



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118064355 A

(43) 申请公布日 2024. 05. 24

(21) 申请号 202410188312.3

(22) 申请日 2024.02.20

(71) 申请人 南京医科大学

地址 210000 江苏省南京市鼓楼区汉中路
140号

(72) 发明人 杨杨 张文逸 安世钰

(74) 专利代理机构 南京天华专利代理有限责任
公司 32218

专利代理师 傅婷婷 徐冬涛

(51) Int. Cl.

G12N 5/0735 (2010.01)

G12N 5/073 (2010.01)

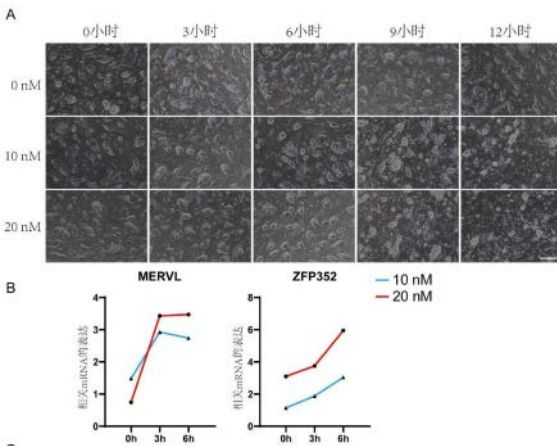
权利要求书2页 说明书11页 附图6页

(54) 发明名称

一种在体外快速诱导小鼠全能样干细胞及
以此为基础制备类囊胚的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种在体外快速诱导小鼠全能样干细胞及以此为基础制备类囊胚的方法。一种快速制备小鼠全能样干细胞的方法,包括:采用浓度为10-20nM的剪接体抑制剂Pladienolide B处理小鼠胚胎干细胞3-12小时获得瞬时全能样干细胞。一种在体外快速制备类囊胚的方法,包括使用类囊胚诱导培养基重悬本发明方法获得的全能样干细胞,混匀,转移至使用抗粘附冲洗液处理过的微孔培养板中;将微孔培养板置于37℃细胞培养箱培养5天。本发明提供了一种比现有技术更快且更为便捷的诱导小鼠全能样干细胞及以此为基础制备类囊胚的方法,极大缩短了体外制备类囊胚的时间。



1. 一种快速制备小鼠全能样干细胞的方法, 其特征在于, 包括: 采用浓度为10-20nM的剪接体抑制剂处理小鼠胚胎干细胞3-12小时获得小鼠全能样干细胞。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, 所述的小鼠胚胎干细胞是将其先解离成单细胞, 然后分布在小鼠饲养层细胞上, 使用mESM培养基不超过48小时。

3. 根据权利要求2所述的方法, 其特征在于, 所述的小鼠饲养层细胞是丝裂霉素处理过的小鼠成纤维细胞, 或市售的小鼠成纤维细胞。

4. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, 所述的剪接体抑制剂为Pladienolide B。

5. 一种在体外快速制备类囊胚的方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

S1. 按照权利要求1~4中任一项所述的方法制备全能样干细胞;

S2. 使用类囊胚诱导培养基重悬步骤S1获得的全能样干细胞, 混匀, 转移至使用抗粘附冲洗液处理过的微孔培养板中;

S3. 将微孔培养板置于37℃细胞培养箱培养4-6天。

6. 根据权利要求5所述的方法, 其特征在于, 使用抗粘附冲洗液处理微孔培养板的方法是将AggreWell™400微孔培养板使用抗粘附冲洗液处理30分钟以上, 弃去冲洗液, PBS冲洗后待用。

7. 根据权利要求5所述的方法, 其特征在于, S2中平均每个微孔内接种的全能样干细胞8-12个。

8. 根据权利要求5所述的方法, 其特征在于, 所述的类囊胚诱导培养基的配置体系为:

名称	终浓度或用量
N2B27 基础培养基	12.5 ml
TSC 基础培养基	12.5 ml
KSOM	25 ml
rhFGF4	12.5 ng/ ml
Heparin	0.5 mg/ ml
CHIR99021	3 μM
BMP4	5 ng/ ml
A83-01	0.5μM
Y27632	10 μM

按照50ml定容;

其中N2B27基础培养基按照50ml的终体积配制, 其组成为:

名称	终浓度或用量
DMEM/F12 培养基	23.85ml
Neurobasal™ 培养基	23.85ml
N-2 添加剂	250μl
B-27 添加剂	500μl
非必须氨基酸	500μl
青霉素链霉素	500μl
谷氨酰胺	500μl
β 巯基乙醇	50μl

其中TSC基础培养基按照50ml的终体积配制,其组成为:

名称	终浓度或用量
RPMI 1640 培养基	37.95ml
胎牛血清	10ml
非必须氨基酸	500μl
青霉素链霉素	500μl
谷氨酰胺	500μl
丙酮酸钠	500μl
β 巯基乙醇	50μl

9. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,S3中每天更换一半的类囊胚诱导培养基。

一种在体外快速诱导小鼠全能样干细胞及以此为基础制备类囊胚的方法

技术领域

[0001] 本发明属于细胞组织的体外培养领域,涉及一种在体外快速诱导全能样干细胞及以此为基础制备类囊胚的方法。

背景技术

[0002] 小鼠胚胎常被用来探究哺乳动物早期胚胎发育的动态过程,尽管小鼠胚胎用于动物实验符合动物伦理要求,但不符合动物研究的3R原则——替代、减少和改进。因此,使用易获得的小鼠胚胎干细胞(Embryonic stem cells,mESCs)在体外构建形态、结构和基因表达谱都类似于小鼠自然囊胚的类囊胚,具有重大的应用价值。

[0003] 但是,mESCs衍生自小鼠囊胚的表胚层细胞,只能向胚内细胞分化,因此,仅依靠mESCs聚集分化不能形成完整的类囊胚结构。相较而言,小鼠全能样干细胞具有胚内和胚外双向分化的潜能,理论上应可作为构建类囊胚的起始细胞。在2012年,一种被称为2-细胞样细胞(2CLC)的小鼠全能样干细胞被发现存在于以血清+LIF为核心的mESCs的培养条件(简称为mESM培养基)中。随后的近十年时间内,众多研究人员致力于探索如何在体外获得可长期稳定培养的小鼠全能样干细胞。直至2021年,北京大学的杜鹏团队首次发现以2.5nM的剪接体抑制剂Pladienolide B(PlaB)长时间持续处理培养于mESM培养基的mESCs(需6-7代,每代3-5天,至少需要18天),可以将mESCs成功转变为小鼠全能样干细胞。2023年,广州实验室张满团队发现可以利用这种全能样干细胞在体外成功构建小鼠的类囊胚,但由于没有对小鼠全能样干细胞的诱导进行改进,没有缩短获得小鼠全能样干细胞的时间,构建小鼠的类囊胚至少要23天以上。

[0004] 然而,上述小鼠全能样细胞的获取需要经过长时间的传代培养,而且低剂量的PlaB依然具有细胞毒性,长时间的持续处理会导致细胞的倍增时间变长、存活能力减弱,最终限制了该种细胞被大量制备的可能性。另一方面,制备全能样干细胞所需的时间周期要远长于类囊胚的形成周期,导致以这种方式制备类囊胚需要较长的制备时间,较为低效。这些缺点导致以小鼠全能样干细胞制备类囊胚的技术难以被推广及应用。

