



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1248288 B

(45) 授权公告日 2011.11.09

(21) 申请号 98802794.1

(22) 申请日 1998.01.05

(30) 优先权数据

08/781,752 1997.01.10 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

1999.08.24

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US1998/000002 1998.01.05

(87) PCT申请的公布数据

W098/30683 EN 1998.07.16

(73) 专利权人 马萨诸塞大学, 马萨诸塞州高等教育公立研究所

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 S·L·丝泰斯 J·西伯利 J·罗布

P·高鲁克 F·A·旁丝德莱昂

D·J·杰里

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 樊卫民

(51) Int. Cl.

C12N 15/00(2006.01)

A01K 67/027(2006.01)

C12N 5/06(2006.01)

(56) 对比文件

WO 9607732 A1, 1996.03.14, 全文.

WO 9516770 A1, 1995.06.22, 全文.

WO 9517500 A1, 1995.06.29, 全文.

审查员 李岚

权利要求书 1 页 说明书 14 页

(54) 发明名称

用分化胎儿和成年供体细胞进行的核转移

(57) 摘要

提供了一种改进了的核转移方法,其涉及将供体分化的细胞核转移到与供体细胞属于相同种类的去核卵母细胞中。获得的核转移单位可以通过产生胎儿和后代用于基因型和转基因基因型的增殖,并可用于制备同基因系 CICM 细胞,包括人类同基因系胚胎或干细胞。由于供体核的分化细胞来源可以进行遗传修饰和克隆增殖,可用本方法促进基因工程的或转基因的哺乳动物胚胎、胎儿和后代的产生。

1. 一种获得活化的牛胚胎核转移单位 (NT) 的方法, 包括:
 - (i) 在适合于核转移 (NT) 单位形成的条件下, 将所需的正在增殖的分化的牛成纤维细胞或细胞核插入到去核的牛卵母细胞;
 - (ii) 活化得到的核转移单位; 和
 - (iii) 培养该活化的核转移单位直到超过两细胞发育期。
2. 根据权利要求 1 的方法, 其中目的 DNA 在所述分化的牛成纤维细胞或细胞核中被插入、移出或被修饰, 因此得到遗传改变的 NT 单位。
3. 根据权利要求 1 的方法, 其中分化的牛成纤维细胞或细胞核衍生自中胚层。
4. 根据权利要求 1 的方法, 其中分化的牛成纤维细胞或细胞核衍生自外胚层。
5. 根据权利要求 1 的方法, 其中分化的牛成纤维细胞或细胞核衍生自内胚层。
6. 根据权利要求 1 的方法, 其中分化的牛成纤维细胞或细胞核为成年细胞或细胞核。
7. 根据权利要求 1 的方法, 其中分化的牛成纤维细胞或细胞核为胚胎细胞或胎儿细胞或细胞核。
8. 根据权利要求 1 的方法, 其中去核牛卵母细胞在去核前已经成熟。
9. 根据权利要求 1 的方法, 其中融合的核转移单位通过接触离子霉素和 6-二甲氨基嘌呤而被活化。
10. 根据权利要求 2 的方法, 其中用显微注射注入异源 DNA。
11. 根据权利要求 2 的方法, 其中用电穿孔注入异源 DNA。
12. 根据权利要求 1 的方法, 其还包括将克隆的 NT 单位与受精胚胎结合以得到嵌合胚胎。
13. 一种制备 CICM(培养的内细胞团) 细胞系的方法, 包括:
 - (i) 在适合于核转移 (NT) 单位形成的条件下, 将所需的正在增殖的分化的牛成纤维细胞或细胞核插入去核的牛卵母细胞;
 - (ii) 活化得到的核转移单位;
 - (iii) 培养该活化的核转移单位直到超过两细胞发育期; 和
 - (iv) 培养获自该培养的 NT 单位的细胞以得到 CICM 细胞系。
14. 一种根据权利要求 13 的方法获得的 CICM 细胞系。
15. 根据权利要求 13 的方法, 其中目的 DNA 在该分化的牛成纤维细胞或细胞核中被插入、移出或被修饰, 因此导致遗传改变的 NT 单位产生。
16. 一种根据权利要求 15 获得的转基因 CICM 细胞系。
17. 权利要求 13 的方法, 其中得到的 CICM 细胞系被诱导至分化。
18. 按照权利要求 17 的方法得到的分化的牛细胞。
19. 一种获得活化的牛核转移单位的方法, 包括:
 - (i) 在适合于核转移 (NT) 单位形成的条件下, 将所需的增殖的分化的权利要求 14 的 CICM 细胞或细胞核插入去核的牛卵母细胞;
 - (ii) 活化得到的核转移单位; 和
 - (iii) 培养该活化的核转移单位直到超过两细胞发育期。

用分化胎儿和成年供体细胞进行的核转移

1 发明领域

[0001] 本发明涉及一种克隆方法,通过该方法将来自分化的哺乳动物胎儿或成年细胞的细胞核作为供体核移植入与供体核属于相同种类的去核哺乳动物卵母细胞中。细胞核经重新编程可完成克隆胚胎的发育,其可再被转移到雌性受体来产生胎儿及后代,或用于制备培养的内细胞团细胞(CICM)。也可将克隆胚胎与受精胚胎结合形成嵌合胚胎、胎儿和/或后代。

2 发明背景

[0003] 可从早先预移植的小鼠胚胎中体外获得胚胎干细胞系(ES)的方法已公知。(见如,Evans等人,自然(Nature),29:154-156(1981);Martin美国国家科学院院报(Proc. Natl. Acad. Sci., USA),78:7634-7638(1981))。在成纤维饲喂层细胞(Evans等人,出处同前)或分化抑制剂存在(Smith等人,发育生物学(Dev. Biol.)121:1-9(1987))的情况下,ES细胞可以以未分化状态传代。

[0004] 曾有报道表明ES细胞有许多用途。例如,曾报道ES细胞可作为体外分化模型来研究尤其是参与早期发育调节的基因。将小鼠ES细胞导入预移植的小鼠胚胎可产生种系嵌合体,并表现出其多能性(Bradley等人,自然,309:255-256)。

[0005] 由于ES细胞可将其基因组传至下一代,通过使用经过或未经过期望的遗传修饰的ES细胞,ES细胞具有可进行家畜的种系操作的潜在用途。另外,对家畜如有蹄类而言,来自如预移植家畜胚胎的核可支持去核卵母细胞发育至足月(Smith等人,生殖生物学(Biol. Reprod.),40:1027-1035(1989);和Keefe等人,生殖生物学,50:935-939(1994))。与之不同的是,来源于超过转移后8细胞期的小鼠胚胎的核并不支持去核卵母细胞的发育(Cheong等人,生殖生物学,48:958(1993))。因此家畜的ES细胞很合乎需要,因为不论是否经过遗传操作,它们可以为核转移方法提供全能的供体核来源。

[0006] 一些研究小组报道了据称是多能胚细胞系的分离。例如,Notarianni等人,受精生殖学杂志增刊(J. Reprod. Fert. Suppl.),43:255-260(1991),报道了据称来自猪和羊囊胚泡的稳定多能细胞系的建立过程,该细胞系的形态与生长特性均与用免疫外科方法自羊囊胚泡中分离的内细胞群原代培养物中的细胞类似。Notarianni等人,受精生物学杂志增刊,41:51-56(1990)也公开了来自猪囊胚泡的公认的多能胚细胞系培养过程中的维持与分化现象。Gerfen等人,动物生物技术(Anim. Biotech),6(1):1-14(1995)公开了源自猪囊胚泡的胚细胞系的分离。在没有使用条件培养基的情况下,这些细胞可在小鼠胚胎的成纤维细胞饲喂层上稳定维持,并且据报道在培养过程中分化成不同的细胞类型。

