



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104215768 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 13

(21) 申请号 201410386506. 0

WO 2010/065940 A1, 2010. 06. 10,

(22) 申请日 2014. 08. 07

Kristen D. McKnight et

(73) 专利权人 北京大学

al. Deconstructing Pancreas Development to Reconstruct Human Islets from Pluripotent Stem Cells. 《Cell Stem Cell》. 2010, (第6期),

地址 100871 北京市海淀区颐和园路5号北京大学金光生命科学大楼430室

Alireza Rezania et al. Maturation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Pancreatic Progenitors Into Functional

专利权人 北京大学深圳研究生院
北京瑞普晨创科技有限公司

Islets Capable of Treating Pre-existing Diabetes in Mice. 《Diabetes》. 2012, 第61卷

(72) 发明人 邓宏魁 刘海松 朱迪聪 杨欢
梁振

Donghui Zhang et al. Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. 《Cell Research》. 2009, 第19卷

(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.

审查员 舒霏霏

G01N 33/68(2006. 01)

C12Q 1/68(2006. 01)

C12Q 1/04(2006. 01)

C12N 15/11(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101188942 A, 2008. 05. 28,

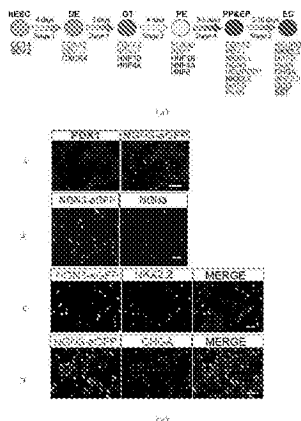
权利要求书1页 说明书13页
序列表7页 附图8页

(54) 发明名称

SUSD2 蛋白作为标记物的用途

(57) 摘要

本发明公开了 SUSD2 蛋白作为标记物的用途, 具体为 SUSD2 蛋白作为标记物在鉴定、筛选或分选胰腺内分泌前体细胞和 / 或新生的胰腺内分泌细胞中的应用 ; 以及编码所述 SUSD2 蛋白的前体蛋白的 mRNA 作为标记物在鉴定胰腺内分泌前体细胞和 / 或新生的胰腺内分泌细胞中的应用。本发明通过分析人多能干细胞定向诱导分化来源的胰腺内胚层细胞的基因表达, 发现 SUSD2 基因在胰腺内分泌前体细胞及新生的胰腺内分泌细胞中富集表达, 而且其编码的蛋白为细胞膜上的受体蛋白, 以该蛋白作为标记物可以用于鉴定、筛选或分选胰腺内分泌前体细胞及新生的胰腺内分泌细胞, 对研究各发育阶段的胰腺相关细胞具有重要意义。



1. 一种分选或辅助分选待测细胞群体中的胰腺内分泌前体细胞或新生的胰腺内分泌细胞的方法,包括如下步骤:检测待测细胞群体中的细胞是否表达 SUSD2 基因,若某些细胞表达 SUSD2 基因,则某些细胞为或候选为胰腺内分泌前体细胞或新生的内分泌细胞;若某些细胞不表达 SUSD2 基因,则某些细胞不为或候选不为胰腺内分泌前体细胞或新生的内分泌细胞;

所述 SUSD2 基因的核苷酸序列为序列表中序列 2;

所述待测细胞为胰腺内胚层细胞。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于:所述检测待测细胞群体中的细胞是否表达 SUSD2 基因是通过检测待测细胞群体中的细胞是否含有 SUSD2 基因表达的蛋白,所述检测待测细胞群体中的细胞是否含有 SUSD2 基因表达的蛋白的方法为如下 1) 或 2) 或 3):

1) 免疫荧光抗体法检测,采用抗体为抗 SUSD2 单抗;

2) 流式分析检测,采用抗体为抗 SUSD2 单抗;

3) 磁珠分选,采用抗体为抗 SUSD2 单抗。

3. 根据权利要求 2 所述的方法,其特征在于:所述胰腺内胚层细胞为人源胰腺内胚层细胞。

4. SUSD2 蛋白或其编码基因或编码所述 SUSD2 蛋白的前体蛋白的 mRNA 作为标记物在鉴定、筛选或分选胰腺内分泌前体细胞和 / 或新生的胰腺内分泌细胞中的应用;

所述 SUSD2 蛋白的氨基酸序列为序列表中序列 1 所示;

所述 SUSD2 蛋白编码基因的核苷酸序列为序列表中序列 2 所示。

5. 能够与权利要求 4 所述 SUSD2 蛋白特异性结合的抗体在制备鉴定、筛选或分选胰腺内分泌前体细胞和 / 或新生的胰腺内分泌细胞试剂中的应用。

6. 如权利要求 5 所述的应用,其特征在于:所述抗体携带荧光标记;所述抗体为单抗。

7. 如权利要求 5 或 6 所述的应用,其特征在于:所述应用为从胰腺内胚层细胞中筛选或分选胰腺内分泌前体细胞和 / 或新生的胰腺内分泌细胞;

所述筛选或分选的方法为免疫磁珠分离法及流式细胞分选法;

所述鉴定的方法为免疫荧光抗体法及流式细胞分析法。

8. 能够与编码权利要求 1-7 任一项所述 SUSD2 蛋白的前体蛋白的 mRNA 特异性结合的引物对或探针在制备鉴定胰腺内分泌前体细胞和 / 或新生的内分泌细胞试剂中的应用。

9. 如权利要求 8 所述的应用,其特征在于,所述引物对由序列表中序列 3 所示的单链 DNA 分子和序列表中序列 4 所示的单链 DNA 分子组成。

SUSD2 蛋白作为标记物的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其涉及 SUSD2 蛋白作为标记物的用途。

背景技术

[0002] 人多能干细胞来源的胰腺 beta 细胞能够为糖尿病特别是 I 型糖尿病的细胞替代治疗提供充足的供体胰岛细胞来源。此外,人多能干细胞向胰腺 beta 细胞的定向诱导分化也能够为研究人胰腺发育过程提供一个体外研究模型。通过模拟体内发育过程,人多能干细胞向胰腺 beta 细胞定向诱导分化主要包括以下几个分步阶段:胚内内胚层、肠管、前肠后部、胰腺内胚层和胰腺内分泌细胞。其中,胰腺内胚层阶段的细胞为混杂细胞,通常包括胰腺前体细胞、胰腺内分泌前体细胞以及新生的胰腺内分泌细胞等。目前主要通过胰腺发育相关基因的表达来指征细胞命运。胰腺前体细胞主要由相关基因如 PDX1、HNF1B、SOX9、NKX6.1、HNF6 等基因的表达来指征。胰腺内分泌前体细胞最主要的一个标记基因是 NGN3,但由于其瞬时表达特征,通常会结合其下游基因如 NKX2.2、NEUROD1 等基因的表达以及 CHROMOGRANIN A、INSULIN、GLUCAGON 等内分泌相关基因的不表达来指征胰腺内分泌前体细胞命运。虽然这些标记基因的表达虽然可以用来指征特定细胞的命运,但是由于其都为转录因子或分泌蛋白等,通常定位于胞浆或细胞核内,因而无法利用这些蛋白的表达来分离纯化特定的细胞类群特别是人胰腺内分泌前体细胞和新生胰腺内分泌细胞,从而对其分子特征进行更为详细的研究。

[0003] 目前,人多能干细胞能够通过定向诱导分化得到胰腺前体细胞,但是这类细胞在体外向功能成熟的胰腺 beta 细胞的分化效率低。虽然,将人多能干细胞来源的胰腺前体细胞移植到免疫缺陷小鼠体内后,能够得到功能成熟的胰岛细胞,但是由于胰腺前体细胞具有一定的增殖能力,其致瘤性限制了其向临床运用的推广。相较于胰腺前体细胞,功能成熟的胰腺 beta 细胞是更为理想的供体细胞来源。但如何在体外将胰腺前体细胞诱导分化成为功能成熟的胰腺 beta 细胞大大限制了糖尿病细胞替代治疗方案的实现,而在胰腺前体细胞向胰腺 beta 细胞分化的过程中,正确的胰腺内分泌前体细胞的高效诱导分化的实现是最为首要的一步。通过对小鼠等模式动物的研究,大大促进了对胰腺 beta 细胞发育过程的了解,这些研究对指导体外胰腺 beta 细胞的定向分化起了决定性的作用。尽管如此,针对胰腺内分泌前体细胞命运特化、不同内分泌细胞之间的命运选择的研究仍然较少,此外,人与小鼠等模式动物之间也存在一定的物种差异性,因此,如果能够找到相关分子标记来直接分离特定发育阶段的胰腺相关细胞进行研究的话,能够大大加快体外功能成熟的胰腺 beta 细胞的获得。

发明内容

[0004] 本发明的一个目的是提供一种分选或辅助分选待测细胞群体中的胰腺内分泌前体细胞或新生的内分泌细胞的方法。

[0005] 本发明提供的方法,包括如下步骤:检测待测细胞群体中的细胞是否表达 SUSD2

基因,若某些细胞表达 SUSD2 基因,则某些细胞为或候选为胰腺内分泌前体细胞或新生的内分泌细胞;若某些细胞不表达 SUSD2 基因,则某些细胞不为或候选不为胰腺内分泌前体细胞或新生的内分泌细胞;;

[0006] 所述 SUSD2 基因的核苷酸序列为序列表中序列 2。

[0007] 上述方法中,所述检测待测细胞群体中的细胞是否表达 SUSD2 基因是通过检测待测细胞群体中的细胞是否含有 SUSD2 基因表达的蛋白,所述检测待测细胞群体中的细胞是否含有 SUSD2 基因表达的蛋白的方法为如下 1) 或 2) 或 3) :

[0008] 1) 免疫荧光抗体法检测,采用抗体为抗 SUSD2 单抗;

[0009] 2) 流式分析检测,采用抗体为抗 SUSD2 单抗;

[0010] 3) 磁珠分选,采用抗体为抗 SUSD2 单抗。

[0011] 上述方法中,所述待测细胞为胰腺内胚层细胞。

[0012] 上述方法中,所述胰腺内胚层细胞为人源胰腺内胚层细胞。

[0013] 本发明另一个目的是通过分析胰腺内胚层细胞的基因表达,发现 SUSD2 基因在胰腺分泌前体细胞及新生的分泌细胞中富集表达,即该基因表达的 SUSD2 蛋白为两者的分子标记。

[0014] 基于上述发现,本发明提供了 SUSD2 蛋白作为标记物在鉴定、筛选或分选胰腺内分泌前体细胞和 / 或新生的胰腺内分泌细胞中的应用,所述 SUSD2 蛋白的氨基酸序列如序列 1 所示。

[0015] 所述 SUSD2 蛋白在 NCBI 的登录号为 (NCBI Reference Sequence):NP_062547.1。

[0016] 所述新生的胰腺内分泌细胞:在人多能干细胞向胰腺 beta 细胞定向诱导分化的过程中,产生的一群激素(包括 Insulin, Glucagon, Ghrelin, Pancreatic Polypeptide, Somatostatin 等)阳性的细胞,这一群细胞通常是多激素共表达的,与成熟的胰腺内分泌细胞相比功能并不成熟。在体内发育过程中,所述新生的胰腺内分泌细胞主要是指胚胎发育时期功能并不成熟的胰腺内分泌细胞。

[0017] 本发明还提供了能够与所述 SUSD2 蛋白特异性结合的抗体在制备鉴定、筛选或分选胰腺内分泌前体细胞和 / 或新生的胰腺内分泌细胞试剂中的应用。

[0018] 所述 SUSD2 蛋白是基因 SUSD2 表达的蛋白,它既不是转录因子,也不是分泌蛋白,而是位于细胞膜上的受体蛋白。

[0019] 通过免疫荧光抗体法检测待测细胞是否含有 SUSD2 蛋白,从而确定待测细胞是否为胰腺分泌前体细胞或新生的胰腺内分泌细胞。

[0020] 所述的抗体可以是完整的抗体分子、嵌合抗体、单链抗体、双特异性抗体、抗体重链、抗体轻链、重链和轻链的同二聚体和异二聚体,以及抗原结合片段和衍生物。完整的抗体分子可以是多抗或单抗,优选为单抗。

