



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102115760 B

(45) 授权公告日 2014. 07. 23

(21) 申请号 201010528609. 8

(22) 申请日 2010. 10. 28

(30) 优先权数据

10-2009-0134966 2009. 12. 30 KR

10-2009-0134974 2009. 12. 30 KR

10-2009-0134976 2009. 12. 30 KR

10-2009-0134986 2009. 12. 30 KR

(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 刘承权 文哉喜 金俊成 尹炳善

李重翰 全恩暻 许峻硕

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127

代理人 丁香兰 庞东成

(51) Int. Cl.

C12N 15/63 (2006. 01)

C12N 5/10 (2006. 01)

C12N 5/071 (2010. 01)

C12N 5/074 (2010. 01)

(56) 对比文件

US 2009047263 A1, 2009. 02. 19, 说明书第 [0111] 段、第 [0113] 段、第 [0115] 段、权利要求 55、摘要、说明书第 15 页实施例 5、说明书第

[0200] 段。

US 2009047263 A1, 2009. 02. 19, 说明书第 [0111] 段、第 [0113] 段、第 [0115] 段、权利要求 55、摘要、说明书第 15 页实施例 5、说明书第 [0200] 段。

US 2008/0206286 A1, 2008. 08. 28, 全文。

KIM JEONG BEOM 等. Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. 《NATURE》. 2009, 第 461 卷 (第 7264 期), 649-653.

LI HAN 等. The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. 《NATURE》. 2009, 第 460 卷 (第 7259 期), 1136-1139.

JACOBS J J L 等. BMI-1 COLLABORATES WITH C-MYC IN TUMORIGENESIS BY INHIBITING C-MYC-INDUCED APOPTOSIS VIA INK4A/ARF. 《GENES AND DEVELOPMENT》. 1999, 第 13 卷 (第 20 期), 2678-2690.

审查员 郭磊

权利要求书1页 说明书17页
序列表3页 附图25页

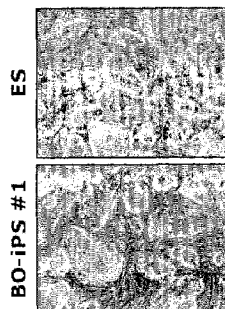
(54) 发明名称

使体细胞重编程以形成诱导全能干细胞的组合物, 和用其形成诱导全能干细胞的方法

(57) 摘要

本发明涉及用于使体细胞重编程以形成胚胎干细胞样细胞的组合物, 以及利用所述组合物形成胚胎干细胞样细胞的方法。所述组合物包含:

a) Bmi1 (B 细胞特异性莫洛尼鼠白血病病毒整合位点 1) 蛋白或编码 Bmi1 的核酸分子; 和 b) Oct4 蛋白或编码 Oct4 的核酸分子。除了减少通常所需的遗传因子数目之外, 所述组合物和方法使得能够形成在各种疾病的细胞疗法中具有较高潜在用的全能胚胎干细胞样细胞。



	集落数
Oct4	0
Bmi1和Oct4 (BO)	50 ± 2

1. 用于对体细胞重编程以形成胚胎干细胞样细胞的组合物,所述组合物包含:
 - a) 重编程因子氧甾醇或嘌呤胺;和
 - b) Oct4 蛋白或编码 Oct4 蛋白的核酸。
2. 如权利要求 1 所述的组合物,其中所述重编程因子是氧甾醇或嘌呤胺,且所述 Oct4 蛋白通过锚定有编码 Oct4 蛋白的核酸分子的病毒表达。
3. 一种用于将非人的体细胞重编程以形成胚胎干细胞样细胞的方法,所述方法包括:
 - 用重编程因子氧甾醇或嘌呤胺处理所述体细胞;和
 - 将 Oct4 基因导入所述体细胞。
4. 如权利要求 3 所述的方法,所述方法包括:
 - (i) 在培养基中培养成纤维细胞;
 - (ii) 用转染有携带 Oct4 基因的载体的包装细胞感染所述成纤维细胞,同时用重编程因子氧甾醇或嘌呤胺处理所述成纤维细胞;和
 - (iii) 在用于培养胚胎干细胞的条件下培养所感染的成纤维细胞。
5. 如权利要求 4 所述的方法,其中在用于培养神经干细胞的条件下,通过将所述 Oct4 基因转入所述成纤维细胞,并同时用重编程因子氧甾醇或嘌呤胺处理所述成纤维细胞从而进行步骤 (ii)。

使体细胞重编程以形成诱导全能干细胞的组合物，和用其 形成诱导全能干细胞的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及使体细胞重编程以形成诱导全能干细胞的组合物，以及使用所述组合物形成诱导全能干细胞的方法，所述组合物包含 Oct4 以及 Bmi1 或其上游调节子。更具体而言，本发明涉及以下技术，其中当导入 Oct1 和选自 Shh (Sonic hedgehog)、氧甾醇和嘌呤胺 (purmorphamine) 的重编程因子时，它们协同作用以诱导体细胞进行重编程过程从而形成诱导全能干细胞。

背景技术

[0002] 干细胞的特征在于自我更新，即经过多个细胞分裂循环依然保持未分化状态的能力，和潜能，即在合适的条件下分化为特定细胞类型的能力。潜能特指干细胞的分化潜能性，并通常分为全潜能 (pluripotency)、多潜能 (multipotency) 和单潜能。因此，使干细胞在细胞培养物中进行自我更新并将它们转化为特定细胞的技术在各种疾病的细胞疗法中具有较高的潜在功用。

[0003] 存在于成人体中，包括造血干细胞、骨髓干细胞和神经干细胞在内的各种干细胞可用于医疗而不会诱发免疫排斥反应，这是因为它们可以由患者自身进行分离。此外，使用成体干细胞的细胞疗法解决了保证器官移植供体的难题。

[0004] 迄今为止，已知成体干细胞保留了多潜能性，即，能分化为多种细胞，但仅仅是密切相关的细胞家族中的那些细胞。许多报道提到了以下效果，即分离自中枢神经系统 (Science255, 1707-1710 1992; Science287, 1433-1438 2000)、骨髓 (Science 276, 71-74, 1997; Science287, 1442-1446, 2000; Science284, 143-147, 1999)、视网膜 (Science287, 2032-2036, 2000) 和骨骼肌 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA96, 14482-14486, 1999; Nature401, 390-394, 1999) 的干细胞转化为密切相关的组织细胞。例如，造血干细胞能分化为血液相关细胞，神经干细胞能分化为神经元或神经胶质细胞，以及骨髓干细胞能分化为中胚层细胞。此外，尽管理论上它们进行无限的自我更新，但成体干细胞实践中难以在体外增殖。而且，由患者分离大量细胞在实践中受到限制。

[0005] 全能干细胞是克服成体干细胞缺点的理想资源。全能干细胞能分化为几乎任何细胞并且能在体外无限复制。迄今已知的全能干细胞有胚胎干细胞、胚胎生殖细胞和胚胎癌细胞，大多数研究集中于胚胎干细胞用于分化为特定细胞、在疾病动物模型中的功能性以及针对各种疾病的治疗潜在功效。

[0006] 尽管如此，与成体干细胞相似，胚胎干细胞的临床使用也遇到必须逾越的障碍。首先，由于分离胚胎干细胞将导致受精人胚胎的死亡，这引发了伦理问题。而且，当将源自胚胎干细胞的已分化细胞植入患者时会有免疫排斥问题。

[0007] 已进行各种尝试以克服上述问题。最多的注意力尤其关注于将已分化的细胞重编程为分化之前的细胞。重编程是通用术语，表示通常通过核转移、细胞融合、细胞提取物处理和诱导全能干 (iPS) 细胞技术 (Cell1132, 567-582, 2008) 实现的诱导已分化的细胞去分

化为全能干细胞,诸如胚胎干细胞。

[0008] 与任何其他技术相比,所述 iPS 细胞技术成功地形成更接近于胚胎干细胞的细胞。自 2006 年首次产生 iPS 细胞以来,已经发表了大量研究文章。原则上,通过将四种基因(重编程诱导基因:Oct4、Sox2、Klf4 和 C-Myc/Oct4、Sox2、Nanog 和 Lin28)转染到小鼠或人的体细胞中,随后在胚胎干细胞专用条件下长时间培养,就可得到与胚胎干细胞相似的干细胞,例如 iPS 细胞。这些 iPS 细胞已显示出在其基因表达方式、表观遗传状况、体外和体内分化为所有三种胚层、畸胎瘤形成、嵌合小鼠生成和嵌合体的种系传递能力(Cell 112 6, 663-676, 2006; Science 318, 1917-1920, 2007)等方面与胚胎干(ES)细胞相类似。

[0009] 然而,对重编程的分子机理还缺乏理解,这主要是由于使用过多遗传因子。为了在实践临床应用中发挥 iPS 细胞的完全效能,必要的是改善所述已建立起来的重编程技术,并且对每种产生的 iPS 细胞系的安全和功效进行评估。

[0010] 最近的研究报道指出肿瘤抑制基因 p53 的失活显著地提高 iPS 细胞产生的效率(Nature 460, 1132-1135, 2009)。p19^{Arf} 和 p16^{Ink4a} 均由 Arf/Ink4a 基因座的替代性阅读框进行编码,已知分别诱导 p53 和 Rb 的表达。相对于只降低 p19^{Arf} 表达所能获得 iPS 细胞形成,通过同时减少 p16^{Ink4a} 和 p19^{Arf} 的表达能提高 iPS 细胞形成(Nature, 460, 1140-1144, 2009)。

[0011] 多梳组(Polycomb group)(PcG)蛋白是表观遗传学基因沉默子。Bmi1 是 PcG 蛋白之一,参与 p16^{Ink4a} 和 p19^{Arf} 的下调,导致对 P53 和 Rb 表达的抑制(Genes Dev, 2678-2690, 1999)。此外,已知 Bmi1 通过重塑染色质组织而调节目标基因的表达。这些功能使得 Bmi1 在神经干细胞和造血干细胞的自我更新中起到重要作用。基于此,本发明人通过在细胞中过表达 Bmi1 而成功地对星形胶质细胞进行重编程,从而诱导出神经干细胞。所诱导的神经干细胞在许多方面与由小鼠分离的那些神经干细胞相类似。尤其是,发现所诱导的神经干细胞具有提高的 Sox2 表达水平,Sox2 是神经干细胞自我更新必需的基因(Biochem Biophys Res Commun. 371, 267-272, 2008)。

[0012] 为了去分化,体细胞需要四种(Oct4、Sox2、Klf4、C-Myc)或三种(Oct4、Sox2、Klf4)基因。已知对于内源性表达这些基因的细胞,可以不再向其中导入这些基因。典型地,已证实单独导入 Oct4 可诱导由小鼠/人神经细胞生成 iPS 细胞,这是由于小鼠/人神经细胞显示出 Sox2、Klf4 和 C-Myc 的内源性表达(Nature, 461, 649-653, 2009)。然而,在本领域中已知还没有单独用 Oct4 因子产生全能胚胎干细胞样细胞的方法。

发明内容

[0013] 本发明人设想,通过 Oct 的过表达结合可导致 Sox2 诱导和 p16^{Ink4a} 和 p19^{Arf} 下调的 Bmi1 过表达,能建立诱导全能干细胞。在此设想的基 础上,将所述两种基因导入体细胞中,然后在用于培养胚胎干细胞的条件下培养。结果,建立了类似胚胎干细胞的细胞系。已发现所建立的细胞系与胚胎干细胞之间的各种性质均高度相似,包括基因表达、表观遗传学、体外/体内分化为所有三种胚层、畸胎瘤形成和嵌合小鼠生成。

[0014] 此外,本发明人想到采用 Bmi1 的上游调节子可能减少重编程通常所需的基因数目。观察到 Shh(Sonic hedgehog)(Bmi1 的上游调节子)及其类似物提供了与所述 Bmi1 基因过表达系统中相同的结果。

[0015] 因此,本发明的目的是提供用于对体细胞进行重编程从而形成胚胎干细胞样细胞

的组合物,所述组合物包含 Oct4 基因以及 Bmi1 或其上游调节子,例如 Shh 或其类似物。

[0016] 本发明的另一个目的是提供通过导入 Oct4 基因以及 Bmi1、Shh 或 Shh 类似物将体细胞重编程以产生胚胎干细胞样细胞的方法。

[0017] 本发明的再一个目标是提供通过所述方法产生的胚胎干细胞样细胞。

附图说明

[0018] 由以下结合附图的详细描述,能更清楚地理解本发明的上述以及其他目的、特征和其它优点,所述附图中:

[0019] 图 1a 至图 1c 显示了将两种因子 Oct4 和 Sox2 基因 (2F),和将三种因子 Oct4、Sox2 和 Bmi1 基因 (2F-Bmi1) 导入小鼠胚胎成纤维细胞的重编程效率。

[0020] 图 1a 显示了由 AP (碱性磷酸酶) 染色测定的导入两种因子 (Oct4 和 Sox2 基因) 和导入三种因子 (Bmi1、Oct4 和 Sox2) 的 iPS 细胞产生频率。由感染 2F-Bmi1 (2F-Bmi1-Ips) 的细胞产生 AP- 阳性集落,而感染 2F 的细胞未产生 AP- 阳性集落 (左),对 AP- 阳性集落进行计数 (右)。

[0021] 图 1b 显示了建立的 2F-Bmi1-iPS 细胞的形态学,其与 ES 细胞的相似。

[0022] 图 1c 显示了由免疫化学染色所检测的在 mES 细胞 (上图) 和 2F-Bmi1-iPS 细胞 (下图) 中胚胎干细胞特异的 SSEA1、Oct4、Sox2 和 Nanog 的表达。在二者中也检测了 AP- 阳性集落。

[0023] 图 2a 至图 2d 显示了通过 Bmi1 逆转录病毒转导将小鼠胚胎成纤维细胞去分化为神经干细胞。

[0024] 图 2a 显示了在小鼠胚胎成纤维细胞中 Bmi1 的表达、Sox2 表达水平的提高和 Bmi1 靶基因 p16^{Ink4a} 和 p19^{Arf} 表达水平的降低。

[0025] 图 2b 显示了当在用于神经干细胞的条件下培养时, Bmi1 诱导的小鼠胚胎成纤维细胞于第 3 天开始聚集并于第 7 天改变其形态为神经球形态。

[0026] 图 2c 显示了由 AP 染色和针对 Nestin 和 Sox2,神经干细胞特异性标记物的免疫细胞化学对神经干细胞样细胞进行的表征。

[0027] 图 2d 显示了 Bmi1 诱导小鼠胚胎干细胞得到的神经干细胞样细胞分化为神经元、少突胶质细胞和星形胶质细胞的多潜能,该图通过针对它们各自的代表性标记物 Tuj1、O4 和 GFAP 的免疫细胞化学而测定。

[0028] 图 3a 至图 3f 显示了通过 Oct4 和 Bmi1 逆转录病毒转导将小鼠胚胎成纤维细胞去分化为神经干细胞。

[0029] 图 3a 显示了 mES 细胞和通过将 Bmi1 和 Oct4 基因导入小鼠胚胎成纤维细胞而建立的 BO-iPS 的 ESC- 样形态。针对 Bmi1 和 Oct4 的组合和单独的 Oct4 给出了重编程效率 (右图)。与 Bmi1 组合的 Oct4 诱导 mES 进行重编程过程,成功地形成约 50 个集落,然而 Oct4 单独则不行。

[0030] 图 3b 显示了由 RT-PCR 所测量的诱导干细胞中的重要基因的表达模式与 mES 细胞相似。

[0031] 图 3c 显示了由实时 PCR 所测量的参与胚胎干细胞自我更新的重要基因的表达模式在诱导干细胞和胚胎干细胞之间相似。

[0032] 图 3d 显示了由免疫细胞化学所测量的在所述诱导干细胞中胚胎干细胞特异性标记物的表达。

[0033] 图 3e 显示了由蛋白印迹分析测量的诱导干细胞和胚胎干细胞中 Oct4 和 Sox2 的表达。

[0034] 图 3f 显示了由 FACS 分析测量的在诱导干细胞中 SSEA1 和 Oct4 的表达达到与胚胎干细胞相似的程度,但与小鼠胚胎成纤维细胞不同。

[0035] 图 4a 至图 4b 显示了本发明的胚胎干细胞样细胞的表现遗传学改变。

[0036] 图 4a 显示了由亚硫酸氢盐测序而测定的参与胚胎干细胞的自我更新的 Oct4 和 Nanog 的启动子区域的甲基化。在小鼠胚胎成纤维细胞中启动子区域大部分被甲基化,但在诱导干细胞样胚胎干细胞中被去甲基化。这对于每个克隆而言都是正确的。

[0037] 图 4b 显示了由实时 PCR 证实的组蛋白 H3 的乙酰化和甲基化的染色质免疫沉淀分析。与在 mES 中相似, Oct4、Sox2 和 Nanog 启动子提高了在 BO-iPS 细胞中组蛋白 H3 的乙酰化 (AcH3),降低了小鼠胚胎成纤维细胞中组蛋白 H3 的赖氨酸 9 的去甲基化。

[0038] 图 5 显示了由 DNA 微阵列分析得到的全局基因表达谱。mES、MEF 和 iPS 细胞的 Pearson 相关分析显示, iPS 细胞与 mES 细胞高度相关,二者之间的相关系数为 0.98,而与 MEF 细胞相关性较差,二者之间的相关系数为 0.69(下图)。全局基因表达谱的散布图显示,BO-iPS 细胞及其克隆与 MEF 细胞有很大不同,但与 mES 细胞相似。并且,大多数基因的表达水平在 2 倍变化范围内,这表明 BO-iPS 细胞和 mES 细胞之间基因表达模式的相似性。

[0039] 图 6a 至图 6d 显示了体外和体内分化为所有三种胚层。

[0040] 图 6a 显示了诱导干细胞的胚体 (EB) 形成,以及由 RT-PCR 测定的三种胚层的特征性标记物的表达。

[0041] 图 6b 显示了由针对三种胚层的典型标记物的免疫细胞化学分析的胚体自发分化为三种胚层的相应代表性细胞。所述胚体分化为内胚层细胞、中胚层细胞和外胚层细胞,其特征为 GATA4、Bry、SMA 和 Tuj1 的表达。

[0042] 图 6c 显示了诱导体内分化为所有三种胚层。iPS 细胞在肾包膜下注射到 Balb/c 裸鼠中,8 周~10 周后,小鼠发育出畸胎瘤,以备 H&E 染色。

[0043] 图 6d 显示了当 BO-iPS 细胞注射入胚泡时嵌合体形成。

[0044] 图 7a 至图 7c 显示了 ES 细胞和由 iPS 细胞同源群得到的克隆之间的比较。

[0045] 图 7a 显示了由 RT-PCR 所测量的 MEF 和 iPS 细胞中对于胚胎干细胞至关重要的主要基因的表达谱。

[0046] 图 7b 显示了由免疫细胞化学测量的阳性 AP 染色和所述克隆上的标记物的检测。

[0047] 图 7c 显示了在肾包膜下注射入 Balb/c 裸鼠后,所述克隆的体内畸胎瘤形成,8 周~10 周后,检测到三种胚层。

[0048] 图 8 是示意图,显示了使用 Oct4 和 Bmi1 将成纤维细胞重编程以产生诱导全能干细胞的新方法。

[0049] 图 9a-9d 显示了经 Shh(sonic hedgehog) 处理而诱导 Bmi1。

[0050] 图 10a-10e 显示了在所述 Shh 处理下通过导入 Oct4 基因而产生的 iPS 细胞与 ES 细胞的比较。

[0051] 图 11a 和 11b 显示了本发明的胚胎干细胞样细胞与胚胎干细胞之间的表现遗传学

比较。

[0052] 图 12 显示了由 DNA 微阵列分析得到的全局基因表达谱。由所述全局基因表达谱的散布图分析,发现 B0-iPS 细胞在基因表达模式上与 mES 细胞相似。Pearson 相关分析显示,ES 细胞与 S0-iPS 细胞高度相关,二者之间的相关系数为 0.98。

