

网络出版时间:2025-05-28 17:20:33 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250528.1317.001

◇基础医学研究◇

TREM2 基因敲除小鼠的构建、繁育和基因鉴定

黄蓉^{1,2}, 赵鑫鑫^{1,2}, 薛慧³, 朱梦娟³, 涂佳杰³, 王鑫铭^{1,2}

(¹ 安徽医科大学药学院, 合肥 230032; ² 安徽医科大学第一附属医院药剂科, 合肥 230022;

³ 安徽医科大学临床药理研究所, 合肥 230032)

摘要 目的 采用 CRISPR/Cas9 技术构建髓细胞触发受体 2 (TREM2) 基因敲除 ($TREM2^{-/-}$) 小鼠, 繁育 $TREM2^{-/-}$ 小鼠并分析其基因型。方法 采用 CRISPR/Cas9 技术选择性敲除 TREM2 基因的外显子 2~3 区域, 构建 $TREM2^{-/-}$ 小鼠模型, 所有小鼠的遗传背景均为 C57BL/6J。采用聚合酶链式反应 (PCR) 法鉴定小鼠的基因型。实时荧光定量 PCR (qPCR) 和蛋白质印迹法 (Western blot) 检测小鼠主要组织中 TREM2 的表达水平, 从 mRNA 水平和蛋白水平上验证 PCR 鉴定结果的真实性以及科学性。根据 sgRNA 序列在 CCTop 网站预测出可能存在的脱靶位点, 提取小鼠尾部 DNA 经 PCR 扩增后进行 Sanger 测序, 检测 $TREM2^{-/-}$ 小鼠有无产生脱靶效应。结果 通过 CRISPR/Cas9 技术成功构建了 $TREM2^{-/-}$ 小鼠, 并对小鼠进行了基因型鉴定, 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 仅扩增出 415 bp 条带的小鼠基因型为野生型 (WT); 仅扩增出 449 bp 条带的小鼠基因型为 $TREM2^{-/-}$; 扩增出 415 bp 和 449 bp 双条带的小鼠基因型为杂合型。qPCR 结果显示, 与 WT 小鼠相比, $TREM2^{-/-}$ 小鼠的心脏、脑组织中 TREM2 的 mRNA 表达水平均下调 ($P < 0.01$), 胸腺、肺组织中 TREM2 的 mRNA 表达也呈现下降趋势 ($P < 0.05$)。Western blot 结果显示, 与 WT 小鼠相比, $TREM2^{-/-}$ 小鼠的心脏、脑、胸腺、肺组织以及外周血单个核细胞 (PBMC) 中 TREM2 的蛋白表达水平均降低 ($P < 0.01$)。Sanger 测序结果表明 $TREM2^{-/-}$ 小鼠没有产生脱靶效应。结论 成功构建并繁育了 $TREM2^{-/-}$ 小鼠, 建立了一种可靠的基因型鉴定方法, 并采用 qPCR、Western blot 以及 Sanger 测序分析, 验证了小鼠模型遗传的稳定性, 将为 TREM2 基因功能的研究提供重要的基因动物模型。

关键词 髓细胞触发受体 2; CRISPR / Cas9; 基因敲除; 聚合酶链式反应; 琼脂糖凝胶电泳; 基因型鉴定

中图分类号 R-332

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)06-0977-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.06.001

髓细胞触发受体 2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2, TREM2) 属于免疫球蛋白超家族, 是一种单向跨膜免疫反应受体。TREM2 有一个胞外域, 这个胞外域包含有一个 V 型免疫球蛋白结构域、一个短胞外域、一个跨膜螺旋结构域和一个短胞质尾端^[1]。TREM2 有多种配体, 这些配体大多是组织损伤的标志, 主要为结合在质膜上的带负电分子, 包括细菌的成分、DNA、脂蛋白和磷脂^[2]。在生

理状态下中, TREM2 的活性仅限在特定的组织中, 而在病理状态中, TREM2 信号途径成为感知组织损伤并抑制损伤的免疫信号枢纽。研究^[3]表明 TREM2 参与多种生物过程, 如细胞存活、脂质代谢、吞噬作用和炎症反应等, 其在阿尔兹海默病、肥胖症、癌症等疾病中都发挥了重要的作用^[4]。

CRISPR/Cas9 技术具有突变、沉默、诱导或替换遗传元件的功能, 凭借其快速、简易以及精确的优势得到广泛应用^[5]。该技术已经在基础和临床研究、治疗、药物开发、农业和环境等领域得到了认可^[6], CRISPR 基因组编辑使研究人员能够快速、精准地创建转基因细胞系和动物模型。该研究利用 CRISPR/Cas9 技术构建 $TREM2^{-/-}$ 小鼠, 并对后代进行基因型鉴定与敲除效率验证, 以期为研究 TREM2 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 实验动物 9 只 $TREM2^{-/-}$ 小鼠, 7 只雄鼠、2 只雌鼠, 体质量为 (20 ± 2) g, 购自上海南方模式生

