# CRISPR/Cas9基因编辑HeLa细胞以mNeonGreen标记蛋白质

## 摘要

信号转导过程中蛋白质的亚细胞定位动态对确定信号输出至关重要。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，但该通路在细胞中的运行区域仍未充分表征。用荧光蛋白标记信号通路的内源性组分可以在其天然表达水平下更准确地表征其细胞内动态，避免过表达和错误定位的潜在干扰。本研究描述了使用CRISPR/Cas9基因编辑技术标记EGFR-RAS-MAPK通路组分（如Grb2、KRAS和NRAS）的方法，以及生成标记目标蛋白的纯合单细胞克隆的生成过程。

## 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，在那里它要么被回收到细胞膜，要么被靶向溶酶体降解。激活的EGFR是否继续通过RAS-ERK1/2轴从内体信号传导以维持ERK1/2激活仍有争议。内体到ERK1/2的信号传导证据基于在EGF刺激的细胞中检测到ERK1/2通路组分。然而，这些观察是通过过表达重组蛋白、化学固定细胞或亚细胞分馏进行的，这些方法可能无法正确报告内源性蛋白的亚细胞定位。

我们使用CRISPR-Cas9系统对KRAS、NRAS和Grb2进行标记。CRISPR-Cas9技术有两个主要组成部分：

1. Cas9 - RNA引导的核酸内切酶
2. 短非编码引导RNA，包括靶向互补CRISPR RNA(crRNA)和转激活crRNA(tracrRNA)

这些组件通过质粒或纯化的Cas9和纯化的sgRNA的体外生成复合物的直接递送进入细胞。递送后，gRNA通过Watson-Crick碱基配对与其靶DNA序列结合，Cas9在gRNA的PAM位点附近产生双链断裂(DSB)。DSB要么通过易错的非同源末端连接(NHEJ)机制修复，要么通过精确的同源依赖修复(HDR)机制修复。对于基因标记，还提供了额外的修复模板，即含有荧光蛋白或诸如His、HA或MYC等小标签序列的供体DNA，通过HDR允许感兴趣标签的插入。HDR修复机制本质上效率低下，导致具有框内插入标签的细胞克隆的产量较低，而敲除克隆的生成（通常涉及NHEJ）通常效率更高。

## 材料与试剂

1. CellTrics 50 μm无菌一次性过滤器 (Sysmex, 04-004-2327)
2. 96孔板(Ibidi, 15 μ-Plate 96孔黑色)
3. 12孔细胞培养板 (Corning, 3513)
4. 25或75 cm²细胞培养瓶 (Corning, 430639或430641U)
5. 15 mL锥形管 (Sarstedt, 62.554.205)
6. DNA寡核苷酸引物（IDT）
7. GeneArt Precision gRNA合成试剂盒 (Invitrogen, A29377)
8. Tracr片段+ 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, A29377)
9. Phusion™高保真PCR主混合物(2×) (Invitrogen, A29377)
10. 无核酸酶水
11. dNTP混合物(10 mM每种dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (NEB, N0447)
12. 5× TranscriptAid™反应缓冲液 (Invitrogen, A29377)
13. TranscriptAid™酶混合物 (Invitrogen, A29377)
14. DNase I (Invitrogen, A29377)
15. 单链DNA(ssDNA)寡核苷酸（来自IDT）
16. NEBuilder® HiFi DNA组装主混合物 (NEB, E2621)
17. pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459)质粒 (Addgene #62988)
18. BbsI (NEB, R0539)
19. NEB缓冲液2 (NEB, B7002S)
20. NEB® 5-α感受态大肠杆菌（高效率）(NEB, C2987)
21. 氨苄青霉素琼脂平板和卡那霉素琼脂平板
22. NEB缓冲液2.1 (NEB, B7202)
23. QIAquick PCR纯化试剂盒 (Qiagen, 28104)
24. 合成双链供体DNA（来自IDT）
25. Phusion高保真DNA聚合酶 (NEB, M0530)
26. Phusion GC缓冲液5× (NEB, B0519)
27. Zero Blunt™ TOPO™ PCR克隆试剂盒 (Invitrogen, 45-1245)
28. EcoRI-HF (NEB, R3101)
29. CutSmart缓冲液10× (NEB, B6004)
30. QIAquick凝胶提取试剂盒 (Qiagen, 28704)
31. XbaI (NEB, R0145)
32. Easy-Fusion Halo质粒 (Addgene #112850)
33. EcoRI-HF (NEB, R3101)
34. AvaI (NEB, R0152)
35. HincII (NEB, R0103)
36. DMEM (Gibco, 11965-092)与10% FBS (Invitrogen, 16140071)
37. DPBS（无Ca²⁺或Mg²⁺）(Gibco, 14190-144)
38. 胰蛋白酶 (Gibco, 25200-056)
39. Neon转染系统 (Invitrogen, MPK5000)
40. Neon转染系统10 μL试剂盒 (Invitrogen, MPK1025)
41. 缓冲液R
42. 嘌呤霉素 (Sigma-Aldrich, P8833)
43. Platinum Cas 9 (Invitrogen, A36498)
44. BD FACSAria III分选仪（配有488 100 mW Trigon激光器和100 μm喷嘴）(BD Biosciences)
45. 诺考达唑 (Sigma-Aldrich, M1404)
46. Lipofectamine 3000 (Invitrogen, L3000001)
47. OptiMEM (Invitrogen, 31985062)
48. 重组KRAS兔单克隆抗体 (Thermo Fisher Scientific, 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>
2. <https://portals.broadinstitute.org/gppx/crispick/>
3. <http://chopchop.cbu.uib.no/>
4. <https://nebuilder.neb.com>

