



王可洲, 基础兽医学专业博士, 研究员。现任山东第一医科大学 (山东省医学科学院) 实验动物学院 (省实验动物中心) 常务副院长 (常务副主任)、药理学专业硕士研究生指导教师, 主要从事消化道黏膜免疫及分子病理学研究, 以及全省实验动物管理、检测、病理及毒理等方面的研究管理工作。同时兼任中国实验动物学会理事, 中国实验动物学会标准化委员会副主任委员、实验动物与毒理学专业委员会常务委员、实验病理学专业委员会委员、环境控制与节能专业委员会委员, 山东省实验动物学会副理事长兼秘书长, 山东药理学学会药物毒理专业委员会副主任委员, 山东药理学学会中药药理专业委员会副主任委员, 山东省毒理学学会副秘书长, 山东免疫学会兽医免疫学专业委员会副主任委员。主持完成国家自然科学基金项目1项, 山东省自主创新成果转化重大专项2项, 省博士基金1项, 山东省科技攻关计划项目2项, 国家重点研发计划子课题1项, 现主持山东省重点研发计划项目1项。在国内外期刊发表论文40余篇, 主译著作2部, 副主编著作1部, 参编著作4部。

利用CRISPR/Cas9技术构建脂多糖结合蛋白基因敲除小鼠

李思迪¹, 付彬¹, 郭中坤¹, 林颖杰^{1,2}, 张振宇¹, 米传靓¹, 王可洲¹

(1. 山东第一医科大学(山东省医学科学院)实验动物学院(省实验动物中心), 济南 250002; 2. 山东第一医科大学附属皮肤病医院(山东省皮肤病医院), 山东省皮肤病性病防治研究所, 济南 250022)

[摘要] **目的** 利用成簇的规律间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) /CRISPR相关蛋白核酸酶9 (CRISPR-associated nuclease 9, Cas9) 基因编辑技术构建稳定遗传的脂多糖结合蛋白 (lipopolysaccharide binding protein, *Lbp*) 基因敲除小鼠。**方法** 根据C57BL/6J小鼠的*Lbp*基因序列特征, 设计sgRNA靶点, 删除*Lbp*基因5'-端蛋白编码保守序列并引入移码突变, 使编码LBP失活。提取F0、F1、F2、F3代小鼠基因组, PCR鉴定并测序验证*Lbp*基因敲除效果, RT-PCR测序验证*Lbp*基因转录水平, 蛋白质印迹法验证F2代LBP蛋白表达水平。**结果** F0代获得5只杂合子敲除小鼠 (*Lbp*^{+/-})、F1代获得3只*Lbp*^{+/-}小鼠, F2代获得4只*Lbp*纯合子敲除小鼠 (*Lbp*^{-/-}), F3代获得30只*Lbp*^{-/-}小鼠。RT-PCR测序表明, *Lbp*^{-/-}小鼠mRNA缺失244 bp且发生移码突变, 导致翻译提前终止。蛋白质印迹证明*Lbp*^{-/-}小鼠肝脏组织中无LBP蛋白表达。**结论** 通过CRISPR/Cas9技术成功构建可以稳定遗传的*Lbp*基因敲除小鼠, 为后续进一步研究LBP的免疫及其生理作用提供基础。

[关键词] 脂多糖结合蛋白; CRISPR/Cas9技术; 稳定遗传; 基因敲除小鼠

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)04-0294-07

Construction of Lipopolysaccharide Binding Protein Knockout Mice Using CRISPR/Cas9 Technology

LI Sidi¹, FU Bin¹, GUO Zhongkun¹, LIN Yingjie^{1,2}, ZHANG Zhenyu¹, MI Chuanliang¹, WANG Kezhou¹

(1. School of Laboratory Animal & Shandong Laboratory Animal Center, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250002, China; 2. Shandong Provincial Hospital for Skin Diseases & Shandong Provincial Institute of Dermatology and Venereology, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250022, China)

Correspondence to: WANG Kezhou (ORCID: 0000-0003-1919-272X), E-mail: wangkezhou_cn@163.com

[ABSTRACT] **Objective** To construct a stable hereditary lipopolysaccharide binding protein (*Lbp*) gene

[第一作者] 李思迪 (1996—), 女, 硕士研究生, 药理学专业。E-mail: 1322701578@qq.com

[通信作者] 王可洲 (1974—), 男, 研究员, 硕士研究生导师, 主要从事药理毒理学研究。E-mail: wangkezhou_cn@163.com。ORCID: 0000-0003-1919-272X

knockout mice by using clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated nuclease 9 (Cas9) gene editing technology. **Methods** According to the sequence characteristics of *Lbp* gene in C57BL/6J mice, the target of sgRNA was designed, the 5'-end protein coding conserved sequence of *Lbp* gene was deleted and the shift mutation was introduced to inactivate LBP. The genome of F0, F1, F2, F3 generation mice was extracted; PCR was used to identify and sequence *Lbp* knockout; RT-PCR was used to verify *Lbp* gene transcription, and Western blotting was used to verify LBP protein expression in F2 generation. **Results** Five *Lbp*^{-/-} mice from F0 generation, three *Lbp*^{-/-} mice from F1 generation, four *Lbp*^{-/-} mice from F2 generation and thirty *Lbp*^{-/-} mice from F3 generation were obtained. RT-PCR showed that *Lbp*^{-/-} mice mRNA was 244 bp and the translation was stopped early by code-shifting mutation. Western blotting showed that LBP protein was not expressed in the liver of *Lbp*^{-/-} mice. **Conclusion** The *Lbp* gene knockout mice were successfully constructed by CRISPR/Cas9 technique, which will provide a basis for further study of the immune and physiological effects of LBP.

