[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810009977.4

[51] Int. Cl.
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 12 月 31 日

[11] 公开号 CN 101333516A

[22] 申请日 1996.8.29
[21] 申请号 200810009977.4
分案原申请号 96197787.6
[30] 优先权
[32] 1995. 8.29 [33] JP [31] 242340/95
[32] 1996. 2.15 [33] JP [31] 27940/96
[71] 申请人 麒麟医药株式会社
地址 日本东京都
[72] 发明人 富塚一磨 吉田均 石田功
花冈和则 押村光雄

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 郭文洁 梁 谋

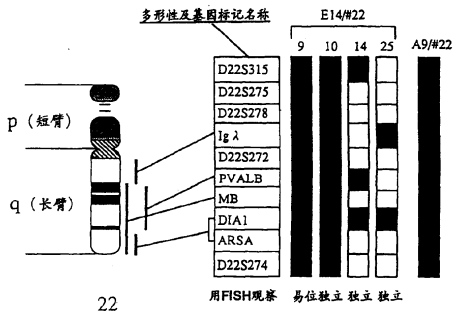
权利要求书 3 页 说明书 93 页 附图 25 页

[54] 发明名称

嵌合体动物及其制备方法

[57] 摘要

一种制备嵌合体非人动物的方法，包括制备保持单一或多个外源染色体或其片段的微细胞，通过与该微细胞融合将该外源染色体或其片段转移到分化多能性细胞；一种嵌合体非人动物，可通过上述方法进行构建，或其后代；来源于它们的组织和细胞；一种应用这些组织和细胞的方法；含有单个或多个外源染色体或其片段和持续分化多能性细胞；一种构建该细胞的方法；一种应用该细胞的方法。



E14耐药株中人22号染色体(片段)的保持(PCR分析)

1. 制备能表达人抗体基因的嵌合非人动物或其子代的方法，其包括下述步骤：制备包含至少一个下述的人染色体片段的微细胞，所述的染色体片段选自碱基长度不小于 1Mb、包含编码人抗体的基因或其大片段功能序列部分的染色体 2，14 和 22 的片段；通过与所述的微细胞融合将所述的染色体片段转化到非人动物多能细胞中，由此制备保有所述的至少一个人染色体片段的多能细胞;由所述的多能细胞制备所述的嵌合非人动物；可选择地，由所述的嵌合非人动物生产其子代。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述的非人动物、其子代或多能细胞保有包含人抗体重链基因的人染色体 14 的片段。

3. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述的非人动物、其子代或多能细胞保有包含人抗体轻链κ基因的人染色体 2 的片段。

4. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述的非人动物、其子代或多能细胞保有包含人抗体轻链λ基因的人染色体 22 的片段。

5. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述的非人动物、其子代或多能细胞保有包含人抗体轻链κ基因的人染色体 2 的片段和包含人抗体轻链λ基因的人染色体 22 的片段。

6. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述的非人动物、其子代或多能细胞保有包含人抗体重链基因的人染色体 14 的片段和包含人抗体轻链κ基因的人染色体 2 的片段。

7. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述的非人动物、其子代或多能细胞保有包含人抗体重链基因的人染色体 14 的片段和包含人抗体轻链λ基因的人染色体 22 的片段。

8. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述的含有至少一个染色体片段的微细胞是通过诱导下述杂合细胞得来的，所述杂合细胞是由衍生所述染色体片段的细胞与具备有效形成微细胞能力的细胞融合形成的。

9. 如权利要求 8 所述的方法，其中，所述的含有至少一个染色体片段的微细胞是通过诱导下述细胞得来的，所述细胞是将诱导上述杂合细胞所得的微细胞与具备有效形成微细胞能力的细胞进一步融合所得

的。

10. 如权利要求 **8** 所述的方法，其中，作为所述至少一个染色体片段的来源的细胞是人正常二倍体细胞。

11. 如权利要求 **8** 所述的方法，其中，具备有效形成微细胞能力的细胞是小鼠 **A9** 细胞。

12. 如权利要求 **1** 所述的方法，其中，所述的多能细胞是胚胎干细胞。

13. 如权利要求 **1** 所述的方法，其中，所述的 **ES** 细胞来源于小鼠。

14. 如权利要求 **1** 所述的方法，其中，所述的多能细胞具有经破坏的、与所述染色体片段上的编码人抗体的基因或其大片段功能序列同一或同源的基因。

15. 如权利要求 **1** 所述的方法，其中，所述的嵌合非人动物细胞抗原能够将所述的至少一个染色体片段传递到其子代中。

16. 如权利要求 **1** 所述的方法，其中，所述的嵌合非人动物是哺乳动物。

17. 如权利要求 **16** 所述的方法，其中，所述的哺乳动物是小鼠。

18. 制备人抗体的方法，其包括在由权利要求 **1** 的方法制备的除小鼠之外的、嵌合非人动物、其子代、其组织或其细胞中表达至少一个染色体片段上的人抗体基因，并收集人抗体。

19. 如权利要求 **18** 所述的方法，其中，所述的嵌合非人动物或其子代的细胞是 **B** 细胞。

20. 如权利要求 **19** 所述的方法，其中，所述的 **B** 细胞通过与骨髓瘤细胞融合无限增殖化。

21. 制备多克隆人抗体的方法，其包括用抗原免疫由权利要求 **1** 的方法制备的除小鼠之外的、嵌合非人动物或其子代，从所述动物的血液或腹水中收集抗血清。

22. 制备单克隆人抗体的方法，其包括用抗原免疫由权利要求 **1** 的方法制备的除小鼠之外的、嵌合非人动物或其子代，从来源于所述动物或

其子代的杂交瘤收集针对所述抗原的单克隆抗体。

23. 制备人抗体的方法，其包括用抗原免疫由权利要求 **1** 的方法制备的除小鼠之外的、嵌合非人动物或其子代，从经免疫的动物中提取人抗体基因或其大片段功能序列；将所述的人抗体基因或其大片段功能序列转化到细胞中；培养所述的细胞；收集针对所述抗原的抗体。

嵌合体动物及其制备方法

本申请是申请日为1996年8月29日，申请号为96197787.6的、发明名称和本发明相同的发明专利申请的分案申请。

技术领域

本发明涉及嵌合体非人动物，其制备方法及使用方法。若使用本发明的嵌合体非人动物，则可以在动物体内保持，表达1 Mb（百万碱基对）以上的巨大DNA片段，这在目前尚不能做到。因此，利用本发明可做到：

·可制作保持、表达编码生物活性物质基因的全长，如人抗体基因全长的动物。从该动物得到的生物活性物质具有医药品的利用价值。

·可对动物中的人巨大基因（组织相容性抗原、肌营养不良白蛋白等）进行功能分析。

·可用于制备人显性遗传性疾病和染色体异常症的动物模型。

技术背景

在动物中表达外来基因的技术，即转基因动物的制作技术，不仅有利于获得有关基因在生物体内功能的信息，而且可用于检测调控基因表达的DNA序列（例，Magram等，自然，315：338，1985），建立人类疾病的动物模型（山村等，疾病小鼠模型手册，中山书店，1994），家畜的繁殖（例，Muller等，Experientia，47：923，1991），以及利用它生产有用的物质（例，Velander等，美国国家科学院院刊，89：12003，1992）。目前为止应用最多的是以小鼠作为转基因的对象。作为实验动物，已对小鼠进行了全面研究，且已建立了胚胎操作技术，所以小鼠是最适宜的哺乳动物。

已知外源基因转移到小鼠的方法大致有两种。1种是将DNA注入受精卵的原核（Gordon等，美国国家科学院院刊，77：7380，1980），另一种是将DNA转移到全能胚胎干细胞（以下称作ES细胞），制作嵌合体小鼠的方法（Takahashi等，发育，102：259，1988）。在后者的嵌合体小鼠中，仅仅在提供ES细胞的细胞和组织中保留转移基因，而在经ES细胞分化的生殖细胞而获得的后代所有细胞和组织中均保留转移基因。目前应用该技术已制备了大量的转基因小鼠。

但是，由于目前可转移DNA的大小受到限制，也大大限制了该技

术的应用范围．这种限制依赖于可以被克隆的DNA的大小，目前为止转移最大DNA片段的1例是将大约670kb的DNA片段克隆到酵母人工染色体（YAC）中（Jakobovits等，自然，365：255，1993）。该实验是将含有YAC的酵母与ES细胞融合而进行的．YAC中可克隆大约2Mb的外源DNA（Den Dunnen等，人类分子基因，1：19，1992），但由于在出芽酵母细胞中，同源DNA序列间重组的发生率高，所以以完整形式保持具有很多重复序列的人的DNA片段是很困难的。事实上，在含有人基因组DNA的YAC文库中大约发生20～40%的重组（Green等，基因组，11：584，1991）。

另外偿试的一个方法是，在显微镜下切断由人的培养细胞而得到的中期染色体，然后将片段（估计10Mb以上）注入小鼠受精卵中（Richa等，科学，245：175，1989）。在所得到的小鼠中能检测到人特异的DNA序列（Alu序列），但不能证实有人基因的表达。此外，这里所应用的制备染色体的方法中，将染色体固定于载玻片时，由于使用了醋酸甲醇，不可避免地DNA出现小片段，所注入的DNA以完整形式存在的可能性很小。

无论如何，目前为止尚无将1 Mb以上的外源连续DNA转移到小鼠进行表达的报道。

已知那些希望转移到小鼠、有益的且吸引人的人类基因，如抗体（例Cook等，Natune Genetics，7：162，1994）、T细胞受体（Hood等，冷泉港分析生物学研讨会，Vol. LVIII，339，1993）、组织相容性抗原（Carrol等，美国国家科学院院刊，84：8535，1987）、肌营养不良蛋白（DenDunnen等，同前），其编码区域的大小至少为1 Mb．由于人类抗体是很重要的医药品，所以人们期望能够制作保持、表达人免疫球蛋白重链（~1.5Mb，Cook等，同前）、轻人类分子遗传学链κ（~3Mb，Zachau，基因，135：167，1993）、轻链λ（~1.5Mb，Frippiat等，4：983，1995）基因全长的小鼠，但目前该领域内的技术尚无法完成（Nikkei Biotec，1993，7.5.）。

人类显性遗传疾病、引起先天异常的染色体异常症（唐氏综合征等）的许多诱因基因尚不能克隆，只能利用染色体上大致位置的信息。例如，对中期染色体进行吉姆萨染色所得到的G带，通常在数Mb～10Mb大小。由此可发现某些诱因基因存在于特定的G带上，而将这些

异常表型转移到小鼠的时候，有必要将诱因基因周围的染色体片段（数Mb以上）进行转移，这也是目前的技术达不到的。

因此，希望能开发一种能将长度超过1 Mb限制的外源DNA导入到小鼠中并使其表达的技术。

应用目前的技术，可以将超过上述界限的DNA转移到动物的培养细胞中。这主要以染色体（人染色体的大小为50～300Mb）为介质进行。有一些关于将染色体移入细胞的方法的报道（例，McBride等，美国国家科学院院刊，70：1258，1973），其中微细胞法是只将1条所选染色体进行转移的最佳方法（Koi等，日本癌症研究杂志，80：413，1989）。叫做微细胞的构造体是用核膜和质膜包裹一至数条染色体。经抑制某种细胞中纺缍体形成的抑制剂诱导形成微细胞，分离它，与受体细胞融合，可转移少数（大多数为1条）染色体。用这种方法所得到的，只含有1条人类染色体的单染色体杂交细胞的文库，可用于已知基因的作图，说明未知抑癌基因、细胞老化基因所存在的染色体（例，Saxon等，EMBO J.，5：3461，1986）。此外，还可用γ－射线照射微细胞，将所得染色体片段的一部分进行转移（Koi等，科学（Science），260：361，1993）。如上所述，微细胞法是将1 Mb以上的DNA转移到动物培养细胞中的一种适宜的方法。

随着ES细胞这一能稳定保持全能性细胞的发现（Evans等，自然（Nature），292：154，1981），从培养细胞到能制备小鼠的愿望成为现实，可以将外源基因、各种突变及目的基因重组造成的突变基因均可转移到ES细胞，可在小鼠水平进行大范围的基因修饰（例，Mansour等，自然（Nature），336：348，1988）。导入巨大DNA的意思是以前面所讲的克隆到YAC载体中的可能的外源DNA片段的大小为界限的。目前将较长的DNA导入培养细胞的染色体转移技术还不能用于小鼠的基因转移，相信这是难以完成的（村松等，转基因生物学，讲谈社Scientific，p143－，1989）。

理由如下。

将人的染色体转移到正常核型的受体细胞ES细胞是转移染色体异常。至今人们认为如果发生显微镜下可识别的染色体水平的基因异常，通常对小鼠的胚胎发生是致死性的（Gropp等，实验动物杂志（实

验动物学， 228： 253， 1983）；相沢慎一，生物技术手册系列 8，基因打靶，羊土社， 1995）。

· 我们所能得到的人染色体通常是有限增殖的正常纤维母细胞、或是癌细胞等分化的体细胞，将这样来源于体细胞的染色体转移到未分化的 ES 细胞的时候，会引起 ES 细胞的分化（ Muller 等，自然（ Nature），311： 438， 1984）或老化（ Sugawara，科学（ Science），247： 707， 1990）。

· 将体细胞来源的染色体转移到初期胚胎中，在胚胎的发育过程中能否起到与来源于生殖细胞的染色体一样的功能、确保各种组织、细胞中特异基因的表达，关于这一问题所进行的研究很少。二者最大的差异之一是关于染色体 DNA 的甲基化状态。甲基化伴随细胞的分化而有所不同，这表明甲基化对于组织特异性基因的表达起到主要作用（ Ceder，细胞， 53： 3， 1988）。例如，有这样的报道，在活化抗体基因对所进行的基本的位点特异性 DNA 重组反应中，将甲基化的底物转移到 B 细胞，若复制后也保持甲基化状态，就阻碍重组反应（ Hsieh 等， EMBO. J.,11： 315， 1992）。此外，与生物体内相比所建立的细胞株中，容易发生从头甲基化（ Antequera 等，细胞， 62： 503， 1990）。基于目前的研究，不能简单地设想，纤维母细胞、人－鼠杂交细胞中高度甲基化的抗体基因在小鼠的 B 细胞中正常表达。

必需注意的是这里有 Ill mensee 等的两个相关报道（美国国家科学院院刊， 75： 1914， 1978；美国国家科学院院刊， 76： 879， 1979）。一个是人的肉瘤细胞与小鼠 EC 细胞融合，另一个是大鼠的肝癌细胞与小鼠 EC 细胞融合，用得到的融合株制作嵌合体小鼠。这些报道中，对实验结果指出了许多问题，其可靠性低（野口等，小鼠畸胎瘤，理工学社， 5 版， 1987）。此外，尽管人们期望能早日探讨清楚，但是报道发表后的 17 年至今没有成功重复这些实验的报道。因此我们认为根据这些报道，在小鼠体内保持外源染色体，并表达该染色体上的基因是不可能的。

在目前的状况下，将染色体片段那样的巨大 DNA 转移到小鼠等动物体内并使之表达是很困难的，实际上，自上面 Ill mensee 等的报道以来没有对此问题进行研究。

因此，本发明的目的是提供嵌合体非人动物及其后代，以及其制

作方法，其中该动物保持外源染色体或其片段，并能表达该染色体或其片段上的基因。

另外，本发明的目的是提供来源于上述嵌合体非人动物及其后代的组织和细胞。

本发明的另一目的是提供杂交瘤，该杂交瘤是上述嵌合体非人动物及其后代的细胞与骨髓瘤融合而形成。

本发明还有一目的是提供制备生物活性物质的方法，它是非人动物、其组织或细胞来表达外源染色体或其片段上基因的表达产物。

发明公开

为了解决上述问题，本发明人进行了多种研究，结果是用微细胞法成功地将来源于人正常纤维母细胞的染色体或其部分片段转移到ES细胞中，得到能稳定保持它们的克隆。并且他们从该ES细胞株得到嵌合体小鼠，该小鼠的正常组织中保持有人染色体，并且能表达包含人抗体重链基因的数个人基因。我们通过这一系列方法能够制备保持巨大DNA片段并表达该DNA片段上基因的动物，而这在目前是不可能的。

本发明的主旨如下：

（1）嵌合体非人动物的制备方法，其特征在于制备含有一个或几个外源染色体或含有其片段的微细胞，通过与该微细胞融合，将上述的单一或几个外源染色体或其片段导入具有分化多能性的细胞中。

（2）含有单一或几个外源染色体或其片段的、具有分化多能性的细胞的制备方法，其特征在于，制作含有一个或几个外源染色体或含有其片段的微细胞，通过与该细胞融合，将上述的单一或几个染色体或其片段移入具有分化多能性的细胞中。

（3）用上述（1）的方法能够制备的保持有单一或多个外源染色体或其片段，并表达该染色体或其片段上基因的嵌合体非人动物及其具有同一特性的后代。

（4）用（2）的方法能够制备的含有一个或几个外源染色体或其片段、具有分化多能性的细胞。

（5）（4）中具有分化多能性的细胞用于制备嵌合体非人动物。

（6）上述（3）中的嵌合体非人动物或其后代交配而得到的保持有一个或几个外源性染色体或其片段、并表达该染色体或其片段上基因

的非人动物或其后代。

（7）来源于（3）的嵌合体非人动物或其后代或来源于（6）的非人动物或其后代的组织。

（8）一种细胞，其来源于（3）的嵌合体非人动物或其后代或来源于（6）的非人动物或其后代。

（9）上述（8）的细胞与骨髓瘤细胞融合而得到的杂交瘤。

（10）一种非人动物及其后代，其制备是将（3）的嵌合体非人动物或其后代或将（6）的非人动物或其后代与上述染色体或其片段上同一基因或相似基因缺陷的非人动物系交配而得到的。

（11）一种生物活性物质的制备方法，其特征在于在（3）的嵌合体非人动物或其后代、组织或细胞中或在（6）的非人动物或其后代、组织或细胞中表达一个或几个外源染色体或其片段上的基因，回收作为表达产物的生物活性物质。

（12）一种制备生物活性物质的方法，其特征在于，将（3）或将（6）的嵌合体非人动物或其后代与缺乏上述染色体或其片段上同一基因或相似基因的非人动物系交配，在所得到的子代动物、组织或细胞中表达上述一个或几个外源染色体或其片段上的基因，并回收作为表达产物的生物活性物质。

附图简述

图1表示保持有人2号染色体(片段)的A9细胞的分析结果（PCR分析）。

图2表示E14耐药株中保持有人的22号染色体（片段）（PCR分析）。

图3是一电泳的照片图，它表明在由于移入了22号染色体的ES细胞而来的嵌合体小鼠中保持有人的L1序列（Southen分析）。

图4是一电泳的照片，它表明在导入了人22号染色体的嵌合体小鼠的脏器中保持有人染色体（PCR分析）。

图5是一电泳的照片，它表明了在导入了人22号染色体的嵌合体小鼠中，人基因表达的结果（RT－PCR）。

图6是一电泳的照片，它表明了在导入了人22号染色体的嵌合体小鼠的脏器中，人基因表达的结果（RT－PCR）。

图7表示在E14耐药株中保持有人的4号染色体(片段)（PCR）。

图 8 是一电泳的照片，它表示在导入了人 4 号染色体的 E14 细胞株中，对人 L1 序列的检测结果（ Southern ）.

图 9 是一电泳的照片，它表明在由导入了人 4 号染色体的 ES 细胞而来的嵌合体小鼠中，保持有人 L1 序列（ Southern ）.

图 10 表示在 TT2 耐药株中保持有人 14 号染色体(片段)（ PCR ）.

图 11 是一电泳的照片，它表明在由导入了人 4 号染色体的 ES 细胞而来的嵌合体小鼠的脏器中，保持有人染色体（ PCR ）.

图 12 表示尾部来源的纤维母细胞对 G418 抗性的试验结果.

图 13 表示经人血清白蛋白免疫的嵌合体小鼠血清中人 IgM 抗体的浓度（ ELISA ）.

图 14 表示经人血清白蛋白免疫的嵌合体小鼠血清中人 IgG 抗体的浓度（ ELISA ）.

图 15 表示产生人 IgM 的杂交瘤克隆 H4B7 的分析结果（ ELISA ）.

图 16 是一染色体形态的照片，它表明保持有人 2 号和 14 号染色体片段的小鼠 ES 细胞株（ TT2 细胞株 PG15 ）的 FISH 分析结果.

图 17 表示在经人血清白蛋白免疫的嵌合体小鼠血清中抗人血清白蛋白的人 IgG 抗体的效价增加.

图 18 表示在经人血清白蛋白免疫的嵌合体小鼠血清中，抗人血清白蛋白的人 Igκ 抗体的效价增高.

图 19 是一电泳的照片，它表示在导入了人 22 号染色体的 TT2 细胞中，人 L1 序列的检测结果（ Southern 分析）.

图 20 表示在经人血清白蛋白免疫的嵌合体小鼠血清中，抗人血清白蛋白的人 Igλ 抗体的效价增高.

图 21 表明在导入了人 2 号染色体部分片段的嵌合体小鼠的后代中，保持有人 2 号染色体的部分片段（ PCR ）.

图 22 表明在导入了人 14 号染色体的嵌合体小鼠脾脏中，有细胞表面表达人μ链的细胞存在（流式细胞术分析）.

图 23 表明 LoxP － pst NEO 质粒 DNA 的构建.

图 24 表明小鼠抗体重链 Cμ 基因组 DNA 的结构.

图 25 表明小鼠抗体轻链κ基因组 DNA 的结构.

图 26 表明小鼠抗体重链靶向载体、Southern 印迹法中应用的探针及在同源重组体中能够检测到的 DNA 片段的结构.

图 27 表明小鼠抗体轻链κ的靶向载体、 Southern 印迹法中应用的探针及在同源重组体中能够检测到的 DNA 片段的结构.

图 28 是一电泳的照片，它表明小鼠抗体重链同源重组体及由同源重组体而来的高浓度 G418 耐药株的 Southern 印迹分析结果.

实施本发明的最佳方式

保持有人染色体或其片段、并表达该染色体或其片段上的基因的小鼠，其制备如下:

（ 1 ）制备保持有标记的人染色体或其片段的染色体供体细胞

（ 2 ）用微细胞法将人染色体或其片段移入具有分化多能性的小鼠细胞中

（ 3 ）用上述小鼠细胞制作嵌合体小鼠，

（ 4 ）证实在嵌合体小鼠中保持有人染色体，并表达人基因。

这里，保持有人染色体或其片段、表达该染色体或其片段上的基因的非人动物是以小鼠为例的（此后，小鼠称作“导入人染色体的小鼠”）。

术语“人染色体”指自然形成的复合体，它由人细胞的核酸和蛋白质组成. 正常的人类染色体有 46 条， 23 种（男性为 24 种），每条染色体约含 50 - 300Mb 的 DNA 。本发明中，独立染色体是指能稳定复制、分离的部分片段，并且也包括能异位到小鼠染色体上，稳定保持的部分片段。 DNA 的大小通常在 1 Mb 以上，也有小于 1 Mb 的情况. 本发明的特征是以染色体为介质在小鼠内保持、表达人基因，而不用在大肠杆菌、酵母等中克隆或从细胞中提取 DNA 。

导入人染色体的小鼠指，在其全部或部分正常体细胞中保持有一个或几个人染色体或其片段. 另外，指在其全部或部分体细胞中表达人染色体上的一个或几个人基因。

（ 1 ）制备保持有标记的人染色体或其片段的染色体供体细胞

所希望的染色体供体细胞是 1 ）保持有标记物标记的人染色体，而该标志物可用于受体细胞的筛选 2 ）不含除此之外的人染色体 3 ）形成微细胞的能力高。

来源于人的任何细胞株、癌细胞和原代培养细胞均可用作提供人染色体的物质，但正常纤维母细胞较合适，因为它的染色体发生缺失，扩增等异常现象的可能性较小，且容易培养。

首先，对（ 1 ）来讲，人细胞可用表达耐药性（ G418，嘌呤霉素，潮霉素，杀稻瘟素）等标记基因的载体进行转化。希望用于调节标记基因的启动子，不仅在人细胞中而且在小鼠ES细胞等受体细胞中也能很好地发挥作用。为了达到这一目的可应用与SV和增强子联结的单纯疱疹病毒胸苷激酶启动子（ Katoh等，细胞结构功能（ Cen Struct. Funct., 12： 575， 1987 ）、小鼠PGK－1启动子（ Soriano等，细胞，64： 693， 1991 ）。用电穿孔法（石田等，细胞工学实验操作入门，讲谈社， 1992 ）进行转化，将导入的标记基因随机插入23种、46条人染色体上，随后进行筛选，可得到人细胞转化体文库。

对于3），由于大多数的人正常细胞形成微细胞的能力较低，可将上述的转化体与形成微细胞能力较高的细胞，如小鼠A9细胞（ Oshimura, M.，环境和健康展望， 93： 57， 1991 ）进行整个细胞融合，由此可提高其形成微细胞的能力。已知在小鼠－人的杂交细胞中，人染色体的选择性消失，用上述的标记物进行选择，所得到的融合细胞能稳定保持标记了的人染色体。

为了满足2）的条件，希望从这种融合细胞得到微细胞，然后再度与小鼠A9细胞融合。这种情况下用人染色体上的标记物进行选择，所得到的微细胞株大多能满足1）、2）、3）的条件。可在最后得到的小鼠－人单染色体杂交细胞中，通过PCR（聚合酶链式反应， Saiki等，科学， 239： 487， 1988 ）、 Southern印迹分析（ Ausukel等，现代分子生物学方法， John Wiley和Sons, Inc. 1994 ）、 FISH（荧光原位杂交， Lawrence等，细胞， 52： 51， 1988 ）分析等来鉴定标记的人染色体。如果想转移特定的染色体，则对多个人细胞转化体克隆的每个克隆重复上述过程，检测目的染色体被标记的克隆。或者对人细胞转化体克隆的混合物实施上述过程，对所得的大量小鼠－人单染色体杂交细胞进行人染色体的鉴定。

此外，可通过所期望染色体上DNA序列的同源重组（ Thomas等，细胞， 51： 503， 1987 ），将标记基因插入到特定的部位。

用γ射线照射小鼠－人杂交细胞制备的微细胞，标记的人染色体成为片段，可移到小鼠A9细胞中。即使微细胞不经γ射线照射，部分片段化的人染色体也可以一定的比例转移。这时所得到的微细胞融合株保持了标记的人染色体的部分片段。当想把染色体部分片段转移到受

体细胞的时候可应用这些克隆.

（2）向保持有分化多能性的小鼠细胞移入人染色体或其片段.

到目前为止已有这样的报道，将来源于各种品系小鼠的胚胎肿瘤细胞（EC细胞，Hanaoka等，分化，48：83，1991）、胚胎干细胞（ES细胞，Evan等，自然，292：154，1981）、胚胎生殖细胞（EG细胞，Matsui等，细胞，70：841，1992）注入小鼠的初期胚胎或与之共同培养，可形成正常体细胞，即可制成嵌合体小鼠. ES、EG细胞的这种能力尤其高，许多情况下它们可对生殖细胞起作用，由这些细胞可得到其后代. EC细胞主要从生殖细胞癌获得，ES细胞来源于胚泡的内部细胞块，EG细胞来源于胚胎发生初期出现的原始生殖细胞. 作为本发明中移入人染色体的可用这些细胞株及受体细胞其突变株，以及在小鼠中能分化成其全部或部分正常体细胞的任何未分化细胞.

可用由（1）中得到的人染色体供体细胞制备的微细胞或经γ射线照射的微细胞作为移到受体细胞中的人染色体的物质。可用清水素行，细胞工程学手册，羊土社，1992中所记载的方法，将受体细胞与微细胞融合，从而把人的染色体转移到受体细胞。微细胞供体细胞中保持有在受体细胞中可以筛选某些人染色体或其片段的标记. 应用同（1）一样的PCR、Sonthem印迹分析、FISH分析等方法，可以从中筛选保持有导入的目的基因或染色体或其片段的克隆，这样可转移任何人染色体或其片段。另外，依次导入含有不同选择标记的几个染色体或其片段，可得到同时保持这些标记的受体细胞。此外，可从已转移了人染色体的细胞克隆中选择移入的染色体数目增加了的克隆。这通常是通过提高加到培养液中的筛选药物的浓度而完成的.

通过下面的方法来证实经人染色体上的标记（G418耐性，等）所筛选的受体细胞是否保持供体细胞所保持的全部或部分人染色体。用从筛选的受体细胞中提取的基因组DNA、以人特异的重复序列（L1，Alu等，Korenberg等，细胞，53：391，1988）或人基因作探针进行Sonthern印迹分析。或者，用人基因特异的引物进行PCR，以及用人染色体特异的探针进行荧光原位杂交（FISH）等染色体分析方法来进行验证.

