



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103992409 B

(45)授权公告日 2017.08.25

(21)申请号 201410158270.5

C12N 15/873(2010.01)

(22)申请日 2014.04.18

A01K 67/027(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103992409 A

(56)对比文件

US 8183342 B2,2012.05.22,

CN 102827873 A,2012.12.19,

(43)申请公布日 2014.08.20

Jose A.Gomez et al..Cell-Penetrating

(73)专利权人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

Penta-Peptides (CPP5s): Measurement of

Cell Entry and Protein-Transduction

(72)发明人 李宁 孙照霖 康倩倩 李秋艳

赵蕊 孙永川

Activity.《Pharmaceuticals (Basel)》.2010,

第3卷(第12期),3594-3613.

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

公司 11002

审查员 李翠莹

代理人 王文君

(51)Int.Cl.

G07K 19/00(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

序列表5页 附图2页

(54)发明名称

用于剔除标记基因的融合蛋白及其应用

(57)摘要

本发明涉及基因工程,具体公开了一种用于剔除标记基因的CPP5-Cre融合蛋白及其应用,所述CPP5-Cre融合蛋白包括短的5氨基酸细胞穿膜肽CPP5(KLPVM)和位点特异重组酶Cre蛋白。利用表达纯化后的CPP5-Cre融合蛋白与带有筛选标记基因的猪成纤维细胞孵育后,获得筛选标记基因剔除的阳性克隆后进行体细胞克隆,获得F0代的筛选标记基因剔除的转基因猪。

1. 一种剔除转基因猪筛选标记基因的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

1) 构建CPP5-Cre原核表达载体;

2) 利用步骤1) 表达载体进行CPP5-Cre融合蛋白的表达及纯化;

3) 将步骤2) 得到的CPP5-Cre融合蛋白与带有筛选标记基因的猪成纤维细胞进行孵育共培养获得克隆;

4) 鉴定筛选标记基因剔除的阳性克隆;

5) 通过体细胞克隆获得F0代,筛选标记基因剔除的转基因猪个体;

所述CPP5-Cre融合蛋白包括细胞穿膜肽CPP5和位点特异重组酶Cre蛋白,所述细胞穿膜肽CPP5的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.1所示。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤1) 将含有CPP5序列及其NcoI和NdeI两个酶切位点的引物对,通过体外做成linker;用NcoI+NdeI酶双切pET-28.2CRE,回收得到目的片段与linker连接,转化、摇菌、小提质粒、酶切鉴定阳性的pCPP5-CRE载体;所述pCPP5-CRE载体的核苷酸序列如序列表SEQ ID No.3所示。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤5) 将步骤4) 筛选得到的阳性克隆细胞作为核移植供体细胞,离体的卵母细胞为核移植受体细胞,通过核移植技术进行体细胞克隆获得F0代筛选标记基因剔除的转基因阳性猪。

4. CPP5-Cre融合蛋白在生产筛选标记基因剔除的转基因猪中的应用,其特征在于,将CPP5-Cre融合蛋白与带有筛选标记基因的猪成纤维细胞共培养,鉴定筛选标记基因剔除的阳性克隆,通过体细胞克隆获得F0代,筛选标记基因剔除的转基因猪个体;

所述CPP5-Cre融合蛋白包括细胞穿膜肽CPP5和位点特异重组酶Cre蛋白,所述细胞穿膜肽CPP5的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.1所示。

用于剔除标记基因的融合蛋白及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程,具体地说,涉及一种用于剔除标记基因的融合蛋白及其应用。

背景技术

[0002] 动物转基因技术是在经典遗传学、分子遗传学和DNA重组技术的基础上,运用基因工程等技术手段,将感兴趣的外源目的基因或重组基因稳定整合于宿主动物的染色体基因组并稳定遗传给后代的一种新兴生物技术。最早于1976年由Jaenisch首先利用逆转录病毒感染小鼠早期胚胎首次得到莫氏白血病病毒转基因小鼠。随着新技术新方法的出现,动物转基因技术也在不断的完善之中。利用传统的转基因方法,如显微注射法、精子载体法、电穿孔法、体细胞克隆法等,已经制备了转基因小鼠、大鼠、猪、牛、羊、鸡等多种转基因动物。而且由于猪于人类具有大量相似的解剖、生理、代谢、病理。例如,他们有一个非常相似的胃肠道解剖和功能、胰腺形态和代谢调节。因此猪比小鼠更适合用于人类疾病模型研究,同时猪肉又是人类主要的营养来源。伴随着ZNF/TALEN/Cas9等最新技术的出现,使得转基因大动物具有更加广阔的应用前景,如制备动物生物反应器、提高畜禽生产能力及肉奶品质、培育抗病动物、生产人类用动物器官、建立人类疾病模型等,将给人类带来巨大的经济效益。在我国,主要畜牧类品种则严重依赖于进口,在主要的畜牧类品种中,奶牛品种依赖程度达100%,猪、鸡品种依赖程度接近90%,这意味着作为动物农业整个产业链源头的畜牧类品种,严重依赖于国际市场。因此转基因技术提高迫切需要。目前最大限制转基因技术发展的障碍是筛选标记基因的存在。因为在转基因过程中,除了表达目的基因外,还需要筛选标记基因。标记基因即选择性标记基因是指在遗传转化中能够使转化细胞(或个体)从众多的非转化细胞中筛选出来的标记基因。由于转基因效率低,因此必须利用标记基因对阳性克隆进行筛选和富集。但标记基因的存在不仅对邻近基因及其目的基因表达产生影响,同时还将带来严重的安全性问题。目前虽然有一些技术可以去除筛选标记基因,但是这些方法主要用于小鼠,而且有很大缺陷。例如通过瞬时表达Cre重组酶载体,需要额外的细胞转染过程,而且存在整合隐患和细胞毒性。在大动物的研究很少,2009年,本课题组利用体外转录mRNA瞬时表达Cre酶,获得标记基因敲除的转基因牛。目前为止,还没有对猪进行筛选标记基因即(marker free)的相关研究。因此建立简便、高效、快速标记基因敲除的转基因猪技术研究显得尤为重要。

