

(19)中华人民共和国国家知识产权局



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107858378 A

(43)申请公布日 2018.03.30

(21)申请号 201711157123.6

(22)申请日 2017.11.20

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

(72)发明人 刘光慧 曲静 王思 任若通

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅

(51)Int.Cl.

C12N 15/90(2006.01)

C12N 15/85(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

权利要求书1页 说明书11页
序列表3页 附图2页

(54)发明名称

衰老细胞模型及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了衰老细胞模型及其制备方法。本发明提供的衰老细胞模型的制备方法包括:降低多能干细胞ATF6的含量或活性,得到ATF6缺失多能干细胞;诱导ATF6缺失多能干细胞,得到ATF6缺失间充质干细胞,ATF6缺失间充质干细胞即为衰老细胞模型,多能干细胞为胚胎干细胞或诱导多能干细胞。本发明的衰老细胞模型表现为细胞增殖能力降低、退行速度加快、存活能力降低和整合能力降低,以及细胞内蛋白质稳态失衡,细胞内蛋白质聚集体的增加,能够用于建立筛选可调控成体干细胞蛋白质稳态维持,减缓细胞衰老的备选(天然)化合物的个性化药物筛选平台。

1. 细胞模型的制备方法,包括:降低干细胞ATF6的含量和/或活性,得到ATF6缺失和/或活性被抑制干细胞,所述ATF6缺失和/或活性被抑制干细胞即为细胞模型。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述干细胞为间充质干细胞或多能干细胞。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于:所述干细胞为多能干细胞,所述细胞模型的制备方法包括:降低所述多能干细胞ATF6的含量和/或活性,得到ATF6缺失和/或活性被抑制多能干细胞;诱导所述ATF6缺失和/或活性被抑制多能干细胞,得到ATF6缺失和/或活性被抑制间充质干细胞,所述ATF6缺失和/或活性被抑制间充质干细胞即为细胞模型。

4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于:所述多能干细胞为胚胎干细胞或诱导多能干细胞。

5. 根据权利要求3或4所述的方法,其特征在于:所述多能干细胞为人胚胎干细胞或人诱导多能干细胞。

6. 根据权利要求1-5中任一所述的方法,其特征在于:ATF6的含量或活性的降低是通过敲除所述干细胞中ATF6的编码基因实现的。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于:所述ATF6的编码基因的敲除利用CRISPR/Cas9方法实现。

8. 根据权利要求6或7所述的方法,其特征在于:所述ATF6的编码基因的敲除为敲除所述ATF6的编码基因的第一个外显子。

9. 下述X1)-X6) 中任一产品:

X1) 权利要求1-8中任一所述方法得到的细胞模型;

X2) 一种筛选减缓细胞衰老物质的模型,为权利要求1-8中任一所述方法得到的细胞模型;

X3) 用于构建权利要求1-8中任一所述细胞模型的系统,由靶向ATF6的编码基因的gRNA和Cas9组成;

X4) 用于构建权利要求1-8中任一所述细胞模型的系统,由表达靶向ATF6的编码基因的gRNA的载体、表达Cas9的载体组成;

X5) 用于构建权利要求1-8中任一所述细胞模型的系统,由靶向ATF6的编码基因的第一个外显子的gRNA、Cas9和含有所述第一个外显子上下游同源臂的DNA片段组成;

X6) 用于构建权利要求1-8中任一所述细胞模型的系统,由表达靶向ATF6的编码基因的第一个外显子的gRNA的载体、表达Cas9的载体和含有所述第一个外显子上下游同源臂的DNA片段的载体组成。

10. 权利要求1-8中任一所述方法得到的细胞模型的下述任一应用:

Y1) 在作为细胞衰老模型中的应用;

Y2) 在作为蛋白质稳态失衡细胞模型中的应用;

Y3) 在筛选减缓细胞衰老物质中的应用;

Y4) 在筛选调控细胞蛋白质稳态维持物质中的应用。

衰老细胞模型及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域中,衰老细胞模型及其制备方法。

背景技术

[0002] 人口老龄化是世界尤其是中国社会面临的日益严峻的社会问题,给社会和家庭带来沉重的经济、精神负担,将会影响社会的持续性发展。因此,如何延缓衰老,使老年人们健康长寿,实现“健康衰老”,是保证社会长治久安、经济持续性发展的必要条件。因此,衰老及衰老相关疾病已成为全球科研领域亟需解决和突破的热点及难点。线虫、果蝇、小鼠等模式生物与人类差异巨大,利用模式生物并不能在理论层面上更好地认识人类衰老的进程,也使得临床转化研究受到极大的限制,因此新的人类衰老研究模型亟待产生。成体干细胞是干细胞中的一类广泛存在于机体内,具有自我更新和多向分化潜能的细胞,包括神经干细胞(Neural stem cell, NSC)、间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSC)等,是进行组织修护、开展临床应用治疗特定组织器官疾病的重要资源。在衰老细胞中,干细胞出现功能性衰老或耗竭,干细胞稳态失衡,例如,随着年龄增长,神经干细胞出现衰老被大量耗竭时,将无法发挥NSC在神经系统中的保护与修复作用,最终导致神经系统退行性疾病的发生,如常见的老年相关疾病帕金森氏症(PD)等。间充质干细胞是成体干细胞家族的重要成员之一,源于发育早期的中胚层和外胚层,具有自我复制能力和多向分化的潜能。间充质干细胞在体外特定的诱导条件下,可分化为脂肪、肌肉、心肌、胰岛 β 细胞和内皮等多种组织细胞。伴随着衰老的过程,间充质干细胞的耗竭会导致成骨能力变差,发生增龄性骨质疏松,此外,还将影响成肌能力,导致增龄性的肌肉萎缩等等。以上多种证据证实成体干细胞的衰竭,是组织器官丧失修复及再生能力的主要因素。

[0003] ATF6基因位于人1号染色体1q22-q23,共17个外显子。ATF6蛋白约90kDa,含670个氨基酸,又称p90ATF6。ATF6位于内质网膜上,属于II型跨膜蛋白,N端位于胞浆内包含锌指蛋白结构域,C端处于内质网内腔可感受内质网膜上的内质网应激信号。ATF6在哺乳动物中存在ATF6 α 和ATF6 β 两种结构相似的亚型。目前普遍认为只有ATF6 α 参与内质网应激反应,而ATF6 β 不参与这一过程(也有少量报道称ATF6 β 对ATF6 α 具有抑制作用或极低水平的类似ATF6 α 的作用)。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是如何制备细胞衰老模型。

[0005] 本发明首先提供了细胞模型的制备方法,所述方法包括:降低干细胞ATF6的含量和/或活性,得到ATF6缺失和/或活性被抑制干细胞,所述ATF6缺失和/或活性被抑制干细胞即为细胞模型。