[Key words] Lipopolysaccharide binding protein; CRISPR / cas9 technology; Stable inheritance; Gene knockout mice

脂多糖结合蛋白 (lipopolysaccharide binding protein, LBP) 作为一种糖蛋白, 是LBP家族成员之一^[1]。LBP的相对分子质量为60 000, 其蛋白质部分是相对分子质量为50 000的单链多肽^[2-3]。LBP分布广泛, 在啮齿类动物的心、肝、肺等多个器官中均有表达, 其中在肝脏中的表达水平较高。人和动物血清中的LBP主要与脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 结合发挥作用^[4]。LPS又被称为内毒素, 是革兰阴性菌外膜上的主要成分之一, 可以促进炎症发生, 引起机体各种疾病, 严重时甚至会导致机体死亡^[5]。研究表明, LBP与多种疾病的发生发展相关。如Heizhati等^[6]在研究LBP对睡眠结构影响的实验中发现, 血清LBP高浓度与中年男性高血压患者睡眠第一阶段时间延长相关; Pal等^[7]在研究与帕金森病有关的胃肠道炎症性标志物时, 发现LBP是一种与LPS神经毒性相关的胃肠道生物标志物。He等^[8]在研究LPS诱导下LBP编码基因缺失 (*Lbp*^{-/-}) SD大鼠的转录水平及其在脓毒症期间对肝脏的影响时发现, 当核因子κB (nuclear factor kappa-B, NF-κB) 的活性受到抑制时, *Lbp*基因缺失会影响过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferators activated receptor, PPAR) 信号通路, 从而影响细菌清除。Li等^[9]研究了牛野生型LBP和突变型LBP (67Ala变Thr) 对LPS诱导牛乳腺上皮细胞 (bovine mammary epithelial cells, BMEC) 炎症反应的影响, 发现5 μg/mL突变型LBP处理BMEC导致的细胞凋亡率高于野生型LBP, 且没有细胞毒性。这些相关研究揭示了LBP与LPS结合可导致炎症反应的发生, 但对其具体作用机制的研究还不够深入。为探索LPS在*Lbp*基因敲除小鼠体内如何诱导炎症反应发生、发展, 本文将外显子2

的全部序列与外显子3的部分序列特异剪切, 建立*Lbp*基因敲除小鼠模型, 为进一步研究LBP蛋白在免疫方面的作用机制和生理作用提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级C57BL/6J小鼠和ICR小鼠均购自北京唯尚立德生物科技有限公司 [SCXK (京) 2016-0009], 饲养于山东省实验动物中心 [SYXK (鲁) 2019-0007], 饲料购自济南朋悦实验动物繁育有限公司, 并经⁶⁰Co灭菌。实验动物使用遵循3R原则, 且获得山东省实验动物中心伦理委员会批准 (20181224-01)。

1.2 主要试剂与仪器

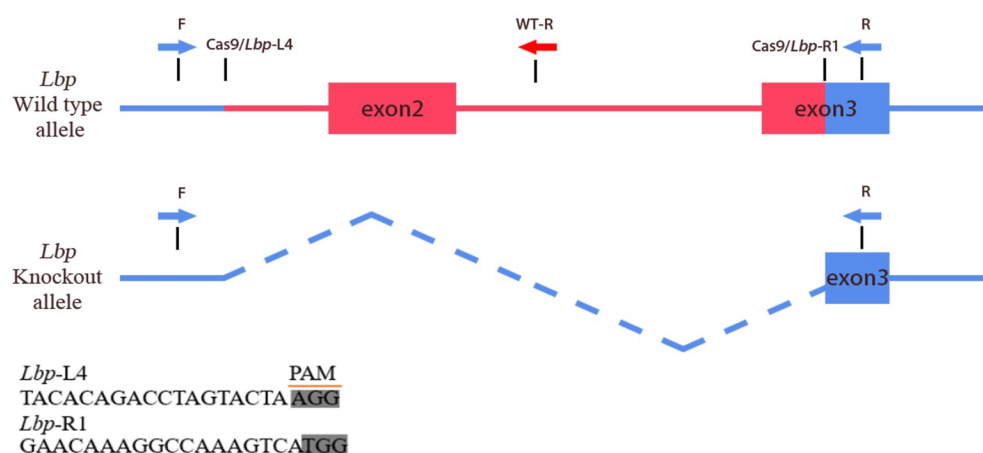
实验所用试剂: Cas9 mRNA、Cas9/gRNA靶点效率检测试剂盒 (VK007) 购自北京唯尚立德生物科技有限公司; Hi Scribe T7 ARCA mRNA试剂盒 (E2065S) 购自美国New England Biolabs公司; 人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, hCG) (181223)、血促性素 (pregnant mare serum gonadotrophin, PMSG) (1905152) 购自宁波第二激素厂; pClone007 Blunt Simple VECTOR Kit (OCE20601)、金牌 mix (TSE101)、动物组织/细胞基因组DNA提取试剂盒 (0180331AX) 均购自北京擎科生物科技有限公司; Total RNA Kit II (R6934-02) 购自美国Omega公司; 通用抗体稀释液 (U3635) 购自美国Sigma公司; 高效抗体稀释液 (WA-002) 购自美国Invent Biotechnologies公司; 高效RIPA组织/细胞快速裂解液 (R0010) 购自北京索莱宝科技有限公司; 一抗β-actin (4970S)、辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase,

