

网络出版时间:2024-03-22 13:25:24 网络出版地址:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.007

髓系特异性 *Spi1* 基因敲除小鼠的构建和基因鉴定

吴旭铭,王卉卉,朱向玲,周园园,王安琪,张慧茹,刘崇,涂佳杰

摘要 **目的** 构建髓系特异性 *Spi1* 基因敲除小鼠并分析其基因型,为疾病病理机制及药物靶点研究提供动物模型基础。**方法** 根据 CRISPR/Cas9 技术原理和 Cre/LoxP 系统,设计并构建 sgRNA 和 Donor 载体,以第 2 号外显子(Exon 2)所在的转录本为敲除区域,在 Exon 2 两侧各放置同向 Loxp 元件;将 Cas9 蛋白、sgRNA 和 Donor 载体混合显微注射到 C57BL/6J 小鼠的受精卵中,移植受精卵到假孕的 C57BL/6J 母鼠的子宫中,19~20 d 后获得 F0 代。将阳性 F0 代小鼠与 C57BL/6J 小鼠交配,得到稳定的 F1 代 *Spi1*^{flox/+} 小鼠。F1 代 *Spi1*^{flox/+} 小鼠雌雄自交得到 *Spi1*^{flox/flox} 小鼠。*Spi1*^{flox/flox} 与 *Lyz2-Cre*⁺ 小鼠交配得到 *Spi1*^{flox/+}/*Lyz2-Cre*⁺ 小鼠,再将其与 *Spi1*^{flox/flox} 交配,得到的 *Spi1*^{flox/flox}/*Lyz2-Cre*⁺ 小鼠为髓系特异性 *Spi1* 基因敲除(KO)小鼠;*Spi1*^{flox/flox}/*Lyz2-Cre*⁻ 小鼠作为野生型(WT)小鼠。提取 WT 和 KO 小鼠 DNA,PCR 扩增后琼脂糖凝胶电泳鉴定基因型;Western blot 检测 WT 和 KO 小鼠免疫细胞中脾病灶形成病毒前病毒整合癌基因-1/富含嘌呤盒 1(PU.1)表达。**结果** PCR 鉴定结果显示,采用 flox 引物鉴定时仅扩增出 220 bp 条带的小鼠,即基因型为 *Spi1*^{flox/flox} 纯合子,采用 *Lyz2-Cre* 引物鉴定时扩增出 700 bp 的小鼠,基因型为 *Lyz2-Cre*⁺;Western blot 结果显示,与 WT 组比较,KO 组小鼠骨髓来源巨噬细胞(BMDMs)和腹腔原位巨噬细胞(PM)中的 PU.1 不表达($P < 0.01$);T 细胞中 KO 小鼠 PU.1 表达水平与 WT 小鼠差异无统计学意义;PCR 和 Western blot 结果均表明髓系特异性 *Spi1*KO 小鼠构建成功。**结论** 成功构建和鉴定髓系特异性 *Spi1*KO 小鼠,为进一步揭示 PU.1 在免疫调节中的潜在机制研究提供动物模型基础。

关键词 髓系特异性; *Spi1*; 基因敲除; CRISPR/Cas9; Cre/LoxP; PCR; Western blot

中图分类号 Q 291

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)03-0413-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.007

脾病灶形成病毒前病毒整合癌基因-1/富含嘌呤

2024-02-01 接收

基金项目:安徽省高校杰出青年科研项目(编号:2022AH020052)

作者单位:安徽医科大学临床药理研究所,合肥 230032

作者简介:吴旭铭,男,硕士研究生;