[0006] 所述活性被抑制可以是ATF6活性被不同程度的抑制,包括ATF6活性被完全抑制或部分抑制。

[0007] 上述方法中,所述干细胞可为间充质干细胞或多能干细胞。

[0008] 上述方法中,所述干细胞可为多能干细胞时,所述细胞模型的制备方法可包括:降低所述多能干细胞ATF6的含量和/或活性,得到ATF6缺失和/或活性被抑制多能干细胞;诱导所述ATF6缺失和/或活性被抑制多能干细胞,得到ATF6缺失和/或活性被抑制间充质干细胞,所述ATF6缺失和/或活性被抑制间充质干细胞即为细胞模型。

[0009] 所述诱导所述ATF6缺失多能干细胞可包括将所述ATF6缺失多能干细胞进行拟胚体分化,筛选表达CD73、CD90和CD105即得到所述细胞模型。

[0010] 上述方法中,所述多能干细胞可为胚胎干细胞或诱导多能干细胞。

[0011] 上述方法中,所述多能干细胞可为人胚胎干细胞或人诱导多能干细胞。

[0012] 所述人胚胎干细胞可为商业化细胞,如H9。

[0013] 上述方法中,ATF6的含量或活性的降低可通过敲除所述干细胞中ATF6的编码基因实现的。

[0014] 上述方法中,所述ATF6的编码基因的敲除可利用CRISPR/Cas9方法实现。

[0015] 上述方法中,所述ATF6的编码基因的敲除可为敲除所述ATF6的编码基因的第一个外显子。

[0016] 所述ATF6的编码基因的序列可为GenBank:NC_000001.11的第161,766,244-161,964,070位(ATF6基因的基因组序列),updated on PRI 12-JUL-2017;所述ATF6的编码基因的序列还可为GenBank:NM_007348.3(ATF6基因的cDNA序列),updated on PRI 10-JUL-2017。

[0017] 利用CRISPR/Cas9方法敲除所述ATF6的编码基因的第一个外显子包括:将靶向所述第一个外显子的gRNA与Cas9导入所述干细胞中,实现所述ATF6的编码基因的第一个外显子的敲除。

[0018] 进一步,利用CRISPR/Cas9方法敲除所述ATF6的编码基因的第一个外显子可包括:将靶向所述第一个外显子的gRNA、Cas9以及含有所述第一个外显子上下游同源臂的DNA片段(记为DNA片段1)导入所述干细胞中,实现所述ATF6的编码基因的第一个外显子的敲除。

[0019] 所述gRNA的靶序列具体可为序列表中序列3。

[0020] 所述上下游同源臂的序列具体可为序列表中序列1和2。

[0021] 所述DNA片段1中还含有neo抗性基因。

[0022] 利用CRISPR/Cas9方法敲除所述ATF6的编码基因的第一个外显子进一步可包括:将表达所述gRNA的载体和表达Cas9的载体导入所述干细胞中,实现所述ATF6的编码基因的第一个外显子的敲除。

[0023] 更进一步,利用CRISPR/Cas9方法敲除所述ATF6的编码基因的第一个外显子可包括:将表达所述gRNA的载体、表达Cas9的载体以及含有所述DNA片段1的载体导入所述干细胞中,实现所述ATF6的编码基因的第一个外显子的敲除。

[0024] 所述表达所述gRNA的载体具体可为向gRNA克隆载体中通过同源重组连接的方法整合入序列表中序列4所示的DNA片段得到的重组载体。所述重组载体可表达能靶向所述ATF6的编码基因的第一个外显子的gRNA。

[0025] 所述含有所述DNA片段1的载体可为将pCR2.1-neo的ApaI和XhoI识别序列间的DNA片段替换为序列表中序列1的第10-1658位所示的DNA片段、将pCR2.1-neo的BamHI和HindIII识别序列间的DNA片段替换为序列表中序列2的第9-1444位所示的DNA片段得到的重组载

体,该重组载体含有序列表中序列1的第10-1658位所示的同源臂左臂和序列列表中序列2的第9-1444位所示的同源臂右臂,左右同源臂间还含有neo抗性基因。

[0026] 本发明还提供了下述X1)-X6)中任一产品:

[0027] X1) 利用所述细胞模型的制备方法得到的细胞模型;

[0028] X2) 一种筛选减缓细胞衰老物质的模型,为所述细胞模型;

[0029] X3) 用于构建所述细胞模型的系统,由靶向ATF6的编码基因的gRNA和Cas9组成;

[0030] X4) 用于构建所述细胞模型的系统,由表达X3)所述gRNA的载体、表达Cas9的载体组成;

[0031] X5) 用于构建所述细胞模型的系统,由靶向所述第一个外显子的gRNA、Cas9和含有所述第一个外显子上下游同源臂的DNA片段(所述DNA片段1)组成;

[0032] X6) 用于所述细胞模型的系统,由表达所述gRNA的载体、表达Cas9的载体和含有所述第一个外显子上下游同源臂的DNA片段(所述DNA片段1)的载体组成。

[0033] X3)和X4)中所述gRNA具体可靶向ATF6的编码基因的第一个外显子。

[0034] 本发明还提供了所述细胞模型的下述任一应用:

[0035] Y1) 在作为细胞衰老模型中的应用;

[0036] Y2) 在作为蛋白质稳态失衡细胞模型中的应用;

[0037] Y3) 在筛选减缓细胞衰老物质中的应用;

[0038] Y4) 在筛选调控细胞蛋白质稳态维持物质中的应用。

[0039] 上述应用中,所述细胞可为干细胞。所述干细胞具体可为成体干细胞。

[0040] 本发明中,所述衰老可表现为增殖能力降低、退行速度加快、存活能力降低和/或整合能力降低。所述衰老还可表现为细胞内蛋白质稳态失衡,进一步还可表现为细胞内蛋白质聚集体的增加。

[0041] 本发明中,所述ATF6具体均可ATF6 α 。

[0042] 实验证明,本发明的细胞模型的增殖能力降低、退行速度加快、存活能力降低和/或整合能力降低,细胞内蛋白质稳态失衡,细胞内蛋白质聚集体的增加。因此本发明的细胞模型能够用于建立筛选可调控成体干细胞蛋白质稳态维持,减缓细胞衰老的备选(天然)化合物的个性化药物筛选平台,同时也为延缓自然衰老提供了更多的线索。

附图说明

[0043] 图1为本发明产生了ATF6蛋白缺失的ATF6 $^{-/-}$ -ESC。A为人胚胎干细胞ATF6第一外显子基因打靶策略图;B为ATF6相关打靶鉴定的基因组PCR检测结果;C为免疫荧光检测ATF6 $^{-/-}$ -ESC的干细胞特性;D为Western blotting检测野生型及ATF6 $^{-/-}$ -ESC中ATF6蛋白表达水平。ATF6 $^{-/-}$ 表示ATF6 $^{-/-}$ -ESC,ATF6 $^{+/+}$ 表示H9细胞系,

