



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 117264891 B

(45) 授权公告日 2024. 10. 22

(21) 申请号 202311262260.1

(22) 申请日 2023.09.27

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 117264891 A

(43) 申请公布日 2023.12.22

(73) 专利权人 中国科学院香港创新研究院再生
医学与健康创新中心

地址 中国香港新界沙田区香港科学园科技
大道西15号5楼

专利权人 中国科学院广州生物医药与健康
研究院

(72) 发明人 请求不公布姓名 请求不公布姓名
请求不公布姓名 请求不公布姓名

(74) 专利代理机构 北京轻创知识产权代理有限
公司 11212

专利代理师 姚晓丽

(51) Int. Cl.

C12N 5/0793 (2010.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 35/30 (2015.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61P 25/14 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 115645539 A, 2023.01.31

US 2005147970 A1, 2005.07.07

审查员 姚进孝

权利要求书1页 说明书9页

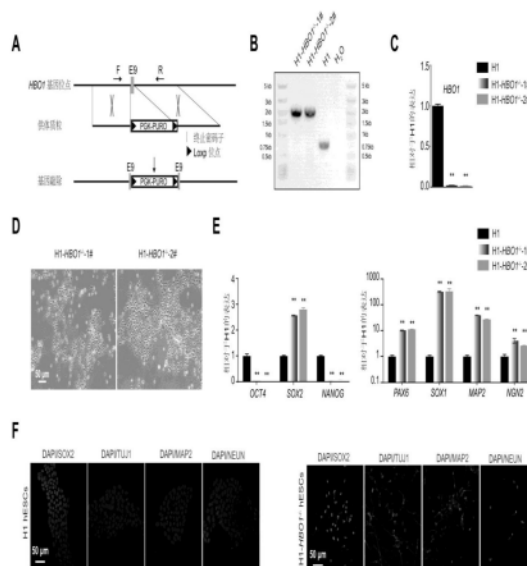
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

一种获得高纯度神经细胞的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种获得高纯度神经细胞的方法,涉及生物领域,敲除人多能干细胞的HB01基因,获得敲除HB01基因的人多能干细胞株;将所述敲除HB01基因的人多能干细胞株向神经外胚层分化,制备得到神经细胞。敲除人多能干细胞的HB01基因的细胞退出多能性,无需诱导即可自发分化为神经元样细胞,实现获得高纯度的神经细胞。



1. 一种获得高纯度神经细胞的方法,其特征在于,包括如下步骤:

- (1) 敲除人胚胎干细胞H1系的HB01基因,获得敲除HB01基因的人胚胎干细胞H1系;
- (2) 将所述敲除HB01基因的人胚胎干细胞H1株向神经外胚层分化,制备得到神经细胞。

2. 根据权利要求1所述一种获得高纯度神经细胞的方法,其特征在于,敲除人胚胎干细胞H1系的HB01基因为第九号外显子中删除34144到34325位182bp的核苷酸,序列如SEQ ID NO:1所示,在所述删除的位置插入终止密码子,所述终止密码子序列如SEQ ID NO:2所示。

3. 根据权利要求1至2任一项所述一种获得高纯度神经细胞的方法,其特征在于,步骤(1)具体为:利用CRISPR/Cas9技术敲除人胚胎干细胞H1系的HB01基因,获得敲除HB01基因的人胚胎干细胞H1系。

4. 根据权利要求3所述一种获得高纯度神经细胞的方法,其特征在于:

利用CRISPR/Cas9技术敲除人胚胎干细胞H1系的HB01基因包括具体如下的步骤:

(1-1) 设计靶向HB01基因的sgRNA,克隆至CRISPR/Cas9质粒中,构建靶向HB01基因敲除的质粒,并构建含有同源臂的donor质粒;

(1-2) 将步骤(1-1)中靶向HB01基因敲除质粒和含有同源臂的donor质粒转染到所述人胚胎干细胞H1系中,经筛选,得到敲除HB01基因的人胚胎干细胞H1系。

5. 根据权利要求4所述一种获得高纯度神经细胞的方法,其特征在于,步骤(1-1)中sgRNA的核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示。

6. 根据权利要求4所述一种获得高纯度神经细胞的方法,其特征在于,步骤(1-1)中,靶向HB01基因敲除的质粒为含有Cas9的pX330质粒,含有同源臂donor质粒为含有donor的pUC57质粒。

7. 根据权利要求1所述一种获得高纯度神经细胞的方法,其特征在于,步骤(2)中所述敲除HB01基因的人胚胎干细胞H1系地向神经外胚层分化具体步骤为:将所述敲除HB01基因的人胚胎干细胞H1系在培养基中培养,传代分化得到所述神经细胞。

8. 权利要求1至7所述的方法获得的神经细胞作为制备治疗帕金森或亨廷顿药物中的应用。

一种获得高纯度神经细胞的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物领域,具体涉及一种获得高纯度神经细胞的方法。

背景技术

[0002] 目前已有研究证明,将多巴胺能神经元移植到患有帕金森或亨廷顿病人的大脑中,神经元不仅能存活还能缓解疾病症状,给疾病的治疗带来希望。但是移植所需的神经细胞从何而来却是一大难题。体内极难分离得到大量纯化的神经谱系细胞,所以体外分化产生人神经谱系的细胞进行细胞治疗是最切实可行的方法。

[0003] 为了在体外获得神经谱系的细胞,前期的研究中科学家将神经相关的转录因子在体细胞内过表达,成功将体细胞转变为神经谱系的细胞。但是这种转分化的方式效率低下,并且无法获得大量的可用于移植的神经谱系的细胞,所以其应用前景有限。

[0004] 人胚胎干细胞(human Embryonic Stem Cells,hESCs)拥有无限增殖的潜能,并且能分化为所有类型的体细胞,所以其在再生医学领域有很好的应用前景。目前有两种常用的方法将hESCs诱导为神经谱系的细胞。第一种是利用hESCs具有多向分化的潜能,诱导其形成EB球从中分离得到神经干细胞;第二种是根据发育生物学知识利用化学成分清晰的培养基诱导其分化为神经干细胞。经典的分化方法是利用N2、B27培养基并添加小分子SB431542和Dorsomorphin抑制TGF β -SMAD信号通路,提高hESCs分化为神经干细胞的效率。但是这两种方法都有一个明显的缺陷,无法高效的指导hESCs特定的向神经谱系分化,在诱导过程中会有其它谱系的细胞出现。

