

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103740757 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 23

(21) 申请号 201410027420. 9

(22) 申请日 2014. 01. 21

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 刘光慧 曲静 徐秀玲 付丽娜
杨济平 任若通 刘林 刘凯

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅

(51) Int. Cl.

C12N 15/85 (2006. 01)

C12N 5/10 (2006. 01)

C12N 5/0797 (2010. 01)

C12N 5/0793 (2010. 01)

权利要求书2页 说明书8页

序列表5页 附图2页

(54) 发明名称

一种利用重编程制备猪神经干细胞的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种利用重编程制备猪神经干细胞的方法,本发明提供了一种利用重编程制备哺乳动物神经干细胞的方法,包括如下步骤:1) 将基因 OCT3/4、SOX2、KLF4、LMyc 和 LIN28 用非整合型附着体载体共同导入哺乳动物体细胞中,得到转基因细胞,2) 用包含丁酸钠的诱导培养体系所述转基因细胞,即得到神经干细胞;本发明的实验证明,本发明利用非整合型附着体载体(episomal 载体)将 OCT3/4、SOX2、KLF4、LMyc 和 LIN28 等因子导入猪体细胞,通过优化培养条件,将体细胞转分化为神经干细胞,进一步分化获得有生理活性的神经细胞,为以猪为模型的神经系统疾病奠定基础。

1. 一种利用重编程制备哺乳动物神经干细胞的方法,包括如下步骤:
 - 1) 将基因 OCT3/4、SOX2、KLF4、LMyc 和 LIN28 用非整合型附着体载体共同导入离体的哺乳动物体细胞中,得到转基因细胞,
 - 2) 用丁酸钠诱导培养所述转基因细胞,即得到神经干细胞;
所述基因 OCT3/4 的核苷酸序列为序列表中的序列 1;
所述基因 SOX2 的核苷酸序列为序列表中的序列 2;
所述基因 KLF4 的核苷酸序列为序列表中的序列 3;
所述基因 LMyc 的核苷酸序列为序列表中的序列 4;
所述基因 LIN28 的核苷酸序列为序列表中的序列 5。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于:
所述哺乳动物体细胞为哺乳动物成纤维细胞,所述哺乳动物成纤维细胞具体为哺乳动物胚胎成纤维细胞。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其特征在于:
所述非整合型附着体载体为 Episomal 质粒载体。
4. 根据权利要求 1-3 中任一所述的方法,其特征在于:
所述共同导入的方法包括如下步骤:将表达 OCT3/4 的 Episomal 载体、表达 SOX2 和 KLF4 的 Episomal 载体、表达 LMyc 和 LIN28 的 Episomal 载体和表达标记基因的载体共同导入哺乳动物体细胞中。
5. 根据权利要求 4 所述的方法,其特征在于:
所述表达 OCT3/4 的 Episomal 载体为 pCXLE-hOCT3/4;
所述表达 SOX2 和 KLF4 的 Episomal 载体为 pCXLE-hSK;
所述表达 LMyc 和 LIN28 的 Episomal 载体为 pCXLE-hUL;
所述标记基因为 EGFP,所述 EGFP 的核苷酸序列为序列表中的序列 6;
所述表达标记基因的载体为 pCXLE-EGFP。
6. 根据权利要求 4 或 5 所述的方法,其特征在于:所述表达 OCT3/4 的 Episomal 载体、表达 SOX2 和 KLF4 的 Episomal 载体、表达 LMyc 和 LIN28 的 Episomal 载体和表达标记基因的载体等质量导入共同导入哺乳动物体细胞中。
7. 根据权利要求 1-6 中任一所述的方法,其特征在于:
所述用丁酸钠诱导培养所述转基因细胞包括如下步骤:
 - 1) 将所述转基因细胞接种在小鼠胚胎成纤维细胞饲养层上,在哺乳动物体细胞培养基中培养;
 - 2) 将所述哺乳动物体细胞培养基替换为含有 50-200 μ M 丁酸钠的多能干细胞培养基,继续培养;
 - 3) 将所述含有 50-200 μ M 丁酸钠的多能干细胞培养基替换为无丁酸钠的多能干细胞培养基,再次培养至得到克隆样细胞;
 - 4) 将所述克隆样细胞在神经干细胞培养基中培养,得到哺乳动物神经干细胞。
8. 根据权利要求 7 所述的方法,其特征在于:
步骤 1) 中,所述培养为连续培养,所述培养的时间为 1-2 天。
步骤 2) 中,所述培养的时间为 3-4 天。

步骤 3) 中,所述继续培养的时间为 3-4 周。

步骤 4) 中,所述继续培养的时间为 4-5 天。

9. 根据权利要求 1-8 中任一所述的方法,其特征在于:

所述哺乳动物为人、大鼠、小鼠、猴、狗、猫、牛、兔、马或猪;所述哺乳动物具体为猪;

所述多能干细胞培养基为 cDF12 培养基。

10. 一种由哺乳动物体细胞获得哺乳动物功能性神经细胞的方法,包括如下步骤:

1) 按照权利要求 1-9 中任一所述的方法进行,得到哺乳动物神经干细胞;

2) 将所述哺乳动物神经干细胞在神经分化培养基中培养,得到哺乳动物功能性神经细胞;

所述哺乳动物为人、大鼠、小鼠、猴、狗、猫、牛、兔、马或猪;所述哺乳动物具体为猪;

所述哺乳动物体细胞为哺乳动物成纤维细胞,所述哺乳动物成纤维细胞具体为哺乳动物胚胎成纤维细胞;

所述哺乳动物胚胎成纤维细胞具体为猪胚胎成纤维细胞;

所述功能性神经细胞为 Tuj1 阳性的神经元或 GFAP 阳性的神经胶质细胞。

一种利用重编程制备猪神经干细胞的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其涉及一种利用重编程制备猪神经干细胞的方法。

背景技术

[0002] 神经干细胞在神经生物学基础研究和神经系统疾病细胞治疗中具有广阔的前景。长期以来,神经干细胞的来源始终局限于胎脑或经由多能干细胞的定向分化,严重限制了其进一步的应用。目前,一种新型的转分化技术为提供了新的神经干细胞来源。神经转分化技术是直接成体终末分化细胞特定向转化为神经细胞的技术。该技术不需要经过多能干细胞阶段,就可快速直接的获得神经细胞材料,因此将在神经修复性治疗中得到广泛应用。目前神经细胞转分化已在小鼠和大鼠等生物成功实现。然而,小鼠和大鼠在体形特征、生理特性、寿命等方面与人存在很大的差异,因而利用其作为模式生物模拟人类神经系统疾病和治疗存在明显的缺陷。相对而言,猪在解剖、生理生化 and 代谢等方面与人更为近似,在器官大小、免疫学和物种演化上也与人接近,因此建立猪的神经干细胞系更有利于研究疾病机制和探索有效的治疗模式。

