基于细胞融合开发双基因共敲除技术

于鲁孟， 刘思思， 高晓冬， 藤田盛久*
（江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122）

摘要： 基因编码工具（例如 CRISPR/Cas9）的出现使敲除哺乳动物细胞基因成为现实。然而，实现细胞的多基因敲除成功率低且所需时间长。细胞融合技术是构建杂合细胞的常用方法，通过融合两种不同表型的细胞，构建出一种具有杂合表型的新型细胞。但是，由于基因的互补作用，通过基因敲除而获得的性状在细胞融合后成为隐性性状，融合细胞不能表现该性状。本研究的目的是设计一种通过细胞融合技术和 CRISPR/Cas9 技术获得基因双敲除细胞的方法。由于现阶段没有关于 HEK 293 细胞株细胞融合的参考数据，所以首先在 HEK 293 野生型细胞株中分别敲除 GPI 生物合成必需的 *PIGA* 或 *PIGK*，获得 PIGA-KO 细胞株和 PIGK-KO 细胞株，并以这两个细胞株作为模型进行条件优化。经过反应条件优化，HEK 293 细胞的融合效率显著提高，且实现了 *FUT8* 敲除细胞株和 *ST6GAL1* 敲除细胞株的快速融合；其次是将细胞融合技术与 CRISPR/Cas9 技术结合从而实现多种糖基因的快速敲除。将分别含有 *FUT8* 和 *ST6GAL1* 目标导向 RNAs 且都能稳定表达 Cas9 蛋白的两个细胞株进行融合，即可获得 *FUT8* 和 *ST6GAL1* 基因都被敲除的双敲细胞株。实验结果表明，将细胞融合技术和 CRISPR/Cas9 技术结合可简便而快速地获得基因双敲除细胞株。

关键词： HEK 293；细胞融合；基因敲除；CRISPR/Cas9
中图分类号：Q 78　**文章编号：**1673-1689(2021)01-0065-10　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.01.009

Development of a Technique for Double Gene Knockout Using Cell Fusion

YU Lumeng, *LIU Sisi*, *GAO Xiaodong*, *FUJITA Morihisa**
(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Emerging of genome-editing tools such as CRISPR/Cas9 enables us to perform gene knockout (KO) in mammalian cells. However, KO of multiple genes in a cell is inefficient and time consuming. Cell fusion, frequently used for hybridoma construction, is a way to fuse two different cells and create a new cell line with hybrid phenotypes. However, the recessive phenotype by gene-KO cannot be obtained by cell fusion, because gene complementation occurs from the other cell to be fused. The purpose of this study is to develop a method to obtain double KO cells using cell fusion combined with CRISPR/Cas9. The process and method are as follows. Without available cell fusion data using HEK 293. We first knocked out *PIGA* or *PIGK*, which were necessary for GPI biosynthesis, in HEK 293 wild-type cell line to obtain PIGA-KO cell line and PIGK-KO cell line.

收稿日期： 2019-04-09
基金项目： 国家自然科学基金项目(31770853)。
* **通信作者：** 藤田盛久(1979—)，男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事细胞生物学研究。E-mail：fujita@jiangnan.edu.cn

Then the two cell lines were as optimized as models. By optimizing the fusion condition, the fusion efficiency of HEK 293 cells was greatly improved. Secondly, we combined cell fusion technology with CRISPR/Cas9 technology to achieve the knockout of multiple sugar genes. Under optimized condition, fusion of *FUT8*-KO cells and *ST6GAL1*-KO cells was performed. Both *FUT8* and *ST6GAL1* were successfully disrupted after cell fusion. These results suggest a simple and quick method to acquire double KO cells using our developed method combined cell fusion with CRISPR/Cas9.

Keyword: HEK 293, cell fusion, gene knockout, CRISPR/Cas9

近年来,针对哺乳动物细胞基因编辑的手段越来越多,包括设计锌指结构(ZFs)[1]、转录激活因子样效应物(TALEs)[2]、CRISPR/Cas9 技术[3-4],这些技术都可以特异性的敲除基因。尤其是 CRISPR/Cas9 技术通过目标导向 RNA 介导 Cas9 蛋白造成 DNA 双链断裂[5],可以更精准的进行基因编辑,有效地缩短了基因编辑的周期和成本,获得了广泛的运用。然而这些编辑手段都只能特异性编辑一个基因,目前有效编辑几个基因还有一定局限性。已有相关文献报道[6-8],可以借助 CRISPR/Cas9 技术和含多个目标导向 RNA 的单个慢病毒质粒实现易转染细胞的多基因共敲除,但是基因敲除效率取决于细胞类型。因此仍需探索一种高效稳定的动物细胞多基因共敲除方法。

众所周知,在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的生命周期中,单倍体酵母细胞通过配对产生二倍体酵母细胞。当营养缺乏时,二倍体酵母细胞形成孢子,从而再次产生酵母单倍体细胞[9]。在有丝分裂过程中,酵母细胞染色体发生重组并平均分配到两个子细胞中[10]。若已敲除两个不同基因的两个单倍体酵母细胞经过配对和孢子形成,可以产生基因双敲除的酵母细胞[11]。在哺乳动物细胞中相同或不同类型细胞可以融合并导致同核或异核形成,且亲本核保持离散并包含在由共享细胞质支持的单个细胞体中[12-14]。不同种细胞间可以通过融合产生杂种细胞,获得多种目标表现型。比如,将胚胎干细胞分别与神经干细胞、成纤维细胞或胸腺细胞融合的实验表明,通过细胞融合可以促进细胞向多能干细胞转化[15-16]。通过细胞融合也可利用现有细胞直接获得新型细胞,而不必进行复杂漫长的基因编辑工作。人类胚胎肾细胞(Human Embryonic Kidney 293 cells,HEK 293),是一种特定的细胞系,最初来源于在组织培养中生长的人类胚胎肾细胞[17]。HEK 293 细胞易于生长且表现出较高的转染效率。HEK 293 细胞的基因组学、转录组学及蛋白质组学数据现已基本完整[18],因此以 HEK 293 细胞为模型进行科学探索更具优势。

