

研究报告

DOI:10.14188/j.ajsh.20251112002

I型干扰素受体1基因敲除SD大鼠的遗传表型鉴定

蔡曾,鲜巧阳,包容,张璟怡,苏珊,龙子文,张璋,汤宏斌*

(武汉大学动物实验中心/ABSL-III实验室,湖北武汉430072)

摘要: I型干扰素(type I interferon, IFN-I)是宿主抗病毒免疫的核心细胞因子,其信号通路自身免疫病及肿瘤发生发展也密切相关。基因敲除动物模型是研究该通路功能的关键工具,然而,广泛应用的I型干扰素受体1(type I interferon receptor 1, IFNAR1)基因敲除小鼠模型存在种属差异及操作局限性,限制了其临床转化价值。为解决此问题,本研究利用CRISPR/Cas9技术,成功构建了SD(Sprague Dawley)大鼠的*Ifnar1*基因敲除模型。通过对繁育子代进行基因型鉴定,获得了稳定的*Ifnar1*^{-/-}纯合子大鼠品系。表型分析显示,该敲除大鼠在外形、行为及繁殖能力上与野生型大鼠无显著差异。免疫组织化学染色结果进一步证实,在*Ifnar1*^{-/-}大鼠的肝脏、脾脏、肾脏、脑及生殖器等多种组织中,IFNAR1蛋白表达完全缺失。本研究成功构建的*Ifnar1*基因敲除大鼠模型,为在更贴近人类生理的动物背景下,深入探究I型干扰素信号通路的在体功能、评估相关药物疗效提供了新的、更具潜力的临床前研究平台。

关键词: I型干扰素;基因敲除;大鼠模型

中图分类号: R373

文献标志码: A

文章编号: 2096-3491(2025)06-0551-05

Genetic phenotype identification of type I interferon receptor 1-gene knockout SD rats

Cai Zeng, Xian Qiaoyang, Bao Rong, Zhang Jingyi, Su Shan,

Long Ziwen, Zhang Zhang, Tang Hongbin*

(Center for Animal Experiment/ABSL-III Laboratory, Wuhan University, Wuhan 430072, Hubei, China)

Abstract: Type I interferon (IFN-I) is a central cytokine in host antiviral immunity, and its signaling pathway is also closely associated with the pathogenesis of autoimmune diseases and tumors. Gene knockout animal models are crucial tools for studying the function of this pathway. However, the widely used type I interferon receptor 1 (IFNAR1) knockout mouse model has limitations, including species differences and technical constraints, which restrict its translational value. To address this, we successfully generated an *Ifnar1* knockout model in Sprague Dawley (SD) rats using CRISPR/Cas9 technology. Through genotyping of the offspring, we established a stable strain of *Ifnar1*^{-/-} homozygous rats. Phenotypic analysis revealed no significant differences in morphology, behavior, or reproductive capability between the knockout and wild-type rats. Furthermore, immunohistochemical staining confirmed the complete absence of IFNAR1 protein expression in multiple tissues of *Ifnar1*^{-/-} rats, including the liver, spleen, kidney, brain, and reproductive organs. The generation of this *Ifnar1* knockout rat model provides a novel and promising preclinical platform for investigating the *in vivo* functions of the type I interferon signaling pathway in a physiological context that more closely recapitulates human

收稿日期: 2025-11-12 修回日期: 2025-11-24 接受日期: 2025-12-10

作者简介: 蔡曾(1990-),男,博士,主要从事病毒学、抗病毒天然免疫调控、医学病毒感染的动物模型构建、生物安全,E-mail: caiz@whu.edu.cn

*通信作者: 汤宏斌(1971-),男,博士,教授,E-mail: tanghb1971@163.com

基金项目: 国家重点研发计划(2021YFF0702002),湖北省实验动物研究科技项目(2022DFE022),湖北省自然科学基金(2024AFB103)

引用格式: 蔡曾,鲜巧阳,包容,等. I型干扰素受体1基因敲除SD大鼠的遗传表型鉴定[J]. 生物资源, 2025, 47(6): 551-555.