[0003] 迄今为止,以体细胞为起始材料获得猪神经细胞均是通过重编程实现的,即通过病毒载体将重编程因子导入猪体细胞,诱导体细胞重新获得多能性;进一步对诱导多能干细胞进行神经定向诱导分化,产生具有重要科研价值和临床价值的神经细胞(Jeong-Yeh Yang, Jennifer L. Mumaw, Yubing Liu, Steve L. Stice and Franklin D. West. SSEA4Positive Pig Induced Pluripotent Stem Cells Are Primed for Differentiation into Neural Cells. Cell Transplantation. 2013;22(6):945-59.)。然而与其他物种的重编程不同,在对猪体细胞重编程过程中引入的外源重编程因子无法沉默,因而获得的细胞为持续表达外源干性基因和内源干性基因的非经典诱导多能干细胞(Toshihiko Ezashi, Bhanu Prakash V. L. Telugu, Andrei P. Alexenko, Shrikesh Sachdev, Sunilima Sinha, and R. Michael Roberts. Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells. PNAS. 2009. 106(27):10993-10998.)。在此基础上定向分化产生的神经干细胞,在应用于基础研究或临床研究时,具有不可避免的偏见性。

发明内容

[0004] 本发明的一个目的是提供一种利用重编程制备哺乳动物神经干细胞的方法。

[0005] 本发明提供的方法,包括如下步骤:

[0006] 1) 将基因 OCT3/4、SOX2、KLF4、LMyc 和 LIN28 用非整合型附着体载体共同导入离体的哺乳动物体细胞中,得到转基因细胞,

[0007] 2) 用丁酸钠诱导培养所述转基因细胞,即得到神经干细胞;

[0008] 所述基因 OCT3/4 的核苷酸序列为序列列表中的序列 1;

[0009] 所述基因 SOX2 的核苷酸序列为序列列表中的序列 2;

[0010] 所述基因 KLF4 的核苷酸序列为序列列表中的序列 3;

- [0011] 所述基因 LMyC 的核苷酸序列为序列表中的序列 4；
- [0012] 所述基因 LIN28 的核苷酸序列为序列表中的序列 5。
- [0013] 上述方法中,所述哺乳动物体细胞为哺乳动物成纤维细胞,所述哺乳动物成纤维细胞具体为哺乳动物胚胎成纤维细胞。
- [0014] 上述方法中,所述非整合型附着体载体为 Episomal 质粒载体。
- [0015] 上述方法中,所述共同导入的方法包括如下步骤:将表达 OCT3/4 的 Episomal 载体、表达 SOX2 和 KLF4 的 Episomal 载体、表达 LMyC 和 LIN28 的 Episomal 载体和表达标记基因的载体共同导入哺乳动物体细胞中。
- [0016] 上述方法中,所述表达 OCT3/4 的 Episomal 载体为 pCXLE-hOCT3/4；
- [0017] 所述表达 SOX2 和 KLF4 的 Episomal 载体为 pCXLE-hSK；
- [0018] 所述表达 LMyC 和 LIN28 的 Episomal 载体为 pCXLE-hUL；
- [0019] 所述标记基因为 EGFP,所述 EGFP 的核苷酸序列为序列表中的序列 6；
- [0020] 所述表达标记基因的载体为 pCXLE-EGFP。
- [0021] 上述方法中,所述表达 OCT3/4 的 Episomal 载体、表达 SOX2 和 KLF4 的 Episomal 载体、表达 LMyC 和 LIN28 的 Episomal 载体和表达标记基因的载体等质量导入共同导入哺乳动物体细胞中。
- [0022] 上述方法中,所述用丁酸钠诱导培养所述转基因细胞包括如下步骤：
- [0023] 1) 将所述转基因细胞接种在小鼠胚胎成纤维细胞饲养层上,在哺乳动物体细胞培养基中培养；
- [0024] 2) 将所述哺乳动物体细胞培养基替换为含有 50-200 μ M 丁酸钠的多能干细胞培养基,继续培养；
- [0025] 3) 将所述含有 50-200 μ M 丁酸钠的多能干细胞培养基替换为无丁酸钠的多能干细胞培养基,再次培养至得到克隆样细胞；
- [0026] 4) 将所述克隆样细胞在神经干细胞培养基中培养,得到哺乳动物神经干细胞。
- [0027] 上述方法中,步骤 1) 中,所述培养为连续培养,所述培养的时间为 1-2 天。
- [0028] 步骤 2) 中,所述培养的时间为 3-4 天。
- [0029] 步骤 3) 中,所述继续培养的时间为 3-4 周。
- [0030] 步骤 4) 中,所述继续培养的时间为 4-5 天。
- [0031] 上述方法中,所述哺乳动物为人、大鼠、小鼠、猴、狗、猫、牛、兔、马或猪;所述哺乳动物具体为猪；
- [0032] 所述多能干细胞培养基为 cDF12 培养基。
- [0033] 本发明的另一个目的是提供一种由哺乳动物体细胞获得哺乳动物功能性神经细胞的方法。
- [0034] 本发明提供的方法,包括如下步骤：
- [0035] 1) 按照上述的方法进行,得到哺乳动物神经干细胞；
- [0036] 2) 将所述哺乳动物神经干细胞在神经分化培养基中培养,得到哺乳动物功能性神经细胞；
- [0037] 所述哺乳动物为人、大鼠、小鼠、猴、狗、猫、牛、兔、马或猪;所述哺乳动物具体为猪；

[0038] 所述哺乳动物体细胞为哺乳动物成纤维细胞,所述哺乳动物成纤维细胞具体为哺乳动物胚胎成纤维细胞;

[0039] 所述哺乳动物胚胎成纤维细胞具体为猪胚胎成纤维细胞;

[0040] 所述功能性神经细胞为 TuJ1 阳性的神经元或 GFAP 阳性的神经胶质细胞。

[0041] 其中,涉及的培养基如下:

[0042] 猪体细胞培养基配方:

[0043] DMEM/F12(Invitrogen,11320-033)

[0044] 0.1mM 非必需氨基酸(Invitrogen,11140-050)

[0045] 1mM GlutaMAX™ 二肽(Invitrogen,35050-061)

[0046] 1% 青霉素/链霉素(Invitrogen,15070-063)

