CHO 细胞 *Kcmf1* 基因内定点整合 *ZsGreen1* 报告基因的表达稳定性研究

杨 蕾[1]，丁学峰[1]，蔡燕飞[2]，陈 蕴[2]，龚笑海[2]，
段作营[1]，李华钟[1]，金 坚[*2]
（1. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 药学院，江苏 无锡 214122）

摘要：以 *Kcmf1* 基因 NW_003614172.1 第 629890 碱基处定点整合 *ZsGreen1* 报告基因的 CHO-K1 细胞（2C3）为研究材料，采用倒置荧光显微镜和流式细胞仪定量分析 ZsGreen1 的表达，开展系统的稳定性表达研究。2C3 细胞贴壁培养连续传代 50 代次，100%的细胞可以稳定表达 *ZsGreen1* 报告基因。无血清悬浮驯化培养 2C3 细胞后，细胞表达 ZsGreen1 的平均荧光强度明显降低；连续悬浮传代培养 60 代次，表达 ZsGreen1 的细胞数目显著增多，添加体积分数 10% FBS 到悬浮培养的细胞池，ZsGreen1 阳性细胞比例上升到 95%以上。流式细胞术分选细胞池中高、低表达 ZsGreen1 蛋白的 2C3 细胞，PCR 确认它们均含有 *ZsGreen1* 报告基因；Q-PCR 发现在高、低表达 ZsGreen1 蛋白的细胞中，相关的 ZsGreen1 mRNA 水平有明显的差异。提示 CHO-K1 细胞 *Kcmf1* 基因内非编码区域定点整合外源基因后，不会因细胞分裂和生长而丢失外源表达基因；悬浮驯化需要优化培养基和培育条件，达到构建工程细胞的需求。

关键词：定点整合；稳定性；ZsGreen1
中图分类号：Q 786；Q 813　**文章编号**：1673-1689(2021)04-0058-09　DOI：10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.04.007

Expression Stability of *ZsGreen1* Reporter Gene in *Kcmf1* Gene of CHO Cells

YANG Lei[1]，*DING Xuefeng*[1]，*CAI Yanfei*[2]，*CHEN Yun*[2]，*GONG Xiaohai*[2]，
DUAN Zuoying[1]，*LI Huazhong*[1]，*JIN Jian*[*2]
（1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Jiangnan University, Wuxi 214122, China）

Abstract: The expression of ZsGreen1 in CHO-K1 cells (2C3) with the *ZsGreen1* reporter gene integrated at the 629890 base of *Kcmf1* gene NW_003614172.1 was quantitatively analyzed by inverted fluorescence microscope and flow cytometry to carry out the systematic stability expression study. The *ZsGreen1* reporter gene could be expressed stably in 100% of 2C3 cells after continuous passage of 50 generations in adherent culture. After cultured without serum, the average fluorescence intensity of ZsGreen1 expression in 2C3 cells decreased significantly. After 60 generations of continuous suspension culture, the number of cells expressing ZsGreen1 increased significantly.

收稿日期：2019-11-22
基金项目：国家 863 计划项目(2015AA020802)。
*通信作者：金 坚(1960—)，男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事药物设计与分子药理学研究。E-mail：jianjin@jiangnan.edu.cn

When 10% FBS was added to the cell pool of suspension culture, the proportion of ZsGreen1 positive cells increased to over 95%. Flow cytometry sorted 2C3 cells with high and low expression of ZsGreen1 protein in the cell pool, and PCR confirmed that they all contained the *ZsGreen1* reporter gene. Q-PCR found significant differences in the levels of related ZsGreen1 mRNA in cells with high and low expression of ZsGreen1 protein. It was suggested that the non-coding region of *Kcmf1* gene in CHO-K1 cells integrated exogenous genes at specific sites, and the exogenous expressed genes would not be lost due to cell division and growth. The suspension and acclimation should optimize the culture medium and cultivation conditions to meet the needs of engineering cells construction.

Keywords: site-specific integration, stability, ZsGreen1

中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary，CHO)细胞作为生物技术药物生产细胞的优势地位已经明确，且构建适于稳定生产治疗性生物制品的 CHO 工程细胞系一直是研究工作的热点[1-2]。经典的CHO 工程细胞系构建均是采用目的基因随机整合，多轮单克隆筛选，挑选相对稳定表达目的蛋白细胞株的方法[3-4]。带来的麻烦是构建工作费时费力，更重要的是无法知晓高、低表达目的蛋白的原因。随着主细胞库到生产细胞库的放大和生产过程传代，目的蛋白的表达量极易变化，丢失了目的蛋白表达的非生产性细胞克隆持续增加，难以达到生产和监管的要求。构建定点整合的稳定表达外源基因的 CHO 工程细胞系是理论上解决这些问题的有效方法。CHO 细胞的一、二和三代基因测序结果均已相继公布，相关品系的 CHO 细胞染色体变异很大。对已保有的各种生产治疗性生物制品的高、低表达 CHO 细胞株，结合其整合位点和临近区域的结构分析，还未有成功地将 CHO 细胞的稳定高表达整合位点用于建立生产型 CHO 工程细胞系的报道[5-7]。

