

网络出版时间: 2025-06-30 14:31:15 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250630.0857.014>

肿瘤坏死因子受体相关因子 2 杂合子敲除小鼠构建和表型研究

王伟康 左书俊 谷金涛 郭富媛 郭昊周 韩陈陈 魏 伟

(安徽医科大学药理学学院临床药理研究所 抗炎免疫药物教育部重点实验室,
抗炎免疫药物安徽省协同创新中心 合肥 230032)

摘要 目的 应用 CRISPR/Cas9 技术构建肿瘤坏死因子受体相关因子 2 (TRAF2) 杂合子敲除小鼠,用于研究 TNF- α -TRAF2 信号转导异常介导的炎症免疫性疾病的病理机制及新靶点药物的开发。方法 构建靶向敲除 TRAF2 基因的载体,通过显微注射,将先导 RNA 和 Cas9 mRNA 导入到 C57BL/6JGpt 小鼠的受精卵中,介导小鼠 TRAF2 基因突变,提取鼠尾蛋白,通过 PCR 和 Western blot 测定 F0 代基因型,成功获得 TRAF2^{+/-}小鼠。使用 F0 代小鼠与 C57BL/6JGpt 野生型小鼠回交,获得稳定的 TRAF2^{+/-}小鼠用于扩繁及后续实验。检测 TRAF2^{+/-}小鼠体质量;Western blot 检测 TRAF2^{+/-}小鼠脾脏、肝脏及肾脏组织中 TRAF2 表达;HE 染色检测 TRAF2^{+/-}小鼠脾脏、肝脏及肾脏组织的发育情况。结果 利用引物进行 PCR 鉴定,结果表明 TRAF2^{+/-}小鼠在 679 bp 出现目的条带;Western blot 结果表明,与野生型组比较,TRAF2^{+/-}小鼠鼠尾蛋白中 TRAF2 的表达明显下降 ($P < 0.01$)。与野生型小鼠比较,TRAF2^{+/-}小鼠体质量减轻 ($P < 0.05$);Western blot 结果表明,与野生型小鼠比较,TRAF2^{+/-}小鼠的脾脏、肝脏及肾脏组织中 TRAF2 蛋白表达均降低 ($P < 0.01$)。HE 染色结果表明,与野生型小鼠比较,TRAF2^{+/-}小鼠脾脏、肝脏及肾脏组织内细胞形态无明显差异。结论 成功构建 TRAF2^{+/-}小鼠,为探究 TRAF2 在发育调控中的作用、揭示 TNF- α -TRAF2 信号异常介导的炎症免疫疾病机制以及筛选相关药物靶点提供了重要动物模型。

关键词 TRAF2; CRISPR/Cas9; 基因敲除; 基因工程小鼠; 基因型鉴定; 表型研究

中图分类号 R 332

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2025)07-1291-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.07.018

肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 是一种多功能的细胞因子,在调节免疫反应、炎症反应、细胞凋亡和细胞增殖等方面发挥重要作用^[1]。肿瘤坏死因子受体相关因子 2 (tumor necrosis factor receptor associated factor 2, TRAF2) 是 TRAF 家族蛋白中的一员,介导 TNF- α 下游信号传导,参与促进核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 和 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 等多种信号转导通路的激活,对细胞存活、免疫反应以及炎症过程具有重要影响^[2-3]。TNF- α -TRAF2 信号活化促进 NF- κ B 信号转导,参与多种炎症免疫性疾病的发生发展,包括肿瘤、类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 等^[4-5]。

目前暂无商品化的 TRAF2 基因敲除小鼠,研

究^[6]显示 TRAF2 基因全敲除可引起胚胎致死。为了揭示 TRAF2 在肿瘤、RA 等多种炎症免疫性疾病进程中的重要作用,该研究利用 Cas9 mRNA 技术构建 TRAF2 基因半敲除 (TRAF2^{+/-}) 小鼠,将 TRAF2^{+/-}小鼠与同背景的野生型小鼠交配得的子代小鼠,利用 PCR 和 Western blot 进行基因型鉴定,为进一步探索 TRAF2 介导炎症免疫性疾病的病理机制及药物靶点的研究提供重要的动物模型。