## 程序

### 实验设计

**图1. 在KRAS、NRAS和Grb2中插入mNG的示意图。** mNG序列被插入KRAS和NRAS基因的氨基末端(A)和Grb2基因的羧基末端(B)。为所有三种基因生成了带有500至1,000 bp同源臂的供体DNA。ATG：起始密码子；STOP：终止密码子；HA：同源臂；mNG：mNeongreen；gRNA：引导RNA；空盒表示KRAS，NRAS和Grb2的外显子。

**表1. 用于标记基因的组件来源**

|  | **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 | 克隆在质粒PX459中 |
| 供体 | 合成基因片段 | 合成基因片段 | 同源臂和mNG片段克隆在质粒中 |
| 递送方法 | 电穿孔 | 电穿孔 | Lipofectamine转染 |

### A. 为KRAS、NRAS和Grb2生成gRNA

#### 1. KRAS和NRAS的体外合成gRNA

a. 确定靶向gRNA 我们使用KRAS和NRAS基因的氨基末端进行mNeonGreen荧光蛋白序列标记，因为所有RAS蛋白在其羧基末端都经过处理（图1）。在线提供了几种引导RNA设计工具。我们通常使用Benchling、Broad研究所GPP（现为CRISPick）和CHOPCHOP等工具设计靶向gRNA。使用这些工具，为KRAS和NRAS确定了两个靶点，它们非常接近两个基因的起始密码子。为每个靶点订购两个互补引物（表2）。

**表2. 体外翻译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 |

i. 将靶点引物稀释到1×TE缓冲液中100 μM的储备溶液。 ii. 通过将每个100 μM正向和反向靶点引物各10 μL加入到80 μL无核酸酶水中，制备10 μM靶点引物混合物储备溶液。 iii. 通过将10 μM靶点引物混合物储备溶液的3 μL稀释在97 μL无核酸酶水中，制备0.3 μM靶点引物混合物工作溶液。

b. 组装gRNA DNA模板 此步骤生成gRNA体外转录所需的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。按照给定的顺序在25-μL体积中设置以下PCR组装反应（表3）。

**表3. 制作gRNA DNA模板的组件**

|  |  |
| --- | --- |
| **Phusion™高保真PCR主混合物(2×)** | **12.5 μL** |
| **Tracr片段+ T7引物混合物** | **1 μL** |
| **0.3 μM靶点F/R寡核苷酸混合物** | **1 μL** |
| **无核酸酶水** | **10.5 μL** |

