

CSF1R^{+/-}小鼠的构建和基因鉴定

周园园, 刘 崇, 王安琪, 张慧茹, 邱佳琪, 朱梦娟, 涂佳杰

(安徽医科大学临床药理研究所, 安徽 合肥 230022)

摘要 **目的** 构建集落刺激因子1受体杂合(CSF1R^{+/-})小鼠并分析其基因型,为疾病病理机制及药物靶点提供动物模型基础。**方法** 根据 Cre/Loxp 系统设计一种线性化的靶向载体,在集落刺激因子1受体(CSF1R)基因第5外显子上游插入一个 Loxp 位点,在第5外显子下游插入一个双侧有 Loxp 位点的新霉素抗性盒(PGK-neo)。将线性化的靶向载体电穿孔至胚胎干细胞(ES)。将正确靶向的 ES 注射到 C57BL/6J 小鼠的胚泡中得到嵌合小鼠,与透明带 3-Cre(Zp3-Cre)小鼠进行繁殖。新生小鼠出生后 9~14 天编号并剪鼠尾,提取小鼠的 DNA,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 CSF1R^{+/-}小鼠。应用流式细胞术检测小鼠巨噬细胞中 CSF1R 的表达;Western blot 检测小鼠组织中 CSF1R 的蛋白表达。**结果** 琼脂糖凝胶电泳结果显示,野生小鼠(WT)扩增出 453 bp 的条带,CSF1R^{+/-}小鼠扩增出 453 bp 和 650 bp 的条带。流式细胞术结果显示,与 WT 组比较,CSF1R^{+/-}组小鼠的腹腔来源巨噬细胞(PM)和骨髓来源巨噬细胞(BMDM)中的 CSF1R 低表达($P < 0.05$)。Western blot 结果显示,与 WT 组比较,CSF1R^{+/-}组小鼠脾脏、肾脏、脑组织中的 CSF1R 蛋白低表达($P < 0.05$)。**结论** 成功构建、繁育和鉴定 CSF1R^{+/-}小鼠,为进一步揭示 CSF1R 在免疫调节中的潜在机制研究提供动物模型基础。

关键词 CSF1R;PCR;Western blot;流式细胞术;Cre/Loxp;动物模型

中图分类号 R 331

文献标志码 A

集落刺激因子1受体(colony-stimulating factor 1 receptor, CSF1R)基因编码的蛋白质是集落刺激因子1的受体,集落刺激因子1是一种控制巨噬细胞产生、分化和功能的细胞因子。CSF1R 在巨噬细胞中表达,在卵母细胞、破骨细胞、滋养细胞、中枢神经系统小胶质细胞和部分成肌细胞中也有表达。该基因的突变与髓系恶性肿瘤的易感性有关。Wang et al^[1]认为阻断 CSF1R 会特异性地抑制小鼠骨髓瘤相关巨噬细胞的分化、增殖和存活。经了解,中枢神经系统中的 CSF1R 主要表达于脑组织中的小胶质细胞,突变通常直接导致小胶质细胞数量和功能的变化^[2]。CSF1R 基因在疾病免疫调节中作用显著,与巨噬细胞及多个组织关系密切,其可成为诸多免疫性疾病的潜在治疗靶点^[3]。

胚胎干细胞(embryonic stem, ES)基因打靶技术是基于基因同源重组原理,利用 Cre/Loxp 系统对胚胎干细胞的基因组进行位点特异性基因修饰,再通过电穿孔将打靶载体引入到胚胎干细胞中^[4]。本

研究利用 Cre/Loxp 系统构建的 CSF1R^{+/-}小鼠,并对其进行基因型鉴定与 CSF1R 表达降低的验证,以期研究 CSF1R 在免疫疾病中的作用提供动物模型基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 16只6周龄 CSF1R^{+/-}小鼠,分别为6只雄鼠、10只雌鼠,体质量(20±2)g,购自美国 Jackson 实验室。CSF1R^{+/-}小鼠与 Jackson 实验室联合构建和繁育,在 20~22℃、湿度 40%~60% 的安徽医科大学临床药理研究所 SPF 级动物房中饲养繁殖,12/12 h 昼夜节律,自由摄食饮水,状况良好。