HRP) 标记的抗兔 IgG 二抗 (7074S) 均购自 Cell Signaling Technology 公司; 一抗 LBP (PA5-79586) 购自美国 Invitrogen 公司。

实验所用仪器: 拉针仪 (PN-31) 购自日本 Narishige 公司; 高速冷冻离心机 (5424R) 购自德国 Eppendorf 公司; 凝胶成像仪 (Universal Hood II) 购自美国 Bio-Rad 公司; 体视显微镜 (SMZ745T) 购自日本 Nikon 公司; PCR 仪 (Mastercycler X50s) 购自德国 Eppendorf 公司; 显微注射用显微镜 (IX73P1F) 购自日本 Olympus 公司; 电泳仪 (PowerPac™ Basic) 购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 *Lbp* 基因 sgRNA 靶点设计及制备

根据数据 NCBI-Gene ID: 16803 及 Ensembl-Gene: *Lbp* ENSMUSG00000016024 可得 *Lbp* 基因的序列结构、保守区域及转录产物等信息, 依据这些信息设计小向导 RNA (small guide RNA, sgRNA) 的靶点。对 *Lbp* 基因的序列进行分析后, 本实验选择剪切 2 号外显子全部序列及 3 号外显子部分序列, 图 1 为靶点剪切示意图。靶点设计完成后进行体外转录, 并检测转录产物活性, 筛选出酶切活性较高的 sgRNA 靶点备用。同时参照 Hi Scribe T7 ARCA mRNA 试剂盒说明书制备 Cas9 mRNA。



注: *Lbp* 指脂多糖结合蛋白基因。下方为靶点 *Lbp*-L4 和 *Lbp*-R1 的序列, 序列标灰为原间隔序列临近基序 (PAM)

Note: *Lbp*, lipopolysaccharide binding protein gene. Below is the sequences of *Lbp*-L4 and *Lbp*-R1, and the sequence gray is protospacer adjacent motif (PAM).

图1 *Lbp* 基因敲除示意图

Figure 1 *Lbp* gene knockout diagram

1.4 胚胎移植及其前期准备

准备 4 周龄 C57BL/6J 雌鼠和 8~12 周龄 C57BL/6J 雄鼠。雌鼠腹腔注射 PMSG 0.1 mL (5 U) /只, 48 h 后腹腔注射 hCG 0.1 mL (5U) /只, 18 h 后取卵子备用。取雄鼠附睾, 再从附睾中取出精子。

取出的精子在获能液中获能后, 选取活力较好的精子滴加到经过短暂培养的卵细胞中, 经 3~4 h 体外受精获得受精卵。用 RNA-free 水配制 sgRNA&Cas9 mRNA 混合物 (sgRNA 25 ng/μL, Cas9 mRNA 50 ng/μL), 借助显微注射系统将其注射到受精卵内。将注射 sgRNA&Cas9 mRNA 混合物的受精卵移植到经 12.5 mg/mL 三溴乙醇腹腔注射麻醉后的假孕 ICR 雌鼠输卵管中, 将代孕 ICR 雌鼠置于独立通气笼盒 (individual

ventilated cages, IVC) 中饲养, 待小鼠出生后鉴定基因型。

1.5 *Lbp* 基因敲除小鼠的获得及鉴定

将代孕 ICR 雌鼠生产的仔鼠作为 Founder 并命名为 F0 代, F0 代出生 2 周后, 剪小鼠的脚趾进行编号, 使用基因组提取试剂盒提取小鼠基因组。使用正向引物 (F: CATTTGTTTGGAACCCC) 和反向引物 (R: AAGGGCTGGAATGCTAATG) 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: TSE101 mix 15 μL、上游引物 0.6 μL、下游引物 0.6 μL、DNA 1.2 μL、ddH₂O 2.6 μL。反应条件: 94 °C 预变性 4 min; 98 °C 变性 20 s, 59 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 55 s, 共 35 个循环; 68 °C 延伸 10 min; 10 °C 保持。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 目的条带切胶