涂佳杰,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:tujiajie@ahmu.edu.cn

呤盒 1 (spleen focus forming virus proviral integration oncogene, Spi-1/purine rich box-1, PU.1) 是鼠红白血病中基因转录上调的一种原癌基因。人类的 *Spi1* 基因位于 11 号染色体,在骨髓和 B 淋巴细胞的发育过程中发挥重要作用。转录因子 PU.1 是 E26 转化特异性转录因子家族的一员,该家族成员在多种人体组织中普遍表达,各成员发挥不同的生物学功能。PU.1 蛋白有 272 个氨基酸,N-末端含有一个转录激活结构域,C-末端含有一个 DNA 结合结构域^[1]。目前病理条件下 PU.1 的研究主要集中在免疫系统相关的癌症,其在系统性自身免疫性疾病中的作用尚不清楚^[2]。最近的研究^[3-5]表明 PU.1 参与多种自身免疫性疾病的发展,包括类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)、实验性自身免疫性脑脊髓炎和系统性红斑狼疮,并通过影响多种免疫细胞的功能来影响这些疾病的过程。课题组前期研究^[6]表明,PU.1 可直接靶向巨噬细胞和成纤维样滑膜细胞中的 FMS 样酪氨酸激酶 3 从而促进关节炎的发生发展。PU.1 在多种免疫细胞中的特异性作用为 RA 的发病机制提供了新的思路和潜在的治疗靶点。构建 *Spi1* 基因敲除小鼠对充分阐明 PU.1 的病理作用机制及药物靶点的明确具有重要意义。该研究利用 CRISPR/Cas9 技术和 Cre/LoxP 系统构建髓系特异性 *Spi1* 基因敲除小鼠,对后代子鼠进行基因型鉴定和蛋白水平验证从而验证小鼠构建结果,为进一步以 PU.1 为靶点的疾病和药物研究提供基因工程动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物 *Spi1*^{flox/+} 小鼠与赛业(苏州)生物科技有限公司联合构建;*Lyz2-Cre*⁺ 小鼠由该公司赠送,生产许可证号:SCXK(苏)2018-0003。实验动物通过安徽医科大学临床药理研究所动物实验伦理委员会批准,伦理审查批准号为 PZ-2022-023,并在安徽医科大学临床药理研究所动物实验中心无特定病原体级动物房饲养繁殖。

1.2 主要材料 GenCrispr NLS-Cas9-EGFP Nucle-

ase(南京金斯瑞生物科技,货号:Z03393);sgRNA、Donor载体由赛业(苏州)生物科技有限公司合成;孕马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotropin,PMSG)(武汉艾美捷科技有限公司,货号:HOR-272);人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin,HCG)(上海羽喙生物科技有限公司,货号:YLY0803);M16培养基(美国Sigma-Aldrich公司,货号:M7292);2×HotStrat Taq PCR Master Mix、50×TAE Buffer、Gelred核酸染料10 000×、100 bp Ladder DNA Marker(北京博迈德基因技术有限公司,货号:MT205、EL102-01、EL108、MD112);琼脂糖Agarose(德国BioFroxx公司,货号:1110GR100);RPMI 1640培养基(上海逍鹏生物科技有限公司,货号:C3010-0500);磷酸盐缓冲液PBS pH7.2(上海源培生物科技股份有限公司,货号:B310KJ);Western blot抗体:Anti-PU.1/*Spi1*抗体(英国Abcam公司,货号:ab230336); β -actin抗体(美国Affinity公司,货号:#T0022);辣根过氧化物酶偶联亲和山羊抗兔IgG(H+L)、辣根过氧化物酶偶联亲和山羊抗小鼠IgG(H+L)(武汉三鹰生物技术有限公司,货号:SA00001-2、SA00001-1)。

1.3 主要仪器 CO₂培养箱(上海博旅仪器有限公司,型号:P-90A);荧光定量PCR仪(杭州朗基科学仪器有限公司,型号:T20);多功能水平电泳槽(上海天能科技有限公司,型号:HE-120);Tanon 1600系列全自动凝胶图像分析系统(上海天能科技有限公司,型号:Tanon 1600)。

