

甲基化酶 DNMT3B 基因敲除的 CHO-K1 细胞系构建

陈奇娜¹, 王 斌², 郭 庆², 王 静², 黄 伟², 王 霄², 纪 华^{3*}

(1. 大理大学 药学院, 云南 大理 671000; 2. 昆明学院 农学与生命科学学院, 云南 昆明 650214;
3. 解放军联勤保障部队第 920 医院 肿瘤科, 云南 昆明 650032)

摘要: 构建敲除 DNMT3B 基因的细胞系, 为重组蛋白药物生产使用的高效表达系统提供 DNMT3B 基因缺失的稳定细胞株. 采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 构建敲除 DNMT3B 基因的质粒, 并利用脂质体转染 CHO-K1 细胞进行基因编辑、T7E1 核酸内切酶切及筛选 DNMT3B 基因敲除细胞, 以及软琼脂法获得单克隆. 结果表明, 通过对获得的单细胞克隆进行测序比对, 确定 DNMT3B 基因第 4 个外显子处被编辑产生移码突变. 最终获得 DNMT3B 基因特异位点删除的 CHO 细胞单克隆.

关键词: CRISPR/Cas9; 基因敲除; DNMT3B; 表观遗传学; T7E1 核酸内切酶

中图分类号: R782.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674 - 5639 (2021) 06 - 0114 - 06

DOI: 10.14091/j.cnki.kmxyxb.2021.06.019

Construction of CHO-K1 Cell Line with DNMT3B Gene Knockout

CHEN Qina¹, WANG Bin², GUO Qing², WANG Jing², HUANG Wei², WANG Xiao², JI Hua^{3*}

(1. College of Pharmacy, Dali University, Dali, Yunnan, China 671000;

2. School of Agriculture and Life Sciences, Kunming University, Kunming, Yunnan, China 650214;

3. Department of Oncology, 920th Hospital of PLA Joint Logistic Support Force, Kunming, Yunnan, China 650032)

Abstract: Cell lines with DNMT3B gene knockout were constructed to provide the stable productive cells of efficient expression system for recombinant protein-drug production. CRISPR/Cas9 gene editing technology was used to construct a plasmid to knocked out DNMT3B gene, and CHO-K1 cells were transfected with liposomes for gene editing. DNMT3B gene knockout cells were verified by T7E1 enzyme and screened by soft AGAR method to obtain monoclones. The results showed that DNA sequencing analysis confirmed that the fourth exon of DNMT3B gene was edited to produce frameshift mutation. Then monoclones of CHO cells which DNMT3B gene deleted in specific locus were obtained.

Key words: CRISPR/Cas9; gene knockout; DNMT3B; epigenetics; T7E1 endonuclease

DNA 甲基化转移酶 (DNA methyltransferase, DNMT) 是在 DNA 序列的 CpG 二核苷酸的胞嘧啶残基上加一个甲基的重要表观修饰酶, DNMT 分为 DNA 甲基转移酶 DNMT1 和从头甲基转移酶 DNMT3A、DNMT3B^[1], DNA 甲基化修饰可在 DNA 复制过程中经细

胞分裂并遗传给下一代, 这种修饰通常与基因沉默有关, 被认为是构成性和兼性异染色质形成的重要因素^[2]. 此外, DNA 高甲基化也被证明是用来维持基因的永久沉默^[3]. 因此, DNA 甲基化被认为是转基因沉默^[4]的重要原因. 近年来, CHO-K1 细胞越来越多地

收稿日期: 2021 - 05 - 14

基金项目: 国家自然科学基金 (31760256, 32060147); 云南省地方高校联合基金 (202001BA070001-217); 云南省教育厅科学研究基金资助项目 (2020J0510).

作者简介: 陈奇娜 (1995—), 女, 福建龙岩人, 在读硕士研究生, 主要从事临床药学研究.

*通信作者: 纪华 (1974—), 女, 山西晋中人, 主治医师, 博士, 主要从事肿瘤分子病因学及基因治疗研究, E-mail: 896724396@qq.com.