回收进行平末端克隆、转化、涂板,并挑单克隆测序验证。结合基因组鉴定和测序结果:只出现770 bp左右的目的条带,且测序显示单链缺失1 457 bp的判断为 $Lbp^{-/-}$;只出现2 153 bp左右的野生型(wild type, WT)条带,且测序显示与WT一致的判断为 $Lbp^{+/+}$;出现770 bp左右的目的条带及2 153 bp左右的WT条带,且770 bp左右目的条带测序显示单链缺失1 457 bp的判断为 $Lbp^{+/-}$ 。F0代后新增引物WT-R(TGCCTGACCCAAGAGTTT),对引物F/R基因鉴定结果进一步验证:F/WT-R出现810 bp左右的WT条带的为 $Lbp^{+/+}$ 或 $Lbp^{+/-}$,未出现任何条带的为 $Lbp^{-/-}$ 。F0代小鼠进行基因组鉴定测序后,选出 $Lbp^{+/-}$ 小鼠与WT小鼠交配,生产的后代为F1代;F1代小鼠基因组鉴定测序后,选出 $Lbp^{+/-}$ 小鼠自交,生产的后代为F2代;F2代小鼠基因组鉴定及测序后,选出 $Lbp^{+/-}$ 小鼠自交,生产的后代为F3代;F3代小鼠继续进行基因组鉴定及测序。

1.6 RT-PCR 测序鉴定 Lbp 基因敲除小鼠的 mRNA 转录

使用Total RNA Kit II试剂盒提取组织总RNA,将总RNA反转录为cDNA,使用正向引物(F: TGCTCTCTACATTGCTGGGG)和反向引物(R: GGAGGTCCACTGAAATGGTG)进行PCR扩增。PCR反应体系:TSE101 mix 10 μ L、上游引物0.4 μ L、下游引物0.4 μ L、cDNA 1 μ L、ddH₂O 3.2 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性3 min;95 $^{\circ}$ C变性30 s,52 $^{\circ}$ C退火50 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,共35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸5 min;10 $^{\circ}$ C保持。PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,目的条带切胶回收后进行平末端克隆、转化、涂板、挑单克隆测序验证。结合PCR结果和测序结果:只出现121 bp左右目的条带,且测序显示单链缺失244 bp的判断为 $Lbp^{-/-}$;只出现365 bp左右WT条带,且测序显示与WT一致的判断为 $Lbp^{+/+}$;出现121 bp左右目的条带及365 bp左右WT条带,且121 bp左右目的条带测序显示单链缺失244 bp的判断为 $Lbp^{+/-}$ 。

1.7 蛋白质印迹法检测 Lbp 基因敲除小鼠的 LBP 蛋白表达

因NCBI及MGI数据提示LBP在肝脏中表达量较高,故本实验选取肝脏组织蛋白进行蛋白质印迹实验。取WT小鼠、 Lbp 敲除杂合子鼠($Lbp^{+/-}$)及 Lbp 敲除纯合子鼠($Lbp^{-/-}$)的肝脏组织,加入预冷的蛋白裂解液与蛋白酶抑制剂,组织破碎后冰上反应30 min,4 $^{\circ}$ C

14 000 $\times g$ 离心5 min,取上清液并用改良型Bradford蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。然后加5 $\times$ 蛋白Loading于100 $^{\circ}$ C煮沸10 min,用5%的浓缩胶与8%的分离胶分离蛋白,0.2 A、1.5 V转膜50 min,5%的脱脂奶粉37 $^{\circ}$ C封闭2 h,用预冷的TBST洗3次(每次10 min),加入一抗(β -actin及兔抗小鼠LBP抗体均1:1 000稀释)且4 $^{\circ}$ C孵育过夜,第二天用预冷的TBST洗3次(每次10 min),加入二抗(HRP标记的抗兔 β -actin IgG以1:2 000稀释,HRP标记的抗兔LBP IgG以1:10 000稀释)且37 $^{\circ}$ C孵育2 h,用预冷的TBST洗3次(每次10 min),Immobilon Western化学发光HRP底物(ECL发光试剂)显色后凝胶成像仪成像。

2 结果

2.1 根据 Lbp 基因组结构设计 CRISPR/gRNA 靶点

通过NCBI及Ensembl网站查询可知, Lbp 基因有5个转录产物,其中3个可翻译为蛋白质。对该基因蛋白功能保守区域及基因序列相关信息分析发现,2、3号两个公共外显子位于功能保守区BPI/LBP/CETP N端区,剪切位点位于42~123 aa处,其蛋白编码区的碱基数为244,非3的倍数,剪切后造成移码突变,从而导致蛋白失活。最终我们选择 Lbp -201作为敲除转录模板。在2号外显子一端与3号外显子中间部位设计靶点,靶点序列信息如表1所示。针对上述设计的多个sgRNA靶点,使用sgRNA体外酶切活性检测试剂盒检测其体外酶切活性,根据靶点活性检测结果,本实验选择 Lbp -L4和 Lbp -R1作为首选靶点。

2.2 Lbp 基因敲除鼠的鉴定

显微注射后,共获得65枚生长活性较好的受精卵,将这些受精卵移植到2只假孕的ICR雌鼠中,分娩后共获得17只F0代小鼠,基因组鉴定及测序显示脚趾编号为3、8、10、12、15的小鼠为阳性杂合子鼠(图2A、B),阳性率为22.73%。因F0代3号小鼠770 bp左右目的条带较为清晰,测序显示单链缺失1 457 bp,故将F0代3号小鼠与WT的C57BL/6小鼠交配,共获得6只F1代,基因组鉴定及测序表明3只小鼠为 $Lbp^{+/-}$ 。