2025-04-25 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 82104185); 安徽省高校科研项目 (编号: 2022AH051153); 安徽省自然科学基金 (编号: 2008085QH400); 抗炎免疫药物教育部重点实验室 (安徽医科大学) 开放课题 (编号: KFJJ-2020-03); 安徽医科大学校科研基金 (编号: 2021xkj148)

作者简介: 黄蓉, 女, 硕士研究生;

王鑫铭, 男, 博士, 主管药师, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: wangxinming@ahmu.edu.cn;

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

物科技股份有限公司(货号:NM-KO-190402),所有小鼠的遗传背景均为 C57BL/6J,在 SPF 级动物房饲养繁殖。该动物实验获得安徽医科大学临床药理研究所动物实验伦理委员会批准(编号:PZ-2023-035)。

1.2 主要试剂 2 × HotStrat Taq PCR Master Mix、Gelred 核酸染料、100 bp Ladder DNA Marker 购自北京博迈德基因技术有限公司(货号:MT205、EL108、MD112);琼脂糖 Agarose 购自德国 BioFroxx 公司(货号:1110GR100);小鼠淋巴细胞分离液购自深圳达科为生物技术股份有限公司(货号:7211011);5 × Evo M-MLV RT Master Mix 和 2 × SYBR Green Pro Taq HS Premix 购自湖南艾科瑞生物工程有限公司(货号:AG11706、AG11701);所用引物均由通用生物(安徽)股份有限公司合成; β -actin 抗体购自美国 Affinity 公司(货号:#T0022);TREM2 抗体购自英国 Abcam 公司(货号:ab305103);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)购自武汉三鹰生物技术有限公司(货号:SA00001-2、SA00001-1)。

1.3 主要仪器与设备 PCR 扩增仪购自上海伯乐生命医学产品有限公司;核酸定量仪购自德国 Eppendorf 公司;荧光定量 PCR 仪购自上海伯乐生命医学产品有限公司;多功能水平电泳槽购自上海天能科技有限公司;Tanon 1600 系列全自动凝胶图像分析系统购自上海天能科技有限公司。

1.4 方法

1.4.1 *TREM2*^{-/-} 小鼠的构建及繁育 利用 CRISPR/Cas9 技术选择性敲除 *TREM2* 基因的外显子 2~3 区域,将体外转录的与目标 DNA 序列互补的单链 RNA 引导分子(single guide RNA, sgRNA)与 Cas9 mRNA 混合后显微注射到 C57BL/6J 小鼠受精卵中,将受精卵移植进 C57BL/6J 雌性小鼠体内,获得 F0 代基因敲除小鼠,为构建稳定遗传的 *TREM2*^{-/-} 小鼠,将 F0 代雄鼠与不同母本的雌鼠按照 1:3 进行合笼,得到 F1 代小鼠^[7]。sgRNA 序列如下: gRNA1, CGCTATGCTCCCTGCACTCCTGG; gRNA2, CTGGCAGTGACTGCGGATGGAGG。构建策略见图 1。

1.4.2 *TREM2*^{-/-} 小鼠的基因型鉴定

1.4.2.1 鼠尾组织 DNA 提取 新生小鼠 2 周龄时,剪取小鼠尾尖部约 0.3~0.5 cm,置于无 DNA 污染的 1.5 ml EP 管中,加入 50 μ l 鼠尾裂解液 A(配方:10 ml 蒸馏水中含 50 μ l 5 mol/L NaOH、4 μ l 0.5

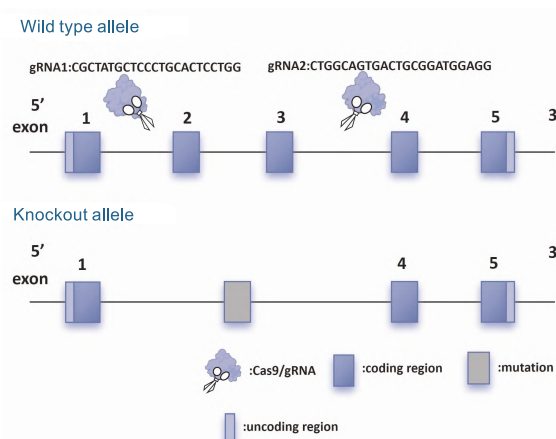


图 1 利用 CRISPR/Cas9 系统敲除 *TREM2* 基因策略
Fig. 1 Strategy for knockout of *TREM2* gene using CRISPR/Cas9 system

mol/L pH 8.0 EDTA 溶液),确保鼠尾沉至管底,将含有鼠尾的 EP 管放入 95 $^{\circ}$ C 电热恒温热块中孵育 30 min,充分裂解鼠尾,稍冷却后加入 50 μ l 鼠尾裂解液 B(配方:10 ml 蒸馏水中含 400 μ l 1 mol/L pH 8.0 Tris-HCl 溶液),再涡旋振荡使其充分混匀。3 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液作为 DNA 模板,进行 PCR 扩增反应。