发明内容

[0003] 为了解决现有技术中存在的问题,本发明的目的是提供一种用于剔除标记基因的融合蛋白及其应用。

[0004] 为了实现本发明目的,本发明首先提供一种用于剔除标记基因的CPP5-Cre融合蛋白,所述融合蛋白包括细胞穿膜肽CPP5和位点特异重组酶Cre蛋白,所述细胞穿膜肽CPP5的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.1所示。

- [0005] 进一步地,所述融合蛋白的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.2所示。
- [0006] 本发明还提供了一种表达前述CPP5-Cre融合蛋白的载体。
- [0007] 本发明还提供了一种剔除转基因猪筛选标记基因的方法,所述方法包括以下步骤:
- [0008] 1) 构建CPP5-Cre原核表达载体;
- [0009] 2) 利用步骤1) 表达载体进行CPP5-Cre融合蛋白的表达及纯化;
- [0010] 3) 将步骤2) 得到的CPP5-Cre融合蛋白与带有筛选标记基因的猪体细胞共培养;
- [0011] 4) 鉴定筛选标记基因剔除的阳性克隆;
- [0012] 5) 通过体细胞克隆获得F0代,筛选标记基因剔除的转基因猪个体。
- [0013] 进一步地,所述步骤1) 将含有CPP5序列及其NcoI和NdeI两个酶切位点的引物对,通过体外做成linker;用NcoI+NdeI酶双切pET28.2-Cre,回收得到目的片段与linker连接,转化、摇菌、小提质粒、酶切鉴定阳性的pCPP5-CRE载体;所述pCPP5-CRE载体的核苷酸序列如序列表SEQ ID No.3所示。
- [0014] 进一步地,所述步骤3) 将步骤2) 得到的CPP5-Cre融合蛋白与带有筛选标记基因的猪成纤维细胞,进行孵育共培养获得克隆。
- [0015] 进一步地,所述步骤5) 将步骤4) 筛选得到的阳性克隆细胞作为核移植供体细胞,离体的卵母细胞为核移植受体细胞,通过核移植技术进行体细胞克隆获得F0代筛选标记基因剔除的转基因阳性猪。
- [0016] 本发明进一步提供了前述CPP5-Cre融合蛋白和表达该融合蛋白的载体在生产筛选标记基因剔除的转基因猪中的应用。
- [0017] 本发明的有益效果在于:本发明提供了简便、高效、快速的去除转基因猪筛选标记基因方法即marker free。其原理是利用短的5氨基酸的细胞穿膜肽和位点特异重组酶Cre/loxP系统构建融合蛋白使其具有穿膜、入核、剪切marker gene的功能。而且只要将纯化出的蛋白与带有marker gene的猪成纤维细胞孵育3h后,共培养获得克隆,然后进行PCR鉴定,将阳性克隆用于后期核移植,即可在F0代获得marker free 的转基因猪。
- [0018] 本发明解决了猪标记基因敲除的技术问题,对于大动物转基因未来的应用及其基础研究打下重要的基础。

附图说明

- [0019] 图1为本发明含有短细胞穿梭肽和Cre酶的融合蛋白表达载体图;
- [0020] 图2为本发明CPP5-Cre蛋白纯化图;
- [0021] 图3为本发明蛋白处理后获得阳性克隆PCR鉴定结果;
- [0022] 图4为本发明marker free阳性F0代猪PCR检测结果;

具体实施方式

- [0023] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。
- [0024] 实施例中载体设计由本课题组完成,序列测定由北京华大基因完成。Taq酶、T4DNA连接酶、内切酶均购自北京NEB公司,体细胞克隆所用试剂均购自Sigma公司。酶切、连接、回收、转化、PCR扩增、原核表达及其纯化等常规实验操作步骤详见《分子克隆(第三版)》。实施

例1 含有短细胞穿梭肽和Cre酶的融合蛋白表达载体图

[0025] 将5氨基酸短肽CPP5构建到pET28.2-Cre原核表达载体(addegene公司提供)中。

[0026] 首先通过生工公司合成1对引物,引物中含有CPP5序列及其NcoI和NdeI 两个酶切位点:

[0027] Up:catgggcAAACTGCCGGTTATGggcca;

[0028] Down:tatggccCATAACCGGCAGTTTgcc。

[0029] 然后通过体外做成linker,50体系:引物各22.5 μ l、5 μ l的10xbufferPCR.99度变性5分钟室温复性10分钟,4度保存用于后面实验。

[0030] 用NcoI+NdeI酶双切pET28.2-Cre,体系为50 μ l:载体2 μ l、酶各2 μ l、10xbuffer4加5 μ l、无菌水31 μ l,37度酶切2h,跑胶回收得到6319bp的目的片段;将上述回收的片段和linker连接,体系10 μ l:回收片段7 μ l、大linker 1 μ l、10xbuffer加1 μ l、T4连接酶1 μ l,16度过夜连接。

[0031] 转化、摇菌、小提质粒、酶切鉴定阳性的pCPP5-CRE载体(核苷酸序列如SEQ ID No.3所示),备用。

[0032] 实施例2 CPP5-Cre蛋白纯化图

[0033] 1.CPP5-Cre的原核表达

[0034] 1)将含有表达载体的BL21菌接种到5ml的培养基中,37 $^{\circ}$ C过夜培养;

