



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106755115 A
(43)申请公布日 2017.05.31

(21)申请号 201710065515.3

(22)申请日 2017.02.06

(71)申请人 南方医科大学

地址 510000 广东省广州市白云区沙太南路1023号-1063号

申请人 广东圣赛生物科技有限公司

(72)发明人 徐洋

(74)专利代理机构 北京东正专利代理事务所
(普通合伙) 11312

代理人 李梦福

(51)Int.Cl.

C12N 15/89(2006.01)

A01K 67/027(2006.01)

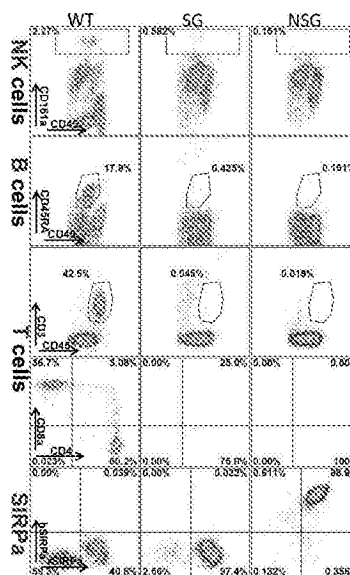
权利要求书1页 说明书9页
序列表3页 附图6页

(54)发明名称

一种免疫缺陷大鼠模型的构建方法

(57)摘要

本发明公开一种免疫缺陷大鼠模型的构建方法,包括以下步骤:将针对大鼠DNA的Prkdc和IL2R γ 基因敲除的gRNA分别进行体外转录,再分别与体外转录的CAS9蛋白mRNA混合,冻存于无RNA酶的超纯水中,得到相应的注射液A及B;将人SIRPa基因组DNA扩增,纯化,冻存于无RNA酶的超纯水中,得注射液C;采用显微注射法将注射液A和B分别注射进不同的大鼠受精卵的胞质中,将注射液C注射进另一大鼠受精卵的原核中,将三种受精卵移植入不同假孕雌鼠体内,培育分别得到第二代大鼠A,B和C;将第二代大鼠A,B和C进行杂交,繁殖F1代;再将F1代进行杂交,得到敲除了IL2R γ 和Prkdc基因并转入了人SIRPa基因的免疫缺陷大鼠模型。该大鼠模型可以让人类细胞高效植入,符合试验指标,品系背景纯正。



CN 106755115 A

1. 一种免疫缺陷大鼠模型的构建方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将针对大鼠DNA的Prkdc和IL2R γ 基因敲除的gRNA分别进行体外转录,再分别与体外转录的CAS9蛋白mRNA混合,冻存于无RNA酶的超纯水中,得到相应的注射液A及注射液B;

(2) 将人SIRPa基因组DNA扩增,纯化,冻存于无RNA酶的超纯水中,得到注射液C;

(3) 采用显微注射法将注射液A和注射液B分别注射进不同的大鼠受精卵的胞质中,然后将大鼠受精卵分别移植入不同假孕雌鼠体内,培育得到第二代大鼠A和第二代大鼠B;

(4) 采用显微注射法将注射液C注射进大鼠受精卵的原核中,然后将大鼠受精卵移植入假孕雌鼠体内,培育得到第二代大鼠C;

(5) 将第二代大鼠A、第二代大鼠B和第二代大鼠C进行杂交,繁殖F1代;再将F1代进行杂交,得到敲除了IL2R γ 和Prkdc基因并转入了人SIRPa基因的免疫缺陷大鼠模型。

2. 根据权利要求1所述的免疫缺陷大鼠模型的构建方法,其特征在于,步骤(1)中的敲除大鼠Prkdc基因采用两条gRNA序列,分别为:第一外显子gRNA序列1:TTCCGGCACTATGGCGGACC;第一外显子gRNA序列2:GCCAGTTACCAGCTGATCCG。

3. 根据权利要求1所述的免疫缺陷大鼠模型的构建方法,其特征在于,步骤(1)中的敲除大鼠IL2R γ 基因采用两条gRNA序列,分别为:第二外显子gRNA序列1:CAGCCGACCAACCTCACTAT;第四外显子gRNA序列2:GAGTGAATCTCAGGTAGAAC。

4. 根据权利要求3所述的免疫缺陷大鼠模型的构建方法,其特征在于,敲除大鼠IL2R γ 基因还采用另外两条gRNA序列,分别为:第二外显子gRNA序列1:CAGCCGACCAACCTCACTAT;第四外显子gRNA序列3:GAGCAACCGAGATCGAAGCT。

5. 根据权利要求1所述的免疫缺陷大鼠模型的构建方法,其特征在于,步骤(1)中,体外转录CAS9蛋白mRNA采用T7转录试剂盒、T3转录试剂盒或SP6转录试剂盒。

6. 根据权利要求1所述的免疫缺陷大鼠模型的构建方法,其特征在于,步骤(3)和步骤(4)中的假孕雌鼠在SPF级别条件下饲养。

7. 根据权利要求1所述的免疫缺陷大鼠模型的构建方法,其特征在于,步骤(3)中的大鼠受精卵取自在SPF级别条件下饲养的受孕雌鼠。

8. 一种免疫缺陷大鼠模型,其特征在于,所述大鼠模型敲除了IL2R γ 和Prkdc基因并转入了人SIRPa基因。

一种免疫缺陷大鼠模型的构建方法

技术领域

[0001] 本发明属于大鼠模型构建领域,具体涉及一种免疫缺陷大鼠模型的构建方法。

背景技术

[0002] 动物模型主要用于实验生理学、实验病理学和实验治疗学(包括新药筛选)研究。人类疾病的发展十分复杂,以人本身作为实验对象来深入探讨疾病发生机制,推动医药学的发展来之缓慢,临床积累的经验不仅在时间和空间上都存在局限性,而且许多实验在道义上和方法上也受到限制。而借助于动物模型的间接研究,可以有意识地改变那些在自然条件下不可能或不易排除的因素,以便更准确地观察模型的实验结果并与人类疾病进行比较研究,有助于更方便、更有效地研究人类疾病的发生发展规律,研究防治措施。免疫缺陷动物模型可用于药物开发、移植研究以及人类疾病的治疗机理研究。目前,常用的免疫缺陷动物模型多为小鼠,而大鼠与人类的同源性更接近,所以使用大鼠模型比小鼠模型研究人类相关疾病具有明显的优势。衡量机体免疫缺陷的程度,主要测量机体内T、B淋巴细胞和NK细胞所占的比例。日本学者Tomoji等人(Mashimo T,Takizawa A,et al:Generation and characterization of severe combined immunodeficiency rats.Cell reports 2012, 2:685-694.、Mashimo T,Takizawa A,et al:Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases.PloS one 2010,5:e8870.)用Zinc-Finger技术得到IL2R γ 和Prkdc基因敲除的大鼠,并证实IL2R γ 纯合敲除大鼠外周血、骨髓和脾脏中T细胞明显减少,B细胞和NK细胞在外周血和骨髓中消失,仅在脾脏中有一些残留;Prkdc基因敲除的大鼠CD4 $^{-}$ CD8 $^{+}$ 、CD4 $^{+}$ CD8 $^{-}$ 和CD4 $^{+}$ CD8 $^{+}$ T细胞全部消失,B细胞也明显消失,而NK细胞数量增加;两个基因同时敲除的大鼠,T、B淋巴细胞和NK细胞全部消失。但是,发明人发现现有技术中的免疫缺陷大鼠模型至少存在如下的问题:在Prkdc和IL2R γ 同时敲除的大鼠模型上移植人的CD34 $^{+}$ 造血干细胞,却并没有产生人的免疫系统细胞。

[0003] 因此,现有的免疫缺陷动物模型还不能满足药物试验和异种细胞移植研究等的需求,这是本领域技术人员亟待解决的问题。

发明内容

[0004] 为解决上述技术问题,本发明提供了一种新的免疫缺陷大鼠模型,填补了免疫缺陷大鼠模型品系空缺,能够符合试验需求。

[0005] 第一方面,提供了一种免疫缺陷大鼠模型的构建方法,包括以下步骤:

[0006] (1) 将针对大鼠DNA的Prkdc和IL2R γ 基因敲除的gRNA分别进行体外转录,再分别与体外转录的CAS9蛋白mRNA混合,冻存于无RNA酶的超纯水中,得到相应的注射液A及注射液B;

[0007] (2) 将人SIRPa基因组DNA扩增,纯化,冻存于无RNA酶的超纯水中,得到注射液C;

[0008] (3) 采用显微注射法将注射液A和注射液B分别注射进不同的大鼠受精卵的胞质

中,然后将大鼠受精卵分别移植入不同假孕雌鼠体内,培育得到第二代大鼠A和第二代大鼠B;

[0009] (4) 采用显微注射法将注射液C注射进大鼠受精卵的原核中,然后将大鼠受精卵移植入假孕雌鼠体内,培育得到第二代大鼠C;

[0010] (5) 将第二代大鼠A、第二代大鼠B和第二代大鼠C进行杂交,繁殖F1代;再将F1代进行杂交,得到敲除了IL2R γ 和Prkdc基因并转入了人SIRPa基因的免疫缺陷大鼠模型。

[0011] 结合第一方面,在第一方面的一种可能的实现方式中,步骤(1)中的敲除大鼠Prkdc基因采用两条gRNA序列,分别为:第一外显子gRNA序列1:TTCCGGCACTATGGCGGACC;第一外显子gRNA序列2:GCCAGTTACCAGCTGATCCG。

[0012] 结合第一方面或上述某些可能的实施方式,在第一方面的一种可能的实现方式中,步骤(1)中的敲除大鼠IL2R γ 基因采用两条gRNA序列,分别为:第二外显子gRNA序列1:CAGCCGACCAACCTCACTAT;第四外显子gRNA序列2:GAGTGAATCTCAGGTAGAAC。

[0013] 结合第一方面或上述某些可能的实施方式,在第一方面的一种可能的实现方式中,敲除大鼠IL2R γ 基因还采用另外两条gRNA序列,分别为:第二外显子gRNA序列1:CAGCCGACCAACCTCACTAT;第四外显子gRNA序列3:GAGCAACCGAGATCGAAGCT。

[0014] 结合第一方面或上述某些可能的实施方式,在第一方面的一种可能的实现方式中,体外转录CAS9蛋白mRNA采用T7转录试剂盒、T3转录试剂盒或SP6转录试剂盒。

[0015] 结合第一方面或上述某些可能的实施方式,在第一方面的一种可能的实现方式中,体外转录CAS9蛋白mRNA采用T7转录试剂盒、T3转录试剂盒或SP6转录试剂盒。

[0016] 结合第一方面或上述某些可能的实施方式,在第一方面的一种可能的实现方式中,步骤(3)中的假孕雌鼠在SPF级别条件下饲养。

[0017] 结合第一方面或上述某些可能的实施方式,在第一方面的一种可能的实现方式中,步骤(3)中的大鼠受精卵取自在SPF级别条件下饲养的受孕雌鼠。

[0018] 第二方面,提供了一种免疫缺陷大鼠模型,所述大鼠模型敲除了IL2R γ 和Prkdc基因并转入了人SIRPa基因。

[0019] 结合第二方面,在第二方面的一种可能的实现方式中,所述免疫缺陷大鼠模型由第一方面的任一种方法构建而成。

[0020] 上述技术方案中,在Prkdc和IL2R γ 敲除的大鼠中过表达人的SIRPa (hSIRPa) 基因,构建免疫功能丧失和过表达人的SIRPa基因的大鼠,从而得到了完全对异体移植无免疫作用的大鼠模型,使得这种大鼠模型在用于进行异种移植时除T淋巴细胞、B淋巴细胞和NK细胞以外的免疫细胞也不攻击人源性的异种移植物,满足药物试验和异种细胞移植研究等的需求。该方法得到的免疫缺陷大鼠模型不但填补了免疫缺陷大鼠模型品系空缺,符合试验指标,可以让人类细胞高效植入,而且品系背景纯正。

附图说明

[0021] 图1为本发明提供的免疫缺陷大鼠模型构建方法的其中一个具体实施方式中敲除Prkdc基因所使用的gRNA在大鼠DNA中的位置示意图。

[0022] 图2为本发明提供的免疫缺陷大鼠模型构建方法的其中一个具体实施方式中敲除IL2R γ 基因所使用的gRNA在大鼠DNA中的位置示意图。

[0023] 图3为正常野生大鼠 (WT) 和本发明一个具体实施方式中过表达人SIRPa (hSIRPa) 大鼠的外周血中人的hSIRPa和大鼠的rSIRPa表达情况的流式细胞测量图谱。

[0024] 图4为正常野生大鼠 (WT)、一个具体实施方式中Prkdc单敲 (Prkdc^{+/-}) 和双敲 (Prkdc^{-/-}) 大鼠的外周血中NK细胞、B淋巴细胞和T淋巴细胞的流式细胞测量图谱。

[0025] 图5为正常野生大鼠 (WT)、一个具体实施方式中IL2R γ 单敲 (IL2R γ ^{+/-}) 和双敲 (IL2R γ ^{-/-}) 大鼠的外周血中NK细胞、B淋巴细胞和T淋巴细胞的流式细胞测量图谱。

[0026] 图6为正常野生大鼠 (WT)、本发明一个具体实施方式中SG (IL2R γ ^{-/-}, Prkdc^{-/-}) 大鼠和NSG (hSIRPa, IL2R γ ^{-/-}, Prkdc^{-/-}) 大鼠模型的外周血中NK细胞、B淋巴细胞和T淋巴细胞的流式细胞测量图谱, 以及hSIRPa和rSIRPa表达情况的流式细胞测量图谱。

[0027] 图7为人造血干细胞尾静脉注射本发明其中一个实施方式所构建出的免疫缺陷大鼠模型5周后人的免疫细胞在外周血和骨髓中的表达情况检测结果。

[0028] 图8为肿瘤细胞和胚胎干细胞在SG (IL2R γ ^{-/-}, Prkdc^{-/-}) 大鼠和NSG (hSIRPa, IL2R γ ^{-/-}, Prkdc^{-/-}) 大鼠模型皮下移植后的成瘤情况。

具体实施方式

[0029] 为更清楚的对本发明技术方案予以阐述, 下面将结合具体实施方式对本发明的技术方案进行进一步阐述:

[0030] 发明人发现现有技术中的免疫缺陷大鼠模型至少存在如下的问题: 在Prkdc和IL2R γ 同时敲除的大鼠模型上移植人的CD34+造血干细胞, 却并没有产生人的免疫系统细胞。发明人经过分析认为, 主要可能原因是该大鼠模型内的巨噬细胞和单核细胞的异体排斥作用导致的移植失败。

[0031] 为此, 在一个具体的实施方式中, 提供了一种免疫缺陷大鼠模型的构建方法, 包括以下步骤: (1) 将针对大鼠DNA的Prkdc和IL2R γ 基因敲除的gRNA分别进行体外转录, 再分别与体外转录的CAS9蛋白mRNA混合, 冻存于无RNA酶的超纯水中, 得到相应的注射液A及注射液B;

[0032] (2) 将人SIRPa基因组DNA扩增, 纯化, 冻存于无RNA酶的超纯水中, 得到注射液C;

[0033] (3) 采用显微注射法将注射液A和注射液B分别注射进不同的大鼠受精卵的胞质中, 然后将大鼠受精卵分别移植入不同假孕雌鼠体内, 培育得到第二代大鼠A和第二代大鼠B;

[0034] (4) 采用显微注射法将注射液C注射进大鼠受精卵的原核中, 然后将大鼠受精卵移植入假孕雌鼠体内, 培育得到第二代大鼠C;

