



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104918484 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 16

(21) 申请号 201380060720. 0

(22) 申请日 2013. 11. 26

(30) 优先权数据

61/730, 771 2012. 11. 28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 05. 20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/072088 2013. 11. 26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/085501 EN 2014. 06. 05

(71) 申请人 瑞泽恩制药公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 G·C·龚 K·V·莱

D·M·瓦伦泽拉

(74) 专利代理机构 北京商专永信知识产权代理
事务所(普通合伙) 11400

代理人 郭玥 葛强

(51) Int. Cl.

A01K 67/027(2006. 01)

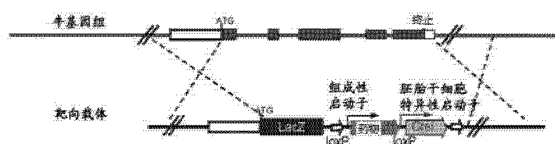
权利要求书4页 说明书20页 附图2页

(54) 发明名称

不含选择性标志的克隆的非人类动物

(57) 摘要

本发明提供了非人类动物的经过遗传修饰的体细胞,其经过工程改造以含有可自切除的重组酶表达盒,所述重组酶表达盒含有可操作地连接至ES细胞特异性启动子的位点特异性重组酶基因。本发明提供了用于产生不含选择性标志基因和重组酶基因的经过遗传修饰的、克隆的非人类动物的组合物和方法,其中将包含可操作地连接至ES细胞特异性启动子的可自切除的重组酶基因的靶向构筑体引入分化的体细胞中。将体细胞的经过遗传修饰的基因组转移至无核的宿主卵母细胞中。然后在试管内培养人工产生的受精卵直至囊胚胚胎期,并且随后将所述受精卵植入代孕母体的子宫中以形成不含选择性标志和重组酶基因的经过遗传修饰的、克隆的非人类动物。



1. 一种非人类动物的经过遗传修饰的体细胞,其包含可自切除的重组酶表达盒,所述重组酶表达盒具有可操作地连接至胚胎干 (ES) 细胞特异性启动子的位点特异性重组酶基因,

其中所述位点特异性重组酶盒上游和下游侧接有第一和第二重组位点,所述重组位点关于彼此在相同方向上定向以使得所述盒可以在所述位点特异性重组酶存在下被切除,并且

其中所述 ES 细胞特异性启动子驱使所述位点特异性重组酶基因在未分化的多能干细胞中而不在所述经过遗传修饰的体细胞中转录。

2. 如权利要求 1 所述的经过遗传修饰的体细胞,其中所述体细胞选自由以下组成的群组:皮肤细胞、血细胞、神经细胞、肌细胞、骨细胞、肾细胞、肝细胞以及脂肪细胞。

3. 如权利要求 1 所述的经过遗传修饰的体细胞,其中所述体细胞是成纤维细胞。

4. 如权利要求 3 所述的经过遗传修饰的体细胞,其中所述成纤维细胞来源于猪。

5. 如权利要求 4 所述的经过遗传修饰的体细胞,其中所述猪是小型猪。

6. 如权利要求 3 所述的经过遗传修饰的体细胞,其中所述成纤维细胞来源于母牛。

7. 如权利要求 1 所述的经过遗传修饰的体细胞,其中所述 ES 细胞特异性启动子选自由以下组成的群组:Oct-3/4 启动子、Sox2 启动子、Klf4 启动子、c-Myc 启动子、Nanog 启动子、Lin28 启动子以及其组合。

8. 如权利要求 1 所述的经过遗传修饰的体细胞,其中所述 ES 细胞特异性启动子驱使所述位点特异性重组酶基因在囊胚期胚胎的 ES 细胞中转录。

9. 如权利要求 1 所述的经过遗传修饰的体细胞,其中所述可自切除的重组酶表达盒进一步包含介于所述第一和第二重组位点之间的选择性标志基因,其中所述选择性标志基因可操作地连接至启动子。

10. 如权利要求 9 所述的经过遗传修饰的体细胞,其中可操作地连接至所述选择性标志基因的所述启动子是组成性启动子。

11. 如权利要求 1 所述的经过遗传修饰的体细胞,其中所述可自切除的重组酶表达盒不包含选择性标志基因,并且所述选择性标志基因位于所述体细胞的基因组中的另一个基因座中,并且其中所述选择性标志基因上游和下游侧接有第三和第四重组位点,所述重组位点关于彼此在相同方向上定向以使得所述选择性标志可以在所述位点特异性重组酶存在下被去除。

12. 如权利要求 1 所述的经过遗传修饰的体细胞,其中所述体细胞的经过遗传修饰的基因组包含条件性敲除等位基因,并且其中所述条件性敲除等位基因上游和下游侧接有所述第一和第二重组位点以使得所述条件性等位基因可以在所述位点特异性重组酶存在下被去除。

13. 如权利要求 1 所述的经过遗传修饰的体细胞,其中所述重组酶表达盒包含与被靶向的内源基因的至少一个外显子同源的核苷酸序列,并且其中所述核苷酸序列上游和下游侧接有所述第一和第二重组位点。

14. 如权利要求 1 所述的经过遗传修饰的体细胞,其中所述重组酶表达盒包含与被靶向的内源基因的至少一个内含子同源的核苷酸序列,并且其中所述核苷酸序列上游和下游侧接有所述第一和第二重组位点。

15. 如权利要求 1 所述的经过遗传修饰的体细胞,其中所述可自切除的重组酶表达盒位于所述体细胞的基因组中的转录活性基因座中。

16. 如权利要求 1 所述的经过遗传修饰的体细胞,其中所述位点特异性重组酶选自由以下组成的群组:Cre、Flp 以及 Dre 重组酶。

17. 一种产生不含选择性标志基因和重组酶基因的经过遗传修饰的和克隆的非人类动物的方法,所述方法包括:

(a) 将核酸构筑体引入非人类动物的分化的体细胞中以产生经过遗传修饰的基因组;

(b) 将 (a) 的所述经过遗传修饰的基因组转移至无核的宿主卵母细胞中;

(c) 融合并活化 (b) 的所述卵母细胞以形成人工受精卵;

(d) 培养 (c) 的所述人工受精卵直至所述受精卵到达囊胚胚胎期;以及

(e) 将 (d) 的所述囊胚植入代孕母体的子宫中以形成不含所述选择性标志基因和所述重组酶基因的所述经过遗传修饰的、克隆的非人类动物,

其中所述核酸构筑体包含可自切除的重组酶表达盒,所述重组酶表达盒包含可操作地连接至 ES 细胞特异性启动子的位点特异性重组酶基因,

其中所述重组酶表达盒上游和下游侧接有第一和第二重组位点,所述重组位点在相同方向上定向以使得所述盒可以在所述位点特异性重组酶存在下被切除,并且

其中所述 ES 细胞特异性启动子驱使所述位点特异性重组酶基因在未分化的多能干细胞中而不在所述分化的体细胞中转录。

18. 如权利要求 17 所述的方法,其中所述 ES 细胞特异性启动子选自由以下组成的群组:Oct-3/4 启动子、Sox2 启动子、Klf4 启动子、c-Myc 启动子、Nanog 启动子、Lin28 启动子以及其组合。

19. 如权利要求 17 所述的方法,其中所述可自切除的重组酶表达盒包含位于所述第一和第二重组位点之间的选择性标志基因,并且其中所述选择性标志基因可操作地连接至启动子。

20. 如权利要求 19 所述的方法,其中可操作地连接至所述选择性标志基因的所述启动子是组成性启动子。

21. 如权利要求 17 所述的方法,其中所述可自切除的重组酶表达盒不包含选择性标志基因,并且所述选择性标志基因位于所述体细胞的所述基因组中的另一个基因座中,并且其中所述选择性标志基因上游和下游侧接有第三和第四重组位点,所述重组位点关于彼此在相同方向上定向以使得所述选择性标志可以在所述位点特异性重组酶存在下被去除。

22. 如权利要求 17 所述的方法,其中所述体细胞在所述基因组中包含条件性敲除等位基因,并且其中所述条件性敲除等位基因上游和下游侧接有所述第一和第二重组位点以使得所述条件性等位基因可以在所述位点特异性重组酶存在下被去除。

23. 如权利要求 17 所述的方法,其中所述核酸构筑体包含与被靶向的内源基因的至少一个外显子同源的核苷酸序列,并且其中所述核苷酸序列上游和下游侧接有所述第一和第二重组位点。

24. 如权利要求 17 所述的方法,其中所述核酸构筑体包含与被靶向的内源基因的至少一个内含子同源的核苷酸序列,并且其中所述核苷酸序列上游和下游侧接有所述第一和第二重组位点。

25. 如权利要求 17 所述的方法,其中所述核酸构筑体包含可操作地连接至启动子的选择性标志基因。

26. 如权利要求 23 所述的方法,其中所述启动子是组成性启动子。

27. 如权利要求 17 所述的方法,其中所述位点特异性重组酶选自以下组成的群组: Cre、Flp 以及 Dre 重组酶。

28. 一种非人类动物的克隆的卵母细胞,其包含来自分化的体细胞的经过遗传修饰的基因组,其中所述经过遗传修饰的基因组包含可自切除的重组酶表达盒,所述重组酶表达盒具有可操作地连接至 ES 细胞特异性启动子的位点特异性重组酶基因,并且其中所述可自切除的重组酶表达盒侧接有第一和第二重组位点,所述重组位点关于彼此在相同方向上定向以使得所述盒可以在所述位点特异性重组酶存在下被切除。

29. 如权利要求 28 所述的克隆的卵母细胞,其中所述非人类动物选自以下组成的群组:小鼠、大鼠、兔、禽类、母牛、猪、绵羊、山羊、马以及驴。

30. 如权利要求 28 所述的克隆的卵母细胞,其中所述分化的体细胞选自以下组成的群组:皮肤细胞、血细胞、神经细胞、肌细胞、骨细胞、肝细胞以及脂肪细胞。

31. 如权利要求 28 所述的克隆的卵母细胞,其中所述分化的体细胞是成纤维细胞。

32. 如权利要求 31 所述的克隆的卵母细胞,其中所述成纤维细胞来源于猪。

33. 如权利要求 32 所述的克隆的卵母细胞,其中所述猪是小型猪。

34. 如权利要求 31 所述的克隆的卵母细胞,其中所述成纤维细胞来源于母牛。

35. 如权利要求 28 所述的克隆的卵母细胞,其中所述 ES 细胞特异性启动子选自以下组成的群组:Oct-3/4 启动子、Sox2 启动子、Kif4 启动子、c-Myc 启动子、Nanog 启动子、Lin28 启动子以及其组合。

36. 如权利要求 28 所述的克隆的卵母细胞,其中所述 ES 细胞特异性启动子驱使所述位点特异性重组酶基因在囊胚期胚胎的 ES 细胞中转录。

37. 如权利要求 28 所述的克隆的卵母细胞,其中所述可自切除的重组酶表达盒包含介于所述第一和第二重组位点之间的选择性标志基因,并且其中所述选择性标志基因可操作地连接至启动子。

38. 如权利要求 37 所述的克隆的卵母细胞,其中可操作地连接至所述选择性标志基因的所述启动子是组成性启动子。

39. 如权利要求 28 所述的克隆的卵母细胞,其中所述可自切除的重组酶表达盒不包含选择性标志基因,并且所述选择性标志基因位于所述体细胞基因组中的另一个基因座中,并且其中所述选择性标志基因上游和下游侧接有第三和第四重组位点,所述重组位点关于彼此在相同方向上定向以使得所述选择性标志可以在所述位点特异性重组酶存在下被去除。

40. 如权利要求 28 所述的克隆的卵母细胞,其中所述体细胞在基因组中包含条件性敲除等位基因,并且其中所述条件性敲除等位基因上游和下游侧接有所述第一和所述第二重组位点以使得所述条件性等位基因可以在所述位点特异性重组酶存在下被去除。