（3）从导入人染色体的ES细胞制备嵌合体小鼠

参照相沢慎一，基因工程手册，8，基因打靶，羊土社，1995等所描述的方法，从（2）中得到的ES细胞株制备嵌合体小鼠。为了有效地制备嵌合体小鼠，在选择宿主胚胎的发生期、品系时，希望用对各个ES细胞株已回顾过的条件。例如，对于CBA × C57BL/6 F1来源的TT2细胞（野鼠色，Yagi等，分析生物化学，214：70，1993），希望选用Balb/c（白化体，日本CREA社）或ICR（白化体，日本CREA社）来源的8细胞期胚胎作宿主胚。

（4）嵌合体小鼠中人染色体的保持及人基因的表达。

通过毛色来粗略判断在由注入了ES细胞的胚胎而产生的小鼠中，ES细胞的贡献率．但是，即使对毛色一点贡献也没有也不能判断没有贡献给其它组织．更为详细的，可以嵌合体小鼠的各组织中提取基因组DNA，用Sonthern印迹分析、PCR等方法来证实各组织中是否保持人染色体。

通过以下的方法来证实导入的人染色体上基因的表达。用各组织的RNA、通过RT－PCR法（Kawasaki等，美国国家科学院院刊，85：5698，1988）、Northern印迹法（Ausubel等，同前）来检测人染色体mRNA的表达。可用与小鼠同种蛋白质的交差反应性最小的抗人蛋白质抗体，通过酶免疫测定法（ELISA，富山·安东，单克隆抗体实验手册，讲谈社Sentific，1987；石川，超高敏感度酶免疫测定法，学会出版中心，1993）、Western印迹法（Ausubel，同前）或者利用电泳泳动度的差别进行同功酶分析（Koi等，日本癌症研究，80：413，1989）等方法来检测蛋白质水平的表达．另外，嵌合体小鼠细胞中人染色体的保持及该染色体上基因的表达，可通过在嵌合体小鼠原代培养细胞中出现表达耐药性标记基因的耐药性细胞而证实的。

例如，用与小鼠抗体产生交差反应性最小的抗人Ig抗体进行酶免疫测定法，可检测由ES细胞所制备的嵌合体小鼠的血清中人IgM、IgG、IgA等，而该ES细胞保持存在人免疫球蛋白重链的人14号染色体中。或者，用来源于人的抗原（如血清白蛋白）免疫嵌合体小鼠，将其脾细胞与小鼠的骨髓瘤融合，通过ELISA对此杂交瘤（安东·千叶，单克隆抗体实验操作入门，讲谈社Scientific，1991）进行筛选，可得到能产生人免疫球蛋白重链的杂交瘤。

以上以小鼠为例说明了保持人染色体或其片段、表达该染色体或其片段上基因的嵌合体非人动物的制作方法，但本发明中，移入到嵌合体非人动物的染色体或其片段并不限于人，而包括广泛的外源染色体或其片段，并表达该染色体或其片段上的基因．这里“外源染色体”是以转移到保持有分化多能性的细胞中，在嵌合体非人动物中能表达该染色体或其片段上的基因为特征，其来源的生物种类没有特别限制。应用本发明的方法，不仅可制作嵌合体小鼠，也可制作其它的嵌合体动物，如大鼠、猪等哺乳类及其它种类的嵌合体动物。有这样的报道，ES 细胞或 ES 样细胞在小鼠以外的动物种类中建立，如在大鼠（ Iannaccone 等，发育生物学， 163， 288 －， 1994 ）、猪（ Wheeler 等，繁殖、生殖和发育， 6， 563 －， 1994 ）、牛（ Sims 等，美国国家科学院院刊， 91， 6143 － 6147， 1994 ）等，也有用鳟、鸡等做过偿试（转基因动物，蛋白质核酸酶， 1995 年 10 月增刊，共立出版）。已知，将 ES 样细胞（ ED 细胞）至少经过 10 代传代以上而获得的上皮样细胞的核移植到未受精卵中，这样在绵羊中可正常发育（ Campben 等，自然， 380， 64 －， 1996 ）。这样通过以 ES 或 ES 样细胞作受体细胞，移入外源染色体，可与用小鼠一样，制作出保持外源染色体或其片段、表达该染色体或其片段上基因的嵌合体非人动物。

本发明中，保持被转移的外源染色体或其片段，具有分化多能性的细胞并不局限于上述的 ES 细胞、 EC 细胞和 EG 细胞。例如可以将外源染色体或其片段转移到骨髓干细胞，而通过这种向骨髓干细胞活体的移植，可进行遗传病的治疗。

保持外源染色体的 ES 细胞在嵌合体非人动物中分化成生殖细胞时，其所繁殖的后代也能保持转移的染色体或其片段，并能表达导入染色体或其片段上的基因。

利用上面所得到的嵌合体非人动物或其后代来表达外源染色体或其片段上的基因，回收表达产物，可制造生物活性物质．具体而言，在能表达外源染色体或其片段上基因的条件下饲养嵌合体非人动物或其后代，然后从动物的腹水和血液中回收表达产物．或者在能够表达外源染色体或其片段上基因的条件下培养嵌合体非人动物或其后代的组织、细胞或获得不死性的细胞（例如，与骨髓瘤细胞融合而形成的

不死性杂交瘤），然后从培养物中回收表达产物。此外可将从这些嵌合体非人动物、或其后代的组织、细胞或它们的不死性细胞中提取的外源染色体或其片段、或将构成外源染色体或其片段的DNA、或将嵌合体非人动物或其后代的组织、细胞或它们的不死性细胞中保持的外源染色体或其片段来源的cDNA转化到动物细胞或昆虫细胞如CHO细胞、BHK细胞、肝癌细胞、骨髓瘤细胞、SF9细胞），在表达外源染色体或其片段上基因的条件下培养该细胞，从培养物中回收表达产物（如特定抗原特异的抗体蛋白质等）。用离心等众所周知的方法进行回收，并用硫酸铵分级分离、分配色谱、凝胶过滤色谱、吸附色谱、制备薄层色谱等已知的方法进行纯化。生物学活性物质包括外源染色体上所编码的任何物质，如抗体、尤其是抗人抗体。例如，可克隆从嵌合体动物的脾细胞或其杂交瘤等不死性细胞而来的染色体上的人抗体基因，转移到中国仓鼠卵巢细胞（CHO）和骨髓瘤细胞，就能生产人抗体（Lynette等，生物工程学，10，1121－，1992；Bebbington等，生物工程学，10，169－，1992）。

本发明中所得到的保持人2号、14号、22号染色体（片段）的嵌合体小鼠及其后代保持有人抗体重链（14号染色体上）、轻链κ（2号染色体上）、轻链λ（22号染色体上）各种基因功能序列的大部分。也就是说，与利用酵母人工染色体等转移人抗体基因的一部分这一已知的转基因小鼠相比（Green等，Nature Genetics，7，13－，1994，Lonberg等，自然，368，856－，1994等），能够表达与人非常相似的、非常多样的人抗体库（repertory）。另外，依照本发明所得到的同时保持2号＋14号、22号＋14号等染色体（片段）的嵌合体小鼠及其后代、以及它们交配所得到的同时保持2号＋14号＋22号等染色体（片段）的小鼠及其后代，可产生重链、轻链二者均来源于人的完全人抗体。这些小鼠可识别人抗原，把它当作异物与之进行免疫反应，这样可产生抗原特异的人抗体。这些特性对于得到治疗用的人单克隆抗体、多克隆抗体非常有益（Green等，同前；Lonberg等，同前）。另一方面，为了更有效地获得对特定抗原亲和性高的人抗体，希望能制成不产生小鼠抗体、只产生人抗体的小鼠（Green等，同前；Lonberg等，同前）。本发明中可根据下面已知的方法A或方法B来完成。

方法 A：利用小鼠抗体缺陷的 ES 细胞及小鼠抗体缺陷的嵌合体宿主胚的方法

方法 B：从导入了人染色体的嵌合体小鼠得到保持人染色体的后代，与小鼠抗体基因缺陷的小鼠品系进行交配的方法

以下对 A、B 每种方法的典型实施例进行具体描述。

方法 A 的具体过程

1.用目的基因同源重组（Joyner 等，基因打靶，1993，IRL 出版）的方法破坏小鼠 ES 细胞中以 2 拷贝存在的小鼠抗体重链基因中的一个。随后通过定点特异重组除去基因破坏部分两侧可能的序列，如 loxP 序列（用 Cre 重组酶进行重组，Sauer 等，同前，用 FLP 重组酶－FRT 序列 O'Gorman 等，科学，251，1351－，1991 等例），在基因破坏的部位插入 G418 耐药基因等标记基因。

2.在高浓度药物存在的条件下培养上述一个抗体重链基因被破坏了的耐药性小鼠 ES 细胞，选择耐高浓度药物的克隆。通过筛选这些克隆可获得两个抗体重链基因均被破坏了的克隆（相沢慎一，同前）。

3.将在 1 中耐药基因的两端插入的重组序列间引起定点特异性重组的酶基因，如 Cre 重组酶基因（Sauer 等，同前）瞬时转移到 2 中所得到的 2 个抗体重链基因场被破坏了的小鼠 ES 细胞中，去除插入到能在 loxP 序列间引起重组反应的 2 个抗体重链基因中的耐药性基因，选择这样的药物敏感性克隆（高津圣志等，实验医学分册，免疫研究的基本技术，p255－，1995，羊土社）。

4.对小鼠抗体轻链κ基因重复上述 1－3 的操作过程，最终可获得抗体重链和κ链完全缺失的药物敏感性克隆。

5.以 4 的克隆（抗体重链、κ链缺失的小鼠 ES 细胞）作受体细胞，通过微细胞融合导入用耐药标记基因（如 G418 耐药基因）标记了的、含有人抗体重链基因的人 14 号染色体（片段）。

6.以 5 中所得到的克隆为受体细胞，通过微细胞融合，导入用与 5 中不同的耐药标记基因（如嘌呤霉素耐药基因）标记了的、含有人抗体轻链基因的人 2 号染色体（片段）或 22 号染色体或二者均导入。

7.以从不能产生自身抗体的小鼠品系（如 RAG－2 基因敲除小鼠，Shinkai 等，细胞，68，855－，1992；膜型μ链敲除小鼠，Kitamura 等，自然，350，423－，1991）得到的胚胎为宿主胚，用 6 中得到

的 ES 细胞制作嵌合体小鼠.

8.所得嵌合体小鼠中的大多数功能性 B 淋巴细胞来源于 ES 细胞（高津圣志等，实验医学分册，免疫研究的基础技术，P234，羊土社，1995）．由于这种 B 淋巴细胞缺乏小鼠重链、κ 链，所以主要由导入的染色体上功能性人抗体基因的表达而产生人的抗体。

方法 B 的具体过程

1.从保持含有人抗体重链、轻链κ或轻链λ的人染色体或其片段的嵌合体小鼠得到能稳定保持这些人染色体或其片段并可连续传给下一代的后代。

2.从 1 中所得能表达抗体重链或轻链的小鼠品系或由其交配而得到表达人抗体重链和轻链的小鼠品系，将该品系与缺乏自身抗体基因的小鼠品系（如膜型μ链基因敲除小鼠，同前；轻链κ敲除小鼠，Chen 等，EMBO J.，3，821－，1993）进行交配，可得到缺乏小鼠抗体重链及轻链的纯合子及保持含人抗体重链（14 号）＋轻链κ（2 号）、抗体重链（14 号）＋轻链λ（22 号）或人抗体重链（14 号）＋轻链κ（2 号）＋轻链λ（22 号）的人染色体的小鼠品系。在这一小鼠品系中由于缺乏小鼠抗体重链、轻链κ基因，所以只要由于转移的染色体上功能性人抗体基因的表达而只产生人的抗体。

上述的方法 A 和方法 B 不只用于生产人抗体，而且可用于生产外源染色体上存在的任何基因的表达产物。

以下用实施例进行具体说明，但本发明并不限于这些实施例.

（实施例 1）保持 G418 耐性标记的人染色体（片段）的染色体供体细胞的制备

用限制性酶 SalI（宝酒造）将含有 G418 耐性基因的质粒 pSTneoB（Katoh 等，细胞的结构、功能，12：575，1987；日本研究生物制品保藏中心（JCRB），保藏号：VE039）线性化，导入人的正常纤维母细胞 HFL－1（RIKEN 细胞库，RCB0251）.用胰酶处理 HFL－1 细胞，以 5×10^6 细胞/ml 的浓度悬浮在 Dulbecco's 磷酸缓冲盐水（PBS）中，在 10μg DNA 存在的情况下，用基因脉冲仪（Bio－Rad）进行电穿孔（石田等，细胞工程学实验操作入门，讲谈社，1992）。以 25μF 的电容，用 4mm 距离的电穿孔细胞（165－2088，Bio－Rad）在室温下加 1000V 的电压。将电穿孔的细胞接种到 3－6 个 100mm

的组织培养用的塑料平皿中（ Corning ），其中含有增加了 15 % 胎牛血清（ PBS ）的 Eagle's F12 培养基（以下称作 F12 ）。 1 天后，换用含有 200μg/ml G418 （ GENETICIN， Sigma ），添加了 15 % FBS 的 F12 培养基。 2 - 3 周后，收集形成的克隆， 100 个为一组，共 52 组，然后将每一组的克隆重新接种到 100mm 的平皿中，进行培养。

用添加了 10 % 胎牛血清（ PBS ）的 Dulbecco's 改良培养液（以下为 DMEM ），在 100mm 的平皿中培养小鼠 A9 细胞（ Oshimura, 环境和健康展望., 93： 57， 1991， JCRB0211 ）。分别在 100mm 平皿中用补充了 15 % 胎牛血清（ FBS ）和 200μg/ml 的 G418 的 F12 培养 52 组 G418 抗性 HFL - 1 细胞。用胰酶处理小鼠 A9 细胞和 HFL - 1 细胞，每种细胞取 1/4 - 1/2 进行混合，在 100mm 平皿中将添加了 10 % 胎牛血清（ FBS)的 DMEM 与添加了 15 % 胎牛血清（ FBS)的 F12 进行等量混合，将细胞接种到混合物中培养半天到一天。参照（清水等，细胞工程学手册，羊土社， p.127 -， 1992 ）所描述的方法进行细胞融合。用 DMEM 洗涤细胞表示 2 次，之后在 2ml PEG （ 1： 1.4 ）溶液中处理 1 分钟，再换用 2ml PEG （ 1： 3 ）溶液处理 1 分钟。吸去 PEG 溶液后用无血清培养基（ DMEM ）洗涤 3 次，之后用常规的培养基（ 10 % FBS、 DMEM ）培养 1 天。用胰酶处理细胞使之分散，悬浮剂含有乌木箭毒苷（ 1×10^{-5}M， Sigma ）和 G418 （ 800μg/ml ）的二重选择培养基中，接种到 3 枚 100mm 的平皿中。大约培养 3 周后，用胰酶处理生成的克隆使之分散，在含有 G418 （ 800μg/ml ）的选择培养基（ 10 % FBS、 DMEM ）上培养。

用胰酶处理细胞使之分散后，将 2 组收集为 1 组，在 6 个 $25cm^2$ 离心用的培养瓶中（ Costar， 3025 ）培养到细胞密度达到 70 - 80 % 的汇合度。换成含 Colcemid （ 0.05μg/ml， demecolcine，和光纯药）的培养基（ 20 % FBS、 DMEM ），培养 2 天以形成微细胞。去除培养液，用预温（ 37 ℃ ）的细胞松弛素 B 溶液（ 10μg/ml， Sigma ）充满离心用培养瓶，将瓶插入到丙烯酰基离心容器内，在 34 ℃，以 800rpm 离心 1 小时。当小鼠 A9 细胞达到 80 % 汇合状态时，向 $25cm^2$ 瓶中加入纯化的微小核，用 PEG 溶液进行融合。在含 G418 的选择培养基中分离形成的克隆。用以下的方法来鉴定各克隆中所保持的人染色体（ 2 号、 4 号、 14 号、 22 号）。除上面以外的所有实验操作及试剂均参

照（清水等，细胞工程学手册，羊土社，p.127 - ）。

（1）PCR 分析

培养分离的细胞，用 Puregene DNA 分离试剂盒（Gentra System 社）提取基因组 DNA，以该基因组 DNA 为模板、用人染色体特异的引物、通过 PCR 来选择保持有 2、4、14、22 号人染色体的克隆。PCR 的扩增大约使用 0.1 μg 的基因组 DNA（Innis 等，PCR 实验手册，HBJ 出版局，1991，热循环仪，GeneAmp 9600，Perkin - Elmer 社）。Taq 聚合酶购自 Rerkin - Elmer 公司，反应条件是 94 ℃、5 分钟 1 循环后、94 ℃变性，15 秒、54 ℃ ~ 57 ℃、退火 15 秒钟（根据引物而适当改变）、72 ℃延伸 20 秒，进行 35 个循环。可用染色体上存在的基因（O'Brien，基因图谱，第 6 版，Book 5，Cold Spring Harbor Laboratony Press, 1993）和多形性标记（多形性 STS 引物对，BIOS 社；Weissenbach 等，自然 359：794，1992；Walter 等，Nature Genetics，7：22，1994）等作引物。可以 GenBank、EMBL 等数据库获得的碱基序列为基础来制作基因引物。下面将以实施例来说明每个染色体的多形性引物的名称和基因引物的序列（2 号：实施例 1，4 号实施例 6，14 号实施例 9，22 号实施例 2）。用以下所示的基因标记和多形性标记（多形性 STS 引物对，BIOS 社：D2S207，D2S177，D2S156，D2S159，BIOS 社）来鉴定 2 号染色体。

Cκ （免疫球蛋白κ恒定区）：5'-TGGAAGGTGGATAACGCCCT （序列号 1），5'-TCATTCTCCTCCAACATTAGCA （序列号 2）

FABP1 （肝脂肪酸结合蛋白 - 1）：5'-GCAATCGGTCTGCCGGAAGA （序列号 3），5'-TTGGATCACTTTGGACCCAG （序列号 4）

Vk3-2 （免疫球蛋白κ可变区）：5'-CTCTCCTGCAGGGCCAGTCA （序列号 5），5'-TGCTGATGGTGAGAGTGAACTC （序列号 6）

Vk1-2 （免疫球蛋白κ可变区）：5'-AGTCAGGGCATTAGCAGTGC （序列号 7），5'-GCTGCTGATGGTGAGAGTGA （序列号 8）

（2）荧光原位杂交（FISH）

根据（松原等，FISH 实验方案，秀润社，1994）所记载的方法，用人 2 号、4 号、14 号、22 号染色体特异的探针（CHROMOSOME

PAINTING SYSTEM, Cambio 社）进行 FISH 分析。

例如在 26 组（ 745 克隆）中有 10 组可以得到保持 2 号染色体的克隆。其中有 5 个克隆对 2 号染色体特异的引物全部呈阳性，将这些克隆进行 FISH 分析。根据（松原等， FISH 实验方案，秀润社， 1994 ）所记载的方法，用人 2 号染色体特异的探针（ CHROMOSOME PAINTING SYSTEM， CANBIO 社）进行 FISH 分析。在对所有引物呈现阳性的细胞中可观察到人 2 号染色体的完整形态，在只对一部分引物阳性的一些克隆中可观察到比人 2 号染色体较小的独立染色体，或观察到含有与人 2 号染色体以外的染色体发生融合的染色体的细胞（图 1 ）。图 1 中横轴为克隆名称，纵轴为 PCR 中应用的引物。•表示阳性， x 表示阴性。底行表示通过 FISH 所观察到的人 2 号染色体存在的形态。未做描述的表明没有实施。

同样可得到保持人 2 号、 14 号、 22 号染色体的 A9 细胞。

（ 实施例 2 ）用微细胞法将人 22 号染色体导入小鼠 ES 细胞。

用（ 实施例 1 ）中得到的保持人 22 号染色体的 A9 细胞株（以下称作 A9/#22 ）作染色体供体细胞。用小鼠 ES 细胞株 E14 （ Martin L. Hopper， Hooper 等，自然， 326： 292， 1987 ）作染色体受体细胞。参照（相沢慎一，生物手册， 8，基因打靶，羊土社， 1995 ）所描述的方法培养 E14 细胞，并用丝裂霉素 c （ Sigama ）处理的 G418 耐性 STO 细胞株（大阪大学，近藤寿人教授）作饲养细胞。首先，参照清水等（细胞工程学手册，羊土社， 1992 ）所报道的方法，从大约 10^8 A9/#22 制备微细胞。将所得微细胞悬浮到 5ml 的 DMEM 中。用胰酶分散大约 10^7 的 E14，之后用 DMEM 洗涤 3 次，悬浮到 5ml 的 DMEM 中，然后混合微细胞， 1250rpm 、离心 10 分钟，弃上清。轻扣沉淀使之分散，加入 0.5ml 的 1： 1.4 PEG 溶液（ 5g PEG 1000（和光纯药）、 1 ml DMSO （ Sigma ）溶解到 6ml DMEM 中），室温静置 1 分 30 秒，然后缓慢加入 10ml 的 DMEM 。立即离心 1250rpm， 10 分钟，弃上清，将沉淀悬浮到 30ml 培养 ES 细胞用的培养基中，接种到 3 个直径 100mm 、接种了饲养细胞的组织培养用塑料瓶（ Corning ）中。 24 小时后，换成添加了 300μg/ml G418 （ GENETICIN， Sigma ）的培养基，其后，每天换培养基。 1 周 - 10 天后出现耐药性克隆，其出现频率为每 10^7 个 E14 细胞出现 0 - 5 个。挑选克隆进行增殖，每 5×10^6 个悬

浮到 1 ml 的保存培养基<ES 细胞培养液 + 10 % DMSO（ Sigma)>中，－ 80 ℃冻存．同时用 Puregene DNA 分离试剂盒（ Gentra System 社）从每种耐药克隆的 $10^6 \times 10^7$ 个细胞中制备基因组 DNA．

用γ射线照射微细胞使人 22 号染色体片段化（ koi 等，科学，260： 361， 1993 ）．将从 10^8 个 A9/#22 所得的微细胞悬浮到 5ml DMEM 中，用 Gammacell 40（加拿大原子能公共公司）在冰上进行 60Gy γ射线的照射（ 1.2Gy/分 × 50 分）。经γ射线照射的微细胞的融合与耐药株的选择与未经照射的微细胞一样，其选择结果是，耐药株的出现频率是每 10^7 个 E14 细胞出现 1 － 7 个．与未照射的情况一样对耐药株进行冻存、提取 DNA．

根据下面（ 1 ）－（ 3 ）的方法来证实未经照射的微细胞耐药株 E14/#22 － 9、 E14/#22 － 10、γ射线照射的微细胞耐药株 E14/#22 － 14、 E14/#22 － 25 中所导入染色体的保持。

（ 1 ） PCR 分析（图 2 ）

以耐药株基因组 DNA 为模板，通过 PCR 来检测人 22 号染色体上存在的基因（（ Genetic Maps ）基因图谱，同前）和多形性标记（多形性 STS 引物对， BIOS 社： D22S315， D22S275， D22S278， D22S272， D22S274；自然， 359： 794， 1992 ）的存在。下面是以 GenBank、 EMBL 等的数据库获得的碱基序列为基础制备的基因引物－寡核苷酸序列。

PVALB (小白蛋白): 5' -TGGTGGCTGAAAGCTAAGAA (序列号 9), 5' -CCAGAAGAA TGGTGTCATTA (序列号 10)

MB (肌红蛋白): 5' -TCCAGGTTCTGCAGAGCAAG (序列号 11), 5' -TGTAGTTGGAGGCC ATGTCC (序列号 12)

DIA1 (细胞色素 b-5 还原酶): 5' -CCCCACCCATGATCCAGTAC (序列号 13), 5' -GCCCTCAGAAGACGAAGCAG (序列号 14)

Ig λ (免疫球蛋白λ): 5' -GAGAGTTGCAGAAGGGGTGACT (序列号 15), 5' -GGAGACCACCAAACCCTCCAAA (序列号 16)

ARSA (芳基硫酸酯酶): 5' -GGCTATGGGGACCTGGGCTG (序列号 17), 5' -CAGAGA CACAGGCACGTAGAAG (序列号 18)

以大约 10μg 的基因组 DNA 作模板，用上述 10 种引物进行 PCR 扩增（ Innis 等，同前）。其结果是未经照射的 2 个克隆对所有的引物、经γ射线照射的 2 个克隆对部分引物产生所期待长度的扩增产物。图 2 示上述结果。图 2 中左边是以人 22 号染色体的 G 带为基础制作的染色体模式图和一些位置明确的标记在 G 带的位置（ O'Brien，基因图谱，第 6 版，第 5 册等）。根据目前获得的信息（科学，人类基因图， 1994；Nature Genetics, 7： 22， 1994；自然， 359： 794， 1992 等），基因和多形性标记的排列表明其大致的位置关系，其顺序未必准确。用 PCR 对 4 种 G418 耐性 E14 细胞克隆进行检测，能得到所期待扩增产物的标记用■表示，不能检测出的标记用□表示。下面是通过 FISH 分析观察到的结果。 A9/#22 是染色体供体细胞。

（ 2 ） Southern 印迹分析

参照（ Ausubel 等，现代分子生物学方案， John Wiley Sons 公司， 1994 ）所描述的方法，以人特异的重复序列 L1 序列（每单倍体基因组存在 10^4 - 10^5 拷贝，来自 RIKEN DNA Bank；核酸研究， 13： 7813， 1995；来自 pUK 的 1.4kb 的 EcoRI - BamHI 片段）作探针，对经限制酶（ BglII，宝酒制造）处理的约 2μg 的基因组 DNA 进行 Southern 印迹分析。其结果是，在各耐药克隆 DNA 中，大多能检测出与人 L1 序列进行杂交的杂交带。有 2 个未照射的克隆，其带型和根据各带密度而推测出的人染色体 DNA 对小鼠基因组 DNA 的定量比与 A9/#22 相同。γ射线照射克隆的全部信号强度与 A9/#22 相比，与 PCR 分析所显示的缺损程度相关。

（ 3 ）荧光原位杂交（ FISH ）

参照（松原等， FISH 实验方案，秀润社， 1994 ）所记载的方法，应用人 22 号染色体特异的探针（ CHROMOSOME PAINTING SYSTEM， Cambio 社）进行 FISH 分析。其结果是，在几乎所有观察到的分裂像中，对于 E14/#22 - 9 能检测到异位到小鼠染色体上的形态，而对于其它 3 株则能检测到独立的人 22 号染色体。

通过以上实验可知，所得到的 G418 耐药株 E14/#22 - 9、 E14/#22 - 10 保持全部或大部分的人 22 号染色体， E14/#22 - 14、 E14/#22 - 15 则保持有其部分片段。

（实施例 3 ）从保持人 22 号染色体的 ES 细胞制备嵌合体小鼠。

（实施例 3 ）由保持人 22 号染色体的 ES 细胞制备嵌合体小鼠

参照（相沢慎一，生物手册，8，基因打靶，羊土社，1995 ）所记载的方法，用常规技术从小鼠获取胚胎、培养，将 ES 细胞注入胚胎，移植到代孕母亲的子宫等。将（实施例 2 ）中得到的、经证实保持人 22 号染色体的、冻存的 G418 耐性 ES 细胞株 E14/ #22 - 9 融化，培养，注入到 C57B2/6 × C3H F1 雌性小鼠（日本 CREA 社）与 C3H 雄性小鼠（日本 CREA 社）交配而得到的胚泡期胚中，每一胚胎注入约 10 - 15 个细胞。在代孕母亲 ICR 小鼠（日本 CREA 社）伪妊娠 2.5 天后，将注入大约 10 个细胞的胚胎移植到子宫的两侧。（第 1 表）表示了其结果。

表 1. 从保持人 22 号染色体（片段）的 E14 细胞制备嵌合体小鼠

ES 细胞克隆/人染色体	G418 耐性克隆号	注入 ES 细胞的胚泡期的胚胎数	后代小鼠的数目	嵌合体小鼠的数目	对毛色的贡献率 ~10%	10-30%	30%
E14/#22	9	166	29	16	7	3	6

其移植了 166 个注入胚，诞生了 29 只子鼠。由宿主胚而来的毛色为野鼠色（深棕色），其中若能见到由 E14 细胞而来的浅灰色，则可判定为嵌合体。所生 29 只中具有明显浅灰色的，也就是说能识别出由 E14 细胞贡献的个体有 16 只。在 K22 - 22 中最大的贡献率为 40 %.

根据该结果可表明保持人 22 号染色体的小鼠 ES 细胞株/#22 - 19 能形成嵌合体，即使有分化或小鼠正常组织的能力。

（实施例 4 ）在保持人 22 号染色体的 ES 细胞而来的嵌合体小鼠的各组织中证实人染色体 DNA 的保持。

在（实施例 3 ）中用毛色判断的基础上，以从尾部制备的基因组 DNA 为模板，通过 PCR 来证实导入染色体的保持。参照（腾木元也，发育工程学实验手册，讲谈社 Scientific， 1987 ）的方法，从出生后 3 周的嵌合体小鼠获取尾部，用 Puregene DNA 分离试剂盒提取 DNA .

以该基因组DNA为模板，应用（实施例2）中使用的多形性引物中的PVALB、D22S278，来证实扩增产物。对能观察到毛色贡献的10只小鼠进行分析，结果在所有的小鼠中可检测到至少由一引物而产生的扩增产物。

Southern印迹分析与（实施例2）相同，用人L1序列作引物，对从6个嵌合体小鼠、1个非嵌合体小鼠尾部得到的2μg基因组DNA进行分析。结果可证实在所有的嵌合体小鼠中存在多数的人L1序列，其带型与E14/#22－9相类似。与小鼠基因组的定量比率最多可达到10％（图3）。图3中每道中均使用BglII消化的2μg基因组DNA。用^{32}P标记的人L1序列作探针，通过图像分析仪BAS2000（富士照相胶片公司)来检测信号。从右边数是由嵌合体小鼠（K22－6，7，8，9，10，11，12：9为非嵌合体）尾部而来的基因组DNA和对照DNA（C：C是E14/#22－9与E14基因组DNA以1：9的重量比混合）。左边表示DNA分子量，右边表示各嵌合体的嵌合率。（－：0％；＋：～10％；＋＋：10－30％）。

用ISOGEN（日本Gene公司）从毛色贡献达到5％的嵌合体小鼠（K22－7）的脑、肝脏、肌肉、心脏、脾、胸腺、卵巢、肾获取基因组DNA，用（实施例2）中所用基因引物中的MB、DIA1，对各种组织进行PCR分析。结果是在所有的组织中，2个引物均产生所期待的扩增产物。（图4）是用DIA1引物所产生的结果。PCR产物经20％琼脂糖凝胶电泳后，用溴化乙锭染色进行检测。图4中每一泳道从左开始为B：脑，L：肝，SM：骨骼肌，H：心脏，Sp：脾，Th：胸腺，Ov：卵巢，K：肾，nc：非嵌合体小鼠尾部的NDA（阴性对照），pc：人纤维母细胞（HFL－1）DNA（阳性对照）。

该结果表明，E14/#22－9在小鼠各种正常组织中起作用，并确证保持有人22号染色体。

（实施例5）由保持人22号染色体的ES细胞而来的嵌合体小鼠中人基因的表达

将毛色贡献达5％个体（K22－7)的尾部在液氮中冻结粉碎后，可作为证实人基因表达的材料。这是皮肤、骨、骨肉、血液等组织的混合物。用ISOGEN（日本Gene）从中提取总RNA，通过RT－PCR检测人肌红蛋白（MB）、人细胞色素b5还原酶（DIA1）的mRNA。

参照（ Innts 等， PCR 实验手册， HBJ 出版局， 1991 ）的方法进行 RT - PCR 。用随机六聚物寡核苷酸（终浓度 1000pmol ，宝酒制造）作逆转录反应的引物，逆转录酶使用 BRL 公司的 Super Script 。下面是用 cDNA 作模板进行扩增时用的引物。

MB： 5′- TTAAGGGTCACCCAGAGACT （序列号 19 ）， 5′- TGTAGTTGGAGGCCATGTCC(序列号 20)

DIA1： 5′- CAAAAAGTCCAACCCTATCA （序列号 21 ）， 5′- GCCCTCAGAAGACGAAGCAG （序列号 22 ）

该结果可检测出两基因 mRNA 特异的扩增产物（图 5 ）。 RT - PCR 产物经 20 % 琼脂糖凝胶电泳后，用溴化乙锭染色进行检测。图 5 中 M 表示标准（ Hind III 消化λ DNA + Hae III 消化∅ X174 DNA ，宝酒造）， MB 表示人肌红蛋白， DIA1 为细胞色素 - b5 - 还原酶， WT 为野生型 C3H 小鼠。

由对同一个体（ K22 - 7 ），用 ISOGEN 从脑、心脏、胸腺、肝、脾、肾、卵巢、骨骼肌提取总 RNA ，用上述 2 种引物对各脏器进行 RT - PCR 。结果在所有的脏器中发现 DIA1 所期待的扩增产物，仅在心脏和骨骼肌中发现 MB 所期待的扩增产物（图 6 ）。肌红蛋白对肌细胞特异性表达（ Bassel - Duby 等， MCB ， 12： 5024 ， 1992 ），由此可知导入的人染色体上的基因在小鼠中能接受正常组织特异性表达的调控。 PCR 产物经 20 % 琼脂糖凝胶电泳后，用溴化乙锭染色进行检测。图 6 中，各泳道从左开始分别为 B： 脑， H： 心脏， Th： 胸腺， L： 肝脏， Sp： 脾脏， K： 肾， Ov： 卵巢， SM： 骨骼肌， M： 标准（同前）。据认为 MB 的结果中所观察到的低分子量带是非特异性产物。

总之，导入的人 22 号染色体在嵌合体小鼠的正常组织中能发挥功能。

（实施例 6 ）将人 4 号染色体或其部分片段导入 ES 细胞

用（实施例 1 ）中得到的保持人 4 号染色体的小鼠 A9 细胞（以下称作 A9/#4 ）作为染色体供体细胞。用小鼠 ES 细胞的 E14 （与实施例 2 相同）作染色体受体细胞。微细胞融合试验及 G418 耐性克隆的选择与（实施例 2 ）相同。耐药性克隆出现的频率为每 10^7 个 E14 细胞出现 1 - 2 个。耐药性克隆的冻存、基因组 DNA 的提取与（实施例 2 相同）。

用以下（1）-（3）的方法来证实耐药性克隆E14/#4 - 4、E14/#4 - 7、E14/#4 - 11中人染色体或其片段的保持情况。

（1）PCR分析（图7）

以耐药株基因组DNA为模板，通过PCR来检测人4号染色体上存在的基因（（Genetic Maps）基因图谱，同前）和多形性标记（多形性STS引物对，BIOS社：D4S395，D4S412，D4S422，D4S413，D4S418，D4S426，F11；自然，359：794，1992）的存在。下面是以Gen Bank、ENBL等数据库获得的碱基序列为基础制备的基因引物-寡核苷酸序列。

HD(享廷顿疾病)：5′- TCGTTCCTGTCGAGGATGAA(序列号23)，5′- TCACTCCGAAGCTGCCTTTC(序列号24)

IL - 2(白介素- 2)：5′- ATGTACAGGATGCAACTCCTG(序列号25)，5′- TCATCTGTAAATCCAGCAGT(序列号26)

KIT(c-kit)：5′- GATCCCATCGCAGCTACCGC(序列号27)，5′- TTCGCCGAGTAGTCGCACGG(序列号28)

FABP2(脂肪酸结合蛋白2,肠)：5′-GATGAACTAGTCCAGGTGAGTT(序列号29)，5′- CCTTTTGGCTTCTACTCCTTCA(序列号30)

对上述11种引物进行PCR扩增，结果有3株能得到全部或部分引物所期待的扩增产物。也可看到象E14/#4 - 4、E14/#4 - 7一样缺乏一部分区域。以上结果如图7所示。图7中，左边是以人4号染色体的G带为基础制作的染色体模式图和一些位置明确的标记在G带的位置（参照实施例2）。根据目前的资料（参照实施例2）基因和多形性标记的排列表明其大致的位置关系，其顺序未必准确。用PCR对3种G418耐性E14细胞克隆进行检测，能得到所期待扩增产物的标记用■表示，不能检测出的标记用□表示。下面是通过FISH分析观察到的结果。A9/#4是染色体供给细胞。

（2）Southern印迹分析（图8）

与（实施例2）的方法相同，用人L1序列作探针，对E14/#4 - 4、E14/#4 - 7的基因组DNA进行Southern印迹分析。其结果是，在两株DNA中，大多能检测出与人L1序列进行杂交的杂交带。与A9/#4相比，全部信号强度与PCR分析所显示的缺损程度相关。图8中，各泳道均使用经BglII消化了的2μg基因组DNA。以^{32}P标记的人L1序列

作探针，通过图像分析仪 BAS2000 （富士照相胶片公司）检测信号。图 8 中，各道从左依次为 1： A9/#4（染色体供体细胞）、2： A9/#4 + A9（1： 2）、3： A9/#4 + A9（1： 9）、4： A9、5： E14/#4 - 7、6： E14/#4 - 4。2、3 中 2 种 DNA 按括号内的比例进行混合。左侧为分子量。

（3）荧光原位杂交（FISH）

用与（实施例 2）相同的方法，用人 4 号染色体特异的探针（CHROMOSOME PAINTING SYSTEM， Cambio 社）进行 FISH 分析。结果在 3 株几乎所有的分裂像中能检测出人 4 号染色体或其部分片段。E14/#4 - 4 中能检测到易位到小鼠染色体上的形态，其它 2 株才能检测到独立的染色体。所观察到的人染色体的相对大小当用 PCR 分析的结果推测出的一致。

以上实验表明，所得 G418 耐药株保持人 4 号染色体的全部或部分片段。

（实施例 7）由保持人 4 号染色体部分片段的 ES 细胞制备嵌合体小鼠

将证实保持人 4 号染色体部分片段的 G418 耐性 ES 细胞株 E14/#4 - 4、E14/#4 - 7 的冻存株融化，注入到按（实施例 3）的方法所得胚泡期胚胎中，每个胚胎注入 10 ~ 15 个细胞。代孕母亲 ICR 小鼠（日本 AREA）伪孕 2.5 天后，移植到其子宫中，每侧子宫移入大约 10 个 ES 细胞注入胚。结果如（表 2）所示。

表 2. 由保持人 4 号染色体（片段）的 ES 细胞制备嵌合体小鼠

ES 细胞克隆/人染色体	G418 耐性克隆号	注入 ES 细胞的胚泡期的胚胎数	后代小鼠的数目	嵌合体小鼠的数目	对毛色的贡献率 ~10%	10-30%	30%
E14/#4	4	160	8	5	5	-	-
	7	80	5	2	1	1	-

