



(10) 授权公告号 CN 111801414 B

(45) 授权公告日 2023. 06. 30

(21) 申请号 201880083045.6

(22) 申请日 2018.12.21

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111801414 A

(43) 申请公布日 2020.10.20

(30) 优先权数据
10-2017-0178706 2017.12.22 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.06.22

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2018/016519 2018.12.21

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/125073 KO 2019.06.27

(73) 专利权人 高丽大学校产学协力团
地址 韩国首尔

(72) 发明人 金秉秀 李承珍 姜嘉援

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

专利代理师 郑天松

(51) Int.Cl.
C12N 5/074 (2006.01)

(56) 对比文件
KR 20120118407 A, 2012.10.26
WO 2012141471 A2, 2012.10.18
KR 20120116193 A, 2012.10.22
CN 103087981 A, 2013.05.08
US 2012264215 A1, 2012.10.18
周一叶等. 体细胞诱导为多能干细胞的最新进展.《生命科学》.2008, (第03期),
肖雄等. 哺乳动物体细胞重编程机制的研究进展.《中国畜牧杂志》.2013, (第09期),
阮光萍等. 体细胞重编程为干细胞的方法研究与进展.《中国组织工程研究》.2013, 第17卷 (第1期),

审查员 白鸽

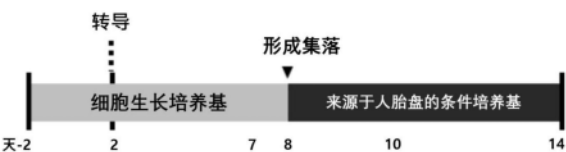
权利要求书1页 说明书9页
序列表8页 附图12页

(54) 发明名称

用于诱导从体细胞到诱导性多能干细胞的脱分化的来源于胎盘的细胞条件培养基及利用其的脱分化诱导方法

(57) 摘要

本发明涉及用于诱导从体细胞到诱导性多能干细胞的脱分化的来源于胎盘的细胞条件培养基及利用其的脱分化诱导方法。当使用本发明的用于诱导脱分化的来源于胎盘的细胞条件培养基时, 仅使用由来源于人的产物构成的培养基便可稳定确立个性化定制的脱分化干细胞, 并通过提供来源于人胎盘的环境来再现成类似生物环境, 从而可制备适用于临床的细胞治疗剂。



1. 来源于胎盘的细胞条件培养基用于诱导经编码选自由OCT4、SOX2、c-Myc及KLF4组成的组中的全部蛋白质的核酸序列转化的体细胞到诱导性多能干细胞的脱分化的用途，

其中所述来源于胎盘的细胞条件培养基通过包括下列步骤的方法制备：

在添加培养液的细胞生长培养基中培养来源于人胎盘的细胞；以及

从细胞生长培养基中回收含有来源于人胎盘的细胞培养物的培养液，

其中所述来源于胎盘的细胞为从人绒毛膜板中分离并培养的来源于胎盘的纤维细胞样细胞，且

其中所述体细胞为选自由内皮细胞、上皮细胞及胎盘细胞组成的组中的一种以上。

2. 一种从体细胞到诱导性多能干细胞的脱分化诱导方法，其包括：

体细胞转化步骤，向体细胞转导用于编码选自由OCT4、SOX2、c-Myc及KLF4组成的组中的全部蛋白质的核酸序列；以及

体细胞培养步骤，在来源于胎盘的细胞条件培养基中培养经转化的体细胞，

其中所述来源于胎盘的细胞条件培养基通过包括下列步骤的方法制备：

在添加培养液的细胞生长培养基中培养来源于人胎盘的细胞；以及

从细胞生长培养基中回收含有来源于人胎盘的细胞培养物的培养液，

其中所述来源于胎盘的细胞为从人绒毛膜板中分离并培养的来源于胎盘的纤维细胞样细胞，且

其中所述体细胞为选自由内皮细胞、上皮细胞及胎盘细胞组成的组中的一种以上。

3. 根据权利要求2所述的方法，其中所述脱分化诱导方法还包括从在体细胞培养步骤中形成的集落中分离干细胞的干细胞分离步骤。

4. 根据权利要求3所述的方法，其中所述干细胞分离步骤通过利用干细胞标记物进行染色来执行。

5. 根据权利要求3所述的方法，其中所述脱分化诱导方法还包括在从集落中分离的干细胞中对选自由OCT-4、NANOG、SSEA-4及Tra-81组成的组中的一种以上的蛋白质的活性进行确认的干细胞活性验证步骤。

6. 根据权利要求3所述的方法，其中所述脱分化诱导方法还包括通过利用从集落中分离的干细胞在生物体外形成胚芽口来确认分化为外胚层、中胚层或内胚层的分化能力的干细胞分化能力验证步骤。

用于诱导从体细胞到诱导性多能干细胞的脱分化的来源于胎盘的细胞条件培养基及利用其的脱分化诱导方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于诱导从体细胞到诱导性多能干细胞的脱分化的来源于胎盘的细胞条件培养基及利用其的脱分化诱导方法。

背景技术

[0002] 为了生产干细胞治疗剂,必须对作为其来源的干细胞进行大量的体外培养,并且在临床中用作细胞治疗剂必须安全且经济。

[0003] 但是,为了当前使用的人诱导性多能干细胞的增殖培养,来源于动物的支持细胞的方法及在涂敷包含来源于动物的产物的特殊凝胶的容器中培养的方法能够产生因异种蛋白污染引起的安全性问题,当使用高价的特殊凝胶时,在经济层面上并不适用大量生产。

[0004] 当使用来源于胎盘的细胞条件培养基时,可培养利用无动物、无支持细胞的诱导性多能干细胞,诱导性多能干细胞通过作为趋化因子受体的CXCR2的机制可增殖及分化。

[0005] 因此,本发明人通过将用于干细胞培养的来源于胎盘的细胞条件培养基适用于诱导性多能干细胞的脱分化,从而开发了细胞治疗剂。

发明内容

[0006] 技术问题

[0007] 本发明人一直致力于研究用于诱导从体细胞到诱导性多能干细胞(iPS, induced pluripotent stem cell)的脱分化的来源于胎盘的细胞条件培养基的开发。

[0008] 其结果,与并未利用来源于胎盘的细胞条件培养基的情况相比,可增加从体细胞到诱导性多能干细胞的脱分化效率,从而完成了本发明。

[0009] 因此,本发明的目的在于,提供用于诱导从体细胞到诱导性多能干细胞的脱分化的来源于胎盘的细胞条件培养基。

[0010] 本发明的再一目的在于,提供用于诱导从体细胞到诱导性多能干细胞的脱分化的来源于胎盘的细胞条件培养基的制备方法。

[0011] 本发明的另一目的在于,提供通过用于诱导脱分化的来源于胎盘的细胞条件培养基的从体细胞到诱导性多能干细胞的脱分化诱导方法。

[0012] 技术方案

[0013] 本发明人一直致力于研究用于诱导从体细胞到诱导性多能干细胞(iPS, induced pluripotent stem cell)的脱分化的来源于胎盘的细胞条件培养基的开发。结果发现,与并未利用来源于胎盘的细胞条件培养基的情况相比,本发明可增加从体细胞到诱导性多能干细胞的脱分化效率。

[0014] 以下,进一步详细说明本发明。

[0015] 本发明的一实施方式涉及用于诱导从体细胞到诱导性多能干细胞(iPS, induced pluripotent stem cell)的脱分化的来源于胎盘的细胞条件培养基。

[0016] 上述体细胞可由用于编码蛋白质的核酸序列转化而成,上述蛋白质为选自由OCT4、SOX2、c-Myc及KLF4组成的组中的一种以上,例如,可由用于编码OCT4蛋白质的核酸序列、用于编码SOX2蛋白质的核酸序列、用于编码c-Myc蛋白质的核酸序列及用于编码KLF4蛋白质的核酸序列转化而成。

[0017] 上述OCT4蛋白质可包括序列1的氨基酸序列,例如,可由序列1的氨基酸序列组成,也可以将其解释为包含与其显示实质等同性(substantial identity)的序列。

[0018] 并且,用于编码上述OCT4蛋白质的核酸序列可以为用于编码包含序列1的氨基酸序列的OCT4蛋白质,例如,可以为由序列1的氨基酸序列组成的OCT4蛋白质的核酸序列,也可以将其解释为包含与其显示实质等同性(substantial identity)的序列。

[0019] 上述SOX2蛋白质可包含序列2的氨基酸序列,例如,可由序列2的氨基酸序列组成,也可以将其解释为包含与其显示实质等同性的序列。

[0020] 并且,用于编码上述SOX2蛋白质的核酸序列可以为用于编码包含序列2的氨基酸序列的SOX2蛋白质的核酸序列,例如,可以为用于编码由序列2的氨基酸序列组成的SOX2蛋白质的核酸序列,也可以将其解释为包含与其显示实质等同性的序列。

[0021] 上述c-Myc蛋白质可包含序列3的氨基酸序列,例如,可由序列3的氨基酸序列组成,也可以将其解释为包含与其显示实质等同性的序列。

[0022] 并且,用于编码上述c-Myc蛋白质的核酸序列可以为用于编码包含序列3的氨基酸序列的c-Myc蛋白质的核酸序列,例如,可以为用于编码由序列3的氨基酸序列组成的c-Myc蛋白质的核酸序列,也可以将其解释为包含与其显示实质等同性的序列。

[0023] 上述KLF4蛋白质可包含序列4的氨基酸序列,例如,可由序列4的氨基酸序列组成,也可以将其解释为包含与其显示实质等同性(substantial identity)的序列。

[0024] 并且,用于编码KLF4蛋白质的核酸序列可以为用于编码包含序列4的氨基酸序列的KLF4蛋白质的核酸序列,例如,可以为用于编码由序列4的氨基酸序列组成的KLF4蛋白质的核酸序列,也可以将其解释为包含与其显示实质等同性的序列。

[0025] 上述实质等同性为以最大限度地使上述靶序列与任意其他序列相对应的方式进行对准,当通过在所属领域中所利用的算法分析对准序列时,可以为最少显示60%的相同性、最少70%的相同性、最少80%的相同性或最少90%相同性的序列。

[0026] 用于序列比较的对准方法为在所属领域中公知的方法,例如,通过美国国家生物技术信息中心(NCBI)的基于局部比对算法的搜索工具(BLAST, Basic Local Alignment Search Tool)可在网络上利用如lastp、blastx、tblastn及tblastx的序列分析程序。

[0027] 表1

[0028]

