**CRISPR/Cas9基因编辑HeLa细胞以mNeonGreen标记蛋白质的方案**

**摘要**

参与信号转导过程的蛋白质亚细胞定位动态对于确定信号传导结果至关重要。然而，关于活细胞中内源性信号蛋白定位的信息非常有限。例如，表皮生长因子(EGF)受体(EGFR)到 RAS-RAF 和 ERK1/2/MAPK 信号通路的生化机制已被充分理解，而该通路在细胞内的操作区域仍未得到充分表征。用荧光蛋白标记信号通路的内源性组分可以在其由内源性调控机制控制的天然表达水平下更准确地表征其细胞内动态，从而避免过表达和错误定位的潜在干扰效应。本研究描述了使用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术，以荧光蛋白 mNeonGreen (mNG) 标记 EGFR-RAS-MAPK 通路组分(如 Grb2、KRAS 和 NRAS)的方法学途径，以及生成经编辑靶蛋白的纯合单细胞克隆的方法。

**背景**

表皮生长因子(EGF)受体(EGFR)在细胞表面被 EGF 或其他配体激活，触发参与细胞增殖、分化、存活和运动的 RAS-RAF-MAPK/ERK1/2 信号通路。激活的 EGFR 被内吞并积累在早期内体中，在那里它或被回收到细胞膜，或被靶向溶酶体降解。活化的 EGFR 是否继续通过 RAS-ERK1/2 轴从内体传递信号以维持 ERK1/2 激活在文献中仍有争议（参见 von Zastrow 和 Sorkin, 2021 的综述）。支持 ERK1/2 内体信号传导的证据基于在 EGF 刺激的细胞内体中检测到 ERK1/2 通路组分（Pol 等, 1998; Howe 等, 2001; Jiang 和 Sorkin, 2002; Lu 等, 2009; Schmick 等, 2014）。然而，这些观察要么是使用过表达的重组蛋白，要么是在化学固定的细胞中，或通过亚细胞分级进行的，这些方法可能无法正确报告内源性蛋白的亚细胞定位。

我们最初使用基于锌指核酸酶(ZFN)和转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)的基因编辑技术，通过荧光标记来研究内源性 EGFR 和 ERK1/2 通路组分的时空动态(Pinilla-Macua 等, 2017, 2016)。随后，我们转向使用 CRISPR-Cas9 系统进行基因编辑(Surve 等, 2019; Surve 等, 2021)。我们选择了一种表达水平与体内许多哺乳动物细胞相似的 HeLa 细胞亚变体进行这些研究，并且我们已经对这些细胞中的 EGFR 内吞转运系统进行了严格表征。

CRISPR-Cas9 相比 ZFN 和 TALEN 已被证明是一种更灵活高效的基因编辑方法，被广泛用于基因敲除、基因激活、基因抑制和敲入。本方案描述了在 HeLa 等转化细胞系中实现基因标记（敲入）的变异方法（表 1）。