[0035] 2)1:100转接至500ml的培养基中,37 $^{\circ}$ C培养2.5h;

[0036] 3)加入IPTG至终浓度0.2mM,16 $^{\circ}$ C诱导16h。

[0037] 2.Ni-Nta柱纯化

[0038] 1)集菌,加入培养基体积1/10的solutionA,重悬并超声破碎细胞;

[0039] 2)13000g离心10min,上清液用0.45 μ m的滤膜过滤;

[0040] 3)Ni柱用5倍体积的milli Q水洗涤,再用5倍体积的solutionA平衡;

[0041] 4)上样;

[0042] 5)样品全部流完后,用8倍体积的solutionA冲洗柱子;

[0043] 6)8倍体积solutionA+洗涤柱子;

[0044] 7)用3倍体积的solution B将蛋白从柱子上洗涤下来;

[0045] 8)用超滤柱将蛋白置换到10%甘油的DMEM中。

[0046] 3.去内毒素

[0047] 1)将1ml去内毒素凝胶加入柱床中,自然沉降;

[0048] 2)用5倍体积的0.2N NaOH洗涤凝胶并过夜浸泡;

[0049] 3)用5倍体积的NaCl洗涤柱床;

[0050] 4)5倍体积MilliQ水洗涤柱床;

[0051] 5)用5倍体积10%甘油DMEM洗涤柱床;

[0052] 6)上样,收集流出液;

[0053] 7)用2倍体积10%甘油DMEM洗涤柱床,收集流出液;

[0054] 8)步骤3.2到3.4步骤再生柱床,蛋白测定浓度后分装及冻在-80 $^{\circ}$ C保存。

[0055] 实施例3蛋白处理后获得阳性克隆PCR鉴定结果

[0056] 1、长白胎儿成纤维细胞建立

[0057] 1)取妊娠30d的长白猪,处死后取输卵管子宫、包扎出口、2h内运回实验室。

[0058] 从子宫内取出胎儿,用含抗生素的DPBS清洗胎儿,转移到超净工作台内,用眼科剪去除胎儿头部、四肢、内脏、用DPBS冲洗。

[0059] 2)在直径100mm细胞培养皿内用眼科剪将剩余部分尽量剪碎。

[0060] 3)加入少许血清,将1ml枪头尖端用剪刀剪断,留下直径约为40mm以上部分,接上1ml枪,将组织块转移到3个T25细胞培养瓶的底壁,用弯头吸管将组织块均匀铺开。

[0061] 4)将铺有组织块的一面向上,各加入5ml细胞培养液,放入CO₂培养箱,39℃、5%CO₂、100%湿度培养。

[0062] 5)待培养6-8h后,将铺有组织块的一面翻转,使细胞培养液浸没组织块。

[0063] 6)培养5天左右观察组织块周围是否有细胞爬出。

[0064] 7)待细胞生长至80%汇合时,进行传代培养或进行冷冻保存。

[0065] 2、重组蛋白与成纤维细胞孵育然后培养出克隆

[0066] 将实施例2中表达的CPP5-Cre重组蛋白与长白胎儿成纤维细胞孵育培养。将5um-10um浓度的CPP5-Cre蛋白加入,常规培养猪成纤维细胞的培养基中,然后进行细胞培养,作用3-24小时后,PBS清洗然后换不含CPP5-Cre重组蛋白的细胞培养基,然后进行单细胞培养2周后获得克隆,用于后面PCR鉴定。

[0067] 3、蛋白去除marker gene后阳性克隆PCR鉴定

[0068] 将上面获得的克隆部分细胞冻存、部分细胞细胞提取基因组进行PCR鉴定(PCR分子鉴定图如图3-A所示),鉴定原单敲猪原代细胞用M1和M2两个引物扩增会扩出2374bp和1102bp两个片段,当标记基因删除后,再用M1和M2两个引物扩增会扩出664bp和1102bp两个片段,当PCR扩增过程中,延伸时间设为45s的时候,扩不2374bp条带。出图3-B显示PCR扩增结果,其中2、4、5、7、9、11、12、14、15、17和18扩增除664bp和1102bp条带,证明是标记基因删除的阳性克隆,用于后续克隆实验。

[0069] 实施例4marker free阳性F0代猪PCR检测结果

[0070] 1、猪卵母细胞体外成熟

[0071] 从屠宰场取卵巢,放入28℃-35℃,含青霉素和硫酸链霉素的生理盐水中,2h内运回实验室用配有18号针头的20mL注射器抽吸卵巢上3-6mm的卵泡。将抽取液放于50mL离心管中,37℃水浴静置15min去上清,加入PVA-TL-HEPES重悬沉淀,再静置15min,重复一次,将重悬液放入直径60mm的塑料培养皿中,在体式显微镜下,用口吸管挑选卵丘包裹2层以上,致密,而且胞质均匀的卵丘细胞-卵母细胞复合体(Cumulus-Oocyte-complexes, COCs),用成熟培养液洗涤3遍转入在培养箱中至少已经平衡4h的培养液滴内(每100μL液滴放25枚)。每一直径35mm的塑料培养皿中做4个液滴,用胚胎级矿物油覆盖。将COCs先在成熟培养液中培养20±2h,然后转移到无hCG以及eCG的成熟液中继续培养20±2h。

[0072] 2、体细胞准备

[0073] 利用血清饥饿法,将实施例3中获得的打靶阳性细胞待其生长至80%汇合时,进行血清饥饿处理,即把培养液中的FBS(Gibco,Life Technologies)浓度从20%降至0.5%继续培养2-5d,按常规方法消化,离心洗涤,最后加1mL显微操作液重悬细胞沉淀备用。

