

利用 CRISPR/Cas9 技术构建 *FAM50A* 基因敲除的 Beta-TC-6 细胞系及 *FAM50A* 的多克隆抗体制备

邱雅萱¹, 孟祥瑞¹, 谢小燕², 程思彤¹, 彭宇帆², 柳思琪¹, 赵雪^{2,3}, 胡长峰^{2,3}, 邢俊俏^{2,3}, 王卫华^{2,3}
(江汉大学¹ 医学部、² 生命科学学院、³ 微藻合成生物学与绿色制造研究院, 武汉 430056)

摘要 **目的** 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建 50 序列相似的家庭成员 A (*FAM50A*) 基因敲除的小鼠胰岛素瘤胰岛 β 细胞系 Beta-TC-6, 并制备特异性识别 *FAM50A* 的多克隆抗体。**方法** 设计 2 条靶向 *FAM50A* 基因的向导 RNA (sgRNA), 然后构建表达亮蓝荧光蛋白 (BFP) 的重组质粒用于基因敲除。将构建成功的重组质粒转染入 Beta-TC-6 细胞, 并筛选出 BFP 阳性单细胞进行克隆扩增。对扩增后的单克隆细胞采用 Sanger 测序进行基因型鉴定, 并使用 Western blot 检测 *FAM50A* 蛋白的表达。将纯化的人源 *FAM50A* 重组蛋白免疫新西兰兔以制备多克隆抗体, 并利用已构建的基因敲除细胞系验证其特异性。**结果** 成功筛选并鉴定出 1 株 *FAM50A* 基因敲除的单克隆细胞系, Sanger 测序证实其靶向位点存在碱基缺失。Western blot 检测结果显示, 该细胞系中无 *FAM50A* 蛋白表达。所制备的多克隆抗体能够识别野生型 Beta-TC-6 细胞中的鼠源 *FAM50A* 蛋白及 hTERT-RPE1 细胞中过表达的人源 *FAM50A*-GFP 融合蛋白, 但在 *FAM50A* 敲除细胞中未检测到信号。**结论** 成功建立了 *FAM50A* 基因敲除的 Beta-TC-6 细胞模型, 且成功制备了 *FAM50A* 的多克隆抗体。这些成果为后续研究提供了有力工具。

关键词 *FAM50A*; 抗体制备; 基因敲除; 纤毛; 胰腺; 糖尿病

中图分类号 R 587.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)11-2105-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.11.016

2025-09-17 接收

基金项目: 国家重点研发计划 (编号: 2020YFA0907400); 国家自然科学基金 (编号: 32170702)

作者简介: 邱雅萱, 女, 硕士研究生;

王卫华, 男, 博士, 副研究员, 通信作者, E-mail: wangweihua@jhun.edu.cn;

邢俊俏, 女, 硕士, 实验员, 通信作者, E-mail: juniao@fox-mail.com

糖尿病是一种严重的公共卫生问题, 胰腺 β 细胞的功能障碍是其核心病因之一^[1]。 β 细胞负责维持血糖稳态, 而其表面的初级纤毛在这一过程中起着关键作用^[2-4]。缺少 β 细胞初级纤毛的小鼠会出现循环激素失衡、葡萄糖稳态受损及糖尿病症状, 表明初级纤毛在糖尿病的病理机制中扮演重要角色^[5-7]。研究与胰腺 β 细胞纤毛相关的转录调控因子, 对于揭示糖尿病的发病机制, 为临床治疗提供理

observed with transmission electron microscopy. The KIM-1 and necroptosis-related protein expression levels were detected by Western blot, immunohistochemistry, and immunofluorescence. **Results** Compared with the NC group, CRE and BUN levels were elevated in the CIS group, and these levels were further increased after LPZ intervention (all $P < 0.001$). Compared with the CIS group, renal tubular dilation and brush border loss were evident in the CIS + LPZ group based on HE staining of kidney tissue ($P < 0.001$). Compared with the NC group, the expression levels of KIM-1, RIPK1, RIPK3, and MLKL in the renal tissues of mice in the CIS group increased (all $P < 0.001$), and compared with the CIS group, The expression levels of KIM-1, RIPK1, RIPK3 and MLKL in the renal tissues of mice in the CIS + LPZ group increased (all $P < 0.001$). After Pae treatment, compared with group M, the expression levels of CRE, BUN, KIM-1, RIPK1, RIPK3 and MLKL in each group of mice decreased significantly and in a dose-dependent manner (all $P < 0.001$). **Conclusion** LPZ promotes CIS-induced AKI by enhancing necroptosis in renal tubular epithelial cells, and Pae can improve CIS and LPZ-induced AKI by inhibiting necroptosis.

Key words acute kidney injury; lansoprazole; cisplatin; paeoniflorin; necroptosis; renal tubular epithelial cells

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 81770722); Basic and Clinical Promotion Plan of Anhui Medical University (No. 2023xkjT034)

