



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109762845 A

(43)申请公布日 2019.05.17

(21)申请号 201910034589.X

A61K 35/28(2015.01)

(22)申请日 2019.01.15

A61P 39/06(2006.01)

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

(72)发明人 刘光慧 曲静 张钊 刘尊鹏

王思

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 关畅

(51) Int. Cl.

C12N 15/90(2006.01)

C12N 9/22(2006.01)

C12N 15/85(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

C12Q 1/02(2006.01)

权利要求书2页 说明书12页

序列表3页 附图2页

(54)发明名称

RAP1功能丧失的间充质干细胞模型及其构建方法与应用

(57)摘要

本发明公开了RAP1功能丧失的间充质干细胞模型及其构建方法与应用。本发明提供的RAP1功能丧失的间充质干细胞模型的制备方法包括如下步骤:降低多能干细胞中RAP1的含量和/或活性或抑制多能干细胞中RAP1编码基因的表达,得到RAP1功能丧失的多能干细胞;诱导RAP1功能丧失的多能干细胞,得到RAP1功能丧失的间充质干细胞;所述多能干细胞为胚胎干细胞或诱导多能干细胞。本发明的RAP1功能丧失的间充质干细胞模型表现为细胞增殖能力提升、退行速度减慢、体内留存能力提升、端粒长度延长,可用于研究端粒长度改变与细胞衰老的关系,筛选使细胞加速衰老的毒性分子及作为增殖和体内留存能力增强的细胞材料用于细胞治疗。

1. 细胞模型的制备方法,包括如下步骤:降低干细胞中RAP1的含量和/或活性或抑制干细胞中RAP1编码基因的表达,得到细胞模型。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述干细胞为间充质干细胞或多能干细胞。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于:所述干细胞为多能干细胞时,所述细胞模型的制备方法包括如下步骤:降低所述多能干细胞中的RAP1的含量和/或活性或抑制多能干细胞中RAP1编码基因的表达,得到RAP1功能丧失的多能干细胞;诱导所述RAP1功能丧失的多能干细胞,得到所述细胞模型。

4. 根据权利要求2或3所述的方法,其特征在于:所述多能干细胞为胚胎干细胞或诱导多能干细胞。

5. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于:所述胚胎干细胞为人胚胎干细胞或人诱导多能干细胞;

或,所述人胚胎干细胞为人胚胎干细胞H9。

6. 根据权利要求1-5中任一所述的方法,其特征在于:所述降低干细胞中RAP1的含量和/或活性或抑制干细胞中RAP1编码基因的表达是通过敲除干细胞中RAP1的编码基因来实现的。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于:所述敲除干细胞中RAP1的编码基因是通过CRISPR/Cas9方法来实现的;

或,所述敲除干细胞中RAP1的编码基因为敲除干细胞中RAP1的编码基因的第2外显子。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于:所述CRISPR/Cas9的靶序列如序列3所示。

9. 下述X1)-X6) 中任一产品:

X1) 权利要求1-8中任一所述方法得到的细胞模型;

X2) 一种筛选影响细胞端粒长度和/或细胞增殖能力和/或体内存留能力和/或细胞衰老进程的物质的细胞模型,为权利要求1-8中任一所述方法得到的细胞模型;

X3) 用于构建权利要求1-8中任一所述细胞模型的系统,由靶向RAP1的编码基因的gRNA和Cas9核酸酶组成;

X4) 用于构建权利要求1-8中任一所述细胞模型的系统,由表达靶向RAP1的编码基因的gRNA的载体和表达Cas9核酸酶的载体组成;

X5) 用于构建权利要求1-8中任一所述细胞模型的系统,由靶向RAP1的编码基因的第2外显子的gRNA、Cas9核酸酶和含有所述第2外显子上下游同源臂的DNA片段组成;

X6) 用于构建权利要求1-8中任一所述细胞模型的系统,由表达靶向RAP1的编码基因的第2外显子的gRNA的载体、表达Cas9核酸酶的载体和含有所述第2外显子上下游同源臂的DNA片段的载体组成。

10. 权利要求1-8中任一所述方法得到的细胞模型在下述Y1)-Y6) 中任一应用:

Y1) 在作为增殖和/或体内存留能力增强的细胞模型中的应用;

Y2) 在作为端粒延长的细胞模型中的应用;

Y3) 在作为衰老进程延缓的细胞模型中的应用;

Y4) 在筛选影响细胞端粒长度和/或细胞增殖能力和/或体内存留能力和/或细胞衰老进程的物质中的应用;

Y5) 在筛选缩短端粒长度和/或抑制细胞增殖和/或抑制细胞体内存留和/或加速细胞衰老的物质中的应用;

Y6) 在制备用于细胞治疗的产品中的应用。

RAP1功能丧失的间充质干细胞模型及其构建方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及RAP1功能丧失的间充质干细胞模型及其制备方法与应用,特别涉及RAP1功能丧失的人胚胎干细胞模型和RAP1功能丧失的人间充质干细胞模型及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 端粒DNA是真核生物线性染色体末端的DNA重复序列,与其招募的复杂蛋白组分一起形成高级结构,维持染色体末端的稳定,具有重要的生理学意义。端粒的异常将导致细胞染色体失稳,引起DNA损伤及修复反应,进而导致染色体异常重组、末端粘结等情况。随着DNA复制与细胞分裂,“衰老学说”认为,端粒的过度缩短将导致细胞活力衰退、分裂能力丢失,从而导致细胞的复制性衰老,进而引起机体的衰老。

[0003] 成体干细胞是存在于机体内,具有自我更新和一定分化潜能的细胞总称,对于机体内环境稳态维持、补充损耗的多种终末分化细胞有重要作用,成体干细胞的稳态失衡、衰退及耗竭与机体衰老关系密切。间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSC)是成体干细胞的重要成员,最初来自发育早期的中胚层和外胚层,具有自我复制能力以及向脂肪、肌肉、心肌、软骨、成骨等多种细胞分化的能力,对于机体内炎症反应的调控也具有重要意义,间充质干细胞的异常或加速耗竭是引起骨质疏松、肌肉萎缩及某些早衰症的重要诱因。在应用方面,基于分离、体外分化、培养人类间充质干细胞的体系较为成熟,及间充质干细胞具有重要的功能、作用等优点,间充质干细胞已经成为细胞治疗领域重要的工具细胞类型。研究表明,体外培养的间充质干细胞明显地表现出复制性衰老的表型。综上,在人类间充质干细胞中人为地调节端粒长度具有重要意义:(1)在科学研究方面,端粒与间充质干细胞都与复制性衰老具有紧密联系,衰老一直是人类感兴趣的话题,而人口老龄化也是世界特别是中国面对的严峻问题,以间充质干细胞为模型对于端粒展开研究,将帮助人们进一步理解衰老,对“健康衰老”的实现助力。同时,由于线虫、小鼠等模式生物的端粒长度及调控机制与人类有明显差异,而肿瘤细胞的端粒与正常细胞具有明显差别,在人类间充质干细胞中的研究有助于人们更好地了解人类生理状态下端粒的作用与调控机制。(2)在应用方面,通过基因编辑获得具有较高活力和体内留存能力的间充质干细胞,可以为使用间充质干细胞进行细胞治疗助力。对于具有复制性衰老表型的间充质干细胞来说,延长端粒可能是增强其活力的重要手段之一。目前延长端粒最简单的方法是过表达端粒酶,但端粒酶的过度激活存在癌变的潜在风险,因此寻找其他较为安全的、调控端粒长度的方法成为了重要的问题。