Cai Zeng, Xian Qiaoyang, Bao Rong, et al. Genetic phenotypic analysis of type I interferon receptor 1-gene knockout rats [J]. Biotic Resources, 2025, 47(6): 551-555.

biology, and for evaluating the efficacy of related therapeutics.

Key words: type I interferon; gene knockout; rat model

0 引言

I型干扰素(type I interferon, IFN-I)是宿主抗病毒免疫应答中最为重要的一类细胞因子,可以诱导多种干扰素刺激基因(interferon stimulated gene, ISG)表达。IFN-I包含多种亚型,如IFN- α 、IFN- β 等。这些分子在机体抵抗病毒入侵、抑制肿瘤生长以及调节免疫应答中发挥着不可或缺的作用^[1]。I型干扰素的功能实现依赖于其与细胞表面特异性受体——I型干扰素受体(type I interferon receptor, IFNAR)的结合^[2]。然而,这一通路的异常活化也与多种自身免疫性疾病,如系统性红斑狼疮的发生发展密切相关^[3]。因此,精确解析I型干扰素信号通路的在体功能,对于揭示病毒致病机制、自身免疫病发病机理及开发新型免疫疗法具有至关重要的意义。

基因敲除动物模型是阐明特定基因功能的最常用的研究工具。*Ifnar1*基因敲除的小鼠模型的建立与应用,为解析I型干扰素信号通路的激活与调控奠定了坚实的基础。研究表明,*Ifnar1*的缺失会导致小鼠对多种病毒,如水泡性口炎病毒、流感病毒等的高度易感^[4-5]。然而,小鼠模型在转化医学研究中也存在其固有的局限性:其一,小鼠与人类在免疫系统、代谢通路等方面存在显著的种属差异,限制了从小鼠实验结论向临床应用的直接转化;其二,小鼠体型较小,在需要进行重复采血、复杂外科手术或活体成像等研究时,面临技术挑战与限制。相比之下,大鼠模型在生理学、药理学及神经科学等领域展现出独特优势。其心血管系统、代谢特征及部分器官功能与人类更为接近,且因其体型较大,便于进行更精细的操作和长期动态观察^[6]。尽管具备这些优势,但受制于大鼠胚胎干细胞技术的发展,*Ifnar1*基因敲除大鼠模型的开发与应用远落后于小鼠,这在一定程度上制约了研究人员在更贴近人类的生理背景下,深入研究I型干扰素通路的复杂调控网络^[7-8]。

本研究利用CRISPR/Cas9技术成功构建了SD(Sprague Dawley)大鼠IFNAR1基因敲除模型,并在无特定病原体(specific pathogen free, SPF)屏障设施内以1雄2雌的合笼方式进行了饲养、保种繁育,并对繁育的子代鼠基因型进行了鉴定,获得了稳定的*Ifnar1*^{-/-}基因型大鼠。为深入探讨I型干扰素在抗病毒免疫、自身免疫炎症及肿瘤免疫监视中的分子机制,评估新型干扰素药物或干扰素通路抑制剂的

药效与安全性,提供比小鼠模型更具预测价值的临床前研究实验平台。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SD大鼠在武汉大学动物实验中心的SPF屏障环境中进行饲养与繁育,本中心实验动物使用许可证(编号:SYXK(鄂)2024-0013)及实验动物生产许可证(编号:SCXK(鄂)2024-0004),定期接受年检。所有动物均满足SPF级,饲养于屏障环境IVC笼盒,饲养温度控制在20~24℃,相对湿度40%~70%,自由饮水进食,昼夜节律光照。所有操作均通过武汉大学实验动物福利伦理审查(审查批号:WP20240318)。

1.2 主要试剂与仪器

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪购于Life Technologies公司;磷酸盐缓冲液(1×PBS)购于GIBCO公司;核酸抽提试剂盒、2×EasyTaq PCR SuperMix、2K DNA Marker、6×loading buffer购于北京全式金生物技术有限公司;Gelred购于武汉科瑞生物技术有限公司;凝胶成像系统购于上海培清科技有限公司;兔抗大鼠IFNAR1抗体购于爱必信(上海)生物科技有限公司;Thermo LEGEND MACH 1.6R高速离心机;北京东联哈尔生物安全柜,汽化过氧化氢灭菌传递舱。