结合哺乳动物细胞基因编辑技术和细胞融合技术,以 HEK 293 细胞株为模型建立了一种双基因共敲除技术。为了便于鉴定细胞基因型,分别构建了 *PIGA* 敲除细胞株、*PIGK* 敲除细胞株、*FUT8* 敲除细胞株以及 *ST6GAL1* 敲除细胞株。PIGA 和 PIGK 均为糖基磷脂酰肌醇(glycosylphosphatidylinositol,GPI)生物合成的必须基因[19-20],可根据细胞表面 GPI 锚定蛋白表达情况鉴定基因敲除与否。岩藻糖转移酶 8 是糖链结合核心岩藻糖的主要酶[21];α-2,6-唾液酸转移酶 1 是糖链结合 α-2,6 连接的唾液酸的必须酶[22-23],可根据细胞表面糖链结构判定基因敲除与否。由于现阶段没有以 HEK 293 细胞为模型研究细胞融合条件的可供参考的数据,故以 *PIGA* 敲除细胞株和 *PIGK* 敲除细胞株为模型优化细胞融合的条件。依据优化后的细胞融合条件并结合 CRISPR/Cas9 技术构建了 *FUT8* 和 *ST6GAL1* 双敲除细胞株。本研究构建的动物细胞基因敲除技术可有效缩短构建双基因敲除细胞的时间。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

大肠杆菌培养基:Amp 培养基:胰蛋白胨,1.6 g/dL 酵母提取物质量分数 1.5%,NaCl 质量分数 0.5%。灭菌后添加氨苄青霉素(Amp)使其终质量浓度为 100 mg/mL。

SOB 培养基:胰蛋白胨 2 g/dL,质量分数 0.5%,酵母提取物质量分数 0.5%,NaCl 质量分数 0.5%,

KCl 2 g/dL,$MgCl_2$ 10 mmol/L。

SOC 培养基:1 L SOB 中添加 10 mL 2 mol/L 葡萄糖溶液。

细胞培养基:

FBS 培养基:500 mL DMEM 溶液(Gibco,Life technologies)中加入 55 mL 胎牛血清。

Hyg 培养基:向 550 mL 质量分数 10% FBS 培养基中加入 2.2 mL 100 mg/mL 的潮霉素溶液。

BSD 培养基:向 550 mL 质量分数 10% FBS 培养基中加入 0.55 mL 100 mg/mL 的杀稻瘟菌素溶液。

Puro 培养基:向 550 mL 质量分数 10% FBS 培养基中加入 55 μL 100 mg/mL 的嘌呤霉素溶液。

人体胚胎肾细胞 HEK 293 和 HEK 293 T 细胞株培养条件均为 37 ℃,CO_2 体积分数 5%。

1.2 质粒构建

构建 pME-Hyg-EGFP 质粒。以 pME18s-EGFP 为模板,PCR 扩增绿色荧光蛋白基因片段(*EGFP*)。以限制性内切酶处理并纯化 PCR 扩增片段,用连接酶(Ligation Mix,Takara)连接入 pME-Hyg 的 *EcoR*I 和 *Not*I 位点。

构建 pX330-EGFP-FUT8-cr1 和 pX330-EGFP- FUT8-cr2 质粒。通过 E-CRISP 网站(http://www.e-crisp.org/E-CRISP/)设计敲除 *FUT8* 的两对目标序列 FUT8-cr1 和 FUT8-cr2,qPCR 分别扩增这两对目标序列,以限制性内切酶处理并纯化 qPCR 扩增片段,用连接酶连入 pX330-EGFP 的 *Bbs*I 位点。

构建 pX330-EGFP-ST6GAL1-cr1 和 pX330-EGFP- ST6GAL1-cr2 质粒。同上。

构建 Lenti-Cas9-Blast-FUT8-cr1 质粒。以 pX330-EGFP-FUT8-cr1 为模板,PCR 扩增 *FUT8* 目标序列(FUT8-cr1)。以限制性内切酶处理并纯化 PCR 扩增片段,用连接酶连接入 Lenti-Cas9-Blast 的 *Nhe*I 位点。

构建 Lenti-Cas9-Puro 中间质粒。以 Lenti-CRISPR v2-Puro 为模板,PCR 扩增嘌呤霉素基因片段(*Puro*)。以限制性内切酶处理并纯化 PCR 扩增片段,用连接酶(Quick cloning Mix)连接入 Lenti-Cas9 的 *BamH*I 和 *EcoR*I 位点。

构建 Lenti-Cas9-Puro-ST6GAL1-cr1 质粒。以 pX330-EGFP-ST6GAL1-cr1 为模板,PCR 扩增 *ST6GAL1* 目标序列(ST6GAL1-cr1)。以限制性内切酶处理并纯化 PCR 扩增片段,用连接酶连接入 Lenti-Cas9-Puro 的 *Nhe*I 位点。

表 1 本文中所用引物

Table 1 Primers of this stduy

引物名称	引物说明	引物序列(5′— 3′)
FUT8-cr1	敲除 *FUT8* 基因序列	CACCGAGACACCCACCACACTGCA AAACTGCAGTGTGGTGGGTGTCTC
FUT8-cr2	敲除*FUT8* 基因序列	CACCGTCAGACGCACAGACAAAGT AAACACTTTGTCTGTGCGTCTGAC
ST6GAL1-cr1	敲除 *ST6GAL1* 基因序列	CACCGGATGTAAAAGGGCTGATTG AAACCAATCAGCCCTTTTACATCC
ST6GAL1-cr2	敲除*ST6GAL1*基因序列	CACCGGTTTGGCTGAATCTCTTCT AAACAGAAGAGATTCAGCCAAACC
Puro	扩增 *Puro* 基因序列	ACGATGACGATAAGGGATCCGGCGCAACAAACTTCTCTCTG ATAAGCTTGATATCGAATTCTCAGGCACCGGGCTTGCGGGTCAT
Puro check	验证 *Puro* 基因序列	CCGAGAATATCATCCACCTGTTTACCC
pX330sgRNA-*Nhe*I	扩增 *FUT8* 和*ST6GAL1*基因序列	CAGTTTGGTTAATTAGCTAGCGAGGGCCTATTTCCCATGATTC TCCTTTCAAGACCTAGCTAGCAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCAC

1.3 细胞株构建方法

1.3.1 Lipofectamine 2000 介导 HEK 293 细胞株稳定转染 在 6 孔板上接种 HEK 293 野生型细胞,培养至细胞长到平板底面积的 80%。先将质粒酶切,然后按照 Invitrogen 的说明书,将线型质粒转染到 HEK 293 野生型细胞。待细胞长到满板,用含抗生素的培养基筛选,即可获得新型稳定细胞株。