1.4 方法

1.4.1 *Spi1*^{fllox/+}小鼠构建 根据*Spi1* Gene ID(20375)小鼠基因组序列信息,发现*Spi1*基因有5个转录本,根据*Spi1*基因的结构,推荐选择第2号外显子(Exon 2)所在的转录本为敲除区域。利用CRISPR/Cas9技术对*Spi1*基因进行改造,在Exon 2两侧各放置同向Loxp元件。利用美国麻省理工学院CRISPR Design软件(<http://crispr.mit.edu>)设计筛选得到一对先导RNA(single guide RNA,sgRNA),即gRNA1(GAGTGAGTCTCCACGGCTTT)和gRNA2(AGGTTCGAGCTCCGCGCTCCC)。根据sgRNA序列设计并合成Donor载体。筛选10只3~4周C57BL/6雌鼠,注射5 IU PMSG,46~48 h后再注射5 IU HCG;注射HCG 12 h后将雌鼠与成年的可育雄鼠交配,使雌鼠受精;次日将雌鼠安乐死后,从输卵管内收集受精卵,放置37℃恒温5%的CO₂

培养箱内备用;将30 ng/ μ l Cas9蛋白、2 pmol/ μ l靶向*Spi1*基因的sgRNA和15 ng/ μ l含有Loxp位点的Donor供体载体混合体显微注射到C57BL/6J小鼠的受精卵中,注射共计280枚受精卵,将注射完毕的受精卵转移到M16培养基中,并放入37℃恒温5%的CO₂培养箱内,培养0.5~1 h后进行移植;选取适龄的可育母鼠与输精管结扎后绝育的雄鼠交配得到假孕母鼠,移植受精卵到假孕的C57BL/6J小鼠的子宫中,共计移植10只代孕鼠,19~20 d后获得F0代。将阳性F0代(*Spi1*^{fllox/fllox})小鼠与C57BL/6J小鼠交配,得到稳定的F1代*Spi1*^{fllox/+}小鼠。

1.4.2 *Spi1*^{fllox/fllox}/*Lyz2*-Cre⁺小鼠获得 将*Spi1*^{fllox/+}小鼠雌雄自交获得*Spi1*^{fllox/fllox}小鼠。*Spi1*^{fllox/fllox}与*Lyz2*-Cre⁺小鼠交配,得到*Spi1*^{fllox/+}/*Lyz2*-Cre⁺小鼠。将*Spi1*^{fllox/+}/*Lyz2*-Cre⁺小鼠与*Spi1*^{fllox/fllox}交配,最终得到*Spi1*^{fllox/fllox}/*Lyz2*-Cre⁺小鼠和*Spi1*^{fllox/fllox}/*Lyz2*-Cre⁻小鼠。*Spi1*^{fllox/fllox}/*Lyz2*-Cre⁺小鼠为髓系特异性*Spi1*基因敲除小鼠(myeloid-specific *Spi1* knockout mice,KO小鼠);*Spi1*^{fllox/fllox}/*Lyz2*-Cre⁻小鼠作为野生型(wild type mice,WT)小鼠。

1.4.3 PCR鉴定*Spi1*^{fllox/+}和KO小鼠基因 剪取适龄小鼠鼠尾3 mm,置于无DNA污染的1.5 ml EP管,每支EP管加入50 μ l鼠尾裂解液[25 mmol/L NaOH,0.2 mmol/L EDTA(pH=8.0)],95℃振荡恒温金属浴30 min。3 000 r/min离心5 min后加入50 μ l[4 mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH=8.0)],于涡旋震荡器上震荡并充分混匀。3 000 r/min离心5 min,吸取上清液至新的EP管中作为DNA模版。PCR扩增反应体系:DNA模板2 μ l、正反向引物各1 μ l(10 μ mol/L)、2×HotStrat Taq PCR Master Mix 12.5 μ l,去离子水补齐至25 μ l。其中Loxp基因型鉴定正向引物:5'-GTGTGGACATGTGAGAGT-GAGTCT-3',反向引物:5'-TCTCTTATTATCCACTG-CACCGTT-3';*Lyz2*-Cre基因型鉴定正向引物:5'-CCCAGAAATGCCAGATTACG-3',反向引物:5'-CT-TGGGCTGCCAGAATTTCTC-3'。PCR扩增程序:94℃预变性3 min;94℃变性30 s,60℃退火35 s,72℃延伸35 s,35个循环;72℃5 min终止反应。琼脂糖凝胶电泳:取1.2 g琼脂糖溶于60 ml 1×TAE缓冲液中,微波沸腾3次,待稍冷却后加入10 μ l核酸染料,倒入模具凝固后得到琼脂糖凝胶。取10 μ l PCR扩增产物及5 μ l DNA Marker进行电泳,120 V,30 min,用Tanon 1600系列全自动凝胶图像分析系