用于重组蛋白药物的生产, 以及克服转基因沉默等以提高 CHO-K1 高效表达的手段而备受关注. 因而, 获得 DNA 甲基化缺陷并稳定高效表达的 CHO 细胞株已成为产业界追求的目标.

CRISPR/Cas9 是用于基因编辑的前沿方法, 以 CRISPR/Cas9 为基础的基因编辑技术在一系列基因治疗的应用领域都展现出极大的应用前景. 例如血液病、肿瘤和其他遗传疾病. 此外, 该技术的成果已应用于人类细胞、斑马鱼、小鼠以及细菌的基因组精确修饰^[5-6]. 通过设计含有 20 个核苷酸的 sgRNA (small guide RNA), 并且 sgRNA 与核苷酸序列为 NGG 的 PAM 序列相邻; sgRNA 和靶标 DNA 之间的互补碱基配对, sgRNA 引导 Cas9 内切酶接近基因组中的任意 DNA 序列, Cas9-DNA 的相互作用以及相关的构象变化驱动 R-loop 的形成和在靶向基因组 DNA 中进行双链断裂 (DSB). 双链断裂后 DNA 修复机制启动并催化非同源端连接 (NHEJ) 或同源定向修复 (HDR). 对于 NHEJ, 丢失的序列可能无法恢复, 导致序列插入或缺失, 以及基因功能丧失. 而对于 HDR, 引入外源 DNA 模板将填补 DSB, 从而进行基因敲入、删除、调整或突变^[7-8].

CHO 细胞主要包括 CHO-dxb11、CHO-K1、CHO-dg44 和 CHO-s 等多种细胞系^[9-11]. 随着 CHO 细胞培养条件的不断改进优化, 比如, 改进培养温度、驯化贴壁细胞悬浮培养、无胎牛血清培养等, 可以获得不同表观遗传背景的细胞系用于提高工业化生产中蛋白的表达量. 虽然已有 CHO-K1 中甲基化酶基因 DNMT3A、DNMT3B 基因敲除后的报道^[12-16], 但是, 可能存在因为基因敲除靶点的区别、不同甲基化背景的 CHO-K1 细胞甲基化酶基因敲除后诱变条件的不同, 导致表观遗传背景差别, 以及获得的细胞系高效表达的潜质完全不同, 因此, 筛选 DNMT3B 基因特异位点敲除的特异细胞系仍然很有必要.

本研究利用 CRISPR/Cas9 基因修饰技术, 通过优化的软琼脂培养法对本实验室驯化培养的 CHO-K1 细胞进行靶向 sgRNA 设计、细胞筛选和阳性克隆鉴定等, 以期得到具有高效表达潜力的 DNMT3B 基因特异位点敲除的 CHO-K1 细胞系.

1 材料与方法

1.1 靶向 DNMT3B 基因的 sgRNAs 设计

根据 CRISPR/Cas9 靶点设计原则^[17-18], 设

计大于 20 个核苷酸长度的 sgRNAs^[19]. 同时选择 DNMT3B 基因第 4 个外显子 3 个不同的靶点序列 (表 1), 通过体外实验, 从中筛选出效率较高的 sgRNA, 以增加成功率和增强敲除效率^[8], CRISPR/Cas 基因敲除质粒构建示意图如图 1 所示.

表 1 sgRNA 设计序列

sgRNA 名称	sgRNA 序列(5'-3')
DNMT3B plasmid-1 F	CCATGTGCAGGAATACCCCGTGG
DNMT3B plasmid-1 R	CCACGGGGTATTCCTGCACATGG
DNMT3B plasmid-2 F	CCAGGGCCGCCACCATGTGCAGG
DNMT3B plasmid-2 R	CCTGCACATGGTGGCGGCCCTGG
DNMT3B plasmid-3 F	GCCTCTGGTGATTCTGGGCGAGG
DNMT3B plasmid-3 R	CCTCGCCCAAGATCACCAGAGGC