1 材料与方法

1.1 动物 TRAF2 基因杂合敲除小鼠以 C57BL/6JGpt 为背景,饲养于 SPF 实验室,由江苏集萃药康生物科技有限公司生产,生产许可证号: SCXK(苏)2023-0009。本研究动物饲养和繁育均得到安徽医科大学动物实验伦理委员会批准(批准号: PZ-2022-031)。

1.2 主要试剂与仪器

1.2.1 主要试剂 Tris-HCl、NaOH(货号: ST780、ST840,上海碧云天生物技术股份有限公司); 2 × Rapid Taq Master Mix(货号: A2A1590,南京诺唯赞生物科技股份有限公司); DNA Marker 2000(货号:

2025-03-21 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 82104187、82173824)

作者简介: 王伟康 男 硕士研究生;

韩陈陈 女 博士,硕士生导师,通信作者, E-mail: chenchenhan@ahmu.edu.cn;

魏 伟 男 教授,博士生导师,通信作者, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

AG11706 湖南艾科瑞生物工程有限公司); Agarose (货号: TSJ001 北京擎科生物科技股份有限公司); RAPI 裂解液、5 × SDS 上样缓冲液(货号: P0013B、P1040 北京索莱宝生物科技股份有限公司); TRAF2 一抗(货号: AB126758 艾博抗贸易有限公司); β -actin 一抗(货号: 20536-1-AP 美国 Proteintech 公司); 辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG、辣根酶标记山羊抗兔 IgG (货号: ZB-2305、ZB-2301 北京中杉金桥生物技术有限公司); 核酸染料、50 × TAE、显影液(货号: A8746、BL523A、BL520A 北京兰杰柯科技有限公司)。

1.2.2 主要仪器 超微量核酸蛋白检测仪(型号: DS-11 美国丹诺尔公司); 台式梯度 PCR 仪 T100™ Thermal Cycler、显影仪(型号: T100™、ChemiDoc 美国 Bio-Rad 公司); 通用型电泳仪(型号: DYY-6C 北京六一生物科技股份有限公司)、组织原位细胞扫描分析系统(型号: Panoramic MIDI II 山东斯瑞缔医疗科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 Cas9/先导 RNA(single guide RNA ,sgRNA) 载体构建 根据小鼠 TRAF2 基因的结构,利用非同源末端连接修复引入突变的方式,通过在线 sgRNA 设计网站(<http://crispor.tefor.net/>)设计 sgRNA , TRAF2 基因有 3 个转录本,选取 TRAF2-201(ENS-MUST00000028311.12) 转录本的第 3 外显子至第 4 外显子作为敲除区域。该区域包含 178 bp 的编码序列,敲除该区域将导致蛋白质功能的破坏。敲除策略见图 1。

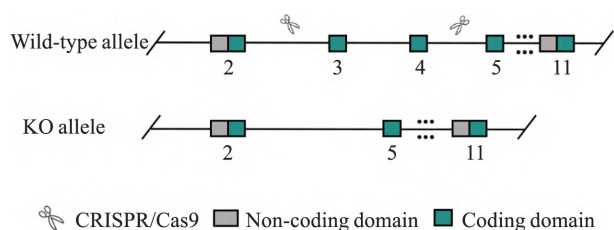


图 1 TRAF2^{+/-} 小鼠构建策略

Fig. 1 Construction strategy of TRAF2^{+/-} mice

1.3.2 F0、F1 代 TRAF2^{+/-} 小鼠获得 在高倍显微镜下获得及鉴定阳性基因敲除品系,用显微操作器控制显微注射针向 C57BL/6 野生小鼠的受精卵中注射 Cas9 mRNA 和 sgRNA,并将注射后的受精卵移植到假孕母鼠中,新生出的小鼠为 F0 代小鼠。由于受精卵早期卵裂速度很快,因此得到的 F0 代小鼠

为嵌合体,通过传代获得 F1 代小鼠,F1 代小鼠具有稳定遗传能力。

1.3.3 PCR 鉴定

1.3.3.1 鼠尾 DNA 提取 剪取 3 周龄小鼠鼠尾 3 ~ 5 mm,置于无 DNA 污染的 1.5 mL EP 管,每管加入 100 μ L 0.05 mol/L NaOH,100 $^{\circ}$ C 振荡恒温金属浴 30 min。待冷却后加入 10 μ L 1 mol/L Tris -HCl 于涡旋振荡器上振荡并充分混匀。12 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液至新的 EP 管中作为 DNA 模版。

