

网络出版时间: 2025-06-30 14:03:31 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250630.0925.023>

◇基础医学研究◇

CCR2 基因敲除小鼠的构建及基因型鉴定

张慧茹, 王安琪, 刘崇, 周园园, 薛慧, 涂佳杰

(安徽医科大学药理学科学院, 临床药理研究所, 合肥 230032)

摘要 目的 探讨 C-C 趋化因子受体 2 型(CCR2) 基因敲除鼠的繁育和基因型分析, 验证聚合酶链式反应(PCR) 法对 CCR2 基因敲除鼠基因型检测的适用性。方法 将引进的 CCR2 纯合雄性小鼠和野生型雌性小鼠进行交配繁殖出子一代, 获得的 F1 代杂合子小鼠继续进行交配, 待小鼠 2 周龄时剪尾部组织提取 DNA, PCR 法扩增目的基因片段, 琼脂糖凝胶电泳进行基因型结果判定。通过遗传杂交, 提高产生携带 CCR2 基因敲除纯合子后代比例, 采用 Western blot 技术针对主要免疫细胞及关键脏器验证后代小鼠中 CCR2 基因的敲除效果, 使用流式细胞术针对主要免疫细胞检测 CCR2 基因的敲除对免疫系统功能是否有影响。结果 成功繁育并鉴定了 CCR2 基因敲除鼠, 得到了 3 种基因型的 F2 代小鼠: CCR2^{+/+}、CCR2^{+/-}、CCR2^{-/-}。通过 PCR 法鉴别了子代基因型, Western blot 显示 CCR2 基因敲除小鼠中 CCR2 蛋白表达极低。流式分析表明, CCR2 基因敲除会减少小鼠脾脏来源 T 细胞中 CD4⁺T 和 Th1 型细胞表达, 但不影响巨噬细胞功能。结论 正确的繁殖和鉴定是得到纯合 CCR2 基因敲除鼠的重要途径, PCR 法鉴别小鼠基因型具有简便、快捷、可靠的特点。

关键词 C-C 趋化因子受体 2 型; 基因敲除; 聚合酶链式反应; 基因型鉴定; 蛋白表达; 类风湿关节炎

中图分类号 R 593.22

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2025)07-1167-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.07.001

白细胞的组织募集是炎症的主要特征之一, 这一过程主要由趋化因子通过其在迁移细胞上的受体介导。C-C 趋化因子受体 2 型(C-C motif chemokine receptor type 2, CCR2) 属于 G 蛋白偶联受体家族, 是一种 7 次跨膜 G 蛋白偶联受体, 其主要在单核细胞、巨噬细胞、少量自然杀伤细胞和 T 细胞表面表达, 并介导淋巴细胞、血液来源的树突状细胞和单核巨噬细胞的迁移^[1-2]。在类风湿关节炎、急性心肌梗死、神经系统损伤和肝纤维化等多种复杂疾病过程中, CCR2 趋化因子因其关键性的调节作用而备受关注^[3-6]。为了深入解析 CCR2 的相关功能, 构建 CCR2 基因敲除模型则成为了一种强有力的研究手段, 可在整体动物水平上直接观察 CCR2 缺失所引发的生物学效应。该研究聚焦于 CCR2 基因敲除小鼠的繁育策略及其基因型鉴定方法的优化与探讨, 旨在通过进一步改进方法学, 为相关科研提供精准可靠的 CCR2 敲除动物模型, 以深入理解 CCR2 相关疾病发生发展机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 CCR2 基因敲除纯合子小鼠, 雄性 5 只, 7 周龄, 体质量(20 ± 2) g, C57BL/6J 遗传背景, 购自美国 Jackson 实验室; 野生型 C57BL/6J 小鼠, 雌雄各 10 只, 7 周龄, 体质量(20 ± 2) g, 购自苏州斯贝福生物技术有限公司。小鼠均饲养于安徽医科大学临床药理研究所 SPF 级动物房, 实验动物的饲养及操作严格遵循国标及安徽省实验动物饲养管理规范, 实验动物伦理号为 PZ-2020-009。

