

微小 RNA-22-3p 基因敲除小鼠的构建、繁育和基因鉴定

王安琪,张慧茹,周园园,刘 崇,陈义昭,涂佳杰
(安徽医科大学药理学科学学院,合肥 230032)

摘要 目的 采用 CRISPR/Cas 9 技术构建微小 RNA-22-3p(miR-22)基因敲除(miR-22^{-/-})小鼠,繁育 miR-22^{-/-}小鼠并鉴定其基因型。方法 使用 CRISPR/Cas 9 技术,构建 miR-22^{-/-}基因工程小鼠,基因鉴定 F0 代 miR-22^{-/-}小鼠后,待其性成熟后与同窝野生型小鼠交配得 F1 代 miR-22^{-/-}小鼠,通过实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)从 RNA 水平上分析 miR-22 敲除效率。蛋白质印迹法(Western blot)检测 miR-22 与靶基因的相互作用。结果 利用 CRISPR/Cas 9 技术成功构建了 miR-22^{-/-}小鼠,对繁育获得的小鼠进行了基因鉴定,鉴定出了 miR-22^{+/+}、miR-22^{+/-}、miR-22^{-/-}三种稳定的基因型。qPCR 检测结果证实 miR-22^{-/-}小鼠与同窝野生型小鼠比较,心、肝、肺、肾、脾、胸腺六种组织中几乎不表达 miR-22。Western blot 检测出 miR-22^{-/-}小鼠组织中的 NLRP3 蛋白的相对表达量低于野生型小鼠。结论 成功构建了 miR-22^{-/-}小鼠模型,并得到稳定遗传的纯合 miR-22^{-/-}小鼠。miR-22 对下游靶基因 NLRP3 有抑制作用。

关键词 miR-22;CRISPR/Cas 9;基因敲除;聚合酶链式反应;琼脂糖凝胶电泳;基因型鉴定;NLRP3

中图分类号 R 394.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2025)06-1052-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.06.011

miR-22 是一种非编码 RNA,长度约为 22 nt,可以抑制 mRNA 的表达^[1]。微小 RNA(microRNA, miRNA)是一类保守的非编码 RNA,被广泛认为是各种生物过程中的重要调节剂^[2]。课题组先前的研究中实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)检测的结果显示 miR-22 在类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)患者滑膜组织上的表达较骨关节炎(osteoarthritis, OA)患者滑膜组织上的表达下降明显,提示 miR-22 可能抑制 RA 的发展^[3]。该研究旨在构建出 miR-22^{-/-}基因工程小鼠,并对 miR-22^{-/-}小鼠进行了繁殖、基因鉴定以及 qPCR 检测等实验,为进一步研究 miR-22 在疾病发病机制中发挥的作用提供实验动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物 12 只 7 周龄 C57 BL/6 J 鼠,雄性 6 只,雌性 6 只,体质量为(25±2)g,购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司,于安徽医科大学临床药

理研究所 SPF 级实验室饲养繁育小鼠(伦理编号: PZ-2020-049)。

1.2 主要试剂 SuperRed/GelRed 核酸染料(货号:BS354B)水溶液购于合肥 Biosharp 生物技术有限公司;NLRP3 抗体(货号:ab263899)购于英国 Abcam 公司;三色预染蛋白 marker(货号:WJ103)购于上海雅酶生物医药科技有限公司;琼脂糖凝胶购于法国 Biowest 公司;DNA marker(货号:MD112)购于北京博迈德生物基因技术有限公司;Hairpin-itTM microRNA and U6 snRNA Normalization RT-PCR Quantitation kit(货号:E22001)购于苏州吉玛生物科技有限公司。

1.3 主要仪器 通用型电泳仪(型号:DYY-7 C)购自北京六一生物科技有限公司;荧光定量 PCR 仪(型号:CFX Connect)购自上海伯乐生命医学产品有限公司;化学发光成像分析仪(型号:Amersham WB system)购自美国 GE health care 公司。

1.4 方法

1.4.1 miR-22^{-/-}小鼠的获得 根据 Gene ID (T017691)小鼠的基因组序列信息,将 miR-22-201 转录本的外显子 1 作为敲除区域(敲除序列见江苏集萃药康公司官网:https://cn.gempharmatech.com/shop/productDetails/43279),敲除该区域得到 miR-22^{-/-}小鼠。在 C57BL/6J GPT 小鼠受精卵中显微注射 CAS9 和向导 RNA(single guide RNA,

2025-04-11 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:王安琪,女,硕士研究生;

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

sgRNA)进行同源重组,得到 F0 代小鼠。确认小鼠基因型后对其进行科学交配,获得 F1 代小鼠的稳定遗传性模型。

1.4.2 *miR-22*^{-/-} 小鼠的饲养和繁育 *miR-22*^{-/-} 小鼠于 SPF 级动物实验室内饲养和繁殖。饲养严格控制温度、湿度、昼夜交替时间,所有小鼠所需的饲料、垫料、笼具以及蒸馏水等都经过高温高压灭菌,并在饲养期间每隔 3 d 更换小鼠垫料 1 次,全面监测小鼠每日饮水、饲料以及垫料的补给情况。F1 代敲基因鼠被繁育出来后,等到其性成熟后与同窝野生型(Wide type, WT)小鼠进行合笼繁殖,以进行后续实验操作。

