



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 112608939 A

(43) 申请公布日 2021.04.06

(21) 申请号 202011359691.6

(22) 申请日 2020.11.27

(71) 申请人 复旦大学附属肿瘤医院

地址 200032 上海市徐汇区东安路270号

(72) 发明人 王玉龙 于鹏程 余发星

(74) 专利代理机构 上海申新律师事务所 31272

代理人 郎祺

(51) Int.Cl.

C12N 15/85 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

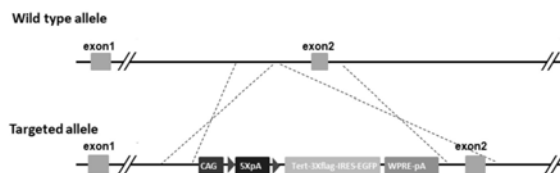
序列表2页 附图6页

(54) 发明名称

一种条件性mTERT过表达的小鼠模型的构建方法及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种条件性mTERT过表达的小鼠模型的构建方法及其应用。该构建方法包括：通过无缝克隆的技术构建打靶载体，该打靶载体包含3.3kb 5'同源臂、CAG启动子、loxP-stop-loxP、TERT-3XFlag-IRES-EGFP-WPRE-polyA和3.3kb 3'同源臂；将Cas9 mRNA、gRNA和上述打靶载体显微注射到野生型小鼠的受精卵中，获得F0代小鼠，并鉴定出同源重组阳性F0代小鼠，回交后繁育获得F1代小鼠，即为条件性mTERT过表达的小鼠模型。本发明提供的构建方法构建的小鼠可以与不同的Cre工具鼠交配，实现在全身各种组织器官、细胞类型中的特异性过表达。该鼠可以用于研究胚胎和神经发育、衰老、创伤修复、肿瘤发生发展和治疗的多种转基因模型造模，且与CreERT工具鼠的交配可以通过他莫昔芬控制TERT过表达的时间。



1. 一种条件性mTERT过表达的小鼠模型的构建方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤一,通过无缝克隆的技术构建打靶载体,所述打靶载体包含3.3kb 5'同源臂、CAG启动子、loxP-stop-loxP、TERT-3XFlag-IRES-EGFP-WPRE-polyA和3.3kb 3'同源臂;

步骤二,将Cas9 mRNA、gRNA和所述打靶载体显微注射到野生型小鼠的受精卵中,获得F0代小鼠,并鉴定出同源重组阳性F0代小鼠,回交后获得F1代小鼠,即为条件性mTERT过表达的小鼠模型。

2. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,所述gRNA的序列为SEQ ID NO.:1。

3. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,步骤二中所述鉴定采用的技术是长片段PCR技术。

4. 根据权利要求3所述的构建方法,其特征在于,所述长片段PCR技术采用的引物序列为SEQ ID NO.:2~SEQ ID NO.:5。

5. 根据权利要求3所述的构建方法,其特征在于,所述长片段PCR技术采用的反应体系包括ddH₂O、PrimeStar GXL PCR Buffer、dNTP、引物和基因组DNA,其中引物的浓度为20pmol/μl。

6. 根据权利要求3所述的构建方法,其特征在于,所述长片段PCR技术的反应程序为:

98	5 min	
98	10 sec	} 循环 34 次
68	15 sec	
68	5 min	
68	5 min	
12	∞	°

7. 如权利要求1-6任一项所述的构建方法在不同组织器官中特异性过表达mTERT中的应用,其特征在于,将所述构建方法构建的小鼠模型与对应的Cre小鼠交配。

一种条件性mTERT过表达的小鼠模型的构建方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其涉及一种条件性mTERT过表达的小鼠模型的构建方法及其应用。

背景技术

[0002] 人体多数正常分化组织内几乎无端粒酶活性,但90%以上的恶性肿瘤中都能检测到端粒酶活性,提示端粒酶在肿瘤发展的过程中具有重要作用。TERT mRNA表达水平与端粒酶活性呈正比,TERT(端粒酶逆转录酶)作为端粒酶的主要亚基之一,可以TERC(端粒酶RNA基因)为模板,通过与其他亚基的共同作用延长端粒。

[0003] TERT在肿瘤中存在多种激活途径。目前已有报道的有启动子点突变、拷贝数变异、表观遗传修饰、病毒整合、基因融合或重排等。脑胶质瘤、黑色素瘤、肺癌、肝癌、甲状腺癌等多种常见恶性肿瘤均存在TERT启动子突变。此外,TCGA数据库显示,肺癌、膀胱癌、卵巢癌等多种肿瘤均有TERT扩增。

