

• 生物技术与方法 •

$\beta 2m$ 基因敲除小鼠构建

李振¹, 孙瑞林², 刘雯¹

1 复旦大学 基础医学院细胞与遗传医学系, 上海 200300

2 上海南方模式生物科技股份有限公司, 上海 201318

李振, 孙瑞林, 刘雯. $\beta 2m$ 基因敲除小鼠构建. 生物工程学报, 2021, 37(8): 2924-2935.

Li Z, Sun RL, Liu W. Construction of $\beta 2m$ knockout mice. Chin J Biotech, 2021, 37(8): 2924-2935.

摘要: $\beta 2m$ (Beta-2-microglobulin) 基因编码一个非糖基化蛋白, 作为主要组织相容性复合体 I 类 (MHC I) 的重要组分, 发挥抗原递呈的作用。为了避免免疫介导的清除, 人类肿瘤和病原体采取了不同的策略, 其中包括 MHC I 表达的丢失。合适的动物模型对于评估和开发肿瘤及其他疾病的临床治疗新方法, 以及阐明目前临床有效治疗方法的机制至关重要。利用 CRISPR/Cas9 基因编辑、显微注射等方法构建了 $\beta 2m$ 基因敲除小鼠。随后, 通过 PCR 鉴定、qPCR、流式分析等实验技术进行基因型和表型鉴定。基因型鉴定结果显示在该品系小鼠中, 目的基因编码区目标区域缺失。qPCR 检测发现, $\beta 2m$ 的 mRNA 水平发生显著的下调。流式结果显示, 在不同的免疫组织和器官中, $CD8^+$ 杀伤性 T 细胞显著减少。综上, 成功构建 $\beta 2m$ 基因敲除小鼠, 为后续体内研究 $\beta 2m$ 基因的功能奠定了基础。

关键词: 主要组织相容性复合物, $\beta 2m$, 基因敲除小鼠, CRISPR/Cas9

Construction of $\beta 2m$ knockout mice

Zhen Li¹, Ruilin Sun², and Wen Liu¹

1 Department of Cell and Genetic Medicine, School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200300, China

2 Shanghai Model Organisms Center, Shanghai 201318, China

Abstract: The $\beta 2m$ (Beta-2-microglobulin) gene encodes a non-glycosylated protein that functions as an important component of major histocompatibility complex I (MHC I) for antigen presentation. To evade immune mediated clearance, human tumors and pathogens have adopted different strategies, including loss of MHC I expression. Appropriate animal models are essential for understanding the mechanisms underpinning the clinical treatment of tumor and other human diseases. We constructed $\beta 2m$ knockout mice using CRISPR/Cas9 gene editing tool through embryo microinjection. Subsequently, genotyping and phenotyping of knockout mice were performed by PCR, qPCR, and flow cytometry. Mice genotyping showed that the coding region of the target gene was absent in the knockout mice. Real time PCR showed that mRNA level of $\beta 2m$ was significantly downregulated. Flow cytometry showed that the proportions of $CD8^+$ killer T cells was significantly reduced in a variety of tissues and organs of the immune system. Taken together, we have successfully constructed a strain of $\beta 2m$ knockout mice, which will facilitate subsequent *in vivo* study on the function and mechanism of the $\beta 2m$ gene.

Received: October 2, 2020; **Accepted:** March 25, 2021

Corresponding author: Wen Liu. Tel: +86-21-54237311-601; E-mail: liuwen@shmu.edu.cn

Keywords: major histocompatibility complex, $\beta 2m$, knockout mice, CRISPR/Cas9

主要组织相容性复合物 I (Major histocompatibility complex I, MHC I) 是 MHC 的主要类型之一, 另外一种类型是 MHC II。MHC I 存在于除红细胞之外几乎所有的脊椎动物的体细胞表面, 主要功能是反映细胞的状态、递呈抗原。例如, 细胞被病毒感染, 病毒包膜蛋白破碎形成的多态链呈递给细胞表面的 MHC I。细胞毒性 T 淋巴细胞不断监测细胞表面的 MHC I 类复合物, 最终, 清除表达异常蛋白来源多肽的转化和病毒感染的细胞。MHC II 位于抗原递呈细胞表面, 如巨噬细胞等, 通过主动识别细胞外抗原, 发挥抗原递呈和起始免疫的作用。人类的 MHC 也叫作 HLA (Human leukocyte antigen, HLA), 小鼠的 MHC 被称为 H-2。

$\beta 2m$ 是 $\beta 2m$ 基因编码的, 由 119 个氨基酸残基组成分子量大小为 12 kDa 的一个非糖基化蛋白。作为主要组织相容性复合体 I 类 (MHC I) 的组分, 主要位于除红细胞之外几乎所有的脊椎动物的体细胞表面。另外, $\beta 2m$ 还存在于多种细胞外液当中, 包括血液、尿液和关节液等^[1-2]。 $\beta 2m$ 从细胞表面脱落或由细胞分泌, 进入血液循环, 大多数 $\beta 2m$ 通过肾小球滤过和随后的肾小管分解代谢被肾脏清除, 极少数的通过其他途径清除。早在 1972 年, 已经有研究报道了 $\beta 2m$ 的结构^[3], 该研究发现, $\beta 2m$ 与免疫球蛋白有类似的结构, 该蛋白在序列上与免疫球蛋白轻链 (CL) 的恒定部分和免疫球蛋白 G 的重链恒定部分区域 (CH1、CH2 和 CH3) 同源并且两者具有相似的三级结构^[4]。 $\beta 2m$ 含有一个 57 个氨基酸残基的链内二硫键环, 其大小与免疫球蛋白 G 恒定区中的二硫键环相似^[3]。另外, 与免疫球蛋白的恒定区域一致的是, $\beta 2m$ 结构也是非常保守的^[5]。这些发现表明, $\beta 2m$ 可能具有类似的免疫调控的功能。