其移植了240个注入胚，诞生了13只子鼠。由宿主胚而来的毛色为野鼠色（深棕），其中若能见到由E14细胞而来的浅灰色，则可判定为嵌合体。所生13只中具有明显浅灰色的，也就是说能识别出由E14细胞贡献的个体有7只。在E14/#4－7的1小鼠中，最大的贡献率为15％。

根据该结果可表明保持人4号染色体的小鼠ES细胞株E14/#4－4、E14/#4－7能形成嵌合体，即使有分化或小鼠正常组织的能力。

（实施例8）在保持人4号染色体的ES细胞而来的嵌合体小鼠中证实人染色体DNA的保持和G418耐性基因的表达

（1）PCR分析

（实施例7）中所得嵌合体小鼠中，来源于E14/#4－7的1只（K#4－7－1：嵌合率约5％）、来源于E14/#4－4的一只（K#4－4－41：嵌合率约5％），用（实施例4）的方法，从它们的尾部制备基因组DNA。以该DNA为模板，用（实施例6）中分析4号染色体用的引物中检测出E14/#4－7、E14/#4－4的多形性标记F11进行PCR分析。结果2只小鼠均检测出所期待的扩增产物。

（2）Southern印迹分析（图9）

与（实施例2）相同，用人L1序列作探针，对E14/#4－7来源的1只小鼠（K#4－7－1：嵌合率约5％）.尾部的2μg基因组DNA进行Southern印迹分析。结果可以看到多数存在人L1序列，其带型与E14/#4－7相类似。与小鼠基因组的质量比约为E14/#4－7的10％。图9中所示，各道均使用经BglII消化了的2μg尾部基因组DNA．用^{32}P标记的人L1序列作探针，通过图像分析仪BAS200（富士照片胶片公司）检测信号。左侧为分子量。各道从左依次为1：K#/4－7－1、2：空白、3：E14/#4－7。

（3）尾部纤维母细胞的G418耐性试验

嵌合体小鼠中，来源于E14/#4－7的1只（K#4－7－1：嵌合率约5％）、来源于E14/#4－4的1只（K#4－4－41“嵌合率约5％），按以下的方法从它们的尾部制备纤维母细胞。DNA的制备与（实施例4）相同，切嵌合体小鼠的尾部5mm～10mm，在PBS/1 mM EDTA中洗涤数次后，过网除去切下的表皮，用网研细内部组织。将组织细片移入盛有5ml PBS/1 mM EDTA的试管中，室温静置30分钟－1小

时．其后余下 1 ml 的 PBS/EDTA，除去上清，加入 1 ml 0.25 % 胰酶/PBS，室温放置 5 - 10 分，边轻扣或边吹打边搅拌组织．1000rpm，离心 10 分钟，将沉淀悬浮到 2ml 的 DMEM（10 % FCS）中，接种到 35mm 培养皿中．培养 7 - 10 天后，用胰酶处理细胞使之脱离皿壁，接种到 2 块 35mm 培养皿，每瓶约 10^4 个细胞，其中 1 瓶中加入终浓度 400μg/ml 的 G418，培养 5 - 7 天，观察每瓶中的活细胞．这种条件下，来源于野生型 ICR 小鼠的纤维母细胞在 G418 的存在下几乎 100 % 死亡．结果在 2 只小鼠中均见到 G418 耐性纤维母细胞的存在．

这些结果表明，E14/#4 - 7、E14/#4 - 4 在小鼠中贡献给各种正常组织，且保持人 4 号染色体部分片段．

（实施例 9）将人 14 号染色体或其片段导入小鼠 ES 细胞

用（实施例 1）中得到的保持人 14 号染色体的小鼠 A9 细胞株（以下称作 A9/#14）作染色体供体细胞．用小鼠 ES 细胞株 TT2（购自 Lifetech Oriental 公司，Yagi 等，分析生化，214：70，1993）作受体细胞．TT2 的培养方法参照（相沢慎一，生物学手册系列，8，基因打靶，羊土社，1995）的方法进行，饲养细胞选用丝裂霉素 c（Sigma）处理的 G418 耐性原代培养细胞（购自 Lifetech Oriental 公司）．微细胞融合实验及 G418 耐药株的筛选与（实施例 2）相同．耐药株的出现频率为每 10^7 个 TT2 细胞出现 326 个．耐药株的冻存、基因组 DNA 的制备与（实施例 2）相同．

用γ射线照射微细胞可得到人 14 号染色体的片段（Koi 等，科学，260：361，1993）．将从约 10^8 个 A9/#14 获取的微细胞悬浮剂 5ml DMEM 中，通过用 Gammacell 40（同前）、在冰上照射 30Gy 的γ射线（1.2 Gy/分 × 25 分）．经γ射线照射的微细胞的融合以及耐药株的筛选与未经照射的微细胞相同，结果耐药株的出现频率为每 10^7 个 TT2 细胞出现 3 个．耐药株的冻存、DNA 提取与（实施例 2）相同。

根据下面（1）（2）的方法来证实未经照射的微细胞 G418 耐药株 1 - 4、1 - 5，γ射线照射的微细胞 G418 耐药株 3 - 1、3 - 2，4 株中人 14 号染色体的保持。

（1）PCR 分析（图 10）

以耐药株基因组 DNA 为模板，通过 PCR 来检测人 14 号染色体上存在的基因（（Genetic Maps）基因图谱，同前）和多形性标记（多

形性 STS 引物对， BIOS 社： D14S43 ， D14S51 ， D14S62 ， D14S65 ， D14S66 ， D14S67 ， D14S72 ， D14S75 ， D14S78 ， D14S81 ， PCI； 自然， 359： 794 ， 1992 ）的存在. 下面是以 Gen Bank、EMBL 等的数据库获得的碱基序列为基础制备的基因引物－寡核苷酸序列.

NP （核苷磷酸化酶）： 5'-ATAGAGGGTACCCACTCTGG (序列号 31), 5'-AACCAGGTAGGTTGATATGG (序列号 32)

TCRA （T－细胞受体α）： 5'-AAGTTCCTGTGATGTCAAGC (序列号 33), 5'-TCATGAGCAGATTAAACCCG (序列号 34)

MYH6 （心肌球蛋白重链）： 5'-TGTGAAGGAGGACCAGGTGT (序列号 35), 5'-TGTAGGGGTTGACAGTGACA (序列号 36)

IGA2 （免疫球蛋白α－2 恒定区）： 5'-CTGAGAGATGCCTCTGGTGC (序列号 37), 5'-GGCGGTTAGTGGGGTCTTCA (序列号 38)

IGG1 （免疫球蛋白γ－1 恒定区）： 5'-GGTGTCGTGGAACTCAGGCG (序列号 39), 5'-CTGGTGCAGGACGGTGAGGA (序列号 40)

IGM （免疫球蛋白μ恒定区）： 5'-GCATCCTGACCGTGTCCGAA (序列号 41), 5'-GGGTCAGTAGCAGGTGCCAG (序列号 42)

IGVH3 （免疫球蛋白高链可变区）： 5'-AGTGAGATAAGCAGTGGATG (序列号 43), 5'-GTTGTGCTACTCCCATCACT (序列号 44)

以 4 个耐药株的基因组 DNA 作模板，用与（实施例 2 ）相同的方法对上述 18 种引物进行了 PCR 扩增，结果全部或部分引物得到所期待的扩增产物。用经γ射线照射的微细胞而得到的耐药株 3－1、3－2 才发现 14 号染色体的一部分区域有缺失倾向. 另外，用未经照射的微细胞耐药株 1－4 株也有缺失现象。结果如图 10 所示. 图 10 中左边为以人 14 号染色体的 G 带为基础制作的染色体模式图和一些位置明确的标记在 G 带的位置（参照实施例 2 ）。根据目前获得的信息（参照实施例 2 ），基因和多形性标记的排列表明其大致的位置关系，其顺序未必准确. 用 PCR 对 4 种 G418 耐性 TT2 细胞克隆进行检测，能得到所期待扩增产物的标记用■表示，不能检测出的标记用□表示。

A9/#22 是染色体供体细胞. 右端表示实施例 11 （ 1 ）的结果.

（ 2 ）荧光原位杂交（ FISH ）

参照（松原等， FISH 实验方案，秀润社， 1994 ）所记载的方法，应用人 14 号染色体特异的探针（ CHROMOSOME PAINTING SYSTEM， Cambio 社）进行 FISH 分析. 其结果是，对于 4 株在几乎所有观察到的分裂像中，能观察到人 14 号染色体或其部分片段是独立的染色体. 所观察到的人染色体的相对大小与用 PCR 分析结果进行的推测一致。

通过以上实验可以证实所得 G418 耐药株 1 - 4、 1 - 5、 3 - 1、 3 - 2 保持人 14 号染色体的全部或其部分片段.

（实施例 10 ）由保持人 14 号染色体片段的 ES 细胞制备嵌合体小鼠

将在（实施例 9 ）中得到的，经证实保持人 14 号染色体的 4 株 G418 耐性 ES 细胞株（ 1 - 4， 3 - 1， 3 - 2， 1 - 5 ）的冻存株融化，注入到 ICR 或 MCH （ ICR ）（日本 CREA ）雄雌小鼠进行交配而得到的 8 细胞期胚胎中，每个胚胎注入 8 - 10 个. 用 ES 培养基（实施例 9 ）培养一晚，形成胚泡后，移植到经伪孕处理 2.5 天后的代孕母亲 ICR 小鼠（日本 CREA ）的子宫中，每侧移入大约 10 个注入胚. 结果如（表 3 ）所示.

表 3. 由保持人 14 号染色体（片段）的 TT2 细胞株制备嵌合体小鼠

ES 细胞克隆/人染色体	G418 耐性克隆号	注入 ES 细胞的胚泡期的胚胎数	后代小鼠的数目	嵌合体小鼠的数目	对毛色的贡献率 ~20%	20-50%	50-80%
TT2/#14	1 - 4	98	20	1	-	-	1
	1 - 5	110	14	2	1	-	1
	3 - 1	103	11	2	1	1	-
	3 - 2	183	19	3	-	2	1

共移植了 494 个注入胚，诞生了 64 只子鼠. 由宿主胚而来的毛色

为野鼠色（深棕），其中若能见到由 E14 细胞而来的浅灰色，则可判定为嵌合体。所生 64 只中具有明显浅灰色的，也就是说能识别出由 E14 细胞贡献的个体有 8 只。在来源于 1 - 4 的 1 小鼠中最高的贡献率为 80 %。

根据该结果可表明保持人14号染色体的小鼠ES细胞株（1 - 4，1 - 5，3 - 1，3 - 2）能形成嵌合体，即有分化或小鼠正常组织的能力。

（实施例 11）在保持人 14 号染色体片段的 ES 细胞而来的嵌合体小鼠中证实人 14 号染色体片段的保持。

通过下面（1）~（3）的方法来证实（实施例 10）中所得嵌合体小鼠中保持人 14 号染色体部分片段（1）用各组织的 DNA 进行 PCR 分析。

用与（实施例 4）相同的方法，从嵌合体小鼠中来源于 3 - 1 的小鼠（K3 - 1 - 1：嵌合率约 25 %）的尾部制备基因组 DNA。以此作模板，用（实施例 9）中所示分析 14 号染色体时应用的引物中的能检测出 3 - 1 的全部 14 种引物进行 PCR 分析。结果所有 14 种引物均检测到预期的扩增产物（图 10）。

此外，用 Puregene DNA 分离试剂盒从同一小鼠（K3 - 1 - 1）的脑、肾、脾、心、肝、胸腺提取基因组 DNA，用 IGM 引物（实施例 9）对各组织进行 PCR 分析。结果在所有的组织中发现预期的扩增产物（图 11）。将 PCR 产物经 2 % 琼脂糖凝胶电泳后，用溴化乙锭染色进行检测。图 11 中各泳道从左依次为 B：脑，K：肾，Sp：脾，H：心脏，Th：胸腺，Pc：人纤维母细胞（HFL - 1）DNA（阳性对照），nc：非嵌合体小鼠尾部 DNA（阴性对照），M：标准（HindIII 消化入 DNA + HaeIII 消化ØX174 DNA，宝酒造）。

（2）尾部纤维母细胞的 G418 耐性试验

用以下方法，从嵌合体小鼠中来源于 3 - 2 的小鼠 2 个（K - 3 - 2 - 1：嵌合率约 25 %，K3 - 2 - 3：嵌合率约 50 %）、来源于 1 - 4 的 1 个小鼠（K1 - 4 - 1：嵌合率约 80 %）的尾部制备纤维母细胞。DNA 制备与（实施例 4）相同，从 3 ~ 6 周龄嵌合体小鼠的尾部取 5 ~ 10mm，在 PBS/1 mM EDTA 中洗数次后，过网除去切下的表皮，在网上研磨内部组织。将组织细片移到盛 5ml PBS/1mM EDTA 的

试管中，室温静置 30 分～ 1 小时．其后剩余 1 ml PBS/EDTA，去除上清，加入 1 ml 0.25 % 胰酶/PBS，室温放置 5 － 10 分钟，边轻扣或吹打边搅拌组织． 1000rpm 离心 10 分钟，将沉淀悬浮到 2ml 的 DMEM（ 10 % FCS ）中，接种到 35mm 培养皿上．培养 7 － 10 天后，用胰酶处理细胞使之脱离皿壁，接种到 4 个 35mm 培养皿，每个皿中约 10^4 个细胞，在其中 2 皿中加入 400μg/ml 的 G418，培养 5 － 7 天后，计算每皿中的存活细胞数。来源于野生型 ICR 小鼠的纤维母细胞，在 G418 存在的条件下几乎 100 % 死亡。假如 G418 耐性纤维母细胞的增殖速度在 2 种条件下相同，那么选择培养基中存活的细胞数与非选择培养基上存活的细胞数的比率能够反映对 G418 耐性 ES 细胞株来源的纤维母细胞的纤维母细胞集落的贡献率。结果如（图 12 ）所示，可看到 3 株中均存在 G418 耐性纤维母细胞。在图 12 中，耐性率是每个个体从 2 组选择/非选择 35mm 培养皿得到的值进行平均． ICR 表示野生型 ICR 小鼠。

（ 3 ）尾部来源的 G418 耐药纤维母细胞的 FISH 分析

用与（实施例 2 ）相同的方法，对上面（ 2 ）得到的 G418 耐药纤维母细胞（ K3 － 2 － 3， K1 － 4 － 1 来源）进行 FISH 分析。用 FITC 标记从 HFL － 1 细胞（实施例 1 ）提取的人总 DNA （松原等， FISH 实验方案，秀润社， 1994 ），以此作探针。结果在 2 株细胞中均在几乎所有分裂像中观察到独立的人染色体部分片段。

这些结果证实，保持人 14 号染色体部分片段的 TT2 细胞株在小鼠中贡献给各种正常组织，并且其中保持人 14 号染色体部分片段。

（实施例 12 ）将人 2 号染色体部分片段导入 ES 细胞

用（实施例 1 ）中获得的保持人 2 号染色体部分片段的小鼠 A9 细胞 W23（以下简称 A9/#W23 ）作染色体供体细胞．用小鼠 ES 细胞株 TT2（实施例 9 ）作染色体受体细胞。微细胞融合及 G418 耐药株的选择与（实施例 2 ）相同。耐药株的出现频率为每 10^7 个 TT2 细胞出现 1 － 3 个。耐药株的冻存、基因组 DNA 的制备与（实施例 2 ）相同。通过下面（ 1 ）、（ 2 ）的方法证实耐药株 5 － 1、 5 － 2、 5 － 3 中保持有人 2 号染色体部分片段。

（ 1 ） PCR 分析

以耐药株基因组 DNA 为模板，存在于人 2 号染色体上的基因（基

因图谱，同前）中选择在染色体供给细胞 A9/#W23 中检测出的 Cκ、FABPI 进行 PCR。

对各引物进行扩增，结果在 3 株中均检测出两个引物所期待的扩增产物。

（2）荧光原位杂交（FISH）

与（实施例 2）相同，用人 2 号染色体特异的探针（CHROMOSOME PAINTING SYSTEM，Cambio 社）进行 FISH 分析。结果在 3 株几乎所有的分裂像中检测出人 2 号染色体部分片段是独立的染色体。其大小与在 A9/#2 W23 中观察到的相同。

以上实验证实，所得 G418 耐药株保持有人 2 号染色体部分片段。

（实施例 13）由保持人 2 号染色体片段的 ES 细胞制备嵌合体小鼠

将（实施例 12）中得到的、证实保持有人 2 号染色体部分片段的 G418 耐性 ES 细胞株 5 - 1 的冻存株融化，注入到 ICR 或 MOH（ICR）（日本 CREA）雄雌小鼠交配而得到的 8 细胞期胚胎中，每个胚胎注入 10 - 12 个细胞。用 ES 培养基（实施例 9）培养一晚上形成胚泡后，移植到经伪孕处理的 2.5 天的代孕母亲 ICR 小鼠（日本 CREA）子宫中，每侧注入约 10 个注入胚。

结果如（表 4）所示。

表 4. 由保持人 2 号染色体（片段）的 TT2 细胞株制备嵌合体小鼠

ES 细胞克隆/人染色体	G418 耐性克隆号	注入 ES 细胞的胚泡期的胚胎数	后代小鼠的数目	嵌合体小鼠的数目	对毛色的贡献率 ~20%	20-50%	50-80%
TT2/#2 (W23)	5 - 1	264	51	18	7	5	6

共移植了 264 个注入胚，结果产生 51 只子鼠。根据毛色可判断嵌合体小鼠在来源于宿主胚（ICR）的白色中有可识别的来源于 TT2 细胞的野鼠色（浓茶）。所生 51 只小鼠中，毛色明显野鼠色，即可看出

由ES细胞贡献的个体有18只．另外，最高的嵌合率为80％．

该结果证实，保持人2号染色体部分片段的G418耐性ES细胞（5－1）有形成嵌合体的能力，即有分化成小鼠正常组织的能力．

（实施例14）在导入了人14号染色体的嵌合体小鼠血清中检测人抗体重链

用酶联免疫吸附实验（ELISA）来测定血清中人抗体的浓度．依照下面所描述的方法来进行ELISA。富山·安东，单克隆抗体实验手册，讲谈社，1987；安东·千叶，单克隆抗体实验操作入门，讲谈社，1991；石川，超敏感性酶免疫测定法，学会出版中心，1993；Ed Harlow，Darid lane，抗体实验室手册，冷泉港实验室，1988；A. Doyle，J.B. Griffiths，细胞和组织培养：实验室方法，John Wiley & Sons Ltd.，1996．参照这些文献中描述的方法调整反应条件，反应在4℃，过夜进行。测定时要把抗人免疫球蛋白的抗体或抗原稀释为0.5－10μg/ml（100－5000倍），铺ELISA板，4℃，过夜。测定血清样品时，用补充了5％小鼠血清（Sigma，M5905）的PBS封闭。稀释样品和标记的抗体，在对杂交瘤培养上清进行测定的时候，用补充了1％胎牛血清的PBS。用PBS将嵌合体小鼠血清稀释20倍．洗涤后将铺层过的板封闭1小时以上．洗板后，加样品，培养30分钟．洗板后，加入稀释了100－5000倍的酶标记的抗人免疫球蛋白抗体温育1小时后，洗板，加底物液进行显色。另外，对于不同的测定系统基本上进行同样的操作步骤，但用生物素标记的抗体时，洗板后加入亲和素－酶复合体，培养后，洗涤，加入底物液．用（酶标仪）微板读数仪（Biotech，EL312e）测定吸光度。

从出生后29－35天的嵌合体小鼠（实施例10，K3－1－2，K－3－2－2，K3－2－2，K3－2－3）中采血，进行ELISA分析。将用50mM碳酸盐－碳酸氢盐缓冲液，pH9.6稀释的抗人IgM小鼠单克隆抗体（Sigma，16385）铺到96孔微滴度板上，加入用补充有小鼠血清（Sigma，M5905）的PBS稀释的血清样品。然后加入过氧化物酶标记的抗人IgM的羊抗体（Tago，2392），培养后加入ABTS底物（Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.，506200），用405nm的吸光度测定酶活性。用纯化的人IgM抗体（CAPPEL，6001－1590）或人IgG抗体（Sigma，14506）作标准。用补充了小鼠血清

的 PBS 对标准物进行梯度稀释。在测定人 IgG 时，将抗人 IgG 的羊抗体（ Sigma， 13382 ）固定到板中，用过氧化物酶标记的抗人 IgG 羊抗体（ Sigma， A0170 ）进行检测。结果如（表 5 ）所示。人 IgM 和 IgG 的被检测出。

将 2ml 溶于 PBS 的人血清白蛋白（ HSA， Sigma， A3782 ）与佐剂（ MPL + TDM 乳液， RIBI 免疫化学研究公司）混合制成抗原溶液。在出生后的第 27 天、 34 天、 41 天对保持人 14 号染色体片段的嵌合体小鼠(实施例 10， K3 - 1 - 1， K3 - 2 - 1)进行 3 次免疫，每次用 0.2ml 的 0.25mg/ml 的抗原溶液。用 ELISA 对这些嵌合体小鼠的血清进行同样地分析。其结果如（图 13 、图 14 ）所示。结果是用 HSA 免疫的嵌合体小鼠血清中，人抗体的浓度在免疫后上升，免疫后的第 17 天可在 K3 - 1 - 1 的血清中检测出人 IgM 18μg/ml 和 IgG 2.6μg/ml 。在未移入人染色体的小鼠血清中，人抗体的效价不明显。

表 5. 嵌合体小鼠血清中人抗体的浓度（ ELISA ）

嵌合体小鼠	IgG （ mg/l ）	IgM （ mg/l ）
K3 - 1 - 2	0.37	3.7
K3 - 2 - 2	0.33	5.9
K3 - 2 - 3	0.51	3.4

（实施例 15 ）从导入了人 14 号染色体的嵌合体小鼠中获取产生人抗体重链的杂交瘤

在（实施例 14 ）中用人白蛋白免疫的嵌合体小鼠（ K3 - 1 - 1，实施例 14 ）出生后 44 天，取出其脾脏，与骨髓瘤细胞进行细胞融合，制作杂交瘤细胞。参照<安东，单克隆抗体实验操作入门，讲谈社（ Scientific， 1991 ）的方法，使用 P3X63 - Ag.8.653（购自大日本制药， 05 - 565 ）作骨髓瘤细胞进行杂交瘤的制备。杂交瘤铺到 10 块 96 孔板中，培养 1 周后用 ELISA 方法对培养上清进行分析。同实施例 14 一样，将抗人 IgM 小鼠单克隆抗体（ Sigma， I6385 ）固定到板

中来进行 ELISA，得到 6 个阳性克隆．另外，在 50mM 的碳酸盐－碳酸氢盐缓冲液，pH9.6 中将抗原 HSA 配成 5μg/ml 的溶液，以每孔 100μl 加到 ELISA 板的全部孔中．用过氧化物酶标记的抗人 IgA + IgG + IgM 羊抗体（ Kirkegaard & Perry Labrrotaries Inc.， 04 － 10 － 17 ）进行检测． 10 块板中检测出 1 个有阳性克隆的．这个克隆是 6 个人 IgM 阳性克隆中的一个．将该克隆（ H4B7 ）再进行培养，稀释培养上清，以 HSA 为抗原，与上面相同，用过氧化酶标记的抗人 IgM 羊抗体（ Tago， 2392 ）进行 ELISA，可以看到随着培养上清稀释度的增加吸光度减少．而从培养人 IgM （ CAPPEL， 6001 － 1590 ）得到的稀释为 2μg/ml 的样品中，吸光度较低，且与稀释度无关．这表明杂交瘤 H4B7 所产生的抗体是对 HSA 具有特异性的抗体（图 15 ）．图 15 中，横轴为培养上清样品的稀释率，纵轴表示 405nm 处的吸光度。

（实施例 16 ） G418 耐性标记的人 2 号染色体片段对嘌呤霉素耐性的再标记

在 100mm 平皿中，用含有 G418 （ 800μg/ml ）的选择培养基（ 10 % FBS、 DMEM ）培养保持 G418 耐性标记的人 2 号染色体片段的 A9 细胞（ W23 ）（参照实施例 1 、图 1 ）．在转染前，用限制酶 SalI（宝酒造）线性化含有嘌呤霉素耐性基因的质粒 pPGKPuro （ WHITEHEAD INSTITUTE， Dr. Peter W. Laird 提供）．用胰酶处理细胞，以 5 × 10^6/ml 的浓度悬浮到 Dulbecco's 磷酸盐缓冲液（ PBS ）中，参照（实施例 1 ），在 10μg DNA 存在的条件下，用 Gene. Pulser （基因脉冲仪）（ Bio － rad ）进行电穿孔．以 25μF 的电容、用 4mm 距离的电穿孔细胞（实施例 1 ）、在室温下施加 1000V 的电压．将电穿孔后的细胞接种到 3 － 6 块 100mm 平皿中． 1 日后换成含 10μg/ml 嘌呤霉素（ Sigma， P － 7255 ）和 G418 （ 800μg/ml ）的双重选择培养基． 2 － 3 周后，将所生成的克隆 200 个左右收集为一组．将 3 组中每组的细胞培养到 2 － 3 个 25cm^2 的培养瓶中，将形成的微细胞与在 25cm^2 培养瓶中培养的小鼠 A9 细胞进行与实施例 1 相同的细胞融合．然后将融合细胞移入 2 块 100mm 平皿中，用含 G418 和嘌呤霉素的上述双重选择培养基培养， 3 组中有 1 组得到具有 2 种双重耐药性的克隆．该克隆中，嘌呤霉素耐性标记导入人 2 号染色体的可能性很高。

（实施例 17 ）导入了人染色体的 ES 细胞中所导入的人染色体的加倍

用添加了高浓度G418的培养基培养保持G418耐性基因标记的人14号染色体片段的ES细胞（E14/#14 - 36），可得到染色体加倍了的ES细胞克隆（生物手册，8，基因打靶，羊土社，1985）。将未经丝裂霉素处理的G418耐性小鼠原代细胞（购自Lifetech Oriental）接种到100mm的平皿中作为饲养细胞。将E14/#14 - 36接种到该100mm平皿中，半日后换成G418浓度为16mg/ml的培养基。每1 - 2天换一次培养基，1周后将G418变为10mg/ml，继续培养，从生成的克隆中选出15个进行培养，用人14号染色体特异的探针（参照实施例9）对染色体进行FISH分析。结果在8个克隆中出现人14号染色体的加倍。

（实施例18）同时保持人2号和4号染色体部分片段的小鼠ES细胞的获得

以（实施例16）中得到的具有双重耐药性克隆中的PG1为供体细胞、野生型A9细胞为受体细胞进行微细胞转移试验，可以证实PG1所保持的人2号染色体部分片段标记有嘌呤霉素耐性基因。微细胞的获得以及与A9细胞的融合与（实施例1）相同。结果在微细胞融合10天后其出现59个G418耐性克隆。将这些克隆的培养液换为含8μg/ml嘌呤霉素的培养基，然后再培养3天，有45个（76％）克隆生存。由于微细胞法中，大多数情况下1个受体细胞中只能移入1条或少数几个染色体，所以两个耐性基因同时以高频率转移表明PG1中所保持的G418耐性标记的人2号染色体部分片段标记有嘌呤霉素耐性基因。此外，为了检测人2号染色体部分片段上各个标记基因，分别以pSTneoB（实施例1）、pPGKPuro（实施例16）为探针对A9/#2 W23（只对G418耐性，实施例16）和PG1进行了FISH分析（松原等，FISH实验方案，秀润社，1994）。结果在A9/#2 W23中，在（实施例12）所证实的人2号染色体部分片段的相应姊妹染色体上分别有1个信号，共观察到2个信号，这表明pSTneoB插入到人2号染色体部分片段上的1个位点。在PG_1中，在同等大小的染色体片段上观察到4个信号。pSTneoB和pPGKPuro的载体部分具有相同的序列，用pPGKPuro探针也可检测出pSTneoB。因此认为在PG1中所观察到的4个信号，其中2个为pSTneoB，另外2个是来源于pPGKPuro的信号。由此可以表明，PG1所保持的人2号染色体部分片段标记有G418耐

性、嘌呤霉素耐性两种标记.

为了获得同时具有人 2 号、 14 号染色体部分片段的小鼠 ES 细胞，就以 PG1 细胞作为染色体供体细胞. 用已保持有人 14 号染色体部分片段 G418 耐性 TT2 细胞 1 - 4（实施例 9）作染色体受体细胞。微细胞融合实验及嘌呤霉素耐药株的选择，除嘌呤霉素的浓度为 0.75μg/ml 外，其它与（实施例 9）中 G418 耐药株的选择相同. 该结果中嘌呤霉素耐药株的出现频率为每 10^7 个 1 - 4 细胞出现 3 ~ 7 个. 由此可以说明这些嘌呤霉素耐药株在 G418 以 300μg/ml 存在的情况下只能增殖，并同时保持了 G418 耐性. 双重耐药株的冻存、基因组 DNA 的获得与（实施例 2）相同. 参照下面（ 1 ）的方法来证实双重耐药株 PG5、 PG15、 PG16 中保持人 2 号和 14 号染色体部分片段，而 PG15 也可参照（ 2 ）进行。

（ 1 ） PCR 分析

以双重耐药株的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。在人 2 号、14 号染色体上的基因（基因图谱，同前）中，应用（实施例 12； A9/#2 W23 ）中所证实的存在于 2 号染色体的引物以及在（实施例 9； TT2/#14 1 - 4 ）中所证实的存在于 14 号染色体上的引物。在 3 株细胞中，所有的引物均有期待的扩增产物。

（ 2 ）荧光原位杂交（ FISH ）

与（实施例 11 ）相同，用 FITC 标记的人总 DNA 作探针进行 FISH 分析。结果几乎在所有的分裂相，可观察到大、小两个染色体片段。与（实施例 9； TT2/#14 1 - 4 ）中由人 14 号染色体特异的探针所确定的部分片段的大小相同，而小的与（实施例 12； TT2/#2 5 - 1 ）中由人 2 号染色体特异的探针所确定的部分片段的大小相同。（图 16 ）为其结果。图中亮度低的染色体为小鼠的染色体，由于 FITC 荧光染色而呈现高亮度的大小 2 个染色体片段（箭头所示）是人的，认为分别是人 14 号、 2 号染色体部分片段。

以上的实验证实所得到的双重耐药性 ES 细胞同时保持人 2 号、 14 号染色体部分片段.

（实施例 19 ）用同时保持人 2 号、 14 号染色体部分片段的 ES 细胞株制备嵌合体小鼠

将（实施例 18 ）中得到的、经证实保持人 2 号、 14 号染色体部

分片段、具有G418、嘌呤霉素双重耐药性的TT2细胞株PG5、PG15、PG16的冻存株融化，注入到ICR或MCH（ICR）（日本CREA社）雄雌小鼠交配而得到的8细胞期胚胎中，每个胚胎注入10－12个细胞。用培养ES细胞的培养基（实施例9）培养1晚上形成胚泡后，移植到假孕处理2.5天后代孕母亲ICR小鼠（日本CREA社）的子宫中，每侧子宫大约移植10个注入胚。

结果如（表6）所示。

表6. 用同时保持人2号和14号染色体部分片段的ES细胞株制备嵌合体小鼠

ES细胞株/人染色体	双重耐药株的信号	注入了ES细胞的8细胞期胚胎数	子代小鼠的数目	嵌合体小鼠的数目	毛色的贡献率 ~10%	10-50%	50%~
TT2/#14+#2	PG5	160	26	8	7	1	-
	PG15	168	15	3	1	2	-
	PG16	223	32	12	3	6	3

共移植了551个注入胚，结果产生了73只子代小鼠。可根据毛色，由宿主胚（ICR）产生的白色中有TT2细胞来源的野鼠色（深棕）来判断嵌合体的左右。73只后代中毛色明显呈野鼠色的，也就是说能够识别由ES细胞贡献的个体有23只。

该结果表明，保持人2号和14号染色体部分片段的ES细胞株（PG5、PG15、PG16）具有形成嵌合体的能力，即保持有分化成小鼠正常组织的能力。

（实施例20）从同时保持人2号和14号染色体部分片段的ES细胞来源的嵌合体小鼠血清中检测人抗体。

将溶于PBS的人血清白蛋白（HSA，Sigma，A3782）与佐剂（MPL + TDM乳液，RIBI）混合，配成0.25mg/ml的HSA溶液，用它来免疫（实施例19）中制备的嵌合体小鼠KPG－15（9周龄，来源于PG5，嵌合率10％）、KPG－18（5周龄，来源于PG5，

嵌合率 10 %）2 只小鼠，每只 0.2ml．免疫前及免疫 8 天后，从嵌合体小鼠采血，用 ELISA 方法（参照实施例 14）检测血清中的人抗体μ链和人抗体κ链．将用 50mM 碳酸盐－碳酸氢盐缓冲液，pH9.6 稀释的抗人抗体κ链的羊抗体加到 96 孔微滴度板中，加入血清样品，然后加入生物素标记的抗人抗体κ链的羊抗体（VECTOR LABORATORIES，INC.，BA－3060），培养，再加入生物素化的辣根过氧化物酶和亲和素 DH 的复合体（VECTOR LABORATORIES，INC.，Vectastain ABC Kit PK 400），培养后加入底物 3,3′,5,5′四甲基联苯胺（TMBZ，住友 Bakelite ML－1120T），用 450nm 的吸光度检测酶活性。用纯化的含有κ链的、已知浓度的人 IgG（Sigma，I－3889）作标准，用补充有小鼠血清的 PBS 对标准物进行梯度稀释．μ链的检测是这样的，将用 50mM 碳酸盐－碳酸氢盐缓冲液，pH9.6 稀释的抗人抗体μ链的小鼠单克隆抗体（Sigma，I－6385）加到 96 孔微滴度板中，加入血清样品，然后加入过氧化酶标记的抗人μ链的小鼠抗体（The Binding Site Limited，MP008），培养后加入 TMBZ（住友 Bakelite，ML－1120T），用 450nm 的吸光度测定酶活性．纯化的含有μ链的浓度已知的人 IgM（CAPPEL，6001－1590）作标准，用补充了小鼠血清（Sigma，M5905）的 PBS 进行梯度稀释。结果在免疫前的 2 只小鼠中均检测出人抗体μ链和κ链，其在血清中的浓度随免疫后上升（表 7、表 8）．

表 7．嵌合体小鼠 KPG15 中人抗体的浓度（ELISA）

	IgM（mg/l）	Igκ（mg/l）
免疫前	0.19	1.6
免疫后第 8 天	0.75	1.7

表 8．嵌合体小鼠 KPG18 中人抗体的浓度（ELISA）

	IgM（mg/l）	Igκ（mg/l）
免疫前	0.29	0.57
免疫后第 8 天	3.4	0.87

该结果表明由保持人 2 号和 14 号染色体部分片段的 ES 细胞而来的嵌合体小鼠中，人抗体重链和轻链基因能发挥功能.