**材料和试剂**

1. CellTrics 50 μm 无菌一次性过滤器(Sysmex, 目录号: 04-004-2327)
2. 96 孔板(Ibidi, 15 μ-Plate 96孔黑色)
3. 12 孔细胞培养板(Corning, 目录号: 3513)
4. 25 或 75 cm² 细胞培养瓶(Corning, 目录号: 430639 或 430641U)
5. 15 mL 锥底管(Sarstedt, 目录号: 62.554.205)
6. IDT公司的DNA寡核苷酸引物
7. GeneArt Precision gRNA合成试剂盒(Invitrogen, 目录号: A29377)
8. Tracr Fragment + T7引物混合物(包含通用PCR扩增引物和crRNA/tracrRNA的80-nt恒定区域)(Invitrogen, 目录号: A29377)
9. Phusion™ High-Fidelity PCR Master Mix (2×)(Invitrogen, 目录号: A29377)
10. 无核酸酶水
11. dNTP 混合物(每种dATP、dGTP、dCTP、dTTP 10mM)(NEB, 目录号: N0447)
12. 5× TranscriptAid™ 反应缓冲液(Invitrogen, 目录号: A29377)
13. TranscriptAid™ 酶混合物(Invitrogen, 目录号: A29377)
14. DNase I (Invitrogen, 目录号: A29377)
15. IDT 公司的单链 DNA (ssDNA) 寡核苷酸
16. NEBuilder® HiFi DNA 组装主混合物(NEB, 目录号: E2621)
17. pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) 质粒(Addgene 质粒 # 62988)
18. BbsI (NEB, 目录号: R0539)
19. NEB Buffer 2 (NEB, 目录号: B7002S)
20. NEB® 5-α 感受态 E. coli (高效)(NEB, 目录号: C2987)
21. 氨苄青霉素琼脂平板和卡那霉素琼脂平板
22. NEB buffer 2.1 (NEB, 目录号: B7202)
23. QIAquick PCR 纯化试剂盒(Qiagen, 目录号: 28104)
24. IDT 公司的合成双链供体 DNA
25. Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, 目录号: M0530)
26. Phusion GC 缓冲液 5× (NEB, 目录号: B0519)
27. Zero Blunt™ TOPO™ PCR 克隆试剂盒(Invitrogen, 目录号: 45-1245)
28. EcoRI-HF (NEB, 目录号: R3101)
29. CutSmart Buffer 10× (NEB, 目录号: B6004)
30. QIAquick 凝胶提取试剂盒(Qiagen, 目录号: 28704)
31. XbaI (NEB, 目录号: R0145)
32. Easy-Fusion Halo 质粒(Addgene 质粒 # 112850)
33. EcoRI-HF (NEB, 目录号: R3101)
34. AvaI (NEB, 目录号: R0152)
35. HincII (NEB, 目录号: R0103)
36. DMEM (Gibco, 目录号:11965-092) 含10%FBS (Invitrogen,目录号: 16140071)
37. DPBS (不含Ca²⁺或Mg²⁺)(Gibco,目录号:14190-144)
38. 胰蛋白酶(Gibco, 目录号: 25200-056)
39. Neon 转染系统(Invitrogen, 目录号: MPK5000)
40. Neon 转染系统 10 μL 试剂盒(Invitrogen, 目录号: MPK1025)
41. Buffer R
42. 嘌呤霉素(Sigma-Aldrich, 目录号: P8833)
43. Platinum Cas 9 (Invitrogen, 目录号: A36498)
44. BD FACSAria III 流式分选仪配备 488 100 mW Trigon 激光器和 100 μm 喷嘴(BD Biosciences)
45. 诺考达唑(Sigma-Aldrich, 目录号: M1404)
46. Lipofectamine 3000 (Invitrogen, 目录号: L3000001)
47. OptiMEM (Invitrogen, 目录号: 31985062)
48. 重组KRAS兔单克隆抗体(Thermo Fisher Scientific, 目录号: 703345)
49. 细胞分选缓冲液(见配方)
50. TGH缓冲液(见配方)

**软件**

1. https://www.benchling.com/。Benchling是一个基于云的信息学平台，对学术研究人员免费。它提供 DNA、寡核苷酸和氨基酸的设计工具。
2. https://portals.broadinstitute.org/gppx/crispick/。该网站由马萨诸塞州博大研究所的基因扰动平台主办。
3. http://chopchop.cbu.uib.no/。CHOPCHOP 是一个网络工具，由挪威卑尔根大学的 Valen 小组设计。该网站仅供非营利和学术使用。
4. https://nebuilder.neb.com。该网络工具可用于设计 HiFi DNA 组装或 Gibson 组装的引物。

**实验步骤**

**实验设计**

表1. 用于标记基因的组分来源

|  | **KRAS** | **NRAS** | **Grb2** |
| --- | --- | --- | --- |
| Cas9 | 商业纯化酶 | 商业纯化酶 | 质粒-PX459 |
| gRNA | 体外转录 | 体外转录 | 克隆至质粒-PX459 |
| 供体 | 合成基因片段 | 合成基因片段 | 同源臂和 mNG 片段克隆至质粒 |
| 递送方法 | 电穿孔 | 电穿孔 | Lipofectamine 转染 |