[0053] 图 13a 至 13c 显示了体外和体内分化为所有三种胚层。

[0054] 图 14a 至 14d 显示了通过羟基胆固醇(氧甾醇)(Shh 类似物)处理的 Bmi1 的诱导。

[0055] 图 15a 至 15d 显示了在氧甾醇处理下通过导入 Oct4 基因而产生的 iPS 细胞与 ES 细胞的比较。

[0056] 图 16a 和 16b 显示了本发明的胚胎干细胞样细胞与胚胎干细胞之间的表观遗传学比较。

[0057] 图 17 显示了由 DNA 微阵列分析得到的 ES 细胞和 00-iPS 细胞的全局基因表达谱。由所述全局基因表达谱的散布图分析,发现 00-iPS 细胞在基因表达模式上与 mES 细胞相似(上图)。Pearson 相关分析显示,ES 细胞与 S0-iPS 细胞高度相关,二者之间的相关系数为 0.98。诱导干细胞的克隆相对于 ES 细胞的 Pearson 相关系数为 0.95。

[0058] 图 18a 和 18b 显示了本发明的胚胎干细胞样细胞体外和体内分化为所有三种胚层。

[0059] 图 19a 和 19b 显示了在应用于小鼠胚胎成纤维细胞的条件下由成体小鼠胚胎成纤维细胞建立诱导干细胞系(00-iPS-TTF#1 和 2),以及它们的性质。

[0060] 图 20a 和 20b 显示了由成体小鼠成纤维细胞得到的胚胎干细胞样细胞(00-iPS-TTF#1 和 2)的表观遗传学。

[0061] 图 21a 和 21b 显示了本发明由成体小鼠成纤维细胞得到的诱导胚胎干细胞样细胞(00-iPS-TTF#1 和 2)的体外和体内分化为所有三种胚层的潜能。

[0062] 图 22a-22d 显示了通过 Shh 类似物嘌呤吗啡胺处理进行的 Bmi1 诱导。

[0063] 图 23a-23e 显示了在嘌呤吗啡胺处理下将 Oct4 基因导入而产生的诱导干细胞与胚胎干细胞的比较。

[0064] 图 24a 和 24b 显示了本发明的胚胎干细胞样细胞的表观遗传学。

[0065] 图 25 显示了由 DNA 微阵列分析得到的 ES 细胞和 P0-iPS 细胞的全局基因表达谱。由所述全局基因表达谱的散布图分析,发现 P0-iPS 细胞在基因表达模式上与 mES 细胞相似。Pearson 相关分析显示,ES 细胞与 P0-iPS 细胞高度相关,相关系数为 0.97 和 0.95。

[0066] 图 26a-26d 显示了本发明的诱导胚胎干细胞样细胞体外和体内分化为所有三种胚层的潜能。

具体实施方式

[0067] 为实现本发明,本发明人对体细胞去分化进行了集中深入的研究,以克服现有技术中遇到的难题,这导致发现当将 Oct4 与选自 Shh 或 Shh 类似物如氧甾醇或嘌呤吗啡胺的重编程因子组合导入体细胞时,能诱使体细胞进行去分化成为全能胚胎干细胞样细胞。

[0068] 本发明的一方面提供了用于对体细胞进行重编程从而形成胚胎干细胞样细胞的组合物,所述组合物包含:

[0069] a) Bmi1 (B 细胞特异性莫洛尼鼠白血病病毒整合位点 1, B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site1) 蛋白或编码 Bmi1 的核酸分子 ; 和

[0070] b) Oct4 蛋白或编码 Oct4 的核酸分子。

[0071] 如本文中所使用, 术语“胚胎干细胞 (ESC) 样细胞”意指以 ESC 细胞的性质为特征的全能细胞, 所述 ESC 细胞的性质包括但不限于不转变而增殖、无限复制、自我更新和分化为所有三种胚层。在上下文中, 胚胎干细胞样细胞可以与胚胎干细胞或诱导全能干细胞交换使用。

[0072] 当诱导产生胚胎干细胞样细胞时, 对于起始体细胞没有特别限制。只要所述体细胞被诱导进行去分化, 可以采用任何体细胞。例如, 可以采用胚胎时期的体细胞或成熟体细胞。当所述胚胎干细胞样细胞应用于疾病治疗时, 理想的是它们源自患者的体细胞, 例如与疾病相关或者参与疾病治疗的体细胞。优选的是, 所述体细胞是成纤维细胞, 所述成纤维细胞可分离自动物, 优选分离自哺乳动物, 包括人、小鼠、马、绵羊、猪、山羊、骆驼、羚羊、狗等。所述胚胎时期的体细胞不来自人。

[0073] 根据本发明的实施方式, Bmi1 和 Oct4 可以为蛋白形式, 也可以为核酸分子形式。可用于本发明的 Bmi1 和 Oct4 的实例包括来自于动物, 例如人、小鼠、马、绵羊、猪、山羊、骆驼、羚羊、狗等的那些 Bmi1 和 Oct4, 优选人 Bmi1 和 Oct4。此外, 用于去分化为胚胎干细胞样细胞的 Bmi1 和 Oct4 蛋白可具有其野生型氨基酸序列或变体。

[0074] Bmi1 和 Oct4 蛋白变体指这样的蛋白 : 由于在一个或多个氨基酸残基处的缺失、插入、非保守或保守替换或它们的组合而与野生型蛋白在氨基酸序列上存在差异, 但仍保持与之等等的生物和功能性, 并且生理化学性质上发生改变或未发生改变。如果发生改变, 所述变体在面对物理和化学条件时可具有更高的结构稳定性以及更高的生理活性。

[0075] 在本发明的优选实施方式中, Bmi1 和 Oct4 提供为编码所述蛋白的核苷酸序列。

[0076] 所述核苷酸序列可编码 Bmi1 和 Oct4 的野生型或变体蛋白, 并可以在一个或多个核苷酸残基处经替代、缺失、插入或其组合而进行改变。它们可以经天然分离或者化学合成。

[0077] 编码 Bmi1 和 Oct4 的核苷酸序列可以是单链或双链形式的 DNA 分子 (基因组 DNA、cDNA) 或 RNA 分子。

[0078] 根据本发明的优选实施方式, 用于对体细胞进行重编程从而形成胚胎干细胞样细胞的组合物还包括携带并表达 Bmi1 和 Oct4 基因的载体。

[0079] 在本文中所使用的术语“载体”指 DNA 构建体, 其中感兴趣的基因可操作地与调节元件相连, 从而使得所述基因能在其中带有所述载体的适当宿主中表达。

[0080] 本文中所使用的术语“可操作地相连”意指调节元件和编码感兴趣的蛋白的核苷酸序列之间以所述元件能用于启动并调控核苷酸序列转录的功能性关系进行的功能性连接。在重组载体中, 所述功能性连接可以采用本领域中已知的基因重组技术得到。使用典型酶能实现位点特异性 DNA 切割和连接。

[0081] 根据本发明的目的, 本发明所用载体的调节元件可以包括用于膜靶定或分泌的信号序列或前导序列, 以及表达调节元件如启动子、操纵子和起始密码子、终止密码子、聚腺苷酸化信号和增强子。所述启动子可以是组成型 (constitutive) 或诱导型 (inducible)。此外, 所述表达载体可以含有选择标记, 从而选取其转化的宿主细胞。如果表达载体可复

制,所述表达载体将含有复制起始点。所述载体可以自我复制或者可以整合到宿主细胞的染色体中。

[0082] 可用于本发明的载体有质粒、粘粒和病毒载体,优选病毒载体。病毒载体的实例包括但不限于由逆转录病毒诸如 HIV(人类免疫缺陷病毒)、MLV(鼠白血病病毒)、ASLV(禽肉瘤/白血病)、SNV(脾坏死病毒)、RSV(劳氏肉瘤病毒)和 MMTV(小鼠乳腺肿瘤病毒)、腺病毒、腺相关病毒和单纯疱疹病毒得到的那些病毒载体。在本发明的一个实施方式中,Bmi1 基因插入到 pBbe puro 载体中,即带有嘌呤霉素选择标记的基于 MLV(莫洛尼白血病病毒)的病毒载体,并采用 pBabe neo 载体来携带和表达 Oct4 基因,该 pBabe neo 载体是含有新霉素选择标记的基于 MLV 的病毒载体。

[0083] 在本发明中,采用本领域中已知技术可以将编码 Bmi1 和 Oct4 的核苷酸序列引入到宿主细胞中,诸如以裸 DNA 载体的形式(Wolff et al., Science, 1990; Wolff et al. J Cell Sci. 103:1249-59, 1992)或由脂质体或阳离子聚合物协助。脂质体是用于基因转移的磷脂膜,由诸如 DOTMA 和 DOTAP 等阳离子磷脂的混合物构成。当阳离子脂质体与阴离子核酸分子以一定的比例混合时,形成适用于跨细胞膜基因转移的核酸-脂质体复合物。

[0084] 根据本发明的另一优选实施方式,用于对体细胞重编程以形成胚胎干细胞样细胞的组合物还包括锚定和表达编码 Bmi1 和 Oct4 的核苷酸序列的病毒。

[0085] 在本文中,术语“病毒”是通过用携带编码 Bmi1 和 Oct4 的基因的病毒载体转染和感染包装细胞而制备的。

[0086] 可在表达 Bmi1 和 Oct4 的病毒制备中使用的病毒的实例包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒和单纯性疱疹病毒,并优选逆转录病毒。在本发明的实施方式中,通过将 Bmi1 编码核苷酸序列(SEQ ID NO. :1)插入到 pBabe puro 载体构建的 pBabe puro Bmi1 载体和通过插入 Oct4 编码核苷酸序列(SEQ ID NO. :2)构建的 pBabe neo Oct4 载体转染到 PT67 包装细胞系中以产生可表达 Bmi1 和 Oct4 的病毒,随后将病毒用于感染成纤维细胞。由 PT67 细胞包装的病毒显示出高病毒滴度并且能用于感染较宽范围的哺乳动物细胞。

[0087] 根据本发明的再一个方面,本发明提供了由体细胞产生胚胎干细胞样细胞的方法,该方法包括将 Bmi1(B 细胞特异性莫洛尼鼠白血病病毒整合位点 1) 基因和 Oct4 基因导入体细胞。

[0088] 更具体而言,所述方法包括 (i) 在培养基中培养成纤维细胞;(ii) 将各自携带 Bmi1 基因和 Oct4 基因的载体转染入包装细胞,用所述包装细胞感染所述成纤维细胞;和 (iii) 在用于培养胚胎干细胞的条件下培养所感染的成纤维细胞。

[0089] 在步骤 (i) 中使用的培养基是通常用于培养成纤维细胞的培养基。通常,所述培养基含有碳源、氮源和痕量元素。在本发明的优选实施方式中,成纤维细胞在补充有 10%FBS(胎牛血清)、0.1mM 非必需氨基酸、1% 青霉素/链霉素和 0.1mM β -巯基乙醇的 DMEM(高葡萄糖,不含有丙酮酸钠)中培养。

[0090] 在步骤 (ii) 中,通过将 Bmi1 编码核苷酸序列插入到 pBabe puro 载体构建的 pBabe puro Bmi1 载体和通过插入 Oct4 编码序列(SEQ ID NO. :2)插入 pBabe neo 载体构建的 pBabe neo Oct4 载体被转染到可产生能感染多种哺乳动物宿主细胞的高滴度病毒的包装细胞中,从而形成随后可用于感染成纤维细胞的病毒。Bmi1 和 Oct4 或编码它们的核苷酸序列可以

是得自于动物,如人、小鼠、马、绵羊、猪、山羊、骆驼、羚羊、狗等的野生型序列或其变体。在优选实施方式中,采用人 Bmi1 (NCBI 登记号 No. L13689 ;SEQ ID NO. :1) 和人 Oct4 (NCBI 登记号 No. NM_002701 ;SEQ ID NO. :2)。

[0091] 步骤 (iii) 中可以采用任何培养基,只要该培养基常用于培养胚胎干细胞即可。在优选实施方式中,在饲养细胞存在下,受感染的成纤维细胞在补充有 15%FBS (胎牛血清)+0.1mM 非必需氨基酸+1% 青霉素 / 链霉素+0.1mM β -巯基乙醇+1000 单位 /ml 小鼠 LIF (白血病抑制因子) 的高葡萄糖 DMEM 中进行培养,每两天或三天传代一次。

[0092] 本发明的再一个方面提供了由本发明方法制备的胚胎干细胞样细胞。

[0093] 发现由本发明的方法制备的胚胎干细胞样细胞对于抗胚胎干细胞标记物碱性磷酸酶、SSEA-1、Oct4 和 Sox2 的抗体有阳性反应,并且以与胚胎干细胞相似的方式表达对保持胚胎干细胞的自我更新非常关键的基因 (Oct4、Sox2、Nanog、c-myc、Klf4)。此外,本发明的胚胎干细胞样细胞展现出与典型胚胎干细胞一样的全能性。而且,本发明的胚胎干细胞样细胞的特征在于自我更新。

[0094] 因此,本发明的胚胎干细胞样细胞可用作各种类型细胞的来源。例如,当在用于细胞分化的条件下培养时,所述胚胎干细胞样细胞可被诱导分化为造血细胞、神经元、 β 细胞、肝细胞、软骨细胞、上皮细胞、尿道上皮细胞及其类似细胞。

[0095] 关于用于胚胎干细胞分化的条件、培养基和方法,可参考 Palacios 等,PNAS. USA, 92:7530-7537 (1995)、Pedersen, J. Reprod. Fertil. Dev., 6:543-552 (1994) 和 Bain 等., Dev. Biol, 168:342-357 (1995)。通过植入,所述胚胎干细胞可用于治疗大量疾病,包括糖尿病、帕金森氏症、阿尔茨海默氏症、癌症、脊髓损伤、多发性硬化症、肌萎缩侧索硬化症 (卢伽雷氏症)、肌肉营养不良、肝病、高胆固醇血症、心脏病、软骨疾病、创伤、足部溃疡、胃肠功能紊乱、血管疾病、肾脏疾病、子宫疾病、衰老有关的疾病等。此外,本发明的胚胎干细胞样细胞能用于药物评价。

[0096] 本发明的又一个方面提供了由体细胞产生诱导神经干细胞的方法,所述方法包括将 Bmi1 (B 细胞特异性莫洛尼鼠白血病病毒整合位点 1) 基因导入所述体细胞,和在用于培养神经干细胞的条件下培养所述体细胞。

[0097] 通过特异性标记物 (Nestin 和 Sox2) 的检测,鉴定体细胞去分化为神经干细胞。当置于典型分化条件下时,通过针对相应标记 (GFAP、Tuj1 和 O4) 的免疫化学染色测定,发现所述诱导神经干细胞分化为星形胶质细胞、神经元和少突胶质细胞。

[0098] 本发明的再一个方面提供了用于对体细胞重编程以形成胚胎干细胞的组合物,所述组合物包含:

[0099] a) 选自 Shh (Sonic Hedgehog 信号) 蛋白、Shh 编码核酸分子、氧甾醇、嘌呤衍生物及其组合的 Bmi1 上游调节子;和

[0100] b) Oct4 蛋白或 Oct4 编码核酸分子。

[0101] Bmi1 由上游调节子 Shh (sonic hedgehog) 信号传递路径调节。如果采用 Shh 或 Shh 类似物的试验可提供与通过 Bmi1 过表达系统所得相似的结果,则有可能减少用于重编程的基因的数量。迄今,未见报道公开利用单一基因由成纤维细胞产生诱导 PS 细胞。因此,该方法可产生用于诱导去分化的新方法,并且进一步产生作为提供无需导入基因而形成 iPS 细胞的方法的基础的技术。

[0102] 该设想使得可利用 Shh 信号传导路径来使 Bmi1 过表达。经报道,在神经干细胞的自我更新中起到重要作用的细胞因子 Shh,直接影响 Gli1 转录并上调神经干细胞的主要因子 Bmi1 和 Sox2 的表达 (Curr Mol Med. 9, 873-886, 2009; Crit Rev Oncol Hematol. 65, 43-53, 2008)。利用这些报道中所含的知识,本发明人在学术文章中公开了 Bmi1 的导入可诱导星形胶质细胞重编程为神经干细胞,其内容已获得专利权。并且,发现 Shh 诱导去分化。所述文章的内容已获得专利权。当转移到用于神经干细胞的培养条件中时,已转染有 Bmi1 基因的鼠成纤维细胞重编程为神经干细胞,通过神经干细胞的特征性标记物 nestin 和 Sox2 的表达监测了该过程。此外,通过针对各自特异性标记物的免疫染色测定,发现诱导神经干细胞分化为星形胶质细胞、少突胶质细胞和神经元。另外,诱导 Bmi1 表达的 Shh 处理确实启动了由体细胞产生诱导神经干细胞。

[0103] 基于此,用 Shh 处理的同时引入 Oct4,随后在胚胎干细胞的条件下培养建立了胚胎干细胞样细胞,发现所述胚胎干细胞样细胞在基因表达谱、表观遗传学、体外和体内分化为所有三种胚层和畸胎瘤形成方面高度类似小鼠胚胎干细胞。

[0104] 根据本发明的一个实施方式,Shh 和 Oct4 可以是蛋白形式,也可以是核酸分子形式。可用于本发明的 Shh 和 Oct4 的实例包括来自动物,例如人、马、绵羊、猪、山羊、骆驼、羚羊、狗等的那些 Shh 和 Oct4,优选人 Shh 和 Oct4。此外,可用于去分化为胚胎干细胞样细胞的 Shh 和 Oct4 蛋白可以具有其野生型氨基酸序列或其变体。

[0105] Shh 和 Oct4 蛋白变体指这样的蛋白:由于在一个或多个氨基酸残基处的缺失、插入、非保守或保守替换或它们的组合而具有不同于野生型蛋白的氨基酸序列,但仍保持与之等同的生物功能,并且生理化学性质上发生改变或未发生改变的蛋白。如果发生改变,所述变体在面对物理和化学条件时可具有更高的结构稳定性以及更高的生理活性。

[0106] 优选为,Shh 以蛋白形式提供。例如,通过用 Shh 蛋白处理其培养基,可将体细胞重编程为胚胎干细胞样细胞。除了诱导 Bmi1 表达,Shh 如果以蛋白形式提供,还能减少因重编程而导入的基因数量。

[0107] 在培养基中应当含有有效量的 Shh 蛋白。Shh 蛋白的有效量可根据如培养基种类、培养方法等已知因素而变化。在本发明的优选实施方式中,Shh 的用量为 500ng/ml。

[0108] 在本发明的一个实施方式中,Shh 和 Oct4 以编码所述蛋白的核苷酸序列形式提供。

[0109] 所述核苷酸序列可以编码 Shh 和 Oct4 的野生型或变体蛋白,并且可由于替换、缺失、插入或它们的组合而具有一个或多个被改变的核苷酸残基。它们可以从自然界分离或者化学合成。

[0110] 编码 Shh 和 Oct4 的核苷酸序列可以是单链或双链形式的 DNA 分子(基因组 DNA、cDNA)或 RNA 分子。

[0111] 根据本发明的优选实施方式,用于对体细胞进行重编程从而形成胚胎干细胞样细胞的组合物还包括携带和表达 Shh 和 Oct4 基因的载体。

[0112] 根据本发明的再一个优选实施方式,用于对体细胞重编程以形成胚胎干细胞样细胞的组合物还包括 Shh 蛋白以及锚定和表达编码 Oct4 的核苷酸序列的病毒。

[0113] 作为替代性方式,可以采用 Shh 类似物,诸如羟基胆固醇(氧甾醇)或嘌呤胺替代 SHh 以诱导 Shh 信号 (Stem cells 27, 703-713, 2009)。在神经干细胞的培养条件下,观察