发明内容

[0005] 本发明的目的是针对现有技术的上述不足,提供体外快速诱导小鼠全能样干细胞的方法。

[0006] 本发明的另一目的是提供一种基于小鼠全能样干细胞在体外构建人造小鼠类囊胚的方法,为研究小鼠早期胚胎发生、着床研究和胚胎毒理学筛选提供了替代模型。

[0007] 本发明的发明人在研究中发现,短时间且高剂量的剪接体抑制剂的处理并不会损伤细胞的存活及增殖能力,并且实时定量PCR和RNA测序结果均显示,短时间处理后的细胞将上调全能基因的表达并降低部分多能基因的表达。这些结果显示高浓度剪接体抑制剂处理后的细胞显示出全能性特征,并开发出基于该全能样干细胞衍生的类囊胚构建方法。

[0008] 一种快速制备小鼠全能样干细胞的方法,包括:采用浓度为10-20nM的剪接体抑制剂处理小鼠胚胎干细胞3-12小时获得全能样干细胞。

[0009] 作为本发明的一种优选,所述的小鼠胚胎干细胞是将其先解离成单细胞,然后分布在小鼠饲养层细胞上,使用mESM培养基不超过48小时,每天更换培养基。

[0010] 作为本发明的一种优选,所述的小鼠饲养层细胞是10 μ g/ml丝裂霉素处理过的小鼠成纤维细胞,或直接购买使用市售的小鼠成纤维细胞。

[0011] 作为本发明的进一步优选,分布在小鼠饲养层细胞上的小鼠胚胎干细胞的密度为1-2万个细胞/cm²;使用mESM培养基时间为44-48小时,每天更换新鲜的mESM培养基。

[0012] 作为本发明的一种优选,所述的剪接体抑制剂为Pladienolide B,后续简写为PlaB。

[0013] 优选地,小鼠的胚胎干细胞由小鼠囊胚的表胚层谱系分离建立,被认为不具有向胚外,即滋养层细胞分化的能力。但经过高浓度的PlaB处理过后,在2D分化体系中小鼠全能样干细胞可以向滋养层样细胞和原始内胚层样细胞分化。本发明证实剪接体抑制剂的处理体系可以应用在多个不同来源的小鼠胚胎干细胞系,例如分离自C57BL/6小鼠囊胚表胚层谱系的胚胎干细胞系(B6-mESCs)和市售的TT2-mESCs。

[0014] 本发明中提及的mESM培养基可以在任何关于小鼠胚胎干细胞培养的文章中检索获得,所需要的成分均可以从市售获得,其具体配置体系为:

	名称	终浓度或用量
	Knockout DMEM	40.45 ml
	胎牛血清	7.5 ml
	非必须氨基酸	500 μ l
[0015]	青霉素链霉素	500 μ l
	谷氨酰胺	500 μ l
	丙酮酸钠	500 μ l
	β 巯基乙醇	50 μ l
	重组人 LIF	10 μ g/ml

[0016] 一种在体外快速制备类囊胚的方法,包括

[0017] S1.按照本发明所述的方法制备全能样干细胞;

[0018] S2.使用类囊胚诱导培养基重悬步骤S1获得的全能样干细胞,混匀,转移至使用抗粘附冲洗液处理过的微孔培养板中;

[0019] S3,将微孔培养板置于37 $^{\circ}$ C细胞培养箱培养4-6天。

[0020] 作为本发明的一种优选,使用抗粘附冲洗液处理微孔培养板的方法是将AggreWellTM400微孔培养板使用抗粘附冲洗液处理30分钟以上,弃去冲洗液,PBS冲洗后待用。

[0021] S2中不同的起始细胞接种量会影响后续类囊胚的形成,包括类囊胚的直径和类囊胚形成的效率等。在本发明的优选实例中,作为本发明的一种优选,起始全能样干细胞接种量为每微孔6-25个细胞。进一步优选地,当细胞接种量为每微孔6-15个细胞时,形成类囊胚

的直径与小鼠自然囊胚更加接近。更优的,细胞接种量为每微孔8-12个细胞,例如可以是每微孔8,10或12个细胞。

[0022] 作为本发明的一种优选,所述的类囊胚诱导培养基的配置体系为:

	名称	终浓度或用量
[0023]	N2B27 基础培养基	12.5 ml
	TSC 基础培养基	12.5 ml
	KSOM	25 ml
	rhFGF4	12.5 ng/ ml
	Heparin	0.5 mg/ ml
	CHIR99021	3 μ M
	BMP4	5 ng/ ml
	A83-01	0.5 μ M
	Y27632	10 μ M

[0024] 按照50ml定容;

[0025] 其中N2B27基础培养基按照50ml的终体积配制,其组成为:

	名称	终浓度或用量
[0026]	DMEM/F12 培养基	23.85 ml
	Neurobasal™ 培养基	23.85 ml
	N-2 添加剂	250 μ l
	B-27 添加剂	500 μ l
	非必须氨基酸	500 μ l
	青霉素链霉素	500 μ l
	谷氨酰胺	500 μ l
	β 巯基乙醇	50 μ l

[0027] 其中TSC基础培养基按照50ml的终体积配制,其组成为:

	名称	终浓度或用量
[0028]	RPMI 1640 培养基	37.95 ml
	胎牛血清	10 ml
	非必须氨基酸	500 μ l
	青霉素链霉素	500 μ l
	谷氨酰胺	500 μ l
	丙酮酸钠	500 μ l
	β 巯基乙醇	50 μ l

[0029] 本发明构建类囊胚的方法包括:

[0030] (1) 基于小鼠胚胎干细胞的培养条件, 经过短暂的高浓度剪接体抑制剂P1aB处理就可以诱导产生全能样干细胞, 确定为构建类囊胚的细胞来源。

[0031] (2) 收集步骤(1)的细胞, 利用AggreWell微孔培养板进行体外组装, 特定培养基诱导5天, 可得到类似小鼠囊胚结构的模型。

[0032] (3) 根据以上方法获得的类囊胚结构模型, 从大小、形态、分子特征、基因表达等方面进行评估, 并且比较类囊胚与小鼠自然胚胎(E3.5-E4.5)的异同, 另一方面应用胚胎体外培养系统进行体外培养, 模拟早期胚胎植入后发育, 为早期胚胎发育研究提供研究模型。

[0033] 本发明中, 为了验证高浓度剪接体抑制剂P1aB处理后的小鼠胚胎干细胞具有全能性, 可以先使用类囊胚诱导培养基进行2D分化实验, 并利用免疫荧光技术检测OCT4蛋白, CDX2蛋白和GATA6蛋白来对应小鼠囊胚期的三种细胞谱系。本发明还包括了在2D分化体系下验证全能样干细胞的全能性, 例如使用如下方法:

[0034] (1) 使用高浓度剪接体抑制剂P1aB处理培养于mESM培养基中的小鼠胚胎干细胞;

[0035] (2) 使用0.05%的胰酶将全能样干细胞消化为单细胞, 重新接种至层粘连蛋白包被的孔板上, 并使用类囊胚诱导培养基培养5天;

