

外源蛋白在CHO细胞染色体上一个新位点的定点整合和稳定表达

胡湾湾¹, 丁学峰¹, 蔡燕飞², 陈 蕴², 段作营¹, 金 坚², 李华钟^{1*}

(¹江南大学生物工程学院, 无锡 214122; ²江南大学药学院, 无锡 214122)

摘要 寻找中国仓鼠卵巢(CHO)细胞染色体上稳定表达位点是解决CHO细胞长期培养表达不稳定问题的有效手段。本课题组前期利用慢病毒转染将示踪基因(*Zsgreen1*)整合CHO细胞染色体上并发现多个潜在稳定表达位点。本研究验证了其中一个位点稳定表达外源蛋白的能力,该位点位于染色体NW_003614241.1上148 052~148 157 bp区域。首先观察*Zsgreen1*基因的表达情况,随后采用CRISPR/Cas9技术将增强绿色荧光蛋白(EGFP)基因定点整合至该位点,获得3株EGFP基因定点整合的细胞,经60代悬浮培养,细胞荧光强度无明显变化,证明此位点可稳定表达EGFP基因。采用同样方法构建了表达人血清白蛋白(HSA)基因的重组CHO细胞株,经Western blot验证,此位点可分泌表达HSA,表明上述位点可定点整合和稳定表达外源蛋白。

关键词 CRISPR/Cas9; 定点整合; 稳定表达; 新位点; 中国仓鼠卵巢细胞

中图分类号 Q786 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2021)04-0487-09

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20210412

引用本文 胡湾湾, 丁学峰, 蔡燕飞, 等. 外源蛋白在CHO细胞染色体上一个新位点的定点整合和稳定表达[J]. 中国药科大学学报, 2021, 52(4): 487–495.

Cite this article as: HU Wanwan, DING Xuefeng, CAI Yanfei, et al. Site-specific integration and stable expression of exogenous protein at a novel site on CHO cell chromosome[J]. *J China Pharm Univ*, 2021, 52(4): 487–495.

Site-specific integration and stable expression of exogenous protein at a novel site on CHO cell chromosome

HU Wanwan¹, DING Xuefeng¹, CAI Yanfei², CHEN Yun², DUAN Zuoying¹, JIN Jian², LI Huazhong^{1*}

¹School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122;

²School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract Finding stable expression sites on the chromosomes of Chinese hamster ovary (CHO) cells is an effective method to solve the problem of unstable expression of CHO cells in long-term culture. Our group used lentiviral transfection to integrate the tracer gene (*Zsgreen1*) into the chromosome of CHO cells and found multiple potential stable expression sites. This study verified the ability of one of the sites located in the 148052-148157 bp region on chromosome NW_003614241.1 to stably express exogenous proteins. The expression of *Zsgreen1* gene was first observed, and CRISPR/Cas9 technology was then used to integrate the enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene into this site. Three strains of EGFP gene integrated cells were obtained. After 60 generations of suspension culture, the fluorescence intensity of the cells had no significant changes, which proved that this site can stably express the EGFP gene. The same method was used to construct recombinant CHO cell lines expressing the human serum albumin (HSA) gene, and was verified by Western blot that this site could express and secrete HSA. It shows that the above-mentioned sites can be integrated and can stably express exogenous proteins.

Key words CRISPR/Cas9; site-specific integration; stable expression; a novel site; Chinese hamster ovary (CHO) cells

中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞是当前生物制药领域广泛使用的宿主细胞,生产了超过70%的治疗性蛋白质^[1-2]。构建CHO工程细胞的传统方法是将外源基因随机整合至细胞基因组内,经过多轮筛选获得重组细胞系。此方法耗时费力,并且重组CHO细胞在生产过程中易丢失目的基因,导致非生产性细胞克隆逐渐增多,不利于生产及监管^[3]。寻找稳定的整合位点,将外源基因定点整合至CHO细胞基因组的稳定位点,可有效缩短工程细胞株的构建周期并解决表达不稳定问题^[4]。

初始位点的选择对后期的稳定表达起着决定性作用,经过多年的研究发现了一些潜在热点,如人纤维肉瘤细胞HT1080中14号染色体上的*Ighg2*基因、21号染色体上*Grik1*基因中第12个外显子—第13个内含子区域^[5];CHO-S和HEK293T细胞的*Hipp11*基因^[6]等。虽然有许多关于稳定位点的研究,但是目前CHO细胞还未有稳定性高、产量理想的整合位点成功应用于工业生产^[6]。因此,CHO细胞基因组稳定位点的寻找发现,并探索构建定点整合的稳定高产细胞株,对生物药的研发生产有着重大意义。

本研究团队前期敲除了Bcl-2家族中促凋亡*Bak*和*Bax*基因获得了抗凋亡特性明显提升的*Bak*⁻/*Bax*⁻CHO-K1细胞株(Ie3),应用慢病毒转染和染色体步移技术,发现了该细胞基因组内可表达示踪基因*Zsgreen1*的多个位点^[7]。其中一个位点位于染色体NW_003614241.1上,在LOC103162683基因和*Cobll1*基因之间,富含AT碱基。*Cobll1*基因编码蛋白质cordon-bleu WH2 repeat protein like 1,主要与人慢性淋巴细胞白血病和形成胰岛素抵抗相关^[8-11],而在CHO细胞中的功能尚不明确。