到用氧甾醇或嘌呤胺对小鼠胚胎成纤维细胞的处理诱导 Bmi1 表达水平的提高以及随之 Sox2 表达水平的提高。同时,均为 Bmi1 标靶的 p16^{Ink4a} 和 p19^{Arf} 被下调。因此,用氧甾醇或嘌呤胺处理诱导了 Bmi1 和 Sox2 的上调以及 Bmi1 的标靶基因的下调。观察到通过用氧甾醇或嘌呤胺处理诱导的细胞具有与神经干细胞相似的形态,并且表达神经干细胞的特征性标记 nestin 和 sox2。这些结果与 Bmi1 过表达的情形中发生的相同,表明 Shh 类似物氧甾醇或嘌呤胺能用以诱导体细胞进行去分化成为胚胎干细胞样细胞。该方法同样具有减少为重编程而导入的基因数目的优点。用 Shh 类似物处理的同时引入 Oct4,随后在用于胚胎干细胞的条件下培养建立了胚胎干细胞样细胞,发现所述胚胎干细胞样细胞在形态、基因表达谱、表观遗传学、体外和体内分化为所有三种胚层、畸胎瘤形成和嵌合小鼠形成等方面高度类似小鼠胚胎干细胞。

[0114] 氧甾醇是可用于本发明的 Shh 类似物,也称之为羟基胆固醇,是胆固醇的氧化衍生物。据报道氧甾醇在包括急性和慢性炎症、胆石病、胆管癌等胆疾病的病理生理学中起到重要作用。最近报道在脑发育过程中产生多巴胺的神经元的形成取决于氧甾醇对脑中特异受体的激活。然而 在之前的文献中并没有报道氧甾醇在通过去分化形成胚胎干细胞样细胞中的应用。

[0115] 对于用于本发明的氧甾醇并没有任何特殊限制。只要能发挥作用诱导 Shh 信号,任何羟基胆固醇均可用作在本发明中有用的 Shh 类似物。例如,可以采用市售的 25-、7 β - 和 19- 羟基胆固醇作为 Shh 类似物。

[0116] 可以通过用氧甾醇处理其培养基,来将体细胞重编程为神经干细胞样细胞。除了诱导 Bmi1 表达,氧甾醇还能减少因重编程而导入的基因数量。

[0117] 在培养基中应当含有有效量的氧甾醇。氧甾醇的有效量可根据诸如培养基种类、培养方法等已知因素而变化。在本发明的优选实施方式中,氧甾醇以 0.1 μ M 至 0.5 μ M 的量使用。

[0118] 嘌呤胺是嘌呤化合物,参与 Shh 信号传递路径。

[0119] 只要能够诱导 Shh 信号,可以在本发明中使用任何嘌呤胺衍生物,而并没有特别限制。例如,可以使用市售的 2-(1- 萘氧基)-6-(4- 吗啉代苯胺)-9- 环己基嘌呤。

[0120] 而已通过用嘌呤胺处理其培养基,来将体细胞重编程为神经干细胞样细胞。除了诱导 Bmi1 表达,嘌呤胺还能减少因重编程而导入的基因数量。

[0121] 在培养基中应当含有有效量的嘌呤胺。嘌呤胺的有效量可根据诸如培养基种类、培养方法等已知因素而变化。在本发明的优选实施方式中,嘌呤胺以 0.5 μ M 至 1 μ M 的量使用。

[0122] 根据本发明的再一个方面,本发明提供了用于将体细胞重编程以形成胚胎干细胞样细胞的方法,所述方法包括:用选自 Shh(Sonic Hedgehog)、Shh 编码核苷酸序列、氧甾醇、嘌呤胺及其组合的 Bmi1 上游调节子处理所述体细胞,和将 Oct4 基因导入所述体细胞。

[0123] 更具体而言,所述方法包括 (i) 在培养基中培养成纤维细胞;(ii) 用选自 Shh(Sonic hedgehog)、Shh 编码核苷酸序列、氧甾醇、嘌呤胺及其组合的 Bmi1 上游调节子处理所述体细胞,同时用转染有携带 Oct4 基因的载体的包装细胞来感染所述体细胞;和 (iii) 在用于培养胚胎干细胞的条件下培养所述受感染的成纤维细胞。

[0124] 在步骤 (i) 中使用的培养基是通常用于培养成纤维细胞的培养基。通常,所述培养基含有碳源、氮源和痕量元素。在本发明的优选实施方式中,成纤维细胞在补充有 10%FBS(胎牛血清)、0.1mM 非必需氨基酸、1% 青霉素 / 链霉素和 0.1mM β -巯基乙醇的 DMEM(高葡萄糖,不含有丙酮酸钠)中培养。

[0125] 在步骤 (ii) 中,优选将 Oct4 基因导入成纤维细胞,同时通过在神经干细胞的培养条件下用 Shh、氧甾醇或嘌呤胺处理将所述成纤维细胞重编程为神经干细胞。对此,将成纤维细胞用氧甾醇或嘌呤胺处理一天,此后在持续用 Shh、氧甾醇或嘌呤胺处理的同时,以 16 小时的定期间隔用 Oct4 病毒进行感染三次。在用 Shh、氧甾醇或嘌呤胺处理总时间 72 小时的同时,培养条件由适用于神经干细胞的条件变化为适用于胚胎干细胞的条件以提高重编程效率。

[0126] 在步骤 (ii) 中,通过将 Oct4 编码核苷酸序列插入到 pBabe neo 载体而构建的 pBabe neo Oct4 被转染到可产生能感染多种哺乳动物宿主细胞的高滴度病毒的 PT67 包装细胞中,从而形成随后用于感染进入成纤维细胞的病毒。Shh 和 Oct4 或编码它们的核苷酸序列可以是得自于动物例如人、马、绵羊、猪、山羊、骆驼、羚羊、狗等的野生型序列或其变体。在优选实施方式中,采用人 Oct4(NCBI 登记号 No. NM_002701 ;SEQ ID NO. :2)。

[0127] 步骤 (iii) 中可以采用任何培养基,只要该培养基常用于培养胚胎干细胞即可。在优选实施方式中,在饲养细胞存在下,受感染的成纤维细胞在补充有 15%FBS(胎牛血清)+0.1mM 非必需氨基酸+1% 青霉素 / 链霉素+0.1mM β -巯基乙醇+1000 单位 /ml 小鼠 LIF(白血病抑制因子)的高葡萄糖 DMEM 中进行培养,每两天或三天传代一次。

[0128] 根据本发明的再一个方面,提供了由本发明的方法制备的胚胎干细胞样细胞。

[0129] 发现由本发明的方法制备的胚胎干细胞样细胞对抗胚胎干细胞标记物碱性磷酸酶、SSEA-1、Oct4 和 Sox2 的抗体有阳性反应,并且以与胚胎干细胞相似的方式表达对保持胚胎干细胞的自我更新非常关键的基因 (Oct4、Sox2、Nanog、c-myc、Klf4)。此外,本发明的胚胎干细胞样细胞展现出与典型胚胎干细胞一样的全能性。

[0130] 通过以下实施例能更好地理解本发明,所述实施例为阐述而被描述,但不应解释为是对本发明的限制。

[0131] 实施例

[0132] 实施例 1 :小鼠胚胎成纤维细胞的培养以及其中 Oct4 和 Bmi1 的导入

[0133] 使用小鼠胚胎成纤维细胞来形成胚胎干细胞样细胞。于 13.5 个胚胎日由 CF1 系小鼠取得胚胎。于组织培养瓶中,细胞在补充有 10%FBS(胎牛血清)、0.1mM 非必需氨基酸、1% 青霉素 / 链霉素和 0.1mM β -巯基乙醇的 DMEM(高葡萄糖,不含丙酮酸钠)中培养,其后,第三代传代的成纤维细胞以 2×10^5 细胞 / 孔的密度接种在 6 孔板中。

[0134] 为用于基因转移,由 PT67 包装细胞系制备逆转录病毒颗粒。对此,将人 Bmi1 基因 (NCBI 登记号 No. L13689) 插入 pBabe puro 载体而构建的 pBabe puro Bmi1(来自于 Dr. G. P. Dimri, Evanston Northwestern Healthcare Research Institute, Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Evanston, IL60201, USA) 和将人 Oct4 基因 (NCBI 登记号 No. NM_002701) 插入 pBabe neo 载体而构建的 pBabe neo Oct4 载体,在 Turbofect(Fermentas) 的辅助下,转染到 PT67 包装细胞系 (Clontech),随后用嘌呤霉素 ($3 \mu\text{g/ml}$, BD bioscience) 和新霉素 ($1000 \mu\text{g/ml}$, BD biosciences) 进行药物选择。所述

PT67 包装细胞系使得可以产生能感染多种哺乳动物宿主细胞的高滴度病毒。

[0135] 各基因的表达由 RT-PCR 进行监控。当细胞生长至 80% 聚满 (confluency) 时, 取上清液, 经 0.45 μ m 过滤器 (Millipore) 过滤以除去细胞碎片, 并在聚凝胺 (6 μ g/ml, sigma) 存在下加入到细胞中。以 12 小时的定期间隔重复感染三次。

[0136] 实施例 2: 通过导入 Oct4、Sox2 和 Bmi1 基因进行重编程

[0137] 通过将两种基因 Oct4 和 Sox2(2F) 或三种基因 Oct4、Sox2 和 Bmi1(2F-Bmi1) 引入小鼠胚胎成纤维细胞而诱导重编程, 并比较结果。

[0138] 在进行实施例 1 的逆转录病毒转导之后, 在小鼠胚胎干细胞的培养条件下诱导细胞进行重编程。为此, 在饲养细胞存在下, 在补充有 15%FBS(胎牛血清)、0.1mM 非必需氨基酸、1% 青霉素 / 链霉素、0.1mM β -巯基乙醇和 1000 单位 /ml 小鼠 LIF(白血病抑制因子) 的高葡萄糖 DMEM 中分培养细胞, 每 2 至 3 天传代一次。

[0139] 图 1 显示了导入 Oct4 和 Sox2 基因, 以及导入 Oct4、Sox2 和 Bmi1 基因时的重编程效率。如图 1a 中所见, 由编码 Bmi1 基因和两种因子基因 (Oct4 和 Sox2) (2F-Bmi1) 的逆转录病毒感染的细胞远比由编码两种因子基因 (2F) 的逆转录病毒感染的细胞产生更多数量的 AP 阳性集落。观察到所建立的 iPS 细胞具有与胚胎干细胞相似的形态 (图 1b)。进行 AP 染色以检验经重编程的细胞是否表达胚胎干细胞的特征性标记物。同样, 由免疫染色测量发现 SSEA1、Oct4、Sox2 和 Nanog 的表达 (图 1c)。这些数据表明随着 Oct4、Sox2 和 Bmi1 的导入, 体细胞能进行重编程, Bmi1 在所述重编程中起到关键作用。

[0140] 实施例 3: 通过 Bmi1 基因引入将小鼠胚胎成纤维细胞重编程为神经干细胞样细胞

[0141] 当如实施例 1 对小鼠胚胎成纤维细胞进行逆转录病毒转导时, 通过蛋白印迹分析测定发现 Bmi1 靶基因 p16^{Ink4a} 和 p19^{arf} 表达水平降低, 而 Sox2 表达提高 (图 2a)。

[0142] 当在适于神经干细胞的培养基中培养 Bmi1 转导细胞时, 观察到它们聚集并改变形态为神经球形态 (图 2b)。针对神经干细胞典型标记物 Nestin 和 Sox2, 用 AP 染色和免疫化学对这些细胞进行分析。同样, 经针对分别为星形胶质细胞、神经元和少突胶质细胞典型标记物的 GFAP、Tuj1 和 O4 的免疫化学染色测定, Bmi1 转导细胞与神经干细胞相似地分化为星形胶质细胞、神经元和少突胶质细胞。因此, Bmi1 基因的导入诱导小鼠胚胎成纤维细胞经历重编程过程而成为神经干细胞样细胞。

[0143] 实施例 4: 通过导入 Oct4Bmi1 基因形成诱导 PS 细胞

[0144] 考虑到 Bmi1 转导小鼠胚胎成纤维细胞具有提高的 Sox2 表达水平, 并且重编程为神经干细胞的结果, 单独用 Oct4 和 Bmi1 基因诱导重编程过程。与单独用 Oct4 未产生集落相比, 用 Bmi1 和 Oct4 进行重编程使得出现约 50 个与胚胎干细胞形态相似的集落 (图 3a)。经 RT-PCR 和实时 PCR 测量, 发现这些建立的 iPS 细胞 (B0-iPS) 表达胚胎干细胞特异性基因 (图 3b 和 3c)。同样, 在 B0-iPS 上检测到阳性 AP 染色以及 SSEA1、Oct4 和 Sox2 免疫反应活性 (图 3d)。将由胚胎干细胞 (ES)、小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 和诱导干细胞 (B0-iPS) 得到的蛋白进行蛋白印迹分析以检测胚胎干细胞特征性标记物 Oct4 和 Sox2, 并且 FACS 分析显示了 SSEA1 和 Oct4 的表达 (图 3e 和 3f)。图 3 的数据表明, 在 B0-iPS 中没有表达外源性 Oct4 基因。DNA PCR(基因组 DNA PCR) 揭示 Oct4 基因整合到 B0-iPS 的基因组 DNA 中。

[0145] 实施例 5: B0-iPS 和 ES 中主要基因启动子的甲基化检验

[0146] 在诱导干细胞、胚胎干细胞和小鼠胚胎成纤维细胞中检验了对于胚胎干细胞的自

我更新至关重要的基因的启动子。进行亚硫酸氢盐测序以测验 Oct4 和 Nanog 启动子区域的甲基化状态。发现在小鼠胚胎成纤维细胞中它们大部分被甲基化,而在诱导干细胞中则与胚胎干细胞中相似地被去甲基化。这些结果对于同源性克隆都是正确的(图 4a)。染色质免疫沉淀分析显示 Oct4、Sox2 和 Nanog 启动子提高了 ES 和 B0-iPS 中组蛋白 H3 的乙酰化,以及 MEF 中 K9 位置处的去甲基化(图 4b)。

[0147] 实施例 6:胚胎干细胞和诱导干细胞中基因表达的 DNA 微阵列检验

[0148] 通过微阵列检验测试了胚胎干细胞、小鼠胚胎成纤维细胞和诱导干细胞中基因表达谱,并表示为散点图,显示出在对于胚胎干细胞的自我更新至关重要的基因的表达谱方面,诱导干细胞与胚胎干细胞相似,而与小鼠胚胎成纤维细胞不同。

[0149] 同源克隆也表现出诱导干细胞和胚胎干细胞之间的相似模式。0.98 的 Pearson 相关系数证实了诱导干细胞和胚胎干细胞之间的高相关性(图 5)。

[0150] 实施例 7:B0-iPS 的分化潜能和嵌合体形成

[0151] 通过胚体分析测试了 B0-iPS 细胞的体外分化潜能。RT-PCR 显示 B0-iPS 以与 ES 相似的模式表达三种胚层的基因(图 6a)。通过相应的特征性标记物染色测量,发现由 B0-iPS 细胞得到的胚体分化为对应于三种胚层的典型细胞。在本文中,用 Tuj1、bry、SMA 和 GATA4 进行免疫化学,表明 B0-iPS 细胞具有与 ES 细胞相同的体外分化潜能(图 6b)。

[0152] 为了研究 B0-iPS 细胞体内分化潜能,对其检测了畸胎瘤形成。 1×10^6 细胞于 8000rpm 离心 5 分钟,由此得到的团块在用于胚胎干细胞的增殖培养基中培养 24 小时,随后将这些细胞于肾包膜下注入 6 周龄的 Balb/c 裸鼠的脊侧。8 周至 10 周后,切除肾脏,以石蜡包埋并进行 H&E 染色。结果显示 B0-iPS 细胞分化为对应于三种胚系的细胞。将所述细胞注入 C57/BL6 的胚泡。将经注入的胚泡转移到代孕雌鼠中。嵌合小鼠于 F1 出生。通过比较代孕小鼠和 C57/BL6 小鼠证实了嵌合体形成(图 6d)。这些结果证实了 B0-iPS 具有与 ES 细胞相似的性质。

[0153] 实施例 8:B0-iPS 细胞同源群是否具有与 ES 细胞相似性质的测验

[0154] 为了研究 B0-iPS 细胞同源群是否显示出与 ES 细胞相同的性质,制造了单细胞克隆。对 5 个 B0-iPS 克隆检验分析了对于 ES 细胞至关重要的基因的表达。通过 RT-PCR 检测到二者之间相似的表达谱(图 7a)。在所述克隆中检测到阳性 AP 染色以及 SSEA1、Oct4 和 Sox2 免疫反应性(图 7b)。此外,通过 H&E 染色鉴别了克隆的畸胎瘤形成(图 7c)。

[0155] 图 8 是示意图,在证实本发明的设想的数据基础上进行设计,显示了将体细胞重编程从而产生诱导全能干细胞的新方法。新型重编程因子 Bmi1 与 Oct4 基因的组合引入使体细胞能进行重编程过程。此外,采用上游调节子替代 Bmi1 享有减少重编程因子数量的优点,并且能深入理解无需导入基因即可产生诱导全能干细胞的技术。

[0156] 实施例 9:通过 Shh 或 Shh 类似物处理进行 Bmi1 表达,以及 Oct4 基因引入

[0157] 对实施例 1 中制备的成纤维细胞测试它们在以 Shh 或其类似物,诸如氧甾醇或嘌呤咖啡胺处理时的 Bmi1 表达。图 9a、14a 和 22a 是显示已知为 Bmi1 上游调节子的 Shh(Sonic hedgehog) 或其类似物对其下游基因表达的作用的 RT-PCR 结果。在神经干细胞培养条件(DMEM/F12+B27+N2+1% 青霉素/链霉素+20ng/ml bFGF+20ng/ml EGF)下,用 500ng/ml Shh、0.1 μ M 和 0.5 μ M 羟基胆固醇(Sigma, 25-羟基胆固醇, H1015)、或 0.5 μ M 或 1 μ M 嘌呤咖啡胺(Calbiochem cat.no. 540220)处理,可导致 Gli1 和 Bmi1 的上调和 Bmi1 靶基因 p16^{Ink4a}

和 p19^{Arf} 的下调。

[0158] 同样,观察到细胞聚集并改变其形态为神经元的形态(图 9b、14b 和 22b)。经 AP 染色和针对 SSEA1、Nestin 和 Sox2 的免疫化学分析,所述诱导神经干细胞样细胞为阳性(图 9c、14c 和 22c)。因此,经 Shh 处理的细胞表现出与 Bmi1 转导细胞相似的性质。

[0159] 为了用于将 Oct4 基因导入经 Shh 或其类似物羟基胆固醇或嘌呤胺处理的成纤维细胞,由 PT67 包装细胞系制备逆转录病毒颗粒。就此而言,通过将人 Oct4 基因(NCBI 登记号 No. NM_002701)插入 pBabe neo 载体而构建的 pBabe neo Oct4 载体在 Turbofect(Fermentas) 的协助下转染到 PT67 包装细胞系(Clontech) 中,随后用新霉素(1000 μ g/ml, BD biosciences) 进行药物选择。所述 PT67 包装细胞系可以产生能感染广泛哺乳动物宿主细胞的高滴度病毒。

[0160] Oct4 的表达由 RT-PCR 进行监控。当细胞生长至 80% 聚满(confluency) 时,取上清液,经 0.45 μ m 过滤器(Millipore) 过滤以除去细胞碎片,并在聚凝胺(6 μ g/ml, sigma) 存在下加入到细胞中。以 16 小时的定期间隔重复感染三次。

[0161] 使用逆转录病毒系统,以 16 小时定期间隔,总共 48 小时的时间将 Oct4 基因三次导入成纤维细胞,同时用 Shh、羟基胆固醇或嘌呤胺处理所述细胞。该处理持续总时间为 72 小时。在处理期间,保持神经干细胞培养条件。其后,将条件改变为用于胚胎干细胞的条件以诱导重编程过程。图 9d、14d 和 22d 是显示用 Shh、羟基胆固醇或嘌呤胺处理、Oct4 基因转导和在用于胚胎干细胞的条件中培养的重编程方案的示意图。该方案基于适用于用 Oct4 和 Sox2 进行基因导入和化学处理的常规方案,但如本文所述比常规方案更先进。在所述重编程过程进行 10 天至 14 天后,出现形态与 ES 细胞相同的集落。

