(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 114277190 B
(45)授权公告日 2024.07.23

(21)申请号 202111668786.0

(22)申请日 2021.12.31

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114277190 A

(43)申请公布日 2022.04.05

(73)专利权人 安徽中盛溯源生物科技有限公司
地址 230088 安徽省合肥市高新区创新大道2800号创新产业园二期H3栋

(72)发明人 请求不公布姓名 请求不公布姓名 请求不公布姓名 请求不公布姓名 请求不公布姓名

(74)专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569
专利代理师 薛红凡

(51)Int.Cl.
C12Q 1/70(2006.01)
C12Q 1/6851(2018.01)
C12N 15/11(2006.01)

(56)对比文件
CN 112301052 A,2021.02.02
CN 109321651 A,2019.02.12

Kejin Hu等.Efficient generation of transgene-free induced pluripotent stem cells from normal and neoplastic bone marrow and cord blood mononuclear cells.Blood.2011,第117卷(第14期),Methods和Results部分.

Kejin Hu等.Efficient generation of transgene-free induced pluripotent stem cells from normal and neoplastic bone marrow and cord blood mononuclear cells.Blood.2011,第117卷(第14期),Methods和Results部分.

崔思颖.杜氏肌营养不良患胎绒毛来源非整合诱导多能干细胞的建立与鉴定.中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑.2018,(第12期),第3.3.4和4.3小节.

(续)

注意：
申请人在申请日后补交了实验数据,但该数据并未包含在本授权公告文档中。

审查员 郝明媚

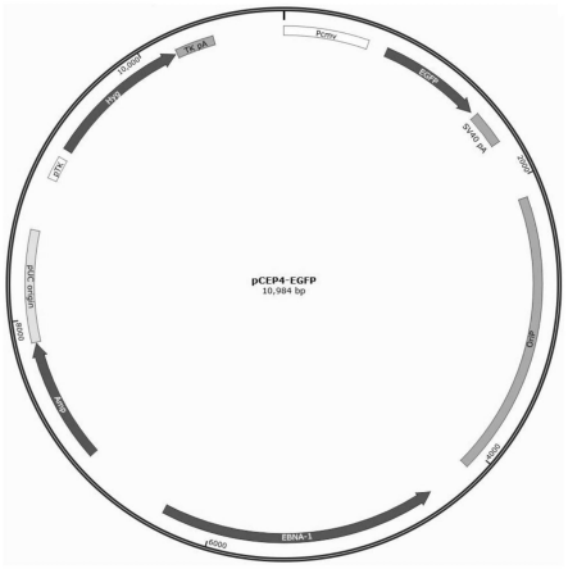
权利要求书1页 说明书25页
序列表8页 附图4页

(54)发明名称

一种hiPSC中外源基因残留检测用特异性DNA片段、引物、试剂盒和检测方法

(57)摘要

本发明提供了一种hiPSC中外源基因残留检测用特异性DNA片段、引物组、试剂盒和检测方法,本发明属于干细胞技术领域。本发明以诱导制备hiPSC时所用的游离型载体序列进行筛选特异性DNA序列,以筛选获得的特异性DNA序列分别设计检测引物,获得扩增效果好,而且检测灵敏高的引物对。本发明基于qPCR方法检测hiPSC中外源基因残留情况,不需要抽取基因组DNA,通过直接裂解细胞方式获得基因组,全程在5～6小时左右即可完成,适合hiPSC产品质控,更经济、更省时,对于监控临床级hiPSC的安全性、经济性、生产性更有保障。



CN 114277190 B

[转续页]

[接上页]

(56)对比文件

崔思颖.杜氏肌营养不良患胎绒毛来源非整合诱导多能干细胞的建立与鉴定.中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑.2018,(第12期),第3.3.4和4.3小节.

1.一种hiPSC中外源基因残留检测用引物,其特征在于,为特异性检测来源于制备hiPSC时所用的OriP/EBNA1游离型载体的特异性DNA片段的引物,所述特异性DNA片段为核苷酸序列如SEQ ID NO:21所示的OriP-1;

所述引物为OriP-1-F、OriP-1-R引物对;

所述OriP-1-F的核苷酸序列如SEQ ID NO:10所示;

所述OriP-1-R的核苷酸序列如SEQ ID NO:11所示。

2.一种基于qPCR技术检测hiPSC中外源基因残留用试剂盒,其特征在于,包括权利要求1所述引物。

3.权利要求1所述引物或权利要求2所述试剂盒在检测临床级hiPSC的外源基因残留中的应用。

4.一种基于qPCR技术临床级hiPSC的外源基因残留的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

1)筛选OriP/EBNA1游离型载体载有的特异性DNA片段作为目的DNA,所述特异性DNA片段为核苷酸序列如SEQ ID NO:21所示的OriP-1;

2)根据步骤1)中所述目的DNA设计得到权利要求1所述引物;

3)以步骤1)中所述游离型载体为质粒标准品,将hESC和所述质粒标准品按不同比例混合制备阳性梯度标准品;

4)将待检测的hiPSC经细胞裂解,获得待测样品,将所述待测样品、阳性梯度标准品和引物进行qPCR检测,根据阳性梯度标准品的PCR的检测下限,对应待测样品中hiPSC产品的检测数值判断待测样品中hiPSC外源性基因残留限量。

5.根据权利要求4所述检测方法,其特征在于,所述qPCR检测的反应体系如下:

10×扩增缓冲液5%~35%、10×增强缓冲液5%~45%、dNTPs 0.01%~10%、0.1mM~6mM $MgSO_4$ 0.1%~25%、1.25×~10×SYBR green I 0.01%~2.5%、正向引物 0.5%~10%、反向引物0.5%~10%、Platinum pfx DNA 聚合酶 0.01%~5.5%、模板DNA 5%~50%;

以上组分为体积百分比。

6.根据权利要求4所述检测方法,其特征在于,所述qPCR检测的反应程序如下:

94℃ 5min;94℃ 15sec,58℃ 30sec,68℃ 30sec,35~55个循环;95℃ 10sec,65℃ 1min,97℃ 1min。

7.根据权利要求4~6任意一项所述检测方法,其特征在于,步骤4)中所述细胞裂解时,蛋白酶K的浓度为1~50μg/ml。

8.根据权利要求4~6任意一项所述检测方法,其特征在于,细胞裂解时,细胞数量为1.0×10^6~4.0×10^6个/10μl。

一种hiPSC中外源基因残留检测用特异性DNA片段、引物、试剂盒和检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于干细胞技术领域,具体涉及一种hiPSC中外源基因残留检测用特异性DNA片段、引物组、试剂盒和检测方法。

背景技术

[0002] 人多能干细胞(humanpluripotent stem cell,hPSC),包括人胚胎干细胞(human embryonic stem cell,hESC)和人诱导多能干细胞(human induced pluripotent stem cell,hiPSC),是一类能在体外无限增殖,且具有分化为成体几乎所有功能细胞潜能的干细胞。基于这两个特性,hPSC在针对目前尚无有效疗法的疑难杂症的治疗上有着广阔的临床应用前景。目前,随着干细胞技术的快速发展,越来越多的hPSC来源功能细胞产品已在各国获批进入临床试验。

[0003] hiPSC是通过在已分化的体细胞中表达特定的基因或特定基因产物等方式,重编程而获得的多能干细胞,不但避免了胚胎来源hESC涉及的社会伦理问题,而且来源丰富,遗传背景不受限制,有望克服细胞移植所面临的免疫配型问题。基于hiPSC的这些优势,近几年来,已有多类hiPSC衍生的功能性细胞产品进入临床应用。早期iPSC重编程使用了逆转录/慢病毒载体表达外源基因。这类载体能实现外源基因的长期稳定表达,从而获得较高的重编程效率,但会导致插入性基因突变,外源基因表达也会严重影响iPSC的功能和成瘤性。用于制备临床级功能细胞产品的hiPSC应不含外源DNA残留,所以需要优先的选择非整合型重编程系统的重编程方法。常用的非整合型hiPSC重编程系统常基于OriP/EBNA1的游离型DNA质粒载体构建得到。这个载体的两个关键的序列OriP/EBNA1来源于双链DNA疱疹病毒(Epstein-Barr virus,EBV)。全世界大约90％的成人都感染有EBV,在潜伏期,EBV以环形DNA质粒的形式游离于细胞基因组外,OriP与EBNA1是稳定维持其游离态唯二需要的病毒原件[1]。OriP/EBNA1载体在转染细胞后,能在部分细胞中建立稳定的游离态(约5～50个质粒/细胞),从而稳定表达外源基因以确保重编程的成功。而OriP/EBNA1载体复制与分配的缺陷使每次细胞分裂都有约5％的细胞丢失质粒,从而易于筛选出无痕iPSC[2]。2009年,Yu等利用OriP/EBNA1载体首次获得了人无痕iPSC[3],与小分子的合用更是大幅度提高了这个系统的重编程效率[4]。与其它方法相比,OriP/EBNA1载体有不少优点:能在多类细胞内建立稳定游离态,因此不受细胞种类的限制;可以用常规方法制备质粒,不需要病毒包装;只需一次转染,操作简单;建立游离态的细胞内只含少量载体,降低了基因组整合的风险;由于载体复制与分配的缺陷,以及表达EBNA1的病毒启动子在PSC中的沉默,只需常规传代培养就可以获取无痕iPSC,无需繁杂的单细胞克隆筛选工作。因此这个方法在制备临床级iPSC中比较常用。

[0004] 虽然OriP/EBNA1载体可以经hiPSC多次传代后丢失,但是仍然可能存在剔除不完全,重编程质粒在hiPSC内残留的风险,从而增加细胞产品致瘤性的安全隐患。在国际及国内研究中,详见我国《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则》对外源性异物(外源基因)有

严格要求。虽然制备hiPSC的方法是多样的,但是均要严格遵从外源基因的控制原则,把控产品质量标准,因此要对涉及外源基因诱导形成hiPSC细胞时,要有合适于产业化规模生产且灵敏度高的检测方法检测hiPSC细胞产品中的外源基因的残留以使产品符合临床使用及下游应用。

[0005] 除应用基于OriP/EBNA1的游离型载体重编辑诱导获得hiPSC外,还可采用S/MAR系统质粒载体、SV40系统质粒载体和S/MAR系统质粒载体构建。

[0006] S/MAR系统质粒载体介绍:在真核生物的细胞核内,基因组是通过DNA的核骨架附着区(SAR)或称核基质附着区(MAR)(简记为S/MAR)锚定在核骨架网状系统上。S/MAR既有一定的特征,又有多样性,研究认为它参与了DNA复制调控和转录调控等多种核内生化过程。通过重组,在目的基因一侧或两侧带上S/MAR后作基因转染或转基因动植物,发现整合后的基因表达有时可增强几倍,甚至上万倍,和/或显示位置独立效应。有些研究还报道,S/MAR能克服转基因在传代过程中存在的转基因沉默的问题。这些功效使得S/MAR将可能成为基因工程中一个有用的顺式调控元件。

[0007] SV40系统游离型载体属于SV40 DNA-质粒DNA杂合载体,重组的SV40DNA分子必须经过包装后才具有感染能力,因此插入的外源DNA片段不能太大。为了尽量提高SV40的装载量,必须删除一些基因片段,因此重组的SV40分子必须与野生型病毒共感染受体细胞,才能形成有感染力的重组病毒颗粒。S/MAR系统质粒载体能够对外源基因高效表达,但是装载量小。

[0008] BKV系统游离型载体是基于人乳头瘤病毒序列的一种新型游离型载体。人乳头瘤病毒(BKV)属于多肿瘤毒科乳头瘤病毒属,其基因组为双链DNA,感染宿主细胞后基因组不发生整合,独立于染色体而自主复制,每个宿主细胞最高可达500个拷贝。删除编码病毒核心蛋白和外壳蛋白的基因,并与大肠杆菌质粒拼接,构成穿梭载体,它不整合,同时也不能形成成熟的病毒颗粒裂解受体细胞。安装细胞色素P45dioxin介导的增强子DRE,控制小鼠乳腺癌启动子MMTP,有其带动外源基因的表达。

[0009] 目前hiPSC细胞产品的外源基因的残留检测方法有常规PCR法和实时荧光定量PCR法(qPCR),常规PCR方法通过PCR后进行凝胶电泳分析,该方法不精确,误差太大,不能满足高精确检测要求。qPCR为常用方法,但是目前qPCR方法检测hiPSC外源基因残留的灵敏度、限度和稳定性受多种因素影响(如qPCR方法中反应体系成分的用量、反应条件等),不能满足高灵敏度的hiPSC外源基因残留检测的要求。而且在现有检测方法中大都需要抽提细胞基因组DNA,操作麻烦,检测过程长且耗费资金多,不能有效监控hiPSC细胞质量控制。因此需要稳定的、灵敏度高的、更经济、更省时的检测方法,对于监控临床级hiPSC的安全性、经济性、生产性更有保障。只有建立了安全的hiPSC细胞库,才能更好的供应下游应用,这也是细胞治疗领域对于监控细胞质量一直追求和要解决问题。

[0010] 参考文献:

[0011] [1]Yates JL,Warren N,Sugden B.Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barrvirus in various mammalian cells.Nature,1985,313:812-815.

[0012] [2]Nanbo A,Sugden A,Sugden B.The coupling of synthesis and partitioning of EBV's plasmid replicon is revealed in live cells.EMBO J,2007,26:4252-4262.

[0013] [3]Yu J,Hu K,Smuga-Otto K,et al.Human induced pluripotent stem cells free of vector andtransgene sequences.Science,2009,324:797-801.

[0014] [4]Yu J,Chau KF,Vodyanik MA,et al.Efficient feeder-free episomal reprogramming with small molecules.PLoS One,2011,6:e17557.

发明内容

[0015] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种hiPSC中外源基因残留检测用特异性DNA片段、引物组、试剂盒和检测方法,具有灵敏度高的特点。

[0016] 本发明提供了一种用于检测hiPSC中外源基因残留的特异性DNA片段,所述特异性DNA片段来源于诱导制备为hiPSC时所用的游离型载体。

[0017] 优选的,所述游离型载体包括以下一种或几种体系的游离型载体:基于OriP/EBNA1、S/MAR、SV40、BKV、BPV-1中的一种或几种的游离型载体。

[0018] 优选的,基于OriP/EBNA1的游离型载体包括pCEP-EGFP、nEP4-E-EGFP、PMEP4-C-EGFP和PKEP4-E-EGFP。

[0019] 优选的,当所述游离型载体为基于OriP/EBNA1的游离型载体时,所述特异性DNA片段选自以下序列中至少一种:

[0020] A.截取SV40 polyA信号区全长70bp以上的截短DNA序列;

[0021] B.截取OriP序列片段区全长70bp以上的截短DNA序列;

[0022] C.截取EBNA1序列片段区全长70bp以上的截短DNA序列;

[0023] D.截取质粒上细菌来源DNA片段区全长70bp以上的截短DNA序列。

[0024] 优选的,所述SV40 polyA信号区包括以下至少一种DNA片段:

[0025] 1)核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示的DNA片段;

[0026] 2)与SEQ ID NO:1互补的DNA片段;

[0027] 3)在SEQ ID NO:1的基础上经过添加、缺失、插入一个或多个核苷酸序列形成的DNA片段;

[0028] 优选的,所述EBNA1序列片段区包括以下至少一种DNA片段:

[0029] 1)核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示的DNA片段;

[0030] 2)与SEQ ID NO:2互补的DNA片段;

[0031] 3)在SEQ ID NO:2的基础上经过添加、缺失、插入一个或多个核苷酸序列形成的DNA片段;

[0032] 优选的,所述OriP序列片段区包括以下至少一种DNA片段:

[0033] A.核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示的DNA片段;

[0034] B.与SEQ ID NO:3互补的DNA片段;

[0035] C.在SEQ ID NO:3的基础上经过添加、缺失、插入一个或多个核苷酸序列形成的DNA片段;

[0036] 优选的,质粒上细菌来源DNA片段区包括以下至少一种DNA片段:

[0037] 1)核苷酸序列如SEQ ID NO:27所示的DNA片段;

[0038] 2)与SEQ ID NO:27互补的DNA片段;

[0039] 3)在SEQ ID NO:27的基础上经过添加、缺失、插入一个或多个核苷酸序列形成的

DNA片段;

[0040] 优选的,所述特异性DNA片段包括以下一种或几种DNA片段:EBNA1截短片段、OriP截短片段、SV40截短片段和质粒上细菌来源DNA片段;

[0041] 优选的,所述EBNA1截短片段包括核苷酸序列如SEQ ID NO:18所示的EBNA1-1、核苷酸序列如SEQ ID NO:19所示的EBNA1-2和/或核苷酸序列如SEQ ID NO:20所示的EBNA1-3;

[0042] 所述OriP截短片段包括核苷酸序列如SEQ ID NO:21所示的OriP-1、核苷酸序列如SEQ ID NO:22所示的OriP-2和核苷酸序列如SEQ ID NO:23所示的OriP-3;

[0043] 所述SV40截短片段的核苷酸序列如SEQ ID NO:24所示。

[0044] 本发明提供了一种hiPSC中外源基因残留检测用引物,包括特异性检测所述特异性DNA片段的引物;

[0045] 优选的,所述引物包括以下一对或几对引物:特异性检测EBNA1截短片段的引物对、特异性检测OriP截短片段的引物对、特异性检测SV40截短片段的引物对和特异性检测质粒上细菌来源DNA截短片段的引物对;

[0046] 优选的,所述特异性检测EBNA1截短片段的引物对包括EBNA1-1-F/EBNA1-1-R、EBNA1-2-F/EBNA1-2-R、EBNA1-3-F/EBNA1-3-R;

[0047] EBNA1-1-F的核苷酸序列如SEQ ID NO:4所示;

[0048] EBNA1-1-R的核苷酸序列如SEQ ID NO:5所示;

[0049] EBNA1-2-F的核苷酸序列如SEQ ID NO:6所示;

[0050] EBNA1-2-R的核苷酸序列如SEQ ID NO:7所示;

[0051] EBNA1-3-F的核苷酸序列如SEQ ID NO:8所示;

[0052] EBNA1-3-R的核苷酸序列如SEQ ID NO:9所示;

[0053] 优选的,所述特异性检测OriP截短片段的引物对包括OriP-1-F/OriP-1-R、OriP-2-F/OriP-2-R、OriP-3-F/OriP-3-R;

[0054] OriP-1-F的核苷酸序列如SEQ ID NO:10所示;

[0055] OriP-1-R的核苷酸序列如SEQ ID NO:11所示;

[0056] OriP-2-F的核苷酸序列如SEQ ID NO:12所示;

[0057] OriP-2-R的核苷酸序列如SEQ ID NO:13所示;

[0058] OriP-3-F的核苷酸序列如SEQ ID NO:14所示;

[0059] OriP-3-R的核苷酸序列如SEQ ID NO:15所示;

[0060] 优选的,特异性检测SV40截短片段的引物对包括SV40-F/SV40-R;

[0061] 所述SV40-F的核苷酸序列如SEQ ID NO:16所示

[0062] 所述SV40-R的核苷酸序列如SEQ ID NO:17所示。

[0063] 本发明提供了一种基于qPCR技术检测hiPSC中外源基因残留用试剂盒,包括所述引物。

[0064] 本发明提供了所述特异性DNA片段、所述引物、所述试剂盒在检测临床级hiPSC的外源基因残留中的应用。

[0065] 本发明提供了一种基于qPCR技术临床级hiPSC的外源基因残留的检测方法,包括以下步骤:

[0066] 1)筛选游离型载体载有的特异性DNA片段作为目的DNA;

[0067] 2)根据步骤1)中所述目的DNA设计引物;

[0068] 3)以步骤1)中所述游离型载体为质粒标准品,将hESC和所述质粒标准品按不同比例混合制备阳性梯度标准品;

[0069] 4)将待检测的hiPSC经细胞裂解,获得待测样品,将所述待测样品、阳性梯度标准品和引物进行qPCR检测,根据阳性梯度标准品的PCR的检测下限,对应待测样品中hiPSC产品的检测数值判断待测样品中hiPSC外源性基因残留限量。

[0070] 优选的,所述qPCR检测的反应体系如下:

[0071] 10×扩增缓冲液5%~35%、10×增强缓冲液5%~45%、dNTPs 0.01%~10%、0.1~6mM $MgSO_4$ 0.1%~25%、(1.25~10)×SYBR green I 0.01%~2.5%、正向引物0.5%~10%、反向引物0.5%~10%、Platinum pfx DNA聚合酶0.01%~5.5%、模板DNA 5%~50%;

[0072] 所述正向引物和反向引物为所述引物。

[0073] 优选的,所述qPCR检测的反应程序如下:

[0074] 94℃5min;94℃15sec,58℃30sec,68℃30sec,35~55个循环;95℃10sec,65℃1min,97℃1min。

[0075] 优选的,步骤1)中所述细胞裂解时,所述蛋白酶K的浓度为1~50μg/ml;

[0076] 优选的,细胞裂解时,细胞数量为1.0×10^6~4.0×10^6个/10μl。

[0077] 本发明提供了一种人诱导多能干细胞中外源基因残留检测用特异性DNA片段及其对应的扩增引物,本发明通过对候选目的DNA序列筛选,分别对EBNA序列片段区、OriP序列片段区、SV40截短片段、质粒上细菌来源DNA序列片段区不同位点的DNA序列设计引物,对SV40截短片段设计一对引物,检测结果表明,扩增EBNA1截短片段或OriP截短片段的引物对以及SV40 polyA信号区的引物对的扩增结果较好,灵敏度达到0.1%(1000个细胞含1copy DNA片段)或者0.01%(10000个细胞含1copy DNA片段)。

[0078] 本发明提供了一种基于qPCR技术临床级hiPSC的外源基因残留的检测方法,具有以下优点:

[0079] (1)采用质粒载体特异性DNA序列或其片段作为检测标记基因,可以检测到hiPSC外源性基因的残留量,特异性强,大大提高hiPSC产品的质量安全性。

[0080] (2)检测体系和方法更准确、灵敏度高、稳定性更高、检测时间短、可在5~6小时左右即可完成,灵敏度可达到0.1%,远远高于目前国际标准。

[0081] (3)本发明的方法在检测时,并不需要传统实验中抽取基因组DNA等操作,仅需通过直接裂解细胞方式获得基因组及qPCR试剂准备,简化质量控制操作,降低成本,更适合于产业化制备临床级hiPSC。

[0082] (4)本发明建立方法中,在裂解细胞后加入蛋白酶K,起到降解或抑制DNA酶的作用,从而保护低拷贝质粒浓度,使方法更准确、可靠、灵敏度更高。

附图说明

[0083] 图1为阳性质粒pCEP4-EGFP的结构图;

[0084] 图2为阳性质粒nEP4-E-EGFP的结构图;

[0085] 图3为阳性质粒PMEP4-C-EGFP的结构图;

[0086] 图4为阳性质粒PKEP4-E-EGFP的结构图。

具体实施方式

[0087] 本发明提供了一种用于检测hiPSC中外源基因残留的特异性DNA片段,所述特异性DNA片段来源于诱导制备为hiPSC时所用的游离型载体。

[0088] 在本发明中,所述游离型载体优选包括以下一种或几种体系的游离型载体:基于OriP/EBNA1、S/MAR、SV40、BKV、BPV-1中的一种或几种的游离型载体。在本发明中,具体以基于OriP/EBNA1的游离型载体为例具体说明特异性DNA片段的内容。

[0089] 在本发明中,所述基于OriP/EBNA1的游离型载体优选包括pCEP-EGFP、nEP4-E-EGFP、PMEP4-C-EGFP和PKEP4-E-EGFP,质粒的结构图分别对应图1～图4。下面质粒pCEP4-EGFP为例,具体说明特异性DNA片段情况。当所述游离型载体为pCEP-EGFP时,所述特异性DNA片段选自以下序列中至少一种:

[0090] A.截取SV40 polyA信号区基因全长70bp以上的截短DNA序列;

[0091] B.截取OriP序列片段区全长70bp以上的截短DNA序列;

[0092] C.截取EBNA1序列片段区全长70bp以上的截短DNA序列;

[0093] D.截取质粒上细菌来源DNA片段区全长70bp以上的截短DNA序列。

[0094] 其中,图1中SV40所示区域为SV40 polyA信号区,图1中OriP所示区域和下游空白区域统称为OriP序列片段区;图1中EBNA1所示区域和下游空白区域统称为EBNA1序列片段区。

[0095] 其中,所述SV40 polyA信号区优选包括以下至少一种DNA片段:1)核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示的DNA片段;

[0096] 2)与SEQ ID NO:1互补的DNA片段;

[0097] 3)在SEQ ID NO:1的基础上经过添加、缺失、插入一个或多个核苷酸序列形成的DNA片段;

[0098] 所述EBNA1序列片段区优选包括以下至少一种DNA片段:

[0099] 1)核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示的DNA片段;

[0100] 2)与SEQ ID NO:2互补的DNA片段;

[0101] 3)在SEQ ID NO:2的基础上经过添加、缺失、插入一个或多个核苷酸序列形成的DNA片段;

[0102] 所述OriP序列片段区优选包括以下至少一种DNA片段:

[0103] A.核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示的DNA片段;

[0104] B.与SEQ ID NO:3互补的DNA片段;

[0105] C.在SEQ ID NO:3的基础上经过添加、缺失、插入一个或多个核苷酸序列形成的DNA片段;

[0106] 所述质粒上细菌来源DNA片段区优选包括以下至少一种DNA片段:

[0107] 1)核苷酸序列如SEQ ID NO:27所示的DNA片段;

[0108] 2)与SEQ ID NO:27互补的DNA片段;

[0109] 3)在SEQ ID NO:27的基础上经过添加、缺失、插入一个或多个核苷酸序列形成的

DNA片段。

[0110] 在本发明实施例中,具体采用EBNA1截短片段、OriP截短片段、SV40截短片段和质粒上细菌来源DNA片段说明特异性DNA片段的检测方法。所述EBNA1截短片段包括核苷酸序列优选如SEQ ID NO:18所示的EBNA1-1、核苷酸序列如SEQ ID NO:19所示的EBNA1-2和/或核苷酸序列如SEQ ID NO:20所示的EBNA1-3。所述OriP截短片段优选包括核苷酸序列如SEQ ID NO:21所示的OriP-1、核苷酸序列如SEQ ID NO:22所示的OriP-2和核苷酸序列如SEQ ID NO:23所示的OriP-3。所述SV40截短片段的核苷酸序列如SEQ ID NO:24所示。

[0111] 在本发明中,以候选DNA片段EBNA1截短片段作为扩增序列,然后按照扩增序列设计引物,结果表明EBNA1在检测人诱导多能干细胞中外源基因残留方面,具有更高的扩增效果以及更高的检测灵敏度。

[0112] 在本发明中,以候选DNA片段OriP部分序列作为扩增序列,然后按照扩增序列设计引物,结果表明OriP在检测人诱导多能干细胞中外源基因残留方面,具有更高的扩增效果以及更高的检测灵敏度。同时本发明还以SV40 polyA信号区的DNA片段作为检测靶点,结果表明,扩增效果较理想,检测灵敏度与OriP和EBNA1截短片段相差不大较低。

[0113] 在本发明中,以候选SV40截短片段为扩增序列,然后按照扩增序列设计引物,结果表明SV40信号区在检测人诱导多能干细胞中外源基因残留方面,具有理想的扩增效果和检测灵敏度。

[0114] 本发明提供了一种hiPSC中外源基因残留检测用引物,包括特异性检测权利要求1所述特异性DNA片段的引物;

[0115] 在本发明中,所述引物优选包括以下一对或几对引物:特异性检测EBNA1截短片段的引物对、特异性检测OriP截短片段的引物对和特异性检测SV40截短片段的引物对。

[0116] 在本发明中,所述特异性检测EBNA1的引物对优选包括EBNA1-1-F/EBNA1-1-R、EBNA1-2-F/EBNA1-2-R、EBNA1-3-F/EBNA1-3-R。EBNA1-1-F/EBNA1-1-R扩增产物为EBNA1-1。EBNA1-2-F/EBNA1-2-R扩增产物为EBNA1-2。EBNA1-3-F/EBNA1-3-R扩增产物为EBNA1-3。EBNA1-1-F的核苷酸序列如SEQ ID NO:4所示;EBNA1-1-R的核苷酸序列如SEQ ID NO:5所示。EBNA1-2-F的核苷酸序列如SEQ ID NO:6所示;EBNA1-2-R的核苷酸序列如SEQ ID NO:7所示。EBNA1-3-F的核苷酸序列如SEQ ID NO:8所示;EBNA1-3-R的核苷酸序列如SEQ ID NO:9所示。

[0117] 在本发明中,所述特异性检测OriP的引物对优选包括OriP-1-F/OriP-1-R、OriP-2-F/OriP-2-R、OriP-3-F/OriP-3-R。OriP-1-F/OriP-1-R扩增产物为OriP-1。OriP-2-F/OriP-2-R扩增产物为OriP-2。OriP-3-F/OriP-3-R扩增产物为OriP-3。OriP-1-F的核苷酸序列如SEQ ID NO:10所示;OriP-1-R的核苷酸序列如SEQ ID NO:11所示;OriP-2-F的核苷酸序列如SEQ ID NO:12所示;OriP-2-R的核苷酸序列如SEQ ID NO:13所示;OriP-3-F的核苷酸序列如SEQ ID NO:14所示;OriP-3-R的核苷酸序列如SEQ ID NO:15所示。特异性检测SV40截短片段的引物对包括SV40-F/SV40-R。SV40-F/SV40-R的扩增产物为SV40片段(SEQ ID NO:24)。所述SV40-F的核苷酸序列如SEQ ID NO:16所示,所述SV40-R的核苷酸序列如SEQ ID NO:17所示。

[0118] 本发明对所述引物的来源没有特殊限制,采用本领域所熟知的引物合成方法即可。

[0119] 本发明提供了一种基于qPCR技术人诱导多能干细胞中外源基因残留检测用试剂盒,包括所述引物组。

[0120] 在本发明中,优选还包括qPCR检测用试剂,例如扩增缓冲液、增强缓冲液、dNTPs、SYBR green I、$MgSO_4$和Platinumpfx DNA聚合酶等。

[0121] 本发明提供了所述特异性DNA片段、所述引物、所述试剂盒在检测临床级hiPSC的外源基因残留中的应用。

[0122] 本发明提供了一种基于qPCR技术临床级hiPSC的外源基因残留的检测方法,包括以下步骤:

[0123] 1)筛选游离型载体载有的特异性DNA片段作为目的DNA;

[0124] 2)根据步骤1)中所述目的DNA设计引物;

[0125] 3)以步骤1)中所述游离型载体为质粒标准品,将hESC和所述质粒标准品按不同比例混合制备阳性梯度标准品;

[0126] 4)将待检测的hiPSC经细胞裂解,获得待测样品,将所述待测样品、阳性梯度标准品和引物进行qPCR检测,根据阳性梯度标准品的PCR的检测下限,对应待测样品中hiPSC产品的检测数值判断待测样品中hiPSC外源性基因残留限量。

[0127] 本发明对临床级hiPSC的种类没有特殊限制,采用本领域所熟知的临床级hiPSC即可。在本发明中,所述方法适用于CN201711462604.8、CN201810137319.7、CN201810252408.6、CN201810400878.2、CN202010313083.5专利中记载的hiPSC。本发明所述方法不仅适用于上述制备方法获得的hiPSC的检测,还适用于检测本领预其他方法获得hiPSC。不同代次的hiPSC实验表明,种子细胞库(seed)、主细胞库(Master cell bank/MCB)、工作细胞库(working cell Bank/WCB)均能够采用所述方法完成外源基因检测目的。

[0128] 在本发明中,按不同比例与hESC混合优选为以质粒拷贝数与细胞数量百分比混合。所述质粒拷贝数与细胞数量百分比优选为0.01%、0.1%、1%、10%和100%。

[0129] 为了达到检测临床级hiPSC的外源基因残留的目的,特异性DNA序列应为外源基因所特有,而临床级hiPSC不表达的特异DNA片段。在本发明提供的特异性DNA片段中,为重编程过程中使用的所有质粒共有的外源基因片段,所含的OriP截短片段和EBNA1截短片段的来源为疱疹病毒的序列,在hiPSC中是不表达的。

[0130] 在本发明中,所述细胞裂解时,所述蛋白酶K的浓度优选为1~50μg/ml,更优选为1~20μg/mL,最优选为1μg/mL。蛋白酶K为1~50μg/ml进行细胞裂解,检测灵敏度达到0.1%,当用1μg/mL蛋白酶K处理时效果最好。

[0131] 在本发明中,细胞裂解时,细胞密度优选为1.0×10^6~4.0×10^6个/10μl。所述细胞密度呈现梯度性好,且梯度间数据差别大,说明灵敏度差别大,灵敏度可以达到0.01%,数据稳定,且重复性好。虽然1.0×10^6~2.0×10^6个/10μl以及5.0×10^6~6.0×10^6个/10μl检测灵敏度均能达到0.1%,多次试验都不稳定。选取裂解1.0×10^6~$4.1.0\times10^6$个/10μl均可,优选3.0×10^6cells~4.0×10^6个/10μl。

[0132] 在本发明中,经过筛选,将EBNA1、OriP的DNA片段、SV40截短片段和质粒上细菌来源DNA片段中的一种或几种作为外源基因片段,来评估临床级hiPSC中外源基因残留情况。所述qPCR检测用引物为EBNA1-F/EBNA1-R和/或OriP-F/OriP-R。

[0133] 在本发明中,所述qPCR检测的反应体系优选如下:10×扩增缓冲液5%~35%、10

×增强缓冲液5%～45%、dNTPs 0.01%～10%、0.1～6mM $MgSO_4$ 0.1%～25%、(1.25～10)×SYBR green I 0.01%～2.5%、正向引物0.5%～10%、反向引物0.5%～10%、Platinumpfx DNA聚合酶0.01%～5.5%、模板DNA 5%～50%。其中SYBR green I、$MgSO_4$溶液浓度是影响检测结果的重要因素。所述SYBR green I的稀释倍数优选为10×、5×、2.5×和1.25×,均可达到1%的检测灵敏度,其中5×SYBR green I组数据较为稳定,组内重复孔重复性较好。$MgSO_4$溶液浓度为10mM以上时,影响酶催反应,灵敏度下降。0.1～6mM $MgSO_4$实现了检测灵敏度到0.1%,优选0.1～4mM $MgSO_4$实验稳定,重复性较好,更优选1.5mM $MgSO_4$。实验结果表明,5×SYBR green I和1.5mM $MgSO_4$为初选最佳组合方式。

[0134] 在本发明中,所述qPCR检测的反应程序优选如下:94℃5min;94℃15sec,58℃30sec,68℃30sec,35～55个循环;95℃10sec,65℃1min,97℃1min。qPCR的反应程序中循环数也是影响灵敏度的关键因素。45循环组数据呈现梯度性好,且梯度间数据差别大,说明灵敏度差别大,灵敏度可以达到0.01%;而35循环和40循环组,其检测结果灵敏度最高可达到0.1%,在0.01%时,也能达到,但是差别不明显;55循环和60循环检测灵敏度只能达到1%,因此45循环灵敏度最高,到达0.01%,而且每个梯度差异比较均匀,检测结果稳定。

[0135] 下面结合实施例对本发明提供的一种hiPSC中外源基因残留检测用特异性DNA片段、引物、试剂盒和检测方法。进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0136] 如本文所述的术语'DNA序列'是指编码蛋白的DNA序列,例如,但不限于,存在于细胞基因组中的编码蛋白的DNA序列。

[0137] 以下实施例中,其中本发明所述hiPSC为安徽中盛溯源生物科技有限公司制备的hiPSC,可参见CN201711462604.8;CN201810137319.7;CN201810252408.6;CN201810400878.2;CN202010313083.5。本发明所述方法不仅适用于上述制备方法获得的hiPSC,还适用于本领其他方法获得hiPSC。实施例中涉及的引物由南京金斯瑞生物公司合成,质粒来源于本公司制备。

[0138] 以下实施例中,涉及具体操作步骤等信息如有省略,其均可采用本领域常规操作或试剂均可,对于涉及的关键信息在文中进行表述。

[0139] 其中本申请中涉及人胚胎干细胞(hESC),人胚胎干细胞是未经过体内发育的受精14天以内的人类胚胎分离或者获取干细胞,以及是经过商业化获批的胚胎干细胞或干细胞。本申请中的人胚胎干细胞(hESC)是由安徽医院产科生产后抛弃的脐带为来源分离培养获得。

[0140] 实验中涉及的实验试剂信息如下表1所示

[0141] 表1本发明实施例中涉及的药品、试剂的来源说明

[0142]

材料	生产商	货号
DMEM/F-12	Thermo	C1133050 0BT
DPBS	Thermo	C1419050 0BT
待检 hiPSC	Nuwacell	N/A
Nova 培养基	Nuwacell	RP01001
UltraPure 0.5 M EDTA	Thermo	15575020
Solase 单细胞消化液	Nuwacell	RP01021
DPBS	Thermo	C1419050 0BT

[0143]

阳性质粒 pCEP4-EGFP	Nuwacell	N/A
Platinum® Pfx DNA Polymerase	Thermo	11708-039
PCRx Enhancer System	Thermo	11495017
10000 x SYBR Green I	Solarbio	SR4110-5 0μL
Triton X-100	Sigma	T9284
Nuclease-free Water	全式金	GI101-01

[0144] 实施例1

[0145] 阳性梯度标准品的制备方法

[0146] 采用培养hESC,待细胞密度达80％～90％时,吸弃培养基,加入DPBS(不含钙镁),吸弃DPBS,后加入Solase消化液消化细胞,后加入培养基重悬吸出细胞悬液至离心管中离心收集细胞,弃上清;收集细胞DPBS重悬后分装于EP管;EP管离心并加入Lysis buffer反复吹打裂解,后转移至PCR管中,漩涡振荡,用70～95℃静置5～15min;4℃保存,处理结束管内含絮状沉淀物,向管中加入蛋白酶K(Proteinase K,10μg/ml),漩涡振荡,用37℃静置30min;再70℃,静置10min;4℃保存,即可获得hESC裂解细胞样品,再将hESC裂解细胞样品和质粒样品进行梯度稀释配制成为阳性梯度标准品,具体制备方法见下表2所述:

[0147] 阳性梯度标准品配制,使用前混匀。

[0148] 取相应体积的hESC裂解细胞样品,如表2加入相应的质粒梯度标准品,制备阳性梯度标准品。

[0149] 表2.阳性梯度标准品

[0150]

样品	细胞	细胞数	裂解细胞体积(uL)	质粒数
#1-0	hESC	3×10^5	13	0
#2-0.01%	hESC	3×10^5	13	30
#3-0.1%	hESC	3×10^5	13	300
#4-1%	hESC	3×10^5	13	3000
#5-10%	hESC	3×10^5	13	3×10^4
#6-100%	hESC	3×10^5	13	3×10^5

[0151] 实施例2

[0152] 候选目的DNA序列筛选方法

[0153] 1、筛选候选目的DNA序列:以质粒pCEP4-EGFP为例,通过NCBI官方网址,检索质粒的DNA序列表达谱,筛选一系列DNA序列在质粒中高表达,hiPSC细胞不表达的DNA序列。并通过qPCR方法检测候选特异性DNA序列EBNA1-1、OriP-1、SV40截短片段在质粒表达水平。

[0154] 首先利用qPCR法,用设计好的引物分别扩增,反应体系见表3。

[0155] 表3 qPCR反应体系

[0156]

组分	体积百分比/PCR
10×扩增缓冲液	35%
10×增强缓冲液	15%
dNTPs	10%

[0157]

1.5mM $MgSO_4$	0.1%
5×SYBR green	1.5%
primer F2 上游引物	5%
primer R2 下游引物	5%
Platinum pfx DNA 聚合酶	1.5%
模板	26.9%

[0158] 所用引物见表4。

[0159] 表4设计引物序列表

[0160]

引物编号	引物名称	序列
引物 1	EBNA1-1-F	GGACACCATCTCTATGTCTT（SEQ ID NO:4）
	EBNA1-1-R	TATTCACTGAGCGTCGTCTA（SEQ ID NO:5）
引物 3	OriP-1-F	GTAGTAGAGTGGGAGTGCTA（SEQ ID NO:10）
	OriP-1-R	CTGTCTTGTCACCATTTTCG（SEQ ID NO:11）
引物 5	SV40-F	ATGGCTGATTATGATCCGGCTG（SEQ ID NO:16）
	SV40-R	TACAGACAAGCTGTGACCGTCT（SEQ ID NO:17）
引物 6	RPL13A-F	CACCTGCACTTATTCTTGGCAG（SEQ ID NO:25）
	RPL13A-R	TATTGGGCTCAGACCAGGAGTC（SEQ ID NO:26）

[0161] 使用商品化PCRx Enhancer System,外加SYBR green I进行qPCR,其他试剂为:型号为:厂家为Thermo:所有操作在冰上进行。反应体系为每孔10μl,具体反应体系配制如表3,每个样本设3个复孔,qPCR条件见表5。

[0162] 表5 qPCR的反应条件

[0163]

94℃ 5min	45×[94℃ 15sec，58℃20sec，68℃20sec]
降解	95℃5sec，65℃1min，97℃ 1min，降温 40℃ 30sec。

[0164] 记录CT值。

[0165] 根据上述qPCR反应体系及qPCR条件,通过qPCR检测结果Ct值见如表6所示。

[0166] 表6 qPCR检测结果Ct值

[0167]

序号	EBNA1-1-F /EBNA1-1-R	OriP-1-F/OriP -1-R	SV40-F/SV40-R	RPL13A-F/ RPL13A-R
#1-0	32.76	35.00	30.88	24.52
	32.24	35.00	30.73	24.62
	32.21	35.00	30.95	24.54
#2-0.01%	31.76	32.48	30.04	24.45
	29.63	32.44	30.45	24.43
	31.75	32.88	29.60	24.48
#3-0.1%	29.62	31.00	28.55	24.51
	29.23	31.92	27.64	24.50
	29.37	31.40	27.45	24.57
#4-1%	27.00	30.60	26.47	24.13
	27.32	29.16	26.91	24.07
	27.02	30.48	26.73	24.20

[0168]

#5-10%	26.44	27.27	25.92	24.31
	26.45	27.68	26.92	24.32
	26.56	27.90	25.88	24.43
#6-100%	23.02	23.30	23.73	24.20
	23.06	23.51	23.75	24.20
	23.00	23.54	23.76	24.17

[0169] 本次实验利用qPCR法,选择3种qPCR引物,其中EBNA1-1和数据比较分析:EBNA1-1检测数据从#1-#6,根据质粒梯度,数据呈现梯度性好,且梯度间数据差别大,说明灵敏度差别大;OriP-1同样筛选原则,最终根据实验结果筛选出EBNA-1、OriP-1和SV40截短片段对应的三种引物及DNA片段,其扩增结果较好,灵敏度达到0.1%(1000个细胞1copy DNA)或者0.01%(10000个细胞1copy DNA)。

[0170] 实施例3

[0171] SYBR green I稀释倍数的优化

[0172] 该实施例同上述实施例1和实施例2的方法及步骤,其中采用10×SYBR greenI、5×SYBR greenI、2.5×SYBR greenI、1.25×SYBR greenI、0.625×SYBR greenI、0.313×SYBR greenI、0.156×SYBR greenI的稀释倍数检测hiPSC残留基因灵敏度。选择5.5mM $MgSO_4$加入不同稀释倍数SYBR green I进行qPCR,筛选最佳稀释倍数的SYBR green I浓度。此实施例反应体系和反应程序见表9。

[0173] 表9 SYBR green I稀释倍数优化实验中反应体系和反应程序

[0174]

组分	体积百分比/PCR
10x 扩增缓冲液	20%
10x 增强缓冲液	20%
dNTPs	2.5%
5.5mM $MgSO_4$	15%
SYBR green I	0.1%
上游引物	10%
下游引物	10%
Platinum pfx DNA 聚合酶	0.5%
模板	21.9%
94℃ 5min	
55cycles [94℃: 15sec, 58℃: 30sec, 68℃: 30sec]	
Dissociation: 95℃ 10sec, 65℃ 1min, 97℃ 1min	
Cooling 40℃ 30sec。	

[0175] 通过qPCR检测结果见如表10所示。

[0176] 表10 SYBR green I不同稀释倍数下OriP-1的DNA序列qPCR检测结果

[0177]

	10×SYBR green I	5×SYBR green I	2.5×SYBR green I	1.25×SYBR green I	0.625×SYBR green I	0.313×SYBR green I	0.156×SYBR green I
#1-0	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00
	35.00	35.18	35.00	35.00	34.98	35.00	35.00
	35.00	35.39	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00
#2-0.01%	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00
	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00
	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00

[0178]

#3-0.1%	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00
	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00
	35.00	35.00	34.01	35.00	35.00	35.00	35.00
#4-1%	33.20	32.96	31.43	33.00	34.98	35.00	35.00
	32.11	32.73	32.05	32.28	34.00	35.00	35.00
	33.00	32.65	30.86	32.52	34.00	35.00	35.00
#5-10%	29.75	28.13	28.63	28.56	28.77	28.37	35.00
	29.48	28.29	28.29	29.08	28.49	28.61	35.00
	29.19	28.89	29.06	28.54	28.69	28.79	35.00
#6-100%	25.24	25.06	24.83	25.06	25.79	25.67	25.77
	25.33	24.98	24.92	24.99	25.63	25.14	25.67
	25.23	24.95	24.80	25.01	25.47	25.05	25.88

[0179] 根据qPCR结果,10×、5×、2.5×和1.25×SYBR green I浓度均可以检测到1%灵敏度(100个细胞1copy DNA),其中5×SYBR green I组数据较为稳定,组内重复孔重复性较好,最终筛选5×SYBR green I浓度。因此在实验中1.25×～10×的5×SYBR green I均可选用。

[0180] 实施例4

[0181] $MgSO_4$溶液浓度的优化

[0182] 该实施例同上述实施例1和实施例2的方法及步骤,其中采用0.1mM $MgSO_4$、0.5mM $MgSO_4$、1.5mM $MgSO_4$、2mM $MgSO_4$、4Mm $MgSO_4$、6mM $MgSO_4$、10mM $MgSO_4$溶液检测hiPSC残留基因

灵敏度。其中用5×SYBR green I加入不同浓度$MgSO_4$分别选择#1、#3和#6号三种样品分别进行qPCR,筛选最佳$MgSO_4$浓度。

[0183] 此实施例反应体系见表11。

[0184] 表11 $MgSO_4$溶液浓度的优化实验中反应体系和反应程序

[0185]

组分	体积百分比/PCR
10x 扩增缓冲液	20%
10x 增强缓冲液	30%
1dNTPs	6.5%
$MgSO_4$	10%
5X SYBR green	1 %
上游引物	10%
下游引物	10%
Platinum pfx DNA 聚合酶	1.5%
Template 模板	11%
94℃ 5min	
50 循环 [94℃: 15sec, 58℃: 30sec, 68℃: 30sec]	
降解: 95℃ 10sec, 65℃ 1min, 97℃ 1min	
冷却: 40℃ 30sec。	

[0186] 通过qPCR检测结果见如表8所示。

[0187] 表12不同浓度$MgSO_4$条件下OriP-1的DNA序列qPCR检测结果

[0188]

序号	0.1mM $MgSO_4$	0.5mM $MgSO_4$	1.5mM $MgSO_4$	2mM $MgSO_4$	4mM $MgSO_4$	6mM $MgSO_4$	10mM $MgSO_4$
#1-0	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00
	33.19	34.28	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00
	32.78	34.37	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00
#3-0.1%	31.99	31.57	31.26	32.12	32.45	33.64	35.00
	31.49	30.96	31.35	32.43	32.33	33.93	35.00
	31.99	31.70	31.06	32.23	32.87	32.71	35.00
#6-100%	22.03	22.05	22.06	23.30	23.63	23.30	34.10
	21.97	21.98	22.01	23.14	23.87	24.14	34.34
	21.97	22.04	22.10	23.18	23.98	23.18	34.28

[0189]

[0190] 根据qPCR结果,10mM以上$MgSO_4$浓度太高,影响酶催反应,灵敏度下降;0.1～6mM $MgSO_4$实现了检测灵敏度到0.1%,0.1～4mM $MgSO_4$实验稳定,重复性较好,再优选1.5mM $MgSO_4$。

[0191] 通过实施例3和实施例4实验结果可以筛选出最佳条件:5×SYBR green I和1.5mM

$MgSO_4$为初选最佳组合方式。

[0192] 实施例5

[0193] qPCR反应循环数的优化

[0194] 在上述实施例的基础上,该实施例同上述实施例1和实施例2的方法及步骤,其中qPCR实验中分别选用35、40、45、55、60循环检测hiPSC外源基因残留灵敏度。其中用5×SYBR green I和1.5mM $MgSO_4$为最佳组合方式分别对OriP-1片段进行qPCR,筛选最佳qPCR循环数。

[0195] 此实施例反应体系见表13。

[0196] 表13 qPCR反应循环数优化实验反应体系和反应程序

[0197]

组分	体积百分比/PCR
10×扩增缓冲液	15%
10×增强缓冲液	20%
dNTPs	4.5%
$MgSO_4$	10%
SYBR green	0.5%
primer F2 上游引物	7%
primer R2 下游引物	7%
Platinum pfx DNA 聚合酶	1.5%
模板	34.5%
94℃ 5min	
35/40/45/55/60cycles [94℃：15sec，58℃：30sec，68℃：30sec]	
降解：95℃ 10sec，65℃ 1min，97℃ 1min	
冷却：40℃ 30sec。	

[0198] 通过qPCR检测OriP-1的DNA序列结果见如表14所示。

[0199] 表14 qPCR检测OriP-1的DNA序列结果

[0200]

	OriP				
	35cycles	40cycles	45cycles	55cycles	60cycles
#1-0	34.79	34.99	50.00	50.00	60.00
	34.14	35.51	50.00	50.00	60.00
	33.46	36.17	50.00	50.00	60.00
#2-0.01%	32.26	34.83	42.87	50.00	60.00
	32.87	33.36	40.03	50.00	60.00
	33.57	35.88	40.54	50.00	60.00
#3-0.1%	31.82	32.49	35.11	50.00	60.00
	32.84	32.63	34.91	50.00	60.00
	32.83	32.55	35.06	50.00	60.00
#4-1%	27.49	28.70	32.23	41.52	55.00
	27.44	28.74	31.67	42.24	53.55
	27.36	28.56	31.68	42.65	55.45
#5-10%	24.25	24.84	27.04	38.13	45.90
	24.15	24.87	27.26	38.47	46.87
	24.20	24.67	27.11	38.06	47.51
#6-100%	21.34	21.98	23.87	32.35	39.14
	21.31	21.90	23.57	32.30	39.55
	21.29	21.92	23.74	32.09	38.79

[0201] 根据qPCR结果:从#1-#6,根据质粒梯度,45循环组数据呈现梯度性好,且梯度间数据差别大,说明灵敏度差别大,灵敏度可以达到0.01%;而35循环和40循环组,其检测结果灵敏度最高可达到0.1%,在0.01%时,也能达到,但是差别不明显;55循环和60循环检测灵敏度只能达到1%,因此45循环灵敏度最高,到达0.01%,而且每个梯度差异比较均匀,检测结果稳定。因此35-55循环均可选用,优选35-45循环,更优选45循环。

[0202] 实施例6

[0203] 裂解不同细胞数量的优化

[0204] 在上述实施例的基础上,该实施例同上述实施例1和实施例2的方法及步骤,其中qPCR实验中分别裂解不同细胞数量的hESC,作为模板以检测hiPSC外源基因残留灵敏度。其中用5×SYBR green I和1.5mM $MgSO_4$为最佳组合方式分别选择#1、#2、#3、#4号样品分别进行qPCR,筛选最佳细胞裂解数量以进行qPCR检测。其中以10ul体系或20ul体系进行优化不同细胞数量。

[0205] 此实施例反应体系见表15。

[0206] 表15裂解不同细胞数量优化实验反应体系和反应程序

[0207]

组分	体积百分比/PCR
10×扩增缓冲液	20%
10×增强缓冲液	30%
dNTPs	6.5%
$MgSO_4$	10%
5×SYBR green	1 %

[0208]

上游引物	10%
下游引物	10%
Platinum pfx DNA 聚合酶	1.5%
模板	11%
94℃ 5min	
50 循环 [94℃: 15sec, 58℃: 30sec, 68℃: 30sec]	
降解: 95℃ 10sec, 65℃ 1min, 97℃ 1min	
冷却: 40℃ 30sec。	

[0209] 检测细胞裂解不同数量时,通过qPCR检测,OriP-1的DNA序列结果如表16所示。

[0210] 表16裂解不同数量细胞检测结果

[0211]

序号	裂解不同数量细胞（×10^6cells）				
	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
	OriP F1/R1	OriP F1/R1	OriP F1/R1	OriP F1/R1	OriP F1/R1
#1-0	39.57	45.00	42.67	40.25	36.93
	41.42	45.00	42.32	39.52	38.68
	41.02	44.49	41.14	39.40	36.93
#2-0.01%	41.24	45.00	40.95	37.30	36.26
	41.88	42.56	39.67	38.34	37.70
	41.05	43.13	37.65	36.53	36.63
#3-0.1%	38.62	36.30	35.20	33.91	33.97
	38.66	37.21	35.15	33.77	35.31
	39.61	37.15	35.48	33.43	35.27
#4-1%	38.35	35.91	31.64	29.58	28.91
	35.24	36.98	32.33	29.26	28.88
	34.15	35.64	31.21	29.62	28.95

[0212] 结果:从#1-#6,根据质粒梯度,3.0×10^6cells组和4.0×10^6cells数据呈现梯度性好,且梯度间数据差别大,说明灵敏度差别大,灵敏度可以达到0.01%,多次试验0.1%均可达到,数据稳定,且重复性好。而1.0×10^6cells和2.0×10^6cells组,其检测结果灵敏度最高可达到0.1%;5.0×10^6cells组检测灵敏度也能达到0.1%,但是多次试验都不稳定,因此选取裂解1.0×10^6cells～4.0×10^6cells均可,优选3.0×10^6cells～4.0×10^6cells。

[0213] 实施例7

[0214] 不同浓度蛋白酶K处理样品

[0215] 在上述实施例的基础上,该实施例同上述实施例1和实施例2的方法及步骤,当裂解细胞(hESC或者hiPSC)获得模板时加入不同浓度的蛋白酶K对qPCR检测存在重要影响,以筛选最佳蛋白酶K使用浓度,更稳定、精确检测hiPSC中的外源基因残留检测,其中用5×SYBR green I和1.5mM $MgSO_4$为最佳组合方式分别进行qPCR,筛选最佳浓度蛋白酶k进行qPCR检测。此实施例反应体系见表17。

[0216] 表17不同浓度蛋白酶K处理样品实验反应体系和反应程序

[0217]

组分	体积百分比/PCR
10×扩增缓冲液	15%
10×增强缓冲液	25%
dNTPs	8%

[0218]

$MgSO_4$	10%
SYBR green I	0.5%
上游引物	6%
下游引物	6%
Platinum pfx DNA 聚合酶	0.5%
模板	29%
94℃ 5min	
45cycles [94℃: 15sec, 58℃: 30sec, 68℃: 30sec]	
降解: 95℃ 10sec, 65℃ 1min, 97℃ 1min	
冷却: 40℃ 30sec。	

[0219] 通过qPCR检测,OriP的DNA序列结果见如表18所示。

[0220] 表18不同浓度的蛋白酶K处理样品检测结果

[0221]

序号	0μg/mL	1μg/mL	10μg/mL	20μg/mL	50μg/mL
#1-0	37.70	50.00	50.00	50.00	50.00
	36.75	50.00	50.00	50.00	50.00
	39.66	50.00	50.00	50.00	50.00
#2-0.01%	36.53	38.50	41.57	45.00	50.00
	35.68	39.52	45.00	45.00	50.00
	36.30	39.82	40.62	45.00	50.00
#3-0.1%	35.26	34.54	37.59	41.03	44.03
	34.35	34.63	38.04	41.17	45.00
	33.05	36.29	37.82	40.58	45.00
#4-1%	29.21	31.00	33.89	36.32	38.34
	29.37	31.24	33.82	36.37	37.86
	28.95	31.36	33.89	36.76	39.71
#5-10%	25.79	27.54	28.99	32.31	33.84
	25.79	27.51	29.34	31.90	33.61
	25.85	27.54	28.82	32.22	33.52
#6-100%	22.28	23.02	23.75	26.12	27.74
	22.29	23.00	23.86	25.81	27.62
	22.32	23.24	23.72	25.94	27.55

[0222] qPCR结果:从#1-#6,根据质粒梯度,每列组别的实验数据分析:1-50μg/ml蛋白酶K检测数据在相应列中显示,均可选用,且灵敏度均能达到0.1%;1～20μg/ml蛋白酶K检测数据在相应列中显示,均可选用,且灵敏度均能达到0.01%,当用1ug/mL蛋白酶K处理模板效果最好,qPCR结果数据稳定且存在良好梯度差异,标准品组间梯度明显,可以有效保护标准品中低拷贝DNA浓度,防止细胞中DNA酶降解添加的外源DNA,同时保护iPSC中低拷贝外源DNA浓度。

[0223] 实施例8

[0224] 质粒序列中EBNA1的DNA序列随机截取片段进行hiPSC外源基因残留检测

[0225] 随机截取质粒序列中EBNA1序列片段区的DNA序列,序列如下EBNA1-2,序列如下:

[0226] CTGGTCCAGATGTGTCTCCCTTCTCTCCTAGGCCATTTCCAGGTCCTGTACCTGGCCCCTCGTCAGACATGATTCACACTAAAAGAGATCAATAGACATCTTTATTAGACGACGCTCAGTGAATACAGGGAGTGCAGACTCCTGCCCCCTCCAACAGCCCCCCCACCCTCATCCCCTTCATGGTCGCTGTCAGACAGATCCAGGTCTGAAAATTCCCCAT

CCTCCGAACCATCCTCGTCCTCATCACCAATTACTCGCAGCCCGGAAAAC(SEQ ID NO:19,)。

[0227] 同时随机截取质粒序列中EBNA1序列片段区的DNA序列,序列如下EBNA1-3,序列如下:

[0228] CTCTATGTCTTGGCCCTGATCCTGAGCCGCCCGGGGCTCCTGGTCTTCCGCCTCCTCGTCCTCGTCCTCTTCCCCGTCCTCGTCCATGGTTATCACCCCCTCTTCTTTGAGGTCCACTGCCGCCGGAGCCTTCTGGTCCAGATGTGTCTCCCTTCTCTCCTAGGCCATTTCCAGGTCCTGTACCTGGCCCCTCGTCAGACATGATTCACACTAAAAGAGATCAATAGACATCTTTATTAGACGACGCTCAGTGAATACAGGGAGTGCAGACTCCTGCCCCCTCCAACAGCCCCCCCACCCTCAT(SEQ ID NO:20)。

[0229] 将上述EBNA1-2扩增序列和EBNA1-3扩增序列进行hiPSC中外源基因残留检测,针对该序列设计引物;设计引物序列如下表19,内参及引物同上述实施例2。

[0230] 表19引物序列表

[0231]

引物名称	序列
EBNA1-2-F	CTGGTCCAGATGTGTCTCC(SEQ ID NO:6)
EBNA1-2-R	GTTTTCCGGGCTGCGAGTAAT(SEQ ID NO:7)
EBNA1-3-F	CTCTATGTCTTGGCCCTGAT(SEQ ID NO:8)
EBNA1-3-R	ATGAGGGTGGGGGGGCTGTTG(SEQ ID NO:9)

[0232] 在以上实施例1-实施例7的基础上选择各组分或条件优选使用浓度或范围,进行qPCR检测,具体见表20。其中用5×SYBR green I、1.5mM $MgSO_4$、1μg/mL蛋白酶K处理模板、3.0×10^6～4.0×10^6细胞裂解密度、qPCR 45循环数为最佳组合方式,分别选择#1、#2、#3、#4号样品分别进行qPCR。

[0233] 表20反应体系和反应程序

[0234]

组分	体积百分比/PCR
10×扩增缓冲液	8%
10×增强缓冲液	25%
dNTPs	8%
$MgSO_4$	15%
SYBR green I	0.25%
上游引物	4.5%
下游引物	4.5%
Platinum pfx DNA 聚合酶	1.5%
模板	33.25%
94℃ 5min	
45cycles [94℃: 15sec, 58℃: 30sec, 68℃: 30sec]	
降解: 95℃ 10sec, 65℃ 1min, 97℃ 1 分钟	
冷却: 40℃ 30sec。	

[0235] 随机截取EBNA1的DNA序列的片段进行hiPSC外源基因残留检测,通过qPCR检测,EBNA1的DNA序列的片段检测结果如表21所示。

[0236] 表21 EBNA1的DNA序列的片段qPCR检测结果

[0237]

序号	不同序列片段的引物		
	EBNA1-	EBNA1-	内参

[0238]

	2	3	RPL13A
#1-0	33.57	33.51	24.35
	33.42	34.00	24.42
	33.02	34.29	24.56
#2-0.01%	31.44	31.00	24.51
	31.68	32.56	24.53
	32.05	31.13	24.49
#3-0.1%	28.52	28.30	24.31
	28.63	28.91	24.40
	27.69	27.75	24.51
#4-1%	25.35	25.11	24.33
	24.24	24.83	24.27
	25.15	24.74	24.52

[0239] qPCR结果:从#1-#4,根据质粒梯度,每列组别的实验数据分析:DNA序列EBNA1-2或EBNA1-3,在质粒梯度情况下,qPCR结果均存在梯度差异,且每列梯度差异均较为明显,梯度灵敏度对应均可达到0.1%(相比较于#1-0的结果,#3-0.1%的结果差别大于2,可视为有效梯度检测),且有的组的检测结果灵敏度可以达到0.01%。说明随意截取的EBNA1序列片段区的DNA序列的片段均可用于hiPSC外源基因残留检测。

[0240] 实施例9

[0241] 质粒序列中OriP的DNA序列中随机截取片段进行hiPSC外源基因残留检测

[0242] 随机截取质粒序列中OriP序列片段区的DNA序列,如下OriP-2,具体序列如下:TATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTCATGCATATACAGTCAGCATATGATACCCAGTAGTAGAGTGGGAGTGCTATCCTTTGCATATGCCGCCACCTCCCAAGGGGGCGTGAATTTTCGCTGCTTGTCCTTTTCCTGCTGGTTGCTCCCATTCTTAGGTGAATTTAAGGAGGCCAGGCTAAAGCCGTCGCATGTCTGATTGCT(SEQ IDNO:22,)。

[0243] 随机截取质粒序列中OriP序列片段区的DNA序列如下OriP-3,具体序列如下:

[0244] CTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTCATGCATATACAGTCAGCATATGATACCCAGTAGTAGAGTGGGAGTGCTATCCTTTGCATATGCCGCCACCTCCCAAGGGGGCGTGAATTTTCGCTGCTTGTCCTTTTCCTGCTGGTTGCTCCCATTCTTAGGTGAATTTAAGGAGGCCAGGCTAAAGCCGTCGCATGTCTGATTGCTCACCAGGTAAATGTCGCTAATGTTTTCCAACGCGAGAAGGTGT(SEQ ID NO:23)。

[0245] 基于上述OriP-2扩增序列和OriP-3扩增序列进行hiPSC中外源基因残留检测,针对该序列设计引物;设计引物序列如下表22,内参及引物同上述实施例2。

[0246] 表22引物序列表

[0247]

引物名称	序列
OriP-2-F	TATGCTATCCTAATTTATATC (SEQ ID NO:12)
OriP-2-R	AGCAATCAGACATGCGACGGC (SEQ ID NO:13)
OriP-3-F	CTGGGTAGTATATGCTATC (SEQ ID NO:14)

[0248]

OriP-3-R	ACACCTTCTCGCGTTGGAAAAC (SEQ ID NO:15)

[0249] 在以上实施例1-实施例7的基础上选择各组分或条件优选使用浓度或范围,进行qPCR检测,具体见表23。其中用5×SYBR green I、1.5mM $MgSO_4$、1μg/mL蛋白酶K处理模板、3.0×10^6～4.0×10^6细胞裂解密度、qPCR 45循环数为最佳组合方式,分别选择#1、#2、#3、#4号样品分别进行qPCR。

[0250] 表23 qPCR检测的反应体系和反应程序

[0251]

组分	体积百分比/PCR
10x 扩增缓冲液	10%
10x 增强缓冲液	25%
dNTPs	8%
$MgSO_4$	15%
SYBR green I	0.25%
上游引物	4.5%
下游引物	4.5%
Platinum pfx DNA 聚合酶	1.5%
模板	33.25%
94℃ 5min	
45cycles [94℃：15sec，58℃：30sec，68℃：30sec]	
降解:95℃ 10sec，65℃ 1min，97℃ 1 分钟	
冷却：40℃ 30sec。	

[0252] 随机截取OriP的DNA序列的片段进行hiPSC外源基因残留检测,通过qPCR检测,OriP的DNA序列的片段检测结果如表24所示。

[0253] 表24 OriP的DNA序列的片段qPCR检测结果

[0254]

序号	不同序列片段的引物		
	OriP-2	OriP-3	内参
			RPL13A
#1-0	34.67	35.51	24.37
	34.56	34.90	24.48
	33.82	34.92	24.46
#2-0.01%	31.84	31.33	24.51
	31.81	3156	24.43
	32.05	31.42	24.61
#3-0.1%	28.42	28.30	24.47
	28.33	28.68	24.42
	28.71	28.65	24.71
#4-1%	25.44	25.23	24.53
	25.56	25.63	24.67
	25.45	25.61	24.42

[0255] qPCR结果:从#1-#4,根据质粒梯度,每列组别的实验数据分析:DNA序列OriP-2或OriP-3,在质粒梯度情况下,qPCR结果均存在梯度差异,且每列梯度差异均较为明显,梯度灵敏度对应均可达到0.1%(相比较于#1-0的结果,#3-0.1%的结果差别大于2,可视为有效梯度检测),且有的列组的检测结果灵敏度可以达到0.01%。说明随意截取的OriP序列片段区的DNA序列的片段均可用于hiPSC外源基因残留检测。

[0256] 实施例10

[0257] 不同代次的hiPSC中外源基因残留检测

[0258] 选用3种不同代次的hiPSC为待测细胞样品,采用上述实施例中筛选目的DNA序列(OriP DNA序列和EBNA1 DNA序列)检测方法检测hiPSC中外源基因残留量。其中选用的hiPSC为种子细胞库(seed)、主细胞库(Master cell bank/MCB)、工作细胞库(working cell Bank/WCB)。上述种子细胞库为原代分化细胞,为P10代次;主细胞库为P15代细胞;工作细胞库为P20代细胞。从上述细胞库中分别选取相应代次细胞,检测不同细胞库中外源基因残留情况。在以上实施例的基础上选择各组分优选使用浓度及范围,进行qPCR检测,具体见表25。其中用5×SYBR green I、1.5mM $MgSO_4$、1μg/mL蛋白酶K处理模板、3.0×10^6～4.0×10^6细胞裂解密度、qPCR 45循环数为最佳组合方式。

[0259] 表25不同代次的hiPSC中外源基因残留检测结果

[0260]

组分	体积百分比/PCR
10×扩增缓冲液	15%
10×增强缓冲液	25%
dNTPs	8%
$MgSO_4$	10%
SYBR green I	0.5%
上游引物	6%
下游引物	6%
Platinum pfx DNA 聚合酶	0.5%
模板	29%
94℃ 5min	
45cycles [94℃: 15sec, 58℃: 30sec, 68℃: 30sec]	
降解: 95℃ 10sec, 65℃ 1min, 97℃ 1min	
冷却: 40℃ 30sec。	

[0261] 通过qPCR检测,OriP-1和EBNA1-1的DNA序列结果见如表26所示。

[0262] 表26OriP-1和EBNA1-1的DNA序列的检测结果Ct值

[0263]

序号	OriP-1	EBNA1-1	RPL13A
#1-0	35.14	34.56	23.57
	35.60	34.61	23.64
	35.50	35.08	23.53
#2-0.01%	32.46	32.75	23.50
	32.67	32.28	23.55
	32.22	32.64	23.53
#3-0.1%	29.51	29.56	23.56
	29.32	30.21	23.58
	29.36	30.19	23.59
#4-1%	25.98	25.67	23.66
	25.84	26.34	23.82
	25.77	25.77	23.79
#5-10%	22.54	22.43	23.748
	22.61	22.81	23.82
	22.72	23.45	23.73

[0264]

#6-100%	19.32	20.12	23.64
	19.38	19.64	23.75
	19.39	20.33	23.73
Seed	30.56	30.89	24.27
	30.46	31.43	24.13
	31.02	31.92	24.02
MCB	32.00	32.73	20.79
	32.52	32.28	20.72
	32.04	32.17	20.66
WCB	32.46	32.52	21.49
	32.64	33.83	21.59
	33.47	32.74	21.49

[0265] 由结果可看出,采用本申请的检测方法,通过q-PCR方法检测,从#1-#6,根据质粒梯度,每列组别的实验数据分析:标准品数据稳定且存在良好梯度差异,Seed、MCB、WCB样品检测数据可达到灵敏度0.01%～0.1%之间,OriP或EBNA1序列,均可实现hiPSC中外源基因残留量检测,且限度稳定达到0.1%,MCB和WCB组灵敏度可达到0.01%,该方法稳定,简单。

[0266] 实施例11

[0267] 游离型质粒nEP4-E-EGFP、PMEP4-C-EGFP和PKEP4-E-EGFP分别重编程制备hiPSC,hiPSC外源基因残留检测

[0268] 使用上述实施例2-实施例3中OriP-1的扩增序列及其引物检测由游离型质粒载体nEP4-E-EGFP、PMEP4-C-EGFP和PKEP4-E-EGFP重编程制备hiPSC中的外源基因残留。

[0269] 在以上实施例的基础上选择各组分优选使用浓度及范围,进行qPCR检测,具体见表26反应体系。其中用5×SYBR green I、1.5mM $MgSO_4$、1μg/mL蛋白酶K处理模板、3.0×10^6～4.0×10^6细胞裂解密度、qPCR45循环数为最佳组合方式。

[0270] 表26 qPCR反应体系

[0271]

组分	体积百分比/PCR
10x 扩增缓冲液	15%
10x 增强缓冲液	25%
dNTPs	8%
$MgSO_4$	10%
SYBR green I	0.5%
上游引物	6%
下游引物	6%
Platinum pfx DNA 聚合酶	0.5%
模板	29%
94℃ 5min	
45cycles [94℃：15sec，58℃：30sec，68℃：30sec]	
降解: 95℃ 10sec，65℃ 1min，97℃ 1min	
冷却：40℃ 30sec。	

[0272] 通过qPCR检测,OriP-1的DNA序列结果见如表27所示。

[0273] 表27 OriP-1的DNA序列结果Ct值

[0274]

序号	OriP-1	RPL13A

[0275]

#1-0	31.59	23.08
	31.23	23.07
	31.57	23.08
#2-0.01%	30.99	22.93
	30.99	22.88
	30.9	22.91
#3-0.1%	28.69	22.95
	28.76	23.01
	28.88	22.98
#4-1%	26.84	22.97
	26.75	22.96
	26.95	22.98
#5-10%	23.34	23.02
	23.27	23.05
	23.35	23.04
#6-100%	19.94	23.07
	19.91	23.04
	19.88	23.08
nEP4-E-EGFP 制备 hiPSC	30.8	23.46
	30.59	23.46
	30.88	23.47
PMEP4-C-EGFP 制备 hiPSC	31.61	22.84
	31.89	22.83
	31.09	22.86
PKEP4-E-EGFP 制备 hiPSC	30.68	23.16
	30.89	23.14
	31.32	23.12

[0276] 由结果可看出,采用本申请的检测方法,通过q-PCR方法检测,从#1-#6,根据质粒梯度,每组别的实验数据分析:标准品数据稳定且存在良好梯度差异,游离型质粒nEP4-E-EGFP、PMEP4-C-EGFP和PKEP4-E-EGFP分别重编程制备hiPSC样品检测数据可达到灵敏度0.01%～0.1%之间,本申请设计方法及序列、引物等,均可实现hiPSC中外源基因残留量检测,且限度稳定达到0.1%,更高可达到0.01%,该方法稳定,简单。

[0277] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

[0001] 序列表

[0002] <110> 安徽中盛溯源生物科技有限公司

[0003] <120> 一种hiPSC中外源基因残留检测用特异性DNA片段、引物、试剂盒和检测方法

[0004] <160> 27

[0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0

[0006] <210> 1

[0007] <211> 420

[0008] <212> DNA

[0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0010] <400> 1

[0011] cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac aactagaatg cagtgaaaaa 60

[0012] aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca 120

[0013] ataaacaagt taacaacaac aattgcattc attttatgtt tcaggttcag ggggaggtgt 180

[0014] gggaggtttt ttaaagcaag taaaacctct acaaatgtgg tatggctgat tatgatccgg 240

[0015] ctgcctcgcg cgtttcggtg atgacggtga aaacctctga cacatgcagc tcccggagac 300

[0016] ggtcacagct tgtctgtaag cggatgccgg gagcagacaa gcccgtcagg cgtcagcggg 360

[0017] tgttggcggg tgtcggggcg cagccatgag gtcgatcgac tctagctaga ggatcgatgc 420

[0018] <210> 2

[0019] <211> 2318

[0020] <212> DNA

[0021] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0022] <400> 2

[0023] tcactcctgc ccttcctcac cctcatctcc atcacctcct tcatctccgt catctccgtc 60

[0024] atcaccctcc gcggcagccc cttccaccat aggtggaaac cagggaggca aatctactcc 120

[0025] atcgtcaaag ctgcacacag tcaccctgat attgcaggta ggagcgggct ttgtcataac 180

[0026] aaggtcctta atcgcatcct tcaaaacctc agcaaatata tgagtttgta aaaagaccat 240

[0027] gaaataacag acaatggact cccttagcgg gccaggttgt gggccgggtc caggggccat 300

[0028] tccaaagggg agacgactca atggtgtaag acgacattgt ggaatagcaa gggcagttcc 360

[0029] tcgccttagg ttgtaaaggg aggtcttact acctccatat acgaacacac cggcgaccca 420

[0030] agttccttcg tcggtagtcc tttctacgtg actcctagcc aggagagctc ttaaaccttc 480

[0031] tgcaatgttc tcaaatttcg ggttggaacc tccttgacca cgatgctttc caaaccaccc 540

[0032] tccttttttg cgcctgcctc catcaccctg accccggggt ccagtgcttg ggccttctcc 600

[0033] tgggtcatct gcggggccct gctctatcgc tcccgggggc acgtcaggct caccatctgg 660

[0034] gccaccttct tggtggtatt caaaataatc ggcttcccct acagggtgga aaaatggcct 720

[0035] tctacctgga gggggcctgc gcggtggaga cccggatgat gatgactgac tactgggact 780

[0036] cctgggcctc ttttctccac gtccacgacc tctccccctg gctctttcac gacttccccc 840

[0037] cctggctctt tcacgtcctc taccccggcg gcctccacta cctcctcgac cccggcctcc 900

[0038] actacctcct cgaccccggc ctccactgcc tcctcgaccc cggcctccac ctcctgctcc 960

[0039] tgcccctcct gctcctgccc ctcctcctgc tcctgccccc cctgcccctc ctgctcctgc 1020

[0040] ccctcctgcc cctcctgctc ctgccccctcc tgcccctcct gctcctgccc ctcctgcccc 1080

[0041] tcctcctgct cctgccccctc ctgccccctcc tcctgctcct gcccctcctg cccctcctgc 1140

[0042] tcctgcccct cctgcccctc ctgctcctgc ccctcctgcc cctcctgctc ctgcccctcc 1200
[0043] tgctcctgcc cctcctgctc ctgcccctcc tgctcctgcc cctcctgccc ctcctgcccc 1260
[0044] tcctcctgct cctgcccctc ctgctcctgc ccctcctgcc cctcctgccc ctcctgctcc 1320
[0045] tgcccctcct cctgctcctg cccctcctgc ccctcctgcc cctcctcctg ctcctgcccc 1380
[0046] tcctgcccct cctcctgctc ctgcccctcc tcctgctcct gcccctcctg cccctcctgc 1440
[0047] ccctcctcct gctcctgccc ctcctgcccc tcctcctgct cctgcccctc ctcctgctcc 1500
[0048] tgcccctcct gcccctcctg cccctcctcc tgctcctgcc cctcctcctg ctcctgcccc 1560
[0049] tcctgcccct cctgcccctc ctgcccctcc tcctgctcct gcccctcctc ctgctcctgc 1620
[0050] ccctcctgct cctgcccctc ccgctcctgc tcctgctcct gttccaccgt gggtcccttt 1680
[0051] gcagccaatg caacttggac gtttttgggg tctccggaca ccatctctat gtcttggccc 1740
[0052] tgatcctgag ccgcccgggg ctcctggtct tccgcctcct cgtcctcgtc ctcttccccg 1800
[0053] tcctcgtcca tggttatcac cccctcttct ttgaggtcca ctgccgccgg agccttctgg 1860
[0054] tccagatgtg tctcccttct ctcctaggcc atttccaggt cctgtacctg gcccctcgtc 1920
[0055] agacatgatt cacactaaaa gagatcaata gacatcttta ttagacgacg ctcagtgaat 1980
[0056] acagggagtg cagactcctg ccccctccaa cagccccccc accctcatcc ccttcatggt 2040
[0057] cgctgtcaga cagatccagg tctgaaaatt ccccatcctc cgaaccatcc tcgtcctcat 2100
[0058] caccaattac tcgcagcccg gaaaactccc gctgaacatc ctcaagattt gcgtcctgag 2160
[0059] cctcaagcca ggcctcaaat tcctcgtccc ccttttttgct ggacggtagg gatggggatt 2220
[0060] ctcgggaccc ctcctcttcc tcttcaaggt caccagacag agatgctact ggggcaacgg 2280
[0061] aagaaaagct gggtgcggcc tgtgaggatc agcttatc 2318
[0062] <210> 3
[0063] <211> 2532
[0064] <212> DNA
[0065] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0066] <400> 3
[0067] cccgccccgg acgaactaaa cctgactacg acatctctgc cccttcttcg cggggcagtg 60
[0068] catgtaatcc cttcagttgg ttggtacaac ttgccaactg ggccctgttc cacatgtgac 120
[0069] acgggggggg accaaacaca aaggggttct ctgactgtag ttgacatcct tataaatgga 180
[0070] tgtgcacatt tgccaacact gagtggcttt catcctggag cagactttgc agtctgtgga 240
[0071] ctgcaacaca acattgcctt tatgtgtaac tcttggctga agctcttaca ccaatgctgg 300
[0072] gggacatgta cctcccaggg gcccaggaag actacgggag gctacaccaa cgtcaatcag 360
[0073] aggggcctgt gtagctaccg ataagcggac cctcaagagg gcattagcaa tagtgtttat 420
[0074] aaggcccccc tgttaaccct aaacgggtag catatgcttc ccgggtagta gtatatacta 480
[0075] tccagactaa ccctaattca atagcatatg ttacccaacg ggaagcatat gctatcgaat 540
[0076] tagggttagt aaaagggtcc taaggaacag cgatatctcc caccccatga gctgtcacgg 600
[0077] ttttatttac atggggtcag gattccacga gggtagtgaa ccattttagt cacaagggca 660
[0078] gtggctgaag atcaaggagc gggcagtgaa ctctcctgaa tcttcgcctg cttcttcatt 720
[0079] ctccttcgtt tagctaatag aataactgct gagttgtgaa cagtaaggtg tatgtgaggt 780
[0080] gctcgaaaac aaggtttcag gtgacgcccc cagaataaaa tttggacggg gggttcagtg 840
[0081] gtggcattgt gctatgacac caatataacc ctcacaaacc ccttgggcaa taaatactag 900
[0082] tgtaggaatg aaacattctg aatatcttta acaatagaaa tccatggggt ggggacaagc 960
[0083] cgtaaagact ggatgtccat ctcacacgaa tttatggcta tgggcaacac ataatcctag 1020

[0084] tgcaatatga tactggggtt attaagatgt gtcccaggca gggaccaaga caggtgaacc 1080

[0085] atgttgttac actctatttg taacaagggg aaagagagtg gacgccgaca gcagcggact 1140

[0086] ccactggttg tctctaacac ccccgaaaat taaacggggc tccacgccaa tggggcccat 1200

[0087] aaacaaagac aagtggccac tctttttttt gaaattgtgg agtgggggca cgcgtcagcc 1260

[0088] cccacacgcc gccctgcggt tttggactgt aaaataaggg tgtaataact tggctgattg 1320

[0089] taaccccgct aaccactgcg gtcaaaccac ttgcccacaa aaccactaat ggcaccccgg 1380

[0090] ggaatacctg cataagtagg tgggcgggcc aagatagggg cgcgattgct gcgatctgga 1440

[0091] ggacaaatta cacacacttg cgcctgagcg ccaagcacag ggttgttggt cctcatattc 1500

[0092] acgaggtcgc tgagagcacg gtgggctaat gttgccatgg gtagcatata ctacccaaat 1560

[0093] atctggatag catatgctat cctaatctat atctgggtag cataggctat cctaatctat 1620

[0094] atctgggtag catatgctat cctaatctat atctgggtag tatatgctat cctaatttat 1680

[0095] atctgggtag cataggctat cctaatctat atctgggtag catatgctat cctaatctat 1740

[0096] atctgggtag tatatgctat cctaatctgt atccgggtag catatgctat cctaatagag 1800

[0097] attagggtag tatatgctat cctaatttat atctgggtag catatactac ccaaatatct 1860

[0098] ggatagcata tgctatccta atctatatct gggtagcata tgctatccta atctatatct 1920

[0099] gggtagcata ggctatccta atctatatct gggtagcata tgctatccta atctatatct 1980

[0100] gggtagtata tgctatccta atttatatct gggtagcata ggctatccta atctatatct 2040

[0101] gggtagcata tgctatccta atctatatct gggtagtata tgctatccta atctgtatcc 2100

[0102] gggtagcata tgctatcctc atgcatatac agtcagcata tgatacccag tagtagagtg 2160

[0103] ggagtgctat cctttgcata tgccgccacc tcccaagggg gcgtgaattt tcgctgcttg 2220

[0104] tccttttcct gctggttgct cccattctta ggtgaattta aggaggccag gctaaagccg 2280

[0105] tcgcatgtct gattgctcac caggtaaatg tcgctaatgt tttccaacgc gagaaggtgt 2340

[0106] tgagcgcgga gctgagtgac gtgacaacat gggtatgccc aattgcccca tgttgggagg 2400

[0107] acgaaaatgg tgacaagaca gatggccaga aatacaccaa cagcacgcat gatgtctact 2460

[0108] ggggatttat tctttagtgc gggggaatac acggctttta atacgattga gggcgtctcc 2520

[0109] taacaagtta ca 2532

[0110] <210> 4

[0111] <211> 20

[0112] <212> DNA

[0113] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0114] <400> 4

[0115] ggacaccatc tctatgtctt 20

[0116] <210> 5

[0117] <211> 20

[0118] <212> DNA

[0119] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0120] <400> 5

[0121] tattcactga gcgtcgtcta 20

[0122] <210> 6

[0123] <211> 19

[0124] <212> DNA

[0125] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0126] <400> 6

[0127] ctggtccaga tgtgtctcc 19

[0128] <210> 7

[0129] <211> 21

[0130] <212> DNA

[0131] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0132] <400> 7

[0133] gttttccggg ctgcgagtaa t 21

[0134] <210> 8

[0135] <211> 20

[0136] <212> DNA

[0137] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0138] <400> 8

[0139] ctctatgtct tggccctgat 20

[0140] <210> 9

[0141] <211> 21

[0142] <212> DNA

[0143] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0144] <400> 9

[0145] atgagggtgg gggggctgtt g 21

[0146] <210> 10

[0147] <211> 20

[0148] <212> DNA

[0149] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0150] <400> 10

[0151] gtagtagagt gggagtgcta 20

[0152] <210> 11

[0153] <211> 20

[0154] <212> DNA

[0155] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0156] <400> 11

[0157] ctgtcttgtc accattttcg 20

[0158] <210> 12

[0159] <211> 21

[0160] <212> DNA

[0161] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0162] <400> 12

[0163] tatgctatcc taatttatat c 21

[0164] <210> 13

[0165] <211> 21

[0166] <212> DNA

[0167] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0168] <400> 13

[0169] agcaatcaga catgcgacgg c 21

[0170] <210> 14

[0171] <211> 19

[0172] <212> DNA

[0173] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0174] <400> 14

[0175] ctgggtagta tatgctatc 19

[0176] <210> 15

[0177] <211> 22

[0178] <212> DNA

[0179] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0180] <400> 15

[0181] acaccttctc gcgttggaaa ac 22

[0182] <210> 16

[0183] <211> 22

[0184] <212> DNA

[0185] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0186] <400> 16

[0187] atggctgatt atgatccggc tg 22

[0188] <210> 17

[0189] <211> 22

[0190] <212> DNA

[0191] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0192] <400> 17

[0193] tacagacaag ctgtgaccgt ct 22

[0194] <210> 18

[0195] <211> 266

[0196] <212> DNA

[0197] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0198] <400> 18

[0199] ggacaccatc tctatgtctt ggccctgatc ctgagccgcc cggggctcct ggtcttccgc 60

[0200] ctcctcgtcc tcgtcctctt ccccgtcctc gtccatggtt atcacccccc cttctttgag 120

[0201] gtccactgcc gccggagcct tctggtccag atgtgtctcc cttctctcct aggccatttc 180

[0202] caggtcctgt acctggcccc tcgtcagaca tgattcacac taaaagagat caatagacat 240

[0203] ctttattaga cgacgctcag tgaata 266

[0204] <210> 19

[0205] <211> 270

[0206] <212> DNA

[0207] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0208] <400> 19

[0209] ctggtccaga tgtgtctccc ttctctccta ggccatttcc aggtcctgta cctggcccct 60

[0210] cgtcagacat gattcacact aaaagagatc aatagacatc tttattagac gacgctcagt 120
[0211] gaatacaggg agtgcagact cctgcccccct ccaacagccc ccccaccctc atccccttca 180
[0212] tggtcgctgt cagacagatc caggtctgaa aattccccat cctccgaacc atcctcgtcc 240
[0213] tcatcaccaa ttactcgcag cccggaaaac 270
[0214] <210> 20
[0215] <211> 304
[0216] <212> DNA
[0217] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0218] <400> 20
[0219] ctctatgtct tggccctgat cctgagccgc ccggggctcc tggtcttccg cctcctcgtc 60
[0220] ctcgtcctct tccccgtcct cgtccatggt tatcaccccc tcttctttga ggtccactgc 120
[0221] cgccggagcc ttctggtcca gatgtgtctc ccttctctcc taggccattt ccaggtcctg 180
[0222] tacctggccc ctcgtcagac atgattcaca ctaaaagaga tcaatagaca tctttattag 240
[0223] acgacgctca gtgaatacag ggagtgcaga ctcctgcccc ctccaacagc ccccccaccc 300
[0224] tcat 304
[0225] <210> 21
[0226] <211> 272
[0227] <212> DNA
[0228] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0229] <400> 21
[0230] gtagtagagt gggagtgcta tcctttgcat atgccgccac ctcccaaggg ggcgtgaatt 60
[0231] ttcgctgctt gtccttttcc tgctggttgc tcccattctt aggtgaattt aaggaggcca 120
[0232] ggctaaagcc gtcgcatgtc tgattgctca ccaggtaaat gtcgctaatg ttttccaacg 180
[0233] cgagaaggtg ttgagcgcgg agctgagtga cgtgacaaca tgggtatgcc caattgcccc 240
[0234] atgttgggag gacgaaaatg gtgacaagac ag 272
[0235] <210> 22
[0236] <211> 309
[0237] <212> DNA
[0238] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0239] <400> 22
[0240] tatgctatcc taatttatat ctgggtagca taggctatcc taatctatat ctgggtagca 60
[0241] tatgctatcc taatctatat ctgggtagta tatgctatcc taatctgtat ccgggtagca 120
[0242] tatgctatcc tcatgcatat acagtcagca tatgataccc agtagtagag tgggagtgct 180
[0243] atcctttgca tatgccgcca cctcccaagg gggcgtgaat tttcgctgct tgtccttttc 240
[0244] ctgctggttg ctcccattct taggtgaatt taaggaggcc aggctaaagc cgtcgcatgt 300
[0245] ctgattgct 309
[0246] <210> 23
[0247] <211> 272
[0248] <212> DNA
[0249] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0250] <400> 23
[0251] ctgggtagta tatgctatcc taatctgtat ccgggtagca tatgctatcc tcatgcatat 60

[0252] acagtcagca tatgataccc agtagtagag tgggagtgct atcctttgca tatgccgcca 120
[0253] cctcccaagg gggcgtgaat tttcgctgct tgtccttttc ctgctggttg ctcccattct 180
[0254] taggtgaatt taaggaggcc aggctaaagc cgtcgcatgt ctgattgctc accaggtaaa 240
[0255] tgtcgctaat gttttccaac gcgagaaggt gt 272
[0256] <210> 24
[0257] <211> 97
[0258] <212> DNA
[0259] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0260] <400> 24
[0261] atggctgatt atgatccggc tgcctcgcgc gtttcggtga tgacggtgaa aacctctgac 60
[0262] acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgta 97
[0263] <210> 25
[0264] <211> 22
[0265] <212> DNA
[0266] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0267] <400> 25
[0268] cacctgcact tattcttggc ag 22
[0269] <210> 26
[0270] <211> 22
[0271] <212> DNA
[0272] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0273] <400> 26
[0274] tattgggctc agaccaggag tc 22
[0275] <210> 27
[0276] <211> 2018
[0277] <212> DNA
[0278] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0279] <400> 27
[0280] gatgataagc tgtcaaacat gagaattctt gaagacgaaa gggcctcgtg atacgcctat 60
[0281] ttttataggt taatgtcatg ataataatgg tttcttagac gtcaggtggc acttttcggg 120
[0282] gaaatgtgcg cggaacccct atttgtttat ttttctaaat acattcaaat atgtatccgc 180
[0283] tcatgagaca ataaccctga taaatgcttc aataatattg aaaaaggaag agtatgagta 240
[0284] ttcaacattt ccgtgtcgcc cttattccct tttttgcggc attttgcctt cctgtttttg 300
[0285] ctcacccaga aacgctggtg aaagtaaaag atgctgaaga tcagttgggt gcacgagtgg 360
[0286] gttacatcga actggatctc aacagcggta agatccttga gagttttcgc cccgaagaac 420
[0287] gttttccaat gatgagcact tttaaagttc tgctatgtgg cgcggtatta tcccgtgttg 480
[0288] acgccgggca agagcaactc ggtcgccgca tacactattc tcagaatgac ttggttgagt 540
[0289] actcaccagt cacagaaaag catcttacgg atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg 600
[0290] ctgccataac catgagtgat aacactgcgg ccaacttact tctgacaacg atcggaggac 660
[0291] cgaaggagct aaccgctttt ttgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc cttgatcgtt 720
[0292] gggaaccgga gctgaatgaa gccataccaa acgacgagcg tgacaccacg atgcctgcag 780
[0293] caatggcaac aacgttgcgc aaactattaa ctggcgaact acttactcta gcttcccggc 840

[0294] aacaattaat agactggatg gaggcggata aagttgcagg accacttctg cgctcggccc 900

[0295] ttccggctgg ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg tctcgcggta 960

[0296] tcattgcagc actggggcca gatggtaagc cctcccgtat cgtagttatc tacacgacgg 1020

[0297] ggagtcaggc aactatggat gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt gcctcactga 1080

[0298] ttaagcattg gtaactgtca gaccaagttt actcatatat actttagatt gatttaaaac 1140

[0299] ttcatttta atttaaaagg atctaggtga agatcctttt tgataatctc atgaccaaaa 1200

[0300] tcccttaacg tgagttttcg ttccactgag cgtcagaccc cgtagaaaag atcaaaggat 1260

[0301] cttcttgaga tcctttttt ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc 1320

[0302] taccagcggt ggtttgtttg ccggatcaag agctaccaac tctttttccg aaggtaactg 1380

[0303] gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg tccttctagt gtagccgtag ttaggccacc 1440

[0304] acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat acctcgctct gctaatcctg ttaccagtgg 1500

[0305] ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta ccgggttgga ctcaagacga tagttaccgg 1560

[0306] ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa 1620

[0307] cgacctacac cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccg 1680

[0308] aagggagaaa ggcggacagg tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga gagcgcacga 1740

[0309] gggagcttcc agggggaaac gcctggtatc tttatagtcc tgtcgggttt cgccacctct 1800

[0310] gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt caggggggcg gagcctatgg aaaaacgcca 1860

[0311] gcaacgcggc ctttttacgg ttcctggcct tttgctggcc ttgaagctgt ccctgatggt 1920

[0312] cgtcatctac ctgcctggac agcatggcct gcaacgcggg catcccgatg ccgccggaag 1980

[0313] cgagaagaat cataatgggg aaggccatcc agcctcgc 2018

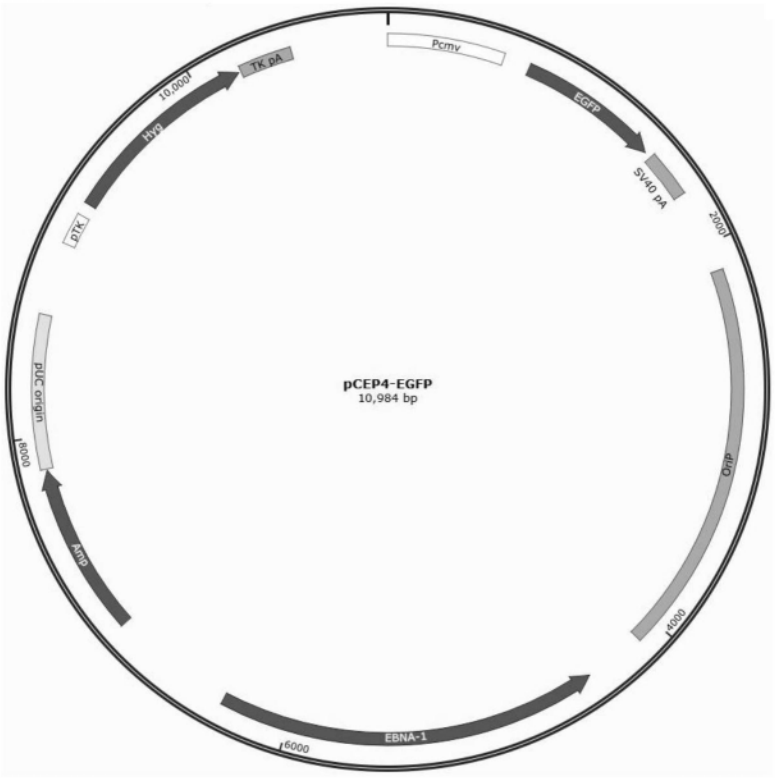

pCEP4-EGFP
10,984 bp
Pcmv
EGFP
SV40 pA
2000
OriP
4000
EBNA-1
6000
Amp
pUC origin
8000
pTK
Hyg
TK pA
10,000

图1

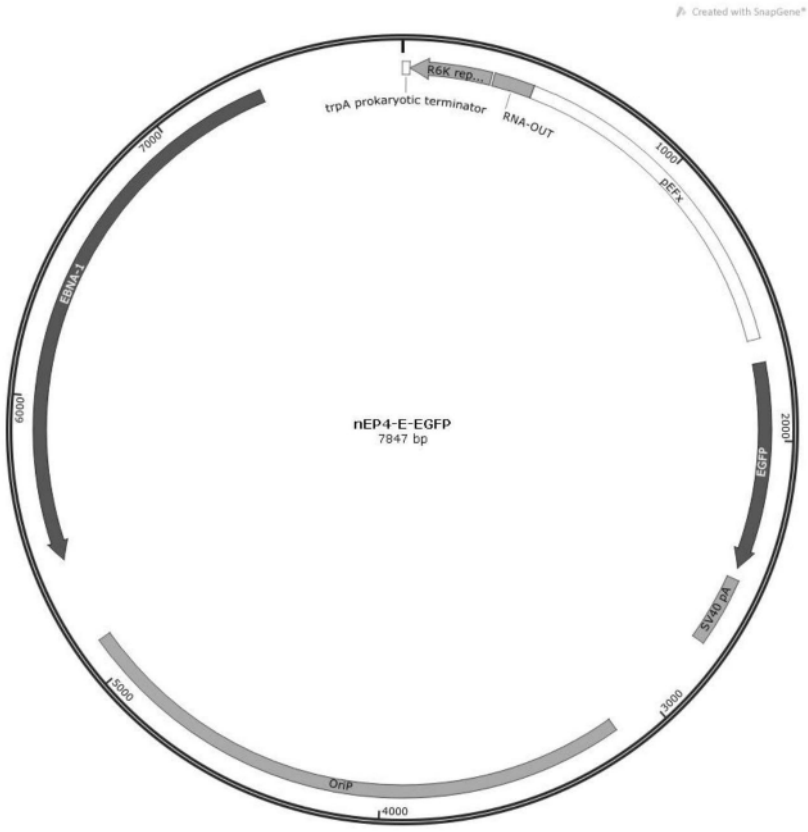

Created with SnapGene*
R6K rep...
trpA prokaryotic terminator
RNA-OUT
1000
pEFx
2000
EGFP
SV40 pA
3000
OriP
4000
5000
EBNA-1
6000
7000
nEP4-E-EGFP
7847 bp

图2


Created with SnapGene®
pMEP4-C-EGFP
9602 bp
pUC origin
Amp
attP
HSV-P
EBNA-1
oriP
SV40 pA
EGFP
PB-5TR-partial
attB
30xI-SceI
pCMV
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
9000

图3


Created with SnapGene*
9000
pUC origin
pEFx
1000
Kan
EGFP
2000
SV40 pA
HSV-P
pKEP4-E-EGFP
9264 bp
7000
3000
EBNA-1
6000
OriP
4000
5000

图4