1.1.2 主要试剂 2×HotStrat Taq PCR Master Mix、核酸染料、100 bp Ladder DNA Marker、50×TAE Buffer(北京博迈德基因技术有限公司,货号:MT205、EL108、MD112、EL102-01);琼脂糖 Agarose(德国 BioFroxx 公司,货号:1110GR100);所用引物均由通用生物(安徽)股份有限公司合成;RPMI 1640 培养基(上海逍鹏生物科技有限公司,货号:C3010-0500);高糖 DMEM 培养基(上海源培生物科技股份有限公司,货号:L110KJ);青-链霉素溶液

2025-02-13 接收

基金项目:安徽省高校杰出青年科研项目(编号:2022AH020052)

作者简介:周园园,女,硕士研究生;

涂佳杰,男,副教授,硕士生导师,通信作者, E-mail: tujiajie

@ahmu.edu.cn

(简称“双抗”)(武汉普诺赛生命科技有限公司,货号:PB180120);优级胎牛血清(FBS-Superior quality,简称FBS)(南京维森特生物技术有限公司,货号:086-150);小鼠集落刺激因子1(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)重组蛋白(苏州奕赛生物科技有限公司,货号:315-02); β -actin 抗体(美国 Affinity 公司,货号:#T0022);CSF1R 抗体(美国 SAB 公司,货号:#40729);辣根过氧化物酶偶联亲和山羊抗兔 IgG(H+L)、辣根过氧化物酶偶联亲和山羊抗小鼠 IgG(H+L)(武汉三鹰生物技术有限公司,货号:SA00001-2、SA00001-1);小鼠含生长因子样模体粘液样激素样受体(mouse EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1, F4/80)、 α M 整合素(CD11 antigen-like family member B, CD11b)CSF1R 流式抗体(美国 Biolegend 生物科技有限公司,货号:123110、101205、135523)。

1.1.3 主要仪器 CO₂ 培养箱(上海博旅仪器有限公司,型号:P-90A);荧光定量 PCR 仪(杭州朗基科学仪器有限公司,型号:T20);多功能水平电泳槽、全自动凝胶图像分析系统(上海天能科技有限公司,型号:HE-120、Tanon 1600);十色流式细胞仪(美国贝克曼库尔特有限公司,型号:CytoFLEX)。

1.2 方法

1.2.1 CSF1R^{+/-} 小鼠构建 Hampe et al^[5] 对人类 CSF1R DNA 序列及其内含子 - 外显子排列的分析表明,去除外显子 5 会导致 mRNA 的翻译发生移码,预期的蛋白质将不具有功能。因此,本研究在外显子 5 的两侧分别放置 Loxp 位点,并插入一个 PGK - neomycin (PGK - neo) 盒,Loxp 位点也位于 PGK - neo 盒的两侧。将该构建体电穿孔到 ES 细胞中。将正确靶向的 ES 细胞注射到 C57BL/6J 小鼠的胚胎中,将得到的嵌合小鼠与 Zp3-Cre 小鼠进行杂交,生成 CSF1R^{+/-} 小鼠。构建策略见图 1。

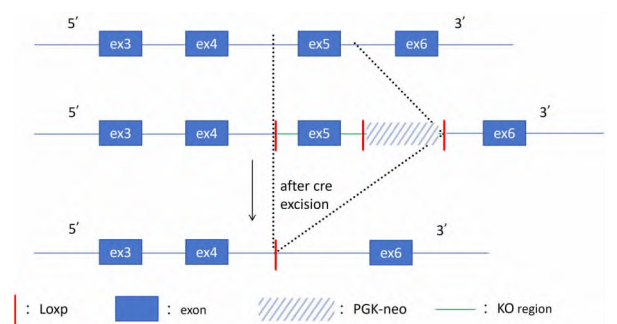


图 1 转基因小鼠构建策略

Fig. 1 Transgenic mice construction strategy

1.2.2 CSF1R^{+/-} 小鼠基因鉴定 剪取 2 周龄小鼠鼠尾 3 ~ 5 mm,放入 1.5 ml 的 EP 管中,加入 50 μ l 鼠尾裂解液[25 mmol/L NaOH,0.2 mmol/L EDTA (pH = 8.0)],置于 95 $^{\circ}$ C 电热恒温水箱中煮 30 min,冷却后加入 50 μ l B 液(4 mmol/L Tris-Hcl 缓冲液, pH = 8.0),涡旋混合均匀。3 000 r/min 离心 5 min,取上清液进行 DNA 扩增,引物序列、PCR 反应体系及程序见表 1 ~ 表 3。PCR 扩增反应结束后,琼脂糖凝胶电泳:称取 1.2 g 琼脂糖溶于 60 ml 1 $\times$ TAE 至锥形瓶中,放入微波炉,加热沸腾 3 次,待稍冷却后加入 6 μ l 核酸染料,摇匀倒入模具。待凝固后,取 10 μ l PCR 扩增产物及 5 μ l DNA Marker 进行上样电泳,120 V,30 min,电泳结束后至 Tanon 1600 全自动凝胶图像分析系统分析成像并观察。