1.1.2 主要材料 pH = 8.0 Tris-HCl 溶液(货号: G2003-4, 北京索莱宝科技有限公司); pH8.0 EDTA 溶液、蛋白上样缓冲液、RIPA 蛋白裂解液(货号: E1170、P0015L、P0013C, 上海碧云天生物技术有限公司); 所用引物均由通用生物(安徽)股份有限公司合成; 2 × HotStrat Taq PCR Master Mix、核酸染料、100 bp Ladder DNA Marker、50 × TAE 电泳缓冲液(货号: MT205、EL108、MD111、EL102-01, 北京博迈德基因技术有限公司); 琼脂糖(货号: 1110GR100, 广州赛国生物科技有限责任公司); PBS 缓冲液(货号: B310KJ, 上海源培生物科技股份有限公司); CCR2 抗体(货号: WY-P80385, 美国 MCE 公司); β-

2025-03-26 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 82373877)

作者简介: 张慧茹, 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

actin 抗体(货号: #T0022, 美国 Affinity Biosciences 公司); ECL 化学发光试剂盒(货号: BL520B, 北京兰杰柯科技有限公司); 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*, GM-CSF) (货号: 315-02, 美国 Peprotech 公司); F4/80 和 CD4 流式抗体(货号: 123110、302604, 美国 Biolegend 试剂公司); IFN- γ 流式抗体(货号: 2851067, 美国 eBioscience 试剂公司)。

1.1.3 主要仪器 CO₂ 培养箱(型号: HF100, 上海力申科学仪器有限公司); PCR 扩增仪(型号: T100, 上海伯乐生命医学产品有限公司); 核酸定量仪(型号: DS-11, 德国 Eppendorf 公司); DYY-7C 型电泳仪(型号: DYY-7C, 北京六一生物科技有限公司); 全自动数码凝胶图像分析系统(型号: Tanon-1600, 上海天能科技有限公司); 艾本德离心机(型号: Centrifuge 5810, 德国 Eppendorf 公司)。十色流式细胞仪(型号: A00-1-1102, 美国贝克曼库尔特有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 CCR2 基因敲除小鼠的饲养及繁殖 CCR2 基因敲除小鼠饲养和繁殖均在安徽医科大学临床药理研究所实验动物中心 SPF 级动物房内。饲养温度维持在 18~22 °C, 湿度保持在 40%~70%, 确保明暗循环为 12 h/12 h, 以模拟自然光照条件。小鼠的居住空间、垫料、食物及水源均经过严格的高温高压消毒, 确保无菌状态。此外, 小鼠还定期获得灭菌葵花籽作为营养补充。每天进入 SPF 房观察并记录小鼠生长状况, 每周更换垫料 2 次, 并持续供应新鲜饲料与饮用水。为扩大实验群体, 初期采用纯合雄鼠与野生型雌鼠以 1:2 比例合笼繁殖, 利用小鼠约 8 周性成熟及 21 d 妊娠期的特点, 成功培育出 F1 代杂合子后, 再进一步以 1:2 比例合笼, 以期获得更多 F2 代小鼠用于后续检测与分析。

1.2.2 CCR2^{-/-} 小鼠基因鉴定 F1 代小鼠 2 周龄时, 剪取 3~5 mm 鼠尾至 1.5 mL EP 管中, 加 50 μ L 裂解液处理 [25 mmol/L NaOH, 0.2 mmol/L EDTA (pH=8.0)], 置于 95 °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, 按照逆转录试剂盒要求进一步扩增 cDNA, CCR2^{-/-} 小鼠基因鉴定引物序列详见表 1。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 8 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, 电泳条件: 120 V、45 min, 结束后至 Tanon 1600 全自动凝胶图像分析系统, 进一步观察凝胶图像^[7]。

表 1 CCR2^{-/-} 小鼠基因鉴定引物序列

Tab. 1 Primer sequences for CCR2^{-/-} mice gene identification

Primer name	Sequence (5'-3')
Wild type Forward	CACAGCATGAACAATAGCCAAG
Common	CCACAGAATCAAAGGAAATGG
Mutant Forward	CCTTCTATCGCCTTCTTGACC

