

小鼠 TDO2 基因条件性敲除打靶载体的构建

许媛,魏伟,常艳

摘要 目的 构建小鼠 TDO2 基因条件性敲除打靶载体,为建立 TDO2 基因条件性敲除小鼠奠定基础。方法 根据 CRISPR/Cas9 技术原理,设计并构建单链向导 RNA (sgRNA) 和 Donor 载体,以 TDO2-201 (ENSMUST00000029645.13) 转录本的外显子 3 作为敲除区,在打靶基因两侧各放置一个 Loxp 元件,建立条件性敲除 TDO2 第 3 号外显子的条件性基因打靶载体。将 CRISPR/Cas9 复合体和 Donor 载体显微注射到 C57BL/6 小鼠的受精卵中,获得阳性 F0 小鼠,再将阳性 F0 代小鼠与 C57BL/6 小鼠交配获得 F1 代小鼠,并经 PCR 和基因测序鉴定 F1 代小鼠基因型。结果 结果证实所构建的 TDO2 基因条件性敲除打靶载体符合设计要求,成功繁育并鉴定出 B6/JGpt-TDO2^{em1C} flox/Gpt 小鼠。结论 成功构建了小鼠 TDO2 基因条件性敲除打靶载体,为后续进一步构建 TDO2 基因条件敲除小鼠奠定了基础。

关键词 TDO2;基因敲除;CRISPR/Cas9;打靶载体

中图分类号 R 346; R 394.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)07-1082-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.07.004

色氨酸 2,3-双加氧酶 (tryptophan 2,3-dioxygenase, TDO2) 是犬尿氨酸代谢通路的限速酶之一,是调节系统色氨酸 (tryptophan, Trp) 水平的关键酶^[1]。与对照组小鼠相比,TDO2 基因敲除 (TDO2 knockout, TDO2-KO) 小鼠生长发育正常,血浆 Trp 浓度高于对照组小鼠 8~9 倍^[2]。TDO2 介导的犬尿氨酸代谢通路异常在癌症、中枢神经系统疾病和自身免疫病中发挥重要作用。研究^[3]显示,TDO2 代谢产物激活芳香烃受体,从而参与肿瘤免疫逃逸。TDO2-KO 小鼠的海马体神经活动增强,表现出神经

保护现象^[4]。在实验性自身免疫性脑脊髓炎模型研究中发现 TDO2 缺失缓解了神经炎症^[5]。研究^[6-7]表明 TDO2 在佐剂诱导关节炎大鼠体内表达升高可能介导了滑膜炎症和关节破坏。为了进一步研究 TDO2 在特定组织和细胞类型上的生物学功能以及在疾病状态下所参与的分子机制,利用 CRISPR/Cas9 技术构建敲除 TDO2-201 转录本外显子 3 的打靶载体,为进一步构建 TDO2 基因条件性敲除小鼠奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选择 C57BL/6 小鼠,与南京集萃药康生物科技有限公司实验室合作,采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建 TDO2 基因条件性敲除打靶载体。实验动物饲养和繁育均符合安徽医科大学实验动物管理与伦理委员会相关规定,伦理批准号:PZ-2022-007。

1.2 主要试剂 蛋白酶 K (批号:WXBD6886V) (美国 Sigma 公司);Marker I DNA 标准分子量 Ladder (批号:20220311) (北京索莱宝科技有限公司),50 × TAE (批号:765782AA) (博迈德生物);Agarose (批号:EZ6789D112) (赛国生物科技);1 × TE pH 8.0 (批号:70105832)、核酸染料 (批号:22116561) (biosharp 生物科技公司);2 × Rapid Taq Master Mix (批号:7E572H1) (诺唯赞生物科技股份有限公司)。

1.3 主要仪器 台式梯度 PCR 仪 Thermal Cycler (型号:T100™) (美国 Bio-Rad 公司);HH 数显恒温水浴锅 (常州国宇仪器制造有限公司);天能 Tanon 琼脂糖凝胶电泳仪 (型号:EPS-300)、全自动数码凝胶图像分析系统 (型号:Tanon-1600) (上海天能公司)。

1.4 CRISPR-Cas9 靶向位点和 Donor 载体的设计以及 sgRNA 的合成 根据 TDO2 Gene ID (56720) 小鼠基因组序列信息,发现 TDO2 基因有 4 个转录本,根据 TDO2 基因的结构,推荐选择敲除区为 TDO2-201 (ENSMUST00000029645.13) 转录本的第