作者前期以 CHO-K1 为出发细胞株，组合应用慢病毒示踪报告基因技术和染色体步移技术，寻找到了可以持续表达绿色荧光标签的基因组内位点。测序结果明确了该整合位点为 NW_003614172.1 第 629890 碱基处，位于钾通道调节因子 1(potassium channel modulatory factor 1，*Kcmf1*)基因内部的一段非编码区域。该基因编码锌指蛋白，参与钾通道的调节[8-9]。以此为基础，构建和单克隆化了以 *Kcmf1* 基因 NW_003614172.1 第 629890 碱基处定点整合 *ZsGreen1* 报告基因的 CHO-K1 细胞(2C3)，对其作为工程细胞的稳定性开展了系统评价。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 中国仓鼠卵巢细胞亚株 CHO-K1，购自美国 ATCC 公司；2C3 细胞，为染色体 NW_003614172.1 内第 629890 号碱基处整合了 *ZsGreen1* 基因的 CHO-K1 细胞株，由作者所在课题组构建和保存[9]。

1.1.2 主要试剂 Ham′s F-12K 培养基、胎牛血清：美国 Gibco 公司产品；M2、M4 无血清基础培养基：苏州康聚生物技术公司产品；PCR 试剂：南京诺唯赞生物科技有限公司产品；TRIzol 试剂：美仑生物公司产品；反转录试剂盒、SYBR® Green Master Mix：Takara 公司产品；DEPC 水、基因组 DNA 小量抽提试剂盒：上海碧云天生物技术有限公司产品；其他试剂均为国产分析纯。实验中所用引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物列表

Table 1 List of PCR primers

Name	Sequence	PCR product/bp
ZsGreen1-F.1	5′-GCCCAGTCCAAGCACGG-3′	664
ZsGreen1-R.1	5′-CGTGCTCGGTCAGGTGC-3′	
ZsGreen1-F.2	5′-GCCCTTCGCCGAGGACATCTTG-3′	202
ZsGreen1-R.2	5′-GTACATGCAGTTCTCCTCCACGC-3′	

1.1.3 仪器与设备 细胞培养箱 Series Ⅱ Water Jacket、NANODROP 2000：美国 Thermo Fisher 公司产品；倒置荧光显微镜、倒置式生物显微镜 TE2000-S：日本 NIKON 公司产品；流式细胞仪、流式分选仪 BD FACSAriaIII：美国 BD 公司产品；酶标仪 infinite M200 PRO、凝胶成像系统 Tanon-5200Multi：上海天能公司产品；核酸电泳仪 Mini-Protean、PCR 仪 C1000 和 Q-PCR 仪 CFX96：美国伯乐公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 CHO-K1 细胞和 2C3 细胞在完全培养基(Ham's F-12K+体积分数 10% FBS)内连续贴壁传代培养，培养条件为 37 ℃，体积分数 5% CO_2。

先后采用了两种方法对 2C3 细胞进行悬浮驯化：第一种是使用无血清基础培养基 M2+M4(体积比为 1:1)直接替换完全培养基来培养细胞，第二种是使用无血清基础培养基 M2+M4(体积比为 1:1)逐步取代完全培养基，使培养基中血清的最终体积分数也逐步递减，梯度为 10%、8%、6%、4%、2%、1%、0.5%、0%，每个梯度连续传代培养 2~3 次，当细胞生长状态良好时减为另一梯度。

细胞驯化成功后，在 150 mL 摇瓶中使用无血清基础培养基 M2+M4（体积比为 1:1）悬浮传代培养，培养基为 30 mL，恒温摇床上的培养条件为 110 r/min、37 ℃、体积分数 5% CO_2。每天取样计数，调整细胞接种密度为 1.0×10^6 个/mL。

1.2.2 MTT 法检测 2C3 贴壁细胞的倍增时间 将 T75 培养瓶中的培养细胞用胰蛋白酶消化后计数，用新鲜的完全培养基将细胞稀释至 1×10^4 个/mL，吹打混匀后按每孔 2 500 个细胞接种到 96 孔板中，5 个重复孔，共接种 10 块相同的 96 孔板，置于恒温培养箱中培养过夜。第二天，取出一块 96 孔板，避光加入 MTT，每孔 10 μL，4 小时后加入 MTT Buffer，每孔 100 μL，过夜反应后用酶标仪测取 560 nm 波长下的吸光值。之后 9 天内，在每天相同时间点取一块板重复上述操作，依据测得的吸光值绘制出细胞的生长曲线。

1.2.3 倒置荧光显微镜观察 ZsGreen1 蛋白表达情况 贴壁细胞每分裂倍增 10 次，细胞汇合度达 50%~60%时，倒置荧光显微镜观察 ZsGreen1 蛋白表达情况，随机选择镜下视野进行明场和荧光场拍摄。每次拍摄条件一致，AE Compensation 为+0.0 EV，Exposure Time 为 1 s，Gain 为 4×，Contrast 为 Linear，荧光场照片采用 ImageJ 软件分析细胞的平均荧光强度。

按血清终浓度递减的方法悬浮驯化的细胞(2C3-M2M4+体积分数 0% FBS)，每次降低血清含量时观察 ZsGreen1 蛋白表达情况；直接使用无血清基础培养基培养的细胞(2C3-M2M4)，待细胞转至摇瓶培养时初次观察。驯化成功后的悬浮 2C3 细胞，每分裂倍增 10 次进行观察，拍摄条件及分析方法与贴壁细胞相同。

