



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104894163 B

(45)授权公告日 2019.01.18

(21)申请号 201510122581.0

(22)申请日 2015.03.19

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104894163 A

(43)申请公布日 2015.09.09

(73)专利权人 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

(74)专利代理机构 北京元中知识产权代理有限公司
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)

A01K 67/027(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

(56)对比文件

CN 104120147 A,2014.10.29,

CN 104120147 A,2014.10.29,

US 5849991 A,1998.12.15,

CN 102399817 A,2012.04.04,

Julie Milland,et al..The Molecular Basis for Gal α (1,3)Gal Expression in Animals with a Deletion of the 1,3 Galactosyltransferase Gene.《The Journal of Immunology》.2006,第176卷第2448-2454页.

Li P,et al..Efficient generation of genetically distinct pigs in a single pregnancy using multiplexed single-guide RNA and carbohydrate selection.《Xenotransplantation》.2014,第22卷第20-31页.

审查员 于淼

权利要求书2页 说明书20页

序列表10页 附图11页

(54)发明名称

一种制备GGTA1和iGb3S双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GGTA1和iGb3S双基因敲除的非人哺乳动物的方法及应用。其制备方法为:分别构建打靶载体;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GGTA1和iGb3S纯合子动物;再将GGTA1和iGb3S纯合子动物进行交配,筛选GGTA1和iGb3S同时缺失的双基因敲除纯合子动物,并建系获得基因敲除动物种群。

1. 一种制备GGTA1和iGb3S双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:分别从基因组DNA中分离GGTA1和iGb3S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GGTA1打靶载体和iGb3S打靶载体;

(2) 将GGTA1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GGTA1的F1代杂合子;

(3) 将iGb3S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iGb3S的F1代杂合子;

(4) 将GGTA1的F1代杂合子和iGb3S的F1代杂合子之间交配后获得两条染色体均被剔出的GGTA1和iGb3S纯合子动物;

(5) 再将GGTA1和iGb3S纯合子动物进行交配,筛选GGTA1和iGb3S同时缺失的双基因敲除纯合子动物,并建系获得基因敲除动物种群;

其中,非人哺乳动物为小鼠;

所述的GGTA1基因敲除为敲除GGTA1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;所述的iGb3S基因敲除为敲除iGb3S基因的功能性催化区第五外显子,其核苷酸序列如SEQ NO ID: 2所示;其中,GGTA1基因敲除为用NeoR-PA取代 α -1,3GT基因的功能性催化区第九外显子,被替换部分的长度为第九外显子催化区全长694 bp加上5'端的246 bp,全部长度为940 bp;

GGTA1和iGb3S双基因敲除纯合子小鼠中alpha-Gal的表达量几乎完全被消除。

2. 根据权利要求1所述的制备GGTA1和iGb3S双基因敲除的非人哺乳动物的方法,其特征在于,所述的小鼠为C57BL小鼠。

3. 根据权利要求1所述的制备GGTA1和iGb3S双基因敲除的非人哺乳动物的方法,其特征在于,所述GGTA1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分别取代第9外显子;所述iGb3S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分别取代第5外显子。

4. 根据权利要求1所述的制备GGTA1和iGb3S双基因敲除的非人哺乳动物的方法,其特征在于,用于GGTA1打靶载体构建的耐药抗生素基因NeoR-PA 5'端和3'端的同源臂序列取自小鼠第二条染色体上GGTA1基因第9外显子的5'端和3'端,分别为4.123 kb和7.343 kb;用于iGb3S打靶载体构建的耐药抗生素基因NeoR-PA 5'端和3'端的同源臂序列取自小鼠第四条染色体上iGb3S基因第5外显子的5'端和3'端,分别为8.3kb和9.1kb。

5. 根据权利要求1所述的制备GGTA1和iGb3S双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:

其中,GGTA1打靶载体的构建步骤为:

(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-GGTA1-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-GGTA1-A-B用EcoRV酶切,pL452-AB切出2885 bp、2930 bp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-GGTA1-C的线性化处理,即EcoRV酶切处理pDTA-Down-GGTA1-C,回收目的条带,电转已经重组了NeoR的GGTA1的BAC菌;pDTA-GGTA1-C拯救GGTA1-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;

iGb3S打靶载体的构建步骤为:

(1) 从正常C57BL/6J小鼠分离基因组DNA,扩增第5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-iGb3S-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-iGb3S-A-B用EcoRV酶切,pL452-AB切出2880bp、2885bp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- iGb3S -C的线性化处理,即EcoRV酶切处理pDTA-Down-iGb3S-C,回收目的条带,电转已经重组了NeoR的iGb3S的BAC菌;pDTA-iGb3S-C拯救iGb3S-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。

6. 根据权利要求1所述的制备GGTA1和iGb3S双基因敲除的非人哺乳动物的方法,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。

7. 一种如权利要求1所述的双基因敲除的非人哺乳动物的方法在生物源性材料免疫学研究中的应用;所述生物源性材料为动物源性生物材料,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。

8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,所述的应用包括在免疫学研究、免疫毒理学研究、 α -Gal抗原表达的调控机理研究、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及肿瘤免疫的研究;所述的安全性评价包括动物源性生物材料在临床实验研究前的安全性评价和GGTA1基因敲除动物组织、器官移植的免疫学评价。

一种制备GGTA1和iGb3S双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GGTA1和iGb3S双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1-3%),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GGTA1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。

[0004] 国际上早在90年代就有通过构建GGTA1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GGTA1基因敲除小鼠模型的成功制作方法,之后开始有报告使用GGTA1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,GGTA1基因敲出小鼠免疫后诱导的抗-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,GGTA1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GGTA1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GGTA1基因敲除猪的研究,甚至GGTA1基因敲除牛的研究,期望能够直接从GGTA1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GGTA1基因敲除猪(GT/KO pig)。实验研究显示GGTA1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GGTA1基因敲除动物模型的研究也取得了一定的成果,戴一凡和赖良学教授是国际上最早报道GGTA1基因敲除杂合子猪的学者。他们回国后在国内先后成功构建了GGTA1基因敲除猪的模型,并已经获得了纯合子。然而,关于iGb3S基因敲除动物的研究国内未见报道。

[0007] 有研究发现,GGTA1基因敲除的小鼠或者猪仍然表达 α -Gal抗原,仍然能够观察到后期的免疫排斥反应。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组织、器官或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GGTA1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。GGTA1基因敲除小鼠表达iGb3S mRNA,更重要的是GGTA1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GGTA1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] 因此,GGTA1和iGb3S双基因敲除小鼠模型将是深入研究和评价Gal抗原介导的免疫反应的有利工具。然而,GGTA1和iGb3S双基因敲除小鼠国内、国际都还没有报道。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GGTA1和iGb3S双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GGTA1和iGb3S双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GGTA1和iGb3S双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:分别从基因组DNA中分离GGTA1和iGb3S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GGTA1打靶载体和iGb3S打靶载体;

[0014] (2) 将GGTA1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GGTA1的F1代杂合子;

[0015] (3) 将iGb3S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iGb3S的F1代杂合子;

[0016] (4) 将GGTA1的F1代杂合子和iGb3S的F1代杂合子之间交配后获得两条染色体均被

剔出的GGTA1和iGb3S纯合子动物;

[0017] (5) 再将GGTA1和iGb3S纯合子动物进行交配,筛选GGTA1和iGb3S同时缺失的双基因敲除纯合子动物,并建系获得基因敲除动物种群。

[0018] 本发明的第一优选技术方案为:非人哺乳动物为小鼠,进一步优选C57BL小鼠。

[0019] 本发明的第二优选技术方案为:GGTA1基因敲除为敲除GGTA1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;iGb3S基因敲除为敲除iGb3S基因的功能性催化区第五外显子,其核苷酸序列如SEQ NO ID:2所示。

[0020] 本发明的第三优选技术方案为:所述GGTA1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分别取代第9外显子;所述iGb3S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分别取代第5外显子。

[0021] 本发明的第四优选技术方案为:用于GGTA1打靶载体构建的耐药抗生素基因NeoR-PA 5'端和3'端的同源臂序列取自小鼠第二条染色体上GGTA1基因第9外显子的5'端和3'端,分别为4.123kb和7.343kb;用于iGb3S打靶载体构建的耐药抗生素基因NeoR-PA 5'端和3'端的同源臂序列取自小鼠第四条染色体上iGb3S基因第5外显子的5'端和3'端,分别为8.3kb和9.1kb。

[0022] 本发明的第五优选技术方案为:

[0023] GGTA1打靶载体的构建步骤为:

[0024] (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;

[0025] (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-GGTA1-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;

[0026] (3) 将连接正确的pL452-GGTA1-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;

[0027] (4) pDTA-down-GGTA1-C的线性化处理,即EcoRV酶切处理pDTA-Down-GGTA1-C,回收目的条带,电转已经重组了NeoR的GGTA1的BAC菌;pDTA-GGTA1-C拯救GGTA1-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;

[0028] iGb3S打靶载体的构建步骤为:

[0029] (1) 从正常C57BL/6J小鼠分离基因组DNA,扩增第5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;

[0030] (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-iGb3S-A-B,同时,通过OverlapPCR将测序正确的C1、C2片段融合后连接到pDTA-Down载体上;

[0031] (3) 将连接正确的pL452-iGb3S-A-B用EcoRV酶切,pL452-AB切出2880bp、2885bp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;

[0032] (4) pDTA-down-iGb3S-C的线性化处理,即EcoRV酶切处理pDTA-Down-iGb3S-C,回收目的条带,电转已经重组了NeoR的iGb3S的BAC菌;pDTA-iGb3S-C拯救iGb3S-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。

[0033] 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。

[0034] 本发明还涉及来自双基因敲除动物的精子、卵细胞、受精卵、胚胎、子代、组织或细胞。

[0035] 本发明还涉及双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、异种器官移植领域研究和评价及Gal抗原介导的肿瘤免疫研究与评价中的应用；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、异种免疫排斥反应及其机理的研究、肿瘤免疫学研究及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、GGTA1基因敲除猪、牛等异种器官移植在临床试验前的安全性评价。

[0036] 打靶载体剔除序列片段是GGTA1第9外显子的全长694bp，其核苷酸序列如SEQ NO ID:1:

[0037] 20430 G TACATTGAGC ATTACTTAGA AGACTTTCTG

[0038] 20461 GAGTCTGCTG ACATGTACTT CATGGTTGGC CATCGGGTCA TATTTTACGT
CATGATAGAC

[0039] 20521 GACACCTCCC GGATGCCTGT CGTGCACCTG AACCTCTAC ATTCCTTACA
AGTCTTTGAG

[0040] 20581 ATCAGGTCTG AGAAGAGGTG GCAGGATATC AGCATGATGC GCATGAAGAC
CATTGGGGAG

[0041] 20641 CACATCCTGG CCCACATCCA GCACGAGGTC GACTTCCTCT TCTGCATGGA
CGTGGATCAA

[0042] 20701 GTCTTTCAAG ACAACTTCGG GGTGGAACT CTGGGCCAGC TGGTAGCACA
GCTCCAGGCC

[0043] 20761 TGGTGGTACA AGGCCAGTCC CGAGAAGTTC ACCTATGAGA GGCGGGAACT
GTCGGCCGCG

[0044] 20821 TACATTCCAT TCGGAGAGGG GGATTTTTTAC TACCACGCGG CCATTTTTTG
AGGAACGCCT

[0045] 20881 ACTCACATTC TCAACCTCAC CAGGGAGTGC TTTAAGGGGA TCCTCCAGGA
CAAGAAACAT

[0046] 20941 GACATAGAAG CCCAGTGGCA TGATGAGAGC CACCTCAACA AATACTTCCT
TTTCAACAAA

[0047] 21001 CCCACTAAAA TCCTATCTCC AGAGTATTGC TGGGACTATC AGATAGGCCT
GCCTTCAGAT

[0048] 21061 ATTAAAAGTG TCAAGGTAGC TTGGCAGACA AAAGAGTATA ATTTGGTTAG
AAATAATGTC

[0049] 21121 TGA

[0050] 打靶载体剔出序列片段是iGb3S第5外显子的全长687bp,其核苷酸序列为如SEQ NO ID:2:

[0051] 7728 GTA CCTGGAGAAG

[0052] 7741 TACCTGGAAC ACTTCCTGGT ATCGGCAGAG CAGCACTTCA TGGTCGGCCA GAACGTGGTG

[0053] 7801 TACTATGTGT TTACGGATCG CCCGGAAGCA GTGCCCTATG TGGCTCTAGG CCAGGGTCGC

[0054] 7861 CTGCTGCGGG CAAAACCCGT GCAGCGAGAG AGGCGCTGGC AGGACGTGTC CATGGCACGC

[0055] 7921 ATGCCCACGC TACACGAGGC TCTGGGAGGG CAGCTGGGCC AAGAAGCTGA CTTTGTGTTT

[0056] 7981 TGCCTGGACG TGGACCAGTA CTTACCGGT AACTTCGGGC CTGAGGTGCT GGCAGATTTG

[0057] 8041 GTGGCACAGC TGCACGCCTG GCACTACCGC TGGCCGCGGT GGCTGCTGCC CTACGAGAGG

[0058] 8101 GACAAGCGAT CGGCTGCTGC GCTGTCGTTA AGCGAAGGCG ATTTCTACTA CCACGCTGCG

[0059] 8161 GTGTTTGGCG GCAGTGTGGC TGCACTGCTC AAGCTGACGG CCCACTGTGC GACTGGCCAA

[0060] 8221 CAGCTGGACC ATAAGCGCGG CATTGAGGCA CTCTGGCACG ACGAAAGCCA CCTTAACAAG

[0061] 8281 TTCTTCTGGC TGAACAAGCC CACCAAGCTG CTGTCGCCTG AGTTCTGCTG GGCAGAGGAA

[0062] 8341 ATTATCTGGA GGAGAGAGAT CCATCACCCA CGCCTGCTCT GGGCACCCAA GGAATATACG

[0063] 8401 CTGGTGCAGAA ACTAG

[0064] 下面对本发明的技术方案做进一步的解释和说明。

[0065] 本发明涉及一种制作双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)、异种组织或器官的免疫学研究;Gal抗原介导的免疫排斥反应及其机理的研究;动物组织、器官或动物源性生物材料的临床前安全性评价(如免疫学评价、移植或植入实验等)中的用途;Gal抗原介导的肿瘤免疫学研究;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。

[0066] 本发明的动物模型被人为地剔出了GGTA1基因的功能性催化区第9外显子和iGb3S基因的功能性催化区第5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GGTA1基因的功能性催化区第9外显子和iGb3S基因的功能性催化区第5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中分别分离GGTA1基因和iGb3S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,GGTA1与iGb3S的杂合子或者纯合子进行杂交繁育获得GGTA1与iGb3S双基因缺失的纯合子小鼠,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。

[0067] 具体的,本发明提出了一种从小鼠基因组中剔除了GGTA1和iGb3S基因的功能性催化区第9外显子和第5外显子的啮齿类基因敲除动物的制作方法。本发明所用的GGTA1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。GGTA1基因含有9个外显子,其功能性催化区位于第9外显子。构建的GGTA1基因打靶载体长度为18.966kb,如图1-1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。本发明所用的iGb3S基因全长约10kb,基因序列选自C57BL/6J小鼠第4染色体基因组DNA。iGb3S基因含有5个外显子,其功能性催化区位于第5外显子。构建的iGb3S基因打靶载体长度为25.2kb,如图1-2所示,含有5' (上游) 同源臂 (8.3kb)、NeoR-PA (7.343bp) 和3' (下游) 同源臂 (9.1kb)。用NeoR-PA取代第5外显子。

[0068] 本发明中GGTA1打靶载体设计与文献报道的不同(文献1:The Journal of Biological Chemistry, Vol. 270, No. 37: 21437-21440, 1995),图2-1a为文献1报道打靶位点示意图。图2-1b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。

[0069] 本发明中iGb3S打靶载体设计与文献报道的不同:文献Normal development and function of invariant natural killer T cells in mice with isoglobotrihexosylceramide (iGb3) deficiency (PNAS, 2007, 104 (14) 5977-5982) 利用Cre-介导的loxP-NeoR选择盒(PGK-gb2-neomycin selection cassette (neo) symbolize loxP sequences) 剔除第5外显子,重组完成之后脱掉NeoR序列,其示意图如图2-2所示。最上端为野生型基因位点(WT locus),含有1~5个外显子(Exon1-5);插入的抗生素耐药基因(neo, PGK-gb2-neomycin selection cassette)取代了外显子5'和部分3'端序列;打靶载体包括上游同源臂(含2~4外显子),抗生素耐药基因序列和下游同源臂;重组完成后脱掉neo序列(recombined locus)。

[0070] 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。

[0071] 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GGTA1和iGb3S双基因剔除动物模型尚未见报道,其表型特征有待进一步观察。

[0072] 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。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。

[0073] 基因水平表型鉴定采用RT-PCR鉴定法。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。由于alpha-Gal抗原的表达由GGTA1和iGb3S调控,所以这两个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。GGTA1/iGb3S双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。

[0074] 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)、异种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。

[0075] 本动物模型被人为地剔出了GGTA1和iGb3S基因的功能性催化区第9外显子和第5外显子。目前,国内外均未见GGTA1/iGb3S双基因剔除动物的报道,也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。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,如自体肿瘤疫苗:将自体肿瘤细胞如血液肿瘤细胞、固体肿瘤细胞膜,与神经氨酸酐酶、尿嘧啶核苷二磷酸半乳糖和重组GGTA1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GGTA1/iGb3S双基因剔除小鼠,可用于动物组织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:

[0076] 图1-1. GGTA1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;

[0077] 图1-2. iGb3S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;

[0078] 图2-1. 背景技术中文献报道打靶位点示意图;

[0079] 图2-2. 背景技术中文献报道打靶位点示意图;

[0080] 图3-1. 打靶载体pDTA-GGTA1-A-B-C和pDTA-iGb3S-A-B-C酶切验证的电泳图;

[0081] 图3-2. 打靶载体pDTA-GGTA1-A-B-C和pDTA-iGb3S-A-B-C酶切验证的电泳图;

[0082] 图4-1. 打靶载体pDTA-GGTA1-A-B-C和pDTA-iGb3S-A-B-C质粒大提后酶切验证的电泳图;

[0083] 图4-2.打靶载体pDTA-GGTA1-A-B-C和pDTA-iGb3S-A-B-C质粒大提后酶切验证的电泳图;

[0084] 图5-1.为质粒pDTA-GGTA1-A-B-C重组ES细胞经探针1的Southern Blot确认阳性克隆电泳图;

[0085] 图5-2.为质粒pDTA-iGb3S-A-B-C重组ES细胞经探针1的Southern Blot确认阳性克隆电泳图;

[0086] 图6-1.质粒pDTA-GGTA1-A-B-C重组ES细胞经探针2的Southern Blot确认阳性克隆电泳图;

[0087] 图6-2.质粒pDTA-iGb3S-A-B-C重组ES细胞经探针2的Southern Blot确认阳性克隆电泳图;

[0088] 图7-1. GGTA1嵌合体小鼠照片;图7-2.iGb3S嵌合体小鼠照片;

[0089] 图8-1. GGTA1杂合子小鼠照片;图8-2.iGb3S杂合子小鼠照片;

[0090] 图9-1. GGTA1杂合子小鼠基因型鉴定高保真PCR引物设计图;

[0091] 图9-2. iGb3S杂合子小鼠基因型鉴定高保真PCR引物设计图;

[0092] 图10-1. GGTA1杂合子小鼠基因型鉴定高保真PC电泳图;

[0093] 图10-2. iGb3S杂合子小鼠基因型鉴定高保真PC电泳图;

[0094] 图11-1. GGTA1纯合子小鼠照片;图11-2.iGb3S纯合子小鼠照片;

[0095] 图12-1.剔除GGTA1基因纯合子小鼠基因型鉴定高保真PCR扩增基因片段的电泳图;

[0096] 图12-2.剔除iGb3S基因纯合子小鼠基因型鉴定高保真PCR扩增基因片段的电泳图;

[0097] 图13-1.剔除GGTA1基因的Southern blot筛选策略的示意图;

[0098] 图13-2.剔除iGb3S基因Southern blot筛选策略的示意图;

[0099] 图14-1.基因组DNA经GGTA15' Probe1 (探针1) 和3' Probe2 (探针2) 的Southern Blot图;上图为探针1;下图为探针2;

[0100] 图14-2.基因组DNA经iGb3S 5' Probe1 (探针1) 和3' Probe2 (探针2) 的Southern Blot图;a、b分别为探针1和探针2;

[0101] 图15-1. GGTA1/iGb3S双基因敲除杂合子小鼠基因组DNA经GGTA1高保真PCR检测的电泳图;

[0102] 图15-2. GGTA1/iGb3S双基因敲除杂合子小鼠基因组DNA经iGb3S高保真PCR检测的电泳图;

[0103] 图16. GGTA1和iGb3S纯合子及双基因敲除杂合子小鼠的mRNA表达检测结果图;a为GGTA1基因敲除纯合子小鼠GGTA1基因的表达;b为iGb3S基因敲除纯合子小鼠iGb3S基因的表达;c为GGTA1/iGb3S及双基因敲除杂合子小鼠iGb3S基因的表达;d为GGTA1/iGb3S及双基因敲除杂合子小鼠GGTA1基因的表达。

[0104] 图17.本发明制作基因敲除动物模型的流程示意图;

[0105] 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

[0106] 实施例1

[0107] 1、打靶载体的构建

[0108] 1.1从正常C57BL/6J小鼠分别分离GGTA1和iGb3S基因组DNA,然后采用PCR方法分别扩增第9外显子第5外显子5'端C1、A和3'端B、C2片段。

[0109] GGTA1打靶位点示意图如图1-1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1-1)。

[0110] GGTA1克隆A片段的引物序列如SEQ NO ID:3和SEQ NO ID:4所示;

[0111] SEQ NO ID:3的核苷酸序列为:cgatGGTACCGATATCCGAGACCGCATAGTAAG;

[0112] SEQ NO ID:4的核苷酸序列为:cgatGAATTCCATATGTCGATGCCTGCCACACTG;

[0113] iGb3S打靶位点示意图如图1-2所示:基因序列选自C57BL/6J小鼠第4染色体基因组DNA(GRCm38.p1C57BL/6J,NCBI Reference Sequence:NC_000070.6)。剔除基因部分位于外显子5,其长度为第5外显子催化区全长687bp加上5' (上游)端的255bp,全部长度为942bp。本发明所用打靶载体长度为25.2kb(图1-2)。

[0114] iGb3S克隆A片段的引物序列如SEQ NO ID:5和SEQ NO ID:6所示;

[0115] SEQ NO ID:5的核苷酸序列为:CGATGGTACCGATATCACAGAATCTTTCTCTGTTTTTC;

[0116] SEQ NO ID:6的核苷酸序列为:CGATGAATTCCATATGCAGGGTTTCTCTGTGTAGCC;

[0117] 扩增体系和条件如表1所示:

[0118] 表1:

反应体系 (30μl)		PCR 条件	
BAC	2 μl	98℃	30sec
5xHF buffer	6 μl	98℃	10sec
dNTP (10mM)	0.6 μl	58℃	25sec
引物 F(10pm)	1.5 μl	72℃	20sec
引物 R(10pm)	1.5 μl	2 to 4, 35 cycles	
Phusion	0.3 μl	72℃	10min
H ₂ O	18.1 μl	4℃	10min

[0120] GGTA1克隆B片段的引物序列如SEQ NO ID:7和SEQ NO ID:8所示;

[0121] SEQ NO ID:7的核苷酸序列为:cgatGGATCCCATATGCTTCAAATTGTGATGGAAACTTGA

[0122] SEQ NO ID:8的核苷酸序列为:cgatGCGGCCGCGATATCAGCTTTTACAGACTGATGG

[0123] iGb3S克隆B片段的引物序列如SEQ NO ID:9和SEQ NO ID:10所示;

[0124] SEQ NO ID:9的核苷酸序列为:CGATGGATCCCATATGCAGCCCTTCCCTGGCCAAGC

[0125] SEQ NO ID:10的核苷酸序列为:CGATGCGGCCGCGATATCCTGGTCACAGGAATGGCTTCA

[0126] 扩增体系和条件如表2所示:

[0127] 表2:

[0128]

反应体系 (30μl)		PCR 条件	
BAC	2 μl	98℃	30sec
5xHF buffer	6 μl	98℃	10sec
dNTP (10mM)	0.6 μl	58℃	25sec
引物 F(10pm)	1.5 μl	72℃	20sec
引物 R(10pm)	1.5 μl	2 to 4, 35 cycles	
Phusion	0.3 μl	72℃	10min
H ₂ O	18.1 μl	4℃	10min

[0129] 其中GGTA1克隆片段A和片段B的引物如表3所示：

[0130] 表3：

[0131]

序列号	引物	序列	限制性内切酶	产物大小	Tm
SEQ NO ID: 11	GGTA1 -A-F	cgatGGTACCGATATCCGAGACCG CATAGTAAG	KpnI/EcoRV	547bp	53
SEQ NO ID: 12	GGTA1 -A-R	cgatGAATTCCATATGTCGATGCCT GCCACACTG	EcoRI/NdeI		56
SEQ NO ID: 13	GGTA1 -B-F	cgatGGATCCCATATGCTTCAAATT GTGATGGAACTTGA	BamHI/NdeI	486bp	64

[0132]

SEQ NO ID: 14	GGTA1 -B-R	cgatGCGGCCGCGATATCAGCTTT TACAGACTGATGG	NotI/EcoRV		62
---------------	------------	---	------------	--	----

[0133] 其中iGb3S克隆片段A和片段B的引物如表4所示：

[0134] 表4：

[0135]

序列号	引物	序列	限制性内切酶	产物大小	Tm
SEQ NO ID: 15	iGb3S-A-F	CGATGGTACCGATATCACAGAAT CTTCTCTGTTTTTC	KpnI/EcoRV	547bp	53
SEQ NO ID: 16	iGb3S-A-R	CGATGAATTCCATATGCAGGG TTTCTCTGTGTAGCC	EcoRI/NdeI		56
SEQ NO ID: 17	iGb3S-B-F	CGATGGATCCCATATGCAGCCC TTCCCTGGCCAAGC	BamHI/NdeI	486bp	64
SEQ NO ID: 18	iGb3S-B-R	CGATGCGGCCGCGATATCCTGGT CACAGGAATGGCTTCA	NotI/EcoRV		62

[0136] GGTA1克隆C1片段的引物序列如SEQ NO ID:19和SEQ NO ID:20所示；

[0137] SEQ NO ID:19的核苷酸序列为：cgatCTCGAGATAATCACAAGCAAAGTGTCTGG

[0138] SEQ NO ID:20的核苷酸序列为：

[0139] CTATTAGGAGGATTGTTTACTTGATATCAGAAGAAGTACCAACACC

[0140] iGb3S克隆C1片段的引物序列如SEQ NO ID:21和SEQ NO ID:22所示；

[0141] SEQ NO ID:21的核苷酸序列为：CGATCTCGAGGTGGATGTCTCAGTGTGCGAA

[0142] SEQ NO ID:22的核苷酸序列为：

[0143] TACCGCAGACGGTGGATATCATTGACAGTCACTGAGCAA

[0144] 扩增体系和条件如表5所示：

[0145] 表5：

[0146]

反应体系 (30μl)		PCR 条件	
BAC	2 μl	98℃	30sec
5xHF buffer	6 μl	98℃	10sec
dNTP (10mM)	0.6 μl	58℃	25sec
引物 F(10pm)	1.5 μl	72℃	20sec
引物 R(10pm)	1.5 μl	2 to 4, 35 cycles	
Phusion	0.3 μl	72℃	10min
H ₂ O	18.1 μl	4℃	10min

[0147] GGTA1克隆C2片段的引物序列如SEQ NO ID:23和SEQ NO ID:24所示;

[0148] SEQ NO ID:23的核苷酸序列为:

[0149] GGTGTTGGTACTTCTTCTGATATCAAGTAAACAATCCTCCTAATAG

[0150] SEQ NO ID:24的核苷酸序列为:cgatGCGGCCGCGAACACAAATGCCAGCCCAG

[0151] iGb3S克隆C2片段的引物序列如SEQ NO ID:25和SEQ NO ID:26所示;

[0152] SEQ NO ID:25的核苷酸序列为:TTGCTCAGTGACTGTCAATGATATCCACCGTCTGCGGTA

[0153] SEQ NO ID:26的核苷酸序列为:CGATGCGGCCGCTATCGAGTGTTATTCTCAGGG

[0154] 扩增体系和条件如表6所示:

[0155] 表6:

[0156]

反应体系 (30μl)		PCR 条件	
BAC	2 μl	98℃	30sec
5xHF buffer	6 μl	98℃	10sec
dNTP (10mM)	0.6 μl	58℃	25sec
引物 F(10pm)	1.5 μl	72℃	20sec
引物 R(10pm)	1.5 μl	2 to 4, 35 cycles	
Phusion	0.3 μl	72℃	10min
H ₂ O	18.1 μl	4℃	10min

[0157] 其中GGTA1克隆片段C1和C2的引物如表7所示:

[0158] 表7:

[0159]

序列号	引物	序列	限制性内切酶	产物大小	Tm
SEQ NO ID:19	GGTA1 -C-F	cgatCTCGAGATAATCACAAGCAAA GTGTCTGG	XhoI	586bp	58
SEQ NO ID:20	GGTA1 -C-R(in)	CTATTAGGAGGATTGTTTACTTGAT ATCAGAAGAAGTACCAACACC	EcoRV		56
SEQ NO ID: 23	GGTA1 -C-F(in)	GGTGTGTTGGTACTTCTTCTGATATC AAGTAAACAATCCTCCTAATAG	EcoRV	585bp	56
SEQ NO ID:24	GGTA1 -C-R	cgatGCGGCCGCGAACACAAATGC CAGCCCAG	NotI		56

[0160] 其中iGb3S克隆片段C1和C2的引物如表8所示:

[0161] 表8:

[0162]

序列号	引物	序列	限制性内切酶	产物大小	Tm
SEQ NO ID:21	iGb3S-C-F	CGATCTCGAGGTGGATGTCTC AGTGTGCGAA	XhoI	586bp	58
SEQ NO ID: 22	iGb3S-C-R(in)	TACCGCAGACGGTGGATATCA TTGACAGTCACTGAGCAA	EcoRV		56
SEQ NO ID: 25	iGb3S-C-F(in)	TTGCTCAGTGACTGTCAATGAT ATCCACCGTCTGCGGTA	EcoRV	585bp	56
SEQ NO ID: 26	iGb3S-C-R	CGATGCGGCCGCCTATCGAGT GGTTATTCTCAGGG	NotI		56

[0163] 1.2连接到pBlunt载体:

[0164] 1.2.1分别将酶切鉴定、测序正确的A和B片段依次连接到pL452载体,得到pL452-GGTA1-A-B和pL452-iGb3S-A-B。

[0165] 1.2.2分别通过Overlap PCR将测序正确的C1、C2片段融合连接到pDTA-Down载体上,得到pDTA-Down-GGTA1-C和pDTA-Down-iGb3S-C。

[0166] 1.2.3分别将连接正确的pL452-GGTA1-A-B和pL452-iGb3S-A-B用EcoRV酶切,回收目的片段A-NeoR-B。

[0167] 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。

[0168] 1.3分别将目的片段A-NeoR-B电转入含pBCTG的BAC菌进行重组:

[0169] 分别将切下来的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。

[0170] 1.4分别进行菌落PCR检测A-NeoR-B片段重组BAC,鉴定扩增条带正确:

[0171] 分别在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9、10所示;通过AB两端的PCR来验证重组是否正确。

[0172] 表9:

[0173]

序列号	引物	序列	产物大小	Tm
SEQ NO ID:27	GGTA1-A test-F	TAGAATACACACCTAATATTGATTAGCA	673bp	54
SEQ NO ID:28	GGTA1-A test-R	TGGACGTAAACTCCTCTTCAG		55
—	GGTA1-B test-F	NEO-F	734bp	56
SEQ NO ID: 29	GGTA1-B test-R	GGAGAGCTGAGGCTGAAGTC		58

[0174] 表10:

[0175]

序列号	引物	序列	产物大小	Tm
SEQ NO ID: 30	iGb3S-A test-F	TAGAATACACACCTAATATTGATTAGCA	673bp	54
SEQ NO ID: 31	iGb3S-A test-R	TGGACGTAAACTCCTCTTCAG		55
—	iGb3S-B test-F	NEO-F	734bp	56
SEQ NO ID: 32	iGb3S-B test-R	GGAGAGCTGAGGCTGAAGTC		58

[0176] 1.5pDTA-down-GGTA1-C和pDTA-Down-iGb3S-C的线性化处理:

[0177] EcoRV酶切分别处理pDTA-down-GGTA1-C和pDTA-Down-iGb3S-C,使其线性化,回收目的条带,然后再通过电转化的方法将线性化条带分别转入到重组了NeoR的BAC菌里。

[0178] 1.6pDTA-GGTA1-C拯救GGTA1-NeoR BAC (AmpR+KanR):pDTA-iGb3S-C拯救iGb3S-

NeoR BAC (AmpR+KanR) :

[0179] 线性化后电转到重组了NeoR的GGTA1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;

[0180] 线性化后电转到重组了NeoR的iGb3S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。

[0181] 1.7分别对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。

[0182] 检测引物的序列如表11所示:

[0183] 表11-1:

[0184]

序列号	引物	序列	产物大小	Tm
—	GGTA1 -C1test-F	M13R	730bp	56
SEQ NO ID: 33	GGTA1 -C1test-R	GGCTAAATGCACCTGTCATG		56
SEQ NO ID: 34	GGTA1 -C2test-F	ACACAAGGACTTGACCATGG	667bp	56
—	GGTA1 -C2test-R	C2test-R		56

[0185] 表11-2:

[0186]

序列号	引物	序列	产物大小	Tm
—	iGb3S-C1test-F	M13R	730bp	56
SEQ NO ID: 35	iGb3S-C1test-R	GGCTAAATGCACCTGTCATG		56
SEQ NO ID: 36	iGb3S-C2test-F	ACACAAGGACTTGACCATGG	667bp	56
—	iGb3S-C2test-R	C2test-R		56

[0187] 经转化Stb13感受态细胞后,酶切验证如图3所示。

[0188] 酶切检测pDTA-GGTA1-A-B-C:如图3-1所示;

[0189] MfeI:1705bp+2104bp+3582bp+5249bp+6326bp;

[0190] HindIII+EcoRI:555bp+1129bp+6547bp+10735bp;