为探究NW_003614241.1位点稳定表达外源蛋白的能力,本研究首先观察了于NW_003614241.1第148 118 bp处随机整合*Zsgreen1*的细胞株(1g11)*Zsgreen1*基因表达情况。接着同样应用研究团队构建的抗凋亡Ie3细胞株^[7,12-13],采用CRISPR/Cas9技术,在Ie3细胞染色体NW_003614241.1上148 052~148 157 bp区域定点整合增强绿色荧光蛋白EGFP,考察该位点的可编辑性和基因表达的稳定性;随后采用同样的整合方

法在该位点定点整合了一个分泌蛋白——人血清白蛋白(HSA),检验此位点表达分泌性外源蛋白的稳定性,旨在探索CHO细胞染色体基因组中可定点整合稳定表达外源蛋白的新的位点。

1 材料

1.1 试 剂

无内毒素质粒小提中量试剂盒(北京天根生化科技有限公司);*Bbs* I -HF外切酶、T7核酸内切酶I(美国NEB公司);T4 DNA连接酶(美国Promega公司);DMEM/F12培养基、胎牛血清(美国Gibco公司);1×无菌磷酸盐缓冲液(美国HyClone公司);CD CHO培养基粉末(美国Irvine公司);基因组DNA小量抽提试剂盒(碧云天生物技术研究所);L-谷氨酰胺、嘌呤霉素、SanPrep柱式PCR产物纯化试剂盒(上海生工生物工程有限公司);高保真DNA聚合酶(南京诺唯赞生物科技有限公司);蛋白酶K(北京索莱宝科技有限公司);LipofectamineTM 3000试剂(美国Invitrogen公司);HSA抗体、山羊抗小鼠IgG(美国Abcam公司)。

1.2 仪 器

C1000 PCR仪、Mini-Protean核酸电泳仪(美国伯乐公司);倒置荧光显微镜(日本Nikon公司);FACSAriaTM III流式分选仪(美国BD公司)。

1.3 质粒、菌株及细胞

密码子优化Cas9表达质粒(丹麦科技大学Dr. Kildegard馈赠);CD513B-Cas9质粒、Psk-U6-gRNA表达质粒(复旦大学卢大儒课题组馈赠);大肠埃希菌*E. coli* DH5 α 感受态(北京天根生化科技有限公司);中国仓鼠卵巢细胞亚株CHO-K1(美国ATCC细胞库);*Bak*⁻/*Bax*⁻CHO-K1细胞株Ie3(本课题组前期构建^[5]);表达绿色荧光报告基因*Zsgreen1*的*Bak*⁻/*Bax*⁻CHO-K1细胞株1g11(本课题组前期构建^[5])。

2 方法

2.1 靶向质粒的构建和位点可编辑性验证

靶向识别序列sgRNA位于NW_003614241.1中148 052~148 157 bp范围内。首先构建sgRNA质粒,设计引物sgRNA-F和sgRNA-R在以下体系进行退火:sgRNA-F 4 μ L、sgRNA-R 4 μ L、NEBuffer2 2 μ L、ddH₂O 10 μ L,水浴95℃5 min,水浴锅中

自然降至室温。Psk-U6-gRNA 质粒载体 37 °C 水浴经 *Bbs* I -HF 酶切 4 h 后, 使用 SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒回收载体酶切片段。最后, 将退火后的 sgRNA 片段通过 T4 DNA 连接酶在 16 °C 过夜条件下连接至 Psk-U6-gRNA 载体上。

将构建好的 sgRNA 质粒和 CD513B-Cas9 质粒按物质的量比 1.8:1 用 Lipofectamine™ 3000 试剂转染进 Ie3 细胞。72 h 后收集细胞, 提取基因组用 edit-F 和 edit-R 进行 PCR 扩增, 扩增产物用 T7 核酸内切酶 I 酶切。将 PCR 扩增产物送苏州金唯智生物科技有限公司进一步测序验证。引物序列如表 1 所示。

Table 1 Primers sequence related to sgRNA

Primer	Primer sequence (5'→3')
sgRNA-F	<u>TTTGGACCCTTGTGCCCAAAAGACAGGT</u>
sgRNA-R	<u>TAAAACGTCTTGGGGACAAGGGTC</u>
edit-F	GCTGTGCATTGAAACCCATG
edit-R	TGGGTATGGAGATGGGGCGG