1.2.4 流式细胞分析仪检测细胞平均荧光强度 贴壁细胞每分裂倍增 10 次后取出部分细胞进行冻存，储存于液氮罐中。在细胞总倍增次数达到 50 次时，同时复苏之前冻存的所有不同代次的细胞，传代培养至细胞生长状态良好，使用流式细胞分析仪检测细胞的平均荧光强度，检测结果使用 FlowJo 7.6.2 软件进行分析。

悬浮细胞在驯化成功后每分裂倍增 10 次进行流式分析，检测时和贴壁细胞使用同一条件，数据分析方法相同。

1.2.5 流式细胞分选仪分选悬浮细胞池 分析悬浮驯化成功的 2C3 细胞池，发现细胞池中的细胞表达 ZsGreen1 蛋白的荧光强度有一定的差异。以未插入外源基因的 CHO-K1 细胞为阴性对照，收集 10 000 个细胞测定对照组细胞荧光强度，确定 10^3 为阴、阳性细胞分界线：单细胞 FITC-A 荧光强度低于 10^3 时为阴性细胞，高于 10^3 时为阳性细胞。流式细胞分选仪对 2C3 细胞池进行分选，收集阴性细胞 1.2×10^6 个，分成四组分别培养在 M2M4、M2M4+10%FBS、Ham's F-12K、Ham's F-12K+10%FBS 四种培养基中(M2:M4 体积比为 1:1)；收集荧光强度值最高的 10%阳性细胞 3×10^5 个，使用无血清基础培养基扩培。

1.2.6 2C3 细胞中 *ZsGreen1* 基因的分析 使用基因组 DNA 小量抽提试剂盒，分别提取在无血清基础培养基里扩培后的阴性、阳性细胞的基因组，使用表 1 中 ZsGreen1-F.1 和 ZsGreen1-R.1 引物进行 PCR 扩增，反应体系为：2× Phanta® Max Buffer 12.5 μL，dNTP Mix 0.5 μL，ZsGreen1-F.1（10 μmol/L）1 μL，ZsGreen1-R.1(10 μmol/L) 1 μL，Phanta® Max Super-Fidelity DNA Polymerase 0.5 μL，DNA 100 ng，ddH_2O 补足 25 μL。扩增条件为：95 ℃预变性 3 min；

95 ℃变性 15 s,58 ℃退火 15 s,72 ℃延伸45 s,30 个循环;72 ℃延伸 5 min,4 ℃保存。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测并测序。

1.2.7 2C3 细胞中 *ZsGreen1* 基因转录水平分析

分别提取在 M2M4、M2M4+10%FBS、Ham's F-12K、Ham′s F-12K+10%FBS 四种不同培养基中扩培的阴性细胞的 RNA,将其反转录成 cDNA,反转录体系为:5×PrimeScript RTMaster Mix (Perfect Real Time) 4 μL,Total RNA 1 μg,RNase Free dH_2O 补足 20 μL。轻柔混匀后使用 PCR 仪进行反转录反应,反应条件为:37 ℃,15 min;85 ℃,5 s;降温至 4 ℃,于-20 ℃长期保存。反转录得到的 cDNA 产物进行 Q-PCR,反应体系为:SYBR® Premix Ex TaqTM Ⅱ (2×)10 μL,ZsGreen1 -F.2 (10 μmol/L) 1 μL,ZsGreen1 -R.2 (10 μmol/L) 1 μL,cDNA 10 ng,ddH_2O 补足 20 μL。反应条件为:95 ℃预变性 30 s;95 ℃变性 5 s,60 ℃延伸 30 s,40 个循环;溶解曲线为 65 ℃反应 5 s,95 ℃反应 60 s。

2 结果与分析

2.1 2C3 细胞倍增时间检测结果

用 MTT 法检测 560 nm 波长下的吸光值,绘制出的细胞生长曲线见图 1。CHO 细胞一般 20~24 h 分裂一次,定点整合 *ZsGreen1* 报告基因的 CHO-K1 细胞(2C3)的倍增时间与 CHO-K1 细胞大体一致,分裂倍增时间按 24 h 计,即每 1 天细胞发生 1 次倍增,记做细胞传代 1 次。

