网络出版时间:2021-3-18 15:27 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210317.1519.001.html

◇基础医学研究◇

巨噬细胞 *Lamtor2* 基因敲除小鼠对肺炎克雷伯菌易感性的研究

苏 丛[1],伍 婷[2],徐方明[2],陈昊然[3],刘艳艳[2,3,4],律 娜[2],兰燕虎[3,4],李家斌[1,2,3,4]

摘要 **目的** 通过建立 *Lamtor2* 巨噬细胞条件敲除小鼠感染肺炎克雷伯菌(Kp)模型,初步研究 *Lamtor2* 基因生物学功能及其在 Kp 感染过程中的相关机制。**方法** 将引进的 $Lamtor2^{flox/+}$ 小鼠自交,*Lyz2*-Cre 小鼠与 $Lamtor2^{flox/+}$ 进行杂交,获得基因型为 $Lamtor2^{flox/flox}$ *Lyz2*-$Cre^{-/-}$ 和 $Lamtor2^{flox/+}$ *Lyz2*-$Cre^{+/-}$ 的子代小鼠;将上述两种基因型子代小鼠进行杂交,得到对照组小鼠($Lamtor2^{flox/flox}$ *Lyz2*-$Cre^{-/-}$)和 *Lamtor2* 条件性基因敲除小鼠($Lamtor2^{flox/flox}$ *Lyz2*-$Cre^{+/-}$)。提取小鼠脚趾基因组 DNA,经聚合酶链式反应(PCR)扩增,通过琼脂糖凝胶电泳鉴定子代小鼠基因型并提取肺泡巨噬细胞,利用 qRT-PCR 和 Western blot 验证 *Lamtor2* 基因敲除效果。小鼠感染 Kp,观察生存状况;体外采用 RT-qPCR 检测 Kp 感染肺泡巨噬细胞肿瘤坏死因子(TNF)-α、白细胞介素(IL)-1β 和 Cxcl1 表达水平,两组间比较采用 *t* 检验;Western blot 验证 iNOS 的表达水平。**结果** 成功建立 *Lamtor2* 条件性基因敲除小鼠模型,子代存活且可育;与对照组小鼠比较,实验组小鼠在感染 Kp 后生存率降低;$Lamtor2^{flox/flox}$ *Lyz2*-$Cre^{+/-}$ 小鼠来源的肺泡巨噬细胞中的 TNF-α($t=17.54$,$P=0.003\ 2$)、IL-1β($t=15.37$,$P=0.004\ 2$)和 Cxcl1($t=37.82$,$P=0.000\ 7$)表达水平降低,且 iNOS 表达下降。**结论** 构建了 *Lamtor2* 条件性基因敲除小鼠,感染肺炎克雷伯菌后,小鼠的生存率下降;肺泡巨噬细胞 iNOS 表达降低。

关键词 *Lamtor2*;条件性基因敲除;繁育;肺炎克雷伯菌
中图分类号 R 332
文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)04-0505-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.04.001

近些年,肺炎克雷伯菌(*klebsiella pneumoniae*,Kp)的高致病性感染在世界范围内不断被报道[1-5],人类健康也因此受到严重威胁。当微生物侵入机体时,巨噬细胞首先对病原体发挥吞噬作用,此为固有免疫;而晚期核内体溶酶体适配器(late endosomal/lysosomal adaptor 2,Lamtor2)在吞噬的发生过程中发挥重要作用;Lamtor2 也是丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)以及哺乳动物雷帕霉素(mTOR)激活物/调节剂复合物 2 的靶点[6]。巨噬细胞在抗感染免疫过程中,巨噬细胞的 Lamtor2 分子与细胞向 M1 分化及其对病原菌杀伤力密切相关。该实验通过构建、饲养、繁育和鉴定 *Lamtor2* 条件性基因敲除小鼠,获得 $Lamtor2^{flox/flox}$ *Lyz2*-$Cre^{+/-}$ 鼠,建立 *Lamtor2* 巨噬细胞条件敲除小鼠感染 Kp 模型,为探究 *Lamtor2* 基因在抗 Kp 感染免疫过程中的机制提供线索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 *实验动物* $Lamtor2^{flox/+}$ 小鼠共 3 只,雌鼠 1 只、雄鼠 2 只;*Lyz2*-Cre 工具鼠共 2 只,雌、雄各 1 只,均购自赛业(广州)生物科技有限公司,20~30 g/6 周龄,小鼠品系为 C57BL/6J,无特殊病原体(SPF 级),实验动物生产许可证号:SCXK(粤)2018-0032,使用许可证号:SYXK(皖)2017-006;伦理审批号:LLSC20190253。实验过程遵循 3R 原则。

