



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108624622 A

(43)申请公布日 2018.10.09

(21)申请号 201810467123.4

(22)申请日 2018.05.16

(71)申请人 湖南艾佳生物科技股份有限公司  
地址 410013 湖南省长沙市银盆南路火炬  
城M0栋南7楼

(72)发明人 艾立平 蒋明贵

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限  
公司 11002  
代理人 王文君 陈征

(51)Int.Cl.

C12N 15/90(2006.01)

C12N 9/22(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

C12N 15/06(2006.01)

C12P 21/08(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页  
序列表4页 附图6页

(54)发明名称

一种基于CRISPR-Cas9系统构建的能分泌小鼠白细胞介素-6的基因工程细胞株

(57)摘要

本发明提供了一种基于CRISPR-Cas9系统构建的能分泌小鼠白细胞介素-6的基因工程细胞株。本发明首先提供了特异性靶向小鼠ROSA26基因的sgRNA,其靶序列如SEQ ID NO.1所示,进而构建能同时表达所述sgRNA和Cas9蛋白的定点切割载体;本发明还构建了含有小鼠白细胞介素-6和ROSA26基因同源序列的donor载体,在小鼠细胞SP2/0的ROSA26位点定点整合小鼠白细胞介素-6,并通过筛选标记筛选获得纯合细胞系,获得高表达小鼠白细胞介素-6的基因工程细胞株,本发明的细胞株可用于生产具有高比例分泌能力的杂交瘤细胞,在单克隆抗体制备领域具有广阔的应用前景。

1. 一种基于CRISPR-Cas9系统构建的能分泌小鼠白细胞介素-6的基因工程细胞株的制备方法,包括以下步骤:

(1) 构建能同时表达sgRNA和Cas9蛋白的定点切割载体;

(2) 构建了含有小鼠白细胞介素-6基因和ROSA26基因同源序列的donor载体;

(3) 将定点切割载体和donor载体转入小鼠细胞SP2/0骨髓瘤细胞,筛选阳性克隆,鉴定即得。

2. 如权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述sgRNA的靶序列为5`-CTCCAGTCTTTCTAGAAGAT-3`。

3. 如权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述定点切割载体含有筛选标记,优选筛选标记为荧光标记。

4. 如权利要求1-3任一所述的制备方法,其特征在于,所述donor载体中,小鼠白细胞介素-6基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。

5. 如权利要求1-3任一所述的制备方法,其特征在于,所述donor载体中,ROSA26基因同源序列的同源左臂的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示,同源右臂的核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示。

6. 如权利要求1-3任一所述的制备方法,其特征在于,所述donor载体还含有抗生素筛选标记,优选所述抗生素筛选标记为嘌呤霉素抗性基因。

7. 权利要求1-6任一所述制备方法在制备白细胞介素6表达量提高的细胞中的应用。

8. 权利要求1-6任一所述制备方法构建得到的基因工程细胞株。

9. 权利要求7所述的基因工程细胞株在制备单抗分泌量高的杂交瘤细胞中的应用。

10. 权利要求7所述的基因工程细胞株在制备单克隆抗体中的应用。

## 一种基于CRISPR-Cas9系统构建的能分泌小鼠白细胞介素-6的基因工程细胞株

### 技术领域

[0001] 本发明属于基因工程和基因遗传修饰领域,具体地说,涉及基于CRISPR-Cas9系统构建的能分泌小鼠白细胞介素-6的基因工程细胞株。

### 背景技术

[0002] CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas (CRISPR-associated) 系统是一种原核生物特有的针对外源性遗传物质的免疫系统,通过序列特异的RNA介导,切割降解外源性DNA,包括噬菌体和外源质粒,致使目的基因功能的缺失或部分缺失。CRISPR/Cas系统可以作为一种具有位点特异性的基因编辑系统,其最大的特点是操作简单、成本低、作用高效,是近两年来新发现并广泛用于基础研究的基因编辑新技术。CRISPR/Cas9系统中,crRNA (CRISPR-derived RNA) 通过碱基配对与tracrRNA (trans-activating RNA) 结合形成tracrRNA/crRNA复合物,此复合物能够引导核酸酶Cas9蛋白在与crRNA配对的序列靶位点剪切双链DNA。通过人为设计,可以将crRNA和tracrRNA改造,形成具有引导作用的单个RNA,即sgRNA (single guide RNA)。实验证明,sgRNA足以引导Cas9对DNA的定点切割。

[0003] CRISPR/Cas9是进行基因编辑的强大工具,可以对基因进行精确编辑。如果将含有Cas9蛋白编码基因的质粒和sgRNA表达质粒一同转入细胞中,sgRNA可以靶向目标序列,Cas9蛋白则会使相应的DNA双链发生断裂。而生物体自身存在着DNA损伤修复的应答机制,会将断裂上下游两端的序列连接起来,从而实现细胞中目标基因的敲除。如果在此基础上为细胞引入一个修复的模板质粒(供体DNA分子,即donor载体),细胞就会按照提供的模板在修复过程中引入片段或定点突变,这样就可以实现基因的替换或者突变。

[0004] ROSA26位点位于小鼠基因组第6号染色体,该位点转入的基因能正常稳定表达,是小鼠细胞中最常使用的定点整合位点。特异靶向ROSA26位点的CRISPR/Cas9体系能在小鼠第6号染色体上的ROSA26位点上生成DNA双链断裂,触发细胞的DNA修复机制,诱导基因组与ROSA26供体质粒质粒发生同源重组(HR),将供体质粒上的DNA片段整合到基因组上的ROSA26位点。

[0005] 单克隆抗体具有滴度高,特异性强,质地均一的特点,它不但大量用于基础研究,还用于临床诊断、体内显像定位、食品环境监测、体内治疗和导向治疗等领域。随着生物技术的发展,单克隆抗体在疾病诊断与治疗方面的作用越来越受到人们的重视。

[0006] 目前,单克隆抗体通常是通过杂交瘤技术来制备的。但是,传统杂交瘤技术制备单克隆抗体是个复杂而费时的工作。需要经历抗原制备、动物免疫、骨髓瘤细胞及饲养细胞制备、细胞融合、融合细胞筛选、阳性杂交瘤细胞株筛选与克隆化等一系列流程,平均六个月才能开发一种或几种单克隆抗体,而且成功率低、成本高,限制了抗体产业的发展。提高制备单克隆抗体效率的一个可供参考的改进方向是怎样获得高比例的能够分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞?