41. 如权利要求 28 所述的克隆的卵母细胞,其中所述可自切除的重组酶表达盒包含与被靶向的内源基因的至少一个外显子同源的核苷酸序列,并且其中所述核苷酸序列上游和下游侧接有所述第一和第二重组位点。

42. 如权利要求 28 所述的克隆的卵母细胞,其中所述可自切除的重组酶表达盒包含与被靶向的内源基因的至少一个内含子同源的核苷酸序列,并且其中所述核苷酸序列上游和下游侧接有所述第一和第二重组位点。

43. 如权利要求 28 所述的克隆的卵母细胞,其中所述可自切除的重组酶表达盒位于所述体细胞基因组中的转录活性基因座中。

44. 如权利要求 28 所述的克隆的卵母细胞,其中所述位点特异性重组酶选自由以下组成的群组:Cre、Flp 以及 Dre 重组酶。

不含选择性标志的克隆的非人类动物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是 2012 年 11 月 28 日提交的 US 61/730, 771 的非临时申请, US 61/730, 771 出于所有目的以全文引用的方式并入。

技术领域

[0003] 本发明提供了不含选择性标志基因和重组酶基因的经过遗传修饰的和克隆的非人类动物。本发明提供了非人类动物的分化的体细胞, 其经过遗传工程改造以含有可自切除的重组酶表达盒, 这种重组酶表达盒包含可操作地连接至 ES 细胞特异性启动子的位点特异性重组酶基因, 其中这种 ES 细胞特异性启动子驱使位点特异性重组酶基因在未分化的多能干细胞中而不在分化的体细胞中表达。本发明提供了用于产生不含选择性标志和位点特异性重组酶基因的经过遗传修饰的和克隆的非人类动物的组合物和方法。

背景技术

[0004] 遗传修饰技术, 例如转基因、敲入、敲除、插入诱变以及缺失, 不可避免地需要在宿主基因组中插入选择性标志基因以确认成功的遗传修饰。然而, 保留在宿主基因组中的选择性标志基因在已经确认了成功的遗传修饰之后就变得多余并且对于来源于含有选择性标志的动物的产物的使用可能引起安全问题。

[0005] 出于这些原因, 已经作出许多努力以在遗传修饰之后从宿主细胞或宿主动物中去除选择性标志和重组酶基因。举例来说, 经由例如显微注射、转染或通过使用病毒粒子转导将重组酶基因引入 ES 细胞或受精卵中, 以去除侧接有重组位点 (例如, loxP 或 FRT) 的选择性标志基因。或者, 将携带选择盒的动物育种为表达位点特异性重组酶的缺失品系以达到相同的效果。然而, 这些技术具有许多缺点, 包括在 ES 细胞中低水平的转染效率; 由于延长的试管内培养所致的 ES 细胞多能性下降; 以及需要附加的人力和财政资源用于额外的育种步骤。

[0006] 因此, 需要用于从经过遗传修饰的动物中有效地去除选择性标志和重组酶基因的组合物和方法。

发明内容

[0007] 提供了用于产生不含选择性标志基因和位点特异性重组酶基因的经过遗传修饰的和克隆的非人类动物的组合物和方法。

[0008] 提供了不含选择性标志基因和位点特异性重组酶基因的经过遗传修饰的和克隆的非人类动物, 例如小型猪和母牛, 其中经过遗传修饰的和克隆的非人类动物的基因组已经从体细胞 (例如, 成纤维细胞) 中转移, 这种体细胞经过工程改造以包含可自切除的重组酶表达盒, 这种重组酶表达盒含有可操作地连接至 ES 细胞特异性启动子的位点特异性重组酶基因。ES 细胞特异性启动子驱使位点特异性重组酶在未分化的多能干细胞中, 例如在囊胚期胚胎的内细胞团中的 ES 细胞 (其中 ES 细胞特异性转录因子被表达并且有活性) 中

转录,而不在分化的体细胞中转录。因此,在遗传修饰期间已经引入的选择性标志基因和重组酶基因可以在克隆胚胎发育期间从多能干细胞的基因组中去除。

[0009] 提供了非人类动物的分化的体细胞,其经过遗传修饰以含有可自切除的重组酶表达构筑体,其中这些体细胞包含可操作地连接至 ES 细胞特异性启动子的位点特异性重组酶基因,其中这种构筑体上游和下游侧接有重组位点,这些重组位点关于彼此在相同方向上定向以使得重组酶基因可以在位点特异性重组酶存在下被切除,并且其中这种 ES 细胞特异性启动子驱使位点特异性重组酶基因在未分化的多能干细胞(例如,ES 细胞)中而不在分化的体细胞中表达。通过将分化的体细胞的经过遗传修饰的基因组转移至无核的宿主卵母细胞中或转移至多能干细胞(其中 ES 细胞特异性转录因子被表达并且有活性)中,选择性标志和重组酶基因可以从发育中的克隆胚胎中的多能干细胞中去除,或从任何多能干细胞中去除,包括重编程为多能(例如,诱导多能(iPS 细胞))的体细胞。

[0010] 提供了产生不含选择性标志基因和重组酶基因的经过遗传修饰的和克隆的非人类动物的方法,其中这种方法包括:(a) 将核酸构筑体引入非人类动物的分化的体细胞中以产生经过遗传修饰的基因组;(b) 将(a)的经过遗传修饰的基因组转移至无核的宿主卵母细胞中;(c) 融合并活化(b)的卵母细胞以形成人工受精卵;(d) 在试管内培养(c)的人工受精卵直至受精卵发育至囊胚胚胎期;以及(e) 将(d)的囊胚植入代孕母体的子宫中以形成不含选择性标志基因和位点特异性重组酶基因的经过遗传修饰的和克隆的非人类动物,其中这种核酸构筑体包含可自切除的重组酶表达盒,这种重组酶表达盒包含可操作地连接至 ES 细胞特异性启动子的位点特异性重组酶基因,其中这种重组酶表达盒上游和下游侧接有重组位点,这些重组位点关于彼此在相同方向上定向以使得位点特异性重组酶可以在位点特异性重组酶存在下被切除,并且其中这种 ES 细胞特异性启动子驱使位点特异性重组酶基因在未分化的多能干细胞中而不在分化的体细胞中转录。因此,将分化的体细胞的经过遗传修饰的基因组转移至无核的宿主卵母细胞中并且使人工产生的受精卵发育成胚胎之后,选择性标志和重组酶基因就从发育中的克隆胚胎中的多能干细胞(其中 ES 细胞特异性转录因子被表达并且有活性)的基因组中去除。以这种方式,本发明可以避免去除选择性标志和重组酶基因所需的 ES 细胞的操纵或任何额外的育种步骤。在多种实施方案中,核酸构筑体是靶向构筑体。在一个实施方案中,靶向构筑体包含敲除等位基因。在一个实施方案中,靶向构筑体包含敲入等位基因。在一个实施方案中,核酸构筑体包含转基因。

[0011] 提供了产生不含选择性标志基因和重组酶基因的非人类动物的经过遗传修饰的和克隆的多能干细胞的方法,其包括:(a) 将核酸构筑体引入非人类动物的分化的体细胞中以产生经过遗传修饰的基因组;以及(b) 将(a)的经过遗传修饰的基因组转移至多能干细胞中以产生不含选择性标志基因和重组酶基因的经过遗传修饰的和克隆的多能干细胞,其中这种核酸构筑体包含可自切除的重组酶表达盒,这种重组酶表达盒包含可操作地连接至 ES 细胞特异性启动子的位点特异性重组酶基因,其中这种重组酶表达盒上游和下游侧接有重组位点,这些重组位点关于彼此在相同方向上定向以使得位点特异性重组酶可以在位点特异性重组酶存在下被切除,并且其中这种 ES 细胞特异性启动子驱使位点特异性重组酶基因在未分化的多能 ES 细胞中而不在分化的体细胞中转录。在多种实施方案中,核酸构筑体是靶向构筑体。在一个实施方案中,靶向构筑体包含敲除等位基因。在一个实施方

案中,靶向构筑体包含敲入等位基因。在一个实施方案中,核酸构筑体包含转基因。

[0012] 通过将分化的体细胞的经过遗传修饰的基因组转移至多能干细胞或重编程为多能的任何体细胞(其中ES细胞特异性转录因子有活性)中,可以从多能干细胞的基因组中去除侧接有重组位点的选择性标志和重组酶基因。

[0013] 在一个方面,提供了非人类动物的分化的体细胞,其经过工程改造以含有可自切除的重组酶表达盒,其中这种可自切除的重组酶表达盒包含可操作地连接至ES细胞特异性启动子的位点特异性重组酶基因,其中这种重组酶表达盒上游和下游侧接有第一和第二重组位点,这些重组位点关于彼此在相同方向上定向以使得选择性标志基因和重组酶基因可以在位点特异性重组酶存在下被切除,并且其中这种ES细胞特异性启动子驱使位点特异性重组酶基因在未分化的多能干细胞中而不在分化的体细胞中转录。

[0014] 在一个实施方案中,分化的体细胞选自以下组成的群组:皮肤细胞、血细胞、神经细胞、肌细胞、骨细胞、肝细胞以及脂肪细胞。

[0015] 在一个实施方案中,分化的体细胞是成纤维细胞。在一个实施方案中,成纤维细胞来源于选自以下组成的群组的非人类动物:小鼠、大鼠、兔、禽类、母牛、猪、绵羊、山羊、马以及驴。在一个实施方案中,成纤维细胞来源于猪。在一个更特定的实施方案中,猪是小型猪。在一个实施方案中,成纤维细胞来源于母牛。

[0016] 在一个实施方案中,ES细胞特异性启动子选自以下组成的群组:Oct-3/4启动子、Sox2启动子、Klf4启动子、c-Myc启动子、Nanog启动子、Lin28启动子以及其组合。

[0017] 在一个实施方案中,ES细胞特异性启动子驱使位点特异性重组酶基因在囊胚期胚胎的ES细胞中转录。

[0018] 在一个实施方案中,核酸构筑体包含介于第一和第二重组位点之间的第二表达盒,其中第二表达盒包含可操作地连接至启动子的选择性标志基因。在一个实施方案中,选择性标志基因位于位点特异性重组酶基因的上游。在另一个实施方案中,选择性标志基因位于位点特异性重组酶基因的下游。

[0019] 在一个实施方案中,可操作地连接至选择性标志基因的启动子是组成性启动子。在一个实施方案中,组成性启动子选自以下组成的群组:Ubc启动子、hCMV启动子、mCMV启动子、EF-1启动子、Pgk1启动子、 β -肌动蛋白启动子以及ROSA26启动子。

[0020] 在一个实施方案中,选择性标志选自以下组成的群组:新霉素磷酸转移酶(neo^r)、潮霉素B磷酸转移酶(hyg^r)、嘌呤霉素N乙酰转移酶(puro^r)、灭瘟素S脱氨酶(blasticidin S deaminase)(bsr^r)、黄嘌呤/鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(gpt)以及单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-k)。

[0021] 在一个实施方案中,可自切除的重组酶表达构筑体不包含选择性标志基因,并且选择性标志基因位于分化的体细胞的基因组中的另一个基因座(例如,呈反式)中,其中这种选择性标志基因上游和下游侧接有第三和第四重组位点,这些重组位点关于彼此在相同方向上定向以使得选择性标志可以在位点特异性重组酶存在下被去除。在一个实施方案中,分化的体细胞在基因组中包含条件性敲除等位基因,其中这种条件性敲除等位基因上游和下游侧接有第一和第二重组位点以使得条件性等位基因可以在位点特异性重组酶存在下被去除。在一个实施方案中,条件性敲除等位基因进一步包含介于第一和第二重组位点之间的选择性标志基因。