（实施例 21）在导入了人 14 号染色体片段的嵌合体小鼠血清中检测抗 HSA 的人抗体γ链

用（实施例 10）中的方法制备保持人 14 号染色体片段的嵌合体小鼠（K9、K11，均来自 TT2 细胞株 3 - 2，嵌合率分别为 50 %、30 %），在小鼠出生后第 79 天、93 天、107 天、133 天，用与（实施例 20）相同的方法，用 HSA 进行 4 次免疫（K9），或在出生后 74 天、88 天、111 天，对（K11）进行 3 次免疫。用 ELISA 方法（参照实施例 14）来检测嵌合体小鼠血清中含有抗人血清白蛋白的人γ链的抗体。将用 50mM 碳酸盐 - 碳酸盐缓冲液，pH9.6 稀释的 HSA（Sigma，A3782）加到 96 孔微滴度板中，加入样品，然后加入过氧化酶标记的抗人 IgG 小鼠抗体（Pharmagen，08007E），培养后，加入过氧化酶的底物液邻苯二胺（OPD，住友 Bakelite，ML - 11300），用 490nm 的吸光度测定酶活性。用 HSA 免疫的嵌合体小鼠血清中抗人 HSA 的人 IgG 的效价在免疫后增多。在对照 ICR 小鼠中，HSA 免疫后，抗 HSA 人 IgG 的效价处于背景水平。结果如（图 17）所示. 图 17 中，横轴为用 HSA 免疫嵌合体小鼠后的天数，纵轴为 490nm 处的吸光度.该结果表明，在保持人 14 号染色体部分片段的嵌合体小鼠中，HSA 抗原的刺激能引起对抗原特异性的人 IgG 抗体效价的增加.

（实施例 22）在导入了人 22 号染色体片段的嵌合体小鼠血清中检测人抗体λ链

从 9 个月龄的嵌合体小鼠（实施例 3，K22 - 7，嵌合率 10 %）采血，用 ELISA 方法检测血清中的人抗体λ链（参照实施例 14）。将用 50mM 碳酸盐 - 碳酸氢盐缓冲液，pH9.6 稀释的抗人抗体λ链的羊抗体（VECTOR LABORATORIES，INC.，A1 - 30 %）加到 96 孔微滴度板中，加入血清样品，然后加入生物素标记的抗人抗体λ链的羊抗体（VECTOR LABORATORIES，INC.，BA - 3070），培养，再加入生物素化的辣根过氧化物酶和亲和素 DH 的复合体（VECTOR LABORATORIES，INC.，Vectastain ABC Kit, PK4000），培养，之后加入过氧化物酶的底物 TMBZ（住友 Bakelite，ML - 1120T），用 450nm 的吸光度测定酶活性.用纯化的含有λ链的浓度已知的人 IgG

（Sigma，I－4014）作标准，用补充有小鼠血清的PBS进行梯度稀释。从嵌合体小鼠中可检测出相当于180ng/ml人IgG的人抗体λ链。该结果表明，保持人22号染色体的嵌合体小鼠中，人抗体λ链的基因能发挥功能。

（实施例23）在导入了人2号染色体片段的嵌合体小鼠血清中检测人抗体κ链

从5周龄的嵌合体小鼠（实施例13，K2－8，嵌合率为70％）和9周龄的嵌合体小鼠（实施例13，K2－3，K2－4，K2－12，嵌合率分别为50％、20％、80％）采血，用ELISA方法（参照实施例14）来检测血清中的人抗体κ链．将用50mM碳酸盐－碳酸氢盐缓冲液，pH9.6稀释的抗人抗体κ链的羊抗体（VECTOR LABORATORIES，INC.，AL－3060）加到96孔微滴度板中，加入血清样品，然后加入生物素标记的抗人抗体κ链的羊抗体（VECTOR LABORATORIES，INC.，BA－3060），培养，再加入生物素化辣根过氧化物酶和亲合物DH的亲合体（VECTOR LABORATORIES，INC.，Vectastain ABC Kit），培养后加入TMBZ（住友Bakelite，ML1120T），用在450nm的吸光度测定酶活性．用纯化的含有κ链的已知浓度的人IgG（Sigma，I－3889）作标准，用补充有小鼠血清的PBS进行梯度稀释，结果如（表9）所示。

表9．嵌合体小鼠中人抗体κ链的浓度（ELISA）

嵌合体小鼠	Igκ（mg/l）
K2－3	124
K2－4	85
L2－8	25
K2－12	56

用与（实施例20）相同的方法，在保持人2号染色体片段的嵌合体小鼠（实施例13、K2－3和K2－4）出生后的第66天、80天、102天，用HSA进行3次免疫。或者在嵌合体小鼠（K2－12）出生

后的第 13 天、 77 天、 91 天、 116 天，用 ELISA 方法（参照实施例 14 ）检测该嵌合体小鼠血清中抗 HSA 的人抗体κ链．将用 50mM 碳酸盐－碳酸氢盐缓冲液， pH9.6 稀释的 HSA （ Sigma， A3782 ）铺到 96 孔微滴度板中，加入样品，然后加入生物素标记的抗人抗体κ链的羊抗体（ VECTOR LABORATORIES， INC.， BA － 3060 ），培养，由加入生物素化的辣根过氧化物酶和亲和素 DH 的复合体（ VECTOR LABORATORIES， INC.， Vectastain ABC Kit ），培养后加入过氧化物酶的底物 OPD （住友 Bakelite， ML － 11300 ），用 490nm 的吸光度测定酶活性。在 HSA 免疫的嵌合体小鼠血清中，抗 HSA 人κ链的效价在免疫后上升。而在对照 ICR 小鼠中， HSA 免疫后抗 HSA 的人抗体κ链的效价处于背景水平．结果如（图 18 ）所示．图 18 中，横轴为嵌合体小鼠经 HSA 初次免疫后的天数，纵轴为 490nm 处的吸光度．该结果表明，在保持人 2 号染色体部分片段的嵌合体小鼠中，人抗体κ链基因能发挥功能，而且 HSA 抗原的刺激能引起抗原特异性人 Igκ 抗体效价的上升。

（实施例 24 ）由移入人 14 号染色体的嵌合体小鼠获得能产生人抗体重链（μ链或γ链）的杂交瘤。

在（实施例 21 ）中用 HSA 免疫的嵌合体小鼠 K9 出生后第 136 天，取出其脾脏，与骨髓瘤细胞融合，制备杂交瘤．参照（安东·千叶，单克隆抗体实验操作入门，讲谈社 Scientific， 1997 ）的方法，用 SP － 2 % － Ag14 （大日本制药， 05 － 554 ）作骨髓瘤细胞进行杂交瘤的制备．培养液中加入 10 % ORIGEN 杂交瘤克隆因子（ HCF， Bokusui. Brown ），铺到 8 块 96 孔板中， 3 天后向培养液中加入 1 mg/ml 的 G418．培养 1 ～ 3 周后，用 ELISA 方法对培养上清进行分析（参照实施例 14 ）．检测μ链时，将用 50mM 碳酸盐－碳酸氢盐缓冲液， pH9.6 稀释的抗人μ链小鼠单克隆抗体（ Sigma， I － 6385 ）加到 96 孔微滴度板中，加入用 PBS 稀释的样品，然后加入过氧化酶标记的抗人μ链小鼠抗体（ The Binding Site Limited、 MP 008 ），培养后加入底物 2,2′－连氮基－（ 3 －乙基－苯并噻唑啉－ 6 －磺酸）二铵盐（ ABTS， Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.， 04 － 10 － 17 ），可检测出 7 个阳性孔。检测γ链时，将抗人γ链的小鼠单克隆抗体（ Sigma， I － 6260 ）铺到 96 孔微滴度板中，加入 PBS 稀释的样品，然后加入过氧

化酶标记的抗人γ链小鼠抗体（ pharmingen， 08007E ），培养后，用 ABTS （ Kirkegaard & Perry Labonatories Inc.， 04 - 10 - 17 ）检测出 2 个人抗γ链阳性的孔。

（实施例 25 ）用导入了人 2 号染色体的嵌合体小鼠制备能产生人抗体轻链的杂交瘤

在(实施例 23)中用 HSA 免疫的嵌合体小鼠 K2 - 3 出生后第 105 天，取出其脾脏，与骨髓瘤细胞融合制备杂交瘤．参照（安东 · 千叶，单克隆抗体实验操作入门，讲谈社 Scientific， 1991)的方法，用 P3X63 Ag8.653（大日本制药， 05 - 565 ）作骨髓瘤细胞进行杂交瘤的制备．将培养液中添加 10 % HCF （ Bokusui Brown ）铺到 10 块 96 孔板中，3 天后向培养液中加入 G418， 1 mg/ml， 1 ~ 3 周后用 ELISA 方法分析出现克隆孔的培养上清． ELISA 方法与（实施例 23 ）的相同，得到 2 个人抗体κ链特性的克隆。

（实施例 26 ） G418 耐性标记的人 22 号染色体对嘌呤霉素耐性的再标记

用与（实施例 16 ）相同的方法，对保持 G418 耐性标记的人 22 号染色体的 A9 细胞（ A9/ #22 γ2； 实施例 1 中获得）进行人 22 号染色体的嘌呤霉素耐性的再标记。用 pPGKPuro 对γ2 细胞进行电穿孔而得到双重耐药性克隆，每 200 个克隆收集到一组，这样 3 组（ P1 、 P2 、P3 ）作供体细胞，野生型小鼠 A9 细胞为受体细胞，进行微细胞转移。结果从 P1 得到 6 个双重耐药性克隆，从 P2 得到 1 个，从 P3 得到 3 个。在所得双重耐药性克隆中，以 P3 来源的 6 - 1 作微细胞供给细胞，野生型 A9 细胞为受体细胞进行微细胞转移实验，由此可以证实人 22 号染色体还标记有嘌呤霉素耐性基因（实施例 18 ）．微细胞的获得和与 A9 细胞的融合，与（实施例 11 ）中的方法相同．结果在微细胞导入 11 日后出现 28 个 G418 耐性克隆．将这些克隆的培养基换成含嘌呤霉素 8μg/ml 的培养基后，再培养 3 天，有 21 个（ 75 % ）克隆生存．微细胞法中，对于 1 个供体细胞多数情况下只能移入 1 条或少数几个染色体，所以两个耐性基因能同时、高频率导入表明 6 - 1 保持的 G418 耐性标记的人 22 号染色体还标记有嘌呤霉素耐性基因。

（实施例 27 ）从产生人抗体重链的杂交瘤获得人抗体重链可变区的 cDNA 并测定其碱基序列

在（实施例 15）中所得能产生人抗体重链（IgM）的杂交瘤中，从 H4B7（HSA 特异的）和 H8F9（非特异的）用 ISOGEN（日本基因）提取总 RNA．用 Ready - To - Go T - primed Ist strand Kit（Pharmacia），使用 5μg 的每个总 RNA 来合成 cDNA．用下面所示的引物（参照 Larrick 等，生物/技术，7，934 -，1989；Word 等，国际免疫学，1，296 -，1989 制作）对所得 cDNA 进行 PCR，扩增人抗体重链可变区。

CM1(人 IgM 恒定区): 5′-TTGTATTTCCAGGAGAAAGTG(序列号 45)

CM2(人 IgM 恒定区): 5′-GGAGACGAGGGGGAAAAGGG(序列号 46)

HS1（人重链可变区域）：5′ - ATGGACTGGACCTGGAGG(AG)TC(CT)TCT(GT)C(序列号 47)(8 种的混合物)

HS2（人重链可变区域）：5′ - ATGGAG(CT)TTGGGCTGA(GC)CTGG(GC)TTT(CT)T(序列号 48)(16 种的混合物)

HS3（人重链可变区域）：5′ - ATG(AG)A(AC)(AC)(AT)ACT(GT)TG(GT)(AT)(GCT)C(AT)(CT)(GC)C T(CT)CTG(序列号 49)(6144 种的混合物)

*( )は表示其位置的碱基是( )内任一个形成的混合物。

H4B7、H8F9 的第一轮 PCR 均用 HS1 × CM1、HS2 × SM1、HS3 × CM1 3 种引物的组合物进行，（94 ℃ 1 分、50 ℃ 2 分、72 ℃ 3 分，40 个循环，Perkin - Elmer 公司，热循环仪 140），分别用 HS1 × CM2、HS2 × CM2、HS3 × CM2 的引物对其 PCR 产物进行再次扩增（温度条件同前，30 个循环）．扩增产物经 1.5 % 琼脂糖电泳后，根据溴化乙锭染色进行检测。结果用 HS3 × CM2 的引物时，从 H4B7 得到 490bp 的扩增产物．另外，对于 H8F9，用 HS3 × CM2 引物时，在相同位置得到一微量带，因此用该引物进行了再次扩增（温度条件同前，30 个循环）。结果在扩增产物中检测出非常强的信号．参照石田等（基因表达实验手册，讲谈社 Scientific，1995）的方法，将这些 PCR 产物在 pBlueScriptll SK +（Stratagere）载体的 Smal 部位进行克隆。在插入了扩增产物的质粒中选择质粒#2、#3、#4（H4B7）、#11、#13、#14（H8F9），用自动荧光测序仪（Applyed Bio System

社）检测扩增产物的碱基序列。将所得碱基序列和预计的氨基酸序列与已报道的人抗体 VH 区（ Marks 等，欧洲免疫学杂志， 21， 985 －，1991 ）、 JH 区（ Raretch 等， 细胞， 27， 583 －， 1981 ）的序列进行比较，结果表明 H4B7 、 H8F9 均含有 VH4 家族和 JH 的组合。该结果表明在保持人 14 号染色体部分片段的嵌合体小鼠中能产生有完整功能的人抗体重链蛋白质。

（ 实施例 28 ）从表达人抗体κ 链的嵌合体小鼠脾脏获取人抗体κ 链 cDNA 并测定其碱基序列

用与（ 实施例 5 ）相同的方法，从（ 实施例 13 ）中获得的。在（ 实施例 23 ）中证实能表达人抗体κ 链的嵌合体小鼠 K2 － 8 脾脏中合成 cDNA ， 应用下面的引物（ 参照 Larrick 等， 生物/技术， 7, 934 －，1989； Whitehurt 等，核酸研究， 20, 4929 －， 1992 制作）进行 PCR ，扩增人κ 链可变区。阴性对照可应用 K2 － 8 的肝脏 cDNA 及（ 实施例 10 ）的 TT2/#14 3 － 2 来源的嵌合体小鼠 K3 － 2 － 2 的脾脏 cDNA 。

KC2(人 Igκ 链恒定区): 5′-CAGAGGCAGTTCCAGATTTC(序列号 50)

KC3(人 Igκ 链恒定区): 5′-TGGGATAGAAGTTATTCAGC(序列号 51)

KVMIX(人 Igκ 链 可 变 区): 5′-ATGGACATG(AG)(AG)(AG)(AGT)(CT)CC(ACT)(ACG)G(CT)(GT)CA(CG)CTT(序列号 52)(3456 种的混合物)

*（ ）表示其结果的碱基是（ ）内任何一种组成的混合物。

PCR 的条件是，使用 KVMIX × KC2 、 KKVMIX × KC3 引物的组合物，以 94 ℃ 15 秒、 55 ℃ 15 秒、 72 ℃ 20 秒进行 40 个循环（ Perlin － Elmer ， 热循环仪 9600 ）。扩增产物经 1.5 % 琼脂糖电泳后，用溴化乙锭染色进行检测。结果检测到所期望的约 420bps （ KC2 ）、 450bps （ KC3 ）长度的扩增产物。而在 2 种阴性对照中未检测出特异的扩增产物。参照石田等（ 基因表达实验手册， 讲谈社 Scientific ， 1995 ）的方法将这些扩增产物克隆到 pBlue ScriptII SK + （ Stratagene ）载体的 SmaI 或 EcoRV 部位。 在插入了扩增产物的质粒中选择来源于 KVMIX × KC2 的 VK －#1 克隆， 用自动荧光测序仪（ Applyed Bio System ）测定扩增产物的碱基序列。由于在所得到的碱基序列中，从人 Ig κ 链的起始密码子到恒定区不含有终止密码子，所以认为克隆的扩增产物编码功能性人 Ig κ 链的可变区。另外， 已报道的人抗体 Vκ

区（ Klein 等，欧洲免疫学杂志， 23 ， 3248 －， 1993 ）、 Jκ 区（ Whitehurst 等，同前）的碱基序列相比较，结果表明γ － 1 克隆含有 Vκ3 家族、 Jκ 的组合。该结果表明在保持人 2 号染色体部分片段的嵌合体小鼠中，能产生完整功能的人抗体κ链蛋白质。

（实施例 29 ）在保持人 14 号染色体片段的嵌合体小鼠血清中检测人抗体γ链亚类和μ链，并进行定量

从（实施例 10 ）中出生后 11 周龄的嵌合体小鼠（ K15A 和 K16A；来源于 1 － 4，嵌合率为 70 、 50 % ）采血，参照（实施例 14 ），用 ELISA 方法检测血清中人抗体γ链亚类的浓度。

[人 IgG1 的测定]用 PBS 稀释抗人 IgG 抗体（ Sigma， I － 6260 ），铺到 96 孔微滴度板中。加入血清样品，然后加入过氧化酶标记的抗人 IgG1 抗体（ Phamnigen， 08027E ），培养后加入 7MBZ（住友 Bakelite，ML － 1120T ），用 450mm 的吸光度测定酶活性。用补充了小鼠血清的 PBS 梯度稀释纯化的浓度已知的标准人 IgG 1 （ Sigma， I － 3889 ）。

〔人 IgG 2 的测定〕用 PBS 稀释抗人 IgG 2 抗体（ Sigma， I － 9513 ），铺到 96 孔微滴度板中。加入血清样品，然后加入过氧化酶标记的抗人 IgG 抗体（ Sigma， A － 0170 ）培养后加入 TMBZ （同上），用 450nm 的吸光度测定酶活性。用纯化的，浓度已知的人 IgG 2 （ Sigma， I － 4139 ）作标准，用补充有小鼠血清的 PBS 进行梯度稀释。

〔人 IgG 3 的测定〕用 100mM 盐酸－甘氨酸缓冲液 pH 2.5 稀释抗人 IgG 3 抗体（ Sigma， I － 7260 ），室温放置 5 分钟后，用 100mM 磷酸盐缓冲液， pH 7.0 稀释到 10 倍。铺到 96 孔微滴度板中。加入血清样品，然后加入过氧化酶标记的抗人 IgG 抗体（ pharmingen， 08007E ），培养后加入 TMBZ （同前），用 450nm 的吸光度测定酶活性。用纯化的，浓度已知的人 IgG 3 作标准（ Sigma， I － 4389 ），用补充有小鼠血清的 PBS 进行梯度稀释。

〔人 IgG 4 测定〕用 100mM 甘氨酸盐酸缓冲液 pH 2.5,稀释抗人 IgG 4 抗体（ Sigma， I － 7635 ），室温放置 5 分钟后，用 100mM 磷酸盐缓冲液， pH 7.0 稀释到 10 倍。铺到 96 孔微滴度板中。加入血清样品，然后加入过氧化物酶标记的抗人 IgG 抗体（ pharmingen， 08007E ），培养后加入 TMBZ （同前），用 450nm 的吸光度测定酶活性。用纯化的，已知浓度的人 IgG 4 （ Sigma， I － 4639 ）作标准，用补充有小鼠血清的

PBS 进行梯度稀释。

〔人 IgM 的测定〕测定μ链时，将 PBS 稀释的抗人μ链小鼠单克隆抗体（ Sigma， I－6385 ）铺到 96 孔微滴度板中．加入血清样品，然后加入过氧化酶标记的抗人μ链小鼠抗体（ The Binding Site limited, MP 008 ），培养后，加入过氧化酶的底物 TMBZ（同前），用 450nm 的吸光度测定酶活性．以纯化的，含有μ链的浓度已知的人 IgM（ CAPPEL，6001－1590 ）作标准，用补充有小鼠血清（ Sigma， M 5905 ）的 PBS 进行梯度稀释。

结果如表 10 所示，在嵌合体小鼠 K15A 和 K16A 中，检测出 IgG 1、IgG 2、IgG 3、IgG 4 的全部亚类和 IgM。

表 10 嵌合体小鼠中人抗体 IgG 亚类和 IgM 的浓度

嵌合体小鼠	IgG 1	IgG 2	IgG 3	IgG 4	IgM(mg/ℓ)
K15A	2.25	1.96	0.17	0.43	7.09
K16A	0.30	0.69	0.10	0.07	0.87

（实施例 30） 保持人 22 号染色体的小鼠 ES 细胞株（ TT2 ）的制备

为了制备保持人 22 号染色体的小鼠 ES 细胞（ TT2 ），用（实施例 26 ）中制备的 6－1（ A9/#22， G418，嘌呤霉素耐性）细胞株作染色体供体细胞。用野生型 TT_2 细胞株（实施例 9 ）作染色体受体细胞。微细胞融合试验和嘌呤霉素耐药株的选择，除嘌呤霉素的浓度为 0.75mg/ml 外，其它的与（实施例 9 ）中 G418 耐药株的选择一样。结果嘌呤霉素耐药株的出现频率为 10^7 个 TT2 细胞出现 1～2 个。嘌呤霉素耐药株的冻存、基因组 DNA 的制备与（实施例 2 ）相同。根据下面（ 1 ）、（ 2 ）的方法来证实嘌呤霉素耐药株 PG 22－1 中保持有人 22 号染色体。

（ 1 ） PCR 分析

以嘌呤霉素耐药株基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。存在于人 22 号染色体的基因（基因图谱，同前），证实在（实施例 2； A9/#22 ）中存在的有 10 种引物；用这些引物进行 PCR 扩增，结果检测出（实施例 2；A9/#22 ）上存在的全部标记。

（ 2 ） Southern 印迹分析

参照（实施例 2 ）的方法，用人 L1 序列作探针，对来源于阴性对照野生型 TT2、染色体供体细胞 6－1、嘌呤霉素耐性 TT2 细胞株 PG 22

- 1 的基因组 DNA 进行 Southern 印迹分析。结果如（图 19）所示。图中左侧为 DNA 分子量。由于 PG 22 - 1 中的带型与 6 - 1 的一致，且信号强度也相同，所以可以表明 6 - 1 细胞株中的 22 号染色体确实导入到 PG 22 - 1 中。

以上实验证明嘌呤霉素耐性 TT2 细胞株 PG 22 - 1 保持全部或部分人 22 号染色体。

（实施例 31）用保持人 22 号染色体的小鼠 ES 细胞株（TT2）制备嵌合体小鼠

将（实施例 30）中制备的，经证实保持有人 22 号染色体的嘌呤霉素耐药性 TT2 细胞株 PG 22 - 1 的冻存株融化，注入 ICR 或 MCH（ICR）（日本 CREA）雄雌小鼠交配而得到的 8 细胞期胚胎中，每个胚胎注入 10 ~ 12 个细胞。用（实施例 9）中培养 ES 细胞用的培养基培养一晚上，形成胚泡后。移植到伪孕处理后 2.5 天的代孕母亲 ICR 小鼠（日本 CREA）的子宫中，每侧子宫约移植 10 个注入胚。

结果如（表 11）所示。共移植了 266 个注入胚，结果产生了 36 只子代小鼠。嵌合体的判断可依据毛色，在来源于宿主胚（ICR）的白色中能见到来源于 TT2 细胞的野鼠色（深棕）。在所生的 36 只子代小鼠中，毛色呈明显野鼠色的部分，即能够识别出由 ES 细胞贡献的有 8 只。

该结果表明保持人 22 号染色体的 ES 细胞株（来源于 TT2，PG 22 - 1）有形成嵌合体的能力，也就是说具有分化成小鼠正常组织的能力。

表 11 用保持人 22 号染色体的 TT2 细胞株制备嵌合体小鼠

ES 细胞株/人染色体	嘌呤霉素耐药株的序号	注入了 ES 细胞的 8 细胞胚胎数	子代小鼠的数目	嵌合体小鼠的数目	对毛色的贡献率 ~20%	20-50%	50-80%
TT2/#22	PG 22-1	266	36	8	4	1	3

（实施例 32）在保持人 22 号染色体的嵌合体小鼠的血清中检测人抗体λ链并进行定量

参照（实施例 14），用 ELISA 方法对（实施例 31）的嵌合体小鼠 KPG 22 - 1 ~ 3 血清中人抗体浓度进行定量。从出生后 2 个月的嵌合体小鼠采血，用 ELISA 方法检测血清中的人抗体λ链。将 PBS 稀释的抗人免疫球蛋白λ链抗体（VECTOR LABORATORIES，INC，BA - 3070）铺到 96 孔微滴度板中，加入血清样品，然后加入生物素标记的抗

人免疫球蛋白λ链抗体（VECTOR LABORATORIES，INC.，BA－3070），培养，再加入生物素化的辣根过氧化酶和亲合素DH的复合物（VECTOR LABORATORIES，INC.，Vectastain ABC kit），培养后加入TMBZ（同前），用450nm的吸光度测定酶活性。用纯化的含λ链浓度已知的人IgM（大日本制药，U13200）作标准，用补充有小鼠血清的PBS进行梯度稀释。结果如表12所示。该结果表明人抗体λ链基因保持人22号染色体的嵌合体小鼠中能起作用。

表 12 嵌合体小鼠中人抗体λ链的浓度

嵌合体小鼠	嵌合率	Igλ(mg/ℓ)
KPG 22－1	50	12
KPG 22－2	50	18
KPG 22－3	20	24

（实施例33）导入了人22号染色体的嵌合体小鼠血清中抗人HSA人抗体λ链的检测

与（实施例20）的方法相同，在嵌合体小鼠（实施例31，KPG 22－3）出生后的第79天、94天、110天，用HSA免疫3次。参照（实施例14），用ELISA方法检测血清中人抗体λ链。将50mM碳酸盐－碳酸氢盐缓冲液，pH 9.6稀释成5μg/ml的HSA（Sigma，A 3782）铺到96孔微滴度板中，加入血清样品，然后加入生物素标记的抗人免疫球蛋白λ链抗体（VECTOR LABORATORIES，Inc.，BA－3070），培养，再加入生物素化的辣根过氧化酶和亲合素DH的复合物（VECTOR LABORATORIES INC.，Vectastain ABC kit），培养后，加入TMBZ（同前），用450nm的吸光度测定酶活性。用HSA免疫的嵌合体小鼠血清中抗HSA人λ链的效价在免疫后升高。而在对照的ICR小鼠中，HSA免疫后的抗HSA人抗体λ链的效价处于背景水平。结果如（图20）所示。图20中，横轴为嵌合体小鼠初次HSA免疫后的天数，纵轴为450nm处的吸光度。该结果表明保持人22号染色体的嵌合体小鼠中人抗体λ链基因起到作用，而且HSA抗原的刺激能引起抗原特异性人Igλ的效价上升。

（实施例34）用导入了人22号染色体的嵌合体小鼠制备产生人抗体轻链的杂交瘤

与（实施例25）的方法相同，在（实施例33）中用人白蛋白免疫

的嵌合体小鼠 KPG 22 - 3 出生后第 113 天取出其脾脏，与骨髓瘤细胞融合，制备杂交瘤。参照（安东·千叶，单克隆抗体实验操作入门，讲谈社 Scientific， 1991）的方法，用 SP - 2/0 - Ag 14（大日本制药， 05 - 554）作骨髓瘤细胞进行杂交瘤的制备。在培养液中添加 10 % 的 HCF（Air Brown），加到 5 块 96 孔板中，培养 1 ~ 3 周，用 ELISA 方法分析出现克隆孔的培养上清。ELISA 方法同（实施例 33）相同，得到 4 个人抗体λ链的阳性克隆。

（实施例 35）制备同时保持人 22 号和 14 号染色体部分片段的小鼠 ES 细胞株

为了制备同时保持人 22 号和 14 号染色体部分片段的小鼠 ES 细胞，用在（实施例 26）中制备的 6 - 1（A9/#22， G418， 嘌呤霉素耐性）细胞株作染色体供体细胞。用已经保持人 14 号染色体部分片段的 G418 耐性 TT2 耐性株 1 - 4（实施例 9）作染色体受体细胞。微细胞融合实验和嘌呤霉素耐药株的选择除嘌呤霉素的浓度为 0.75μg/ml 外，其它与（实施例 9）中 G418 耐药株的选择相同。结果嘌呤霉素耐药株的出现频率为每 10^7 个 1 - 4 细胞出现 1 ~ 2 个。这些嘌呤霉素耐药株在 G418 以 300μg/ml 存在的情况下仍能增殖，这表明它们同时具有 G418 耐性。双重耐药株的冻存、基因组 DNA 的制备与（实施例 2）相同。根据下面的 PCR 分析来证实双重耐药株 PG 22 - 5 保持人 22 号和 14 号染色体部分片段。用双重耐药株的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。22 号、14 号染色体上存在的基因（基因图谱，同前）中，选择（实施例 2； A9/#22）中证实的存在于 22 号染色体的引物和（实施例 9； TT2/# 14 1 - 4）中证实的存在于 14 号染色体上的引物进行扩增，结果检测出 22 号染色体上 10 种标记中的 3 种（D22S275， D22S315， Igλ），在 TT2/#14 1 - 4 中检测出全部存在于 14 号染色体上的标记。上面的实验表明所得到的双重耐药性 TT2 细胞株同时保持人 22 号和 14 号染色体的部分片段。

（实施例 36）用同时保持人 22 号和 14 号染色体部分片段的小鼠 ES 细胞株制备嵌合体小鼠

将（实施例 35）中制备的，证实保持人 22 号和 14 号染色体部分片段的 G418、嘌呤霉素双重耐药性 TT2 细胞株 PG 22 - 5 的冻存株融化，注入到 ICR 或 MCH（ICR）（日本 CREA）雄雌小鼠交配而得到的 8 细胞期胚胎中，每个胚胎注入 10 ~ 12 个。用（实施例 9）中 ES 细胞用

的培养基培养 1 晚，形成胚泡后，移植到经伪孕处理 2.5 天后的代孕母亲 ICR 小鼠（日本 CREA）的子宫中，每侧子宫注入约 10 个的注入胚。

结果如（表 13）所示。其移植了 302 个注入胚，结果产生了 16 只子代小鼠。可根据毛色来判断嵌合体，来源于宿主胚（ICR）的白色中有可识别的来源于 TT2 细胞的野鼠色（深棕）。所生 16 只子鼠中有 5 只毛色呈明显的野鼠色，即有 5 只是 ES 细胞贡献的个体。

该结果表明，保持人 22 号和 14 号染色体部分片段的 ES 细胞株（PG 22 - 5）具有形成嵌合体的能力，即具有分化成小鼠正常组织的能力。

表 13 用保持人 22 号和 14 号染色体的 TT2 细胞株制备嵌合体小鼠

ES 细胞株/人染色体	双重耐药株的序号	注入了 ES 细胞的 8 细胞胚胎数	子代小鼠的数目	嵌合体小鼠的数目	对毛色的贡献率 ~20%	20-50%	50-80%
TT2/#22+#14	PG22-5	302	16	5	3	2	0

（实施例 37）由同时保持人 22 号和 14 号染色体部分片段的 ES 细胞而来的嵌合体小鼠血清中人抗体λ链和人抗体μ链的检测和定量

用 HSA 免疫（实施例 36）中的嵌合体小鼠（KPG 22 - 9、10 和 12）。KPG 22 - 9 和 KPG 22 - 10 在出生后 10 周龄时进行免疫，免疫 2 周后采血。KPG 22 - 12 在出生后 7 周龄和 9 周龄进行 2 次免疫，第 2 次免疫 2 周后采血。

参照（实施例 14）用 ELISA 方法检测血清中含有人抗体μ链的抗体和含人抗体λ链的抗体以及含有人λ链及人μ链的抗体。

检测完整抗体时，将用 PBS 稀释的抗人免疫球蛋白λ链抗体（Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., 01 - 10 - 11）铺到 96 孔微滴度板中，加入血清样品，然后加入过氧化酶标记的抗人免疫球蛋白μ链抗体（The Binding Site limited MP 008），培养后，加入过氧化物酶的底物 TMBZ（同前），用 450mm 的吸光度测定酶活性，以纯化的，含有λ链浓度已知的人 IgM（大日本制药，U13200）作标准，用补充有小鼠血清的 PBS 进行梯度稀释，与此相比较求出血清中人抗体的浓度。用 ELISA，按照与（实施例 29）和（实施例 32）相同的方法对人抗体μ链和人抗体λ链进行检测和定量。结果如表 14 所示。在嵌合体小鼠中检测出λ链和μ链。也检测出含人抗体μ链并含λ链的抗体。该结果表明，在由保持人 22 号和 14 号染色体部分片段的 ES 细胞而来的嵌合体