统分析成像并保存。

1.4.4 小鼠免疫细胞分离 小鼠处死后用 75 % 酒精消毒,取出股骨和胫骨,用生理盐水冲出骨髓细胞,细胞筛过滤除去残存肉沫,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清,加入含 10 ng/ml M-CSF 的 1640 培养基,培养 7 d 获得骨髓来源巨噬细胞 (bone marrow-derived macrophages, BMDMs); 剪开小鼠腹部皮肤,用注射器抽取磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 约 6 ~ 8 ml 注入腹腔,5 min 后用眼科镊稍提起腹腔,用 1 ml 注射器吸出,1 500 r/min 离心 5 min 弃上清获得腹腔原位巨噬细胞 (peritoneal macrophage, PM); 取出胸腺剪碎研磨,细胞筛过滤,离心弃上清液获得胸腺 T 细胞。

1.4.5 Western blot 检测 PU.1 表达水平 将分离出的 BMDMs、PM 和胸腺 T 细胞制备成蛋白样本进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,封闭,置于封闭液稀释的 PU.1 (1 : 1 000) 及内参 β -Actin (1 : 10 000) 抗体中 4 °C 孵育过夜,洗膜除去残留的一抗,分别置于封闭液稀释的辣根过氧化物酶偶联亲和山羊抗兔 IgG (H + L) (1 : 100 000) 和辣根过氧化物酶偶联亲和山羊抗小鼠 IgG (H + L) (1 : 100 000),室温孵育 2 h,洗膜除去残留的二抗,暗室显影。

1.5 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *Spi1*^{flox/flox} 小鼠获得及鉴定结果 采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术将 *Spi1*^{flox/+} 小鼠 *LoxP* 位点放置于 *Spi1* 基因 Exon2 区域两侧,构建策略如图 1。*Spi1*^{flox/flox} 基因型小鼠由 *Spi1*^{flox/+} 基因型小鼠雄雌自交获得,采用 flox 引物鉴定时仅扩增出 220 bp 条带的小鼠基因型为 *Spi1*^{flox/flox} 纯合子,仅扩增出

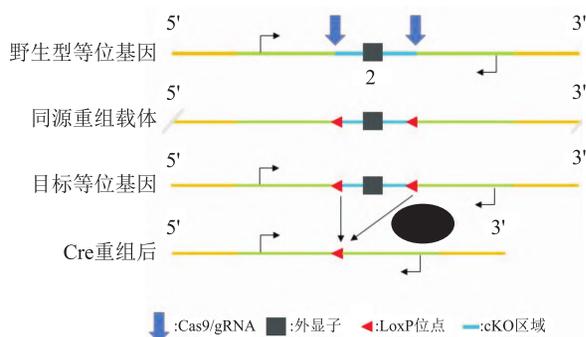


图 1 *Spi1*^{flox/flox} 小鼠构建策略

159 bp 条带的小鼠基因型为 *Spi1*^{+/+} 纯合子,同时扩增出 220 bp 和 159 bp 条带的小鼠基因型为 *Spi1*^{flox/+} 杂合子(图 2)。结果表明 *Spi1*^{flox/flox} 小鼠构建成功。

2.2 KO 小鼠获得及鉴定结果 为获得 KO 基因型小鼠,首先将 *Spi1*^{flox/flox} 与 *Lyz2-Cre*⁺ 小鼠交配获得 *Spi1*^{flox/+}/*Lyz2-Cre*⁺ 小鼠,再将其与 *Spi1*^{flox/flox} 交配,最终获得 KO 基因型小鼠。PCR 鉴定结果显示,采用 flox 引物鉴定时仅扩增出 220 bp 条带的小鼠基因型为 *Spi1*^{flox/flox} 纯合子,采用 *Lyz2-Cre* 引物鉴定时可扩增出 700 bp 的小鼠基因型为 *Lyz2-Cre*⁺,无条带的小鼠基因型为 *Lyz2-Cre*⁻(图 2)。

