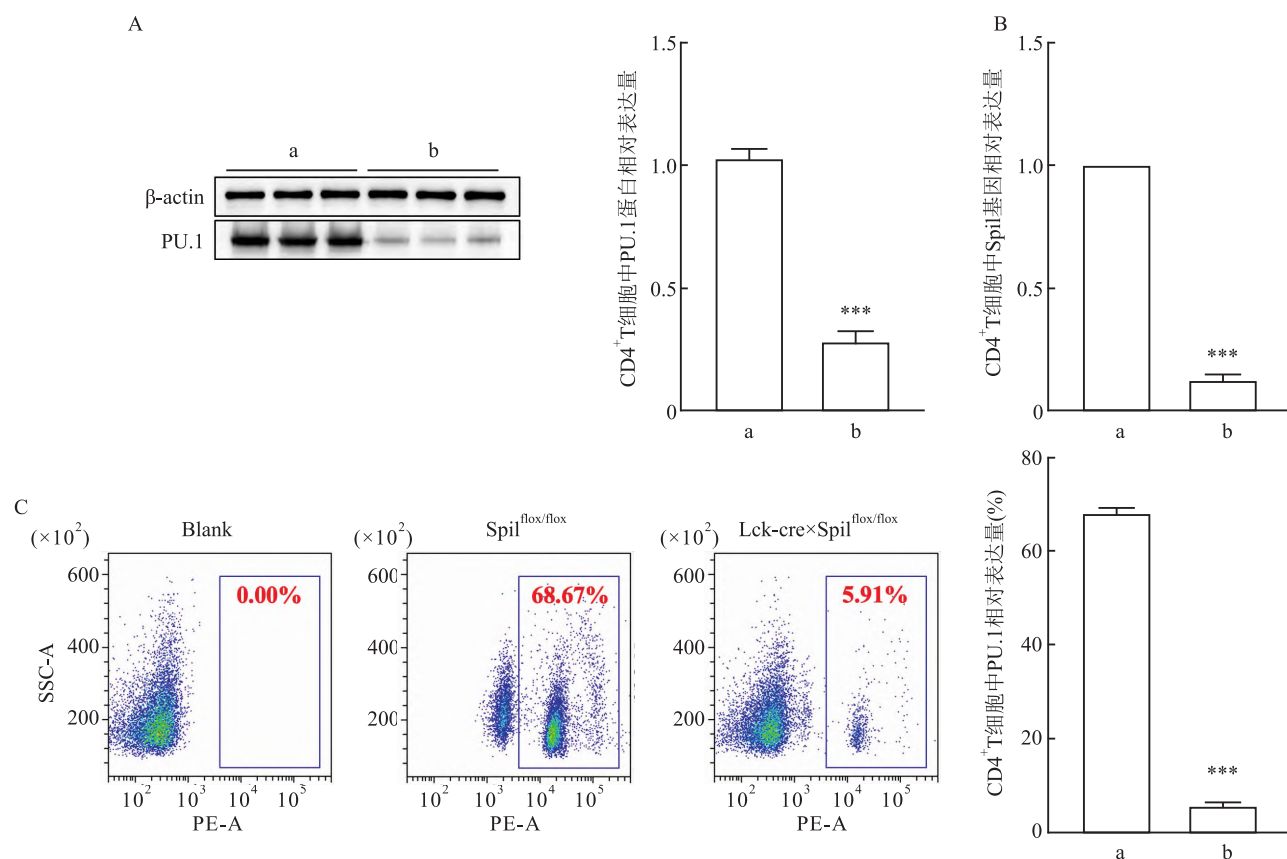


图3 Lck-Cre × Spi1^{flox/flox}小鼠的表型验证结果

A: Western blot 检测小鼠 T 细胞中 PU.1 蛋白表达;B: qPCR 法检测小鼠 T 细胞中 Spi1 基因表达;C: 小鼠 T 细胞中 PU.1 表达的流式代表图;Blank: 未标记 PU.1 抗体的空白对照组; Spi1^{flox/flox}: Spi1^{flox/flox} 小鼠的 PU.1 阳性对照组; Lck-Cre × Spi1^{flox/flox}: Lck-Cre × Spi1^{flox/flox} 小鼠的 PU.1 敲除组;a: Spi1^{flox/flox} 小鼠;b: Lck-Cre × Spi1^{flox/flox} 小鼠;与 Spi1^{flox/flox} 小鼠比较: *** $P < 0.001$

knockout,CKO)区域,CKO的有效区域大小为597 bp,且这段区域并没有任何其他已知基因。为了进一步研究PU.1对T细胞的调控在类风湿关节炎疾病中所起到的作用,以及避免PU.1全身性敲除可能导致胚胎致死的问题^[10],采用CRISPR/Cas9介导的基因组工程技术以及Cre/LoxP重组系统,将Cas9 mRNA、CKO片段的gRNA和含有loxP位点的靶向载体共同注射到受精卵中,Cas9通过识别gRNA先导链切割CKO片段的两侧,随后将两个loxP分别放置于切割位点,经过数代杂交并筛选后得到基因型为Spi1^{fllox/fllox}的小鼠。在与Lck-Cre小鼠交配后,Cre重组酶会切割loxP位点,即实现特异地删除CKO区域,从而建立起T细胞Spi1基因条件性敲除的小鼠模型,同时依据PCR扩增反应和琼脂糖凝胶电泳法确保小鼠的基因型背景符合预期,利用qPCR和Western blot及流式细胞术检测小鼠的Spi1表达水平及敲除效果,证实了PU.1特异性缺陷的小鼠模型建立成功。