[0007] 另外,Saito等人,Roux's Arch. Dev. Biol.,201:134-141(1992)报道,培养的牛胚胎干细胞样细胞系存活了三代,在第四次传代后死亡。Handyside等人,Roux发育生物学文献,196:185-190(1987)公开了用免疫外科方法分离的羊胚胎内细胞群在允许来自小鼠ICM的小鼠ES细胞系分离的条件下的培养。Handyside等人报道在上述条件下,羊ICM贴附、扩展并发育成ES细胞样细胞和内胚层样的细胞,但延长培养后仅可见到内胚层样细胞。

[0008] 最近,Cherny 等人,动物基因学 (Theriogenology),41 :175(1994) 报道,牛多能原始生殖细胞衍生的细胞系可在长期培养中维持。培养约 7 天后,这些细胞可产生碱性磷酸酶 (AP) 染色阳性的 ES 样集落,表现出可形成胚状体,并自发分化成至少两种不同的细胞类型的能力。据报道这些细胞还可表达转录因子 OCT4、OCT6 和 HES1 的 mRNA,这是据认为只被 ES 细胞表达的同源异型框基因的模式。

[0009] 最近, Campbell 等人,自然,380 :64-68(1996) 报道,在可促进小鼠中 ES 细胞系分离的条件下,自培养第九天的绵羊胚中培养的胚盘 (ED) 细胞进行核转移后,可产生活羊羔。作者认为来自第九天羊胚的 ED 细胞通过核转移获得了全能性,并在培养中保持了全能性。

[0010] Van Stekelenbueg-Hamers 等人,分子生殖发育 (Mol. Reprod. Dev) 40 :444-454(1995),报道了据称源自牛囊胚泡内细胞团细胞的永久细胞系的分离与表征。作者在不同条件下自 8 或 9 天牛囊胚泡中分离、培养了 ICM,以确定支持牛 ICM 细胞贴壁和生长的最佳饲喂细胞和培养基。他们得出结论认为,使用 STO(小鼠成纤维细胞)饲喂细胞(而不是牛子宫上皮细胞)和将经活性炭过滤的血清(而不是正常血清)补至培养基中后,可提高培养的 ICM 细胞的贴壁及生长能力。然而 VanStekelenburg 等人报道,他们的细胞系更像上皮细胞而不是多能 ICM 细胞。

[0011] Smith 等人,WO 94/24274(1994 年 10 月 27 日公开)、Evans 等人,WO 90/03432(1990 年 4 月 5 日公开)和 Wheeler 等人,WO 94/26889(1994 年 11 月 24 日公开)报道了据称可用来获得转基因动物的动物干细胞的分离、筛选和增殖方法。Evans 等人也报道了可用于生产转基因动物的来自猪和牛的据称是多能胚胎干细胞的获得方法。另外,Wheeler 等人,WO 94/26884(1994 年 11 月 24 日公开)公开了据称可用于生产嵌合和转基因有蹄动物的胚胎干细胞。

[0012] 因此根据前述,例如因为它们它们在克隆或转基因胚胎的生产中及在核移植中有潜在应用价值,很显然许多小组已尝试培养 ES 细胞系。

[0013] 也有将有蹄动物内细胞团 (ICM) 细胞用于核移植的报道。例如, Collas 等人,分子生殖发育,38 :264-267(1994) 公开了通过将裂解的供体细胞显微注射入去核的成熟卵母细胞中进行牛 ICM 的核转移。Collas 等人公开了体外培养胚胎 7 天以产生 15 个囊胚泡,囊胚泡转移到牛体内后 4 只怀孕 2 只产仔。同样, Keefer 等人,生殖生物学,50 :935-939(1994) 公开了在核转移方法中可用牛 ICM 细胞作为供体核产生囊胚泡,再将囊胚泡移植入受体牛内产生多个活的后代。另外, Sims 等人,美国国家科学院院报,90 :6143-6147(1993) 公开了将体外短期培养的牛 ICM 细胞的核转移入成熟去核卵母细胞中产生牛犊。

[0014] 也有报道称将培养的胚盘细胞进行核转移后可以产生活羊羔 (Campbell 等人,自然,380 :64-68(1996))。还有报道称,将牛的多能胚胎细胞用于核转移并产生嵌合胎儿。(Stice 等人,生殖生物学,54 :100-110(1996);Collas 等人,分子生殖发育,38 :264-267(1994))。Collas 等人证明在克隆牛的技术中可用颗粒细胞(成年细胞)来产生胚胎。但是未见关于经过胚胎早期阶段后(囊胚泡期)的发育的报道。而且,颗粒细胞不易培养并且只能从雌性获得。Collas 等人没有尝试去扩增培养的颗粒细胞或对其进行遗传修饰。

[0015] 虽然用胚胎细胞作为供体可以进行基因型的复制,现存的方法存在一些问题。例如,用现存方法只能用有限数量的胚胎供体核(少于100)或与体外细胞系进行胚胎克隆。直到克隆动物长至成年才能知道该胚胎基因组是否编码了优良基因型。

[0016] 在转基因哺乳动物的生产领域也存在着一些问题。用现有的方法将异源DNA导入早期胚胎或胚细胞系后,其在胎儿期分化成许多细胞类型并最终发育成转基因动物。但是,产生一个转基因动物需要许多早期胚胎,因此上述方法效率很低。再者,也没有简单有效的方法以在将胚胎植入代理母体而花费时间和金钱之前对转基因胚胎进行筛选。另外用早期胚胎转基因方法不易实施基因打靶(gene targeting)技术。

[0017] 使用小鼠胚胎干细胞使得研究者筛选转基因细胞和进行基因打靶成为可能。较其它的转基因技术可以进行更多的遗传操作。可是,胚胎干细胞系和其它的胚细胞系须在未分化状态下维持,该状态需要有饲喂细胞层和/或补加细胞因子至培养基中。即使在这些预防措施存在的情况下,这些细胞常常进行自发分化,无法用现有方法用它们产生转基因后代,而且有些胚细胞系必须以不可进行基因打靶技术的方式增殖。

[0018] 因此,尽管目前文献中已报道了诸多方法,仍需改进的克隆哺乳动物细胞的方法。

[0019] 发明目的及概述

[0020] 本发明目的之一是提供新的改进方法用以产生克隆的哺乳动物细胞。

[0021] 本发明更具体的一个目的是提供一种克隆哺乳动物细胞的新方法,包括将分化的哺乳动物细胞核移植入属于相同种类的去核卵母细胞中。

[0022] 本发明另一目的是提供一种方法来繁殖已证明有遗传优势或其它所需特性的成年哺乳动物。

[0023] 本发明另一目的是提供一种改进的方法来产生经遗传操作的或转基因哺乳动物(即:胚胎、胎儿、后代)。

[0024] 本发明一个更具体的目的是提供一种方法来产生经遗传操作的或转基因哺乳动物,通过该方法在用分化细胞或用细胞核形成NT单位之前,在分化的哺乳动物细胞或细胞核中将目的基因插入、移出或在其中进行修饰。

