



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 118166038 B

(45) 授权公告日 2024.08.09

(21) 申请号 202410578467.8

A01K 67/0276 (2024.01)

(22) 申请日 2024.05.10

C12N 15/26 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C12N 15/12 (2006.01)

申请公布号 CN 118166038 A

C12N 15/113 (2010.01)

(43) 申请公布日 2024.06.11

(56) 对比文件

(73) 专利权人 广州明迅生物科技有限责任公司

CN 116064681 A, 2023.05.05

地址 510535 广东省广州市黄埔区开源大

CN 106755115 A, 2017.05.31

道188号十三栋101房(部位:十三栋
601房)

尹媛等.Prkdc和Il2rg双敲除免疫缺陷小鼠的构建和初步应用.南京医科大学学报(自然科学版).2022,第42卷(第8期),第1107-1111页.

(72) 发明人 梁云 林少华 艾婷 戴丽华

审查员 张冲

(74) 专利代理机构 北京睿阳联合知识产权代理

有限公司 11758

专利代理师 王朋飞

(51) Int. Cl.

C12N 15/85 (2006.01)

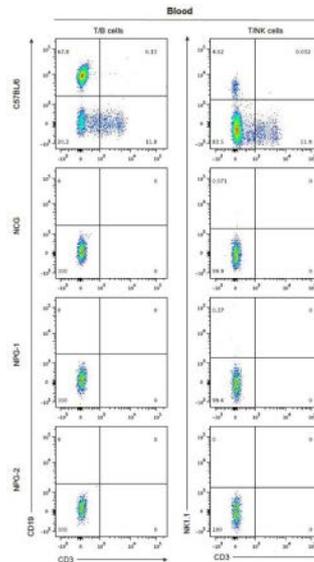
权利要求书2页 说明书8页
序列表(电子公布) 附图1页

(54) 发明名称

免疫缺陷动物模型的构建方法

(57) 摘要

本公开提供了一种免疫缺陷动物模型构建的方法及应用。该方法包括使用CRISPR基因编辑技术获得IL2-rg基因和Prkdc基因敲除的体细胞或受精卵。本公开提供的构建方法能够降低免疫缺陷动物的制备成本,对实现免疫缺陷动物的量产具有重要意义。采用本公开方法制备的免疫缺陷动物可以用于肿瘤模型构建、免疫缺陷疾病药物的筛选和/或评估。



1. 一种免疫缺陷动物模型的构建方法,其特征在于,所述方法包括使用CRISPR/Cas9基因编辑技术获得IL2-rg基因和Prkdc基因敲除的动物体细胞或受精卵,所述动物为小鼠;

所述方法包括:

(1) 分别根据IL2-rg基因的2号外显子和7号外显子、以及Prkdc基因的2号外显子和9号外显子的序列确定打靶位点;

(2) 根据步骤(1)确定的打靶位点设计sgRNA序列;

(3) 将步骤(2)获得的sgRNA和Cas9蛋白导入所述动物的受精卵或体细胞中,获得IL2-rg基因和Prkdc基因敲除的体细胞或受精卵;

其中,根据IL2-rg基因的2号外显子和7号外显子的序列确定2个打靶位点,所述IL2-rg基因的打靶位点的sgRNA包括:

sgRNA1:tagagtacatgaattgcact (SEQ ID NO: 2),

sgRNA2:agttggataaagggtataataa (SEQ ID NO: 4);

根据Prkdc基因的2号外显子和9号外显子的序列确定2个打靶位点,所述Prkdc基因的打靶位点的sgRNA包括:

sgRNA3:aggccttacaagcgggacgt (SEQ ID NO: 9),

sgRNA4:aaaagctgcacattcagccc (SEQ ID NO: 12);

所述免疫缺陷动物模型的基因组不含有IL2-rg基因的2号外显子至7号外显子以及Prkdc基因的2号外显子至9号外显子。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述方法还包括将获得的IL2-rg基因和Prkdc基因敲除的受精卵移植到受体动物的输卵管内,从而制备所述免疫缺陷动物模型;或者,所述方法还包括将获得的IL2-rg基因和Prkdc基因敲除的体细胞的细胞核移植到去核卵母细胞中,然后将核移植后的去核卵母细胞移植到受体动物的输卵管内,从而制备IL2-rg基因和Prkdc基因编辑模型。

3. 打靶载体,所述打靶载体包括针对IL2-rg基因的2号外显子和7号外显子的打靶位点的sgRNA序列和/或针对Prkdc基因的2号外显子和9号外显子的打靶位点的sgRNA序列,以及骨架载体;