Corresponding author Wu Yonggui, E-mail: wuyonggui@medmail.com.cn

论依据具有重要意义。

50 序列相似的家庭成员 A (family with sequence similarity 50 member A, *FAM50A*), 又称 X 染色体相关蛋白 5, 其编码基因位于 X 染色体上, 是一类古老保守的纤毛基因转录调控因子^[8-9]。它不仅在单细胞生物衣藻中调控纤毛基因表达, 也在小鼠精子发生中作为转录因子调控纤毛相关基因^[10-11]。然而, *FAM50A* 在胰腺 β 细胞纤毛功能及血糖调节中的具体作用尚不明确。该研究利用 CRISPR/Cas9 技术构建了 *FAM50A* 基因敲除的小鼠胰岛素瘤 β 细胞系 Beta-TC-6, 旨在探索 *FAM50A* 对 β 细胞纤毛功能的影响, 并制备 *FAM50A* 多克隆抗体, 为深入研究其分子机制和开发糖尿病治疗新策略提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及载体 感受态细胞 DH5 α (货号: TSC-C01) 购自北京擎科生物科技股份有限公司; 感受态细胞 BL21 (DE3) (货号: CD701-02) 购自北京全式金生物技术有限公司; 质粒 pGEX-6P-1 (货号: P0300) 购自北京索莱宝科技有限公司; 质粒 pU6-sgROSA-1_CBh-Cas9-T2A-BFP (货号: #64216) 购自美国 Addgene 公司; Beta-TC-6 细胞 (货号: STCC20040P) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司; hTERT-RPE1 细胞 (货号: CRL-4000) 购自美国 ATCC 公司。

1.1.2 实验动物 所有动物实验均经江汉大学伦理委员会批准 (编号: JHDXLL2024-126)。实验动物均饲养在江汉大学动物实验中心。新西兰兔 4 只, 雄性, 体质量 1.5 ~ 3.0 kg, 自由饮水、进食, 室温 (22 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$ 饲养, 购自湖北逸挚诚生物科技有限公司, 动物许可证号: SCXK (鄂) 2021-0020。

1.1.3 主要试剂 氨苄青霉素 (货号: A430258)、胶回收试剂盒 (货号: B518131)、质粒小提试剂盒 (货号: B518191)、苯甲磺酰氟 (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF; 货号: A610425)、琼脂粉 (货号: A505255) 购自上海生工生物有限公司; EcoR I (货号: 1040S) 和 BamH I (货号: 1010S) 限制性内切酶购自北京 Takara 生物技术有限公司; 反转录试剂盒 (货号: R211)、点突变试剂盒 (货号: C214-01)、同源重组试剂盒 (货号: C112)、溶菌酶 (货号: DE103-01) 和细胞转染试剂 (货号: T101-01) 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; RNA 提取试剂盒 (货号: Y1526)、基因组 DNA 提取试剂盒 (货号: DP304) 购

自天根生化科技 (北京) 有限公司; 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG; 货号: 367-93-1) 购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 还原型谷胱甘肽 (货号: 70-18-8)、PVDF 膜 (货号: IPVH00010)、完全弗氏佐剂 (货号: F5881) 和不完全弗氏佐剂 (货号: F5506) 购自 Sigma-Aldrich (上海) 贸易有限公司; RIPA 裂解液 (货号: P0013B) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 蛋白 Marker (货号: RM19001) 购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; 发光显影液 ECL (货号: 1705061) 购自 BIO-RAD 生命医学产品 (上海) 有限公司; 驴血清 (货号: SL050) 购自北京索莱宝科技有限公司; DMEM 基础培养基 (货号: 11965092) 和胎牛血清 (货号: A5256701) 购自美国 ThermoFisher Scientific 公司; anti-FAM50A (货号: HPA003585) 购自 Sigma-Aldrich (上海) 贸易有限公司; anti- β -actin (货号: AC038) 和 anti-GFP (货号: AE078) 购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。

1.1.4 仪器 CO₂ 细胞培养箱 (货号: 51033564)、超微量分光光度计 (货号: 840-317500) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Gene Pulser Xcell 电转仪 (货号: 1652660) 购自 BIO-RAD 生命医学产品 (上海) 有限公司; 卧式摇床 (货号: KB-1) 购自海门市其林贝尔仪器制造有限公司; 恒温振荡箱 (货号: ZWYR-200D) 购自上海智城分析仪器制造有限公司; 电热恒温培养箱 (货号: DHP-9012) 购自上海一恒科学仪器有限公司; PCR 仪 (货号: 4375305) 购自美国 Applied Biosystems 公司; 荧光显微镜 (型号: Axio Vert. A1) 购自德国 Zeiss 公司; 电泳仪电源 (型号: DYY-7C) 购自北京六一生物科技有限公司; 化学发光图像分析系统 (型号: Tanon 5200) 购自上海天能生命科学有限公司。

1.2 方法

1.2.1 *FAM50A* 基因敲除重组质粒的构建 首先, 使用在线设计工具 CRISPick (<https://portals.broad-institute.org/gppx/crispic-k/public>) 预测靶向 *FAM50A* 基因的 sgRNA 序列, 基于 CRISPick 工具提供的评分结果及目标 sgRNA 在 *FAM50A* 基因组上的位置分布, 选择了两个高得分的 sgRNA 序列 (sgRNA1: 5'-AGAGATGGCTATGTACGAGG-3'; sgRNA2: 5'-GGCAAAAAAGGAGCAGTCAA-3') 进行后续实验操作。随后, 采用定点突变方法将上述选定的 sgRNA 序列整合至 Cas9/sgRNA 共表达载体 pU6-sgROSA-1-CBh-Cas9-T2A-BFP 中。用于定点突变的