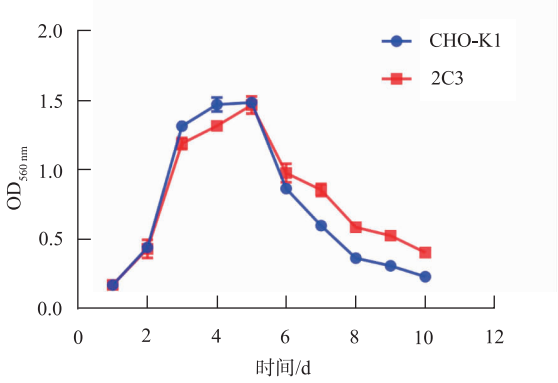


图 1 2C3 细胞生长速率

Fig. 1 Growth rate of 2C3 cells

2.2 贴壁培养的 2C3 细胞表达 ZsGreen1 蛋白情况

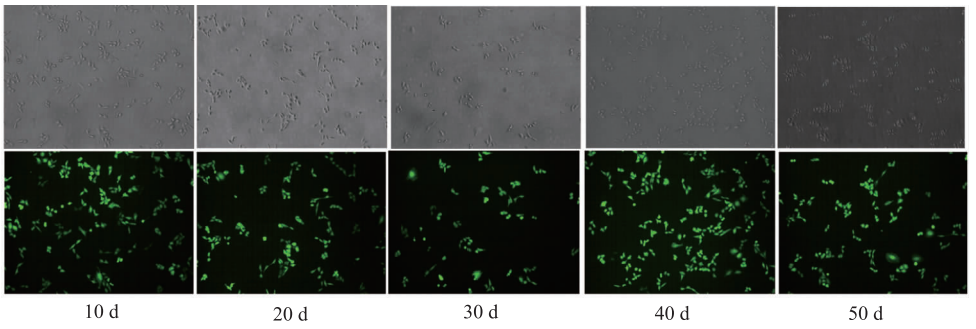
为了验证位点 NW_003614172.1 表达外源基因的稳定性,作者持续观察 2C3 细胞连续贴壁传代培养过程中 ZsGreen1 蛋白的表达情况。前期对此细胞已进行了 20 代传代实验,发现荧光蛋白可以持续表达[10]。基于从生产细胞库扩增到大生产罐需要 45~50 代次的实际状态,本实验设计以传至 20 代的 2C3 细胞为初始细胞,连续传代 50 次为实验终点,观察目的基因的表达情况,进行稳定性评估。具体实验为,每传 10 个代次,用倒置荧光镜观察并拍照记录,见图 2(a),荧光场照片使用 ImageJ 软件分析细胞的平均荧光强度,见图 2(b)。同时,传代过程中每传代 10 次进行一次细胞冻存,在连续传代 50 次后,复苏之前冻存的不同代次的细胞,使用流式细胞仪进一步对荧光蛋白的表达情况进行定量分析,见图 2(c)、(d)。倒置荧光显微镜的观察结果和流式细胞仪分析结果皆显示,在连续贴壁传代培养 50 代的过程中,100% 的 2C3 细胞可以稳定表达 *ZsGreen1* 报告基因。

2.3 悬浮培养的 2C3 细胞表达 ZsGreen1 蛋白情况

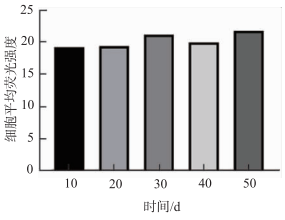
治疗性生物制品的原料药生产基本采用悬浮细胞大规模生产,所以在验证了贴壁培养的 2C3 细胞表达 ZsGreen1 蛋白的稳定性后,对其进行了悬浮驯化。先采用无血清基础培养基直接替换完全培养基的方法驯化 2C3 细胞。当细胞生长状态良好,大小均一,数量能隔天翻倍时,认为其驯化成功,开始进行无血清基础培养基悬浮传代培养。倒置荧光显微镜观察发现,细胞表达 ZsGreen1 蛋白荧光强度较培养基中含血清时有明显差异,细胞平均荧光强度降低。为了判断此现象是否因直接更换培养基引起的细胞不适应导致,作者采用了第二种悬浮驯化方法,使培养基中血清终浓度逐步递减,但是驯化成功后观察到了同样的实验结果:细胞平均荧光强度较培养基中含血清时有明显差异。

对两种方法驯化成功的细胞连续悬浮传代培养 30、60 d 后,倒置荧光显微镜均观察到细胞平均荧光强度有所提高,见图 3,同时使用流式细胞仪对不同代次的悬浮细胞表达荧光蛋白的情况进行检测,使用 FlowJo 7.6.2 软件分析检测结果,见图 4。以 CHO-K1 细胞为对照,通过连续传代培养后,表达荧光蛋白的细胞数目增多,阳性细胞比例有了12%~15%的提升。

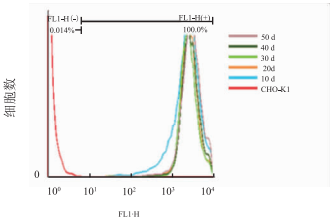
与此同时,作者发现当悬浮培养使用的无血清基础培养基中加入体积分数 10%血清后,悬浮细胞池中表达荧光蛋白的细胞比例明显提升,95%以上的细胞能够表达 *ZsGreen1* 报告基因,见图 5。