既往研究^[4]表明,PU.1对T细胞的前期增殖和后期分化有着重要作用。在自身免疫性疾病中,PU.1对于T细胞的调控也扮演着重要角色。例如,在SLE中,PU.1与T细胞的过度激活有关;在EAE中,PU.1能够作用于T细胞来促进疾病的进展^[2]。然而,RA中PU.1对于T细胞的调控机制有待进一步研究。因此,借助CRISPR/Cas9技术结合Cre/LoxP系统,成功构建出T细胞中Spi1基因特异性敲除小鼠,有利于在整体动物水平上研究PU.1在T细胞相关癌症及自身免疫性疾病中调控T细胞

具体作用机制,并为相关药物靶点的研发提供理论基础和实验基础。

参考文献

- [1] Li G, Hao W, Hu W. Transcription factor PU.1 and immune cell differentiation[J]. Int J Mol Med, 2020, 46(6): 1943–50.
- [2] Fang Y, Chen W, Li Z, et al. The role of a key transcription factor PU.1 in autoimmune diseases[J]. Front Immunol, 2022, 13: 1001201.
- [3] Tu J, Chen W, Fang Y, et al. PU.1 promotes development of rheumatoid arthritis via repressing FLT3 in macrophages and fibroblast-like synoviocytes[J]. Ann Rheum Dis, 2023, 82(2): 198–211.
- [4] Rothenberg E V, Hosokawa H, Ungerback J. Mechanisms of action of hematopoietic transcription factor PU.1 in initiation of T-cell development[J]. Front Immunol, 2019, 10: 228.
- [5] Gupta D, Bhattacharjee O, Mandal D, et al. CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing[J]. Life Scim, 2019, 232:116636.
- [6] 王向宇,朱睿智,赵志平,等. CRISPR/Cas9结合Cre-LoxP技术制备溴结构域蛋白4基因敲除小鼠[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(32): 5179–84.
- [7] 张杨,贾林涛,闫雨冬,等. Cre-LoxP系统及其衍生系统方法学的研究和在神经科学中的应用[J]. 药理学, 2020, 55(9): 2035–42.
- [8] 乔思源,江文刚,汪思应. miR-100基因敲除小鼠模型的构建及基因型鉴定[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(4): 510–3.
- [9] 仝慧慧,齐浩铭,王辰,等. CRISPR/Cas9系统介导Slc6a6基因敲除大鼠的繁殖与鉴定[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(5): 44–50.
- [10] 谭茗,李雯,孙雯宁. 转录因子PU.1的最新研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2021, 43(1): 249–62.

Breeding and genotyping of T lymphocyte-conditional Spi1 knockout mice

Wang Huihui, Zhu Xiangling, Wu Xuming, Zhang Huiru, Zhou Yuanyuan, Wang Anqi, Liu Chong, Tu Jiajie
(Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Medicines, Hefei 230032)

Abstract Objective To breed and identify the T lymphocyte-conditional Spi1 knockout mice for the further investigation of the specific role of Spi1-encoded protein PU.1. **Methods** The Lck-Cre mice were mated with Spi1^{fllox/fllox} mice to obtain Lck-Cre × Spi1^{fllox/fllox} mice (T lymphocyte-specific Spi1 knockout mice), and the genotype was determined by polymerase chain reaction (PCR) and agarose gel electrophoresis. Magnetic beads were used to sort out the splenic T lymphocytes, and the knockdown efficiency of PU.1 in T cells was detected by Western blot, quantitative real-time PCR (qPCR) and flow cytometry. **Results** The Lck-Cre × Spi1^{fllox/fllox} mouse genotype was stably inherited. Compared with Spi1^{fllox/fllox} mice, the expression level of PU.1 was significantly reduced in splenic T cells of Lck-Cre × Spi1^{fllox/fllox} mice. **Conclusion** In this study, the T lymphocyte-specific Spi1 knockout mice were successfully constructed by applying Cre/LoxP system and CRISPR/Cas9 technology, which provided a reliable animal model for the subsequent experiments of the specific role of PU.1 in T cell-related diseases.

Key words Spi1; Cre/LoxP system; CRISPR/Cas9 technology; T cells; PU.1; conditional knockout