[0047] 10% 胎牛血清(Hyclone,SH30084.83)

[0048] cDF12 培养基配方:

[0049] DMEM/F12(Invitrogen,11320-033)

[0050] 0.1mM 非必需氨基酸(Invitrogen,11140-050)

[0051] 1mM GlutaMAX™ 二肽(Invitrogen,35050-061)

[0052] 20%Knockout 血清替代物(Invitrogen,N10828-028)

[0053] 1% 青霉素/链霉素(Invitrogen,15070-063)

[0054] 55 μ M β-巯基乙醇(Invitrogen,21985-023)

[0055] 10ng/ml 人 FGF2(Joint Protein Central)

[0056] 神经干细胞培养基配方:

[0057] DMEM/F12(Invitrogen,11320-033)

[0058] 0.1mM 非必需氨基酸(Invitrogen,11140-050)

[0059] 1mM GlutaMAX™ 二肽(Invitrogen,35050-061)

[0060] 1% 青霉素/链霉素(Invitrogen,15070-063)

[0061] 1%N-2 添加剂(Invitrogen,17502-048)

[0062] 2% B-27® 添加剂(Invitrogen,0080085-SA)

[0063] 神经分化培养基:

[0064] DMEM/F12(Invitrogen,11320-033)

[0065] 0.1mM 非必需氨基酸(Invitrogen,11140-050)

[0066] 1mM GlutaMAX™ 二肽(Invitrogen,35050-061)

[0067] 1% 青霉素/链霉素(Invitrogen,15070-063)

[0068] 1%N-2 添加剂(Invitrogen,17502-048)

[0069] 步骤 2) 中,所述培养为连续培养,所述培养的时间为 3-4 周。

[0070] 本发明的实验证明,本发明利用非整合型附着载体(episomal 载体)将 OCT4, SOX2, KLF4、LMyc 和 LIN28 等因子导入猪体细胞,利用丁酸钠诱导培养,将体细胞转分化为神经干细胞,进一步分化获得有生理活性的神经细胞,为以猪为模型的神经系统疾病奠定基础。

[0071] 预期本发明所含技术将在转化医学研究和应用方面产生重要意义。与鼠等小动物不同,以猪为代表的大动物模型在神经医学转化研究中有着无可比拟的价值。目前已经产

生了包括帕金森病、老年痴呆、自闭症等猪模型，很好的重现了神经系统疾病症状。因而本发明转分化产生的猪神经干细胞是用于评价神经细胞移植治疗效果和安全性的一个重要移植材料。同时，结合转基因猪疾病模型，还能够建立用于筛选神经系统疾病治疗药物的个性化药物筛选平台。

[0072] 总之，通过表达载体直接从猪成纤维细胞转分化为神经干细胞及其衍生的神经细胞，为实验动物模型和临床提供大量用于疾病模拟和治疗性移植的细胞移植材料，并且应用于治疗神经退行性疾病的药物筛选和安全评估。

附图说明

[0073] 图 1 为本发明的总体技术方案

[0074] 图 2 为猪诱导神经干细胞各相关分子标志物的鉴定

[0075] 图 3 为由猪诱导神经干细胞体外定向分化的神经细胞的分子标志物和生理功能鉴定

[0076] 图 4 为猪诱导神经干细胞小鼠脑内移植后存活和神经整合能力的鉴定

具体实施方式

[0077] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明，均为常规方法。

[0078] 下述实施例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

[0079] 下述实施例中的细胞培养条件如无特殊说明，均为 37 摄氏度，5%CO₂。

[0080] 下述实施例中的细胞培养基配方如下：

[0081] 猪体细胞培养基配方：

[0082] DMEM/F12 (Invitrogen, 11320-033)

[0083] 0.1mM 非必需氨基酸 (Invitrogen, 11140-050)

[0084] 1mM GlutaMAX™ 二肽 (Invitrogen, 35050-061)

[0085] 1% 青霉素 / 链霉素 (Invitrogen, 15070-063)

[0086] 10% 胎牛血清 (Hyclone, SH30084.83)

[0087] cDF12 培养基配方：

[0088] DMEM/F12 (Invitrogen, 11320-033)

[0089] 0.1mM 非必需氨基酸 (Invitrogen, 11140-050)

[0090] 1mM GlutaMAX™ 二肽 (Invitrogen, 35050-061)

[0091] 20% Knockout 血清替代物 (Invitrogen, N10828-028)

[0092] 1% 青霉素 / 链霉素 (Invitrogen, 15070-063)

[0093] 55 μM β-巯基乙醇 (Invitrogen, 21985-023)

[0094] 10ng/ml 人 FGF2 (Joint Protein Central)

[0095] 神经干细胞培养基配方：

[0096] DMEM/F12 (Invitrogen, 11320-033)

[0097] 0.1mM 非必需氨基酸 (Invitrogen, 11140-050)

[0098] 1mM GlutaMAX™ 二肽 (Invitrogen, 35050-061)

[0099] 1% 青霉素 / 链霉素 (Invitrogen, 15070-063)

- [0100] 1%N-2 添加剂 (Invitrogen,17502-048)
- [0101] 2% B-27[®] 添加剂 (Invitrogen,0080085-SA)
- [0102] 神经分化培养基 :
- [0103] DMEM/F12 (Invitrogen,11320-033)
- [0104] 0.1mM 非必需氨基酸 (Invitrogen,11140-050)
- [0105] 1mM GlutaMAX[™] 二肽 (Invitrogen,35050-061)
- [0106] 1% 青霉素 / 链霉素 (Invitrogen,15070-063)
- [0107] 1%N-2 添加剂 (Invitrogen,17502-048)
- [0108] 下述实施例中的 qPCR 检测中使用的引物序列如表 1 所示 :
- [0109] 表 1 为 qPCR 检测中使用的引物序列
- [0110]
- [0111]

猪-SOX2 正向	AATGCGCACAGCGGGCT
猪-SOX2 反向	GCCCATGGAACCGAGCGT
猪-NESTIN 正向	GTCCGCTGCTGCTCCCTTGG
猪-NESTIN 反向	AGGGGCGCTTGGGACATCT
猪-PAX6 正向	GAGTTCTTCGCAACCTGGCTA
猪-PAX6 反向	TGGTATTCTCTCCCCCTCCTT
猪-TUJ1 正向	GTGGTGCGGAAGGAGTGTG
猪-TUJ1 反向	TGGTGATGGACAGCGTGG
猪-NCAM 正向	CGGAGGGAAGCACACGGAG
猪-NCAM 反向	CGCTTTGCTCTCGTTCTCCTT
猪-GFAP 正向	TTGACCTGCGACGGGAGTC
猪-GFAP 反向	AGGTGGCGATCTCGATGTCC
猪-GAPDH 正向	TCGGAGTGAACGGATTTG
猪-GAPDH 反向	CCTGGAAGATGGTGATGG
猪-MBP 正向	GAGGCAGAGCTCCTGACTACAAA
猪-MBP 反向	GTCCCGTCTCCAGCTT