[0007] 已有研究表明,通过在常用的小鼠骨髓瘤细胞系SP2/0中过表达一个因子-小鼠白细胞介素-6而获得的基因工程细胞株SP2/mIL-6能增加具有分泌单克隆抗体的杂交瘤所占比例,且获得的杂交瘤具有较高的获得免疫球蛋白的能力。目前市场上通常使用的SP2/mIL-6细胞株是通过感染携带mIL-6的逆转录病毒而获得的,而基于CRISPR/Cas9技术构建的过表达mIL-6的细胞系至今未见报道。逆转录病毒不具有精确编辑能力,病毒元件是随机整合到细胞基因组中,有可能整合进功能区域(如整合在某个基因的外显子,启动子区域,就会影响这个基因的功能),进而影响细胞的功能。因此,迫切需要一种能将外源基因精确地整合到特定位点的载体,以有效规避病毒原件随机整合带来的风险。

## 发明内容

[0008] 本发明的目的是提供一种基于CRISPR-Cas9系统构建的能分泌小鼠白细胞介素-6的基因工程细胞株。

[0009] 本发明首先提供一种基于CRISPR-Cas9系统构建的能分泌小鼠白细胞介素-6的基因工程细胞株的制备方法,包括以下步骤:

[0010] (1) 构建能同时表达sgRNA和Cas9蛋白的定点切割载体;

[0011] (2) 构建了含有小鼠白细胞介素-6基因和ROSA26基因同源序列的donor载体;

[0012] (3) 将定点切割载体和donor载体转入小鼠细胞SP2/0骨髓瘤细胞,筛选阳性克隆,鉴定即得。

[0013] 步骤(1)所述的定点切割载体,优选地,选择的原始载体中已经将crRNA和tracrRNA改造形成sgRNA。

[0014] 所述sgRNA的靶序列为5`-CTCCAGTCTTTCTAGAAGAT-3`。

[0015] 所述定点切割载体含有筛选标记,优选筛选标记为荧光标记。如EGFP、RFP、EBFP等。可以通过流式分选,获得定点切割载体已经转入的单个细胞。

[0016] 所述donor载体中,小鼠白细胞介素-6基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0017] 所述donor载体中,ROSA26基因同源序列的同源左臂的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示,同源右臂的核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示该载体能够定点整合到小鼠细胞ROSA26位点。

[0018] 本发明所述donor载体还含有抗生素筛选标记,优选所述抗生素筛选标记为嘌呤霉素抗性基因。

[0019] 更优选地,本发明所述的donor载体含有小鼠白细胞介素-6(mIL-6)蛋白编码区及嘌呤霉素抗性基因。其中,小鼠白细胞介素-6蛋白编码区和嘌呤霉素抗性基因之间通过元件T2A进行连接。另外,本发明所述的donor载体还包括位于上游的组成型启动子或组织特异性启动子,以及位于下游的终止子。优选地,所述的donor载体含有EF1启动子。

[0020] 本发明提供了上述制备方法在制备白细胞介素6表达量提高的细胞中的应用。

[0021] 本发明提供了利用上述制备方法构建得到的基因工程细胞株。

[0022] 本发明提供了所述基因工程细胞株在制备单抗分泌量高的杂交瘤细胞中的应用。

[0023] 本发明提供了所述基因工程细胞株在制备单克隆抗体中的应用。本发明结合CRISPR/Cas9技术和同源重组技术,使用带有特异片段(如Rosa26位点)的donor载体,将外源序列精确地整合到特定位点,就能有效规避病毒元件随机整合带来的风险。在小鼠细胞

SP2/0的安全港位点——ROSA26位点定点整合小鼠白细胞介素-6,并通过筛选标记筛选获得纯合细胞系,获得高表达小鼠白细胞介素-6的基因工程细胞株,进而能获得数量更多的具有分泌单抗能力的杂交瘤细胞。因此,本发明的细胞株可用于生产具有分泌单抗能力的杂交瘤细胞,效率高,成本降低,在单克隆抗体制备领域具有广阔的应用前景。

### 附图说明

- [0024] 图1为整合进小鼠SP2/0细胞的元件骨架示意图。
- [0025] 图2为不同的sgRNA靶序列被Cas9蛋白切割的效率图(带荧光的细胞比例越高,则sgRNA越容易被Cas9蛋白切割)。
- [0026] 图3为设计并构建的定点切割载体图谱。
- [0027] 图4为构建的donor载体图谱。
- [0028] 图5为转染定点切割载体和donor载体的SP2/0细胞转染图。
- [0029] 图6为嘌呤霉素筛选后流式细胞仪分选获得单细胞形态图。
- [0030] 图7为流式分选获得的单细胞形成的单克隆细胞亚系图。
- [0031] 图8为阳性细胞的基因组PCR鉴定图。
- [0032] 图9为mIL-6基因表达的Q-PCR鉴定图。
- [0033] 图10为鉴定不同细胞株mIL-6表达量的MTT柱状图。

### 具体实施方式

[0034] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。在不背离本发明精神和实质的情况下,对本发明方法、步骤或条件所作的修改或替换,均属于本发明的范围。

[0035] 若未特别指明,实施例中所用的材料、生物化学试剂均为常规市售试剂,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员熟知常规手段。

[0036] 实施例1设计并构建合适的定点切割载体

[0037] 1.1提取切割载体原始质粒

[0038] 使用质粒小提试剂盒(购买自康为世纪,货号CW0511C),按照产品说明书的实验步骤小量提取切割载体原始质粒(购买自addgene,货号plasmid#48138)。

[0039] 1.2酶切切割载体原始质粒

[0040] 使用内切酶(购买自Neb,货号R0539L),按照产品说明书的实验步骤对1.1提取的质粒进行酶切,并回收酶切产物。

[0041] 1.3筛选合适的sgRNA靶序列片段

[0042] 1.3.1挑选sgRNA靶位点。

[0043] 根据NCBI网站上给出的小鼠ROSA26位点基因组序列(NCBI Reference Sequence: NC\_000072.6),选择多个靶位点进行测试,以下仅记载其中3个靶位点的测试情况。序列如下:

[0044] sg1:5`-3`CTCCAGTCTTTCTAGAAGAT

[0045] sg2:5`-3`:AAGATGGGCGGGAGTCTTCT

[0046] sg3:5`-3`:AGTCTTCTGGGCAGGCTTAA

[0047] 1.3.2 sgRNA靶位点筛选

[0048] 使用gRNA活性荧光检测试剂盒(购买自北京合生基因,货号HS-SR-0001A),按照产品说明书操作步骤构建检测载体,并进行细胞实验。实验结果如图2所示,选择的1号靶序列进行的细胞实验中荧光比例最高。根据使用的gRNA活性荧光检测试剂盒的检测原理,荧光比例越高,说明靶序列被切割的细胞比例越高(靶序列被Cas9蛋白切割,随后进行同源重组,细胞才会表达荧光),因此靶序列越容易被Cas9蛋白切割。

