

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A01N 1/00

C12Q 1/02 C12N 5/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00815283.7

[43] 公开日 2002 年 12 月 25 日

[11] 公开号 CN 1387401A

[22] 申请日 2000.11.2 [21] 申请号 00815283.7

[30] 优先权

[32] 1999.11.2 [33] US [31] 60/163,086

[86] 国际申请 PCT/US00/30202 2000.11.2

[87] 国际公布 WO01/32015 英 2001.5.10

[85] 进入国家阶段日期 2002.4.30

[71] 申请人 马萨诸塞大学

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 J·M·罗博尔

P·莫雷拉

[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

代理人 唐伟杰

权利要求书 6 页 说明书 21 页

[54] 发明名称 单倍体基因组用于遗传诊断、修饰和
增殖

[57] 摘要

本发明提供了用于增殖雄性或雌性来源的单倍体基因组和对其进行遗传筛选和修饰的方法。可以将这些单倍体基因组用于生产单倍体胚胎和胚胎干细胞样细胞和分化的细胞。此外,这些单倍体基因组和含有这些单倍体基因组的细胞可以用作产生二倍体核转移单位的核转移供体。可以将这些二倍体 NT 单位、例如人 NT 单位用于获得多能细胞和分化细胞以及组织。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种用于选择含有单倍体基因组的细胞的方法，该方法包括下列步骤：

(i) 获得含有雄性或雌性来源的单倍体基因组的细胞并扩增其数目；

(ii) 将所述单倍体细胞的基因组进行遗传筛选或分析以便测定所述单倍体基因组是否包括所需的遗传组成；和

(iii) 选择含有所述所需遗传组成的细胞。

2. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的雌性衍生的单倍体细胞是通过活化其中半数染色体排出在极体中的卵母细胞而产生的。

3. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的雌性衍生的单倍体细胞是通过使卵受精并从其中除去雄性原核而产生的。

4. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的雌性衍生的单倍体细胞是通过活化卵以便产生含有两个雌性原核的卵并除去所述原核中的一个而产生的。

5. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的雌性衍生的单倍体细胞是通过将二倍体细胞核插入未成熟的卵母细胞、随后使所述染色体分入两个单倍体核而产生的。

6. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的雌性衍生的单倍体细胞是通过下列步骤产生的：将含有半数染色体但增殖所有 DNA 成分即四条染色单体的单性胚的核转移到卵母细胞中，随后从其中排出染色体的一半。

7. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的雄性衍生的单倍体细胞来源于除去了雌性原核的受精卵。

8. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的雄性衍生的单倍体细胞通过使去核卵受精而衍生。

9. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的雄性衍生的单倍体细胞通过对精核进行人工解凝、然后将其注入非卵衍生的胞质体而产生。

10. 权利要求 1 所述的方法，其中通过选自下述的方法来扩增所述的雌性或雄性衍生的单倍体细胞：(i) 使单倍体卵胞质体进行细胞分裂；(ii) 使单倍体细胞产生单倍体胚胎，然后将这种胚胎培养以产生“增殖单倍体”细胞；(iii) 将单倍体胚胎培养以产生增殖单倍体细胞并使这类胚胎干细胞样细胞分化；和(iv) 在允许细胞分裂的条件下培养单倍体体细胞胞质体。

11. 权利要求 1 所述的方法，其中将所述选择的单倍体基因组进行遗传修饰。

12. 权利要求 11 所述的方法，其中对选择的雄性和雌性单倍体基因组二者均进行遗传修饰。

13. 权利要求 1 所述的方法，其中进一步包括使用所述选择的雄性或雌性单倍体基因组或含有所述选择的单倍体基因组的细胞用于产生二倍体胚胎的步骤。

14. 权利要求 1 所述的方法，其中进一步包括使用选择的雄性和雌性单倍体基因组产生二倍体胚胎的步骤。

15. 权利要求 1 所述的方法，其中将所述选择的雄性或雌性单倍体基因组或将含有所述雄性或雌性基因组的细胞用作核转移供体。

16. 权利要求 15 所述的方法，其中将选择的雄性和雌性单倍体基因组用作核转移供体以便产生含有所述选择的雄性和雌性单倍体基因组的二倍体核转移单位。

17. 权利要求 15 所述的方法，其中所述的单倍体基因组是人的。

18. 权利要求 15 所述的方法，其中所述的单倍体细胞或基因组包括来源于增殖单倍体胚胎的分化细胞、胚胎干细胞样细胞或内细胞团细胞。

19. 权利要求 18 所述的方法，其中所述的分化细胞或胚胎干细胞样细胞通过体外培养单倍体胚胎而产生。

20. 权利要求 13 所述的方法，其中将所述选择的单倍体基因组进行遗传修饰。

21. 权利要求 19 所述的方法，其中将所述选择的单倍体基因组二者均进行遗传修饰。

22. 权利要求 20 所述的方法，其中通过同源重组对所述选择的单倍体基因组进行遗传修饰，以便消除、插入或取代特定的 DNA。

23. 权利要求 21 所述的方法，其中通过同源重组对所述选择的单倍体基因组二者均进行遗传修饰，以便消除、插入或取代特定的 DNA。

24. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的遗传测试包括下列步骤：

对所述扩增的单倍体基因组筛选遗传缺陷、与异常基因组印记相关的DNA甲基化缺陷或选择含有所需DNA、等位性状或缺乏功能基因的细胞。

25. 权利要求24所述的方法，其中所述的遗传缺陷导致下列遗传疾病中的一种： α -1抗胰蛋白酶缺乏症； α -地中海贫血；腺瘤样结肠息肉病；成人多囊性肾病；因BRCA1或BRCA2缺陷导致的乳腺癌易感性； β -地中海贫血；沙-马-图病；因MSH2、MLH1、PMS1或PMS2缺陷导致的结肠癌易感性；先天性肾上腺增生；囊性纤维化；杜兴/贝克肌营养不良；脆性X染色体综合征；A型和B型血友病；戈谢病；亨廷顿舞蹈病；肯尼迪病；莱-尼综合征；马方综合征；中链脂酰辅酶A脱氢酶缺乏症；黑素瘤易感性；1或2A型多发性内分泌腺瘤形成；强直性肌营养不良；1型神经纤维瘤病；鸟氨酸转氨甲酰酶缺乏病；视网膜母细胞瘤；镰形细胞贫血；类固醇硫酸酶；泰-萨病；或韦-霍病。

26. 权利要求24所述的方法，其中所测试的DNA甲基化缺陷选自普-威综合征、安格尔曼综合征、单亲异双躯干畸胎病、伯-韦综合征、维尔姆斯瘤发生和冯·希佩尔-林道综合征。

27. 权利要求24所述的方法，其中所述的遗传测试包括使用直接或间接与标记连接的核酸序列或选择含有所需DNA或等位性状或缺乏功能基因的细胞的步骤，所述的标记可以和与特定遗传缺陷相关的核酸序列特异性结合。