1.1.2 *试剂与仪器* 基因组 DNA 提取试剂盒(货号:JL45852)购自北京天根生化科技有限公司;Taq PCR Master Mix(货号:RR901)、TB Green Premix Ex Taq™(货号:RR420)以及 DL2 000 bp DNA marker(批号:A1A0438)均购自日本 TaKaRa 公司;琼脂糖粉(批号:111860)购自上海生工生物工程股份有限公司。β-Actin 抗体(货号:sc-47778)购自美国 Santa Cruz 公司;iNOS 抗体(货号:AF0199)购自美国 Affinity 公司;二抗山羊抗 IgG/辣根酶标记[货号:ZB-2305(抗鼠)、ZB-2301(抗兔)]购自北京中杉金桥公司。

2020-10-02 接收
基金项目:国家自然科学基金(编号:81673242、81973983);2018 年度安徽高校自然科学研究项目(编号:KJ2018A0193);2018 安徽省高校优秀拔尖人才培育(编号:gxyq2018010)
作者单位:[1] 安徽医科大学附属巢湖医院感染病科,巢湖 238000
[2] 安徽医科大学第一附属医院感染病科,合肥 230022
[3] 安徽省细菌耐药性监控中心,合肥 230022
[4] 安徽医科大学细菌耐药研究所,合肥 230022
作者简介:苏 丛,女,硕士研究生;
兰燕虎,男,博士,责任作者,E-mail:zixinhu@163.com;
李家斌,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:lijiabin@ahmu.edu.cn

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

荧光定量 PCR 仪(罗氏 LightCycler 96,瑞士),基因扩增仪(Biometra Tone,德国),Western blot 电泳仪(Bio-Rad,美国),凝胶电泳成像仪(Tanon 5 200 Multi,上海天能)。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠的饲养与繁殖 根据国家实验动物饲养和使用指南,将小鼠饲养于安徽医科大学 SPF 级动物房中,室温控制在 20 ~ 25 ℃,湿度 50% ~ 60%,保证 12 h 光照,昼夜交替[7]。饲养过程中保持无菌环境,观察并记录小鼠生长发育情况。将性成熟(6 ~9 周龄)的雌鼠与其中一只雄鼠同笼合养进行繁殖,每周给予灭菌的蛋黄和瓜子补充营养。小鼠的平均发情周期为4 ~5 d,发情时间约20 h,妊娠期 19 ~21 d,子代出生后 20 ~21 d 断奶分笼,雌性幼鼠和雄性幼鼠分笼饲养。

1.2.2 小鼠亲代及子代信息记录 为详细记录繁殖后代的信息,设计亲代和子代标签,在亲代标签中,针对小鼠的笼号、基因型、出生日期、周龄、合笼日期、产仔日期和数量进行详细记录;在子代标签中,对幼鼠的笼号、出生日期、周龄、来源笼进行详细记录。

1.2.3 小鼠基因型鉴定 鼠出生后 3 ~4 周与母鼠分笼,剪取小鼠脚趾 0.3 ~0.5 cm 置无菌 1.5 ml EP 管中,并依据剪取的不同脚趾标记小鼠。用基因组 DNA 提取试剂盒提取小鼠基因组 DNA,所得样品置 -20 ℃保存。采用 PCR 法:*flox* 基因上游引物:5′-CCAAATGAACCAAAGTCCAGTCTGC-3′;下游引物:5′-GGAACACAGTGAACAGGAACTAAGG-3′;

Cre 基因上游引物:5′-TGGAATGGCTGGCTACTATGG-3′;下游引物:5′-TGCAATTGATCCCACAGGCA-3′,5′-CCCAGAAATGCCAGATTACG-3′。反应体系为 25 μl,反应程序:95 ℃、3 min,95 ℃、30 s,60 ℃、30 s,72 ℃、30 s,共 35 个循环;72 ℃、10 min,4 ℃、1 h。