1.2.3 小鼠免疫细胞分离 采用颈椎脱臼法处死小鼠, 将小鼠浸泡于 75% 乙醇中 5 min, 小心剥离小鼠腿部肌肉, 取下股骨和胫骨, 使用 0.9% 氯化钠溶液将骨髓冲洗至 15 mL 离心管中, 用 70 μ m 过滤筛网去除组织碎片, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入 1 mL 红细胞裂解液, 避光静置 5 min 后 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入含有 10 ng/mL 巨噬细胞集落刺激因子的 1640 培养基, 培养 7 d 获得骨髓来源巨噬细胞 (bone marrow-derived macrophages, BMDM); 剪开小鼠腹部皮肤, 露出腹膜, 将 6~8 mL 0.9% 氯化钠溶液注入小鼠腹腔, 轻轻按摩腹部 5 min 后用 1 mL 注射器将注入的 0.9% 氯化钠溶液吸出, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液即可获得腹腔原位巨噬细胞 (peritoneal macrophage, PM); 左手抓取小鼠双耳及颈后部皮肤, 以此固定住小鼠, 右手使用剪刀剪去小鼠胡须后, 轻压取血侧眼部皮肤, 使眼球充血突出, 用弯头镊夹取眼球并快速摘取, 使血液从眼眶内以不同速度垂直流入 1.5 mL 离心管中, 当血液流尽时, 用脱臼法处死小鼠, 将小鼠血样转移至 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分离液, 将稀释后的血样沿离心管内壁缓慢加入, 800 r/min 离心 30 min, 中间白膜层细胞即为外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。随后分离小鼠的脾脏和肺组织用 1.5 mL 离心管收集备用, 脾脏来源的 PBMC 分离方法同外周血来源 PBMC。

1.2.4 Western blot 检测 CCR2 蛋白的表达 提取 F2 代小鼠所分离的肝脏和脾脏组织取部分剪碎以及“1.2.3 项下”分离出的免疫细胞置于 1.5 mL 离心管中, 提取组织总蛋白, 经标准蛋白定量后上样, 采用 10% SDS-PAGE 电泳, 并转至 PVDF 膜。膜以 TBST 溶解的 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 随后分别加入 CCR2 一抗 (1:1 000) 和内参 β -actin (1:10 000) 4 °C 孵育过夜。次日, 经 TBST 洗涤 3

次,每次 10 min,后加入山羊抗兔 IgG (1:10 000),室温孵育 2 h,再经 TBST 洗涤 3 次和 PBS 洗涤 1 次,每次 10 min。最后,使用化学发光成像分析仪扫描并采集图像,通过 Image J 软件分析目标条带灰度值。

1.2.5 流式细胞术检测 CCR2^{-/-} 小鼠对免疫系统功能的影响 将“1.2.3 项下”提取的 PM 和脾脏来源的 PBMC 分别移至 1.5 mL 离心管中,分成 WT 组和 CCR2^{-/-} 组 2 000 r/min 离心 5 min,两组细胞经固定破膜后,加入相应体积的 F4/80、CD4 和 IFN- γ 流式抗体 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min 后,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。

1.3 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, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠的繁育情况 F1 代母鼠成功繁育出 F2 代幼鼠,其中纯合子小鼠与异性杂合子交配,高效产出 F3 代基因敲除纯合子小鼠。母鼠妊娠期稳定在 19~21 d,每胎产幼鼠数量 3~8 只,且幼鼠成活率超过 90%。

2.2 小鼠基因型鉴定结果 图 1A 展示了 F2 代小鼠的基因型鉴定结果,其中 3 号小鼠仅显示 494 bp 条带,确认为野生型;而 1、2、5、7 号小鼠同时出现 390 bp 和 494 bp 双条带,为杂合子;4 和 6 号小鼠则单一呈现 390 bp 条带,为纯合子。随后,实验筛选出 F2 代纯合子小鼠与异性杂合子小鼠进行配对繁殖,所得 F3 代小鼠的基因型检测结果如图 1B 所示,其中 2 号为杂合子(双条带),而 1、3、4、5 号小鼠均为纯合子(单条带)。再选取雌雄纯合子小鼠进行扩繁,至 F4 代及后续世代,所有小鼠均仅呈现约 390 bp 的单一条带,如图 1C 所示,结果明确表明已成功获得了稳定的纯合基因敲除小鼠种群。