28. 权利要求1所述的方法，其中所述的遗传测试包括对特定DNA序列、等位性状或遗传缺陷使用质谱、荧光或放射性核检测的步骤。

29. 权利要求1所述的方法，其中这类遗传筛选包括RFLP分析、SSCP分析、STR分析、VNTR分析或变性梯度凝胶电泳。

30. 权利要求 13 所述的方法，其中将所述胚胎植入合适的雌性替代物并使之发育成可存活的后代。

31. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的单倍体基因组是牛的单倍体基因组。

32. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的单倍体基因组是灵长类的单倍体基因组。

33. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的单倍体基因组选自山羊、绵羊、牛、猪、羊、马、绵羊、犬、猫、鼠、兔、灵长类、人、象、豚鼠、小鼠、大鼠的单倍体基因组组成的组。

34. 一种使用权利要求 10 所述方法获得的增殖单倍体细胞系。

35. 权利要求 34 所述的增殖单倍体细胞系，其中所述的细胞系是雌性细胞或雄性细胞衍生的单倍体细胞系。

36. 一种通过核转移产生的二倍体胚胎，其中所述的核转移方法包括将单倍体基因组或按照权利要求 1 方法产生的细胞用作核转移供体的步骤。

37. 权利要求 36 所述的二倍体胚胎，其中所述的核转移方法包括移植雄性和雌性单倍体基因组二者或按照权利要求 1 方法产生的细胞的步骤。

38. 由单倍体胚胎产生的胚胎干细胞样细胞或分化的细胞。

39. 一种用于产生克隆的胚胎、胎儿或动物的改进的核转移方法，其中所述的改进包括将由单倍体胚胎产生的胚胎干细胞样细胞或分化的细胞用作核转移供体。

单倍体基因组用于遗传诊断、修饰和增殖

政府权限

研发本发明是接受美国农业部的基金支出的结果，因此政府对本发明拥有权限。

发明领域

本发明涉及单倍体基因组的增殖和应用，目的在于(1)遗传诊断；(2)遗传选择；和(3)遗传修饰。所选择的单倍体基因组在与另一种单倍体基因组、优选一种具有所需遗传组成的单倍体基因组合时可用于生产胚胎和胚胎干细胞。

发明背景

配子是通过减数分裂产生的特定的单倍体细胞(例如精子和卵母细胞)且涉及有性生殖。相反，二倍体细胞具有同源配对的染色体且带有每种常染色体遗传基因座的两个拷贝。二倍数($2n$)等于单倍数的2倍且是大多数细胞而非配子的特征数。合子是因受精过程中雄性和雌性配子融合而产生的二倍体细胞。参见：《细胞生物学词典》(THE DICTIONARY OF CELL BIOLOGY) 103, 139, 388 (J. M. Lackie 等，编辑，1995)。仅(二倍体)合子能够产生存活的后代。相反，尽管单倍体配子有可能产生属于雌性衍生的单倍体细胞(卵母细胞)的孤雌发育的胚胎，但是这些胚胎一般在胚胎发生完成前终止发育。这类胚胎可以自发产生，但更一般的情况是通过对卵母细胞进行人工活化来产生。这类雌核发育胚胎可用于研究胚胎发生。

以前曾经报导了合适单倍体衍生的多能细胞系的生产。例如，据推定通过从 129 SvE 或 C57BL x CBA 杂种小鼠中获得卵并在与 7%乙醇的磷酸缓冲盐水(PBS)溶液接触后以孤雌生殖方式将其活化来生成所

述的多能单倍体细胞。然而，在检查这些早期传代的“单倍体”细胞系的染色体时，所有的细胞均为带有 40 条染色体模态数的二倍体 (Kaufman 等, 《胚胎学和形态学实验杂志》(J. Embryol. Exp. Morphol.) 73: 249-61 (1983))。

尽管已经充分报导了哺乳动物胚胎可以由单倍体基因组产生，但是尚未将这类哺乳动物胚胎用于遗传分析。相反，就本发明者所了解到的情况而言，通常使用显然正常的(二倍体)胚胎在子宫内或子宫外进行产前遗传诊断。然而，子宫内的遗传诊断是侵害性的且对发育中的胎儿而言可能存在危险性(例如羊膜腔穿刺术和绒毛膜取样)。可以使经诊断患有疾病的胎儿流产或孕育至分娩期，因为子宫内手术和基因疗法仍然具有很高的风险性和实验性。

在人体中，一般对通过体外受精(IVF)技术产生的胚胎进行子宫外遗传诊断。一般从最新的胚胎中取 1 个或 2 个细胞并检测诸如囊性纤维化(CF)、性连锁疾病、染色体异常、脆性 X 染色体综合征、脊柱肌肉萎缩和强直性肌营养不良这样的疾病(de Die-Smulders 等, Ned. Tijdschr. Geneesk. 142: 2441-4 (1998))。可以使用聚合酶链反应(PCR)或嵌套式 PCR 进行植入前遗传诊断 (PGD) 以便诊断 CF 常见的 $\Delta F508$ 突变(Cui 等, 《人体生殖分子学》(Mol. Hum. Reprod.) 2: 63-1 (1996); 和 Ao 等, 《产前诊断》(Prenat. Diagn.) 16: 137-42 (1996)) 以及其它疾病(Ben-Ezra, 《临床实验室医学》(Clin. Lab. Med.) 15: 95-815 (1995))。还可以通过对猕猴卵裂早期胚胎血型分型进行单个卵裂球活检(RhD) (Avner 等, 《人体生殖分子学》(Mol. Hum. Reprod.) 2: 60-2 (1996)) 或通过胚泡活检(Verlinsky 等, Bailieres Clin. Obstet. Gynaecol. 8: 177-96 (1994)) 来进行遗传筛选。可以将原位致敏标记(PRINS)和原位杂交用于为 PGD 检测人染色体的异常(Pellestor 等, 《人体生殖分子学》(Mol. Hum. Reprod.) 2: 135-8 (1996))。还使用荧光原位杂交(FISH)进行了 PGD 以便防止因具有单倍体 X 的精子(随后发生复制)与失活卵母细胞受精而产生的胎块发育 (Reubinoff 等, 《人体生殖》(Hum. Reprod.) 12: 805-8

(1997)). 可以对卵母细胞进行 PGD 以便通过第一极体分析来诊断单一基因病症并鉴定含有母体未受影响的基因的卵母细胞 (Verlinsky 等, 《生物化学与分子医学》 (Biochem. Mol. Med.) 62: 182-7 (1997); Verlinsky 等, 《最新产科学与妇科学观点》 (Curr. Opin. Obstet. Gynecol.) 4: 720-5 (1992); 和 Verlinsky 等, 《人体生殖》 (Hum. Reprod.) 5: 826-9 (1990)). 在一种情况中, 通过稀释和显微操作使有两个具有成骨不全受感染婴儿的父代的各个精子分离。使用嵌套式 PCR 来扩增含有所述突变的 I 型胶原蛋白基因的片段并测序以便检测野生型基因和带有单一点突变的基因 (Iida 等, 《人体生殖分子学》 (Mol. Hum. Reprod.) 2: 131-4 (1996)). 就应用胞质内精子注射技术 (ICSI) 而言, 已经研发了选择精子的方法 (Meschede 等, 《人体生殖》 (Hum. Reprod.) 10: 2880-6 (1995)). 对第一和第二极体的序列分析和多样 PCR 可以比通过单细胞 DNA 分析遇到的易产生的错误获得更精确的遗传诊断 (Richitsky 等, J. Assist. Reprod. Genet. 16: 192-8 (1999)).