引物由诺唯赞在线设计平台 (<https://crm.vazyme.com/cetool/singlepoint.html>) 设计 (sgRNA1-F: 5'-GAGATGGCTATGTACGAGGGTTTTAGAGCTAGAA-TAGCAAGTTAAAATAA-3', sgRNA1-R: 5'-CTCGTACATAGCCATCTCTCGGTGTTTCGTCCTTTCCAC-3'; sgRNA2-F: 5'-GGCAAAAAAGGAGCAGTCAAGTTT-TAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA-3', sgRNA2-R: 5'-GACTGCTCCTTTTTTGCCCGGTGTTTCGTCCT-TTCCAC-3'), 并由武汉生工生物有限公司合成。定点突变实验按照点突变试剂盒的操作指南进行, 将成功构建的重组质粒通过热激法转化至 DH5 α 大肠埃希菌感受态细胞中。转化后的细菌被铺展于含有氨苄青霉素 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的溶菌肉汤 (lysogeny broth, LB) 固体平板上, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中过夜培养。次日, 挑选单个菌落接种至含有氨苄青霉素 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 液体培养基中, 并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下以 200 r/min 的速率振荡培养 5 ~ 6 h。之后, 提取质粒并送往武汉生工生物科技有限公司进行测序验证, 测序反应采用通用引物 hU6-F。经过测序确认无误的阳性克隆被分别命名为 pU6-sgFAM50A-1_CBh-Cas9-T2A-BFP 和 pU6-sgFAM50A-2_CBh-Cas9-T2A-BFP (分别对应 sgRNA1 和 sgRNA2)。

1.2.2 Beta-TC-6 细胞的培养、重组质粒电转及阳性细胞的筛选 Beta-TC-6 细胞采用含有 15% 胎牛血清和 1% 青链霉素混合液的 DMEM 高糖培养基进行培养, 细胞汇合度达到 70% ~ 80% 时进行传代。传代的细胞汇合度达到 80% 左右时进行电转, 用 0.25% Trypsin-EDTA 消化后加入 Opti-MEM 重悬细胞并使其细胞密度为 4×10^6 个/mL, 吸取 250 μL 细胞悬液加入等质量比的重组质粒混合物轻轻混匀, 然后转入 4 mm 电击杯中进行电转染。使用指数衰减脉冲波 (exponential decay pulse) 进行电转, 设置参数为: 电压 280 V, 电容 950 μF 。

完成电转染的细胞用含有 15% 胎牛血清 DMEM 高糖培养基 (不含抗生素) 进行培养, 24 h 后用 0.25% Trypsin-EDTA 消化成单细胞, 在荧光显微镜下挑取表达亮蓝荧光蛋白 (blue fluorescent protein, BFP) 的单细胞转入 96 孔板进行克隆扩增。

1.2.3 FAM50A 敲除的单克隆细胞株基因型鉴定

收集扩增培养的单克隆细胞株, 提取基因组 DNA。分别在 sgRNA1 和 sgRNA2 靶向的基因组序列上下游设计引物 P1/P2 (P1: 5'-AGGAAGAGGAG-GAGGGAGTT-3'; P2: 5'-AAGAGAGCTCTGCTGGGC-T-3') 和 P3/P4 (P3: 5'-ACTGGTGAAGGAGCGAGAG-

3'; P4: 5'-TGTGAGGGGAGAGCTGCTGA-3'), 利用提取的基因组 DNA 进行基因型鉴定 PCR, PCR 产物经电泳回收后进行 Sanger 测序。

1.2.4 Western blot 检测 FAM50A 蛋白表达水平

首先将 Beta-TC-6 野生型细胞 (WT) 和阳性单克隆细胞 (KO) 用含有蛋白酶抑制剂和磷酸化抑制剂的 RIPA 缓冲液裂解, 通过 SDS-PAGE 分离后, 将凝胶上的蛋白质湿转到 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 一抗 (商业化 FAM50A 抗体) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 第 2 天常温孵育二抗 1 h, 加入 ECL 发光液进行曝光, 以 β -actin 作为内参。

1.2.5 FAM50A 基因片段的扩增 已有文献报道

FAM50A 蛋白在不同物种间高度同源^[9], 因此选择人 FAM50A 蛋白序列进行抗原决定簇的预测 (<https://servi-cs.healthtech.dtu.dk/services/BepiPred-3.0/>), 并最终确定人 FAM50A 蛋白用 N 端 68-173 aa 序列作为抗原片段 hFAM50A-Fragment (hFAM50A-F)。选择 pGEX-6P-1 载体酶切位点 BamH I 和 EcoR I 作为插入 hFAM50A-F 的位点, 利用诺唯赞在线设计平台 <https://crm.vazyme.com/cetool/singlefragment.html> 设计扩增 hFAM50A-F 的引物 (Forward: 5'-TTCCAGGGGCCCCTGGGATCCGT-GACCCTGAATGACATGAAGGC-3', Reverse: 5'-CTC-GAGTCGACCCGGAATTCTCACTCACGGTCTCGATC-AGGCAA-3') 并由武汉生工生物有限公司进行合成。用 RNA 提取试剂盒提取 hTERT-RPE1 细胞总 RNA, 并用反转录试剂盒反转录。将反转录获得的 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增得到 363 bp 的 hFAM50A-F 目的片段。PCR 产物经电泳回收后进行测序以确保目的片段序列的正确性。

1.2.6 原核表达载体 pGEX-6P-1-FAM50A 的构建与鉴定

大肠埃希菌表达载体 pGEX-6P-1 经 BamH I 和 EcoR I 双酶切, 琼脂糖电泳鉴定酶切产物后切胶回收。将纯化后的 hFAM50A-F PCR 产物与酶切后的线性化载体用同源重组试剂盒进行同源重组反应。随后, 将重组产物加入 DH5 α 感受态细胞中, 将混合物置于冰上孵育 20 min, 接着在 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中进行热激处理 45 s, 并立即转移至冰上孵育 2 min 以完成转化。加入 250 μL 无抗生素 LB 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 1 h 进行复苏。将复苏菌液均匀涂布于含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 14 h。挑取单克隆菌落接种至含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 4 h 至菌液浑浊。取 1