序列	名称	序列表	备注
1	OCT4	MAGHLASDFAFSPPPGGGGDGPGGPEPGWVDPRTWLS FQGPPGGPGIGPGVGPSEVWGIPPCPPPYEFCGGMAYC GPQVGVLVPQGGLETSQPEGEAGVGVESNSDGASPEP CTVTPGAVKLEKEKLEQNPEESQDIKALQKELEQFAKL LKQKRITLGYTQADVGLTLGVLF GKVFSQTTICRFEALQ LSFKNMCKLRPLLQKWVEEADNNENLQEICKAETLVQ ARKRKRTSIENRVRGNLENLFLQCPKPTLQQISHIAQQ GLEKDVVRVWFCNRRQKGKRSSSDYAQREDFEAAGSP FSGGPVSFPLAPGPHFGTPGYGSPHFTALYSSVPFPEGEA FPPVSVTTLGSPMHSN	
2	SOX2	MYNMMETELKPPGPQQTSGGGGGNSTAAAAGGNQKN SPDRVKRPMNAFMVWSRGQRRKMAQENPKMHNSEIS	

[0029]

		KRLGAEWKLLSETEKRPFIDEAKRLRALHMKEHPDYKY RPRRKTTLMKKDKYTLPGGLLAPGGNSMASGVGVGA GLGAGVNQRMDSYAHMNGWSNGSYMMQDQLGY PQ HPGLNAHGAAQMMPMHRYDVSALQYNSMTSSQTYMN GSPTYSMSYSQQGTPGMALGSMGSVVKSEASSSPVVT SSSHSRAPCQAGDLRDMISMYLPGA EVPEPAAPSRLHM SQHYQSGPVPGTAINGTLP LSHM	
3	c-Myc	MDFFRVVENQQPATMPLNVSFTNRNYDL DYDSVQPY FYCDEEENFYQQQQQSELQPPAPSEDIWKKFELLPTPPL SPSRSGLCSPSYVAVTPFSLRGDNDGGGGSFSTADQLE MVTELLGGDMV NQSFICDPDDETFIKNIIQDCMWSGFS AAAKLVSEKLASYQAARKDSGSPNPARGHSVCSTSSLY LQDLSAAASECIDPSVVPYPLNDSSSPKSCASQDSSAFS PSSD SLLSSTESSPQGSPEPLVLHEETPPTTSSDSEEEQED EEEIDVVSVEKRQAPGKRSESGSPSAGGH SKPPHSPLVL KRCHVSTHQHNYAAPPSTRKDYPAAKRVKLD SVRVLR QISNNRKCTSPRSSDTEENVKRRTHNVLERQRRNELKRS FFALRDQIPELENNEKAPKVVLK KATAYILSVQAEQK LISEEDLLRKRREQLKHKLEQLRNSCA	
4	KLF4	MAVSDALLPSFSTFASGPAGREKTLRQAGAPNNRWREE LSHMKRLPPVLPGRPYDLAAATVATDLES GGAGAACG GSNLAPLPRRETEEFNDLLDLD FILSNSLTHPPESVAATV SSSASASSSSSPSSSGPASAPSTCSFTYPIRAGNDPGVAPG GTGGGLLYGRESAPPPTAPFNLADINDVSPSGGFVAELL RPELDPVYIPPQQPQPPGGGLMGKFVLKASLSAPGSEYG SPSVISVSKGSPDGSHPVV VAPYNGGPPRTCPKIKQEAV SSCTHLGAGPPLSNGHRPAAHDFPLGRQLPSRTTPTLGL EEVLSSRDCHPALPLPPGFHHPGPNYPSFLPDQM QPQV PPLHYQGQSRGFVARAGEPCVCWPHFGTHGMMLTPPS SPLELMPPGSCMPEEPKPKRGRRSWPRKRTATHTCDYA GCGKTYTKSSHLKAHLRTHTGEPYHCDWDGCGWKF ARSDDELTRHYRKHTGHRPFQCQKCDRAFSRSDHLALH MKRHF	

[0030] 上述体细胞可以为选自由内皮细胞、上皮细胞及胎盘细胞组成的组中的一种以上。

[0031] 上述来源于胎盘的细胞可以为从人绒毛膜板中分离并培养的来源于胎盘的纤维细胞类似细胞。

[0032] 上述来源于胎盘的细胞条件培养基可包括在细胞生长培养基中培养的来源于人胎盘的细胞。

[0033] 本发明的再一实施方式涉及用于诱导脱分化的来源于胎盘的细胞条件培养基的制备方法,包括:

[0034] 来源于胎盘的细胞培养步骤,在添加培养液的细胞生长培养基中培养来源于人胎盘的细胞;以及

[0035] 培养液回收步骤,从细胞生长培养基中回收含有来源于人胎盘的细胞培养物的培养液。

[0036] 上述来源于胎盘的细胞可以为从人绒毛膜板中分离并培养的来源于胎盘的纤维细胞类似细胞。

[0037] 上述培养步骤中的培养液可以为杜贝克改良鹰培养基(DMEM,Dulbecco's modified Eagle's medium)/F-12,例如,可以为包含10%的胎牛血清(FBS)、10%的青霉素、10%的丙酮酸钠(sodium pyruvate)的杜贝克改良鹰培养基(DMEM),高葡萄糖培养基。

[0038] 上述培养液还可包含血清替代剂,例如,KnockOut™Serum Replacement (KnockOut™SR),但并不限于此。

[0039] 在上述回收步骤中回收的培养液可包含来源于胎盘的细胞培养物,例如,可包含来源于人胎盘的细胞培养物。

[0040] 本发明的另一实施方式涉及从体细胞到诱导性多能干细胞(iPS,induced pluripotent stem cell)的脱分化诱导方法,包括:

[0041] 体细胞转化步骤,向体细胞转导用于编码选自OCT4、SOX2、c-Myc及KLF4组成的组中的一种以上的蛋白质的核酸序列;以及

[0042] 体细胞培养步骤,在来源于胎盘的细胞条件培养基中培养经转化的体细胞。

[0043] 上述体细胞可以为选自内皮细胞、上皮细胞及胎盘细胞组成的组中的一种以上。

[0044] 上述来源于胎盘的细胞可以为从人绒毛膜板中分离并培养的来源于胎盘的纤维细胞类似细胞。

[0045] 上述脱分化诱导方法还可包括从在体细胞培养步骤中形成的集落中分离干细胞的干细胞分离步骤。

[0046] 上述干细胞分离步骤可通过利用干细胞标记物进行染色来执行,例如,可通过利用Tra-60、碱性磷酸酶剂(Alkaline phosphatase)、SSEA4、TRA-1-60及TRA-1-80等进行染色来执行,为了确认所形成的集落是否为干细胞,可通过活体染色(Live stain)进行分离。

[0047] 上述脱分化诱导方法还可包括在从集落中分离的干细胞中对选自OCT-4、NANOG、SSEA-4及Tra-81组成的组中的一种以上的蛋白质的活性进行确认的干细胞活性验证步骤。

[0048] 上述活性验证步骤可以为转导脱分化因子7天并在来源于胎盘的细胞条件培养基或E8中诱导脱分化干细胞3天后,通过碱性磷酸酶剂进行染色,从而可比较重编码效率,但并不限于此。

[0049] 上述脱分化诱导方法还可包括通过利用从集落中分离的干细胞在生物体外形成胚芽口来确认分化为外胚层、中胚层或内胚层的分化能力的干细胞分化能力验证步骤。

[0050] 可通过选自UJ1、巢蛋白 (Nestin)、Otx2、SOX1及Pax6组成的组中的一种以上的抗体来确认上述分化为外胚层的分化能力,但并不限于此。

[0051] 可通过选自结蛋白 (Desmin)、Brachyury、HAND1及锌指转录因子 (Snail) 组成的组中的一种以上的抗体来确认上述分化为中胚层的分化能力,但并不限于此。

[0052] 可通过选自AFP、GATA-4、SOX17、HNF4A及FOXA2组成的组中的一种以上的抗体来确认上述分化为内胚层的分化能力,但并不限于此。

[0053] 发明的效果

[0054] 本发明涉及用于诱导从体细胞到诱导性多能干细胞的脱分化的来源于胎盘的细胞条件培养基及利用其的脱分化诱导方法。当使用本发明的用于诱导脱分化的来源于胎盘的细胞条件培养基时,仅使用由来源于人的产物构成的培养基便可稳定确立个性化定制的脱分化干细胞,与并未利用来源于胎盘的细胞条件培养基的情况相比,可增加从体细胞到诱导性多能干细胞的脱分化效率。

附图说明

[0055] 图1为示出本发明一实施例的从体细胞到诱导性多能干细胞的脱分化诱导过程的示意图。

[0056] 图2为根据本发明一实施例示出从体细胞到诱导性多能干细胞的脱分化诱导过程的形态学变化的照片。

[0057] 图3a为根据本发明一实施例示出向通过诱导脱分化制备的诱导性多能干细胞染色作为干细胞标记物的ALP的结果的照片。

[0058] 图3b为根据本发明一实施例示出对脱分化为在普通培养基中诱导的诱导性多能干细胞与脱分化为在来源于胎盘的细胞条件培养基中诱导的诱导性多能干细胞的脱分化效率进行比较的结果的曲线图。

[0059] 图4a为根据本发明一实施例示出利用免疫组织化学法对通过诱导脱分化制备的诱导性多能干细胞确认是否发生干细胞特异性基因的表达的的结果的照片。

[0060] 图4b为根据本发明一实施例示出利用聚合酶链式反应对通过诱导脱分化制备的诱导性多能干细胞确认是否发生干细胞特异性基因的表达的的结果的曲线图。

[0061] 图5a为根据本发明一实施例示出利用染色体分析对在血管内皮细胞中通过诱导脱分化制备的诱导性多能干细胞确认核型的结果的照片。

[0062] 图5b为根据本发明一实施例示出利用染色体分析对在胎盘细胞中通过诱导脱分化制备的诱导性多能干细胞确认核型的结果的照片。

[0063] 图5c为根据本发明一实施例示出利用染色体分析对在成纤维细胞中通过诱导脱分化制备的诱导性多能干细胞确认核型的结果照片。

[0064] 图6a为根据本发明一实施例示出利用在体细胞中通过诱导脱分化制备的诱导性多能干细胞在生物体外形成畸胎瘤 (teratoma) 来确认分化为外胚层、中胚层及内胚层的分化能力的结果的照片。

[0065] 图6b为根据本发明一实施例示出利用在体细胞中通过诱导脱分化制备的诱导性多能干细胞验证是否在缺乏免疫的小家鼠中形成畸胎瘤的结果的照片。

[0066] 图6c为根据本发明一实施例示出利用在体细胞中通过诱导脱分化制备的诱导性

多能干细胞验证是否在缺乏免疫的小家鼠中形成畸胎瘤的结果的照片。

具体实施方式

[0067] 用于诱导从体细胞到诱导性多能干细胞(iPS,induced pluripotent stem cell)的脱分化的来源于胎盘的细胞条件培养基。

[0068] 发明的实施方式

[0069] 以下,通过实施例进一步详细说明本发明。这些实施例仅用于进一步具体说明本发明,对于所属领域的普通技术人员显而易见的是,根据本发明的要旨,这些实施例并不限制本发明的范围。

