

网络出版时间:2025-10-28 13:26:50 网络出版地址:<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20251027.1508.015>

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@foxmail.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; paoniflorin; 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: JHDXL2024-126)。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 ± 2) °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 Thermo Fisher 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 CO_2 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 (型号: KB-1) 购自海门市其林贝尔仪器制造有限公司; 恒温振荡箱 (型号: 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 (型号: 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'-GGCAAAAAGGAGCAGTCAA-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'-GAGATGGCTATGTACGAGGGTTTAGAGCTAGAAA-TAGCAAGTAAATAA-3'; sgRNA1-R: 5'-CTCGTACATGCCATCTCGCTGTTCCCTTCAC-3'; sgRNA2-F: 5'-GGCAAAAAAGGAGCAGTCAAGTT-TAGAGCTAGAAATAGCAAGTAAATAA-3'; sgRNA2-R: 5'-GACTGCTCCTTTGCCCCGTGTTCTGCCT-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'-AAGAGAGCTCTGGTGGGC-T-3') 和 P3/P4 (P3: 5'-ACTGGTGAAGGAGCCGAGAG-3'; P4: 5'-TGTGAGGGAGAGCTGCTGA-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-ces.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'-TTCCAGGGGCCCTGGATCCGT-GACCCTGAATGACATGAAGGC-3', Reverse: 5'-CTC-GAGTCGACCCGGAAATTCTCACTCACGGTCTCGATC-AGCAA-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 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 于 37 °C、200 r/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 mmol/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 mmol/L PMSF (蛋白酶抑制剂) 和终浓度为 1 mg/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 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0, 含 10 mmol/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 μL 洗脱液; 随后再孵育 5 min, 分别收集 1 mL 和 500 μL 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 (6~8 点) 进行免疫。21 d 后进行第 2 次免疫, 取 500 μg 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、3 000 r/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。

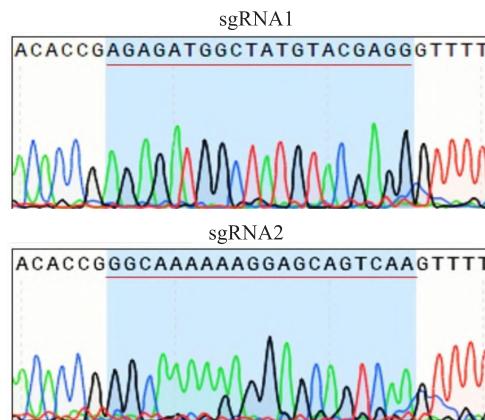


图 1 重组质粒的测序图谱

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, 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

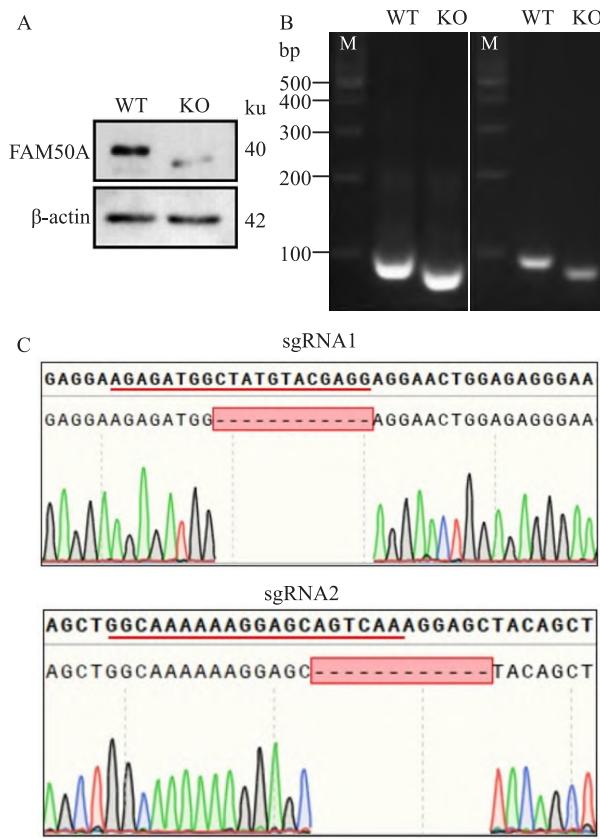


图 2 FAM50A 基因敲除细胞系的鉴定

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,可用于后续的蛋白表达与纯化研究。

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* 中成功实现高效的可溶性表达,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。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。