[0035] (5) 将第二代大鼠A、第二代大鼠B和第二代大鼠C进行杂交, 繁殖F1代; 再将F1代进行杂交, 得到敲除了IL2R γ 和Prkdc基因并转入了人SIRPa基因的免疫缺陷大鼠模型。

[0036] 上述的显微注射法是利用管尖极细 (0.1至0.5 μ m) 的玻璃微量注射针, 将外源基因片段直接注射到原核期胚或培养的细胞中, 然后藉由宿主基因组序列可能发生的重组、缺失、复制或易位等现象而使外源基因嵌入宿主的染色体。

[0037] 上述人SIRPa基因组DNA, 即Signal Regulatory Protein Alpha基因组DNA, 可通过商业途径直接采购。例如, 上述方案中使用的人SIRPa基因组DNA采购自life technologies (BAC, RP11-993C19)。初始购买的人SIRPa 基因组DNA先进行扩增纯化。受精

卵显微注射需要足够纯,否则容易导致受精卵发育不下去,从而得不到阳性结果。

[0038] 上述技术方案中,SIRPa主要表达于单核细胞和巨噬细胞表面,与CD47配体结合后介导负性调节信号,是一个“别吃我”的基因。发明人经过创造性劳动和大量实验,将针对大鼠DNA的Prkdc和IL2R γ 基因敲除的gRNA分别进行体外转录,再分别与体外转录制备好的CAS9蛋白mRNA按比例混合,再各自通过显微注射法注射进入受孕雌鼠的不同的受精卵的胞质中,在受精卵中依赖真核翻译系统将Cas9的mRNA翻译成蛋白质,即Cas9蛋白;Cas9蛋白与gRNA结合,在gRNA的介导下结合到作用靶点,Cas9蛋白对所结合靶点进行切割,破坏免疫相关基因序列,从而使免疫相关基因的功能丧失,将受精卵移植入假孕雌鼠后培育得到敲除了Prkdc的第二代大鼠A和敲除了IL2R γ 基因的第二代大鼠B。再将人SIRPa基因组DNA通过显微注射法注射进入另一大鼠受精卵的原核中,SIRPa基因组DNA在受精卵分裂期间随机插入基因组中,从而使培育得到的第二代大鼠C表达人的SIRPa。最后通过将第二代大鼠A、第二代大鼠B和第二代大鼠C进行杂交,繁殖F1代,再将F1代进行杂交,建立稳定纯合的Prkdc和IL2R γ 基因敲除和人SIRPa(hSIRPa)基因稳定表达的免疫缺陷大鼠品系,从而构建出免疫功能丧失和过表达人的SIRPa基因的大鼠模型。

[0039] 通过上述方法培育得到的大鼠模型对异体移植完全无免疫作用,使得这种大鼠模型在用于进行异种移植时除T淋巴细胞、B淋巴细胞和NK细胞以外的免疫细胞也不攻击人源性的异种植物,从而满足药物试验和异种细胞移植研究等的需求。该免疫缺陷大鼠模型是一种良好的人源化大鼠的载体,通过大鼠体内移植人的ES细胞、肿瘤细胞,结果均呈现出很好的异种移植能力,并且在移植了人CD34⁺造血干细胞后,可以建立造血系统人源化大鼠模型。此外还可以应用于干细胞移植、肿瘤生物学、人源化免疫系统重建、人类抗体制造、HIV研究等研究领域。

[0040] 上述技术方案得到的免疫缺陷大鼠模型不但填补了免疫缺陷大鼠模型品系空缺,符合试验指标,而且品系背景纯正。

[0041] 上述敲除了Prkdc基因的第二代大鼠A和敲除了IL2R γ 基因的第二代大鼠B都是采用CRISPR/Cas9技术构建的。CRISPR/Cas9技术与之前的Zinc-Finger和TALEN技术都可以实现对基因的敲除,但因为每个技术对基因编辑位点都有一定的要求,所以最终都到大鼠DNA敲除序列(位点)不一样,此外CRISPR/Cas9技术设计简单,操作方便,效率更高。

[0042] 上述的gRNA又称引导RNA,是CRISPR/Cas9技术的核心组成部分之一。

[0043] 进一步地,步骤(1)中的敲除大鼠Prkdc基因采用两条gRNA序列,分别为:第一外显子gRNA序列1:TTCCGGCACTATGGCGGACC;第一外显子gRNA序列2:GCCAGTTACCAGCTGATCCG。

[0044] 请结合图1,图1中示意了大鼠DNA第一外显子中要敲除Prkdc基因所使用的gRNA引导的大概位置。

[0045] 野生大鼠的Prkdc基因序列为:

[0046] SD-Prkdc-WT#1:

GGTTCGGCACTATGGCGGACCCGGGGGCCGGCTTGCGGTGCTGGCTA

[0047] CTACAGCTGCAGGAGTTCGTGTCCGCAGCAGACCGCTACAATGCTGCC

GGGGCCAGTTACCAGCTGATCCGTGGCCTGGGGCAAG

[0048] 通过CRISPR/Cas9技术对基因进行编辑,CRISPR/Cas9在gRNA的介导下结合到靶向

序列的DNA, Cas9蛋白在PAM (protospacer adjacent motif) 序列的第三个碱基处进行切割, 断开的DNA会进行末端连接修复, 此过程有可能插入一些碱基。在本方案中, 通过CRISPR/Cas9技术敲除后得到两个Prkdc敲除序列。

[0049] 第一Prkdc敲除序列缺失第20-114个共95个碱基, 突变1个碱基, 突变的为第115个, 由A突变为G。其序列具体如下:

[0050] Deletion#1:

[0051] GGTTCGGCACTATGGCGG-----missing 95 bases and mutating 1 base

[0052] -----GTCCGTGGCCTGGGGCAAG

[0053] 第二Prkdc敲除序列缺失第16-115个共100个碱基, 突变1个碱基, 突变的为第116个, 由T突变为C。其序列具体如下:

[0054] Deletion#2:

[0055] GGTTCGGCACTATG-----missing 100 bases and mutating 1 base

[0056] -----CCCGTGGCCTGGGGCAAG

[0056] 进一步地, 步骤(1)中敲除大鼠IL2R γ 基因采用两条gRNA序列, 分别为: 第二外显子gRNA序列1: CAGCCGACCAACCTCACTAT; 第四外显子gRNA序列2: GAGTGAATCTCAGGTAGAAC。

[0057] 进一步地, 步骤(1)中敲除大鼠IL2R γ 基因还采用另外两条gRNA序列, 分别为: 第二外显子gRNA序列1: CAGCCGACCAACCTCACTAT; 第四外显子gRNA序列3: GAGCAACCGAGATCGAAGCT。

[0058] 请结合图2, 图2中示意了大鼠DNA中要敲除IL2R γ 基因可使用的3条不同gRNA引导的大概位置。

[0059] 野生大鼠的IL2rg基因序列1为:

[0060] SD-IL2rg-WT#2:

[0061]

CAGTTCTGAGCCTCAGCCGACCAACCTCACTATGCACTATAGGTATGAGAAGGGGAGGGGTAGTACAGGAAGAAGA
GAAGGTGGGTTAGCTGAGAGAGACGGGGGAGCAAAAAGTGGGTAGCCAGCTCCTCAGGTACCATAACAGTTTCTCA
TGGGATAAGTTATCAGTTCAGACCAGATGAAGCTAGGCTATGGGCAGATGTGGTACCTACCTATGTTTGGCCCATCA
TTCTTTTGCTTGTAACCCTTCTCTAGGTACAAGGGATCTGATAATAATACATTCAGG
AGTGCAGCCACTATCTGTTCTCAAAAGAGATTACTTCTGGCTGTCAGATACAAAAGAAGATATCCAGCTCTACCAG
ACATTTGTTGTCCAGCTTCAGGACCCCCAGAAACCCAGAGGCGAGCCGAACAGAAGCTAAACCTACAGAATCTTGG
TAATCGGAAAGAAGTGGCCAAGAGGCCAGGGAGCTTAAAGGCACTGGAGTTTATAGATTGTTCTTTTCTCATTGTT
GGTCATGGGCAGAAAGGCGAAGATGGGGGGGGGGCGGGGAGGGATGAAGGAATTACCTCCAAGATCCTGACTTGTC
TAGGCCAGGGCAATGACCACGCACACATATTCCAGTGATCCCATGGGCTCCAGAGAATCTAACACTTTATAACCT
GAGTGAATCTCAGGTAGAAC