[0049] 根据实验筛选结果,本申请选择sgRNA靶位点sg1:5`-3`CTCCAGTCTTTCTAGAAGAT (SEQ ID NO.1)进行后续实验。

[0050] 1.4构建sgRNA靶序列片段

[0051] 合成sgRNA靶序列引物,并通过PCR仪进行退火反应。

[0052] 1.4.1设计的sgRNA靶序列:

[0053] sg-F:5`-3`:CACCTCCAGTCTTTCTAGAAGAT

[0054] sg-R:5`-3`:AAACATCTTCTAGAAAGACTGGAG

[0055] 1.4.2退火反应使用程序:

[0056] 95°C 5min

[0057] 25°C 20min

[0058] 1.4.3将退火完成的产物稀释成10uM,用于后续实验。

[0059] 1.5构建切割载体

[0060] 1.5.1使用T4连接酶(购买自Neb,货号M0202S),按照产品说明书,将酶切好的原始质粒和稀释好的sgRNA靶序列进行连接反应。

[0061] 1.5.2使用感受态细胞(购买自博迈德,货号BC102-02),按照产品说明书,将连接完成的混合物进行转化实验。

[0062] 1.5.3挑取单克隆进行测序,并比对测序结果,选择构建成功的定点切割载体。图谱见图3。

[0063] 实施例2构建带有小鼠白细胞介素-6以及抗生素筛选标记(嘌呤霉素)的donor载体

[0064] 2.1提取供体(donor)载体原始质粒

[0065] 使用质粒小提试剂盒(购买自康为世纪,货号CW0511C),按照产品说明书的实验步骤小量提取供体(donor)载体原始质粒(购买自addgene,货号plasmid#37200)。

[0066] 2.2酶切供体(donor)载体原始质粒

[0067] 使用内切酶(购买自Neb,货号R3103S和R0146S),按照产品说明书的实验步骤对2.1提取的质粒进行双酶切,并回收酶切产物。

[0068] 2.3克隆小鼠白细胞介素-6蛋白编码区序列

[0069] 2.3.1收集小鼠SP2/0细胞;

[0070] 2.3.2使用Trizol法提取mRNA;

[0071] 2.3.3使用mRNA逆转录试剂盒(购买自Thermo,货号K1622),按照产品说明书的实验步骤将2.3.2提取的mRNA进行反转录;

[0072] 2.3.4克隆小鼠白细胞介素-6蛋白编码区

[0073] 2.3.4.1设计克隆引物;

[0074] donor-f2:5`-3`:CGCCTACACTAGTGCCACCatgaagttcctctctgcaa

- [0075] donor-r2:5`-3`:GAAGACTTCCTCTGCCCTCggtttgcccagtagatctc
- [0076] 2.3.4.2扩增小鼠白细胞介素-6蛋白编码区;
- [0077] 2.3.4.3回收扩增片段并对扩增的片段进行测序,其核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。
- [0078] 2.4合成核心元件区
- [0079] 2.4.1克隆EF1启动子区
- [0080] 2.4.1.1设计克隆引物;
- [0081] donor-f1:5`-3`:TCTTTCTAGAGaattcAAGGATCTGCGATCGCTCCGGT
- [0082] donor-r1:5`-3`:ttgcagagaggaacttcatGGTGGCACTAGTG TAGGCG
- [0083] 2.4.1.2扩增EF1启动子区;
- [0084] 2.4.1.3回收扩增片段。
- [0085] 2.4.2克隆抗生素筛选区
- [0086] 2.4.2.1设计克隆引物;
- [0087] donor-f3:5`-3`:gagatctactcggcaaaccGAGGGCAGAGGAAGTCTTC
- [0088] donor-r3:5`-3`:tttaaacctcgagGCGGGGAGGCGGCCCAAAGGGAGAT
- [0089] 2.4.2.2扩增抗生素筛选区;
- [0090] 2.4.2.3回收扩增片段。
- [0091] 2.5构建donor载体
- [0092] 2.5.1使用无缝连接酶(购买自擎科生物,货号TSV-S2),按照产品说明书步骤,将2.2,2.3,2.4.1和2.4.2的回收产物进行连接;
- [0093] 2.5.2使用感受态细胞(购买自博迈德,货号BC102-02),按照产品说明书步骤,将连接完成的混合物进行转化实验。
- [0094] 2.5.3挑取单克隆进行测序,并比对测序结果,选择构建成功的donor载体。图谱见图4。
- [0095] 实施例3电转定点切割载体及donor载体进入小鼠与Sp2/0骨髓瘤细胞
- [0096] 3.1培养小鼠SP2/0骨髓瘤细胞
- [0097] 复苏并培养小鼠SP2/0骨髓瘤细胞(购买自ATCC,货号CRL-1581)。细胞培养基见下表。
- [0098] 表1小鼠骨髓瘤细胞完全培养基成分表

	DMEM	435ml
	FBS	50ml
[0099]	三抗	5ml
	mercaptoethanol	0.5ml
[0100]	8-azaguanine	10ml 1mg/ml
	4°C保存,使用前无菌检测	

[0101] 3.2设定电转仪参数

[0102] 本发明采用H1新型高效细胞电转染仪(购买自苏州壹达生物科技有限公司),采用以下实验参数进行电转实验。

[0103] 表2 H1电转仪电转SP2/0参数表

[0104]

程序号	细胞数目	电压(伏特)	脉冲持续时间(微米秒)	脉冲数	间隔时长(毫秒)	缓冲液体积(微升)	质粒量(微克)
1	$3 \times 10^5$	200	250	6	1000	60	3
2	$3 \times 10^5$	使用细胞及质粒,但是不做电转				60	3

[0105] 注:电转体积为60u1,每组设置5个复孔。

[0106] 3.3电转SP2/0细胞

[0107] 3.3.1细胞计数

[0108] 显微镜下观察细胞,收集细胞,计数,并根据表2中条件,取所需细胞数量。

[0109] 3.3.2加入质粒DNA

[0110] 根据表2中条件,加入buffer及质粒(donor质粒2ug,切割载体质粒1ug),轻轻吹打混匀。

[0111] 3.3.3电转定点切割载体及donor载体进入小鼠与Sp2/0骨髓瘤细胞。

[0112] 3.3.4电转后第三天(72小时后),观察带绿色荧光的细胞比例,显微镜视野中,绿色荧光比例呈阳性的细胞越多,绿色荧光越强,标明电转效率越高。(见图5),并用流式细胞分选仪分选绿色荧光阳性SP2/0细胞。

