



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101955977 A

(43) 申请公布日 2011.01.26

(21) 申请号 201010141384.0

C12P 21/00(2006.01)

(22) 申请日 2010.03.25

(66) 本国优先权数据

200910129099.4 2009.03.25 CN

(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 马跃 马艳妮 赵静

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

11002

代理人 王朋飞

(51) Int. Cl.

C12N 15/869(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

C12N 5/00(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 7 页 序列表 8 页  
附图 10 页

(54) 发明名称

一种非整合的、长时间的、可删除表达载体的表达系统

(57) 摘要

本发明提供了一种非整合的、长时间的、可调控删除载体的表达系统,该表达系统的表达载体采用人疱疹病毒复制子(replication origin, Ori),并引入 EBNA-1 表达盒,在所述复制子的两端、EBNA-1 的两端或者 Ori-EBNA-1 的两端具有重组酶识别序列,本发明表达载体不整合到细胞基因组中;能够长时间稳定表达;能够从宿主细胞中通过瞬时引入(或表达)重组酶可控地删除载体质粒;通过使用较强的启动子可以应用到大多数种类的细胞;通过使用实时标记可将含有载体质粒和已丢失载体质粒的细胞区分开来。该表达系统可广泛应用于哺乳动物细胞表达以及通过表达外源基因实现细胞重编程的生物医学工程。

1. 一种表达载体,包括复制子,其特征在于,所述复制子为人疱疹病毒复制子,该表达载体还具有 EBNA-1 表达盒,在所述复制子的两端、EBNA-1 的两端或者复制子-EBNA-1 的两端具有重组酶识别序列。

2. 如权利要求 1 所述的表达载体,其特征在于,所述 EBNA-1 表达盒的启动子为具有真核细胞广谱性的强启动子。

3. 如权利要求 2 所述的表达载体,其特征在于,所述启动子为 CMV、PGK、CAG 或 EF-1  $\alpha$  启动子。

4. 如权利要求 1 所述的表达载体,其特征在于,所述重组酶识别序列为 Cre 酶识别序列或 FLP 酶识别序列。

5. 如权利要求 4 所述的表达载体,其特征在于,所述重组酶识别序列为 LoxP 序列和 / 或 frt 序列。

6. 如权利要求 1 ~ 5 任一项所述的表达载体,其还具有药物筛选标记基因和 / 或实时筛选标记基因。

7. 如权利要求 6 所述的表达载体,其特征在于,所述药物筛选标记基因为 neo、hph、gpt、Hprrt、tk 或 puro 基因。

8. 如权利要求 6 所述的表达载体,其特征在于,所述的实时筛选标记基因为荧光蛋白基因。

9. 如权利要求 1 所述的表达载体,其为 :A). pBR322-rrs-0rip-rrs-EBNA1-MCS ;B). pBR322-0rip-rrs-EBNA1-rrs-MCS ;C. pBR322-rrs-0rip-EBNA1-rrs-MCS ; 或 D). pBR322-rrs-0rip-EBNA1-rrs-EGFP ;

10. 由权利要求 1 ~ 9 任一项所述表达载体构建的重组载体。

11. 如权利要求 10 所述的重组载体,其为 1). pBR322-rrs-0rip-rrs-EBNA1-OSN ;2). pBR322-rrs-0rip-rrs-EBNA1-MK ;3). pBR322-0rip-rrs-EBNA1-rrs-OSN ;4). pBR322-0rip-rrs-EBNA1-rrs-MK ;5). pBR322-rrs-0rip-EBNA1-rrs-OSN 或 6). pBR322-rrs-0rip-EBNA1-rrs-MK

12. 含有权利要求 1 ~ 9 任一项所述表达载体或权利要求 10 或 11 所述重组载体的宿主细胞。

13. 一种表达系统,其包括权利要求 1 ~ 9 任一项所述表达载体或权利要求 10 或 11 所述重组载体。

14. 如权利要求 13 所述的表达系统,其还包括重组酶。

15. 如权利要求 13 或 14 所述的表达系统,其特征在于,将所述表达载体或重组载体转染细胞后,适时通过重组酶将该表达载体或重组载体删除。

16. 权利要求 1 ~ 9 任一项所述表达载体、权利要求 10 或 11 所述重组载体或权利要求 13 ~ 15 所述表达系统在表达外源蛋白中的应用。

17. 如权利要求 16 所述的应用,其特征在于,所述外源蛋白为对细胞有毒性或可诱导细胞凋亡的蛋白质。

18. 如权利要求 17 所述的应用,其特征在于,在哺乳动物细胞中表达具有细胞毒性与细胞凋亡相关的蛋白质。

19. 如权利要求 16 所述的应用,其特征在于,所述外源蛋白为能引起或有助于细胞重

编程的蛋白。

20. 权利要求 1 ~ 9 任一项所述表达载体、权利要求 10 或 11 所述重组载体或权利要求 13 ~ 15 所述表达系统在细胞的分化状态及细胞功能中的应用。

21. 如权利要求 20 所述的应用,其特征在于,将成体细胞重编成为多能干细胞。

22. 含有权利要求 1 ~ 9 任一项所述表达载体、权利要求 10 或 11 所述重组载体或权利要求 13 ~ 15 所述表达系统的试剂盒。

## 一种非整合的、长时间的、可删除表达载体的表达系统

### 技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程技术,具体涉及一种表达载体以及基于该表达载体的表达系统。

### 背景技术

[0002] 在哺乳动物细胞中表达外源基因的方法多种多样。例如,1) 可以利用转染普通质粒 (Plasmid DNA) 进行非整合的瞬时表达,还可通过将质粒整合到基因组而实现基因的长时间表达;2) 利用可包装为病毒颗粒的病毒载体,如慢病毒载体 (lentiviral vector)、反转录病毒载体等,需要将外源基因导入细胞并整合到细胞的基因组中得以稳定长期地表达外源基因;3) 腺病毒 (adenovirus) 载体可以将外源基因导入细胞,并以非整合的形式在细胞内表达,但这种方法只能实现外源基因的短期表达,不能实现长时间(一个月左右)的表达。

[0003] 这些方法中有的可以实现外源基因的长时间表达,但需要外源基因整合到细胞的基因组中,从而破坏了细胞的基因组的完整性;有的虽然可以保证细胞基因组的完整,但表达的时间比较短。更重要的是这些方法都不能人为地控制删除外源基因表达载体,因而在生物医学工程中存在着很大的风险。

### 发明内容

[0004] 针对上述不足,本发明提供一种非整合的、长时间的、可调控删除表达载体的表达系统。

[0005] 为实现上述目的,本发明首先提供一种表达载体,该表达载体的复制子采用人疱疹病毒复制子 (replication origin, Ori<sub>p</sub>),并引入 EBNA-1 表达盒,在所述复制子的两端、EBNA-1 的两端或者 Ori<sub>p</sub>-EBNA-1 的两端具有重组酶识别序列。

[0006] EBNA-1 基因编码的核抗原将表达载体质粒以游离染色体的形式存在,在细胞中实现外源基因的非整合且长期表达。

[0007] 由于 EBNA-1 基因的启动子为其病毒原始启动子,而该启动子在许多种类的细胞中几乎不会被激活,因而只能在少数血液系统细胞、肝脏细胞及心肌细胞等少数细胞中使用。为此,本发明将该表达盒的启动子替换为具有真核细胞广谱性的强启动子,诸如 CMV、PGK、CAG 或 EF-1 $\alpha$  等等启动子,使得其能够在各种不同的细胞中表达,特别是在哺乳动物细胞中表达。

[0008] 本发明在复制子或 EBNA-1 的两端加入重组酶识别序列,其能够在重组酶的作用下将识别序列内的 DNA 序列删除,从而使质粒不能复制,在细胞传代时质粒将被逐渐删除。所述的重组酶识别序列可以采用 Cre/LoxP 系统的 Loxp 序列或者是为 FLP/FRT 系统的 frt 序列。当然,也可以是 Loxp-frt 的融合序列。

[0009] 进一步,本发明表达载体还包括筛选标记,例如药物筛选标记或者实时筛选标记,或者它们的组合。药物筛选标记基因可以是新霉素磷酸转移酶 (neo)、潮霉素 B 磷酸转移

酶 (hph)、黄嘌呤 / 鸟嘌呤磷酸转移酶 (gpt)、次黄嘌呤磷酸转移酶 (Hpvt)、胸腺嘧啶激酶 (tk) 或嘌呤霉素乙酰转移酶 (puro) 等等基因。实时筛选标记基因可以是荧光蛋白基因或非荧光标记基因, 荧光蛋白基因可以是诸如绿荧光蛋白基因、黄荧光蛋白基因以及红荧光蛋白基因等等, 非荧光标记可以是免疫组化标记等等。本发明的一个实施例中采用了 neo 与 GFP 筛选标记的组合, 其引入的筛选标记表达盒是由 CMV 启动子、增强型绿荧光蛋白基因 (EGFP)、核糖体进入位点 (internal ribosome entry site, IRES) 以及新霉素磷酸转移酶基因 (neo) 构成的 CMV-EGFP-IRES-NEO 选择标记基因。利用实时荧光标记可将含有载体质粒和已丢失载体质粒的细胞区分开来。