[0004] RAP1(repressor activator protein 1)基因又名TERF2IP(TERF2interacting protein),位于人16号染色体16q23.1,共3个外显子。RAP1蛋白约50kDa,含399个氨基酸。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是如何制备端粒延长、体内存留能力和增殖能力增

强、衰老进程延缓的细胞模型。

[0006] 为了解决上述技术问题,本发明首先提供了细胞模型的制备方法,所述方法包括如下步骤:降低干细胞中RAP1的含量和/或活性或抑制干细胞中RAP1编码基因的表达,得到细胞模型。

[0007] 上述方法中,所述干细胞可为间充质干细胞或多能干细胞。

[0008] 所述干细胞为多能干细胞时,所述细胞模型的制备方法可包括如下步骤:降低所述多能干细胞中的RAP1的含量和/或活性或抑制多能干细胞中RAP1编码基因的表达,得到RAP1功能丧失的多能干细胞;诱导所述RAP1功能丧失的多能干细胞,得到间充质干细胞模型。

[0009] 进一步的,诱导所述RAP1功能丧失的多能干细胞的方法可包括如下步骤:将所述RAP1功能丧失的多能干细胞进行拟胚体分化,筛选CD73、CD90和CD105均为阳性的细胞即得到所述细胞模型。

[0010] 更进一步的,诱导所述RAP1功能丧失的多能干细胞的方法具体可按照如下步骤进行:将所述RAP1功能丧失的多能干细胞进行拟胚体分化(分化时间可为48-72小时),得到拟胚体(EB);然后将EB接种于基质胶(Matrigel)包被的培养板中进行培养,培养至纤维状细胞出现(培养时间可为2周)。再经过一次传代后,利用流式细胞术分选其中CD73、CD90和CD105均为阳性的细胞类群即得到所述细胞模型。

[0011] 上述方法中,所述多能干细胞可为胚胎干细胞或诱导多能干细胞。

[0012] 进一步的,所述胚胎干细胞或诱导多能干细胞可为人胚胎干细胞或人诱导多能干细胞。

[0013] 更进一步的,所述人胚胎干细胞可为商业化人胚胎干细胞,如人胚胎干细胞H9。

[0014] 上述方法中,所述降低干细胞中RAP1的含量和/或活性可通过如下任一种方式:抑制干细胞中RAP1蛋白的合成、抑制干细胞中RAP1蛋白的功能、促进干细胞中RAP1蛋白的降解。所述抑制干细胞中RAP1编码基因的表达可通过如下任一种方式:RNA干扰、基因沉默、基因敲除、基因突变。

[0015] 进一步的,所述降低干细胞中RAP1的含量和/或活性可通过向干细胞中加入RAP1蛋白抑制剂来实现。所述RAP1蛋白抑制剂可为抑制RAP1蛋白合成或抑制RAP1蛋白功能或促进RAP1蛋白降解的蛋白质、多肽或小分子化合物。

[0016] 所述抑制干细胞中RAP1编码基因的表达可通过向干细胞中加入可干扰RAP1蛋白的编码基因表达的RNA来实现,也可通过向干细胞中加入用于敲除或突变RAP1蛋白的编码基因的物质来实现。

[0017] 更进一步的,所述抑制干细胞中RAP1编码基因的表达是通过敲除干细胞中RAP1的编码基因来实现的。所述敲除干细胞中RAP1的编码基因具体可通过CRISPR/Cas9方法来实现。所述敲除干细胞中RAP1的编码基因具体可为敲除干细胞中RAP1的编码基因的第2外显子。

[0018] 在本发明的一个实施例中,利用CRISPR/Cas9方法敲除所述RAP1的编码基因的第2外显子的方法可包括如下步骤:将靶向所述第2外显子的gRNA、Cas9以及含有所述第2外显子上下游同源臂的DNA片段(记为DNA片段1)导入所述干细胞中,实现所述RAP1编码基因的第2外显子的敲除。

[0019] 所述gRNA的靶序列具体可为序列表中序列3。

[0020] 所述上下游同源臂的序列具体可为序列表中序列1和序列2。

[0021] 所述DNA片段1中还含有neo抗性基因。所述DNA片段1依次包括序列表中序列1的第21-1461位所示的同源臂左臂、neo抗性基因和序列表中序列2的第21-1259位所示的同源臂右臂。

[0022] 利用CRISPR/Cas9方法敲除所述RAP1的编码基因的第2外显子进一步可包括如下步骤：将表达所述gRNA的载体、表达Cas9的载体和含有所述DNA片段1的载体导入所述干细胞中，实现所述RAP1编码基因的第2外显子的敲除。

[0023] 所述表达所述gRNA的载体具体可为向gRNA克隆载体中通过同源重组连接的方法整合入序列表中序列4所示的DNA片段得到的重组载体。所述重组载体可表达能靶向所述RAP1的编码基因的第2外显子的gRNA。

[0024] 所述含有所述DNA片段1的载体可为将pCR2.1-neo的ApaI和XhoI识别序列间的DNA片段替换为序列表中序列1的第21-1461位所示的DNA片段，且将pCR2.1-neo的SacI和KpnI识别序列间的DNA片段替换为序列表中序列2的第21-1259位所示的DNA片段后得到的重组载体，该重组载体含有序列表中序列1的第21-1461位所示的同源臂左臂和序列表中序列2的第21-1259位所示的同源臂右臂，左右同源臂间还含有neo抗性基因。

[0025] 所述将表达所述gRNA的载体、表达Cas9的载体和含有所述DNA片段1的载体导入所述干细胞中后还包括筛选和鉴定阳性克隆的步骤，具体可按照如下步骤进行：

[0026] 1) 向细胞培养体系中加入G418，筛选得到neo阳性的克隆；

[0027] 2) 完成步骤1)后，采用PCR技术初步筛选基因组水平编辑成功的人胚胎干细胞克隆，并将其扩大培养；

[0028] 3) 完成步骤2)后，使用可以表达FLPo重组酶的载体电转化，并使用puro筛选阳性克隆；

[0029] 4) 完成步骤3)后，挑取阳性克隆扩增并再次使用PCR技术进行鉴定与验证，得到鉴定结果正确的克隆。

[0030] 本发明还提供了下述X1)-X6)中任一产品：

[0031] X1) 利用所述细胞模型的制备方法得到的细胞模型；所述细胞模型具有端粒长度延长、细胞增殖能力提高、体内留存能力提高、衰老进程延缓的表型；

[0032] X2) 一种筛选影响细胞端粒长度和/或细胞增殖能力和/或体内存留能力和/或细胞衰老进程的物质的细胞模型，为所述细胞模型；

[0033] X3) 用于构建所述细胞模型的系统，由靶向RAP1的编码基因的gRNA和Cas9核酸酶组成；

[0034] X4) 用于构建所述细胞模型的系统，由表达X3)所述gRNA的载体和表达Cas9核酸酶的载体组成；

[0035] X5) 用于构建所述细胞模型的系统，由靶向所述第2外显子的gRNA、Cas9核酸酶和含有所述第2个外显子上下游同源臂的DNA片段(所述DNA片段1)组成；