表 1 CSF1R 小鼠基因鉴定引物序列

Tab.1 Primer sequence for CSF1R mice gene identification			
Primer	Sequence (5' $\rightarrow$ 3')	Primer Type	Reaction
16421	TTC ATG GGT TGT GTT TCT GG	Wild type Forward	A
16422	GGA CTA GCC ACC ATG TCT CC	Common	A, B
25657	GAC ATG GTG GAG GAC ATC TG	Mutant Forward	B

表 2 CSF1R 小鼠基因 PCR 反应体系

Tab.2 The PCR reaction system of CSF1R mice genes	
Reaction system	Volume
2 $\times$ HotStrat Taq PCR Master Mix	12.5 μ l
primer	0.8 μ l
DNA samples	2 μ l
dd H ₂ O	Make-up to 25 μ l

表 3 CSF1R 小鼠基因 PCR 反应程序

Tab.3 The PCR reaction procedure for CSF1R mice genes			
Procedure	Temperature ($^{\circ}$ C)	Time	Circle
1	94	5 min	
2	94	30 s	
3	65	30 s	10 $\times$
4	68	1 min	
5	94	30 s	28 $\times$
6	60	30 s	
7	72	45 s	
8	72	5 min	

1.2.3 小鼠腹腔来源巨噬细胞(peritoneal macrophage, PM)、骨髓来源巨噬细胞(bone marrow-derived macrophage, BMDM)分离 根据 1.2.2 小鼠基因鉴定结果,随机选取 WT 小鼠和 CSF1R^{+/-} 小鼠各 3 只,经颈椎脱臼处死,置于 75% 乙醇中浸泡 5 min 后转入超净台;用镊子夹起实验动物腹部皮毛,用剪

刀沿腹中线剪一小口露出腹膜后,向小鼠腹腔内注射无菌 PBS 缓冲液 5 ml(含 1% 双抗)轻揉腹部约 1 min。在下缘处用无菌注射器吸取腹腔液,转入 15 ml 离心管中,置于冰上暂存;收集的腹腔液在 4 ℃、1 500 r/min 离心 10 min,弃上清液。细胞沉淀用 PBS 缓冲液(含 1% 双抗)重悬清洗 1 遍。腹腔液以 1 500 r/min、4 ℃ 离心 10 min。离心后,弃上清液。沉淀用 RPMI1640 全培养基重悬。取巨噬细胞重悬液用细胞计数板计数,调整浓度至 1×10^6 个/ml;细胞接种于 12 孔板(2.5×10^5 个/孔,约加 1 ml 培养基);培养 2~4 h 后,用 PBS 缓冲液清洗 2 遍,除去不贴壁的红细胞及其他杂细胞,剩余贴壁细胞即是 PM,用刮刀刮下细胞用于后续实验。

在超净台中,用手术刀在小鼠脚踝划一刀,沿腿骨方向纵切一刀,撕开腿部皮肤。去除大腿根部附近肌肉,用手术刀沿着小鼠大腿根部髌关节处将整条腿拆下。切断跟腱,切除胫骨周围主要肌肉。剪刀贴着股骨方向,切除股骨周围的主要肌肉,切除膝关节软组织,以获得股骨。切断腓骨及其周围肌肉,以暴露完整的胫骨。切除股骨和胫骨两端的骨髓,用 23G 针从末端进入骨髓。将骨髓冲洗到细胞培养皿中,每根骨头缓慢注射约 2~3 ml DMEM,直至骨髓腔变白。培养基为 DMEM + 10% FBS + 1% 双抗 + 100 ng/ml M-CSF。培养第 4 天更换新鲜培养基,培养基同前。培养第 7 天获得成熟的 BMDM,用刮刀刮下细胞用于后续实验。随后,分离小鼠的脾脏、肾脏和脑组织,用 1.5 ml 离心管收集备用。