**A. 生成用于 KRAS、NRAS 和 Grb2 的 gRNA**

**1. 体外合成用于标记 KRAS 和 NRAS 的 gRNA**

a. 确定靶向gRNA

我们使用KRAS和NRAS基因的氨基末端标记 mNeonGreen荧光蛋白序列，因为所有RAS蛋白在其羧基末端都会被加工修饰（图1）。有几种在线gRNA设计工具可用。我们通常使用Benchling、Broad Institute GPP (现在的CRISPick)和CHOPCHOP等工具设计靶向gRNA。使用这些工具，我们为KRAS和NRAS各确定了两个靶点，它们非常接近两个基因的起始密码子。为每个靶点订购两条互补引物（表 2）。

表2. 体外转录gRNA的引物

| **引物** | **序列 5'--- 3'** |  |
| --- | --- | --- |
| Kras\_1F | TAATACGACTCACTATAGGAATATAAACTTGTGGTAGT | 靶点1 |
| Kras\_1R | TTCTAGCTCTAAAACACTACCACAAGTTTATATTC | 靶点1 |
| Kras\_2F | TAATACGACTCACTATAGAATGACTGAATATAAACTTG | 靶点2 |
| Kras\_2R | TTCTAGCTCTAAAACCAAGTTTATATTCAGTCATT | 靶点2 |
| Nras\_1F | TAATACGACTCACTATAGGACTGAGTACAAACTGGTGG | 靶点1 |
| Nras\_1R | TTCTAGCTCTAAAACCCACCAGTTTGTACTCAGTC | 靶点1 |
| Nras\_2F | TAATACGACTCACTATAGAATGACTGAGTACAAACTGG | 靶点2 |
| Nras\_2R | TTCTAGCTCTAAAACCCAGTTTGTACTCAGTCATT | 靶点2 |

* 1. 在1×TE缓冲液中将靶点引物稀释至100μM的储备溶液。
  2. 通过将各100μM的正向和反向靶点引物各10μL加入80μL无核酸酶水中，制备10μM的靶点引物混合物储备溶液。
  3. 通过在97μL无核酸酶水中加入3μL的10μM靶点引物混合物储备溶液，制备0.3μM的靶点引物混合物工作溶液。

b. 组装gRNA DNA模板

此步骤生成体外转录gRNA所需的DNA模板。在冰上解冻GeneArt Precision gRNA合成试剂盒中的试剂。混合并离心所有小瓶的内容物。按照给定顺序设置以下25 μL体积的PCR组装反应（表 3）。

表3. 制备gRNA DNA模板的组分

| **组分** | **用量** |
| --- | --- |
| Phusion™ High-Fidelity PCR Master Mix (2×) | 12.5μL |
| Tracr Fragment + T7 Primer Mix | 1μL |
| 0.3 μM靶向F/R寡核苷酸混合物 | 1μL |
| 无核酸酶水 | 10.5μL |

由于PCR产物预计很短（120bp），使用以下参数执行两步组装PCR（表4）。

表4. 生成gRNA DNA模板的PCR参数

| **循环步骤** | **温度** | **时间** | **循环次数** |
| --- | --- | --- | --- |
| 初始变性 | 98°C | 10 秒 | 1× |
| 变性 | 98°C | 5 秒 | 32× |
| 退火 | 55°C | 15 秒 | 32× |
| 最终延伸 | 72°C | 1 分钟 | 1× |
| 保持 | 4°C | 保持 | 1× |

c. gRNA的体外转录(IVT)

使用步骤 A.1.b中生成的gRNA DNA模板进行gRNA的体外转录。按以下给定顺序设置反应（表 5）。

表5. IVT 反应的组分

| **组分** | **用量** |
| --- | --- |
| NTP 混合物 (每种 ATP、GTP、CTP、UTP 100 mM) | 8 μL |
| gRNA DNA 模板 (来自 PCR 组装) | 6 μL |
| 5× TranscriptAid™ 反应缓冲液 | 4 μL |
| TranscriptAid™ 酶混合物 | 2 μL |