[0022] 在一个实施方案中,核酸构筑体包含与被靶向的内源基因的至少一个外显子同源的核苷酸序列,其中这种核苷酸序列侧接有第一和第二重组位点。在一个更特定的实施方案中,外显子是内源基因的第一外显子。

[0023] 在一个实施方案中,核酸构筑体包含与被靶向的内源基因的至少一个内含子同源的核苷酸序列,其中这种核苷酸序列侧接有第一和第二重组位点。

[0024] 在一个实施方案中,核酸构筑体包含在内源基因的起始密码子上游的 5' - 非翻译区 (UTR) 和在内源基因的终止密码子下游的 3' - 非翻译区 (UTR) 以使得整个内源基因可以由同源重组被核酸构筑体置换。

[0025] 在一个实施方案中,核酸构筑体进一步包含被靶向的内源基因的经过修饰的序列,其中这种经过修饰的序列位于侧接有第一和第二重组位点的区域外部。在一个实施方案中,经过修饰的序列是内源基因的至少一个外显子的敲入等位基因。在一个实施方案中,经过修饰的序列是整个内源基因的敲入等位基因(即,“基因交换敲入”)。敲入等位基因可以是向含有这种等位基因的动物赋予所需特征的等位基因,这些特征如改善的抗病性或更大的尺寸(例如,更大的肌肉尺寸)。在一个实施方案中,核酸构筑体进一步包含转基因序列,其中这种转基因序列位于侧接有第一和第二重组位点的区域外部。在一个实施方案中,转基因序列编码人类蛋白质(例如,胰岛素、 α -乳白蛋白、转铁蛋白、人血清白蛋白、人生长激素、凝血因子,等等)。在一个实施方案中,转基因序列编码治疗剂(例如,治疗性抗体)。

[0026] 在一个实施方案中,核酸构筑体进一步包含被靶向的内源基因的经过修饰的序列,其中这种经过修饰的序列是内源基因的敲除等位基因。在一个实施方案中,敲除等位基因包含报告基因,其中报告基因的 5' 包含在内源基因的起始密码子(ATG)上游紧邻的核苷酸序列(即,5' - 非翻译区(5' -UTR))以使得报告基因的转录可以用驱使内源基因表达的内源启动子来起始,并且可以消除内源基因的转录。

[0027] 在一个实施方案中,报告基因位于第一重组位点的上游。

[0028] 在一个实施方案中,报告基因编码选自以下组成的群组的报告蛋白:碱性磷酸酶、荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖苷酸酶、绿色荧光蛋白(GFP)、增强型绿色荧光蛋白(EGFP)、青色荧光蛋白(CFP)、黄色荧光蛋白(YFP)、DsRed 以及 ZsGreen。

[0029] 在一个实施方案中,可自切除的重组酶表达盒位于分化的体细胞的基因组中的转录活性基因座中。在一个实施方案中,转录活性基因座是 ROSA26 基因座。在一个实施方案中,转录活性基因座是 CH25h 基因座。

[0030] 在一个实施方案中,位点特异性重组酶选自以下组成的群组:Cre、Flp 以及 Dre 重组酶。

[0031] 在一个实施方案中,位点特异性重组酶是 Cre 重组酶。

[0032] 在一个实施方案中,Cre 重组酶包含内含子序列。在一个实施方案中,Cre 重组酶包含核定位信号(NLS)。在一个实施方案中,Cre 重组酶包含内含子序列与核定位信号(NLS)。

[0033] 在一个实施方案中,第一和第二重组位点选自以下组成的群组:loxP、lox511、lox2272、lox66、lox71、loxM2、lox5171、FRT、FRT11、FRT71、attP、att、FRT 以及 Dre 位点。

[0034] 在一个方面,提供了一种产生不含选择性标志基因和重组酶基因的经过遗传修饰

的和克隆的非人类动物的方法,这种方法包括:

[0035] (a) 将核酸构筑体引入非人类动物的分化的体细胞中以产生经过遗传修饰的基因组;

[0036] (b) 将(a)的经过遗传修饰的基因组转移至无核的宿主卵母细胞中;

[0037] (c) 融合并活化(b)的卵母细胞以形成人工受精卵;

[0038] (d) 培养(c)的人工受精卵直至受精卵到达囊胚胚胎期;以及

[0039] (e) 将(d)的囊胚植入代孕母体的子宫中以形成不含选择性标志基因和重组酶基因的经过遗传修饰的和克隆的非人类动物,

[0040] 其中这种核酸构筑体包含可自切除的重组酶表达盒,这种重组酶表达盒包含可操作地连接至ES细胞特异性启动子的位点特异性重组酶基因,其中重组酶表达构筑体上游和下游侧接有第一和第二重组位点,这些重组位点关于彼此在相同方向上定向以使得位点特异性重组酶可以在位点特异性重组酶存在下被切除,并且其中这种ES细胞特异性启动子驱使位点特异性重组酶基因在未分化的多能干细胞中而不在分化的体细胞中转录。将分化的体细胞的经过修饰的基因组转移至无核的宿主卵母细胞中并且使人工产生的受精卵发育成克隆胚胎(其中ES细胞特异性转录因子在多能干细胞中有活性)之后,选择性标志和重组酶基因就从克隆胚胎的基因组中去除。

[0041] 在一个实施方案中,核酸构筑体是靶向构筑体。在一个实施方案中,靶向构筑体包含敲除等位基因。在一个实施方案中,靶向构筑体包含敲入等位基因。在一个实施方案中,核酸构筑体包含转基因。

[0042] 在一个实施方案中,ES细胞特异性启动子选自由以下组成的群组:Oct-3/4启动子、Sox2启动子、Klf4启动子、c-Myc启动子、Nanog启动子、Lin28启动子以及其组合。

[0043] 在多种实施方案中,可自切除的重组酶表达盒包含位于第一和第二重组位点之间的第二表达盒,其中第二表达盒包含可操作地连接至启动子的选择性标志基因。在一个实施方案中,选择性标志位于位点特异性重组酶基因的上游。在另一个实施方案中,选择性标志位于位点特异性重组酶基因的下游。

[0044] 在一个实施方案中,可操作地连接至选择性标志基因的启动子是组成性启动子。在一个实施方案中,组成性启动子选自由以下组成的群组:Ubc启动子、hCMV启动子、mCMV启动子、EF-1启动子、Pgk1启动子、 β -肌动蛋白启动子以及ROSA26启动子。

[0045] 在一个实施方案中,选择性标志选自由以下组成的群组:新霉素磷酸转移酶(neo^r)、潮霉素B磷酸转移酶(hyg^r)、嘌呤霉素N乙酰转移酶(puro^r)、灭瘟素S脱氨酶(bsr^r)、黄嘌呤/鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(gpt)以及单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-k)。

[0046] 在一个实施方案中,可自切除的重组酶表达构筑体不包含选择性标志基因,并且选择性标志基因位于分化的体细胞的基因组中的另一个基因座(例如,呈反式)中,其中这种选择性标志基因上游和下游侧接有第三和第四重组位点,这些重组位点关于彼此在相同方向上定向以使得选择性标志可以在位点特异性重组酶存在下被去除。在一个实施方案中,分化的体细胞在基因组中包含条件性敲除等位基因,其中这种条件性敲除等位基因上游和下游侧接有第一和第二重组位点以使得条件性等位基因可以在位点特异性重组酶存在下从基因组中被去除。在一个实施方案中,条件性敲除等位基因包含介于第一和第二重组位点之间的选择性标志基因。

[0047] 在一个实施方案中,核酸构筑体包含与被靶向的内源基因的至少一个外显子同源的核苷酸序列,其中这种核苷酸序列侧接有第一和第二重组位点。在一个实施方案中,外显子是内源基因的第一外显子。

[0048] 在一个实施方案中,核酸构筑体包含与被靶向的内源基因的至少一个内含子同源的核苷酸序列,其中这种核苷酸序列上游和下游侧接有第一和第二重组位点。

[0049] 在一个实施方案中,核酸构筑体是靶向构筑体,并且靶向构筑体的靶向臂包含在内源基因的起始密码子上游的 5' - 非翻译区 (UTR) 和在内源基因的终止密码子下游的 3' - 非翻译区 (UTR) 以使得整个内源基因可以经由同源重组被靶向构筑体置换。在一个实施方案中,靶向臂包含在内源基因的起始密码子上游紧邻的 5' -UTR 区。在一个实施方案中,靶向臂包含在内源基因的终止密码子下游紧邻的 3' 非翻译区。

[0050] 在一个实施方案中,核酸构筑体进一步包含被靶向的内源基因的经过修饰的序列,其中这种经过修饰的序列位于侧接有第一和第二重组位点的区域外部。在一个实施方案中,经过修饰的序列是至少一个外显子的敲入等位基因。在一个实施方案中,经过修饰的序列是整个基因的敲入等位基因 (即,“基因交换敲入”)。敲入等位基因可以是向含有这种等位基因的动物赋予所需特征的等位基因,这些特征如改善的抗病性或更大的尺寸 (例如,更大的肌肉尺寸)。在一个实施方案中,核酸构筑体进一步包含转基因序列,其中这种转基因序列位于侧接有第一和第二重组位点的区域外部。在一个实施方案中,转基因序列编码人类蛋白质 (例如,胰岛素、 α -乳白蛋白、转铁蛋白、人血清白蛋白、人生长激素、凝血因子,等等)。在一个实施方案中,转基因序列编码治疗剂 (例如,治疗性抗体)。

[0051] 在一个实施方案中,核酸构筑体进一步包含被靶向的内源基因的经过修饰的序列,其中这种经过修饰的序列是内源基因的敲除等位基因。在一个实施方案中,敲除等位基因包含报告基因,其中报告基因的 5' 包含在内源基因的起始密码子 (ATG) 上游紧邻的核苷酸序列 (即,5' - 非翻译区 (5' -UTR)) 以使得报告基因的转录用驱动内源基因的内源启动子来起始,并且消除内源基因的转录。

[0052] 在一个实施方案中,报告基因位于第一重组位点的上游。在一个实施方案中,报告基因编码选自由以下组成的群组的报告蛋白:绿色荧光蛋白 (GFP)、增强型绿色荧光蛋白 (EGFP)、青色荧光蛋白 (CFP)、黄色荧光蛋白 (YFP)、DsRed、ZsGreen 以及 lacZ。

[0053] 在一个实施方案中,经由体细胞核转移技术 (SCNT) 将分化的体细胞的经过遗传修饰的基因组转移至无核的宿主卵母细胞中。

[0054] 在一个实施方案中,将分化的体细胞的经过遗传修饰的基因组显微注射至无核的宿主卵母细胞的卵周隙 (即,透明带与细胞膜之间的空隙) 中。

[0055] 在一个实施方案中,表达构筑体包含可操作地连接至启动子的选择性标志基因。在一个实施方案中,启动子是组成性启动子。在一个实施方案中,组成活性启动子选自由以下组成的群组:Ubc 启动子、hCMV 启动子、mCMV 启动子、EF-1 启动子、Pgk1 启动子、 β -肌动蛋白启动子以及 ROSA26 启动子。

[0056] 在一个实施方案中,选择性标志基因位于位点特异性重组酶基因的上游。在一个实施方案中,选择性标志基因位于位点特异性重组酶的下游。

[0057] 在一个实施方案中,选择性标志是选自由以下组成的群组的抗药基因:新霉素磷酸转移酶 (neo^r)、潮霉素 B 磷酸转移酶 (hyg^r)、嘌呤霉素 N 乙酰转移酶 (puro^r)、灭瘟素 S 脱

氨酶 (bsr^r)、黄嘌呤 / 鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (gpt) 以及单纯疱疹病毒胸苷激酶 (HSV-k)。