2.3 基因敲除小鼠 CCR2 蛋白表达情况 为验证 PCR 鉴定结果,本实验采用 Western blot 方法检测 CCR2 野生型和 CCR2 纯合子小鼠 PMs、BMDMs、PBMC、肺和脾脏中 CCR2 蛋白表达。结果显示,野生型小鼠免疫细胞和部分脏器中表达 CCR2 蛋白,而纯合子小鼠在免疫细胞和脏器中几乎无 CCR2 表达,与 PCR 鉴定结果吻合。这一结果验证了 CCR2^{-/-} 纯合小鼠模型的构建成功,为后续研究

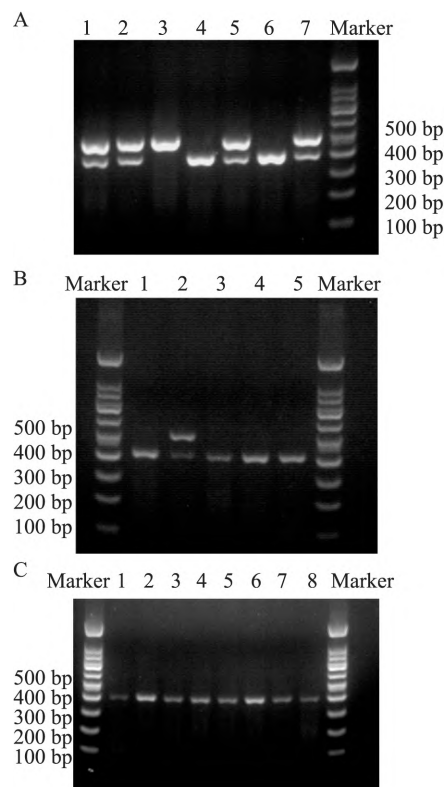


图 1 CCR2^{-/-} 小鼠基因鉴定结果

Fig. 1 Results of the CCR2^{-/-} mice gene identification

A: Genotyping results of F2 generation mice; B: Genotyping results of F3 generation mice; C: Genotyping results of F4 generation mice; 1-8: Represent different mouse numbers.

CCR2 功能提供了可靠的动物模型。见图 2。

2.4 CCR2 基因敲除小鼠对免疫系统功能的影响

为了探寻 CCR2 基因的敲除是否会影响小鼠免疫系统功能,本研究采用流式细胞术检测了 CCR2 野生型和 CCR2 纯合子小鼠腹腔来源 PM 和脾脏来源 CD4⁺T 中 T 细胞分型变化情况。结果显示,与 CCR2 野生型小鼠比较,CCR2 纯合子小鼠脾脏来源 T 细胞中 CD4⁺T 和 Th1 细胞表达降低(图 3A),CCR2 纯合子小鼠 PM 中 F4/80 细胞占比无明显变化(图 3B)。

3 讨论

CCR2 位于人类 3 号染色体上,编码 355 个氨基酸,分子质量为 42 ku,CCR2 包含 1 个 N 端细胞外结构域和 7 个保守的跨膜结构域。CCR2 有两种选择性剪接形式,CCR2A 和 CCR2B^[8]。CCR2 的表达主要局限于骨髓、血源性细胞和次级淋巴器官,其主要表达在单核细胞中,在高度激活的 T 细胞中表达程度较小。CCR2 是 MCP-1/CCL2 的受体,其激活