1.4.3 基因型鉴定

1.4.3.1 鼠尾 DNA 提取 F1 小鼠生长到 20 d 左右时,在小鼠尾巴末端剪下约 2~4 mm 长的尾尖部分;将剪下来的鼠尾放置于无酶的 1.5 ml EP 管中,加入 50 μl A 液(10 ml 蒸馏水 + 50 μl 5 mol/L NaOH + 4 μl pH 8.0 EDTA),鼠尾应完全没于 A 液液面下方,95 ℃煮 30 min;向 EP 管中加入 50 μl B 液(10 ml 蒸馏水 + 400 μl 1 mol/L pH 8.0 Tris HCl),涡旋混匀;2 500 r/min 离心 5 min;吸取上清液用作 DNA 逆转录的模板。

1.4.3.2 PCR 扩增反应 实验用引物由通用生物(安徽)股份有限公司合成。基因敲除(knockout, KO)及 WT 引物序列及扩增反应程度见表 1、2。

表 1 *miR-22*^{-/-} 小鼠基因鉴定 PCR 反应引物序列

Tab.1 Primer sequences for *miR-22*^{-/-} mice gene identification

Primer name	Primer sequences (5'-3')
T017691-KO-F1	TTCATTCGCGAGCTCGTGCCTC
T017691-KO-R1	GAAGGACAACAGTTTCATGTGAAGAGC
T017691-WT-F2	AGAAGCTGTCATGGTGCCAGAGAG
T017691-WT-R2	TGGTTCTGCACAGTCAGTCCAAG

1.4.3.3 琼脂糖凝胶电泳 取 100 ml 锥形瓶,向瓶中称取 1.2 g 琼脂糖溶解在 60 ml TAE 缓冲溶液中,加热至澄清透明后于琼脂糖溶液中加入 10 μl 核酸染料,摇匀后倒入模具中凝固;在电泳槽内放入凝固的凝胶。在每孔中加入待测的 DNA 样品,每个样本各 10 μl,其中 1 个孔中加入 5 μl DNA marker。电泳仪调至 120 V,电泳 40 min。紫外成像系统下观察分析每只小鼠的基因型,截图保存结果。

1.4.4 小鼠主要器官 *miR-22* 水平检测 在第 8 周时,将 F2 代小鼠禁食过夜,只供给适量饮用水,取同窝 WT 及 *miR-22*^{-/-} 纯合子小鼠心、肝、肺、肾、脾、

表 2 *miR-22*^{-/-} 小鼠基因鉴定 PCR 扩增反应程序

Tab.2 PCR amplification reaction program for *miR-22*^{-/-} mouse gene identification

Seg.	Temp (℃)	Time	Cycle
1	95	5 min	
2	98	30 s	20 ×
3	65 (-0.5 /cycle)	30 s	
4	72	45 s	
5	98	30 s	20 ×
6	55	30 s	
7	72	45 s	
8	72	5 min	
9	10	hold	

胸腺共 6 个脏器组织匀浆提取组织 RNA。将提取小鼠组织块放入 EP 管中,加入适量 PBS 清洗,每个 EP 管中加入 3~4 个小钢珠和 1 ml TRIzol 溶液,放入组织研磨机中研磨组织。研磨后取上清液放入新的 EP 管中,然后加入 200 μl 三氯甲烷,上下振荡后放入 4 ℃冰箱静置 5 min 后,观察其产生明显分层后以 1 200 r/min 离心 5 min。吸取上清液移至新的 EP 管中,加入与吸取的上清液等量异丙醇,充分混匀置于 4 ℃冰箱中静置 30 min 后离心,弃上清液,管底有白色沉淀为所需 RNA,加 1 ml 75% 乙醇清洗沉淀后离心弃上清液得到 RNA,加入 10 μl DEPC 水溶解后检测其浓度及纯度。根据表 3 miRNA 和 U6 逆转录体系将 RNA 逆转录为 cDNA,其余部分保存于 -80 ℃。

表 3 20 μl 逆转录体系加样量

Tab.3 Sample dosage of 20 μl reaction system for reverse transcription

Component	Final concentration	Volume (μl)
5 × RT Buffer	1 ×	4.00
dNTP (10 mmol/L)	0.375 mmol/L	0.75
U6 snRNA/miRNA RT primer mix (1 μmol/L)	60 nmol/L	1.20
RNase inhibitor (40 U/μl)	0.5 U/μl	0.25
MMLV Reverse Transcriptase (200 U/μl)	40 U	0.20
RNA Sample	1 μmol/L	X
RNase Free H ₂ O		Up to 20

