



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104789592 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 22

(21) 申请号 201510122827. 4

A01K 67/027(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 03. 19

G01N 33/53(2006. 01)

(71) 申请人 中国食品药品检定研究院

地址 100050 北京市东城区天坛西里 2 号

(72) 发明人 徐丽明 邵安良 范昌发 陆艳

单永强 章娜 杨昭鹏 徐斌

张伟

(74) 专利代理机构 北京元中知识产权代理有限

责任公司 11223

代理人 王明霞

(51) Int. Cl.

C12N 15/85(2006. 01)

C12N 15/54(2006. 01)

C12N 5/10(2006. 01)

权利要求书2页 说明书16页

序列表4页 附图5页

(54) 发明名称

一种制备 α -1, 3GT 基因敲除的非人哺乳动物
的方法及应用

(57) 摘要

本发明涉及制作基因敲除动物模型的领域，具体讲，涉及一种制备 α -1, 3GT 基因敲除的非人哺乳动物的方法及应用。其制备方法为：从基因组 DNA 中分离 α -1, 3GT 基因，经长链 PCR 方法扩增获得同源臂，与抗生素耐药基因复合构建打靶载体；将打靶载体转入到胚胎细胞，将重组胚胎细胞注入代孕动物胚胎中，移植到假孕动物体内，与正常动物交配；对得到的嵌合体动物进行基因型验证，筛选基因成功敲除的阳性基因敲除的嵌合体动物；进一步与野生型动物交配，获得 F1 代杂合子；F1 代杂合子之间交配后获得两条染色体均被剔出的纯合子动物，建系获得基因敲除动物种群。

1. 一种制备 α -1, 3GT 基因敲除的非人哺乳动物的方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

(1) 构建打靶载体: 从基因组 DNA 中分离 α -1, 3GT 基因, 经长链 PCR 方法扩增获得同源臂, 与抗生素耐药基因复合构建打靶载体;

(2) 将打靶载体转入到胚胎细胞, 将重组胚胎细胞注入代孕动物胚胎中, 移植到假孕动物体内, 与正常动物交配;

(3) 对得到的嵌合体动物进行基因型验证, 筛选基因成功敲除的阳性基因敲除的嵌合体动物; 进一步与野生型动物交配, 获得 F1 代杂合子; F1 代杂合子之间交配后获得两条染色体均被剔出的纯合子动物, 建系获得基因敲除动物种群。

2. 根据权利要求 1 所述的制备 α -1, 3GT 基因敲除的非人哺乳动物的方法, 其特征在于, 所述的非人哺乳动物为小鼠, 进一步优选 C57BL 小鼠。

3. 根据权利要求 1 所述的制备 α -1, 3GT 基因敲除的非人哺乳动物的方法, 其特征在于, 所述的 α -1, 3GT 基因敲除为敲除 α -1, 3GT 基因的功能性催化区第九外显子, 其核苷酸序列如 SEQ NO ID:1 所示。

4. 根据权利要求 1 所述的制备 α -1, 3GT 基因敲除的非人哺乳动物的方法, 其特征在于, 所述打靶载体含有 5' 同源臂、耐药抗生素基因 NeoR-PA 和 3' 同源臂, 用 NeoR-PA 取代第 9 外显子。

5. 根据权利要求 1 所述的制备 α -1, 3GT 基因敲除的非人哺乳动物、子代、胚胎或细胞的方法, 其特征在于, 耐药抗生素基因 NeoR-PA 5' 端和 3' 端的同源臂序列取自小鼠第二条染色体上 α -1, 3GT 基因第九外显子的 5' 端和 3' 端, 分别为 4.123kb 和 7.343kb。

6. 根据权利要求 2 所述的制备 α -1, 3GT 基因敲除的非人哺乳动物的方法, 其特征在于, 构建打靶载体的步骤为:

(1) 从正常 C57BL/6J 小鼠分离基因组 DNA, 扩增第 9 外显子 5' 端 C1 片段、A 片段和 3' 端 B 片段、C2 片段, 分别连接到 pBlunt 载体;

(2) 将酶切鉴定、测序正确的 A 和 B 片段依次连接到 pL452 载体得到 pL452- α -1, 3GT-A-B, 同时, 通过 Overlap PCR 将测序正确的 C1、C2 片段融合后连接到 pDTA-Down 载体上;

(3) 将连接正确的 pL452- α -1, 3GT-A-B 用 EcoRV 酶切, pL452-AB 切出 2885bp、2930bp 两条带, 回收目的片段 A-NeoR-B, 电转含 pBCTG 的 BAC 菌进行重组; 菌落 PCR 检测 A-NeoR-B 片段重组 BAC, 鉴定扩增条带正确;

(4) pDTA-down- α -1, 3GT-C 的线性化处理, 即 EcoRV 酶切处理 pDTA-Down- α -1, 3GT-C, 回收目的条带, 电转已经重组了 NeoR 的 α -1, 3GT 的 BAC 菌; pDTA- α -1, 3GT-C 拯救 α -1, 3GT-NeoR BAC (AmpR+KanR); 对 C 拯救后的菌落进行 PCR 检测鉴定, 将重组正确克隆进行扩增, 经 Stb13 纯化后酶切验证。

7. 根据权利要求 1 所述的制备 α -1, 3GT 基因敲除的非哺乳动物、子代、胚胎或细胞的方法, 其特征在于, 步骤 (2) 包括以下步骤: 制备不育雄鼠和假孕母鼠; 超排卵; 收获受精卵; 目的 DNA 的制备; 将目的 DNA 导入受精卵; 受精卵的移植; 首建鼠中目的 DNA 整合情况的检测; 通过杂交繁育基因剔除小鼠种系。

8. 一种来自权利要求 1 所述的基因敲除动物的精子、卵细胞、受精卵、胚胎、子代、组织或细胞。

9. 一种如权利要求 1 所述的基因敲除的非人哺乳动物或如权利要求 8 所述的精子、卵细胞、受精卵、胚胎、子代、组织或细胞在生物源性材料中的应用和在 α -Gal 抗原介导的肿瘤免疫的应用；所述生物源性材料包括动物源性或取自人体的，所述的动物源性生物材料不包括灵长类动物；所述的动物源性生物材料的种类包括取自动物体内的各种组织、脏器及其衍生物，或者由组织或脏器制备的各种材料；所述的灵长类动物优选古世纪猴、狒狒。

10. 根据权利要求 9 所述的应用，其特征在于，所述的应用包括在免疫学研究、免疫毒理学、异种移植的免疫排斥反应及其机理的研究、安全性评价中的应用。所述的免疫学研究包括 α -Gal 抗原介导的异种动物组织、器官或动物源性生物材料和肿瘤免疫的研究；所述的安全性评价包括生物源性材料，优选动物源性生物材料在临床实验研究前的安全性评价和 GGTA1 (α -1, 3GT) 基因敲除猪、牛等动物组织、器官移植的免疫学评价。

一种制备 α -1, 3GT 基因敲除的非人哺乳动物的方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及制作基因敲除动物模型的领域,具体讲,涉及一种制备 α -1, 3GT 基因敲除的非人哺乳动物的方法及应用。

背景技术

[0002] 由哺乳动物细胞外基质构成的生物源性材料因其具有良好的生物相容性被广泛用于外科的创伤修复、组织重建和组织工程的支架材料等。异种器官也早已成为解决器官移植中供器官严重缺乏的潜在途径之一。然而,动物源性生物材料或异种器官组织应用于人体所带来的免疫学问题直接影响着这类材料使用的安全性和有效性。异种器官移植的最大障碍是供器官异种抗原与受者体内天然抗体结合后激活补体系统,攻击供器官而产生的超急性免疫排斥反应 (Hyperacute rejection, HAR),其发生时间在异种移植后的几分钟至数小时,供器官在短时间内发生功能衰竭使移植失败。动物源性生物材料虽经各种去除抗原的处理,却难以彻底去除所有的异种抗原,残留抗原仍然是造成慢性免疫排斥反应和免疫毒性而影响创伤愈合的重要因素。

[0003] 已有研究显示异种抗原 α -半乳糖基抗原 (α -1,3-galactosyle, α -Gal) 是动物源性生物材料或异种器官移植超急性免疫排斥反应中的主要靶抗原。 α -Gal 是含有聚乳糖胺核心末端残基的细胞表面分泌型糖蛋白或糖脂,广泛存在于猪和其它低等动物体内。 α -Gal 主要受 α -1,3 半乳糖基转移酶 (α 1,3-galactosyltransferase, α -1,3GT 或 GGTA1) 及异红细胞糖苷酯合成酶 (isoglobotriosylceramide synthase 或 isogloboside 3synthase, iGb3S) 调控。由于人体及类人猿、旧世纪猴的半乳糖苷转移酶基因有 2 个碱基错位变异而不表达 Gal 抗原,但人血清中存在高滴度的抗 α -Gal 抗体 (占总血清球蛋白的 1%),因此当人体接受含有 Gal 抗原的生物材料或异种器官移植时会导致超急性免疫排斥反应及慢性的免疫毒性反应。有研究证实人血清中的抗 α -Gal 抗体既与 α -1,3GT 催化的 Gal 抗原 (糖蛋白) 反应,也与 iGb3S 催化的 Gal 抗原 (糖脂肪) 反应。动物源性生物材料或异种器官移植中 Gal 抗原的去除成为降低免疫排斥和慢性免疫毒性反应的关键。目前,如何评价 Gal 抗原的去除和残留 Gal 抗原诱导的免疫毒性尚存在着瓶颈。由于野生型低等动物都表达 α -Gal 抗原,因此无法利用野生型低等动物去评价 α -Gal 抗原相关的免疫毒性反应,只能用狒狒作为受体来考察 α -Gal 抗原阳性或者异体器官的免疫毒性反应,而这种动物稀少很难普及使用。因此,如何评价动物源性生物材料或异种器官组织的免疫毒性存在着瓶颈。检测与监管机构因没有方法和标准可依据而无法进行有效的安全性和质量监控,同时也限制了该类产品的研发和产业化发展。

[0004] 国际上早在 90 年代就有通过构建 α -1,3GT 基因敲除小鼠,来研究 α -Gal 相关的免疫学反应,探讨不含 Gal 抗原的克隆动物的构建方法和可行性。早在 1996 年,RG Tearle 等报告了 α -1,3GT 基因敲除小鼠模型的成功制作方法,为 α -1,3GT 基因敲除克隆猪的构建开辟了先锋。之后开始有报告使用 α -1,3GT 基因敲除小鼠模型研究其与人所诱导抗