1.3.2 Lipofectamine 2000 介导 HEK 293 细胞株瞬时转染 在 6 孔板上接种 HEK 293 野生型细胞,培养至细胞长到平板底面积的 80%。按照 Invitrogen 的说明书,将环型质粒转染到 HEK 293 野生型细胞。待细胞长到满板,用含抗生素的培养基筛选,即

可获得新型稳定细胞株。

1.3.3 慢病毒介导 HEK 293 细胞株稳定转染 在 6 孔板上接种 HEK 293 T 细胞,培养至细胞长到平板底面积的 80%。将 PMD-G,psPAX2 与重组质粒按照质量比 1:1:2 转染到 HEK 293 T 细胞,将在 HEK 293 T 细胞中产生慢病毒。24 h 后,将含有病毒的培养基与质量分数 10% FBS 培养基以体积比 1:1 混合,然后接入 HEK 293 野生型细胞。病毒转染 24 h 后用含抗生素的培养基筛选 1 周。对细胞染色并用流式细胞分选仪 S3e 分选未染色细胞,由此获得新型稳定细胞株。

1.4 细胞融合的实验操作

聚乙二醇是一种常用的细胞融合试剂。日本血凝病毒外壳是日本凝血病毒去除遗传物质后获得的,也可以介导细胞融合。

以 PEG 为诱导剂介导细胞融合。收集细胞,按照杨建等[24]修改的 PEG 的使用方法将 PIGA-KO-Hyg-GFP 细胞株和 PIGK-KO-BSD-BFP 细胞株(各 5×10^6 个细胞)融合,并用质量分数 10% FBS 培养基培养 3 d,通过流式细胞分析仪分析并确定细胞表型。

以 HVJ-E 为诱导剂介导细胞融合。收集细胞,按照 GenomONE-CF EX 说明书中 HVJ-E 的使用方法将 PIGA-KO-Hyg-GFP 细胞株和 PIGK-KO-BSD-BFP 细胞株(各 2×10^5 个细胞)融合,并用质量分数 10% FBS 培养基培养 3 d,通过流式细胞分析仪分析并确定细胞表型。

1.5 流式细胞分析

收集细胞,用磷酸盐缓冲液洗涤并重悬(细胞终浓度为 5×10^5 个/mL)。CD59 抗体可识别 GPI 锚定蛋白 CD59[25],因此 *PIGA* 和 *PIGK* 基因敲除的细胞用 CD59 抗体及结合红色荧光蛋白的二抗染色。*FUT8* 敲除的细胞用结合荧光的凝集素 LCA 或生物素凝集素 LCA 染色[26],*ST6GAL1* 敲除的细胞用生物素凝集素 SSA(Bio-SSA,Cosmo Bio,Japan)染色[21]。采用流式细胞分析仪分析细胞的荧光信号。

1.6 荧光显微镜检测

用 1 g/dL 的明胶溶液将垫片固定于 24 孔板中,然后加入大约 3.3×10^4 个细胞及质量分数 10% FBS 培养基培养 1~2 d。用 4 g/dL 的多聚甲醛固定液固定细胞然后加入氯化铵溶液。将垫片置于一片干净的载玻片上并封闭,通过共聚焦荧光显微镜检测细胞的荧光信号。

1.7 核型分析

在 6 孔板上接种待检测细胞并培养至细胞长至平板底面积的 50%。向平板中加入秋水仙胺(质量浓度 1 μg/mL)培养 3 h,使细胞的有丝分裂停止于染色体辨识性最高的分裂中期[27]。用 1 g/dL 的柠檬酸钠溶液处理以防止细胞黏连,用乙酸与甲醇的混合溶液(体积比为 1:3)固定细胞。将细胞液滴于温热的载玻片后滴加 Hochest 溶液使染色体着色,盖上盖玻片并用指甲油封闭。通过共聚焦荧光显微镜观察细胞荧光信号。

1.8 细胞生长活性检验

收集并计数细胞,将 200 个细胞接种到 96 孔板中用 100 mL 质量分数 10% FBS 培养基培养。4 h 后加入 10 μL CCK-kit,1 h 后借助酶标仪(450 nm 波长)分析细胞活性。

2 结果与讨论

2.1 PIGA-KO-Hyg-GFP 细胞株和 PIGK-KO-BSD-BFP 细胞株的构建

通过稳定转染方法将抗潮霉素基因和绿色荧光蛋白(GFP)基因插入 PIGA-KO 细胞株中,同时将抗杀稻瘟菌素基因和蓝色荧光蛋白(BFP)基因插入 PIGK-KO 细胞株,从而便于用抗性培养基筛选细胞以及借助流式细胞仪和共聚焦荧光显微镜确定细胞类型。流式分析结果显示 PIGA-KO 细胞样本具有绿色荧光、无蓝色荧光且不能结合 Anti-CD59 抗体,如图 1(a)、(b),共聚焦显微镜结果显示细胞具有绿色荧光、无蓝色荧光,如图 1(c);PIGK-KO 样

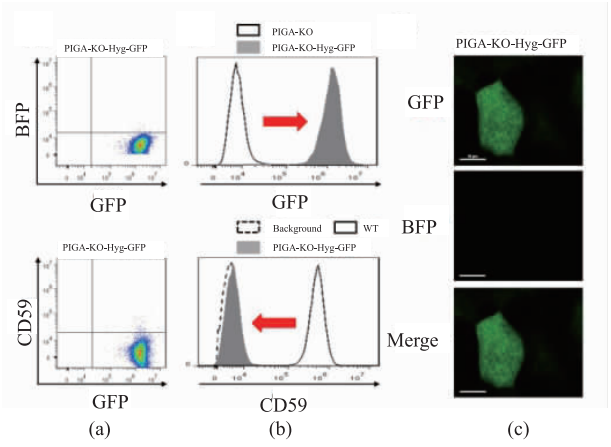


图 1 PIGA-KO-Hyg-GFP 细胞株的鉴定

Fig. 1 Identification of PIGA-KO-Hyg-GFP cell line

本细胞具有蓝色荧光、无绿色荧光且不能结合 Anti-CD59 抗体,如图 2(a)、(b),共聚焦显微镜结果显示细胞具有蓝色荧光、无绿色荧光,如图 2(c)。从而确定 PIGA-KO 细胞样本为 PIGA-KO-Hyg-GFP 细胞株,PIGK-KO 细胞样本为 PIGK-KO-BSD-BFP 细胞株。

