

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<sup>1</sup>, 孟祥瑞<sup>1</sup>, 谢小燕<sup>2</sup>, 程思彤<sup>1</sup>, 彭宇帆<sup>2</sup>, 柳思琪<sup>1</sup>, 赵雪<sup>2,3</sup>, 胡长峰<sup>2,3</sup>, 邢俊俏<sup>2,3</sup>, 王卫华<sup>2,3</sup>  
(江汉大学<sup>1</sup> 医学部、<sup>2</sup> 生命科学学院、<sup>3</sup> 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  $\beta$  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@jhu.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  $\beta$  细胞的功能障碍是其核心病因之一<sup>[1]</sup>。 $\beta$  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<sup>[2-4]</sup>。缺少  $\beta$  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<sup>[5-7]</sup>。研究与胰腺  $\beta$  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<sup>[8-9]</sup>。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<sup>[10-11]</sup>。然而, FAM50A 在胰腺  $\beta$  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  $\beta$  细胞系 Beta-TC-6, 旨在探索 FAM50A 对  $\beta$  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 $\alpha$  (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: JHDXML2024-126)。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- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl  $\beta$ -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- $\beta$ -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<sub>2</sub> 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 $\alpha$ 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  $\mu$ g/mL)的溶菌肉汤(lysogeny broth, LB)固体平板上,置于37  $^{\circ}$ 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  $\mu$ g/mL)的LB液体培养基中,并在37  $^{\circ}$ 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 $4 \times 10^6$ 个/mL,吸取250  $\mu$ L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  $\mu$ F。

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'-AAGAGAGCTCTGGTGGC-T-3')和P3/P4(P3:5'-ACTGCTGAAGGAGCGAGAG-

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  $^{\circ}$ 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 $\beta$ -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<sup>[9]</sup>,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'-TTCCAGGGGCCCCCTGGGATCCGT-GACCCTGAATGACATGAAGGC-3', Reverse:5'-CTC-GAGTCGACCCGGGAATTCTCACTCACGGTCTCGATC-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 $\alpha$ 感受态细胞中,将混合物置于冰上孵育20 min,接着在42  $^{\circ}$ 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  $\mu$ L无抗生素LB培养基,37  $^{\circ}$ 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  $\mu$ g/mL氨苄青霉素的LB固体培养基上,37  $^{\circ}$ C倒置培养14 h。挑取单克隆菌落接种至含100  $\mu$ g/mL氨苄青霉素的LB液体培养基中,37  $^{\circ}$ 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  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  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  $50\text{ }\mu\text{g/mL}$  氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $200\text{ r/min}$  条件下振荡培养。待菌液吸光度 ( $600\text{ nm}$ ) 值达到 0.7 左右时, 加入终浓度  $0.3\text{ mmol/L}$  的 IPTG, 在  $16\text{ }^{\circ}\text{C}$  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  $1\text{ mmol/L}$  PMSF (蛋白酶抑制剂) 和终浓度为  $1\text{ mg/mL}$  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  $5\text{ mL}$ ), 以除去非特异性结合的杂蛋白。最后, 用  $2\text{ mL}$  洗脱缓冲液 ( $50\text{ mmol/L}$  Tris-HCl, pH 9.0, 含  $10\text{ mmol/L}$  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  $500\text{ }\mu\text{L}$  洗脱液; 随后再孵育 5 min, 分别收集  $1\text{ mL}$  和  $500\text{ }\mu\text{L}$  洗脱液。所有操作均在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下进行<sup>[12-13]</sup>。

**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  $1\text{ mg}$  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  $500\text{ }\mu\text{g}$  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  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下静置过夜以使其充分凝固。随后于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $3\text{ }000\text{ r/min}$  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  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  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  $\beta$ -

