



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0036066

(51)⁷ C12N 5/0735; C12N 15/86

(13) B

(21) 1-2019-03305

(22) 24/11/2017

(86) PCT/GB2017/053531 24/11/2017

(87) WO/2018/096343 31/05/2018

(30) 1619876.4 24/11/2016 GB

(45) 26/06/2023 423

(43) 30/01/2020 382A

(73) Cambridge Enterprise Limited (GB)

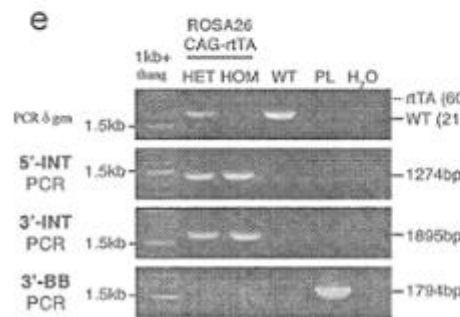
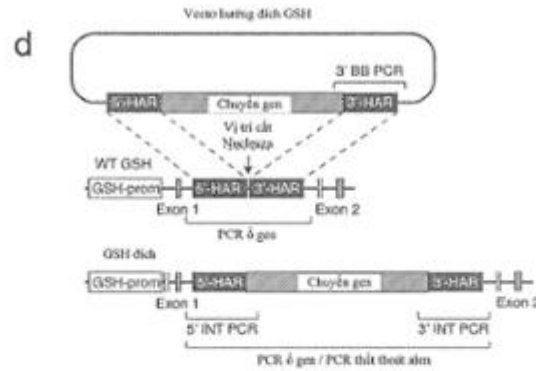
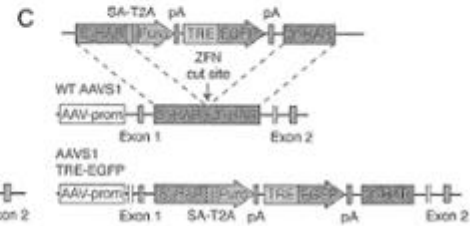
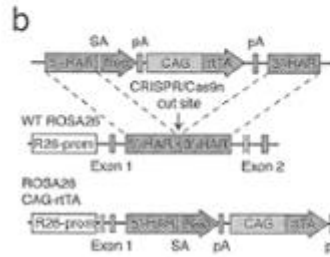
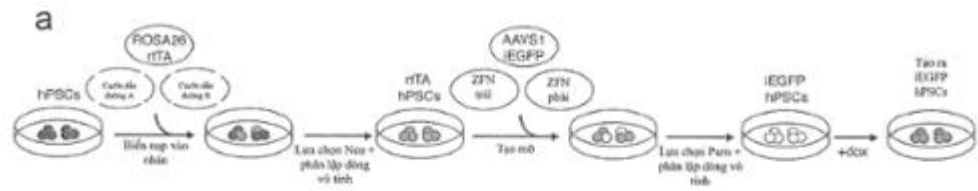
The Old Schools, Trinity Lane, Cambridge, Cambridgeshire CB2 1TN, United Kingdom

(72) VALLIER, Ludovic (GB); KOTTER, Mark (GB); PAWLOWSKI, Matthias (GB);
BERTERO, Alessandro (GB); ORTMANN, Daniel (GB).

(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) PHƯƠNG PHÁP THỰC HIỆN NGOÀI CƠ THỂ SỐNG ĐỂ KIỂM SOÁT SỰ
PHIÊN MÃ TRÌNH TỰ DI TRUYỀN TRONG TẾ BÀO, TẾ BÀO ĐƯỢC TẠO RA
BẰNG PHƯƠNG PHÁP NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP THỰC HIỆN NGOÀI CƠ
THỂ SỐNG ĐỂ SẢN XUẤT TẾ BÀO CƠ HOẶC TẾ BÀO THẦN KINH ĐỆM ÍT
NHÁNH