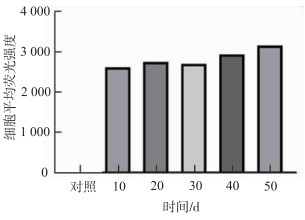
(a)倒置荧光显微镜观察结果



(b)ImageJ软件分析细胞平均荧光强度



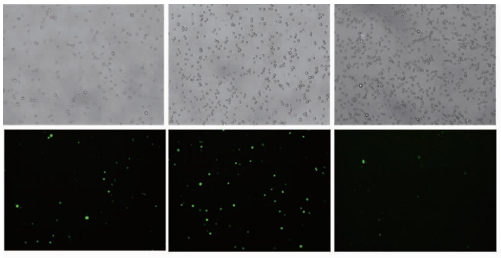
(c)流式细胞仪定量分析ZsGreen1蛋白质表达水平



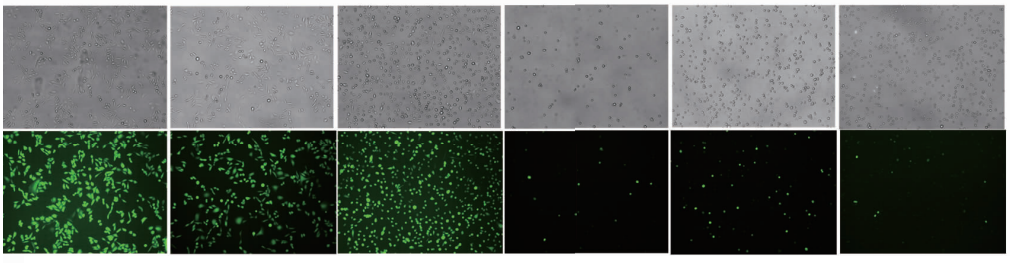
(d)流式细胞仪定量分析结果

图 2　贴壁传代培养的 2C3 细胞表达 ZsGreen1 蛋白情况

Fig. 2　Expression of ZsGreen1 protein by adherently subcultured 2C3 cells



(a)直接撤血清法驯化细胞时蛋白的表达情况



(b) 递减血清法驯化细胞时蛋白的表达情况

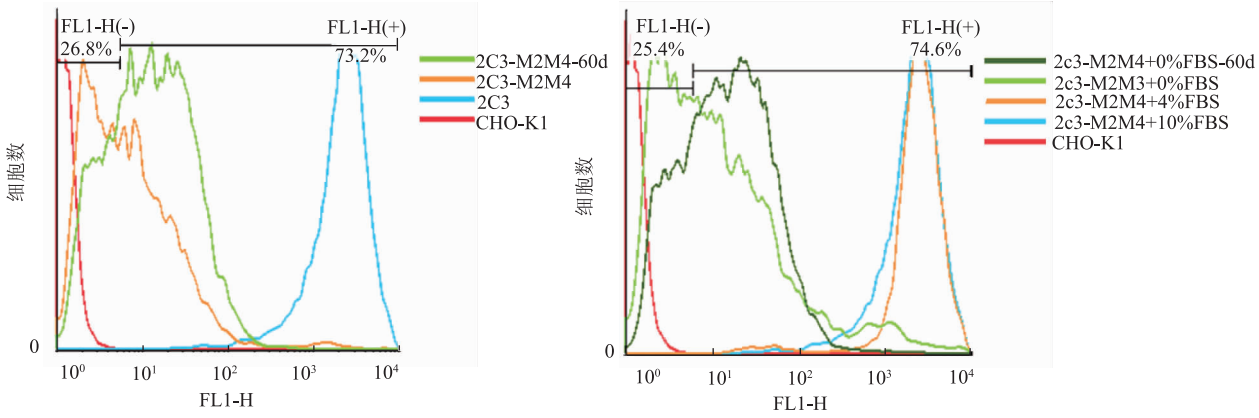
图 3　悬浮传代培养的 2C3 细胞表达 ZsGreen1蛋白情况

Fig. 3　Expression of ZsGreen1 protein in suspension-cultured 2C3 cells

2.4　ZsGreen1 蛋白的 DNA 水平验证

为了确认流式分析仪检测到的阴性细胞是否在细胞分裂过程中丢失了 *ZsGreen1* 基因,采用流式细胞术从直接更换培养基的方法中驯化成功的 2C3 细胞分选细胞,以未插入外源基因的 CHO-K1 为对照，以 FITC-A 荧光强度值 10^3 为阴性和阳性细胞的分界,分别收集细胞,见图 6。

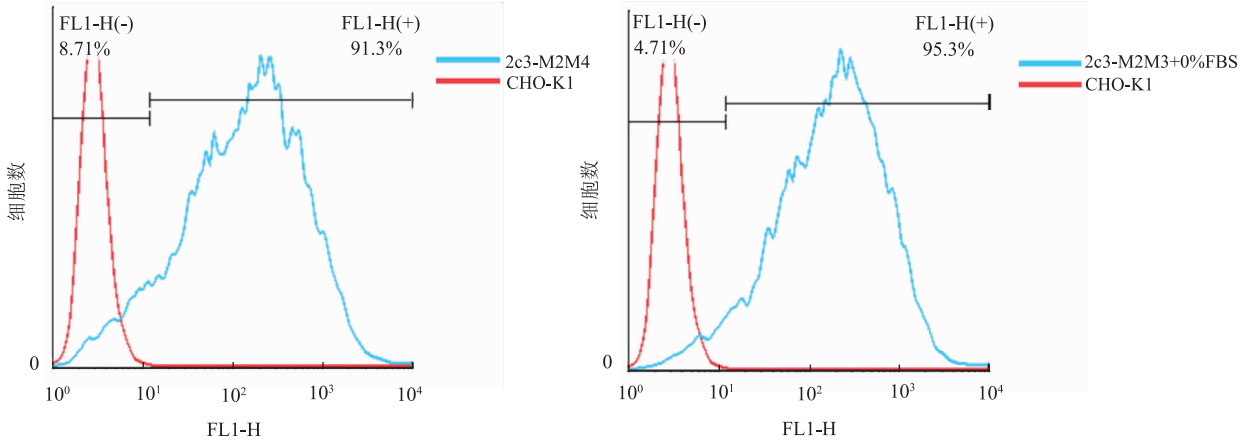
以分别回收的 1.50×10^6 个荧光蛋白表达阴性和阳性细胞为材料，分别提取基因组,PCR 扩增 *ZsGreen1* 基因，琼脂糖凝胶电泳验证扩增结果见图7,