[0036] X6) 用于构建所述细胞模型的系统，由表达所述gRNA的载体、表达Cas9核酸酶的载体和含有所述第2外显子上下游同源臂的DNA片段(所述DNA片段1)的载体组成。

[0037] X3)和X4)中所述gRNA具体可靶向RAP1的编码基因的第2外显子。

- [0038] 本发明还提供了所述细胞模型在下述Y1)-Y6)中任一应用:
- [0039] Y1) 在作为增殖和/或体内留存能力增强的细胞模型中的应用;
- [0040] Y2) 在作为端粒延长的细胞模型中的应用;
- [0041] Y3) 在作为衰老进程延缓的细胞模型中的应用;
- [0042] Y4) 在筛选影响细胞端粒长度和/或细胞增殖能力和/或体内存留能力和/或细胞衰老过程的物质中的应用;
- [0043] Y5) 在筛选缩短端粒长度和/或抑制细胞增殖和/或抑制细胞体内存留和/或加速细胞衰老的物质中的应用;
- [0044] Y6) 在制备用于细胞治疗的产品中的应用。
- [0045] 上述应用中,所述细胞可为干细胞。所述干细胞具体可为成体干细胞。
- [0046] 上述应用中,所述物质可为药物和/或天然有机物和/或小分子化合物和/或毒性分子。
- [0047] 上述应用中,所述用于细胞治疗的产品具体可为端粒长度延长的细胞治疗产品或增殖能力增强的细胞治疗产品或衰老进程延缓的细胞治疗产品或体内留存能力增强的细胞治疗产品。
- [0048] 上述方法或产品或应用中,所述RAP1的编码基因的序列可为GenBank:NC_000016.10的第75,647,737-75,657,442位(RAP1基因的基因组序列),updated on PRI12-JUL-2017;所述RAP1的编码基因的序列还可为GenBank:NM_018975.3(RAP1基因的cDNA序列),updated on PRI 10-JUL-2017。
- [0049] 实验证明,本发明的细胞模型的端粒长度延长、细胞增殖能力提高、体内留存能力提高、衰老进程延缓。因此本发明的细胞模型能够用于研究端粒长度改变与细胞衰老的关系,筛选使细胞加速衰老的毒性分子及作为增殖和体内留存能力增强的细胞材料用于细胞治疗。

附图说明

- [0050] 图1为本发明产生了RAP1功能丧失的人胚胎干细胞(human embryonic stem cells,hESCs)系RAP1^{-/-}hESC。A为人胚胎干细胞中RAP1第2外显子基因编辑策略图;B为RAP1相关打靶鉴定的基因组PCR检测结果;C为免疫荧光检测RAP1^{-/-}hESC的干细胞特性;D为Western blotting检测野生型及RAP1^{-/-}hESC中RAP1蛋白表达水平。RAP1^{-/-}表示RAP1^{-/-}hESC,RAP1^{+/+}表示H9细胞系。
- [0051] 图2为本发明涉及的RAP1^{-/-}hESC衍生的RAP1^{-/-}hMSC具有增殖和体内留存能力增强的表型。其中,A为RAP1^{+/+}hMSC和RAP1^{-/-}hMSC阳性表面标志蛋白CD105、CD73、CD90流式细胞术分选结果;B为Western blotting鉴定RAP1^{+/+}hMSC和RAP1^{-/-}hMSC中RAP1蛋白表达量,RAP1^{-/-}hMSC中RAP1表达缺失;C为RAP1^{+/+}hMSC和RAP1^{-/-}hMSC细胞的增殖曲线;D为衰老相关的β-Gal染色结果;E为RAP1^{-/-}hMSC体内留存能力检测。RAP1^{-/-}表示RAP1^{-/-}hMSC,RAP1^{+/+}表示野生型hMSC。
- [0052] 图3为本发明涉及的RAP1^{-/-}hMSC具有端粒延长的表型。A为使用Southern blotting方法对端粒限制片段长度进行检测;B为使用实时定量PCR检测端粒长度,RAP1^{-/-}hMSC端粒长度更长。RAP1^{-/-}表示RAP1^{-/-}hMSC,RAP1^{+/+}表示野生型hMSC。

具体实施方式

[0053] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述,给出的实施例仅为了阐明本发明,而不是为了限制本发明的范围。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的材料、试剂、仪器等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。以下实施例中的定量试验,均设置三个重复,结果取平均值。

[0054] 下述实施例中的细胞培养条件均为37°C,5%CO₂。

[0055] 下述实施例中用于流式细胞术分选hMSC的荧光标记抗体如下:

[0056] 荧光素FITC标记的抗人细胞表面识别分子CD90抗体(555595),BD Biosciences。

[0057] 荧光素PE标记的抗人细胞表面识别分子CD73抗体(550257),BD Biosciences。

[0058] 荧光素APC标记的抗人细胞表面识别分子CD105抗体(17-1057-42),eBiosciences。

[0059] 荧光素APC标记同型对照抗体(555751),BD Biosciences。

[0060] 荧光素PE标记同型对照抗体(555749),BD Biosciences。

[0061] 荧光素FITC标记同型对照抗体(555742),BD Biosciences。

[0062] 下述实施例中的人胚胎干细胞H9细胞系(WiCell公司产品,货号:WA09(H9)-DL-7)。

[0063] 下述实施例中的细胞培养基配方如下:

[0064] (1) CDF12培养基配方:

[0065] DMEM/F12培养基(Invitrogen公司产品,货号:11320-033);

[0066] 0.1mM非必需氨基酸(Invitrogen公司产品,货号:11140-050);

[0067] 1mM GlutaMAX™二肽(Invitrogen公司产品,货号:35050-061);

[0068] 20%(体积百分含量)Knockout血清替代物(Invitrogen公司产品,货号:N10828-028);

[0069] 1%(1g/100ml)青霉素/链霉素(Invitrogen公司产品,货号:15070-063);

[0070] 55μMβ-巯基乙醇(Invitrogen公司产品,货号:21985-023);

[0071] 10ng/ml人FGF2(Joint Protein Central公司产品)。

[0072] (2) 间充质干细胞(MSC)培养基配方:

[0073] MEM培养基(Invitrogen公司产品,货号:12571071);

[0074] 10%(体积百分含量)胎牛血清(Gemcell公司产品,货号:100-500);

[0075] 0.1mM非必需氨基酸(Invitrogen公司产品,货号:11140-050);

[0076] 1mM GlutaMAX™二肽(Invitrogen公司产品,货号:35050-061);

[0077] 1%(1g/100ml)青霉素/链霉素(Invitrogen公司产品,货号:15070-063);

[0078] 10ng/ml人FGF2(Joint Protein Central公司产品)。

[0079] 下述实施例中的表达荧光素酶Luciferase的病毒载体记载在文献“Pan,H.,Guan,D.,Liu,X.,Li,J.,Wang,L.,Wu,J.,Zhou,J.,Zhang,W.,Ren,R.,Li,Y.,et al.(2016).SIRT6safeguards human mesenchymal stem cells from oxidative stress by coactivating NRF2.Cell research 26,190-205.”中,公众可从申请人处获得该生物材料,该生物材料只为重复本发明的相关实验所用,不可作为其它用途使用。