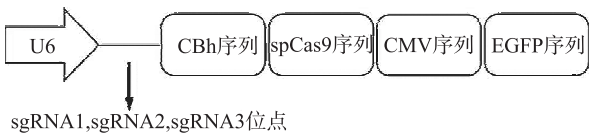


图 1 CRISPR/Cas 基因敲除质粒构建示意图

1.2 引物合成

根据实验要求设计 DNMT3B 基因第 4 外显子的检测引物 (表 2), 引物由上海生工生物工程有

引物名称	引物序列(5'-3')	产物大小/bp
DNMT3B-F	cag tca cct aag gcc ctg tg	483
DNMT3B-R	ggt ctc cag gaa act ggc tc	483

1.3 转染及嘌呤霉素筛选

采用脂质体转染, 转染前 2 d, 将 24 孔板的培养基换成不含抗生素的血清. 当细胞汇合度达到 50% ~ 70%, 进行转染. 转染效率最佳的为 10 μ L 体系, 转染试剂 3.6 μ L, 质粒 1.2 μ g. 步骤如下: 加 3.6 μ L 转染液到无抗生素培养基中, 孵育 5 min; 加 1.2 μ g 的质粒到无抗生素培养基和转染液中孵育 20 min; 24 孔板换液 490 μ L 无抗生素培养基; 将孵育好的转染试剂和 DNA 转入细胞培养基中轻柔混匀. 设置 3 个重复和阴性对照, 荧光显微镜下观察 3 个重复转染效率相差不大, 阴性对照没有荧光. 转染 24 h 后加入 12 μ L 的嘌呤霉素, 培养 4 d.

1.4 单克隆筛选

本实验采用软琼脂法挑取单克隆。配置终质量分数为 0.5% 琼脂 + 10% FBS + 1% 三抗 + 1 × DMEM 的下层琼脂, 以及终质量分数为 0.35% 琼脂 + 10% FBS + 1% 三抗 + 1 × DMEM 的上层琼脂铺板到 5 cm 的细胞培养皿中^[20]。细胞经过细胞筛过滤以后, 计数 200 个细胞加入上层琼脂中。

通常铺板 14 d 左右, 肉眼可以观察到针尖样的单克隆细胞团, 细胞铺软琼脂期间每隔 2 ~ 3 d, 往软琼脂中加入 200 μL 的培养基, 避免软琼脂过于干燥。当肉眼能看到单克隆细胞团时, 用镊子挑出单克隆到 96 孔板中将细胞团吹散。

1.5 TE1 酶切

1.5.1 反应体系

T7E1 核酸内切酶反应体系见表 3。

表 3 T7E1 核酸内切酶反应体系

编号	1	2	3
突变体 DNA PCR 产物/μL	9.0	4.5	0.0
野生型 DNA PCR 产物/μL	0.0	4.5	9.0
阳性对照/μL	0.0	0.0	0.0
10XT7E1 Buffer/μL	1.0	1.0	1.0
ddw/μL	0.0	0.0	0.0
总体积/μL	10.0	10.0	10.0

1.5.2 酶切反应程序

95 ℃ 5 min; 95 ~ 85 ℃ - 2 ℃/s; 85 ~ 25 ℃ - 0.1 ℃/s; 4 ℃; 置于 PCR 仪中反应结束后, 加入 0.5 μL 的 T7E1 内酶, 严格冰上操作; 加入 T7E1 内切酶后, 37 ℃ 反应 0.5 h 后, 立刻跑电泳, 电泳槽 TAE 每次换成新的。