[0191] ScaI+NheI:229bp+588bp+1827bp+2798bp+3665bp+4128bp+5731bp。

[0192] 酶切检测pDTA-iGb3S-A-B-C:如图3-2所示;

[0193] BglII:740bp+2354bp+4252bp+5015bp+12389bp;

[0194] NheI:90bp+930bp+9890bp+13840bp;

[0195] SpeI:2850bp+3880bp+7110bp+10910bp。

[0196] 1.8 GGTA1酶切正确克隆经测序鉴定,经测序确认序列正确质粒进行扩增。

[0197] 序列正确质粒样本大提后酶切检测pDTA-GGTA1-A-B-C结果见图4-1。

[0198] 打靶载体pDTA-GGTA1-A-B-C 1号质粒大提后酶切检测:

[0199] MfeI:1705bp+2104bp+3582bp+5249bp+6326bp;

[0200] HindIII+EcoRI:555bp+1129bp+6547bp+10735bp;

[0201] ScaI+NheI:229bp+588bp+1827bp+2798bp+3665bp+4128bp+5731bp。

[0202] 将酶切正确的克隆用于酶切线性化电转胚胎干细胞(AscI)。

[0203] iGb3S酶切正确克隆经测序鉴定,经测序确认序列正确质粒进行扩增。

[0204] 序列正确质粒样本大提后酶切检测pDTA-iGb3S-A-B-C结果见图4-2。

[0205] 打靶载体pDTA-iGb3S-A-B-C 1号质粒大提后酶切检测：

[0206] Bgl11I:740bp+2354bp+4252bp+5015bp+12389bp；

[0207] NheI:90bp+930bp+9890bp+13840bp；

[0208] SpeI:2850bp+3880bp+7110bp+10910bp。

[0209] 将酶切正确的克隆用于酶切线性化电转胚胎干细胞 (AscI)。

[0210] 2、胚胎细胞的重组

[0211] 分别将线性化重组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。

[0212] 详细步骤为：

[0213] 将大提质粒pDTA-GGTA1-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12-1。剔除GGTA1的探针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，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。用探针1进行重组ES细胞的阳性克隆筛选。如图5-1所示。将挑选的阳性克隆再用探针2进行复筛。剔除GGTA1的探针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标记的结果见图6-1，证实探针1筛选出的阳性克隆被探针2确认正确的将用于鼠胚的囊胚注射。

[0214] 将大提质粒pDTA-iGb3S-A-B-C线性化后转染C57BL/6ES细胞，通过G418筛选，挑选200个克隆用探针1进行筛选，探针的设计见图1，序列见表12-2。剔除iGb3S的探针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不同，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。用探针1进行重组ES细胞的阳性克隆筛选。如图5-2所示。剔除iGb3S的探针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25.2kb和11.3kb，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。将挑选的阳性克隆再用剔除iGb3S的探针2进行复筛。剔除iGb3S的探针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25.2kb和12.3kb这些阳性克隆将用于鼠胚的囊胚注射，结果如图6-2所示。

[0215] 探针1和探针2的核苷酸序列如表12所示：

[0216] 表12-1：

[0217]

序列号	引物	序列	产物大小	Tm
SEQ NO ID: 37	GGTA1-probe1-F	GGAAAGAGAGCGCAAATGTGT	435 bp	56
SEQ NO ID: 38	GGTA1-probe2-R	TAAGAATATGTTCTATGGGGTGTGG		56
SEQ NO ID: 39	GGTA1-probe2-F	GATAGACTGGCTAGCACTGAAC	535 bp	56
SEQ NO ID: 40	GGTA1-probe2-R	GTCGCAGCTTGTGAACCACAG		56

[0218] 表12-2：

[0219]

序列号	引物	序列	产物大小	Tm
SEQ NO ID: 41	iGb3S-probe1-F	CATTCTGATACTCTGTCAATCAATTC	479bp	56
SEQ NO ID: 42	iGb3S-probe2-R	GGATGGACCAACCAGAACTA		56
SEQ NO ID: 43	iGb3S-probe2-F	GTATTACTCGTGAACACTCTTGGC	521bp	56
SEQ NO ID: 44	iGb3S-probe2-R	GTAGAGTCAGCGCCTCACAG		56

[0220] 3、重组胚胎细胞的囊胚注射

[0221] 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:

[0222] 3.1制备不育雄鼠和假孕雌鼠

[0223] 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。

[0224] 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)。

[0225] 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。

[0226] 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。

[0227] 假孕雌鼠准备:

[0228] 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。

[0229] 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。

[0230] 3.2超排卵

[0231] 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。

[0232] 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。

[0233] 3.3采集囊胚

[0234] 3.3.1培养液准备:M2培养液放到37℃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℃二氧化碳培养箱温育备用。

[0235] 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。

[0236] 3.3.3采集胚胎:取原核胚是将输卵管放到300μl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。

[0237] 3.4将重组的胚胎细胞导入囊胚

[0238] 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。

[0239] 3.5受精卵的移植

[0240] 囊胚移植:假孕鼠背部距尾部3~4cm的背中线上被毛,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。

[0241] 4、交配、繁育与建系

[0242] 将上述获得的ES细胞(C57BL/6ES细胞GGTA1^{-/-})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(Balb/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Balb/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(其中图7-1为剔除GGTA1基因的嵌合体小鼠,图7-2为剔除iGb3S基因的嵌合体小鼠)所示;通过杂交繁育基因剔除小鼠种系。

[0243] 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,照片如图8(其中图8-1为剔除GGTA1基因的杂合子小鼠,图8-2为剔除iGb3S基因的杂合子小鼠)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。利用GGTA1和iGb3S的杂合子或者纯合子进行杂交繁育,筛选GGTA1和iGb3S双基因敲除的纯合子小鼠,并进行保种建系。

[0244] 5、基因型鉴定

[0245] 5.1杂合子及纯合子小鼠中目的重组DNA整合情况的检测:

[0246] 分别从基因剔除动物(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13,其PCR条件见表14。

[0247] 表13-1. 引物序列

[0248]

序列号	引物	序列	Tm	产物大小
SEQ NO ID: 45	GGTA1-WT-F	TAGCATGAACCTTACTGCAACGC	59	WT: 189 bp
SEQ NO ID: 46	GGTA1-WT-R	TGGCTTCTCCACATACCACTCG	60	
SEQ NO ID: 47	GGTA1-Neo-F	TAGCATGAACCTTACTGCAACGC	59	Mut: 302 bp
SEQ NO ID: 48	GGTA1-WT-R	CAGAGGCCACTTGTGTAGCG (Neo-GT-R)	59	

[0249] 表13-2. 引物序列

[0250]

序列号	引物	序列	Tm	产物大小
SEQ NO ID: 49	iGb3S-WT-F	GGAATATACGCTGGTGCGAAAC	58	WT:173bp
SEQ NO ID: 50	iGb3S-WT-R	AGCTGACAAAGGGTCTACAGG	58	
SEQ NO ID: 51	iGb3S-Neo-F	TGGGCTCTATGGCTTCTGAG	57	Mut:276bp
SEQ NO ID: 52	iGb3S-WT-R	AGCTGACAAAGGGTCTACAGG	58	

[0251] 表14. PCR条件:

[0252] WT-F/WT-R Neo-F/WT-R

[0253]

95℃	5 min	35 cycle	95℃	5 min	
95℃	30 sec		95℃	30 sec	35 cycle
64℃	30 sec		64℃	30 sec	
72℃	20 sec		72℃	30 sec	
72℃	10 min		72℃	10 min	
4℃	10 min		4℃	10 min	

[0254] GGTA1模型鼠PCR扩增基因片段的电泳图如图10-1所示,图10-1左侧图为GGTA1-WT-F/WT-R高保真PCR电泳图;其中,由GGTA1-WT-F/WT-R配对引物扩增的片段为189bp,代表野生型;图10-1右侧图为GGTA1-Neo-F/WT-R高保真PCR电泳图;由GGTA1-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。

[0255] iGb3S模型鼠PCR扩增基因片段的电泳图如图10-2所示,图10-2(a)为iGb3S-WT-F/WT-R高保真PCR电泳图;其中由iGb3S-WT-F/WT-R配对引物扩增的片段为173bp;图10-2(b)为iGb3S-Neo-F/WT-R高保真PCR电泳图,由iGb3S-Neo-F/WT-R配对引物扩增的片段为276bp,图10-2中显示获得3个杂合子克隆,2、3、7号为阳性克隆。

[0256] 分别经多次繁育获得批量纯合子小鼠。纯合子小鼠照片如图11(其中图11-1为剔除GGTA1基因的纯合子小鼠,图11-2为剔除iGb3S基因的纯合子小鼠)所示,将GGTA1的F1杂合子小鼠和F1杂合子小鼠交配,获得GGTA1的F2纯合子小鼠;将iGb3S的F1杂合子小鼠和F1杂合子小鼠交配,获得iGb3S的F2纯合子小鼠;再将GGTA1的F2纯合子小鼠和iGb3S的F2纯合子小鼠进行杂交繁育,获得GGTA1和iGb3S双基因敲除小鼠;或者将GGTA1的F1杂合子小鼠与iGb3S的F1杂合子小鼠进行杂交繁育,筛选GGTA1和iGb3S双基因敲除小鼠纯合子小鼠。GGTA1、iGb3S及GGTA1和iGb3S双基因敲除小鼠纯合子小鼠出生后20周均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。更久的观察还在进行中。

[0257] 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13和表14),其

PCR扩增基因片段的电泳图如图12(其中图12-1为剔除GGTA1基因的电泳图,图12-2为剔除iGb3S基因的电泳图)所示。

[0258] 纯合子高保真PCR基因型筛选后,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(其中图13-1为剔除GGTA1基因的Southern blot筛选策略的示意图,图13-2为剔除iGb3S基因Southern blot筛选策略的示意图),其中用短线标示出了5'-Probe1和3'-Probe 2的位点。所示探针1和探针2的引物设计同表12;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15。

[0259] 表15-1. GGTA1的Southern blot检测基因片段的大小

[0260]

	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

[0261] 表15-2. iGb3S的Southern blot检测基因片段的大小

[0262]

	探针	WT/WT	Mut/WT	Mut/Mut
NdeI	5'-Probe 1	25.2kb	25.2kb/11.3kb	11.3kb
NdeI	3'-Probe 2	25.2kb	25.2kb/12.3kb	12.3kb

[0263] Southern Blot合计检测6只小鼠(纯合子、杂合子和野生型各2只),提取鼠尾基因组DNA。其Southern Blot鉴定结果分别如图14(14-1为GGTA1的探针1(上部)和探针2(下部)的检测结果;14-2的a、b分别为iGb3S探针1、探针2的检测结果)所示,证实了纯合子小鼠已经获得了稳定的遗传。

[0264] GGTA1和iGb3S双基因敲除小鼠杂合子的高保真PCR检测结果见图15,证实了GGTA1和iGb3S单侧染色体变异的存在。

[0265] 6、表型鉴定

[0266] 本发明获得的GGTA1和iGb3S双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GGTA1和iGb3S双基因剔除动物模型尚未见报道,其表型特征有待进一步观察。

[0267] 模型小鼠基因表达水平表型鉴定采用mRNA表达的RT-PCR鉴定法。取GGTA1和iGb3S纯合子及双基因敲除杂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16;其检测结果见图16(其中图a为GGTA1KO小鼠脏器组织GGTA1mRNA的验证结果;图b为iGb3S KO小鼠脏器组织iGb3S mRNA的验证结果;图c为GGTA1 KO和iGb3S KO双基因剔除杂合子小鼠脏器组织iGb3S mRNA的验证结果;图d为GGTA1 KO和iGb3S KO双基因剔除杂合子小鼠脏器组织GGTA1mRNA的验证结果),GGTA1和iGb3S单独敲出小鼠完全失去了相应的mRNA的表达;双基因剔除的杂合子小鼠显著降低了GGTA1和iGb3S mRNA的表达。