[0044] 图2为本发明涉及的ATF6 $^{-/-}$ -ESC衍生的ATF6 $^{-/-}$ -MSC具有加速衰老的表型。其中,A为ATF6 $^{+/+}$ -MSC和ATF6 $^{-/-}$ -MSC细胞形态(明场)及阳性表面标志蛋白CD105、CD73、CD90流式细胞术鉴定;B为Western blotting鉴定ATF6 $^{+/+}$ -MSC及ATF6 $^{-/-}$ -MSC中ATF6蛋白表达量,ATF6 $^{-/-}$ -MSC中ATF6表达缺失;C为ATF6 $^{+/+}$ -MSC及ATF6 $^{-/-}$ -MSC细胞的增殖曲线;D为衰老相关SA-beta-Gal染色结果;E为ATF6 $^{-/-}$ -MSC体内增殖能力检测。ATF6 $^{+/+}$ 和ATF6 $^{-/-}$ 分别表示ATF6 $^{+/+}$ -MSC和ATF6 $^{-/-}$ -MSC。

[0045] 图3为本发明涉及的ATF6^{-/-}MSC可以作为由蛋白质稳态失衡导致的成体干细胞衰老模型。其中,ATF6^{+/+}和ATF6^{-/-}分别表示ATF6^{+/+}MSC和ATF6^{-/-}MSC,空白表示不加蛋白聚集体探针的细胞。

具体实施方式

[0046] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述,给出的实施例仅为了阐明本发明,而不是为了限制本发明的范围。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的材料、试剂、仪器等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。

[0047] 下述实施例中的细胞培养条件如无特殊说明,均为37摄氏度,5%CO₂。

[0048] 下述实施例中用于流式细胞术分选MSC的荧光标记抗体如下:

[0049] 荧光素FITC标记的抗人细胞表面识别分子CD90抗体(555595),BD Biosciences。

[0050] 荧光素PE标记的抗人细胞表面识别分子CD73抗体(550257),BD Biosciences。

[0051] 荧光素APC标记的抗人细胞表面识别分子CD105抗体(17-1057-42),BD Biosciences。

[0052] 荧光素APC标记同型对照抗体(555751),BD Biosciences。

[0053] 荧光素PE标记同型对照抗体(555749),BD Biosciences。

[0054] 荧光素FITC标记同型对照抗体(555742),BD Biosciences。

[0055] 下述实施例中的人胚胎干细胞H9细胞系,WiCell公司产品(货号:WA09(H9)-DL-7)。

[0056] 下述实施例中的细胞培养基配方如下:

[0057] (1) CDF12培养基配方:

[0058] DMEM/F12培养基(Invitrogen,11320-033);

[0059] 0.1mM非必需氨基酸(Invitrogen,11140-050);

[0060] 1mM GlutaMAX™二肽(Invitrogen,35050-061);

[0061] 20%(体积百分含量)Knockout血清替代物(Invitrogen,N10828-028);

[0062] 1%(1g/100ml)青霉素/链霉素(Invitrogen,15070-063);

[0063] 55μMβ-巯基乙醇(Invitrogen,21985-023);

[0064] 10ng/ml人FGF2(Joint Protein Central)。

[0065] (2) 间充质干细胞(MSC)培养基配方:

[0066] MEM培养基(Invitrogen,12571071);

[0067] 10%(体积百分含量)胎牛血清(Invitrogen,10091148);

[0068] 1%(1g/100ml)青霉素/链霉素(Invitrogen,15070-063);

[0069] 10ng/ml重组人成纤维细胞生长因子(JPC,bFGF);

[0070] 下述实施例中的表达荧光素酶Luciferase的病毒载体记载在“Pan,H.,Guan,D.,Liu,X.,Li,J.,Wang,L.,Wu,J.,Zhou,J.,Zhang,W.,Ren,R.,Li,Y.,et al.(2016).SIRT6 safeguards human mesenchymal stem cells from oxidative stress by coactivating NRF2.Cell research 26,190-205.”一文中,公众可从申请人处获得该生物材料,该生物材料只为重复本发明的相关实验所用,不可作为其它用途使用。

[0071] 实施例1、ATF6缺失胚胎干细胞系的建立及其鉴定

[0072] 本实施例涉及在人胚胎干细胞中靶向失活人类ATF6基因(基因组序列为基因组序列为GenBank:NC_000001.11的第161,766,244-161,964,070位,updated on PRI 12-JUL-2017;cDNA序列为GenBank:NM_007348.3,updated on PRI 10-JUL-2017),使ATF6丧失功能,得到ATF6功能丧失的人胚胎干细胞。由于ATF6 β 的生物学功能鲜有报道,故直接用ATF6代表ATF6 α ,即本文中的ATF6为ATF6 α 。

[0073] 本发明首先设计并通过分子克隆方法获得靶向人类基因组中ATF6基因第1号外显子两侧的同源臂序列,然后将其构建进入pCR2.1-neo载体(载体由美国Salk研究所Juan Carlos Izpisua Belmonte教授馈赠,记载在“Duan,S.,Yuan,G.,Liu,X.,Ren,R.,Li,J.,Zhang,W.,Wu,J.,Xu,X.,Fu,L.,Li,Y.,et al.(2015).PTEN deficiency reprogrammes human neural stem cells towards a glioblastoma stem cell-like phenotype.Nature communications 6,10068.”和“Pan,H.,Guan,D.,Liu,X.,Li,J.,Wang,L.,Wu,J.,Zhou,J.,Zhang,W.,Ren,R.,Li,Y.,et al.(2016).SIRT6safeguards human mesenchymal stem cells from oxidative stress by coactivating NRF2.Cell research 26,190-205.”中,并由第一发明人保存在中国科学院生物物理研究所,公众可从申请人处获得该载体)上,获得ATF6同源臂载体。再构建靶向ATF6基因第一外显子的gRNA载体(Addgene公司,商品名和货号分别为gRNA Cloning Vector,Plasmid#41824)。接着将ATF6同源臂载体、gRNA表达载体和Cas9表达载体(载体由美国George M.Church教授馈赠,记载在“Mali,P.,Yang,L.,Esvelt,K.M.,Aach,J.,Guell,M.,DiCarlo,J.E.,Norville,J.E.,and Church,G.M.(2013).RNA-guided human genome engineering via Cas9.Science 339,823-826.”中,并由第一发明人保存在中国科学院生物物理研究所,公众可从申请人处获得该载体,)共同电转化人胚胎干细胞,获得ATF6第1外显子缺失的人胚胎干细胞(图1中A)。其中,电转化人胚胎干细胞后,还包括用G418进行克隆筛选的步骤;在克隆筛选之后还包括对挑选的克隆用基因组PCR的方法对其同源重组的情况进行确认的步骤。