[0005] 除此之外,神经干细胞在体外培养会自发分化为神经元和胶质细胞,即使在FGF2和EGF等因子的作用下能促进神经干细胞的增殖,但是仍然无法阻止其自发分化,这一现象导致在体外大量扩增神经干细胞存在困难。鉴于此,本发明一种获得高纯度神经细胞的方法。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题如何解决在体外大量扩增神经干细胞时存在的纯度不够的现象。目的是提供一种获得高纯度神经细胞的方法,以获得高纯度神经细胞。

[0007] 本发明解决上述技术问题的技术方案如下:

[0008] 第一方面,本发明提供一种获得高纯度神经细胞的方法,包括如下步骤:

[0009] (1) 敲除人多能干细胞的HB01基因,获得敲除HB01基因的多能干细胞株;

[0010] (2) 将所述敲除HB01基因的多能干细胞株向神经外胚层分化,制备得到神经细胞。

[0011] 在上述技术方案的基础上,本发明还可以做如下改进。

[0012] 进一步,敲除人多能干细胞的HB01基因为第九号外显子中删除34144到34325位182bp的核苷酸,序列如SEQ ID NO:1所示,在所述删除的位置插入终止密码子,所述终止密码子序列如SEQ ID NO:2所示。

[0013] 进一步,所述人多能干细胞包括人胚胎干细胞和人诱导性多能干细胞进一步,所述人胚胎干细胞为人胚胎干细胞H1系等。

[0014] 另外,根据现有的实验结果和相关文献报道可知在primed胚胎干细胞中应该是同样的表型。

[0015] 进一步,步骤(1)具体为:利用CRISPR/Cas9技术敲除人多能干细胞的HB01基因,获得敲除HB01基因的人多能干细胞株。

[0016] 进一步,利用CRISPR/Cas9技术敲除人多能干细胞的HB01基因包括具体如下的步骤:

[0017] (1-1) 设计靶向HB01基因的sgRNA,克隆至CRISPR/Cas9质粒中,构建靶向HB01基因敲除的质粒,并构建含有同源臂的donor质粒;

[0018] (1-2) 将步骤(1-1)中靶向HB01基因敲除质粒和含有同源臂的donor质粒转染到所述人多能干细胞中,经筛选,得到敲除HB01基因的人多能干细胞株。

[0019] 其中,构建含有同源臂的donor质粒,利用细胞DNA同源重组修复精确的敲除HB01的核心结构域;同源臂有两段,左同源臂称为左臂,右同源臂称为右臂。在基因组中,左臂和右臂中间的序列则是本发明计划敲除的区域;除此之外,本发明还会在左臂的反向上添加终止密码子,确保基因敲除的可靠性;左臂上游引物序列AGAGGCAGGGTTTGCTGGCTAC;左臂下游引物序列CTCCTATTGCCAAGAAATCAAAAGTCA;右臂上游引物序列GCACATGGTGAGTTGTCTTGGGTT;右臂下游引物序列CTGGAGAACCTGAGTCAAAGCAACA。

[0020] 进一步,步骤(1-1)中sgRNA的核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示。

[0021] 进一步,步骤(1-1)中,靶向HB01基因敲除的质粒为含有Cas9的pX330质粒,含有同源臂donor质粒为含有donor的pUC57质粒。

[0022] 进一步,步骤(2)中所述敲除HB01基因的人多能干细胞株地向神经外胚层分化具体步骤为:将所述敲除HB01基因的人多能干细胞株在培养基(例如mTeSR1培养基)中培养,传代分化得到所述神经细胞。

[0023] 第二方面,提供一种神经细胞的应用,将所述方法获得的神经细胞用于治疗帕金森或亨廷顿的药物中。

[0024] 本发明在研究过程中发现乙酰转移酶HB01在hESCs自我更新以及早期命运决定过程中发挥重要作用,缺失HB01的人多能干细胞退出多能性,丧失了向中、内胚层分化的潜能,具有向神经外胚层分化的倾向性。因此,构建了可诱导敲除HB01的人多能干细胞作为种子细胞用于获得高纯度的人神经谱系细胞。并通过以下实验进行构建和验证:

[0025] (1) 通过CRISPR/Cas9技术联合同源重组的方式在人胚胎干细胞系H1中敲除HB01,发现H1-HB01^{-/-}hESCs退出多能性并特异地向神经外胚层分化,最终形成神经元样细胞;

[0026] (2) 通过构建可诱导敲除HB01的H1 hESCs(H1-OE-HB01^{-/-}hESCs),在添加强力霉素(Doxycycline, Dox)的条件下其诱导HB01的表达维持自我更新,在不添加Dox的条件下其缺失HB01,也会退出多能性并特异的向神经外胚层分化,最终形成神经元样细胞;

[0027] (3) 通过畸胎瘤实验和BMP4诱导原肠胚形成模型,发现缺失HB01的H1 hESCs丧失了向中、内胚层分化的潜能,更倾向于向神经外胚层分化。

[0028] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:敲除人多能干细胞的HB01基因的细胞退出多能性,无需诱导即可自发分化为神经元样细胞。例如H1-OE-HB01^{-/-}hESCs在添加Dox时

能维持自我更新大量增殖,撤掉Dox后无需诱导自发向神经谱系分化,15天后即可产生神经元样细胞。H1-0E-HB01^{-/-}hESCs丧失了向中、内胚层分化的潜能,更倾向于向神经外胚层分化。

附图说明

[0029] 图1是本发明的实施例1提供的在H1 hESCs中敲除HB01 (H1-HB01^{-/-}hESCs) 导致其退出多能性能够并自发分化出神经元细胞的实验结果图;其中,A为针对HB01的第九个外显子;B为PCR胶图;C为RT-qPCR分析野生型H1和敲除细胞系的HB01的转录水平柱状图;D为HB01敲除细胞系培养30天后的细胞形态图,标尺为200 μ m;E为在野生型H1和HB01敲除细胞系中进行RT-qPCR分析多能性基因OCT4、SOX2、NANOG以及神经外胚层基因PAX6、SOX1、MAP2、NGN2的表达,野生型H1为对照;F为免疫荧光分析野生型H1和HB01敲除细胞系中SOX2、TUJ1、MAP2、NEUN(均为红色)的表达,DAPI(蓝色)指示细胞核,标尺为50 μ m;

[0030] 图2是本发明的实施例2提供的在H1 hESCs中构建可诱导敲除HB01细胞系(H1-0E-HB01^{-/-}hESCs)的示意图和实验结果图;其中,A为通过Tet-on过表达系统;B为通过蛋白印迹验证;C为通过RT-qPCR证明DOX能调控HB01的表达,添加DOX能诱导HB01的表达,撤掉DOX后HB01的表达恢复到正常水平,野生型H1为对照;D为构建可诱导敲除HB01的示意图;E为PCR胶图;F为通过RT-qPCR证明DOX能调控HB01的表达,添加DOX能诱导HB01的表达,撤掉DOX后HB01不表达;