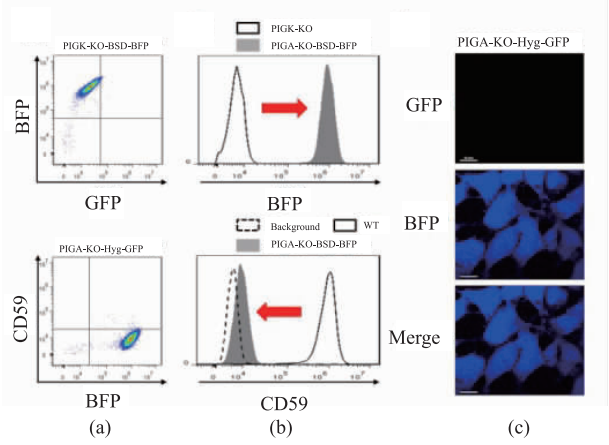


图 2 PIGK-KO-BSD-BFP 细胞株的鉴定

Fig. 2 Identification of PIGK-KO-BSD-BFP cell line

2.2 PIGA-KO-Hyg-GFP & PIGK-KO-BSD-BFP 融合细胞株构建

以 PIGA-KO-Hyg-GFP 细胞株和 PIGK-KO-BSD-BFP 细胞株为模型构建融合细胞株。将上述两种细胞株混合并用 PEG 处理。流式分析结果显示,部分细胞株融合,如图 3(a)。限制性稀释含多种细胞株的混合样本,以期获得单克隆细胞株。流式分析结果显示单克隆细胞株能够结合 Anti-CD59 抗体,这表明已获得融合单克隆细胞株,如图 3(b)。通过镜检可检测到绿色荧光信号和蓝色荧光信号,如图 3(c),并且核型分析结果表明融合细胞中染色体数目近乎是 PIGA-KO-Hyg-GFP 细胞株和 PIGK-KO-BSD-BFP 细胞株的染色体数目总和,如图 3(d),这充分证明已获得 PIGA-KO-Hyg-GFP & PIGK-KO-BSD-BFP 融合细胞株且可以稳定培养。

2.3 细胞融合条件优化

依据现有融合方法获得 HEK 293 融合细胞的效率极低,所以在此以 HEK 293 细胞为研究模型进行细胞融合条件的优化,从而提高细胞融合效率。

2.3.1 以 PEG 为融合试剂的细胞融合条件优化

PEG 可以改变各种细胞膜结构,使两个细胞接触部分的脂质分子疏散并重组[2],从而引发细胞融合,如图 4(a)。由于 PEG 的相对分子质量不同,因而被分为不同的类型,例如本实验中用到的 Solar 4000、Merck 4000、Sigma 8000、Roche 1500 和 Solarbio 3350 5 种 PEG。首先以 PEG 为融合试剂,从 PEG 的种类,如图 4(b);37 ℃培养时间,如图 4(c);室温培养时间,如图 4(d);PEG 浓度,如图 4(e)共 4 个方

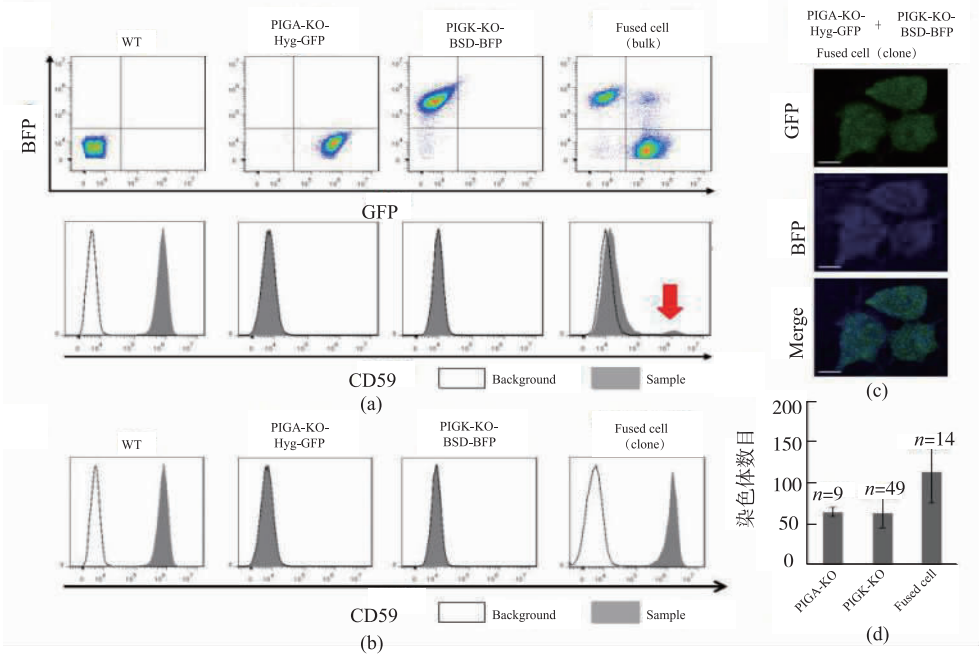
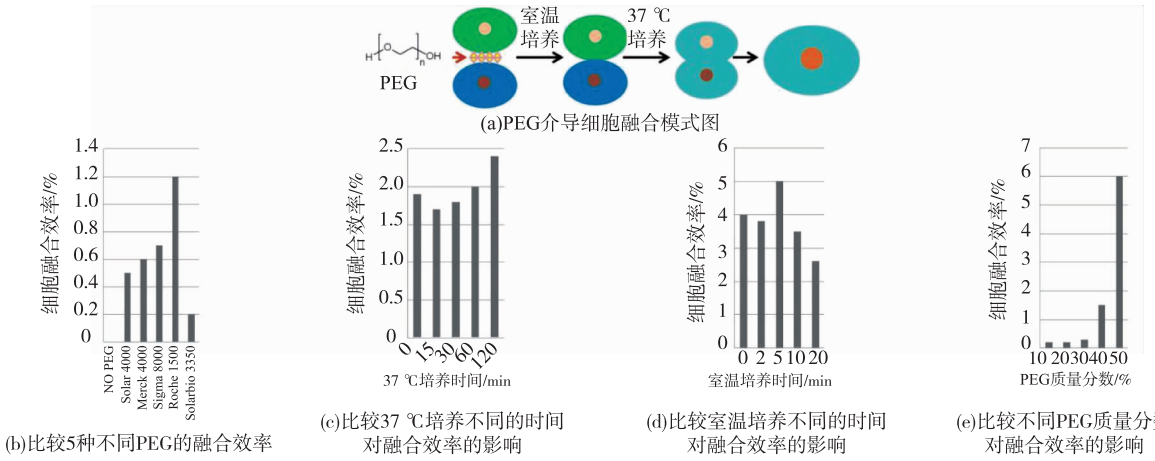