[0074] 具体方法如下:

[0075] 1. 构建gRNA载体:

[0076] 构建用以敲除ATF6基因的gRNA表达载体,将设计好的gRNA序列连入Addgene公司的gRNA克隆载体(Plasmid#41824)中。

[0077] 具体步骤如下:

[0078] 1) 根据NCBI提供ATF6基因组数据查找分析,设计靶向ATF6基因第一个外显子的gRNA序列。目标序列信息为:GGCTCGGTTTCGCTCTAA(序列3)。合成的引物序列如下:

[0079]

ATF6 gRNA-F	<u>TTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGGCTCGGGTT</u> <u>CGCGTCTAA</u>
ATF6 gRNA-R	<u>GACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACCTTAGACGCGAA</u> <u>CCCGAGCC</u>

[0080] 2) 将ATF6gRNA-F和ATF6gRNA-R稀释到100p mole/L(100M)。用Phusion聚合酶退

火、延伸。反应体系如下：

[0081]

5×GC buffer	10μL
2.5mM dNTP	4μL
ATF6gRNA-F	2μL
ATF6gRNA-R	2μL
Phusion聚合酶	0.5μL
ddH ₂ O	31.5μL

[0082] 反应条件如下：

98℃ 10min

0.1℃/s 降至 25℃ 每降 10℃停 1min

[0083] 25℃ 1min

72℃ 10min

16℃ ∞

[0084] 反应完成后，用PCR回收试剂盒(QIAquick, Cat.No.28106)回收。

[0085] 3) 将PCR回收试剂盒回收的gRNA序列与gRNA克隆载体连接。

[0086] 将gRNA克隆载体用Afl I I酶切，回收后的载体片段与PCR回收试剂盒回收的gRNA序列进行同源重组连接，反应体系(20μL)如下：

	2×Gibson Assembly® Master Mix	10 μL
[0087]	gRNA 酶切回收后的载体片段	x μL (100 ng)
	gRNA 序列	y μL
	ddH ₂ O	补至 20μL

[0088] 50℃, 1小时。

[0089] 注：x, y的值根据gRNA酶切载体和gRNA PCR回收产物的浓度决定。一般gRNA酶切回收后的载体片段和gRNA序列的摩尔比为1:3-1:10。2×Gibson Assembly® Master Mix为NEB产品。

[0090] 将得到的序列正确的重组载体命名为gRNA-ATF6, gRNA-ATF6含有序列表中序列4所示的DNA片段。

[0091] 2. 构建同源臂载体：

[0092] 依据gRNA位置设计左右同源臂，将左右同源臂构建入pCR2.1-neo载体中，左右同源臂在人细胞基因组中分别位于ATF6基因第一个外显子的上下游。具体步骤如下：

[0093] 利用ATF6 Left Arm Primer F和ATF6 Left Arm Primer R对人基因组DNA进行PCR扩增，得到同源臂左臂；利用ATF6 Right Arm Primer F和ATF6 Right Arm Primer R对人基因组DNA进行PCR扩增，得到同源臂右臂(序列为序列列表中序列2)。用于PCR扩增的酶为primeSTAR (TaKaRa Code:DR010A)。

[0094] 引物序列如下：

[0095]

ATF6 Left Arm Primer F	ATAGGGCCCGGTGATAGGTCACAAATGTTTG
ATF6 Left Arm Primer R	CCGCTCGAGCACAAGTTCCTTCTCCCTGGAAC
ATF6 Right Arm Primer F	CGGGATCCGTTTCTTCTCCCTACTTCCGCCCACTCGT
ATF6 Right Arm Primer R	TCCAAGCTTAGCCAAGATTGCGCCATTACACTCTAGCCT

[0096] 将PCR扩增得到的同源臂左臂、右臂分别连接至pEASY-Blunt载体(北京全式金生物技术有限公司,货号CB101-01),将得到的序列正确的重组载体分别命名为pEASY-Blunt-L、pEASY-Blunt-R。

[0097] 将pEASY-Blunt-L用ApaI和XhoI酶切,得到含有同源臂左臂的DNA片段;将pCR2.1-neo用ApaI和XhoI酶切,得到pCR2.1-neo载体骨架;将含有同源臂左臂的DNA片段与pCR2.1-neo载体骨架相连,将得到的序列正确的重组载体命名为pCR2.1-neo-L。将pEASY-Blunt-R用BamHI和HindIII酶切,得到含有同源臂右臂的DNA片段;将pCR2.1-neo-L用BamHI和HindIII酶切,得到pCR2.1-neo-L载体骨架;将含有同源臂右臂的DNA片段与pCR2.1-neo-L载体骨架相连,将得到的序列正确的重组载体命名为pCR2.1-neo-ATF6。pCR2.1-neo-ATF6含有序列表中序列1的第10-1658位所示的DNA片段和序列表中序列2的第9-1444位所示的DNA片段,左右同源臂间还含有neo抗性基因。

[0098] 3. 获得ATF6缺失人胚胎干细胞

[0099] 采取基于CRISPR/Cas9的基因打靶技术在人胚胎干细胞中进行特异性敲除ATF6基因的第二个外显子。具体步骤如下:

[0100] 1) 培养人胚胎干细胞H9细胞系,培养方法为a或b:

[0101] a. 将人胚胎干细胞H9细胞系接种至预先培养了经过丝裂霉素(美国Sigma公司产品,货号:M0503)灭活的小鼠胚胎成纤维细胞(美国Invitrogen公司产品,货号:S1520-100)的培养板中,使用人类胚胎干细胞培养基(CDF12培养基)与小鼠胚胎成纤维细胞共同培养;

[0102] b. 将人胚胎干细胞H9细胞系接种至预先用细胞外基质(qualified-Matrigel,美国BD Biosciences产品,货号:354277)包被的培养板中,使用mTeSR培养基(美国StemCell Technologies产品)培养。

[0103] 2) 将处于对数期增殖的H9细胞,PBS清洗一次,Tryple Express(Invitrogen公司,货号为12604021)消化5-10分钟后,轻轻吹打成单细胞;

[0104] 3) 将步骤2)得到的 1.5×10^6 个H9单细胞,依据Cologne_CoA_cGMP Solution P3 Primary Cell 4D-Nucleofector Kit(Lonza公司,货号V4XPG-3024)说明书配置细胞悬液,将Cas9表达载体、以及上述步骤中得到的gRNA-ATF6与pCR2.1-neo-ATF6加入细胞悬液中,使用4D电转仪(Lonza公司,货号4D-Nucleofector™System)进行电转。