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp ổn định để đưa ít nhất một casset cảm ứng vào trong tế bào, và cho phép sự phiên mã kiểm soát được trong phạm vi casset cảm ứng đó. Phương pháp này có thể được sử dụng cho dạng tế bào bất kỳ, từ vi sinh vật có nhân điển hình bất kỳ, nhưng có ứng dụng cụ thể trong việc đưa các casset cảm ứng vào trong tế bào gốc đa tiềm năng, như là tế bào gốc đa tiềm năng ở động vật hoặc ở người (hPSC). Casset cảm ứng được chèn có kiểm soát theo cách này để đảm bảo rằng vật liệu di truyền chứa trong đó không bị bất hoạt hoặc là đối tượng gây ảnh hưởng bất lợi từ vị trí chèn, và sự phiên mã vật liệu di truyền được kiểm soát.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp ổn định để đưa ít nhất một casset cảm ứng vào trong tế bào, và cho phép sự phiên mã kiểm soát được trong phạm vi casset cảm ứng đó. Phương pháp này có thể được sử dụng cho dạng tế bào bất kỳ, từ vi sinh vật có nhân điển hình bất kỳ, nhưng có ứng dụng cụ thể trong việc đưa các casset cảm ứng vào trong tế bào gốc đa tiềm năng, như là tế bào gốc đa tiềm năng ở động vật hoặc ở người (hPSC). Casset cảm ứng được chèn một cách có kiểm soát theo cách này để đảm bảo rằng vật liệu di truyền chứa trong đó không bị bất hoạt hoặc là đối tượng gây ảnh hưởng bất lợi từ vị trí chèn, và sự phiên mã vật liệu di truyền được kiểm soát.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc nghiên cứu tế bào mầm có hứa hẹn lớn để nghiên cứu sự phát triển ở người, thuốc tái sinh, lập mô hình bệnh học, tìm ra thuốc mới, và cấy ghép tế bào. Hơn nữa, các tế bào được tạo ra từ tế bào gốc cho phép nghiên cứu các đáp ứng sinh lý và chữa bệnh của quần thể tế bào ở người mà không dễ dàng có thể đạt tới được. Điều này thường là đưa đến việc nghiên cứu về gen (và các dạng khác của cơ chế điều tiết được mã hóa trong các ARN không mã hóa protein - ncARN). Tuy nhiên, sự phiên mã hoặc biểu hiện kiểm soát được của thông tin di truyền ở các tế bào ở người đã được chứng tỏ là đặc biệt khó.

Hơn nữa, đối với một vài khía cạnh chủ đạo của thuốc tái sinh, lập mô hình bệnh học, tìm ra thuốc mới và cấy ghép tế bào, việc thao tác và sản xuất các loại tế bào người trưởng thành từ nguồn dễ dàng tiếp cận được là cần thiết. Việc kiểm soát sự biểu hiện của các gen chuyển ở các tế bào ở người là cơ sở của việc nghiên cứu sinh học. Tuy nhiên, điều này đã được chứng tỏ là khó thực hiện ở tế bào ở người. Hơn nữa, có nhu cầu thực sự đối với sản phẩm trong ống nghiệm của nhiều loại tế bào ở người có nhu cầu cao về lượng và về chất phù hợp cho các mục đích tìm ra thuốc mới và tạo thuốc tái sinh. Bởi vì sự biệt hóa được định hướng của tế bào gốc

thành các loại tế bào mong muốn thường là thách thức, đã xuất hiện các cách tiếp cận khác, gồm có việc lập trình hướng biệt hóa các tế bào gốc thành các loại tế bào mong muốn. Cụ thể, việc lập trình phát triển, là phương pháp chuyển hóa trực tiếp tế bào gốc đa tiềm năng, bao gồm cả các tế bào hPSC, thành các loại tế bào trưởng thành đã được ghi nhận là chiến thuật mạnh mẽ để tạo ra các tế bào ở người. Việc lập trình lại này liên quan đến sự biểu hiện cưỡng ép của các yếu tố phiên mã phân dòng chủ đạo (hoặc các ARN không mã hóa, bao gồm các ARN không mã hóa dài (lncARN) và ARN không mã hóa nhỏ (microARN)) để chuyển hóa tế bào gốc thành loại tế bào trưởng thành cụ thể. Cũng trong bối cảnh này, việc biểu hiện kiểm soát được của thông tin di truyền ở các tế bào ở người cũng đã thách thức. Các cách thức lập trình phát triển hiện có dựa rất nhiều vào việc tải nạp virus lây nhiễm chậm của các tế bào, mà dẫn đến sự biểu hiện xen lẫn hoặc sự bất hoạt hoàn toàn của các cassette cảm ứng được xen vào một cách ngẫu nhiên. Điều này dẫn đến việc cần có các bước tinh chế bổ sung để phân lập tiểu quần thể biểu hiện các yếu tố phiên mã cần thiết. Do đó, rõ ràng là cần hoàn thiện hơn nữa các phương pháp này.

Ngoài sự biểu hiện cảm ứng được của gen chuyển, còn rất mong muốn tạo khả năng kiểm soát việc làm mất tác dụng và làm bất hoạt các gen hoặc các trình tự mã hóa khác trong các tế bào, để cho phép tiến hành các nghiên cứu thất thoát chức năng. Các nghiên cứu thất thoát chức năng ở các tế bào gốc và các loại tế bào trưởng thành là cơ hội duy nhất để nghiên cứu cơ chế điều hòa sự phát triển, bệnh và sinh lý ở người. Tuy nhiên, các kỹ thuật hiện nay không cho phép thao tác một cách dễ dàng và hiệu quả đối với sự biểu hiện gen. Các kỹ thuật hiện nay để đưa vật liệu như là các ARN kẹp tóc ngắn cảm ứng được (shARN) vào trong các tế bào gốc để kích hoạt sự làm gen mất tác dụng có nhiều nhược điểm được thấy với việc lập trình phát triển lại được thảo luận ở đây, như là bất hoạt gen chuyển và các ảnh hưởng liên quan đến vị trí làm hạn chế hoạt tính. Do đó, có nhu cầu đối với gen cảm ứng được làm bất hoạt và làm mất tác dụng trong các tế bào gốc mà cho phép các nghiên cứu thất thoát chức năng trong các tế bào gốc.