1.3 *Ifnar1*基因敲除大鼠的构建策略

利用CRISPR/Cas9(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9)技术,靶向基因ID:288264;座位:11q11设计sgRNA,见图1(a)。分别选取外显子1~2、外显子10~11中内含子序列作为重组位点1、2,通过体外转录成为可注射的Cas9-RNA,重组成功后,*Ifnar1*基因的外显子2~10将被敲除,从而达到敲除*Ifnar1*基因的目的,见图1(b)。取约150枚受精卵进行注射,通过胚胎移植术将注射后的胚胎移植到假孕鼠体内。待子代鼠出生7~10 d后,剪取尾尖进行基因型鉴定。

1.4 大鼠基因型鉴定方法

大鼠基因组DNA提取:剪取大鼠尾尖长0.2~0.3 cm的组织,放入1.5 mL离心管中,用DNA提取试剂盒提取大鼠DNA后,存放于4℃备用。

PCR鉴定:鉴定引物由生工生物工程(上海)股

份有限公司合成,正向及反向引物按 1:1 比例混合至 10 μmol/L,进行 PCR 反应。PCR 反应体系 (20 μL):2× PCR Mix 10 μL,引物 1 μL,模板 DNA 1 μL,灭菌双蒸水 8 μL。扩增程序:95 °C 预热 15 min;变性 95 °C,30 s;退火 60 °C,30 min;延伸 72 °C,30 s;循环 30 次;最后延伸 72 °C,5 min;4 °C 保存。引物序列如表 1 所示。

琼脂糖凝胶电泳:取 PCR 扩增产物 1 μL,灭菌双蒸水 15 μL 与 6× loading buffer 4 μL 混合均匀后,在 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳。结束后,置于化学发光凝胶成像系统中进行拍照观察结果。

结果判定:按条带大小不同鉴别大鼠基因型,野生型大鼠 PCR 产物大小为 652 bp;*Ifnar1* 敲除大鼠 PCR 产物大小为 685 bp。两条电泳条带均存在则为杂合型大鼠。

1.5 免疫组化染色

利用 CO₂ 安死术处死 8 周龄大鼠,收集脑、肝、脾及生殖器官组织,4% 多聚甲醛固定,经水洗、脱水和石蜡包埋后进行切片,免疫组化染色观察组织中 IFNAR1 表达水平。

2 结果与分析

2.1 *Ifnar1* 基因敲除大鼠的遗传分析

显微注射后的 SD 大鼠子代出生后 7~10 d,剪取尾尖提取基因组,筛选出重组成功的子代,经饲养繁育后,F2 代杂合子以雄雌比例 1:2 合笼,得到子代 14 只,出生 7~10 d 后剪尾尖提取基因组 DNA,经凝胶电泳成像结果显示,其中编号#36、#39、#41、#43 大鼠基因组 PCR 产物大小为 652 bp,且敲除鉴定引物 PCR 无条带,表明上述 4 只子代大鼠为野生型;编号#31、#37、#40 大鼠基因组 PCR 产物大小为 685 bp,且野生型鉴定引物 PCR 无条带,表明上述 3 只子代大鼠为 *Ifnar1* 基因敲除纯合子;编号#32、#33、#34、#35、#42、#44 大鼠野生型及敲除鉴定引物 PCR 均检出,表明上述 6 只子代大鼠为 *Ifnar1* 基因敲除杂合子,见图 2。上述大鼠子代野生型、杂合子、*Ifnar1* 基因敲除纯合子比例约为 1:2:1,符合孟

德尔遗传定律。

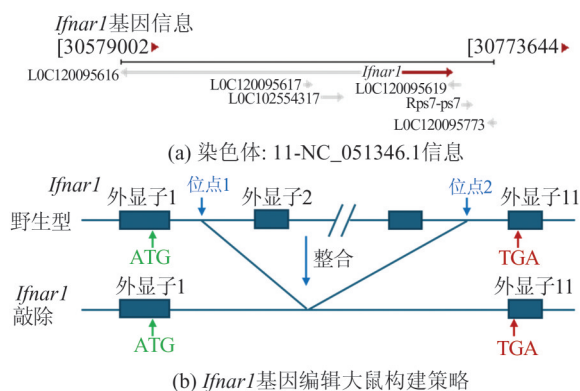


图 1 *Ifnar1*^{-/-} 大鼠子代基因 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图
Figure 1 Agarose gel electrophoresis image of PCR products for genotyping progeny of *Ifnar1*^{-/-} rats

