

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510025861.6

[51] Int. Cl.

C12N 5/08 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

[43] 公开日 2006年5月24日

[11] 公开号 CN 1775945A

[22] 申请日 2005.5.17

[21] 申请号 200510025861.6

[71] 申请人 上海大学

地址 200444 上海市宝山区上大路99号

[72] 发明人 任雯雯 杨洋 陈付学

[74] 专利代理机构 上海上大专利事务所

代理人 何文欣

权利要求书1页 说明书4页

[54] 发明名称

体外抑制 AF116909 基因诱导神经干细胞定向
分化为胆碱能神经元的方法

[57] 摘要

提供一种体外诱导神经干细胞定向分化为胆碱能神经元的方法，包括神经干细胞分离、培养和鉴定后，在含 1% B27 (v/v)、20ng/mL EGF 的 F12 - DMEM (1:1) 培养基中加入 bFGF、肝素、层粘连蛋白后，于 37°C、50mL/L CO₂ 饱和湿度下诱导分化神经干细胞并体外培养 7 天，然后作胆碱能神经元的免疫鉴定。本发明的方法操作简单，重复性好，分化率达 30% 以上。是一种获得胆碱能神经元的新途径。

1. 一种体外抑制 AF116909 基因诱导神经干细胞定向分化为胆碱能神经元的方法，包括以下步骤：
 - (1) 神经干细胞的分离、培养和鉴定；
 - (2) shRNA 表达载体的构建：按照 SilenCircle™RNAi Transcription Kit 方法设计转录 shRNA 的对应于 AF116909 基因的回文序列，将两条回文序列在 95℃退火合成双链序列，再与线状的 pSilenCircle 载体连接，转化到感受态的 DH5 α 进行扩增，质粒抽提，测序鉴定；
 - (3) NSC 的转染：转染当天，将 NSCs 传代，吹打制成密度为 10^6 - 10^8 个/mL 的细胞悬液，取 5mL 该悬液置于 60-mm 的培养瓶中；将经测序确定为 shRNA 的表达载体 6.0 μ g -10.0 μ g 稀释在 500 μ L 无抗生素、无血清的 DMEM 中；同时将 20 μ L 的 Lipofectamine™2000 转染试剂稀释在同样体积的上述 DMEM 中，室温下培养 5 分钟后；然后将稀释的 shRNA 表达载体同稀释的转染试剂混合，室温培养 20 分钟后，最后再将此混合物转染到 NSCs 中；
 - (4) 胆碱能神经元的鉴定。
2. 根据权利要求 1 所述的体外抑制 AF116909 基因诱导神经干细胞定向分化为胆碱能神经元的方法，其特征在于所述的神经干细胞是从胎鼠纹状体分离得到。
3. 根据权利要求 1 所述的体外抑制 AF116909 基因诱导神经干细胞定向分化为胆碱能神经元的方法，其特征在于所述神经干细胞的培养方法是：将胎鼠纹状体在含有 1 % B27、20 ng/mL EGF、10 ng/mL bFGF 的 F12-DMEM(1:1)培养基中，吹打制成细胞悬液，于 37℃、50 mL/L CO₂饱和湿度下进行培养。
4. 根据权利要求 1 所述的体外抑制 AF116909 基因诱导神经干细胞定向分化为胆碱能神经元的方法，其特征在于所述神经干细胞的鉴定采用免疫荧光法。
5. 根据权利要求 1 所述的体外抑制 AF116909 基因诱导神经干细胞定向分化为胆碱能神经元的方法，其特征在于所述 NSC 的转染的时间为 11 天。
6. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述胆碱能神经元的鉴定采用 RT-PCR 定性分析法。

体外抑制 AF116909 基因诱导神经干细胞 定向分化为胆碱能神经元的方法

技术领域

本发明涉及神经干细胞的分化研究，特别是体外抑制 AF116909 基因诱导神经干细胞定向分化为胆碱能神经元的方法。

发明背景：

神经干细胞的发现是近年来神经科学领域研究的重大突破，已成为近期研究的热点，不仅因为其具有研究神经系统发育的重要性，更主要的是其潜在的治疗价值。Mckay 等认为，神经干细胞指具有自我更新能力和分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞能力的细胞。它的分化、迁移、成熟的过程是内因和外因相互作用的结果，内因也就是细胞基因的表达状态。神经干细胞要进入临床应用，首先要解决的是定向分化问题，因为只有搞清神经干细胞的分化机制，才能充分利用它的可塑性，以实现细胞替代。胆碱能神经元是一种重要的神经元，能取代由于肌萎缩或脊髓损伤导致的运动神经元的损失，能改善人或动物的学习、记忆等能力，对老年痴呆、癫痫等也具有重要的调节作用。该发明为体外获得胆碱能神经元提供了一条途径，为治疗老年痴呆、癫痫等疾病提供了一定的思路。