[0036] (3) 利用免疫荧光染色技术, 分别检测OCT4蛋白, CDX2蛋白和GATA6蛋白。优选地, 常规小鼠胚胎干细胞培养至44-48小时或汇合度达到80%左右时使用剪接体抑制剂P1aB处理, 具体开始处理的时间依据小鼠胚胎干细胞的生长状态而定。

[0037] 优选地, 本发明尝试了两种来源的胚胎干细胞系, 分别是来自市售的TT2mESCs和分离自C57BL/6小鼠囊胚表胚层谱系的B6-mESCs。不同来源的胚胎干细胞系和不同的细胞密度可能对剪接体抑制剂的反应不同, 具体处理时间以不影响细胞状态而定。在本发明优选实例中, 剪接体抑制剂的处理时间为3-9小时, 更优的为6-8小时。

[0038] 优选地, 剪接体抑制剂的处理时间以不影响小鼠胚胎干细胞的状态而定。在本发明的优选实施例中, 剪接体抑制剂P1aB的测试浓度为10-20nM。

[0039] 优选地, 所述的AggreWell微孔培养板源自STEMCEL公司, 货号:#34415。

[0040] 优选地, 使用Anti-Adherence Rinsing Solution(抗粘附冲洗液), 厂商是STEMCEL公司, 货号#07010, 室温处理30分钟以上。

[0041] 本发明中, 通常将待培养的细胞放置在细胞培养箱中培养。例如, 细胞培养的温度是37℃, 5%CO₂。

[0042] 本发明的创新点在于:

[0043] 1. 利用高浓度的剪接体抑制剂P1aB快速诱导产生小鼠全能样干细胞, 其具有小鼠全能细胞的特性, 并具有向囊胚三种谱系分化的能力, 并基于此提供了一种构建类囊胚的方法。

[0044] 2. 提供了一种新的小鼠类囊胚构建方法, 以上述快速诱导产生的小鼠全能样干细胞为起始细胞, 很大程度上缩短了全能样细胞的诱导时间, 在诱导6-9小时后即可用于类囊胚的形成实验。

[0045] 3. 快速诱导产生的全能样干细胞衍生的类囊胚很好的模拟了小鼠植入前胚胎的形态结构和转录组特征, 为研究小鼠早期胚胎发生、着床研究和胚胎毒理学筛选提供了更为便捷的替代模型。

[0046] 本发明的有益效果:

[0047] 本发明以培养在mESM培养基中的mESCs作为起始细胞,提出以十倍于现有技术中的Plab的剂量、短时间处理mESCs,最大限度在赋予其全能性的同时也不损伤其存活和增殖能力,从而获得小鼠全能样干细胞,再制备类囊胚。相较于现有技术,本发明大大缩短了基于全能样干细胞制备类囊胚的培养周期,也降低了培养成本及技术难度,使其更易于推广应用。此外,本发明所制备的类囊胚在转录组水平上比现有技术所衍生的类囊胚更接近小鼠自然囊胚,为研究小鼠早期胚胎发生、着床研究和胚胎毒理学筛选提供了更贴近于小鼠自然囊胚的研究模型。

附图说明

[0048] 为了更清楚地说明本申请的技术方案,下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的每一幅附图针对本申请的部分实施例。

[0049] 图1显示了不同Plab的处理浓度以及处理时间对TT2-mESCs的影响。其中,A图表示在Plab的不同剂量、不同处理时长下的TT2-mESCs的明场状态图。因为9小时和12小时后的TT2-mESCs均出现了明显的细胞凋亡现象,后续实验排除了9小时组和12小时组。B图对应(A)中TT2-mESCs经不同浓度和不同处理时长后的全能基因MERVL和ZFP352的表达情况。

[0050] 图2显示了以上述方法诱导获得的小鼠全能样干细胞的基因表达情况。其中,A图显示TT2-mESCs经不同剂量Plab处理相应时长后的典型全能基因和多能基因的表达情况。B图显示TT2-mESCs经20nM Plab处理6小时后,相较于未经处理的细胞的转录组的表达水平的变化。

[0051] 图3显示了本发明中B6-mESCs诱导的小鼠全能样干细胞和衍生类囊胚的形成。图A显示了小鼠胚胎干细胞经20nM Plab处理6小时后形成全能样干细胞以及以此为基础制备类囊胚的示意图。图B显示了B6-mESCs经20nM Plab处理6小时前、后的细胞明场图。图C显示了以20nM Plab处理B6-mESCs 6小时后,在AggreWell1孔板中形成类囊胚的过程。图D显示了(B)中AggreWell1孔板中的情况,包括类囊胚、实心细胞团和空白孔。

[0052] 图4显示了本发明中TT2-mESCs诱导的小鼠全能样干细胞和衍生类囊胚的形成。图A显示了TT2-mESCs经20nM Plab处理前、后的细胞明场图。图B显示了TT2-mESCs在经过Plab诱导后在AggreWell1孔板中形成类囊胚的过程。图C显示了分别以TT2-mESCs和以TT2-mESCs诱导产生的全能样干细胞为起始细胞,分别制备的类囊胚结构的明场图片,其中以TT2-mESCs为起始细胞只能产生连接松散的细胞团块。图D显示了以TT2 mESCs和以TT2 mESCs诱导产生的全能样干细胞分别为起始细胞制备类囊胚时,AggreWell1孔板中的情况,包括类囊胚、实心细胞团和空白孔。

[0053] 图5显示了针对TT2-类囊胚中细胞谱系的存在情况进行鉴定。图A-B显示了小鼠自然囊胚和TT2-类囊胚的CDX2和OCT4或OCT4和GATA6的免疫荧光染色情况,右边的柱状图显示了不同类型的自然囊胚或TT2-类囊胚在所有被检测的样品中的比例。图C显示了小鼠自然囊胚和TT2-类囊胚中各谱系细胞的存在比例。

[0054] 图6显示了类囊胚的发育过程很好的模拟了小鼠植入前胚胎发育的关键生物学事件。图A-B显示了紧密连接蛋白ZO-1在小鼠全能样干细胞形成类囊胚的过程中所形成的细胞团内的定位情况和ZO-1阳性的细胞团的比例统计。以小鼠自然桑葚胚作为阳性对照。图C-D显示了极化蛋白Ezrin在小鼠全能样干细胞形成类囊胚的过程中所形成的细胞团内的

定位情况和Ezrin阳性的细胞团的比例统计。以小鼠自然桑葚胚作为阳性对照。图E-F显示了活化的YAP1蛋白在小鼠全能样干细胞形成类囊胚的过程中所形成的细胞团内的定位情况和该蛋白阳性的细胞团的比例统计。

[0055] 图7显示了小鼠胚胎干细胞以20nM P1aB处理6小时后所形成的类囊胚作为样品,进行RNA测序及分析的结果。该图表明本发明中全能样干细胞衍生的类囊胚与小鼠自然囊胚十分相似。其中,图A显示了类囊胚形成过程中,表胚层(Epiblast,EPI)、滋养层(Trophectoderm,TE)和原始内胚层(Primitive Endoderm,PrE)典型基因的表达水平。图B显示小鼠16细胞胚胎、E3.5和E4.5囊胚、TBLC-和EPS-类囊胚以及和本发明中全能样干细胞衍生的类囊胚(即图中的“类囊胚(本研究)”)的转录组的主成分分析(PCA)。图C显示了本发明中的类囊胚与小鼠E3.5囊胚或E4.5囊胚的差异基因比较。图D-E显示本发明中的类囊胚与E3.5囊胚或E4.5囊胚之间的GO分析结果。图F显示在囊胚各谱系的标记基因在本发明中的类囊胚以及E3.5和E4.5囊胚中的表达情况。