(a)细胞经直接撤血清法驯化的蛋白表达水平检测结果　(b)细胞经递减血清法驯化的蛋白表达水平检测结果

图 4　流式细胞仪分析 2C3 细胞表达荧光蛋白情况

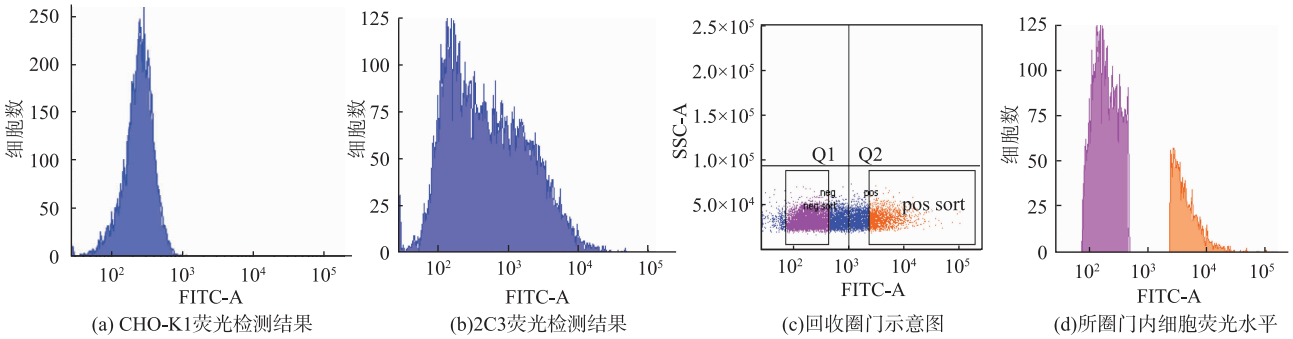
Fig. 4　Flow cytometry analysis of the expression of fluorescent protein in 2C3 cells



(a)直接撤血清法驯化成功的细胞添加血清培养后蛋白表达水平的检测　(b)递减血清法驯化成功的细胞添加血清培养后蛋白表达水平的检测

图 5　无血清基础培养基中添加体积分数 10%胎牛血清后 2C3 细胞表达 ZsGreen1 蛋白的情况

Fig. 5　Expression of ZsGreen1 protein in 2C3 cells supplemented with 10% FBS in serum-free basal medium

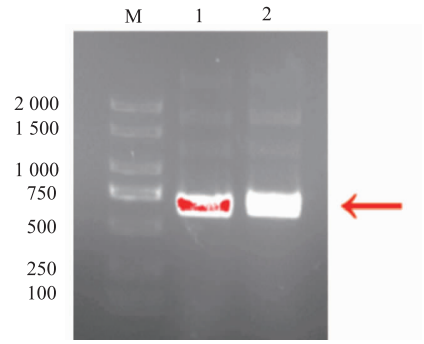


(a) CHO-K1荧光检测结果　(b)2C3荧光检测结果　(c)回收圈门示意图　(d)所圈门内细胞荧光水平

图 6　流式分选仪分选 2C3 细胞示意图

Fig. 6　Schematic diagram of sorting 2C3 cells by flow sorter

测序结果见表 2。结果显示,阴性和阳性细胞群基因组内均含有 *ZsGreen1* 基因,说明蛋白表达的差异是细胞从贴壁培养到适应悬浮培养的过程中受到影响的结果。



图片显示了琼脂糖凝胶电泳的结果。M:DNA Marker,从上至下依次为 2 000、1 500、1 000、750、500、250、100 bp;泳道 1 是分选后收集的阳性细胞池,泳道 2 是分选后收集的阴性细胞池。目标片段大小应为 664 bp。

图 7　2C3 细胞流式分选后阴性细胞池 *ZsGreen1* 基因验证

Fig. 7　Verification of the *ZsGreen1* gene in the negative cell pool after 2C3 cell flow sorting

为了验证上文提到的血清的作用,将回收的阴性细胞以 3×10^5 个/孔接种在六孔板内,使用 M2M4、M2M4+10%FBS、F-12K+10%FBS 三种培养基培养。扩培至 T75 培养瓶后,待细胞生长状态良好,进行流式细胞仪分析,结果见图 8。培养基中加入血清后,有 50%左右的阴性细胞转变为阳性细胞。以上结果都可以证明,在对 2C3 细胞悬浮培养的过程中,*ZsGreen1* 基因并没有因细胞分裂、生长而丢失,通过优化悬浮驯化的培养基和培育条件,有望提高目的蛋白的表达量。