配制反应体系:取 2 支新的 EP 管置于冰上,依照表 4 各组分的量分别配制 miRNA 和 U6 snRNA qPCR 两种反应体系;将配制的反应体系充分混匀,分别加入到对应的 8 连管内,加入逆转录的 *miR-22* 和 U6 的 cDNA,置于 PCR 仪器中,并按如下程序进行:预变性:95 ℃、3 min,PCR 反应(40 个循环):95 ℃、12 s,62 ℃、40 s(采集)。

1.4.5 Western blot 检测 *miR-22*^{-/-} 小鼠脏器组织

中 NLRP3 的表达 取 1.4.4 中同窝野生型及 *miR-22*^{-/-} 纯合子小鼠心、肝、肺、肾、脾、胸腺共 6 个脏器组织加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,4 ℃ 孵育 30 min 后离心取上清液。将上清液与 5 × 上样缓冲液按 4 : 1 混合,100 ℃ 加热 10 min 变性后保存于 -80 ℃。制备 10% 的分离胶和浓缩胶,加入蛋白样品及蛋白 marker。以电压 120 V 进行电泳,将电泳完毕的凝胶以 400 mA 恒定电流转膜 1 h。将膜置于快速封闭溶液中封闭 10 min。将膜放入对应的一抗工作溶液中,4 ℃ 孵育过夜。次日,采用 TBST 溶液清洗该膜 3 次,PBS 溶液清洗 1 次,每次清洗 7 min。随后,在二抗工作液中室温孵育 1.5 h,再以 TBST、PBS 溶液清洗。最后置于显影仪内进行化学发光成像。

表 4 染料法定量 PCR 20 μl 反应体系加样量		
Tab.4 Sample dosage of 20 μl reaction system for quantitative PCR with dye method		
Component	Final concentration	Volume (μl)
2 × Real-time PCR Master Mix (SYBR)	1 ×	10
miRNA/U6 snRNA specific Primer set (10 μmol/L)	0.2 μmol/L	0.4
ROX reference dye (50 ×)	1 ×	0.4
rTaq DNA polymerase(5 U/μl)	1 U	0.2
cDNA		2
RNase Free H ₂ O		Up to 20

1.5 统计学处理 使用 GraphPad PRISM 10 软件进行数据统计与分析,计量数据表示为均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)。多组之间采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两组之间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 获得 *miR-22*^{-/-} F0 代小鼠 C57BL/6 J 小鼠受精卵中,微量注射 sgRNA 和 CAS9 的混合物,获得数量约为 12 只的 1 ~ 12 的 F0 代小鼠,然后提取小鼠尾部 DNA,利用 sgRNA (CCGGTTACCGCGTTTCCCCCG 和 GGTACTTACCCTTACACCTGTGG) 在 CCTop 网站上预测出可能的脱靶位点,序列见表 5,对小鼠尾部 DNA 进行 PCR 扩增,得到的 PCR 扩增产物进行 Sanger 测序,测序结果(图 1)说明并无脱靶效应。其次对小鼠尾部 DNA 进行 PCR 扩增验证,与 KO 引物和 WT 引物分别进行 PCR 扩增反应,然后通过琼脂糖凝胶电泳对目的条带进行分析。如果 DNA 与 KO 引物进行 PCR 扩增后有条带,与 WT

引物进行 PCR 后无条带则为纯合子,为 338 bp;若相反则为 WT,为 351 bp;两个 PCR 中均有条带则为杂合子,具体鉴定结果见图 2。由图可知,红色纯合子编号为 7、10;黄色杂合子编号为 1、2、4、5、6、8、9、11、12;蓝色 WT 编号为 2。此实验成功获得遗传稳定的 F0 代 *miR-22*^{-/-} 小鼠。

表 5 <i>miR-22</i> ^{-/-} 小鼠预测的脱靶位点及序列	
Tab.5 <i>miR-22</i> ^{-/-} mice predicted off target sites and sequences	
Off target site	Sequences (5'-3')
Gm24131	GGTCAAGGGCCCCAAGGGGTAC
Kndc1	CTGGAGGGAACCTCGGGAACCTGG
Dnajc6	GGCCAAGGGCCCCAAGGGGTCCC
Letm2	TTTACTTTTCCTTACACCTGAGG
Gucd1	AGTACTACTGTACACCTGAGG
Acot10	TGTCCTATCCCTACACCTGGGG