[0004] TERT经典的功能为作为端粒酶的主要亚基之一,参与维持端粒长度。但近年来也有许多研究表明,TERT也具有不依赖端粒酶延长端粒功能的作用。缺少RT-domain的TERT,可通过MYC和WNT通路激活小鼠毛囊干细胞、促进上皮增殖。TERT在不依赖端粒酶活性的前提下,通过NF- κ B通路激活MMP家族蛋白表达,促进肿瘤的侵袭作用。TERT可参与FOXO3a蛋白的泛素化,影响ITGB1表达水平及细胞外基质,从而影响胃癌细胞的侵袭能力。此外,TERT可通过AKT、WNT等多条通路参与细胞周期、DNA修复、炎症反应等多种细胞功能,从而影响肿瘤的生物行为,也可通过与POL I/III的结合增强rRNA和tRNA的表达水平从而促进肿瘤增殖。但多数关于TERT对肿瘤发展的机制研究均是基于体外肿瘤细胞系,而这些细胞系多为永生化细胞系,其中很大一部分是通过不同途径激活了端粒酶的活性,从而避免了因为端粒缩短所导致的细胞衰老和死亡,在这种细胞系中,难以观察到TERT促进肿瘤细胞跨越“永生”和“恶性转化”屏障的动态作用和机制,通过体内观察TERT促进肿瘤发展的动态演变过程,有助于了解肿瘤的发展进程中的关键事件,从而为治疗提供靶点。同时体内研究肿瘤的发展过程,可同时研究肿瘤微环境的作用,包括免疫系统、血管内皮、间质细胞等在肿瘤进展中的作用,这些整体化的研究更有利于全面了解肿瘤的进展过程。

[0005] 既往有研究团队构建过K5-TERT小鼠,该小鼠可实现K5启动子驱动的mTERT过表达,但不能实现在K5阴性的组织中的TERT过表达,且不能控制mTERT开始过表达的时间。因此,我们构建了mTERT条件性过表达小鼠——首个条件性过表达mTERT的转基因小鼠,可以通过与不同Cre工具鼠交配得到不同组织中的MTERT过表达模型。

发明内容

[0006] 本发明针对现有技术的不足,提供了一种条件性mTERT过表达的小鼠模型的构建方法,构建了R26-e(CAG-LSL-Tert-3XFlag-IRES-EGFP)1条件性过表达小鼠模型。

[0007] 为实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0008] 本发明的第一方面是提供一种条件性mTERT过表达的小鼠模型的构建方法,包括如下步骤:

[0009] 步骤一,通过无缝克隆的技术构建打靶载体,该打靶载体包含3.3kb 5'同源臂、CAG启动子、loxP-stop-loxP-TERT-3XFlag-IRES-EGFP-WPRE-polyA和3.3kb 3'同源臂;

[0010] 步骤二,将Cas9 mRNA、gRNA和上述打靶载体显微注射到野生型小鼠的受精卵中,获得F0代小鼠,并鉴定出同源重组阳性F0代小鼠,回交后获得F1代小鼠,即为条件性mTERT过表达的小鼠模型。

[0011] 进一步地,上述gRNA的序列为(5'-3')GGGGACACACTAAGGGAGCT (SEQ ID NO.:1)。

[0012] 进一步地,步骤二中所述鉴定采用的技术是长片段PCR技术。

[0013] 进一步地,上述长片段PCR技术采用的引物序列如下:

[0014] Primer I (5'-3'):GCCGGGCCTCGTCGTCT (SEQ ID NO.:2);

[0015] Primer II (5'-3'):TTTTTGGGGGTGATGGTGGTC (SEQ ID NO.:3);

[0016] Primer III (5'-3'):CTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTAC (SEQ ID NO.:4);

[0017] Primer IV (5'-3'):GGGATCCATTGCCACCTTTCACTT (SEQ ID NO.:5)。

[0018] 进一步地,上述长片段PCR技术采用的反应体系包括ddH₂O、PrimeStar GXL PCR Buffer、dNTP、引物和基因组DNA,其中引物的浓度为20pmol/μl。

[0019] 进一步地,上述长片段PCR技术的反应程序为:

[0020]

98	5 min	
98	10 sec	} 循环 34 次
68	15 sec	
68	5 min	
68	5 min	
12	∞	

[0021] 本发明的第二方面是提供上述构建方法在不同组织器官中特异性过表达mTERT中的应用,将上述构建方法构建的小鼠模型与对应的Cre小鼠交配。

[0022] 本发明采用以上技术方案,与现有技术相比,具有如下技术效果:

[0023] 本发明提供的构建方法构建的小鼠可以与不同的Cre工具鼠交配,实现在全身各种组织器官、细胞类型中的特异性过表达。该鼠可以用于研究胚胎和神经发育、衰老、创伤修复、肿瘤发生发展和治疗的多种转基因模型造模,且与CreERT工具鼠的交配可以通过他莫昔芬控制TERT过表达的时间。

附图说明

[0024] 图1为本发明一实施例中构建条件性mTERT过表达的小鼠模型的策略示意图;

[0025] 图2为本发明一实施例中打靶质粒载体的图谱;

[0026] 图3为本发明一实施例中对F0代小鼠的PCR鉴定电泳图,其中maker左侧为5'同源臂鉴定结果,右侧为3'同源臂鉴定结果;

[0027] 图4为本发明一实施例中F1代小鼠的PCR鉴定电泳图;其中,图A为采用引物P1和P2

扩增的结果,图B是采用引物P3和P4扩增的结果;“HE”表示杂合子,“WT”表示野生型,“M”表示marker;

[0028] 图5为本发明一实施例中条件性mTERT过表达的小鼠与TP0-CreERT2工具鼠交配得到的后代的qPCR鉴定结果;

[0029] 图6为本发明一实施例中条件性mTERT过表达的小鼠与TP0-CreERT2工具鼠交配得到的后代的IHC鉴定结果;

[0030] 图7为本发明一实施例中条件性mTERT过表达的小鼠与Alb-Cre工具鼠交配得到的后代的IHC鉴定结果,其中,图A、B分别为交配后代和条件性mTERT过表达的小鼠的结果;

[0031] 图8为本发明一实施例中条件性mTERT过表达的小鼠与BRF^{CA/+};