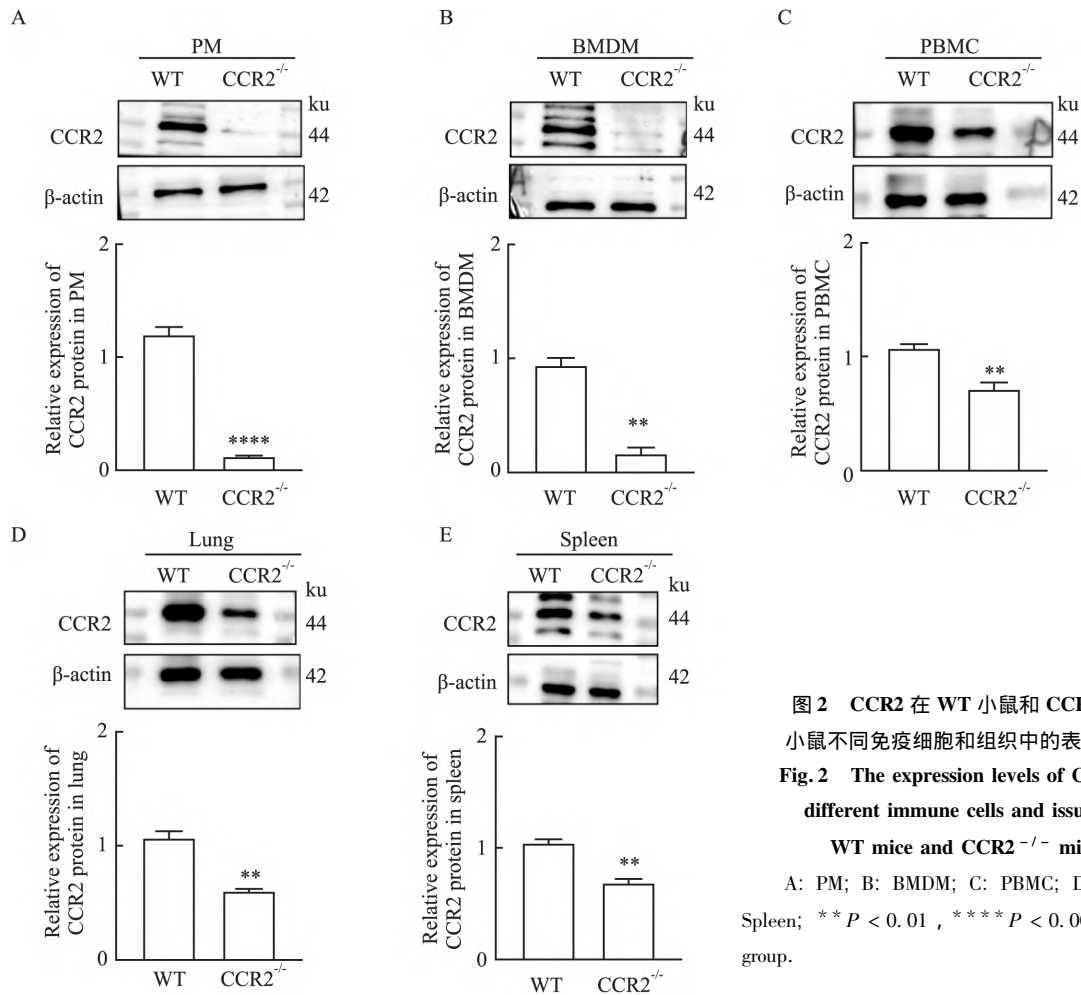


图2 CCR2在WT小鼠和CCR2^{-/-}小鼠不同免疫细胞和组织中的表达水平
Fig.2 The expression levels of CCR2 in different immune cells and tissues of WT mice and CCR2^{-/-} mice

A: PM; B: BMDM; C: PBMC; D: Lung; E: Spleen; ** P < 0.01, **** P < 0.0001 vs WT group.

的细胞内信号涉及 JAK2、STAT3、MAPK 和 PI3K 的信号转导途径。CCL2-CCR2 轴是趋化因子配体 - 受体网络固有的复杂性和冗余性的 1 个很好的例子 据报道 CCR2 可与具有一系列亲和力和效力的 7 种配体结合,除 CCL2 外,还包括 CCL7、CCL8、CCL11、CCL13、CCL16 和 CCL26^[9-10]。

类风湿关节炎、强直性脊柱炎以及银屑病关节炎 均属于最为普遍的炎症性风湿性疾病范畴,在这 3 种类型关节炎中,CCR2 单核细胞亚群的比例都很高^[11-12]。已有文献记载,CCR2 在 CD14 单核细胞/巨噬细胞中显著表达,其可作为风湿性疾病研究的新靶点^[13]。CCR2 基因敲除小鼠也已被用作自身炎症性疾病和自身免疫性疾病的实验模型,且 CCR2 缺陷小鼠可免受这些疾病的侵害^[14-16]。课题组目前建立了胶原抗体诱导的类风湿性关节炎小鼠模型,发现随着关节炎病程的加重,骨髓和腹腔来源的巨噬细胞中 CCR2 表达逐渐上升,提示 CCR2 与类