[0080] 下述实施例中的pCR2.1-neo载体由美国Salk研究所Juan Carlos Izpisua

Belmonte教授馈赠,记载在文献“Duan,S.,Yuan,G.,Liu,X.,Ren,R.,Li,J.,Zhang,W.,Wu,J.,Xu,X.,Fu,L.,Li,Y.,et al.(2015).PTEN deficiency reprogrammes human neural stem cells towards a glioblastoma stem cell-like phenotype.Nature communications 6,10068.”和“Pan,H.,Guan,D.,Liu,X.,Li,J.,Wang,L.,Wu,J.,Zhou,J.,Zhang,W.,Ren,R.,Li,Y.,et al.(2016).SIRT6safeguards human mesenchymal stem cells from oxidative stress by coactivating NRF2.Cell research 26,190-205.”中,并由第一发明人保存在中国科学院生物物理研究所,公众可从申请人处获得该生物材料,该生物材料只为重复本发明的相关实验所用,不可作为其它用途使用。

[0081] 下述实施例中的Cas9表达载体由美国George M.Church教授馈赠,记载在文献“Mali,P.,Yang,L.,Esvelt,K.M.,Aach,J.,Guell,M.,DiCarlo,J.E.,Norville,J.E.,and Church,G.M.(2013).RNA-guided human genome engineering via Cas9.Science 339,823-826.”中,并由第一发明人保存在中国科学院生物物理研究所,公众可从申请人处获得该生物材料,该生物材料只为重复本发明的相关实验所用,不可作为其它用途使用。

[0082] 下述实施例中的FLPo重组酶表达载体记载在文献“Liu,G.H.,Qu,J.,Suzuki,K.,Nivet,E.,Li,M.,Montserrat,N.,Yi,F.,Xu,X.,Ruiz,S.,Zhang,W.,et al.(2012).Progressive degeneration of human neural stem cells caused by pathogenic LRRK2.Nature491,603-607.”中,并由第一发明人保存在中国科学院生物物理研究所,公众可从申请人处获得该生物材料,该生物材料只为重复本发明的相关实验所用,不可作为其它用途使用。

[0083] 实施例1、RAP1功能丧失的胚胎干细胞系的构建及其鉴定

[0084] 本实施例涉及在人胚胎干细胞中靶向失活人类RAP1基因(基因组序列为GenBank:NC_000016.10的第75,647,737-75,657,442位,updated on PRI 12-JUL-2017;cDNA序列为GenBank:NM_018975.3,updated on PRI 10-JUL-2017),使RAP1蛋白功能丧失,得到RAP1功能丧失的人胚胎干细胞。

[0085] 本发明首先设计并通过分子克隆方法获得靶向人类基因组中RAP1基因第2外显子两侧的同源臂序列,然后将其构建到pCR2.1-neo载体上,获得RAP1同源臂载体。再构建靶向RAP1基因第2外显子的gRNA载体(Addgene公司产品,商品名和货号分别为gRNA Cloning Vector,Plasmid#41824)。最后将RAP1同源臂载体、gRNA表达载体和Cas9表达载体共同电转化人胚胎干细胞,获得RAP1第2外显子缺失的人胚胎干细胞(图1A)。其中,电转化人胚胎干细胞后,还包括用G418进行克隆筛选的步骤;在克隆筛选后还包括对挑选的克隆用基因组PCR的方法对其同源重组的情况进行确认的步骤。具体方法如下:

[0086] 一、RAP1功能丧失的胚胎干细胞系的构建

[0087] 1、gRNA表达载体的构建

[0088] 将靶向RAP1基因的gRNA编码基因连入Addgene公司的gRNA克隆载体中,构建得到敲除RAP1基因的gRNA表达载体。具体步骤如下:

[0089] 1) 根据NCBI提供RAP1基因组数据查找分析,设计靶向RAP1基因第2外显子的gRNA序列。设计的靶序列如下:TGGGTGAATGAGCACGTCCT-AGG(序列3)。

[0090] 2) 以人基因组DNA为模板,采用RAP1gRNA-F和RAP1gRNA-R引物进行PCR扩增,得到gRNA序列。引物序列如下(下划线所示的序列为靶序列):

- [0091] RAP1gRNA-F:
 [0092] TTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCTGGGTGAATGAGCACGTCCT;
 [0093] RAP1gRNA-R:
 [0094] GACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAACAGGACGTGCTCATTACCCCA。
 [0095] PCR扩增体系如下:5×GC buffer 10μL、2.5mM dNTP 4μL、RAP1gRNA-F (10μM) 2μL、RAP1gRNA-R (10μM) 2μL、Phusion聚合酶 (NEB公司产品,货号:M0530L) 0.5μL,ddH₂O 31.5μL。
 [0096] PCR反应条件如下:

98°C 10 min

0.1°C/s 降至 25°C 每降 10°C 停 1 min

- [0097] 25°C 1 min

72°C 10 min

16°C ∞

- [0098] 反应完成后,用PCR回收试剂盒 (QIAquick公司产品,货号:28106) 回收gRNA序列。
 [0099] 3) 将gRNA克隆载体用Af1 II酶切,回收后的载体片段与PCR回收试剂盒回收的gRNA序列进行同源重组连接,将得到的序列正确的重组载体命名为gRNA-RAP1,gRNA-RAP1含有序列表中序列4所示的DNA片段。

- [0100] 连接反应体系 (20μL) 如下:

2×Gibson Assembly® Master Mix 10 μL

gRNA 酶切回收后的载体片段 x μL (100 ng)

- [0101] gRNA 序列 y μL

ddH₂O 补至 20 μL

- [0102] 注:x,y的值根据gRNA酶切载体和gRNA PCR回收产物的浓度决定。一般gRNA酶切回收后的载体片段和gRNA序列的摩尔比为1:3-1:10。2×GibsonAssembly® Master Mix为NEB公司产品。

- [0103] 连接反应条件如下:50°C,1小时。

- [0104] 2、同源臂载体的构建

- [0105] 依据gRNA位置设计左右同源臂,将左右同源臂构建入pCR2.1-neo载体中,左右同源臂在人细胞基因组中分别位于RAP1基因第2外显子的上下游。具体步骤如下:

- [0106] 1) 利用RAP1Left Arm Primer F和RAP1Left Arm Primer R对人基因组DNA进行PCR扩增,得到同源臂左臂(序列为序列列表中序列1);利用RAP1Right Arm Primer F和RAP1Right Arm Primer R对人基因组DNA进行PCR扩增,得到同源臂右臂(序列为序列列表中序列2)。用于PCR扩增的酶为PrimeSTAR (TaKaRa公司产品,货号:DR010A)。引物序列如下:

- [0107]

RAP1Left Arm Primer F	ctatagggcgaattgggcccAGCCTCTATTACCGTCTCTGTCTGTTGCAT
RAP1Left Arm Primer R	ctggcgccgctcgaGGGCCACGTACCACAATCCACCAATATACCAT
RAP1Right Arm Primer F	ttactagtggatccgagctcTGAAAATGGGACTGATCTGGGCTTCAGAC
RAP1Right Arm Primer R	attacgccaagcttggtagcTCACCACATCTCCAATACCCACCAATGCCTA

[0108] 2) 将pCR2.1-neo用ApaI和XhoI酶切,得到pCR2.1-neo载体骨架;利用PCR一步定向克隆试剂盒(NovoRec:NR001)将含有同源臂左臂的DNA片段与pCR2.1-neo载体骨架相连,将得到的序列正确的重组载体命名为pCR2.1-neo-RAP1-u。