1.4.2.2 PCR 扩增反应 引物均由通用生物(安徽)股份有限公司合成,引物序列见表 1。PCR 扩增反应体系:12.5 μ l 2 × HotStrat Taq PCR Master Mix,0.8 μ l 引物(P1、P2、P3),2 μ l DNA 模板,ddH₂O 补至 25 μ l。PCR 扩增程序如下:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环数,72 $^{\circ}$ C 5 min 终止反应。

表 1 *TREM2* 小鼠基因鉴定引物序列

Tab. 1 Primer sequences for *TREM2* mice gene identification

Primers	Sequences (5'-3')	Primer types
P1	CTCACGGGCAAGCTCATAGG	Common
P2	TGGTGGTGACACAGGTATGT	Mutant
P3	TGCTCCCATTCGCTTCTTC	Wild type

1.4.2.3 琼脂糖凝胶电泳 60 ml 1 × TAE 缓冲液中加入 1.2 g 琼脂糖摇匀后,置于微波炉中加热煮沸 3 次,直至变得澄清透明,待其稍冷却,加入 6 μ l 的核酸染料,轻轻摇晃混匀,将溶液倒至插有电泳梳的制胶器。30 min 胶凝固后,拔去电泳梳,从制胶器中小心取出凝胶,放入电泳槽内,每孔加入上述所得 PCR 扩增产物 10 μ l,两端孔内加入 5 μ l 100 bp DNA maker,设置电压 95 V、电泳时间为 1 h。电泳

结束后将凝胶置于紫外成像系统中拍照观察并记录结果,分析小鼠的基因型。

1.4.3 小鼠血液采集及组织分离 将小鼠从笼中取出,全身麻醉后采集血液,将血滴入抗凝管中。将小鼠血样移至 15 ml 离心管中,加入等量 PBS 混匀,另取 15 ml 离心管加入等量小鼠淋巴细胞分离液,最终血液:PBS:淋巴细胞分离液=1:1:1,将稀释后的血样沿壁加入离心管,防止下沉。2 200 r/min 离心 30 min,将离心后的中层(白膜层)吸入新离心管,加 PBS 重悬离心,弃上清液得外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。处死小鼠,用乙醇喷壶喷湿小鼠全身,将小鼠腹部朝上,用镊子轻提腹部皮肤,在腹部剪开一小口,用镊子夹住皮肤边缘,轻轻分离皮肤,并将皮肤拨向两侧,依次取出小鼠心脏、脑、胸腺以及肺组织,用 PBS 将组织洗净,装于 1.5 ml EP 管中, -80 ℃ 储存,便于后续实验操作。

1.4.4 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 检测小鼠组织中 TREM2 的 mRNA 表达水平 称取野生型(wild type, WT)及 *TREM2*^{-/-} 小鼠心脏、脑、胸腺以及肺组织约 50 mg 置于 1.5 ml EP 管中,研磨后采用 TRIzol 法提取组织总 RNA,核酸定量仪检测 RNA 的浓度和纯度,使用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA,使用荧光定量 PCR 仪对

SYBR Green、cDNA 和引物进行 PCR 扩增反应。以 β -actin 作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算目的基因相对表达量。PCR 引物序列如下, *TREM2*: 上游 5'-ctg-gaaccgtcaccatcactc-3', 下游 5'-cgaaactcgatgactcctcgg-3'; β -actin: 上游 5'-TGAGCTGCGTTTACACCCT-3', 下游 5'-TTTGGGGGATGTTTGCTCCA-3'。

1.4.5 Western blot 检测小鼠组织以及 PBMC 中 TREM2 的蛋白表达水平 称取 WT 及 *TREM2*^{-/-} 小鼠心脏、脑、胸腺以及肺组织约 50 mg 置于 1.5 ml EP 管中,加入 RIPA 裂解液,放入组织研磨机中匀浆提取组织蛋白,测定蛋白浓度。加入 5 × loading buffer 后,100 ℃ 水浴锅中煮 10 min 用于后续实验。10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白后转移至 PVDF 膜,快速封闭液封闭 15 min, TBST 清洗膜 3 次,加入 β -actin (1:5 000) 和 TREM2 一抗 (1:1 000), 放于 4 ℃ 冰箱中孵育过夜,次日用 TBST 清洗 3 次, PBS 清洗 1 次,加入对应山羊抗小鼠 IgG 和山羊抗兔 IgG (1:10 000), 摇床上室温孵育 1.5 h, TBST 清洗 3 次, PBS 清洗 1 次,化学发光成像分析仪扫描膜,采集图像显影。Image J 软件分析目的条带灰度值。

1.4.6 脱靶位点验证 根据 gRNA1 (CGCTATGCTCCCTGCACTCCTGG) 和 gRNA2 (CTGGCAGTGACTGCCGATGGAGG) 在 CCTop 网站上预测出 10 个可能存在的脱靶位点(图2), 随机选择3个预测

Sequence: CGCTATGCTCCCTGCACTCCTGG

Efficacy score by CRISPRater: 0.53 LOW

Oligo pair with 5' extension fwd: TAggCGCTATGCTCCCTGCACTCC rev: AAACGGAGTGCAGGAGCATAGCG