所述IL2-rg基因的打靶位点的sgRNA包括:

sgRNA1:tagagtacatgaattgcact (SEQ ID NO: 2),

sgRNA2:agttggataaagggtataataa (SEQ ID NO: 4);和/或

所述Prkdc基因的打靶位点的sgRNA包括:

sgRNA3:aggccttacaagcgggacgt (SEQ ID NO: 9),

sgRNA4:aaaagctgcacattcagccc (SEQ ID NO: 12)。

4. 由权利要求1或2的方法获得的免疫缺陷动物模型的体细胞、组织或器官,所述体细胞、组织或器官不是胚胎。

5. 一种免疫缺陷动物模型的体细胞、组织或器官,其特征在于,所述体细胞、组织或器官不是胚胎;

所述体细胞、组织或器官的基因组不含有IL2-rg基因的2号外显子至7号外显子以及Prkdc基因的2号外显子至9号外显子;和/或

所述体细胞、组织或器官的基因组不含有SEQ ID NO: 17和SEQ ID NO: 18所示的核苷

酸序列。

6. 权利要求1或2所述的方法制备的免疫缺陷动物模型、权利要求4或5所述的体细胞、组织或器官在肿瘤模型构建中的应用。

免疫缺陷动物模型的构建方法

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程领域,具体地涉及一种IL2rg基因和Prkdc基因缺失的免疫缺陷动物模型的构建方法。

背景技术

[0002] 当前,人源化免疫缺陷小鼠模型在新型抗肿瘤药物的筛选、人源细胞和组织移植的研究中发挥着至关重要的作用。NSG小鼠作为目前公认的免疫缺陷程度最高的小鼠,因其具有重度免疫缺陷表型,无成熟T细胞、B细胞和功能性NK细胞,细胞因子信号传递能力缺失等特性,备受科研工作者的青睐。NSG小鼠可用于研究人造血干细胞及外周血单核细胞的移植和生长。

[0003] 现阶段,制备NSG小鼠的方法主要是通过原核显微注射与基因同源重组编辑技术,将受精卵的Prkdc和IL2rg基因敲除,再将受精卵移植到假孕小鼠体内,从而获得NSG小鼠。对于同源重组编辑技术,sgRNA的切割活性的高低是制备NSG小鼠过程中的关键因素,而低的sgRNA切割活性导致了大量时间与资源的浪费,阻碍了其大规模、工业化的生产。

[0004] 因此,需要一种新的制备免疫缺陷小鼠的方法。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种IL2rg基因和Prkdc基因缺失的免疫缺陷动物模型的构建方法及应用。

[0006] 本公开的一个方面提供了一种免疫缺陷动物模型构建的方法,所述方法包括使用CRISPR/Cas9基因编辑技术获得IL2-rg基因和Prkdc基因敲除的体细胞或受精卵。

[0007] 在一些实施方式中,所述方法包括:

[0008] (1) 分别根据IL2-rg基因的2号外显子和7号外显子、以及Prkdc基因的2号外显子和9号外显子的序列确定打靶位点;

[0009] (2) 根据步骤(1)确定的打靶位点设计sgRNA序列;

[0010] (3) 将步骤(2)获得的sgRNA和Cas9蛋白导入所述动物的受精卵或体细胞中,获得IL2-rg基因和Prkdc基因敲除的体细胞或受精卵。

[0011] 在一些实施方式中,根据IL2-rg基因的2号外显子和7号外显子的序列确定2个打靶位点。

[0012] 优选地,所述IL2-rg基因的打靶位点的sgRNA包括:

[0013] sgRNA1:tagagtacatgaattgcact (SEQ ID NO: 2),

[0014] sgRNA2:agttggataaagggtataataa (SEQ ID NO: 4)。

[0015] 在一些实施方式中,根据Prkdc基因的2号外显子和9号外显子的序列确定2个打靶位点。

[0016] 优选地,所述Prkdc基因的打靶位点的sgRNA包括:

[0017] sgRNA3:aggccttacaagcgggacgt (SEQ ID NO: 9),

- [0018] sgRNA4:aaaagctgcacattcagccc (SEQ ID NO: 12)。
- [0019] 在一些实施方式中,所述动物为非人哺乳动物。优选地,所述非人哺乳动物为啮齿类动物。更优选地,所述啮齿类动物为小鼠或大鼠。
- [0020] 在一些实施方式中,所述方法还包括将获得的IL2-rg基因和Prkdc基因敲除的受精卵移植到受体动物的输卵管内,从而制备所述免疫缺陷动物模型。
- [0021] 在一些实施方式中,所述免疫缺陷动物模型为nuNPG小鼠。
- [0022] 在一些实施方式中,所述nuNPG小鼠的构建方法包括如下步骤:
- [0023] (1)对供体雌鼠进行超排卵处理,优选地,在所述供体雌鼠的腹腔依次注射孕马血清和人绒毛膜促性腺激素;
- [0024] (2)将超排卵处理的供体雌鼠与雄鼠合笼,从而获取供体雌鼠的受精卵;
- [0025] (3)将所述sgRNA、Cas9 mRNA或Cas9蛋白利用显微注射方法导入所述受精卵内;
- [0026] (4)将步骤(3)得到的受精卵移植至代孕雌鼠输卵管内,代孕雌鼠生产后,得到nuNPG小鼠。
- [0027] 在一些具体实施方式中,所述nuNPG小鼠的构建方法包括如下步骤:
- [0028] (1)取3-5周龄雌鼠作为超排卵供体,腹腔注射2-8 IU孕马血清,40-60小时后注射2-8 IU人绒毛膜促性腺激素;
- [0029] (2)将步骤(1)处理后的雌鼠与正常雄鼠合笼,次日清晨检查阴道栓,挑选检栓成功的雌鼠取受精卵;
- [0030] (3)将上述sgRNA、Cas9 mRNA或Cas9蛋白利用显微注射方法注入受精卵内;
- [0031] (4)注射后的受精卵移植至代孕雌鼠输卵管内,代孕雌鼠生产后,得到阳性小鼠。
- [0032] 在另一些实施方式中,所述方法还包括将获得的IL2-rg基因和Prkdc基因敲除的体细胞的细胞核移植到去核卵母细胞中,然后将核移植后的去核卵母细胞移植到受体动物的输卵管内,从而制备IL2-rg基因和Prkdc基因编辑模型。
- [0033] 本公开的另一方面提供了一种打靶载体,所述打靶载体包括针对IL2-rg基因的2号外显子和7号外显子的打靶位点的sgRNA序列和/或针对Prkdc基因的2号外显子和9号外显子的打靶位点的sgRNA序列,以及骨架载体。
- [0034] 在一些实施方式中,所述IL2-rg基因的打靶位点的sgRNA包括:
- [0035] sgRNA1:tagagtacatgaattgcact (SEQ ID NO: 2),
- [0036] sgRNA2:agttggataaagggttaataa (SEQ ID NO: 4)。
- [0037] 在一些实施方式中,所述Prkdc基因的打靶位点的sgRNA包括:
- [0038] sgRNA3:aggccttacaagcgggacgt (SEQ ID NO: 9),
- [0039] sgRNA4:aaaagctgcacattcagccc (SEQ ID NO: 12)。本公开的另一方面提供了由上述方法获得的免疫缺陷动物模型的体细胞、组织或器官。
- [0040] 本公开的又一方面提供了一种免疫缺陷动物模型的体细胞、组织或器官,所述体细胞、组织或器官的基因组不含有IL2-rg基因的2号外显子至7号外显子以及Prkdc基因的2号外显子至9号外显子。
- [0041] 在一些实施方式中,所述体细胞、组织或器官的基因组不含有SEQ ID NO: 17和/或SEQ ID NO: 18所示的核苷酸序列。
- [0042] 本发明的又一方面提供了一种引物对组合物在检测所述免疫缺陷动物模型的基

基因组序列的免疫缺陷动物模型中的应用,其中,所述引物对组合物包括如下引物对:

[0043] 针对IL2rg基因的引物对:

[0044] 正向引物:gtgctcactataatgactaaaacga (SEQ ID NO: 11),

[0045] 反向引物:tgactgcactcctggaatgt (SEQ ID NO: 12);和/或

[0046] 针对Prkdc基因的引物对:

[0047] 正向引物:actggctgggattacaaggttc (SEQ ID NO: 13),

[0048] 反向引物:ctttcctccacctctatgctcc (SEQ ID NO: 14)。

[0049] 本公开的又一方面提供了上述方法制备的免疫缺陷动物模型、本发明所述的体细胞、组织或器官在肿瘤模型构建、免疫缺陷疾病药物的筛选和/或评估中的应用。

附图说明

[0050] 图1示出了本公开一些实施方式的nuNPG小鼠表型的流式细胞分边术鉴定结果,其中,C57BL/6为野生型小鼠(阴性对照),NCG为免疫缺陷小鼠(阳性对照),NPG-1和NPG-2为来自实施例3制备的2只nuNPG小鼠。

