



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101748100 A

(43) 申请公布日 2010.06.23

(21) 申请号 200810201352.8

(22) 申请日 2008.10.17

(71) 申请人 中国科学院上海生命科学研究院
地址 200031 上海市徐汇区岳阳路 320 号

(72) 发明人 肖磊 廖婧 陈思晔 崔春
陈霁君 任江涛

(74) 专利代理机构 上海德昭知识产权代理有限公司 31204

代理人 肖剑南

(51) Int. Cl.

C12N 5/10 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/42 (2006.01)

C12Q 1/25 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 12 页 附图 7 页

(54) 发明名称

一种大鼠可诱导多能干细胞及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种大鼠可诱导多能干细胞及其制备方法,本发明的大鼠可诱导多能干细胞的制备方法包括步骤:A) 构建携带转录因子的慢病毒载体,所述转录因子选自:Oct4、Sox2、c-Myc、Klf4、Lin28、Nanog;B) 将步骤A) 所得慢病毒载体以组合形式感染大鼠成体细胞,挑选形态类似胚胎干细胞的克隆传代培养,通过筛选符合胚胎干细胞特性的细胞克隆,得到大鼠 iPS 细胞。本发明有助于确立大鼠 ES 细胞建系的最适培养条件和方法;大鼠 iPS 细胞是大鼠基因打靶的良好载体,大鼠 iPS 细胞将利于揭示大鼠各基因功能和复杂的发育事件。

1. 一种大鼠可诱导多能干细胞 iPS 的制备方法,其特征在于,包括步骤:
 - A) 构建携带转录因子的慢病毒载体,所述转录因子选自:Oct4、Sox2、c-Myc、Klf4, Lin28、Nanog;
 - B) 将步骤 A) 所得慢病毒载体以组合形式感染大鼠成体细胞,挑选形态类似胚胎干细胞的克隆传代培养,通过筛选符合胚胎干细胞特性的细胞克隆,得到大鼠 iPS 细胞。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述大鼠成体细胞包括大鼠原代骨髓细胞或原代耳尖成纤维细胞。
3. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述慢病毒载体以组合形式携带的转录因子包括:Oct4、Sox2、c-Myc、Klf4。
4. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述步骤 B) 的传代培养是将大鼠 iPS 克隆按 1 : 3 ~ 50 的比例传至辐照过的小鼠胚胎成纤维细胞上。
5. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述步骤 B) 的筛选是筛选碱性磷酸酶染色呈阳性的细胞。
6. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,还包括步骤 C) 大鼠 iPS 细胞的干细胞多能性鉴定。
7. 如权利要求 6 所述的方法,其特征在于,所述步骤 C) 大鼠 iPS 细胞的干细胞多能性鉴定包括:
 - D) 碱性磷酸酶表达呈阳性;
 - E) 干细胞表面特异标记 SSEA-1 (+)、Nanog (+);
 - F) 自然分化形成胚状体后,外胚层 NCAM (+)、PAX6 (+),中胚层 SM22-a (+)、Myod (+) 和内胚层 Sox17 (+)、AFP (+);
 - G) 大鼠 iPS 细胞注射先天性免疫缺陷小鼠后形成畸胎瘤。
8. 如权利要求 7 所述的方法,其特征在于,所述步骤 G) 形成的畸胎瘤具有外胚层、中胚层和内胚层。
9. 如权利要求 7 所述的方法,其特征在于,所述大鼠 iPS 细胞的干细胞多能性鉴定还包括:
 - H) Oct4 基因的启动子区域被去甲基化;
 - I) 端粒酶活性比大鼠成体细胞高。
10. 一种按权利要求 1 ~ 9 所述任一项制备的大鼠可诱导多能干细胞。

一种大鼠可诱导多能干细胞及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程领域,具体涉及一种大鼠成体细胞重编程为类似胚胎干细胞的可诱导多能干细胞(Induced pluripotent stem cell,简称 iPS 细胞)及其制备方法。

背景技术

[0002] 大鼠是重要的实验动物,在行为学、癌症、心血管、血液、自体免疫等疾病、以及生理药理等方面都有广泛用途,针对大鼠的研究对于指导生物医学、人类健康和病理学等方面意义重大。

[0003] 胚胎干细胞是来自胚泡,可无限繁殖同时能维持多能性,即可分化为三个胚层的一类祖细胞。基于胚胎干细胞研究的反向遗传学手段对于遗传学、发育生物学、基因敲除模型的建立等方面具有巨大的推动作用。从 25 年前小鼠胚胎干细胞获得到现在,人们利用反向遗传学手段不断建立和完善各种小鼠模型(Demers, S. P., et al. (2007), Cloning and stem cells, 9, 512-522)。但数十年来科学界始终没能成功建立大鼠胚胎干细胞(ES)系,首次报道在 1994 年, P. Lannaccone 实验室宣布获得了大鼠 ES 细胞并打出了嵌合体,但三年后,他们却推翻了当年的成果,原因是污染了小鼠胚胎干细胞(Iannaccone, P. M., Taborn, G. U., Garton, R. L., et al. (1994). Dev. Biol. 163, 288-292; Brenin, D., et al. (1997). Transplant. Proc. 29, 1761-1765); 本世纪初,又有几个实验室相继报道建立了类似大鼠胚胎干细胞(ES-like)的细胞系(Demers, et al. (2007), Cloning and stem cells 9, 512-522; Vassilieva, S., et al. (2000), Exp. Cell Res. 258, 361-373; Notarianni, E., et al. (2001), Placenta 22, 111-123; Fandrich, F., et al. (2002), Nat. Med. 8, 171-178; Buehr, M., et al. (2003), Biol. Reprod. 68, 222-229; Mullins, L. J., et al. (2004), J. Physiol. 554, 4-12; Tesson, L., et al. (2005), Transgenic Res. 14, 531-546),但缺陷是:ES-like 细胞得不到长期维持;体内验证 ES-like 细胞多能性的实验结果不理想,即打不出畸胎瘤;没有成功的嵌合体大鼠得的报道,注射到囊胚的 ES-like 细胞只能分化成胚外组织,也就无法对生殖系嵌入情况进行探索;此外,对干细胞特征性指标的鉴定也很有限。大鼠胚胎干细胞的建系成为阻碍大鼠在生物医学方面用途广泛的巨大限制因素,而就前人的这些研究结果来看,使用传统方法(小鼠 ES 细胞的建立方法)建立大鼠 ES 细胞是相当困难的。

[0004] 2006 年 8 月, Yamanaka 实验室利用外源表达 Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4 四个转录因子,成功诱导小鼠胚胎成纤维细胞为类似小鼠胚胎干细胞的“可诱导的多能干细胞”(induced pluripotent stem cells, iPS),这项实验结果说明分化细胞可以通过几个转录因子诱导,重编程到全能性的状态(Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126, 663-676); 2007 年,人类 iPS 的建立,进一步验证了该方法的可行性(Takahashi, K., et al. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 131, 861-872; Yu, J., et al. (2007).

Induced pluripotent stem cell lines derived from humansomatic cells.Science 318,1917-1920)。尽管 iPS 细胞并非百分之百的 ES 细胞,但有理由相信, iPS 细胞可运用到那些使用传统方法无法建立 ES 细胞的物种上,比如大鼠。

发明内容

[0005] 本发明的首要目的在于,提供一种大鼠可诱导多能干细胞。

[0006] 本发明的第二个目的在于,提供一种大鼠可诱导多能干细胞的制备方法。

[0007] 根据本发明的大鼠可诱导多能干细胞 iPS 的制备方法,包括步骤:

[0008] A) 构建携带转录因子的慢病毒载体,所述转录因子选自:Oct4、Sox2、c-Myc、Klf4、Lin28、Nanog;

[0009] B) 将步骤 A) 所得慢病毒载体以组合形式感染大鼠成体细胞,挑选形态类似胚胎干细胞的克隆传代培养,通过筛选符合胚胎干细胞特性的细胞克隆,得到大鼠 iPS 细胞。

[0010] 根据本发明所述的方法,所述大鼠成体细胞包括大鼠原代骨髓细胞或原代耳尖成纤维细胞。

[0011] 根据本发明所述的方法,所述慢病毒载体以组合形式携带的转录因子包括:Oct4、Sox2、c-Myc、Klf4。

[0012] 根据本发明所述的方法,所述步骤 B) 的传代培养是将大鼠 iPS 克隆按 1:3~50 的比例传至辐照过的小鼠胚胎成纤维细胞上。

[0013] 根据本发明所述的方法,所述步骤 B) 的筛选是筛选碱性磷酸酶染色呈阳性的细胞。

[0014] 根据本发明所述的方法,还包括步骤 C) 大鼠 iPS 细胞的干细胞多能性鉴定。

[0015] 根据本发明所述的方法,所述步骤 C) 大鼠 iPS 细胞的干细胞多能性鉴定包括:

[0016] D) 碱性磷酸酶表达呈阳性;

[0017] E) 干细胞表面特异标记 SSEA-1(+)、Nanog(+);

[0018] F) 自然分化形成胚状体后,外胚层 NCAM(+)、PAX6(+),中胚层 SM22-a(+)、Myod(+) 和内胚层 Sox17(+)、AFP(+);

[0019] G) 大鼠 iPS 细胞注射先天性免疫缺陷小鼠后形成畸胎瘤。

[0020] 根据本发明所述的方法,所述步骤 G) 形成的畸胎瘤具有外胚层、中胚层和内胚层。

[0021] 根据本发明所述的方法,所述大鼠 iPS 细胞的干细胞多能性鉴定还包括:

[0022] H) Oct4 基因的启动子区域被去甲基化;

[0023] I) 端粒酶活性比大鼠成体细胞高。

[0024] 本发明有助于确立大鼠 ES 细胞建系的最适培养条件和方法;大鼠 iPS 细胞是大鼠基因打靶的良好载体,本发明的大鼠 iPS 细胞将利于揭示大鼠各基因功能和复杂的发育事件;此外,大鼠 iPS 是继小鼠和人的 iPS 成功诱导后第一项其它物种的 iPS,这对于其它模式动物 iPS 的诱导有着重大指导意义。

附图说明

[0025] 图 1 是病毒载体 LV-ef1 α -IRES-EGFP 结构图。

[0026] 图2是大鼠 iPS 细胞形态荧光镜检结果,其中 A:PEF 的 ES-like 克隆形态 B:PEF 的 ES-like 克隆的绿色荧光镜检结果 C:BMC 的 ES-like 克隆形态 D:BMC 的 ES-like 克隆的绿色荧光镜检结果 E:非 ES-like 克隆形态 F:非 ES-like 克隆的绿色荧光镜检结果。

[0027] 图3是大鼠 iPS 细胞碱性磷酸酶检测阳性克隆统计结果。

[0028] 图4是大鼠 iPS 细胞经多次挑克隆和传代后的细胞形态,其中 A:克隆形态 B:克隆绿色荧光镜检结果。

[0029] 图5是大鼠 iPS 细胞碱性磷酸酶活性检测,其中 A:由 PEF 得到的大鼠 iPS 细胞 AP 染色结果, B:由 BMC 得到的大鼠 iPS 细胞 AP 染色结果。

[0030] 图6是 Realtime PCR 检测大鼠 iPS 细胞未分化 Marker 表达情况的电泳图,从左到右泳道依次是:大鼠骨髓细胞,大鼠耳尖成纤维细胞, M13 号 iPS 细胞, F65 号 iPS 细胞, 大鼠胚胎细胞, 阴性对照。

[0031] 图7是免疫荧光染色检测大鼠 iPS 细胞干细胞相关 marker 表达情况,其中 A:由 BMC 得到的大鼠 iPS 细胞 SSEA-1 染色结果, B:由 PEF 得到的大鼠 iPS 细胞 SSEA-1 染色结果, C:由 BMC 得到的大鼠 iPS 细胞 Nanog 染色结果, D:由 BMC 得到的大鼠 iPS 细胞 Nanog 染色结果,其中标尺代表 100 μ m。

[0032] 图8是 Realtime PCR 检测大鼠 iPS 细胞内外源基因表达水平,从上到下依次是: Oct4, Nanog, Sox2。

[0033] 图9是大鼠 iPS 细胞重亚硫酸盐基因组测序分析结果,从上到下依次是:大鼠耳尖成纤维细胞,大鼠骨髓细胞, M13 号 iPS 细胞, F65 号 iPS 细胞。

[0034] 图10是大鼠 iPS 细胞端粒酶活性检测,从左到右泳道依次是:大鼠骨髓细胞,大鼠耳尖成纤维细胞, M13 号 iPS 细胞, F65 号 iPS 细胞, 阳性对照细胞, 热失活阳性对照细胞, 裂解液;其中 - 表示未进行热失活, + 表示热失活。

[0035] 图11是 Realtime PCR 检测大鼠 iPS 细胞在体外向三个胚层的分化能力,从左到右泳道依次是:大鼠骨髓细胞,大鼠耳尖成纤维细胞, M13 号 iPS 细胞, F65 号 iPS 细胞, M13 号 iPS 细胞分化后的细胞, F65 号 iPS 细胞分化后的细胞, 大鼠胚胎细胞, 阴性对照。

[0036] 图12是大鼠 iPS 细胞畸胎瘤形成情况,其中 A:神经上皮(外胚层) B:软骨(中胚层) C:肠样上皮(内胚层)。

具体实施方式

[0037] 以下结合具体实施例,对本发明作进一步说明。应理解,以下实施例仅用于说明本发明而非用于限定本发明的范围。

[0038] 以下实施例中,用到的培养基有:

[0039] 大鼠原代骨髓细胞的培养基,具体组成为:90%的 α -MEM 培养液(购自 Invitrogen, 12571);10%的胎牛血清(购自 HyClone, SH30396.03)。

[0040] 大鼠原代耳尖成纤维细胞在原代培养时的培养基,具体组成为:69%的 D-MEM 培养液(购自 Invitrogen, 11965);30%的胎牛血清(购自 HyClone, SH30396.03);1mM L-谷氨酸(购自 Invitrogen, 25030);1%的非必须氨基酸(购自 Invitrogen, 11140050)。

[0041] 大鼠原代耳尖成纤维细胞传代后的培养基,具体组成为:89%的 D-MEM 培养液(购自 Invitrogen, 11965);10%的胎牛血清(购自 HyClone, SH30396.03);1mM L-谷氨酸(购

自 Invitrogen, 25030) ;1% 的非必须氨基酸 (购自 Invitrogen, 11140050) 。

[0042] 大鼠 iPS 细胞的培养基, 具体组成为 :79% 的 Knockout D-MEM/F12 培养液 (购自 Invitrogen, 12660) ;10% 的胎牛血清 (购自 HyClone, SH30396. 03) ;10% 的 Knockout SR (购自 Invitrogen, 10828) ;1mM L- 谷氨酸 (购自 Invitrogen, 25030) ;1% 的非必须氨基酸 (购自 Invitrogen, 11140050) ;0.1mM β - 巯基乙醇 (购自 Sigma, M7522) 。

[0043] 以下实施例中所使用的慢病毒载体 LV-ef1 α -IRES-EGFP 购自 Invitrogen 公司, 其结构如图 1 所示, 具有氨苄抗性。

[0044] 以下实施例中, 通用的细胞培养产品均购自 Invitrogen 公司。

[0045] 实施例 1、慢病毒载体的构建

[0046] 1.1、从 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 查询干细胞中特异表达或高表达的特定基因 (Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4, Lin28, Nanog) 的编码区, 根据编码区序列设计引物, 并引入酶切位点, 引物序列如表 1 所示 (其中 F 表示正向引物, R 表示反向引物) 。

[0047] 表 1

[0048]

基因名称	GenBank 序列号	引物名称	引物序列	对应的酶
Lin28	NP_078950	1F	ggggGGATCCgccaccatgggctccgtgtccaaccag	BamHI
		1R	gcgcGCTAGCtcaattctgtgcctccgggag	NheI
c-Myc	NP_002458	2F	ggggGGATCCgccaccatgccctcaacgttagcttca	BamHI
		2R	gcgcGCTAGCttacgcacaagagttccgtagc	NheI
Klf4	NP_004226	3F	ggggGGATCCgccaccatgaggcagccacctggcgag	BamHI
		3R	gcgcGCTAGCttaaaaatgcctcttcatgtg	NheI
Nanog	NP_079141	4F	ggggAGATCTgccaccatgagtgtggatccagcttgc	BglII
		4R	gcgcGCTAGCtcacacgtcttcaggttgcag	NheI
Oct4 (又称 Oct3, Pou5F1)	NM_002701	5F	ggggGGATCCgccaccatggcgggacacctggcttc	BamHI
		5R	gcgcGCTAGCtcagtttgaatgcatgggag	NheI
Sox2	NP_003097	6F	ggggGGATCCgccaccatgtacaacatgatggagacgg	BamHI
		6R	gcgcGCTAGCtcacatgtgtgagaggggcag	NheI

[0049] 注 :引物序列中大写的字母为引入的酶切位点。

[0050] 1.2、PCR 扩增

[0051] 以人类总 cDNA 为模板, 利用表 1 中各基因引物进行 PCR 扩增, 具体如下 :

[0052] 反应体系 (25 μ l) :10 $\times$ pfx Mix 2.5 μ l, AccuPrime pfx 酶 0.2 μ l, 上下游引物 (50 μ M) 各 0.25 μ l, 模板 0.25 μ l, ddH₂O 21.55 μ l。

[0053] 反应条件 :95 $^{\circ}$ C 2min ;95 $^{\circ}$ C 20sec, 66 $^{\circ}$ C 20sec, 68 $^{\circ}$ C 30sec, 循环 35 次 ;68 $^{\circ}$ C 10min。