[0010] 在本发明的实施例中, 采用 pBR322 作为出发质粒, 构建了 A). pBR322-rrs-Orip-rrs-EBNA1-MCS ; B). pBR322-Orip-rrs-EBNA1-rrs-MCS ; C. pBR322-rrs-Orip-EBNA1-rrs-MCS ; 以及 D). pBR322-rrs-Orip-EBNA1-rrs-EGFP 等表达载体。

[0011] 本领域技术人员可利用上述表达载体构建各种含有外源基因的重组载体, 用于基因的功能研究或各种应用。因此本发明还包括由上述表达载体构建的重组载体, 以及含有所述表达载体或重组载体的宿主细胞, 例如哺乳动物细胞。

[0012] 在本发明实施例中, 构建了诸如 1) pBR322-rrs-Orip-rrs-EBNA1-OSN ; 2) pBR322-rrs-Orip-rrs-EBNA1-MK ; 3). pBR322-Orip-rrs-EBNA1-rrs-OSN ; 4). pBR322-Orip-rrs-EBNA1-rrs-MK ; 5). pBR322-rrs-Orip-EBNA1-rrs-OSN 以及 6). pBR322-rrs-Orip-EBNA1-rrs-MK 等表达载体。这些表达载体含有诸如 Oct-4, Sox-2, Nanog, c-Myc, Klf4 等与成体细胞重编程相关的基因, 诱导人包皮成纤维细胞重编程为多能干细胞并保持其基因组的完整。

[0013] 将上述表达载体与重组酶构成表达系统, 该表达系统通过将上述表达载体 (重组载体) 转染宿主细胞, 并在适时通过重组酶将该表达载体 (重组载体) 删除。这里所述的“适时”, 是指本领域技术人员根据研究的需要, 在某个特定阶段将该重组质粒删除。所述重组酶可以通过重组酶表达载体进行瞬时表达, 或者是通过添加 N 端携带诸如 TAT 蛋白的重组酶, 利用 TAT 蛋白介导重组酶进入细胞。

[0014] 利用本发明所述表达载体、重组载体或表达系统可用于表达外源蛋白, 如表达对细胞有毒性或可诱导细胞凋亡的蛋白质, 用于研究该蛋白的作用机制或毒理分析, 特别是在哺乳动物细胞中表达具有细胞毒性或与细胞凋亡相关的蛋白质。还可以表达细胞重编程蛋白用于改变细胞的分化状态及细胞功能, 例如将成体细胞重编程为多功能干细胞。

[0015] 此外, 为了便于使用, 还可以将本发明表达载体、重组载体或表达系统与适当的试剂例如限制性内切酶、缓冲液等组装成试剂盒。

[0016] 在本发明实施例中, 将上述重组载体转染人包皮成纤维细胞 (HFF), 结果表明在人 HFF 中表达 Oct-4, Sox-2, Nanog 和 c-Myc, Klf4 基因, 可诱导该细胞转变为多能干细胞, 通过 TAT 介导 Cre 进入干细胞, 将该表达载体删除, 最终分离得到无载体整合到基因组、无载体存在的多能干细胞。

[0017] 在本发明中, rrs 表示重组酶识别序列, OSN 表示外源基因 Oct4-Sox2-Nanog, MK 表示外源基因 cMyc-Klf4。

[0018] 本发明表达载体具有如下优点:

- [0019] 1) 不整合到细胞基因组中；
- [0020] 2) 能够长时间稳定表达；
- [0021] 3) 能够从细胞中可控地删除载体质粒；
- [0022] 4) 通过使用较强的启动子可以应用到大多数种类的细胞；
- [0023] 5) 通过使用实时标记可将含有载体质粒和已丢失载体质粒的细胞区分开来。
- [0024] 本发明表达载体可在以下领域广泛应用：
- [0025] 1) 研究对细胞有毒性或可诱导细胞凋亡的蛋白质的作用机制及毒理分析。
- [0026] 2) 利用本发明载体在哺乳动物细胞中进行具有细胞毒性或与细胞凋亡相关的蛋白质的表达。
- [0027] 3) 利用本发明载体的非整合和可控删除载体的特点,将成体细胞重编程为多能干细胞。
- [0028] 4) 本发明载体在各种通过表达外源基因改变细胞的分化状态、细胞类型、细胞命运以及细胞功能方面的研究以及临床应用。

#### 附图说明

- [0029] 图 1 所示的是 pBR322-rrs-0rip-rrs-EBNA1-MCS 的质粒图谱；
- [0030] 图 2 所示的是 pBR322-0rip-rrs-EBNA1-rrs-MCS 的质粒图谱；
- [0031] 图 3 所示的是 pBR322-rrs-0rip-EBNA1-rrs-MCS 的质粒图谱；
- [0032] 图 4 所示的是 pBR322-rrs-0rip-EBNA1-rrs-EGFP 的质粒图谱；
- [0033] 图 5 所示的是 pBR322-rrs-0rip-rrs-EBNA1-OSN 的质粒图谱；
- [0034] 图 6 所示的是 pBR322-rrs-0rip-rrs-EBNA1-MK 的质粒图谱；
- [0035] 图 7 所示的是 pBR322-0rip-rrs-EBNA1-rrs-OSN 的质粒图谱；
- [0036] 图 8 所示的是 pBR322-0rip-rrs-EBNA1-rrs-MK 的质粒图谱；
- [0037] 图 9 所示的是 pBR322-rrs-0rip-EBNA1-rrs-OSN 的质粒图谱；
- [0038] 图 10 所示的是 pBR322-rrs-0rip-EBNA1-rrs-MK 的质粒图谱；
- [0039] 图 11 显示的是使用表达载体 pBR322-rrs-0rip-EBNA1-rrs-EGFP 电击转染 HFF 细胞 2 天、5 天、10 天、20 天的显微图片；
- [0040] 图 12 所示的是外源基因在人包皮成纤维细胞 (HFF) 中的表达检测,其中 H7 为人胚胎干细胞 ;HFF 为自 ATCC 购买的人包皮成纤维细胞 ;HFF/OSNMK4d,HFF/OSNMK10d 分别为共转染表达载体 pBR322-rrs-0rip-rrs-EBNA1-OSN 和 pBR322-rrs-0rip-rrs-EBNA1-MK4 天以及 10 天的 HFF 细胞；
- [0041] 图 13 显示的是使用上述表达载体在 HFF 细胞中表达外源基因 25 天时检测碱性磷酸酶活性。其中 A、B 所示为外源基因在 HFF 细胞中表达 25 天时所产生的碱性磷酸酶阳性克隆,C 为人胚胎干细胞阳性对照,D 为 HFF 细胞作为阴性对照；
- [0042] 图 14 显示的是使用本发明的表达载体将 HFF 细胞诱导转变为多能干细胞的鉴定,其中 A. 使用本发明表达系统从 HFF 细胞得到的多能干细胞表达 Oct4、Sox2、Nanog 基因；B. HFF 细胞本身不表达 Oct4、Sox2、Nanog 基因。第一列显示分别表达 Oct4、Sox2、Nanog 的细胞,第二列 DAPI 染色显示所有细胞,第三列为前两者的叠加。
- [0043] 图 15 显示的是携带可进入细胞定位于细胞核的 Cre 表达载体,其中, TAT 来自于

HIV 病毒,可介导蛋白进入细胞,NLS 为核定位信号。

[0044] 图 16 显示的是 Cre 蛋白在大肠杆菌中的表达以及通过 Ni 柱进行纯化的电泳图片。

[0045] 图 17 显示的是 HFF 细胞经该表达载体诱导形成的 GFP 阳性多能干细胞以及经 Cre 蛋白去除外源基因后的不表达 GFP 的多能干细胞。

[0046] 图 18 显示从细胞基因组中 PCR 扩增外源基因,检测得到的诱导多能干细胞有无外源基因插入。分别检测了转染该表达载体的 HFF 细胞、不转染的 HFF 细胞以及得到的两株经 Cre 处理并扩大培养的诱导多能干细胞系 iPS1 和 iPS2。

### 具体实施方式

[0047] 以下实施例进一步说明本发明的内容,但不应理解为对本发明的限制。在不背离本发明精神和实质的情况下,对本发明方法、步骤或条件所作的修改或替换,均属于本发明的范围。

[0048] 若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。PCR 扩增条件、酶切条件、细胞的培养、染色等参照《分子克隆实验指南》第三版或者相关产品进行。

[0049] 实施例 1 表达载体的构建

[0050] pBR322-rrs-OriP-rrs-EBNA1-MCS 的构建:

[0051] 1) 合成带重组酶识别序列的引物从 pCEP4 载体(购自 Invitrogen 公司)中 PCR 扩增得到 rrs-OriP-rrs(引物序列:P5':GAATTCATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAA GTTATCCT;P3':AAGCTTATAACTTCGTATAGCATAACATTATACGAAGTTATGCAG),并在两端引入酶切位点 EcoRI 和 HindIII,酶切并插入到 PBR322 中得到 PBR322-rrs-OriP-rrs。2) 从 pCEP4 载体中 PCR 扩增 EBNA1(引物序列:P5':CGAGCTAGCATGTCTGACGAGGGCCAGGTACAGG;P3':GGATCCTCTAGAAGATCTCTCGAGTCACTCCTGCCCTCC),并在 5'端引入 NheI,在 3'端引入 XhoI-BglIII-XbaI-BamHI(下称 MCS),用 NheI 和 BamHI 酶切后插入到 PBR322-rrs-OriP-rrs 中得到 PBR322-rrs-OriP-rrs-(p)EBNA1-MCS。3) 从 pLP-IRESneo(购自 Clontech 公司)载体中 PCR 扩增 IRES-neo(引物序列:P5':GAATTCAGCTCGCTGATCAGCCCCTCT;P3':TCTAGAGGATCCTCAGAAGAACTCGTC),经 EcoRI 和 XbaI 插入到 EGFP-N1(购自 Clontech 公司)载体 CMV-EGFP 的下游。从以上构建载体中 PCR 扩增 CMV-EGFP-IRES-neo(引物序列:P5':TCTAGATAGTTATTAATAGTAATCAAT;P3':TCTAGAGGATCCTCAGAAGAACTCGTC),XbaI 酶切,插入到 PBR322-rrs-OriP-rrs-(p)EBNA1-MCS 中。4) 从 EGFP-N1 载体中 PCR 扩增 CMV 启动子(引物序列:P5':ATCGATATAGTTATTAATAGTAATCAAT;P3':ATCGATGATCTGACGG TTCCTAAAC),经 ClaI 酶切后插入到 EBNA1 启动子中,以更换 EBNA1 的启动子,最终得到 PBR322-rrs-OriP-rrs-EBNA1-MCS。

[0052] 参照上述方法分别构建得到 pBR322-OriP-rrs-EBNA1-rrs-MCS, pBR322-rrs-OriP-EBNA1-rrs-MCS。

[0053] 实施例 2 重组载体的构建

[0054] pBR322-rrs-OriP-EBNA1-rrs-EGFP 的构建:

[0055] 利用 BglIII 酶切位点将 pWPXL(购自 Addgene 公司)载体中的 EF1a-EGFP-BGHpolyA

插入到 pBR322-rrs-Orip-EBNA1-rrs-MCS 中。pBR322-rrs-Orip-rrs-EBNA1-OSN 的构建：  
 [0056] 1) 从人胚胎干细胞 cDNA 中 PCR 扩增 Oct4(NM\_001159542) 开放阅读框（引物序列：P5' :GGATCCATGGCGGGACACCTGGCTTC ;P3' :GAATTCGTTTGAATGCATGGGAGAGCC），经 BamHI/EcoRI 插入到 PSP73 载体（购自 Invitrogen 公司）EF1a 启动子的下游。2) 合成 2A 序列（AAAATTGTCGCTCCTGTCAAACAACTCTTAACCTTTGATTTACTCAAACCTGGCTGGGGATGTAGAAAGCAATCCAGGTCCA），并以此作为模板扩增带有 EcoRI 和 XhoI 酶切位点的 2A 序列（引物序列：P5' :GAATTCAAAATTGTCGCTCCTG ;P3' :CTCGAGTGGACCTGGATTGCT）。同样从人胚胎干细胞 cDNA 中 PCR 扩增 Sox2 基因（NM\_003106），（引物序列：P5' :CTCGAGATGTACAACATGATGGA ;P3' :ACTAGTCATG TGTGAGAGGGGACAG），2A PCR 产物经 EcoRI/XhoI 酶切，Sox2 PCR 产物经 XhoI/SpeI 酶切，同时插入 PSP73-EF1a-Oct4 下游得到载体 PSP73-EF1a-Oct4-2A-Sox2。3) 同样以上述 2A 序列作为模板，扩增带有 SpeI 和 SmaI 酶切位点的 2A 序列（引物序列：P5' :ACTAGTAAAATTGTCGCTCCTG ;P3' :CCCGGGTGGACCTGGATTGCT）。从人胚胎干细胞 cDNA 中 PCR 扩增 Nanog 基因（NM\_024865），上游引物带 SmaI 酶切位点下游带 XhoI 酶切位点（引物序列：P5' :CCCGGATGAGTGTGGATCCAGC ;P3' :CTCGAGTCACACGTCTTCAGGTTGCATGT），2A PCR 产物经 SpeI/SmaI 酶切，Nanog PCR 产物经 SmaI/XhoI 酶切，与上游带 XhoI 酶切位点下游带 BglIII 酶切位点的 BGH polyA（从购自 invitrogen 公司的 pcDNA3.1+ 载体中 PCR 扩增得到，引物序列：P5' :CTCGAGCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGC ;P3' :AGATCTCCATAGAGCCCACCGCATCCCC）同时插入以上 PSP73-EF1a-Oct4-2A-Sox2 载体中得到 PSP73-EF1a-Oct4-2A-Sox2-2A-Nanog。4) 最后利用 BglIII 酶切位点将整个 EF1a-Oct4-2A-Sox2-2A-Nanog 插入 pBR322-rrs-Orip-rrs-EBNA1-MCS 载体中。

[0057] pBR322-Orip-rrs-EBNA1-rrs-OSN，利用 BglIII 酶切位点将整个 EF1a-Oct4-2A-Sox2-2A-Nanog 插入 pBR322-Orip-rrs-EBNA1-rrs-MCS 载体中。

[0058] pBR322-rrs-Orip-EBNA1-rrs-OSN，利用 BglIII 酶切位点将整个 EF1a-Oct4-2A-Sox2-2A-Nanog 插入 pBR322-rrs-Orip-EBNA1-rrs-MCS 载体中。

[0059] pBR322-rrs-Orip-rrs-EBNA1-MK 的构建：

[0060] 1) 从购买的 C-Myc（购自武汉三鹰生物技术有限公司）cDNA 克隆中 PCR 扩增 C-Myc 开放阅读框（引物序列：P5' :GGTACCATGCCCCTCAACGTTAGCTTACCA ;P3' :GGATCCCGCACAAAGAGTTCCGTAGCTG），经 KpnI/BamHI 插入到 PSP73 载体（购自 Invitrogen 公司）EF1a 启动子的下游，得到 PSP73-EF1a-c-Myc。2) 同样以上述 2A 序列作为模板，扩增带有 BamHI 和 SalI 酶切位点的 2A 序列（引物序列：P5' :GGATCCAAAATTGTCGCTCCTG ;P3' :GTCGACTGGACCTGGATTGCT）。从购买的 Klf4（购自武汉三鹰生物技术有限公司）cDNA 克隆中 PCR 扩增 Klf4 开放阅读框（引物序列：P5' :GTGCACATGAGGCAGCCACCTGGCGAGTCTG ;P3' :AAGCTTTTAAAAATGCCTTTCATGTGTA）。2A PCR 产物经 BamHI/SalI 酶切，Klf4PCR 产物经 SalI/HindIII 酶切，同时插入 PSP73-EF1a-c-Myc 下游，得到 PSP73-EF1a-c-Myc-2A-Klf4。3) BGHpolyA 从 pcDNA3.1+ 载体中 PCR 扩增得到，引物序列：P5' :AAGCTTCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGC ;P3' :AGATCTCCATAGAGCCCACCGCATCCCC，经 HindIII/BglIII 插入 PSP73-EF1a-c-Myc-2A-Klf4 下游。4) 最后利用 BglIII 酶切位点将整个 EF1a-c-Myc-2A-Klf4 插入 pBR322-rrs-Orip-rrs-EBNA1-MCS 载体中。pBR322-Orip-rrs-EBNA1-rrs-MK，利用 BglIII 酶切位点将整个 EF1a-c-Myc-2A-Klf4 插入



pBR322-Orip-rrs-EBNA1-rrs-MCS 载体中。

[0061] pBR322-rrs-Orip-EBNA1-rrs-MK, 利用 BglIII 酶切位点将整个 EF1a-c-Myc-2A-Klf4 插入 pBR322-rrs-Orip-EBNA1-rrs-MCS 载体中。

[0062] 实施例 3 重组载体在细胞中的表达

[0063] 上述构建好的 pBR322-rrs-Orip-EBNA1-rrs-EGFP 载体采用电击的方法转染人包皮成纤维细胞 (HFF) :3.5  $\mu$ gDNA/ $1.0 \times 10^6$  cells 于 100  $\mu$ l amaxa 缓冲液 (购自 LONZA 公司, 产品货号为 DPI-1002) 中, 使用 nucleofector 核转仪, U023 程序进行转染。转染 48 小时后, 加入 100  $\mu$ g/ml 的 G418 (上海浩然生物技术有限公司) 进行筛选, 并一直观察 GFP 的表达, GFP 表达量随着时间的延长降低, 但在 G418 筛选压力下 GFP 可持续表达一个月以上。