配制 2.5% 的琼脂糖凝胶:称取 2.5 g 琼脂糖粉末溶于 100 ml 1 × TAE 电泳缓冲液中,微波炉中高火加热 3 min,冷却约 7 min 后加入 10 μl EB 核酸染料,轻轻摇匀,避免产生气泡,制胶。取 5 μl PCR 产物和 3 μl DL 2 000 bp DNA marker 加入上样孔中进行电泳分析,恒压 150 V,时间 45 min;然后置于凝胶电泳成像仪中成像,观察电泳条带。若 PCR 条带出现与 flox 基因、Cre 基因 PCR 产物大小一致的条带则为阳性结果,即 *Lamtor2*$^{flox/flox}$ *Lyz2*-Cre$^{+/-}$。

1.2.4 *Lamtor2* 基因敲除效果验证 待小鼠成熟至 8 周龄,收集 *Lamtor2*$^{flox/flox}$ *Lyz2*-Cre$^{-/-}$ 小鼠和 *Lamtor2*$^{flox/flox}$ *Lyz2*-Cre$^{+/-}$ 小鼠肺泡巨噬细胞,采用 qRT-PCR 方法检测两组 *Lamtor2* mRNA 的表达。*Lamtor2* 基因上游引物:5′-ATAATGAGGGATCGCTGCTGG-3′;下游引物:5′-CTACGGTCTCCTTGGCATACA-3′;内参 GAPDH 基因上游引物:5′-GTCAAGGCCGAGAATGGGAA-3′;下游引物:5′-CTCGTGGTTCACACCCATCA-3′。

1.2.5 小鼠肺泡巨噬细胞 iNOS 表达水平检测 用 RIPA 裂解液提取 *Lamtor2*$^{flox/flox}$ *Lyz2*-Cre$^{-/-}$ 和 *Lamtor2*$^{flox/flox}$ *Lyz2*-Cre$^{+/-}$ 小鼠肺泡巨噬细胞蛋白,吸取 30 μl 上清液与上样缓冲液混合后金属浴煮沸 10 min 变性,将所制蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳,恒压 75 V、120 min;电泳结束后将蛋白转至经甲醇浸泡数分钟且适当大小的 PVDF 膜上,恒流 220 mA,冰上转膜 1 ~2 h 后用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h。分别加入经 Western blot 一抗稀释液稀释的 β-Actin 抗体(1 ∶ 5 000)、Lamtor2 抗体(1 ∶ 1 000)和 iNOS 抗体(1 ∶ 1 000),4 ℃孵育过夜;1 × TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 10 min;加入 5% 脱脂奶粉稀释的山羊抗兔或山羊抗鼠的二抗(1 ∶ 10 000)孵育 2 h,1 × TBST 缓冲液洗脱 3 次后化学发光成像系统进行拍照。观察 Lamtor2 和 iNOS 的表达情况,进一步确定 *Lamtor2* 敲除后的杀菌活性效果。

1.2.6 小鼠肺泡巨噬细胞内炎症因子表达水平检测 收集繁殖子代中野生型小鼠的肺泡巨噬细胞作为对照组,而纯合子小鼠的肺泡巨噬细胞作为实验组,分别感染肺炎克雷伯标椎菌株(ATCC 43816)(细菌 ∶ 细胞 = 10 ∶ 1),刺激 6 h 后收集细胞,采用 RT-qPCR 方法检测两组细胞分泌的炎性因子肿瘤坏死因子(TNF)-α、白细胞介素(interleu kin,IL)-1β 和 Cxcl1 的 mRNA 相对表达量。

1.2.7 小鼠 Kp 肺部感染 小鼠处于麻醉状态下,鼻内注射 1×10^5 CFU 的 Kp(ATCC 43816)50 μl,观察小鼠的生存状况。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,每组实验重复 3 次,组间比较采用 *t* 检验。对于生存曲线比较,使用 Log-rank (Mantel-Cox) test 分析结果,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠繁殖及发育 *Lamtor2*$^{flox/+}$ 自交后雌鼠 1 个月内生产幼鼠 10 只,幼鼠出生后由母鼠母乳喂养,新生小鼠无毛发,全身粉红色;哺乳期约 3 周,存活 10 只,其中,*Lamtor2*$^{flox/flox}$ 1 只,雄性。*Lam-*

