

(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 109295234 A

(43)申请公布日 2019.02.01

(21)申请号 201710610807.0

(22)申请日 2017.07.25

(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 王晓群 吴倩 刘静

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 穆彬

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6888(2018.01)

C12N 15/87(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

A01K 67/027(2006.01)

A61K 45/00(2006.01)

A61P 25/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54)发明名称

皮层扩张以及沟回形成的小鼠模型的建立

(57)摘要

本发明涉及皮层扩张以及沟回形成的小鼠模型的建立。具体是通过单细胞测序发现TMEM14B基因是在人脑oRG细胞特异表达的基因。基于此建立皮层扩张以及沟回形成的小鼠模型,另外,本发明还涉及TMEM14B基因在疾病预测、诊断以及治疗上的应用。

1. TMEM14B基因用于调控大脑皮层发育的用途。
2. 根据权利要求1所述的用途,所述调控大脑皮层发育包括增加神经干细胞的数量。
3. 根据权利要求2所述的用途,所述增加神经干细胞的数量通过促进神经干细胞的分裂来实现。
4. TMEM14B基因用于制备药物的用途,所述药物用于调控大脑皮层发育,预测、诊断和治疗脑部疾病,所述脑部疾病优选包括脑小畸形,平滑脑,巨脑症,所述治疗优选为基因治疗。
5. 一种建立模拟人脑发育过程的转基因小鼠模型的方法,所述方法包括以下步骤:
 - 1) 筛选出人类大脑皮层发育相关的重要基因,优选为TMEM14B基因;
 - 2) 在野生型小鼠的遗传背景下对该基因进行定点敲入,得到F0代;
 - 3) F0代小鼠和NestinCre或者EmxCre杂交,启动该基因在神经系统里的表达。
6. 根据权利要求5所述的方法,所述转基因小鼠模型具有明显的皮层扩张和沟回结构的形成。
7. 根据权利要求5或6所述方法得到的转基因小鼠模型用于脑发育及脑相关疾病的研究和/或治疗脑疾病的药物的筛选的用途。
8. TMEM14B基因作为脑疾病预测、诊断以及治疗的靶点的用途。
9. 脑不同类型神经干细胞的分选方法,所述方法包括以下步骤:
 - 1) 分离脑的左右半球;
 - 2) 根据脑图谱切下前额叶的位置进行震荡切片;
 - 3) 通过显微精细分割出脑室区,脑室外区,皮层区;
 - 4) 用酶消化不同区域的组织;
 - 5) 中和反应后重悬步骤4)得到的单细胞;
 - 6) 利用流式抗体通过流式细胞术分选不同类型神经干细胞。
10. 根据权利要求9所述的方法,步骤4)中使用的酶是木瓜蛋白酶。

皮层扩张以及沟回形成的小鼠模型的建立

发明领域

[0001] 本发明涉及神经生物学领域,具体涉及TMEM14B基因在人脑oRG细胞中的特异表达,以及基于此,TMEM14B基因用于制备具有沟回的动物脑模型的用途及制备的动物脑模型的应用。

背景技术

[0002] 大脑新皮层(Neocortex)是哺乳动物的高级情感和认知中心。大脑皮层的进化在功能上表现为更高的学习和认知能力,在结构上表现为皮层表面积的扩张和神经元数量种类的增多。于是,沟回的产生是大脑发育的飞跃。大脑皮层的正常发育取决于神经干细胞特定时程内的分裂,分化已经新生神经元的迁移和成熟。脑容量和皮层扩张主要基于神经干细胞的种类、分裂方式、细胞周期长短等因素。目前大脑皮层发育研究的热点主要在大脑扩张的进化机制、脑发育相关疾病的发生机制的研究。

[0003] 近期的跨物种研究显示灵长类皮层进化出新的增生区脑室外区,此区域包含大量的具有增殖能力的oRG细胞。对oRG细胞分裂能力和自身分子特性的深入了解为解释大脑皮层的进化提供了可能。