1.3.3.2 PCR 扩增 引物由通用生物(安徽)股份有限公司合成。鉴定策略见图 2,引物序列、PCR 反应体系及 PCR 程序见表 1 - 表 4。

1.3.3.3 凝胶电泳 称取 1.2 g 琼脂糖放入锥形瓶中,加入 60 mL TAE 缓冲液。混合均匀后微波炉

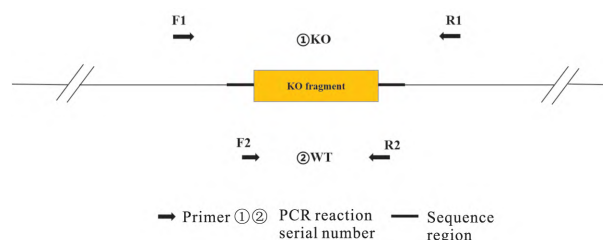


图 2 小鼠鼠尾基因组 PCR 鉴定策略

Fig. 2 Identification strategy of mouse tail genome by PCR

表 1 TRAF2^{+/-} 基因鉴定引物序列

Tab. 1 Primer sequences for gene identification of TRAF2^{+/-}

PCR No.	Primer No.	Sequence(5'-3')	Band size(bp)
PCR 1	T052861-F1A	CCACACTTAATGAAG-GAGAGAGCTG	WT: 7 206
	T052861-R1A	CTTCTGCTACCTGTGGAT-CAAGAGAC	KO: 679
PCR 2	T052861-F2	TAGACGTTGCTTCATCGA-CAGTAGGG	WT: 341
	T052861-R2	ACCCAGCTCAATTCTCGG-TAGGC	KO: 0

表 2 TRAF2^{+/-} 基因鉴定 PCR 反应体系

Tab. 2 PCR reaction system for TRAF2^{+/-} gene identification

Seg.	Reaction component	Volume(μ L)
1	2 × Rapid Taq Master Mix	12.5
2	ddH ₂ O	9.5
3	Primer A	1
4	Primer B	1
5	Template	1

表3 TRAF2^{+/−} 基因鉴定 PCR 1 反应程序Tab. 3 PCR program 1 for TRAF2^{+/−} gene identification

Seg.	Temperature (°C)	Time	Cycle
1	95	5 min	20 ×
2	98	30 s	
3	65	30 s	
4	72	45 s	15 ×
5	98	30 s	
6	55	30 s	
7	72	45 s	15 ×
8	72	5 min	
9	10	∞	

表4 TRAF2^{+/−} 基因鉴定 PCR 2 反应程序Tab. 4 PCR program 2 for TRAF2^{+/−} gene identification

Seg.	Temperature (°C)	Time	Cycle
1	95	5 min	35 ×
2	98	30 s	
3	58	30 s	
4	72	45 s	15 ×
5	72	5 min	
6	10	∞	

高功率加热 沸腾 3 次,每次沸腾后取出待其冷却。加入 10 μL 的核酸染料,轻轻摇晃以确保均匀混合,接着将混合液倒入凝胶板中,并插入梳子形成样品孔。静置 30 min 以等待凝胶凝固。每孔中加入 10 μL 的样品,标记孔加入 5 μL Marker。140 V、400 mA 电泳 30 min。电泳完成后,使用显影仪拍摄凝胶照片以观察结果。

1.3.4 TRAF2^{+/−} 小鼠繁育饲养 在 SPF 级别的实验室条件下,对 TRAF2^{+/−} 小鼠进行饲养和繁殖。实验室温度严格控制在 22~26 °C,相对湿度保持在 40%~70% 的范围内。为了模拟自然环境,室内的光照周期被设定为 12 h 的光照和 12 h 的黑暗。小鼠的饮食、垫料和饮水都经过了高温高压的消毒处理。鼠笼和垫料每周更换 2 次,保持清洁。所有操作在超净工作台内按照无菌要求进行。在繁育初始阶段,雌性 TRAF2^{+/−} 小鼠与 C57BL/6JGpt 雄性小鼠以 1:1 的比例进行合笼。妊娠期通常持续约 21 d。小鼠幼崽在出生后的 19~21 d 可以与母鼠分开饲养,并开始按性别分开饲养。雄性小鼠一般 8 周左右,雌性小鼠 6 周左右达到性成熟,可以用于进一步的繁殖。

