



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102933074 B

(45) 授权公告日 2015.04.08

(21) 申请号 201180028717.1

(22) 申请日 2011.06.10

(30) 优先权数据

61/353,896 2010.06.11 US

13/157,728 2011.06.10 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012.12.11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/039997 2011.06.10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/156723 EN 2011.12.15

(73) 专利权人 瑞泽恩制药公司

地址 美国纽约

(72) 发明人 W·奥尔巴克 T·德希阿拉

W·普埃米洛 D·弗伦德维

D·巴伦苏埃拉

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 袁泉

(51) Int. Cl.

A01K 67/027(2006.01)

C12N 9/02(2006.01)

C12N 15/873(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101506354 A, 2009.08.12,

CN 1649489 A, 2005.08.03,

CN 1423522 A, 2003.06.11,

EP 1516924 A1, 2005.03.23,

CN 1217746 A, 1999.05.26,

ROBIN LOVELL-BADGE and ELIZABETH

ROBERTSON. XY female mice resulting from a heritable mutation in the primary testis-determining gene, Tdy.. 《Development》. 1990, 第 109 卷 635-646.

宋震涛等. 从早期胚胎多能干细胞生成的嵌合鼠. 《遗传学报》. 1993, 第 20 卷 (第 6 期), 499-503.

童英等. 具高效种系嵌合能力的 C57BL/6J 小鼠 ES 细胞系的建立. 《遗传学报》. 1999, 第 26 卷 (第 5 期), 468-473.

陈伟胜等. 小鼠 ES 细胞种系嵌合体的获得. 《遗传学报》. 1999, 第 26 卷 (第 2 期), 126-134.

Jinsong Li, etc.. Non-equivalence of cloned and clonal mice.. 《Current Biology》. 2005, (第 18 期), 756-757.

审查员 冷婷婷

权利要求书2页 说明书16页 附图2页

(54) 发明名称

由 XY ES 细胞制备能育的 XY 雌性动物

(57) 摘要

描述了用于由 XY 供体细胞和合适的宿主胚胎制备表型雌性的能育动物的方法和组合物。提供了用于将 XY 供体细胞维持在培养中的培养基和方法,在引入宿主胚胎内和在合适的宿主中孕育后,所述 XY 供体细胞将导致能育的 XY 雌性动物。描述了用于由供体 XY 细胞和宿主胚胎在 F0 代中制备能育的雌性动物的方法和组合物,以及用于由杂合的 F0 能育雄性和杂合的 F0 能育雌性同胞制备 F1 后代的方法,所述 F1 后代对于修饰是纯合的。

衍生自 XY ES 细胞克隆的表型雌性 F0 代小鼠的生育力分析

克隆	基因型	F0 设置 交配 (#)	F0 窝 (#)	F0 窝 (%)	窝 (#)	总幼崽 (#)	每窝幼崽 (#)
660a-H1	XY	2	1	50	3	11	3.7
629a-E2	XY	1	0	0	0	0	---
6339a-A5	XY	2	2	100	8	55	6.9
6315a-D1	XY	1	1	100	8	48	6
6317b-D1	XY	4	1	25	4	37	9.3
6310a-D4	XY	1	1	100	6	32	5.3
6310a-B1	XY	6	6	100	34	168	5.5
6310a-A5	XY	2	2	100	11	75	6.8
6137b-E1	XY	2	2	100	12	74	6.2
294d-A5	XY	1	0	0	0	0	---
1563a-A10	XY	2	0	0	0	0	---
1533b-A2	XY	2	1	50	2	16	8
13304a-D5	XY	1	1	100	2	15	7.5
1313h-F3	XY	2	1	50	1	2	2
12221b-B3	XY	1	1	100	1	10	10
11465d-G1	XY	1	1	100	6	49	8.2
884a-D1	XY	2	0	0	0	0	---
总计		33 (2)	21 (2)	63%	98 (2)	592 (2)	6 (平均)

1. 一种用于在 F0 代中制备能育的雌性 XY 小鼠的方法,其包括:
 - (a) 通过在包含下述的培养基中维持供体 XY 小鼠 ES 细胞而控制 XY 小鼠胚胎干 (ES) 细胞的性别比,所述供体 XY 小鼠 ES 细胞不包含 Tdy- 阴性性逆转遗传修饰,
 - (i) 基础培养基,和
 - (ii) 适合于维持培养中的小鼠 ES 细胞的补充物,其中所述基础培养基具有:200mOsm/kg - 329mOsm/kg 的摩尔渗透压浓度、浓度 50-110mM 的碱金属和卤素的盐、和 17-30mM 的碳酸盐浓度;
 - (b) 将来自步骤 (a) 的包含 XY 雌性小鼠 ES 细胞的供体 XY 小鼠 ES 细胞引入宿主胚胎内;
 - (c) 孕育所述宿主胚胎;和
 - (d) 鉴定 F0 XY 雌性小鼠,其中在达到性成熟后,所述 XY 雌性小鼠是能育的。
2. 权利要求 1 的方法,其中衍生自 F0 代供体 XY 小鼠 ES 细胞的所有雌性都是 XY。
3. 权利要求 1 的方法,其中所述供体 XY 小鼠 ES 细胞包含遗传修饰。
4. 权利要求 3 的方法,其中所述遗传修饰包含一个或多个核酸的取代、内源核酸序列由异源核酸序列的替换、敲除或敲入中的一种或多种。
5. 权利要求 4 的方法,其中所述遗传修饰是 STEAP2 基因的敲除。
6. 权利要求 1、3、4 或 5 任一项的方法,其中所述基础培养基具有 $50 \pm 5\text{mM}$ NaCl、 $26 \pm 5\text{mM}$ 碳酸盐和 $218 \pm 22\text{mOsm/kg}$ 的摩尔渗透压浓度。
7. 权利要求 1、3、4 或 5 任一项的方法,其中所述基础培养基具有 3mg/mL NaCl、 2.2mg/mL 碳酸氢钠和 218mOsm/kg 的摩尔渗透压浓度。
8. 权利要求 7 的方法,其中衍生自供体 XY 小鼠 ES 细胞的后代的至少 34% 是表型雌性的 XY 小鼠。
9. 权利要求 1、3、4 或 5 任一项的方法,其中所述基础培养基具有 $87 \pm 5\text{mM}$ NaCl、 $18 \pm 5\text{mM}$ 碳酸盐和 $261 \pm 26\text{mOsm/kg}$ 的摩尔渗透压浓度。
10. 权利要求 1、3、4 或 5 任一项的方法,其中所述基础培养基具有 5.1mg/mL NaCl、 1.5mg/mL 碳酸氢钠和 261mOsm/kg 的摩尔渗透压浓度。
11. 权利要求 10 的方法,其中衍生自供体 XY 小鼠 ES 细胞的后代的至少 15% 是表型雌性的 XY 小鼠。
12. 权利要求 1、3、4 或 5 任一项的方法,其中所述基础培养基具有 $110 \pm 5\text{mM}$ NaCl、 $18 \pm 5\text{mM}$ 碳酸盐和 $294 \pm 29\text{mOsm/kg}$ 的摩尔渗透压浓度。
13. 权利要求 1、3、4 或 5 任一项的方法,其中所述基础培养基具有 6.4mg/mL NaCl、 1.5mg/mL 碳酸氢钠和 294mOsm/kg 的摩尔渗透压浓度。
14. 权利要求 1、3、4 或 5 任一项的方法,其中所述基础培养基具有 $87 \pm 5\text{mM}$ NaCl、 $26 \pm 5\text{mM}$ 碳酸盐和 $270 \pm 27\text{mOsm/kg}$ 的摩尔渗透压浓度。
15. 权利要求 1、3、4 或 5 任一项的方法,其中所述基础培养基具有 5.1mg/mL NaCl、 2.2mg/mL 碳酸氢钠和 270mOsm/kg 的摩尔渗透压浓度。
16. 权利要求 1、3、4 或 5 任一项的方法,其中所述基础培养基具有 $87 \pm 5\text{mM}$ NaCl、 $26 \pm 5\text{mM}$ 碳酸盐、 $86 \pm 5\text{mM}$ 葡萄糖和 $322 \pm 32\text{mOsm/kg}$ 的摩尔渗透压浓度。
17. 权利要求 1、3、4 或 5 任一项的方法,其中所述基础培养基具有 5.1mg/mL NaCl、

2. 2mg/mL 碳酸氢钠、15. 5mg/mL 葡萄糖和 322mOsm/kg 的摩尔渗透压浓度。

18. 一种在 F1 代中产生对于遗传修饰纯合的遗传修饰的小鼠的方法,其包括

(a) 根据权利要求 3 的方法鉴定 F0 XY 能育的雌性小鼠;

(b) 使步骤 (a) 的 F0 XY 能育的雌性小鼠与同期组群 F0 XY 能育的雄性小鼠杂交,其中所述 F0 XY 能育的雌性小鼠和 F0 XY 能育的雄性小鼠各自对于所述遗传修饰是杂合的,和

(c) 获得对于所述遗传修饰是纯合的 F1 后代小鼠。

19. 权利要求 18 的方法,其中所述遗传修饰包含一个或多个核酸的取代、内源核酸序列由异源核酸序列的替换、敲除或敲入中的一种或多种。

20. 权利要求 19 的方法,其中所述 F0 XY 能育的雌性小鼠根据权利要求 7 的方法制备。

由 XY ES 细胞制备能育的 XY 雌性动物

发明领域

[0001] 本发明涉及衍生自 XY 胚胎干(“ES”)细胞且具有 XY 核型的能育的雌性动物的制造。在特定实施方案中,描述了关于由 XY 供体鼠 ES 细胞制备能育的 XY 雌性小鼠的方法和组合物。还描述了用于支持表型雌性形成的体外受精方法。