[0021] 如上所述,一般可以通过免疫荧光抗体法检测 SUSD2 蛋白,所述抗体或抗该抗体的二抗需携带相应的荧光标识。

[0022] 所述胰腺内分泌前体细胞和新生的胰腺内分泌细胞是指胰腺内胚层细胞中的一群细胞,在适当条件下能够产生功能成熟的胰腺内分泌细胞。

[0023] 所述的人胰腺内胚层细胞主要是指人多能干细胞向胰腺 beta 细胞定向诱导分化过程中胰腺内胚层阶段的细胞,或新鲜分离的及经离体培养的相应发育阶段的人胚胎胰腺

组织细胞,主要包括胰腺前体细胞、胰腺内分泌前体细胞以及新生的胰腺内分泌细胞,本发明的主要目的在于从胰腺内胚层细胞群中筛选或分选胰腺内分泌前体细胞以及新生的胰腺内分泌细胞。

[0024] 所述胰腺内胚层细胞的来源包括:1、人多能干细胞定向诱导分化获得;2、从分离的人胚胎胰腺组织获取;3、分离的人胚胎胰腺内胚层细胞经体外培养后的细胞。

[0025] 所述筛选或分选的方法主要采用免疫磁珠分离法或流式分选法。

[0026] SUSD2 基因表达过程中首先转录成 mRNA,然后再翻译成 SUSD2 蛋白前体蛋白,再经过加工后产生成熟的 SUSD2 蛋白。

[0027] 基于以上原因,本发明还提供了编码所述 SUSD2 蛋白的前体蛋白的 mRNA 作为标记物在鉴定胰腺内分泌前体细胞和/或新生的胰腺内分泌细胞中的应用。

[0028] 本发明又提供了能够与 mRNA 特异性结合的引物、探针或它们的互补链在制备鉴定胰腺内分泌前体细胞和/或新生的胰腺内分泌细胞试剂中的应用。

[0029] 所述引物可以是扩增整个 mRNA 的引物,也可以是扩增 mRNA 特征区域的引物,所述探针是识别 mRNA 特定区域的核苷酸,一般携带标识。

[0030] 根据实施例的记载,本发明提供了一对具体扩增所述 mRNA 的引物,如下所示:

[0031] 上游引物:GGCACCGCCAACACCTCA

[0032] 下游引物:GCGTGGGCAGCGACTTGA。

[0033] 所述鉴定的方法可以采用荧光定量 PCR。

[0034] 本发明通过分析内胚层细胞的基因表达,发现 SUSD2 基因在胰腺分泌前体细胞及新生的胰腺内分泌细胞中富集表达,而且其编码的蛋白为细胞膜上的受体蛋白,以该蛋白作为标记物可以用于鉴定、筛选或分选胰腺内分泌前体细胞及新生的胰腺内分泌细胞,对研究各发育阶段的胰腺相关细胞具有重要意义。

附图说明

[0035] 图 1 为人多能干细胞定向分化产生胰腺内胚层细胞。(a) 人多能干细胞向胰腺 beta 细胞定向诱导分化示意图;(b) 免疫荧光染色检测分化第四阶段末胰腺内胚层相关蛋白及标记 NGN3 基因的绿色荧光蛋白(EGFP)的表达的染色图。

[0036] 图 2 为流式分析法鉴定胰腺内胚层中的 NGN3-EGFP+ 细胞为胰腺内分泌前体细胞或新生的内分泌细胞的结果图。(a) 流式分析法检测胰腺内胚层细胞中 NGN3-EGFP 及 NGN3, NKX2.2, NEUROD1, CHROMOGRANIN A(CHGA) 等胰腺内分泌相关蛋白的表达;(b) 流式分析法检测胰腺内胚层细胞中 NGN3-EGFP 与胰腺前体细胞标记蛋白 PDX1 的表达,表明 NGN3-EGFP+ 细胞低表达或不表达胰腺前体相关蛋白 PDX1。

[0037] 图 3 为 mRNA 测序分析分选获得的 NGN3-EGFP+ 细胞、NGN3-EGFP- 细胞中胰腺相关基因的表达情况,表明 NGN3-EGFP+ 的胰腺内分泌前体细胞及新生的内分泌细胞群相对富集胰腺内分泌相关基因的表达。

[0038] 图 4 为免疫有关染色检测 SUSD2 和 NGN3-EGFP 的共染情况,说明 SUSD2 可以用来标记人多能干细胞分化来源的 NGN3-EGFP+ 细胞。

[0039] 图 5 为流式分析检测人多能干细胞来源的胰腺内胚层细胞中 SUSD2 及胰腺发育相关蛋白的表达情况分析图,说明 SUSD2 可用于标记体外分化得到的胰腺内分泌前体细胞

及新生的内分泌细胞。(a) 流式分析检测胰腺内胚层细胞中 SUSD2 及胰腺内分泌相关蛋白 NGN3, NKX2. 2, NEUROD1, CHROMOGRANIN A (CHGA) 等的表达情况 ;(b) 流式分析检测胰腺内胚层细胞中 SUSD2 与胰腺前体细胞相关蛋白 PDX1 的表达。

[0040] 图 6 为 RT-QPCR 鉴定流式分选获得的 SUSD2+ 细胞, SUSD2- 细胞及未分选的胰腺内胚层细胞中胰腺发育相关基因的表达情况,表明 SUSD2+ 细胞相对富集胰腺内分泌前体细胞相关基因及胰腺内分泌细胞相关基因的表达,相对低表达胰腺前体细胞相关基因的表达,证明 SUSD2 标记的是胰腺内分泌前体细胞和 / 或新生的内分泌细胞。

[0041] 图 7 为 SUSD2 抗体用于磁珠分选来富集胰腺内分泌前体细胞及新生的胰腺内分泌细胞。(a) 流式分析检测用 SUSD2 抗体对体外分化获得的胰腺内胚层细胞进行磁珠分选所富集的 SUSD2+ 细胞、SUSD2- 细胞中胰腺内分泌前体细胞及胰腺内分泌细胞的标记蛋白 NKX2. 2 的表达,说明 SUSD2 抗体用于磁珠分选能够高效富集 NKX2. 2+ 胰腺内分泌前体细胞及新生的胰腺内分泌细胞。(b) 对磁珠分选获得的 SUSD2+ 细胞、SUSD2- 细胞及未分选的胰腺内胚层细胞进行延长培养后,免疫组化检测胰腺前体及胰腺内分泌相关蛋白的表达,表明 SUSD2+ 细胞能够大量产生内分泌细胞,证明其为内分泌前体细胞或新生的内分泌细胞 ;(c) 将磁珠分选获得的 SUSD2+ 细胞、SUSD2- 细胞移植到免疫缺陷小鼠体内,19 周后对移植物免疫荧光染色,检测胰腺内分泌相关蛋白的表达,表明 SUSD2+ 细胞能够产生多种类型的胰腺内分泌细胞,而 SUSD2- 细胞主要产生导管样细胞,证明 SUSD2 富集的是胰腺内分泌前体细胞或新生的胰腺内分泌细胞。

[0042] 图 8 为 SUSD2 能够用于标记人胚胎来源的胰腺内分泌前体细胞及新生的胰腺内分泌细胞。(a) 免疫组化检测胚胎胰腺组织及成体胰腺组织中 SUSD2 与胰腺内分泌前体细胞相关蛋白、胰腺内分泌细胞相关蛋白的共表达,表明 SUSD2 仅在胚胎胰腺组织中的胰腺内分泌前体或内分泌细胞中表达。(b) 免疫荧光检测胚胎胰腺组织中 SUSD2 与胰腺内分泌相关蛋白及胰腺导管相关蛋白的表达。

[0043] 图 9 为 SUSD2 能够用于富集人胚胎来源的胰腺内分泌前体细胞及新生的胰腺内分泌细胞。

具体实施方式

[0044] 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。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。SUSD2 基因如序列 2 所示,编码的蛋白的氨基酸序列为序列 1。

[0045] 实施例 1、SUSD2 作为胰腺内分泌前体细胞标记基因的发现及应用

[0046] 一、SUSD2 作为修饰过人多能干细胞分化得到的胰腺内分泌前体细胞标记基因

[0047] 1. 1、胰腺内胚层细胞的获得

[0048] 将 EGFP 基因 (NC_013179.1(3313..4126)) 通过同源重组 (Ngn3 contig 编号 :NT_030059.13, 位于 Chromosome 10, 左侧同源臂在基因组中的位置 :71325654-71332154 ;右侧同源臂在基因组中的位置 :71332158-71467568) 离体的人多能干细胞系 H1 (WiCell Research Institute, NIH 编号为 WA01), 得到修饰后细胞的人多能干细胞系 NGN3-EGFP。将其按 15% -20% 接种到细胞培养液 I, 培养 1 天 ;再直接换用细胞培养液 II, 培养 1-2 天 ;再直接换用细胞培养液 III, 培养 1 天 ;继续直接换用细胞培养液

IV, 培养 2 天; 直接换用细胞培养液 V, 培养 1 天; 直接换用细胞培养液 VI, 培养 3 天; 直接换用细胞培养液 VII, 培养 4 天; 直接换用细胞培养液 VIII, 培养 4-6 天; 直接换用细胞培养液 IX, 培养 4-6 天, 得到胰腺内胚层细胞。

[0049] 通过免疫荧光抗体法检测该阶段细胞群体中胰腺内胚层相关的多个标识转录因子的表达情况。

[0050] 检测 NKX2.2 的抗体是鼠来源的单抗(该抗体购自 DSHB, 产品目录号为 74.5A5); 检测 PDX1 的是山羊来源的多抗(该抗体购自 R&D Systems, 产品目录号为 AF2419); 检测 EGFP 的是鸡来源的多抗(该抗体购自 Abcam, 产品目录号为 AB13970); 检测 NGN3 的抗体是绵羊来源的多抗(该抗体购自 R&D System, 产品目录号为 AF3444)。

[0051] 所有抗体均为非直标抗体, 检测中分别用 Jackson ImmunoResearch 公司购来的抗体复染: Alexa Fluor 488 标记的驴来源的抗山羊的多抗(产品目录号为 705-545-147); Cyanine Cy3 标记的驴来源的抗山羊的多抗(产品目录号为 705-165-147); Cyanine Cy3 标记的驴来源的抗绵羊的多抗(产品目录号为 715-165-147); Alexa Fluor 488 标记的驴来源的抗小鼠的多抗(产品目录号为 715-545-151); Cyanine Cy3 标记的驴来源的抗小鼠的多抗(产品目录号为 715-165-151); Alexa Fluor 488 标记的驴来源的抗鸡的多抗(产品目录号为 703-545-155)。

[0052] 结果如图 1 所示, 该阶段获得的细胞中, 部分细胞表达 PDX1 这一胰腺前体的标记蛋白(图 1(b) 中的 A); 另一部分细胞表达 NGN3-EGFP, 两者几乎不共染(图 1(b) 中的 B); NGN3-EGFP+ 细胞表达胰腺内分泌前体细胞标识转录因子 NGN3 或者早期阶段内分泌细胞相关蛋白 NKX2.2、CHROMOGRANIN A(CHGA) 等(图 1(b) 中的 C 和 D); 说明获得的细胞为胰腺内胚层阶段的细胞, 其中存在 NGN3-EGFP 标记的胰腺内分泌前体细胞或者新生的内分泌细胞。

[0053] 上述采用的培养液配方如下:

[0054] 细胞培养液 I 按照如下方法配制得到: 将 Essential 8 培养基、和 Y27632 混合, 得到细胞培养液 I, 其中 Essential 8 培养基和 Y27632 的配比为 1ml : 10 μ mol。

[0055] 细胞培养液 II 为 Essential 8 培养基。

[0056] 细胞培养液 III 按照如下方法配制得到: 将 DMEM/F12 培养基, BSA, rmWnt3A 和 ActivinA 混合, 得到细胞培养液 III, 其中 DMEM/F12 培养基, BSA, rmWnt3A 和 ActivinA 的配比为: 1ml : 0.1g : 25ng : 120ng。

[0057] 细胞培养液 IV 按照如下方法配制得到: 将 DMEM/F12 培养基, BSA 和 ActivinA 混合, 得到细胞培养液 IV, 其中 DMEM/F12 培养基, BSA 和 ActivinA 的配比为: 1ml : 0.1g : 120ng。