1.3.5 Western blot 法 向鼠尾、脾脏、肝脏及肾脏组织中加入裂解液(RIPA:PMSF:PI=98:1:1),每 1 mg 组织加入 100 μL 裂解液,使用超声破碎仪对组织进行破碎,将离心收集的蛋白与 5 × 上样缓

冲液按比例混合,100 °C 振荡恒温金属浴 10 min。先通过电泳将蛋白分离后,再 220 mA 转膜 1 h 获得蛋白条带;将条带放入 5% 脱脂牛奶(1 g 脱脂奶粉+20 mL TPBS)中,摇床上低速室温封闭 2 h;分别在对应位置的条带中敷上 β-actin 一抗(1:10 000)和 TRAF2 一抗(1:400),4 °C 孵育过夜;TPBS 清洗 3 次,在牛奶中加入山羊抗兔 IgG(1:5 000)或山羊抗小鼠 IgG(1:10 000),摇床上室温孵育 2 h;孵育完成后 TPBS 清洗 3 次,PBS 清洗 1 次,每次 5 min;使用显影仪进行拍摄。

1.3.6 小鼠体质量检测 同时取同窝野生型及 TRAF2^{+/−} 小鼠,禁食过夜,称重,同时观察小鼠外观及生理表现。

1.3.7 HE 染色 选取 10 周龄,同窝雄性 TRAF2^{+/−} 小鼠和野生型小鼠肝脏、肾脏及脾脏组织固定,包埋脱蜡、HE 染色、脱水透明、封片拍照。

1.4 统计学处理 使用 Graphpad Prism 8.3.0 软件进行统计分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TRAF2^{+/−} 小鼠基因型鉴定

2.1.1 PCR 鉴定 TRAF2^{+/−} 小鼠基因型 提取鼠尾 DNA,利用 T052861-F1A 和-R1A 引物,通过 PCR 1 程序进行扩增后进行凝胶电泳,结果如图 3A 所示,扩增出 679 bp 目的条带为 TRAF2^{+/−} 小鼠;利用 T052861-F2 和-R2 引物,通过 PCR 2 程序进行扩增后进行凝胶电泳,结果如图 3B 所示,扩增出 341 bp 目的条带为野生型小鼠,结合二者鉴定结果可知:1 为野生型小鼠,2 为 TRAF2^{+/−} 小鼠。

2.1.2 Western blot 检测 TRAF2^{+/−} 小鼠基因型 提取鼠尾蛋白,利用 Western blot 检测野生型和

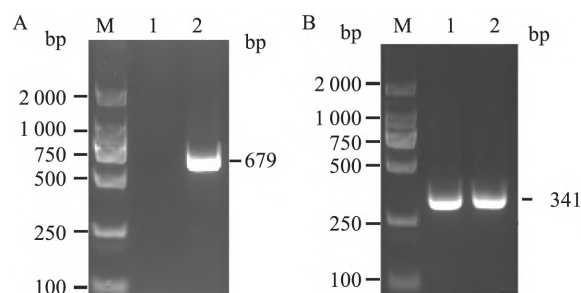


图3 小鼠基因型 PCR 鉴定结果

Fig. 3 Results of genotyping PCR identification in mice

A: Identification results of PCR 1 program; B: Identification results of PCR 2 program; M: DNA Marker; 1: WT mice; 2: TRAF2^{+/−} mice.

TRAF2^{+/-} 小鼠鼠尾组织中 TRAF2 蛋白表达,结果如图 4 所示,与野生型小鼠比较,TRAF2^{+/-} 小鼠鼠尾 TRAF2 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)。