[0002] 发明背景

[0003] 几乎所有通常采用的用于制备遗传修饰小鼠的 ES 细胞系都是基因型雄性(XY)ES 细胞系。因此,在 F0 代中,所有 XY 动物都是雄性。大多数遗传修饰通过靶向 XY ES 细胞执行,以产生两种现有等位基因之一的修饰,即供体小鼠 ES 细胞对于遗传修饰是杂合的。然而,通常希望获得对于遗传修饰是纯合的小鼠。因为基本上没有完全 ES 细胞衍生的雌性小鼠在包含该修饰的 F0 代中出生,所以 F0 雄性一般与雌性(例如匹配的近亲繁殖的雌性)交配,以生成其中至少一个雌性(F1 雌性)对于遗传修饰可能是杂合的一窝动物。随后使杂合 F1 雌性与 F1 杂合雄性互交,以获得纯合后代。此类交配需求代表昂贵和费时的步骤。希望在 F0 代中生成交配对,或至少生成大部分或完全衍生自供体(XY 雄性)ES 细胞的 F0 雌性。

[0004] 本领域存在关于由供体雄性(XY)ES 细胞和宿主胚胎在 F0 代中制备能育的雌性动物的方法和组合物的需要。

[0005] 发明概述

[0006] 在一个方面,提供了用于由 XY 供体细胞制备能育的雌性非人动物的方法,其包括:(a)将非人 XY 供体细胞引入非人宿主胚胎内,以形成嵌合胚;和(b)使该嵌合胚孕育,以形成非人雌性动物,其中所述非人雌性动物是 XY 并且在达到性成熟后是能育的。

[0007] 在一个实施方案中,非人动物是小鼠。

[0008] 在一个实施方案中,非人 XY 雌性动物在 F0 代中形成。在一个实施方案中,在 F0 代中的非人雌性 XY 动物是小鼠且具有 100% 衍生自供体细胞的毛色。在一个实施方案中,在 F0 代中形成的非人雌性 XY 动物至少 90%、92%、94%、96%、98% 或 99.8% 衍生自 XY 供体细胞。在一个实施方案中,在 F0 代中的非人雌性 XY 动物约 100% 衍生自供体细胞。在一个实施方案中,宿主胚胎细胞对 F0 代中非人雌性 XY 动物的贡献通过定量测定法进行测定,所述定量测定法能够检测 2,000 中的 1 个细胞(0.05%),并且没有雌性 XY 动物的组织对于宿主胚胎细胞贡献是阳性的。

[0009] 在一个实施方案中,供体细胞包含遗传修饰。在一个实施方案中,遗传修饰包含内源核酸序列整体或部分的缺失;一个或多个核酸的取代;内源核酸序列例如基因整体或部分由异源核酸序列的替换;敲除;和/或敲入。

[0010] 在一个实施方案中,该方法进一步包括使对于遗传修饰杂合的 F0 代 XY 雄性与对于遗传修饰杂合的 F0 代 XY 雌性(例如同胞)交配,并且由所述交配获得对于遗传修饰纯合的 F1 代动物。

[0011] 在一个实施方案中,在引入宿主胚胎内之前,将 XY 供体细胞维持在包含基础培养基和补充物的培养基中,其中所述基础培养基显示选自下述的特征:(a)约 250–310mOsm/kg 的摩尔渗透压浓度;(b)约 11–13mS/cm 的导电性;(c)浓度约 60–105mM 的碱金属和卤素

的盐；(d)约 20-30mM 的碳酸盐浓度；(e)至多约 85-130mM 的碱金属卤盐和碳酸盐总浓度；和(f)其组合。

[0012] 在一个实施方案中,补充物包含用于维持在培养中的 ES 细胞的组分。在一个实施方案中,补充物包含胎牛血清(FBS)、谷氨酰胺、抗生素、丙酮酸盐、非必需氨基酸、2- 巯基乙醇和 LIF 中的一种或多种。

[0013] 在一个实施方案中,基础培养基是低盐 DMEM。在特定实施方案中,低盐 DMEM 具有 85-130mM 的 NaCl 浓度。在一个实施方案中,基础培养基是低摩尔渗透压浓度 DMEM。在特定实施方案中,低摩尔渗透压浓度 DMEM 具有 250-310mOsm/kg 的摩尔渗透压浓度。在一个实施方案中,基础培养基是低导电性 DMEM。在特定实施方案中,低导电性 DMEM 具有 11-13mS/cm 的导电性。

[0014] 在一个实施方案中,在引入宿主胚胎内之前,将供体细胞在所述基础培养基加上补充物中维持约 1、2、3、4、5、6 天,1 周,8、9、110、11 或 12 天,2 周、3 周或 4 周或更久。在特定实施方案中,在引入宿主胚胎内之前,将供体细胞维持在所述基础培养基加上补充物中至少一周。在特定实施方案中,在引入宿主胚胎内之前,将供体细胞维持在所述基础培养基加上补充物中 2-4 周。

[0015] 在一个实施方案中,宿主胚胎是 2- 细胞期、4- 细胞期、8- 细胞期、16- 细胞期、32- 细胞期或 64- 细胞期胚胎。在另一个实施方案中,宿主胚胎是囊胚。在一个实施方案中,胚胎在选自桑椹胚前期、桑椹胚期、非致密的桑椹胚期和致密的桑椹胚期的阶段中。在一个实施方案中,胚胎期选自泰勒期(Theiler Stage) 1 (TS1)、TS2、TS3、TS4、TS5 和 TS6,参考 Theiler (1989) "The House Mouse :Atlas of Mouse Development," Springer-Verlag, New York 中所述的泰勒期。在特定实施方案中,泰勒期选自 TS1、TS2、TS3 和 TS4。在一个实施方案中,胚胎包含透明带,并且供体细胞是通过透明带中的孔引入胚胎内的 ES 细胞。

[0016] 在一个实施方案中,胚胎包含囊胚前胚胎。在一个实施方案中,胚胎是桑椹胚期胚胎。在特定实施方案中,桑椹胚期胚胎是聚集的。在一个实施方案中,胚胎是少带(zona-less)胚胎。

[0017] 在一个实施方案中,XY 供体细胞选自 ES 细胞、诱导的多能干(iPS)细胞、多能细胞和全能细胞。在特定实施方案中,XY 供体细胞是小鼠 ES 细胞并且宿主胚胎是小鼠胚胎。

[0018] 在一个实施方案中,XY 供体细胞是来自近交小鼠品系的 ES 细胞。在一个实施方案中,XY 供体细胞是来自杂交或远交小鼠品系的 ES 细胞。

[0019] 在一个实施方案中,宿主胚胎是小鼠宿主胚胎。在一个实施方案中,小鼠宿主胚胎来自近交品系,在另一个实施方案中,来自杂交或远交品系。在一个实施方案中,供体细胞是小鼠供体细胞。在一个实施方案中,宿主胚胎和供体细胞都是小鼠,并且各自独立地选自其为 129 品系、C57BL/6 品系、129 和 C57BL/6 的杂种、BALB/c 品系或 Swiss Webster 品系的小鼠。在特定实施方案中,小鼠是 50% 129 和 50% C57BL/6。在一个实施方案中,小鼠是选自其为 129P1、129P2、129P3、129X1、129S1(例如 129S1/SV、129S1/SvIm)、129S2、129S4、129S5、129S9/SvEvH、129S6 (129/SvEvTac)、129S7、129S8、129T1、129T2 (参见例如,Festing 等人(1999) Revised nomenclature for strain129 mice、Mammalian Genome 10:836) 品系的 129 品系。在一个实施方案中,小鼠是 C57BL 品系,在特定实施方案中,选自 C57BL/A、C57BL/An、C57BL/GrFa、C57BL/KaLwN、C57BL/6、C57BL/6J、C57BL/6ByJ、C57BL/6NJ、C57BL/10、

C57BL/10ScSn、C57BL/10Cr、C57BL/01a。在特定实施方案中，小鼠是前述 129 品系和前述 C57BL/6 品系的杂种。在另一个特定实施方案中，小鼠是前述 129 品系的杂种或前述 BL/6 品系的杂种。在特定实施方案中，杂种的 129 品系是 129S6 (129/SvEvTac) 品系。

[0020] 在一个实施方案中，XY 雌性小鼠在其寿命期间产生 1、2、3、4、5、6、7、8 或 9 窝的活小鼠。在一个实施方案中，XY 雌性小鼠产生至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 只幼崽 / 窝。在一个实施方案中，XY 雌性小鼠产生约 4-6 只幼崽 / 窝。在一个实施方案中，XY 雌性小鼠产生 2-6 窝，其中每窝具有至少 2、3、4、5 或 6 只幼崽。在一个实施方案中，约 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45% 或 50% 的幼崽是 XY 雌性幼崽。在特定实施方案中，约 15%-25% 是 XY 雌性幼崽。