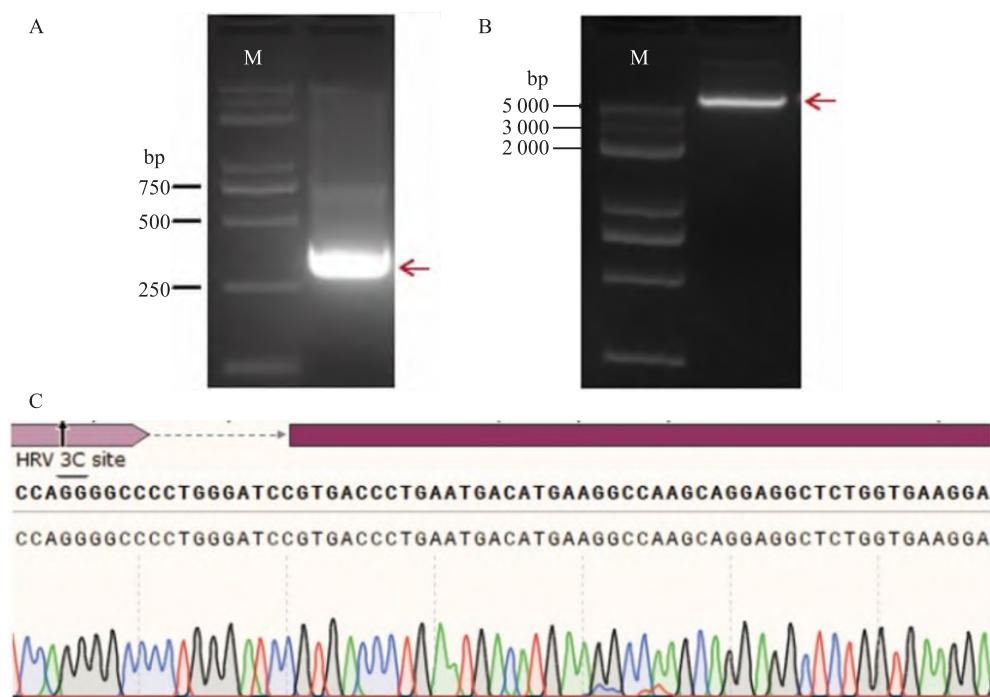


图3 FAM50A 原核表达载体的构建与鉴定

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.

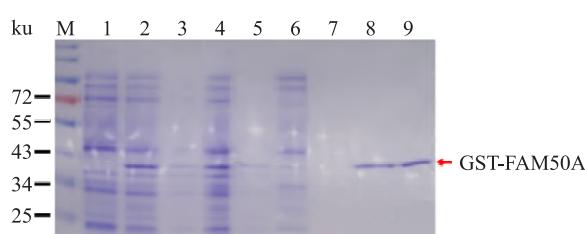


图4 SDS-PAGE凝胶考马斯亮染色分析

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体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

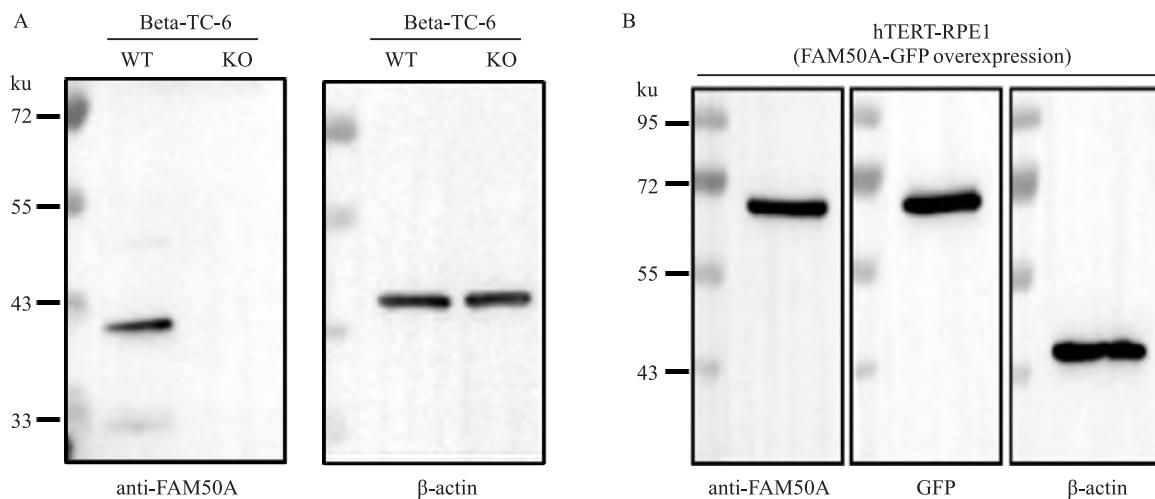


图 5 自主制备的 FAM50A 多克隆抗体的特异性验证

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* 在胰岛 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:10.1522/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 Siqui¹, Zhao Xue^{2,3}, Hu Zhangfeng^{2,3}, Xing Junqiao^{2,3}, Wang Weihua^{2,3}
(¹School of Medicine, ²School of Life Sciences,

³Institute of Microalgae Synthetic Biology and Green Manufacturing, Jianghan 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

Fund 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@jhun.edu.cn; Xing Junqiao, E-mail: juniao@foxmail.com