体的相似性及其免疫学特征。Chiang TR 等报告, α -1, 3GT 基因敲出小鼠免疫后诱导的抗 α -Gal 抗体与 α -Gal 结合的亲和性和人的抗 Gal 抗体相似, 是能够诱导 Gal 抗原阳性异种心脏补片的超急性免疫排斥反应。Chong A 等报告, α -1, 3GT 基因敲除小鼠能够诱导自然的抗 α -Gal IgM 和 IgG, 并呈现周龄依存性增强; 在同种异体或异种补片移植后可以观察到 T-cell 依存性的抗 α -Gal 抗体反应。这些研究提示 α -1, 3GT 基因敲除小鼠模型对 Gal 抗原残留诱导的免疫毒性具有敏感的反应性。

[0005] α -Gal 抗原引起的超急性免疫排斥反应和慢性免疫毒性的克服方法得到了深入研究。许多实验室采用了不同的方法对供器官或细胞进行处理, 其中以酶处理法、物理化学分离法及交联法和基因改造等方法的研究最广泛。在 2000 年初研究者们开始了 α -1, 3GT 基因敲除猪的研究, 甚至 α -1, 3GT 基因敲除牛的研究, 期望能够直接从 α -1, 3GT 基因敲除猪或牛获得没有 Gal 抗原的组织或器官, 以避免动物源性生物材料及异种脏器移植的免疫排斥反应。Dai Y 及 Lai L 等报道, 他们运用核转移技术成功培育出了 α -1, 3GT 基因敲除猪 (GT/KO pig)。实验研究显示 α -1, 3GT 基因敲除猪来源的生物材料能够显著减轻 Gal 抗原诱导的超急性排斥反应。

[0006] 国内关于 α -1, 3GT 基因敲除动物模型的研究也已起步, 但进展缓慢, 大部分研究都还停留在打靶载体构建或胚胎细胞重组的阶段。关于 iGb3S 基因敲除动物的研究未见报道。第三军医大学的张伟在博士论文中曾记述了 C57BL/6J 小鼠胚胎干细胞的 α -1, 3GT 基因敲除的工作, 成功获得了 α -1, 3GT 基因敲除的小鼠胚胎干细胞。作者周建在林爱星导师的指导下曾进行了“猪体细胞 α -1, 3- 半乳糖基转移酶基因的敲除并敲入 HLA-G1 基因的研究”, 获得敲除 α -1, 3GT 并敲入 HLA-G1 基因的体细胞。在 2011 年, 南方医科大学的郑道山硕士研究生开展了“利用启动子缺陷型打靶载体敲除五指山小型猪 GGTA1 (α -1, 3GT) 基因”的研究。军事医学科学院野战输血研究所的作者常宏宇报道了利用正负筛选打靶载体在猪肾细胞系 PK-15 细胞中敲除 GGTA1 基因, 获得了杂合子 GGTA1 (+/-)PK-15 细胞。戴一凡教授早在 2002 年在美国留学期间就在国际上率先发表了 α -1, 3GT 基因敲除猪的研究成果。据报道戴一凡教授于 2011 年回到南京医科大学代谢疾病研究中心, 率领团队开始了 α -1, 3GT 基因敲除猪的深入研究和育种繁殖, 并很快成功迎来了首批转基因克隆猪的诞生。

[0007] 有研究发现, α -1, 3GT 基因敲除的小鼠或者猪仍然表达 α -Gal 抗原, 仍然能够观察到轻度的免疫排斥反应。另外有研究已经证实人的组织器官中不表达活性的 iGb3, 提示由 iGb3S 转移酶基因转写的 iGb3 含半乳糖基脂蛋白可能是动物源性材料移植于人体时造成异种免疫排斥反应的另一种外源性抗原。Milland 等的研究显示在 α -1, 3GT 基因敲除动物体内仍然表达低水平但有显著意义的 Gal 抗原。 α -1, 3GT 基因敲除小鼠表达 iGb3S mRNA, 更重要的是 α -1, 3GT 基因敲除小鼠来源的抗体与 iGb3S 合成的脂肪骨架的 Gal α (1, 3)Gal 抗原反应。这一研究结果提示 iGb3S 合成的 Gal α (1, 3)Gal 糖脂肪抗原可能是造成异体移植慢性免疫排斥反应的主要原因。因此, Milland 等认为 α -1, 3GT 基因敲除动物虽然避免了急性免疫排斥反应, 脂肪连接的 Gal 抗原是异体移植后期慢性免疫排斥反应的根源。有学者开始研究 iGb3 介导的免疫反应以及 iGb3S 缺损模型动物的免疫学变化。

[0008] 然而, 上述的一些研究也只限于个人的实验室研究范围, 国内还没有具有自主知

识产权的 α -1, 3GT 基因敲除小鼠。而由于国际间技术壁垒的存在,在国内无法得到相关的模型动物。针对现有技术的不足和缺陷,特提出本发明。

发明内容

[0009] 本发明的首要发明目的在于提出了一种制备 α -1, 3GT 基因敲除的非人哺乳动物的方法。

[0010] 本发明的第二发明目的在于提出该 α -1, 3GT 基因敲除的非人哺乳动物的应用。

[0011] 为了实现本发明的目的,采用的技术方案为:

[0012] 一种制备 α -1, 3GT 基因敲除的非人哺乳动物的方法,包括以下步骤:

[0013] (1) 构建打靶载体:从 C57BL/6J 小鼠基因组 DNA 中分离 α -1, 3GT (GGTA1) 基因,经长链 PCR 方法扩增获得同源臂,与抗生素耐药基因复合构建打靶载体;

[0014] (2) 将打靶载体转入到胚胎细胞,将重组胚胎细胞注入代孕动物胚胎中,移植到假孕动物体内,与正常动物交配;

[0015] (3) 对得到的嵌合体动物进行基因型验证,筛选基因成功敲除的阳性基因敲除的嵌合体动物;进一步与野生型动物交配,获得 F1 代杂合子;F1 代杂合子之间交配后获得两条染色体均被剔除的纯合子动物,建系获得基因敲除动物种群。其制备方法的流程图如图 16 所示。

[0016] 本发明的第一优选技术方案为:所述的非人哺乳动物为小鼠,进一步优选 C57BL 小鼠。

[0017] 本发明的第二优选技术方案为:所述的 α -1, 3GT 基因敲除为敲除 α -1, 3GT 基因的功能性催化区第九外显子,其核苷酸序列如 SEQ NO ID:1 所示,全长 694bp。

[0018] 本发明的第三优选技术方案为:所述打靶载体含有 5' 同源臂、耐药抗生素基因 NeoR-PA 和 3' 同源臂,用 NeoR-PA 取代第 9 外显子。

[0019] 本发明的第四优选技术方案为:耐药抗生素基因 NeoR-PA 5' 端和 3' 端的同源臂序列取自小鼠第二条染色体上 α -1, 3GT 基因第九外显子的 5' 端和 3' 端,分别为 4.123kb 和 7.5kb。

[0020] 本发明的第五优选技术方案为:构建打靶载体的步骤为:

[0021] (1) 从正常 C57BL/6J 小鼠分离基因组 DNA,扩增第 5 外显子 5' 端 C1 (582bp)、A (558bp) 和 3' 端 B (525bp)、C2 (559bp) 片段,分别连接到 pBlunt 载体;

[0022] (2) 将酶切鉴定、测序正确的 A 和 B 片段依次连接到 pL452 载体得到 pL452- α -1, 3GT-A-B,同时,通过 Overlap PCR 将测序正确的 C1、C2 片段融合后连接到 pDTA-Down 载体上;

[0023] (3) 将连接正确的 pL452- α -1, 3GT-A-B 用 EcoRV 酶切, pL452-AB 切出 2885bp、2930bp 两条带,回收目的片段 A-NeoR-B,电转含 pBCTG 的 BAC 菌进行重组;菌落 PCR 检测 A-NeoR-B 片段重组 BAC,鉴定扩增条带正确;

[0024] (4) pDTA-down- α -1, 3GT-C 的线性化处理,即 EcoRV 酶切处理 pDTA-Down- α -1, 3GT-C,回收目的条带,电转已经重组了 NeoR 的 α -1, 3GT 的 BAC 菌;pDTA- α -1, 3GT-C 拯救 α -1, 3GT-NeoR BAC (AmpR+KanR);对 C 拯救后的菌落进行 PCR 检测鉴定,将重组正确克隆进行扩增,经 Stb13 纯化后酶切验证。

[0025] 本发明的第六优选技术方案为：步骤(2)包括以下步骤：制备不育雄鼠和假孕母鼠；超排卵；收获受精卵；目的DNA的制备；将目的DNA导入受精卵；受精卵的移植；首建鼠中目的DNA整合情况的检测；通过杂交繁育基因剔除小鼠种系。

[0026] 本发明还涉及来自基因敲除动物的精子、卵细胞、受精卵、胚胎、子代、组织或细胞。

[0027] 本发明还涉及基因敲除的非人哺乳动物或来自基因敲出动物的精子、卵细胞、受精卵、胚胎、子代、组织或细胞在生物源性材料中的应用；所述生物源性材料包括动物源性或取自人体的，所述的动物源性生物材料不包括灵长类动物；所述的动物源性生物材料的种类包括取自动物体内的各种组织、脏器及其衍生物，或者由组织或脏器制备的各种材料；所述的灵长类动物特指古世纪猴、狒狒。所述的应用包括在免疫学研究、免疫毒理学、免疫排斥反应及其机理的研究、安全性评价中的应用，所述的安全性评价包括生物源性材料在临床试验前的安全性评价。