[0058] 在一个实施方案中,位点特异性重组酶选自自由以下组成的群组:Cre、Flp 以及 Dre 重组酶。

[0059] 在一个实施方案中,位点特异性重组酶是 Cre 重组酶。

[0060] 在一个实施方案中,Cre 重组酶包含内含子序列。在一个实施方案中,Cre 重组酶包含核定位信号 (NLS)。在一个实施方案中,Cre 重组酶包含内含子序列与核定位信号 (NLS)。

[0061] 在一个实施方案中,第一和第二重组位点选自自由以下组成的群组:loxP、lox511、lox2272、lox66、lox71、loxM2、lox5171、FRT、FRT11、FRT71、attP、att、FRT 以及 Dre 位点。

[0062] 在一个方面,提供了一种获得经过遗传修饰的母牛或猪的方法,其包括以下步骤:遗传修饰猪或母牛的体细胞以包括自切除盒,这种自切除盒包含由在多能细胞中有活性的启动子驱动的重组酶基因,和侧接有重组酶位点以形成经过遗传修饰的猪或母牛基因组的选择基因;以及将经过遗传修饰的基因组引入适合的卵母细胞中,将卵母细胞培养至囊胚期,在适合的代孕母体中孕育囊胚,以及使囊胚发育成经过遗传修饰的子代。

[0063] 在一个方面,提供了非人类动物的克隆的卵母细胞,其包含来自分化的体细胞的经过遗传修饰的基因组,其中这种经过遗传修饰的基因组包含含有可自切除的重组酶表达盒的核酸构筑体,在这种重组酶表达盒中位点特异性重组酶基因可操作地连接至 ES 细胞特异性启动子,其中重组酶表达盒侧接有重组位点,这些重组位点关于彼此在相同方向上定向以使得位点特异性重组酶可以在位点特异性重组酶存在下被切除。

[0064] 在一个实施方案中,非人类动物选自自由以下组成的群组:小鼠、大鼠、兔、禽类、母牛、猪、绵羊、山羊、马以及驴。

[0065] 在一个实施方案中,分化的体细胞选自自由以下组成的群组:皮肤细胞、血细胞、神经细胞、肌细胞、骨细胞、肝细胞以及脂肪细胞。

[0066] 在一个实施方案中,分化的体细胞是成纤维细胞。在一个实施方案中,成纤维细胞来源于选自自由以下组成的群组的非人类动物:小鼠、大鼠、兔、禽类、母牛、猪、绵羊、山羊、马以及驴。在一个实施方案中,成纤维细胞来源于猪。在一个更特定的实施方案中,猪是小型猪。在一个实施方案中,成纤维细胞来源于母牛。

[0067] 在一个实施方案中,ES 细胞特异性启动子选自自由以下组成的群组:Oct-3/4 启动子、Sox2 启动子、Klf4 启动子、c-Myc 启动子、Nanog 启动子、Lin28 启动子以及其组合。

[0068] 在一个实施方案中,核酸构筑体包含介于第一和第二重组位点之间的第二表达盒,其中第二表达盒包含可操作地连接至启动子的选择性标志基因。在一个实施方案中,选择性标志基因位于位点特异性重组酶基因的上游。在另一个实施方案中,选择性标志基因位于位点特异性重组酶基因的下游。

[0069] 在一个实施方案中,可操作地连接至选择性标志基因的启动子是组成性启动子。在一个实施方案中,组成性启动子选自自由以下组成的群组:Ubc 启动子、hCMV 启动子、mCMV 启动子、EF-1 启动子、Pgk1 启动子、 β -肌动蛋白启动子以及 ROSA26 启动子。

[0070] 在一个实施方案中,选择性标志选自自由以下组成的群组:新霉素磷酸转移酶 (neo^r)、潮霉素 B 磷酸转移酶 (hyg^r)、嘌呤霉素 N 乙酰转移酶 (puro^r)、灭瘟素 S 脱氨酶 (bsr^r)、黄嘌呤 / 鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (gpt) 以及单纯疱疹病毒胸苷激酶 (HSV-k)。

[0071] 在一个实施方案中,可自切除的重组酶表达构筑体不包含选择性标志基因,并且选择性标志基因位于分化的体细胞的基因组中的另一个基因座(例如,呈反式)中,其中这种选择性标志基因上游和下游侧接有第三和第四重组位点,这些重组位点关于彼此在相同方向上定向以使得选择性标志基因可以在位点特异性重组酶存在下被去除。在一个实施方案中,分化的体细胞在基因组中包含条件性敲除等位基因,其中这种条件性敲除等位基因上游和下游侧接有第一和第二重组位点以使得条件性等位基因可以在位点特异性重组酶存在下被去除。在一个实施方案中,条件性敲除等位基因进一步包含介于第一和第二重组位点之间的选择性标志基因。

[0072] 在一个实施方案中,核酸构筑体包含与被靶向的内源基因的至少一个外显子同源的核苷酸序列,其中这种核苷酸序列上游和下游侧接有第一和第二重组位点。在一个更特定的实施方案中,外显子是内源基因的第一外显子。

[0073] 在一个实施方案中,核酸构筑体包含与被靶向的内源基因的至少一个内含子同源的核苷酸序列,其中这种核苷酸序列上游和下游侧接有第一和第二重组位点。

[0074] 在一个实施方案中,核酸构筑体包含在内源基因的起始密码子上游的 5' - 非翻译区(UTR)和在内源基因的终止密码子下游的 3' - 非翻译区(UTR)以使得整个内源基因可以经由同源重组被核酸构筑体置换。

[0075] 在一个实施方案中,核酸构筑体进一步包含被靶向的内源基因的经过修饰的序列,其中这种经过修饰的序列位于侧接有第一和第二重组位点的区域外部。在一个实施方案中,经过修饰的序列是内源基因的至少一个外显子的敲入等位基因。在一个实施方案中,经过修饰的序列是整个内源基因的敲入等位基因(即,“基因交换敲入”)。敲入等位基因可以是向含有这种等位基因的动物赋予所需特征的等位基因,这些特征如改善的抗病性或更大的尺寸(例如,更大的肌肉尺寸)。在一个实施方案中,核酸构筑体进一步包含转基因序列,其中这种转基因序列位于侧接有第一和第二重组位点的区域外部。在一个实施方案中,转基因序列编码人类蛋白质(例如,胰岛素、 α -乳白蛋白、转铁蛋白、人血清白蛋白、人生长激素、凝血因子,等等)。在一个实施方案中,转基因序列编码治疗剂(例如,治疗性抗体)。

[0076] 在一个实施方案中,核酸构筑体进一步包含被靶向的内源基因的经过修饰的序列,其中这种经过修饰的序列是内源基因的敲除等位基因。在一个实施方案中,敲除等位基因包含报告基因,其中报告基因的 5' 包含在内源基因的起始密码子(ATG)上游紧邻的核苷酸序列(即,5' - 非翻译区(5' -UTR))以使得报告基因的转录可以用驱使内源基因表达的内源启动子来起始,并且可以消除内源基因的转录。

[0077] 在一个实施方案中,报告基因位于第一重组位点的上游。

[0078] 在一个实施方案中,报告基因编码选自以下组成的群组的报告蛋白:碱性磷酸酶、荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖苷酸酶、绿色荧光蛋白(GFP)、增强型绿色荧光蛋白(EGFP)、青色荧光蛋白(CFP)、黄色荧光蛋白(YFP)、DsRed 以及 ZsGreen。

[0079] 在一个实施方案中,可自切除的重组酶表达盒位于分化的体细胞的基因组中的转录活性基因座中。在一个实施方案中,转录活性基因座是 ROSA26 基因座。在一个实施方案中,转录活性基因座是 CH25h 基因座。

[0080] 在一个实施方案中,位点特异性重组酶选自以下组成的群组:Cre、Flp 以及 Dre

重组酶。

[0081] 在一个实施方案中,位点特异性重组酶是 Cre 重组酶。

[0082] 在一个实施方案中,Cre 重组酶包含内含子序列。在一个实施方案中,Cre 重组酶包含核定位信号 (NLS)。在一个实施方案中,Cre 重组酶包含内含子序列与核定位信号 (NLS)。

[0083] 在一个实施方案中,第一和第二重组位点选自以下组成的群组:loxP、lox511、lox2272、lox66、lox71、loxM2、lox5171、FRT、FRT11、FRT71、attP、att、FRT 以及 Dre 位点。

[0084] 在一个实施方案中,ES 细胞特异性启动子在克隆的卵母细胞中没有活性。在一个实施方案中,ES 细胞特异性启动子偶合至配体诱导性启动子,例如四环素 (tet) 开/关系统,以使得 ES 细胞特异性启动子的活性在不存在配体的情况下关闭,而启动子活性在施用适合的配体(例如,四环素)之后并且在 ES 细胞特异性转录因子存在下开启。

[0085] 在一个方面,提供了一种在缺乏选择基因的 F0 代中制备经过遗传修饰的猪或母牛的方法,其包括遗传修饰猪或母牛的体细胞以包括自切除盒,这种自切除盒包含由在多能细胞中有活性的启动子驱动的位点特异性重组酶基因,和侧接有重组酶位点以形成经过遗传修饰的猪或母牛基因组的选择基因;以及将经过遗传修饰的基因组引入适合的卵母细胞中,将卵母细胞培养至囊胚期,在适合的代孕母体中孕育囊胚,以及使囊胚发育成经过遗传修饰的子代。

[0086] 在一个方面,提供了一种修饰母牛或猪的分化的体细胞的基因组的方法,其包括:(a) 向母牛或猪的分化的体细胞中引入包含以下的组合物:(i) 第一核酸构筑体,其包含可自切除的重组酶表达盒,这种重组酶表达盒含有可操作地连接至 ES 细胞特异性启动子的位点特异性重组酶基因;以及(ii) 第二核酸构筑体,其包含编码 ES 细胞特异性转录因子的基因,

[0087] 其中这种重组酶表达盒侧接有重组位点,这些重组位点关于彼此在相同方向上定向以使得位点特异性重组酶可以在位点特异性重组酶存在下被切除,并且

[0088] 其中这种 ES 细胞特异性转录因子能够活化 ES 细胞特异性启动子。

[0089] 在一个实施方案中,ES 细胞特异性转录因子是选自以下组成的群组的至少一者:Oct-3/4、Sox2、c-Myc、Klf4、Nanog 以及 Lin28。在一个实施方案中,至少一个 ES 细胞特异性转录因子能够将分化的体细胞重编程为多能干细胞。

[0090] 在一个实施方案中,核酸构筑体是靶向构筑体。在一个实施方案中,靶向构筑体包含敲除等位基因。在一个实施方案中,靶向构筑体包含敲入等位基因。在一个实施方案中,核酸构筑体包含转基因。

附图说明

[0091] 图 1 图解了用于产生经过遗传工程改造的和克隆的非人类动物的步骤。

[0092] 图 2 图解了用于产生不含标志的、经过遗传修饰的非人类动物的可自切除盒。

[0093] 图 3 图解了用于产生不含选择性标志的经过遗传工程改造的和克隆的非人类动物的步骤。

[0094] 图 4 图解了用于产生经过遗传修饰的和克隆的非人类动物的平台。

具体实施方式

[0095] 术语表

[0096] 如本文所用的术语“克隆”包括产生原始生物体的相同拷贝的过程。

[0097] 如本文所用的术语“胚胎干细胞”或“ES 细胞”包括来源于胚胎的未分化的内团细胞的干细胞,其在引入胚胎中后可以有助于发育中的胚胎的任何组织。

[0098] 如本文所用的短语“可操作地连接”包括将编码启动子的核苷酸序列连接至编码蛋白质的另一核苷酸序列以使得这个启动子控制编码蛋白质的核苷酸序列的表达。

[0099] 如本文所用的术语“启动子”和“启动子调控元件”等等包括在核酸片段或基因内控制那个基因的表达的核苷酸序列元件。这些元件还可以包括表达控制序列。来自多种来源的启动子调控元件等等可以有效地用于促进基因表达。启动子调控元件有意包括组成性、组织特异性、发育特异性、诱导性、亚基因组启动子,等等。启动子调控元件还可以包括改善或调控转录效率的某些增强子元件或沉默元件。

