



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110891417 B

(45) 授权公告日 2023.05.23

(21) 申请号 201880031011.2

专利权人 印第安纳大学研究与技术公司

(22) 申请日 2018.03.21

(72) 发明人 G·豪厄尔 M·萨斯纳 G·卡特
B·兰姆

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110891417 A

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256

(43) 申请公布日 2020.03.17

专利代理人 陈文平 徐志明

(30) 优先权数据

62/474,358 2017.03.21 US

(51) Int.Cl.

C12N 5/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A01K 67/027 (2006.01)

2019.11.11

(56) 对比文件

(86) PCT国际申请的申请数据

CN 1668745 A, 2005.09.14

PCT/US2018/023565 2018.03.21

US 2015337030 A1, 2015.11.26

(87) PCT国际申请的公布数据

审查员 王丽丽

W02018/175581 EN 2018.09.27

(73) 专利权人 杰克逊实验室

权利要求书2页 说明书35页

地址 美国缅因州

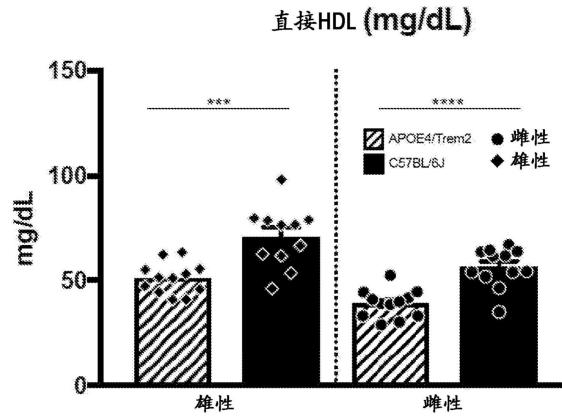
序列表30页 附图5页

(54) 发明名称

表达人APOE4和小鼠Trem2 p.R47H的遗传修饰小鼠及其使用方法

(57) 摘要

提供了遗传修饰小鼠，其具有一种或多种与人APOE4p和小鼠Trem2p表达相关的并且与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的症状或体征，其中该小鼠的基因组包括：1)可操作地与启动子连接的编码人APOE4蛋白 (APOE4p) 的DNA序列；和2)可操作地与启动子连接的编码具有突变 p.R47H的小鼠Trem2蛋白 (Trem2p) 的DNA序列，使得小鼠表达人APOE4p和小鼠Trem2p。提供了使用这种遗传修饰小鼠筛选用于阿尔茨海默氏病治疗中的化合物的方法。



1. 一种筛选用于非家族性迟发性阿尔茨海默氏病的治疗中的化合物的方法,包括:
通过免疫组织化学方法评估所述化合物处理的遗传修饰小鼠的脑血管渗漏和炎症和/或通过转录分析评估所述小鼠的AD相关的基因表达变化,
其中该遗传修饰小鼠具有与人APOE4p和小鼠Trem2p表达相关的并且与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的脑血管渗漏、炎症和AD相关的基因表达变化,和
其中所述小鼠的基因组包含:1)可操作地与启动子连接的编码人APOE4蛋白 (APOE4p) 的DNA序列;和2)可操作地与启动子连接的编码具有突变p.R47H的小鼠Trem2蛋白 (Trem2p) 的DNA序列,其中所述小鼠表达人APOE4p和小鼠Trem2p。
2. 如权利要求1所述的筛选用于非家族性迟发性阿尔茨海默氏病的治疗中的化合物的方法,其中所述APOE4p包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,或所述APOE4p由在高严格杂交条件下与SEQ ID NO:2杂交的核酸的互补序列编码。
3. 如权利要求1所述的筛选用于非家族性迟发性阿尔茨海默氏病的治疗中的化合物的方法,其中所述小鼠Trem2p包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,或所述小鼠Trem2p由在高严格杂交条件下与SEQ ID NO:4杂交的核酸的互补序列编码。
4. 如权利要求1所述的筛选用于非家族性迟发性阿尔茨海默氏病的治疗中的化合物的方法,其中所述遗传修饰小鼠是B6(SJL)-Apoe^{tm1.1(APOE*)4}Adiuj Trem2^{em1Adiuj}/J小鼠,其基因组包含:1)可操作地与启动子连接的编码人APOE4蛋白 (APOE4p) 的DNA序列;和2)可操作地与启动子连接的编码具有突变p.R47H的小鼠Trem2蛋白 (Trem2p) 的DNA序列,其中所述小鼠对于编码APOE4p的DNA序列和对于编码Trem2p的DNA序列是纯合的,并且其中所述小鼠表达人APOE4p和小鼠Trem2p。
5. 如权利要求1所述的筛选用于非家族性迟发性阿尔茨海默氏病的治疗中的化合物的方法,其中所述评估包括将所述化合物对所述遗传修饰小鼠的效果与对照进行比较。
6. 如权利要求5所述的筛选用于非家族性迟发性阿尔茨海默氏病的治疗中的化合物的方法,其中所述对照包括:
将所述化合物施用于不表达人APOE4p和小鼠Trem2p的小鼠;和
评估所述化合物对该小鼠的效果。
7. 如权利要求5或6所述的筛选用于非家族性迟发性阿尔茨海默氏病的治疗中的化合物的方法,其中所述对照包括:
将所述化合物施用于野生型C57BL/6J小鼠;和
评估所述化合物对野生型C57BL/6J小鼠的效果。
8. 如权利要求5或6所述的筛选用于非家族性迟发性阿尔茨海默氏病的治疗中的化合物的方法,其中所述对照包括:
将所述化合物施用于APOE3-表达小鼠;和
评估所述化合物对所述APOE3-表达小鼠的效果。
9. 一种产生表达APOE4p和Trem2p的遗传修饰小鼠的方法,其包括:
将遗传修饰引入小鼠基因组中以产生表达APOE4p和Trem2p的所述遗传修饰小鼠,
其中所述遗传修饰小鼠包含与编码人APOE4蛋白 (APOE4p) 的核苷酸序列可操作地连接的启动子,和与编码具有突变p.R47H的小鼠Trem2蛋白 (Trem2p) 的核苷酸序列可操作地连接的启动子,和

其中所述遗传修饰小鼠表达人APOE4p和小鼠Trem2p,且不过度表现家族性阿尔茨海默氏病突变。

10.一种产生遗传修饰小鼠的方法,该遗传修饰小鼠特征在于与人APOE4p和小鼠Trem2p表达相关的并且与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的脑血管渗漏、炎症和AD相关的基因表达变化,该方法包括:

i)产生在其基因组中具有编码人APOE4p的DNA序列的第一修饰小鼠;

ii)产生在其基因组中具有编码具有突变p.R47H的小鼠Trem2p蛋白的DNA序列的第二修饰小鼠;和

iii)使i)的所述第一修饰小鼠的近交系与ii)的所述第二修饰小鼠的近交系杂交;

其中由所述杂交得到的所述遗传修饰小鼠表达人APOE4p和包含R47H突变的小鼠Trem2p。

11.一种产生遗传修饰小鼠的方法,包括:使小鼠近交系B6(SJL)-*Apoe*^{tm1.1(APOE*4)Adpme}/J(APOE*4KI(JAX))与小鼠近交系C57BL/6J-Trem2^{em1Adpme}/J(Trem2 R47H KI(JAX))杂交,其中所述遗传修饰小鼠表达人APOE4p和包含R47H突变的小鼠Trem2p,且不过度表现家族性阿尔茨海默氏病突变。

表达人APOE4和小鼠Trem2 p.R47H的遗传修饰小鼠及其使用方法

[0001] 相关申请的参考

[0002] 本申请要求2017年3月21日提交的美国临时专利申请系列No.62/474,358的优先权,将其完整内容按引用并入本文中。

技术领域

[0003] 本发明总体地涉及可用作人阿尔茨海默氏病模型的遗传修饰小鼠。在特定的方面,本发明涉及表达人APOE4和小鼠Trem2 p.R47H的遗传修饰小鼠及其使用方法。

背景技术

[0004] 研发针对阿尔茨海默氏病(AD)的疗法的主要障碍之一是缺乏可用于临床前试验的动物模型。这种情况的原因之一可能是现有模型是基于家族性突变,而绝大多数临床人群具有非家族性迟发性AD。

[0005] 家族性或早发性阿尔茨海默氏病是由淀粉样前体蛋白(APP)基因的突变或过表达或者早老素基因(PSEN1或PSEN2)的突变引起的。所有这些导致A_β42肽的产生增加,该肽被认为是神经毒性的。已经建立了数十个(如果不是数百个的话)模拟阿尔茨海默氏病的多个方面的小鼠模型。在这些家族性阿尔茨海默氏病小鼠模型中,许多治疗显示是有效的,但在临床试验中测试时没有一种是有效的。

[0006] 相反,占人类阿尔茨海默氏病患者人群的95-98%的迟发性阿尔茨海默氏病没有简单和明确的遗传病因。迟发性阿尔茨海默氏病被认为是由多种遗传和环境因素(其与衰老过程相互作用)引起的多因素综合症。由于这种复杂性,其遗传原因仍未完全明了,并且迄今尚未报道人类迟发性阿尔茨海默氏病的有用小鼠模型。

发明内容

[0007] 根据本发明的方面提供了遗传修饰小鼠,其具有一种或多种与人APOE4p和小鼠Trem2p的表达相关并且与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的症状或体征,其中小鼠的基因组包括:1)编码人APOE4蛋白(APOE4p)的DNA序列,该编码APOE4p的DNA序列可操作地与启动子连接,和2)编码具有突变p.R47H的小鼠Trem2蛋白(Trem2p)的DNA序列,该编码Trem2p的DNA序列可操作地与启动子连接,并且其中小鼠表达人APOE4p和小鼠Trem2p。根据本发明的方面,小鼠对于编码APOE4p的DNA序列和对于编码Trem2p的DNA序列是纯合的。

[0008] 根据本发明的方面,提供了遗传修饰小鼠,其具有一种或多种与人APOE4p和小鼠Trem2p的表达相关的并且与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的症状或体征,其中小鼠的基因组包括:1)编码人APOE4蛋白(APOE4p)的DNA序列,该编码APOE4p的DNA序列可操作地与启动子连接;和2)编码具有突变p.R47H的小鼠Trem2蛋白(Trem2p)的DNA序列,该编码Trem2p的DNA序列可操作地与启动子连接,其中小鼠表达人APOE4p和小鼠Trem2p,并且其中APOE4p包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列,或者APOE4p由在高严格杂交条件下与SEQ ID NO:2

杂交的核酸的互补序列编码。根据本发明的方面,小鼠对于编码APOE4p的DNA序列和对于编码Trem2p的DNA序列是纯合的。

[0009] 根据本发明的方面,提供了遗传修饰小鼠,其具有一种或多种与人APOE4p和小鼠Trem2p的表达相关的并且与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的症状或体征,其中小鼠的基因组包括:1) 编码人APOE4蛋白(APOE4p)的DNA序列,该编码APOE4p的DNA序列可操作地与启动子连接;和2) 编码具有突变p.R47H的小鼠Trem2蛋白(Trem2p)的DNA序列,该编码Trem2p的DNA序列可操作地与启动子连接,其中小鼠表达人APOE4p和小鼠Trem2p,并且其中小鼠Trem2p包括SEQ ID NO:3的氨基酸序列,或者小鼠Trem2p由在高严格杂交条件下与SEQ ID NO:4杂交的核酸的互补序列编码。根据本发明的方面,小鼠对于编码APOE4p的DNA序列和对于编码Trem2p的DNA序列是纯合的。

[0010] 根据本发明的方面,提供了遗传修饰小鼠,其具有一种或多种与人APOE4p和小鼠Trem2p的表达相关的并且与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的症状或体征,其中小鼠的基因组包括:1) 编码人APOE4蛋白(APOE4p)的DNA序列,该编码APOE4p的DNA序列可操作地与启动子连接;和2) 编码具有突变p.R47H的小鼠Trem2蛋白(Trem2p)的DNA序列,该编码Trem2p的DNA序列可操作地与启动子连接,其中小鼠表达人APOE4p和小鼠Trem2p,其中APOE4p包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列,或者APOE4p由在高严格杂交条件下与SEQ ID NO:2杂交的核酸的互补序列编码,和其中小鼠Trem2p包括SEQ ID NO:3的氨基酸序列,或者小鼠Trem2p由在高严格杂交条件下与SEQ ID NO:4杂交的核酸的互补序列编码。根据本发明的方面,小鼠对于编码APOE4p的DNA序列和对于编码Trem2p的DNA序列是纯合的。

[0011] 根据本发明的方面,提供了遗传修饰小鼠,其具有一种或多种与人APOE4p和小鼠Trem2p的表达相关的并且与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的症状或体征,其中遗传修饰小鼠是B6(SJL)-Apoe^{tm1.1(APOE*4)Adiuj}Trem2^{em1Adiuj}/J小鼠,其基因组包括:1) 编码人APOE4蛋白(APOE4p)的DNA序列,该编码APOE4p的DNA序列可操作地与启动子连接;和2) 编码具有突变p.R47H的小鼠Trem2蛋白(Trem2p)的DNA序列,该编码Trem2p的DNA序列可操作地与启动子连接,其中小鼠对于编码APOE4p的DNA序列和对于编码Trem2p的DNA序列是纯合的,并且其中小鼠表达人APOE4p和小鼠Trem2p。

[0012] 根据本发明的方面,提供了筛选用于治疗阿尔茨海默氏病的疗法的方法,所述方法包括对具有一种或多种与人APOE4p和小鼠Trem2p的表达相关的并且与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的症状或体征的遗传修饰小鼠施用治疗,其中小鼠的基因组包括:1) 编码人APOE4蛋白(APOE4p)的DNA序列,该编码APOE4p的DNA序列可操作地与启动子连接;和2) 编码具有突变p.R47H的小鼠Trem2蛋白(Trem2p)的DNA序列,该编码Trem2p的DNA序列可操作地与启动子连接,并且其中小鼠表达人APOE4p和小鼠Trem2p;和评估该治疗对小鼠的一种或多种与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的与人APOE4p和小鼠Trem2p表达相关的症状或体征的效果。根据本发明的方面,小鼠对于编码APOE4p的DNA序列和对于编码Trem2p的DNA序列是纯合的。根据本发明的方面,评估治疗的效果包括将治疗对遗传修饰小鼠的效果与对照进行比较。根据本发明的方面,对照包括对不表达人APOE4p和小鼠Trem2p的小鼠施用治疗,并评估治疗对不表达人APOE4p和小鼠Trem2p的小鼠的效果。根据本发明的方面,对照包括对野生型C57BL/6J小鼠施用治疗,并评估治疗对野生型C57BL/6J小鼠的效果。根据本发明的方面,对照包括对表达APOE3的小鼠施用治疗,并评估治疗对表达APOE3

的小鼠的效果。

[0013] 根据本发明的方面,提供了筛选用于治疗阿尔茨海默氏病的疗法的方法,所述方法包括对具有一种或多种与人APOE4p和小鼠Trem2p的表达相关的并且与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的症状或体征的遗传修饰小鼠施用治疗,其中小鼠的基因组包括:1)编码人APOE4蛋白(APOE4p)的DNA序列,该编码APOE4p的DNA序列可操作地与启动子连接;和2)编码具有突变p.R47H的小鼠Trem2蛋白(Trem2p)的DNA序列,该编码Trem2p的DNA序列可操作地与启动子连接,其中小鼠表达人APOE4p和小鼠Trem2p,并且其中APOE4p包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列,或者APOE4p由在高严格杂交条件下与SEQ ID NO:2杂交的核酸的互补序列编码;和评估该治疗对小鼠的一种或多种与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的与人APOE4p和小鼠Trem2p表达相关的症状或体征的效果。根据本发明的方面,小鼠对于编码APOE4p的DNA序列和对于编码Trem2p的DNA序列是纯合的。根据本发明的方面,评估治疗效果包括将治疗对遗传修饰小鼠的效果与对照进行比较。根据本发明的方面,对照包括对不表达人APOE4p和小鼠Trem2p的小鼠施用治疗,并评估治疗对不表达人APOE4p和小鼠Trem2p的小鼠的效果。根据本发明的方面,对照包括对野生型C57BL/6J小鼠施用治疗,并评估治疗对野生型C57BL/6J小鼠的效果。根据本发明的方面,对照包括对表达APOE3的小鼠施用治疗,并评估治疗对表达APOE3的小鼠的效果。

[0014] 根据本发明的方面,提供了筛选用于治疗阿尔茨海默氏病的疗法的方法,所述方法包括对具有一种或多种与人APOE4p和小鼠Trem2p的表达相关的并且与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的症状或体征的遗传修饰小鼠施用治疗,其中小鼠的基因组包括:1)编码人APOE4蛋白(APOE4p)的DNA序列,该编码APOE4p的DNA序列可操作地与启动子连接;和2)编码具有突变p.R47H的小鼠Trem2蛋白(Trem2p)的DNA序列,该编码Trem2p的DNA序列可操作地与启动子连接,其中小鼠表达人APOE4p和小鼠Trem2p,并且其中小鼠Trem2p包括SEQ ID NO:3的氨基酸序列,或者小鼠Trem2p由在高严格杂交条件下与SEQ ID NO:4杂交的核酸的互补序列编码;和评估该治疗对小鼠的一种或多种与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的与人APOE4p和小鼠Trem2p表达相关的症状或体征的效果。根据本发明的方面,小鼠对于编码APOE4p的DNA序列和对于编码Trem2p的DNA序列是纯合的。根据本发明的方面,评估治疗的效果包括将治疗对遗传修饰小鼠的效果与对照进行比较。根据本发明的方面,对照包括对不表达人APOE4p和小鼠Trem2p的小鼠施用治疗,并评估治疗对不表达人APOE4p和小鼠Trem2p的小鼠的效果。根据本发明的方面,对照包括对野生型C57BL/6J小鼠施用治疗,并评估治疗对野生型C57BL/6J小鼠的效果。根据本发明的方面,对照包括对表达APOE3的小鼠施用治疗,并评估治疗对表达APOE3的小鼠的效果。

[0015] 根据本发明的方面,提供了筛选用于治疗阿尔茨海默氏病的疗法的方法,所述方法包括对具有一种或多种与人APOE4p和小鼠Trem2p的表达相关的并且与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的症状或体征的遗传修饰小鼠施用治疗,其中小鼠的基因组包括:1)编码人APOE4蛋白(APOE4p)的DNA序列,该编码APOE4p的DNA序列可操作地与启动子连接;和2)编码具有突变p.R47H的小鼠Trem2蛋白(Trem2p)的DNA序列,该编码Trem2p的DNA序列可操作地与启动子连接,其中小鼠表达人APOE4p和小鼠Trem2p,并且其中APOE4p包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列,或者APOE4p由在高严格杂交条件下与SEQ ID NO:2杂交的核酸的互补序列编码,和其中小鼠Trem2p包括SEQ ID NO:3的氨基酸序列,或者小鼠Trem2p由在高严格

杂交条件下与SEQ ID NO:4杂交的核酸的互补序列编码;和评估该治疗对小鼠的一种或多种与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的与人APOE4p和小鼠Trem2p表达相关的症状或体征的效果。根据本发明的方面,小鼠对于编码APOE4p的DNA序列和对于编码Trem2p的DNA序列是纯合的。根据本发明的方面,评估治疗的效果包括将治疗对遗传修饰小鼠的效果与对照进行比较。根据本发明的方面,对照包括对不表达人APOE4p和小鼠Trem2p的小鼠施用治疗,并评估治疗对不表达人APOE4p和小鼠Trem2p的小鼠的效果。根据本发明的方面,对照包括对野生型C57BL/6J小鼠施用治疗,并评估治疗对野生型C57BL/6J小鼠的效果。根据本发明的方面,对照包括对表达APOE3的小鼠施用治疗,并评估治疗对表达APOE3的小鼠的效果。

[0016] 根据本发明的方面,提供了筛选用于治疗阿尔茨海默氏病的疗法的方法,所述方法包括对具有一种或多种与人APOE4p和小鼠Trem2p的表达相关的并且与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的症状或体征的遗传修饰小鼠施用治疗,其中遗传修饰小鼠是B6(SJL)-Apoe^{tm1.1(APOE*4)Adiuj}Trem2^{em1Adiuj}/J小鼠,其基因组包括:1)编码人APOE4蛋白(APOE4p)的DNA序列,该编码APOE4p的DNA序列可操作地与启动子连接;和2)编码具有突变p.R47H的小鼠Trem2蛋白(Trem2p)的DNA序列,该编码Trem2p的DNA序列可操作地与启动子连接,其中小鼠对于编码APOE4p的DNA序列和对于编码Trem2p的DNA序列是纯合的,并且其中小鼠表达人APOE4p和小鼠Trem2p;和评估该治疗对小鼠的一种或多种与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的与人APOE4p和小鼠Trem2p表达相关的症状或体征的效果。根据本发明的方面,小鼠对于编码APOE4p的DNA序列和对于编码Trem2p的DNA序列是纯合的。根据本发明的方面,评估治疗的效果包括将治疗对遗传修饰小鼠的效果与对照进行比较。根据本发明的方面,对照包括对不表达人APOE4p和小鼠Trem2p的小鼠施用治疗,并评估治疗对不表达人APOE4p和小鼠Trem2p的小鼠的效果。根据本发明的方面,对照包括对野生型C57BL/6J小鼠施用治疗,并评估治疗对野生型C57BL/6J小鼠的效果。根据本发明的方面,对照包括对表达APOE3的小鼠施用治疗,并评估治疗对表达APOE3的小鼠的效果。

[0017] 根据本发明的方面,提供了筛选用于治疗阿尔茨海默氏病的化合物的方法,所述方法包括对具有一种或多种与人APOE4p和小鼠Trem2p的表达相关的并且与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的症状或体征的遗传修饰小鼠施用化合物,其中小鼠的基因组包括:1)编码人APOE4蛋白(APOE4p)的DNA序列,该编码APOE4p的DNA序列可操作地与启动子连接;和2)编码具有突变p.R47H的小鼠Trem2蛋白(Trem2p)的DNA序列,该编码Trem2p的DNA序列可操作地与启动子连接,并且其中小鼠表达人APOE4p和小鼠Trem2p;和评估化合物对小鼠的一种或多种与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的与人APOE4p和小鼠Trem2p表达相关的症状或体征的效果。根据本发明的方面,小鼠对于编码APOE4p的DNA序列和对于编码Trem2p的DNA序列是纯合的。根据本发明的方面,评估化合物的效果包括将化合物对遗传修饰小鼠的效果与对照进行比较。根据本发明的方面,对照包括对不表达人APOE4p和小鼠Trem2p的小鼠施用化合物,并评估化合物对不表达人APOE4p和小鼠Trem2p的小鼠的效果。根据本发明的方面,对照包括对野生型C57BL/6J小鼠施用化合物,并评估化合物对野生型C57BL/6J小鼠的效果。根据本发明的方面,对照包括对表达APOE3的小鼠施用化合物,并评估化合物对表达APOE3的小鼠的效果。

[0018] 根据本发明的方面,提供了筛选用于治疗阿尔茨海默氏病的化合物的方法,所述

方法包括对具有一种或多种与人APOE4p和小鼠Trem2p的表达相关的并且与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的症状或体征的遗传修饰小鼠施用化合物,其中小鼠的基因组包括:1)编码人APOE4蛋白(APOE4p)的DNA序列,该编码APOE4p的DNA序列可操作地与启动子连接;和2)编码具有突变p.R47H的小鼠Trem2蛋白(Trem2p)的DNA序列,该编码Trem2p的DNA序列可操作地与启动子连接,其中小鼠表达人APOE4p和小鼠Trem2p,并且其中APOE4p包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列,或者APOE4p由在高严格杂交条件下与SEQ ID NO:2杂交的核酸的互补序列编码;和评估化合物对小鼠的一种或多种与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的与人APOE4p和小鼠Trem2p表达相关的症状或体征的效果。根据本发明的方面,小鼠对于编码APOE4p的DNA序列和对于编码Trem2p的DNA序列是纯合的。根据本发明的方面,评估化合物的效果包括将化合物对遗传修饰小鼠的效果与对照进行比较。根据本发明的方面,对照包括对不表达人APOE4p和小鼠Trem2p的小鼠施用化合物,并评估化合物对不表达人APOE4p和小鼠Trem2p的小鼠的效果。根据本发明的方面,对照包括对野生型C57BL/6J小鼠施用化合物,并评估化合物对野生型C57BL/6J小鼠的效果。根据本发明的方面,对照包括对表达APOE3的小鼠施用化合物,并评估化合物对表达APOE3的小鼠的效果。

[0019] 根据本发明的方面,提供了筛选用于治疗阿尔茨海默氏病的化合物的方法,所述方法包括对具有一种或多种与人APOE4p和小鼠Trem2p的表达相关的并且与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的症状或体征的遗传修饰小鼠施用化合物,其中小鼠的基因组包括:1)编码人APOE4蛋白(APOE4p)的DNA序列,该编码APOE4p的DNA序列可操作地与启动子连接;和2)编码具有突变p.R47H的小鼠Trem2蛋白(Trem2p)的DNA序列,该编码Trem2p的DNA序列可操作地与启动子连接,其中小鼠表达人APOE4p和小鼠Trem2p,并且其中小鼠Trem2p包括SEQ ID NO:3的氨基酸序列,或者小鼠Trem2p由在高严格杂交条件下与SEQ ID NO:4杂交的核酸的互补序列编码;和评估化合物对小鼠的一种或多种与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的与人APOE4p和小鼠Trem2p表达相关的症状或体征的效果。根据本发明的方面,小鼠对于编码APOE4p的DNA序列和对于编码Trem2p的DNA序列是纯合的。根据本发明的方面,评估化合物的效果包括将化合物对遗传修饰小鼠的效果与对照进行比较。根据本发明的方面,对照包括对不表达人APOE4p和小鼠Trem2p的小鼠施用化合物,并评估化合物对不表达人APOE4p和小鼠Trem2p的小鼠的效果。根据本发明的方面,对照包括对野生型C57BL/6J小鼠施用化合物,并评估化合物对野生型C57BL/6J小鼠的效果。根据本发明的方面,对照包括对表达APOE3的小鼠施用化合物,并评估化合物对表达APOE3的小鼠的效果。

[0020] 根据本发明的方面,提供了筛选用于治疗阿尔茨海默氏病的化合物的方法,所述方法包括对具有一种或多种与人APOE4p和小鼠Trem2p的表达相关的并且与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的症状或体征的遗传修饰小鼠施用化合物,其中小鼠的基因组包括:1)编码人APOE4蛋白(APOE4p)的DNA序列,该编码APOE4p的DNA序列可操作地与启动子连接;和2)编码具有突变p.R47H的小鼠Trem2蛋白(Trem2p)的DNA序列,该编码Trem2p的DNA序列可操作地与启动子连接,其中小鼠表达人APOE4p和小鼠Trem2p,其中APOE4p包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列,或者APOE4p由在高严格杂交条件下与SEQ ID NO:2杂交的核酸的互补序列编码,并且其中小鼠Trem2p包括SEQ ID NO:3的氨基酸序列,或者小鼠Trem2p由在高严格杂交条件下与SEQ ID NO:4杂交的核酸的互补序列编码;和评估化合物对小鼠的一种或多种与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的与人APOE4p和小鼠Trem2p表达相关的症状

或体征的效果。根据本发明的方面,小鼠对于编码APOE4p的DNA序列和对于编码Trem2p的DNA序列是纯合的。根据本发明的方面,评估化合物的效果包括将化合物对遗传修饰小鼠的效果与对照进行比较。根据本发明的方面,对照包括对不表达人APOE4p和小鼠Trem2p的小鼠施用化合物,并评估化合物对不表达人APOE4p和小鼠Trem2p的小鼠的效果。根据本发明的方面,对照包括对野生型C57BL/6J小鼠施用化合物,并评估化合物对野生型C57BL/6J小鼠的效果。根据本发明的方面,对照包括对表达APOE3的小鼠施用化合物,并评估化合物对表达APOE3的小鼠的效果。