小鼠中，人抗体λ链基因和人抗体μ链基因同时起作用，并且在一部分B细胞中能产生重链和轻链均为人源性的完整抗体。

而在对照中，在只保持人14号染色体（实施例10）的嵌合体小鼠（K9），只保持人22号染色体（实施例31）的嵌合体小鼠（KPG 22－2）的血清中，含人抗体μ链或λ链的抗体浓度处于背景水平，这表明，在该检测系统中只检测出保持人λ链及μ链的完整抗体。

表 14 嵌合体小鼠中人抗体的浓度

ES克隆	嵌合体小鼠	嵌合率%	IgM(mg/ℓ)	Igλ(mg/ℓ)	IgM, λ(mg/ℓ)
PG 22-5	KPG 22-9	30	2.54	9.9	0.043
PG 22-5	KPG 22-10	5	4.96	21.5	0.333
PG 22-5	KPG 22-12	40	3.71	7.0	0.048
3-2	K9	50	6.66	-	<0.003
PG 22-1	KPG 22-2	50	-	17.6	<0.003

（实施例38）在由同时保持人2号和14号染色体部分片段的ES细胞而来的嵌合体小鼠血清中检测人抗体（含有人κ链和μ链的抗体）

将溶于PBS的人血清白蛋白（HSA，Sigma，A3782）和佐剂（MPL + TDM乳液，RIBI免疫化学研究公司）混合，配制成0.75mg/ml的HSA溶液，用该溶液免疫（实施例19）中制备的嵌合体小鼠KPG－15（来源于TT2ES PG5，嵌合率10％），从出生后第2－3个月龄开始免疫，每次0.2ml，免疫3回，然后采血。另外从出生后6周龄的（实施例19）中的嵌合体小鼠KPG－26（来源于TT2ES PG6，嵌合率40％）采血。参照（实施例14）用ELISA方法检测血清中完整人抗体的浓度。将在PBS中稀释的抗人免疫球蛋白κ链抗体（Kirkegaard & Perry Laboratories Inc. 01－10－10）铺到96孔微量滴度板中，加入用补充了小鼠血清（Sigma，M 5905）的PBS稀释的血清样品，然后加入过氧化物酶标记的抗人免疫球蛋白μ链抗体（The Binding Site limited, MP 008），培养后加入过氧化物酶底物TMBZ（住友Bakelite, ML－11207），用450mm处的吸光度测定酶活性，用纯化的，含有κ链，浓度已知的人IgM（CAPPEL，6001－1590）作标准，用补充有小鼠血清的PBS进行梯度稀释。用与（实施例20）相同的方法求出κ链，μ链

的浓度。结果如表 15 所示。检测出既含人抗体μ链又含有κ链的抗体。而在对照中，即在只保持人 14 号染色体（实施例 10 ）的嵌合体小鼠（ K9 ），只保持人 2 号染色体（实施例 13 ）的嵌合体小鼠（ K2 - 9 ）的血清中既含有人抗体κ链又含有μ链的抗体浓度在 0.002mg/ml 以下，处于背景水平。该结果表明，在由同时保持人 2 号和 14 号染色体部分片段的 ES 细胞而来的嵌合体小鼠中，人抗体κ链基因和人抗体μ链基因能同时发挥功能，在一部分 B 细胞中能产生重链和轻链均为人源性的完整抗体。

表 15 嵌合体小鼠中人抗体的浓度

ES 克隆	嵌合体小鼠	嵌合率%	IgM(mg/ℓ)	Igκ(mg/ℓ)	IgM, κ(mg/ℓ)
PG - 5	KPG 15	10	0.18	1.01	0.075
PG - 6	KPG 26	40	1.52	1.26	0.018
3 - 2	K9	50	6.66	-	0.002 以下
5 - 1	K2 - 9	40	-	135	0.002 以下

（实施例 39 ）保持人 2 号染色体部分片段的小鼠 ES 细胞株（ TT2F，X0 ）的制备

为了制备保持人 2 号染色体部分片段的小鼠 ES 细胞，用（实施例 16 ）中制备的 PG1 细胞株作染色体供给细胞。用 TT2F 细胞（购自 Lifetech Oriental 公司）作染色体受体细胞，据报道该细胞株具有（ 39， X0 ）的染色体组型，在嵌合体小鼠中能有效地分化成卵母细胞（相尺慎一，生物手册， 8，基因打靶，羊土社， 1995 ）。微细胞融合及嘌呤霉素耐药株的选择除嘌呤霉素的浓度为 0.75μg/ml 外，其余用（实施例 9 ）中 G418 耐药株的选择相同。结果嘌呤霉素耐药株的出现频率为每 10^7 个 TT2F 细胞出现 5 个。这些嘌呤霉素耐药株的冻存，基因组 DNA 的制备与（实施例 2 ）相同。根据下面的 PCR 分析来证实耐药株 P - 20、 P - 21 中保持有人 2 号染色体。以耐药株基因组 DNA 为模板，用存在于人 2 号染色体上的基因（基因图谱，同前）中，在（实施例 1； A9/#2 W23 ）中证实存在的引物 Cκ、 FABP1、 Vκ1 - 2 的 3 种进行 PCR 扩增，结果在 2 克隆株中，所有的三种引物均产生所期待的扩增产物。

以上实验表明，所得嘌呤霉素耐药株 ES 细胞株（ TT2F， XO ）保持有人 2 号染色体部分片段。

（实施例 40 ）用保持人 2 号染色体部分片段的小鼠 ES 细胞株（ TT2F，XO ）制备嵌合体小鼠

将（实施例 39 ）中制备的，证实含有人 2 号染色体部分片段的嘌呤霉素耐药性 TT2 细胞株 P - 21 的冻存株融化，注入到 ICR 或 MCH（ ICR ）（日本 CREA ）雄雌小鼠交配而得到的 8 细胞期胚胎中，每个胚胎注入 10 ~ 12 个细胞。用（实施例 9 ）中 ES 细胞用培养基培养 1 晚上，形成胚泡后，移植到经伪孕处理 2.5 天后的代孕母亲 ICR 小鼠（日本 CREA ）的子宫中，每侧子宫注入大约 10 个注入胚。

其移植了 141 个注入胚，结果产生 20 只小鼠。可根据毛色来判断嵌合体，在来源于宿主胚（ ICR ）的白色中有可识别的来源于 TT2 细胞的野鼠色（深棕）。结果如（表 16 ）所示。在所生的 20 只小鼠中毛色中有明显野鼠色部分，也就是说可以识别由 ES 细胞所贡献的个体有 9 只。其中有 4 只毛色完全呈野鼠色（ ES 细胞来源）。

该结果表明，保持人 2 号染色体部分片段的 ES 细胞株（ P - 21 ）具有形成嵌合体的能力，即具有分化成小鼠正常组织的能力。

表 16 用保持人 2 号染色体部分片段的 TT2 细胞株制备嵌合体小鼠

ES 细胞株/人染色体	嘌呤霉素耐药株的序号	注入了 ES 细胞的 8 细胞胚胎数	子代小鼠的数目	嵌合体小鼠的数目	对毛色的贡献率 ~20%	20-50%	50-90%	100%
TT2/#2fg。	P - 21	141	20	9	0	2	3	4

（实施例 41 ）由保持人 2 号染色体部分片段的 TT2F 而来的嵌合体小鼠血清中人抗体κ链的检测及定量

从（实施例 40 ）中出生后约 1 个月的嵌合体小鼠（来源于 P - 21 嵌合率为 100 %， K2 - 1F ~ 4F)采血，用与(实施例 20)相同的 ELISA 方法对人抗体κ链的浓度进行定量。

结果如表 17 所示。结果表明当用 TT2F ES 细胞株时，人抗体κ链基因在嵌合体小鼠中能发挥作用。

表 17 嵌合体小鼠中人抗体κ链的浓度

嵌合体小鼠	嵌合率	Igκ(mg/ℓ)
K2 - 1F	100	66
K2 - 2F	100	156
K2 - 3F	100	99

K2 - 4F	100	20

（实施例 42）在由保持人 2 号染色体部分片段的小鼠 ES 细胞（TT2F，X0）而来的嵌合体小鼠的后代中检测人染色体的保持

将（实施例 40）中所得的雌性嵌合体小鼠中的 K2 - 1F、K2 - 4F（二者毛色的嵌合率为 100 %）与雄性 ICR 小鼠进行交配，检测能否得到来源于 ES 细胞的后代，交配过程中用 ICR 雄性小鼠（白化，隐性）的精子使嵌合体小鼠的卵子受精，若卵子来源于 TT2F 细胞（野鼠色，显性）则产生野鼠色小鼠，若卵子来源于 ICR 则产生白化小鼠。分别经 1 次交配所得到的可生存子代小鼠（K2 - 1F：10 只，K2 - 4F：5 只）全部表现来源于 ES 细胞的野鼠色。从这些子代小鼠的尾部制备基因组 DNA，通过 PCR 来检测人染色体片段的保持。用 P - 21（实施例 39）中证实存在的 3 种引物进行 PCR 扩增，结果证实 10 只中有 4 只（K2 - 1F）、5 只中有 2 只（K2 - 4F）存在 P - 21 中检测出的 3 种引物。15 只子鼠的 PCR 结果如（图 21）所示。图中右侧为标记物（φX174，HaeIII 片段，日本 Gene）和主要带的分子量，左侧用箭头表示的是各个引物预期的扩增产物的长度。右侧也表示用阳性对照亲代嵌合体 K2 - 1F、K2 - 4F 尾部 DNA 的结果。这些结果表示保持人 2 号染色体部分片段的 TT2F 细胞株 P - 21 在嵌合体小鼠中能分化成功能性卵子，并且将人 2 号染色体部分片段传递给由其卵子而来的后代。

（实施例 43）在由保持人 2 号染色体部分片段的小鼠 ES 细胞株（TT2，XY）而来的嵌合体小鼠后代中检测人染色体的保持

将（实施例 13）中得到的嵌合体小鼠中的 K2 - 18（雄性，嵌合率 70 %）、K2 - 19L（雌性，嵌合率 60 %）及同胞的非嵌合体雌鼠进行混合交配，检测能否产生来源于 ES 细胞的后代。因为 TT2 细胞具有（40，XY）的染色体组型，所以在雄性嵌合体 K2 - 18 中有分化成功能性精子的可能。这种情况下嵌合体小鼠中来源于 TT2 细胞（野鼠色，显性）的精子使 ICR（白色：隐性）来源的卵子受精可产生野鼠色子鼠。交配而产生的可生存的子代小鼠共 110 只，其中有 10 只显示来源于 ES 细胞的野鼠色。从这 10 只野鼠色子鼠中选 7 只，用其尾部制备基因组 DNA，用 PCR 检测人染色体片段的保持。用证实在 5 - 1 株（TT2/#2fg.，实施例 12）中存在的 2 种引物（Cκ，FABP1）和在（实施例 1）中显

示的 Vκ 1 - 2 引物进行 PCR 扩增，结果证实 7 只中有 2 只全存在这 3 种标记。该结果显示，保持人 2 号染色体部分片段的 TT2 细胞株 5 - 1 在嵌合体小鼠中能分化成功能性的精子，并且可将人 2 号染色体部分片段传递给由其精子而来的后代。

（实施例 44）嵌合体小鼠后代的血清中人抗体κ链的检测和定量

用 ELISA 方法对（实施例 42）的嵌合体小鼠后代 K2 - 1F - 1 ~ 10F 及 K2 - 4F - 1 ~ 5 血清中人抗体κ链浓度进行定量。从出生后约 4 ~ 6 周龄的小鼠采血，用与（实施例 20）相同的 ELISA 方法对血清中人抗体κ链进行检测。结果与（实施例 42）中所得保持染色体的结果一起用（表 18）表示。该结果证实嵌合体小鼠所生后代中的人抗体κ链基因也能发挥作用。

表 18 嵌合体小鼠后代中人抗体κ链的浓度

亲代嵌合体小鼠	小鼠号	人 2 号染色体片段	Igκ(mg/ℓ)
K2 - 1F	#1	-	0.58
K2 - 1F	#2	+	84.1
K2 - 1F	#3	+	12.8
K2 - 1F	#4	+	15.1
K2 - 1F	#5	-	0.52
K2 - 1F	#6	-	0.58
K2 - 1F	#7	-	1.30
K2 - 1F	#8	-	0.90
K2 - 1F	#9	-	0.56
K2 - 1F	#10	+	28.8
K2 - 4F	#1	-	0.04 以下
K2 - 4F	#2	+	23.3
K2 - 4F	#3	+	11.8
K2 - 4F	#4	-	0.08
K2 - 4F	#5	-	0.06

（实施例 45）对导入了人 14 号染色体部分片段的嵌合体小鼠脾细胞的分析

参照下列文献所描述的方法用流式细胞术进行分析。日本生化学会

编，新生化学实验讲座12，分子免疫学Ⅰ－免疫细胞。细胞因子， 1989，东京化学同仁；东京大学医科学研究所，制癌研究部编，细胞工程分册第8卷，新细胞工学实验方案， 1991，秀润社； A. Doyle and J. B. Griffiths,“细胞和组织培养：实验室方法” John Wiley & Sons Ltd. 出版， 1996。从（实施例19）出生后约6个月龄的嵌合体小鼠（KPG06；来源于PG 16，嵌合率为30％）取脾，经氯化铵水溶液处理后，用含1％大鼠血清的PBS中异硫氰酸荧光素（FITC）标记的抗小鼠CD 45R（B220）抗体（Pharmingen， 01124A）进行染色。洗涤后，与含5％小鼠血清的PBS中生物素标记的抗人IgM抗体（Pharmigen， 08072D）或作为对照的生物素标记的抗人λ链抗体（Pharmingen， 08152D）进行反应，之后用链霉亲和素藻红蛋白（Pharmigen， 13025D）染色，用流式细胞仪（BD， FACSort）进行分析。结果如图22所示。图中横轴为人IgM，纵轴为CD45R（B220）。B细胞标记－CD45R阳性（FITC）且人IgM阳性（PE）的细胞群增加了4％，这证实在嵌合体小鼠中存在细胞表面表达了人抗体μ链的细胞。

（实施例46）用分别表达人抗体重链、κ链、λ链的嵌合体小鼠脾脏cDNA克隆人抗体基因的可变区并测定碱基序列

从在（实施例29）、（实施例23）、（实施例32）中证实分别表达人抗体重链、κ链、λ链的嵌合体小鼠K15A（来源于1－4株，按实施例10的方法制作）、K2－8（实施例13中制作）、KPG22－2（实施例31中制作）的脾脏提取RNA，用与（实施例5）相同的方法合成cDNA，用下面的引物进行PCR，分别扩增人抗体基因的可变区。从非嵌合体小鼠ICR取脾制备cDNA，用它作阴性对照。无参考文献的引物的制作是以GenBank等数据库中碱基序列为基础的。

· K15A（重链）

恒定区用：HIGMEX1－2：5′－CCAAGCTTCAGGAGAAAGTGATGGAGTC（序列号53）

HIGMEX 1－1：5′－CCAAGCTTAGGCAGCCAACGGCCACGCT（VH3BACK的第2轮PCR使用）（序列号54）

可变区用：VH1/5BACK（59℃，35个循环，Marks等，欧洲免疫学杂志，21，985－，1991），VH4BACK（59℃，35个循环，Marks等，同前），VH3BACK（第1次PCR：59℃，35个循环，第2次PCR：

59 ℃， 35 个循环， Marks 等， 同前）。

· K2 - 8（轻链κ）

恒定区用： KC2H：5′- CCAAGCTTCAGAGGCAGTTCCAGATTTC（序列号 55）

可变区用： Vκ1/4BACK（ 55 ℃， 40 个循环， Marks 等，欧洲免疫学杂志， 21， 985 -， 1991）， Vκ2BACK（ 55 ℃， 40 个循环， Marks 等， 同前）， Vκ3BACK（ 55 ℃， 40 个循环， Marks 等， 同前）。

· KPG22 - 2（轻链λ）

恒定区用： CλMIX（以下 3 种引物等摩尔比混合）

IGL1 - CR ：5′- GGGAATTCGGGTAGAAGTCACTGATCAG（序列号 56）

IGL2 - CR ：5′- GGGAATTCGGGTAGAAGTCACTTATGAG（序列号 57）

IGL7 - CR ：5′- GGGAATTCGGGTAGAAGTCACTTACGAG（序列号 58）

可变区用： Vλ1LEA1（ 55 ℃， 40 个循环， Williams 等，欧洲免疫学杂志， 23， 1456 -， 1993）， Vλ2MIX（ 55 ℃， 40 个循环，如前面 Williams 等的报道中，将 Vλ2LEA1 、 Vλ2JLEAD 等摩尔比混合。 Vλ3MIX（ 55 ℃， 40 个循环，如前面 Williams 等的报道，将 Vλ3LEA1 、 Vλ3JLEAD 、 Vλ3BACK4 等摩尔比混合）。

PCR 是这样进行的：各个恒定区域与可变区域（重链 3 种、κ 链 3 种、λ 链 3 种）引物的组合在 94 ℃， 15 秒，各个可变区引物的退火温度 15 秒， 72 ℃， 20 秒用各个可变区引物的循环数（使用 Perkin - Elmer，热循环仪 9600）。 VH3BACK 的第 2 轮 PCR 是将第 1 轮 PCR 的扩增产物与（ HIGMEX1 - 1 × VH3BACK ）的引物组合进行再度扩增。全部的扩增产物经 1.5 % 琼脂糖电泳后，用溴化乙锭染色进行检测。结果在所有的组合中检测出所期待的长度（重链，约 470bp，轻链κ： 400bp，轻链λ： 约 510bp ）的扩增产物。除在阴性对照中，在全部相同位置粉末检测出特异的扩增产物。用 Prep.A.gene（ Bio - Rad ）将所有的扩增产物从琼脂糖凝胶提取出，然后用限制性酶处理（重链： HindIII - Pst I，重链κ： Hind III - Pvull，轻链λ： Hind III - EcoR I），克隆到 pUC119（泵酒透）载体的 Hind III， Pst I 部位（重链）， Hind III， HincII 部位

（κ链）， Hind III， EcoRI 部位（λ链）。用下面的引物（右侧表示克隆数）进行扩增所得到的扩增产物克隆到质粒中，用自动荧光测序仪（ Applyed Bio System ）测定扩增产物的碱基序列。

- HIGMEX1-2×VH1/5BACK：10 克隆
- HIGMEX1-2×VH4BACK：8 克隆
- HIGMEX1-2(2nd PCR, HIGMEX1-1)×VH3BACK：5 克隆
- KC2H×Vκ1/4BACK：6 克隆
- KC2H×Vκ2BACK：7 克隆
- KC2H×Vκ3BACK ：4 克隆
- CλMIX×Vλ1LEA1：5 克隆
- CλMIX×Vλ2MIX：6 克隆
- CλMIX×Vλ3MIX：5 克隆

用 DNASIS （日立软件工程公司）分析所得碱基序列，结果表明所有的序列来自人，它们是从起始密码子到恒定区域间不包含终止密码子的功能序列，所有的κ链、λ链、23 种重链中的 21 种中均如此。在所确定的序列中去除同一序列后，可确定各不相同的可变区序列：重链为 17 种，κ链 11 种，λ链 12 种。

（实施例 47 ）从分别表达人抗体重链，κ链、λ链的嵌合体小鼠脾脏制备 cDNA，用它分析人抗体基因可变区的碱基序列

在以下几个方面分析（实施例 46 ）中所确定的碱基序列（重链 17 克隆、κ链 11 克隆、λ链 12 克隆）。

1. 鉴定各可变区序列中使用的已知胚系 V 基因区段
2. 鉴定各可变区序列中使用的已知胚系 J 基因区段
3. 鉴定重链可变区中使用的已知胚系 D 区段
4. 在 1、2、3 结果的基础上鉴定重链可变区中 N 领域的付加
5. 确定从各可变区序列推断出的氨基酸序列

结果如(表 19)所示。 1、 2 的鉴定是通过用 DNASIS 检索 Genbank 中登记的同源胚系 V 及 J 区段。分别参照（ Cook 等， Nature genetics 7， 162 - 1994 ），（ Klein 等，欧洲免疫学杂志， 23， 3248 -， 1993 ）、（ Williams 等，同前）所描述的方法， VH 区段、 Vκ区段。 Vλ区段

和各 V 区段家族的名称一起列在表中。在 3 中，用 DNASIS 检索（ Ichinhara 等， The EMBO J.,7， 13， 4141 -， 1988)报道中的同源胚系 D 区段，以连续 8 bp 以上的一放性为标准来确定，结果如表中所示。认为 DN*是（ Green 等， Nature Genetics， 7， 13 - 1994 ）报道中的新 DN*家族。 4 中，在 1 （ V ）、 2 （ J ）、 3 （ D ）结果的基础上，将在任何胚系区段中都不出现的碱基序列确定为 N 区。结果在确定为 D 区的 13 种顺序列中的 11 种中有 N 区，其平均长度为 8.7bp 。 5 中用 DNASIS 将各碱基序列变换为用单符号表示的氨基酸序列。表中只表示了 CD_3 区。表中右侧为克隆各可变区时使用的引物名称及各克隆名称。

表 19

V 家族	V 区段	CDR3	J (D)	V 引物	克隆
K15A					
VH1	VH1-8	VRSSSWYEYYYYGMDV	J6 (DN1)	VH4BACK	H4-10
	VH1-18	GGITMVRGLIITDWYFDL	J2 (DXP'1)	VH1/5BACK	H1-7
	VH1-24	APYSGRFDY	J4 (DK1)	VH1/5BACK	H1-6
	VH1-46	ERYYGSGSYQDYYYYYGMDV	J6 (DXP'1)	VH1/5BACK	H1-2
	VH1-46	GGYSGYEDYYYYGMDV	J6 (DK1)	VH1/5BACK	H1-10
VH2	VH2-5	SYFDWPDFDY	J4 (DXP1)	VH4BACK	H4-14
VH3	VH3-21	EGCSGGSCLPGYYYYGMDV	J6 (DLR2)	VH1/5BACK	H1-4
	VH3-23	AHGDPYFDY	J4	VH1/5BACK	H1-3
	VH3-23	DADAFDI	J3	VH1/5BACK	H1-8
	VH3-23	SGWDY	J4 (DN1*)	VH3BACK	H3-3
	VH3-23	TGFDL	J2	VH4BACK	H4-4
	VH3-33	EGGYGSVGDYYYYGMDV	J6 (DXP'1)	VH1/5BACK	H1-9
	VH3-33	GGYSYGYDYYYYGMDV	J6 (DXP'1)	VH3BACK	H3-5
	VH3-33	GYSSGWYDY	J4 (DN1*)	VH4BACK	H4-9
VH4	VH4-34	RYSSGWYYFDY	J4 (DN1*)	VH4BACK	H4-15
	VH4-59	GRIAVASFDY	J4 (DN1*)	VH4BACK	H4-2
	VH4-59	GSGSYFHFDY	J4	VH4BACK	H4-6
K2-8					
Vκ1	O18-8	QQHDNLPFT	J3	Vκ1BACK	K1-1
	O18-8	QQYDNLPIT	J5	Vκ1BACK	K1-3
	O18-8	QQHDNLPFA	J3	Vκ2BACK	K2-2
	L1	QQYNSYPLT	J4	Vκ1BACK	K1-6
Vκ2	A17	MQGTHLLT	J4	Vκ2BACK	K2-1
	A17	MQGTHWIT	J5	Vκ2BACK	K2-5
Vκ3	A27	QQYGSSPTWT	J1	Vκ3BACK	K3-1
	A27	QQYGSSPFT	J3	Vκ3BACK	K3-4
	A27	QQYGSSPLWT	J1	Vκ3BACK	K3-5
	A27	QQYGSSPPWT	J1	Vκ3BACK	K3-6
Vκ6	A26-10	HQSSSLPQT	J1	Vκ2BACK	K2-4
KPG22-2					
Vλ1	DPL3	AAWDDSLDVV	JC3	Vλ1LEA1	L1-3
	DPL5	GTWDSSLSAGV	JC2	Vλ1LEA1	L1-4
	DPL5	GTWDSSLSAGVV	JC3	Vλ1LEA1	L1-6
	DPL5	GTWDSSLSAVV	JC2	Vλ1LEA1	L1-9
	DPL8	QSYDSSLSGVV	JC3	Vλ1LEA1	L1-8
Vλ2	DPL10	CSYAGSSTLV	JC2	Vλ2MIX	L2-4
	DPL11	SSYTSSSTVV	JC2	Vλ2MIX	L2-1
	DPL11	SSYTSSSTLV	JC2	Vλ2MIX	L2-3
	DPL11	CSYTSSSTFV	JC2	Vλ2MIX	L2-7
	DPL12	SSYAGSNNLV	JC3	Vλ2MIX	L2-5
	DPL12	SSYAGSNNFVV	JC3	Vλ2MIX	L2-6
Vλ3	DPL16	NSRDSSGNLV	JC2	Vλ3MIX	L3-1

（实施例 48）制备用于敲除掉 TT2（或 TT2F）的细胞的抗体基因（重链、软链κ）靶向载体

小鼠抗体基因（重链、软链κ）破坏后，可将 G418 耐药基因标记的人 14 号染色体片段（实施例 9）和嘌呤霉素耐药基因标记的人 2 号（实施例 18）或 22 号染色体（实施例 35）导入 TT2（或 TT2F）细胞。这样参照（主链 + κ链：实施例 19，主链 + λ链：实施例 36）的方法，应用导入的人 14 号 + 2 号或人 14 号 + 22 号染色体、小鼠抗体基因（主链、转链κ）基因破坏了的 TT2（或 TT2F）的细胞，可制成嵌合体小鼠，期望它能产生重链和轻链主要来源于人的抗体。以下表示图 23 ~ 27 中限制性酶的简称。

限制性酶：Kp: KpnI、B: BamHI、RI: EcoRI、RV: EcoRV、N: NotI、SII: ScaII、Sca: ScaI、Sfi: SfiI、Sm: SmaI、X: XhoI、SI: SalI、dKp: KpnI 的删除、（X）：λ载体的 XhoI 酶切位点。

点线部分：pBluescript SKII (+) 质粒 DNA。

◁▷：LoxP 序列

1．制备 G418 耐药基因两侧插入了 LoxP 序列的 LoxP ~ pstNEO 质粒

TT2（或 TT2F）细胞的抗体基因被除掉以后，为了去除 G418 耐药基因，有必要在 G418 耐药基因（实施例 1）的两端同向插入 Cre 重组酶（Sauer 等，美国国家科学院院刊，85，5166 ~，1988）的识别序列 LoxP 序列（Sauer 等，同前）。用限制酶 XhoI 把 pstNEO 基因从 pSTneoB 质粒 DNA（实施例 1）切出，用琼脂糖凝胶电泳纯化 DNA 片段，用 T4DNA 聚合酶（Takara 社制 Blunting end kit）将两端平端化。含 LoxP 序列的质粒 DNA pBS246（质粒 pBS246，LoxP2 盒式载体，U. S. 专利 4959317）购自 GIBCO BRL 公司。在该质粒的 EcoRI 和 SpeI 切断位点插入 XhoI 接头 DNA。变成 XhoI 的识别序列。将上述 pstNEO DNA 片段插入这一改变的 pBS246 的 EcoRV 酶切位点，得到质粒 LoxP ~ pstNEO（图 23）。

2．包含来源 于 C57BL/6 的抗体重链 Cμ（IgM 恒定区）、轻链 Jκ ~ Cκ（Igκ 连结区域和恒定区）的基因组 DNA 克隆的分离

由于 TT2（或 TT2G 细胞）来源于 C57BL/6 小鼠和 CBA 小鼠的 F_1 代小鼠，本发明者打算用来源于 C57BL/6 小鼠的基因组 DNA 克隆制备敲除掉抗体基因用的载体。用来源于 Clontech 公司成熟 C57BL/6N 雄性小

鼠肝脏的基因组 DNA 文库作基因组 DNA 库。用以下的合成 DNA 序列（60 聚体）作筛选用的探针。

重链 Cμ 探针: 5′- ACC TTC ATC GTC CTC TTC CTC CTG AGC CTC TTC TAC AGC ACC ACC GTC ACC CTG TTC AAG - 3′（序列号 59）

轻链κ探针: 5′- TGA TGC TGC ACC AAC TGT ATC CAT CTT CCC ACC ATC CAG TGA GCA GTT AAC ATC TGG AGG - 3′（序列号 60）。

分析分离出的λ克隆，将含有重链 Cμ 或轻链 Jκ - Cκ 的 DNA 片段亚克隆到 pBluescript SKII（+）质粒（Stratagene 公司）中（重链 Cμ：图 24；轻链 Jκ - Cκ：图 25）。用这些 DNA 片段制备破坏以下 TT2（或 TT2F）ES 细胞中的小鼠抗体基因的靶向载体。

3．制备破坏小鼠抗体重链基因用的载体－质粒

在编码含有 2 中制备的小鼠抗体重链恒定区的基因组 DNA Cμ 的区域内，用 1 中制备的 LoxP - pstNEO 基因替换含有第 2 ~ 第 4 外显子的 DNA 片段（BamHI ~ XhoI）（图 26）。pstNEO 的转录方向与抗体基因的转录方向相反。用大肠杆菌 JM109 扩增该质粒 DNA，通过氯化铯平衡离心进行纯化（细胞工学实验操作入门，1992 年讲谈社刊）。用限制性酶 SacII 在一个位点酶切纯化的质粒 DNA，用于 TT_2（或 TT_2F）ES 细胞的转染。为了从转化体 TT2（或 TT2F）ES 细胞检测抗体重链部分与靶向载体间同源重组而形成的克隆，用 Cμ 上游存在的转换区 DNA 片段（约 500 对碱基）作转化体基因组 DNA Southern 印迹用的探针。该 DNA 片段是在以下条件用 PCR 扩增 129 小鼠基因组 DNA 而得到的。

有义引物: 5′- CTG GGG TGA GCC GGA TGT TTT G - 3′（序列号 61）

反义引物: 5′- CCA ACC CAG CTC AGC CCA GTT C - 3′（序列号 62）

模板 DNA: EcoRI 消化的 129 小鼠基因组 DNA 1μg

反应缓冲液：脱氧核苷混合物、Taq DNA 聚合酶，均为 Takara 公司产品。

反应条件: 94 ℃，3 分，1 次→ 94 ℃，1 分；55 ℃，2 分；72 ℃，2 分；3 次→ 94 ℃，45 秒；55 ℃，1 分；72 ℃，1 分；36 次。

证实所扩增的 DNA 能按照 Genbank 的数据库，用 H 限制性酶 HindIII 在一位点酶切后，将它亚克隆到 pBluescript 质粒的 EcoRV 酶切部位。用

限制性酶 BamHI 和 XhoI 酶切该质粒 DNA （ S8 ），用琼脂糖凝胶电泳纯化 PCR 片段（约 550 碱基对），用来作探针．用 EcoRI 和 XohI 消化靶向载体转化的 TT2 （或 TT2F ） ES 细胞的基因组 DNA，经琼脂糖凝胶电泳后，分离，进行 Southern 印迹，用上述探针进行检测。

4．制备破坏小鼠抗体基因轻链κ用的载体

将 2 中制备的含小鼠抗体轻链κ J 区及恒定区的基因组 DNA 的含 J 区（ J_1 ~ J_5 ）的 DNA 片段（ EcoRI ~ SacII ）用 1 中制备的 LoxP - pst NEO 基因替换（图 27 ）。 pst NEO 的转录方向与抗体基因的转录方向相同。用大肠杆菌 JM 109 扩增该质粒 DNA，通过氯化铯平衡离心进行纯化。用限制性酶 KpnI 在一个位点酶切纯化的质粒 DNA，用以转染 TT2 （或 TT2F ） ES 细胞。为了从转化体 TT2 （或 TT2F ） ES 细胞检测抗体重链部分与靶向载体进行同源重组而形成的克隆而进行转化体基因组 DNA Southern 印迹分析时用轻链 Jκ - Cκ 基因组 DNA （参照图 25 ）的 3′端 DNA 片段（ XhoI ~ EcoRI ；约 1.4k bp ）作探针。用 EcoRI 和 NotI 消化靶向载体转化的 TT2 （或 TT2F ） ES 细胞的基因组 DNA，经琼脂糖凝胶电泳分离后，进 Southern 印迹分析，有上述的探针检测。

（实施例 49 ）获取抗体基因破坏了的小鼠 ES 细胞株

为了获得抗体重链基因的同源重组体，用限制酶 SacII （宝酒造）使（实施例 48 ）中制备的抗体重链靶向载体线性化，参照（相尺慎一、生物学手册， 8，基因打靶，羊土社， 1995 ）的方法，导入小鼠 ES 细胞 TT2F 。用胰酶处理 TT2F 细胞，以 2.5 × 10^7/ml 的浓度悬浮到 HBS 中，加入 5μg DNA，用基因脉冲仪（ Bio - Rad，未连接电阻器装置）进行电穿孔。用 4mm 距离的电穿孔细胞，在 960μF 、 250V 的条件下于室温进行。将经过电穿孔的细胞悬浮到 20ml 的 ES 培养基中，接种到 2 块预先铺有饲养细胞的 100mm 组织培养用的塑料平皿中（ Corning ）。同样用 10 ， 15μg DNA 进行实验。 1 天后换成含 300μg /ml 的 G418 （ GENETICIN ， Sigma ）的培养基。 7 - 9 天后，挑选生成的 176 个克隆，分别在 12 孔培养板中进行增殖至汇合，将其 4/5 悬浮到 0.2ml 的保存用培养基（ ES 培养基 + 10 % DMSO （ Sigma ））中， - 80 ℃冻存。将剩余的 1/5 接种到 12 孔明胶板中，培养 2 天，用（实施例 2 ）的方法提取基因组 DNA 。用限制性酶 EcoRI 和 XhoI （宝酒造）消化这些 G418 耐药性 TT2F 细胞的基因组 DNA ，经琼脂糖凝胶电泳分离后，进行