[0021] 在一个方面，提供了用于制备对于遗传修饰是纯合的小鼠的方法，采用对于遗传修饰是杂合的 XY ES 细胞。在一个实施方案中，该方法包括遗传修饰 XY 供体 ES 细胞，以形成杂合 XY 供体 ES 细胞，将杂合 XY 供体 ES 细胞维持在低盐和 / 或低摩尔渗透压浓度或低导电性培养基中，将杂合 XY 供体 ES 细胞引入桑椹胚前宿主胚胎内，使宿主胚胎孕育，在孕育后获得能育的 F0 代雌性 XY 小鼠，其包含杂合修饰且至少部分衍生自供体 ES 细胞，并且在孕育后获得能育的 F0 代雄性 XY 小鼠，其包含杂合修饰且至少部分衍生自供体 ES 细胞，并且使 F0 雄性和 F0 雌性交配，以获得包含纯合修饰的 F1 后代。

[0022] 在一个实施方案中，F0 代雌性 XY 小鼠和 / 或 F0 代雄性 XY 小鼠至少 20% 或更多衍生自供体 ES 细胞。在一个实施方案中，F0 雌性 XY 小鼠至少 30%、40%、50%、60%、70% 或 80% 衍生自供体 ES 细胞。

[0023] 在一个实施方案中，F0 代雌性 XY 小鼠和 / 或雄性 XY 小鼠至少 90% 衍生自供体 ES 细胞。在一个实施方案中，F0 雌性 XY 小鼠至少 92%、94%、96%、98%、99% 或 99.8% 衍生自供体 ES 细胞。在一个实施方案中，F0 代雌性 XY 小鼠和 / 或 F0 代雄性 XY 小鼠具有 100% 衍生自供体 ES 细胞的毛色。

[0024] 在一个实施方案中，F0 代小鼠包含 XY 卵母细胞。

[0025] 在一个实施方案中，F1 代后代小鼠包含完全衍生自供体 ES 细胞的基因组。

[0026] 在一个实施方案中，F0 代雄性和 F0 代雌性小鼠产生完全 ES 细胞衍生小鼠的杂交频率是 100%。

[0027] 在一个方面，提供了用于生成小鼠幼崽窝的方法，其包括将根据本发明制备的 XY 供体 ES 细胞引入宿主小鼠胚内，使胚胎在合适的小鼠中孕育，并且获得包含至少一只 XY 雌性小鼠幼崽的一窝小鼠幼崽，所述 XY 雌性小鼠幼崽在达到性成熟后是能育的 XY 雌性小鼠。

[0028] 在一个实施方案中，出生的在达到性成熟后是能育的 XY 雌性小鼠幼崽百分比是约 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45% 或 50%。在特定实施方案中，该百分比是约 15-25%。

[0029] 在一个方面，提供了用于将 XY ES 细胞维持在培养中的方法，其中在将 XY ES 细胞引入宿主胚胎内之后且在合适的雌性小鼠中孕育之后，在促进或支持雌性 XY 小鼠发育的条件下维持所述 XY ES 细胞。该方法包括将雄性 ES 细胞维持在包含基础培养基和补充物的合适培养基中，其中所述基础培养基显示约 240-320mOsm/kg 的摩尔渗透压浓度、约 10-14mS/cm 的导电性、约 50-105mM 的碱金属卤盐浓度、10-40mM 的碳酸盐浓度、和 / 或约 80-140mM 的合并的碱金属盐和碳酸盐浓度。在一个实施方案中，在引入宿主胚胎内之前，将 XY ES 细胞维持在所述培养基(具有用于维持 ES 细胞的补充物)中 1、2、3、4、5 或 6 天，或 1

周,8、9、110、11 或 12 天,2 周、3 周或 4 周的时期。在特定实施方案中,在引入宿主胚胎内之前,将 ES 细胞维持在所述培养基(具有用于维持 ES 细胞的补充物的低盐基础培养基)中约 2-4 周。

[0030] 在一个实施方案中,基础培养基显示至多约 320、310、300、290、280、270、260、250 或 240mOsm/kg 的摩尔渗透压浓度。在一个实施方案中,基础培养基显示至多约 240-320、250-310 或 260-300mOsm/kg 的摩尔渗透压浓度。在特定实施方案中,基础培养基显示约 270mOsm/kg 的摩尔渗透压浓度。

[0031] 在一个实施方案中,基础培养基显示至多约 10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.0、13.5 或 14.0mS/cm 的导电性。在一个实施方案中,基础培养基显示至多约 10-14mS/cm 或 11-13mS/cm 的导电性。在特定实施方案中,基础培养基显示约 12-13mS/cm 的导电性。

[0032] 在特定实施方案中,基础培养基显示约 12-13mS/cm 的导电性和约 260-300mOsm/kg 的摩尔渗透压浓度。在进一步的特定实施方案中,基础培养基包含浓度约 90mM NaCl 的氯化钠。在进一步的特定实施方案中,氯化钠的浓度是约 70-95mM。在进一步的特定实施方案中,基础培养基包含浓度小于约 35mM 的碳酸氢钠。在进一步的特定实施方案中,碳酸氢钠的浓度是约 20-30mM。

[0033] 在一个实施方案中,基础培养基显示至多约 100mM 的碱金属和卤素的盐浓度。在一个实施方案中,碱金属和卤素的盐是 NaCl。在一个实施方案中,碱金属和卤素的盐的浓度不高于 90、80、70、60 或 50mM。在一个实施方案中,在基础培养基中的碱金属和卤素的盐浓度是约 60-105、70-95 或 80-90mM。在特定实施方案中,该浓度是约 85mM。

[0034] 在一个实施方案中,基础培养基显示碳酸盐浓度。在一个实施方案中,碳酸盐是钠盐。在一个实施方案中,钠盐是碳酸氢钠。在一个实施方案中,在基础培养基中的碳酸盐浓度不高于 40、35、30、25 或 20mM。在一个实施方案中,在基础培养基中的碳酸盐浓度是约 10-40,在另一个实施方案中,是约 20-30mM。在特定实施方案中,该浓度是约 25 或 26mM。

[0035] 在一个实施方案中,在基础培养基中碱金属和卤素的盐以及碳酸盐的浓度总和是至多 140、130、120、110、100、90 或 80mM。在一个实施方案中,在基础培养基中碱金属和卤素的盐以及碳酸盐的浓度总和是约 80-140、85-130、90-120、95-120 或 100-120mM。在特定实施方案中,在基础培养基中碱金属和卤素的盐以及碳酸盐的浓度总和是约 115mM。

[0036] 在一个实施方案中,碱金属和卤素的盐以及碳酸盐的摩尔比高于 2.5。在一个实施方案中,该比是约 2.6-4.0、2.8-3.8、3-3.6 或 3.2-3.4。在一个实施方案中,该比是 3.3-3.5。在特定实施方案中,该比是 3.4。

[0037] 在一个实施方案中,基础培养基显示约 250-310mOsm/kg 的摩尔渗透压浓度,和约 60-105mM 的碱金属和卤素的盐浓度。在进一步的实施方案中,基础培养基具有约 20-30mM 的碳酸盐浓度。在进一步的实施方案中,碱金属和卤素的盐以及碳酸盐的浓度总和是约 80-140mM。在进一步的实施方案中,基础培养基的导电性是约 12-13mS/cm。

[0038] 在一个方面,提供了在如本文描述的条件下用于维持培养中的供体 XY ES 细胞的方法,其中在将供体 XY ES 细胞引入宿主胚胎内以形成嵌合胚,和嵌合胚在合适动物中孕育之后,嵌合胚发育成其为至少 90%XY 且在达到性成熟后是能育的雌性的小鼠幼崽。

[0039] 在一个实施方案中,小鼠幼崽是至少 92%、94%、96%、98% 或 99.8%XY。

[0040] 在一个方面,提供了用于制备能育的 XY 雌性动物的方法,其包括在将供体细胞引

入宿主胚胎内之前,将 XY 供体细胞维持在包含低盐基础培养基的培养基中,将供体细胞引入宿主胚胎内,使宿主胚胎在合适动物中孕育至足月,和在孕育后由其获得 XY 雌性动物,其中在达到性成熟后该 XY 雌性动物是能育的。

[0041] 在一个实施方案中,XY 供体细胞是小鼠 ES 细胞,并且宿主胚胎是来自 XX 雌性小鼠的胚胎。

[0042] 在一个实施方案中,供体细胞在其中维持的培养物包含如本文描述的基础培养基,和适合于维持培养中的小鼠 ES 细胞的一种或多种补充物。在特定实施方案中,适合于维持培养中的小鼠 ES 细胞的一种或多种补充物是 FBS (90mL FBS/0.5L 基础培养基)、谷氨酰胺 (2.4mmol/0.5L 基础培养基)、丙酮酸钠 (0.6mmol/0.5L 基础培养基)、非必需氨基酸 (<0.1mmol/0.5L 基础培养基)、2-巯基乙醇、LIF 和一种或多种抗生素。

[0043] 在一个实施方案中,在将供体细胞引入宿主胚胎内之前,将供体细胞维持在具有低盐基础培养基的培养基中至少 1、2、3、4、5 或 6 天,或 1 周,8、9、110、11 或 12 天,2 周、3 周或 4 周。在特定实施方案中,在将供体细胞引入宿主胚胎内之前,将供体细胞维持在具有低盐基础培养基的培养基中至少 2-4 周。

[0044] 在一个实施方案中,在将供体细胞引入宿主胚胎内之前,将供体细胞维持(例如冷冻)在包含低盐基础培养基的培养基中,并且将供体细胞解冻且维持在包含低盐基础培养基的培养基中至少 1、2、3 或 4 或更多天。在特定实施方案中,在引入宿主胚胎内之前,将供体细胞在包含低盐基础培养基的培养基中传代至少一次,将细胞在包含低盐基础培养基的培养基中冷冻,并且将细胞在包含低盐基础培养基的培养基中解冻且生长 1、2、3、4、5 或 6 天或更久,或 1 周,8、9、110、11 或 12 天,2 周、3 周或 4 周或更久。