遗传筛选的其它方法包括限制片段长度多态性 (RFLPs)、串联重复 (VNTR) 序列和二核苷酸或其它短串联重复 (STR) 序列的可变数量的检测或改变。另一方面, 使用与野生型或突变体序列互补的引物进行等位基因特异性扩增和等位基因特异性连接, 为检测特异性突变提供了两种选择方式。还有其它方法可用于筛选突变的存在情况而不鉴定特异性突变自身。这些方法包括单链构象多态 (SSCP) 分析、变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 和通过酶 (RNA 酶 A) 或化学 (喉啶) 方式进行的错配裂解分析。参见 Fujimura, 《分子生物学和生物技术综合参考书》 (MOLECULAR BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY: A COMPREHENSIVE DESK REFERENCE) 中的“遗传测试” (“Genetic Testing”), 374-379 (Robert A. Meyers, 编辑, 1995)。

因此, 以上述为基础, 显然尽管在使植入前遗传筛选和体外生成的胚胎操作完善方面正在取得进展, 但是在对配子进行遗传筛选或用于生产转基因动物的配子进行遗传操作方面几乎没有取得任何进

展。

因此，尽管文献中预先报导了什么内容，对配子遗传筛选的改进方法和遗传加工单倍体细胞用于生产转基因动物仍存在需求。

本发明的概括和目的

本发明的一个方面提供了一种选择用于生产胚胎、胚胎干细胞或胚胎种系细胞的基因组的方法，该方法包括下列步骤：(i)培养含有雄性或雌性衍生的单倍体遗传组成的细胞；(ii)将所述培养细胞的遗传组成进行遗传测试以便鉴定所述单倍体基因组是否包括遗传缺陷、所需基因或缺乏功能基因；和(iii)选择不包括遗传缺陷的细胞或选择含有所需基因或缺乏功能基因的细胞。

特别就雌性衍生的单倍体细胞而言，可以通过5种方法之一获得该细胞：(1)对其中一半染色体排出在极体中的卵母细胞进行激活；(2)通过使卵受精并从其中除去雄性原核；(3)通过活化卵以便产生含有两个雌性原核的卵并除去所述原核之一；(4)通过将二倍体细胞核插入不成熟的卵母细胞，随后使所述染色体分入两个单倍体核；和(5)通过将单性胚胎（含有半数染色体，但增殖全部DNA成分即4条染色单体）的核转入卵母细胞且随后从其中排出半数染色体。

本发明的另一个目的涉及可以通过下列方法之一获得的雄性衍生的单倍体细胞的筛选方法：(1)从除去雌性原核的受精卵中获得雄性衍生的单倍体细胞；(2)通过使去核的卵受精而获得雄性衍生的单倍体细胞；和(3)通过对精核进行人工解凝、然后将其注入非卵衍生的胞质体而获得雄性衍生的单倍体细胞。

本发明的另一个目的是一种增殖雄性或雌性衍生的单倍体细胞的方法，该方法通过选自的方法来进行：(i)使单倍体卵胞质体进行细胞分裂；(ii)使单倍体细胞产生单倍体胚胎，然后将这种胚胎培养成“增殖单倍体”细胞；(iii)将单倍体胚胎培养产生单倍体的胚胎干细胞样细胞并使这类胚胎干细胞样细胞分化；和(iv)在使细胞分裂的条件下培养单倍体体细胞胞质体。

本发明的另一个目的是提供雄性或雌性来源的增殖单倍体基因组细胞系、即包括所需遗传组成或包括所需遗传修饰的细胞系。

本发明的另一个目的是提供由单倍体细胞系产生的多能或胚胎干细胞样细胞和由其来源的分化细胞，它们包括所需遗传组成、例如包括所需的遗传修饰。

本发明的另一个目的是提供由遗传修饰或选择的单倍体雄性和/或雌性基因组产生的二倍体哺乳动物胚胎以及由其来源的多能细胞系和分化细胞。

定义

本发明涉及通过任意方法进行的含有雄性或雌性衍生的单倍体染色体组成的细胞的生产 and 增殖方法、这些细胞在特异性单倍体基因组的遗传评价、遗传修饰或增殖中的应用以及这些细胞在生产具有 DNA 的二倍体组成的胚胎中的应用。所增殖、筛选和/或修饰的单倍体基因组包括下列动物的单倍体基因组：有蹄类动物，诸如牛、绵羊、猪、马、山羊；犬、猫、鼠、家兔和啮齿动物（例如豚鼠、仓鼠和大鼠）；人、非人灵长目，诸如猕猴、黑猩猩、狒狒和大猩猩。

所谓“遗传筛选”、“遗传诊断”、“遗传分析”和“遗传测试”指的是通过常规方法分析单倍体基因组以便检测存在或不存在与表型、疾病或疾患相关的特异性 DNA。这类方法包括原位杂交、聚合酶链反应、嵌套式聚合酶链反应、荧光检测法、RFLP 分析 VNTR 或 STR 检测法（其中筛选大量串联重复二核苷酸或其它短串联重复 (STR) 序列的用法）、单链构象多态性 (SSCP) 分析、指示梯度凝胶电泳 (DGGE) 和错配裂解分析、即通过酶 (RNA 酶 A) 或化学 (哌啶) 方式而进行的裂解分析。这类方法综述在 Fujimura, 《分子生物学和生物技术综合参考书》(MOLECULAR BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY: A COMPREHENSIVE DESK REFERENCE) 中的“遗传测试”(“Genetic Testing”), 374-379 (Robert A. Meyers, 编辑, 1995) 中。

所谓“遗传选择”指的是使用遗传测试对基因型进行的定向选择。

所谓“遗传修饰”或“遗传操作”指的是对细胞、一般是单倍体细胞的基因组进行的修饰。它包括插入、缺失和取代这样的修饰。优选在基因组中的靶位点上进行修饰。在一个优选的实施方案中，最终将修饰的单倍体细胞用于核移植以便产生表达所修饰/操作的基因的动物。

所谓“增殖”指的是增加包括所需雄性或雌性来源的单倍体基因组的细胞数。

所谓“单倍体细胞”指的是带有单倍体数量(n)染色体的细胞。“配子”是通过减数分裂产生并涉及有性生殖的特化单倍体细胞(例如精子和卵母细胞)。“二倍体细胞”具有同源配对的染色体并带有每种常染色体遗传基因座的两个拷贝($2n$)。“合子”是因受精过程中雄性和雌性配子融合产生的二倍体细胞。