2023-05-29 接收

基金项目:安徽省自然科学基金资助项目 (编号:2108085MH320);安徽省高校协同创新项目 (编号:GXXT-2020-065)

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,安徽医科大学类风湿关节炎研究中心,抗炎免疫药物安徽省协同创新中心,合肥 230032

作者简介:许媛,女,硕士研究生;

魏伟,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:wwei@ahmu.edu.cn;

常艳,女,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:yychang@ahmu.edu.cn

3号外显子。该区域包含91 bp的编码序列,敲除后将破坏TDO2蛋白质功能。利用CRISPR/Cas9技术对TDO2基因进行改造,在TDO2基因的打靶区域两侧各放置同向Loxp元件。设计针对TDO2基因的第3号外显子的寡聚核苷酸链序列sgRNA,sgRNA序列信息见表1。根据sgRNA序列设计并合成Donor载体。

表1 sgRNA序列信息

sgRNA 编号	sgRNA序列(5'-3')	间隔序列邻近 基序(PAM)
sgRNA1	TCAGAACCCCAAATCCCAT	CGG
sgRNA2	TTCCAGGGCTAACTTCTCT	GGG

1.5 Cas9 mRNA、sgRNA和donor片段混合体的受精卵显微注射和移植

将Cas9 mRNA、sgRNA和纯化后的donor片段混合体显微注射到C57BL/6小鼠的受精卵中,移植受精卵到假孕的C57BL/6母鼠的子宫中,获得阳性F0小鼠,经PCR证实Loxp突变基因已经整合到小鼠染色体上。小鼠TDO2基因条件性敲除打靶载体构建策略见图1。Cas9蛋白被sgRNA诱导与靶位点结合,从而导致外显子3碱基序列缺失,并在断裂处插入Loxp位点修饰的靶基因序列。最后获得小鼠TDO2基因条件敲除打靶载体。

1.6 TDO2基因条件性敲除打靶载体的PCR鉴定

1.6.1 小鼠尾组织基因组DNA的提取 取鼠尾组织50~100 mg(1周龄鼠尾2~5 mm),加入鼠尾裂

解液0.5 ml,在55℃下,轻微震荡混匀消化8~12 h至无肉眼可见块状或絮状物,采用乙醇沉淀提取法进一步提取基因组DNA。12 000 r/min离心1 min,将上清液0.450 ml移入新EP管中,留少许以免枪头接触残留组织或毛发。再加入0.9 ml无水乙醇,上下缓慢颠倒混匀5~10次,12 000 r/min离心15 min。弃上清液,加入1 ml 75%乙醇溶液,上下缓慢颠倒洗涤5~10次,12 000 r/min离心5 min。弃上清液,保持离心管开盖状态,室温晾置5~10 min。加入0.3 ml DEPC水置于37℃下溶解DNA,30 min后用无酶枪头吹打混匀。4℃冰箱保存备用。

1.6.2 PCR鉴定

1.6.2.1 PCR体系 反应总体系25 μl,分别加入Taq Master Mix, Dye Plus 12.5 μl, ddH₂O 9.5 μl,引物1 μl,模板基因组DNA 1 μl。PCR仪扩增,95℃预变性5 min,95℃变性30 s,58℃退火30 s,72℃延伸30 s,35个循环,72℃ 5 min终止反应。基因鉴定策略见图2,引物信息见表2。图2显示,基于sgRNA序列,设计携带靶位点同源区和Loxp位点的重组质粒,并在该靶区设计引物,用于小鼠后续基因鉴定。

1.6.2.2 凝胶电泳 配置2%的琼脂糖凝胶,每孔点样10 μl,marker 5 μl,以140 V、400 mA的条件电泳30 min。电泳结束后,拍照观察。根据DNA marker,对比PCR条带位置,判断是纯合子还是杂合子。