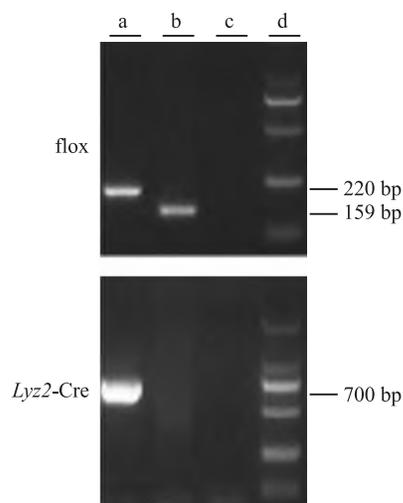


图 2 *Spi1*^{flox/flox} 小鼠和 *Spi1*^{flox/flox}/*Lyz2-Cre*⁺ 小鼠基因型鉴定

a: *Spi1*^{flox/flox}/*Lyz2-Cre*⁺; b: *Spi1*^{+/+}/*Lyz2-Cre*⁻; c: water; d: DNA Marker

2.3 KO 小鼠免疫细胞中 PU.1 的表达 分离 WT 和 KO 小鼠的 BMDMs、PM 和胸腺 T 细胞,Western blot 检测 PU.1 表达,结果显示,与 WT 组比较,KO 组小鼠 BMDMs 中 PU.1 不表达 ($P < 0.001$); PM 中 PU.1 也不表达 ($P < 0.001$); T 细胞中 PU.1 表达水平与 WT 小鼠差异无统计学意义(图 3)。表明髓系特异性 *Spi1* 基因敲除小鼠构建成功。

3 讨论

目前基因敲除技术在基础实验研究中广泛应用,但全基因敲除过程中常导致小鼠胚胎致死^[7]。条件性基因敲除技术与全基因敲除技术相比显然有着明显的优势和更为广泛的应用前景,其中基于 Cre-loxP 系统的条件性基因敲除小鼠在改善小鼠胚

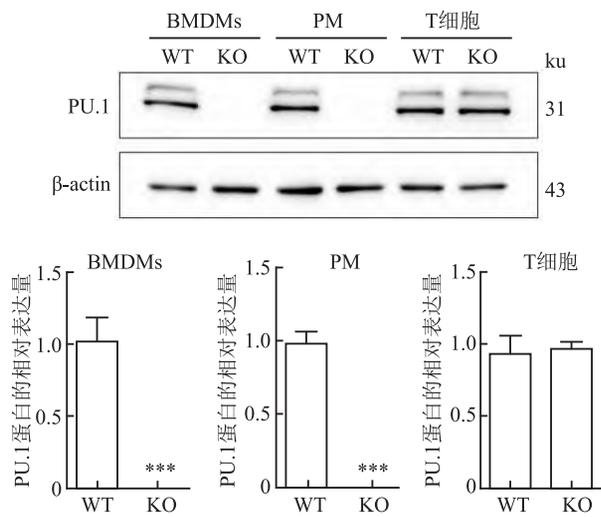


图3 小鼠 PU.1 表达的比较
与 WT 比较: *** $P < 0.001$

胎致死的同时也为在特定的细胞亚群中研究基因功能提供了可能。

LoxP 序列是从大肠埃希菌 P1 噬菌体中发现的长度为 34 bp 的碱基序列,由两个 13 bp 的反向重复序列和中间 8 bp 的间隔序列组成^[8]。Cre 重组酶可以特异性识别细胞内基因或 DNA 上的 LoxP 序列,并根据其位置和序列之间的关系介导不同的特异性重组反应。应用 Cre-LoxP 系统构建条件性基因敲除小鼠,主要是构建具有 LoxP 序列的目的基因突变小鼠和构建带有 Cre 酶基因的转基因 Cre 小鼠,将两种小鼠杂交后经筛选可得到细胞内同时存在 Cre 重组酶基因和 LoxP 序列的小鼠,通过条件性表达 Cre 重组酶并与细胞内 LoxP 序列特异性识别,删除相应的基因或基因片段,从而完成条件性基因敲除小鼠的构建^[8]。