mL 菌液送武汉生工生物有限公司进行测序分析。经序列比对验证正确的阳性克隆命名为 pGEX-6P-1-FAM50A, 保存于 -80°C 备用。

1.2.7 抗原蛋白的制备 将 pGEX-6P-1-FAM50A 质粒转化至大肠埃希菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 构建重组表达菌株。将阳性克隆接种于含 $50\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 于 37°C 、 $200\text{ r}/\text{min}$ 条件下振荡培养。待菌液吸光度 (600 nm) 值达到 0.7 左右时, 加入终浓度 $0.3\text{ mmol}/\text{L}$ 的 IPTG, 在 16°C 条件下诱导表达 20 h 。收集菌液离心去上清, 用适量 PBS 于冰上重悬后加入 $1\text{ mmol}/\text{L}$ PMSF (蛋白酶抑制剂) 和终浓度为 $1\text{ mg}/\text{mL}$ 的溶菌酶, 冰上孵育 30 min 。利用超声破碎细胞, 离心收集上清菌液, 将得到的上清菌液加入到含有 Glutathione-agarose 的纯化柱中以充分结合 GST 融合目的蛋白。过柱完毕后, 用含 1% Triton-X 100 的 PBS 洗涤层析柱 4 次 (每次 5 mL), 以除去非特异性结合的杂蛋白。最后, 用 2 mL 洗脱缓冲液 ($50\text{ mmol}/\text{L}$ Tris-HCl, pH 9.0, 含 $10\text{ mmol}/\text{L}$ 还原型谷胱甘肽) 洗脱目的蛋白: 首次加入洗脱缓冲液后孵育 10 min , 收集 $500\text{ }\mu\text{L}$ 洗脱液; 随后再孵育 5 min , 分别收集 1 mL 和 $500\text{ }\mu\text{L}$ 洗脱液。所有操作均在 4°C 条件下进行^[12-13]。

1.2.8 多克隆抗体制备和抗体特异性检测 将纯化的抗原蛋白作为抗原免疫成年新西兰白兔, 共免疫 4 次。首次免疫 (第 1 天) 取 1 mg 抗原蛋白与等体积弗氏完全佐剂充分乳化, 采用背部皮下多点注射 ($6\sim 8$ 点) 进行免疫。 21 d 后进行第 2 次免疫, 取 $500\text{ }\mu\text{g}$ 抗原蛋白与等体积弗氏不完全佐剂乳化后注射。第 36 天和第 50 天分别进行第 3 、 4 次免疫, 免疫剂量和方法与第 2 次相同。末次免疫 7 d 后, 通过颈动脉采血法收集全血。将血样于 4°C 条件下静置过夜以使其充分凝固。随后于 4°C 、 $3\text{ }000\text{ r}/\text{min}$ 的条件下离心 15 min , 小心吸取上清液, 即为抗 FAM50A 血清, 分装后于 -80°C 保存备用。为全面评估自制抗 FAM50A 血清的特异性及物种交叉反应性, 使用两种独立的细胞验证模型。首先, 在 Beta-TC-6 小鼠细胞中, 通过比较 WT 与 FAM50A KO 细胞, 验证抗体对内源性靶点的识别能力。其次, 检测了过表达 FAM50A-GFP 融合蛋白的 hTERT-RPE1 人源细胞, 验证抗体能否识别蛋白分子量因 GFP 标签而增大的人源 FAM50A 融合蛋白。上述 2 组实验的 Western blot 流程均参照方法 1.2.4 部分, 一抗统一使用自制抗 FAM50A 血清。所有实验均以 β -

actin 为内参, 确保蛋白上样量一致。抗体特异性的判断标准为: 在 Beta-TC-6 KO 细胞中 FAM50A 条带消失; 在 hTERT-RPE1 过表达细胞中, 能检测到一条分子量更大的 FAM50A-GFP 特异性条带, 且此条带位置与抗 GFP 抗体检测到的条带位置相同。

2 结果

2.1 靶向 FAM50A 基因的 CRISPR/Cas9 重组质粒的构建与鉴定 为构建 FAM50A 基因敲除系统, 本研究设计并构建了 pU6-sgFAM50A-1_CBh-Cas9-T2A-BFP 和 pU6-sgFAM50A-2_CBh-Cas9-T2A-BFP 两种重组质粒。通过通用引物进行测序分析, 结果显示两种重组质粒的序列与预期完全一致, 其中 sgRNA1 和 sgRNA2 均正确插入到载体中 (图 1)。测序结果证实重组质粒构建成功, 为后续基因敲除实验奠定了基础。

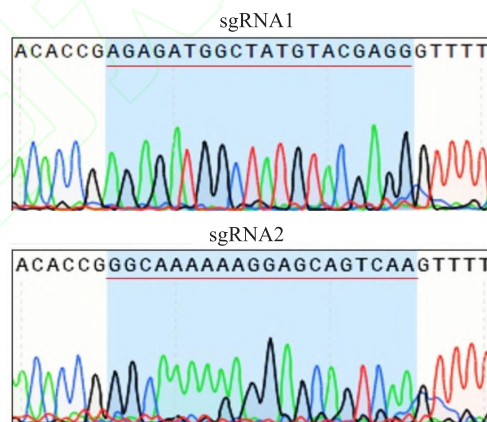


图 1 重组质粒的测序图谱

Fig. 1 Sequencing chromatogram of the recombinant plasmid

The red line: Marking the successfully inserted FAM50A sgRNA sequence

2.2 FAM50A 基因敲除细胞系的构建与鉴定 通过 Western blot 对获得的单克隆株进行蛋白表达水平的筛选鉴定, 结果显示, 其中 1 株单克隆细胞 (命名为 KO) 中未检测到 FAM50A 蛋白的表达 (图 2A)。琼脂糖凝胶电泳结果显示, 与 WT 细胞相比, KO 细胞株的 PCR 产物大小变小了 (图 2B)。对该 PCR 产物进行 Sanger 测序, 结果进一步证实, 在 sgRNA1 和 sgRNA2 的靶向位点附近, 均发生了一个 12 bp 的碱基缺失 (图 2C)。此外, 序列分析表明, 此 12 bp 的缺失为框内缺失 (in-frame deletion), 不会引起蛋白质翻译的阅读框转移或提前终止。