[0032] TP0-CreER^{T2}工具鼠交配得到的后代甲状腺超声结果;

[0033] 图9为本发明一实施例中条件性mTERT过表达的小鼠与BRF^{CA/+};

[0034] TP0-CreER^{T2}工具鼠交配得到的后代甲状腺的HE染色结果;

[0035] 图10为本发明一实施例中条件性mTERT过表达的小鼠与BRF^{CA/+};

[0036] TP0-CreER^{T2}工具鼠交配得到的后代肺的HE染色结果,其中,图A、B分别表示不同视野中肺转移灶。

具体实施方式

[0037] 本发明提供了一种条件性mTERT过表达的小鼠模型的构建方法及其应用。本发明提供的小鼠模型因loxP-stop-loxP表达框的存在阻止了下游目的基因TERT的转录,而目的基因TERT的表达部位及效率,取决于Cre表达的组织类型和效率。具体为,TERT基因Rosa26位点条件性过表达小鼠与Cre小鼠交配后,在其后代双阳性小鼠中,Cre表达的组织 and 细胞类型,loxP-stop-loxP表达框将被敲除,目的基因TERT在CAG启动子的驱动下,实现高表达。综上,上述构建方法构建的小鼠可以用于研究胚胎和神经发育、衰老、创伤修复、肿瘤发生发展和治疗的多种转基因模型造模。

[0038] 下面通过具体实施例和附图对本发明进行详细和具体的介绍,以使更好的理解本发明,但是下述实施例并不限制本发明范围。

[0039] 实施例中方法如无特殊说明的采用常规方法,使用的试剂如无特殊说明的使用常规市售试剂或按常规方法配制的试剂。

[0040] 实施例1

[0041] 参考图1,本实施例提供一种条件性mTERT过表达的小鼠模型的构建方法,该方法采用CRISPR/Cas9技术,通过同源重组的方式,在Rosa26基因位点定点插入CAG-LSL-Tert-3XFlag-IRES-EGFP-wpre-polyA表达框,具体的步骤如下:

[0042] 步骤一,通过无缝克隆的技术构建打靶载体,该打靶载体包含3.3kb 5'同源臂、CAG启动子、loxP-stop-loxP、TERT-3XFlag-IRES-EGFP-WPRE-polyA和3.3kb 3'同源臂;

[0043] 步骤二,将Cas9 mRNA、gRNA和上述打靶载体显微注射到C57BL/6J小鼠的受精卵中,获得F0代小鼠,并鉴定出同源重组阳性F0代小鼠,即为条件性mTERT过表达的小鼠模型。

[0044] 其中,上述gRNA的序列为(5'-3')GGGGACACACTAAGGGAGCT (SEQ ID NO.:1);打靶质粒载体的图谱如图2所示各个元件对应的名称如下表1所示。

[0045] 表1打靶质粒载体中的元件信息

[0046]

元件	名称
Amp	氨苄抗性筛选基因
5'arm	5'同源臂
CAG promoter	CAG 启动子（哺乳动物细胞中表达的强启动子）
PolyA	多聚腺苷酸加尾信号
WPRE	woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element (WPRE, 用于增强 RNA 转录的稳定性)
3'arm	3'同源臂

[0047] 发明人通过上述方法构建出25只F0代小鼠,通过长片段PCR的方式,对F0代小鼠的基因型进行鉴定,PCR结果经测序确认,共获得5只正确同源重组的阳性F0代小鼠(如图3所示)。

[0048] 其中,该长片段PCR采用的引物序列如下:

[0049] Primer I (5' -3') :GCCGGGCCTCGTCGTCT (SEQ ID NO.:2) ;

[0050] Primer II (5' -3') :TTTTTGGGGGTGATGGTGGTC (SEQ ID NO.:3) ;

[0051] Primer III (5' -3') :CTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTAC (SEQ ID NO.:4) ;

[0052] Primer IV (5' -3') :GGGATCCATTGCCACCTTTCACTT (SEQ ID NO.:5) 。

[0053] 该长片段PCR的反应体系如下:

[0054]

组分	体积 (μl)
ddH ₂ O	31
PrimeStar GXL PCR Buffer	10
2.5 mM dNTP	4
正向引物 (20pmol/μl)	1
反向引物 (20pmol/μl)	1
PrimeStar GXL DNA Polymerase*	2
基因组 DNA	1
总计	50

[0055] *PrimeStar GXL (TaKaRa, 产品型号:R050A)

[0056] 该长片段PCR采用的反应程序如下:

98 5 min
 98 10 sec
 68 15 sec } 循环 34 次
 68 5 min
 68 5 min
 12 ∞

[0058] 实施例2

[0059] 本实施例将实施例1中F0代阳性小鼠与野生型C57BL/6J小鼠交配,繁育获得F1代小鼠,对F1代经PCR鉴定及测序确认为阳性(图4,其中,突变型:617bp,杂合型:617bp和192bp,野生型:192bp),其中,该PCR鉴定采用的引物序列如下:

[0060] P1 (5' -3') : TCAGATTCTTTTATAGGGGACACA (SEQ ID NO.:6);

[0061] P2 (5' -3') : TAAAGGCCACTCAATGCTCACTAA (SEQ ID NO.:7);

[0062] P3 (5' -3') : GGTGTTGTCTGGGGAAATCATCGTC (SEQ ID NO.:8);