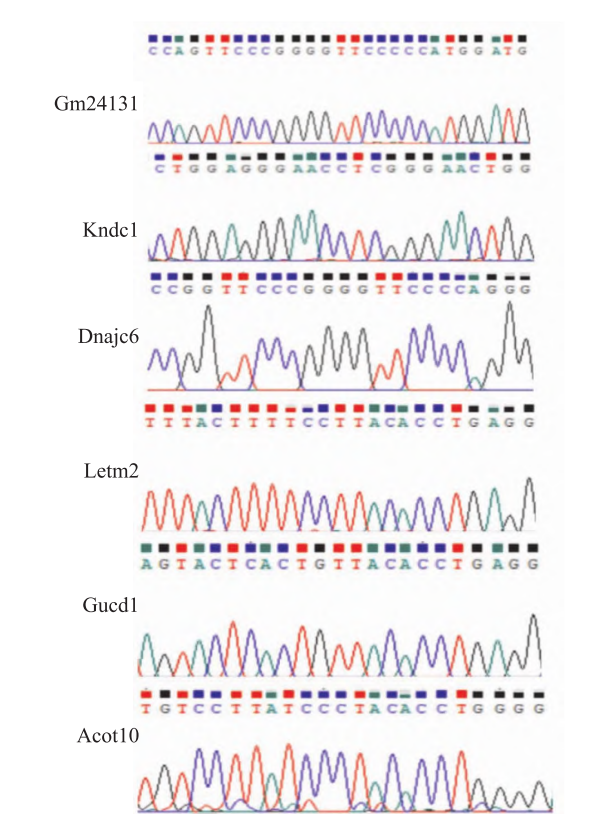


图 1 *miR-22*^{-/-} 小鼠尾部 DNA Sanger 测序结果
Fig.1 *miR-22*^{-/-} mice tail DNA Sanger sequencing results

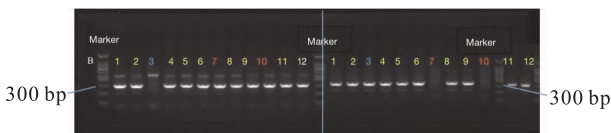


图 2 F0 代 *miR-22*^{-/-} 小鼠基因型鉴定
Fig.2 Genotyping identification of *miR-22*^{-/-} mice in F0 generation
PCR KO primer on the left, PCR WT primer on the right; B: Blank control, control without DNA template; 1 - 12: Numer of mice.

2.2 获得 $miR-22^{-/-}$ F1 代小鼠 将 F0 代中 9 只杂合子小鼠按雌雄 3 : 1 的比例合笼后得到 22 只 F1 代小鼠, 编号为 13 ~ 34。基因鉴定后结果见图 3。由图可知, 红色为纯合子, 编号有 14、16、17、18、20、21、25、27、28、29、31; 黄色为杂合子, 编号有 13、15、22、23、24、30、32、34; 蓝色为 WT, 编号有 19、26、33。

2.3 $miR-22^{-/-}$ 小鼠的繁殖情况 将 F0 代 $miR-$

$22^{-/-}$ 小鼠与同窝 WT 小鼠繁育交配出 F1 代。母鼠的妊娠期 20 d 左右, 每胎平均 6 只小鼠, 成活率超过 98%。每只小鼠身体特征均无明显差异。

2.4 $miR-22^{-/-}$ 小鼠主要脏器内 $miR-22$ 表达情况

通过 qPCR 对 $miR-22^{-/-}$ 纯合子小鼠和野生型小鼠进行 $miR-22$ 表达的检测, 包括心、肝、肺、肾、脾、胸腺 6 个脏器, 结果见图 4。进一步从 RNA 水平上

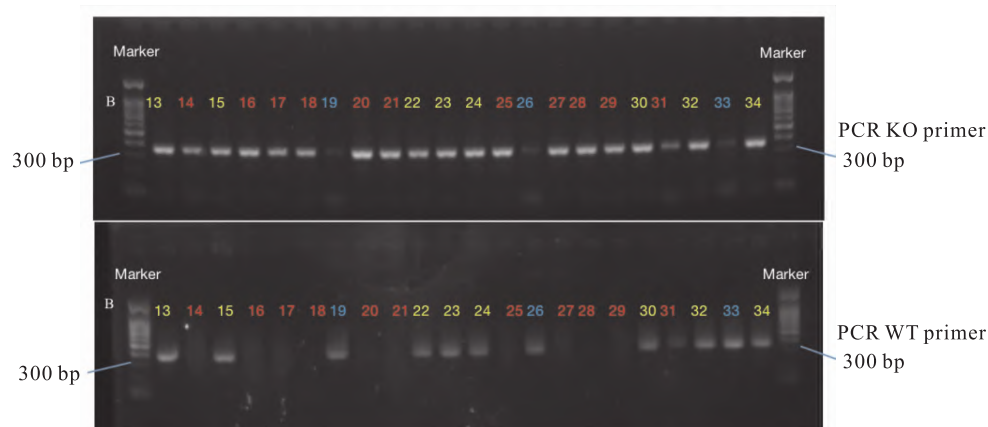


图 3 F1 代 $miR-22^{-/-}$ 小鼠 PCR 结果

Fig. 3 PCR results of $miR-22^{-/-}$ mice in F1 generation

13 - 34: Number of $miR-22^{-/-}$ mice in F1 generation; B: Blank control, control without DNA template.