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。

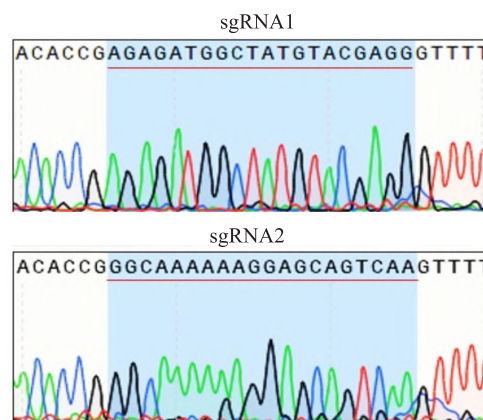


图 1 重组质粒的测序图谱

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



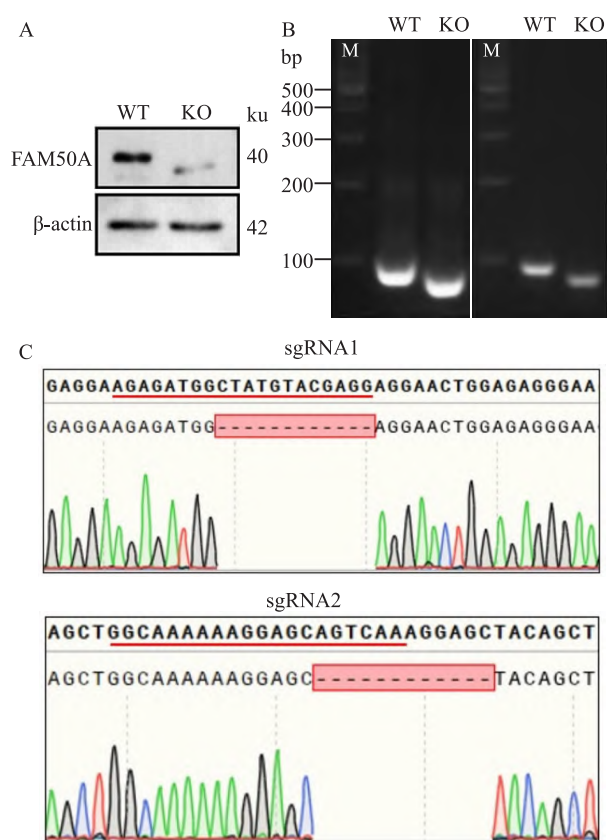


图2 FAM50A 基因敲除细胞系的鉴定

Fig.2 Identification of the FAM50A knockout cell line

A: Western blot analysis of FAM50A protein expression in wild-type and knockout cells, with  $\beta$ -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

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。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  $\beta$  细胞系。胰岛  $\beta$  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<sup>[7]</sup>。既往研究<sup>[14-17]</sup>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<sup>[10-11]</sup>,探索其在胰岛  $\beta$  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。

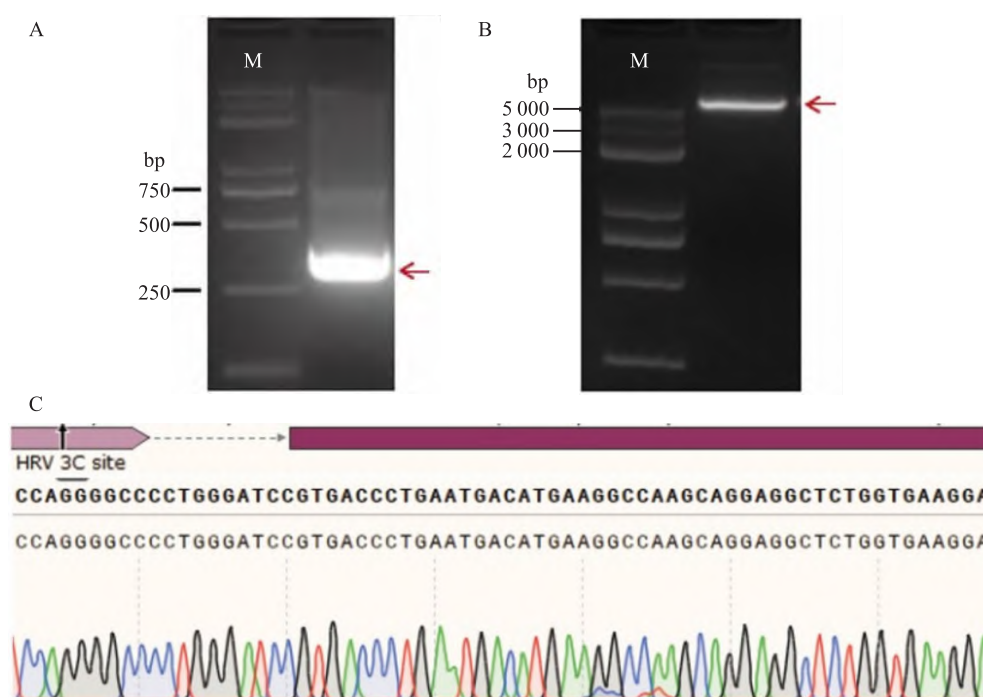
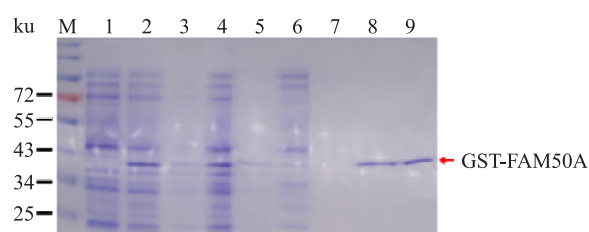