[0109] 将pCR2.1-neo-RAP1-u用SacI和KpnI酶切,得到pCR2.1-neo-RAP1-u载体骨架;将含有同源臂右臂的DNA片段与pCR2.1-neo-RAP1-u载体骨架相连,将得到的序列正确的重组载体命名为pCR2.1-neo-RAP1。

[0110] pCR2.1-neo-RAP1含有序列表中序列1的第21-1461位所示的DNA片段(同源臂左臂)和序列表中序列2的第21-1259位所示的DNA片段(同源臂右臂),左右同源臂间还含有neo抗性基因。

[0111] 3、RAP1功能丧失的人胚胎干细胞的获得

[0112] 基于CRISPR/Cas9的基因打靶技术在人胚胎干细胞中进行特异性敲除RAP1基因的第2外显子。具体步骤如下:

[0113] 1) 培养人胚胎干细胞H9细胞系,培养方法为a或b:

[0114] a. 将人胚胎干细胞H9细胞系接种至预先培养了经过丝裂霉素(Selleck公司产品,货号:S8146)灭活的小鼠胚胎成纤维细胞(Invitrogen公司产品,货号:S1520-100)的培养板中,使用人类胚胎干细胞培养基(CDF12培养基)与小鼠胚胎成纤维细胞共同培养;

[0115] b. 将人胚胎干细胞H9细胞系接种至预先用细胞外基质(qualified-Matrigel,BD Biosciences公司产品,货号:354277)包被的培养板中,使用mTeSR培养基(StemCell Technologies公司产品)培养。

[0116] 2) 将处于对数期增殖的H9细胞,PBS清洗一次,Tryple Express(Invitrogen公司,货号为12604021)消化5-10分钟后,轻轻吹打成单细胞。

[0117] 3) 将步骤2)得到的 5×10^6 个H9单细胞,依据Cologne_CoA_cGMP Solution P3Primary Cell 4D-Nucleofector Kit(Lonza公司产品,货号:V4XPG-3024)说明书配置细胞悬液,将Cas9表达载体、以及步骤1得到的gRNA-RAP1载体与步骤2得到的pCR2.1-neo-RAP1载体各7 μ g加入细胞悬液中,使用4D电转仪(Lonza公司,货号:4D-Nucleofector™System)进行电转。

[0118] 4) 将电转后的细胞加入含MEF的培养板中。24小时后换新鲜CDF12培养基。

[0119] 5) 约2天后,待培养板中长出克隆,依据克隆数目及大小向细胞培养体系中加入G418,筛选得到neo阳性的克隆,结合PCR技术初步筛选基因组水平编辑成功的人胚胎干细胞克隆,扩大培养并使用可以表达FLPo重组酶的载体10 μ g电转化,并使用puro筛选,挑取阳性克隆扩增并再次使用PCR技术进行鉴定与验证,得到鉴定结果正确的克隆,即为RAP1功能丧失的人胚胎干细胞(记为RAP1^{-/-}hESC)。上述PCR技术中所使用的引物同下述步骤二的1中的鉴定引物。

[0120] 二、RAP1功能丧失的人胚胎干细胞的鉴定

[0121] 通过定量PCR、Western blotting等手段鉴定产生的克隆是否被正确打靶,具体分别从如下几个方面进行检测:检测基因组中RAP1基因的第2外显子是否被删除、RAP1蛋白是否缺失。

[0122] 1、PCR鉴定

[0123] 提取野生型(H9细胞系)及RAP1^{-/-}hESC基因组DNA,采用如下引物PCR鉴定第2外显

子是否被删除。引物序列如下：

[0124] P1:5' -TTGGCAAAAGTCAATACAATGGGTAATATCCAAAG-3' ;

[0125] P2:5' -TTTGACTTCACTCTCAAGACTGTAAGCTCCT-3' ;

[0126] P3:5' -GTGGATTGTGGTACGTGGCCCAGATCTGCC-3' ;

[0127] P4:5' -TAACATACCACAACCTCCTCAAACCTCCCGG-3' 。

[0128] 其中,P1+P2跨越左右同源臂,RAP1第2外显子被删除后PCR获得的条带长度缩短。其中,P4在RAP1第2外显子内部,该外显子被删除后P3+P4不能获得PCR产物。PCR鉴定结果如图1中B所示,结果显示RAP1^{-/-}hESC中RAP1第2外显子已缺失。

[0129] 2、免疫荧光检测经过改造的人胚胎干细胞的干细胞特性

[0130] 以H9细胞系和RAP1^{-/-}hESC这两种细胞作为供试细胞,采用免疫荧光技术对人胚胎干细胞的干性维持相关的分子标记物OCT4,SOX2和NANOG进行检测。具体如下:

[0131] 将培养于盖玻片上的供试细胞用4%的多聚甲醛室温固定30分钟,PBS漂洗(3次,5分钟/次)后,使用含有0.4%(体积百分含量)Triton X-100的PBS室温孵育30分钟,继而换用10%(体积百分含量)驴血清(Jackson ImmunoResearch Laboratories,Inc.公司产品,货号:017-000-121)室温封闭1小时。之后换用添加一抗的封闭液于4摄氏度孵育过夜。PBS漂洗(3次,5分钟/次)后,然后加入对应二抗,室温孵育1小时。PBS漂洗(3次,5分钟/次)后,用工作浓度为2 μ g/ml的Hoechst 33342(Life technology公司产品,货号:H3570)室温孵育15分钟,最后封片和观察。

[0132] 结果如图1中C所示,与H9细胞系细胞相似,RAP1^{-/-}hESC能够表达OCT4(绿色荧光),SOX2(红色荧光)和NANOG(黄色荧光)三种分子标记物。

[0133] 以上结果表明,RAP1功能丧失对干细胞干性基因的表达没有显著影响。

[0134] 3、Western blotting鉴定RAP1蛋白

[0135] 以H9细胞系和RAP1^{-/-}hESC这两种细胞作为供试细胞,提取各细胞的总蛋白,利用Western blotting检测细胞表达的蛋白质。所用一抗为RAP1抗体(anti-RAP1,鼠源单克隆,Santa Cruz公司产品,货号:sc-53434),二抗为HRP标记的羊抗鼠抗体(Santa cruz公司产品,货号:sc-2005)。以 β -actin为内参,一抗为鼠源抗 β -actin抗体(Santa cruz公司产品,货号:sc-8432),二抗为HRP标记的羊抗鼠抗体(Santa cruz公司产品,货号:sc-2005)。

[0136] Western blotting检测RAP1蛋白结果如图1中D所示,RAP1^{-/-}hESC细胞用RAP1抗体无法检测到RAP1蛋白的表达;而H9细胞系用RAP1抗体可检测到RAP1蛋白的表达(分子量约为50kDa)。

[0137] 实施例2、RAP1^{-/-}hESC体外定向分化制备RAP1^{-/-}hMSC及RAP1^{-/-}hMSC表型鉴定

[0138] 本实施例将实施例1中获得的RAP1^{-/-}hESC进一步体外定向分化为间充质干细胞(RAP1^{-/-}hMSC),并发现RAP1^{-/-}hMSC能够一定程度延缓衰老表型。