[0021] 根据本发明的方面,提供了筛选用于治疗阿尔茨海默氏病的化合物的方法,所述方法包括对具有一种或多种与人APOE4p和小鼠Trem2p的表达相关的并且与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的症状或体征的遗传修饰小鼠施用化合物,其中遗传修饰小鼠是B6 (SJL) -Apoe^{tm1.1(APOE*4)Adiuj}Trem2^{em1Adiuj}/J小鼠,其基因组包括:1) 编码人APOE4蛋白 (APOE4p) 的DNA序列,该编码APOE4p的DNA序列可操作地与启动子连接;和2) 编码具有突变p.R47H的小鼠Trem2蛋白 (Trem2p) 的DNA序列,该编码Trem2p的DNA序列可操作地与启动子连接,其中小鼠对于编码APOE4p的DNA序列和对于编码Trem2p的DNA序列是纯合的,并且其中小鼠表达人APOE4p和小鼠Trem2p;和评估化合物对小鼠的一种或多种与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的与人APOE4p和小鼠Trem2p表达相关的症状或体征的效果。根据本发明的方面,小鼠对于编码APOE4p的DNA序列和对于编码Trem2p的DNA序列是纯合的。根据本发明的方面,评估化合物的效果包括将化合物对遗传修饰小鼠的效果与对照进行比较。根据本发明的方面,对照包括对不表达人APOE4p和小鼠Trem2p的小鼠施用化合物,并评估化合物对不表达人APOE4p和小鼠Trem2p的小鼠的效果。根据本发明的方面,对照包括对野生型C57BL/6J小鼠施用化合物,并评估化合物对野生型C57BL/6J小鼠的效果。根据本发明的方面,对照包括对表达APOE3的小鼠施用化合物,并评估化合物对表达APOE3的小鼠的效果。

附图说明

[0022] 图1是本文实施例中详细描述的人源化ApoE4表达构建体的示意图。

[0023] 图2是来自B6 (SJL) -Apoe^{tm1.1(APOE*4)Adiuj}Trem2^{em1Adiuj}/J(通用名:B6J.APOE4/Trem2)小鼠(4-6道)的脑组织和对照(野生型(WT)C57BL/6J(缩写为B6J))小鼠脑组织(1-3道)的蛋白质印迹图像。

[0024] 图3A是显示从12个月大的B6J.APOE4/Trem2小鼠和12个月大的C57BL/6J对照小鼠获得的血液样品中高密度脂蛋白 (HDL) 的测定结果的图。

[0025] 图3B是显示从12个月大的B6J.APOE4/Trem2小鼠和12个月大的C57BL/6J对照小鼠获得的血液样品中低密度脂蛋白 (HDL) 的测定结果的图。

[0026] 图3C是显示从12个月大的B6J.APOE4/Trem2小鼠和12个月大的C57BL/6J对照小鼠获得的血液样品中总胆固醇的测定结果的图。

[0027] 图4显示了7-8个月大时B6J.APOE4/Trem2组织的代表性图像,其经过免疫染色来显示胶原IV(Col IV) 和纤维蛋白(原),以及来自对照C57BL/6J(缩写为B6J) 小鼠的类似大脑矢状切片的代表性图像,其相似地进行了免疫染色。

[0028] 图5是与野生型对照B6J小鼠相比,B6J.APOE4/Trem2小鼠中差异表达的基因的基因表达热图。

具体实施方式

[0029] 本发明总体地涉及遗传修饰小鼠，其是非家族性迟发性阿尔茨海默氏病的模型，并且在其基因组中编码两种外源引入的非家族性迟发性AD的风险因子，使得该小鼠产生人载脂蛋白E4 (APOE4) 和小鼠Trem2 p.R47H蛋白。

[0030] 人载脂蛋白是具有命名为ApoE2、ApoE3和ApoE4的三种异形体的多态性蛋白。这三种异形体对于蛋白质的氨基酸序列的位置130和176 (对应于没有18氨基酸信号肽的成熟APOE蛋白质中的位置112和158) 处的氨基酸性质彼此不同。ApoE2的特征在于130和176处的半胱氨酸，ApoE3的特征在于130处的半胱氨酸和176处的精氨酸，而ApoE4的特征在于130和176处的精氨酸。具有一个或多个ApoE4等位基因的个体发生非家族性迟发性AD的风险更高，并且已经提出了许多与病理学有关的机制，例如，参见Di Battista等，2016年，*Exp. Neurol.* 280: 97-105；Bu等，*Nature Reviews Neuroscience*, 2009, 10: 333-344；Huang等，*Cell*, 2017, 168: 1-15；和Tambini等，*EMBO Reports*, 2016, 17: 27-36。

[0031] Trem2 (髓样细胞表达触发受体2) 是由脑小胶质细胞表达的免疫吞噬受体。Trem2 触发细胞碎片的吞噬，并调节炎性反应的多个方面。TREM2的一种罕见变体 (p.R47H) 与人类阿尔茨海默氏病显著相关。

[0032] 在特定的实施方式中，本发明涉及一种遗传修饰小鼠，其基因组包括编码人APOE4 蛋白的DNA序列和编码具有R47H点突变的小鼠Trem2蛋白的DNA序列。

[0033] 编码人APOE4蛋白 (下文为APOE4p或“人APOE2”) 的人APOE4 DNA序列 (下文为APOE4g) 在本文显示为SEQ ID NO:2。编码的APOE4p在本文显示为SEQ ID NO:1。

[0034] 编码具有R47H点突变的小鼠Trem2蛋白 (下文为Trem2p或“小鼠Trem2p”) 的小鼠突变Trem2 DNA序列 (下文为Trem2g) 在本文显示为SEQ ID NO:4。编码的Trem2p在本文显示为SEQ ID NO:3。

[0035] 根据本发明方法的实施方式，可以将一个或多个遗传修饰引入小鼠基因组中以在遗传修饰小鼠中编码APOE4p的变体和/或Trem2p的变体。

[0036] 如本文使用的，术语“变体”是指与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的相应蛋白质相比，其氨基酸序列中含有一个或多个突变的APOE4p或Trem2p。例如，这样的突变可以是一个或多个氨基酸置换、添加和/或缺失，只要APOE4p或Trem2p的变体分别保留SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的APOE4p或Trem2p的功能特征。

[0037] 在特别的实施方案中，根据本发明实施方式的变体APOE4p在其整个长度上与SEQ ID NO:1具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同一性，并且作为本文显示为SEQ ID NO:1的包括18氨基酸信号肽的APOE4蛋白的氨基酸130和176具有R(精氨酸) 和R(精氨酸)，以及保留SEQ ID NO:1的APOE4p的功能特征。

[0038] 在特别的实施方案中，根据本发明实施方式的变体APOE4p在其整个长度上与SEQ ID NO:15具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同一性，并且作为本文显示为SEQ ID NO:15的不包括18氨基酸信号肽的APOE4蛋白的氨基酸112和158具有R(精氨酸) 和R(精氨酸)，以及保留SEQ ID NO:15的APOE4p的功能特征。

[0039] 在特别的实施方案中，根据本发明实施方式的变体Trem2p在其整个长度上与SEQ ID NO:3具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同一性并且保留SEQ ID NO:3的Trem2p的功能特征。

[0040] 可以使用标准分子生物学技术,如CRISPR技术,来引入突变。可选的技术包括定点诱变和PCR介导的诱变等。本领域技术人员将认识到可以引入一个或多个氨基酸突变而不改变APOE4p和小鼠Trem2p蛋白的功能特性。

[0041] 用于评价APOE4p、Trem2p和变体的功能特性的分析是本领域已知的。

[0042] 可以在APOE4p和Trem2p蛋白中进行保守性氨基酸置换来产生APOE4p和Trem2p变体。保守性氨基酸置换是本领域公认的一个氨基酸对具有相似特征的另一个氨基酸的置换。例如,各个氨基酸可以描述为具有一个或多个以下特征:电正性、电负性、脂肪族、芳香族、极性、疏水性和亲水性。保守性置换是具有指定结构或功能特征的一个氨基酸对具有相同特征的另一个氨基酸的置换。酸性氨基酸包括天冬氨酸、谷氨酸;碱性氨基酸包括组氨酸、赖氨酸、精氨酸;脂肪族氨基酸包括异亮氨酸、亮氨酸和缬氨酸;芳香族氨基酸包括苯丙氨酸、甘氨酸、酪氨酸和色氨酸;极性氨基酸包括天冬氨酸、谷氨酸、组氨酸、赖氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸;和疏水性氨基酸包括丙氨酸、半胱氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、缬氨酸和色氨酸;并且保守置换包括各组内氨基酸之间的置换。氨基酸也可以就相对大小来描述,丙氨酸、半胱氨酸、天冬氨酸、甘氨酸、天冬酰胺、脯氨酸、苏氨酸、丝氨酸、缬氨酸,这些全部通常被认为是小的。

[0043] APOE4p和Trem2p变体可以包括合成氨基酸类似物、氨基酸衍生物和/或非标准氨基酸,说明性地包括但不限于, α -氨基丁酸、瓜氨酸、刀豆氨酸、氰丙氨酸、二氨基丁酸、二氨基庚二酸、二羟基-苯丙氨酸、黎豆氨酸、同型精氨酸、羟脯氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、3-磷酸丝氨酸、同型丝氨酸、5-羟基色氨酸、1-甲基组氨酸、3-甲基组氨酸和鸟氨酸。

[0044] 本领域普通技术人员将知道,由于遗传密码的简并特性,除了SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:4之外的核酸序列分别编码APOE4p和Trem2p,并且这样的可选核酸可以引入小鼠基因组中以产生本公开的表达APOE4p和Trem2p的遗传修饰小鼠。

[0045] 单数术语“一个(a)”、“一(an)”和“该(the)”不意图是限制性的,而是包括复数指代物,除非另外特意指出或上下文明确表示另外的情况。

[0046] 术语“表达(expressing)”和“表达(expresses)”是指基因的转录以产生相应的mRNA,和/或mRNA的翻译以产生相应的蛋白质。

[0047] APOE4p和Trem2p变体由分别与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4具有高度同一性的核酸编码。编码APOE4p变体的核酸的互补序列在高严格条件下与编码APOE4p的SEQ ID NO:2特异性地杂交。编码Trem2p变体的核酸的互补序列在高严格条件下与编码Trem2p的SEQ ID NO:4特异性地杂交。

[0048] 术语“核酸”是指具有多于一个核苷酸的任何形式的RNA或DNA分子,包括单链、双链、寡核苷酸或多核苷酸。术语“核苷酸序列”是指单链核酸形式的寡核苷酸或多核苷酸中核苷酸的排序。

[0049] 术语“杂交(hybridization)”和“杂交(hybridizes)”是指互补核酸的配对和结合。如本领域公知的,根据诸如核酸的互补程度、核酸的解链温度T_m和杂交条件的严格性的因素,杂交在两个核酸之间以不同程度发生。

[0050] 术语“杂交条件的严格性”是指温度、离子强度和关于特定的常见添加剂(如甲酰胺和Denhardt's溶液)的杂交介质组成的条件。与指定核酸有关的特定杂交条件的确定是常规的,并且是本领域公知的,例如,如J.Sambrook和D.W.Russell,Molecular Cloning:A

Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 第3版, 2001年; 和 F.M.Ausubel编辑, Short Protocols in Molecular Biology, Current Protocols; 第5版, 2002中描述的。高严格性杂交条件是仅允许基本上互补的核酸杂交的条件。通常, 具有约85-100%互补性的核酸被认为是高度互补的, 并且在高严格性条件下杂交。中等严格性条件由具有中等互补性(约50-84%互补性)以及具有高度互补性的核酸杂交的条件来举例说明。相反, 低严格性杂交条件是其中具有低互补性程度的核酸杂交的条件。

[0051] 术语“特异性杂交”和“特异地杂交”是指特定核酸与靶核酸的杂交, 而基本上没有与样品中除靶核酸以外的其他核酸的杂交。

[0052] 杂交和洗涤条件的严格性取决于几个因素, 包括探针和靶的Tm以及杂交和洗涤条件的离子强度, 这是本领域技术人员公知的。杂交和达到所需杂交严格性的条件描述于例如Sambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; 和Ausubel, F. 等(编辑), Short Protocols in Molecular Biology, Wiley, 2002中。

[0053] 高严格性杂交条件的一个实例是在37°C下在含有6X SSC、5X Denhardt's溶液、30%甲酰胺和100微克/ml变性鲑鱼精子的溶液中长度超过约100个核苷酸的核酸杂交过夜, 然后在0.1X SSC和0.1% SDS的溶液中洗涤于60°C下洗涤15分钟。SSC为0.15M NaCl/0.015M柠檬酸钠。Denhardt's溶液是0.02%牛血清白蛋白/0.02%FICOLL/0.02%聚乙烯吡咯烷酮。

[0054] 术语“互补”是指核苷酸之间的Watson-Crick碱基配对, 并且具体地是指核苷酸彼此氢键键合, 其中胸腺嘧啶或尿嘧啶通过两个氢键连接腺嘌呤残基且胞嘧啶和鸟嘌呤残基通过三个氢键连接。通常, 核酸包括被描述为与指定的第二核苷酸序列具有“百分互补性”的核苷酸序列。例如, 核苷酸序列可以与指定的第二核苷酸序列具有80%、90%或100%的互补性, 表明序列的10个核苷酸中的8个、10个中的9个或10个中的10个核苷酸与指定的第二核苷酸序列互补。例如, 核苷酸序列3'-TCGA-5'与核苷酸序列5'-AGCT-3'100%互补。此外, 核苷酸序列3'-TCGA-5'与核苷酸序列5'-TTAGCTGG-3'的区域100%互补。

[0055] 为了确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的同一性百分比, 将序列比对以达到最佳比较目的(例如, 可以在第一氨基酸或核酸序列的序列中引入空位以实现与第二氨基酸或核酸序列的最佳比对)。然后比较相应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置在第二序列中的相应位置被相同的氨基酸残基或核苷酸占据时, 则分子在该位置处是相同的。两个序列之间的同一性百分比是该序列共有的相同位置数的函数(即, %同一性=相同重叠位置数/位置总数×100%)。在一个实施方式中, 两个序列具有相同的长度或长度的差异不超过参考序列总长度的1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%。

[0056] 两个序列之间的同一性百分比的确定也可以使用数学算法来完成。用于比较两个序列的数学算法的优选的非限制性实例是Karlin和Altschul, 1990, PNAS 87:2264-2268的算法, 如在Karlin和Altschul, 1993, PNAS 90:5873-5877中改良的。这种算法被结合到Altschul等, 1990, J.Mol.Biol.215:403的NBLAST和XBLAST程序中。使用NBLAST核苷酸程序参数集进行BLAST核苷酸搜索, 例如, 对于分数=100, 字长=12, 以获得与本发明的核酸分子同源的核苷酸序列。用XBLAST程序参数集进行BLAST蛋白质搜索, 例如对于评分50, 字长

=3,以获得与本发明的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的带空位比对,如Altschul等,1997,Nucleic Acids Res.25:3389 3402中所述使用Gapped BLAST。或者,使用PSI BLAST来执行迭代搜索,其检测分子之间的距离关系(同上)。利用BLAST、Gapped BLAST和PSI Blast程序时,使用相应程序(例如XBLAST和NBLAST)的默认参数(参见,例如,NCBI网站)。用于序列比较的数学算法的另一个优选的非限制性实例是Myers和Miller,1988,CABIOS 4:11 17的算法。这种算法被结合到ALIGN程序(2.0版)中,该程序是GCG序列比对软件包的部分。利用ALIGN程序比较氨基酸序列时,使用PAM120权重残基表,空位长度罚分12和空位罚分4。

[0057] 使用与上述那些类似的技术在具有或不具有允许的空位的情况下确定两个序列之间的同一性百分比。在计算同一性百分比时,通常只计数完全匹配。

[0058] 编码APOE4p、Trem2p或其任一的变体的核酸可以使用公知的方法从天然来源分离、重组产生或通过化学合成技术制得。

[0059] 遗传修饰小鼠

[0060] 根据本发明的实施方式,提供了遗传修饰小鼠,其基因组包括可操作地与启动子连接的编码APOE4p的核酸,其中动物表达编码的APOW4p,并且其基因组包括可操作地与启动子连接的编码Trem2p的核酸,其中动物表达编码的Trem2p。

[0061] 根据本发明的实施方式,提供了遗传修饰小鼠,其基因组包括可操作地与内源性小鼠Apoe启动子连接的编码APOE4p的核酸,其中动物表达编码的APOW4p,并且其基因组包括可操作地与内源性小鼠Trem2启动子连接的编码Trem2p的核酸,其中动物表达编码的Trem2p。

[0062] 可以使用各种方法中的任何一种以将遗传修饰引入小鼠基因组中,从而产生表达APOE4p和Trem2p的遗传修饰小鼠。

[0063] 用于产生根据本发明实施方式的遗传修饰小鼠的基因组编辑方法包括但不限于,定点诱变、基于重组的方法和核酸酶基因组编辑技术,所述小鼠的基因组包括可操作地与启动子连接的编码APOE4p的核酸,其中动物表达编码的APOW4p,并且其基因组包括可操作地与启动子连接的编码Trem2p的核酸,其中动物表达编码的Trem2p。

[0064] 通过在基因组中的预定靶位点处引入离散的突变,基因组编辑技术可以用于改变基因组序列。

[0065] 例如,可以使用基因组编辑技术,用一个或多个不同的核苷酸替代基因组序列中的一个或多个核苷酸,使得基因组序列编码与未改变的基因组序列相比具有单个氨基酸差异或多个氨基酸差异的蛋白质。

[0066] 还可以通过在预定靶位点处将编码序列插入基因组中(“敲入(knock-in)”技术),将基因组编辑技术用于改变基因组序列。

[0067] 如本文使用的,在基因编辑技术的一般情况中,术语“靶位点”和“靶序列”是指限定待编辑的染色体序列的一部分的核酸序列。

[0068] 例如,可以在基因组中的预定靶位点处插入编码蛋白质的核酸序列,使得基因组包括编码蛋白质的核酸,并且蛋白质被表达。核酸序列还可以含有启动子来驱动编码的蛋白质的表达,或在核酸插入到使得其可操作地连接内源性启动子的位置时,编码的蛋白质的表达可以通过内源性启动子来启动。

[0069] 根据本发明的特定的方面,使用基因组编辑技术将点突变引入第一小鼠的基因组中,使得小鼠编码Trem2p,并且通过“敲入”基因组编辑技术将编码人APOE4的核酸插入第二小鼠的基因组的Apoe4基因中,使得第二小鼠的基因组含有“人源化”APOE4基因,如图1中所示,其含有小鼠Apoe4基因的外显子1以及人APOE4基因的外显子2、3和4。然后自然地或通过人工方法使第一和第二小鼠繁殖以获得遗传修饰小鼠,其基因组包括编码APOE4p的DNA序列和编码Trem2p的DNA序列。

[0070] 根据本发明的特定的方面,使用CRISP基因组编辑技术将点突变引入第一小鼠的基因组中,使得小鼠编码Trem2p,并且通过“敲入”CRISPR基因组编辑技术将编码人APOE4的核酸引入第二小鼠的基因组的Apoe4基因中,使得第二小鼠的基因组含有“人源化”APOE4基因,如图1中所示,其含有小鼠Apoe4基因的外显子1以及人APOE4基因的外显子2、3和4。然后使第一和第二小鼠自然地或通过人工方法繁殖以产生遗传修饰小鼠,其基因组包括编码APOE4p的DNA序列和编码Trem2p的DNA序列。

[0071] 例如,通过本文描述的方法,并且如J.P.Sundberg和T.Ichiki编辑,Genetically Engineered Mice Handbook,CRC Press;2006;M.H.Hofker和J.van Deursen编辑,Transgenic Mouse Methods and Protocols,Human Press,2002;A.L.Joyner,Gene Targeting:A Practical Approach,Oxford University Press,2000;Manipulating the Mouse Embryo:A Laboratory Manual,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press;2002年12月15日,ISBN-10:0879695919;Kursad Turksten(编辑),Embryonic stem cells:methods and protocols in Methods Mol Biol.2002;185,Human Press;Current Protocols in Stem Cell Biology,ISBN:978047015180;Meyer等,PNAS USA,2010,vol.107(34),15022-15026;和Doudna,J.等(编辑),CRISPR-Cas:A Laboratory Manual,2016,CSHP中详述的,来进行基因组编辑。

[0072] 用于小鼠遗传修饰的核酸酶技术

[0073] 遗传修饰方法,例如但不限于,核酸酶基因编辑技术,可以用于将所需的DNA序列在预定的靶位点处引入基因组中,如使用归巢核酸内切酶、整合酶、大范围核酸酶、转座子、使用锌指核酸酶(ZFN)的核酸酶介导方法、转录激活因子样(TAL)、成簇的规则间隔短回文重复序列(CRISPR)-Cas或果蝇重组相关蛋白(DRAP)的方法。简而言之,可以使用的遗传修饰方法包括将编码靶向的TALEN、ZFN、CRISPR或DRAP的RNA分子和至少一个寡核苷酸引入ES细胞、iPS细胞、体细胞、受精卵母细胞或胚胎中,然后选择具有所需遗传修饰的ES细胞、iPS细胞、体细胞、受精卵母细胞或胚胎。

[0074] 例如,可以通过核酸酶技术,例如但不限于,CRISPR方法、TAL(转录激活样)效应子方法、锌指介导的基因组编辑或DRAP,将所需的核酸序列在预定的靶位点处引入小鼠的基因组中以产生根据本发明的实施方案提供的遗传修饰小鼠,其基因组包括可操作地与启动子连接的编码APOE4p的核酸,其中动物表达编码的APOE4p,并且其基因组包括可操作地与启动子连接的编码Trem2p的核酸,其中动物表达编码的Trem2p。

[0075] 如本文使用的,在核酸酶基因编辑技术的情况下,术语“靶位点”和“靶序列”是指限定待编辑的染色体序列的一部分的核酸序列,并且核酸酶针对其工程化以识别和结合,提供足够的使结合发生的条件。

[0076] CRISPR-Cas系统

[0077] CRISPR(成簇的规则间隔短回文重复序列)是含有多个短的直接重复序列的基因座,其在约40%的测序细菌和90%的测序古细菌的基因组中发现并且赋予对外源DNA元件的抗性,参见Horvath,2010,Science,327:167-170;Barrangou等,2007,Science,315:1709-1712;和Makarova等,2011,Nature Reviews Microbiology.9:467-477。

[0078] CRISPR重复序列的大小范围为24至48个碱基对。它们通常表现出一定的对偶对称性,这意味着形成诸如发夹的二级结构,但并不是真正的回文。CRISPR重复序列被相似长度的间隔子分隔。

[0079] CRISPR相关(cas)基因通常与CRISPR重复序列-间隔子阵列相关。已经描述了超过四十种不同的Cas蛋白家族(Haft等,2005,PLoS Comput Biol.1 (6) :e60)。cas基因和重复序列结构的特定组合已经用于定义8种CRISPR亚型,其中一些与编码重复序列相关未知蛋白(RAMP)的其他基因模块相关。

[0080] 不同生物体中存在多样的CRISPR系统,并且最简单的一种是来自化脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的II型CRISPR系统:只有单个编码Cas9蛋白的基因和两个RNA,成熟CRISPR RNA(crRNA)和部分互补的反式作用RNA(tracrRNA),是必需的并且对于RNA指导的外源DNA的沉默是足够的(Gasiunas等,2012,PNAS 109:E2579-E2586;Jinek等,2012,Science 337:816-821)。crRNA的成熟需要tracrRNA和RNase III(Deltcheva等,2011,Nature 471:602-607)。然而,可以通过使用含有模拟tracrRNA-crRNA复合物的设计发夹的工程化小指导RNA(sgRNA)来回避这种需求(Jinek等,2012,Science 337:816-821)。由于Cas9的核酸内切酶活性,sgRNA和靶DNA之间的碱基配对引起双链断裂(DSB)。结合特异性通过sgRNA-DNA碱基配对以及与DNA互补区并列的短DNA基序(原间隔子相邻基序[PAM]:NGG)来决定(Marraffini&Sontheimer,2010,Nature Reviews Genetics,11:181-190)。例如,CRISPR系统需要最小两个分子的组,Cas9蛋白和sgRNA,并且因此可以用作非宿主依赖性的基因靶向平台。Cas9/CRISPR可用于位点选择性的RNA指导的基因组编辑(如靶向插入),参见,例如,Carroll,2012,Molecular Therapy 20:1658-1660;Chang等,2013,Cell Research 23:465-472;Cho等,2013,Nature Biotechnol 31:230-232;Cong等,2013,Science 339:819-823;Hwang等,2013,Nature Biotechnol 31:227-229;Jiang等,2013,Nature Biotechnol 31:233-239;Mali等,2013,Science 339:823-826;Qi等,2013,Cell 152:1173-1183;Shen等,2013,Cell Research 23:720-723和Wang等,2013,Cell 153:910-918描述了使用与寡核苷酸组合的CRISPR/Cas9系统的靶向插入。

[0081] TAL(转录激活子样)效应子

[0082] 转录激活因子样(TAL)效应子或TALE(转录激活子样效应子)源自植物病原细菌属黄单胞菌属(*Xanthomonas*),并且这些蛋白质模拟植物转录激活因子和操纵植物转录产物,参见,Kay等,2007,Science,318:648-651。

[0083] TAL效应子含有集中的串联重复序列的结构域,每个重复序列含有大约34个氨基酸,其对于这些蛋白质的DNA结合特异性是关键的。此外,它们含有核定位序列和酸性转录激活结构域,对于综述参见Schornack等,2006,J. Plant Physiol.,163 (3) :256-272;Scholze和Boch,2011,Curr Opin Microbiol,14:47-53。

[0084] TAL效应子的特异性取决于串联重复序列中发现的序列。重复的序列包括大约102bp并且重复序列通常彼此91-100%同源(Bonas等,1989,Mol Gen Genet 218:127-

136)。重复序列的多态性通常位于12和13位处，并且在12和13位处的高变双残基的性质与TAL效应子的靶序列中连续核苷酸的性质之间存在一一对应性，参见Moscou和Bogdanove 2009, Science 326:1501; 和Boch等, 2009, Science 326:1509-1512。两个高变残基称为重复可变双残基(RVD)，由此一个RVD识别DNA序列的一个核苷酸并确保每个TAL效应子的DNA结合结构域可以以高精确性(15-30nt)靶向大的识别位点。在实验上,已经确定了用于这些TAL-效应子的DNA识别的密码,使得位置12和13处的HD序列导致与胞嘧啶(C)的结合,NG结合于T,NI结合于A,C,G或T,NN结合于A或G,而IG结合于T。这些DNA结合重复序列已经装配成具有新的重复序列组合和数量的蛋白质,以形成能够与新序列相互作用并在植物细胞中激活报告基因的表达的人工转录因子(Boch等, 2009, Science 326:1509-1512)。这些DNA结合结构域已经显示出在所有细胞类型的靶向基因组编辑或靶向基因调控领域中具有一般适用性,参见Gaj等,Trends in Biotechnol,2013,31(7):397-405。此外,工程化TAL效应子已经在哺乳动物细胞中显示出与不是天然存在于黄单胞菌属TAL效应或蛋白中的外源性功能蛋白效应子结构域(如核酸酶)相结合来发挥功能。可以通过将TAL与核酸酶,例如,在N-末端或C-末端的FokI核酸酶结构域,结合来构建TAL核酸酶(TALN或TALEN),Kim等,1996,PNAS 93:1156-1160;Christian等,2010,Genetics 186:757-761;Li等,2011,Nucleic Acids Res 39:6315-6325;和Miller等,2011,Nat Biotechnol 29:143-148。已经在大鼠、小鼠、斑马鱼、非洲爪蟾、青鳉、家鼠和人细胞中显示了TALEN通过NHEJ引起缺失的功能性,Ansai等,2013,Genetics,193:739-749;Carlson等,2012,PNAS,109:17382-17387;Hockemeyer等,2011,Nature Biotechnol.,29:731-734;Lei等,2012,PNAS,109:17484-17489;Moore等,2012,PLoS ONE,7:e37877;Stroud等,2013,J.Biol.Chem.,288:1685-1690;Sung等,2013,Nature Biotechnol 31:23-24;Wefers等,2013,PNAS 110:3782-3787。