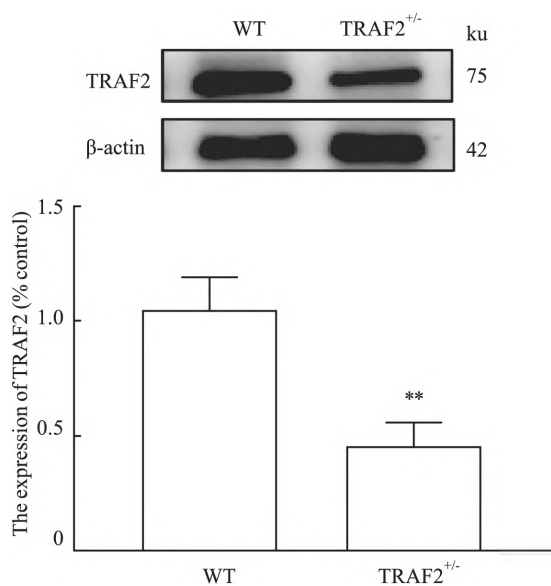


图 4 野生型和 TRAF2^{+/-} 小鼠鼠尾中 TRAF2 表达

Fig. 4 The expression of TRAF2 in the tails

of WT and TRAF2^{+/-} mice

** $P < 0.01$ vs WT mice.

2.2 TRAF2^{+/-} 小鼠发育情况及组织中 TRAF2 的表达 检测野生型小鼠和 TRAF2^{+/-} 小鼠的体质量变化,结果如图 5A 所示,与野生型小鼠比较,TRAF2^{+/-} 小鼠外观及生理表现未见明显异常,但与野生型小鼠比较,TRAF2^{+/-} 小鼠体质量降低 ($P < 0.05$)。进一步提取小鼠脾脏、肝脏及肾脏蛋白,利用 Western blot 检测 TRAF2 蛋白的表达,结果如图 5B 所示,与同窝野生型小鼠比较,TRAF2^{+/-} 小鼠的脾脏、肝脏以及肾脏中 TRAF2 蛋白的表达水平明显下降 ($P < 0.01$)。

2.3 TRAF2^{+/-} 小鼠组织器官生长发育情况 取野生型和 TRAF2^{+/-} 小鼠的肝脏、肾脏和脾脏组织进行固定,HE 染色检测组织结构,结果如图 6 所示,TRAF2^{+/-} 小鼠肝脏中肝细胞形态结构均完整且大小正常,肝索呈放射状排列,周围未发现炎症细胞浸润;肾脏中肾小管无变性,排列有序,管腔形态大小正常,肾小球等结构均正常;脾脏结构正常,红白髓边界清晰,生发中心清晰可见。以上结果提示 TRAF2^{+/-} 小鼠各组织器官的发育未受到影响。

3 讨论

TNF- α 通过 2 种不同的受体传递信号,即肿瘤

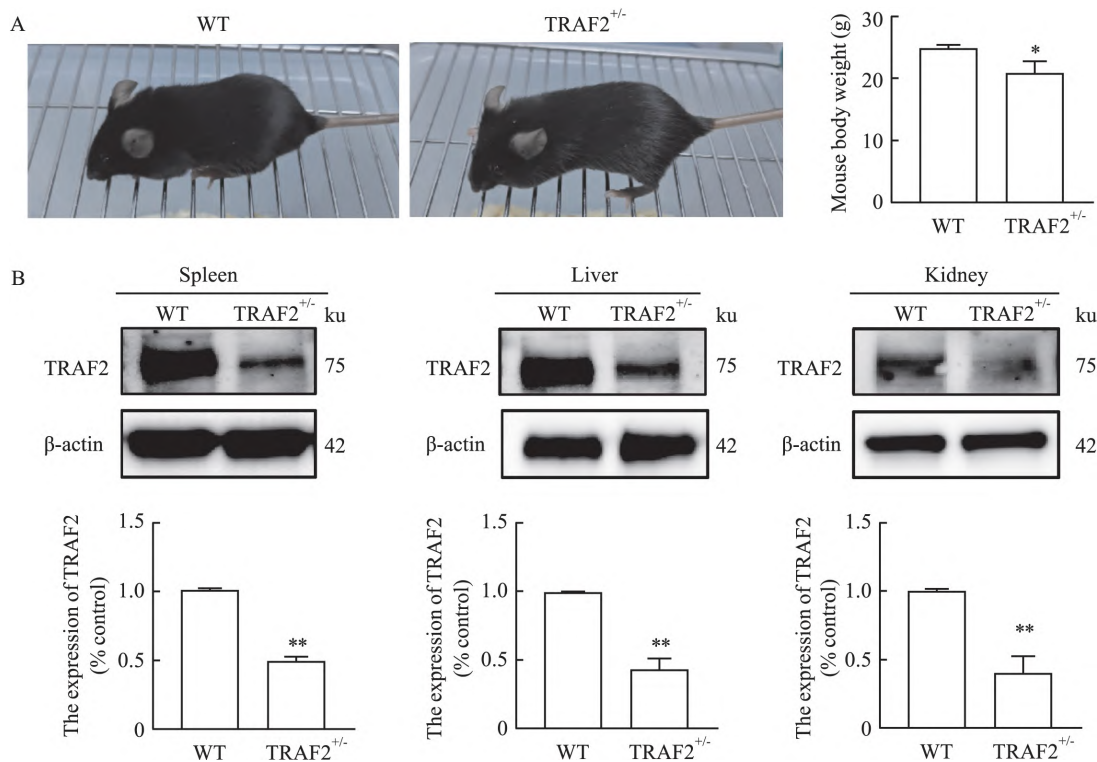
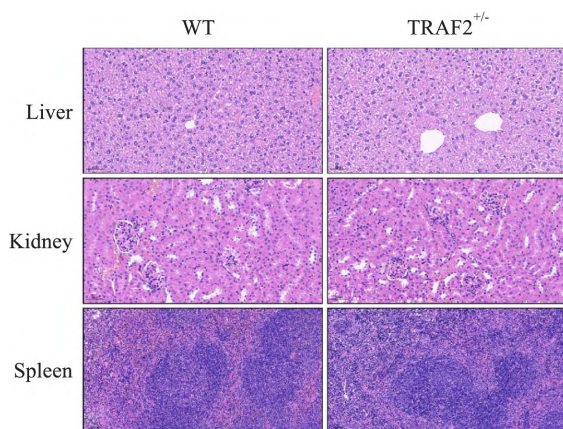