[0139] 一、RAP1^{-/-}hESC体外定向分化制备RAP1^{-/-}hMSC

[0140] 将RAP1^{-/-}hESC进行拟胚体(EB)分化,分化48-72小时,得到拟胚体(EB)。然后将EB接种于基质胶(Matrigel)(Invitrogen公司产品)包被的6孔板中进行培养,继续培养2周至纤维状细胞出现。再经过一次传代后,利用流式细胞术分选其中的CD73、CD90和CD105均为阳性的细胞类群(图2中A),即为RAP1功能丧失(RAP1^{-/-})的人间充质干细胞(记为RAP1^{-/-}hMSC)。同时将H9细胞系定向诱导分化为间充质干细胞(记为RAP1^{+/+}hMSC)。

[0141] 二、RAP1^{-/-}hMSC的表型鉴定

[0142] 1、Western blotting检测定向分化所得MSC中RAP1蛋白的丰度

[0143] 以RAP1^{+/+}hMSC和RAP1^{-/-}hMSC这两种细胞作为供试细胞,按照实施例1步骤二的3中的方法利用Western blotting检测细胞中是否表达RAP1蛋白。

[0144] 结果如图2中B所示,RAP1^{-/-}hMSC细胞用RAP1抗体无法检测到RAP1蛋白的表达;而RAP1^{+/+}hMSC细胞用RAP1抗体可检测到RAP1蛋白的表达(分子量约为50kDa)。

[0145] 2、增殖能力测定

[0146] 利用细胞计数统计连续传代的RAP1^{-/-}hMSC细胞和RAP1^{+/+}hMSC细胞的生长能力,结果显示,与RAP1^{-/-}hMSC细胞相比,RAP1^{+/+}hMSC表现出明显的增殖能力降低(图2中C)。具体操作步骤如下:

[0147] 1) 利用细胞计数,统计连续传代RAP1^{-/-}hMSC和RAP1^{+/+}hMSC的细胞累积增殖倍数;

[0148] 2) 计算每代细胞增殖倍数=每代结束培养时细胞数/每代起始培养时细胞数;

[0149] 3) 细胞累积增殖倍数= \log_2 (P1细胞增殖倍数)+ \log_2 (P2细胞增殖倍数)+...+ \log_2 (P17细胞增殖倍数)。

[0150] 统计结果如图2中C所示,结果表明:与RAP1^{+/+}hMSC细胞相比,RAP1^{-/-}hMSC增殖能力更强,具体表现为当RAP1^{+/+}hMSC增殖速率减慢时,RAP1^{-/-}hMSC仍可维持较快的增殖速率数代,且达到生长阻滞的代次晚于RAP1^{+/+}hMSC。

[0151] 3、SA-β-Gal染色

[0152] 细胞衰老相关的β-半乳糖苷酶染色是一种基于衰老时SA-β-Gal (senescence-associated beta-galactosidase) 活性水平上调而对衰老细胞或组织进行染色检测的方法。

[0153] 分别以RAP1^{-/-}hMSC细胞和RAP1^{+/+}hMSC细胞为供试细胞(分别设置P2和P9两个代次作为实验组),进行SA-β-Gal染色:

[0154] 1) 6孔板中以合适密度种入细胞;

[0155] 2) 细胞密度达到60~80%时,PBS清洗两次细胞;

[0156] 3) 2%多聚甲醛+0.2%异戊醛固定,不超过5分钟;

[0157] 4) PBS清洗2次;

[0158] 5) 加入染色液,37度避光过夜孵育。染色液配方如下:

[0159]	柠檬酸/磷酸钠缓冲液	40 mM
	K ₄ [Fe(CN) ₆]·6H ₂ O	5 mM
	K ₃ [Fe(CN) ₆]	5 mM

[0160]	NaCl	150 mM
	MgCl ₂	2 mM
	X-Gal	1 mg/ml

[0161] 6) PBS清洗2次;

[0162] 7) Hoechst 33342 (Life technology公司产品,货号:H3570) 室温避光孵育5分钟;

[0163] 8) PBS清洗一次;

[0164] 9) 显微镜下观察。

[0165] 以X-Gal为底物,在衰老特异性的 β -半乳糖苷酶催化下会生成深蓝色产物。在普通的光学显微镜下可以观测到细胞或组织的衰老情况,并进一步对两组细胞中的SA- β -Gal染色阳性细胞比率进行定量统计分析。

[0166] 结果如图2中D所示,第2代(Passage 2,P2) $RAP1^{+/+}$ hMSC及 $RAP1^{-/-}$ hMSC中SA- β -Gal染色阳性细胞比例无显著差异;而第9代(Passage 9,P9) $RAP1^{-/-}$ hMSC与 $RAP1^{+/+}$ hMSC相比,SA- β -Gal染色阳性细胞比例明显较少($P < 0.001$)。可见,随细胞传代, $RAP1^{-/-}$ hMSC的衰老进程相较于 $RAP1^{+/+}$ hMSC明显延缓。

[0167] 4、 $RAP1^{-/-}$ hMSC细胞小鼠体内留存能力测定

[0168] 为了验证野生型($RAP1^{+/+}$ hMSC)与 $RAP1^{-/-}$ hMSC的体内生存能力,首先用表达荧光素酶Luciferase的病毒载体分别感染 $RAP1^{+/+}$ hMSC和 $RAP1^{-/-}$ hMSC细胞,感染3~5天后,将两种细胞分别消化为单细胞状态,随后分别注射入免疫缺陷型NOD-SCID小鼠(是北京维通利华实验动物技术有限公司的产品)左、右胫骨前肌,两种细胞的注射量均相同。注射2、4、6天后分别通过利用小动物活体成像系统(Xenogen IVIS spectrum,PE公司产品)检测小鼠左、右胫骨前肌中luciferase活性,来反映hMSC的体内留存能力。具体操作方法如下:

[0169] 1) 选取生长状态良好、细胞密度为60~80%的细胞,感染表达荧光素酶Luciferase的病毒载体;

[0170] 2) 感染后3~5天,待细胞长满,记为第0天,TrypLEExpress消化为单细胞;

[0171] 3) 细胞计数,每 1×10^6 个细胞以100 μ l PBS重悬;

[0172] 4) 取等量细胞,与Luciferase底物(D-Luciferin Firefly,potassium salt,GOLDBIO公司产品)混合,使用酶标仪测定荧光强度与细胞数的关系。

[0173] 5) 取100 μ l细胞悬液注射入小鼠胫骨前肌;

[0174] 6) 每日观察小鼠状态;

[0175] 7) 移植后2、4、6天后,取出小鼠,腹腔注射Luciferase底物,麻醉后用小动物活体成像系统进行分析。统计5组生物学重复的荧光强度。

[0176] 结果显示, $RAP1^{-/-}$ hMSC(右腿)在胫骨前肌中的luciferase活性较 $RAP1^{+/+}$ hMSC(左腿)在胫骨前肌中有显著提升(图2中E),表明与 $RAP1^{+/+}$ hMSC相比, $RAP1^{-/-}$ hMSC在体内退行速度较慢,留存能力较强。

[0177] 实施例3、 $RAP1^{-/-}$ hMSC端粒长度的检测

[0178] 1、使用Southern blotting分析端粒限制片段长度

[0179] 为了研究RAP1功能丧失是否会影响端粒长度的变化,以 $RAP1^{+/+}$ hMSC(野生型)和 $RAP1^{-/-}$ hMSC细胞(P2和P9两个代次)为供试细胞,正常培养并消化收集细胞,提取完整的基因组DNA并使用Southern blotting的方法分析端粒限制片段的相对长度。具体步骤如下:

[0180] 1) 消化收集细胞,1000转/秒离心5分钟;

[0181] 2) 用PBS洗涤一次,使用盐析法DNA提取试剂盒(美基公司产品,货号:D3313-01)提取供试细胞的基因组DNA,获得大量、完整的基因组DNA;

[0182] 3) 使用HinfI(NEB公司产品,货号:R0155)和RsaI(NEB公司产品,货号:R0167)过夜酶切基因组DNA;

[0183] 4) 取2 μ g酶切的基因组DNA上样,使用0.8%琼脂糖凝胶进行电泳,以2V/cm电泳24小时;利用含有0.5M NaOH的变性缓冲液将DNA变性;

[0184] 5) 使用毛细管转膜法,利用虹吸作用将DNA从凝胶中转移至带正电的尼龙膜上;

[0185] 6) 使用DIG Easy Hyb Granules (Roche公司产品,货号:11796895001)在杂交炉中42 $^{\circ}$ C预杂交,加入变性的端粒特异探针杂交过夜;

[0186] 7) 使用Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (Roche公司产品,货号:11093274910)室温杂交1小时;

[0187] 8) 使用CDP-Star, ready-to-use (Roche公司产品,货号:12041677001)显色,观察端粒限制片段的相对长度。

[0188] Southern blotting显示,RAP1^{-/-}hMSC的端粒限制片段印迹明显后移,说明RAP1^{-/-}hMSC端粒长度更长(图3中A)。

[0189] 2、使用实时定量PCR分析端粒信号强度

[0190] 为了进一步确认Southern blotting的结果,以RAP1^{+/+}hMSC(野生型)和RAP1^{-/-}hMSC细胞为供试细胞,使用另一种方法,即实时定量PCR,检测端粒长度,具体步骤如下:

[0191] 1) 消化收集细胞,1000转/秒离心5分钟;

[0192] 2) 用PBS洗涤一次,使用离心柱型基因组DNA提取试剂盒(天根公司产品,货号:DP318-02)提取供试细胞的基因组DNA;

[0193] 3) 使用如下引物和SYBR qPCR mix(东洋纺公司产品,货号:QPS-201C)进行实时定量PCR检测。引物序列如下:

[0194]

Te1 1	GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT
Te1 2	TCCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTA
36B4u	CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC
36B4d	CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA

[0195] 其中Te1 1和2检测基因组内端粒序列丰度,36B4u和d检测基因组内单拷贝基因36B4位点的丰度。实验后,以36B4为内参,标准化Te1结果。

[0196] 实时定量PCR显示,RAP1^{-/-}hMSC的端粒信号更强,说明RAP1^{-/-}hMSC端粒长度更长(图3中B)。

[0197] 上述结果一方面说明在hMSC中,RAP1是端粒长度的负调控因子;另一方面说明RAP1功能丧失后,端粒增长可能是细胞增殖能力增强、衰老进程延缓的重要原因。综上,在不改变端粒酶活性的情况下,通过RAP1的敲除和体外分化,可以获得端粒长度更长的间充质干细胞,而这种细胞与野生型相比,具有更好的细胞活力。

<110> 中国科学院生物物理研究所
 <120> RAP1功能丧失的间充质干细胞模型及其构建方法与应用
 <160> 4
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 1477
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223>
 <400> 1
 ctatagggcg aattgggcc agcctctatt accgtctctt gtctgttgca tgtccccttt 60
 gctcatagta ataactagcac actagacatc aacttaatct gtggtttact ttttttaaac 120
 ttaattatth atcttgaagt gtttgtgtgt ctgcacaaag cttttctca ttcttttcta 180
 attgattgca ctgtatttca ttatgtgaat gaacagtaat ttacttttta ttatggagaa 240
 ttccaagcat ttacaaatac agaatagtat aatgaactat actgcatata cccatcacc 300
 accttcacct gattttagtt catggcattt tttaaatcta tacttttcat cccaacttcc 360
 tggactgttt tgaagcaaat gccagacatc atatcatttt atctatttta gcatgtatct 420
 ctcaaagata agcctctttt agttactatt taagaatttt attaaataca tacagtaaaa 480
 ttaacttttt atgggtgtaa attatatgca ttttaaaaac tttatttttt attgtggtaa 540
 aatgtatata cagtaaaatt tacagttcag atagtttttt aagtgttctg ttcagtggca 600
 ttattaagtg cattcacatt gttgggcaac tgcaccacc atctgtatct agaacttact 660
 cattttctaa aactgaaact ccatgccttt tattattttc tgcttctagg ggtcagaaac 720
 atgcctatta aacactaatt cccatttct cctcctctt agcccctgga aacaaccatt 780
 ccgcttctg tttctatgaa ttcaatattt ctagatacct catacaagta gaatcatgta 840
 atatttgccc ttttgtgtct ggcttatttc actttacata atatcttcaa agttcatcca 900
 tattgtagca tgtgtcagaa tttgattcct ttttaaaggt gaataatatt ccattgtatg 960
 tatatactac attttgtttt tccattaatg tatcaattga catttggctt atttccatct 1020
 tttgtttatt ttgaataatg ctgctgtgaa catgggtata actagtatct gtttgagacc 1080
 ctgctttcca ttattttagg tatatgcta gaaatgcaat tgctggatca tatggtaatt 1140
 ttatgtttaa ttttttctt ttcttgtgg gttgtcatca tgaattata ttgaattttt 1200
 tgaggaactg ctgtactctt ttccagttat atgtgtttta acataggtaa atttttgtaa 1260
 ccagcaccca cattgggatt tagaacaatt ccatcacgaa aaactcctc ttgctgcccc 1320
 tttgtagtat gttttagtaa gtagaaaagg agcagagtta aatcttcaga gaacaaaatg 1380
 taaaggaaag gaacaggatg tttaaattta ggaggectc cttttttag atggtatatt 1440
 ggtggattgt ggtacgtggc cctcgagcgg ccgccag 1477
 <210> 2
 <211> 1279

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 2

```

ttactagtagg atccgagctc tggaaaatgg gactgatctg ggcttcagac atgttgcct 60
gaagcttttg cttcaciaaag cttttagttt ttggcaggac aagttgaggg ggaaaggag 120
aaaaattggg tagaataggg acagttgtat aaacagtata aagcatcca ctttgagtac 180
tttaatgtca atatatTTTT caaaaagttt atagtaattg ttttttctat ttttttgagc 240
cagagtctgg ctctgtcgcc caggctggag tgcagtgggt cgatcttggc tctactgcaag 300
ctccgcctcc tgggttcaca ccattctect gcctcagcct cccgagtagc tgggactaca 360
ggcgcccacc accatgcctg gctaattatt tgtatTTTT gtagagacgg ggtttcactg 420
tgttagccag gatggcctcg atctctgac ctctgtatcc gccgccttg gcctcccaaa 480
gtgctgggat tacaggcgtg agccaccgct ttttgtattt ttttgaggtg gagtctcact 540
ctgtcaccca ggctggagtg cagtgggtgc atctcagctc actgtagcct ccacctcca 600
ggttcagca attcttctgc ctcagcctcc tgggtaactg ggattacagg catgtgccat 660
catgcccagc tacttatagt aatTTTTTT atcaagcaa tttagctttt tgtgtacttt 720
gagctTTTTT aaaatgtttt agctcttcca tattcagtct agcttatatt actctgttag 800
aatctgatat ttaataatag ctacagagaa agacaggagc catacaataa tgataagttt 860
tttaaaggct caaattatat gtatatattt ttccatgata aagcgtcttg tgaactaaca 920
aagaaaattc atattaacaa agaaaaatgg ttaggcttca gtccaacaa gggaaataat 980
ttaaagcttc tgtaattggt gagtgaaggg atgcacagga attgaaggga tgcacaggaa 1040
ttggcaggat ttagggattg ttgccttttg tagtctgttt tattatttga tatttggttc 1100
atTTTTcata aacttcaaac actcagctct caacatgac ctacctaggc ctcttctcat 1160
atagcatgct ttgtaatctg tctaaccagt atagcttggg agccctaata cattcataca 1220
gcagtgcttt ttgagtactt actatgtata ggcatgggtg ggtattggag atgtgggtgag 1280
gtaccaagct tggcgtaat 1299