F1代 $Lbp^{+/-}$ 鼠间自交共获得12只F2代鼠,基因组鉴定及测序表明4只小鼠为 $Lbp^{-/-}$,5只为 $Lbp^{+/-}$,3只为WT。F3代共获得122只小鼠,其中 $Lbp^{-/-}$ 30只(14 ♀ +16 ♂)、 $Lbp^{+/-}$ 61只(32 ♀ +29 ♂)、WT 31只(14 ♀ +17 ♂),分别占F3代总数的24.59%、50.00%和25.41%。

表1 针对 *Lbp* 基因的 sgRNA 靶点名称及序列

Table 1 Names and sequences of lipopolysaccharide binding protein (*Lbp*) gene-small guide RNA (gRNA) target

靶点名称	靶点序列 (5'→3')
Target name	Target sequence (5'→3')
<i>Lbp</i> -L1	AGTTGCTCCCATCATCCCTGG
<i>Lbp</i> -L2	AGCCTGTGCTGTGACTGCCGG
<i>Lbp</i> -L3	ACCCCTGACAACCCTGCAGG
<i>Lbp</i> -L4	TACACAGACCTAGTACTAAGG
<i>Lbp</i> -L5	TGGTTAGAAAAGTCCACAGG
<i>Lbp</i> -R1	GAACAAAGGCCAAAGTCATGG
<i>Lbp</i> -R2	GCCTTTGTTCTTCTTCCTGG
<i>Lbp</i> -R3	GACAGACAGGTGTAACCCAGG
<i>Lbp</i> -R4	TGTAACCCAGGCCCCAGTGGG
<i>Lbp</i> -R5	AGAAAGAACTCGGGACTCGG

注：在靶点序列中后三位为原间隔临近基序（PAM）序列。

Note: The last three bits in target sequence are protospacer adjacent motif (PAM) sequence.

约为 1 : 2 : 1，符合孟德尔遗传定律且性别比例约为 1 : 1。

2.3 F2代 *Lbp* 基因敲除鼠的 mRNA 和蛋白鉴定

由 *Lbp*^{-/-} 小鼠肝脏组织中 mRNA 的 RT-PCR 测序结果可知，*Lbp*^{-/-} mRNA 缺失 244 bp，符合设计目的（图 3A、B）。序列剪切后 mRNA 发生移码突变，拼接成新的 mRNA，新序列在剪切位点后第 29 位（图 4B 划框

位置）对应 LBP 的第 71 位氨基酸处引入翻译终止信号，导致翻译提前终止，从而无法进行正常翻译。

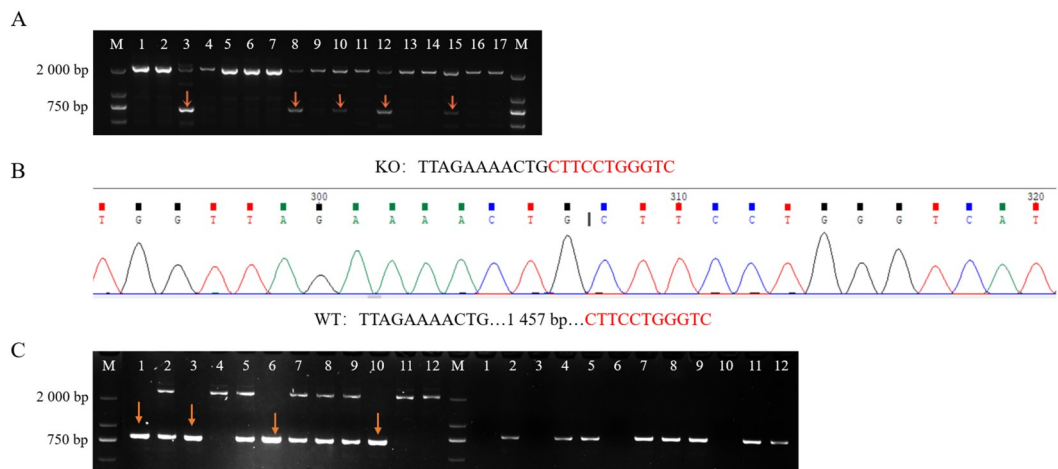
蛋白质印迹实验结果如图 3C 所示，提示 *Lbp*^{-/-} 小鼠肝脏不表达 LBP。

2.4 *Lbp* 基因敲除鼠的表型分析

观察 F0、F1、F2、F3 代 *Lbp*^{-/-}、*Lbp*^{+/-} 小鼠的表型发现，与 WT 相比，其体重、毛色、窝产仔鼠数量、对外界刺激的反应大小、自发活动等均无明显差异。后续腹腔注射不同剂量（10、20、50、100、150 μL）、质量浓度为 1 mg/mL 的 LPS，观察不同时间段 *Lbp*^{-/-}、*Lbp*^{+/-} 及 WT 小鼠的表型，发现 WT 小鼠随注射剂量的增加，冷颤、发抖、腹泻、眼分泌黏液、行动迟缓等症状加重，甚至出现死亡的现象（150 μL 剂量 84 h 死亡）；相同条件下 *Lbp*^{-/-} 小鼠的症状明显轻于 WT 和 *Lbp*^{+/-} 小鼠，且没有出现死亡现象。