[0045] 在一个实施方案中,在引入宿主胚胎内之前,将供体细胞维持一、二、三或四天的时期。在一个实施方案中,将供体细胞维持在包含所述基础培养基的培养基中 3 天的时期。

[0046] 在一个方面,提供了用于在相同 F0 代中制备各自完全衍生自供体 ES 细胞的可育的小鼠交配对的方法,其包括:将供体雄性小鼠 XYES 细胞维持在如本文描述的包含基础培养基和补充物的培养物中,其中所述 ES 细胞维持在基础培养基和补充物中至少一天的时期;将 ES 细胞引入宿主胚胎(例如来自 XX 小鼠)内以形成嵌合胚;使嵌合胚在合适小鼠中孕育至足月;且由合适小鼠获得一窝小鼠幼崽,其包含完全衍生自供体 ES 细胞的 F0 代能育的雄性 XY 小鼠,且包含完全衍生自供体 ES 细胞的 F0 代能育的雌性 XY 小鼠。

[0047] 在一个实施方案中,供体 ES 细胞包含遗传修饰。在一个实施方案中,供体 ES 细胞包含其为杂合的遗传修饰。在一个实施方案中,供体 ES 细胞包含杂合的遗传修饰,F0 代能育的雄性小鼠和 F0 代能育的雌性 XY 小鼠各自对于遗传修饰是杂合的,并且 F0 代能育的雄性和 F0 代能育的雌性彼此交配,且产生对于遗传修饰纯合的 F1 代小鼠的后代。

[0048] 在一个实施方案中,将 ES 细胞维持两天、三天或四天或更久的时期。

[0049] 在一个方面,提供了用于在 F0 代中制备能育的雌性 XY 小鼠的方法,其包括步骤(a)在包含基础培养基和适合于维持培养中的小鼠 ES 细胞的补充物的培养基中维持供体 XY 小鼠 ES 细胞,(b)将供体 XY 小鼠 ES 细胞引入宿主胚胎内,(c)孕育宿主胚胎,和(d)获得 XY 雌性小鼠后代,其中在达到性成熟后 XY 雌性小鼠是能育的。根据这个方面的基础培养基显示选自下述的一种或多种特征:(1)200mOsm/kg 至小于 329mOsm/kg 的摩尔渗透压浓度,(2)约 11-13mS/cm 的导电性,(3)浓度约 50-110mM 的碱金属和卤素的盐,(4)约 17-30mM

的碳酸盐浓度,和(5)约 85-130mM 的碱金属卤盐和碳酸盐总浓度。

[0050] 在一个实施方案中,供体 XY 小鼠 ES 细胞包含遗传修饰。在一些实施方案中,遗传修饰包含内源核酸序列、一个或多个核酸的取代、内源核酸序列由异源核酸序列的替换、敲除和敲入中的一种或多种。在一个特定实施方案中,遗传修饰是 STEAP2 基因的敲除。

[0051] 在一个实施方案中,基础培养基尤其含有(显示)50±5mM NaCl 和 26±5mM 碳酸盐,具有 218±22mOsm/kg 的摩尔渗透压浓度。在特定实施方案中,基础培养基显示约 3mg/mL NaCl 和 2.2mg/mL 碳酸氢钠,具有约 218mOsm/kg 的摩尔渗透压浓度。

[0052] 在另一个实施方案中,基础培养基显示 87±5mM NaCl 和 18±5mM,具有 261±26mOsm/kg 的摩尔渗透压浓度。在特定实施方案中,基础培养基显示约 5.1mg/mL NaCl 和 1.5mg/mL 碳酸氢钠,具有约 261mOsm/kg 的摩尔渗透压浓度。

[0053] 在另一个实施方案中,基础培养基显示 110±5mM NaCl 和 18±5mM 碳酸氢钠,具有 294±29mOsm/kg 的摩尔渗透压浓度。在特定实施方案中,基础培养基显示约 6.4mg/mL NaCl 和 1.5mg/mL 碳酸氢钠,具有约 294mOsm/kg 的摩尔渗透压浓度。

[0054] 在另一个实施方案中,基础培养基显示 87±5mM NaCl 和 26±5mM 碳酸氢钠,具有约 270±27mOsm/kg 的摩尔渗透压浓度。在特定实施方案中,基础培养基显示约 5.1mg/mL NaCl 和 2.2mg/mL 碳酸氢钠,具有约 270mOsm/kg 的摩尔渗透压浓度。

[0055] 在另一个实施方案中,基础培养基显示 87±5mM NaCl、26±5mM 碳酸氢钠和 86±5mM 葡萄糖,具有 322±32mOsm/kg 的摩尔渗透压浓度。在特定实施方案中,基础培养基显示约 5.1mg/mL NaCl、约 2.2mg/mL 碳酸氢钠和约 15.5mg/mL 葡萄糖,具有约 322mOsm/kg 的摩尔渗透压浓度。

[0056] 在一个方面,提供了用于在 F1 代中产生对于遗传修饰纯合的转基因小鼠的方法,其包括步骤(a)使根据前述方法产生的 F0 XY 能育的雌性小鼠与同期组群 F0 XY 雄性小鼠杂交,和(b)获得对于遗传修饰是杂合的 F1 后代小鼠。根据这个方面,F0 XY 能育的雌性小鼠和 F0 XY 雄性小鼠各自对于遗传修饰是杂合的。在一些实施方案中,遗传修饰包含内源核酸序列、一个或多个核酸的取代、内源核酸序列由异源核酸序列的替换、敲除和敲入中的一种或多种。

[0057] 在一个特定实施方案中,F0 XY 能育的雌性小鼠根据前述方法制备,其中基础培养基显示 50±5mM NaCl 和 26±5mM 碳酸盐,具有 218±22mOsm/kg 的摩尔渗透压浓度。在特定实施方案中,基础培养基显示约 3mg/mL NaCl 和 2.2mg/mL 碳酸氢钠,具有约 218mOsm/kg 的摩尔渗透压浓度。

[0058] 在一个方面,提供了根据前述方法产生的对于遗传修饰纯合的转基因小鼠。

[0059] 在一个方面,提供了根据前述方法中的任何产生的能育的雌性 XY 小鼠。在一个实施方案中,将由其衍生 XY 雌性小鼠的 ES 细胞维持在基础培养基中,所述基础培养基显示 50±5mM NaCl 和 26±5mM 碳酸钠,具有 218±22mOsm/kg 的摩尔渗透压浓度。在特定实施方案中,基础培养基显示约 3mg/mL NaCl 和 2.2mg/mL 碳酸钠,具有约 218mOsm/kg 的摩尔渗透压浓度。

[0060] 除非明确说明,或由上下文显而易见的,本文描述的任何方面或实施方案可以彼此组合。

[0061] 附图简述

[0062] 图 1 显示使用由不同 XY ES 细胞克隆制备的 F0 代雌性 XY 小鼠的交配结果。

[0063] 图 2 显示由 ES 细胞生成 XY 雌性小鼠, 所述 ES 细胞与低盐 DMEM、DMEM 或补充有 FS 的低盐 DMEM (Wnt-3a- 条件培养基, 即通过由 Wnt-3a 表达构建体转染的小鼠 L 细胞条件化的培养基)、NaCl 和 NaHCO₃ 一起温育。

[0064] 发明详述

[0065] 本公开内容中引用的所有出版物在此引入作为参考。

[0066] 短语“基础培养基”包括本领域已知的基础培养基(例如 DMEM), 其适合于用于(伴随加入的补充物) 生长或维持培养中的 ES 细胞。适合于制备能育的 XY 雌性的基础培养基(即, “低盐 DMEM”)不同于一般用于将 ES 细胞维持在培养中的基础培养基。为了一般而言讨论基础培养基的目的, 不适合于制备能育的 XY 雌性的基础培养基在这个部分和下表中(例如一般的 DMEM 培养基)描述为“DMEM”。为了讨论适合于制备能育的 XY 雌性的基础培养基的目的, 使用短语“低盐 DMEM”。在一般用于维持培养中的 ES 细胞的基础培养基(例如 DMEM) 和适合于制备能育的 XY 雌性的基础培养基(例如“低盐 DMEM”)之间的差异在本文中连接。短语“低盐 DMEM”为了方便使用; 用于制备能育的 XY 雌性的合适 DMEM 显示不限于“低盐”的特征, 还包括本文描述的那些。例如, 通过改变如对于本文提供的氯化钠和 / 或碳酸氢钠浓度, 如与表 1 中所示的 DMEM 相比较的, 其还导致不同的摩尔渗透压浓度和不同的导电性, 表 1 中所示的 DMEM 可以制备为适合于制备能育的 XY 雌性的。基础培养基的例子是以多种形式的达尔贝科改良伊格尔培养基(DMEM)(例如 Invitrogen DMEM, 目录号 11971-025)(表 1)。合适的低盐 DMEM 可作为 KO-DMEM™ (Invitrogen 目录号 10829-018) 商购获得。当用于维持培养中的细胞用于用作供体细胞时, 基础培养基一般补充有本领域已知的许多补充物。此类补充物在本公开内容中指示为“补充物”或“+ 补充物”。