术语“核转移”或“核移植”指的是一种克隆方法，其中将来自供体细胞的核移植入去核的卵母细胞。已知核转移技术或核移植技术公开在文献中(Campbell等,《动物生殖学》(Theriogenology) 43: 181 (1995); Collas等,《生殖与发育分子学》(Mol. Reprod. Dev.) 38: 264-267 (1994); Keefer等,《生物学与生殖》(Biol. Reprod.) 50: 935-939 (1994); Sims等,《美国国家科学院学报》(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 90: 6143-6147 (1993); Evans等, WO 90/03432 (1990年4月5日); Smith等, WO 94/24274 (1994年10月27日); Wheeler等, WO 94/26884 (1994年11月24日))。另外,美国专利号 US 4,994,384 和 US 5,057,420 中描述了用于牛核移植的步骤。另外参见美国专利号 US 5,945,577; WO 97/06668 和 WO 97/06669, 受让人或申请人的名称分别为 The University of Massachusetts 和 Roslin Institute。将该专利和申请引入本文作为参考。在本申请中,核转移或核移植或 NT 可以互换使用。本定义还包括植入一个或两个选择的单倍体基因组以便产生胚胎的过程。

所谓“缺乏功能基因”指的是整个基因从本发明主题的基因组中缺失或该基因突变至它不再起作用(例如产生野生型蛋白)的程度。

所谓“遗传缺陷”指的是核酸缺失或插入,相当于基因转录、基因

mRNA 翻译成蛋白质的改变、蛋白质或基因 mRNA 的半衰期改变或该基因野生型表达的其它改变。给定基因的不同形式称作“等位基因”。基因的“野生型等位基因”是那些在天然群体中以相对高的频率存在并产生野生型或正常表型的等位基因。产生异常或非野生型表型的基因的等位基因是“突变体等位基因”。

所谓“增殖单倍体细胞系”指的是在单倍体细胞宿主生物体外通过人工方式产生的增殖单倍体细胞的细胞系。一般来说，这类单倍体细胞系包含在体外培养物中。另一方面，例如可以通过注入 SKID 小鼠以产生分化细胞类型使单倍体细胞增殖。

发明详述

如上所述，本发明涉及单倍体基因组的生产和增殖方法、通过遗传分析从所述增殖单倍体基因组中选择所需单倍体基因组和所述选择的单倍体基因组在生产二倍体胚胎中的应用。正如本申请背景技术中所述，已知将对植入前胚胎进行遗传评价作为选择适合于移植和产生后代的胚胎的方式。这类方法包括在植入前对所述胚胎的一个或多个细胞的基因组进行遗传评价。

然而，这类方法可能产生伦理问题，即胚胎受到操作，且如果它表现出不需要的遗传特性，那么将会被破坏。最特别的情况是，就人植入前胚胎而言，这类方法可能产生伦理问题、尤其是通过核转移或常规体外受精产生的那些人体胚胎而言更是如此。

相反，本发明通过对单倍体细胞基因组进行遗传测试而选择用于生产二倍体胚胎的单倍体 DNA。由于单倍体细胞不能产生存活后代，因此这类方法不会产生相同的伦理忧虑。因此，弃去不理想的单倍体基因组或对单倍体基因组操作避免了与操作和破坏二倍体胚胎、例如人二倍体胚胎相关的伦理问题。

因为本发明包括对单倍体基因组进行遗传测试，所以需要这类单倍体基因组的增殖来源。这种情况最初需要构建或获得含有单倍体基因组的细胞并要求其增殖。

可以使用生产含有雄性或雌性单倍体基因组的细胞的各种方法。例如，根据实例，生产含有雌性来源的单倍体基因组的单倍体细胞的方法包括下列步骤：

(i) 在体外活化卵母细胞，其中半数染色体被排出在极体中；

(ii) 使卵受精并除去雄性原核；

(iii) 在体外活化包括两个雌性原核的卵并从其中除去所述原核之一；

(iv) 将二倍体细胞核插入未成熟的卵母细胞并将所述染色体分入两个单倍体核；和

(v) 将包含半数染色体、但增殖全部 DNA 成分即四条染色单体的孤雌生殖核转移入卵母细胞并从其中排出一半染色单体。

在上述方法中，优选(i)、(iii)、(iv)和(v)，因为这些方法在任何情况下均不会产生其中半数其 DNA 组成属于雄性来源且另一半属于雌性来源的二倍体胚胎。因此，即使将它们植入，它们也不能够发育成足月后代。

用于提供雄性来源单倍体基因组的方法包括：

(i) 使卵受精并除去雌性原核；

(ii) 使去核的卵母细胞受精；和

(iii) 将精子核进行人工解凝并注入非卵衍生的胞质体。

可以通过各种方法增殖上述单倍体细胞和其它单倍体细胞。例如，可以通过诱导卵胞质体的分裂来增殖单倍体基因组。另一方面，可以将单倍体胚胎用于胚胎干细胞样细胞的生产中。这可以通过使用已知培养基和用于维持培养中的胚胎的方法培养所述胚胎并培养内细胞团或来源于其中的细胞来进行该步骤，以便产生胚胎干细胞样细胞。例如，可以通过将内细胞团或单倍体基因组衍生胚胎的内细胞团细胞置于饲养层、例如鼠胎儿成纤维细胞上来进行该步骤以便产生含有胚胎干细胞样细胞的培养物，所述的胚胎干细胞样细胞在例如移离饲养层后可产生不同的分化细胞类型。

另一方面，可以将来源于单倍体胚胎的胚胎干细胞样细胞用于产

生具有亲代单倍体基因组的基因组的分化细胞。增殖单倍体基因组的另一种方式包括诱导通过将单倍体基因组导入胞质体产生的单倍体体细胞胞质体的分裂。

应注意，在优选的实施方案中，所述的单倍体基因来源于人，例如来源于人的精子或卵母细胞。然而，本发明包括任意哺乳动物种类来源的单倍体基因组的构建，所述的哺乳动物种类例如有：非人的灵长类、狗、猫、小鼠、大鼠、家兔、熊、牛、马、猪、绵羊、豚鼠、水牛、山羊、羚羊等。本发明主要适用于选择例如需要通过核转移增殖任意动物，这些含有特别重要的所需遗传组成的动物是农用动物，尤其是具有长妊娠期的动物。本发明应能够快速筛选可产生具有所需遗传特性的二倍体胚胎的单倍体基因组。例如，性连锁遗传疾病的存在或不存在可能是遗传筛选的基础。

此外，本发明使得按照本发明产生的单倍体细胞系通过同源重组进行遗传修饰成为可能。

这是本发明的一个有利的方面，因为在基因座上的等位差异不会干扰所需重组事件。此外，本发明可以使得对雄性和雌性单倍体细胞系中相同基因座进行打靶，然后将产生的修饰雄性和雌性单倍体基因组合并而产生对特定修饰（例如缺失特定基因）而言属于纯合的二倍体胚胎。