2.2 *Ifnar1* 基因敲除大鼠的成年鼠和仔鼠外形特征及生育情况

SD-*Ifnar1*^{-/-} 大鼠亲本交配所生的子代纯合子幼鼠 1 日龄呈现四肢蜷缩,皮肤呈肉红色,外观及行动与野生型幼鼠并无明显差异,如图 3(a) 所示。SD-*Ifnar1*^{-/-} 大鼠 8 周龄被毛为白色,与对照野生型 SD 大鼠相比,在活动水平(奔跑、跳跃、爬行)、进食与饮水行为、睡眠行为、社交行为(交互、接触)方面均未发现明显异常,如图 3(b) 所示。统计 8 组 SD-*Ifnar1*^{-/-} 大鼠亲本交配所生子代平均每胎约 10.9 只,雌雄平均比例约为 1:1。

2.3 SD-*Ifnar1*^{-/-} 大鼠组织 IFNAR1 表达分析

8 周龄野生型 SD 大鼠及 *Ifnar1*^{-/-} 大鼠经 CO₂ 安死术,取肝、脾、肾、脑及生殖器。组织免疫组化染色结果显示,野生型 SD 大鼠肝脏中 IFNAR1 呈弥漫性表达;肝、脾、肾、脑及生殖器可见密集 IFNAR1 染色阳性信号(呈棕黄色),见图 4(a),表明 IFNAR1 正常表达。而 SD-*Ifnar1*^{-/-} 大鼠肝细胞无 IFNAR1 阳性染色信号,脾脏骨髓区无 IFNAR1 阳性染色信号,肾小管上皮细胞无 IFNAR1 阳性染色信号,脑部组织及生殖器均无 IFNAR1 阳性染色信号(呈蓝色),见图 4(b),表明 *Ifnar1*^{-/-} 大鼠上述组织中 IFNAR1 均未检测到表达,成功敲除 IFNAR1。

表 1 本实验所用引物序列

Table 1 Primer sequences used in this experiment

引物名称	引物序列(5'→3')
IFNAR1-WT-F	CTGAGCTCATACTTTCTGTTCTGGTC
IFNAR1-WT-R	GGACACAGGAGAAGAGCAAGAAG
IFNAR1-KO-F	TGGTACTGCTGAAGTTATGTAATTGCTC
IFNAR1-KO-F	CACCATCTCCTTGTCCTCGTCC

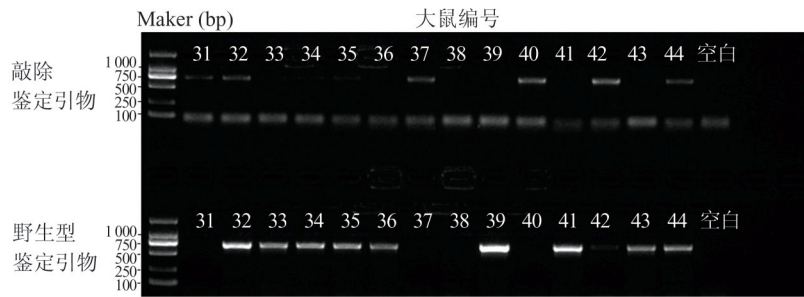


图2 *Ifnar1* 基因敲除大鼠的基因型鉴定

Figure 2 Genotyping of *Ifnar1* gene-knockout rats

注:大鼠子代DNA凝胶电泳成像。敲除鉴定引物PCR产物大小为685 bp,野生型鉴定引物PCR产物大小为652 bp。大鼠基因组经2种鉴定引物PCR后,单独条带为纯合子,双条带则为杂合子。

Note: Gel electrophoresis imaging of rat offspring DNA. The PCR product size for the knockout identification primers is 685 bp, while that for the wild-type identification primers is 652 bp. After PCR amplification of the rat genome using these two identification primers, a single band indicates a homozygous genotype, whereas two bands indicate a heterozygous genotype.