表 1: 用于维持 ES 细胞的 DMEM 基础培养基

组分	mg/L	mM
甘氨酸	30	0.4
L-精氨酸•HCl	84	0.398
L-胱氨酸•2HCl	63	0.201
L-谷氨酰胺	584	4
L-组氨酸•HCl•H ₂ O	42	0.2
L-异亮氨酸	105	0.802
L-亮氨酸	105	0.802
L-赖氨酸•HCl	146	0.798
L-甲硫氨酸	30	0.201
L-苯丙氨酸	66	0.4
L-丝氨酸	42	0.4
L-苏氨酸	95	0.798
L-色氨酸	16	0.0784
L-酪氨酸二钠盐二水合物	104	0.398
L-缬氨酸	94	0.803

[0067]

[0068]

氯化胆碱	4	0.0286
D-泛酸钙	4	8.39×10^{-3}
叶酸	4	9.07×10^{-3}
烟酰胺	4	0.0328
吡哆醇•HCl	4	0.0196
核黄素	0.4	1.06×10^{-3}
硫胺•HCl	4	0.0119
i-肌醇	7.2	0.04
氯化钙 (CaCl ₂) (无水)	200	1.8
硝酸铁 (Fe (NO ₃) ₃ •9H ₂ O)	0.1	2.48×10^{-4}
硫酸镁 (MgSO ₄) (无水)	97.67	0.814
氯化钾 (KCl)	400	5.33
D-葡萄糖 (右旋糖)	4500	25
酚红	15	0.0399
DMEM 的 NaCl/NaHCO₃ 含量		
碳酸氢钠 (NaHCO ₃)	3700	44.05
氯化钠 (NaCl)	6400	110.34
低盐 DMEM 的 NaCl/NaHCO₃ 含量		
碳酸氢钠 (NaHCO ₃)	< 3700	< 44.05
氯化钠 (NaCl)	< 6400	< 110.34

[0069] 术语“补充物”或短语“+ 补充物”包括加入基础培养基用于生长或维持培养中的供体细胞的元素,例如用于维持培养中的供体细胞的多能性或全能性。例如,适合于生长或维持培养中的非人 ES 细胞的培养基补充物包括胎牛血清(FBS)、谷氨酰胺、青霉素和链霉素(例如青霉素 - 链霉素(penstrep))、丙酮酸盐(例如丙酮酸钠)、非必需氨基酸(例如 MEM NEAA)、2- 巯基乙醇和 LIF。

[0070] 在用于维持培养中的非人供体细胞的培养基的多个实施方案中,向约 500mL 基础培养基中加入下述补充物:约 90mL FBS(例如 Hyclone FBS 目录号 SH30070.03)、约 2.4 毫摩尔谷氨酰胺(例如约 12mL 200mM 谷氨酰胺溶液,例如 Invitrogen 目录号 25030-081)、青霉素:链霉素(例如 60,000 单位的青霉素 G 钠和 60mg 硫酸链霉素,具有约 51mg NaCl;例如约 6mL Invitrogen 青霉素 - 链霉素,目录号 15140-122)、约 0.6 毫摩尔丙酮酸钠(例如 6mL 100mM 丙酮酸钠,Invitrogen 目录号 11360-070)、约 0.06 毫摩尔非必需氨基酸(例如约 6mL MEM NEAA,例如来自 Invitrogen 目录号 11140-050 的 MEMNEAA)、约 1.2mL 2- 巯基乙醇、和约 1.2 微克 LIF(例如约 120 微升 10^6 单位/mL LIF 制剂;例如约 120 微升 Millipore ESGRO™-LIF,目录号 ESG1107)。当组成用于维持 XY ES 细胞的基础培养基用于制备能育的 XY 雌性时,一般地采用以约相同量的相同补充物,但基础培养基的组成将不同(于 DMEM,例如上表中所述的培养基),并且差异对应于本文教导的差异。

[0071] 在一些实施方案中,补充物包括 Wnt 条件化培养基,例如 Wnt-3a 条件化培养基。

[0072] 提及供体细胞和 / 或宿主胚胎的术语“动物”包括哺乳动物、鱼和鸟。哺乳动物包

括例如人、非人灵长类动物、啮齿类动物(例如小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠)、家畜(例如牛物种,例如母牛、阉牛等;羊物种例如绵羊、山羊等;和猪物种,例如猪和公猪)。鸟包括例如鸡、火鸡、鸵鸟、鹅、鸭等。提及供体细胞和/或宿主胚胎的短语“非人哺乳动物”排除人。

[0073] 在多个实施方案中,供体细胞和/或宿主胚胎不来自下述中的一种或多种:原鼠属物种(*Akodon* spp.)、林旅鼠属物种(*Myopus* spp.)、田鼠属物种(*Microtus* spp.)、鼯鼠属物种(*Talpa* spp.)。在多个实施方案中,供体细胞和/或宿主胚胎不来自其中正常野生型特征是XY雌性生育力的任何物种。在多个实施方案中,当遗传修饰存在于供体细胞或宿主胚胎中时,遗传修饰不是XYY或XXY、Tdy- 阴性性逆转、Tdy- 阳性性逆转、X0修饰、非整倍性、SRY易位或修饰、*fgf9*^{-/-}基因型、或SOX9修饰。

[0074] 概述

[0075] 用于由供体ES细胞和宿主胚胎制备非人动物例如小鼠的方法是本领域已知的。供体ES细胞就特定特征加以选择,所述特定特征增强细胞繁殖宿主胚胎的能力,且从而部分或大部分促成由供体ES细胞和宿主胚胎形成的动物。形成的动物可以是雄性或雌性,大部分基于ES细胞的基因型(例如XY或XX)。

[0076] 用于制备小鼠的大多数ES细胞系具有雄性XY基因型。因为Y染色体在哺乳动物性别决定中的优势,所以当引入宿主胚胎内且孕育时,XY ES细胞几乎总是导致在表型雄性动物中的第一代(F0),其为嵌合体,即含有衍生自雄性供体ES细胞(XY)的细胞和衍生自宿主胚胎的细胞,其可以是雄性(XY)或雌性的(XX)。就在F0代中观察到表型雌性而言,这些一般起于XY ES细胞引入雌性XX胚胎内,这导致其ES细胞贡献不足以雄性化胚胎生殖脊的嵌合体。在大多数情况下,此类雌性嵌合体不产生衍生自XY ES细胞的卵母细胞,且因此不能将ES细胞基因组传递给下一代。在罕见情况下,雌性嵌合体不产生衍生自XY ES细胞的卵母细胞;这些雌性可以将ES细胞基因组传递给下一代(参见例如,Bronson等人(1995) High incidence of XXY and XYY males among the offspring of female chimeras from embryonic stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 92:3120-3123)。

[0077] 具有XY基因型的表型雌性小鼠可以由于特定突变而出现。参见例如, Lovell-Badge等人(1990) XY female mice resulting from a heritable mutation in the primary testis determining gene, Tdy, *Development* 109:635-646;还参见 Colvin等人(2001) Male-to-Female Sex Reversal in Mice Lacking Fibroblast Growth Factor 9, *Cell* 104 (6):875-889 (在出生时死于肺发育不全的 *Fgf*^{-/-}XY雌性)。啮齿类动物的南美原鼠属物种包含XY雌性(参见例如, Hoekstra等人(2000) Multiple origins of XY female mice (genus *Akodon*): phylogenetic and chromosomal evidence, *Proc. R. Soc. Lond. B* 267:1825-1831),但来自此类小鼠的ES细胞系一般是不可用的且并未广泛使用,如果发生的话。

[0078] 在一些情况下,例如使用**VELOCIMOUSE®**方法(参见例如,美国专利号 7,659,442、7,576,259、7,294,754 和 Poueymirou等人(2007) F0 generation mice fully derived from gene-targeted embryonic stem cells allowing immediate phenotypic analyses, *Nat. Biotech.* 25 (1):91-99;各自在此引入作为参考),可以获得完全衍生自供体ES细胞的F0代小鼠。在正常情况和标准实验条件下,XY供体ES细胞仅产生表型雄性的完全ES细胞衍生的小鼠,而其为XX或X)(已丧失Y染色体的XY ES细胞)的ES细胞仅

产生表型雌性的完全 ES 细胞衍生的小鼠。为了由雄性和雌性的完全 ES 细胞衍生的小鼠产生具有纯合靶向突变的小鼠,需要后续两代的交配,以首先产生 F1 代杂合的雄性和雌性,当互交时,其具有在 F2 代中产生纯合后代的潜力。

[0079] 本发明人已设想用于由 XY 供体细胞(例如衍生自表型雄性小鼠的 XY 供体细胞)和合适的宿主胚胎制备表型雌性的能育 XY 小鼠的方法。该方法包括在 F0 代中制备此类小鼠,这允许在 F0 代中形成交配对(雄性 F0 和雌性 F0)。当供体细胞包含杂合的遗传修饰,并且需要纯合小鼠时,这是特别有用的。尽管本公开内容在由供体小鼠 XY ES 细胞制备表型雌性的能育 XY 小鼠的背景中举例说明本发明,但本文描述的方法和组合物可以应用于由任何合适的非人细胞(例如 iPS 细胞、ES 细胞或多能细胞)和任何合适的非人胚胎制备表型雌性的 XY 能育的非人动物。