```

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 3

tgggtgaatg agcacgtcct agg 23

<210> 4

<211> 100

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 4

tttcttggct ttatatatct tgtggaaagg acgaaacacc tgggtgaatg agcacgtcct 60

gttttagagc tagaaatagc aagttaaaat aaggctagtc 100

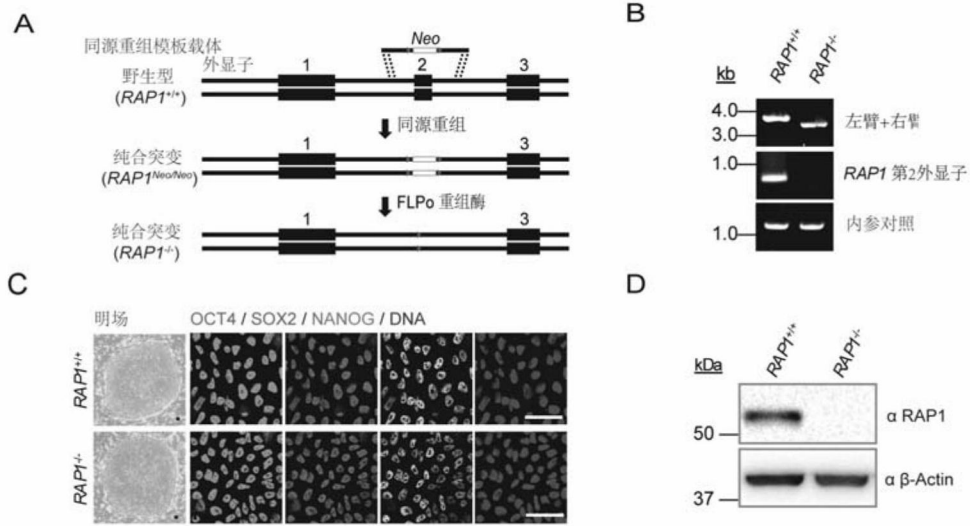


图1

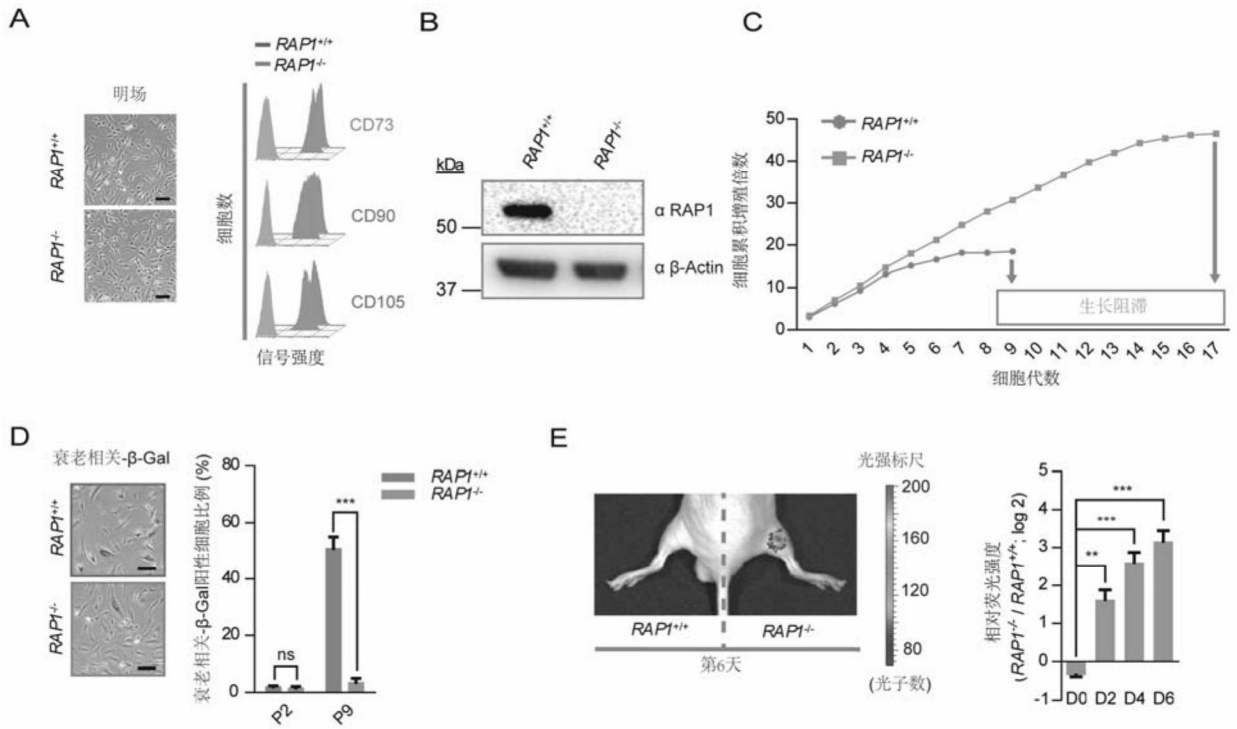


图2

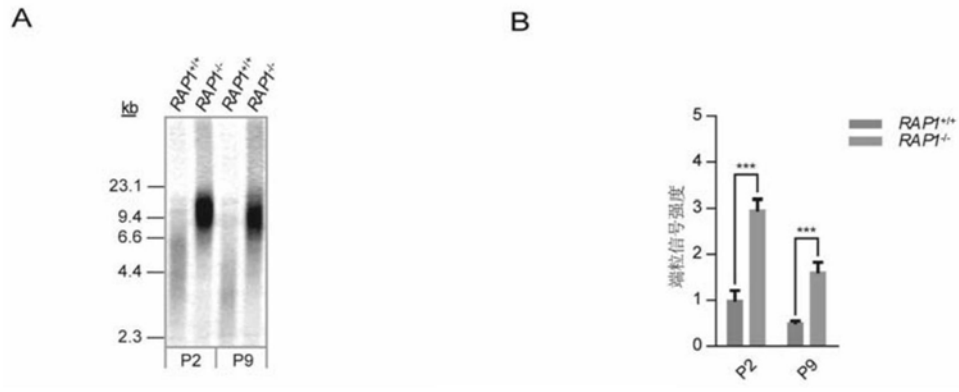


图3