

(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 105567642 A

(43) 申请公布日 2016. 05. 11

(21) 申请号 201610069342. 8

(22) 申请日 2016. 02. 01

(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 付丽娜 任若通

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 关畅 白艳

(51) Int. Cl.

C12N 5/10(2006. 01)

C12Q 1/02(2006. 01)

权利要求书2页 说明书12页

序列表7页 附图7页

(54) 发明名称

一种着色性干皮病人多能干细胞的制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种着色性干皮病人多能干细胞的制备方法。本发明利用 iPSC 技术将着色性干皮病人来源的皮肤成纤维细胞,通过非整合附加型质粒电转的方法使其重编程为其特异性的诱导多能干细胞,并将其定向分化成神经细胞,这些细胞在体外表现出对于 UV 的极度敏感,更易发生细胞凋亡,为着色性干皮病人发生的神经退行提供了一定的线索。另外,这些携带病人基因突变的神经干细胞和神经元可以作为有效的平台进行高通量的个性化药物筛选,为疾病研究、开发疾病模型、研究疾病的发病机制并进行疾病治疗奠定基础。在个性化治疗和转化医学中具有巨大的应用前景。

1. 一种着色性干皮病人特异性的神经元的制备方法,包括如下步骤:

(1)对离体的着色性干皮病人来源的成纤维细胞进行重编程,得到携带着色性干皮病人基因的诱导多能干细胞;

(2)对所述诱导多能干细胞进行定向诱导分化,得到携带着色性干皮病人基因的神经干细胞;

(3)对所述神经干细胞进行定向诱导分化,得到携带着色性干皮病人基因的神经元。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:

步骤(2)中,所述对诱导多能干细胞进行定向诱导分化包括如下步骤:

A)在诱导多能干细胞培养基中对所述诱导多能干细胞进行诱导培养,得到诱导培养后细胞;

B)在神经干细胞诱导培养基1中对所述诱导培养后细胞进行第一次分化培养,得到第一次分化培养后细胞;

C)在神经干细胞诱导培养基2中对所述第一次分化培养后细胞进行第二次分化培养,即得到携带着色性干皮病人基因的神经干细胞;

所述神经干细胞诱导培养基2为在神经干细胞基础诱导培养基中添加Compound E得到的培养基,所述Compound E在所述神经干细胞诱导培养基2中的浓度为0.1-0.5 μ M;

所述神经干细胞诱导培养基1为在神经干细胞诱导培养基2中添加Dorsomorphin得到的培养基,所述Dorsomorphin在所述神经干细胞诱导培养基1中的浓度为1-3 μ M;

步骤(3)中,所述对神经干细胞进行定向诱导分化为在神经元分化培养基培养所述神经干细胞;

所述神经元分化培养基为在神经元分化基础培养基中添加双丁环磷腺苷、抗坏血酸维生素C、脑源性神经营养因子和胶质细胞源性神经营养因子得到的培养基;

所述双丁环磷腺苷在所述神经元分化培养基中的浓度为350-450 μ M;

所述抗坏血酸维生素C在所述神经元分化培养基中的浓度为150-250 μ M;

所述脑源性神经营养因子在所述神经元分化培养基中的浓度为5-15ng/ml;

所述胶质细胞源性神经营养因子在所述神经元分化培养基中的浓度为5-15ng/ml。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于:

在步骤C)中,还包括如下步骤:将所述第二次分化培养得到的细胞在所述神经干细胞基础诱导培养基中传代培养,得到携带着色性干皮病人基因的神经干细胞;

所述神经干细胞基础诱导培养基为在细胞培养基中添加Neurobasal、N2、B27、GlutaMAX、hLIF、CHIR99021和SB431542得到的培养基;

所述神经元分化基础培养基为在细胞培养基中添加N2和B27得到的培养基。

4. 根据权利要求2或3所述的方法,其特征在于:

步骤A)中,所述诱导培养的时间为1-3天;

步骤B)中,所述第一次分化培养的时间为1-3天;

步骤C)中,所述第二次分化培养的时间为4-6天;

步骤(3)中,所述培养的时间为14-21天。

5. 根据权利要求1-4中任一所述的方法,其特征在于:

所述重编程为将基因OCT3/4、SOX2、KLF4、LMyc和LIN28共同导入离体的着色性干皮病

人来源的成纤维细胞中。

6. 根据权利要求1-5中任一所述的方法,其特征在于:所述离体的着色性干皮病人来源的成纤维细胞为XPA成纤维细胞、XPB成纤维细胞、XPC成纤维细胞、XPG成纤维细胞或XPV成纤维细胞。

7. 一种用于制备着色性干皮病人特异性的神经元的试剂盒,包括权利要求2中所述的诱导多能干细胞培养基和/或神经干细胞基础诱导培养基和/或神经干细胞诱导培养基1和/或神经干细胞诱导培养基2和/或神经元分化培养基。

8. 一种着色性干皮病人特异性的神经干细胞的制备方法,包括如下步骤:为权利要求1所述的方法中的步骤(1)-(2)。

9. 权利要求1-6中任一所述的方法制备得到的神经干细胞;

或权利要求1-6中任一所述的方法制备得到的神经元。

10. 权利要求1-6中任一所述的方法或权利要求7所述的试剂盒或权利要求8所述的方法或权利要求9所述的神经干细胞或神经元在制备筛选和/或鉴定用于治疗 and/或预防着色性干皮病的临床药物和/或天然有机物和/或小分子化合物的产品中的应用;

或权利要求9所述的神经干细胞或神经元在作为或制备着色性干皮病的细胞模型中的应用。

一种着色性干皮病人多能干细胞的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种着色性干皮病人多能干细胞的制备方法,尤其涉及多种着色性干皮病人特异性的多能干细胞和神经细胞的制备方法。

背景技术

[0002] 着色性干皮病(Xeroderma pigmentosum,简称XP)是由基因突变导致DNA修复缺陷而引起的一种罕见的常染色体隐性遗传疾病。根据对应突变基因(XPA、XPB、XPC、XPD、XPE、XPF、XPG和XPV)的不同,可将着色性干皮病人分为如下8种不同的互补型:着色性干皮病互补型A,着色性干皮病互补型B,着色性干皮病互补型C,着色性干皮病互补型D,着色性干皮病互补型E,着色性干皮病互补型F,着色性干皮病互补型G和着色性干皮病变异型V。

[0003] 着色性干皮病的临床表型主要是皮肤对于紫外极其敏感、色素沉积、容易发生光损伤和日光诱发的皮肤癌。目前关于着色性干皮病皮肤损伤的致病机理已经有多种报道阐述,主要是与体内的两种DNA损伤修复缺陷相关。其中7个互补型与核苷酸切除修复(Nucleotide Excision Repair,NER)缺陷有关,1个变异型与跨损伤合成(Translesion Synthesis,TLS)缺陷有关。核苷酸切除修复可分为全基因组修复(global genome repair,GGR)和转录偶联修复(transcription-coupled repair,TCR),是紫外(UV)照射产生DNA损伤的最主要修复途径。GGR能够修复全基因组上的DNA损伤,而TCR只能修复转录过程中的DNA损伤。在GGR修复通路中,XPC和hHR23B蛋白复合体识别UV导致的DNA损伤;在TCR修复通路中CSA-CSB复合体识别损伤。待DNA损伤都被复合物识别后,蛋白XPA也会招募过来进一步验证损伤位点,同时XPB和XPD作为转录因子复合体TFIIH的一部分被招募过来作为解旋酶打开损伤部位的DNA双链,然后XPG,XPF会在损伤位点的两端进行剪切,大约30个核苷酸左右的片段会被移除,留下的空缺按照碱基互补原则重新合成,至此UV导致的DNA损伤被完全修复。变异型XPV病人具有正常的核苷酸剪切修复功能,但是在跨损伤DNA合成中存在缺陷。XPV基因编码一种DNA-聚合酶 η ,其能特异性识别UV产生的环丁烷嘧啶二聚体的突变,在DNA合成过程中在突变的互补链上插入正确的配对碱基完成DNA复制。因此每一个基因的突变都会导致蛋白功能受损进而影响DNA损伤的修复,造成基因组的不稳定性,引发病人对紫外的敏感性及紫外诱导皮肤癌的高发生率。

[0004] 虽然关于着色性干皮病人皮肤癌的致病机理已经清楚,但是目前仍然没有很好的治疗方法。病人也只能通过减少紫外照射来减缓疾病的发生。然而存在一部分着色性干皮病人还伴随有一定程度的神经退行性疾病,包括头小畸形,痴呆,感觉神经性听力损失,周围神经病变等。由于大脑内部没有受到紫外的照射,因此着色性干皮病人发生神经退变的发病机理目前并没有很好的解释,同样对此也没有有效的治疗方法或药物。目前对于着色性干皮病人神经退行的机理研究处于停滞状态,主要原因就是很难获得合适的实验材料。因此,急需建立一种合适的平台或模型,用于在实验室内模拟神经退行疾病的发生,便于对疾病分子机制的研究。

[0005] 近年来,诱导多能干细胞(Induced Pluripotent Stem Cell,iPSC)技术的出现和

发展为多种罕见类疾病的基因治疗和细胞治疗提供了广阔前景。iPSC是通过将特定转录因子(如OCT4,SOX2,KLF4,cMYC等)导入体细胞,使其转变成为可以不断增殖,具有多向分化潜能的干细胞。iPSCs不仅可用于细胞移植,器官再生,特别是细胞损伤、坏死严重的疾病的细胞移植治疗;还可以构建疾病模型,以便于研究疾病形成的机制,筛选新的药物,以及研究新的治疗方法。