[0058] 细胞培养液 V 按照如下方法配制得到: 将 DMEM/F12 培养基, BSA, ActivinA 和 Wnt-C59 混合, 得到细胞培养液 V, 其中 DMEM/F12 培养基, BSA, ActivinA 和 Wnt-C59 的配比为: 1ml : 0.1g : 120ng : 50nmol。

[0059] 细胞培养液 VI 按照如下方法配制得到: 将 DMEM/F12 培养基, B27 supplement without VitaminA, KGF 和 SB525334 混合, 得到细胞培养液 VI, 其中 DMEM/F12 培养基, B27 supplement without VitaminA, KGF 和 SB525334 的配比为: 1ml : 10 μ l : 50ng : 1 μ mol。

[0060] 细胞培养液 VII 按照如下方法配制得到: 将 DMEM-H 培养基, B27 supplement,

all-trans retinoic acid,NOGGIN 和 SANT-1 混合,得到细胞培养液 VII,其中 DMEM-H 培养基,B27 supplement,all-trans retinoic acid,NOGGIN 和 SANT-1 的配比为:1ml:10 μ l:2 μ mol:250ng:0.25 μ mol。

[0061] 细胞培养液 VIII 按照如下方法配制得到:将 DMEM-H 培养基,B27 supplement without VitaminA,NOGGIN 和 TPB((2S,5S)-(E,E)-8-(5-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-2,4-pentadienoylamino)benzotactam) 混合,得到细胞培养液 VIII,其中 DMEM-H 培养基,B27 supplement without VitaminA,NOGGIN 和 TPB 的配比为:1ml:10 μ l:250ng:50nmol。

[0062] 细胞培养液 IX 按照如下方法配制得到:将 DMEM-H 培养基,B27 supplement without VitaminA,NOGGIN,human LIF 和 Alk5 inhibitor II 混合,得到细胞培养液 VIII,其中 DMEM-H 培养基,B27 supplement without VitaminA,NOGGIN 和 TPB 的配比为:1ml:10 μ l:250ng:10ng:1 μ mol。

[0063] 1.2、流式分析鉴定 NGN3-EGFP+ 细胞是否为胰腺内分泌前体细胞或新生的内分泌细胞

[0064] 将上述得到的胰腺内胚层细胞用 BD FACS Aria IIu 进行流式分析,得到 NGN3-EGFP+ (含有胰腺内分泌前体来源的细胞群体)、NGN3-EGFP- (不含有胰腺内分泌前体来源的细胞群体) 两群细胞,EGFP 为 FL1 通道。

[0065] 通过胞内流式分析检测 NGN3-EGFP+ 和 NGN3-EGFP- 群体中是否含有胰腺内分泌前体细胞的多个标识转录因子或分泌蛋白。

[0066] 检测 NKX2.2 的抗体是鼠来源的单抗(该抗体购自 DSHB,产品目录号为 74.5A5);检测 NGN3 的抗体是绵羊来源的多抗(该抗体购自 R&D Systems,产品目录号为 AF3444)和小鼠来源的单抗(该抗体购自 DSHB,产品目录号为 F25A1B3);检测 NEUROD1 的是山羊来源的多抗(该抗体购自 R&D Systems,产品目录号为 AF2746);检测 PDX1 的是山羊来源的多抗(该抗体购自 R&D Systems,产品目录号为 AF2419);检测 CHROMOGRANIN A 的是兔来源的多抗(该抗体购自中杉金桥,产品目录号为 ZA-0507)。

[0067] 所有抗体均为非直标抗体,检测中分别用 Jackson ImmunoResearch 公司购来的抗体复染。Alexa Fluor 488 标记的驴来源的抗山羊的多抗(产品目录号为 705-545-147);Alexa Fluor 488 标记的驴来源的抗小鼠的多抗(产品目录号为 715-545-151),Alexa Fluor 647 标记的驴来源的抗小鼠的多抗(产品目录号为 715-605-151);Alexa Fluor488 标记的山羊来源的抗小鼠抗原亚型 1 的多抗(产品目录号为 115-545-205),Alexa Fluor 647 标记的山羊来源的抗小鼠的多抗(产品目录号为 115-605-205);Alexa Fluor488 标记的山羊来源的抗小鼠抗原亚型 2b 的多抗(产品目录号为 115-545-207),Alexa Fluor 647 标记的山羊来源的抗小鼠抗原亚型 2b 的多抗(产品目录号为 115-605-207);Alexa Fluor 488 标记的驴来源的抗兔的多抗(产品目录号为 711-545-152)。

[0068] 结果如图 2 所示,NGN3-EGFP+ (含有胰腺内分泌前体细胞或新生的内分泌细胞) 群体中有 NKX2.2、NGN3、CHROMOGRANIN A (CHGA) 的表达,而不表达或低表达胰腺前体相关基因 PDX1,表明该细胞群的确主要为胰腺内分泌前体细胞或新生的内分泌细胞。

[0069] NGN3-EGFP- 群体中无 NKX2.2、CHROMOGRANIN A (CHGA)、GFP 的表达,主要高表达胰腺前体相关转录因子 PDX1,有极少部分细胞表达 NGN3 或 NEUROD1,表明该细胞群主要为胰

腺前体细胞或非胰腺细胞类型细胞。

[0070] 1.3、NGN3-EGFP+ 细胞群富集 SUSD2 的表达

[0071] 1) RNA 测序显示 SUSD2 在 NGN3-EGFP+ 细胞群里富集表达

[0072] 用 QIAGEN 的 RNeasy Plus Mini Kit 对上述 2 获得的 NGN3-EGFP+ 细胞以及 NGN3-EGFP- 细胞进行提取,各获得 2 μ g 的总 mRNA。将得到的 mRNA 纯化后进行反转录得到单链 cDNA。用末端脱氧核苷酸转移酶 (terminal deoxynucleotidyl transferase) 对得到的单链 cDNA 的 3' 端加上 poly A 尾巴。将 cDNA 扩增 12 个 PCR 循环之后,用 Illumina Paired-End DNA Sample Prep Kit 进行 cDNA 文库的构建。然后用 Illumina HiSeq2000 对其进行测序。用 Tophat 软件将测序结果 (raw reads) 和人参考基因组 (the human reference genome, NCBI Build 37, hg19) 进行比对,通过将配对序列 (Mapping reads) 和 NCBI 的参考数据库 (RefSeq Genes hg19) 进行正向或反向匹配后重建转录组。通过计算所有基因的表达丰度,并将其用 RPKM 进行标准化以后,下列标准来判断一个基因在 NGN3-EGFP+ 与 NGN3-EGFP- 细胞之间差异表达的显著性:1) 表达倍比关系 (fold change) 大于 2 或小于 0.5;2) P 值小于 0.05。采用 R 软件的热图软件包 (heatmap package) 对获得的数据基于 RPKM 采用 log₁₀ 进行热图分析。利用差异基因表达 (Differential Gene Expression, DGE) 进行 GO 分析。

[0073] 结果如图 3 所示,相较于 NGN3-EGFP- 细胞,NGN3-EGFP+ 细胞富集表达胰腺内分泌相关基因 NGN3、NEUROD1、NKX2.2、PAX4、ARX 等,低表达胰腺前体细胞相关基因 PDX1、HNF1B、HNF6 等,说明分选获得的 NGN3-EGFP+ 细胞是胰腺内分泌前体细胞及新生的内分泌细胞。

[0074] NGN3-EGFP+ 细胞富集表达 SUSD2 (NR02212),表达倍比关系是 2.30,说明从 mRNA 水平上,SUSD2 基因 (序列 2) 可以作为鉴定待测细胞是否为胰腺内分泌前体细胞或新生的胰腺内分泌细胞的标志。下一步鉴定 SUSD2 基因表达的蛋白是否也是同样的情况。

[0075] 2) 免疫荧光抗体法验证 SUSD2 能够标记 NGN3-EGFP+ 细胞群

[0076] 对上述 2 获得的 NGN3-EGFP+ 细胞以及 NGN3-EGFP- 细胞用免疫荧光抗体法检测 EGFP 和 SUSD2 的表达。

[0077] 检测 EGFP 的是鸡来源的多抗 (该抗体购自 Abcam,产品目录号为 AB13970);检测 SUSD2 的是鼠来源的单抗 (该抗体购自 BioLegend,产品目录号为 327401)。

[0078] 所有抗体均为非直标抗体,检测中分别用 Jackson ImmunoResearch 公司购来的抗体复染。Cyanine Cy3 标记的驴来源的抗小鼠的多抗 (产品目录号为 715-165-151);Alexa Fluor 488 标记的驴来源的抗鸡的多抗 (产品目录号为 703-545-155)。

[0079] 结果如图 4 所示,免疫组化结果显示,SUSD2 的表达与 NGN3-EGFP 完全吻合,且在 NGN3-EGFP- 细胞中不表达,即在 NGN3-EGFP+ 细胞中富集表达;说明 SUSD2 可以用来鉴定或标记 NGN3-EGFP+ 细胞,即胰腺内分泌前体细胞或新生的胰腺内分泌细胞所组成的混合细胞群。

[0080] 二、SUSD2 作为人多能干细胞分化得到的胰腺内分泌前体细胞标记基因

[0081] 2.1、胰腺内胚层细胞的获得

[0082] 将离体的人多能干细胞系 NGN3-EGFP 按照 1.1 的方法,分化得到胰腺内胚层细胞;

[0083] 2.2、流式分析检测 SUSD2 基因的表达及胰腺内分泌前体细胞标记基因 NKX2.2、

NEUROD1 的表达

[0084] 将上述 2.1 得到的胰腺内胚层细胞通过流式分析法检测 SUSD2 基因编码蛋白的表达,按照 BD Biosciences 购来的细胞固定/通透试剂盒(产品目录号为 554714)进行,将上述 2.1 得到的胰腺内胚层细胞固定后使用对应抗体和 SUSD2 直标抗体(小鼠来源的 PE 标记的抗 SUSD2 的单抗(购自 BioLegend,产品目录号为 327406);以及小鼠来源的 APC 标记单抗(购自 BioLegend,产品目录号为 327408)。小鼠来源的未标记的单抗(购自 BioLegend,产品目录号为 327401))染色,之后再用荧光二抗复染。用流式分选仪进行分析。

[0085] 检测 NKX2.2 的抗体是鼠来源的单抗(该抗体购自 DSHB,产品目录号为 74.5A5);检测 NGN3 的抗体是绵羊来源的多抗(该抗体购自 R&D Systems,产品目录号为 AF3444)和小鼠来源的单抗(该抗体购自 DSHB,产品目录号为 F25A1B3);检测 NEUROD1 的是山羊来源的多抗(该抗体购自 R&D Systems,产品目录号为 AF2746);检测 PDX1 的是山羊来源的多抗(该抗体购自 R&D Systems,产品目录号为 AF2419);检测 CHROMOGRANIN A 的是兔来源的多抗(该抗体购自中杉金桥,产品目录号为 ZA-0507)。

[0086] 二抗购自 Jackson ImmunoResearch:Alexa Fluor 488 标记的驴来源的抗山羊的多抗(产品目录号为 705-545-147);Alexa Fluor 488 标记的山羊来源的抗小鼠抗原亚型 2b 的多抗(产品目录号为 115-545-207),Alexa Fluor 647 标记的山羊来源的抗小鼠抗原亚型 2b 的多抗(产品目录号为 115-605-207);Alexa Fluor 488 标记的驴来源的抗兔的多抗(产品目录号为 711-545-152);Alexa Fluor 488 标记的驴来源的抗鸡的多抗(产品目录号为 703-545-155)。

[0087] 结果图如图 5 所示,在第四阶段第 0 天的时候,NGN3 阳性或弱阳性的细胞并不表达 SUSD2 或 NEUROD1,弱表达 NKX2.2。在第四阶段第 1 天,分别有 80%、93% and 88% 的 SUSD2+ 细胞表达 NGN3, NKX2.2 和 NEUROD1。这表明绝大部分 SUSD2+ 细胞同时表达 NGN3、NKX2.2 和 NEUROD1,说明这一群 SUSD2+ 细胞具有内分泌前体细胞特征。在第四阶段第 4 天的时候,大部分 SUSD2+ 细胞表达 NKX2.2 或 CHROMOGRANIN A (CHGA),并不表达 NGN3,说明在该时期这群 SUSD2+/NGN3- 的细胞具有内分泌细胞的特征。此外, SUSD2+ 细胞持续低表达或不表达胰腺前体的标记 PDX1。说明 SUSD2 可以用来标记胰腺内分泌前体细胞及其子代内分泌细胞。