[0025] 本发明另一目的是提供经遗传操作或转基因的哺乳动物(即:胚胎、胎儿、后代),方法是由将分化细胞的核移植入与分化细胞属于相同种类的去核卵母细胞中。

[0026] 本发明另一目的是提供产生哺乳动物CICM细胞的新方法,包括将已分化细胞的核移植入与该分化细胞属于相同种类的去核卵母细胞中。

[0027] 本发明另一目的是提供CICM细胞,该细胞由将分化哺乳动物细胞的核移植入与该分化细胞属于相同种类的去核卵母细胞中获得。

[0028] 本发明更具体的一个目的是提供用于产生人类CICM细胞的方法,包括将人类细胞如人成年细胞的核移植入人类去核卵母细胞中。

[0029] 本发明另一目的是用该CICM细胞进行治疗或诊断。

[0030] 本发明一个具体的目的是把该CICM细胞,包括人类和有蹄类CICM细胞,用于治疗或诊断任何适合用细胞、组织或器官移植方法治疗或诊断的疾病。该CICM细胞可在同种类内或不同种类间使用。

[0031] 本发明另一目的是用来自NT胚胎、胎儿或后代的组织,包括人类和有蹄类组织,治疗或诊断任何适合用细胞、组织或器官移植方法治疗或诊断的疾病。该组织可在同种类

内或不同种类间使用。

[0032] 本发明另一具体目的是应用根据本发明产生的 CICM 细胞制备分化的细胞、组织或器官。

[0033] 本发明的一个更具体的目的是用根据本发明产生的人类 CICM 细胞制备分化的人细胞、组织或器官。

[0034] 本发明另一具体目的是体外应用根据本发明产生的 CICM 细胞,用于例如细胞分化的研究和用于分析如药物研究的目的。

[0035] 本发明另一目的是提供改进的移植治疗的方法,包括来自根据本发明产生的 CICM 细胞的同基因系细胞、组织或器官的应用。这些治疗以举例的方式包括帕金森氏病、亨廷顿舞蹈病、阿尔茨海默氏病、ALS、脊髓损伤、多发性硬化、肌营养不良、糖尿病、肝脏疾病、心脏病、软骨更新、烧伤、血管病、泌尿道疾病、以及免疫缺陷病、骨髓移植、癌症和其它疾病的治疗。

[0036] 本发明另一目的是提供经遗传操作或转基因的 CICM 细胞,方法是由在使用分化的细胞或细胞核形成 NT 单位之前在已分化的哺乳动物细胞或细胞核内插入、移出或修饰目的基因。

[0037] 本发明另一目的是用本发明所产生的转基因或经遗传操作的 CICM 细胞来进行基因治疗,尤其是用于上述疾病和损伤的治疗和 / 或预防。

[0038] 本发明另一目的是把本发明所产生的 CICM 细胞或本发明所产生的转基因或经遗传操作的 CICM 细胞作为核供体用于核移植。

[0039] 因此,一方面,本发明提供了一种克隆哺乳动物(如胚胎、胎儿、后代)的方法。该方法包括:

[0040] (i) 在适于核转移(NT)单位形成的条件下,将所需分化的哺乳动物细胞或细胞核插入与该分化细胞或细胞核属于相同种类的去核哺乳动物卵母细胞中;

[0041] (ii) 活化产生的核转移单位;

[0042] (iii) 培养所述经活化的核转移单位直至超过两细胞发育期;并且

[0043] (iv) 将所述培养的 NT 单位转移到宿主哺乳动物体内以使 NT 单位发育成胎儿。

[0044] 该胎儿的细胞、组织和 / 或器官可用于细胞、组织和 / 或器官移植的领域。

[0045] 本发明还包括克隆经遗传操作或转基因哺乳动物的方法,用该方法在将分化的哺乳动物细胞或细胞核插入到去核卵母细胞中之前,在已分化哺乳动物的细胞或细胞核内插入、移出或修饰目的基因。

[0046] 本发明还提供了用上述方法获得的哺乳动物及其后代。

[0047] 本发明优选用于克隆有蹄类动物。

[0048] 另一方面,本发明提供了产生 CICM 细胞的方法。该方法包括:

[0049] (i) 在适于核转移(NT)单位形成的条件下,将所需分化的哺乳动物细胞或细胞核插入到与该分化细胞或细胞核属于相同种类的去核哺乳动物卵母细胞中;

[0050] (ii) 活化产生的核转移单位;

[0051] (iii) 培养所述已活化的核转移单位直至超过两细胞发育期;并且

[0052] (iv) 培养获自所述培养的 NT 单位的细胞以获得 CICM 细胞。

[0053] 该 CICM 细胞可用于细胞、组织和器官移植领域。

[0054] 根据上述和其它目的,可以明显看到本发明的优势及特点,参考下面本发明优选实施方案的详述和附加权利要求,可以更清楚地理解本发明的本质。

[0055] 发明详述

[0056] 本发明提供了通过核转移或核移植来克隆哺乳动物的改进的方法。该主题申请中,核转移或核移植或 NT 可互换使用。

[0057] 根据本发明,将来自分化胎儿或成年哺乳动物细胞的细胞核移植入与供体核属于相同种类的去核哺乳动物卵母细胞中。该核经重新编程以完成克隆胚胎的发育,再将克隆胚胎转移入雌性受体来产生胎儿及后代,或用于产生 CICM 细胞。也可将克隆胚胎与受精胚胎结合以产生嵌合胚胎、胎儿和 / 或后代。

[0058] 在克隆过程中现有技术方法使用的是胚胎细胞类型。这包括 Campbell 等人 (自然, 380 :64-68, 1996) 和 Stice 等人 (生殖生物学, 54 :100-110, 1996) 的研究工作。在二者的工作中,胚细胞系来自受孕不到 10 天的胚胎。在二者的研究中,细胞是在饲喂层上维持,以避免用于克隆方法中的供体细胞的明显分化。本发明使用已分化的细胞。

[0059] 出人意料的是,内含分化供体核的克隆胚胎可发育至高级胚胎及胎儿期。以往的科学教条认为只有胚胎或未分化的细胞类型能导致此类发育。出人意料的是,大量克隆胚胎可来自这些已分化的细胞类型。也未曾想到的是,新的转基因胚胎细胞系可从转基因克隆胚胎中方便获得。

[0060] 因此根据本发明,繁殖有优良基因型的哺乳动物,包括有蹄类,成为可能。这将允许繁殖已证明有遗传优势或其它所需特性的成年动物,从而加速如许多重要有蹄类动物种类的发育。根据本发明可获得的上亿胎儿或成年细胞,并将其用于克隆方法。这将很可能导致在短期内产生许多同样的后代。

[0061] 通过使用可被克隆增殖的分化的细胞来源,本发明还可简化转基因步骤。这就无需在未分化状态下维持细胞生长,从而使遗传修饰包括随机整合及基因打靶更易于完成。另外,通过将核转移与体外修饰和筛选这些细胞相结合,本方法比以前的转基因胚胎技术更有效。根据本发明,可在无细胞因子、条件培养基和 / 或饲喂层的情况下克隆增殖这些细胞,从而简化、便利了转基因方法。在按照本发明的克隆方法中使用转染的细胞时,可产生转基因胚胎,其可发育成胎儿及后代。另外,这些转基因克隆胚胎可用于产生 CICM 细胞系或其它胚胎细胞系。因此,本发明无需从体外获得并维持用于施行基因工程技术的未分化细胞系。