$\beta 2m$ 与多种疾病的发生发展密切相关, 例如慢性肾病、透析相关的淀粉样病变和癌症等。随

着慢性肾病的进展, 血清中 $\beta 2m$ 的水平持续升高, 与肾小球滤过率 (Glomerular filtration rate, GFR) 呈负相关^[1]。与其他的血清标记物相比, $\beta 2m$ 作为一个新的肾功能的标记物拥有多种优势, 例如, 与代谢产物肌酐相比, $\beta 2m$ 受到年龄、性别和种族的影响较小, 并且 $\beta 2m$ 与疾病的不良预后更相关^[6-8]。正常状态下, 从 MHC I 上解离后, $\beta 2m$ 从细胞表面持续释放进入血液循环。 $\beta 2m$ 的产生速率是恒定的, 为 2–4 mg/(kg·d), 正常人血浆浓度为 1–3 $\mu\text{g/mL}$, 然而, 在终末期肾病患者血清 $\beta 2m$ 水平通常在 20–50 mg/L 范围内, 在特殊情况下可观察到高于 100 mg/L 的水平^[9-10]。近年来, 越来越多的证据表明 $\beta 2m$ 的表达受多种因素的影响, 包括炎症、酸中毒、钙三醇治疗和透析技术等^[1,11-12]。透析相关的淀粉样病变 (Dialysis-related amyloidosis, DRA) 是晚期肾病的一个并发症, 常常与患者血液透析治疗有关, 也可能发生在血液透析治疗之前。1980 年, 在法国塔辛, 从腕管综合征 (Carpal tunnel syndrome, CTS) 手术时获得的滑膜活检结果显示, 7 名长期血液透析 (Haemodialysis, HD) 患者中存在不明性质的淀粉样沉积^[13]。随后的几年里, 这种疾病的临床特征和分子机制被逐步阐明。这种疾病又被称为透析相关的淀粉样病变, 其临床表现为腕管综合征、多关节痛、破坏性脊柱关节炎和骨囊肿, 显然, 淀粉样蛋白对关节组织具有明显的亲和力。1985 年, Gejyo 等和 Gorevic 等发现淀粉样沉积的主要成分是 $\beta 2m$ 原纤维^[14-15], 因此, DRA 又可以称为 $\beta 2m$ 淀粉样病变 (A $\beta 2m$)。有研究报道, 在血液透析过程中, 使用高通量膜可以有效去除 A $\beta 2m$ 患者血清中的 $\beta 2m$ ^[16-18], 然而使用低通量膜则不能达到同样的效果^[19]。使用高通量膜去除血液中的 $\beta 2m$ 之后, 可以显著改善 A $\beta 2m$ 引起的临床症状, 例如 CTS 和破坏性关节炎^[20-22]。 $\beta 2m$ 与肿瘤之间的关系也是一个长久以

来被广泛关注的课题^[23-24]。研究人员发现, 尽管不同的年龄和性别的人群血清中 $\beta 2m$ 的含量可能存在差异^[23], 然而经过校正, 晚期癌症患者血清 $\beta 2m$ 的含量要明显高于对照组, 包括正常人群和早期癌症患者^[23]。并且, 血清 $\beta 2m$ 的含量与肿瘤的临床分期、格里森分级、远距离转移及治疗效果等均有明显的相关性^[24]。在机制上, $\beta 2m$ 可能通过诱导上皮间质转化的过程, 进而促进肿瘤细胞的转移^[24-26], 最终导致肿瘤进展。例如, 在前列腺癌的研究中发现, 前列腺癌细胞中, $\beta 2m$ 的表达量升高会刺激下游肿瘤细胞生长和骨转移相关因子的表达, 例如骨钙素、骨唾液蛋白、细胞周期素 A、细胞周期素 D1 和血管内皮生长因子^[26]。该研究还发现, 利用小干扰 RNA 下调 $\beta 2m$ 的 mRNA, 能够增加细胞凋亡, 有效抑制前列腺癌细胞的生长和骨转移^[26]。

CRISPR/Cas9 来源于细菌获得性免疫系统, 从被发现以来, 被广大实验者应用于细胞、植物和动物的基因编辑。目前, 大多数模式动物模型的构建都采用 CRISPR/Cas9 技术, 例如, 亨廷顿舞蹈病小鼠模型^[27]、杜兴氏肌肉萎缩症小鼠模型^[28]和其他多种基因敲除小鼠^[29]等。

合适的动物模型对于评估和开发肿瘤及其他疾病的临床治疗新方法, 对阐明目前临床有效治疗方法的机制至关重要。本研究结合 CRISPR/Cas9、显微注射、胚胎移植等技术, 在 C57BL/6 品系小鼠的背景下, 构建 $\beta 2m$ 基因敲除的小鼠模型。基因型鉴定和表型鉴定结果表明, $\beta 2m$ 基因敲除的小鼠模型构建成功。为后续进一步探究 $\beta 2m$ 在疾病发生发展过程中的功能及作用机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物伦理

实验方案经由上海南方模式生物科技股份有限公司实验动物福利和伦理委员会批准 (IACUC

号 2017-0003)。

1.2 试剂、耗材和仪器

体外转录试剂盒 (mMESSAGE mMACHINE™ T7 ULTRA Transcription Kit, Thermo Fisher Scientific, American, Cat. No. AM1345)、RNA 合成试剂盒 (HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit, New England Biolabs, American, Cat. No. E2040S)、TRNzol Universal 总 RNA 提取试剂 (Tiangen, China, Cat. No. DP424)、RNA 反转录试剂 (QuantScript RT Kit, Tiangen, China, Cat. No. KR103)、实时荧光定量 PCR 试剂 SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) (Tiangen, China, Cat. No. FP205)、鼠尾裂解液、普通 PCR 试剂 (TaKaRa LA Taq®, TaKaRa, China, Cat. No. RR02MA)、质粒小量提取试剂盒 (Plasmid Mini Kit II, Omega biotek, American, Cat. No. D6945)、琼脂糖凝胶回收试剂盒、*Bsa* I (New England Biolabs, American, Cat. No. R0535)、*Xba* I (New England Biolabs, American, Cat. No. R0145)、*Not* I (New England Biolabs, American, Cat. No. R0189)、T4 DNA 连接酶 (TaKaRa, China, Cat. No. 2011)、T4 DNA 聚合酶 (TaKaRa, China, Cat. No. 2040)、大肠杆菌 DH5a 感受态细胞 (*Escherichia coli* DH5a competent cells, TaKaRa, China, Cat. No. 9057)、电泳液 (MES running buffer, biofuraw™, Cat. No. BT8100-2001)、转膜液 (Fast transfer buffer stock solution (10×), biofuraw™, Cat. No. 8006-6006)、 $\beta 2m$ 抗体 (β -2-microglobulin (G-10), Santa cruz, American, Cat. No. sc-46697)、 β -actin 抗体 (β -actin antibody (C4) Alexa Fluor® 790, Cat. No. Santa cruz, American, sc-47778)、抗鼠的荧光二抗 (IRDye 800CW goat anti-mouse IgG (H+L), odyssey, American, Cat. No. 926-32212)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (增强型) (上海碧云天生物技术有限公司 Beyotime, China, Cat. No. P0009)、PCR 仪 (Eppendorf, type. Pro S)、移液

枪 (GILSON)、实时荧光定量 PCR 仪 (Analytikjena, type. QTOWER22)、琼脂糖凝胶电泳仪 (上海天能科技有限公司 TIANNENG, EPS-600)、恒温振荡仪 (上海智诚投资有限公司 ZHICHENG, type. ZHWY-211C)、流式细胞仪 (Beckman Coulter, type. CytoFLEX)。

1.3 质粒构建及体外转录

1.3.1 sgRNA 设计

参考 NCBI 数据库中 $\beta 2m$ 基因序列 (ID: 12010), 通过靶向 $\beta 2m$ 唯一转录本的 2 号和 3 号外显子。利用在线软件 CRISPR (<http://crispor.tefor.net/>) 进行 sgRNA 的设计, 分别选取效率高、特异性好的上游和下游的 sgRNA 序列 (表 1)。在 2 号外显子的上游 190 bp 位置和 3 号外显子的下游 138 bp 位置分别获得了一段 sgRNA 靶向核苷酸序列 (表 1)。