[0028] 打靶载体剔除序列片段是 α -1, 3GT 第9外显子的全长694bp。

[0029] SEQ NO ID:1

[0030]

```
20430          G TACATTGAGC ATTACTTAGA AGACTTTCTG
20461 GAGTCTGCTG ACATGTACTT CATGGTTGGC CATCGGGTCA TATTTTACGT CATGATAGAC
20521 GACACCTCCC GGATGCCTGT CGTGCACCTG AACCCCTCTAC ATTCCTTACA AGTCTTTGAG
20581 ATCAGGTCTG AGAAGAGGTG GCAGGATATC AGCATGATGC GCATGAAGAC CATTGGGGAG
20641 CACATCCTGG CCCACATCCA GCACGAGGTC GACTTCCTCT TCTGCATGGA CGTGGATCAA
20701 GTCTTTCAAG ACAACTTCGG GGTGGAAACT CTGGGCCAGC TGGTAGCACA GCTCCAGGCC
20761 TGGTGGTACA AGGCCAGTCC CGAGAAGTTC ACCTATGAGA GGC GGAACT GTCGGCCGCG
20821 TACATTCCAT TCGGAGAGGG GGATTTTAC TACCACGCGG CCATTTTGG AGGAACGCCT
20881 ACTCACATTC TCAACCTCAC CAGGGAGTGC TTTAAGGGGA TCCTCCAGGA CAAGAAACAT
20941 GACATAGAAG CCCAGTGGCA TGATGAGAGC CACCTCAACA AATACTTCCT TTTCAACAAA
21001 CCCACTAAAA TCCTATCTCC AGAGTATTGC TGGGACTATC AGATAGGCCT GCCTTCAGAT
21061 ATTA AAAAGTG TCAAGGTAGC TTGGCAGACA AAAGAGTATA ATTTGGTTAG AAATAATGTC
21121 TGA
```

[0031] 下面对本发明的技术方案做进一步的解释和说明。

[0032] 本发明涉及一种制作基因敲除动物模型的方法，以及该动物模型在多种生物源性材料（动物源性、取自人体的）、组织或器官的免疫学研究、免疫排斥反应及其机理的研究、临床前安全性评价（如免疫学评价、植入实验等）中的用途；以及由该模型动物衍生出来的细胞、组织、器官及胚胎在上述领域中的用途。

[0033] 本发明的动物模型被人为地剔出了 α -1, 3GT 基因的功能性催化区第9外显子。利用了细菌人工染色体同源重组技术，以抗生素耐药基因和附加在5'端（上游）与3'端（下游）的同源臂构成打靶载体，替换 α -1, 3GT 基因的功能性催化区第9外显子。实施该发明的途径主要包括打靶载体构建、重组胚胎细胞克隆和囊胚显微注射。首先从C57BL小鼠的基因组DNA中分离 α -1, 3GT (GGTA1) 基因，经长链PCR方法扩增获得同源臂，再与抗生素耐药基因复合构建打靶载体；从C57BL小鼠的胚胎中分离胚胎细胞，短期扩增培养后

用于打靶载体的电转,筛选、获得阳性胚胎细胞克隆;经显微注射方法将重组胚胎细胞注入鼠胚胎中,然后移植到假孕鼠体内;获得黑斑状嵌合体小鼠;进一步与野生型 C57BL 小鼠交配,获得 F1 代杂合子;利用分子生物学方法对得到的 F1 代杂合子小鼠进行基因型验证,筛选基因成功敲除的阳性基因敲除的杂合子小鼠;F1 代杂合子之间交配后获得两条染色体均被剔除的纯合子小鼠;Southern Blot 方法进行基因型鉴定后,建系获得基因敲除动物种群。在此基础上,可以进一步获得该动物模型的细胞、器官及胚胎。

[0034] 具体的,本发明提出了一种从小鼠基因组中剔除了 α -1, 3GT 基因的功能性催化区第 9 外显子的啮齿类基因敲除动物的制作方法。本发明所用的 α -1, 3GT 基因全长约 16.2kb,基因序列选自 C57BL/6J 小鼠第 2 染色体基因组 DNA。 α -1, 3GT 基因含有 9 个外显子,其功能性催化区位于第 9 外显子。本发明所构建的打靶载体长度为 18.966kb,如图 1 所示,含有 5' (上游)同源臂 (4.123kb)、NeoR-PA (7.343kb) 和 3' (下游)同源臂 (7.5kb)。用 NeoR-PA 取代第 9 外显子。

[0035] 与文献报道的不同(文献 1: The Journal of Biological Chemistry, Vol. 270, No. 37: 21437 - 21440, 1995),图 2a 为文献 1 报道打靶位点示意图,图 2b 示 GGTA1 基因的 9 个外显子。文献 1 的打靶位点位于 GGTA1 基因的最大外显子,即第 9 外显子的 5' 端,通过插入 pgkNeo,并设定前终止编码来终止 Neo 和第 9 外显子的转译。在 NeoR 的两侧含有基因组 DNA 5' - 端同源臂 11kb 和 3' - 端同源臂 0.9kb;文献 2 (Transplantation. 61 (1): 13-19, January 15, 1996): GGTA1 基因敲除小鼠打靶载体打靶位点是第 8 和第 9 外显子,以 NeoR 取代。

[0036] 通过显微注射 (Microinjection) 生产基因敲除动物的过程包括以下步骤:制备不育雄鼠和假孕母鼠;超排卵;收获受精卵;重组胚胎细胞的制备;将重组阳性的胚胎细胞导入受精卵;受精卵的移植;嵌合体小鼠的获得,进一步与野生型小鼠交配,获得杂合子小鼠(首建鼠);首建鼠 (Founder) 中重组 DNA 整合情况的检测;通过杂交繁育基因剔除小鼠种系。

[0037] 本发明获得的首建鼠具有新的表型。一般生命指征正常,生长发育正常。由于 α -1, 3GT 基因剔除动物模型报道极少,其表型特征有待进一步观察。

[0038] 采用如下方案交配建系:对于雌性嵌合体小鼠(图 7) 则与正常雄鼠交配,选择周龄在 10 周,具有交配经历、身体健壮的 C57BL 小鼠与之交配。同居 1 周后开始检查受孕情况,如果发现怀孕即将雌鼠单独饲养,直至生产。如果为雄性嵌合体小鼠,则选择 8 周以上,健壮的雌鼠与之交配。每一只纯合子小鼠的后代单独标记,作为一个系对待。检测发现基因剔除能在后代中稳定遗传,每窝产仔数量与正常小鼠无异,一般能成功喂养,少有吃仔等母性不良现象。这些有利特性为下一步大规模繁殖建系打下了基础。

[0039] α -1, 3GT 的基因水平表型鉴定采用 α -1, 3GT mRNA 的 RT-PCR 鉴定法。 α -1, 3GT 的蛋白质水平表型鉴定采用 alpha-Gal ELISA 抑制法,利用其特异性抗体进行 alpha-Gal 抗原表达的检测。alpha-Gal 抗原的表达由 alpha-GT (GGTA1) 和 iGb3S 调控。由于 α -1, 3GT 是催化合成 alpha-Gal 抗原的主要基因之一, α -1, 3GT 基因表达的缺失将会导致 alpha-Gal 抗原表达的减少。alpha-Gal ELISA 抑制法采用 alpha-Gal 抗原的特异性抗体 M86,先用 M86 与组织中的 alpha-Gal 抗原反应,再进行离心分离未反应的剩余抗体;将剩余抗体通过 alpha-Gal/BSA 固相抗原包被 96 孔板进行测定,以此计算与组织反应的 alpha-Gal 抗原的

表达量。 α -1, 3GT 基因剔除动物的生命周期与野生型动物无显著差异, 未见生命周期不同的报道。本发明中, 首建鼠的生命周期未见缩短现象, 且一般状态正常。

[0040] 本发明涉及制作基因敲除动物模型的方法, 以及该动物模型在多种生物源性材料(动物源性、取自人体的)、组织或器官的免疫学研究、免疫排斥反应及其机理的研究、临床前安全性评价(如免疫学评价、植入实验等)中的用途; 以及由该模型动物衍生出来的细胞、组织、器官及胚胎及其在上述领域中的用途。

[0041] 本动物模型被人为地剔出了 α -1, 3GT 基因的功能性催化区第 9 外显子。目前, 没有人研究用来作为动物源性生物材料安全性评价和质量控制的一种工具和方法, 或者异种器官、组织移植(如来源于 GGTA1 基因敲除猪、牛)的评价与研究; 国内还没有具有自主知识产权的 α -1, 3GT 基因敲除小鼠, 国内无法得到相关的模型动物; 除此之外, 还有许多研究利用 α -Gal 能够诱导人体超急性免疫反应的特性将其用于肿瘤的免疫治疗, 自体肿瘤疫苗: 将自体肿瘤细胞, 如血液肿瘤细胞、固体肿瘤细胞膜, 与神经氨酸酞酶、尿嘧啶核苷二磷酸半乳糖和重组 α -1. 3GT 共培养。本发明利用同源重组技术以及胚胎干细胞技术构建稳定遗传的 α -1, 3GT 基因敲除小鼠, 用于动物组织 Gal 抗原相关的免疫学研究和免疫排斥机理的研究; 动物源性生物材料的免疫毒理学研究、再生修复医学研究; 同时还可用于癌症治疗的免疫学研究。

附图说明:

[0042] 图 1 为 α -1, 3GT 基因打靶位点示意图, 标出了与全基因拼接相关的酶切位点和重组验证用探针的位点;

[0043] 图 2 为背景技术中文献报道打靶位点示意图;

[0044] 图 3 为打靶载体 pDTA- α -1, 3GT-A-B-C 酶切验证的电泳图;

[0045] 图 4 为打靶载体 pDTA- α -1, 3GT-A-B-C 1 号质粒大提后酶切验证的电泳图;

[0046] 图 5 为重组 ES 细胞经探针 1 的 Southern Blot 确认阳性克隆电泳图;

[0047] 图 6 重组 ES 细胞经探针 2 的 Southern Blot 确认阳性克隆电泳图;

[0048] 图 7 为 α -1, 3GT 嵌合体小鼠照片;

[0049] 图 8 为 α -1, 3GT(+/-) 杂合子小鼠(首建鼠)照片;

[0050] 图 9 为杂合子小鼠基因型鉴定高保真 PCR 引物设计图;

[0051] 图 10 为 α -1, 3GT-WT-F/WT-R 及 α -1, 3GT-Neo-F/WT-R 高保真 PCR 电泳图;

[0052] 图 11 为 α -1, 3GT(-/-) 纯合子小鼠照片;

[0053] 图 12 纯合子小鼠基因型鉴定高保真 PCR 扩增基因片段的电泳图;

[0054] 图 13 为 Southern blot 筛选策略的示意图;

[0055] 图 14 基因组 DNA 经 5' Probe 和 3' Probe 的 Southern Blot 图;