[0268] 模型小鼠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。 α -Gal抗原的表达由GGTA1和iGb3S调控,GGTA1和iGb3S基因表达的缺失将会导致 α -Gal抗原表达的显著减少或者完全消失。 α -Gal ELISA抑制法采用 α -Gal抗原的特异性抗体M86,先用M86与组织中的 α -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 α -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 α -Gal抗原的表达量。其检测结果见表17,GGTA1和iGb3S基因剔除纯合子小鼠的 α -Gal抗原的表达量较野生型小鼠(WT)相比均显著减少。GGTA1是 α -Gal的主要调控基因,因此GGTA1基因的剔除使得 α -Gal的表达降低了52%~94%;而iGb3S单独的基因缺失使得 α -Gal的表达降低了8.8%~46.6%;GGTA1和iGb3S双基因剔除杂合子小鼠,较野生型小鼠相比显著减少了Gal抗原的表达。GGTA1和iGb3S双基因剔除纯合子小鼠将几乎完全消除 α -Gal抗原的表达,这将在国际上首次证明这一科学现象。

[0269] 表16-1:GGTA1的RT-PCR引物序列

[0270]

序列号	序列号	引物	序列	产物大小
SEQ NO ID: 53	NM_010283.3	GGTA1-F	ACCTATGAGAGGCGGGAACCT	129 bp
SEQ NO ID: 54		GGTA1-R	CCCCTTAAAGCACTCCCTGG	
SEQ NO ID: 55	NC_000072.6	GAPDH-F	GTTGTCTCCTGCGACTTCA	182 bp
SEQ NO ID: 56		GAPDH-R	TGGTCCAGGGTTTCTTACTC	

[0271] 表16-2:iGb3S的RT-PCR引物序列

[0272]

序列号	序列号	引物	序列	产物大小
SEQ NO ID: 57	NM_001009819.2	iGb3S-F	TGTCGTAAAGCGAAGGCGAT	138 bp
SEQ NO ID: 58		iGb3S-R	CGTGCCAGAGTGCCTCAAT	
SEQ NO ID: 59	NC_000072.6	GAPDH-F	GTTGTCTCCTGCGACTTCA	182 bp

[0273]

SEQ NO ID: 60		GAPDH-R	TGGTCCAGGGTTTCTTACTC	
---------------	--	---------	----------------------	--

[0274] 表17-1:GGTA1K0纯合子小鼠 α -Gal抗原的表达检测结果

	α -Gal 表达	肝脏	肾脏	脾脏	肺脏	心脏
[0275]	decrease rate(%WT)	65.34	73.18	94.34	68.53	52.07

[0276] 表17-2:iGb3S K0模型纯合子小鼠 α -Gal抗原的表达检测结果

	α -Gal 表达	肝脏	肾脏	脾脏	肺脏	心脏
[0277]	decrease rate(%WT)	17.8	11.4	8.8	46.6	26.74

[0278] 表17-3:GGTA1/iGb3S双基因敲除小鼠杂合子 α -Gal抗原的表达检测结果

[0279]

α -Gal表达	肝脏	肾脏	脾脏	肺脏	心脏
decrease rate (%WT)	52.4	60.1	71.2	59.4	48.3

[0280] 7、基因剔除动物的生命周期

[0281] GGTA1/iGb3S双基因敲除小鼠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GGTA1/iGb3S双基因敲除基因剔除小鼠的生命周期尚未见缩短现象,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 GGTA1 和 iGb3S 双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
CATATTTTACGTCATGATAGACGACACCTCCCGGATGCCTGTCGTGCACCTGAACCTCTACATTCCTT
ACAAGTCTTTGAGATCAGGTCTGAGAAGAGGTGGCAGGATATCAGCATGATGCGCATGAAGACCATT
GGGGAGCACATCCTGGCCACATCCAGCACGAGGTCGACTTCCTCTTCTGCATGGACGTGGATCAAG
TCTTTCAAGACAACCTTCGGGGTGGAACTCTGGGCCAGCTGGTAGCACAGCTCCAGGCCTGGTGGTA
CAAGGCCAGTCCCGAGAAGTTCACCTATGAGAGGCGGGAACCTGTCGGCCGCGTACATTCCATTCCGA
GAGGGGGATTTTACTACCACGCGGCCATTTTGGAGGAACGCCTACTCACATTCTCAACCTCACCAG
GGAGTGCTTTAAGGGGATCCTCCAGGACAAGAAACATGACATAGAAGCCCAGTGGCATGATGAGAGC
CACCTCAACAAATACTTCCTTTTCAACAAACCCACTAAAATCCTATCTCCAGAGTATTGCTGGGACTAT
CAGATAGGCCTGCCTTCAGATATTAAAAGTGTCAAGGTAGCTTGGCAGACAAAAGAGTATAATTGGT
TAGAAATAATGTCTGA

<210>2

<211>688

<212>DNA

<213>小家鼠种 (mus musculus)

<400>2

GTACCTGGAGAAGTACCTGGAACACTTCCTGGTATCGGCAGAGCAGCACTTCATGGTCGGCCAGAAC
GTGGTGTACTATGTGTTTACGGATCGCCCGGAAGCAGTGCCCTATGTGGCTCTAGGCCAGGGTCGCCT
GCTGCGGGCAAAAACCCGTGCAGCGAGAGAGGCGCTGGCAGGACGTGTCCATGGCACGCATGCCAC
GCTACACGAGGCTCTGGGAGGGCAGCTGGGCCAAGAAGCTGACTTTGTGTTCTGCCTGGACGTGGAC
CAGTACTTCACCGGTAACCTTCGGGCCTGAGGTGCTGGCAGATTTGGTGGCACAGCTGCACGCCTGGC
ACTACCGCTGGCCGCGGTGGCTGCTGCCCTACGAGAGGGACAAGCGATCGGCTGCTGCGCTGTCGTT
AAGCGAAGGCGATTTCTACTACCACGCTGCGGTGTTTGGCGGCAGTGTGGCTGCACTGCTCAAGCTG
ACGGCCCACTGTGCGACTGGCCAACAGCTGGACCATAAGCGCGGCATTGAGGCACTCTGGCACG
ACGAAAGCCACCTTAACAAGTTCTTCTGGCTGAACAAGCCCACCAAGCTGCTGTGCGCTGAGTTCTG
CTGGGCAGAGGAAATTATCTGGAGGAGAGAGATCCATCACCCACGCCTGCTCTGGGCACCCAAGGAA
TATACGCTGGTGCGAAACTAG

<210>3

<211>33

<212>DNA

<213>人工序列

<400>3

CGATGGTACCGATATCCGAGACCGCATAGTAAG

<210>4

[0002]

<211>34
<212>DNA
<213>人工序列
<400>4
CGATGAATTCCATATGTCGATGCCTGCCACACTG

<210>5
<211>37
<212>DNA
<213>人工序列
<400>5
CGATGGTACCGATATCACAGAATCTTTCTCTGTTTTTC

<210>6
<211>36
<212>DNA
<213>人工序列
<400>6
CGATGAATTCCATATGCAGGGTTTCTCTGTGTAGCC

<210>7
<211>40
<212>DNA
<213>人工序列
<400>7
CGATGGATCCCATATGCTTCAAATTGTGATGGAAACTTGA

<210>8
<211>37
<212>DNA
<213>人工序列
<400>8
CGATGCGGCCGCGATATCAGCTTTTACAGACTGATGG

<210>9
<211>36
<212>DNA
<213>人工序列
<400>9
CGATGGATCCCATATGCAGCCCTTCCCTGGCCAAGC

<210>10
<211>39
<212>DNA

<213>人工序列
<400>10
CGATGCGGCCGCGATATCCTGGTCACAGGAATGGCTTCA

<210>11
<211>33
<212>DNA
<213>人工序列
<400>11
CGATGGTACCGATATCCGAGACCGCATAGTAAG

<210>12
<211>34
<212>DNA
<213>人工序列
<400>12
CGATGAATTCCATATGTCGATGCCTGCCACACTG

<210>13
<211>40
<212>DNA
<213>人工序列
[0003] <400>13
CGATGGATCCCATATGCTTCAAATTGTGATGGAAACTTGA

<210>14
<211>37
<212>DNA
<213>人工序列
<400>14
CGATGCGGCCGCGATATCAGCTTTTACAGACTGATGG

<210>15
<211>37
<212>DNA
<213>人工序列
<400>15
CGATGGTACCGATATCACAGAATCTTTCTCTGTTTC

<210>16
<211>36
<212>DNA
<213>人工序列
<400>16
CGATGAATTCCATATGCAGGGTTTCTCTGTGTAGCC

[0004]

<210>17
<211>36
<212>DNA
<213>人工序列
<400>17
CGATGGATCCCATATGCAGCCCTTCCCTGGCCAAGC

<210>18
<211>39
<212>DNA
<213>人工序列
<400>18
CGATGCGGCCGCGATATCCTGGTCACAGGAATGGCTTCA

<210>19
<211>33
<212>DNA
<213>人工序列
<400>19
CGATCTCGAGATAATCACAAGCAAAGTGTCTGG

<210>20
<211>46
<212>DNA
<213>人工序列
<400>20
CTATTAGGAGGATTGTTTACTTGATATCAGAAGAAGTACCAACACC

<210>21
<211>31
<212>DNA
<213>人工序列
<400>21
CGATCTCGAGGTGGATGTCTCAGTGTGCGAA

<210>22
<211>39
<212>DNA
<213>人工序列
<400>22
TACCGCAGACGGTGGATATCATTGACAGTCACTGAGCAA

<210>23
<211>46
<212>DNA
<213>人工序列

<400>23
GGTGTGGTACTTCTTCTGATATCAAGTAAACAATCCTCCTAATAG

<210>24

<211>32

<212>DNA

<213>人工序列

<400>24
CGATGCGGCCGCGAACACAAATGCCAGCCCAG

<210>25

<211>39

<212>DNA

<213>人工序列

<400>25
TTGCTCAGTGACTGTCAATGATATCCACCGTCTGCGGTA

<210>26

<211>35

<212>DNA

<213>人工序列

<400>26
CGATGCGGCCGCGCTATCGAGTGGTTATTCTCAGGG

[0005]

