

基因编辑荧光报告系统的建立

摘要

随着基因编辑技术的发展，特别是近年来 CRISPR/Cas9 技术的出现，使基因编辑技术简便易行，从而为重大疾病的基因治疗和细胞治疗提供了一个新的技术突破点。但是基因编辑在基因组不同位点效率不同，为我们基因治疗造成一定困难。针对这个问题，我们拟设计一个基因编辑荧光报告系统，通过荧光表达效率来评价基因编辑效率。首先，我们构建了 piggybac 转座子为基础的 PB-CAG-puro-T-sfGFP 荧光报告载体，puro 为筛选基因，T 为基因编辑的 Target 序列，sfGFP 是绿色荧光基因。Target 位点和 sfGFP 基因之间是终止密码。然后，我们将报告载体转染到 293T 细胞中，利用嘌呤霉素我们筛选获得了染色体整合报告载体的 293T 细胞，并通过进一步测序证实这些细胞具有 CAGpuro-T-sfGFP 序列，由于 target 序列后有终止密码，绿色荧光基因无法表达，只有通过基因编辑实现密码子移码才会表达绿色荧光。最后，为了验证我们的基因编辑荧光报告系统的有效性，我们针对 Target 位点序列设计了 CRISPR/Cas9 基因编辑质粒，并转染到报告细胞中，观察到大量细胞表达了绿色荧光，表明基因编辑导致 Target 位点序列移码，实现了绿色荧光基因的表达。通过本课题研究，我们成果建立了一套有效的基因编辑荧光报告系统，实现了基因编辑的实时的直观的观测，为基因编辑研究以及制作基因重组细胞和动物提供了有用的工具。

关键词：CRISPR/Cas9 技术, 基因敲除, 荧光报告系统, 293T 细胞

第 1 章 文献综述

1.1 基因编辑技术发展现状

基因编辑 (Gene editing), 也称基因组工程, 近年来, 通过开发诸如锌指核酶 (ZFN)、转录激活器样效应器核糖核酸酶 (TALEN)、巨型核素酶 (MNs), 以及与 CRISPR 相关蛋白质 (CRISPR/Cas) 组合的 CRISPR 等工具, 让精确改变人类基因的能力成为可能。通过产生有针对性的删除, 插入, 基因敲出和点变异, 或瞄准和修改 RNA, 将转录因子或表观遗传机制定位到 DNA 来调节基因表达。内源修复机制用于对 DNA 进行必要的修饰。它们包括非同源端连接、同源定向修复、同源独立目标整合、微同源介导端连接、位点修复和不匹配修复。

基因编辑技术的临床开发正在多个领域取得进展, 包括癌症治疗的免疫疗法、艾滋病毒感染的抗病毒治疗以及治疗遗传性疾病, 如 β -地中海贫血、刀状细胞疾病、溶酶体储存障碍和视网膜营养不良。其巨大的潜力将会继续做出贡献。

1.2 基因编辑技术的方法

1.2.1 同源重组

同源重组允许两种相同或几乎完全相同的序列组成 DNA 分子之间互相传递遗传信息，是修复双链 DNA 断裂的主要途径，也是进化的主要驱动力。同源重组的一个关键方面是重组蛋白质的能力，用以完全对齐受损的 DNA 与位于基因组其他地方的同源序列。这种反应被称为同源搜索，类似于许多不同的 DNA 结合蛋白进行的目标搜索。这种方法的缺点是效率太低，失误率高。

1.2.2 核酸酶

基因组编辑取决于在基因组中产生特定的预先设计的改变的能力。引发双链断裂 (DSBs)、单链断裂 (也称为“刻痕”) 或特定基数变化导致内源修复机制的激活，可用于改变基因组。用于基因编辑的四种核酸酶分别是巨核酸酶 (Meganuclease)、锌指核酸酶 (ZFNs)、转录激活样效应因子核酸酶 (TALEN) 和聚集的规则间隔短回文重复序列 (CRISPR/Cas9) 系统[1]。MNs、ZFN 和 TALENs 是哺乳动物细胞中基因组编辑的第一批工具。MN 是自然发生的内核，可以重新定位到新位点。与 ZFN 和 TALENs 的基因编辑结果来自 FokI 核酶域与锌指核酸酶 DNA 结合模块 (在 ZFN 的情况下)，转录激活样效应因子 (TALEs) 在 TALENs 的情况下融合。总的来说，这些基因编辑工具的设计和构造可以是结合起来应用的，它们执行基因编辑的效率也各不相同。

1) 锌指核酸酶

作为可编程 DNA 的原型平台，锌指核糖核酸酶 (ZFN) 在基因组编辑的研发运用中作主要支撑。ZFN 有锌指蛋白 (ZFPs) 和 FokI 限制酶两个可分离 DNA 结合域和非特定域的两部分结构。研究发现 ZFN 可以诱导 DSB，与细胞同源重组有关联。ZFN 首先确立了对包括人类细胞在内的哺乳动物细胞的定制位置进行有针对性的修改是可能的，从而引发了基因组工程。