具体实施方式

[0051] 为使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步的详细说明。此处所描述的具体实施例仅用于解释本发明,并不用于构成对本发明的任何限制。此外,在以下说明中,省略了对公知结构和技术的描述,以避免不必要地混淆本公开的概念。这样的结构和技术在许多出版物中也进行了描述。

[0052] 定义

[0053] 除非另有定义,否则本发明使用的所有技术术语和科技术语都具有如在本发明所属领域中通常使用的相同含义。出于解释本说明书的目的,将应用以下定义,并且在适当时,以单数形式使用的术语也将包括复数形式,反之亦然。

[0054] 除非上下文另有明确说明,否则本文所用的表述“一种”和“一个”包括复数指代。例如,提及“一个细胞”包括多个这样的细胞及本领域技术人员可知晓的等同物等等。

[0055] 本文所用的术语“约”表示其后的数值的 $\pm 20\%$ 的范围。在一些实施方式中,术语“约”表示其后的数值的 $\pm 10\%$ 的范围。在一些实施方式中,术语“约”表示其后的数值的 $\pm 5\%$ 的范围。

[0056] 在本公开中,术语“nuNPG小鼠”是由Prkdc基因及Il2rg基因的敲除突变导致的免疫缺陷型小鼠,其缺乏成熟的T细胞、B细胞以及NK细胞,且不生成免疫球蛋白,树突状细胞(Dendritic cells, DC)功能异常。

[0057] 在本公开中,术语“IL2rg”或“IL-2rg”是指白细胞介素-2受体亚基 γ 。IL2rg位于X染色体上,具有8个外显子,编码369个氨基酸。IL-2受体具有三种形式或链, α 、 β 和 γ ,其参与T细胞介导的免疫响应。

[0058] 在本公开中,术语“Prkdc”是指Prkdc (protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide) 基因,主要编码DNA依赖性蛋白激酶(DNA-PK)的催化亚基,是参与双链DNA断裂修复、免疫球蛋白和T细胞受体可变(V)、多样性(D)、连接(J)区段重组的重要基因。

[0059] 在本公开中,术语“KO”是指基因敲除(knock-out)。

[0060] 在本公开中,术语“sgRNA”是指与靶基因序列互补的、引导Cas9对靶基因进行切割的RNA(single guide RNA)。

[0061] 可使用规律成簇的间隔短回文重复(CRISPR)和CRISPR相关(Cas)系统来修复非人类动物(包括小鼠)中的C5补体成分结构基因。已经在广泛的细菌和古细菌宿主中鉴定了三种类型(I-III)的CRISPR系统,其中每个系统包含一簇CRISPR相关(Cas)基因、非编码RNA和区别性的重复元件阵列(同向重复)。这些同向重复由来源于原型间隔区的外源DNA靶标的短变异序列间隔开,并且一起构成CRISPR RNA(crRNA)阵列。在DNA靶标中,每一原型间隔区与原型间隔区相邻基序(PAM)相关联,可以根据特定的CRISPR系统而有所不同。

[0062] 例如,II型ICRISPR-Cas9系统能在各种真核细胞中进行靶向基因切割和基因剪辑。为了使用CRISPR-Cas9系统来操作基因,可以将天然存在的tracrRNA和crRNA融合成单个合成的“导向RNA”,用于将Cas9引导至几乎任何所需的靶向DNA序列。由于CRISPR-Cas9系统中的核酸内切酶切割特异性是由导向RNA介导的,所以通过改造导向RNA,并将其与Cas核酸内切酶一起递送至靶细胞,其实际上能够对任何基因组的基因座进行编辑。合成的导向RNA与Cas9所识别的特定基序之前的20个核苷酸的DNA序列杂交。这导致在所识别的基序上游三个核苷酸处发生双链断裂。双链断裂可以启动同源性定向修复。因此,CRISPR-Cas9系统可以开发,以利用外源引入的双链或单链DNA修复模板来修正基因组中的突变。本领域技术人员能够改造Cas系统(例如CRISPR-Cas9系统)的导向RNA序列,以靶向非人类动物(包括小鼠)的结构基因,并使用外源引入的双链或单链DNA修复模板来修复结构基因。