2.3 人 FAM50A 基因片段表达载体的构建与鉴定 为构建人源 FAM50A 的原核表达载体, 首先通过 PCR

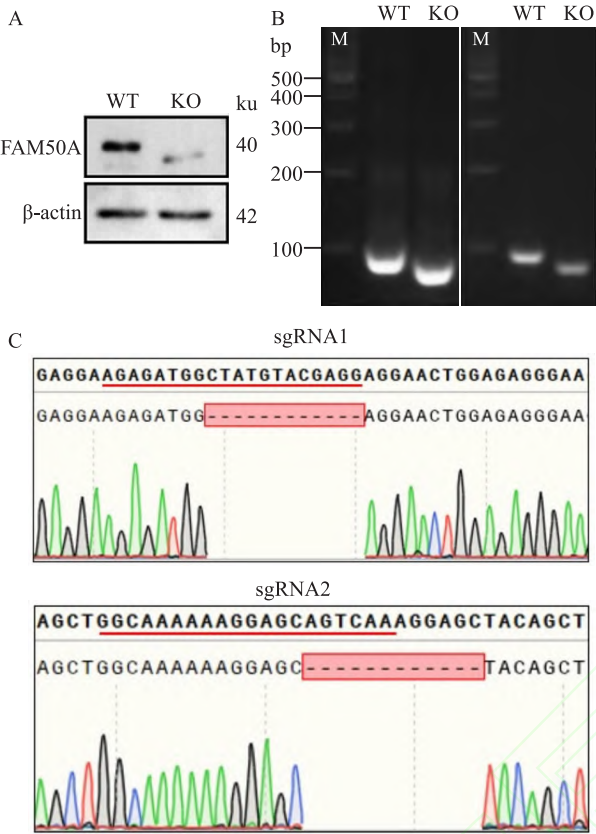


图2 FAM50A 基因敲除细胞系的鉴定

Fig.2 Identification of the FAM50A knockout cell line

A: Western blot analysis of FAM50A protein expression in wild-type and knockout cells, with β -actin serving as a loading control; B: Genotyping of the genomic loci targeted by sgRNA1 (left) and sgRNA2 (right) by PCR, showing smaller PCR products in the KO cells, M: Marker; C: Sanger sequencing alignment of the target sites. The red lines indicate the sgRNA sequences, and the red boxes highlight the 12 bp deletions found in the KO clone.

技术从 hTERT-RPE1 细胞 cDNA 文库中扩增其编码区序列。琼脂糖凝胶电泳结果显示,PCR 产物在 360 bp 附近有一条单一、清晰的条带,与 FAM50A 目的基因的预期大小相符(图 3A)。随后,将此纯化后的 PCR 产物克隆至经 BamH I 和 EcoR I 双酶切处理的 pGEX-6P-1 载体中(图 3B)。对筛选得到的重组质粒进行 Sanger 测序,比对结果(图 3C)证实,插入的基因片段序列与人 FAM50A 的参考序列(GenBank 登录号: NM_004699.4)完全一致,且插入方向和阅读框均正确。上述结果表明,人源 FAM50A 的 GST 融合表达载体 pGEX-6P-1-FAM50A 已成功构建,可用于后续的表达与纯化研究。

2.4 人 FAM50A 抗原蛋白的表达与纯化 对纯化

过程中关键节点的样品进行 SDS-PAGE 分离,并对凝胶进行考马斯亮蓝染色,结果如图 4 所示。相较于未诱导的对照菌株,经 IPTG 诱导后的样品在约 37 ku 处出现一条清晰、显著的蛋白条带,其分子量与 GST-FAM50A 融合蛋白的理论值相符,表明目的蛋白已成功表达。对裂解产物的上清液与沉淀组分进行分析,可见该蛋白条带主要存在于可溶性组分中。将此可溶性蛋白组分经 Glutathione 亲和层析纯化后,最终的洗脱产物在凝胶上呈现为 1 条均一的蛋白条带,无明显可见的杂蛋白污染。提示考马斯亮蓝染色的凝胶结果直观地证实了人源 GST-FAM50A 重组蛋白已在 E. coli 中成功实现高效的溶解性表达,并通过亲和层析方法得到了有效纯化,可以满足后续实验要求。

2.5 FAM50A 多克隆抗体的特异性验证 利用基因敲除和蛋白过表达 2 种细胞模型进行了 Western blot 验证。在鼠源的 Beta-TC-6 细胞中,该抗体能够识别 WT 细胞内 1 条约 40 ku 的蛋白条带,该分子量与鼠源 FAM50A 的理论大小相符;而在 FAM50A 基因 KO 细胞中,该特异性条带完全消失(图 5A)。为进一步验证抗体对人源蛋白的识别能力,在稳定过表达人源 FAM50A-GFP 融合蛋白的 hTERT-RPE1 细胞中,该抗体成功检测到 1 条约 67 ku 的特异性条带,与 FAM50A-GFP 融合蛋白的预测分子量一致(图 5B)。作为关键的阳性对照,GFP 抗体也在完全相同的位置识别出该融合蛋白条带,从而进一步确认了该信号的准确性。提示基因敲除实验证实了该抗体对内源性鼠源 FAM50A 蛋白的高度特异性,而过表达实验则证明其能有效识别人源 FAM50A 蛋白。这些结果表明自主制备的 FAM50A 多克隆抗体是一种有效的且可用于检测人、鼠两种属 FAM50A 蛋白的特异性工具。