[0080] 描述了包括用于维持供体细胞的条件的的方法和组合物,从而使得当通过将供体细胞引入宿主胚胎内,供体细胞用于生成动物时,如此生成的动物包括表型雌性的能育 XY 动物。表型雌性的能育 XY 动物包括显示足够的表型雌性特征的动物,以排卵且在通过动物中的排卵产生的卵子受精后孕育胚胎,包括将胚胎孕育至足月,且生育活产动物。

[0081] 本发明人已设想在多个实施方案中至少约 10%、15%、20% 或 25% 或更多倍导致由 XY 小鼠 ES 细胞出生能育的雌性 XY 小鼠的方法。

[0082] 畜牧业

[0083] 在一个方面,提供了用于由精细胞和卵细胞生成雌性动物的方法,其包括在受精前将精细胞和 / 或卵细胞维持在包含低盐基础培养基的培养基中一、二、三或四天或更多天,使精细胞和卵细胞在允许受精的条件下接触以形成受精卵,将受精卵植入合适的宿主中用于孕育,在宿主中孕育,且获得包含雌性动物的一窝动物。

[0084] 在一个实施方案中,在植入合适的宿主中之前,受精卵进一步在包含低盐基础培养基的培养基中维持一、二、三或四天或更多天。

[0085] 在一个方面,提供了用于支持由受精卵或胚胎生成雌性动物的方法,其包括在植入合适的宿主中之前,将受精卵或胚胎在包含低盐基础培养基的培养基中维持一、二、三或四天或更多天,将受精卵或胚胎植入合适的宿主中用于孕育,在宿主中孕育受精卵或胚胎,且获得包含雌性动物的一窝动物。

[0086] 在一个方面,本发明的方法或组合物用于制备雌性宠物、雌性驯养农场动物、作为科学研究受试者的雌性动物、或濒临灭绝的物种的动物。在一个实施方案中,动物是小鼠、大鼠、仓鼠、猴、猿、猫、犬、母牛、马、公牛、绵羊、山羊、猪、鹿和野牛。

实施例

[0087] 实施例 1 :供体 XY ES 细胞和宿主胚胎

[0088] 供体细胞和宿主胚胎。供体 ES 细胞是 129S6C57B16/F1 杂种 ES 细胞。供体 ES 细胞在含有 10%DMSO 的冷冻培养基中冷冻直至使用时。解冻后,将供体 ES 细胞维持在如下所述的基础培养基和补充物中。宿主胚胎来自 Swiss Webster (SW) 小鼠,且维持在 KSOM 培养基(Millipore)中直至使用时。如先前所述获得八-细胞胚(Poueymirou 等人(2007) Nature Biotech. 25 (1):91-99 ;美国专利号 7,659,442、7,576,259 和 7,294,754)。

[0089] DMEM ES 细胞 :在 DMEM 制备且冷冻的 ES 细胞在 DMEM 中解冻,生长三天,且显微注

射到在 DMEM 中的宿主胚胎内。

[0090] 低盐 DMEM ES 细胞:在低盐 DMEM 制备且冷冻的 ES 细胞在低盐 DMEM (KO-DMEM)中解冻,生长三天,且显微注射到在 DMEM 中的宿主胚胎内。

[0091] FS 低盐 DMEM:在低盐 DMEM 制备且冷冻的 ES 细胞在低盐 DMEM(440mL)+10%Wnt-3a 条件化培养基(FS) (60mL) 中解冻且维持,且显微注射到在 DMEM 中的宿主胚胎内。

[0092] 低盐 DMEM+NaCl+NaHCO₃:ES 细胞在具有 NaCl (1, 300mg/L) 和 NaHCO₃ (1, 500mg/L) 添加的低盐 DMEM 中制备且冷冻,且显微注射到在 DMEM 中的宿主胚胎内。

[0093] 10%Wnt-3a 条件化培养基(FS):由用 Wnt-3a 表达载体(ATCCCL-2647) 转化的小鼠 L 细胞的培养物制备 Wnt-3a 条件化培养基。L 细胞根据 ATCC 说明(除了使用 KO-DMEM™ 代替 DMEM 外) 在 Fibrastage™ (New Brunswick) 系统中生长。

[0094] 实施例 2:制备衍生自供体 ES 细胞的 F0 代小鼠

[0095] 生成 F0 代小鼠。如先前所述(Poueymirou 等人(2007) Nature Biotech. 25 (1):91-99; 美国专利号 7,659,442、7,576,259 和 7,294,754), 使用 **VELOCIMOUSE®** 方法将供体 ES 细胞引入 8- 细胞期桑椹胚前宿主胚胎内,除了将小鼠 ES 细胞维持在如本文描述的基础培养基加上补充物中。对于显微注射,使 ES 细胞生长且显微注射到胚胎内,并且在植入代孕母亲内之前,将胚胎在 KSOM 或 DMEM 培养基中培养过夜。

[0096] 实施例 3:来自 XY ES 细胞的 F0 代能育的雌性小鼠

[0097] 在一般方案中,在 KO-DMEM™ 的存在下将 ES 细胞解冻且生长用于一次传代(约 5 五天)。随后将传代细胞与基因靶向载体一起电穿孔,且随后在包含 KO-DMEM™ (Invitrogen 目录号 10829-018) 的培养基中置于选择下 10 天。收获药物抗性细胞且在包含 KO-DMEM™ 的培养基中扩增,随后冷冻。对于显微注射,将细胞在 KO-DMEM™ 中解冻且在 KO-DMEM™ 中生长 3 天,随后显微注射到在 DMEM 中的胚胎内。随后将胚胎引入代孕母亲内用于孕育。

[0098] 小鼠幼崽最初基于外生殖器的外观表征为雄性或雌性,以便选择交配对。

[0099] 图 1 显示 F0 XY 雌性显示高比率的生育力。33 个 F0 XY 雌性中的二十一个产生一窝动物。

[0100] 实施例 4:比较 DMEM 与低盐 DMEM

[0101] 摩尔渗透压浓度在 **Advanced®** 型号 3250 Single-Sample 渗压计上进行测量。导电性在 Mettler Toledo GmbH SevenMulti™ ECN #15055 电导计上进行测量。

[0102] 研究低盐 DMEM 和 DMEM (各自具有补充物) 对由 XY ES 细胞形成 F0 代 XY 雌性的作用。表 2 显示含和不含另外的盐和 / 或补充物的基础培养基的摩尔渗透压浓度和导电性值。指示物“+ 补充物”= 下述的添加(向 0.5L 基础培养基中):90mL Hyclone FBS (目录号 SH30070.03)、12mL Invitrogen 谷氨酰胺溶液(目录号 25030-081)、6mL Invitrogen Pen Strep (目录号 15140-122)、6mL Invitrogen 丙酮酸钠(目录号 11360-070)、6mL MEM NEAA (Invitrogen 目录号 11140-050)、1.2mL 2- 巯基乙醇和 120 微升 Millipore ESGRO™-LIF (目录号 ESG1107)。

[0103] 图 2 显示在显微注射到宿主胚胎内之前,在不同培养基中生长的 XY ES 细胞的比较。XY ES 细胞在低盐 DMEM 中生长且维持且随后注射到胚胎内,产生 XY 雌性。XY ES 细胞在补充有 NaCl 和 NaHCO₃ 的低盐 DMEM 中生长且维持且随后注射到胚胎内,不产生 XY 雌性。

这证实当 XY ES 细胞在低盐 DMEM 中维持时,促进 XY 雌性产生,并且通过改变基础培养基的盐浓度可以控制 XY ES 细胞的性别比。将 Wnt-3a 条件化培养基(10%FS)加入低盐 DMEM 中增加 F0 XY 雌性产生的频率。

[0104] 此外,当 ES 细胞维持在低盐 DMEM 中时,在 F0 中生成 ES 细胞衍生的小鼠的效率增加。ES 细胞衍生的幼崽与在 F0 代中生成的总幼崽的比从在 DMEM 中维持的 ES 细胞的约 23% 增加到在低盐 DMEM 中维持的 ES 细胞的 61%,到在补充有 10%Wnt-3a 条件化培养基的低盐 DMEM 中维持的 ES 细胞的 72%。参见图 2。

[0105]

表 2: DMEM 和低盐 DMEM 物理特征的比较		
用于 ES 细胞的培养基	导电性 (mS/cm)	摩尔渗透压浓度 (mOsm/kg)
低盐 DMEM, 单独的	12.84	270
DMEM, 单独的	15.40	337

[0106]

低盐 DMEM + NaHCO ₃ + NaCl, 单独的	15.82	342
低盐 DMEM, + 补充物	12.75	279
DMEM, + 补充物	14.91	330
低盐 DMEM + NaHCO ₃ + NaCl, + 补充物	15.29	335

[0107] 实施例 5 :F0 代小鼠的分析

[0108] 毛色。就来自供体 XY ES 细胞(刺豚鼠皮毛上的深浅环纹(agouti))和宿主胚胎(白色)的毛色贡献分析小鼠。F0 代小鼠无一显示来自宿主胚胎的任何毛色贡献。

[0109] 性别。F0 代幼崽通过外生殖器的目视检查鉴定为雌性或雄性。F0 幼崽基于目视检查指定性别且配对用于交配。

[0110] 基因分型。使用对于 X 染色体上的序列特异性的 TAQMAN™QPCR 测定法检测 X 染色体的存在。使用对于 Y 染色体上的序列特异性的 TAQMAN™ QPCR 测定法检测 Y 染色体的存在。表型雌性 F0 代小鼠的基因分型指出在测试的那些表型雌性小鼠中 X 染色体的单个拷贝和 Y 染色体的单个拷贝。