The underlined part is the *Bbs* I -HF restriction site

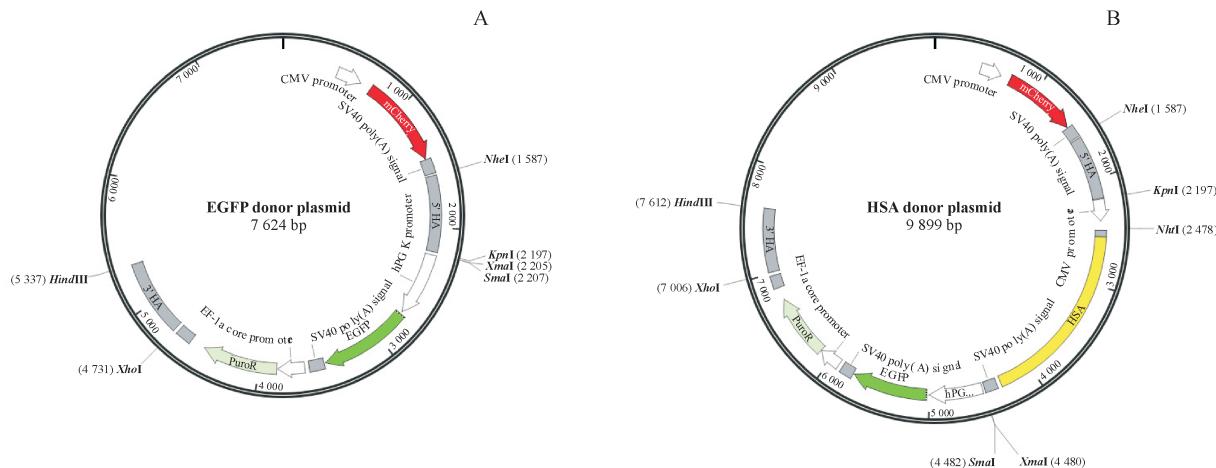


Figure 1 Map of donor plasmid

A: Map of EGFP donor plasmid; B: Map of HSA donor plasmid

基因敲入体系主要包括 sgRNA 质粒、Cas9 质粒和供体质粒 (EGFP 质粒/HSA 供体质粒)。sgRNA 靶向识别位点, 在 Cas9 复合物的作用下通过同源修复将供体质粒 5' 同源臂和 3' 同源臂之间的元件整合至细胞基因组内, 红色荧光基因设计在 5' 同源臂外侧, 用于排除随机整合事件, 定点整合成功的目的细胞株会表达 HSA 蛋白、绿色荧光蛋白及嘌呤霉素, 且不表达红色荧光蛋白, 外源基因定点整合示意图见图 2。

2.2 供体质粒构建和重组单克隆筛选

sgRNA 5'-ACCCTTGTGCCCAAAAGACAGGG-3' 引导 Cas9 复合物切割位置在染色体 NW_003614241.1 第 148 097 bp 处, 上下游的两段长度为 600 bp 的 DNA 序列分别为 5' 同源臂和 3' 同源臂。EGFP 供体质粒和 HSA 供体质粒由苏州金唯智生物科技有限公司化学合成。EGFP 供体质粒在 5' 同源臂和 3' 同源臂之间设计绿色荧光基因表达盒 (hPGK-EGFP-SV40 polyA) 和嘌呤霉素基因表达盒 (EF1 α -PuroR-SV40 polyA), 在 5' 同源臂上游有红色荧光基因表达盒 (CMV-mCherry-SV40 polyA)。HSA 供体质粒在 5' 同源臂和 3' 同源臂之间设计包括人血清白蛋白表达盒 (CMV-HSA-SV40 polyA)、绿色荧光基因表达盒 (hPGK-EGFP-SV40 polyA) 和嘌呤霉素基因表达盒 (EF1 α -PuroR-SV40 polyA), 在 5' 同源臂上游有红色荧光基因表达盒 (CMV-mCherry-SV40 polyA)。质粒图谱如图 1 所示。

将构建好的 sgRNA 质粒、CD513B-Cas9 质粒和供体质粒 (EGFP 质粒/HSA 供体质粒) 按物质的量比 1.8:1:1.8, 用 Lipofectamine™ 3000 试剂转染进 Ie3 细胞。培养 48 h 后, 4 μ g/mL 的嘌呤霉素筛选, 对照组细胞全部死亡后, 收集稳转细胞池, 利用流式细胞仪进行单克隆分选, 筛选只表达绿色荧光不表达红色荧光的单克隆。分选出的单克隆细胞培养 6~7 d 后, 将能观察到细胞团的单克隆扩大培养。使用基因组 DNA 小量抽提试剂盒收集基因

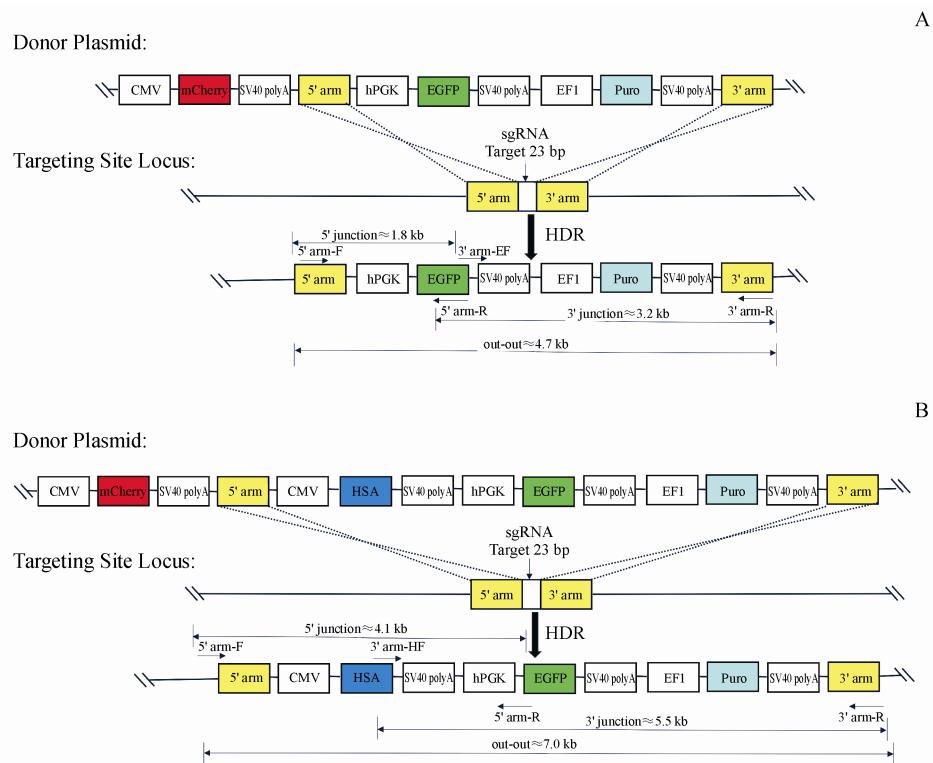


Figure 2 Schematic of exogenous gene site-specific integration into *Bak*^{-/-}*Bax*^{-/-} CHO-K1 genome