本实验首先利用 CRISPR Design 工具,结合 *Spi1* Gene ID(20375)小鼠基因组序列信息,设计针对 Exon2 的 sgRNA,再根据 sgRNA 序列设计 Donor 载体。将 Cas9 蛋白和转录好的 sgRNA 以及纯化后的 Donor 载体片段显微注射到受精卵中,随后将胚胎转移到假孕动物中以产生 F0 代。最后将阳性 F0 代与 C57BL/6J 交配获得稳定的 F1 代 *Spi1*^{fllox/+} 小鼠,F1 代小鼠之间杂交得到 *Spi1*^{fllox/fllox} 小鼠。将 *Spi1*^{fllox/fllox} 小鼠与带有骨髓细胞特异性表达 Cre 酶的 *Lyz2-Cre*⁺ 小鼠杂交获得 *Spi1*^{fllox/+}/*Lyz2-Cre*⁺ 小鼠,再将其与 *Spi1*^{fllox/fllox} 小鼠杂交即可获得 *Spi1*^{fllox/fllox}/*Lyz2-Cre*⁺ 小鼠。

转录因子 PU.1 对多种骨髓细胞的分化和功能

是必需的^[9-10],并在病理情况下如血液系统相关疾病^[11-12]和自身免疫性疾病^[3-5]中发挥重要作用。巨噬细胞从髓系祖细胞分化伴随着 E26 转化特异性转录因子 PU.1 的表达增加;PU.1 表达减少导致髓系祖细胞增殖增加和分化受损^[9]。PU.1 结合大多数受 IL-1 抑制的靶基因,在炎症应激期间调节造血干细胞(hemopoietic stem cell,HSC)周期活动从而影响血液系统对炎症信号的反应^[11]。在自身免疫性疾病类风湿性关节炎中,PU.1 可直接靶向巨噬细胞和成纤维样滑膜细胞中的 FMS 样酪氨酸激酶 3 从而促进关节炎的发生发展^[6]。因此,构建 *Spi1* 基因敲除小鼠对充分阐明 PU.1 的病理作用机制及药物靶点的明确具有重要意义。

综上所述,本研究成功构建了髓系特异性 *Spi1* 基因敲除小鼠,可为探讨 PU.1 在自身免疫性疾病及肿瘤中的作用机制提供动物模型基础。

参考文献

- [1] Klemsz M J, Maki R A. Activation of transcription by PU.1 requires both acidic and glutamine domains [J]. *Mol Cell Biol*, 1996,16(1): 390-7.
- [2] Wang L, Wang E, Prado Balcazar J, Wu Z, et al. Chromatin remodeling of colorectal cancer liver metastasis is mediated by an HGF-PU.1-DPP4 axis [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, 8(19): e2004673.
- [3] Xie Z, Qu Y, Shen P, et al. PU.1 attenuates TNF- α -induced proliferation and cytokine release of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by regulating miR-155 activity [J]. *Mol Med Rep*, 2018,17(6):8349-56.
- [4] Shakerian L, Ghorbani S, Talebi F, et al. MicroRNA-150 targets PU.1 and regulates macrophage differentiation and function in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *J Neuroimmunol*, 2018,323:167-74.
- [5] Xiang N, Fang X, Sun X G, et al. Expression profile of PU.1 in CD4⁺ T cells from patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Clin Exp Med*, 2021,21(4):621-32.
- [6] Tu J, Chen W, Fang Y, et al. PU.1 promotes development of rheumatoid arthritis via repressing FLT3 in macrophages and fibroblast-like synoviocytes [J]. *Ann Rheum Dis*, 2023, 82(2):198-211.
- [7] Perez-Garcia V, Fineberg E, Wilson R, et al. Placentation defects are highly prevalent in embryonic lethal mouse mutants [J]. *Nature*, 2018, 555(7697):463-8.
- [8] 孔维健, 常宇鑫, 管春芳, 等. 基于 Cre-loxP 系统条件性基因敲除小鼠的构建及其应用进展 [J]. *中国实验诊断学*, 2017, 21(12):2208-11.
- [9] Solomon L, Podder S, He J, et al. Coordination of myeloid differ-