1.2.4 流式细胞术 将 1.2.3 提取的 WT 组和 $CSF1R^{+/-}$ 组小鼠 PM、BMDM 分别移至 1.5 ml 离心管,分别从各只小鼠的 PM、BMDM 中吸取约 5 000 个细胞留作 Blank 组,分成 Blank 组、WT 组、 $CSF1R^{+/-}$ 组,将 Blank 组、WT 组、 $CSF1R^{+/-}$ 组的 PM、BMDM 分别以 1 200 r/min 离心 5 min,Blank 组细胞用适量 PBS 重悬。其余两组细胞用 100 μ l PBS 重悬后,加入 F4/80 抗体(1 μ g/ 10^6 个细胞)、CD11b 抗体(0.25 μ g/ 10^6 个细胞)、CSF1R 抗体(0.125 μ g/ 10^6 个细胞),4 ℃ 避光孵育 30 min 后,2 000 r/min,离心 5 min 离心弃上清液,适量 PBS 重悬后,透过纱网转移至流式管中,上机十色流式细胞仪进行分析。

1.2.5 Western blot 检测 CSF1R 的蛋白表达 将分离出的脾脏、肾脏、脑组织制备成蛋白样品,10% SDS-PAGE 分离蛋白,将蛋白转至 PVDF 膜,封闭,用 β -actin(1 : 10 000)和 CSF1R(1 : 1 000)一抗

4 ℃ 孵育过夜,次日 TBST 洗膜 3 次,分别对应加入辣根过氧化物酶偶联亲和山羊抗小鼠 IgG(H + L)(1 : 10 000)和辣根过氧化物酶偶联亲和山羊抗兔 IgG(H + L)(1 : 1 000)二抗室温摇床孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,用化学发光成像仪显影,使用 ImageJ 软件分析目的蛋白灰度值。

1.2.6 统计学处理 采用 GraphPad Prism 9.5.0 软件进行数据分析及图表的制作,计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较使用独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 $CSF1R^{+/-}$ 小鼠的鉴定 $CSF1R$ 全身敲降小鼠的基因型鉴定结果见图 2,可见编号 4、6、13、15、16 号在 WT 引物扩增产物 453 bp 处有阳性条带,在 Common 引物及 Mutant 引物扩增产物 650 bp 处没有条带,为野生型小鼠;编号 1、2、3、5、7、8、9、10、11、12、14 号在 WT 引物扩增产物 453 bp 处有阳性条带,在 Common 引物及 Mutant 引物扩增产物 650 bp 处有阳性条带,即为 $CSF1R^{+/-}$ 小鼠。以上结果说明初步构建出了 $CSF1R^{+/-}$ 小鼠。

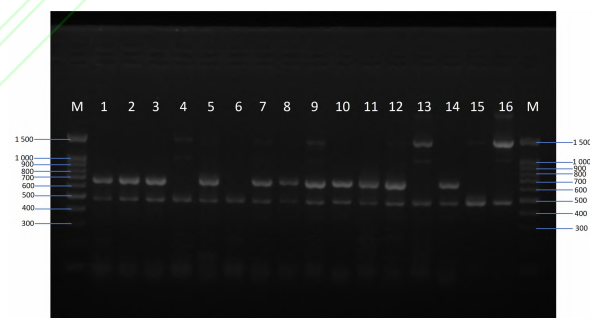


图 2 $CSF1R$ 小鼠基因鉴定结果

Fig. 2 Results of the $CSF1R$ mice gene identification

M: DNA marker; 1-16: Mouse serial number.

2.2 流式细胞术检测 PM、BMDM 中 CSF1R 的表达 通过流式细胞术检测小鼠 PM 和 BMDM 中 CSF1R 的相对表达量,可进一步验证 $CSF1R^{+/-}$ 小鼠是否构建成功。使用 FlowJo 软件分析数据,采用以下门控策略。首先通过 FSC-A/SSC-A 门控圈出适当细胞群。接着通过 F4/80 和 CD11b 双阳性圈出巨噬细胞。然后,依据 Blank 组的 CSF1R 的圈门进一步检测不同组别中 CSF1R 的表达情况。流式细胞术分析显示,CSF1R 在 $CSF1R^{+/-}$ 小鼠的 PM 和 BMDM 中明显降低($t_{PM} = 11.54, P < 0.001$; $t_{BMDM} = 6.17, P < 0.01$)。见图 3。