[0054] 1.3、慢病毒载体的构建

[0055] 将所得 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,使用天根公司的通用型 DNA 纯化回收试剂盒(离心柱型)回收各基因片段,分别利用各自酶切位点双酶切,用相应的酶双酶切慢病毒载体 LV-ef1 α -IRES-EGFP,得到慢病毒载体的骨架片段,将慢病毒载体的骨架片段和各基因片段用 T4DNA 连接酶(Fermentas 公司)于 22℃连接 3h。

[0056] 将连接产物转化 GBE180 感受态细菌(制备方法见 [http://www.chem.uga.edu/scottgrp/GrpProtocols/Competent cell preparation.htm](http://www.chem.uga.edu/scottgrp/GrpProtocols/Competent%20cell%20preparation.htm)),在琼脂平板上(含氨苄抗生素),于 37℃培养 12 小时,从平板上挑取阳性单菌落,使用博大泰克 B 型质粒小量快速提取试剂盒提取质粒,经测序鉴定为正确方可使用,将所得载体分别命名为 LV-ef1 α -Oct4-IRES-EGFP、LV-ef1 α -Sox2-IRES-EGFP、LV-ef1 α -c-Myc-IRES-EGFP、LV-ef1 α -Klf4-IRES-EGFP、LV-ef1 α -Lin28-IRES-EGFP、LV-ef1 α -Nanog-IRES-EGFP。

[0057] 实施例 2、细胞培养

[0058] 2.1、大鼠原代骨髓细胞(BMC)的培养

[0059] 取 6 周 SD 雄性大鼠的大腿股骨和胫骨,浸泡于 75%酒精中 10min,使用含双抗(青霉素、链霉素)的 PBS 冲洗三次,剪开骨两端,用含 10%胎牛血清(FBS)的 α -MEM 培养基的无菌注射器冲骨髓至 15mL 无菌离心管中,1200rpm 离心 5min,使用上述培养基重悬细胞一次,再次 1200rpm 离心 5min,培养基再次重悬后将细胞移入培养瓶中。三天后换液,可见微小克隆,约一周后按 1 比 3 传代,传代时使用 PBS 清洗细胞 2 次,37℃下 0.25%胰酶消化 5min,大鼠原代骨髓细胞(BMC)在前四代能保持较好状态。

[0060] 2.2、大鼠原代耳尖成纤维细胞(PEF)的培养

[0061] 取大鼠耳朵,75%酒精清洗后剃毛,浸泡于含双抗(青霉素、链霉素)的 PBS 中 15min,再依次使用 PBS,无血清培养基(D-MEM)清洗耳朵数次,然后将耳朵浸泡于少量含 30% FBS 的 D-MEM 中,同时使用无菌剪刀将其剪成小块,移至培养瓶中,小块之间保持较小的距离,培养瓶倒置。6-8 小时后,补加含 30% FBS 的 D-MEM,正置,此后每天补加少量该培养基,一般 3、4 天后可明显观察到成纤维细胞,约一周后传代,传代时使用 PBS 清洗细胞 2 次,37℃下 0.25%胰酶消化 5min,以 10% FBS 的 D-MEM 终止反应吹打。首次传代按 1 比 1 或 2 传(视细胞量而定),此后每 3 至 4 天传代,按 1 比 3 或 4 传,大鼠原代耳尖成纤维细胞(PEF)传 10 代以上依然有较好的增殖能力。

[0062] 2.3、其它细胞的培养

[0063] 293T 细胞(购自中科院上海生命科学研究院生化细胞所细胞库)的培养:传代时 37℃下 0.25%胰酶消化 5min,使用 10% FBS 的 D-MEM 终止反应,吹打后按 1 比 8~10 传代。

[0064] 小鼠胚胎成纤维(MEF)细胞根据文献(Thomson JA., Itskovitz-Eldor J., Shapiro SS., et al. Science. Nov 6 1998;282(5391):1145-1147 及 Xu, C., et al. Nat Biotechnol. 2001,19(10):971-4)的方法制备,作为滋养层细胞铺于平板备用。

[0065] 实施例 3、病毒包装

[0066] 3.1、包装质粒的扩增

[0067] 将实施例 1 中得到的六种鉴定正确的载体转化感受态细菌以进行扩增,经 AxygenAxyPrep™ plasmid Maxiprep Kit 试剂盒(Axygen 公司)中抽后,在超净工作台

中进行纯化,即用中抽后质粒的十分之一体积的 3M NaAC 和 2 倍体积的无水乙醇混匀后,13000rpm 离心 15min,去上清,使用 75%乙醇漂洗,吸去上清,于超净工作台中吹干后,使用无菌去离子蒸馏水溶解质粒,最后使用分光光度计及凝胶电泳确定质粒的浓度。

[0068] 3.2、转染

[0069] 按照 Invitrogen 公司转染试剂盒 (ViraPower™ Lentiviral Expression Systems) 的说明书,使用转染试剂 Lipofectamine™ 2000 将步骤 3.1 中的六个慢病毒质粒分别与包装质粒 ViraPower™ Packaging Mix (Invitrogen 公司) 共同转染 293T 细胞。

[0070] 具体步骤为:转染实验前一天铺 293T 细胞,使第二天细胞可生长至 90%满,对于一个 T75 瓶,取 9 μ g ViraPower™ Packaging Mix 和 3 μ g 病毒质粒于 1.5mL opti-MEM 中,轻轻混匀,另取已摇匀的 Lipofectamine™ 2000 转染试剂 36 μ l 于另一份 1.5mL opti-MEM 中,轻轻混匀后,室温放置 5min,将上述两份分别含 DNA 和转染试剂的 opti-MEM 轻轻混匀,室温放置 20min 后将上述混合液至于 293T 细胞 90%满的 T75 培养瓶中。按相同的方法转染其它五种慢病毒质粒。

[0071] 3.3、病毒滴度测定

[0072] 将步骤 3.2 中转染获得的六种病毒分别在 24h 内更换培养基,此后收集转染 48h,72h 和 96h 的病毒上清,一般无需进行病毒浓缩,而直接取 5 μ l 和 1 μ l 上述六种病毒,分别于 24 孔板中悬浮感染 15 万 293T 细胞,同时加入 polybrene,由感染 48h 后六种病毒感染的 293T 细胞的 GFP 情况来确定病毒滴度,可由视野中 GFP 阳性细胞所占比例估算 15 万细胞中 GFP 阳性总细胞数,继而获知单位体积病毒上清中的病毒颗粒数,即为相应病毒的滴度。

[0073] 实施例 4、病毒感染

[0074] 将实施例 3 包装的慢病毒,以 MOI 50 感染 5×10^4 个大鼠原代耳尖成纤维细胞 (PEF) 和大鼠原代骨髓细胞 (BMC) 两种细胞,所用病毒的滴度约为 $5 \sim 8 \times 10^6$ IU/mL,

[0075] 实验分为 3 组:

[0076] a) 空白对照组:仅携带有绿色荧光蛋白 (GFP) 的慢病毒;

[0077] b) 实验组 1:包含 4 种因子的第一种慢病毒组合,Oct4, Sox2, Nanog 和 Lin28;

[0078] c) 实验组 2:包含 4 种因子的第二种慢病毒组合,Oct4, Sox2, c-Myc 和 Klf4。

[0079] 每组实验均有 6 个平行样,其中 3 个用于碱性磷酸酶 (AP) 染色,统计阳性克隆数,另 3 个样用于克隆挑选。

[0080] 感染 48 小时后,将上述细胞用 0.25%胰酶,37℃下消化 5min,计数后传代转移至铺好小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 的 6 孔板中,传代后 24h 内改用人胚胎干细胞 (ES) 培养基,隔天换液,待出现克隆后每天换液。

[0081] 实施例 5、转染后阳性细胞的筛选

[0082] 5.1、感染细胞的荧光镜检及碱性磷酸酶 (AP) 染色

[0083] 用荧光显微镜观察实施例 4 感染后的细胞,发现感染后 48 小时有绿色荧光表达。传代后 24 小时空白对照组中没有克隆形成,实验组 1 也没有克隆形成,实验组 2 传代后 2-3 天细胞形态发生改变,呈圆形和明显的细胞聚集,克隆出现在传代后 4-6 天,实验组 2 显微镜观察的结果如图 2 所示,其形态主要有两种,一类是小鼠胚胎干细胞类 (mES-like) 克隆,其细胞致密,克隆表面光滑,边缘平滑,边界清晰光亮 (见转染 PEF 所得图 2A、2B,转染 BMC 细胞所得图 2C、2D);另一类克隆中部明显突起,细胞相对松散,边缘不够平滑,边界相对模