具体实施方式

[0056] 本发明主要涉及一种新型利用小鼠全能样干细胞体外构建小鼠的类囊胚方法,包括的步骤是:

[0057] 1.获取体外培养的小鼠胚胎干细胞;

[0058] 2.利用高浓度的剪接体抑制剂P1aB处理mESM培养基培养条件下的小鼠胚胎干细胞,记为起始点day 0;

[0059] 3.收取剪接体抑制剂P1aB处理6-12小时的全能样干细胞;

[0060] 4.将AggreWellTM400微孔培养板使用抗粘附冲洗液处理30分钟以上,并弃去冲洗液,PBS冲洗后待用;

[0061] 5.使用类囊胚诱导培养基重悬步骤S3获得的细胞,混匀,转移至S4步骤处理过的微孔培养板中;

[0062] 6.将微孔培养板置于37℃细胞培养箱培养5天。

[0063] 实施例1:探索剪接体抑制剂P1aB处理的浓度和处理时间。

[0064] 目的:获得既具有较快增殖速度和存活能力,又高表达全能基因的全能样干细胞。

[0065] 方法:

[0066] 1.取在mESM培养基培养下的小鼠胚胎干细胞消化成单细胞,接种在丝裂霉素处理过的小鼠成纤维细胞上。此处的小鼠胚胎干细胞为市售的TT2-mESCs。

[0067] 2.当48小时后,更换新鲜mESM培养基。将时间再度记为0h,并在培养基中分别加入10nM、20nM的P1aB处理,并每隔3小时观察记录细胞状态并收集细胞沉淀。

[0068] 3.运用实时定量RT-PCR技术对0h、3h和6h的未经P1aB处理与10nM和20nM P1aB处理的细胞进行全能标志性基因的评估。

[0069] 4.运用实时定量RT-PCR技术和RNA测序技术对6h的未经P1aB处理与20nM P1aB处理的细胞进行进一步基因表达检测和转录组水平分析。

[0070] 结果与讨论:

[0071] 因为P1aB具有较强的细胞毒性,所以P1aB的处理时间必须控制在合适的范围内。细胞明场图片(图1的A图)显示,小鼠胚胎干细胞被10nM和20nM的P1aB处理3、6小时时,其状

态不会发生明显改变,而在处理时间延长至9小时时,克隆周围出现了凋亡细胞,到12小时时大量细胞死亡。实时定量PCR显示经20nM Plab处理6小时的细胞相较于经10nM Plab处理同等时间的细胞而言,全能性标志基因MERVL和ZFP352在前者中的表达水平更高(图1的B图)。随后,我们聚焦于20nM Plab处理对小鼠胚胎干细胞多能性和全能性基因表达的影响。与未经处理的细胞相比,20nM Plab处理使细胞从3小时开始高表达全能性基因,并在6小时时表现出更显著的提升(图2的A图);而多能性基因的表达未受到明显影响。RNA测序技术结果(图2的B图)也进一步佐证了这一点。

[0072] 为了兼顾细胞的良好状态和更高的全能基因表达,我们认为20nM Plab处理6小时是最为合适的处理方案。

[0073] 实施例2:获得小鼠全能样干细胞以及以此为基础制备类囊胚的方法。

[0074] 目的:获得小鼠全能样干细胞并以此为基础衍生形成小鼠类囊胚结构。

[0075] 该实施例分为两个方面,分别为:

[0076] 第一方面:使用优化后的Plab处理方案诱导小鼠全能样干细胞的方法,该方法包括以下内容:

[0077] 1.取在mESM培养基培养下的小鼠胚胎干细胞消化成单细胞,接种在丝裂霉素处理过的小鼠成纤维细胞上。此处的小鼠胚胎干细胞分别是市售的TT2-mESCs,以及分离自C57BL/6小鼠囊胚表胚层谱系的胚胎干细胞系(B6-mESCs)。

[0078] 2.当接种后48小时(细胞汇合度达到80%),更换新鲜mESM培养基,并在培养基中加入20nM剪接体抑制剂Plab处理6小时。

[0079] 结果与讨论:

[0080] 本发明提供了一种新的快速从常规小鼠胚胎干细胞中衍生形成全能样干细胞的方法(图3的A图),Plab的处理方案经过优化后,无论是作用于分离获得的B6-mESCs(图3的B图)还是市售的TT2-mESCs(图4的A图),其对小鼠胚胎干细胞的状态几乎没有影响。这样的方案大大缩短了小鼠全能样干细胞的诱导时间,为小鼠全能样干细胞的建立提供了新的思路。

[0081] 第二方面:利用上述获得的全能样干细胞在体外构建类囊胚的方法,该方法包括以下内容:

[0082] (1)20nM剪接体抑制剂Plab处理6小时成功诱导出全能样干细胞,使用0.05%胰酶消化将其消化成单细胞,离心收集细胞沉淀,作为体外构建小鼠类囊胚的起始细胞。

[0083] (2)配置类囊胚诱导培养基:

	名称	终浓度或用量
[0084]	N2B27 基础培养基	12.5 ml
	TSC 基础培养基	12.5 ml
	KSOM	25 ml
	rhFGF4	12.5 ng/ ml
	Heparin	0.5 mg/ ml
	CHIR99021	3 μ M
	BMP4	5 ng/ ml
	A83-01	0.5 μ M
	Y27632	10 μ M

[0085] 按照50ml定容；

[0086] 其中N2B27基础培养按照50ml的终体积配制,其组成为:

	名称	终浓度或用量
[0087]	DMEM/F12 培养基	23.85ml
	Neurobasal™ 培养基	23.85ml
	N-2 添加剂	250 μ l
	B-27 添加剂	500 μ l
	非必须氨基酸	500 μ l
	青霉素链霉素	500 μ l
	谷氨酰胺	500 μ l
	β 巯基乙醇	50 μ l

[0088] 其中TSC基础培养按照50ml的终体积配制,其组成为:

	名称	终浓度或用量
[0089]	RPMI 1640 培养基	37.95ml
	胎牛血清	10ml
	非必须氨基酸	500 μ l
	青霉素链霉素	500 μ l
	谷氨酰胺	500 μ l
	丙酮酸钠	500 μ l
	β 巯基乙醇	50 μ l

[0090] (3) 将AggreWell™400微孔培养板使用抗粘附冲洗液处理40分钟,弃掉液体,并用PBS清洗一次。

[0091] (4) 使用类囊胚诱导培养基重悬前述全能样干细胞并计数,转移至AggreWell™400

微孔培养板中,将微孔培养板置于37℃培养箱中培养,视为day0。

[0092] (5)每天更换一半的类囊胚诱导培养基,继续培养4天,在第五天收取类囊胚。

[0093] 结果与讨论:

[0094] Plab处理方案获得的TT2衍生全能样干细胞在接种至微孔培养板后第一天就会自发聚集形成紧密的细胞团,其体积会随着培养时间的延长而不断增加(图4的B图),并且在第五天收集到了具有典型小鼠囊胚形态的类囊胚,这与未处理的TT2细胞聚集仅形成松散的细胞团块形成对比(图4的C图)。通过对全部微孔板的统计,我们发现经Plab诱导后,细胞形成类囊胚结构的效率占全部微孔的 $5.53\% \pm 0.31\%$,而接种了未经Plab诱导的胚胎干细胞的微孔中仅有 $0.14\% \pm 0.04\%$ 形成类囊胚(图4的D图)。