如上所述，本文所述的本发明对现有的移植前遗传诊断 (PGD) 方法进行了改进，因为这些方法不会涉及对胚胎的操作。一般来说，极少有胚胎可用于筛选。此外，为测试而从胚胎中取出细胞对该胚胎的进一步发育而言可能是有害的。而通常仅有一个或极少的几个细胞用于遗传测试，这将导致因 DNA 缺失或 DNA 污染而产生不准确的结果。最后，关于胚胎的处理存在伦理考虑。单倍体 DNA 的遗传筛选提供的优势在于，如果筛选雄性和/或雌性配子，那么尽管筛选的配子极少，但总体上可能的组合将是很大的。

就性连锁遗传疾病而言，可以仅对精子进行筛选，而精子通常易于大量获得。如果不能获得大量精子，那么使精子基因组增殖也是有

用的。这项技术可以制成基因组的许多相同拷贝用于筛选，以便将误诊的可能性减小到最低限度，并允许分析其它样品以便检验结果。有关与精子相关的工作和对精子的操作的伦理忧虑与那些使用胚胎进行工作的情况相比是最小的。

例如，还可以筛选单倍体细胞，以便测定该单倍体细胞中的遗传或 DNA 甲基化缺陷是否可以导致由其发育而成的任何成年动物患癌或其它疾病。对遗传疾病和易感性的筛选可以用于消除含有这类缺陷的有缺陷单倍体细胞。可以将本发明用于筛选与疾病或其它不需要的性状相关的染色体畸变和 DNA 序列。一般将这些单倍体基因组弃去。然而，在某些情况中，可以保留这类单倍体基因组。例如，编码涉及疾病的基因的单倍体基因组的产生可以用于生产用于研究目的的动物，例如用于评价推定的治疗或预防的功效。此外，可以将本发明用于选择含有所需遗传组成、例如包括涉及促进生长、疾病耐受性、产奶或其它所需性状的 DNA 序列的单倍体基因组。例如，可以使用 DNA 探针和连锁 (L) 或突变 (M) 检测对表 1 中所列下列人体疾病进行单倍体细胞的遗传分析：

表 1

疾病	染色体	L/M	克隆的
α -1 抗胰蛋白酶缺乏症	14	M	是
α -地中海贫血	16	M	是
腺瘤样结肠息肉病	5	L, M	是
成人多囊性肾病	16	L	非
乳腺癌易感性 (BRCA1)	17	L, M	是
乳腺癌易感性 (BRCA2)	13	L	非
β -地中海贫血	11	M	是
沙-马-图病	1	M	是
结肠癌易感性 (MSH2)	2	M	是
结肠癌易感性 (MLH1)	3	M	是
结肠癌易感性 (PMS1)	2	M	是
结肠癌易感性 (PMS2)	7	M	是
先天性肾上腺增生	6	M, L	是
囊性纤维化 (CF)	7	M	是
杜兴/贝克肌营养不良	X	M, L	是
脆性 X 染色体综合征	X	M, L	是
A 型血友病	X	M, L	是
戈谢病	1	M	是
B 型血友病	X	M, L	是
亨廷顿舞蹈病	4	M, L	是
肯尼迪病	X	M	是
莱-尼综合征	X	L, M	是
马方综合征	15	M	是
中链脂酰辅酶 A 脱氢酶缺乏症	1	M	是
黑素瘤易感性	9	M	是
1 型多发性内分泌腺瘤形成	11	L	非
2A 型多发性内分泌腺瘤形成	10	L, M	是
强直性肌营养不良	19	M, L	是
1 型神经纤维瘤病	17	L, M	是
鸟氨酸转氨甲酰酶缺乏症	X	M, L	是
视网膜母细胞瘤	13	M, L	是
镰形细胞贫血	11	M	是
类固醇硫酸酶缺乏症	X	L, M	是
泰-萨病	15	M	是
韦-霍病	5	L	非

Frank K. Fujimura, 《分子生物学和生物技术综合参考书》

(MOLECULAR BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY: A COMPREHENSIVE DESK REFERENCE) 中的“遗传测试”(“Genetic Testing”), 374-379 (Robert A. Meyers, 编辑, 1995)。

用于筛选基因组检查特异性 DNA 序列或染色体畸变是否存在的方法是众所周知的。根据实例, 这类筛选方法包括: 聚合酶链分析(PCR)技术, 包括嵌套式 PCR 和直接 PCR 扩增; SSCP 分析; RFLP 分析; 原位引发标记(PRINS)法(参见 Pellestor 等, 1996); 荧光原位杂交(FISH)分析; 和 VNTRs 或 STRs 分析; 变性梯度凝胶电泳(DGGE); 以及使用酶(例如 RNA 酶 A)或化学(例如吡啶)法进行的错配裂解分析。

其它筛选方法包括可用于鉴定基因组印记相关综合征的 DNA 甲基化分析。与基因组印记相关的人体综合征和疾病包括普-威综合征(PWS)、安格尔曼综合征(AS)、单亲异双躯干畸胎病(uniparental isodisomy)、伯-韦综合征(BWS)、维尔姆斯瘤癌发生和冯·希佩尔-林道(von Hippel-Lidau, VHL)病。就进行 DNA 甲基化分析的方法而言, 参见 Buchholz 等, 《人体遗传学》(Hum. Genet.)103: 535-9 (1998)。可以通过遗传突变、诸如缺失以及异常基因组印记产生 PWS (Barabash 等, 《临床医学》(Med. Clin.) (Barc) 108: 304-6 (1997))。在动物中, 还将基因组印记与皮毛颜色联系起来。例如, 小鼠 agouti 基因赋予野生型毛色, Aiapy 等位基因的差异表达与基因上游调节序列的甲基化情况有关 (Michaud 等, 《基因发育》(Genes Dev.) 8: 1463-72)。可以将农学上的遗传筛选用于遗传选择以便产生最佳组合, 这种组合可将隐性突变减小到最低限度、增加杂合性或纯合性或累积有益的或者所需的等位基因。

如上所述, 许多遗传筛选和测试方法在本领域中是公知的且可以用于本发明。此外, 已经鉴定了与所需或不需要的性状相关的许多序列。

可以将本发明的方法用于例如农业、实验室或驯养动物这样的动物以及人中的遗传选择。目前, 构成胚胎的配子基因组的组合是随机

的。然而，通过对配子进行遗传筛选，可以获得最佳组合以便将隐性突变最小到最低限度、增加杂合性、增加纯合性或累积有益的等位基因。选择到的具有所需遗传组成的单倍体基因组可以用于产生二倍体胚胎和后代。

如上进一步所述，还可以将生产增殖单倍体细胞的方法用于制备遗传修饰的单倍体细胞。就同源重组而言，基因座上的等位差异不会干扰重组事件。此外，靶向雄性和雌性细胞系可以获得纯合修饰。

用于进行基因组修饰的方法在本领域中是众所周知的，例如包括应用逆转录病毒载体、显微注射和使用包括待插入序列的 DNA 进行转化。优选在基因组的靶位点进行遗传修饰。已经充分报导了用于对基因组，特别是哺乳动物基因组进行靶向插入、缺失和取代修饰的方法，它们在许多专利的主题。