[0100] 如本文所用的术语“组成性启动子”和“组成活性启动子”包括在大多数时间内引导基因在大多数细胞或组织中转录的调控序列。

[0101] 如本文所用的术语“多能干细胞”或“多潜能干细胞”包括具有发育成一种以上分化的细胞类型的能力的未分化细胞。

[0102] 如本文所用的术语“重组位点”包括由位点特异性重组酶识别并且可以充当重组事件的底物的核苷酸序列。

[0103] 如本文所用的术语“位点特异性重组酶”包括一组可以促进“重组位点”之间重组的酶,其中两个重组位点在单个核酸分子内实体分离或在独立的核酸分子上。“位点特异性重组酶”的实例包括(但不限于)Cre、Flp 以及 Dre 重组酶。

[0104] 如本文所用的术语“体细胞”包括构成生物体的身体的具有两组染色体(2n)的任何细胞,而排除具有单组染色体(n)的生殖细胞。

[0105] 如本文所用的术语“体细胞核转移”或“SCNT”包括将来自供体动物(如绵羊、牛、猪、山羊、兔、大鼠或小鼠)的体(身体)细胞的细胞核转移至无核卵子(已经去除了自身的细胞核的卵子)的细胞质中的技术。可以通过本发明方法对细胞核进行遗传修饰。处于卵子内部之后,用卵子细胞质因子将体细胞核重编程以成为受精卵(受精卵)的细胞核。受精卵然后可以在试管内发育至例如囊胚期,随后将其转移至受体动物,通常是与供体相同的物种,从而产生含有以克隆方式来源于受精卵并且具有被引入转移的细胞核中的任何遗传修饰的细胞的后代。可以使用许多体细胞类型,包括乳腺上皮细胞、卵巢卵丘细胞、来自皮肤和内脏器官的成纤维细胞、各种内脏器官细胞、塞尔托利细胞(Sertoli cell)、巨噬细胞以及血液白细胞(参看例如 Tian 等,生殖生物学与内分泌学 1(Reproductive Biology and Endocrinology), 1-7(2003))。

[0106] 包含可自切除的重组酶表达盒的体细胞

[0107] 已经作出许多努力以在遗传修饰之后从宿主细胞或宿主动物中去除选择性标志和重组酶基因。举例来说,为了去除侧接有重组位点(例如,loxP 或 FRT)的选择性标志基因,经由例如显微注射、转染或用病毒粒子转导将位点特异性重组酶基因引入 ES 细胞或受精卵中。或者,将携带选择盒的动物育种为表达位点特异性重组酶的缺失品系以达到相同的效果。然而,这些技术具有许多缺点,包括在 ES 细胞中低水平的转染效率;由于延长的

试管内培养所致的 ES 细胞多能性下降 ; 以及需要附加的人力和财政资源用于额外的育种步骤。

[0108] 本发明提供了一种新的方法以在遗传修饰之后从非人类动物中去除选择性标志和重组酶基因, 这是通过向分化的体细胞中引入由 ES 细胞特异性启动子驱动的可自切除的位点特异性重组酶基因, 接下来经由例如体细胞核转移 (SCNT) 技术将分化的体细胞的经过遗传修饰的基因组转移至无核的宿主卵母细胞中来完成。在融合和活化后, 在试管内培养包含体细胞的经过遗传修饰的基因组的人工产生的受精卵直至其到达囊胚期并且将其植入代孕母体中以供完全发育 (参看例如 Gong 等, 从不同类型的体细胞产生克隆小牛 (Generation of cloned calves from different types of somatic cells), Sci China C Life Sci, 2004, 47:470-476 ; 以全文引用的方式并入本文中)。在人工产生的受精卵发育期间, 位点特异性重组酶在 ES 细胞特异性转录因子有活性的多能干细胞中被表达并且有活性, 并且选择性标志和重组酶基因从克隆胚胎的基因组中缺失。以这种方式, 这种方法避免了对去除选择性标志和重组酶基因所需的 ES 细胞的操纵或任何额外的育种步骤的需要。

[0109] 提供了非人类动物的分化的体细胞, 其经过遗传工程改造以含有可自切除的重组酶表达盒, 这种重组酶表达盒包含可操作地连接至 ES 细胞特异性启动子的位点特异性重组酶基因, 其中这种位点特异性重组酶基因在未分化的多能干细胞中, 例如在囊胚期胚胎的内细胞团中的 ES 细胞中表达, 而不在分化的体细胞中表达。

[0110] 在一个方面, 提供了非人类动物的分化的体细胞, 其经过工程改造以含有可自切除的重组酶表达盒, 其中这种可自切除的重组酶表达盒包含可操作地连接至 ES 细胞特异性启动子的位点特异性重组酶基因, 其中这种位点特异性重组酶基因上游和下游侧接有第一和第二重组位点, 这些重组位点关于彼此在相同方向上定向以使得重组酶可以在位点特异性重组酶存在下被切除, 并且其中这种 ES 细胞特异性启动子驱使位点特异性重组酶基因在未分化的多能干细胞中而不在体细胞中转录。

[0111] 将分化的体细胞的经过修饰的基因组转移至无核的宿主卵母细胞中之后, 以及使人工产生的受精卵发育成胚胎之后, 可以从发育中的克隆胚胎的基因组中去除选择性标志和重组酶基因。

[0112] 在一个实施方案中, 分化的体细胞包括 (但不限于) 皮肤细胞、血细胞、神经细胞、肌细胞、骨细胞、肾细胞、肝细胞以及脂肪细胞。

[0113] 在一个实施方案中, 分化的体细胞是成纤维细胞。成纤维细胞可以来源于任何非人类动物, 包括 (但不限于) 小鼠、大鼠、兔、禽类、母牛、猪、绵羊、山羊、马以及驴。在一个实施方案中, 成纤维细胞来源于猪。在一个更特定的实施方案中, 猪是小型猪。在一个实施方案中, 成纤维细胞来源于母牛。

[0114] 在一个实施方案中, ES 细胞特异性启动子选自由以下组成的群组 : Oct-3/4 启动子、Sox2 启动子、Klf4 启动子、c-Myc 启动子、Nanog 启动子、Lin28 启动子以及其组合。

[0115] 在一个实施方案中, ES 细胞特异性启动子驱使位点特异性重组酶基因在囊胚期胚胎的 ES 细胞中转录。

[0116] 在一个实施方案中, 可自切除的重组酶表达盒包含介于第一和第二重组位点之间的第二表达盒, 其中第二表达盒包含可操作地连接至启动子的选择性标志基因。在一个实

施方案中,选择性标志位于位点特异性重组酶基因的上游。在另一个实施方案中,选择性标志位于位点特异性重组酶基因的下游。

[0117] 在一个实施方案中,可操作地连接至选择性标志基因的启动子是组成性启动子。在一个实施方案中,组成性启动子选自由以下组成的群组:Ubc 启动子、hCMV 启动子、mCMV 启动子、EF-1 启动子、Pgk1 启动子、 β -肌动蛋白启动子以及 ROSA26 启动子。

[0118] 在一个实施方案中,选择性标志选自由以下组成的群组:新霉素磷酸转移酶(neo^r)、潮霉素 B 磷酸转移酶(hyg^r)、嘌呤霉素 N 乙酰转移酶(puro^r)、灭瘟素 S 脱氨酶(bsr^r)、黄嘌呤/鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(gpt)以及单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-k)。

[0119] 在一个实施方案中,可自切除的重组酶表达构筑体不包含选择性标志基因,并且选择性标志基因位于体细胞的基因组中的另一个基因座(例如,呈反式)中,其中这种选择性标志基因上游和下游侧接有第三和第四重组位点,这些重组位点关于彼此在相同方向上定向以使得选择性标志可以在位点特异性重组酶存在下被去除。

[0120] 在一个实施方案中,分化的体细胞在基因组中包含条件性敲除等位基因,其中这种条件性敲除等位基因上游和下游侧接有第一和第二重组位点以使得条件性等位基因可以在位点特异性重组酶存在下被去除。在一个实施方案中,条件性敲除等位基因包含介于第一和第二重组位点之间的选择性标志基因。

[0121] 在一个实施方案中,可自切除的重组酶表达构筑体包含与被靶向的内源基因的至少一个外显子同源的核苷酸序列,其中这种核苷酸序列上游和下游侧接有第一和第二重组位点。在一个更特定的实施方案中,外显子是内源基因的第一外显子。

[0122] 在一个实施方案中,可自切除的重组酶表达构筑体包含与被靶向的内源基因的至少一个内含子同源的核苷酸序列,其中这种核苷酸序列上游和下游侧接有第一和第二重组位点。

[0123] 在一个实施方案中,可自切除的重组酶表达构筑体包含在内源基因的起始密码子上游的 5'-非翻译区(UTR)和在内源基因的终止密码子下游的 3'-非翻译区(UTR)以使得整个内源基因可以经由同源重组被靶向构筑体置换。

[0124] 在一个实施方案中,可自切除的重组酶表达构筑体进一步包含被靶向的内源基因的经过修饰的序列,其中这种经过修饰的序列位于侧接有第一和第二重组位点的区域外部。在一个实施方案中,经过修饰的序列是内源基因的至少一个外显子的敲入等位基因。在一个实施方案中,经过修饰的序列是整个内源基因的敲入等位基因(即,“基因交换敲入”)。敲入等位基因可以是向含有这种等位基因的动物赋予所需特征的等位基因,这些特征如改善的抗病性或更大的尺寸(例如,更大的肌肉尺寸)。在一个实施方案中,核酸构筑体进一步包含转基因序列,其中这种转基因序列位于侧接有第一和第二重组位点的区域外部。在一个实施方案中,转基因序列编码人类蛋白质(例如,胰岛素、 α -乳白蛋白、转铁蛋白、人血清白蛋白、人生长激素、凝血因子,等等)。在一个实施方案中,转基因序列编码治疗剂(例如,治疗性抗体)。

[0125] 在一个实施方案中,核酸构筑体进一步包含被靶向的内源基因的经过修饰的序列,其中这种经过修饰的序列是内源基因的敲除等位基因。在一个实施方案中,敲除等位基因包含报告基因,其中报告基因的 5' 包含在内源基因的起始密码子(ATG)上游紧邻的核苷酸序列(即,5'-非翻译区(5'-UTR))以使得报告基因的转录可以用驱使内源基因表达的内

源启动子来起始,并且可以消除内源基因的转录。

[0126] 在一个实施方案中,报告基因位于第一重组位点的上游。

[0127] 在一个实施方案中,报告基因编码选自以下组成的群组的报告蛋白:碱性磷酸酶、荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖苷酸酶、绿色荧光蛋白(GFP)、增强型绿色荧光蛋白(EGFP)、青色荧光蛋白(CFP)、黄色荧光蛋白(YFP)、DsRed 以及 ZsGreen。

[0128] 在一个实施方案中,可自切除的重组酶表达盒位于分化的体细胞的基因组中的转录活性基因座中。在一个实施方案中,转录活性基因座是 ROSA26 基因座。在一个实施方案中,转录活性基因座是 CH25h 基因座。

[0129] 在一个实施方案中,位点特异性重组酶选自以下组成的群组:Cre、Flp 以及 Dre 重组酶。

[0130] 在一个实施方案中,位点特异性重组酶是 Cre 重组酶。

[0131] 在一个实施方案中,Cre 重组酶包含内含子序列。在一个实施方案中,Cre 重组酶包含核定位信号(NLS)。在一个实施方案中,Cre 重组酶包含内含子序列与核定位信号(NLS)。