[0162] 实施例 10:通过 Oct4 导入并同时用 Shh 或其类似物处理而建立 iPS 细胞

[0163] 根据实施例 9 中所提出的方案,通过 Oct4 的逆转录病毒转导并同时用 Shh 或其类似物羟基胆固醇或嘌呤胺进行处理,随后在用于小鼠胚胎干细胞的条件下培养,从而建立 iPS 细胞。这些条件使得细胞在饲养细胞存在下,在补充有 15%FBS(胎牛血清)、0.1mM 非必需氨基酸、1% 青霉素/链霉素、0.1mM β -巯基乙醇和 1000 单位/ml 小鼠 LIF(白血病抑制因子)的高葡萄糖 DMEM 中培养,每 2 天至 3 天传代一次。在培养 10 天至 14 天以后,开始出现与胚胎干细胞形态相似的集落。由此建立的诱导干细胞分别命名为 SO-iPS、OO-iPS 和 PO-iPS。

[0164] 对 SO-iPS 细胞进行分析并与胚胎干细胞进行比较。对胚胎干细胞至关重要的基因的 RT-PCR 表明,SO-iPS 和 ES 细胞之间的基因表达谱存在相似性(图 10a)。通过实时 PCR 定量测量,还发现 SO-iPS 细胞具有与 ES 细胞相同的对自我更新至关重要的基因的表达方式(图 10b)。在 SO-iPS 细胞中观察到与 ES 细胞相似的形态。检测了阳性 AP 染色。经免疫化学染色测量,Oct4、SSEA1 和 Sox2 的表达模式也与 ES 细胞相似(图 10c)。蛋白印迹分析表明了与 ES 细胞中相同的 Oct4 表达(图 10d)。FACS 分析显示 Oct4 和 SSEA1 大量表达,正如它们在 ES 细胞中一样(图 10e)。

[0165] 对 OO-iPS 细胞进行分析以与胚胎干细胞进行比较。对胚胎干细胞至关重要的基因的 RT-PCR 表明,OO-iPS 和 ES 细胞之间的基因表达谱存在相似性(图 15a)。这对于诱导干细胞的同源性克隆是正确的(图 15a)。蛋白印迹分析检测到 Oct4 和 Sox2 的表达(图 15b)。同样,FACS 数据显示 SSEA1 和 Oct4 表达程度与 ES 细胞中相似(图 15c)。在 OO-iPS

细胞中观察到与 ES 细胞相似的形态。检测到阳性 AP 染色。经免疫化学染色测量, Oct4、SSEA1 和 Sox2 的表达模式也与 ES 细胞相似。这对于诱导干细胞克隆是正确的(图 15d)。

[0166] 对 P0-iPS 细胞进行分析并与胚胎干细胞进行比较。对胚胎干细胞至关重要的基因的 RT-PCR 表明, P0-iPS 和 ES 细胞之间的基因表达谱 存在相似性(图 23a)。在诱导干细胞中外源性 Oct4 基因沉默。DNAPCR(基因组 DNA PCR) 揭示 Oct4 基因整合到 P0-iPS 的基因组 DNA 中(图 23b)。通过实时 PCR 定量测量, 还发现 P0-iPS 细胞具有与 ES 细胞相同的对自我更新至关重要的基因的表达谱(图 23c)。另外, FACS 数据显示 SSEA1 和 Oct4 表达程度均与 ES 细胞中相似(图 23d)。在 P0-iPS 细胞中观察到与 ES 细胞相似的形态。检测到阳性 AP 染色。经免疫化学染色测量, Oct4、SSEA1、Sox2 和 Nanog 的表达模式也与 ES 细胞相似(图 23e)。

[0167] 实施例 11 :S0-iPS、00-iPS 和 P0-iPS 的表观遗传学测试

[0168] 与 ES 细胞进行比较,对 S0-iPS、00-iPS 和 P0-iPS 分析 Oct4 和 Nanog(已知对于 ES 细胞的自我更新至关重要)的启动子区域的甲基化状态进行分析。亚硫酸氢盐基因组测序分析显示,相对于亲代成纤维细胞系,在 iPS 细胞中 Oct4 和 Nanog 启动子区域被去甲基化(图 11a、16a 和 24a)。染色质免疫沉淀分析揭示了 Oct4、Sox2 和 Nanog 启动子提高了组蛋白 H3 的乙酰化,表明基因表达的活化(图 11b、16b 和 24b)。相反,在小鼠胚胎成纤维细胞的组蛋白 H3 的赖氨酸 9 处检测到去甲基化(图 11b、16b 和 24b)。在 ChIP 检测分析后,用 Oct4、Sox2 和 Nanog 启动子的相应引物通过实时 PCR 对数据量化。

[0169] 实施例 12 :与 ES 细胞相比的全局基因表达

[0170] 采用 DNA 微阵列检验,分析 S0-iPS、00-iPS 和 P0-iPS 细胞的全局基因表达,并与 ES 细胞作比较。全局基因表达的散点图显示大多数基因的表达在 2 倍变化范围之内,已知对于 ES 细胞至关重要的 Oct4、Sox2、Nanog、c-myc、Klf4 在诱导干细胞和 ES 细胞之间以相似模式进行表达(图 12、17 和 25)。

[0171] 0.98 的 Pearson 相关系数证实了 S0-iPS 细胞和 ES 细胞之间的高相关性(图 12)。

[0172] 对于 00-iPS 的克隆观察到与上述相同的结果。0.98 的 Pearson 相关系数指明 00-iPS 细胞和 ES 细胞之间的高相关性。0.95 的系数也证实了克隆之一也与 ES 细胞高度相关(图 17)。

[0173] 用不同浓度的嘌呤胺处理的 00-iPS 细胞中观察到与上述相同的结果。不同 00-iPS 细胞和 ES 细胞之间的 Pearson 相关系数经计算为 0.97 和 0.95,指明相互之间的高相关性(图 25)。

[0174] 实施例 13 :体外和体内分化为三种胚系层的检验

[0175] 为了研究 S0-iPS 细胞的体外分化潜能,首先,对它们进行胚体(EB)形成测试(图 13a、18a 和 26a)。在 EB 形成后的第 7 天,经 RT-PCR 测量,发现胚体按照与 ES 细胞相同的模式表达三种胚层的特征性基因(图 13a 和 26a,右图)。将胚体重新铺板到 0.1% 明胶涂覆板上。通过用指示的抗体对代表性世系特异性标记物的免疫染色测试自发分化。免疫化学染色检验检测到 S0-iPS 细胞中 Tuj1、bry、SMA 和 CK18 的表达,00-iPS 细胞中 Nestin、SMA 和 CK18 的表达,P0-iPS 中 Tju1 和 SMA 的表达,表明体外分化为三种胚细胞(图 13b、18a 和 26a)。

[0176] 为了研究 iPS 细胞体内分化潜能,对其检测了畸胎瘤形成。 1×10^6 细胞于 8000rpm

离心 5 分钟,由此得到的团块在用于胚胎干细胞的增殖培养基中于 37℃ 培养 24 小时,随后于肾包膜下将这些细胞注入 6 周龄的 Balb/c 裸鼠的脊侧。8 周至 10 周后,切除肾脏,以石蜡包埋并进行 H&E 染色。结果显示 iPS 细胞分化为对应于三种胚系的细胞,证实了其畸胎瘤的形成(图 13c、18b 和 26c)。对于 P0-iPS 细胞,将它们注入 C57/BL6 的胚泡。将经注入的胚泡转移到代孕雌鼠中。嵌合小鼠于 F1 出生。通过比较代孕小鼠和 C57/BL6 小鼠证实了嵌合体形成(图 26d)。这些结果证实了 B0-iPS 细胞具有与 ES 细胞相似的性质。

[0177] 实施例 14 :通过 Oct14 导入并同时用氧甾醇处理由成体小鼠胚胎成纤维细胞建立 iPS 细胞 (00-iPS-TTF#1, 2)

[0178] 用小鼠胚胎成纤维细胞建立的重编程方法应用于成体小鼠胚胎成纤维细胞。所述重编程方法也能得到胚胎干细胞样细胞(图 19a),命名为 00-iPS-TTF#1 和 2,其分别为用 0.1 μ M 和 0.5 μ M 不同氧甾醇浓度处理而得到。00-iPS-TTF#1 和 2 用 AP 染色为阳性,并通过免疫化学染色检验测量发现其表达 SSEA1、Oct4、Sox2 和 Nanog(图 19a)。另外,定量实时 PCR 显示这些细胞的对自我更新至关重要的基因的表达谱与 ES 细胞相同(图 19b)。

[0179] 实施例 15 :00-iPS-TTF#1 和 2 的表观遗传学研究

[0180] 出于与 ES 细胞进行比较的目的,对 00-iPS-TTF#1 和 2 分析 Oct4 和 Nanog(已知对于 ES 细胞的自我更新至关重要)的启动子区域的甲基化状态进行分析。亚硫酸氢盐基因组测序分析显示,相对于亲代成纤维细胞系,在 iPS 细胞中 Oct4 和 Nanog 启动子区域被去甲基化(图 20a)。染色质免疫沉淀分析揭示了 Oct4、Sox2 和 Nanog 启动子提高了组蛋白 H3 的乙酰化,表明基因表达的活化(图 20b)。

[0181] 实施例 16 :00-iPS-TTF#1 和 2 体外和体内分化为三种胚系层的检验

[0182] 为了研究 00-iPS-TTF#1 和 2 的体外分化潜能,首先,测试它们的胚体(EB)形成。将胚体重新谱板到 0.1% 明胶涂覆板上。通过用指示的抗体对代表性世系特异性标记物的免疫染色测试自发分化。免疫化学染色检验检测到 Nestin、SMA 和 GATA4 的表达,表明 00-iPS-TTF#1 和 2 能体外形成胚体并体外分化为三种胚细胞(图 21a)。为了研究 00-iPS-TTF#1 和 2 的体内分化潜能,重复与 00-iPS 细胞的实验中使用的相同步骤。8 周至 10 周后,切除肾脏,用石蜡包埋并进行 H&E 染色。结果显示 00-iPS-TTF#1 和 2 细胞分化为对应于三种胚层的细胞,证实了其畸胎瘤的形成(图 21b)。

[0183] 至此所述,Oct4 基因与 Bmi1 基因组合导入,或者 Oct4 基因伴随 Shh 或 Shh 类似物诸如氧甾醇或嘌呤胺进行处理而导入,并随后在用于胚胎干细胞的条件下培养,将诱导体细胞进行去分化成为全能干细胞。

[0184] 在合适的条件下,根据本发明制备的诱导胚胎干细胞样细胞能例如分化为心肌细胞、产生胰岛素的细胞或神经元,它们因此可用于各种疾病的细胞疗法,包括心功能障碍、胰岛素依赖性糖尿病、帕金森综合征、脊椎损伤等。因此,对于伴随人类胚胎发生的那些问题,即人类胚胎死亡和免疫排斥,诱导胚胎干细胞样细胞是有前景的解决方案。此外,由 iPS 细胞分化的各种细胞(例如,心肌细胞、肝细胞等)可用作评估化学品、药物、毒素等的医疗效果或毒性的系统。

[0185] 此外,作为 Bmi1 上游调节子的 Shh 蛋白或者 Shh 类似物诸如氧甾醇或嘌呤胺能替代 Bmi1 用于将体细胞重编程以产生 iPS 细胞,从而可以单独用 Oct4 基因进行转染,这可减少通常所需要的遗传因子的数目。而且,本发明提供了这样的技术:以该技术为基础,能

提供无需导入基因即可形成 iPS 细胞的方法。

[0186] 尽管出于说明性目的而披露了本发明的优选实施方式,本领域技术人员将能理解可以进行各种修改、添加和替代,而不会背离在所附权利要求书中所公开的本发明的范围和精神。

[0001]

FAI10KR3034C 序列表

<110> 高丽大学校产学协力团
 <120> 使体细胞重编程以形成诱导全能干细胞的组合物，和用其形成诱导全能干细胞的方法
 <130> P21-100727-Bmi1
 <150> KR-10-2009-0134966
 <151> 2009-12-30
 <150> KR 10-2009-0134974
 <151> 2009-12-30
 <150> KR 10-2009-0134976
 <151> 2009-12-30
 <150> KR 10-2009-0134986
 <151> 2009-12-30
 <160> 2
 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 3203
 <212> DNA
 <213> 智人
 <400> 1
 gagaggcaga gatcggggcg agacaatggg gatgtgggcg cgggagcccc gttccggctt 60
 agcagcacct cccagccccg cagaataaaa ccgatcgcgc cccctccgcg cgcgccctcc 120
 cccgagtgcg gagcggggagg aggcggcgcc ggccgaggag gaggaggagg agggccccgga 180
 ggaggaggcg ttggaggtcg aggcggaggc ggaggaggag gaggccgagg cgccggaggga 240
 ggccgaggcg ccggagcagg aggaggcccg ccggaggcgg catgagacga gcgtggcgcc 300
 cgcggctgct cggggccgcg ctggttgccc attgacagcg gcgtctgcag ctgccttcaa 360
 gatggccgct tggctcgcat tcattttctg ctgaacgact tttaactttc attgtctttt 420
 ccgcccgctt cgatcgctc gcgcggctg ctctttccgg gattttttat caagcagaaa 480
 tgcacogaac aacgagaatc aagatcactg agctaaatcc ccacctgatg tgtgtgcitt 540
 gtggagggta ctcatgatg gccacaacca taatagaatg tctacattcc ttctgtaaaa 600
 ctgtattgtg tcgttacctg gagaccagca agtattgtcc tatttgtgat gtccaagttc 660
 acaagaccag accactactg aatataaggt cagataaaac tctccaagat attgtataca 720
 aattagtgtc agggcttttc aaaaatgaaa tgaagagaag aagggttttt tatgcagctc 780
 atccttctgc tgatgtctgc aatggctcta atgaagatag aggagagggt gcagatgaag 840
 ataagagaat tataactgat gatgagataa taagcttata cattgaattc ttgaccaga 900
 acagattgga tcggaaagta aacaaagaca aagagaaatc taaggaggag gtgaatgata 960
 aaagatactt acgatgcccc gcagcaatga ctgigatgca ctaagaaaag tttctcagaa 1020
 gtaaaatgga catacctaata actttccaga ttgatgtcat gtatgaggag gaacctttaa 1080
 aggattatta tacactaatg gatattgcct acatttatac ctggagaagg aatgggccac 1140
 ttccattgaa atacagagtt cgacctactt gtaaaagaat gaagatcagt caccagagag 1200
 atggactgac aaatgttgga gaactggaaa gtgactctgg gagtgacaag gccaacagcc 1260
 cagcaggagg agtccctcc acctcttctt gttgcctag cccagctact ccagtgcagt 1320
 ctctcatccc acagtttctt cacatttcca gtactatgaa tggaaccagc aacagcccca 1380
 gcggtaacca ccaatcttct ttgccaata gacctcgaaa atcatcagta aatgggtcat 1440

[0002]

FAI10KR3034C 序列表

cagcaacttc ttctggttga tacctgagac tgtaaaggaa aaaaatttta aacccctgat	1500
ttatatagat atcttcagcc attacgactt tctagagcta atacatgtga ctatcgtcca	1560
atttgctttc tttttagtg acattaaatt tggctataaa agatggacta catgtgatac	1620
tcctgtccgt cttaggttcaa aagaaagatt gttgttataa agaattggtt tcttggaag	1680
caggcaagac tttttctctg tgtaggaaa gatgggaaat ggttctgta accattgttt	1740
ggatttggaa gtactctgca gtggacataa gcattgggcc atagttgtt aatctcaact	1800
aacgcctaca ttacattctc ctgatcgtt ctgttatta cgctgttttg tgaacctgta	1860
gaaaaacaag tgctttttat ctgaaattc aaccaacgga aagaatatgc atagaataat	1920
gcattctatg atgccatgtc actgtgaata acgatttctt gcagctatit agccattttg	1980
attgctgttt gatttatact tctctgttgc tacgcaaaac cgatcaaaga aaagtgaact	2040
tcagttttac aatctgtatg cctaaaagcg ggtactaccg tttattttac tgacttgttt	2100
aaatgattcg cttttgtaag aatcagatgg cattatgctt gttgtacaat gccatattgg	2160
tatatgacat aacaggaaac agtattgtat gatatactta taaatgctat aaagaaatat	2220
tgtgtttcat gcattcagaa atgattgtta aaattctccc aactgggtcg acctttgcag	2280
atacccataa cctatgttga gccttgctta ccagcaaaga atatttttaa tgtggatatac	2340
taattctaaa gtctgttcca ttagaagcaa ttggcacatc tttctatact ttatatactt	2400
ttctccagta atacatgttt actttaaaaa ttgttgcagt gaagaaaaac ctttaactga	2460
gaaatatgga aaccgtctta attttccatt ggctatgatg gaattaatat tgtattttaa	2520
aaatgcataat tgatcactat aattctaaaa caatttttta aataaaccag caggttgcta	2580
aaagaaggca tttatctaa agttatttta ataggtggta tagcagtaat tttaaattta	2640
agagtgtctt ttacagttaa caatggaata tgccctctct gctatgtctg aaaatagaag	2700
ctatttatta tgagcttcta caggtatttt taaatagagc aagcatgttg aatttaaaat	2760
atgaataacc ccaccaaca attttcagtt tattttttgc tttggtcgaa ctigtgtgt	2820
gttcatcagt tatttgtgag ggtgtttatt ctatatgaat attgtttcat gttttaggg	2880
aaattgtagc taaacatttc attgtcccca gtctgcaaaa gaagcacaat tctattgctt	2940
tgtcttgctt atagtcatta aatcattact tttacatata ttgctgttac ttctgcttct	3000
tttaaaaata tagtaaagga tgtttatga agtcacaaga tacatatatt tttattttga	3060
cctaaatttg tacagtccca ttgtaagtgt tgtttctaant tatagatgta aaatgaaatt	3120
tcatttgtaa ttggaaaaaa tccaataaaa aggatattca tttagaaaat agctaagatc	3180
tttaataaaa atttgatatg aaa	3203

<210> 2
 <211> 1411
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 2	
ccctcgcaag ccttcatttc accaggeccc cgcttgggg cgcttccct ccccatggcg	60
ggacacctgg ctctggattt cgccttctcg cccctccag gtggtggagg tgatgggcca	120
ggggggccgg agccgggctg ggttgatcct eggacctggc taagcttcca aggcctcct	180
ggagggccag gaatcgggcc gggggttggg ccaggctctg aggtgtgggg gattccccc	240

[0003]

FAI10KR3034C 序列表

tgccccccgc cgtatgagtt ctgtgggggg atggcgctact gtgggccccca ggttggagtg	300
gggctagtgc cccaaggcgg cttggagacc tctcagcctg agggcgaagc aggagtcggg	360
gtggagagca actccgatgg ggcctccccg gagccctgca ccgtcacccc tggtgccgtg	420
aagctggaga aggagaagct ggagcaaaac ccggaggagt ccagggacat caaagctctg	480
cagaaagaac tcgagcaatt tgccaagctc ctgaagcaga agaggatcac cctgggatat	540
acacaggccg atgtggggct caccctgggg gtctctattg ggaaggtatt cagccaaacg	600
accatctgcc gctttgaggc tctgcagctt agcttcaaga acatgtgtaa gctgcggccc	660
ttgtctcaga agtgggtgga ggaagctgac aacaatgaaa atcttcagga gatatgcaaa	720
gcagaaaccc tcgtgcaggc ccgaaagaga aagcgaacca gtatcgagaa ccgagtgaga	780
ggcaaccttg agaatttggt cctgcagtgc ccgaaaccca cactgcagca gatcagccac	840
atcgcgccagc agcttgggct cgagaaggat gtgggccgag tgtggttctg taaccggcgc	900
cagaagggca agcgatcaag cagcgactat gcacaacgag aggattttga ggctgctggg	960
tctcctttct cagggggacc agtgtccttt cctctggccc cagggcccca ttttggtagc	1020
ccaggctatg ggagccctca cttcactgca ctgtactcct cggtcccttt ccctgagggg	1080
gaagcccttc cccctgtctc cgtcaccact ctgggctctc ccatgcattc aaactgaggt	1140
gcctgccctt ctaggaatgg gggacagggg gaggggagga gctagggaaa gaaaacctgg	1200
agtttgtgcc agggtttttg ggattaagtt cttcattcac taaggaagga attgggaaca	1260
caaagggtgg gggcagggga gtttggggca actggttgga gggaaggatga agttcaatga	1320
tgctcttgat tttaatccca catcatgtat cacttttttc ttaaataaag aagcctggga	1380
cacagtagat agacacactt aaaaaaaaaa a	1411