Oligo pair with 5' substitution fwd: TAggCTATGCTCCCTGCACTCC rev: AAACGGAGTGCAGGAGCATAG

Top 20 offtarget sites out of 85 (including on target; for full list see xls file)

Coordinates	strand	MM	target seq	PAM	distance	gene name	gene id
chr17:48348399-48348421	+	0	CGCTATGC [TCCTTGCACCTC]	TGG	0	E Trem2	ENSMUSG00000023992
chr14:64197692-64197714	+	4	TCATCTGC [TCCTTGCACCTC]	CGG	12714	I Msra	ENSMUSG00000054733
chr14:32620180-32620202	-	3	CTCTCAGC [TCCTTGCACCTC]	AGG	8533	I Prxl1	ENSMUSG00000041730
chr11:98004970-98004992	+	4	CCTCATGT [TCCTTGCACCTC]	AGG	0	E Cacnb1	ENSMUSG00000020882
chr18:66647810-66647832	+	4	CACAGTGT [TCCTTGCACCTC]	TGG	28529	Gm22219	ENSMUSG00000088187
chr18:75645671-75645693	+	4	CTCTTTCT [TCCTTGCACCTC]	AGG	8333	I Ctif	ENSMUSG00000052928
chr12:90739157-90739179	-	4	CTTTCTGC [TCATCGCACTCC]	TGG	719	I Dio2	ENSMUSG00000007682
chr13:34659430-34659452	-	4	CTCTGGGC [TTCTCGCACTCC]	AGG	173	I Gm15908	ENSMUSG00000086786
chr1:163829273-163829295	+	4	CCCAAGC [TCATCGCACTCC]	TGG	0	E Kifap3	ENSMUSG00000026585
chr9:111516879-111516901	+	4	CCCAATGC [CACTCGCACTCC]	AGG	27103	Gm42523	ENSMUSG000000106647

Sequence: CTGGCAGTGACTGCCGATGGAGG

Efficacy score by CRISPRater: 0.74 MEDIUM

Oligo pair with 5' extension fwd: TAggCTGGCAGTGACTGCCGATGG rev: AAACCCATCCGAGTCACTGCCAG

Oligo pair with 5' substitution fwd: TAggGGCAGTGACTGCCGATGG rev: AAACCCATCCGAGTCACTGCC

Top 20 offtarget sites out of 92 (including on target; for full list see xls file)

Coordinates	strand	MM	target seq	PAM	distance	gene name	gene id
chr17:48351220-48351242	+	0	CTGGCAGT [GACTGCCGATGG]	AGG	29	I Trem2	ENSMUSG00000023992
chr10:80176307-80176329	-	4	GGTTCAGT [GACTGCCGATGG]	TGG	1161	-1600002K03Rik	ENSMUSG00000035595
chr16:29787188-29787210	-	4	ACAGCCGT [GACTGCCGATGG]	AGG	23848	Gm26834	ENSMUSG000000097307
chr14:40427779-40427801	-	4	ATAGCAGC [CACTGCCGATGG]	TGG	1769	-Irlr1	ENSMUSG00000026069
chr9:4548945-4548967	-	4	CTGTCTCT [GGCTGCCGATGG]	AGG	11126	I Gria4	ENSMUSG00000025892
chr1:86956130-86956152	+	2	CTGGAAGT [GACTGTGGATGG]	GGG	3591	I Dis3l2	ENSMUSG000000053333
chr15:83657624-83657646	+	3	GTTCGAGT [GACTGTGGATGG]	TGG	1380	I Scube1	ENSMUSG000000016763
chr2:137229562-137229584	+	2	CTGCCAGT [GACTGTGGATGG]	TGG	29830	Gm28214	ENSMUSG000000099683
chr4:47651190-47651212	-	4	CACCCAGT [GACTGTGGATGG]	GGG	47182	Gm27668	ENSMUSG000000098518
chr12:58216845-58216867	+	4	CTCACAT [GACTACGGATGG]	GGG	2401	-Sstr1	ENSMUSG000000035431

图2 预测的脱靶位点

Fig.2 Predicted off-target sites

的脱靶位点进行引物设计,提取小鼠尾部 DNA 经 PCR 扩增后进行 Sanger 测序。10 个预测的脱靶位点见图 2,引物序列见表 2。

表 2 脱靶位点引物序列	
Tab.2 Off-target site primer sequences	
Genes	Sequences of primers (5'-3')
<i>Msra</i>	F: AAGTCACCTCAGTCCATGCA R: GATGCAGCACAGGAAACACA
<i>Gm22219</i>	F: CAGTGTGCAGTTGTGTCGAA R: CAGGCTAAGAGCGCTATCCA
<i>Ctlf</i>	F: ATCCCCATGCCTTGACTGA R: CATTGCTCTCCCTTCCCCT
<i>1600002K03Rik</i>	F: GGTCTAGTCCCTGGAGCTG R: GAACTGCAATTACCCCTGC
<i>Dis3l2</i>	F: ATGTGGCTTCCCTTGACTCA R: CCCCAATTCAAGGCAGCTT
<i>Gm28214</i>	F: AAAGCTGCTAGAGGGCAAT R: ACGAGCTGCAGCATCTATGG