风湿性关节炎的发病机制有一定的联系,表明 CCR2 可能在类风湿性关节炎进程中扮演重要角色。

为了深入探究 CCR2 在类风湿性关节炎中的作用机制,本研究引入了 CCR2 基因敲除小鼠,并遵循 SPF 级标准精心饲养与繁育,采用高效、可重复的琼脂糖凝胶电泳技术,对小鼠进行基因型鉴定,确保实验准确性。鉴于 CCR2 在多种生理活动中的广泛参与,其敲除可能导致小鼠生长发育的某些功能受限^[17],实际观察中,纯合子小鼠体型偏小,因此,在饲养与繁殖过程中需特别关注。本研究采取杂合子小鼠杂交策略,既有效筛选了所需基因型小鼠用于野生型与纯合子的对照造模及表型分析,又保留了杂合子小鼠作为种源,为后续实验提供持续支持。这一策略平衡了实验需求与种群维持,成功培育出一批 CCR2 基因敲除小鼠,为深入解析 CCR2 在类风湿性关节炎中的相关机制奠定了坚实的模型基础,对整体研究进程具有重要推动作用。

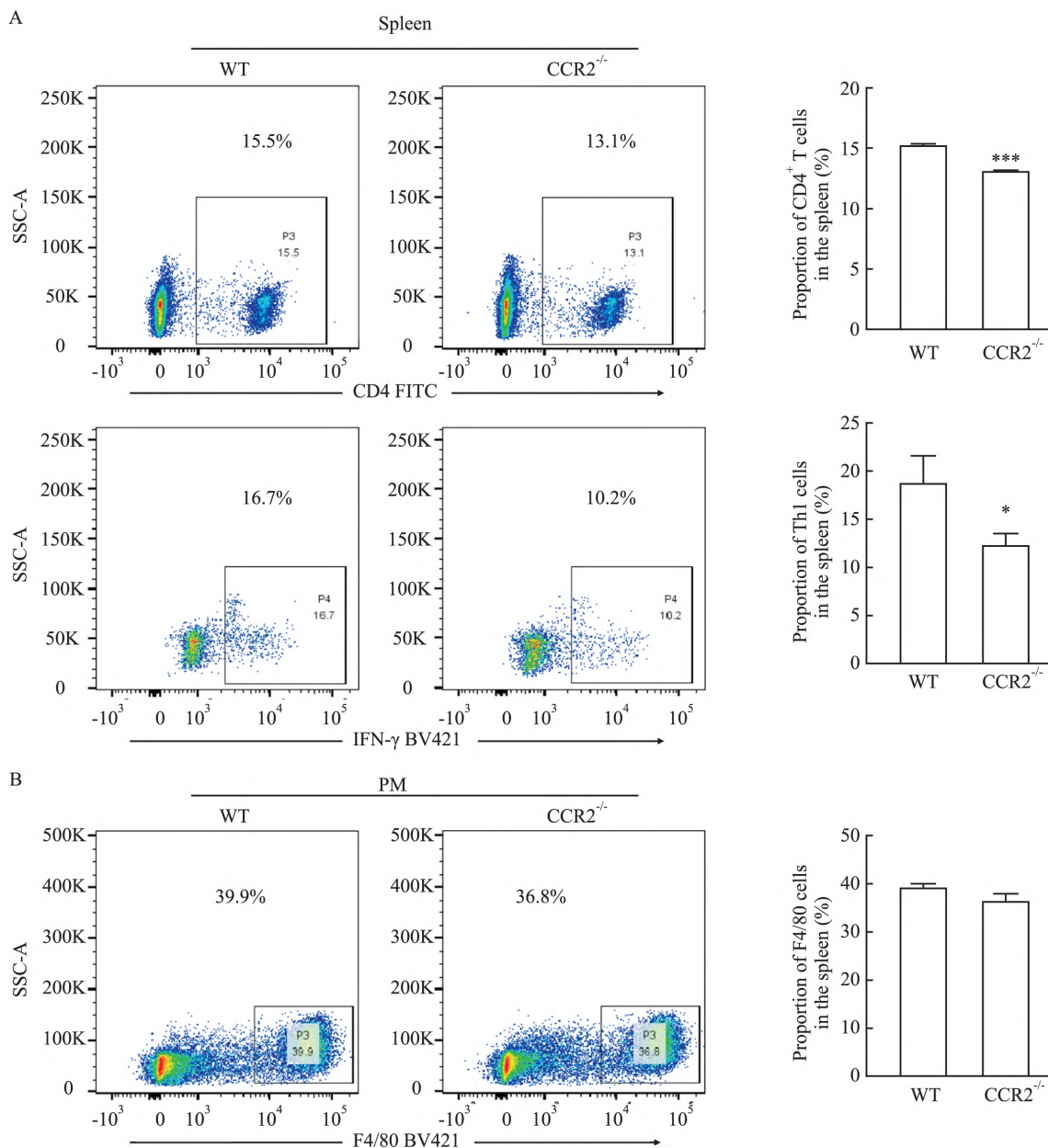


图3 CCR2 基因的敲除对 T 细胞和巨噬细胞功能的影响

Fig. 3 The effect of CCR2 knockout on T cell and macrophage function

A: The expression of CD4⁺ T cells and Th1-type cells is decreased in T cells derived from the spleens of mice; B: Percentage of F4/80 cells among peritoneal macrophages; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs WT group.

参考文献

[1] Chen W, Fang Y, Wang H, et al. Role of chemokine receptor 2 in rheumatoid arthritis: a research update[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 116: 109755. doi: 10.1016/j.intimp.2023.109755.