彻底混合内容物并离心。在37°C进行IVT反应3小时。

d. 通过DNase I消化去除DNA模板

从IVT反应中去除DNA有助于防止其干扰RNA转录物的后续应用。

i. 在IVT反应结束后立即用1μL DNase I (1 U/μL)孵育IVT反应混合物，并在37°C孵育15分钟。

e. 使用试剂盒提供的柱子和缓冲液纯化gRNA

i. 用无核酸酶水将IVT反应稀释至200μL，并加入100 μL结合缓冲液。通过移液混匀。

ii. 加入300 μL乙醇（>96%）并通过移液混匀。

iii. 将混合物转移到GeneJET™ RNA纯化微柱（预装配收集管）中，并以14,000×g离心30-60秒。丢弃流出液。

iv. 用700μL洗涤缓冲液1和洗涤缓冲液2洗涤结合的RNA。

v. 以14,000×g再离心空的纯化柱60秒，以完全去除残留的洗涤缓冲液。

vi. 将纯化柱转移到干净的1.5 mL收集管中。

vii. 向纯化柱过滤器中心加入10 μL无核酸酶水，并以14,000×g离心60秒以洗脱RNA。

viii. 将洗脱的gRNA存储在-20°C直至使用。对于长时间存储，将gRNA存储在-80°C。

注意：在处理RNA时遵循所有必要的预防措施，以避免其降解或污染，并参考制造商的详细指南以生成gRNA。

**2. 克隆用于标记Grb2的gRNA**

a. 确定靶向gRNA

Grb2在其羧基末端标记mNG。Grb2 gRNA的克隆使用NEBuilder HiFi DNA组装混合物进行，该混合物允许将线性质粒和单链DNA片段组装，就像多个 DNA 片段组装一样。与 RAS 蛋白类似，使用 Benchling 和 Broad Institute GPP（现在的 CRISPick）确定了 Grb2 的两个靶向 gRNA。以下靶向 gRNA 序列寡核苷酸作为 ssDNA 从 IDT 订购（表 6）。下划线序列代表实际的靶向 gRNA 序列，两侧是来自 PX459 的 BbsI 限制酶切位点周围的重叠序列。

表6. Grb2 gRNA 的 ssDNA 寡核苷酸

|  |  |
| --- | --- |
| grb2-RNA\_T1 | ATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGGGTTAGACGTTCCGGTTCACGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT |
| grb2-gRNA\_T2 | ATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGGGCTTAGACGTTCCGGTTCACGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT |

b. 用 BbsI 消化 PX459

通过在 37°C 消化 BbsI 4 小时线性化 PX459 质粒（表 7）。使用 QIAquick PCR 纯化试剂盒纯化消化的质粒。

表7. PX459 消化设置

| **组分** | **用量** |
| --- | --- |
| PX459 质粒 (500 ng/μL) | 10 μL |
| 10× Buffer 2.1 | 2 μL |
| BbsI (10 U/μL) | 1 μL |
| ddH₂O | 7 μL |

c. ssDNA 连接到消化的 PX459

离心 ssDNA 寡核苷酸沉淀，并将其重悬于 1× TE 中至最终浓度为 100 μM，然后进一步稀释至 NEB Buffer 2 中的 0.4 μM 工作储备液。按以下给定顺序设置线性化 PX459 和 ssDNA 寡核苷酸的连接反应（表 8）。

表8. HiFi DNA 组装设置

| **组分** | **用量** |
| --- | --- |
| 线性 PX459 质粒 (50 ng) | 1 μL |
| 0.4 μM ssDNA 储备液 | 5 μL |
| ddH₂O | 4 μL |
| NEBuilder® HiFi DNA 组装主混合物 | 10 μL |

在 50°C 孵育组装反应 1 小时，并将 2 μL 的反应混合物转化到 NEB 5-α 感受态 E. coli 细胞中。通过将转化的 E. coli 细胞涂布到氨苄青霉素琼脂平板上选择氨苄青霉素抗性菌落。

d. 筛选和确认阳性克隆

从氨苄青霉素平板上选择几个菌落进行质粒分离。通过 Sanger 测序确认含有 gRNA 序列的阳性克隆。

**B. 生成用于标记 KRAS、NRAS 和 Grb2 的供体 DNA**

**1. 克隆用于标记 KRAS 和 NRAS 的供体 DNA**

用mNG序列标记的供体 DNA，两侧各有约500bp的5'和3'同源臂，从IDT获得为基因片段。这些片段使用引物扩增并克隆到pCRBluntII-TOPO质粒中，使用TOPO PCR克隆试剂盒。

a. 扩增供体 DNA

离心含有基因片段的小瓶以收集沉淀物，在50μL 1×TE中溶解。使用Phusion聚合酶（表10和11）和以下提到的引物（表9）扩增合成DNA。

表9. 扩增KRAS和NRAS合成供体DNA的引物

| **引物** | **5'------------3'** |
| --- | --- |
| KRas\_5HAF | AGGTGGGGGTCCACTAGGAA |
| KRas\_3HAR | CATATGATGTCACAATACCAAGAAAC |
| NRas\_5HAF | CAGAGGCAGTGGAGCTTG |
| NRas\_3HAR | ACAATCAGACAGTCTCGCTACTAT |