[0056] 图 15 α -1, 3GT mRNA 的 RT-PCR 检测结果图

[0057] 图 16 为本发明制作基因敲除动物模型的流程示意图。

[0058] 本发明的具体实施方式仅限于进一步解释和说明本发明, 并不对本发明的内容构成限制。

具体实施方式

[0059] 实施例 1

[0060] 1、打靶载体的构建

[0061] 1.1 从正常 C57BL/6J 小鼠分离基因组 DNA, 然后采用 PCR 方法分别扩增第 5 外显子 5' 端 C1 (582bp)、A (558bp) 和 3' 端 B (525bp)、C2 (559bp) 片段, A 和 B 片段分别位于外显子 5 催化功能区的 5' 端和 3' 端, C1 和 C2 片段分别位于 A 片段的 5' 端和 B 片段的 3' 端。

[0062] 打靶位点示意图如图 1 所示: 基因序列选自 C57BL/6J 小鼠第 2 染色体基因组 DNA (GRCm38. p1C57BL/6J, NCBI Reference Sequence: NC_000068.7)。剔除基因部分位于外显子 9, 其长度为第 9 外显子催化区全长 694bp 加上 5' (上游) 端的 246bp, 全部长度为 940bp。本发明所用打靶载体长度为 18.966kb (图 1), 含有 5' (上游) 同源臂 (4.123kb)、NeoR-PA (7.343kb)、3' (下游) 同源臂 (7.5kb)。

[0063] 克隆 A 片段的引物序列如 SEQ NO ID:2 和 SEQ NO ID:3 所示;

[0064] SEQ NO ID:2 的核苷酸序列为: cgatGGTACCGATATCCGAGACCGCATAGTAAG;

[0065] SEQ NO ID:3 的核苷酸序列为: cgatGAATTCCATATGTCGATGCCTGCCACACTG;

[0066] 扩增体系和条件如表 1 所示:

[0067] 表 1:

[0068]

反应体系 (30 μ l)		PCR 条件	
BAC	2 μ l	98 $^{\circ}$ C	30sec

[0069]

5xHF buffer	6 μ l	98 $^{\circ}$ C	10sec
dNTP (10mM)	0.6 μ l	58 $^{\circ}$ C	25sec
引物 F (10 μ m)	1.5 μ l	72 $^{\circ}$ C	20sec
引物 R (10 μ m)	1.5 μ l	2 to 4, 35 cycles	
Phusion	0.3 μ l	72 $^{\circ}$ C	10min
H ₂ O	18.1 μ l	4 $^{\circ}$ C	10min

[0070] 克隆 B 片段的引物序列如 SEQ NO ID:4 和 SEQ NO ID:5 所示;

[0071] SEQ NO ID:4 的核苷酸序列为: cgatGGATCCCATATGCTTCAAATTGTGATGGAAACTTGA

[0072] SEQ NO ID:5 的核苷酸序列为: cgatGCGGCCGCGATATCAGCTTTTACAGACTGATGG

[0073] 扩增体系和条件如表 2 所示:

[0074] 表 2:

[0075]

反应体系 (30 μ l)		PCR 条件	
BAC	2 μ l	98 $^{\circ}$ C	30sec
5xHF buffer	6 μ l	98 $^{\circ}$ C	10sec
dNTP (10mM)	0.6 μ l	58 $^{\circ}$ C	25sec
引物 F(10pm)	1.5 μ l	72 $^{\circ}$ C	20sec
引物 R(10pm)	1.5 μ l	2 to 4, 35 cycles	
Phusion	0.3 μ l	72 $^{\circ}$ C	10min
H ₂ O	18.1 μ l	4 $^{\circ}$ C	10min

[0076] 其中克隆片段 A 和片段 B 的引物如表 3 所示：

[0077] 表 3：

[0078]

序列号	引物	序列	限制性内切酶	产物大小	Tm
SEQ NO ID: 2	α -1,3GT -A-F	cgatGGTACCGATATCCGAGACCG CATAGTAAG	KpnI/EcoRV	547bp	53
SEQ NO ID: 3	α -1,3GT -A-R	cgatGAATTCATATGTCGATGCCT GCCACACTG	EcoRI/NdeI		56
SEQ NO ID: 4	α -1,3GT -B-F	cgatGGATCCCATATGCTTCAAATT GTGATGGAAACTTGA	BamHI/NdeI	486bp	64
SEQ NO ID: 5	α -1,3GT -B-R	cgatGCGGCCGCGATATCAGCTTT TACAGACTGATGG	NotI/EcoRV		62

[0079] 克隆 C1 片段的引物序列如 SEQ NO ID:6 和 SEQ NO ID:7 所示；

[0080] SEQ NO ID:6 的核苷酸序列为 :cgatCTCGAGATAATCACAAGCAAAGTGCTGG

[0081] SEQ NO ID:7 的核苷酸序列为：

[0082] CTATTAGGAGGATTGTTTACTTGATATCAGAAGAAGTACCAACACC

[0083] 扩增体系和条件如表 4 所示：

[0084] 表 4：

[0085]

反应体系 (30 μ l)		PCR 条件	
BAC	2 μ l	98 $^{\circ}$ C	30sec
5xHF buffer	6 μ l	98 $^{\circ}$ C	10sec
dNTP (10mM)	0.6 μ l	58 $^{\circ}$ C	25sec
引物 F(10 μ m)	1.5 μ l	72 $^{\circ}$ C	20sec
引物 R(10 μ m)	1.5 μ l	2 to 4, 35 cycles	
Phusion	0.3 μ l	72 $^{\circ}$ C	10min
H ₂ O	18.1 μ l	4 $^{\circ}$ C	10min

[0086] 克隆 C2 片段的引物序列如 SEQ NO ID:8 和 SEQ NO ID:9 所示；

[0087] SEQ NO ID:8 的核苷酸序列为：

[0088] GGTGTTGGTACTTCTTCTGATATCAAGTAAACAATCCTCCTAATAG

[0089] SEQ NO ID:9 的核苷酸序列为：cgatGCGGCCGCGAACACAAAATGCCAGCCCAG

[0090] 扩增体系和条件如图 5 所示：

[0091] 表 5：

[0092]

反应体系 (30 μ l)		PCR 条件	
BAC	2 μ l	98 $^{\circ}$ C	30sec
5xHF buffer	6 μ l	98 $^{\circ}$ C	10sec
dNTP (10mM)	0.6 μ l	58 $^{\circ}$ C	25sec
引物 F(10 μ m)	1.5 μ l	72 $^{\circ}$ C	20sec
引物 R(10 μ m)	1.5 μ l	2 to 4, 35 cycles	
Phusion	0.3 μ l	72 $^{\circ}$ C	10min
H ₂ O	18.1 μ l	4 $^{\circ}$ C	10min

[0093] 其中克隆片段 C1 和 C2 的引物如表 6 所示：

[0094] 表 6：

[0095]

序列号	引物	序列	限制性内切酶	产物大小	Tm
SEQ NO ID: 6	α -1,3GT-C-F	cgatCTCGAGATAATCACAAGC AAAGTGTCTGG	XhoI	586bp	58
SEQ NO ID: 7	α -1,3GT-C-R(in)	CTATTAGGAGGATTGTTTACT TGATATCAGAAGAAGTACCA ACACC	EcoRV		56
SEQ NO ID: 8	α -1,3GT-C-F(in)	GGTGTGGTACTTCTTCTGAT ATCAAGTAAACAATCCTCCT AATAG	EcoRV	585bp	56
SEQ NO ID: 9	α -1,3GT-C-R	cgatGCGGCCGCGAACACAAA TGCCAGCCAG	NotI		56

[0096] 1.2 连接到 pBlunt 载体：

[0097] 1.2.1 将酶切鉴定、测序正确的 A 和 B 片段依次连接到 pL452 载体，得到 pL452- α -1,3GT-A-B：

[0098] 通过酶切连接方法将 A 片段连接到 pL452 载体得到 pL452- α -1,3GT-A，然后再通过酶切连接的方法将 B 片段连接到 pL452- α -1,3GT-A 上得到 pL452- α -1,3GT-A-B。

[0099] 1.2.2 通过 Overlap PCR 将测序正确的 C1、C2 片段融合 (1134bp) 连接到 pDTA-Down 载体上：

[0100] C1 和 C2 片段通过 Overlap PCR 得到 C 片段 (1095bp)，C 片段连接到 pBlunt 载体测序正确后，通过酶切连接的方法连接到 pDTA-down 载体上得到 pDTA-Down- α -1,3GT-C。

[0101] 1.2.3 将连接正确的 pL452- α -1,3GT-A-B 用 EcoRV 酶切，pL452-AB 切出 2885bp、2930bp

[0102] 两条带，回收目的片段 A-NeoR-B。

[0103] 在 A 片段的正向引物和 B 片段的反向引物上添加有 EcoRV 酶切位点，所以 pL452-AB 可以用 EcoRV 将 A-Neo-B 片段切下来。

[0104] 1.3 将目的片段 A-NeoR-B 电转入含 pBCTG 的 BAC 菌进行重组：

[0105] 将切下来的 A-Neo-B 片段回收纯化，然后通过电转化的方法转入到含 pBCTG 的 BAC 菌里面。

[0106] 1.4 菌落 PCR 检测 A-NeoR-B 片段重组 BAC，鉴定扩增条带正确：

[0107] 在 A 和 B 片段两端设计合适的检测引物，检测引物的序列如表 7 所示；通过 AB 两端的 PCR 来验证重组是否正确。

[0108] 表 7：

[0109]

序列号	引物	序列	产物大小	Tm
SEQ NO ID: 10	α -1,3GT-Atest-F	TAGAATACACACCTAATATTGATTAGCA	673bp	54
SEQ NO ID: 11	α -1,3GT-Atest-R	TGGACGTAAACTCCTCTTCAG		55
	α -1,3GT-Btest-F	NEO-F	734bp	56
SEQ NO ID: 12	α -1,3GT-Btest-R	GGAGAGCTGAGGCTGAAGTC		58

[0110] 1. 5pDTA-down- α -1, 3GT-C 的线性化处理：

[0111] EcoRV 酶切处理 pDTA-Down- α -1, 3GT-C, 使 pDTA-down- α -1, 3GT-C 线性化, 回收目的条带, 然后再通过电转化的方法将线性化条带转入到重组了 NeoR 的 α -1, 3GT 的 BAC 菌里。1. 6pDTA- α -1, 3GT-C 拯救 α -1, 3GT-NeoR BAC (AmpR+KanR)：

[0112] 线性化的 pDTA-down- α -1, 3GT-C 电转到重组了 NeoR 的 α -1, 3GT 的 BAC 菌里面后, 通过同源重组的方式将 A-Neo-B 片段拯救到 pDTA-down-C 上。