[2] Farina F M, Santovito D, Weber C. Two-faced Janus: CCR2-expressing macrophages and their dual role in allograft rejection of the transplanted heart [J]. Circulation, 2022, 146(8): 639 - 42. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.122.061088.

[3] Caso F, Saviano A, Tasso M, et al. Analysis of rheumatoid- vs psoriatic arthritis synovial fluid reveals differential macrophage

(CCR2) and T helper subsets (STAT3/4 and FOXP3) activation [J]. Autoimmun Rev, 2022, 21(12): 103207. doi: 10.1016/j.autrev.2022.103207.

[4] Li L, Cao J, Li S, et al. M2 macrophage-derived sEV regulate pro-inflammatory CCR2⁺ macrophage subpopulations to favor post-AMI cardiac repair [J]. Adv Sci (Weinh), 2023, 10(14): e2202964. doi: 10.1002/advs.202202964.

[5] Ryu S, Liu X, Guo T, et al. Peripheral CCL2-CCR2 signalling contributes to chronic headache-related sensitization [J]. Brain, 2023, 146(10): 4274 - 91. doi: 10.1093/brain/awad191.

[6] She S, Wu X, Zheng D, et al. PSMP/MSMP promotes hepatic fibrosis through CCR2 and represents a novel therapeutic target [J].