表10. 扩增KRAS和NRAS合成供体DNA的 PCR 设置

| **组分** | **KRAS 供体 DNA** | **NRAS 供体 DNA** |
| --- | --- | --- |
| 供体基因片段 | 5 μL | 5 μL |
| Phusion GC Buffer 5× | 10 μL | 10 μL |
| 10mM dNTP | 1 μL | 1 μL |
| 5HAF | 2.5 μL | 2.5 μL |
| 3HAR | 2.5 μL | 2.5 μL |
| Phusion Polymerase | 1 μL | 1 μL |
| 无核酸酶水 | 28 μL | 28 μL |

表11. 扩增KRAS和NRAS合成供体DNA的PCR参数

| **循环步骤** | **温度** | **时间** | **循环次数** |
| --- | --- | --- | --- |
|  | KRAS 供体 | NRAS 供体 |  |
| 初始变性 | 98°C | 98°C | 1 分钟 |
| 变性 | 98°C | 98°C | 15 秒 |
| 退火 | 61.6°C | 64.7°C | 15 秒 |
| 延伸 | 72°C | 72°C | 1 分钟 |
| 最终延伸 | 72°C | 72°C | 10 分钟 |
| 保持 | 4°C | 4°C | 保持 |

对KRAS和NRAS扩增的供体DNA中的1.68 kb PCR产物进行凝胶纯化。

b. 扩增的供体DNA和pCRBluntII-TOPO质粒的连接

按以下方式在6μL体积中设置凝胶洗脱的KRAS和NRAS供体DNA与pCRII-Blunt-TOPO质粒的连接反应（表12）。

表12. 供体DNA和pCRBluntII-TOPO连接设置

| **组分** | **KRAS 供体** | **NRAS 供体** |
| --- | --- | --- |
| 凝胶洗脱片段 | 2 μL | 2 μL |
| 盐溶液 | 1 μL | 1 μL |
| 无核酸酶水 | 2 μL | 2 μL |
| pCR-II-Blunt-TOPO | 1 μL | 1 μL |

在室温下孵育连接反应5分钟。将1-2 μL的连接混合物转化到感受态E. coli中，并在含卡那霉素的平板上涂布进行选择。

c. 筛选和确认供体DNA

从卡那霉素平板上选择几个菌落并培养以分离质粒。通过EcoRI消化和Sanger测序确认阳性克隆，确保供体序列中没有变化。

d. 从阳性克隆中消化和凝胶洗脱供体DNA序列

片段插入pCRII-Blunt-TOPO的方式使EcoRI位点位于插入物的两端，允许通过EcoRI消化恢复插入物。如下所示用EcoRI消化含有供体序列的阳性克隆（表13）。

表13. pCR-II-Blunt-TOPO-Donor 质粒的消化

| **组分** | **KRAS** | **NRAS** |
| --- | --- | --- |
| pCR-II-Blunt-TOPO-Donor (1 μg/μL) | 20 μL | 20 μL |
| CutSmart buffer 10× | 5 μL | 5 μL |
| EcoRI-HF (10 U/μL) | 3 μL | 3 μL |
| 无核酸酶水 | 22 μL | 22 μL |

在72°C进行消化3小时。从两个样品中凝胶洗脱1.68 kb条带。将洗脱的供体片段存储在-20°C。

注意：克隆供体PCR片段是为了便于使用Sanger测序确认正确的供体序列，并避免重复扩增。纯化的PCR片段可直接用作供体DNA，从而减少克隆时间。

**2. 克隆用于标记Grb2的供体DNA**

为了克隆用于Grb2基因编辑的供体DNA，使用由NEbuilder算法（NEB）设计的引物从HeLa基因组DNA扩增5'和3'同源臂（HA），而KRAS供体DNA用作模板扩增mNG ORF。引物为产生的PCR片段添加重叠序列，然后使用NEBuilder® HiFi DNA组装主混合物将这些片段与Easy-Fusion Halo质粒组装在一起（表14）。