[0062] 采用CRISPR/Cas9技术, 第二外显子gRNA序列1和第四外显子gRNA序列2为引导

RNA,获得第一IL2R γ 敲除序列,缺失第17-678个共662个碱基。其序列具体如下:

[0063] Deletion#3:

missing 662 bases

CAGTTCTGAGCCTCAG-----
 [0064] -----TG

AATCTCAGGTAGAAC

[0065] 野生大鼠的IL2rg基因序列2为:

[0066] SD-IL2rg-WT#3:

GCACCTTGAATAGCAGTTCTGAGCCTCAGCCGACCAACCTCACTATGC
 ACTATAGGTATGAGAAGGGGGAGGGGTAGTACAGGAAGAAGAGAAGG
 [0067] TGGGTTAGCTGAGAGAGACGGGGGAGCAAAAAGTGGGTAGCCAGCT
 CCTCAGGTACCATAACCAGTTTCTCATGGGATAAGTTATCAGTTCAGACC
 AGATGAAGCTAGGCTATGGGCAGATGTGGTACCTACCTATGTTTGGCCC
 ATCATTCTTTTGCCTTGTAACCCTTCTCTAGGTACAAGGGATCTGATAAT
 AATACATTCCAGGAGTGCAGCCACTATCTGTTCTCAAAGAGATTACTT
 CTGGCTGTCAGATACAAAAGAAGATATCCAGCTCTACCAGACATTTGT
 TGTCCAGCTTCAGGACCCCCAGAAACCCAGAGGCGAGCCGAACAGA
 AGCTAAACCTACAGAATCTTGGTAATCGGGAAAGAAGTGGCCAAGAG
 GCCAGGGAGCTTAAAGGCACTGGAGTTTATAGATTGTTCTTTTCTCATT
 [0068] GTTGGTCATGGGCAGAAAGGCGAAGATGGGGGGGGGGCGGGGAGGG
 ATGAAGGGAATTACCTCCAAGATCCTGACTTGTCTAGGCCAGGGCAAT
 GACCACGCACACACATATTCCAGTGATCCCATGGGCTCCAGAGAATCTA
 ACACTTTATAACCTGAGTGAATCTCAGGTAGAACTGAGGTGGAAAAGC
 AGATACATAGAACGCTGTTTACAATACTTGGTGCAGTACCGGAGCAAC
CGAGATCGAAGCT

[0069] 采用CRISPR/Cas9技术,第二外显子gRNA序列1和第四外显子gRNA序列3为引导RNA,获得第二IL2R γ 敲除序列,缺失第17-767个共751个碱基,并在第16个碱基后插入第17-27个共8个碱基。其序列具体如下:

[0070] Deletion#4:

inserting 8 bases and missing 751

CCACTTGAATAGCAGATCAGAAT-----
 [0071] -----AACCGAGATCGAAG

CT

[0072] 进一步地,步骤(1)中,体外转录CAS9蛋白mRNA采用T7转录试剂盒、T3转录试剂盒

或SP6转录试剂盒。转录试剂盒的选取由启动gRNA和Cas9蛋白的启动子决定。

[0073] 进一步地,步骤(3)和步骤(4)中的假孕雌鼠在SPF级别条件下饲养。

[0074] SPF (Specefic pathogen Free) 级别是指无特定病原体级别。本方案中要构建的是免疫缺陷大鼠,CRISPR/Cas9技术敲除可能在第一代就产生纯合的免疫缺陷大鼠,所以假孕雌鼠需要在SPF条件下。

[0075] 本发明的技术方案中步骤(1)、(2)、(3)、(4)、(5)等标号不用于限定制备方法中各个步骤的顺序,方法中的各个步骤,只要逻辑上合理,各步骤的顺序可以变化。例如,上述的步骤(1)可以与步骤(2)同时独立进行;又例如,步骤(2)可以放在步骤(1)之前进行。

[0076] 下面通过实施例进一步说明上述具体实施方式,但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之内。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,按照常规方法和条件,或按照商品说明书选择。其他未做特别说明的试剂、原料和仪器设备均可通过商业途径直接购得。

[0077] 实施例一

[0078] (1) 将针对大鼠DNA的Prkdc和IL2R γ 基因敲除的gRNA分别进行体外转录,再分别与体外转录的CAS9蛋白mRNA混合,冻存于无RNA酶的超纯水中,得到相应的注射液A、注射液B备用。

[0079] 敲除大鼠Prkdc基因采用两条gRNA序列,分别为:第一外显子gRNA序列1: TTCCGGCACTATGGCGGACC;第一外显子gRNA序列2:GCCAGTTACCAGCTGATCCG。

[0080] 敲除大鼠IL2R γ 基因采用两条gRNA序列,分别为:第二外显子gRNA序列1: CAGCCGACCAACCTCACTAT;第四外显子gRNA序列2:GAGTGAATCTCAGGTAGAAC。

[0081] 体外转录CAS9蛋白mRNA采用T7转录试剂盒。

[0082] (2) 将人SIRPa DNA扩增,纯化,冻存于无RNA酶的超纯水中,得到注射液C,备用。

[0083] (3) 在SPF级别条件下饲养的受孕雌鼠腹腔中获取输卵管,用浓度为0.9%的生理盐水清洗后,显微镜下观察、挑取并收集受精卵。

[0084] (4) 采用显微注射法将注射液A和注射液B分别注射进步骤(3)获取的不同的受精卵的胞质中,将大鼠受精卵分别移植入SPF级别条件下饲养的不同的假孕雌鼠体内,培育得到第二代大鼠A和第二代大鼠B。

[0085] (5) 将注射液C注射进步骤(3)获取的另一受精卵的原核中,将大鼠受精卵移植入另一SPF级别条件下饲养的假孕雌鼠体内,培育得到第二代大鼠C;

[0086] (6) 将第二代大鼠A,第二代大鼠B,第二代大鼠C进行杂交,繁殖F1代;再将F1代进行杂交,得到敲除了IL2R γ 和Prkdc基因并转入了人SIRPa基因的免疫缺陷大鼠模型。

[0087] 实施例二

[0088] (1) 将针对大鼠DNA的Prkdc和IL2R γ 基因敲除的gRNA分别进行体外转录,再分别与体外转录的CAS9蛋白mRNA混合,冻存于无RNA酶的超纯水中,得到相应的注射液A和B,备用。

[0089] 敲除大鼠Prkdc基因采用两条gRNA序列,分别为:第一外显子gRNA序列1: TTCCGGCACTATGGCGGACC;第一外显子gRNA序列2:GCCAGTTACCAGCTGATCCG。

[0090] 敲除大鼠IL2R γ 基因采用两条gRNA序列,分别为:第二外显子gRNA序列1: CAGCCGACCAACCTCACTAT;第四外显子gRNA序列2:GAGTGAATCTCAGGTAGAAC。

[0091] 敲除大鼠IL2R γ 基因还采用另外两条gRNA序列,分别为:第二外显子gRNA序列1:CAGCCGACCAACCTCACTAT;第四外显子gRNA序列3:GAGCAACCGAGATCGAAGCT。