[0031] 图3是本发明的实施例2提供的在H1-0E-HB01^{-/-}hESCs中添加Dox维持自我更新,撤掉Dox其自发特化为神经谱系细胞的实验结果图;其中,A为可诱导敲除细胞系,在添加DOX(+DOX)和撤掉DOX(-DOX)后5天、10天、15天、20天的细胞形态图;B为RT-qPCR分析可诱导敲除细胞系在+DOX与-DOX的D5、D10、D15、D20时多能性基因OCT4、NANOG、SOX2,中内胚层基因T、RUNX1、SOX17,神经外胚层PAX6、SOX1、MAP2的表达;C为免疫荧光照片展示可诱导敲除细胞系在+DOX与-DOX的D35细胞中TUJ1(绿色)/SOX2(红色)、MAP2(红色)/TUJ1(绿色)、TH(绿色)/GABA(红色)神经谱系标记基因的表达,DAPI(蓝色)指示细胞核的位置,标尺为50 μ m;D为蛋白印迹实验照片展示野生型H1与可诱导敲除细胞系在+DOX与-DOX D5、D10、D15、D20的细胞中多能性基因OCT4、SOX2、NANOG的富集水平;

[0032] 图4是本发明的实施例3提供的缺失HB01的H1 hESCs丧失了向中内胚层分化的潜能的实验结果图,其中,A为蛋白印迹实验照片,GAPDH为对照;B为通过BMP4诱导原肠胚形成的示意图;C为通过BMP4诱导野生型H1和可诱导敲除细胞系-DOX3天形成原肠胚的细胞形态图;D为免疫荧光检测野生型H1、可诱导敲除细胞系在BMP4诱导三天之后SOX2(红色)/NES(绿色)、GATA3(绿色)/T(红色)、GATA3(绿色)/SOX17(红色)、OCT4(绿色)/GATA6(红色)的表达,DAPI(蓝色)指示细胞核的位置,标尺为50 μ m;E为野生型H1和可诱导敲除细胞系撤掉DOX的条件下形成畸胎瘤的H&E染色图。

具体实施方式

[0033] 以下对本发明的原理和特征进行描述,所举实例只用于解释本发明,并非用于限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的文献所描述的技术或条件,或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可通过正规渠

道商购得的常规产品。

[0034] 实施例1

[0035] 在人胚胎干细胞中敲除HB01导致其退出多能性并特异地转变为神经谱系的细胞。结果如图1,图1是本发明的实施例1提供的在H1 hESCs中敲除HB01 (H1-HB01^{-/-}hESCs) 导致其退出多能性能够并自发分化出神经元细胞的实验结果图;其中,A为针对HB01的第九个外显子;B为PCR胶图,鉴定HB01敲除细胞系基因型,野子进行敲除,设计sgRNA和同源臂示意图。生型的H1是阴性对照。C为RT-qPCR分析野生型H1和敲除细胞系的HB01的转录水平柱状图;野生型H1为对照;D为HB01敲除细胞系培养30天后的细胞形态图,标尺为200 μm ;E为在野生型H1和HB01敲除细胞系中进行RT-qPCR分析多能性基因OCT4、SOX2、NANOG以及神经外胚层基因PAX6、SOX1、MAP2、NGN2的表达;野生型H1为对照;F为免疫荧光分析野生型H1和HB01敲除细胞系中SOX2、TUJ1、MAP2、NEUN (均为红色) 的表达,DAPI (蓝色) 指示细胞核,标尺为50 μm 。

[0036] 具体的过程如下:

[0037] 1、构建用于获得神经细胞的胚胎干细胞株

[0038] 一种用于获得神经细胞的胚胎干细胞株的构建方法,包括如下步骤:利用CRISPR/Cas9技术敲除人胚胎干细胞(与2018年5月4日在WiCell Research Institute购买)的HB01基因,得到用于获得神经细胞的胚胎干细胞株。

[0039] 具体的,包括如下具体步骤:本发明针对HB01的MYST结构域设计了靶向敲除,在第九号外显子中删除了182bp(基因序列),并且加入了终止密码子使翻译提前终止确保基因敲除的有效性(图1A)。构建好敲除所需的质粒后,在野生型H1中通过电转的方式进行基因敲除实验。

[0040] (1) 敲除质粒的构建

[0041] 利用CRISPR/Cas9技术可以靶向基因组产生双链断裂,DNA的双链断裂会激活细胞的DNA修复功能,根据修复是否需要模板可以分为同源重组和非同源末端修复。相比于非同源末端随机的不可控的修复,同源重组由于提供了同源臂DNA会以同源臂为模板进行重组,修复之后的DNA序列会和同源臂一致,所以我们选择CRISPR/Cas9联合同源重组技术设计靶基因核心结构域的敲除。

[0042] 1) sgRNA设计原理:为了实现基因敲除的目标,在NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)寻找相关基因的关键结构域。HB01是乙酰转移酶,我们针对它具有乙酰转移酶活性的MYST结构域进行敲除。

[0043] 2) sgRNA设计方法:把编码关键结构域的mRNA序列上传到可以自动设计sgRNA的网站(<https://cctop.cos.uni-heidelberg.de/>),寻找效率较高脱靶位点较少的sgRNA。sgRNA的序列ACCAGGTATCAAGCTCATAG(SEQ ID NO:3)。

[0044] 3) 退火复性:相关的引物合成都是在广州擎科生物公司完成的,引物合成后用ddH₂O稀释成10 μM ,将两条互补的引物退火复性。配好体系后,利用PCR仪完成退火复性,退火产物可以在4 $^{\circ}\text{C}$ 长期保存。

[0045] 4) 酶切质粒:退火后的产物,要连接到pX330载体上。在连接之前要先将pX330载体进行酶切(快切酶Bpi I),37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱酶切1小时。对酶切之后的产物进行DNA琼脂糖凝胶电泳,鉴定质粒是否切开(切开之后的质粒是线性的,会比原质粒迁移速度慢)。利用胶回收试