本质上说，在本发明中，可以对增殖单倍体细胞系中包含的特定单倍体基因组进行遗传修饰以便除去、添加或取代特定的 DNA 序列。在例如通过同源重组进行这类遗传修饰后，对所述的单倍体基因组进行测试或筛选以便确定它确实包括所述修饰。例如，可以通过上文确定的遗传筛选方法或通过表达例如酶、抗生素抗性标记、荧光或放射性标记等这样在插入的 DNA 中包含的特定标记来完成上述步骤。

在产生了遗传修饰的单倍体基因组后，优选通过上述方法扩增它。

所得选择的雄性或雌性来源的单倍体（其基因组可以是遗传修饰的）特别可用于核转移或核移植。这类方法主要包括将所选择的雄性和雌性单倍体基因组导入去核的卵母细胞或将所选择的雄性或雌性单倍体基因组导入单倍体卵母细胞的步骤，其中这类单倍体 DNA 是雄性或雌性来源。由此获得二倍体核转移单位，其中已基于其遗传组成对其中的雄性或雌性 DNA 进行了选择。可以将这些二倍体核转移单位用于生成具有所需遗传组成、例如含有涉及疾病耐受性、生长或编码所需产物的异源 DNA 的基因的子代。

核转移技术或核移植技术在文献中是众所周知的。特别参见 Sims 等，《美国国家科学院学报》（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）90:

6143-6147 (1993); Collas 等, 《发育的分子学报告》(Mol. Report Dev.) 38 : 264-267 (1994); Keefer 等, 《生殖生物学》(Biol. Reprod.) 50: 935-939 (1994); Campbell 等, 《动物生殖学》(Theriogenology), 43: 181 (1995); Campbell 等, 《自然》(Nature), 380: 64-66 (1996); Schnieke 等, 《科学》(Science) 278: 2130-3 (1997); Wells 等, 《生殖生物学》(Biol. Reprod.) 57: 385-393 (1997); Wilmut 等, 《自然》(Nature) 386 : 810-813 (1997); Cibelli 等, 《科学》(Science) 280: 1256-8 (1998); Kato 等, 《科学》(Science) 282: 2095-8 (1998); Wakayama 等, 《自然》(Nature) 394: 369-74 (1998); Wolf 等, 《生物技术杂志》(J. Biotechnol.) 65: 99-110 (1998); Baguisi 等, 《国家生物技术》(Nat. Biotechnol.)17: 456-61 (1999); Dominko 等, 《生殖生物学》(Biol. Reprod.) 60: 1496-1502 (1999); Wolf 等, 《生殖生物学》(Biol. Reprod.) 60 : 199-204 (1999); PCT/US99/00045; WO 94/26884; WO 94/24274; 和 WO 90/03432, 将这些文献的全部内容引入本文作为参考。此外, 美国专利号 US 4, 944, 384 和 5, 057, 420 中描述了用于牛核转移的步骤。另外参见美国专利号 US 5, 945, 577, 将该文献的全部内容引入作为参考。

用于核转移的卵母细胞可以获自包括哺乳动物和两栖类动物在内的动物。卵母细胞的合适的哺乳动物来源包括绵羊、牛、羊、猪、马、兔、豚鼠、小鼠、仓鼠、大鼠、灵长类、人和非人等。在优选的实施方案中, 卵母细胞可以获自: 灵长类, 例如人卵母细胞; 或有蹄类动物。

用于分离卵母细胞的方法在本领域中是众所周知的。这些方法主要包括从例如牛这样的哺乳动物卵巢或生殖道中分离卵母细胞的步骤。牛卵母细胞的易于得到的来源是来自屠宰场的物质。

为了成功地使用诸如遗传工程、核转移和克隆这样的技术, 在将这些细胞用作核转移用的受体细胞前并在能够与使精子细胞受精而发育成胚胎之前, 一般必须在体外使卵母细胞成熟。这种方法一般需要

从卵巢(例如在屠宰场获得的牛卵巢)中收集不成熟的(前 I 期)卵母细胞并在受精或去核前在成熟培养基中使卵母细胞成熟,直到卵母细胞达到中期 II 阶段为止,就牛卵母细胞的情况而言,中期 II 阶段一般发生在吸出后约 18-24 小时。就本发明的目的而言,将该时间期限称作“成熟期”。本文计算时间期限所用的“吸出”指的是从卵泡中吸出不成熟的卵母细胞。此外,本发明包括通过从许可供体中吸出而分离人卵母细胞的方法。

另一方面,可以将已经在体内成熟的中期 II 阶段的卵母细胞用于核转移技术。例如,通过手术方法从动情期开始后或注射人绒毛膜促性腺素(hCG)或相似激素后 35-48 小时的非超排卵或超排卵的母牛或小母牛中采集成熟的中期 II 卵母细胞。

已经报导去核和核转移时卵母细胞的成熟阶段对 NT 法的成功是至关重要的。(例如参见 Prather 等,《分化》(Differentiation) 48: 1-8 (1991); Tanaka 等,《动物生殖科学》(Anim. Reprod. Sci.) 49: 113-23 (1997))。一般来说,成功的哺乳动物胚胎克隆实践应用中期 II 卵母细胞作为受体卵母细胞,因为认为在该阶段卵母细胞可能或被充分“活化”而将导入的核作为受精精子对待。在驯养动物且特别是牛中,卵母细胞活化期通常是在吸出后约 16-52 小时、优选约 28-42 小时的范围。

例如,可以如 Seshagine 等在《生殖生物学》(Biol. Reprod.) 40: 544606 (1989)中所述在 HEPES 缓冲的仓鼠胚胎培养基(HECM)中洗涤不成熟的卵母细胞,且然后在 39℃下将其放入处于轻质石蜡或硅烷层之下的成熟培养基液滴中,该液滴由含有 10%胎牛血清(FCS)的 50 ul 组织培养基(TCM)199 组成,所述培养基含有诸如黄体生成素(LH)和促卵泡激素(FSH)这样适当的促性腺素以及雌二醇。

在约 10-40 小时且优选约 16-18 小时范围的固定成熟期后,可以将卵母细胞去核。在去核前,优选取出该卵母细胞并在除去卵丘细胞前将其放入含有 1 mg/ml 透明质酸酶的 HECM 中。通过经极其精密孔径分吸量管反复吸移或通过简单地涡旋来完成上述步骤。然后对剥

离的卵母细胞筛选极体，随后将通过存在极体确定的所选择中期 II 卵母细胞用于核转移。去核过程如下。

可以通过诸如美国专利号 US 4,994,384 中所述的公知方法进行去核，将该文献引入作为参考。例如，将中期 II 卵母细胞置于可以含有或不含有 7.5 μ g/ml 松胞菌素 B 的 HECM 中以便于即刻去核，或可以将其置于例如 CR1 aa + 10% 动情期母牛血清的适宜培养基中以后再去核，优选在不超过 24 小时后且更优选在 16 - 18 小时后去核。

可以使用微量吸移管通过显微手术的方式进行去核以便除去极体和相邻的细胞质。然后可以筛选卵母细胞以便鉴定已经成功去核的那些卵母细胞。可以通过用 HECM 中的 1 μ g/ml 33342 Hoechst 染料对卵母细胞染色且然后在紫外线照射下将所述卵母细胞观测 10 秒以下进行这种筛选。可以将随后成功去核的卵母细胞置于合适的培养基、例如 CR1 aa + 10% 血清中。