3 讨论

本研究利用 CRISPR/Cas9 技术,首次成功构建了 FAM50A 基因敲除的 Beta-TC-6 胰岛 β 细胞系。胰岛 β 细胞的初级纤毛是维持血糖稳态的关键细胞器,其功能异常与糖代谢障碍密切相关^[7]。既往研究^[14-17]多聚焦于纤毛的结构或信号蛋白,而上游的转录调控机制仍是研究的薄弱环节。本研究将焦点置于纤毛相关转录因子 FAM50A^[10-11],探索其在胰岛 β 细胞这一全新背景下的功能,提供了关键的细胞模型和新的研究视角。

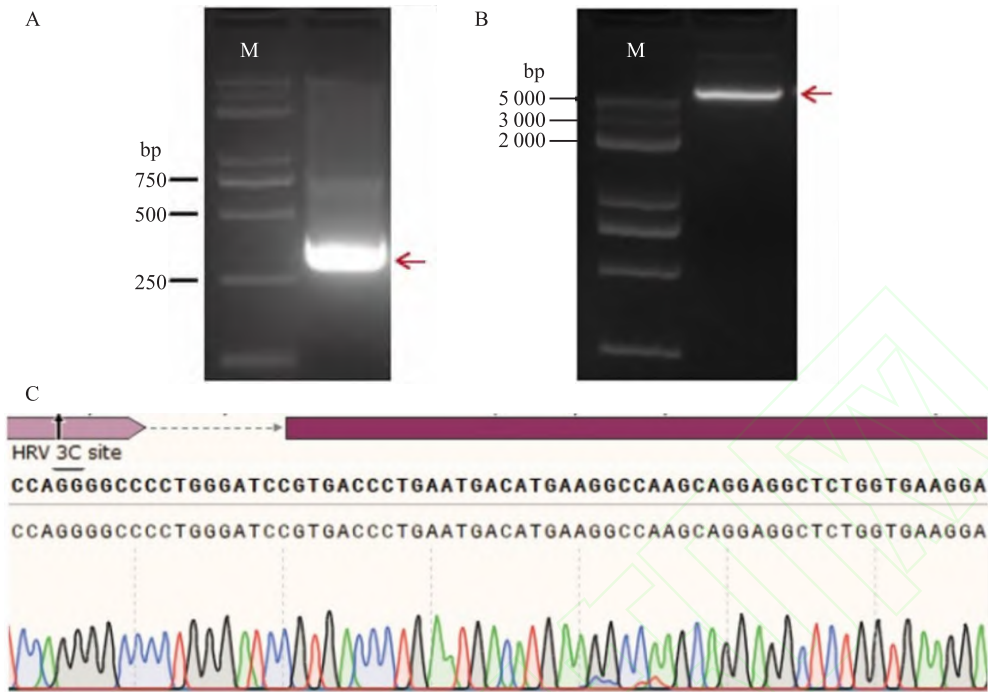


图3 FAM50A 原核表达载体的构建与鉴定

Fig. 3 Construction and identification of the FAM50A prokaryotic expression vector

A: Electrophoresis of the PCR-amplified FAM50A gene fragment; B: The pGEX-6P-1 vector linearized by double digestion; C: Partial Sanger sequencing chromatogram of the recombinant plasmid pGEX-6P-1-FAM50A, confirming the correct sequence at the vector-insert junction. Red arrows indicate the target bands; M: DNA Marker.

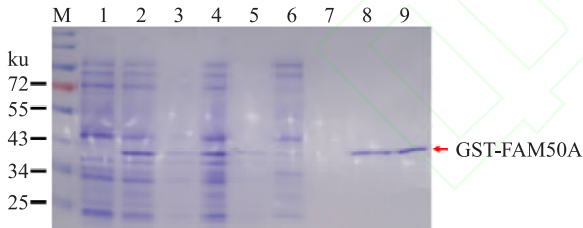


图4 SDS-PAGE 凝胶考马斯亮蓝染色分析

GST-FAM50A 融合蛋白表达与纯化结果

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of GST-FAM50A fusion protein expression and purification by Coomassie blue staining

The lanes are as follows: M: Marker; 1: Total bacterial protein before IPTG induction; 2: Total bacterial protein after IPTG induction; 3: Sample before sonication; 4: Supernatant after sonication; 5: Pellet after sonication; 6: Glutathione affinity chromatography column flow-through; 7-9: Eluted GST-FAM50A fusion protein collected from three washes, respectively. The red arrow indicates the band of the target GST-FAM50A fusion protein at approximately 37 ku.