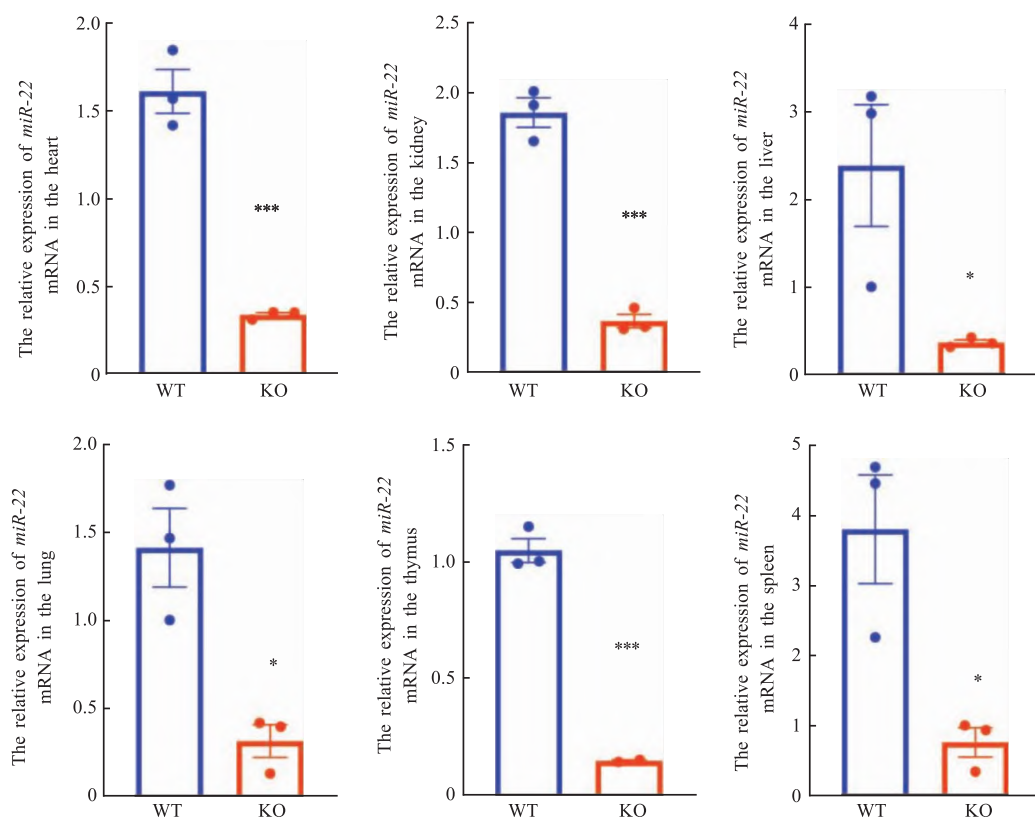


图 4 F2 代 $miR-22^{-/-}$ 纯合子小鼠与野生型小鼠 $miR-22$ 的表达

Fig. 4 The expression of $miR-22$ in F2 generation $miR-22$ gene knockout homozygous mice and wild-type mice

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs WT group.

验证了 PCR 鉴定结果的可靠性。

2.5 miR-22 下游靶基因的预测

2.5.1 生物信息学预测 miR-22 潜在的下游靶点

利用 miRDB 和 miRWalk 下游靶基因预测网站预测 miR-22 下游的靶基因,对两个网站的靶基因取交集见图 5,并结合研究方向及作用特点在交集中筛选得到了靶点为 *NLRP3*。

2.5.2 Western blot 检测 miR-22 对 *NLRP3* 的抑制作用 提取 *miR-22*^{-/-} 小鼠与同窝 WT 小鼠的心、肝、肺、肾、脾、胸腺共 6 个脏器组织约 50 mg,提取组织蛋白后,进行 Western blot 检测,检测结果如图 6 所示。结果显示 *miR-22*^{-/-} 小鼠比 WT 小鼠的 *NLRP3* 蛋白表达量升高,提示 *miR-22* 具有抑制 *NLRP3*