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

tor2$^{flox/+}$雄鼠与 *Lyz*2-Cre 雌鼠杂交后 1 月内生产幼鼠共 8 只，其中 *Lamtor2*$^{flox/+}$ *Lyz*2-Cre$^{+/-}$ 3 只。*Lamtor2*$^{flox/flox}$雄性小鼠与 *Lamtor2*$^{flox/+}$ *Lyz*2-Cre$^{+/-}$雌性小鼠交配 1 个月内生产幼鼠共 5 只。

2.2 小鼠基因型鉴定结果 取幼鼠脚趾组织进行 PCR 扩增，*flox* 基因型鉴定如图 1 所示。

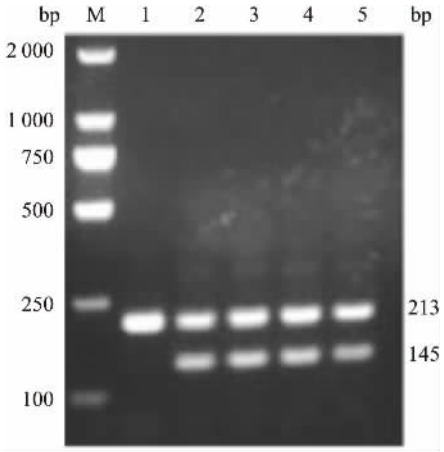

图 1 *flox* 基因型鉴定结果

M: Marker; 1: *Lamtor2*$^{flox/flox}$纯合子小鼠; 2、3、4、5: *Lamtor2*$^{flox/+}$杂合子小鼠

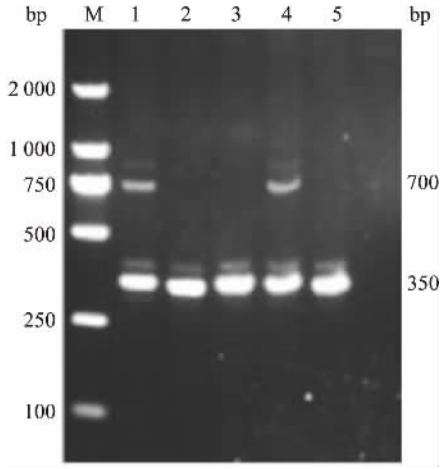

图 2 Cre 基因型鉴定结果

M: Marker; 1 和 4: *Lyz*2-Cre$^{+/-}$; 2、3、5: *Lyz*2-Cre$^{-/-}$

2.3 条件基因敲除小鼠肺泡巨噬细胞 *Lamtor2* mRNA 水平鉴定 分别提取 10 只实验组和 10 只对照组小鼠肺泡巨噬细胞 RNA，逆转录为 cDNA，RT-qPCR 结果如图 3 所示，*Lamtor2*$^{flox/flox}$ *Lyz*2-Cre$^{+/-}$小鼠 *Lamtor2* mRNA 的表达低于 *Lamtor2*$^{flox/flox}$*Lyz*2-Cre$^{-/-}$小鼠［(0.06 ± 0.006) *vs* (1.00 ± 0.003)，$P < 0.01$］。

2.4 蛋白水平的 *Lamtor2* 基因敲除鉴定和肺泡巨噬细胞感染后 iNOS 表达 提取两组小鼠肺泡巨噬细胞蛋白进行 Western blot 检测，结果如图 4 所示，与 *Lamtor2*$^{flox/flox}$ *Lyz*2-Cre$^{-/-}$小鼠比较，*Lamtor2*$^{flox/flox}$ *Lyz*2-Cre$^{+/-}$小鼠 Lamtor2 蛋白不表达，且 *Lamtor2*$^{flox/flox}$ *Lyz*2-Cre$^{+/-}$小鼠肺泡巨噬细胞在感染 Kp 6 h 后，iNOS 表达减少。

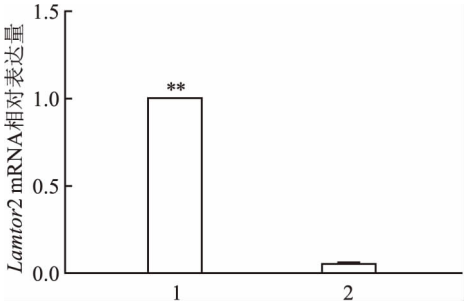

图 3 两组小鼠 *Lamtor2* mRNA 表达量

1: *Lamtor2*$^{flox/flox}$ *Lyz*2-Cre$^{-/-}$小鼠; 2: *Lamtor2*$^{flox/flox}$ *Lyz*2-Cre$^{+/-}$小鼠; 与 *Lamtor2*$^{flox/flox}$ *Lyz*2-Cre$^{+/-}$比较: ** $P < 0.01$