表14. HiFi DNA 组装的组分片段

| **名称** | **长度 (bp)** | **生产方式** |
| --- | --- | --- |
| 5HA 片段 | 793 | PCR |
| 3HA 片段 | 743 | PCR |
| mNG 片段 | 755 | PCR |
| 作为骨架载体的EasyFusion halo质粒 | 2,927 | 限制性消化 |

a. 扩增同源臂(HA)和mNG ORF

使用NEBuilder算法设计带有重叠序列的引物（表15）。按照以下方式扩增构建供体DNA所需的全部三个片段（表16、17和18）。

表15. 扩增Grb2同源臂和mNG ORF的引物

| **引物** | **5'……………..3'** |
| --- | --- |
| Grb2-5HA\_f | TATCGATAAGCTTGATATCGAGAGGCAGTGTGTAGCCAG |
| Grb2-5HA\_r | CTCCTCCTAAGACGTTCCGGTTCACGGG |
| Grb2-Neon\_f | CCGGAACGTCTTAGGAGGAGGAGGATCAG |
| Grb2-Neon\_r | TTGACTCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG |
| Grb2-3HA\_f | GCTGTACAAGTAAGAGTCAAGAAGCAATTATTTAAAG |
| Grb2-3HA\_r | CCACCGCGGTGGCGGCCGCTTCTCGAACTCCTGACCTTG |

表16. 扩增 Grb2 HAs 的 PCR 设置

| **组分** | **5HA 片段** | **3HA 片段** |
| --- | --- | --- |
| HeLa 基因组 DNA (100 ng/μL) | 3 μL | 3 μL |
| Phusion GC Buffer 5× | 10 μL | 10 μL |
| 10 mM dNTP | 1 μL | 1 μL |
| Grb2-5/3HA\_f | 2.5 μL | 2.5 μL |
| Grb2-5/3HA\_r | 2.5 μL | 2.5 μL |
| Phusion Polymerase | 1 μL | 1 μL |
| 无核酸酶水 | 30 μL | 30 μL |

表17. 扩增 mNG ORF 的 PCR 设置

| **组分** | **mNG 片段** |
| --- | --- |
| mNG-KRAS 供体 (100 ng/μL) | 3 μL |
| Phusion GC Buffer 5× | 10 μL |
| 10mM dNTP | 1 μL |
| Grb2-Neon\_f | 2.5 μL |
| Grb2-Neon\_r | 2.5 μL |
| Phusion Polymerase | 1 μL |
| 无核酸酶水 | 30 μL |

表18. 扩增 Grb2 HAs 和 mNG ORF 的 PCR 参数

| **循环步骤** | **温度** | **时间** | **循环次数** |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 5HA | 3HA | mNG |
| 初始变性 | 98°C | 98°C | 98°C |
| 变性 | 98°C | 98°C | 98°C |
| 退火 | 64.4°C | 60°C | 59.6°C |
| 延伸 | 72°C | 72°C | 72°C |
| 最终延伸 | 72°C | 72°C | 72°C |
| 保持 | 4°C | 4°C | 4°C |

使用QIAquick凝胶提取试剂盒凝胶洗脱PCR产物，并估计洗脱片段的DNA浓度。

b. EasyFusion-Halo质粒的限制性酶消化

用EcoRI和XbaI在37°C消化EasyFusion-Halo质粒4小时，去除Halo插入物（表19）。

表19. 去除Halo插入物的EasyFusion-Halo质粒消化

| **组分** | **用量** |
| --- | --- |
| EasyFusion-Halo (5 μg) | 10 μL |
| CutSmart buffer 10× | 2 μL |
| EcoRI | 2 μL |
| XbaI | 2 μL |
| 无核酸酶水 | 2 μL |