[0085] 对于TALEN,其制备方法进一步描述于美国专利No.8,420,782、8,450,471、8,450,107、8,440,432和8,440,431,以及美国专利申请公开2013/0137161和2013/0137174中。

[0086] 其他有用的核酸内切酶可以包括,例如,HhaI、HindIII、NotI、BbvCI、EcoRI、Bg/I和AlwI。可以利用某些核酸内切酶(例如,FokI)仅作为二聚体起作用的事实来增强TAL效应子的靶标特异性。例如,在某些情况下,每个FokI单体可以与识别不同的DNA靶序列的TAL效应子序列融合,并且只有当两个识别位点密切接近时,非活性单体才在一起形成功能性酶。通过需要DNA结合来激活核酸酶,可以产生高度位点特异性的限制酶。

[0087] 在一些实施方式中,TALEN可以进一步包括核定位信号或序列(NLS)。NLS是促进TALEN核酸酶蛋白靶向到细胞核中的氨基酸序列,以在染色体的靶序列处引入双链断裂。

[0088] 核定位信号是本领域已知的,参见,例如,Makkerh等,1996,Curr Biol.6:1025-1027.NLS包括来自SV40大的T抗原的序列PKKKRKV (SEQ ID NO:16),Kalderon 1984,Cell,39:499-509;来自核质蛋白的RPAATKKAGQAKKK (SEQ ID NO:17),Dingwallet等,1988,J Cell Biol.,107,841-9。更多实例描述于McLane和Corbett 2009,IUBMB Life,61,697-70;Dopie等,2012,PNAS,109,E544-E552中。

[0089] 切割结构域可以获自任何核酸内切酶或核酸外切酶。可以从其获得切割结构域的核酸内切酶的非限制性实例包括但不限于限制性核酸内切酶和归巢核酸内切酶。参见,例如,2002-2003Catalog,New England Biolabs,Beverly,Mass.;和Belfort等(1997) Nucleic Acids Res.25:3379-3388。切割DNA的其他酶是已知的,例如SI核酸酶;绿豆核酸

酶；胰DNA酶I；微球菌核酸酶；酵母HO核酸内切酶。还参见Linn等(编辑) Nucleases, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993。这些酶中的一种或多种，或其功能性片段，可用作切割结构域的来源。

[0090] 锌指介导的基因组编辑

[0091] 锌指核酸酶(ZFN)用于基因编辑的用途，如通过同源性指导的修复过程的靶向插入，已充分确定。例如，参见Carbery等，2010, Genetics, 186:451-459; Cui等，2011, Nature Biotechnol., 29:64-68; Hauschild等，2011, PNAS, 108:12013-12017; Orlando等，2010, Nucleic Acids Res., 38:e152-e152; 和Porteus&Carroll, 2005, Nature Biotechnology, 23:967-973。

[0092] ZFN-介导过程的组分包括具有DNA结合结构域和切割结构域的锌指核酸酶。这些描述于例如Beerli等(2002) Nature Biotechnol., 20:135-141; Pabo等，(2001) Ann. Rev. Biochem., 70:313-340; Isalan等(2001) Nature Biotechnol. 19:656-660; Segal等(2001) Curr Opin. Biotechnol., 12:632-637; 和Choo等(2000), Curr Opin. Struct. Biol., 10:411-416; 以及美国专利No.6,453,242和6,534,261中。设计和选择针对靶序列的锌指结合结构域的方法是本领域已知的，参见，例如，Sera等, Biochemistry 2002, 41, 7074-7081; 美国专利No.6,607,882; 6,534,261和6,453,242。

[0093] 在一些实施方式中，锌指核酸酶可以进一步包括核定位信号或序列(NLS)。NLS是促进锌指核酸酶蛋白靶向到核中的氨基酸序列，以在染色体中的靶序列处引入双链断裂。核定位信号是本领域已知的。参见，例如，Makkerh等(1996) Current Biology 6:1025-1027。

[0094] 切割结构域可以获自任何核酸内切酶或核酸外切酶。从其可以获得切割结构域的核酸内切酶的非限制性实例包括，但不限于，限制性核酸内切酶和归巢核酸内切酶。参见，例如，2002-2003 Catalog, New England Biolabs, Beverly, Mass.; 和Belfort等(1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388。切割DNA的其他酶是已知的(例如SI核酸酶；绿豆核酸酶；胰DNA酶I；微球菌核酸酶；酵母HO核酸内切酶)。还参见Linn等(编辑) Nucleases, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993。这些酶中的一种或多种(或其功能性片段)可用作切割结构域的来源。如上所述，切割结构域还可以源自酶或其部分，其对于切割活性需要二聚化。

[0095] 两个锌指核酸酶可能是切割需要的，因为每个核酸酶包括活性酶二聚体的单体。或者，单个锌指核酸酶可以同时包括两个单体以形成活性酶二聚体。限制核酸内切酶(限制酶)存在于许多物种中并且能够序列特异性地结合DNA(在识别位点处)和在结合位点处或附近切割DNA。某些限制酶(例如，IIS型)在远离识别位点的位点处切割DNA并具有可分开的结合和切割结构域。例如，IIS型酶FokI在一条链上距其识别位点9个核苷酸处和在另一条链上距其识别位点13个核苷酸处催化DNA的双链切割。参见，例如，美国专利No.5,356,802; 5,436,150和5,487,994; 以及Li等(1992) PNAS 89:4275-4279; Li等(1993) PNAS 90:2764-2768; Kim等(1994) PNAS 91:883-887; Kim等(1994) J. Biol. Chem. 269:31,978-31,982。因此，锌指核酸酶可以包括来自至少一个IIS型限制酶的切割结构域和一个或多个锌指结合结构域，其可以是或不是工程化的。示例性IIS型限制酶描述于例如国际公开WO 07/014275中，将其公开内容以其整体按引用并入本文。其他限制酶也含有可分离的结合和切割结构

域，并且这些也包括在本公开中。参见，例如，Roberts等(2003)Nucleic Acids Res.31:418-420。其切割结构域可与结合结构域分离的示例性IIS型限制酶是FokI。这种特别的酶作为二聚体是活性的(Bitinaite等,1998,PNAS 95:10,570-10,575)。因此，对于本公开的目的，认为锌指核酸酶中使用的FokI酶的部分是切割单体。因此，对于使用FokI切割结构域的靶向双链切割，可以使用各自包括FokI切割单体的两个锌指核酸酶来重建活性酶二聚体。或者，也可以使用含有锌指结合结构域和两个FokI切割单体的单个多肽分子。在某些实施方式中，切割结构域可以包括最小化或防止同型二聚化的一个或多个工程化切割单体，如例如美国专利公开No.2005/0064474、2006/0188987和2008/0131962中所述的，将每篇以其整体按引用并入本文。作为非限制性实例，FokI的位置446、447、479、483、486、487、490、491、496、498、499、500、531、534、537和538处的氨基酸残基是影响FokI切割半结构域的二聚化的所有靶标。形成专性的异二聚体的示例性工程化FokI切割单体包括一对，其中第一切割单体包括在FokI的氨基酸残基位置490和538处的突变，助理第二切割单体包括在氨基酸残基位置486和499处的突变。因此，在一个实施方案中，氨基酸位置490处的突变用Lys(K)替代Glu(E)；氨基酸残基538处的突变用Lys(K)替代Ile(I)；氨基酸残基486处的突变用Glu(E)替代Gln(Q)；和位置499处的突变用Lys(K)替代Ile(I)。具体地，可以通过将一个切割单体中的位置490从E突变成K以及位置538从I突变成K来制备工程化切割单体，以产生称为“E490K:I538K”的工程化切割单体，以及通过将另一个切割单体中的位置486从Q突变成E以及位置499从I突变成L以产生称为“Q486E:I499L”的工程化切割单体。上述工程化切割单体是专性的异二聚体突变体，其中最小化或消除了异常的切割。可以使用合适的方法，例如，通过野生型切割单体(FokI)的定点诱变，来制备工程化切割单体，如美国专利公开No.2005/0064474中所述的。

[0096] 可以将上述的锌指核酸酶工程化以在靶向整合位点处引入双链断裂。双链断裂可以在靶向的整合位点处，或其可以距离整合位点多达1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100或1000个核苷酸。在一些实施方式中，双链断裂可以距离整合位点多达1、2、3、4、5、10、15或20个核苷酸。在其他实施方式中，双链断裂可以距离整合位点多达10、15、20、25、30、35、40、45或50个核苷酸。在再其他实施方式中，双链断裂可以距离整合位点多达50、100或1000个核苷酸。

[0097] DRAP技术已经描述于美国专利No.6,534,643、6,858,716和6,830,910以及Watt等,2006中。

[0098] 任选地，可以将编码蛋白质的核酸序列在基因组中的随机靶位点处插入，使得基因组包括编码该蛋白质的核酸。通常，对于随机插入，核酸序列还含有启动子以驱动插入的核酸的表达。

[0099] 在再一个选项中，将编码所需蛋白质APOE4p、Trem2p或APOE4p和Trem2p两者的核酸插入基因组中Apoe4基因或Trem2基因以外的预定靶位点中。

[0100] 例如，将编码所需蛋白质APOE4p、Trem2p或APOE4p和Trem2p两者的核酸插入已知导致可靠表达的基因组中的预定靶位点(如Hprt或Rosa26基因座)中。

[0101] 根据一些方面，对于预定靶位点处的基因组编辑，靶向构建体使用重组DNA技术制得，并且包括与细胞中的靶向内源基因同源的5'和3'序列。靶向构建体进一步包括选择标记，如新霉素磷酸转移酶、潮霉素或嘌呤霉素，编码所需蛋白质APOE4p、Trem2p或APOE4p和

Trem2p两者的核酸,和任选的多腺苷酸化信号。为了确保编码所需蛋白质的核酸的正确转录和翻译,编码所需蛋白质的核酸与内源性基因座同框,或可以包括剪接受体位点和内部核糖体进入位点(IRES)序列。

[0102] 将这样的靶向构建体转染至所需的细胞类型中,例如但不限于,干细胞,并使用PCR、Southern印迹或测序分析对细胞进行筛选来检测正确的基因组编辑事件。可以通过蛋白质分析,如ELISA或Western印迹分析,进一步分析具有正确基因组编辑事件的细胞的所编码蛋白质的表达。如果需要,可以将编码选择标记的核酸设置成可通过用重组酶(如Cre重组酶或翻转酶(F1p))处理干细胞而去除。重组酶处理后,分析细胞中编码所需蛋白质的核酸的存在。

[0103] 如上所述选择具有正确基因组编辑事件的细胞并注入植入前胚胎中。选择嵌合雄性用于繁育。可以通过毛色(coat color)和遗传分析(如PCR、Southern印迹或测序)分析后代的ES细胞基因组的传递,并可以例如通过蛋白质分析(Western印迹、ELISA)或其他功能性测定来测试所需蛋白质的表达。将表达正确蛋白质的后代杂交以产生对于遗传修饰纯合的小鼠。

[0104] 表达APOE4p和Trem2p的遗传修饰小鼠的产生可以包括将合适的核酸注射或转染至植入前胚胎或干细胞(如胚胎干(ES)细胞或诱导的多能性干(iPS)细胞)中,所述核酸如一个或多个编码所需蛋白质的核酸和/或一个或多个表达构建体,如编码蛋白或RNA(如,用于CRISPR中的cas9或指导RNA)的表达构建体。

[0105] 本文使用的术语“表达构建体”和“表达盒”是指含有所需核酸编码序列和含有一个或多个对于可操作地连接的编码序列的表达需要或期望的调控元件的双链重组DNA分子。

[0106] 如本文使用的术语“调控元件”是指控制核酸序列的表达的一些方面的核苷酸序列。示例性调控元件说明性地包括增强子、内部核糖体进入位点(IRES)、内含子;复制起点、多腺苷酸化信号(pA)、启动子、转录终止序列和上游调控结构域,其有助于核酸序列的复制、转录、转录后加工。本领域普通技术人员能够仅使用常规实验选择和使用表达构建体中的这些和其他调控元件。可以使用公知方法重组或合成产生表达构建体。

[0107] 如本文使用的术语“可操作地连接的”是指在处于与第二核酸的功能性关系中的核酸。

[0108] 在特别的实施方式中,表达盒中包括的调控元件是启动子。如本文使用的术语“启动子”是指可操作地连接于待转录的核酸序列(如编码所需分子的核酸序列)的DNA序列。启动子通常位于待转录的核酸序列的上游,并且提供用于被RNA聚合酶和其他转录因子特异性结合的位点。在特定的实施方案中,启动子通常位于转录以产生所需分子的核酸序列的上游,并且提供用于RNA聚合酶和其他转录因子特异性结合的位点。诱导的启动子可以是组成型启动子或可以提供诱导性表达;并且可以提供遍在、组织特异性或细胞类型特异性的表达。

[0109] 可以包括在表达构建体中的遍在启动子包括,但不限于,3-磷酸甘油酸激酶(PGK-1)启动子、β-肌动蛋白启动子、ROSA26启动子、热休克蛋白70(Hsp70)启动子、编码延伸因子1α(EF1)的EF-1α基因启动子、真核生物起始因子4A(eIF-4A1)启动子、氯霉素乙酰转移酶(CAT)启动子和CMV(巨细胞病毒)启动子。

[0110] 这些和其他启动子是本领域已知的,如Abboud,S.L.等,J.Histochem&Cytochem.,51(7):941-949,2003;Schorpp等,Nucl.Acids Res.,24(9):1787-1788,1996;McBurney,M.W.等,Devel.Dynamics,200:278-293,1994和Majumder,M.等,Blood,87(8):3203-3211,1996中举例说明的。

[0111] 除了启动子,可以包括一个或多个增强子序列,例如,但不限于,巨细胞病毒(CMV)早期增强子元件和SV40增强子元件。

[0112] 其他包括的序列包括内含子序列,如β珠蛋白内含子或通用内含子、转录终止序列和mRNA多聚腺苷酸化(pA)序列,例如但不限于SV40-pA、β-珠蛋白-pA和SCF-pA。

[0113] 表达构建体可以包括对于在细菌细胞中扩增需要的序列,如选择标记(例如,卡那霉素或氨苄青霉素抗性基因)和复制子。

[0114] 对于将表达构建体注入到植入前胚胎中的DNA注入方法,任选地在注入到小鼠植入前胚胎中之前将表达构建体线性化。优选地,将表达构建体注入受精卵母细胞中。在交配次日从超数排卵的雌性收集受精卵母细胞(0.5dpc),并注射表达构建体。将经注射的卵母细胞培养过夜或直接转移到0.5天p.c假孕雌性的输卵管中。

[0115] 用于超数排卵、卵母细胞收获、表达构建体注射和胚胎转移的方法是本领域已知的并且描述于Manipulating the Mouse Embryo:A Laboratory Manual,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press;2001年12月15日,ISBN-10:0879695919中。

[0116] 可以通过DNA分析,如PCR、Southern印迹或测序来测试后代的所需突变或插入序列的存在。可以通过如,例如,ELISA或Western印迹分析来测试携带所需突变或插入序列的小鼠的蛋白质表达。

[0117] 或者,可以使用公知的方法,如电穿孔、磷酸钙沉淀和脂质转染,将核酸或表达构建体转染至干细胞(ES细胞或iPS细胞)中。通过DNA分析,如PCR、Southern印迹或测序,针对所需突变或插入序列的存在来筛选细胞。可以通过蛋白质分析,如例如,通过ELISA或Western印迹分析,针对功能性表达测试具有所需突变或插入序列的细胞。

[0118] 将小鼠ES细胞在针对特定系优化的培养基中生长。通常ES培养基在Dulbecco's改良Eagle培养基(DMEM)中包含15%胎牛血清(FBS)或者合成或半合成的等价物,2mM谷氨酰胺,1mM丙酮酸钠,0.1mM非必需氨基酸,50U/ml青霉素和链霉素,0.1mM 2-巯基乙醇和1000U/ml LIF(对于某些细胞系,加上分化化学抑制剂)。详细描述是本领域已知的(Tremml等,2008,Current Protocols in Stem Cell Biology,第1章:单元1C.4。有关ES细胞分化抑制剂的综述参见Buehr,M.等(2003)。Genesis of embryonic stem cells.Philosophical Transactions of the Royal Society B:Biological Sciences 358,1397-1402。

[0119] 可以将整合了所需突变或插入序列的选定细胞注入植入前胚胎中。对于显微注射,使用胰蛋白酶和EDTA的混合物使ES或iPS细胞成单细胞,然后重悬于ES培养基中。使用精细拉出的玻璃针(20-25微米内径)选择单细胞的组,并使用配备有显微操纵器的倒置显微镜将其通过胚胎的透明带引入并导入胚泡腔(囊胚腔)中。

[0120] 或者,对于胚泡注射,可以将干细胞注入早期胚胎中(例如2细胞、4细胞、8细胞、桑椹胚前或桑椹胚)。可以用激光或压电脉冲钻孔打开透明带来辅助注射。每个胚泡或8细胞阶段的胚胎注射大约9-10个选定的干细胞(ES或iPS细胞),每个4细胞阶段的胚胎注射6-9

个干细胞，而每个2细胞阶段的胚胎注射约6个干细胞。干细胞引入后，允许胚胎在37°C下，在氮气中的5% CO₂、5% O₂中恢复数小时，或培养过夜，然后转移至假孕受体雌性中。在干细胞注射的另一种替代方案中，干细胞可以与桑椹胚阶段的胚胎聚集在一起。所有这些方法都是良好确立的，且可用于生产干细胞嵌合体。对于更详细的描述参见Manipulating the Mouse Embryo:A Laboratory Manual, 第3版本 (A.Nagy, M.Gertsenstein, K.Vintersten, R.Behringer, Cold Spring Harbor Laboratory Press; December 15, 2002, ISBN-10: 0879695919, Nagy等, 1990, Development 110, 815-821; US 7,576,259: Method for making genetic modifications, US7659442, US 7,294,754和Kraus等, 2010, Genesis 48, 394-399。

[0121] 使用本领域已知的方法制备假孕的胚胎受体。简而言之，将6-8周龄的可育雌性小鼠与输精管切除或不育雄性小鼠交配以诱导适合于支持通过手术引入的胚胎的激素状态。在交配后2.5天(dpc)时，将多达15个含有干细胞的胚泡引入非常靠近子宫输卵管交界处的子宫角。对于早期胚胎和桑椹胚，将这些胚胎体外培养成胚泡或根据胚胎阶段植入0.5dpc或1.5dpc假孕雌性的输卵管中。来自植入胚胎的嵌合幼崽在转移后16-20天出生，这取决于植入时的胚胎龄。选择嵌合雄性用于繁育。可以通过毛色和遗传分析(如PCR、Southern印迹或测序)来分析后代的ES细胞基因组的传递。此外，可以通过蛋白质分析(Western印迹、ELISA)或其他功能性测定来分析编码蛋白的表达。

[0122] 本发明的遗传修饰小鼠对于遗传修饰可以是杂合或纯合的。

[0123] 根据本发明的一些方面，本发明的遗传修饰小鼠对于“敲入”人源化APOE4修饰可以是杂合或纯合的，其中小鼠表达APOE4p，并且对于编码Trem2p的突变基因组序列也可以是杂合或纯合的，其中小鼠表达Trem2p。

[0124] 可以将表达APOE4p的纯合遗传修饰小鼠与表达Trem2p的纯合遗传修饰小鼠杂交以根据一些实施方式产生对于两种修饰纯合并且表达APOE4p和Trem2p两者的同类品系。

[0125] 本发明的遗传修饰小鼠可以是各种品系中的任何一种。

[0126] 可以在敲入策略中，将遗传修饰引入分离的小鼠胚胎干(ES)细胞、小鼠诱导多能干(iPS)细胞、小鼠体细胞、受精小鼠卵母细胞(受精卵)或小鼠胚胎的基因组中以产生本发明的遗传修饰小鼠。

[0127] 本发明的实施方式提供在其所有或基本上所有细胞中包括所需遗传修饰的遗传修饰小鼠，以及在其一些而非全部细胞中包括所需遗传修饰的遗传修饰小鼠。

[0128] 根据本发明一些方面的遗传修饰小鼠可以包括一个或多个与人类中迟发性阿尔茨海默氏病的提高风险相关的另外的遗传变体。

[0129] 治疗和化合物的鉴定

[0130] 根据本发明的实施方案提供了筛选用于人阿尔茨海默氏病的推定治疗的方法，其包括：对遗传修饰小鼠施用用于阿尔茨海默氏病的推定治疗，其中小鼠的基因组包括：1)可操作地与启动子连接的编码人APOE4蛋白(APOE4p)的DNA序列；和2)可操作地与启动子连接的编码具有突变p.R47H的小鼠Trem2蛋白(Trem2p)的DNA序列，其中小鼠表达APOE4p和Trem2p，并且其中小鼠具有与本发明的非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的与APOE4p和Trem2p表达相关的一种或多种症状或体征；和评估推定治疗对小鼠的效果。

[0131] 根据本发明的实施方案提供了筛选用于人阿尔茨海默氏病的推定治疗的方法，其

包括:对B6 (SJL) -Apoe^{tm1.1 (APOE*4) AdiujTrem2^{em1Adiuj}/J小鼠施用用于阿尔茨海默氏病的推定治疗,所述小鼠的基因组包括:1)可操作地与启动子连接的编码人APOE4蛋白(APOE4p)的DNA序列;和2)可操作地与启动子连接的编码具有突变p.R47H的小鼠Trem2蛋白(Trem2p)的DNA序列,其中小鼠对于编码APOE4p的DNA序列和对于编码Trem2p的DNA序列是纯合的,和其中小鼠表达人APOE4p和小鼠Trem2p;和评估推定治疗对小鼠的效果。}

[0132] 根据本发明的一些方面提供了筛选用于人阿尔茨海默氏病治疗的化合物的方法,其包括:对本发明的遗传修饰小鼠施用化合物;和评估化合物在治疗与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的与人APOE4p和小鼠Trem2p表达相关的一种或多种症状或体征中的效果。评估化合物在治疗与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的与人APOE4p和小鼠Trem2p表达相关的一种或多种症状或体征的效果优选包括将评估结果与合适的对照进行比较,所述对照例如,但不限于,化合物对对照的效果,如APOE3表达小鼠或野生型小鼠(如携带Apoe基因的小鼠)。

[0133] 这样的体征和症状包括,但不限于,以下任何一种或多种:1)与对照(如APOE3-表达小鼠或野生型对照小鼠)相比,本发明的遗传修饰小鼠的脑中存在明显更多的小胶质细胞;2)与对照(如APOE3表达小鼠或野生型对照小鼠)相比,本发明的遗传修饰小鼠的脑中存在明显更多的淀粉样蛋白斑块;3)与对照(如APOE3表达小鼠或野生型对照小鼠相比),本发明的遗传修饰小鼠的脑中存在明显更多的tau聚集体;4)与对照(如APOE3表达小鼠或野生型对照小鼠)相比,本发明的遗传修饰小鼠的脑中存在明显更多的炎症;5)与对照(如APOE3表达小鼠或野生型对照小鼠)相比,本发明的遗传修饰小鼠的脑中存在明显更多的突触和/或神经元损失;6)与对照(如APOE3表达小鼠或野生型对照小鼠)相比,本发明的遗传修饰小鼠的脑中存在明显更多的认知缺陷;7)与对照(如APOE3-表达小鼠或野生型对照小鼠)相比,本发明的衰老遗传修饰小鼠存在明显更多的虚弱迹象;8)与对照(如APOE3表达小鼠或野生型对照小鼠)相比,本发明的遗传修饰小鼠的脑中存在明显更多的血流不足;9)与对照(如APOE3表达小鼠或野生型对照小鼠)相比,本发明的遗传修饰小鼠的血液、血清或组织中非家族性迟发性阿尔茨海默氏病的一种或多种生物标志物的存在、水平和/或功能的显著差异;10)与对照(如APOE3-表达小鼠或野生型对照小鼠)相比,本发明的遗传修饰小鼠中的脑血管渗漏;和11)与对照(如APOE3-表达小鼠或野生型对照小鼠)相比,本发明的遗传修饰小鼠中一种或多种血液脂蛋白(如高密度脂蛋白和低密度脂蛋白和/或胆固醇)的水平。

[0134] 根据本发明的一些方面,提供了筛选用于人阿尔茨海默氏病的推定治疗的方法,其中评估化合物的效果包括将化合物对遗传修饰小鼠的效果与对照进行比较,其中该小鼠的基因组包括:1)可操作地与启动子连接的编码人APOE4蛋白(APOE4p)的DNA序列;和2)可操作地与启动子连接的编码具有突变p.R47H的小鼠Trem2蛋白(Trem2p)的DNA序列,其中小鼠表达APOE4p和Trem2p,并且其中小鼠具有与本发明的非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的与APOE4p和Trem2p表达相关的一种或多种症状或体征。

[0135] 根据本发明的一些方面,提供了筛选用于人阿尔茨海默氏病的推定治疗的方法,其中评估化合物的效果包括将化合物对B6 (SJL) -Apoe^{tm1.1 (APOE*4) AdiujTrem2^{em1Adiuj}/J小鼠的效果与对照进行比较。}

[0136] 合适的对照包括,例如,将化合物施用于不表达人APOE4p和小鼠Trem2p的小鼠并评估化合物对小鼠的效果。合适的对照包括,例如,将化合物施用于APOE3-表达小鼠或野生

型对照小鼠。野生型对照小鼠可以是不表达人APOE4p和小鼠Trem2p的任何小鼠。合适的对照包括,例如,将化合物施用于野生型C57BL/6J小鼠;和评估化合物对野生型C57BL/6J小鼠的效果。

[0137] 可以通过本领域公知的方法,包括但不限于,免疫测定、核酸测定、组织化学染色、认知测定、体内成像、动物的身体评估、脑血管渗漏评估以及组织和/或细胞的形态评估,来评估与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的与人APOE4p和小鼠Trem2p的表达相关的症状或体征。

[0138] 可以使用的免疫测定是本领域公知的并且包括,但不限于,酶联免疫吸附测定(ELISA),例如但不限于抗原捕获ELISA、间接ELISA、固定细胞ELISA;免疫层析;抗原捕获;流式细胞术;免疫印迹;免疫沉淀;免疫扩散;竞争性免疫测定、免疫细胞化学;放射性免疫测定;以及这些任意的组合。免疫测定的一般细节描述于标准参考文献中,说明性地包括Wild,D.,The Immunoassay Handbook,第3版,Elsevier Science,2005;Gosling,J.P.,Imunoassays:A Practical Approach,Practical Approach Series,Oxford University Press,2005;E.Harlow和D.Lane,Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1988;F.Breitling和S.Dübel,Recombinant Antibodies,John Wiley& Sons,New York,1999;H.Zola,Monoclonal Antibodies:Preparation and Use of Monoclonal Antibodies and Engineered Antibody Derivatives,Basics:From Background to Bench, BIOS Scientific Publishers,2000;B.K.C.Lo,Antibody Engineering:Methods and Protocols,Methods in Molecular Biology,Humana Press,2003;F.M.Ausubel等,编辑,Short Protocols in Molecular Biology,Current Protocols,Wiley,2002;Ormerod,M.G.,Flow Cytometry:a practical approach,Oxford University Press,2000;和Givan,A.L.,Flow Cytometry:first principles,Wiley,New York,2001。