[0063] 在本公开中,术语“核酸”、“基因”或“核苷酸”序列是指具有多于一个核苷酸,包括单链、双链、寡核苷酸或多核苷酸的任何形式的RNA或DNA分子。

[0064] 在本公开中,术语“外显子”指基因内的DNA序列以及RNA转录物中的相应序列两者。

[0065] 在本公开中,术语“内含子”是指包含在基因(或表达的感兴趣的多核苷酸序列)中的被转录但不被翻译的任何核酸序列。

[0066] 下面提供实施例和附图以帮助理解本发明。但应理解,这些实施例和附图仅用于说明本发明,但不构成任何限制。本发明的实际保护范围在权利要求书中进行阐述。应理解,在不脱离本发明精神的情况下,可以进行任何修改和改变。

[0067] 实施例1:IL-2rg基因和Prkdc基因sgRNA的设计

[0068] (1) IL2-rg基因的sgRNA设计

[0069] IL2-rg基因(GenbankID:16186)在其2号外显子和7号外显子分别设计的打靶位点的sgRNA包括:

[0070] IL2-rg-E2-sgRNA1:ccaacctcacgctgcactat (SEQ ID NO: 1)

[0071] IL2-rg-E2-sgRNA2:tagagtacatgaattgcact (SEQ ID NO: 2)

[0072] IL2-rg-E7-sgRNA1:ggaagctagaggttccatgc (SEQ ID NO: 3)

[0073] IL2-rg-E7-sgRNA2:agttggataaagggttaataa (SEQ ID NO: 4)

[0074] 针对以上sgRNA序列在公司(金斯瑞)直接合成sgRNA粉末,用无Rnase水溶解成50 μ M RNA悬液。

[0075] (2) IL2-rg基因的sgRNA切割效率检测

[0076] C57BL6/J小鼠胚胎干细胞(mESC)从液氮中复苏,在6cm培养皿中培养生长3天,每天更换含15%胎牛血清的mESC培养基(Gibco)。用300 μ l 0.25%胰酶消化1-2min使其成为单细胞,用1ml 培养基终止消化,收集细胞液至1.5mlEP管中,250g离心5分钟,弃掉上清后培养基重悬细胞。以10万mESC/24孔板每孔种至相应24孔板内。将Cas9蛋白(NEB0646)、相应的sgRNA用lipo3000进行孵育转染,具体步骤如下,分别按照表1和表2配置Mix1和Mix2:

[0077] 表1

Mix1 试剂	用量
opti-MEM medium (Gibco)	50 μ l
lipofectamine 3000 转染试剂 (ThermoFisher)	3 μ l

[0079] Mix1用枪先吹打20-30下混匀,静置5分钟。

[0080] Mix2: (RNP) 常温孵育10min。

[0081] 表2

Mix2 试剂	用量
opti-MEM medium	50 μ l
Cas9 (10pmol)	0.5 μ l (母液浓度: 20 μ M)
sgRNA (30pmol)	0.6 μ l (母液浓度: 50 μ M)

[0083] 最后将mix1缓慢滴加到mix2中,用枪吹打40-50下混匀,不能产生气泡,静置15min。将混合液逐滴加入到24孔板孔内。摇匀后放回培养箱转染后6-10h(一般8h)后换液,48h后收取细胞进行基因组提取。用对应的引物进行PCR扩增目的片段,将PCR产物进行送测,检测切割效率。

[0084] PCR反应体系(使用诺唯赞Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase)见表3:

[0085] 表3.PCR反应体系

试剂	用量
2xPhanta Max Buffer	25 μ L
dNTP Mix	1 μ L
上游引物 (10 μ M)	2 μ L
下游引物 (10 μ M)	2 μ L
Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase	1 μ L
模板	1 μ L
H2O	补至 50 μ L

[0087] PCR扩增反应条件见下表4:

[0088] 表4

循环数	温度	时间
1	95°C	3min
32	95°C	30s
	60°C	30s
	72°C	30s
1	72°C	5min
1	4°C	-

[0090] PCR所需引物序列如下:

[0091] IL2rg-E2-F:gtgctcactataatgactaaaacga (SEQ ID NO: 5)

[0092] IL2rg-E2-R:cctggagctggacaacaaat (SEQ ID NO: 6)

[0093] IL2rg-E7-F: cttgtttgcactggaagctg (SEQ ID NO: 7)