[0113] 1. 7 对 C 拯救后的菌落进行 PCR 检测鉴定, 将重组正确克隆进行扩增, 在 C1 和 C2 两端设计合适的检测引物, 通过 PCR 来验证重组是否正确, 将重组正确的菌落摇菌过夜培养。

[0114] 检测引物的序列如表 8 所示：

[0115] 表 8：

[0116]

序列号	引物	序列	产物大小	Tm
—	α -1,3GT-C1test-F	M13R	730bp	56
SEQ NO ID: 13	α -1,3GT-C1test-R	GGCTAAATGCACCTGTCATG		56
SEQ NO ID: 14	α -1,3GT-C2test-F	ACACAAGGACTTGACCATGG	667bp	56
SEQ NO ID: 15	α -1,3GT-C2test-R	C2test-R AGCTAGCTTGGCTGGACGTA		56

[0117] 经转化 Stb13 感受态细胞后, 酶切验证如图 3 所示。

[0118] 酶切检测 pDTA- α -1, 3GT-A-B-C：

[0119] MfeI :1705bp+2104bp+3582bp+5249bp+6326bp；

[0120] HindIII+EcoRI :555bp+1129bp+6547bp+10735bp；

[0121] ScaI+NheI :229bp+588bp+1827bp+2798bp+3665bp+4128bp+5731bp。

[0122] 1. 8 酶切正确克隆 1 号和 2 号经测序鉴定, 1 号质粒经测序确认序列正确。

[0123] 1 号样本大提后酶切检测 pDTA- α -1, 3GT-A-B-C 结果见图 4。

[0124] 打靶载体 pDTA- α -1, 3GT-A-B-C 1 号质粒大提后酶切检测：

[0125] MfeI :1705bp+2104bp+3582bp+5249bp+6326bp；

[0126] HindIII+EcoRI :555bp+1129bp+6547bp+10735bp；

[0127] ScaI+NheI :229bp+588bp+1827bp+2798bp+3665bp+4128bp+5731bp。

[0128] 将酶切正确的克隆用于酶切线性化电转胚胎干细胞 (AscI)。

[0129] 2、胚胎细胞的重组

[0130] 将线性化重组 DNA 通过电转方式同源重组进胚胎干细胞, 再通过 G418 筛选, 筛除掉未重组的胚胎干细胞, 挑取剩下的克隆, 进行 PCR 和 Southern 筛选, 最后选取正确的克隆进行注射。

[0131] 详细步骤为：将 1 号样本大提质粒 pDTA- α -1, 3GT-A-B-C 线性化后转染 C57BL/6ES 细胞, 通过 G418 筛选, 挑选 400 个克隆用探针 1 进行筛选, 探针的设计见图 1, 序列见表 9。

[0132] 探针 1 (Probe1) 位于 5' 端同源臂的外侧, 在 A 片段 3' 端引入了 NdeI 的酶切位点,

因此,野生型和突变型酶切后探针标记的大小是不同的,分别是 16.2kb 和 5.7kb,以此来确定是否重组成功,并确认重组是特异的,而非随机插入。

[0133] 用探针 1 进行重组 ES 细胞的阳性克隆筛选。探针 1(Probe1) 位于 5' 端同源臂的外侧,在 A 片段 3' 端引入了 NdeI 的酶切位点,因此,野生型和突变型酶切后探针标记的大小分别是 16.2kb 和 5.7kb,以此来确定是否重组成功,并确认重组是特异的,而非随机插入。如图 5 所示,共获得了 7 个阳性克隆。

[0134] 将挑选的阳性克隆再用探针 2 进行复筛。探针 2(Probe2) 位于 3' 端同源臂的内侧,野生型和突变型酶切后探针 2 标记的大小分别是 16.2kb 和 9.5kb。结果见图 6,证实探针 1 筛选出的 7 个阳性克隆均正确,这些阳性克隆将用于鼠胚的囊胚注射。

[0135] 探针 1 和探针 2 的核苷酸序列如表 9 所示:

[0136] 表 9:

[0137]

序列号	引物	序列	产物大小	Tm
SEQ NO ID: 16	α -1,3GT-probe1-F	GGAAAGAGAGCGCAAATGTGT	435 bp	56
SEQ NO ID: 17	α -1,3GT-probe2-R	TAAGAATATGTTCTATGGGGTGTGG		56
SEQ NO ID: 18	α -1,3GT-probe2-F	GATAGACTGGCTAGCACTGAAC	535 bp	56
SEQ NO ID: 19	α -1,3GT-probe2-R	GTCGCAGCTTGTGAACCACAG		56

[0138] 3、重组胚胎细胞的囊胚注射

[0139] 通过囊胚的显微注射 (Microinjection) 生产基因敲除动物,其主要过程包括以下步骤:

[0140] 3.1 制备不育雄鼠和假孕雌鼠

[0141] 3.1.1 麻醉准备:选择 7 周龄雄鼠称重并经腹腔注射 0.7% 戊巴比妥钠溶液。

[0142] 3.1.2 准备手术器械:眼科镊 3 把,眼科剪 1 把,剪毛剪 1 把,酒精灯,酒精喷壶一个,三棱针,缝合线,消毒滤纸片(直径 15cm 左右)。

[0143] 3.1.3 雄鼠结扎:将已麻醉雄鼠腹部距生殖器 2cm 处剪毛,70% 酒精棉擦拭消毒后,分别开口皮肤层和肌肉层,用眼科镊夹住睾丸脂肪团拉出睾丸、附睾、输精管,选取输精管中间部分,用缝合线将输精管及毛细血管扎紧,间隔 1cm 处再次扎紧,用简单将缝合线扎紧的中间部分剪掉,一侧的结扎手术完成,用同样方式再结扎另外一侧,两侧完成用镊子夹住脂肪团将其送回腹腔,缝合肌肉层和皮肤层,复苏后单笼饲养。

[0144] 3.1.4 术后复苏:结扎完成饲养两周后,用 6 周龄发情雌鼠合笼交配,翌日检栓后单独饲养,15 日后确认妊娠与否,检查结扎成功与否。

[0145] 假孕雌鼠准备:

[0146] 3.1.5 发情雌鼠挑选:挑选发情前期和发情期雌鼠,组织表征为阴道裂缝,组织为淡红色到粉色,较湿润,在阴道背唇和腹唇上都出现许多纵横的皱纹。

[0147] 3.1.6 与结扎雄鼠交配:将已选发情雌鼠 1:1 结扎雄鼠交配,次日检栓,单笼饲养备用,见栓当天为 0.5 天,输卵管移植用见栓 0.5 天假孕鼠,子宫移植用见栓 2.5 天假孕鼠。

[0148] 3.2 超排卵

[0149] 3.2.1 激素准备:用 0.9% 生理盐水稀释孕马血清 (PMSG) 和人绒毛膜促性激素

(hCG), 国产激素稀释为 10IU/0.1ml, 进口激素稀释为 5IU/0.1ml。

[0150] 3.2.2 激素注射: 准备 4~6 周龄雌鼠, 间隔 48 小时, 每只分别腹腔注射 PMSG 和 hCG 10IU。hCG 注射后与同品系性成熟雄鼠合笼交配, 次日检栓, 单笼饲养备用, 见栓当日为 0.5 天, 3.5 天后处死雌鼠采集囊胚。

[0151] 3.3 采集囊胚

[0152] 3.3.1 培养液准备: M2 培养液放到 37°C 水浴锅温育, KSOM 培养液和 1mg/ml 透明质酸酶在超净工作台内做成培养液滴, 放到 37°C 二氧化碳培养箱温育备用。

[0153] 3.3.2 解剖动物: 颈椎脱臼处死见栓 3.5 天雌鼠, 70% 酒精棉消毒擦拭腹部后, 打开腹腔, 取其子宫, 放到已温育有 1ml M2 培养液的 35mm 培养皿中。

[0154] 3.3.3 采集胚胎: 取原核胚是将输卵管放到 300 μ l 透明质酸酶液滴中, 在实体显微镜下, 找到输卵管膨大部, 用 1ml 注射器针头将其刺破, 释放卵母细胞团, 3~4 分钟后在显微镜下观察, 卵母细胞周围的颗粒细胞已消化, 就可以收集卵母细胞, 洗涤干净后放到 KSOM 培养液滴, 放到二氧化碳培养箱中备用。取囊胚是将子宫放到 60mm 培养皿中, 用 1ml 注射器吸取 M2 培养液, 在实体显微镜下, 将注射器针头插入子宫一端, 冲洗子宫, 并在镜下收集囊胚, 洗涤干净后放到 KSOM 培养液滴, 放到二氧化碳培养箱中培养备用。

[0155] 3.4 将重组的胚胎细胞导入囊胚

[0156] 囊胚显微注射: 用 M2 培养液在 60mm 培养皿上做椭圆形注射滴, 覆盖石蜡油, 将培养皿放到显微操作仪镜下, 取 30 个囊胚放到注射滴中, 再吸取干细胞加入注射滴中, 调整显微镜物镜, 在合适倍数下, 调整注射针, 吸入 50~100 个干细胞, 在镜下找到囊胚, 操作持卵针, 固定囊胚, 操作注射针将 10~15 个胚胎细胞注射到 1 个囊胚腔中, 完成注射。一批囊胚注射完成后放回 KSOM 培养液滴中, 于二氧化碳培养箱培养, 恢复 30 分钟后挑选好的囊胚进行子宫移植。

[0157] 3.5 受精卵的移植

[0158] 囊胚移植: 假孕鼠背部距尾部 3~4cm 的背中线处被毛, 用 70% 酒精棉擦拭消毒后剪开皮肤层, 再找到卵巢部位, 剪开肌肉层, 将卵巢、输卵管和子宫取出, 用止血钳固定, 在实体显微镜下吸取 8 个囊胚, 同时将已经固定好卵巢、输卵管的假孕鼠放到显微镜下, 找到子宫和输卵管连接处血管少的部位, 用 1ml 注射器针头刺一小口, 将有囊胚的吸卵管沿口插入, 把胚胎吹入, 用同样方式移植另一侧。术后缝合皮肤层, 动物苏醒后单笼饲养, 等待注入重组胚胎细胞的受精卵着床, 母鼠的受孕。