[0062] 本发明还可用来产生 CICM 细胞、胎儿及后代,它们可用于例如细胞、组织及器官移植。从动物中获取胎儿或成年细胞用于克隆步骤,克隆胎儿经过器官发生而进行发育时可从中获得许多细胞、组织及可能的器官,也可以从克隆后代中分离出细胞、组织及器官。该方法可为许多医学及兽医治疗包括细胞及基因治疗提供了“材料”来源。如果将细胞转移回其来源的动物体内,可防止发生免疫排斥反应。而且由于可从这些克隆中分离出许多细胞类型,用其它方法学如造血嵌合可以避免在相同种类内和不同种类间发生免疫排斥反应。

[0063] 因此,一方面,本发明提供了一种克隆哺乳动物的方法。一般而言,通过包括以下步骤的核转移方法可产生哺乳动物:

[0064] (i) 获得所需的分化哺乳动物细胞,将其作为供体核的来源;

- [0065] (ii) 从与供体核来源细胞属于相同种类的哺乳动物中获得卵母细胞；
- [0066] (iii) 去掉所述卵母细胞的核；
- [0067] (iv) 通过如融合或注射的方法将所需分化细胞或细胞核转移至去核卵母细胞中形成 NT 单位；
- [0068] (v) 活化产生的 NT 单位；
- [0069] (vi) 培养上述活化的 NT 单位直至超过两细胞发育期；并且
- [0070] (vii) 将上述培养的 NT 单位转移到宿主哺乳动物内以使该 NT 单位发育成胎儿。
- [0071] 本发明还包括了克隆经遗传操作或转基因的哺乳动物的方法，通过该方法，在分化哺乳动物细胞或细胞核插入去核卵母细胞之前，在分化哺乳动物细胞或细胞核中插入、移出或修饰目的基因。
- [0072] 本发明还提供了用上述方法获得的哺乳动物及其后代。本发明优选用于克隆有蹄类。
- [0073] 本发明还提供了可用于细胞、组织及器官移植领域的 NT 胎儿及 NT 和嵌合后代。
- [0074] 另一方面，本发明还提供了一种产生 CICM 细胞的方法。该方法包括：
- [0075] (i) 在适于核转移 (NT) 单位形成的条件下，将所需分化哺乳动物细胞或细胞核插入与该分化细胞或细胞核属于相同种类的去核哺乳动物卵母细胞中；
- [0076] (ii) 活化产生的核转移单位；
- [0077] (iii) 培养所述已活化的核转移单位直至超过两细胞发育期；并且
- [0078] (iv) 培养获自所述培养的 NT 单位中的细胞以获得 CICM 细胞。
- [0079] 该 CICM 细胞可有效地用于细胞、组织和器官移植领域，或用来产生胎儿或后代，包括转基因胎儿或后代。
- [0080] 优选地，将 NT 单位培养到至少 2-400 个细胞的大小，优选为 4-128 个细胞，最优选为至少约 50 个细胞的大小。
- [0081] 核转移或核移植技术公知于文献，并且发明背景所引用的许多参考文献中描述了该技术。尤其见 Campbell 等人，动物生殖学 (Theriogenology), 43 :181 (1995) ;Collas 等人，分子生殖发育 (Mol. Report Dev.), 38 :264-267 (1994) ;Keefe 等人，生殖生物学, 50 : 935-939 (1994) ;Sims 等人，美国国家科学院院报, 90 :6143-6147 (1993) ;W094/26884 ;W094/24274 和 W090/03432, 在此全文引入作为参考。另外，美国专利第 4, 944, 384 号和第 5, 057, 420 号描述了牛的核移植方法。
- [0082] 分化哺乳动物细胞是超过胚胎早期的细胞。更具体而言，分化细胞是来自至少经过胚盘期（牛胚胎发生第 10 天）的细胞。分化细胞可来自外胚层、中胚层或内胚层。
- [0083] 哺乳动物细胞包括人类细胞可用周知方法获得。用于本发明的哺乳动物细胞包括以举例方式，如上皮细胞、神经细胞、表皮细胞、角质细胞、造血细胞、黑色素细胞、软骨细胞、淋巴细胞 (B 和 T 淋巴细胞)、红细胞、巨噬细胞、单核细胞、成纤维细胞、心肌细胞或其它肌细胞等。另外，用于核转移的哺乳动物细胞可获自不同的器官，如皮肤、肺、胰、肝、胃、肠、心脏、生殖器官、膀胱、肾、尿道及其它泌尿器官等。这些仅仅为合适的供体细胞的实例。用于本发明的合适的供体细胞可从机体的任何细胞或器官获得，包括所有体细胞或生殖细胞。
- [0084] 成纤维细胞是一种理想的细胞类型，因为它们可从正在发育的胎儿及成年动物中

大量获得。成纤维细胞已分化到一定程度,因此曾被认为不是适用于克隆过程的细胞类型。重要的是,这些细胞体外倍增时间短,易于增殖,并能克隆增殖以用来进行基因打靶操作。本发明创新之处还在于使用了分化细胞类型。本发明的优势在于这些细胞在体外容易进行增殖、遗传修饰和筛选。

[0085] 合适的哺乳动物卵母细胞的来源包括绵羊、母牛、猪、马、兔、豚鼠、小鼠、仓鼠、大鼠、灵长类等。优选地,卵母细胞获自有蹄类,最优选为牛。

[0086] 分离卵母细胞的方法在本领域众所周知。基本上包括从哺乳动物如牛的卵巢或生殖道中分离出卵母细胞。牛卵母细胞的便利来源是屠宰场的原料。

[0087] 为了成功使用如基因工程、核转移及克隆的技术,在卵母细胞作为受体细胞用于核转移之前,以及在由精子细胞受精而发育成胚胎之前,必须先体外使其大体成熟。该过程通常需要从哺乳动物卵巢如来自屠宰场的牛卵巢里收集未成熟(分裂前期 I)的卵母细胞,在成熟培养基里使之成熟至分裂中期 II 阶段,就牛卵母细胞而言大体是在抽吸后约 18-24 小时,然后再使该卵母细胞受精或去核。对本发明目的而言,该时期称为“成熟时期”。这里计算该时期时,“抽吸”是指自卵巢滤泡中抽吸出未成熟的卵母细胞。

[0088] 另外,在体内已成熟到分裂中期 II 阶段的卵母细胞已经成功地应用于核转移技术。基本上,成熟的分裂中期阶段 II 的卵母细胞是在发情后或注射入人绒毛膜促性腺激素(hCG)或类似激素后 35-48 小时用外科方法从非超排卵或超排卵的母牛或小母牛中获得。

[0089] 去核和核转移过程中卵母细胞的成熟期被认为对 NT 方法成功与否很重要(见如 Prather 等人,分化(Differentiation)48,1-8,1991)。通常,成功的哺乳动物胚胎克隆操作作用分裂中期 II 阶段的卵母细胞作为受体卵母细胞,因为据信卵母细胞在该阶段能被或足够被活化以处理导入的核,如同受精过程。家养动物尤其是牛的卵母细胞活化时间一般为抽吸后 16-52 小时左右,优选约 28-42 小时左右。

[0090] 例如,如 Seshagine 等人在生殖生物学,40,544-606,1989 中所述,将未成熟的卵母细胞在 HEPES 缓冲的仓鼠胚胎培养基(HECM)中洗涤后,在 39°C 放入轻石蜡或硅层下的成熟培养基滴中,该培养基包括 50 微升组织培养基(TCM)199,内含 10%胎牛血清和适量促性腺激素如黄体生成素(LH)和卵泡刺激素(FSH)。