[0139] 根据本发明的一些方面,检测与野生型小鼠相比本发明的遗传修饰小鼠中与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的核酸分析物的核酸测定包括,但不限于,核酸扩增技术,例如但不限于,PCR、RT-PCR连接介导的PCR和phi-29PCR;核酸杂交技术,例如但不限于,Northern印迹、Southern印迹、RNase保护测定、斑点印迹、转录组分析和原位杂交。用于样品中核酸的定性和定量测定的核酸测定详细描述于标准参考文献中,说明性地包括J.Sambrook和D.W.Russell,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press;第3版,2001;F.M.Ausubel等,编辑,Short Protocols in Molecular Biology,Current Protocols,Wiley,2002;C.W.Dieffenbach等,PCR Primer:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,2003;和V.Demidov等,DNA Amplification:Current Technologies and Applications,Taylor&Francis,2004。

[0140] 可以使用的生物标志物测定是本领域公知的,并且包括,但不限于,脑脊液(CSF)、血液、血清或组织中的A_B和tau物质、神经丝、神经丝蛋白、白细胞介素、TNF α 、GM-CSF和可溶性Trem2的测定。

[0141] 可以使用的认知测定是本领域公知的,并且包括,但不限于,空间记忆、短期记忆、长期记忆的测定、执行功能的测定、注意任务(如3和5种选择的串行反应时间测试)、处理速度测试、设定移位测试、逆向学习任务、对象记忆测定、模式识别测定、被动回避记忆测定、

习惯化测定和新对象识别测定、水迷宫测试、恐惧条件化测试，放射状臂水迷宫测试、Y型迷宫测试、T型迷宫测试和野外习惯化测试。

[0142] 可以使用的动物的身体评估方法在本领域中是公知的，并且包括但不限于，与对照(如APOE3-表达小鼠或野生型小鼠)相比，本发明的遗传修饰小鼠中的虚弱指数的评估，作为与正常衰老相比。

[0143] 可以使用的体内成像方法是本领域已知的，并且包括但不限于，磁共振成像(MRI)、计算机断层扫描(CT)成像、X射线、光学成像和超声成像。此类成像技术可用于评估与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病有关的与人APOE4p和小鼠Trem2p的表达相关的一种或多种症状或体征，包括但不限于，淀粉样或tau聚集、异常血流、病理性神经元损失和异常葡萄糖代谢。

[0144] 可以使用本领域公知的方法进行与野生型小鼠相比和/或与临床样品相比，本发明的遗传修饰小鼠的转录组谱、蛋白质组谱和代谢谱中一种或多种的变化的评估。

[0145] 可以通过一种或多种炎症生物标志物的测定来进行炎症的评估，例如但不限于，IL-8、IL-11、TNF- α 、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、TGF- β 、VEGF、单核细胞趋化因子-1、巨噬细胞迁移抑制因子、s100B、纤维蛋白原和干扰素 γ 诱导蛋白10。可以对获自本发明的遗传修饰小鼠和野生型小鼠的样品进行这些测定，如脑、脊髓、血液、血浆、血清、脑脊液或其他相关组织或体液的样品。

[0146] 组织和/或细胞的形态学评估可以包括大体解剖学的身体检查和/或组织和/或细胞的显微镜检查，有或没有组织和/或细胞的组织化学或细胞化学染色。组织和/或细胞的形态学评估可以包括突触和神经元损失的评估。

[0147] 根据本发明的一些方面，提供了筛选用于患有或怀疑患有阿尔茨海默氏病的个体人类受试者中阿尔茨海默氏病的治疗的化合物的方法，其包括将化合物施用于本发明的遗传修饰小鼠；和评估化合物对小鼠的淀粉状蛋白和/或tau的效果，淀粉状蛋白和/或tau与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病相关的人APOE4p和小鼠Trem2p表达相关。根据特定的实施方式，评估化合物对淀粉状蛋白和/或tau的效果包括评估淀粉状蛋白和/或tau的水平和/或定位。根据特定的实施方式，评估化合物对淀粉状蛋白和/或tau的效果包括评估本发明的遗传修饰小鼠中淀粉状蛋白和/或tau聚集物，如评估聚集物大小、数量、位置或其任意两者或多者的组合。

[0148] 脑血管渗漏是非家族性迟发性阿尔茨海默氏病的关键方面，并且本发明令人惊讶和出人意料的发现人APOE4p和小鼠Trem2p的表达导致脑血管渗漏。

[0149] 根据本发明的一些方面，提供了筛选用于患有或怀疑患有非家族性迟发性阿尔茨海默氏病的个体人类受试者中非家族性迟发性阿尔茨海默氏病的治疗的化合物的方法，其包括将化合物施用于本发明的遗传修饰小鼠；和评估化合物对小鼠中脑血管渗漏的效果，脑血管渗漏与非家族性迟发性阿尔茨海默氏病相关的人APOE4p和小鼠Trem2p表达相关。评估化合物对脑血管渗漏的效果包括，但不限于，评估脑血管渗透性。术语“脑血管渗透性”是指血管壁允许小分子或物质(如水、离子、某些药物和营养素)正常移动穿过血管壁而同时作为较大分子和物质(如纤维蛋白原和白蛋白)移动的屏障的能力。术语“脑血管渗漏”是指导致较大分子和物质(如纤维蛋白原和白蛋白)通过血管壁渗漏的血管异常。用于评估脑血管渗漏的测定是本领域公知的，包括使用从本发明的遗传修饰小鼠分离的细胞或组织的体

外测定,和体内测定。脑血管渗漏的体内测定的非限制性实例包括标记的蛋白(例如,Evans蓝标记的白蛋白)的静脉内注射和脑组织中染料标记蛋白质的出现的评估,参见例如,Radu等,An in vivo Assay to Test Blood Vessel Permeability.,J.Vis.Exp.2013,(73):50062。

[0150] 推定治疗可以是任何治疗方式,例如,但不限于,化合物的施用。如本文所用的术语“化合物”不受限制,并且例如包括小分子化学物质和生物物质,如肽、蛋白质、糖蛋白,包括抗体。

[0151] 在以下实施例中说明了本发明组合物和方法的实施方式。提供这些实施例用于说明性目的并且不认为是对本发明组合物和方法的范围的限制。

[0152] 实施例

[0153] 在其基因组中具有编码APOE4p的DNA序列的遗传修饰小鼠的产生

[0154] 小鼠Apoe4基因位于7号染色体上的19,696,109-19,699,166处。制备了APOE4基因靶向构建体,其包含4980bp(SEQ ID NO:9)的小鼠序列(其限定了包括小鼠ApoE外显子1的小鼠5'同源臂)、4292bp(SEQ ID NO:10)的人APOE4序列(其包括编码人蛋白的人基因的外显子2-4)以及在3'UTR之后的另外1.5kb的侧翼人序列以包括任何潜在的调控序列。

[0155] 图1显示了人源化ApoE4构建体的示意图(参见“m/hAPOE靶向载体E4”)。在图1上,外显子4'上方的(C C)表明外显子4中存在分别用于p.R310和R176处的精氨酸的nt,亚型E4。具有(T T)的亚型E2编码C130和C176处的半胱氨酸,而E3(T C)编码C130R处的半胱氨酸和R176位点处的精氨酸。

[0156] 人APOE4外显子4含有编码基因的ApoE4亚型的序列并编码R130和R176处的精氨酸的核苷酸序列。注意到APOE4在蛋白质的N-末端处包括18个氨基酸的信号肽,使得包括信号肽的APOE4是317个氨基酸,并且在APOE2、APOE3和APOE4之间不同的变体氨基酸在位置130和176处。在成熟APOE蛋白(299个氨基酸)中,在APOE2、APOE3和APOE4之间不同的变体氨基酸在位置112和158处。

[0157] 在人序列后插入Frt neo Frt选择盒(FNF盒,SEQ ID NO:11),接着是NdeI限制性位点(为了利于Southern筛选)。FNF盒接着是5166bp的小鼠序列(SEQ ID NO:12),3'同源臂。使用重组工程技术将所得到的14,438bp合成的构建体克隆至pBlight载体中,产生称为mApoe_hAPOE4_PGKneo_mApoE的构建体用于胚胎干细胞中的基因靶向。

[0158] 通过电穿孔将ApoE4基因靶向构建体引入培养的C57B16小鼠品系的胚胎干(ES)细胞中。同源重组产生了保留所有正常小鼠调控序列(加非编码外显子1)与人APOE4蛋白编码外显子2-4的基因座。转染的ES细胞通过Southern印迹筛选以确保正确的靶向。鉴定了正确靶向的三个克隆。将含有正确靶向的基因座的ES细胞引入C57BL/6J胚胎中,并且将所得到的嵌合小鼠与C57BL/6J小鼠杂交。将种系中携带修饰基因座的后代杂交繁殖以产生同源的遗传修饰基因组。所有F1交配产生了具有孟德尔基因座分布的正常同胎生仔数。

[0159] 在其基因组中具有编码Trem2p的DNA序列的遗传修饰小鼠的产生

[0160] 在Jackson实验室,通过将Cas9 RNA(100ng)和单个指导序列(50ng)
GAAGCACTGGGGGAGACGCA(SEQ ID NO:7)与183nt供体寡聚物(40ng)(GCCCTAACACCACGGTGC
TGCAGGGCATGGCCGGCCAGTCCTTGAGGGTGTATGTACTTATGACGCCTGAAGCACTGGGGAGACACAaGC
aTGGTGTGCGCAGCTGGGTGAGGAGGGCCCATGCCAGCGTGTGGTGAGCACACACGGTGTGGCTGCTGGCCTTC

CTGAAGAAGCGG (SEQ ID NO:8) 前核注射至基因中(以防止同源定向修复中再次切割供体序列) 产生了Term2 R47H KI等位基因, 该供体寡聚物含有用于在R47H处的氨基酸序列改变的核苷酸G>A点突变 (SEQ ID NO:8中nt 89处的下划线大写字母“A”) 以及2个沉默突变(赖氨酸AAG>AAA (SEQ ID NO:8中nt 93处的下划线小写字母“a”) 和丙氨酸GCC>GCA (SEQ ID NO:8中nt 96处的下划线小写字母“a”))。CRISPR策略产生了特定的R47H敲入, 以及存在于初始小鼠的Trem2基因中的沉默突变。

[0161] 将种系中携带修饰的等位基因的后代杂交繁殖以产生同源的遗传修饰的基因组。所有F1交配产生了具有孟德尔基因座分布的正常同胎生仔数。所得到的杂交小鼠品系称为C57BL/6J-Trem2^{em1Adpmc}/J(通用名称Trem2 R47H KI (JAX)) 并表达Trem2p。

[0162] 在其基因组中具有编码APOE4p的DNA序列和编码Trem2p的DNA序列的遗传修饰小鼠的产生

[0163] 在这个实施例中, 通过将表达人APOE4p的小鼠近交系B6 (SJL) - Apoe^{tm1.1 (APOE *4) Adpmc}/J (通用名称APOE*4KI (JAX)) 与表达小鼠Trem2p的小鼠近交系C57BL/6J-Trem2^{em1Adpmc}/J(通用名称Trem2 R47H KI (JAX)) 杂交来产生遗传修饰小鼠。所得到的对于人源化APOE4等位基因和小鼠Trem2基因的R47H等位基因两者纯合的遗传修饰小鼠命名为B6 (SJL) - Apoe^{tm1.1 (APOE*4) Adiuj}Trem2^{em1Adiuj}/J (之前称为B6 (SJL) - Apoe^{tm1.1 (APOE*4) Adpmc}Trem2^{em1Adpmc}/J, 缩写为APOE4 X Trem2 R47H (JAX) 小鼠), 通用名称:B6J.APOE4/Trem2, 其表达人APOE4和小鼠Trem2p两者。

[0164] 非家族性迟发性阿尔茨海默氏病的遗传修饰小鼠模型的验证

[0165] 组织采集、蛋白质分离和切片

[0166] 通过腹膜内注射对小鼠施用致死剂量的氯胺酮/甲苯噻嗪, 并用1xPBS (磷酸盐缓冲盐水) 经心灌注。解剖大脑, 并将右半球速冻用于蛋白质分离, 同时将左半球在4%多聚甲醛中于4℃下固定过夜。将固定的半球用1xPBS冲洗, 在4℃下在10%的蔗糖中, 然后30%的蔗糖中低温保护, 且最后包埋在OCT (最佳切割温度化合物) 中。将冷冻的脑以25μm切片, 并保存在-80℃下直至需要。按照制造商的指导, 用Trizol试剂(Life Technologies, Cat# 15596-018) 提取蛋白质。将蛋白质沉淀重悬浮于1:1的8M尿素和1% SDS的溶液中。

[0167] 免疫荧光、硫黄素S染色和图像捕获

[0168] 将冷冻切片用PBT (含1% TritonX-100的1×PBS) 漂洗5分钟(min), 然后在室温(RT) 下与500μL的Liberate抗体结合溶液(L.A.B.-Polysciences Inc.) 溶液一起孵育20分钟用于抗原修复。然后将载玻片在以下一抗中于4℃下孵育过夜: 兔多克隆抗-GFAP (1:200, Dako); 兔多克隆抗-IBA1抗体 (1:250, Wako); 兔多克隆抗-NeuN (1:100, Cell Signaling Inc.); 小鼠单克隆抗非磷酸化神经丝 (1:200, Covance) 和绵羊多克隆抗-TREM2 (1:200, RD Systems)。先前使用Trem2缺陷小鼠验证了绵羊多克隆抗-TREM2抗体。将所有抗体在含有10%正常山羊或驴血清的PBTB (1xPBS, 1% TritonX-100和1% BSA) 中稀释。初次孵育后, 将切片在PBT中清洗3次, 并与适当的二抗(山羊抗兔Alexa Fluor 488/594/633、山羊抗小鼠Alexa Fluor 488、驴抗绵羊Alexa Fluor 594, 1:1000稀释, Life Technologies) 一起在RT下孵育2hr。

[0169] 然后将所有切片用DAPI复染并用Aqua PolyMount (Polysciences) 装片。对于硫黄素S染色, 用IBA1和GFAP染色的切片进一步用1%硫黄素S(以1:1的水:乙醇比率稀释) 复染。

将载玻片在1%硫黄素-S中于室温下孵育8分钟，在80%乙醇、然后95%乙醇和最后dH₂O中洗涤，并装片。使用Leica SP5共焦显微镜或Zeiss Axio Imager.Z2拍摄图像。对于每种抗体，使用相同参数捕获所有图像以进行准确定量。

[0170] 在来自雄性和雌性的切片中进行初步观察。因为性别之间没有明显差异，对至少4-6只雄性小鼠的脑切片进行了细胞数的定量。对于斑块计数，确定每只小鼠的内嗅皮质区中存在的斑块数。对于IBA1+细胞，从每只小鼠的中央脑切片获取（使用20×光学透镜）皮质（内嗅皮质区）或海马的5张等距图像。对于NeuN+细胞，获取（使用20×光学透镜）5张等距图像。对于与斑块相关的IBA1+细胞，对每个脑的8+斑块进行成像（使用20×光学透镜）

[0171] 处理图像并使用ImageJ/FIJI的细胞计数器插件计数20×图像中的所有细胞。单个细胞作为与细胞特异性抗体染色剂（例如，IBA1或NEUN）相关的DAPI染色的细胞核确定。将来自每只小鼠的5张图像中的细胞数合计，并然后在小鼠之间平均。对于所有细胞计数分析对研究人员屏蔽小鼠编号和饮食。

[0172] Western印迹分析证明B6 (SJL) -Apoe^{tm1.1 (APOE*4) Adiuj}Trem2^{em1Adiuj}/J (通用名称：B6J.APOE4/Trem2) 小鼠中人APOE4的表达

[0173] 将脑提取物（~25微克蛋白质）在2x Laemmli样品缓冲液（Bio-Rad 1610737）中稀释，并以4-20%的梯度（BioRad微型蛋白TGX 456-1096）运行和转移至硝酸纤维素膜（InVitrogen IB301001）。

[0174] 印迹用5%脱脂奶粉封闭，并用1:100稀释的人APOE4特异性抗体（Novus Biologicals NBP1-49529）在+4°C下探测过夜。然后在室温下用1:30,000稀释的二抗（Millipore山羊抗小鼠HRP AP191P）探测印迹2小时。印迹使用ECL化学发光试剂（GE Healthcare RPN 2109）在Amersham Hyperfilm ECL（GE Healthcare 28906838）上检测。

[0175] 将对人APOE4变体特异性的抗体（Novus Biologicals NBP1-49529, 1:100稀释）用于探测来自C57BL/6J（缩写为B6J）或B6J.APOE4/Trem2脑组织的约25微克蛋白质的蛋白质印迹。图2是来自B6J.APOE4/Trem2（泳道4-6）的脑组织和对照（WT (B6J)；泳道1-3）脑组织的蛋白质印迹的图像。如图2所示，仅在B6J.APOE4/Trem2小鼠的蛋白质中检测到人APOE4蛋白表达。

[0176] 血液化学显示B6J.APOE4/Trem2小鼠中的代谢改变

[0177] APOE变体已经显示差异地调节脂蛋白和胆固醇代谢。尽管尚不知道APOE4变体增加罹患阿尔茨海默氏病风险的机制，但认为对代谢改变的这些影响起着作用。根据标准血液化学方法，分析了获自12个月大的B6J.APOE4/Trem2（在图3A、3B和3C中缩写为APOE4/Trem2）小鼠和12个月大的C57BL/6J对照小鼠的血液样品中的高密度脂蛋白（HDL）、低密度脂蛋白（LDL）和总胆固醇。

[0178] 将收集时提取的血液储存在冰上的EDTA涂覆的小瓶中，并进一步以5000RPM离心15分钟。取出血浆并等分以在-80°C下长期保存。对血浆等分试样进行以下分析：总胆固醇（mg/dL）、LDL（mg/dL）、HDL（mg/dL）。按照制造商的说明，使用Wako L型HDL-C试剂盒（Wako 99100101）测定了高密度脂蛋白胆固醇（HDL）。按照制造商的说明，使用Beckman Coulter LDL-胆固醇试剂盒（Beckman Coulter OSR6196）测定了LDL。使用Beckman Coulter胆固醇试剂盒（Beckman Coulter OSR6116）测定了总胆固醇。

[0179] 结果分别显示于图3A、3B和3C中。这些数据表明B6J.APOE4/Trem2小鼠在胆固醇代

谢中具有APOE4-依赖性的改变,包括降低的总胆固醇以及降低的LDL和HDL两者的水平。

[0180] 免疫组织化学显示B6J.APOE4/Trem2小鼠中的脑血管渗漏和炎症

[0181] 所有小鼠繁殖和以12/12小时的光/暗周期圈养。根据IACUC批准的程序,对八个月大的小鼠腹腔内注射致死量的氯胺酮/甲苯噻嗪。用1×PBS(磷酸盐缓冲盐水)灌注小鼠,并除去整个脑。将一个半球在+4°C下在4%多聚甲醛中固定过夜。固定后,将组织在1×PBS中冲洗,在+4°C下10%蔗糖中孵育过夜,然后在4°C下30%蔗糖中孵育过夜。然后将脑在最佳切割温度(OCT)化合物中冷冻,并在-80°C下保存直至切片。将冷冻的脑以25微米切片和封装在载玻片上,并保存在-80°C下直至需要进行免疫荧光染色。

[0182] 将载玻片干燥并在4% PFA中后固定。随后将切片在37°C下浸入diH₂O中3分钟,然后转移并在37°C下于0.2N HC1中的0.5mg/mL胃蛋白酶中孵育15min。将切片在diH₂O中再洗涤3分钟,转移到加湿室中,并在1×PBS中洗涤。将切片在1×PBT中于+4°C下在兔抗纤维蛋白(1:200)和山羊抗ColIV(抗胶原蛋白IV)(1:40)中孵育过夜。将载玻片在1×PBT中洗涤,并在浓度为1:1000的合适二抗(驴抗兔IgG 594, 驴抗山羊488)中于室温下孵育2小时。将组织用DAPI复染,和使用Aqua-Poly封片剂(Polyscience Inc)封片。染色在Zeiss AxioImager上以20倍放大倍率成像。

[0183] 对B6J.APOE4/Trem2小鼠的矢状脑切片进行纤维蛋白原(纤维蛋白)的免疫染色以检测脑血管渗漏。图4中显示了7-8个月大的B6J.APOE4/Trem2组织的代表性图像,以及来自对照C57BL/6J(缩写为B6J)小鼠的相似矢状切片的代表性图像。箭头表示脑血管渗漏,如血管外的纤维蛋白免疫染色所示的。通过对胶原蛋白IV(Co1 IV)进行免疫染色来显示血管。

[0184] 血管损伤可能是迟发性阿尔茨海默氏病病理学的关键方面。一些现有的家族性阿尔茨海默氏病小鼠模型已经证明了脑淀粉样血管病(CAA),但是B6J.APOE4/Trem2小鼠是第一个不过度表现家族性阿尔茨海默氏病突变以显示血管缺陷的模型。

[0185] 转录分析证明B6J.APOE4/Trem2模型中基因表达的AD相关变化

[0186] 用NanoString Neuropathology基因组合进行了基因表达分析。该分析测量770个神经病理学相关基因的表达。对于B6J.APOE4/Trem2品系和C57BL/6J(缩写为B6J)品系,对大约八个月大的雌性小鼠进行测定,每个品系三个生物学重复。

[0187] 从脑匀浆中提取总RNA。将组织裂解并在TRIzol试剂(Ambion)中匀浆,然后根据制造商的实验方案(包括任选的DNase消化步骤)使用miRNeasy Mini试剂盒(Qiagen)分离RNA。使用Nanodrop 2000分光光度计(Thermo Scientific)和RNA 6000Nano LabChip测定(Agilent Technologies)评估了样品浓度和质量。

[0188] 根据制造商的说明将RNA与NanoString探针杂交并多重化。将靶基因的计数相对于管家基因进行标准化以说明RNA含量的变异性。使用Nanostring nSolver分析软件分析数据。

[0189] 将B6J.APOE4/Trem2品系中每个基因的表达与对照C57BL/6J品系进行比较,并通过线性回归模型鉴定出具有显著($p<0.05$)表达的基因,如图5所示。图5是与C57BL/6J相比,B6J.APOE4/Trem2中差异表达基因的基因表达热图。表达值是相对于每个基因的C57BL/6J平均值的Log2倍数变化。

[0190] 这个组合中使用的探针检测小鼠Apoe,而不是人APOE。因为在这个模型中,小鼠Apoe已被人类APOE4变体替代,所以未检测到Apoe表达,并且这显示为最强烈下调的转录产

物。

[0191] 差异表达基因的列表含有多个与脑功能和神经变性相关的基因。查询Gene Ontology Biological Process and Panther Pathway注释数据库以鉴定由这些基因代表的过程和途径。相关过程包括,但不限于,表I中显示了由B6J.APOE4/Trem2品系中差异表达的基因代表的途径和过程的结果。值得注意的是,这些相互关联的过程和途径包括许多与神经变性高度相关的过程。

表 I	
过程或途径	基因
阿尔茨海默氏病-淀粉样蛋白分泌酶途径	Pcsk2, Mapk10, Mapk9, Prkcq
5HT2型受体介导的信号传导途径	Slc18a2, Plcb2, Slc6a4, Gng2, Prkcq
通过趋化因子和细胞因子信号传导途径 介导的炎症	Akt3, Gnao1, Plcb3, Arrb2, Il6, Myh10, Gng2
[0192]	化学突触传递的调节
	Cnr1, Stx1a, Arrb2, Unc13a, Cdk5, Calb1, Slc6a4, Gria4
	神经元发育
	Cnr1, Thy1, Mapk10, Hcn1, Cdk5, Chl1, Il6, Mapk9, Myh10, Uchl1
	认知
	Cnr1, Amph, Cdk5, Calb1, Chl1, Slc6a4, Chmp2b
	Akt3, Mapk10, Mapk9, Casp7, Prkcq
老化	Cnr1, Slc18a2, Gnao1

[0193] 本文使用的科学和技术术语旨在具有本领域普通技术人员通常理解的含义。发现这些术语在各种标准参考文献中被定义和使用,说明性地包括J.Sambrook和D.W.Russell, Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press;第3版,2001;F.M.Ausubel编辑,Short Protocols in Molecular Biology,Current Protocols;第5版,2002;B.Alberts等,Molecular Biology of the Cell,第4版,Garland,2002;D.L.Nelson和M.M.Cox,Lehninger Principles of Biochemistry,第4版,W.H.Freeman&Company,2004;Herdewijn,P.(编辑),Oligonucleotide Synthesis:Methods and Applications,Methods in Molecular Biology,Human Press,2004;A.Nagy,M.Gertsenstein,K.Vintersten,R.Behringer(编辑)2002,Manipulating the Mouse Embryo:A Laboratory Manual,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,ISBN-10:0879695919;和K.Turksen(编辑),Embryonic stem cells:methods and protocols in Methods in Molecular Biology,2002;185,Human Press;Current Protocols in Stem Cell Biology,ISBN:9780470151808。

[0194] 序列

[0195] APOE4p的氨基酸序列与编码APOE4p的示例性核酸序列一起显示。

[0196] SEQ ID NO:1: APOE4p(317个氨基酸)

[0197] MKVLWAALLVTFLAGCQAKVEQAVETEPEPELRRQQTEWQSGQRWELALGRFWDYLRLWVQLSEQVQEEL
LSSQVTQELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAEETRARLSKELQAAQARLGADMEDVRGRLVQYRGEVQAMLGQ
STEELRVRLASHLRKLRKLLRDADDLQKRLAVYQAGAREGAERGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATVGSLAGQPLQE

RAQAWGERLARMEEMGSRDRDLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFEPLVEDMQRQWAGLVEK
VQAAVGTSAAPVPSDNH

[0198] SEQ ID NO:2:编码包括18氨基酸信号肽的人APOE4p的人APOE4基因组DNA序列的外显子2、3和4

[0199] ACTGGCCAATCACAGGCAGGAAGATGAAGGTTCTGTGGGCTGCGTGCTGGTCACATTCCGGCAGGTA
TGGGGCGGGGCTTGCCTGGTCCCCCGCTCCTCCCCCTCATCCTCACCTAACCTGGCCCGATTCAAGGCA
GACCCCTGGGCCCTCTCTGAGGCTTCTGTGCTGCTTCTGGCTCTGAACACAGCATTGACGCTCTGGGCTCG
GTTTCCCCATCCTGAGATAGGAGTTAGAAGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGAG
ATGAAGTCTCGCTCTGCGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGGGATCTGGCTCACTGCAAGCTCCGCCTCCAGGTC
CACGCCATTCTCCTGCCTCAGCCTCCAAAGTAGCTGGACTACAGGCACATGCCACCACACCGACTAACTTTTG
TATTTCACTAGAGACGGGTTTACCATGTTGCCAGGCTGGTCTGGAACCTGACCTCAGGTGATCTGCCGTT
TCGATCTCCAAAGTGCTGGATTACAGGCGTGAGCCACCGCACCTGGCTGGAGTTAGAGGTTCTAATGCATTG
AGGCAGATAGTAATACAGACACGGGCAGCTGTGATCTTATTCTCCATACCCCCACACAGCCCTGCCTGGGC
ACACAAGGACACTCAATACATGCTTCCGCTGGCGCGTGGCTCACCCCTGTAATCCAGCACTTGGGAGGCCA
AGGTGGGAGGATCACTTGAGCCCAGGAGTTCAACACCAGCCTGGCAACATAGTGAGACCCGTCTACTAAAAAT
ACAAAAATTAGCCAGGCATGGTGCCACACACCTGTGCTCTCAGCTACTCAGGAGGCTGAGGAGGAGATCGCTGA
GCCAGAAGGTCAAGGTTGCAGTGAACCATGTTCAGGCCGCTGCACTCCAGCCTGGTGCAGAGAGCAAGACCTGTT
TATAAATACATAATGCTTCCAAGTGATTAAACCGACTCCCCCTCACCCCTGCCACCATGGCTCAAAGAACATT
TGTGGAGCACCTCTGTGCCCCTAGGTACTAGATGCCCTGGACGGGTCAGAAGGACCCGTACCCACCTGAACTT
GTTCCACACAGGATGCCAGGCAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAGAGCCGAGCCGACTGCCAGACCCG
AGTGGCAGAGCGGCCAGCGCTGGGAACCTGGCACTGGACTGGTCGCTTGGATTACCTGCCTGGTGCAGACACTGTCT
GAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTCCAGGTACCCAGGAACCTGAGGTGAGTGTCCCCATCCTGGCCCTTGAC
CCTCTGGTGGCGCTATACCTCCCCAGGTCCAGGTTCTAGCTGCCCTGTCGCTAAGTCTTGGGGGGCTGGGT
CTCTGCTGGTTCTAGCTCCTCTTCCATTCTGACTCCTGGCTTCTAGCTCTGGATATCTCTCTCAGCTTTATAT
AGAGACAGAGAGATGGGGTCTCACTGTGTTGCCAGGCTGGTCTTGAACCTCTGGCTCAAGCGATCCTCCGCCTC
GGCCTCCAAAGTGCTGGATTAGAGGCATGAGCCACCTGCCGGCCTCTAGCTCCTCTGCTCTGCCCTG
CCCTCTGCATCTGCTCTGCATCTGCTCTGCTCTGCTCTCTGCTCTGCCCTCTGCCCTCTCTCTCTCTGG
TCTCTCTGGCTCATCCCCATCTGCCCGCCCCATCCAGCCCTCTCCCGCCCTCCACTGTGCGACACCCCTCCGC
CCTCTGGCCGCAGGGCGCTGATGGACGAGACATGAAGGAGTTGAAGGCCTACAAATCGGAACCTGGAGGAACAACT
GACCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGCCGGCAGGCCGGCTGGCGCG
TGGAGGACGTGCGCGGCCCTGGTGCAGTACCGCGGCCAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTG
CGGGTGCCTCGCCTCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATGACCTGCAGAAGCGCT
GGCAGTGTACCGGCCGGGCCCGAGGGCGCCAGCGCGGCCCTAGCGCCATCCGCGAGCGCCTGGGGCCCTGG
TGGAACACGGCCCGTCCGGGCCCCACTGTGGCTCCCTGCCAGGGCTACAGGAGGCCAGGCCCTGG
GGCAGCGGCTGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGAGCCGGACCCGCGACCCGCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGT
GGCGAGGTGCGCGCCAAGCTGGAGGAGCAGGCCAGCAGATACGCCCTGCAAGGCCAGGCCCTCCAGGCCCTCA
AGAGCTGGTCAGGCCCTGGTGAAGACATGCAGGCCAGTGGCCGGCTGGTGGAGAAGGTGCAGGCTGCCGTG
GGCACCAGGCCGCCCTGTGCCAGCGACAATCACTGAACGCCAGGCCATGCGACCCACGCCACCCCC

