

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2016 年 1 月 7 日 (07.01.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/000217 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 15/113 (2010.01) *C12N 15/85* (2006.01)
A01K 67/033 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2014/081427
- (22) 国际申请日: 2014 年 7 月 1 日 (01.07.2014)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 清华大学 (TSINGHUA UNIVERSITY)
[CN/CN]; 中国北京市海淀区清华园, Beijing 100084 (CN)。
- (72) 发明人: 倪建泉 (NI, Jianquan); 中国北京市海淀区清华园, Beijing 100084 (CN)。 刘鲁萍 (LIU, Luping); 中国北京市海淀区清华园, Beijing 100084 (CN)。
- (74) 代理人: 北京清亦华知识产权代理事务所 (普通合伙) (TSINGYIHUA INTELLECTUAL PROPERTY LLC); 中国北京市海淀区清华园清华大学照澜院商业楼 301 室, Beijing 100084 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,

BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: SEPARATED OLIGONUCLEOTIDE AND APPLICATIONS THEREOF

(54) 发明名称: 分离的寡核苷酸及其应用

(57) Abstract: Provided are a separated oligonucleotide and applications thereof. The oligonucleotide has a nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:1.

(57) 摘要: 提供了分离的寡核苷酸及其应用, 其中, 该寡核苷酸具有 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列。



WO 2016/000217 A1

分离的寡核苷酸及其应用

优先权信息

无

技术领域

本发明涉及生物技术领域，具体涉及分离的寡核苷酸及其应用，更具体地，涉及、分离的核苷酸、构建体以及敲除果蝇目的基因的方法。

背景技术

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是指在进化过程中高度保守的、由双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA)诱发的、同源 mRNA 高效特异降解的现象。RNAi 技术可以特异性的降低基因的表达，并且效率高，易于操作，所以该技术已被广泛应用于果蝇的各研究领域。

在果蝇研究中，RNAi 技术一般和双元表达系统相结合，实现转基因果蝇中组织特异性及特定发育时期的基因敲除。目前在果蝇中广泛应用的双元表达系统是 GAL4-UAS 系统，该系统中的酵母转录因子基因 GAL4 受特定的启动子控制。反过来，GAL4 可以激活另一个包含上游激活序列(UAS)的外源插入基因的表达。

目前 RNAi 载体普遍应用的启动子是 Hsp70，当受到 GAL4 激活时，该启动子可以启动外源插入基因的表达。但是，当不存在 GAL4 时，该启动子仍然能够对外源插入基因发挥启动作用，使得外源基因存在一定量的背景表达，影响对实验结果的判断。

而第三代 RNAi 技术是由表达载体转录形成短发卡 RNA (short hairpin RNA, shRNA)，来模拟果蝇体内天然存在的 microRNA。shRNA 再通过果蝇体内的 microRNA 途径产生小干扰 RNA (siRNA)，从而实现基因敲除 (Ni et al., Nature Methods. 2011 May;8(5):405-7.)。但是，该技术只能敲除单个基因。因此，当目的基因的功能与其它基因存在冗余，或在涉及多个基因功能的研究时，该技术不能很好的满足研究者的需求。

发明内容

本发明旨在至少解决现有技术中存在的技术问题之一。为此，本发明的一个目的在于提出一种能够同时敲除果蝇的多个目的基因的手段。

因而，根据本发明的一个方面，本发明提供了一种分离的寡核苷酸。根据本发明的具体实施例，该寡核苷酸具有 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列。发明人发现，在制备用于果蝇基因敲除的构建体时，将该寡核苷酸用来连接多个 shRNA 模板序列，即将多个 siRNA 中相邻的两个 siRNA 通过该寡核苷酸相连，能够使转录产物通过果蝇自身的剪切机制形成各自独立的 shRNA，从而同时 RNAi 各自的靶基因，进而，能够同时敲除多个基因，实现对果蝇多基因的同时调控。在本文中，有时也将该 SEQ ID NO: 1 所

示的寡核苷酸称为“linker”。

根据本发明的另一方面，本发明还提供了一种构建体。根据本发明的实施例，该构建体包含多个 siRNA，所述多个 siRNA 中相邻的两个 siRNA 通过前面所述的寡核苷酸相连，其中所述多个 siRNA 的靶基因相同或不同。发明人惊奇地发现，本发明的构建体不仅能够同时高效表达多个针对不同基因的 siRNA，从而能够实现对多基因的同时调控，还能够表达多个针对同一个基因 siRNA，以增强单个基因的敲除效率。并且该构建体的构建简单方便，表达高效稳定，适用于果蝇所有的组织和细胞，从而能够有效用于各种果蝇基因功能性研究。

根据本发明的实施例，所述构建体进一步包含：2×QUAS 序列；和/或 10×UAS 序列。由此，这两种可抑制型二元表达系统能够丰富果蝇中转基因表达、世系追踪和基因功能嵌合体分析的手段，使表达的调控更加灵活。

根据本发明的实施例，所述构建体进一步包含筛选标记基因。由此，便于筛选阳性质粒。根据本发明的一些具体示例，所述筛选标记基因为氨苄青霉素抗性基因和/或筛选标记 vermilion 基因。由此，阳性质粒筛选效果好。

根据本发明的实施例，所述构建体进一步包含启动子。发明人发现，U-promoter（即 U-启动子）在果蝇各组织器官中的背景表达效率低，在受到诱导时表达效率高，因而，根据本发明的一个实施例，所述启动子为 U-启动子。

根据本发明的实施例，所述构建体进一步包含：基因组定点整合 attB 序列；ftz 内含子序列；以及 SV40 ployA 序列。由此，能够使质粒定点整合到果蝇基因组中、翻译效率增强，且有利于调控转录终止。

根据本发明的实施例，所述构建体进一步包含：2 个 LoxP 序列；以及隔绝子 gypsy 序列，其中，所述隔绝子 gypsy 序列位于 2 个 LoxP 序列之间。由此，能够在 Cre 重组酶的作用下去掉 LoxP 之间的 gypsy 序列，达到调节 siRNA 表达量的目的，而且 gypsy 序列可以增强基因的转录，进而使基因表达的调控更加灵活，基因功能分析的手段更加多样。

本发明的再一方面，本发明还提供了一种敲除果蝇目的基因的方法。根据本发明的实施例，该方法利用前面所述的构建体转化果蝇。发明人惊奇的发现，利用本发明的方法，不仅能够在果蝇中同时高效表达多个针对不同基因的 siRNA，从而能够实现多个基因的同时敲除，还能够在果蝇中表达多个针对同一个基因 siRNA，从而实现单个基因的高效敲除，敲出效果好。并且，本发明的方法操作简单，结果稳定，适用于果蝇所有的组织和细胞，且利用该方法易于调控果蝇的基因敲除效率，获得的果蝇表型明显，从而能够有效用于果蝇基因功能研究。

根据本发明的实施例，本发明的敲除果蝇目的基因的方法利用 GAL4-UAS 双元表达载体系统进行所述转化，其中所述构建体包含 2×QUAS 序列；和/或 10×UAS 序列。由此，这两种可抑制型二元表达系统能够丰富果蝇中转基因表达、世系追踪和基因功能嵌合体分析的手段，使该方法的表达调控更加灵活。

根据本发明的实施例，所述转化进一步包括：利用所述构建体转化第一果蝇，以便获得第一转基因果蝇；提供第二转基因果蝇，所述第二转基因果蝇能够表达 Gal4 蛋白和/或 Q 蛋白；以及将所述第一转基因果蝇与所述第二转基因果蝇杂交，以便获得后代转基因果蝇，所述后代转基因果蝇中所述目的基因被敲除。

本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出，部分将从下面的描述中变得明显，或通过本发明的实践了解到。

附图说明

本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解，其中：

图 1 显示了根据本发明一个实施例的 VADUM 表达载体的图谱；

图 2 显示了根据本发明一个实施例的野生型及各转基因雄果蝇翅膀的图片，其中图 2A 显示了野生型雄果蝇翅膀的图片，

图 2B 显示了 H1 KD1 与 ms1096-Gal4 杂交后代雄果蝇翅膀的图片，

图 2C 显示了 H1 KD2 与 ms1096-Gal4 杂交后代雄果蝇翅膀的图片，

图 2D 显示了 H1 KD3 与 ms1096-Gal4 杂交后代雄果蝇翅膀的图片。

发明详细描述

下面详细描述本发明的实施例，所述实施例的示例在附图中示出。下面通过参考附图描述的实施例是示例性的，仅用于解释本发明，而不能理解为对本发明的限制。

根据本发明的一个方面，本发明提供了一种分离的寡核苷酸。根据本发明的具体实施例，该寡核苷酸具有 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列。其中，SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列如下：CGCGATGCTCAAGGCAAAAAAAAAATCAATCAAAAAACAATTGAAAATTCCAAAAAAAAAGCATAATTGAACACAAAAAGTATAAAAACGGTAA CAAGTGTCTGATTTTGTATTATCATTACATGAGCATGAAAACCAAAATTGAAAAT TCTGAACTCCCGCAGTCAAGTATCCCGAAACCTCAATCAATAAACTATATTGGC GCATTCATGCTG(SEQ ID NO: 1)。

需要说明的是，该寡核苷酸序列为一段来自于果蝇 Mir2 基因簇的间隔序列，是果蝇基因组中 mir-2a-1 和 mir-2b-2 之间的序列，发明人发现，该寡核苷酸带有果蝇体内核糖核酸酶的识别位点，将其用来连接多个 shRNA 模板序列，即将多个 siRNA 中相邻的两个 siRNA 通过该寡核苷酸相连，能够使转录产物通过果蝇自身的剪切机制形成各自独立的 shRNA，从而同时 RNAi 各自的靶基因，进而，能够同时敲除多个基因，实现对果蝇多基因的同时调控。

根据本发明的另一方面，本发明还提供了一种构建体。根据本发明的实施例，该构建体包含多个 siRNA，所述多个 siRNA 中相邻的两个 siRNA 通过前面所述的寡核苷酸相连，其中所述多个 siRNA 的靶基因相同或不同。发明人惊奇地发现，本发明的构建

体不仅能够同时高效表达多个针对不同基因的 siRNA,从而能够实现对多基因的同时调控,还能够表达多个针对同一个基因 siRNA,以增强单个基因的敲除效率。并且该构建体的构建简单方便,表达高效稳定,适用于果蝇所有的组织和细胞,从而能够有效用于各种果蝇基因功能性研究。

根据本发明的实施例,所述构建体进一步包含: 2×QUAS 序列; 和/或 10×UAS 序列。其中,需要说明的是,果蝇中目前有两种二元表达系统, Gal4/UAS 和 QF/QUAS 系统。它们的工作原理是一样的,以 QF/QUAS 为例, QF 是一种转录调控因子, QUAS 是 DNA 上 QF 结合的位点, 2×QUAS 指含有两个 QF 结合位点。当 QF 结合 QUAS 时,会启动 QUAS 下游基因的转录。而本发明的载体上同时包含 UAS 和 QUAS,从而既可以用 Gal4 调控,也可以用 QF。由此,这两种可抑制型二元表达系统能够丰富果蝇中转基因表达、世系追踪和基因功能嵌合体分析的手段,使表达的调控更加灵活。

根据本发明的实施例,所述构建体进一步包含筛选标记基因。由此,便于筛选阳性质粒。根据本发明的一些具体示例,所述筛选标记基因为氨苄青霉素抗性基因和/或筛选标记 vermilion 基因。由此,阳性质粒筛选效果好。

根据本发明的实施例,所述构建体进一步包含启动子。发明人发现, U-promoter 在果蝇各组织器官中的背景表达效率低,在受到诱导时表达效率高,因而,根据本发明的一个实施例,所述启动子为 U-启动子。

根据本发明的实施例,所述构建体进一步包含: 基因组定点整合 attB 序列; ftz 内含子序列; 以及 SV40 ployA 序列。由此,能够使质粒定点整合到果蝇基因组中、翻译效率增强,且有利于调控转录终止。

根据本发明的实施例,所述构建体进一步包含: 2 个 LoxP 序列; 以及隔绝子 gypsy 序列,其中,所述隔绝子 gypsy 序列位于 2 个 LoxP 序列之间。由此,能够在 Cre 重组酶的作用下去掉 LoxP 之间的 gypsy 序列,达到调节 siRNA 表达量的目的,而且 gypsy 序列可以增强基因的转录,进而使基因表达的调控更加灵活,基因功能分析的手段更加多样。

其中,根据本发明的实施例,上述各元件的序列如下:

attB:

GCTGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCGGATCAATTCGGCTTCACGTACCGT
CGACGATGTAGGTCACGGTCTCGAAGCCGCGGTGCGGGTGCCAGGGCGTGCCCTT
GGGCTCCCCGGGCGCGTACTCCACCTCACCCATCTGGTCCATCATGATGAACGGG
TCGAGGTGGCGGTAGTTGATCCCGGCGAACGCGCGGCGCACCGGGAAGCCCTCGC
CCTCGAAACCGCTGGGCGCGGTGGTCACGGTGAGCACGGGACGTGCGACGGCGTC
GGCTGGTGCGGATACGCGGGGCAGCGTCAGCGGGTTCTCGACGGTCACGGCGGGC
ATGTCGACAAGCCGAATTGATCCACTAGAAGGCCTAATTC(SEQ ID NO: 44);

ftz 内含子:

CTAGTTCTGATCTGCTAGACAATTGTTGGCATCAGGTAGGCATCACACACGAT

TAACAACCCCTAAAAATACACTTTGAAAATATTGAAAATATGTTTTTGTATACATT
TTTGATATTTTCAAATAATACGCAGTTATAAACTCATTAGCTAACCCATTTTTTCT
TTGCTTATGCTTACAGATTGCAAAGAACTAGAG(SEQ ID NO: 45);

SV40 ployA:

GGATCTTTGTGAAGGAACCTTACTTCTGTGGTGTGACATAATTGGACAAACTA
CCTACAGAGATTTAAAGCTCTAAGGTAAATATAAAATTTTTTAAGTGTATAATGTGT
TAAACTACTGATTCTAATTGTTTGTGTATTTTAGATTCCAACCTATGGAAGTATG
AATGGGAGCAGTGGTGGAAATGCCTTTAATGAGGAAAACCTGTTTTGCTCAGAAGA
AATGCCATCTAGTGATGATGAGGCTACTGCTGACTCTCAACATTCTACTCCTCCAA
AAAAGAAGAGAAAGGTAGAAGACCCCAAGGACTTTCCTTCAGAATTGCTAAGTTT
TTTGAGTCATGCTGTGTTTAGTAATAGAACTCTTGCTTGCTTTGCTATTTACACCAC
AAAGGAAAAAGCTGCACTGCTATACAAGAAAATTATGGAAAAATATTTGATGTAT
AGTGCCTTGACTAGAGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTG
CTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGGAAT
TGTTGTTGTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCA
TCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCA
AACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGTTCCA(SEQ ID NO: 46);

LoxP:

CTAGTATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATG(SEQ ID NO: 47);

gypsy:

TTGGCCACGTAATAAGTGTGCGTTGAATTTATTCGCAAAAACATTGCATATTT
TCGGCAAAGTAAAATTTTGTTCATACCTTATCAAAAAATAAGTGCTGCATACTTT
TTAGAGAAACCAAATAATTTTTTTATTGCATACCCGTTTTTAATAAAATACATTGCA
TACCCTCTTTTAATAAAAAATATTGCATACTTTGACGAAACAAATTTTCGTTGCAT
ACCCAATAAAAAGATTATTATATTGCATACCCGTTTTTAATAAAATACATTGCATAC
CCTCTTTTAATAAAGAATATTGCATACGTTGACGAAACAAATTTTCGTTGCATACC
CAATAAAAGATTATTATATTGCATACCTTTTCTTGCCATACCATTAGCCGATCAA
TTCTGCTCGGCAACAGTATATTTGTGGTGTGCCAACCAACAAC(SEQ ID NO: 48);

2×QUAS:

CGCTCGGGTAATCGCTTATCCTCGGGTAATCGCTTATCCTTAAGC(SEQ ID NO:
49);

10×UAS:

GCAGGTCGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGTAC
TGTCCTCCGAGCGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGA
CTCCCGCGGTTCGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGTA
CTGTCCTCCGAGCGGAGTAC(SEQ ID NO: 50)。

本发明的再一方面，本发明还提供了一种敲除果蝇目的基因的方法。根据本发明的实施例，该方法利用前面所述的构建体转化果蝇。发明人惊奇的发现，利用本发明的方法，不仅能够在果蝇中同时高效表达多个针对不同基因的 siRNA，从而能够实现多个基因的同时敲除，还能够在果蝇中表达多个针对同一个基因 siRNA，从而实现单个基因的高效敲除，敲出效果好。并且，本发明的方法操作简单，结果稳定，适用于果蝇所有的组织和细胞，且利用该方法易于调控果蝇的基因敲除效率，获得的果蝇表型明显，从而能够有效用于果蝇基因功能研究。

根据本发明的实施例，本发明的敲除果蝇目的基因的方法利用 GAL4-UAS 二元表达载体系统进行所述转化，其中所述构建体包含 2×QUAS 序列；和/或 10×UAS 序列。由此，这两种可抑制型二元表达系统能够丰富果蝇中转基因表达、世系追踪和基因功能嵌合体分析的手段，使该方法的表达调控更加灵活。

根据本发明的实施例，所述转化进一步包括：利用所述构建体转化第一果蝇，以便获得第一转基因果蝇；提供第二转基因果蝇，所述第二转基因果蝇能够表达 Gal4 蛋白和/或 Q 蛋白；以及将所述第一转基因果蝇与所述第二转基因果蝇杂交，以便获得后代转基因果蝇，所述后代转基因果蝇中所述目的基因被敲除。

下面将结合实施例对本发明的方案进行解释。本领域技术人员将会理解，下面的实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件的，按照本领域内的文献所描述的技术或条件（例如参考 J.萨姆布鲁克等著，黄培堂等译的《分子克隆实验指南》，第三版，科学出版社）或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品，例如可以采购自 Illumina 公司。

实施例 1

构建 RNAi 表达载体 VADUM，其具体步骤如下：

1、载体基因元件的克隆

1.1、克隆基因元件所用的载体

载体 pVALIUM20 用 HindIII 和 Sac I 双酶切，与退火的合成 MCS 片段连接，转化大肠杆菌 Top10，挑选阳性克隆。测序得到正确的质粒记为 pV-MCS，以此质粒来克隆各个基因元件。

退火用的 MCS 引物分别为：

MCS-F：AGCTTCAGCTAGCATGAGCTCAACTGCAGATCCGCGGAATCTAGAAGCT
(SEQ ID NO: 2)

MCS-R：TCTAGATTCCGCGGATCTGCAGTTGAGCTCATGCTAGCTGA (SEQ ID NO: 3)

1.2、克隆一个 LoxP

质粒 pV-MCS 用 Nhe I 和 Sac I 双酶切，与退火的合成 LoxP 片段连接，转化大肠杆菌 Top10，挑选阳性克隆。测序得到正确的质粒记为 pV-LoxP。

退火用的 LoxP 引物分别为:

LoxP-F1: ctagcATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGagct(SEQ ID NO: 4)

LoxP-R1: CATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATg(SEQ ID NO: 5)

1.3、克隆 Q-UAS

质粒 pV-LoxP 用 Pst I 和 Sac I 双酶切, 与退火的合成 Q-UAS 片段连接, 转化大肠杆菌 Top10, 挑选阳性克隆。测序得到正确的质粒记为 pV-Q-LoxP。

退火用的 Q-UAS 引物序列分别为:

Q-F: CGCTCGGGTAATCGCTTATCCTCGGGTAATCGCTTATCCTTAAGCTGCA(SEQ ID NO: 6)

Q-R: GCTTAAGGATAAGCGATTACCCGAGGATAAGCGATTACCCGAGCGagct(SEQ ID NO: 7)

1.4、克隆 5×UAS

以 pVALIUM20 为模板, 用引物 UAS-F 和 UAS-R 进行 PCR 扩增, 引物序列如下:

UAS-F: AACTGCAGGTCGGAGTACTGTCCTCC(SEQ ID NO: 8)

UAS-R: AACCGCGGGAGTCTCCGCTCGGAG(SEQ ID NO: 9)

得到 123 碱基 PCR 产物。PCR 产物用 Pst I 和 Sac II 双酶切, 与经过同样双酶切的质粒 pV-Q-LoxP 连接, 转化大肠杆菌 Top10, 挑选阳性克隆。测序得到正确的质粒记为 pV-UAS-Q-LoxP。

1.5、克隆另外 5×UAS 和 U-promoter

以 pVALIUM3 为模板, 用引物 promoter-F 和 promoter-R 进行 PCR 扩增, 引物序列如下:

Promoter-F: AACCGCGGTCGGAGTACTGTCCTCC(SEQ ID NO: 10)

Promoter-R: AATCTAGACTTTGGTATGCGTCTTGTGAT(SEQ ID NO: 11)

得到 282 碱基 PCR 产物。PCR 产物用 Xba I 和 Sac II 双酶切, 与经过同样双酶切的质粒 pV-UAS-Q-LoxP 连接, 转化大肠杆菌 Top10, 挑选阳性克隆。测序得到正确的质粒记为 pV-U-promoter-UAS-Q-LoxP。

2、表达载体的构建

2.1 构建表达载体骨架

载体 pVALIUM20 用 Spe I 酶切, 与退火的合成 MCSb 片段连接, 转化大肠杆菌 Top10, 挑选阳性克隆。测序得到正确的质粒记为 pV-MCS2。

退火用的 MCSb 引物分别为:

MCSb-F: CTAGGCTAGCTCAGATCTTGGAATTCATCTAGACAGTA(SEQ ID NO: 12)

MCSb-R: CTAGTACTGTCTAGATGAATTCCAAGATCTGAGCTAGC(SEQ ID NO: 13)

用以下突变的方法把质粒 pV-MCS2 的一些酶切位点去除, 方便以后的克隆。去掉的酶切位点分别是 vermilion 中的 EcoRV、BamH I 和 Xho I, vermilion 和 attB 之间的 Xho I, attB 中的 Kpn I, 以及 gypsy 中的 Mfe I。

以质粒 pV-MCS2 为模板, 用一对反向互补的突变引物进行 PCR 扩增。PCR 产物用 Dpn

I 酶切后直接转化大肠杆菌 Top10, 挑选单克隆摇菌, 提取质粒酶切鉴定得到正确的突变质粒。用到的突变引物如下:

EcoR V -F: GGAGCGCAGATATTGATAACCAGACGAGCCACCAGTG(SEQ ID NO: 14)

EcoR V -R: CACTGGTGGCTCGTCTGGTTATCAATATCTGCGCTCC(SEQ ID NO: 15)

BamH I -F: CCAGTGCCCAACTGTTGCGATCCAATCATGCGTTG(SEQ ID NO: 16)

BamH I -R: CAACGCATGATTGGATCGCAACAGTTGGGCACTGG(SEQ ID NO: 17)

Xho I -F1: CAGATCGTGACTCCTCGACCGGCGGATGCTGGCGAAC(SEQ ID NO: 18)

Xho I -R1: GTTCGCCAGCATCCGCCGGTCGAGGAGTCACGATCTG(SEQ ID NO: 19)

Xho I -F2: GATATCATCGATCTCGACGCTGCATCCAACGCGTT(SEQ ID NO: 20)

Xho I -R2: AACGCGTTGGATGCAGCGTCGAGATCGATGATATC(SEQ ID NO: 21)

Kpn I -F: GGATCAATTCGGCTTCACGTACCGTCGACGATGTA(SEQ ID NO: 22)

Kpn I -R: TACATCGTCGACGGTACGTGAAGCCGAATTGATCC(SEQ ID NO: 23)

Mfe I -F: CCATTTAGCCGATCAATTCTGCTCGGCAACAGTATAT (SEQ ID NO: 24)

Mfe I -R: ATATACTGTTGCCGAGCAGAATTGATCGGCTAAATGG(SEQ ID NO: 25)

突变后的质粒记为 pVAM, 以此为骨架构建表达载体。

2.2、添加表达元件 U-promoter、UAS、Q-UAS 和 LoxP

质粒 pV-U-promoter-UAS-Q-LoxP 用 Xba I 和 Nhe I 双酶切, 胶回收得到 473 碱基的片段, 即 U-promoter-UAS-Q-LoxP, 与用同样双酶切的载体 pVAM 连接, 转化大肠杆菌 Top10, 挑选阳性克隆。质粒记为 pVAM-U-promoter-UAS-Q-LoxP,

2.3、添加另一个 LoxP

质粒 pVAM-U-promoter-UAS-Q-LoxP 用 Nhe I 酶切, 用碱性磷酸酶处理, 再与退火的合成 LoxP 片段连接, 转化大肠杆菌 Top10, 挑选阳性克隆。测序得到正确的质粒记为 pVAM-U-promoter-UAS-Q-LoxP2。

退火用的 LoxP 引物序列分别为:

LoxP-F2: CTAGTATAACTTCGTATAATGTATGCTATAACGAAGTTATG(SEQ ID NO: 26)

LoxP-R2: TAGCATAACTTCGTATAGCATAACATTATACGAAGTTATA(SEQ ID NO: 27)

2.4、在两个 LoxP 之间加入 gypsy

以 pVAM 为模板, 用引物 gypsy-F 和 gypsy-R 进行 PCR 扩增。

Gypsy-F: TTACTAGTTGGCCACGTAATAAGTGTGC(SEQ ID NO: 28)

gypsy-R: TTACTAGTGTTGTTGGTGGCACACCAC(SEQ ID NO: 29)

得到 447 碱基 PCR 产物。PCR 产物用 Spe I 酶切, 与经过 Nhe I 酶切和碱性磷酸酶处理的质粒 pVAM-U-promoter-UAS-Q-LoxP2 连接, 转化大肠杆菌 Top10, 挑选阳性克隆。测序得到正确的质粒记为 pVAM-U-promoter-UAS-Q-LoxP2-gypsy。

2.5、添加克隆单个 hairpin DNA 的多克隆酶切位点 MCS1

质粒 pVALIUM20 用 Xba I 和 Spe I 双酶切, 胶回收 730 碱基的片段, 与用同样双酶切的质粒 pVAM-U-promoter-UAS-Q-LoxP2-gypsy 连接, 转化大肠杆菌 Top10, 挑选阳性克隆。

正确的质粒记为 pVAM-U-promoter-UAS-Q-LoxP2-gypsy-MCS1。

2.6、添加连接多个 hairpin DNA 的 linker

以果蝇基因组为模板，用引物 linker-F 和 linker-R 进行 PCR 扩增。

Linker-F: AATCTAGACGCGATGCTCAAGGCAAAAA(SEQ ID NO: 30)

linker-R: AACCTAGGCAGCATGAATGCGCCAATAT(SEQ ID NO: 31)

得到 233 碱基 PCR 产物。PCR 产物用 Xba I 和 Avr II 双酶切，与经过 Avr II 酶切和碱性磷酸酶处理的质粒 pVAM-U-promoter-UAS-Q-LoxP2-gypsy-MCS1 连接，转化大肠杆菌 Top10，挑选出阳性克隆。测序得到正确的质粒记为 pVAM-U-promoter-UAS-Q-LoxP2-gypsy-MCS1-linker。

2.7、添加克隆多个 hairpin DNA 的多克隆酶切位点 MCS2

质粒 pVAM-U-promoter-UAS-Q-LoxP2-gypsy-MCS1-linker 用 Spe I 酶切，用碱性磷酸酶处理，再与退火的合成 MCS2 片段连接，转化大肠杆菌 Top10，挑选阳性克隆。测序得到正确的质粒作为表达载体，记为 VADUM，如图 1 所示。

实施例 2

Polycomb Group (PcG)蛋白是在果蝇中首次发现的一类能够重塑染色质从而使特定基因在表观遗传上维持沉默的蛋白质家族，在发育过程中起着非常重要的作用。PcG 蛋白通过形成不同的蛋白复合体发挥作用，其中包括两种抑制复合体，Polycomb repressive complexes 1 and 2 (PRC1 and PRC2)。果蝇的核心 PRC1 由 4 种蛋白构成，Polycomb (Pc)、Sex combs extra (Sce)、Polyhomeotic (Ph)和 Posterior sex combs (Psc)。由于 PRC1 复合体组成的复杂及多变性，它的功能及生理作用还不是很清楚。尤其是单独敲除核心 PRC1 的 4 种组分往往没有明显的表型，这给 PRC1 功能的研究造成很大的困扰。利用本发明可以同时抑制这 4 种蛋白的表达，得到与单个基因敲除不同的表型，给 PRC1 功能的研究带来便利。

按照下面的方法，利用本发明的构建体同时抑制果蝇 PRC1 复合体中的各蛋白：

1、抑制核心 PRC1 各组分基因表达的 RNAi 载体构建

把 Pc，Sce，Ph 和 Psc 基因的 CDS 序列输入 DSIR 网站 (<http://biodev.extra.cea.fr/DSIR/DSIR.html>)，设计只针对各个基因的 21 核苷酸 siRNA。把 21 核苷酸 反义核苷酸 (anti-sense oligo) 序列及其反向互补序列 (sense oligo) 分别放在以下引物的相应位置，得到 4 对分别用于各个基因的引物。

F: cttagcagt sense oligo tagttatattcaagcata anti-sense oligo gcg

R: aattcgc sense oligo tatgcttgaatataacta anti-sense oligo actg

Pc-F:cttagcagtCTCATCGACATCTACGAACAAtagttatattcaagcataTTGTTCGTAGATGTTCGATGAGgcg(SEQ ID NO: 32)

Pc-R:aattcgcCTCATCGACATCTACGAACAAtatgcttgaatataactaTTGTTCGTAGATGTTCGATGAGactg(SEQ ID NO: 33)

Sce-F:cttagcagtCCGCAAGAAGCTCGTCTCCAAtagttatattcaagcataTTGGAGACGAGCTT

CTTGCGGgcg(SEQ ID NO: 34)

Sce-R:aattcgcCCGCAAGAAGCTCGTCTCCAAtatgcttgaatataactaTTGGAGACGAGCTTC
TTGCGGactg(SEQ ID NO: 35)

Ph-F:ctagcagtCCGGGTCAGCTGGTTCTCTTAtagttatattcaagcataTAAGAGAACCAGCTG
ACCCGGgcg(SEQ ID NO: 36)

Ph-R:aattcgcCCGGGTCAGCTGGTTCTCTTAtagttgaatataactaTAAGAGAACCAGCTGA
CCCGGactg(SEQ ID NO: 37)

Psc-F:ctagcagtCCAGTCGAATATGATGTACAAtagttatattcaagcataTTGTACATCATATTCG
ACTGGgcg(SEQ ID NO: 38)

Psc-R:aattcgcCCAGTCGAATATGATGTACAAtagttgaatataactaTTGTACATCATATTCGA
CTGGactg(SEQ ID NO: 39)

把合成的 4 对引物退火, 分别与用 *Nhe* I 和 *Eco*R I 双酶切的质粒 VADUM 连接, 转化大肠杆菌 Top10, 挑选阳性克隆。测序得到 RNAi 单个基因的重组质粒, 分别记为 VADUM-Pc, VADUM-Sce, VADUM-Ph 和 VADUM-Psc。

质粒 VADUM-Sce 用 *Xba* I 和 *Spe* I 双酶切, 回收 407 碱基的小片段, 再与用 *Spe* I 单酶切和碱性磷酸酶处理的质粒 VADUM-Pc 连接, 转化大肠杆菌 Top10, 挑选阳性克隆。正确的质粒记为 VADUM-Pc-Sce。质粒 VADUM-Ph 用 *Xba* I 和 *Spe* I 双酶切, 回收 407 碱基的小片段, 与用 *Spe* I 单酶切和碱性磷酸酶处理的质粒 VADUM-Pc-Sce 连接, 转化大肠杆菌 Top10, 经鉴定得到正确的质粒记为 VADUM-Pc-Sce-Ph。最后, 质粒 VADUM-Psc 用 *Xba* I 和 *Spe* I 双酶切, 回收 407 碱基的小片段, 与用 *Spe* I 单酶切和碱性磷酸酶处理的质粒 VADUM-Pc-Sce-Ph 连接, 转化大肠杆菌 Top10, 挑选阳性克隆, 就得到同时 RNAi 4 个基因的重组质粒, 记为 VADUM-Pc-Sce-Ph-Psc。

2、转基因果蝇的获得

用显微注射仪将上一步得到的 5 种 RNAi 载体分别注射到 0-1 h 的果蝇 (基因型为 *y sc v nanos-integrase;attP2*) 胚胎中, 放于 25 摄氏度培养。

然后, 将孵化出的雄果蝇与基因型为 *y sc v* 的果蝇杂交, 从后代中挑选眼睛颜色是野生型深红色的雄果蝇, 即为已整合入 RNAi 载体的转基因果蝇。挑选出的雄果蝇与基因型为 *y sc v;Dr,e/TM3,sb* 的果蝇杂交, 从后代中挑选深红眼且短刚毛的果蝇自交, 再从其后代中挑选深红眼且长刚毛的果蝇, 就得到纯合的转基因果蝇。

3、抑制核心 PRC1 各组基因表达对果蝇发育的影响

将本实施例步骤 2 得到的转基因果蝇与 *nos-Gal4* 果蝇杂交, 放于 25℃ 培养, 观察后代的表型。

结果如下: Pc, Sce, Ph 和 Psc 单独 RNAi 的果蝇与野生型果蝇相比, 没有显示出明显的不同; 而 4 个基因同时被 RNAi 后, 后代雌果蝇的卵巢明显变小, 并且不产卵。这表明核心 PRC1 各组的功能存在冗余, 单独 RNAi 后可能由于其他组分的作用没有显示出表型, 同时 RNAi 所有组分后才得到明显的表型。

实施例 3

组蛋白 H1 是组成真核生物染色质的 5 种组蛋白中的一种, 不仅在染色体高级结构的建立和维持方面具有重要作用, 在细胞增殖、基因表达调控等方面也具有一定作用。果蝇中只有一种组蛋白 H1 基因, 是研究其功能的有利模型。但是由于果蝇组蛋白 H1 基因有 23 个拷贝, 很难得到它的突变体, 传统 RNAi 方法往往达不到理想的敲除效率。利用本发明可以方便的调节基因敲除的效率, 大大方便了其功能的研究。

利用本发明的构建体增强组蛋白 H1 的敲除效率, 具体方法如下:

1、组蛋白 H1 RNAi 载体的构建

按照实施例 2 中所诉的方法设计两对针对组蛋白 H1 的引物, 序列如下:

H1-F1:ctagcagtTTGGTACATGTTTCGCAATTAAtagttatattcaagcataTTAATTGCGAACATGTACCAAgcg(SEQ ID NO: 40)

H1-R1:aattcgcTTGGTACATGTTTCGCAATTAAatgcttgaatataactaTTAATTGCGAACATGTACCAAactg(SEQ ID NO: 41)

H1-F2:ctagcagtACCAGCGACAGTTGAGAAGAAtagttatattcaagcataTTCTTCTCAACTGTCGCTGGTgcg(SEQ ID NO: 42)

H1-R2:aattcgcACCAGCGACAGTTGAGAAGAAatgcttgaatataactaTTCTTCTCAACTGTCGCTGGTactg(SEQ ID NO: 43)

两对引物退火后, 分别与用 *Nhe* I 和 *Eco*R I 双酶切的质粒 VADUM 连接, 转化大肠杆菌 Top10, 挑选阳性克隆。测序得到 RNAi 组蛋白 H1 的重组质粒, 记为 VADUM-H1-1 和 VADUM-H1-2。

质粒 VADUM-H1-2 用 *Xba* I 和 *Spe* I 双酶切, 回收 407 碱基的小片段, 再与用 *Spe* I 单酶切和碱性磷酸酶处理的质粒 VADUM-H1-1 连接, 转化大肠杆菌 Top10, 挑选阳性克隆。正确的质粒记为 VADUM-2×H1。质粒 VADUM-2×H1 再用 *Xba* I 和 *Spe* I 双酶切, 回收 814 碱基的片段, 再与用 *Spe* I 单酶切和碱性磷酸酶处理的质粒 VADUM-2×H1 连接, 转化大肠杆菌 Top10, 挑选阳性克隆。正确的质粒记为 VADUM-4×H1。最后, 质粒 VADUM-4×H1 用 *Xba* I 和 *Spe* I 双酶切, 回收 1628 碱基的片段, 与用 *Spe* I 单酶切和碱性磷酸酶处理的质粒 VADUM-4×H1 连接, 转化大肠杆菌 Top10, 挑选阳性克隆。正确的质粒记为 VADUM-8×H1。

2、组蛋白 H1 敲除对翅膀发育的影响

使用上一步得到的 RNAi 载体 VADUM-H1-1、VADUM-4×H1 和 VADUM-8×H1, 按照实施例 2 中所述的方法获得转基因 RNAi 果蝇(即用显微注射仪将上一步得到的 5 种 RNAi 载体分别注射到 0-1 h 的果蝇(基因型为 *y sc v nanos-integrase;attP2*) 胚胎中, 放于 25 摄氏度培养。然后, 将孵化出的雄果蝇与基因型为 *y sc v* 的果蝇杂交, 从后代中挑选眼睛颜色是野生型深红色的雄果蝇, 即为已整合入 RNAi 载体的转基因果蝇), 分别记为 H1 KD1、H1 KD2 和 H1 KD3。

将 3 种转基因 RNAi 果蝇分别与 ms1096-Gal4 杂交，25 摄氏度培养，观察后代的翅膀表型。结果如图 2 所示：相对于野生型雄果蝇（wt）的翅膀，H1 KD1 与 ms1096-Gal4 杂交后代雄果蝇的翅膀无明显差异；H1 KD2 与 ms1096-Gal4 杂交后代雄果蝇的翅膀大小稍微变小，脉络异常且轻微卷曲；H1 KD3 与 ms1096-Gal4 杂交后代雄果蝇的翅膀明显变小，脉络严重紊乱且卷曲成一团。

本领域技术人员均了解，传统的 RNAi 载体很难达到 H1 KD3 的敲除效果，而利用上述的本发明可以方便地从弱到强调节基因的敲除效率。

工业实用性

本发明的分离的寡核苷酸，能够有效地用于制备果蝇基因敲除构建体，具体地，在制备用于果蝇基因敲除的构建体时，将该寡核苷酸用以连接多个 shRNA 模板序列，即将多个 siRNA 中相邻的两个 siRNA 通过该寡核苷酸相连，从而使该构建体包含多个 siRNA，进而利用该构建体能够同时敲除多个基因，实现对果蝇多基因的同时调控。

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导，可以对那些细节进行各种修改和替换，这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

在本说明书的描述中，参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示意性实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中，对上述术语的示意性表述不一定指的是相同的实施例或示例。而且，描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任何的一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。

权利要求书

- 1、一种分离的寡核苷酸，其具有 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列。
- 2、一种构建体，其特征在于，包含多个 siRNA，所述多个 siRNA 中相邻的两个 siRNA 通过权利要求 1 所述的寡核苷酸相连，其中所述多个 siRNA 的靶基因相同或不同。
- 3、根据权利要求 2 所述的构建体，其特征在于，进一步包含：
2×QUAS 序列；和/或
10×UAS 序列。
- 4、根据权利要求 2 所述的构建体，其特征在于，进一步包含筛选标记基因，
任选地，所述筛选标记基因为氨苄青霉素抗性基因和/或筛选标记 *vermilion* 基因。
- 5、根据权利要求 2 所述的构建体，其特征在于，进一步包含启动子，
任选地，所述启动子为 U-启动子。
- 6、根据权利要求 2 所述的构建体，其特征在于，进一步包含：
基因组定点整合 attB 序列；
ftz 内含子序列；以及
SV40 ployA 序列。
- 7、根据权利要求 2 所述的构建体，其特征在于，进一步包含：
2 个 LoxP 序列；以及
隔绝子 gypsy 序列，
其中，所述隔绝子 gypsy 序列位于 2 个 LoxP 序列之间。
- 8、一种敲除果蝇目的基因的方法，其特征在于，
利用权利要求 2-7 所述的构建体转化果蝇。
- 9、根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于，利用 GAL4-UAS 双元表达载体系统进行
所述转化，其中所述构建体包含 2×QUAS 序列；和/或 10×UAS 序列。
- 10、根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述转化进一步包括：
利用所述构建体转化第一果蝇，以便获得第一转基因果蝇；
提供第二转基因果蝇，所述第二转基因果蝇能够表达 Gal4 蛋白和/或 Q 蛋白；以及
将所述第一转基因果蝇与所述第二转基因果蝇杂交，以便获得后代转基因果蝇，所述
后代转基因果蝇中所述目的基因被敲除。

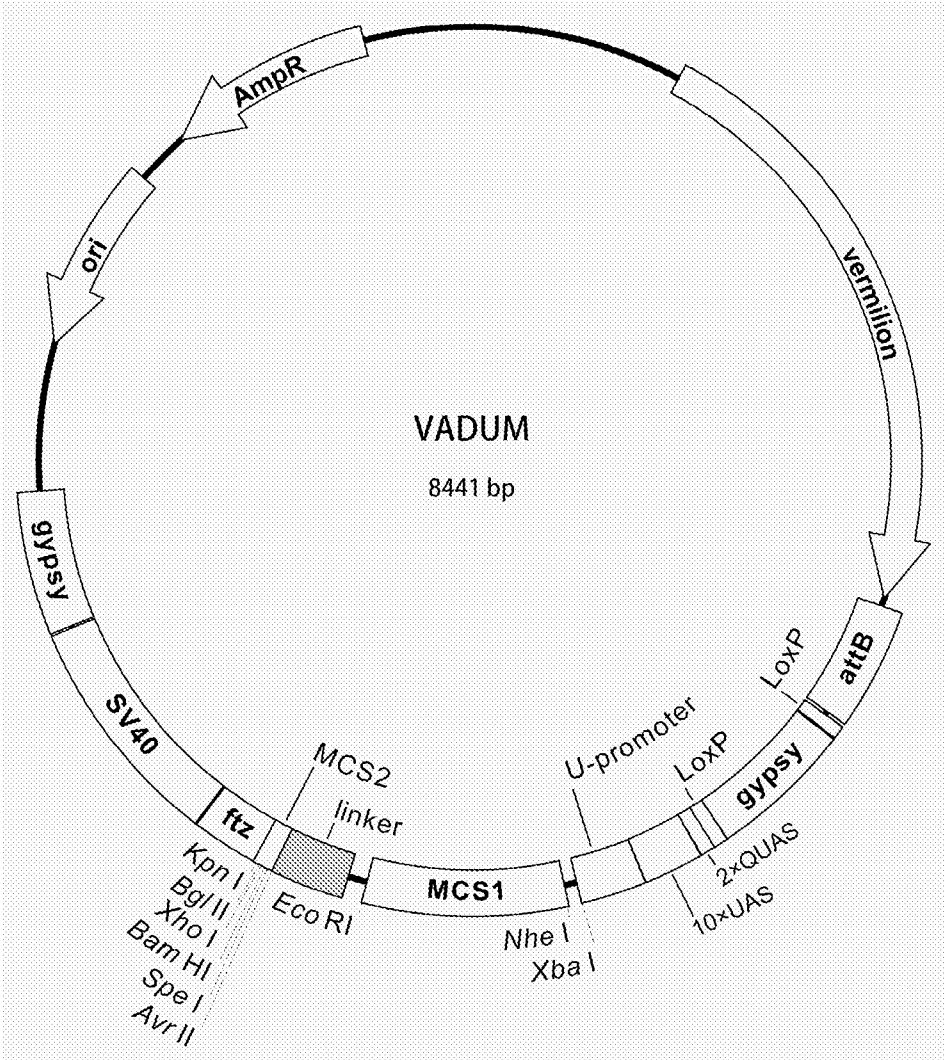


图 1

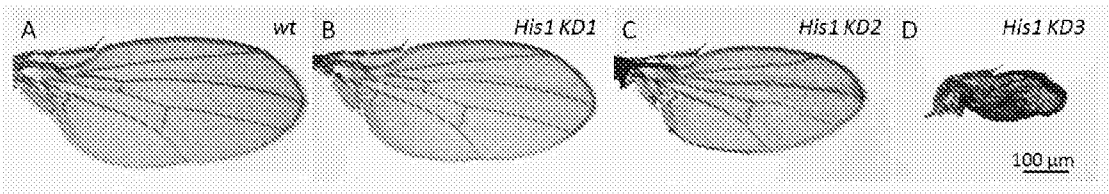


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2014/081427

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/113 (2010.01) i; A01K 67/033 (2006.01) i; C12N 15/85 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; A01K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; DWPI; SIPOABS; CJFD; Pubmed: joint, drosophila, knockout, knockdown, genome, integrat+, hairpin, QUAS, UAS, siRNA, RNAi, linker, Sequence-based Search: SEQ ID NOs: 1-50

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JIANG, Q.N. et al., "A Drosophila Resource of Transgenic RNAi Lines for Neurogenetics", GENETICS, vol. 182, no. 4, 31 August 2009 (31.08.2009), ISSN: pages 1089-1100, see the whole document	1-10
A	JIANG, Q.N. et al., "Vector and parameters for targeted transgenic RNA interference in Drosophila Melanogaster", NATURE METHODS, vol. 5, no. 1, 31 January 2008 (31.01.2008), ISSN: pages 49-51, see the whole document	1-10
A	WO2005060721 A2 (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS et al.), 07 July 2005 (07.07.2005), see the whole document	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 25 March 2015 (25.03.2015)	Date of mailing of the international search report 13 April 2015 (13.04.2015)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer LI, Kangqi Telephone No.: (86-10) 62411034

International application No.
PCT/CN2014/081427

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2009)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2014/081427

A. 主题的分类

C12N 15/113(2010.01)i; A01K 67/033(2006.01)i; C12N 15/85(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N; A01K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS;DWPI;SIPOABS;CJFD;Pubmed: 果蝇, 敲除, 敲减, 基因组, 整合, 发夹, 发卡, 接头, drosophila, knockout, knockdown, genome, integrat+, hairpin, QUAS, UAS, siRNA, RNAi, linker, 基于序列的检索: SEQ ID NOs:1-50

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	Jian-Quan Ni等. "A Drosophila Resource of Transgenic RNAi Lines for Neurogenetics" Genetics, 第182卷卷, 第4期期, 2009年 8月 31日 (2009 - 08 - 31), ISSN: 第1089-1100页, 参见全文	1-10
A	Jian-Quan Ni等. "Vector and parameters for targeted transgenic RNA interference in Drosophila melanogaster" Nature Methods, 第5卷卷, 第1期期, 2008年 1月 31日 (2008 - 01 - 31), ISSN: 第49-51页, 参见全文	1-10
A	WO 2005060721 A2 (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS等) 2005年 7月 7日 (2005 - 07 - 07) 参见全文	1-10

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2015年 3月 25日

国际检索报告邮寄日期

2015年 4月 13日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
北京市海淀区蓟门桥西土城路6号
100088 中国

传真号 (86-10)62019451

授权官员

李康琦

电话号码 (86-10)62411034

国际申请号	PCT/CN2014/081427
-------	-------------------

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2005060721	A2	2005年 7月 7日	US	2005214818	A1	2005年 9月 29日
				WO	2005060721	A3	2005年 12月 8日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)