1.7 纯合突变小鼠(TDO2^{fllox/fllox})的生长和繁育

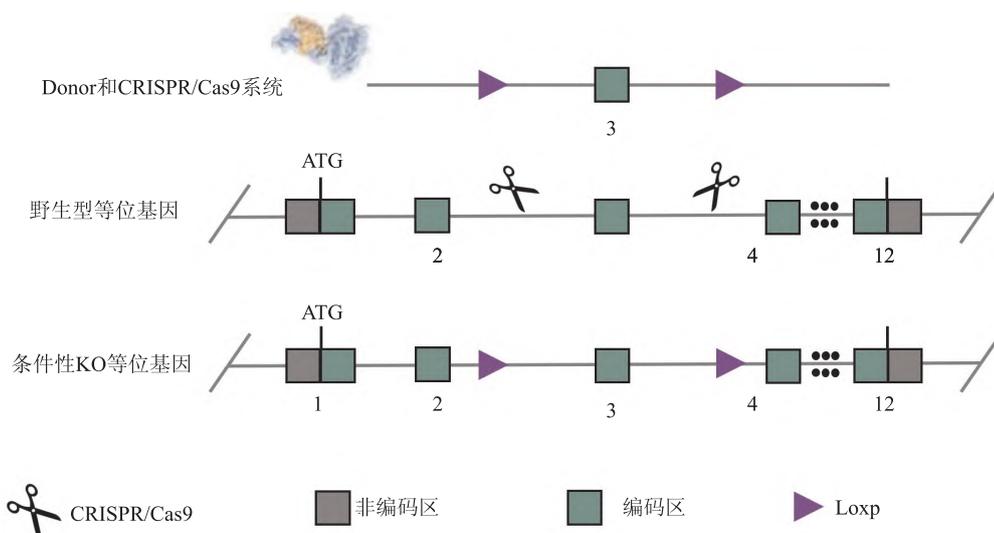


图1 小鼠TDO2基因条件敲除打靶载体的构建策略

表2 TDO2^{fllox/fllox}小鼠引物信息

PCR 反应	引物名称	引物序列	产物大小(bp)
5'同源臂	JS04371-Tdo2-5wt-tF1	F1: TGTGCCTATTCAAATCTGCT ATG	WT:305
	JS04371-Tdo2-5wt-tR1	R1: CGAACCATAATCACCTCC CAA	Targeted:407
	JS04371-Tdo2-3wt-tF1	F1: ACCTTGTTCCATACCAATGA GAT	WT:305
	JS04371-Tdo2-3wt-tR1	R1: AGCCTGTATCTCTGATAATC AAGAC	Targeted:408

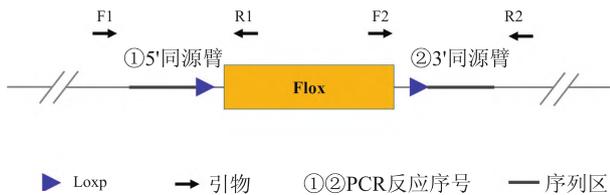


图2 小鼠 TDO2 基因条件敲除打靶载体基因型鉴定策略

将 PCR 和测序鉴定的阳性 F0 代小鼠与 C57BL/6 小鼠交配获得 F1 代小鼠。利用 PCR 鉴定筛选出 F1 代杂合子,将其作为亲本。交配繁育后得到 F2 代,PCR 鉴定后,选择最佳繁育路线,最终得到两条染色体均带有 Loxp 点的纯合突变小鼠(以下简称 TDO2^{fllox/fllox})。

TDO2^{fllox/fllox}小鼠饲养于 SPF 级环境中,饲养室内的温度保持在 22 ~ 28 ℃,相对湿度维持在 40% ~ 60%。饲料为无菌全价营养颗粒料,饮用水为高压灭菌后的纯净水。定期观察登记小鼠体质量变化、精神状态等情况。孕鼠的妊娠期一般 20 d 左右;小鼠出生后 5 ~ 7 d 可进行剪尾操作;3 周左右可将雌雄小鼠分开饲养。一般雄鼠性成熟为 8 周龄,雌鼠 6 周龄左右。同时观察 TDO2^{fllox/fllox}小鼠的饮食、活动、体质量变化等情况。

1.8 统计学处理 数据均用 Mean ± SEM 表示,采用 SPSS 25.0 软件分析数据,采用单因素方差(One-way ANOVA)分析进行比较,P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TDO2^{fllox/fllox}小鼠的鉴定结果 以 JS04371-Tdo2-5wt-tF1 和 JS04371-Tdo2-5wt-tR1 为引物的情况下,PCR 反应获得 305 bp 和 407 bp 双条带的为 TDO2-flox 杂合子小鼠;获得 305 bp 条带的为同窝 WT 小鼠;获得 407 bp 条带的为 TDO2^{fllox/fllox}小鼠,见