糊(图 2E、2F),为非 ES-like 克隆。

[0084] 感染第 12 天对 3 组实验下 6 个平行样中的三个进行碱性磷酸酶(AP)染色,统计阳性克隆数,结果如图 3 所示,由图 3 可知,空白对照组和实验组 1 没有克隆形成,实验组 2(慢病毒组合 Oct4、Sox2、c-Myc、Klf4)克隆基本都显示较弱的 AP 阳性,5×10⁴ 个大鼠 BMC 和 PEF 传代后分别形成 10±8 个和 21±8 个 AP 阳性的 iPS 细胞集落。

[0085] 由以上结果可知,转入特定的因子可以使已经分化的大鼠成体细胞重编程形成类似胚胎干细胞(ES-like)的克隆(iPS 细胞集落),感染 PEF 比感染 BMC 产生的克隆多 1 倍左右。

[0086] 5.2、阳性细胞的筛选

[0087] 在感染后 12 天随机挑选克隆,使用 0.25%胰酶 37℃下消化 5min,吹打为单细胞后,用含 10% SR(血清替代物)+10% FBS 的 D-MEM 的 Knock D-MEM/F12 培养液终止反应,此后每天更换该培养基,此时细胞增殖很快,每三天可传一代,每三天按 1:3~50 传代(视克隆总数而定)至辐照过的滋养层细胞 MEF 上,此后不断进行克隆挑选和 AP 检测。

[0088] 大鼠 iPS 细胞经 5、6 次传代后,经 AP 检测发现阳性率明显提升。大鼠 iPS 细胞经多次挑克隆和传代后的细胞形态镜检结果如图 4 所示,由图 4 可以看出,经多次克隆挑选传代后,其克隆形态和挑克隆前第一类(图 2A、2B)的接近。

[0089] 由以上结果可知,大鼠 iPS 细胞经多次挑克隆和传代,其形态逐渐类似于胚胎干细胞。

[0090] 实施例 6、干细胞特性检测

[0091] 取传至 15 代的小鼠成纤维细胞形成的克隆 F65 和转染骨髓细胞形成的克隆 M13 进行以下大鼠 iPS 细胞检测,以证明其具备干细胞特性。

[0092] 6.1、碱性磷酸酶表达

[0093] 使用 Chemicon Alkaline Phosphatase Detection Kit(Millipore 公司)进行染色,具体步骤如下:

[0094] 使用 PBS 清洗细胞两次,4% PFA(多聚甲醛)室温固定 1-2min,TBST 清洗一遍,AP 染料(按试剂盒中注明的配制)避光染色 15min,TBST 再清洗一遍后使细胞浸泡于 PBS 中。显微镜检测,结果如图 5 所示。

[0095] 由图 5 可以看出,细胞被染成紫红色,而紫红色表示细胞具有碱性磷酸酶活性,从而说明反复挑克隆后的大鼠 iPS 细胞具有很强的碱性磷酸酶活性,进一步地说形成的大鼠 iPS 克隆具有胚胎干细胞特性,即表达碱性磷酸酶。

[0096] 6.2、大鼠 iPS 细胞的未分化状态检测

[0097] 用 realtime PCR 方法检测大鼠 iPS 细胞与诱导前细胞大鼠 BMC 及 PEF 进行对比,分析其未分化基因表达水平。

[0098] 6.2.1、引物设计

[0099] 由于未分化的细胞会特异性表达以下基因,包括 Oct4、Sox2、Nanog、Nodal、Fgf4、Gal、Lefty、Lin28、Gabra,所以可通过检测这些基因的表达情况得知所获得的大鼠 iPS 细胞的未分化状态。未分化 marker 引物序列设计如表 2 所示,引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成(其中 f 表示正向引物,r 表示反向引物)。

[0100] 表 2

[0101]

基因名称	引物序列
Oct43' UTR-f	CGAGGCCTTTCCCTCTGTTCCCT
Oct43' UTR-r	TCTCTTTGTCTACCTCCCTTCCTTGC
Sox23' UTR-f	GGCCATTAACGGCACACTGCC
Sox23' UTR-r	TTACTCTCCTCTTTTGCACCCCTCC
Nanog-f	ACCTACCTCTTCAAGATAGCCCTG
Nanog-r	ACCTTTGCCTCTGAAACCTATCCT
Nodal-f	GAGCGTGTTTGGATGGAGAGG
Nodal-r	ATGCCAACACTTTCCTGCTTGAC
Fgf4-f	GTGTGCCTTTCTTTACCGACGAGTG
Fgf4-r	GGAAGTGGGTTACCTTCATGGTCG
Gal-f	TGGAAGTGGAGGAAGGGAGACTAGG
Gal-r	GGGATGCCAGGCAGGCTGTC
Leftyb-f	TGACCATCAGGTGGCCATTTCTG
Leftyb-r	TGTTGGGCAGGCTGACCACTTG
Lin283' UTR-f	CGGGAGGAGGAAGAAGAGATCCAC
Lin283' UTR-r	CCACTCTGCGGATTGATGCCTC
Gabrb-f	AATCAACCGGGTGGATGCTC
Gabrb-r	GTGCGGGATGCTTCTGTCTC

[0102] 6.2.2、PCR 扩增

[0103] 使用 Toyobo Syber green PCR Mix, 反应体系 (15 μ l): 模板 0.3 μ l, 引物 (5 μ M) 1 μ l, Syber green Mix 7.5 μ l, ddH₂O 6.2 μ l, 其中模板为抽提 iPS 细胞的 RNA 反

转得到的 cDNA。

[0104] 反应条件 :94℃,5min ;94℃ 15sec,66℃ 10sec,72℃ 15sec,循环 40 次 ;72℃,10min。

[0105] 将所得 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,结果如图 6 所示,其中阳性对照的模板取自大鼠胚胎细胞 RNA 反转得到的 cDNA,阴性对照的模板为未进行反转的 RNA。

[0106] 由图 6 的结果可知,大鼠 iPS 细胞 (F65、M13) 与诱导前的大鼠 BMC 及 PEF 相比,其干细胞相关的 marker,即 Oct4, Sox2, Nanog, Nodal, Fgf4, Gal, Lefty, Lin28, Gata3 均有高水平的表达。

[0107] 6.2.3、通过免疫荧光染色检测胚胎干细胞未分化相关 marker 是否表达 (包括 SSEA-1 和 Nanog)

[0108] 使用 PBS 清洗细胞两次,4% PFA 室温固定 30min, PBS 洗三次,再用含 0.2% BSA+0.1% Triton-100 的 PBS 洗两次,接着使用含 1% BSA+4% normal serum+0.1% Triton-100 的 PBS 封闭细胞 1h,再将一抗 (SSEA-1 和 Nanog) 稀释在含 0.2% BSA+0.1% Triton-100 的 PBS 中,然后加到样品上,室温 2h 或 4℃ 过夜,然后用 PBS (0.1% Triton-100 的 PBS) 洗涤细胞 3-5 次,将二抗 (anti-mouse IgM 和 anti-rabbit IgG) 稀释在含 0.2% BSA+0.1% Triton-100 的 PBS 中,然后加到样品上,室温 1h,再用 PBS 洗三次,将 Hoechst 母液以 1 : 1000 用 PBS 稀释,室温避光放置 5min,然后 PBS 洗涤两次,每次 5min,再用 4% PFA 室温固定 30min,最后用 PBS 洗涤两次,每次 5min。免疫荧光染色结果如图 7 所示。

[0109] 由图 7 可以看出,荧光镜检测到大鼠 iPS 细胞表达干细胞相关 marker SSEA-1 和 Nanog,说明大鼠 iPS 克隆持续传代后,仍能自我更新,维持未分化的状态,具有胚胎干细胞能自我更新的特性。

[0110] 6.3、大鼠 iPS 细胞内外源基因表达水平检测

[0111] 6.3.1、引物设计

[0112] 由于使用人源的基因诱导大鼠 BMC 及 PEF 重编程为大鼠 iPS 细胞,因此使用人源的引物检测外源基因的表达情况,使用大鼠基因检测大鼠 iPS 细胞内源基因的表达情况,引物序列如表 3 所示,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成 (其中 f 表示正向引物, r 表示反向引物)。

[0113] 表 3

[0114]

	基因名称	引物序列
内源基因	Oct4 3'UTR-f	CGAGGCCTTTCCCTCTGTTTCCT
	Oct4 3'UTR-r	TCTCTTTGTCTACCTCCCTTCCTTGC
	Sox2 3'UTR-f	GGCCATTAACGGCACACTGCC
	Sox2 3'UTR-r	TTACTCTCCTCTTTTGCACCCCTCC
	Nanog-f	ACCTACCTCTTCAAGATAGCCCTG
	Nanog-r	ACCTTTGCCTCTGAAACCTATCCT
外源基因	Oct4 3'UTR-f	AGAAGGATGTGGTCCGAGTGTG
	Oct4 3'UTR-r	CAGAGTGGTGACAGAGACAGGG
	Sox2-f	TCTTGGCTCCATGGGTTCGG
	Sox2-r	AGTGCTGGGACATGTGAAGTCTG
	Nanog-f	GCTGAGATGCCTCACACGGA
	Nanog-r	GGTCTTCACCTGTTTGTAGCTGAG

