

# 应用荧光原位杂交技术检测康柏西普基因在 CHO 细胞染色体上的整合状态

师明磊<sup>1</sup>, 赖维莉<sup>2</sup>, 易天红<sup>2</sup>, 柯潇<sup>2</sup>, 赵志虎<sup>1</sup>

1. 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071;

2. 成都康弘生物科技有限公司, 成都 610037

**摘要:** CHO 细胞是常用的哺乳动物表达工程细胞。外源基因整合至 CHO 细胞染色体后, 在大规模蛋白质生产过程中, 由于相关压力撤除, 外源基因存在丢失的可能, 因此有必要对其整合稳定性进行检测。康柏西普(conbercept)是一个能够特异性结合 VEGF-A 的各种异构体、VEGF-B 以及 PlGF, 从而发挥抗血管生成活性的融合蛋白。康柏西普目前已在美国进入 III 期临床试验。本文运用荧光原位杂交对康柏西普基因在 CHO 细胞的整合状态进行了检测, 发现经过 4 和 19 次传代后, 康柏西普基因依然能稳定整合在基因组上, 并且呈现出 3 个特点: (1)分布在一条染色体上, 而不是多条染色体上; (2)分布在较长的染色体上; (3)在同一染色体上有较多拷贝数。同时, 荧光定量 PCR 结果证明基因拷贝数无明显改变, ELISA 检测证明蛋白表达水平亦无明显改变。上述实验证明在经过 19 次传代以后, 康柏西普基因仍然稳定整合在基因组中, 并可活跃表达, 为康柏西普大规模生产及产品质控提供了有力依据。

**关键词:** 荧光原位杂交; 康柏西普; CHO 工程细胞; 基因组整合

## Characterization of the conbercept gene localization in DHFR-amplified CHO cells using fluorescence *in situ* hybridization

Minglei Shi<sup>1</sup>, Weili Lai<sup>2</sup>, Tianhong Yi<sup>2</sup>, Xiao Ke<sup>2</sup>, Zhihu Zhao<sup>1</sup>

1. Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China;

2. Chengdu Kanghong Biotechnology Co. Ltd., Chengdu 610037, China

**Abstract:** Chinese-hamster ovary (CHO) cells are most widely used for mammalian protein expression. After integration into the CHO genome, the exogenous gene may be lost in the process of large-scale protein production due to the removal of related selection pressures. Therefore, it is necessary to test its stability in the genome. Conbercept is a fusion protein that specifically binds to the various isoforms of vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, VEGF-B, and placental growth factor (PlGF), thereby exerting anti-angiogenic activities. It has been approved for Phase III clinical trials in the United States. In this study, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was used to lo-

收稿日期: 2016-10-08; 修回日期: 2017-01-11

作者简介: 师明磊, 博士, 助理研究员, 研究方向: 表观遗传学。E-mail: shiml79@126.com

赖维莉, 硕士, 专业方向: 细胞生物学。E-mail: laiweili@cnkh.com.

师明磊和赖维莉为并列第一作者。

通讯作者: 赵志虎, 博士, 研究员, 研究方向: 表观遗传学; E-mail: zhaozh@nic.bmi.ac.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.16-335

网络出版时间: 2017/3/21 10:31:27

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20170321.1031.001.html>

calize the conbercept gene in dihydrofolatereductase (DHFR)-amplified CHO cell lines. Metaphase FISH showed that genomic integration of the conbercept gene was stable after 4 and 19 passages, and manifested three characteristics: first, the gene locates on one chromosome, rather than a number of chromosomes; second, the gene locates on the longer chromosomes; third, there are many copies located on the same chromosome. At the same time, the copy number of the conbercept gene in the CHO genome and the conbercept protein expression levels are also stable, as verified by qPCR and ELISA assays, respectively. These experiments demonstrated that the conbercept gene remained stable in the genome after 19 passages, and could be actively expressed, which strongly support the mass production and the quality control of conbercept.