[0113] 实施例4嘌呤霉素筛选阳性克隆

[0114] 4.1使用正常的小鼠骨髓瘤细胞完全培养基(见表1)扩增实施例3的3.3.4中流式分选获得的GFP+细胞。

[0115] 4.2在正常的小鼠骨髓瘤细胞完全培养基(见表1)中加入嘌呤霉素,进行细胞筛选。本发明使用的嘌呤霉素筛选浓度为0.03ug/ml,筛选时间为3天。筛选3天后换成正常的小鼠骨髓瘤细胞完全培养基培养一周,进行二次筛选。二次筛选使用的嘌呤霉素筛选浓度为0.05ug/ml,筛选时间为3天。筛选3天后换成正常的小鼠骨髓瘤细胞完全培养基培养一周。

[0116] 4.3使用流式细胞分选仪对4.2中筛选两轮后获得的细胞进行单细胞分选,确保每个孔中只含有1个细胞(见图6)。

[0117] 4.4使用正常的小鼠骨髓瘤细胞培养基培养4.3中获得的单细胞,直至长成单细胞来源的单克隆细胞亚系(见图7),并命名为CSP2/mIL-6(CRISPR/Cas9 derived SP2/mIL-6, CSP2/mIL-6)。挑取8个单细胞来源的细胞亚系进行扩大培养,分别命名为CSP2/mIL-6-1、CSP2/mIL-6-2、CSP2/mIL-6-3、CSP2/mIL-6-4、CSP2/mIL-6-5、CSP2/mIL-6-6、CSP2/mIL-6-7



和CSP2/mIL-6-8。

[0118] 实施例5通过分子生物学实验鉴定获得基于CRISPR/Cas9系统构建的能分泌小鼠白细胞介素-6的基因工程细胞株

[0119] 5.1基因组PCR鉴定阳性克隆

[0120] 5.1.1分别收集实施例4的8株亚克隆细胞系,使用基因组提取试剂盒(购买自天根,货号DP304-03)分别提取基因组。

[0121] 5.1.2设计基因组鉴定引物,对提取的基因组进行PCR扩增。

[0122] F:agccagacctccatcgcgca

[0123] R:tgtagttttgctgcataaaa

[0124] 接着,通过凝胶电泳对扩增的DNA产物进行鉴定,鉴定图见8。

[0125] 如图所示:亚克隆细胞系1(CSP2/mIL-6-1)经鉴定为假阳性,基因组中没有整合mIL-6;亚克隆细胞系2-8为阳性克隆,其中亚克隆细胞系2,3,4,6,8为杂合子,克隆5,和7(CSP2/mIL-6-5和CSP2/mIL-6-7)为纯合子。因此,选择亚克隆细胞系CSP2/mIL-6-5和CSP2/mIL-6-7作为目标细胞系进行下述进一步验证。

[0126] 5.2 Q-PCR鉴定mIL-6基因表达量

[0127] 5.2.1收集小鼠相关细胞

[0128] 分别选择小鼠SP2/0细胞作为阴性细胞,选择SP2/mIL-6作为阳性细胞(购买自ATCC,货号CRL-2016),选择CSP2/mIL-6-5和CSP2/mIL-6-7作为目标细胞系,收集细胞。

[0129] 5.2.2使用Trizol法提取mRNA;

[0130] 5.2.3使用mRNA逆转录试剂盒(购买自Thermo,货号K1622),按照产品说明书的实验步骤将5.2.2提取的mRNA进行反转录;

[0131] 5.2.4设计引物对5.2.3反转录的cDNA进行Q-PCR扩增。

[0132] Q-F:AGAAAAGAGTTGTGCAATG

[0133] Q-R:CCAGAAGACCAGAGGAAA

[0134] 5.2.5 Q-PCR实验数据见表3,Q-PCR结果分析见图9。

[0135] 表3 Q-PCR检测IL-6基因在小鼠骨髓瘤细胞样本中的表达数据

[0136]

	SP2/mIL-6	CSP2/mIL-6-5	CSP2/mIL-6-7	SP2/0
IL-6	1.0061±0.1643	1.2613±0.0454	1.4762±0.1758	0.0001±0.0000

[0137] 结果表明:本发明制得的基于CRISPR/Cas9构建的过表达小鼠白细胞介素-6的基因工程细胞株CSP2/mIL-6-5和CSP2/mIL-6-7中mIL-6基因表达量高于ATCC出售的细胞株SP2/mIL-6。

[0138] 实施例6通过细胞功能学实验鉴定基于CRISPR/Cas9系统构建的能分泌小鼠白细胞介素-6的基因工程细胞株

[0139] 6.1细胞系选择

[0140] 分别选择小鼠SP2/0细胞作为阴性细胞,选择SP2/mIL-6作为阳性细胞(购买自ATCC,货号CRL-2016),选择CSP2/mIL-6-5和CSP2/mIL-6-7作为目标细胞系。选择IL-6依赖细胞株7TD1作为测试细胞。

[0141] 6.2待检组样品准备

[0142] SP2/0细胞、SP/2mIL-6、CSP/2mIL-6-5、CSP/2mIL-6-7复苏,调整细胞状态,经细胞计数后按 $2 \times 10^6$ 接种至100mm细胞培养皿中,持续培养35小时后,换液,每种细胞均放置10ml RPMI-10%FBS培养基,培养24小时收集各组上清,2000rpm,离心5分钟,0.22 $\mu$ m过滤器过滤,配制成20%骨髓瘤上清-RPMI-10%FBS培养基,作为待检组样品。标记为:上清组1 (SP2/0)、上清组2 (SP/2mIL-6)、上清组3 (CSP/2mIL-6-5)、上清组4 (CSP/2mIL-6-7)。

[0143] 6.3细胞预处理

[0144] 培养细胞7TD1至80~90%满皿,无血清RPMI洗涤收集7TD1细胞。RPMI-10%FBS调整细胞密度为 $2 \times 10^4$ 个/ml。