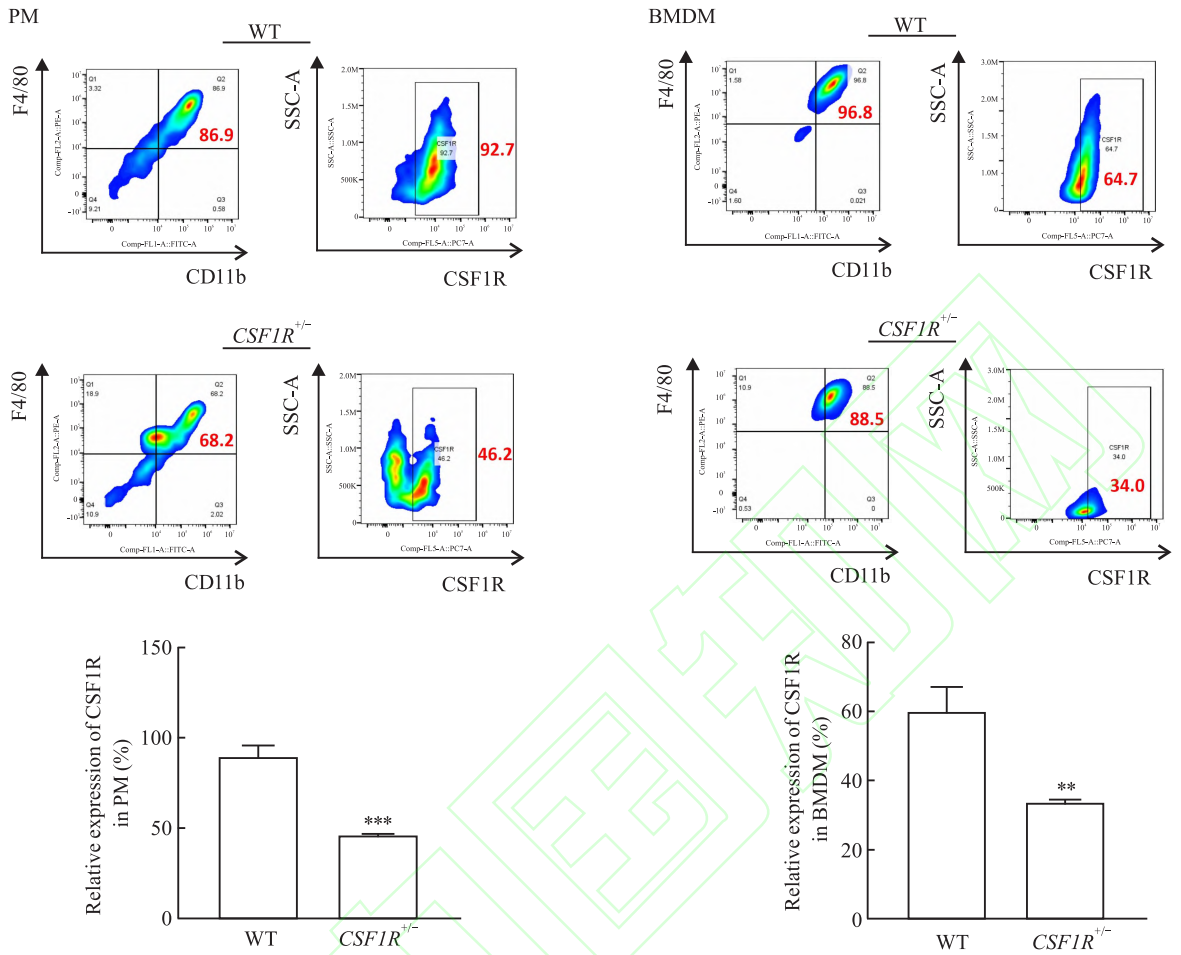


图3 *CSF1R* 在 WT 小鼠和 *CSF1R*^{+/-} 小鼠的 PM、BMDM 的相对表达量 (n = 3)

Fig.3 The relative expression of *CSF1R* in PM and BMDM of WT mice and *CSF1R*^{+/-} mice (n = 3)

** P < 0.01, *** P < 0.001 vs WT mice.

2.3 *CSF1R*^{+/-} 小鼠组织中 *CSF1R* 蛋白的表达

为了进一步检验 *CSF1R*^{+/-} 小鼠是否构建成功,通过 Western blot 检测 *CSF1R* 在脾脏、肾脏以及脑组织中的蛋白表达。结果表明,与 WT 小鼠相比, *CSF1R*^{+/-} 小鼠在不同组织中 *CSF1R* 均下调 ($t = 5.662, 5.155, 6.549$, 均 $P < 0.01$)。见图 4。