2) 转录激活样效应因子核酸酶

转录激活器般的效应体核酶 (TALENs) 是面对不同细胞类型和生物体进行定向基因组编辑的有力工具。它包括一个 TaleDNA 结合区域和一个 FokI 限制内核糖核酸区域。与 Tale 蛋白结合的 DNA 由 TALA 重复单元的基因阵列指定一个 DNA 碱基对进行中介，每个单元由 33 至 35 个碱基对组成。重复性高度相同，但位置 12 和 13 处的重复可变二残留 (RVD) 除外，这些位置可识别目标 DNA 序列。然而，高度相同的 TaleL 重复序列使得使用传统的克隆方法组装 TALEs 变得具有挑战性，并且一个质粒中的多次重复很容易被催化为细菌的同源重组。虽然 TALE 装配方法不断改进，但由于组装步骤费力或模块库庞大，这些方法并不方便，限制了其广泛的效用。

3) CRISPR/Cas 系统

CRISPR/Cas 作为一个新的基因编辑平台被发现，为科研引进了一种快速、廉价和相对高效的基因组编辑方法，彻底改变了基因组工程。

CRISPR/Cas 的机制基于其在原核生物中自适应免疫的作用。短段入侵的外来核酸，即所谓的原体，被纳入细菌或原基因组的 CRISPR 轨迹。纳入后，CRISPR RNA (crRNA) 由 CRISPR 轨迹的原空间生成。这种 crRNA 可以结合互补的外来核酸，并指示 Cas 蛋白识别入侵序列。第二个 RNA 称为转激活 CRISPR RNA (跟踪 RNA)，从 CRISPR 轨迹上游的基因组轨迹转录，并与 crRNA 形成复合体。crRNA:tracrRNA 复合物与 Cas 蛋白 (核糖核酸) 相关联，并创建一个活性核蛋白 (RNP) 复合物，针对外来核酸的降解。

对于基因组编辑，跟踪 RNA 和 crRNA 融合成一个单一的导引 RNA (sgRNA)，它与 DNA 目标互补结合，并将 Cas 蛋白引导到所需的靶点，创建 DSB。PAM 序列的存在，是 Cas 蛋白诱导 DSB 的决定条件。关于 CRISPR 阵列的第一批出版物可追溯到 1987 年，Cas 基因于 2002 年被发现，CRISPR/Cas 于 2010 年在特定地点体内切开噬菌体和质粒 DNA。然而，直到 2012 年，两组才将这个系统改编成基因编辑工具。

因其普遍性和相对较低的成本，CRISPR/Cas 在全球的研究中获得了大量应用，并推动了进一步研究了解其行动机制、提高其功能能力和扩大其生物学应用。早期使用的 CRISPR/Cas9 系统特异性更低，基因序列相对较大，容易脱靶。针对脱靶情况，许多创新性研究已经产生了许多适应原始系统，大大提高其多功能性和提高特性，如特异性和有效性。

根据 Cas 基因和识别机制及 crRNA 加工方式的不同，可将 CRISPR/Cas 系统区分为 4 种类型，对 Type I, Type II, Type III 三个系统的研究较为深[2]。

1.3 CRISPR/Cas9 在生物学上的应用

CRISPR/Cas 系统可以编程为在各种物种中切割宿主 DNA，从而使基因编辑能够用于多种生物学应用。基因编辑技术的临床开发正在多个领域取得进展，包括癌症治疗的免疫疗法、艾滋病毒感染的抗病毒治疗以及治疗遗传性疾病，如 β -地中海贫血、刀状细胞疾病、溶酶体储存障碍和视网膜营养不良。在很多情况下需要对家养动物进行精确的基因组修饰，在过去只有通过漫长而繁重的克隆程序来得到，现在我们可以用最新的基因编辑工具 CRISPR/Cas9 来实现这个目标[3]。由于核酶只是诱导 DNA 断裂，因此引入遗传密码的具体改动需要利用独特的 DNA 修复机制。原始基因组编辑工具的智能工程拓宽了该工具包的范围，使大量应用成为可能。因此，CRISPR/Cas 可以应用于基因表达过程的多个步骤的干扰，并可以在基因组和转录水平上定位过程。

1.3.1 目的基因的制备

- 1) 直接从细胞核分离
- 2) 人工体外合成

3) 限制性内切酶酶解

当 DNA 序列列末尾有粘性时，可以把目标 DNA 和载体 DNA 片段组合在一起，使粘性末端产生。具有特异性识别的 II 型限制性内切酶可以使出现两种 DNA 末端。