1.3.2 pX-T7-sg $\beta 2m$ 质粒构建

上述 sg $\beta 2m$ 寡核苷酸序列设计完成后送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成 sg $\beta 2m$ 寡核苷酸单链。由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成的 sg $\beta 2m$ 寡聚核苷酸单链采用以逐步降温的方式退火形成双链寡核苷酸, 首先, 预混 1 μ L (100 μ mol/L) sg $\beta 2m$ 正义链、1 μ L (100 μ mol/L) sg $\beta 2m$ 反义链, 补加双蒸水 ddH₂O 至 20 μ L。其次, 将预混液放置于 95 $^{\circ}$ C 沸水, 逐步冷却至室温, 即获得退火产物双链寡核苷酸。空载质粒

pX-T7-sgRNA 经限制性内切酶 *Bsa* I 酶切, 再经过琼脂糖凝胶电泳, 切胶回收获得纯化的线性化载体, 用 ddH₂O 稀释到 20 ng/ μ L。然后将双链寡核苷酸与稀释后的线性化载体在 T4 DNA 连接酶的作用下进行连接。连接体系和程序如下: 2 μ L 10 \times T4 DNA 连接酶缓冲液, 1 μ L T4 DNA 连接酶, 1 μ L 稀释后的线性化载体, 2 μ L 双链寡核苷酸, 14 μ L ddH₂O。室温过夜连接, 获得连接产物。将连接产物转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α , 转化过程参照 TaKaRa 的 *E. coli* DH5 α 感受态细胞转化流程, 转化产物涂布于含有氨苄青霉素的 LB 琼脂板, 第 2 天在 LB 琼脂板上挑取多个单克隆菌落, 接种于 6 mL LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 12–16 h。参照美国 Omega biotek 公司质粒小量提取试剂盒 Plasmid Mini Kit 的提取步骤提取质粒。送往生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 进行序列比对, 测序结果匹配的阳性克隆保存备用。

1.3.3 表达载体 pX-T7-sg $\beta 2m$ 和 Cas9 体外转录

首先, 表达载体分别用限制性内切酶 *Not* I 和 *Xba* I 进行酶切, 经过琼脂糖凝胶电泳, 切胶回收获得纯化的线性化转录模板 pX-T7-sg $\beta 2m$ -*Not* I 和 Cas9-*Xba* I。sg $\beta 2m$ 的体外合成参照美国 NEB 公司的 RNA 合成试剂盒 HiScribeTM T7 High Yield RNA Synthesis Kit 操作说明。Cas9 的

表 1 靶向 $\beta 2m$ 基因靶位点的 guideRNA 位点和寡核苷酸序列

Table 1 GuideRNA and oligonucleotide sequences targeting the target site of $\beta 2m$ gene

Primers	Sequence (5'-3')
Upstream sgRNA-1	GGAAAACAGAAGGTACTCGTAGG
Downstream sgRNA-2	ATTGTTTGATTCACTATCCTAGG
sg $\beta 2m$ -1 sense sequence	CACCGGGAAAACAGAAGGTACTCGT
sg $\beta 2m$ -1 antisense sequence	AAACACGAGTACCTTCTGTTTTCC
sg $\beta 2m$ -2 sense sequence	CACCGATTGTTTGATTCACTATCCT
sg $\beta 2m$ -2 antisense sequence	CACCGAGGATAGTGAATCAAACAAT

体外转录参照美国 Thermo Fisher Scientific 公司的体外转录试剂盒 mMESSAGE mMACHINE™ T7 ULTRA Transcription Kit 操作说明, 获得 Cas9 mRNA。

1.4 动物及动物模型构建

本实验小鼠饲养环境为 SPF 级, 符合国家标准[SXYK(沪)2014-0002]。C57BL/6 品系小鼠由上海南方模式生物有限公司提供。

利用显微注射的方法, 使体外转录获得的 Cas9 mRNA 和 sgβ2m 转染进入 C57BL/6 小鼠受精卵, 随后, 将此受精卵移植到假孕母鼠的卵巢内, 经胚胎发育, 分娩获得子代小鼠。在这一批子代小鼠中, 经鉴定存在 β2m 基因敲除的小鼠称作 F0 代小鼠, 将 F0 代小鼠与野生型小鼠杂交, 即可获得杂合子的 F1 代小鼠。将 F1 代杂合子小鼠自交, 有 1/4 的机率可获得 β2m 基因敲除的纯合子小鼠。

1.5 小鼠基因组 DNA 提取

剪取小鼠鼠尾 (长度 0.5 cm 左右), 放入已编号的 1.5 mL 离心管中并盖好盖子。每管加 0.5 mL 裂解液和 50 μL 蛋白酶 K 贮存液并将盖盖紧。将离心管置杂交炉中, 56 °C 转动过夜。次日将样本于室温、12 000 r/min 离心 10 min。上清倒入 1.5 mL 离心管中, 加 1 mL 无水乙醇 (约 2 倍上清体积), 盖紧盖子后轻摇, 可见絮状沉淀。13 000 r/min 离心 15 min, 弃上清。加 70% 乙醇 1 mL, 洗涤, 13 000 r/min 离心 10–15 min, 弃上清, 收集沉淀, 室温晾置 15 min。每管加 80–100 μL 灭菌水, 盖好后置室温或 37 °C 孵育 1 h 充分溶解。在室温中

放置数小时, 待 DNA 全部溶解后–20 °C 保存, 或直接进行 PCR 等实验。如 DNA 溶解不完全, 可在 37 °C 水浴中放置 30–60 min, 但不可过夜。DNA 浓度控制在 50–100 ng/μL, OD_{260/280} 在 1.8–2.0 之间。

1.6 PCR 鉴定小鼠基因型

经杂交和自交获得的子代小鼠, 需要通过 PCR 的方法进行基因型鉴定, 判断是否发生目的基因突变。PCR 模板为鼠尾裂解液中提取获得的基因组 DNA (Tail genomic DNA)。本实验中 F0 代小鼠、F1 代杂合子小鼠以及纯合子小鼠进行基因型鉴定的引物如表 2。

20 μL PCR 反应体系: 2 μL PCR 缓冲液 La Taq PCR Buffer, 2 μL 核苷酸混合物 (2.5 mmol/L) dNTPs, 0.5 μL 引物 1 (10 pmol/μL), 0.5 μL 引物 2 (10 pmol/μL), 0.8 μL DNA 聚合酶 La Taq DNA Polymerase, 1 μL Tail genomic DNA, 补加 ddH₂O 到 20 μL。PCR 反应程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 20 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 2 min。

1.7 实时荧光定量 PCR

qPCR 实验用以检测不同样本间的同种基因表达量的差异。首先将反转录得到的 cDNA 以一定的比例稀释, 在 StepOne Plus 实时定量 PCR 仪 (Applied Biosystem, USA) 中, 用特异性的引物 (表 2) 和 qPCR SYBR Green Master Mix 试剂进行扩增, 同时采集荧光数据。最终用于统计检验的结果来自至少 3 次生物重复实验。通过细胞骨架蛋白 β-actin 进行校正样本间目的基因表达水平的差异, 校正后即为: ΔCt(目的基因)=Ct(β-actin)–Ct