[0088] 在整个分化过程中,尽管存在部分 SUSD2- 细胞表达胰腺内分泌相关蛋白 NGN3、NKX2.2 等,绝大部分 SUSD2- 细胞不表达这些胰腺内分泌相关蛋白,而表达胰腺前体相关蛋白 PDX1,说明 SUSD2- 细胞主要包含胰腺前体细胞或非胰腺细胞类型细胞(图 5)。

[0089] 上述结果表明, SUSD2+ 细胞为胰腺内分泌前体细胞或新生的胰腺内分泌细胞,进一步证明, SUSD2 基因编码蛋白的表达可以鉴定细胞是否为目的细胞。

[0090] 2.3、SUSD2+ 细胞的 mRNA 水平上检测用流式分选获得了 SUSD2- 细胞和 SUSD2+ 细胞,用定量 PCR 技术分析了这两群细胞及未分选的胰腺内胚层细胞的基因表达情况。采用 Power SYBR® Master Mix 试剂盒进行定量 PCR(购自 Life Technologies,产品目录号为 4367659),扩增引物见表 1,内参引物为 GAPDH,具体操作参见说明书。

[0091] 表 1 为扩增引物

[0092]

基因	5' -引物	3' -引物
<i>HHEX</i>	ACCTCTACTCTGGAGCCCCTTCT	ATCTCACCTGGCCGCCTTT
<i>WNT3</i>	ACAAGCACAACAACGAGGCG	GAGGTGCATGTGGTCCAGGATAG
<i>MIXL1</i>	CCGAGTCCAGGATCCAGGTA	CTCTGACGCCGAGACTTGG
<i>MEOX1</i>	GCGATGACTACGGGGTGCTT	TTCTCCGCCTGGATGATTTC
<i>GAPDH</i>	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
<i>OCT4</i>	CCGAAAGAGAAAGCGAACCAG	ATGTGGCTGATCTGCTGCAGT
<i>SOX17</i>	GCATGACTCCGGTGTGAATCT	TCACACGTCAGGATAGTTGCAGT
<i>T</i>	GATGATCGTGACCAAGAACGG	CCACGAAGTCCAGCAGGAA
<i>FOXA2</i>	CTGAGCGAGATCTACCAGTGGGA	CAGTCGTTGAAGGAGAGCGAGT
<i>CXCR4</i>	CCATCGTCCACGCCACCAAC	ACGCCAACATAGACCACCTT
<i>CER1</i>	TGAAGTACATTGGGAGACCTGC	CACAGCCTTCGTGGGTATAGT
<i>BRAX1</i>	CACGCCGGACAGAATAGATC	GGTACCACGTCTTCACCTGCAAC
<i>CDX2</i>	CTGGAGCTGGAGAAGGAGTTTC	ATTTTAACCTGCCTCTCAGAGAGC
<i>AFP</i>	CCCGAACTTTCCAAGCCATA	TACATGGGCCACATCCAGG
<i>SOX2</i>	CCATGACCAGCTCGCAGAC	GGACTTGACCACCGAACCC
<i>HNF1B</i>	GCACCTCTCCCAGCATCTCA	GTCGGAGGATCTCTCGTTGC
<i>HNF4A</i>	ACTACATCAACGACCGCCAGT	ATCTGCTCGATCATCTGCCAG
<i>HNF6</i>	TGTGGAAGTGGCTGCAGGA	TGTGAAGACCAACCTGGGCT
<i>HB9</i>	GCTCATGCTCACCGAGACCC	TTTGCTGCGTTTCCATTTTCATC
<i>NKX61</i>	GGGCTCGTTTGGCCTATTCGTT	CCACTTGGTCCGGCGGTTCT
<i>PDX1</i>	CGGAACTTTCTATTTAGGATGTGG	AAGATGTGAAGGTCATACTGGCTC
<i>CAP1</i>	CTCGGAAGATTTGGCACTGACTAT	CGTGGTGGGCATTGTGGAGATA

[0093]

<i>PTF1A</i>	GAAGGTCATCATCTGCCATCG	GGCCATAATCAGGGTCGCT
<i>SOX9</i>	CTGAGCTCGGCGTTGTG	AAAGGCTACGACTGGACG
<i>NOD1</i>	ATTGCACCAGCCCTTCCTTTGAT	ACTCGGCGGACGGTTCGTGTTT
<i>NGN3</i>	GGCTGTGGGTGCTAAGGGTAAG	CAGGGAGAAGCAGAAGGAACAA
<i>NKX22</i>	TTCCAGAACCACCGCTACAAG	GGGCGTCACCTCCATACCT
<i>PAX6</i>	CGAATTCTGCAGGTGTCCAA	ACAGACCCCTCGGACAGTAAT
<i>ARX</i>	GGAGGCAGAAAGGCACAAAGA	GGTGGGGTTAGATAGCGGGTT
<i>PAX4</i>	AGTGTCTCCTCCATCAACCG	TGGTGACCTGAGCCGTGT
<i>AMY</i>	AGGAGGTAATTGATCTGGGTGG	AAGTGCTCTGTCAGAAGGCATG
<i>GCG</i>	GAGATTTCCAGAAGAGGTCG	TGGCGGCAAGATTATCAAGAA
<i>GCK</i>	CTTCCCTCAGTTTTTCGGTGG	TTGATTCCAGCGAGAAAGGTG
<i>INS</i>	GCAGCCTTTGTGAACCAACAC	CCCCGCACACTAGGTAGAGA
<i>ISL1</i>	ATTTCCCTATGTGTTGGTTGCG	CGTTCTTGCTGAAGCCGATG
<i>MAFB</i>	CCCGACCGAACAGAAGACA	ACTGGGTGCGAGCCGATGAG
<i>SST</i>	CGCTGTCCATCGTCCTG	GGGCATCATTCTCCGTCTG
<i>GRELIN</i>	GAGGCCCCAGCCGACAAGTG	AAGCAAGCGAAAAGCCAGAT
<i>PPY</i>	AGTGTACCCAGGGGACAATGC	CAGCATGTTGATGTATCTACGGA
<i>MAFA</i>	CAGAGCCAGGTGGAGCAGC	CGTATTTCTCCTTGTACAGGTCCC
<i>CELA2A</i>	CATCGTCAGCTTCGGGTCTCGC	GAAGACGGAGGGCTTGTGGTAG
<i>CTRB1</i>	CGCCATCCACCCTGTGCTCA	GACGGCGTCTCCCCATTCA
<i>CPA1V2</i>	CCTGGGCTGGGTGGCTATGG	GCGGCATCATTCAATTTCTTTCA
<i>CHROMOG RANIN A (CHGA)</i>	CGCAAACCGCAGACCAGAGGA	AGCTCTGCTTCAATGGCCGACA
<i>SUSD2</i>	GGCACCGCCAACACCTCA	GCGTGGGCAGCGACTTGA

[0094] 结果如图 6 所示, SUSD2⁺ 细胞富集胰腺内分泌前体细胞及内分泌细胞相关基因的表达 NGN3、NEUROD1、NKX2. 2、PAX4、ARX 等的表达, 表明其为胰腺内分泌前体细胞或新生的内分泌细胞, 而 SUSD2⁻ 细胞则富集胰腺前体相关基因 PDX1、HNF6、SOX9、PTF1A 的表达, 表明其不为胰腺内分泌前体细胞或新生的内分泌细胞。

[0095] 三、磁珠分选 SUSD2 阳性细胞和 SUSD2 阴性细胞

[0096] 3. 1、胰腺内胚层细胞的获得

[0097] 将离体的人多能干细胞系 H1 按照 1. 1 的方法, 分化得到胰腺内胚层细胞;

[0098] 3. 2、磁珠分选

[0099] 磁珠分选胰腺内胚层细胞,所需的抗体为 SUSD2 直标抗体(小鼠来源的 PE 标记的抗 SUSD2 的单抗购自 BioLegend,产品目录号为 327406),磁珠分选相关试剂购自 Miltenyi Biotec,根据使用说明获得 SUSD2 阳性细胞和 SUSD2 阴性细胞。

[0100] 3. 3、检测

[0101] A、流式分析

[0102] 对 SUSD2+ 细胞、SUSD2- 细胞以及未分选的细胞进行流式分析,检测方法同上。

[0103] 结果如图 7(a) 所示, SUSD2+ 细胞能够高纯度富集 NKX2. 2+ 细胞,该细胞为 NGN3+ 的内分泌前体细胞或新生的内分泌细胞(图 7(a))。

[0104] B) 对 SUSD2 阳性细胞培养的子代细胞进行免疫荧光鉴定

[0105] 对分选获得的 SUSD2+ 细胞和 SUSD2- 细胞以及未分选的胰腺内胚层细胞进行体外延长培养。将目标细胞重悬在细胞培养液 X 中,铺于 Matrigel 包被的细胞培养板上培养一天使其贴壁。第二天,去掉培养基之后用 PBS 洗一遍,换做细胞培养液 XI 继续培养 5 天。培养条件为 37 摄氏度,5% 的二氧化碳。

[0106] 细胞培养液 X 由如下方法得到:DMEM-H:B27 without VitaminA:Y27632 = 1ml:10 μ l:10 μ M。

[0107] 细胞培养液 XI 由如下方法得到:DMEM-H:B27 without vitamin A:Noggin:human LIF:Alk5 inhibitor II = 1ml:10 μ l:250ng:10ng:100nM

[0108] 进行免疫组化染色。

[0109] 结果如图 7(b) 所示, SUSD2+ 培养获得的细胞能够产生大量的 INSULIN+,即可获得大量的内分泌细胞, SUSD2- 培养获得的细胞主要富集的是 PDX1+ 胰腺前体细胞,仅能够产生少量 INSULIN+ 细胞,说明 SUSD2 所富集的细胞是胰腺内分泌前体细胞。

[0110] 说明 SUSD2 富集的是胰腺内分泌前体细胞或新生的内分泌细胞。

[0111] C) 免疫缺陷小鼠肾包囊移植

[0112] 对分选获得的 SUSD2 阳性细胞和 SUSD2 阴性细胞以及未分选的胰腺内胚层细胞进行免疫缺陷小鼠(6-8 周)肾包囊移植。移植 19 周之后,取移植物进行冰冻切片免疫组化染色。

[0113] 结果如图 7(c) 所示,将 MACS 获得的 SUSD2+ 及 SUSD2- 移植到小鼠体内, SUSD2+ 细胞能够产生所有种类的内分泌细胞(INSULIN+ 的 beta 细胞, Glucagon+ 的 alpha 细胞, SST+ 的 delta 细胞, Ghrelin+ 的 epsilon 细胞以及 PPY+ 的 PPY 细胞),而无导管样结构产生,说明 SUSD2+ 细胞是胰腺内分泌前体细胞或新生的内分泌细胞。

[0114] 四、SUSD2 在体内分选人胚胎来源的胰腺内分泌前体细胞及新生的内分泌细胞

[0115] 4. 1、人胚胎组织的冰冻切片的免疫荧光染色

[0116] 组织切片:将离体人胎胰组织用 4% 的 PFA 在 4℃ 固定 2 小时,用 PBS 在 4℃ 洗三次(时间分别是迅速,10 分钟和 2 小时。随后将组织块放在 30% 的蔗糖溶液中 4℃ 过夜,直至组织沉降。将组织块用 Optimal Cutting Temperature Compound(O. C. T) (Tissue-Tek) 包埋后,用液氮进行冰冻,用冰冻切片机 Cryostat(Leica) 切成 10 μ m 的切片。

[0117] 将上述切片采用 1.1 的免疫荧光抗体法检测,结果切片为胰腺内胚层阶段的细胞, SUSD2 标记的是胰腺内分泌前体细胞和 / 或新生的胰腺内分泌细胞(图 8)。