3 讨论

基因敲除小鼠是研究某个基因功能的重要研究工具,Cre/Loxp 系统是构建基因工程小鼠的重要工具。Cre 重组酶介导的 Loxp 侧翼序列的切除是转基因和各种基因治疗策略中强有力的技术^[6]。Cre 重组酶是一种由噬菌体 P1 编码的 38 kDa 的单体蛋白,而 Loxp 位点是该酶的特异性识别序列,由两个反向的 13 bp 回文序列和一个 8 bp 的间隔序列构成。Cre 重组酶能够在 Loxp 位点之间进行 DNA 切割和重连,从而实现对特定基因的精准编辑。

近几年国内外对 *CSF1R* 基因的研究比较热门,主要聚集在 *CSF1R* 基因对癌症的治疗影响。相关研究^[7]主要提出 *CSF1R* 基因可以影响巨噬细胞的表型,从而使巨噬细胞在调节肿瘤发生中出现耗竭或重编程肿瘤相关巨噬细胞的表型,以此作为癌症患者的治疗方法。2023 年国内提出 *CSF1R* 抑制剂是用于癌症治疗的新兴免疫治疗药物^[8]。关于 *CSF1R* 基因的研究中, *CSF1R* 基因缺失导致小胶质细胞的缺乏对神经退行性疾病的影响备受关注, *CSF1R* 基因突变会导致先天性小胶质细胞缺乏,导致儿童患白质脑病^[9]。多项基因库显示 *CSF1R* 基因在脾脏组织中高度表达。并且重度抑郁症患者脾脏中 *CSF1R* 的表达降低,脾脏 *CSF1R* 水平与顶叶皮层 *CSF1R* 水平呈正相关^[10]。抑制 *CSF1R* 还影响脾脏的先天免疫细胞,包括脾脏的巨噬细胞和 T 细胞,在体外实验中发现抑制 *CSF1R* 可显著改变 CD4 细胞的转录谱,并在定向刺激和非刺激细胞中抑制

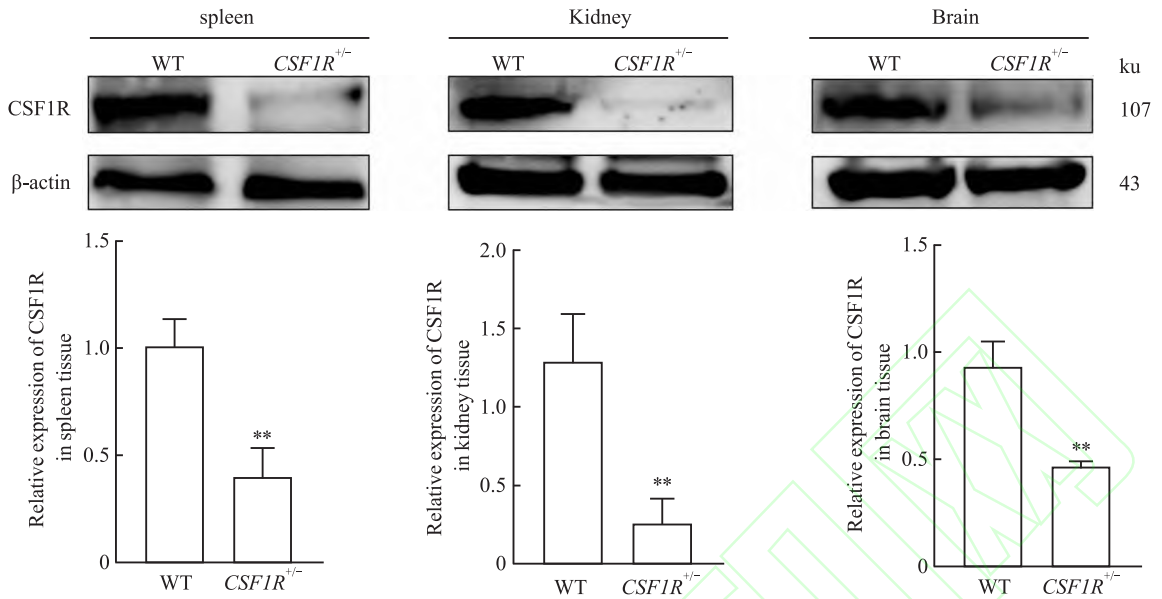


图4 CSF1R 在 WT 小鼠和 CSF1R^{+/-} 小鼠在脾脏、肾脏、脑组织中相对表达量($n=3$)