3 讨论

LPS 作为一种促炎因子及免疫分子，可以刺激机体发生相应的免疫反应，在天然免疫反应中发挥着重要的作用。但过高的 LPS 会对机体产生不同程度的伤害，导致机体炎性因子过度释放，严重时可引起多器官功能衰竭、败血症休克等，危及生命 [10-11]。LBP 的作用主要与炎性反应有关，其在发挥作用时对炎性反

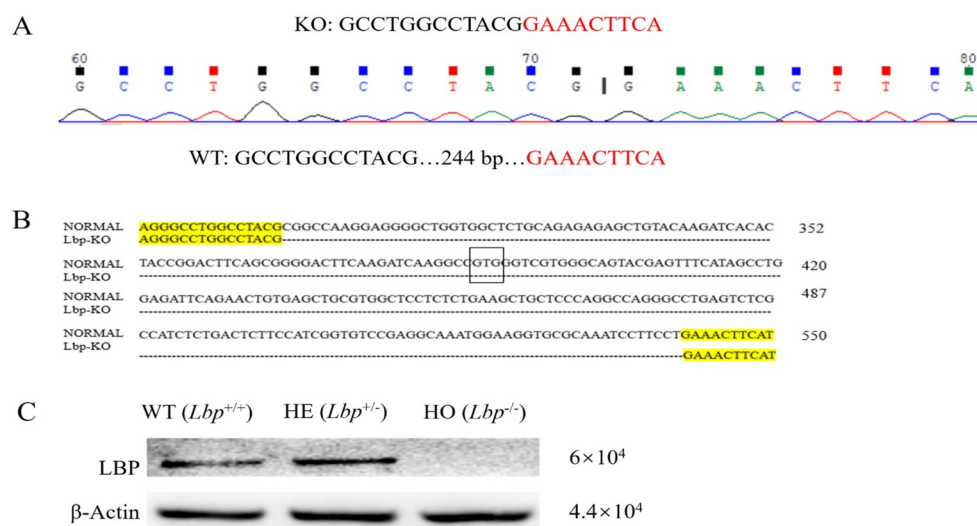


注：A 为 F0 代鼠基因型鉴定结果（引物为 F/R，M 即 DL2000 Marker，图中箭头所指条带即为突变条带）；B 为 F0 代 3 号雌鼠测序峰图（碱基缺失 1457 bp）；C 为 F2 代鼠基因型鉴定结果（左部分引物为 F/R，右部分引物为 F/WT-R，M 即 DL2000 Marker，图中箭头所指条带即为纯合子小鼠的突变条带）。KO 为敲除，WT 为野生型。

Note: A, the results of genotype identification of F0 generation mice (using F and R primers, M is DL2000 marker, the arrow in the figure points to the mutation strip); B, the sequencing peak map of F0 offspring No.3 female mice (base deletion 1457 bp); C, F2 mice genotype identification results (using F and R primers in left, using F and WT-R primers in right, M is DL2000 marker, the arrow in the figure points to the mutant band of homozygous mice). KO: knockout; WT: wild type.

图2 F0代及F2代 *Lbp* 基因敲除小鼠的基因型鉴定结果

Figure 2 Genotyping results of F0 and F2 lipopolysaccharide binding protein (*Lbp*) gene knockout mice



注: A为 *Lbp* 基因敲除鼠 mRNA 测序峰图; B为 *Lbp* 敲除鼠的 mRNA 序列与 WT 鼠 mRNA 序列对比图 (最右边数字为每行最后一个碱基在整个 *Lbp* mRNA 序列对应的碱基数, 第二行划框位置为 *Lbp*^{-/-} 翻译终止位置); C为蛋白质印迹鉴定 F2 代小鼠肝脏组织中 LBP 表达结果。KO 为敲除, WT 为野生型。HE 为杂合子, HO 为纯合子。

Note: A, mRNA sequencing peak mapping in *Lbp* knockout mice; B, the mRNA sequence of the *Lbp* gene knockout mice was aligned against the WT mice (the rightmost number is the base number corresponding to the last base in each line of *Lbp* mRNA sequence, and the second line is *Lbp*^{-/-} termination); C, western blotting of LBP expression in the liver of F2 generation mice. KO, knockout; WT, wild type. HE, heterozygote; HO, homozygote.