[0091] 经过一定时间的成熟期后将卵母细胞去核,此成熟期为从约 10 至 40 小时左右,优选为约 16-18 小时左右。去核前优选取出卵母细胞,放入含有 1 毫克每毫升透明质酸酶的 HECM 液中,再去掉卵丘细胞。可通过反复用极细孔移液管移液或短促振荡实现上述目的。然后根据极性小体的有无来筛选被剥离的卵母细胞,存在极性小体的为应选的分裂中期 II 卵母细胞,再将其用于核移植。下一步是去核。

[0092] 可用已知的方法去核,如美国专利第 4,994,384 号中所述,在此引入作为参考。例如可将分裂中期 II 卵母细胞置入任选地含有 7.5 微克每毫升松胞素 B 的 HECM 中立即去核,或者置入合适培养基如胚胎培养基(如加入 10%发情牛血清的 CR1aa)中然后去核,优选不超过 24 小时之后,且更优选为 16-18 小时后。

[0093] 可用显微外科法去核,用微移液管去掉极性小体和周围胞质。再筛选鉴定那些已成功去核的卵母细胞。筛选时可用含 1 微克每毫升 33342Hoechst 染料的 HECM 对卵母细胞进行染色,再在紫外照射下观察卵母细胞不到 10 秒。将已成功去核的卵母细胞置入合适培养基如加入 10%血清的 CR1aa 中。

[0094] 本发明中,优选在体外成熟开始后约 10 至约 40 小时的时间范围将受体卵母细胞去核,更优选为在体外成熟开始后约 16 至约 24 小时,最优选为在体外成熟开始后约 16-18 小时。

[0095] 再将与去核卵母细胞属于相同种类的单个哺乳动物细胞转移到用来产生 NT 单位的去核卵母细胞的卵周隙。按照本领域已知方法使该哺乳动物细胞和去核卵母细胞形成 NT 单位。例如可用电融合法融合细胞。通过提供足以使质膜产生瞬态破裂的电子脉冲可以实现电融合。质膜破裂非常短暂是因为膜很快又恢复完整。因此,如果两个相邻质膜被诱导破裂并且在恢复完整脂双层时发生混合,两个细胞间的小管道将会开放。如此小的开口在热动力学上是不稳定的,开口会扩大直到两个细胞合二为一。参考文献见 Prather 等人美国专利 4,997,384(在此全部引入作为参考),该文献对此过程作了深入探讨。可使用许多电融合介质包括如蔗糖、甘露醇、山梨醇和磷酸缓冲液。也可用仙台病毒作为融合物实现融合 (Graham wister Inot Symp Monogr ,9,19,1969)。

[0096] 另外在某些情况下(如小的供体核),优选将核直接注射入卵母细胞而不是用电穿孔融合法。该技术见 Collas 和 Barres 分子生殖发育,38:264-267(1994),在此全部引入作为参考。

[0097] 优选地,卵母细胞成熟开始约 24 小时后在 500 μ m 宽的槽内施以 90-120V 电脉冲约 15 微秒,使哺乳动物细胞和卵母细胞发生电融合。融合后将产生的融合 NT 单位置入合适的培养基如 CR1aa 培养基中直到活化。典型地,经过短暂时间后便开始活化,一般不超过 24 小时,优选为约 4-9 小时之后。

[0098] 用已知方法可活化 NT 单位。该方法包括,例如,在亚生理温度的条件下培养 NT 单位,也就是在凉或实际上冷的温度刺激下培养 NT 单位。最方便的做法是在室温下培养 NT 单位,因为相对于胚胎通常暴露于其中的生理温度而言室温是较低的。

[0099] 另外,也可用已知的活化剂达到活化目的。例如,受精过程中精子穿入卵母细胞可以活化融合前的卵母细胞,从而在核移植后产生更多数量可生存下来的孕胎和多个有着相同基因的小牛。融合后也可用电或化学休克活化 NT 胚胎。适当的卵母细胞活化方法可见美国专利第 5,496,720 号,Susko-Parrish 等人,在此全部引入作为参考。

[0100] 另外,活化可通过同时或顺序地进行下列操作而实现:

[0101] (i) 提高卵母细胞内二价阳离子的水平,并且

[0102] (ii) 减少卵母细胞内细胞蛋白的磷酸化水平。

[0103] 通常可通过将二价阳离子如镁、锶、钡、钙等通过以如离子载体的形式导入卵母细胞胞质中达到上述目的。其它提高二价阳离子水平的方法包括电休克、用乙醇处理和用骨架螯合剂处理。

[0104] 可以用已知方法降低磷酸化水平,比如加入激酶抑制剂像丝氨酸-苏氨酸激酶抑制剂,如 6-二甲基-氨基嘌呤、星形孢菌素、2-氨基嘌呤和神经鞘氨醇等。

[0105] 另外,也可以通过将磷酸酶如磷酸酶 2A 和磷酸酶 2B 导入卵母细胞内来抑制胞内蛋白质的磷酸化。

[0106] 在一实施方案中用以下方法活化 NT,先将融合的 NT 单位短暂接触含 5 μ M 离子霉素和 1mg/ml BSA 的 TL-HEPES 培养基中,再放入含 30mg/ml BSA 的 TL-HEPES 中洗涤,该过程应在融合后 24 小时左右内进行,优选是在融合后 4-9 小时左右进行。

[0107] NT 单位活化后可在合适的体外培养基中培养直至产生 CICM 细胞和细胞集落。适合胚胎培养和成熟的培养基在本领域众所周知。已知的培养基例如,可用于牛胚胎培养和维持的培养基包括 Ham' s F-10+10%的胎牛血清 (FCS)、组织培养基-199 (TCM-199)+10%胎牛血清、Tyrodes- 白蛋白-乳酸-丙酮酸 (TALP)、Dulbecco' s 磷酸缓冲盐液 (PBS)、Eagle' s 和 Whitten' s 培养基。用来收集卵母细胞并使之成熟的最常用培养基之一是 TCM-199,其补加 1-20%血清,包括胎牛血清、新生血清、发情期母牛血清、小羊血清或阉牛血清。优选的维持培养基包括含 Earl 盐、10%胎牛血清、0.2mM 丙酮酸钠和 50 μ g/ml 硫酸庆大霉素的 TCM-199。上述任何一种培养基也涉及许多细胞类型如颗粒细胞、输卵管细胞、BRL 细胞、子宫细胞和 STO 细胞的共培养。

[0108] 另一种维持培养基见 Rosenkrans, Jr 等人的美国专利第 5,096,822 号,在此引入作为参考。称为 CR1 的胚胎培养基含有支持胚胎生长所必需的营养成分。

[0109] CR1 培养基含有 L-乳酸半钙,含量为 1.0mM-10mM,优选为 1.0mM-5mM。L-乳酸半钙是 L-乳酸经掺入半钙盐所得。L-乳酸半钙的重要性在于一种单一成分可满足培养基两方面的需要:(i) 收缩和细胞骨架排列所必需的钙;以及(ii) 代谢和电子转运所必需的乳酸。L-乳酸半钙还为胚胎存活提供了重要的矿物质和能量来源。

[0110] CR1 培养基的优点在于不含血清如胎牛血清,也不需要共培养动物细胞或其它生物介质,亦即,含有动物细胞如输卵管细胞的介质。生物介质有时是不利的,因为其中可含有对胚胎有害的微生物或痕量因子,这些成分不易检测、定性和去除。