剂盒(诺唯赞)纯化回收酶切产物,纯化回收的酶切质粒可以在-20°C长期保存。

[0046] 5) 连接:将退火之后的产物与已经酶切好的pX330质粒进行连接,16°C金属浴中连接1小时,连接后的产物可以直接进行连接转化。

[0047] 6) 转化:在1.5mL的EP管中将10 μ L的连接产物与50 μ L的大肠杆菌DH5 α 感受态混匀,插入冰中静止30分钟。之后放入42°C水浴锅中90秒,再插入冰中放置2分钟。在超净工作台向EP管中加入120 μ L的LB液体培养基混匀,将混合物均匀的涂布到LB的固体平板上,放入37°C恒温箱培养16小时。

[0048] 7) 测序鉴定:等到有菌落长出,挑选单菌落到700 μ L的LB液体培养基中,在37°C摇床中培养数小时。菌液浑浊后送公司测序,相关的测序是在广州艾基公司和擎科公司完成的。选择测序对的菌液,用去内毒素试剂盒提质粒

[0049] (2) 敲除细胞系的构建

[0050] 1) 细胞培养:当H1细胞密度达到80%的时候,细胞就可以用来做电转。电转是指将之前已经构建好的sgRNA和供体质粒,一起转入H1细胞。利用CRISPR/Cas9和同源重组修复的技术对靶基因进行敲除。

[0051] 2) 细胞电转:当细胞长到合适的密度后,吸去培养基,用DMEM/F12清洗细胞。加入700 μ L的Accutase消化细胞,放入细胞培养箱中,消化5分钟左右,细胞会变成单细胞。加入等体积的DMEM/F12稀释Accutase终止消化,轻轻吹打重悬细胞,收集到1.5mL的EP管中,200g离心5分钟。去上清,向EP管中加入电转试剂(82 μ L solution+18 μ L supplement)和之前构建好的电转质粒(4 μ g pUC57-LPR和4 μ g pX330-sgRNA),轻轻吹打重悬细胞,将细胞悬液转移到电转杯中。将电转杯放入电转仪中,选择电转程序B-016,进行电转。之后立即向电转杯中补加800 μ L的mTeSR1,重悬细胞,按照1:3的比例分装到6孔板的3个孔中,向孔内补加新鲜培养基到2mL,并加入终浓度为0.5 μ M的Thiazovivin,摇匀后,放入细胞培养箱中培养。之后按照正常细胞培养的方式培养。

[0052] 3) 细胞筛选:如果细胞成功的被敲除基因,不论是单等位基因还是双等位基因敲除都具有puromycin的抗性。而没有敲除的细胞对puromycin非常敏感,一般加入终浓度1 μ g/mL的puromycin一天后就会死掉。所以当电转后的细胞由单细胞长成克隆时(克隆大小100 μ m左右),加入1 μ g/mL puromycin进行筛选,筛选5-7天。当筛选后的细胞克隆长到500 μ m左右时,就可以将它们单独的挑选出来,放到24孔板中继续培养,此时可以撤掉puromycin,只更换新鲜培养基mTeSR1正常培养即可。培养7-10天左右,当细胞克隆长到1000 μ m左右时,加入0.5mM EDTA消化,取一半的细胞进行基因组鉴定,剩下的细胞转移到新的24孔板中继续培养。

[0053] 4) 基因组鉴定:取出的细胞12000g离心2分钟,去掉上清。用动物基因组DNA快速抽提试剂盒进行DNA的提取(具体步骤参考说明书),作为PCR鉴定的模板。我们在同源臂上设计了敲除鉴定的引物,引物序列见附录一,随后做PCR鉴定。PCR体系见表3-5(总体积为10 μ L),PCR程序见表3-6。获得PCR扩增产物后,进行琼脂糖凝胶电泳鉴定,野生型(WT)的条带大约是700bp左右,敲除后的条带大约是1500bp左右。根据条带的数量和位置我们可以判断细胞是单敲(两条带都有)、双敲(只有一条1500bp的条带)、还是野生型(只有一条700bp的条带)。完成鉴定后,我们将双敲细胞,传到6孔板继续培养,用于后续mRNA鉴定以及蛋白鉴定。完成相关鉴定后,初步任务已完成敲除细胞系的构建,可用于后续实验。

[0054] 本发明设计特异的敲除验证引物上游引物CCTCTGCCTCTTGGGCGATTC;下游引物GAAATGAAGAGCAGTAGGCAGCAAG,对获得的细胞克隆进行PCR鉴定,野生型H1的条带大小为737bp,HB01双等位基因敲除细胞的条带大小为1947bp,本发明展示了两株HB01双等位基因敲除的PCR结果(图1B)。随后本发明对这两株细胞进行转录水平的检测。通过qPCR实验发现HB01的转录水平显著下降(图1C),证明本发明针对HB01的敲除是成功的,得到HB01基因敲除的人胚胎干细胞(H1-HB01^{-/-}hESCs)。

[0055] 2、H1-HB01^{-/-}hESCs退出多能性并向神经谱系分化

[0056] 令本发明人感到意外的是,本发明使用mTeSR1培养基(购买来自STEMCELL Technologies公司)培养HB01敲除细胞系1-HB01^{-/-}hESCs,在正常的传代培养过程中它有自发分化的倾向,并伴随着神经元样的细胞出现(图1D)。

[0057] 取培养30天后的HB01敲除细胞1-HB01^{-/-}hESCs进行RT-qPCR分析,发现本发明1-HB01^{-/-}hESCs与野生型H1相比,HB01敲除细胞系的多能性相关的基因OCT4、NANOG的表达明显下降,但是SOX2的表达却有明显的上升(图1E),除此之外发现本发明神经相关的基因PAX6、SOX1、MAP2、NGN2也有明显的上调表达(图1E)。随后进行免疫荧光实验检测神经谱系标志物的表达,发现与野生型H1相比,HB01敲除细胞系的神经元标志物TUJ1、MAP2、NEUN都有表达(图1F)。

[0058] 总之,本发明发现乙酰转移酶HB01对于人胚胎干细胞干性的维持是必需的,并且敲除HB01基因会导致人胚胎干细胞倾向神经方向分化;这表明HB01不仅对人胚胎干细胞干性的维持很重要,它在谱系分化中也发挥着重要而独特的作用。

[0059] 实施例2

[0060] 本发明构建了可诱导敲除HB01的H1 hESCs(H1-OE-HB01^{-/-}hESCs),添加Dox能维持其自我更新,撤掉Dox其退出多能性,并向神经外胚层分化。

[0061] 通过先构建一株可诱导表达HB01的细胞系(H1-HB01-OE hESCs),在此细胞系的基础上进行HB01敲除。结果如图2和3:

[0062] 图2是本发明的实施例2提供的在H1 hESCs中构建可诱导敲除HB01细胞系(H1-OE-HB01^{-/-}hESCs)的示意图和实验结果图;其中,A为通过Tet-on过表达系统,构建可诱导表达HB01的示意图;B为通过蛋白印迹验证证明DOX能调控HB01的表达,添加DOX能诱导HB01的表达,撤掉DOX后HB01不表达;C为通过RT-qPCR证明DOX能调控HB01的表达,添加DOX能诱导HB01的表达,撤掉DOX后HB01的表达恢复到正常水平,野生型H1为对照;D为构建可诱导敲除HB01的示意图;E为PCR胶图,鉴定可诱导敲除HB01细胞系基因型,野生型的H1是阴性对照;F为通过RT-qPCR证明DOX能调控HB01的表达,添加DOX能诱导HB01的表达,撤掉DOX后HB01不表达;

[0063] 图3是本发明的实施例2提供的在H1-OE-HB01^{-/-}hESCs中添加Dox维持自我更新,撤掉Dox其自发特化为神经谱系细胞的实验结果图;其中,A为可诱导敲除细胞系,在添加DOX(+DOX)和撤掉DOX(-DOX)后5天、10天、15天、20天的细胞形态图;B为RT-qPCR分析可诱导敲除细胞系在+DOX与-DOX的D5、D10、D15、D20时多能性基因OCT4、NANOG、SOX2,中内胚层基因T、RUNX1、SOX17,神经外胚层PAX6、SOX1、MAP2的表达;C为免疫荧光照片展示可诱导敲除细胞系在+DOX与-DOX的D35细胞中TUJ1(绿色)/SOX2(红色)、MAP2(红色)/TUJ1(绿色)、TH(绿色)/GABA(红色)神经谱系标记基因的表达,DAPI(蓝色)指示细胞核的位置,标尺为50μm;D

为蛋白印迹实验照片展示野生型H1与可诱导敲除细胞系在+DOX与-DOX D5、D10、D15、D20的细胞中多能性基因OCT4,SOX2,NANOG的富集水平。

[0064] 具体的过程如下:

[0065] 1、构建可诱导敲除HB01的H1 hESCs (H1-OE-HB01^{-/-}hESCs)

[0066] 构建可诱导敲除HB01的H1 hESCs,包括如下的具体的步骤:

[0067] (1) 可诱导表达HB01的H1 hESCs构建:

[0068] 本发明使用的是Tet-on系统,实现基因的可诱导表达的。当Dox存在的时候基因表达,不存在的时候基因不表达。通过第二代慢病毒包装系统,将FUW-HB01 (购买自addgene) (可诱导表达HB01的质粒) 和rtTA分别包装到慢病毒中。用包装好的FUW以及rtTA慢病毒共同感染细胞H1hESCs,通过筛选构建出可诱导表达细胞系(图2A)。本发明对可诱导HB01过表达的细胞系进行了蛋白印迹、RT-qPCR检测HB01基因的表达,结果表明通过添加Dox能诱导HB01的表达;撤掉Doxycycline一天之后,HB01的表达恢复到与野生型H1一致的水平(图2B、2C)。

[0069] (2) 可诱导敲除HB01细胞系的构建:

[0070] 随后在上述构建的H1-HB01-OE hESCs细胞系的基础上进行了HB01的敲除实验,撤掉Dox两天后进行电转敲除(具体操作与实施例1的记载相同),通过药筛之后添加Dox诱导HB01的表达,待细胞克隆长大之后对其进行鉴定(图2D)。通过PCR鉴定,本发明获得了在可诱导HB01表达的细胞中HB01双等位基因敲除的细胞系(H1-OE-HB01^{-/-}hESCs),展示其中两株细胞的PCR鉴定结果(图2E)。通过RT-qPCR验证,与野生型H1相比,撤掉Dox导致可诱导敲除HB01细胞系的HB01基因表达显著性下降;而添加Dox之后能恢复HB01基因表达(图2F)。可知,本发明成功构建了可诱导敲除HB01的人胚胎干细胞系。

[0071] 2、H1-OE-HB01^{-/-}hESCs的分化验证

[0072] 本发明发现H1-OE-HB01^{-/-}hESCs在含有Dox的培养基中能维持正常的ES形态,然而一旦撤掉Dox,可诱导敲除HB01的细胞系就会呈现自发分化的现象,并且出现神经元样的细胞(图3A),细胞形态类似于本发明在野生型H1中直接敲除HB01的结果(图1D)。

[0073] 本发明以撤掉Dox的当天为第0天,依次在第5、10、15、20天收取细胞进行检测。通过RT-qPCR分析,本发明发现多能性基因OCT4、NANOG的表达是逐渐下降的,而SOX2的表达呈现上升趋势,并且中、内胚层标志物T、RUNX1、SOX17都没有显著性的改变,而外胚层标志基因PAX6、SOX1、MAP2都有显著的上调表达(图3B)。通过免疫荧光实验也证明神经元特异的标志物TUJ1、MAP2都有明显的表达,除此之外TH(多巴胺能神经元)、GABA(抑制型神经元)也有一定的表达(图3C)。通过免疫印迹实验证明,与野生型H1和添加Dox培养H1-OE-HB01^{-/-}hESCs的细胞相比,撤掉Dox之后HB01的蛋白水平显著性降低,多能性标志物OCT4、NANOG的表达水平逐渐减少,而SOX2的表达水平却逐渐升高(图3D)。而SOX2不仅是多能性的标志物,也是神经干细胞的标志基因。

[0074] 总之,本发明构建的可诱导敲除HB01细胞系在撤掉Dox与在野生型H1 hESCs中直接敲除HB01的表型是一致的,都会造成其向神经方向自发分化。即H1-OE-HB01^{-/-}hESCs在添加Dox时能维持自我更新,撤掉Dox后退出多能性并向神经谱系分化。表明HB01的确在H1 hESCs早期命运决定中发挥关键的调控作用,缺失HB01之后H1 hESCs能自发的向神经谱系分化。

[0075] 实施例3

[0076] 体内、外实验验证缺失HB01的hESCs丧失中、内胚层分化能力。结果如图4；图4是本发明的实施例3提供的缺失HB01的H1 hESCs丧失了向中内胚层分化的潜能的实验结果图，其中，A为蛋白印迹实验照片展示可诱导敲除细胞系+DOX和-DOX的D1、D2、D3天HB01和OCT4的表达水平，GAPDH为对照；B为通过BMP4诱导原肠胚形成的示意图；C为通过BMP4诱导野生型H1和可诱导敲除细胞系-DOX3天形成原肠胚的细胞形态图；D为免疫荧光检测野生型H1、可诱导敲除细胞系在BMP4诱导三天之后SOX2 (红色) /NES (绿色)、GATA3 (绿色) /T (红色)、GATA3 (绿色) /SOX17 (红色)、OCT4 (绿色) /GATA6 (红色) 的表达，DAPI (蓝色) 指示细胞核的位置，标尺为50 μ m；E为野生型H1和可诱导敲除细胞系撤掉DOX的条件下形成畸胎瘤的H&E染色图。