[0105] 4) 将电转后的细胞加入含MEF的培养板中。24小时后换新鲜CDF12培养基。

[0106] 5) 7-10天后,待培养板中长出新的克隆,依据克隆数目及大小向细胞培养体系中加入G418,筛选得到neo阳性的克隆,即得到ATF6缺失人胚胎干细胞(记为ATF6-/-ESC)。

[0107] 3. ATF6缺失人胚胎干细胞的鉴定

[0108] 通过定量PCR、Western blotting等手段鉴定neo阳性的克隆是否被正确打靶,具体分别从如下几个方面进行检测:检测基因组中ATF6基因的第二个外显子是否被替换、neo片段插入基因组位置是否正确、ATF6蛋白是否缺失。

[0109] (1) PCR鉴定基因组

[0110] 提取野生型 (H9细胞系) 及ATF6^{-/-}-ESC基因组进行PCR鉴定第一外显子是否被替换。分别检测基因组中是否存在第一个外显子 (Exon1F+Exon1R)、Neo是否替换第一外显子 (P1+P2,P3+P4),同时以GAPDH为内参,其扩增引物序列如下:

[0111] 引物序列如下:

[0112] Exon1-F:5' -CGCCGCCGTCCTCCAGATAT-3'

[0113] Exon1-R:5' -CGGGCTAAAAGGTGACTCCA-3'

[0114] P1:5' -GCTCCACTGCAATCCAGCCTAGGGGACA-3'

[0115] P2:5' -CCCCAAAGGCCTACCCGCTTCCATTGCTCA-3'

[0116] P3:5' -CTACCTGCCCATTGACCACCAAGCGAAACATC-3'

[0117] P4:5' -ACCAGCCTAACCAACATGGAGAAACCTCGTC-3'

[0118] GAPDH-F:5' -GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3'

[0119] GAPDH-R:5' -GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'

[0120] 其中,Exon1 F和Exon1 R均位于ATF6基因的第一外显子上,P1、P2、P3和P4的位置如图1中A所示。PCR鉴定结果如图1中B所示,结果显示ATF6第一外显子已缺失。

[0121] (2) 免疫荧光检测经过改造的人胚胎干细胞的干细胞特性

[0122] 以H9细胞系和ATF6^{-/-}-ESC这两种细胞作为供试细胞,采用免疫荧光技术对人胚胎干细胞的干性维持情况相关的分子标记物OCT4,SOX2和NANOG进行检测。具体如下:

[0123] 将培养于盖玻片上的供试细胞用4%的多聚甲醛室温固定30分钟,PBS漂洗(3次,5分钟/次)后,使用含有0.4%(体积百分含量)Triton X-100的PBS室温孵育30分钟,继而换用10%(体积百分含量)驴血清(Jackson ImmunoResearch Laboratories,Inc.货号:017-000-121)室温封闭1小时。之后换用添加一抗的封闭液于4摄氏度孵育过夜。PBS漂洗(3次,5分钟/次)后,然后加入对应二抗,室温孵育1小时。PBS漂洗(3次,5分钟/次)后,用工作浓度为2 μ g/ml的Hoechst 33258(Invitrogen,货号:H3569)室温孵育15分钟,最后封片和观察。

[0124] 结果如图1中C所示,与H9细胞系细胞相似,ATF6^{-/-}-ESC能够表达OCT4(红色荧光),SOX2(黄色荧光)和NANOG(绿色荧光)三种分子标记物。

[0125] 以上结果表明,ATF6缺失不影响干细胞干性基因的表达。

[0126] (3) Western blot鉴定ATF6蛋白

[0127] 以H9细胞系和ATF6^{-/-}-ESC这两种细胞作为供试细胞,提取各细胞的总蛋白,利用western-blot检测细胞表达的蛋白质。所用一抗为ATF6抗体(anti-ATF6,兔源,Santa Cruz公司(sc-22799)),二抗为HRP标记的羊抗兔抗体(Santa cruz公司(货号为sc-2004))。以 β -actin为内参,一抗为鼠源抗 β -actin抗体(Santa cruz公司,货号为sc-8432),二抗为HRP标记的羊抗鼠抗体,Santa cruz公司(货号为sc-2005)。

[0128] Western blot检测ATF6蛋白结果如图1中D所示,ATF6^{-/-}-ESC细胞用ATF6抗体无法检测到ATF6蛋白的表达;而H9细胞系用ATF6抗体可检测到ATF6蛋白的表达(分子量约90KD)。

[0129] 实施例2、ATF6^{-/-}-ESC体外定向分化制备ATF6^{-/-}-MSC

[0130] 本发明将实施例1中获得的ATF6^{-/-}-ESC,进一步体外定向分化为间充质干细胞(ATF6^{-/-}-MSC),并发现ATF6^{-/-}-MSC能够表现出典型的细胞衰老症状。

[0131] 具体方法如下：

[0132] 1、ATF6^{-/-}间充质干细胞的定向诱导分化

[0133] 将ATF6^{-/-}ESC进行拟胚体(EB)分化,分化14天,将EB接种于基质胶(matrigel)(Invitrogen公司)包被的6孔板中进行培养,继续培养2周至纤维状细胞出现。再经过一次传代后,利用流式细胞术分选其中的CD73、CD90和CD105均为阳性的细胞类群(图2中A),即为ATF6缺失(ATF6^{-/-})的间充质干细胞(记为ATF6^{-/-}MSC)。本发明同时将H9细胞系定向诱导分化为间充质干细胞(记为ATF6^{+/+}MSC)。

[0134] 2、ATF6^{-/-}MSC的表型鉴定

[0135] (1) Western blot定向分化所得MSC中的ATF6的表达情况

[0136] 以ATF6^{+/+}MSC和ATF6^{-/-}MSC这两种细胞作为供试细胞,按照实施例1中步骤3中(3)的方法利用Western blot检测细胞中是否表达ATF6蛋白。结果如图2中B所示,ATF6^{-/-}MSC细胞用ATF6抗体无法检测到ATF6蛋白的表达;而ATF6^{+/+}MSC细胞用ATF6抗体可检测到ATF6蛋白的表达(分子量约90KD)。

[0137] (2) 生长抑制测定

[0138] 利用细胞计数统计连续传代的ATF6^{-/-}MSC细胞和ATF6^{+/+}MSC细胞的生长能力,结果显示,与ATF6^{+/+}MSC细胞相比,ATF6^{-/-}MSC表现出明显的增殖能力降低(图2中C)。具体操作步骤如下：

[0139] 1) 利用细胞计数,统计连续传代(p2-p11)的ATF6^{-/-}MSC和ATF6^{+/+}MSC的细胞累积增殖倍数；

[0140] 2) 计算每代细胞增殖倍数=每代结束培养时细胞数/每代起始培养时细胞数；

[0141] 3) 细胞累积增殖倍数= \log_2 (p2细胞增殖倍数)+ \log_2 (p3细胞增殖倍数)+ \dots + \log_2 (p11细胞增殖倍数)。