对所构建的敲除细胞模型进行的分子鉴定,从蛋白和基因层面确证了 FAM50A 功能的完全缺失。本研究采用了双 sgRNA 策略进行基因编辑,但并未导致 2 个靶点之间的大片段 DNA 序列缺失。相反,

基因测序结果显示,2 个 sgRNA 的靶向位点各自独立地发生了 12 bp 的小片段缺失,从而造成了总计 24 bp 的框内缺失突变。尽管此 24 bp 的缺失并未引起下游阅读框的移码,但 Western blot 结果仍证实了 FAM50A 蛋白的完全不表达。这有力地表明,该复合缺失破坏了 FAM50A 蛋白某个关键的功能结构域或稳定性元件,可能导致翻译产物被细胞内的蛋白酶系统迅速识别并降解。此外,FAM50A 基因位于 X 染色体,确保了单克隆来源的 Beta-TC-6 细胞在单等位基因被编辑后无补偿性表达,从而实现了功能的彻底敲除。因此,该细胞模型为后续功能学研究提供了可靠的平台。

与细胞模型并行的,本研究另一项核心贡献是成功制备并验证了高特异性的多克隆抗体。利用 FAM50A 敲除细胞作为理想的阴性对照,本研究证实了该抗体无任何非特异性结合;同时,其能有效识别人源 FAM50A-GFP 融合蛋白,表明其识别的抗原表位在人、鼠物种间具有保守性。一个经过基因敲除验证的特异性抗体,是研究目标蛋白最可靠的工具之一^[12-13]。该抗体不仅是本研究验证模型成功与否的关键,更为未来的深入研究铺平了道路。如

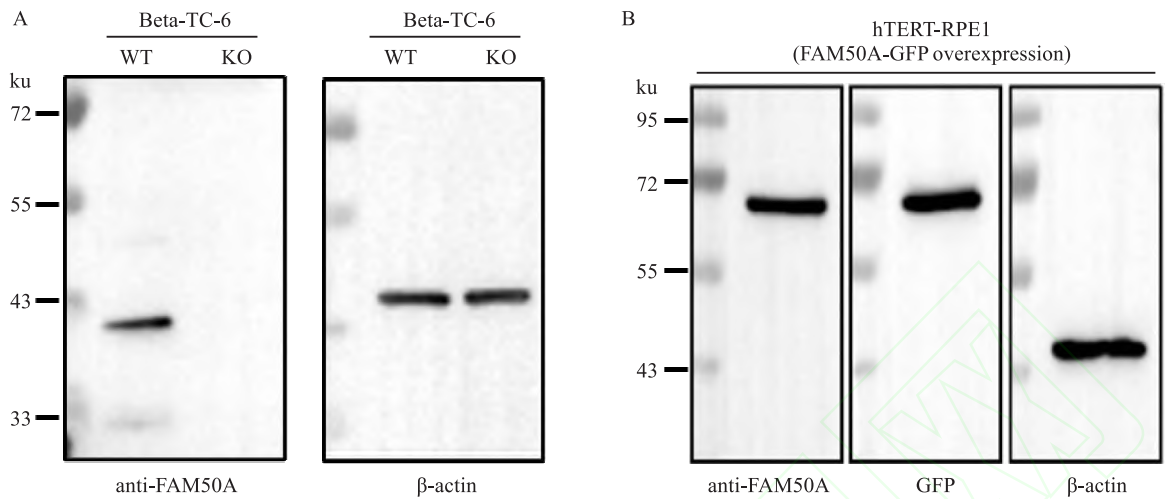


图5 自主制备的 FAM50A 多克隆抗体的特异性验证

Fig. 5 Specificity verification of the self-prepared FAM50A polyclonal antibody

A: Western blot analysis of WT and FAM50A KO Beta-TC-6 cells. β -actin was used as a loading control. B: Western blot analysis of hTERT-RPE1 cells overexpressing human FAM50A-GFP fusion protein.

通过免疫荧光探究 FAM50A 在 β 细胞内的亚细胞定位,或利用免疫共沉淀技术筛选其相互作用蛋白,进而揭示其调控网络。

参考文献

- [1] Pazour G J. *Cilia* structure and function in human disease[J]. Curr Opin Endocr Metab Res, 2024, 34: 100509. doi:10.1016/j.coemr.2024.100509.
- [2] Adamson S E, Hughes J W. Paracrine signaling by pancreatic islet *Cilia*[J]. Curr Opin Endocr Metab Res, 2024, 35: 100505. doi:10.1016/j.coemr.2024.100505.
- [3] Cho J H, Li Z A, Zhu L, et al. Islet primary *Cilia* motility controls insulin secretion[J]. Sci Adv, 2022, 8(38): eabq8486. doi:10.1126/sciadv.abq8486.
- [4] Idevall-Hagren O, Incedal Nilsson C, Sanchez G. Keeping pace: the primary *Cilium* as the conducting baton of the islet[J]. Diabetologia, 2024, 67(5): 773 – 82. doi:10.1007/s00125 – 024 – 06096 – 6.
- [5] Quilichini E, Fabre M, Nord C, et al. Insights into the etiology and physiopathology of MODY5/HNF1B pancreatic phenotype with a mouse model of the human disease[J]. J Pathol, 2021, 254(1): 31 – 45. doi:10.1002/path.5629.
- [6] Volta F, Scerbo M J, Seelig A, et al. Author Correction: glucose homeostasis is regulated by pancreatic β -cell *Cilia* via endosomal EphA-processing[J]. Nat Commun, 2021, 12: 4796. doi:10.1038/s41467 – 021 – 24865 – 4.
- [7] Hughes J W, Cho J H, Conway H E, et al. Primary *Cilia* control glucose homeostasis via islet paracrine interactions[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2020, 117(16): 8912 – 23. doi:10.1073/pnas.2001936117.
- [8] 熊 竹, 马丹丹, 张智勇. 基于多数据库分析 FAM50A 在肝细胞癌中的临床意义及生物学功能[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(1): 65 – 71. doi:10.19405/j.cnki.issn1000 – 1492.2021.01.013.
- [8] Xiong Z, Ma D D, Zhang Z Y. Clinical significance and biological functions of FAM50A in hepatocellular carcinoma: an analysis based on multidatabase[J]. Acta Univ Med Anhui, 2021, 56(1): 65 – 71. doi:10.19405/j.cnki.issn1000 – 1492.2021.01.013.
- [9] Anver S, Roguev A, Zofall M, et al. Yeast X-chromosome-associated protein 5 (Xap5) functions with H2A.Z to suppress aberrant transcripts[J]. EMBO Rep, 2014, 15(8): 894 – 902. doi:10.15252/embr.201438902.
- [10] Li L, Tian G, Peng H, et al. New class of transcription factors controls flagellar assembly by recruiting RNA polymerase II in *Chlamydomonas*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115(17): 4435 – 40. doi:10.1073/pnas.1719206115.
- [11] Wang W, Xing J, Zhang X, et al. Control of ciliary transcriptional programs during spermatogenesis by antagonistic transcription factors[J]. eLife, 2025, 13: RP94754. doi:10.7554/elife.94754.
- [12] 冯 雳, 魏志新, 花梦婷, 等. 莱茵衣藻 IFT144 蛋白的原核表达及多克隆抗体的制备[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2019, 42(6): 32 – 7. doi:10.7612/j.issn.2096 – 5281.2019.06.005.
- [12] Feng L, Wei Z X, Hua M T, et al. Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of *Chlamydomonas reinhardtii* IFT144 protein[J]. J Nat Sci Hunan Norm Univ, 2019, 42(6): 32 – 7. doi:10.7612/j.issn.2096 – 5281.2019.06.005.
- [13] 冯 雳, 丁 梅, 邢俊俏, 等. 莱茵衣藻中 IFT80 蛋白多克隆