[0094] IL2rg-KO-R: accactccaggcctaaagac (SEQ ID NO: 8)

[0095] 将PCR产物送测结果进行编辑效率分析,统计结果如表5所示。针对IL2rg基因外显子2号以及外显子7号,IL2-rg-E2-sgRNA2和IL2-rg-E7-sgRNA2分别具有更高的切割效率。

[0096] 表5. IL2rg sgRNA效率检测结果

SgRNA 名称	sgRNA 序列(5'to3')	PCR 引物	Indel%
IL2-rg-E2-sgRNA1	ccaacctcacgctgcactat (SEQ ID NO: 1)	IL2rg -E2-F +IL2rg-E2-R	3%
IL2-rg-E2-sgRNA2	tagagtacatgaattgcact (SEQ ID NO: 2)	IL2rg -E2-F +IL2rg-E2-R	21%
IL2-rg-E7-sgRNA1	ggaagctagaggttccatgc (SEQ ID NO: 3)	IL2rg -E7-F +IL2rg-KO-R	12%
IL2-rg-E7-sgRNA2	agttggataaaggtaataa (SEQ ID NO: 4)	IL2rg -E7-F +IL2rg-KO-R	51%

[0098] (3) Prkdc基因的sgRNA设计

[0099] 所述针对Prkdc基因 (Genbank ID:19090) 的2号外显子和9号外显子分别设计的靶位点的sgRNA包括:

[0100] Prkdc-E2-sgRNA3:aggccttacaagcgggacgt (SEQ ID NO: 9)

[0101] Prkdc-E2-sgRNA5:tctctgtttttgtatagata (SEQ ID NO: 10)

[0102] Prkdc-E9-sgRNA4:ctaaagtacgtctcagga (SEQ ID NO: 11)

[0103] Prkdc-E9-sgRNA6:aaaagctgcacattcagccc (SEQ ID NO: 12)

[0104] 针对以上sgRNA序列在公司直接合成sgRNA粉末,用无Rnase水溶解成50μM RNA悬液。

[0105] (4) Prkdc基因的sgRNA切割效率检测

[0106] 采用与IL2-rg基因的sgRNA切割效率检测方法相同的方法检测Prkdc基因的sgRNA切割效率。

[0107] PCR所需引物序列如下：

[0108] Prkdc-WT-F:actggctgggattacaaggttc (SEQ ID NO: 13)

[0109] Prkdc-E2-R:aagatTTTTgttccacaaagatgc (SEQ ID NO: 14)

[0110] Prkdc-E9-F:tggcctacgattacttaccctg (SEQ ID NO: 15)

[0111] Prkdc-KO-R:ctttcctccacctctatgctcc (SEQ ID NO: 16)

[0112] 将PCR产物送测结果进行编辑效率分析,统计结果如表6所示。针对Prkdc基因外显子2号以及外显子9号,Prkdc-E2-sgRNA3和Prkdc-E9-sgRNA6分别具有更高的切割效率。

[0113] 表6. PrkdcsgRNA效率检测结果

SgRNA 名称	sgRNA 序列(5'to3')	PCR 引物	Indel%
[0114] Prkdc-E2-sgRNA3	aggccttacaagcgggacgt (SEQ ID NO: 9)	Prkdc-WT-F +Prkdc-E2-R	64%
Prkdc-E2-sgRNA5	tctctgtttttgtatagata (SEQ ID NO: 10)	Prkdc-WT-F +Prkdc-E2-R	50%
Prkdc-E9-sgRNA4	Ctaaagtacctgtctcagga (SEQ ID NO: 11)	Prkdc-E9-F +Prkdc-KO-R	19%
Prkdc-E9-sgRNA6	aaaagctgcacattcagccc (SEQ ID NO: 12)	Prkdc-E9-F +Prkdc-KO-R	21%

[0115] 实施例2:原核显微注射

[0116] 选取3-5周龄NOD雌鼠作为超排卵供体,腹腔注射5 IU孕马血清(PMSG)。48小时后,再注射5 IU人绒毛膜促性腺激素(HCG)。注射HCG后,每只雌鼠置于一个单独饲养的正常NOD雄鼠笼中,第二天早上检查阴道栓。然后用颈椎脱臼法处死供体雌鼠,将完整的输卵管剪下,置于含有0.3 mg/mL透明质酸酶的M2培养液(M7167,Sigma-Aldrich)中。在解剖镜下找出隆起的壶腹部,并用镊子将其撕破。将去除颗粒细胞的受精卵转移到M16培养液中,然后置于37℃、5% CO₂的培养箱中培养。