[0111] CR1 培养基的主要成分的例子包括 L-乳酸半钙、氯化钠、氯化钾、碳酸氢钠和少量不含脂肪酸的牛血清白蛋白 (Sigma A-6003)。另外,也可将一定量的必需和非必需氨基酸加入培养基中。含氨基酸的 CR1 缩写为" CR1aa"。

[0112] CR1 培养基优选包含含量如下的下列成分:

[0113] 氯化钠 114.7mM

[0114] 氯化钾 3.1mM

[0115] 碳酸氢钠 26.2mM

[0116] L-乳酸半钙 5mM

[0117] 无脂肪酸的 BSA 3mg/ml

[0118] 在一实施方案中,将活化的 NT 胚胎单位置于含 1.9mM DMAP 的 CR1aa 培养基中约 4 个小时,在 HECM 中洗涤后置于含 BSA 的 CR1aa 中培养。

[0119] 例如,可以将活化的 NT 单位转移到含 2.0mM DMAP (Sigma) 的 CR1aa 培养基中并在室温条件下培养,比如在约 38.5 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下培养适当的时间如约 4-5 小时左右。

[0120] 然后,优选洗涤培养的 NT 单位,再将其置于孔板内恰当的培养基如含 10% FCS 和 6mg/ml 的 CR1aa 培养基,该孔板优选含有合适的融合饲喂细胞层。合适的饲喂细胞层包括例如,成纤维细胞和上皮细胞(如有蹄动物的成纤维细胞和子宫上皮细胞)、鸡成纤维细胞、啮齿类(如大鼠和小鼠)成纤维细胞、STO 和 SI-M220 饲喂层细胞系和 BRL 细胞。

[0121] 在一实施方案中,饲喂细胞包括小鼠胚胎成纤维细胞。合适的成纤维饲喂细胞的制备方法将在下面的实施例中得到说明,该制备方法属于该领域普通技术人员的范畴内。

[0122] 在饲喂层上培养 NT 单位直至其长到适于转移至雌性受体或用来获得可产生 CICM 细胞或细胞集落的细胞的体积。优选地,将这些 NT 单位培养到至少约 2-400 个细胞左右,

更优选的为约 4-128 个细胞左右,最优选为至少约 50 个细胞。在适当条件下即约 38°C 和 5% CO₂ 下培养,为了使细胞更好地生长,一般约每 2-5 天、优选约每 3 天更换一次培养基。

[0123] 本发明中的核转移方法和动物受体处理方法均为胚胎转移工程中的标准步骤。同步转移对本发明成功很重要,亦即 NT 胚胎发育阶段要与雌性受体发情周期同步。其优势以及如何维护受体见 Siedel, G. E., Jr. 的综述(“关于牛胚胎转移的重要综述”,体外受精与胚胎发育, *Fertilization and Embryonic Development in Vitro* (1981), L. Mastroianni, Jr. 和 J. D. Biggers 编, Plenum 出版社, 纽约, NY, 323 页),在此引入作为参考。

[0124] 本发明还可用于克隆经遗传操作或转基因的哺乳动物。如上所述,本发明优势在于通过利用可被克隆增殖的分化细胞源进行操作简化了转基因步骤。具体地,在作为核供体的分化细胞内插入、移出或修饰目的基因。再将那些遗传特性改变的分化细胞与去核卵母细胞一起用于核移植。

[0125] 可用任何插入、删除或修饰来自哺乳动物细胞目的基因的方法来改变作为核供体的分化细胞。可用这些方法移出一个基因的全部或部分,且基因可以是异源的。同源重组技术也包括在内,用该技术可以在细胞基因组一个特定位点或多个位点插入、删除或修饰一个基因或多个基因。

[0126] 因此可用本发明来提供带有所需基因型的成年哺乳动物。尤其有用的是繁殖已证明有遗传优势或其它有利特性的成年有蹄类动物,包括转基因或经遗传操作过的动物和嵌合动物。另外,可用取自 NT 胎儿包括转基因和 / 或嵌合胎儿的细胞和组织进行细胞、组织和器官移植,其与应用 CICM 相结合治疗下述多种疾病。

[0127] 为了获得 CICM 细胞和细胞系,在得到合适大小的 NT 单位后,从条带区机械法切下细胞再使用。优选实施方法是取出一般包括至少 50 个细胞的带 NT 单位的细胞团,洗涤这些细胞并放到饲喂层比如照射过的成纤维细胞上。典型地,用来获得干细胞或细胞集落的细胞来自培养的 NT 单位的最内部,该 NT 单位优选为至少 50 个细胞大小。然而也可用含有较多或较少细胞数目的 NT 单位和 NT 单位其它部分的细胞来获取 ES 细胞和细胞集落。细胞在合适的生长培养基中在饲喂层上维持,如补加了 10% FCS、0.1mM β -巯基乙醇 (Sigma) 和 L-谷氨酰胺的 α MEM 培养基。为了细胞的最佳生长,要经常更换生长培养基,如约每 2-3 天更换一次。

[0128] 此培养方法导致 CICM 细胞或细胞系的形成。为了维持特定 CICM 细胞的最佳生长状态,本领域技术人员可以按照需要调整培养条件。也可用本发明获得遗传操作过或转基因哺乳动物的 CICM 细胞。也就是说,上述方法可用于获得 NT 单位,其中一个或多个目的基因已经被导入,或者一个或多个内源基因的全部或部分已经被移出或进行了修饰。这些遗传操作过的或者转基因 NT 单位可用于产生遗传操作过或转基因的 CICM 细胞,包括人类细胞。

[0129] 产生的 CICM 细胞和细胞系,优选为人类 CICM 细胞和细胞系,有多种治疗和诊断应用。特别尤其是 CICM 细胞可以用于细胞移植治疗。用人类 CICM 细胞可以治疗许多疾病。也可用人类 NT 单位以自知方式治疗疾病。

[0130] 在这方面,已知小鼠胚胎干细胞 (ES) 能够分化成几乎任何细胞类型,例如造血干细胞。所以本发明产生的人类 CICM 细胞应有类似的分化能力。用已知方法可以诱导本发明产生的 CICM 细胞分化成所需细胞类型。例如,在分化培养基中和利于细胞分化的条件下

培养人 CICM 细胞,可诱导其分化成造血干细胞、肌细胞、心肌细胞、肝细胞、软骨细胞、上皮细胞、尿道细胞等。导致 CICM 细胞分化的培养基和方法以及合适的培养条件在本领域众所周知。

[0131] 例如 Palacios 等人在美国国家科学院院报,92 :7530-7537 (1995) 教导,通过将干细胞经历诱导步骤可以从胚胎细胞系产生造血干细胞,该诱导步骤包括开始将细胞聚集体在无视黄酸的悬浮培养基中培养,再在含有视黄酸的同样培养基中培养,再将细胞聚集体转移到利于细胞贴附的底物中。

[0132] 另外, Pedersen 在生殖受精发育杂志 (J. Reprod. Fertil. Dev.) 6 :543-552 (1994) 上参阅了大量文献的综述公开了胚胎干细胞体外分化成各种分化细胞类型,包括造血干细胞、肌细胞、心肌细胞、神经细胞及其它细胞的方法。

[0133] 另外, Bain 等人在发育生物学,168 :342-357 (1995) 上教导胚胎干细胞体外分化成有神经元特性的神经细胞。上述文献为从胚胎或干细胞得到分化细胞的方法示例。在此全部引入上述文献尤其是其中涉及分化胚胎干细胞的方法的公开内容作为参考。

[0134] 因此,本领域技术人员可以用已知方法和培养基来培养 CICM 细胞,包括遗传操作过或转基因的 CICM 细胞,以获得所需分化细胞类型如神经细胞、肌细胞、造血细胞等。