图 3 PIGA-KO-Hyg-GFP 和 PIGK-KO-BSD-BFP 融合细胞株的鉴定

Fig. 3 Identification of PIGA-KO-Hyg-GFP & PIGK-KO-BSD-BFP fused cell line



(a)PEG介导细胞融合模式图

(b)比较5种不同PEG的融合效率

(c)比较37 ℃培养不同的时间对融合效率的影响

(d)比较室温培养不同的时间对融合效率的影响

(e)比较不同PEG质量分数对融合效率的影响

图 4　PEG 介导的细胞融合条件优化

Fig. 4　Optimization of cell fusion by PEG

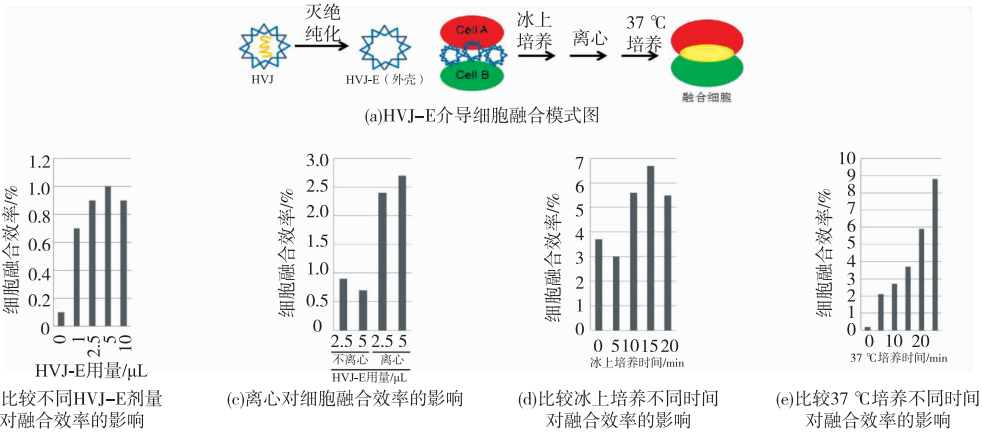
面对细胞融合条件进行了优化。由于每个实验中细胞的融合效率不完全相同,因此作者仅展示其中的代表性结果以说明其趋势。得到最优条件为:混合两种细胞（各 5×10^6 个细胞）后用预热的 PBS 和 DMEM 清洗，室温下缓慢加入 1 mL 质量分数 50% 的 PEG,室温培养 5 min,加入预热的 DMEM 溶液,37 ℃培养 120 min,用预热的 DMEM 溶液清洗细胞 2 次,然后用质量分数 10% FBS 培养基培养 3 d。经过条件优化,细胞融合效率达到了 6%。

2.3.2　以 HVJ-E 为融合试剂的细胞融合条件优化

HVJ-E 可以像完整病毒一样使细胞膜发生改变从而引起细胞融合,如图 5(a),却没有细胞致死性。也以 HVJ-E 为融合试剂,从 HVJ-E 使用剂量,如图5(b);是否需要离心,如图 5(c);冰上培养时间,如图 5(d);37 ℃培养时间,如图 5(e)共 4 个方面对细胞融合条件进行了优化。由于每个实验中细胞的融合效率不完全相同,因此作者仅展示其中的代表性结果以说明其趋势。得到最优条件为:分别收集两种细胞(各 2×10^5 个细胞)后分别用PBS 清洗细胞一次并用 25 μL 的融合缓冲液重悬细胞,将两种细胞溶液在 2 mL 离心管中混合再加入 2.5 μL 冰冻 HVJ-E 溶液并用手轻敲离心管混匀，冰上放置培养 15 min,2 000 r/min 4 ℃离心 3 min,然后 37 ℃培养 25 min。最后将细胞转移至 6 孔板并加入预热的质量分数 10% FBS 培养基培养 3 d。经过条件优化,细胞融合效率达到了 8.8%。

2.4　FUT8-KO-Hyg 细胞株和 ST6GAL1-KO-BSD 细胞株的构建与融合

核心岩藻糖能被凝集素 LCA 特异性识别并结合[26],因此可用结合荧光的凝集素(LCA-FITC)处理细胞并用流式细胞仪鉴定细胞表面糖链结构。当唾液酸与半乳糖以 α-2,6 连接时,唾液酸可被凝集素



(a)HVJ-E介导细胞融合模式图

(b)比较不同HVJ-E剂量对融合效率的影响

(c)离心对细胞融合效率的影响

(d)比较冰上培养不同时间对融合效率的影响

(e)比较37 ℃培养不同时间对融合效率的影响

图 5　HVJ-E 介导的细胞融合条件优化

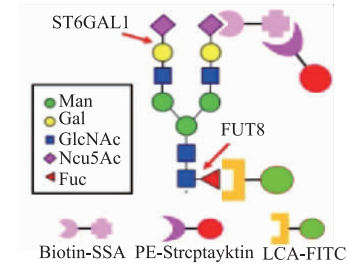
Fig. 5　Optimization of cell fusion by HVJ-E

SSA 特异性识别并结合,因此可用生物素凝集素(Bio-SSA)处理细胞并用流式细胞仪鉴定细胞表面糖链结构,如图 6(a)。

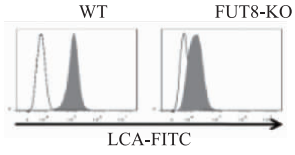
2.4.1 FUT8-KO-Hyg 细胞株和 ST6GAL1-KO-BSD 细胞构建 通过瞬时转染方法将 pX330-FUT8-cr1 和 pX330-FUT8-cr2 质粒转入 HEK 293 野生型细胞,并经限制性稀释获得 FUT8-KO 单克隆细胞株。通过稳定转染方法将 pME-Hyg 转入 FUT8-KO 单克隆细胞株,并用 400 μg/mL Hyg 培养基筛选以期获得 FUT8-KO-Hyg 细胞株。流式分析结果表明细胞不能结合 LCA-FITC,如图 6(b),即获得了 FUT8-KO-Hyg 细胞株。