表达的作用。

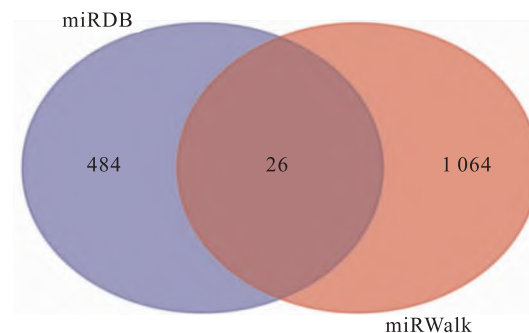


图 5 miRDB 和 miRWalk 靶点预测交集 Venn 图

Fig. 5 Intersection Venn diagram of miRDB and miRWalk target prediction

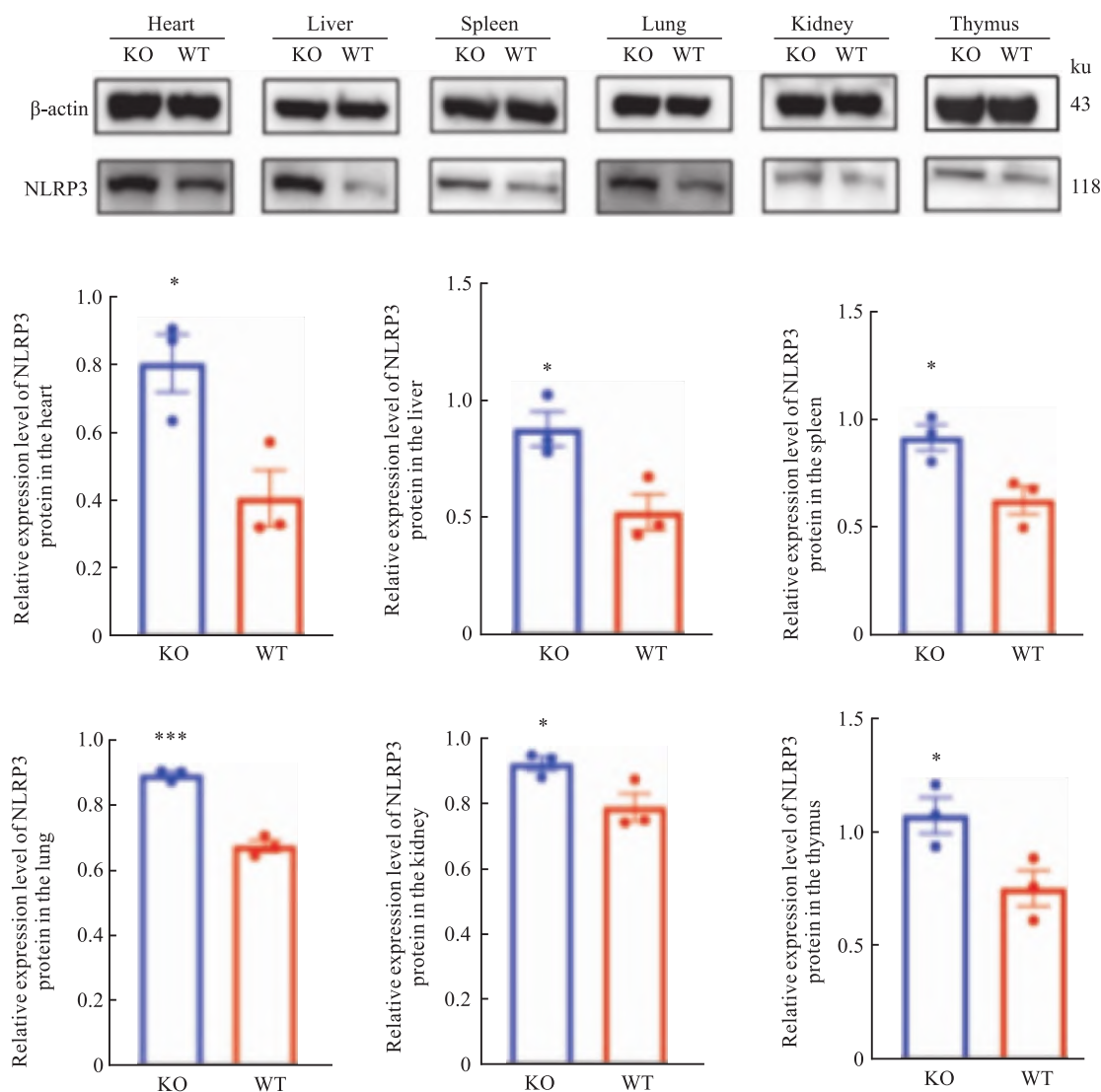


图 6 F2 代 *miR-22*^{-/-} 纯合子小鼠与 WT 小鼠 *NLRP3* 蛋白的相对表达量

Fig. 6 Relative expression levels of *NLRP3* protein between F2 *miR-22* gene knockout homozygous mice and wild-type mice

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs WT group.