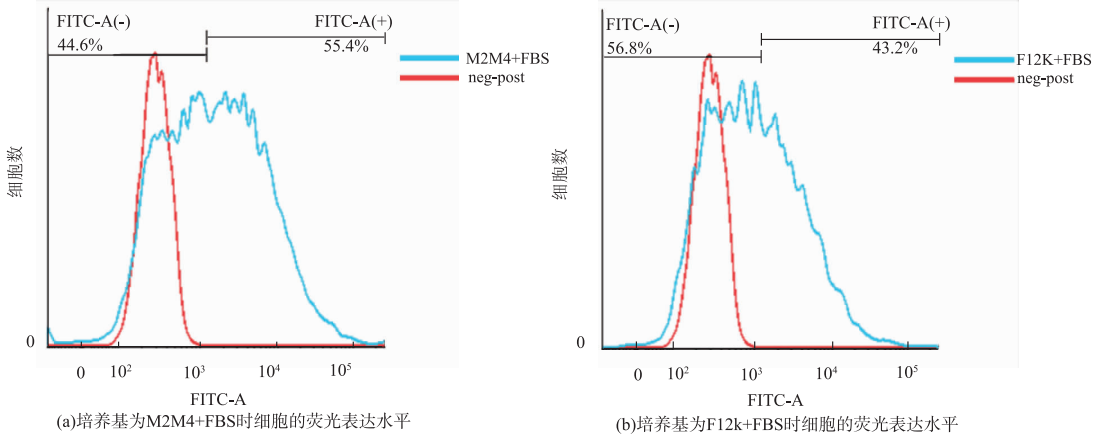
2.5　*ZsGreen1* 基因的转录水平验证

作者推测血清可能在转录水平上影响了蛋白表达,所以提取了在培养基 M2M4、M2M4+10%FBS 和 F-12K+10%FBS 中扩培的 3 组阴性细胞以及 M2M4 培养的阳性细胞的 RNA,反转录成 cDNA 后,进行了 Q-PCR 实验,以 GAPDH 为内参。已经适应悬浮培养的细胞在 F-12K+10%FBS 培养基中培养后,mRNA 含量稍高于对照组,而在培养基 M2M4 中加入血清后,ZsGreen1 蛋白的 mRNA 含量明显提

表 2　2C3 阴性细胞 PCR 扩增后片段测序结果

Table 2　Fragment sequencing results of PCR amplification of 2C3 negative cells

序列
CGCATGGAGGGCTGCGTGGACGGCCACAAGTTCGTGATCACCGGCGAGGGCATCGGCTACCCCTTCAAGGGCAAGCAGGCCATCAACCT
GTGCGTGGTGGAGGGCGGCCCCTTGCCCTTCGCCGAGGACATCTTGTCCGCCGCCTTCATGTACGGCAACCGCGTGTTCACCGAGTACCC
CCAGGACATCGTCGACTACTTCAAGAACTCCTGCCCCGCCGGCTACACCTGGGACCGCTCCTTCCTGTTCGAGGACGGCGCCGTGTGCAT
CTGCAACGCCGACATCACCGTGAGCGTGGAGGAGAACTGCATGTACCACGAGTCCAAGTTCTACGGCGTGAACTTCCCCGCCGACGGCC
CCGTGATGAAGAAGATGACCGACAACTGGGAGCCCTCCTGCGAGAAGATCATCCCCGTGCCCAAGCAGGGCATCTTGAAGGGCGACGTG
AGCATGTACCTGCTGCTGAAGGACGGTGGCCGCTTGCGCTGCCAGTTCGACACCGTGTACAAGGCCAAGTCCGTGCCCCGCAAGATGCC
CGACTGGCACTTCATCCAGCACAAGCTGACCCGCGAGGACCGCAGCGACGCCAAGAACCAGAAGTGGCACCTGACC



(a)培养基为M2M4+FBS时细胞的荧光表达水平　(b)培养基为F12k+FBS时细胞的荧光表达水平

图 8　血清影响阴性 2C3 细胞表达 ZsGreen1 蛋白的验证

Fig. 8　Effect of serum on the ZsGreen1 protein expression in the negative 2C3 cells

高，也稍高于同时收集的阳性细胞，见图 9。

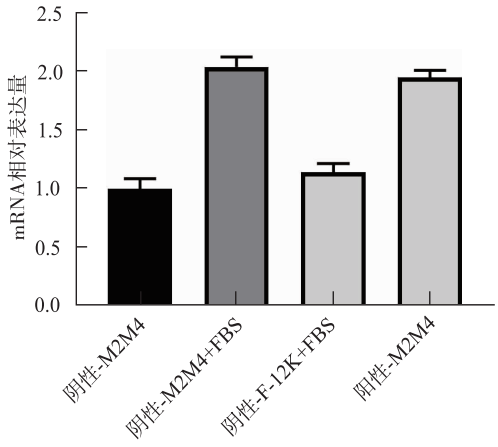


图 9 不同培养基培养下 2C3 细胞内 ZsGreen1 的 mRNA 表达量的变化

Fig. 9 ZsGreen1 mRNA content in 2C3 cells cultured in different culture media

3 结 语

应用定点整合的方法构建 CHO 工程细胞系，可以快速将外源基因插入宿主细胞基因组的特定位置，从而避免传统的随机整合方法带来的耗时费力、“位置效应”等问题。为了能挑选出相对稳定、高表达目的蛋白的细胞株，初始整合位点的选择尤其重要。