**Keywords:** fluorescence in situ hybridization (FISH); conbercept; CHO cell; chromosome integration

哺乳动物细胞是目前生物制药产业中常用的宿主细胞,其中最常用的是中华仓鼠卵巢(Chinese-hamster ovary, CHO)细胞<sup>[1]</sup>。通过把外源目的基因稳定整合到CHO细胞基因组上的高表达位点,实现重组蛋白的高产。为了进一步提高靶基因的表达水平,人们常常通过采用二氢叶酸还原酶(dihydrofolatereductase, DHFR)缺陷型CHO细胞系,在甲氨蝶呤的存在下,驱动载体DHFR基因带动外源基因扩增<sup>[2]</sup>。然而在重组蛋白大规模生产阶段,由于不能持续使用甲氨蝶呤,获得扩增的外源基因面临减少或丢失的风险,因此检测外源基因在CHO细胞基因组的整合状态成为必要要求<sup>[3]</sup>。

康柏西普(conbercept)是一种利用CHO细胞生产的重组蛋白,其活性成分是由人血管内皮生长因子受体1(vascular endothelial growth factor receptor 1, VEGFR1)中的免疫球蛋白样区域2(Domain 2)、人血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)中的免疫球蛋白样区域3和4(Domain 3, 4),以及人免疫球蛋白Fc片段融合而成。它能够特异性结合VEGF-A的各种异构体、VEGF-B以及PlGF,抑制病理条件下的血管异常增生。目前,康柏西普眼用注射液用于治疗湿性年龄相关性黄斑变性(AMD)<sup>[4,5]</sup>。2016年10月10日,康柏西普眼用注射液获得美国食品和药品监督管理局(FDA)批准在美国直接开展二期临床试验。

荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)是一种直观、灵敏、特异、安全的基因检测和定位技术,被广泛应用于细胞遗传学分析、遗传病诊断、基因图谱绘制等研究领域<sup>[6-11]</sup>。随着生物制药产业的发展,FISH也逐渐被应用于检测工程细胞株中外源基因的整合情况<sup>[12-16]</sup>。作为检测外源

基因整合的方法,FISH较PCR、qPCR、Southern blot、Northern blot等方法更为直观,并可实现精确定位。这对研究外源基因的位置效应、提高外源基因的表达效率具有重要意义。

本文应用FISH技术,对康柏西普基因在不同传代次数的CHO细胞染色体上的整合状态进行了检测,为长期传代稳定性研究过程中观察外源基因在细胞系的稳定整合提供了可靠依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞系

CHO DukxB11/dhfr-(ATCC CRL-9096),由成都康弘生物科技有限公司驯化为悬浮细胞;稳定整合KH902基因(KH902基因为康柏西普基因内部编号)的CHO细胞系不同代次KHC1(P4)/(P19)由成都康弘生物科技有限公司构建并保存。培养基为EX-CELL CHO DHFR-Medium(Sigma,美国)。

#### 1.1.2 质粒

康柏西普基因表达载体pCMVi-KH902;基因拷贝数定量标准品pKAT质粒:在pMD19-T质粒(TaKaRa,大连)上插入了KH902基因及 $\beta$ -actin基因,由成都康弘生物科技有限公司构建并保存。

#### 1.1.3 FISH试剂

信号放大试剂Tyramide Signal Amplification Kits(Molecular Probes,美国);探针制备试剂BioPrime<sup>®</sup> DNA Labeling System(Invitrogen,美国);杂交过程试剂Dextran sulfate (50%)(Intergen,美国);

Formamide, deionized(Ambion, 美国); RNaseA(天根, 北京); Salmon testes DNA(Sigma, 美国); Vectashield(Vector Laboratories, 美国)。

#### 1.1.4 qPCR 试剂与引物

*KH902* 定量引物及探针: 上游引物, 5'-GTG-GAGTGGGAGAGCAATGG-3'; 下游引物, 5'-TGCT-GCCACCTGCTCTTGT-3'; 探针, 5'-(FAM)CGGAG-AACAACCTACAAGGCCACGCCT(Eclipse)-3'。

$\beta$ -actin 定量引物及探针: 上游引物, 5'-TCTAT-GAGGGCTACGCTCTCC-3'; 下游引物, 5'-ACGCT-CGGTCAGGATCTTCA-3'; 探针, 5'-(FAM)CCTGC-GTCTGGACCTGGCTGGC(Eclipse)-3'。

#### 1.1.5 ELISA 试剂

山羊抗人 IgG(FC)、ABTS 过氧化物酶底物 A 和过氧化物酶底物 B、ABTS 过氧化物酶终止液(5 $\times$ ) 购自美国 KPL 公司; 山羊抗人 IgG-FC HRP conjugated 购自美国 BETHYL 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 细胞培养