3 讨论

miRNA 是一组调节基因表达的内源性非编码 RNA,其表达的改变导致涉及一系列生物过程的基因特征发生变化,引发许多人类疾病^[4],异常细胞的出现导致自身抗体的产生和免疫复合物的形成也对疾病的发展至关重要^[5]。miR-22 具有在不同疾病中呈现差异表达的特性。自身免疫性疾病具有复杂的发病机制和显著的临床表现异质性的特点^[6],RA 属于一种慢性自身免疫性疾病,容易导致炎症、疼痛和功能障碍^[6],RA 发病机制中涉及的途径也与 miRNA 的靶点有关^[7]。有实验^[8-9]预测,下游靶基因 *NLRP3* 在 RA 患者的滑膜中的表达有升高的趋势。*NLRP3* 炎症体是先天免疫系统的关键组成成分,它介导酪蛋白酶-1 激活和促炎细胞因子 IL-1 β /IL-18 的分泌,提示 *NLRP3* 过度活化与 RA 活性密切相关。研究^[10]表明,滑膜组织上的炎症指标可能与 RA 病程发展相互影响。为进一步揭示 miR-22 在 RA 中的功能角色,本次实验构建了基于 *miR-22*^{-/-} 小鼠的胶原抗体诱导的关节炎 (collagen-antibody-induced arthritis, CAIA) 模型,对比分析野生型及 *miR-22*^{-/-} 小鼠 6 种脏器中 RNA 和 *NLRP3* 蛋白的表达,结果显示 *miR-22* 基因敲除显著升高了 *NLRP3* 蛋白的表达,使得在一定程度上加重了 CAIA 的病征,提示 miR-22 可抑制 RA 病理进程的发展。此外,miR-22/*NLRP3* 轴在改善细胞凋亡中也发挥着重要作用,达格列净 (dapagliflozin, DAPA) 可能通过 miR-22/*NLRP3* 轴改善 ox-LDL 介导的内皮细胞焦亡^[11]。研究^[12]表明 miR-22 通过上调沉默信息调节因子 1 (silence information regulator1, SIRT1) 的表达有效提高了慢性阻塞性肺病大鼠的肺功能并减轻了肺损伤,提示 SIRT1 作为一种翻译后调节剂,可在调节炎症方面发挥作用^[13],miR-22/SIRT1 信号通路可以调节炎症的发生^[14]。有报道在巨噬细胞中 miR-22 过度表达从而抑制体内胶质瘤的形成^[15]。以上提示 miR-22 在多种机制中调节疾病发生发展。

研究^[2]表明,10-11 易位 3 (ten-eleven translocation 3, TET3) 通过促进 RA 中成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLS) 中靶点 *MTRNR2L2* 的启动子产生 5hmC 来发挥其促炎作用,作用成纤维细胞样 FLS 影响慢性炎症使 RA 患者的关节被破坏。本研究构建了 *miR-22*^{-/-} 小鼠,并对使用 PCR 琼脂糖凝胶成像获得的 *miR-22*^{-/-} 小鼠进行了基因

鉴定和脱靶位点的 PCR 扩增验证,验证了模型基因的稳定性;但在不同组织中 miR-22 的表达水平不同,在一定程度上可能存在一些转录和翻译差异。qPCR 结果表明,*miR-22*^{-/-} 纯合子小鼠的主要脏器中 miR-22 几乎不表达,此结果验证模型构建的可靠性和稳定性。Western blot 实验结果表明 miR-22 对 *NLRP3* 有抑制作用,miR-22 具有抑制 RA 发展的作用。

参考文献

- [1] Wang S, Cao X, Ge L, et al. miR-22-3p inhibits proliferation and promotes differentiation of skeletal muscle cells by targeting IGFBP3 in hu sheep [J]. *Animals (Basel)*, 2022, 12(1): 114. doi: 10.3390/ani12010114.
- [2] Wen W, Chen X, Huang Z, et al. miR-22-3p regulates muscle fiber-type conversion through inhibiting AMPK/SIRT1/PGC-1 α pathway [J]. *Anim Biotechnol*, 2021, 32(2): 254-61. doi: 10.1080/10495398.2020.1763375.
- [3] Fang Y, Huang W, Zhu X, et al. Epigenetic regulatory axis MIR22-TET3-MTRNR2L2 represses fibroblast-like synoviocyte-mediated inflammation in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2024, 76(6): 845-56. doi: 10.1002/art.42795.
- [4] Ho P T B, Clark I M, Le L T T. microRNA-based diagnosis and therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(13): 7167. doi: 10.3390/ijms23137167.
- [5] Negrini S, Emmi G, Greco M, et al. Sjögren's syndrome: a systemic autoimmune disease [J]. *Clin Exp Med*, 2022, 22(1): 9-25. doi: 10.1007/s10238-021-00728-6.
- [6] 武君珂, 张芳芳, 黄丽平, 等. 基于 *NLRP3* 介导细胞焦亡在类风湿性关节炎中的机制及中医药研究进展 [J]. *中草药*, 2024, 55(24): 8632-43. doi: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.24.030.
- [6] Wu J K, Zhang F F, Huang L P, et al. Mechanism of *NLRP3* mediated pyroptosis in rheumatoid arthritis and research progress in traditional Chinese medicine [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2024, 55(24): 8632-43. doi: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.24.030.
- [7] Ormseth M J, Solus J F, Sheng Q, et al. Development and validation of a microRNA panel to differentiate between patients with rheumatoid arthritis or systemic lupus erythematosus and controls [J]. *J Rheumatol*, 2020, 47(2): 188-96. doi: 10.3899/jrheum.181029.
- [8] Fu J, Wu H. Structural mechanisms of *NLRP3* inflammasome assembly and activation [J]. *Annu Rev Immunol*, 2023, 41: 301-16. doi: 10.1146/annurev-immunol-081022-021207.
- [9] Gao J, Zhang H, Yang Y, et al. Therapeutic potential of targeting the *NLRP3* inflammasome in rheumatoid arthritis [J]. *Inflammation*, 2023, 46(3): 835-52. doi: 10.1007/s10753-023-01795-5.
- [10] 陈阿圆, 许媛, 许和鹏, 等. 色氨酸-2, 3-双加氧酶 2 在类