图3 FAM50A 原核表达载体的构建与鉴定

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<sup>[12-13]</sup>。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

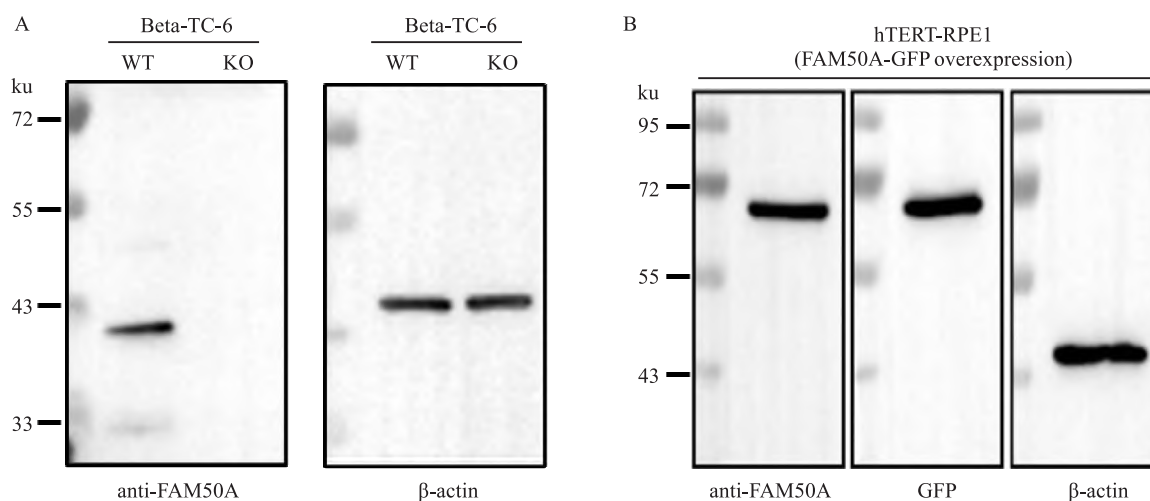


图5 自主制备的 FAM50A 多克隆抗体的特异性验证

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

A: Western blot analysis of WT and FAM50A KO Beta-TC-6 cells,  $\beta$ -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  $\beta$  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  $\beta$ -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  $\beta$ - and  $\alpha$ -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 Yaxuan<sup>1</sup>, Meng Xiangrui<sup>1</sup>, Xie Xiaoyan<sup>2</sup>, Cheng Sitong<sup>1</sup>, Peng Yufan<sup>2</sup>,  
Liu Siqi<sup>1</sup>, Zhao Xue<sup>2,3</sup>, Hu Zhangfeng<sup>2,3</sup>, Xing Junqiao<sup>2,3</sup>, Wang Weihua<sup>2,3</sup>

(<sup>1</sup>School of Medicine, <sup>2</sup>School of Life Sciences,

<sup>3</sup>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  $\beta$ -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@jhu.edu.cn; Xing Junqiao, E-mail: juniao@foxmail.com