表 2 基因型鉴定和 qPCR 引物

Table 2 Genotyping and qPCR primers

Primers	Sequence (5'–3')	Application
P2	CTGCGGGCTTTGATGTGGATACT	Genotyping
P1	CCGGTGGGTGGCGTGAGT	Genotyping
P3	TGGCAGGGTTAAACAGAAGG	Genotyping
F	TCTCACTGACCGCCTGTAT	qPCR
R	GATTTCAATGTGAGGCGGGTG	qPCR

(目的基因)。为了计算得出基因相对表达量,还需要将 ΔCt 值转化为线性分度,再将实验组的数值除以对照组,最终得到标准化后的目的基因的相对表达量。

1.8 Western blotting

Western blotting 实验测定野生小鼠和 $\beta 2m$ -KO 小鼠不同免疫器官中目标基因的蛋白水平。实验步骤如下所述,首先进行蛋白的提取和蛋白定量,将取出的组织块放入离心管中,加入适量磁珠和 RIPA 裂解液,6 000 r/min 振荡 30 s 破碎 2 次,冰浴 10 min。随后进行离心,4 °C、12 000 r/min 离心 15 min,去除沉淀,得到的上清即为该组织蛋白。其次测定蛋白浓度,根据上海碧云天生物技术公司产品 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)的使用说明书进行蛋白定量,测得不同组织蛋白样品的浓度。然后取 20 μg 的蛋白加入等体积的上样缓冲液,在 100 °C 的水浴锅中煮沸 10 min,使蛋白变性。最后进行 Western blotting 实验。此实验具体过程如下,首先将上述变性后的 20 μg 蛋白样品进行电泳、转膜、封闭的过程,使蛋白吸附于硝酸纤维素膜(Nitrocellulose filter membrane,简称 NC 膜),然后将 NC 膜放置于 4 °C 冰箱孵育一抗过夜。第 2 天,取出该膜用 PBST 清洗 3 次,每次 5 min,去除多余的一抗。然后孵育荧光二抗,孵育条件为室温避光 1 h。再次取出该膜用 PBST 清洗 3 次,每次 5 min,去除多余的二抗。最后用 Odyssey 的双色红外激光成像仪进行成像。

1.9 流式细胞分析各免疫器官的细胞表型

野生型小鼠及 $\beta 2m$ 基因敲除小鼠分别取抗凝血、脾脏和胸腺。外周血取 100 μL ,加入抗体 PE anti-mouse CD3 antibody hh-200 μg (100206, Biolegend)、抗体 APC anti-mouse CD8a antibody (100712, Biolegend) 和 PE/Cy7 anti-mouse CD4 antibody (100422, Biolegend) 各 1.5 μL 。室温避光标记 30 min,标记结束后加入 1 mL 红细胞裂

解液,裂红 5 min。裂解完成后,4 °C、300 \times g 离心 5 min,弃上清。加入 1 mL PBS,洗涤细胞沉淀,随后 4 °C、300 \times g 离心 5 min,弃上清。200 μL PBS 重悬细胞沉淀,上机检测。对于脾脏和胸腺,先在 100 μm 滤网研磨,研磨后用 1 mL 红细胞裂解液反复冲洗滤网,将细胞冲洗下来,静置 5 min,裂解红细胞。裂解完成后,4 °C、300 \times g 离心 5 min,弃上清,加入 1 mL PBS 洗涤细胞沉淀。随后,4 °C、300 \times g 离心 5 min,弃上清,加入 PBS,调节细胞浓度至 10^7 个/mL,取 100 μL 用于标记。加入抗体 PE anti-mouse CD3 antibody hh-200 μg (100206, Biolegend)、抗体 APC anti-mouse CD8a antibody (100712, Biolegend) 和 PE/Cy7 anti-mouse CD4 antibody (100422, Biolegend) 各 1.5 μL ,室温避光标记 30 min,加入 1 mL PBS 洗涤细胞沉淀。4 °C、300 \times g 离心 5 min,弃上清,200 μL PBS 重悬细胞沉淀,上机检测。

1.10 统计学方法

所有实验结果都是使用 GraphPad Prism 6 软件进行统计学检验的,两组之间的比较使用 *t* 检验 (Student's *t*-test),只有一个影响因素的 3 组及 3 组以上的比较首先进行方差齐性分析检验,若方差是齐的则可进行单因素方差分析 (One-way ANOVA)。本论文所有的实验结果都是采用平均值 \pm 标准误 ($\bar{x} \pm s$) 形式,样本量“*n*”代表本实验的重复次数。 $P < 0.05$ 用*表示; $P < 0.01$ 用**表示; $P < 0.001$ 用***表示; $P > 0.05$ 用 NS (Not significant) 表示。

2 结果与分析

2.1 获得 $\beta 2m$ 基因敲除小鼠策略

$\beta 2m$ 基因编码蛋白 $\beta 2m$,全长 119 aa,包含一个信号肽和一个免疫球蛋白样的结构域(图 1A)。为了获得 $\beta 2m$ 基因敲除小鼠,我们利用 CRISPR/Cas9 技术进行构建。首先,我们将 Cas9 mRNA 和靶向 2 个不同位点的 sgRNA 利用显微注

射的方式,使之进入 C57BL/6 小鼠受精卵细胞中(图 1C)。CRISPR/Cas9-sgRNA 复合物可以通过对小鼠受精卵细胞进行基因修饰,靶向 $\beta 2m$ 的外显子 1 和 3'非翻译区 (3'UTR)(图 1B),去除小鼠基因组 $\beta 2m$ 基因的外显子 2 和外显子 3,破坏 $\beta 2m$ 蛋白的结构和功能。将基因编辑后小鼠受精卵体