[0074] 3、受体卵母细胞去核及供体细胞核移植

[0075] 利用盲吸法进行成熟卵母细胞去核,即成熟40-44h猪卵母细胞,脱卵丘后选择胞

质均匀,卵周隙清晰,胞膜完整的卵母细胞放入无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、HEPES缓冲NCSU-23备用转移到显微操作液滴内:核移植前1h做好,直径60mm细胞培养皿盖中央(液滴50-80 μl ,2-3mm宽,8-10mm长,石蜡油覆盖),作用15-30min,把供体细胞以及成熟卵母细胞同时转入其中于39%、5% CO_2 、100%湿度平衡15min,安装显微固定管以及去核/注射针,调节好操作系统位置,在装配有显微操作仪及恒温台的倒置显微镜下,40 \times 用固定管(内径25-35 μm ,外径100-120 μm)吸持卵母细胞用内径15-25 μm 的去核/注射针拨动卵母细胞,使第一极体处于钟表1点钟位置200 \times 下,从钟表3点处将去核/注射针刺过透明带,吸出第一极体及其附近少许细胞质退出去核/注射针,将第一极体以及少许胞质吐出挑选直径15-20 μm ,折光性强,圆形,光滑的体细胞,200 \times 下用去核/注射针吸取一个供体细胞,从去核进针处将体细胞注射到透明带下的卵周隙内用注射针点压透明带,使供体细胞与受体卵胞质的细胞膜彼此紧密接触每批25-30个卵母细胞,构建完成后,结束后将供体细胞-卵胞质构成的细胞对(重构卵)转移到NCSU-23+4mg/ml BSA中,39 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、100%湿度培养箱中修复1-2h。

[0076] 4、融合与激活

[0077] 将恢复好的重构卵分批转移到融合液中平衡3min,用融合/激活液洗涤3遍后,每批5个放入已经铺满融合液的融合槽内,用拉制的且尖端很细的实心玻璃针拨动重组卵,使供体细胞-受体卵细胞膜接触面与电极平行用ECM2001融合仪施加一个30 μs ,2.0kv/cm的直流电脉冲诱导融合同时激活,用NCSU-23+4mg/ml BSA洗涤5遍,立即转入矿物油覆盖的胚胎培养液中、39 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、100%湿度培养0.5h~1h后取出,在体视显微镜下判定融合。

[0078] 5、胚胎培养

[0079] 在开始显微操作前至少4h预先做好培养液滴,在超净台内取35mm细菌培养皿,做6-8个30 μL 大的液滴,小心加入2.5-3ml矿物油覆盖,做好标记后放入 CO_2 培养箱内平衡将上述融合的重构胚用胚胎培养液洗涤5遍后转入,每个30 μL 的液滴培养8-10个重构胚,培养48h和168h时记录卵裂和囊胚形成结果。

[0080] 6、胚胎移植

[0081] 用公猪试情或者观察压背反应,挑选自然发情母猪,一般在构建克隆胚的当天将在 CO_2 培养箱中培养12-30h的1-2细胞克隆胚取出,装入2.5ml细管内。用灭菌的锡箔纸包装好,做好标记,放到恒温运输箱中运到猪移植地点,用40-60ml(1mg/100kg体重)生理盐水溶解1-1.5mg硫喷妥钠和地西洋,耳静脉注射20ml,待受体猪初步麻倒后,将其抬到手术架上仰卧(青年后备母猪)或者侧卧(经产母猪)保定对后备母猪:在腹部下面第1对和第2对乳头之间,腹中线局部15 \times 10 cm^2 面积内清洁刮毛后先碘酒消毒,后酒精棉脱碘(对经产母猪:在腹部欣窝部15 \times 10 cm^2 的范围内清洁,刮毛碘酒消毒后酒精脱碘)在准备动刀切开腹中线之前,把前面余下的麻醉药再酌情注射20-30ml,沿腹中线切开一个长约8-10cm的口,打开腹腔,探进去一只手,取出卵巢后用润湿的灭菌脱脂纱布盖上(而对经产母猪:沿侧腹部做一个与腹中线面垂直的长约10cm的切口)在手术人员即将取出卵巢,调整好输卵管伞之际,将装在吸管内的胚胎取出放在热台上,体视显微镜下将胚胎装入移植管内,手术人员和胚胎移植人员相互协调,将移植管从输卵管伞部探入输卵管至少5cm大致到了壶腹-峡部结合处,一边推动注射器,以便外撤移植管移植后体视镜下观察胚胎是否仍滞留在移植管内,确认没有后,开始卵巢回位,术口缝合胚胎移植后第10d肌肉注射800IU hCG,13d注射500IU PMSG。

[0082] 7、囊胚细胞计数

[0083] 取出重构胚囊胚,在含3.7%多聚甲醛的DPBS中洗涤3遍后再固定10min将固定后的囊胚转移到含10 μ g/ml Hoechst33342(bisbenzimidazole)的DPBS中避光的暗盒中室温孵育10min染色结束后,将囊胚转移到载玻片上,尽量少带液体,尽快用9:1的凡士林/石蜡油在其四角点四个柱,盖上盖玻片,在实体显微镜下小心按压盖玻片,使卵受压后稍微膨大但不至于破碎为宜,用指甲油封片,NikonE800显微镜,紫外光激发下观察、照相、计数。

[0084] 实施例5F0代公猪阳性鉴定

[0085] F0代猪组织基因组DNA的提取:

[0086] 将猪场出生的公猪(来源于实施例3中的阳性细胞克隆)取少量尾巴组织块,剪碎或细胞沉淀放入1.5ml离心管中,加700 μ l DNA抽提缓冲液,20 μ l蛋白酶K(20mg/ml),混匀56 $^{\circ}$ C水浴消化18h以上,直至组织块或细胞沉淀完全消失,间歇摇动以获得更好的效果,加入700 μ lTris-饱和酚,温和摇动12min,12000 rpm离心12 min。将上层液相转移至另一新的离心管中,重复上一步骤,将上层液相转移至另一新的离心管中,加入700 μ l酚:仿(1:1),温和摇动12min,12000rpm离心12min。将上层液相转移至另一新的离心管中,加入700 μ l氯仿,温和摇动12 min,12000rpm离心12 min。将上层液相转移至另一新的离心管中,加2倍体积无水乙醇,颠倒混匀后,12000rpm离心10 min。弃上清,用70%乙醇洗沉淀和管壁,倾弃乙醇,沥尽残液,室温下敞口放置20~30min,使乙醇完全挥发,加适量(约100 μ l)TE缓冲液,于56 $^{\circ}$ C水浴中溶解DNA,0.7%琼脂糖凝胶电泳检测基因组DNA浓度,测量260/280nm波长下检测基因组DNA的浓度和纯度,将其调整至适当浓度,-20 $^{\circ}$ C保存,同时进行PCR鉴定打靶阳性公猪。进行琼脂糖凝胶电泳检测基因组DNA,假如扩出800bp和388bp条带的既为marker free阳性,如果只扩出800bp为野生型或者单敲没有去处marker gene的个体,检测结果如图4所示,其中其中1-12号12头F0代猪都为marker free成功个体,其中WT即野生型和+/-单敲的为对照。

[0087] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范

<110> 中国农业大学

<120> 用于剔除标记基因的融合蛋白及其应用

<130> KHP141111501.5

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> CPP5

<400> 1

Lys Leu Pro Val Met

1 5

<210> 2

<211> 280

<212> PRT

<213> CPP5-Cre

<400> 2

[0001]

Lys Val Met Gly His Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Met Gly Arg Asp
1 5 10 15

Asn Ser Met Ser Asn Thr Val His Asn Ala Val Asp Ala Thr Ser Asp
20 25 30

Val Arg Lys Asn Met Asp Met Arg Asp Arg Ala Ser His Thr Trp Lys
35 40 45

Met Ser Val Cys Arg Ser Trp Ala Ala Trp Cys Lys Asn Asn Arg Lys
50 55 60

Trp Ala Asp Val Arg Asp Tyr Tyr Ala Arg Gly Ala Val Lys Thr Ile
65 70 75 80

His Gly Asn Met His Arg Arg Ser Gly Arg Ser Asp Ser Asn Ala Val
85 90 95

Ser Val Met Arg Arg Ile Arg Lys Asn Val Asp Ala Gly Arg Ala Lys
100 105 110

Ala Ala Arg Thr Asp Asp Val Arg Ser Met Asn Ser Asp Arg Cys Asp

115	120	125	
Ile Arg Asn Ala Gly Ile Ala Tyr Asn Thr Arg Ile Ala Ile Ala Arg			
130	135	140	
Ile Arg Val Lys Asp Ile Ser Arg Thr Asp Gly Gly Arg Met Ile His			
145	150	155	160
Ile Gly Arg Thr Lys Thr Val Ser Thr Ala Gly Val Lys Ala Ser Gly			
165	170	175	
Val Thr Lys Val Arg Trp Ile Ser Val Ser Gly Val Ala Asp Asp Asn			
180	185	190	
Asn Tyr Cys Arg Val Arg Lys Asn Gly Val Ala Ala Ser Ala Thr Ser			
195	200	205	
Ser Thr Arg Ala Gly Ile Ala Thr His Arg Ile Tyr Gly Ala Lys Asp			
210	215	220	
Asp Ser Gly Arg Tyr Ala Trp Ser Gly His Ser Ala Arg Val Gly Ala			
225	230	235	240
Ala Arg Asp Met Ala Arg Ala Gly Val Ser Ile Ile Met Ala Gly Gly			
245	250	255	
Trp Thr Asn Val Asn Ile Val Met Asn Tyr Ile Arg Asn Asp Ser Thr			
260	265	270	
Gly Ala Met Val Arg Asp Gly Asp			
275	280		

[0002]

<210> 3
 <211> 6346
 <212> DNA
 <213> pCPP5-CRE
 <400> 3
 tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg 60
 cagegtgacc gctacacttg ccagcgcctt agcgcgccgt cctttcgtt tcttcccttc 120
 cttttcgcgc acgttcgccg gctttccccc tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg 180
 gttccgattt agtgccttac ggcacctega ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc 240
 acgtagtggg ccategccct gatagacggt ttctgcctt ttgacgttgg agtccacgtt 300
 ctttaaatgt ggactcttgt tccaaactgg aacaacacte aacctatct cggcttatct 360
 ttttgattta taagggattt tgcgatttc ggcctatfgg ttaaaaaatg agctgattta 420