抗体的制备及其应用[J]. 湖北师范大学学报(自然科学版), 2019, 39(4): 53–8. doi:10.3969/j.issn.2096–3149.2019.04.010.

- [13] Feng L, Ding M, Xing J Q, et al. Polyclonal antibody's preparation and application in *Chlamydomonas reinhardtii* intraflagellar transport protein 80 (IFT80) [J]. J Hubei Norm Univ Nat Sci, 2019, 39(4): 53–8. doi:10.3969/j.issn.2096–3149.2019.04.010.

- [14] Lee E Y, Hughes J W. Rediscovering primary *Cilia* in pancreatic islets[J]. Diabetes Metab J, 2023, 47(4): 454–69. doi:10.4093/dmj.2022.0442.

- [15] Wu C T, Hilgendorf K I, Bevacqua R J, et al. Discovery of ciliary G protein-coupled receptors regulating pancreatic islet insulin and glucagon secretion[J]. Genes Dev, 2021, 35(17–18): 1243–55. doi:10.1101/gad.348261.121.

- [16] Melena I, Hughes J W. Islet *Cilia* and glucose homeostasis[J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 1082193. doi:10.3389/fcell.2022.1082193.

- [17] Pablos M, Casanueva-álvarez E, González-Casimiro C M, et al. Primary *Cilia* in pancreatic β - and α -cells; time to revisit the role of insulin-degrading enzyme[J]. Front Endocrinol, 2022, 13: 922825. doi:10.3389/fendo.2022.922825.

Generation of a FAM50A knockout Beta-TC-6 cell line using CRISPR/Cas9 technology and preparation of a FAM50A polyclonal antibody

Qiu Yaxuan¹, Meng Xiangrui¹, Xie Xiaoyan², Cheng Sitong¹, Peng Yufan²,
Liu Siqi¹, Zhao Xue^{2,3}, Hu Zhangfeng^{2,3}, Xing Junqiao^{2,3}, Wang Weihua^{2,3}

(¹ School of Medicine, ² School of Life Sciences,

³ Institute of Microalgae Synthetic Biology and Green Manufacturing, Jiangnan University, Wuhan 430056)

Abstract Objective To construct a Family with sequence similarity 50 member A (*FAM50A*) gene knockout mouse insulinoma pancreatic β -cell line Beta-TC-6 using CRISPR/Cas9 gene editing technology and to prepare polyclonal antibodies specifically recognizing FAM50A. **Methods** Two guide RNAs (sgRNAs) targeting the *FAM50A* gene were designed, and a recombinant plasmid expressing blue fluorescent protein (BFP) was constructed for gene knockout. The successfully constructed plasmid was transfected into Beta-TC-6 cells, and BFP-positive single cells were isolated for clonal expansion. The expanded monoclonal cell lines were genotyped by Sanger sequencing, and FAM50A protein expression was assessed by Western blot. Purified human recombinant FAM50A protein was used to immunize New Zealand rabbits for the preparation of a polyclonal antibody. The specificity of the prepared antibody was then validated using the successfully established *FAM50A* knockout cell line. **Results** A monoclonal cell line with a successful knockout of the *FAM50A* gene was identified. Sanger sequencing confirmed base deletions at the target site. Western blot analysis showed a complete absence of FAM50A protein expression in this cell line. The prepared polyclonal antibody successfully recognized endogenous murine FAM50A protein in wild-type Beta-TC-6 cells and in hTERT-RPE1 cells overexpressing human FAM50A-GFP fusion protein, while no signal was detected in the *FAM50A* knockout cells. **Conclusion** This study successfully established a *FAM50A* gene knockout Beta-TC-6 cell model and generated a FAM50A polyclonal antibody, providing powerful tools for future research.

Key words FAM50A; antibody preparation; gene knockout; cilia; pancreas; diabetes mellitus

Found programs National Key Research and Development Program of China (No. 2020YFA0907400); National Natural Science Foundation of China (No. 32170702)

Corresponding authors Wang Weihua, E-mail: wangweihua@jhu.edu.cn; Xing Junqiao, E-mail: juniao@foxmail.com