- [0112] 下述实施例中的质粒 :pCXLE-hOCT3/4、pCXLE-hSK、pCXLE-hUL 和 pCXLE-EGFP 均购

自 Addgene (货号分别为 :27077、27078、27080 和 27082)。

[0113] 下述实施例中的抗体 :

[0114] 抗人 OCT-3/4 抗体 (sc-5279), Santa Cruz Biotechnology

[0115] 抗人 NANOG 抗体 (ab21624), Abcam

[0116] 抗人 NESTIN 抗体 (MAB5326), Millipore

[0117] 抗人 β -Tubulin III/Tuj1 抗体 (T2200), Sigma

[0118] 抗人 PAX6 抗体 (PRB-278P), Covance

[0119] 抗人 GFAP 抗体 (ab10062), Abcam

[0120] 下述实施例中的慢病毒载体构建 :

[0121] 慢病毒载体包装质粒为 pMDL、pCMV-VSVG 和 pRSV-REV (均从美国 Addgene 公司购买, 货号 :12251、35616 和 12253)。表达 GFP 的慢病毒质粒载体为 pGreenZeo 慢病毒载体 (美国 System Biosciences 公司, 货号 :#SR500VA/PA)。病毒包装过程是利用 Lipofectamine2000 (购自美国 Invitrogen 公司, 货号 :11668019) 将 pMDL、pCMV-VSVG、pRSV-REV 和 pGreenZeo 转染进入人胚胎肾细胞 293T (购自美国 ATCC, 货号 :CRL-11268), 于转染 48 和 72 小时后收集培养上清混合, 并用 $0.45 \mu\text{m}$ PVDF 膜 (购自美国 Millipore 公司, 货号 :SLHV033) 过滤。最后用超速离心的方法浓缩病毒载体, 得到表达 GFP 的慢病毒载体 (滴度为 6×10^7 Infectious units/ml)。

[0122] 下述实施例中间接免疫荧光染色的方法如下 :用 4% 多聚甲醛于 4 摄氏度固定细胞 30 分钟后, 将细胞用 0.1% PBS 清洗 3 次, 每次 5 分钟 ;之后用含有 0.4% Triton X-100 的 0.1% PBS 室温通透 30 分钟 ;用 10% 驴血清于 4 摄氏度封闭细胞 1 小时后, 再用含有一抗的 10% 驴血清于 4 摄氏度孵育细胞过夜 ;将细胞用 0.1% PBS 清洗 3 次, 每次 10 分钟 ;用含有二抗的 10% 驴血清室温孵育细胞 2 小时 ;将细胞用 0.1% PBS 清洗 3 次, 每次 5 分钟 ;封片观察。。

[0123] 下述实施例中 qPCR 检测方法如下 :提取待测细胞 RNA, 并将其反转录为 cDNA, 再用对应分子标志物的扩增引物进行扩增, 同时以 GAPDH 为内参。

[0124] 下述实施例中电生理检测方法参照《实用膜片钳技术》, 刘振伟, 军事医科出版社, 2006。

[0125] 实施例 1、利用重编程由猪胚胎成纤维细胞获得神经细胞

[0126] 一、共导入

[0127] 猪胚胎成纤维细胞 (记载在如下文献中 :Liu K., et al. Generation of porcine-induced pluripotent stem cells by using OCT4 and Klf4 porcine factors. Cell Reprogram. 2012, 14 (6) :505-513, 公众可从中国科学院生物物理研究所获得) 在猪体细胞培养基中进行体外培养。

[0128] 首先弃去猪胚胎成纤维细胞的原有培养基, 然后添加 TrypLE™ Express (美国 Life Technology 公司, 货号 :12605010) 于 37 摄氏度消化细胞, 5 分钟后使用猪体细胞培养基终止消化反应, 1000rpm 离心 10 分钟收集细胞, 即为待导入猪胚胎成纤维细胞。

[0129] 利用哺乳动物细胞电转仪将表达基因 OCT3/4 的 Episomal 质粒载体 pCXLE-hOCT3/4 (OCT3/4 的核苷酸序列为序列列表中的序列 1), 表达基因 SOX2 和 KLF4 的 Episomal 质粒载体 pCXLE-hSK (SOX2 的核苷酸序列为序列列表中的序列 2, KLF4 的核苷酸序

列为序列表中的序列 3)、表达基因 LMyC 和 LIN28 的 Episomal 质粒载体 pCXLE-hUL(LMyC 的核苷酸序列为序列表中的序列 4, LIN28 的核苷酸序列为序列表中的序列 5) 和表达报告基因 EGFP 的载体 pCXLE-EGFP (报告基因 EGFP 核苷酸序列为序列表中的序列 6) 各 1.5 μ g 共同电转导入待导入猪胚胎成纤维细胞, 电转后将细胞在猪体细胞培养基中连续培养 4 天, 得到转基因细胞。

[0130] 二、丁酸钠诱导培养

[0131] 1、猪神经干细胞的获得

[0132] 丝裂霉素 (购自美国 Sigma 公司, 货号 :M0503) 灭活小鼠胚胎成纤维细胞 (MEFs, 购自美国 Life Technology 公司, 货号 :S1520-100), 得到小鼠胚胎成纤维细胞饲养层。

[0133] 1) 将上述 1 得到的转基因细胞用 TrypLETMExpress (美国 Life Technology 公司, 货号 :12605010) 消化, 进而接种至小鼠胚胎成纤维细胞饲养层上, 在猪体细胞培养基中培养 2 天 ;

[0134] 2) 次日将猪体细胞培养基替换为含有 50 μ M (工作浓度) 丁酸钠 (NaBT, 为组蛋白去乙酰化抑制剂) 的 cDF12 培养基继续培养 3 天 ;

[0135] 3) 将含有 50 μ M 丁酸钠的 cDF12 培养基将培养基更换为无 NaBT 的 cDF12 培养基再次培养至克隆样细胞出现 (3 周) (转分化流程详见图 1 所示) ;