[0004] 目前的研究主要集中在通过荧光蛋白标记来观察分裂行为,以及免疫染色来观察表达特性。由于对oRG细胞分子表达谱的认知缺乏,现有的研究主要集中于对oRG特异表达基因的筛选。

[0005] 小鼠由于其独特的饲养繁殖近缘优势,是常见的生物学研究的模式动物。然而小鼠是平滑脑,人类是沟回脑。虽然小鼠和人脑发育很多过程和机制在进化上保守,然而由于形态上的差别,小鼠用于研究人脑的发育过程就有些不足之处。

[0006] 现有技术中,通过在胚胎期在小鼠脑中利用胚胎电转的方法敲降神经干细胞调控基因(鼠源的Trnp1),或者瞬时过表达人源基因ARHGAP11B,使得小鼠脑中出现了沟回的结构[1,2]。另外,通过在胚胎期在小鼠脑中通过胚胎电转以及定点敲入人源基因TBC1D3的方法过表达人源基因,小鼠脑中出现了沟回的结构[3]。

发明内容

[0007] 本专利通过单细胞测序发现TMEM14B基因是在人脑oRG细胞中特异表达的基因。本专利制备了人源TMEM14B基因的条件敲入小鼠,发现小鼠脑发育表现出皮层扩张并出现似人脑的沟回,从而可以通过小鼠模型来模拟人脑的发育,作为工具模型对大脑皮层进化的研究有着重要意义。

[0008] 具体而言,本发明一方面涉及脑不同类型神经干细胞的分选方法,所述方法包括以下步骤:

[0009] 1) 分离脑的左右半球;

[0010] 2) 根据脑图谱切下前额叶的位置进行震荡切片;

[0011] 3) 通过显微精细分割出脑室区,脑室外区,皮层区;

- [0012] 4) 用酶消化不同区域的组织;
- [0013] 5) 中和反应后重悬步骤4) 得到的单细胞;
- [0014] 6) 利用流式抗体通过流式细胞术分选不同类型神经干细胞。
- [0015] 在优选的实施方案中,步骤4) 中使用的酶是木瓜蛋白酶。
- [0016] 在优选的实施方案中,步骤5) 中所述中和利用含胎牛血清的DMEM完全培养基。
- [0017] 在优选的实施方案中,所述胎牛血清含量为5%。
- [0018] 在优选的实施方案中,所述流式抗体根据要分离的神经干细胞类型选择。
- [0019] 在优选的实施方案中,对于脑室区和脑室外区收集CD15阳性/CD184阳性/CD56阴性/CD140 α 阴性的细胞,对于皮层区收集CD56阳性/CD184阴性的神经元。
- [0020] 在优选的实施方案中,CD15用的是eBioscience,CD56和CD184以及CD140 α 用的是BD Biosciences。
- [0021] 在优选的实施方案中,对于脑室外区收集的细胞,通过是否表达Tbr2基因区分oRG和IP细胞。
- [0022] 在本发明中,发明人将区域的精细切割、流式分选和单细胞测序技术结合,筛选出的细胞纯度高;可以对每一个细胞的RNA表达谱分析从而筛选出更特异的基因。
- [0023] 本发明另一方面涉及TMEM14B基因(NM_030969.4)用于调控大脑皮层发育的用途。
- [0024] 在优选的实施方案中,所述调控大脑皮层发育包括增加神经干细胞的数量。
- [0025] 在优选的实施方案中,所述增加神经干细胞的数量通过促进神经干细胞的分裂来实现。
- [0026] 本发明另一方面涉及TMEM14B基因用于制备药物的用途,所述药物用于调控大脑皮层发育,预测、诊断和治疗脑部疾病。
- [0027] 在优选的实施方案中,所述脑部疾病包括脑小畸形,平滑脑,巨脑症。
- [0028] 在优选的实施方案中,所述治疗为基因治疗。
- [0029] 在优选的实施方案中,所述调控大脑皮层发育包括增加神经干细胞的数量。
- [0030] 在优选的实施方案中,所述增加神经干细胞的数量通过促进神经干细胞的分裂来实现。
- [0031] 本发明另一方面涉及建立模拟人脑发育过程的转基因小鼠模型的方法,所述方法包括以下步骤:
- [0032] 1) 筛选出人类大脑皮层发育相关的重要基因。
- [0033] 2) 在野生型小鼠的遗传背景下对该基因进行定点敲入,得到F0代。
- [0034] 3) F0代小鼠和NestinCre或者EmxCre杂交,启动该基因在神经系统里的表达,从而观察对脑发育的影响。
- [0035] 在优选的实施方案中,所述重要基因是TMEM14B基因。
- [0036] 在优选的实施方案中,所述转基因小鼠模型具有明显的皮层扩张和沟回结构的形成。
- [0037] 本发明另一方面涉及根据所述建立模拟人脑发育过程的转基因小鼠模型的方法得到的转基因小鼠模型用于脑发育及脑相关疾病的研究的用途。
- [0038] 本发明另一方面涉及TMEM14B基因作为疾病治疗的靶点的用途。
- [0039] 一方面,TMEM14B基因可作为脑疾病评估的候选基因,该基因的突变会有发生平滑