1.5 统计学处理 采用 GraphPad Prism 10 软件进行数据分析以及统计图表的制作,数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *TREM2*^{-/-} 小鼠的构建及鉴定 将 sgRNA 与 Cas9 的混合物显微注射入 C57BL/6J 小鼠受精卵中,获得 F0 代小鼠。新生小鼠 2 周龄时提取尾部 DNA,与引物 Wild type、Common、Mutant 进行 PCR 反应,最后通过琼脂糖凝胶电泳分析目的条带。鉴定结果显示,仅扩增出 415 bp 条带的小鼠基因型为 WT 型;仅扩增出 449 bp 条带的小鼠基因型为 *TREM2*^{-/-};扩增出 415 bp 和 449 bp 双条带的小鼠基因型为杂合型,见图 3。

2.2 *TREM2*^{-/-} 小鼠组织中 *TREM2* 的 mRNA 表达水平 通过 qPCR 检测 *TREM2* 在不同组织中的 mRNA 表达水平。结果显示,与 WT 小鼠相比, *TREM2*^{-/-} 小鼠的心脏、脑组织中 *TREM2* 的 mRNA 表达水平均下调 ($P < 0.01$),胸腺、肺组织中 *TREM2* 的 mRNA 表达也呈现下降趋势 ($P < 0.05$),与基因鉴定结果一致,见图 4。

2.3 *TREM2*^{-/-} 小鼠组织以及 PBMC 中 *TREM2* 的蛋白表达水平 通过 Western blot 检测 *TREM2* 在不同组织中以及 PBMC 中的蛋白表达水平。结果显示,与 WT 小鼠相比, *TREM2*^{-/-} 小鼠组织以及 PBMC 中 *TREM2* 的蛋白表达水平均降低 ($P < 0.01$),

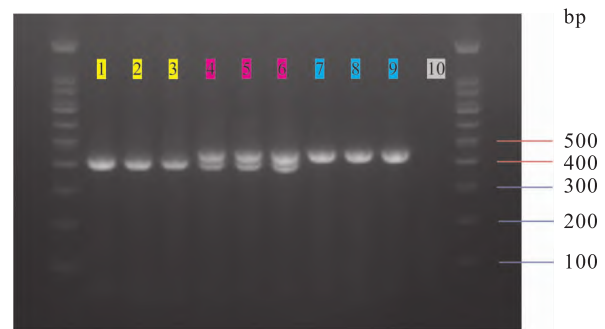


图 3 小鼠基因型鉴定结果

Fig.3 Mouse genotype identification results

Only 415 bp bands were amplified in lanes 1 – 3. They were identified as WT mice; Lanes 4 – 6 amplified 415 bp and 449 bp double bands. They were identified as heterozygous mice; Only 449 bp bands were amplified in lanes 7 – 9. They were identified as *TREM2*^{-/-} mice. Lane 10 was a blank control.

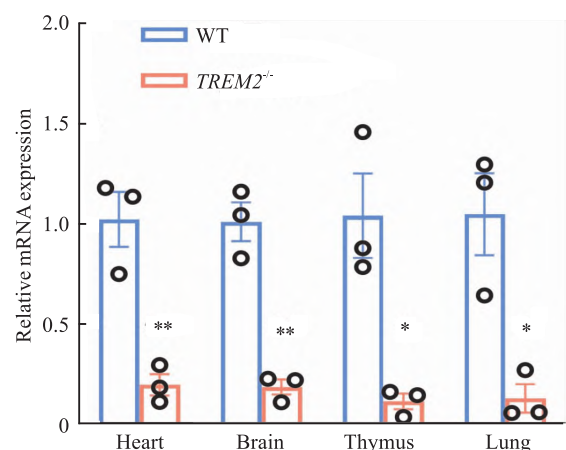


图 4 WT 小鼠和 *TREM2*^{-/-} 小鼠不同组织中 *TREM2* 的 mRNA 表达水平

Fig.4 mRNA expression levels of *TREM2* in different tissues of WT mice and *TREM2*^{-/-} mice

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the WT group.