通过瞬时转染方法将 pX330-ST6GAL1-cr1 和 pX330-ST6GAL1-cr2 质粒转入 HEK293 野生型细胞,并经限制性稀释获得 ST6GAL1-KO 单克隆细胞株。通过稳定转染方法将 pME-BSD 转入 ST6GAL1-KO 单克隆细胞株,并用 10 μg/mL BSD 培养基筛选以期获得 ST6GAL1-KO-BSD 细胞株。流式分析结果表明细胞不能结合 Bio-SSA,如图 6(c),即获得了 ST6GAL1-KO-BSD 细胞株。

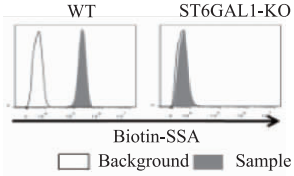
2.4.2 FUT8-KO-Hyg 细胞株和 ST6GAL1-KO-BSD 细胞株融合 以 PEG 为融合试剂,依据细胞融合最优条件对 FUT8-KO-Hyg 细胞株和 ST6GAL1-KO-BSD 细胞株进行融合处理。用 400 μg/mL Hyg 和 10 μg/mL BSD 培养基筛选后进行流式分析,结果显示样品中的绝大多数细胞均可结合 LCA-FITC 和



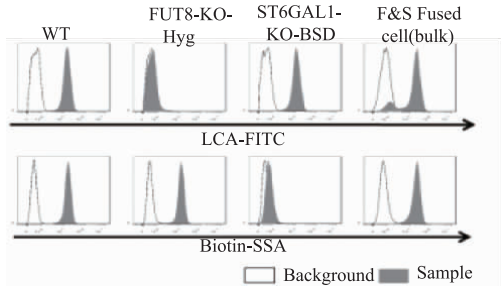
(a)糖链结构及与Bio-SSA和LCA-FITC结合示意图



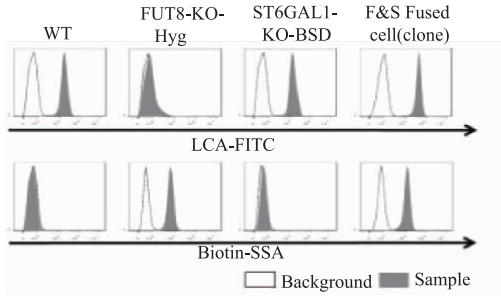
(b)FUT8-KO-Hyg样本细胞的流式分析



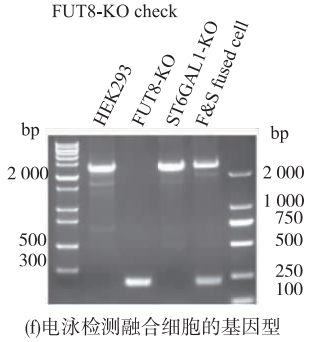
(c)ST6GAL1-KO-BSD样本细胞的流式分析



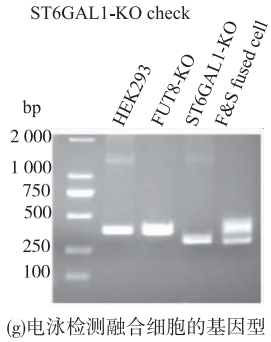
(d)PEG处理后,混合样本细胞的流式分析



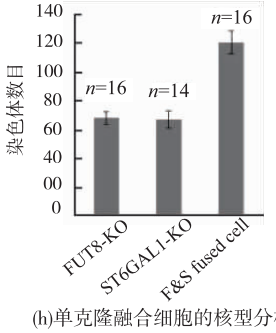
(e)单克隆融合细胞株的流式分析



(f)电泳检测融合细胞的基因型



(g)电泳检测融合细胞的基因型



(h)单克隆融合细胞的核型分析

图 6 FUT8-KO-Hyg 细胞株和 ST6GAL1-KO-BSD 细胞株的鉴定及融合细胞的鉴定

Fig. 6 Identification of FUT8-KO-Hyg cell line,ST6GAL1-KO-BSDcell line and fused cell line

Bio-SSA,这表明绝大多数细胞已融合,如图 6(d)。限制性稀释含多种表型细胞的混合样本,获得了单克隆细胞株。通过流式分析单克隆细胞株,结果显示其均可结合 LCA-FITC 和 Bio-SSA,如图 6(e),这初步表明获得了融合的单克隆细胞株。通过电泳检测分析融合细胞株的 *FUT8* 和 *ST6GAL1* 两种基因型,结果显示融合细胞株中既有野生型的条带也有敲除型的条带,如图 6(f)、(g)。核型分析的结果表明样本细胞中染色体数目近乎是 FUT8-KO-Hyg 细胞株和 ST6GAL1-KO-BSD 细胞株的染色体数目总和,如图 6(h),这充分证明已获得 FUT8-KO-Hyg & ST6GAL1-KO-BSD 融合细胞株。

2.5 *FUT8* 和 *ST6GAL1* 的共敲除

质粒 Lenti-Cas9-Blast 中有 *Cas9* 基因,通过病毒转染可使 HEK 293 细胞表达 *Cas9* 蛋白,在转入目的基因的目标序列的条件下可以实现目的基因的敲除[5],如图 7(a)。作者通过用生物素凝集素(Bio-LCA)和生物素凝集素(Bio-SSA)处理细胞并用流式细胞仪鉴定细胞表型,如图 7(b)。作者期望可以通过细胞融合获得基因双敲除细胞株。

2.5.1 FUT8-cr1-KO-BSD 细胞株和 ST6GAL1-cr1-KO-Puro 细胞株的构建、鉴定及生长活性分析

通过病毒转染的方法,将 *Cas9* 和 *BSD* 基因及 *FUT8*-cr1 单向引导 RNA 转入 HEK 293 野生型细胞株,并用 10 μg/mL BSD 培养基筛选以期获得 FUT8-cr1-KO-BSD 细胞株。用流式细胞仪分析待测细胞,结果显示被检验细胞株不能被 Bio-LCA 染色,如图 7(c),说明 *FUT8* 基因已被突变且不能表达,表明已获得 FUT8-cr1-KO-BSD 细胞株。