外培养到囊胚期,然后移植到假孕母鼠的子宫,待其妊娠并产下子代小鼠(图 1C)。

2.2 $\beta 2m$ 基因敲除小鼠基因型鉴定

我们总共将 330 个受精卵移植到 10 个假孕母鼠的子宫内,最后获得 9 只 F0 代小鼠,利用特异性引物进行基因型鉴定(图 2A),结果显示得到了

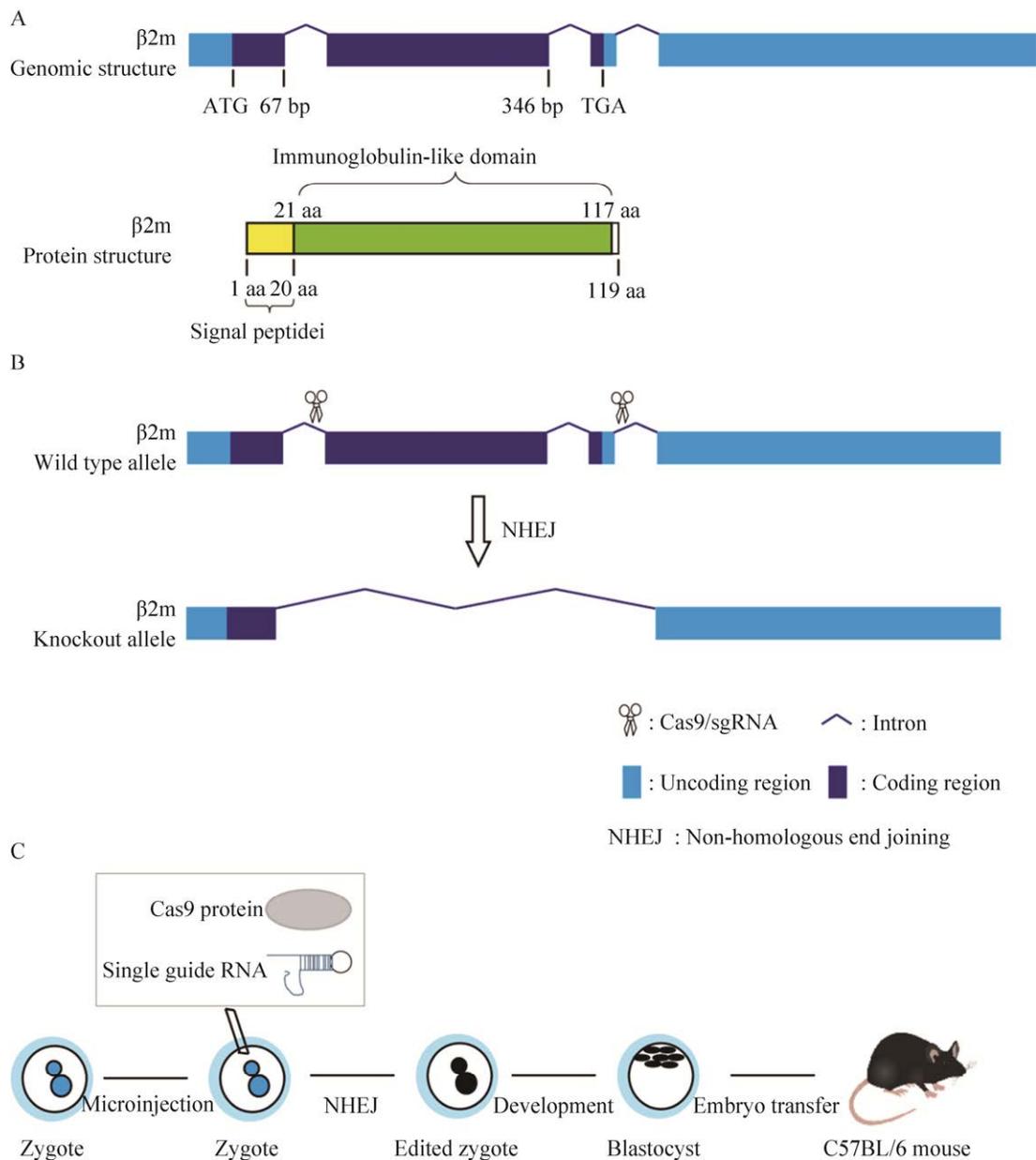


图 1 $\beta 2m$ 基因敲除小鼠构建策略

Fig. 1 Strategy for constructing $\beta 2m$ knockout mice. Schematic representation of the genomic and protein structure of $\beta 2m$ (A), the strategy for knocking out $\beta 2m$ (B), and the procedure for generating $\beta 2m$ knockout mice (C).

7 只阳性的 F0 代小鼠 (图 2B), 编号为 2、3、4、5、7、8、9。然后通过回交和自交分别获得 F1 代的杂合敲除小鼠和 F2 代的纯合敲除小鼠, 基因型

鉴定, 结果如图 2C 所示, 基因测序结果显示目标区域发生缺失 (图 2D)。基因型鉴定结果表明, 我们获得了带有纯合基因型的 $\beta 2m$ 基因敲除小鼠。

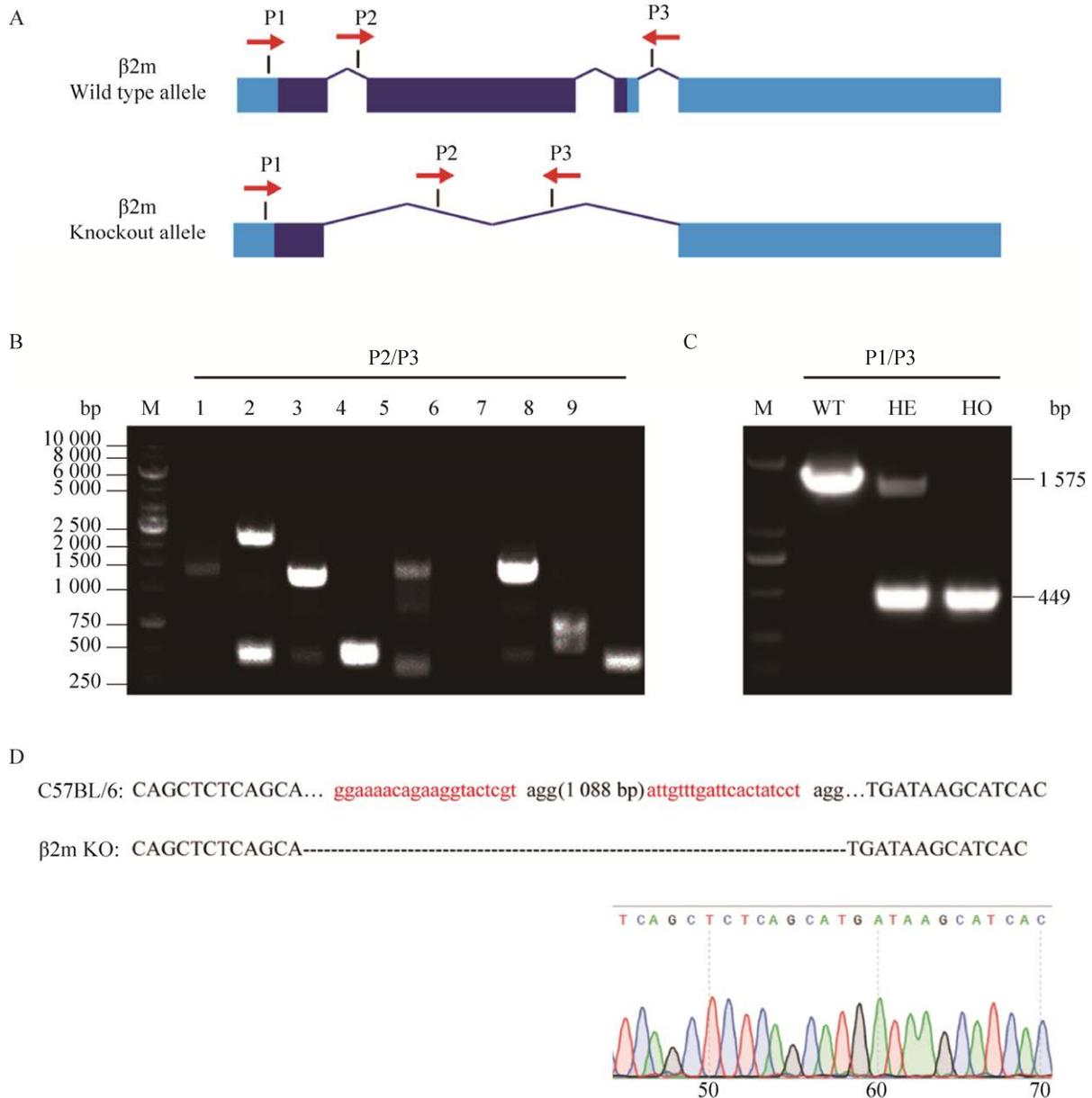


图 2 $\beta 2m$ 基因敲除小鼠基因型鉴定及序列测定

Fig. 2 Genotyping and sequencing of $\beta 2m$ knockout mice. (A) Strategy of $\beta 2m$ genotyping. (B) Genotyping results of F1 with primers (P2/P3) amplifying a band of 397 bp. (C) Genotyping results of F2 with primers (P2/P3) amplifying bands of 449 bp and 1 575 bp for heterozygous mice, and only a band of 449 bp for homozygous mice, and only a band of 1 575 bp for wild type mice. M, DL2000 DNA marker. (D) Genome sequence of C57BL/6 and homozygous mice. The red text is labeled as the guide RNA sequence. WT: wild type mice. KO: knockout mice, HE, heterozygous mice. HO: homozygous mice.