[0136] 4) 将克隆样细胞消化为单细胞, 并接种于 Matrigel (购自美国 BD Biosciences 公司, 货号 :354277) 包被的培养板上, 用神经干细胞培养基继续培养 4 天, 即为猪神经干细胞。

[0137] 2、检测

[0138] 1) 克隆样细胞验证

[0139] 为了验证产生的克隆样细胞的细胞特性, 本发明进一步鉴定了其细胞标志物的表达。

[0140] 将克隆样细胞进行间接免疫荧光染色, 结果如图 2 所示, 克隆样细胞不表达多能干细胞标志物 OCT3/4 和 Nanog 蛋白 (图 2A), 却表达神经干细胞标志物 Nestin 蛋白 (图 2B), 同时细胞克隆的形态也表现出神经上皮细胞典型的玫瑰花环 (Rosette) 结构。

[0141] 2) 神经干细胞鉴定

[0142] (1) 细胞标志物鉴定

[0143] 将上述 1 得到的猪神经干细胞进行间接免疫荧光染色, 结果如图 2C 所示, 发现其能够表达神经干细胞的另一种标志物 Pax6。

[0144] 将上述 1 得到猪神经干细胞进行 qPCR, 结果如图 2D (横坐标中 PEF 代表猪胚胎成纤维细胞, ipNPC 代表猪神经干细胞) 所示, 与猪胚胎成纤维细胞相比, 克隆样细胞中的神经干细胞的分子标志物 NCAM、Nestin、Pax6 以及 Sox2 的基因表达均显著升高, 说明其具有神经干细胞的特性, 即为猪神经干细胞。

[0145] (2) 猪神经干细胞具有体内存活和神经整合能力

[0146] 为了鉴定本发明制备的猪神经干细胞是否具有体内存活和整合的能力, 进行如下实验 :

[0147] 将表达 GFP 的慢病毒载体标记猪神经干细胞, 然后将其定向移植进入小鼠 (免疫缺陷小鼠 NOD SCID, 专业名称为 NOD.CB17-Prkdcscid/NcrCr1Vr, 品系代码为 406, 购自北

京维通利华实验动物技术有限公司) 大脑的海马区域, 移植 5 周后分离小鼠大脑, 并实施冰冻切片术观察移植部位。

[0148] 用间接免疫荧光染色方法检测, 结果如图 4 所示, 脑内移植猪神经干细胞 4-5 周后, 在小鼠大脑的海马齿状回区域, 仍有大量表达绿色荧光蛋白的细胞存活, 并且已表现出明显的神经细胞分化状态, 同时其神经突起也表现出向周边脑区伸展的形态, 说明本发明制备的猪诱导神经干细胞具有良好的体内存活和神经整合能力。

[0149] 实施例 2、猪神经干细胞定向分化为功能性神经细胞

[0150] 1、功能性神经细胞的获得

[0151] 将由实施例 1 制备的猪神经干细胞接种于 Magrigel (购自美国 BD Biosciences 公司, 货号: 354277) 包被的培养板中, 添加神经分化培养基连续培养 3 周, 得到猪功能性神经细胞。

[0152] 2、功能性神经细胞的检测

[0153] 检测上述 1 中得到的猪功能性神经细胞的细胞形态, 产生的神经细胞的形态都是用间接免疫荧光检测其是否为神经元或神经胶质细胞。

[0154] 将上述 1 得到的猪功能性神经细胞进行间接免疫荧光染色, 结果如图 3A 所示, 可以看出, 猪诱导神经干细胞具有神经分化潜能, 能够成功分化为 Tuj1 阳性的神经元和 GFAP 阳性的神经胶质细胞。

[0155] 将功能性神经细胞进行 qPCR 检测, 结果如图 3B 所示, 证明在由猪诱导神经干细胞定向分化形成的功能性神经细胞群体中神经元分子标志物 Tuj1 和神经胶质细胞分子标志物 GFAP 的表达水平均显著升高, 进一步证明, 得到的功能性神经细胞为 Tuj1 阳性的神经元和 GFAP 阳性的神经胶质细胞。

[0156] 由于电生理特性是神经细胞的重要生理表征, 因此本发明进一步使用全细胞膜片钳技术对由猪诱导神经干细胞定向分化形成的功能性神经细胞实施了全细胞电流记录。

[0157] 结果如图 3C 所示, 显示定向分化获得的神经细胞能够产生正常的电压依赖的内向钠电流和外向钾电流。同时, 通过电流钳记录, 能够检测到神经细胞产生的动作电位和自发动作电位, 更进一步地说明由猪诱导神经干细胞定向分化形成的神经细胞是功能性神经元。

[0001]

序列表

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120>一种利用重编程制备猪神经干细胞的方法

<130>

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1083

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400> 1

```

atggcggggac acctggette ggatttegee ttetegcccc ctccaggtgg tggaggtgat 60
gggccagggg ggccggagcc gggetgggtt gatctctgga cctggctaag ctccaaggc 120
cctcctggag ggccaggaat cgggccgggg gttgggccag getctgaggt gtgggggatt 180
ccccatgcc ccccgcgta tgagttctgt ggggggatgg cgtactgtgg gccccaggtt 240
ggagtggggc tagtgeccca aggeggettg gagacctete agcctgaggg cgaagcagga 300
gtcggggttg agagcaactc cgatggggcc tccccggagc cctgcaccgt caccctggt 360
gccgtgaagc tggagaagga gaagctggag caaaaccgg aggagtcca ggacatcaaa 420
getctgcaga aagaactega gcaatttgcc aagetctga agcagaagag gatcaacctg 480
ggatatacac aggccgatgt ggggctcacc ctgggggttc tatttgggaa ggtattcagc 540
caaagacca tctgcegett tgaggetctg cagcttagct teaagaacat gtgtaagctg 600
cggcccttgc tgcagaagtg ggtggaggaa gctgacaaca atgaaaatct tcaggagata 660
tgcaaagcag aaaccctcgt gcaggccga aagagaaagc gaaccagtat cgagaaccga 720
gtgagaggca acctggagaa tttgttctg cagtgcccg aaccacact gcagcagatc 780
agccacateg cccagcaget tgggetcgag aaggatgtgg tccgagtgtg gttctgtaac 840
cggcgccaga agggcaagcg atcaagcagc gactatgcac aacgagagga ttttgaggct 900
gctgggtctc ctttctcagg gggaccagtg tcctttctc tggecccagg gccccatctt 960
ggtacccag gctatgggag ccctcacttc actgeactgt actctcteggt cccttccct 1020
gagggggaag cctttcccc tgtctcgtc accactctgg getctcccat gcattcaaac 1080
tga 1083

```

[0002]