[0070] 实施例1:从体细胞到诱导性多能干细胞的脱分化

[0071] 如图1所示,利用仙台病毒脱分化因子(OCT4、SOX2、c-Myc、KLF4)转化作为3种人体细胞的内皮细胞(原代脐静脉内皮细胞(Primary Umbilical Vein Endothelial Cells), ATCC#PCS-100-010)、上皮细胞(原代真皮成纤维细胞(Primary Dermal Fibroblasts), ATCC#PCS-201-012)及胎盘细胞后,通过提供生长培养基培养7天。

[0072] 获得在妊娠7周时接受治疗性流产的健康孕妇的书面同意后,从通过外科剖腹产手术分离的胎盘组织中获得胎盘细胞。

[0073] 具体地,从胎盘的绒毛膜绒毛组织分离细胞,并将分离的胎盘细胞在包含20%的胎牛血清(FBS,fetal bovine serum)、100U/ml的青霉素(penicillin)及100g/ml的链霉素(streptomycin)的DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)培养基中涂敷0.1%的明胶(gelatin)的烧瓶中培养一周。

[0074] 通过使用试剂盒(CytoTune™-iPS 2.0Sendai Reprogramming Kit,Life Technologies)来进行转化。

[0075] 将转化的体细胞转移到新培养容器,当经过8天时,通过提供来源于胎盘的细胞条件培养基进行培养,从而在24小时内形成集落。

[0076] 如图2所示,其中,利用作为干细胞标记物的Tra-60进行染色来选择性地分离所确认的脱分化干细胞并进行培养。在这种情况下,作为对照组使用了普遍使用的培养液(define Essential 8medium:E8)。

[0077] 实施例2:脱分化干细胞的确认

[0078] 通过碱性磷酸酶的染色在体细胞中诱导的脱分化干细胞中确认是否具有作为诱导性多能干细胞特性的自我再生能力,并将其效率与在作为对照组的E8培养基中诱导脱分化的对照组进行比较。使用试剂盒(ES Cell Characterization kit,Chemicon International)进行碱性磷酸酶的染色,其结果如图3a所示,将其计算成效率(%)并制作成曲线图,其结果如图3b及表2所示。

[0079] 表2

[0080]

条件	细胞铺板(Cells plated)	集落/孔(Colonies/well)	效率(Efficiency) (%)
E8	1×10^5	312 ± 0.05	0.312
PCCM	1×10^5	3921 ± 0.01	3.921

[0081] 如图3a所示,通过肉眼可在来源于胎盘的细胞条件培养基中观察出大量具有诱导性多能干细胞的特性的细胞。并且,如图3b及表2所示,在总共100000个的细胞中,分别在E8

中的 312 ± 0.05 个细胞和在PCCM中的 3921 ± 0.01 个细胞具有ALP的活性,并且,在来源于胎盘的细胞条件培养基中脱分化效率比对照组高约10倍。

[0082] 实施例3:脱分化干细胞的特异性确认

[0083] 3-1.特异标记因子表达量确认

[0084] 通过确认作为诱导性多能干细胞特异标记因子的OCT-4、NANOG、SSEA-4、Tra-81等的表达量来验证干细胞的功能。为了确认3种确立的干细胞株是否维持着其特性,通过免疫荧光染色法确认对脱分化干细胞具有特异性的多个特异标记因子的表达。首先,为了免疫荧光染色,在盖玻片(cover slip)培养细胞,并通过免疫荧光染色法测定作为干细胞特异性标记物的OCT-4与SSEA-4的表达。

[0085] 具体地,当70~80%的细胞生长时,通过4%的多聚甲醛固定细胞10分钟。随后,将0.1%的聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)渗透于细胞中,并以1:1000的比例稀释作为第一抗体的OCT-4(Cell Signaling Technology#2750)与SSEA-4(Millipore#MAB4304)来处理。接着,在4℃的条件下培养过夜。第二天,在常温条件下将第二抗体处理1小时,通过处理4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)在暗条件下放置5分钟后,利用荧光显微镜进行观察。然后,利用实时定量聚合酶链式反应(Quantitative real-time PCR Analysis)测定对神经干细胞具有特异性的因子OCT-4、Nanog、REX-1的mRNA表达程度。具体地,利用试剂盒(Qiagen RNeasy kit,Qiagen Hilden,Germany)从诱导成脱分化干细胞的细胞中分离RNA,并利用2ug的RNA、聚合(dT)及逆转录酶(Superscript II reverse transcriptase,Gibco)合成cDNA。向合成的各个cDNA中添加下述表3中记载的OCT-4、Nanog及REX-1基因的引物和反应混合物(iQ SYBR Green qPCR Master Mix)并使用设备(Bio-Rad iCycler iQ系统,Bio-Rad Laboratories,USA)进行分析,其结果如图4a至4b及表4所示。

[0086] 表3

序列	名称	序列表(5->3)	备注
5	OCT-4_F	TCTCGCCCCCTCCAGGT	
6	OCT-4_R	CTGCTTCGCCCTCAGGC	
7	Nanog_F	AAAGAATCTTCACCTATGCC	
8	Nanog_R	GAAGGAAGAGGAGAGACAGT	
9	REX-1_F	CAGATCCTAAACAGCTCGCAGAAT	
10	REX-1_R	GCGTACGCAAATTAAAGTCCAGA	
11	GAPDH_F	GAGTCCACTGGCGTCTTCAC	
12	GAPDH_R	TTCACACCCATGACGAACAT	

[0089] 表4

	H1对照组 (control)	人脐静脉内皮细胞_诱导性多能干细胞 (HUVEC_iPSC)	胎盘_诱导性多能干细胞 (PLACENTA_iPSC)	成纤维细胞_诱导性多能干细胞 (FIBROBLAST_iPSC)
OCT-4	1.0733333	1.21	1.09	1.0923333
Nanog	1.1233333	1.4333333	1.39	1.1366667
REX-1	1.1333333	1.4466667	1.3666667	1.35

[0091] 如图4a所示,作为干细胞特异性标记物的OCT4及SSEA4在脱分化干细胞中强烈表达。并且,如图4b及表4所示,在脱分化干细胞中细胞内诱导性多能干细胞特异蛋白质的含

量高于作为对照组的人胚芽干细胞株H1(WiCell,Wisconsin,USA)。

[0092] 3-2. 染色体分析

[0093] 通过染色体分析测定脱分化干细胞是否维持正常的核型,从而验证稳定性。具体地,为了进行染色体分析,将脱分化干细胞 1.5×10^6 个细胞(cells)用0.1g/ml的秋水仙胺(colcemid)处理3~4小时。随后,通过将0.25%的胰蛋白酶(Trypsin)-EDTA处理5分钟来使其从培养皿中分离后,在37℃的条件下在0.075M的KCl溶液中培养20分钟。接着,以3:1的比例混合甲醇与乙酸并固定细胞后,以300频带级的分辨率测定已确立的脱分化干细胞的核型,其结果如图5a至图5c所示。

[0094] 如图5a至图5c所示,通过染色体分析确认脱分化干细胞是否维持着正常的核型。在总共3种不同的体细胞中通过使用来源于胎盘的条件培养基以高效率确立的脱分化干细胞中,通过特异性标记物等验证了特性及稳定性。

[0095] 实施例4:脱分化干细胞的分化能力确认

[0096] 4-1. 分化能力确认

[0097] 通过在生物体外形成胚芽口来确认分化能力,以便判断脱分化的诱导性多能干细胞是否具有分化为外胚层,中胚层及内胚层的能力。具体地,为了确认在生物体外中的分化能力,通过在并不能够附着的培养容器中形成2周的胚芽口并进行免疫荧光法,以便确认是否能够分别分化为外胚层、中胚层及内胚层。

[0098] 具体地,通过4%的多聚甲醛固定细胞10分钟后,随后,将0.1%的聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)渗透于细胞中,并用的含有3%的马血清(horse serum)的PBS封闭1小时。接着,以1:1000的比例稀释作为第一抗体的TUJ1(COVANCE#MRB-435P)、巢蛋白(Nestin)(Abcam#ab22035)、结蛋白(Desmin)(Santacruz#sc-14026)、AFP(Santacruz#sc-166335)并在4℃的条件下培养过夜。第二天,在常温条件下将第二抗体处理1小时,通过处理4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)在暗条件下放置5分钟后,利用荧光显微镜进行观察,其结果如图6a所示。

[0099] 如图6a所示,通过TUJ1和巢蛋白(Nestin)标记物确认分化为外胚层的神经上皮(Neuroepithelium),通过作为中胚层标记物的结蛋白(Desmin)确认分化为中胚层的软骨(Cartilage)。而且,通过免疫组织化学法验证分化为内胚层的肠上皮(Intestinal epithelium),通过免疫荧光法验证作为中胚层标记物的结蛋白(Desmin)及作为内胚层标记物的AFP的表达,从而判断是否从生物体外胚芽口的形成中分化为外胚层。

[0100] 4-2. 畸胎瘤形成验证

[0101] 为了确认生物体内的分化能力,通过验证是否在缺乏免疫的小家鼠中形成畸胎瘤。具体地,在缺乏免疫的小家鼠的皮下组织中注入 1.0×10^6 个脱分化的诱导性多能干细胞细胞,并经过12周后,通过免疫组织化学法验证畸胎瘤。

[0102] 具体地,当形成的畸胎瘤大小 $\geq 1\text{cm}^3$ 时,使用二氧化碳气体进行安乐死。通过外科手术摘取畸胎瘤并固定在4%的甲醛。进行脱水(Dehydration)后,通过将组织浸渍在二甲苯中一段时间来进行清洁。在60℃的烘箱中的液体石蜡容器中放入组织并进行浸润。将组织包埋在模具中并附着在载玻片上进行干燥后,然后放入60℃的烘箱中进行约一天的脱石蜡。通过在常温下培养在常温下暴露哈里斯氏苏木精(H) 30秒的伊红(E) 1分钟来进行组织学分析,结果如图6b和6c所示。

[0103] 如图6b及6c所示,观察到在缺乏免疫的小家鼠的皮下组织中形成畸胎瘤。结果,通过确认脱分化的诱导性多能干细胞在生物体内及生物体外的分化能力来验证来源于人胎盘的条件培养基具有可将脱分化的干细胞分化为所期望的细胞的能力。