Fig.4 The relative expression of CSF1R in spleen, kidney and brain tissues of WT mice and CSF1R^{+/-} mice ($n=3$)

** $P < 0.01$ vs WT mice.

Th1 和 Th2 分化^[11]。在对 CSF1R 的研究中陆续发现,在炎症性疾病中 CSF1R 可能出现过度激活,从而导致骨骼、肾脏、肺、肝脏和中枢神经系统发生炎症反应;在炎症疾病的临床前及临床研究中,越来越多针对 CSF1R 信号转导的药物被开发和研究,为疾病治疗提供了新的可能性^[12]。有文献报道小鼠 PM 与 BMDM 均表达 CSF1R 且发挥重要作用;其中 PM 的 CSF1R 信号转导网络调节炎症单核细胞的募集以及巨噬细胞对脂多糖等的反应,调节巨噬细胞的极化^[13];CSF1R 与巨噬细胞集落刺激因子结合,会刺激 BMDM 的增殖、分化和行为^[14]。因此构建 CSF1R^{+/-} 小鼠可帮助实现 CSF1R 在不同巨噬细胞及不同组织中 CSF1R 的缺失,模拟特定的疾病模型,为癌症及炎症类等疾病提供动物模型基础。

在构建 CSF1R^{+/-} 小鼠和对 CSF1R 基因的学习研究中,查阅文献了解到 CSF1R 与骨骼的发育、生长等有关^[15-16]。因此,利用 CSF1R^{+/-} 小鼠研究其具体机制,可揭示骨骼相关疾病发病机制并有利于寻找新的治疗靶点。综上所述,本研究中通过对 CSF1R^{+/-} 小鼠进行 PCR、流式细胞术和 Western blot 等技术分析鉴定,成功构建 CSF1R^{+/-} 小鼠,为未来对 CSF1R 相关机制研究提供动物模型基础。

参考文献

- [1] Wang Q, Lu Y, Li R, et al. Therapeutic effects of CSF1R-blocking antibodies in multiple myeloma[J]. Leukemia, 2018, 32(1): 176-83. doi: 10.1038/leu.2017.193.
- [2] Wang Y L, Wang F Z, Li R, et al. Recent advances in basic research for CSF1R-microglial encephalopathy[J]. Front Aging Neurosci, 2021, 13: 792840. doi: 10.3389/fnagi.2021.792840.
- [3] Ramesh A, Kumar S, Nandi D, et al. CSF1R- and SHP2-inhibitor-loaded nanoparticles enhance cytotoxic activity and phagocytosis in tumor-associated macrophages[J]. Adv Mater, 2019, 31(51): e1904364. doi: 10.1002/adma.201904364.
- [4] 谢尚训, 谢明琦, 陈治池, 等. 利用基因打靶技术构建转基因小鼠及其在生物学中的应用[J]. 生物医学工程与临床, 2016, 20(5): 540-4. doi: 10.13339/j.cnki.sgcl.2016.05.001.
- [4] Xie S X, Xie M Q, Chen Z C, et al. Progress of using gene targeting to build genetically mice and its application in biology[J]. Biomed Eng Clin Med, 2016, 20(5): 540-4. doi: 10.13339/j.cnki.sgcl.2016.05.001.
- [5] Hampe A, Shamon B M, Gobet M, et al. Nucleotide sequence and structural organization of the human FMS proto-oncogene[J]. Oncogene Res, 1989, 4(1): 9-17.
- [6] Gorman C, Bullock C. Site-specific gene targeting for gene expression in eukaryotes[J]. Curr Opin Biotechnol, 2000, 11(5): 455-60. doi: 10.1016/s0958-1669(00)00127-0.
- [7] Cannarile M A, Weissner M, Jacob W, et al. Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy[J]. J Immunotherapy Cancer, 2017, 5(1): 53. doi: 10.1186/s40425-017-0257-y.
- [8] Wen J, Wang S, Guo R, et al. CSF1R inhibitors are emerging immunotherapeutic drugs for cancer treatment[J]. Eur J Med Chem, 2023, 245 (Pt1): 114884. doi: 10.1016/j.ejmech.