A: Schematic of EGFP gene site-specific integration into Ie3 genome; B: Schematic of HSA gene site-specific integration into Ie3 genome

组作为后续PCR反应的模板DNA。5'同源臂侧PCR和3'同源臂侧PCR中间包含部分重叠片段,通过5'同源臂侧PCR和3'同源臂侧PCR鉴定目的基因的定点整合,通过全长PCR鉴定所获单克隆细胞是纯合子还是杂合子。

在重组细胞中PCR扩增验证5'同源臂侧靶位点定点整合外源蛋白EGFP或HSA的正反向引物分别为5'同源臂-F和5'同源臂-R;在重组细胞中PCR扩增验证3'同源臂侧靶位点定点整合外源基因EGFP的正反向引物分别为3'同源臂-EF和3'同源臂-R;在重组细胞中PCR扩增验证3'同源臂侧靶位点定点整合外源基因HSA的正反向引物分别为3'同源臂-HF和3'同源臂-R。引物所在位置如图2所示,引物序列如表2所示。

Table 2 Primers used for PCR

Primer	Sequence(5'→3')
5' arm-F	CACCTTTAATCTCGGCCTCAGG
5' arm-R	CGTCGGCGTCCAGCTGACAG
3' arm-EF	CCACATGAAGCAGCACGACTT
3' arm-HF	GCACCGCCTCCACGATAATG
3' arm-R	CAAGAGGTAGGCATGGCCACATATGCTTG

2.3 目的蛋白质检测

绿色荧光报告蛋白(ZsGreen1)和增强型绿色荧光蛋白(EGFP)组合使用倒置荧光显微镜和流式细胞仪检测,倒置荧光显微镜拍摄条件为曝光时间1 s,增益为2×,拍摄多个视野,使用Image J软件分析细胞平均荧光强度;流式细胞仪检测以Ie3为阴性对照,消化后的细胞用磷酸盐缓冲液重悬,上样量为1×10⁴个,使用FlowJo软件分析细胞荧光强度。

人血清白蛋白(HSA)是血浆中含量最丰富的蛋白,约占血浆总蛋白的60%,作为血浆扩容剂用途广泛,且基于其无免疫原性、相对分子质量大及半衰期长等优点,多用于白蛋白融合技术延长其他激素、抗体等的半衰期^[14]。本研究中HSA的检测使用Dot blot和Western blot方法,在细胞生长状态良好时接种2×10⁵个细胞至6孔板内培养,培养24 h后待细胞汇合度至80%左右时换无血清培养基培养,48 h后收集细胞培养液上清,检测上清中HSA含量。Dot blot和Western blot所使用的一抗均为HSA抗体,二抗均为山羊抗小鼠IgG。

2.4 细胞培养

CHO 细胞有贴壁和悬浮两种生长状态。贴壁培养使用完全培养基(DMEM/F12 + 10% 胎牛血清)在 T75 培养瓶中置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱静置培养。悬浮培养使用无血清的 CD CHO 培养基(L-谷氨酰胺 8 mmol/L)在 37 °C、5% CO₂、100 r/min 恒温摇床振荡培养。