CHO 细胞复苏 24 h 后对方瓶内细胞计数, 按  $3 \times 10^5$  个/mL 接入 100 mL 摇瓶(培养体积 20 mL), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、120 r/min 培养。每 3~4 天传代一次。

### 1.2.2 染色体制备

使用 Nocodazole 200 ng/mL 12 h 阻滞细胞至 M 期, 1000 r/min 离心 5 min。用 20~50 mL 的 0.56% KCl 溶液悬浮细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴 20 min。加 2~5 mL 的固定液(甲醇与冰醋酸 3:1)至细胞低渗液中, 轻轻混匀。1000 r/min 离心悬液 5 min, 用 1 mL 新的固定液重新悬浮细胞。调整细胞悬液至合适浓度, 直接滴加至玻片上。每一中期染色体片加 RNase A 100  $\mu\text{L}$  (0.1 mg/mL), 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 40~60 min; 加胃蛋白酶工作液(0.05%), 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 13 min; 用磷酸盐平衡液(PBS)室温下清洗 5 min。用快速固定液(0.95% 甲醛, 1 mL 的 37% 甲醛, 0.18 g  $\text{MgCl}_2$  和 39 mL 的 PBS, 4 $^{\circ}\text{C}$  保存, 一个月内使用)固定样品 5 min, 在室温下用 PBS 清洗 5 min。梯度酒精脱水(70%, 85%, 100% 乙醇), 空气中干燥。

### 1.2.3 荧光原位杂交

以 *KH902* 基因表达载体 pCMVi-KH902 为模板, 使用 BioPrime<sup>®</sup> DNA Labeling System 制备标记探针, 详细步骤参见试剂盒说明书。取纯化好的标记探针, 加入 10 $\times$  salmon testes DNA, 乙醇沉淀。用杂交液溶解探针, 在杂交液中 75 $^{\circ}\text{C}$  水浴变性 8 min。变性后的探针池杂交液迅速埋在冰里骤冷 1 min, 置 37 $^{\circ}\text{C}$  预复性 20~30 min。将中期染色体片置于 50 mL 70% 去离子甲酰胺/2 $\times$ SSC(35 mL 100% 甲酰胺, 5 mL 20 $\times$ SSC, 10 mL ddH<sub>2</sub>O, pH 7.0)中, 70 $^{\circ}\text{C}$  变性 2.5 min。在预先冷却的 2 $\times$ SSC(0~4 $^{\circ}\text{C}$ )中洗涤 2 次, 每次 3 min。梯度酒精脱水(70%, 85%, 100% 乙醇), 空气中干燥。将经过变性处理的探针杂交液滴加在中期染色体片标记好的部位, 盖上盖玻片。封好的中期染色体片置于湿盒内, 在 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 48 h。小心去除中期染色体片上的盖玻片, 将中期染色体片浸泡在 37 $^{\circ}\text{C}$  预热的 50 mL 50% 去离子甲酰胺/2 $\times$ SSC(25 mL 100% 甲酰胺, 5 mL 20 $\times$ SSC, 20 mL ddH<sub>2</sub>O, pH 7.0)中洗涤 15 min。2 $\times$ SSC 中室温下摇洗 2 次, 每次 3 min。采用 Tyramide Signal Amplification Kits (Molecular Probes)放大信号, 详细步骤参见试剂盒说明书。Vectashield 封片, 使用 LSM 510 META 激光共聚焦显微镜(Zeiss, 德国)观测 FISH 信号。

### 1.2.4 qPCR 定量检测基因拷贝数

提取 pKAT 质粒作为定量标准品; 提取 CHO DukxB11/dhfr-、KHC1(P4)/(P19)各细胞基因组 DNA, 取去离子水一管同时操作, 作为阴性对照。qPCR 操作如下: 将含有 *KH902* 与  $\beta$ -actin 的 pKAT 质粒标准品, 从  $1 \times 10^9$  个/ $\mu\text{L}$  到  $1 \times 10^2$  个/ $\mu\text{L}$  做 10 倍稀释, 作为标准曲线上的各点。PCR 反应程序: 50 $^{\circ}\text{C}$ , 2 min $\rightarrow$ 93 $^{\circ}\text{C}$ , 5 min $\rightarrow$ (93 $^{\circ}\text{C}$ , 20 s $\rightarrow$ 60 $^{\circ}\text{C}$ , 30 s) $\times$ 50 次。同时扩增各样本中 *KH902* 与  $\beta$ -actin 基因。将 Ct 值与标准曲线对应, 获得相应拷贝数。