前期作者应用慢病毒示踪报告基因技术以及染色体步移技术，在 CHO-K1 细胞株中，寻找到了可以持续表达绿色荧光标签 ZsGreen1 的基因组内位点，测序结果明确了该整合位点为 *Kcmf1* 基因 NW_003614172.1 第 629890 碱基处[9]。本实验中主要使用倒置荧光显微镜和流式细胞术，以细胞荧光强度为指标，定量分析 *ZsGreen1* 报告基因的表达情况。通过对 2C3 细胞以贴壁和悬浮两种不同的培养条件传代培养，可以确定 NW_003614172.1 第 629890 碱基处可作为整合位点用于外源基因的稳定表达。

在实际工业生产过程中，生产细胞库扩增到大生产罐需要 45~50 代次，所以本研究中的稳定性评价以连续传代 50 次为实验终点，观察目的基因的表达情况。2C3 细胞贴壁培养连续传代 50 代次，100%的细胞可以稳定表达 *ZsGreen1* 报告基因。无血清悬浮驯化培养 2C3 细胞时，倒置荧光显微镜观察到细胞平均荧光强度明显降低，但连续悬浮传代培养 60 代次，荧光细胞数目显著增多。在悬浮培养基中添加体积分数 10% FBS 后，悬浮培养的细胞池中 ZsGreen1 阳性细胞比例上升到 95%以上。流式细胞术分选细胞池中高、低表达 ZsGreen1 蛋白的 2C3 细胞，可以确定细胞分裂生长过程中没有丢失 *ZsGreen1* 基因，培养环境的改变影响了基因表达水平，猜测细胞在营养匮乏时优先表达必需基因，关闭了非必需基因的表达以满足生长需求，当营养充足时重新开启。通过优化培养基和培养条件，比如在悬浮培养基中添加血小板裂解液、植物水解素等增加培养基的营养，有望提高目的蛋白质的表达量。无血清基础培养基直接替换完全培养基和无血清基础培养基逐步取代完全培养基这两种不同的悬浮驯化方法，不会造成细胞生长和外源蛋白表达的明显差异，推荐使用直接替换的驯化方法更能缩短驯化时间。

目前，作者以 CHO-K1 为出发细胞株，使用 CRISPR/Cas9 介导的定点整合技术，在该位点成功敲入了生物药市场上有代表性的 3 种治疗性蛋白质基因：人血清白蛋白(HSA，68 000)的基因、胰高血糖素样肽-1 突变双联体-人血清白蛋白（HSA-NGG，75 000）的基因和靶向 VEGF 人源化抗体(VEGF-hAb，150 000)轻重链的基因[10-11]，在连续的贴壁和悬浮传代培养中，细胞均可以表达对应蛋白质，进一步验证了该位点的适用度。综上，*Kcmf1* 基因 NW_003614172.1 第 629890 碱基处可作为整合位点成为研究人员构建 CHO 工程细胞株的可靠选择。

参考文献：

[1] WURM F M，HACKER D. First CHO genome[J]. **Nature Biotechnology**，2011，29(8)：718-720.

[2] WURM F M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells[J]. **Nature Biotechnology**，2004，22(11)：1393-1398.

[3] ZHU J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production[J]. **Biotechnology Advances**，2012，30(5)：1158-1170.

[4] HACKER D L,Balasubramanian S. Recombinant protein production from stable mammalian cell lines and pools[J]. **Current Opinion in Structural Biology**,2016,38:129-136.
[5] XU X,NAGARAJAN H,LEWIS N E,et al. The genomic sequence of the Chinese hamster ovary(CHO)-K1 cell line[J]. **Nature Biotechnology**,2011,29(8):735-741.
[6] LEWIS N E,LIU X,LI Y X,et al. Genomic landscapes of Chinese hamster ovary cell lines as revealed by the *Cricetulus griseus* draft genome[J]. **Nature Biotechnology**,2013,31(8):759-765.
[7] HUANG Y,LI Y,WANG Y G,et al. An efficient and targeted gene integration system for high-level antibody expression[J]. **Journal of Immunological Methods**,2007,322(1-2):28-39.
[8] BEILKE S,OSWALD F,GENZE F,et al. The zinc-finger protein KCMF1 is overexpressed during pancreatic cancer development and downregulation of KCMF1 inhibits pancreatic cancer development in mice[J]. **Oncogene**,2010,29(28):4058-4067.
[9] ZHOU S T,DING X F,YANG L,et al. Discovery of a stable expression hot spot in the genome of Chinese hamster ovary cells using lentivirus-based random integration[J]. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**,2019,33(1):605-612.
[10] ZHOU S T,CHEN Y,GONG X H,et al. Site-specific integration of light chain and heavy chain genes of antibody into CHO-K1 stable hot spot and detection of antibody and fusion protein expression level[J]. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**,2019,49(4):1-7.
[11] 周松涛,陈蕴,龚笑海,等. 利用 CRISPR/Cas9 技术构建稳定表达人白蛋白基因的中国仓鼠卵巢细胞系[J]. 中国生物工程杂志,2019,39(4):52-59.

科　技　信　息

澳新拟批准一种葡糖氧化酶作为加工助剂

2021 年 2 月 25 日,澳新食品标准局发布 151-21 号通知,其中 A1224 号申请,申请将来自青霉菌的葡糖氧化酶(glucose oxidase)作为加工助剂。

据通知,该葡糖氧化酶用于各种食品和饮料的生产中。

[信息来源]食品伙伴网.澳新拟批准一种葡糖氧化酶作为加工助剂[EB/OL]. (2021-2-25). http://news.foodmate.net/2021/02/585889.html