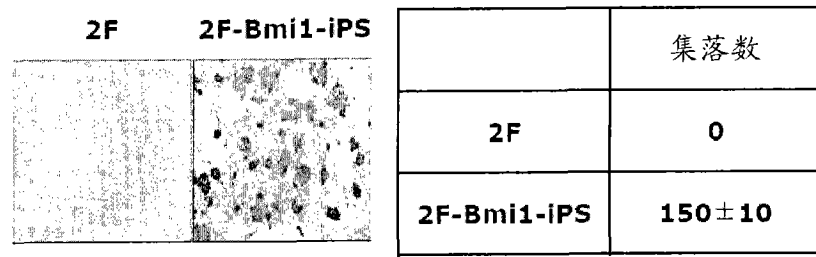


图 1a

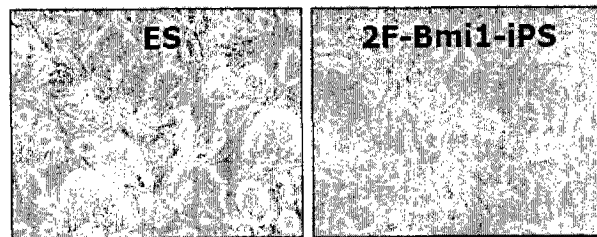


图 1b

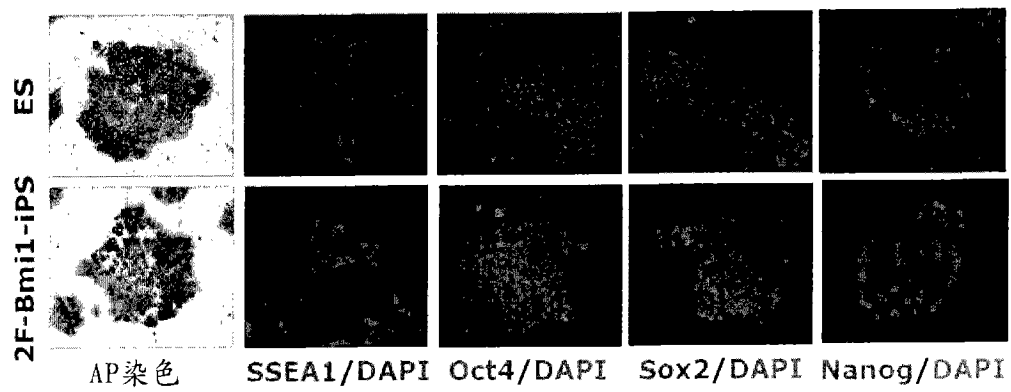


图 1c

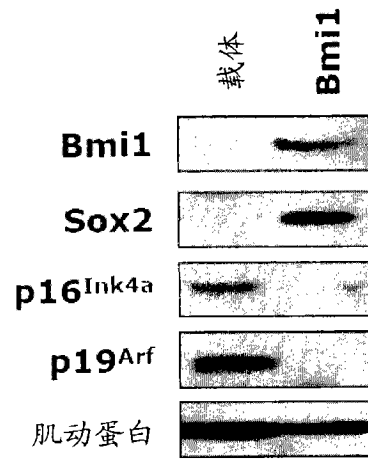


图 2a

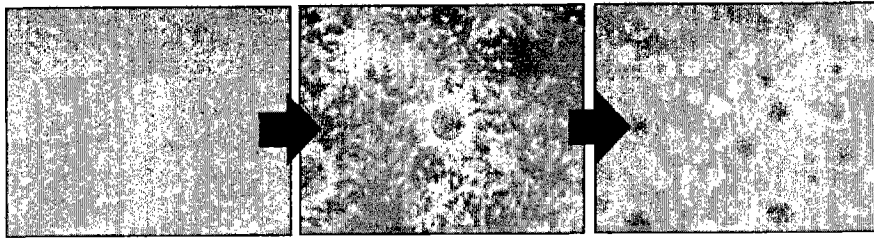


图 2b

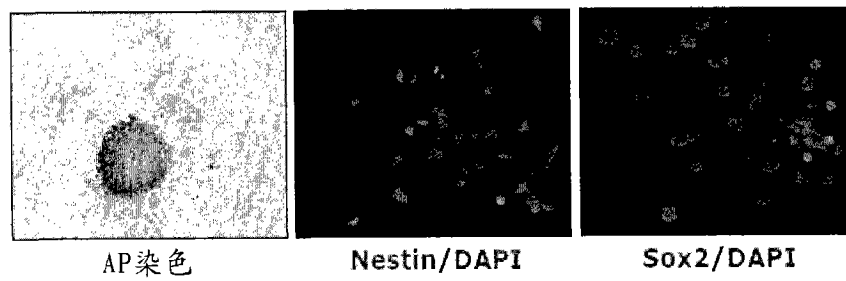


图 2c

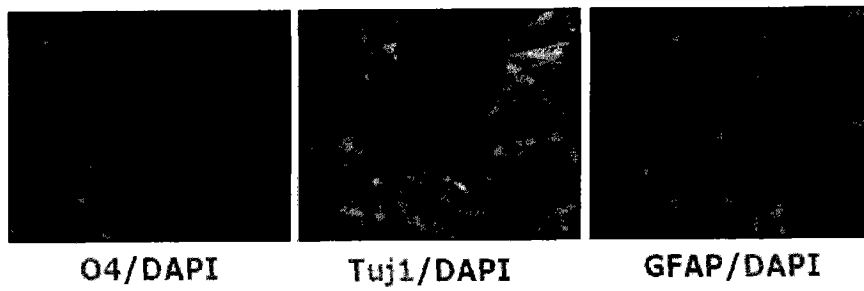
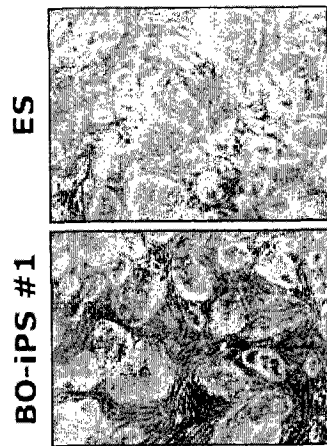