### 1.2.5 蛋白表达水平检测

对 KHC1 细胞进行长期传代稳定性研究, 细胞复苏后每 3 天传代一次, 连续传代 19 次, 取第 2~19 代细胞培养 72 h 的上清液进行 ELISA 检测, 通过与标准曲线比对, 计算得到 *KH902* 蛋白含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 康柏西普基因能够稳定整合在基因组上

本实验取稳定整合 *KH902* 基因的 CHO 细胞系 KHC1(P4)/(P19), 以 *KH902* 探针进行 FISH 检测, 结果显示, 在 KHC1(P4)/(P19) 细胞中, *KH902* 基因均整合在染色体中(图 1), 说明该基因在细胞传代过程中稳定存在。从实验结果来看, FISH 检测获得的信号有 3 个特点: (1) 分布在一条染色体上, 而不是多条染色体上; (2) 分布在较长的染色体上; (3) 在同一染色体上有较多拷贝数。

### 2.2 康柏西普基因拷贝数维持稳定

qPCR 定量检测基因拷贝数共分 3 次进行, 每次做 5 个重复样本, 目的基因和  $\beta$ -actin 分别做标准曲

线(展示第 1 次, 图 2), 取 5 个重复样本的均值与 3 次实验的均值得到目的基因拷贝数。由于每套基因组中含有 2 个(见表 1)基因拷贝, 对细胞数目的校正采用以下公式:  $KH902$  基因拷贝数 = 测得 *KH902* 基因拷贝数 / (测得  $\beta$ -actin 基因拷贝数 / 2), 从而获得平均每套基因组中 *KH902* 基因拷贝数。qPCR 定量检测基因拷贝数显示, KHC1 第 4 代的目的基因拷贝数为 82 个, 第 19 代的目的基因拷贝数为 67 个(表 1), 基因拷贝数基本维持稳定。

### 2.3 康柏西普蛋白能够稳定表达

为了测定康柏西普是否在蛋白水平稳定表达, 对 KHC1 进行了传代稳定性实验, 一共传代 19 次, 取每次传代后 72 h 的细胞培养上清进行 ELLSA, 测定蛋白含量, 从图 3 结果看出, 在传代过程中细胞

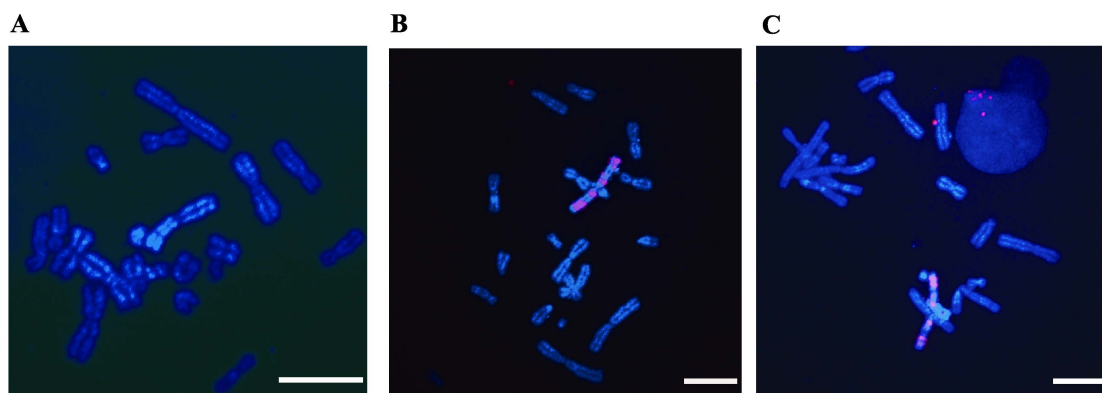


图 1 康柏西普基因在 CHO 宿主细胞染色体上的分布情况

Fig. 1 Localization of conbercept gene in CHO cell chromosome

A: DukXB11/dhfr- 细胞作为阴性对照, 无荧光信号; B: 第 4 代细胞, 在一条较长染色体上成簇分布着多个信号; C: 第 19 代细胞, 在一条较长染色体上成簇分布着多个信号。标尺: 10  $\mu$ m。