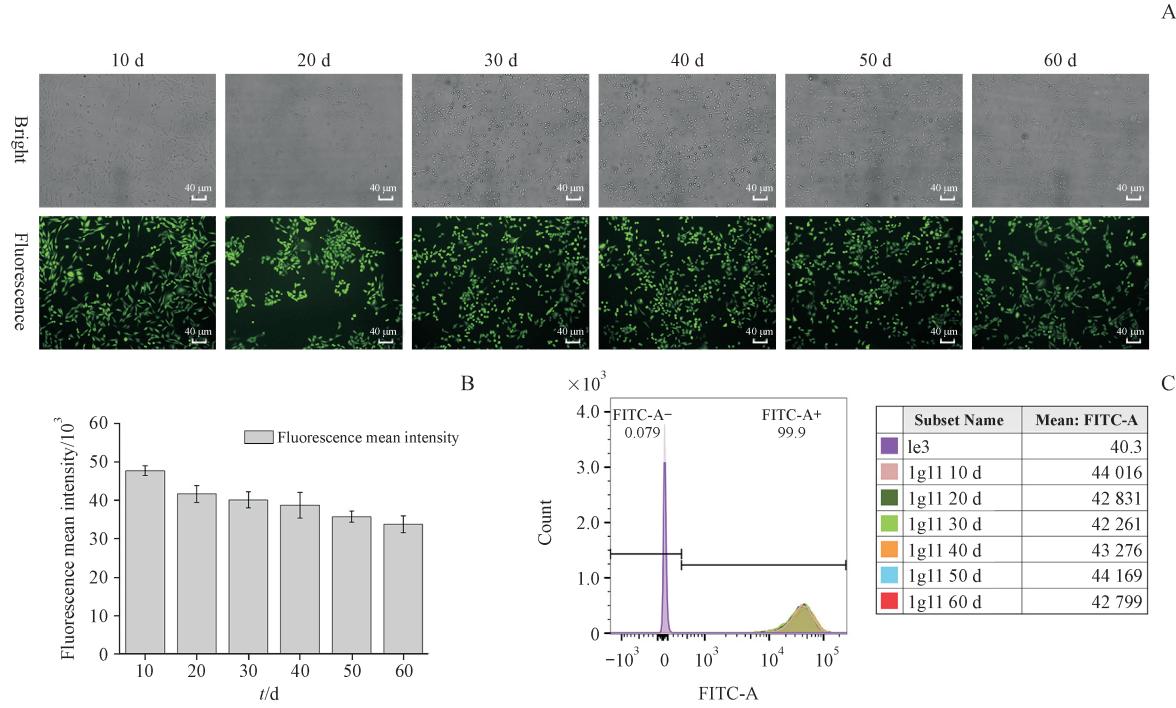
3 结果

3.1 1g11 细胞表达绿色荧光报告蛋白 ZsGreen1 的稳定性

为了验证 NW_003614241.1 位点的稳定性,首先检测慢病毒随机整合示踪基因 *Zsgreen1* 的 *Bak^{-/-}* / *Bax^{-/-}* CHO-K1(1g11) 细胞株在贴壁传代培养过程中的平均绿色荧光强度。重组细胞株的稳定性包括传代稳定性和冻存稳定性,传代稳定性为细胞连续传代培养过程中产物表达量的稳定性,冻存稳定性是指定期检查经液氮深低温冷冻的细胞复

苏后产物表达量的稳定性^[15]。本实验 1g11 细胞连续传代 60 代,其间每隔 10 代,使用倒置荧光显微镜观察、Image J 软件分析细胞的平均荧光强度评价传代稳定性,同时进行细胞冻存。复苏第 10、20、30、40、50 和 60 代的细胞,使用流式细胞仪定量分析各代细胞的绿色荧光蛋白表达情况评价冻存稳定性。

图 3-A 为 1g11 细胞连续传代过程中荧光显微镜拍照结果,可以看出 100% 的细胞均发绿色荧光,图 3-B 为 Image J 软件分析荧光场照片中细胞的平均荧光亮度结果,显示不同代次的 1g11 细胞平均荧光强度虽有小幅度降低,但表达绿色荧光蛋白的水平基本一致,图 3-C 为 FlowJo 软件分析后的流式细胞仪检测结果,显示不同代次的 1g11 细胞荧光强度保持在 45 000 ± 2 200,与荧光显微镜结果基本一致,证明了 1g11 贴壁细胞的传代稳定性和冻存稳定性,初步证明 NW_003614241.1 位点的稳定性。



3.2 sgRNA 编辑效率验证

检测 sgRNA 在 Ie3 细胞内的实际编辑情况,PCR 扩增转染后细胞池的 Cas9 切割位点上下游的

序列,用 T7 核酸内切酶 I 对 PCR 产物酶切验证,如果细胞内发生了基因编辑事件,DNA 会因源定向修复在切开缺口处发生错配,T7 核酸内切酶 I

可以识别并切割发生错配的DNA双链。PCR扩增片段大小为850 bp,切割后理论上会出现302 bp和547 bp两条条带,琼脂糖凝胶电泳图结果如图4-A所示,与理论结果相符,说明sgRNA可以在目标靶点有效编辑。使用Image J软件分析图4-A凝胶中条带的灰度值^[14],得到sgRNA在Ie3细胞内的编辑效率为69.5%。

测序结果(图4-B)显示:在PAM序列上游的第4个碱基之后发生了明显的套峰,Cas9复合物识别的位置正是PAM序列上游的3,4碱基之间,这也证明了有细胞在目标靶点发生了基因编辑事件。

3.3 NW_003614241.1定点整合EGFP基因单克隆细胞株的筛选

根据所设计的敲入整合策略,成功发生定点整合事件的细胞株表达EGFP,表现为只发绿色荧光;发生随机整合事件的细胞株可能既表达EGFP也表达mCherry或只表达mCherry,表现为既发绿色荧光也发红色荧光或只发红光;未发生整合事件的细胞株不发荧光。收集转染后细胞用流式细胞仪进行分选的结果如图5所示,以Ie3细胞为阴性对照,只发绿色荧光的细胞为24.1%,分选只发绿色荧光的单克隆细胞。

提取单克隆细胞基因组进行PCR验证,如PCR产物的电泳图(图6-A, 6-B)所示,5'同源臂和3'同源臂PCR产物分别在1 800 bp和3 200 bp附近,与预期相符,经5'同源臂侧PCR、3'同源臂侧PCR筛选出3株阳性单克隆株(EGFP-Ie3-19、EGFP-Ie3-48、EGFP-Ie3-51),PCR产物测序结果表明在NW_003614241.1上的第148 097 bp处敲入了完整EGFP。全长PCR结果(图6-C)表明获得的阳性单克隆细胞为杂合子,测序结果显示4 800 bp大小的条带包含定点整合完整的EGFP,2 200 bp大小

的条带为未整合的染色体DNA,与预期相符。

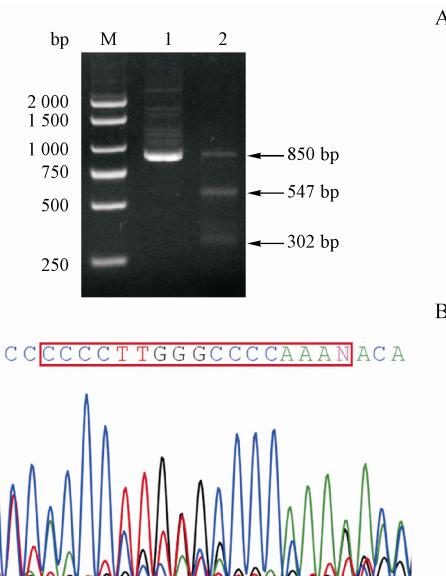
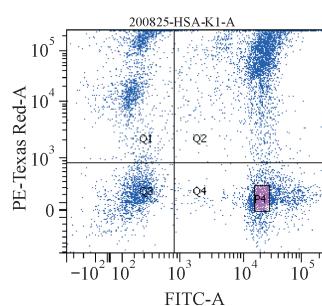