在本发明中，可以将 1 个或 2 个选择的可能进行遗传修饰的单倍体基因组植入任选去核的卵母细胞的卵周隙或其它胞质体中。按照本领域中公知的方法将所得的含有属于二倍体的卵母细胞或胞质体的单倍体基因组用于产生 NT 单位。例如，可以通过电融合融合细胞。通过提供足以使质膜短暂破裂的电脉冲来进行电融合。质膜的这种破裂时间极短，因为该膜可快速重形成。实质上，如果诱导两个相邻的膜破裂，则重形成时脂双层渗入，在两个细胞之间将开放小的通道。由于这类小孔存在热力学不稳定性，它扩大至两个细胞合二为一为止。有关该方法的进一步讨论参阅 Prather 等的美国专利 US 4,997,384。可以使用例如包括蔗糖、甘露糖醇、山梨醇和磷酸缓冲溶液在内的各种电融合介质。还可以使用仙台病毒作为融合剂进行融合 (Graham, Wister Inst. Symp. Monogr. 9: 19 (1969))。

此外，在某些情况中(例如使用小供体核)，可能优选将单倍体细胞或核直接注入卵母细胞而不是使用电穿孔融合法。这类技术公开在 Collas 等的 Mol. Reprod. Dev. 38: 264-267 (1994) 中。

可以通过公知方法对人或动物细胞和卵母细胞或胞质体进行电融

合：例如在引发卵母细胞成熟后约 24 小时，在 500 μm 室内通过使用 90-120 V 的电脉冲约 15 μsec 。融合后，将所得的融合 NT 单位置于合适的培养基中至活化为止。可以在融合之前或之后不久、一般在小于 24 小时后且优选在约 4-9 小时后进行活化。

可以通过公知方法活化 NT 单位。这类方法包括：例如在亚生理学温度下培养 NT 单位，实质上是通过 NT 单位施用冷或事实上冷却的温度休克。最方便的是通过在与胚胎通常暴露的生理学温度相比属于室温的条件下培养 NT 单位来进行该步骤。

另一方面，可以通过施用公知的活化剂来进行活化。例如，已经证实在受精过程中由精子透入卵母细胞可活化充满的卵母细胞而产生较大数量的存活受孕体并在核转移后倍增出遗传方式相同的幼体。此外，可以将诸如电休克和化学休克这样的处理方法用于活化融合后的 NT 胚胎。卵母细胞的活化方法是 Susko-Parrish 等的美国专利号 US 5,496,720 的主题。

另一方面，可以同时或依次进行下述步骤完成活化：

- (i) 增加卵母细胞中二价阳离子的浓度；和
- (ii) 降低卵母细胞中细胞蛋白的磷酸化。

一般可以通过将例如镁、镉、钡或钙这样的二价阳离子以例如离子载体的形式导入卵母细胞细胞质来进行上述步骤。其它增加二价阳离子浓度的方法包括使用电休克、用乙醇处理和用笼状螯合剂 (caged chelators) 处理。

可以通过公知方法、例如通过添加诸如丝氨酸-苏氨酸激酶抑制剂 (例如 6-二甲氨基嘌呤、staurosporine、2-氨基嘌呤和鞘氨醇) 这样的激酶抑制剂来减少磷酸化。另一方面，可以通过将磷酸酶 (例如磷酸酶 2A 和磷酸酶 2B) 导入卵母细胞来抑制细胞蛋白的磷酸化。

进行 NT 活化的一种方式通过下列步骤来进行：使融合的 NT 单位与含有 5 μM 离子霉素和 1 mg/ml BSA 的 TL-HEPES 培养基简单接触，随后在融合后约 24 小时内、且优选在融合后约 4 - 9 小时内在含有 30 mg/ml BSA 的 TL-HEPES 中洗涤。另一方面，可以通过使用乙醇或

反复的电脉冲来进行活化。

然后将由一种或两种选择的单倍体基因组产生的活化 NT 单位在合适的体外培养基中培养至胚胎或胚胎干细胞样细胞和细胞集落产生为止。适合于培养胚胎和使之成熟的培养基在本领域中是众所周知的。可以用于牛胚胎培养和维持的已知培养基的实例包括 Ham's F-10 + 10%胎牛血清(FCS)、组织培养基-199 (TCM-199) + 10%胎牛血清、蒂罗德清蛋白-乳酸-丙酮酸(TALP)、Dulbecco's 磷酸缓冲盐水(PBS)、Eagle's 和 Whitten's 培养基。用于收集卵母细胞并使之成熟的最常用培养基之一是 TCM-199 + 1 - 20%血清补充剂、包括胎牛血清、新生血清、动情期的母牛血清、小羊血清或公牛血清。优选的维持培养基包括含有 Earl 盐、10%胎牛血清、0.2 mM 丙酮酸钠和 50 µg/ml 硫酸庆大霉素的 TCM-199。上述任何一种还可以包括与诸如颗粒细胞、输卵管细胞、BRL 细胞、子宫细胞和 STO 细胞这样不同细胞类型的共培养物。

此后，优选将活化的培养 NT 单位进行洗涤且然后置于例如带孔平板中的含有 10% FCS 和 6 mg/ml 的 CR1aa 培养基这样合适的培养基中，这些平板优选含有合适的汇合饲养层。合适的饲养层包括例如成纤维细胞和上皮细胞，例如来源于有蹄类动物的成纤维细胞和子宫上皮细胞、鸡成纤维细胞、鼠(例如小鼠或大鼠)成纤维细胞、STO 和 SI-m220 饲养层细胞系和 BRL 细胞。

在饲养层上将 NT 单位培养至 NT 单位达到适合于获得可用于产生胚胎干细胞样细胞或细胞集落的细胞的大小。优选将这些 NT 单位培养至至少约 2 - 400 个细胞、更优选约 4 - 128 个细胞和最优选至少约 50 个细胞。在合适的条件、例如约 38.5°C 和 5% CO₂ 条件下进行培养，并且一般约每 2-5 天、优选约每 3 天更换所述培养基以使生长达到最佳。

在获得所需大小的 NT 单位后，以机械方式从所述区域中取出所述细胞且然后用于产生胚胎或胚胎干细胞样细胞和细胞系。优选通过取出包括一般含有至少约 50 个细胞的所述 NT 单位的细胞块、洗涤这类细胞并将这些细胞铺在例如照射的成纤维细胞这样的饲养层上来完成

上述步骤。一般来说，用于获得所述干样细胞或细胞集落的细胞将获自优选至少为 50 个细胞大小的培养 NT 单位的最内层部分。然而，也可以将较小或较大细胞数量的 NT 单位以及来自 NT 单位其它部分的细胞用于获得 ES-样细胞和细胞集落。将这些细胞维持在例如补充了 10% FCS 和 0.1 mM β -巯基乙醇(Sigma)和 L-谷氨酰胺的 α MEM 这样的适宜生长培养基内的饲养层中。根据需要更换生长培养基以便使生长最佳化，例如每 2-3 天更换一次。该培养过程导致形成胚胎或胚胎干细胞样细胞或细胞系。在这类细胞产生前的培养时间可能随特定核供体细胞、具体卵母细胞和培养条件的不同而改变。本领域技术人员可以根据需要的不同而改变培养条件以便使特定胚胎或胚胎干细胞样细胞的生长最佳化。