2.3 $\beta 2m$ 基因表达水平检测

为了进一步鉴定 $\beta 2m$ 基因敲除后该基因的表达水平,我们设计了针对 $\beta 2m$ 基因敲除区的特异性引物 (图 3A), 每种基因型的小鼠分别选择 2 只, 分别提取其脾脏、胸腺和血液中的 RNA。利用靶向敲除区的特异性引物, 通过 qPCR 实验, 比较了野生型 C57BL/6 小鼠和 C57BL/6 敲除小鼠不同免疫器官中 $\beta 2m$ 基因的表达水平。qPCR 结果显示, $\beta 2m$ 基因表达在不同免疫器官中均有下降。相对于野生型小鼠, 杂合小鼠 $\beta 2m$ 基因表达显著下降, 在

纯合小鼠的不同免疫器官中 $\beta 2m$ 基因则完全没有表达 (图 3B、3C、3D)。琼脂糖凝胶电泳结果进一步证实了这一现象 (图 3E)。结果表明, 我们构建的 $\beta 2m$ 基因敲除小鼠成功实现 $\beta 2m$ 基因表达下调。

2.4 $\beta 2m$ 基因敲除小鼠表型鉴定

为了鉴定 $\beta 2m$ 基因敲除小鼠的表型, 我们通过流式细胞分析, 对比了敲除小鼠与野生小鼠的不同免疫器官中 $CD4^+$ T 和 $CD8^+$ T 细胞的数量。首先, 我们进一步证实敲除小鼠的不同免疫器官中 $\beta 2m$ 的表达水平发生显著下调 (图 4A、4B)。FACS 结

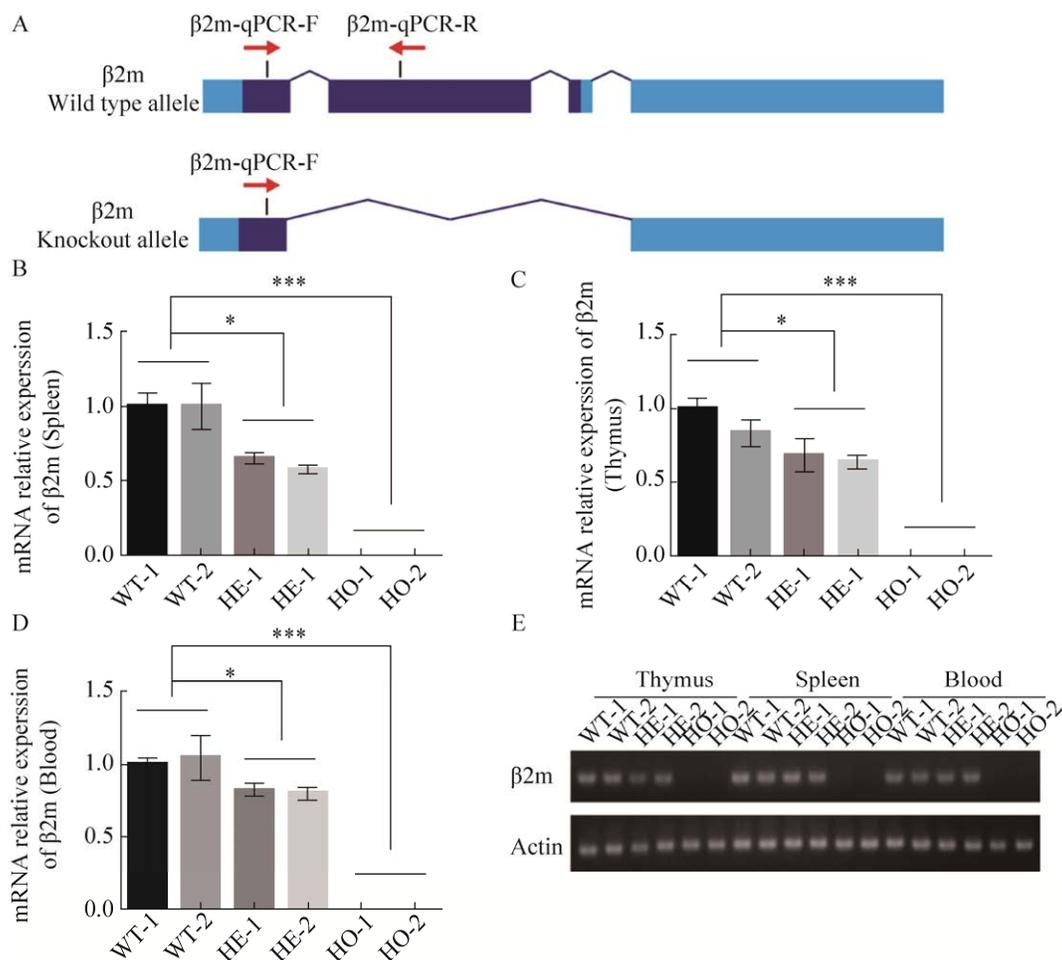


图 3 KO 小鼠 $\beta 2m$ 基因表达水平检测

Fig. 3 Detection of $\beta 2m$ gene expression. (A) Strategy for identification of $\beta 2m$ knockout mice. (B) Detection of relative expression of $\beta 2m$ mRNA in spleen. (C) Detection of relative expression of $\beta 2m$ mRNA in thymus. (D) Detection of relative expression of $\beta 2m$ mRNA in blood. Error bars: *s*; *n*=3; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; NS: not significant, $P > 0.05$; one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test. (E) Electrophoresis identification results. WT: wild type mice; HE: heterozygous mice; HO: homozygous mice.