[0104] 产业上的可利用性

[0105] 本发明涉及用于诱导从体细胞到诱导性多能干细胞的脱分化的来源于胎盘的细胞条件培养基及利用其的脱分化诱导方法。

[0001]	序列表															
[0002]	<110> Industry-University Cooperation Foundation Korea University															
[0003]	<120> 用于诱导从体细胞到诱导性多能干细胞的脱分化的来源于胎盘的细胞条件培养基及利用其的脱分化诱导方法															
[0004]	<130> PP180071															
[0005]	<150> KR 10-2017-0178706															
[0006]	<151> 2017-12-22															
[0007]	<160> 12															
[0008]	<170> KoPatentIn 3.0															
[0009]	<210> 1															
[0010]	<211> 360															
[0011]	<212> PRT															
[0012]	<213> 人工序列															
[0013]	<220>															
[0014]	<223> OCT4															
[0015]	<400> 1															
[0016]	Met	Ala	Gly	His	Leu	Ala	Ser	Asp	Phe	Ala	Phe	Ser	Pro	Pro	Pro	Gly
[0017]	1				5					10					15	
[0018]	Gly	Gly	Gly	Asp	Gly	Pro	Gly	Gly	Pro	Glu	Pro	Gly	Trp	Val	Asp	Pro
[0019]					20				25					30		
[0020]	Arg	Thr	Trp	Leu	Ser	Phe	Gln	Gly	Pro	Pro	Gly	Gly	Pro	Gly	Ile	Gly
[0021]					35				40					45		
[0022]	Pro	Gly	Val	Gly	Pro	Gly	Ser	Glu	Val	Trp	Gly	Ile	Pro	Pro	Cys	Pro
[0023]					50				55					60		
[0024]	Pro	Pro	Tyr	Glu	Phe	Cys	Gly	Gly	Met	Ala	Tyr	Cys	Gly	Pro	Gln	Val
[0025]	65					70					75				80	
[0026]	Gly	Val	Gly	Leu	Val	Pro	Gln	Gly	Gly	Leu	Glu	Thr	Ser	Gln	Pro	Glu
[0027]					85					90					95	
[0028]	Gly	Glu	Ala	Gly	Val	Gly	Val	Glu	Ser	Asn	Ser	Asp	Gly	Ala	Ser	Pro
[0029]					100					105					110	
[0030]	Glu	Pro	Cys	Thr	Val	Thr	Pro	Gly	Ala	Val	Lys	Leu	Glu	Lys	Glu	Lys
[0031]					115					120					125	
[0032]	Leu	Glu	Gln	Asn	Pro	Glu	Glu	Ser	Gln	Asp	Ile	Lys	Ala	Leu	Gln	Lys
[0033]					130					135					140	
[0034]	Glu	Leu	Glu	Gln	Phe	Ala	Lys	Leu	Leu	Lys	Gln	Lys	Arg	Ile	Thr	Leu
[0035]	145					150					155				160	
[0036]	Gly	Tyr	Thr	Gln	Ala	Asp	Val	Gly	Leu	Thr	Leu	Gly	Val	Leu	Phe	Gly
[0037]					165					170					175	

[0038]	Lys Val Phe Ser Gln Thr Thr Ile Cys Arg Phe Glu Ala Leu Gln Leu
[0039]	180 185 190
[0040]	Ser Phe Lys Asn Met Cys Lys Leu Arg Pro Leu Leu Gln Lys Trp Val
[0041]	195 200 205
[0042]	Glu Glu Ala Asp Asn Asn Glu Asn Leu Gln Glu Ile Cys Lys Ala Glu
[0043]	210 215 220
[0044]	Thr Leu Val Gln Ala Arg Lys Arg Lys Arg Thr Ser Ile Glu Asn Arg
[0045]	225 230 235 240
[0046]	Val Arg Gly Asn Leu Glu Asn Leu Phe Leu Gln Cys Pro Lys Pro Thr
[0047]	245 250 255
[0048]	Leu Gln Gln Ile Ser His Ile Ala Gln Gln Leu Gly Leu Glu Lys Asp
[0049]	260 265 270
[0050]	Val Val Arg Val Trp Phe Cys Asn Arg Arg Gln Lys Gly Lys Arg Ser
[0051]	275 280 285
[0052]	Ser Ser Asp Tyr Ala Gln Arg Glu Asp Phe Glu Ala Ala Gly Ser Pro
[0053]	290 295 300
[0054]	Phe Ser Gly Gly Pro Val Ser Phe Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Phe
[0055]	305 310 315 320
[0056]	Gly Thr Pro Gly Tyr Gly Ser Pro His Phe Thr Ala Leu Tyr Ser Ser
[0057]	325 330 335
[0058]	Val Pro Phe Pro Glu Gly Glu Ala Phe Pro Pro Val Ser Val Thr Thr
[0059]	340 345 350
[0060]	Leu Gly Ser Pro Met His Ser Asn
[0061]	355 360
[0062]	<210> 2
[0063]	<211> 317
[0064]	<212> PRT
[0065]	<213> 人工序列
[0066]	<220>
[0067]	<223> SOX2
[0068]	<400> 2
[0069]	Met Tyr Asn Met Met Glu Thr Glu Leu Lys Pro Pro Gly Pro Gln Gln
[0070]	1 5 10 15
[0071]	Thr Ser Gly Gly Gly Gly Gly Asn Ser Thr Ala Ala Ala Ala Gly Gly
[0072]	20 25 30
[0073]	Asn Gln Lys Asn Ser Pro Asp Arg Val Lys Arg Pro Met Asn Ala Phe
[0074]	35 40 45
[0075]	Met Val Trp Ser Arg Gly Gln Arg Arg Lys Met Ala Gln Glu Asn Pro
[0076]	50 55 60

[0077]	Lys Met His Asn Ser Glu Ile Ser Lys Arg Leu Gly Ala Glu Trp Lys
[0078]	65 70 75 80
[0079]	Leu Leu Ser Glu Thr Glu Lys Arg Pro Phe Ile Asp Glu Ala Lys Arg
[0080]	85 90 95
[0081]	Leu Arg Ala Leu His Met Lys Glu His Pro Asp Tyr Lys Tyr Arg Pro
[0082]	100 105 110
[0083]	Arg Arg Lys Thr Lys Thr Leu Met Lys Lys Asp Lys Tyr Thr Leu Pro
[0084]	115 120 125
[0085]	Gly Gly Leu Leu Ala Pro Gly Gly Asn Ser Met Ala Ser Gly Val Gly
[0086]	130 135 140
[0087]	Val Gly Ala Gly Leu Gly Ala Gly Val Asn Gln Arg Met Asp Ser Tyr
[0088]	145 150 155 160
[0089]	Ala His Met Asn Gly Trp Ser Asn Gly Ser Tyr Ser Met Met Gln Asp
[0090]	165 170 175
[0091]	Gln Leu Gly Tyr Pro Gln His Pro Gly Leu Asn Ala His Gly Ala Ala
[0092]	180 185 190
[0093]	Gln Met Gln Pro Met His Arg Tyr Asp Val Ser Ala Leu Gln Tyr Asn
[0094]	195 200 205
[0095]	Ser Met Thr Ser Ser Gln Thr Tyr Met Asn Gly Ser Pro Thr Tyr Ser
[0096]	210 215 220
[0097]	Met Ser Tyr Ser Gln Gln Gly Thr Pro Gly Met Ala Leu Gly Ser Met
[0098]	225 230 235 240
[0099]	Gly Ser Val Val Lys Ser Glu Ala Ser Ser Ser Pro Pro Val Val Thr
[0100]	245 250 255
[0101]	Ser Ser Ser His Ser Arg Ala Pro Cys Gln Ala Gly Asp Leu Arg Asp
[0102]	260 265 270
[0103]	Met Ile Ser Met Tyr Leu Pro Gly Ala Glu Val Pro Glu Pro Ala Ala
[0104]	275 280 285
[0105]	Pro Ser Arg Leu His Met Ser Gln His Tyr Gln Ser Gly Pro Val Pro
[0106]	290 295 300
[0107]	Gly Thr Ala Ile Asn Gly Thr Leu Pro Leu Ser His Met
[0108]	305 310 315
[0109]	<210> 3
[0110]	<211> 454
[0111]	<212> PRT
[0112]	<213> 人工序列
[0113]	<220>
[0114]	<223> c-Myc
[0115]	<400> 3

[0116]	Met	Asp	Phe	Phe	Arg	Val	Val	Glu	Asn	Gln	Gln	Pro	Pro	Ala	Thr	Met
[0117]	1				5					10					15	
[0118]	Pro	Leu	Asn	Val	Ser	Phe	Thr	Asn	Arg	Asn	Tyr	Asp	Leu	Asp	Tyr	Asp
[0119]				20					25					30		
[0120]	Ser	Val	Gln	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Cys	Asp	Glu	Glu	Glu	Asn	Phe	Tyr	Gln
[0121]			35					40					45			
[0122]	Gln	Gln	Gln	Gln	Ser	Glu	Leu	Gln	Pro	Pro	Ala	Pro	Ser	Glu	Asp	Ile
[0123]		50					55					60				
[0124]	Trp	Lys	Lys	Phe	Glu	Leu	Leu	Pro	Thr	Pro	Pro	Leu	Ser	Pro	Ser	Arg
[0125]	65				70					75						80
[0126]	Arg	Ser	Gly	Leu	Cys	Ser	Pro	Ser	Tyr	Val	Ala	Val	Thr	Pro	Phe	Ser
[0127]				85					90						95	
[0128]	Leu	Arg	Gly	Asp	Asn	Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Phe	Ser	Thr	Ala	Asp
[0129]				100					105					110		
[0130]	Gln	Leu	Glu	Met	Val	Thr	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Asp	Met	Val	Asn	Gln
[0131]			115					120					125			
[0132]	Ser	Phe	Ile	Cys	Asp	Pro	Asp	Asp	Glu	Thr	Phe	Ile	Lys	Asn	Ile	Ile
[0133]		130					135					140				
[0134]	Ile	Gln	Asp	Cys	Met	Trp	Ser	Gly	Phe	Ser	Ala	Ala	Ala	Lys	Leu	Val
[0135]	145				150					155						160
[0136]	Ser	Glu	Lys	Leu	Ala	Ser	Tyr	Gln	Ala	Ala	Arg	Lys	Asp	Ser	Gly	Ser
[0137]				165					170					175		
[0138]	Pro	Asn	Pro	Ala	Arg	Gly	His	Ser	Val	Cys	Ser	Thr	Ser	Ser	Leu	Tyr
[0139]			180						185					190		
[0140]	Leu	Gln	Asp	Leu	Ser	Ala	Ala	Ala	Ser	Glu	Cys	Ile	Asp	Pro	Ser	Val
[0141]			195					200					205			
[0142]	Val	Phe	Pro	Tyr	Pro	Leu	Asn	Asp	Ser	Ser	Ser	Pro	Lys	Ser	Cys	Ala
[0143]		210					215					220				
[0144]	Ser	Gln	Asp	Ser	Ser	Ala	Phe	Ser	Pro	Ser	Ser	Asp	Ser	Leu	Leu	Ser
[0145]	225				230					235						240
[0146]	Ser	Thr	Glu	Ser	Ser	Pro	Gln	Gly	Ser	Pro	Glu	Pro	Leu	Val	Leu	His
[0147]				245					250					255		
[0148]	Glu	Glu	Thr	Pro	Pro	Thr	Thr	Ser	Ser	Asp	Ser	Glu	Glu	Glu	Gln	Glu
[0149]				260					265				270			
[0150]	Asp	Glu	Glu	Glu	Ile	Asp	Val	Val	Ser	Val	Glu	Lys	Arg	Gln	Ala	Pro
[0151]			275					280					285			
[0152]	Gly	Lys	Arg	Ser	Glu	Ser	Gly	Ser	Pro	Ser	Ala	Gly	Gly	His	Ser	Lys
[0153]		290					295					300				
[0154]	Pro	Pro	His	Ser	Pro	Leu	Val	Leu	Lys	Arg	Cys	His	Val	Ser	Thr	His