[0092] 体外转录CAS9蛋白mRNA采用T7转录试剂盒。

[0093] (2) 将人SIRPa DNA扩增,纯化,冻存于无RNA酶的超纯水中,得到注射液C,备用。

[0094] (3) 在SPF级别条件下饲养的受孕雌鼠腹腔中获取输卵管,用浓度为0.9%的生理盐水清洗后,显微镜下观察、挑取并收集受精卵。

[0095] (4) 采用显微注射法将注射液A和注射液B分别注射进步骤(3)获取的不同的受精卵的胞质中,将大鼠受精卵分别移植入SPF级别条件下饲养的假孕雌鼠体内,培育得到第二代大鼠A和第二代大鼠B。

[0096] (5) 将注射液C注射进步骤(3)获取的另一受精卵的原核中,将大鼠受精卵移植入另一SPF级别条件下饲养的假孕雌鼠体内,培育得到第二代大鼠C;

[0097] (6) 将第二代大鼠A,第二代大鼠B,第二代大鼠C进行杂交,繁殖F1代;再将F1代进行杂交,得到敲除了IL2R γ 和Prkdc基因并转入了人SIRPa基因的免疫缺陷大鼠模型。

[0098] 图3为正常野生大鼠(WT)和本发明一个具体实施方式中过表达人SIRPa(hSIRPa)大鼠(即第二代大鼠C)的外周血中hSIRPa和rSIRPa表达情况的流式细胞测量图谱。

[0099] 图4为正常野生大鼠(WT)、Prkdc单敲(Prkdc^{+/-})和双敲(Prkdc^{-/-})大鼠的外周血中NK细胞、B淋巴细胞和T淋巴细胞的流式细胞测量图谱。

[0100] 图5为正常野生大鼠(WT)、IL2R γ 单敲(IL2R γ ^{+/-})和双敲(IL2R γ ^{-/-})大鼠的外周血中NK细胞、B淋巴细胞和T淋巴细胞的流式细胞测量图谱。

[0101] 图6为正常野生大鼠(WT)、SG(IL2R γ ^{-/-},Prkdc^{-/-})大鼠和NSG(hSIRPa,IL2R γ ^{-/-},Prkdc^{-/-})大鼠模型的外周血中NK细胞、B淋巴细胞和T淋巴细胞的流式细胞测量图谱,以及hSIRPa和rSIRPa表达情况的流式细胞测量图谱。

[0102] 图4中的Prkdc单敲(Prkdc^{+/-})和双敲(Prkdc^{-/-})大鼠即第二代大鼠A可能的两种敲除情况。图5中IL2R γ 单敲(IL2R γ ^{+/-})和双敲(IL2R γ ^{-/-})大鼠即第二代大鼠B可能的两种敲除情况。图6中的NSG大鼠即本发明的一个优选的实施例所构建的免疫缺陷大鼠模型。

[0103] 比较例一

[0104] 采用NSG大鼠进行人的造血干细胞CD34尾静脉注射移植,移植1*10⁶个人的CD34+细胞。5周后,外周血和骨髓中均检测到了人的免疫细胞,并且在未移植人的胸腺情况下,主要是以人的B细胞(hCD19阳性)为主,占65%以上,而T细胞(hCD3阳性)和单核细胞/巨噬细胞(hCD14阳性)占很少比例。这充分表明NSG大鼠可以用于建立人源化大鼠。

[0105] 图7为人的造血干细胞CD34尾静脉注射移植本发明其中一个实施方式所构建出的免疫缺陷大鼠模型5周后发育成人外周血细胞的情况。

[0106] 比较例二

[0107] 用肺癌肿瘤细胞H460和人胚胎干细胞H9分别在SG和NSG大鼠模型皮下注射1*10⁵个细胞。

[0108] 图8A-8C为H460肺癌细胞在SG和NSG大鼠皮下的成瘤情况(大小、体积、生长情况)。

[0109] 图8D-8F为人胚胎干细胞H9在SG和NSG大鼠皮下的成瘤情况(大小、体积、生长情况)。

[0110] 最后应说明的是:以上各实施例仅用以帮助理解本发明的技术方案及核心思想,而非对其限制;尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人

员应当理解：其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改，或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换，而这些修改或者替换也落入本发明权利要求的保护范围内。

SEQUENCE LISTING

<110> 南方医科大学;广东圣赛生物科技有限公司

<120> 一种免疫缺陷大鼠模型的构建方法

<130> EKP160641-DD-1-SQ

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 133

<212> DNA

<213> 野生大鼠

<400> 1

ggttccggca ctatggcgga cccgggggccc ggcttgccgt gctggctact acagctgcag 60
gagttcgtgt ccgcagcaga ccgetacaat gctgccgggg ccagttacca gctgatecgt 120
ggcctggggc aag 133

<210> 2

<211> 38

<212> DNA

<213> 大鼠

<400> 2

ggttccggca ctatggcggg tccgtggcct ggggcaag 38

<210> 3

<211> 33

<212> DNA

<213> 大鼠

<400> 3

ggttccggca ctatgcccgt ggcctggggc aag 33

<210> 4

<211> 695

<212> DNA

<213> 野生大鼠

<400> 4

cagttctgag cctcagccga ccaacctcac tatgcactat aggtatgaga agggggaggg 60
gtagtacagg aagaagagaa ggtgggtag ctgagagaga cgggggagca aaaaagtggg 120
tagccagctc ctcaggtacc ataccagttt ctcatgggat aagttatcag ttcagaccag 180
atgaagctag gctatgggca gatgtggtac ctacctatgt ttgcccate attcttttgc 240
cttghtaacc ttctctaggt acaagggate tgataataat acattccagg agtgcagcca 300
ctatctgttc tcaaaagaga ttacttctgg ctgtcagata caaaaagaag atatccagct 360
ctaccagaca tttgtgtgcc agcttcagga cccccagaaa ccccagagge gagccgaaca 420

gaagctaaac ctacagaatc ttggtaatcg ggaaagaagt ggccaagagg ccaggagct 480
 taaaggcact ggagtttata gattgttctt ttctcattgt tggatcatggg cagaaaggcg 540
 aagatggggg gggggcgggg agggatgaag ggaattacct ccaagatcct gacttgtcta 600
 ggccagggca atgaccacgc acacacatat tccagtgate ccatgggctc cagagaatct 660
 aacactttat aacctgagtg aatctcaggt agaac 695

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> 大鼠

<400> 5

cagttctgag cctcagtga tctcaggtag aac 33

<210> 6

<211> 783

<212> DNA

<213> 野生大鼠

<400> 6

gcacttggaa tagcagttct gacccctcagc cgaccaacct cactatgcac tataggtatg 60
 agaagggggga ggggtagtac aggaagaaga gaaggtgggt tagctgagag agacggggga 120
 gcaaaaaagt gggtagccag ctctcaggt accataccag tttctcatgg gataagttat 180
 cagttcagac cagatgaagc taggctatgg gcagatgtgg tacctaccta tgtttgccc 240
 atcattcttt tgcttgtaa cccttctcta ggtacaaggg atctgataat aatacattcc 300
 aggagtgcag ccactatctg ttctcaaaag agattacttc tggctgtcag atacaaaaag 360
 aagatatcca gctctaccag acatttggtg tccagettca ggacccccag aaacccccaga 420
 ggcgagcccga acagaagcta aacctacaga atcttggtaa tcgggaaaga agtggccaag 480
 aggccagggga gcttaaaggc actggagttt atagattggt cttttctcat tgttgggtcat 540
 gggcagaaaag gcgaagatgg gggggggcg gggagggatg aagggaatta cctccaagat 600
 cctgacttgt ctaggccagg gcaatgacca cgcacacaca tattccagtg atcccatggg 660
 ctccagagaa tctaacactt tataacctga gtgaatctca ggtagaactg aggtggaaaa 720
 gcagatacat agaacgctgt ttacaatact tgggtgcagta ccggagcaac cgagatcgaa 780
 gct 783