[0159] 4、交配、繁育与建系

[0160] 将上述获得的 ES 细胞 (C57BL/6ES 细胞 α -1, 3GT^{-/-}) 阳性克隆经显微注射技术注入 C57BL/6 小鼠 (黑色) 的受精卵, 再移植入代孕母鼠 (Ba1b/C, 白色) 的子宫内, 获得嵌合体小鼠 (黑色花斑)。嵌合鼠确认: 在移植 17 日后产子, 记录产子数量, 在 10~15 天据毛色确认是否有嵌合鼠。胚胎细胞来源于 C57BL/6, 黑色; 假孕鼠 Ba1b/C 是白色的, 所以得到黑色斑点的花斑嵌合体小鼠, 照片如图 7 所示; 通过杂交繁育基因剔出小鼠种系。

[0161] 采用如下方案交配建系: 对于雌性嵌合体小鼠则与野生型雄鼠交配, 选择周龄在 10 周, 具有交配经历、身体健壮的 C57BL/6 小鼠与之交配。同居 1 周后开始检查妊娠情况, 如果发现怀孕即将雌鼠单独饲养, 直至生产。如果为雄性嵌合体小鼠, 则选择 8 周以上, 健壮的野生型 C57BL/6 雌鼠与之交配, 获得 F1 代杂合子小鼠 (首建鼠), 照片如图 8 所示。F1

代杂合子小鼠再与野生型 C57BL/6 交配,筛选纯合子小鼠。每一只纯合子小鼠的后代单独标记,作为一个系对待。

[0162] 5、基因型鉴定

[0163] 5.1 首建鼠 (Founder) 及纯合子小鼠中目的重组 DNA 整合情况的检测:

[0164] 从基因剔除动物首建鼠 (杂合子小鼠,图 8) 的尾尖组织提取 DNA,通过高保真 PCR 扩增基因的部分片段进行基因型的鉴定。用于基因型鉴定的引物设计见图 9,引物序列见表 10,其 PCR 条件见表 11。

[0165] 表 10. 引物序列

[0166]

序列号	引物	序列	Tm	产物大小
SEQ NO ID: 20	α -1,3GT-WT-F	TAGCATGAACCTTACTGCAACGC	59	WT: 189 bp
SEQ NO ID: 21	α -1,3GT-WT-R	TGGCTTCTCCACATACCACTCG	60	
SEQ NO ID: 22	α -1,3GT-Neo-F	TAGCATGAACCTTACTGCAACGC	59	Mut: 302 bp
SEQ NO ID: 23	α -1,3GT-WT-R	CAGAGGCCACTTGTGTAGCG (Neo-GT-R)	59	

[0167] 表 11. PCR 条件:

[0168]

WT-F/R			WT-F/Neo-GT-R		
95°C	5 min	35 cycle	95°C	5 min	35 cycle
95°C	30 sec		95°C	30 sec	
64°C	30 sec		64°C	30 sec	
72°C	20 sec		72°C	30 sec	
72°C	10 min		72°C	10 min	
4°C	10 min		4°C	10 min	

[0169] PCR 扩增基因片段的电泳图如图 10 所示,图 10 左侧图为 α -1,3GT-WT-F/WT-R 高保真 PCR 电泳图;其中,由 α -1,3GT-WT-F/WT-R 配对引物扩增的片段为 189bp,代表野生型;图 10 右侧图为 α -1,3GT-Neo-F/WT-R 高保真 PCR 电泳图;由 α -1,3GT-Neo-F/WT-R 配对引物扩增的片段为 302bp,代表重组型。图 10 中显示获得 5 个杂合子克隆,10、13、2、3、4 号为阳性克隆。

[0170] 经多次繁殖,合计获得 24 只杂合子小鼠,其中 20 只用于纯合子小鼠的育种繁育。 α -1,3GT(-/-) 纯合子小鼠照片如图 11 所示,将 F1 杂合子小鼠和 F1 杂合子小鼠交配,获得 F2 纯合子小鼠。纯合子小鼠出生后未见明显的生理状况异常,生长、发育以及摄食、活动等均正常。

[0171] 纯合子的基因型鉴定采用高保真 PCR 扩增法(其引物和 PCR 条件同表 10 和表 11),其 PCR 扩增基因片段的电泳图如图 12 所示。克隆 2、6、8、10、11、13 是纯合子小鼠;克隆 1、4、5、12、14、17 是杂合子小鼠;克隆 3、7、9、15、16、18 是野生型小鼠。

[0172] 纯合子基因型鉴定后,用探针 1 和探针 2 进行 Southern Blot 鉴定,确认敲除基因的正确性和稳定性。Southern blot 筛选策略的示意图如图 13,其中用短线标示出了 5'-Probe 和 3'-Probe 的位点。所示探针 1 和探针 2 的引物设计同表 9;在 5' 端和 3' 端 loxP 位点外侧分别引入两端的 southern 酶切位点,分别用 NdeI 消化酶切,通过 5'-Probe 和 3'-Probe 的 southern blot 检测 α -1,3GT 基因敲除纯合子小鼠 (Mut/Mut) 只会产生突变型条带,杂合子小鼠 (Mut/WT) 会产生野生型和突变型条带,而 α -1,3GT 基因未敲除的野生型小鼠 (WT/WT) 只会产生野生型条带。各条带的大小见表 12。

[0173] 表 12. Southern blot 检测基因片段的大小

[0174]

	探针	WT/WT	Mut/WT	Mut/Mut
NdeI	5'-Probe 1	16.2kb	5.7kb/16.2kb	5.7kb
NdeI	3'-Probe 2	16.2kb	9.5kb/16.2kb	9.5kb

[0175] Southern Blot 合计检测 6 只小鼠 (纯合子、杂合子和野生型各 2 只),提取 α -1,3GT 基因敲除纯合子小鼠 (Mut/Mut)、杂合子小鼠 (Mut/WT) 以及野生型小鼠 (WT/WT) 鼠尾基因组 DNA。其 Southern Blot 鉴定结果分别如图 14(5'-Probe,上图和 3'-Probe,上图) 所示,克隆 1 和 2 是变异型纯合子小鼠 (Mut/Mut);克隆 3 和 4 是杂合子小鼠 (Mut/WT)、克隆 5 和 6 是野生型小鼠 (WT/WT),证实了纯合子小鼠已经获得了稳定的遗传。

[0176] 6、表型鉴定

[0177] 本发明获得的 α -1,3GT 基因敲除小鼠具有新的表型。一般生命指征正常,生长发育正常。由于 α -1,3GT 基因剔除动物模型报道极少,其表型特征有待进一步观察。

[0178] α -1,3GT 的基因表达水平表型鉴定采用 α -1,3GT mRNA 的 RT-PCR 鉴定法。取纯合子小鼠的多种脏器组织,包括肝、肺、肾、脾、心脏,进行 mRNA 的表达测定。RT-PCR 所用引物见表 13;其检测结果见图 15, α -1,3GT 基因剔除的纯合子小鼠完全失去了 α -1,3GT mRNA 的表达。

[0179] α -1,3GT 的蛋白质表达水平表型鉴定采用 alpha-Gal ELISA 抑制法进行 alpha-Gal 抗原表达的检测。alpha-Gal 抗原的表达由 α -1,3GT (GGTA1) 和 iGb3S 调控,由于 α -1,3GT 是催化合成 alpha-Gal 抗原的最主要基因, α -1,3GT 基因表达的缺失将会导致 alpha-Gal 抗原表达的显著减少。alpha-Gal ELISA 抑制法采用 alpha-Gal 抗原的特异性抗体 M86,先用 M86 与组织中的 alpha-Gal 抗原进行反应,再进行离心分离未反应的剩余抗体;将剩余抗体通过 alpha-Gal/BSA 固相抗原包被 96 孔板进行测定,以此计算与组织反应的 alpha-Gal 抗原的表达量。其检测结果见表 14, α -1,3GT 基因剔除纯合子小鼠的 alpha-Gal 抗原的表达量较野生型小鼠 (WT) 相比显著减少。

[0180] 表 13:RT-PCR 引物序列

[0181]

序列号	序列名称	引物	序列	产物大小
SEQ NO ID: 24	NM_010283.3	α -1,3GT-F	ACCTATGAGAGGCGGGAAC	129 bp
SEQ NO ID: 25		α -1,3GT-R	CCCCTTAAAGCACTCCCTGG	
SEQ NO ID: 26	NC_000072.6	GAPDH-F	GTTGTCTCCTGCGACTCA	182 bp
SEQ NO ID: 27		GAPDH-R	TGGTCCAGGGTTTCTTACTC	

[0182] 表 14 : α -Gal 抗原的表达量检测结果

[0183]

alpha-Gal 表达量 ($n \times 10^9$)	肝脏	肾脏	脾脏	肺脏	心脏
WT type	6.15	13.24	103.5	39.04	42.71
α -1,3GT ^{-/-}	2.13	3.55	5.86	12.29	20.47
decrease rate(%)	65.34	73.18	94.34	68.53	52.07

[0184] 7、基因剔除动物的生命周期

[0185] α -1,3GT 基因剔除动物的生命周期与野生型动物无显著差异,未见生命周期不同的报道。本发明中 α -1,3GT 基因剔除小鼠的生命周期未见缩短现象,且一般状态正常。

[0001]

核苷酸序列表

<110>中国食品药品检定研究院

<120>一种制备 iGb3S 基因敲除的非人哺乳动物的方法及应用

<160>12

<210>1

<211>694

<212>DNA

<213>小家鼠种 (mus musculus)

<400>1

GTACATTGAGCATTACTTAGAAGACTTTCTGGAGTCTGCTGACATGTACTTCATGGTTGGCCATCGGGT
CATATTTTACGTCATGATAGACGACACCTCCCGGATGCCTGTCGTGCACCTGAACCCTCTACATTCCTT
ACAAGTCTTTGAGATCAGGTCTGAGAAGAGGTGGCAGGATATCAGCATGATGCGCATGAAGACCATT
GGGGAGCACATCCTGGCCCACATCCAGCACGAGGTCGACTTCCTCTTCTGCATGGACGTGGATCAAG
TCTTTCAAGACAACCTTCGGGGTGGAACTCTGGGCCAGCTGGTAGCACAGCTCCAGGCCTGGTGGTA
CAAGGCCAGTCCCGAGAAGTTCACCTATGAGAGGCGGGAACCTGTCGGCCGCGTACATTCCATTCGGA
GAGGGGGATTTTTACTACCACGCGGCCATTTTTGGAGGAACGCCTACTCACATTCTCAACCTCACCAG
GGAGTGCTTTAAGGGGATCCTCCAGGACAAGAAACATGACATAGAAGCCAGTGGCATGATGAGAGC
CACCTCAACAAATACTTCCTTTTCAACAAACCCACTAAAATCCTATCTCCAGAGTATTGCTGGGACTAT
CAGATAGGCCTGCCTTCAGATATTAAGTGTCAAGGTAGCTTGGCAGACAAAAGAGTATAATTTGGT
TAGAAATAATGTCTGA