4) 用逆转录酶制备 cDNA

总的来说，目的基因片段的获取是可以利用逆转录 DNA 来制取。以 RNA 为模板，可以得到序列。使用寡聚 dT 纤维素柱分离 mRNA。将 12-18 DT 的寡 dT 片段作为适当的起始引物组合在 PolyA 尾巴上，在逆转录酶的作用下靶基因的第一条 cDNA 链。第二条 cDNA 链用 Base 除去 mRNA 后，以 DNA 聚合酶决定 Klenow 片段。双链合成后，割开发夹结构即得。

1.3.2 基因敲除

基因敲除(knock out, KO)是基因编辑工具的一个重要功能，可以实现基因组 DNA 特异片段的删除，进而导致目标基因的失活或激活等[4]。

用基因编辑工具抑制异常表达的基因或敲除突变基因的特定区域是基因治疗遗传病的一个主要策略。从大势来看，有三种类型的基因敲除疗法。第一个是完全的基因敲除。第二种是对基因的一些功能区（如增强子区）进行敲除。第三种是敲除杂合子中的显性突变基因。这三种基因敲除已被应用于各种疾病研究，可以扩展出多方面研究内容。

同源定向修复，由于使用供体模板，HDR 是一种非常精确的修复路径，比 NHEJ 更不容易出错。然而，HDR 在细胞中的活跃度较低，因此在基因组编辑方面比 NHEJ 效率低得多，这限制了其临床潜力。为了有利于其激活而不是 NHEJ 感应，必须提高其效率。

同源独立目标集成（HITI）的技术，类似的，我们在 NHEJ 方面也可以利用该技术创建敲除。在将含有 CRISPR 靶点侧翼的所需转基因的供体载体引入细胞后，供体载体和基因组目标被 Cas9 切割，在基因组靶点和供体载体上产生钝端。这些钝端诱导 NHEJ 介导的端到端结，允许将供体序列集成到目标位置。由于 NHEJ 的活性高于 HDR，因此此方法可以更有效，可用于非分体细胞类型，因为 NHEJ 在细胞周期的所有阶段仍然处于活动状态。几个缺点限制了 NHEJ 调解的敲除的临床潜力。首先，转基因入一个随机的方向。其次，由于 CRISPR/Cas9 系统的潜在非目标效应，使用供体模板可能导致此模板的非特定插入。最后，NHEJ 可以引入随机的碱基，可能会破坏目标位置。然而，巧妙的矢量设计和目标选址可以最大限度地减少非特定插入和插入在错误的方向

在 NHEJ 和 HDR 路径之外，已经出现新的 DNA 修复途径，微同位介导端加入（MMEJ）。在 MMEJ 中，在两条 DNA 链上，DSB 站点的上下游都可以导致微结构退火。具有微溶血症的 DSB 可能导致微溶血症的退化和 MMEJ 的后续修复，这可能导致短删除。该途径已用于整合想要获得的基因，通过使用精确集成到目标染色体（PITCh）系统在培养细胞，斑马鱼，蚕和青蛙。据报道，敲击效率是 HR 辅助基因敲击的 2.5 倍，并且细胞周期的所有阶段都有活动，这一途径为细胞周期的不同阶段提供了更有效靶向基因敲击的可能性。还需要做进一步的工作，以证明 MMEJ 调解的精确基因组编辑敲击的适用性和可行性。

1.4 报告基因

1.4.1 报告基因的概念

从分子生物学中，报告基因概念被提出来。它是指在某些情况下在细胞，组织和器官中发现的一组遗传因子，这些遗传因子很容易被鉴定并以非生产性形式在实验材料中产生。总的来说，报告基因有几个特点：

- 1) 它被克隆和已经确定全部序列；
- 2) 在其他方法中没有在复合细胞中发现该产物，即转化的细胞没有相同的内源表达产物；
- 3) 能定量测量该表达产物是必需的。

1.4.2 报告基因的应用

前瞻性基因筛查被证明是强大和公正的解剖生物和识别其基础基因和调控的工具。起初它应用在植物基因的调控中，但在已被到发展为真核生物的一种重要的基因的调控手段。

荧光蛋白（FPs）是一种同源类蛋白质，含有铬酚，由三种氨基酸组成，在其多肽内，在发射时产生可见光波长。作为一个常见的研究过程，编码工程的 FPs 基因被引入活细胞，使用荧光显微镜来追踪基因产物的位置及其动力学。对于涉及 FPs 的成功实验，应满足几个标准：FP 应有效表达，同时不对细胞造成毒性，信号也应足够强，远远高于自动荧光水平，在实验期间应有足够的稳定性，最终不受环境影响。如果 FP 被用作融合蛋白，它不应该被寡聚。

1.4.3 绿色荧光蛋白

绿色荧光蛋白（GFP）是西村等人首次发现的 FP 之一，是一种由水母产生的化疗乙基蛋白的伴生蛋白。在过去的

20 年里，GFP 已经从一种基本上不为人知的蛋白质推广成为分子生物学、生物化学和制药生物技术中常用的工具。

GFP 基因于 1992 年首次测序。GFP 是一个 11 链的 β 桶，由 α 螺旋螺旋和圆柱体的轴构成，色谱连接到 α 螺旋几乎完全埋在圆柱体的中心，称为 β 罐。研究发现，GFP 对热、碱性 pH、有机和热带