图 5 TRAF2^{+/-} 小鼠发育情况及组织中 TRAF2 的表达

Fig. 5 TRAF2 expression in multiple tissues of TRAF2^{+/-} mice and developmental profiles

A: Body weight of wild-type mice and TRAF2^{+/-} mice; B: TRAF2 expression in the spleen, liver and kidney of wild-type and TRAF2^{+/-} mice;

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs WT mice.

图6 野生型小鼠和 TRAF2^{+/−} 小鼠各组织 HE 染色图 ×40Fig. 6 HE staining of tissues from wild-type mice and TRAF2^{+/−} mice ×40

坏死因子受体(TNF receptor, TNFR) 1 和 TNFR2, 介导多种炎症免疫性疾病的发生发展^[7]。TRAF2 作为 TNF- α /TNFR 下游重要的衔接蛋白, 主要由 1 个 N 端的锌指结构域、1 个 RING finger domain、中间的卷曲螺旋结构域和 1 个 C 端的 WD40 结构域组成, 这些结构域共同参与了 TRAF2 的蛋白-蛋白相互作用和信号转导功能^[8-9]。TNF- α 信号活化, 促进 TRAF2 结合细胞凋亡信号调节激酶 1、肿瘤坏死因子受体 1 型相关死亡结构域蛋白、G 蛋白偶联受体激酶 2 (G protein-coupled receptor kinase 2, GRK2) 等蛋白, 激活 NF- κ B、JNK 和 Caspases 等多种信号通路, 调节免疫细胞的活化、增殖和凋亡, 参与炎症反应和自身抗体产生的调控, 影响 RA 等炎症免疫性疾病的发生和发展^[10]。研究^[11]表明, TRAF2 通过泛素化激活 RA 成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLS) 中的 NF- κ B 和 JNK 信号, 诱导抗凋亡信号和基质金属蛋白酶产生, 促进 RA FLSs 细胞增殖和炎症。课题组前期研究^[12]发现, FLSs 中 TRAF2 与 GRK2 相互作用, 促进 GRK2 转膜, 诱导 EP4 脱敏内化, 导致细胞内 cAMP 的产生减少, 促进 FLSs 异常增殖。