与基因鉴定结果一致,由此可以进一步说明 *TREM2*^{-/-} 小鼠构建成功,见图 5。

2.4 脱靶位点验证 根据 gRNA1 序列预测的脱靶位点如下: *Msra*, 5'-TCATCTGCTCCCTGCACTCCCGG-3'; *Gm22219*, 5'-CACAGTGTTCCTGCACTCCTGG-3'; *Ctlf*, 5'-CTCTTTCTTCCCTGCACTCCAGG-3'。根据 gRNA2 序列预测的脱靶位点如下: *1600002K03Rik*, 5'-CCACCATCCGCAGTCACTGAACC-3'; *Dis3l2*, 5'-CTGGAAGTGAAGTGTGGATGGGGG-3'; *Gm28214*, 5'-CTGC-CAGTGAAGTGTGGATGGGGG-3'。Sanger 测序结果表明 *TREM2*^{-/-} 小鼠没有产生脱靶效应,见图 6。

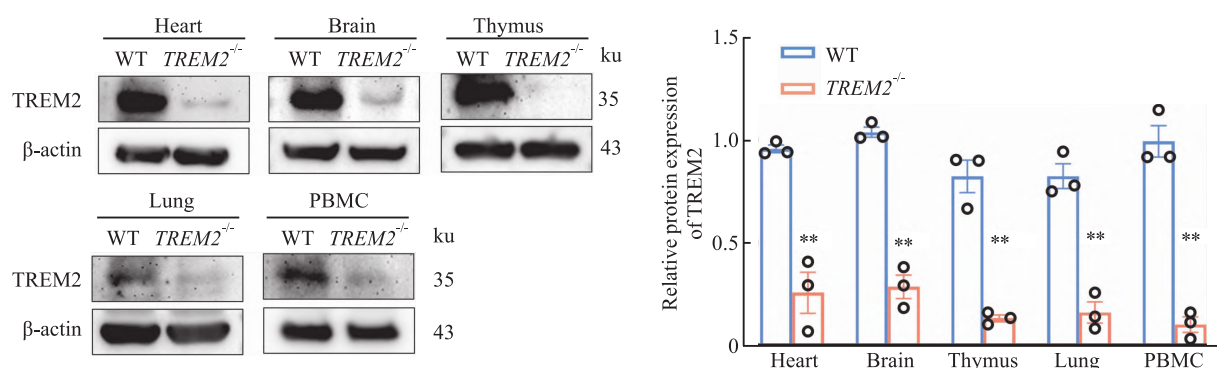
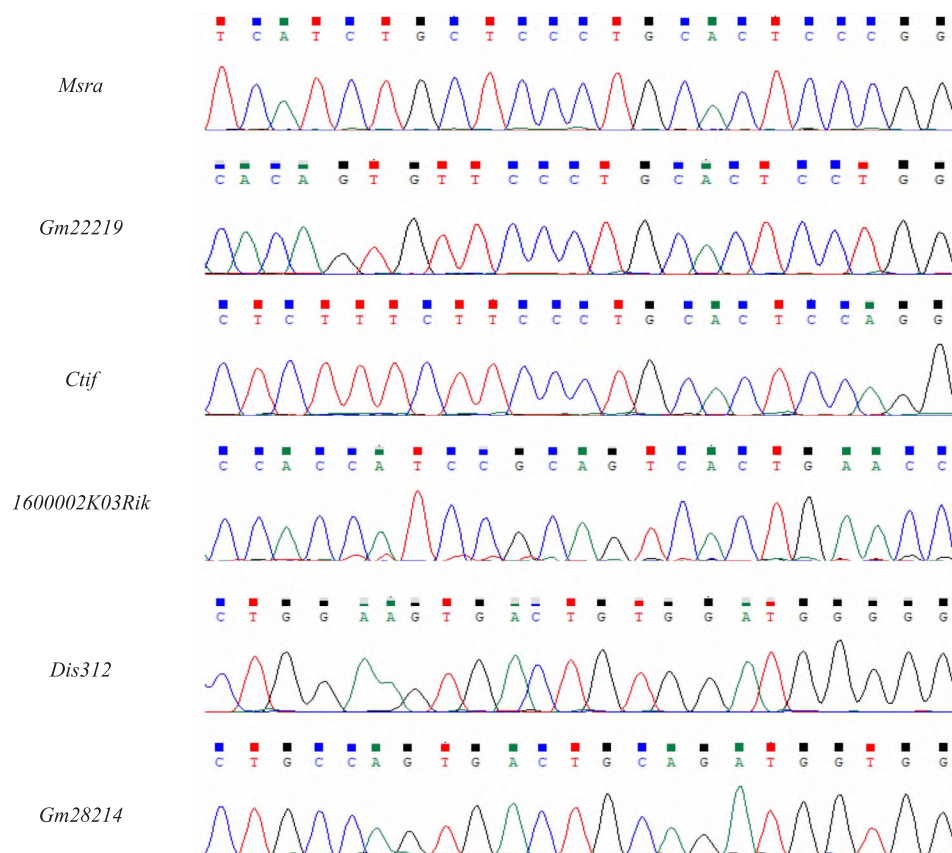
图5 WT小鼠和 *TREM2*^{-/-}小鼠不同组织中 *TREM2* 的蛋白表达水平Fig. 5 Protein expression levels of *TREM2* in different tissues of WT mice and *TREM2*^{-/-} mice** $P < 0.01$ vs the WT group.