[0063] P4 (5' -3') : AGGAGCCTGCCAAGTAAC (SEQ ID NO.:9)。

[0064] 采用的反应体系如下:

反应组分	体积 (μl)
ddH ₂ O	14.9
10×Taq PCR Buffer	2
2.5mM dNTP	1
P1 (10pmol/μl)	0.5
P2 (10pmol/μl)	0.5
Taq DNA Polymerase*	0.1
基因组DNA	1
总计	20
ddH ₂ O	14.9
10×Taq PCR Buffer	2
2.5mM dNTP	1
P3 (10pmol/μl)	0.5
P4 (10pmol/μl)	0.5
Taq DNA Polymerase*	0.1
基因组DNA	1
总计	20

[0066] *PrimeStar GXL (TaKaRa, 产品型号:R050A)

[0067] 采用的反应程序如下:

[0068]	94	5 min	}	循环 34 次
	94	30 sec		
	60	30 sec		
	72	1 min		
	72	1 min		
	12	∞		

[0069] 实施例3

[0070] 本实施例采用条件性mTERT过表达的小鼠与TP0-CreERT2工具鼠交配后,并通过qPCR和Anti-Flag IHC验证其后代mTERT过表达。

[0071] 1.使用Trizol法提取小鼠甲状腺组织的总RNA,使用全式金反转录试剂盒反转录,使用TAKARA SYBR Green qPCR试剂进行TERT mRNA表达水平的检测,其中,qPCR采用的引物如下:

[0072] F (5' -3'):TCAAACCCAGAACACGTAC (SEQ ID NO.:10);

[0073] R (5' -3'):GCACATGAAGCGTAGGAAGAC (SEQ ID NO.:11)。

[0074] qPCR的结果如图5所示。由结果可知,mTERT mRNA水平过表达。

[0075] 2.对TERT;TP0-CreER^{T2}腹腔注射他莫昔芬诱导后2周后,取其甲状腺连同气管进行石蜡包埋。使用3-5um厚的石蜡切片,65℃烘箱1h,二甲苯、梯度酒精水化,使用柠檬酸钠缓冲液进行抗原热修复,使用3%H₂O₂封闭内源性过氧化物酶,3%BSA封闭,anti-flag一抗4℃过夜后,TBST洗5min*3次,二抗室温1h,TBST洗5min*3次,DAB显色,苏木素复染,脱水封片。如图6可知,mTERT-3xflag蛋白水平过表达。

[0076] 实施例3

[0077] 本实施例采用条件性mTERT过表达的小鼠与Alb-Cre工具鼠交配后,并通过Anti-Flag IHC (操作步骤如实施例2) 验证其后代是否mTERT过表达。

[0078] 如图7所示,mTERT-3xflag蛋白水平在肝内过表达。

[0079] 实施例4

[0080] 本实施例采用条件性mTERT过表达的小鼠与BRAF^{CA/+};TP0-CreER^{T2}工具鼠交配后,并通过甲状腺超声和甲状腺、肺HE染色验证确定获得了伴肺转移的低分化甲状腺癌模型(如图8~10)。

[0081] 其中,使用vevo 2100小动物超声仪进行观测;图8为BRAF^{CA/+};Rs26-mTert^{LSL/+};TP0-CreER^{T2}小鼠12月龄时甲状腺肿瘤的超声图像。

[0082] HE染色的步骤如下:取3-5um厚的石蜡切片,65℃烘箱1h,二甲苯、梯度酒精水化;或取-80℃保存的10um冰冻切片,苏木素染色、分化返蓝,85%、95%酒精处理后,伊红染色,100%酒精,二甲苯透明、封片。其中,图9为BRAF^{CA/+};Rs26-mTert^{LSL/+};TP0-CreER^{T2}小鼠12月龄时甲状腺肿瘤的冰冻切片HE染色,图10为BRAF^{CA/+};Rs26-mTert^{LSL/+};TP0-CreER^{T2}小鼠12月龄时肺转移灶的石蜡切片HE染色。

[0083] 以上对本发明的具体实施例进行了详细描述,但其只是作为范例,本发明并不限制于以上描述的具体实施例。对于本领域技术人员而言,任何对本发明进行的等同修改和