图 3A。以 JS04371-Tdo2-3wt-tF1 和 JS04371-Tdo2-3wt-tR1 为引物,PCR 反应获得 305 bp 和 408 bp 双条带的为 TDO2-flox 杂合子小鼠;获得 305 bp 条带的为 WT 小鼠;获得 408 bp 条带的为 TDO2^{fllox/fllox}小鼠,见图 3B。TDO2^{fllox/fllox}小鼠之间进行杂交,最终得到大量 TDO2^{fllox/fllox}小鼠,为后续构建 TDO2 基因条件敲除小鼠模型奠定了基础。图 3A 采用 JS04371-Tdo2-5wt-tF1PCR 和 JS04371-Tdo2-5wt-tR1 为引物,Line1 为阴性对照,Line2、3、4 为阳性对照,分别为 TDO2-flox 杂合子小鼠、同窝 WT 小鼠、TDO2^{fllox/fllox}小鼠。80、82 号鼠为 TDO2-flox 杂合子小鼠,81、83、84、85、86、87 均为 TDO2^{fllox/fllox}小鼠。图 3B 采用 JS04371-Tdo2-3wt-tF1 和 JS04371-Tdo2-3wt-tR1 为引物,结果同图 3A。同时对基因鉴定结果阳性的引物扩增产物进行测序,检测 Loxp 位点信息(ATAACTTCGTAT AGCATA CATTAT ACGAAG TTAT),根据测序结果进一步证实小鼠 TDO2 基因条件性敲除打靶载体构建成功,测序结果见图 4。

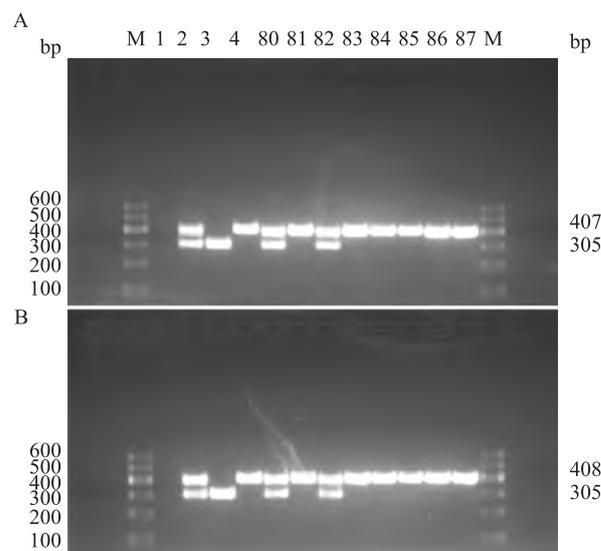
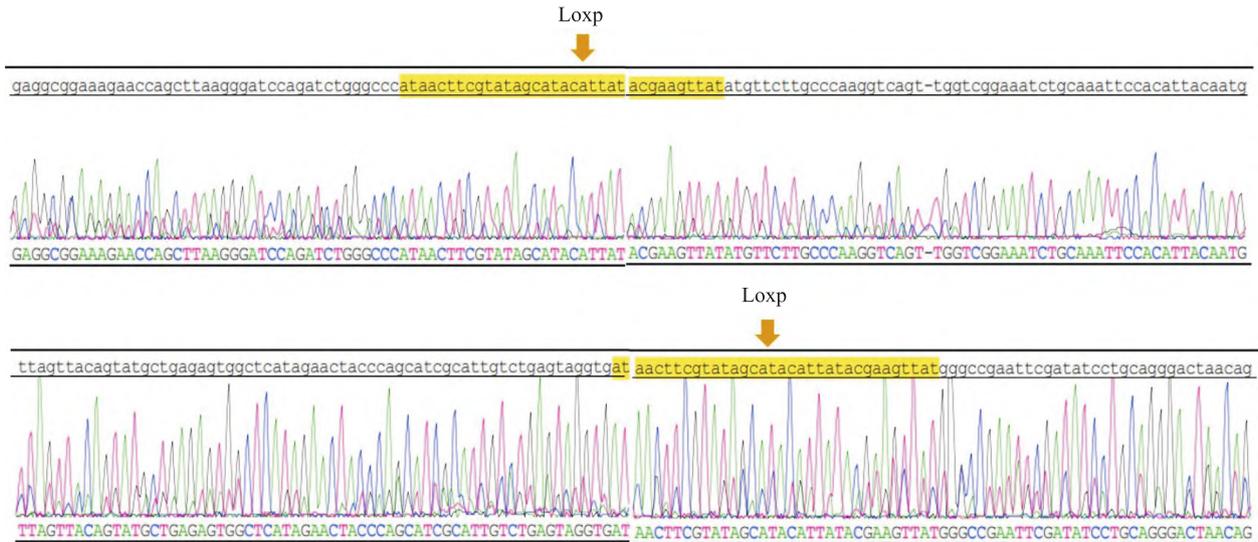