<210> 2

<211> 954

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400> 2

```

atgtacaaca tgatggagac ggagctgaag ccgcccgggccc cgcagcaaac ttccgggggggc 60
ggcggcgggca actccaccgc ggcggcggccc ggcggcaacc agaaaaacag cccggaccgc 120
gtcaagcggc ccatgaatgc cttcatggtg tggteccgcg ggcagcggcg caagatggcc 180
caggagaacc ccaagatgca caactcggag atcagcaagc gcctggggcg cgagtggaaa 240
cttttgtcgg agacggagaa gcggccgttc atcgacgagg ctaagcggct gcgagcgcctg 300
cacatgaagg agcacccgga ttataaatac cggccccggc ggaaaaccaa gacgctcatg 360
aagaaggata agtacacgct gcccgggggg ctgctggccc ccggcggcaa tagcatggcg 420
agcggggctg ggggtgggccc cggcctgggc gggggcgtga accagcgcac ggacagttac 480
gagcacatga acggtcggag caacggcagc tacagcatga tgcaggacca gctgggctac 540
ccgcagcacc egggcctcaa tgcgcacggc gcagcgcaga tgcagcccat gcaccgctac 600
gacgtgagcg ccctgcagta caactccatg accagctcgc agacctacat gaacggctcg 660
cccacctaca geatgtecta ctgcagcag ggcacccctg geatggetct tggtccatg 720
ggttcgggtg tcaagtccga ggccagctcc agccccctg tggttacctc ttctctccac 780
tccaggggcg cctgccagge cggggacctc cgggacatga tcagcatgta tctccccggc 840
gccgaggtgc cggaaaccgc cggccccagc agacttcaca tgtcccagca ctaccagagc 900
ggccccgtgc ccggaaccgc cattaacggc aactgcccc tctcacacat gtga 954

```

<210> 3

<211> 1440

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400> 3

```

atgaggecag cacctggcga gtctgacatg gctgtcagcg acgctctctt cccatctttc 60

```

[0003]

tccacgttgc cgtctggccc ggccgggaagg gagaagacac tgcgtcaage aggtgccccg 120
 aataaccgct ggccgggagga gctctcccaac atgaagegac tccccccagt gcttccccgc 180
 cgccccatg acctggcggc ggccgaccgtg gccacagacc tggagagcgg cggagccggt 240
 gcggcttgcg gcggtagcaa cctggcgccc ctacctcgga gagagaccga ggagttcaac 300
 gatctcttgg acctggactt tattctctcc aattegetga cccatctccc ggagtcagtg 360
 gccgccaccg tgctctctgc agcgtcagcc tctctcttct cgtctccctc gagcagcggc 420
 cctgccagcg cgcctctcac ctgcagcttc acctatccga tccgggcccg gaaccgcccg 480
 ggctgtggcg cggcgggcac gggcgagggc ctctctatg gcagggagtc cgtccccct 540
 ccgacggctc cttcaacct ggccggacatc aacgacgtga gccctcggg cggettctgt 600
 gccgagctcc tgcggccaga attggaccg gtgtacattc cgcgcagca gccgcagccg 660
 ccaggtggcg ggctgatggg caagttctgt ctgaaggcgt cgtgagcgc cctggcagc 720
 gactacggca gcccgctcgt catcagcgtc agcaaaggca gccctgacgg cagccaccgc 780
 gtggtgtgg cgcctacaa cggcgggccc ccgcgcact gccccaagat caagcaggag 840
 gcggtctctt cgtgcacca cttgggcgct ggaccctctc teagcaatgg ccaccggccc 900
 gctgcacacg acttccccct gggcgggcag ctccccagca ggaactcccc gaccctgggt 960
 cttgaggaag tgctgagcag cagggactgt caccctgccc tgcgcttcc tcccggcttc 1020
 catccccacc cggggcccac ttaccctacc ttcctgcccg atcagatgca gccgcaagtc 1080
 ccgcccctcc attaccaaga gctcatgca cccggttctt gcatgccaga ggagcccag 1140
 ccaaagaggg gaagacgac gtggccccgg aaaaggaccg ccacccacac ttgtgattac 1200
 gcgggctgcg gcaaaacctc cacaaagagt tcccattca aggcacacct gcgaaccac 1260
 acaggtgaga aacctacca ctgtgactgg gacggctgtg gatggaaatt cgcgccctca 1320
 gatgaactga ccaggeacta ccgtaaacac aeggggcacc gcccttcca gtgcaaaaa 1380
 tgcgaccgag cttttccag gtcggaccac ctgccttac acatgaagag gcatttttaa 1440

<210> 4

<211> 1095

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400> 4

atggactacg actcgtacca gcactatttc tacgactatg actgcgggga ggattttctac 60
 cgctccacgg cgcaccgca ggacatctgg aagaaattcg agctgggtgcc atgccccc 120

[0004]

acgtcgcgcg cctggggctt gggteceggc gcaggggacc cggeccccgg gattggtecc 180
 ceggagccgt ggccccgagg gtgcaecgga gacgaagcgg aateccgggg ccactcgaaa 240
 ggctggggca ggaactacgc ctccatcata cgccgtgact gcatgtggag cggcttctcg 300
 gcccggaac ggctggagag agctgtgagc gaccggctcg ctctggcgc gccccggggg 360
 aaccgcecca aggcgtcgcg cgeccccgac tgcactccca gectegaage cggcaaccgg 420
 ggcgccgccc cccctgtcc gctgggagaa cccaagacce aggcctgctc cgggtccgag 480
 agcccaagcg actcggagaa tgaagaaatt gatgttgtga cagtagagaa gaggcagtct 540
 ctgggtatcc ggaagccggt caccatcaag gtgcgagcag accccctgga tccctgcatg 600
 aagcatttcc acatctecat ccatcagcaa cagcacaact atgctgcccc ttttctcca 660
 gaaagctgct cccaagaaga ggcttcagag aggggtcccc aagaagaggt tctggagaga 720
 gatgctgcag gggaaaagga agatgaggag gatgaagaga ttgtgagtec cccacctgta 780
 gaaagtgagg ctgccagtc ctgccacccc aaacctgtca gttctgatac tgaggatgtg 840
 accaagagga agaatecaaa ctctctggag cgcaagagge ggaatgacct gcgttcgca 900
 ttcttggcgc tgagggacca ggtgcccacc ctggccagct getccaagge ccccaaagta 960
 gtgatcctaa gcaaggcctt ggaatacttg caagccctgg tgggggctga gaagaggatg 1020
 gctacagaga aaagacagct ccgatgccgg cagcagcagt tgcagaaaag aattgcatac 1080
 ctcactggct actaa 1095