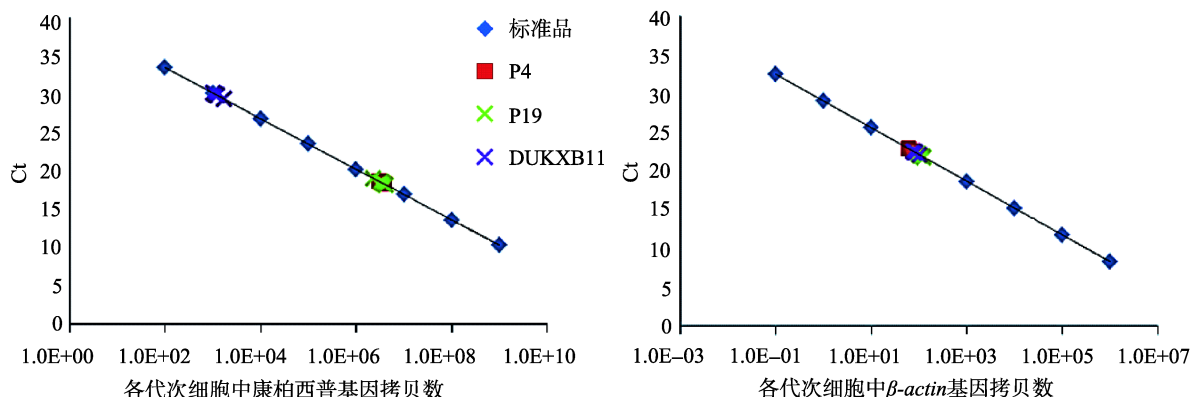


图 2 qPCR 定量检测康柏西普基因拷贝数

Fig. 2 Copy number quantification of conbercept gene by qPCR

表 1 qPCR 定量检测康柏西普基因拷贝数汇总

Table 1 Summary of copy number quantification of conbercept gene by qPCR

细胞代数	试验次数	康柏西普基因拷贝数	$\beta$ -actin 基因拷贝数	康柏西普基因拷贝数/细胞
P4	第 1 次	$3.45 \times 10^6$	$7.56 \times 10^4$	91
	第 2 次	$3.07 \times 10^6$	$9.28 \times 10^4$	66
	第 3 次	$4.59 \times 10^6$	$1.03 \times 10^5$	89
	平均	—	—	82
P19	第 1 次	$3.69 \times 10^6$	$1.11 \times 10^5$	67
	第 2 次	$5.78 \times 10^6$	$1.25 \times 10^5$	93
	第 3 次	$2.61 \times 10^6$	$1.25 \times 10^5$	42
	平均	—	—	67

的蛋白表达水平比较稳定,一直维持在 8000~10 000 ng/mL 左右。说明 KH902 基因不仅稳定整合,且能够稳定表达。

### 3 讨 论

FISH 是一种对外源基因在染色体整合状况进行定位的直观、可靠的方法。虽然 qPCR 与 ELISA 测定方法也是检测外源蛋白是否稳定表达的必然要求,但是在单细胞水平提供外源基因整合定位的直接证据以确保外源基因的稳定存在,已经成为基因重组药物报批的常规要求。事实上,Haugg 等<sup>[8]</sup>报道,大约 15% 的高表达细胞株中,外源基因并非全部整合在染色体上,而是部分以质粒的形式存在,这样的外源基因表达方式无疑是不稳定的。但是 FISH 实验作为一种原位检测方法,实验步骤繁多,对靶标大小、探针质量、杂交条件以及实验操作都有较高的要求,才能顺利进行实验,获得满意结果<sup>[17,18]</sup>。康柏西普基因全长只有 1.8 kb,远低于 FISH 检测的通常靶标长度(100~200 kb)。但在实际检测时,却获得了明亮、清晰的 FISH 信号(图 1)。这主要是由于