[0117] 挑选有双核且形态良好的合子,将实施例1获得的优选的效率高的sgRNA 90pmol(金斯瑞)以及Cas9蛋白30pmol(NEB0646)注射到NOD受精卵核中。其中,针对IL2rg基因选用IL2-rg-E2-sgRNA2和IL2-rg-E7-sgRNA2;针对Prkdc基因选用Prkdc-E2-sgRNA3和Prkdc-E9-sgRNA6。

[0118] 代孕雌鼠称重后,按麻药浓度腹腔注射麻药。将小鼠置于9mm塑料培养皿的盖子上待小鼠完全麻醉,将需输送的受精卵吸入移植管,吸入受精卵前先在移植管中吸入一个小气泡,然后吸入M2培养液(M7167,Sigma-Aldrich)、受精卵,在末端再吸入一个小气泡,将移植管挂在体视镜上备用。消毒麻醉的雌鼠,沿背中线从最后肋骨开始用剪刀在皮肤上剪开一个小口。用70%乙醇擦拭创口及毛发,通过平行或垂直于脊柱的一个背部切口可以接触到两侧的输卵管和卵巢。用显微操作镊在靠近输卵管的体壁上开口,用镊子夹出脂肪垫并将输卵管、卵巢暴露在体腔外并用小弹簧夹固定。在体视镜下找到输卵管开口(伞部),调整好小鼠及输卵管的位置,撕开卵巢囊。一手用显微注射镊提起输卵管一手用显微注射镊提起

输卵管伞部开口,另一手将移植管插入到伞部开口中并将受精卵送入,若在输卵管内看到气泡则说明移植成功。松开弹簧夹并把输卵管及卵巢送入体内,缝合体壁及皮肤创口。术后将小鼠放在干净的笼盒中并保温待其完全清醒后放回笼架上。

[0119] 实施例3:nuNPG小鼠基因型鉴定

[0120] 在实施例2获得的代孕雌鼠生产后,待仔鼠长至两周龄,剪取0.5cm左右的鼠脚趾进行基因组提取并鉴定。利用PCR技术检验小鼠体细胞中的IL-2rg基因和Prkdc基因是否被敲除。

[0121] 其中,对于IL2rg基因,使用实施例1中的IL2rg-E2-F和IL2rg-E2-R引物对判断为野生型(WT)小鼠;使用实施例1中的IL2rg-E2-F和IL2rg-KO-R引物对来判断IL2rg基因敲除小鼠。对于Prkdc基因,使用实施例1中的Prkdc-WT-F和Prkdc-E2-R引物对判断为野生型(WT)小鼠;使用实施例1中的Prkdc-WT-F和Prkdc-KO-R引物对来判断Prkdc基因敲除小鼠。

[0122] 根据鼠趾PCR鉴定结果统计,采用本公开的构建方法得到的34只小鼠中,IL2rg^{-/-}Prkdc^{-/-}小鼠共16只,验证了本公开的方法能够成功制备nuNPG小鼠。

[0123] 经过测序表明,其中,IL2rg^{-/-}Prkdc^{-/-}小鼠的基因组不含有IL2-rg基因的2号外显子至7号外显子以及Prkdc基因的2号外显子至9号外显子。其中,IL2rg^{-/-}Prkdc^{-/-}小鼠中,IL2rg基因缺失的序列如SEQ ID NO: 17所示,Prkdc基因缺失的序列如SEQ ID NO: 18所示。

[0124] 实施例4:nuNPG小鼠表型鉴定

[0125] 获得的IL2rg与Prkdc基因缺失nuNPG小鼠具有免疫系统不健全的病理表型,会引起小鼠免疫系统的紊乱(即:无发育成熟的T、B细胞、NK细胞),对于确认品系制作有效性至关重要。以流式细胞分选术检测小鼠免疫指标(主要为T/B/NK细胞),判定小鼠的免疫系统指标。从雄性 C57BL/6小鼠和实施例3制备的nuNPG小鼠(n=3, 8 周龄)中分离外周血淋巴细胞,经裂解红细胞、Fc受体阻断后,细胞用CD45 (biolegend,103101)/CD3 (Biolegend, 100205)/CD19 (Biolegend,152407)/NK1.1 (Biolegend,156503)抗体染色,进行流式细胞术分析(外周血白细胞FACS鉴定(所有细胞均为CD45+);B细胞:CD3-CD19+;T细胞:CD3+CD19-;T细胞:CD3+ NK1.1-;NK:CD3-NK1.1+)。