图3 TDO2^{fllox/fllox}小鼠基因鉴定结果

M:Marker;1:阴性对照组;2:杂合子阳性对照组;3:WT 阳性对照组;4:纯合子阳性对照组;小鼠编号 80 和 82:杂合子小鼠;81、83-87:纯合子小鼠

2.2 TDO2^{fllox/fllox}小鼠的生长和繁育情况 与同窝 WT 小鼠相比,TDO2^{fllox/fllox}小鼠的饮食、活动、体质量变化正常。对不同性别和基因型的 8 ~ 14 周龄小鼠进行体质量分析(n = 10)。结果显示,同一基因型小鼠,雌性小鼠的体质量低于雄性小鼠,差异有统计

图4 TDO2^{flox/flox}小鼠基因测序结果

学意义 ($F = 16.33$, $P < 0.01$); 同一性别中, TDO2^{flox/flox}小鼠与同窝 WT 小鼠相比,体质量无明显差异, 雄性 WT: (22.53 ± 0.313) mg; 雄性 TDO2^{flox/flox}: (22.28 ± 0.423) mg; 雌性 WT: (19.88 ± 0.258) mg; 雌性 TDO2^{flox/flox}: (20.58 ± 0.254) mg。TDO2^{flox/flox}小鼠性成熟时间表现为: 雄鼠 8 周, 雌鼠 6 周左右; 母鼠妊娠期为 19 ~ 21 d, 每胎产 5 ~ 6 只幼鼠, 成活率 > 95%, 与同窝 WT 小鼠繁殖情况无差异。

3 讨论

TDO2 表达异常导致犬尿氨酸代谢通路紊乱, 在中枢神经系统疾病、肿瘤和自身免疫病等多种疾病中发挥重要作用。研究^[3,8]表明, 在疾病状态下, TDO2 介导免疫细胞功能异常, 参与肿瘤细胞和各组织细胞的病理机制。课题组首次发现 TDO2 在免疫细胞中均有表达, 如巨噬细胞、B 细胞和 T 细胞等, 提示 TDO2 在免疫调节和维持局部免疫稳态中具有潜在作用^[9]。课题组为了进一步研究 TDO2 在靶细胞和靶组织中的病理机制, 采用 CRISPR/Cas9 技术构建了小鼠 TDO2 基因条件性敲除打靶载体。

本实验首先利用 CRISPR Design 工具 (<http://crispr.mit.edu/>)^[10], 结合 TDO2 Gene ID (56720) 小鼠基因组序列信息, 设计针对 TDO2-201 (ENSMUST0000029645.13) 转录本的第 3 号外显子打靶位点的 sgRNA, 再根据 sgRNA 序列设计 Donor 载体。其次, 制备 Cas9 mRNA、sgRNA 和 Donor

片段产物。将合成后的 2 条单链寡聚核苷酸 sgRNA 序列退火 (95 °C 5 min 后自然降至室温) 形成双链 DNA, 经 T7 RNA 聚合酶合成 sgRNA。Cas9 表达质粒, 经 Age I 酶切线性化, 体外利用 T7 RNA 聚合酶合成 Cas9 mRNA。然后将转录好的 sgRNA 和 Cas9 mRNA 以及纯化后的 Donor 载体片段显微注射到受精卵中, sgRNA 的碱基与靶基因的序列特异性结合, 进而诱导 Cas9 酶对第 3 号外显子进行切割, 导致 DNA 双链断裂, 在断裂处插入经 Loxp 位点修饰的第 3 号外显子基因序列, 随后将胚胎转移到假孕动物中以产生 F0 代^[11]。最后将阳性 F0 代小鼠与野生型 C57BL/6 小鼠交配获得稳定的 F1 代小鼠, 通过 F1 代小鼠之间的杂交得到 TDO2^{flox/flox}小鼠。

通过 PCR 鉴定发现, 小鼠 TDO2 基因条件性敲除打靶载体遗传稳定。与同窝 WT 小鼠相比, TDO2^{flox/flox}小鼠在繁育过程中, 生长发育正常。对不同性别和基因型的 8 ~ 14 周龄小鼠进行体质量情况分析, 结果表明, 与同窝 WT 小鼠相比, TDO2^{flox/flox}小鼠体质量无差异。利用 CRISPR/Cas9 技术成功构建小鼠 TDO2 基因条件性敲除打靶载体, 不仅为构建 TDO2 基因条件性敲除小鼠模型奠定基础, 也为进一步研究 TDO2 基因在靶组织和细胞上的功能和在疾病状态下的病理机制奠定了基础。

参考文献

- [1] Mondal P, Wijeratne G B. Modeling tryptophan/indoleamine 2,3-dioxygenase with heme superoxide mimics: Is ferryl the key intermediate? [J]. J Am Chem Soc, 2020, 142(4):1846-56.