发明内容

[0006] 本发明的一个目的是提供一种着色性干皮病人特异性的神经元的制备方法。

[0007] 本发明提供的着色性干皮病人特异性的神经元的制备方法包括如下步骤:

[0008] (1)对离体的着色性干皮病人来源的成纤维细胞进行重编程,得到携带着色性干皮病人基因的诱导多能干细胞;

[0009] (2)对所述诱导多能干细胞进行定向诱导分化,得到携带着色性干皮病人基因的神经干细胞;

[0010] (3)对所述神经干细胞进行定向诱导分化,得到携带着色性干皮病人基因的神经元;

[0011] 所述基因OCT3/4的核苷酸序列为序列表中的序列1;

[0012] 所述基因SOX2的核苷酸序列为序列表中的序列2;

[0013] 所述基因KLF4的核苷酸序列为序列表中的序列3;

[0014] 所述基因LMyc的核苷酸序列为序列表中的序列4;

[0015] 所述基因LIN28的核苷酸序列为序列表中的序列5。

[0016] 上述方法中,

[0017] 步骤(2)中,所述对诱导多能干细胞进行定向诱导分化包括如下步骤:

[0018] A)在诱导多能干细胞培养基中对所述诱导多能干细胞进行诱导培养,得到诱导培养后细胞;

[0019] B)在神经干细胞诱导培养基1中对所述诱导培养后细胞进行第一次分化培养,得到第一次分化培养后细胞;

[0020] C)在神经干细胞诱导培养基2中对所述第一次分化培养后细胞进行第二次分化培养,即得到携带着色性干皮病人基因的神经干细胞;

[0021] 所述神经干细胞诱导培养基2为在神经干细胞基础诱导培养基中添加Compound E得到的培养基,所述Compound E在所述神经干细胞诱导培养基2中的浓度为0.1-0.5 μ M;所述Compound E在所述神经干细胞诱导培养基2中的浓度具体为0.1 μ M;

[0022] 所述神经干细胞诱导培养基1为在神经干细胞诱导培养基2中添加Dorsomorphin得到的培养基,所述Dorsomorphin在所述神经干细胞诱导培养基1中的浓度为1-3 μ M;所述Dorsomorphin在所述神经干细胞诱导培养基1中的浓度为2 μ M;

[0023] 步骤(3)中,所述对神经干细胞进行定向诱导分化为在神经元分化培养基培养所述神经干细胞;

[0024] 所述神经元分化培养基为在神经元分化基础培养基中添加双丁环磷腺苷、抗坏血酸维生素C、脑源性神经营养因子和胶质细胞源性神经营养因子得到的培养基;

[0025] 所述双丁环磷腺苷在所述神经元分化培养基中的浓度为350-450 μ M,所述双丁环

磷腺苷在所述神经元分化培养基中的浓度为400 μ M;

[0026] 所述抗坏血酸维生素C在所述神经元分化培养基中的浓度为150-250 μ M,所述抗坏血酸维生素C在所述神经元分化培养基中的浓度为200 μ M;

[0027] 所述脑源性神经营养因子在所述神经元分化培养基中的浓度为5-15ng/ml,所述脑源性神经营养因子在所述神经元分化培养基中的浓度为10ng/ml;

[0028] 所述胶质细胞源性神经营养因子在所述神经元分化培养基中的浓度为5-15ng/ml;

[0029] 所述胶质细胞源性神经营养因子在所述神经元分化培养基中的浓度为10ng/ml。

[0030] 上述方法中,

[0031] 在步骤C)中,还包括如下步骤:将所述第二次分化培养得到的细胞在所述神经干细胞基础诱导培养基中传代培养,得到携带着色性干皮病人基因的神经干细胞;

[0032] 所述传代培养为每4-5天传代一次,连续传至第三代。

[0033] 所述诱导多能干细胞培养基为在细胞培养基上添加Knockout血清替代物、非必需氨基酸、GlutaMAX、青霉素/链霉素、 β -巯基乙醇、人FGF2得到的培养基;所述Knockout血清替代物在所述诱导多能干细胞培养基中的体积分数为20%;所述非必需氨基酸在所述诱导多能干细胞培养基中的浓度为0.1mM;所述GlutaMAX在所述诱导多能干细胞培养基中的浓度为1mM;所述青霉素或链霉素在所述诱导多能干细胞培养基中的体积分数为1%;所述 β -巯基乙醇在所述诱导多能干细胞培养基中的浓度为55 μ M;所述人FGF2在所述诱导多能干细胞培养基中的浓度为10ng/ml;

[0034] 所述神经干细胞基础诱导培养基为在细胞培养基中添加Neurobasal、N2、B27、GlutaMAX、hLIF、CHIR99021和SB431542得到的培养基;所述Neurobasal在所述神经干细胞基础诱导培养基中的体积分数为50%;所述N2在所述神经干细胞基础诱导培养基中的体积分数为1%;所述B27在所述神经干细胞基础诱导培养基中的体积分数为2%;所述GlutaMAX在所述神经干细胞基础诱导培养基中的浓度为2mM;所述CHIR99021在所述神经干细胞基础诱导培养基中的浓度为3 μ M或4 μ M;所述SB431542在所述神经干细胞培养基或神经干细胞诱导培养基2或神经干细胞诱导培养基1中的浓度为3 μ M;所述hLIF在所述神经干细胞基础诱导培养基中的浓度为10ng/ml;

[0035] 所述神经元分化基础培养基为在细胞培养基中添加N2和B27得到的培养基,所述N2在所述神经元分化培养基中的体积分数为1%;所述B27在所述神经元分化培养基中的体积分数为2%;

[0036] 所述细胞培养基具体为DMEM/F12。

[0037] 上述方法中,

[0038] 步骤A)中,所述诱导培养的时间为1-3天,所述诱导培养的具体时间为2天;

[0039] 步骤B)中,所述第一次分化培养的时间为1-3天;所述第一次分化培养的时间具体为2天;

[0040] 步骤C)中,所述第二次分化培养的时间为4-6天;所述第二次分化培养的时间为5天;

[0041] 步骤(3)中,所述培养的时间为14-21天;所述培养的时间为18天。

[0042] 上述方法中,

- [0043] 所述重编程为将基因OCT3/4、SOX2、KLF4、LMyc和LIN28共同导入离体的着色性干皮病人来源的成纤维细胞中；
- [0044] 所述共同导入的方法包括如下步骤：将表达OCT3/4的Episomal载体、表达SOX2和KLF4的Episomal载体、表达LMyc和LIN28的Episomal载体和表达标记基因的载体共同导入离体的着色性干皮病人来源的成纤维细胞中；
- [0045] 所述表达OCT3/4的Episomal载体为pCXLE-hOCT3/4；
- [0046] 所述表达SOX2和KLF4的Episomal载体为pCXLE-hSK；
- [0047] 所述表达LMyc和LIN28的Episomal载体为pCXLE-hUL；
- [0048] 所述标记基因为EGFP，所述EGFP的核苷酸序列为序列列表中的序列6；
- [0049] 所述表达标记基因的载体为pCXLE-EGFP。
- [0050] 上述方法中，所述离体的着色性干皮病人来源的成纤维细胞为XPA成纤维细胞、XPB成纤维细胞、XPC成纤维细胞、XPG成纤维细胞或XPV成纤维细胞。
- [0051] 本发明的另一个目的是提供一种用于制备着色性干皮病人特异性的神经元的试剂盒。
- [0052] 本发明提供的试剂盒包括上述诱导多能干细胞培养基和/或神经干细胞基础诱导培养基和/或神经干细胞诱导培养基1和/或神经干细胞诱导培养基2和/或神经元分化培养基。
- [0053] 本发明还有一个目的是提供一种着色性干皮病人特异性的神经干细胞的制备方法。
- [0054] 本发明提供的着色性干皮病人特异性的神经干细胞的制备方法包括如下步骤：为上述方法中的步骤(1)-(2)。
- [0055] 上述方法制备得到的神经干细胞或上述方法制备得到的神经元也属于本发明的保护范围。
- [0056] 本发明的最后一个目的是提供上述方法或上述神经干细胞或上述神经元的新用途。
- [0057] 本发明提供了上述方法或上述神经干细胞或上述神经元在制备筛选和/或鉴定用于治疗 and/或预防着色性干皮病的临床药物和/或天然有机物和/或小分子化合物的产品中的应用。
- [0058] 本发明还提供了上述神经干细胞或上述神经元在作为或制备着色性干皮病的细胞模型中的应用。
- [0059] 本发明获得的多能干细胞具有如下优点：1)在体外具有自我更新和分化成三个胚层的潜能，因而可以定向分化成受疾病累积的细胞系；2)获得的多能干细胞无外源基因整合，具有安全性，利用现有的基因打靶技术可以针对患者自体来源的诱导型多能干细胞进行基因突变的基因组原位矫正，从而在基因水平清除内源性致病因素；3)患者自体来源的诱导多能干细胞，避免了配型和排斥反应的困扰。
- [0060] 本发明利用iPSC技术将着色性干皮病人来源的皮肤成纤维细胞，通过非整合附加型质粒电转的方法使其重编程为其特异性的诱导多能干细胞，并将其定向分化成神经细胞，这些细胞在体外表现出对于UV的极度敏感，更易发生细胞凋亡，为着色性干皮病人发生的神经退化提供了一定的线索。另外，这些携带病人基因突变的神经干细胞和神经元可以