[0115] 6.3.2、PCR 扩增

[0116] 使用 Toyobo Syber green PCR Mix 反应体系 (15 μ l) : 模板 0.3 μ l, 引物 (5 μ M) 1 μ l, Sybergreen Mix 7.5 μ l, ddH₂O 6.2 μ l, 其中模板为抽提 iPS 细胞的 RNA 反转得到的 cDNA。

[0117] 反应条件 : 94 $^{\circ}$ C, 5min ; 94 $^{\circ}$ C 15sec, 66 $^{\circ}$ C 10sec, 72 $^{\circ}$ C 15sec, 循环 40 次 ; 72 $^{\circ}$ C, 10min。

[0118] 根据定量 PCR 原理, 利用绝对定量, 未知样品的量 (拷贝数) 可以通过从已知量的标准品的范围中推算得出。为了建立标准曲线, 需要已知浓度的模板 (模板即质粒载体 Lv-ef1 α -Oct4-IRES-EGFP, Lv-ef1 α -Sox2-IRES-EGFP, Lv-ef1 α -Nanog-IRES-EGFP)。模板稀释后, 用这些稀释样品作为标准样品, 将未知的待测样本和标准样本置于同一次实验中进行反应, 用稀释的样品标准样品构建标准曲线, 通过计算来确定未知样品中目的基因的量。

[0119] 标准品基因 PCR 的 ct 值与起始量 (拷贝数) 的对数呈线性关系, 据此可作一条 ct 值对 log (拷贝数) 的曲线, 得到线性相关得方程式, 样本基因的拷贝数可以通过对应的 ct 值利用方程式计算得出, 将结果绘制成图 8。

[0120] 由图 8 结果可知, 大鼠 iPS 细胞 M13 及 F65 的外源 Oct4 基因表达水平较内源 Oct4 表达水平高一倍以上。F65 外源 Sox2 基因已沉默, 仅表达内源 Sox2, M13 克隆仍有部分外源 Sox2 基因表达, M13 及 F65 均无外源 Nanog 表达。

[0121] 由以上结果可知, 得到的大鼠 iPS 细胞, 其内源的胚胎干细胞全能性相关 marker Oct4, Nanog, Sox2 均得到激活表达, 但仍有部分外源 Oct4 表达, M13 有外源 Sox2 表达。

[0122] 6.4、干细胞特异启动子去甲基化程度检测

[0123] 为检测得到的大鼠 iPS 细胞的 Oct4 基因的启动子区域是否被去甲基化, 先使用

Bisulphite 处理 DNA,具体步骤如下:

[0124] 取每份样品 DNA 210ng, 双蒸水稀释到 21 μ l, 每管加入新鲜配置的 2M 的 NaOH 4 μ l, 50 $^{\circ}$ C 反应 15min, 向该样品中加入 50 $^{\circ}$ C 的 50 μ l 2% 的低熔点琼脂糖 (该琼脂糖预先置于 100 $^{\circ}$ C 5min), 混匀后取 10 μ l 于预冷的 300 μ l 液体石蜡中, 冰上至少放置 30min, 使形成的 beads 坚硬。然后向 beads 中加入 500 μ l 新配的 2.5M 焦亚硫酸钠 (Sodiummetabisulphite) 摇匀, 使 beads 位于分层上, 离心甩一下, 然后 50 $^{\circ}$ C 避光反应 4h-12h (不超过 16-18h)。接着使用 1ml TE (pH8.0) 洗 3 次, 每次 10min, 0.5ml 0.2M NaOH 洗 2 次, 每次 15min, 再用 1ml TE, 每次 10min, 然后每管加 100 μ l TE, 4 $^{\circ}$ C 保存。

[0125] 在大鼠目的基因 (Oct4) Promoter 区富含 CpG 区域的上下游设计引物, 将各富含 CpG 区的 PCR 产物连接至 T 载体上, 转化后抽提质粒酶切鉴定送测序, 其中的 CG 区即为甲基化位点, 而 TG 区为未甲基化位点, 绘制图谱 (Analysis of DNA methylation using bisulphate sequencing, contributed by Dr. Alexei Gratchev), 结果见图 9。

[0126] 由图 9 的结果可见, 诱导前的大鼠 BMC 及 PEF 细胞, 其 Oct4 基因的启动子区域被高度甲基化, 而诱导重编程得到的大鼠 iPS 细胞的 Oct4 基因的启动子区域被高度去甲基化, 诱导后的细胞大鼠 BMC 及 PEF 细胞得到有效的重编程。

[0127] 6.5、端粒酶活性检测

[0128] 按照试剂盒 TRAPEZER Telomerase Detection Kit (Chemicon 公司) 中的操作步骤, 经过提取端粒酶、端粒酶延伸反应和 PCR 扩增反应, 上样于 PAGE 胶上染色照相。

[0129] 具体步骤为: 收集 100 万大鼠 iPS 细胞以及阳性对照细胞 (肿瘤细胞或干细胞), PBS 洗一次, 使用含 150U/mL RNase inhibitor 的 1 $\times$ CHAPS Lysis Buffer, 冰上裂解 30min, 12000rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 20min, 收集上清, 使用 Lysis Buffer 适当稀释后取少量 85 $^{\circ}$ C 热处理, 分别取热处理和非热处理的上述裂解液, 按照试剂盒中所说进行端粒酶延伸反应和 PCR 扩增反应。然后上样于 12.5% 的非变性 PAGE 胶上, 缓冲液为 0.5 $\times$ TBE, 使用 EB 按 1 μ g/mL 染色 30min, 之后用去离子水洗脱 10-20min, 凝胶电泳成像的结果如图 10 所示。

[0130] 由图 10 可知大鼠 iPS 细胞如 M13, F65 与大鼠 BMC 及 PEF 细胞相比具有较高端粒酶活性, 且热失活情况下细胞端粒酶失活, 说明该活性为 RNA 特异性依赖的端粒酶活性。

[0131] 6.6、拟胚体向三个胚层及滋养层的分化潜能 (大鼠 iPS 细胞体外分化能力)

[0132] 为了验证大鼠 iPS 细胞的多能性, 使之自然分化形成胚状体 (EB), 使用相对定量 PCR 的方法, 即在确保看家基因 Gapdh 表达水平基本一致的情况下, 比较各个样品, 其三个胚层不同标记基因的表达水平间的差异。

[0133] 将所得 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 结果如图 11 所示。由图 11 的结果可知, 大鼠 iPS 细胞能够表达外胚层 NCAM、PAX6, 中胚层 SM22-a、Myod 和内胚层 Sox17、AFP 的分化基因, 证明大鼠 iPS 细胞能够分化形成胚状体中所有三个胚层。

[0134] 以上结果证明形成的克隆多具有胚胎干细胞的特性, 具有体外分化成不同的组织细胞的潜能。

[0135] 6.6、畸胎瘤形成的检测

[0136] 为了验证得到的克隆在体内具有多组织的分化能力, 用畸胎瘤石蜡切片, 苏木精-伊红 (HE) 染色显示三个胚层组织细胞。

[0137] 6.6.1、畸胎瘤形成

[0138] 将 F65 号 iPS 细胞用 0.25% 胰酶消化为单细胞, 将其铺于用于细胞培养的培养皿中, 置于 37℃ 培养箱静置 45min, 取上层未贴壁的细胞 (feeder 贴壁快, 故可将 feeder 与 iPS 细胞分离)。计数, 500 万 iPS 细胞悬浮于 300 μ l 10% D-MEM 中, 对先天性免疫缺陷小鼠 NOD-SCID 小鼠进行后腿肌肉注射。第 20 天观察到有瘤形成, 于第 25-30 天将其取出。

[0139] 6.6.2、石蜡切片及 HE 染色

[0140] 畸胎瘤石蜡切片制作步骤: 将畸胎瘤用 4% PFA 固定后, PBS 洗三次, 依次使用 30%、50%、70%、80%、90%、95%、100% 乙醇脱水 1h, 继续使用 100% 乙醇脱水 1h 后, 使用 100% 乙醇脱水过夜, 接着用氯仿处理 1h, 处理三次, 之后浸没于石蜡中 2h, 随后包埋, 5 μ m 切片。

[0141] HE 染色步骤: 将石蜡切片用二甲苯 (Xylene) 洗四次, 每次 5min (在脱色摇床上进行), 无水乙醇洗两次, 每次 10min, 95%、90%、80%、70% 乙醇依次洗 5min, 再用蒸馏水洗三次, 每次 5min, 苏木精染色 10min 后流水冲洗 15-30min 至适合的颜色, 接着再用蒸馏水洗 5min, 伊红 A 液染 1min, 伊红 B 液染 5min, 再用蒸馏水洗, 接着用 70% 乙醇涮洗, 90% 乙醇涮洗至适合颜色, 再用无水乙醇洗两次, 每次 10min, 最后用 Xylene 洗四次, 每次 5min 后封片。