GTGCCTCCTGCCCTCGCGCAGCCTGCAGCGGGAGACCCGTCCCCGCCCCAGCCGTCCCTGGGGTGGACCCTAGTTAATAAAAGATTCACCAAGTTCACGCA

[0200] SEQ ID NO:3:Trem2p(249个氨基酸,R47H突变)

[0201] MGPHQFLLLITALSQALNTVLQGMAGQSLRVSCTYDALKHWGRHKAWCRQLGEEGPCQRVVSTHGVWLLAFLKKRNGSTVIADDTLAGTVITLKNLQAGDAGLYQCQSLRGREAEVLQKVLVEVLEDPLDDQDAGDLWVPEESSSFEGAQVEHSTSQRVSSCGSPLAYHLPPLSKESRDLLPTHLHSSPPGLRSPEQVSCSQHPLGCGQGQAEAGNTCGQRAGLWPRCWAPTSDFPHWTRRYVREF

[0202] SEQ ID NO:4:编码Trem2p的突变的小鼠基因组DNA序列(1056个核苷酸)

[0203] ACTTCAAGGGAAAAGCAAGATCTGCACAAGGTCCCCCTCCGGCTGGCTGGCAAAGGAAAGGTGCCATGGGACCTCTCCACCAGTTCTCCTGCTGCTGATCACAGCCCTGTCCAAGCCCTAACACACCACGGTGCTGCAGG GCATGGCCGGCCAGTCCTTGAGGGTGTACTGACTTATGACGCCTGAAGCAGTGGGGAGACACAAaGCaTGTT TCGGCAGCTGGGTGAGGAGGGCCATGCCAGCGTGTGGTGAGCACACACGGTGTGGCTGGCCTTCCTGAAGA AGCGGAATGGGAGCACAGTCATCGCAGATGACACCCCTGCTGGAACCGTCACCATCACTCTGAAGAACCTCCAAGGCC GGTGACGCGGGCCTTACCAAGTGTCAAGGTCTCGAGGCCAGAGGCTGAGGTCTGCAGAAAGTACTGGTGAGGT GCTGGAGGACCCCTAGATGACCAAGATGCTGGAGATCTCTGGTCCCCGAGGAGTCATCGAGTTCGAGGGTGC CAAAGTGAACACAGCACCTCCAGGCAGGTTTACCTGTGGGTACCTCTAGCCTACCACCTTCCTCCTCTTCCAAG GAATCAAGAGACCTCCTCCCACCCACCTCATTCTCCTCCTGGCCTGCGTCTCCTGAGCAAGTTCTGCAG CCAGCATTCTGGCTGTGGCCAGGGCAGGCAGAACGCCAGGTTACCTGTGGTCAGAGGGCTGGACTGTGCCAA GATGCTGGGACCAACTCAGATCCTCACTGGACCCGGAGGTACGTGAGAGAATTCTGAGTGGAGGAGAACTACAG CTTAAGTCCAGCCAGGAGTCATCCAGCCTGCTGCTCTCCCTCCACCAAGACTCTGTTCTGCTACTTTG CTTCAGAGGCCCTCTGCCTCAAGCCCACCTATCCTGGGAGCAGGAATACTGGTGTACATCTGTGTTGAGTGG GAAGACAGCTGGATGGTTGTCTGTCAACTTCTGCACTTGGACATTAAACATTCTCACACACCAA

[0204] SEQ ID NO:5:Trem2p(249个氨基酸,小鼠野生型蛋白,无R47H突变)

[0205] MGPHQFLLLITALSQALNTVLQGMAGQSLRVSCTYDALKHWRRKAWCRQLGEEGPCQRVVSTHGVWLLAFLKKRNGSTVIADDTLAGTVITLKNLQAGDAGLYQCQSLRGREAEVLQKVLVEVLEDPLDDQDAGDLWVPEESSSFEGAQVEHSTSQRVSSCGSPLAYHLPPLSKESRDLLPTHLHSSPPGLRSPEQVSCSQHPLGCGQGQAEAGNTCGQRAGLWPRCWAPTSDFPHWTRRYVREF

[0206] SEQ ID NO:6:编码Trem2小鼠野生型蛋白的小鼠野生型基因组DNA序列(1056个恒氨酸)

[0207] ACTTCAAGGGAAAAGCAAGATCTGCACAAGGTCCCCCTCCGGCTGGCTGGCAAAGGAAAGGTGCCATGGGACCTCTCCACCAGTTCTCCTGCTGCTGATCACAGCCCTGTCCAAGCCCTAACACACCACGGTGCTGCAGGGC ATGGCCGGCCAGTCCTTGAGGGTGTACTGACTTATGACGCCTGAAGCAGTGGGGAGACGCAAGGCCCTGGTGTGCGCAGCTGGGTGAGGAGGGCCATGCCAGCGTGTGGTGAGCACACACGGTGTGGCTGGCCTTCCTGAAGAAC GGAATGGGAGCACAGTCATCGCAGATGACACCCCTGCTGGAACCGTCACCATCACTCTGAAGAACCTCCAAGCCGGT GACCGGGGCTCTACCAACTGTCAAGGTCTCCAGGCCAGAGGCTGAGGTCTGCAGAAAGTACTGGTGGAGGTGCT GGAGGACCCCTAGATGACCAAGATGCTGGAGATCTCTGGTCCCCGAGGAGTCATCGAGTTCGAGGGTGC CAAAGTGAACACAGCACCTCCAGGCAGGTTACCTGTGGTCACCTCTAGCCTACCACCTTCCTCCTTTCCAAGGAA TCAAGAGACCTCCTCCCACCCACCTCATTCTCCTCCTGGCCTGCGTCTCCTGAGCAAGTTCTGCAGCCA GCATCCTCTGGCTGTGGCCAGGGCAGGCAGAACGCCAGGAAACACCTGTGGTCAGAGGGCTGGACTGTGCCAAGAT

GCTGGGCACCAACTCAGATCCTCACTGGACCCGGAGGTACGTGAGAGAATTCTGAGTGGGAGGAGAACTACAGCTT
AACTCCAGCCAGGAGTCATCCAGCCTGCATGCTCTCCCCTCCACCAAGACTTCTGTTCTGCTACTTTGCTT
CAGAGGCCGCTCTGCCTCAAGCCCACCTATCCTGGGAGCAGGAATACTGGTGTACATCTGTGTTGAGTGGGAA
GACAGCTGGATGGTTCTGTCAACTTCTGCACTTGACATTAAACATTCTCCACACACCAA

[0208] SEQ ID NO:7:Trem2 CRISPR指导

[0209] GAAGCACTGGGGAGACGCA

[0210] SEQ ID NO:8:Trem2修复寡聚物(183个核苷酸),其含有用于R47H处的氨基酸序列改变的核苷酸G>A点突变(这个寡聚物序列中的核苷酸89处)以及2个沉默突变(赖氨酸AAG>AAA(这个寡聚物序列的核苷酸93处)和丙氨酸GCC>GCA(这个寡聚物序列的核苷酸96处),其进入基因中以防止同源定向修复中供体序列的再切割:

[0211] GCCCTCAACACCACGGTGCTGCAGGGCATGGCCGGCAGTCCTGAGGGTGTATGTACTTATGACGC
CTTGAAGCACTGGGGAGACACAAaGCaTGGTGTGGCAGCTGGGTGAGGAGGGCCATGCCAGCGTGTGGTGAGC
ACACACGGTGTGGCTGCTGGCCTCTGAAGAACGG

[0212] SEQ ID NO:9:包括在插入小鼠基因组中的“人源化”小鼠ApoE构建体中的5'同源臂(4980个核苷酸:小鼠Apoe4外显子1,和小鼠Apoe4内含子2序列的757个核苷酸)。

[0213] CCTGTATCTCAGGGTTGAGAGGGAAAGAGAGTGGGTTCCAGATGCCACATCCCTGATACCTAGTCC
TCACCCAACCTCTGCTCTCCTAGTGAACAACAGGGTGGCTACAGTAACGCTGGCCAGGCAGGCATGCATGCGACGTA
TTACCACAAAGCCAGTGACCAGGTGAGCCGGAGGGAGCGCCTAGCTGTGGTCCCAGGCTGGTTGCTGGTGCAGT
TGGTATGCCAGGAGTCCTAATGGCCACTCACATGTGTGCCGGCCCTCTCTCCCCCAGCTGCAGGTGGTGTGGA
GTTGAGGCCAGCACAGGATGCAGGACACCAGTGCCTCCTGGTATCAGCTGGACCTGCCAAGGCCAACTTCC
TTTTAAAGGTAAAGGAAGGCCCTAGCTCCCTGGGAACAGGCCAGATAAGACTCAGCTGTGTGGTAGAGTC
CATGGAAATAGGGAGGTTGAACATGTGCTGGTAGTGGCGGGACTCTGTGCAGCTCAAATTACTCTGGTGG
CTTGTCAAACAGTGGGCTCCTACCCCTGGCATGTTAGTACATGTTGGGGCCTCGCTTAAGCCCTCTCTCCAT
TCCCATCTAGCAAGCTCTGGCCCTCCCCACTCACTCTTACCTACTGGAGTTCTTCTATTGTGTGATGAAACAC
TATGATGGTAAACAGCTAGGGAGCAAAGAGGTTATGTTGGTTACAACCTCAGGTGGCATGCCCTACACTGAGGA
GAAGATGGGCAGGACTCAGCAGAAAGCTGAAGGCAAGCTGATGCAGAAGGCCCTGTGGAGTGCTGCTGTGGCT
TGCTCCTATGGCTTCCTCAGCCTGCTTATAGCCTCCGGACCATTAGCCCAGGGTGCCCACTGAAAATAATCTG
GGTACTCCCACATCAACTTAGAAAGTGCCTACAGGCTGCCAGCTGCCAGCTAATGGAGACATATGTATTG
AGGTTCCCTCAGCTGGATCTTGTAGTTCAAGACCAGCCTGGTCTACAGAGCAAGTTCTGGACAGCCAGGGCTACC
CAGAGAAACCTGTCTCAGAAAAGAAAAAGAAAAGGTGGGGTGGGTGACTAGCTGTATAAAACTAGCCAG
CACAGCAGGGAAAGCTGTGAATAGTGACAGCCAGGTTCAGAACCTCATTCTGCGCAGTGACATGGTTGTCAAGC
CTGGCGGTGTTGAGCCACTTAAAGGGTTGCTGTGATGGTCTGGAGTGGCCTGGTTGTGACTTAGGACATACGGGT
CCGGTGTGGCTACCATAGAGATGGTGGCCAGGCACATCAAGCCACCCAGTCTGCCCCGCTCTGGCCCAAGGC
TCTGTGAACAGTAACCTGGATCGTGGCGCCACGCTGGAGAAGAAGCTCCGCCCTGCCAGACTGTCCCTCTG
GCCCTCCTGAACCACCCCAAGAATAAGTCCCTGTGTGGCTCCGGCTCACCATCGGCTGAGCCCTCTGTCCCTCC
TCTGCAGACCACATCGCTGGCGGCTGCCCTCCCTCCTCCCTCTCTTGGGGTGGGCAGTGGAGGGGG
ACCTCCCATGCCCAAGGATCCCCAGCGCCAGGGGACAGTGCCTGGGGCCTGGGTCCCAGGGAGGAGTCCTGGGAT
CTGAAGGGCATTGATTGTGAGCGCCAGGCAGAGGCGCAGAGGCGGCTGTACACAGGCTCAGAAAGGAAAGACTTG
ATGTCCTCCTGAGGGCAGCAGAGGAGCGCCAGGCCCTGTCACCTCCCCCTCCACCCCTCCATAGAAATCATGTT

ATAAGTTATGGAAAACCGGGACATTTACAGAAAAAAAAACTTAAAAACAAAAATACGTGGAAAAAAAT
AGGATCTGGGAGGCCTCGGTTCTCCAGTTGACATGGTGCCAGCAGGCCGCCAGGGTCAGAAAGCACA
GCAGCACCAAGCAGTTAGAGAAAGCTTGGCCAGGCATGGTCACACCCTGCTCTGGGACTTACACTGCCGAA
CATCAGAGGCCTGGCCTACCCAGGAGGGTGGCTCCAGGTCACTGCCCTGTGCACTGGCCCCGAGAGCTGGCAG
AGGACTTTGCTCTGTAAACAGGGTGGGGCAGGGAGACGGGCTCAGGAGCCTCCGTCCCACAGGGCTGAGG
TGGTAGCTTGCTGACTTCTCCAGTGGGAAGGTCAAGGGTCTCAGAAACTCAGGAAGAACGGAGTCCCTGGA
AGTCAGCACAATAAGGAAAGTTACTCTGGGAGGAACGGGCCCTAGCACCTCCCAGGCTAACAGGAAATGTCAA
GTTGTTTGTAAATTGTTGAAGATGTAGCTCTGGCCTCACGTGTCAGGAGGTGCTGCTGGGTTCCCTA
TAGTGCTTTCCGTGAGGCCTGCTCTGGGTGTGCGATAAGGGCCTCAGATTGGCTCTGCATCTCACTGCTGCACC
TCATGGCATCCAAGGAAGCAAAGACTCACGATGAACGGTCAGTGTCTAGACCGCAGCACTAACGACCCCTCTCA
CTGCCTGGGCTGGAGATGGAGCTGGCCTAGCAACCCATGAAAATCATCTCACCAACACCAGTCCTGCCAGTGT
TTCTGAAGCCAAGCTAACAGGCCTGGCCTGGCCAGGCACCCGTACGTACCCCTGGAGGCCAGGTGTTCCGCCTC
TGCCCATCCTGCAGAATCATGTTGCCGTCTGGTGCCAACACTGCTATGTGGCTCTCCTGCCATCACAG
CTGGGAACAGGGAACCTGTGCAAGGCAGTCTAGCAAGCTGCTGTGGCTCTGAGCCCCTGCTACCTGAC
TTCCCAGGTACAATGGCTTCCCACTTTGGGGTTTGTGTTGGTTTTTTGTTCAAGACAGGGT
TTCTCTGTAGTCCTGCGTCTGGAACTCACTTGTAGACCAGGCTGGCCTCCAACTCAGAAATTCAACCTGCCT
CTGCCTCCAAGTGCTGGGATTATGGATTAAAGGCATGTGCCACCACGCCAGCTGGCTTCCACTTTAGCCAG
GACTTCATTCTATTACCTGAGCTCGGGATCTCCTGCCAGCTTGCAATGGCTAGCACTATAGACCCATGTTCC
AGTGAATGACTTATGGCTGTCTTTTTTTTTTTATGTGCATTAGTGTGCTGCATGTATG
CCTCGTGAGGGTAGCAGATCTGGTGTACAGTTGAGCTGCTGTGGTGTGCGATTGAACTAGTCCT
GTGAAATGCAGTCAGTGCCTAACCTCTGAGTCATCTCCAGCTCTGCTCTGCTTTATGAGGAAAAGAA
AAGAGAAGTGGCTTGAGAGTGAAAATGCACATGCAGGGTGACACCTGCAGTCCCAGCATGCTACAGCAGAGGCA
GAAGGACCTTGTGGGTAGAGGGCAGCCTGAGAATCTTATCTAAAACACTTTAAAATGTGCTGTAGGGT
AGCTCTCCCTCCAAGGTGACACATCTGGCAATGCCAGAAACAGATCAGGAGCATCACGCTGGTTCCAGGG
CTTGGCTTAATGTATGGCTCAAACCCATGGGAGCCACCACTGAACAGCTCCTGAAGGAACGGACAGTCCCAG
CCTTGGGAATGGAAAGAGTTCACCTGTGGTGGAGGAATCAACAACGAGGGATCCCAGAACACGATCTCACCCAGA
AGCTGAGCCTCTAGCCCCACCCACCCATTCCATTAGGCTGCCAGCTTTCTTACAATGCACCAGACCCCG
CGGGGAAAGGAAGGAGCGGTTCTCAGTGGCCAGTACCAAGGCCTGGATTATTCAATGAGGTGTCGCTCCCTTG
TTGGCGGGGGAGGGAGCGGGGGTACAAGGCATCCAAACTCCACCTCTTCCCTGCCCTGCTGTGAAGGGGAG
AGAACAAACCGCCTCGTACAGGGGCTGGCACAGCCGCCCTAGCCCTGAGGAGGGGGAGCACAGGGAGTCCT
ATAATTGGACCGGTCTGGATCCGATCCCCTGCTCAGACCCCTGGAGGCTAAGGACTTGTGGAAGGAGCTGGTAA
GACAAGCTGGCTGGGATTCAACCCAGGGACCTGGTAGGATGTGGCTGGAACCTTGAGATCCCCGGAGTCCAG
GAAACAGGCACAAGAATGGAAAAGCAGGCAGCACGATAGAAGTCTGGGGACAAACTAAGGACTCGAGGTAAC
GCCTTGCCAGAGTCAGAGCAGGTGGAGGGTTACCTCCAGGAAGGAGTACGGGACTGCGGTGCACGGCGTACCGG
CTCAACTAGGAACCACCTATGGCAAAACTCGGGATGAGCCTTAGGCTGCTTTATATAACACCTACTGATTT
CCATCACAGTCCCCAAGTAACCCGGACTGGTTCAAACCTGTGGCTCCTCATGGCTGAGCTCCCTAAGTCTGTAGTT
GTGGGAGGGTACCACTCGCAGGGATGGAGGACGATTAAAATCGTGTAAATTACACAAATGGAAAGCAGGACT
TAGCCGGGAAGAAAGAGGAATGTAAGCTGGACCACCCGCTGGCCCTGTGAAGTGGAAATTGAACCTAGGAGGAG
GAGCTGGAATTGGCAGCGATCCACCCGGGTGCCAGATAGCGAACCTGGCAAGGGAGGTAAACAGACCTT

TGGGAAGAGCGGGTGCTCTGTTTGAGATGTTGTGATGGCTCACAGATCTGAGAAGGAAAGATGGGTTCTCTGG
GTGGCCGGAGTCCTCCACCCCCGCCCTGGTGTCAAAGACAATTTCCTCCGAG

[0214] SEQ ID NO:10:包括在插入小鼠基因组中的“人源化”小鼠ApoE构建体中的DNA序列,其包括人APOE4基因的外显子2、3和4和外显子4之后的人APOE4基因的1500个核苷酸3'UTR(4292个核苷酸)。

GGCACCGGCCGCCCTGTGCCAGCACAATCACTGAACGCCAAGCCTGCAGCCATGCGACCCCAGGCCACCC
 GTGCCCTCCTGCCCTCGCGCAGCCTGCAGCGGGAGACCCCTGTCCCCGCCAGCCGTCCCTGGGTGGACCCTAGT
 TTAATAAAGATTACCAAGTTCACGCATCTGCTGGCCTCCCCCTGTGATTCCTCTAACAGCCCCAGCCTCAGTTCT
 CTTCTGCCACACACTGGCACACAATTCTCAGCCCCCTCCTCCATCTGTGTCTGTGTATCTTCTCTGC
 CCTTTTTTTTTAGACGGAGTCTGGCTCTGTACCCAGGCTAGAGTGCAGTGGCACGATCTGGCTACTGCA
 ACCTCTGCCTCTGGGTTCAAGCGATTCTGCTGCCTCAGTAGCTGGGATTACAGGCTCACACCACACCCGGCTA
 ATTTTGATTTTAGTAGAGACGAGCTTCACCATGTTGCCAGGCAGGTCTCAAACCTCTGACCAAGTGATCCAC
 CCGCCGGCCTCCAAAGTGCTGAGATTACAGGCCTGAGCCACCATGCCGGCCTGCCCCCTTTCTTTAGGG
 GGCAGGGAAAGGTCTCACCTGTACCCGCCATCACAGCTACTGCAGCCTCCACCTCTGGACTCAAGTGATAAGT
 GATCCTCCCGCCTCAGCCTTCCAGTAGCTGAGACTACAGGCGCATACCACTAGGATTAATTGGGGGGGGGTGG
 TGTGTGTGGAGATGGGCTGGCTTGTGGCAGGCTGATGTGAATTCTGGCTCAAGCGATACTCCCACCTTG
 GCCTCCTGAGTAGCTGAGACTACTGGCTAGCACCACACCCAGCTTTATTATTATTGTAGAGACAAGGTCTC
 AATATGTTGCCAGGCTAGTCTAAACCCCTGGCTCAAGAGATCCTCCGCCATGGCCTCCAAAGTGCTGGATT
 CCAGGCATGGGCTCCGAGCCGGCCTGCCAACTTAATAACTTGTCTCAGAGTGCACCTCAAATGACCTG
 AGATTGGTGCCTTATTCTAAGCTATTTCTGCTGTCATTATTCTCCCCCTCTCCCTCAGTCT
 ATCTGATATCTGCCTCCCTCCCACCCACCCACTGCACCCATCCCACCCCTCTGTCTCCCTGTTCTCAGGAGAC
 TCTGGCTTCCTGTTCTCCACTCTATCTTATCTCTCCCTACGGTTCTTCTCTCCCGCCTGCT
 TGTTCTCCCCAACCCCTTCATCTGGATTCTCTGCCATTCAAGTTGGTTGAGCTCTGCTCTCCGGT
 TCCCTGAGCTAGCTGCCCTCACCCACTGTGAACGGGTTCCCTGCCAACCCCTCATTCTCTTCTTCTTC
 TTTTTTTTTTTTTTTTTGAGACAGAGTCTGCTCTGTTGCCAGCCTGGAGTGCAGTGGTGA
 ATCTTGGTCACTGCAACCTCCACTCCCAGATTCAAGCAATTCTCCTGCCCTCAGCCTCCAGAGTAGCTGGATTAC
 AGCGTGTCCCACCACACCCGACTAATTTGTATTTGGTAGAGACAAGGCTCGGCATTGTT

[0216] SEQ ID NO:11:在核苷酸9272和9273之间插入“人源化”小鼠ApoE构建体中的Frt PGKneo Frt盒,接着是NdeI限制性酶位点(CATATG) (1834个核苷酸),以允许在这个盒的重组酶介导的去除之前的选择。

[0217] GAAGTTCCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACCTCAGGTCTGAAGAGGAGTTACGTCCAGCCAAGCTAG
 CTTGGCTGCAGGTCGCGAAATTCTACCGGGTAGGGAGGCAGCTTCCCAAGGCAGTCTGGAGCATGCGCTTAC
 AGCCCCGCTGGCACTGGCGCTACACAAGTGGCCTCTGGCCTCGCACACATTCCACATCCACCGTAGGCCAAC
 CGGCTCCGTTCTTGGTGGCCCTCGGCCACCTCTACTCCTCCCTAGTCAGGAAGTTCCCCCGCCCCGAG
 CTCGCGTGTGCAGGACGTGACAAATGGAAGTAGCACGTCTCACTAGTCTCGTGCAGATGGACAGCAGCCTGAGCA
 ATGGAAGCGGGTAGGCCTTGGGCAGCGGCCAATAGCAGCTTGCTCCTCGTTCTGGCTCAGAGGCTGGAA
 GGGGTGGGTCCGGGGCGGGCTCAGGGCGGGCTCAGGGCGGGCGCCGAAGGTCTCCGGAGGCCGGCA
 TTCTGCACGCTCAAAAGCGCACGTCGCGCTGTTCTCCTCTCCTCATCTCCGGCTTCTGACCTGCAGCCT
 GTTGACAATTATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGACAAGGTGAGGAACAAACCATGGATCGGC
 CATTAACAACAGATGGATTGCACCGCAGGTCTCCGGCCCTTGGCTGGAGAGGCTATTGGCTATGACTGGCACAAC
 AGACAATCGGCTGCTGATGCCCGCTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGCGCCGGTTCTTGTCAAGACCGAC
 CTGTCGGTGCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGCCACGACGGCGTCTGCGC
 AGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAGGGACTGGCTGCTATTGGCGAAGTGCCTGGGAGGATCTCCTGT
 CATCTCACCTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATGGCTGATGCAATGCCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCT

ACCTGCCATTGACCACCAAGCGAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCA
GGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGCTCGGCCAGCGAACTGTTGCCAGGCTCAAGGCAGGCATGCCGACG
GCGATGATCTCGTCGTACCCATGGCGATGCCATGCCAATATCATGGTGAAAATGGCGCTTCTGGATT
ATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGCCACTCCGTGATATTGCTGAAGAGCT
TGGCGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTCTTACGGTATGCCGCTCCGATTCGAGCGCATGCCCTATC
GCCTTCTTGACGAGTTCTCTGAGGGATCAATTCTAGAGCTCGTGATCAGCCTGACTGTGCCCTAGTTGC
CAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCCGTGCCCTTGACCCCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCCCTTAATA
AAATGAGGAAATTGCATCGCATTGCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGG
GGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGATGCGGTGGCTATGGCTCTGAGGCGAAAGAACCGAC
TGGGCTCGACTAGAGCTTGCAGACCTCTGAAGTCCATTCTAGAAAGTATAGGAACCTCCATATG