- 风湿关节炎患者外周血单个核细胞和滑膜组织中的表达及意义[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(7): 1099–103. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2023.07.007.
- [10] Chen A Y, Xu Y, Xu H P, et al. Expression and significance of tryptophan-2, 3-dioxygenase 2 in peripheral blood mononuclear cells and synovial tissue in rheumatoid arthritis patients[J]. Acta Univ Med Anhui, 2023, 58(7): 1099–103. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2023.07.007.
- [11] 王 静. 达格列净通过 *miR*-22-3p/*NLRP3* 轴改善 ox-LDL 介导的内皮细胞焦亡的机制研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2022. doi: 10.27466/d.cnki.gzzdu.2022.004835.
- [11] Wang J. Dapagliflozin ameliorates ox-LDL-mediated endothelial cell pyroptosis via *miR*-22-3p/*NLRP3* axis: a mechanistic study[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2022. doi: 10.27466/d.cnki.gzzdu.2022.004835.
- [12] 白莉敏, 吕 行, 任引刚, 等. *miR*-22-3p 靶向抑制 SIRT1 信号通路加重慢性阻塞性肺疾病[J]. 山西医科大学学报, 2023, 54(7): 944–51. doi: 10.13753/j.issn.1007–6611.2023.07.010.
- [12] Bai L M, Lü X, Ren Y G, et al. *miR*-22-3p exacerbates chronic obstructive pulmonary disease by targetedly inhibiting SIRT1 signaling pathways[J]. J Shanxi Med Univ, 2023, 54(7): 944–51. doi: 10.13753/j.issn.1007–6611.2023.07.010.
- [13] Yang Y, Liu Y, Wang Y, et al. Regulation of SIRT1 and its roles in inflammation[J]. Front Immunol, 2022, 13: 831168. doi: 10.3389/fimmu.2022.831168.
- [14] Ren Y, Sun-Waterhouse D, Ouyang F, et al. Apple phenolic extracts ameliorate lead-induced cognitive impairment and depression- and anxiety-like behavior in mice by abating oxidative stress, inflammation and apoptosis via the *miR*-22-3p/SIRT1 axis[J]. Food Funct, 2022, 13(5): 2647–61. doi: 10.1039/d1fo03750a.
- [15] Tu J, Fang Y, Han D, et al. microRNA-22 represses glioma development via activation of macrophage-mediated innate and adaptive immune responses[J]. Oncogene, 2022, 41(17): 2444–57. doi: 10.1038/s41388–022–02236–7.

Construction, breeding, and gene identification of *microRNA*-22-3p knockout mice

Wang Anqi, Zhang Huiru, Zhou Yuanyuan, Liu Chong, Chen Yizhao, Tu Jiajie
(College of Pharmaceutical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To construct *microRNA* (*miR*)-22 gene knockout (*miR*-22^{-/-}) mice using CRISPR/Cas 9 technology, to breed *miR*-22^{-/-} mice and to identify their genotypes. **Methods** In this experiment, CRISPR/Cas 9 technology was used to construct *miR*-22^{-/-} genetically engineered mice. After gene identification, the F0 generation *miR*-22^{-/-} mice were mated with wild-type mice in the same litter to obtain F1 generation *miR*-22^{-/-} mice. The *miR*-22 knockout efficiency was analyzed at the RNA level by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Western blot was used to detect the interaction between *miR*-22 and target genes. **Results** *miR*-22^{-/-} mice were successfully constructed using CRISPR/Cas 9 technology, gene identification was performed on the bred mice, and three stable genotypes of *miR*-22^{+/+}, *miR*-22^{+/-}, and *miR*-22^{-/-} were identified. The real-time fluorescence quantitative PCR detection results confirmed that *miR*-22^{-/-} mice showed almost no expression of *miR*-22 in the heart, liver, lung, kidney, spleen, and thymus tissues compared to wild-type mice in the same litter. Western blot analysis showed that the relative expression level of *NLRP3* protein in *miR*-22^{-/-} mouse tissues was lower than that in wild-type mice. **Conclusion** A *miR*-22^{-/-} mouse model is successfully constructed, and stable genetic homozygous *miR*-22^{-/-} mice is obtained. This indicates that *miR*-22 has an inhibitory effect on the downstream target gene *NLRP3*.

Key words *miR*-22; CRISPR/Cas 9; gene knockout; polymerase chain reaction; agarose gel electrophoresis; genotype identification; *NLRP3*

Fund program Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2022AH020052)

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