[0142] 将玻片显微镜镜检, 结果如图 12 所示。由图 12 可以看到, 大鼠 iPS 细胞能够在体内分化形成三个胚层细胞, 包括, 内胚层的肠样上皮细胞, 中胚层的软骨组织以及外胚层的玫瑰状结样的神经上皮细胞。

[0143] 由以上结果进一步证明形成的克隆多具有胚胎干细胞的特性, 具有在体内分化成不同的组织细胞的潜能。

[0144] 综上所述, 本发明大鼠成体细胞重编程为类似胚胎干细胞的可诱导多能干细胞, 使用大鼠原代骨髓细胞 (BMC) 和原代耳尖成纤维细胞 (PEF), 已获得数株大鼠 iPS 细胞, 并由碱性磷酸酶表达、干细胞表面特异标记 (SSEA-1, Nanog), 干细胞特异启动子去甲基化程度、端粒酶活性、拟胚体向三个胚层及滋养层的分化潜能以及畸胎瘤形成, 确认其干细胞特性。

[0145] 本发明有助于确立大鼠 ES 细胞建系的最适培养条件和方法; 大鼠 iPS 细胞是大鼠基因打靶的良好载体, 大鼠 iPS 细胞将利于揭示大鼠各基因功能和复杂的发育事件; 此外, 本发明的大鼠 iPS 是继小鼠和人的 iPS 成功诱导后第一项其它物种的 iPS, 这对于其它模式动物 iPS 的诱导有着重大指导意义。