图3 RT-PCR 测序和蛋白质印迹法分别检测 *Lbp* 基因敲除鼠的 mRNA 转录及蛋白表达情况

Figure 3 The expression of mRNA and protein in liver tissues of *Lbp* gene knockout mice detected by RT-PCR sequencing and Western blotting

应有两方面的影响^[12-13]: 一是当 LPS 与 LBP 的炎性位点结合时, 引起相关转录因子及炎性介质产生, 从而起到促炎作用; 二是当 LPS 结合 LBP 的抗炎部位时, 它向靶细胞传递信号, 中和或消除 LPS, 阻止 LPS 发挥作用, 从而起到抗炎作用^[14]。*Lbp*^{-/-} 小鼠在多种实验研究中均有重要作用, 如: Won 等^[15] 以 BALB/c *Lbp*^{-/-} 小鼠为背景, 讨论了低炎性反应下与骨关节炎相关的致病介质; Molinaro 等^[16] 以 MyD88 敲除小鼠为背景, 探讨了 LBP 的表达对小鼠葡萄糖稳态的影响; 宋子晨^[17] 将 SD 大鼠的 *Lbp* 基因敲除, 研究了 LPS 对肝脏线粒体的损害及作用机制。然而, 在 LBP 这些相关研究中, 以 C57BL/6J *Lbp*^{-/-} 小鼠为背景的相关报告较少。LBP 与 LPS 结合的具体作用机制虽有研究, 但造成炎性反应的因素较为复杂, LBP 在抗菌、抗炎等方面的作用机制需要进一步揭示^[18-20]。

Lbp 基因有 5 个转录产物, 其中 *Lbp*-201、*Lbp*-202、*Lbp*-203 可翻译为蛋白质, *Lbp*-202 的序列为 1 ~ 123 aa, *Lbp*-203 的序列起始位点为 194 aa。本次实验在设计靶点时考虑到这 3 个序列的差异, 因此选择对 *Lbp*-201 的序列进行剪切, 剪切位点位于功能保守区的 N 端 (42 ~ 123 aa), 剪切后导致 *Lbp*-201、*Lbp*-202、

Lbp-203 均无法正常翻译, 从而达到 LBP 失活的目的。本次实验利用 CRISPR/Cas9 技术构建 *Lbp* 敲除小鼠, 通过 PCR 鉴定及测序验证, F0 代共获得 5 只 *Lbp*^{+/+} 小鼠, F1 代 3 只 *Lbp*^{+/+}, F2 代 4 只 *Lbp*^{-/-}、5 只 *Lbp*^{+/-}, F3 代 30 只 *Lbp*^{-/-}、61 只 *Lbp*^{+/-}。F2 代 *Lbp*^{-/-} DNA 测序结果显示, 1 457 bp 缺失符合预期, 其 RNA 测序结果显示 244 bp 缺失符合预期。

蛋白质印迹实验结果表明, *Lbp*^{-/-} 小鼠肝脏中 LBP 不表达, F3 代各小鼠基因型和性别数值显示, 本次构建获得的 *Lbp* 敲除小鼠能够稳定遗传, 且符合孟德尔遗传规律。杂合子小鼠继续繁育, 即可获得大量可用于后续实验的纯合子敲除鼠。正常情况下 *Lbp*^{-/-} 的表型与 WT 没有显著差异, 但注射 LPS 后 WT 小鼠的炎性反应显著大于 *Lbp*^{-/-}, 由此推测 *Lbp*^{-/-} 虽无法正常表达 LBP, 但仍会将 LPS 信号传递给靶细胞, 引起机体出现冷颤、发抖等炎性反应, 但是此传递过程缓慢, 引起的炎性反应程度轻。

综上, 本实验利用 CRISPR/Cas9 技术成功构建了以 C57BL/6J 为背景的 *Lbp*^{-/-} 小鼠, 为进一步探索 LBP 对 C57BL/6J 小鼠肠道菌群的影响, 研究 LBP 缺失前后 LPS 对肝、肾等组织免疫调节的影响提供了基础。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究中动物实验遵循3R原则, 已获得山东省实验动物中心伦理批准(20181224-01)。所有实验过程均遵照实验动物相关法律法规条例要求进行。

The animal experiments involved in this study were carried out in accordance with the principle of 3Rs, and had obtained the ethical approval of Shandong Laboratory Animal Center (No. 20181224-01). All experiment protocols were carried out following the relevant laws and regulations on Laboratory animals.

[作者贡献 Author Contribution]

李思迪负责论文撰写及实验实施; 付彬、郭中坤负责论文撰写及实验实施指导; 林颖杰负责论文实验操作指导; 张振宇、米传靓负责论文相关实验操作; 王可洲负责实验实施指导、论文撰写及修改指导。

[利益声明 Declaration of Interest]