[0077] 具体的过程如下：

[0078] 1、体外验证

[0079] 在BMP4 ((Bone Morphogenetic Protein 4)) 诱导下，HB01的缺失导致hESCs丧失中、内胚层分化能力。

[0080] 在图3中撤掉DOX后，H1-OE-HB01^{-/-}hESCs细胞失去多能性开始自发分化，但是本发明并没有检测到中、内胚层基因的表达，所以猜想缺失HB01的hESCs丧失了中、内胚层的分化能力。

[0081] 为了进一步验证本发明的猜想，首先本发明通过蛋白印迹实验检测了在撤掉Dox，1、2、3天时HB01的表达水平(图4A)，结果表明撤掉Dox第3天时HB01的蛋白水平基本检测不到，并且此时多能性核心转录因子OCT4的表达基本不变，所以本发明选择这个时间点的细胞检测其三胚层分化的能力。

[0082] 本发明使用高浓度的BMP4 (终浓度50ng/mL) 诱导hESCs分化形成原肠胚模型(图4B)。在BMP4诱导三天后，野生型H1 hESCs和H1-OE-HB01^{-/-}hESCs细胞都出现了原肠胚的圆环结构(图4C)。对BMP4诱导分化D3天的细胞进行免疫荧光检测，本发明发现野生型H1 hESCs形成了完整的原肠胚结构，最外层是GATA3阳性的滋养层，其次是T阳性和SOX17阳性的中、内胚层以及GATA6阳性的原始内胚层，中间是SOX2阳性的神经外胚层和未分化的OCT4阳性的多能干细胞。但是H1-OE-HB01^{-/-}hESCs细胞形成的原肠胚模型却有明显的不同，虽然最外层依然是GATA3阳性的滋养外胚层，但是缺少了T阳性和SOX17阳性的中、内胚层以及GATA6阳性的原始内胚层，并且中间的SOX2阳性的神经外胚层明显增多，OCT4阳性的多能干细胞明显减少(图4D)。

[0083] 总之，本发明发现在BMP4诱导分化过程中，HB01的缺失导致hESCs丧失中、内胚层分化的能力，更倾向于向神经外胚层分化。

[0084] 2、体内验证

[0085] 缺失HB01的hESCs形成的畸胎瘤，更倾向于向神经外胚层分化。

[0086] 为了验证HB01敲除的hESCs是否丧失了中、内胚层分化的潜能，更倾向于向神经外胚层分化。本发明分别收集了200万H1 hESCs和H1-OE-HB01^{-/-}hESCs细胞，注射到免疫缺陷小鼠(购买自集萃药康)的腹股沟中形成畸胎瘤，6-8周畸胎瘤长到合适的大小后用脱颈的方式处死小鼠，将畸胎瘤取出，放到4%的PFA中4 $^{\circ}$ C放置一天。用石蜡包埋畸胎瘤随后切片，用苏木精-伊红(H&E)染色拍照观察。

[0087] 与野生型H1 hESCs细胞形成的畸胎瘤相比,H1-OE-HB01^{-/-}hESCs细胞形成的畸胎瘤组织结构更小,更不规则。其中神经组织显著性增多,大约占全部组织结构的70%,与此同时中、内胚层的组织显著性的减少(图4E)。这一结果证明了缺失HB01的hESCs更倾向于形成神经外胚层的结构。

[0088] 综上所述可知,本发明发现乙酰转移酶HB01在hESCs自我更新以及早期命运决定过程中发挥重要作用,缺失HB01的hESCs退出多能性,丧失了向中、内胚层分化的潜能,具有向神经外胚层分化的倾向性;通过构建可诱导敲除HB01的hESCs作为种子细胞,用于获得高纯度的人神经谱系细胞。

[0089] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例,可以理解的是,上述实施例是示例性的,不能理解为对本发明的限制,本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