图6 Sanger 测序结果

Fig. 6 Sanger sequencing results

3 讨论

TREM2 是一个极其重要的免疫靶点,主要在髓系细胞上表达,在基底节、脾脏、延髓和脊髓中的表达最丰富,是一种主要表达在小胶质细胞上的免疫反应受体,参与调控小胶质细胞的数量、吞噬、细胞因子释放和代谢功能。迄今为止,越来越多的证据表明 *TREM2* 在阿尔茨海默病、多发性硬化症和

帕金森病中具有神经保护作用^[8-10]。

目前关于 *TREM2* 基因敲除的影响已经得到了广泛研究,*TREM2* 的激活可以调节增殖,抑制炎症细胞因子的产生,促进细胞存活,并有利于凋亡神经元的吞噬作用^[11]。在阿尔茨海默病中,*TREM2* 的减少会加速衰老和神经丧失的过程,最后,它会降低小胶质细胞活性并导致神经炎症^[12]。在骨关节炎中,*TREM2* 缺陷加剧炎症反应并抑制了巨噬细胞

M2 极化,同时加剧了软骨细胞凋亡并抑制了它们的增殖,从而破坏了软骨细胞的正常功能^[13]。在创伤性脑损伤过程中,*TREM2* 敲除消除了 COG1410(一种 *TREM2* 激动剂)对血管表型和小胶质细胞状态的影响,COG1410 的神经保护作用被 *TREM2* 耗竭抑制,*TREM2* 激活可能会减轻受控皮质冲击后的神经损伤^[14]。在这些疾病情况下,*TREM2* 作为病理学诱导的免疫信号枢纽,可响应组织损伤,并进行免疫重塑,在疾病发展回归中,发挥不可替代的作用。

CRISPR/Cas9 技术是一种基因编辑方法,利用 Cas9 核酸酶与 sgRNA 一起被递送到细胞中,sgRNA 引导 Cas9 核酸酶到基因组中的特定位置,并促使 Cas9 在该位置切割 DNA 双链。细胞修复切割产生的 DNA 断裂时,可以引入突变,从而实现基因的敲除、插入或替换,实现对基因的精确修改。相对于传统方法,该技术具有高效性、灵活性、精确性以及更为经济等多种优势,是近年来生物学和医学领域最重大的革命之一。基因组编辑已经成为生命科学和人类医学的变革性力量,提供了前所未有的机会来剖析复杂的生物过程并从根本上治疗遗传疾病^[15]。根据 *TREM2* Gene ID (83433) 小鼠基因组序列信息,发现 *TREM2* 基因包含 5 个外显子,根据 sgRNA 设计原则以及 *TREM2* 基因的结构,选择外显子 2 ~ 3 作为敲除区域,利用 CRISPR/Cas9 技术敲除 *TREM2* 基因以获得 *TREM2*^{-/-} 小鼠。

综上所述,该研究对 *TREM2*^{-/-} 小鼠的构建方法进行了详细阐述,同时建立了一种可靠的基因型鉴定方法,并通过 qPCR、Western blot 及 Sanger 测序分析,验证了小鼠模型遗传的稳定性,可用于未来对小鼠不同疾病研究提供动物模型基础。

参考文献

- [1] Zhong L, Sheng X, Wang W, et al. *TREM2* receptor protects against complement-mediated synaptic loss by binding to complement C1q during neurodegeneration [J]. *Immunity*, 2023, 56(8): 1794–808. e8. doi:10.1016/j.immuni.2023.06.016.
- [2] Boza-Serrano A, Ruiz R, Sanchez-Varo R, et al. Galectin-3, a novel endogenous *TREM2* ligand, detrimentally regulates inflammatory response in Alzheimer's disease [J]. *Acta Neuropathol*, 2019, 138(2): 251–73. doi:10.1007/s00401-019-02013-z.
- [3] Cheng X, Wang X, Nie K, et al. Systematic pan-cancer analysis identifies *TREM2* as an immunological and prognostic biomarker [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 646523. doi:10.3389/fimmu.2021.646523.
- [4] Qin Q, Teng Z, Liu C, et al. *TREM2*, microglia, and Alzheimer's disease [J]. *Mech Ageing Dev*, 2021, 195: 111438. doi:10.1016/j.mad.2021.111438.
- [5] Du Y, Liu Y, Hu J, et al. CRISPR/Cas9 systems: Delivery technologies and biomedical applications [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2023, 18(6): 100854. doi:10.1016/j.ajps.2023.100854.
- [6] Bao A, Burritt D J, Chen H, et al. The CRISPR/Cas9 system and its applications in crop genome editing [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2019, 39(3): 321–36. doi:10.1080/07388551.2018.1554621.
- [7] 蒋吉, 胡姗姗, 魏伟. 血管紧张素 II 2 型受体基因敲除小鼠的构建、繁育和基因型鉴定 [J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(8): 1236–40. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.08.013.
- [7] Jiang J, Hu S S, Wei W. Breeding, building and genotyping identification of Angiotensin II type 2 receptor knockout mice [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2021, 56(8): 1236–40. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.08.013.
- [8] Li R Y, Qin Q, Yang H C, et al. *TREM2* in the pathogenesis of AD: a lipid metabolism regulator and potential metabolic therapeutic target [J]. *Mol Neurodegener*, 2022, 17(1): 40. doi:10.1186/s13024-022-00542-y.
- [9] Cignarella F, Filipello F, Bollman B, et al. *TREM2* activation on microglia promotes myelin debris clearance and remyelination in a model of multiple sclerosis [J]. *Acta Neuropathol*, 2020, 140(4): 513–34. doi:10.1007/s00401-020-02193-z.
- [10] Huang P, Zhang Z, Zhang P, et al. *TREM2* deficiency aggravates NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis in MPTP-induced Parkinson's disease mice and LPS-induced BV2 cells [J]. *Mol Neurobiol*, 2024, 61(5): 2590–605. doi:10.1007/s12035-023-03713-0.
- [11] Deczkowska A, Weiner A, Amit I. The physiology, pathology, and potential therapeutic applications of the *TREM2* signaling pathway [J]. *Cell*, 2020, 181(6): 1207–17. doi:10.1016/j.cell.2020.05.003.
- [12] Zhu B, Liu Y, Hwang S, et al. Trem2 deletion enhances tau dispersion and pathology through microglia exosomes [J]. *Mol Neurodegener*, 2022, 17(1): 58. doi:10.1186/s13024-022-00562-8.
- [13] Fang C, Zhong R, Lu S, et al. *TREM2* promotes macrophage polarization from M1 to M2 and suppresses osteoarthritis through the NF-κB/CXCL3 axis [J]. *Int J Biol Sci*, 2024, 20(6): 1992–2007. doi:10.7150/ijbs.91519.
- [14] Yan J, Zhang Y, Wang L, et al. *TREM2* activation alleviates neural damage via Akt/CREB/BDNF signalling after traumatic brain injury in mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 289. doi:10.1186/s12974-022-02651-3.
- [15] Wang S W, Gao C, Zheng Y M, et al. Current applications and future perspective of CRISPR/Cas9 gene editing in cancer [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 57. doi:10.1186/s12943-022-01518-8.