<210>27
<211>28
<212>DNA
<213>人工序列
<400>27
TAGAATACACACCTAATATTGATTAGCA

<210>28
<211>21
<212>DNA
<213>人工序列
<400>28
TGGACGTAAACTCCTCTTCAG

<210>29
<211>20
<212>DNA
<213>人工序列
<400>29
GGAGAGCTGAGGCTGAAGTC

<210>30
<211>28
<212>DNA

<213>人工序列
<400>30
TAGAATACACACCTAATATTGATTAGCA

<210>31
<211>21
<212>DNA
<213>人工序列
<400>31
TGGACGTAAACTCCTCTTCAG

<210>32
<211>20
<212>DNA
<213>人工序列
<400>32
GGAGAGCTGAGGCTGAAGTC

<210>33
<211>20
<212>DNA
<213>人工序列
<400>33
GGCTAAATGCACCTGTCATG

[0006] <210>34
<211>20
<212>DNA
<213>人工序列
<400>34
ACACAAGGACTTGACCATGG

<210>35
<211>20
<212>DNA
<213>人工序列
<400>35
GGCTAAATGCACCTGTCATG

<210>36
<211>20
<212>DNA
<213>人工序列
<400>36
ACACAAGGACTTGACCATGG

<210>37
<211>21

<212>DNA
<213>人工序列
<400>37
GGAAAGAGAGCGCAAATGTGT

<210>38
<211>25
<212>DNA
<213>人工序列
<400>38
TAAGAATATGTTCTATGGGGTGTGG

<210>39
<211>22
<212>DNA
<213>人工序列
<400>39
GATAGACTGGCTAGCACTGAAC

<210>40
<211>21
<212>DNA
<213>人工序列
<400>40
GTCGCAGCTTGTGAACCACAG

[0007] <210>41
<211>26
<212>DNA
<213>人工序列
<400>41
CATTCTGATACTCTGTCAATCATTC

<210>42
<211>20
<212>DNA
<213>人工序列
<400>42
GGATGGACCACCAGAACTA

<210>43
<211>24
<212>DNA
<213>人工序列
<400>43
GTATTACTCGTGAACACTCTTGCC

<210>44

<211>20
<212>DNA
<213>人工序列
<400>44
GTAGAGTCAGCGCCTCACAG

<210>45
<211>23
<212>DNA
<213>人工序列
<400>45
TAGCATGAACCTTACTGCAACGC

<210>46
<211>22
<212>DNA
<213>人工序列
<400>46
TGGCTTCTCCACATACCACTCG

[0008] <210>47
<211>23
<212>DNA
<213>人工序列
<400>47
TAGCATGAACCTTACTGCAACGC

<210>48
<211>20
<212>DNA
<213>人工序列
<400>48
CAGAGGCCACTTGTGTAGCG

<210>49
<211>22
<212>DNA
<213>人工序列
<400>49
GGAATATACGCTGGTGCGAAAC

<210>50
<211>21
<212>DNA
<213>人工序列
<400>50

AGCTGACAAAGGGTCTACAGG

<210>51

<211>20

<212>DNA

<213>人工序列

<400>51

TGGGCTCTATGGCTTCTGAG

<210>52

<211>21

<212>DNA

<213>人工序列

<400>52

AGCTGACAAAGGGTCTACAGG

<210>53

<211>20

<212>DNA

<213>人工序列

<400>53

ACCTATGAGAGGCGGGAAC

[0009]

<210>54

<211>20

<212>DNA

<213>人工序列

<400>54

CCCCTTAAAGCACTCCCTGG

<210>55

<211>19

<212>DNA

<213>人工序列

<400>55

GTTGTCTCCTGCGACTTCA

<210>56

<211>20

<212>DNA

<213>人工序列

<400>56

TGGTCCAGGTTTCTTACTC

<210>57

<211>20
<212>DNA
<213>人工序列
<400>57
GGCCAACAGCTGGACCATAA

<210>58
<211>20
<212>DNA
<213>人工序列
<400>58
CTCTGCCCAGCAGAACTCAG

[0010]