[0095] 同样的,该方法也同样适用于B6-mESCs。经Plab处理后,B6衍生全能样干细胞也可以在微孔培养板中聚集分化,并在第五天形成类囊胚(图3的C图)。通过对微孔板的统计,Plab处理后的B6衍生形成的类囊胚占全部微孔的 $4.14\% \pm 0.26\%$ (图3的D图)。

[0096] 上述结果表明,采用本发明的方法能够成功将小鼠胚胎干细胞转变为全能样干细胞,并以此为基础制备类囊胚结构,为新型类囊胚的构建提供了更为便捷、制备周期更短的方法。

[0097] 实施例3:全能样干细胞衍生的类囊胚的鉴定与分析。

[0098] 目的:评估全能样干细胞衍生的类囊胚与小鼠自然囊胚的异同点,并分析该新型小鼠类囊胚的优势。

[0099] 该实施例分为三个方面,分别为:

[0100] 第一方面:利用免疫荧光技术,对类囊胚的细胞谱系标志蛋白的定位和存在比例进行统计分析,并与小鼠自然囊胚进行对比。

[0101] 方法:

[0102] 1.收集来自TT2诱导形成的全能样干细胞衍生的TT2-类囊胚;

[0103] 2.运用免疫荧光染色技术鉴定小鼠自然囊胚时期的三种细胞谱系对应的标志性蛋白在类囊胚中的存在情况;

[0104] 3.荧光显微镜下记录各阳性细胞的定位情况并计算不同阳性细胞在类囊胚中的存在比例。

[0105] 结果与讨论:

[0106] 本发明通过免疫荧光技术证实TT2-类囊胚存在CDX2、OCT4和GATA6阳性的细胞,且定位与小鼠自然囊胚相似,然而仍有部分TT2-类囊胚中没有CDX2阳性细胞或OCT4阳性细胞(图5的A-B图)。通过阳性细胞来指征对应的细胞谱系,结果显示其与小鼠自然囊胚的谱系构成也很相似,尽管TT2-类囊胚中有部分细胞不属于这三种细胞谱系,占全部细胞的 $4.4\% \pm 0.7\%$ (图5的C图)。

[0107] 第二方面:利用免疫荧光技术,评估在类囊胚的形成过程中能否重现小鼠植入前胚胎发育的关键生物学事件,其中主要包含致密化,极化和YAP1蛋白的入核。

[0108] 方法:

[0109] 1.分别收集在AggreWell™400孔板中聚集24、48和72小时的细胞聚集体;

[0110] 2.通过免疫荧光染色技术,分别对指征致密化的紧密连接蛋白ZO-1、指征极化现象的极性蛋白Ezrin和YAP1蛋白进行染色;

[0111] 3. 荧光显微镜下记录阳性细胞的存在和定位情况。

[0112] 结果与讨论：

[0113] 本发明通过免疫荧光技术证实在类囊胚的发育过程中，所有的细胞聚集体都会发生致密化，在细胞与细胞之间高表达紧密连接蛋白ZO-1(图6的A-B图)；极性蛋白Ezrin在细胞聚集48小时后开始定位在部分细胞聚集体的外围，其出现的比例随着48小时时的50%左右至72小时时升高至80%左右(图6的C-D图)；YAP1蛋白在细胞聚集48小时后出现在外围细胞的细胞核中，其出现的比例随着48小时时的30%左右至72小时时升高至40%左右(图6的E-F图)。这些现象均说明本发明提出的新型类囊胚可以在形成过程中再现小鼠植入前胚胎的关键生物学事件，包括致密化，极化和YAP1蛋白的入核。

[0114] 第三方面：利用RNA测序技术对类囊胚进行转录组水平上的评估。

[0115] 方法：

[0116] 1. 在5天内每天收集由全能样干细胞产生的细胞聚集体；。

[0117] 2. 运用RNA测序技术对各时间点的类囊胚进行转录组水平上的评估；

[0118] 3. 运用RNA测序技术对最终获得的类囊胚进行转录组水平分析，并与小鼠自然囊胚进行比较。

[0119] 结果与讨论：

[0120] 本发明比较了类囊胚发育过程中定义EPI、TE和PrE细胞系的标志基因的表达水平，其结果显示在类囊胚形成过程中，与TE细胞系相关的基因(Tfap2c、Gata2和Gata3)的表达显著升高，而与EPI和PrE细胞系相关的基因(Esrrb、Dppa3和Nr5a2之于EPI，Gata6、Col4a1和Sox17之于PrE)的表达没有明显增加(图7的A图)。类囊胚与小鼠自然16细胞期胚胎和E3.5、E4.5囊胚以及TBLC-类囊胚和EPS-类囊胚进行PCA分析，结果显示本发明形成的类囊胚更趋向于处于E3.5至E4.5之间，而TBLC-类囊胚更接近E4.5(图7的B图)。；类囊胚分别与E3.5和E4.5的差异基因显示E3.5相较于类囊胚有1604个上升基因和3226个下降基因；E4.5相较于类囊胚有979个上升基因和2869个下降基因(图7的C图)。类囊胚与E3.5囊胚之间的GO分析显示，这些上调基因主要富集在“核糖核蛋白复合物生物合成”、“磷脂代谢过程”和“嘌呤核糖核苷酸代谢过程”中，这些过程已被证明有助于TE谱系的分化(图7的D图)。此外，下调基因富集在与细胞周期和负调节细胞器组织相关的过程中。类囊胚与小鼠E4.5囊胚之间的GO分析显示，上调基因主要富集在“核糖体亚基”、“线粒体翻译”和“细胞呼吸”中，这些过程也与滋养层细胞系的分化有关，而下调基因则富集在负调节磷酸化代谢和分解代谢过程中(图7的E图)。通过对小鼠囊胚时期全部细胞谱系代表基因的比较，结果显示无论是Polar TE还是Mural TE，类囊胚均有不低于小鼠自然囊胚的表达量(图7的F图)。这些结果都显示该全能样干细胞有向滋养层细胞分化的强大潜力，衍生的类囊胚在一定程度上很好的模拟了小鼠自然囊胚的发育，这将成为我们了解小鼠植入前发育事件的有力细胞工具。

[0121] 参考文献

[0122] (1) Deng, Q., Ramsköld, D., Reinius, B., & Sandberg, R. (2014). Single-cell RNA-seq reveals dynamic, random monoallelic gene expression in mammalian cells. *Science* 343, 193-196.

[0123] (2) Hu, Y., Yang, Y., Tan, P., Zhang, Y., Han, M., Yu, J., Zhang, X., Jia, Z., Wang,

D.,&Yao,K. (2023) .Induction of mouse totipotent stem cells by a defined chemical cocktail.nature 617,792-797.

[0124] (3)Li,R.,Zhong,C.,Yu,Y.,Liu,H.,Sakurai,M.,Yu,L.,Min,Z.,Shi,L.,Wei,Y.,&Takahashi,Y. (2019) .Generation of blastocyst-like structures from mouse embryonic and adult cell cultures.Cell 179,687-702.e618.