图 2d



	集落数
Oct4	0
Bmi1和Oct4 (BO)	50±2

图 3a

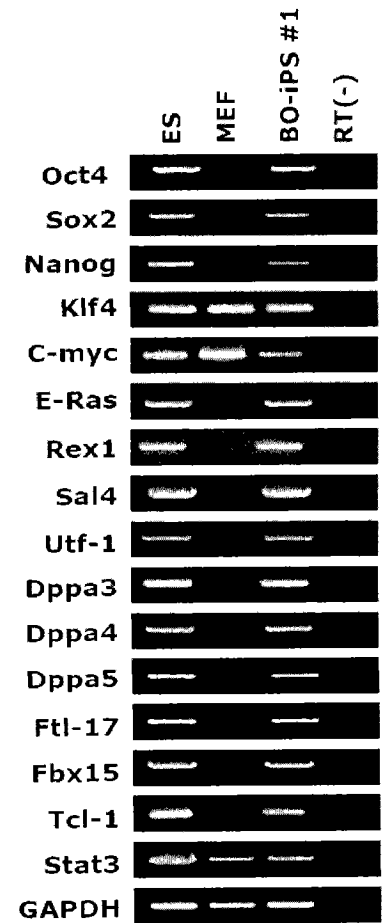


图 3b

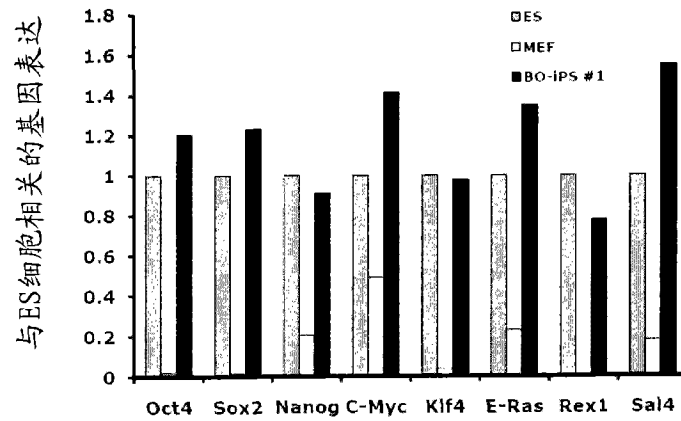


图 3c

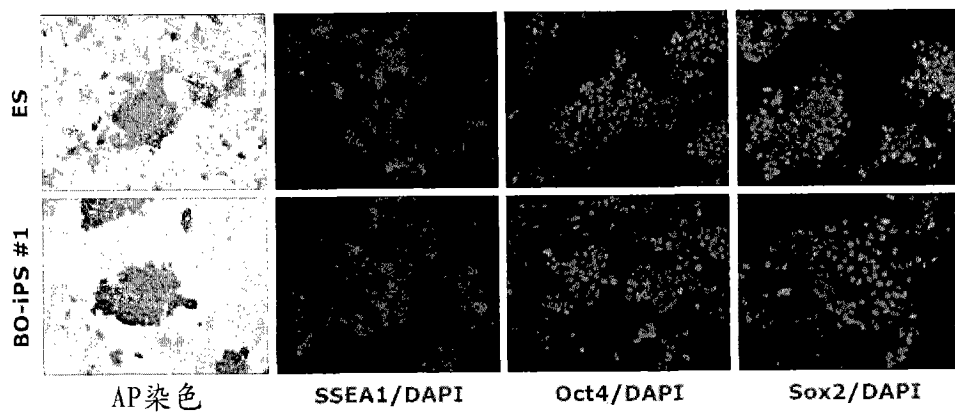


图 3d

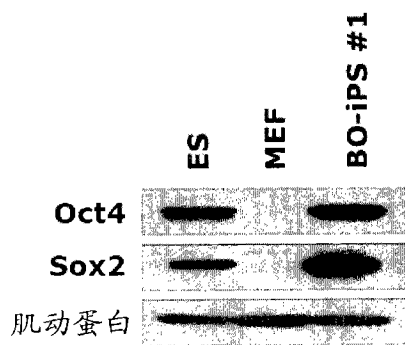


图 3e

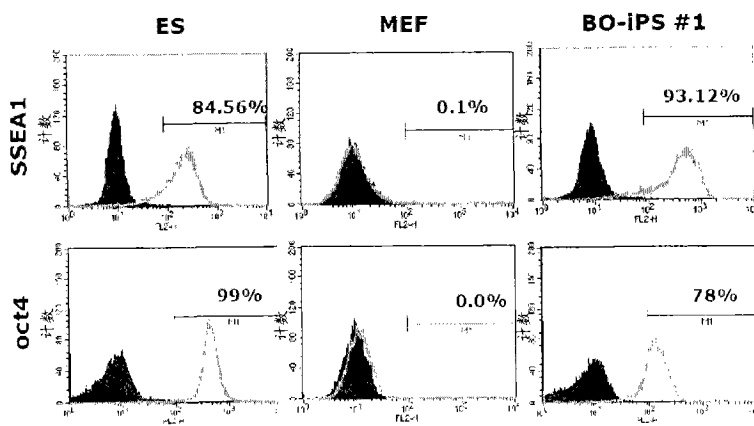


图 3f

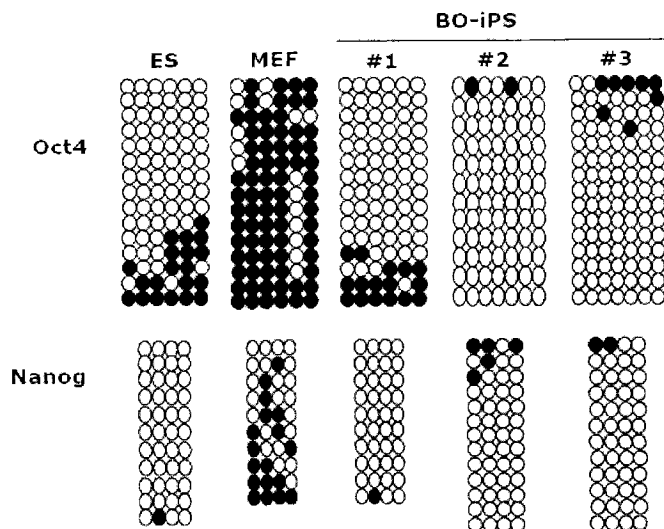


图 4a

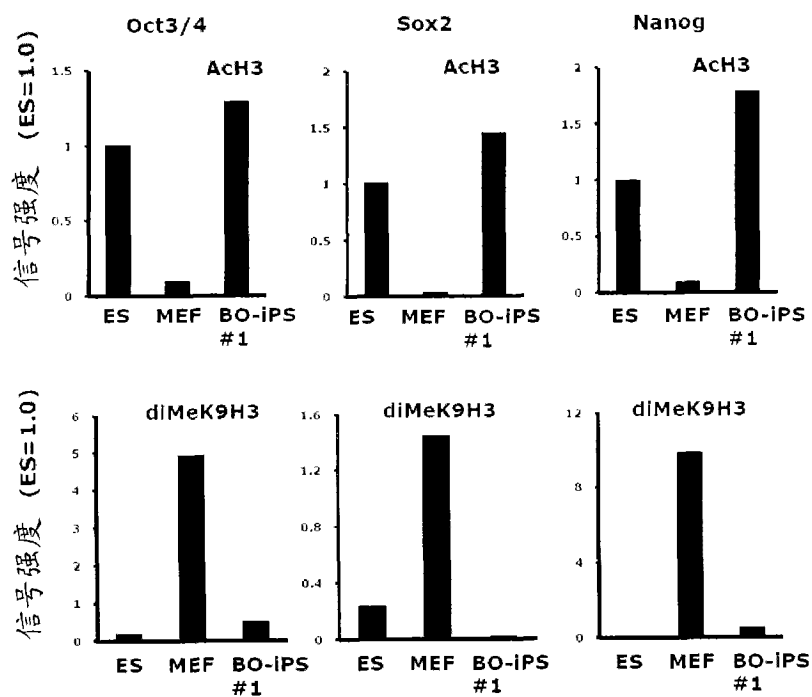


图 4b

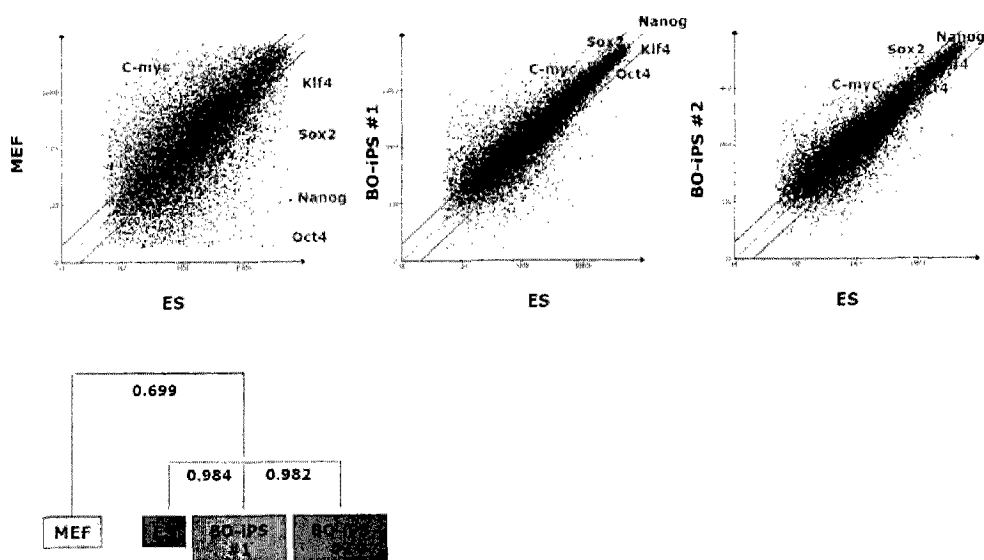


图 5

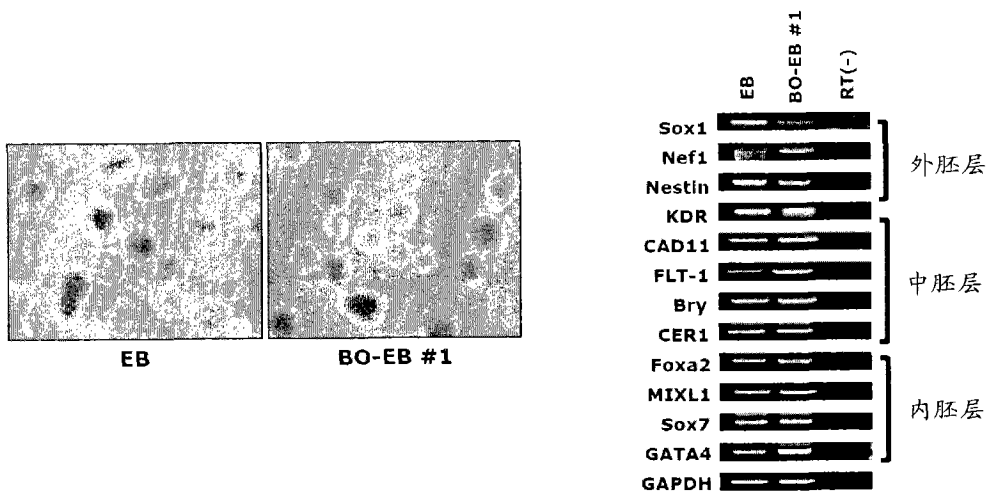


图 6a

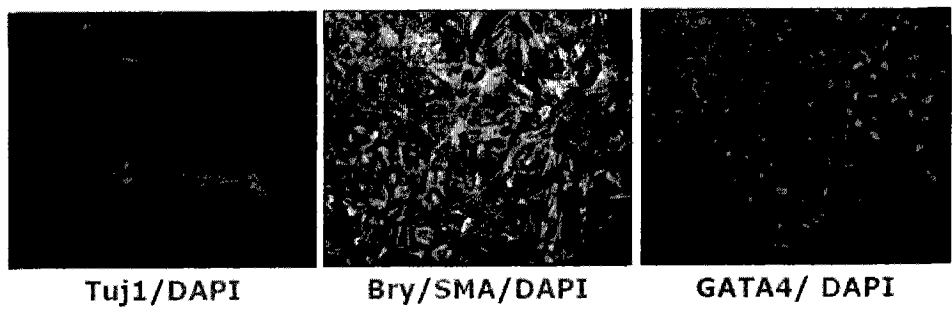


图 6b

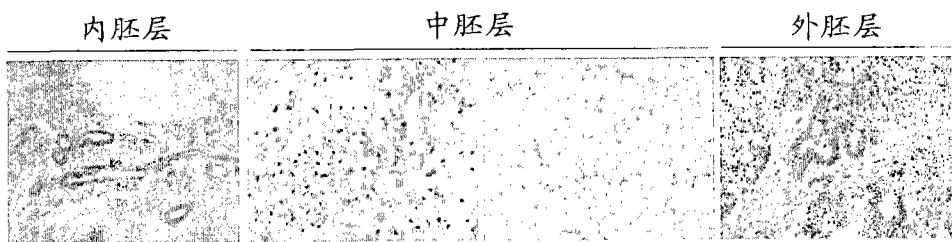


图 6c

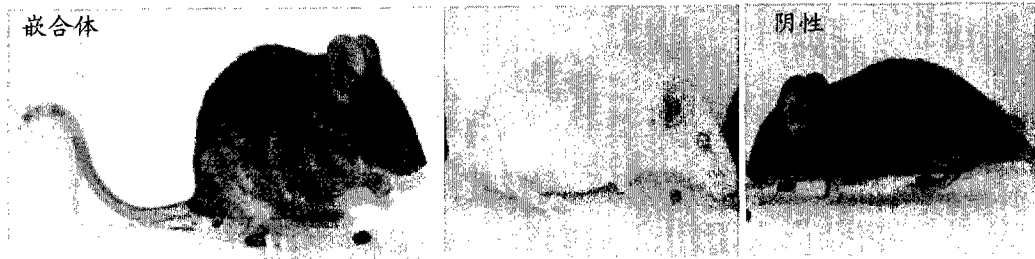


图 6d

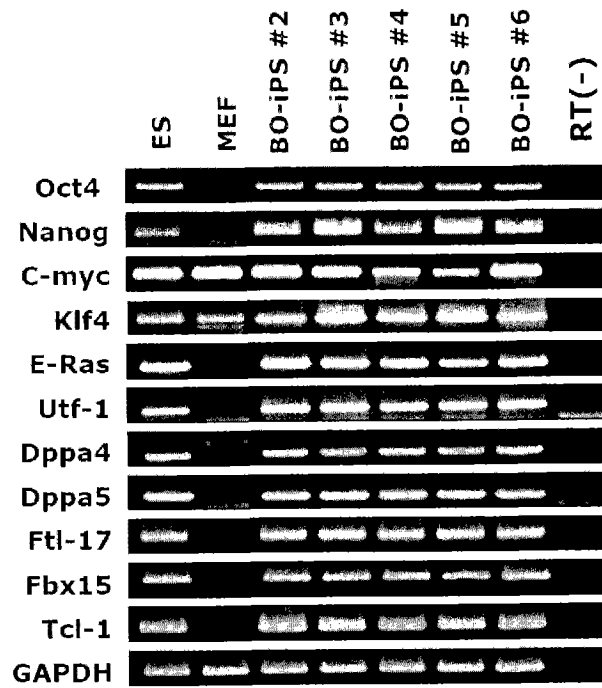


图 7a

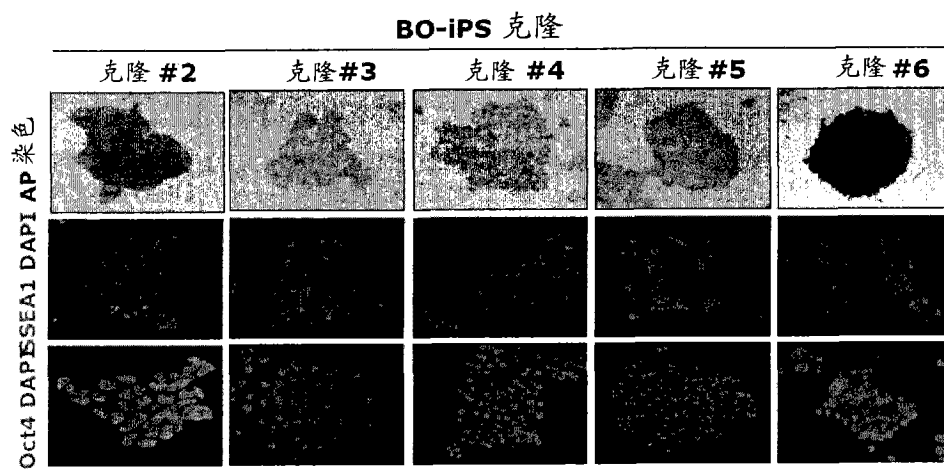


图 7b

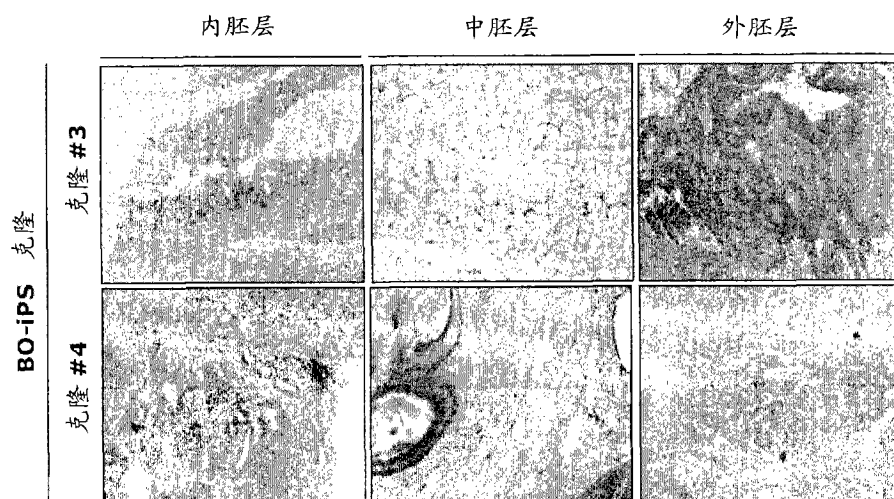


图 7c

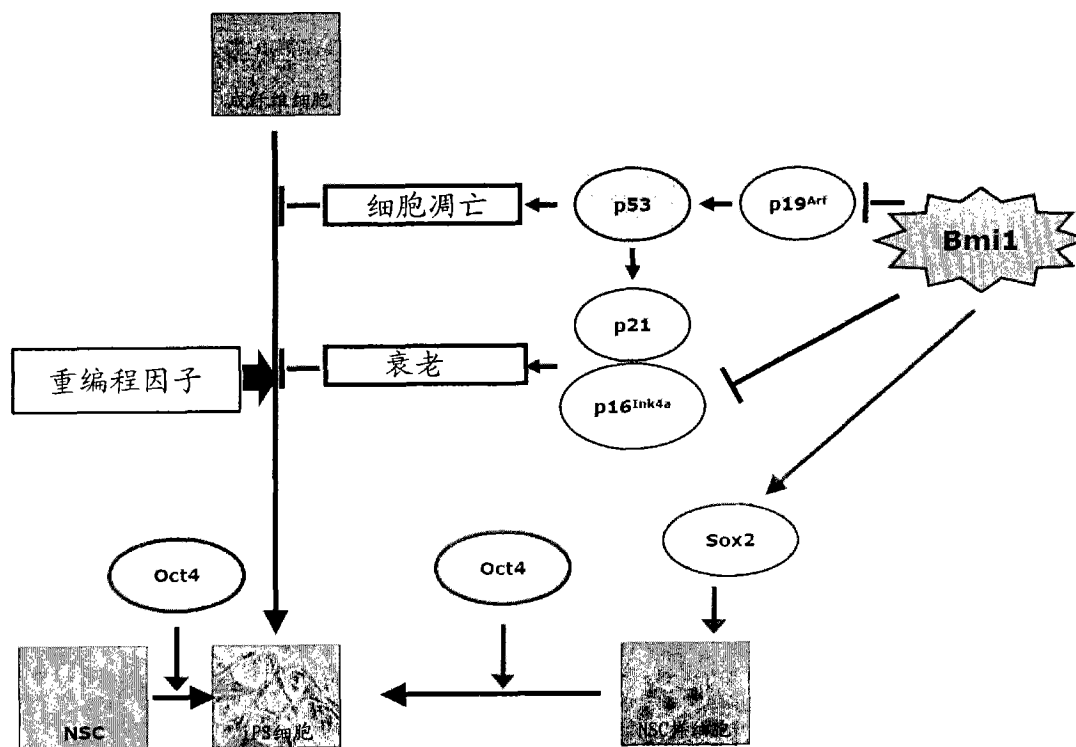


图 8



图 9a

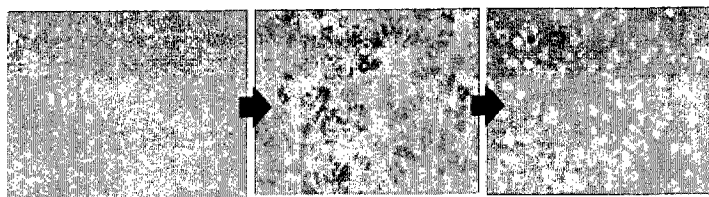


图 9b

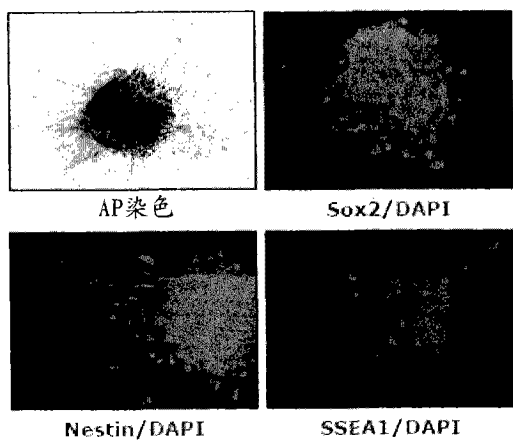


图 9c

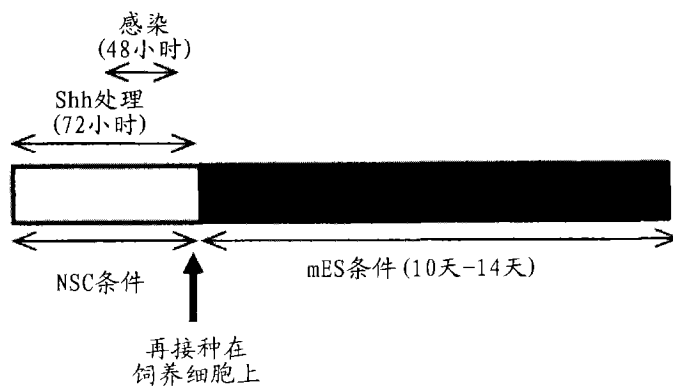


图 9d

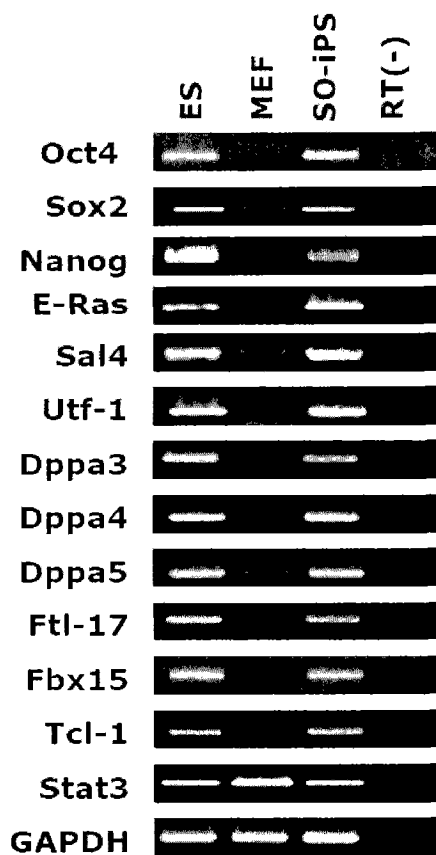


图 10a