[0145] 6.4MTT实验

[0146] 设置48h、72h两个时间点,取两块96孔细胞培养板,将待检样品组加在96孔板上,每孔100 $\mu$ l,每个样品设置5个复孔,其中阴性对照组为RPMI-10%FBS、IL-6 (0.5ng/ml) - RPMI-10%FBS组为阳性对照组;

[0147] 每孔加入100 $\mu$ l 7TD1细胞悬液 ( $2 \times 10^3$ 个/孔),边缘孔用无菌PBS填充以消除边缘效应,共铺2块板;

[0148] 将96孔板置于5%CO<sub>2</sub>,37 $^{\circ}$ C培养箱中培养48h,取出第1块板进行检测;

[0149] 每孔加入MTT溶液20 $\mu$ l,放入细胞培养箱中继续培养4h;

[0150] 小心吸去孔内培养液,每孔加入100 $\mu$ l DMSO,使结晶物充分溶解;用酶标仪检测各孔在570nm波长处的吸光值;37 $^{\circ}$ C培养箱中培养72h,取出第2块板进行检测;采用Graphpad统计、分析数据。实验数据见表4,分析结果见图10。

[0151] 表4 MTT结果数据

[0152]

时间	SP2/0 上清组	SP/2mIL-6 上清组	CSP/2mIL-6-5 上清组	SP/2mIL-6-7 上清组	RPMI1640-1 0%FBS 培养基组	IL-6 (0.5ng/ml) -RPMI1640-10%FBS 培养基组
48h	0.088 $\pm$ 0.016	0.544 $\pm$ 0.052	0.594 $\pm$ 0.033	0.612 $\pm$ 0.024	0.085 $\pm$ 0.026	1.123 $\pm$ 0.046
72h	0.040 $\pm$ 0.009	1.007 $\pm$ 0.075	1.101 $\pm$ 0.051	1.229 $\pm$ 0.079	0.041 $\pm$ 0.021	1.788 $\pm$ 0.033

[0153] 结果表明:本发明所述的基于CRISPR/Cas9构建的过表达小鼠白细胞介素-6的基因工程细胞株CSP2/mIL-6-5和CSP2/mIL-6-7中mIL-6分泌量高于ATCC出售的通过逆转录病毒构建的过表达mIL-6的细胞株SP2/mIL-6分泌的mIL-6分泌量。

[0154] 虽然,上文中已经用一般性说明、具体实施方式及试验,对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的

## 序列表

<110> 湖南艾佳生物科技股份有限公司

<120> 一种基于CRISPR-Cas9系统构建的能分泌小鼠白细胞介素-6的基因工程细胞株

<130> KHP181112204.0

<160> 18

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

ctccagtctt tctagaagat 20

<210> 2

<211> 636

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

atgaagttcc tctctgcaag agacttccat ccagttgect tcttgggact gatgctggtg 60  
 acaaccacgg ccttcctac ttcacaagtc cggagaggag acttcacaga ggataccact 120  
 cccaacagac ctgtctatac cacttcacaa gtcggagget taattacaca tgttctctgg 180  
 gaaatcgtgg aatgagaaa agagttgtgc aatggcaatt ctgattgtat gaacaacgat 240  
 gatgcacttg cagaaaacaa tctgaaactt ccagagatac aaagaaatga tggatgctac 300  
 caaactggat ataatcagga aatttgcta ttgaaaattt cctctggtct tctggagtac 360  
 catagctacc tggagtacat gaagaacaac ttaaaagata acaagaaaga caaagccaga 420  
 gtccttcaga gagatacaga aactctaatt catatctca accaagaggt aaaagattta 480  
 cataaaatag tccttcctac cccaatttcc aatgctctcc taacagataa gctggagtca 540  
 cagaaggagt ggctaaggac caagaccatc caattcatct tgaatcact tgaagaattt 600  
 ctaaaagtca ctttgagatc tactcggcaa acctag 636

<210> 3

<211> 794

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

cagttaacgg cagccggagt ggcgagccgc cggcagcctc gctctgcca ctgggtgggg 60  
 cgggaggtag gtggggtgag gcgagctgga cgtgcgggcg cggtcggcct ctggcggggc 120  
 gggggagggg agggagggtc agcgaagta gctcgcgcgc gagcggcgc ccacctccc 180  
 cttcctctgg gggagtcgtt ttaccgccg ccggccgggc ctcgtcgtct gattgctct 240  
 cggggcccag aaaactggcc cttgccattg gctcgtgttc gtgcaagttg agtccatccg 300

ccggccagcg ggggcggcga ggaggcgctc ccaggttccg gccctcccct cggctccgcg 360  
 ccgcagagtc tggccgcgcg cccctgcgca acgtggcagg aagcgcgcgc tggggcggg 420  
 gacgggcagt agggctgagc ggctgcgggg cgggtgcaag cacgtttccg acttgagttg 480  
 cctcaagagg ggcgtgctga gccagacctc catcgcgcac tccggggagt ggagggaagg 540  
 agcgagggct cagttgggct gttttggagg caggaagcac ttgctctccc aaagtcgctc 600  
 tgagttgtta tcagtaaggg agctgcagtg gagtaggcgg ggagaaggcc gcacccttct 660  
 ccggaggggg gaggggagtg ttgcaatacc tttctgggag ttctctgctg cctcctggct 720  
 tctgaggacc gccctgggcc tgggagaatc cttcccct cttccctcgt gatctgcaac 780  
 tccagtcttt ctag 794

<210> 4

<211> 811

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 4

agatgggagg gagtcttctg ggcaggetta aaggtaacc tgggtgtgtg gcgttgctct 60  
 gcaggggaat tgaacaggtg taaaattgga gggacaagac ttcccacaga ttttcggttt 120  
 tgtcgggaag tttttaata ggggcaaata aggaaaatgg gaggataggt agtcatctgg 180  
 ggttttatgc agcaaaacta caggttatta ttgcttgtga tccgcctcgg agtattttcc 240  
 atcgaggtag attaaagaca tgetcaccgg agttttatac tctcctgctt gagatcctta 300  
 ctacagtatg aaattacagt gtcgcgagtt agactatgta agcagaattt taatcatttt 360  
 taaagagccc agtacttcat atccatttct cccgetcett ctgcagcett atcaaaaggt 420  
 attttagaac actcatttta gcccatttt catttattat actggettat ccaaccctta 480  
 gacagagcat tggcatttct ctttctga tcttagaagt ctgatgactc atgaaaccag 540  
 acagattagt tacatacacc acaaatcgag gctgtagctg gggcctcaac actgcagttc 600  
 tttataact ccttagtaca cttttgttg atcctttgcc ttgatcctta attttcagtg 660  
 tctatcacct ctcccgtcag gtgggttcc acatttgggc ctattctcag tccaggaggt 720  
 tttacaacaa tagatgtatt gagaatccaa ctaaagctt aactttccac tcccatgaat 780  
 gcctctctcc tttttctcca ttataaact g 811