脑,脑小畸形,巨脑症等疾病的风险。

[0040] 另一方面,通过在脑小畸形,平滑脑患者中上调该基因的表达,从而促进神经干细胞的增殖,补偿神经生成的能力,从而部分或完全治疗脑小或平滑脑的表型。

[0041] 此外,对巨脑症,可以对该基因通过基因操作沉默该基因的表达。

附图说明

[0042] 图1人脑皮层不同类型神经干细胞的分选

[0043] 图2oRG特异基因TMEM14B在胚胎皮层中的表达位置。标尺:200 μ m

[0044] 图3TMEM14B转基因小鼠神经干细胞数量显著增多。

[0045] A.在脑片上对PAX6和P-VIM进行免疫荧光染色标尺:100 μ m(左),20 μ m(右)

[0046] B.皮层蛋白的Western Blot显示SOX2,PAX6,TBR2的表达量

[0047] 图4TMEM14B转基因小鼠EdU/BrdU双标。标尺:50 μ m(左),20 μ m(右)

[0048] 图5TMEM14B转基因小鼠神经的沟回形成。

[0049] A.荧光体视镜下小鼠脑的俯视图。标尺:1mm

[0050] B.对新生小鼠的大脑皮层不同参数的测量。纵坐标为各个参数的比例(转基因小鼠/野生型小鼠)。

[0051] C.新生转基因小鼠脑的矢切片进行CTIP2染色。标尺:500 μ m

具体实施方式

[0052] 缩写:

[0053] RG:Radial Glia放射状胶质细胞

[0054] oRG:outer Radial Glia外侧放射状胶质细胞

[0055] IP:Intermediate Progenitor中间前体细胞

[0056] NesCre::+/:NesCre背景下的野生型小鼠

[0057] NesCre::T/+ :NesCre背景下的TMEM14B的转基因小鼠

[0058] 实施例1.大脑皮层不同类型神经干细胞的分选

[0059] 1)获得脑组织,分离左右半球,根据脑图谱切下前额叶的位置进行震荡切片。之后通过显微精细分割出脑室区、脑室外区和皮层区。

[0060] 2)用木瓜蛋白酶将不同区域的组织在37 $^{\circ}$ C条件下消化20分钟,并用移液枪轻轻吹打成单细胞悬液。用含5%胎牛血清(FBS)的DMEM完全培养基中和反应,2000rpm离心5分钟,用含有0.5%血清蛋白(BSA)的PBS重悬。不同区域的单细胞悬液按比例加入流式抗体:CD15(eBioscience),CD184(BD Biosciences),CD56(BD Biosciences),CD140 α (BD Biosciences)。脑室区和脑室外区收集CD15阳性/CD184阳性/CD56阴性/CD140 α 阴性的细胞。皮层区收集CD56阳性/CD184阴性的神经元。脑室外区筛选出的细胞通过是否表达Tbr2区分oRG和IP细胞(图1)。