<210> 7

<211> 40

<212> DNA

<213> 大鼠

<400> 7

ccacttggaa tagcagatca gaataaccga gatcgaagct 40

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列
<400> 8
ttccggcact atggcggacc 20
<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 9
gccagttacc agctgatccg 20
<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 10
cagccgacca acctcactat 20
<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 11
gagtgaatct caggtagaac 20
<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 12
gagcaaccga gatcgaagct 20

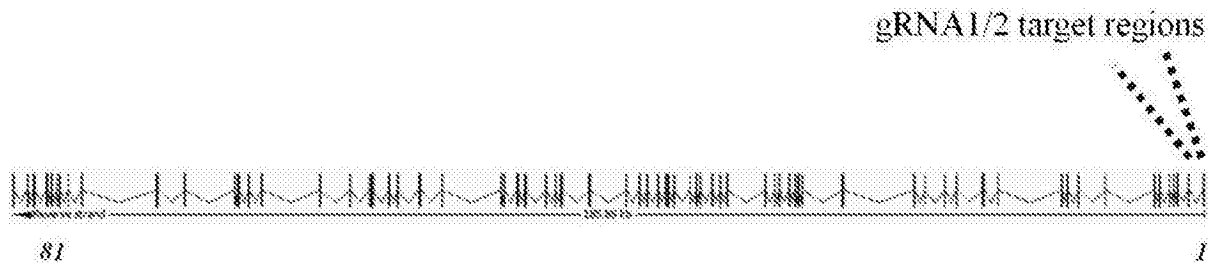


图1

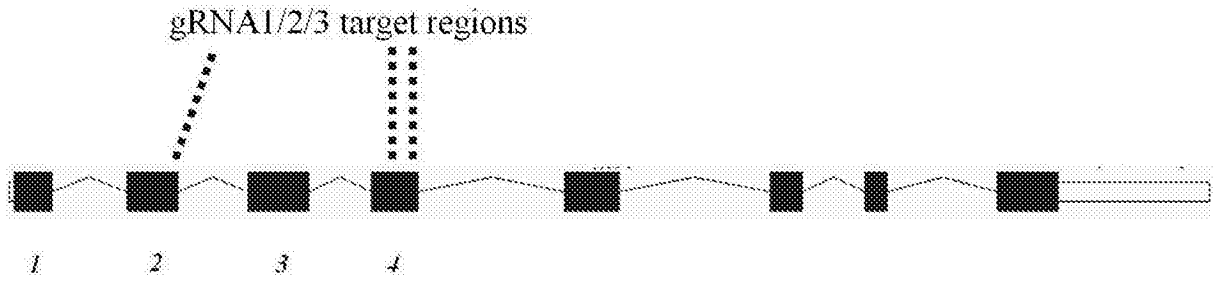