由于PCR产物预期很短（120 bp），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** |
| --- | --- | --- | --- |
| 初始变性 | 98°C | 10 s | 1× |
| 变性 | 98°C | 5 s | 32× |
| 退火 | 55°C | 15 s | 32× |
| 最终延伸 | 72°C | 1 min | 1× |
| 保持 | 4°C | 保持 | 1× |

c. gRNA的体外转录(IVT) 使用在步骤A.1.b中生成的gRNA DNA模板进行gRNA的体外转录。按照给定的顺序设置反应（表5）。

**表5. IVT反应组件**

|  |  |
| --- | --- |
| NTP混合物（每种NTP 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. 用DNase I消化去除DNA模板 从IVT反应中去除DNA是有帮助的，这样它就不会干扰RNA转录本的后续应用。 i. 在IVT反应后立即用1 μL 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反应稀释到200 μL，并加入100 μL结合缓冲液。通过吹打混合。 ii. 加入300 μL乙醇（>96%）并通过吹打混合。 iii. 将混合物转移到GeneJET™ RNA纯化微柱（预组装有收集管）并以14,000 × g离心30-60秒。弃去流出物。 iv. 用700 μL洗涤缓冲液1和洗涤缓冲液2洗涤结合的RNA。 v. 将空纯化柱再以14,000 × g离心额外60秒，以完全去除任何残留的洗涤缓冲液。 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储存在-20°C直到使用。长期储存，将gRNA储存在-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，并参考制造商的说明以获取生成gRNA的详细指南。

#### 2. 克隆用于标记Grb2的gRNA

a. 确定靶向gRNA Grb2在其羧基末端用mNG标记。使用NEBuilder HiFi DNA组装混合物进行Grb2 gRNA的克隆，该混合物允许线性质粒和单链DNA片段的组装，就像多个DNA片段组装一样。与RAS蛋白类似，使用Benchling和Broad研究所GPP（现为CRISPick）确定了Grb2的两个靶向gRNA。以ssDNA形式从IDT订购了以下靶向gRNA序列寡核苷酸（表6）。下划线序列表示实际靶向gRNA序列，由来自PX459的BbsI限制酶切割位点周围的重叠序列包围。

**表6. 用于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用BbsI消化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**

|  |  |
| --- | --- |
| PX459质粒（500 ng/μL） | 10 μL |
| 10× 缓冲液 2.1 | 2 μL |
| BbsI（10 U/μL） | 1 μL |
| ddH₂O | 7 μL |

c. 将ssDNA连接到消化的PX459 离心ssDNA寡核苷酸沉淀并将其在1× TE中重悬至最终浓度为100 μM，然后进一步稀释至NEB缓冲液2中0.4 μM的工作储备液。按下面给定的顺序设置线性化PX459和ssDNA寡核苷酸的连接反应（表8）。

**表8. HiFi DNA组装设置**

|  |  |
| --- | --- |
| 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感受态大肠杆菌细胞中。通过将转化的大肠杆菌细胞铺板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 从氨苄青霉素平板中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

带有约500 b每个的5'和3'同源臂包围的mNG序列的供体DNA作为基因片段从IDT获得。使用TOPO PCR克隆试剂盒，将这些片段采用引物扩增并克隆到pCRBluntII-TOPO质粒中。

a. 扩增供体DNA 在含有基因片段的小瓶中离心以收集沉淀物在50 μL 1× TE中。使用Phusion聚合酶（表10和11）和下面提到的引物（表9）扩增合成DNA。

**表9. 用于扩增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. 用于扩增KRAS和NRAS合成供体DNA的PCR设置**

|  | **KRAS供体DNA** | **NRAS供体DNA** |
| --- | --- | --- |
| 供体基因片段 | 5 μL | 5 μL |
| Phusion GC缓冲液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聚合酶 | 1 μL | 1 μL |
| 无核酸酶水 | 28 μL | 28 μL |