盐、洗涤剂、嘌呤霉素和许多蛋白酶具有抗药性。在无细胞体外翻译系统中，GFP 可以以足够的效率表达，这证实了蛋白质能够自主折叠的事实。当下，GFP 适用在大多数生物体中。它是广泛用作细菌、转基因植物、真菌和哺乳动物的实时分子和细胞分析工具。GFP 现在被认为是一个重要的标志。作为一般方法，GFP 基因与目标追踪基因融合在一起，在表达时可以使用荧光显微镜检测到。GFP 基本不会影响蛋白质的活动或流动性，一般不是有毒的，除非在极少数情况下用了高浓度 GFP。GFP 已成功地用于指示蛋白酶作用、转录因子、钙敏感性和对生物体中基因表达的定量监测。然而，到目前为止，在 GFP 中已经发现了几个缺陷：信号可能被背景荧光效应所混淆，特别是如果它不是密集的部位或高度表达，色谱形成在转化后慢慢发生，需要氧气。绿色荧光蛋白（GFP）作为报告基因，在生物化学和细胞生物学中发挥了重要作用。它已用于评估促进剂对重组蛋白生产的效力。

在一般基因转移的定性探讨中，已知 GFP 报告基因具有高敏感度、可靠性及监测的动力学范围、不易变性的优点，被科研人员频频用在了高通量筛选上

1.5 抗药性基因

病原体具有共同的生物特征，它们能够在极端选择性压力（例如由药物强加）下，在可观察到的较短时间快速适应。它们的体积大、突变率高、生成时间短的病原体种群可能在短时间内产生耐药性突变。病原体还包括各种各样的生物，包括真核生物、原核生物和病毒。抗药性基因（Drug-resistance gene），使有机体或细胞对药物产生抗药性的基因，能在大多数突变微生物的质粒 DNA 中编码抗药性产物的基因。通过细胞膜传输 DNA 的实际方法包括转化、转导和结合。转化是将 DNA 吸收到细胞中，通常由具有某种 DNA 特异性的膜蛋白进行介导。这是一种仅限于进化到吸收 DNA 的物种的方法[6]。一种著名的结合方法是大肠杆菌共聚质粒，它编码为细胞接触的细胞结构（称为“pili”），以及机械将 DNA 注入受体细胞。

1.6 CRISPR/CAS9 联合转座子技术在外源 DNA 整合中应用

1.6.1 转座子

转座子是作为基因组可以自我复制的移动基因序列[7]。它们非常有效地突变了許多基因组，并占据了人类至少一半基因组。转位器含有 TFBS，其插入已被证明影响报告基因测定中附近基因的表达。一般情况下，哺乳动物基因组中的许多增强剂被认为来自转座子。由于几乎可以定位任何相对于其目标基因的地方，它们的识别和特征具有挑战性。

转座调控分为非复制型转座和复制型转座两种[8]。

由于人类的跳跃基因通常是沉默的。因为其中的指令很难被细胞读懂，科学家用细胞愿意接受的指令取代了这些跳跃基因的指令，创造了一个非常活跃的人工跳跃基因。

反映移动 DNA 整合的重复基因片段在各种生物体中占基因组的很大一部分。移动 DNA 在基因组中的比例在物种之间变化很大，每个真核生物都有最近的活跃可转位元素（TEs）的特定补充。因此，转座子是区分相关物种的关键遗传特征。

人类也不例外。像大多数其他哺乳动物一样，我们的基因组排列反映了被称为 I 类可转移元素的逆转录病毒的悠久活动历史。这些元素通过复制和粘贴机制复制，产生 mRNA 样中间体，由元素编码酶反向转录。相比之下，II 类 DNA 转位采用复制粘贴机制，将 DNA 片段从一个位置直接移动到另一个位置。虽然 DNA 转座子在人类中并不活跃，但一个选择的 DNA 切割和粘贴系统参与重组事件，产生淋巴细胞抗原结合多样性。在目前的基因组组装中，大约 45% 的 DNA 可以识别为具有与逆转录量的共识序列的同源性片段。一种新的计算方法依赖于对富集寡核苷酸的无核识别，它识别了在数亿年的脊椎动物进化过程中积累的许多较小的元素片段，并估计重复的元素几乎占我们总基因组的三分之二，逆转录病毒对人类基因组的真正贡献可能要大得多。

1.6.2 PB 转座子与基因编辑技术

PB 转座子与基因编辑技术的结合可以提高外源 DNA 靶向整合效率，研究至今，PB 转座子和 CRISPR/Cas9 相结合使用，实现了对人诱导多能干细胞的靶向整合[9]。