[0142] 统计结果如图2中C所示,结果表明:与ATF6^{+/+}MSC细胞相比,在连续传代培养5代后,ATF6^{-/-}MSC表现出明显的生长抑制。

[0143] (3) SA-beta-Gal染色

[0144] 细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色是一种基于衰老时SA-beta-Gal(senescence-associated beta-galactosidase)活性水平上调而对衰老细胞或组织进行染色检测的方法。

[0145] 分别以ATF6^{-/-}MSC细胞和ATF6^{+/+}MSC细胞为供试细胞(分别设置早代(第5代)和晚代(第11代)实验组),进行SA-beta-Gal染色：

[0146] 1) 6孔板中以合适密度种入细胞；

[0147] 2) 细胞密度达到60~80%时,PBS清洗两次细胞；

[0148] 3) 2%多聚甲醛+0.2%异戊醛固定,不超过5分钟；

[0149] 4) PBS清洗2次；

[0150] 5) 加入染色液,37度避光过夜孵育。染色液配方如下：

[0151]

柠檬酸/磷酸钠缓冲液	40mM
K ₄ [Fe(CN) ₆]·6H ₂ O	5mM
K ₃ [Fe(CN) ₆]	5mM

NaCl	150mM
MgCl ₂	2mM
X-gal	1mg/ml

[0152] 6) PBS清洗2次;

[0153] 7) Hoechst 33258 (Invitrogen, 货号:H3569) 室温避光孵育5分钟;

[0154] 8) PBS清洗一次;

[0155] 9) 显微镜下观察。

[0156] 以X-Gal为底物,在衰老特异性的 β -半乳糖苷酶催化下会生成深蓝色产物。在普通的光学显微镜下就可以观测到细胞或组织的衰老情况,并进一步对两组细胞中的SA-beta-Gal染色阳性细胞比率进行定量统计分析。

[0157] 结果如图2中D所示,早代(第5代,Passage 5,P5)ATF6+/+MSC及ATF6-/-MSC中SA-beta-Gal染色阳性细胞比例无显著差异;晚期(第11代,Passage 11,P11)ATF6-/-MSC有明显的蓝色,而晚期(第11代,Passage 11,P11)ATF6+/+MSC基本上没有蓝色,与ATF6+/+MSC相比,晚期ATF6-/-MSC SA-beta-Gal染色阳性细胞比例显著提高($P < 0.01$)。可见,在细胞传代后,与相同代数的ATF6+/+MSC相比,ATF6-/-MSC表现出严重衰老的症状,ATF6-/-MSC比ATF6+/+MSC更容易衰老。

[0158] (4) ATF6-/-MSC细胞小鼠体内增殖和整合能力测定

[0159] 为了验证野生型(ATF6+/+MSC)与ATF6-/-MSC的体内生存能力,首先用表达荧光素酶Luciferase的病毒载体分别感染ATF6+/+MSC和ATF6-/-MSC细胞,感染3天后,将两种细胞分别消化为单细胞状态,随后分别注射入免疫缺陷型NOD-SCID小鼠(维通利华)左、右胫骨前肌,两种细胞的注射量均相同。注射0,2,4,7天后分别通过利用小动物活体成像系统(Xenogen IVIS spectrum,PE公司)检测小鼠左、右胫骨前肌中luciferase活性,来反映MSC的存活及体内整合能力。

[0160] 具体操作方法如下:

[0161] 1) 选取生长状态良好、细胞密度为60~80%的细胞,感染表达荧光素酶Luciferase的病毒载体;

[0162] 2) 感染后72小时,TrypLEExpress消化为单细胞;

[0163] 3) 细胞计数,每 1×10^6 个细胞以100 μ l PBS重悬;

[0164] 4) 取100 μ l细胞悬液注射入小鼠胫骨前肌;

[0165] 5) 每日观察小鼠状态;

[0166] 6) 移植后0,2,4,7天后,取出小鼠,腹腔注射Luciferase底物(D-Luciferin Firefly,potassium salt,GOLDBIO公司),麻醉后小动物活体成像系统进行分析。统计4组生物学重复的荧光强度。

[0167] 结果显示,ATF6-/-MSC(右腿)在胫骨前肌中的luciferase活性较ATF6+/+MSC(左腿)在胫骨前肌中有显著降低(图2中E),表明与ATF6+/+MSC相比,ATF6-/-MSC细胞在体内退化速度更快,存活并整合的细胞数目更少。

[0168] 实施例3、检测在刺激剂诱导下ATF6-/-MSC细胞产生的蛋白质稳态失衡所致的细胞表型。

[0169] 本发明在培养前述源于ATF6-/-ESC的ATF6-/-MSC的过程,检测细胞在蛋白质稳态

方面的异常。具体如下：

[0170] 当细胞内蛋白质稳态失衡时，细胞内错误折叠蛋白增加，异常蛋白无法降解，导致细胞内蛋白质聚集体会显著增加。ATF6^{+/+}MSC (野生型) 和ATF6^{-/-}MSC细胞正常培养至晚代 (第10代) 后，消化收集细胞，并用标记蛋白质聚集体的探针 (ENZO, ENZ-51035-K100 PROTEOSTAT Aggresome detection kit) 对野生型和ATF6^{-/-}MSC进行染色。具体分析方法如下：

[0171] 1) 消化收集细胞，1000转/秒，离心5分钟；

[0172] 2) 用PBS洗涤一次，用4%多聚甲醛室温固定30分钟；

[0173] 3) 1000转/秒，离心10分钟，弃去多聚甲醛，加入0.5% Triton-100溶液 (溶剂为PBS，溶质为Triton-100)，冰上孵育30分钟；

[0174] 4) 1000转/秒，离心10分钟，弃去上清液，再用PBS洗涤一次；

[0175] 5) 1000转/秒，离心10分钟，加入稀释浓度 (1:2000) 蛋白质聚集体检测探针 (用PBS溶解)，37℃，孵育半小时；

[0176] 6) 探针孵育结束后，上流式细胞仪进行分析。

[0177] 蛋白质聚集体检测探针染色及流式细胞术分析显示，与野生型细胞 (ATF6^{+/+}MSC) 相比，ATF6^{-/-}MSC中，蛋白质聚集体强度更高，暗示着ATF6^{-/-}MSC中积累的蛋白质聚集体更多 (图3)。当细胞内蛋白质稳态失衡时，细胞内错误折叠蛋白增加，异常蛋白无法降解，导致细胞内蛋白质聚集体会显著增加。图3中A为蛋白质聚集体检测探针染色及流式细胞术分析，与野生型细胞 (ATF6^{+/+}MSC) 相比，ATF6^{-/-}MSC细胞中蛋白质聚集体荧光强度的显著提高，证明了，ATF6^{-/-}MSC中积累了更多的蛋白质聚集体。图3中B为以野生型细胞 (ATF6^{+/+}MSC) 中蛋白质聚集体的平均强度为界限，超过该强度的细胞比例，统计显示与野生型细胞 (ATF6^{+/+}MSC) 相比，ATF6^{-/-}MSC细胞中积累了更多的蛋白质聚集体。该结果证明ATF6^{-/-}MSC可以作为一种细胞蛋白质稳态失衡导致的人类成体干细胞衰老的研究模型。