[0064] 上述构建好的 pBR322-rrs-Orip-rrs-EBNA1-OSN 以及 pBR322-rrs-Orip-rrs-EBNA1-MK 载体采用以上同样的方法转染人包皮成纤维细胞 (HFF)。HFF 细胞转染后, 于不同时间收集样品进行 Western blot 检测外源基因的表达。结果显示外源基因均过表达成功, 且能长时间表达。

[0065] 实施例 4 诱导产生多能干细胞及其多能性的鉴定

[0066] 将转入 pBR322-rrs-Orip-rrs-EBNA1-OSN 以及 pBR322-rrs-Orip-rrs-EBNA1-MK 载体的 HFF 细胞于转染后 48 小时加入 100  $\mu$ g/ml 的 G418 进行筛选, 药物筛选 6 天后, 大部分不表达外源基因的 HFF 被杀死。将能够在 100  $\mu$ g/ml 的 G418 条件下存活的 HFF 消化至小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 上, 以 10% 的汇合率接种。于接种第二天更换胚胎干细胞培养基, 每天换液。培养至接种后 12 天左右即可见克隆样细胞生长。进行碱性磷酸酶染色 (根据 milipore 碱性磷酸酶染色试剂盒说明书进行操作) 初步确定克隆样细胞是否可能为多能干细胞, 并确定碱性磷酸酶阳性克隆的比例。进一步扩大培养该诱导多能干细胞, 免疫荧光染色以及 PCR 扩增的方法鉴定其表面标记 SSEA-3, SSEA-4 以及特异基因 oct4, sox2, nanog 的表达水平。并通过 EB 分化后鉴定各个胚层标志基因的表达, 确定其向各个方向分化的能力。并进一步通过将该多能干细胞注入免疫缺陷的小鼠鉴定其在小鼠中形成畸胎瘤的能力确定其多能性。结果表明: pBR322-rrs-Orip-rrs-EBNA1-OSN 以及 pBR322-rrs-Orip-rrs-EBNA1-MK 载体转染 HFF 细胞所产生的克隆样细胞均为碱性磷酸酶阳性, 且经扩大培养后确定其表面标记 SSEA-3, SSEA-4 以及基因 oct4, sox2, nanog 的表达水平均与人胚胎干细胞相当, 说明 pBR322-rrs-Orip-rrs-EBNA1-OSN 以及 pBR322-rrs-Orip-rrs-EBNA1-MK 载体可以诱导 HFF 细胞形成多能干细胞。进一步 EB 分化检测显示各个胚层的标记基因均有表达, 将该诱导多能干细胞注入免疫缺陷的小鼠, 在两个月后可明显观察到畸胎瘤的形成, 说明经该表达载体诱导产生的多能干细胞具有多能性。

[0067] 实施例 5 Cre 表达载体的构建以及纯化

[0068] 从 pTriEx-HTNC (购自 Addgene 公司) 载体中 PCR 扩增 TAT-NLS-Cre (引物序列: P5': CATATGGGCATGGGCGCTGCAGGTCG; P3': GAATTCCTAATCGCCATCTTCCAGC), 经 NdeI/EcoRI 插入 pet28a 原核表达载体, 与 6 $\times$ His 融和表达。在 BL21 细胞中, 经 1mM IPTG 诱导 4 小时表达 Cre 蛋白, 于含 25mM 咪唑的缓冲液中与 Ni 柱结合, 250mM 咪唑洗脱目的蛋白, 根据电泳结果将含目的蛋白的洗脱液收集并浓缩, 换缓冲液至 PBS 中备用。

[0069] 实施例 6 Cre 去除诱导多能干细胞中的外源基因表达载体

[0070] 在诱导多能干细胞成功后, 于培养基中加入纯化好的携带 tat 可进入细胞

的 Cre 蛋白,浓度为  $10 \mu\text{m}$ ,作用 2 小时。Cre 处理两天后,荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达,70-80% 的细胞不表达绿色荧光蛋白,进而通过流式细胞分选的方法筛选出不表达绿色荧光蛋白的细胞,进行扩大培养,并建立细胞系。进一步对于建立好的无外源基因插入的诱导多能干细胞株进行 PCR 检测,设计位于表达载体上重组基因外的引物序列 (Oct4p5':TGCAGTAGTCGCCGTGAACG, Oct4p3':TGGGGCCAGAGGAAAGGACA; Sox2p5':TTGGTACCCCAGGCTATGGG, Sox2p3':CTGCCCCGCGGGACCACACCA; Nanogp5':GGAACACTCAGACCTGGTGC, Nanogp3':CACCCCACCCCCAGAATAG; cMycp5':TACCAGCAGCAGCAGCAGAG, cMycp3':TGGAGGGAGGCGCTGCGTAG; Klf4p5':GTGGTGGCGCCCTACAACGG, Klf4p3':AAAGGACAGTGGGAGTGGCA),以细胞基因组为模板 PCR 扩增检测是否有外源基因插入到细胞基因组。检测结果表明建立的无外源基因插入的诱导多能干细胞不表达外源基因,且其基因组中不存在外源基因载体的插入 (图 18)。

## 序列表

序列表

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> 一种非整合的、长时间的、可删除表达载体的表达系统

<130>KHP10112347.9

<160>43

<170>PatentIn version 3.5

<210>1

<211>43

<212>DNA

<213> 人工序列

<400>1

gaattcataa cttcgtataa tgtatgctat acgaagttat cct 43

<210>2

<211>44

<212>DNA

<213> 人工序列

<400>2

aagcttataa cttcgtatag catacattat acgaagttat gcag 44

<210>3

<211>35

<212>DNA

<213> 人工序列

<400>3

cgagctagca tgtctgacga ggggccaggt acagg 35

<210>4

<211>40

<212>DNA

<213> 人工序列

<400>4

ggatcctcta gaagatctct cgagtcactc ctgcccttcc 40

<210>5

<211>27

---

<212>DNA	
<213> 人工序列	
<400>5	
gaattcagct cgctgatcag cccctct	27
<210>6	
<211>27	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<400>6	
tctagaggat cctcagaaga actcgtc	27
<210>7	
<211>27	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<400>7	
tctagatagt tattaatagt aatcaat	27
<210>8	
<211>27	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<400>8	
tctagaggat cctcagaaga actcgtc	27
<210>9	
<211>28	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<400>9	
atcgatatag ttattaatag taatcaat	28
<210>10	
<211>26	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<400>10	
atcgatgac tgacggttca ctaaac	26

<210>11		
<211>26		
<212>DNA		
<213> 人工序列		
<400>11		
ggatccatgg cgggacacct ggcttc	26	
<210>12		
<211>27		
<212>DNA		
<213> 人工序列		
<400>12		
gaattcgttt gaatgcatgg gagagcc	27	
<210>13		
<211>81		
<212>DNA		
<213> 人工序列		
<400>13		
aaaattgtcg ctctgtcaa acaaactctt aactttgatt tactcaaact ggctggggat	60	
gtagaaagca atccaggtcc a	81	
<210>14		
<211>22		
<212>DNA		
<213> 人工序列		
<400>14		
gaattcaaaa ttgtcgctcc tg	22	
<210>15		
<211>21		
<212>DNA		
<213> 人工序列		
<400>15		
ctcgagtgga cctggattgc t	21	
<210>16		
<211>23		
<212>DNA		

---

<213> 人工序列	
<400>16	
ctcgagatgt acaacatgat gga	23
<210>17	
<211>24	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<400>17	
actagtcatg tgtgagaggg gcag	24
<210>18	
<211>22	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<400>18	
actagtaaaa ttgtcgctcc tg	22
<210>19	
<211>21	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<400>19	
cccgggtgga cctggattgc t	21
<210>20	
<211>23	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<400>20	
cccgggatga gtgtggatcc agc	23
<210>21	
<211>29	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<400>21	
ctcgagtcac acgtcttcag gttgcatgt	29