经过 DHFR 扩增,康柏西普基因获得数十倍复制,从而有效提高了靶标大小,降低了检测难度。同时,康柏西普基因具有较高拷贝数也为其高表达提供了坚实基础。

本研究中对康柏西普基因的 FISH 定位检测结果与 Davies 等<sup>[12]</sup>报道的对使用 DG44 细胞构建的 3 种不同工程细胞系(分别表达 anti-CD20, anti-B7.1 和 anti-CD40L 抗体基因)检测的结果颇为类似。Davies 等<sup>[12]</sup>研究发现,3 种细胞株都各自含有一个整合位点,扩增基因都位于同一条染色体上;Derouazi 等<sup>[14]</sup>报道在转染方式、转染 DNA 形态(环形/线形)以及整合基因拷贝数(1~51)各异的 16 个细胞系中,有 15 个都只含有单一整合位点。Lattenmayer 等<sup>[15]</sup>对 14 种 CHO DUK 来源的细胞系进行 FISH 检测,发现绝大多数外源基因高表达细胞株中,其整合位点都位于较大的染色体上。Li 等<sup>[16]</sup>对外源基因在 CHO 细胞的整合情况进行了动态研究,发现经过瞬时转染后,外源基因可以整合在不同染色体上,但是整合在 1 号染色体(最大染色体)上的细胞株,其蛋白表达水平高且稳定,在传代过程中(80 代)不易丢失;相反,整合在 Z3、Z4 染色体上的细胞株,蛋白水平表达较低且在传代过程中迅速丢失。瞬时转染的位点呈现为点状信号,在经过 DHFR 扩增的 CHO 细胞中,外源基因则成簇分布,说明这种分布特点是由 DHFR 带动外源基因向两侧扩增导致的。

另外,在制备有丝分裂期染色体的过程中,我们还发现所用细胞株的染色体条数并不固定,除了明显的多倍体以外,染色体数目分布在 20~28 条不等。已有研究证实,作为一种永生细胞系,CHO 细胞及其衍生细胞系的基因组高度不稳定<sup>[19~24]</sup>。Cao

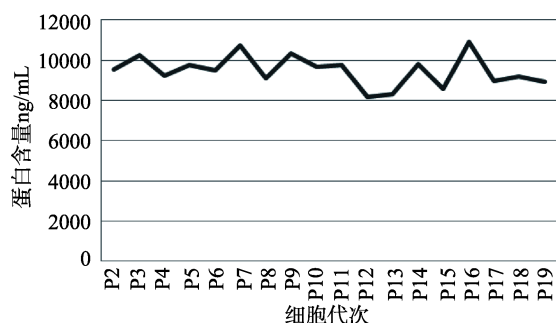


图 3 ELISA 检测康柏西普蛋白表达

Fig. 3 Protein expression quantification of conbercept gene by ELISA



等<sup>[25]</sup>发现中国仓鼠基因组含有22条染色体,始祖CHO-K1细胞系则含有21条染色体,常用的DHFR缺陷型细胞系DUKX-B11和DG44则含有20条染色体。

在使用CHO细胞构建各种外源基因表达工程细胞系的过程中,基因组进一步紊乱。Davies等<sup>[12]</sup>报道使用DG44细胞构建的3种不同工程细胞系(分别表达anti-CD20抗体、anti-B7.1抗体和anti-CD40L抗体)染色体条数(众数)分别为34,33和37。Derouazi等<sup>[14]</sup>报道在16个检测的细胞系中,11个具有20条染色体,然而3个出现了21~46条不等的染色体,2个出现了19条染色体。染色体紊乱呈现为非整倍体,转座,重排,缺失等多种形态。CHO细胞在各种不同染色体数目下均能有效存活,也许是其容易产生有丝分裂跳出(mitotic slippage),进而难以被有效阻滞在有丝分裂期的原因之一。值得注意的是,Derouazi等<sup>[14]</sup>分析认为,基因组不稳定性与蛋白表达水平并没有明显关联。但是Yamano等<sup>[26]</sup>通过在不同染色体数目的DG44细胞中转染相同种类与数量的载体,发现染色体数目高(>30)的DG44细胞,其外源蛋白表达水平亦高。其原因可能是较多的染色体为外源基因表达载体提供了较多的整合机会。