- J Hepatol, 2020, 72(3): 506–18. doi: 10.1016/j.jhep.2019.09.033.
- [7] 王卉卉, 朱向玲, 吴旭铭, 等. T 细胞条件性敲除 Spil 基因小鼠的繁育及鉴定[J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(4): 595–9. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2024.04.006.
- [7] Wang H H, Zhu X L, Wu X M, et al. Breeding and genotyping of T lymphocyte-conditional Spil knockout mice [J]. *Acta Univ Med Anhui* 2024, 59(4): 595–9. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2024.04.006.
- [8] Park H K, Na Y H, Nguyen H T, et al. Analysis of CCR2 splice variant expression patterns and functional properties [J]. *Cell Biosci*, 2022, 12(1): 59. doi: 10.1186/s13578–022–00787–6.
- [9] Georgakis M K, Bernhagen J, Heitman L H, et al. Targeting the CCL2-CCR2 axis for atheroprotection [J]. *Eur Heart J*, 2022, 43(19): 1799–808. doi: 10.1093/eurheartj/ehac094.
- [10] Zhu S, Liu M, Bennett S, et al. The molecular structure and role of CCL2 (MCP-1) and C-C chemokine receptor CCR2 in skeletal biology and diseases [J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(10): 7211–22. doi: 10.1002/jcp.30375.
- [11] Li R, Wu X, Peng S, et al. CCR2 antagonist represses fibroblast-like synoviocyte-mediated inflammation in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 122: 110570. doi: 10.1016/j.intimp.2023.110570.
- [12] Flegar D, Filipović M, Šučur A, et al. Preventive CCL2/CCR2 axis blockade suppresses osteoclast activity in a mouse model of rheumatoid arthritis by reducing homing of CCR2^{hi} osteoclast progenitors to the affected bone [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 767231. doi: 10.3389/fimmu.2021.767231.
- [13] Jeong J H, Hong S, Kwon O C, et al. CD14⁺ cells with the phenotype of infiltrated monocytes consist of distinct populations characterized by anti-inflammatory as well as pro-inflammatory activity in gouty arthritis [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1260. doi: 10.3389/fimmu.2017.01260.
- [14] Hasan H, Peng W, Wijayarathna R, et al. Monocytes expressing activin A and CCR2 exacerbate chronic testicular inflammation by promoting immune cell infiltration [J]. *Hum Reprod*, 2024, 39(7): 1404–22. doi: 10.1093/humrep/deae107.
- [15] De Oliveira V L S, Pollenus E, Berghmans N, et al. Absence of CCR2 promotes proliferation of alveolar macrophages that control lung inflammation in acute respiratory distress syndrome in mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(21): 12920. doi: 10.3390/ijms232112920.
- [16] Willecockson H, Ozkan H, Arbeeve L, et al. Early ablation of Ccr2 in aggrecan-expressing cells following knee injury ameliorates joint damage and pain during post-traumatic osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2022, 30(12): 1616–30. doi: 10.1016/j.joca.2022.08.015.
- [17] Santos A G A, Pereira L A A C, Viana J H M, et al. The C-C chemokine receptor 2 is involved in the control of ovarian folliculogenesis and fertility lifespan in mice [J]. *J Reprod Immunol*, 2020, 141: 103174. doi: 10.1016/j.jri.2020.103174.

Breeding and genotype identification of CCR2 knockout mice

Zhang Huiru, Wang Anqi, Liu Chong, Zhou Yuanyuan, Xue Hui, Tu Jiajie

(Institute of Clinical Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the breeding and genotyping of CCR2 knockout mice, and to verify the applicability of the polymerase chain reaction (PCR) method for genotype detection of CCR2 knockout mice. **Methods** The introduced CCR2 pure male mice and wild-type female mice were mated and bred to produce the offspring generation, the obtained F1 generation heterozygous mice were continued to be mated. DNA was extracted by clipping the tail tissues of the mice at the age of 2 weeks, the target gene fragment was amplified by PCR, and the genotypic results were determined by agarose gel electrophoresis. The proportion of purebred progeny carrying the CCR2 knockout gene was increased by genetic crosses, the effect of CCR2 knockout in the progeny mice was verified by using Western blot against major immune cells and key organs, and flow cytometry was used to detect whether the knockout of the CCR2 gene had any effect on the function of the immune system by targeting the major immune cells. **Results** CCR2 knockout mice were successfully bred and characterized, and three genotypes of F2 generation mice were obtained: CCR2^{+/+}, CCR2^{+/-}, and CCR2^{-/-}. The offspring genotypes were identified by PCR, and Western blot showed extremely low CCR2 protein expression in CCR2 knockout mice. Flow analysis showed that CCR2 knockdown reduced the expression of CD4⁺T and Th1 cells in mouse spleen-derived T cells, but did not affect macrophage function. **Conclusion** Correct breeding and identification are important ways to get the pure CCR2 knockout mice, and PCR method for identifying mouse genotypes is simple, fast and reliable.

Key words C-C motif chemokine receptor type 2; knockout; polymerase chain reaction; genotyping; protein expression; rheumatoid arthritis

Fund program National Natural Science Foundation of China (No. 82373877)

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