Southern 印迹分析，用（实施例 48）- 3 中所示的探针检测同源重组体。结果 176 株中得到 3 株同源重组体。野生型 TT2F 细胞和同源重组体 # 131、# 141 的 Southern 印迹分析结果如（图 28）左侧第 3 列所示。用 EcoRI、XhoI 消化野生型 TT2F 细胞可检测出 2 条带（a、b），预期在同源重组体中这 2 条带均消失，出现新的下部的带（c）。结果图中 # 131、# 141 中 a 带消失，出现新的 c 带。图中左侧表示 DNA 的大小。结果表明这些克隆中抗体重链基因的一个等位基因被同源重组所破坏。

（实施例 50）用抗体重链同源重组体 ES 细胞制备嵌合体小鼠

将（实施例 49）中所得到的抗体重链同源重组体 TT2F 细胞株 # 131 的冻存株融化，注入到 ICR 或 MCH（ICR）（日本 CREA）雄雌小鼠交配而得到的 8 细胞期胚胎中，每个胚胎注入 10 ~ 12 个。用 ES 细胞的培养基（实施例 9）培养一晚上，形成胚泡后，移植到伪孕 2.5 天的代孕母亲 ICR 小鼠（日本 CREA）的子宫中，每侧注入约 10 个注入胚。其移植了 94 个注入胚，结果产生了 22 只子鼠。根据毛色，来源于宿主胚（ICR）的白色中有可识别的来源于 TT2F 细胞的野鼠色（深棕），来判断嵌合体。所生 22 只子鼠中毛色中有明显呈野鼠色部分的，也就是说可识别由 ES 细胞所贡献的有 18 只。其中 16 个是毛色有 80 % 以上野鼠色（来源于 ES 细胞）的雌性嵌合体小鼠。该结果表明，抗体重链同源重组体 ES 细胞株 # 131 具有形成嵌合体的能力。由于所得嵌合体小鼠中贡献率非常多的个体多为雌性，表明 ES 细胞分化成机能性生殖细胞（卵子）的可能性较多。将嵌合体小鼠中贡献率为 100 % 的 2 个雌性嵌合体，与 MCH（ICR）雄性小鼠交配，结果所生子鼠全部为野鼠色。这些子鼠来自 # 131（参照实施例 42），我们认为破坏的抗体重链等位基因以 2：1 的比例进行遗传。

（实施例 51）从抗体重链同源重组体制备双重破坏株

有这样的报道：因 G418 耐药基因的插入而破坏了一个等位基因的 ES 细胞株，在高浓度 G418 的培养液中进行培养，筛选高浓度 G418 耐药株，可得到 2 个等位基因同时破坏了的细胞株（相沢慎一等，生物学手册系列 8，基因打靶，羊土社，1995）。基于此，为了得到 TT2F 抗体重链同源重组体 # 131、# 141 的 2 个等位基因破坏株，我们进行了以下实验。首先，为了测定 # 131、# 141 两株的 G418 致死浓度，以每

个平皿约 100 个细胞的比例接种到 10 块 35mm 的平皿中（该例中使用未经丝裂霉素处理的 G418 耐性原代培养细胞作营养细胞，参照实施例 9），在 G418 的浓度分别为 0，0.5，1，2，3，5，8，10，15，20mg/ml（GENETICIN，Sigma）的 ES 培养基中培养 10 天。结果在 3mg/ml 时还能看到克隆，而到 5mg/ml 时则未见克隆形成。由此可确定最小致死浓度为 5mg/ml，在浓度为 4，5，6，7，8mg/ml 的情况下筛选高浓度 G418 耐药株。将 # 131、# 141 分别以每块平皿约 10^6 个细胞的比例接种到 10 个 100mm 平皿中，在含有上述各浓度 G418 的 ES 培养基中进行培养（5 个浓度，每个浓度两块平皿）。培养开始 12 天后在 7mg，8mg/ml 的平皿中挑选明确的克隆（# 131：12 株，# 141：10 株），用与（实施例 49）相同的方法进行冻存、提取 DNA。用限制性酶 EcoRI 和 XhoI（宝酒造）消化这些高浓度 G418 耐药株的基因组 DNA，经琼脂糖凝胶电泳分离后进行 Southern 印迹分析，用（实施例 48）－ 3 中所示的探针检测破坏了 2 个等位基因的克隆。结果从 # 131 得到，株（# 131 － 3）2 个等位基因被破坏了的细胞株。对 # 131 的 6 株进行 Southern 印迹分析的结果如（图 28）所示。用 EcoRI、XhoI 进行消化，在野生型 TT2F 细胞中检测出 2 条野生型带（a、b）。在一个等位基因同源重组体（# 131、# 141）中上部的 a 带消失，出现新的 c 带（实施例 49）。预期在 2 个等位基因被破坏的情况下，另一个野生型带 b 消失，只出现破坏型 c 带。在图中的 3 号（# 131 － 3）克隆中可观察到这一带型。也就是说该克隆是抗体重链基因的 2 个等位基因均被破坏了的克隆。

（实施例 52）从抗体重链缺陷的纯合子 TT2F 细胞株中除去 G418 耐性标记基因

通过以下步骤除去（实施例 51）中获得的抗体重链 2 个等位基因均被破坏了的细胞株（高浓度 G418 耐药株，# 131 － 3）中 G418 耐药性标记基因，参照（相沢慎一，生物学手册系列 8，基因打靶，羊土社，1995；高津圣志等，实验医学分册，免疫研究的基础技术，p255 －，1995，羊土社）的方法，将含有能在 G418 耐药标记基因两端插入的 LoxP 序列（实施例 48 － 1）间引起位点特异性重组的 Cre 重组酶基因的表达载体－ PBS 185（BRL）导入 # 131 － 3。用胰酶处理 # 131 － 3 细胞，以 2.5×10^7/ml 的浓度悬浮到 HBS 中，加入 30μg 的 pBS 185DNA，用基因脉冲仪（Bio － Rad，未接电阻器装置）进行电穿孔。用 4mm 距

离电穿孔细胞（实施例 1），在 960μF、250V 的情况下进行。将经过电穿孔的细胞悬浮到 5ml ES 培养基中，接种到 1 块预先铺有饲养细胞的、60mm 组织培养用塑料培养瓶中（Corning）。2 天后用胰酶处理细胞，再次接种到预先铺有饲养细胞、100mm 的培养瓶中，每个接种 100、200、300 个细胞，共接种 3 瓶。基因脉冲仪的设定条件只改变为（接连电阻器装置，电阻值无限大），其余同前。7 天后，挑选长出的 96 个克隆，经胰酶处理后，分成 2 份，分别接种到 2 块铺有饲养细胞的 48 孔板中和只经凝胶处理的 48 孔板中。在含有 300μ/ml G418（GENETIC、Sigma）的培养基中，将后者培养 3 天，根据其生存率来判断 G418 耐性。结果有 6 个克隆在 G418 存在的情况下死亡。将这些 G418 敏感株在 35mm 培养瓶中增殖至汇合，将其 4/5 悬浮到 0.5ml 保存时应用的培养基（ES 培养基 + 10% DMSO <Sigma>）中，－80℃保存。将剩余的 1/5 接种到 12 孔凝胶铺过的板中，按（实施例 2）的方法培养 2 天，制备基因组 DNA。用限制性酶 EcoRI（宝酒造）消化这些 G418 敏感性 TT2F 细胞株的基因组 DNA，经琼脂糖凝胶电泳分离后进行 Southern 印迹分析，用包含 G418 耐药基因、来源于 pSTneoB 的 3.2kb XhoI 片段（探针 A）来证实 G418 耐药基因的去除。其结果在所有的敏感株中均未检测出在 # 131－3 中所观察到的与探针 A 杂交的带。由此可证实，在所得 G418 敏感株中，G418 耐性标记基因确实被去除。此外，用同样的方法，以 EcoRI 消化 pBS 185DNA 的探针 B 进行 Southern 印迹分析，结果在这些 G418 敏感株中没有检测到与探针 B 杂交而形成的特异性带，这表明含有 Cre 重组酶的 pBS 185 未插入到敏感株的染色体中。也就是说，这些敏感株可与实施例 48－4 中所示由于敲除抗体轻链的载体（G418 耐药基因的两端存在 LoxP 序列）进行转化。

（实施例 53）将人 14 号染色体（抗体重链）导入抗体重链缺陷的 ES 细胞株

按（实施例 9）的方法，用微细胞法将 G418 耐药基因标记的人 14 号染色体（含有抗体重链基因）导入（实施例 52）中所得的内源性抗体重链的缺陷小鼠 ES 细胞株中（来于 TT2F，G418 敏感性）。用 PCR 分析等方法（实施例 9）证实在所得 G418 耐药株中保持有包含人抗体重链基因的人 14 号染色体（片段）。

（实施例 54）将人 2 号染色体片段或人 22 号染色体导入保持人 14 号

染色体（片段）、抗体重链缺陷的ES细胞株中

按照（实施例18、35），用微细胞法，将嘌呤霉素耐药基因标记的人2号染色体（含有人抗体轻链κ基因）或人22号染色体（含有人抗体轻链λ基因）导入在（实施例53）中得到的、保持人14号染色体片段、抗体重链缺陷的小鼠ES细胞株（G418耐性）中。通过PCR分析等（实施例18、35）来证实在所得嘌呤霉素、G418双重耐药株中保持有人14号染色体（片段）和2号染色体片段或22号染色体（片段）。

（实施例55）用内源性抗体重链缺陷，保持含人抗体重链基因的14号染色体（片段）的ES细胞制作嵌合体小鼠

按照（实施例10）中的方法，用（实施例53）中获得的缺乏内源性抗体重链、保持含人抗体重链基因的14号染色体（片段）的ES细胞制作嵌合体小鼠。用（实施例14）的方法在所得嵌合体小鼠中检测来源于ES细胞株的B细胞所产生的人抗体重链。由于来源于ES细胞的B细胞中的功能性抗体重链基因只有导入染色体上的人源基因，所以大多数来源于ES细胞株的B细胞产生人抗体重链。

（实施例56）用保持人14号+2号、14号+22号染色体（片段）、内源性抗体重链缺陷的ES细胞制备嵌合体小鼠

参照（实施例19、36）的方法，用在（实施例54）中获取的保持人14号+2号、14号+22号染色体（片段）、缺乏内源性抗体重链的小鼠ES细胞制备嵌合体小鼠。用（实施例14、23、32）中所示的方法在所得嵌合体小鼠中来源于ES细胞株的B细胞中检测人抗体重链和轻链κ或轻链λ。与（实施例55）相同由于来源于ES细胞的B细胞中的功能性抗体重链基因只有导入染色体上的人源基因，所以多数来源于ES细胞的B细胞产生人抗体重链。另外，按如（实施例37、38）所示的方法，也检测出重链、轻链均来源于人的完整人抗体分子。

（实施例57）用保持人14号+2号、14号+22号染色体（片段）、内源性抗体重链缺陷的小鼠ES细胞来源的嵌合体小鼠制备产生人抗体的杂交瘤

与（实施例15、25、34）相同，用目的抗原免疫（实施例56）中制备的嵌合体小鼠，取脾，与骨髓瘤细胞进行细胞融合，制成杂交瘤。用ELISA法分析1～3周间的培养上清。按（实施例14、15、21、24、25、33、34、37、38）中所示的方法进行ELISA，可得到人

抗体阳性以及人抗体阳性且对免疫抗原特异的克隆。

（实施例 58）用抗体重链缺陷的纯合子小鼠 ES 细胞制备破坏了抗体轻链基因的细胞株

通过以下步骤制备同源重组体，该同源重组体是在（实施例 52）中获得的抗体重链缺陷纯分子 TT2F 细胞株（G418 敏感性）中又破坏了抗体轻链基因。用限制性酶 KpnI（宝酒造）将（实施例 48 - 4）中制备的抗体轻链靶向载体线性化，参照（相沢慎一、生物学手册系列 8，基因打靶，羊土社，1995）的方法，导入到上述 TT2F 细胞株（G418 敏感性）。7 - 9 天后挑选所生克隆，按（实施例 49）的方法冻存、提取基因组 DNA。用限制性酶 EcoRI 和 NotI（宝酒造）消化 G418 耐药株的基因组 DNA，经琼脂糖凝胶电泳分离后进行 Southern 印迹分析，用（实施例 48 - 4）中的探针检测同源重组体。

（实施例 59）从抗体轻链同源重组体制备双重破坏株

依照下面程序，从（实施例 58）的 TT2F 抗体轻链同源重组体（并且抗体重链缺陷的纯合子）制备破坏了轻链两侧等位基因的克隆。用（实施例 51）的方法制备高浓度 G418 耐药株，冻存、提取 DNA。用限制性酶 EcoRI 和 NotI（宝酒造）消化高浓度 G418 耐药株的基因组 DNA，经琼脂糖凝胶电泳分离后进行 Southern 印迹分析，用（实施例 48 - 4）中的探针检测破坏了两侧等位基因的细胞株。

（实施例 60）从抗体轻链缺陷的纯合子（并且抗体重链缺陷的纯合子）TT2F 细胞株除去 G418 耐性标记基因

按（实施例 52）中的步骤除去（实施例 59）中抗体轻链两侧等位基因破坏株（高浓度 G418 耐药株）的 G418 耐性标记基因。将含有 Cre 重组酶基因的表达载体 pBS 185（BRL）按（实施例 52）的方法导入上述细胞株，其中 Cre 重组酶基因能在 G418 耐性标记基因两侧插入的 LoxP 序列（实施例 48 - 1）间引起位点特异性重组。与（实施例 52）相同，将所得 G418 敏感株在 35mm 培养瓶中进行增殖至汇合，将其 4/5 悬浮到 0.5ml 保存用培养基（ES 培养基 + 10 % DMSO <Sigmn>）中，- 80 ℃冻存。将剩余的 1/5 接种到 12 孔铺有凝胶的板中，培养 2 天，按（实施例 2）的方法提取基因组 DNA。用限制性酶 EcoRI（宝酒造）消化这些 G418 敏感性 TT2F 细胞的基因组 DNA，经琼脂糖凝胶电泳分离后进行 Southern 印迹分析，用含有 G418 耐性基因、来源于 pSTneoB 的

3.2kb XhoI 片段作探针证实 G418 耐性基因的去除。

（实施例 61）将人 14 号染色体（抗体重链）导入抗体重链、轻链缺陷的 ES 细胞株

参照（实施例 9），用微细胞法将 G418 耐性基因标记的人 14 号染色体（含有人抗体重链基因）导入（实施例 60）中内源性抗体重链和轻链缺陷的小鼠 ES 细胞株（来于 TT2F， G418 敏感性），用 PCR 分析等方法（实施例 19）来证实在所得 G418 耐药株中保持有含人抗体重链基因的人 14 号染色体（片段）.

（实施例 62）将人 2 号染色体（轻链κ）导入抗体重链、轻链缺陷且保持人 14 号染色体（抗体重链）的 ES 细胞株中

参照（实施例 18），用微细胞法将嘌呤霉素耐性基因标记的人 2 号染色体（含人抗体轻链κ基因）部分片段导入（实施例 61）中内源性抗体重链和轻链缺陷，且保持人 14 号染色体的小鼠 ES 细胞株（来源于 TT2F，G418 耐性）中。用 PCR 分析等方法（实施例 18）来证实在 G418 双重耐药株中保持有人 14 号染色体（片段）和人 2 号染色体片段。

（实施例 63）将人 22 号染色体（轻链λ）导入抗体重链、轻链且保持人 14 号染色体（抗体重链）的 ES 细胞株

参照（实施例 35），用微细胞法将嘌呤霉素耐性基因标记的人 22 号染色体（含人抗体轻链λ基因）导入在（实施例 61）中得到的内源性抗体重链和轻链缺陷且保持人 14 号染色体的小鼠 ES 细胞株中（来自 TT2F、G418 耐性）。通过 PCR 分析等方法（实施例 35）在所得嘌呤霉素、G418 双重耐药株中证实人 14 号染色体（片段）和人 22 号染色体（片段）的保持。

（实施例 64）制备同时保持人 2 号（抗体轻链κ）、14 号（抗体重链）、22 号（抗体λ链）染色体或其片段、内源性抗体重链、轻链缺陷的小鼠 ES 细胞

为了得到同时保持 3 种人染色体的小鼠 ES 细胞，将杀稻瘟素耐性（Izumi 等，实验细胞研究，197，229，1991）、潮霉素耐性（Wind 等，细胞，82，321－，1995）等标记基因插入到人 2 号或 22 号染色体进行标记。按照（实施例 16、26）的方法进行。用与（实施例 9）相同的方法将杀稻瘟素耐性或潮霉素耐性标记的人 22 号染色体（含有人抗体轻链λ基因）导入在（实施例 62）中得到的、内源性抗体重链和轻

链缺陷且保持人 14 号染色体（片段）及 2 号染色体部分片段的小鼠 ES 细胞株中（来自 TT2F， G418 耐性、嘌呤霉素耐性）。使用分别与选择标记相适应的饲养细胞用于 ES 细胞的培养。使用潮霉素耐性标记的时候，选用保持、表达该标记的转基因小鼠的原代培养纤维母细胞（Johnson 等，核酸研究，23 卷，7 期，1273 - ，1995）。用 PCR 分析等方法（实施例 9，18，35）来证实所得 G418、嘌呤霉素、潮霉素（或杀稻瘟素三重耐药株是否保持上述 3 种人染色体（片段）。用同样的方法将潮霉素或杀稻瘟素耐性基因标记的人 2 号染色体导入（实施例 63）中所得的、内源性抗体重链和轻链缺陷且保持人 14 号染色体（片段）及 22 号染色体部分片段的小鼠 ES 细胞株（来自 TT2F， G418 耐性、嘌呤霉素耐性）。

（实施例 65）从保持含人抗体基因（重链 + 轻链）的染色体（片段）、内源性抗体重链、轻链缺陷基因的小鼠 ES 细胞制备嵌合体小鼠

按照（实施例 10）的方法，用（实施例 61、62、63、64）中得到的保持有含人抗体基因的染色体（片段）、内源性抗体重链、轻链基因缺陷的小鼠 ES 细胞株制作嵌合体小鼠。用（实施例 14、23、32）的方法检测所得嵌合体小鼠中，来自宿主胚的 B 细胞产生的小鼠抗体和来自 ES 细胞株的 B 细胞所产生的人抗体。由于来源于 ES 细胞的 B 细胞中，功能性抗体重链及轻链 κ 基因只有存在于导入染色体上的人源基因，所以来源于 ES 细胞的 B 细胞多数产生人抗体重链和轻链 κ（Lonberg 等，自然，368，856 - ，1994）。此外，用（实施例 37、38）的方法检测重链、轻链均为人源性的完整人抗体分子。

（实施例 66）用来源于小鼠 ES 细胞的嵌合体小鼠制备产生人抗体的杂交瘤，其中 ES 细胞保持有含人抗体基因（重链 + 轻链）的染色体（片段）且内源性抗体重链、轻链基因缺陷。

与（实施例 25）相同，用目的抗原免疫（实施例 65）中得到的嵌合体小鼠，取其脾，与骨髓瘤细胞进行细胞融合，制作杂交瘤。用 ELISA 方法分析 1 - 3 周间进行培养的培养上清。ELISA 方法按（实施例 14、15、21、22、23、24、25、33、34、37、38）的方法进行，可得到人抗体阳性以及人抗体阳性且对免疫抗原特异的克隆。

（实施例 67）用重链基因缺陷的宿主胚制备嵌合体小鼠

来源于（实施例 49）中内源性抗体重链缺陷一侧等位基因的 TT2F

细胞株的嵌合体小鼠的后代中，呈野鼠色的个体，通过 Southern 印迹分析或 PCR（实施例 49）等方法选拔保持等位基因缺陷的个体（预期可能性为 1/2）。抗体重链缺陷的杂合子雌雄个体进行交配产生子代小鼠，用 Southern 印迹分析（参照实施例 49）来分析其淋巴细胞表示μ链的表达（Kitamura 等，自然，350，423－，1991），可得到双侧等位基因缺陷、基本不能产生自身功能性抗体的抗体重链缺陷的纯合子（预期出现率为 1/4，在膜型μ链缺陷小鼠中的结果：参照 Kitamura 等，自然，350，423－，1991）。在清洁环境中饲养的纯合体雌雄个体进行交配，由此而得到胚胎，可用这胚胎作制备嵌合体小鼠时的宿主。这种情况下制备的嵌合体小鼠中，功能性 B 细胞基本上来源于注入的 ES 细胞。RAG－2 缺陷小鼠（Shinkai 等，细胞，68，855－，1992）等不能制备自身功能性 B 细胞的其它小鼠品系也可用于此目的。在该系统中应用（实施例 62，63，64）中得到的内源性抗体重链和轻链缺陷且保持人 14 号＋2 号、或 14 号＋22 号或 14 号＋2 号＋22 号染色体（片段）的小鼠 ES 细胞株，参照（实施例 10）的方法制作嵌合体小鼠。所得嵌合体小鼠中，由来源于 ES 细胞的 B 细胞中功能性人抗体重链（14 号染色体上）、轻链κ（2 号染色体上）、轻链λ（22 号染色体上）基因的表达而产生主要由人重链和人轻链组成的抗体。

（实施例 68）导入了人 14 号染色体（片段）的 ES 细胞来源的嵌合体小鼠后代中人染色体的保持

按照（实施例 9）的方法以及将（实施例 9）中的小鼠 ES 细胞替换为 TT2F（39，XO，实施例 39）的方法得到保持人 14 号染色体（片段）的嵌合体小鼠，将它们与野生型 ICR 小鼠（白色，日本 CREA）混合，交配。从所生野鼠色子鼠的尾部制备基因组 DNA，通过 PCR 来检测人 14 号染色体片段的保持（实施例 9、42、43）。如（实施例 42）和（实施例 43）所示，保持人 14 号染色体（片段）的小鼠 ES 细胞株在嵌合体小鼠中能分化成功能性卵子或精子，人 14 号染色体（片段）能遗传给其后代。也就是说可建立一种小鼠品系，它保持有含人抗体重链基因的人 14 号染色体（片段），并可遗传给后代。在本实施例以及下面的实施例 69－74 中，人 14 号染色体（片段）指含有人抗体重链基因的染色体（片段），人 2 号染色体（片段）指含有人轻链κ基因，人 22 号染色体（片段）指含有人抗体λ链基因的染色体（片段）。

（实施例69）导入了人22号染色体（片段）的ES细胞来源的嵌合体小鼠后代中人染色体的保持

用与（实施例30）相同的方法或稍作调整将（实施例30）的小鼠ES细胞替换为TT2F（39，XO）得到保持人22号染色体（片段）的嵌合体小鼠，将其与ICR小鼠混合，交配。从所生野鼠色子代鼠的尾部制备基因组DNA，用PCR法检测其中人22号染色体片段的保持（参照实施例42、43、30）。如（实施例42）和（实施例43）所示，保持人22号染色体或其部分片段的小鼠ES细胞株在嵌合体小鼠中能分化成功能性卵子或精子，并可将人22号染色体（片段）遗传给其后代。也就是说可建立一种小鼠品系，它保持有含人抗体轻链λ基因的22号染色体（片段），并能遗传给后代。

（实施例70）通过交配制备同时保持人2号染色体片段和14号染色体（片段）的小鼠

将（实施例42）或（实施例43）中得到的保持人2号染色体片段的小鼠品系与（实施例68）中得到的保持人14号染色体（片段）的小鼠品系进行交配，从所生子代小鼠的尾部制备基因组DNA，通过PCR方法等（实施例9、42、43）进行分析，得到同时保持人2号染色体部分片段和人14号染色体（片段）的小鼠。

（实施例71）通过交配制备同时保持人22号染色体（片段）和14号染色体（片段）的小鼠。

将（实施例69）中得到的保持人22号染色体（片段）的小鼠品系与（实施例68）中得到的保持人14号染色体（片段）的小鼠品系进行交配，从所生子代小鼠的尾部制备基因组DNA，通过PCR方法等（实施例30、42、43）进行分析，得到同时保持人22号染色体（片段）和人14号染色体（片段）的小鼠。

（实施例72）通过交配制备同时保持人2号染色体片段，14号染色体（片段）和22号染色体（片段）的小鼠。

将（实施例71）中得到的保持人22号和14号染色体（片段）的小鼠品系与（实施例42、43）中得到的保持人2号染色体片段的小鼠品系进行交配，从所生小鼠的尾部制备基因组DNA，用PCR等方法（实施例9、30、42、43）进行分析，得到同时保持人22号和14号染色体（片段）及人2号染色体部分片段三种染色体的小鼠。或者将（实施

例 70 ）中所得保持人 2 号染色体（片段）和人 14 号染色体（片段）的小鼠品系与（实施例 69 ）中所得保持人 22 号染色体片段的小鼠品系进行交配，同样可得到同时保持 3 种人染色体的小鼠。

（实施例 73 ）通过交配制备能主要产生完整人抗体的小鼠品系

将保持人 2 号 + 14 号（实施例 70 ）、14 号 + 22 号（实施例 71 ）、2 号 + 14 号 + 22 号（实施例 72 ）染色体的小鼠品系与内源性抗体重链缺陷（实施例 67；Kitamura 等，自然，350，423 - ，1991 ）、轻链 κ（Zou 等，EMBO. J. 12，811 - ，1993；Chem 等，EMBO. J., 12, 821 - ，1993 ）基因缺陷的小鼠品系进行反复交配，通过 PCR 等分析（实施例 9 、30 、42 、43 ）筛选保持人 2 号 + 14 号、14 号 + 22 号、或 2 号 + 14 号 + 22 号染色体的小鼠，建立主要产生完整的人抗体的小鼠系统（Green 等，Nature Genetics，7，13 - ，1994；Lonberg 等，自然，368，856 - ，1994 ）。

（实施例 74 ）从交配得到的保持含人抗体基因的人染色体的小鼠品系制备产生人抗体的杂交瘤

与（实施例 25 ）相同，用目的抗原免疫（实施例 42 、43 、68 、69 、70 、71 、72 、73 ）中得到的、保持有含人抗体基因的人染色体的小鼠，取脾，与骨髓瘤细胞融合制备杂交瘤。用 ELISA 方法分析 1 ~ 3 周培养期间的培养上清。按（实施例 14 、15 、21 、22 、25 、33 、34 、37 、38 ）的方法进行 ELISA，得到人抗体阳性及人抗体阳性且对免疫抗原特异的克隆。

（实施例 75 ）小鼠抗体重链两侧等位基因均破坏了的 TT2F 细胞株来源的嵌合体小鼠血清中小鼠 IgM 的检测及定量。

按照（实施例 40 ）的方法，从（实施例 51 ）中获得的小鼠抗体重链两个等位基因均破坏了的 TT2F 细胞株（ # 131 - 3 ）所产生的子代小鼠中分别得到嵌合率为 0 %、50 %、99 % 的 3 个小鼠，对其血清中小鼠 IgM 进行检测和定量。从出生后 2 周龄的嵌合体小鼠采血，用（实施例 14 ）的 ELISA 方法对血清中小鼠 IgM 的浓度进行定量。固定 PBS 稀释的抗小鼠 IgM 抗体（Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., 01 - 18 - 03 ），然后加入血清样品，血清样品用添加了 5 % FBS 的 PBS 稀释。加入过氧化物酶标记的抗小鼠 IgM 抗体（Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., 074 - 1803 ），以 TMBZ 作底物，测定 450nm 的吸

光度。以纯化的小鼠 IgM（ Phamningn， 03081D ）作标准，用补充有 FBS 的 PBS 进行梯度稀释。结果如表 20 所示，该结果显示由小鼠抗体重链两侧等位基因破坏了的 TT2F 细胞而来的嵌合体小鼠中，嵌合率为 99% 的小鼠中小鼠 IgM 浓度低，这表明 ES 细胞的小鼠重链基因基本上没有功能。

表 20 嵌合体小鼠中小鼠 IgM 的浓度（ ELISA ）

嵌合率%	IgM（ mg/l ）
0	12
50	11
99	1.5

产业上利用的可能性

本发明提供了一种嵌合体非人动物，它保持有单一或多个外源染色体或其片段，并能表达该染色体或其片段上的基因。利用本发明的嵌合体非人动物，可制备生物活性物质。

本发明提供具有分化多能性的细胞，它保持有单一或多个外源染色体或其片段，并能表达该外源染色体或其片段上的基因。利用该细胞，通过骨髓移植等方法可治疗遗传病。

序列表

序列号: 1
序列长度: 20
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性
序列的种类: 其它核苷酸 合成 DNA
序列
TGGAAGGTGG ATAACGCCCT

序列号: 2
序列长度: 22
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性
序列的种类: 其它核苷酸 合成 DNA
序列
TCATTCTCCT CCAACATTAG CA

序列号: 3
序列长度: 21
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性
序列的种类: 其它核苷酸 合成 DNA
序列
TGTAGGGGAC CTGGAGCCTT G

序列号: 4
序列长度: 21
序列类型: 核酸
链数: 单链

拓朴学：线性
序列的种类：其它核苷酸 合成 DNA
序列
TTGACAACTC ACCTGGACTA G

序列号：5
序列长度：20
序列类型：核酸
链数：单链
拓朴学：线性
序列的种类：其它核苷酸 合成 DNA
序列
CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA

序列号：6
序列长度：22
序列类型：核酸
链数：单链
拓朴学：线性
序列的种类：其它核苷酸 合成 DNA
序列
TGCTGATGGT GAGAGTGAAC TC

序列号：7
序列长度：20
序列类型：核酸
链数：单链
拓朴学：线性
序列的种类：其它核苷酸 合成 DNA
序列
AGTCAGGGCA TTAGCAGTGC

序列号: 8
序列长度: 20
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性
序列的种类: 其它核苷酸 合成 DNA
序列
GCTGCTGATG GTGAGAGTGA

序列号: 9
序列长度: 20
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性
序列的种类: 其它核苷酸 合成 DNA
序列
TGGTGGCTGA AAGCTAAGAA

序列号: 10
序列长度: 20
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性
序列的种类: 其它核苷酸 合成 DNA
序列
CCAGAAGAAT GGTGTCATTA

序列号: 11
序列长度: 20
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性

序列的种类：其它核苷酸 合成 DNA
序列
TCCAGGTTCT GCAGAGCAAG

序列号：12
序列长度：20
序列类型：核酸
链数：单链
拓朴学：线性
序列的种类：其它核苷酸 合成 DNA
序列
TGTAGTTGGA GGCCATGTCC

序列号：13
序列长度：20
序列类型：核酸
链数：单链
拓朴学：线性
序列的种类：其它核苷酸 合成 DNA
序列
CCCCACCCAT GATCCAGTAC

序列号：14
序列长度：20
序列类型：核酸
链数：单链
拓朴学：线性
序列的种类：其它核苷酸 合成 DNA
序列
GCCCTCAGAA GACGAAGCAG

序列号: 15
序列长度: 22
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性
序列的种类: 其它核苷酸 合成DNA
序列
GAGAGTTGCA GAAGGGGTGA CT

序列号: 16
序列长度: 22
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性
序列的种类: 其它核苷酸 合成DNA
序列
GGAGACCACC AAACCCTCCA AA

序列号: 17
序列长度: 20
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性
序列的种类: 其它核苷酸 合成DNA
序列
GGCTATGGGG ACCTGGGCTG

序列号: 18
序列长度: 22
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性

序列的种类：其它核苷酸 合成 DNA
序列
CAGAGACACA GGCACGTAGA AG

序列号：19
序列长度：20
序列类型：核酸
链数：单链
拓朴学：线性
序列的种类：其它核苷酸 合成 DNA
序列
TTAAGGGTCA CCCAGAGACT

序列号：20
序列长度：20
序列类型：核酸
链数：单链
拓朴学：线性
序列的种类：其它核苷酸 合成 DNA
序列
TGTAGTTGGA GGCCATGTCC

序列号：21
序列长度：20
序列类型：核酸
链数：单链
拓朴学：线性
序列的种类：其它核苷酸 合成 DNA
序列
CAAAAAGTCC AACCCTATCA

序列号: 22
序列长度: 20
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性
序列的种类: 其它核苷酸 合成 DNA
序列
GCCCTCAGAA GACGAAGCAG

序列号: 23
序列长度: 20
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性
序列的种类: 其它核苷酸 合成 DNA
序列
TCGTTCCTGT CGAGGATGAA

序列号: 24
序列长度: 20
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性
序列的种类: 其它核苷酸 合成 DNA
序列
TCACTCCGAA GCTGCCTTTC

序列号: 25
序列长度: 21
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性

序列的种类: 其它核苷酸 合成 DNA
序列
ATGTACAGGA TGCAACTCCT G

序列号: 26
序列长度: 20
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性
序列的种类: 其它核苷酸 合成 DNA
序列
TCATCTGTAA ATCCAGCAGT

序列号: 27
序列长度: 20
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性
序列的种类: 其它核苷酸 合成 DNA
序列
GATCCCATCG CAGCTACCGC

序列号: 28
序列长度: 20
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性
序列的种类: 其它核苷酸 合成 DNA
序列
TTCGCCGAGT AGTCGCACGG

序列号: 29
序列长度: 22
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性
序列的种类: 其它核苷酸 合成 DNA
序列
GATGAACTAG TCCAGGTGAG TT

序列号: 30
序列长度: 22
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性
序列的种类: 其它核苷酸 合成 DNA
序列
CCTTTTGGCT TCTACTCCTT CA