Construction, breeding, and gene identification of *TREM2* knockout mice

Huang Rong^{1,2}, Zhao Xinxin^{1,2}, Xue Hui³, Zhu Mengjuan³, Tu Jiajie³, Wang Xinming^{1,2}

(¹School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²Dept of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

³Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract **Objective** To construct triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (*TREM2*) gene knockout (*TREM2*^{-/-}) mice using CRISPR/Cas9 technology, to breed *TREM2*^{-/-} mice and to analyze the genotype of *TREM2*^{-/-} mice. **Methods** CRISPR/Cas9 technology was used to selectively knock out exon 2 – 3 regions of *TREM2* gene to construct a *TREM2*^{-/-} mouse model, and the genetic background of all mice was C57BL/6J. Polymerase chain reaction (PCR) was used to identify the genotype of mice. Quantitative real-time PCR (qPCR) and Western blot were used to detect the expression level of *TREM2* in major tissues of mice, and the authenticity and scientific nature of PCR identification results were verified from mRNA level and protein level. According to the sgRNA sequence, the possible off-target sites were predicted on the CCTop website, and the tail DNA of mice was extracted and amplified by PCR and then Sanger sequencing was performed to detect whether there was off-target effect in *TREM2*^{-/-} mice. **Results** *TREM2*^{-/-} mice were successfully constructed by CRISPR/Cas9 technology, and the mice were genotyped. The results of agarose gel electrophoresis showed that the mouse genotype with only 415 bp band amplified was wild type (WT), the mouse genotype of the 449 bp band amplified only was *TREM2*^{-/-}, and the mouse genotypes amplified with 415 bp and 449 bp double bands were heterozygous. qPCR results showed that compared with WT mice, the mRNA expression of *TREM2* in heart and brain tissues of *TREM2*^{-/-} mice was down-regulated ($P < 0.01$), and the mRNA expression of *TREM2* in thymus and lung tissues also showed a downward trend ($P < 0.05$). Western blot results showed that compared with WT mice, the protein expression level of *TREM2* in heart, brain, thymus, lung tissues and peripheral blood mononuclear cell (PBMC) of *TREM2*^{-/-} mice was reduced ($P < 0.01$). Sanger sequencing results showed no off-target effects in *TREM2*^{-/-} mice. **Conclusion** *TREM2*^{-/-} mice are successfully constructed and bred, a reliable genotype identification method is established, the genetic stability of the mouse model is verified, which will provide an important genetic animal model for the study of *TREM2* gene function.

Key words triggering receptor expressed on myeloid cells 2; CRISPR / Cas9; gene knockout; polymerase chain reaction; agarose gel electrophoresis; genotype identification

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82104185); Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2022AH051153); Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 2008085QH400); Open Project of Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, at Anhui Medical University (No. KFJJ-2020-03); Scientific Research Project of Anhui Medical University (No. 2021xkj148)

Corresponding authors Wang Xinming, E-mail: wangxinming@ahmu.edu.cn; Tu Jiajie, E-mail: tujiajie@ahmu.edu.cn