[0125] (4)Mohammed,H.,Hernando-Herraez,I.,Savino,A.,Scialdone,A.,Macaulay,I.,Mulas,C.,Chandra,T.,Voet,T.,Dean,W.,&Nichols,J. (2017) .Single-cell landscape of transcriptional heterogeneity and cell fate decisions during mouse early gastrulation.Cell reports 20,1215-1228.

[0126] (5)Shen,H.,Yang,M.,Li,S.,Zhang,J.,Peng,B.,Wang,C.,Chang,Z.,Ong,J.,&Du,P. (2021) .Mouse totipotent stem cells captured and maintained through spliceosomal repression.Cell 184,2843-2859.e2820.

[0127] (6)Xu,Y.,Zhao,J.,Ren,Y.,Wang,X.,Lyu,Y.,Xie,B.,Sun,Y.,Yuan,X.,Liu,H.,&Yang,W. (2022) .Derivation of totipotent-like stem cells with blastocyst-like structure forming potential.Cell Research 32,513-529.

[0128] (7)Yang,M.,Yu,H.,Yu,X.,Liang,S.,Hu,Y.,Luo,Y.,Izsvák,Z.,Sun,C.,&Wang,J. (2022) .Chemical-induced chromatin remodeling reprograms mouse ESCs to totipotent-like stem cells.Cell stem cell 29,400-418.e413.

[0129] (8)Zhang,P.,Zhai,X.,Huang,B.,Sun,S.,Wang,W.,&Zhang,M. (2023) .Highly efficient generation of blastocyst-like structures from spliceosomes-repressed mouse totipotent blastomere-like cells.Science China Life Sciences 66,423-435.