[0111] 核型分型。将六个 F0 代 XY 雌性进行核型分型。核型分型结果指出所有 6 个都具有正常 X 和正常 Y 染色体。

[0112] XY 雌性生殖解剖学。就内部生殖器官检查几个 F0 代 XY 雌性。检查的所有 F0 XY 雌性看起来都具有正常雌性内部生殖器官。来自每个生殖器官(卵巢、输卵管、子宫)的组织样品进行基因分型,并且结果指出组织具有一致的 XY 基因型。

[0113] 实施例 6 :摩尔渗透压浓度对生成 ES 细胞衍生的幼崽和 XY 雌性的效率的作用分析

[0114] 为了测定摩尔渗透压浓度对由维持在低盐、低碳酸盐 DMEM 中的 XY ES 细胞生成 XY 雌性的作用,将葡萄糖加入低盐、低碳酸盐 DMEM 中,以使摩尔渗透压浓度达到在 DMEM 内的那种。摩尔渗透压浓度在 **Advanced®** 型号 3250 Single-Sample 渗压计上进行测量。

[0115] 将供体 XY ES 细胞维持在尤其含有 5.1mg/ml NaCl、2.2mg/ml NaHCO₃ 和 15.5mg/ml 葡萄糖,具有 322mOsm/kg 的摩尔渗透压浓度的低盐、低碳酸盐、高葡萄糖 DMEM (“DMEM-LS/LC/HG”)中。在根据**VELOCIMOUSE®**方法(同上)将所述 ES 细胞转移到胚胎内之后,所有所得到的 ES 细胞衍生的 F0 后代的 15% 是表型雌性的 XY 小鼠。作为阴性对照,在 F0 代中,无表型雌性的 XY 小鼠衍生自维持在 DMEM (“DMEM”:6.4mg/ml NaCl、3.7mg/ml NaHCO₃ 和 4.5mg/ml 葡萄糖;329mOsm/kg)中的 ES 细胞。这个 15%F0 XY 雌性结果在来自 DMEM 衍生的 ES 细胞(329mOsm/L)的 0%F0 XY 雌性和衍生自维持在低盐、低碳酸盐 DMEM (“DMEM-LS/LC”:5.1mg/ml NaCl、2.2mg/ml NaHCO₃ 和 4.5mg/ml 葡萄糖;270mOsm/kg)中的 ES 细胞的 27.8%F0 XY 雌性小鼠之间。因此,一个解释是摩尔渗透压浓度提供一些但并非全部雌性化效应。备选解释是低盐和 / 或低碳酸盐提供雌性化效应,并且高葡萄糖在一定程度上阻碍 XY ES 细胞的雌性化。参见表 3。

[0116]

表 3: 摩尔渗透压浓度、盐和碳酸盐对 ES 细胞衍生的幼崽和 F0 XY 雌性的作用

培养基	摩尔渗透压 浓度 (mOsm/kg)	NaCl (mg/mL)	NaHCO ₃ (mg/mL)	葡萄糖 (mg/mL)	ES 衍生 的幼崽 / 总幼崽	ES 衍生的幼崽	
						XY 雄性	XY 雌性
DMEM	329	6.4	3.7	4.5	13/58 (22.4%)	13/13	0/13 (0%)
DMEM- LS/LC	270	5.1	2.2	4.5	36/71 (50.7%)	26/36	10/36 (27.8%)
DMEM- LS/LC/HG	322	5.1	2.2	15.5	20/50 (40%)	17/20	3/20 (15%)
DMEM- VLS/LC	218	3.0	2.2	4.5	53/58 (91.4%)	35/53	18/53 (34.0%)
DMEM- LS/VLC	261	5.1	1.5	4.5	50/57 (87.7%)	33/50	17/50 (34%)
DMEM- VLC	294	6.4	1.5	4.5	49/68 (72.1%)	35/49	14/49 (28.6%)

[0117] 此外,当 ES 细胞维持在 DMEM-LS/LC/HG 中时,在 F0 中生成 ES 细胞衍生的小鼠的效率(表 3)(即,约 40%)大于维持在 DMEM 中的 ES 细胞的那种(即,约 22%),但不如维持在 DMEM-LS/LC 中的 ES 细胞的那种(即,约 51%)那么高。参见表 3。

[0118] 实施例 7:盐浓度对生成 ES 细胞衍生的幼崽和 XY 雌性的效率的作用分析

[0119] 为了测定盐浓度或离子强度对由 XY ES 细胞生成 XY 雌性的作用,将 ES 细胞维持在极低盐(DMEM-VLS/LC:3.0mg/mL NaCl、2.2mg/mL NaHCO₃、4.5mg/mL 葡萄糖,以 218mOsm/kg)中。在根据**VELOCIMOUSE®**方法(同上)将所述 ES 细胞转移到胚胎内之后,所有所得到的 ES 细胞衍生的 F0 后代的 34% 是表型雌性的 XY 小鼠;略微增加超过 27.8% 的 DMEM-LS/LC 对照水平。有趣的是,起因于维持在 DMEM-VLS/LC 培养基中的 ES 细胞转移的 91.4%F0 幼崽是 ES 细胞衍生的;而仅 50.7% 和 22.4% 是分别在 DMEM-LS/LC 和 DMEM 对照中

衍生的 ES 细胞。

[0120] 在另一个实验中,将 ES 细胞维持在高盐和低碳酸盐培养基(DMEM-HS/VLC: 6.4mg/mL NaCl、1.5mg/mL NaHCO₃、4.5mg/mL 葡萄糖,以 294mOsm/kg)中。在根据 **VELOCIMOUSE®**方法(同上)将所述 ES 细胞转移到胚胎内之后,所有所得到的 ES 细胞衍生的 F0 后代的 28.6% 是表型雌性的 XY 小鼠;略微增加超过 27.8% 的 DMEM-LS/LC 对照水平。有趣的是,起因于维持在 DMEM-HS/VLC 培养基中的 ES 细胞转移的 72.1%F0 幼崽是 ES 细胞衍生的;而仅 50.7% 和 22.4% 是分别在 DMEM-LS/LC 和 DMEM 对照中衍生的 ES 细胞。

[0121] 这些结果证实低盐和 / 或低碳酸盐都促成 ES 细胞衍生的 F0 后代比例以及 F0 XY 雌性中的增加。(参见表 3。)

[0122] 实施例 8:碳酸盐浓度对生成 ES 细胞衍生的幼崽和 XY 雌性的效率的作用分析

[0123] 为了测定碳酸盐浓度对由 XY ES 细胞生成 XY 雌性的作用,将 ES 细胞维持在低盐和极低碳酸盐培养基(DMEM-LS/VLC: 5.1mg/mL NaCl、1.5mg/mL NaHCO₃、4.5mg/mL 葡萄糖,以 261mOsm/kg)中。在根据 **VELOCIMOUSE®**方法(同上)将所述 ES 细胞转移到胚胎内之后,所有所得到的 ES 细胞衍生的 F0 后代的 34% 是表型雌性的 XY 小鼠;略微增加超过 27.8% 的 DMEM-LS/LC 对照水平。有趣的是,起因于维持在 DMEM-LS/VLC 培养基中的 ES 细胞转移的 87.7%F0 幼崽是 ES 细胞衍生的;而仅 50.7% 和 22.4% 是分别在 DMEM-LS/LC 和 DMEM 对照中衍生的 ES 细胞。

[0124] 这些结果证实低碳酸盐促成 ES 细胞衍生的 F0 后代比例以及 F0XY 雌性中的增加。(参见表 3。)

[0125] 实施例 9:F0 XY 雌性小鼠的表型

[0126] 与相同品系的 F1 XX 表型雌性小鼠相比较,F0 XY 表型雌性小鼠显示相对正常的表型属性。然而,XY 雌性小鼠的确显示对于每个物理参数更大范围的值。成年 XY 雌性的体重范围为约 15 克到约 30 克,具有约 21.5 克的平均值。成年 XX 雌性的体重范围为约 16 克到约 17 克,具有约 16.8 克的平均值。

[0127] 测定在肛门和生殖器之间的距离比且计算为体质量的比(肛门与生殖器的距离(cm)/体质量(g))。关于 F0 XY 雌性的比范围为约 0.11cm/g 到约 0.24cm/g,具有约 0.16cm/g 的平均值。关于 F1 XX 雌性的比范围为约 0.17cm/g 到约 0.19cm/g,具有约 0.18cm/g 的平均值。

[0128] 在关于 XY 雌性小鼠和 XX 雌性小鼠的多个器官(例如肝、肾、心与肺、和脾)的相对质量之间不存在显著差异。相对质量表示为器官质量(mg)/体质量(g)。F0 X0 雌性的肝的相对质量范围为约 35mg/g 到约 50mg/g,具有约 42mg/g 的平均值。F1 XX 雌性的肝的相对质量范围为约 37.5mg/g 到约 46.9mg/g,具有约 42.5mg/g 的平均值。F0 X0 雌性的肾的相对质量范围为约 11.5mg/g 到约 15mg/g,具有约 13.4mg/g 的平均值。F1 XX 雌性的肾的相对质量范围为约 12.6mg/g 到约 13.8mg/g,具有约 13.7mg/g 的平均值。F0 X0 雌性的心与肺的相对合并质量范围为约 14.3mg/g 到约 18.9mg/g,具有约 16.1mg/g 的平均值。F1 XX 雌性的心与肺的相对合并质量范围为约 14.7mg/g 到约 16.1mg/g,具有约 15.9mg/g 的平均值。F0 X0 雌性的脾的相对质量范围为约 2.7mg/g 到约 6.6mg/g,具有约 3.3mg/g 的平均值。F1 XX 雌性的脾的相对质量范围为约 2.7mg/g 到约 4.0mg/g,具有约 3.8mg/g 的平均值。