[0135] 可用主题 CICM 细胞来获取任何所需分化细胞类型。这种分化人类细胞在治疗上的用途是多种多样的。例如,可以把人类造血干细胞用于需要骨髓移植的医疗用途。用该方法可以治疗许多疾病,比如,晚期癌症(如卵巢癌和白血病)以及损害免疫系统的疾病(如 AIDS)。如上所述可通过比如使癌症或 AIDS 病人的成年体细胞(如上皮或淋巴细胞)与去核卵母细胞融合,得到 CICM 细胞,再将该细胞在利于分化的条件下培养直至得到造血干细胞来获得造血干细胞。可用该造血干细胞治疗包括癌症和 AIDS 在内的疾病。

[0136] 或者,来自神经失调患者的成年体细胞可与去核卵母细胞融合后得到人类 CICM 细胞,再在分化条件下培养这些细胞以产生神经细胞系。可用该人类神经细胞移植治疗的疾病包括,例如,帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、ALS 和脑瘫及其它。具体就帕金森氏病而言,已证明移植的胎儿脑神经细胞可与周围细胞形成正确连接并能产生多巴胺。这样可导致帕金森氏症状的长期逆转。

[0137] 本发明的主要优点在于,可以提供来源基本上不受限制的适合移植的同基因系或同系人类细胞。这就避免了与现有移植方法相关的重要问题,也就是由于宿主抗移植体或移植体抗宿主排斥反应导致的对移植组织的排斥现象。常规预防或减少排斥反应的方法是施用抗排斥药物如环孢菌素。但是此类药物有明显的不良副作用,如免疫抑制、致癌性且价格昂贵。本发明无需抗排斥药物,或至少会大大减少对抗排斥药物的需要。

[0138] 其它可用同基因系细胞疗法治病的疾病包括,例如,脊髓损伤、多发性硬化、肌营养不良、糖尿病、肝病即高胆固醇血症、心脏病、软骨置换、烧伤、足部溃疡、胃肠道疾病、血管病、肾病、、尿道疾病,以及衰老相关疾病和状况。

[0139] 可用本方法置换缺陷基因如缺陷的免疫系统基因、囊性纤维化基因,或导入基因以表达有治疗作用的蛋白质如生长因子、淋巴因子、细胞因子、酶等。比如,可以将编码脑源生长因子的基因导入人类 CICM 细胞,该细胞分化成神经细胞,再将这些细胞移植入帕金森氏病患者中以延缓该病程中神经细胞的丧失。

[0140] 以前,用 BDNF 转染的细胞类型可以是原代细胞,也可以是永久细胞系,可以是衍

生自神经或非神经（成肌细胞和成纤维细胞）的细胞。比如用逆转录病毒载体将 BDNF 基因转染入星形胶质细胞中，并把该细胞移植入帕金森氏病大鼠模型中（Yshimoto 等人，脑研究，(BrainResearch), 691 :25-36(1995)）。

[0141] 通过离体疗法，移植后 32 天大鼠帕金森氏样症状最高可减少 45%。将酪氨酸羟化酶的基因置于星形胶质细胞也会产生同样效果（Lundberg 等人，神经发育 (Develop. Neurol), 139 :39-53(1996)，在此引入作为参考）。

[0142] 但是该离体方法存在着问题。特别是，目前所用的逆转录病毒载体在体内被下调，转基因仅得到瞬时表达（Mulligan 综述，科学 (Science), 260 :926-932(1993)）。另外该研究使用的是原代细胞、星形胶质细胞，这些细胞有一定寿限且复制缓慢。这些特性降低了转染率，阻碍了对稳定转染细胞的选择。另外在同源重组技术中使用的进行基因打靶的原代细胞几乎不可能大量扩增。与之形成对比的是，使用哺乳动物 CICM 细胞可以消除与逆转录病毒系统相关的困难。

[0143] 可以导入 CICM 细胞的基因包括，例如上皮生长因子、基底成纤维生长因子、神经胶质细胞来源的神经营养生长因子、胰岛素样生长因子 (I 和 II)、神经营养素 -3、神经营养素 4/5、睫状神经营养因子、AFT-1、细胞因子基因（白细胞介素、干扰素、集落刺激因子、肿瘤坏死因子 (α 和 β) 等)、编码治疗用酶的基因等。

[0144] 除了人类 CICM 细胞用于细胞、组织和器官移植的用途外，本发明还包括非人类细胞在治疗人类疾病中的用途。因此可以用任何种类的 CICM 细胞、NT 胎儿及 NT 和嵌合后代（转基因或非转基因）治疗证明可以进行细胞、组织或器官移植的人类疾病。通常，可在相同种类内（自体的、同基因系的或同种移植）或不同种类间（异种移植）使用本发明的 CICM 细胞、胎儿及后代。例如可以用来自牛 NT 胎的脑细胞治疗帕金森氏病。

[0145] 另外，可以把 CICM 细胞，优选是人类细胞，用作体外分化模型，特别是用于研究参与早期发育调节的基因。此外，利用主题 CICM 细胞，分化的细胞、组织和器官也可用于药物研究。

[0146] 也可进一步将主题 CICM 细胞作为核供体来制备其它 CICM 细胞和细胞集落。

[0147] 为了更清楚地描述本发明，提供以下实施例。

[0148] 实施例 1

[0149] 牛和猪胚胎以及成年牛成纤维细胞原代培养物的分离

[0150] 牛和猪成纤维细胞原代培养物获自胎儿（对于牛和猪胎儿分别为怀孕 45 天和 35 天）。以无菌操作除去头、肝脏、心脏和消化道，绞碎胎儿并在预热过的胰蛋白酶 EDTA 溶液（0.05% 胰蛋白酶 / 0.02% EDTA ; GIBCO, GRAND Island, NY）中于 37°C 温育 30 分钟。将成纤维细胞置于组织培养皿中并在补充了 10% 胎牛血清 (FCS) (Hyclone, Logen, UT)，青霉素 (100IU/ml) 和链霉素 (50 μ l/ml) 的 α -MEM 培养基中培养。将成纤维细胞置于空气中带有 5% CO₂ 的潮湿环境中于 37°C 生长。

[0151] 从牛（约 5 岁）肺中分离成年成纤维细胞。将绞碎的肺组织在胰蛋白酶 EDTA 溶液（0.05% 胰蛋白酶 / 0.02% EDTA ; GIBCO, GRAND Island, NY）中于 10°C 温育过夜。次日将组织和任何分化的细胞在预热过的胰蛋白酶 EDTA 溶液（0.05% 胰蛋白酶 / 0.02% EDTA ; GIBCO, GRAND Island, NY）中于 37°C 温育一小时。连续洗涤 3 次并进行胰蛋白酶温育（1 小时）。将成纤维细胞置于组织培养皿中并在补充了 10% 胎牛血清 (FCS) (Hyclone, Logen, UT)，青

霉素 (100IU/ml) 和链霉素 (50 μ l/ml) 的 α -MEM 培养基中培养。基本上可在发育过程中的任何时间分离成纤维细胞,范围大约从后胚盘期一直到动物的成年期(牛从受精后 12 至 15 天一直到 10 至 15 岁)。也可用此方法从其它哺乳动物包括小鼠中分离成纤维细胞。