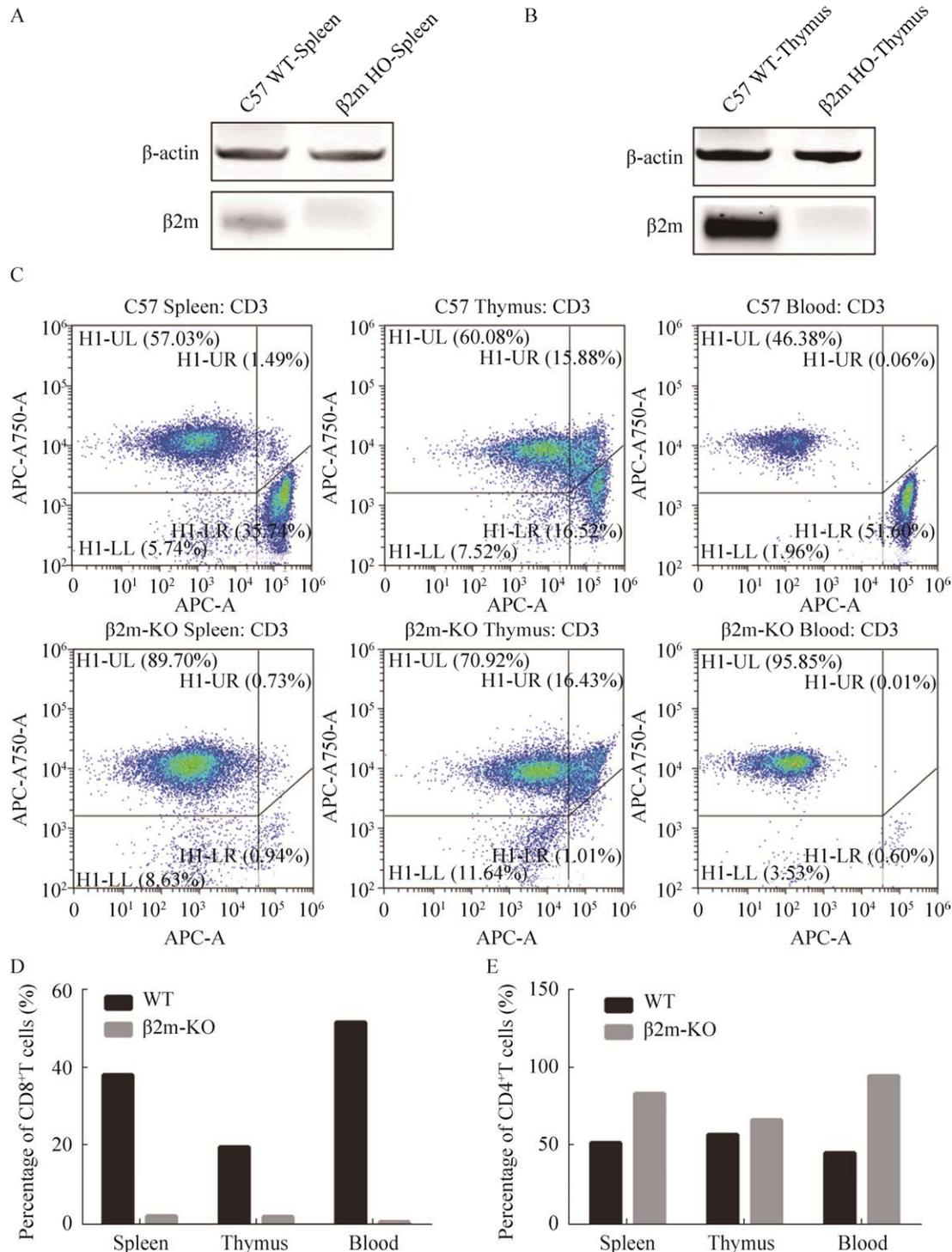


图 4 流式细胞分选鉴定 $\beta 2m$ 基因敲除小鼠表型

Fig. 4 Phenotype identification of knockout mice by flow cytometry. (A) Detection of relative expression of $\beta 2m$ protein in spleen of each genotype mouse. (B) Detection of relative expression of $\beta 2m$ protein in thymus of each genotype mouse. (C) Comparison of the number of different types of T cells in different immune organs between wild type mice and mutant mice by flow cytometry analysis. (D) Statistical analysis of CD4⁺T cell count in different immune organs of C57BL/6 mice with or without $\beta 2m$ knockout. (E) Statistical analysis of CD8⁺T cell count in different immune organs of C57BL/6 mice with or without $\beta 2m$ knockout. WT: wild type mice; $\beta 2m$ -KO: $\beta 2m$ knockout mice.

果(图 4C)显示,在血液、脾脏和胸腺当中,CD8⁺杀伤性 T 细胞的数量显著减少,仅有极少量的 CD8⁺杀伤性 T 细胞的存在(图 4D)。另外,CD4⁺ T 细胞量有少量增加(图 4E),此结果与先前的研究相一致。综上所述,我们成功构建了 $\beta 2m$ 基因敲除小鼠。

3 讨论

器官移植作为晚期器官衰竭的主要治疗选择,在近几十年里受到广泛的关注和应用。在 2015 年,有接近 8000 例的肝移植治疗。移植供体不足和移植后的免疫排斥反应仍然是两个主要问题。移植后的免疫排斥反应是由供体组织或器官细胞表面的主要组织相容性复合体(MHC)介导,激活受体免疫系统产生的免疫反应,最终导致移植器官被破坏无法发挥正常的功能。免疫反应包括免疫细胞直接产生的细胞毒性作用,例如杀伤性 T 细胞介导的靶细胞的程序性细胞死亡。 $\beta 2m$ 作为 MHC I 的主要组成成分,曾经被认为在移植后的排斥反应中发挥着重要的作用。与之前的研究相一致的是,我们的实验结果表明, $\beta 2m$ 敲除的小鼠 CD8⁺杀伤性 T 细胞的数量极大减少,仅有少量的 CD8⁺杀伤性 T 细胞产生,虽然这少量的细胞可能在机体的免疫反应中发挥着重要的作用^[30]。另外,CD4⁺CD8⁻的杀伤性 T 细胞发生代偿性的增加。由此,导致 CD4⁺ T 细胞/CD8⁺ T 细胞比率增加。有文献报道,在早期感染阶段,旋毛虫会引起机体的免疫抑制,表现为在感染后的第 11 天,机体免疫细胞 CD4⁺ T 细胞/CD8⁺ T 细胞比率发生显著的降低。在机体被病原菌感染时,CD4⁺ T 细胞被激活,进而扩增及分化形成多种不同的辅助性 T 细胞。然而当 CD4⁺ T 细胞被过度激活时,可能会引发自身免疫性疾病。所以,CD4⁺ T 细胞/CD8⁺ T 细胞比率增加可能会导致机体的炎症反应。 $\beta 2m$ 敲除的小鼠可以正常生存和增殖,CD8⁺ T 细胞在免疫系统中显著降低。因此, $\beta 2m$ 敲除的小鼠动物模型常常被用来研究 CD8⁺杀伤性 T 细

胞在器官移植后的免疫排斥反应中的作用。

近年来, $\beta 2m$ 的研究主要集中在其他方面。慢性胃病患者血清中高水平的 $\beta 2m$ 与慢性胃病的进展呈正相关,与肾小球滤过率呈负相关。透析相关的淀粉样沉积导致机体各关节部位的 β 淀粉样沉积,沉积的主要成分是 $\beta 2m$ 。另外, $\beta 2m$ 与不同的癌症之间存在着或促进或抑制的关系,可能取决于癌症的类型和肿瘤的进展,但是目前尚无靶向 $\beta 2m$ 用于治疗这些疾病的药物问世,因此, $\beta 2m$ 在这些疾病中作用机制仍需进一步的研究探讨。本研究以基因编辑技术 CRISPR/Cas9 为基础,构建了 $\beta 2m$ 基因敲除 C75BL/6 小鼠,为后续进一步体内实验探究 $\beta 2m$ 在不同疾病中的功能及作用机制奠定了基础。然而由于人和鼠的免疫系统存在巨大的差异,所以本文的实验结果需慎重看待。