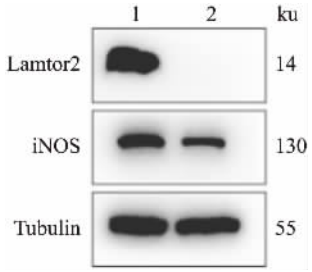

图 4 两组小鼠肺泡巨噬细胞 Lamtor2 及感染后 iNOS 蛋白表达

1: *Lamtor2*$^{flox/flox}$ *Lyz*2-Cre$^{-/-}$小鼠; 2: *Lamtor2*$^{flox/flox}$ *Lyz*2-Cre$^{+/-}$小鼠

2.5 *Lamtor2*$^{flox/flox}$ *Lyz*2-Cre$^{+/-}$小鼠感染 Kp 后生存状况观察 为了研究 *Lamtor*2 基因在 Kp 感染中发挥的作用，对照组和实验组分别取 10 只小鼠，通过鼻滴法制作感染 Kp 小鼠肺炎模型，监测小鼠 7 d 病死率。*Lamtor2*$^{flox/flox}$ *Lyz*2-Cre$^{-/-}$小鼠组 7 d 病死率为 30%，*Lamtor*$^{flox/flox}$ *Lyz*2-Cre$^{+/-}$小鼠 7 d 病死率为 80%（中位生存时间 = 89.5 h，$P = 0.032\ 6$），差异有统计学意义（图 5）。

2.6 Kp 感染 *Lamtor2* 条件性基因敲除小鼠的肺泡巨噬细胞炎症因子的分泌水平 选取 *Lamtor2*$^{flox/flox}$ *Lyz*2-Cre$^{-/-}$小鼠的肺泡巨噬细胞为对照组，而 *Lamtor2*$^{flox/flox}$ *Lyz*2-Cre$^{+/-}$小鼠的肺泡巨噬细胞为实验组，分别感染 Kp 后，实验组细胞内的炎性因子 TNF-α（$t = 17.54$，$P = 0.003\ 2$）、IL-1β（$t = 15.37$，$P = 0.004\ 2$）和 Cxcl1（$t = 37.82$，$P = 0.000\ 7$）的相对表达量均低于对照组，差异均有统计学意义（图 6）。