图3 *Ifnar1* 基因敲除大鼠的成年鼠和幼龄鼠外形特征
Figure 3 External morphological features of adult and neonatal *Ifnar1* gene-knockout rats

3 讨论

本研究成功利用CRISPR/Cas9技术构建并鉴定了*Ifnar1*基因敲除SD大鼠,为I型干扰素研究领域提供了除小鼠之外的重要动物模型。实验数据表明,*Ifnar1*的敲除并未导致大鼠出现明显的发育异常或行为缺陷,出生子代每代约10.9只,雌雄比例约1:1,子代遗传学分析符合孟德尔遗传定律。这表明本研究构建的I型干扰素受体1敲除不影响大鼠生殖及遗传稳定。SD-*Ifnar1*^{-/-}大鼠组织IFNAR1表达分析如图4所示。

*Ifnar1*敲除的小鼠模型常用于病毒感染后发

病机制研究。相较于野生型小鼠,*Ifnar1*敲除的小鼠更容易感染病毒,因此常被用于黄病毒科(*Flaviviridae*)、丝状病毒科(*Filoviridae*)、沙状病毒科(*Arenaviridae*)、布尼亚病毒科(*Bunyaviridae*)等病毒感染模型^[9]。已有研究表明,小鼠*Ifnar1*敲除模型对小鼠生殖影响较大,明显较野生型每胎产仔数量少^[10]。本研究所构建的*Ifnar1*敲除大鼠具有多重潜在优势。首先,大鼠在心血管系统、代谢特征及部分器官功能上与人类更为相似,其免疫系统也可能存在更接近人类的特征,这使得基于该模型的实验结论可能具有更好的临床预测价值。其次,大鼠较大的体型便于进行重复采血、复杂外科手术、活体成像以及长期植入式监测,这对于动态观察病毒感染进程、免疫应答变化及药物代谢动力学至关重要^[6]。免疫组化结果清晰地展示了该模型在多组织中IFNAR1蛋白表达的缺失,为后续在抗病毒免疫、自身免疫炎症及肿瘤免疫等领域的分子机制研究奠定了坚实基础。

本项目构建的*Ifnar1*基因敲除大鼠模型具有广阔的应用前景。在抗病毒研究方面,已利用该模型成功构建了寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)感染的*Ifnar1*^{-/-}大鼠模型^[11]。本模型也可用于探究对特定病毒(如丙型肝炎病毒等更易感染大鼠的病原体)的易感性及免疫应答机制,弥补小鼠模型的不足^[12]。在自身免疫病研究中,该模型可用于构建更贴近人类疾病的狼疮样模型,以深入解析IFN-I通路异常活化在疾病发生中的驱动作用。此外,在肿瘤免疫治疗领域,该模型为评估基于干扰素的免疫疗法或IFN通路抑制剂的药效与安全性提供了更优的临床前测试平台。后续研究将聚焦于