[0155]	305	310	315	320
[0156]	Gln His Asn Tyr Ala Ala Pro Pro Ser Thr Arg Lys Asp Tyr Pro Ala			
[0157]	325	330	335	
[0158]	Ala Lys Arg Val Lys Leu Asp Ser Val Arg Val Leu Arg Gln Ile Ser			
[0159]	340	345	350	
[0160]	Asn Asn Arg Lys Cys Thr Ser Pro Arg Ser Ser Asp Thr Glu Glu Asn			
[0161]	355	360	365	
[0162]	Val Lys Arg Arg Thr His Asn Val Leu Glu Arg Gln Arg Arg Asn Glu			
[0163]	370	375	380	
[0164]	Leu Lys Arg Ser Phe Phe Ala Leu Arg Asp Gln Ile Pro Glu Leu Glu			
[0165]	385	390	395	400
[0166]	Asn Asn Glu Lys Ala Pro Lys Val Val Ile Leu Lys Lys Ala Thr Ala			
[0167]	405	410	415	
[0168]	Tyr Ile Leu Ser Val Gln Ala Glu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu			
[0169]	420	425	430	
[0170]	Asp Leu Leu Arg Lys Arg Arg Glu Gln Leu Lys His Lys Leu Glu Gln			
[0171]	435	440	445	
[0172]	Leu Arg Asn Ser Cys Ala			
[0173]	450			
[0174]	<210> 4			
[0175]	<211> 504			
[0176]	<212> PRT			
[0177]	<213> 人工序列			
[0178]	<220>			
[0179]	<223> KLF4			
[0180]	<400> 4			
[0181]	Met Ala Val Ser Asp Ala Leu Leu Pro Ser Phe Ser Thr Phe Ala Ser			
[0182]	1	5	10	15
[0183]	Gly Pro Ala Gly Arg Glu Lys Thr Leu Arg Gln Ala Gly Ala Pro Asn			
[0184]	20	25	30	
[0185]	Asn Arg Trp Arg Glu Glu Leu Ser His Met Lys Arg Leu Pro Pro Val			
[0186]	35	40	45	
[0187]	Leu Pro Gly Arg Pro Tyr Asp Leu Ala Ala Ala Thr Val Ala Thr Asp			
[0188]	50	55	60	
[0189]	Leu Glu Ser Gly Gly Ala Gly Ala Ala Cys Gly Gly Ser Asn Leu Ala			
[0190]	65	70	75	80
[0191]	Pro Leu Pro Arg Arg Glu Thr Glu Glu Phe Asn Asp Leu Leu Asp Leu			
[0192]	85	90	95	
[0193]	Asp Phe Ile Leu Ser Asn Ser Leu Thr His Pro Pro Glu Ser Val Ala			

[0194]	100	105	110
[0195]	Ala Thr Val Ser Ser Ser Ala Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ser Pro Ser		
[0196]	115	120	125
[0197]	Ser Ser Gly Pro Ala Ser Ala Pro Ser Thr Cys Ser Phe Thr Tyr Pro		
[0198]	130	135	140
[0199]	Ile Arg Ala Gly Asn Asp Pro Gly Val Ala Pro Gly Gly Thr Gly Gly		
[0200]	145	150	155
[0201]	Gly Leu Leu Tyr Gly Arg Glu Ser Ala Pro Pro Pro Thr Ala Pro Phe		
[0202]	165	170	175
[0203]	Asn Leu Ala Asp Ile Asn Asp Val Ser Pro Ser Gly Gly Phe Val Ala		
[0204]	180	185	190
[0205]	Glu Leu Leu Arg Pro Glu Leu Asp Pro Val Tyr Ile Pro Pro Gln Gln		
[0206]	195	200	205
[0207]	Pro Gln Pro Pro Gly Gly Gly Leu Met Gly Lys Phe Val Leu Lys Ala		
[0208]	210	215	220
[0209]	Ser Leu Ser Ala Pro Gly Ser Glu Tyr Gly Ser Pro Ser Val Ile Ser		
[0210]	225	230	235
[0211]	Val Ser Lys Gly Ser Pro Asp Gly Ser His Pro Val Val Val Ala Pro		
[0212]	245	250	255
[0213]	Tyr Asn Gly Gly Pro Pro Arg Thr Cys Pro Lys Ile Lys Gln Glu Ala		
[0214]	260	265	270
[0215]	Val Ser Ser Cys Thr His Leu Gly Ala Gly Pro Pro Leu Ser Asn Gly		
[0216]	275	280	285
[0217]	His Arg Pro Ala Ala His Asp Phe Pro Leu Gly Arg Gln Leu Pro Ser		
[0218]	290	295	300
[0219]	Arg Thr Thr Pro Thr Leu Gly Leu Glu Glu Val Leu Ser Ser Arg Asp		
[0220]	305	310	315
[0221]	Cys His Pro Ala Leu Pro Leu Pro Pro Gly Phe His Pro His Pro Gly		
[0222]	325	330	335
[0223]	Pro Asn Tyr Pro Ser Phe Leu Pro Asp Gln Met Gln Pro Gln Val Pro		
[0224]	340	345	350
[0225]	Pro Leu His Tyr Gln Gly Gln Ser Arg Gly Phe Val Ala Arg Ala Gly		
[0226]	355	360	365
[0227]	Glu Pro Cys Val Cys Trp Pro His Phe Gly Thr His Gly Met Met Leu		
[0228]	370	375	380
[0229]	Thr Pro Pro Ser Ser Pro Leu Glu Leu Met Pro Pro Gly Ser Cys Met		
[0230]	385	390	395
[0231]	Pro Glu Glu Pro Lys Pro Lys Arg Gly Arg Arg Ser Trp Pro Arg Lys		
[0232]	405	410	415

[0233]	Arg Thr Ala Thr His Thr Cys Asp Tyr Ala Gly Cys Gly Lys Thr Tyr
[0234]	420 425 430
[0235]	Thr Lys Ser Ser His Leu Lys Ala His Leu Arg Thr His Thr Gly Glu
[0236]	435 440 445
[0237]	Lys Pro Tyr His Cys Asp Trp Asp Gly Cys Gly Trp Lys Phe Ala Arg
[0238]	450 455 460
[0239]	Ser Asp Glu Leu Thr Arg His Tyr Arg Lys His Thr Gly His Arg Pro
[0240]	465 470 475 480
[0241]	Phe Gln Cys Gln Lys Cys Asp Arg Ala Phe Ser Arg Ser Asp His Leu
[0242]	485 490 495
[0243]	Ala Leu His Met Lys Arg His Phe
[0244]	500
[0245]	<210> 5
[0246]	<211> 17
[0247]	<212> DNA
[0248]	<213> 人工序列
[0249]	<220>
[0250]	<223> OCT-4_F
[0251]	<400> 5
[0252]	tctcgccccc tccaggt 17
[0253]	<210> 6
[0254]	<211> 17
[0255]	<212> DNA
[0256]	<213> 人工序列
[0257]	<220>
[0258]	<223> OCT-4_R
[0259]	<400> 6
[0260]	ctgcttcgcc ctcaggc 17
[0261]	<210> 7
[0262]	<211> 20
[0263]	<212> DNA
[0264]	<213> 人工序列
[0265]	<220>
[0266]	<223> Nanog_F
[0267]	<400> 7
[0268]	aaagaatctt cacctatgcc 20
[0269]	<210> 8
[0270]	<211> 20
[0271]	<212> DNA

[0272] <213> 人工序列
[0273] <220>
[0274] <223> Nanog_R
[0275] <400> 8
[0276] gaaggaagag gagagacagt 20
[0277] <210> 9
[0278] <211> 24
[0279] <212> DNA
[0280] <213> 人工序列
[0281] <220>
[0282] <223> REX-1_F
[0283] <400> 9
[0284] cagatcctaa acagctcgca gaat 24
[0285] <210> 10
[0286] <211> 23
[0287] <212> DNA
[0288] <213> 人工序列
[0289] <220>
[0290] <223> REX-1_R
[0291] <400> 10
[0292] gcgtacgcaa attaaagtcc aga 23
[0293] <210> 11
[0294] <211> 20
[0295] <212> DNA
[0296] <213> 人工序列
[0297] <220>
[0298] <223> GAPDH_F
[0299] <400> 11
[0300] gagtccactg gcgtcttcac 20
[0301] <210> 12
[0302] <211> 20
[0303] <212> DNA
[0304] <213> 人工序列
[0305] <220>
[0306] <223> GAPDH_R
[0307] <400> 12
[0308] ttcacacca tgacgaacat 20