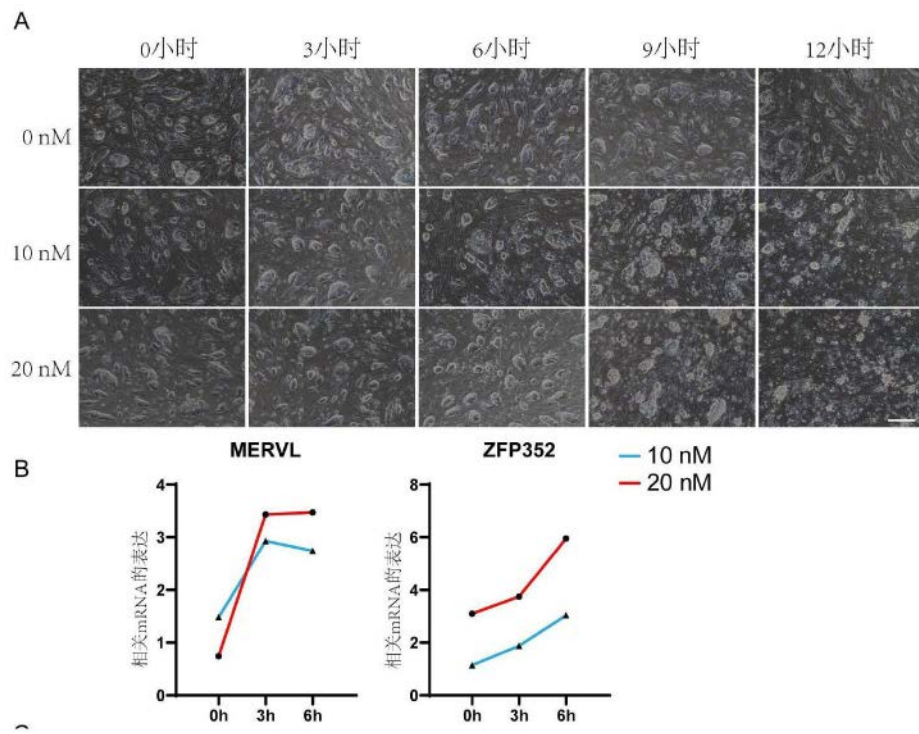


图1

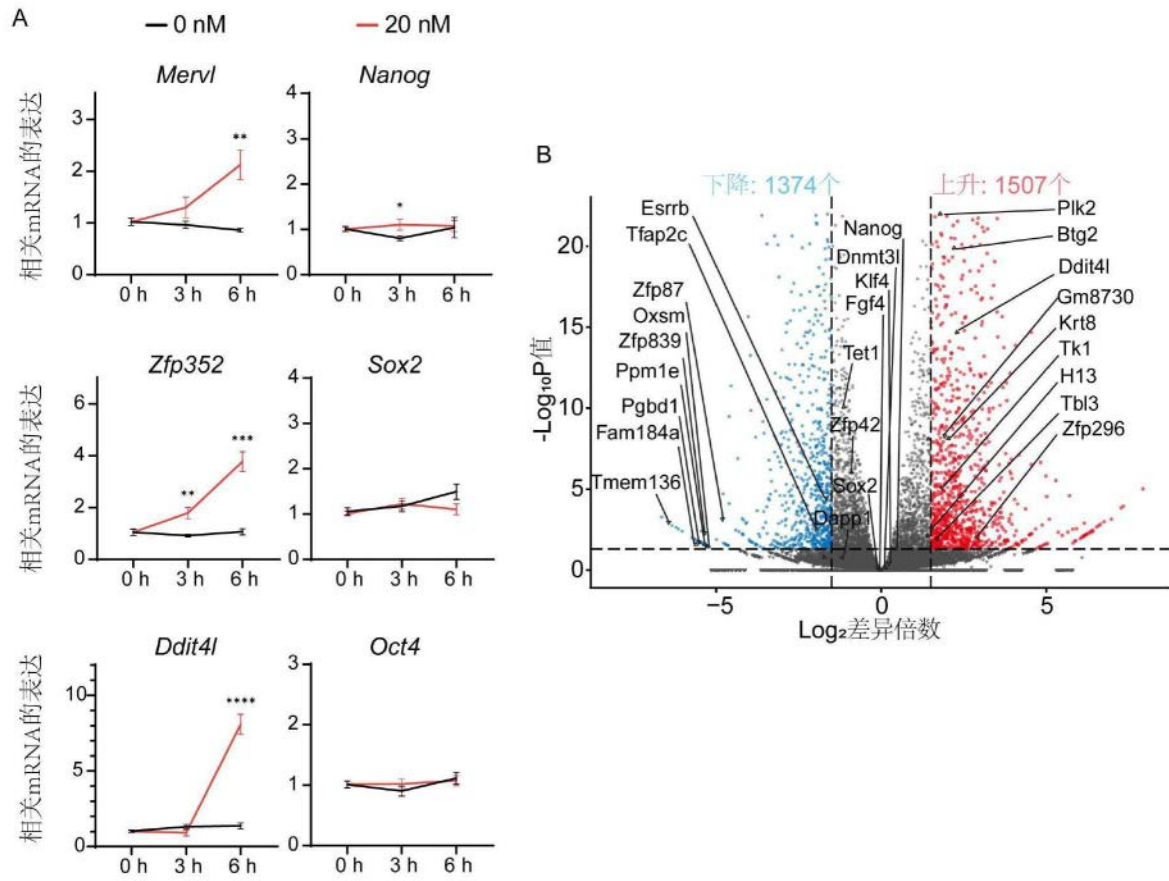


图2

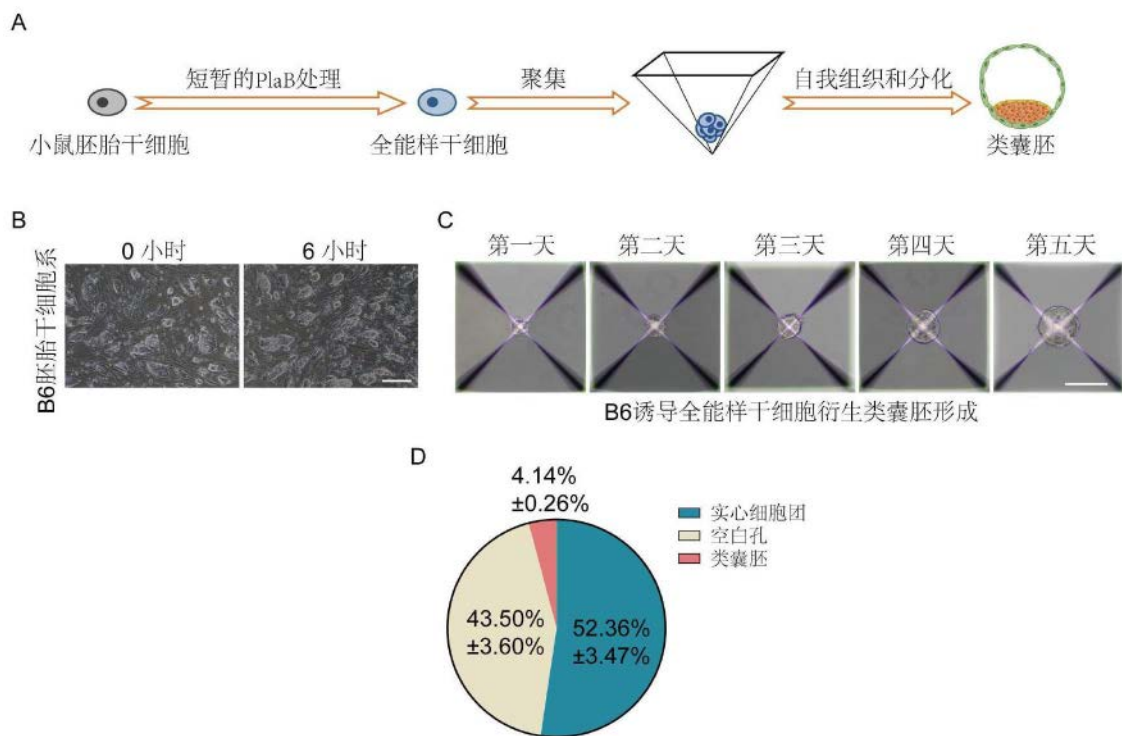


图3

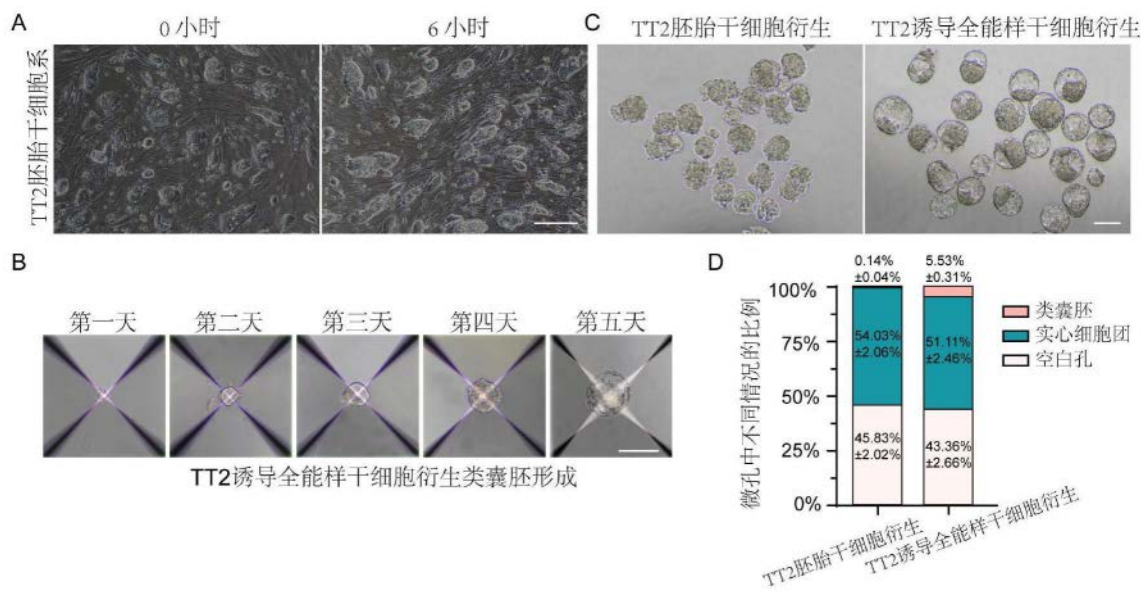


