

(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 103290051 A

(43) 申请公布日 2013.09.11

(21) 申请号 201310222217.2

(22) 申请日 2013.06.05

(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 张克兢 任若通 李颖  
易斐 曲静

(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 王旭

(51) Int. Cl.

*C12N 15/85* (2006.01)

*C12N 5/10* (2006.01)

权利要求书2页 说明书11页  
序列表14页 附图5页

### (54) 发明名称

一种将人类成纤维细胞转分化为视网膜色素  
上皮细胞的方法

### (57) 摘要

本发明涉及一种在体外将哺乳动物成纤维细胞转分化为视网膜色素上皮细胞的方法,所述方法包括将多种转录调控因子和报告基因转入哺乳动物成纤维细胞中,然后使用多种培养基进行培养从而获得视网膜色素上皮细胞。

1. 一种在体外将哺乳动物成纤维细胞转分化为视网膜色素上皮细胞的方法,所述方法包括以下步骤:

a) 构建分别含有编码哺乳动物转录调控因子 cMyc、MitfA、Otx2、Rax 和 Crx 的基因序列的转染载体;

b) 构建含有在视网膜色素上皮细胞特异性启动子控制下的报告基因的转染载体;

c) 将所述步骤 a) 中构建的转染载体和所述步骤 b) 中构建的转染载体转染到在用于培养哺乳动物体细胞的培养基中培养的所述哺乳动物成纤维细胞中;

d) 在转染后将所述用于培养哺乳动物体细胞的培养基换成用于培养哺乳动物干细胞的培养基继续培养直至观察到细胞开始出现形态改变;

e) 将所述用于培养哺乳动物胚胎干细胞的培养基换成含有基质胶的用于哺乳动物胚胎干细胞到神经干细胞分化的培养基继续培养以使所述哺乳动物成纤维细胞进一步分化;

f) 将所述含有基质胶的用于哺乳动物胚胎干细胞到神经干细胞分化的培养基换成用于培养视网膜色素上皮细胞的培养基继续培养直至获得所述报告基因的阳性细胞克隆。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述哺乳动物选自人、大鼠、小鼠、狗、猫、牛、兔、马、猪、猴等。

3. 根据权利要求 2 所述的方法,其中所述哺乳动物是人。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述步骤 a) 还包括构建分别含有转录调控因子 Pax6、Nr1 和 Klf4 的基因序列的转染载体。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,所述方法还包括将所述报告基因的阳性细胞克隆先后在含有视黄酸 (RA) 和 Sonic Hedgehog (SHH) 的用于培养视网膜色素上皮细胞的培养基中继续培养直至观察到明显的黑色素细胞。

6. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述视网膜色素上皮细胞特异性启动子是 Bestrophin1 (Best1) 基因的启动子。

7. 根据权利要求 5 所述的方法,其中所述 Bestrophin1 (Best1) 基因的启动子的序列如 SEQ ID NO. 1 或 SEQ ID NO. 2 所示。

8. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述报告基因是荧光蛋白的基因,例如绿色荧光蛋白的基因。

9. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述步骤 a) 和 b) 中使用的载体是逆转录病毒载体。

10. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述调控因子 Rax 的基因序列如 SEQ ID NO. 3 所示;所述调控因子 Crx 的基因序列如 SEQ ID NO. 4 所示;所述调控因子 MitfA 的基因序列如 SEQ ID NO. 6 所示;所述调控因子 Otx2 的基因序列如 SEQ ID NO. 7 所示;所述调控因子 cMyc 的基因序列如 SEQ ID NO. 9 所示。

11. 根据权利要求 3 所述的方法,其中所述调控因子 Pax6 的基因序列如 SEQ ID NO. 5 所示;所述调控因子 Nr1 的基因序列如 SEQ ID NO. 8 所示;所述调控因子 Klf4 的基因序列如 SEQ ID NO. 10 所示。

12. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述用于培养哺乳动物体细胞的培养基是哺乳动物体细胞培养基;所述用于培养哺乳动物胚胎干细胞的培养基是 CDF12 培养基;所述用

于哺乳动物胚胎干细胞到神经干细胞分化的培养基是 N2/B27 培养基 ;并且,所述用于培养视网膜色素上皮细胞的培养基是 RPE 基础培养基。

13. 利用根据前述任一项权利要求所述的方法获得的视网膜色素上皮细胞。

## 一种将人类成纤维细胞转分化为视网膜色素上皮细胞的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及细胞分化领域。具体地,本发明涉及在体外将哺乳动物成纤维细胞转分化为视网膜色素上皮细胞的方法。

### 背景技术

[0002] 视网膜退行性疾病是视网膜内特殊细胞群的退行病变,往往导致视力损害甚至失明。其主要病理基础是视网膜各级神经元的结构和功能性异常,最终造成患者视力的不可逆性损害。黄斑变性是一种常见的视网膜退行性疾病,致盲性极高,主要与视网膜色素上皮细胞功能紊乱和老化有关。因为这些致盲性的视网膜变性性疾病都存在进行性的视网膜细胞丢失,常规的药物疗法缺乏疗效,所以理想的治疗方法是通过细胞移植来代替丢失的细胞或者起到支持细胞的作用,这一可行的防盲治盲方法越来越多地被运用到临床。视网膜色素上皮细胞的再生医学治疗是目前临床治疗视网膜退行性疾病如黄斑变性最有效的手段。

[0003] 细胞移植材料的来源是再生医学治疗广泛应用的瓶颈之一。以往的细胞来源主要是通过以下几种技术实现从胚胎干细胞或者诱导性多能干细胞向视网膜色素上皮细胞的分化:1. 利用自发分化方法从人类多能干细胞获得视网膜色素上皮细胞的技术 (Meyer, J. S., et al. Modeling early retinal development with human embryonic and induced pluripotent stem cells. PNAS, 2009, 106 :16698-16703); 2. 利用单层分化方法从人类多能干细胞获得视网膜色素上皮细胞的技术 (Nakano, T., et al. Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. Cell stem cell, 2012, 10 :771-785)。3. 利用三维培养方法从人类多能干细胞获得视网膜色素上皮细胞的技术 (Zhu, Y., et al. Three-dimensional neuroepithelial culture from human embryonic stem cells and its use for quantitative conversion to retinal pigment epithelium. PloS one, 2013, 8, e54552)。然而胚胎干细胞由于受到伦理学的限制并不能广泛应用于临床治疗,而诱导性多能干细胞虽然避免了伦理学的限制,但是它分化效率很低,耗时长,并可能存在遗传学和表观遗传学的缺陷和致瘤性,都限制了其在细胞移植的临床应用。

[0004] 转分化手段的出现使一种类型的分化细胞转变成另一种类型的分化细胞,这就为细胞移植的临床应用提供了大量的细胞来源。这种直接的细胞类型之间的转换绕过了干细胞阶段,理论上可以使移植的致瘤风险大大降低。目前转分化技术已经可以产生多种细胞类型,如神经元、肝细胞、上皮细胞等。但是从人成纤维细胞或其它体细胞类型向视网膜色素上皮细胞的转分化方法目前还没有报道。本发明技术使得临床可以大量获得治疗黄斑变性等视网膜退行性疾病的病人自体移植材料,并且可以用于治疗视网膜退行性疾病药物的筛选。

## 发明内容

[0005] 本发明目的是直接从哺乳动物（例如，人）成纤维细胞转分化为视网膜色素上皮细胞，为临床提供大量治疗黄斑变性等视网膜退行性疾病的细胞移植材料，并且应用于治疗视网膜退行性疾病药物的筛选。

[0006] 本发明涉及一种在体外将哺乳动物成纤维细胞转分化为视网膜色素上皮细胞的方法，所述方法包括将多种转录调控因子和报告基因转入哺乳动物成纤维细胞中，然后使用多种培养基进行培养从而获得视网膜色素上皮细胞。

[0007] 更具体地，本发明提供以下各项：

[0008] 1. 一种在体外将哺乳动物成纤维细胞转分化为视网膜色素上皮细胞的方法，所述方法包括以下步骤：

[0009] a) 构建分别含有编码哺乳动物转录调控因子 cMyc、MitfA、Otx2、Rax 和 Crx 的基因序列的转染载体；

[0010] b) 构建含有在视网膜色素上皮细胞特异性启动子控制下的报告基因的转染载体；

[0011] c) 将所述步骤 a) 中构建的转染载体和所述步骤 b) 中构建的转染载体转染到在用于培养哺乳动物体细胞的培养基中培养的所述哺乳动物成纤维细胞中；

[0012] d) 在转染后将所述用于培养哺乳动物体细胞的培养基换成用于培养哺乳动物干细胞的培养基继续培养直至观察到细胞开始出现形态改变；

[0013] e) 将所述用于培养哺乳动物胚胎干细胞的培养基换成含有基质胶的用于哺乳动物胚胎干细胞到神经干细胞分化的培养基继续培养以使所述哺乳动物成纤维细胞进一步分化；

[0014] f) 将所述含有基质胶的用于哺乳动物胚胎干细胞到神经干细胞分化的培养基换成用于培养视网膜色素上皮细胞的培养基继续培养直至获得所述报告基因的阳性细胞克隆。

[0015] 2. 根据第 1 项所述的方法，其中所述哺乳动物选自人、大鼠、小鼠、狗、猫、牛、兔、马、猪、猴等。

[0016] 3. 根据第 2 项所述的方法，其中所述哺乳动物是人。

[0017] 4. 根据第 1 项所述的方法，其中所述步骤 a) 还包括构建分别含有转录调控因子 Pax6、Nr1 和 Klf4 的基因序列的转染载体。

[0018] 5. 根据第 1 项所述的方法，所述方法还包括将所述报告基因的阳性细胞克隆先后在含有视黄酸 (RA) 和 Sonic Hedgehog (SHH) 的用于培养视网膜色素上皮细胞的培养基中继续培养直至观察到明显的黑色素细胞。

[0019] 6. 根据第 1 项所述的方法，其中所述视网膜色素上皮细胞特异性启动子是 Bestrophin1 (Best1) 基因的启动子。

[0020] 7. 根据第 5 项所述的方法，其中所述 Bestrophin1 (Best1) 基因的启动子的序列如 SEQ ID NO. 1 或 SEQ ID NO. 2 所示

[0021] 8. 根据第 1 项所述的方法，其中所述报告基因是荧光蛋白的基因，例如绿色荧光蛋白的基因。

[0022] 9. 根据第 1 项所述的方法，其中所述步骤 a) 和 b) 中使用的载体是逆转录病毒载

体。

[0023] 10. 根据第 1 项所述的方法,其中所述调控因子 Rax 的基因序列如 SEQ ID NO. 3 所示;所述调控因子 Crx 的基因序列如 SEQ ID NO. 4 所示;所述调控因子 MitfA 的基因序列如 SEQ ID NO. 6 所示;所述调控因子 Otx2 的基因序列如 SEQ ID NO. 7 所示;所述调控因子 cMyc 的基因序列如 SEQ ID NO. 9 所示。

[0024] 11. 根据第 3 项所述的方法,其中所述调控因子 Pax6 的基因序列如 SEQ ID NO. 5 所示;所述调控因子 Nr1 的基因序列如 SEQ ID NO. 8 所示;所述调控因子 Klf4 的基因序列如 SEQ ID NO. 10 所示。

[0025] 12. 根据第 1 项所述的方法,其中所述用于培养哺乳动物体细胞的培养基是哺乳动物体细胞培养基;所述用于培养哺乳动物胚胎干细胞的培养基是 CDF12 培养基;所述用于哺乳动物胚胎干细胞到神经干细胞分化的培养基是 N2/B27 培养基;并且,所述用于培养视网膜色素上皮细胞的培养基是 RPE 基础培养基。

[0026] 13. 利用根据前述任一项所述的方法获得的视网膜色素上皮细胞。

#### 附图说明

[0027] 图 1:本发明的总体技术方案。

[0028] 图 2:人类 RPE 细胞特异性报告基因系统的建立。

[0029] 图 3:人类胚胎干细胞向 RPE 细胞分化过程中 Best::GFP 阳性细胞的鉴定。

[0030] 图 4:转录调控因子介导的人类成纤维细胞向 RPE 细胞转分化的策略。

[0031] 图 5:八种转录调控因子诱导人类成纤维细胞分化为 Best1::GFP 阳性细胞克隆。

[0032] 图 6:由人类成纤维细胞转分化而来的 Best1::GFP 阳性细胞的鉴定。

#### 具体实施方式

[0033] 下面结合具体实施例对本发明作进一步说明。

[0034] 材料和方法:

[0035] 1. 培养基:

[0036] 哺乳动物体细胞培养基配方:

[0037] DMEM/F12(Invitrogen,11320-033)

[0038] 0.1mM 非必需氨基酸(Invitrogen,11140-050)

[0039] 1mM GlutaMAX™ 二肽(Invitrogen,35050-061)

[0040] 1%青霉素/链霉素(Invitrogen,15070-063)

[0041] 10%胎牛血清(Hyclone,SH30084.83)

[0042] CDF12 培养基配方:

[0043] DMEM/F12(Invitrogen,11320-033)

[0044] 0.1mM 非必需氨基酸(Invitrogen,11140-050)

[0045] 1mM GlutaMAX™ 二肽(Invitrogen,35050-061)

[0046] 20% Knockout 血清替代物(Invitrogen,N10828-028)

[0047] 1%青霉素/链霉素(Invitrogen,15070-063)

[0048] 55 μM β-巯基乙醇(Invitrogen,21985-023)

- [0049] 10ng/ml Human FGF2(Joint Protein Central)
- [0050] N2/B27 培养基配方：
- [0051] DMEM/F12(Invitrogen,11320-033)
- [0052] 0.1mM 非必需氨基酸 (Invitrogen,11140-050)
- [0053] 1mM GlutaMAX™ 二肽 (Invitrogen,35050-061)
- [0054] 1%青霉素 / 链霉素 (Invitrogen,15070-063)
- [0055] 1% N-2 添加剂 (Invitrogen,17502-048)
- [0056] 2%**B-27®**添加剂 (Invitrogen,0080085-SA)
- [0057] RPE 基础培养基：
- [0058] DMEM/F12(Invitrogen,11320-033)
- [0059] 0.1mM 非必需氨基酸 (Invitrogen,11140-050)
- [0060] 1mM GlutaMAX™ 二肽 (Invitrogen,35050-061)
- [0061] 1%青霉素 / 链霉素 (Invitrogen,15070-063)
- [0062] 1% N-2 添加剂 (Invitrogen,17502-048)
- [0063] 5% Knockout 血清替代物 (Invitrogen, N10828-028)
- [0064] Activin A 培养基：
- [0065] DMEM/F12(Invitrogen,11320-033)
- [0066] 0.1mM 非必需氨基酸 (Invitrogen,11140-050)
- [0067] 1mM GlutaMAX™ 二肽 (Invitrogen,35050-061)
- [0068] 1%青霉素 / 链霉素 (Invitrogen,15070-063)
- [0069] 20% Knockout 血清替代物 (Invitrogen, N10828-028)
- [0070] 100nM Activin A(R&D System,货号 :338-AC)
- [0071] 2. 人类胚胎干细胞培养：
- [0072] 本发明涉及的人类胚胎干细胞系 H9 从美国 WiCell Research Institute(货号：WA09(H9)-DL-7) 获得,利用两种方法进行培养：
- [0073] a. 将 H9 细胞接种至预先培养了经过丝裂霉素 (购自美国 Sigma 公司,货号：M0503) 灭活的小鼠胚胎成纤维细胞 (购自美国 Invitrogen 公司,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；
- [0074] b. 将 H9 细胞接种至预先用细胞外基质 (qualified-Matrigel, 购自美国 BD Biosciences, 货号 :354277) 包被的培养板中,使用 mTeSR 培养基 (购自美国 StemCell Technologies) 培养。
- [0075] 3. 人类胚胎干细胞向视网膜色素上皮细胞的分化：
- [0076] 将人类胚胎干细胞以团块形式消化并接种到经 1% 细胞外基质包被的培养板中,添加 CDF12 培养基于 37 摄氏度和 5% 二氧化碳条件下培养 1 小时,然后改用含有 2% qualified-Matrigel(购自美国 BD Biosciences, 货号 :354277) 的 N2/B27 培养基过夜培养后,再替换为无 qualified-Matrigel(购自美国 BD Biosciences, 货号 :354277) 的 N2/B27 培养基继续培养,每两天更换一次培养基,之后将细胞分为两组,分别按照下列方法进行后续培养：
- [0077] a. RA 和 SHH 处理组 :从上述培养的第 7 天起向培养基中添加 500nM 视黄酸 (RA,美

国 Sigma 公司, 货号 :R2625), 之后视黄酸浓度逐渐降低, 直至第 10 天的 200nM。第 11 至 14 天, 培养基替换为含有 25nM Sonic Hedgehog (SHH, 美国 Sigma 公司, 货号 :SRP3156) 的 N2/B27 培养基。从第 15 天起将培养基更换为基础 RPE 培养基继续培养, 以上培养基均为每两天更换一次。

[0078] b. Acvitin A 处理组 : 在上述培养后的第 10 至 20 天, 培养基替换为 Activin A 培养基, 每两天更换一次培养基。之后替换为 RPE 基础培养基继续培养, 同样是每两天更换一次培养基。

[0079] 4. 慢病毒载体和逆转录病毒载体的构建 :

[0080] 慢病毒载体包装质粒为 pMDL、pCMV-VSVG 和 pRSV-REV (均从美国 Addgene 公司购买, 货号 :12251、35616 和 12253)。逆转录病毒载体包装质粒为 pCMV-GAG-Pol 和 pCMV-VSVG (购自美国 Addgene 公司, 货号 :14887 和 35616)。图 2-A 中构建报告基因的骨架质粒为 pGreenZeo 慢病毒载体 (美国 System Biosciences 公司, 货号 :#SR500VA/PA)。图 4 中用于成纤维细胞转分化的骨架质粒为 pMX-gateway 载体 (购自美国 Addgene 公司, 货号 :18656)。病毒包装过程是利用 Lipofectamine2000 (购自美国 Invitrogen 公司, 货号 :11668019) 将质粒载体转染进入人胚胎肾细胞 293T (购自美国 ATCC, 货号 :CRL-11268), 48 和 72 小时后收集培养上清, 并用 0.45  $\mu$ m PVDF 膜 (购自美国 Millipore 公司, 货号 :SLHV033) 过滤。

[0081] 5. 将人类成纤维细胞转分化为 Best1::GFP 阳性细胞 :

[0082] 首先将人类原代成纤维细胞 (HFF) 培养于添加 1% 青霉素 / 链霉素 (Invitrogen, 15070-063) 的哺乳动物体细胞培养基中, 每两天更换一次培养基, 直至细胞生长密度达到 50-70% 即可进行病毒感染。病毒感染前一天, 将培养基更换为不含 1% 青霉素 / 链霉素 (Invitrogen, 15070-063) 的 MEF 培养基, 以每孔 75,000 细胞 / 孔的密度, 接种到预先用 0.5% qualified-Matrigel (购自美国 BD Biosciences, 货号 :354277) 处理过的 6 孔板中, 在 37 摄氏度和 5% 二氧化碳培养条件下培养 12 小时, 之后直接在培养基中加入具体实施例 2 中提及的病毒载体混合物, 包括八种逆转录病毒和一种慢病毒载体, 感染细胞 12 小时后将培养基更换为 CDF12 培养基。之后每天换液, 病毒感染 5-6 天后可以观察到细胞形态开始从梭形变为圆形 (如图 5-A 所示)。在病毒感染之后第 7 天, 将培养基更换为含有 2% qualified-Matrigel 的 N2/B27 培养基, 继续培养 8-24 小时后, 再将培养基更换为 RPE 基础培养基。之后每两天更换一次培养基, 在病毒感染 20 天后于荧光显微镜下挑选经蓝光照射能够发出绿色荧光的 BEST1::GFP 阳性细胞克隆, 将其接种至预先用 0.5% qualified-Matrigel (购自美国 BD Biosciences, 货号 :354277) 处理过的 24 孔板中, 首先用添加视黄酸 (RA) 和 SHH 的 N2/B27 培养基培养, 每两天更换一次培养基。培养 10 天之后将培养基更换为 RPE 基础培养基 (每两天更换一次培养基), 继续培养直至能够观察到明显的黑色素细胞。

[0083] 6. qPCR 检测中使用的引物序列 :

[0084]



基因	正向引物序列(5' - 3')	反向引物序列(5' - 3')
Best1	CTGGGCTTCTACGTGACGC	AGGTTCTCGTACTGGTTCCAC
cMyc	CGGGCGGGCACTTTG	GGAGAGTCGCGTCCTTGCT
CRALB P	AAGCTGGCTACCCTGGTGT	TGAAGCAATATGCCTGCAAG A
Crx	GCCCCACTATTCTGTCAACG	GTCTGGGTACTGGGTCTTGG
GAPD H	GGACTCATGACCACAGTCCAT GCC	TCAGGGATGACCTTGCCCACA G
Klf4	AGCCTAATTGATGGTGCTTGG T	TTGAAAACCTTTGGCTTCCTTG TT
Lhx2	ATGCTGTTCCACAGTCTGTCG	GCATGGTCGTCTCGGTGTC
Mitf	TGGTTTTCCACGAGCTATTT T	GCACAGAGTCAATTCCTGGT
Nrl	GGCTCCACACCTTACAGCTC	GGCCCATCAACAGGGACTG
Otx2	CAAAGTGAGACCTGCCAAAA AGA	TGGACAAGGGATCTGACAGT G

[0085]

Pax6	AGTGAATCAGCTCGGTGGTGT CTT	TGCAGAATTCGGGAAATGTC GCAC
Pedf	TTCAAAGTCCCCGTGAACAAG	GAGAGCCCCGGTGAATGATGG
Rax	GAATCTCGAAATCTCAGCCC	CTTCACTAATTTGCTCAGGAC
Rpe65	CCTGCTGGTGGTTACAAGAAA	CCTGCCTGTTACATGAGCTGT
Six3	CAAGGAGTCTCACGGCAAG	GCAATGCGTCTTCTGCTCG
Six6	GCCCTCAACAAGAATGAGTC G	GCCTCCTGGTAGTGTGCTTC
Tyr	TGCACAGAGAGACGACTCTT G	GAGCTGATGGTATGCTTTGCT AA
Tyrp2	AACTGCGAGCGGAAGAAACC	CGTAGTCGGGGTGTACTCTCT

[0086] 实施例 1.

[0087] 1. 建立在人类视网膜色素上皮细胞中特异性表达的报告基因系统。

[0088] 由于已有报道表明,人类 Bestrophin1 (Best1) 基因和 Rpe65 基因的启动子,能够特异性地在转基因小鼠的视网膜色素上皮细胞 (RPE) 中驱动报告基因的高效表达,因此我们首先将不同大小的人类 Bestrophin1 (Best1) 基因和 Rpe65 基因的启动子片段克隆进入慢病毒基因组载体 pGreenZeo(美国 System Biosciences 公司,货号:#SR500VA/PA) 中绿色荧光蛋白基因 (gfp) 的上游位点(如图 2-A 所示),其中包括 4 种 Best1 基因启动子(长度分别为 0.2kb、0.3kb、0.6kb 和 1kb) 以及 2 种 Rpe65 基因启动子(长度分别为 0.8kb 和 1kb)(如图 2-A 和表 1 所示),然后利用慢病毒载体包装质粒 pMDLg/pRRE、pCMV-VSVG 和 pRSV-REV(均从美国 Addgene 公司购买,货号:12251、35616 和 12253) 进行慢病毒载体包装。具体病毒包装过程为:利用 Lipofectamine2000(购自美国 Invitrogen 公司,货号:11668019) 将慢病毒基因组载体和包装质粒共转染进入人胚胎肾细胞 293T(ATCC, CRL-11268),48 和 72 小时后收集培养上清,并用 0.45  $\mu$ m PVDF 膜(购自美国 Millipore 公司,货号:SLHV033) 过滤。利用构建的不同慢病毒载体感染多种人类细胞,包括人类原代成纤维细胞 (HFF,购自德国 Lonza 公司,货号:CC-2509)、人类胚胎肾细胞 293T(购自美国 ATCC,货号:CRL-11268)、人类胚胎干细胞 H9(购自美国 WiCell Research Institute,货号:WA09(H9)-DL-7) 以及人类原代 RPE 细胞(购自德国 Lonza 公司,货号:194987) 等。研究表明,只有 Best1-0.6kb(0.6kb,序列如 SEQ ID NO.1 所示) 和 Best1-1kb(1kb,序列如 SEQ ID NO.2 所示) 两种启动子能够特异性地在人类原代 RPE 细胞中驱动绿色荧光蛋白高效表达(如图 2-A 所示),因此我们采用其中的 Best1-0.6kb 启动子进行后续的研究,所构建的报告基因系统在下文中也称作 Best1::GFP 报告基因系统。

[0089] 2. RPE 细胞特异性表达的报告基因系统 (Best1::GFP) 的验证。

[0090] 方法 1:为了进一步验证 Best1::GFP 报告基因的特异性,我们首先用表达

Best1::GFP 报告基因 (Best1-0.6kb 启动子) 的慢病毒载体感染人类胚胎干细胞 H9 (购自美国 WiCell Research Institute, 货号:WA09(H9)-DL-7), 然后利用已报道的方法 (Meyer, J. S., et al. Modeling early retinal development with human embryonic and induced pluripotent stem cells. PNAS, 2009, 106:16698-16703.) 将 H9 细胞分化为包括 RPE 细胞在内的混合细胞群, 研究结果表明 Best1::GFP 报告基因只在具有典型六角形形态的 RPE 样细胞中表达, 而在其它神经元样或成纤维细胞样的分化细胞中均未见表达 (如图 2-B 所示)。

[0091] 方法 2: 首先用表达 Best1::GFP 报告基因 (Best1-0.6kb 启动子) 的慢病毒载体感染人类胚胎干细胞 H9 (购自美国 WiCell Research Institute, 货号:WA09(H9)-DL-7), 并挑取 10 个克隆, 分别抽提其基因组 DNA (试剂盒购自美国 Qiagen 公司, 货号:10243), 通过 PCR 方法验证其为 Best1::GFP 报告基因阳性克隆, 然后将阳性克隆继续扩增培养并利用已报道的方法 (Boucherie, C., et al. Brief report: self-organizing neuroepithelium from human pluripotent stem cells facilitates derivation of photoreceptors. Stem Cells, 2013, 31:408-414; Zhu, Y., et al. Three-dimensional neuroepithelial culture from human embryonic stem cells and its use for quantitative conversion to retinal pigment epithelium. PloS one, 2013, 8, e54552.) 向 RPE 细胞定向分化 (如图 3-A 和 B 中 Activin A 组所示), 3 周后观察到了表达色素的单层细胞, 同时免疫荧光的实验结果表明这些细胞都能够表达 MITF、Best1 和 ZO-1 等 RPE 细胞典型标记物 (如图 3-E 所示), 证明我们成功的将人类胚胎干细胞分化为 RPE 细胞。此外我们还通过创新性的添加 RA 和 SHH 两种与 RPE 成熟和色素化相关的信号因子, 成功的增强了分化的 RPE 细胞的色素化水平 (如图 3-A 和 B 中 RA+SHH 组所示)。

[0092] 另一方面, 从分化后 21 天起我们在 Activin A 组和 RA+SHH 组都开始观察到 Best1::GFP 报告基因阳性的细胞, 并且阳性率在分化 40 天之后会增加到约 50% (如图 3-C 所示), 同时分化细胞中 Best1 mRNA 水平也在开始分化 3 周之后大幅上调 (如图 3-D 所示), 说明 Best1::GFP 报告基因的表达能够直接可视化地反映 RPE 细胞分化的动态过程。此外我们利用 qPCR 方法检测了分化 40 天之后 Best1::GFP 报告基因阳性细胞中的眼早期发育基因 (如图 3-F 所示), 发现 RPE 分化相关的两种关键基因 Mitf 和 Otx2 的表达明显上调, 而其它的成熟 RPE 特异性基因, 如 Best1、Peaf、Rpe65、Cralbp、Tyr 和 Tyr2, 也均有高表达, 并且这些基因的表达模式在 Best1::GFP 报告基因阳性细胞和人类原代 RPE 细胞非常类似, 进一步证明我们成功的建立了人类 RPE 细胞特异性的报告基因系统 Best1::GFP。

[0093] 实施例 2. 人类成纤维细胞向视网膜色素上皮细胞的转分化。

[0094] 我们利用 PCR 方法获得六种与视网膜发育和 RPE 分化相关的转录调控因子 (包括 Rax (NM\_013435.2, 序列如 SEQ ID NO. 3 所示)、Crx (NM\_000554.2, 序列如 SEQ ID NO. 4 所示)、Pax6 (NM\_000280.2, 序列如 SEQ ID NO. 5 所示)、MitfA (NM\_198159.2, 序列如 SEQ ID NO. 6 所示)、Otx2 (NM\_021728.2, 序列如 SEQ ID NO. 7 所示) 和 Nr1 (NM\_006177.2, 序列如 SEQ ID NO. 8 所示)) (如图 4-A 所示) 和两种在成熟 RPE 细胞中高表达的转录调控因子 (包括 cMyc (序列如 SEQ ID NO. 9 所示) 和 Klf4 (序列如 SEQ ID NO. 10 所示)) 的完整编码序列, 并且利用常规的分子生物学方法 (参考《分子克隆》第三版, 萨姆布鲁克, 科学出版社, 2008 年) 将其克隆进入 pMX-gateway 载体 (购自美国 Addgene 公司, 货号:18656) 从而构

建了表达不同因子的逆转录病毒基因组载体,具体方法为:利用扩增 8 种不同转录调控因子全长序列的引物和日本 TaKaRa 公司的 PrimeStar DNA 聚合酶(货号:DR010B),通过 PCR 方法获得 8 种不同转录调控因子全长编码序列的 DNA 片段,因为设计扩增引物时在其 5' 端和 3' 端分别添加限制性内切酶 EcoR I(5' -GAATTC-3') 和 Xho I(5' -CTCGAG-3') 的酶切位点,所以将获得的 8 种不同转录调控因子全长 DNA 片段与 pMX-gateway 载体同时用美国 NEB 公司的限制性内切酶 EcoR I(货号:R0101) 和 Xho I(货号:R0146) 进行双酶切之后,利用美国 Qiagen 公司 QIAquick Gel extraction kit(货号:28706) 胶回收酶切片段,最后利用美国 NEB 公司的 T4DNA 连接酶(货号:M0202) 将 8 种不同转录调控因子全长 DNA 片段连接进入 pMX-gateway 载体中,即获得表达 8 种不同转录调控因子的逆转录病毒基因组载体。然后利用 Lipofectamine2000(购自美国 Invitrogen 公司,货号:11668019) 分别将不同的逆转录病毒基因组载体和逆转录病毒载体包装质粒 pCMV-GAG-Pol 和 pCMV-VSVG(购自美国 Addgene 公司,货号:14887 和 35616) 共同转染进入人胚胎肾细胞 293T(购自美国 ATCC,货号:CRL-11268),48 和 72 小时后收集培养上清,并用 0.45  $\mu$ m PVDF 膜(购自美国 Millipore 公司,货号:SLHV033) 过滤,从而构建了分别表达 8 种因子的逆转录病毒载体。更进一步,我们将表达八种转录调控因子逆转录病毒载体和实施例 1 中构建的表达 Best1::GFP 报告基因(其中的启动子为 Best1-0.6kb 启动子)的慢病毒载体等摩尔比例混合在一起制成病毒混合物,然后利用该病毒混合物感染人类原代成纤维细胞(HFF)(购自德国 Lonza 公司,货号:CC-2509) 来实现从人类成纤维细胞向 RPE 细胞的转分化,具体过程如图 4-B 所示:首先将 HFF 培养于添加 1%青霉素/链霉素(Invitrogen,15070-063) 的哺乳动物体细胞培养基(可以用用于培养哺乳动物体细胞的其它培养基代替)中,每两天更换一次培养基,直至细胞生长密度达到 50-70%即可进行病毒感染。病毒感染前一天,将培养基更换为不含 1%青霉素/链霉素(Invitrogen,15070-063) 的 MEF 培养液,以每孔 75,000 细胞/孔的密度,接种到预先用 0.5% qualified-Matrigel(购自美国 BD Biosciences,货号:354277) 处理过的 6 孔板中,在 37 摄氏度和 5%二氧化碳培养条件下培养 12 小时,之后直接在培养基中加入上述的病毒混合物,感染细胞 4-24 小时后将培养基更换为 CDF12 培养基(可以用用于培养哺乳动物胚胎干细胞的其它培养基代替),之后每天换液一次(弃去全部原有培养基,添加新鲜 CDF12 培养基),病毒感染 5-6 天后可以观察到细胞开始出现形态改变(从梭形变为圆形,如图 5-A 所示)。在病毒感染之后第 7 天,将培养基更换为含有 0.5-2% qualified-Matrigel(购自美国 BD Biosciences,货号:354277) 的 N2/B27 培养基(可以用用于胚胎干细胞到神经干细胞分化的其它培养基代替),继续培养 8-24 小时后,再将培养基更换为 RPE 基础培养基(可以用用于培养 RPE 细胞的其它培养基代替)。之后每两天更换一次培养基(弃去全部原有培养基,添加新鲜 RPE 基础培养基),在病毒感染第 21 天后于荧光显微镜下挑选经蓝光照射能够发出绿色荧光的 BEST1::GFP 阳性细胞克隆,将其接种至预先用 0.5-2% qualified-Matrigel(购自美国 BD Biosciences,货号:354277) 处理过的 24 孔板中,用先后添加视黄酸(RA,美国 Sigma 公司,货号:R2625) 和 Sonic Hedgehog(SHH,美国 Sigma 公司,货号:SRP3156) 的 RPE 基础培养基培养:接种后的第 7-10 天添加 RA,其工作浓度逐天降低,依次为 500nM、400nM、300nM 和 200nM(每天更换一次培养基);接种后的第 11-14 天添加 SHH,其工作浓度为 25nM(每两天更换一次培养基),继续培养直至能够观察到明显的黑色素细胞(此外使用 100nM Activin A 处理以代替 RA 和 SHH 处理也可以实

现转分化为 RPE 细胞,但是只有使用 RA 和 SHH 才能观察到转分化形成的 RPE 细胞表达黑色素)。通过利用分别表达八种转录因子和 mCherry 报告基因(红色荧光蛋白基因,用于指示病毒转染效果,其质粒载体构建和病毒包装与八种转录因子完全相同)的逆转录病毒载体共感染 HFF 的实验,我们发现单独一种病毒载体的转染效率达到约 77% (如图 4-D 所示),据此我们推测被感染的细胞能够同时表达上述八种转录因子的机率可以达到 12%。病毒载体混合物共感染 3 天之后收集所有 HFF 进行 qPCR 分析(所用引物见材料与与方法部分),能够检测到所有 8 种转录调控因子的表达(如图 4-C 所示)。

[0095] 利用上述表达八种不同转录调控因子的逆转录病毒载体和实施例 1 中构建的表达 Best1::GFP 报告基因(其中的启动子为 Best1-0.6kb 启动子)的慢病毒载体共感染 HFF 进行转分化 12 天之后,我们通过荧光显微镜直接观察到了经蓝光照射能够发出绿色荧光的 Best1::GFP 报告基因阳性细胞克隆,转分化 21 天后这些细胞克隆开始表现出活跃的增殖活性,转分化 35 天后细胞克隆逐渐铺展成单层细胞状态,并且开始形成 RPE 前体细胞样的形态(如图 5-A 所示)。

[0096] 更进一步,我们设定了 8 个实验组,每组分别剔除一种转录调节因子,利用表达剩余七种因子的逆转录病毒载体和表达 Best1::GFP 报告基因(Best1-0.6kb 启动子)的慢病毒载体共感染 HFF 进行转分化(如图 5-B 所示),结果表明剔除 cMyc、MitfA 或者 Otx2 后完全检测不到 Best1::GFP 报告基因(Best1-0.6kb 启动子)阳性细胞,此外剔除 Rax 或者 Crx 也会大幅减少 Best1::GFP 报告基因阳性细胞的数量(如图 5-B 所示),提示 cMyc、MitfA、Otx2、Rax 和 Crx 对于由人类成纤维细胞向 Best1::GFP 报告基因(Best1-0.6kb 启动子)阳性细胞转分化的过程至关重要,而另外三种因子 Klf4、Nr1 和 Pax6 则可以被单独剔除或被其它因子所替换。

[0097] 实施例 3. 转分化细胞的鉴定。

[0098] 在使用病毒混合物感染 HFF 细胞之后的第 21 天,于荧光显微镜下挑选经蓝光照射能够发出绿色荧光的 BEST1::GFP 阳性细胞克隆,并将其接种至预先用 0.5% qualified-Matrigel(购自美国 BD Biosciences,货号:354277)处理过的 24 孔板中,将细胞分为两个实验组,首先分别使用添加 1)Activin A(终浓度 100nM, R&D System,货号:338-AC),或者 2)RA(视黄酸,美国 Sigma 公司,货号:R2625)和 SHH(工作浓度 25nM,美国 Sigma 公司,货号:SRP3156)的 N2/B27 培养基,于 37 摄氏度和 5%二氧化碳条件下继续培养,每两天更换一次培养基,以便促进其进一步成熟(如图 6-B 所示)。培养 10 天之后将培养基更换为 RPE 基础培养基(每两天更换一次培养基),继续培养直至能够观察到明显的黑色素细胞。在使用病毒混合物感染 HFF 细胞之后的第 35 天,两个实验组的细胞都表现出与由人类胚胎干细胞定向分化成的 RPE 细胞类似的细胞形态,同时使用实时定量 PCR(qPCR)方法也能够检测到 MITF、ZO-1 和 Best1 等 RPE 细胞特异性分子标记物的表达(如图 6-A 所示)。更重要的是,此时早期使用含有 RA 和 SHH 的培养基培养的 Best1::GFP 阳性细胞中已经能够观察到明显的黑色素细胞(如图 6-B 所示),说明这种培养条件能够使 Best1::GFP 阳性细胞更加成熟而成为具有功能的 RPE 细胞。为了进一步验证这一发现,我们用流式细胞术富集成熟的 Best1::GFP 阳性细胞(添加 RA 和 SHH 的实验组),并用 qPCR 技术分析(所用引物见材料和方法部分)细胞中 RPE 细胞特异性因子的转录产物,通过与人类原代成纤维细胞比较,我们发现成熟的 Best1::GFP 阳性细胞不仅表达人工转入的转录调控因子,而

且还表达 Six3 和 Lhx2 等其它眼内富集的基因,此外还能够检测到一系列直接与维生素 A 代谢、黑色素合成以及生长因子分泌等 RPE 功能相关的基因表达,如 Best1、Cralbp、Pedf 和 Tyrp2 等(如图 6-C 所示)。

[0001]

## 序列表

<110> 生物物理研究所  
 <120> 一种将人类成纤维细胞转分化为视网膜色素上皮细胞的方法  
 <130> IB131030  
 <160> 10  
 <170> PatentIn version 3.1  
  
 <210> 1  
 <211> 596  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <400> 1  
 tagtcccaaa accacacatc tcataatccc ctgcagtget tgattaaaat gcaacatccc 60  
  
 taaggccaca gactcagact ctggagaaag atccagaaaa ctgcccgftt aataaacatt 120  
  
 tgggcatc ttacggctc taaagaccaa gaaccaactgc tgctagagc tctgtctct 180  
  
 tcattgaaca atacaagagg agtgtgtagg tagacaccca ccactccaa cagcttagga 240  
  
 gagccctga gtatggattg atgtattaaa atttattgaa tcacatgctg agatttcac 300  
  
 cagctgcccg tggggatctg ggcattfatt cccatattgc actggctggc tggagccag 360  
  
 cagcataaac tccaggctg ttctgtcaac ccccaccaga ctcaccccc tccaccagcc 420  
  
 ccggcaggct tctcttcca tctcttgaa gcaactfact gatgggcct gccagccaat 480  
  
 cacagccaga ataacgtatg atgcaccag cagccaatca gagctcctcg tcagcatatg 540

[0002]

cagaattctg tcattttact agggatga aattccaag caacaccate ctttcc	596
<210> 2	
<211> 1000	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 2	
cattgcgaaa tagtgtttt tttctagcc agataattat ataaaggcaa aaatgggtg	60
tgggggtggg ggacaagggg agggagagca ttaggacaaa tacctaagc acgcaaggct	120
taaaacctag atgatgggtt gacagtgca gcaaacacc atggcacacg tatacctatg	180
taacaaacct gcacatcatg tafacctatg taacaaacct gtacattctg cacacgtatc	240
ccagaactta aagtgaaaa aaaagtgggtg ttagaaaaa tcacctgcaa tctcagata	300
gttaacgctt agtacattc agagagagag ggtgacagga aaggaggat gagagtgggt	360
ttaagacaca aggtcatatt ataaaatcag ggcttctgga agtttagtcc caaaaccaca	420
catctcataa tcccctgcag tgcttgatta aatgcaaca tccctaaggc cacagactca	480
gactctggag aaagatccag aaaactgccc gtttaataaa catttgggcg attcttacgg	540
cctctaaaga ccaagaacca ctgctgccta gagctctgct ctctcattg acaatacaa	600
gaggagtgtg taggtagaca cccaccactt ccaacagctt aggagagccc ttgagtatgg	660

[0003]



attgatgtat taaaatttat tgaatcacat gctgagattt tcaccagctg cccgtgggga	720
tctgggcatt tattcccata ttgcactggc tggctggaag ccagcagcat aaactccagg	780
gctgttctgt caacccccac cagactcacc cccctccacc agccccggca ggcttctect	840
tccatctctc tgaagcaact tactgatggg ccctgccagc caatcacagc cagaataacg	900
tatgatgtca ccagcagcca atcagagctc ctcgtcagca tatgcagaat tctgtcattt	960
tactaggttg atgaaattcc caagcaacac catccttttc	1000
<210> 3	
<211> 1041	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 3	
atgcacctgc cgggctgcgc gccagccatg gccgacggga gcttctcget tgccggccac	60
ctgctccgca gcccgggcgg gagcaacctc gcacttcaca gcatcgaggc catctfgggg	120
tttaccaagg acgacgggat cctcggcacc ttcccggcgg agcggggcgc cgggggcgcg	180
aaggagcggg ataggaggct gggcgcgcgg cccgcctgcc ccaaggcgcc cgaggaaggc	240
tccgagccct ccccgcgcc agccccggcg cccgccccg agtacgaagc cctcagacc	300
tactgccccca aggagccecgg ggaggcacgg ccgagcccag ggctgcccgt cgggccagcc	360

[0004]

accggcgaag cgaaactgtc agaggaggaa cagcccaaga aaaagcatcg gcggaaccgc	420
acgacttca ccacgtacca gctgcatgag ctggagcgcg cgftcgagaa gtcccactac	480
cggacgtgt acagccgca ggagctggcc ggcaaggtea acctaccaga ggtccgggtc	540
caggtgtggt tccagaaccg acgggctaag tggcggcggc aggagaagct ggaagtgtcc	600
tccatgaage tgcaggactc gccctctc tccttcagcc gtccccgcc ctccgagacg	660
ctgtcgcgcc tcggggcggg cccgggcagc ggtggcgggc cggctggggg cgcgctgccg	720
ctggagtctt ggctcgggcc gccgctgccg ggcgggggcg ccacggcgtt gcagagcctg	780
ccgggcttcg ggccgcccgc gcagagcctg cctgccagct acacgccacc gccgcccctt	840
ccgcccttc tgaactcccc gccgttgggc cccggcctgc aacctctgc gccgcccgcg	900
ccctctacc cgtgcgggcc cggcttcggg gacaagtcc cgtggacga ggcggacccg	960
cgcaacagea gcatcgcggc gctgcgtctg aaagccaagg agcacatcca ggccatcggg	1020
aagccgtggc aggccctcta g	1041

<210> 4

<211> 900

<212> DNA

<213> 人工序列

[0005]

<400> 4	
atgatggcgt atatgaacce ggggceccac tattctgtca acgccttggc cetaagtgge	60
cccagtgtgg atctgatgca ccaggctgtg ccctacccaa ggcceccag gaagcagcgg	120
ggggagcgcga ccaccttcac cggagccaa ctggaggagc tggaggeact gttgccaag	180
accagtfacc cagacgtcta tgcccgtgag gaggtggctc tgaagatcaa tctgcctgag	240
tccagggttc aggtttggtt caagaaccgg agggctaaat gcaggcagca gcgacagcag	300
cagaaacagc agcagcagcc cccagggggc caggccaagg cccggcctgc caagaggaag	360
gcgggcacgt cccaagacc ctccacagat gtgtgtccag accctctggg catctcagat	420
tctacagtc ccctctgcc cggcccctea ggctcccua ccacggcagt ggccactgtg	480
tccatctgga gccagcctc agagtccct ttgctgagg cgcagcgggc tgggctggtg	540
gcctcagggc cgtctctgac ctccgcccc tatgceatga cctacgcccc ggcctcagct	600
ttctgcttt cccctcgc ctatgggtct ccgagctct attcagcgg cctagacccc	660
taccttctc ccatggtgcc ccagctaggg ggcccggctc ttagccccct ctctggcccc	720
tccgtgggac ctccctggc ccagtccccc acctccctat caggccagag ctatggcgcc	780
tacagccccg tggatagctt ggaattcaag gacccccagg gcacctgga attcacctac	840
aatcccatgg acctctgga ctacaaggat cagagtgcct ggaagttca gatctttag	900

[0006]

<210>	5		
<211>	1269		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<400>	5		
	atgcagaaca gtcacagcgg agtgaatcag ctcggtggtg tctttgtcaa cgggcggcca		60
	ctgccggact ccaccggca gaagattgta gagctagctc acagcggggc cggccgtgc		120
	gacattccc gaattctgca ggtgtccaac ggatgtgtga gtaaaattct gggcaggtat		180
	tacgagactg gtcctcag acccaggcca atcgggtgta gtaaaccgag agtagcgact		240
	ccagaagttg taagcaaat agcccagtat aagcgggagt gcccgccat cttgcttgg		300
	gaaatccgag acagattact gtccgagggg gtctgtacca acgataacat accaagcgtg		360
	tcatcaataa acagagttct tcgcaacctg gctagcgaaa agcaacagat gggcgcagac		420
	ggcatgtatg ataaactaag gatgttgaac gggcagaccg gaagctgggg caccegcct		480
	ggttggtatc cggggacttc ggtgccaggg caacctacgc aagatggctg ccagcaacag		540
	gaaggagggg gagagaatac caactccatc agttccaacg gagaagattc agatgaggt		600
	caaatgcgac ttcagctgaa gcggaagctg caaagaaata gaacatcett tacccaagag		660
	caaattgagg ccttgagaa agagtttgag agaaccatt atccagatgt gttgcccga		720

[0007]

gaaagactag cagccaaaat agatctacct gaagcaagaa tacaggtatg gttttcta	780
cgaagggcca aatggagaag agaagaaaaa ctgaggaatc agagaagaca ggccagcaac	840
acacctagtc atattcctat cagcagtagt ttcagcacca gtgtctacca accaattcca	900
caaccaccca caccggtttc ctcttcaca tctggctcca tgttgggccg aacagacaca	960
gccctcaca acacctacag cgctctgccg cctatgccca gcttcacat ggcaaataac	1020
ctgectatgc aacccccagt cccagccag acctctcat actctgeat gctgccacc	1080
agccttegg tgaatgggag gagttatgat acctacacc cccacatat gcagacacac	1140
atgaacagtc agccaatggg cacctcgggc accactcaa caggactcat ttcccctggt	1200
gtgtcagttc cagttcaagt tcccggaggt gaacctgata tgtctcaata ctggccaaga	1260
ttacagtaa	1269
<210> 6	
<211> 1563	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 6	
atgcagtcag aatcggggat cgtgccgat ttcgaagtcg gggaggagtt tcatgaagag	60
cccaaacct attacgaact caaagtcaa ccgctgaaga gcagcagttc cgccgagcat	120

[0008]

cttggggcct ccaagcctcc gataagctcc tccagtatga catcaecgat cttgctacgc	180
cagcaactca tgcgtgagca gatgcaggag caggagcgcga gggagcagca gcagaagctg	240
caggcggccc agttcatgca acagagagtg cccgtgagtc agacaccagc cataaacgtc	300
agtgtgceca ccacccttcc ctctgccacg caggtgccga tggaaagtect taaggtgcag	360
accacctcg aaaacccac caagtaccac atacagcaag cccaacggca gcaggtaaag	420
cagtacctt ctaccactt agcaaataaa catgccaacc aagtctgag cttgccatgt	480
ccaaaccagc ctggcgatca tgtcatgcca cccgtgccgg ggagcagcgc acccaacagc	540
cccatggcta tgcttacgt taactccaac tfgaaaaag agggatttta taagttgaa	600
gagcaaaaaca gggcagagag cgagtgecca ggcatgaaca cacattcacg agcgtctctgt	660
atgcagatgg atgatgtaat cgatgacatc attagcctag aatcaagtta taatgaggaa	720
atcttgggct tgatggatcc tgccttgcaa atggcaaata cgttgctgt ctcgggaaac	780
tfgattgac tttatggaaa ccaaggtctg ccccaccag gcctcacat cagcaactcc	840
tgccagcca accttccaa cataaaaagg gagctcacag agtctgaagc aagagcactg	900
gccaaagaga ggcagaaaaa ggacaatcac aacctgattg aacgaagaag aagatttaac	960
ataaatgacc gcattaaaga actaggtact ttgattccca agtcaaatga tccagacatg	1020

[0009]

egctggaaca agggaacccat cttaaaagca tccgtggact atatccgaaa gttgcaacga 1080

gaacagcaac gcgcaaaaga acttgaaaac cgacagaaga aactggagca cgccaaccgg 1140

cattgtgtgc tcagaataca ggaactgaa atgcaggctc gagctcatgg actttccctt 1200

attocatcca cgggtctctg ctctccagat ttggtgaafc ggatcatcaa gcaagaacct 1260

gttcttgaga actgcagcca agacctcctt cagcatcatg cagacctaac ctgtacaaca 1320

actctcgatc tcacggatgg caccatcacc ttcaacaaca acctcggaac tgggactgag 1380

gccaaccaag cctatagtgt ccccaaaaa atgggatcca aactggaaga catcctgatg 1440

gacgacacce ttctcccgt cgggtgctact gatccactcc ttctctcagt gteccccgga 1500

gcttccaaaa caagcagccg gaggagcagt atgagcatgg aagagacgga gcacacttgt 1560

tag 1563

<210> 7

<211> 870

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 7

atgatgtctt atcttaagca accgccttac gcagtcaatg ggetgagtct gaccacttcg 60

ggtatggact tgetgcacce ctccgtgggc taccggcca cccccggaa acagcgccgg 120

[0010]

gagaggacga cgffcactcg ggcgcagcta gatgtgctgg aagcactgtt tgccaagacc	180
cggtaccag acatcttcat gcgagaggag gtggcactga aaatcaactt gcccagatcg	240
agggtgcagg tatggttaa gaatcgaaga gctaagtgcc gccaacaaca gcaacaacag	300
cagaatggag gtcagaacaa agtgagacct gccaaaaaga agacatctcc agctcgggaa	360
gtgagttcag agagtggaac aagtggccaa ttaactcccc cctctagcac ctcagtcccc	420
accattgcca gcagcagtgc tectgtgtct atctggagcc cagttccat ctccccactg	480
tcagatecct tgtccacete ctcttctgce atgcagaggt cctatcccat gacctatact	540
caggcttcag gttatagtca aggatatgct ggctcaactt cctactffgg gggcatggac	600
tgtggatcat attgacccc tatgcatcac cagttccccg gaccaggggc cacactcagt	660
cccatgggta ccaatgcagt caccagccat ctcaatcagt ccccagcttc tctttcace	720
caaggatatg gagcttcaag cttgggtttt aactcaacca ctgattgctt ggattataag	780
gaccaaactg cctectggaa gettaacttc aatgctgact gcttggatta taaagatcag	840
acatcctcgt ggaaattcca ggftttgtga	870

<210> 8

<211> 714

<212> DNA

[0011]



<213> 人工序列

<400> 8

atggccctgc ccccagccc cctggccatg gaatatgtca atgactttga ctgatgaag 60

tctgagglaa agcgggaacc ctctgagggc cgacctggcc cccctacagc ctcactgggc 120

tccacacctt acagctcagt gctccttca cccacctca gtgaaccagg catggtgggg 180

gcaaccgagg gcacccggcc aggctggag gagctgtact ggctggctac cctgcagcag 240

cagctggggg ctggggaggc attggggctg agtcctgaag aggccatgga gctgctgcag 300

ggtcagggcc cagtcctgt tgatgggccc catggctact acccaggag cccagaggag 360

acaggagccc agcacgtcca gctggcagag cggtttccg acgcggcgt ggtctcgatg 420

tctgtcggg agctaaaccg gcagctcgg ggctgcgggc gcgacgaggc gctgcggctg 480

aagcagaggc gccgcacgt gaagaaccgc ggctacgcgc aggctgtcg ctccaagcgg 540

ctgcagcagc ggcgcgggct ggaggccgag cgcgcccgc tggccgccca gctggacgcg 600

ctgegggccc aggtggcccc cctggccccg gagcgcgac tctacaaggc tcgctgtgac 660

eggtaacct cgagcggccc cgggtccggg gaccctccc acccttctct ctga 714

<210> 9

<211> 266

<212> DNA

[0012]

<213> 人工序列

<400> 9

atggtgccca ctcccaggft cagctgggtgc agtctggagc tgaggtgaag aagcctgggg 60

cctcagtga aagctctgc aagacctctg gttacacitt tatcagctgg gtgcgacagg 120

cccctggaca agggcttgag tggatgggat ggalcagcgt ttattctega ggcaggaggg 180

gagccaggga cggccggggc ccggcgggtg cggccgag cagcacagct cgggggtcct 240

cagccgtcca gaccctcgca ttataa 266

<210> 10

<211> 1440

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 10

atgaggcagc cacctggcga gctgacatg gctgtcagcg accgctgct cccatcttc 60

tccacgttcg cgtctggccc ggcgggaagg gagaagacac tgcgtcaagc aggtgccccg 120

aataaccgct ggcgggagga gctctccac atgaagcgac ttccccagt gcttccggc 180

cgcccctatg acctggcggc ggcgaccgtg gccacagacc tggagagcgg cggagccggt 240

gcggcttgcg gcgtagcaa cctggcggcc ctacctgga gagagaccga ggagtcaac 300

gatctctgg acctggactt tattctctcc aattcgtga cccatctcc ggagtcagtg 360

[0013]

gcegccaccg tctctctgtc agegtcagcc tctctctgt cgtcgccgtc gacgagcggc	420
cctgccagcg cggcctccac ctgcagcttc acctatccga tccgggcccgg gaacgaccg	480
ggcgtggcgc cgggcggcac gggcggaggc ctctctatg gcaggagtc cgtccccct	540
ccgacggctc cttcaacct ggcggacatc aacgacgtga gccctcggg cggctctgtg	600
gcegagctcc tgcggccaga atfggaccg gtgtacattc cggcgcagca gccgcagccg	660
ccaggtggcg ggctgatggg caagttcgtg ctgaaggcgt cgtgagcgc ccctggcagc	720
gagtacggca gcccgctcgt catcagcgtc agcaaaggca gccctgacgg cagccaccg	780
gtggtggtgg cggcctacaa cggcgggccc cgcgcacgt gcccaagat caagcaggag	840
gggtctctt cgtgcacca cttgggcgt ggaccccc tcagcaatgg ccaccggccg	900
gctgcacag acttccccct ggggcggcag ctcccagca ggactacccc gaccctgggt	960
ctgaggaag tctgagcag cagggactgt caccctgcc tgccttcc tcccggcttc	1020
cateccccacc cggggcccaa ttaccatcc ttctgccc atcagatgca gccgcaagtc	1080
ccgccgtcc attaccaaga gctcatgcca cccggttct gcatgccaga ggagcccaag	1140
ccaaagagg gaagacgac gtggccccgg aaaaggaccg ccaccacac ttgtgattac	1200
ggggctgcg gcaaaccta cacaaagat tccatctca aggcacacct gcgaaccac	1260

[0014]

---

acaggtgaga aacctacca ctgtgactgg gacggctgtg gatggaaatt cgcccgetca 1320

gatgaactga ccaggcacta ccgtaaacac acggggcacc gcccgttcca gtgccaaaaa 1380

tgcgaccgag cattttccag gtcggaccac ctgccttac acatgaagag gcatttttaa 1440

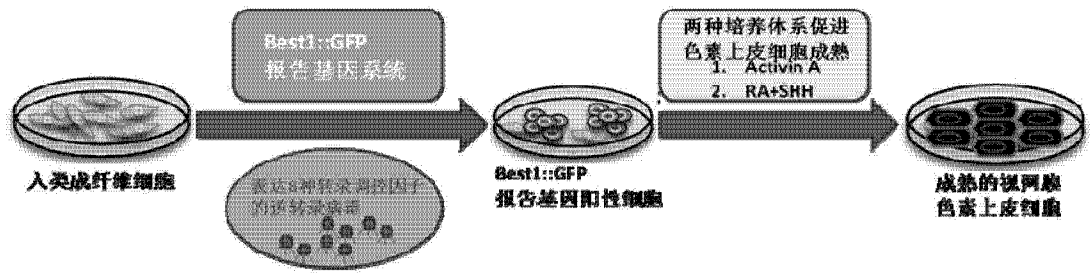
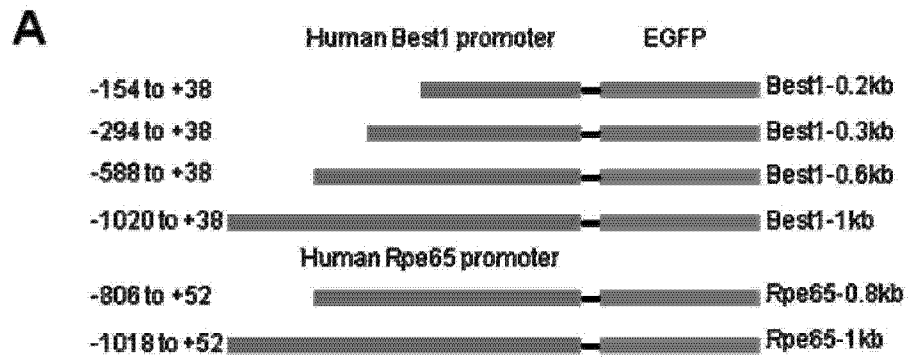


图 1



	293T	HFF	H9 hESC	HRPE
Best1-0.2kb	+	+	-	+
Best1-0.3kb	+	+	-	+
Best1-0.6kb	-	-	-	+++
Best1-1kb	-	-	-	+++
Rpe65-0.8kb	+	+	+	+
Rpe65-1kb	+	+	+	+

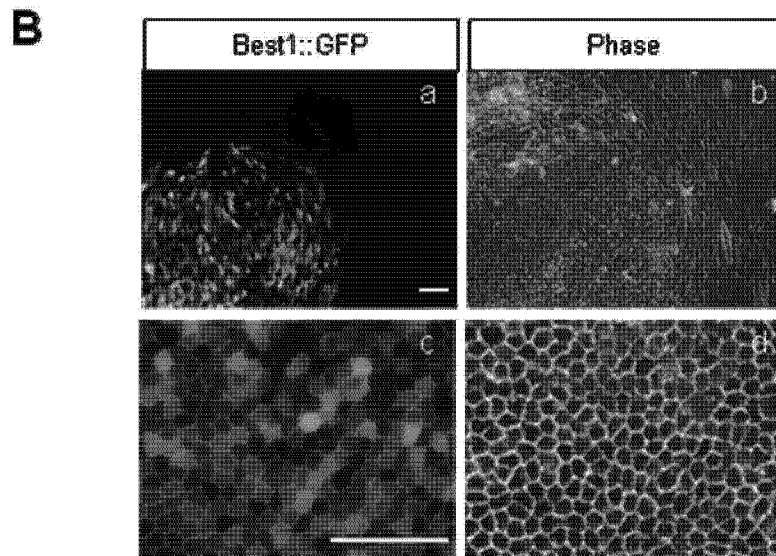


图 2

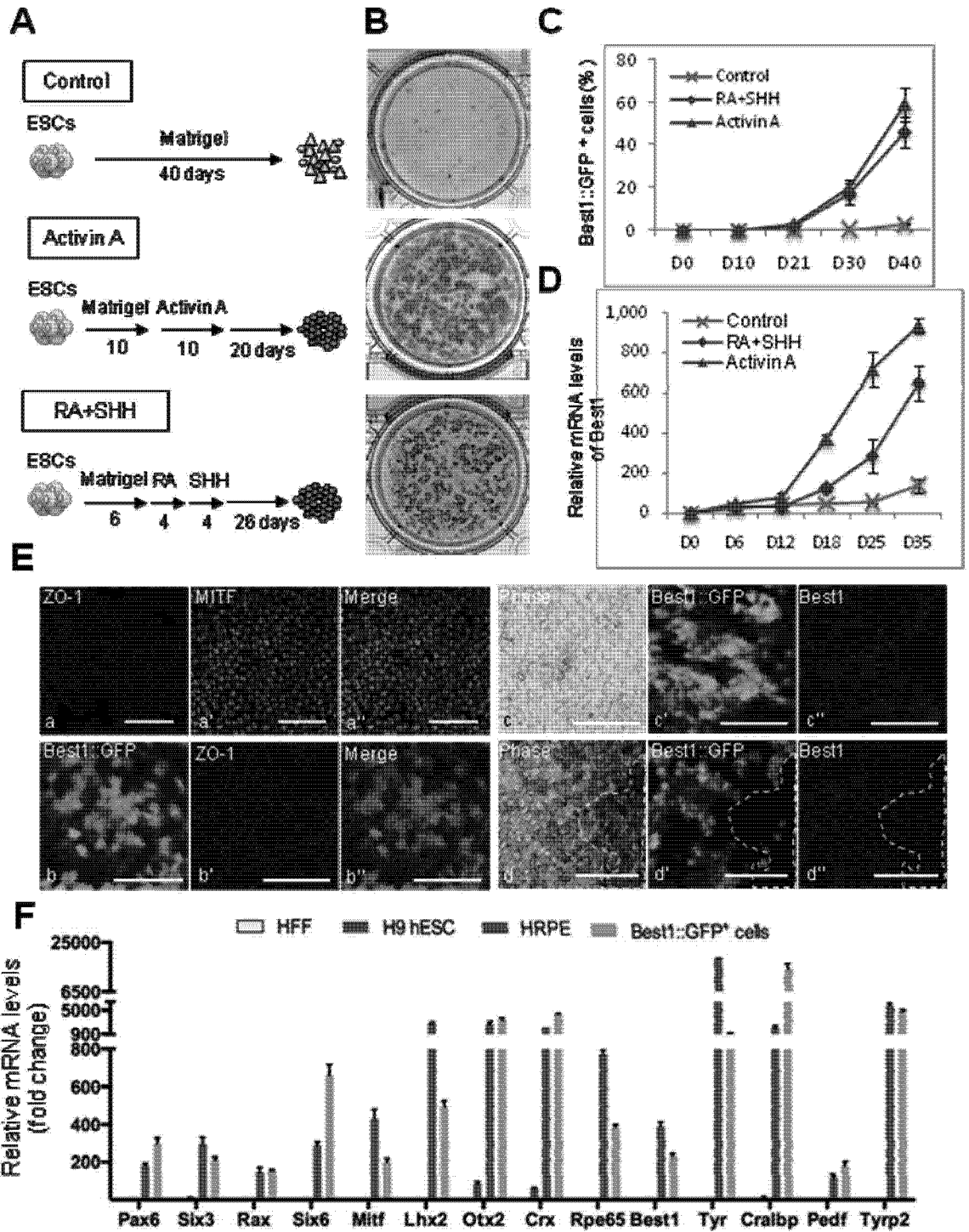


图 3

**A**

Gene	Accession Number	Length (bp)
Crx	NM_000554.2	900
Pax6	NM_000280.2	1269
Mitf-A	NM_198159.2	1563
Otx2	NM_021728.2	891
Nrl	NM_006177.2	714
Rax	NM_013435.2	1041

**B**

Virusinfection  
(TFs pools + Best1::GFP reporter)

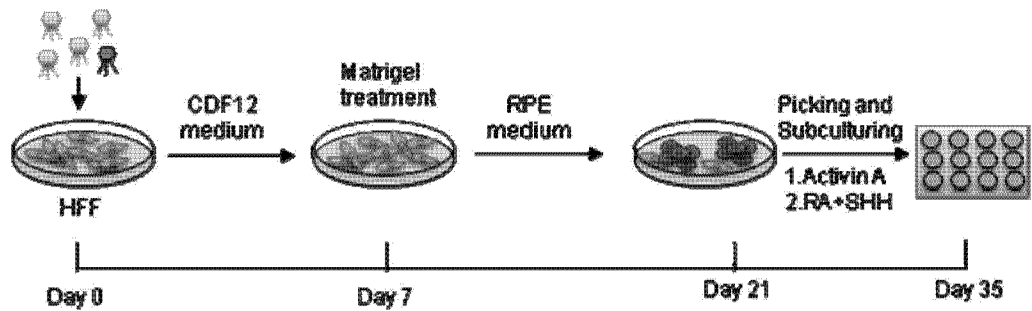
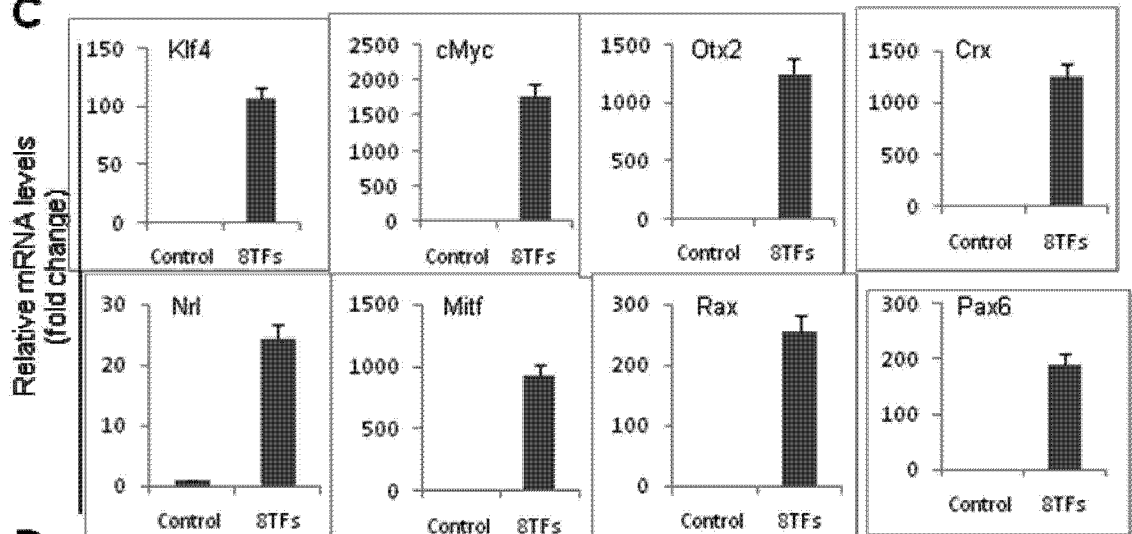
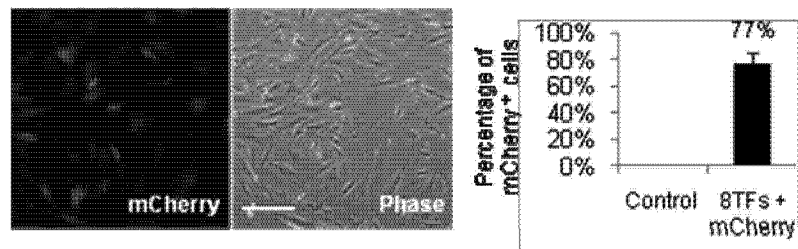
**C****D**

图 4

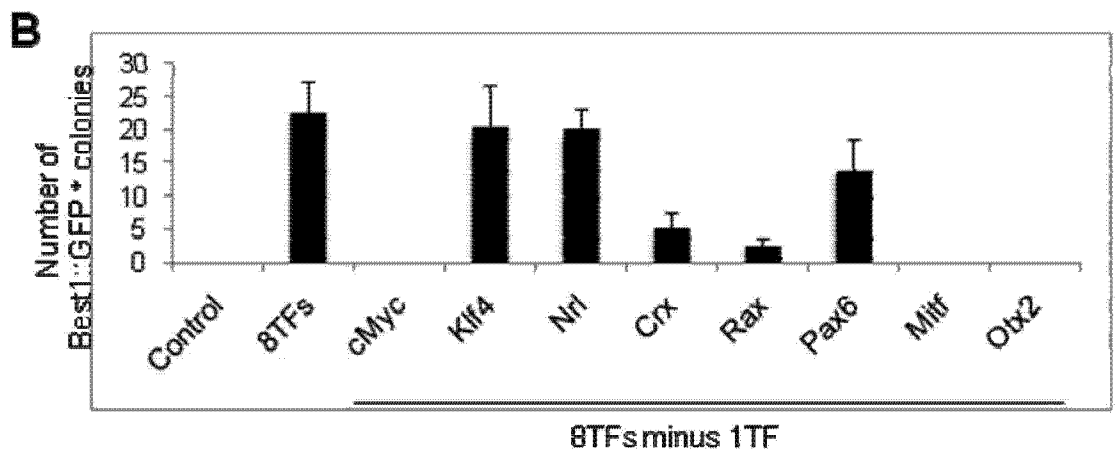
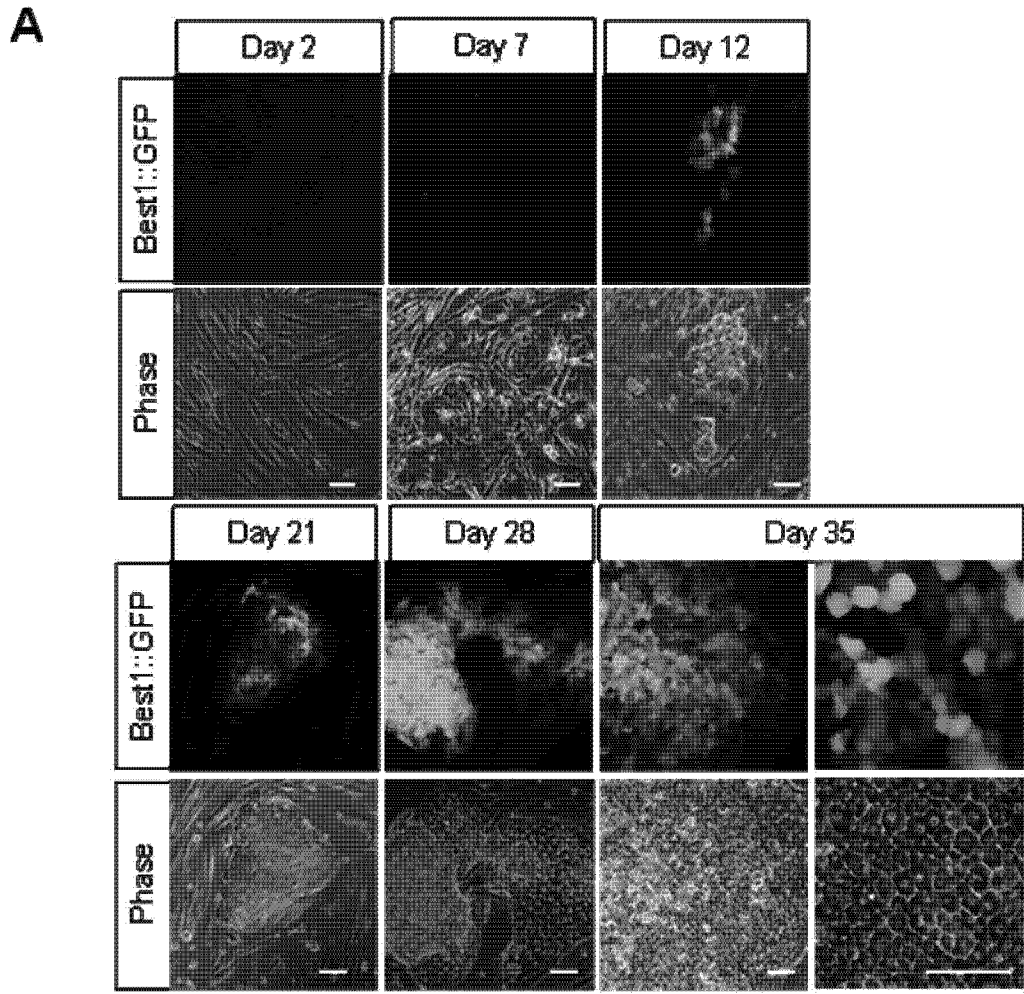


图 5



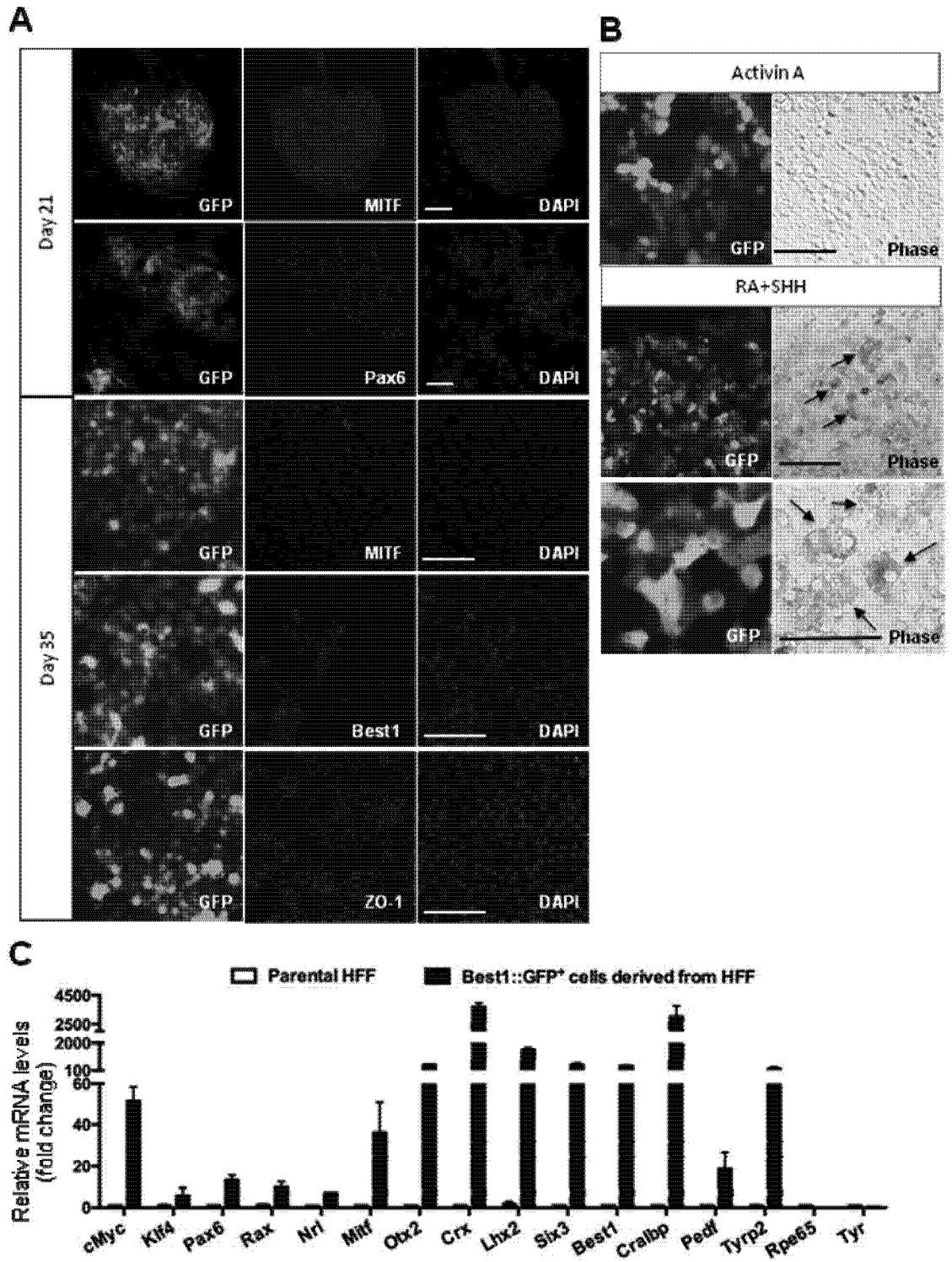


图 6