[0118] 4.2、磁珠分选富集人胚胎来源的胰腺内分泌前体细胞及新生的内分泌细胞

[0119] 将胎胰组织用冷的 PBS 洗涤两次后,用眼科剪剪成 1 立方 mm 的小块。用消化液 (PRMI 1640, 100-400 U/ml Collagenase IV(Life Technologies), 1.2 U/ml Dispase II(Roche), DNase I(0.02%, (wt/vol)) and 0.5% fetal bovine serum(FBS, Hyclone)) 在 37°C 消化 30 分钟,每隔 5 分钟用移液器轻轻吹打使细胞分散。将消化得到的单细胞转移到 PRMI 1640 with 0.5% FBS 中,用含有 0.5% BSA 和 2 mM EDTA 的 PBS 洗两遍。收集残留的组织块按上述步骤再次进行消化。将得到的细胞悬液用 40 μ m 的细胞筛 (BD Biosciences) 进行过滤,得到的单细胞悬液保存在含有 0.5% BSA 和 2mM EDTA 的 PBS 中,置于冰上用于后续分析。

[0120] 将上述单细胞悬液进行磁珠分选,所需的抗体为 SUSD2 直标抗体 (小鼠来源的 PE 标记的抗 SUSD2 的单抗购自 BioLegend, 产品目录号为 327406), 获得 SUSD2 阳性细胞和 SUSD2 阴性细胞

[0121] 4.3、荧光定量 PCR 验证阳性细胞为胰腺内分泌前体细胞或新生的内分泌细胞对磁珠分选获得的 SUSD2 阳性细胞和 SUSD2 阴性细胞以及未分选的胚胎胰腺细胞进行定量 PCR 检测胰腺内胚层细胞相关基因表达情况。具体操作参见 2.3。

[0122] 结果如图 9 所示, SUSD2 阳性细胞富集 SUSD2 基因的表达,同时富集胰腺内分前体细胞及早期阶段内分泌细胞相关基因 NGN3、NEUROD1、NKX2.2、PAX4、ARX 等的表达,低表达胰腺前体相关基因 PDX1、HNF6、SOX9、PTF1A,后期阶段内分泌细胞相关基因 INSULIN、GLUCAGON、PAX6、MAFB、MAFA、CHROMOGRANIN A(CHGA) 以及外分泌相关基因 CPA1 等。说明 SUSD2 阳性细胞为 SUSD2+ 细胞是胰腺内分泌前体细胞或新生的内分泌细胞。

[0123] 因此,可以看出,SUSD2 基因作为胰腺内分泌前体细胞或新生的内分泌细胞的标志基因,可以通过其是否表达分选或辅助分选待测细胞群体中的胰腺内分泌前体细胞或新生的胰腺内分泌细胞,具体如下:

[0124] 检测待测细胞群体中的细胞是否表达 SUSD2 基因,若某些细胞表达 SUSD2 基因,则某些细胞为或候选为人胰腺内分泌前体细胞或其不分泌激素的子代细胞;若某些细胞不表达 SUSD2 基因,则某些细胞不为或候选不为人胰腺内分泌前体细胞或其新生的胰腺内分泌细胞。

[0125] 检测方法通过检测待测细胞群体中的细胞是否含有 SUSD2 基因表达的蛋白,具体为定量检测 SUSD2 基因的 mRNA 水平表达或免疫荧光抗体法检测 SUSD2 基因表达蛋白或流式分析检测 SUSD2 基因表达蛋白或磁珠分选 SUSD2 基因表达蛋白。

[0126] 实施例 2、SUSD2 基因的表达分选人胰腺内分泌前体细胞或其不分泌激素的子代细胞

[0127] 1、胰腺内胚层细胞的获得

[0128] 将离体的人多能干细胞系按照 1.1 的方法,分化得到胰腺内胚层细胞;

[0129] 2、流式分析检测 SUSD2 基因的表达分选人胰腺内分泌前体细胞或其不分泌激素的子代细胞

[0130] 将胰腺内胚层细胞通过流式分析检测,所用的抗体为 SUSD2 直标抗体 (小鼠来源的 PE 标记的抗 SUSD2 的单抗购自 BioLegend, 产品目录号为 327406), 染色,之后再用荧光二抗复染。

[0131] 若某些细胞表达 SUSD2 基因,则某些细胞为或候选为人胰腺内分泌前体细胞或其不分泌激素的子代细胞;若某些细胞不表达 SUSD2 基因,则某些细胞不为或候选不為人胰腺内分泌前体细胞或其不分泌激素的子代细胞;

[0132] 选取 SUSD2+ 细胞,为人胰腺内分泌前体细胞或新生的胰腺内分泌细胞。

[0133] 同时对 SUSD2+ 细胞进行流式分析检测胰腺内分泌前体细胞标记基因 NGN3、NKX2. 2、NEUROD1 的表达。检测 NKX2. 2 的抗体是鼠来源的单抗(该抗体购自 DSHB,产品目录号为 74. 5A5);检测 NGN3 的抗体是绵羊来源的多抗(该抗体购自 R&D Systems,产品目录号为 AF3444)和小鼠来源的单抗(该抗体购自 DSHB,产品目录号为 F25A1B3);检测 NEUROD1 的是山羊来源的多抗(该抗体购自 R&D Systems,产品目录号为 AF2746)。

[0134] 结果 SUSD2+ 细胞表达胰腺内分泌前体细胞标记基因 NGN3、NKX2. 2、NEUROD1,证明其的确为人胰腺内分泌前体细胞或其不分泌激素的子代细胞。证明,本发明的方法正确。

[0001]

说 明 书

序列表

<110> 北京大学、北京大学深圳研究生院、北京瑞普晨创科技有限公司

<120> SUSD2 蛋白作为标记物的用途

<130>

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 822

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

```

Met Lys Pro Ala Leu Leu Pro Trp Ala Leu Leu Leu Leu Ala Thr Ala
1           5           10           15
Leu Gly Pro Gly Pro Gly Pro Thr Ala Asp Ala Gln Glu Ser Cys Ser
           20           25           30
Met Arg Cys Gly Ala Leu Asp Gly Pro Cys Ser Cys His Pro Thr Cys
           35           40           45
Ser Gly Leu Gly Thr Cys Cys Leu Asp Phe Arg Asp Phe Cys Leu Glu
           50           55           60
Ile Leu Pro Tyr Ser Gly Ser Met Met Gly Gly Lys Asp Phe Val Val
65           70           75           80
Arg His Phe Lys Met Ser Ser Pro Thr Asp Ala Ser Val Ile Cys Arg
           85           90           95
Phe Lys Asp Ser Ile Gln Thr Leu Gly His Val Asp Ser Ser Gly Gln
           100          105          110

```

[0002]

Val His Cys Val Ser Pro Leu Leu Tyr Glu Ser Gly Arg Ile Pro Phe
 115 120 125

Thr Val Ser Leu Asp Asn Gly His Ser Phe Pro Arg Ala Gly Thr Trp
 130 135 140

Leu Ala Val His Pro Asn Lys Val Ser Met Met Glu Lys Ser Glu Leu
 145 150 155 160

Val Asn Glu Thr Arg Trp Gln Tyr Tyr Gly Thr Ala Asn Thr Ser Gly
 165 170 175

Asn Leu Ser Leu Thr Trp His Val Lys Ser Leu Pro Thr Gln Thr Ile
 180 185 190

Thr Ile Glu Leu Trp Gly Tyr Glu Glu Thr Gly Met Pro Tyr Ser Gln
 195 200 205

Glu Trp Thr Ala Lys Trp Ser Tyr Leu Tyr Pro Leu Ala Thr His Ile
 210 215 220

Pro Asn Ser Gly Ser Phe Thr Phe Thr Pro Lys Pro Ala Pro Pro Ser
 225 230 235 240

Tyr Gln Arg Trp Arg Val Gly Ala Leu Arg Ile Ile Asp Ser Lys Asn
 245 250 255

Tyr Ala Gly Gln Lys Asp Val Gln Ala Leu Trp Thr Asn Asp His Ala
 260 265 270

Leu Ala Trp His Leu Ser Asp Asp Phe Arg Glu Asp Pro Val Ala Trp
 275 280 285

Ala Arg Thr Gln Cys Gln Ala Trp Glu Glu Leu Glu Asp Gln Leu Pro
 290 295 300

Asn Phe Leu Glu Glu Leu Pro Asp Cys Pro Cys Thr Leu Thr Gln Ala
 305 310 315 320

Arg Ala Asp Ser Gly Arg Phe Phe Thr Asp Tyr Gly Cys Asp Met Glu
 325 330 335

Gln Gly Ser Val Cys Thr Tyr His Pro Gly Ala Val His Cys Val Arg
 340 345 350

Ser Val Gln Ala Ser Leu Arg Tyr Gly Ser Gly Gln Gln Cys Cys Tyr
 355 360 365

[0003]

Thr Ala Asp Gly Thr Gln Leu Leu Thr Ala Asp Ser Ser Gly Gly Ser
 370 375 380
 Thr Pro Asp Arg Gly His Asp Trp Gly Ala Pro Pro Phe Arg Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Arg Val Pro Ser Met Ser His Trp Leu Tyr Asp Val Leu Ser Phe
 405 410 415
 Tyr Tyr Cys Cys Leu Trp Ala Pro Asp Cys Pro Arg Tyr Met Gln Arg
 420 425 430
 Arg Pro Ser Asn Asp Cys Arg Asn Tyr Arg Pro Pro Arg Leu Ala Ser
 435 440 445
 Ala Phe Gly Asp Pro His Phe Val Thr Phe Asp Gly Thr Asn Phe Thr
 450 455 460
 Phe Asn Gly Arg Gly Glu Tyr Val Leu Leu Glu Ala Ala Leu Thr Asp
 465 470 475 480
 Leu Arg Val Gln Ala Arg Ala Gln Pro Gly Thr Met Ser Asn Gly Thr
 485 490 495
 Glu Thr Arg Gly Thr Gly Leu Thr Ala Val Ala Val Gln Glu Gly Asn
 500 505 510
 Ser Asp Val Val Glu Val Arg Leu Ala Asn Arg Thr Gly Gly Leu Glu
 515 520 525
 Val Leu Leu Asn Gln Glu Val Leu Ser Phe Thr Glu Gln Ser Trp Met
 530 535 540
 Asp Leu Lys Gly Met Phe Leu Ser Val Ala Ala Gly Asp Arg Val Ser
 545 550 555 560
 Ile Met Leu Ala Ser Gly Ala Gly Leu Glu Val Ser Val Gln Gly Pro
 565 570 575
 Phe Leu Ser Val Ser Val Leu Leu Pro Glu Lys Phe Leu Thr His Thr
 580 585 590
 His Gly Leu Leu Gly Thr Leu Asn Asn Asp Pro Thr Asp Asp Phe Thr
 595 600 605
 Leu His Ser Gly Arg Val Leu Pro Pro Gly Thr Ser Pro Gln Glu Leu
 610 615 620
 Phe Leu Phe Gly Ala Asn Trp Thr Val His Asn Ala Ser Ser Leu Leu

[0004]

625	630	635	640
Thr Tyr Asp Ser Trp Phe Leu Val His Asn Phe Leu Tyr Gln Pro Lys			
	645	650	655
His Asp Pro Thr Phe Glu Pro Leu Phe Pro Ser Glu Thr Thr Leu Asn			
	660	665	670
Pro Ser Leu Ala Gln Glu Ala Ala Lys Leu Cys Gly Asp Asp His Phe			
	675	680	685
Cys Asn Phe Asp Val Ala Ala Thr Gly Ser Leu Ser Thr Gly Thr Ala			
	690	695	700
Thr Arg Val Ala His Gln Leu His Gln Arg Arg Met Gln Ser Leu Gln			
705	710	715	720
Pro Val Val Ser Cys Gly Trp Leu Ala Pro Pro Pro Asn Gly Gln Lys			
	725	730	735
Glu Gly Asn Arg Tyr Leu Ala Gly Ser Thr Ile Tyr Phe His Cys Asp			
	740	745	750
Asn Gly Tyr Ser Leu Ala Gly Ala Glu Thr Ser Thr Cys Gln Ala Asp			
	755	760	765
Gly Thr Trp Ser Ser Pro Thr Pro Lys Cys Gln Pro Gly Arg Ser Tyr			
	770	775	780
Ala Val Leu Leu Gly Ile Ile Phe Gly Gly Leu Ala Val Val Ala Ala			
785	790	795	800
Val Ala Leu Val Tyr Val Leu Leu Arg Arg Arg Lys Gly Asn Thr His			
	805	810	815
Val Trp Gly Ala Gln Pro			
	820		