acaaaaattt	aacgcgaatt	ttaacaaaat	attaacgttt	acaatttcag	gtggcacttt	480
tcggggaaat	gtgcgcggaa	cccctatttg	tttatttttc	taaatacatt	caaatatgta	540
tccgctcatg	aattaattct	tagaaaaact	catcgagcat	caaatgaaac	tgcaatttat	600
tcatatcagg	attatcaata	ccatattttt	gaaaaagccg	tttctgtaat	gaaggagaaa	660
actcaccgag	gcagttccat	aggatggcaa	gacctggta	tcggtctgcg	attccgactc	720
gtccaacatc	aatacaacct	attaatttcc	ctctgcaaaa	aataaggtta	tcaagtgaga	780
aatcaccatg	agtgcgact	gaatccggtg	agaatggcaa	aagtttatgc	atttctttcc	840
agaettgttc	aacaggccag	ccattacgct	cgcatcaaaa	atcactgca	tcaaccaaac	900
cgttattcat	tegtgattgc	gcctgagcga	gacgaaatac	gcatctgctg	ttaaaaggac	960
aattacaaac	aggaatcgaa	tgcaaccggc	gcaggaacac	tgccagcgca	tcaacaatat	1020
tttcacctga	atcaggatat	tcttctaata	cttggaatgc	tgttttcccc	gggatcgcag	1080
tggtgagtaa	ccatgcatea	tcaggagtac	ggataaaatg	cttgatggtc	ggaagaggca	1140
taaattccgt	cagccagttt	agtctgacca	tctcatctgt	aacatcattg	geaacgetac	1200
ctttgccatg	tttcagaaac	aactctggcg	catcgggctt	cccatacaat	cgatagattg	1260
tcgcacctga	ttgcccgaca	ttatcgcgag	cccatttata	cccatataaa	tcagcatcca	1320
tgttggaatt	taatecggcg	ctagagcaag	acgtttcccg	ttgaatatgg	ctcataaac	1380
cccttgtatt	actgtttatg	taagcagaca	gttttattgt	tcatgaccaa	aatccettaa	1440
cgtgagtttt	cgttccactg	agcgtcagac	ccgtagaaa	agatcaaagg	atcttcttga	1500
gatecttttt	ttctgcgcgt	aatctgctgc	ttgcaaacaa	aaaaaccacc	gctaccagcg	1560
gtggtttggt	tgccggatca	agagetacca	actctttttc	cgaaggtaac	tggettccgc	1620
agagcgcaga	taccaaatac	tgctcttcta	gtgtagccgt	agttaggcca	ccacttcaag	1680
aactctgtag	caccgcctac	atacctgct	ctgctaatcc	tgttaccagt	ggctgctgce	1740
agtggcgata	agtegtgtct	taccgggttg	gaetcaagac	gatagttacc	ggataaggcg	1800
cagcggtcgg	gctgaacggg	gggttcgtgc	acacagccca	gettggagcg	aacgacctac	1860
accgaactga	gatactaca	gcgtgagcta	tgagaaagcg	ccaccttcc	cgaagggaga	1920
aaggcggaca	ggtatccggt	aagcggcagg	gtcggaacag	gagagcgcac	gagggagctt	1980
ccagggggaa	acgectggta	tctttatagt	ctgtcgggt	ttcgccaect	ctgacttgag	2040
cgtcgatttt	tgtgatgctc	gtcagggggg	eggagcctat	ggaaaaacgc	cagcaacgcg	2100
gcctttttac	ggttcttgcg	cttttctggt	cttttctctc	acatgttctt	tctgctgta	2160
tcccctgatt	ctgtggataa	ccgtattacc	gcctttgagt	gagctgatac	cgctcgccgc	2220
agccgaacga	ccgagcgcag	cgagtcagt	agcagaggaag	cggagagcgc	cctgatcgcg	2280
tattttctcc	ttacgcctct	gtcgggtatt	tcacaccgca	tatatgggtgc	actctcagta	2340
caatctgctc	tgatgccgca	tagttaagcc	agtatacact	ccgtategc	tacgtgactg	2400
ggctcatggct	gcgcccgcag	accgcaccaac	accgctgac	gcgcccctgac	ggccttctct	2460
gctcccggca	tccgettaca	gacaagetgt	gaccgtctcc	gggagctgca	tgtgtcagag	2520
gttttcaccg	tcateaccga	aacgcgcgag	gcagctgcgg	taaagctcat	cagcgtggtc	2580
gtgaagcgat	tcacagatgt	ctgcctgttc	atccgcgtcc	agctcgttga	gtttctccag	2640
aagcgttaat	gtctggcttc	tgataaagcg	ggccatgtta	agggcgggtt	tttctgttt	2700
ggctactgat	gcctcctgtg	aagggggatt	ctgttctatg	ggggtaatga	taccgatgaa	2760
acgagagagg	atgctcacga	tacgggttac	tgatgatgaa	catgcccgg	tactggaacg	2820
ttgtgagggt	aaacaactgg	cgttatggat	ggggcgggac	cagagaaaaa	tcactcaggg	2880
tcaatgccag	cgettctgta	atcacagatg	aggtgttcca	caggttagcc	agcagcatcc	2940
tgcatgacag	atccggaaca	taatggtgca	ggcgcctgac	ttccgcgttt	ccagacttta	3000
cgaaacacgg	aaacegaaga	ccattcaatg	tgttgcctcag	gtcgcagacg	ttttgcagca	3060

[0003]