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

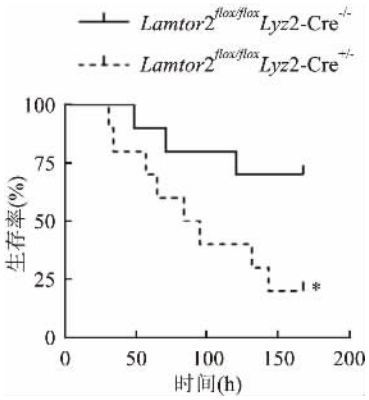

图 5 两组小鼠感染后 7 d 存活率

与 $Lamtor2^{flox/flox}Lyz2\text{-}Cre^{-/-}$ 比较: $^{*}P<0.05$

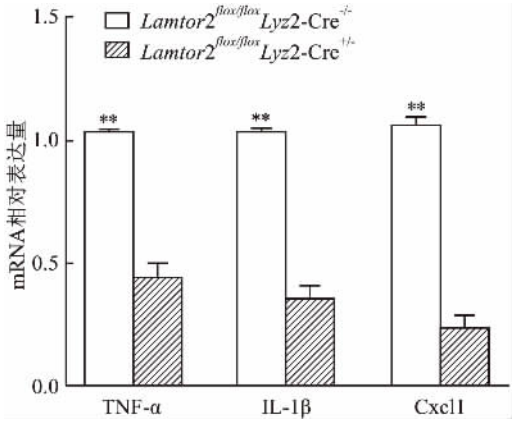

图 6 两组小鼠肺泡巨噬细胞感染后炎症因子 mRNA 表达

与 $Lamtor2^{flox/flox}Lyz2\text{-}Cre^{+/-}$ 比较: $^{**}P<0.01$

3 讨论

基因敲除技术是在 20 世纪 80 年代后半期根据 DNA 同源重组原理而发展起来的。它从分子水平上去除或替代一个基因,整体水平观察实验动物,以此检测被敲除基因功能的实验方法[8]。有文献[9]指出,基因敲除可能对小鼠的生殖功能有影响,但该实验表明条件性基因敲除 *Lamtor2* 基因后并没有影响小鼠的生育能力。利用 Cre-flox 重组酶系统敲除小鼠中 *Lamtor2* 基因,通过繁育和基因鉴定,成功筛选出纯合子幼鼠($Lamtor2^{flox/flox}Lyz2\text{-}Cre^{+/-}$);繁殖子代中的纯合子可用作实验组,野生型用作对照组。

当病原体侵入机体时,巨噬细胞的吞噬作用是固有免疫应答的关键环节[10]; *Lamtor2* 调节着内体 - 溶酶体系统,激活巨噬细胞 MAPK 中的 ERK 信号通路,进一步激活 NADPH 吞噬氧化酶的组装,使吞噬体获得完整抗菌特性。它的缺失会影响 NADPH 吞噬氧化酶及诱导型一氧化氮合酶(iNOS) 的活化,从而抑制 ROS 及 NO 的产生,降低细胞感染病原体时所发挥的抗菌活性[11]。在吞噬过程中,病原体表面同源配体与细胞膜上受体的相互作用导致其内化为噬菌体,需要与内体组分融合形成成熟吞噬体,最终与溶酶体融合杀死微生物[12-14]。事实上, *Lamtor2* 基因在吞噬体与溶酶体的融合过程中充当重要角色[15]。*Lamtor2* 基因的缺失会导致晚期内体(Rab7) 在吞噬小泡上的分布和表达的急剧下降,使得吞噬体 - 内泌体复合物向溶酶体的错误转运,杀菌功能下降。该实验结果显示,条件基因敲除小鼠对 Kp 感染的抵抗能力减弱,病死率高。iNOS 的表达随着 *Lamtor2* 基因的敲除而降低,说明 MAPK-ERK 信号通路杀菌效应受到了影响,而 *Lamtor2* 基因对杀菌效应蛋白 iNOS 的调控作用,可能也是宿主抵抗 Kp 感染的机制之一。此外,感染 Kp 的 *Lamtor2* 条件敲除小鼠肺泡巨噬细胞中炎症因子 TNF-α、IL-1β 和 Cxcl1 的 mRNA 相对表达量均降低,由此可见, *Lamtor2* 促进了 Kp 感染巨噬细胞的杀菌过程。该研究成功构建的 *Lamtor2* 条件基因敲除小鼠可以为后续研究 *Lamtor2* 基因在宿主抗感染的免疫机制奠定了基础。

参考文献

[1] Chang L, Bastian I, Warner M. Survey of *klebsiella pneumoniae* bacteremia in two south Australian hospitals and detection of hypermucoviscous phenotype and magA/rmpA genotypes in *klebsiella pneumoniae* isolates[J]. Infection, 2013, 41(2): 559-63.

[2] Pomakova D K, Hsiao C B, Beanan J M, et al. Clinical and phenotypic differences between classic and hypervirulent *klebsiella pneumonia*: an emerging and under-recognized pathogenic variant [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2012, 31(6): 981-9.

[3] Decré D, Charlotte V, Aurélie E, et al. Emerging severe and fatal infections due to *klebsiella pneumoniae* in two university hospitals in France[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(8): 3012-4.

[4] Siu L K, Fung C P, Chang F Y, et al. Molecular typing and virulence analysis of serotype K1 *klebsiella pneumoniae* strains isolated from liver abscess patients and stool samples from noninfectious subjects in Hong Kong, Singapore, and Taiwan[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(11): 3761-5.

[5] 宋国滨,王 刚,黄 颖, 等. 血流感染肺炎克雷伯菌毒力基因分布及与 CRISPR-CAS 系统相关性研究[J]. 安徽医科大学学报,2020,55(3): 427-31.