本文所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- QIAO J, DONG C, WANG X P, et al. One-step production of bioactive human lipopolysaccharide binding protein from LPS-eliminated *E. coli* [J]. Protein Expr Purif, 2019, 157:17-20. DOI:10.1016/j.pep.2019.01.008.
- TSUKAMOTO H, TAKEUCHI S, KUBOTA K, et al. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein stimulates CD14-dependent Toll-like receptor 4 internalization and LPS-induced TBK1-IKKε-IRF3 axis activation[J]. J Biol Chem, 2018, 293(26):10186-10201. DOI:10.1074/jbc.M117.796631.
- ALDAG J, PERSSON T, HARTMANN R K. 2'-fluoro-pyrimidine-modified RNA aptamers specific for lipopolysaccharide binding protein (LBP)[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(12):3883. DOI: 10.3390/ijms19123883.
- YU Y, SONG G H. Lipopolysaccharide-binding protein and bactericidal/permeability-increasing protein in lipid metabolism and cardiovascular diseases[J]. Adv Exp Med Biol, 2020, 1276:27-35. DOI:10.1007/978-981-15-6082-8_3.
- STASI A, INTINI A, DIVELLA C, et al. Emerging role of lipopolysaccharide binding protein in *Sepsis*-induced acute kidney injury[J]. Nephrol Dial Transplant, 2017, 32(1): 24-31. DOI:10.1093/ndt/gfw250.
- HEIZHATI M, LI N F, SHAO L, et al. Elevated serum concentrations of lipopolysaccharide binding protein might prolong sleep stage one in middle-aged hypertensive males [J]. Sleep Breath, 2017, 21(2):327-332. DOI:10.1007/s11325-016-1415-z.
- PAL G D, SHAIKH M, FORSYTH C B, et al. Abnormal lipopolysaccharide binding protein as marker of gastrointestinal inflammation in Parkinson disease[J]. Front Neurosci, 2015, 9:306. DOI:10.3389/fnins.2015.00306.
- HE Z X, SONG Z C, MENG L L, et al. Lipopolysaccharide-induced transcriptional changes in LBP-deficient rat and its possible implications for liver dysregulation during *Sepsis*[J]. J Immunol Res, 2021, 2021: 8356645. DOI: 10.1155/2021/8356645.
- LI X J, LI L, SUN Y, et al. Comparison of the effect of recombinant bovine wild and mutant lipopolysaccharide-binding protein in lipopolysaccharide-challenged bovine mammary epithelial cells[J]. Cell Stress Chaperones, 2016, 21(3):439-452. DOI:10.1007/s12192-016-0671-y.
- KOPP F, KUPSCH S, SCHROMM A B. Lipopolysaccharide-binding protein is bound and internalized by host cells and colocalizes with LPS in the cytoplasm: implications for a role of LBP in intracellular LPS-signaling[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1863(4):660-672. DOI:10.1016/j.bbamcr.2016.01.015.
- SEETHALER B, BASRAI M, NEYRINCK A M, et al. Biomarkers for assessment of intestinal permeability in clinical practice [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2021, 321(1): G11-G17. DOI:10.1152/ajpgi.00113.2021.
- LAUGERETTE F, VORS C, ALLIGIER M, et al. Postprandial endotoxin transporters LBP and sCD14 differ in obese vs. overweight and normal weight men during fat-rich meal digestion[J]. Nutrients, 2020, 12(6): 1820. DOI: 10.3390/nu12061820.
- CHALUBINSKA-FENDLER J, FENDLER W, SPYCH M, et al. Lipopolysaccharide-binding protein is efficient in biodosimetry during radiotherapy of lung cancer[J]. Biomed Rep, 2016, 5(4):450-454. DOI:10.3892/br.2016.739.
- CIREGIA F, BAIWIR D, COBRAVILLE G, et al. Glycosylation deficiency of lipopolysaccharide-binding protein and corticosteroid-binding globulin associated with activity and response to treatment for rheumatoid arthritis[J]. J Transl Med, 2020, 18(1):8. DOI:10.1186/s12967-019-02188-9.
- WON Y, YANG J I, PARK S, et al. Lipopolysaccharide binding protein and CD14, cofactors of toll-like receptors, are essential for low-grade inflammation-induced exacerbation of cartilage damage in mouse models of posttraumatic osteoarthritis[J]. Arthritis Rheumatol, 2021, 73(8): 1451-1460. DOI:10.1002/art.41679.
- MOLINARO A, KOH A, WU H, et al. Hepatic expression of lipopolysaccharide-binding protein (Lbp) is induced by the gut microbiota through Myd88 and impairs glucose tolerance in mice independent of obesity[J]. Mol Metab, 2020, 37:100997. DOI:10.1016/j.molmet.2020.100997.
- 宋子晨. LBP通过mTOR信号通路抑制脓毒症大鼠肝细胞线粒体损伤[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2020.
- SONG Z C. LBP protected hepatic mitochondria from sepsis-induced damage via mTOR signaling pathway in rat sepsis model[D]. Hefei: Anhui University of Chinese Medicine, 2020.
- WANG M, MA L J, YANG Y, et al. N-3 Polyunsaturated fatty acids for the management of alcoholic liver disease: a critical review[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2019, 59(sup1): S116-S129. DOI:10.1080/10408398.2018.1544542.
- PERVIN M, KARIM M R, KURAMOCHI M, et al. Macrophage populations and expression of regulatory inflammatory factors in hepatic macrophage-depleted rat livers under lipopolysaccharide (LPS) treatment[J]. Toxicol Pathol, 2018, 46(5):540-552. DOI:10.1177/0192623318776898.
- MOTIANI K K, COLLADO M C, ESKELINEN J J, et al. Exercise training modulates gut microbiota profile and improves endotoxemia[J]. Med Sci Sports Exerc, 2020, 52(1):94-104. DOI: 10.1249/MSS.0000000000002112.

(收稿日期:2022-01-10 修回日期:2022-04-27)

(本文编辑:张俊彦,富群华,赵宇朋)