	gcagtcgctt cacgttcgct cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc	3120
	ccgccagcct agccgggtcc tcaacgacag gacacgatac atgcgcaccc gtggggccgc	3180
	catgccggcg ataattggcct gcttctcgc gaaacgtttg gtggcgggac cagtgcagaa	3240
	ggcttgagcg agggcggtca agattccgaa taccgcaagc gacaggccga tcatcgtcgc	3300
	gctccagcga aagcggctct cgcgaaaat gaccagagc gctgceggca cctgtcctac	3360
	gagttgcatg ataaagaaga cagtcataag tgcggcgagc atagtcattc cccgcgccca	3420
	ccggaaggag ctgactgggt tgaaggctct caagggcata ggtcgagatc ccggtgccta	3480
	atgagtgage taacttacat taattgcgtt gcgctcactg cccgcttcc agtcgggaaa	3540
	cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat	3600
	tgggcgccag ggtggttttt cttttcacca gtgagacggg caacagctga ttgccctca	3660
	ccgctggcc ctgagagagt tgcagcaagc gttccacgct ggtttgcccc agcaggcgaa	3720
	aatcctgttt gatggtggtt aacggcggga tataacatga gctgtcttcg gtatcgtcgt	3780
	atcccactac cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccgga ctcggtaatg gegcgcattg	3840
	cgcccagegc catctgateg ttggcaacca gcctcgcagt gggaacgatg ccctcattca	3900
	gcatttgcct ggtttgttga aaaccggaca tggcactcca gtcgccttcc cgttccgcta	3960
	tcggtgaaat ttgattgcga gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc agacgcgccg	4020
	agacagaact taatgggccc gctaacagcg cgatttgcgt gtgaccaat gcgaccagat	4080
	gctccacgce cagtcggcta ccgtcttcat gggagaaaat aatactgttg atgggtgtct	4140
	ggtcagagac atcaagaaat aacgccggaa cattagtgca ggcagcttcc acagcaatgg	4200
	catcctggtc atccagcgga tagttaatga tcagcccact gacgcgttgc gcgagaagat	4260
	tgtgcaccgc cgttttacag gcttcgacgc cgttcgttcc taecatgac accaccacgc	4320
[0004]	tggeaccag ttgatggcg cgagatttaa tcgccgcgac aatttgcgac ggcgcgtgca	4380
	gggccagact ggaggtggca acgccaatca geaacgactg tttgcccgcc agttgtttgtg	4440
	ccaagcgggt gggaaatgaa ttcagctcgc ccctcgcgcg ttccactttt tcccggttt	4500
	tcgcagaaac gtggctggcc tggttcaacca cgcgggaaac ggtctgataa gagacaccgg	4560
	catactctgc gacatcgtat aacgttactg gtttcacatt caccacctg aattgactct	4620
	cttccgggcg ctatcatgcc ataccgcgaa aggttttgcg ccattcgtg gtgtccggga	4680
	tctgcacgct ctcccctatg cgactcctgc attaggaagc agcccagtag taggttgagg	4740
	ccgttgagca ccgcccgccg aaggaatggt gcctgcaagg agatggcgcc caacagtccc	4800
	ccggccacgg ggcctgccac catacccacg ccgaaacaag cgtcctatgag cccgaagtgg	4860
	cgagcccgat ctccccate ggtgatgctg gcgatatagg cggcagcaac cgcacctgtg	4920
	gcgcgggtga tgccggccac gatgcgtccg gcgtagaggga tcgagatctc gatcccgcga	4980
	aattaatacg actcactata ggggaattgt gacgggataa caattccct ctagaaataa	5040
	ttttgtttaa ctttaagaag gagatatacc atgggcaaac tgccggttat gggccatag	5100
	gctagcatga ctggtggaca gcaaatgggt cgggatccga attccatgct caatttactg	5160
	accgtacacc aaaatttgcg tgcattaccg gtcgatgcaa cgagtgatga ggttcgcaag	5220
	aacctgatgg acatgttcag ggatgccag gcgtttctg agcafacctg gaaaatgctt	5280
	ctgtccgctt gccggctcgt ggcggcctgg tgcaagtiga ataaccggaa atggtttccc	5340
	gcagaacctg aagatgttcg cgattatctt ctatatttc aggcgcgcgg tctggcagta	5400
	aaaactatcc agcaacattt gggccagcta aacatgcttc atcgtcggte cgggctgcca	5460
	cgaccaagtg acagcaatgc tgtttcactg gttatgcggc ggatccgaaa agaaaacgtt	5520
	gatgccggtg aacgtgcaaa acaggctcta gcgttcgaac gcactgattt cgaccaggtt	5580
	cgttcactca tggaaaatag cgatcgtcgc caggatatac gtaatctggc atttctgggg	5640
	attgcttata acacctggt acgtatagcc gaaattgcca ggatcagggt taaagatatac	5700

tcacgtactg acggtgggag aatgttaatc catattggca gaacgaaaac gctggttage	5760
accgcaggtg tagagaaggc acttagcctg ggggtaacta aactggtcga gcgatggatt	5820
tccgtctctg gtgtagctga tgatccgaat aactacctgt ttgcccgggt cagaaaaaat	5880
ggtgttgccg cgccatctgc caccagccag ctatcaactc gcgccctgga agggattttt	5940
gaagcaactc atcgattgat ttacggcgct aaggatgact ctggtcagag atacctggcc	6000
tggtetggac acagtgcceg tgtcggagec gcgcgagata tggcccgcgc tggagtitca	6060
ataccggaga tcatgcaagc tgggtgctgg accaatgtaa atattgtcat gaactatate	6120
cgtaacctgg atagtgaaac aggggcaatg gtgcgcctgc tggagatgg cgatgcggcc	6180
gcactegage accaccacca ccaccactga gatccgctg ctaacaaage ccgaaaggaa	6240
gctgagttgg ctgctgccac cgctgagcaa taactagcat aacccttgg ggcctctaaa	6300
cgggtcttga ggggtttttt gctgaaagga ggaactatat ccgat	6346

[0005]