Figure 4 Results of sgRNA editing efficiency verification

A: Agarose gel electrophoresis of T7E1 digests of PCR products of cell pool genome transfected with plasmid sgRNA and CD513B-Cas9, M: DL2000 marker, 1: PCR products of Ie3 cell pool transfected with plasmid sgRNA and CD513B-Cas9, 2: T7E1 digests PCR products of Ie3 cell pool transfected with plasmid sgRNA and CD513B-Cas9; B: Sequencing of genomic PCR products of Ie3 cells transfected with sgRNA and CD513B-Cas9 plasmid

3.4 定点整合EGFP基因单克隆细胞株的表达水平

对悬浮驯化成功的EGFP-Ie3-19、EGFP-Ie3-48、EGFP-Ie3-51 3株细胞,每隔15代用流式细胞仪检测绿色荧光蛋白表达情况,如图7所示3株单克隆均表达EGFP,荧光强度保持在10 000左右。3株单克隆之间绿色荧光强度也基本保持一致,细胞间个体差异较小。表明此位点可以定点整合稳定表达绿色荧光蛋白EGFP。



Population	Parent/%	FITC-A/Mean
Q1(Cell with Red fluorescence)	19.6	236
Q2(Cell with Red & Green fluorescence)	40.3	27 037
Q3(Cell with No fluorescence)	16.0	210
Q4(Cell with Green fluorescence)	24.1	33 060
P4(Cell we sorted)	8.8	20 770

Figure 5 *Bak*⁻/*Bax*⁻CHO-K1 cell pool sorting results with targeted integration of EGFP

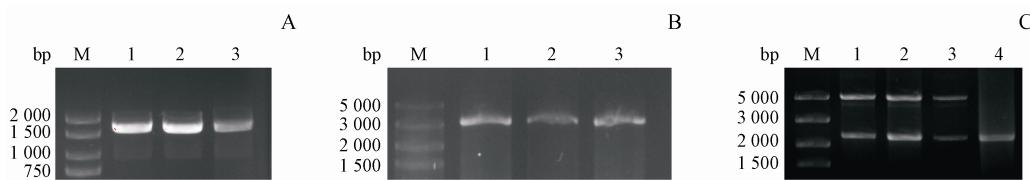


Figure 6 PCR verification results of *Bak*⁻/*Bax*⁻ CHO-K1 cells with targeted integration of EGFP gene

A: Results of 5' junction PCR (M: DL 2000 DNA Marker, 1: EGFP-Ie3-19, 2: EGFP-Ie3-48, 3: EGFP-Ie3-51); B: Results of 3' junction PCR (M: DL 5000 DNA Marker, 1: EGFP-Ie3-19, 2: EGFP-Ie3-48, 3: EGFP-Ie3-51); C: Results of out-out PCR (M: DL 5000 DNA Marker, 1: EGFP-Ie3-19, 2: EGFP-Ie3-48, 3: EGFP-Ie3-51, 4: Ie3 (negative control))

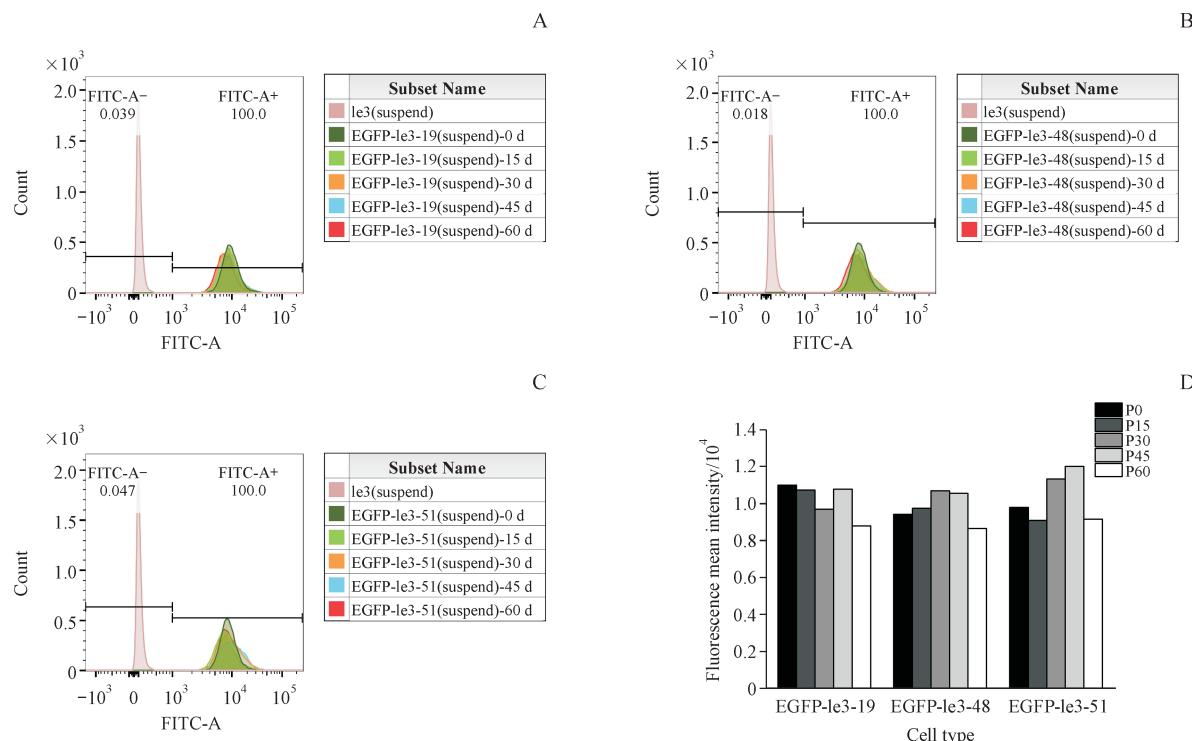


Figure 7 Flow cytometric analysis results of *Bak*⁻/*Bax*⁻ CHO-K1 cells with targeted integration of EGFP gene