转座子有两部分系统，由具有 CAR 的质粒（转座子）以及具有转座酶的另一质粒组成。第一步，这两种成分在外周血单核细胞（PBMC）中进行电穿孔，表达的转座酶作用于 CAR 两侧的反向末端重复序列（TIR），裂解 RAC（转座子）和 CAR（转座子）。然后整合到靶细胞基因组的 TA 二核苷酸序列中。经过转座和稳定的基因组整合后，CAR 蛋白在 T 细胞表面表达，临床上通常会在电穿孔后 3 至 4 周内产生足够数量的 CAR-T 细胞，迄今为止，在对临床恶性肿瘤的治疗方面检测其安全性和有效性。

1.7 本课题的研究意义

CRISPR/Cas9 系统更新速度很快，使用该系统的治疗方法不断提升。在临床测试的时候，要评估优势，重要的是要保持谨慎，以防范可能的风险。为了充分了解涉及精确基因组工程的潜在新疗法的长期影响，需要进行彻底的预科工作。但在实际情况中，检测基因编辑的效率的高效方法还没有被研究出来，我们建立高效普遍的筛选系统能成为非常有用的工具。如果有荧光蛋白表达的可视化筛选，它可以提高筛选效率，并开发出一种新的策略来显着提高同源重组的效率[10]。实现了基因编辑的及时的直观的观测。本系统可用于多种基因编辑系统的验证，为基因编辑系统更好地为科研、以及临床服务提供了一个好的评价体系构建的基因编辑报告系统可以通过荧光的表达来检测现在常用的基因编辑系统的有效性，效率高，应用前景广阔。

第2章 实验材料与试剂

2.1 主要实验仪器

- 1 电子天平, 昆山优科维特电子科技有限公司
- 1 生物安全柜
- 1 家用电冰箱, 美的集团
- 1 药品阴凉/冷藏柜 (2~20℃), 博兴县昕雪尔制冷设备有限公司
- 1 医用低温箱 MDF-548D (-40~-20℃), 松下冷链 (大连) 有限公司
- 1 多用途水平电泳槽, 韦克斯科技 (北京) 有限公司
- 1 电热恒温水槽, 上海一恒科技有限公司
- 1 细胞冻存盒, KEMESSER TECHNOLOGY
- 1 PCR 扩增仪, Analytik Jena
- 1 高速冷冻离心机, 贝克曼库尔特 (美国) 股份有限公司
- 1 凝胶成像系统, Azure Biosystems, Inc
- 1 超微量分光光度仪, 五邑大学资产
- 1 低速离心机, 安徽中科中佳科学仪器有限公司
- 1 金属浴, 卡尤迪生物科技 (北京) 有限公司
- 1 迷你混合仪, 杭州米欧仪器有限公司
- 1 切胶仪, 杭州米欧仪器有限公司
- 1 洁净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司
- 1 摇床, Analytik Jena
- 1 荧光显微镜, ECHO
- 1 二氧化碳培养箱, ESCO
- 1 超低温冰箱, PHcbi

2.2 实验耗材

- 1 烧杯
- 1 量筒
- 1 细菌培养皿
- 1 接种环
- 1 涂布棒
- 1 冻存管
- 1 冻存盒
- 1 11.5ml 离心管
- 1 2ml 离心管
- 1 15ml 离心管
- 1 50 ml 离心管
- 1 PCR 反应管
- 1 移液枪
- 1 移液器
- 1 枪头、巴氏吸管
- 1 14 孔板、6 孔板、24 孔板
- 1 培养皿

2.3 主要试剂及试剂盒

- 1 质粒小提试剂盒 (TIANGEN)
- 1 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (TIANGEN)

1 DNA marker DL2000、DL15000

- 1 琼脂糖

1 Loading buffer

- 1 限制性内切酶 Q.Cut Xba I、Q.Cut Hind III
- 1 Trans1-T1 (Code#CD501、Lot#02561018)
- 1 10.05% 胰酶消化液 BS
- 1 75% 酒精

2.4 主要溶液配制

1) LB 液体培养基的配制

表 2.4 (1) LB 液体培养基

组份	重量
胰化蛋白胨	10g
NaCl	10g

酵母提取物

5g

用超纯水溶解上述物品，混匀，定容至 1L。设定 121℃20min 灭菌。室温冷却，加入 1ml 氨苄霉素或卡那霉素

(0.1%)，于 4℃ 保存备用。

1) LB 固体培养基的配制

表 2.4 (2) LB 固体培养基

组份 重量

胰化蛋白胨 (Tryptone) 10g

NaCl 10g

酵母提取物 (Yeast Extract) 5g 琼脂 (Agar) 15g

用超纯水溶解上述物品，混匀，定容至 1L。设定 121℃，20min 高压灭菌，室温冷却约 60 摄氏度，加入 1ml 氨苄霉素或卡那霉素(0.1%)，转入培养皿。冷却凝固后于 4℃ 保存备用。