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> 衰老细胞模型及其制备方法

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1667

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 1

```

atagggcccc gtgataggtc acaaatgttt gtttcataat tacttgcact ttttgaataa 60
aaataaaatc ttttgaaat taaaaaatt ggcgatttgt catgggtgatt ttcttaaag 120
actaagggtg ctagtgggat acagaagact cgatgatttt attttatttt aggttttttt 180
tttttttttt tttttgagac gcagtctcgc aatgtcgacc aggctgggtg gcagtggtgc 240
gatctccgct cgctgcaacc tctgcctccc gcgttcatgc gattctctg cctcagcctc 300
ccgagtagct gggattacag ctacttgecc gccaccacgc ctggctaact ttttgtattt 360
ttagtggaga cagggtttca ctatgttggc caggctggtc tcgaactcct gacctcgtga 420
tccgccgcc tcggcctccc aaagtgetgg gattacagge gtgagccacc gcgccccggc 480
ttattttagt tttttatgct aatttttgaa tttgtaattg ggtgagaatt aaagtgttat 540
aaatttcacc ttaagtgaat atttattagt tttctaata caaaagtagt tacatctgac 600
gtaaggggat ttaattatct ttttctgggc ttgcgtcccg gaacgctgct gcattatgta 660
atctgtagta atataccac gagcagttt gagggttctg ggaagcacat ttgttttgcct 720
tacctacat gggaaagatt ccacgtggtc ctagaagcat acgtattcgt cggttacagt 780
attttaaata ttactggcc gctgaaattt aaaatggatg aaaaagaaat tctcttaagt 840
agcgttcttg aaactgctt atcaactca gttcatattt tcagttggag ttcgtgatgt 900
atgtgatttt ctttaaata aaaccegaat ctttagtaat acaaatattg ggaacttcga 960
ttactgtagg tcttaggta gactcgctt gactttgact aaatactatg ctttagaaat 1020
ttatctttag gagataaatt tggggggttt atctttttat atttgctttg tttcaattta 1080
tttaaataaa agtagtcttt ctagaagtat gttttatagt accacttacc tcggttactg 1140
tcccagttaa gcagttttca cgaatgtgga aaaatagtag tgtttttctt tcatacacgc 1200
gtatatgaaa aatttttaca ttgatagaga attatctgta aaaattaaag taaatttact 1260
gttagtctct aattttgttc tgagatagcc acgctgtggc attaagaagg ataatcaagg 1320
aataagccat aatgttcaga aaggggcttt actttttatt tttaatatta ttgataaact 1380
ttgtttagtc gaattgatgt ctgcgtgtct tccccgcct tcccataaa acagcgggac 1440
agaaagtctt gaaaactcca aaagggaaat atttactcag aggtctatc aaatttgctt 1500
agtctctgac gtttccctgt gtcgtacaaa tcctcgtgc ggcaaaagta gtttgtcttt 1560
actagggcac cgtctcgtca gcgttacgga gtattttgc cgcctgccc cgccgtccca 1620

```

gatattaatc acggagtcc agggagaagg aacttgtgct cgagcgg 1667

<210> 2

<211> 1453

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 2

cgggatccgt ttcttctec ctacttecgc ccaactcgtg tgacaggtgt ggaccaacc 60
 tgcctgggga gtgaggcccc tcgtcactec tgttcgtgcc cctggaagag tctgggagta 120
 tcgttcggct tctgtcctgg ccacagggag agtagaatat tgtctaactg gagttaactg 180
 tcgtttttca ctattcccac tggggaagta ccgggtgatc tttttgtgtg gctaactactg 240
 gacgtcttta ggaggtttag agcaaaatgg ctgggaccgc caaaaaggct acaagctatt 300
 tcctgagtgt gaaatgtggg cggtagcac aatggagtgg gttttgtgtg gtttggtgta 360
 tatgagagaa tgtggttata tacaagaaat tctaacttta cagcttttac tattggttta 420
 agcctgatgt ccgtcttggc agaaaagcaa aacaccaag cacctgacct cgggtccctg 480
 cttagctaca cctaatactt atggtgtaat cctgactgct ctccagatac agctcttaat 540
 tttcttgta atggatattt tgtttggtt tgggtgctag gaagggtgga atgggatgaa 600
 gtggaatga gaatgaagaa actttgttat ctaagtattt agaggagact tttattctcc 660
 tcttgattgc aagatataat agtaatattg ttcttaggtt ccaatatgaa tttgggattg 720
 tgtaggttcc caaatgggcc cgctagttag cctacaccac tcatcagcct tggaactggg 780
 gggaaaccag tttatcttc tcccttgat cagcattctc aatagcagga gtggaaggaa 840
 tctcaacttt ttattgaaca aagtcattta attgtttcaa ggacagatgt tctctaaaac 900
 tatattctat tggagattta ttttaactct tgggtagatt ttttaagagt tgctgaaaa 960
 cttaagattt tttattccca ttttccaag ccaatgcat tagtgacagt aaccatttat 1020
 tttagctctt gtgtcaggga cctgttaaa ctcttgacat gaagtatttt gtttaactct 1080
 accaacagtc caatgaggta ctgtttatt tagagatgag gaaactgagg ctaacagaat 1140
 ttgtgctcag attcttagag ctagttagtg gcagaagaag gatcagacca ggtttttcta 1200
 cctccaaagt ctgtaccct agcatctatt ctataatgct ttctaactc atgtctacag 1260
 attttattct tctaagate cctggttatt aataagacta cttgaatata ttgggtagtt 1320
 atgatttatt ttgtcageta gtcagctatt atatttctat gacatttctt ttctttacct 1380
 cttttttga gatggagttt cgtttttgtt gccaggceta gagtgtaatg gcgcaatctt 1440
 ggctaagctt gga 1453