[0218] SEQ ID NO:12:包括在插入小鼠基因组中的“人源化”小鼠ApoE构建体中的3'同源臂(5166个核苷酸)。

[0219] AACACCTGATGGAGAAGATAACAGGCCCTGTGGTACCAACCCCACATCACCCAGTGGCCAGGAGAA
TCAATGAGTATCCTCTCGTCAACAAACATCCATATCCAGGCCAGGTGGCCCTGCTCAAGCACCTCTGGC
CCTCTGGTGGCCCTTGCTTAATAAGATTCTCGAGCACATTCTGAGTCTGTGAGTGATTCCAATCAGCTTCAGC
CTCAGTTATTGTTTGCCTACCTAGCACACATTCCATGCCCTGTCACTATCTGTAGAGGGAGGTGGTTTG
AGCAATAGAAATGAAGCCTAGGACCTAGCAACACATAAAAGAACAGTGTACTACCACTGAGCCACGCCACAGCCCT
CACTGGGGATTCTAGGCAGGGCTCTACCACTGAGCCACCCGAGCCCTCACTGGGAATCATATCTACCACTGA
GTCACGCCCTCCAGCCCTCACTACGGAAATTCTAGTCAGTAGCTCTACCACTGAGCCACACCCACAGCCTCTGGG
GCTCTCACCGCCCTACCCCTGGATTCTAGGCATGGCTATTACAGATGGTGTGAGCCACCATGTGGTTGC
TTATGTATAAGGTACACTGCAGCTGTCTCAGGCGTCAGGTCCATTACAGATGGTGTGAGCCACCATGTGGTTGC
TGGGAATTGAACTCAGGACTTATAGAAGAGTAGTCAGTGCTCTTAACGTGCTGAGCCATCTCCAGCACCCAGTACA
GGCTCTTCTATTTAGCTATATCCACCCCTCTTTAGTCTGAAATAGGATCTCAACTGATTTCCCTGACTCCCTC
TAGCCTAGTTGGTCTTGAATATTGAATCTTGTGTTCAAATCAATCTACAGGAACGTGAGAAAGGCATGTACCA
CTTCATGTGGTCAGTGGCTACTTCCCAACTTCCAAAGCACCCACTGCACAGCTATGCCCTGAATCAATCAAC
ATGTAAGAGACCAGGGTCGCCAGGCAGGTGTTACTTTCTGGTTCTATCTCTCCCTCCGCTCTAGTCTTAC
TGACACCCCTCCCTGCCCTGTCTCTCCCTTTCCCTAGGCTCTTCTGGCTCTGGCTCTGGTTCTGATCC
TCTGTTATCTCACCCCTCCCGGGTTCTTGCTCTGGCCTTGGTGGCGTTCTACGGTTCTACGTGGCTTT
TGGAACCTCAGCCTTCTCCCTGCTCTGAAGTTAGCTGGATCTTGCTCCCTGGTCATGGGCCTTAGCCCA
TTCTTCTCCCTGCCTGTGCATGCCCTTGACTTCCAGCAAGTGTATGGAGAGTAGTCAGGCTGGGAC
ACAAAACCATTCTCCCCATGCTCTGGTACTCAAAGGGCATGGTGAAGCTGGAGAGCCCTGGCTGGCTTCCCT
CCCACCCCTCAGTCTCAGGGACTCAGCAGGGCTCCACTAACAGGGCAGGCTAGGCTTGAGCTGTCTGGG
TCGGGCCAAGGCTTCAGAACTCAACTGCCCTGGCACACCCAGGCCTGCAGCTTCCCTGGCATCAAACACTCAGCAT
TATCTGGAGGCAGGCACCACTCCACACATGACTCATTAGGCCAATGAGAAGATGGTGGCTAGTGACAGG
GCCCTAGACAGCCACACTCATGCCCAAGGGCTAGGAGCACACCCAGGCCACTACTCTCAAATATCAAGATG
AGGGAGAGTATAGAGGAATGTCTCCCTGAAAGACCTGAATTATTGTGATGTTATTGAGGCCACGCTGGCCTG
ACTCTGAACCCCTCCTGCCATCTCAAAGGCTGAAATTACAGGTTCGCGCACTAGGCTATCTGAGAACTTAGTT
AATTCTACAGAAGAGAGTTGTTCACTGGTTGAAACGAGGCCTCGTGTACCCAGAGCTACTCTTGCAACTC
ACTGTAGAGCCAAGGATGACCTGAACTCTGGTCTTCCGGCTCCGAGTCCTCGGTACTGGTAGACAATGTGTGAT

CCTAACCCCCAGTTATGTGGTGTATAACAGATGGCATCCAGGGTTCTGCATGGACAGGTCAACCAAC
CGAGCCACATCCTCCTCATCATCACTTGTGTTGGTTCAATCCAGAGCTCATGGAGCCAAGCTGGCCTCA
ATCTATATAACCAAGACTGTGCCTGGTCTCCTGTCTACCTAACAAATGATGGTGGGATGCAGGGATGTACAACC
AGGAGCAGGCCCTACTCTAAACGAAGAAGGAACCCCACCTCCCTGTGGCAGACCTGGAGGTGGGCAAGGACCA
CAGAAAGACATTACAGAACTAGGATCGTAAGGAAGTCATGGAGGCCAGCCTGTTGTACAGAGTGAGTTCCAGGACA
GCCAGGGCTACACAGAGGAAAACAAGAAGGAAAAAAAAAAAAAGAAGTGAATGACTAGCAGTTAGAACCT
TTAGCTGTGTGCTTCCGTACCTACCTGTGGCACAGGAAGCCCTGTTGCTAAGAGTAGGATGACACTGGAAGCAC
CAAGCACTGGCAGAGTAAGGGGAAATCTGTTACATTATTCAAGATGGCGCTTGAGGACTGAGCAGGACTCCTTC
AAGAAGCAAAGGGTCAGGCCTGGGCCACAGGGACTGGAAGCTAGCTAGCGCCGAGTTGGCCCCAGAGATGTCGC
AACCCAGCCAGGGTCGAGAATCTGTTCCACCCCTTCACAACCATCCCCCTGTTGTCGTCCCCACCCCCACCCCC
CGCCCCAAGTACACGTGGGTTGCAGGGCACCAGGCCAGCAACCTAGAGTCTGGGCCCTAGCCACCAGCTGCC
AGGGGTCAGTGTGGTCAATGACAGCTCTGGGGAGGGGGGAGAAGGGCCTGGACTCTAGCCTGAGAGAAAAGGA
TGTGTGGAAGGAGGGGCAGGGAGGCAAGTTAGGGCCTGCAGGGCCTAGGAGGCCACAAGACCTAAAAACGG
GGGAAGGGGGTTGTGCCAGTTAGGGACACTATGGAGCTTGCAAGCTAAGAGGCTCTAGCTTGTGAGTTT
GAAGTGTGAGATGCAAAGGCATTGGAGGTGAAGGGAGGCCAGGGTGCAGCATCCGGACAGAATGTGAGCTGAGGCT
CCTGGTCAAGGAGAAGGTAGAGAAGAGCTAACCTGAGGATGCAAGATCCCAGAGAGCATCCGAGGAGGTCTG
AGGGTGTGAGATGCAAAGGCATTGGAGGTGAAGGGAGGCCAGGGTGCAGCATCCGGACAGAATGTGAGCTGAGGCT
GGAGATCAATGAGATTGGAAGTGAGGATGCTGACAGTGACGAGCCTGGCCTAAATAAAAGCCTGGATGTGG
ATCTGCCTCCAGTATGACCAGAATGACAGAAGAGAGTGGCTGGTGTGGTGTGGTGCATGCCTGTAATCC
CAGCAACTCACTAGAGAGGCAGAGGCAGGAGCATCACAATTCCAGGCCAGCAAAAGCCTATGTAAAAAAA
AAAGAGAAAAAGAAAAAGAAAAAGTAGGTGGACACAGAGACAAGGGGAGGCTCAGGGGAGGGCACCAGCTG
CTCCGCCCCCTCCCAACCGTTAACCTCTGTGCAGGATCCTCCACCGCCATGGCCTCCTGAGAGATCCTTAGA
TCCAGGTTAGTGCATAGGAAAGTGTCCCCCACTACCTACAGCTAAGGGATTGGGTGGTGGATCATGGTGAGGG
CGGTGGTAATACTAGCGATGTCCCCGCTACCGTGCCTGCCTCCAGGGTCCCAACCAGGATGAGGCTC
TTCATCGCTTCTGCTGATTGTGGTGTAGCCATGACCTTGGAAAGGTAAGAAAGAGCCTTGGAAAGGTAAGAAA
GAGGCTTGGAAAGTGTGAAGTTGGCCTTGTGCCTGGGCCAGGCTTAGAAGACCCCTCGAGGAGGGCTTGAGGTCCC
TTCTGTGTATCATTCACTACCGCCCTCCCATCGTCCCCATCCACCTGCCAGGTGCCTTATTTGTGTC
GTGGGTGCTGAAGGAGGCAACTCTGTCCAGAAAAGACGCAGTAACCAATGACCTAGGATACCACCTTGGAAATTGG
CTAATCTCCTAGAAGGGCGGAGCGTAAAACAAGGAGGTGAGAGGTGCAGTAAATCAAGTGTCCAATACCCCTCC
CCCATGCTAATGAGTTGCTCGCAACCCCTCGCGGCAGGCCAGCCCCGCCAGGCCGGGGGATTGTCCCGA
ACATTGGAGAGCATACCGATAAAACTGAAGGAGTTGGAACACTTGGAAAGACAAGGCCGGCAGCCATTGAACA
TATCAAACAGAAGGAAATTGACCAAGACCCGGTTAGGACCTTCAGGGCACGGCGGGTGTGTGTGTG
CGTGCAGCGCGCCGTGTAAAAGCCCTAGCAGACAGTCCACACTGACACAATGGGAAACTGCACCAGAGTGT
TTGACACTTCCCTGAAGTCATAGAACTGTATCTGAAGTCATTGAACGGATGTCAAAGTGCTCGTACTGTGAGAC
AGCCGGTGTAACTCCCAGCCAAGTGTAGAGATGTTCCAAGTCCTAGTGAAGGCCAGCTAGGGCGCTGACTGGT
TAGGACAGACCCCTGACCCCTCCCTGTGACTCTTGAGACAGGTGACTTGAGTCTCCGAGACAGAGAAAGAATGT
AGGAGAGTTGGGCAGGGCACAGCAGAAGCTGTACAGGCCTGGCTCTGCAGTTACACTGGCAAAGAGAGGATTA
GGGCATGCTGGTTAAGAACTAGCCAGGCAGTGGTGGCGCACACCTTGATCCCAGTATTGAGGCAGAGGCAGG

CAGATCTTTGAGGCCAGCCTGATTGGAGCTAGTCTAGGAAAGCCAGGGCTACACAGAGAAACCCGTCTCAACA
CCACCACCACCCCC

[0220] SEQ ID NO:13:野生型氨基酸序列-小鼠Apoe

[0221] MKALWAVLLVTLTGCLAEGEPEVTDQLEWQSNQPWEQALNRFWDYLRWVQTLSQVQEELQSSQVTQE
LTALMEDTMTEVKAYKKELEEQLGPVAEETRARLGKEVQAAQARLGADMEDLRNRLGQYRNEVHTMLGQSTEEIRAR
LSTHLRKMRKRLMRDAEDLQKRLAVYKAGAREGAERGVSAIRERLGPLVEQGRQRTANLGAGAAQPLRDRAQAFGDR
IRGRLEEVGNQARDRLEEVREHMEEVRSKMEEQTQQIRLQAEIFQARLKGFEPIVEDMHRQWANLMEKIQASVATN
PIITPVAQENQ

[0222] SEQ ID NO:14:氨基酸序列-人APOE3

[0223] MKVLWAALLVTFLAGCQAKVEQAVETEPEPELRRQQTEWQSGQRWEALGRFWDYLRWVQTLSEQVQEEL
LSSQVTQELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAEETRARLSKELQAAQARLGADMEDVCGRLVQYRGEVQAMLGQ
STEELRVRLASHLRKLRKLLRDADDLQKRLAVYQAGAREGAERGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATVGSLAGQPLQE
RAQAWGERLRARMEEMGSRTRDRLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFEPPLIEDMQRQWAGLVEK
VQAAVGTSAAPVPSDNH

[0224] SEQ ID NO:15: APOE4p (299个氨基酸)

[0225] KVEQAVETEPEPELRRQQTEWQSGQRWEALGRFWDYLRWVQTLSEQVQEELLSSQVTQELRALMDETMK
ELKAYKSELEEQLTPVAEETRARLSKELQAAQARLGADMEDVRGRLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVRLASHLRKLRK
RLLRDADDLQKRLAVYQAGAREGAERGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATVGSLAGQPLQERAQAWGERLRARMEEMGS
RTRDRLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFEPPLIEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH

[0226] 本说明书中提及的任何专利或出版物都以相同的程度通过引用并入本文，如同每个单独的出版物被具体地和单独地表示通过引用并入一样。

[0227] 本文描述的遗传修饰小鼠和使用方法目前是优选实施方式的代表，是示例性的，并且不意图限制本发明的范围。本领域技术人员将想到其中的改变和其他用途。可以进行这样的改变和其他使用而不脱离权利要求中所示的本发明的范围。

序列表

<110> The Jackson Laboratory
<120> 表达人 APOE4 和小鼠 Trem2 p.R47H 的遗传修饰小鼠

<130> 47JLA12252W0

<150> 62/474, 358
<151> 2017-03-21

<160> 17

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 317
<212> PRT
<213> 智人

<400> 1

[0001]

Met Lys Val Leu Trp Ala Ala Leu Leu Val Thr Phe Leu Ala Gly Cys
1 5 10 15

Gln Ala Lys Val Glu Gln Ala Val Glu Thr Glu Pro Glu Pro Glu Leu
20 25 30

Arg Gln Gln Thr Glu Trp Gln Ser Gly Gln Arg Trp Glu Leu Ala Leu
35 40 45

Gly Arg Phe Trp Asp Tyr Leu Arg Trp Val Gln Thr Leu Ser Glu Gln
50 55 60

Val Gln Glu Glu Leu Leu Ser Ser Gln Val Thr Gln Glu Leu Arg Ala
65 70 75 80

Leu Met Asp Glu Thr Met Lys Glu Leu Lys Ala Tyr Lys Ser Glu Leu
85 90 95

Glu Glu Gln Leu Thr Pro Val Ala Glu Glu Thr Arg Ala Arg Leu Ser
 100 105 110

Lys Glu Leu Gln Ala Ala Gln Ala Arg Leu Gly Ala Asp Met Glu Asp
 115 120 125

Val Arg Gly Arg Leu Val Gln Tyr Arg Gly Glu Val Gln Ala Met Leu
 130 135 140

Gly Gln Ser Thr Glu Glu Leu Arg Val Arg Leu Ala Ser His Leu Arg
 145 150 155 160

Lys Leu Arg Lys Arg Leu Leu Arg Asp Ala Asp Asp Leu Gln Lys Arg
 165 170 175

[0002] Leu Ala Val Tyr Gln Ala Gly Ala Arg Glu Gly Ala Glu Arg Gly Leu
 180 185 190

Ser Ala Ile Arg Glu Arg Leu Gly Pro Leu Val Glu Gln Gly Arg Val
 195 200 205

Arg Ala Ala Thr Val Gly Ser Leu Ala Gly Gln Pro Leu Gln Glu Arg
 210 215 220

Ala Gln Ala Trp Gly Glu Arg Leu Arg Ala Arg Met Glu Glu Met Gly
 225 230 235 240

Ser Arg Thr Arg Asp Arg Leu Asp Glu Val Lys Glu Gln Val Ala Glu
 245 250 255

Val Arg Ala Lys Leu Glu Glu Gln Ala Gln Gln Ile Arg Leu Gln Ala
 260 265 270

Glu Ala Phe Gln Ala Arg Leu Lys Ser Trp Phe Glu Pro Leu Val Glu

275

280

285

Asp Met Gln Arg Gln Trp Ala Gly Leu Val Glu Lys Val Gln Ala Ala

290

295

300

Val Gly Thr Ser Ala Ala Pro Val Pro Ser Asp Asn His

305

310

315

<210> 2

<211> 2792

<212> DNA

<213> 智人

<400> 2

actggccaat cacaggcagg aagatgaagg ttctgtggc tgcgttgctg gtcacattcc 60

[0003] tggcaggtat gggggcgggg cttgctcggt tccccccgct cctccccctc tcatacctcac 120

ctcaacctcc tggcccccatt caggcagacc ctggggccccc tcttctgagg cttctgtgct 180

gcttcctggc tctgaacagc gatttgacgc tctctgggcc tcggttccc ccattcattga 240

gataggagtt agaagttgtt ttgttgtgt tgtttgtgt tgttgtttg ttttttgag 300

atgaagtctc gctctgtcgc ccaggctgga gtgcagtggc gggatctcggt ctcaactgcaa 360

gctccgcctc ccaggtccac gccattctcc tgcctcagcc tcccaagtag ctgggactac 420

aggcacatgc caccacaccc gactaacttt ttgttatattt cagtagagac ggggtttcac 480

catgttggcc aggctggct ggaactcctg acctcaggtg atctgcccgt ttcatctcc 540

caaagtgctg ggattacagg cgtgagccac cgcacctggc tgggagttag aggtttctaa 600

tgcattgcag gcagatagtg aataccagac acggggcagc tgtgatcttt attctccatc 660

accccccacac agccctgcct gggcacaca aggacactca atacatgctt ttccgctggg 720

cgcgggtggct cacccctgta atcccagcac ttggggaggc caaggtggga ggatcacttg	780
agcccaggag ttcaacacca gcctgggcaa catagtgaga ccctgtctct actaaaaata	840
caaaaattag ccaggecatgg tgccacacac ctgtgctctc agctactcag gaggctgagg	900
caggaggatc gctttagcccc agaaggtcaa gttgcagtg aaccatgttc aggccgctgc	960
actccagcct gggtgacaga gcaagaccct gttataaat acataatgct ttccaagtga	1020
ttaaaccgac tccccctca ccctgccac catggctcca aagaagcatt tgtggagcac	1080
cttctgtgtg cccctaggta cttagatgcct ggacggggtc agaaggaccc tgaccacact	1140
tgaacttgtt ccacacagga tgccaggcca aggtggagca agcggtggag acagagccgg	1200
agcccggact gcgcgcaggc accgagtggc agagcggcca gcgcgtggaa ctggcactgg	1260
gtcgcttttg ggattaccctg cgctgggtgc agacactgtc tgagcagggtg caggaggagc	1320
tgctcagctc ccaggtcacc caggaactga ggtgagtgtc cccatcctgg cccttgacc	1380
[0004]	
tcctgggtggg cggctataacc tccccaggc caggtttcat tctgcccctg tcgctaagtc	1440
ttggggggcc tgggtctctg ctgggtctag cttcctcttc ccatttctga ctcctggc	1500
tagctctctg gatatctctc tctcagcttt gtctctctct cttcccttct gactcagtct	1560
ctcacactcg tcctggctct gtctctgtcc ttcccttagct cttttatata gagacagaga	1620
gatggggtct cactgtgttg cccaggctgg tcttgaactt ctgggctcaa gcgcattcc	1680
cgccctggcc tcccaaagtg ctgggattag aggcatgagc caccttggcc ggcctcctag	1740
ctccttcttc gtctctgcct ctgcctctg catctgtct ctgcattgt ctctgtctcc	1800
ttctctcgcc ctctgccccg ttccctctct ccctcttggg tctctctggc tcattccat	1860
ctcgcccccc ccatcccagc cttctcccc gcctcccact gtgcgacacc ctcccccct	1920
ctcgccgca gggcgctgat ggacgagacc atgaaggagt tgaaggccta caaatcgaa	1980
ctggaggaac aactgacccc ggtggcggag gagacgcggg cacggctgtc caaggagctg	2040

caggcggcgc aggccggct gggcgccgac atggaggacg tgcgcggccg cctggtcag	2100
taccgcggcg aggtgcaggc catgctcgcc cagagcacccg aggagctgcg ggtgcgcctc	2160
gcctcccacc tgcgcaagct gcgttaagcgg ctccctccgcg atgccatgaa cctgcagaag	2220
cgcctggcag tgtaccaggc cggggcccgc gagggcgccg agcgcggcct cagcgcac	2280
cgcgagcgcgc tgccccccct ggtggaacag ggccgcgtgc gggcccccac tgtggctcc	2340
ctggccggcc agccgctaca ggagcgggcc caggcctggg gcgagcggct gcgcgcgcgg	2400
atggaggaga tggcagccg gaccgcgac cgcctggacg aggtgaagga gcaggtggcg	2460
gaggtgcgcgc ccaagctgga ggagcaggcc cagcagatac gcctgcaggc cgaggccctc	2520
caggccgcgc tcaagagctg gttcgagccc ctggtggaag acatgcagcg ccagtggcc	2580
gggctggtgg agaagggtgca ggctgccgtg ggcaccagcg ccgcctgtt gcccagcgcac	2640
aatcaactgaa cggcgaagcc tgcagccatg cgacccacg ccacccctgt cctcctgcct	2700
[0005] ccgcgcagcc tgcagcggga gaccctgtcc ccgcggcagc cgtcctcctg gggtgaccc	2760
tagtttaata aagattcacc aagttcacg ca	2792

<210> 3

<211> 249

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有 R47H 点突变的小鼠 Trem2 蛋白

<400> 3

Met	Gly	Pro	Leu
1			

His	Gln	Phe	Leu

Arg Val Ser Cys Thr Tyr Asp Ala Leu Lys His Trp Gly Arg His Lys
 35 40 45

Ala Trp Cys Arg Gln Leu Gly Glu Gly Pro Cys Gln Arg Val Val
 50 55 60

Ser Thr His Gly Val Trp Leu Leu Ala Phe Leu Lys Lys Arg Asn Gly
 65 70 75 80

Ser Thr Val Ile Ala Asp Asp Thr Leu Ala Gly Thr Val Thr Ile Thr
 85 90 95

Leu Lys Asn Leu Gln Ala Gly Asp Ala Gly Leu Tyr Gln Cys Gln Ser
 100 105 110

[0006] Leu Arg Gly Arg Glu Ala Glu Val Leu Gln Lys Val Leu Val Glu Val
 115 120 125

Leu Glu Asp Pro Leu Asp Asp Gln Asp Ala Gly Asp Leu Trp Val Pro
 130 135 140

Glu Glu Ser Ser Phe Glu Gly Ala Gln Val Glu His Ser Thr Ser
 145 150 155 160

Arg Gln Val Ser Ser Cys Gly Ser Pro Leu Ala Tyr His Leu Pro Pro
 165 170 175

Leu Ser Lys Glu Ser Arg Asp Leu Leu Pro Thr His Leu His Ser Ser
 180 185 190

Pro Pro Gly Leu Arg Ser Pro Glu Gln Val Ser Cys Ser Gln His Pro
 195 200 205

Leu Gly Cys Gly Gln Gly Gln Ala Glu Ala Gly Asn Thr Cys Gly Gln
 210 215 220

Arg Ala Gly Leu Trp Pro Arg Cys Trp Ala Pro Thr Ser Asp Pro His
 225 230 235 240

Trp Thr Arg Arg Tyr Val Arg Glu Phe
 245

<210> 4

<211> 1056

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码具有 R47H 点突变的小鼠 Trem2 蛋白的 DNA

[0007] <400> 4
 acttcaaggg aaaagcaaga tcttcaccaa ggtccctcc ggctggctgc tggcaaaggaa 60
 aaggtgccat gggacctctc caccagttc tcctgctgct gatcacagcc ctgtcccaag 120
 ccctcaacac cacggtgctg cagggcatgg ccggccagtc cttgagggtg tcatgtactt 180
 atgacgcctt gaagcactgg gggagacaca aagcatggtg tcggcagctg ggtgaggagg 240
 gcccatgcca gcgtgtggtg agcacacacg gtgtgtggct gctggccttc ctgaagaagg 300
 ggaatggag cacagtcatc gcagatgaca ccattgctgg aaccgtcacc atcactctga 360
 agaacctcca agccggtgac gcgggcctct accagtgtca gagtctccga gcccggagg 420
 ctgaggtcct gcagaaagta ctggtgagg tgctggagga ccctcttagat gaccaagatg 480
 ctggagatct ctgggtcccc gaggagtcat cgagttcga gggtgcccaa gtgaaacaca 540
 gcacccctcag gcaggttca tcctgtgggt cacctctagc ctaccacattt cctccctttt 600
 ccaaggaatc aagagacctc cttcccaccc acctccattt ttctccctt ggcctgcgtt 660

ctcctgagca agtttcttc agccagcatc ctctgggctg tggccaggg caggcagaag	720
ccgggaacac ctgtggtcag agggctggac tgtggccaag atgctggca ccaacttcag	780
atcctcactg gaccggagg tacgtgagag aattctgagt gggaggagaa ctacagctta	840
agtccagcca ggagtcaatc cagcctgcat gctctcccct cctccaccaa gacttctgtt	900
tctgctactt ttgcttcaga ggccgcctct gcctcaagcc cacctatcct gggagcagga	960
atactggtgt gtacatctgt gttgagtggg gaagacagct ggatggttgt ctgtcaactt	1020
ctgcactttg gacattaaac attctccaca caccaa	1056

<210> 5
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 5

[0008]

Met Gly Pro Leu His Gln Phe Leu Leu Leu Ile Thr Ala Leu Ser			
1	5	10	15

Gln Ala Leu Asn Thr Thr Val Leu Gln Gly Met Ala Gly Gln Ser Leu		
20	25	30

Arg Val Ser Cys Thr Tyr Asp Ala Leu Lys His Trp Gly Arg Arg Lys		
35	40	45

Ala Trp Cys Arg Gln Leu Gly Glu Glu Gly Pro Cys Gln Arg Val Val		
50	55	60

Ser Thr His Gly Val Trp Leu Leu Ala Phe Leu Lys Lys Arg Asn Gly			
65	70	75	80

Ser Thr Val Ile Ala Asp Asp Thr Leu Ala Gly Thr Val Thr Ile Thr		
85	90	95

Leu Lys Asn Leu Gln Ala Gly Asp Ala Gly Leu Tyr Gln Cys Gln Ser
 100 105 110

Leu Arg Gly Arg Glu Ala Glu Val Leu Gln Lys Val Leu Val Glu Val
 115 120 125

Leu Glu Asp Pro Leu Asp Asp Gln Asp Ala Gly Asp Leu Trp Val Pro
 130 135 140

Glu Glu Ser Ser Ser Phe Glu Gly Ala Gln Val Glu His Ser Thr Ser
 145 150 155 160

Arg Gln Val Ser Ser Cys Gly Ser Pro Leu Ala Tyr His Leu Pro Pro
 165 170 175

[0009] Leu Ser Lys Glu Ser Arg Asp Leu Leu Pro Thr His Leu His Ser Ser
 180 185 190

Pro Pro Gly Leu Arg Ser Pro Glu Gln Val Ser Cys Ser Gln His Pro
 195 200 205

Leu Gly Cys Gly Gln Gly Gln Ala Glu Ala Gly Asn Thr Cys Gly Gln
 210 215 220

Arg Ala Gly Leu Trp Pro Arg Cys Trp Ala Pro Thr Ser Asp Pro His
 225 230 235 240

Trp Thr Arg Arg Tyr Val Arg Glu Phe
 245

<210> 6

<211> 1056

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 6

acttcaaggg aaaagcaaga tcttgaccaa ggtccctcc ggctggctgc tggcaaaggaa 60

aagggtgccat gggacctctc caccagttc tcctgctgct gatcacagcc ctgtcccaag 120

ccctcaaacac cacggtgctg cagggcatgg ccggccagtc cttgagggtg tcatgtactt 180

atgacgcctt gaagcactgg gggagacgca aggccctggtg tcggcagctg ggtgaggagg 240

gcccatgcca gcgtgtggtg agcacacacg gtgtgtggct gctggccttc ctgaagaagc 300

ggaatgggag cacagtcatc gcagatgaca cccttgctgg aaccgtcacc atcactctga 360

agaacctcca agccggtgac gcgggcctct accagtgtca gagtctccga ggccgagagg 420

ctgaggtcct gcagaaaagta ctggtgagg tgctggagga ccctctagat gaccaagatg 480

ctggagatct ctgggtcccc gaggagtcat cgagttcga gggtgcccaa gtgaaacaca 540

[0010] gcacctccag gcagggttca tcctgtgggt cacctctagc ctaccacctt ctcctcttt 600

ccaaggaatc aagagacctc cttcccaccc acctccattc ttctcctcct ggcctgcgtt 660

ctcctgagca agtttcttgc agccagcatc ctctggctg tggccaggg caggcagaag 720

ccgggaacac ctgtggtcag agggctggac tgtggccaag atgctggca ccaacttcag 780

atccctactg gaccggagg tacgtgagag aattctgagt gggaggagaa ctacagctt 840

agtccagcca ggagtcaatc cagcctgcat gctcccccct cctccaccaa gacttctgtt 900

tctgtactt ttgcttcaga ggccgcctct gcctcaagcc cacctatcct gggagcagga 960

atactggtgt gtacatctgt gttgagtggg gaagacagct ggatggtgt ctgtcaactt 1020

ctgcactttg gacattaaac attctccaca caccaa 1056

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Trem2 CRISPR 指导

<400> 7

gaagcactgg gggagacgca

20

<210> 8

<211> 183

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Trem2 修复寡核苷酸, 含有用于 R47H 的核苷酸 G>A 点突变(该寡聚序列中的核苷酸 89 处)和 2 个沉默突变(赖氨酸 AAG>AAA(核苷酸 93 处)和丙氨酸 GCC>GCA(核苷酸 96 处)