2) 细胞冻存液的配制

表 2.4 (3) 细胞冻存液

组份 总量

FBS 9ml

DMSO 1ml

按比例配置上述成分，并于 0.22um 滤膜过滤，现配现用。

第 3 章 实验方法

2.1 DNA 琼脂糖凝胶电泳及片段回收

3.1.1 DNA 琼脂糖凝胶电泳

1) 配胶: 一般情况下, 我们会用到 70 毫升制备大胶, 50 毫升制备小胶。取一个锥形瓶中, 向里面加入称取好的 0.7 克/0.5 克的琼脂糖和 70 ml (50ml) 1×TAE, 用锡纸封住锥形瓶口。微波炉加热, 大约 1 分钟之后琼脂糖全部溶化。

带隔热手套取出摇匀, 防止烫伤。所得即为 1%的琼脂糖凝胶液。

2) 制备胶板: 清洗电泳槽中的制胶槽, 放入制胶玻璃盘中。检查内槽是否水平放置, 如果没有水平放好的话, 会影响胶板的效果。然后将梳子按固定位置卡紧。把室温放凉琼脂糖凝胶溶液缓慢小心倒入内槽玻璃板中。注意角度方向, 用均匀的力度使得凝胶溶液铺在玻璃板表面。在室温冷底下, 等到凝胶全部固化为止。轻轻垂直向上取出梳子, 检查溢胶的情况。成功的胶板是软硬适中, 表面凝胶层均匀, 较为光滑。把凝胶和玻璃盘放入电泳仪中。用

1×TAE 电泳缓冲液浸过胶板上方。 3) 加样: 将需要检测的基因片段记录好编号, 对检测的样品按和 marker 要求使用 Loading buffer 混匀, 并且

Loading buffer 的稀释倍数不得小于 1X。使用 10 μ l 的移液枪把混合液缓慢注入到胶板的上样孔内。记得一个枪头配一个样品, 免得被污染。获得准确的数据, 注意上样时不要戳到上样孔周围的凝胶面。

4) 电泳: 等待片刻, 待样品溶剂与 Loading buffer 沉着在孔底后, 对其通电进行电泳。当观察到液面有细腻均匀泡沫溢出, 即为通电正常。通常使用 140V 电压。样品由负极向正极方向移动。观察电泳进程, 一般情况下, 指示剂跑到约 1/3 处时, 条带基本可以分离, 这时就可以停止电泳。

5) 照胶观察: 在凝胶电泳成像仪的紫外光下, 我们可以看到荧光条带, 即为 DNA 存在的象征, 荧光越强, DNA 聚集信号越强。最后使用凝胶成像系统拍照存档。

3.1.2 琼脂糖凝胶电泳片段回收采用 TIANGEN 琼脂糖凝胶回收试剂盒进行片段回收

1) 在紫外照胶仪的紫外灯照下, 切取在 3.1.1 中得到目的 DNA 条带, 使得选取的胶块约重 0.1g。把切取下来的片段继续加工成小块, 放入离心管中。

2) 柱平衡: 取出配套的吸附柱 CA2 和收集管, 用移液枪加 500 μ l 平衡液 BL 在吸附柱 CA2 中, 在超高速离心机中按

12,000 rpm 的转速进行离心 45 秒。拿出, 弃去收集管中的废液, 重新把吸附柱放回收集管。

3) 溶解凝胶: 称量胶块的重量, 按比例 1:1 的比例向装有胶块的收集管加 PN 溶液。设置五十摄氏度金属浴, 把离心管放在金属浴中加热, 等待琼脂糖凝胶溶解。观察凝胶溶解状态, 不时拿出收集管摇匀, 提高凝胶溶解的效率。

如果较长时间凝胶未溶解完全, 可继续添加加 PN 溶液, 直到胶块完全溶解。

4)取出凝胶溶液，加到平衡后的吸附柱 CA2 中，设定 12,000 rpm 离心 45 秒。弃去废液，重新放回收集管。

5)把漂洗液 PW，在使用前检查是否已加入无水乙醇，600 μ l 加入吸附柱 CA2 中，12,000 rpm 离心 45 秒。弃去废液，放回收集管。

6)空离：把漂洗后的吸附柱放在收集管，设定 12,000 rpm 空离 2 分钟，去除漂洗液，不要让漂洗液破坏样品影响数据采集。

7)放入取出新的洁净离心管，放入吸附柱。滴加适量 EB 或者超纯净水在吸附柱中间的膜处，注意控制悬空滴加，切忌碰到膜。设定 12,000 rpm 离心 2 分钟，所得收集管中 DNA 溶液。检测浓度，记录数据。