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

catgggcaaa ctgccggtta tgggcca

27

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

tatggeccat aaccggcagt ttgcc

25

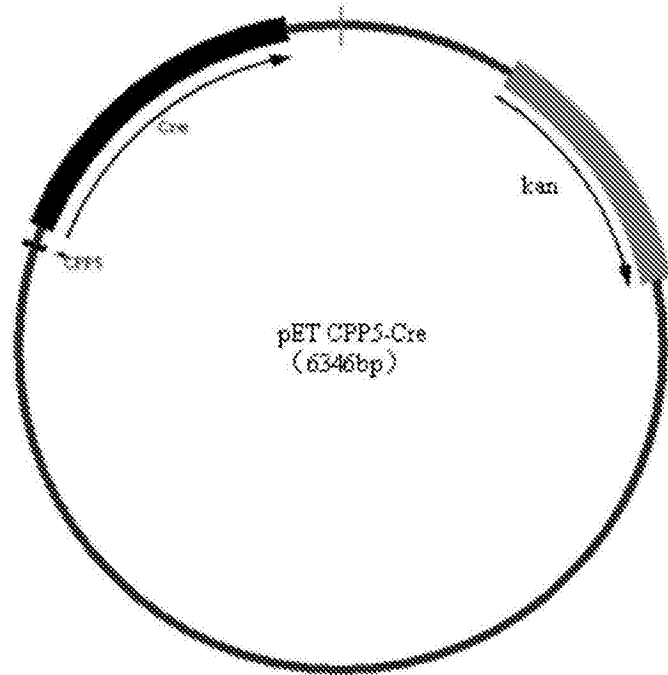


图1

M 上清 沉淀 纯蛋白 未诱导蛋白

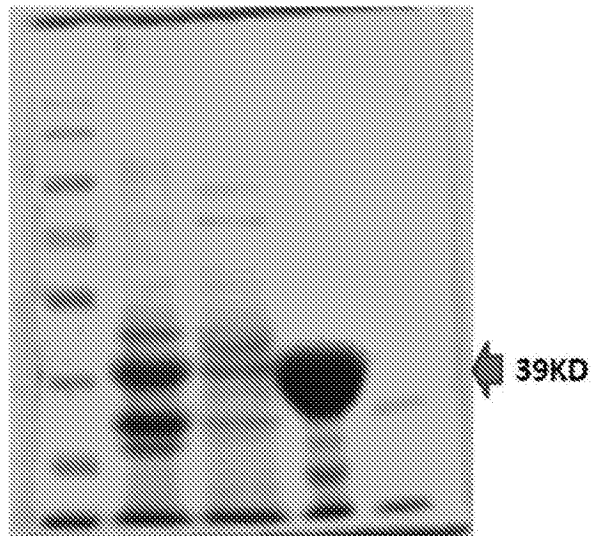


图2

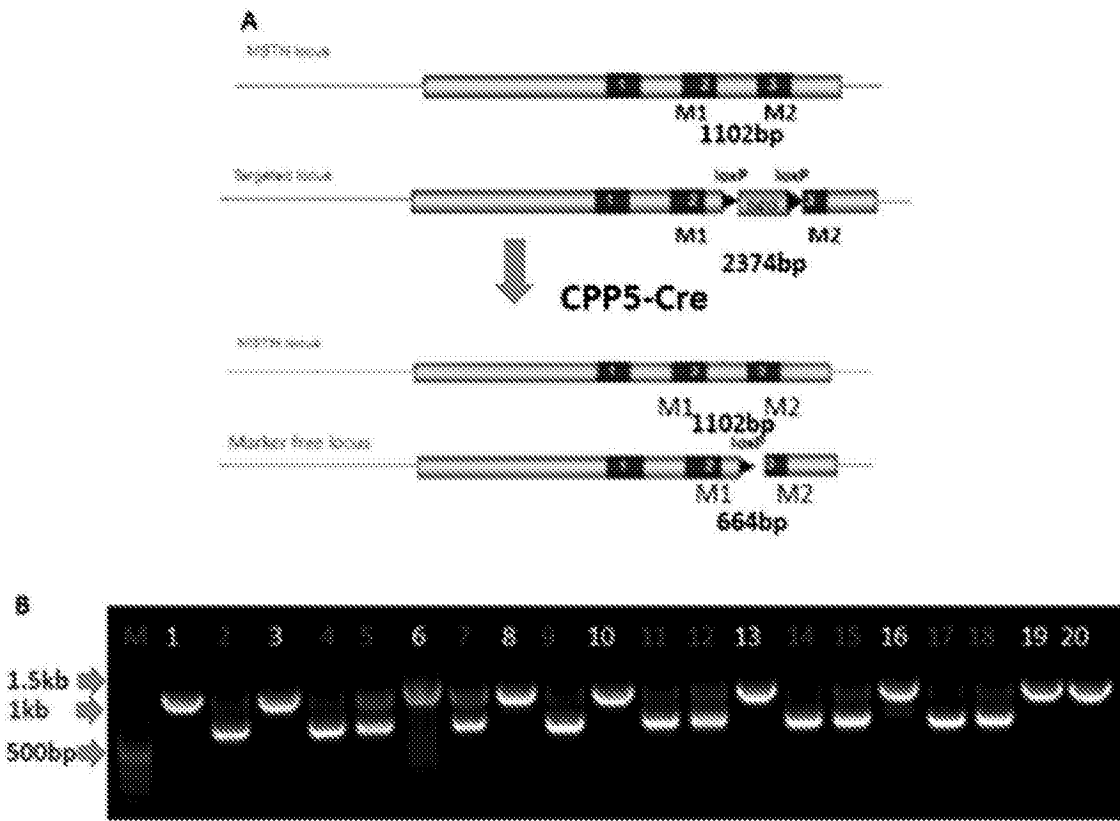


图3

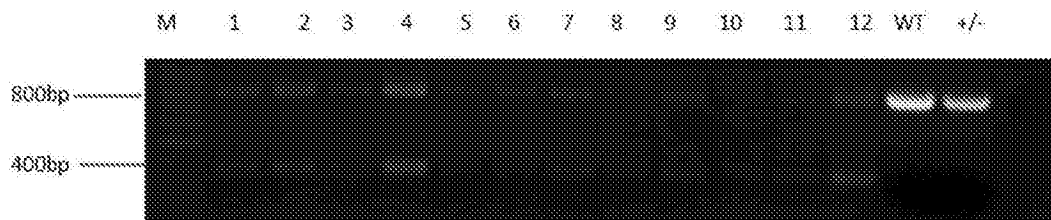


图4