替代也都在本发明的范畴之中。因此,在不脱离本发明的精神和范围下所作的均等变换和修改,都应涵盖在本发明的范围内。

序列表

<110> 复旦大学附属肿瘤医院

<120> 一种条件性mTERT过表达的小鼠模型的构建方法及其应用

<160> 9

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

ggggacacac taaggagct 20

<210> 2

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

gccgggcctc gtcgtct 17

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

tttttggggg tgatggtggt c 21

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

ctgcgcggga cgtccttctg ctac 24

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

gggatccatt gccacctttc actt 24

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

tcagattctt ttatagggga caca 24

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

taaaggccac tcaatgctca ctaa 24

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

ggtgttgtcg gggaaatcat cgtc 24

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

aggagcctgc caagtaac 18

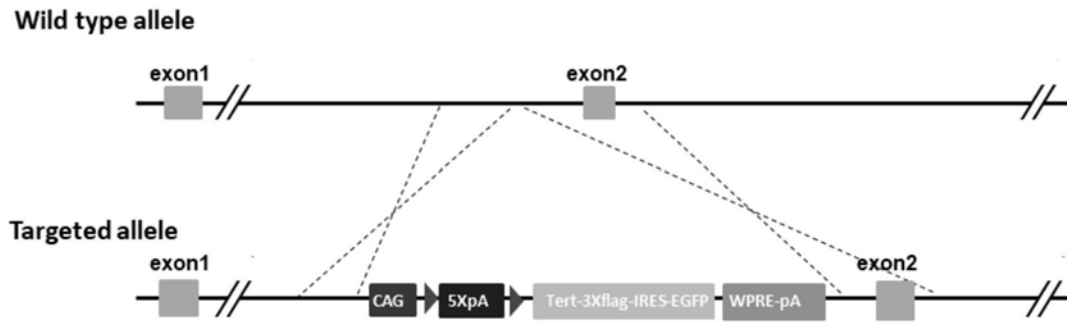


图1

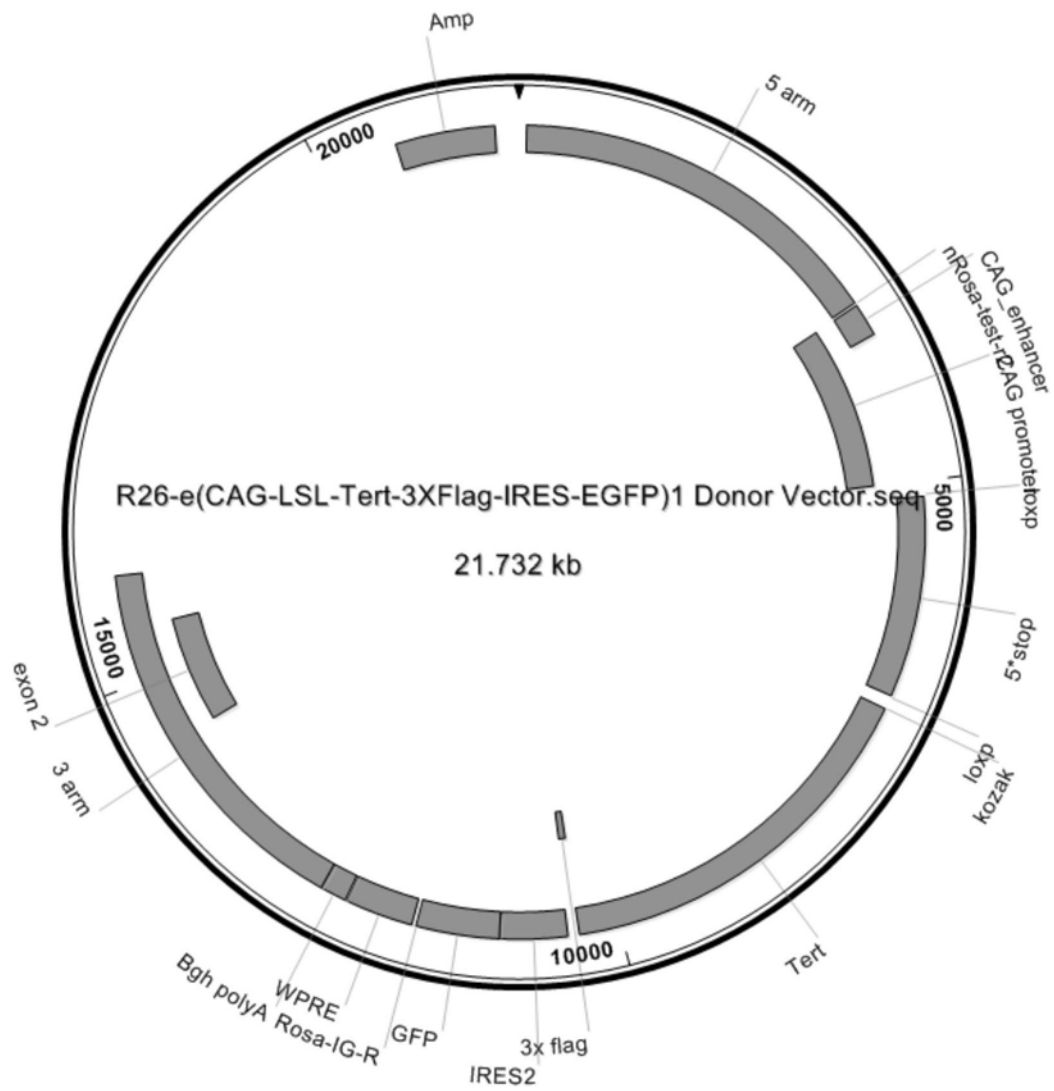


图2

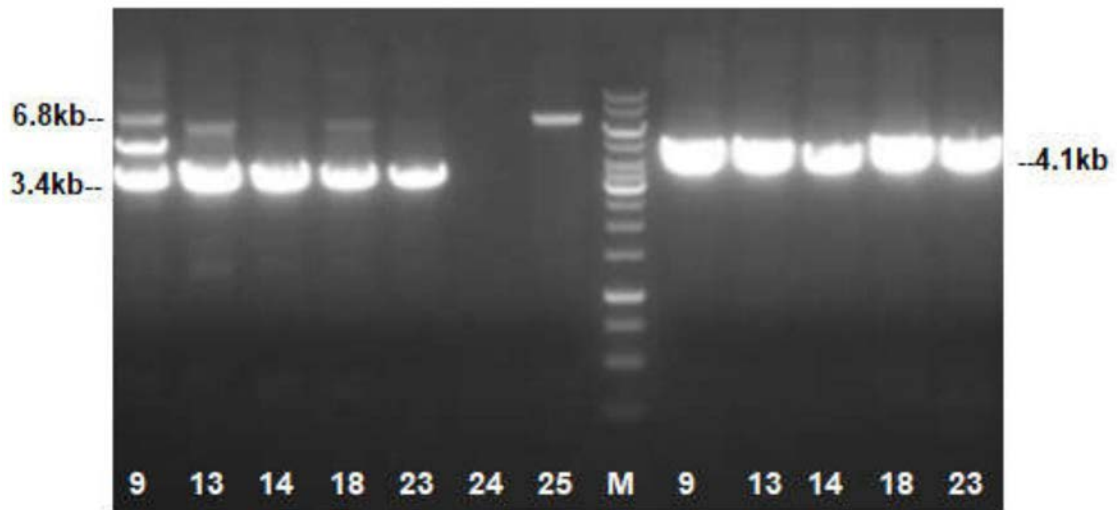