通过病毒转染的方法,将 *Cas9* 和 *Puro* 基因及 *ST6GAL1*-cr1 单向引导 RNA 转入 HEK 293 野生型细胞株,并用 1 μg/mL Puro 培养基筛选以期获得 ST6GAL1-cr1-KO-Puro 细胞株。用流式细胞仪分析待测细胞,结果显示被检验细胞株不能被 Bio-SSA 染色,如图 7(c),说明 *ST6GAL1* 基因已被突变且不能表达,表明已获得 ST6GAL1-cr1-KO-Puro 细胞株。

检测 FUT8-cr1-KO-BSD 细胞株和 ST6GAL1-cr1-KO-Puro 细胞株的生长活性并与 HEK 293 野生型细胞进行比较,结果显示,3 种细胞的生长曲线基本一致,如图 7(d)。这表明 *FUT8* 或 *ST6GAL1* 的敲除不影响细胞的生长。

2.5.2 FUT8-ST6GAL1-DKO 细胞株的构建

以 HVJ-E 为融合剂,依据细胞融合最优条件融合 FUT8-cr1-KO-BSD 细胞株和 ST6GAL1-cr1-KO-Puro 细胞株。理论上两种细胞株融合以后,其胞内存在的目标序列产生的目标导向 RNA 和 *Cas9* 表达产生的蛋白会使对方细胞中的目的基因突变,如图 8(a)。借助流式细胞仪分析用 Bio-LCA 或 Bio-

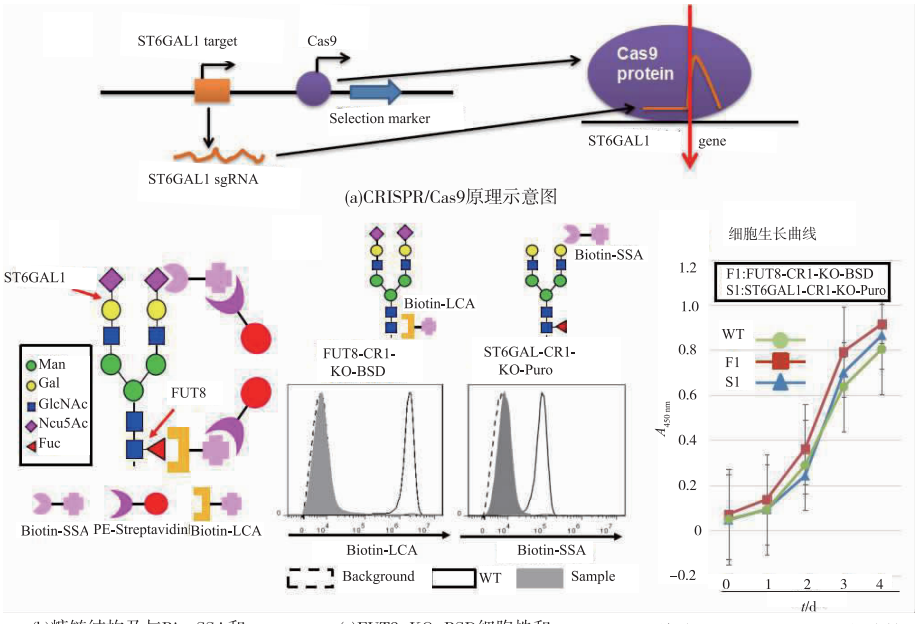
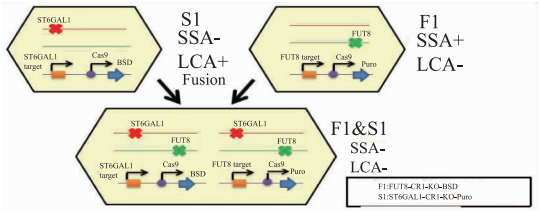


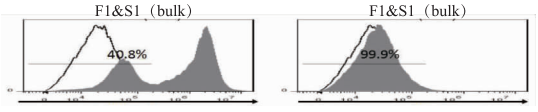
图 7 FUT8-cr1-KO-BSD 细胞株和 ST6GAL1-cr1-KO-Puro 细胞株的鉴定及生长活性检验

Fig. 7 Identification of FUT8-cr1-KO-BSD cell line and ST6GAL1-cr1-KO-Puro cell line and cell growth activity test

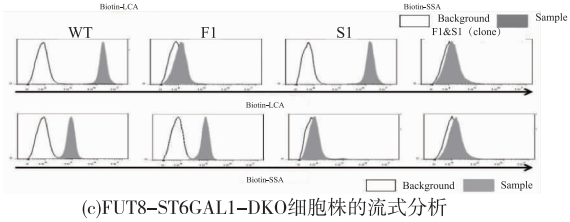
SSA 处理过的 FUT8-cr1-KO-BSD 细胞株和 ST6GAL1-cr1-KO-Puro 融合细胞株,结果显示:部分细胞未被 Bio-LCA 染色,如图 8(b),表明部分细胞中 *FUT8* 被敲除;绝大部分细胞未被 Bio-SSA 染色,表明部分细胞中 *ST6GAL1* 被敲除,如图 8(b)。通过计算,*FUT8* 的敲除效率为 40.8%;*ST6GAL1* 的敲除效率为 99.9%。而事实上,FUT8-cr1-KO-BSD & ST6GAL1-cr1-KO-Puro 细胞株既不能结合 Bio-LCA 又不能结合 Bio-SSA,如图 8(c),这说明融合细胞中的 *FUT8* 和 *ST6GAL1* 基因均被突变且不能表达,即已构建 FUT8-ST6GAL1-DKO 细胞株。



(a)FUT8-ST6GAL1-DKO细胞株的构建原理示意图



(b)检测FUT8-ST6GAL1-DKO细胞株中FUT8和ST6GAL1的敲除效率



(c)FUT8-ST6GAL1-DKO细胞株的流式分析

图 8 FUT8-ST6GAL1-DKO 细胞株的鉴定

Fig. 8 Identification of FUT8-ST6GAL1-DKO cell line

3 结 语

作者构建了 PIGA-KO-Hyg-GFP 细胞株和 PIGK-KO-BSD-BFP 细胞株并将两者融合获得 PIGA-KO-Hyg-GFP & PIGK-KO-BSD-BFP 融合细胞株。通过对细胞融合实验条件的优化,使以 PEG 为融合试剂的细胞融合效率达到了 6%,而以 HVJ-E 为融合试剂的细胞融合效率达到了 8.8%。HVJ-E 作为诱导剂进行细胞融合更具优势,如所需细胞数量少,不必大规模培养细胞,完成实验所需时间短,细胞融合效率高,融合细胞死亡率低等,HVJ-E 作为诱导剂更有利于实验的进行。构建了 FUT8-KO-Hyg 细胞株和 ST6GAL1-KO-BSD 细胞株,并以 PEG 为融合试剂将其融合构建了 FUT8-KO-Hyg 和 ST6GAL1-KO-BSD 融合细胞株;构建了 FUT8-cr1-KO-BSD 细胞株和 ST6GAL1-cr1-KO-Puro 细胞株,并证明了 *FUT8* 或 *ST6GAL1* 的敲除对细胞的生长活性没有影响。此外还以 HVJ-E 为融合试剂将两者融合,并检测了基因敲除效率,最终构建了 FUT8-ST6GAL1-DKO 细胞株。