<210>59
<211>19
<212>DNA
<213>人工序列
<400>59
GTTGTCTCCTGCGACTTCA

<210>60
<211>20
<212>DNA
<213>人工序列
<400>60
TGGTCCAGGGTTTCTTACTC

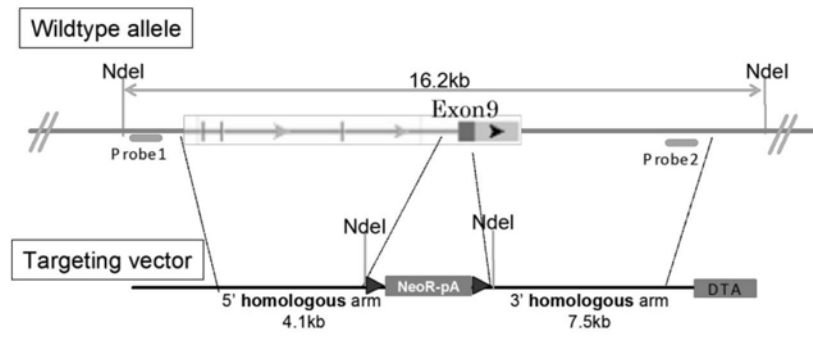


图1-1

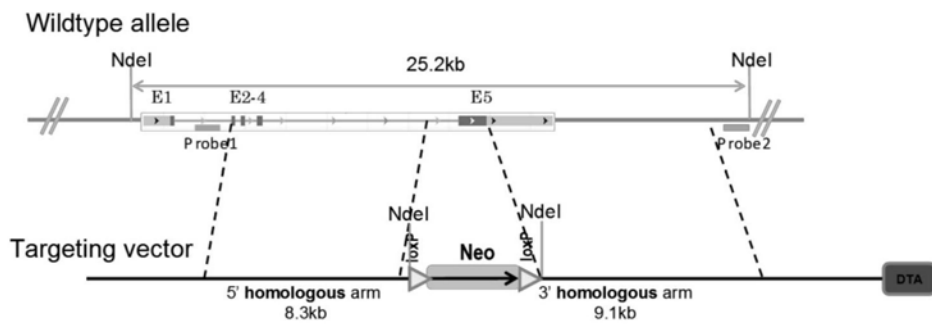


图1-2

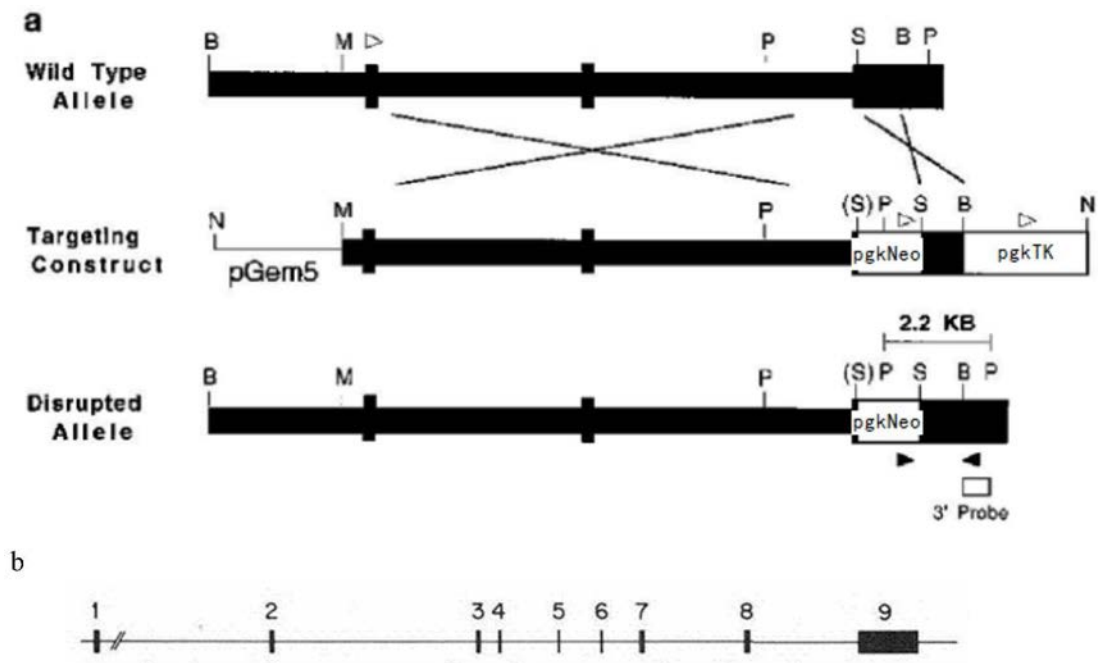


图2-1

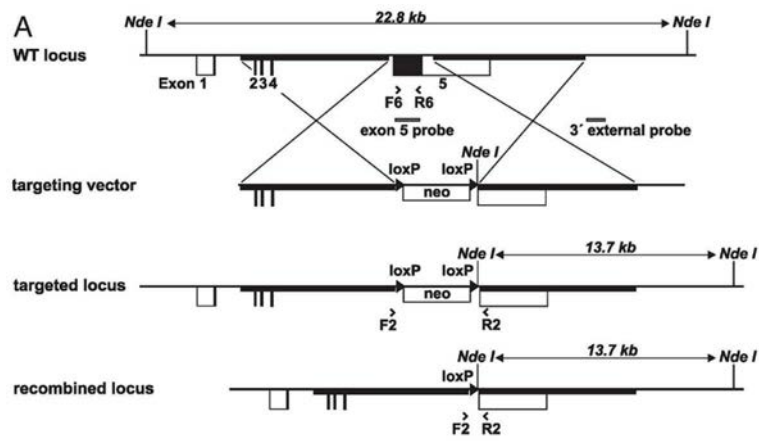


图2-2

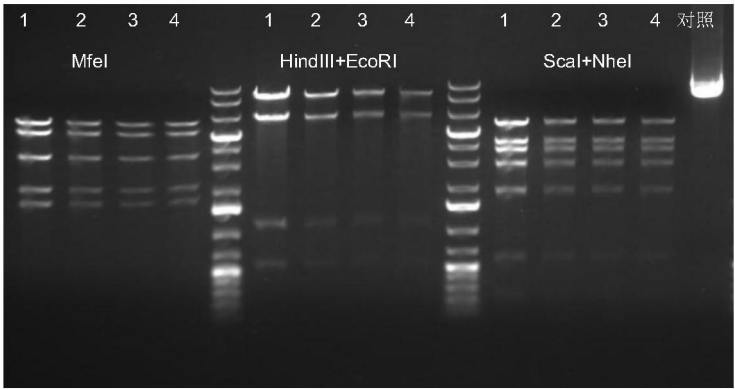


图3-1

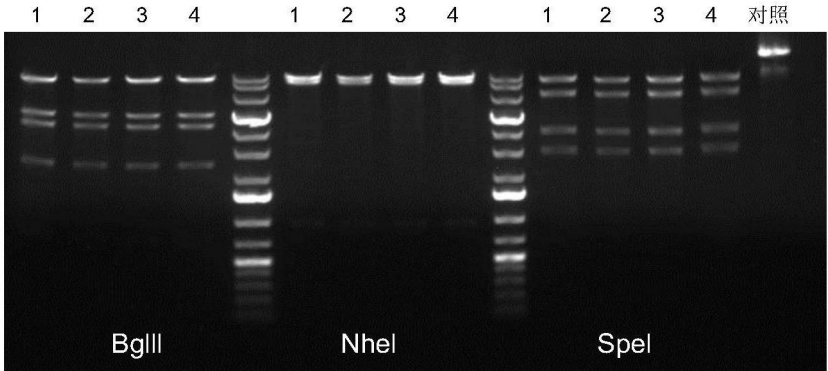


图3-2

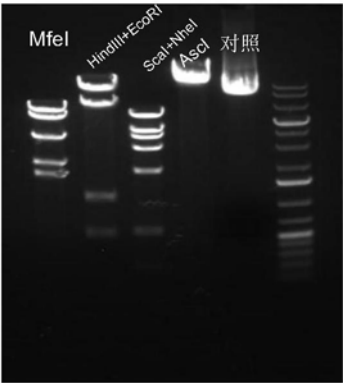


图4-1

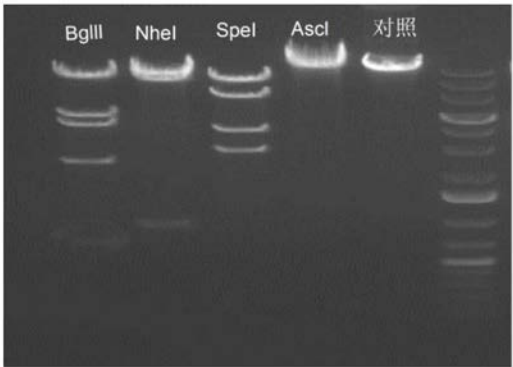


图4-2

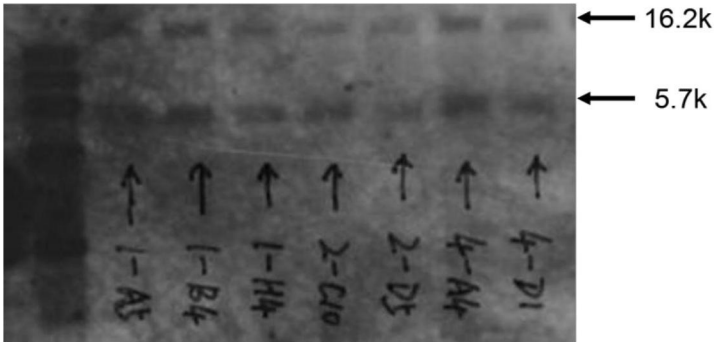


图5-1

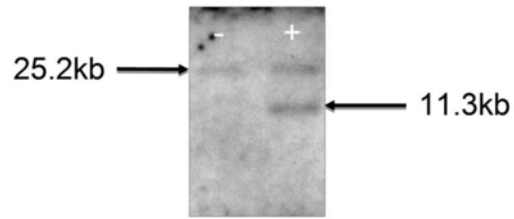


图5-2

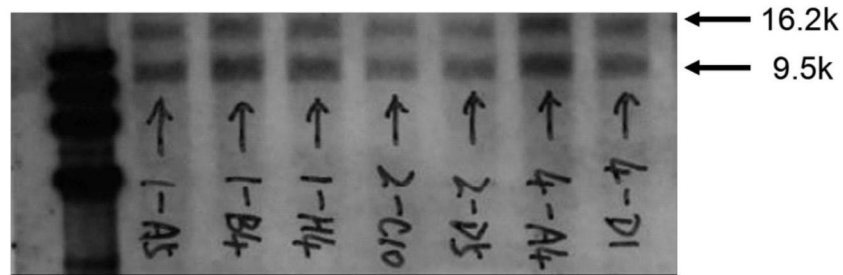


图6-1

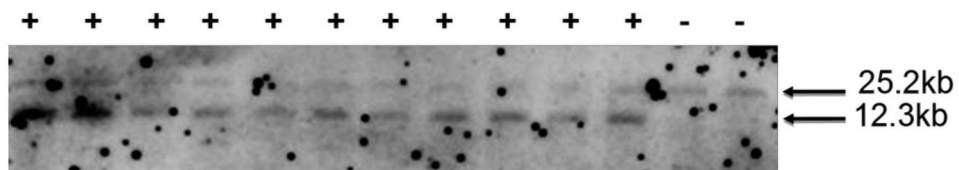


图6-2



图7-1



图7-2

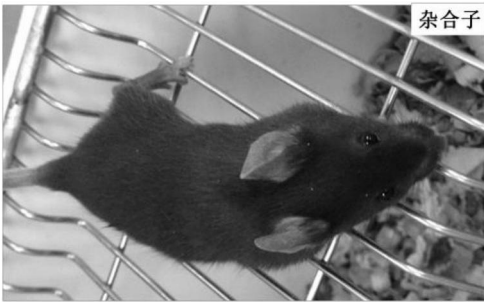


图8-1



图8-2

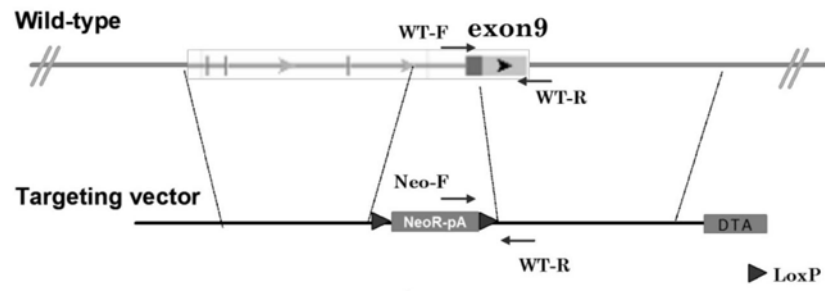


图9-1

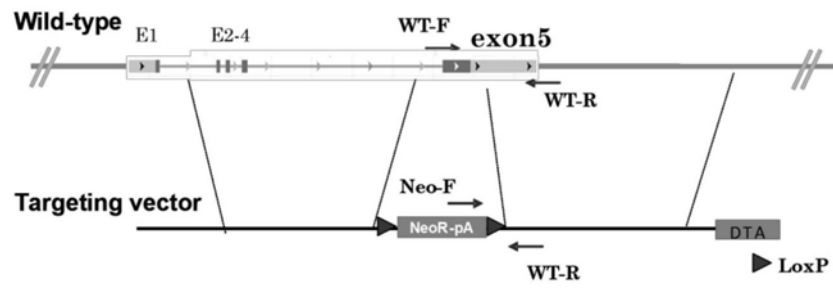


图9-2

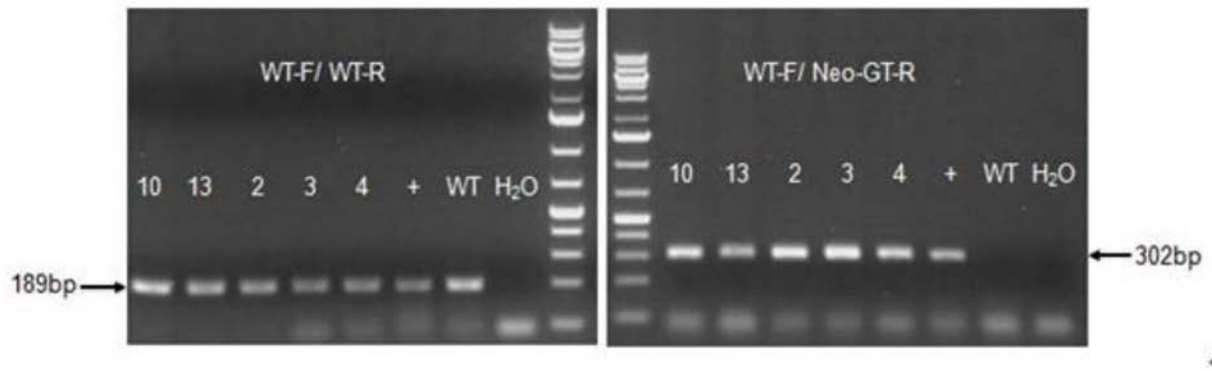


图10-1

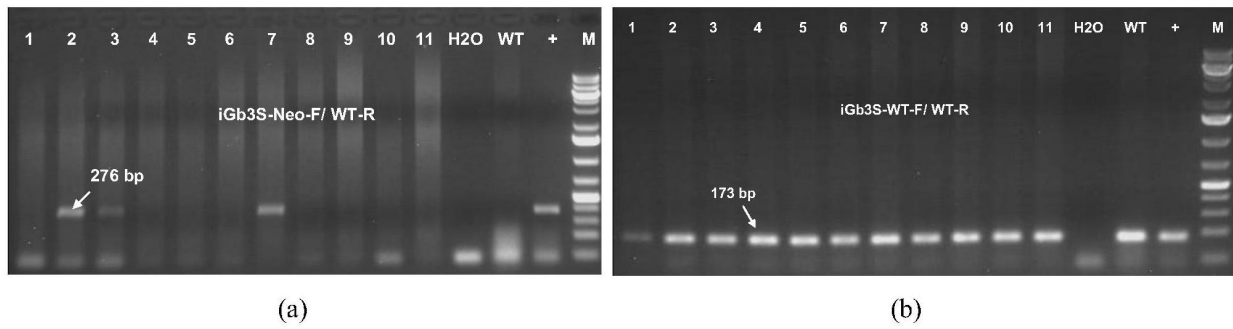


图10-2

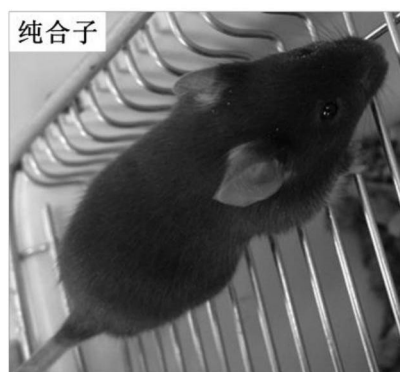


图11-1



图11-2