[0061] 实施例2.TMEM14B是人脑oRG细胞特异表达的基因

[0062] 1)通过聚类的方式[4]对单细胞测序的结果进行了质量检测。

[0063] 2)去掉所有细胞种类中表达量都很低的基因,然后根据不同细胞基因表达量的显著差异,我们从中筛选出9个oRG特异表达的基因,其中TMEM14B作为oRG细胞特异表达基因,

只存在于灵长类动物中,并且原位杂交的验证也证明该基因特异存在于脑室外区(图2)。

[0064] 实施例3. TMEM14B的转基因小鼠表现为神经干细胞数量的显著增多。

[0065] 1) 转基因小鼠制备。人源TMEM14B基因敲入小鼠(百奥赛图)与NestinCre的小鼠获得第一代NESCre::T/+的子代,并对其胚胎期进行表型分析[1-3]。实验发现胚胎期的转基因皮层显著增厚,IP和oRG神经干细胞都显著增多(图3A)。

[0066] 2) Western Blot分析表型。取胚胎期转基因和正常小鼠的皮层,进行总蛋白提取,之后检测Sox2, Pax6, Tbr2等不同蛋白的表达状况,发现转基因小鼠皮层里的神经干细胞特异蛋白的表达显著升高(图3B)。

[0067] 实施例4. TMEM14B过表达使神经干细胞的细胞周期缩短

[0068] 1) BrdU/EdU的双重标记。人源TMEM14B基因敲入小鼠(百奥赛图)与NestinCre的小鼠获得第一代NESCre::T/+的子代,在孕鼠13.5天腹腔注射EdU(50mg/kg),14小时后再次腹腔注射BrdU(50mg/kg),两小时后杀死孕鼠,取脑固定。

[0069] 2) 通过对BrdU和EdU进行染色以及统计,计算出再一次进入细胞周期的细胞数比例。发现过表达TMEM14B的小鼠皮层中有更多的细胞进入下一轮细胞周期,间接证明过表达该基因可以缩短细胞周期(图4),从而可以在更短的时间内产生更多新生神经元,促进大脑皮层的扩张。

[0070] 实施例5. 新生的TMEM14B转基因表现为小鼠皮层扩张以及出现沟回

[0071] 人源TMEM14B基因敲入小鼠与NestinCre的小鼠获得第一代NESCre::T/+的子代,并对其出生后进行表型分析。对新生的P0的幼年转基因小鼠进行脑结构的形态分析,以及染色的结构分析[1-3]。可以发现相比于对照组,转基因小鼠表现为明显的皮层扩张(图5A, B, C),以及沟回的出现(图5A, C)。

[0072] 参考文献

[0073] 1. Stahl, R., et al., Trnp1 regulates expansion and folding of the mammalian cerebral cortex by control of radial glial fate. *Cell*, 2013. 153 (3): p. 535-49.

[0074] 2. Florio, M., et al., Human-specific gene *ARHGAP11B* promotes basal progenitor amplification and neocortex expansion. *Science*, 2015. 347 (6229): p. 1465-1470.

[0075] 3. Ju, X.-C., et al., The hominoid-specific gene *TBC1D3* promotes generation of basal neural progenitors and induces cortical folding in mice. *eLife*, 2016. 5: p. e18197.

[0076] 4. Langfelder, P. and S. Horvath, WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*, 2008. 9 (1): p. 559.