<210> 2

<211> 3201

<212> DNA

<213> 人

<400> 2

[0005]

gcctcggagc	cactgcactg	ctggetgcag	acacaggetg	caccatgaag	ccagecctcc	60
tgccctggge	ctgctgetg	ctggcgacag	cccteggccc	gggccccgga	cccacagcag	120
atgcccaaga	gagctgctcc	atgcgctgtg	gcgccttggg	cgggccatgt	tctgccacc	180
cgactgtctc	tggccttggc	acctgctget	tggatttccg	ggactttctg	ctggagatat	240
tgccctactc	aggatccatg	atgggcgcca	aggactttgt	ggtgcggcac	ttcaagatgt	300
ccagccccac	agacgccagt	gtgatctgca	ggtttaagga	cagcatccag	acctcggccc	360
atgtggactc	ctccgggcaa	gtgcactgtg	tgtaacctct	gctctatgag	agcggccgca	420
tccccttacc	tgtgtcactg	gacaacggcc	actccttccc	tctgtcgggc	acctggctgg	480
ctgtgcaccc	caacaaagtg	tcaatgatgg	agaagagcga	gttggatgaac	gagacgcgtt	540
ggcaatacta	cggcaccgcc	aacacctcag	gcaacctcag	cctgacctgg	catgtcaagt	600
cgtgtcccac	gcagaccate	accatcgaac	tgtggggcta	cgaggagaca	ggaatgccct	660
actcacagga	gtggactgca	aagtggctgt	acctgtacce	cctggccaca	cacatcccca	720
actcggctc	tctcacttcc	acccccaaac	ctgctctccc	cagctaccag	agatggcgag	780
tgggtgcact	tggatcctc	gacagcaaaa	attacgcagg	gcagaaggac	gtgcaggcgc	840
tctggaccaa	cgaccagca	ctggcctggc	acctgagcga	tgacttccga	gaggaccctg	900
tggcctgggc	acgaactcag	tgccaggcct	gggaggagct	ggaggatcag	ctgccccact	960
tcttgaggga	gctgcgggac	tgcctctgca	ccctgaccca	ggeccgggct	gactccggcc	1020
gcttcttacc	ggaactaggc	tgtgacatgg	agcagggcag	cgtgtgcacc	taccaccccg	1080
gggcctgca	ctgtgtgcgt	tctgtgcagg	ccagcctccg	gtacggctca	ggtcagcagt	1140
gctgctacac	agcggacggg	acgcagctcc	tgacagctga	ctccagcggc	ggcagcactc	1200
ccgaccgcgg	ccatgactgg	ggcgaccccc	cgttccgcac	gccaccccga	gtgcccagca	1260
tgtcccactg	gctctacgat	gtcctcagct	tctattaactg	ctgcctctgg	gcacccgaact	1320
gcccccgcta	catgcaacgg	cggccttcca	atgaetgccg	caactaccgg	cccccaagac	1380
tggcctccgc	cttcggagac	ccacactttg	tgaccttcca	cggcaccaac	ttcacattca	1440
atgggcggcg	agagtaactg	ctgctggagg	cagcctgac	cgacctgagg	gtgcaggcgc	1500
gggcccagcc	cgggacgatg	tccaacggca	cggagaccgc	tggcactggg	ctgaccgcag	1560
tggccgtcca	ggagggcaac	tcagatgtgg	tggaagtccg	gctggccaac	aggaccggag	1620
gtctggaggt	gctgctgaac	caggaggtgc	tgacttccac	cgagcagagc	tggatggacc	1680
tgaaaggaat	gttctgtctg	gtggctgccg	gggacagggt	ctccatcatg	ctggcatcag	1740
gggcggcct	ggaggtcagc	gtgcagggcc	cgttctctgag	tgtgtccctc	ctgctgctg	1800
agaagtctct	cacccacacc	cacggcctcc	tgggacact	caacaacgac	cccaccgacg	1860
acttcaccct	gcacagcggg	cggctctctg	ccccaggcac	cagtcaccag	gagctgttcc	1920
tgtttggggc	caactggacc	gtgcacaatg	cgtctctctc	gctcacttac	gattctgtgt	1980

[0006]

tectggtcca caacttctg taccaacca agcaagacce cacettegag cecetettec	2040
ccagtgagac caccctcaac eccagcctgg cacaagagge agccaaaacta tgtggggacg	2100
atcattttctg caactttgat gtggcagcca ctgggagcct gagcacgggc actgccacte	2160
gggtggceca ccagctgcac cagcgtcgea tgcagagcct gcagccagtg gtgtcctgtg	2220
gctggctggc cccacctecc aacggacaaa aggagggcaa caggtaacctg gggggttcca	2280
ccatctactt ccaactgtgac aacggctaca gcctggccgg gccagagacc agcacctgcc	2340
aggctgacgg caccctggtec tcaccacccc cgaagtgcc a gccaggacgc agctacgcgg	2400
tgctgttggg catcatcttt gggggcctcg cgggtgggtg gccgggttgg ctcgtctatg	2460
tgctgctgcg ccgcaggaag ggcaacacgc acgtctgggg tgcacagccc tgatgggagc	2520
agcttgctg tgagcaccag gccaaagactc ctgagaacag gcagcccagt cctgcgactc	2580
ccgcateccc aggaccagac acctgggacc tggatacttg atacctgggc attlaacccc	2640
ctactctgtc atctcagacc ccaggcagga ggcccagtgt tccaacaccc aagccccgtg	2700
ctageagegc tccgtgetct tccccaaata ctcacggete taattcecca aacctgaaac	2760
ttcataacct gggattctaa tacctatgtc ctgagccctg aacctccac acctgagcct	2820
cagattccaa tagctcacte cctagagcct gacgcggggg cccctgacce ctgagcctca	2880
gattccaata cctcaactccc cagagcctga tgccggggcc cctgaccct gatctacgga	2940
ggcctgctcc cggaccgtgc gggcaccagt gcagtgetgc cttggttct ggaccctgg	3000
gcccctctg ggacceca ga tgggtaagg agaggeccca gaaccccaaa gcagacagcg	3060
agacccccag ccgagagagge ctcctcggge actccagget tataatttgg aactcttctg	3120
gaaggtract caggaacacc ctcctgcct gtgcaaagag aaaacaagcg ccttgtttcc	3180
ttcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a	3201

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

ggcaccgcca acacctca

18

<210> 4

[0007]