3.2 细胞转化感受态转化

1)准备冰盒，按照慢冻快融的原则，把感受态细胞 TOP10 放在冰盒中冰浴慢溶。

2)向 1.5ml 离心管加入 10 μ l 目的 DNA 以及 50 μ l 感受态，轻轻摇晃使混合均匀。放回冰盒，静置冰浴 30 分钟。

3)取灭菌密封的冷藏氨苄固体培养基置于 37 $^{\circ}$ C 摇床中预热 30 分钟。

4)准备无菌操作台，开启紫外灯照射灭菌 30 分钟。

5)设定 42 $^{\circ}$ C 金属浴，离心管中的混合物冰浴结束后，热激 30 秒。迅速把离心管放回冰盒，计时冰浴 2 分钟。

6)操作人员开始操作前对手部喷洒 75%酒精消毒。拉开操作台通风橱玻璃门，不要拉太高，预留手臂进出高度即可。点燃酒精灯，对涂布棒进行灼烧灭菌。放置晾凉。在固体培养基外表标注好日期、内容物等信息。

7)平板涂布：按五点法，用移液枪均匀滴加离心管内的菌液在培养基上。用放凉的涂布棒涂匀至菌液晾干。倒置培养基放入培养箱，消毒操作台。

8)约 8 小时后，可见固体培养基表面有单克隆菌落形成。

3.3 重组质粒的提取

1)消毒双手及操作台，取 15ml 离心管 6 个，分别倒入 3~4ml 氨苄 LB 液体培养基。观察标记长势良好的 6 个单克隆菌落。消毒镊子，用小枪头轻蹭挑取。立刻投入装有液体培养基的离心管中。对 6 个离心管进行标号，放入 37 $^{\circ}$ C 的震荡培养箱中。操作完成后，用酒精消毒操作台，紫外灯照灭菌。等待 8 小时以上，菌液浑浊。

2)使用 TIANGEN 质粒小提试剂盒。

3)取出摇菌结束的浑浊菌液，取约 2ml 菌液于 2ml 离心管中，设定 12,000rpm 离心 1 分钟，尽量使上清液清澈无沉淀，除去上清液。

4)离心管中会有淡黄色菌体沉淀。滴加 250 μ l 溶液 P1，在涡旋振荡器上振荡，以达到溶液重新浑浊的目的，即为菌粒充分分散开。

5)加入 250 μ l 溶液 P2 在浑浊溶液中。轻轻地上下翻转 7 次，使菌体裂解。

6)继续添加 350 μ l 溶液 P3。立即温柔地上下翻转 7 次。我们可以看到出现了白色絮状沉淀，这样即表示充分混匀。设定 12,000rpm 离心 4 分钟。

7)取出配套的吸附柱 CP3 和收集管。设定 12,000rpm 离心 45 秒，用 500 μ l 平衡液 BL 平衡柱子。弃去废液。

8)吸取离心管中的上清液至吸附柱 CP3 中，12,000rpm 离心 45 秒。

9)取出漂洗液 PW，在使用前检查是否已加了无水乙醇，加 600 μ l 在吸附柱 CP3 中，12,000 rpm 离心 45 秒。弃去废液，放回收集管。

10)空离：把漂洗后的吸附柱放在收集管，设定 12,000 rpm 空离 2 分钟，达到除尽漂洗液的目的，防止还有未晾干的漂洗液对下一步实验产生影响。取出新的洁净离心管，放入吸附柱。加 30 μ l EB，超纯净水在吸附柱中间的膜处，注意控制悬空滴加，不要让枪头碰到膜。设定 12,000 rpm 离心 2 分钟，所得收集管中 DNA 溶液。检测浓度，记录数据。

11)集得质粒溶液，做好标记，4 $^{\circ}$ C 保存备用，如需长期使用，于-20 $^{\circ}$ C 保存。

3.4 细胞冻存

1)冻存培养液为 10%DMSO 与 10~20% FBS。

2)首先，获取培养增殖良好的细胞。我们用移液枪移走之前的培养液，用 PBS 把培养基清洗干净。

3)用移液枪吸走 PBS。在 37 $^{\circ}$ C 的二氧化碳培养箱，为了使细胞不再继续贴壁增殖，用适量 0.05% 的胰蛋白酶消化 3 分钟取出，这样就会得到漂浮在试液中的细胞。

4)弃去胰蛋白酶。需调节细胞的密度，为了防止细胞过度密集，不宜于后期使用，让它处在 $5 \times 10^6/\text{ml} \sim 1 \times 10^7/\text{ml}$ 的区间。调节操作在混合有培养液的冻存液中完成。

5)分装入冻存管，每管 1~1.5 ml。记录好细胞种类、时间等信息。

6)冻存：根据实际的条件设备，我们将上述冻存管以先放在实验室-20 $^{\circ}$ C 冰箱 2 小时，再转入-80 $^{\circ}$ C 冰箱的方式作为进行长期的使用储藏的方法。