[0152] 标记基因(外源异源 DNA)导入胚胎和成年成纤维细胞

[0153] 对胚胎(牛和猪)和成年(牛)成纤维细胞进行下述电穿孔步骤。也可用标准的显微注射方法将异源 DNA 导入成纤维细胞,然而,在此实施例中采用电穿孔,因为它更容易。

[0154] 含有增殖的成纤维细胞的培养皿置于胰蛋白酶 EDTA 溶液(0.05%胰蛋白酶/0.02% EDTA ;GIBCO, GRAND Island, NY) 中温育直到细胞成为单细胞悬液。以 500 \times g 将细胞沉淀并用磷酸缓冲盐液(PBS)以每毫升 5 百万细胞的浓度再悬浮。

[0155] 报告基因构件含有巨细胞病毒启动子和 β -半乳糖苷酶、新霉素磷酸转移酶融合基因(β -GEO)。将报告基因和浓度为 50 μ g/ml 的细胞加入到电穿孔槽。给予电穿孔脉冲后,将成纤维细胞转移回补充了 10%的胎牛血清(FCS)(Hyclone, Logen, UT)、青霉素(100IU/ml)和链霉素(50 μ l/ml)的生长培养基(α -MEM 培养基)(BioWhittaker, Walkersville, MD)中。

[0156] 电穿孔后第二天,选择贴附的成纤维细胞用于报告基因的稳定整合。将 G418 加到生长培养基中维持 15 天(范围:从 3 天到培养细胞生命跨度的终点)。由于这些细胞不表达新霉素抗性基因,该药物可杀死这些无 β -GEO 基因的细胞。最后存在的是稳定的转基因细胞的集落,每一集落均独立于其它集落进行繁殖。用 X-gal 进行转基因成纤维细胞的染色以观察 β -半乳糖苷酶的表达,并用 β -GEO 基因的 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳证实整合为阳性。

[0157] 转基因成纤维细胞用于核转移方法以产生 CICM 细胞系和转基因胎儿

[0158] 用衍生自牛胚胎成纤维细胞的一个集落的细胞系(CL-1)作为核转移方法(NT)中的核供体。下面描述了常规的 NT 步骤。

[0159] 屠宰场获得的卵母细胞在体外成熟。卵母细胞剥除卵丘细胞并在大约成熟后小时(hpm)18 至 20 小时用斜尖微移液管去核。在 TL-HEPES 中培养基补加 Hoechst 33342(3 μ g/ml ;Sigma))证实去核。然后将单独的供体细胞(成纤维细胞)置于受体卵母细胞的卵黄周隙。用电融合技术使牛卵母细胞细胞质和供体核(NT 单位)融合。NT 单位在 500 μ m 宽的槽内接受由 120V、15 微秒的融合脉冲。此步操作在 24hpm 进行,NT 单位被置于 CR1aa 培养基中直到 26 至 27hpm。

[0160] 上面已经描述了人工活化卵母细胞的常规步骤。NT 单位的活化开始于 26 至 27hpm 之间。简而言之,NT 单位于补充了 1mg/ml BSA 的 TL-HEPES 中接触离子霉素(5 μ M ; CalBiochem, La Jolla, CA)4 分钟,然后用补充了 30mg/ml BSA 的 TL-HEPES 洗 5 分钟经过离子霉素处理,NT 单位也暴露于 2mM 的 DMAP(Sigma)。洗涤后,将 NT 单位转移到一滴含有 2mM 的 DMAP(Sigma)的 CR1aa 培养基中,于 38.5 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 4 至 5 小时。洗涤胚胎并将其置于含有鼠胚胎成纤维细胞铺满饲喂层的 4 孔板中,其中加入了含 10% FCS 和 6mg/ml BSA 的 CR1aa 培养基。将 NT 单位于 38.5 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 再培养 3 天。每 3 天更换培养基直到活化后 5 至 8 天。此时胚胎期 NT 胚胎可用于制备转基因 CICM(培养的内细胞群)细胞系或胎儿。这些 NT 单位的内细胞群可被分离并置于饲喂层中。NT 单位也可被转移进雌性受

体。妊娠第 35 天流产。这导致两种克隆的转基因胎儿在所有被检测的组织中具有 β -GEO 基因。因此,这是一种快速而简单的制备 CICM 细胞系和胎儿的方法。此方法一般适合于 CICM 细胞系和胎儿的基因打靶。

[0161] 下表概述了这些实验的结果

[0162]

供体细胞型	n	分裂 (%)	胚泡 (%)	CICM*系 (%)	转基因胎儿 (%)
CL-1 牛胚胎成纤维细胞 (bGEO)	412	220 (53)	40 (10%)	22 (55%)	
CL-1 牛胚胎成纤维细胞 (bGEO)	505		46 (9%)		4 胎儿 +/16 胚胎 (20%)
衍生自 CL-INT 胚胎的 CICM 细胞系	709		5 (0.7%)		

[0163] * 19 个细胞系为 β -GEO 阳性,2 个为阴性,1 个在 PCR 检查之前死亡。

[0164] + 一个胎儿死亡,另一个在妊娠后第 35 天发育略迟缓。在第 38 天得到的两个胎儿为正常。全部胎儿均证实转基因。

[0165] 实施例 2

[0166] 衍生自转基因 CICM 细胞的嵌合胎儿。此转基因 CICM 细胞系最初衍生自转基因 NT 单位 (分化的细胞)

[0167] 用衍生自转基因 NT 胚胎 (一株转移入去核卵母细胞的 CL-1 细胞) 的 CICM 细胞系制备嵌合胚胎和胎儿。用 1-5mg/ml 链霉菌蛋白酶或 0.05% 胰蛋白酶/EDTA 加上机械解聚方法进行转基因 CICM 细胞集落的解聚,以得到 5 个或更少细胞的团块。通过用 30 至 100% 的胎牛血清多次洗涤细胞可灭活胰蛋白酶或链霉菌蛋白酶活性。将解聚的细胞置于含有 TL-HEPES 培养基的显微操作板上。受精的胚胎也被置于板上,并用显微操作装置制备嵌合胚胎。将 8 至 10 个转基因 CICM 细胞注射入 8-16 细胞期的受精胚胎,体外培养这些胚胎至胚泡期,然后转移入受体动物。

[0168] 共将 6 个胚泡期嵌合胚胎用非外科方法转移入两只受体动物。妊娠 5 周后得到 3 个胎儿,此 3 个胎儿的几种组织,包括生殖腺的生殖细胞 (提示种系嵌合体) 通过 PCR 扩增和将扩增产物与 β -半乳糖苷酶片段进行 Southern 印记杂交来进行筛选。此 3 个胎儿中,2 个为来自于转基因 CICM 细胞的阳性个体。两个胎儿的性腺均具有转基因 CICM。

[0169] 衍生自转基因 CICM 细胞系的转基因 NT 胚胎。转基因 CICM 细胞系最初衍生自一个转基因 NT 单位 (分化的细胞)

[0170] 用相同转基因 CICM 细胞系制备 NT 胚胎。采用实施例 1 描述的 NT 操作步骤,区别在于用 CICM 细胞代替成纤维细胞作为供体细胞与去核卵母细胞融合。用 1-5mg/ml 链霉菌蛋白酶或 0.05% 胰蛋白酶/EDTA 加上机械解聚方法进行转基因 CICM 细胞集落的解聚,以得到 5 个或更少细胞的团块。在将细胞转移入去核卵母细胞之前用 30 至 100% 的胎牛血清多次洗涤细胞以灭活胰蛋白酶或链霉菌蛋白酶。结果见表 1 (第 3 组)。得到了 5 个胚泡期的胚胎。