- entiation with reduced cell cycle progression by PU.1 induction of microRNAs targeting cell cycle regulators and lipid anabolism[J]. *Mol Cell Biol*,2017,37(10):e00013-17.
- [10] Rothenberg E V, Hosokawa H, Ungerback J. Mechanisms of action of hematopoietic transcription factor PU.1 in initiation of T-cell development[J]. *Front Immunol*,2019,10:228.
- [11] Chavez J S, Rabe J L, Loeffler D, et al. PU.1 enforces quiescence and limits hematopoietic stem cell expansion during inflammatory stress[J]. *J Exp Med*,2021,218(6):e20201169.
- [12] Aivalioti M M, Bartholdy B A, Pradhan K, et al. PU.1-dependent enhancer inhibition separates Tet2-deficient hematopoiesis from malignant transformation[J]. *Blood Cancer Discov*, 2022,3(5):444-67.

Construction and gene identification of myeloid-specific *Spi1* knockout mice

Wu Xuming, Wang Huihui, Zhu Xiangling, Zhou Yuanyuan, Wang Anqi, Zhang Huiru, Liu Chong, Tu Jiajie
(*Institute of Clinical Pharmacology of Anhui Medical University, Hefei 230032*)

Abstract Objective To construct myeloid-specific *Spi1* gene knockout mice and analyze their genotypes, so as to provide animal model basis for the study of pathological mechanism of diseases and drug targets. **Methods** According to the principle of CRISPR/Cas9 technology and Cre/LoxP system, sgRNA and Donor vectors were designed and constructed. The transcript of Exon 2 (Exon 2) was used as the knockout region, and *Loxp* elements were placed on both sides of Exon 2. Cas9 protein, sgRNA and Donor vector were mixed and microinjected into the fertilized eggs of C57BL/6J mice, the fertilized eggs were transplanted into the uterus of C57BL/6J pregnant female mice, and F0 generation was obtained after 19 ~ 20 days. Positive F0 mice were mated with C57BL/6J mice to obtain stable F1 *Spi1*^{flox/+} mice. *Spi1*^{flox/+} mice of F1 generation were selfed to obtain *Spi1*^{flox/flox} mice. *Spi1*^{flox/flox} mated with *Lyz2-Cre*⁺ mice to obtain *Spi1*^{flox/+}/*Lyz2-Cre*⁺ mice, and then mated with *Spi1*^{flox/flox}, the *Spi1*^{flox/flox}/*Lyz2-Cre*⁺ mice were myeloid-specific *Spi1* gene knockout (KO) mice. *Spi1*^{flox/flox}/*Lyz2-cre*⁻ mice were used as wild-type (WT) mice. DNA of WT and KO mice was extracted, and the genotypes were identified by agarose gel electrophoresis after PCR amplification. Western blot was used to detect the expression of spleen focus forming virus proviral integration oncogene, Spi-1/purine rich box-1 (PU.1) in immune cells of WT and KO mice. **Results** The results of PCR identification showed that the genotype of mice with only 220 bp amplified by flox primer was *Spi1*^{flox/flox} homozygote, and the genotype of mice with 700 bp amplified by *Lyz2-Cre* primer was *Lyz2-Cre*⁺. Western blot showed that compared with WT group, the protein PU.1 was not expressed in bone marrow-derived macrophages (BMDMs) and peritoneal macrophages (PM) in KO group ($P < 0.01$). There was no significant difference of statistics in the expression level of PU.1 in T cells between KO mice and WT mice. The results of PCR and Western blot showed that myeloid-specific *Spi1* KO mice were successfully constructed. **Conclusion** The myeloid-specific *Spi1* gene KO mice are successfully constructed and identified, which provides animal model basis for further revealing the potential mechanism of PU.1 in immune regulation.

Key words myeloid-specific; *Spi1*; gene knockout; CRISPR/Cas9; Cre/Lox; PCR; Western blot