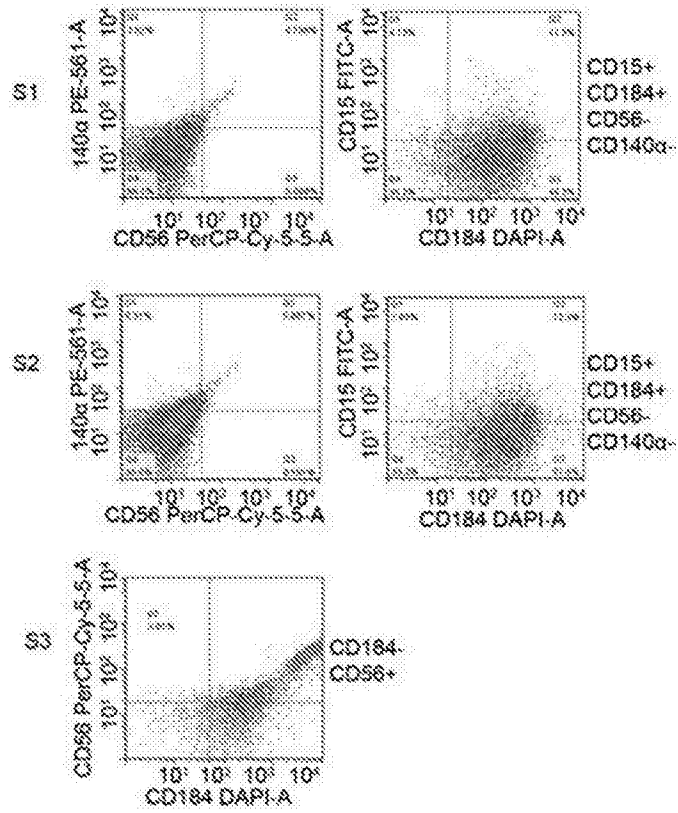


图1

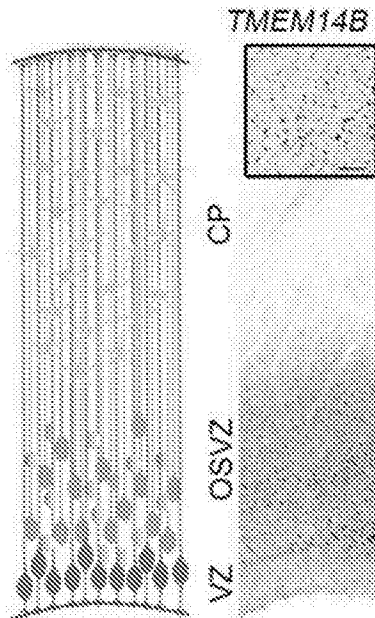


图2

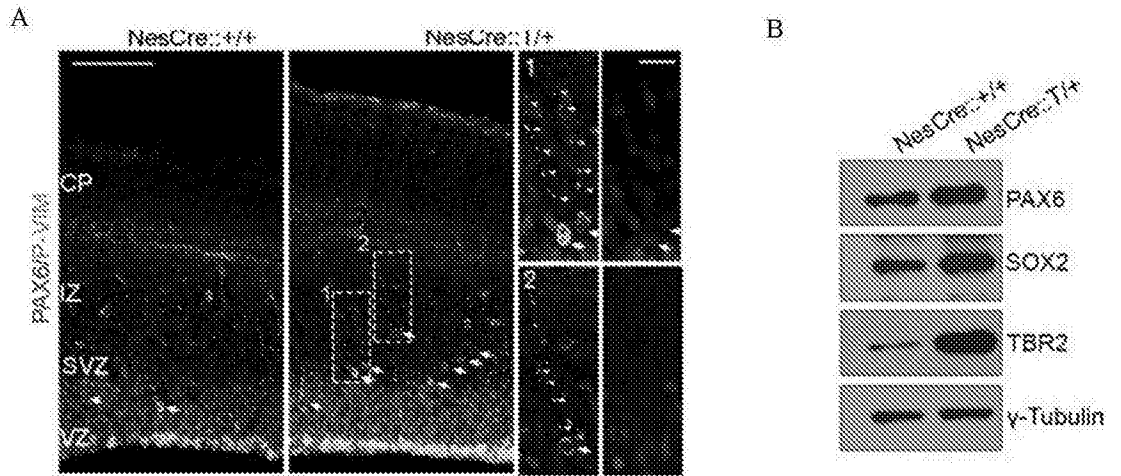