[0129] 与同基因的 F1 XX 雌性相比较,F0 XY 雌性小鼠显示具有相对正常的电解质、酶、

葡萄糖、蛋白质、脂质和其他标记的血清水平。然而,XY 雌性小鼠的确显示对于每种测量的血清参数更大范围的值。成年 XY 雌性的血清钠水平范围为约 150mEq/L 到约 159mEq/L;并且关于 XX 雌性的水平范围为约 148mEq/L 到约 155mEq/L。

[0130] 成年 XY 雌性的血清钾水平范围为约 0.7mEq/L 到约 7mEq/L;并且关于 XX 雌性的水平为约 0.7mEq/L。

[0131] 成年 XY 雌性的血清氯化物水平范围为约 111mEq/L 到约 121mEq/L;并且关于 XX 雌性的水平范围为约 113mEq/L 到约 120mEq/L。

[0132] 成年 XY 雌性的血清钙水平范围为约 7mEq/L 到约 9mEq/L;并且关于 XX 雌性的水平为约 7mEq/L。

[0133] 成年 XY 雌性的血清碱性磷酸酶水平范围为约 124U/L 到约 285U/L;并且关于 XX 雌性的水平范围为约 191U/L 到约 236U/L。

[0134] 成年 XY 雌性的血清丙氨酸氨基转移酶水平范围为约 21U/L 到约 285U/L;并且关于 XX 雌性的水平范围为约 13U/L 到约 34U/L。

[0135] 成年 XY 雌性的血清天冬氨酸氨基转移酶水平范围为约 42U/L 到约 190U/L;并且关于 XX 雌性的水平范围为约 42U/L 到约 269U/L。

[0136] 成年 XY 雌性的血清脂肪酶水平范围为约 16U/L 到约 49U/L;并且关于 XX 雌性的水平范围为约 21U/L 到约 26U/L。

[0137] 成年 XY 雌性的血清葡萄糖水平范围为约 227mg/dL 到约 319mg/dL;并且关于 XX 雌性的水平范围为约 255mg/dL 到约 270mg/dL。

[0138] 成年 XY 雌性的总血清蛋白质水平范围为约 4.6mg/dL 到约 5.2mg/dL;并且关于 XX 雌性的水平范围为约 4.6mg/dL 到约 4.8mg/dL。

[0139] 成年 XY 雌性的血清白蛋白水平范围为约 3mg/dL 到约 3.5mg/dL;并且关于 XX 雌性的水平范围为约 3.1mg/dL 到约 3.2mg/dL。

[0140] 成年 XY 雌性的血清胆固醇(总)水平范围为约 58mg/dL 到约 108mg/dL;并且关于 XX 雌性的水平范围为约 61mg/dL 到约 85mg/dL。

[0141] 成年 XY 雌性的血清甘油三酯水平范围为约 42mg/dL 到约 89mg/dL;并且关于 XX 雌性的水平范围为约 39mg/dL 到约 48mg/dL。

[0142] 成年 XY 雌性的血清 HDL 水平范围为约 29mg/dL 到约 57mg/dL;并且关于 XX 雌性的水平范围为约 23mg/dL 到约 42mg/dL。

[0143] 成年 XY 雌性的血清 LDL 水平范围为约 3.7mg/dL 到约 11mg/dL;并且关于 XX 雌性的水平范围为约 3.7mg/dL 到约 13mg/dL。

[0144] 成年 XY 雌性的血尿素氮(BUN)水平范围为约 12mg/dL 到约 27mg/dL;并且关于 XX 雌性的水平范围为约 18mg/dL 到约 21mg/dL。

[0145] 成年 XY 雌性的血清镁水平范围为约 1.6mg/dL 到约 3.2mg/dL;并且关于 XX 雌性的水平范围为约 2.1mg/dL。

[0146] 成年 XY 雌性的血清无机磷酸盐水平范围为约 5.1mg/dL 到约 10mg/dL;并且关于 XX 雌性的水平范围为约 7.2mg/dL 到约 8.4mg/dL。

[0147] 成年 XY 雌性的血清尿酸水平范围为约 0.9mg/dL 到约 3.5mg/dL;并且关于 XX 雌性的水平范围为约 0.7mg/dL 到约 2.2mg/dL。

[0148] 实施例 10 :在 F1 代中纯合的遗传修饰的小鼠的产生

[0149] 为了测定是否可以制备对于遗传修饰纯合的 F1 小鼠,使含有 STEAP2 基因的至少一个敲除的等位基因的 F0 XY 雌性小鼠与含有相同 STEAP2 基因敲除的 XY 雄性同期组群配对。(STEAP2 (六次跨膜的前列腺上皮抗原 2)基因编码具有铁还原酶和铜还原酶活性的假定的 6 膜金属还原酶,并且已显示在体外刺激铁和铜的细胞摄取。作为细胞表面抗原,STEAP2 是前列腺癌中的潜在诊断或治疗靶。STEAP2 在未处理的原发性和激素难治性前列腺癌中都显著高于良性前列腺增生中,暗示它可能涉及前列腺癌的发展。STEAP2 KO 小鼠仍未得到报道。参见 Ohgami 等人, BLOOD, 第 108 卷(4):1388-1394, 2006.) 结果在表 4 中描述。

[0150]

表 4: 来自 F0 XY 雄性 x F0 XY 雌性的 STEAP2 F1 同期组群的基因型				
性表型	性染色体 (N/%)	STEAP2 基因型 (N/%)		
		Wt/wt	Wt/KO	KO/KO
雌性	XX (7/15%)	2/4.3%	3/6.4%	2/4.3%
	XO (4/8.5%)	1/2.1%	1/2.1%	2/4.3%
	XY (0/0%)	0/0%	0/0%	0/0%
雄性	XY (17/36%)	6/12.8%	6/12.8%	5/10.6%
	XXY (8/17%)	3/6.4%	3/6.4%	2/4.3%
	XYY (11/23.5%)	3/6.4%	3/6.4%	5/10.6%

衍生自XY ES细胞克隆的表型雌性F0代小鼠的生育力分析							
克隆	基因型	F0设置 交配 (#)	F0窝 (#)	F0窝 (%)	窝 (#)	总幼崽 (#)	每窝幼崽 (#)
860a-H1	XY	2	1	50	3	11	3.7
829a-E2	XY	1	0	0	0	0	---
5339a-A5	XY	2	2	100	8	55	6.9
5315a-D1	XY	1	1	100	8	48	6
5311b-D1	XY	4	1	25	4	37	9.3
5310a-D4	XY	1	1	100	6	32	5.3
5310a-B1	XY	6	6	100	34	188	5.5
5310a-A5	XY	2	2	100	11	75	6.8
5137b-E1	XY	2	2	100	12	74	6.2
294d-A5	XY	1	0	0	0	0	---
1553a-A10	XY	2	0	0	0	0	---
1533b-A2	XY	2	1	50	2	16	8
13304a-D5	XY	1	1	100	2	15	7.5
1313h-F3	XY	2	1	50	1	2	2
12221b-B3	XY	1	1	100	1	10	10
11465d-G1	XY	1	1	100	6	49	8.2
884a-D1	XY	2	0	0	0	0	---
总计		33 (Σ)	21 (Σ)	63%	98 (Σ)	592 (Σ)	6 (平均)

图 1

DMEM和低盐DMEM对由XYES细胞形成F0代XY雌性的作用							
	ES 克隆	培养基	转移的胚胎 (#)	出生幼崽 (#)	雄性VM (#)	雌性VM (#)	XY基因分型
		克隆制备和解冻					
1	d-G4	低盐 DMEM	50	19	8	4	所有雌性为XY
2	d-A1	低盐 DMEM	50	5	0	0	所有雌性为XY
3	e-C2	低盐 DMEM	50	4	3	1	所有雌性为XY
4	e-D1	低盐 DMEM	50	22	12	2	所有雌性为XY
5	e-H2	低盐 DMEM	50	14	10	0	—
6	e-H3	低盐 DMEM	50	11	6	0	—
		总数	300	75	39	7	所有雌性为XY
8	d-C6	低盐 DMEM + 10% FS	50	14	2	5	所有雌性为XY
9	d-A5	低盐 DMEM + 10% FS	50	26	7	7	所有雌性为XY
10	e-B6	低盐 DMEM + 10% FS	50	18	8	5	所有雌性为XY
11	e-A5	低盐 DMEM + 10% FS	50	18	13	3	所有雌性为XY
12	e-C6	低盐 DMEM + 10% FS	50	19	11	3	—
13	e-F5	低盐 DMEM + 10% FS	50	19	13	5	—
		总数	300	114	54	28	所有雌性为XY
15	d-H9	低盐 DMEM + NaCl+NaHCO ₃	50	30	9	0	—
16	d-C10	低盐 DMEM + NaCl+NaHCO ₃	50	14	4	0	—
17	e-A9	低盐 DMEM + NaCl+NaHCO ₃	50	3	0	0	—
18	e-G8	低盐 DMEM + NaCl+NaHCO ₃	50	22	3	0	—
19	e-H9	低盐 DMEM + NaCl+NaHCO ₃	50	2	0	0	—
		总数	250	71	16	0	—

图 2