序列号: 31
序列长度: 20
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性
序列的种类: 其它核苷酸 合成 DNA
序列
ATAGAGGGTA CCCACTCTGG

序列号: 32
序列长度: 20
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性

序列的种类：其它核苷酸 合成 DNA
序列
AACCAGGTAG GTTGATATGG

序列号：33
序列长度：20
序列类型：核酸
链数：单链
拓朴学：线性
序列的种类：其它核苷酸 合成 DNA
序列
AAGTTCCTGT GATGTCAAGC

序列号：34
序列长度：20
序列类型：核酸
链数：单链
拓朴学：线性
序列的种类：其它核苷酸 合成 DNA
序列
TCATGAGCAG ATTAAACCCG

序列号：35
序列长度：20
序列类型：核酸
链数：单链
拓朴学：线性
序列的种类：其它核苷酸 合成 DNA
序列
TGTGAAGGAG GACCAGGTGT

序列号: 36
序列长度: 20
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性
序列的种类: 其它核苷酸 合成 DNA
序列
TGTAGGGGTT GACAGTGACA

序列号: 37
序列长度: 20
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性
序列的种类: 其它核苷酸 合成 DNA
序列
CTGAGAGATG CCTCTGGTGC

序列号: 38
序列长度: 20
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性
序列的种类: 其它核苷酸 合成 DNA
序列
GGCGGTTAGT GGGGTCTTCA

序列号: 39
序列长度: 20
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性

序列的种类：其它核苷酸 合成 DNA
序列
GGTGTCGTGG AACTCAGGCG

序列号：40
序列长度：20
序列类型：核酸
链数：单链
拓朴学：线性
序列的种类：其它核苷酸 合成 DNA
序列
CTGGTGCAGG ACGGTGAGGA

序列号：41
序列长度：20
序列类型：核酸
链数：单链
拓朴学：线性
序列的种类：其它核苷酸 合成 DNA
序列
GCATCCTGAC CGTGTCCGAA

序列号：42
序列长度：20
序列类型：核酸
链数：单链
拓朴学：线性
序列的种类：其它核苷酸 合成 DNA
序列
GGGTCAGTAG CAGGTGCCAG

序列号: 43
序列长度: 20
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性
序列的种类: 其它核苷酸 合成 DNA
序列
AGTGAGATAA GCAGTGGATG

序列号: 44
序列长度: 20
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性
序列的种类: 其它核苷酸 合成 DNA
序列
GTTGTGCTAC TCCCATCACT

序列号: 45
序列长度: 21
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性
序列的种类: 其它核苷酸 合成 DNA
序列
TTGTATTTCC AGGAGAAAGT G

序列号: 46
序列长度: 20
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性

序列的种类：其它核苷酸 合成DNA
序列
GGAGACGAGG GGGAAAAGGG

序列号：47
序列长度：27
序列类型：核酸
链数：单链
拓朴学：线性
序列的种类：其它核苷酸 合成DNA
序列
ATGGACTGGA CCTGGAGGRT CYTCTKC

序列号：48
序列长度：27
序列类型：核酸
链数：单链
拓朴学：线性
序列的种类：其它核苷酸 合成DNA
序列
ATGGAGYTTG GGCTGASCTG GSTTTYT

序列号：49
序列长度：27
序列类型：核酸
链数：单链
拓朴学：线性
序列的种类：其它核苷酸 合成DNA
序列
ATGRAMMWAC TKTGKWBCWY SCTYCTG

序列号: 50
序列长度: 20
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性
序列的种类: 其它核苷酸 合成 DNA
序列
CAGAGGCAGT TCCAGATTTC

序列号: 51
序列长度: 20
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性
序列的种类: 其它核苷酸 合成 DNA
序列
TGGGATAGAA GTTATTCAGC

序列号: 52
序列长度: 20
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性
序列的种类: 其它核苷酸 合成 DNA
序列
ATGGACATGR RRDYCCHVGY KCASCTT

序列号: 53
序列长度: 28
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性

序列的种类：其它核苷酸 合成 DNA
序列
CCAAGCTTCA GGAGAAAGTG ATGGAGTC

序列号：54
序列长度：28
序列类型：核酸
链数：单链
拓朴学：线性
序列的种类：其它核苷酸 合成 DNA
序列
CCAAGCTTAG GCAGCCAACG GCCACGCT

序列号：55
序列长度：28
序列类型：核酸
链数：单链
拓朴学：线性
序列的种类：其它核苷酸 合成 DNA
序列
CCAAGCTTCA GAGGCAGTTC CAGATTTC

序列号：56
序列长度：28
序列类型：核酸
链数：单链
拓朴学：线性
序列的种类：其它核苷酸 合成 DNA
序列
GGGAATTCGG GTAGAAGTCA CTGATCAG

序列号: 57
序列长度: 28
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性
序列的种类: 其它核苷酸 合成 DNA
序列
GGGAATTCGG GTAGAAGTCA CTTATGAG

序列号: 58
序列长度: 28
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性
序列的种类: 其它核苷酸 合成 DNA
序列
GGGAATTCGG GTAGAAGTCA CTTACGAG

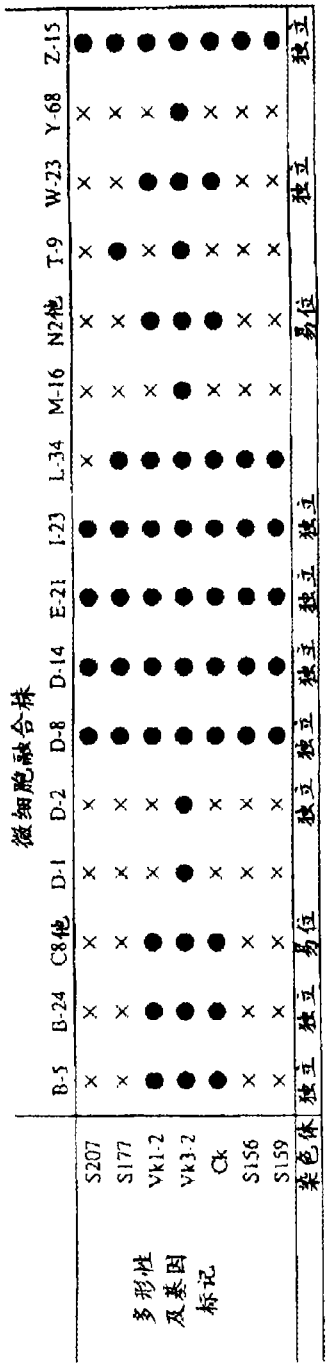
序列号: 59
序列长度: 60
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性
序列的种类: 其它核苷酸 合成 DNA
序列
ACCTTCATCG TCCTCTTCCT CCTGAGCCTC TTCTACAGCA CCACCGTCAC CCTGTTCAAG

序列号: 60
序列长度: 60
序列类型: 核酸
链数: 单链

拓朴学: 线性
序列的种类: 其它核苷酸 合成 DNA
序列
TGATGCTGCA CCAACTGTAT CCATCTTCCC ACCATCCAGT GAGCAGTTAA CATCTGGAGG

序列号: 61
序列长度: 22
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性
序列的种类: 其它核苷酸 合成 DNA
序列
CTGGGGTGAG CCGGATGTTT TG

序列号: 62
序列长度: 22
序列类型: 核酸
链数: 单链
拓朴学: 线性
序列的种类: 其它核苷酸 合成 DNA
序列
CCAACCCAGC TCAGCCCAGT TC



		微细胞融合株																			
		B-5	B-24	C8他	D-1	D-2	D-8	D-14	E-21	I-23	L-34	M-16	N2他	T-9	W-23	Y-68	Z-15
多形性及基因标记	S207	×	×	×	×	×	●	●	●	●	×	×	×	×	×	×	●
	S177	×	×	×	×	×	●	●	●	●	●	×	×	●	×	×	●
	Vk1-2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	×	●	●	●
	Vk3-2	●	●	●	×	×	●	●	●	●	●	×	●	×	●	×	●
	Ck	●	●	●	×	×	●	●	●	●	●	×	×	×	×	×	●
	S156	×	×	×	×	×	●	●	●	●	●	×	×	×	×	×	●
	S159	×	×	×	×	×	●	●	●	●	●	×	×	×	×	×	●
	染色体	独立	独立	易位		独立	独立	独立	独立	独立			易位		独立		独立

图 1 保持人2号染色体(片段)的A9细胞的PCR分析

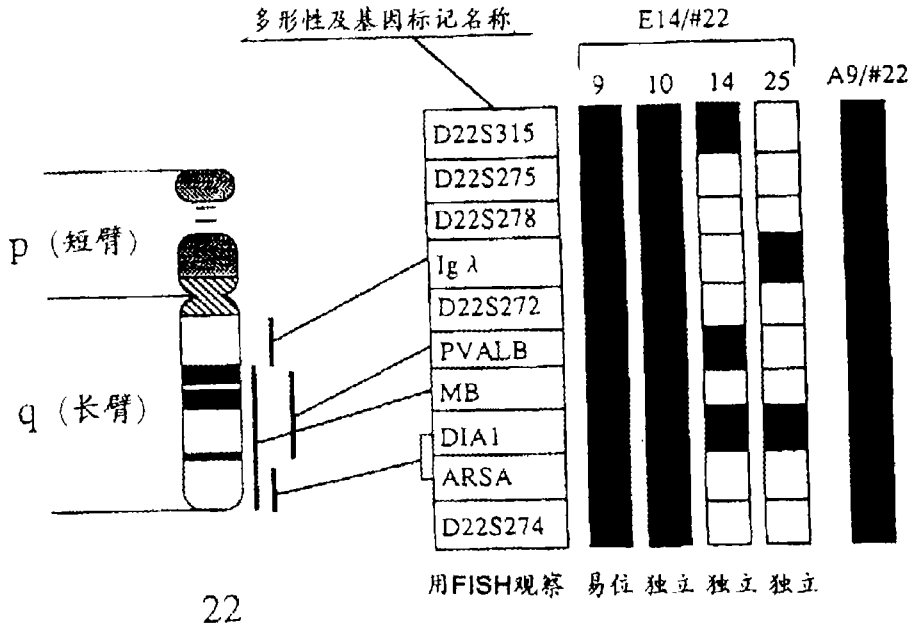
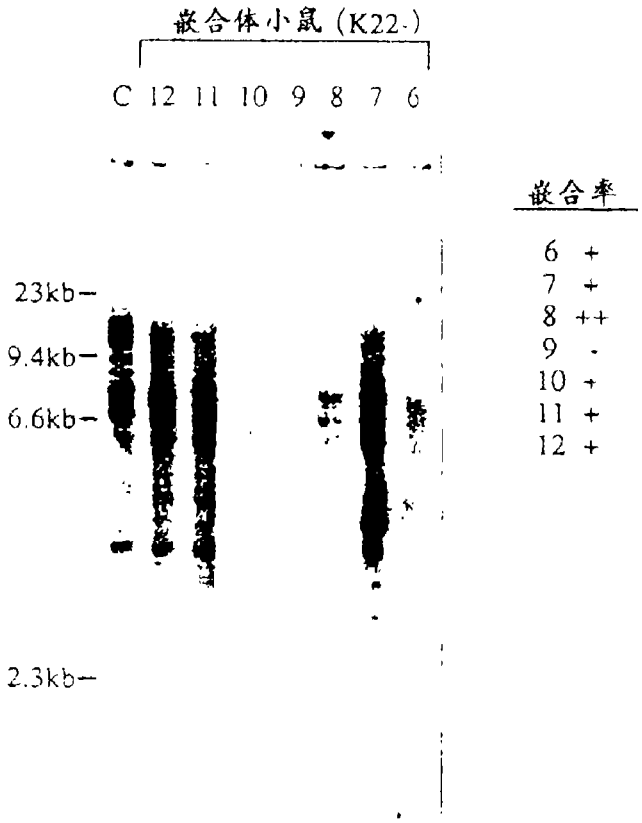
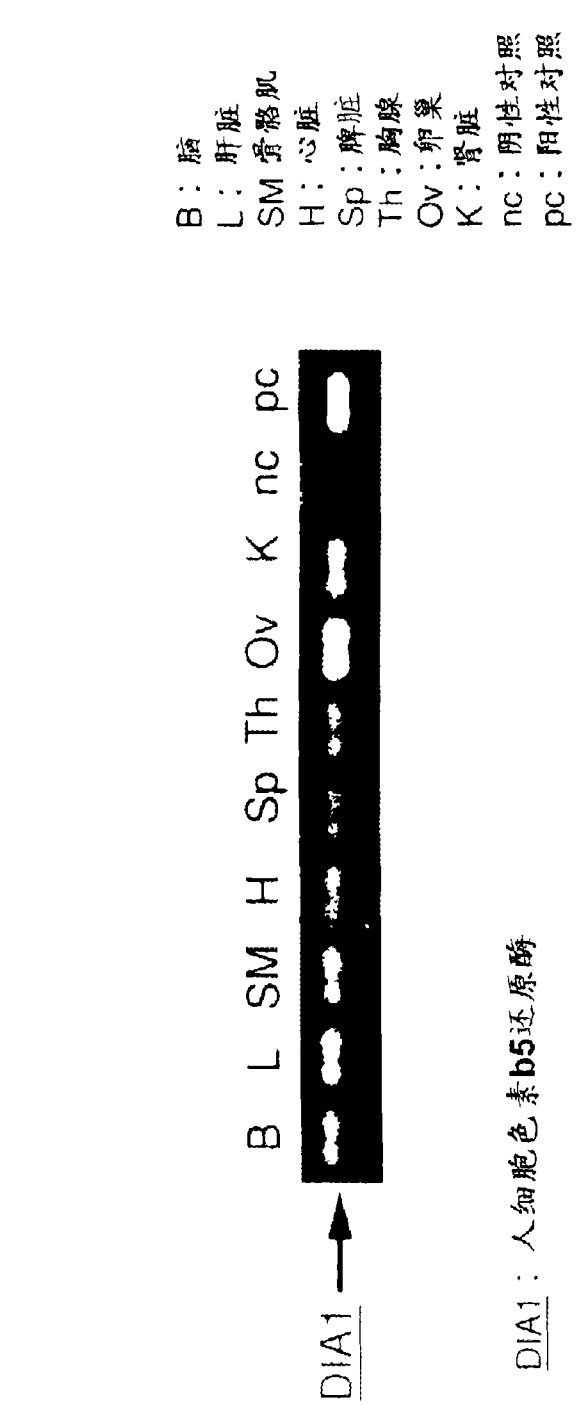


图 2 E14耐药株中人22号染色体(片段)的保持(PCR分析)



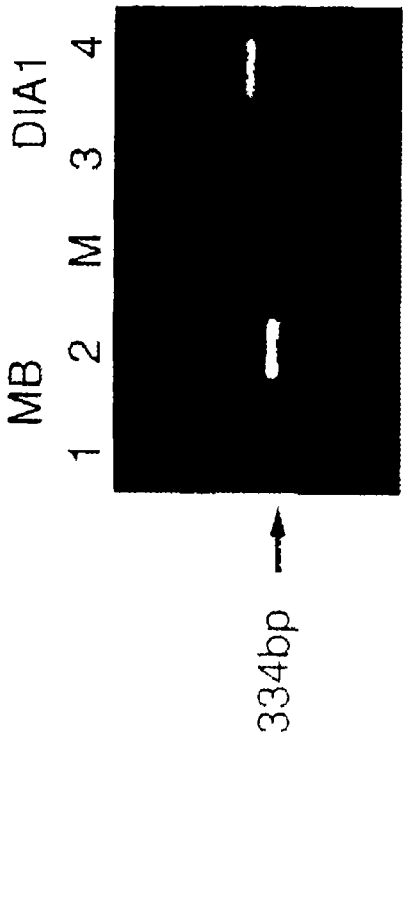
由导入了22号染色体的ES细胞而来的嵌合体小鼠中人L1序列的保持
(Southern分析)

图 3



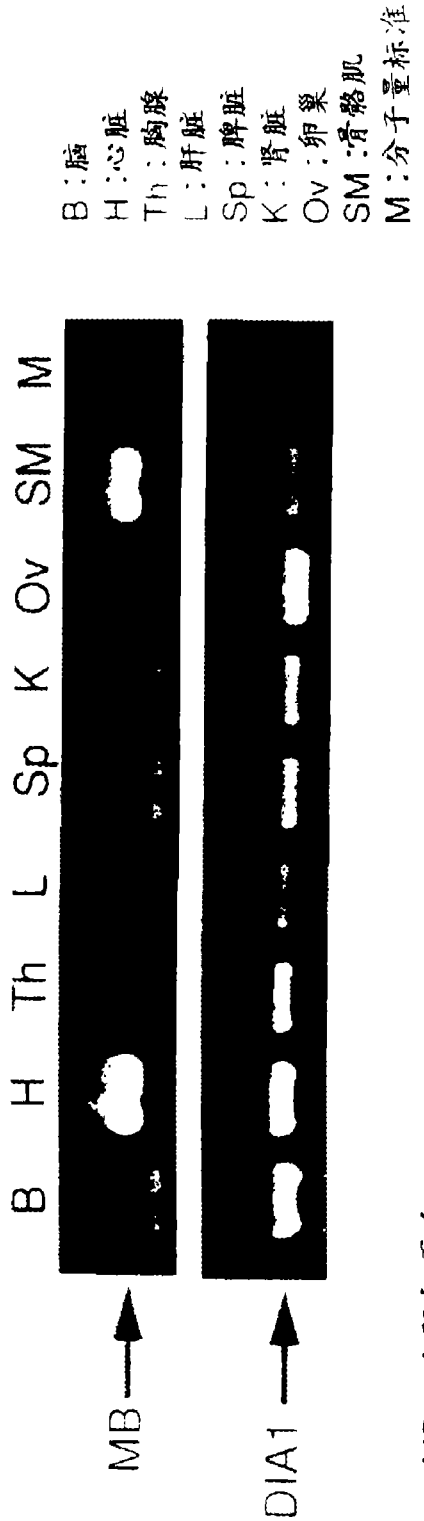
导入了人22号染色体的嵌合体小鼠脏器中人染色体的保持(PCR分析)

图 4



导入了22号染色体的嵌合体小鼠中人基因的表达

图 5

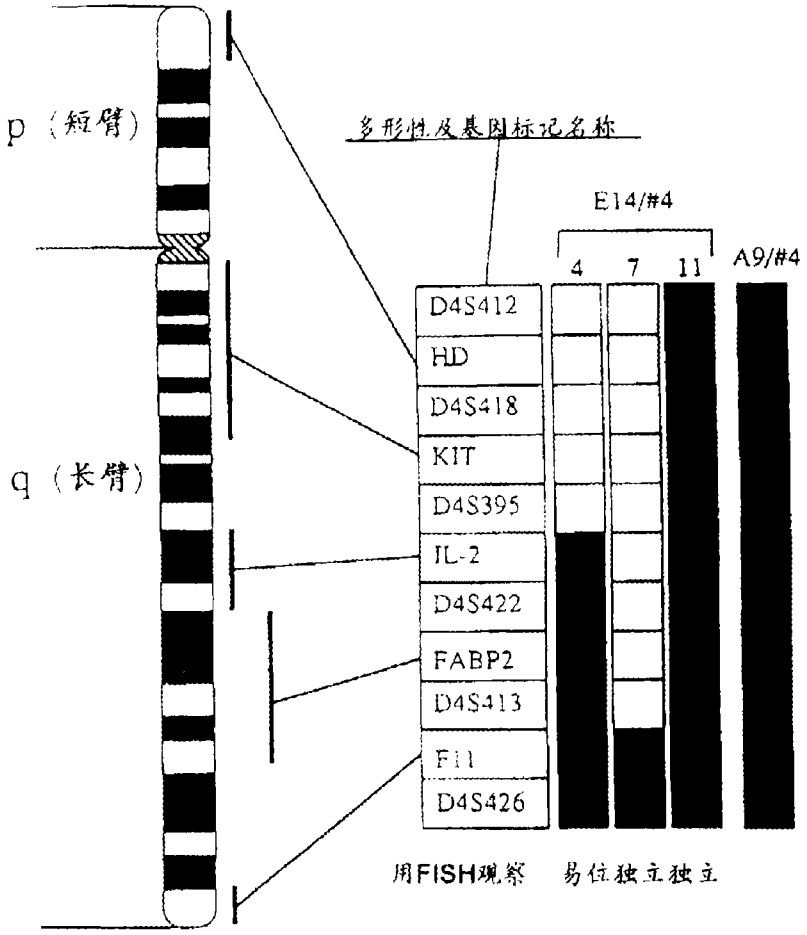


MB：人肌红蛋白

DIA1：人细胞色素b5还原酶

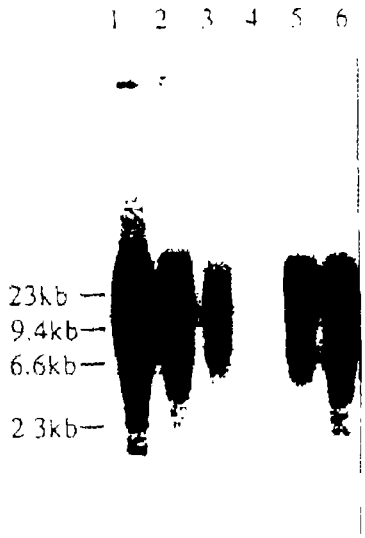
导入了22号染色体的嵌合体小鼠脏器中人基因的表达

图 6



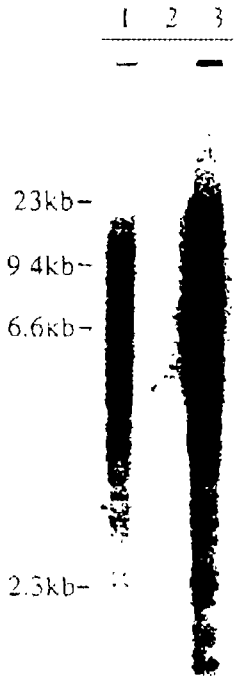
E14耐药株中人4号染色体(片段)的保持(PCR分析)

图 7



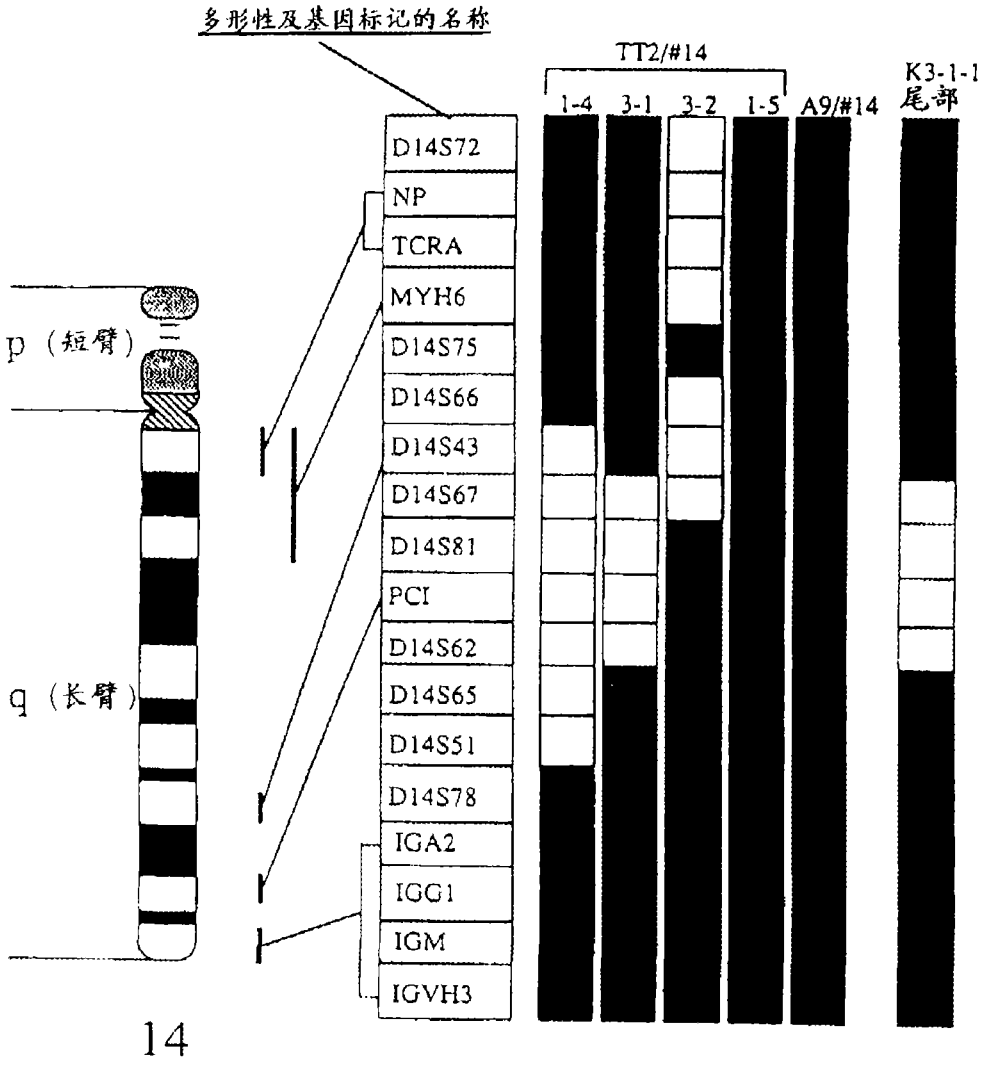
在导入了人4号染色体的E14细胞株中检测人L1序列(Southern 分析)

图 8



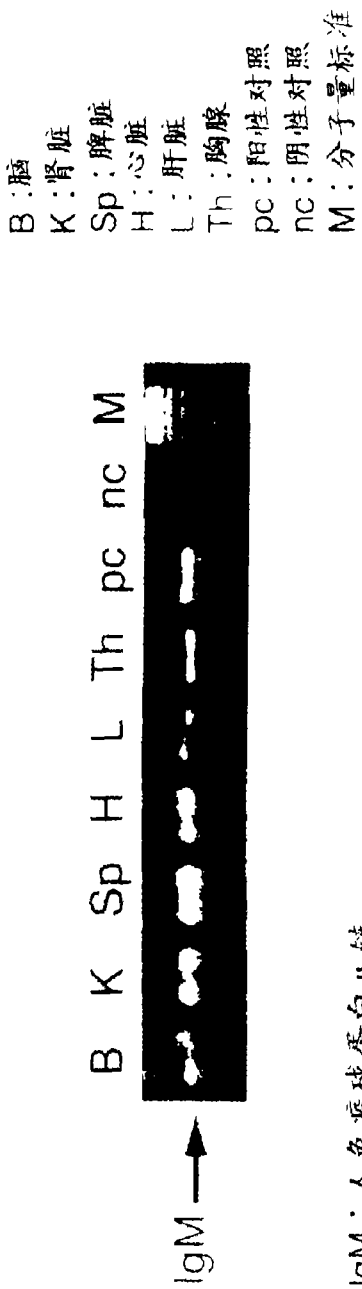
由导入了4号染色体的ES细胞而来的嵌合体小鼠中人L1序列的保持(Southern分析)

图 9



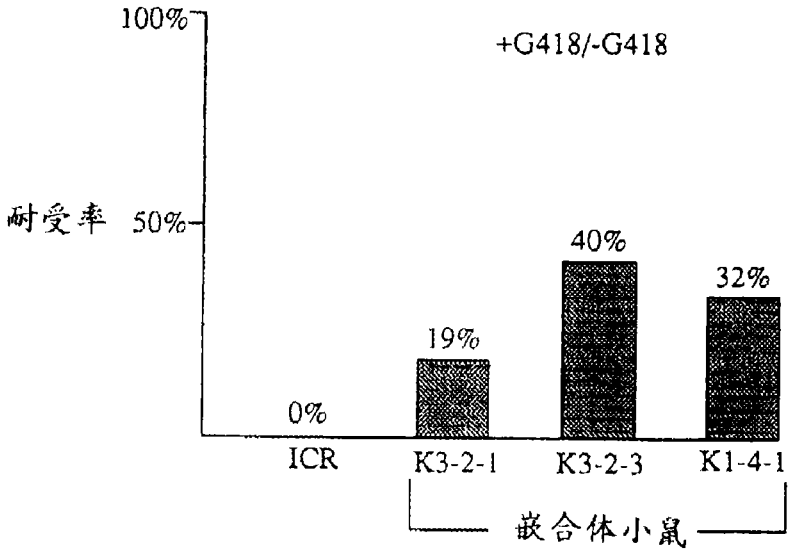
TT2耐药株中人14号染色体(片段)的保持(PCR分析)

图 10



导入了人14号染色体的嵌合体小鼠脏器中人染色体的保持(PCR分析)

图 11



尾部的纤维细胞对G418的耐受试验

图 12

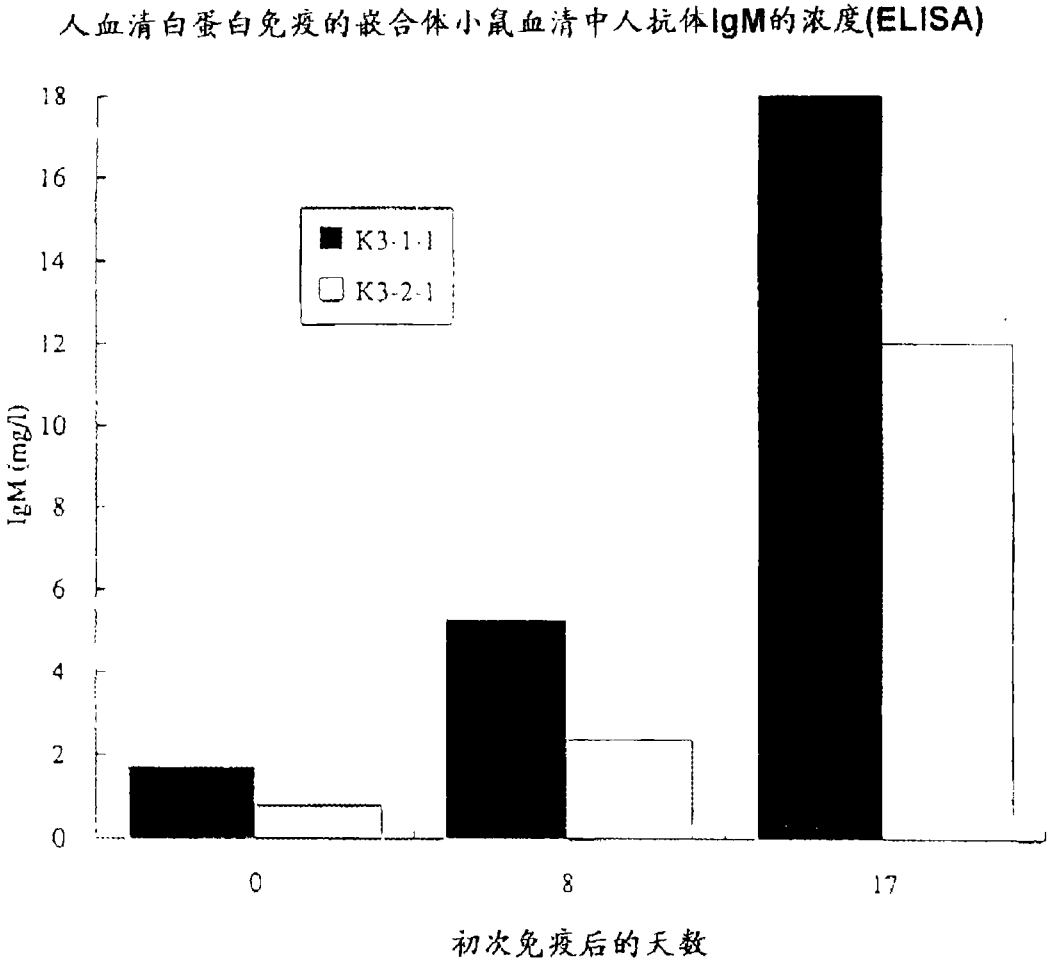

人血清白蛋白免疫的嵌合体小鼠血清中人抗体IgM的浓度(ELISA)
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
IgM (mg/l)
K3-1-1
K3-2-1
0
8
17
初次免疫后的天数