<400> 8

gcacctcaaca ccacgggtct gcagggcatg gccggccagt cttttaggggt gtcatgtact

60

[0011] tatgacgcct tgaaggactg ggggagacac aaagcatggt gtcggcagct gggtgaggag

120

ggcccatgcc agcggtgttgtt gagcacacac ggtgtgtggc tgctggcctt cctgaagaag

180

cgg

183

<210> 9

<211> 4980

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 9

cctgttatctc agggttgaga gggaaagagag tggggtttcc agatgccac atcccttcat

60

accttagtcct caccaactc tgcttccta gtacaacaact gttggctac agtaacgctg

120

ggccaggcag gcatgcatgc gacgtattac cacaagcca gtgaccaggt gagccggagg

180

gagcgcttag ctgtgggtcc caggctgggt ttgctggc agttggatg cccaggagtc

240

ctaatggccc actcacatgt gtccccccc ctctctcccc cagctgcagg tgggtgtgga

300

gtttgaggcc agcaccagga tgcaggacac cagtgcctcc tttgggtatc agctggacct	360
gcccaaggcc aacttcctt ttaaaggtaa ggaaggcctc agttccctc ctgggaaaca	420
ggccagataa gactcagctg tctgtggtag agtccatggg aaatagggag gttgaacatg	480
tgctggtgga gtggcgcccc actctgtgca gctccaaatt actctgggtg gcttgtcaaa	540
cagtgggct cctaccctgg catgtttagt acatgttggg ggcctcgctt taagccctct	600
cttcccattc ccatctagca agctctctgg ccctccccac tcactcttac cttacttgga	660
gttcttctat tgtgtgatga aacactatga tggtaaacag ctttagggagc aaagaggtaa	720
tgtgggtta caactctcag gtggcatgcc taccactgag gagaagatgg ggcaggactc	780
agcagaaaagc tgaaggcaag ctgatgcaga aggcccttgc ggagtgcgtc ttgtggctt	840
gctccttatg gcttcctcag cctgctctta tagcctccgg accattagcc cagggtgccc	900
cactgaaaat aatctggta ctcccacatc aatcacttag aaagtgcct acaggcttgc	960
[0012]	
ctgctgcct agctaatttggaa gacatatgtt ttgaggttcc cttagtggaa tctcttgagt	1020
tcaagaccag cctggctcac agagcaagtt ctggacagc caggctacc cagagaaacc	1080
ctgtctcaga aaagaaaaaaa aagaaaaagg tgggggtggg gtgacttagt tgtataaaac	1140
tagccagcac agcagggaaag ctgtgtgaat agtgacagcc aggttcagaa cctcattctg	1200
cgcagtgaca tgggtttgtc aagcctggc ggtgttgc cacttaagg gttgtgtga	1260
tggctggag tggccttgggt tgtgacttag gacatacggg tccgttggtt ctaccataga	1320
gatgggtggc caggcacate aagccaccca gtcctgtccc cgctctggc ccacaggctc	1380
tgtgaacagt aactggatcg tggcgccac gctggagaag aagcttccgc cttggccct	1440
gacactgtcc ctctgcgcct tcctgaacca ccgcaagaat aagttccgtt gtggcttcgg	1500
cctcaccatc ggctgagccc tcctgtcctt cctctgcaga ccatcgctgg gcccgtgcc	1560
ctccccctctt ctccctctt cttgggggtt gggcagtggg aaggagggga cctccatgc	1620

ccaaggatcc ccagcgccag gggacagtgc ccaggggcc tgggtcccg gagggagtcc	1680
tggatctga agggcattcg attgtgagcg cccaggcaga ggcgcagagg cggctgtaca	1740
caggctcaga aaggaaagac ttgatgtcct cctgagggca gcagaggagc gccgagccgc	1800
ctgtcacttc cccctccacc cctccataga aatcatgttt ataagttatg gaaaaccggg	1860
acattttaca gaaaaaaaaa aactaaaaaa acaaaaaata tacgtggaaa aaaaaatagg	1920
atctgggagg cctcggttt ctccagttgt tgacatggtt gccagcaggc ggcggcagg	1980
gttcagaaag cacagcagca ccaaggcgtt tagagaaagc ttggccaggc atggtcacac	2040
cctctgctct tggggactta cactgccgga acatcagagg cctggcctca ccaggagggt	2100
ggctccaggt cactgcctc tgtcgagtct ggccccgaga gctggcagag gactttgtct	2160
ctgtaaacag ggtggggca gggagacggg gtcaggagc ctccctgtcc caaaacggc	2220
tgaggtggta gcttgtctg actttctccc agtggaaagg tcagaggctc cagaaacttc	2280
[0013] [0013]	
aggaagaaac ggagttcctg gaagttcagc acaataagga aagttactct gggaggaacg	2340
ggccctagca cttcccagg ctgaaacagg aaatgtcaag ttgtttgtt tttaaattt	2400
tgtgaagat gtagctctgg gcctcacgtc tcaggcaggt gctgctgggt tccctatagt	2460
gctttccgt gaggcctgct ctgggtgtg cgataaggc ctcagattgg gctctgcattc	2520
tcactgctgc acctcatggc atcccaaggg aagcaaagac tcacgatgaa ctggcagtg	2580
tcctagaccg cagcactaag accctctcta ctgcctggc tggagatggg agctggccct	2640
tagcaaccca tgaaaatcat ctcaccacac ccagtccttgc ccagtgtttt ctgaagccaa	2700
agctaacagg cctgggcctg gccaggcacc ctgtacgtac cttggagcc aggtgttccg	2760
cctctgccc tccgtcagaa tcatgttttgc ccgtgtctgg tgccaaacac tgctatgtgg	2820
cttctctctt gccatcaaca gctggaaaca gggAACCTTG tgcaggcagt gcttctagca	2880
agcttgcgtt ggtctctgag cccctgtcc tacctgactt cccaggtaca atggcttcc	2940

cacttttgg gggttttgtt gttgttggtt ttttttttgtt ttttcaagac agggtttctc	3000
tgtgttagtcc tgtcggtcct ggaactcaact ttgttagacca ggctggcctc caactcagaa	3060
attcacctgc ctctgcctcc aagtgtggg attatggat taaaggcatg tgccaccacg	3120
cccagctggc tttccactt tttagccagg acttcattctt attacctgag ctcggatct	3180
tcctgcctca gctttgcata tggctagcac tatagaccca tggccagtg aatgacttat	3240
ggcttgtctt tttttttttt tttttttttt ttatgtgca ttagtgtttt gcctgcatgt	3300
atgccttcgt gagggttagca gatctgggtt ttacagttgt gagctgtgt gtgggtgt	3360
cgattttgaa cctagggtcct gtgaaatgca gtcagtgctc ctaacctctg agtcatctct	3420
ccagctcctg ctcttcgtt tttatgagga aaaagaaaaag agaagtggct tgagagtgg	3480
aaatgcacat gcaggggtgc acacctgcag tcccagcatg ctacagcaga ggcagaagga	3540
cctttgtggg ttagagggca gcctgagaat ctatctcaa aacaactttt taaaatgtgc	3600
[0014]	
tctgttagggg tagctttcc ctcccaaggt gacacatctg gcaatcgcca gaaacagatc	3660
aggagcatca acgcttggtt tccaggcgt tggcttaatg tatggcttca aaccatcg	3720
gagccaccac tgaacagctc ctgaaggaac tggagcacgt ccagccttgaatggaaag	3780
agttcacctg tggggagga atcaacaacg agggatccca gaacaacgat cttcacccca	3840
gaagctgagc ctcttagcccc ccaccaccc attccattt aggctgccag ctctttctt	3900
tacaatgcac cagacccgc gggaaaggg aaggagcggt tctcagtgcc ccagtaccaa	3960
ggcctggatt attcaatgag gtgtccgctc cctttgtgg cggggaggg gaggggggg	4020
tcacaaggca tccaaactcc acctcttcc tctgccctgc tgtgaaggg gagagaacaa	4080
ccgcctcggt gacagggggc tggcacagcc cgccctagcc ctgaggaggg ggcggacag	4140
ggggagtcct ataattggac cggtctggga tccgatcccc tgctcagacc ctggaggcta	4200
aggacttggtt tcggaaggag ctggtaagac aagctggct gggattcac ccagggacct	4260

tggtaggatg tgggctggga accttgagat ccccccggagt ccaggaaaca ggcacaagaa	4320
ttggaaaagc aggcagcacg atagaagtct tgggggacaa actaaggact cgaggtaact	4380
agccttgcg agagtcagag caggtggagg gtttacctcc aggaaggagt acgggactgt	4440
cggtgcacgg cgtaccggct caacttaggaa ccatcctatg gcgaaaaaac tcgggatgag	4500
ccttaggctg cttttatata aatacctact gattccatc acagtcggca agtaacccgg	4560
actggttca aactgtggct cctcatggct gagctcccta agttctgttag ttgtgggagg	4620
gtaccactc gcagggatgg aggacgatta aaaatcggt taaattaaca caaaatggaa	4680
agcaggactt agccgggaag aaagaggaat gtaagctgga ccacccgctg gccctctgt	4740
aagtggaaatt tgaaccctag gagagggagc tggaaattttt ggcagcggat ccacccggg	4800
gtgccgagat agcgaactcg gcaaggggag gtaaacagac ctggaaagatgg gggtctctgg	4860
ctgtttggaa gatgtttgtg atggctcaca gatctgagaa ggaaagatgg gggtctctgg	4920
[0015] gtggccggag tccctccacc cccgccccct ggtgttcaaa gacaattttt ccctccgcag	4980

<210> 10

<211> 4292

<212> DNA

<213> 智人

<400> 10

actggccaat cacaggcagg aagatgaagg ttctgtggc tgcgttgctg gtcacattcc	60
tggcaggtat gggggcgggg cttgctcggt tccccccgct cctccccctc tcatcctcac	120
ctcaacctcc tggcccccatt caggcagacc ctggggccccc tcttctgagg cttctgtct	180
gcttcctggc tctgaacagc gattgacgc tctctggcc tcggtttccc ccacccctga	240
gataggagtt agaagttgtt ttgttgtgt tgtttgtgt tggtgttttg ttttttgag	300
atgaagtctc gctctgtcgc ccaggctgga gtgcagtggc gggatctcggt ctcactgcaa	360
gctccgcctc ccaggtccac gccattctcc tgcctcagcc tcccaagtag ctgggactac	420

aggcacatgc caccacaccc gactaacttt tttgtatttt cagtagagac ggggtttcac	480
catgttggcc aggctggct ggaactcctg acctcaggtg atctgccgt ttcgatctcc	540
caaagtgctg ggattacagg cgtgagccac cgcacctggc tgggagttag aggtttctaa	600
tgcattgcag gcagatagt aataccagac acggggcagc tgtgatctt attctccatc	660
acccccacac agccctgcct gggcacaca aggacactca atacatgctt ttccgctgg	720
cgcggggct cacccctgta atcccagcac ttgggaggc caaggtggga ggatcacttg	780
agcccaggag ttcaacacca gcctggcaa catagtgaga ccctgtctct actaaaaata	840
caaaaattag ccaggcatgg tgccacacac ctgtgctctc agctactcag gaggctgagg	900
caggaggatc gctttagcccc agaaggtaa gttgcagtg aaccatgttc aggccgctgc	960
actccagcct gggtgacaga gcaagaccct gttataaat acataatgct ttccaagtga	1020
ttaaaccgac tccccctca ccctgcccac catggctcca aagaagcatt tgtggagcac	1080
[0016] cttctgtgtg cccctaggta ctagatgcct ggacgggtc agaaggaccc tgaccacac	1140
tgaacttgtt ccacacagga tgccaggcca aggtggagca agcggtggag acagagccgg	1200
agcccagct gcgcgcagcag accgagtgcc agagcggcca gcgcgtggaa ctggcactgg	1260
gtcgcttttg ggattacctg cgctgggtgc agacactgtc tgagcaggtg caggaggagc	1320
tgctcagctc ccaggtcacc caggaactga ggtgagtgtc cccatcctgg ccctgaccc	1380
tcctgggtgg cggtataacc tccccaggtc caggttcat tctgcccctg tcgctaagtc	1440
ttggggggcc tgggtctctg ctgggtctag ctccctttc ccatttctga ctcctggctt	1500
tagctctctg gatatctctc ttcagcttt gtctctctct cttcccttct gactcagtct	1560
ctcacactcg tcctggctct gtctctgtcc ttccctagct cttttatata gagacagaga	1620
gatgggtct cactgtgttg cccaggctgg tcttgaactt ctgggctcaa gcgatcctcc	1680
cgcctcgccc tcccaaagtg ctgggattag aggcatgagc caccttggcc ggcctcctag	1740

ctccttcttc gtctctgcct ctgccctctg catctgctct ctgcacatgt ctctgtctcc	1800	
ttctctcgcc ctctgccccg ttccttctct ccctcttggg tctctctggc tcatacccat	1860	
ctcgcccggcc ccatcccagc ccttctcccc gcctcccaact gtgcgacacc ctcccgccct	1920	
ctcgcccgca gggcgctgat ggacgagacc atgaaggagt tgaaggccta caaatcgaa	1980	
ctggaggaac aactgacccc ggtggcggag gagacgcggg cacggctgtc caaggagctg	2040	
caggcggcgc aggccccgct gggcgccggac atggaggacg tgccggcccg cctgggtcag	2100	
tacccggcggcg aggtgcagggc catgctcgcc cagagcacccg aggagctgct ggtgcgcctc	2160	
gcctccacc tgcgcaagct gcgttaagcgg ctccctccgct atgcccgtatga cctgcagaag	2220	
cgccctggcag tgtaccaggc cggggcccgc gagggcgcccg agcgcggcct cagcgccatc	2280	
cgcgagcgcc tggggccccc ggtggAACAG ggccgcgtgc gggccgcac tgtggctcc	2340	
ctggccggcc agccgctaca ggagcgggccc caggcctggg gcgagcggct ggcgcgcgg	2400	
[0017]	atggaggaga tgggcagccg gacccgcac cgccctggacg aggtgaagga gcaggtggcg	2460
	gaggtgcgcg ccaagctgga ggagcaggcc cagcagatac gcctgcagggc cgaggccttc	2520
	caggcccccc tcaagagctg gttcgagccc ctgggtggaaag acatgcagcg ccagtggcc	2580
	gggctgggtgg agaagggtgca ggctgccgtg ggcaccagcg ccgccccgt gcccagcgcac	2640
	aatcactgaa cgccgaagcc tgcagccatg cgaccccaacg ccacccctgt cctcctgcct	2700
	ccgcgcagcc tgcagcggga gaccctgtcc ccgcggccagc cgtcctccgt gggtgaccc	2760
	tagtttaata aagattcacc aagtttcacg catctgctgg cctccctgt tgatttcctc	2820
	taagccccag cctcagtttc tctttctgcc cacatactgg ccacacaaatt ctcagcccc	2880
	tcctctccat ctgtgtctgt gtgttatcttt ctctctgccc ttttttttt ttttagacgg	2940
	agtctggctc tgtcacccag gctagagtgc agtggcacga tcttggctca ctgcacaccc	3000
	tgccctttgg gttcaagcga ttctgctgcc tcagtagctg ggattacagg ctcacaccac	3060

cacacccggc taattttgt attttagta gagacgagct ttcaccatgt tggccaggca	3120
ggtctcaaac tcctgaccaa gtgatccacc cgccggcctc ccaaagtgc gagattacag	3180
gcctgagcca ccatgcccg cctctgcccc tctttctttt ttaggggca gggaaaggctc	3240
tcacctgtc acccgccatc acagctcact gcagcctcca cctcctggac tcaagtgata	3300
agtgatcctc ccgcctcagc ctccagta gctgagacta caggcgata ccactaggat	3360
taatttgggg ggggggggtgg tgtgtgtgga gatggggctc ggctttgtt gccaggctga	3420
tgtggaattc ctgggctcaa gcgatactcc caccttggcc tcctgagtag ctgagactac	3480
tggctagcac caccacaccc agcttttat tattatttg agagacaagg tctcaatatg	3540
ttgcccaggc tagtctaaa cccctggct caagagatcc tccgcctatcg gcctccaaa	3600
gtgctggat tccaggcatg gggctccgag cccggcctgc ccaacttaat aatacttgtt	3660
[0018] cctcagagtt gcaactccaa atgacctgag attgggtgcct ttattctaag ctattttcat	3720
ttttttctg ctgtcattat tctccccctt ctctcctcca gtcttatctg atatctgcct	3780
ccttcccacc caccctgcac cccatccac ccctctgtct ctccctgttc tcctcaggag	3840
actctggctt cctgtttcc tccacttcta tcttttatct ctccctccta cggtttctt	3900
tctttctccc cggcctgctt gtttctcccc caaccccccatt catctggatt tcttctctg	3960
ccattcagtt tggttgagc tctctgcttc tccgggtccc tctgagctag ctgtcccttc	4020
accactgtg aactgggtt ccctgccaa ccctcattct ctttctttct ttctttttt	4080
ttttttttt tttttttttt ttttgagaca gagtcttgct ctgttgcctt gcctggagtg	4140
cagtggtgca atcttggttc actgcaacct ccactccca gattcaagca atttcctgc	4200
ctcagcctcc agagtagctg ggattacagg cgtgtccac cacacccgac taattttgt	4260
atttttggta gagacaaggc ttccggcattt tt	4292

<210>	11	
<211>	1834	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Frt PGKneo Frt 盒接着 NdeI 限制性酶位点 (CATATG)	
<400>	11	
gaagttccta ttctctagaa agtataggaa cttcaggtct gaagaggagt ttacgtccag	60	
ccaagcttagc ttggctgcag gtcgtcgaaa ttctaccggg tagggaggc gctttccca	120	
aggcagtctg gagcatgcgc tttagcagcc ccgctggca cttggcgcta cacaagtggc	180	
ctctggcctc gcacacatc cacatccacc ggtaggcgcc aaccggctcc gtttttgtt	240	
ggccccttcg cgccacccctc tactcctccc ctagtcagga agttcccccc cgcccccgag	300	
ctcgcgtcgt gcaggacgtg acaaattggaa gtagcacgtc tcactagtct cgtgcagatg	360	
[0019] gacagcacccg ctgagcaatg gaagcggta ggccttggtt gcagcggcca atagcagtt	420	
tgctccttcg ctttctggc tcagaggctg ggaaggggtt ggtccgggg cgggctcagg	480	
ggcgggctca gggcggggc gggccccga aggtcctccg gaggccggc attctgcacg	540	
cttcaaaagc gcacgtctgc cgcgctgttc tcctttctt catctccggg ctttcgacc	600	
tgcagcctgt tgacaattaa tcatcgccat agtatatcgg catagtataa tacgacaagg	660	
tgaggaacta aaccatggaa tcggccattt aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg	720	
ccgcttgggt ggagaggcta ttcggtatg actggcaca acagacaatc ggctgtctg	780	
atgccccgt gttccggctg tcagcgagg ggcggccgt tctttttgtc aagaccgacc	840	
tgtccgggtc cctgaatgaa ctgcaggacg aggcaaggcgc gctatcggtt ctggccacga	900	
cggcggtcc ttgcgcagct gtgcgtcagc ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc	960	
tattggcgaa agtgcgggg caggatctcc tgtcatctca ccttgctcct gccgagaaag	1020	
tatccatcat ggctgatgca atgcggcgcc tgcatcgtt tgatccggctt acctgcccatt	1080	

tcgaccacca agcgaaacat cgcatcgagc gagcacgtac tcggatggaa gccggcttg	1140
tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc aggggctcgc gccagcccaa ctgttcgcca	1200
ggctcaaggc gcgcatgcc gacggcgatg atctcgctgt gacccatggc gatgcctgct	1260
tgccgaatat catggtgaa aatggccgct tttctggatt catcgactgt ggccggctgg	1320
gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt tggctacccg tgatattgct gaagagcttgc	1380
gcggcgaatg ggctgaccgc ttccctcgatc tttacggat cggcgctccc gattgcagc	1440
gcacatgcctt ctatgcctt cttgacgagt tcttctgagg gatatcaattc tctagagctc	1500
gctgatcagc ctcgactgtg ctttcttagtt gccagccatc tgggtttgc ccctccccgg	1560
tgccttcctt gaccctggaa ggtgccactc ccactgtcct ttcctaataa aatgaggaaa	1620
ttgcatcgca ttgtctgagt aggtgtcatt ctattctggg gggtggggtg gggcaggaca	1680
[0020] gcaaggggga ggattggaa gacaatagca ggcacgtgtt ggatgcgggtt ggctctatgg	1740
cttctgaggc ggaaagaacc agctgggct cgactagagc ttgcggaaacc cttcgaagtt	1800
cctattctct agaaagtata ggaacttcca tatg	1834
<210> 12	
<211> 5166	
<212> DNA	
<213> 小鼠	
<400> 12	
aaacacctatg gagaagatac aggcccttgtt ggctaccaac cccatcatca ccccaagtggc	60
ccaggagaat caatgagttt ctttctctgt tcctgcaaca acatccatat ccagccaggt	120
ggccctgtct caagcacctc tctggccctc tgggtggccct tgcttaataa agattctccg	180
agcacattct gagtctctgtt gaggatgttcc aatcagcttc agcctcagtt tattgttttt	240
tgccttacctt agcacacattt ccatggccctt gtcactatctt gttagggag gtgggtttgc	300

agcaatagaa atgaaggcta ggaccttagca acataaaaaga acaagtgtac taccactgag	360
ccacggccac agcccctcac tgggggattc taggcagggg ctctaccact gagccacccg	420
cagccccctca ctggggaaatc atatctacca ctgagtcacg cccctccagc ccctcactac	480
ggaattctta gtcagtagct ctaccactga gccacaccca cagcctctgg ggcttccac	540
cggccccctac ccctggattc taggcatggg ctcattttat ttatttttt atttaagatt	600
tgttatctt atgtataagg tacactgcag ctgtcttcag gcgtcaggc ccattacaga	660
tgttgtgag ccaccatgtg gttgctggga attgaactca ggactttag aagagtagtc	720
agtgcctta actgcgtgagc catctctcca gcacccagta caggcttcc tatttagcta	780
tatccaccct tcttttagt ctgaaatagg atctcaactg atttccttg cactccctct	840
agcctagttt ggtcttgaat atttgaatct ttgtttcaa atcaatctct acaggaactg	900
agaaaggcat gtaccacttc atgtgggtca gttgggctac ttttccaaac ttcccaagca	960
[0021]	
cccaactgcac agctatgcct tgaatcaatc aacatgtaa agaccagggt cgccaggcgg	1020
tgtttacttt tctgggtgtc ttatctctcc tcctccgctc tagtcttatac tgacaccctc	1080
tccttgcctt gtctctccctc tttttccctt ctaggcttcc ttttctggct tcctgtttc	1140
ctgatcctct gttatctcac cctcccgccgg ttcttttgc tctggcctt tggttggcgg	1200
tttctacggt ttctacgtgg cttttggAAC ctcagccctt ctcccttgct ctgaagttag	1260
ctggatctt gctccctctg ggtcatgggg ccttagcccc attctttctc ccctgcctgt	1320
gctgcatgcc ttttgacttt cccagcaagt gtatggagag tgagttcagg ctggggacac	1380
aaaaccattc tccccatgtc ctggtaactca aagggtcat ggtgaaagct ggagagcccc	1440
tggctggcctt ctccctccac cccctcagtt ctcagggact cagcaggcgt cccactaaca	1500
ggggcaggct agggctttag ctgtgtcttg ggtcggccca aggcttcaga actcaactgc	1560
ctctggcaca ccccgaggct gcagctttc ctggcatcaa actcagcatt atctggaggc	1620

aggcaccact cccacacatg actcattagg cccaatgaga agatgggtcg gtgggctagt	1680
gacagggccc tagacagcca cacttcatgc ccaggggcta ggagcacacc cccagagcct	1740
cactactctc aaatatcaag atgaggggag agtataaggaa gaatgtctcc ctctgaagac	1800
ctgaattatt gtgatgttat ttgagccacg ctggccttga actctgaacc ctcctgcctc	1860
atttcaaag gctggaatta caggttcgctg ccactaggcc tatctgagaa ctttagttaat	1920
tctacagaag agagttgtt ttcactgggt tgaaacgagg cctcgtgtac ccagagctac	1980
tctttgccca actcactgta gagccaagga tgaccttgaa ctctggctt cctggctccg	2040
agtcctcggt actgggtaga caatgtgtga tcctaaccctt cagtttatg tggtgctata	2100
cagatggcat ccagggttcc ctgcatgctg gacaggtcat caaccaaccg agccacatcc	2160
tcctcatcat catcactttt tggttggtt tcaatccaga gctcatggag cccaaagctgg	2220
cctcaatcta tataaccaag actgtgcctg gtcttcctgt ctctacctaa caaatgtatgg	2280
[0022]	
tgggatgcag ggatgtacaa ccaggaggcag agccttactt ctaaacgaag aaggaaccctt	2340
acctccctgt gggcagacct ggaggtgggg caaggaccac agaaagacat tacagaacta	2400
ggatcgtgaa ggaagtcatg gaggccagcc tgggttacag agtgggttcc aggacagccaa	2460
ggctcacaca gaggaaaaca agaaggaaaa aaaaaaaaaa aaaaagaact gaatgactag	2520
cagttttaga accttagctg tggcttccc gtaccctacc tgtggcacag gaagcccttgc	2580
ttgctaagag taggatgaca ctgaaagcac caagcactgg gcagagtaag gggaaatct	2640
gttacattat tcagatggc gcttgaggac tgaggcaggac tccttcaag aagcaaaagg	2700
gtcaggcctg gtgcccacag ggactggaag ctagctagcg ccgagttggc cccagagatg	2760
tcgcaacccca gccagggtcg agaatctgtt ccacccctt cacaaccatc cccctgttgt	2820
cgtcgcccc accccccaccc cccggccaaac tgacacgtgg gttgcagggg caccaggcca	2880
gccaacctag agtctgggcc ccttagccac cagctgccag ggggtcactg tcggtaatg	2940

acagctctgg gggagggggg gagaagggcc ttggactcta gcctgagaga aaggatgtt	3000
tggaaggagg gggcaggagg gcaagtttag gcctgcagg gccttaggag gccccacaag	3060
acctaaaaac ggggaaaggg gggtgtgcc agttagggga cactatggag ctctgcaagc	3120
taagaggctc ttagcttctt tgcagtttg actagctgaa gaggcaactt ctaaggaagg	3180
gagatgaggg gatgccaaga tcccagagag catccgagga ggtctgaggg tgtgcagatg	3240
caaaggcatt ggaggtgaag ggagccaggg tgcatcgatcc gggacagaat gtgagctgag	3300
gctcctggtc aaggagaagg tagagaagag ctaacctgag gatgcagtgt gagctagggg	3360
tgagatgggg gtgaggggag ttgtttgtaa gacccccc cttaaagggtt gacagcctca	3420
gagagagagt gagtaggcag agcagccaag gctgggtgga gatcaatgag atttggaaat	3480
gaggatgctg accagtgacg agccttggc ctaaataaaa agcctggatg tggatctgc	3540
ctcccagtat cgaccagaat gacagaagag agtggctgg ttgtgttgtt gttgggtgcata	3600
[0023]	
gcctgtaatc ccagcaactc actagagagg cagaggcagg agcatcacaa attccaggcc	3660
agccaaaaag cctatgtaaa aaaaaaaaaa agagaaaaaa gaaaaaaagaa aaagtaggtg	3720
gacacagaga caagggggag gtcagggggg agggcgacca gcttgctccg cccctcccc	3780
aaccggtaa acctctgtgc aggatcctcc caccgccatg ggcctcctga gagatcctta	3840
gatccagggtt agtgcataagg aaagtgtccc cccactacct acagctaagg gattgggtg	3900
gtggatcat ggtggaggc ggtggtaat actagcgatg tcccccgcta cccgtgcgtc	3960
tgcctccagg gtccccctcc aaccaggatg aggctttca tcgctcttcc tgtcctgatt	4020
gtggtcgtag ccatgacctt ggaaggtaag aaagaggctt ggaaggtaag aaagaggctt	4080
ggaagtgtga agttggcctt gtgcctgcgg cccaggcttta gaagaccctc gaggaggct	4140
ctgaggccc tttctgtgtc atcattccac taccgcctc ccatcgcccc ccatcccacc	4200
tgccagggtgc cttattttg tgtcaaagtg ggtgctgaag gaggcaactc tgtccagaaa	4260

agacgcagta accaatgacc taggatacca cccttggaa ttggctaatt ttcctagaag	4320
ggcgaggcg taaaaacaag gaggtgagag gtgcagtaaa atcaagtgtc caataccctc	4380
ccccatgcta atgagttgc tcgcaaccct ctcgcggcag gcccagcccc cgcccaggcg	4440
ccccggatt tgtccgaaac attggagagc ataccggata aactgaagga gtttggaaac	4500
actttggaag acaaggcccg ggcagccatt gaacatatca aacagaagga aattttgacc	4560
aagaccgggt taggacctt cagggcacgg gcgggtggtg tgtgtgtg tgcgtgcgcg	4620
cgcgcgcgtg tgtaaaagcc ctagcagaca gttccacact gacacaatgg ggaaactgca	4680
ccagagtgtt tgacacttgc cctgaagtca tagaactgta tctgaagtca ttgaactgga	4740
tgtcaaagtg ctcgttgt ggagacagggc ggtgtactc ccagccact gtttagagatg	4800
tttccaagtc ctagtgaagg gccaaagctg gcggctgact gtttaggaca gaccctgacc	4860
[0024] cctccctgtg tactctttag acaggtcatg acttgagtct ccgagacaga gaaagaatgt	4920
aggagagttg gggcagggc acagcagaag ctgtacaggc ctggctctg cagttacac	4980
tggccaaaga gagattaggg catgctgggt taagaactag ccaggcagtg gtggcgcaca	5040
cctttgatcc cagtattcat gaggcagagg caggcagatc tcttgaggc cagcctgatt	5100
gagactagtt ctaggaaagc caggctaca cagagaaacc ctgtctcaac accaccacca	5160
cccccc	5166