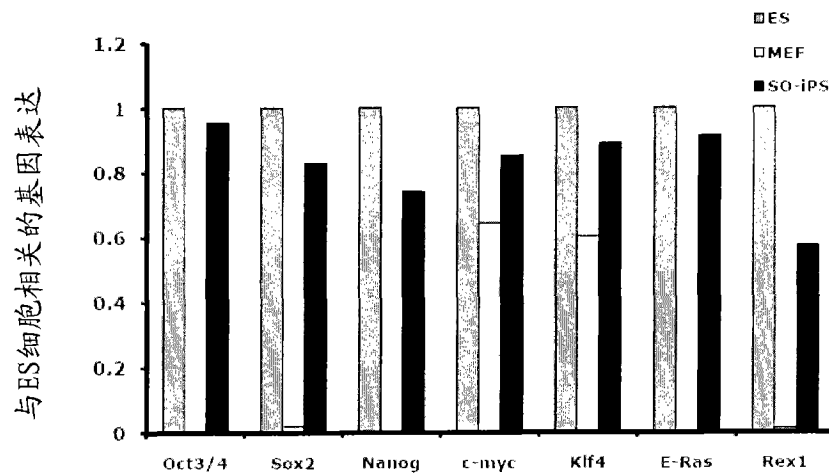


图 10b

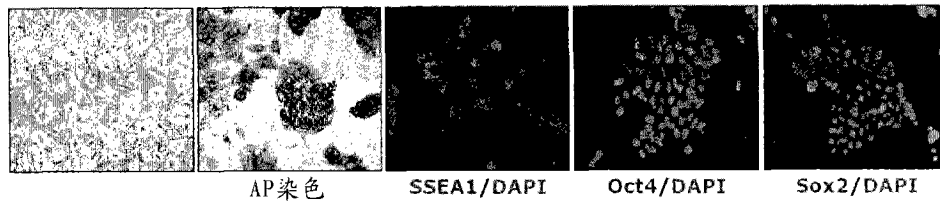


图 10c

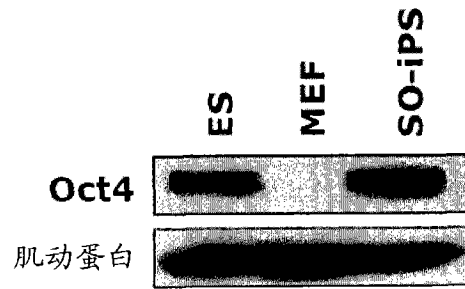


图 10d

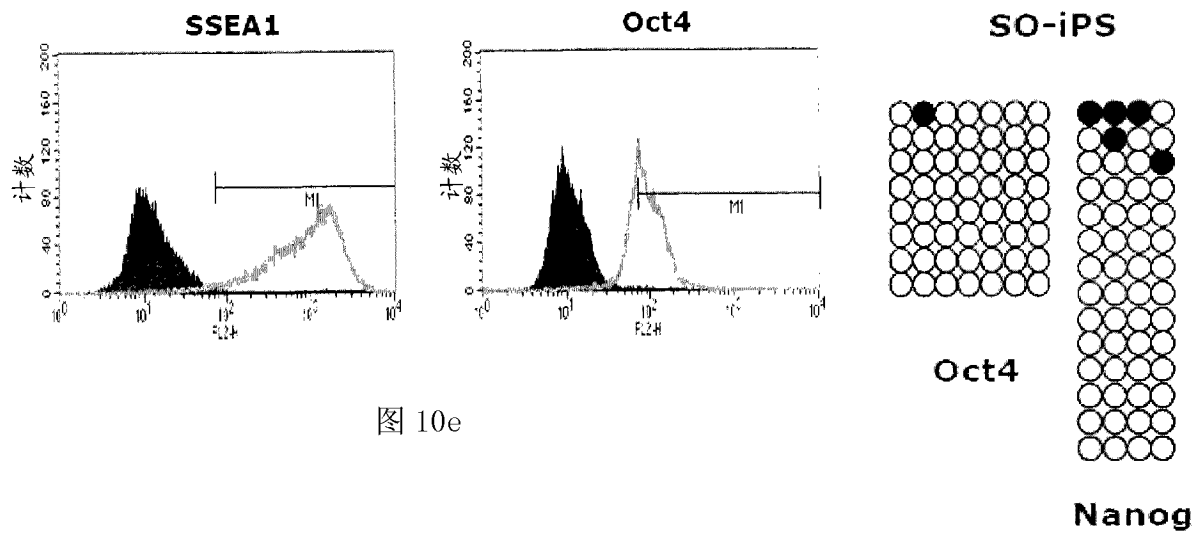


图 10e

图 11a

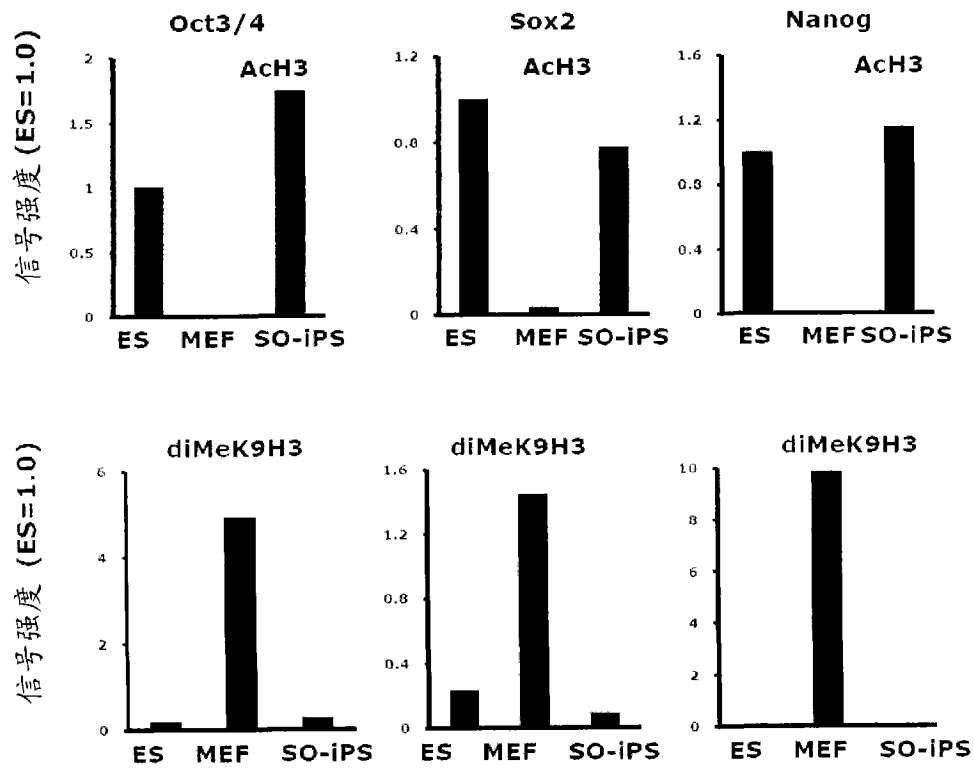


图 11b

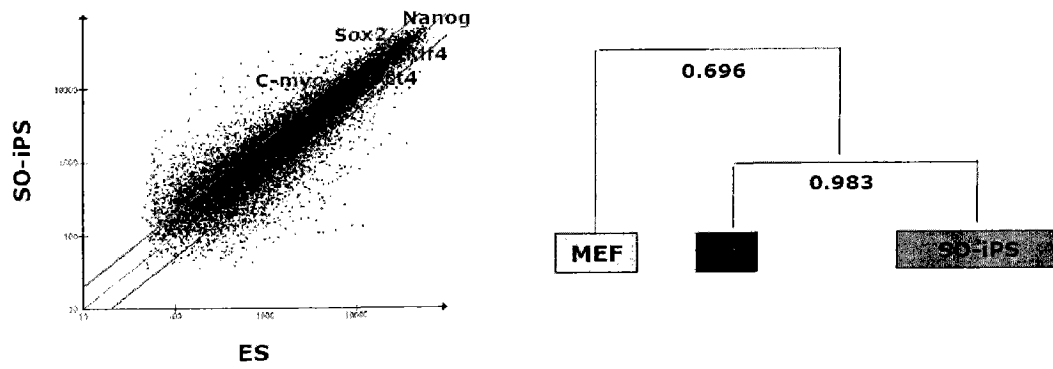


图 12

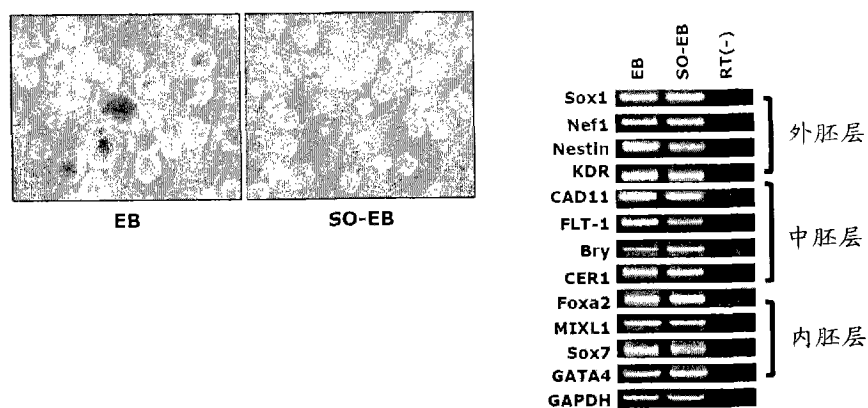


图 13a

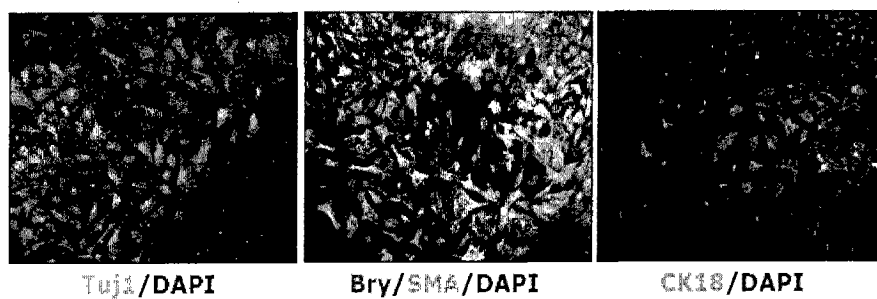


图 13b

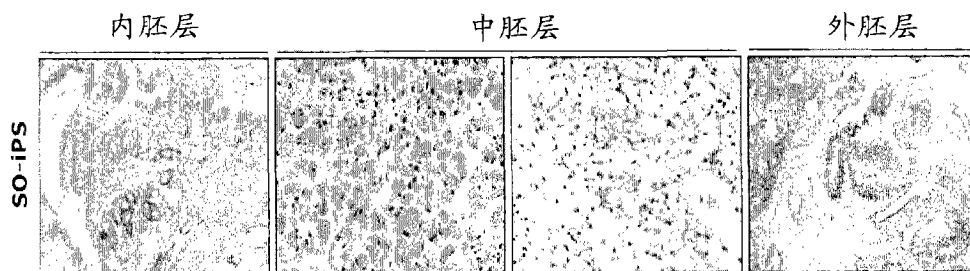


图 13c

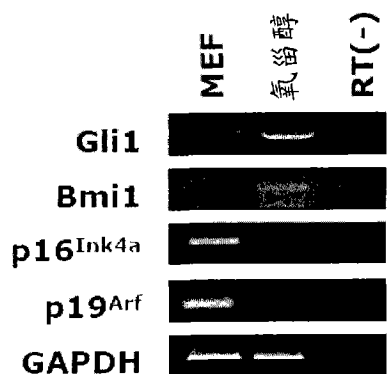


图 14a

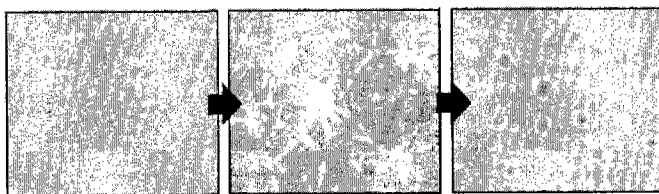


图 14b

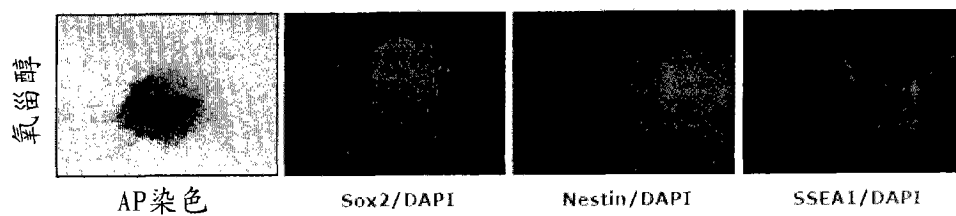


图 14c

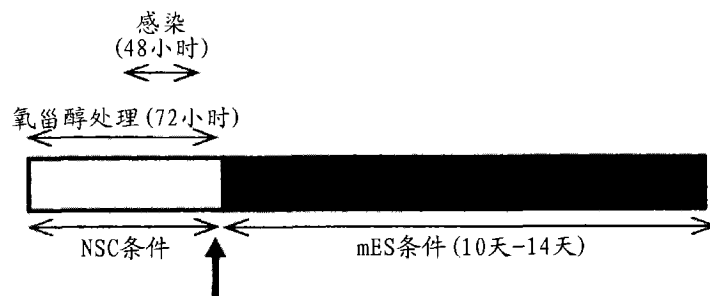


图 14d

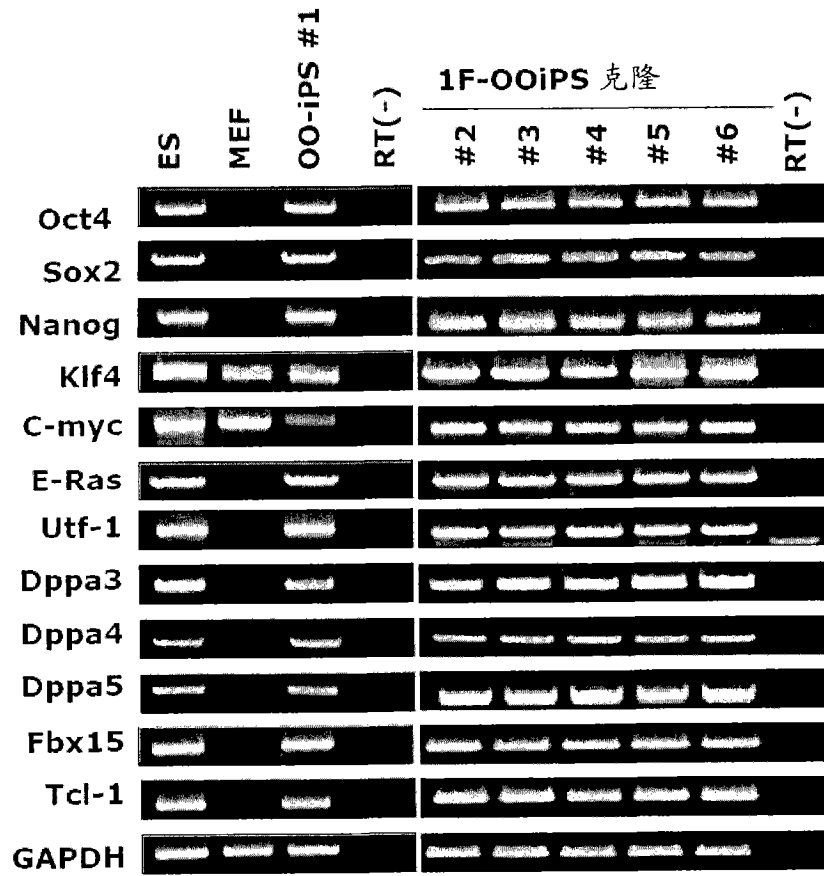


图 15a

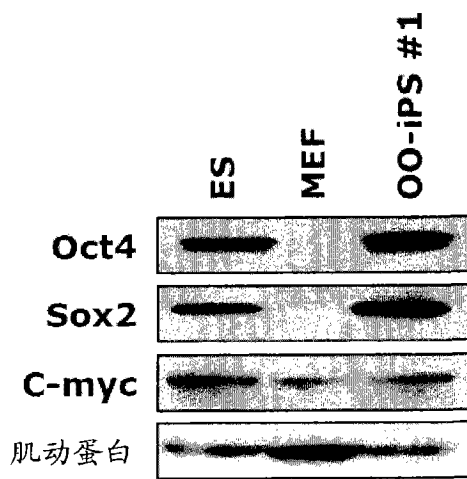


图 15b

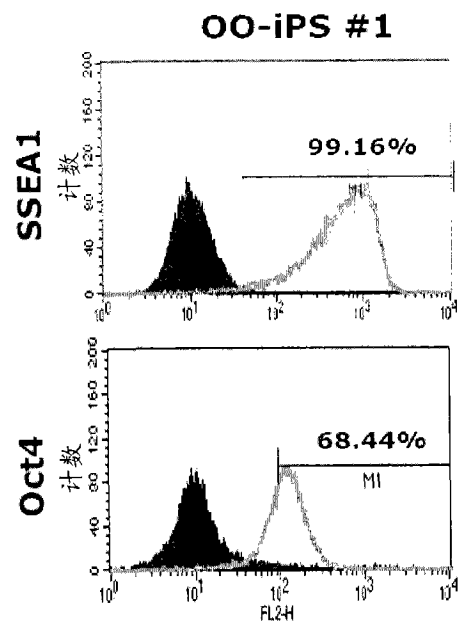


图 15c

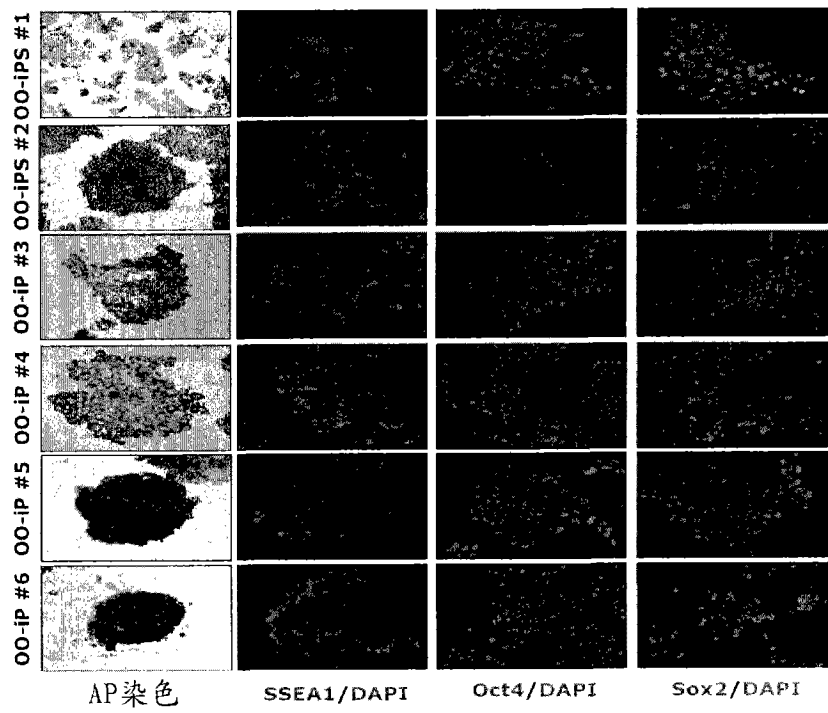


图 15d

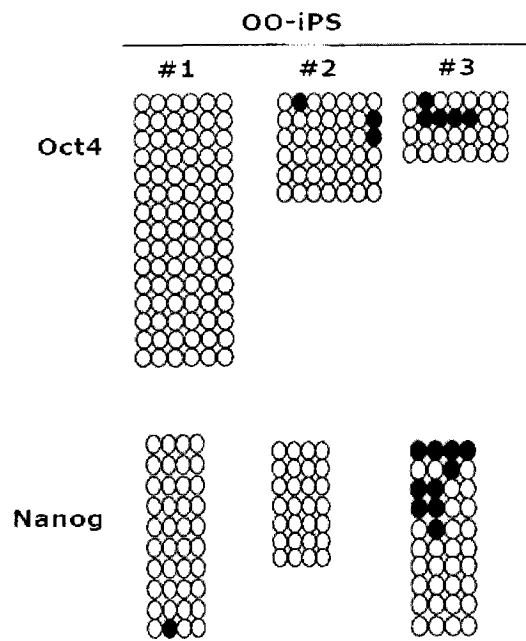


图 16a

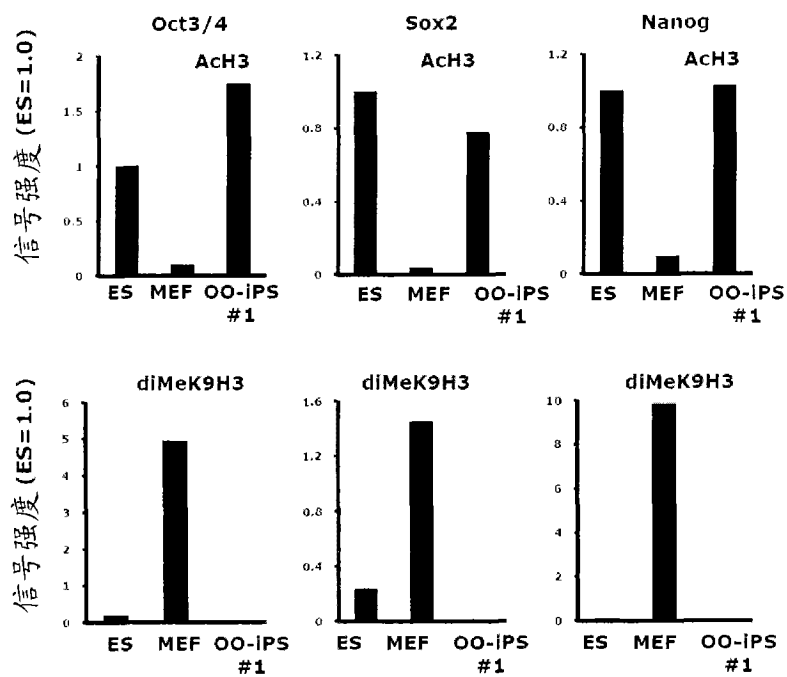


图 16b

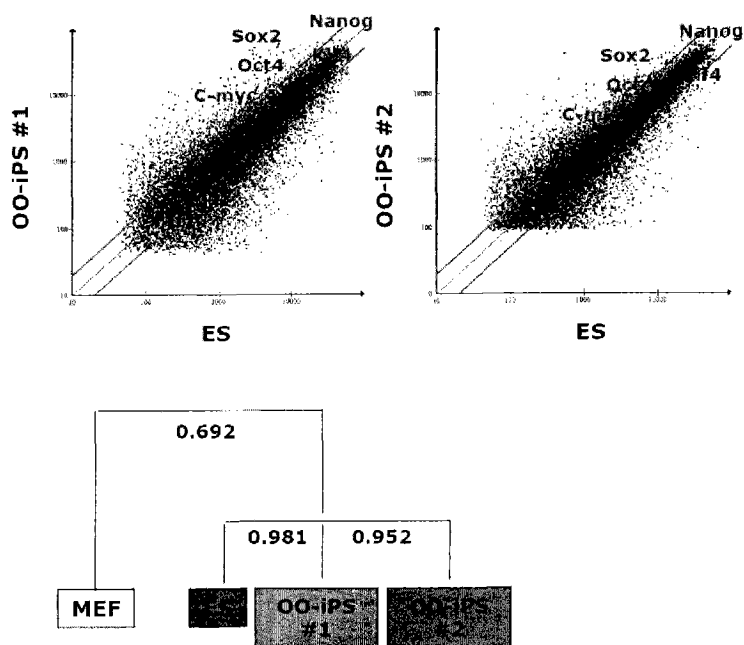


图 17



图 18a

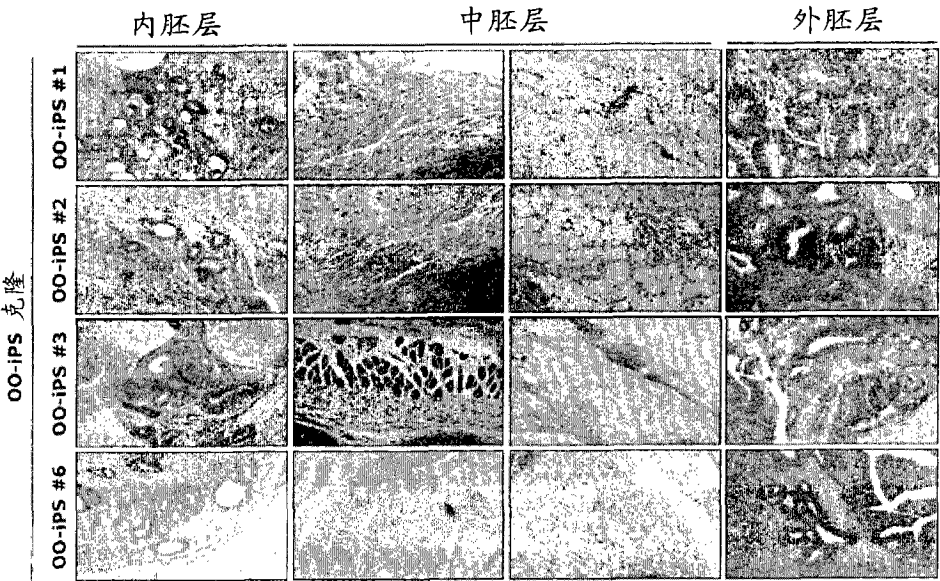