基于 CRISPR/Cas9 基因敲除技术建立稳定的基因敲除实验动物模型已成为研究基因生物学功能的重要手段。将设计好的 Cas9 mRNA 和 sgRNA 注射进小鼠受精卵后移植到假孕母鼠, 得到 F0 代小鼠。该技术具有高效率、精确性、易于遗传、减少嵌合体产生以及伦理优势, 这些特点使得 CRISPR/Cas9 技术不仅能够快速且准确地敲除特定基因, 还能在多种动物模型中实现同时降低了成本和实验动物的使用, 加速了生物医学研究的进程^[13]。此外,

CRISPR/Cas9 技术还具有可以同时编辑多个基因的优势, 通过设计多个 sgRNA, 同时靶向多个不同的基因, 在同一批小鼠中实现多个基因的同时敲除或编辑, 这对于研究基因之间的相互作用、复杂疾病的多基因调控机制等具有重要意义^[14]。

本研究首先通过野生型小鼠与 F0 代 TRAF2^{+/−} 小鼠杂交获得 F1 代 TRAF2^{+/−} 小鼠, PCR、凝胶电泳检测小鼠鼠尾中 TRAF2 的基因条带在 679 bp, Western blot 检测 TRAF2 蛋白表达降低, 成功构建 TRAF2^{+/−} 小鼠。在繁育过程中观察同窝野生型小鼠和 TRAF2^{+/−} 小鼠的体质量, 发现 TRAF2^{+/−} 小鼠体质量较野生型小鼠体质量降低。Western blot 检测同窝野生型小鼠和 TRAF2^{+/−} 小鼠脾脏、肝脏以及肾脏组织中 TRAF2 的蛋白表达, 发现 TRAF2^{+/−} 小鼠中 TRAF2 的蛋白表达较野生型小鼠显著降低。进一步利用 HE 染色检测同窝野生型小鼠和 TRAF2^{+/−} 小鼠脾脏、肝脏以及肾脏组织内部的形态结构均无明显差异。本研究为探索 TRAF2 在炎症免疫性疾病中的作用机制以及开发靶向治疗药物提供了实验动物模型。

参考文献

- [1] De Stefano L, Pallavicini F B, Mauric E, et al. Tumor necrosis factor- α inhibitor-related autoimmune disorders [J]. Autoimmun Rev, 2023, 22(7): 103332. doi: 10.1016/j.autrev.2023.103332.
- [2] Etemadi N, Chopin M, Anderton H, et al. Correction: TRAF2 regulates TNF and NF- κ B signalling to suppress apoptosis and skin inflammation independently of Sphingosine kinase 1 [J]. eLife, 2017, 6: e29849. doi: 10.7554/eLife.29849.
- [3] Kang K, Chen S H, Wang D P, et al. Inhibition of endoplasmic reticulum stress improves chronic ischemic hippocampal damage associated with suppression of IRE1 α /TRAF2/ASK1/JNK-dependent apoptosis [J]. Inflammation, 2024, 47(4): 1479–90. doi: 10.1007/s10753-024-01989-5.
- [4] Xu Y, Li L, Yang W, et al. TRAF2 promotes M2-polarized tumor-associated macrophage infiltration, angiogenesis and cancer progression by inhibiting autophagy in clear cell renal cell carcinoma [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2023, 42(1): 159. doi: 10.1186/s13046-023-02742-w.
- [5] Wu W, Wang J, Xiao C, et al. SMYD2-mediated TRAF2 methylation promotes the NF- κ B signaling pathways in inflammatory diseases [J]. Clin Transl Med, 2021, 11(11): e591. doi: 10.1002/ctm2.591.
- [6] Petersen S L, Chen T T, Lawrence D A, et al. TRAF2 is a biologically important necroptosis suppressor [J]. Cell Death Differ, 2015, 22(11): 1846–57. doi: 10.1038/cdd.2015.35.
- [7] Siegmund D, Wajant H. TNF and TNF receptors as therapeutic