综上所述,本研究获得的FISH检测结果为确认康柏西普基因在CHO细胞染色体上的稳定整合提供了有力依据。

## 参考文献(References):

- [1] Omasa T, Onitsuka M, Kim WD. Cell engineering and cultivation of Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Curr Pharm Biotechnol*, 2010, 11(3): 233–240. [DOI]
- [2] Betts Z, Dickson AJ. Ubiquitous Chromatin Opening Elements (UCOES) effect on transgene position and expression stability in CHO cells following methotrexate (MTX) amplification. *Biotechnol J*, 2016, 11(4): 554–564. [DOI]
- [3] Kim SJ, Lee GM. Cytogenetic analysis of chimeric antibody-producing CHO cells in the course of dihydrofolate reductase-mediated gene amplification and their stability in the absence of selective pressure. *Biotechnol Bioeng*, 1999, 64(6): 741–749. [DOI]
- [4] Zhang M, Zhang JJ, Yan M, Luo DL, Zhu WJ, Kaiser PK, Yu DC, KH902 Phase 1 Study Group. A Phase 1 study of KH902, a vascular endothelial growth factor receptor decoy, for exudative age-related macular degeneration. *Ophthalmology*, 2011, 118(4): 672–678. [DOI]
- [5] Zhang HX, Zhao NN. Effect of conbercept and lucentis on serum CRP, VEGF and CMT, CNV, IOP in age-related macular degeneration. *Chin J Biochem Pharm*, 2016, 36(10): 134–136.  
张海霞, 赵娜娜. 康柏西普与雷珠单抗对老年黄斑病变患者血清CRP、VEGF与CMT、CNV、IOP的影响. *中国生化药物杂志*, 2016, 36(10): 134–136. [DOI]
- [6] Hao JJ, Wang CL, Gu WY, Cheng XY, Zhang Y, Xu X, Cai Y, Wang MR. Identification of chromosomal aberration in esophageal cancer cells by mixed BAC DNA probes of chromosome arms and regions. *Hereditas (Beijing)*, 2014, 36(6): 558–565.  
郝佳洁, 王春丽, 顾文跃, 程潇钰, 张钰, 徐昕, 蔡岩, 王明荣. 利用染色体区段混合BAC探针鉴定食管癌细胞中的染色体畸变. *遗传*, 2014, 36(6): 558–565. [DOI]
- [7] Kaufer BB. Detection of integrated herpesvirus genomes by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Methods Mol Biol*, 2013, 1064: 141–152. [DOI]
- [8] Haugg AM, Rennspiess D, Hausen AZ, Speel EJM, Cathomas G, Becker JC, Schrama D. Fluorescence *in situ* hybridization and qPCR to detect Merkel cell polyomavirus physical status and load in Merkel cell carcinomas. *Int J Cancer*, 2014, 135(12): 2804–2815. [DOI]
- [9] Xia W, Liu DP, Dong WJ, Li B, Guo ZC, Wang J, Li TC, Liang CC. Localization of human  $\beta^E$ -globin gene in chromosomes of transgenic mice by fluorescence *in situ* hybridization. *Hereditas (Beijing)*, 2001, 23(5): 397–400.  
夏薇, 刘德培, 董文吉, 李斌, 郭志晨, 王晶, 李铁昌, 梁植权. 应用荧光原位杂交技术检测人 $\beta^E$ 珠蛋白基因在转基因小鼠染色体上的整合状态. *遗传*, 2001, 23(5): 397–400. [DOI]
- [10] Xiao YP, Xi Y, Huang WY, Huang Y. Detection of the integration of human  $\beta^E$  (hF) on chromosomes of transgenic mice by fluorescence *in situ* hybridization. *Hereditas (Beijing)*, 2002, 24(3): 232–236.  
肖艳萍, 奚鹰, 黄文英, 黄英. 应用荧光原位杂交检测人凝血因子 $\beta^E$ 在转基因小鼠染色体上的整合. *遗传*, 2002, 24(3): 232–236. [DOI]
- [11] Liu W, Lu GX. Localization and position effect of human *APP<sub>SWE</sub>* gene on transgenic mice by means of *in situ* fluorescence hybridization. *Acta Genet Sinica*, 2001, 28(9): 827–831.  
刘薇, 卢光琇. 应用荧光原位杂交技术检测人类*APP<sub>SWE</sub>*基因在转基因小鼠染色体上的定位及位置效应. *遗传学报*, 2001, 28(9): 827–831. [DOI]