图2

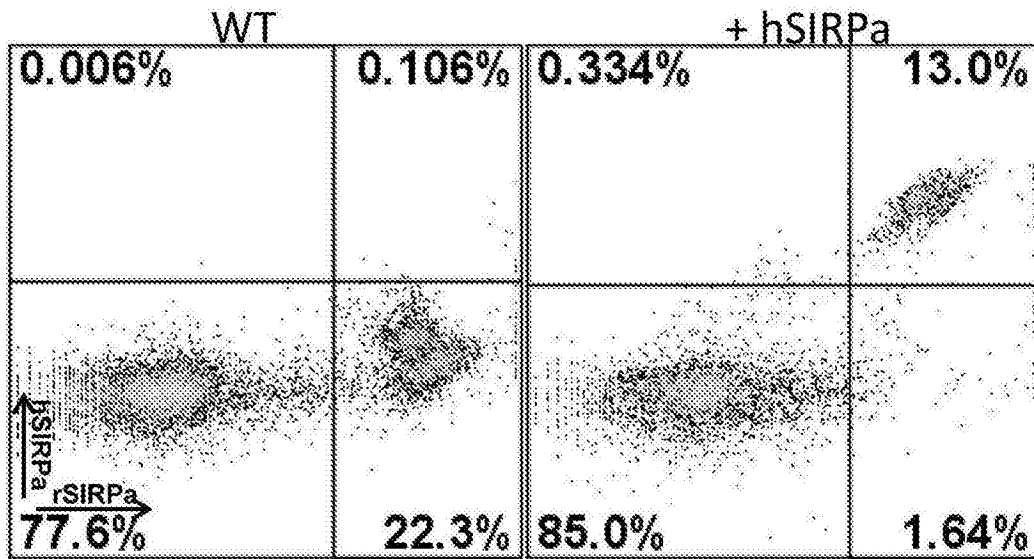


图3

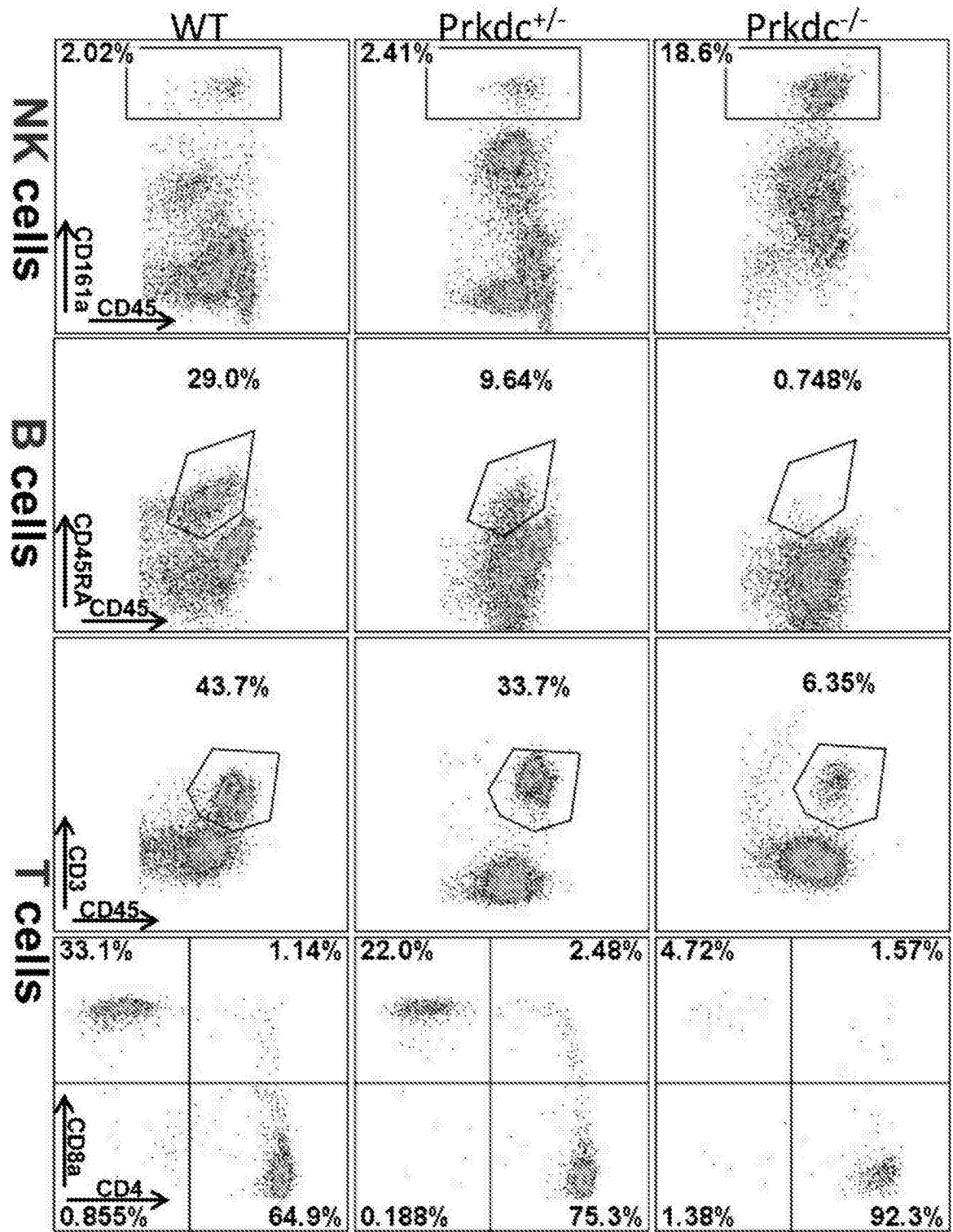


图4

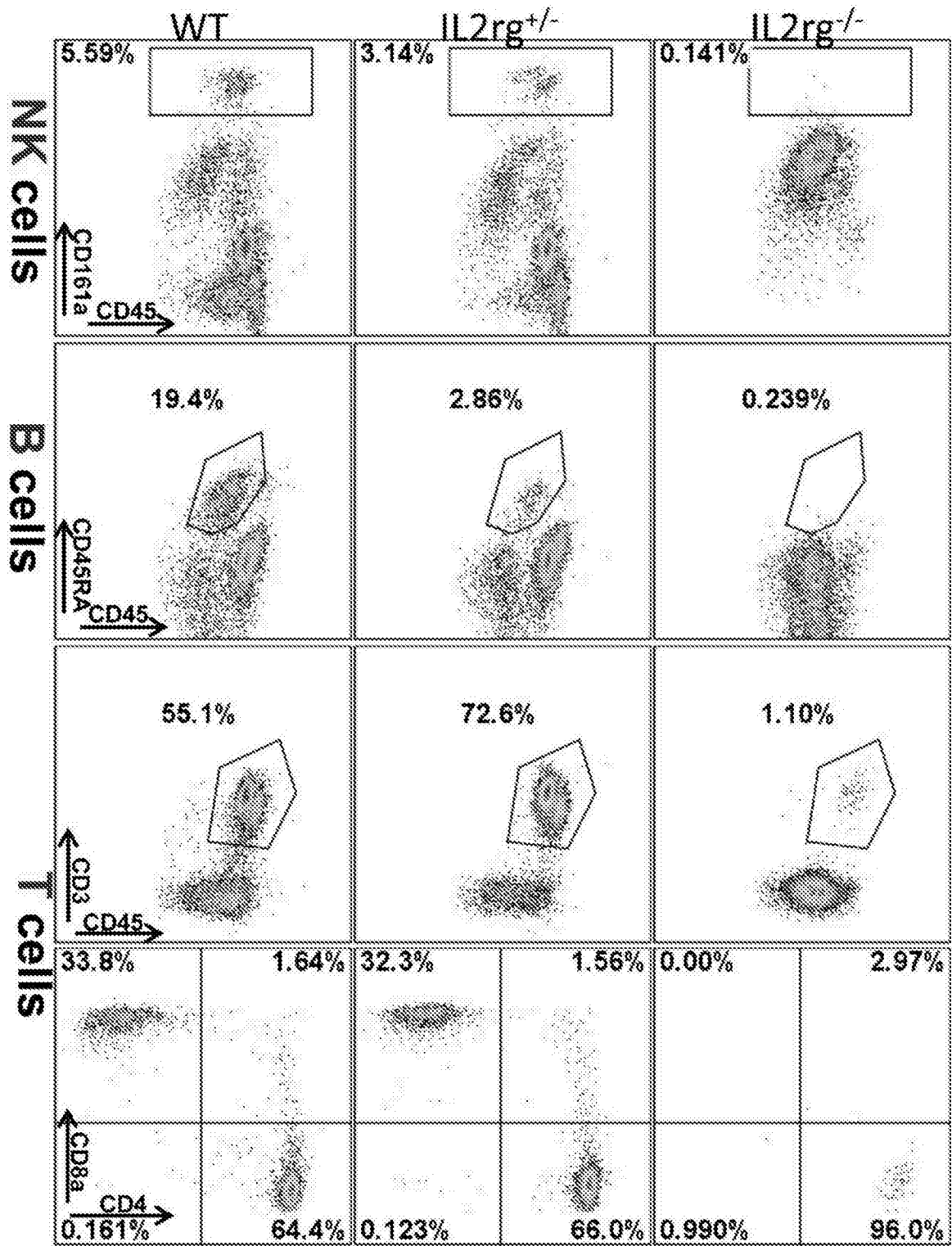


图5

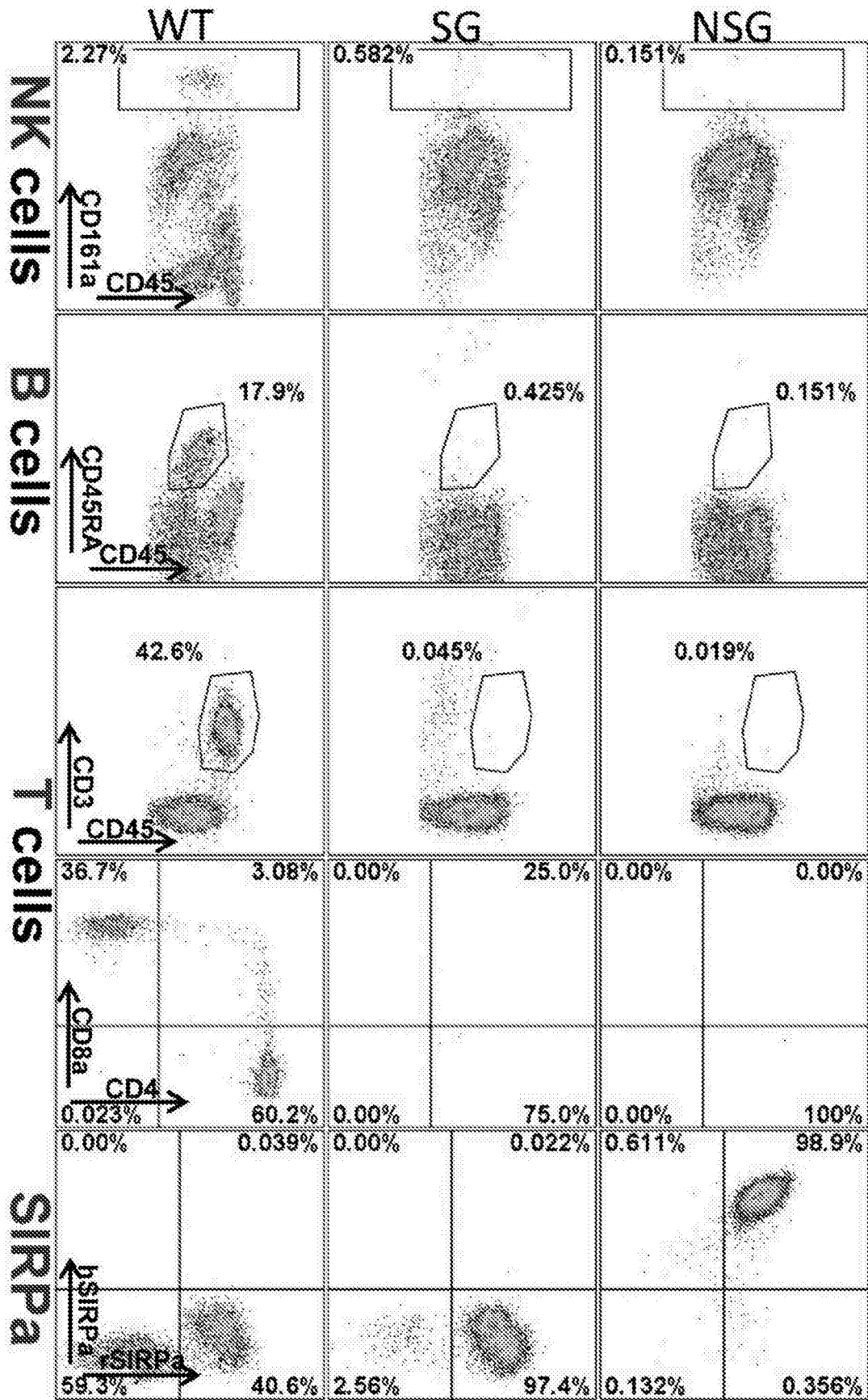


图6

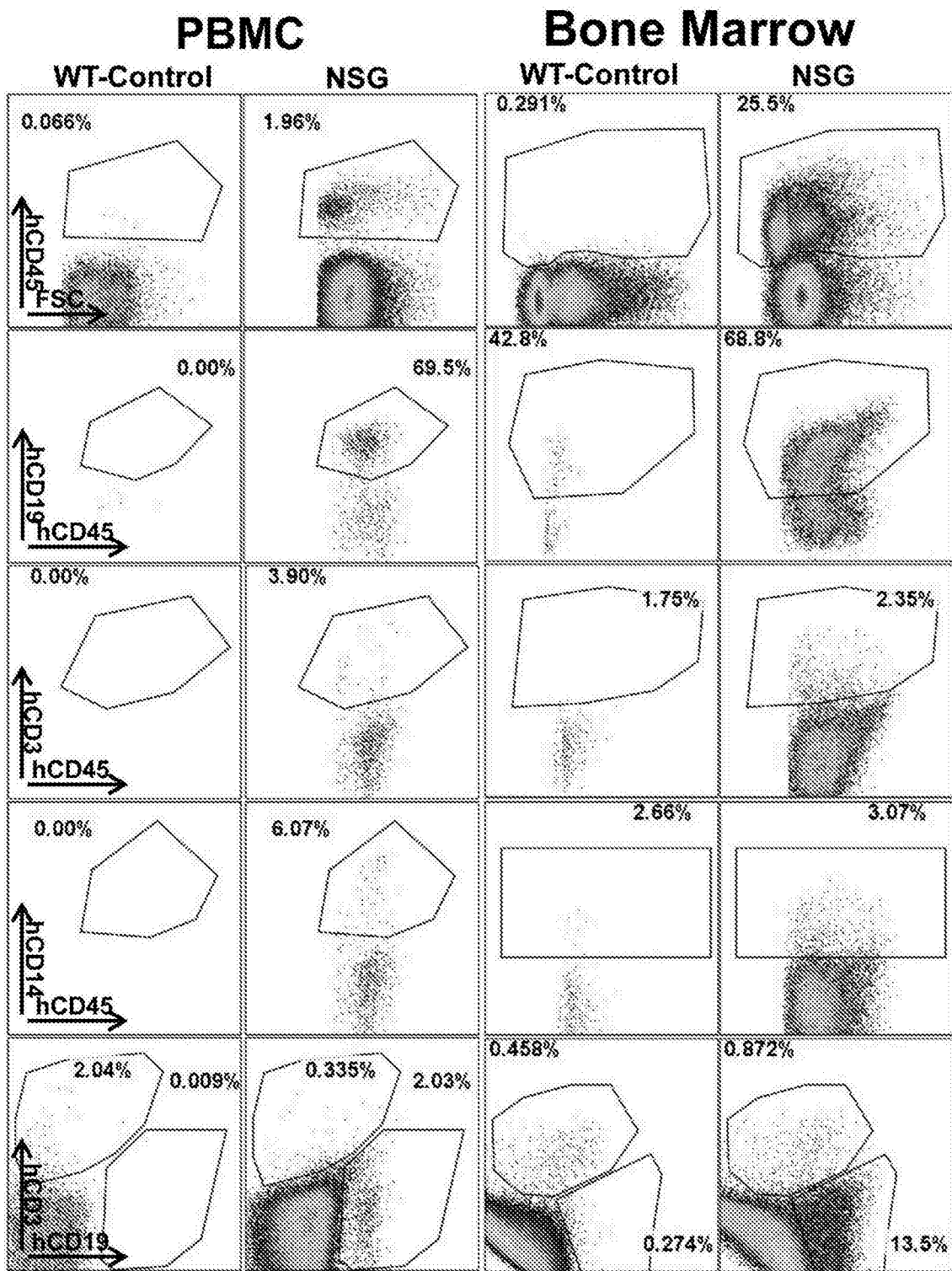


图7

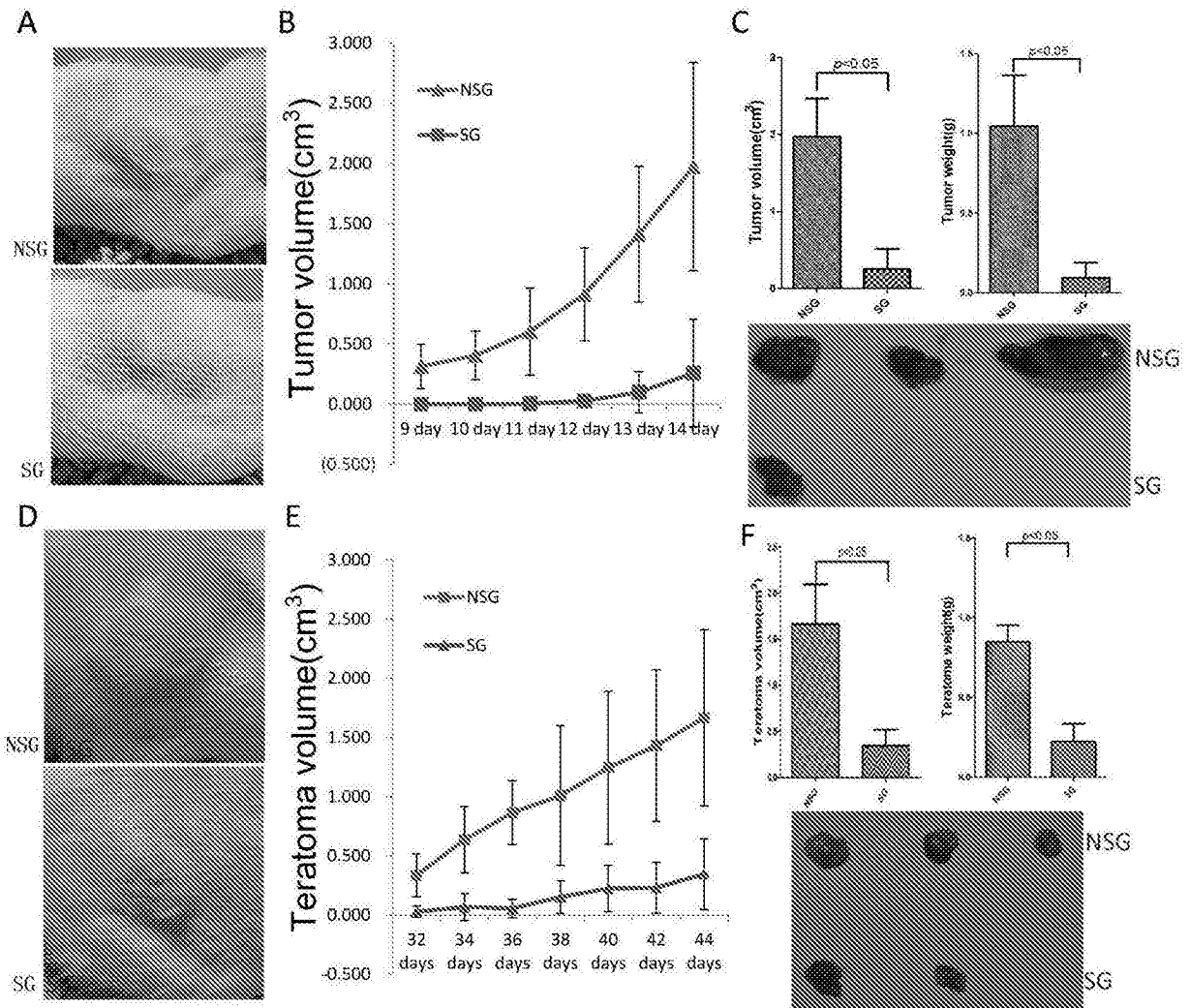


图8