使用QIAquick凝胶提取试剂盒凝胶洗脱消化质粒的2.9 kb片段，并估计洗脱片段的DNA浓度。

c. HiFi DNA组装连接反应

将生成Grb2供体DNA所需的全部四个片段混合至最终体积为10 μL。在冰上解冻HiFi DNA组装混合物并彻底涡旋。向片段中加入等体积的HiFi DNA组装Master Mix（表20）。

表20. 生成 Grb2 供体 DNA 的连接设置

| **组分** | **用量** |
| --- | --- |
| 0.1 pmol 的 5HA | 50 ng |
| 0.1 pmol 的 mNG | 50 ng |
| 0.1 pmol 的 3HA | 50 ng |
| 0.1 pmol 的消化载体 | 185 ng |
| HIFi DNA Master Mix |  |
| 无核酸酶水 |  |

在50°C进行连接反应1小时。将2 μL的反应混合物转化到感受态E. coli中。使用限制性酶消化和Sanger测序筛选几个含有所有三个片段（5HA-mNG-3HA）的阳性克隆。

**C. 在HeLa细胞中递送gRNA和供体DNA**

**1. 电穿孔RNP复合物以标记KRAS和NRAS**

a. 在10% FBS的DMEM中培养HeLa细胞至90%汇合度于75 cm² 瓶中。用100 ng/mL诺考达唑处理细胞12小时。

b. 在电穿孔当天，在冰上解冻并存储buffer R、KRAS和NRAS特异性体外转录的gRNA以及供体DNA。将gRNA和供体DNA用无核酸酶水稀释至适当浓度。

c. 用1×DPBS洗去诺考达唑。用胰蛋白酶分散细胞，并通过添加含FBS的DMEM灭活。以300×g离心单细胞悬液5分钟。将沉淀物重悬于10 mL含10% FBS的DMEM中。使用血球计数器进行细胞计数。

d. 按以下方式在1.5 mL微量离心管中制备RNP混合物（表21），每个基因编辑反应一个。

表21. 用于电穿孔的 RNP 混合物组分

| **组分** | **用量** |
| --- | --- |
| Buffer R | 1 μL |
| Platinum Cas9 (1 μg) | 0.5 μL (1 μg) |
| gRNA (500 ng) | 2 μL |

e. 在室温下孵育RNP复合物20分钟。

f. 在RNP孵育期间，准备电穿孔设置并通过以300×g离心5分钟准备好细胞进行电穿孔。吸出DPBS并将细胞沉淀重悬至buffer R中的最终细胞密度为8 × 10⁷细胞/ml。

g. 在Neon移液器工作站中加入3 mL电解质缓冲液（Buffer E）。

h. 将5μL细胞（最终4 × 10⁵细胞）和1 μg各自的供体DNA片段添加到RNP混合物中。确保最终混合物的体积为10 μL。使用Neon移液器通过Neon吸头吸取最终混合物，避免引入气泡，并以1,005 V的脉冲电压、35 ms的脉冲宽度进行2次脉冲电穿孔。

i. 将电穿孔的细胞转移到含有预热的无抗生素10% FBS DMEM的12孔板中，并继续在37°C CO₂培养箱中孵育。

**2. 转染gRNA和供体以标记Grb2**

a. 在12孔板中培养HeLa细胞至含10% FBS的DMEM中90%汇合度。用100ng/mL诺考达唑处理细胞12小时。

b. 在转染当天，将PX459-Grb2-gRNA和Grb2-mNG供体DNA质粒稀释至无核酸酶水中的适当浓度。

c. 用1× DPBS洗去诺考达唑。加入1 mL新鲜含FBS的DMEM。

d. 按以下顺序在1.5 mL微量离心管中制备DNA-脂质混合物（表 22）。

表22. 标记Grb2的转染混合物组分

**管 1**

| **组分** | **用量** |
| --- | --- |
| OptiMEM | 50 μL |
| PX459-Grb2-gRNA (250 ng) | 0.5 μL |
| Grb2-mNG 供体 (750 ng) | 1 μL |
| P3000 试剂 | 2 μL |