2 结果与分析

2.1 单克隆细胞中 DNMT3B 基因的鉴定

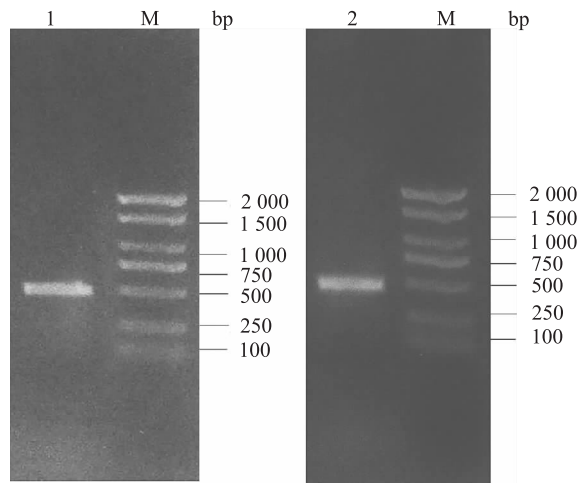
2.1.1 DNMT3B 基因片段鉴定

经过转染 sgRNA 的质粒, 用嘌呤霉素筛选后, 通过对获得的瞬时转染的细胞进行软琼脂法筛选, 并对获得的单克隆进行 DNMT3B 基因鉴定, 扩增片段大小为 483 bp (图 2), 确定为筛选引物扩增的目的片段。

2.1.2 基因敲除阳性细胞筛选

为了确认获得的单克隆是否发生基因编辑, 利用 T7E1 酶切切割 DNMT3B 基因, 而 T7E1 核酸内

切酶能够识别由于碱基缺失或改变造成不完全互补配对的杂合双链 DNA, 进行 DNA 切割, 对野生型则不会产生切割。如图 3 所示, 1 号、2 号为 DNMT3B-1 单克隆 T7E1 酶切 1 号体系和 2 号体系 (表 3) 切开的条带, 7 号、8 号为 DNMT3B-2 单克隆 T7E1 酶切的 1 号体系和 2 号体系 (表 3) 切开的条带, 均切开 3 条条带。



M: Marker; 1: DNMT3B-1, 用 DNMT3B 引物扩增; 2: DNMT3B-2, 用 DNMT3B 引物扩增。

图 2 DNMT3B 基因片段 PCR 鉴定结果

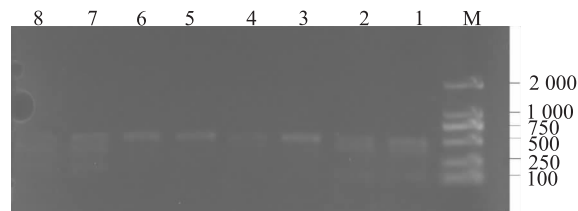


图 3 单克隆筛选酶切鉴定结果

随后, 将 T7E1 酶切切开的 PCR 产物纯化后进行 TA 克隆, 菌落 PCR, 阳性菌落扩大培养后, 小提质粒, DNA 测序比对, 确定该单克隆基因敲除了 25 bp (图 4a) 和敲除了 10 bp (图 4b) 成功, 并进一步通过比对, 确定基因敲除位点发生在第 4 外显子上 (图 4c)。

2.2 DNMT3B 基因特异位点的细胞筛选

基于上述基因鉴定结果, 确定 DNMT3B 基因敲出背景清楚的单克隆, 再通过有限稀释法对单克隆进行重筛选。分别获得 DNMT3B 第 4 个外显子上删除 25 bp 和 10 bp 的特异的细胞株, 普通显微镜下显示细胞生长情况良好 (图 5a)。为进一步确定单克隆均一性, 用倒置荧光显微镜进行分析其荧光均一度 (图 5b)。