图3

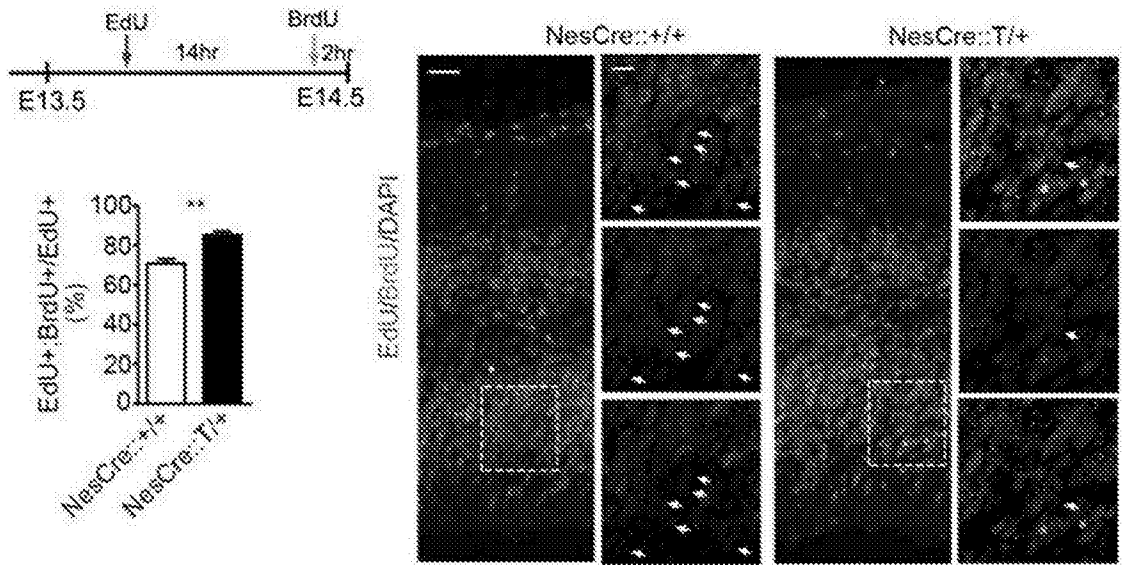


图4

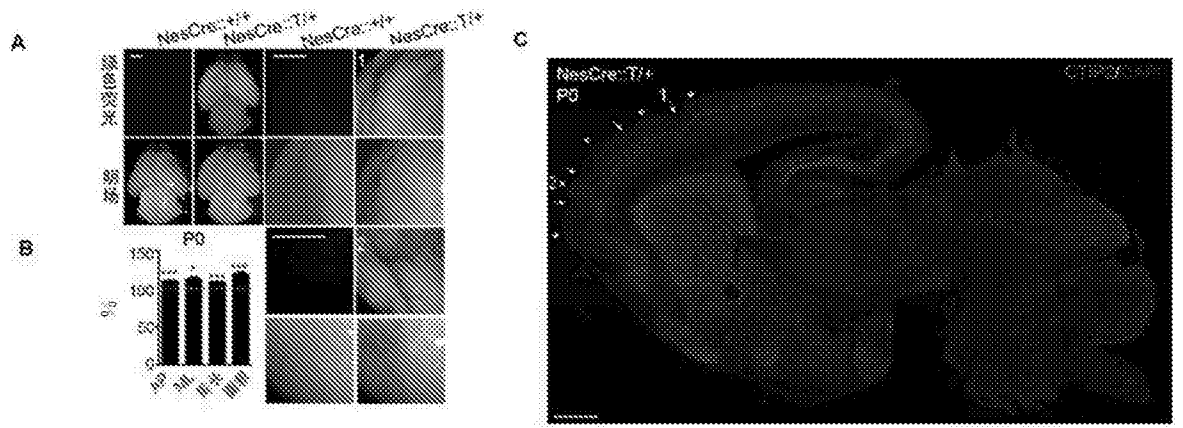


图5