**管 2**

| **组分** | **用量** |
| --- | --- |
| OptiMEM | 50 μL |
| Lipofectamine 3000 试剂 | 1.5 μL |

e. 将管1的内容物加入管2。在室温下孵育混合物10分钟。

f.将质粒-脂质混合物滴加至细胞上。

g.转染后第二天，用2μg/mL嘌呤霉素处理转染的细胞48小时，通过杀死未转染的细胞来富集转染的细胞。

h.去除含嘌呤霉素的DMEM，用DPBS洗涤细胞两次，并让细胞恢复。分散存活的细胞并扩增它们进行流式分选分析。

**D. mNG 阳性细胞的流式分选**

1. 在含 10% FBS 的 DMEM 中于 25 或 75 cm² 烧瓶中扩增标记的 HeLa 细胞。
2. 在分选当天，使用胰蛋白酶分散细胞，并用含FBS的DMEM灭活。离心细胞并用PBS洗涤一次。将最终沉淀物重悬于细胞分选缓冲液中。
3. 在分选前通过一次性过滤器过滤细胞悬液以去除细胞聚集物。使用阳性对照（暂时或稳定表达mNG的亲本HeLa细胞）和阴性对照（亲本未标记HeLa细胞）校准分选仪器。
4. 将单个分选的细胞收集到96孔板中，或作为混合群体收集在含预热的含10% FBS和抗生素的DMEM的15mL锥形管中，以防止污染。

**E. 确认阳性克隆**

1. 在使用单细胞克隆进行确认之前，冻存至少一管作为备份。
2. 可以通过蛋白特异性抗体或mNG抗体的Western blot分析确认克隆。正确的融合蛋白应比亲本蛋白的表观分子量大约25kD。同样重要的是对mNG序列插入位点周围的区域进行测序，以确保在同源修复过程中没有出现不需要的插入或缺失。

注意：未进行不同递送方法效率的头对头比较。在所有情况下，通过流式分选确定的mNG阳性细胞产量为0.1%至0.5%。由于我们对筛选单细胞菌落感兴趣，一个96孔板的单个分选细胞足以进行筛选。应该注意的是，流式分选可能无意中导致表达融合蛋白产量较高的克隆。

**数据分析**

**1. 标记细胞系克隆的表征**

从流式分选群体中选择几个菌落。处理菌落进行 DNA 分离用于 Sanger 测序以及制备用于 Western blot 分析的裂解物。为了生成用于 Sanger 测序的 PCR 产物，设计能够扩增超出同源臂区域的引物。测序应显示正确插入的 mNG 序列以及连接子和起始/终止密码子。Western blot 应显示融合蛋白正确的分子量。例如，使用 Western blot 对 HeLa/mNG-KRAS 克隆的筛选如图 2 所示。菌落在 TGH 缓冲液中裂解，裂解物进行电泳并转移到硝酸纤维素膜上。在筛选的 24 个菌落中，我们检测到两个纯合子克隆。加载亲本细胞系的裂解物作为 WT 未标记蛋白的对照。确保在 Cas9 介导的基因编辑过程中发生的脱靶变化不会以使细胞不适合研究的方式影响细胞是至关重要的。由于我们的重点是研究 EGFR-RAS-MAPK 通路，我们选择了在 EGF 存在下表现出与 HeLa 亲本和标记的 KRAS 和 NRAS 细胞相似的 ERK1/2 磷酸化动力学的克隆（Surve 等, 2021）。

**2. 内源性标记的 KRAS、NRAS 和 Grb2 定位的示例**

在筛选和确认标记的细胞系后，我们使用旋转盘共焦显微镜对活的标记细胞系进行成像（图 3）。

**配方**

**1. 细胞分选缓冲液**

* 1× PBS（无 Ca/Mg++）
* 2% 热灭活 FBS
* 1 mM EDTA

**2. TGH 缓冲液**

* 1% Triton X-100
* 10% 甘油
* 50 mM HEPES
* 2 mM EGTA
* 磷酸酶和蛋白酶抑制剂

**致谢**

作者感谢马萨诸塞州剑桥 Broad 研究所的 Feng Zhang 博士和加拿大安大略省多伦多病童医院 Peter Gilgan 研究与学习中心的 Janet Rossant 博士提供质粒。这项研究由 NIH 资助 CA089151 和 GM124186。S. Surve 还得到国家癌症中心奖学金的支持。本方案改编自 Surve 等（2021）。

**竞争利益**

作者声明没有竞争性财务利益。