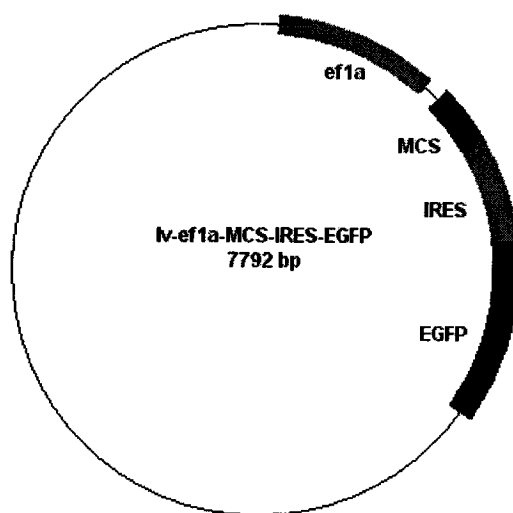


图 1

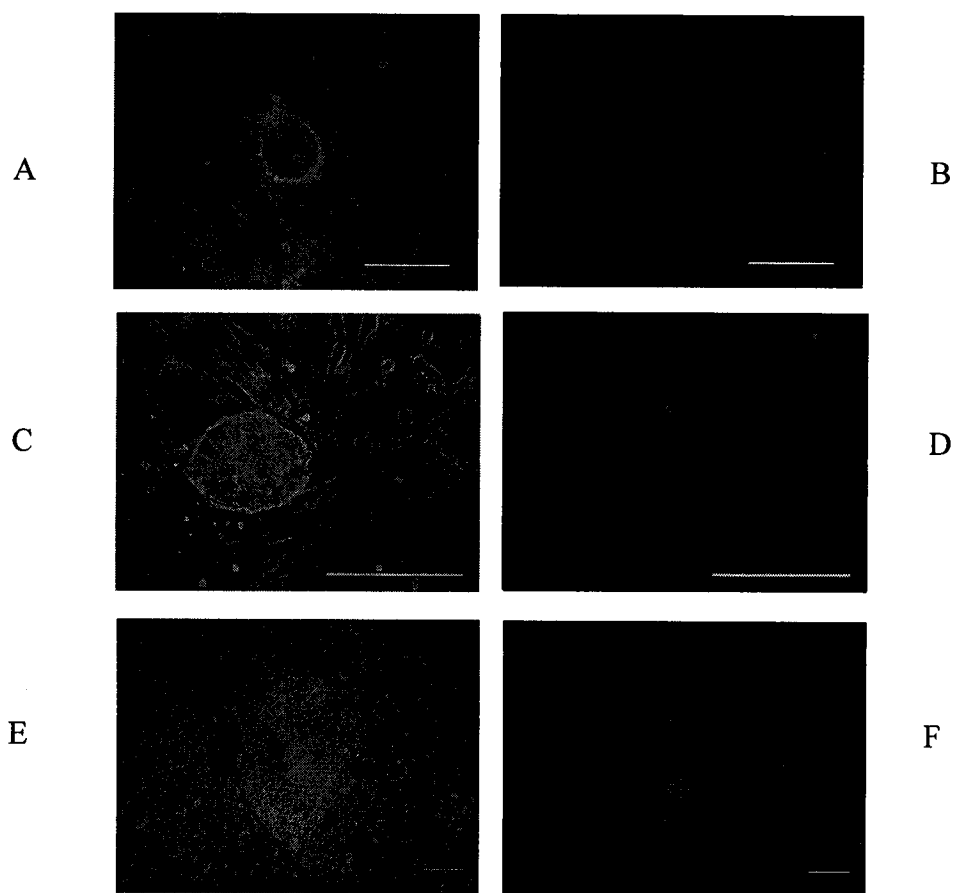


图 2

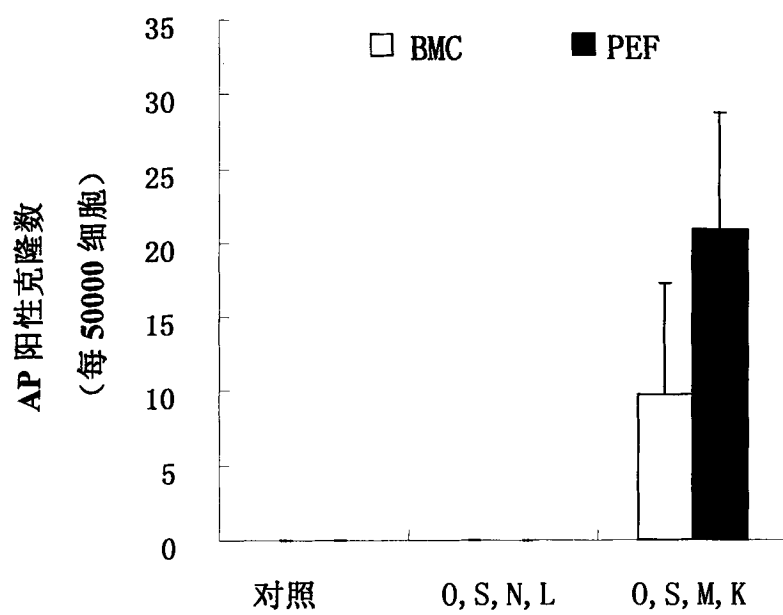


图 3

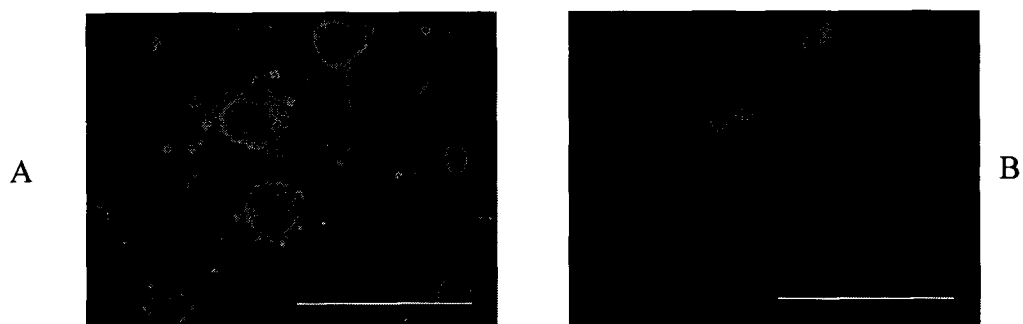


图 4

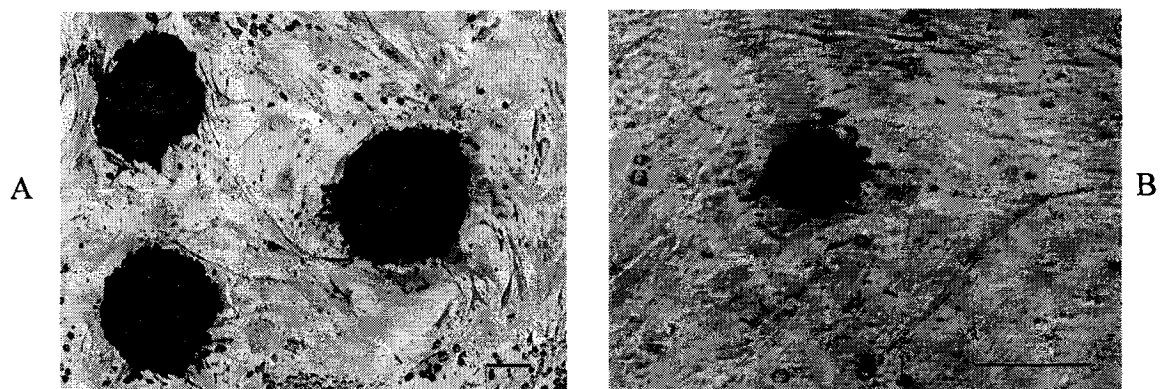


图 5

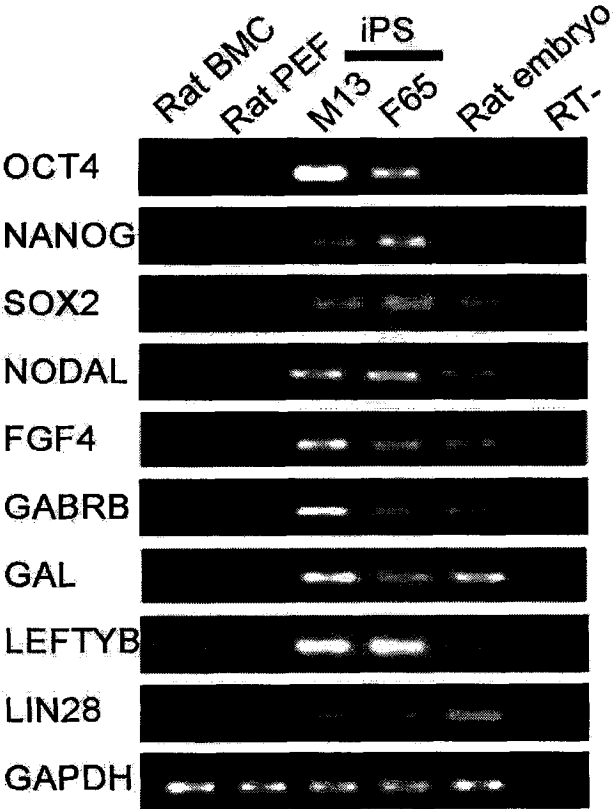


图 6

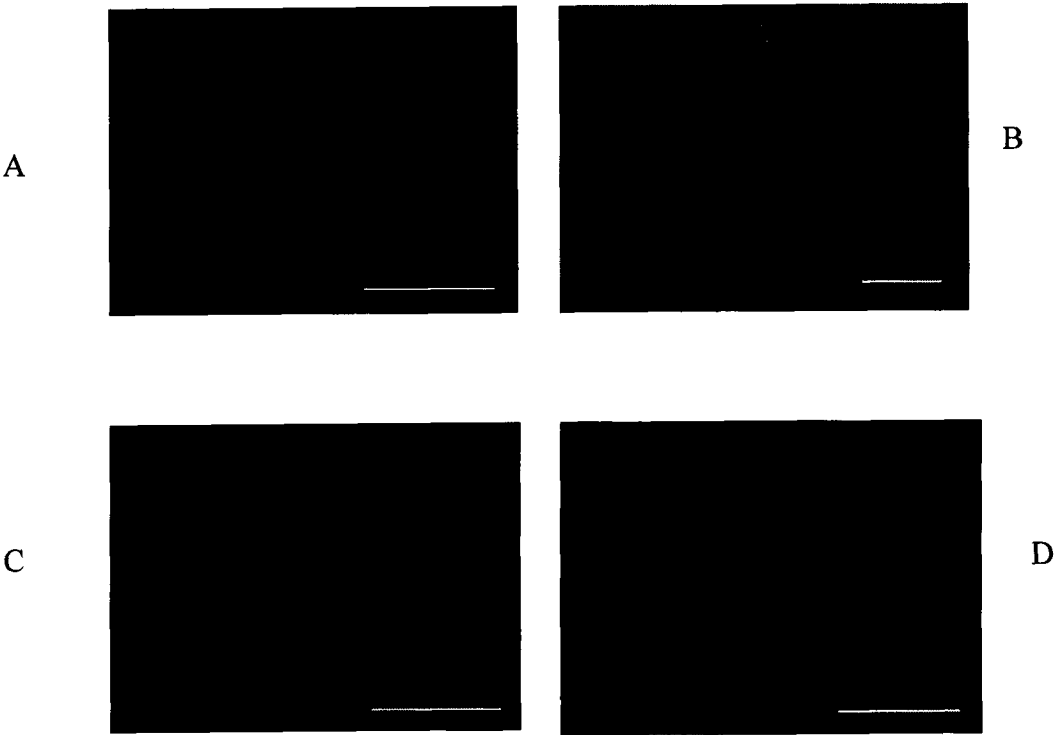


图 7

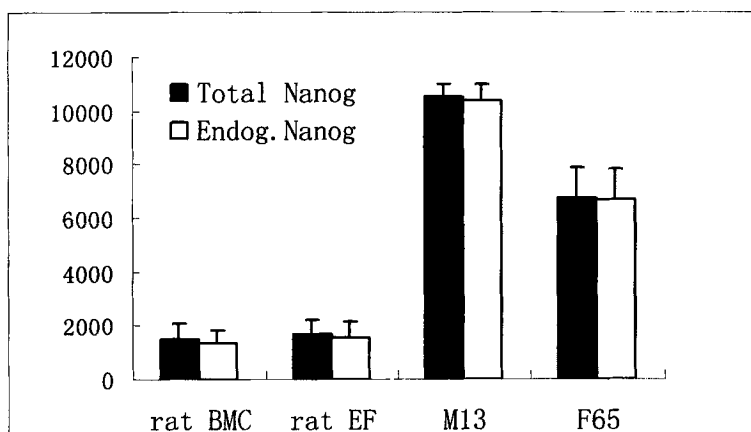
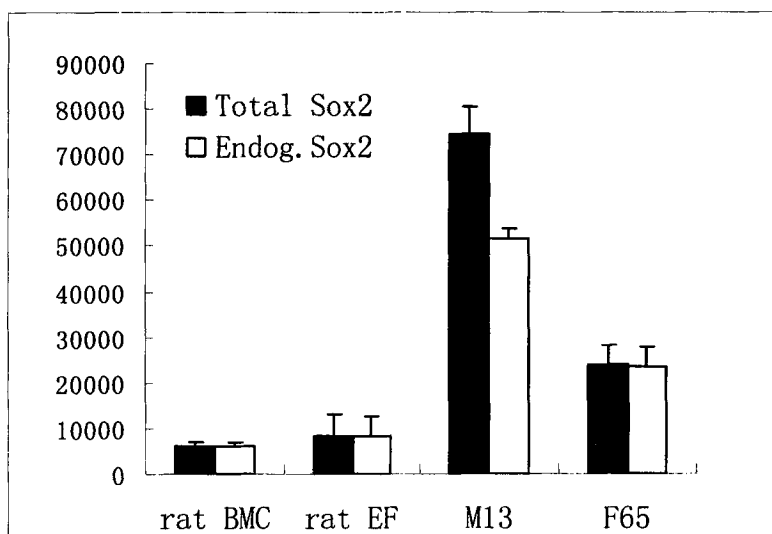
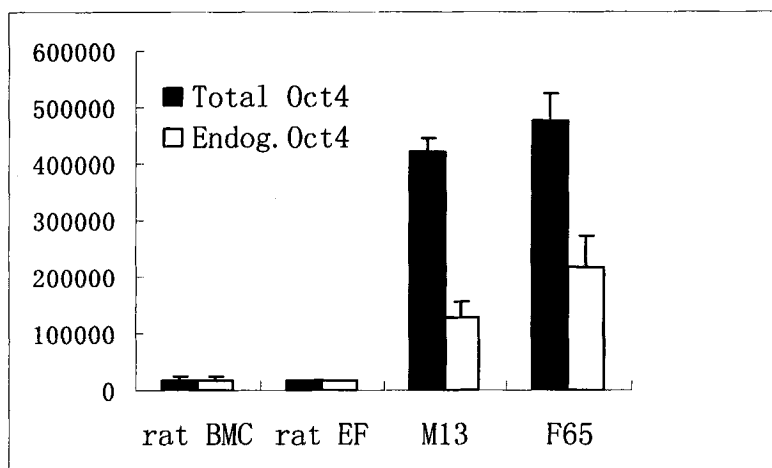