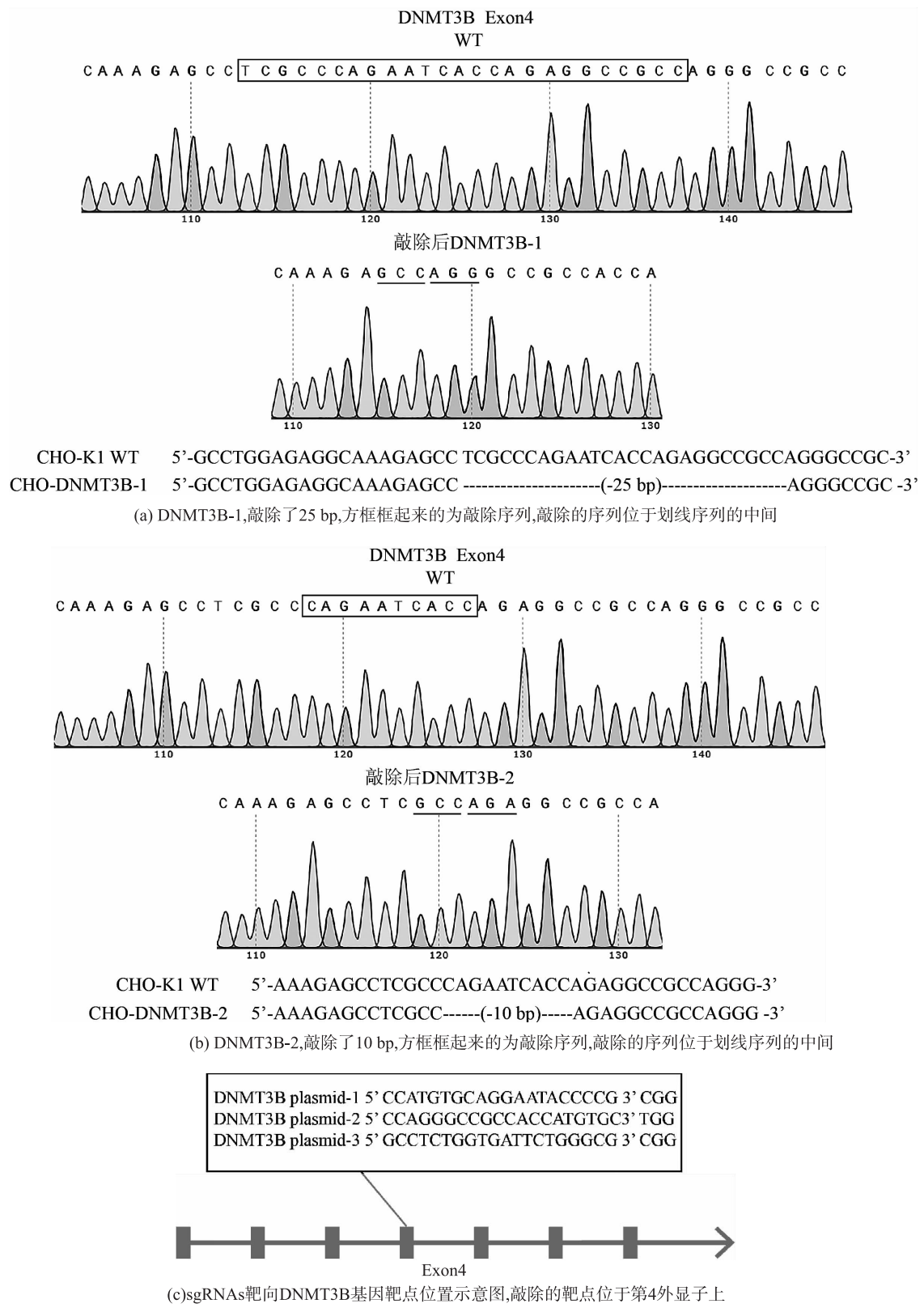


图 4 DNMT3B-1、DNMT3B-2 单克隆测序结果

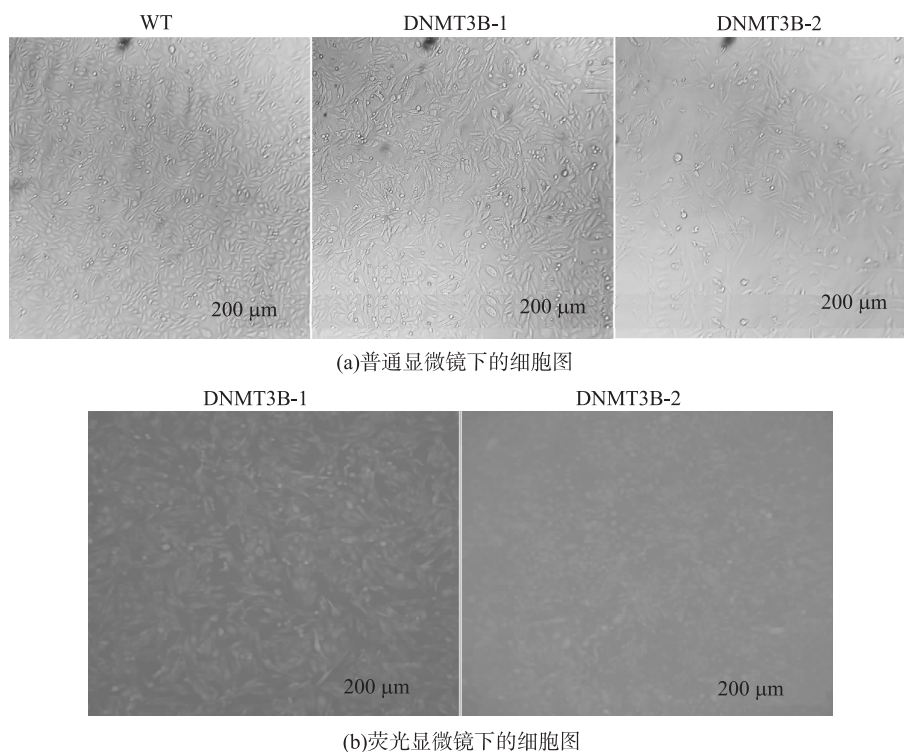


图 5 DNMT3B-1、DNMT3B-2 单克隆细胞

3 讨论

DNMT3B 基因由 23 个外显子组成. 本文通过 CRISPR/Cas9 基因修饰技术, 分别获得 DNMT3B 第 4 个外显子上删除 25 bp 和 10 bp 的特异的细胞株. 虽然已有利用 CRISPR/Cas9 基因修饰技术, 将 CHO-K1 甲基化酶基因 DNMT3B 中第 1 个外显子上的一部分片段的基因敲除的报道^[12], 但是该文与本文的基因敲除靶点完全不同, 并且敲除的片段长度也不同, 因而有可能对细胞的染色质三维结构层面, 如开放染色质、染色质环、或染色质结构域^[21]等造成不同的影响, 导致获得基因敲除细胞的表观遗传背景可能完全不同. 另外, 不同甲基化背景的 CHO-K1 细胞经甲基化酶基因缺失后获得的细胞表观遗传背景也可能有差别. 