- [12] Davies J, Reff M. Chromosome localization and gene-copy-number quantification of three random integrations in Chinese-hamster ovary cells and their amplified cell lines using fluorescence *in situ* hybridization. *Biotechnol Appl Biochem*, 2001, 33(2): 99–105. [DOI]
- [13] Huang Y, Li Y, Wang YG, Gu X, Wang Y, Shen BF. An efficient and targeted gene integration system for high-level antibody expression. *J Immunol Methods*, 2007, 322(1–2): 28–39. [DOI]
- [14] Derouazi M, Martinet D, Schmutz NB, Flaction R, Wicht M, Bertschinger M, Hacker DL, Beckmann JS, Wurm FM. Genetic characterization of CHO production host DG44 and derivative recombinant cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 340(4): 1069–1077. [DOI]
- [15] Lattenmayer C, Loeschel M, Steinfeldner W, Trummer E, Mueller D, Schriebl K, Vorauer-Uhl K, Katinger H, Kunert R. Identification of transgene integration loci of different highly expressing recombinant CHO cell lines by FISH. *Cytotechnology*, 2006, 51(3): 171–182. [DOI]
- [16] Li SW, Gao XP, Peng R, Zhang S, Fu W, Zou FD. FISH-based analysis of clonally derived CHO cell populations reveals high probability for transgene integration in a terminal region of chromosome 1 (1q13). *PLoS One*, 2016, 11(9): e0163893. [DOI]
- [17] Karafiátová M, Bartoš J, Doležel J. Localization of low-copy DNA sequences on mitotic chromosomes by FISH. *Methods Mol Biol*, 2016, 1429: 49–64. [DOI]
- [18] Cao YH, Kimura S, Itoi T, Honda K, Ohtake H, Omasa T. Fluorescence *in situ* hybridization using bacterial artificial chromosome (BAC) clones for the analysis of chromosome rearrangement in Chinese hamster ovary cells. *Methods*, 2012, 56(3): 418–423. [DOI]
- [19] Baik JY, Lee KH. A framework to quantify karyotype variation associated with CHO production instability. *Biotechnol Bioeng*, 2016, doi: 10.1002/bit.26231. [DOI]
- [20] Veith N, Ziehr H, MacLeod RA, Reamon-Buettner SM. Mechanisms underlying epigenetic and transcriptional heterogeneity in Chinese hamster ovary (CHO) cell lines. *BMC Biotechnol*, 2016, 16: 6. [DOI]
- [21] Xu X, Nagarajan H, Lewis NE, Pan SK, Cai ZM, Liu X, Chen WB, Xie M, Wang WL, Hammond S, Andersen MR, Neff N, Passarelli B, Koh W, Fan HC, Wang JB, Gui YT, Lee KH, Betenbaugh MJ, Quake SR, Famili I, Palsson BO, Wang J. The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 735–741. [DOI]
- [22] Lewis NE, Liu X, Li YX, Nagarajan H, Yerganian G, O'Brien E, Bordbar A, Roth AM, Rosenbloom J, Bian C, Xie M, Chen WB, Li N, Baycin-Hizal D, Latif H, Forster J, Betenbaugh MJ, Famili I, Xu X, Wang J, Palsson BO. Genomic landscapes of Chinese hamster ovary cell lines as revealed by the *Cricetulus griseus* draft genome. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 759–765. [DOI]
- [23] Kaas CS, Kristensen C, Betenbaugh MJ, Andersen MR. Sequencing the CHO DXB11 genome reveals regional variations in genomic stability and haploidy. *BMC Genomics*, 2015, 16: 160. [DOI]
- [24] Matsuyama R, Yamano N, Kawamura N, Omasa T. Lengthening of high-yield production levels of monoclonal antibody-producing Chinese hamster ovary cells by down-regulation of breast cancer 1. *J Biosci Bioeng*, 2016, doi: 10.1016/j.jbiosc.2016.09.006. [DOI]
- [25] Cao YH, Kimura S, Itoi T, Honda K, Ohtake H, Omasa T. Construction of BAC-based physical map and analysis of chromosome rearrangement in Chinese hamster ovary cell lines. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109(6): 1357–1367. [DOI]
- [26] Yamano N, Takahashi M, Ali Haghparsat SMA, Onitsuka M, Kumamoto T, Frank J, Omasa T. Increased recombinant protein production owing to expanded opportunities for vector integration in high chromosome number Chinese hamster ovary cells. *J Biosci Bioeng*, 2016, 122(2): 226–231. [DOI]

(责任编辑: 袁慧军)