发明内容

本发明的目的在于通过采用基因调控的方法来实现神经干细胞向胆碱能神经元的定向分化。

为达到上述目的，本发明采用的构思为：将编码对应 AF116909 基因特异序列的并能形成小的发夹结构 RNA (small hairpin RNA, shRNA) 的一对 57bp DNA 回文序列插入到含有 RNA 聚合酶 III (Pol III) U6 启动子的 pSilenCircle 载体中构建成 shRNA 表达载体，再将该 shRNA 表达载体转染到 NSCs 中，观察到 NSC 的分化情况。

根据上述的构思，本发明采用如下技术方案：

一种体外抑制 AF116909 基因诱导神经干细胞定向分化为胆碱能神经元的方法，包括以下步骤：

- (1) 神经干细胞的分离、培养和鉴定；

- (2) shRNA 表达载体的构建：按照 SilenCircle™RNAi Transcription Kit 方法设计转录 shRNA 的对应于 AF116909 基因的回文序列，将两条回文序列在 95℃退火合成双链序列，再与线状的 pSilenCircle 载体连接，转化到感受态的 DH5 α 进行扩增，质粒抽提，测序鉴定；
- (3) NSC 的转染：转染当天，将 NSCs 传代，将 NSCs 传代，吹打制成密度为 10^6 - 10^8 个/mL 的细胞悬液，取 5mL 该悬液置于 60-mm 的培养瓶中；将经测序确定为 shRNA 的表达载体 6.0μg -10.0 μg 稀释在 500μL 无抗生素、无血清的 DMEM 中；同时将 20 μL 的 Lipofectamine™2000 转染试剂稀释在同样体积的上述 DMEM 中，室温下培养 5 分钟后；然后将稀释的 shRNA 表达载体同稀释的转染试剂混合，室温培养 20 分钟后，最后再将此混合物转染到 NSCs 中；
- (4) 胆碱能神经元的鉴定。

上述的神经干细胞是从胎鼠纹状体分离得到。

上述的神经干细胞的培养方法是：将胎鼠纹状体在含有 1 % B27、20 ng/mL EGF、10 ng/mL bFGF 的 F12-DMEM(1:1)培养基中，吹打制成细胞悬液，于 37℃、50 mL/L CO₂ 饱和湿度下进行培养。

上述的神经干细胞的鉴定采用免疫荧光法。

上述的 NSC 的转染的时间为 11 天。

上述的胆碱能神经元的鉴定采用 RT-PCR 定性分析法

采用本发明的体外抑制 AF116909 基因诱导神经干细胞定向分化为胆碱能神经元的方法，从培养起第 3 天的 (12 ± 1.5) %胆碱能神经元分化率增加到第 11 天的 (80 ± 3.1) %。RT-PCR 分析结果表明，AF116909 基因 mRNA 的表达量同对照组相比明显减少。这说明该方法对 AF116909 目的基因确实得到有效的抑制，同时显示抑制该基因具有促使神经干细胞向胆碱能神经元分化的功能。

具体实施方式

实验动物：SD 孕鼠(14d) 购自上海第二军医大学动物房。

神经干细胞的分离培养：无菌条件下取出胎鼠的纹状体，放入含有 1 % B27，20 ng/mL EGF，10 ng/mL bFGF 的 F12-DMEM(1:1)培养基中，吹打制成细胞悬液，于 37℃，5% CO₂ 饱和湿度下常规培养，每培养一周传代一次。

神经干细胞的鉴定：将细胞贴附在载玻片上生长，2 天后取出。吸出培养液，用

PBS 洗去残余培养液, 4 % (m/m) 多聚甲醛固定 20 min。PBS 洗 2 次 (每隔 10 分钟 1 次); 10 % 正常山羊血清封闭 1 h; PBS 洗 3 次; 抗 nestin 抗体 (v/v 1:100, 用 antibody buffer 稀释) 4 °C 过夜, PBS 洗 3 次; 二抗 (v/v 1:50, 用 antibody buffer 稀释) 32 °C 孵育 1 h, PBS 洗 3 次; 50 % (v/v) 甘油封片, 观察荧光。

神经干细胞分离培养及鉴定: Nestin 蛋白是神经干细胞的标记蛋白, 它是一种中间丝蛋白, 分布在细胞质中, 用抗 nestin 免疫荧光染色检测观察到有绿色荧光, 自动聚集成团是神经干细胞在体外培养过程中的一个重要特征。这就进一步证明自胎鼠纹状体中分离培养神经干细胞方法的可靠性。

shRNA 表达载体的构建: 按照 SilenCircle™ RNAi Transcription Kit 方法设计转录 shRNA 的对应于 AF116909 基因的回文序列 (各为 57bp), 其序列为:

sense:

5' ACACCGACCCTCATTCCAGAGAGGGTTTGCTTGAAACCCTCTCTGGAATGAGGGTCT3'

antisense:

5' AAAAAGACCCTCATTCCAGAGAGGGTTTCAAGCAAACCCTCTCTGGAATGAGGGTCG3'

将两条回文序列 95 °C 退火合成双链序列, 再与线状的 pSilenCircle 载体连接, 转化到感受态的 DH5 α 进行扩增, 质粒抽提, 测序鉴定, 经连接后的序列为:

5' ACACCGACCCTCATTCCAGAGAGGGTTTGCTTGAAACCCTCTCTGGAATGAGGGTCT3'

3' GCTGGGAGTAAGGTCTCTCCCAAACGAACCTTGGGAGAGACCTTACTCCCAGAAAAA5'

NSC 的转染: 转染当天, 将 NSCs 传代, 吹打制成密度为 4×10^6 个/mL 的细胞悬液, 取 5 mL 该悬液置于 60-mm 的培养瓶中, 将经测序确定为 shRNA 的表达载体 8.0 μ g 稀释在 500 μ L 无抗生素、无血清的 DMEM 中, 将 20 μ L 的 Lipofectamine™2000 转染试剂稀释在同样体积的上述 DMEM 中, 室温下培养 5 分钟后, 再将稀释的 shRNA 表达载体同稀释的转染试剂混合, 室温培养 20 分钟后, 最后再将此混合物转染到 NSCs 中, 同时设计对照, 细胞在于 37 °C, 50 mL/L CO₂ 饱和湿度下常规培养, 观察实验组与对照组细胞的分化情况, 并作相关的实验记录。

胆碱能神经元的鉴定: 培养 11 天后, 分别收集实验组与对照组细胞, 用 Trizol 分别抽提总 RNA, 纯化, 各取 2 μ g RNA 为模板进行 cDNA 合成 (其合成方法按照 AMV First Strand cDNA Synthesis Kit 进行)。再以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 分别对实验组与对照组中 AF116909 基因 mRNA 表达量的定性分析。其 PCR 引物为: 5' CTGTGGACTCCTGGTCAG3' (Forward) 和 5' GTCTGTCCAGATGCTTCT3' (Reverse), PCR

产物大小为 380bp。

NSCs 转染后细胞形态观察：未转染 shRNA 表达载体的对照组和转染有 shRNA 表达载体的实验组分别培养并计算培养不同天数的分化率（十个视野中分化的细胞占总细胞的百分比）。结果发现，培养 11 天后对照组无明显分化，分化率仅为 $(5 \pm 1.2) \%$ ，而实验组从培养第 3 天后就开始分化，细胞分化的数量明显增多并且分化率为 $(12 \pm 1.5) \%$ ，随着培养天数的增加，细胞的分化率明显增大，并且在培养第 11 天后细胞的分化率到达 $(80 \pm 3.1) \%$ 。

培养 11 天后，用 Trizol 抽提总 RNA 并纯化总 RNA，分别进行 RT-PCR 来定性分析实验组 (T) 和对照组 (C) 细胞中的 AF116909 基因 mRNA 的表达量，结果对照组中 AF116909 基因 mRNA 的表达量明显大于实验组中的表达量，这说明实验组中目的基因的表达得到有效的抑制。

专利名称(译)	体外抑制AF116909基因诱导神经干细胞定向分化为胆碱能神经元的方法		
公开(公告)号	CN1775945A	公开(公告)日	2006-05-24
申请号	CN200510025861.6	申请日	2005-05-17
[标]申请(专利权)人(译)	上海大学		
申请(专利权)人(译)	上海大学		
[标]发明人	任雯雯 杨洋 陈付学		
发明人	任雯雯 杨洋 陈付学		
IPC分类号	C12N5/10 C12N15/85 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/53		
代理人(译)	何文欣		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

提供一种体外诱导神经干细胞定向分化为胆碱能神经元的方法，包括神经干细胞分离、培养和鉴定后，在含1%B27(v/v)、20ng/mL EGF的F12 - DMEM(1:1)培养基中加入bFGF、肝素、层粘连蛋白后，于37°C、50mL/L CO2饱和湿度下诱导分化神经干细胞并体外培养7天，然后作胆碱能神经元的免疫鉴定。本发明的方法操作简单，重复性好，分化率达30%以上。是一种获得胆碱能神经元的新途径。