<210> 5

<211> 630

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400> 5

atgggctccg tgtccaacca gcagtttgca ggtggctgcg ceaaggcgge agaagaggcg 60
 cccgaggagg cgccggagga cgcggcccgg gcggcgagc agcctcagct gctgcacggt 120
 gegggcatct gtaagtggtt caacgtgegc atggggtteg gettctgtc eatgaccgce 180
 cgcgccgggg tcgcgctcga cccccagtg gatgtctttg tgcaccagag taagctgcac 240
 atggaagggt tccggagctt gaaggagggt gaggcagtg agttcaectt taagaagtea 300
 gccaaaggte tggaatccat cegtgtcacc ggacctggtg gagtattctg tattgggagt 360
 gagaggcggc caaaaggaaa gagcatgcag aagcgcagat caaaaggaga caggtgctac 420
 aactgtggag gtctagatca tcatgccaag gaatgcaagc tgccacccca gcccaagaag 480

[0005]

tgccattct gccagagcat cagccatag gtagcctcat gtccgctgaa ggcccagcag 540
 ggcectagtg cacagggaaa gccaacctac tttcgagagg aagaagaaga aatccacagc 600
 cctaccctgc tcccggagge acagaattga 630

<210> 6

<211> 720

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400> 6

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatectggt cgagctggac 60
 ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120
 ggcaagetga cctgaagtt catctgcacc accggcaage tgcccgtgcc etggcccacc 180
 ctctgacca cctgacctc cggegtgcag tgcttcagcc gctaccccca ccacatgaag 240
 cagcagcact tcttcaagtc cgecatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300
 ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360
 gtgaaccgea tegagctgaa gggeatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420
 aagetggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480
 ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540
 gaccactacc agcagaacac ccccatcgge gacggccccg tgctgctgce cgacaaccac 600
 tacctgagca cccagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc 660
 ctgetggagt tcgtgaccgc cgecgggatc actctcggca tggacgaget gtacaagtaa 720