<210>2

<211>33

<212>DNA

<213>人工序列

<400>2

CGATGGTACCGATATCCGAGACCGCATAGTAAG

<210>3

<211>25

<212>DNA

[0002]

<213>人工序列

<400>3

CGATGAATTCATATGTCGATGCCT

<210>4

<211>40

<212>DNA

<213>人工序列

<400>4

CGATGGATCCCATATGCTTCAAATTGTGATGGAAACTTGA

<210>5

<211>37

<212>DNA

<213>人工序列

<400>5

CGATGCGGCCGCGATATCAGCTTTTACAGACTGATGG

<210>6

<211>33

<212>DNA

<213>人工序列

<400>6

CGATCTCGAGATAATCACAAGCAAAGTGTCTGG

<210>7

<211>46

<212>DNA

<213>人工序列

<400>7

[0003]

CTATTAGGAGGATTGTTTACTTGATATCAGAAGAAGTACCAACACC

<210>8

<211>46

<212>DNA

<213>人工序列

<400>8

GGTGTGGTACTTCTTCTGATATCAAGTAAACAATCCTCCTAATAG

<210>9

<211>32

<212>DNA

<213>人工序列

<400>9

CGATGCGGCCGCGAACACAAATGCCAGCCCAG

<210>10

<211>28

<212>DNA

<213>人工序列

<400>10

TAGAATACACACCTAATATTGATTAGCA

<210>11

<211>21

<212>DNA

<213>人工序列

<400>11

TGGACGTAAACTCCTCTTCAG

[0004]