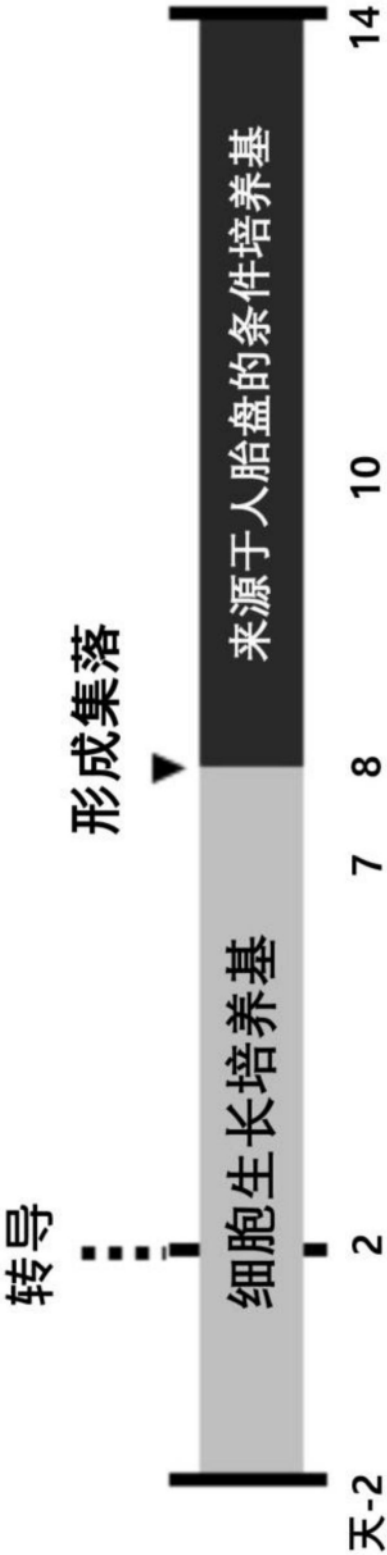


图1

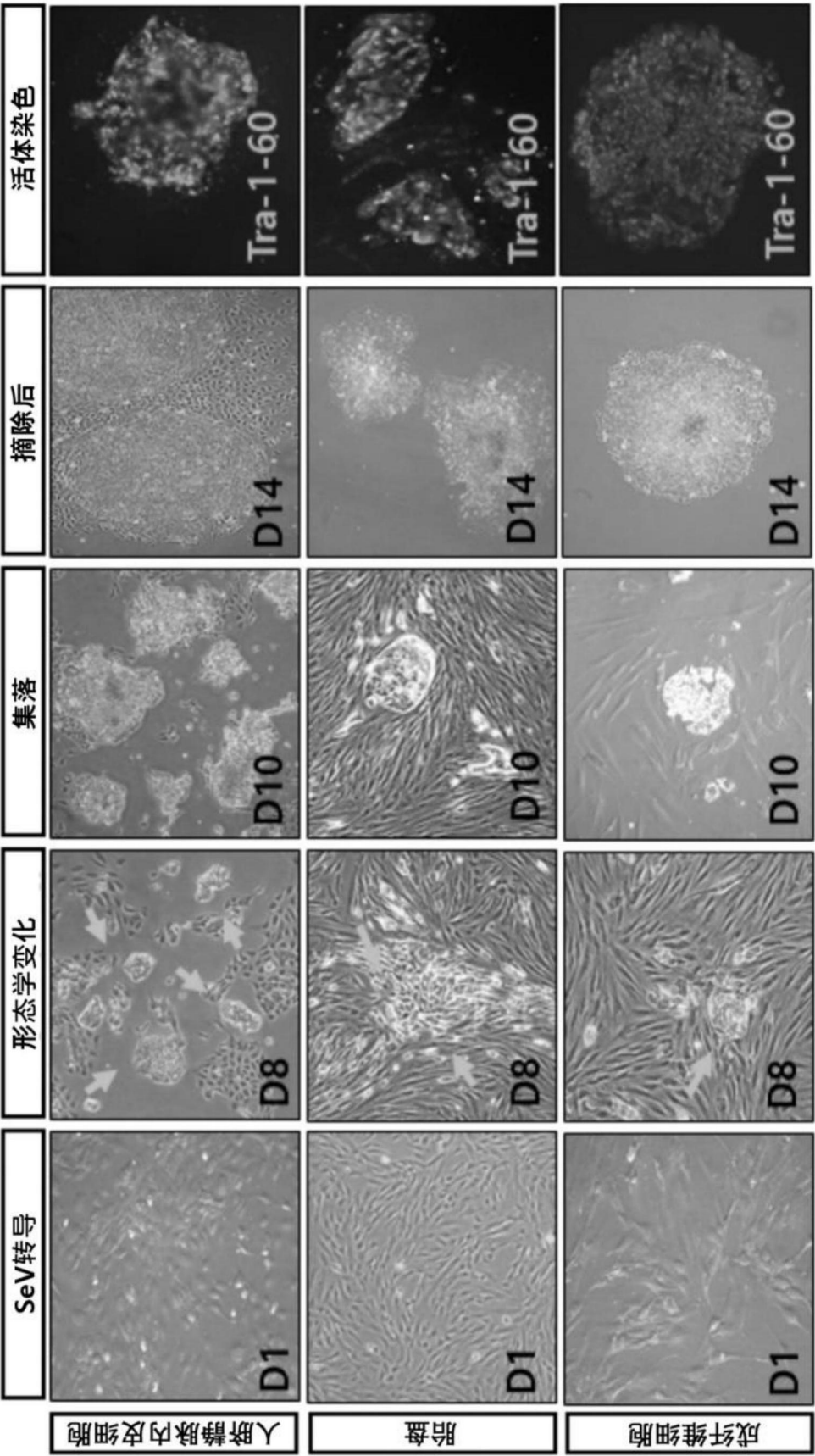
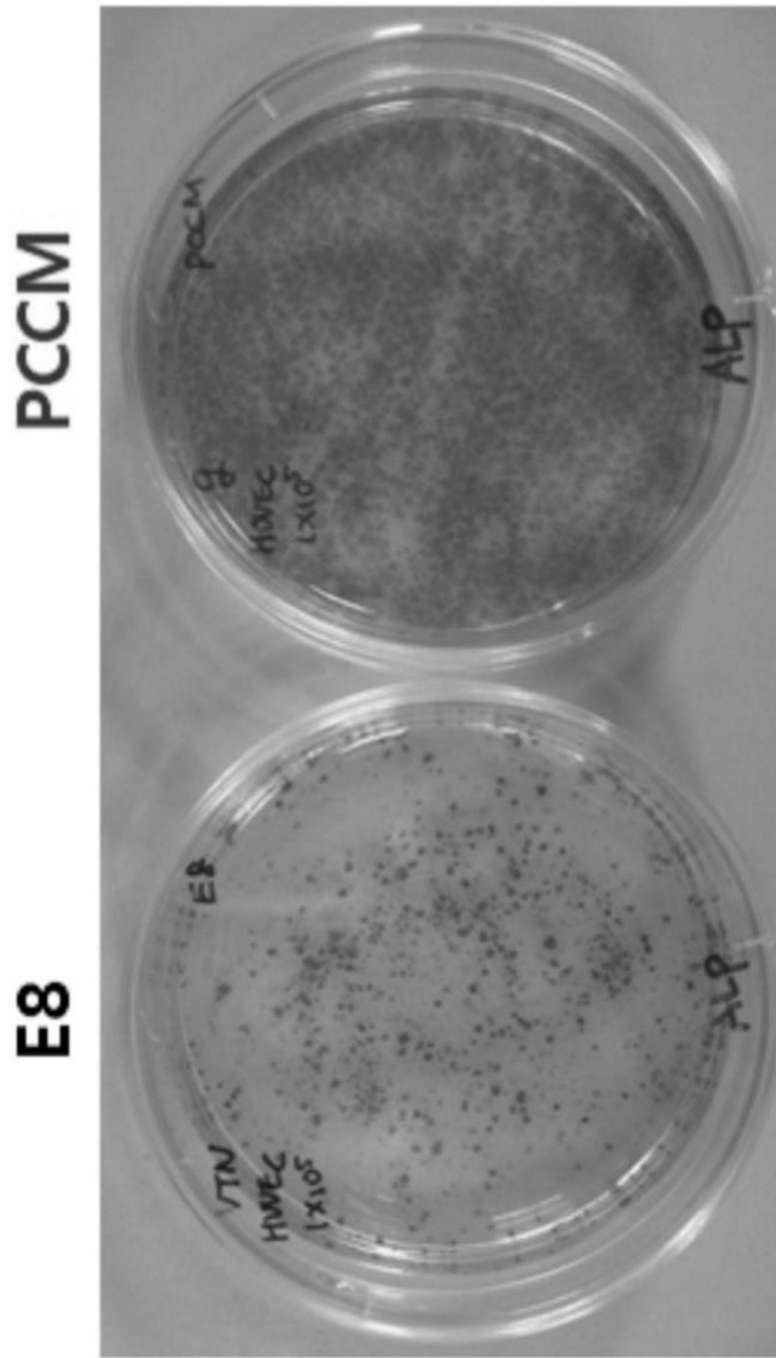