[0126] 结果如图1所示,相比于C57BL/6小鼠,nuNPG小鼠的外周血中,没有发现T细胞、B细胞,NK细胞比正常野生型小鼠明显缺失。这表明本发明构建的nuNPG小鼠具有严重的免疫缺陷生理特征。

[0127] 本发明的技术方案不限于上述具体实施例的限制,凡是根据本发明的技术方案做出的技术变形,均落入本发明的保护范围之内。

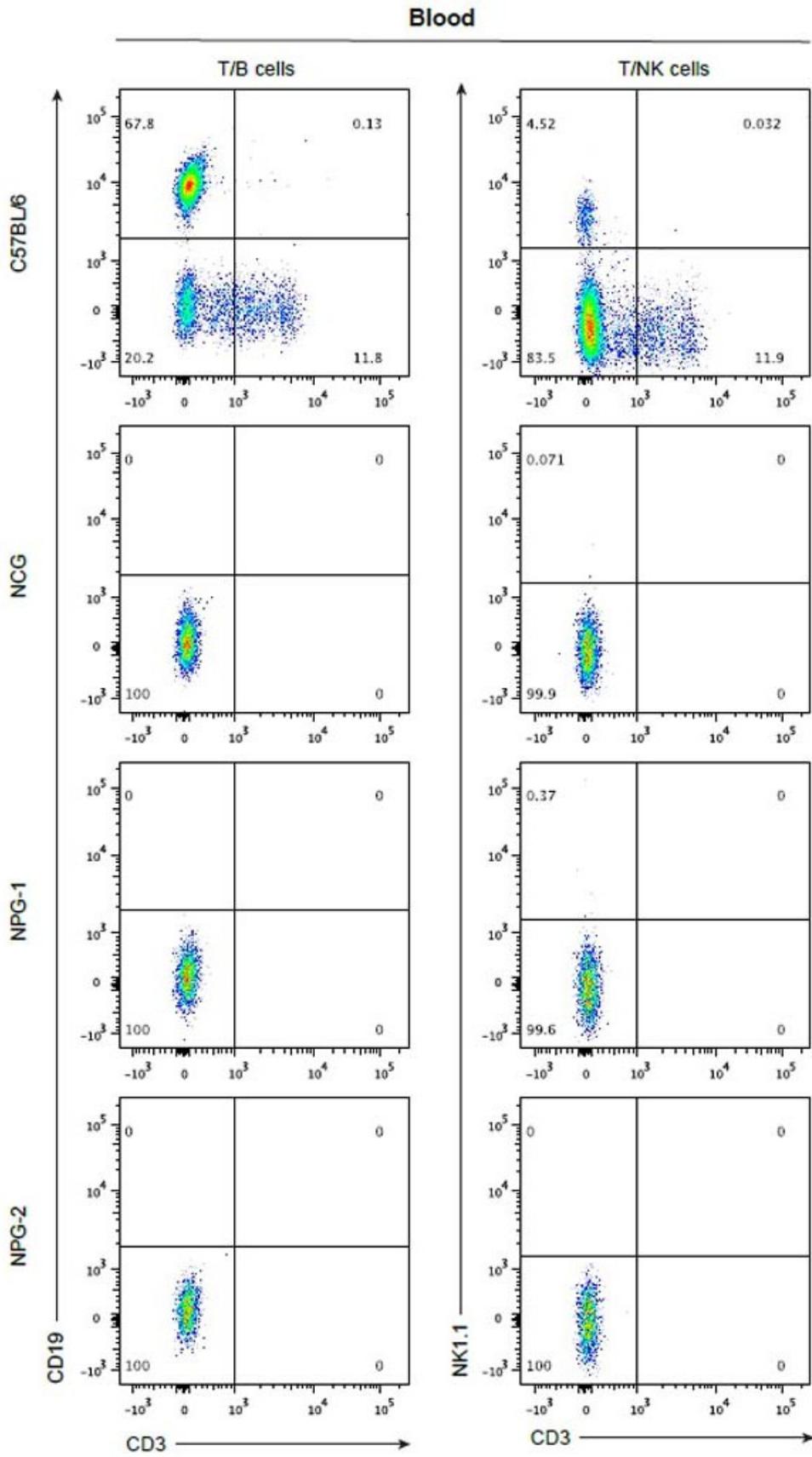


图 1