由所述单倍体基因组所生成胚胎或胚胎干细胞样细胞和细胞集落应表现出与用作核细胞供体的种类的天然胚胎或胚胎干细胞样细胞相似的外观。

已经参照优选实施方案描述了本发明。然而，对本领域技术人员而言，显然能够以非如上所述的特定方式使本发明具体化而不会脱离本发明的实质。下面实施例中所述的优选实施方案是解释性的而不应将其看作以任何方式来限定本发明。本发明的范围由所附的权利要求而非上述描述确定，并且属于权利要求范围内的所有改变和等同内容均包括在其中。

实施例

单倍体细胞系的产生

大鼠 A9 细胞的产生

在补充了 10%胎牛血清的 α mem(Biowhittaker, location) 中用 3.75 μ g/ml 松胞菌素 B (Sigma, location) 将鼠 A9 细胞(HPRT-)培养 96 小时。松胞菌素 B 是微丝的抑制剂，可防止细胞进行胞质分裂，同时使细胞合成 DNA 并增加大小。撤离该药物 24 小时后，可以从培养物表面取出细胞并操作。所得细胞约为 30 μ m 直径。

培养

用聚-D-赖氨酸包被直径约为 2.5 cm 的玻璃圆盘。以 60-80% 汇合率将松胞菌素 B 处理的 A9 细胞平板铺在该圆盘上并使之贴壁 24 小时。将圆盘细胞侧朝下置于含有 5ml 去核培养基(磷酸缓冲盐水、10%胎牛血清、10ug/ml 松胞菌素 B)的离心管内。在 37℃ 下将细胞保温 20 分钟。将离心管置于 37℃ 的超速离心机中并以 23,000g 再旋转 20 分钟。所得的胞质体可存活 24-48 小时。

通过胰蛋白酶消化从玻璃表面取下胞质体。以 1 X 浓度向培养基中加入 HAT 补充剂以便杀伤剩余的有核细胞。该步骤的另一种选择是在导入供体核后加入 HAT 补充剂。该步骤会消除任何有核 A9 细胞,而任何未融合的胞质体会在 48 小时内裂解。

供体核的导入

通过获能或用蛋白酶处理来制备从携带新霉素抗性基因(Neo)的转基因小鼠中采集的精子用于融合。将这些处理方法用于确保精子将粘着胞质体。转基因标记可用于证实精子的来源,但对该过程来说并非必需。或者,单倍体供体可以通过显微操作从新近受精胚胎中取出的雄性和雌性原核(单倍体核体)。

融合

用蛋白酶或 PHA 处理 A9 胞质体和精子二者以便增加胞质体与精子的粘附和融合的可能性。应利用适宜浓度的精子或供体核和胞质体,以便增加带有单核的所得细胞的数量。可以用 AC 脉冲将核/胞质体偶联体定向,使得所融合的膜对电流而言是正交的。可以给予 DC 脉冲以便诱导核供体细胞与胞质体之间的融合。还可以将细胞融合的其他方法用于这样的步骤中,诸如聚乙二醇、融合-诱导病毒或脂质体。

选择

融合几天后，开始选择 A9-单倍体核杂种。将 HAT 敏感性 A9 细胞用作胞质体的来源，因此，HAT 培养基中形成的任何集落来自单倍体-胞质体杂种。非去核的 A9 细胞不能在选择中存活。将所得的杂种以克隆方式增殖直至获得足够数目用于分析。我们可通过荧光原位杂交或核型分析确定杂种是单倍体还是二倍体。

受精

可以将单倍体细胞用作卵母细胞受精中的供体核。使用标准方法进行核转移。使用引起第二极体排出和雌性染色质单倍化的方法可活化胚胎。

专利名称(译)	单倍体基因组用于遗传诊断、修饰和增殖		
公开(公告)号	CN1387401A	公开(公告)日	2002-12-25
申请号	CN00815283.7	申请日	2000-11-02
[标]申请(专利权)人(译)	马萨诸塞大学		
申请(专利权)人(译)	马萨诸塞大学		
当前申请(专利权)人(译)	马萨诸塞大学		
[标]发明人	JM罗博尔 P莫雷拉		
发明人	J·M·罗博尔 P·莫雷拉		
IPC分类号	G01N33/53 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/873 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/566 A01N1/00 C12N5/00		
CPC分类号	C12N15/873 C12N2510/00 C12N2517/04		
代理人(译)	唐伟杰		
优先权	60/163086 1999-11-02 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了用于增殖雄性或雌性来源的单倍体基因组和对其进行遗传筛选和修饰的方法。可以将这些单倍体基因组用于生产单倍体胚胎和胚胎干细胞样细胞和分化的细胞。此外,这些单倍体基因组和含有这些单倍体基因组的细胞可以用作产生二倍体核转移单位的核转移供体。可以将这些二倍体NT单位、例如人NT单位用于获得多能细胞和分化细胞以及组织。

表 1

疾病	染色体	L/M	克隆的
α-1 抗胰蛋白酶缺乏症	14	M	是
α-地中海贫血	16	M	是
腺瘤样结肠息肉病	5	L, M	是
成人多囊性肾病	16	L	非
乳腺癌易感性 (BRCA1)	17	L, M	是
乳腺癌易感性 (BRCA2)	13	L	非
β-地中海贫血	11	M	是
沙-冯-图病	1	M	是
结肠癌易感性 (MSH2)	2	M	是
结肠癌易感性 (MLH1)	3	M	是
结肠癌易感性 (PMS1)	2	M	是
结肠癌易感性 (PMS2)	7	M	是
先天性肾上腺增生	6	M, L	是
囊性纤维化 (CF)	7	M	是
杜兴/贝克肌营养不良	X	M, L	是
脆性 X 染色体综合征	X	M, L	是
A 型血友病	X	M, L	是
戈谢病	1	M	是
B 型血友病	X	M, L	是
亨廷顿舞蹈病	4	M, L	是
肯尼迪病	X	M	是
莱-尼综合征	X	L, M	是
马方综合征	15	M	是
中性脂酰辅酶 A 脱氢酶缺乏症	1	M	是
黑素瘤易感性	9	M	是
1 型多发性内分泌腺瘤形成	11	L	非
2A 型多发性内分泌腺瘤形成	10	L, M	是
强直性肌营养不良	19	M, L	是
1 型神经纤维瘤病	17	L, M	是
鸟氨酸转氨甲酰酶缺乏症	X	M, L	是
视网膜母细胞瘤	13	M, L	是
镰形细胞贫血	11	M	是
类固醇硫酸酯酶缺乏症	X	L, M	是
泰-萨病	15	M	是
韦-霍病	5	L	非