图 8

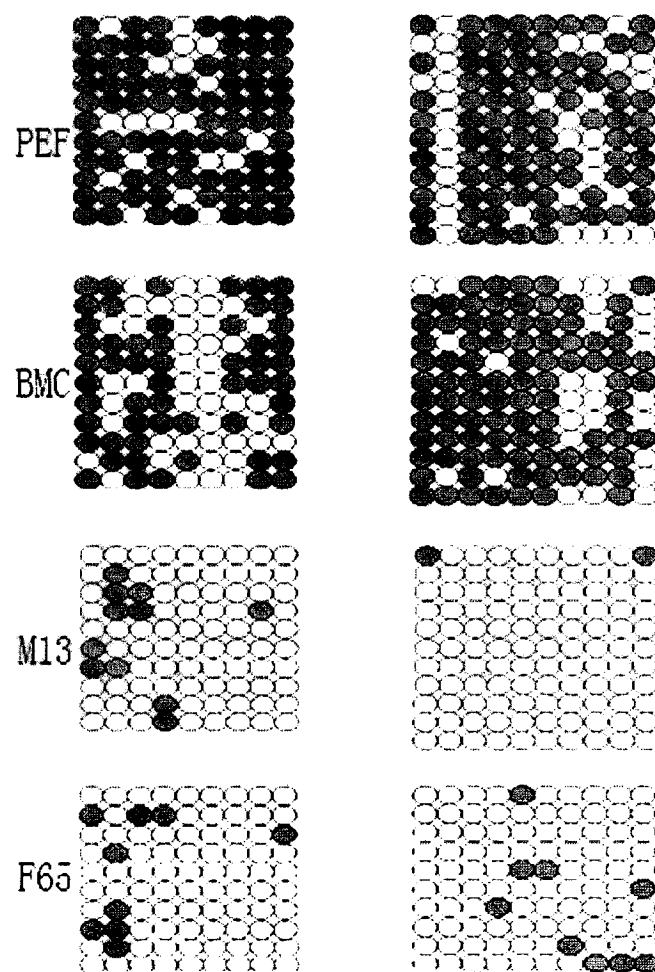


图 9

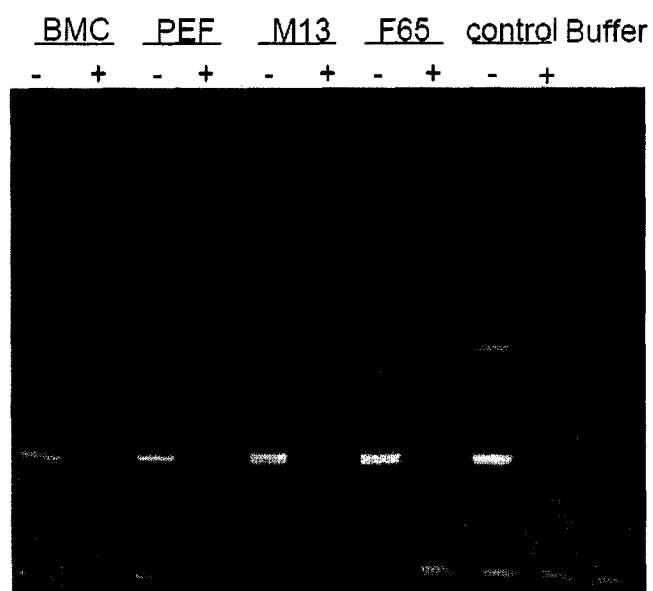


图 10

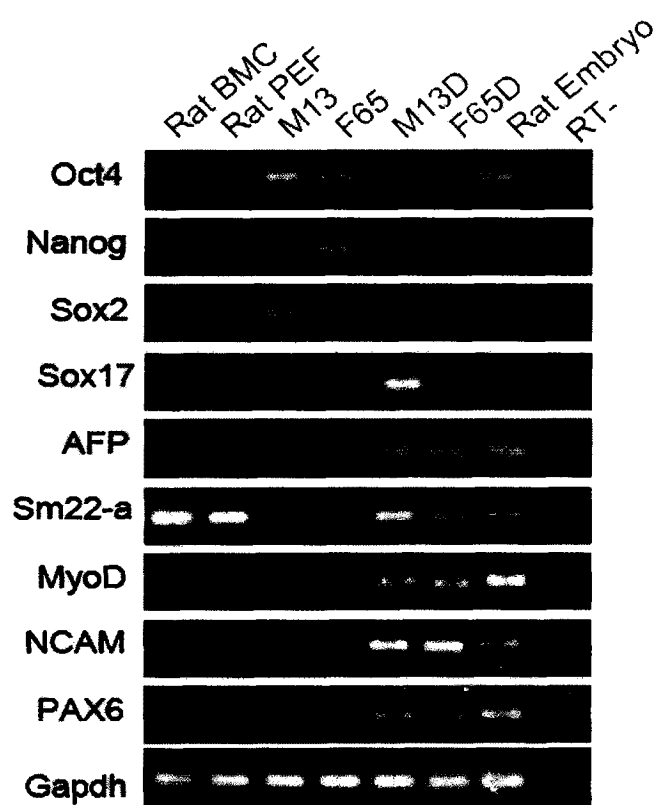


图 11

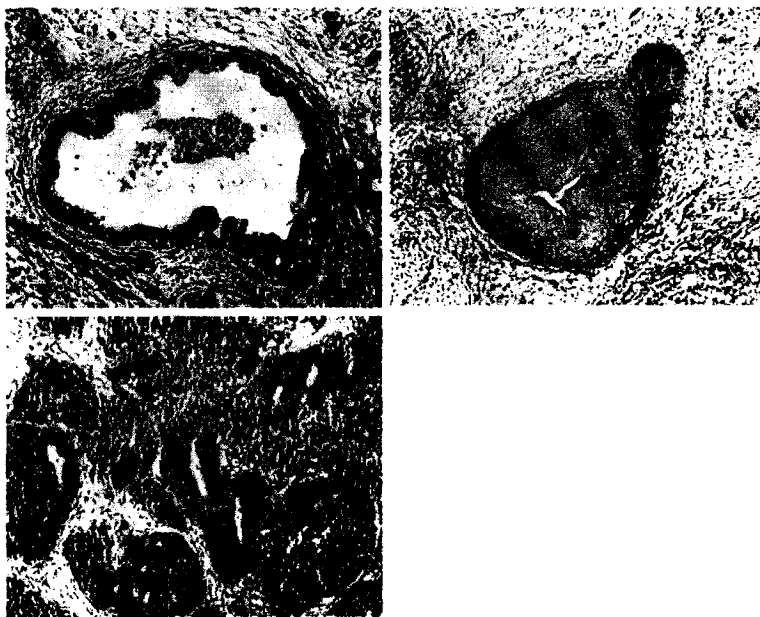


图 12

专利名称(译)	一种大鼠可诱导多能干细胞及其制备方法		
公开(公告)号	CN101748100A	公开(公告)日	2010-06-23
申请号	CN200810201352.8	申请日	2008-10-17
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
[标]发明人	肖磊 廖婧 陈思晔 崔春 陈霁君 任江涛		
发明人	肖磊 廖婧 陈思晔 崔春 陈霁君 任江涛		
IPC分类号	C12N5/10 C12Q1/68 C12Q1/42 C12Q1/25 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种大鼠可诱导多能干细胞及其制备方法，本发明的大鼠可诱导多能干细胞的制备方法包括步骤：A)构建携带转录因子的慢病毒载体，所述转录因子选自：Oct4、Sox2、c-Myc、Klf4，Lin28、Nanog；B)将步骤A)所得慢病毒载体以组合形式感染大鼠成体细胞，挑选形态类似胚胎干细胞的克隆传代培养，通过筛选符合胚胎干细胞特性的细胞克隆，得到大鼠iPS细胞。本发明有助于确立大鼠ES细胞建系的最适培养条件和方法；大鼠iPS细胞是大鼠基因打靶的良好载体，大鼠iPS细胞将利于揭示大鼠各基因功能和复杂的发育事件。

基因名称	GenBank 序列号	引物 名称	引物序列	对应的 酶
Lin28	NP_078950	1F	ggggGGATCCgccaccatgggtccgtgtccaaccag	BamHI
		1R	gcgcGCTAGCtcaattctgtgctccgggag	NheI
c-Myc	NP_002458	2F	ggggGGATCCgccaccatgccctcaacgttagcttca	BamHI
		2R	gcgcGCTAGCttacgcacnagagttccgtgac	NheI
Klf4	NP_004226	3F	ggggGGATCCgccaccatgagggcaccctggcgag	BamHI
		3R	gcgcGCTAGCttaaatagccttctcatgtg	NheI
Nanog	NP_079141	4F	ggggAGATCTgccaccatgagtgatccagcttgtc	BglII
		4R	gcgcGCTAGCtcacacgttccaggttgcag	NheI
Oct4 (又称 Oct3, Pou5F1)	NM_002701	5F	ggggGGATCCgccaccatggcgggacacctggcttc	BamHI
		5R	gcgcGCTAGCtcagtttgatgcatggggag	NheI
Sox2	NP_003097	6F	ggggGGATCCgccaccatgtacaacatgatggagacgg	BamHI
		6R	gcgcGCTAGCtcacatgtgtgagaggggcag	NheI