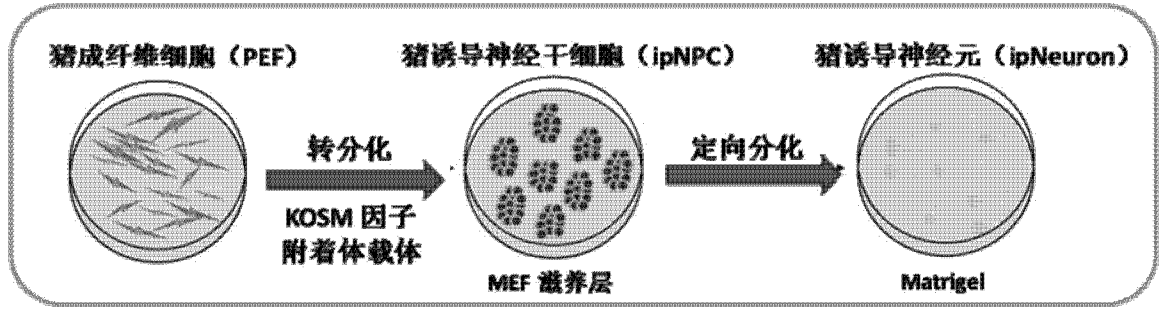


图 1

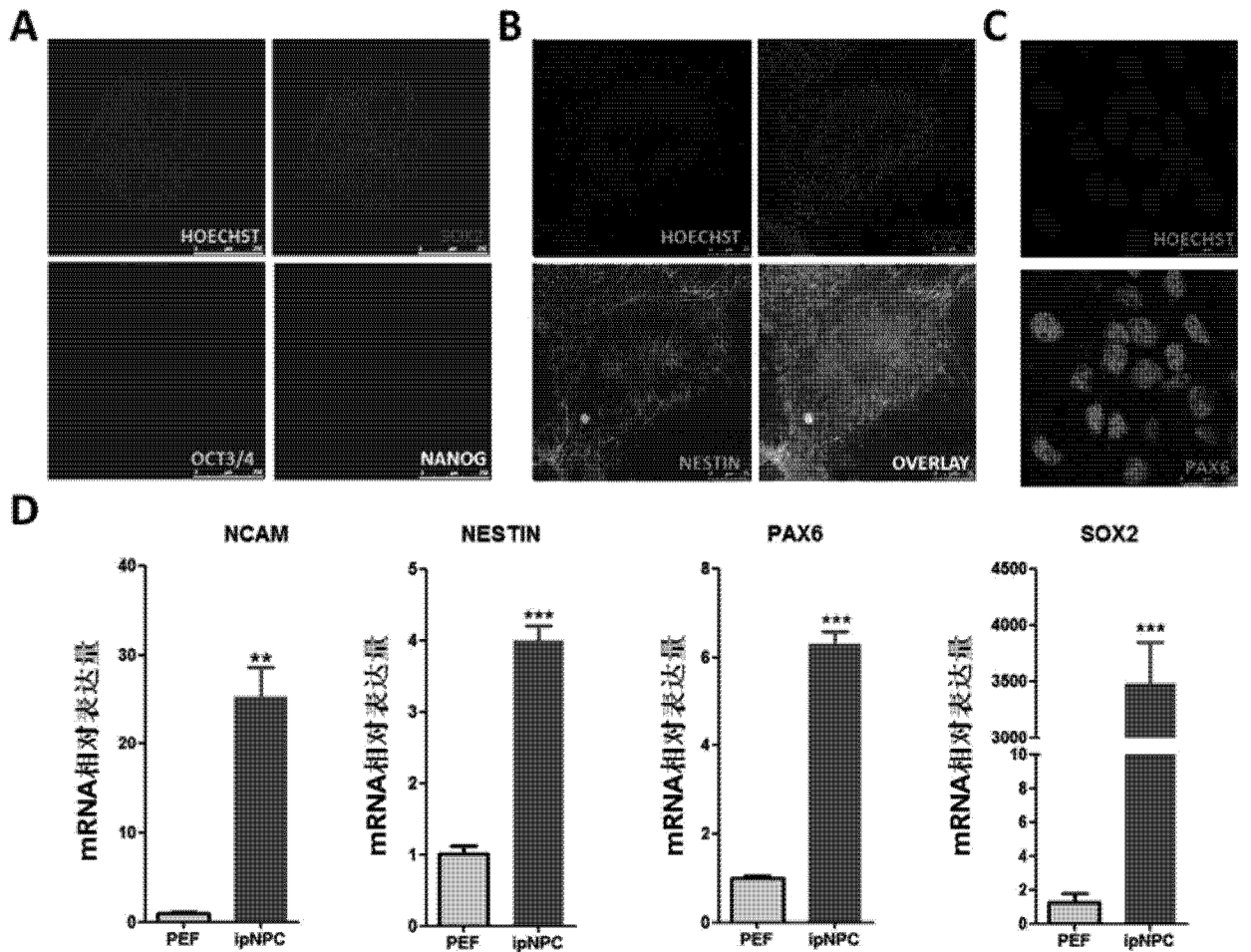


图 2

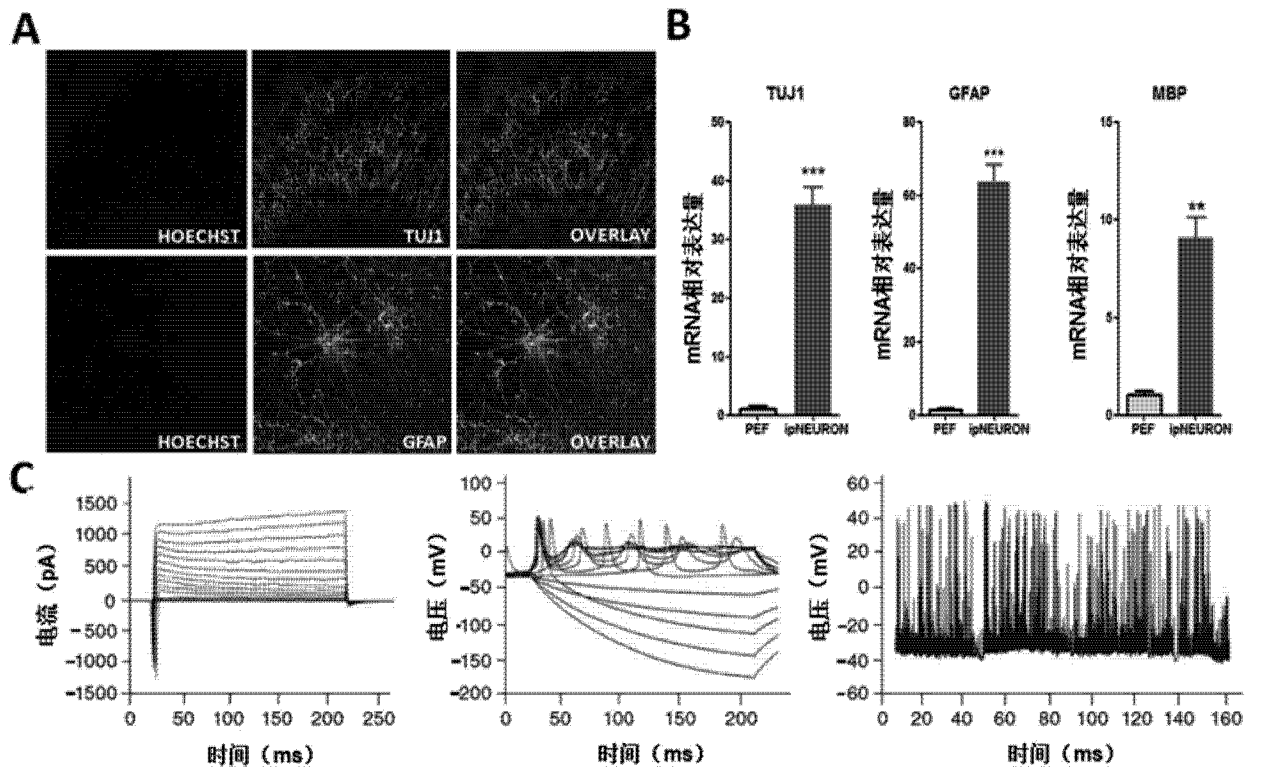


图 3

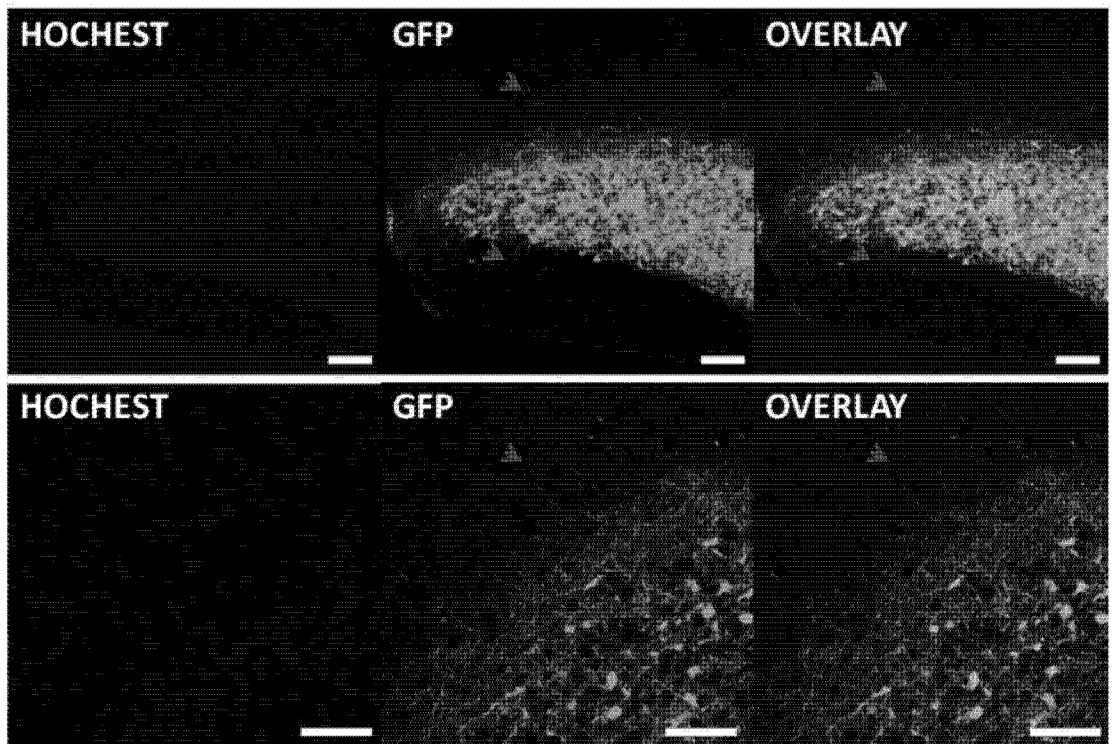


图 4