[0132] 在一个实施方案中,第一和第二重组位点选自以下组成的群组:loxP、lox511、lox2272、lox66、lox71、loxM2、lox5171、FRT、FRT11、FRT71、attP、att、FRT 以及 Dre 位点。

[0133] 产生经过遗传修饰的和克隆的动物

[0134] 本发明采用了一种策略以对非人类动物的分化的体细胞(例如,成纤维细胞)进行遗传修饰,从而在特定基因座处具有由 ES 细胞特异性启动子驱动的可自切除的重组酶表达盒。取代在试管内操纵 ES 细胞以去除选择盒,将经过遗传修饰的体细胞的细胞核转移至无核的宿主卵母细胞中以在克隆胚胎发育期间诱导多能干细胞中基因组的重编程和选择盒的缺失。以这种方式,可以产生从经过遗传修饰的体细胞克隆的不含选择性标志的非人类动物,而不需要操纵 ES 细胞或将含选择盒的动物育种为表达位点特异性重组酶的缺失品系。

[0135] 本发明的方法可以用于产生任何经过遗传修饰的和克隆的非人类动物。非人类动物的非限制性实例包括啮齿动物(例如,小鼠、大鼠)、兔、禽类(例如,家鸡、火鸡、鸭、鹅,等等)、母牛、猪、绵羊、山羊、马以及驴。在一个优选的实施方案中,非人类动物是猪或母牛。

[0136] 在一个方面,提供了一种产生不含选择性标志基因和重组酶基因的经过遗传修饰的和克隆的非人类动物的方法,其中这种方法包括:

[0137] (a) 将靶向构筑体引入非人类动物的分化的体细胞中以产生经过遗传修饰的基因组;

[0138] (b) 将(a)的经过遗传修饰的基因组转移至无核的宿主卵母细胞中;

[0139] (c) 融合并活化(b)的卵母细胞以形成人工受精卵;

[0140] (d) 在试管内培养(c)的人工受精卵直至受精卵到达囊胚胚胎期;以及

[0141] (e) 将(d)的囊胚植入代孕母体的子宫中以形成不含选择性标志基因和重组酶基因的经过遗传修饰的和克隆的非人类动物,

[0142] 其中这种靶向构筑体包含可自切除的重组酶表达盒,这种重组酶表达盒包含可操作地连接至 ES 细胞特异性启动子的位点特异性重组酶基因,其中重组酶表达构筑体上游和下游侧接有第一和第二重组位点,这些重组位点在相同方向上定向以使得位点特异性重

组酶可以在位点特异性重组酶存在下被切除,并且其中这种 ES 细胞特异性启动子驱使位点特异性重组酶基因在发育中的克隆胚胎中的未分化的多能干细胞中而不在分化的体细胞中转录。

[0143] 在一个实施方案中,未分化的多能干细胞是囊胚期胚胎的内细胞团(ICM)中的 ES 细胞。

[0144] 在一个实施方案中,ES 细胞特异性启动子选自由以下组成的群组:Oct-3/4 启动子、Sox2 启动子、Klf4 启动子、c-Myc 启动子、Nanog 启动子以及 Lin28 启动子。

[0145] 可以采用各种基因转移技术将可自切除的重组表达盒引入分化的体细胞中,包括(但不限于)基于化学的转染(例如,磷酸钙;阳离子脂质,如脂质体(lipofectin)或脂质转染剂(lipofectamine);以及阳离子聚合物,如 DEAE-葡聚糖或树状大分子)、物理转染技术(例如,显微注射、生物射弹粒子递送(如基因枪)、基于脂质的转染、电穿孔、声致穿孔、磁性纳米粒子以及激光照射),以及经由生物剂转导,这些生物剂如携带可自切除的重组酶表达盒的病毒粒子。电穿孔广泛用于实现基因转移,特别是在靶向构筑体的尺寸很大时。描述了基因转移技术,包括例如在 Kim 和 Eberwine (2010), Anal. Bioanal. Chem. 397:3173-78 中,其以引用的方式并入。在一些实施方案中,病毒粒子来源于选自由以下组成的群组的病毒:腺病毒、腺相关病毒、SV-40、爱泼斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus)、逆转录病毒、慢病毒、杆状病毒、冠状病毒、单纯疱疹病毒、脊髓灰质炎病毒、塞姆利基森林病毒(Semliki Forest virus)、辛德毕斯病毒(Sindbis virus)以及痘苗病毒。

[0146] 可以使用本领域中已知的任何方法(参看例如 Gong 等,从不同类型的体细胞产生克隆小牛(Generation of cloned calves from different types of somatic cells), Sci China C Life Sci, 2004, 47:470-476;以全文引用的方式并入本文中),将含有分化的体细胞的经过遗传修饰的基因组的细胞核转移至无核的宿主卵母细胞中。在一个实施方案中,经由体细胞核转移技术(SCNT)将体细胞的经过遗传修饰的基因组转移至无核的宿主卵母细胞中。

[0147] 在多种实施方案中,可自切除的重组酶表达盒包含位于第一和第二重组位点之间的第二表达盒,其中第二表达盒包含可操作地连接至启动子的选择性标志基因。在一个实施方案中,选择性标志位于位点特异性重组酶基因的上游。在另一个实施方案中,选择性标志位于位点特异性重组酶基因的下游。

[0148] 在一个实施方案中,可操作地连接至选择性标志基因的启动子是组成性启动子。在一个实施方案中,组成性启动子选自由以下组成的群组:Ubc 启动子、hCMV 启动子、mCMV 启动子、EF-1 启动子、Pgk1 启动子、 β -肌动蛋白启动子以及 ROSA26 启动子。

[0149] 在一个实施方案中,选择性标志选自由以下组成的群组:新霉素磷酸转移酶(neo^r)、潮霉素 B 磷酸转移酶(hyg^r)、嘌呤霉素 N 乙酰转移酶(puro^r)、灭瘟素 S 脱氨酶(bsr^r)、黄嘌呤/鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(gpt)以及单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-k)。

[0150] 在一个实施方案中,可自切除的重组酶表达构筑体不包含选择性标志基因,并且选择性标志基因位于分化的体细胞的基因组中的另一个基因座(例如,呈反式)中,其中这种选择性标志基因上游和下游侧接有第三和第四重组位点,这些重组位点关于彼此在相同方向上定向以使得选择性标志可以在位点特异性重组酶存在下被去除。在一个实施方案中,分化的体细胞在基因组中包含条件性敲除或敲入等位基因,其中这种条件性敲除或敲

入等位基因上游和下游侧接有第一和第二重组位点以使得条件性敲除或敲入等位基因可以在位点特异性重组酶存在下从基因组中被去除。在一个实施方案中,条件性敲除或敲入等位基因包含介于第一和第二重组位点之间的选择性标志基因。

[0151] 在一个实施方案中,靶向构筑体包含与被靶向的内源基因的至少一个外显子同源的核苷酸序列,其中这种核苷酸序列上游和下游侧接有第一和第二重组位点。在一个实施方案中,外显子是内源基因的第一外显子。

[0152] 在一个实施方案中,靶向构筑体包含与被靶向的内源基因的至少一个内含子同源的核苷酸序列,其中这种核苷酸序列上游和下游侧接有第一和第二重组位点。

[0153] 在一个实施方案中,靶向构筑体的靶向臂包含在内源基因的起始密码子上游的 5'-非翻译区(UTR)和在内源基因的终止密码子下游的 3'-非翻译区(UTR)以使得整个内源基因可以经由同源重组被靶向构筑体置换。在一个实施方案中,靶向臂包含在起始密码子上游紧邻的 5'-UTR。在一个实施方案中,靶向臂包含在内源基因的终止密码子下游紧邻的 3'-UTR。

[0154] 在一个实施方案中,靶向构筑体进一步包含被靶向的内源基因的经过修饰的序列,其中这种经过修饰的序列位于侧接有第一和第二重组位点的区域外部。在一个实施方案中,经过修饰的序列是内源基因的至少一个外显子的敲入等位基因。在一个实施方案中,经过修饰的序列是整个内源基因的敲入等位基因(即,“基因交换敲入”)。敲入等位基因可以是向含有这种等位基因的动物赋予所需特征的等位基因,这些特征如改善的抗病性或更大的尺寸(例如,更大的肌肉尺寸)。

[0155] 在一个实施方案中,靶向构筑体进一步包含转基因序列,其中这种转基因序列位于侧接有第一和第二重组位点的区域外部。在一个实施方案中,转基因序列编码人类蛋白质(例如,胰岛素、 α -乳白蛋白、转铁蛋白、人血清白蛋白、人生长激素、凝血因子,等等)。在一个实施方案中,转基因序列编码治疗剂(例如,治疗性抗体)。

[0156] 在一个实施方案中,靶向构筑体进一步包含被靶向的内源基因的经过修饰的序列,其中这种经过修饰的序列是内源基因的敲除等位基因。在一个实施方案中,敲除等位基因包含报告基因,其中报告基因的 5' 包含在内源基因的起始密码子(ATG)上游紧邻的核苷酸序列(即,5'非翻译区(5'-UTR))以使得报告基因的转录可以用驱动内源基因的内源启动子来起始,并且可以消除内源基因的转录。

[0157] 在一个实施方案中,报告基因位于第一重组位点的上游。在一个实施方案中,报告基因编码选自由以下组成的群组的蛋白质:绿色荧光蛋白(GFP)、增强型绿色荧光蛋白(EGFP)、青色荧光蛋白(CFP)、黄色荧光蛋白(YFP)、DsRed、ZsGreen 以及 lacZ。

[0158] 在一个实施方案中,将分化的体细胞的经过遗传修饰的基因组显微注射至宿主无核卵母细胞的卵周隙(即,透明带与细胞膜之间的空隙)中。

[0159] 在一个实施方案中,表达构筑体包含可操作地连接至启动子的选择性标志基因。在一个实施方案中,启动子是组成性启动子。在一个实施方案中,组成性启动子选自由以下组成的群组:Ubc 启动子、hCMV 启动子、mCMV 启动子、EF-1 启动子、Pgk1 启动子、 β -肌动蛋白启动子以及 ROSA26 启动子。

[0160] 在一个实施方案中,选择性标志基因位于位点特异性重组酶基因的上游。在一个实施方案中,选择性标志基因位于位点特异性重组酶的下游。

[0161] 在一个实施方案中,选择性标志是选自由以下组成的群组的抗药基因:新霉素磷酸转移酶(neo^r)、潮霉素 B 磷酸转移酶(hyg^r)、嘌呤霉素 N 乙酰转移酶(puro^r)、灭瘟素 S 脱氨酶(bsr^r)、黄嘌呤/鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(gpt)以及单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-k)。

[0162] 在一个实施方案中,位点特异性重组酶选自由以下组成的群组:Cre、Flp 以及 Dre 重组酶。

[0163] 在一个实施方案中,位点特异性重组酶是 Cre 重组酶。在一个实施方案中,Cre 重组酶包含内含子序列。在一个实施方案中,Cre 重组酶包含核定位信号(NLS)。在一个实施方案中,Cre 重组酶包含内含子序列与核定位信号(NLS)。

[0164] 在一个实施方案中,第一和第二重组位点选自由以下组成的群组:loxP、lox511、lox2272、lox66、lox71、loxM2、lox5171、FRT、FRT11、FRT71、attP、att、FRT 以及 Dre 位点。

[0165] 在一个方面,提供了一种产生不含选择性标志基因和重组酶基因的非人类动物的经过遗传修饰的和克隆的多能干细胞的方法,其包括:

[0166] (a) 将靶向构筑体引入非人类动物的分化的体细胞中以产生经过遗传修饰的基因组;以及

[0167] (b) 将(a)的经过遗传修饰的基因组转移至多能干细胞中以产生不含选择性标志基因和重组酶基因的经过遗传修饰的和克隆的多能干细胞,

[0168] 其中这种靶向构筑体包含可自切除的重组酶表达盒,这种重组酶表达盒包含可操作地连接至 ES 细胞特异性启动子的位点特异性重组酶基因,其中重组酶表达构筑体上游和下游侧接有第一和第二重组位点,这些重组位点在相同方向上定向以使得位点特异性重组酶可以在位点特异性重组酶存在下被切除,并且其中这种 ES 细胞特异性启动子驱使位点特异性重组酶基因在克隆的多能干细胞中而不在分化的体细胞中转录。

[0169] 因此,将分化的体细胞的经过遗传修饰的基因组转移至多能干细胞或重编程为多能的任何体细胞(其中 ES 细胞特异性转录因子有活性)中之后,可以从克隆的多能干细胞的基因组中去除选择性标志和重组酶基因。

[0170] 在一个实施方案中,ES 细胞特异性启动子选自由以下组成的群组:Oct-3/4 启动子、Sox2 启动子、Kif4 启动子、c-Myc 启动子、Nanog 启动子以及 Lin28 启动子。

[0171] 在一个实施方案中,多能干细胞是非人类动物的 ES 细胞。

[0172] 在一个实施方案中,多能干细胞是诱导多能干细胞(iPS 细胞)。

[0173] 在一个实施方案中,经由体细胞核转移(SCNT) 技术进行转移步骤(b)。

[0174] 除非另有规定,否则本文所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的一般技术人员通常所理解的含义相同的含义。尽管类似或等效于本文所描述的那些的任何方法和材料也可以用于实施或测试所描述的发明内容,但现在描述优选的方法和材料。本文所提及的所有出版物都以引用的方式并入本文中以结合所列举的出版物公开并描述方法和/或材料。

[0175] 必须注意,除非上下文另有明确指示,否则如本文和随附权利要求书中所用的单数形式“一(a/an)”和“所述”包括复数个参考物。本文所用的所有技术和科学术语具有相同的含义。

[0176] 本文所论述的出版物仅仅为了其在本申请的提交日期之前的公开内容而提供。其中任何内容都不应被解释为承认所描述的发明内容无权先于因在先发明所作的这类出版

物。此外,所提供的出版日期可能不同于可能需要单独确认的实际出版日期。

[0177] 所描述的发明内容可以在不脱离其精神或本质属性的情况下以其它特定形式体现,并且因此,应参考如指示本发明的范围的随附权利要求书而不是上述说明书。

[0178] 实施例

[0179] 提供以下实施例以向本领域的一般技术人员描述如何制造和使用本发明的方法和组合物,并且不打算限制本发明者视为其发明内容的范围。已经作出努力以确保关于所用数值(例如,量、温度等等)的准确性,但应将一些实验误差和偏差计算在内。除非另有指示,否则份数是重量份,分子量是平均分子量,温度是摄氏度,并且压力是大气压或接近大气压。

[0180] 实施例 1:产生不含选择标志的杂合的经过遗传修饰的动物

[0181] 在从猪、优选小型猪中分离出的胎儿成纤维细胞中进行遗传修饰。使用从猪胎儿成纤维细胞中分离出的基因组 DNA,创建细菌人工染色体(BAC)文库,并且设计并构筑含有所关注的基因或其部分(“靶向的等位基因”)的靶向载体。

[0182] 在这个实施例中,设计靶向载体以用报告基因置换内源靶基因的编码区的全部或一部分。设计靶向载体以含有可自切除的重组酶表达盒,其中(i)可操作地连接至组成性启动子(例如,泛素启动子)的新霉素抗性基因与(ii)可操作地连接至 ES 细胞特异性启动子(例如, Nanog 启动子)的 Cre 重组酶基因(Crei)在 5' 和 3' 处侧接有 loxP 重组位点。另外,在侧接有 loxP(floxed)的重组酶表达盒上游的 5' 处,靶向载体含有可操作地连接至在被靶向的内源基因的起始密码子(ATG)上游紧邻的核苷酸序列(即,5' 非翻译区(5'-UTR))的 lacZ 基因以使得在成功的基因靶向之后,报告基因(lacZ)的转录可以用驱使内源基因表达的内源启动子来起始,并且可以消除内源基因的转录(参看例如图 3)。靶向载体的 3' 端包括靶基因的 3' 非翻译区(3'-UTR)(或侧接靶基因的 3'-UTR 的猪基因组 DNA)。组成性与 ES 细胞特异性启动子的其它组合可以用于靶向载体中。

[0183] 然后,经由电穿孔或核转染将靶向载体引入胎儿成纤维细胞中,并且通过分析型 PCR(例如,实时 PCR)使用特定的探针和引物来确认靶向的等位基因的存在。

[0184] 在确认胎儿成纤维细胞的成功遗传修饰之后,经由体细胞核转移(SCNT)(参看例如 Gong 等,从不同类型的体细胞产生克隆小牛(Generation of cloned calves from different types of somatic cells),Sci China C Life Sci,2004,47:470-476;以全文引用的方式并入本文中),将含有靶向的等位基因(即,对于靶向的等位基因而言是杂合的)的一个拷贝的成纤维细胞转移至无核的宿主卵母细胞中。在融合和活化后,在试管内培养克隆的受精卵直至其到达囊胚胚胎期,并且随后将囊胚期胚胎植入代孕母体中以供完全发育成对于靶向的等位基因而言是杂合的基因靶向动物。

[0185] 在克隆胚胎发育期间,从表达 ES 细胞特异性转录因子的多能干细胞中去除新霉素抗性基因和 Cre 重组酶基因。可以经由分析型 PCR(例如,实时 PCR)使用特定的探针和引物或经由西方墨点法或 ELISA 分析来确认新霉素抗性基因和 Cre 重组酶基因的不存在。

[0186] 所得基因靶向杂合猪的性别取决于分离出电穿孔的猪胎儿成纤维细胞的猪的性别,其中从母猪分离出的猪胎儿成纤维细胞产生母基因靶向猪并且从公猪分离出的猪胎儿成纤维细胞产生公基因靶向猪。

[0187] 这种程序可以加以修改并且应用于其它动物,包括家养的哺乳动物,如母牛、其它

类型的牛、山羊、绵羊、兔、大鼠或小鼠。

[0188] 实施例 2 :产生不含选择标志的纯合的经过遗传修饰的动物

[0189] 为了产生对于靶向的等位基因而言是纯合的动物,从对于靶向的等位基因而言是杂合的动物中分离出胎儿成纤维细胞。经由电穿孔或核转染将用于产生杂合动物的靶向载体引入杂合的胎儿成纤维细胞中。分析靶向的等位基因的接合性,并且经由分析型 PCR(例如,实时 PCR)使用特定的探针和引物来确认。

[0190] 然后,将含有对于靶向的等位基因而言是纯合的基因组的胎儿成纤维细胞转移至无核的宿主卵母细胞中。在融合和活化后,在试管内培养克隆的受精卵(其对于靶等位基因而言是纯合的)直至其到达囊胚胚胎期。然后,将囊胚期胚胎植入代孕母体中以供完全发育成对于靶向的等位基因而言是纯合的基因靶向动物。

[0191] 在克隆胚胎发育期间,从表达 ES 细胞特异性转录因子的多能干细胞中去除新霉素抗性基因和 Cre 重组酶基因。可以经由分析型 PCR(例如,实时 PCR)使用特定的探针和引物或经由西方墨点法或 ELISA 分析来确认新霉素抗性基因和 Cre 重组酶基因的不存在。

[0192] 当然,这种程序可以加以修改并且应用于其它动物,包括家养的哺乳动物,如母牛、其它类型的牛、山羊、绵羊、兔、大鼠或小鼠。

[0193] 实施例 3 :使用 BAC 靶向载体产生经过遗传修饰的克隆的动物

[0194] 可以使用具有相对短(例如,4kb 至 8kb)的 5' 和 3' 同源臂(即,分别与靶插入位点上游和下游的区域同源的侧接可自切除的重组酶表达盒的序列)的靶向载体进行实施例 1 和 2 中的基因靶向步骤。在这些情况下,靶向载体的尺寸通常小于 20kb 或 25kb。或者,可以用基于细菌人工染色体(BAC)的靶向载体进行这些方法,所述靶向载体的长度可以高达几百 kb 并且趋向于产生更少的随机整合事件和异常靶向事件(例如,伴随基因重排和/或缺失所发生的靶向事件)。

[0195] 用于基因靶向的基于 BAC 的靶向载体的使用已经描述于 Valenzuela 等(2003), Nature Biotechnology 21(6):652-59 中,其内容以引用的方式并入本文中。简单地说,已经鉴别出涵盖靶基因的 BAC 之后,通过细菌同源重组将可自切除的重组酶表达盒插入靶基因中。尽管不是必要的,但在插入可自切除的重组酶表达盒期间一部分基因靶常常从 BAC 中缺失。

[0196] 已经修饰 BAC 以产生靶向载体之后,如实施例 1 中所描述,将靶向载体引入体细胞(例如,胎儿成纤维细胞)中。由于 BAC 靶向载体大尺寸,最常通过电穿孔或核转染来引入 BAC 靶向载体。在选择和分离之后,筛选 BAC 转化体以确定靶向事件是否成功。如 Valenzuela 等(同上)所描述,这种筛选可以例如使用基于扩增的“天然等位基因丢失”试验来进行,条件是 BAC 靶向载体的 5' 和 3' 同源臂与对应的靶基因序列是非同基因的。

[0197] 已经产生适当靶向的体细胞之后,如实施例 1 中所描述,可以使用体细胞核转移来产生对于靶向的等位基因而言是杂合的克隆胚胎。此外,如实施例 2 中所描述,可以重新靶向来自克隆胚胎的细胞(例如,胎儿成纤维细胞)以产生对于靶向的等位基因而言是纯合的克隆胚胎。

[0198] 实施例 4 :产生具有经济上有利的性状的经过遗传修饰的克隆的家畜

[0199] 畜牧业已经寻求使用育种来产生组合不同动物品种的有益性状的动物。然而,动物育种已经被证实在许多方面有不足,特别是在以下情况下:(1)性状是密切联系的,以及

(2) 品种之一中的理想性状是复杂的多基因性状。另外,动物育种仅仅可以用于组合存在于相同物种的动物中的性状。因此,没有这些缺点中的任一者的遗传工程改造已经开始补充传统的动物育种技术。然而,经过遗传工程改造的动物中非天然基因(例如,选择性标志基因和/或重组酶基因)的存在仍然是所担忧的根源问题,特别是在动物用于产生供人类消耗的产品,如食品和药品的时候。因此,通过本发明方法产生的经过遗传修饰的、克隆的动物帮助减轻这些担忧。

[0200] 在供养用于人类消耗的家畜中视为理想的性状可以包括例如抗病性、总尺寸或肌肉质量。对于所关注的许多性状,动物育种员已经鉴别出负责或促成所需特征的基因。举例来说,肌肉生长抑制素(myostatin)是抑制动物的肌肉生长的基因。在牛(以及狗和小鼠)中,消除肌肉生长抑制素功能的突变的存在已经显示出增加肌肉质量。参看例如McPherron等(1997),*Nature* 387(6628):83-90;Kambadur等(1997),*Genome Res.* 7(9):910-6;Grobet等(1997),*Nat. Genet.* 17(1):71-4;Mosher等(2007),*PLoS Genet.* 3(5):e79。来自对于功能丧失肌肉生长抑制素突变而言是纯合的牛的肉当前作为特殊产品出售。然而,牛的健壮体格增强需要特别处理和膳食,这使得其肉对于广阔的市场而言太过昂贵。对于功能丧失肌肉生长抑制素突变而言是杂合的动物也具有提高的肌肉质量,不过程度小于纯合突变体。杂合动物的一个优点在于其不需要纯合动物所需的特别处理和膳食。