A: Green fluorescence intensity of EGFP-Ie3-19 cells of different generations; B: Green fluorescence intensity of EGFP-Ie3-48 cells of different generations; C: Green fluorescence intensity of EGFP-Ie3-51 cells of different generations; D: Comparison result of green fluorescence intensity among EGFP-Ie3-19, EGFP-Ie3-48 and EGFP-Ie3-51

3.5 NW_003614241.1 定点整合表达人血清白蛋白 HSA

利用 CRISPR/Cas9 技术将可分泌表达的人血清白蛋白 HSA 基因整合到 Ie3 细胞染色体的 NW_003614241.1 上的第 148 097 bp 处, 经 Dot blot 筛选最终得到 3 株阳性克隆 HSA-Ie3-4、HSA-Ie3-52 和 HSA-Ie3-61。通过 PCR 验证外源基因的整合情况, 通过 Western blot 检测培养上清液中 HSA 的分泌表达情况, 结果如图 8 所示。PCR 产物的电泳图 (图 8-A, 8-B, 8-C) 显示, 5' 同源臂和 3' 同源臂 PCR 产物分别在 4 100 bp 和 5 500 bp 附近, 与预期相

符; 全长 PCR 产物在 7 000 bp 和 2 200 bp 附近均有条带, 7 000 bp 大小的条带包含定点整合的 HSA 基因, 2 200 bp 大小的条带则是 Ie3 染色体 DNA, 回收条带进行测序, 结果与预期一致。Western blot 实验结果 (图 8-D) 显示在 70 kD 左右出现了目标条带, 与 HSA 蛋白的 68 kD 一致, 说明在 HSA-Ie3-4、HSA-Ie3-52、HSA-Ie3-61 3 个单克隆株中 HSA 基因得以定点整合和表达。

4 讨 论

近年来, 关于如何解决 CHO 细胞表达外源蛋

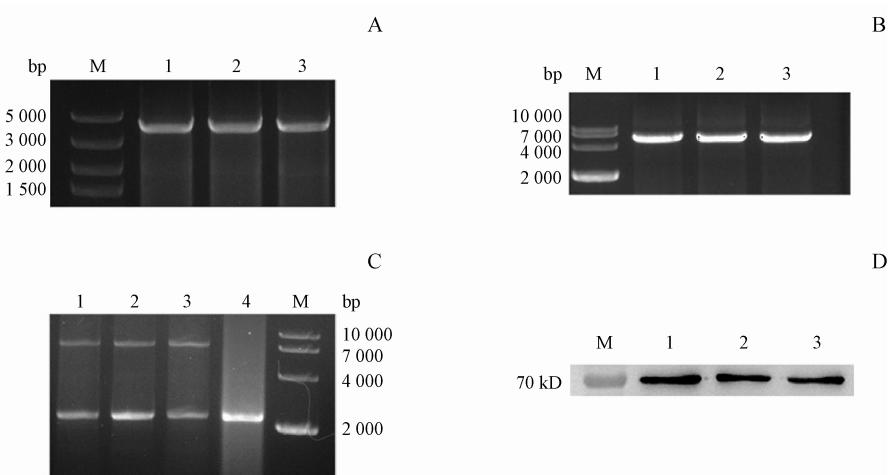


Figure 8 PCR and Western blot detection of HSA gene expression on adherent cells

A: Results of 5' junction PCR (M: DL 5 000 DNA Marker, 1: HSA-Ie3-4, 2: HSA-Ie3-52, 3: HSA-Ie3-61); B: Results of 3' junction PCR (M: DL 10 000 DNA Marker, 1: HSA-Ie3-4, 2: HSA-Ie3-52, 3: HSA-Ie3-61); C: Results of out-out PCR (M: DL 10 000 DNA Marker, 1: HSA-Ie3-4, 2: HSA-Ie3-52, 3: HSA-Ie3-61, 4: Ie3 (negative control)); D: Western blot results of HSA gene expression in adherent cells (M: Molecular mass marker, 1: HSA-Ie3-4, 2: HSA-Ie3-52, 3: HSA-Ie3-61, Exposure time 30 s)

白的不稳定这一问题,研究人员已经进行了多方面的尝试。传统的随机整合方法,不能从根本上消除基因组的固有不稳定性及整合位点不稳定这两个因素,而寻找CHO细胞基因组内的稳定位点,将外源基因通过定点整合的方式整合至位置已知的位点^[17],可以有效避免这一问题。初始位点的选择对后期的稳定表达起着决定性作用,理想的位点应具备稳定性强、适用度宽、表达量高等特性。

本课题组前期利用慢病毒转染及染色体步移技术发现的多个潜在稳定表达位点中,有的位点,Zsgreen1报告基因的表达受培养条件的制约,无血清培养条件下Zsgreen1表达水平大大降低;有的位点,序列中含有较多的未知碱基无法进行编辑^[7],所以需要对每一潜在位点的可编辑性和表达外源蛋白的稳定性进行研究。