2022. 114884.
- [9] Oosterhof N, Chang I J, Karimiani E G, et al. Homozygous mutations in CSF1R cause a pediatric-onset leukoencephalopathy and can result in congenital absence of microglia[J]. *Am J Hum Genet*, 2019, 104(5): 936 – 47. doi: 10.1016/j.ajhg.2019.03.010.
- [10] Zhang J, Chang L, Pu Y, et al. Abnormal expression of colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R) and transcription factor PU.1 (SPI1) in the spleen from patients with major psychiatric disorders: A role of brain-spleen axis[J]. *J Affect Disord*, 2020, 272: 110 – 5. doi: 10.1016/j.jad.2020.03.128.
- [11] Lei F, Cui N, Zhou C, et al. CSF1R inhibition is not specific to innate immune cells but also affects T-helper cell differentiation independently of microglia depletion[J]. *Res Sq*, 2023, doi: 10.21203/rs.3.rs-3308220/v1.
- [12] Xiang C, Li H, Tang W. Targeting CSF-1R represents an effective strategy in modulating inflammatory diseases[J]. *Pharmacol Res*, 2023, 187: 106566. doi: 10.1016/j.phrs.2022.106566.
- [13] Caescu C I, Guo X, Tesfa L, et al. Colony stimulating factor-1 receptor signaling networks inhibit mouse macrophage inflammatory responses by induction of microRNA-21[J]. *Blood*, 2015, 125(8): e1 – 13. doi: 10.1182/blood-2014-10-608000.
- [14] Richardsen E, Sørbye S W, Crowe J P, et al. Expression of M-CSF and CSF-1R is correlated with histological grade in soft tissue tumors[J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(10): 3861 – 6.
- [15] Hume D A, Caruso M, Ferrari-Cestari M, et al. Phenotypic impacts of CSF1R deficiencies in humans and model organisms[J]. *J Leukoc Biol*, 2020, 107(2): 205 – 19. doi: 10.1002/JLB.MR0519-143R.
- [16] Sehgal A, Irvine K M, Hume D A. Functions of macrophage colony-stimulating factor (CSF1) in development, homeostasis, and tissue repair[J]. *Semin Immunol*, 2021, 54: 101509. doi: 10.1016/j.smim.2021.101509.

Construction and gene identification of *CSF1R*^{+/-} mice

Zhou Yuanyuan, Liu Chong, Wang Anqi, Zhang Huiru, Qiu Jiaqi, Zhu Mengjuan, Tu Jiajie
(*Institute of Clinical Pharmacology of Anhui Medical University, Hefei 230022*)

Abstract *Objective* To construct *CSF1R*^{+/-} mice and to analyze their genotypes, so as to provide animal model basis for disease pathological mechanism and drug target. *Methods* A linearized targeting vector was designed according to Cre/Loxp system. A Loxp site was inserted upstream of the 5th exon of the *CSF1R* gene, and a neomycin resistance box with Loxp sites on both sides was inserted downstream of the 5th exon. The linearized targeting vector was electroporated into embryonic stem cells. The correctly targeted embryonic stem cells were injected into the blastocysts of C57BL/6J mice to obtain chimeric mice, which were bred with Zp3-Cre mice. The newborn mice were numbered 9 – 14 days after birth and their tails were cut. The DNA of the mice was extracted, and the genotype of the mice was identified by polymerase chain reaction and agarose gel electrophoresis. The expression of CSF1R in mouse macrophages was detected by flow cytometry. The expression of CSF1R in mouse tissues was detected by Western blot. *Results* The results of agarose gel electrophoresis showed that 453 bp bands were amplified in wild type mice, and 453 bp and 650 bp bands were amplified in heterozygous mice. The results of flow cytometry showed that the expression of CSF1R in peritoneal macrophages and bone marrow-derived macrophages of *CSF1R* heterozygous mice was lower than that of WT group ($P < 0.05$). The results of Western blot showed that the expression of CSF1R in spleen, kidney and brain tissue of *CSF1R* heterozygous group was lower than that of WT group ($P < 0.05$). *Conclusion* *CSF1R*^{+/-} mice are successfully constructed, reproduced and identified, which provides an animal model basis for further revealing the potential mechanism of CSF1R in immune regulation.

Key words CSF1R; PCR; Western blot; flow cytometry; Cre/Loxp; animal model

Fund program Distinguished Young Scholars Support Project of Anhui Educational Committee (No. 2022AH020052)

Corresponding author Tu Jiajie, E-mail: tujiajie@ahmu.edu.cn