图2



碱性磷酸酶染色

图3a

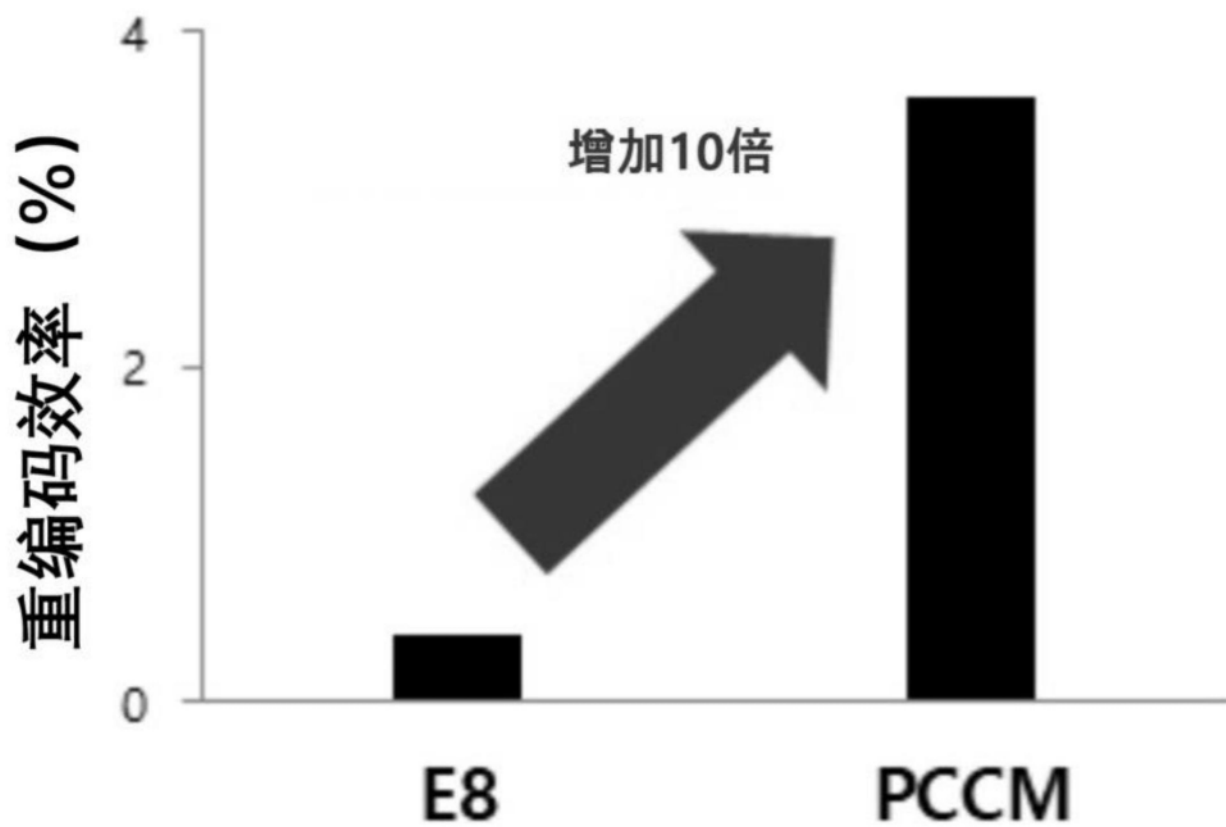


图3b

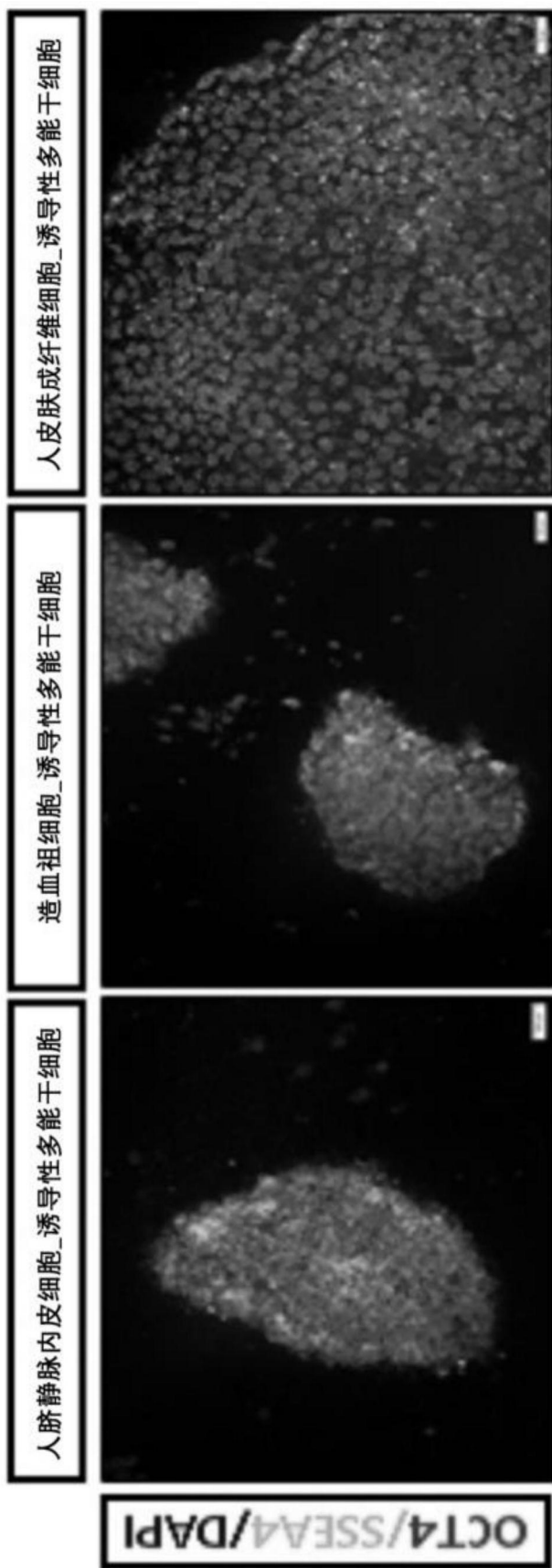


图4a

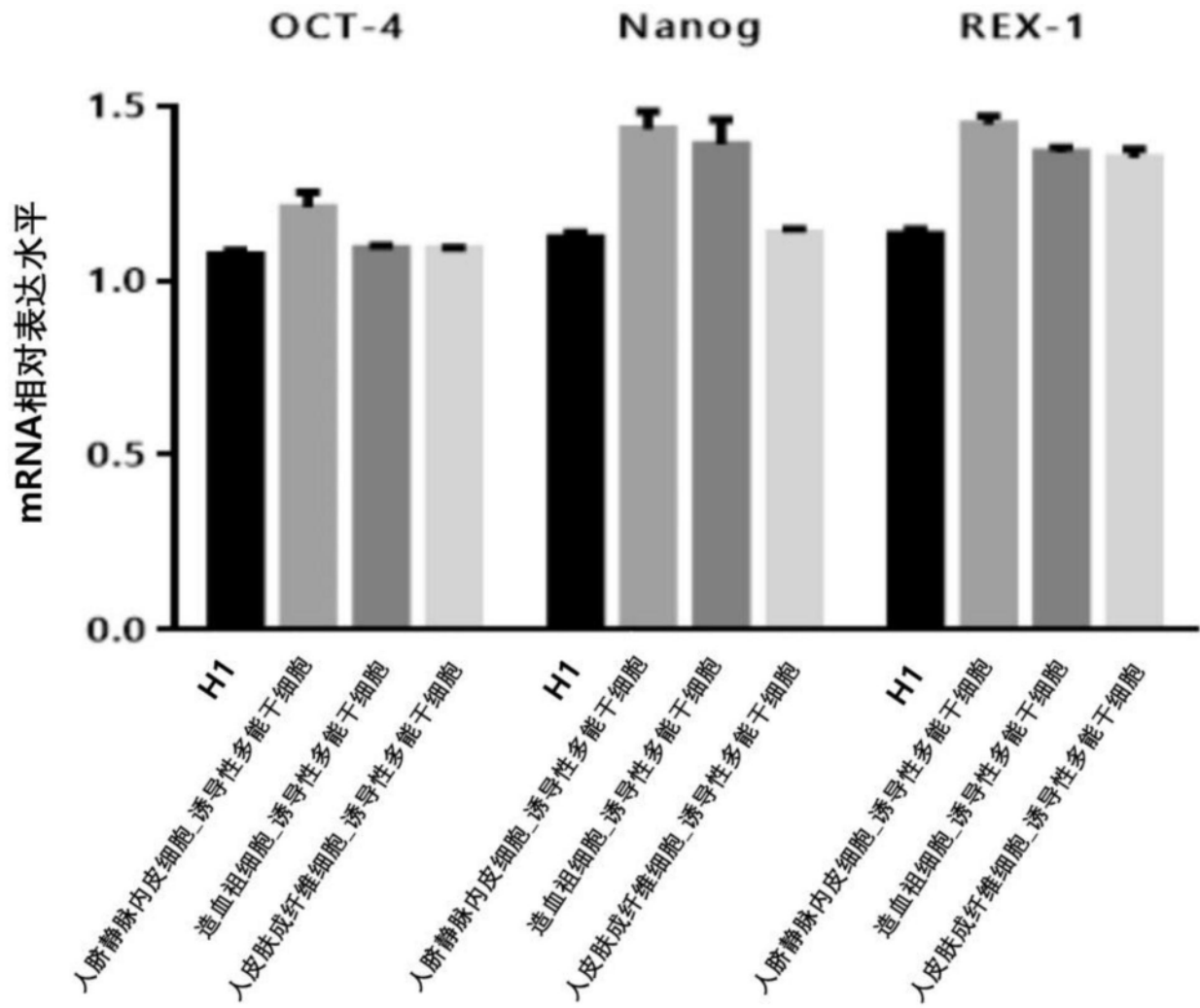


图4b

人脐静脉内皮细胞_诱导性多能干细胞 (46, XY)

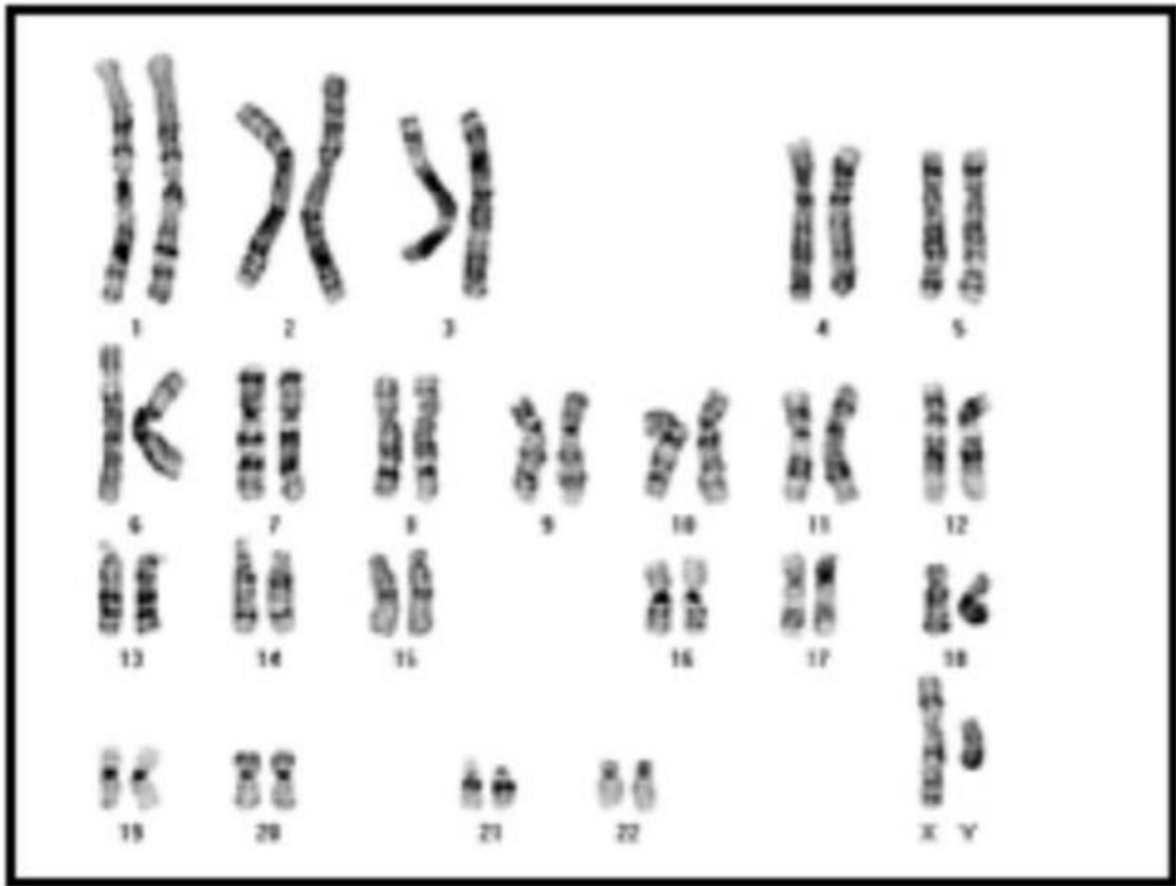


图5a

造血祖细胞_诱导性多能干细胞 (46, XX)