与逐个敲除的常规方法相比,本研究可以直接通过细胞融合获得基因敲除细胞株,这有效地缩短了构建双基因敲除的哺乳动物细胞株所需的时间,也奠定了快速构建哺乳动物细胞多基因共敲除细胞株的基础。但是融合细胞中存在染色体数目加倍且细胞生长相对缓慢的问题,后续研究将致力于此问题的解决。

参考文献:

[1] WOOD A J,TE-WEN L,BRYAN Z,et al. Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs [J]. **Science**,2011,333(6040):307-307.

[2] REYON D,TSAI S Q,KHAYTER C,et al. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing [J]. **Nat Biotechnol**,2012,30(5):460-465.

[3] GIEDRIUS G,RODOLPHE B,PHILIPPE H,et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria[J]. **Proc Natl Acad Sci USA**,2012,109(39):15539-15540.

[4] MALI P,YANG L,ESVELT K M,et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. **Science**,2013,339(6121):823-826.

[5] 吴莹,张淑静,张晨月,等. 靶向 ezrin、radixin、moesin 的 siRNA 慢病毒感染原代肺微血管内皮细胞促进流感病毒的复制[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2015,31(4):456-461.

[6] KABADI A M,OUSTEROUT D G,HILTON I B,et al. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome engineering from a single lentiviral vector[J]. **Nucleic Acids Res**,2014,42(19):147-147.

[7] SAKUMA T,NISHIKAWA A,KUME S,et al. Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system[J]. **Sci Rep**,2014,4(1):1-6.
[8] 闫强. sgRNA-shRNA 串联表达技术的开发及其在基因组编辑中的应用[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2018.
[9] HERSKOWITZ I. Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Microbio Rev**,1988,52(4):536-553.
[10] MIECZKOWSKI P A,LEMOINE F J,PETES T D. Recombination between retrotransposons as a source of chromosome rearrangements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Dna Repair**,2006,5(9-10):1010-1020.
[11] HEGEMANN J H,HEICK S B. Delete and Repeat:A comprehensive toolkit for sequential gene knockout in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Methods Mol Biol**,2011,765:189-206.
[12] JORGE S R,FISHER A G. Reprogramming somatic cells towards pluripotency by cellular fusion [J]. **Curr Opin Gene De**,2012,22(5):459-465.
[13] PEREIRA C F,R MI T,RYAN N K,et al. Heterokaryon-based reprogramming of human B lymphocytes for pluripotency requires Oct4 but not Sox2[J]. **Plos Genetics**,2008,4(9):e1000170.
[14] RAO P N,JOHNSON R T. Mammalian cell fusion:studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis[J]. **Nature**,1970,225(5228):159-164.
[15] JOS S,IAN C. Nanog promotes transfer of pluripotency after cell fusion[J]. **Nature**,2006,441(7096):997-1001.
[16] SOZA-RIED J,FISHER A G. Reprogramming somatic cells towards pluripotency by cellular fusion[J]. **Curr Opin Genet De**,2012,22(5):459-465.
[17] LOBAS A A,KARPOV D S,KOPYLOV A T,et al. Exome-based proteogenomics of HEK-293 human cell line:coding genomic variants identified at the level of shotgun proteome[J]. **Proteomics**,2016,16(14):1980-1991.
[18] CHICK J M,DEEPAK K,NUSINOW D P,et al. A mass-tolerant database search identifies a large proportion of unassigned spectra in shotgun proteomics as modified peptides[J]. **Nat Biotechnol**,2015,33(7):743-749.
[19] KAWAGOE K,TAKEDA J,ENDO Y,et al. Molecular cloning of murine pig-a,a gene for GPI-anchor biosynthesis,and demonstration of interspecies conservation of its structure,function,and genetic locus[J]. **Genomics**,1994,23(3):566-574.
[20] LIM H T,KIM J H,CHOI B H,et al. Characterization of phosphatidylinositol glycan,class K (PIGK) gene and analysis of association with quantitative traits in pigs[J]. **J Anim Sci Tech**,2005,47(2):167-176.
[21] CALDERON A D,LIU Y,LI X,et al. Substrate specificity of FUT8 and chemoenzymatic synthesis of core-fucosylated asymmetric N-glycans[J]. **Org Biomol Chem**,2016,14(17):4027-4031.
[22] HARDUINLEPERS A,VALLEJORUIZ V,KRZEWINSKIRECCHI M A,et al. The human sialyltransferase family [J]. **Biochimie**,2001,83(8):727-737.
[23] LIMBERG G,SLIM G C,FURNEAUX R H,et al. A new assay for sialyltransferases using fluorescein abelled acceptors [J]. **Eur J Org Chem**,2010,1996(11):1773-1784.
[24] ZHAO Y,TAKAHASHI M J G,MIYOSHI E,et al. Functional roles of N-glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer[J]. **Cancer Sci**,2010,99(7):1304-1310.
[25] HATANAKA M,SEYA T,MIYAGAWA S,et al. Cellular distribution of a GPI-anchored complement regulatory protein CD59:homodimerization on the surface of HeLa and CD59-transfected CHO cells[J]. **J Biochem**,1998,123(4):579-586.
[26] MATSUKAWA N,NARIYAMA Y,HASHIMOTO R,et al. Higher reactivity of apolipoprotein B-100 and α-tocopherol compared to sialic acid moiety of low-density lipoprotein(LDL) in radical reaction[J]. **Bioorg Med Chem**,2003,11(18):4009-4013.
[27] COUR L F L,CHAYEN J. A cyclic staining behaviour of the chromosomes during mitosis and meiosis[J]. **Exp Cell Res**,1958,14(3):462-468.