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 5

aagatgggag ggagtcttct 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 6

agtcttctgg gcaggcttaa 20

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 7

caccctccag tctttctaga agat 24

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 8

aaacatcttc tagaaagact ggag 24

<210> 9

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 9

cgcctacact agtgccacca tgaagttcct ctctgcaa 38

<210> 10

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 10

gaagacttcc tctgccctcg gtttgccgag tagatctc 38

<210> 11

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 11

tctttctaga gaattcaagg atctgcgate gctccggg 38

<210> 12

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 12

ttgcagagag gaacttcatg gtggcactag tgtaggcg 38

<210> 13

<211> 38

<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 13  
gagatctact cggcaaaccg agggcagagg aagtcttc 38  
<210> 14  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 14  
tttaaacctc gaggcgggga ggcggcccaa agggagat 38  
<210> 15  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 15  
agccagacct ccatcgcgca 20  
<210> 16  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 16  
tgtagttttg ctgcataaaa 20  
<210> 17  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 17  
agaaaagagt tgtgcaatg 19  
<210> 18  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 18  
ccagaagacc agaggaaa 18

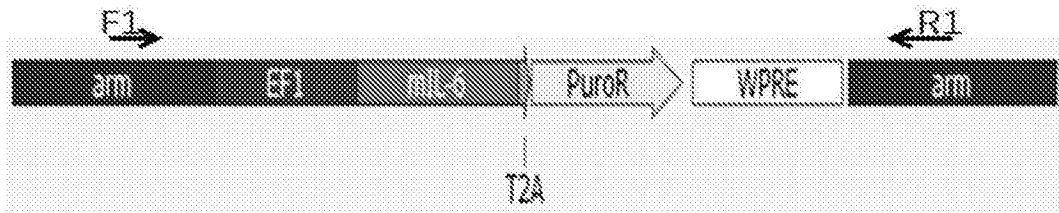


图1

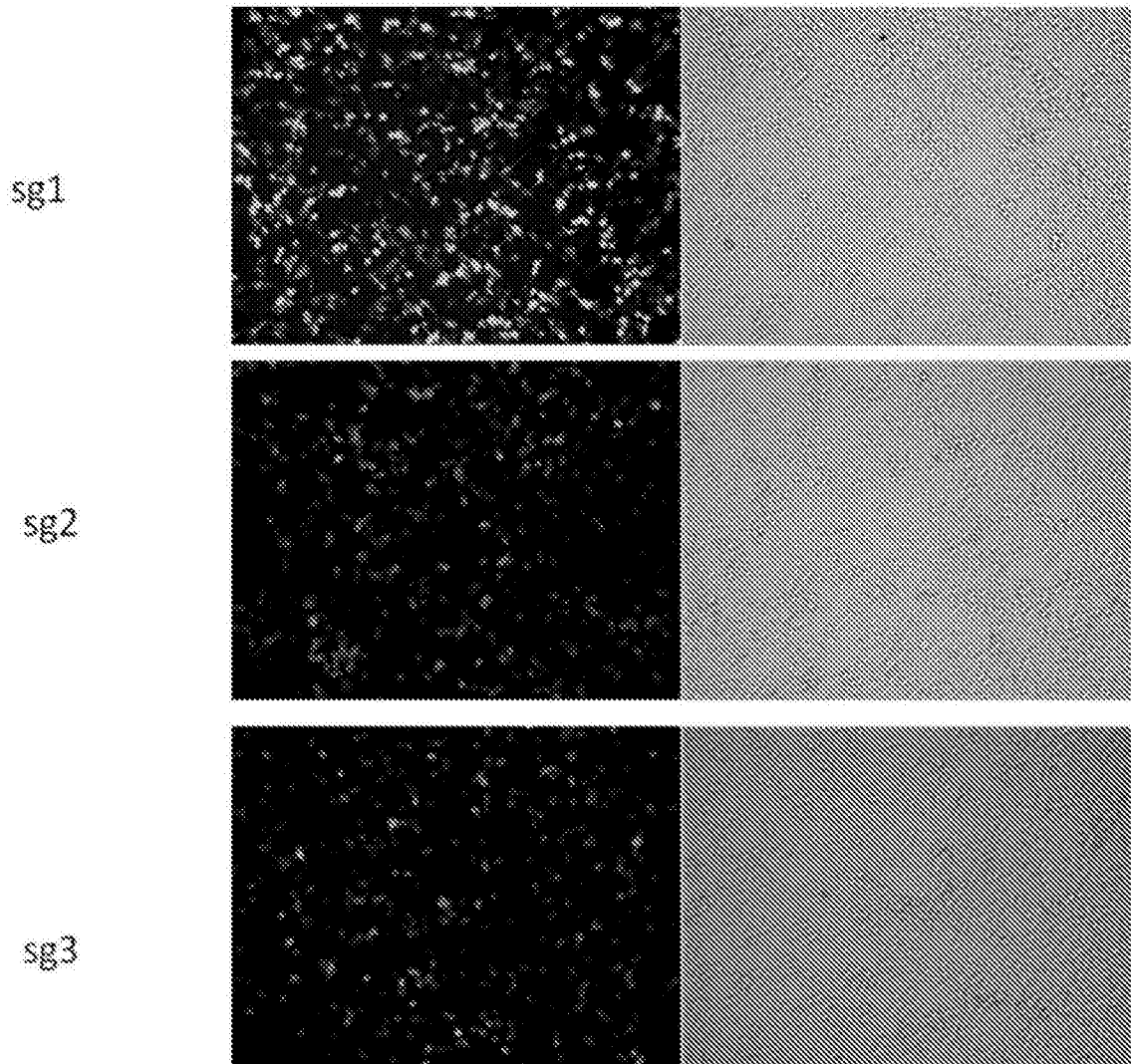


图2

Created with BioGene®

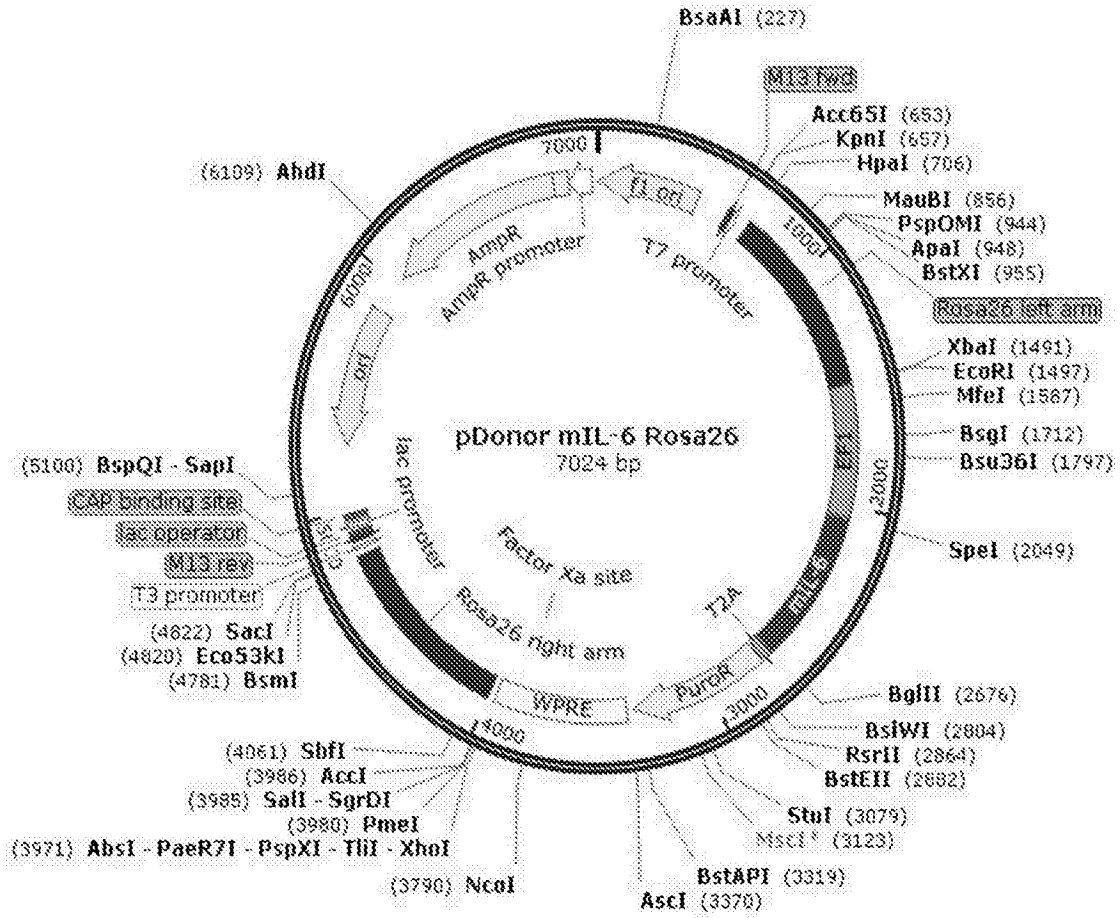


图3



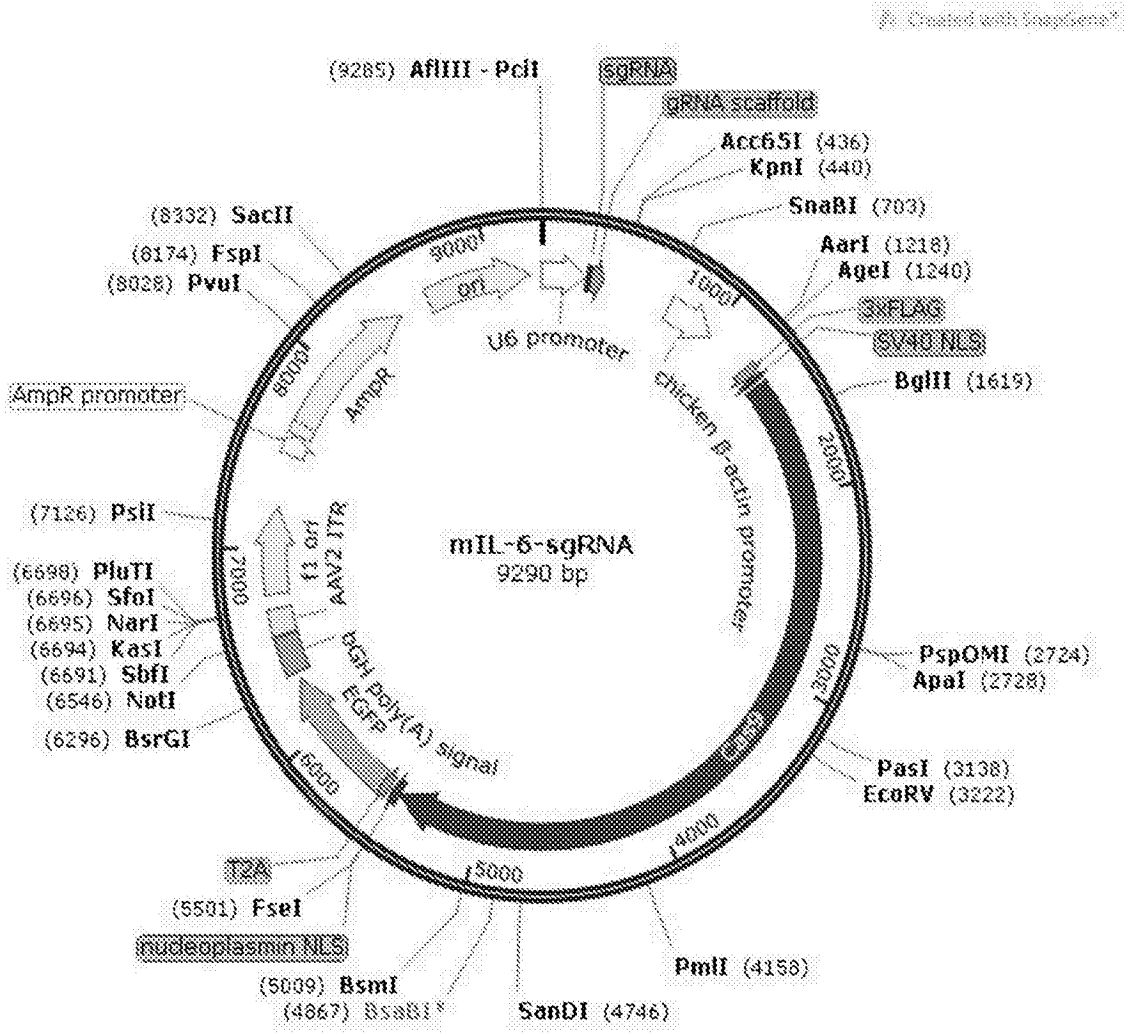


图4

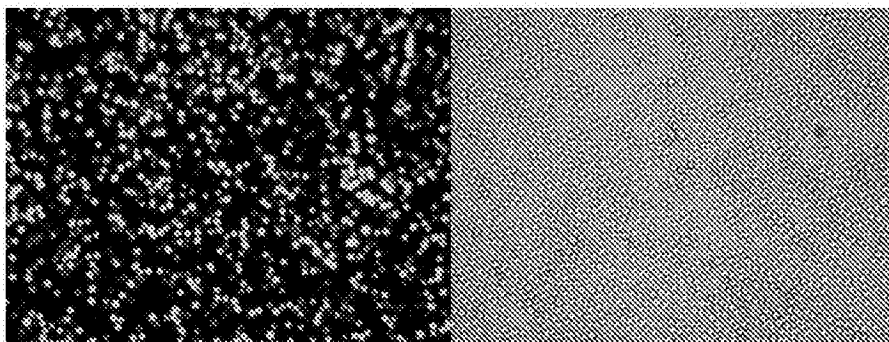


图5



图6

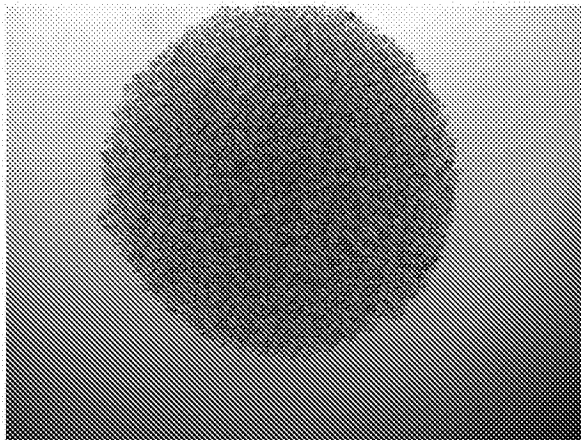


图7

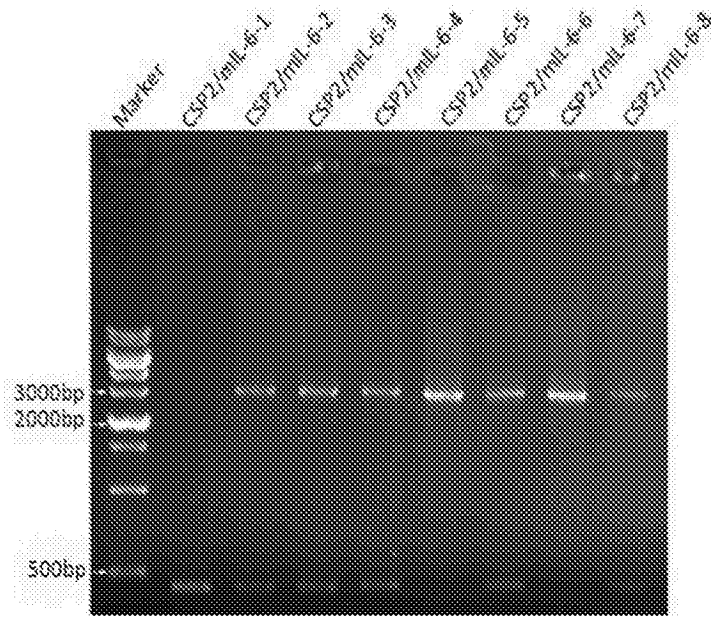


图8

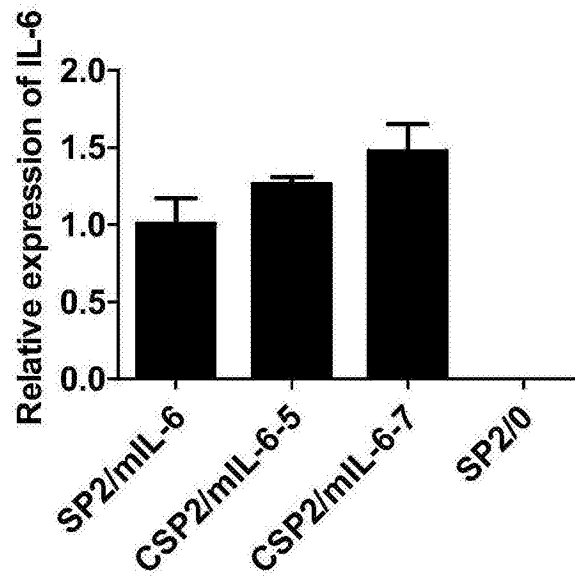


图9

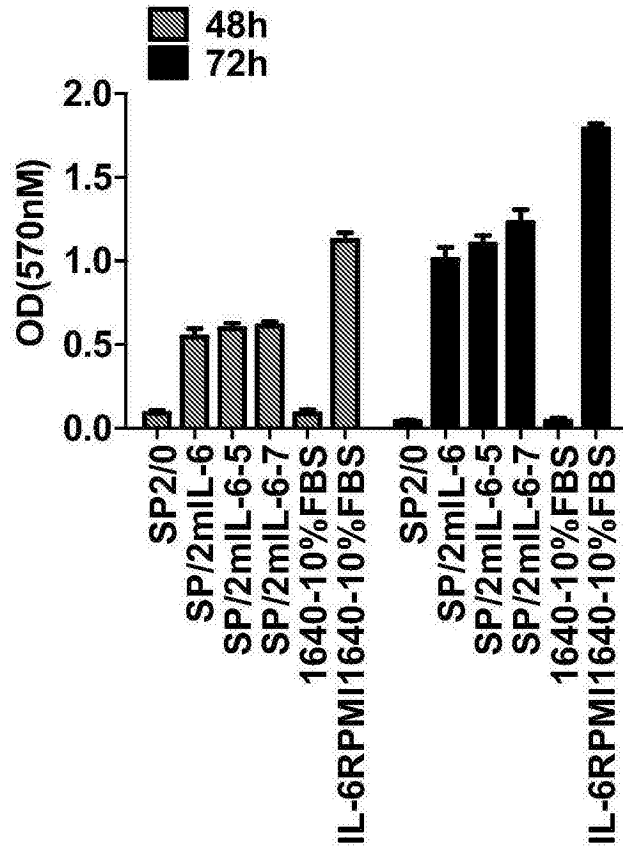


图10