作为有效的平台进行高效高通量的个性化药物筛选,为疾病研究、开发疾病模型、研究疾病的发病机制并进行疾病治疗奠定基础。在个性化治疗和转化医学中具有巨大的应用前景。

附图说明

[0061] 图1为五株着色性干皮病人来源的皮肤成纤维细胞的重编程。图1A为五株着色性干皮病人来源的皮肤成纤维细胞所携带的基因突变;图1B为五株皮肤成纤维细胞和重编程得到的对应诱导多能干细胞的形态。

[0062] 图2为五株着色性干皮病人特异性的多能干细胞的全能性鉴定。图2A为免疫荧光检测干细胞标记物NANOG, OCT4, SOX2;图2B为qPCR检测多能干细胞中外源载体EBNA1的整合;图2C为将五株病人特异的诱导多能干细胞打进免疫缺陷小鼠的皮下,分化成具有三个胚层的畸胎瘤,其中, TUJ1(外胚层标记物), FOXA2(内胚层标记物), α -SMA(中胚层标记物);图2D为五种诱导多能干细胞的核型分析。

[0063] 图3为将着色性干皮病人特异的诱导多能干细胞定向分化成神经干细胞。图3A为诱导多能干细胞定向分化成神经干细胞的示意图;图3B为免疫荧光检测神经干细胞的标记物NESTIN, PAX6。

[0064] 图4为将着色性干皮病人特异的神经干细胞继续分化成神经元。图4A为神经干细胞分化成神经元的示意图;图4B为免疫荧光检测神经元的标记物TUJ1, MAP2。

[0065] 图5为着色性干皮病人特异的神经干细胞和神经元对UV的敏感性检测。图5A为免疫荧光检测神经干细胞经UV处理后环丁烷嘧啶二聚体(cyclobutane pyrimidine dimers, CPD)的含量;图5B为Annexin V-FITC/PI方法用流式检测野生型和XPA突变的神经干细胞在经过UV照射后的凋亡;图5C为野生型和XPA突变的神经干细胞的TUNEL染色;图5D为免疫荧光检测神经元经UV处理后CPD的含量;图5E为野生型和XPA突变的神经元的TUNEL染色。

具体实施方式

[0066] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0067] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0068] 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。

[0069] 下述实施例中的XPA成纤维细胞(GM00710)、XPB成纤维细胞(GM13026)、XPC成纤维细胞(GM15709)、XPG成纤维细胞(GM13371)和XPV成纤维细胞(GM03055)及野生型成纤维细胞(GM00038)均购买于美国的Coriell Cell Repository。

[0070] 上述五种携带不同基因突变的着色性干皮病人来源的皮肤成纤维细胞的突变位点情况如下(图1A):

[0071] (a) XPA成纤维细胞(GM00710)来自于XPA患者的皮肤成纤维细胞,其携带的突变是XPA基因的第619个位点由C突变成T,转录时形成终止密码子,导致XPA蛋白的翻译提前终止;

[0072] (b) XPB成纤维细胞(GM13026)来自于XPB患者的皮肤成纤维细胞,其携带的突变是XPB基因的第295个位点T突变成C,导致XPB蛋白的第99个氨基酸由苯丙氨酸突变成丝氨酸;

[0073] (c) XPC成纤维细胞(GM15709)来自于XPC患者的皮肤成纤维细胞,其携带的突变是在XPC基因的第三个内含子中存在一个T变成A,影响了XPC mRNA的剪切;

[0074] (d)XPG成纤维细胞(GM13371)来自于XPG患者的皮肤成纤维细胞,其携带的突变是XPG基因第2171位点的A碱基发生缺失,造成mRNA编码框的移码;

[0075] (e)XPV成纤维细胞(GM03055)来自于XPV患者的皮肤成纤维细胞,其携带的突变是XPV基因的第376个位点由C突变成T,在mRNA转录时形成终止密码子,导致XPV蛋白的截短。

[0076] 上述基因的突变都会导致其编码蛋白的功能紊乱或缺失,使病人机体内的DNA修复不能正常进行,进而导致着色性干皮病的发生。

[0077] 下述实施例中的pCXLE-hOCT3/4-shp53-F(#27077)、pCXLE-hSK(#27078)、pCXLE-hUL(#27080)和pCXLE-EGFP(#27082)均购买于Addgene。

[0078] 下述实施例中的用于免疫荧光的抗体如下:

[0079] 抗人OCT4抗体(sc-5279),Santa Cruz Biotechnology。

[0080] 抗人SOX2抗体(sc-17320),Santa Cruz Biotechnology。

[0081] 抗人NANOG抗体(ab21624),Abcam。

[0082] 抗人NESTIN抗体(MAB5326),Millipore。

[0083] 抗人PAX6抗体(PRB-278P),Covance。

[0084] 抗人TUJ1抗体(T2220),Sigma。

[0085] 抗人MAP2抗体(4403),Sigma。

[0086] 抗人FOXA2抗体(8186),Cell Signaling Technology。

[0087] 抗人-SMA抗体(A5228),Sigma。

[0088] 抗人CPD抗体(TMD-2),Cosmo Bio。

[0089] 下述实施例中的培养基配方如下:

[0090] 1)成纤维细胞培养基配方:90%DMEM(Invitrogen)、10%FBS(Hyclone)、1%青霉素/链霉素(Invitrogen);

[0091] 2)诱导多能干细胞培养基配方:80%DMEM/F12培养基(Invitrogen)、20%(体积百分含量)Knockout血清替代物(Invitrogen)、0.1mM非必需氨基酸(Invitrogen)、1mM GlutaMAX(Invitrogen)、1%青霉素/链霉素(Invitrogen)、55 μ M β -巯基乙醇(Invitrogen)、10ng/ml人FGF2(Joint Protein Central);

[0092] 3)神经干细胞诱导培养基1配方:50%Advanced DMEM/F12(Invitrogen)、50% Neurobasal(Invitroge)、1%N2(Invitrogen)、2%B27(Invitrogen)、2mM GlutaMAX(Invitrogen)、10ng/ml hLIF(Millipore)、4 μ M CHIR99021(Cell agentech)、3 μ M SB431542(Cellagentech)、0.1 μ M Compound E(EMD Chemicals)、2 μ M Dorsomorphin(Sigma);

[0093] 4)神经干细胞诱导培养基2配方:50%Advanced DMEM/F12(Invitrogen)、50% Neurobasal(Invitroge)、1%N2(Invitrogen)、2%B27(Invitrogen)、2mM GlutaMAX(Invitrogen)、10ng/ml hLIF(Millipore)、4 μ M CHIR99021(Cellagentech)、3 μ M SB431542(Cellagentech)、0.1 μ M Compound E(EMD Chemicals);

[0094] 5)神经干细胞培养基配方:50%Advanced DMEM/F12(Invitrogen)、50% Neurobasal(Invitroge)、1%N2(Invitrogen)、2%B27(Invitrogen)、2mM GlutaMAX(Invitrogen)、10ng/ml hLIF(Millipore)、3 μ M CHIR99021(Cellagentech)、2 μ M SB431542(Cellagentech);

[0095] 6) 神经元诱导培养基配方: 50% Advanced DMEM/F12 (Invitrogen)、1% N2 (Invitrogen)、2% B27 (Invitrogen)、400 μ M dbcAMP (双丁环磷腺苷, Sigma)、200 μ M Ascorbic acid (抗坏血酸维生素C, Sigma)、10ng/ml BDNF (脑源性神经营养因子, Peprotech)、10ng/ml GDNF (胶质细胞源性神经营养因子, Peprotech)。

[0096] 下述实施例中的细胞培养方法如下:

[0097] A、成纤维细胞的培养

[0098] 用成纤维细胞培养基培养, 隔天换液, 每3-4天传一次代。传代时按1:3或1:4传代。

[0099] B、诱导多能干细胞的培养

[0100] B1) 饲养层体系: 将诱导多能干细胞接种至预先铺好的经过丝裂霉素(美国Sigma公司产品, 货号:M0503)灭活处理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, 使用诱导多能干细胞培养基与小鼠胚胎成纤维细胞共同培养, 每5-7天传一次代。

[0101] B2) 无饲养层体系: 将诱导多能干细胞接种至预先用细胞外基质(Growth factor reduced-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, 每5-7天传一次代。

[0102] C、神经干细胞的培养

[0103] 将神经干细胞接种至预先用细胞外基质(Growth factor reduced-Matrigel, 美国BD Biosciences产品, 货号:354277)包被的培养板中, 用神经干细胞培养基培养。每4-5天穿一次代。

[0104] 实施例1、一种着色性干皮病人特异基因突变的神经干细胞和神经元的制备方法

[0105] 一、诱导多能干细胞的获得及鉴定

[0106] 1、诱导多能干细胞的获得

[0107] 分别将携带不同基因突变的着色性干皮病人来源的成纤维细胞进行重编程, 分别获得XPA突变的诱导多能干细胞、XPB突变的诱导多能干细胞、XPC突变的诱导多能干细胞、XPG突变的诱导多能干细胞和XPV突变的诱导多能干细胞。具体方法如下:

[0108] (1) 细胞复苏及扩大培养

[0109] 分别将如下五株携带不同基因突变的着色性干皮病人来源的皮肤成纤维细胞: XPA成纤维细胞(GM00710)、XPB成纤维细胞(GM13026)、XPC成纤维细胞(GM15709)、XPG成纤维细胞(GM13371)和XPV成纤维细胞(GM03055)在成纤维细胞培养基中进行扩大培养。待细胞培养到合适密度, 消化, 计数, 五种成纤维细胞各取 1.5×10^6 个。

[0110] (2) 电转液的制备

[0111] 将82 μ l P2 primary cell solution (Lonza)、18 μ l supplementary 1 (Lonza)、1.5 μ g pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、1.5 μ g pCXLE-hSK、1.5 μ g pCXLE-hUL和1.5 μ g pCXLE-EGFP混匀, 得到电转液, 置于1.5ml EP管中。3个重编程质粒(pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSK和pCXLE-hUL)和1个标记性质粒(pCXLE-EGFP)均购买于Addgene, 产品目录号分别如下: pCXLE-hOCT3/4-shp53-F (#27077), pCXLE-hSK (#27078), pCXLE-hUL (#27080), pCXLE-EGFP (#27082)。

[0112] (3) 电转

[0113] 用步骤(2)获得的电转液分别对步骤(1)获得的XPA成纤维细胞、XPB成纤维细胞、

XPC成纤维细胞、XPG成纤维细胞和XPV成纤维细胞进行重悬,重悬后转移到电转杯中,并放入电转仪(Lonza 4D nucleofector)中,进行电转,电转程序选择EN150(具体步骤参考Lonza 4D nucleofector说明书),分别得到电转后的细胞悬液(1.5×10^6 细胞/100 μ l)。以野生型成纤维细胞为对照。

[0114] (4)分别将电转后的细胞悬液加入到预热的含有成纤维细胞培养基的六孔板的孔中,摇晃均匀,放回培养箱中培养。第二天换液,观察电转效率。

[0115] (5)持续用成纤维细胞培养基培养至第5天,消化接种至预先铺好的经过丝裂霉素灭活处理的小鼠胚胎成纤维细胞的培养板中,使用诱导多能干细胞培养基持续培养。培养至第三周,分别得到类似于胚胎干细胞的小克隆(诱导多能干细胞),将XPA成纤维细胞诱导得到的诱导多能干细胞命名为XPA突变的诱导多能干细胞,将XPB成纤维细胞诱导得到的诱导多能干细胞命名为XPB突变的诱导多能干细胞,将XPC成纤维细胞诱导得到的诱导多能干细胞命名为XPC突变的诱导多能干细胞,将XPG成纤维细胞诱导得到的诱导多能干细胞命名为XPG突变的诱导多能干细胞,将XPV成纤维细胞诱导得到的诱导多能干细胞命名为XPV突变的诱导多能干细胞,将野生型的成纤维细胞诱导得到的诱导多能干细胞命名为野生型的诱导多能干细胞。不同成纤维细胞诱导得到的诱导多能干细胞的形态如图1B所示。分别将小克隆挑至预先铺好的经过丝裂霉素灭活的小鼠胚胎成纤维细胞的培养板中扩大培养。

[0116] 2、诱导多能干细胞的鉴定

[0117] 为了鉴定上述步骤1得到的克隆状细胞是否为诱导型多能干细胞,进行如下实验:

[0118] (1)免疫荧光检测干细胞标记物NANOG, OCT4, SOX2的表达

[0119] 分别将步骤1所得的五种携带基因突变的诱导多能干细胞和野生型的诱导多能干细胞接种到用丝裂霉素处理过的小鼠胚胎成纤维细胞上,待其贴壁后,先用4%多聚甲醛固定30分钟后,再用磷酸盐缓冲液(PBS)润洗3次,再用含0-4% TritonX-100的PBS通透30分钟, PBS洗3次。然后用10%的驴血清封闭1个小时。一抗按照适当比例(抗人鼠源OCT4抗体, sc-5279, 1:100; 抗人羊源SOX2抗体, sc-17320, 1:100; 抗人兔源NANOG抗体, ab21624, 1:250)稀释后于4 $^{\circ}$ C孵育过夜。第二天,再用PBS洗3次后加入适当比例稀释的二抗孵育1个小时。用Hoechst33342(Invitrogen, 货号:H3569)对细胞核进行染色。PBS洗3次后,用封片剂(Vector公司, 货号H-1000)封片。最后在激光共聚焦显微镜下进行观察,拍照。

[0120] 检测结果如图2A所示:从图中可以看出,获得的五种携带基因突变的诱导多能干细胞均表达OCT4, NANOG, SOX2这三个干细胞的标记物,说明五种携带基因突变的诱导多能干细胞均保持有很好的细胞干性。

[0121] (2)qPCR检测多能干细胞中外源载体EBNA1的整合

[0122] 分别提取五种携带基因突变的诱导多能干细胞和野生型的诱导多能干细胞的基因组DNA,采用下述引物进行qPCR。同时以电转后4天的野生型成纤维细胞作为阳性对照,商品化的H9胚胎干细胞作为阴性对照。质粒pCXLE-hFbx15-cont2用来产生FBXO15和EBNA-1的拷贝数与循环阈值的标准曲线。

[0123] FBXO15-F:GCC AGG AGG TCT TCG CTG TA

[0124] FBXO15-R:AAT GCA CGG CTA GGG TCA AA

[0125] EBNA-1-F:ATC AGG GCC AAG ACA TAG AGA TG

[0126] EBNA-1-R:GCC AAT GCA ACT TGG ACG TT

[0127] 结果如图2B所示:电转后4天的成纤维细胞的EBNA-1的拷贝数很多,而获得的五种携带基因突变的诱导多能干细胞和野生型的诱导多能干细胞中EBNA-1的拷贝数极低,说明获得的五种携带基因突变的诱导多能干细胞和野生型的诱导多能干细胞几乎无外源基因插入。

[0128] (3)畸胎瘤实验

[0129] 分别将步骤1所得的XPA突变的诱导多能干细胞、XPB突变的诱导多能干细胞、XPC突变的诱导多能干细胞、XPG突变的诱导多能干细胞和XPV突变的诱导多能干细胞接种到没有饲养层的Matrigel包被的培养板上培养,待诱导多能干细胞长满,消化计数,并用含20% Matrigel,80% mTesR的混合液对诱导多能干细胞(4×10^6 个)进行重悬,得到细胞悬液;并将获得的细胞悬液打入免疫缺陷小鼠皮下。大约8周后,即有黄豆大小的畸胎瘤长成。脱颈处死小鼠后,将畸胎瘤取出,于4%多聚甲醛中固定两天使其充分固定后,泡在30%蔗糖溶液中脱水。待其充分脱水后,使用Compound O.C.T包埋剂进行包埋。然后在冰冻切片机上进行切片,厚度为12 μ m,组织切片晾干后,即可进行免疫荧光检测三个胚层标记物的表达。免疫荧光操作步骤同上述步骤1。其中,一抗包括:抗人兔源TUJ1抗体(Sigma公司,货号T2220,1:500);抗人兔源FOXA2抗体(Cell Signaling Technology公司,货号8186,1:200);抗人鼠源-SMA抗体(Sigma公司,货号A5228,1:200)。

[0130] 结果如图2C所示:XPA突变的诱导多能干细胞、XPB突变的诱导多能干细胞、XPC突变的诱导多能干细胞、XPG突变的诱导多能干细胞和XPV突变的诱导多能干细胞分化形成的畸胎瘤都包括有外,中,内三个胚层,进一步验证了五种携带基因突变的诱导多能干细胞的全能性。

[0131] (4)核型分析

[0132] 用秋水仙素处理五种携带基因突变的诱导多能干细胞,处理40分钟,使细胞阻滞在中后期,收集处理后的细胞;用0.075M KCl低渗液在37度处理30分钟,再用含甲醇:冰醋酸=3:1的固定液固定两次;固定好的细胞即可进行滴片,按适当密度将细胞滴到载玻片上,马上在90度水浴锅上用水汽蒸10秒左右,放入70度烘箱烤3个小时;胰酶消化25~45s后,生理盐水漂洗后,在37度用Gimsa染液染色5-10分钟,自来水晾干。最后用显微镜观察。

[0133] 结果如图2D所示,获得的五种携带基因突变的诱导多能干细胞均保持正常的核型,说明这些基因突变并没有引起染色体异常。

[0134] 二、诱导多能干细胞定向分化为神经干细胞及神经干细胞的鉴定

[0135] 1、诱导多能干细胞定向分化为神经干细胞

[0136] 分别将步骤一中的五种携带基因突变的诱导多能干细胞和野生型的诱导多能干细胞定向分化为神经干细胞(图3A),分别得到XPA突变的神经干细胞、XPB突变的神经干细胞、XPC突变的神经干细胞、XPG突变的神经干细胞、XPV突变的神经干细胞和野生型的神经干细胞。具体步骤如下:

[0137] (1)将步骤一的1中的(5)获得的五种携带基因突变的诱导多能干细胞的小克隆接种到用丝裂霉素处理过的小鼠胚胎成纤维细胞上,用诱导多能干细胞培养基培养大约2天,至其密度达到20%左右,得到1次培养后的细胞。

[0138] (2)将1次培养后的细胞在神经干细胞诱导培养基1继续培养,每天换液,持续培养2天,得到2次培养后的细胞。

[0139] (3)将2次培养后的细胞在神经干细胞诱导培养基2继续培养,每天换液,持续培养5天,得到3次培养后的细胞。

[0140] (4)然后将3次培养后的细胞以单细胞转到Matrigel(美国BD Biosciences产品,货号:354277)包被的培养板中用神经干细胞培养基进行培养,每4-5天传代一次,连续传至第三代,即可得到着色性干皮病人特异性的神经干细胞。

[0141] 2、神经干细胞的鉴定

[0142] 通过免疫荧光检测步骤1获得的XPA突变的神经干细胞、XPB突变的神经干细胞、XPC突变的神经干细胞、XPG突变的神经干细胞、XPV突变的神经干细胞和野生型的神经干细胞标记物NESTIN和PAX6的表达情况。具体实验步骤参照步骤一的2中的(1)。一抗及稀释比例如下:抗人NESTIN抗体(Millipore公司,货号MAB5326,1:250)和抗人PAX6抗体(Covance公司,货号PRB-278P,1:500)。

[0143] 结果图3B所示:分化得到的XPA突变的神经干细胞、XPB突变的神经干细胞、XPC突变的神经干细胞、XPG突变的神经干细胞、XPV突变的神经干细胞和野生型的神经干细胞均表达神经干细胞的特异性标记物。

[0144] 三、神经干细胞继续分化为神经元及神经元的鉴定

[0145] 1、神经干细胞继续分化为神经元

[0146] 分别将步骤二获得的XPA突变的神经干细胞、XPB突变的神经干细胞、XPC突变的神经干细胞、XPG突变的神经干细胞、XPV突变的神经干细胞和野生型的神经干细胞继续分化成携带着色性干皮病人特异基因突变的神经元(图4A),分别得到XPA突变的神经元、XPB突变的神经元、XPC突变的神经元、XPG突变的神经元、XPV突变的神经元和野生型的神经元。具体方法如下:

[0147] (1)将五种着色性干皮病人特异性的神经干细胞以低密度接种到Matrigel包被的培养板中,用神经元诱导培养基继续培养18天。

[0148] (2)在分化进行的第三天在培养基中加入层粘蛋白Laminin(Sigma公司,货号L4544),助于神经元轴突的贴壁和延伸。

[0149] (3)培养大约两周后即可看到具有长突起,形态较好的神经元。

[0150] 2、神经元的鉴定

[0151] 通过免疫荧光检测步骤1获得的XPA突变的神经元、XPB突变的神经元、XPC突变的神经元、XPG突变的神经元、XPV突变的神经元和野生型的神经元标记物MAP2和Tuj1的表达情况。具体实验步骤参照步骤一的2中的(1)。一抗及稀释比例如下:抗人MAP2抗体(Sigma公司,货号T2220,1:500)和抗人Tuj1抗体(Sigma公司,货号4403,1:500)。

[0152] 结果图4B所示:分化得到的XPA突变的神经元、XPB突变的神经元、XPC突变的神经元、XPG突变的神经元、XPV突变的神经元和野生型的神经元均表达神经元的特异性标记物。

[0153] 实施例2、携带着色性干皮病人特异基因突变的神经干细胞和神经元的UV敏感性验证

[0154] UV照射后,DNA主要以两种损伤形式存在,分别为环丁烷嘧啶二聚体(cyclobutane pyrimidine dimers,CPD)和6-4光产物(6-4pyrimidine photoproducts,6-4PPs)。这两种形式完全依赖于细胞内核苷酸剪切修复通路来修复,因此CPD的含量可用来指示细胞核苷酸剪切修复的能力。本实施例采用一定剂量的UV分别照射实施例1制备的五种携带着色性

干皮病人特异基因突变的神经干细胞和神经元,并检测细胞内CPD的含量及细胞生物学反应。

[0155] 一、携带着色性干皮病人特异基因突变的神经干细胞的UV敏感性验证

[0156] 1、UV处理后检测神经干细胞的CPD的含量及细胞生物学反应

[0157] 将实施例1的步骤二获得的五种基因突变的神经干细胞以 1.5×10^5 个细胞的密度接种于24孔板,第二天用 $1\text{J}/\text{m}^2$ UV进行照射。照射后培养24h,免疫荧光检测细胞内环丁烷嘧啶二聚体(CPD)的含量。具体实验步骤参照实施例1的步骤一的2中的(1)。一抗及稀释比例如下:抗人CPD抗体(Cosmo Bio公司,货号TMD-2)。以野生型的神经干细胞为对照。

[0158] 结果如图5A所示,发现携带基因突变的神经干细胞在修复CPD的能力上都存在一定程度的缺陷,尤其是XPA基因突变的神经干细胞。

[0159] 2、UV处理后检测神经干细胞的凋亡情况

[0160] 利用Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒检测XPA基因突变的神经干细胞的凋亡情况。以野生型的神经干细胞为对照。

[0161] 结果如图5B所示,从图中可以看出:XPA基因突变的神经干细胞(XPA神经干细胞)在经过UV照射后细胞凋亡比例增加,XPA基因突变的神经干细胞(XPA神经干细胞)更容易发生细胞凋亡。

[0162] 3、UV处理后检测神经干细胞内DNA断裂情况

[0163] 用原位末端标记法(Terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)-mediated dUTP nick-end labeling,TUNEL)检测XPA基因突变的神经干细胞内DNA断裂情况。以野生型的神经干细胞为对照。

[0164] 结果如图5C所示:从图中可以看出,UV处理后XPA基因突变的神经干细胞内发生DNA断裂情况。

[0165] 以上实验均证明在UV照射后,携带病人基因突变的神经干细胞由于核苷酸剪切修复能力受损导致细胞内DNA损伤累积,其中XPA突变积累的DNA损伤最为严重,也高比例发生细胞凋亡。

[0166] 二、携带着色性干皮病人特异基因突变的神经元的UV敏感性验证

[0167] 1、UV处理后检测神经元的CPD的含量及细胞生物学反应

[0168] 将实施例1的步骤三制备的XPA突变的神经元以 1.5×10^5 个细胞的密度接种于24孔板,第二天用 $1\text{J}/\text{m}^2$ UV进行照射。照射后恢复培养24h,检测细胞内环丁烷嘧啶二聚体(CPD)的含量。参照实施例1的步骤一的2中的(1)。以野生型诱导多能干细胞定向诱导分化的神经元为对照。

[0169] 结果如图5D所示,从图中可以看出,XPA突变的神经元在修复CPD的能力上存在一定程度的缺陷。

[0170] 2、UV处理后检测神经元细胞内DNA断裂情况

[0171] 用原位末端标记法(Terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)-mediated dUTP nick-end labeling,TUNEL)检测XPA突变的神经元细胞内DNA断裂情况。

[0172] 结果如图5E所示:从图中可以看出,UV处理后XPA突变的神经元细胞内发生DNA断裂情况。也说明XPA突变的神经元细胞的凋亡水平增加。

[0173] 以上实验均证明在UV照射后,携带病人基因突变的神经元由于核苷酸剪切修复能

力受损导致细胞内DNA损伤累积,其中XPA突变积累的DNA损伤最为严重,也高比例发生细胞凋亡。

[0001]

序列表

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> 一种着色性干皮病人多能干细胞的制备方法

<160> 6

<210> 1

<211> 1083bp

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 1

atggcgggac acctggette ggatttegec ttctcgcccc ctecagggtg tggaggatgat	60
gggccagggg ggccggagcc ggctgggtt gatcctcgga cctggctaag ctccaagge	120
ctcctggag ggccaggaat cgggccgggg gttggccag gctctgaggt gtgggggatt	180
ccccatgcc ccccgcgta tgattctgt ggggggatgg cgtactgtgg gecccagggt	240
ggagtggggc tagtgecca aggeggett gagacctete agcctgaggg cgaagcagga	300
gtcgggtgg agagcaactc cgatggggc tccccggage cctgcaccgt caccctggt	360
gccgtgaagc tggagaagga gaagetggag caaaaccgg aggagtcca ggacatcaaa	420
gctctgcaga aagaactcga gcaattgcc aagctcctga agcagaagag gatcaccctg	480
ggatatacac aggccgatgt gggctcacc ctgggggtte tatttgggaa ggtattcage	540
caaacgacca tctgccgctt tgaggetctg cagcttagct tcaagaacat gtgtaagctg	600
eggcccttgc tgcagaagtg ggtggaggaa getgacaaca atgaaaatct tcaggagata	660

[0002]

tgcaaagcag aaaccctcgt gcaggcccga aagagaaagc gaaccagtat cgagaaccga	720
gtgagaggca acctggagaa ttigtctctg cagtgcccca aaccacact gcagcagate	780
agccacatcg cccagcagct tgggctcgag aaggatgtgg tccgagtgtg gttctgtaac	840
cggcgccaga agggcaagcg atcaagcagc gactatgcac aacgagagga ttttgaggct	900
gctgggtctc etttctcagg gggaccagtg tectttctc tggccccagg gccccatfff	960
ggtacccag gctatgggag cctcacttc actgcaactgt actcctcggt cctttccct	1020
gagggggaag cctttcccc tgtctcctc accactctgg getctcccat gcattcaaac	1080
tga	1083

<210> 2

<211> 954bp

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 2

atgtacaaca tgatggagac ggagctgaag ccgccgggcc cgcagcaaac ttccgggggc	60
ggcggcgcca actccaccgc ggcggcggcc ggcggcaacc agaaaaacag cccggaccgc	120
gtcaageggc ccatgaatgc ctccatgggt tggctcccg ggcagcggcg caagatggcc	180
caggagaacc ccaagatgca caactcggag atcagcaagc gectgggcgc cgagtggaaa	240
cttttgtcgg agacggagaa gggccgctt atcgacgagg ctaagcggct gcgagcgtg	300
cacatgaagg agcaccggga ttataaatac cgccccgcgc ggaaaaccaa gacgtcatg	360
aagaaggata agtacacgct gcccgcggg ctgctggccc ccggcgcca tagcatggcg	420

[0003]

agcggggctcg ggggtgggcgc cggcctgggc gggggcgtga accagegcat ggacagttac	480
gagcacaatga acggctggag caacggcagc tacagcatga tgcaggacca gctgggctac	540
ccgcagcacc cgggcctcaa tgcgcacggc gcagcgcaga tgcagcccat gcaccgctac	600
gacgtgagcg ccttgacgta caactccatg accagctcgc agacctacat gaacggctcg	660
cccacctaca gcatgtccta ctgcagcagc ggcacccctg gcatggctct tggtccatg	720
ggttcggtag tcaagtccga ggccagctcc agccccctg tggttacctc ttctccac	780
tccagggcgc cctgccaggc cggggacctc cgggacatga tcagcatgta tctcccggc	840
gccgaggtgc cggaacccgc cgcccccagc agacttcaca tgtcccagca ctaccagagc	900
ggcccggtag ccggcagggc cattaacggc aactgcccc tctcacacat gtga	954

<210> 3

<211> 1440bp

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 3

atgaggcagc cacctggcga gtctgacatg getgtcagcg acgcgctgct cccatcttct	60
tccacgttcg cgtctggccc ggcgggaagg gagaagacac tgcgtcaagc aggtgccccg	120
aataaccgct ggcgggagga gctctcccac atgaagcagc ttccccagct gcttcccggc	180
cgcacctatg acctggcggc ggcgaccgtg gcacagacc tggagagcgg cggagccggt	240
gcggtttcgc gcggtageaa cctggcgcgc ctacctcgga gagagaccga ggagttcaac	300
gatctcttgg acctggaatt tattctctcc aatcctctga cccatctctc ggagtcagtg	360

[0004]

gccgccaccg tgctctcgtc agcgtcagcc tctctctcgt cgtcgecgtc gacgagcggc	420
cctgccagcg egccctccac ctgcagcttc acctatccga tccgggcccgg gaacgacccg	480
ggcgtggcgc cgggcggcac gggcggagge ctctctatg gcagggagtc cgtccccct	540
ccgacggetc ccttcaacct ggcggacatc aacgacgtga gcccctcggg cggcttcgtg	600
gccgagctcc tgeggccaga attggaccgg gtgtacatc cggcgcagca gccgcagcgg	660
ccaggtggcg ggctgatggg caagtctgtg ctgaaggcgt cgtgagcgc cctggcagc	720
gagtacggca gccctcgggt catcagcgtc agcaaaggca gccctgaegg cagccaccgg	780
gtggtggtgg cgcctacaa cggcgggccc ccgcgcacgt gcccgaagat caagcaggag	840
gcggtctctt cgtgcacca ctggggcgtt ggacccccct tcagcaatgg ccaccggccc	900
gctgcacacg acttccccct ggggcggcag ctccccagca ggactacccc gacctgggt	960
cttgaggaag tgctgagcag cagggactgt caccctgccc tgcctcttc tcccggcttc	1020
cateccccac cggggcccaa ttaccatec ttcctgcccg atcagatgca gccgcaagtc	1080
ccgccctcc attaccaaga gctcatgca cccggttctt gcattgccaga ggagcccaag	1140
ccaaagaggg gaagacgac gtggcccccg aaaaggaccg ccaccacac ttgtgattac	1200
gcgggetgcg gcaaaacctc cacaagagt tcccatctca aggcacacct gcgaaccac	1260
acaggtgaga aacctacca ctgtgactgg gacggtgtg gatggaatt cgcctctca	1320
gatgaactga ccagcacta ccgtaaacac acggggcacc gcccttcca gtgccaaaa	1380
tgcgaccgag cattttccag gtcggaccac ctgccttac acatgaagag gcatttttaa	1440

<210> 4

<211> 1095bp

<212> DNA

<213> 人工序列

[0005]

<220>

<223>

<400> 4

atggactacg actcgtacca gcactatttc tacgactatg actgeggga ggatttctac	60
cgctccacgg cgcccagcga ggacatctgg aagaaattcg agctggtgcc atcgccccc	120
acgtcgccgc cctggggcctt gggtcceggc gcaggggacc cgccccccgg gatttgctcc	180
ccggagccgt ggcccggagg gtgcaccgga gacgaagcgg aatcccgggg cactcgaaa	240
ggctggggca ggaactacgc ctccatcata cgccgtgact gcatgtggag cggcttctcg	300
gcccgggaac ggcctggagag agctgtgagc gaccggctcg ctcttggegc gcccggggg	360
aaccgcecea aggcgtccgc cgccccggac tgactccca gectegaagc cggcaacccg	420
gcgcccggcg cccctgtcc gctggcgaa cccaagacc aggcctgctc cgggtccgag	480
agcccaagcg actcggagaa tgaagaaatt gatgttga cagtagagaa gaggcagtct	540
ctgggtattc ggaagccggt caccatcaeg gtgcgagcag accccctgga tccctgatg	600
aagcatttcc acatctccat ccatcagcaa cagcacaact atgctgcccg ttttctcca	660
gaaagctgct cccaagaaga ggcttcagag aggggtcccc aagaagaggt tctggagaga	720
gatgctgcag gggaaaagga agatgaggag gatgaagaga ttgtgagtcc cccacctgta	780
gaaagtgagg ctgcccagtc ctgccacccc aaacctgtca gttctgatac tgaggatgtg	840
accaagagga agaatcaciaa ttctctggag cgcaagagge ggaatgaect gcgttcgca	900
ttcttgccgc tgagggacca ggtgccacc ctggccagct gctccaaggc ccccaagta	960
gtgatcctaa gcaaggcctt ggaatacttg caagccctgg tgggggctga gaagaggatg	1020
gctacagaga aaagacagct ccgatgccgg cagcagcagt tgcagaaaag aattgcatac	1080
ctcactgget actaa	1095

[0006]

<210> 5

<211> 630bp

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 5

atgggctccg tgtccaacca gcagtttgca ggtggctgcg ccaaggcggc agaagaggcg	60
cccgaggagg cgccggagga egcgcccg gggcgggacg agcctcagct gctgcacggt	120
gcgggcatct gtaagtggtt caactgctgc atggggctcg gcttctctgc catgaccgcc	180
cgcgccgggg tcgcgctcga cccccagtg gatgtctttg tgcaccagag taagctgcac	240
atggaagggt tccggagctt gaaggagggt gaggcagtgg agttcacctt taagaagtca	300
gccaaagggtc tggaatccat ccgtgtcacc ggacctgggt gagtattctg tattgggagt	360
gagaggcggc caaaaggaaa gagcatgcag aagcgcagat caaaaggaga caggtgctac	420
aactgtggag gtctagatca tcatgccaag gaatgcaage tgccacccca gcccaagaag	480
tgccacttct gccagagcat cagccatatg gtagectcat gtcgctgaa ggcccagcag	540
ggccctagtg cacagggaaa gccaacctac ttctgagagg aagaagaaga aatccacagc	600
cctaccctgc tccggagge acagaatga	630

<210> 6

<211> 720bp

<212> DNA

<213> 人工序列

[0007]

<220>

<223>

<400> 6

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatectggt cgagctggac	60
ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac	120
ggcaagetga ccctgaagtt catctgcacc accggaage tgccectgcc ctggeccacc	180
ctegtacca ccctgacctt cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccca ccacatgaag	240
cagcaagact tcttcaagtc cggcatgccc gaaggetacg tccaggagcg caccatcttc	300
tccaaggacg acggcaacta caagaccgcg gccgaggatg agttcgaggg cgacacctg	360
gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac	420
aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tgcccgacaa gcagaagaac	480
ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc	540
gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgetgctgcc cgacaaccac	600
tacctgagca cccagtcgcg cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc	660
ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaagtaa	720

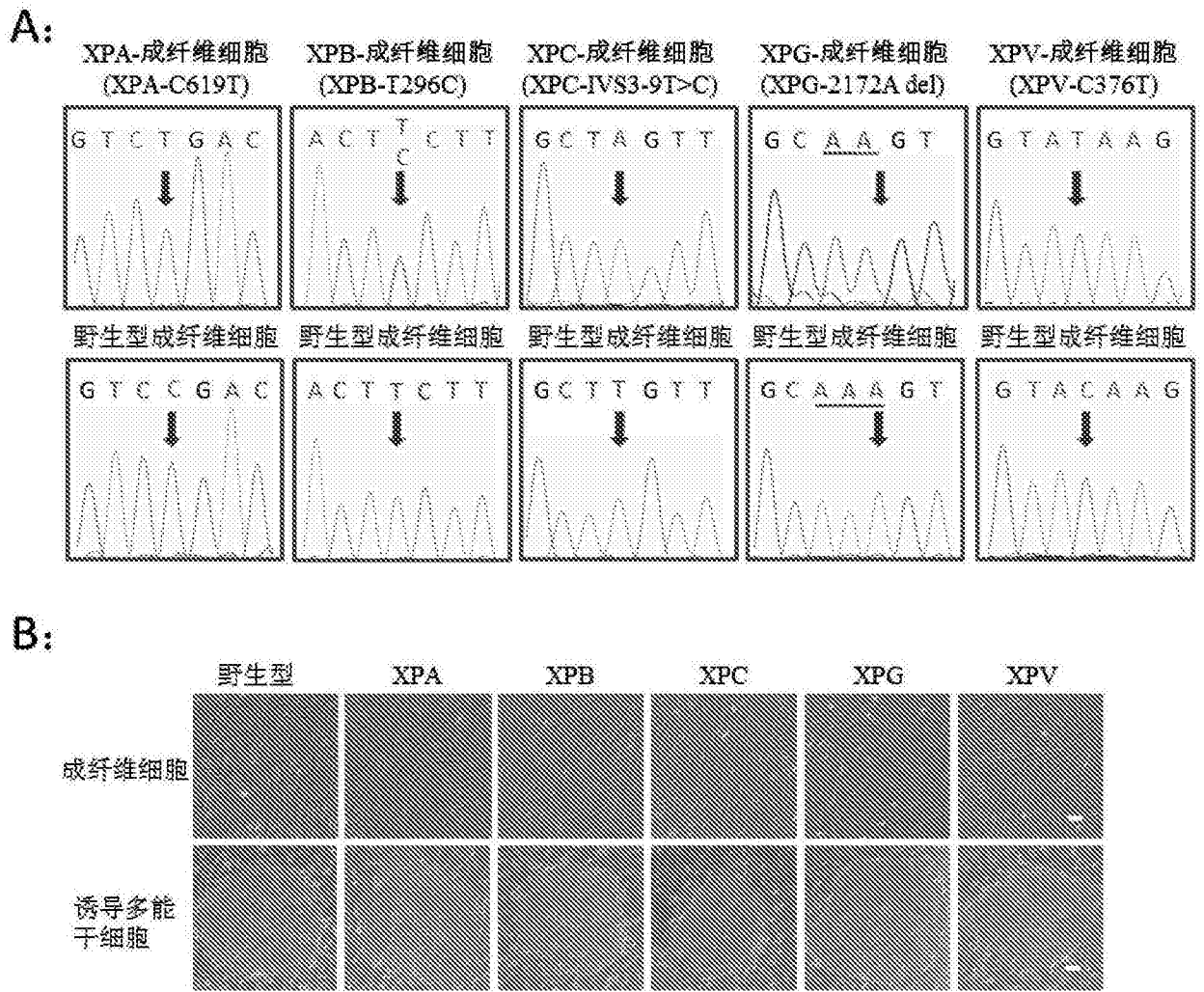
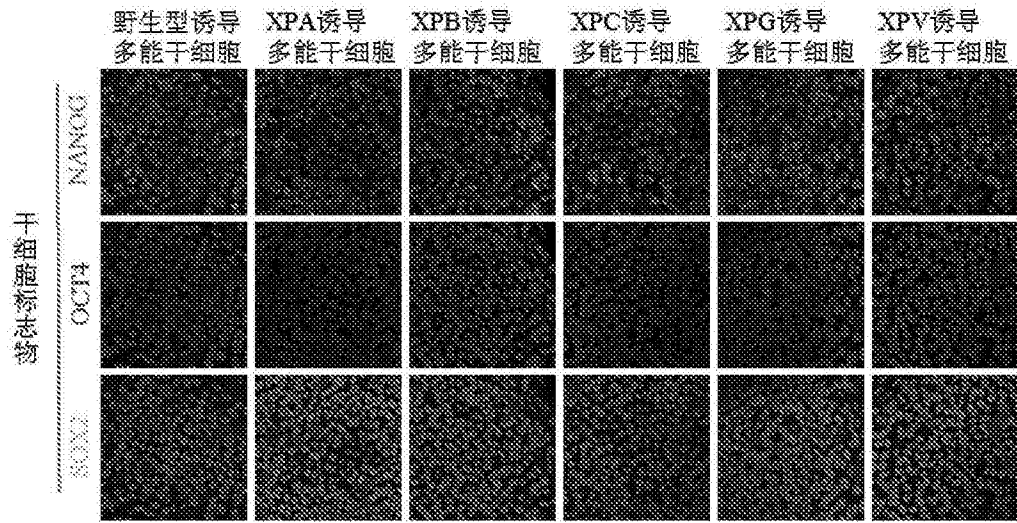
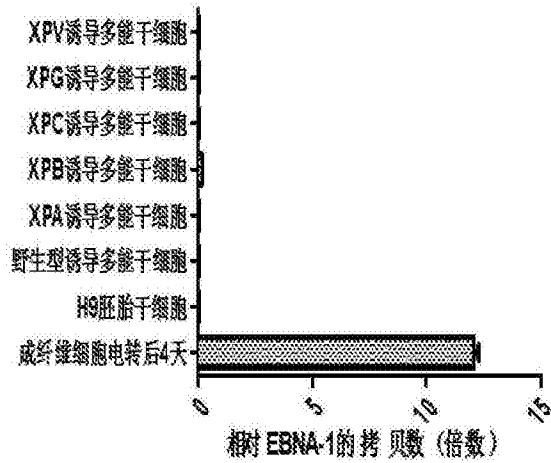


图1

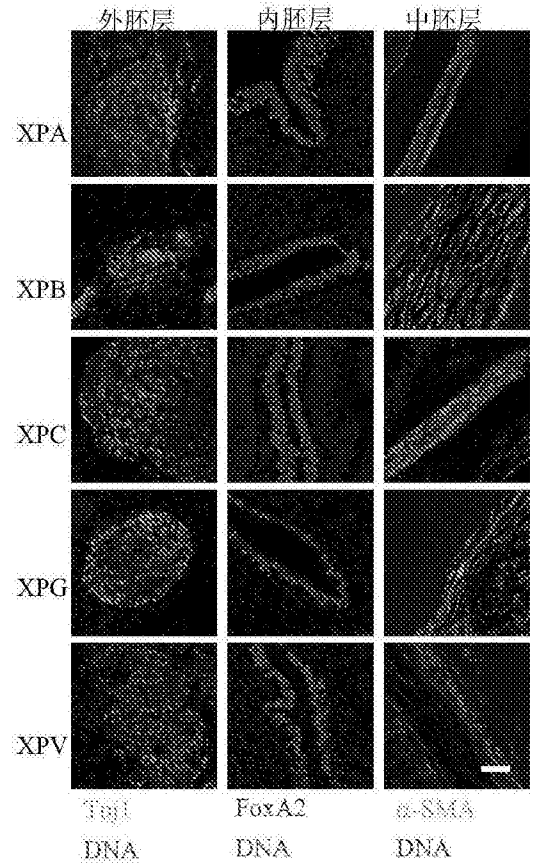
A:



B:



C:



D:

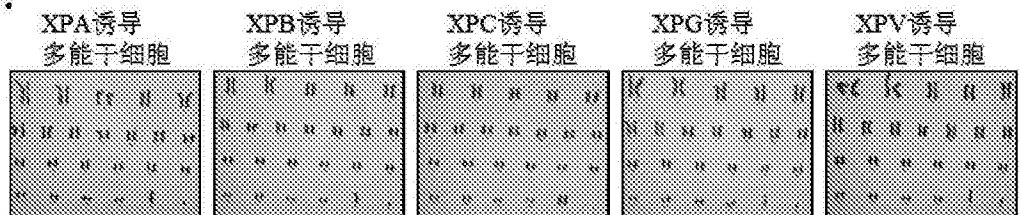
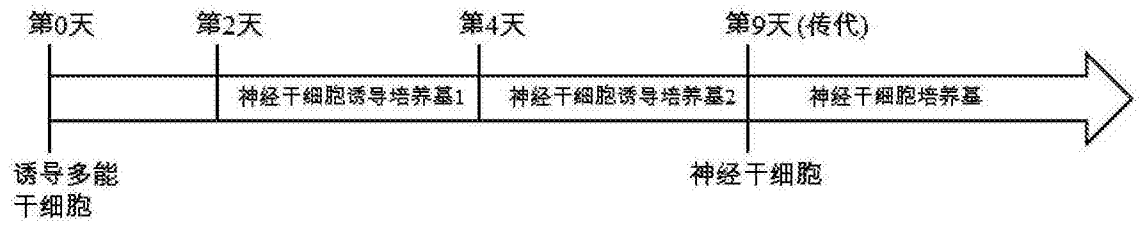


图2

A:



B:

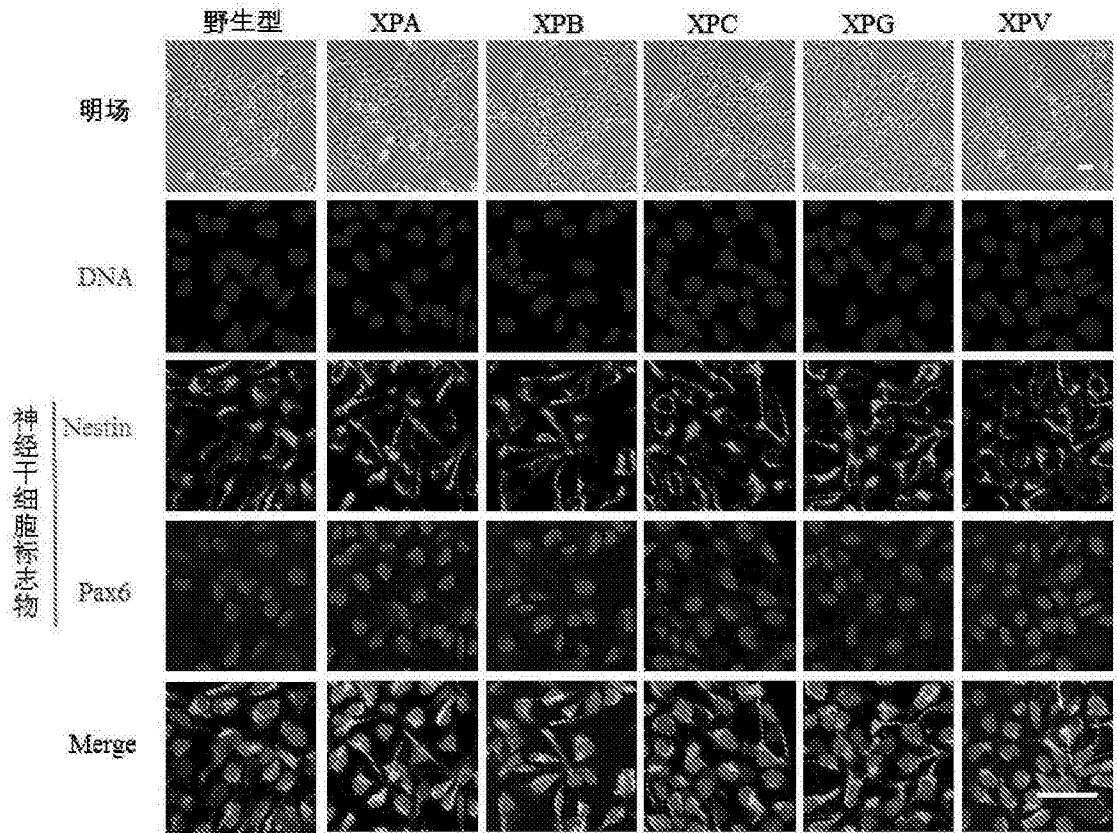


图3

A:



B:

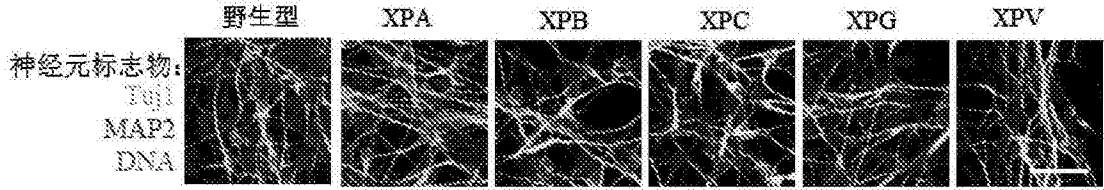
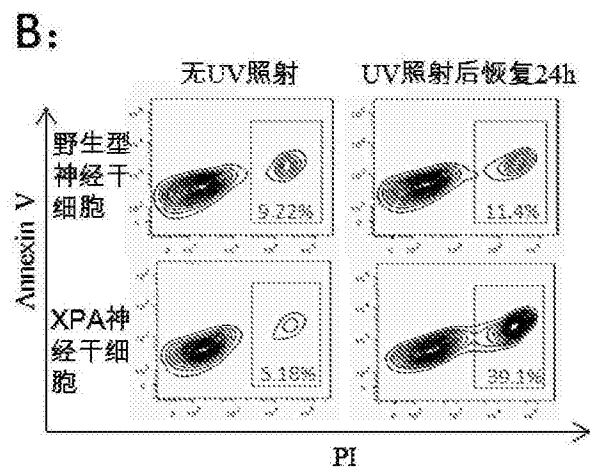
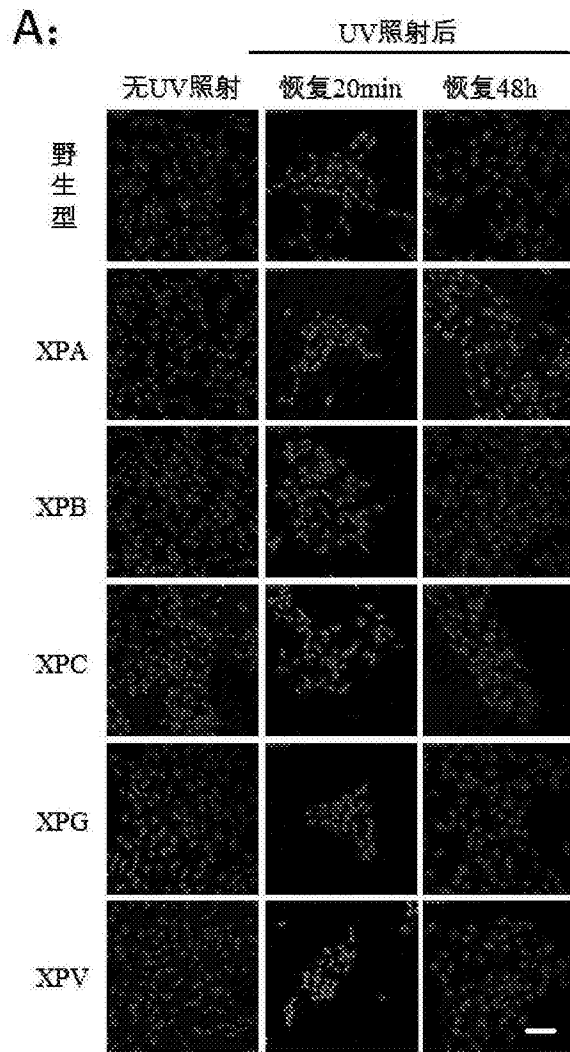
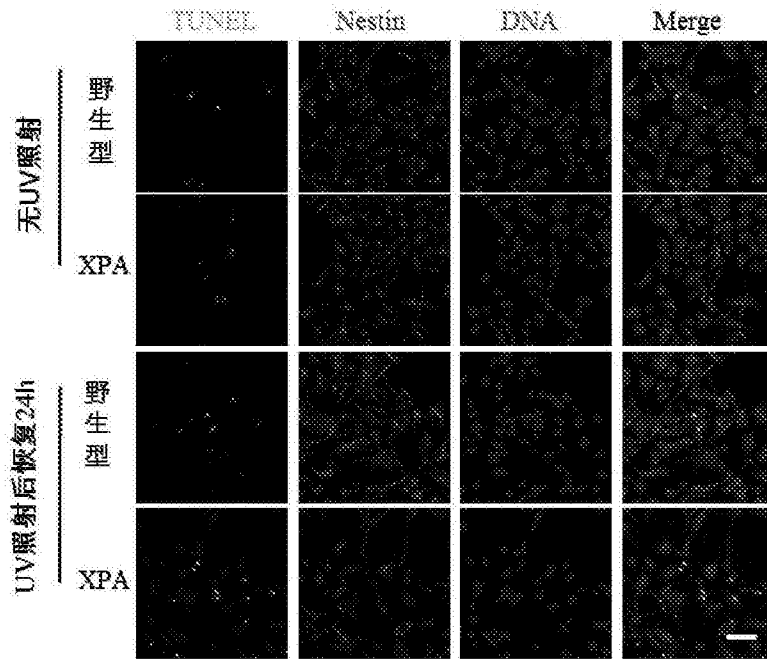


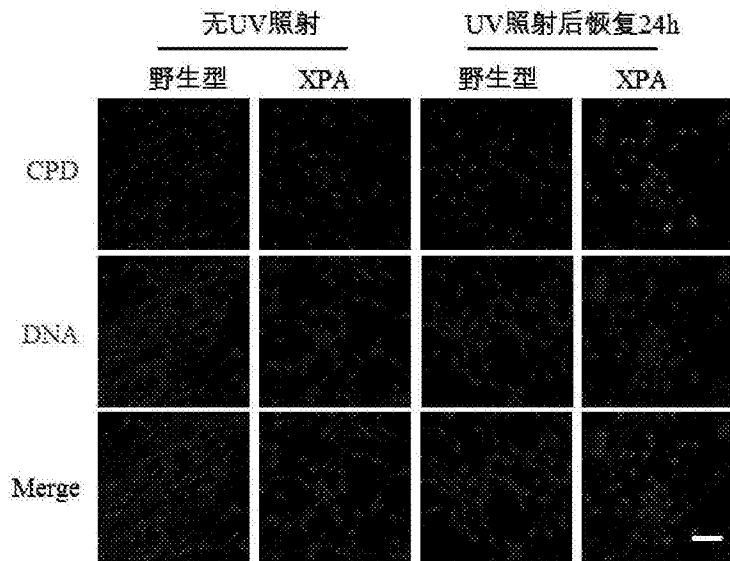
图4



C:



D:



E:

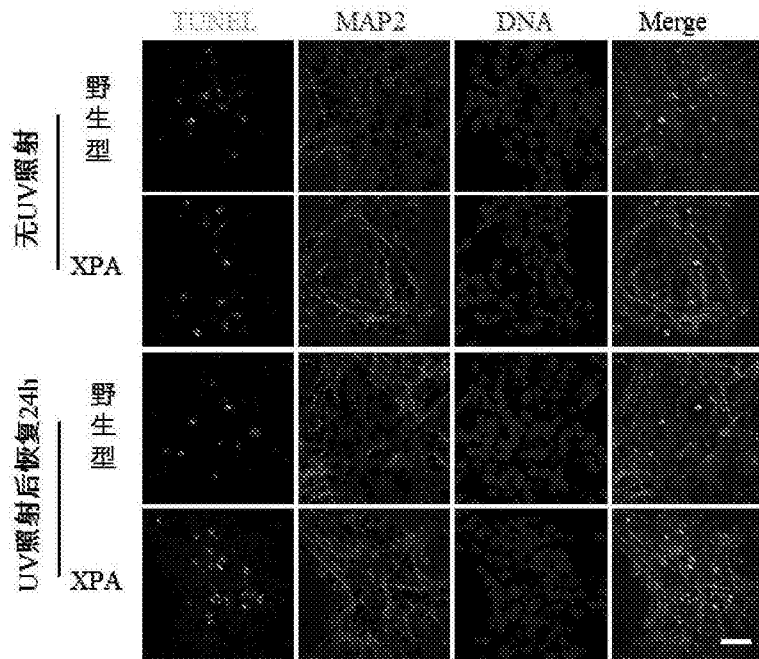


图5