---

<210>22	
<211>27	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<400>22	
ctcgagctgt gccttctagt tgccagc	27
<210>23	
<211>28	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<400>23	
agatctccat agagcccacc gcatcccc	28
<210>24	
<211>31	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<400>24	
ggtaccatgc ccctcaacgt tagcttcacc a	31
<210>25	
<211>27	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<400>25	
ggatcccgca caagagttcc gtagctg	27
<210>26	
<211>22	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<400>26	
ggatccaaaa ttgtcgctcc tg	22
<210>27	
<211>21	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<400>27	

gtcgactgga cctggattgc t 21

<210>28

<211>31

<212>DNA

<213> 人工序列

<400>28

gtcgacatga ggcagccacc tggcgagtct g 31

<210>29

<211>29

<212>DNA

<213> 人工序列

<400>29

aagcttttaa aaatgcctct tcatgtgta 29

<210>30

<211>27

<212>DNA

<213> 人工序列

<400>30

aagcttctgt gccttctagt tgccagc 27

<210>31

<211>28

<212>DNA

<213> 人工序列

<400>31

agatctecat agagcccacc gcatcccc 28

<210>32

<211>26

<212>DNA

<213> 人工序列

<400>32

catatgggca tgggcgctgc aggtcg 26

<210>33

<211>25



<212>DNA  
<213> 人工序列  
<400>33  
gaattcctaa tcgcatctt ccage 25

<210>34  
<211>20  
<212>DNA  
<213> 人工序列  
<400>34  
tgcagtagtc gccgtgaacg 20

<210>35  
<211>20  
<212>DNA  
<213> 人工序列  
<400>35  
tggggccaga ggaaaggaca 20

<210>36  
<211>20  
<212>DNA  
<213> 人工序列  
<400>36  
ttggtacccc aggctatggg 20

<210>37  
<211>20  
<212>DNA  
<213> 人工序列  
<400>37  
ctgcccgcgg gaccacacca 20

<210>38  
<211>20  
<212>DNA  
<213> 人工序列  
<400>38  
ggaacactca gacctggtgc 20

---

<210>39		
<211>20		
<212>DNA		
<213> 人工序列		
<400>39		
cacccacccc cccagaatag	20	
<210>40		
<211>20		
<212>DNA		
<213> 人工序列		
<400>40		
taccagcagc agcagcagag	20	
<210>41		
<211>20		
<212>DNA		
<213> 人工序列		
<400>41		
tggagggagg cgctgcgtag	20	
<210>42		
<211>20		
<212>DNA		
<213> 人工序列		
<400>42		
gtggtggcgc cctacaacgg	20	
<210>43		
<211>20		
<212>DNA		
<213> 人工序列		
<400>43		
aaaggacagt gggagtggca	20	

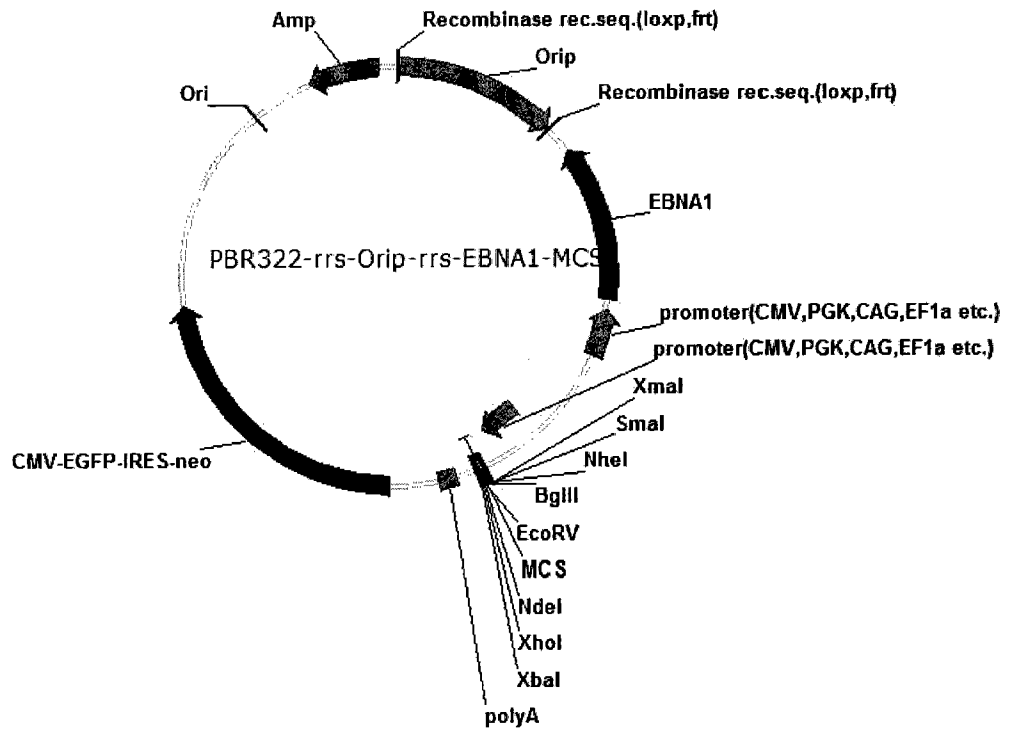


图 1

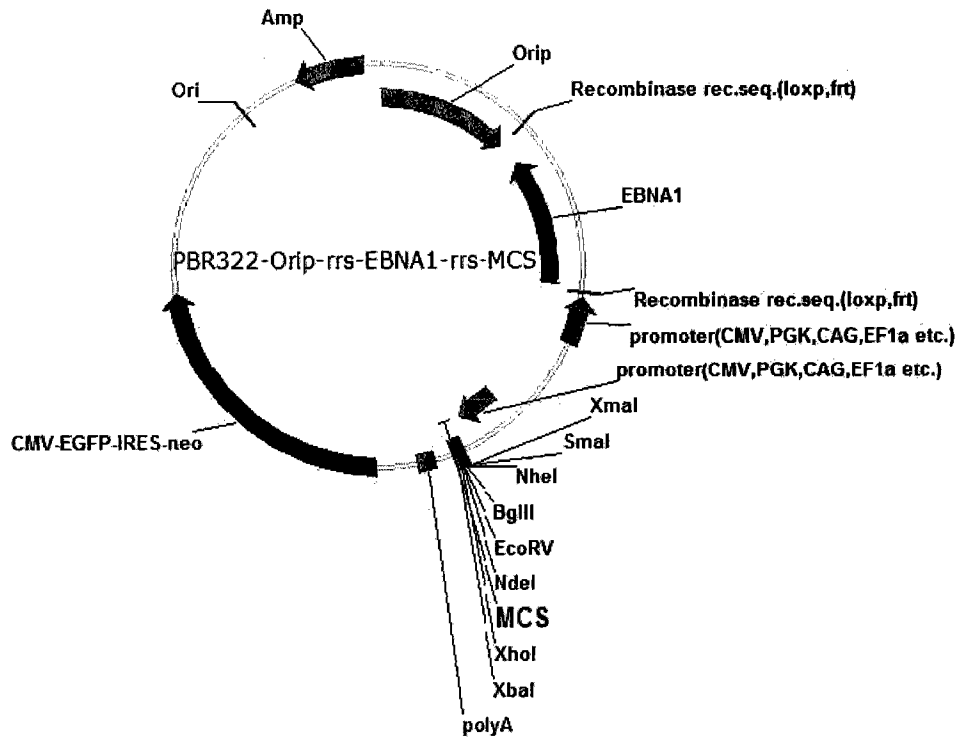


图 2

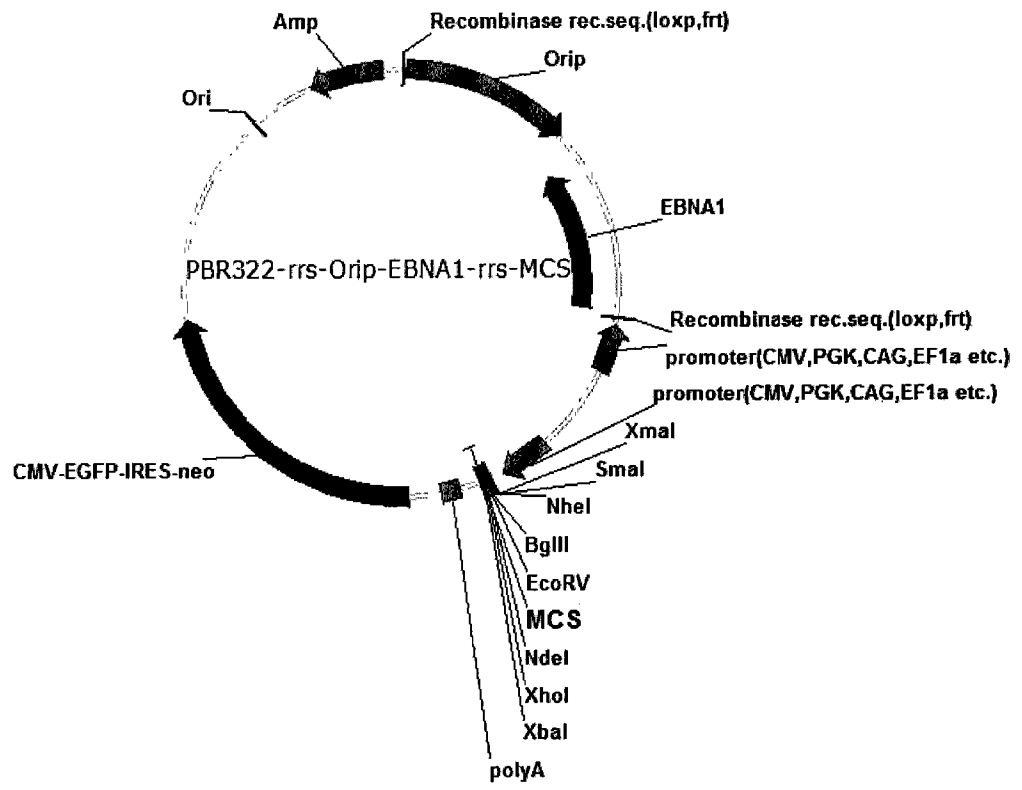


图 3

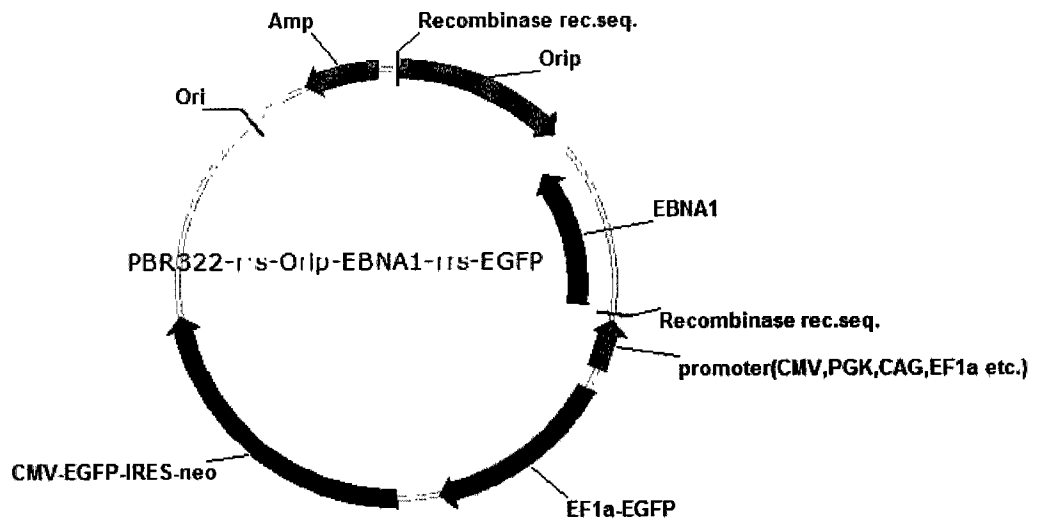


图 4

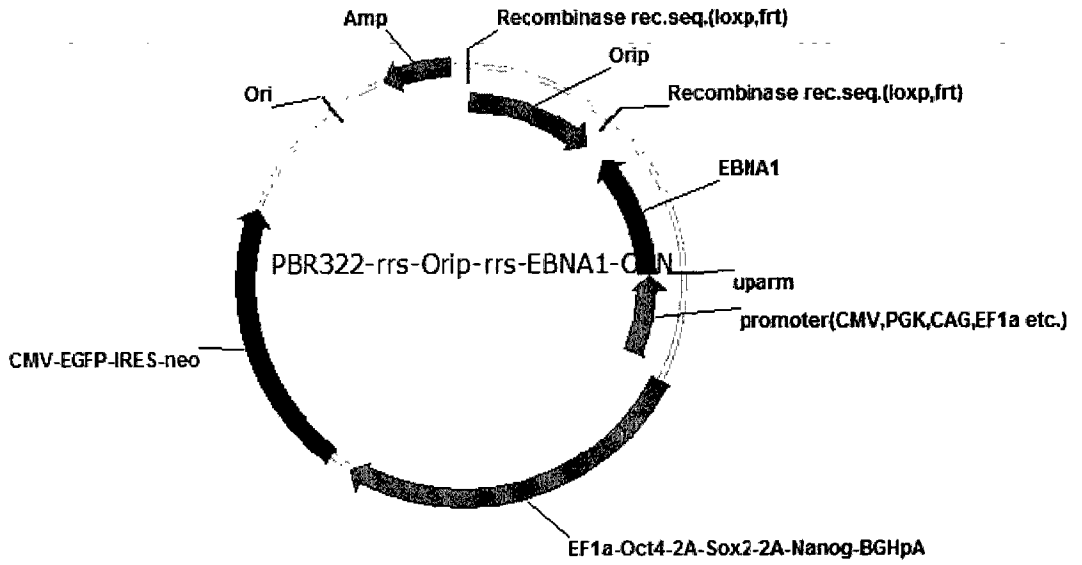


图 5

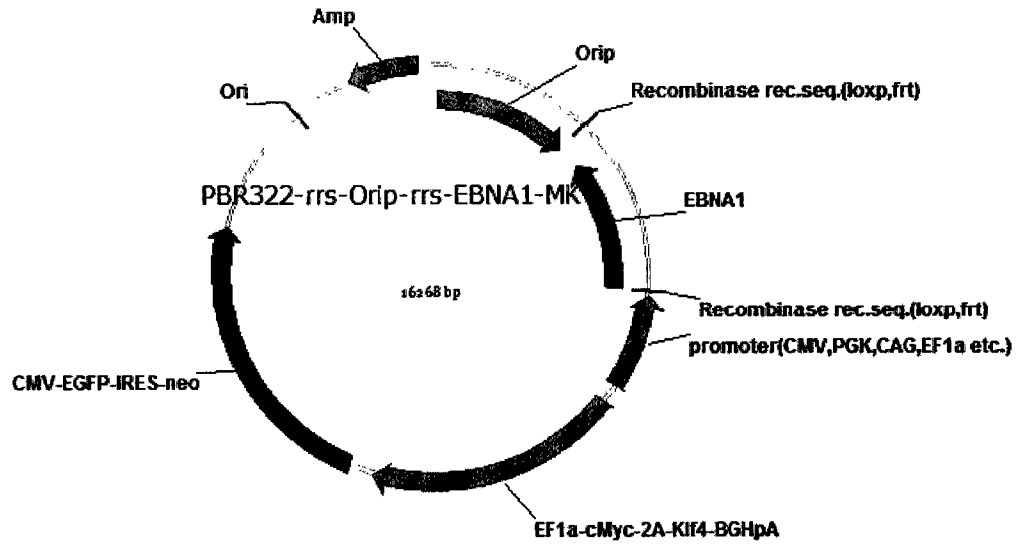


图 6

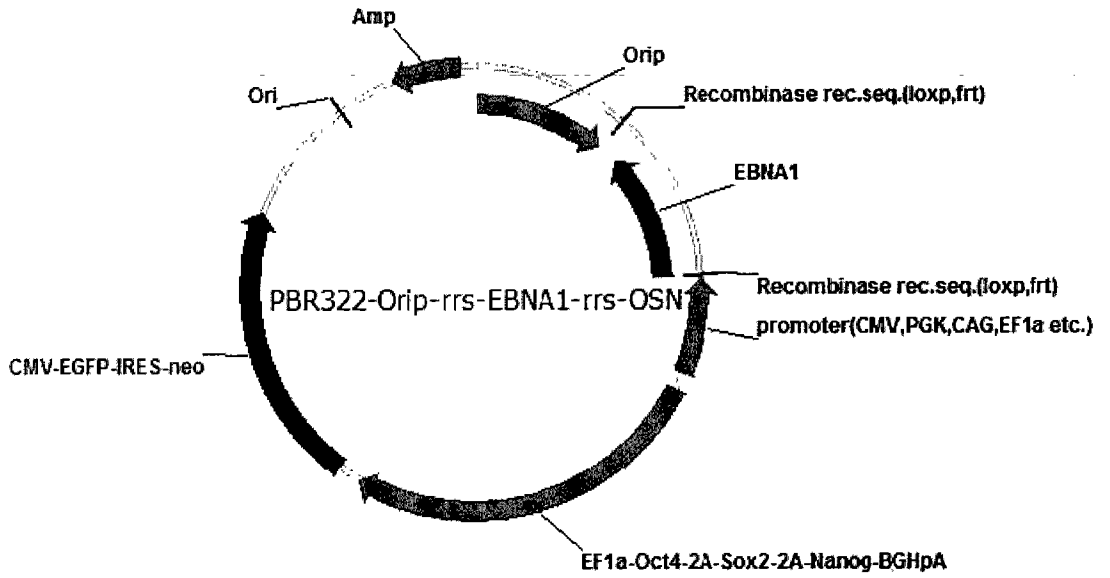


图 7

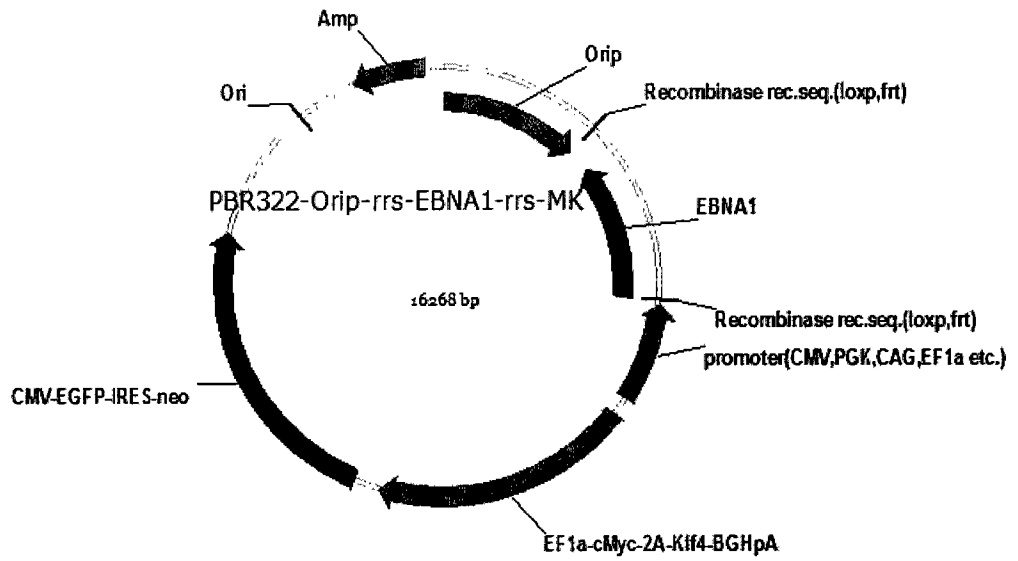


图 8

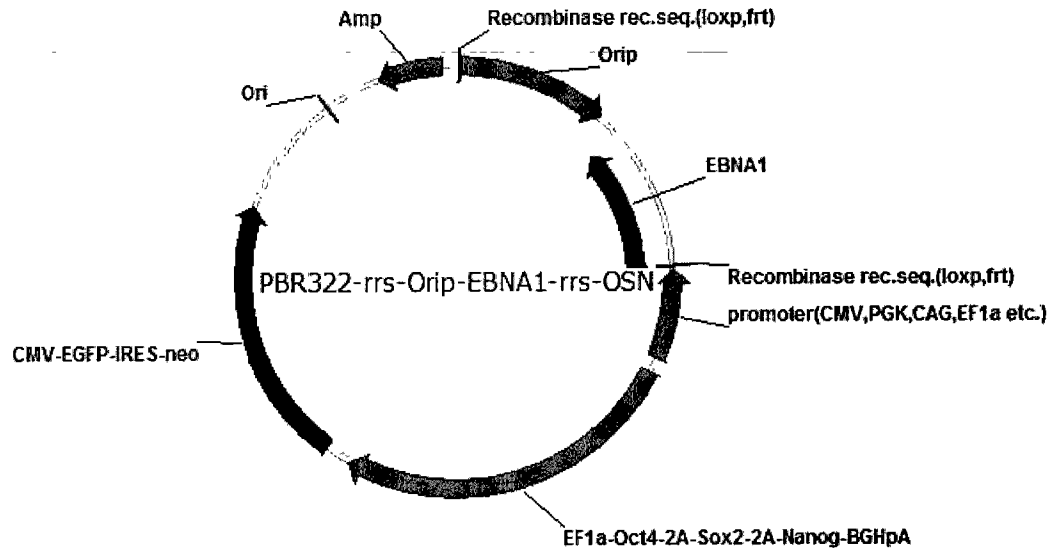


图 9

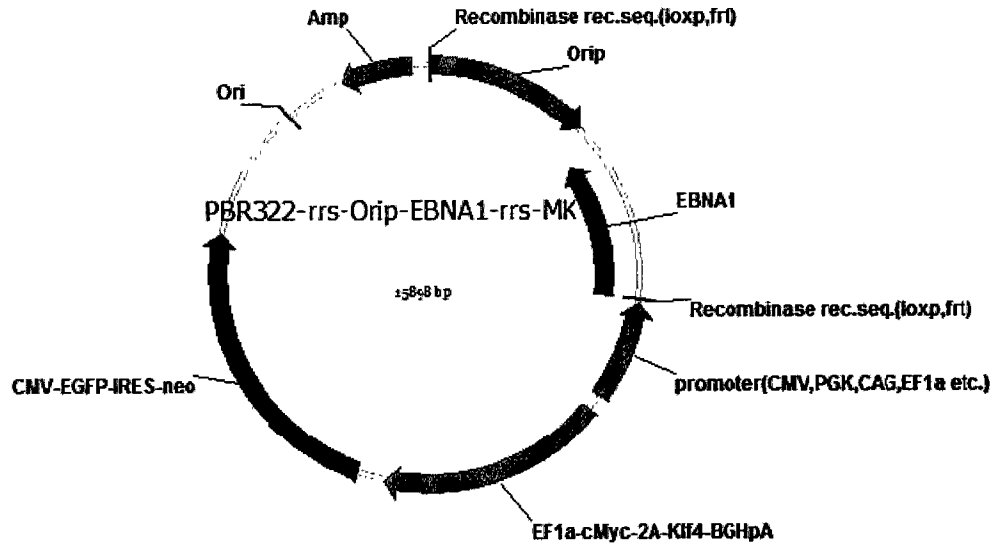


图 10

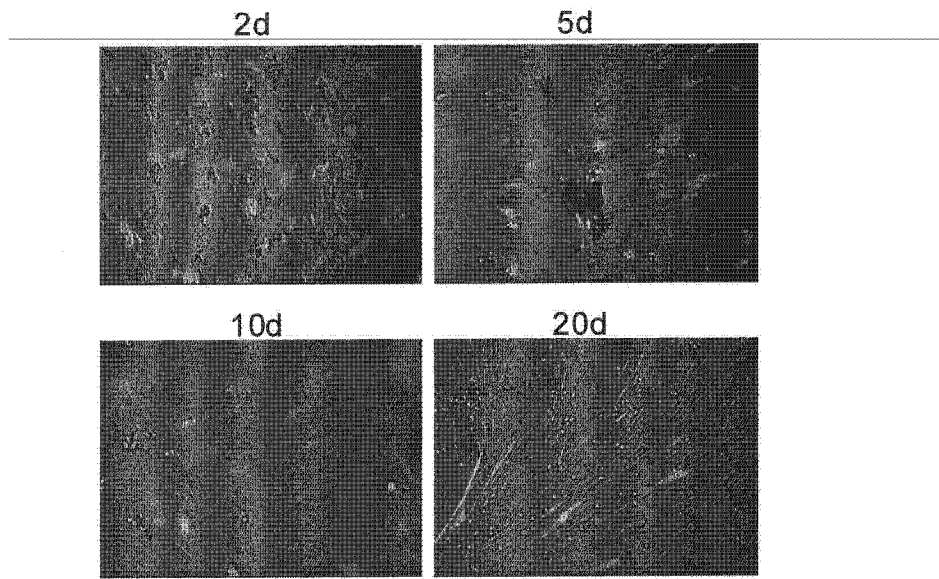


图 11

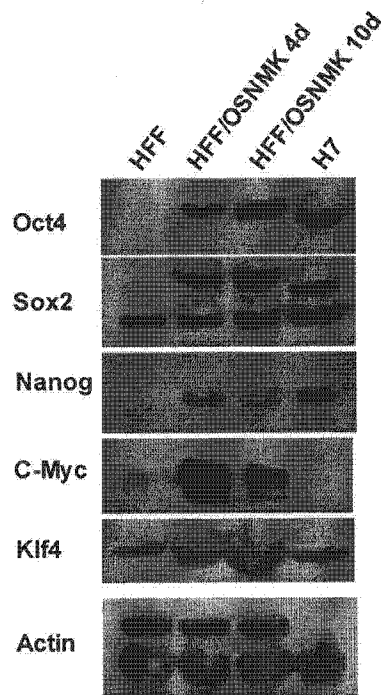


图 12



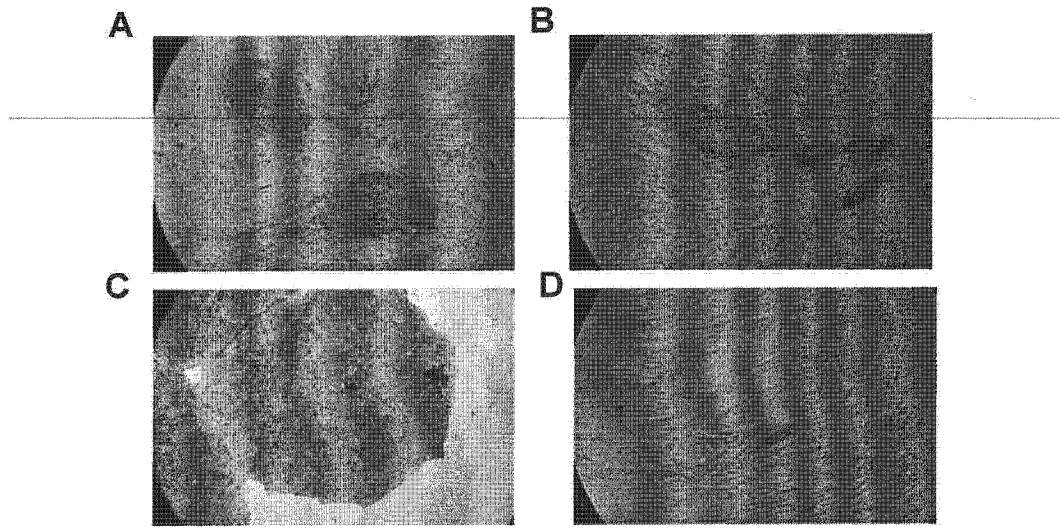


图 13

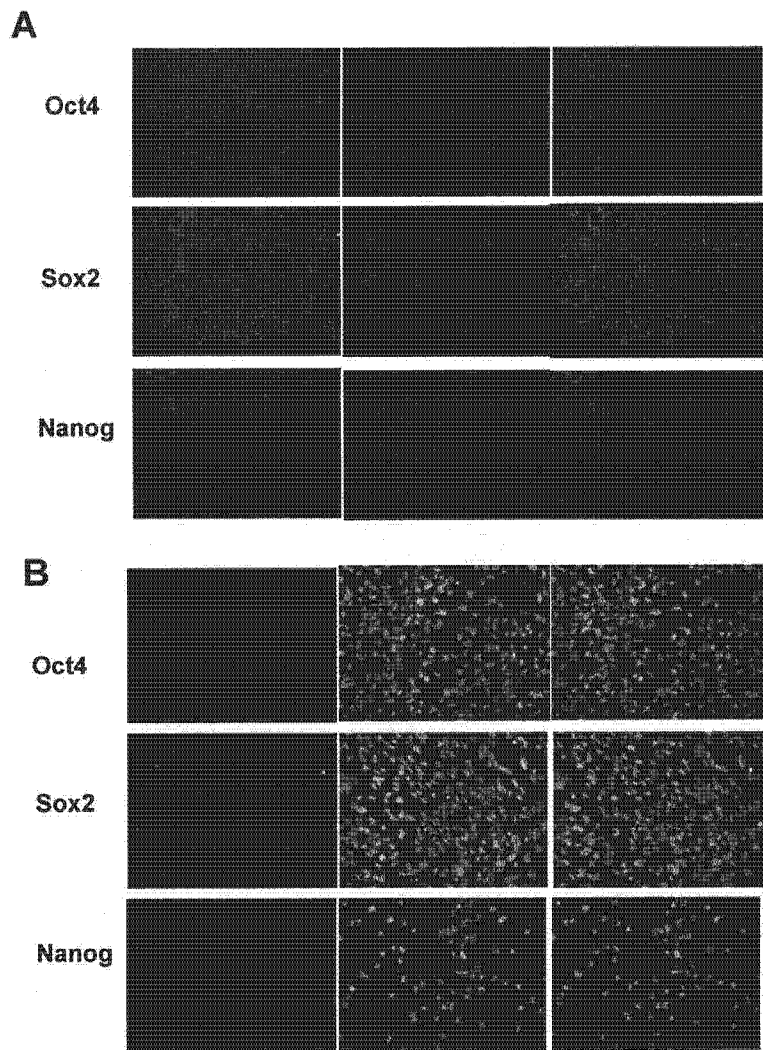


图 14

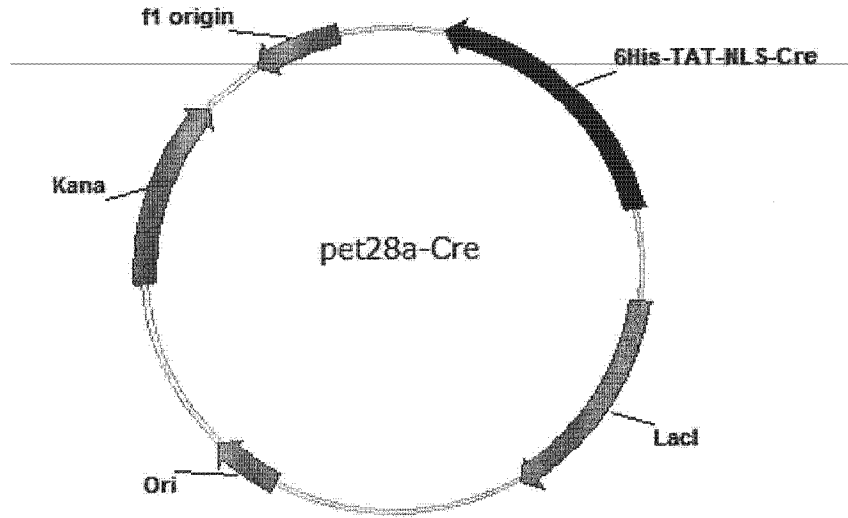


图 15

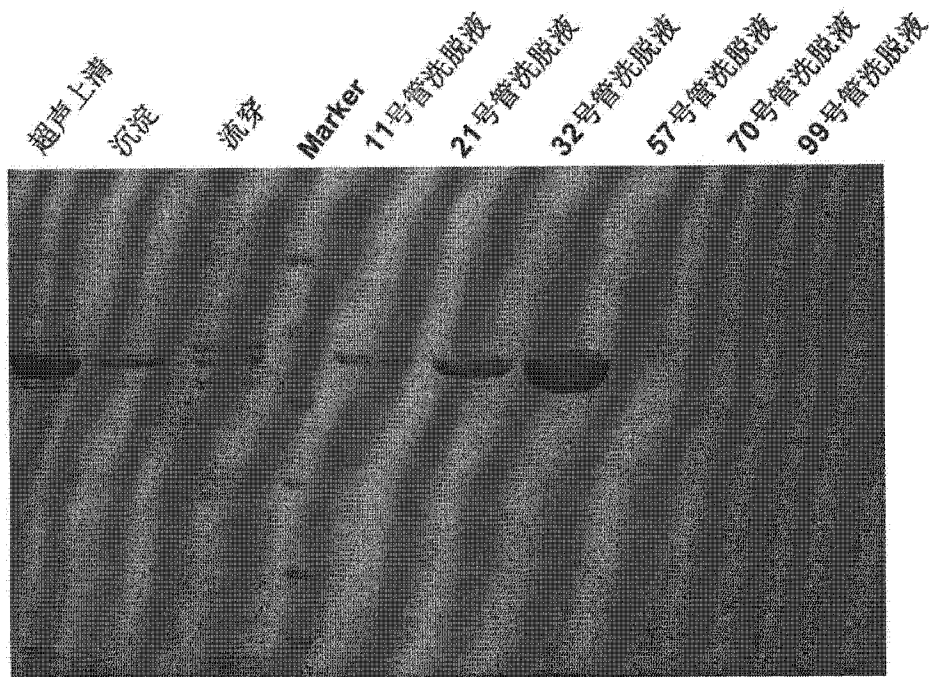


图 16

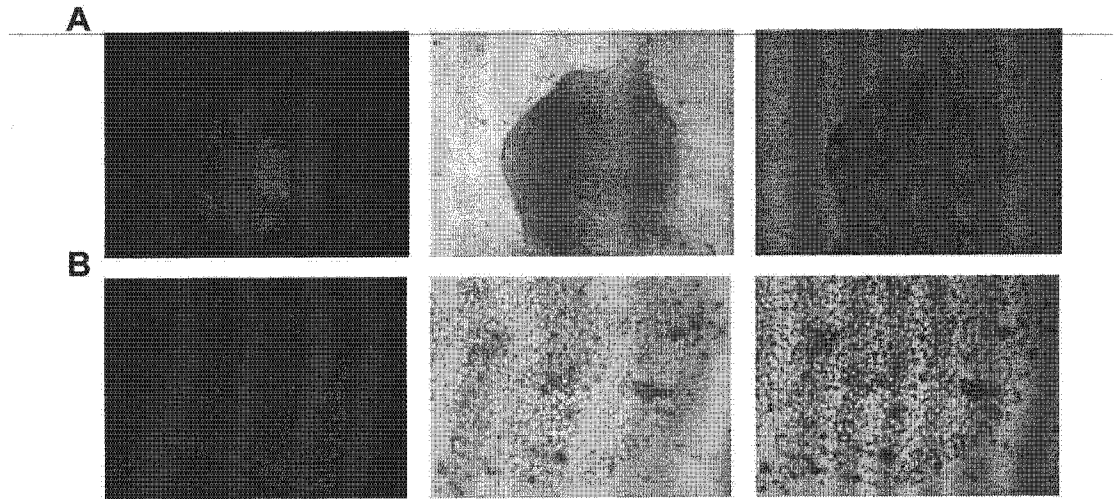


图 17

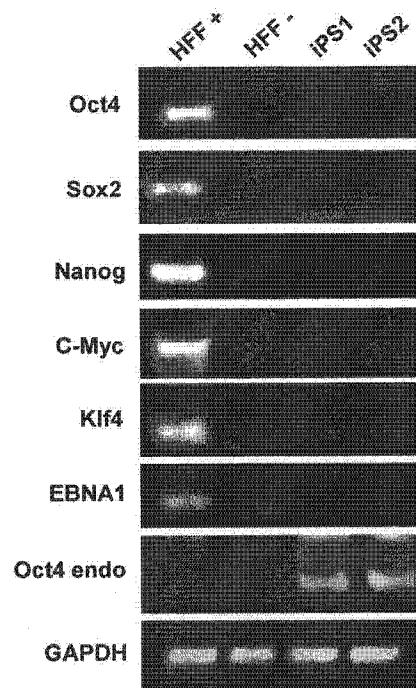


图 18