**表11. 用于扩增KRAS和NRAS合成供体DNA的PCR参数**

| 循环步骤 | 温度 | 时间 | 循环 |

|  | **KRAS供体** | **NRAS供体** |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 初始变性 | 98°C | 98°C | 1 min | 1× |
| 变性 | 98°C | 98°C | 15 s | 30× |
| 退火 | 61.6°C | 64.7°C | 15 s | 30× |
| 延伸 | 72°C | 72°C | 1 min | 30× |
| 最终延伸 | 72°C | 72°C | 10 min | 1× |
| 保持 | 4°C | 4°C | 保持 | 1× |

对来自KRAS和NRAS扩增供体DNA的1.68 kb PCR产物进行凝胶纯化。

b. 连接扩增的供体DNA和pCRBluntII-TOPO质粒 在6 μL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，如下（表12）。

**表12. 供体DNA和pCRBluntII-TOPO连接设置**

|  | **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大肠杆菌中，并在含有卡那霉素的平板上铺板进行选择。

c. 筛选和确认供体DNA 从卡那霉素平板中选择几个菌落并培养它们以分离质粒。通过EcoRI消化和Sanger测序确认阳性克隆，以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 片段以这样的方式插入pCRII-Blunt-TOPO，即EcoRI位点位于插入物的两端，允许通过EcoRI消化恢复插入物。如下消化含有供体序列的阳性克隆（表13）。

**表13. pCR-II-Blunt-TOPO-供体质粒的消化**

|  | **KRAS** | **NRAS** |
| --- | --- | --- |
| pCR-II-Blunt-TOPO-供体（1 μg/μL） | 20 μL | 20 μL |
| CutSmart缓冲液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。从两个样本中凝胶洗脱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片段是为了促进使用Sanger测序确认正确的供体序列，并避免重复扩增。纯化的PCR片段可以直接用作供体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用作扩增mNG ORF的模板。引物为所得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（表14）。

**表14. HiFi DNA组装的组件片段**

| **名称** | **长度 (bp)** | **生产方法** |
| --- | --- | --- |
| 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 |

1. 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）。如下扩增构建供体DNA所需的全部三个片段（表16、17和18）。

**表15. 用于扩增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. 用于扩增Grb2 HA的PCR设置**

|  | **5HA片段** | **3HA片段** |
| --- | --- | --- |
| HeLa基因组DNA（100 ng/μL） | 3 μL | 3 μL |
| Phusion GC缓冲液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聚合酶 | 1 μL | 1 μL |
| 无核酸酶水 | 30 μL | 30 μL |

**表17. 用于扩增mNG ORF的PCR设置**

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

**表18. 用于扩增Grb2 HA和mNG ORF的PCR参数**

| 循环步骤 | 温度 | 时间 | 循环 |

|  | **5HA** | **3HA** | **mNG** |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 初始变性 | 98°C | 98°C | 98°C | 1 min | 1× |
| 变性 | 98°C | 98°C | 98°C | 15 s | 30× |
| 退火 | 64.4°C | 60°C | 59.6°C | 15 s | 30× |
| 延伸 | 72°C | 72°C | 72°C | 25 s | 30× |
| 最终延伸 | 72°C | 72°C | 72°C | 10 min | 1× |
| 保持 | 4°C | 4°C | 4°C | 保持 | 1× |

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消化EasyFusion-Halo质粒，在37°C消化4小时以去除Halo插入物（表19）。

**表19. 消化EasyFusion-Halo质粒以去除Halo插入物**

|  |  |
| --- | --- |
| EasyFusion-Halo（5 μg） | 10 μL |
| CutSmart缓冲液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所需的所有四个片段混合到最终体积为10 μL中。在冰上解冻HiFi DNA组装混合物并充分涡旋。向片段中加入等体积的HiFi DNA组装主混合物（表20）。

**表20. 生成Grb2供体DNA的连接设置**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 0.1 pmol的5HA | 50 ng | 0.8 μL |
| 0.1 pmol的mNG | 50 ng | 0.9 μL |
| 0.1 pmol的3HA | 50 ng | 1.1 μL |
| 0.1 pmol的消化载体 | 185 ng | 2 μL |
| HiFi DNA组装主混合物 |  | 10 μL |
| 无核酸酶水 |  | 5.2 μL |