3.5 239T 细胞的复苏

1)首先在-80℃的超低温冰箱里面拿出冻存的细胞，设置 37℃水浴锅中，按照慢冻快融的原则，快速升高温度加速细胞融化的速率，防止形成冰晶。

2)准备 15 ml 离心管，装进融化好的细胞液 293T 培养基。

3)800×g 室温离心 3 分钟，弃上清。

4)加入 8 ml 新鲜 293T 培养基，用巴氏吸管上下轻轻吹打混匀。

5)准备无菌培养皿，装入上述细胞悬液。37℃，5% 二氧化碳培养箱中培养。

6)当细胞培养至汇合度约 50%进行传代分盘，以确保维持其高滴度生产能力。

7)我们用移液枪移走之前的培养液，用 PBS 把培养基清洗干净。

8)用移液枪吸走 PBS。在 37℃的二氧化碳培养箱，为了使细胞不再继续贴壁增殖，用适量 0.05% 的胰蛋白酶消化 3 分钟取出，这样就会得到漂浮在试液中的细胞。

9)为了不让细胞继续消化，就要加入培养基。当消化结束后，把细胞连同培养基置于 15 ml 离心管中，设定

800×g，离心 5 分钟。

10)离心后，弃去上层澄清液体，需要的细胞就会沉淀在离心管底部，这时，要让细胞重新悬浮起来，因此向离心管内加 1 毫升培养，用巴氏吸管轻轻吹打混匀，通过这些操作，可以得到密度为 4×10^6 的细胞悬浊液。接种在有适量培养基培养皿中，放回 37℃，5% 二氧化碳培养箱培养。

3.6 细胞传代

1)将 293T 细胞复苏培养，用移液枪弃去旧培养基，沿板孔壁缓慢滴加 150 μ l PBS 清洗细胞，吸走清洗后的废液。

2)加入 0.05%胰酶消化液，放入 37℃二氧化碳培养箱中 3 分钟。取出，滴加 1500 μ l 培养基，使细胞被冲悬起来。

3)选定 6 孔板的 2 个板孔，做好标记，填写细胞种类、日期等信息，把细胞培养基混合液平均加入内。置于 37℃ 二氧化碳培养箱内培养。

4)隔天对培养基进行换液。约 7 天细胞可对细胞传代第 4 章 实验步骤

4.1 PB-CAG-puro-T-stGFP 载体构建

4.1.1 PB-CAG 载体酶切

1)在 PCR 反应管中，按比例配制体系

表 4.1.1 PB-CAG 载体酶切体系

组分

体积

质粒	1 μ l	5 μ l EcoR I
HindIII		1 μ l
Buffer		3 μ l
水		21 μ l
总计		30 μ l

2) 置于 PCR 扩增仪中, 37°C, 孵育 2 小时

3) 反应产物用凝胶电泳按 3.1 方法回收获得, 得 DNA 载体。

4.1.2 扩增 puro

1) 合成引物

puro-1: gtctcatcattttggcaaagaattcgccaccatgaccgagtacaagccca

puro-2: ACTGAGGATGggatccccaccgctgccacctccggcaccgggcttgcgggtc

2) 在 PCR 反应管中, 按比例配制 PCR 反应体系表 4.1.2 (1) PCR 体系

组分	体积
质粒	0.5 μ l
puro-1	0.5 μ l
puro-2	0.5 μ l
MAX 酶	10 μ l
水	21 μ l
总计	20 μ l

3) 将上述反应液于 PCR 扩增仪中, 按表 4.1.2 (2) 反应条件进行扩增表 4.1.2 (2) PCR 扩增设定

步骤	温度	时间
预变性	98°C	30s
变性	98°C	10s
退火	58°C	10s
延伸	72°C	10s

go to step 2 for 30 cycles	72°C	1min
保存	16°C	forever

4) 产物回收, 将反应产物用凝胶电泳法按 3.1 方法回收。

4.1.3 扩增突变型 stGFP

1) 合成引物

Sfgm-1: ggggatccCATCCTCAGTACTCCGGTCTACCTggATgccctggtctctcgGGCAA Sfgm-2:

gCACCTTCCTCTTTTTCTTAGGGGATCCttcGTCAGTTAcTGTTTCGATGGTCCTCCCAGTTGCCcgagaccagggc

Sfgm-3: CCCTAAGAAAAAGAGGAAGGTGc

Sfgm-4: gaggctgatcagcgagcaagcttatttgtacagttcatccat

2) 在 PCR 反应管中, 按比例配制 PCR 反应体系

表 4.1.3 (1) PCR 反应体系 1

组分	体积
质粒	0.5 μl
Sfgm-1	0.5 μl
Sfgm-2	0.5 μl
MAX 酶	10 μl
水	8.5 μl
总计	20 μl

表 4.1.3 (2) PCR 反应体系 2

组分	体积 (μl)
质粒	0.5
Sfgm-3	0.5
Sfgm-4	0.5
MAX 酶	10

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/868140033032006143>