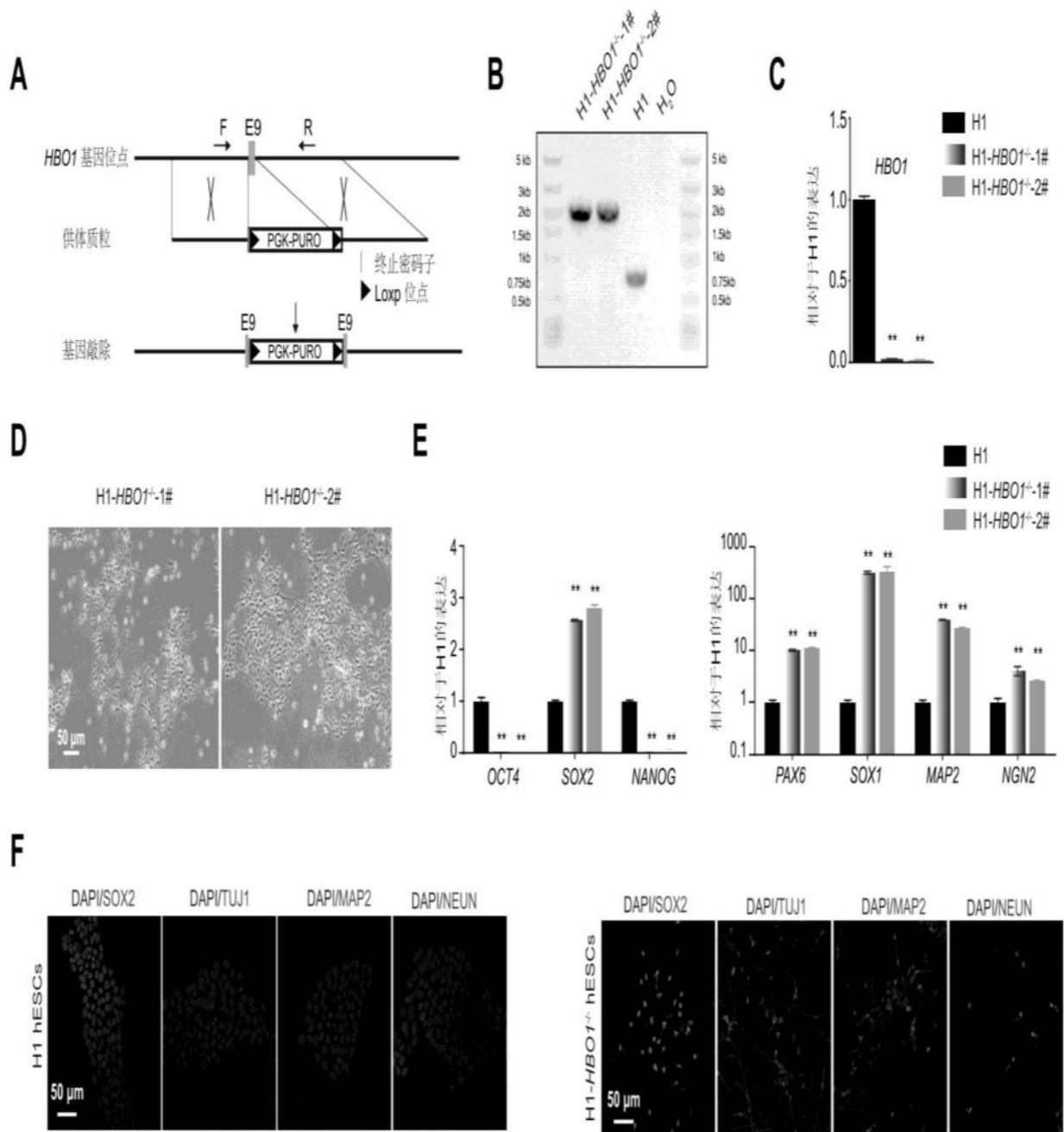


图1

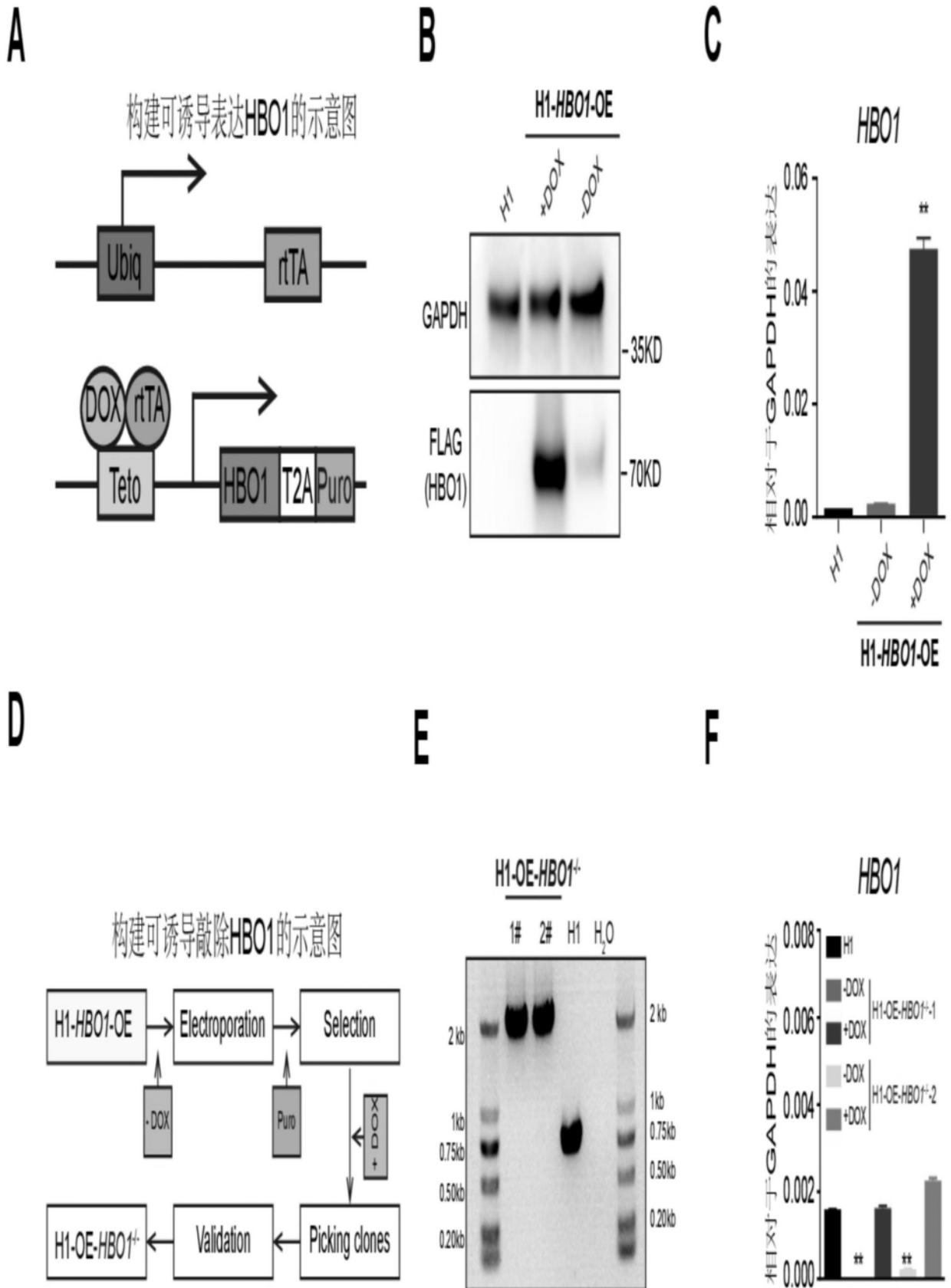


图2