图 18b

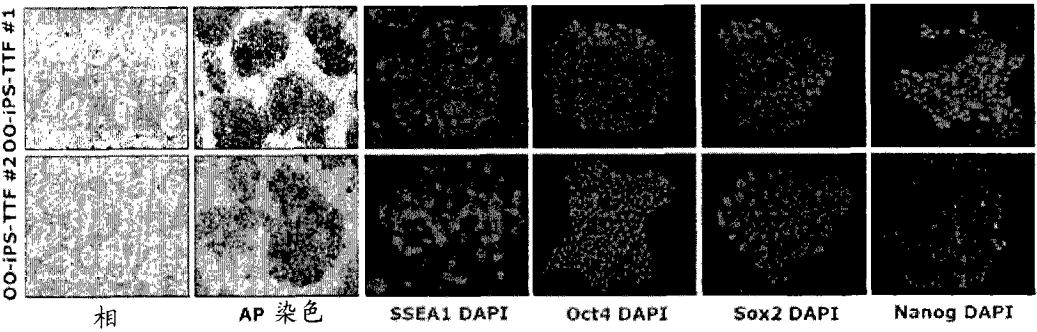


图 19a

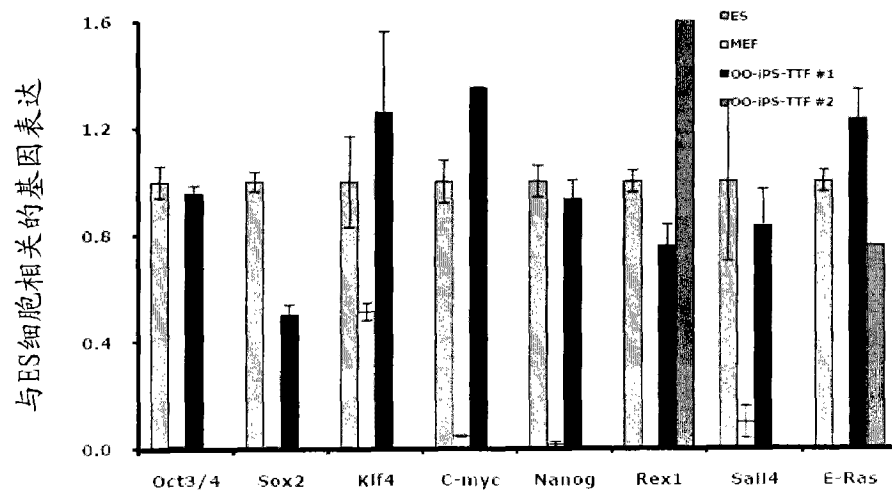


图 19b

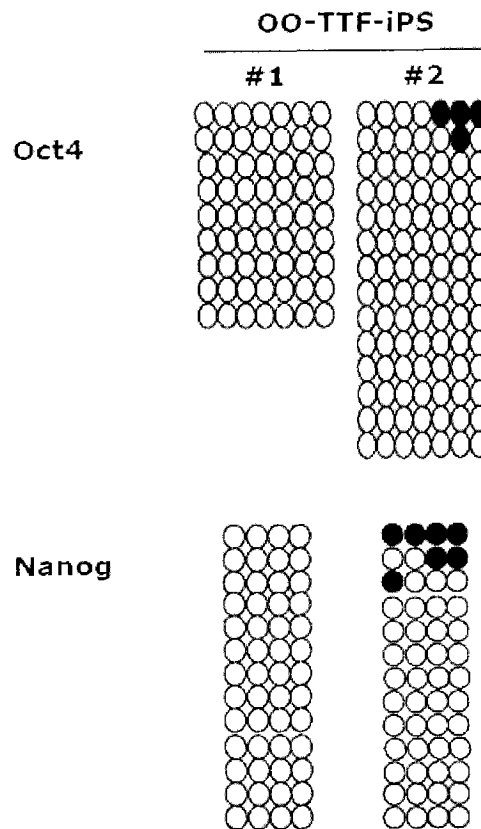


图 20a

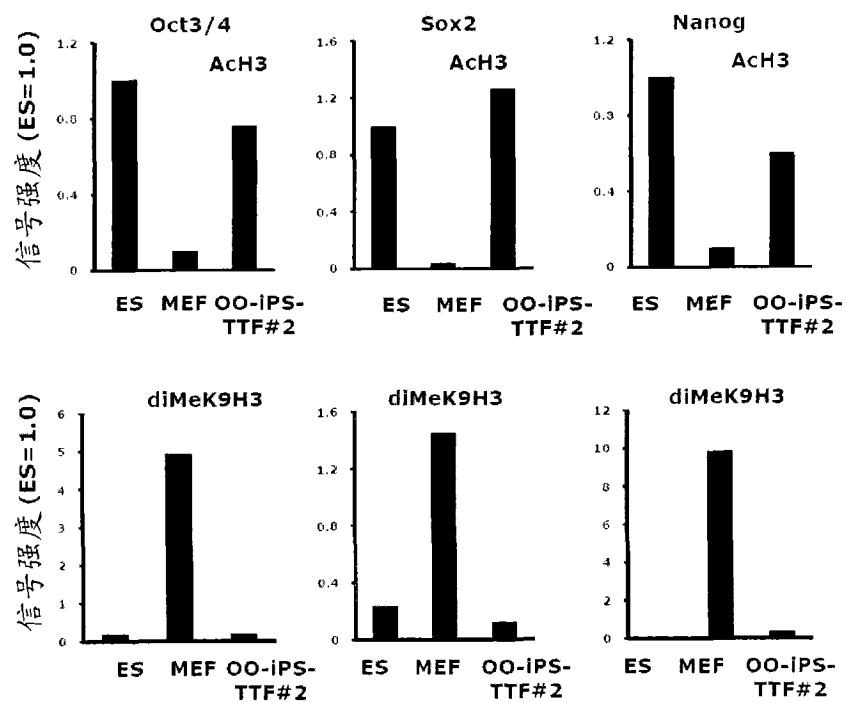


图 20b

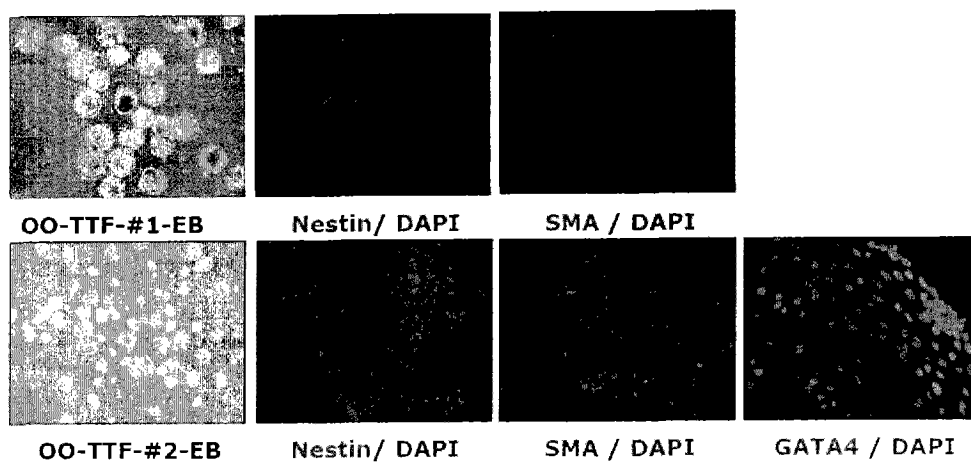


图 21a

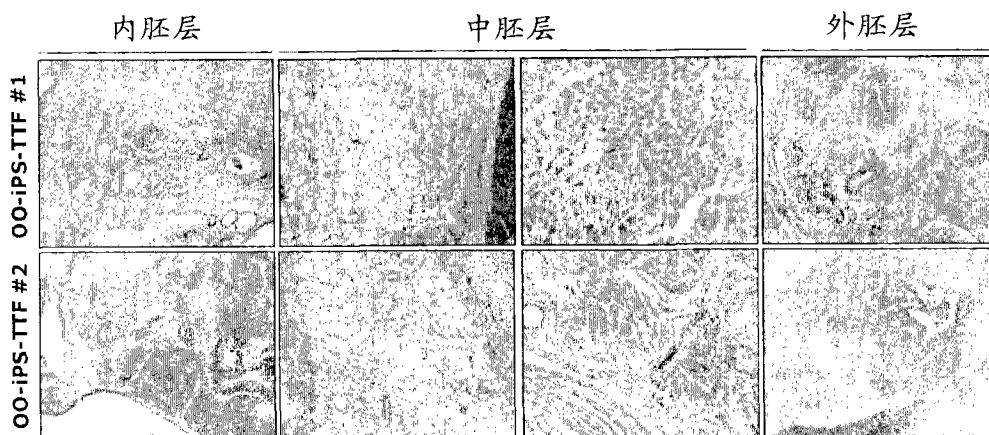


图 21b



图 22a

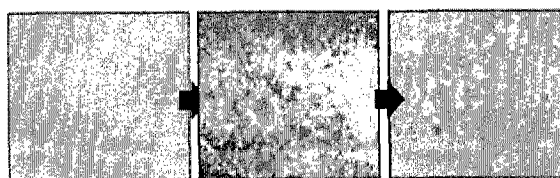


图 22b

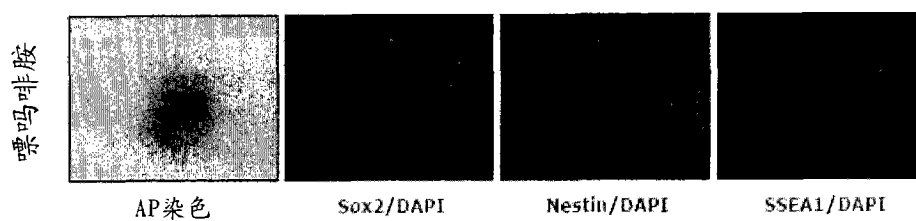


图 22c

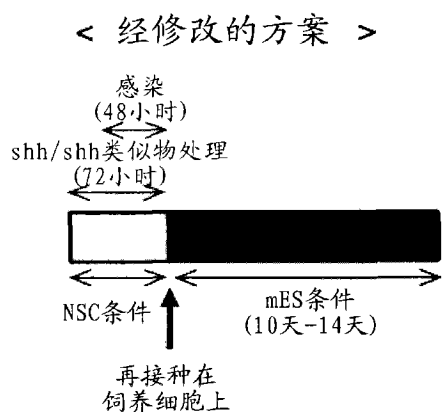


图 22d

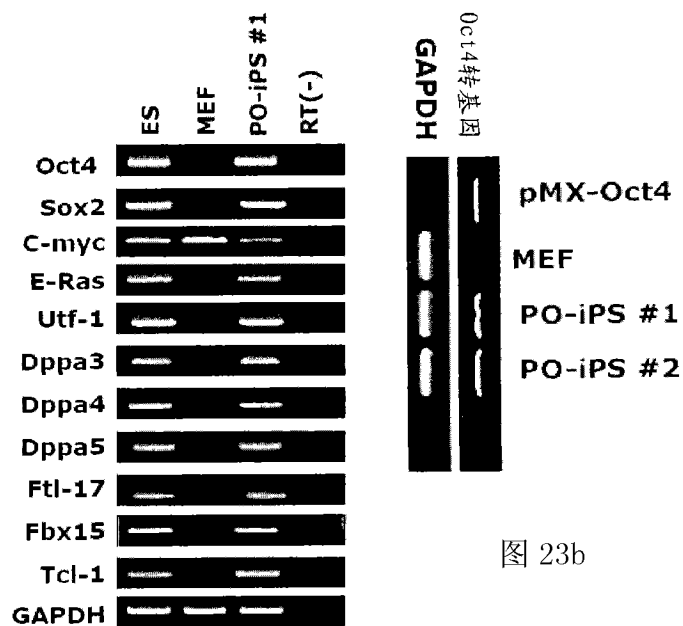


图 23b

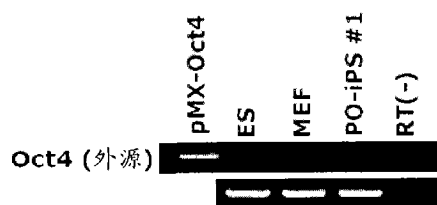


图 23a

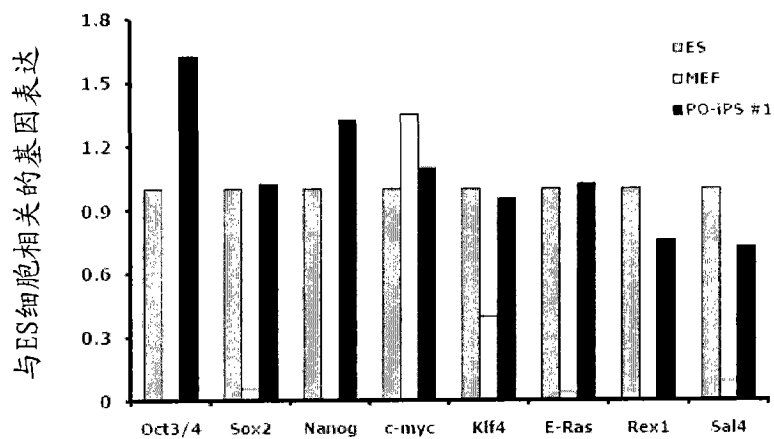


图 23c

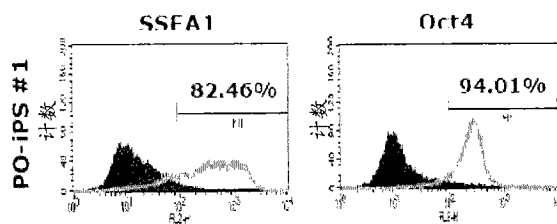


图 23d

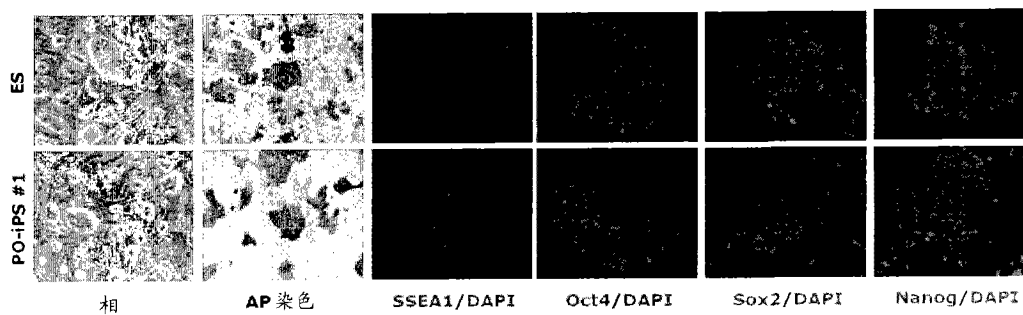


图 23e

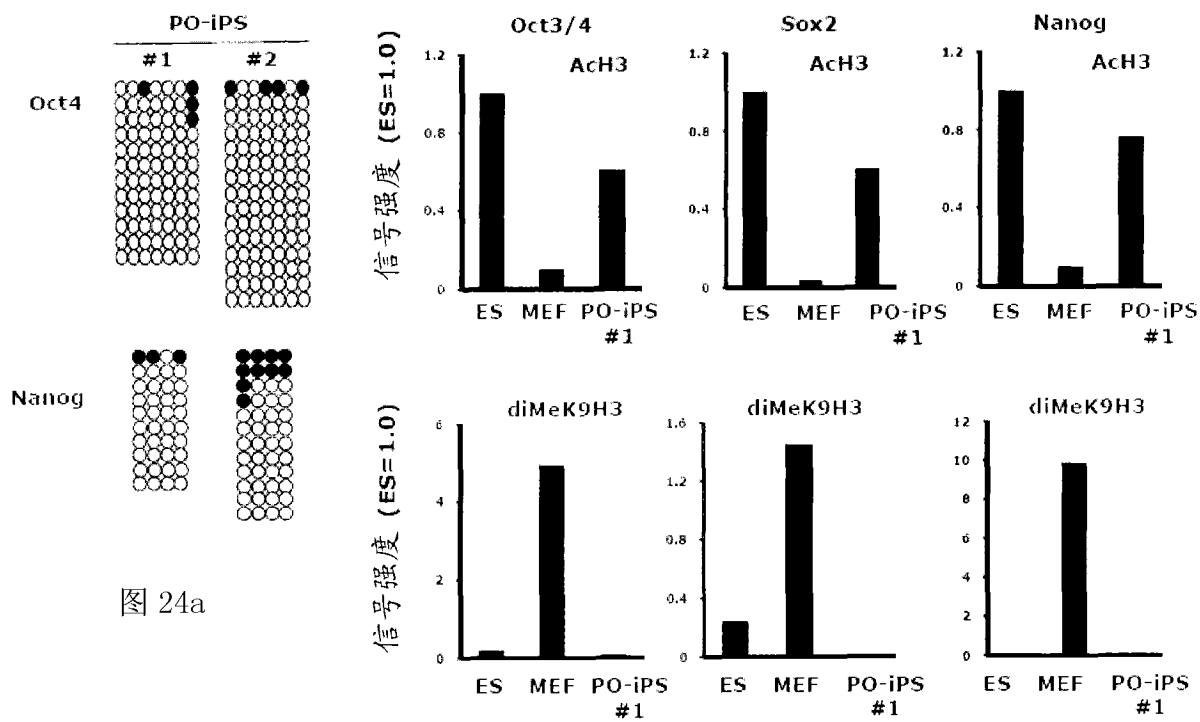


图 24a

图 24b

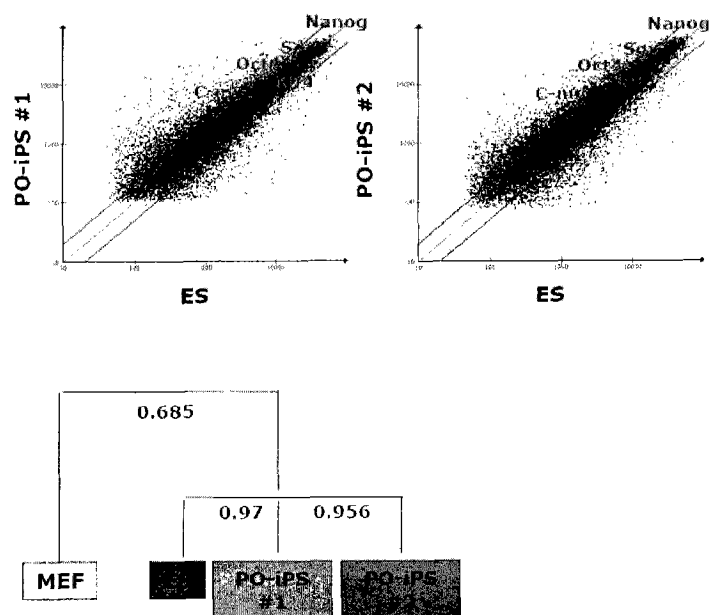


图 25

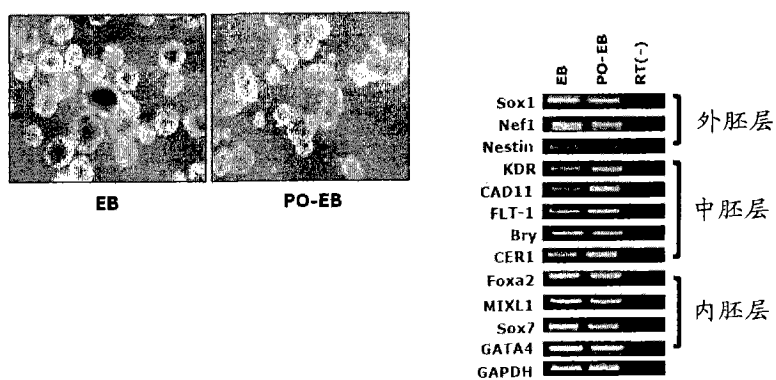


图 26a

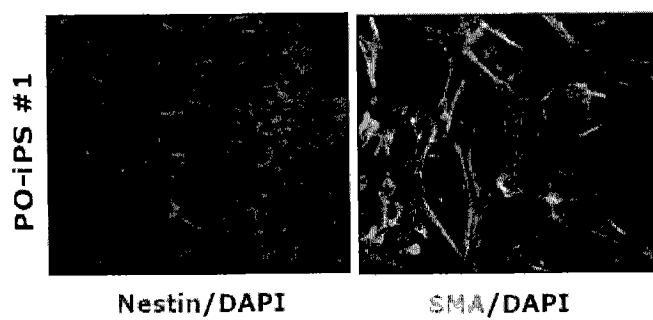


图 26b

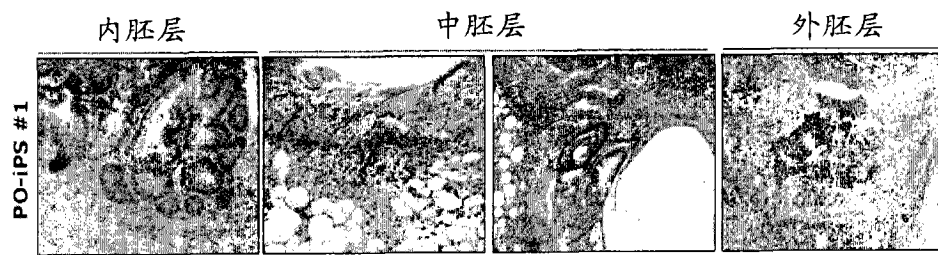


图 26c

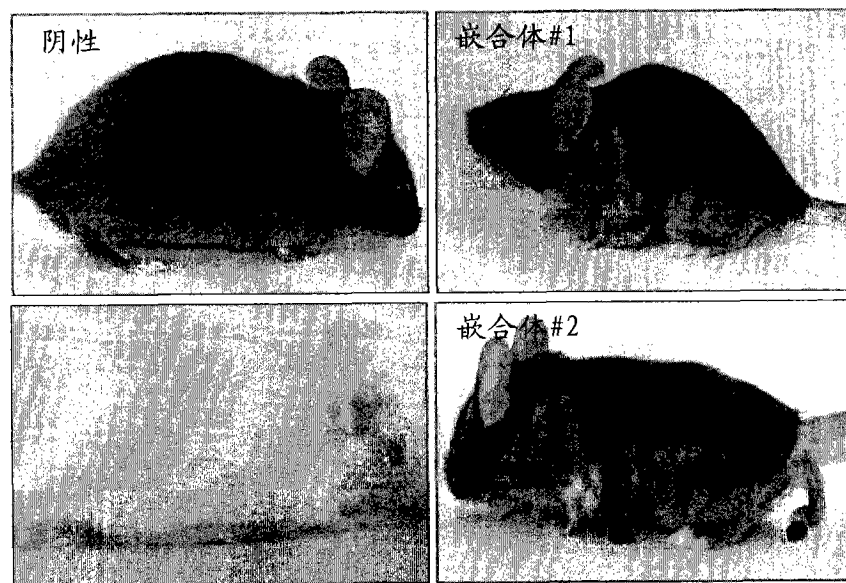


图 26d