[0201] 因此,本发明可以应用于产生具有增加的肌肉质量的家畜。可以鉴别出如猪、山羊、绵羊、兔以及各种类型的牛等动物中的肌肉生长抑制素基因并且用于产生具有完全或部分功能丧失的肌肉生长抑制素等位基因和可自切除的重组酶表达盒的靶向构筑体。靶向构筑体可以用于根据例如实施例1的方法产生克隆的动物,其对于突变型肌肉生长抑制素等位基因(例如,功能丧失的等位基因)而言是杂合的。或者,靶向构筑体可以用于根据例如实施例2的方法产生克隆的动物,其对于突变型肌肉生长抑制素等位基因(例如,部分功能丧失的等位基因)而言是纯合的。因为动物缺乏以其它方式与遗传工程改造相关联的选择性标志和重组酶基因,所以具有增加的肌肉质量的家畜可以提供优质的肉源,这避免了通过现有的遗传工程改造技术产生的食物产品所带来的担忧。

[0202] 实施例5:产生产出工程改造的奶的经过遗传修饰的克隆的哺乳动物

[0203] 奶和从奶生产的奶制品,特别是来自母牛和山羊的奶,构成西方饮食的主要部分。已经完成了大量的工作对这类动物进行遗传工程改造以产出具有优良的营养价值的奶。参看例如Magnus和Lali(2008),*Veterinary World* 1(10):319-20。本发明方法可以类似地应用于促进从不含选择性标志和重组酶基因的经过遗传工程改造的动物产出这种奶。

[0204] 举例来说,使用实施例1的方法,可以对母牛(或山羊或绵羊)进行工程改造以在其奶中表达人类乳铁蛋白或人类 α -乳白蛋白。含有人类 α -乳白蛋白的奶比例如天然的母牛产奶营养更均衡,并且更好地适于婴儿和老年人消耗。参看Magnus和Lali,同上。人类乳铁蛋白是有益的,因为其在刺激免疫系统并且充当对抗感染的一线防御中起作用。可以将编码任一种蛋白质的人类基因引入具有可自切除的重组酶表达盒的本发明的靶向构筑体中。可以将人类基因置于奶特异性启动子(例如,对应的母牛基因的启动子,或者乳清酸性蛋白启动子)的控制下,并且人类基因和重组酶表达盒可以侧接有与母牛的基因组中的适当区域(例如,对应的母牛基因或允许适当转基因表达的非必需区域)同源的5'和3'同源臂。然后,靶向构筑体可以用于根据实施例1或2的方法产生经过遗传修饰的体细胞

以及杂合或纯合的经过遗传改变的、克隆的母牛（或山羊或绵羊）。

[0205] 由于乳腺中高的蛋白质产生速率以及其它原因，因此奶中医药蛋白质的产生是重大的正在进行中的研究的另一个领域。如抗体、胰岛素、人生长激素、凝血因子以及人血清白蛋白等重要的医药剂已经全部产生并且被分泌至母牛产奶中。参看 Houdebine(2009), *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 32:107-121。可以在根据本发明方法产生的经过遗传修饰的动物（例如，母牛、山羊、猪）中有益地产生这些蛋白质中的每一者，从而避免关于选择性标志和重组酶基因对医药产品的影响的监管和消费者的担忧。如上文所论述，可以将人类基因置于奶特异性启动子（例如，乳清酸性蛋白启动子）的控制下，并且人类基因和重组酶表达盒可以侧接有与靶动物的基因组中的适当区域（例如，允许适当转基因表达的非必需区域）同源的 5' 和 3' 同源臂。然后，靶向构筑体可以用于根据实施例 1 或 2 的方法产生经过遗传修饰的体细胞以及杂合或纯合的经过遗传改变的、克隆的动物。

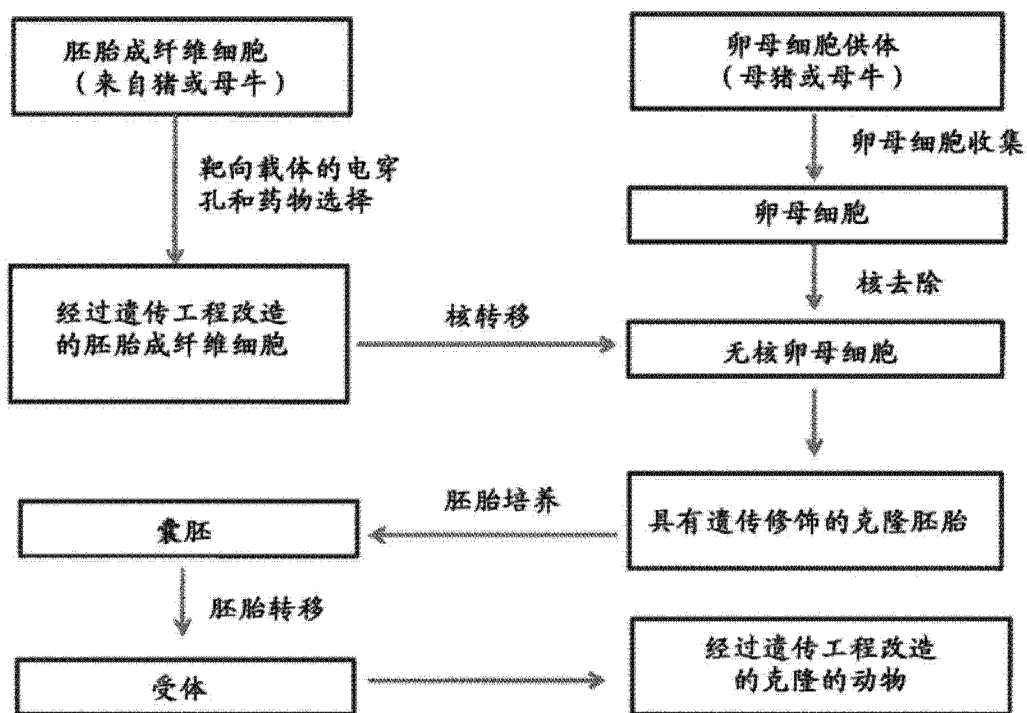


图 1

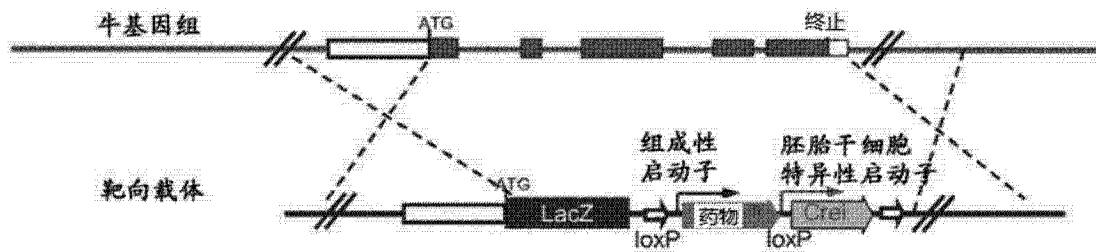


图 2

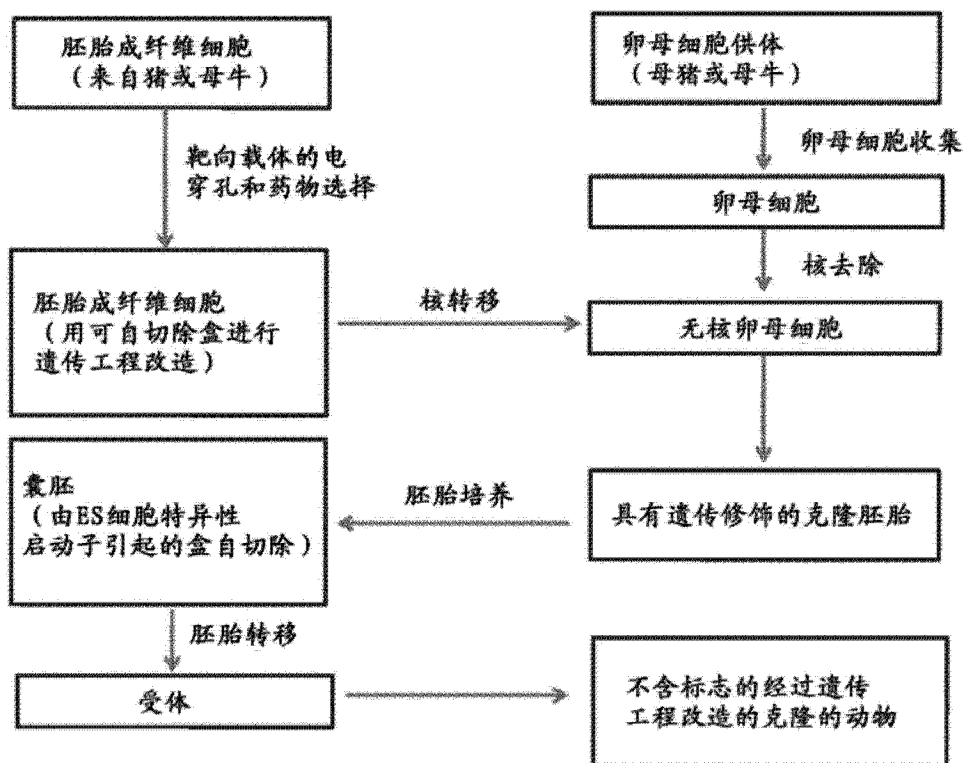


图 3

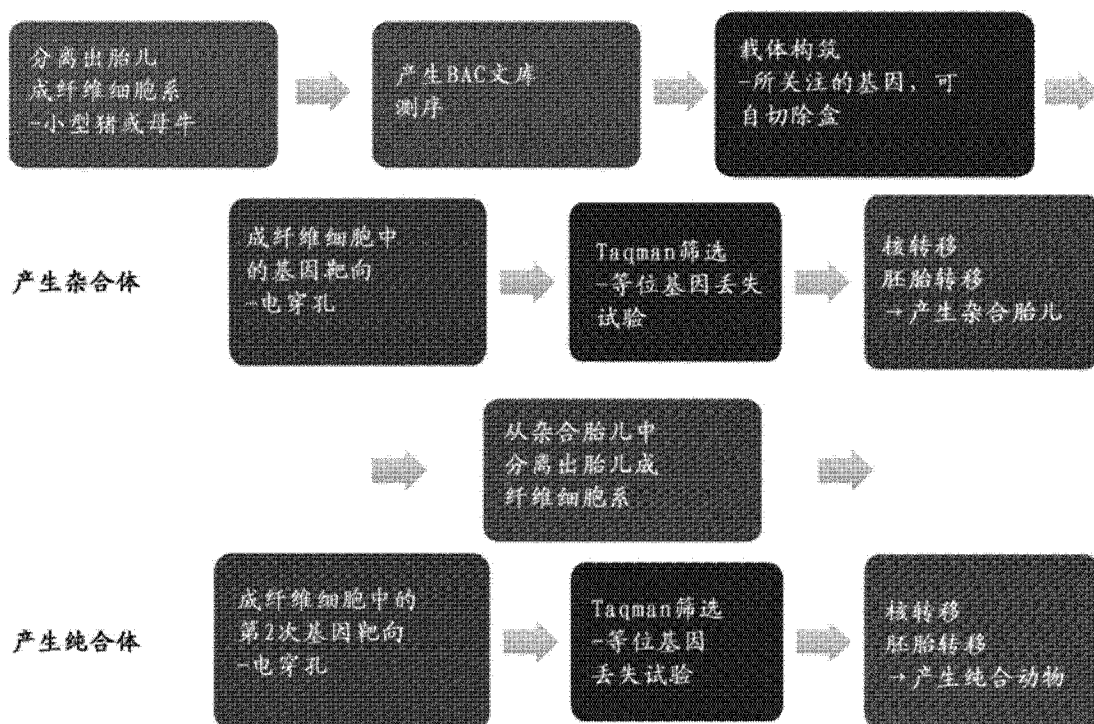


图 4