- targets for rheumatic diseases and beyond [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2023, 19(9): 576–91. doi: 10.1038/s41584-023-01002-7.
- [8] Bradley J R, Pober J S. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) [J]. *Oncogene*, 2001, 20(44): 6482–91. doi: 10.1038/sj.onc.1204788.
- [9] Palumbo C, Mecchia A, Bocedi A, et al. Revisited role of TRAF2 and TRAF2 C-terminal domain in endoplasmic reticulum stress-induced autophagy in HAP1 leukemia cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2022, 145: 106193. doi: 10.1016/j.biocel.2022.106193.
- [10] Lalani A I, Zhu S, Gokhale S, et al. TRAF molecules in inflammation and inflammatory diseases [J]. *Curr Pharmacol Rep*, 2018, 4(1): 64–90. doi: 10.1007/s40495-017-0117-y.
- [11] Potter C, Eyre S, Cope A, et al. Investigation of association between the TRAF family genes and RA susceptibility [J]. *Ann Rheum Dis*, 2007, 66(10): 1322–6. doi: 10.1136/ard.2006.065706.
- [12] Tai Y, Huang B, Guo P P, et al. TNF- α impairs EP4 signaling through the association of TRAF2-GRK2 in primary fibroblast-like synoviocytes [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(2): 401–16. doi: 10.1038/s41401-021-00654-z.
- [13] Hunker A C, Soden M E, Krayushkina D, et al. Conditional single vector CRISPR/SaCas9 viruses for efficient mutagenesis in the adult mouse nervous system [J]. *Cell Rep*, 2020, 30(12): 4303–16. doi: 10.1016/j.celrep.2020.02.092.
- [14] Li Q, Lu J, Zhang G, et al. CRISPR/Cas9-mediated multiplexed genome editing in *Aspergillus oryzae* [J]. *J Fungi (Basel)*, 2023, 9(1): 109. doi: 10.3390/jof9010109.

Construction and phenotypic study of heterozygous knockout mice of tumor necrosis factor receptor associated factor 2

Wang Weikang, Zuo Shujun, Gu Jintao, Guo Fuyuan, Guo Haozhou, Han Chenchen, Wei Wei
(*Institute of Clinical Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Anhui Medical University, Key Laboratory of Anti Inflammatory and Immune Drugs of the Ministry of Education, Anhui Collaborative Innovation Center for Anti Inflammatory and Immune Drugs, Hefei 230032*)

Abstract Objective To generate heterozygous TRAF2 knockout mice, the CRISPR/Cas9 technology was successfully employed. These mice were served as a valuable model to explore the pathological mechanisms underlying inflammatory and immune disorders mediated by abnormal TNF- α -TRAF2 signaling and to develop new therapeutic targets. **Methods** A vector targeting the knockout of the TRAF2 gene was constructed. Lead RNA and Cas9 Mra were introduced into the fertilized eggs of C57BL/6JGpt mice through microinjection to mediate the TRAF2 gene mutation in mice. The mouse tail protein was extracted and the genotype of the F0 generation was determined by PCR and Western blot. TRAF2^{+/-} mice were successfully obtained. F0 generation mice were backcrossed with C57BL/6JGpt wild-type mice to obtain stable TRAF2^{+/-} mice for propagation and subsequent experiments. The body weight of TRAF2^{+/-} mice was detected; Western blot was used to detect the expression of TRAF2 in the spleen, liver and kidney tissues of TRAF2^{+/-} mice. The development of spleen, liver and kidney tissues in TRAF2^{+/-} mice was detected by HE staining. **Results** PCR identification using specific primers demonstrated that TRAF2^{+/-} mice exhibited a target band at 679 bp. Western blot analysis results indicated that, compared with the WT group, the expression of TRAF2 in the tail protein of TRAF2^{+/-} mice was significantly reduced ($P < 0.01$). TRAF2^{+/-} mice had a lower body weight compared to their littermate WT mice ($P < 0.05$). Western blot analysis showed that, relative to the WT group, the expression of TRAF2 protein in the spleen, liver, and kidney tissues of TRAF2^{+/-} mice was decreased ($P < 0.01$). HE staining results indicated that there were no significant differences in cellular morphology in the spleen, liver, and kidney tissues between TRAF2^{+/-} mice and WT mice. **Conclusion**

The successful construction of TRAF2^{+/-} mice has provided an important animal model for exploring the role of TRAF2 in developmental regulation, revealing the mechanism of inflammatory immune diseases mediated by abnormal TNF- α -TRAF2 signaling, and screening related drug targets.

Key words TRAF2; CRISPR/Cas9; gene knockout; genetically engineered mice; genotyping; phenotypic study

Fund programs National Natural Science Foundation of China (Nos. 82104187, 82173824)

Corresponding authors Han Chenchen, E-mail: chenchenhan@ahmu.edu.cn; Wei Wei, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn