



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105051188 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 11

(21) 申请号 201380070275. 6

C12N 5/074(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 12. 17

C12N 5/0735(2006. 01)

(30) 优先权数据

1222693. 2 2012. 12. 17 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 07. 13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2013/053317 2013. 12. 17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/096800 EN 2014. 06. 26

(71) 申请人 巴布拉哈姆研究院

地址 英国剑桥郡

(72) 发明人 W. 赖克 J. 皮特 T. 霍尔

C. 克鲁格

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 李波 彭昶

权利要求书2页 说明书18页

序列表30页 附图11页

按照条约第19条修改的权利要求书2页

按照条约第19条修改的声明或说明1页

(51) Int. Cl.

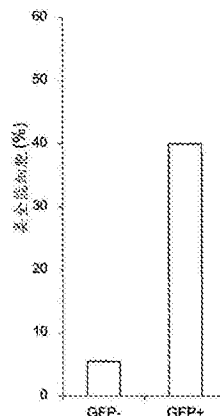
C12N 9/02(2006. 01)

(54) 发明名称

新颖方法

(57) 摘要

本发明涉及通过将 TET 家族基因、其衍生物或片段引入细胞中来增强所述细胞的效力(例如,增强至全能状态)的方法。本发明还涉及用于制备具有增强效力细胞的方法和试剂盒,以及所述细胞的用途。



1. 一种增强细胞效力的方法,其中所述方法以下步骤:包括将 TET 家族基因、其衍生物或片段引入所述细胞中。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述细胞被增强至全能状态。
3. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述细胞被增强至多能状态,如真实多能状态。
4. 如权利要求 1 至 3 中任一项所述的方法,其中所述 TET 家族基因、其衍生物或片段是 TET2 或 TET3。
5. 如权利要求 1 至 4 中任一项所述的方法,其中所述 TET 家族基因、其衍生物或片段是 TET3。
6. 如权利要求 1 至 5 中任一项所述的方法,其中所述 TET 家族基因、其衍生物或片段是 SEQ ID NO:11 或 13 的 TET3 同工型。
7. 如权利要求 1、2 或 4 至 6 中任一项所述的方法,其中所述细胞是多能细胞,如胚胎干 (ES) 细胞,特别是 E14 胚胎干 (ES) 细胞。
8. 如权利要求 1 至 6 中任一项所述的方法,其中所述细胞是体细胞。
9. 如权利要求 1 至 8 中任一项所述的方法,其中所述引入步骤包括用含有所述 TET 家族基因、其衍生物或片段的载体转染所述细胞。
10. 如权利要求 9 所述的方法,其中所述载体是转座子载体。
11. 一种制备具有增强效力的细胞的方法,所述方法包括以下步骤:将 TET 家族基因、其衍生物或片段引入细胞。
12. 如权利要求 11 所述的方法,其中所述细胞是多能细胞,如胚胎干 (ES) 细胞,特别是 E14 胚胎干 (ES) 细胞。
13. 如权利要求 11 所述的方法,其中所述细胞是体细胞。
14. 如权利要求 13 所述的方法,其还包括以下步骤:将 Oct3/4 基因、Sox2 基因、Klf4 基因和 c-Myc 基因引入所述体细胞中。
15. 如权利要求 11 至 14 中任一项所述的方法,其还包括以下步骤:在引入所述 TET 家族基因、其衍生物或片段之后培养所述细胞。
16. 如权利要求 11 至 15 中任一项所述的方法,其还包括以下步骤:选择过表达所述 TET 家族基因、其衍生物或片段的一种或多种细胞。
17. 如权利要求 16 所述的方法,其中使用流式细胞术选择所述一种或多种细胞。
18. 一种具有增强效力的细胞,所述细胞可通过如权利要求 1 至 17 中任一项所述的方法获得。
19. 一种包含 SEQ ID NO:11 或 13 的 TET3 同工型的核酸。
20. 一种包含如权利要求 19 所述的核酸的载体。
21. 如权利要求 19 所述的核酸或如权利要求 20 所述的载体在增强细胞效力的方法中的用途。
22. 如权利要求 18 所述的具有增强效力的细胞,所述细胞用于在疗法中使用。
23. 如权利要求 22 所述的用于使用的具有增强效力的细胞,其中所述疗法包括组织再生。
24. 一种试剂盒,其包括含有 TET 家族基因、其衍生物或片段的载体,和根据如权利要求 1 至 17 中任一项所述的方法来使用所述试剂盒的说明书。

25. 如权利要求 24 所述的试剂盒,其还包括至少一种多能细胞,如胚胎干 (ES) 细胞,特别是 E14 胚胎干 (ES) 细胞。

26. 如权利要求 24 所述的试剂盒,其还包括至少一种体细胞。

27. 如权利要求 25 或 26 所述的试剂盒,其还包括用于培养所述细胞的培养基,和用于根据权利要求 1 至 17 中任一项所述的方法制备具有增强效力的所述细胞的说明书。

新颖方法

发明领域

[0001] 本发明涉及通过将 TET 家族基因、其衍生物或片段引入细胞以增强细胞效力的方法。本发明还涉及用于制备具有增强效力的细胞的方法和试剂盒,以及所述细胞的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 据认为,干细胞的使用可以从根本上改变人类疾病的治疗。已知干细胞具有高水平的效力和自我更新,这意味着它们可以分化成多种细胞类型。这种有利的特性可以在器官和组织的产生或修复中使用。

[0004] 胚胎干 (ES) 细胞的分离已经在干细胞技术和研究中带来很大进步。ES 细胞是多能的,因此它们可被诱导分化成随后可被利用的多种细胞类型,例如,在科学动物模型或细胞移植疗法中使用。然而,ES 细胞尚未满足它们作为在疾病的治疗中现在所面对的大多数问题的方案的预期。例如,已被证实的是,ES 细胞的移植面临与当前器官移植一样的排斥问题。此外,鉴于在收获 ES 细胞期间胚胎遭到破坏的事实,这些细胞的使用引发了伦理问题。

[0005] 最近,科学家已开发出产生诱导多能干 (iPS) 细胞 (如 WO 2007/069666 中所述) 的方法,所述方法允许患者自身的体细胞去分化成多能状态,从而克服与 ES 细胞相关的伦理问题。然而,来自人和啮齿动物谱系之外的其它哺乳动物的 iPS 细胞和 ES 细胞在几乎所有的情况下都缺少完全的多能性。

[0006] 此外,作为多能细胞,来自任何物种的 ES 和 iPS 细胞不能形成胚外谱系的组织,并且必须注射到宿主囊胚以产生完整的有机体。

[0007] WO 2010/037001 描述使用 TET 蛋白家族来调节和检测 DNA 的胞嘧啶甲基化状态以便重编程干细胞的方法。

[0008] 因此需要产生具有更高效力的细胞 (如全能细胞) 以用于在干细胞技术中使用的方法。

[0009] 发明概述

[0010] 根据本发明的第一方面,提供增强细胞效力的方法,其中所述方法包括以下步骤:将 TET 家族基因、其衍生物或片段引入细胞中。

[0011] 根据本发明的另一方面,提供制备具有增强效力的细胞的方法,所述方法包括以下步骤:将 TET 家族基因、其衍生物或片段引入细胞中。

[0012] 根据本发明的另一方面,提供可通过本文所定义的方法获得的具有增强效力的细胞。

[0013] 根据本发明的另一方面,提供包含 SEQ ID NO:11 或 13 的 TET3 同工型的核酸。

[0014] 根据本发明的另一方面,提供包含如本文所定义的核酸的载体。

[0015] 根据本发明的另一方面,提供如本文所定义的核酸或如本文所定义的载体在增强细胞效力的方法中的用途。

[0016] 根据本发明的另一方面,提供用于在疗法中的使用的如本文所定义的具有增强效力的细胞。

[0017] 根据本发明的另一方面,提供试剂盒,所述试剂盒包括含有 TET 家族基因、其衍生物或片段的载体,和根据如本文所定义的方法来使用所述试剂盒的说明书。

[0018] 附图简述

[0019] 图 1 :5' Tet3 基因座的示意图。图不是按比例绘制。虚线代表多个外显子和内含子。箭头表示用于启动子使用分析的 qRT-PCR 引物的位置(参见实施例部分)。所指示的起始密码子与全长 TET3 蛋白同框。‘Cat’ = 催化结构域。

[0020] 图 2 :启动子使用和编码 CXXC 的外显子的并入。示出了相对于参考基因 Atp5b 和 Hspcb 的平均值的转录水平。除了卵母细胞(其具有单个值),所示的值是两个生物学平行测定值的平均值,范围被示出为误差线条。EB :胚状体。

[0021] 图 3 :在由 Tet3 变体 1 转染的分选细胞中通过 qPCR 进行的候选基因的表达分析。示出了相对于参考基因 Atp5b 和 Hspcb 的平均值的转录水平。Mut :催化非活性突变体。

[0022] 图 4 :在由 Tet3 变体 1 转染的分选细胞中通过 qPCR 进行的对照基因的表达分析。示出了相对于参考基因 Atp5b 和 Hspcb 的平均值的转录水平。Mut :催化非活性突变体。

[0023] 图 5 :在由 Tet3 变体 3 转染的分选细胞中通过 qPCR 进行的候选基因的表达分析。示出了相对于参考基因 Atp5b 和 Hspcb 的平均值的转录水平。Mut :催化非活性突变体。

[0024] 图 6 :由 Tet3 变体 1 转染的分选细胞中的表达水平的散点图。每个点代表单个基因。用黑色来指示通过 qPCR 检测的候选基因(参见实施例 4)和几个家族成员,其中用箭头标记一些示例性基因。

[0025] 图 7 :由 Tet3 变体 1 催化突变体转染的分选细胞中的表达水平的散点图。每个点代表单个基因。用黑色来指示通过 qPCR 检测的候选基因(参见实施例 4)和几个家族成员,其中用箭头标记一些示例性基因。

[0026] 图 8 :示出表达 Tet3 变体 1 的胚胎干细胞中单细胞表达数据的结果的热图。

[0027] 图 9 :指示表达 TET3 的亚群中类全能细胞比例的图。

[0028] 图 10 :TET3 表达的定量 RT-PCR 分析。示出了相对于 E14(= 1)的转录水平。值是两个独立平行测定值的平均值;误差线条指示范围。

[0029] 图 11 :6 天转分化测定后的菌落形态的相差显微镜检查。图像代表观察到的菌落形态的范围。

[0030] 图 12 :6 天转分化测定后的 CD40 表达的流式细胞分析。在 TS 细胞培养基中培养 6 天后,将细胞用山羊 α -CD40 一次抗体(R&D System)、然后抗山羊 AlexaFluor 647 二次抗体(Invitrogen)染色。A :点图针对单个细胞,在 Y-轴上示出正向散射宽度值(FSC-W),并且在 X-轴上示出 640nm 的荧光值(即 CD40 信号)。指示了针对称为 CD40 阳性的阈值,以及超过这个水平的细胞百分比。对总细胞群体中的学生 t 检验表明对于两种过表达 TET3 的细胞系来说,在 CD40 阳性细胞中相对于 E14 ES 细胞的非常显著增加(在两种情况下 $p < 0.0001$)。B. 每个细胞系中称为 CD40 阳性的细胞百分比的定量。

[0031] 发明详述

[0032] 根据本发明的第一方面,提供增强细胞效力的方法,其中所述方法包括以下步骤:将 TET 家族基因、其衍生物或片段引入细胞。

[0033] 本文提到的‘增强效力’涉及具有增加的分化成不同细胞类型的能力的细胞。已知全能细胞是具有最高效力的细胞。其次是多能、多潜能、寡能和单能细胞。

[0034] 在一个实施方案中,细胞的效力被增强至多能状态,如真实多能状态。

[0035] 本文提到的‘多能’涉及具有分化成不同细胞类型的潜力的细胞。这些细胞比全能细胞更受限,原因在于单独的多能细胞不能发育成胎儿或成年生物体,因为多能细胞不能分化成胚外细胞。因此,必须使用供体囊胚细胞以产生完整的有机体。

[0036] 如本文所述,产生 iPS 细胞的方法在本领域中是公知的,然而这些细胞已被证明缺乏完全的多能性,因为它们保留其供体体细胞的表观遗传记忆 (Kim 等人 (2011)Nature 467, 285-290 页)。因此,这些细胞不被认为是真实多能的,因为它们不具有如天然的多能细胞分化成多种细胞类型一样的能力。

[0037] 因此,本文提到的‘真实多能状态’涉及具有如天然的多能细胞分化成多种细胞类型一样的能力(即它们是完全的多能)的细胞。特别是,真实/完全的多能细胞可以分化成胚胎的三个胚层(即内胚层、中胚层或外胚层)中的任何层。

[0038] 在一个实施方案中,细胞的效力被增强至多能状态。

[0039] 因此,根据本发明的另一方面,提供将细胞重编程至全能状态的方法,其中所述方法包括以下步骤:将 TET 家族基因、其衍生物或片段引入细胞。

[0040] 本文提到的‘全能’涉及具有分化成不同细胞类型的潜力的细胞,包括包含胚外组织的细胞。因此,全能细胞具有能够发育成完整的生物,而不需要使用宿主产生的囊胚细胞的优点。应理解,提到的‘全能’细胞包括‘类全能’细胞(即与全能细胞有高度的相似性的细胞),例如与全能细胞的高程度转录或表观遗传相似性(参见 Macfarlan 等 (2012) Nature 487, 57-63 页,描述了产生全能性获得的基因表达转移)。此外,如本文所用提到的‘全能’或‘类全能’细胞是指具有比多能细胞更高效力的细胞。

[0041] 本文提到的‘体细胞’是指构成生物体的任何类型的细胞,但排除生殖细胞和未分化的干细胞。体细胞因此包括例如皮肤、心脏、肌肉、骨骼或血液细胞。

[0042] 由于细胞分化为特定细胞类型(例如皮肤、肌肉、血液等),它们失去其成为不同细胞类型的能力(或潜力)。因此,重编程细胞回到多能状态或全能状态,使得它们可以被操作成所期望的细胞类型是有利的。

[0043] 本文提到的‘重编程’是指细胞被转换回到不同的分化状态的过程。本文所述的发明将细胞重编程至全能状态,从而提高其效力和分化成多种细胞类型的能力。

[0044] 当前干细胞技术依赖于 ES 细胞和 iPS 细胞的使用。然而,这两种细胞类型都具有一些缺点。例如,iPS 细胞已被证实保留它们的供体体细胞的表观遗传记忆,所述表观遗传记忆在天然多能细胞中是不存在的 (Kim 等 (2011)Nature 467, 285-290 页)。此外,来自人和啮齿动物谱系之外的其它哺乳动物的 ES 和 iPS 细胞已被证实不是真实多能的。本发明提供增强细胞的效力的状态(例如,增强至全能状态)的方法,从而克服这些与人 ES 和 iPS 细胞相关联的问题。

[0045] 如本文所示,使用 TET 家族基因(例如 Tet3 基因)可以增加细胞培养基中的类全能干细胞的数量(参见图 9)。类全能干细胞的亚群已被证实具有增强效力,如通过其转分化至类滋养层细胞的能力所精确计量的(参见实施例 7)。因此,这些细胞能够形成胚外组织(如滋养层),而不需要供体囊胚细胞。

[0046] 在一个实施方案中,细胞是多能细胞。在替代实施方案中,细胞是体细胞。

[0047] 在一个实施方案中,多能细胞来自哺乳动物。在另一个实施方案中,哺乳动物是

人。

[0048] 多能细胞可获自各种来源,例如胚胎干 (ES) 细胞或诱导的多能干 (iPS) 细胞,其可商业获得或者可以使用 WO 2007/069666 中描述的方法获得。在一个实施方案中,多能细胞是诱导的多能干 (iPS) 细胞。在替代实施方案中,多能细胞是胚胎干 (ES) 细胞。在另一个实施方案中,胚胎干 (ES) 细胞是 E14 胚胎干 (ES) 细胞。

[0049] 哺乳动物的 10-11 易位 (ten-eleven translocation, TET) 家族包含三种蛋白质 (TET1、TET2 和 TET3),它们的 C-末端催化结构域之间全部共享高度同源性 (Iyer 等 (2009) Cell Cycle 8, 1698-1710 页)。它们都被证实将 5-甲基胞嘧啶 (5mC) 转换成另一种称为 5-羟甲基胞嘧啶 (5hmC) 的 DNA 甲基化形式。5hmC 的功能尚不清楚,尽管它被认为通过去除甲基 (即通过脱甲基作用) 来调节基因表达。三种蛋白质具有相当不同的表达图谱,并且迄今为止的研究已证实 TET1 在胚胎干 (ES) 细胞中的作用、TET2 在造血发育和癌中的作用,以及 TET3 在受精卵中的作用。特别地,已经发现与 TET1 和 TET2 的低水平相比, TET3 在卵母细胞和受精的合子中高度表达 (Gu 等 (2011) Nature 477, 606-610 页; Wossidlo 等 (2011) Nature, 2, 241 页)。三种蛋白质家族之间的功能差异尚不清楚。

[0050] 重编程细胞至多能性的一个主要方面是改变它们的表观遗传景观 (landscape), 尤其是它们的 DNA 甲基化分布图。作为去甲基化过程的一部分, 5-甲基胞嘧啶被氧化, 这是由 TET 蛋白的催化功能来介导。因此, TET 蛋白的异位表达可通过复位 DNA 甲基化标记来促进从体细胞到多能细胞的重编程 (Costa 等 Nature 495, 370-374 页, WO 2010/037001)。此外, 多能细胞中的 TET1 和 TET2 表达较高, 如 DNA 中的氧化的 5-甲基胞嘧啶残基的水平。

[0051] 然而, 本发明人惊奇地发现, TET 蛋白的表达 (例如 TET3) 可以增强细胞对全能状态的效力。这种效力的增强也可能在重编程期间影响体细胞。出乎意料的是, 这种效力的增强不取决于 TET 蛋白的催化功能, 并且因此不与 DNA 去甲基化相连。因此, 接近全能性的效力膨胀是 TET 蛋白先前未曾描述的功能。

[0052] 本文提到的 'TET 家族基因' 是指编码 10-11 易位 (TET) 家族的三种蛋白质: TET1、TET2 或 TET3 中的一种的基因。这类提到的基因包括具有与 TET1、TET2 或 TET3, 特别是人 TET1、TET2 或 TET3 至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99% 或更高序列同一性的基因。

[0053] 本发明还包括使用 TET 家族基因的片段的方法。这种片段通常编码至少 5 个氨基酸长度的蛋白质。在优选实施方案中, 它们可以编码 6 至 10、11 至 15、16 至 25、26 至 50、51 至 75、76 至 100 或 101 至 250 或 250 至 500、500 至 1000、1000 至 1500 或 1500 至 2000 个氨基酸的蛋白质。片段可以包含缺失一个或多个氨基酸的序列, 例如, C-末端截短蛋白质。片段还可以包含编码不含特殊结构域的蛋白质的核酸, 例如, 缺乏 CXXC (DNA-结合) 结构域或催化结构域的片段。

[0054] 提到的 'TET 家族衍生物' 指的是编码 TET 家族蛋白质的蛋白质变体的核酸, 所述核酸具有与原始基因不同的核酸序列, 但是产生被认为在形状、结构和 / 或功能相当的蛋白质。导致化学相似的氨基酸序列生产的改变包括在本发明的范围内。本发明的多肽的变体可以天然发生, 例如, 通过突变发生, 或者可例如用如定点诱变的多肽工程改造技术来进行, 这些技术在氨基酸取代的领域中是已知的。

[0055] 目标 TET 家族基因的核酸序列中的变化可以导致氨基酸序列中的保守变化或保

守取代。因此,本发明包括具有保守变化或保守取代的多肽。本发明包括所进行的保守取代不会损坏目标 TET 家族蛋白质的活性的序列。

[0056] 本发明的发明人得到了惊人的发现:引入酶的 TET 家族的成员(特别是 TET3)引起细胞效力的增加,例如,增加至全能状态。

[0057] 在一个实施方案中,TET 家族基因、其衍生物或片段是 TET2 或 TET3 基因、其衍生物或片段。在另一个实施方案中,TET 家族基因、其衍生物或片段是 TET3 基因、其衍生物或片段。在又一个实施方案中,TET 家族基因、其衍生物或片段是 TET3,特别是人 TET3。

[0058] 在一个实施方案中,TET 家族基因、其衍生物或片段是选自 SEQ ID NO:11、12 或 13 的 TET3 同工型,特别是选自 SEQ ID NO:11 或 13 的 TET3 同工型。在一个实施方案中,TET 家族基因、其衍生物或片段是 SEQ ID NO:11 的 TET3 同工型(Tet3 变体 1)。在替代实施方案中,TET 家族基因、其衍生物或片段是 SEQ ID NO:13 的 TET3 同工型(Tet3 变体 3)。

[0059] TET 家族基因、其衍生物或片段可以包含具有与 SEQ ID NO:11 或 13 至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99% 或更高的序列同一性。

[0060] 在一个实施方案中,引入步骤包括用含有 TET 家族基因、其衍生物或片段的载体转染细胞。在另一个实施方案中,载体是转座子载体。

[0061] 载体被用于使用本领域已知的技术将靶序列引入宿主细胞中(例如,参见本文所描述实施例 3)。载体还可以含有各种控制靶序列的转录和翻译的调控序列。载体的实例包括:病毒载体、转座子载体、质粒载体或粘粒载体。

[0062] 用于本发明的可能的载体可从各种供应商处购得,例如从 Invitrogen, Inc. (例如 Gateway® Cloning Technology)、Amersham Biosciences, Inc. 和 Promega, Inc. 购得。

[0063] 转座子载体利用已知作为转座子的可移动遗传元件、使用“剪切和粘贴”机制以移动靶序列至载体和染色体,并且从载体和染色体移出靶序列。转座子载体的实例包括 PiggyBac 载体(System Biosciences)或 EZ-Tn5™ 转座子构建载体(Illumina, Inc.)。

[0064] 病毒载体由基因工程改造的病毒内的 DNA 或 RNA 组成。病毒载体可用于将靶序列整合至宿主细胞基因组中(即整合型病毒载体)。病毒载体的实例包括腺病毒载体、腺病毒相关载体、逆转录病毒载体或慢病毒载体(例如 HIV)。

[0065] 质粒载体通常由环状、双链 DNA 组成。如同大多数工程改造的载体,质粒载体具有多克隆位点(MCS),所述多克隆位点为含有几个常用限制位点的短区,所述限制位点允许目标 DNA 片段的易于插入。

[0066] 本文提到的‘转染’是指将载体引入宿主细胞以便靶序列可得以表达的过程。用载体转染宿主细胞的方法包括本领域技术人员所熟知的电穿孔、超声穿孔或光学转染的方法。

[0067] 但是应当注意到,可以设想其他类型的转染用于本发明,例如利用纳米技术的基于颗粒的方法。在一个实施方案中,TET 家族基因、其衍生物或片段附着于纳米颗粒。然后可以使用纳米颗粒来转染细胞,例如通过使用将纳米颗粒直接递送进细胞核中的‘基因枪’(或‘生物粒子递送系统’)进行。

[0068] 一旦载体被转染入细胞,所述细胞可被诱导以表达所述靶序列。例如转座子载体的某些载体可以使用基于切除的方法以切除来自载体的靶序列,并将其递送进进行表达的

宿主细胞的基因组中。基于切除的方法的实例包括 piggyBAC 技术、Sleeping Beauty (SB) 转座子, LINE1 (L1) 逆转录转座子或 CreloxP 重组。

[0069] 基于切除的方法可以使用转座子以将靶序列递送进宿主基因组中。piggyBAC 转座子具有特别的优点, 即能够切除靶序列而不留下任何可影响重编程过程的外源 DNA 保留部分。

[0070] 根据本发明的另一方面, 提供制备具有增强效力的细胞的方法, 所述方法包括以下步骤: 将 TET 家族基因、其衍生物或片段引入细胞中。

[0071] 根据本发明的另一方面, 提供制备重编程全能细胞的方法, 所述方法包括以下步骤: 将 TET 家族基因、其衍生物或片段引入细胞中。

[0072] 在一个实施方案中, 细胞是多能细胞。

[0073] 在替代实施方案中, 细胞是体细胞。在另一个实施方案中, 当所述细胞是体细胞时, 所述方法还包括以下步骤: 将 Oct3/4 基因、Sox2 基因、Klf4 基因和 c-Myc 基因引入体细胞中。

[0074] 本文定义的方法可以用于诱导体细胞 (例如, 从患者获得的体细胞) 进入多能状态或全能状态。应理解, 这可以在一个步骤中实现, 或通过诱导体细胞至多能状态, 然后至全能状态。例如, TET (例如 TET3) 过表达与现有的过表达系统 (例如 Yamanaka 因子) 相一致, 可以允许在基本上一个实验步骤中对来自体细胞的全能细胞进行衍生作用 (derivation)。

[0075] 本领域存在可广泛用于诱导体细胞成多能状态的方法, 例如通过引入 Yamanaka 因子 (即如 WO 2007/069666 中所述的 Oct3/4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 基因)。可以使用含有所述四种因子的载体来引入这些因子, 如使用可得自 www.addgene.org 的质粒 20959 (PB-TET-MKOS) 来引入。因此, 可以使用如本文所述的方法通过共转染体细胞与包含 TET 家族基因, 其衍生物或片段的载体, 以及包含 Oct3/4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 基因的载体将体细胞重编程至全能状态。

[0076] 本文提到的 ‘重编程全能细胞’ 是指已经通过由 TET 家族基因、其衍生物或片段的引入增加其效力被诱导至全能状态的细胞。

[0077] 将目标核酸序列引入宿主细胞的方法是本领域已知的。例如, 一种基本方案涉及以下步骤:

[0078] a) 核酸靶序列 (例如 TET 家族基因、其衍生物或片段) 的扩增;

[0079] b) 将靶序列重组到载体 (例如病毒载体) 中;

[0080] c) 使用可选择标记 (例如绿色荧光蛋白) 成功鉴定重组体;

[0081] d) 将重组载体转染至宿主细胞中 (例如多能细胞或体细胞);

[0082] e) 将靶序列整合至宿主细胞基因组中 (例如, 使用 piggyBAC 技术);

[0083] f) 使用可选择标记 (例如嘌呤霉素) 鉴定成功的整合;

[0084] g) 靶序列的诱导表达 (例如, 使用强力霉素); 以及

[0085] h) 成功表达靶序列的重编程全能细胞的选择 (例如使用流式细胞术)。

[0086] 在一个实施方案中, 所述方法还包括以下步骤: 在引入 TET 家族基因、其衍生物或片段之后培养所述细胞。

[0087] 一旦基因、其衍生物或片段已经引入细胞中, 就将细胞培养足够的时间以供细胞

获得全能性和增殖。例如,培养可在 1000-100000 个的细胞密度下,例如约 5 万个 / 皿细胞培养物的密度下持续。

[0088] 增强效力的细胞或重编程全能细胞可例如通过培养 12 小时或更长时间,例如 1 天或更长、通过使用适当的培养基用于制备全能或多能细胞来获得,所述培养基例如用于胚胎干细胞的培养基(例如,用于人 ES 细胞的培养基)。本文描述的方法可需要连续培养 2 天或更长时间,例如 5 天或更长时间、7 天或更长时间和 10 天或更长时间。

[0089] 在一个实施方案中,所述方法还包括以下步骤:选择过表达 TET 家族基因、其衍生物或片段的一种或多种细胞。

[0090] 在一个实施方案中,使用标记基因选择一种或多种细胞。

[0091] 在一个实施方案中,标记基因可选自药物抗性基因、荧光蛋白基因、显色酶基因或其组合。在另一个实施方案中,标记基因是药物抗性基因或荧光蛋白基因。

[0092] 药物抗性基因的实例可以包括:嘌呤霉素抗性基因、氨苄青霉素抗性基因、新霉素抗性基因、四环素抗性基因、卡那霉素抗性基因或氯霉素抗性基因。可以在含有适当药物的培养基(即选择培养基)上培养细胞,并且只有并入和表达药物抗性基因的那些细胞将存活。因此,通过使用选择培养基培养细胞,可以容易地选择包含药物抗性基因的细胞。

[0093] 荧光蛋白基因的实例包括:绿色荧光蛋白(GFP)基因,黄色荧光蛋白(YFP)基因、红色荧光蛋白(RFP)基因或水母蛋白基因。表达荧光蛋白质基因的细胞可以使用荧光显微镜检测,并且使用细胞分选仪(例如流式细胞仪)选择。荧光激活细胞分选(FACS)是流式细胞术的专门类型,其可用于选择表达荧光蛋白的细胞。

[0094] 在一个实施方案中,使用流式细胞术选择一种或多种细胞。

[0095] 显色酶基因的实例包括: β -半乳糖苷酶基因, β -葡萄糖醛酸糖苷酶基因、碱性磷酸酶基因、或分泌的碱性磷酸酶 SEAP 基因。可以通过应用适当的显色底物(例如用于 β -半乳糖苷酶的 X-gal)来检测表达这些显色酶基因的细胞,使得表达所述标记基因的细胞将产生可检测的颜色(例如蓝-白筛选测试中的蓝色)。

[0096] 本文所述的所有标记基因是本领域技术人员熟知的。例如,包含这种标记基因的载体可购自 Invitrogen, Inc. (例如 Gateway® Cloning Technology)、Amersham Biosciences, Inc. 和 Promega, Inc.。

[0097] 根据本发明的另一方面,提供可通过本文所定义的方法获得的具有增强效力的细胞。

[0098] 根据本发明的另一方面,提供可通过本文所定义的方法获得的重编程全能细胞。

[0099] 根据本发明的另一方面,提供包含 SEQ ID NO:11 或 13 的 TET3 同工型的核酸。

[0100] 根据本发明的另一方面,提供包含如本文所定义的核酸的载体。

[0101] 根据本发明的另一方面,提供如本文所定义的核酸或如本文所定义的载体在增强细胞效力的方法中的用途。

[0102] 根据本发明的另一方面,提供在如本文所定义的核酸或如本文所定义的载体在将细胞至重编程全能状态的方法中的用途。

[0103] 本发明的增强效力的细胞或重编程全能细胞例如在医学、化学和农业行业中具有多种用途。

[0104] 本发明的增强效力的细胞或重编程全能细胞可以用在治疗中,例如用在细胞或组

织再生中。人 ES 和 iPS 细胞不显示原始态多能性,因此它们在细胞替代治疗和用作疾病的模型中的应用是有限的。本发明能够将多能细胞移动到能克服这个问题的较高效力水平。

[0105] 本发明的增强效力的细胞或重编程全能细胞可以用在家畜的生产和大型动物模型的产生中。目前用于较大的动物克隆和遗传操作的方法依赖于体细胞核转移 (SCNT) 技术,其可以通过经修饰细胞的较差自我更新能力而被限制。大型动物模型中的 ES 和 iPS 细胞的发展具有在人 ES 和 iPS 细胞中观察到的相同效力丧失(如上所述)。本发明提供关键能够在培养基中增殖并操作的真实多能或全能细胞的产生,从而简化在患病家畜和大型动物模型中的遗传修饰。‘大型动物’包括如狗、猪、绵羊、山羊、牛和马的动物。

[0106] 本发明的增强效力的细胞或重编程全细胞可以用在药物筛选的方法中。例如,为了测试可以施用至分化细胞的化合物或药物,可以将细胞分化为目标体细胞、组织或器官以评估它们的生理活性或毒性。

[0107] 根据本发明的另一方面,提供用于在疗法中使用的如本文所定义的具有增强效力的细胞。

[0108] 根据本发明的另一方面,提供用于在疗法中使用的如本文所定义的重编程全能细胞。

[0109] 在一个实施方案中,疗法包括组织再生。

[0110] 本文提到的‘组织再生’是指通过重建丧失或受损组织来恢复患病和受损器官与组织的功能的疗法。

[0111] 干细胞具有发育成多种类型的组织的能力,因此为了治疗疾病或损伤,可以将这些细胞引入至受损组织中。可使用本发明的增强效力的细胞或重编程全能细胞来治疗的疾病或损伤的实例包括:贫血、自身免疫疾病(例如关节炎、炎性肠病、局限性回肠炎、糖尿病、多发性硬化)、出生缺陷、失明、癌症、心血管疾病(例如充血性心力衰竭、心肌梗塞、中风)、肝硬化、耳聋、退化性疾病(例如帕金森病)、遗传疾病、移植物对抗宿主疾病、免疫缺陷、不育症、局部缺血、溶酶体缺陷症,肌肉损伤(例如心脏损伤)、神经元损伤(例如脑损伤,脊髓损伤)、神经变性疾病(例如阿尔茨海默氏病、痴呆、亨廷顿病),视力障碍和伤口愈合。

[0112] 根据本发明的另一方面,提供试剂盒,所述试剂盒包括含有 TET 家族基因、其衍生物或片段的载体,和根据本文所定义的方法来使用所述试剂盒的说明书。

[0113] 试剂盒可以包括用于实施方法的一种或多种制品和/或试剂。例如, TET 家族基因、其衍生物或片段,适用于本文所述的方法的扩增引物的寡核苷酸探针和/或探针对可以分离的形式提供,并且可以是试剂盒的一部分,例如,提供在合适的如小瓶的容器中,容器中的内容物受保护不受外部环境影响。试剂盒可以包括例如在 PCR 中使用核酸的说明书。意图将核酸用于 PCR 中的试剂盒可包括反应所需的一种或多种其它试剂,如聚合酶、核苷酸、缓冲液等。

[0114] 在一个实施方案中,试剂盒还包括至少一种多能细胞。在替代实施方案中,试剂盒还包括至少一种体细胞。

[0115] 在一个实施方案中,试剂盒还包括用于培养细胞的培养基,和用于依照本文所定义的方法制备增强效力的细胞或重编程全能细胞的说明书。

[0116] 根据本发明的另一方面,提供将细胞重编程至多能状态的方法,其中所述方法包

括以下步骤:将 TET3 基因、其衍生物或片段引入细胞中。在一个实施方案中,细胞是体细胞。

[0117] 应理解,这种方法可以包括与本文所定义的用于将细胞重编程至全能状态步骤相同的方法步骤。将 TET3 引入细胞中导致效力的改变,例如,改变至多能状态。因此,将 TET3 引入体细胞中导致诱导的多能干细胞增加的生产。

[0118] 以下研究说明本发明:

[0119] 实施例 1:Tet3 转录变体的鉴定

[0120] Tet3 基因结构的初始注释是由 RefSeq(登录号:NM_183138)提供。然而,根据这项注释,在上游存在大的开放阅读框架指示基因结构可能是不完整的。在 ES 细胞和体组织中,使用 GeneRacer 试剂盒(Invitrogen)进行 cDNA 末端的 5' 扩增,所述试剂盒带有对编码外显子 1 和 3 特异的引物(表 1)。这个分析鉴定了两种启动子,指定为“经典(Canonical)”启动子和“下游”启动子。

[0121] 表 1:设计用于 cDNA 末端的 5' 扩增的引物。

[0122]

引物	序列	SEQ ID NO.
RACE 正向 1	AACCCACTCACACCAACCCTCAG	1
RACE 正向 2	CTGGACACACCGCCAAGAAG	2
RACE 反向 1	AAGCCTGGGAGGTGGAATGAGAAG	3
RACE 反向 2	GGGCTCTCTAGCACCATTGACC	4
RACE 反向 3	GCCCTGCGGGAAATCATAAAG	5

[0123] 来自卵母细胞(Smallwood 等(2011)Nat. Genet. 43, 811-814 页)、ES 细胞(Cloonan 等, 2008)和多种体细胞组织(Cloonan 等(2008)Nat. Methods 5, 613-619 页; ESTs from GenBank)的高通量 RNA 测序(RNA-seq)数据的检测表明存在使用起来似乎限于卵母细胞(指定为“卵母细胞”)的另一上游启动子。

[0124] 上游启动子可以提供用于卵母细胞和因此合子的机制以积累高水平的 TET3,然后切换至在其它组织中更低水平的生产。另外,在卵母细胞特异性外显子内,存在预测的翻译起始位点,所述起始位点与 TET3 蛋白的其余部分同框。所述小肽可以在调节卵母细胞中的 TET3 的功能中起某种作用。RNA-seq 数据也表明,卵母细胞中产生的转录物主要缺乏 Tet3 基因的编码 CXXC 结构域的第一外显子。这个结构域具有其它表观遗传修饰基因中的同系物,如对于通过结合至 CpG 岛而靶向蛋白质有重要作用的 DNA 胞嘧啶-5-甲基转移酶 1(DNMT1)和甲基-CpG 结合结构域蛋白质 1(MBD1)。最近的研究表明, TET1CXXC 结构域能够结合除了未甲基化的胞嘧啶之外的 5-甲基胞嘧啶(5mC)和 5-羟甲基胞嘧啶(5hmC)。因此,这个结构域的差分并入可以导致卵母细胞和其它组织之间的 TET3 蛋白功能的变化。还值得注意的是由‘下游’启动子产生的转录物将缺少编码 CXXC 的外显子,从而允许在不同于卵母细胞的细胞中的蛋白质变化。

[0125] 实施例 2 :组织特异性转录物变化的分析

[0126] 为确认推定卵母细胞启动子的特异性并研究编码 CXXC 的外显子 1 在不同细胞类型中的含入 (inclusion), 如图 1 所示, 将引物设计在三种启动子中的每一个与外显子 1 或外显子 3 之间 (参见表 2)。实际上, 前者捕获含有编码 CXXC 的外显子的转录物, 而后者捕获缺少这种外显子的转录物。因此, 这些转录物分别被称为每个启动子的 CXXC (+) 变体或 CXXC (-) 变体, 其中只能产生 CXXC (-) 变体的下游启动子除外。

[0127] 表 2 :用于启动子分析的引物设计

[0128]

引物	序列	SEQ ID NO.
卵母细胞, 正向	GGGGTCGCACATGTTCCCTC	6
经典, 正向	GAAACTTTGCCCTTTGTGC	7
下游, 正向	CTCGGCGGGGATAATGG	8
外显子 1, 反向	CTTGCTGGGTGGTTCT	9
外显子 3, 反向	GCTTAGCTGCCTGAATCTCCA	10

[0129] 使用 Trizol (Invitrogen) 从 E14 胚状体、E14 ES 细胞、皮质、小脑、肺和脾中提取 RNA, 并且用不含 DNA 的试剂盒 (Ambion) 进行 DNA 酶处理。使用 oligo(dT) 引物, 利用 SuperScriptIII 第一链合成系统 (Invitrogen) 来制备 cDNA。

[0130] 使用 Brilliant II SYBR Green qPCR Master 混合试剂 (Agilent) 在 Stratagene Mx3005P 实时系统 (Agilent) 上完成定量 PCR。检测技术平行测定值的 C_t 值以确保小于 0.5 个周期的差异。将这些平行测定值取平均值, 并且使用 ΔC_t 方法、针对两个参考基因 Atp5b 和 Hspcb 的平均值进行标准化 (Pfaffl (2004) Real Time PCR, 63-82 页)。结果总结在图 2 中。

[0131] 这个数据确认 :卵母细胞启动子的有意义使用限于被检查的组织中的卵母细胞, 并且进一步证明 :卵母细胞独有地使用这个启动子。这表明, 卵母细胞中观察到的高表达是启动子使用的作用。

[0132] 另外, 卵母细胞中超过 98% 的 TET3 转录物缺乏编码 CXXC 的外显子。这与生物信息学分析一致, 从而证实将卵母细胞外显子剪接成外显子 1 产生截短的蛋白质。相反, 其它细胞类型使用经典启动子和下游启动子产生具有或不具有编码 CXXC 的外显子的转录物。因此, 存在于卵母细胞和因此合子中的 TET3 蛋白含有独特编码序列, 并且另外与几乎完全缺乏 CXXC 外显子含入 (exon inclusion) 的其它受检测组织形成对比。这些转录特征可以与全能细胞中的 TET3 的特定作用相关。

[0133] 总之, 本文呈现的数据鉴定出从 Tet3 基因座产生的三种主要转录变体 (参见表 3)。

[0134] 表 3 :所鉴定 Tet3 变体的概述

[0135]

变体	SEQ ID NO.
变体 1 :卵母细胞 CXXC(-)	11
变体 2 :经典 CXXC(-)	12
变体 3 :经典 CXXC(+)	13

[0136] 实施例 3 :ES 细胞中 Tet3 变体的克隆和过表达

[0137] 用 Gateway 系统 (Invitrogen), 通过几种中间载体将 Tet3 变体序列克隆至可诱导过表达载体中。使用被设计来允许使用 piggyBAC 系统 (Ding 等 (2005) Cell 122, 473-483 页; Wilson 等 (2007) Mol. Ther. 15, 139-145 页) 进行基因组合并的过表达载体, 所述系统另外含有克隆序列的 IRES-EGFP3' (以下称为 pBAC)。

[0138] 鉴于限于全能细胞, 选择变体 1 (SEQ ID NO: 11) 用于初始过表达分析。

[0139] 在 37°C 下, 含有 5% CO₂ 的潮湿气氛中, 在 0.1% 的明胶涂板中, 在补充有 15% FBS (胎牛血清, 测试的 ES 细胞, Invitrogen)、1xMEM 非必需氨基酸 (Gibco)、1x 青霉素 - 链霉素 (Gibco)、0.05mM β-巯基乙醇 (1:1000, Gibco) 和 10³ 个单位 /ml LIF (白血病抑制因子, ESGRO, Millipore) 的 DMEM (含 L-谷氨酰胺、4500mg/L D-葡萄糖、110mg/L 丙酮酸钠; Gibco) 中培养 E14 ES 细胞。每天更换培养基, 并且根据到达接近汇合的指示来分开细胞, 选择时除外。

[0140] 使用 FuGENE 6.0 (Roche), 利用各为 2 μg 的 pBAC 构建体和 piggyBAC 系统的以下其它组分来转染 1x10⁶ 个 E14 ES 细胞: 编码 piggyBAC 转座酶的质粒, 和嘌呤霉素可选择 rtTA 反式激活因子。转染后第二天, 通过加入 1 μg/ml 嘌呤霉素至培养基并随后维持来应用选择。

[0141] 在细胞收集的前一天, 将 1 μg/ml 强力霉素加入培养基以诱导 TET3 和绿色荧光蛋白 (GFP) 的同时表达。然后, 使用标准流式细胞技术将细胞胰酶消化并分选成单独的 GFP 阳性 (GFP+) 群体和 GFP 阴性 (GFP-) 群体。

[0142] 实施例 4 : 初步基因表达分析

[0143] 使用 DNA/RNA AllPrep Micro 试剂盒 (Qiagen) 从分选的细胞中提取 RNA, 并且用不含 DNA 的试剂盒 (Ambion) 进行 DNA 酶处理。使用 SuperScript III 第一链合成系统 (Invitrogen) 从 1 μg RNA 制备 cDNA。

[0144] 先前的工作已证实, ES 细胞的小群体 (称为 '2-细胞 ES 细胞') 上调基因与全能 2-细胞胚胎阶段的合子基因组激活相关联的基因, 并且显示全能性的标志, 如有助于胚外谱系的能力 (Macfarlan 等 (2012) Nature 487, 57-63 页)。鉴于 TET3 的表达主要限制于卵母细胞和受精卵, 并且作为在此阶段的唯一同工型而存在, 假设 ES 细胞中的 TET3 过表达将扩展或增强这个群体。因此, 基于观察到的它们在 2-细胞阶段和在 2-细胞 ES 细胞中的上调来选择下列候选者 (Macfarlan 等 (2012) Nature 487, 57-63 页): MuERV-L, Zscan4c, Fgf5, Tbx3, Fbxo15, Pramel17, Mbd5, Calcoco2, Gm4340, Zfp352, Sp110, Tdpoz2, Tcstv3。

[0145] 另外, 选择在 ES 细胞中表达但预期不上调的一些基因作为对照: Tet1、Tcl1、Ooep。

[0146] 还检测了 Tet3 转录物以验证其过表达。

[0147] 设计用于这些基因中的每一个的引物来用于定量 RT-PCR, 在可能的情况下跨越内含子 - 外显子边界进行设计 (参见表 4)。

[0148] 表 4 :基因表达分析引物的概述

[0149]

引物	序列	SEQ ID NO.
<u>候选基因</u>		
Tet3, 正向	GGTCACAGCCTGCATGGACT	14

[0150]

Tet3, 反向	AGCGATTGTCTTCCTTGGTCAG	15
MuERVL pol, 正向	ATCTCCTGGCACCTGGTATG	16
MuERVL pol, 反向	AGAAGAAGGCATTTGCCAGA	17
Zfp352, 正向	GGTTCACACATCCATCCCTACA	18
Zfp352, 反向	CCTGGCTGGGAAGCACCT	19
Fgf5, 正向	GGGATTGTAGGAATACGAGGAGTTT	20
Fgf5, 反向	TCTTGGCTTTCCCTCTCTTGTT	21
Gm4340, 正向	GGACGAAGTTTtagggacagca	22
Gm4340, 反向	TCCAGAGCCAGGGTTTCTTG	23
Sp110, 正向	CAGAATGAGGCAGGAGATTGG	24
Sp110, 反向	AGCACATATCAGGTCAGGAGTTCA	25
Zscan4c, 正向	GAAACAACAGCAATCTGCAACAA	26
Zscan4c, 反向	TTCATTTCCACTACAGCTTTCACC	27
Tdpoz2, 正向	ACACTCTCATCGTGGCTGACCT	28
Tdpoz2, 反向	CAGGGAGCGGAATCTTTCATC	29
Tbx3, 正向	TCCACCTCCAACAACACGTTT	30
Tet3, 反向	AACTGCTGCTATCCGGCACT	31
Mbd5, 正向	CGCATCCTTCTCTGGTGCTC	32
Mbd5, 反向	AGGTCTTGCATGTATAGCCTTCC	33
Tctv3, 正向	GAATCTTGGACTTTACTTCCTCTCC	34
Tctv3, 反向	GTGGCTTTGCTCTTTGCTGA	35
Fbxo15, 正向	GCCTTGAATGGAGAAGTACTGT	36
Fbxo15, 反向	AGCACACTGGAGAAGTACATACC	37
Pramel7, 正向	CGGCATCTCACTATTGATGATGTC	38
Pramel7, 反向	CTGACTGAGAGAGCTGGCACAG	39
Calcoco2, 正向	GCAAGGACTGGATTGGCATC	40
Calcoco2, 反向	CTGCTGTGTGGCTGAATCCTT	41
<u>对照基因</u>		
Tet1, 正向	CCATTCTCACAAGGACATTCACA	42
Tet1, 反向	GCAGGACGTGGAGTTGTTCA	43
Ooep, 正向	CCACACGGCTGATGCTGA	44
Ooep, 反向	CTAGGTTCCAGAGTTGACGG	45
Tell1, 正向	CTCCATGTATTGGCAGATCCTGTA	46
Tell1, 反向	CTCCGAGTCTATCAGTTCAAGCAA	47

[0151] 使用Brilliant II SYBR Green qPCR Master混合试剂(Agilent)在C1000 Touch CFX384实时系统(BioRad)完成定量PCR。检测技术平行测定值的 C_t 值以确保小于0.5个周期的差异。将这些平行测定值取平均值,并且使用 ΔC_t 方法、针对两个参考基因Atp5b和Hspcb的平均值进行标准化(Pfaffl(2004)Real Time PCR,63-82页)。用于Tet3变体1的结果汇总在图3(候选基因)和图4(对照基因)中,以及用于Tet3变体3的结果汇总在图5(候选基因)中。

[0152] GFP阳性细胞中的Tet3如所期望被上调。显著地,所有受检测候选基因显示在细胞中的增加的表达,所述细胞表达Tet3变体1和它的催化非活性对应物——包括表达上调

约 10 倍的一些基因——而对照基因保持相对稳定。可能的是,细胞亚群中发生大的表达变化并且因所述整体表达分析淡化,而不是整个群体更适度的上调。在任一情况下,这个数据支持向全能 2- 细胞阶段的转录程序的转移,从而导致过表达 TET3 的细胞的增强效力。

[0153] 实施例 5 :通过 mRNA-seq 的全基因组基因表达分析

[0154] 使用 Dynabeads mRNA 纯化试剂盒 (Invitrogen) 从 2 μ g 总 RNA 分离信使 RNA,并且用 RNA 断裂试剂 (Ambion) 片段化。使用 SuperScript III 第一链合成系统和 3 μ g μ l⁻¹ 随机六聚物 (Invitrogen) 进行第一链 cDNA 合成,随后用 DNA 聚合酶 I 和 RNA 酶 H 进行第二链合成。纯化后,使用在 PE2.0 上利用 Sanger 索引获得的配对双末端接头 (Illumina) 和 Illumina 的 NEBNext DNA Library Prep Master Mix Set (NEB) 由双链 cDNA 生成测序文库。在 IlluminaHi-Seq2000 的一个通道上利用单端 50bp 方案对样品测序;针对每个编索引样品获得的测序读长的数量在表 5 中给出。使用 TopHat (v1.4.1, 选项 -g 1) 结合来自 Ensembl release 61 的基因模型将信使 RNA-Seq 数据映射至小鼠基因组 (装配体 NCBIM37)。

[0155] 表 5 :用于 mRNA-seq 数据集的读长计数

[0156]

样品	读长
变体 1GFP-	52955484
变体 1GFP+	47627618
变体 1MutGFP-	57632592
变体 1MutGFP+	45503316

[0157] 在初步分析中,检测在上述 qPCR 数据中显示最大上调的候选基因用于与它们的基因家族的一些成员一起上调 :Prame13、Prame15、Prame17、Sp110、Tdpoz1、Tdpoz3、Tdpoz4、Tdpoz5、Tet3、Zfp352、Zscan4c、Zscan4d、Zscan4e、Zscan4f 和 Zscan4-ps2。

[0158] 在散点图上比较 GFP 阳性细胞和 GFP 阴性细胞,并且使用 SeqMonk v0.23.1 突出以上基因列表 (图 6 和 7)。再次, Tet3 如预期地在 GFP 阳性细胞中强烈上调。显著地,这个分析表明 :候选基因及其家族成员都在通过无偏全基因组测序鉴定的大多数上调的基因之中。与 qPCR 数据一致, Tet3 变体 1 或其催化失活对应物的过表达对基因表达上具有在相似效果,从而表明氧化酶功能对于转移到更“类全能”转录程序不是必须的。

[0159] 实施例 6 :类全能亚群的分析

[0160] 胚胎干细胞培养物相对于基因表达和发育能力是不同的。它们可以分成亚群的特征在于不同的标记基因的表达。通过不同的表达模式它们以单个细胞周期在不同的亚群之间移动。在相同胚胎干细胞培养物中的亚群的丰度相对较稳定。在野生型 ES 细胞中,很小比例的细胞 (5%) 显示出非常早期植入前胚胎的特征性表达谱。据认为与大多数 ES 细胞相比,这些细胞具有膨胀的效力的表型,并且它们对 ES 细胞贡献的在聚合实验中的胚外谱系的极罕见情况负责。

[0161] 评估表达 Tet3 变体 1 的 ES 细胞中的类全能亚群的丰度。使用 C1 系统 (Fluidigm) 和 SMARTer cDNA 扩增 (Clontech) 分离来自单独 GFP- 和 GFP+ 细胞的 cDNA。利用 EvaGreen

qPCR化学法 (Bio-Rad)、使用Biomark HD microfluidics 系统 (Fluidigm) 来分析稳态表达水平。下列基因用作用于类全能亚群的标记 (表 6 中以粗体突出显示) :Zscan4c、MuERV-L、Arg2、Dub2a、Testv3、Lgals4。

[0162] 设计用于这些基因中的每一个的引物来用于定量 RT-PCR, 在可能的情况下跨越内含子 - 外显子边界 (参见表 6)。

[0163] 表 6 :单个基因表达分析引物的概述

[0164]

引物	序列	SEQ ID NO.
Merv1_polnew_F	CCAACAGCAGAAACCAACT	48
Merv1_polnew_R	AAGGCAAATCCATAACCAGAATA	49
Arg2_F	CTGGATCAAACCTTGCTCTC	50
Arg2_R	ATCCCAAGTCGATCAATCTCTCTC	51
Dub2a_F	AATGCCTATGTGCTCTTCTATGTG	52
Dub2a_R	AGGTTTCTTTGGTTGCTTTCTTCT	53
Testv3_F	GAATCTTGGACTTTACTTCTCTCC	34(参见表 4)
Testv3_R	GTGGCTTTGCTCTTTGCTGA	35(参见表 4)
Lgals4_F	CAGCTTTATGAATGGCTCTTGG	54
Lgals4_R	ATCTGGACGTAGGACAAGGTGA	55
Stat3_F	CGAGAGCAGCAAAGAAGGAG	56
Stat3_R	GGGTAGAGGTAGACAAGTGGAGAC	57
Serpine2_F	TTCTTTCTTCATCTTGACCACA	58
Serpine2_R	ATCTTCTTCAGCACTTACCAACTC	59
Stella_F	ATGAAGGACCCTGAAACTCCTC	60
Stella_R	ACTCTTGTTCTCCACAGGTACGG	61
Krt8_F	GACATCGAGATCACCACCTACC	62
Krt8_R	TTTCAATCTTCTTACAACCACAG	63
Esrrb_F	GTATGCTATGCCTCCCAACGA	64

Esrrb_R	TACACGATGCCCAAGATGAGA	65
Tet2_F	GCCATTCTCAGGAGTCACTGC	66
Tet2_R	ACTTCTCGATTGTCTTCTCTATTGAGG	67
Asc12_F	AGCCCGATGGAGCAGGAG	68
Asc12_R	CCGAGCAGAGGTCAGTCAGC	69
Gata3_F	TCTGGAGGAGGAACGCTAATG	70
Gata3_R	GAGAGATGTGGCTCAGGGATG	71
Gata4_F	AGCAGCAGCAGTGAAGAGATG	72
Gata4_R	CGATGTCTGAGTGACAGGAGATG	73
Abcb5_F	GGTAGCACACAGGCTCTCCAC	74
Abcb5_R	ATGTCCTTGATTCCATTTGTTTCAT	75
Tgfb2_F	CCTTCGCCCTCTTTACATTGAT	76
Tgfb2_R	GCTTCGGGATTTATGGTGTG	77
Tdrd7_F	CCAATAGCAGGTTCACTCCAAAG	78
Tdrd7_R	TAAGAGGCAGGAGGCGTGATA	79
Gata6_F	TCTACACAAGCGACCACCTCA	80
Gata6_R	GCCAGAGCACACCAAGAATC	81
Zfp352_F	GGTTCACACATCCATCCCTACA	18(参见表4)
Zfp352_R	CCTGGCTGGGAAGCACCT	19(参见表4)
Eomes_F	CACTGGATGAGGCAGGAGATTT	82
Eomes_R	GAGAAGGTGAAGGTCTGAGTCTTG	83
Brachyury_F	ATAACGCCAGCCCACCTACT	84
Brachyury_R	TCATACATCGGAGAACCAGAAGAC	85
Sox2_F	CAGCTCGCAGACCTACATGAAC	86

Sox2_R	CTGGAGTGGGAGGAAGAGGTAA	87
--------	------------------------	----

[0165]

Tet1_F	CCATTCTCACAAAGGACATTCACA	42 (参见表 4)
Tet1_R	GCAGGACGTGGAGTTGTTCA	43 (参见表 4)
Oct4_F	GCTGCTGAAGCAGAAGAGGAT	88
Oct4_R	TCCTGAAGGTTCTCATTGTTGTC	89
Nanog_F	TACCTCAGCCTCCAGCAGATG	90
Nanog_R	CCAGATGCGTTCACCAGATAG	91
Atp5b_F	GGCCAAGATGTCCTGCTGTT	92
Atp5b_R	GCTGGTAGCCTACAGCAGAAGG	93
Hsp90_F	GCTGGCTGAGGACAAGGAGA	94
Hsp90_R	CGTCGGTTAGTGAATCTTCA	95

[0166] 使用 SINGuLAR 分析工具组 2.0 (Fluidigm) 分析单个细胞表达数据, 并且无监测聚类的结果显示为以较浅颜色表示较高表达的热图 (图 8)。基因在一个水平方向上成簇集中。用于类全能状态的标记基因密切相关并且以粗体突出显示。单个基因在一个水平方向上成簇集中。密切相关细胞的亚群显示非常高的类全能标记基因的表达水平 (由水平框突出显示), 并且因此命名为 ‘类全能’ 亚群。落入所述类别的细胞的比例显著上升在 Tet3 变体 1 的表达之上。而在 TET3 没有或非常低地表达的细胞中仅 5% 的细胞是所述亚群的一部分, 在 TET3 表达细胞中所述比例增加至 40% (图 9)。因此, 观察到的朝向类全能表达谱系的转移跨过由类全能亚群的突然膨胀所调节的群体。

[0167] 实施例 7: 通过转分化测定论证增强效力

[0168] ES 细胞是多能的, 因为它们可以产生许多不同细胞类型的胚胎, 但不能产生胚外组织如滋养层。因此在生长条件下形成用于滋养层干细胞 (TS) 培养的一类滋养层细胞的能力提供膨胀的效力的离体测定 (Ng 等人 (2008) *Nat Cell Biol.* 10, 1280-1290)。所述测试应用于野生型 E14ES 细胞和两种过表达 Tet3 变体 1 的组成型 ES 细胞系 (称为 Tet3 克隆 2 和 Tet3 克隆 7)。作为阳性对照, 平行测试已知经历明显转分化的过表达 Ras 转基因 (称为 iRas) 或缺乏 Oct4 表达 (称为 ZHBTc4) 的遗传修饰细胞系 (Niwa 等 (2000) *Nat. Genet.* 24, 372-376; Niwa 等 (2005) *Cell* 1123, 917-929)。

[0169] 为了将任何可观察到的变化与 TET3 表达的水平相关联, 在如以上所述野生类型 E14 ES 细胞和两个 Tet3 过表达 ES 细胞系上进行 qRT-PCR 分析 (图 10)。Tet3 克隆 7 表达 TET3 超过 Tet3 克隆 2 约 2 倍; 相对于 E14 细胞, 这两种细胞系具有显著增加的 Tet3 转录水平。

[0170] 转分化测定

[0171] 由补充有 20% FBS、1mM 丙酮酸钠、50U/mL 青霉素 - 链霉素和 0.05mM B- 巯基乙醇的 RPMI 1640 组成的 TS 基础培养基通过以下方式调节：在细胞培养皿上培养照射过的小鼠胚胎纤维 (MEF) 细胞两天，并且通过 0.22 μ m 过滤器。通过将 70% 条件培养基、30% TS 基础培养基、20ng/mL β - 胎儿生长因子和 1 μ g/mL 肝素混合来制备完全 TS 细胞培养基。

[0172] 在完全 TS 细胞培养基中培养 6 天后，通过形态学评估转分化 (图 11) 和 TS 细胞标记 CD40 的流式细胞术分析 (图 12)。

[0173] 对代表性相差图象的检测揭示：在过表达 TET3 的细胞系中针对 ZHBTc4 细胞的类滋养层形态的显著转移，所述类滋养层形态在 E14 细胞中大程度缺失。这个效果在 Tet3 克隆 7 细胞系中更显著。

[0174] CD40 是用于区分 TS 和 ES 细胞的确定标记 (Rugg-Gunn 等 (2012) Cell 122, 887-901)。流式细胞分析表明在 TET3 过表达之后，CD40 阳性细胞的数量有明显上升。总细胞群体的统计学测试确定相对于 E14ES 细胞用于过表达 TET3 的细胞系的高度显著增加 (学生 t 检验；在两种情况下 $p < 0.0001$)。再者，Tet3 克隆 7 细胞系中的变化更广泛，CD40 阳性细胞达到与阳性对照 iRas 细胞系中观察到的几乎相等的水平。

[0175] 这个数据显示：ES 细胞中 TET3 的过表达导致转分化至类全能状态能力的增强，从而证明发育效力的增强。此外，效力的这种扩展与细胞所接收的 TET3 的剂量相关；在两种分析中，具有较高的 TET3 表达的细胞系 (克隆 7) 显示出更大的效果。

[0001]

序列表

- <110> Babraham Institute
 <120> 新颖方法
 <130> BAB-C-P1499PCT
 <150> 1222693.2
 <151> 2012-12-17
 <160> 95
 <170> PatentIn 3.5版
 <210> 1
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工
 <220>
 <223> 合成引物
 <400> 1
 aaccactca caccaaccct cag 23
 <210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工
 <220>
 <223> 合成引物
 <400> 2
 ctggacacac cggccaagaa g 21
 <210> 3
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工
 <220>
 <223> 合成引物
 <400> 3
 aagcctggga ggtggaatga gaag 24
 <210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工
 <220>
 <223> 合成引物

[0002]

<400> 4 gggctcteta gcaccattga cc	22
<210> 5 <211> 21 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成引物	
<400> 5 gccctgcggg aaatcataaa g	21
<210> 6 <211> 19 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成引物	
<400> 6 ggggtcgcac atgttcctc	19
<210> 7 <211> 20 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成引物	
<400> 7 gaaactttgc ccccttgtgc	20
<210> 8 <211> 17 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成引物	
<400> 8 ctcggcgggg ataatgg	17
<210> 9 <211> 18 <212> DNA <213> 人工	

[0003]

<220>		
<223>	合成引物	
<400>	9	
	cttggctggg fgggttct	18
<210>	10	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	10	
	gettagctgc cttgaatctc ca	22
<210>	11	
<211>	5142	
<212>	DNA	
<213>	小家鼠	
<400>	11	
	atgttctctcc cagaaacccc tcaacaatat gctgtggaaa taaatgctcg tgaaggaacg	60
	gggeccctggg cacaaggggc gactgtcaag acaggctcag agetcagecc agttgatgga	120
	cctgttccag gtcagatgga ctcagggcca gtgtaccatg gagattcaag gcagctaagc	180
	acctcagggg cgccggtea tggtgctaga gagcccgcg gaccgggtct tctgggagct	240
	gegggtcctt ggccggtaga ccagaagccc gactgggagg ctgcctcagg ccccaactcac	300
	gtgctctgtc tggagatgc ccacgacctg gtggcctttt cggccgtggc cgaagctgtg	360
	tcattctacg gggcccttag taccggctc tatgaaacct tcaacctga gatgagtct	420
	gaggetggga gcaacggcag gggcccccg cctgagagct gctctgaggg cagtgaagac	480
	ctggacacgc tgcagacagc cctggccctt gcaaggcatg gcatgaaacc acccaactgc	540
	acctgcatg gcccagagtg ccccgacttc ctcgagtggc tggagggcaa gateaagtct	600
	atggccatgg agggagggca ggggcggcct aggetcccag gcgctctgcc tcccagtgag	660
	gtggcctcc cagcccctag caccagaccg ccactcttta gctctgaggt ccccaggta	720
	ctctcccctgg agggcctgcc tetgtcccag agcgcgctga gcattgcaa ggaaaaaac	780
	atcagcctgc agacagccat cgcctcagag gccctcacac agctctctc cgccctccct	840
	cagcctctc attccacctc ccaggettct tgtccaactc ctgaggcctt gtcccctct	900
	gccccttca ggtctcccca gtctacctc cgggccccct catggcctgt ggttcccca	960

[0004]

gaggaacatc catcctttgc tectgacagc ccagccttec ctccagcaac cccaagacct	1020
gagttttctg aagcgtgggg cactgacacc cccccagcga caccccggaa ctcttggcct	1080
gtacctegcc caagccctga ccctatggca gaactggagc agctattggg cagcgccagt	1140
gattacatcc agtcagtatt caagcggcct gaggccctgc ccaccaagcc caaggtcaag	1200
gttgaggccc ectettcttc ccctgetecg gtaccatetc ctatttctca gagggaggct	1260
ccccgtctgt ctccagagcc tgacacccac cagaaggccc agacagccct tcagcaacat	1320
cttcatcaca agegcaacct attcttggaa caggcccaag atgcctcett cctacttcc	1380
acagagcctc aggctcctgg ttggtgggcc cctcccggct cacctgcccc aaggcctcct	1440
gacaaaccac ccaaggaaaa gaaaaagaag cccccaccc ctgctggagg tcccggtgga	1500
gcagagaaaa ccaccctgg gateaagacc agtgtccgaa agcccattca gatcaagaaa	1560
tccaggteca gggacatgca gccectcttc ctgectgtta ggcagattgt tctggaaggg	1620
ctaaaacccc aagcctcaga aggaeaggca cegttaccg cccagctctc tgtcccacct	1680
cctgcctccc aggggtctgc atcccagagc tgtgcccacc ctctaacccc agaaccctct	1740
cttgcgetat ttgcacctag tccctccggg gacagcctgc tgccccctac tcaggaaatg	1800
agateccccca gccccatggt agecctgcag tcaggetcca ctgggtgccc ccttcccct	1860
gccgatgaca agctggagga gctcatccgg caatttgagg ctgaatttgg ggatagcttt	1920
gggetfcccg gcccaccttc ggtgcccatt caagaacctg aaaaccaatc aacatgtctc	1980
ccagctccgg agagcccttt tgccaccgc tcccccaaga agatcaagat cgagtcctca	2040
ggggccgtga ctgtgctctc aactacctgc ttccattcag aagagggggg acaggaggcc	2100
acgeccacca aggctgagaa ccaactcaca ccaacctca gtggcttctt ggagtcacct	2160
ctaaagtacc tagacacacc tactaagagt ctgctggaca caccggccaa gaaggctcag	2220
tccgattcc ctacctgca ttgtgtcgaa caaatagtgg agaaagatga aggcccatat	2280
tacaactacc tgggatctgg ccccacagta gcttctatcc gggaactcat ggaggatcgg	2340
tatggagaaa aggggaaage tatccgatt gagaaggtea tctacacggg caaggagggg	2400
aagagttctc gaggctgtcc catgccaag tgggtgatcc gaagacacac actggaggag	2460
aagctgctgt gcctggctgc gcatcgggca ggccaccatt gtcagaacgc cgtgattgtt	2520
atcttgatcc tggcctggga gggeatccct cgaagccttg gggacaccct ctaccaggag	2580
cttactgata ccctccgga gtatggcaac cctaccagcc ggagatgtgg cctcaatgat	2640

[0005]

gaceggacct	gtgcttgcca	aggcaaaagac	cctaacacct	gcggtgcctc	cttctccttc	2700
ggctgttccct	ggagcatgta	cttcaacggc	tgcaaatatg	ctcggagcaa	gaegccacga	2760
aagttccgcc	tcacgggaga	caatccgaag	gaggaggagg	tgtccggaa	tagctttcag	2820
gatctggcca	ctgaagtgtc	teccctctac	aagcggetcg	caccccaggc	ctatcagaac	2880
caggtgacca	atgaggatgt	ggcgatcgac	tgccgectgg	ggetgaagga	agggagaccc	2940
ttctcagggg	tcacagcctg	catggacttc	tgtgcccacg	cccacaagga	ccaacataac	3000
ctctacaatg	ggtgcactgt	ggtctgcacc	ctgaccaagg	aagacaatcg	ctgcgtgggc	3060
cagatccctg	aggacgagca	actgcacgtg	ctgcccctct	acaagatggc	cagcacggat	3120
gagtttgcca	gcgaggaaaa	ccagaacgcc	aaggtcagta	gtggggccat	ccaggtgctc	3180
acagcattcc	ccagagaggt	ccggcggtg	cctgagcctg	ccaagtccctg	ccgccaaegg	3240
cagctggaag	ccaggaaggc	ggcggccgag	aagaagaagc	tgcagaagga	gaaactgagc	3300
acgccagaga	agateaagca	ggaggccctg	gagttggctg	gagtcaccac	tgaccagge	3360
ctgtctctga	agggtggatt	gtcccagcaa	agcctgaagc	cctcccctcaa	ggtggagcct	3420
cagaaceact	ttagctcctt	taagtacagt	ggcaatgcgg	tggtggaaag	ctactcgggtg	3480
ctgggcagct	gccggccctc	cgaccctac	agcatgagca	gtgtgtattc	ctaccattcg	3540
egctatgcac	agcctggcct	ggcctctgtc	aacggcttcc	actccaagta	cacacttccc	3600
tcctttggct	actatggctt	tecatcaagc	aacctgtct	tcccctccca	gttcttggtt	3660
cccagtgcct	gggggcatgg	gggcagtgga	ggcagttttg	agaagaagcc	agacctccat	3720
gctctacaca	acagcctgaa	cccagcctac	ggtggtgctg	agtttgccga	getgcccaggt	3780
caggctgttg	ccacagacaa	ccaccacccc	atccctcacc	accagcagcc	tgcctaccca	3840
ggccccaaagg	aatatctget	acccaaggtc	ccccagctcc	acceagcctc	cagggacccc	3900
tctccccttg	ctcagagttc	cagttgctac	aacagatcca	tcaagcaaga	gccaatagac	3960
cctctgaccc	aggctgagtc	cattcccaga	gactctgcta	agatgagtag	aacacccttg	4020
ccggaagcat	ctcagaatgg	gggaccagct	catctgtggg	gacagtactc	aggaggccca	4080
agcatgtccc	cgaagaggac	taacagtgta	ggtggcaact	ggggcgtggt	ccctccgggg	4140
gagagcccta	ccattgttcc	cgacaagctc	aattcttttg	gggccagctg	tctcactctc	4200
tcacacttcc	cagaaagcca	gtggggactg	ttaactgggtg	aaggccagca	gtcggccccc	4260
catgctggag	cacgcttctg	aggcaagcca	tggagcccct	gcaagtttgg	gaacggcacc	4320
tctgccttga	ctggtcccag	cctaactgag	aagccatggg	ggatgggaac	cggggatttc	4380

[0006]

aacccccgcc	tgaaggtgg	acctgggttc	caagacaagt	tgtggaatcc	tgtgaaggtg	4440
gaggaggcca	ggattcccac	accgggggcc	aacccgctag	acaagcctg	gcaagccttt	4500
ggcatgccct	tgagctccaa	cgagaagcta	tttggggccc	tgaagtcaga	ggagaaactg	4560
tgggatccct	tcagcctgga	ggaggggaca	gctgaggagc	ccccageaa	gggggtggtg	4620
aaggaagaga	agagtggacc	cacagtggaa	gaggacgagg	aggaactgtg	gtcggacagt	4680
gaacacaaact	tcctggatga	gaacataggc	ggggtggccg	tggeccccgc	ccattgetcc	4740
atcctcctcg	agtgtgcccc	gegagagctg	catgccacca	ctcactcaa	aaaacccaac	4800
cgtgcccacc	ccaccgcat	ctcctgggtc	ttctaccaac	acaagaacct	caaccagccc	4860
aaceaegggc	tggectctg	ggaggccaag	atgaagcagc	tggeggaacg	ggcgcggcag	4920
eggcaagagg	aggccgcacg	cctgggcctg	ggccagcagg	aggccaagct	ctaegggaag	4980
aagcgaat	gggggggtgc	tatggtggct	gagccccagc	acaagaaaa	gaaggggct	5040
atcctaccc	ggcaggcctg	ggccatgccc	acagactcgc	cggtcacctg	gtcctcttac	5100
gectacacaa	aggtcactgg	cccctacagc	cgctggatct	ag		5142

<210> 12
 <211> 5007
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<400> 12						
atggactcag	ggccagtgta	ccatggagat	tcaaggcagc	taagcacctc	aggggcgccc	60
gtcaatggtg	ctagagagcc	cgecggacc	ggtcttctg	gagctgcggg	tccttggcgg	120
gtagaccaga	agccccactg	ggaggtgccc	tcaggcccca	ctcacgctgc	tcgtctggaa	180
gatgcccacg	acctgggtggc	cttttcggcc	gtggccgaag	ctgtgtcctc	ttacggggcc	240
cttagtaacc	ggctctatga	aaccttaaac	cgtgagatga	gtcgtgagge	tgggagcaac	300
ggcagggggc	cccggcctga	gagctgctct	gagggcagtg	aagacctgga	caecgtgcag	360
acagccctgg	cccttgcaag	gcattggcatg	aaaccaccca	actgcacctg	cgatggccca	420
gagtgccecg	acttctctga	gtggtctggag	ggcaagatca	agtctatgga	catggaggga	480
gggcaggggc	ggcctaggct	cccaggcctc	ctgcctccca	gtgaggctgg	cctcccagcc	540
cctagcacca	gaccgcccact	ccttagctct	gaggtcccc	aggtacctcc	cctggagggc	600
ctgcctctgt	cccagagcgc	gctgagcatt	gccaaggaaa	aaaacatcag	cctgcagaca	660
gcatcgcca	tcgaggecct	cacacagctc	tcctcggccc	tcctcagcc	ttctcattec	720

[0007]

acctcccagg	cttcttgtec	actccctgag	gccttgtecc	cttetgcccc	tttcaggtct	780
ccccagtect	acetcegggc	ccccatgg	cctgtggttc	ccccagagga	acatccatcc	840
tttgctectg	acagcccage	cttccctcca	gcaaceccaa	gacctgagtt	ttctgaagcg	900
tggggcactg	acaceccccc	agcgacaccc	cggaactcct	ggcctgtacc	tcgcccgaagc	960
cctgacecta	tggeagaact	ggagcagcta	ttgggcagcg	ccagtgatta	catccagtca	1020
gtattcaage	ggcctgagge	cctgcccacc	aagcccgaag	tcaaggttga	ggccccctct	1080
tcttcccctg	ctcgggtacc	atctctatt	tctcagaggg	aggctcccct	gctgtcttca	1140
gagcctgaca	cccaccagaa	ggcccagaca	gcccttcagc	aacatcttca	tcacaagcgc	1200
aacctattct	tggaacaggc	ccaagatgcc	tccttcccta	cttccacaga	gcctcaggct	1260
cctggttggg	gggcccctcc	cggtcaccct	gcccgaaggc	ctcctgacaa	accacccaag	1320
gaaaagaaaa	agaagccccc	cacccctgct	ggaggteccg	tgggagcaga	gaaaaccacc	1380
cctgggatca	agaaccagtgt	ccgaaagccc	attcagatca	agaaatccag	gtccagggac	1440
atgcageccc	tcttctgccc	tgtttaggcag	attgttctgg	aagggtctaaa	accccgaagcc	1500
tcagaaggac	aggcaccggt	accgcccag	ctctctgtcc	cacctcttgc	ctcccagggt	1560
getgcatccc	agagctgtgc	caccccteta	accccagaac	cttctcttgc	getatttgca	1620
cctagtccct	ccggggacag	cctgctgecc	cctactcagg	aatgagatc	ccccageccc	1680
atggtagccc	tgcagtcagg	ctccaactgt	ggccccttc	ccccgtccga	tgacaagctg	1740
gaggagetca	tccggcaatt	tgaggctgaa	tttggggata	gctttgggct	tcccggccca	1800
ccttcgggtgc	ccattcaaga	acctgaaaac	caatcaacat	gcttcccagc	tccggagagc	1860
ccttttgcca	cccgctcccc	caagaagatc	aagatcgagt	cctcaggggc	cgtgactgtg	1920
ctctcaacta	cctgcttcca	ttcagaagag	gggggacagg	aggccacgcc	caccaagget	1980
gagaacecac	tcacaccaac	ctcagtgge	ttcttgaggt	cacctctaaa	gtacctagac	2040
acacctacta	agagtctgct	ggacacaccg	gccaagaagg	ctcagtccga	gttcccctacc	2100
tgcgattgtg	tcgaacaaat	agtggagaaa	gatgaaggcc	catattacac	tcacctggga	2160
tctgcccaca	cagtagcttc	tatccgggaa	ctcatggagg	atcggtatgg	agaaaagggg	2220
aaagctatcc	ggattgagaa	ggtcatctac	acgggcaagg	aggggaagag	ttctcgaggc	2280
tgteccatcg	ccaagtgggt	gatccgaaga	cacacactgg	aggagaagct	gctgtgcctg	2340
gtgcggcatc	gggcaggcca	ccattgtcag	aacgccgtga	ttgttatctt	gatcctggcc	2400

[0008]

tgggagggca	tcctegaag	ccttggggac	accctctacc	aggagettac	tgataccete	2460
cggaagtatg	gcaaccctac	cagccggaga	tgtggcctca	atgatgaccg	gacctgtgct	2520
tgccaaggca	aagaccetaa	cacctgcggt	gcctccttct	ccttcggctg	ttcctggage	2580
atgtacttca	acggctgeaa	atatgctcgg	agcaagaage	cacgaaagtt	ccgcctcaeg	2640
ggagacaatc	cgaaggagga	ggaggtgctc	cggaataget	ttcaggatct	ggccactgaa	2700
gttgcetccc	tctacaagcg	gctcgcaccc	caggcctatc	agaaccaggt	gaccaatgag	2760
gatgtggcga	tcgactgccc	cctggggctg	aaggaaggga	gaccttctc	aggggtcaca	2820
gcctgcatgg	acttctgtgc	ccacgcccac	aaggaccaac	ataacctcta	caatgggtgc	2880
actgtggtet	gcacctgac	caaggaagac	aatcgcctgc	tgggccagat	ccctgaggac	2940
gagcaactgc	acgtgetgcc	cctctacaag	atggccagea	cggatgagtt	tggecagcag	3000
gaaaaccaga	acgccaaggt	cagtagtggg	gccatccagg	tgtcacage	attccccaga	3060
gaggtccggc	ggctgectga	gctgccaag	tcctgcccgc	aacggcaget	ggaagccagg	3120
aaggcggcgg	ccgagaagaa	gaagctgcag	aaggagaaac	tgagcacgcc	agagaagate	3180
aagcaggagg	ccctggagtt	ggetggagtc	accactgacc	caggcctgtc	tctgaagggt	3240
ggattgtecc	agcaaagcct	gaagccctcc	ctcaaggtgg	agcctcagaa	ccactttage	3300
tcctttaagt	acagtggcaa	tgeggtggtg	gaaagctact	cgtgtctggg	cagctgcocg	3360
ccctccgacc	cctacagcat	gagcagtggt	tattcctacc	attegcgcta	tgcacagcct	3420
ggcctggcct	ctgtcaacgg	cttccactcc	aagtacacac	ttcctcctt	tggetactat	3480
ggctttccat	caageaacc	tgtcttcccc	tcccagttcc	tgggtcccag	tgeetggggg	3540
catgggggca	gtggaggeag	ttttgagaag	aagccagacc	tccatgctct	acacaacagc	3600
ctgaaccag	cctacgggtg	tgttgagttt	gccgagctgc	caggtcagge	tgttgccaca	3660
gacaaccaac	accecatccc	tcaccaccag	cagcctgctt	accagccc	caaggaatat	3720
ctgctaceca	aggtececca	getccaccca	gcattccagg	accctctccc	ctttgctcag	3780
agttccagtt	gttacaacag	atccatcaag	caagagccaa	tagaccctct	gaccagcgtt	3840
gagtccattc	ccagagactc	tgetaagatg	agtagaacac	ccttgccgga	agcatctcag	3900
aatgggggac	ccagtcctct	gtggggacag	tactcaggag	gcccagcat	gtccccgaag	3960
aggactaaca	gtgtaggtgg	caactggggc	gtgttcctc	cgggggagag	ccctaccatt	4020
gttcccagaca	agctcaattc	ttttggggcc	agctgtctca	ctccttcaca	cttcccagaa	4080
agccagtggtg	gactgttcc	tgggtgaagc	cagcagtcgg	ccccccatgc	tggagcacgg	4140

[0009]

cttcgaggca agccatggag cccctgcaag tttgggaacg gcacctctgc ettgactggt	4200
cccagcctaa ctgagaagcc atgggggatg ggaaccgggg attteaacce cggcctgaaa	4260
ggtggacctg ggttccaaga caagttgtgg aatcctgtga aggtggagga gggcaggatt	4320
cccacaccgg gggccaaccc gctagacaaa gcctggcaag cttttggeat gccttgagc	4380
tccaacgaga agctatttgg ggcctgaag tcagaggaga aactgtggga tcccttcage	4440
ctggaggagg ggacagctga ggagcccccc agcaaggggg tggtaagga agagaagagt	4500
ggacccacag tggagagga cgaggaggaa ctgtgtgagg acagtgaaca caacttctg	4560
gatgagaaca taggcgggggt ggccgtggcc cccgccatt gctccatct catcgagtgt	4620
gcccggcgag agctgcatgc caeactcca ctcaaaaaac ccaaccgtg ccaccccacc	4680
cgcatctgc tggtttcta ccaacacaag aacctcaacc agcccaacca cgggctggcg	4740
ctctgggagg ccaagatgaa gcagctggcg gaacggggcg ggcageggca agaggaggcc	4800
gcacgcctgg gcctgggcca gcaggaggcc aagctctacg ggaagaagcg aaaatggggg	4860
ggtgctatgg tggctgagcc ccagcacaaa gaaaagaagg gggctatccc taccggcag	4920
gcctggcca tgcccacaga ctccggggtc accgtgtect cttacgcta cacaaaggtc	4980
actgcccct acagccgtg gatctag	5007

<210> 13
 <211> 5412
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<400> 13	
atgagccagt ttcaggtgcc cttggcggtc cagccggacc tgtcaggact ttatgatttc	60
ccgagggcc aggtgatggt agggggcttc caggggcctg ggttctat ggctgggagt	120
gagacccaac tgcgaggggg tggagatggg cggaagaaaa ggaaacgggtg tgggacctgc	180
gatecctgcc gacggtgga aaactgtggg tcttgtacca gctgcaecaa tegtegcaca	240
caccagatct gcaaaactccg caagtgtgag gtgctgaaga aaaaagcggg gttcttaag	300
gagtggaata taaatgctcg tgaaggaacg gggccctggg cacaaggggc gactgtcaag	360
acaggtcag agctcagccc agttgatgga cctgttccag gtcagatgga ctcagggcc	420
gtgtaccatg gagattcaag gcagetaagc acctcagggg cgccggtaa tgggtctaga	480
gagccggccg gaccgggtct tetgggagct gcgggtctt ggccggtaga ccagaagccc	540
gactgggagg ctgcctcagg cccactcac gctgctctgc tggagatgc ccacacctg	600

[0010]

gtggcctttt	cggccgtggc	cgaagctgtg	tcattctacg	gggcccttag	taccggctc	660
tatgaaacct	tcaaccgtga	gatgagtcgt	gaggctggga	gcaacggcag	gggcccccg	720
cctgagaget	gctctgaggg	cagtgaagac	ctggacacgc	tgacagacagc	cctggccctt	780
gcaaggcatg	gcatgaaacc	acccaactgc	acctgcatg	gcccagagtg	ccccgacttc	840
ctcagatggc	tggagggcaa	gatcaagtct	atggccatgg	agggagggca	ggggcggcct	900
aggctcccag	gcgctctgcc	tcccagtgag	gctggcctcc	cagcccctag	caccagaccg	960
ccactcetta	gctctgaggt	ccccaggta	cctccccctgg	agggcctgcc	tctgtcccag	1020
agcgcgctga	gcattgccaa	ggaaaaaac	atcagcctgc	agacagceat	cgccatcgag	1080
gcectcacac	agctctctc	cgccctccct	cagccttctc	atccacctc	ccaggettct	1140
tgtccactcc	ctgaggcctt	gtccccctt	gcccccttca	ggtctccca	gtcctacctc	1200
eggccccct	catggcctgt	ggttccccca	gaggaacatc	catcctttgc	tcctgacagc	1260
ccagccttcc	ctccagcaac	cccaagacct	gagttttctg	aagcgtgggg	cactgacacc	1320
ccccagcga	caccccgga	ctctggcct	gtacctcgcc	caagccctga	ccctatgga	1380
gaactggagc	agctattggg	cagcgcctgt	gattacatcc	agtcagtatt	caagcggcct	1440
gaggccctgc	ccaccaagcc	caaggctcaag	gttgaggccc	ctctcttctc	ccctgctcgc	1500
gtaccatctc	ctatttctca	gagggaggt	cccctgctgt	cttcagagcc	tgacacccac	1560
cagaaggccc	agacagccct	tcagcaacat	cttcacaca	agcgcacct	attcttgga	1620
caggeccaag	atgcctcctt	ccctacttcc	acagagcctc	aggctcctgg	ttggtgggcc	1680
ctctccggct	cacctgcccc	aaggcctcct	gacaaaccac	ccaaggaaaa	gaaaaagaag	1740
ccccccacc	ctgetggagg	tcccgtggga	gcagagaaaa	ccaccctgg	gatcaagacc	1800
agtgtccgaa	agccattca	gatcaagaaa	tccaggctca	gggacatgca	gcccccttct	1860
ctgctgttta	ggcagattgt	tctggaagg	ctaaaacccc	aagcctcaga	aggacaggca	1920
ccgttaeccg	cccagetctc	tgtcccacct	cctgcctccc	agggtgctgc	atcccagagc	1980
tgtgccacc	ctctaacc	agaaccttct	cttgccttat	ttgcacctag	tcctctcggg	2040
gacagcctgc	tgccccctac	tcaggaaatg	agatccccca	gccccatggt	agccctgcag	2100
tcaggetcca	ctggtggccc	cttccccct	gccgatgaca	agctggagga	gctcatccgg	2160
caatttgagg	ctgaatttgg	ggatagcttt	gggttccccg	gcccaccttc	ggtgccatt	2220
caagaacctg	aaaaccaatc	aacatgtctc	ccagctccgg	agagcccttt	tgccaccgc	2280

[0011]

tececcaaga	agatcaagat	cgagtcctca	ggggccgtga	ctgtgctctc	aactacctge	2340
ttccattcag	aagagggggg	acaggaggcc	acgcccacca	aggetgagaa	cccactcaca	2400
ccaaccctca	gtggettett	ggagtcacct	ctaaagtacc	tagacacacc	tactaagagt	2460
ctgctggaca	caccggccaa	gaaggctcag	tccgagttcc	ctacctgcca	ttgtgtcgaa	2520
caaatagtgg	agaaagatga	aggccatat	tacactcacc	tgggatctgg	ccccacagta	2580
gcttctatec	gggaactcat	ggaggatcgg	tatggagaaa	aggggaaagc	tatccggatt	2640
gagaaggtea	tctacacggg	caaggagggg	aagagttctc	gaggctgtcc	catcgccaag	2700
tgggtgatcc	gaagacacac	actggaggag	aagctgctgt	gcctgggtcg	gcctcgggca	2760
ggccaccatt	gtcagaacgc	cgtgattggt	atcttgatcc	tggectggga	gggcatccct	2820
cgaagccttg	gggacacct	ctaccaggag	cttactgata	ccctccggaa	gtatggcaac	2880
cctaccagcc	ggagatgtgg	cctcaatgat	gaccggaect	gtgettcca	aggcaaagac	2940
cctaacacct	gcggtgecte	cttctecttc	ggctgttctc	ggagcatgta	cttcaacggc	3000
tgcaaatatg	ctcggagcaa	gacgccacga	aagtccgcc	tacgggaga	caatccgaag	3060
gaggaggagg	tgctecggaa	tagctttcag	gatctggcca	ctgaagttgc	tcccctctac	3120
aagcggctcg	caccccagge	ctatcagaac	caggtgacca	atgaggatgt	ggcgatcgac	3180
tgccgcctgg	ggctgaagga	agggagacc	ttctcagggg	tcacagcctg	catggaette	3240
tgtgcccacg	cccacaagga	ccaacataac	ctctacaatg	ggtgcaactg	ggtctgcacc	3300
ctgaccaagg	aagacaatcg	ctgcgtgggc	cagatccctg	aggacgagca	actgcacgtg	3360
ctgeccctct	acaagatggc	cagcaecgat	gagtttgcca	gcgaggaaaa	ccagaacgcc	3420
aaggteagta	gtggggecat	ccagggtgctc	acagcattcc	ccagagaggt	ccggcgctg	3480
cctgagcctg	ccaagtctcg	ccgccaacgg	cagctggaag	ccaggaaggc	ggcggccgag	3540
aagaagaagc	tgcagaagga	gaaactgagc	acgccagaga	agatcaagca	ggaggccctg	3600
gagtfgctg	gagtcaccac	tgaccagge	ctgtctctga	agggtggatt	gteccagcaa	3660
agcctgaagc	cctcctcaa	ggtggagcct	cagaaccact	ttagctcctt	taagtacagt	3720
ggcaatgegg	tggtggaaag	ctactcgggtg	ctgggcaget	gccggccctc	cgacccttac	3780
agcatgagca	gtgtgtatct	ctaccattcg	cgctatgcac	agcctggcct	ggcctctgte	3840
aacggtctcc	actccaagta	cacacttccc	tcctttggct	actatggett	tcatecaagc	3900
aacctgtct	tcctctccca	gttctgggt	cccagtgctc	ggggcatgg	gggcagtgga	3960
ggcagttttg	agaagaagcc	agacctccat	gctctacaca	acagcctgaa	cccagcctac	4020

[0012]

ggtggtgctg agtttgccga gctgccaggt caggctgttg ccacagacaa ccaccacccc	4080
atccctcacc acccagcagcc tgettaccca ggceccaagg aatatctget acccaaggtc	4140
ccccagctcc acccagcacc cagggacccc tctccctttg ctcagagttc cagttgctac	4200
aacagatcca tcaagcaaga gccaatagac cctctgacce aggetgagtc cattcccaga	4260
gactctgcta agatgagtag aacacccttg ceggaageat ctcagaatgg gggacccagt	4320
catctgtggg gacagtactc aggaggccca agcatgtccc cgaagaggac taacagtga	4380
ggtggcaact ggggcgtgtt cctccgggg gagagcccta ccattgttcc cgacaagctc	4440
aattcttttg gggccagctg tctcactcct tcacacttcc cagaaagcca gtggggactg	4500
tctactggtg aaggccagca gtcggccccc catgtctggag cacggettcc aggcaagcca	4560
tggagcccct gcaagtttgg gaacggcacc tctgccttga ctggtcccag cctaactgag	4620
aagccatggg ggatgggaac cggggatttc aaccccgecc tgaaaggtgg acctgggttc	4680
caagacaagt tgtggaatcc tgtgaaggtg gaggaggca ggatteccac accgggggcc	4740
aacccgctag acaaagcctg gcaagccttt ggcatgcctt tgagctccaa cgagaagcta	4800
tttggggccc tgaagtcaga ggagaaaactg tgggatccct tcagcctgga ggaggggaca	4860
gctgaggagc cccccagcaa gggggtggtg aaggaagaga agagtggacc cacagtggaa	4920
gaggacgagg aggaactgtg gtcggacagt gaacacaact tcttgatga gaacatagge	4980
ggggtggccg tggccccgc ccatgtctcc atctctatcg agtgtcccg gcgagagctg	5040
catgccacca ctccactcaa aaaacccaac cgetgccacc ccaccgcat ctctctggtc	5100
ttctaccaac acaagaact caaccagccc aaccacgggc tggegetctg ggaggccaag	5160
atgaagcagc tggcggaacg ggcgcggcag cggcaagagg aggccgcacg cctgggcctg	5220
ggccagcagg aggccaagct ctacgggaag aagcgaaaat ggggggtgc tatggtggct	5280
gagccccagc acaaagaaaa gaagggggct atccctacce ggcaggcctt ggccatgccc	5340
acagactccg cggtcaccgt gtctctttac gcctacacaa aggtcactgg cccctacagc	5400
cgctggatct ag	5412

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成引物

[0013]

<400> 14 ggtcacagcc tgcattggact	20
<210> 15 <211> 22 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成引物	
<400> 15 agcgattgtc ttccttggtc ag	22
<210> 16 <211> 20 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成引物	
<400> 16 atctctggc acctggatg	20
<210> 17 <211> 20 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成引物	
<400> 17 agaagaaggc atttgccaga	20
<210> 18 <211> 22 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成引物	
<400> 18 ggttcacaca tccatcceta ea	22
<210> 19 <211> 18 <212> DNA <213> 人工	

[0014]

<220>		
<223>	合成引物	
<400>	19	
	cctggctggg aagcacct	18
<210>	20	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	20	
	gggattgtag gaatacgagg agttt	25
<210>	21	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	21	
	tcttggett ccctctcttg tt	22
<210>	22	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	22	
	ggacgaagtt tagggacagc a	21
<210>	23	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	23	
	tccagagcca gggtttcttg	20
<210>	24	

[0015]

<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 24	
cagaatgagg caggagattg g	21
<210> 25	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 25	
agcacatatc aggteaggag ttca	24
<210> 26	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 26	
gaaacaacag caatctgcaa caa	23
<210> 27	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 27	
ttcatttcca ctacagcttt cacc	24
<210> 28	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 28	
acactctcat cgtggetgac et	22

[0016]

<210> 29
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成引物

<400> 29
 cagggagcgg aatctttcat c 21

<210> 30
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成引物

<400> 30
 tccacctcca acaacacggt c 21

<210> 31
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成引物

<400> 31
 aactgetgct atccggcact 20

<210> 32
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成引物

<400> 32
 cgcaccttc tctggtgctc 20

<210> 33
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成引物

[0017]

<400> 33	
aggtcttgca tgtatagcct tcc	23
<210> 34	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 34	
gaatcttgga ctttacttcc tctcc	25
<210> 35	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 35	
gtggctttgc tctttgctga	20
<210> 36	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 36	
gccttgaatg gagaactgac tgt	23
<210> 37	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 37	
agcacactgg agaactcaca tacc	24
<210> 38	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工	

[0018]

<220>		
<223>	合成引物	
<400>	38	
	cggcatctca ctattgatga tgtc	24
<210>	39	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	39	
	ctgactgaga gagctggcac ag	22
<210>	40	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	40	
	gcaaggactg gattggcate	20
<210>	41	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	41	
	ctgctgtgtg gctgaatcct t	21
<210>	42	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	42	
	ccattctcac aaggacattc aca	23
<210>	43	

[0019]

<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 43	
gcaggacgtg gagttgttca	20
<210> 44	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 44	
ccacacggct gatgetga	18
<210> 45	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 45	
ctaggttccc agagttgacg g	21
<210> 46	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 46	
ctccatgtat tggcagatcc tgta	24
<210> 47	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 47	
ctccgagtct atcagttcaa gcaa	24

[0020]

<210> 48
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成引物

<400> 48
 ccaacagcag aaaccaacac t 21

<210> 49
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成引物

<400> 49
 aaggcaaatc cataaccaga ata 23

<210> 50
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成引物

<400> 50
 ctggatcaaaa cettgectet c 21

<210> 51
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成引物

<400> 51
 atcccaagtc gatcaatetc tetc 24

<210> 52
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> Synthtetic primer

[0021]

<400> 52 aatgcctatg tgetettcta tgtg	24
<210> 53 <211> 24 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成引物	
<400> 53 aggtttcitt ggttgctttc ttct	24
<210> 54 <211> 22 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成引物	
<400> 54 cagctttatg aatggctctt gg	22
<210> 55 <211> 22 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成引物	
<400> 55 atctggacgt aggacaaggt ga	22
<210> 56 <211> 20 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成引物	
<400> 56 cgagagcagc aaagaaggag	20
<210> 57 <211> 24 <212> DNA <213> 人工	

[0022]

<220>		
<223>	合成引物	
<400>	57	
	gggtagaggt agacaagtgg agac	24
<210>	58	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	58	
	ttcctttcctt catcttgacc aca	23
<210>	59	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	59	
	atcttcttca gcactttacc aactc	25
<210>	60	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	60	
	atgaaggacc ctgaaactcc tc	22
<210>	61	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	61	
	actcttgctc tccacaggta cgg	23
<210>	62	

[0023]

<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 62	
gacatcgaga tcaccaccta cc	22
<210> 63	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 63	
tttcaatett cttcacaacc acag	24
<210> 64	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 64	
gtatgetatg cctcccaacg a	21
<210> 65	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 65	
tacacgatgc ccaagatgag a	21
<210> 66	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 66	
gccattctca ggagtcactg c	21

[0024]

<210> 67
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成引物

<400> 67
 acttctcgat tgtcttctct attgagg 27

<210> 68
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成引物

<400> 68
 agccccgatgg agcaggag 18

<210> 69
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成引物

<400> 69
 ccgagcagag gtcagtcagc 20

<210> 70
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成引物

<400> 70
 tctggaggag gaacgctaata g 21

<210> 71
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成引物

[0025]

<400> 71
gagagatgtg gctcagggat g 21

<210> 72
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成引物

<400> 72
agcagcagca gtgaagagat g 21

<210> 73
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成引物

<400> 73
cgatgtctga gtgacaggag atg 23

<210> 74
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成引物

<400> 74
ggtagcacac aggctctcca c 21

<210> 75
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成引物

<400> 75
atgtccttga ttccatttgt teat 24

<210> 76
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工

[0026]

<220>		
<223>	合成引物	
<400>	76	
	ccttcgccct cttfacattg at	22
<210>	77	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	77	
	gcttcgggat ttatggtgtt g	21
<210>	78	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	78	
	ccaatagcag gttcagtcca aag	23
<210>	79	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	79	
	taagaggcag gaggcgtgat a	21
<210>	80	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	80	
	tctacacaag cgaccacctc a	21
<210>	81	

[0027]

<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 81	
gccagagcac accaagaate	20
<210> 82	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 82	
cactggatga ggcaggagat tt	22
<210> 83	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 83	
gagaaggatga aggtctgagt cttg	24
<210> 84	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 84	
ataacgccag cccacctact	20
<210> 85	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 85	
tcatacatcg gagaaccaga agac	24

[0028]

<210> 86
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成引物

<400> 86
 cagctctgcag acctacatga ac 22

<210> 87
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成引物

<400> 87
 ctggagtggg aggaagaggt aa 22

<210> 88
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成引物

<400> 88
 gctgetgaag cagaagagga t 21

<210> 89
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成引物

<400> 89
 tcctgaaggt tctcattggt gtc 23

<210> 90
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成引物

[0029]

<400> 90 tacctcagcc tccagcagat g	21
<210> 91 <211> 21 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成引物	
<400> 91 ccagatgcgt tcaccagata g	21
<210> 92 <211> 20 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成引物	
<400> 92 ggccaagatg tcctgctggt	20
<210> 93 <211> 22 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成引物	
<400> 93 gctggtagcc tacagcagaa gg	22
<210> 94 <211> 20 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成引物	
<400> 94 gctggctgag gacaaggaga	20
<210> 95 <211> 21 <212> DNA <213> 人工	

[0030]

<220>

<223> 合成引物

<400> 95

cgtcggttag tggaatcttc a

21

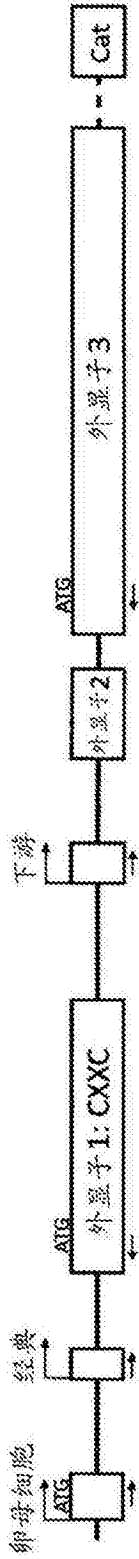


图 1

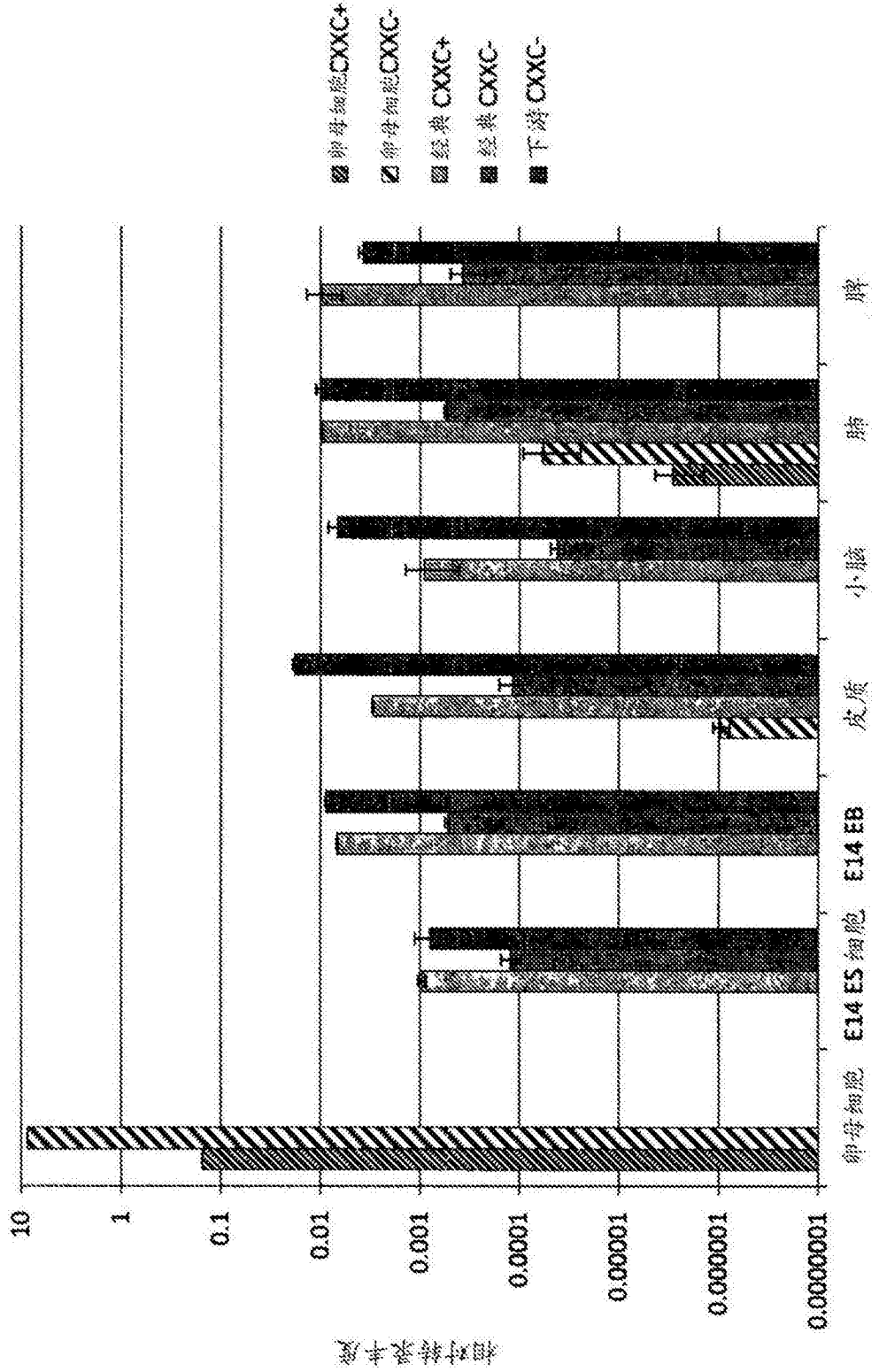


图 2



图 3

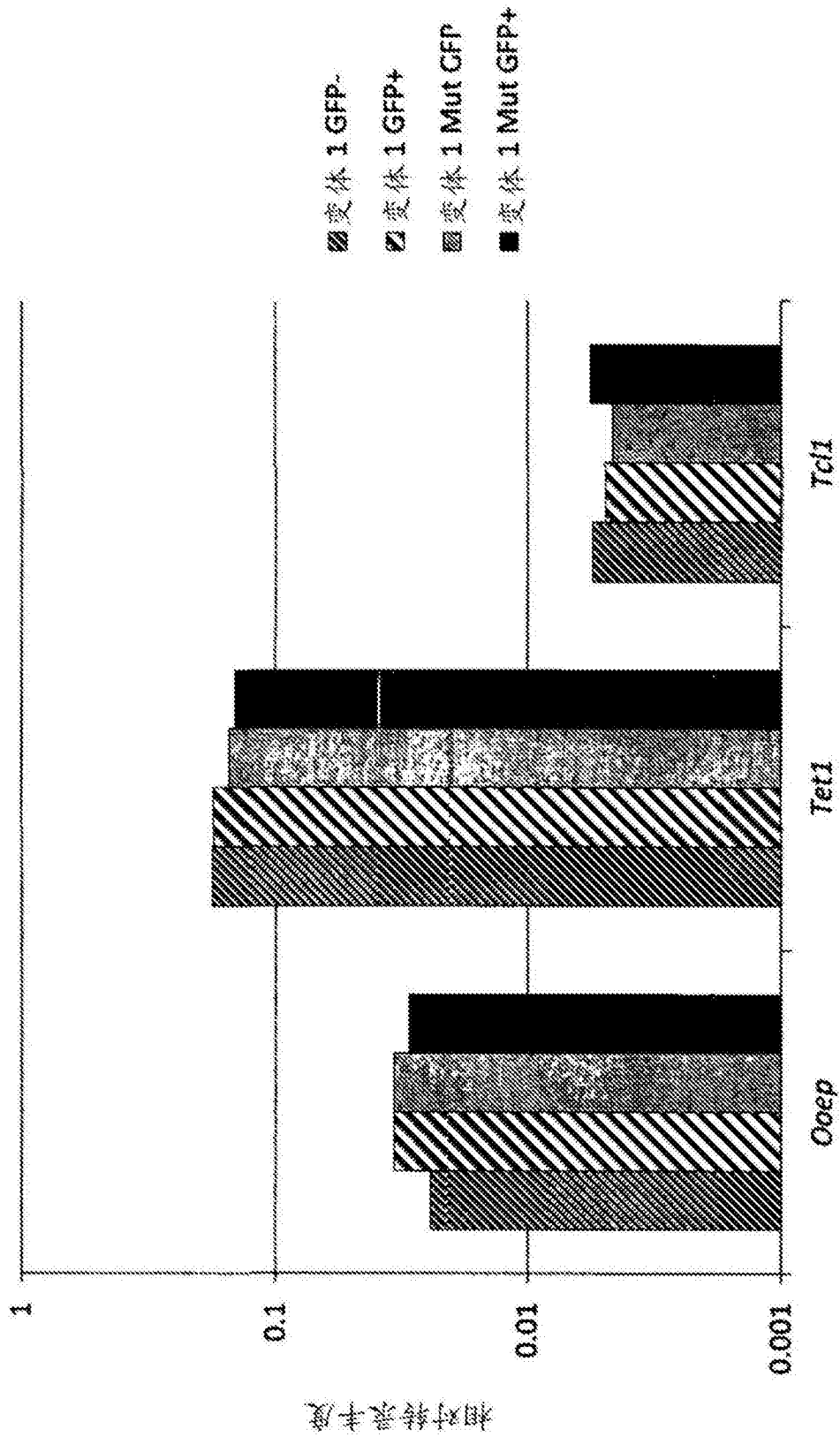


图 4

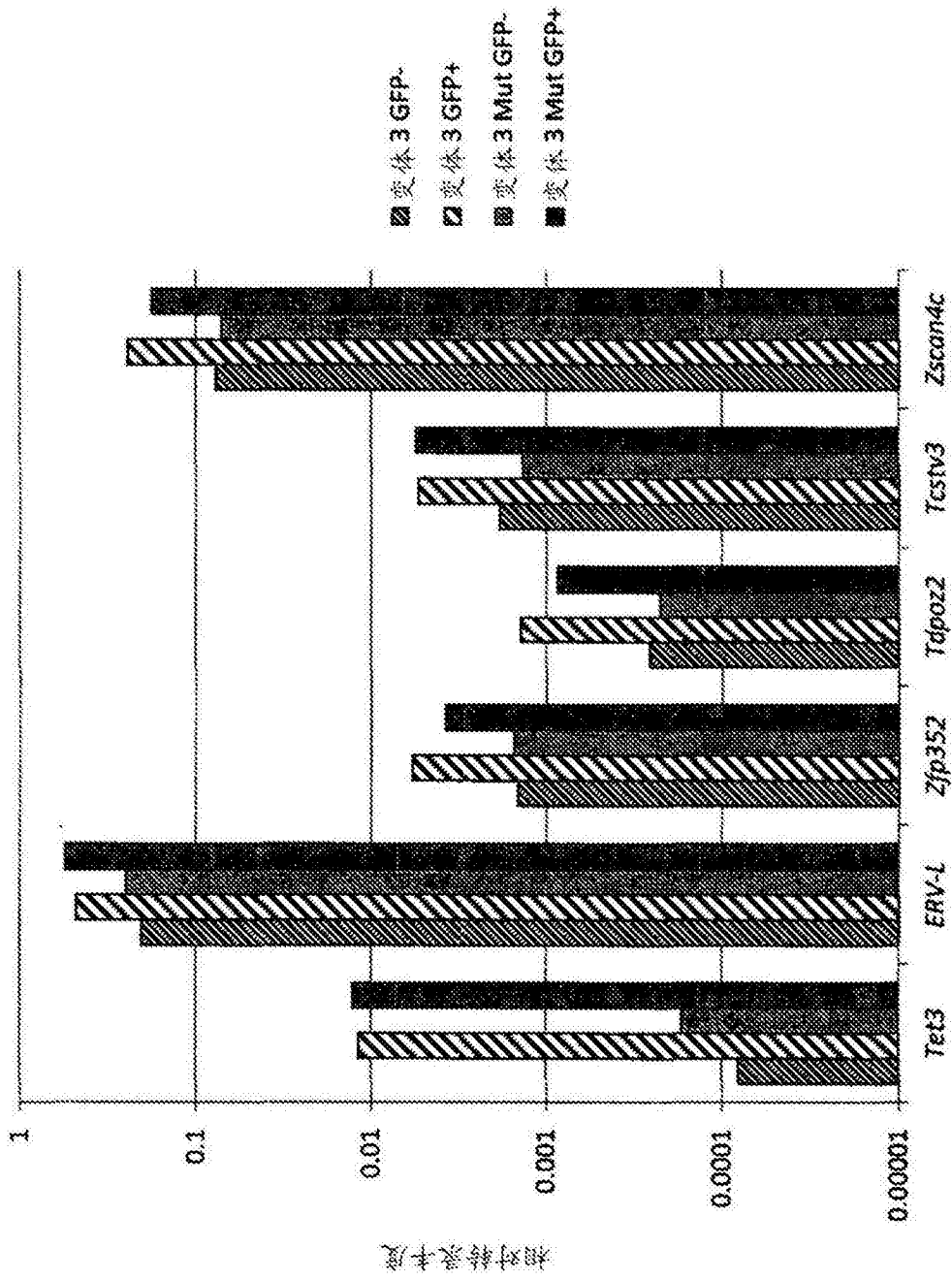


图 5

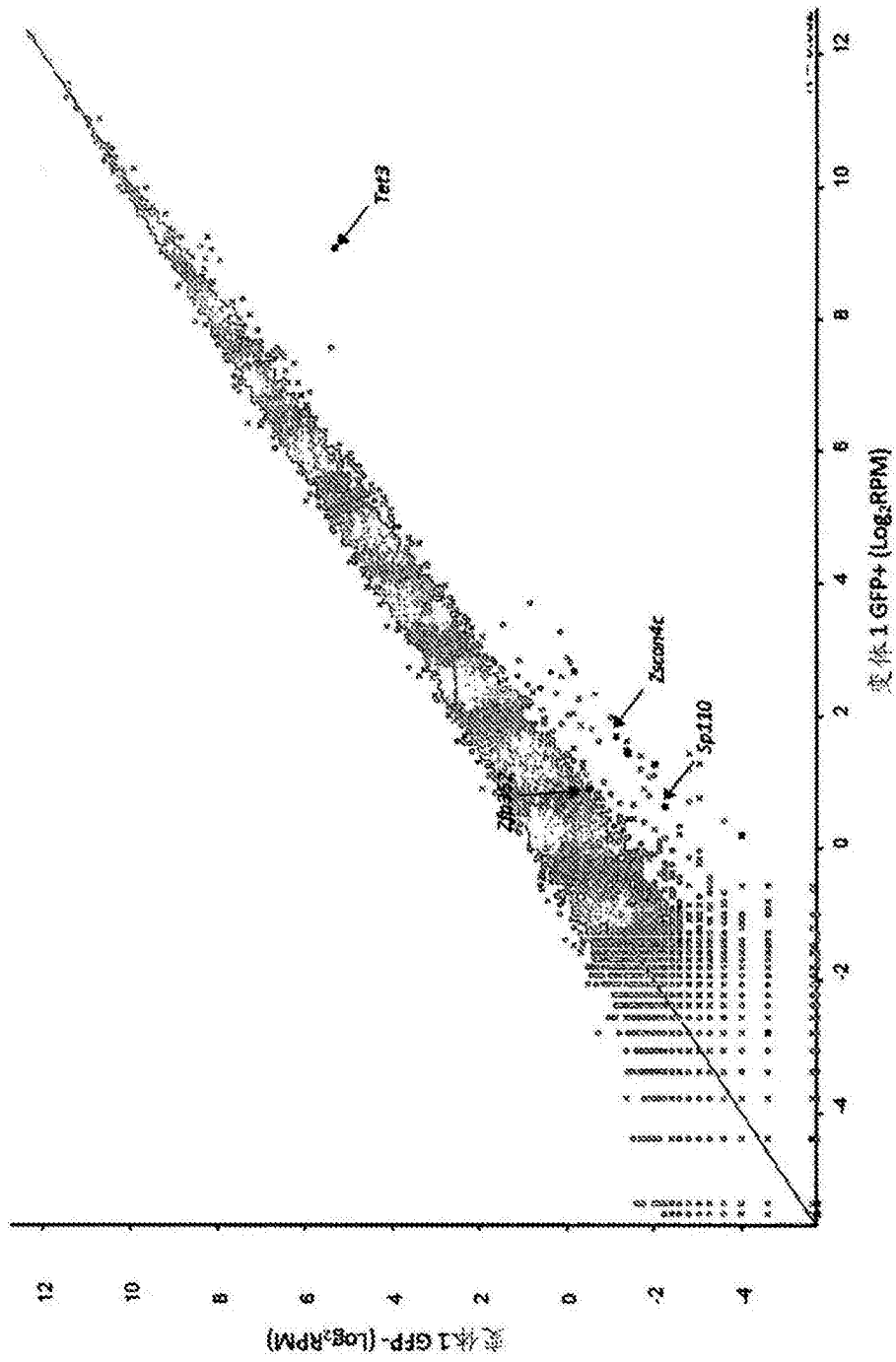


图 6

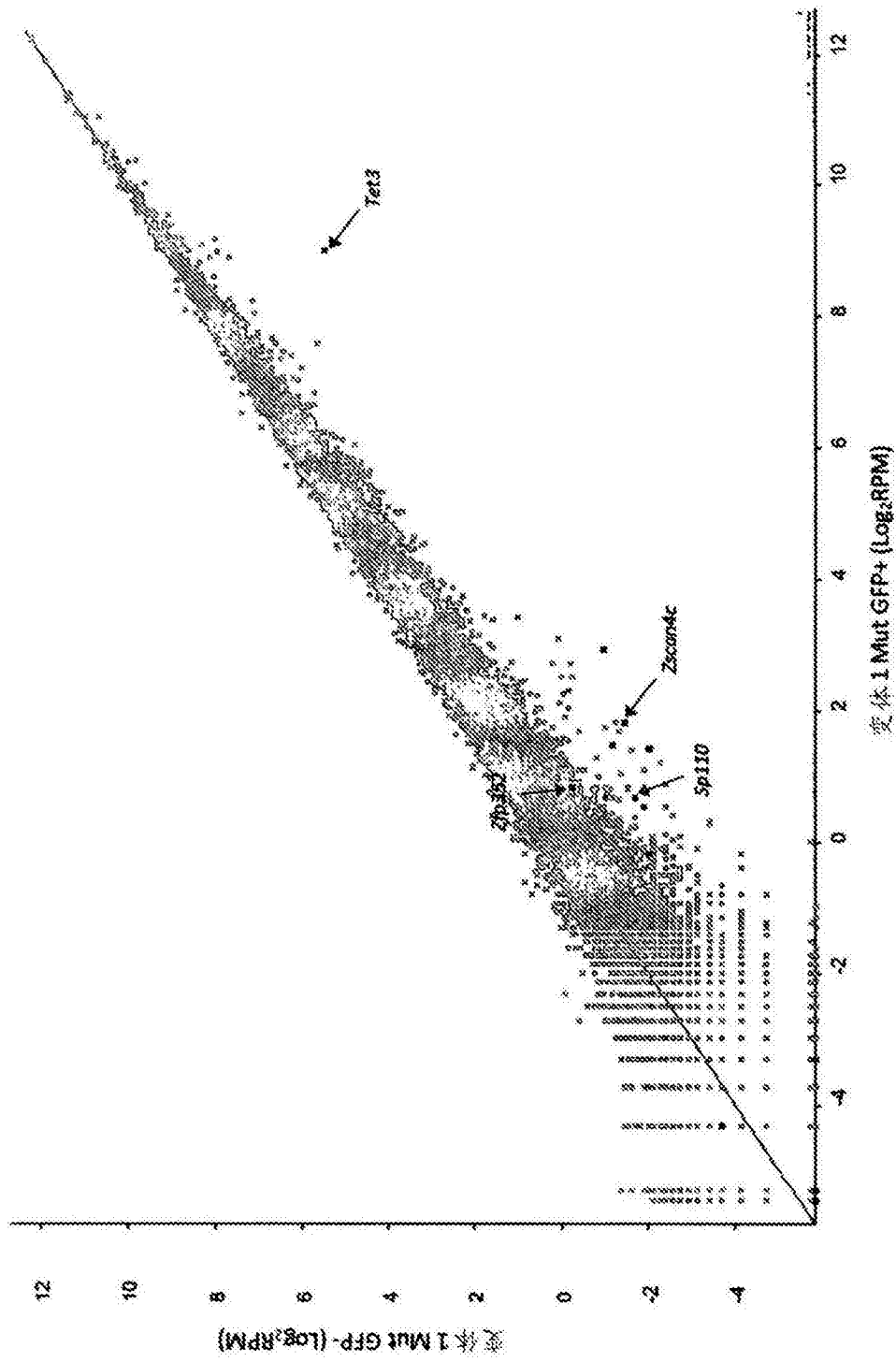


图 7

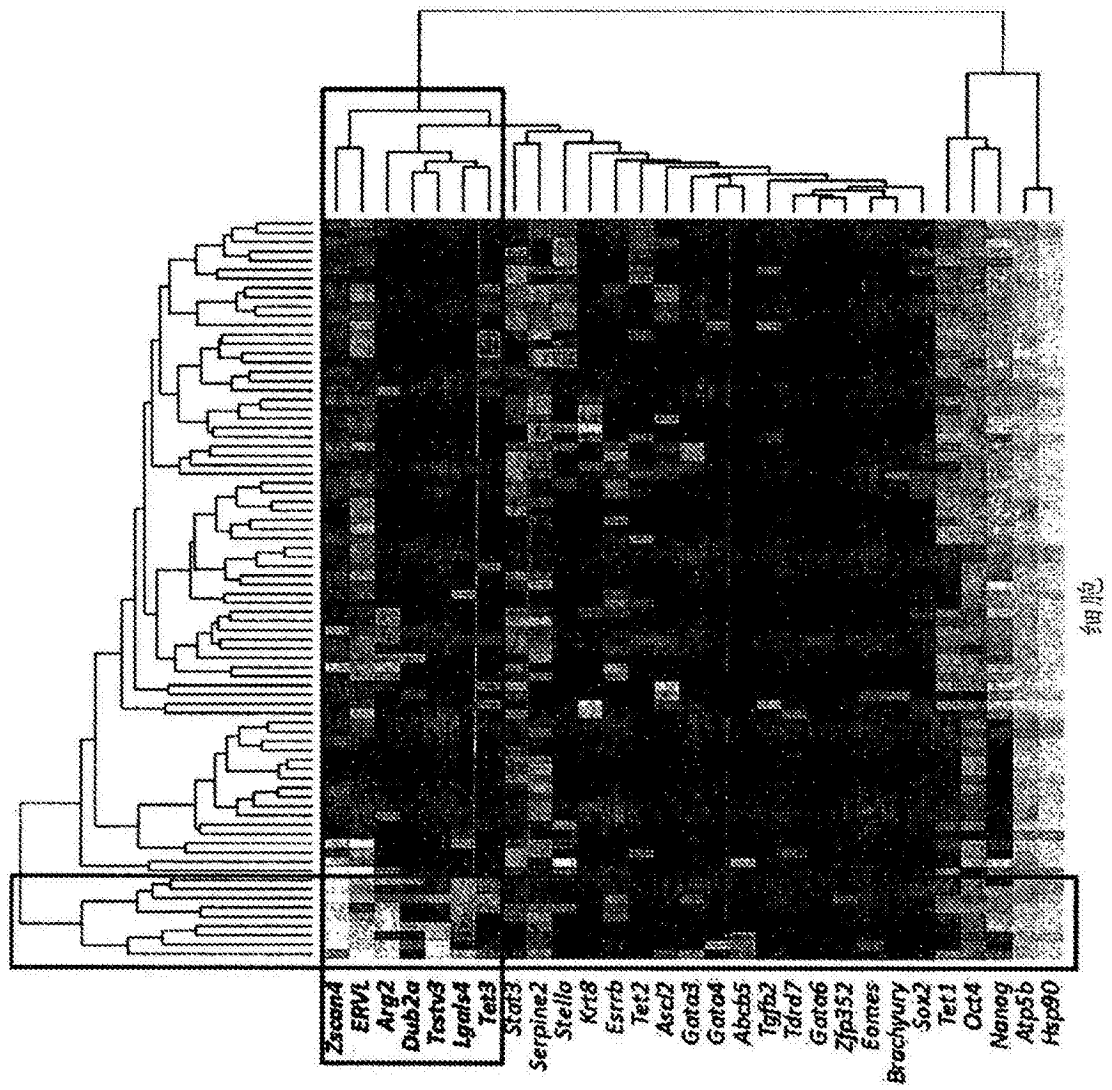


图 8

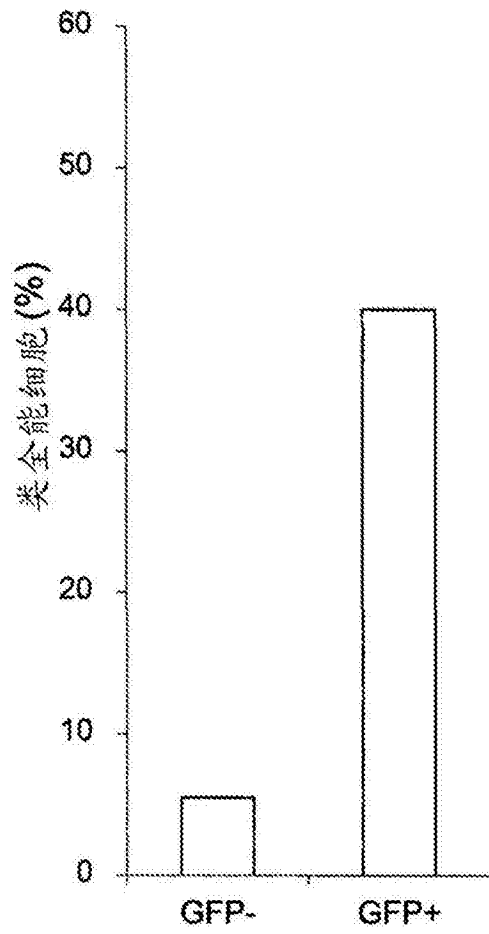


图 9

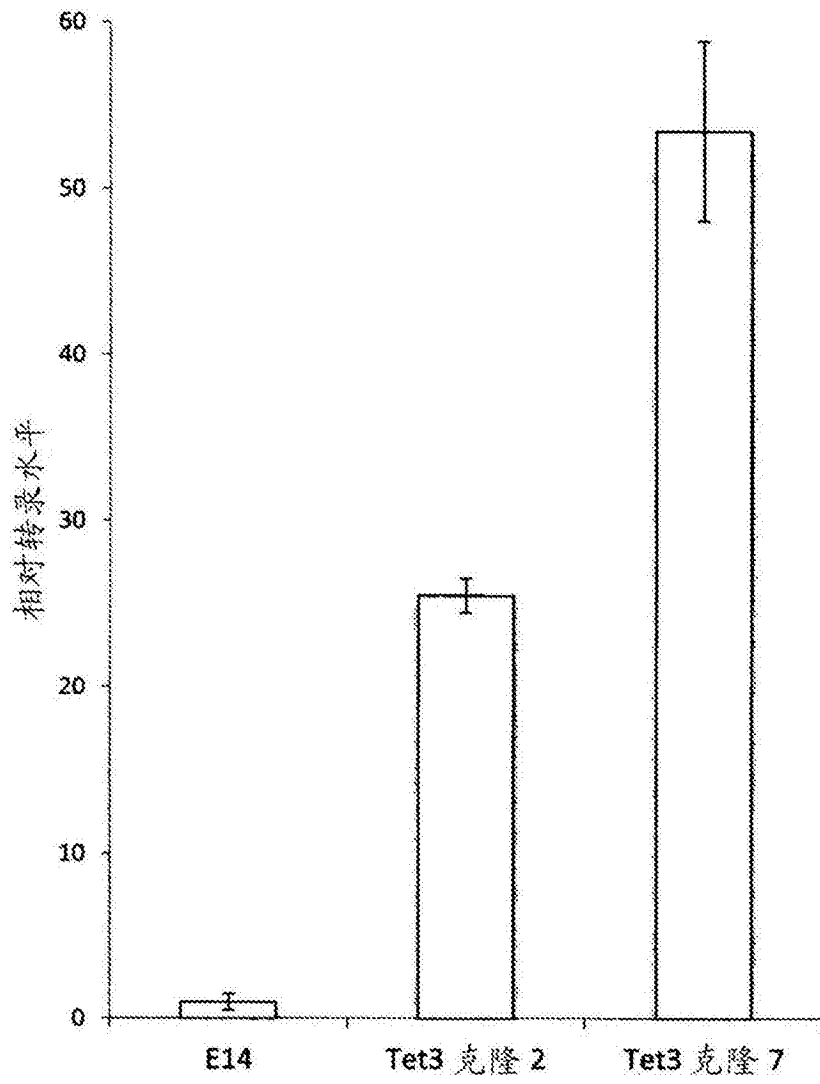


图 10

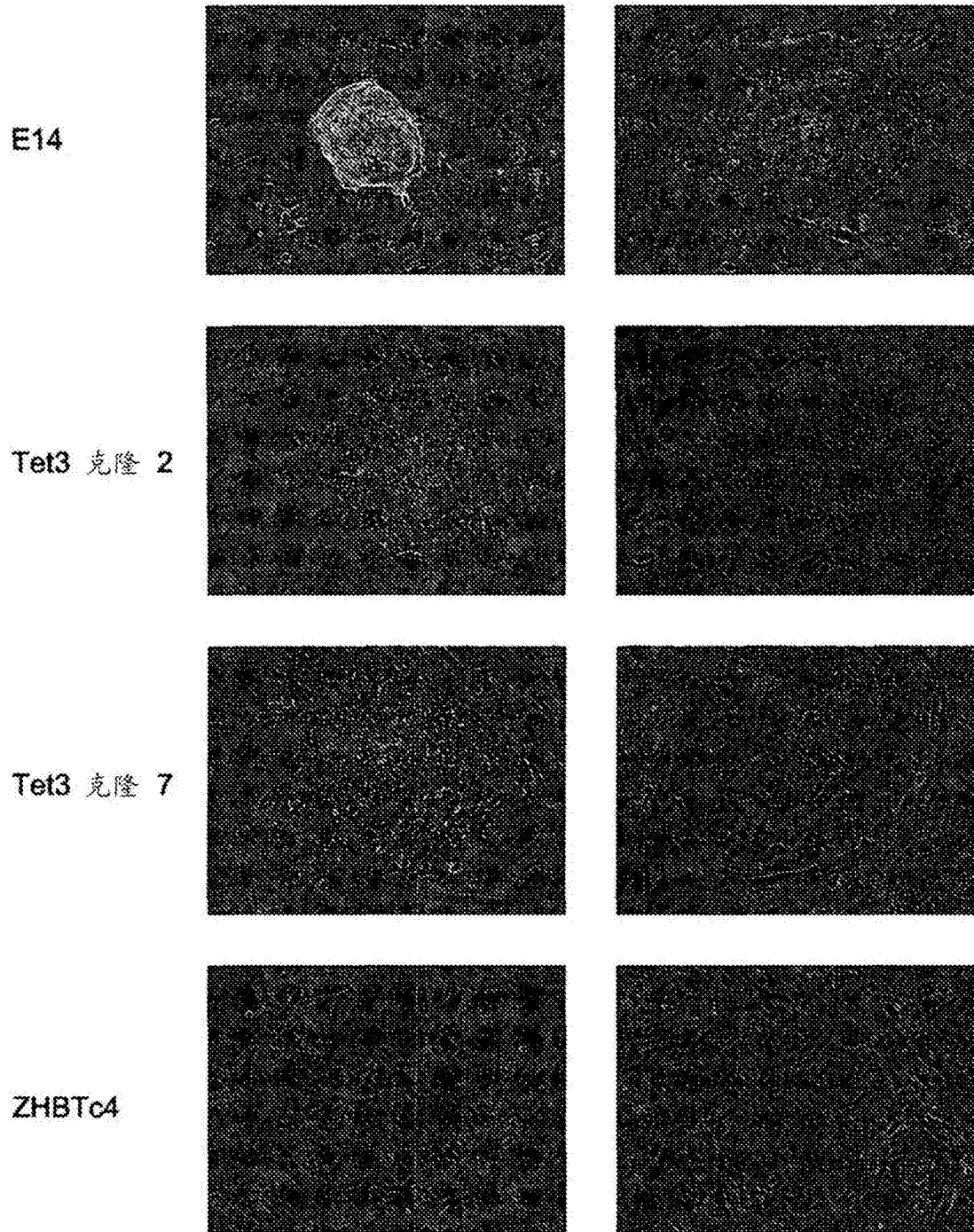


图 11

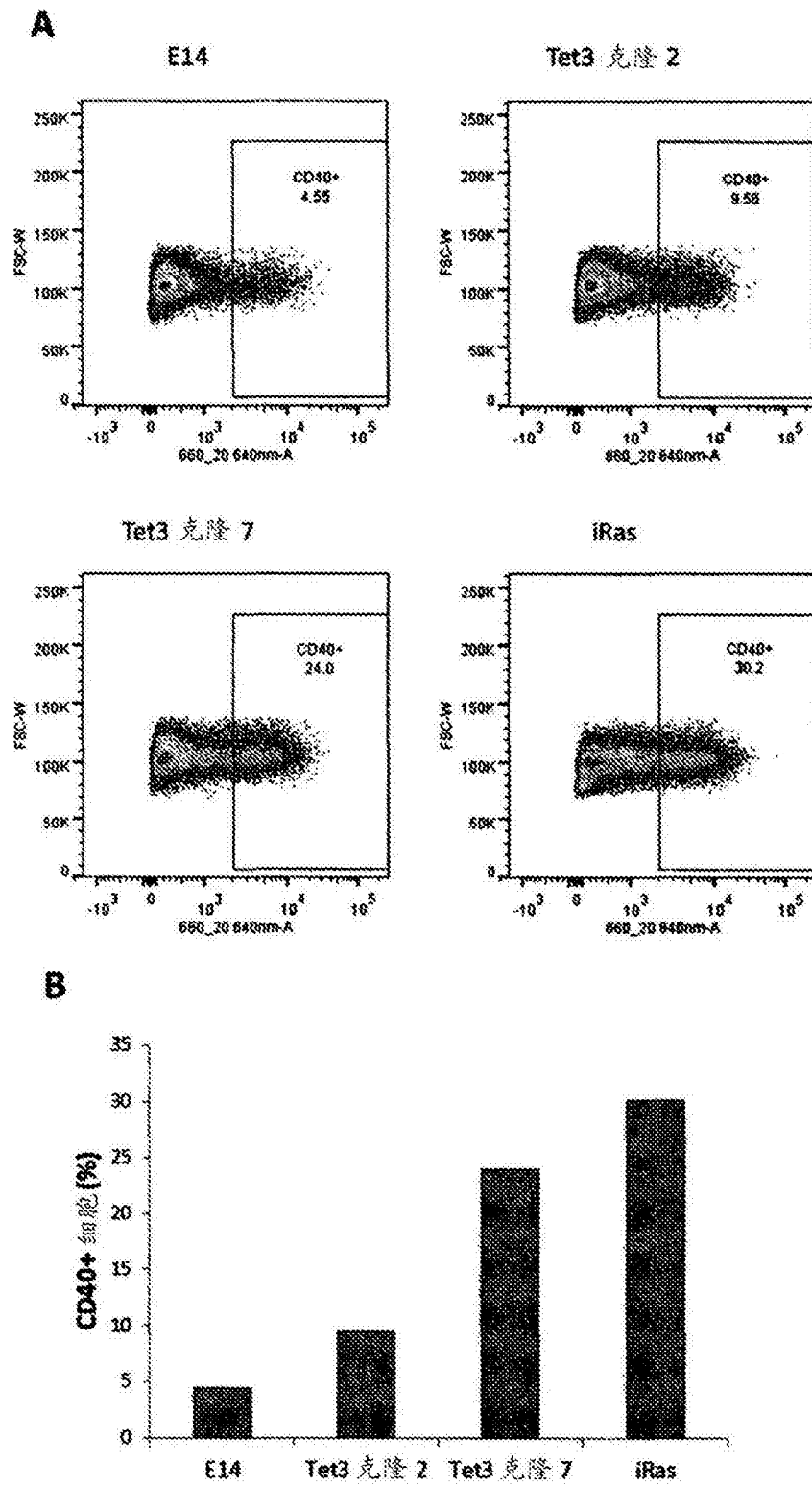


图 12

1. 一种增强细胞效力的方法,其中所述方法以下步骤:包括将 TET3 基因、其衍生物或片段引入所述细胞中。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述细胞被增强至全能状态。
3. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述细胞被增强至多能状态,如真实多能状态。
4. 如权利要求 1 至 3 中任一项所述的方法,其中所述 TET3 基因、其衍生物或片段是 SEQ ID NO:11 或 13 的 TET3 同工型。
5. 如权利要求 1、2 或 4 中任一项所述的方法,其中所述细胞是多能细胞,如胚胎干 (ES) 细胞,特别是 E14 胚胎干 (ES) 细胞。
6. 如权利要求 1 至 4 中任一项所述的方法,其中所述细胞是体细胞。
7. 如权利要求 1 至 6 中任一项所述的方法,其中所述引入步骤包括用含有所述 TET3 基因、其衍生物或片段的载体转染所述细胞。
8. 如权利要求 7 所述的方法,其中所述载体是转座子载体。
9. 一种制备具有增强效力的细胞的方法,所述方法包括以下步骤:将 TET3 基因、其衍生物或片段引入细胞。
10. 如权利要求 9 所述的方法,其中所述细胞是多能细胞,如胚胎干 (ES) 细胞,特别是 E14 胚胎干 (ES) 细胞。
11. 如权利要求 9 所述的方法,其中所述细胞是体细胞。
12. 如权利要求 11 所述的方法,其还包括以下步骤:将 Oct3/4 基因、Sox2 基因、Klf4 基因和 c-Myc 基因引入所述体细胞中。
13. 如权利要求 9 至 12 中任一项所述的方法,其还包括以下步骤:在引入所述 TET3 基因、其衍生物或片段之后培养所述细胞。
14. 如权利要求 9 至 13 中任一项所述的方法,其还包括以下步骤:选择过表达所述 TET3 基因、其衍生物或片段的一种或多种细胞。
15. 如权利要求 14 所述的方法,其中使用流式细胞术选择所述一种或多种细胞。
16. 一种具有增强效力的细胞,所述细胞可通过如权利要求 1 至 15 中任一项所述的方法获得。
17. 一种包含 SEQ ID NO:11 或 13 的 TET3 同工型的核酸。
18. 一种包含如权利要求 17 所述的核酸的载体。
19. 如权利要求 17 所述的核酸或如权利要求 18 所述的载体在增强细胞效力的方法中的用途。
20. 如权利要求 16 所述的具有增强效力的细胞,所述细胞用于在疗法中使用。
21. 如权利要求 20 所述的用于使用的具有增强效力的细胞,其中所述疗法包括组织再生。
22. 一种试剂盒,其包括含有 TET3 基因、其衍生物或片段的载体,和根据如权利要求 1 至 15 中任一项所述的方法来使用所述试剂盒的说明书。
23. 如权利要求 22 所述的试剂盒,其还包括至少一种多能细胞,如胚胎干 (ES) 细胞,特别是 E14 胚胎干 (ES) 细胞。
24. 如权利要求 22 所述的试剂盒,其还包括至少一种体细胞。
25. 如权利要求 23 或 24 所述的试剂盒,其还包括用于培养所述细胞的培养基,和用于

根据权利要求 1 至 15 中任一项所述的方法制备具有增强效力的所述细胞的说明书。

按照条约第 19 条修改的声明

申请人认为国际检索报告中引用的文件都没有描述 TET3 在增强细胞效力的方法中的具体用途。实际上,现有技术文件 D1 (US2011/0236894) 描述了应当使用 TET3抑制剂,以对干细胞进行重编程(参见 D1 的 [0091] 段),这给出了与需要提高 TET3 水平以增强细胞效力的本发明相反的教导。

因此,申请人认为权利要求 1 以及直接或间接引用权利要求 1,或与权利要求 1 属于同一发明构思的权利要求 2-25 具有新颖性和创造性。