[6] Bohn G, Allroth A, Brandes G, et al. A novel human primary immunodeficiency syndrome caused by deficiency of the endosomal adaptor protein p14[J]. Nat Med, 2007, 13(1): 38-45.

[7] 乔录新,徐 萌,柴梦音, 等. p53 基因敲除小鼠的饲养繁殖及

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

鉴定[J]. 实验动物科学,2012,29(1):22-4.
[8] 万海英,汤 华. 基因敲除技术现状及应用[J]. 医学分子生物学杂志,2007,4(1):86-90.
[9] 赵家荣,刘 欢,张 涛,等. 维生素D受体基因敲除小鼠品系的建立与鉴定[J]. 中国实验动物学报,2018,26(6):766-72.
[10] Murray P J, Wynn T A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets[J]. Nat Rev Immunol, 2011,11(11):723-37.
[11] Nada S, Hondo A, Kasai A, et al. The novel lipid raft adaptor p18 controls endosome dynamics by anchoring the MEK-ERK pathway to late endosomes[J]. EMBO J, 2009, 8(5):477-89.
[12] Sarantis H, Grinstein S. Subversion of phagocytosis for pathogen survival[J]. Cell Host Microbe, 2012,12(4):419-31.
[13] Vieira O V, Botelho R J, Grinstein S. Phagosome maturation: aging gracefully[J]. Biochem J, 2002, 366(Pt 3):689-704.
[14] Fairn G D, Grinstein S. How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes[J]. Trends Immunol, 2012, 33(8):397-405.
[15] Taub N, Nairz M, Hilber D, et al. The late endosomal adaptor p14 is a macrophage host-defense factor against *salmonella* infection[J]. J Cell Sci, 2012, 125(Pt 11):2698-708.

Study on susceptibility of macrophage *Lamtor2* knockout mice to *Klebsiella pneumoniae*

Su Cong[1], Wu Ting[2], Xu Fangming[2], et al
([1]*Dept of Infectious Diseases, The Chaohu Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Chaohu* 238000;
[2]*Dept of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei* 230022)

Abstract ***Objective*** To study the biological function of *Lamtor2* gene and its mechanism in the process of *Lamtor2* infection, the model of *Lamtor2* macrophage conditioned knockout mice infected with KP was established. ***Methods*** $Lamtor2^{flox/+}$ mice were introduced for self-crossing, and *Lyz2*-Cre mice were hybridized with $Lamtor2^{flox/+}$ to obtain offspring mice with $Lamtor2^{flox/flox}Lyz2\text{-}Cre^{-/-}$ and $Lamtor2^{flox/+}Lyz2\text{-}Cre^{+/-}$. The two genotypes were hybridized to obtain control mice ($Lamtor2^{flox/flox}Lyz2\text{-}Cre^{-/-}$) and *lamtor2* conditional knockout mice ($Lamtor2^{flox/flox}Lyz2\text{-}Cre^{+/-}$). The toe genomic DNA of mice was extracted and amplified by polymerase chain reaction (PCR). The genotypes of offspring mice were identified by agar-gel electrophoresis and alveolar macrophages were extracted. The *Lamtor2* gene knockout effect was verified by RT-qPCR and Western blot. Mice were infected with Kp and their survival conditions were observed. The expression levels of TNF-α, IL-1β and Cxcl1 after Kp infection with alveolar macrophages were detected by qRT-PCR *in vitro*, and the comparison between the two groups was performed by *t* test. Western blot was used to verify the expression level of iNOS. ***Results*** *Lamtor2* conditional gene knockout mouse model was successfully established with *viable* and fertile offspring. Compared with control mice, experimental mice had lower survival rate after Kp infection. The levels of TNF-α ($t=17.54$, 0.44 ± 0.050, $P=0.003\ 2$), IL-1β ($t=15.37$, 0.35 ± 0.043, $P=0.004\ 2$), and Cxcl1 ($t=37.82$, 0.23 ± 0.043, $P=0.000\ 7$) from $Lamtor2^{flox/flox}Lyz2\text{-}Cre^{+/-}$ mouse alveolar macrophages reduced, and the iNOS expression decreased. ***Conclusion*** *Lamtor2* knockout mice are constructed, and the survival rate of mice and iNOS expression of alveolar macrophges decreases after infected with Kp.

Key words *Lamtor2*; conditional gene knockout; breeding; *Klebsiella pneumoniae*

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net