<210> 13

<211> 311

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 13

Met Lys Ala Leu Trp Ala Val Leu Leu Val Thr Leu Leu Thr Gly Cys

1 5 10 15

Leu Ala Glu Gly Glu Pro Glu Val Thr Asp Gln Leu Glu Trp Gln Ser			
20	25	30	
Asn Gln Pro Trp Glu Gln Ala Leu Asn Arg Phe Trp Asp Tyr Leu Arg			
35	40	45	
Trp Val Gln Thr Leu Ser Asp Gln Val Gln Glu Glu Leu Gln Ser Ser			
50	55	60	
Gln Val Thr Gln Glu Leu Thr Ala Leu Met Glu Asp Thr Met Thr Glu			
65	70	75	80
Val Lys Ala Tyr Lys Lys Glu Leu Glu Glu Gln Leu Gly Pro Val Ala			
85	90	95	
[0025] Glu Glu Thr Arg Ala Arg Leu Gly Lys Glu Val Gln Ala Ala Gln Ala			
100	105	110	
Arg Leu Gly Ala Asp Met Glu Asp Leu Arg Asn Arg Leu Gly Gln Tyr			
115	120	125	
Arg Asn Glu Val His Thr Met Leu Gly Gln Ser Thr Glu Glu Ile Arg			
130	135	140	
Ala Arg Leu Ser Thr His Leu Arg Lys Met Arg Lys Arg Leu Met Arg			
145	150	155	160
Asp Ala Glu Asp Leu Gln Lys Arg Leu Ala Val Tyr Lys Ala Gly Ala			
165	170	175	
Arg Glu Gly Ala Glu Arg Gly Val Ser Ala Ile Arg Glu Arg Leu Gly			
180	185	190	

Pro Leu Val Glu Gln Gly Arg Gln Arg Thr Ala Asn Leu Gly Ala Gly
 195 200 205

Ala Ala Gln Pro Leu Arg Asp Arg Ala Gln Ala Phe Gly Asp Arg Ile
 210 215 220

Arg Gly Arg Leu Glu Glu Val Gly Asn Gln Ala Arg Asp Arg Leu Glu
 225 230 235 240

Glu Val Arg Glu His Met Glu Glu Val Arg Ser Lys Met Glu Glu Gln
 245 250 255

Thr Gln Gln Ile Arg Leu Gln Ala Glu Ile Phe Gln Ala Arg Leu Lys
 260 265 270

Gly Trp Phe Glu Pro Ile Val Glu Asp Met His Arg Gln Trp Ala Asn
 [0026] 275 280 285

Leu Met Glu Lys Ile Gln Ala Ser Val Ala Thr Asn Pro Ile Ile Thr
 290 295 300

Pro Val Ala Gln Glu Asn Gln
 305 310

<210> 14

<211> 317

<212> PRT

<213> 智人

<400> 14

Met Lys Val Leu Trp Ala Ala Leu Leu Val Thr Phe Leu Ala Gly Cys
 1 5 10 15

Gln Ala Lys Val Glu Gln Ala Val Glu Thr Glu Pro Glu Pro Glu Leu

20

25

30

Arg Gln Gln Thr Glu Trp Gln Ser Gly Gln Arg Trp Glu Leu Ala Leu
 35 40 45

Gly Arg Phe Trp Asp Tyr Leu Arg Trp Val Gln Thr Leu Ser Glu Gln
 50 55 60

Val Gln Glu Glu Leu Leu Ser Ser Gln Val Thr Gln Glu Leu Arg Ala
 65 70 75 80

Leu Met Asp Glu Thr Met Lys Glu Leu Lys Ala Tyr Lys Ser Glu Leu
 85 90 95

Glu Glu Gln Leu Thr Pro Val Ala Glu Glu Thr Arg Ala Arg Leu Ser
 100 105 110

[0027]

Lys Glu Leu Gln Ala Ala Gln Ala Arg Leu Gly Ala Asp Met Glu Asp
 115 120 125

Val Cys Gly Arg Leu Val Gln Tyr Arg Gly Glu Val Gln Ala Met Leu
 130 135 140

Gly Gln Ser Thr Glu Glu Leu Arg Val Arg Leu Ala Ser His Leu Arg
 145 150 155 160

Lys Leu Arg Lys Arg Leu Leu Arg Asp Ala Asp Asp Leu Gln Lys Arg
 165 170 175

Leu Ala Val Tyr Gln Ala Gly Ala Arg Glu Gly Ala Glu Arg Gly Leu
 180 185 190

Ser Ala Ile Arg Glu Arg Leu Gly Pro Leu Val Glu Gln Gly Arg Val

195	200	205
-----	-----	-----

Arg Ala Ala Thr Val Gly Ser Leu Ala Gly Gln Pro Leu Gln Glu Arg	210	215	220
---	-----	-----	-----

Ala Gln Ala Trp Gly Glu Arg Leu Arg Ala Arg Met Glu Glu Met Gly	225	230	235	240
---	-----	-----	-----	-----

Ser Arg Thr Arg Asp Arg Leu Asp Glu Val Lys Glu Gln Val Ala Glu	245	250	255
---	-----	-----	-----

Val Arg Ala Lys Leu Glu Glu Gln Ala Gln Gln Ile Arg Leu Gln Ala	260	265	270
---	-----	-----	-----

Glu Ala Phe Gln Ala Arg Leu Lys Ser Trp Phe Glu Pro Leu Val Glu	275	280	285
---	-----	-----	-----

[0028]

Asp Met Gln Arg Gln Trp Ala Gly Leu Val Glu Lys Val Gln Ala Ala	290	295	300
---	-----	-----	-----

Val Gly Thr Ser Ala Ala Pro Val Pro Ser Asp Asn His	305	310	315
---	-----	-----	-----

<210> 15

<211> 299

<212> PRT

<213> 智人

<400> 15

Lys Val Glu Gln Ala Val Glu Thr Glu Pro Glu Pro Glu Leu Arg Gln	1	5	10	15
---	---	---	----	----

Gln Thr Glu Trp Gln Ser Gly Gln Arg Trp Glu Leu Ala Leu Gly Arg	20	25	30
---	----	----	----

Phe Trp Asp Tyr Leu Arg Trp Val Gln Thr Leu Ser Glu Gln Val Gln
 35 40 45

Glu Glu Leu Leu Ser Ser Gln Val Thr Gln Glu Leu Arg Ala Leu Met
 50 55 60

Asp Glu Thr Met Lys Glu Leu Lys Ala Tyr Lys Ser Glu Leu Glu Glu
 65 70 75 80

Gln Leu Thr Pro Val Ala Glu Glu Thr Arg Ala Arg Leu Ser Lys Glu
 85 90 95

Leu Gln Ala Ala Gln Ala Arg Leu Gly Ala Asp Met Glu Asp Val Arg
 100 105 110

[0029] Gly Arg Leu Val Gln Tyr Arg Gly Glu Val Gln Ala Met Leu Gly Gln
 115 120 125

Ser Thr Glu Glu Leu Arg Val Arg Leu Ala Ser His Leu Arg Lys Leu
 130 135 140

Arg Lys Arg Leu Leu Arg Asp Ala Asp Asp Leu Gln Lys Arg Leu Ala
 145 150 155 160

Val Tyr Gln Ala Gly Ala Arg Glu Gly Ala Glu Arg Gly Leu Ser Ala
 165 170 175

Ile Arg Glu Arg Leu Gly Pro Leu Val Glu Gln Gly Arg Val Arg Ala
 180 185 190

Ala Thr Val Gly Ser Leu Ala Gly Gln Pro Leu Gln Glu Arg Ala Gln
 195 200 205

Ala Trp Gly Glu Arg Leu Arg Ala Arg Met Glu Glu Met Gly Ser Arg
 210 215 220

Thr Arg Asp Arg Leu Asp Glu Val Lys Glu Gln Val Ala Glu Val Arg
 225 230 235 240

Ala Lys Leu Glu Glu Gln Ala Gln Ile Arg Leu Gln Ala Glu Ala
 245 250 255

Phe Gln Ala Arg Leu Lys Ser Trp Phe Glu Pro Leu Val Glu Asp Met
 260 265 270

Gln Arg Gln Trp Ala Gly Leu Val Glu Lys Val Gln Ala Ala Val Gly
 275 280 285

[0030] Thr Ser Ala Ala Pro Val Pro Ser Asp Asn His
 290 295

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> 猴病毒 40

<400> 16

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

1 5

<210> 17

<211> 14

<212> PRT

<213> 非洲爪蟾

<400> 17

[0031] Arg Pro Ala Ala Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys
 1 5 10

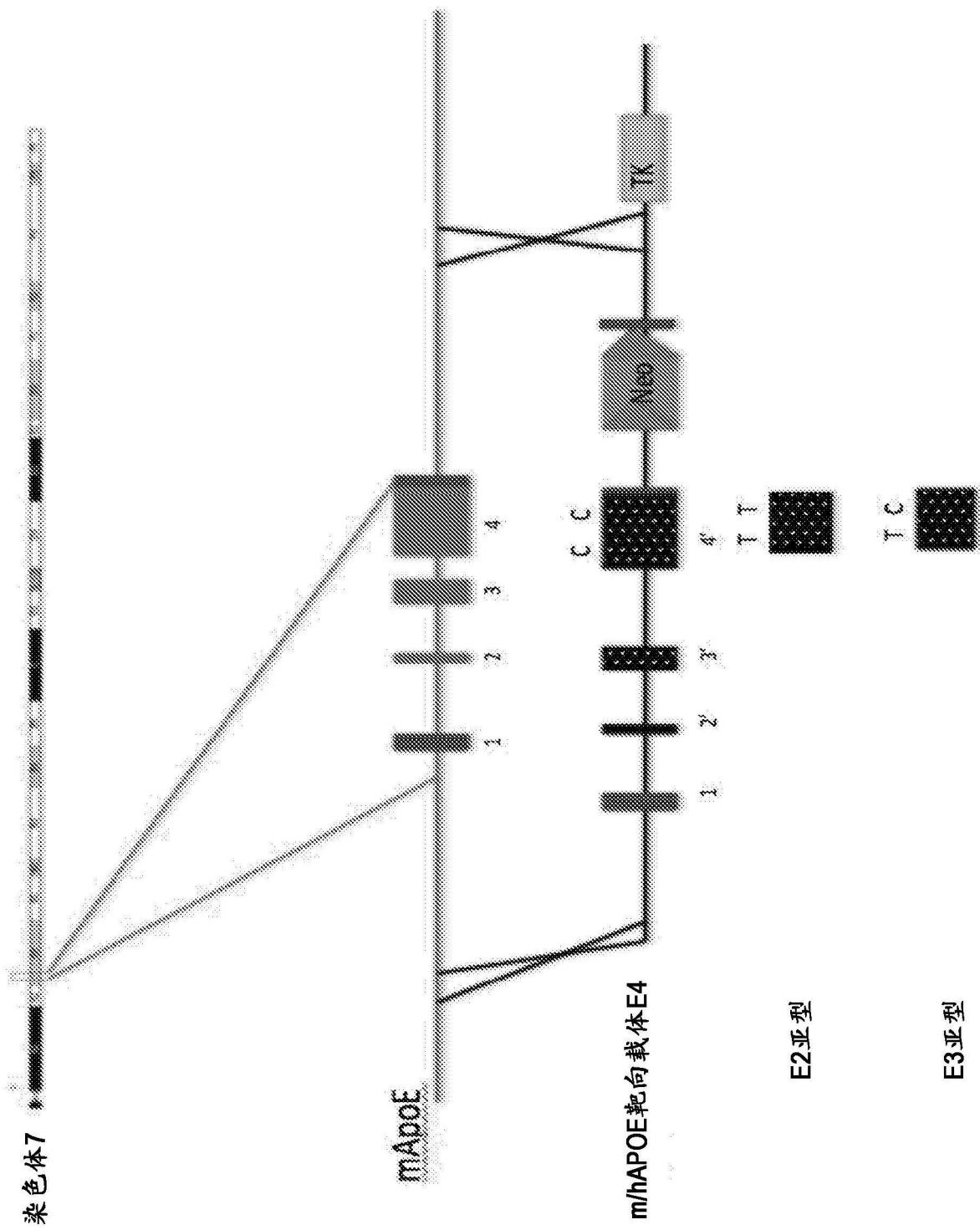


图1



图2

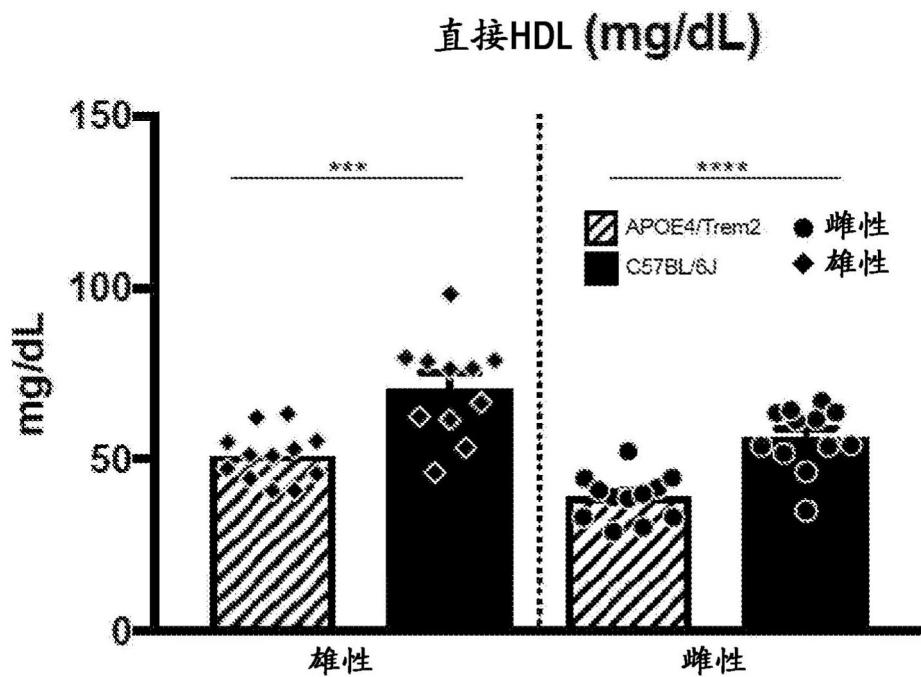


图3A

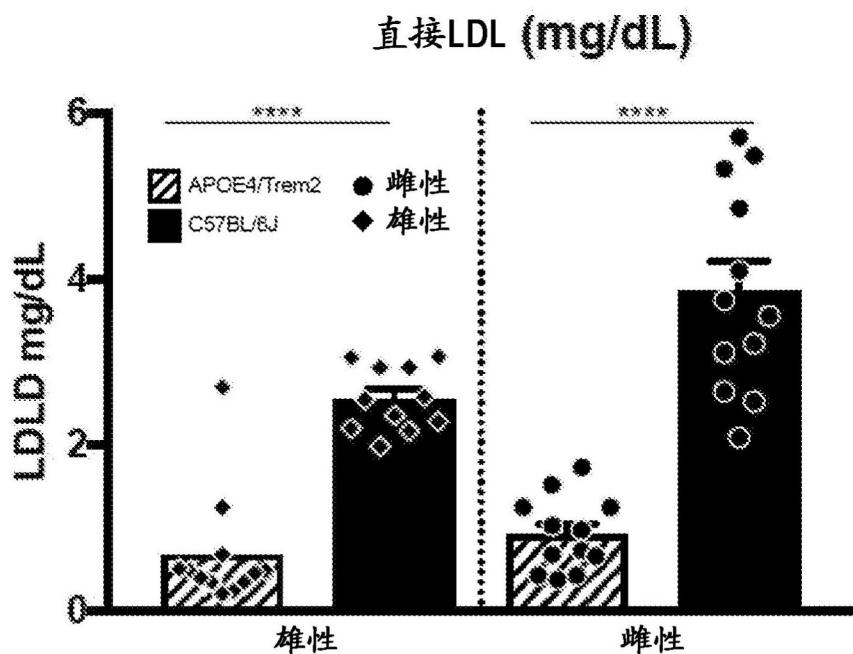


图3B

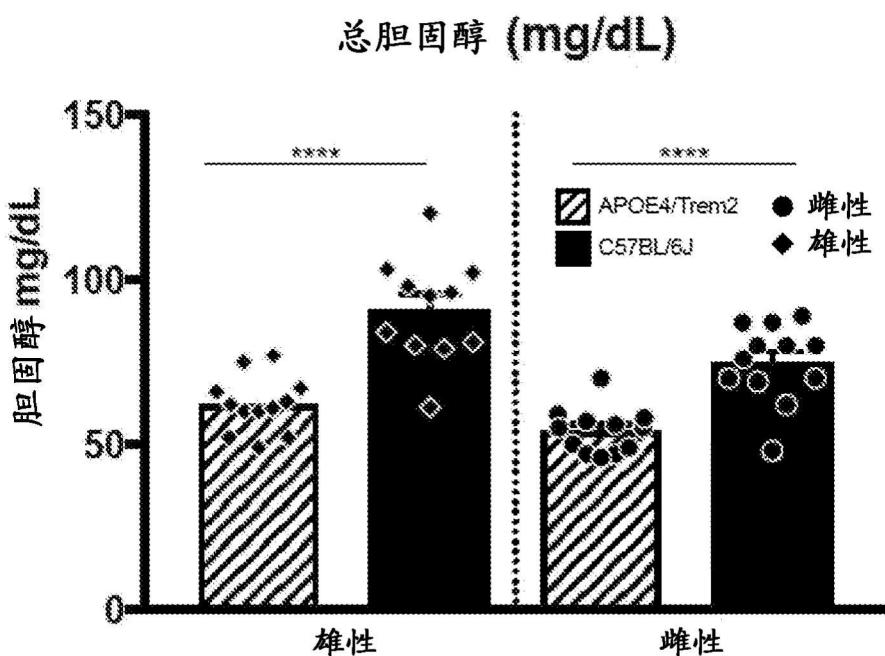


图3C

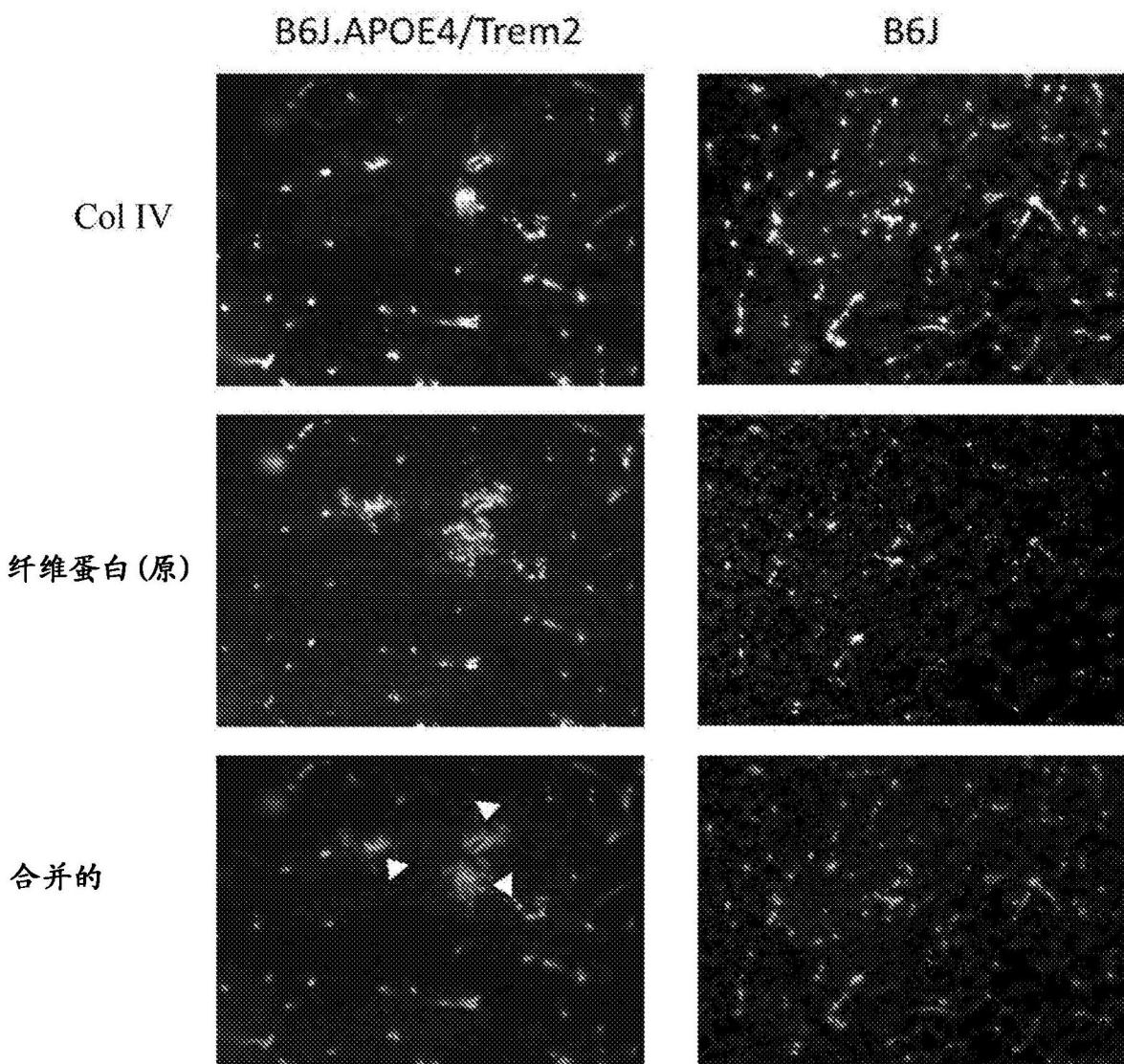


图4

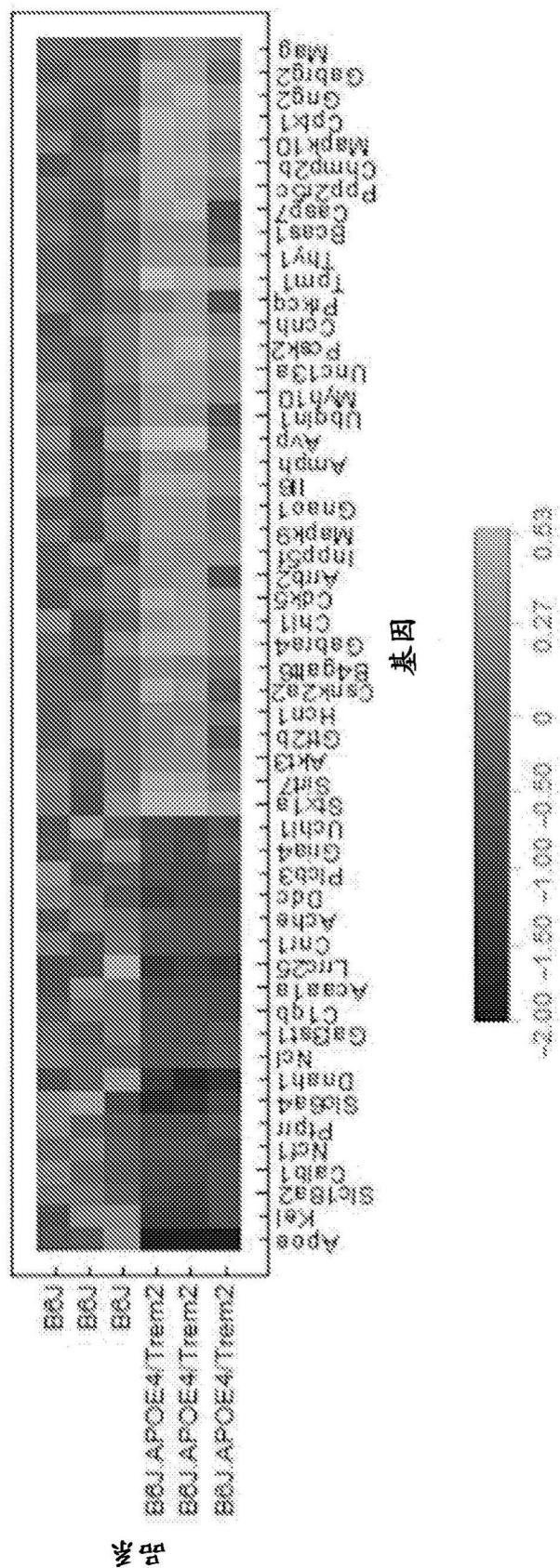


图5