图3

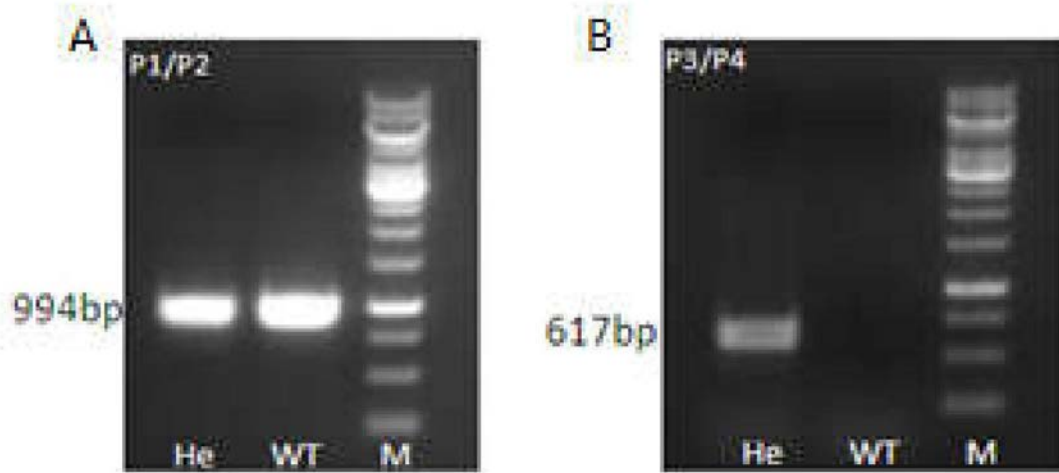


图4

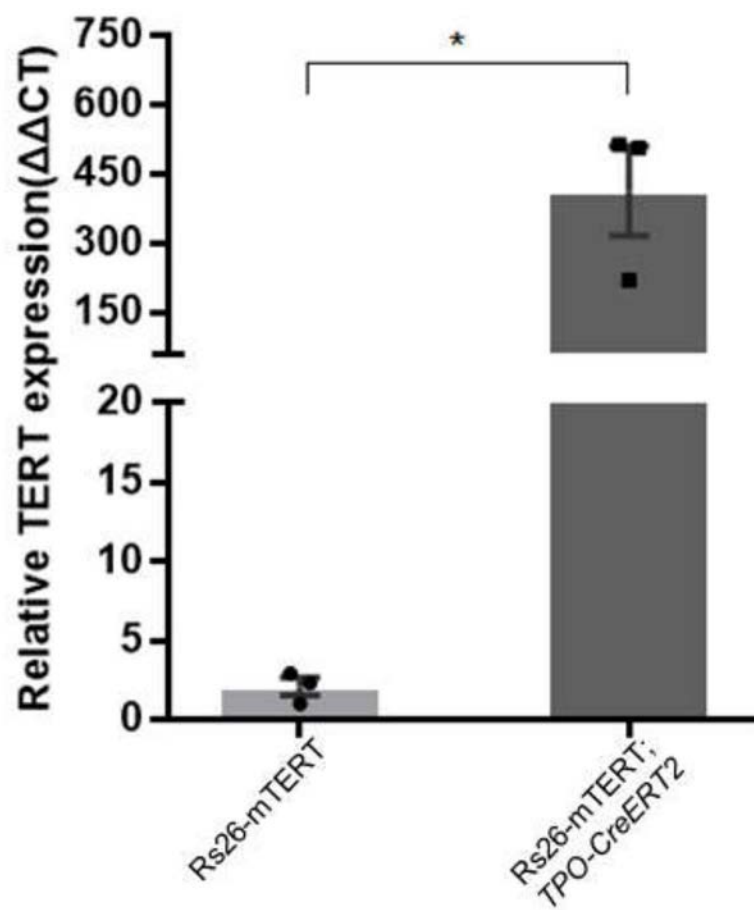


图5

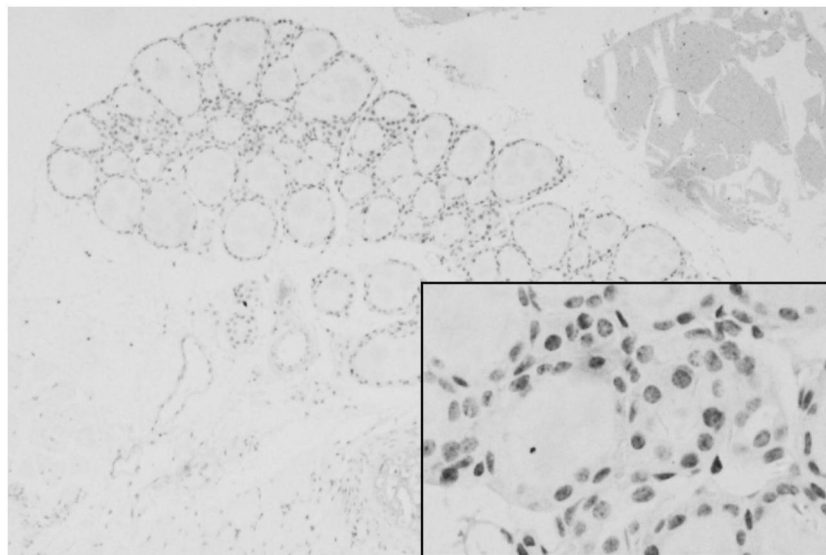


图6

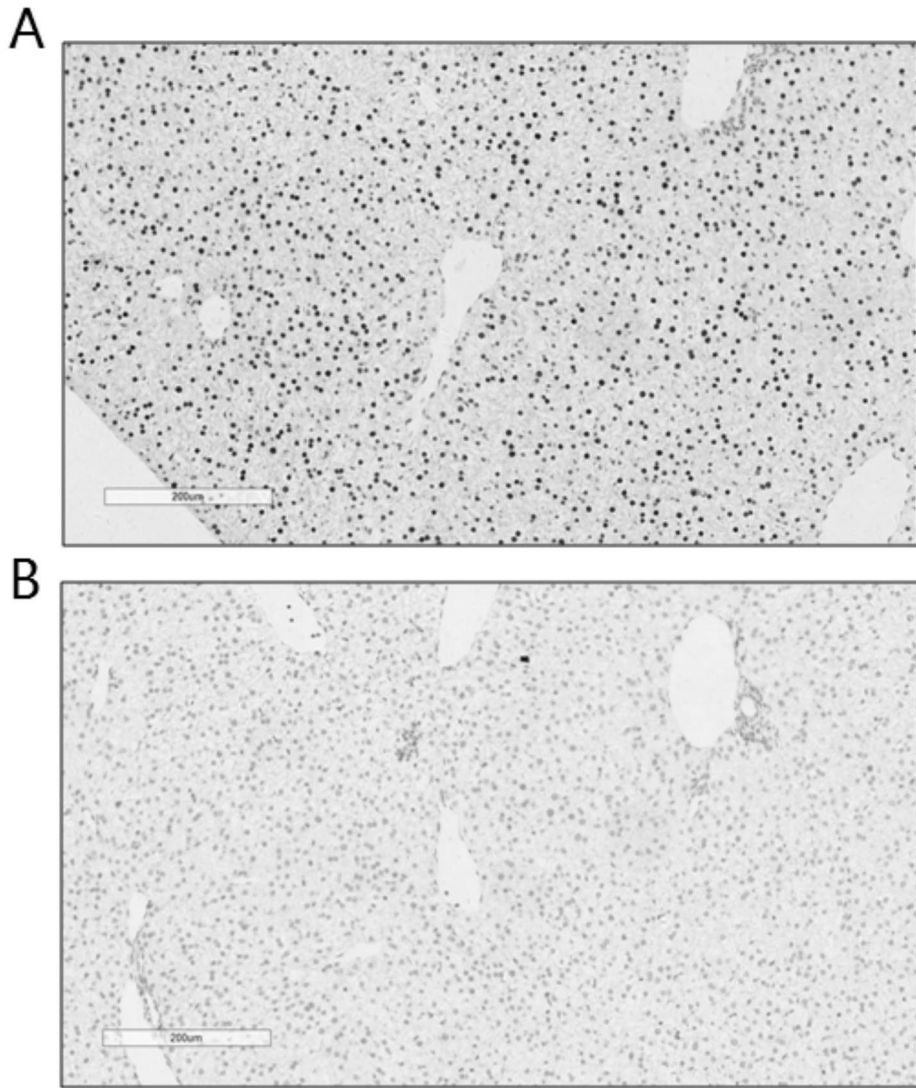


图7

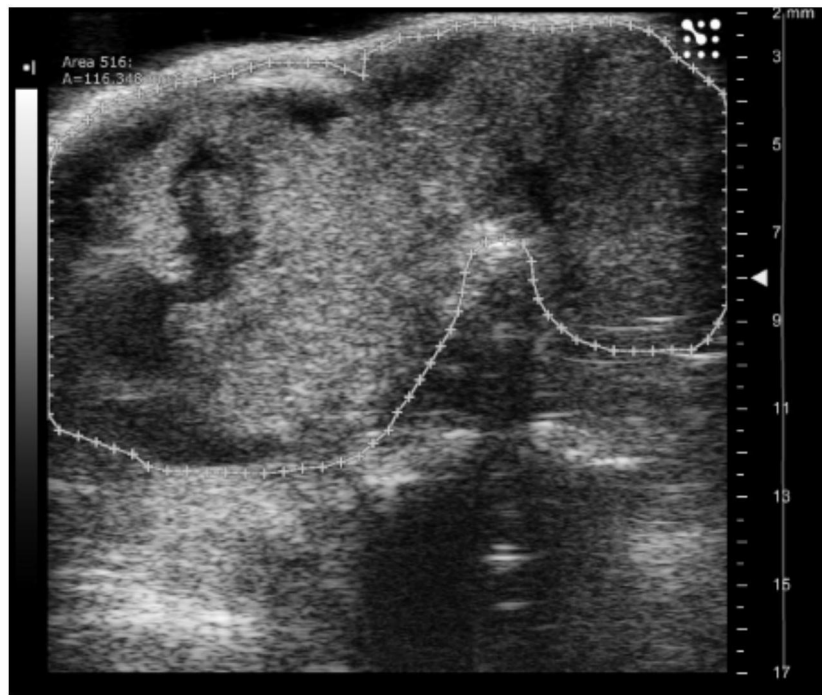


图8

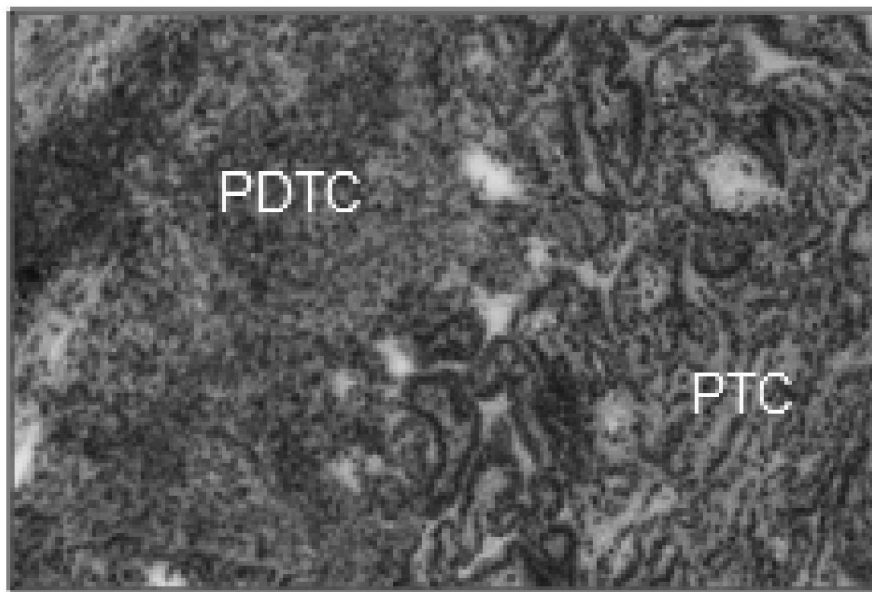


图9

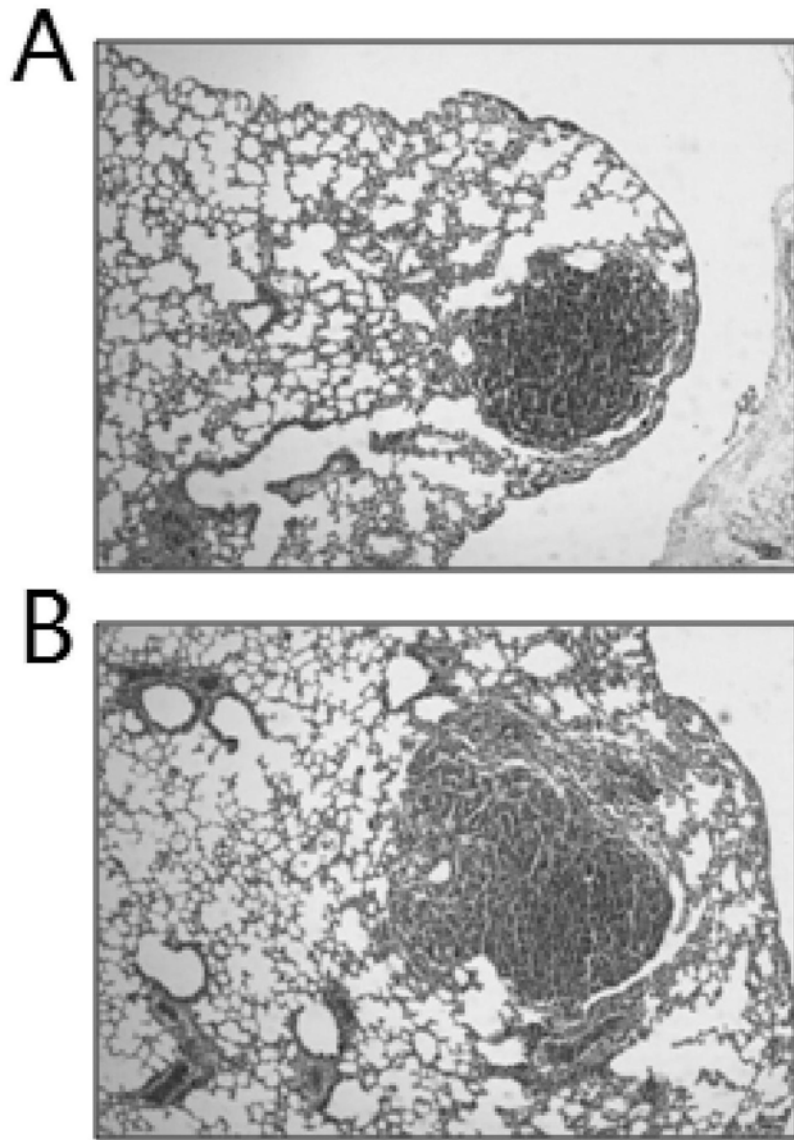


图10