<211> 18

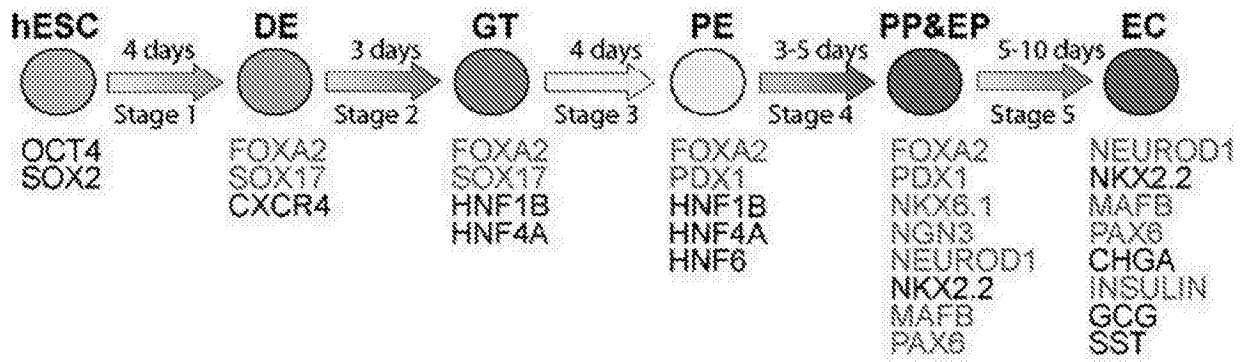
<212> DNA

<213> 人工序列

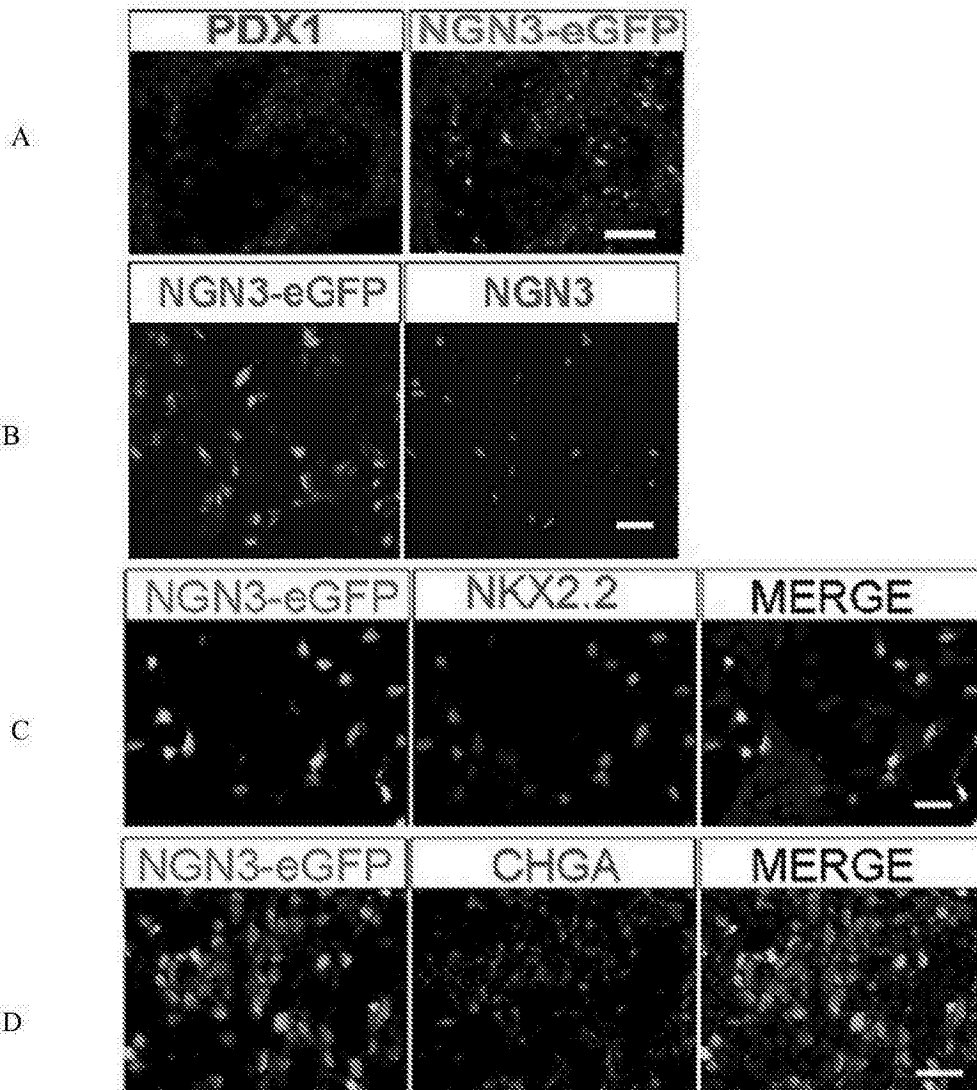
<400> 4

gcgtgggcag cgacttga

18

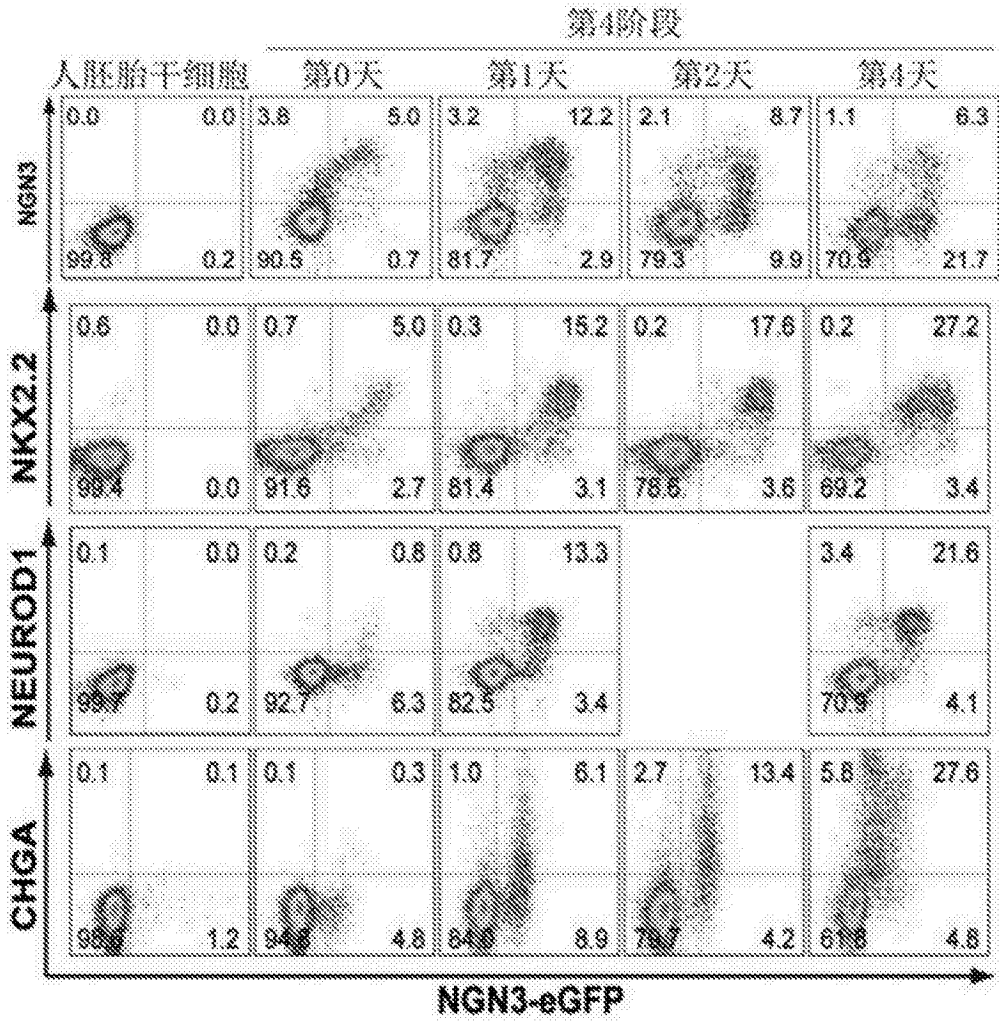


(a)

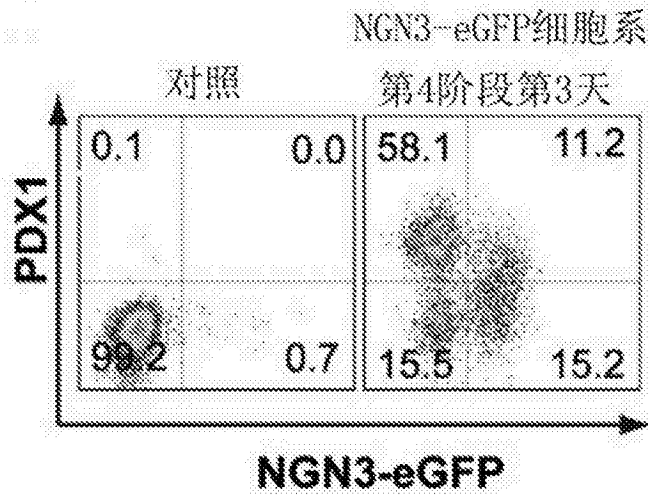


(b)

图 1



(a)



(b)

图 2

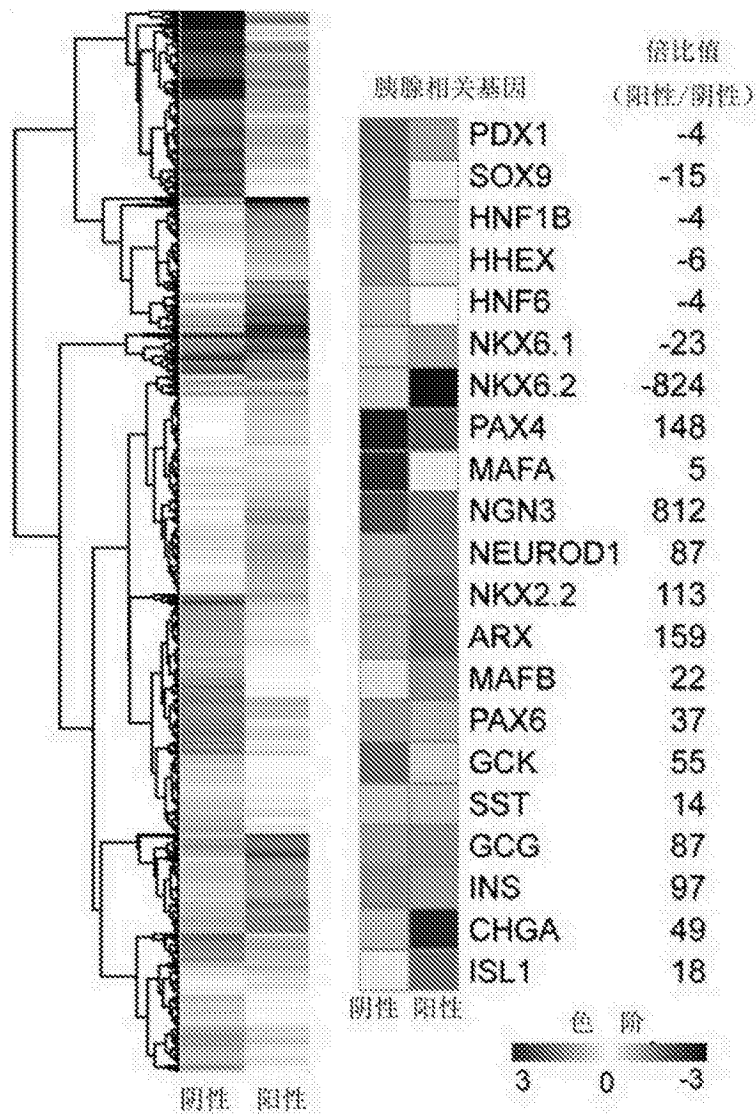
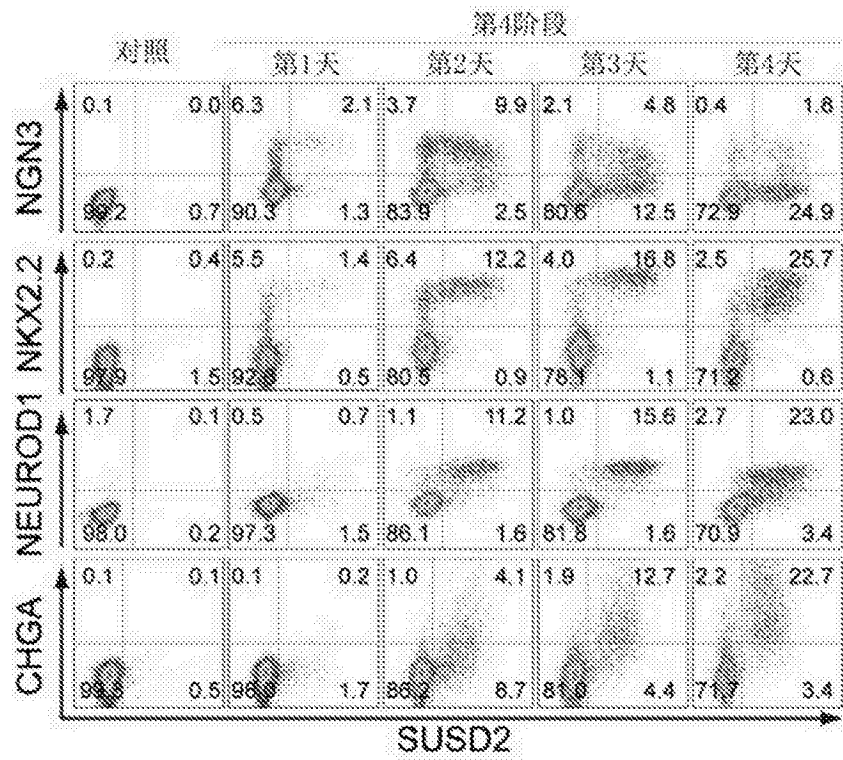


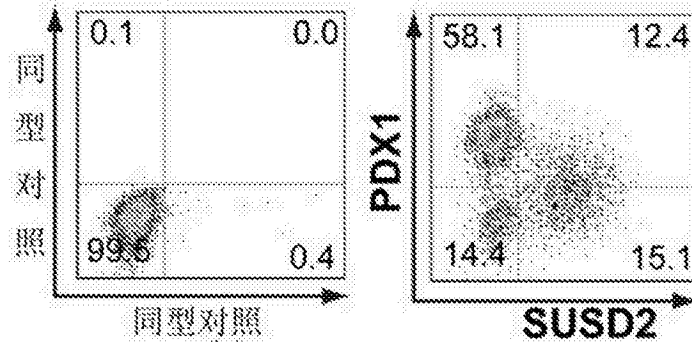
图 3



图 4



(a)



(b)

图 5

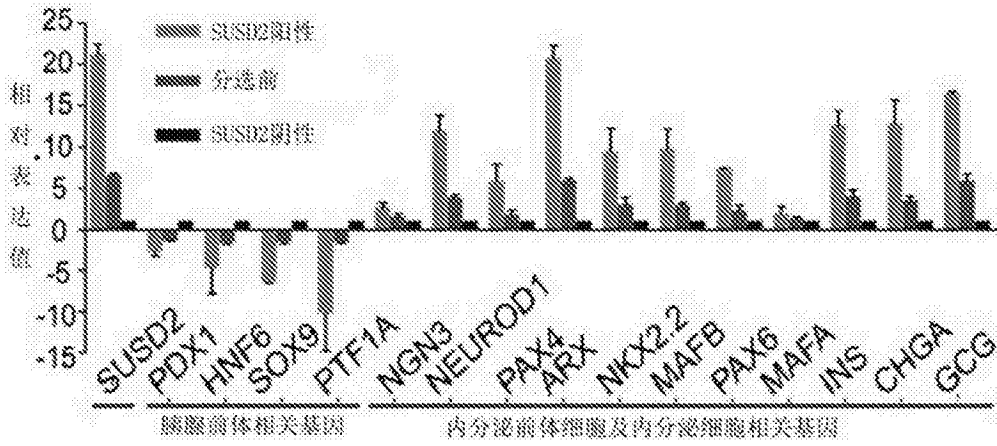
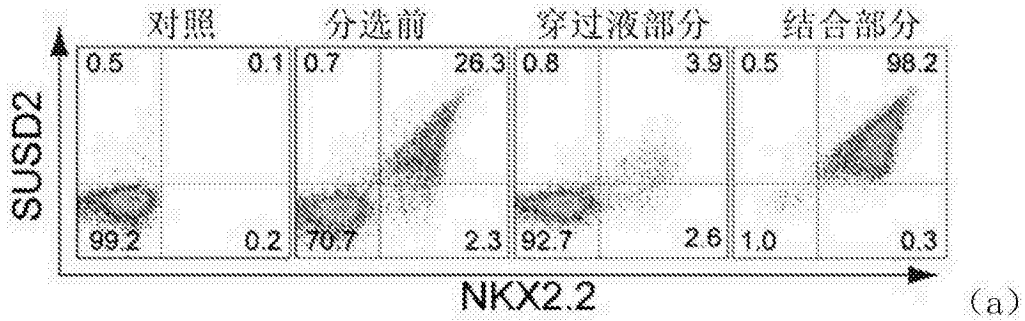
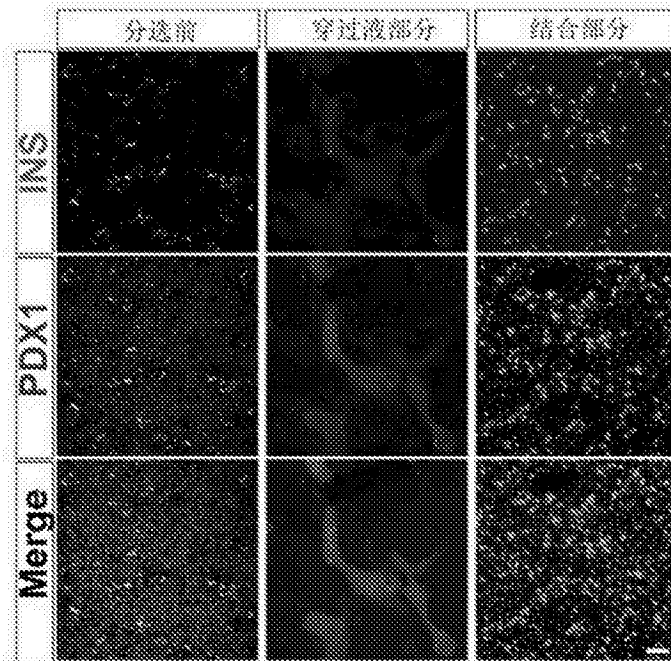