- [2] Schramme F, Crosignani S, Frederix K, et al. Inhibition of tryptophan-dioxygenase activity increases the antitumor efficacy of immune checkpoint inhibitors [J]. *Cancer Immunol Res*, 2020, 8(1):32–45.
- [3] Zhao Y, Sun J, Li Y, et al. Tryptophan 2,3-dioxygenase 2 controls M2 macrophages polarization to promote esophageal squamous cell carcinoma progression *via* AKT/GSK3 β /IL-8 signaling pathway [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(9):2835–49.
- [4] Hattori S, Takao K, Funakoshi H, et al. Comprehensive behavioral analysis of tryptophan 2,3-dioxygenase (Tdo2) knockout mice [J]. *Neuropsychopharmacol Rep*, 2018, 38(2):52–60.
- [5] Boros F A, Bohár Z, Vécsei L. Genetic alterations affecting the genes encoding the enzymes of the kynurenine pathway and their association with human diseases [J]. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 2018, 776:32–45.
- [6] Chang Y, Han P, Wang Y, et al. Tryptophan 2,3-dioxygenase 2 plays a key role in regulating the activation of fibroblast-like synoviocytes in autoimmune arthritis [J]. *Br J Pharmacol*, 2022, 179(12):3024–42.
- [7] 贾成艳, 韩萍, 王越业, 等. 色氨酸-2,3-双加氧酶2上调介导犬尿酸代谢在大鼠佐剂性关节炎中的作用研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(9):1374–9.
- [8] Cheong J E, Sun L. Targeting the IDO1/TDO2-KYN-AhR pathway for cancer immunotherapy-challenges and opportunities [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2018, 39(3):307–25.
- [9] Li S, Li S, Zhao Y, et al. A comprehensive analysis of TDO2 expression in immune cells and characterization of immune cell phenotype in TDO2 knockout mice [J]. *Transgenic Res*, 2021, 30(6):781–97.
- [10] Peng Y, Yang T, Tang X, et al. Construction of an inducible CRISPR/Cas9 system for CXCR4 gene and demonstration of its effects on MKN-45 cells [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2020, 78(1):23–30.
- [11] Chen S, Jiao Y, Pan F, et al. Knock-in of a large reporter gene *via* the high-throughput microinjection of the CRISPR/Cas9 system [J]. *IEEE Trans Biomed Eng*, 2022, 69(8):2524–32.

Construction of targeting vector for conditional knockout of murine TDO2

Xu Yuan, Wei Wei, Chang Yan

(*Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, Center of Rheumatoid Arthritis of Anhui Medical University, Anhui Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Hefei 230032*)

Abstract Objective To construct a conditional knockout target vector for the TDO2 gene in mice, and to lay a foundation for the establishment of conditional knockout mice of the TDO2 gene. **Methods** According to the principle of CRISPR/Cas9 technology, single guides RNA (sgRNA) and Donor vectors were designed and constructed. Exon 3 of the TDO2-201 (ENSMUST00000029645.13) transcript was used as the knockout region, and a Loxp element was placed on each side of the target gene to establish a conditional gene target vector for conditional knockout of TDO2 exon 3. The CRISPR/Cas9 complex and Donor vector were microinjected into the fertilized eggs of C57BL/6 mice to obtain positive F0 mice. Then the positive F0 generation mice were mated with C57BL/6 mice to obtain F1 generation mice, and the F1 generation mice genotypes were identified by PCR and gene sequencing. **Results** The results showed that the constructed TDO2 gene conditional knockout vector met the design requirements, and B6/JGpt-TDO2^{em1C} flox/Gpt mice were successfully bred and identified. **Conclusion** The successful construction of the conditional knockout target vector of the TDO2 gene in mice builds the foundation for the further construction of TDO2 gene conditional knockout mice.

Key words TDO2; gene knockout; CRISPR/Cas9; target carrier