由于不同的表观遗传背景差异, 不同的 DNMT3B 基因敲除的细胞系可能在筛选高效表达细胞系的潜质完全不相同. 因此, 本研究获得的 DNMT3B 基因特异位点敲除的特异细胞系仍然具有一定的创新性.

本研究所采用的 CRISPR/Cas9 方法在单克隆细胞的筛选上利用软琼脂法, 不同于与已有报道^[12-15]的 DNMT3B、DNMT3A 基因敲除研究中用到的流式分选或者 96 孔板稀释法. 流式分选法的

优点是省时省力, 但与其他单克隆筛选的方法相比, 费用较高, 并且有容易污染、细胞膜容易受损等缺点. 有限稀释法作为传统筛选方法, 优点是技术成熟、操作简单、成本较低^[22]; 缺点是单克隆得率低. 而软琼脂法操作简单、成本较低, 并且得到的单克隆细胞均质性更好, 但是生长环境完全不同于有限稀释法的 96 孔板, 因此对获得的细胞的表观遗传背景也可能产生不同的影响. 虽然获得的 DNMT3B 基因缺陷的单克隆细胞已经过严格的测序鉴定, 并且荧光分析结果显示单克隆较为均一, 但是, 仍然需要对其进行进一步鉴定, 并在后续应用于高效表达细胞筛选研究中对其表观遗传背景进行深入分析.