图4

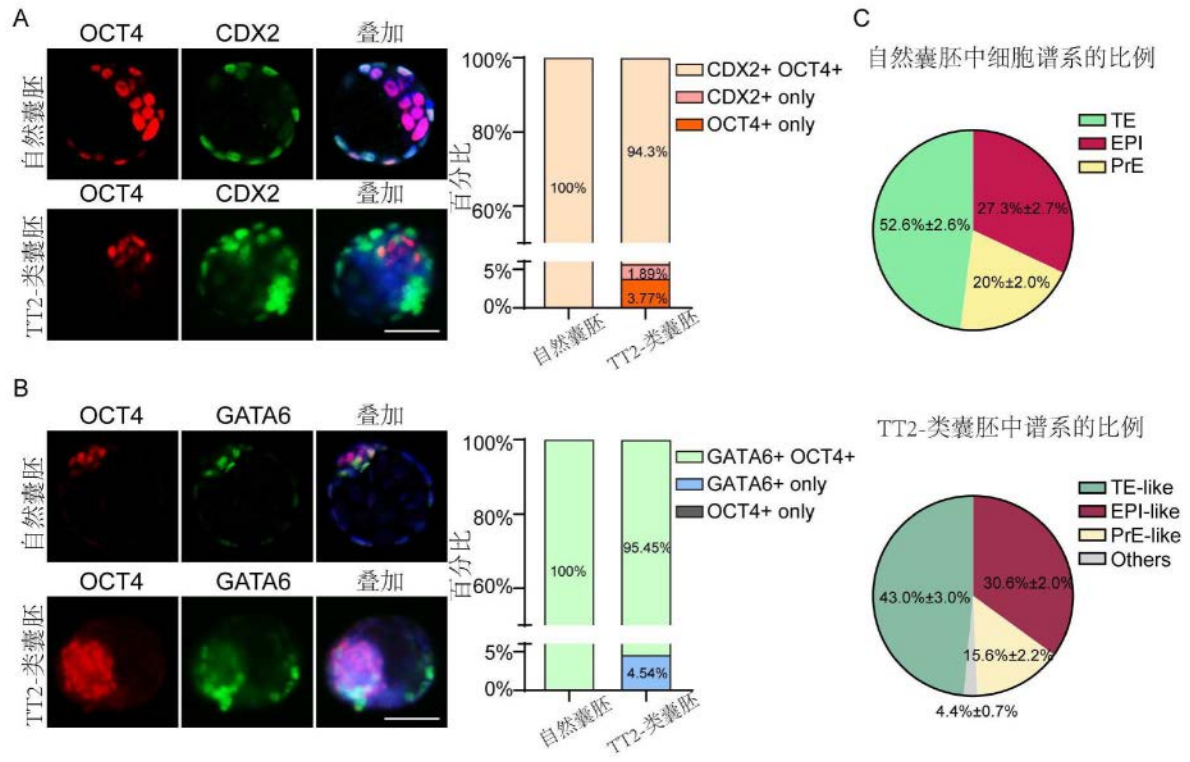


图5

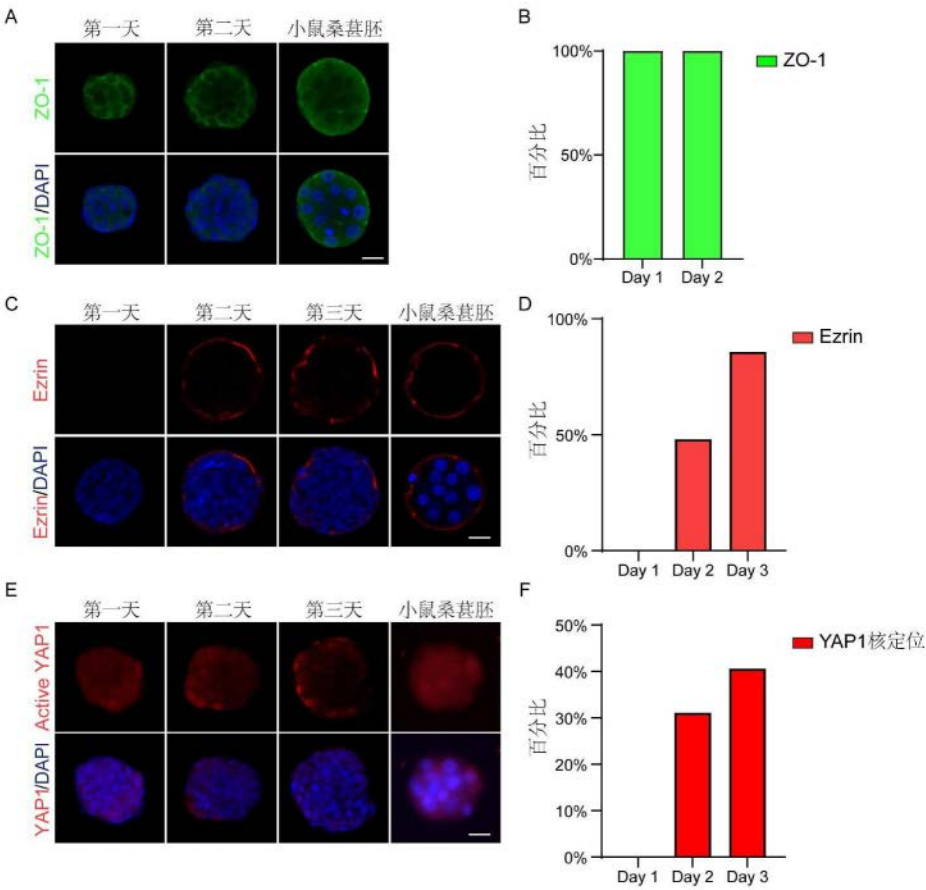


图6

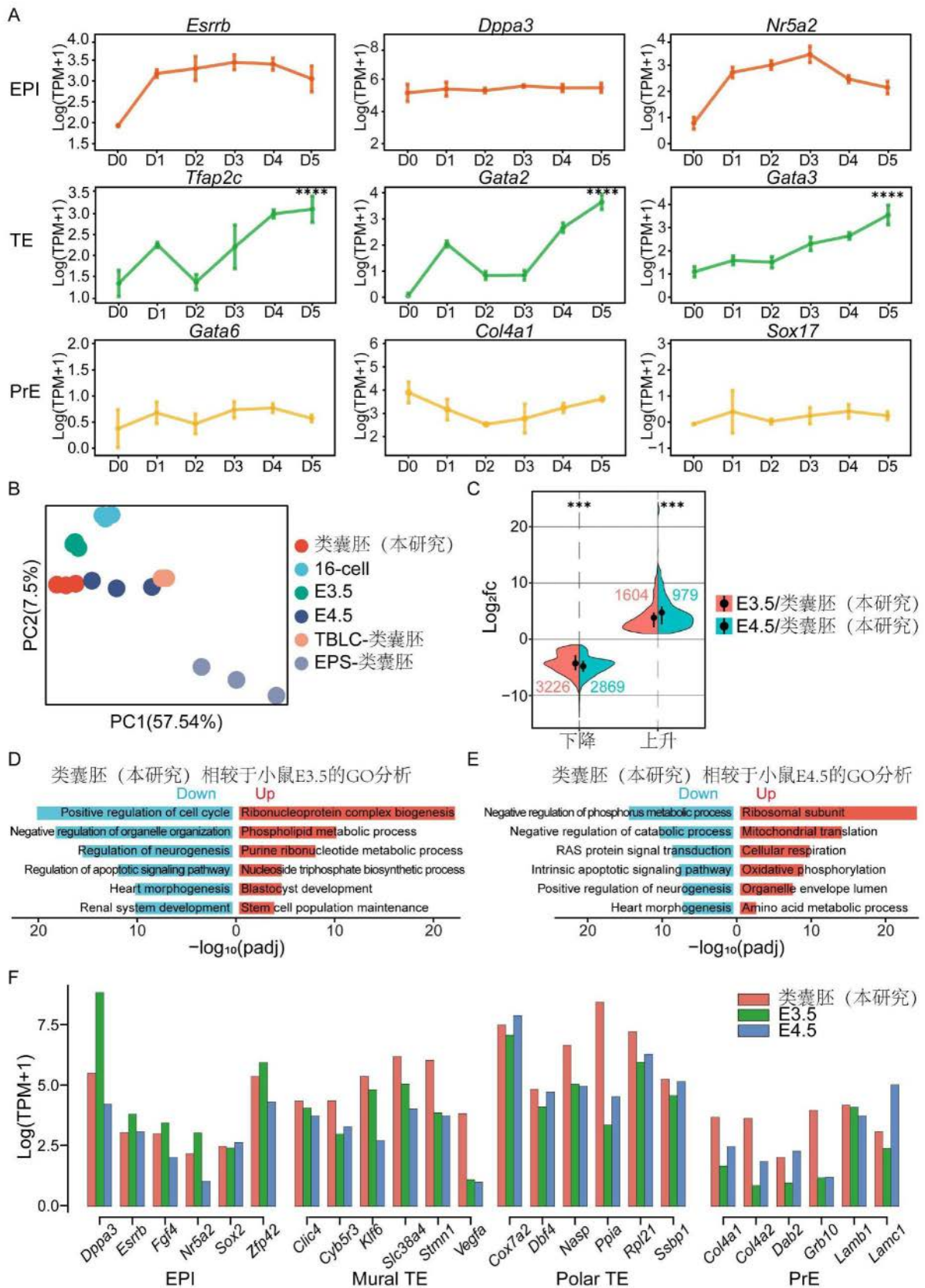


图7