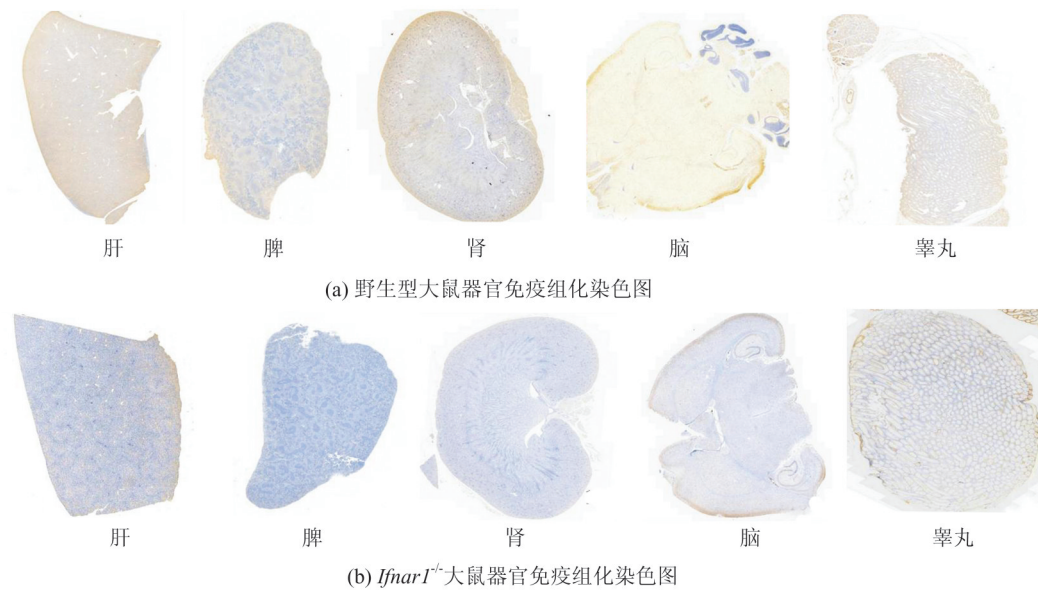


图4 SD-*Ifnar1*^{-/-}大鼠组织*IFNARI*表达分析(10×)

Figure 4 Analysis of *IFNARI* expression in tissues of SD-*Ifnar1*^{-/-} rats (10×)

利用该模型,在病毒攻击实验和自身免疫病模型中,系统验证其表型,并与*Ifnar1*^{-/-}小鼠的表型进行对比,以充分揭示其作为转化医学研究模型的独特价值。

参考文献

- [1] Yu R R, Zhu B, Chen D G. Type I interferon-mediated tumor immunity and its role in immunotherapy [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2022, 79 (3): 191.
- [2] Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. the interferon [J]. Journal of Interferon Research, 1987, 7 (5): 429-438.
- [3] Crow M K. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus: risks, mechanisms and therapeutic targets[J]. Annals of the Rheumatic Diseases, 2023, 82 (8) : 999-1014.
- [4] Detje C N, Meyer T, Schmidt H, et al. Local type I IFN receptor signaling protects against virus spread within the central nervous system[J]. Journal of Immunology, 2009, 182(4): 2297-2304.
- [5] Zivcec M, Safronetz D, Scott D, et al. Lethal Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection in interferon α/β receptor knockout mice is associated with high viral loads, proinflammatory responses, and coagulopathy [J]. The Journal of Infectious Diseases, 2013, 207 (12): 1909-1921.
- [6] Bu W, Li Y. Advances in immunocompetent mouse and rat models[J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2024, 14(3): a041328.
- [7] Kessing C F, Tyor W R. Interferon- α induces neurotoxicity through activation of the type I receptor and the GluN2A subunit of the NMDA receptor[J]. Journal of Interferon & Cytokine Research, 2015, 35 (4) : 317-324.
- [8] 刘田利, 杜芬. microRNA155在动脉粥样硬化发生过程中的网络调控机制[J]. 生物资源, 2021, 43(2): 178-187.
- Liu T L, Du F. The network regulation mechanism of microRNA 155 in the development of atherosclerosis [J]. Biotic Resources, 2021, 43(2): 178-187.
- [9] Wong G, Qiu X G. Type I interferon receptor knockout mice as models for infection of highly pathogenic viruses with outbreak potential[J]. Zoological Research, 2018, 39(1): 3-14.
- [10] 陈亚坤, 孙婧, 蒋亚君, 等. I型干扰素受体(*Ifnar*)基因敲除小鼠的繁育及基因型鉴定[J]. 实验动物科学, 2019, 36(4): 35-38, 43.
- Chen Y K, Sun J, Jiang Y J, et al. Breeding and genotype identification of *ifnar* gene knockout mice [J]. Laboratory Animal Science, 2019, 36(4): 35-38, 43.
- [11] 蔡曾, 鲜巧阳, 苏珊, 等. 寨卡病毒感染 I型干扰素受体缺失大鼠模型的建立[J]. 2025(10): 854-859.
- Cai Z, Xian Q Y, Su S, et al. Establishment of a rat model of Zika virus infection with type I interferon receptor deletion [J]. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2025(10): 854-859.
- [12] Wolfisberg R, Thorselius C E, Salinas E, et al. Neutralization and receptor use of infectious culture-derived rat hepatitis virus as a model for HCV [J]. Hepatology, 2022, 76(5): 1506-1519.