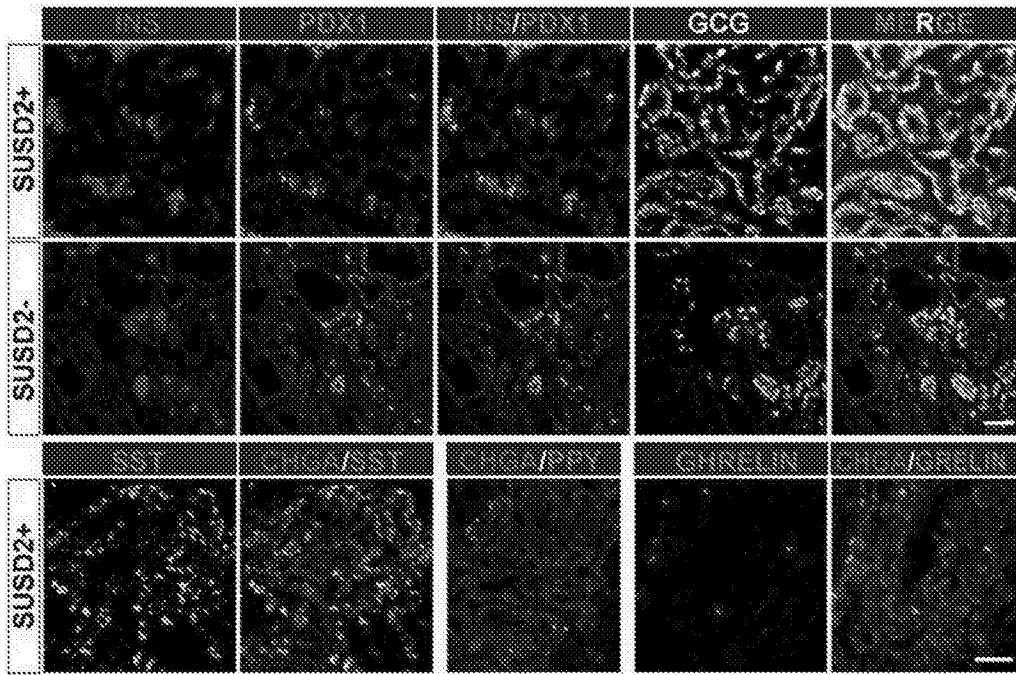
图 6



(a)

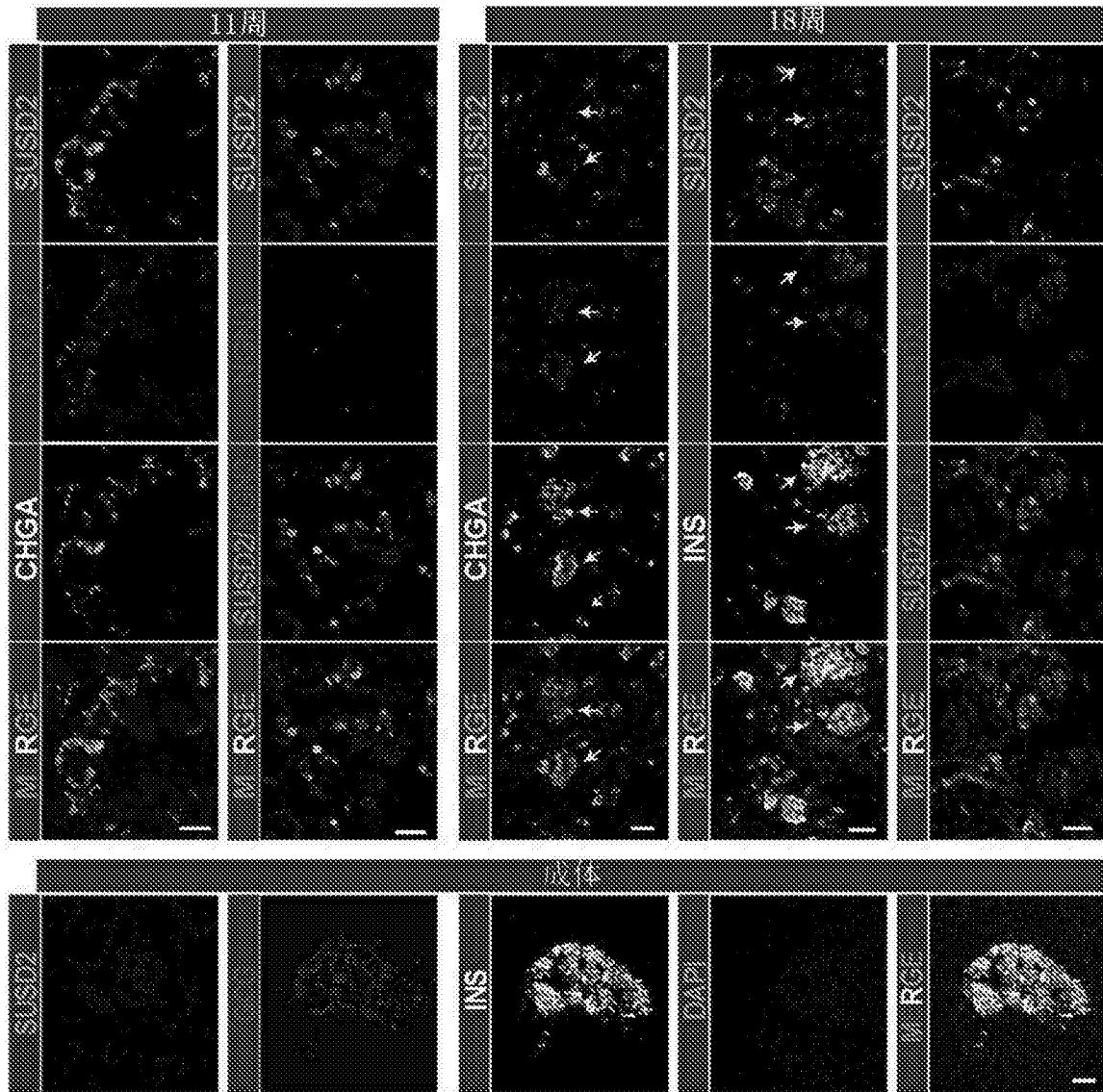


(b)

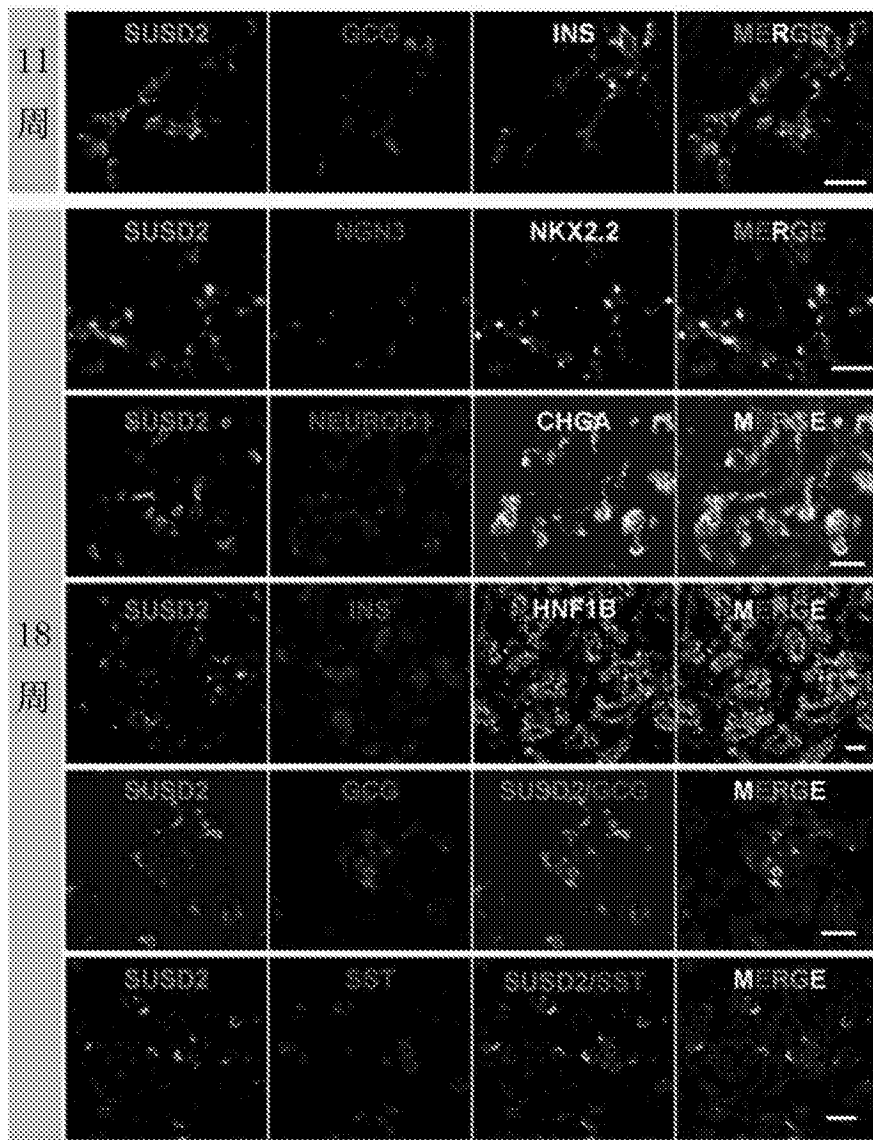


(c)

图 7



(a)



(b)

图 8

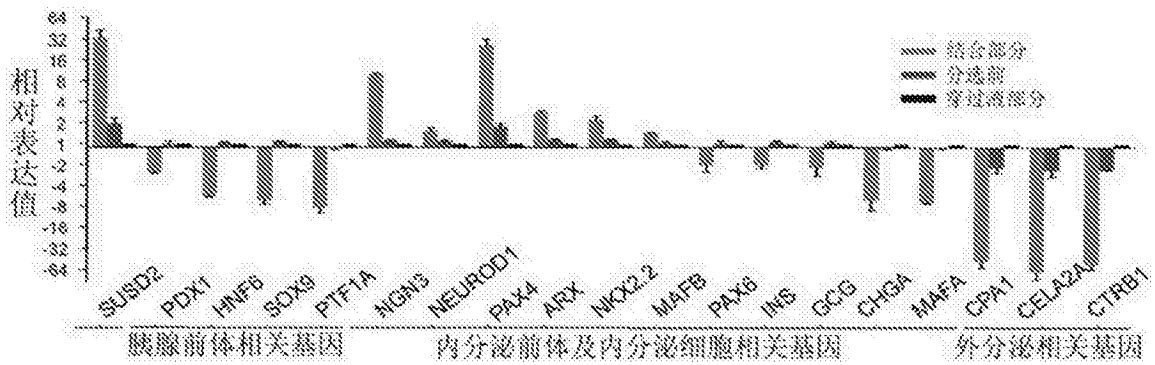


图 9