4 致谢

感谢复旦大学基础医学院细胞与遗传医学系提供的实验平台,感谢细胞与遗传医学系副主任刘雯老师对本实验的指导,同时,感谢上海南方模式生物有限公司提供的实验用鼠。

REFERENCES

- [1] Winchester JF, Salsberg JA, Levin NW. Beta-2 microglobulin in ESRD: an in-depth review. *Adv Ren Replace Ther*, 2003, 10(4): 279-309.
- [2] Vincent C, Revillard JP. Beta-2-microglobulin and HLA-related glycoproteins in human urine and serum. *Contrib Nephrol*, 1981, 26: 66-88.
- [3] Peterson PA, Cunningham BA, Berggård I, et al. 2-microglobulin—a free immunoglobulin domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1972, 69(7): 1697-1701.
- [4] Scarpioni R, Ricardi M, Albertazzi V, et al. Dialysis-related amyloidosis: challenges and solutions. *Int J Nephrol Renovasc Dis*, 2016, 9: 319-328.
- [5] Nakajima Y, Hoshi F, Higuchi S, et al. The complete amino acid sequence of dog beta 2-microglobulin. *J Vet Med Sci*, 1999, 61(5): 517-521.
- [6] Filler G, Lepage N, Delisle B, et al. Effect of cyclosporine on mycophenolic acid area under the

- concentration-time curve in pediatric kidney transplant recipients. *Ther Drug Monit*, 2001, 23(5): 514-519.
- [7] Inker LA, Tighiouart H, Coresh J, et al. GFR estimation using β -trace protein and $\beta 2$ -microglobulin in CKD. *Am J Kidney Dis*, 2016, 67(1): 40-48.
- [8] Juraschek SP, Coresh J, Inker LA, et al. Comparison of serum concentrations of β -trace protein, $\beta 2$ -microglobulin, cystatin C, and creatinine in the US population. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2013, 8(4): 584-592.
- [9] Wadhwa R, Yaguchi T, Hasan MK, et al. Hsp70 family member, mot-2/mthsp70/GRP75, binds to the cytoplasmic sequestration domain of the p53 protein. *Exp Cell Res*, 2002, 274(2): 246-253.
- [10] Floege J, Bartsch A, Schulze M, et al. Clearance and synthesis rates of beta 2-microglobulin in patients undergoing hemodialysis and in normal subjects. *J Lab Clin Med*, 1991, 118(2): 153-165.
- [11] Drüeke TB. Cell biology of parathyroid gland hyperplasia in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 2000, 11(6): 1141-1152.
- [12] Drüeke TB. B 2-microglobulin and amyloidosis. *Nephrol Dial Transplant*, 2000, 15(suppl_1): 17-24.
- [13] Assenat H, Calemard E, Charra B, et al. Hemodialysis: carpal tunnel syndrome and amyloid substance. *La Nouvelle Press Med*, 1980, 9(24): 1715.
- [14] Gejyo F, Yamada T, Odani S, et al. A new form of amyloid protein associated with chronic hemodialysis was identified as beta 2-microglobulin. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985, 129(3): 701-706.
- [15] Gorevic PD, Casey TT, Stone WJ, et al. Beta-2 microglobulin is an amyloidogenic protein in man. *J Clin Invest*, 1985, 76(6): 2425-2429.
- [16] Aoike I, Fumitake G, Arakawa M, et al. Learning from the Japanese registry: how will we prevent long-term complications? *Nephrol Dial Transplant*, 1995, 10(suppl7): 7-15.
- [17] Hakim RM, Wingard RL, Husni L, et al. The effect of membrane biocompatibility on plasma beta 2-microglobulin levels in chronic hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*, 1996, 7(3): 472-478.
- [18] Pickett TM, Cruickshank A, Greenwood RN, et al. Membrane flux not biocompatibility determines beta-2-microglobulin levels in hemodialysis patients. *Blood Purif*, 2002, 20(2): 161-166.
- [19] Hartmann J, Fricke H, Schifffl H. Biocompatible membranes preserve residual renal function in patients undergoing regular hemodialysis. *Am J Kidney Dis*, 1997, 30(3): 366-373.
- [20] Schifffl H, Fischer R, Lang SM, et al. Clinical manifestations of AB-amyloidosis: effects of biocompatibility and flux. *Nephrol Dial Transplant*, 2000, 15(6): 840-845.
- [21] Koda Y, Nishi S, Miyazaki S, et al. Switch from conventional to high-flux membrane reduces the risk of carpal tunnel syndrome and mortality of hemodialysis patients. *Kidney Int*, 1997, 52(4): 1096-1101.
- [22] Miura Y, Ishiyama T, Inomata A, et al. Radiolucent bone cysts and the type of dialysis membrane used in patients undergoing long-term hemodialysis. *Nephron*, 1992, 60(3): 268-273.
- [23] Teasdale C, Mander AM, Fifield R, et al. Serum $\beta 2$ -microglobulin in controls and cancer patients. *Clin Chimica Acta*, 1977, 78(1): 135-143.
- [24] Zhang YX, Wang L, Ji PY, et al. Correlation of serum $\beta 2$ -microglobulin levels with prostate-specific antigen, gleason score, clinical stage, tumor metastasis and therapy efficacy in prostate cancer. *Arch Med Res*, 2013, 44(4): 259-265.
- [25] Jossen S, Nomura T, Lin JT, et al. $\beta 2$ -microglobulin induces epithelial to mesenchymal transition and confers cancer lethality and bone metastasis in human cancer cells. *Cancer Res*, 2011, 71(7): 2600-2610.
- [26] Huang WC, Wu DQ, Xie ZH, et al. $\beta 2$ -microglobulin is a signaling and growth-promoting factor for human prostate cancer bone metastasis. *Cancer Res*, 2006, 66(18): 9108-9116.
- [27] Yang S, Chang R, Yang H, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease. *J Clin Invest*, 2017, 127(7): 2719-2724.
- [28] Bengtsson NE, Hall JK, Odom GL, et al. Muscle-specific CRISPR/Cas9 dystrophin gene editing ameliorates pathophysiology in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun*, 2017, 8: 14454.
- [29] Liu C, Chen CY, Shang QH, et al. Establishment of Ace2 knockout mouse model with CRISPR/Cas9 gene targeting technology. *Sheng Li Xue Bao*, 2019, 71(4): 588-596.
- [30] Freland S, Ljunggren HG. Beta 2-microglobulin/CD8^{-/-} mice reveal significant role for CD8⁺ T cells in graft rejection responses in beta 2-microglobulin^{-/-} mice. *Scand J Immunol*, 2000, 51(3): 219-223.

(本文责编 陈宏宇)