染色体NW_003614241.1上148 052~148 157 bp区域也是本课题组利用慢病毒转染及染色体步移技术发现的CHO细胞基因组内新的表达位点之一^[7],经60代传代实验证明慢病毒整合的绿色荧光示踪基因Zsgreen1在贴壁1g11细胞中可以稳定表达。将EGFP基因用CRISPR/Cas9技术定点整合到抗凋亡Ie3细胞的上述位点的第148 097 bp处,在悬浮培养传代60代过程中EGFP可以稳定表达,说明该位点可以定点整合并稳定表达EGFP蛋白。将HSA基因用同样的方法定点整合

到该位置,经检测HSA基因也可以稳定表达,说明该位点可以定点整合并稳定表达分泌蛋白。上述结果表明该位点有望是一个可定点整合表达外源蛋白的理想位点。

本研究所获得的成功定点整合到此位点的6株阳性单克隆均为杂合子,单拷贝的外源基因会影响表达水平。通过联合利用其他位点进行在多个位点定点整合同一外源基因,或者通过在该位点插入着陆垫,利用Bxb1重组酶系统在着陆垫上插入多拷贝,或者利用IRES序列将外源基因串连整合表达,都可能通过增加目的基因的拷贝数,有效提高外源基因的表达水平^[18]。

References

- [1] Fischer S, Handrick R, Otte K. The art of CHO cell engineering: a comprehensive retrospect and future perspectives [J]. *Biotechnol Adv*, 2015, 33:1878-1896.
- [2] Peng L, Yu X, Cai YF, et al. Research advances of recombinant coagulation factor VII expression and synthesizing mechanism [J]. *J China Pharm Univ (中国药科大学学报)*, 2015, 46(5): 623-628.
- [3] Hamaker NK, Lee KH. Site-specific integration ushers in a new era of precise CHO cell line engineering [J]. *Curr Opin Chem Eng*, 2018, 22: 152-160.
- [4] Lee JS, Grav LM, Pedersen LE, et al. Accelerated homology-directed targeted integration of transgenes in Chinese hamster ovary cells via CRISPR/Cas9 and fluorescent enrichment [J].

- Biotechnol Bioeng*, 2016, **113**(11):2518-2523.
- [5] Cheng JK, Lewis AM, Kim DS, et al. Identifying and retargeting transcriptional hot spots in the human genome [J]. *Biotechnol J*, 2016, **11**(8):1100-1109.
- [6] Yang L. Study on site-specific integration and expression of human serum albumin in CHO-K1 cell genome [D]. Jiangnan University, 2020.
- [7] Zhou ST. Study of site-specific integration of therapeutic protein genes into CHO genome and stable expression [D]. Jiangnan University, 2019.
- [8] Plesingerova H, Janovska P, Mishra A, et al. Expression of COBLL1 encoding novel ROR1 binding partner is robust predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Haematologica*, 2018, **103**(2):313-324.
- [9] Chen ZF, Yu HJ, Shi X, et al. Functional screening of candidate causal genes for insulin resistance in human preadipocytes and adipocytes [J]. *Circ Res*, 2020, **126**(3):330-346.
- [10] Sharma V, Sharma I, Sethi I, et al. Replication of newly identified type 2 diabetes susceptible loci in Northwest Indian population [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2017, **126**:160-163.
- [11] Park JW, Jang HJ, Shin S, et al. Molecular analysis of alternative transcripts of the equine cordon-bleu WH2 repeat protein-like 1 (COBLL1) gene [J]. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2015, **28**(6):870-875.
- [12] Chauhan D, Bartok E, Gaidt MM, et al. BAX/BAK-induced apoptosis results in caspase-8-dependent IL-1beta maturation in macrophages [J]. *Cell Rep*, 2018, **25**(9):2354-2368.
- [13] O'Neill KL, Huang K, Zhang JJ, et al. Inactivation of prosurvival Bcl-2 proteins activates Bax/Bak through the outer mitochondrial membrane [J]. *Genes Dev*, 2016, **30**(8):973-988.
- [14] Zhao SQ, Zhang Y, Tian H, et al. Expression and bioactivity of recombinant 3DHSA-Nartograstim fusion protein in *Pichia pastoris* [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2013, **44**(6):577-582.
- [15] Bailey LA, Hatton D, Field R, et al. Determination of Chinese hamster ovary cell line stability and recombinant antibody expression during long-term culture [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2012, **109**(8):2093-2103.
- [16] Shin SW, Lee JS. Optimized CRISPR/Cas9 strategy for homology-directed multiple targeted integration of transgenes in CHO cells [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2020, **117**(6):1895-1903.
- [17] Zhou ST, Ding XF, 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]. *Biotechnol Biotechnol Eq*, 2019, **33**(1):605-612.
- [18] Gaidukov L, Wroblewska L, Teague B, et al. A multi-landing pad DNA integration platform for mammalian cell engineering [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, **46**(8):4072-4086.

·本刊讯·

《中国药科大学学报》入选《世界期刊影响力指数(WJCI)报告(2020科技版)》

近日,《中国药科大学学报》被《世界期刊影响力指数(WJCI)报告(2020科技版)》收录。该报告旨在建立一个全新的期刊评价体系,入选期刊均被认为是具有地区代表性和学科代表性的优秀期刊。前行路上取得的成绩离不开各位编委、作者与读者的支持和鼓励,在此,感谢大家一贯的鼎力支持!我们将继续坚持本刊的办刊宗旨,提供学术交流的专业平台,将药学领域最前沿的理念和成果及时地传递给读者,时刻关注行业的最新进展,为药学科研人员提供最好的服务。

(本刊编辑部)