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大肠杆菌中。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. 将gRNA和供体DNA递送至HeLa细胞

#### 1. 电穿孔RNP复合物以标记KRAS和NRAS

a. 在75 cm²烧瓶中培养HeLa细胞在含10% FBS的DMEM中至90%汇合度。用100 ng/mL诺考达唑处理12小时。 b. 在电穿孔当天，解冻并在冰上储存缓冲液R、KRAS和NRAS特异性体外转录的gRNA和供体DNA。在无核酸酶水中将gRNA和供体DNA稀释到适当浓度。 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。将单细胞悬浮液以300 × g离心5分钟。将沉淀物重悬在10 mL含10% FBS的DMEM中。使用血球计数器进行细胞计数。 d. 在1.5 mL微量离心管中为每个基因编辑反应准备RNP混合物，如下（表21）。

**表21. 用于电穿孔的RNP混合物组件**

|  |  |
| --- | --- |
| 缓冲液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孵育时，准备电穿孔设置并通过以300 × g离心5分钟使细胞准备好进行电穿孔。吸走DPBS并将细胞沉淀物重悬在缓冲液R中至最终细胞密度为8 × 10⁷ cells/ml。 g. 向Neon枪头站中加入3 mL电解缓冲液（缓冲液E）。 h. 向RNP混合物中加入5 μL细胞（最终4 × 10⁵个细胞）和1 μg各自的供体DNA片段。确保最终混合物的体积为10 μL。使用Neon枪头吸取最终混合物，不要引入气泡，并以1,005 V脉冲电压、35 ms脉冲宽度进行2次脉冲电穿孔。 i. 将电穿孔细胞转移到12孔板中，其中含有预热的不含抗生素的DMEM与10% FBS，并继续在37°C CO₂培养箱中孵育板。

#### 2. 转染gRNA和供体以标记Grb2

a. 在12孔板中培养HeLa细胞在含10% FBS的DMEM中至90%汇合度。用100 ng/mL诺考达唑处理12小时。 b. 在转染当天，将PX459-Grb2-gRNA和Grb2-mNG供体DNA质粒稀释到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. 在1.5 mL微量离心管中按给定顺序准备DNA-脂质混合物，如下（表22）。

**表22. 标记Grb2的转染混合物组件**

|  | **管1** |
| --- | --- |
| 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 |
| OptiMEM | 50 μL |
| Lipofectamine 3000试剂 | 1.5 μL |

e. 将管1的内容物加入管2。在RT孵育混合物10分钟。 f. 将质粒-脂质混合物滴加到细胞上。 g. 转染后第二天，用2 μg/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. 移除含嘌呤霉素的DMEM，用DPBS洗涤细胞两次，并允许细胞恢复。分散存活的细胞并扩增它们进行流式分选分析。

### D. 流式分选mNG阳性细胞

1. 在25或75 cm²烧瓶中扩增标记的HeLa细胞在含10% FBS的DMEM中。
2. 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。将最终沉淀物重悬在细胞分选缓冲液中。
3. 在分选前通过一次性过滤器过滤细胞悬浮液以去除细胞聚集物。使用阳性（瞬时或稳定表达mNG的亲本HeLa细胞）和阴性（亲本未标记HeLa细胞）对照来校准分选仪器。
4. 将单个分选细胞收集在96孔板或15 mL锥形管中作为含有预热的DMEM与10% FBS和抗生素的汇集群体，以防止污染。

### E. 确认阳性克隆

1. 在使用前冷冻至少一管单细胞克隆作为备份。
2. 可以通过使用蛋白质特异性抗体或mNG抗体的Western blot分析确认克隆。正确的融合蛋白应该比亲本蛋白大约25 kD。测序mNG序列插入区域周围的区域也很重要，以确保在同源修复期间没有不需要的插入或缺失。

注意：没有进行不同递送方法的效率头对头比较。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孔板的单独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更高的克隆。

## 配方

### 1. 细胞分选缓冲液

* 1× PBS (Ca/Mg++无)
* 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