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 3

ggctcgggtt cgcgtctaa 19

<210> 4

<211> 99

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 4

tttcttgget ttatatatct tgtggaaagg acgaaacacc ggctcgggtt cgcgtctaag 60

ttttagagct agaaatagca agttaaata aggctagtc 99

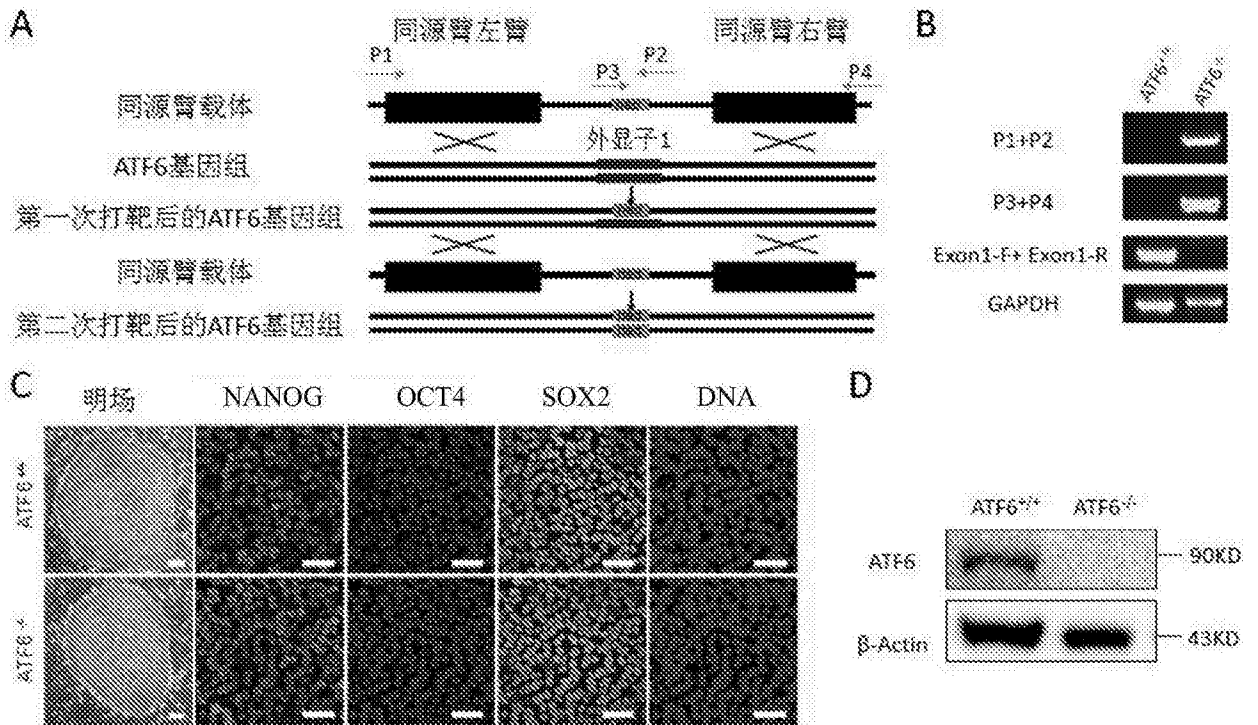


图1

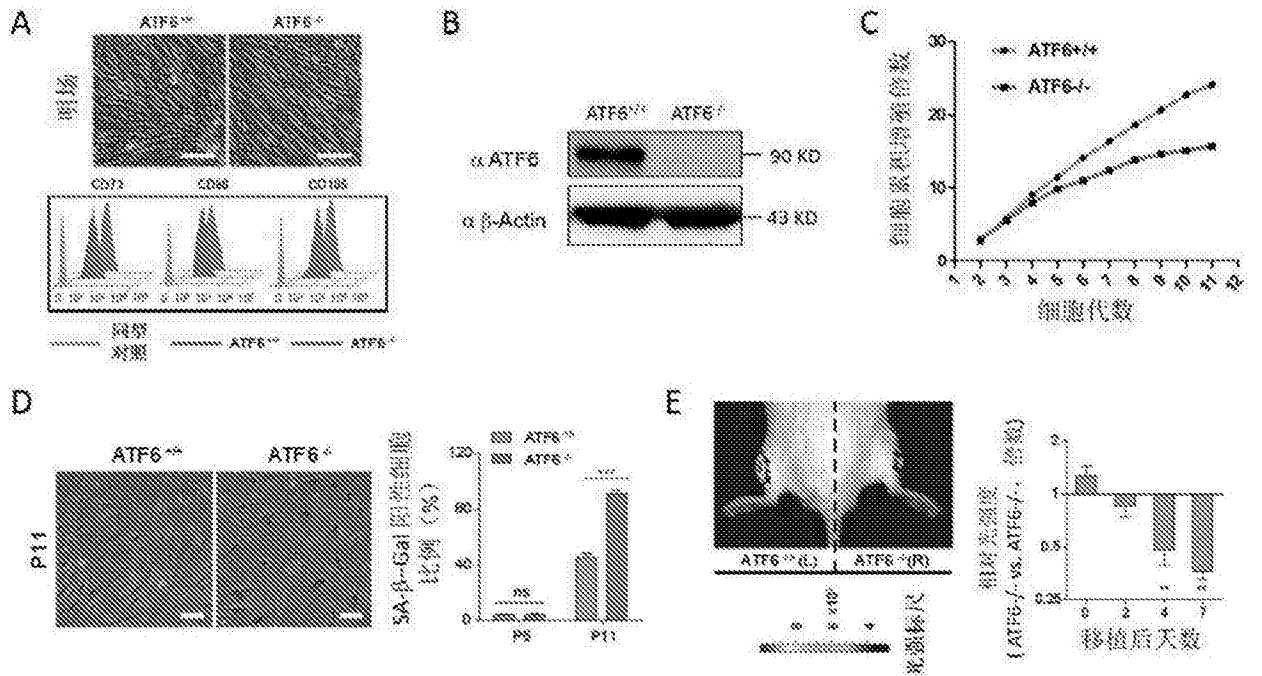


图2

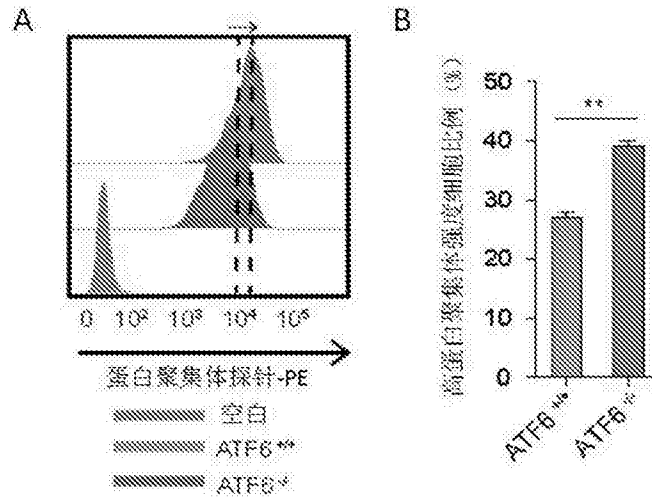


图3