【参考文献】

- [1] JONES P A, LIANG G. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained [J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10 (11): 805 - 811.
- [2] LEWIS J, BIRD A. DNA methylation and chromatin structure [J]. *FEBS Lett*, 1991, 285 (2): 155 - 159.
- [3] HESSON L B, SLOANE M A, WOMG J W, et al. Altered promoter nucleosome positioning is an early event in gene silencing [J]. *Epigenetics*, 2014, 9 (10): 1422 - 1430.
- [4] DALLE B, RUBIN J E, ALKAN O, et al. eGFP reporter

- genes silence LCRbeta-globin transgene expression via CpG dinucleotides [J]. *Molecular Therapy*, 2005, 11 (4): 591–599.
- [5] RAN F A, HSU P D, WRIGHT J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system [J]. *Science*, 2013, 8 (11): 2281–2308.
- [6] ZHAN T Z, RINDTORFF N, BETGE J, et al. CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy [J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2018, 55: 106–119.
- [7] FUGUO J, JENNIFER A D. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms [J]. *Annual Review of Biophysics*, 2017, 46 (1): 505–529.
- [8] CUI Y B, XU J M, CHENG M X, et al. Review of CRISPR/Cas9 sgRNA design tools [J]. *Interdisciplinary Science (Computational Life Sciences)*, 2018, 10: 455–465.
- [9] XU X, HARISH N, NATHAN E L, et al. Genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line [J]. *Nature Biotechnol*, 2011, 29 (8): 735–741.
- [10] REINHART D, DAMJANOVIC L, KAISERMAYER C, et al. Bioprocessing of recombinant CHO-K1, CHO-DG44, and CHO-S: CHO expression hosts favor either mAb production or biomass synthesis [J]. *Biotechnology Journal*, 2018, 14 (3): 686–693.
- [11] ROSSER M P, WEI X, HARTSELL S, et al. Transient transfection of CHO-K1-S using serum-free medium in suspension: a rapid mammalian protein expression system [J]. *Protein Expression & Purification*, 2005, 40 (2): 237–243.
- [12] 贾岩龙, 王天云, 路江涛, 等. Dnmt3b 基因缺陷型的 CHO 细胞系及其制备方法、应用, 重组蛋白表达系统: CN110257340A [P]. 2019–09–20.
- [13] 张梦筱, 王佳贤, 朱建伟, 等. CHO 细胞中 DNMT3A 对 ATF3 基因甲基化的影响 [J]. *中国医药工业杂志*, 2020 (9): 1150–1157.
- [14] 王佳贤. 利用 Crispr/Cas9 技术在 CHO 细胞和 HEK293T 细胞中敲除 DNMT3a 基因及在 CHO 细胞中定点整合 CTLA4Ig 基因 [D]. 上海: 上海交通大学, 2016.
- [15] 付宇婷, 曹硕, 陈杨林, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术建立小鼠 Bdh2、Dnmt3a 和 Dusp9 敲除新型胚胎干细胞系 [J]. *内蒙古大学学报 (自然科学版)*, 2019, 50 (5): 501–512.
- [16] BANASZAK L G, GIUDICE V, ZHAO X, et al. Abnormal RNA splicing and genomic instability after induction of DNMT3A mutations by CRISPR/Cas9 gene editing [J]. *Blood Cells Molecules and Diseases*, 2018, 69: 10–22.
- [17] XU H, XIAO T F, CHEN CH, et al. Sequence determinants of improved CRISPR sgRNA design [J]. *Genome Research*, 2015, 25 (8): 1147–1157.
- [18] FU Y, SANDER J D, REYON D, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs [J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32 (3): 279–284.
- [19] MORENO-MATEOS M A, VEJNAR C E, BEAUDOIN J D, et al. CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo [J]. *Nature Methods*, 2015, 12 (10): 982–988.
- [20] 佛生福. BHK-21 悬浮细胞高密度克隆株的筛选及培养优化 [D]. 兰州: 西北民族大学, 2017.
- [21] 樊逸仙, 杭晓弈, 何西森. 影响染色体三维结构的主要因素及其研究进展 [J]. *中国科学 (生命科学)*, 2020, 50 (5): 465–483.
- [22] 张荣红, 贾铁文, 何志旭, 等. 有限稀释法制备 RecQ 解旋酶单克隆抗体 1C1 及鉴定 [J]. *贵州医科大学学报*, 2019, 44 (2): 12–17.