<210>12

<211>21

<212>DNA

<213>人工序列

<400>12

GGAGAGCTGAGGCTGAAGTC

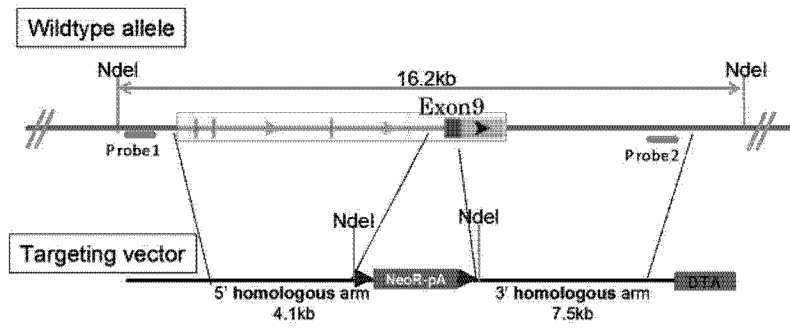


图 1

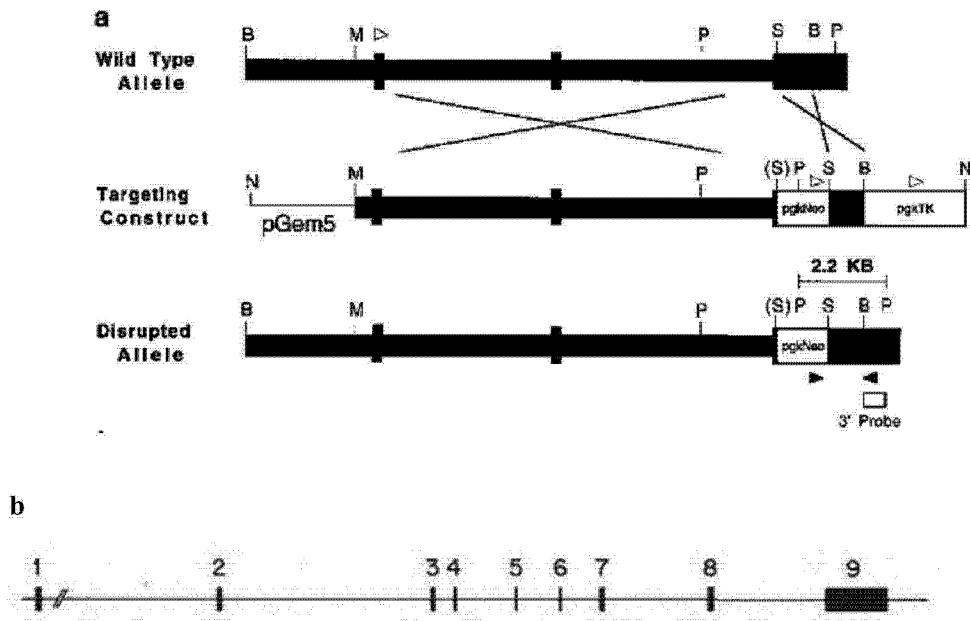


图 2

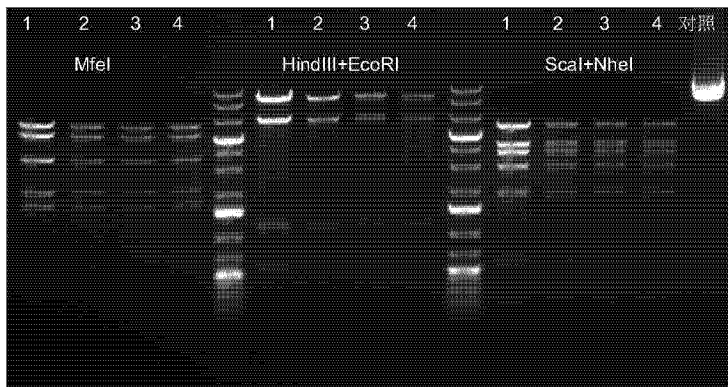


图 3

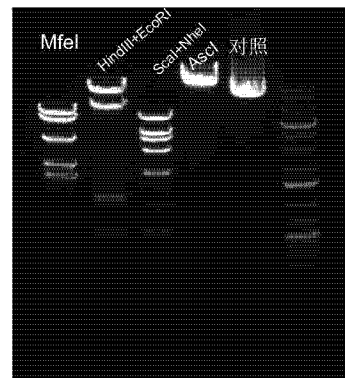


图 4

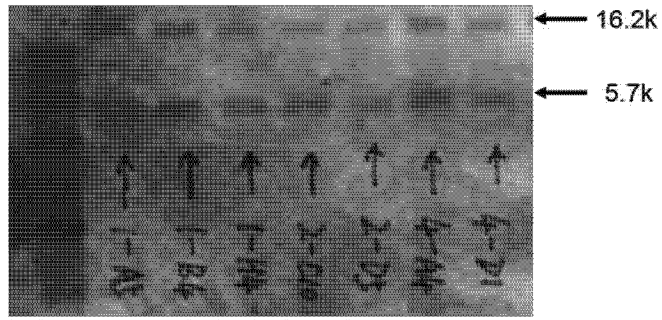


图 5

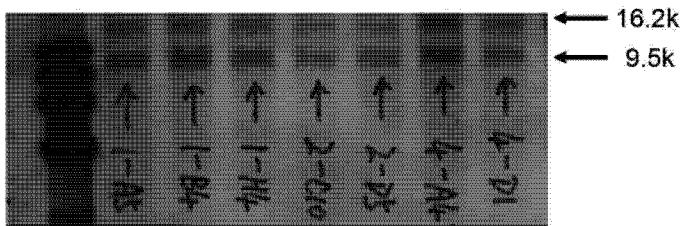


图 6

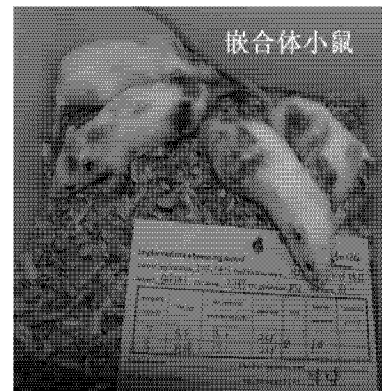


图 7

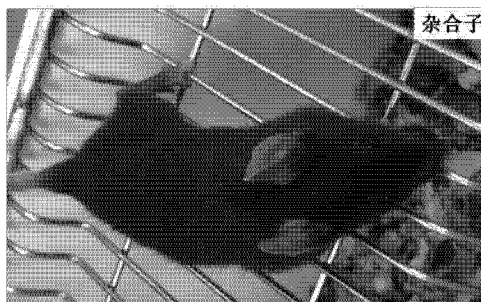


图 8

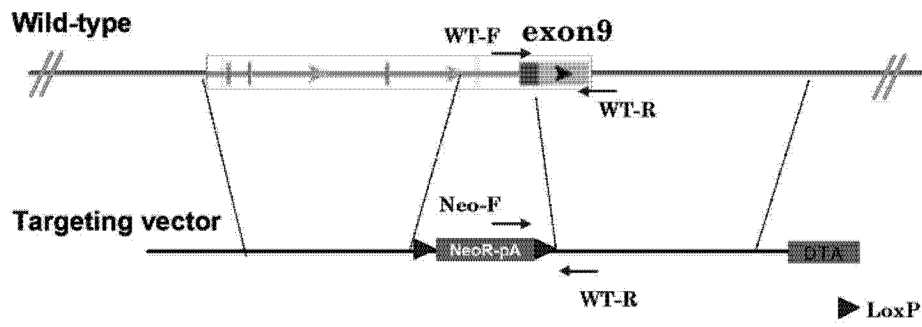


图 9

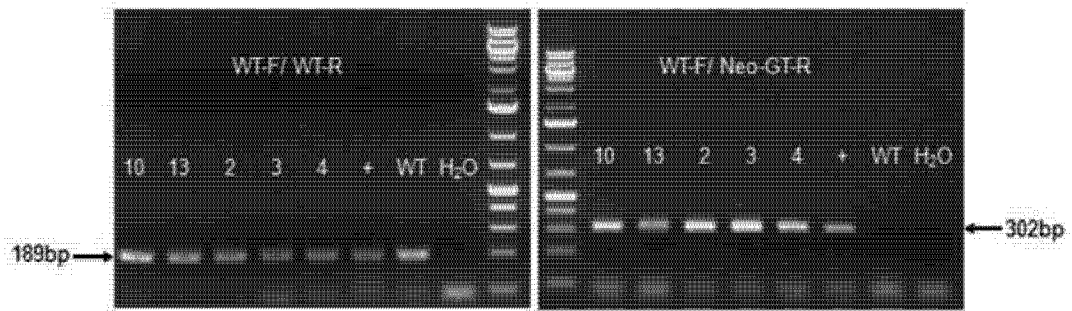


图 10

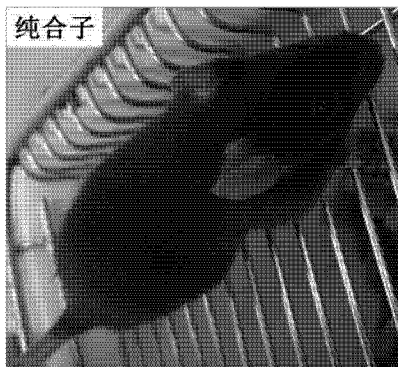


图 11

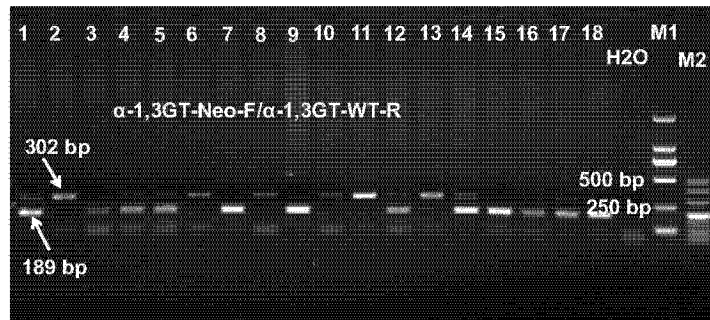


图 12

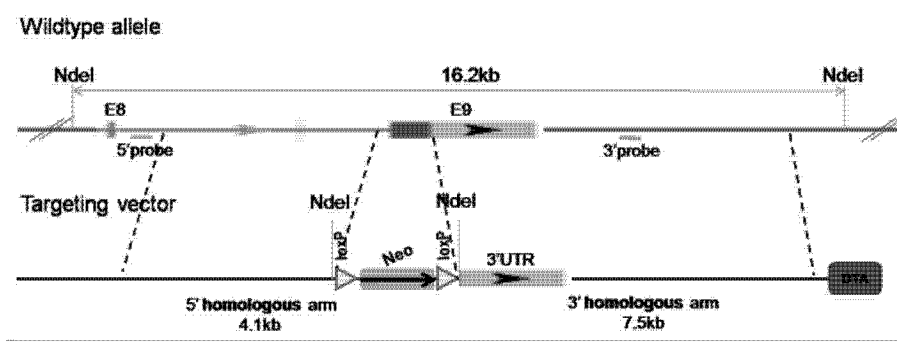


图 13

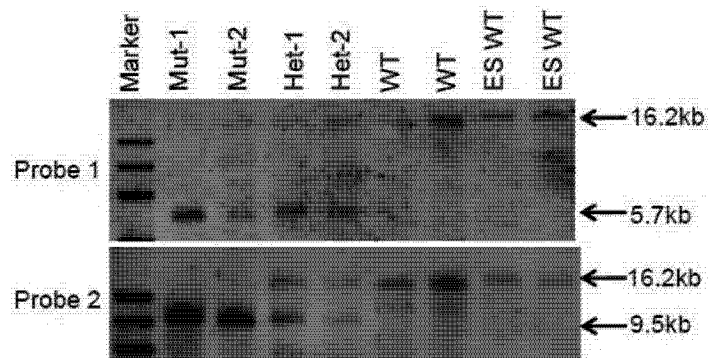


图 14

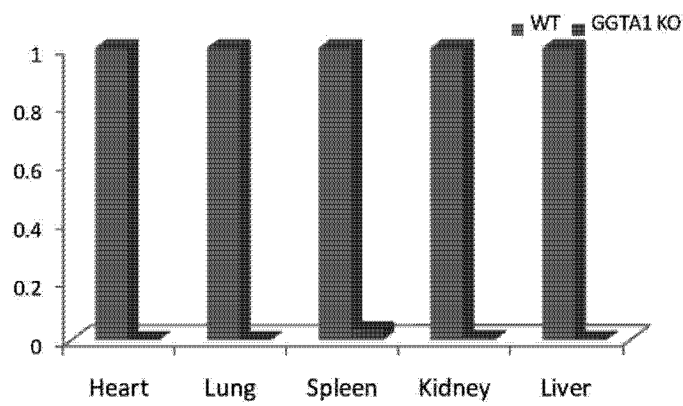


图 15

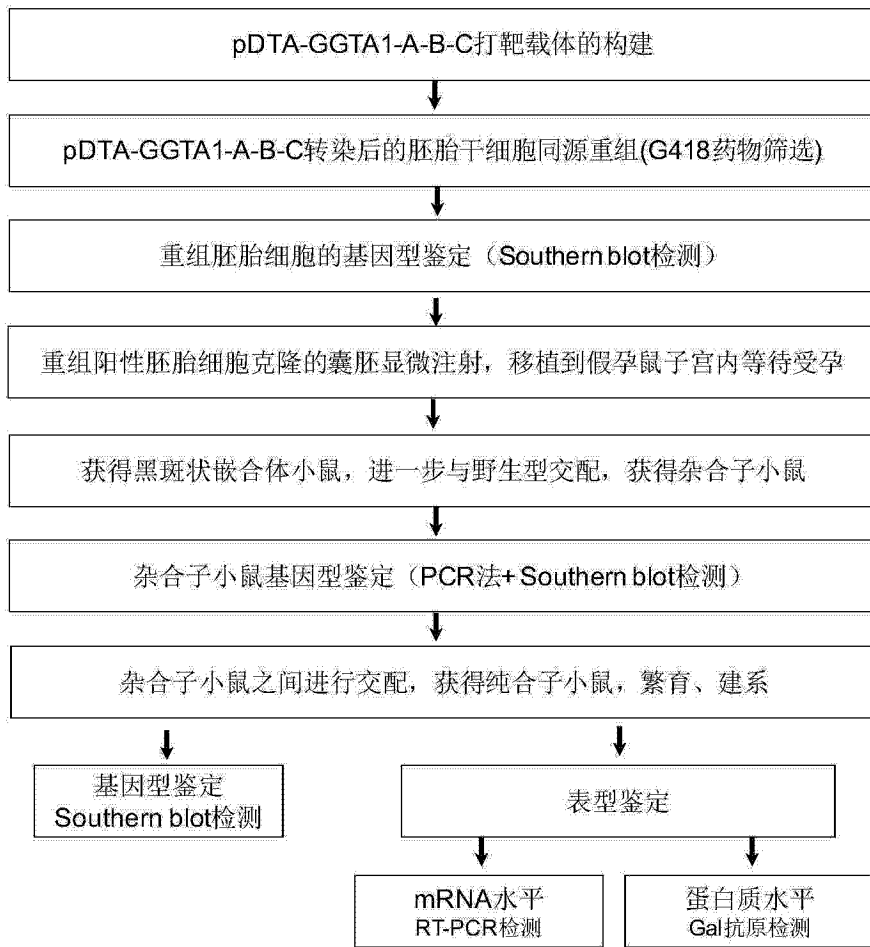


图 16

专利名称(译)	一种制备 α -1,3GT基因敲除的非人哺乳动物的方法及应用		
公开(公告)号	CN104789592A	公开(公告)日	2015-07-22
申请号	CN201510122827.4	申请日	2015-03-19
[标]申请(专利权)人(译)	中国食品药品检定研究院		
申请(专利权)人(译)	中国食品药品检定研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国食品药品检定研究院		
[标]发明人	徐丽明 邵安良 范昌发 陆艳 单永强 章娜 杨昭鹏 徐斌 张伟		
发明人	徐丽明 邵安良 范昌发 陆艳 单永强 章娜 杨昭鹏 徐斌 张伟		
IPC分类号	C12N15/85 C12N15/54 C12N5/10 A01K67/027 G01N33/53		
代理人(译)	王明霞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)	20430	G TACATTGAGC ATTACTTAGAAGACTTTCTG
本发明涉及制作基因敲除动物模型的领域，具体讲，涉及一种制备 α -1,3GT基因敲除的非人哺乳动物的方法及应用。其制备方法为：从基因组DNA中分离 α -1,3GT基因，经长链PCR方法扩增获得同源臂，与抗生素耐药基因复合构建打靶载体；将打靶载体转入到胚胎细胞，将重组胚胎细胞注入代孕动物胚胎中，移植到假孕动物体内，与正常动物交配；对得到的嵌合体动物进行基因型验证，筛选基因成功敲除的阳性基因敲除的嵌合体动物；进一步与野生型动物交配，获得F1代杂合子；F1代杂合子之间交配后获得两条染色体均被剔除的纯合子动物，建系获得基因敲除动物种群。	20461 GAGTCTGCTG ACATGTACTT CATGGTTGGC CATCGGGTCA TATTTTACGT CATGATAGC 20521 GACACCTCCC GGATGCCTGT CGTGCACCTG AACCTCTAC ATTCTTACA AGTCTTTGAG 20581 ATCAGGTCTG AGAAGAGGTG GCAGGATATC AGCATGATGC GCATGAAGAC CATTGGGGAG 20641 CACATCCTGG CCCACATCCA GCACGAGGTC GACTTCCTCT TCTGCATGGA CGTGGATCAA 20701 GTCTTTCAAG ACAACTTCGG GGTGAAACT CTGGGCCAGC TGGTAGCACA GCTCCAGGCC 20761 TGGTGTACA AGGCCAGTCC CGAGAAGTTC ACCTATGAGA GGCGGAACT GTCGGCCGCG 20821 TACATTCCAT TCGGAGAGGG GATTTTTTAC TACCACGCGG CCATTTTTGG AGGAACGCCT 20881 ACTCACATTC TCAACCTCAC CAGGGAGTGC TTTAAGGGGA TCCTCCAGGA CAAGAAACAT 20941 GACATAGAAG CCCAGTGGCA TGATGAGAGC CACCTCAACA AATACTTCT TTTCAACAAA 21001 CCCACTAAAA TCCTATCTCC AGAGTATTGC TGGGACTATC AGATAGGCCT GCCTTCAGAT 21061 ATTA AAAAGTG TCAAGGTAGC TTGGCAGACA AAAGAGTATA ATTTGGTTAG AAATAATGTC 21121 TGA	