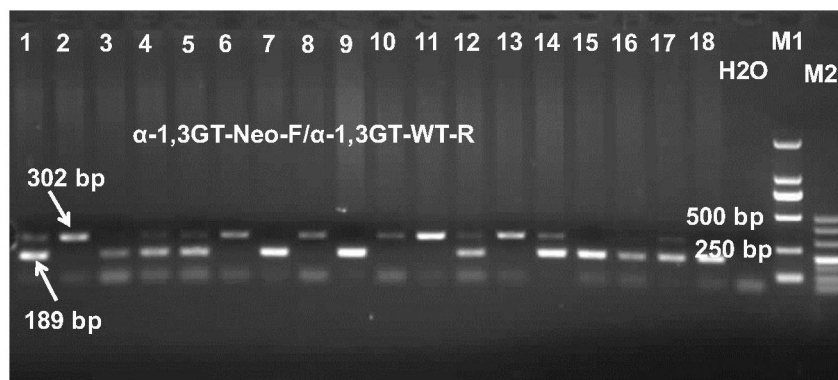


图12-1

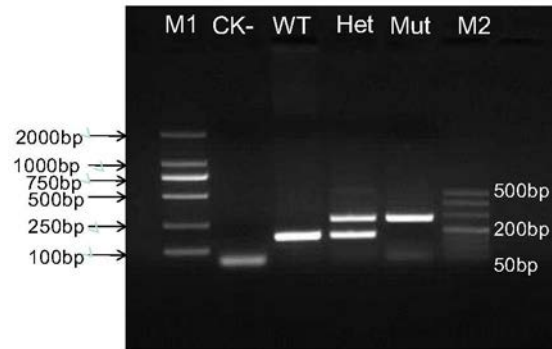


图12-2

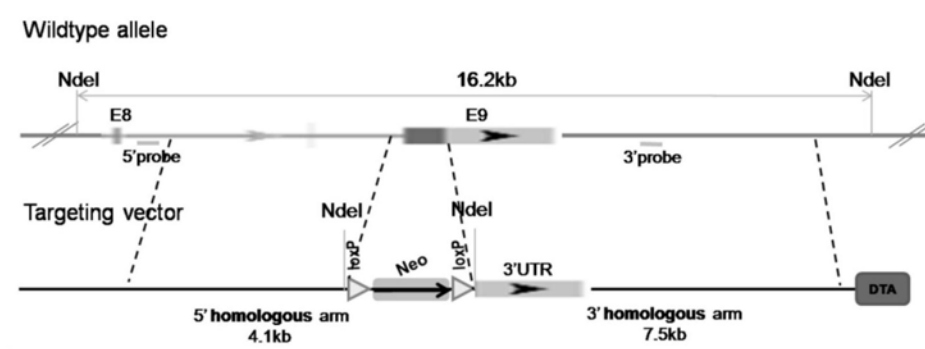


图13-1

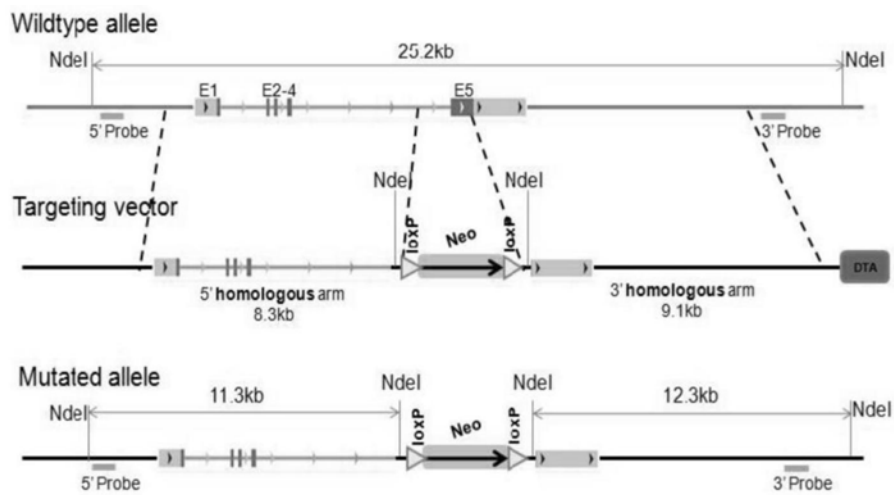


图13-2

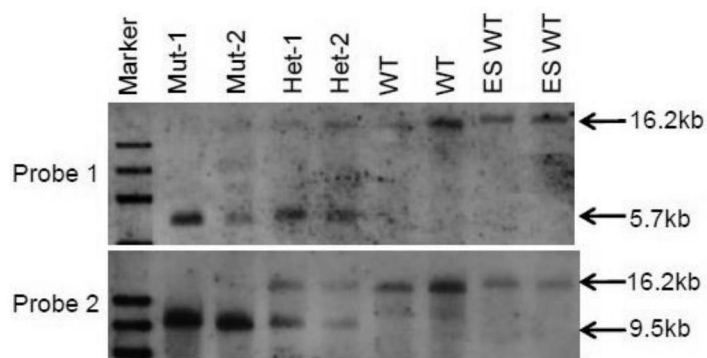


图14-1

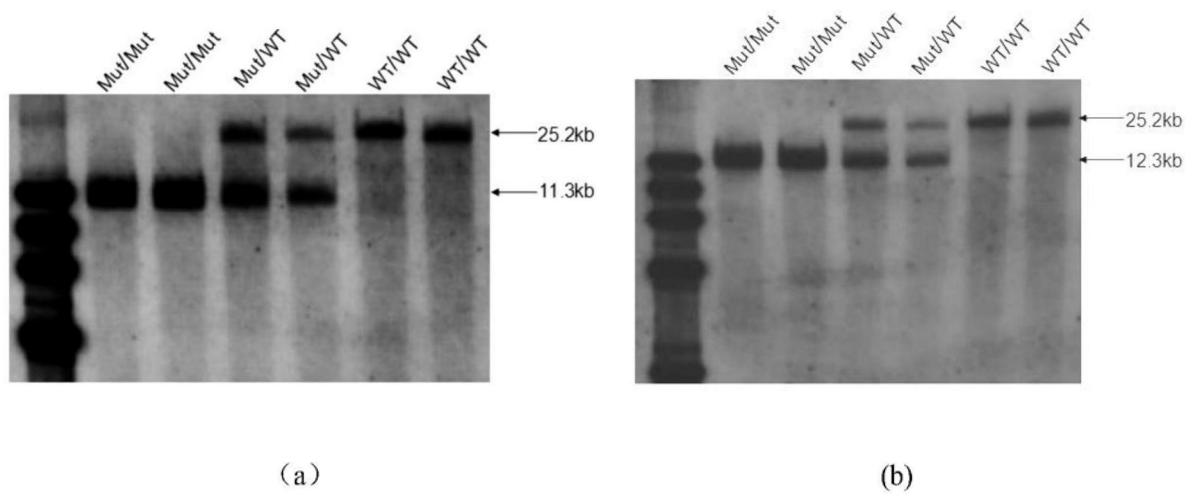


图14-2

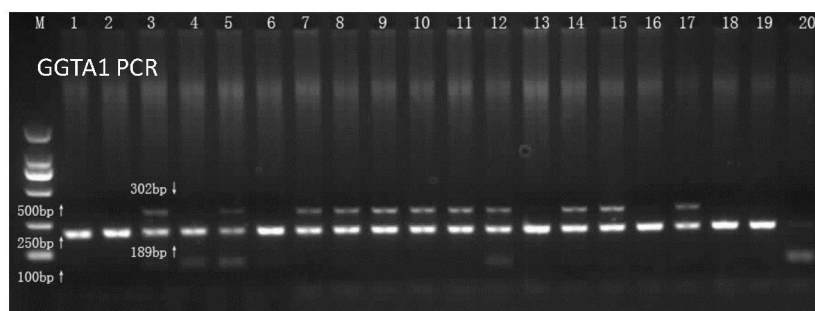


图15-1

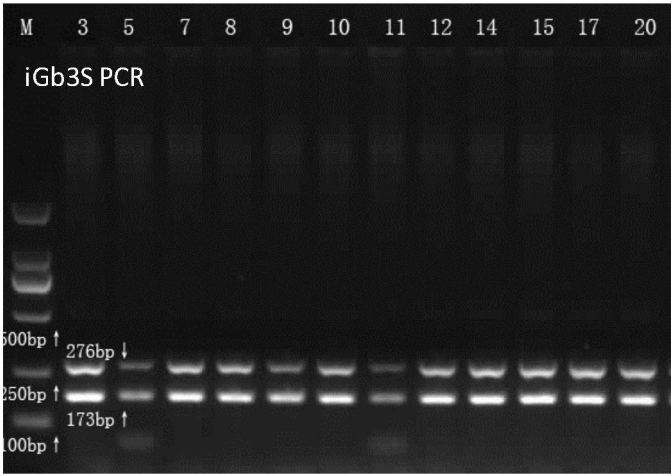


图15-2

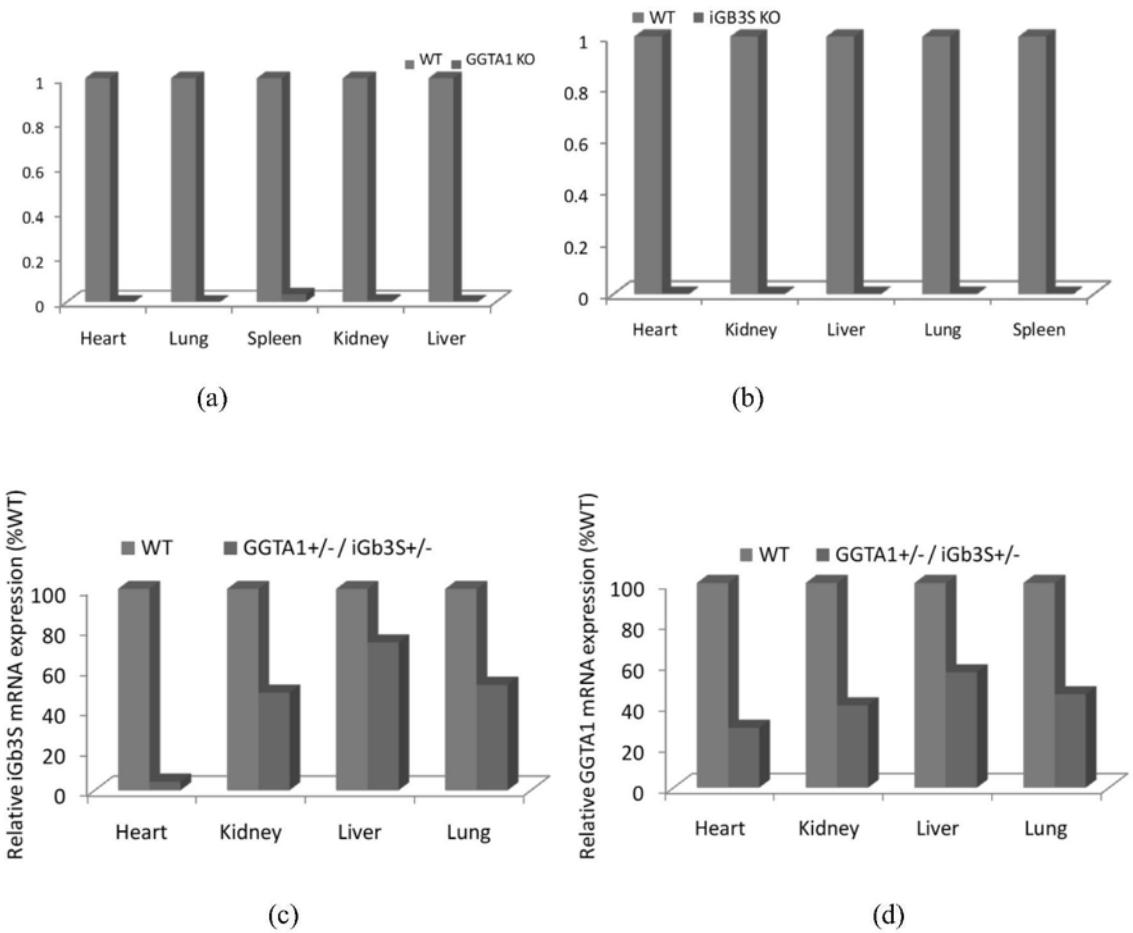


图16

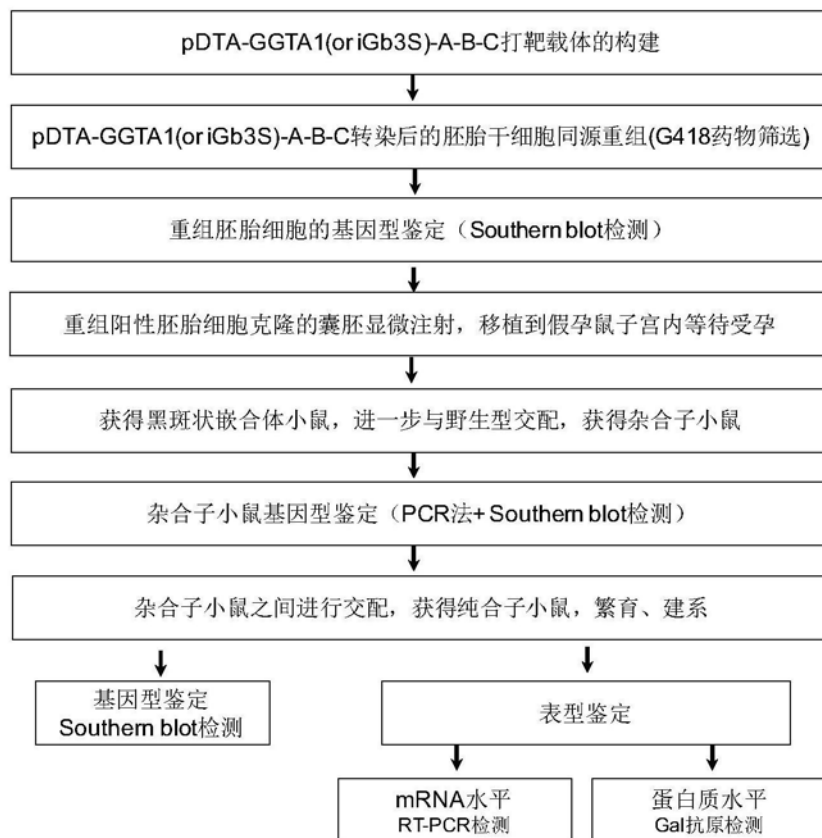


图17

专利名称(译)	一种制备GGTA1和iGb3S双基因敲除的非人哺乳动物的方法及应用		
公开(公告)号	CN104894163B	公开(公告)日	2019-01-18
申请号	CN201510122581.0	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		
发明人	徐丽明 邵安良 范昌发		
IPC分类号	C12N15/85 C12N15/54 C12N5/10 A01K67/027 G01N33/53		
代理人(译)	王明霞		
审查员(译)	于淼		
其他公开文献	CN104894163A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

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GGTA1和iGb3S双基因敲除的非人哺乳动物的方法及应用。其制备方法为：分别构建打靶载体；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GGTA1和iGb3S纯合子动物；再将GGTA1和iGb3S纯合子动物进行交配，筛选GGTA1和iGb3S同时缺失的双基因敲除纯合子动物，并建系获得基因敲除动物种群。