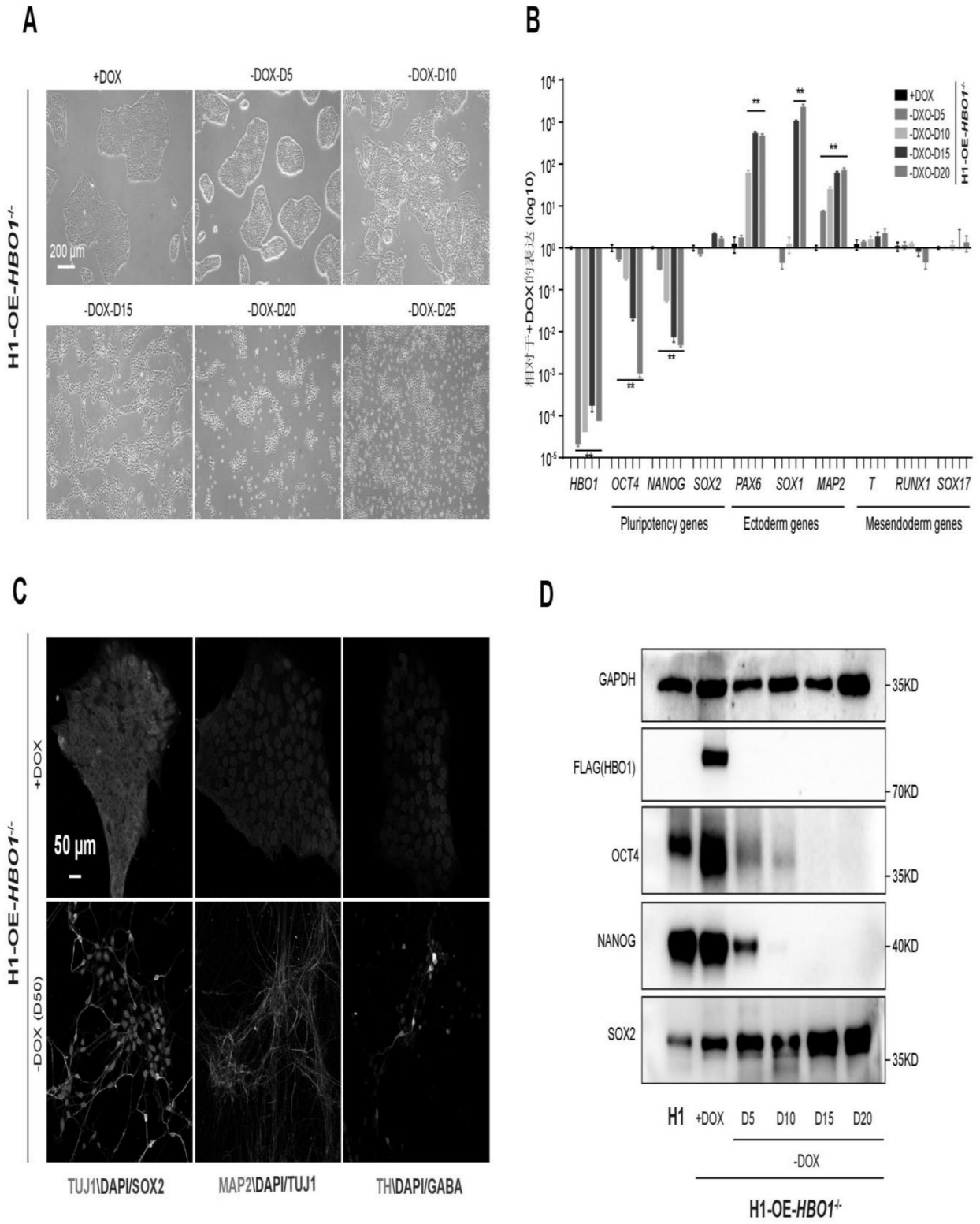


图3

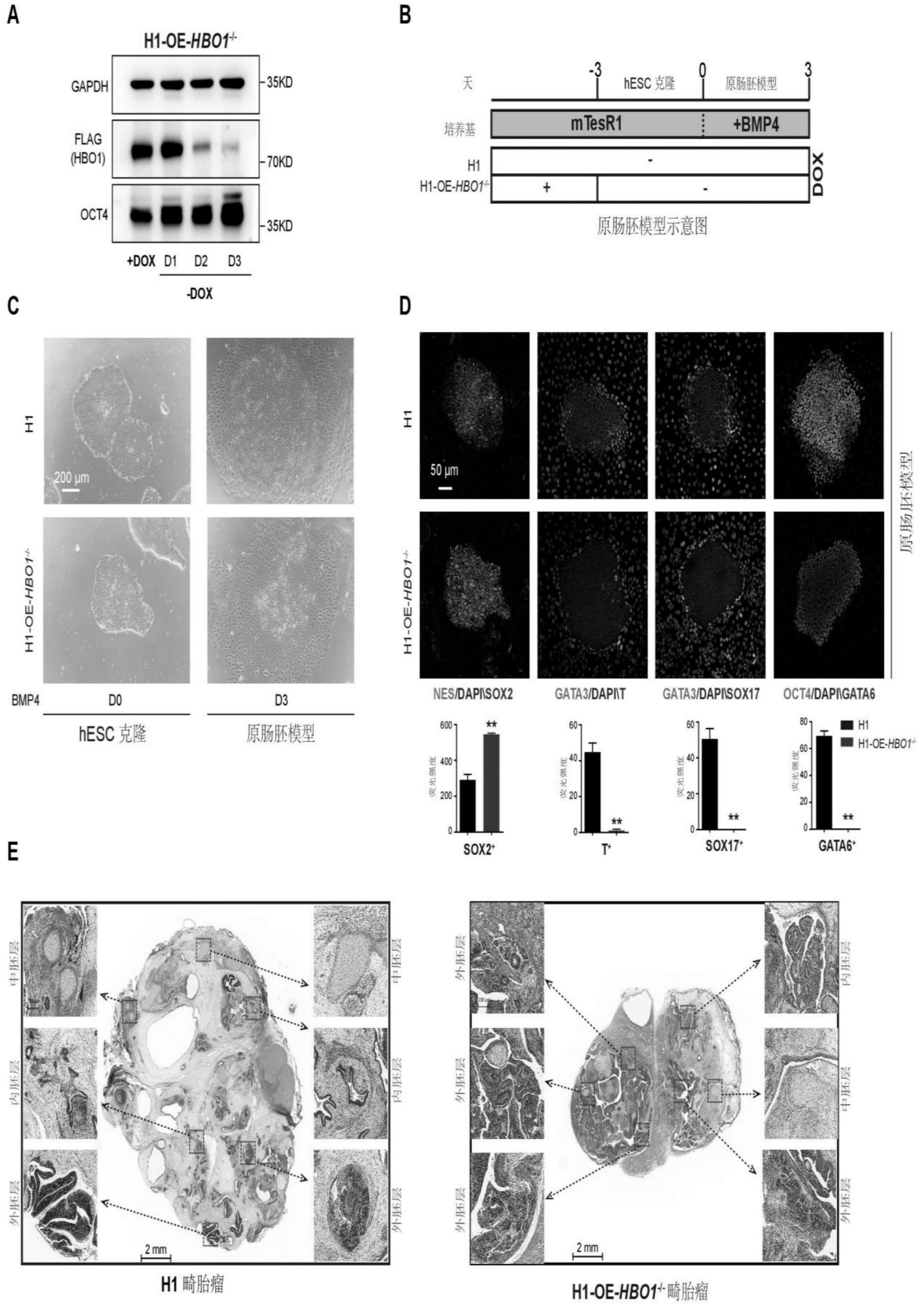


图4