图 13

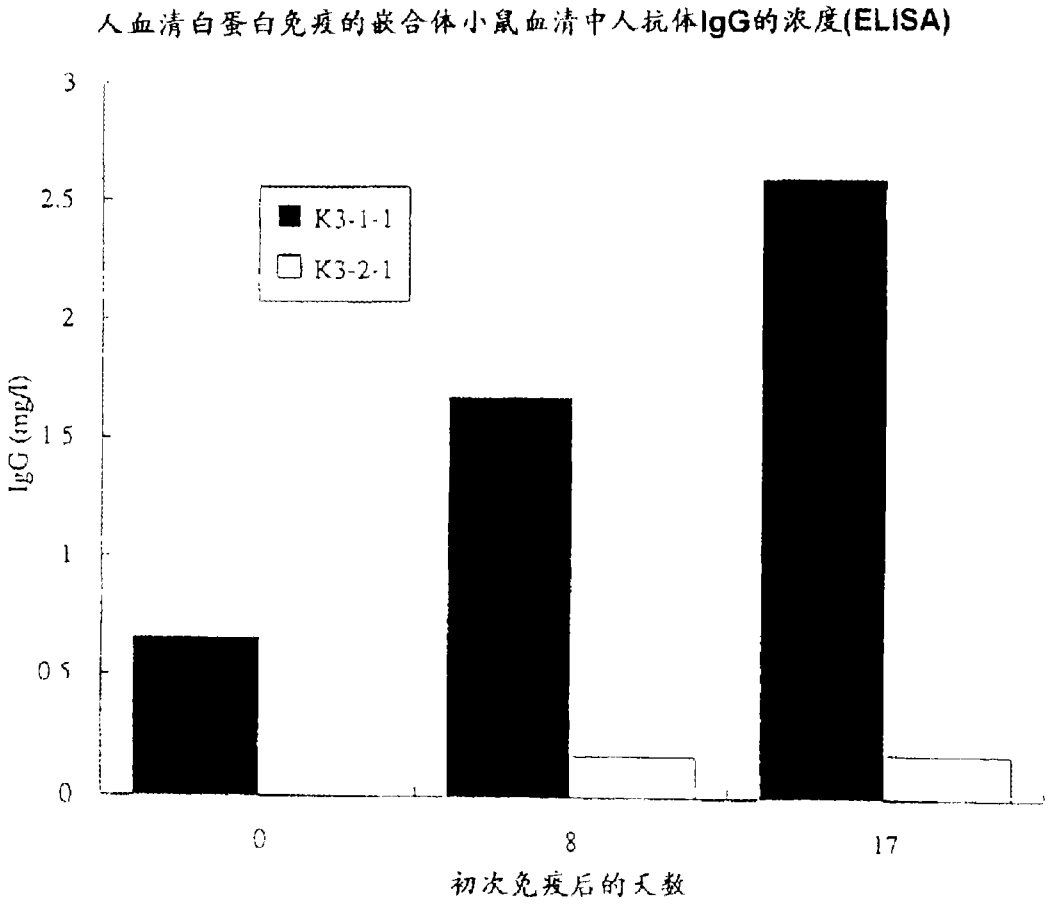

人血清白蛋白免疫的嵌合体小鼠血清中人抗体IgG的浓度(ELISA)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
IgG (mg/l)
K3-1-1
K3-2-1
0
8
17
初次免疫后的天数

图 14

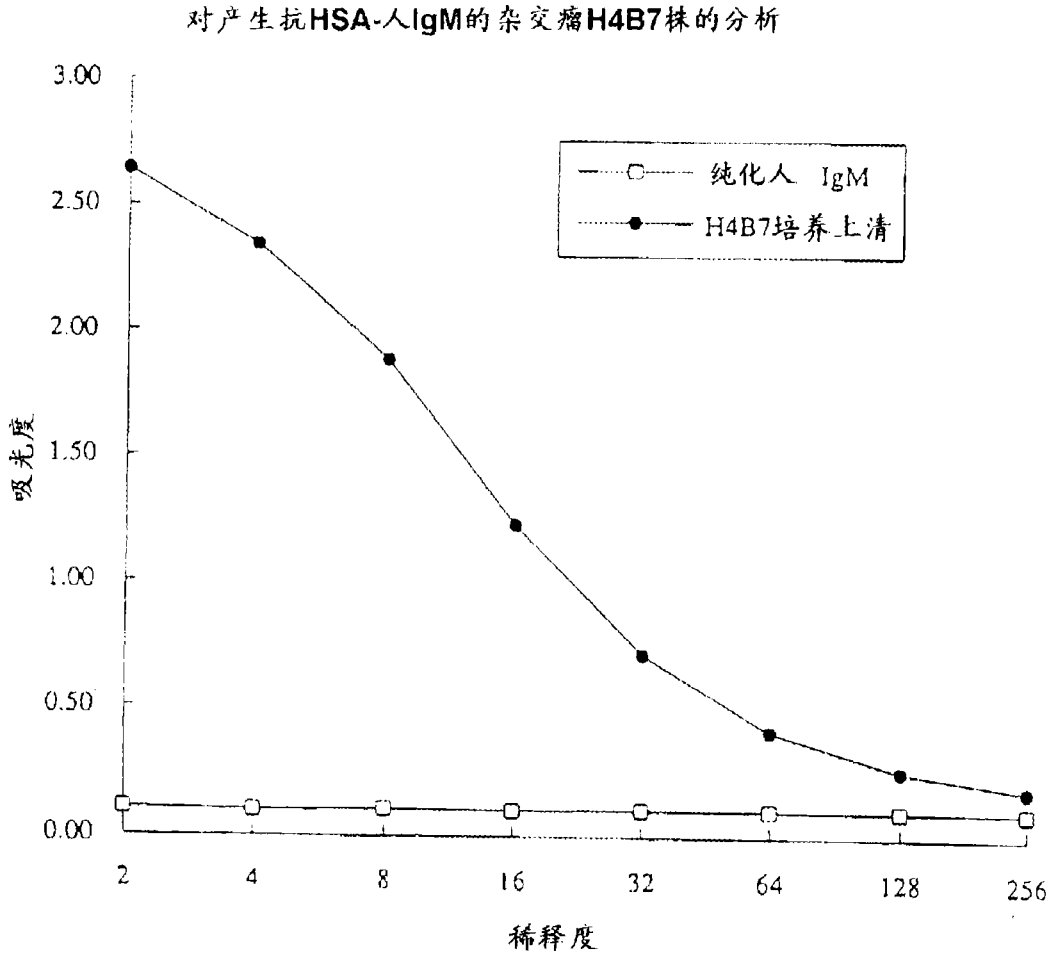

对产生抗HSA-人IgM的杂交瘤H4B7株的分析
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
吸光度
纯化人 IgM
H4B7培养上清
2
4
8
16
32
64
128
256
稀释度

图 15

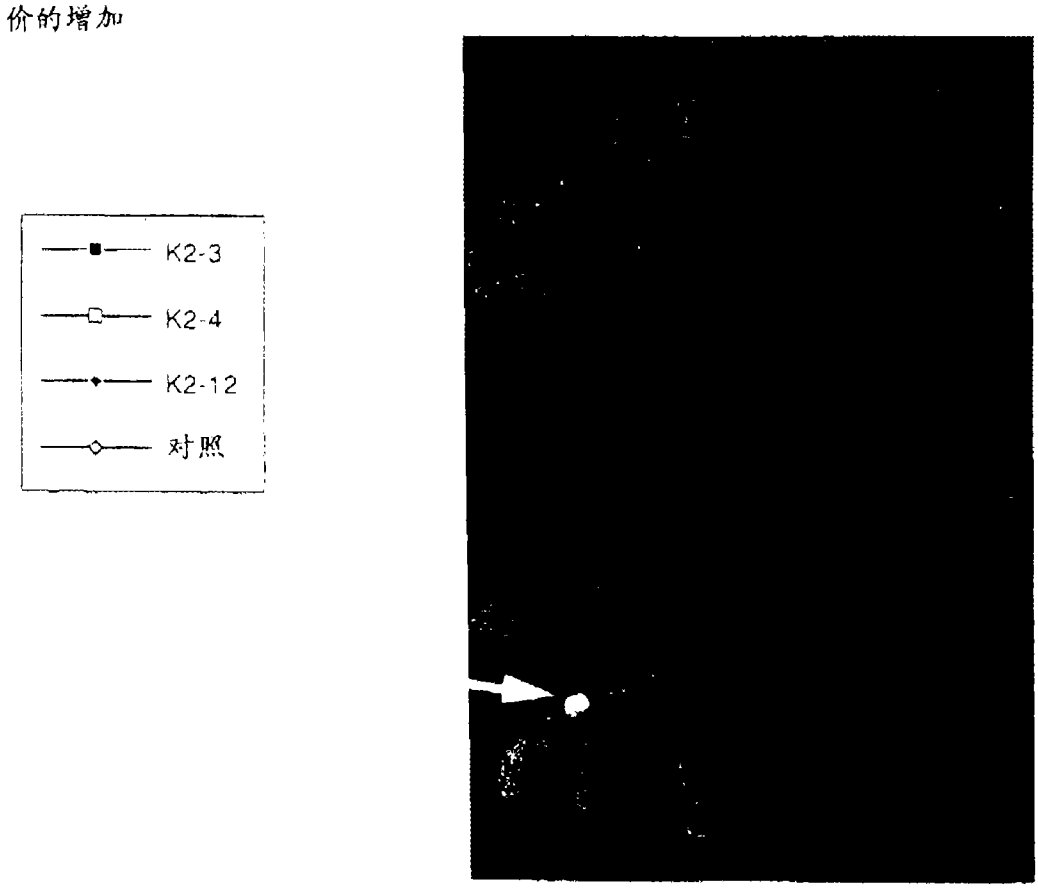


图 16

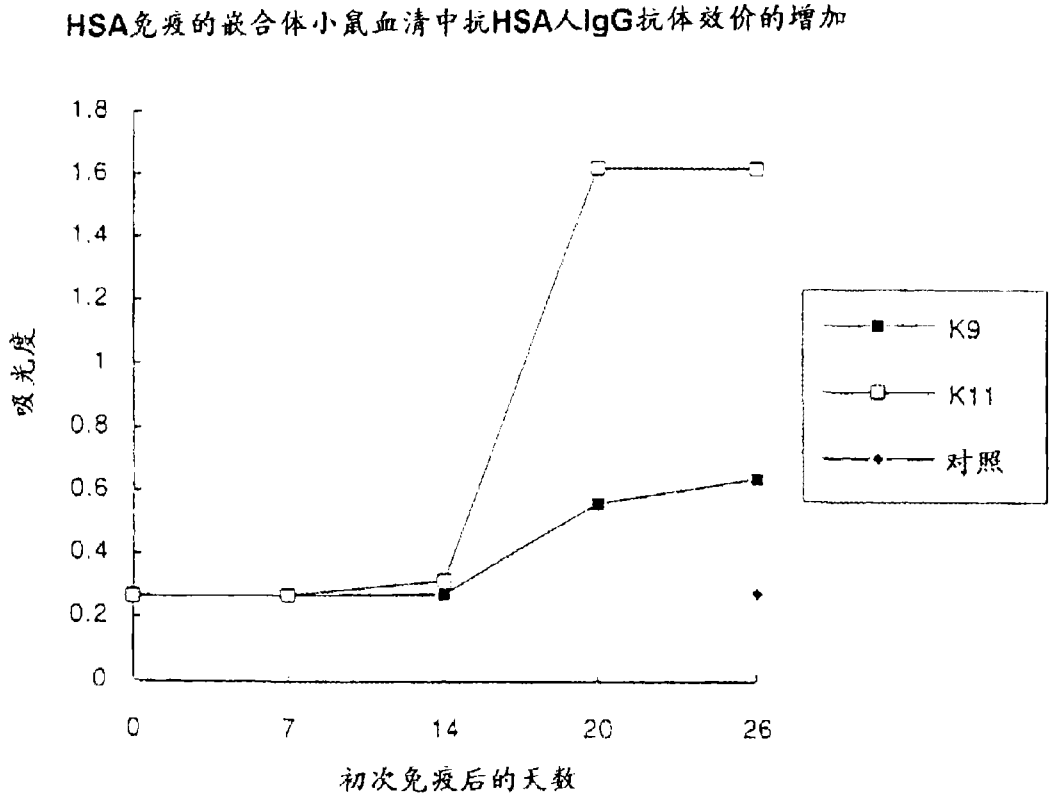

HSA免疫的嵌合体小鼠血清中抗HSA人IgG抗体效价的增加
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
吸光度
0
7
14
20
26
初次免疫后的天数
K9
K11
对照

图 17

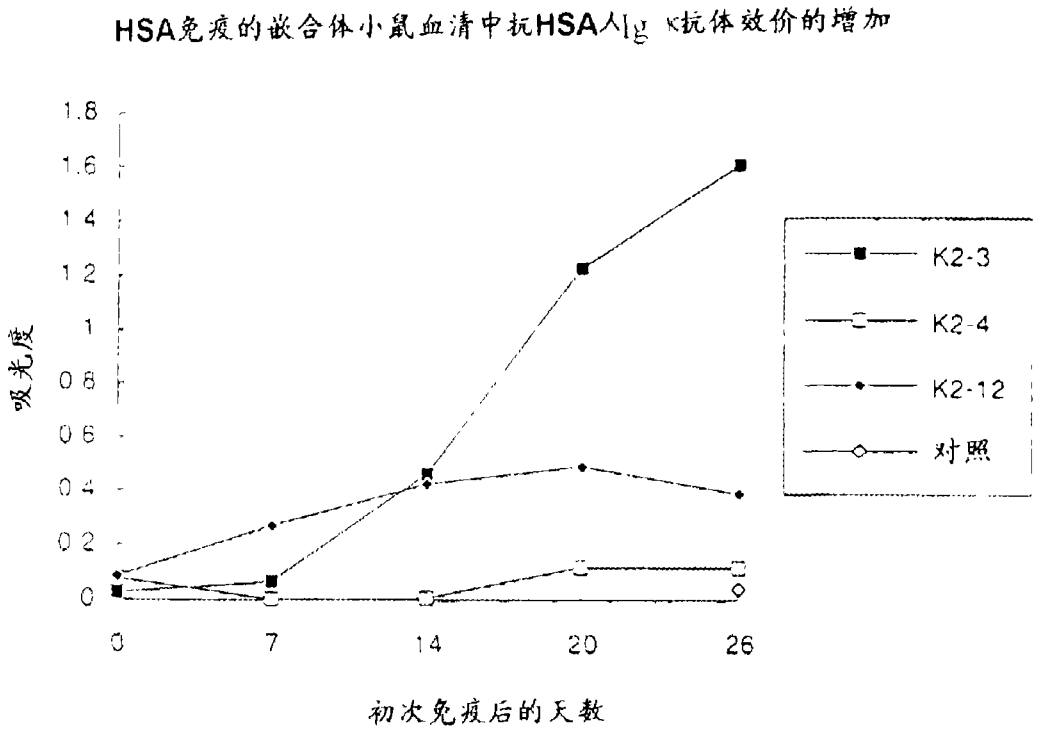

HSA免疫的嵌合体小鼠血清中抗HSA人Ig κ抗体效价的增加
吸光度
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
7
14
20
26
初次免疫后的天数
K2-3
K2-4
K2-12
对照

图 18

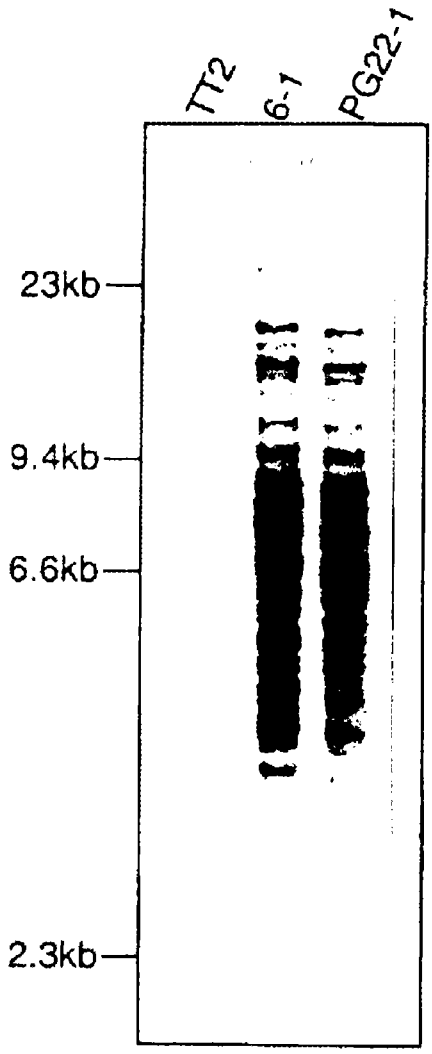


图 19

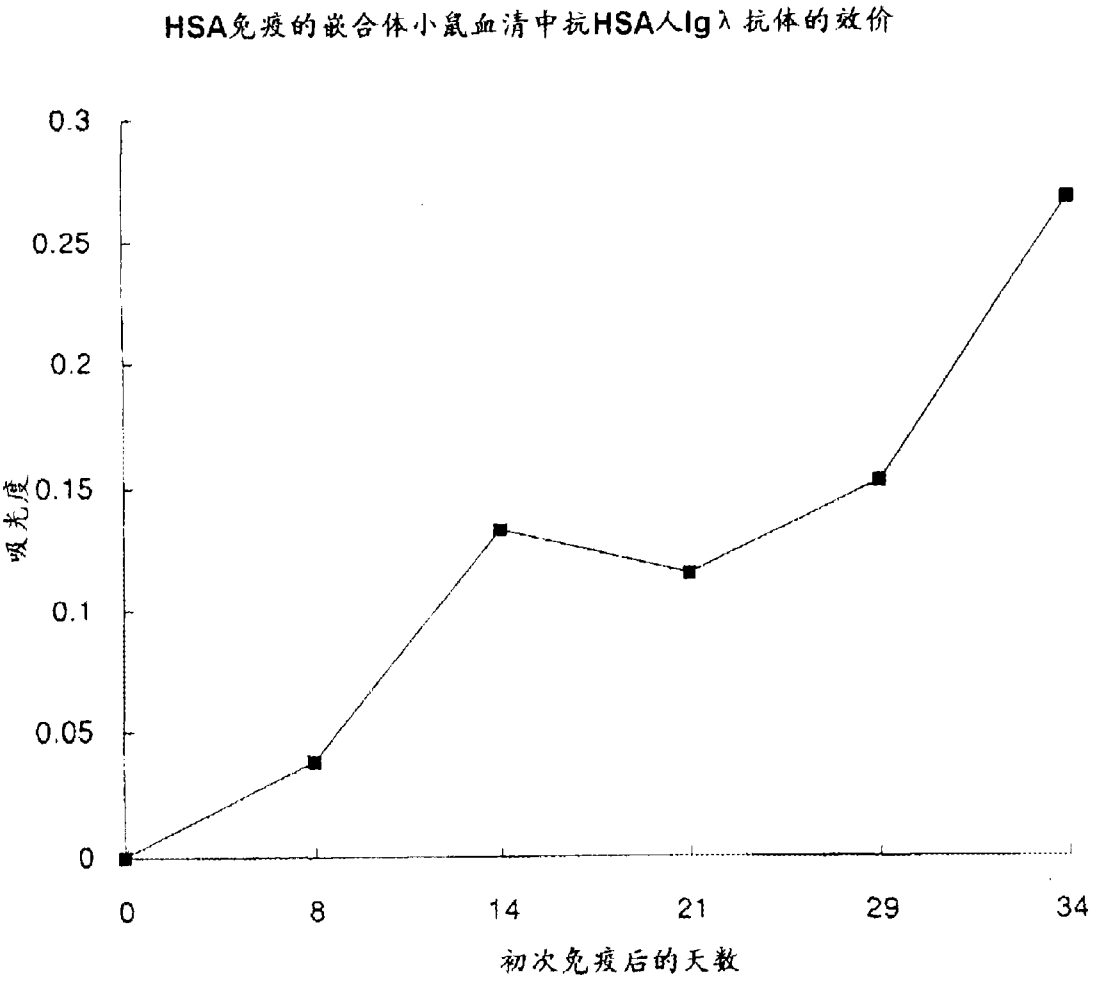
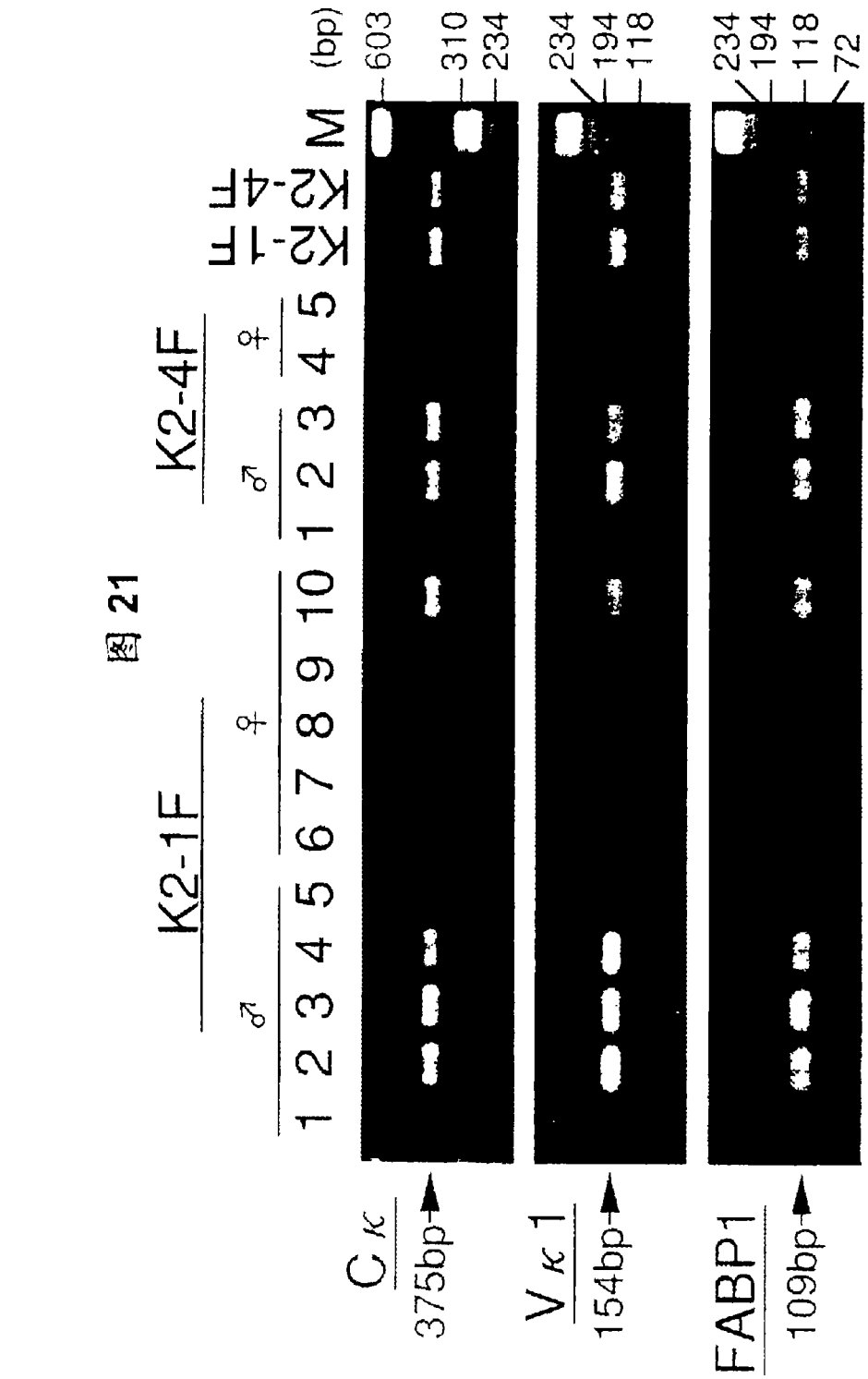
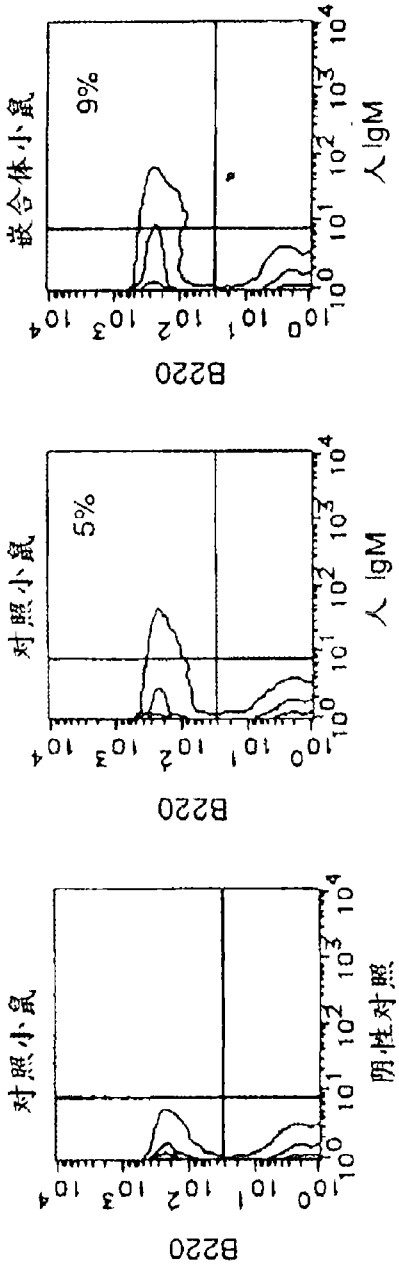

HSA免疫的嵌合体小鼠血清中抗HSA人Igλ抗体的效价
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
吸光度
0
8
14
21
29
34
初次免疫后的天数

图 20


图 21
K2-1F
K2-4F
♂
♀
♂
♀
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 1 2 3 4 5
K2-1F
K2-4F
M
(bp)
603
310
234
234
194
118
234
194
118
72
Cκ
375bp
Vκ1
154bp
FABP1
109bp



导入了人染色体的嵌合体小鼠脾脏细胞的分析

图 22

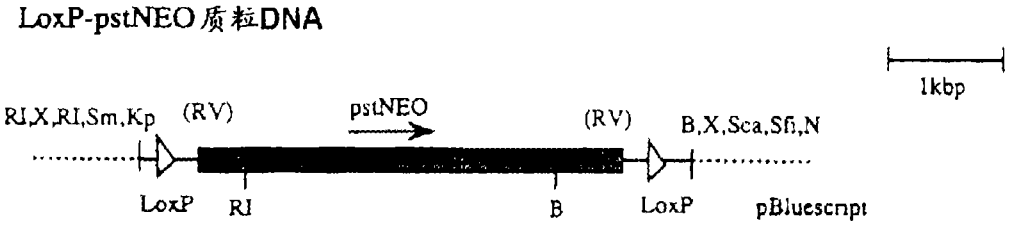

LoxP-pstNEO质粒DNA
1kbp
RI,X,RI,Sm,Kp
(RV)
pstNEO
(RV)
B,X,Sca,Sfi,N
LoxP
RI
B
LoxP
pBluescript

图 23

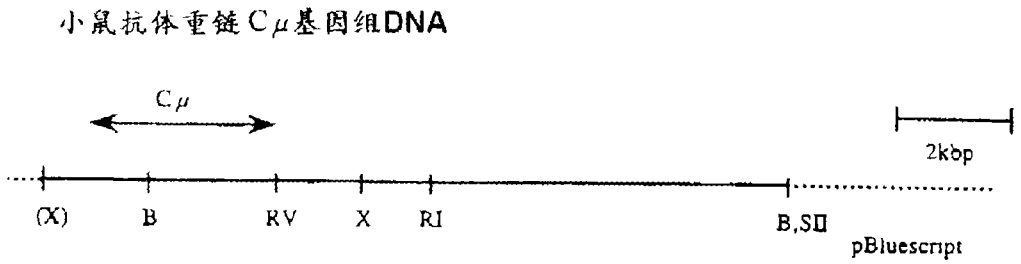

小鼠抗体重链Cμ基因组DNA
Cμ
2kbp
(X)
B
RV
X
RI
B,SII
pBluescript

图 24

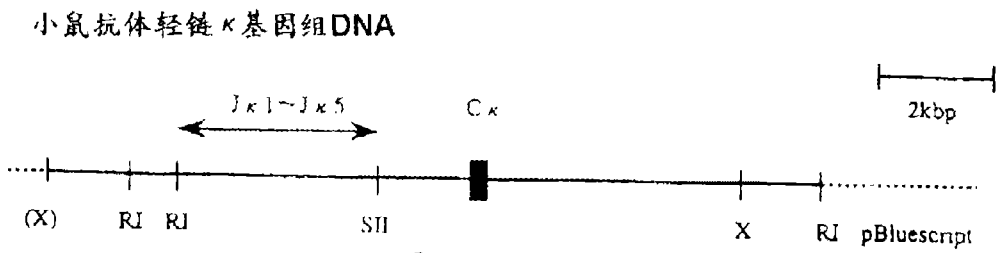

小鼠抗体轻链κ基因组DNA
Jκ1~Jκ5
Cκ
2kbp
(X)
RI
RI
SII
X
RI
pBluescript

图 25

小鼠抗体重链Cμ靶向载体和转化体TT2细胞基因组DNA Southern印迹分析时使用的探针和在同源重组体中可检测出的DNA片段

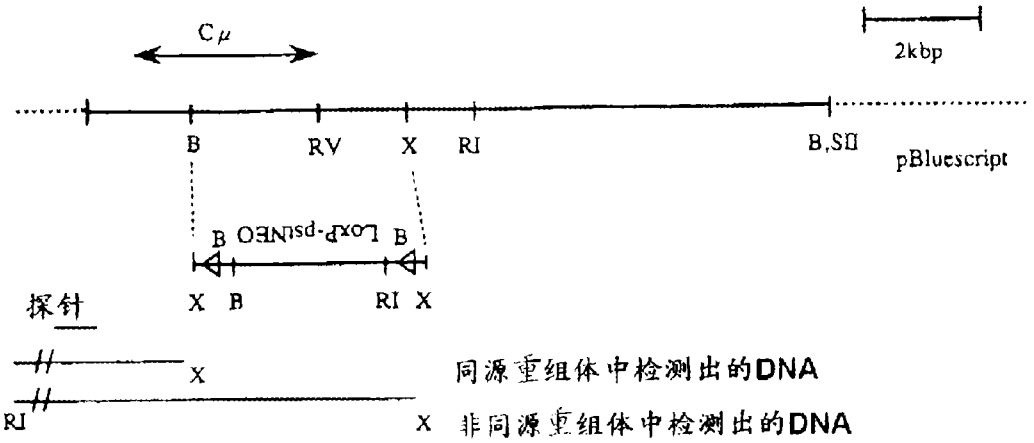
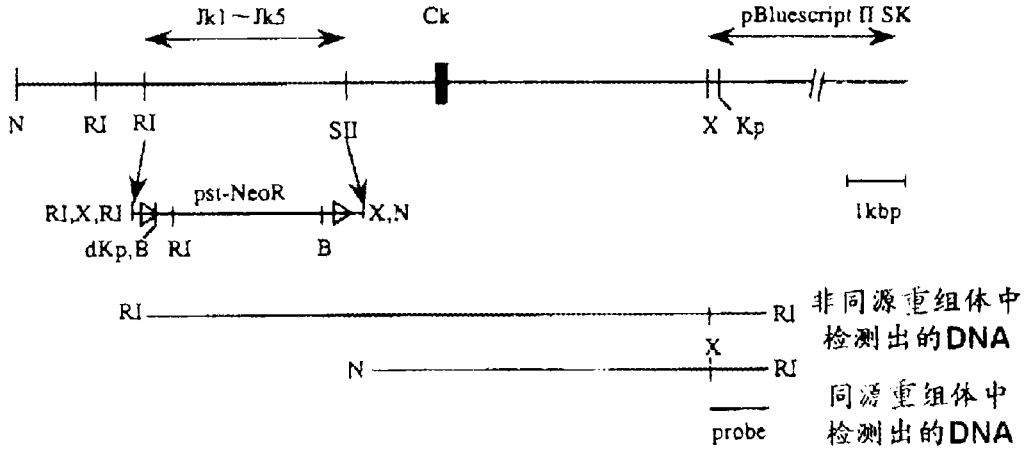


图 26

小鼠抗体轻链k靶向载体和转化体TT2(TT2F)细胞的基因组DNA进行Southern印迹分析时使用的探针和在同源重组体中可检测出的DNA片段



限制性酶：
Kp: KpnI, B: BamHI, RI: EcoRI, RV: EcoRV, N: NotI, SII: SacII, Sca: ScaI, Sfi: SfiI, Sm: SmaI
X: XhoI. (X)：来源于八载体的XhoI酶切部位
总线部分：pBluescript SKII(+)质粒DNA
◁▷ ：LoxP配列

图 27

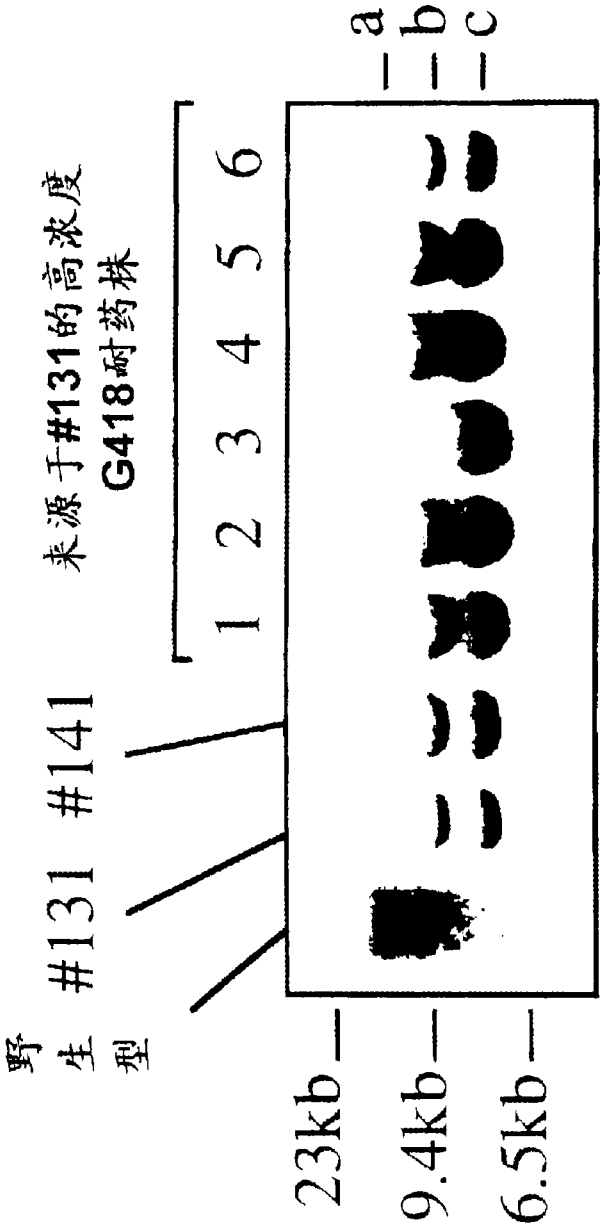


图 28