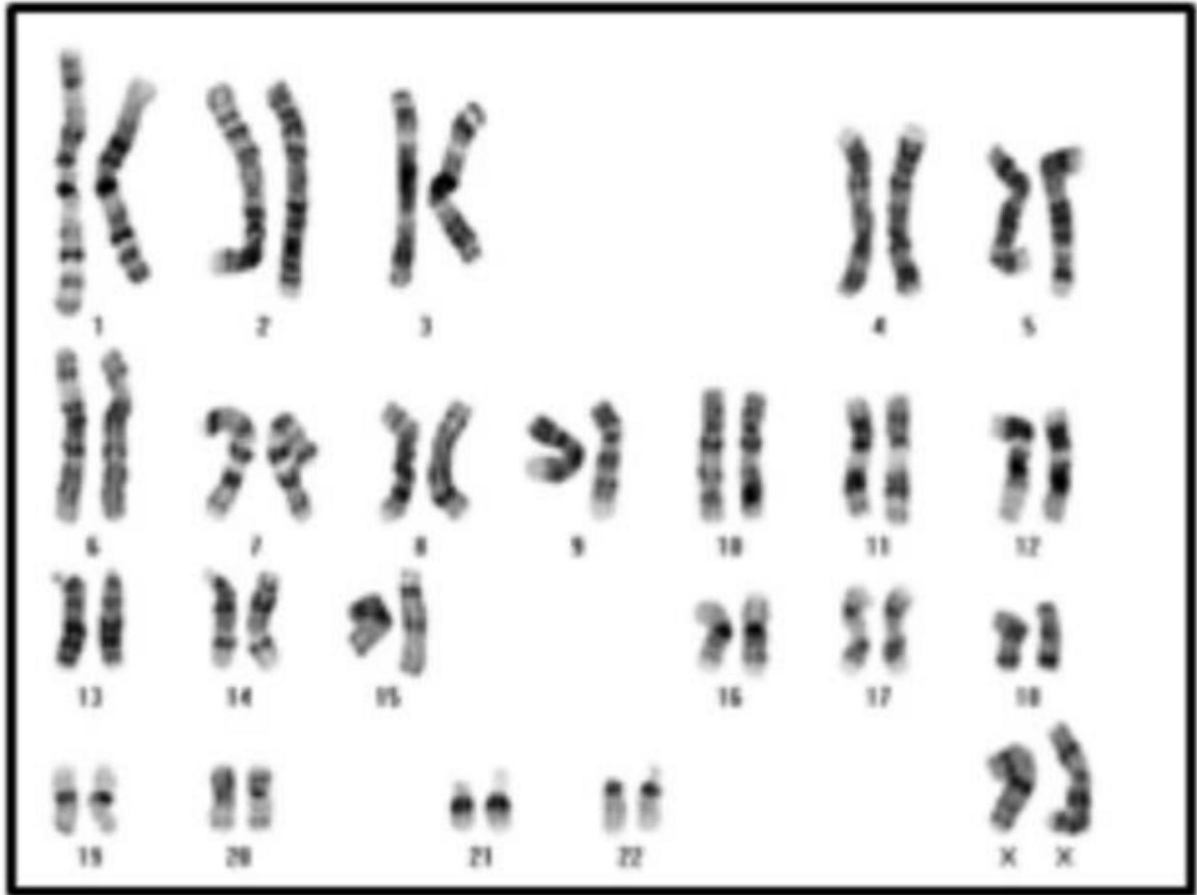


图5b

人皮肤成纤维细胞_诱导性多能干细胞 (46, XY)

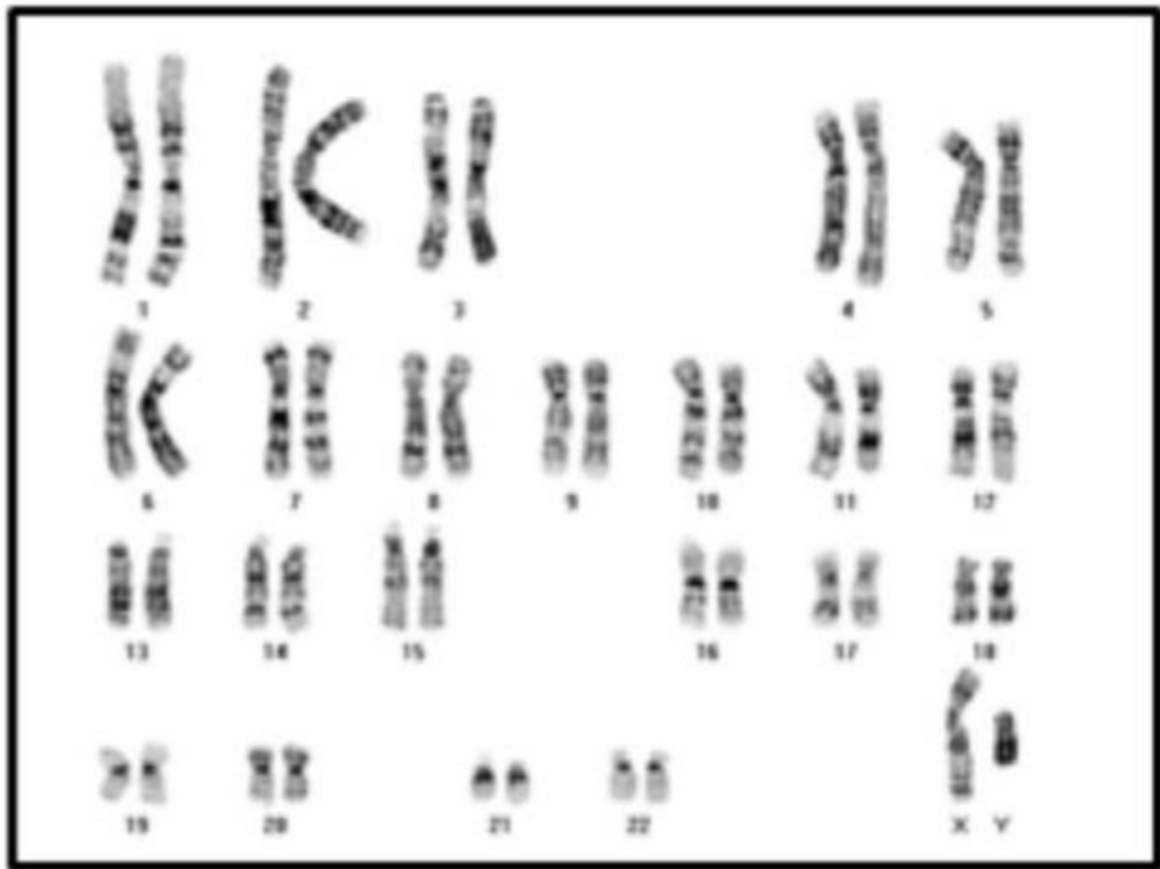


图5c

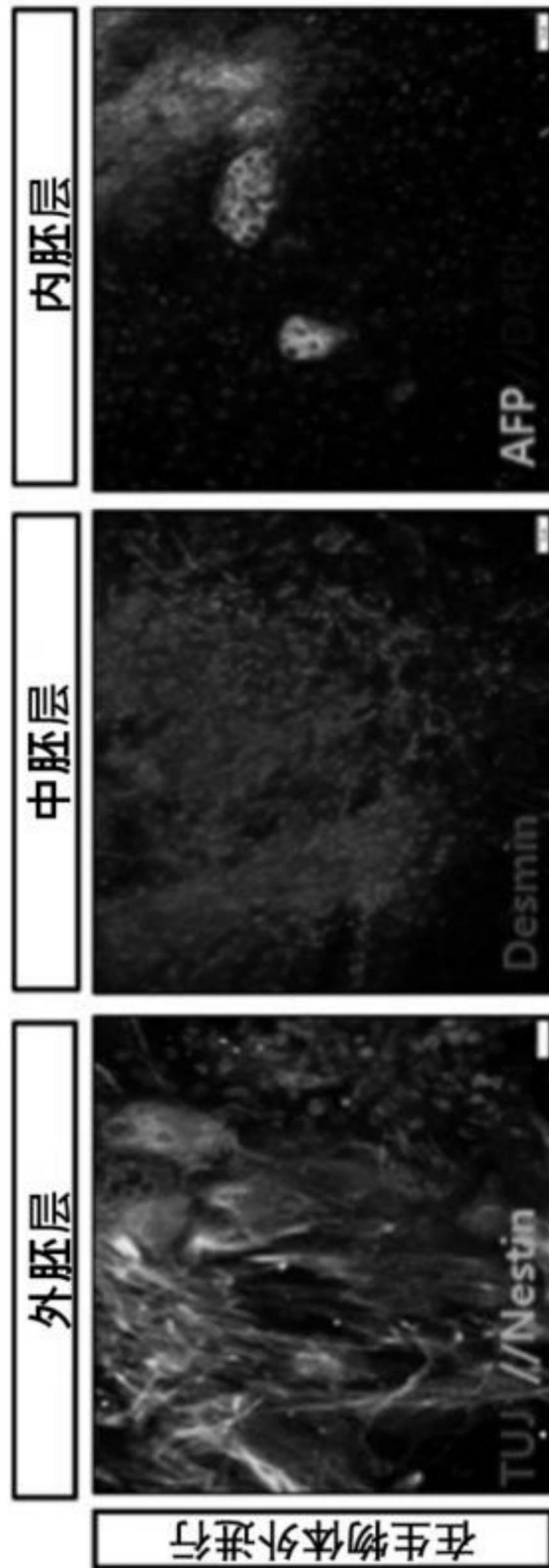


图6a



图6b

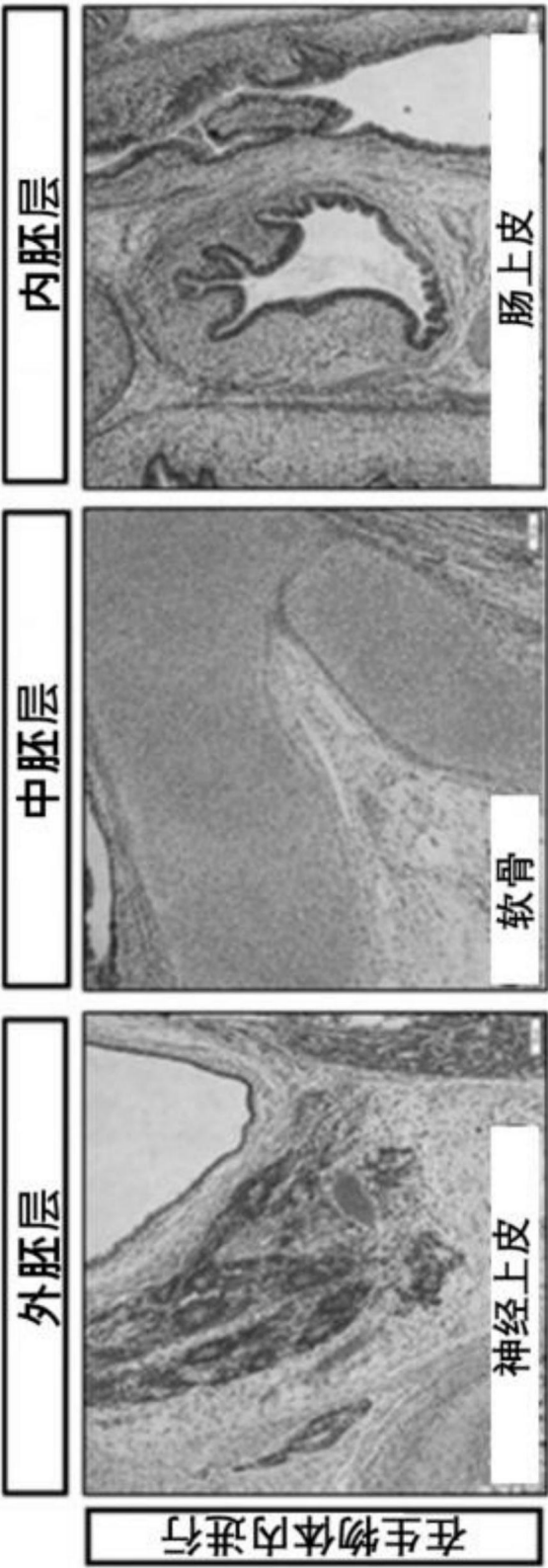


图6c