Việc hoàn thiện bất kỳ cho các phương pháp nêu trên phải đảm bảo rằng đạt được sự phiên mã ổn định của vật liệu di truyền có mặt trong phạm vi cassette cảm ứng, như là gen chuyển, mà điều đó kháng lại việc bất hoạt và ảnh hưởng liên quan

đến vị trí tích hợp bất lợi khác. Bất hoạt có thể được gây ra bởi cơ chế đa biểu sinh, gồm có sự metyl hóa ADN hoặc biến đổi histon. Với các phương pháp theo kỹ thuật hiện nay dựa vào việc tải nạp virus lây nhiễm chậm, các tế bào thu được là quần thể khác nguồn gốc với gen chuyển được biểu hiện toàn bộ, một phần hoặc không biểu hiện. Rõ ràng là, điều này là không mong muốn đối với nhiều ứng dụng. Các vector virus cho thấy xu hướng tích hợp vật liệu di truyền của chúng vào trong các vùng hoạt động phiên mã của bộ gen, do đó làm tăng tiềm năng đối với các trường hợp gây ung thư do sự phát sinh đột biến gen xen đoạn.

Đối với nhiều ứng dụng, có mong muốn kiểm soát phiên mã vật liệu di truyền được chèn vào trong tế bào, như là cassette cảm ứng có thể được bật nếu cần thiết và được sao chép ở các mức cụ thể, gồm có các mức cao. Điều này không thể đạt được nếu sự chèn vào của cassette cảm ứng là ngẫu nhiên trong bộ gen.

Do đó, các tác giả sáng chế đã phát triển phương pháp để cho phép đưa ổn định cassette cảm ứng vào trong bộ gen của tế bào, trong khi có khả năng kiểm soát sự phiên mã của cassette cảm ứng đó. Điều này có ưu điểm trong loại tế bào bất kỳ trong đó có mong muốn đưa cassette cảm ứng vào tế bào và kiểm soát sự phiên mã vật liệu di truyền được đưa vào, cụ thể là ở các tế bào gốc đa tiềm năng. Cassette cảm ứng có thể gồm có vật liệu di truyền bất kỳ có khả năng phiên mã, ví dụ gen chuyển hoặc ARN không mã hóa (ncARN). Vật liệu có trong phạm vi cassette cảm ứng sẽ được xác định bởi tác dụng nào là cần thiết từ tế bào gốc, bao gồm cả sự biểu hiện của gen chuyển hoặc gen bị làm mất tác dụng hoặc bị làm bất hoạt.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng, có thể chèn cassette cảm ứng và kiểm soát sự phiên mã của vật liệu di truyền trong phạm vi cassette cảm ứng đó bằng cách sử dụng hệ đích chèn kép an toàn về mặt di truyền được mô tả ở đây. Phương pháp này có kỳ vọng cao, do giảm rủi ro về bất hoạt biểu sinh của vật liệu di truyền được chèn vào, và có thể thu được quần thể các tế bào đồng nhất phiên mã cassette cảm ứng.

Do đó, sáng chế đề cập đến phương pháp kiểm soát sự phiên mã của trình tự di truyền trong tế bào, phương pháp này bao gồm các bước sau:

a) chèn gen mã hóa protein điều hòa phiên mã đúng vào vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất; và

b) chèn cassette cảm ứng đúng vào vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ hai, trong đó cassette cảm ứng này bao gồm trình tự di truyền được liên kết hoạt động với promoter cảm ứng và promoter cảm ứng này được điều tiết bằng protein điều hòa phiên mã;

trong đó các vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất và thứ hai là khác nhau.

Việc tích hợp cassette cảm ứng đặc hiệu vào các vị trí chèn an toàn về mặt di truyền (genomic safe harbour site -GSH) là được ưu tiên hơn việc chèn ngẫu nhiên vào trong bộ gen. Các GSH đã được xác định trên đây là “các vùng trong gen hoặc vùng ngoài gen của bộ gen người mà có khả năng dàn xếp sự biểu hiện có thể dự đoán trước của ADN mới được tích hợp mà không có tác dụng phụ trên tế bào chủ hoặc vi sinh vật chủ. Sự chèn an toàn hữu dụng phải cho phép sự phiên mã đầy đủ của trình tự di truyền được chèn vào để sản sinh ra các mức protein mong muốn (nhờ dịch mã thêm) hoặc ARN không mã hóa. GSH cũng phải không đưa tế bào bị chuyển sang dạng ác tính, cũng không làm thay đổi các chức năng của tế bào” (Sadelain *et al.*, 2012, Nature Reviews Cancer, 12(1), 51–8. doi:10.1038/nrc3179).

Vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất được sử dụng để đưa gen mã hóa ít nhất là protein điều hòa phiên mã vào tế bào. Protein điều hòa phiên mã (hoặc yếu tố phiên mã) làm tăng sự phiên mã gen của gen. Phần lớn là các protein điều hòa phiên mã là các protein liên kết với ADN mà liên kết vào các phần tăng cường hoặc các yếu tố gần promoter đã được liên kết hoạt động với gen.

Theo một số khía cạnh, protein điều hòa phiên mã được biểu hiện cơ định, và được biểu hiện vĩnh cửu trong tế bào. Do đó, protein điều hòa phiên mã có thể được liên kết hoạt động vào promoter cơ định. Promoter cơ định điều khiển biểu hiện gen đồng nhất trong hầu hết các mô và tế bào ở tất cả các giai đoạn tăng trưởng và phát triển. Promoter cơ định cho các mức biểu hiện gen cao khi được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế.

Vật liệu di truyền còn bao gồm các gen có thể được chèn vào GSH thứ nhất với protein điều hòa phiên mã. Các gen này có thể bao gồm một hoặc nhiều gen đánh dấu như là protein phát huỳnh quang xanh lá cây (green fluorescent protein - GFP) mà có thể được sử dụng để cho thấy rằng, ví dụ, protein điều hòa phiên mã đã được chèn vào thành công. Các lựa chọn khác bao gồm các gen mà cho phép sắp xếp gen, ví dụ Cas9 và các dẫn xuất của nó hoặc CasL và các dẫn xuất của nó, và các trình tự gen thông báo mà có thể được sử dụng để thử nghiệm sự biểu hiện nội sinh hoặc ngoại sinh của các gen đặc hiệu trong tế bào.

GSH thứ hai được sử dụng để đưa cassette cảm ứng, trong đó trình tự di truyền mong muốn được liên kết hoạt động với promoter cảm ứng vào tế bào. Promoter này có khả năng phiên mã chỉ khi được cảm ứng đúng bởi protein điều hòa phiên mã. Protein điều hòa phiên mã này có thể được kiểm soát bởi cơ chất mà được cung cấp từ bên ngoài đến tế bào. Do đó, sự có mặt của cơ chất ngoại sinh có thể cho phép hoặc chặn sự biểu hiện từ promoter cảm ứng. Một ví dụ về biểu hiện kiểm soát được như thế là hệ thống Tet-ON mà được mô tả hơn nữa ở đây.

(Các) cassette cảm ứng khác nữa có thể được chèn vào các GSH khác nữa, các GSH này là khác với các GSH thứ nhất và thứ hai được đề cập ở trên.

Một hoặc nhiều trình tự di truyền có thể được phiên mã một cách có kiểm soát trong phạm vi GSH thứ hai và/hoặc GSH khác nữa. Thực tế, cassette cảm ứng có thể chứa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 trình tự di truyền mà được mong muốn để chèn vào GSH và sự phiên mã của chúng được cảm ứng một cách có kiểm soát.

Trình tự hoặc các trình tự di truyền mà được mong muốn để chèn vào trong GSH hoặc các GSH có trong phạm vi cassette cảm ứng, được liên kết hoạt động với promoter cảm ứng. Các trình tự di truyền này có thể là trình tự phù hợp bất kỳ, mà có khả năng được phiên mã thành ARN một khi hoạt tính của promoter đã được cảm ứng. Trình tự di truyền phù hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, gen chuyển (các gen mã hóa protein, trong đó ARN được sản xuất ra là ARN truyền tin (mARN) được dịch mã thành polypeptit), ARN không mã hóa (ncARN - bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ARN kẹp tóc ngắn (shARN), ARN đối nghĩa (asARN), ARN dẫn đường (gARN), ARN không mã hóa nhỏ (miARN), ARN gây nhiễu nhỏ

(siARN), ARN điều hòa từ phân tử khác (tasiARN), antagomir, aptamer, ban sao miARN mất chức năng (miARN sponge), và ARN chức năng bất kỳ khác).

Casset cảm ứng có thể gồm có vật liệu di truyền bổ sung để được chèn vào GSH thứ hai hoặc GSH khác nữa. Vật liệu di truyền bổ sung này có thể gồm có một hoặc nhiều gen đánh dấu như là protein phát huỳnh quang xanh lá cây (GFP) để chỉ ra rằng sự phiên mã đang xảy ra. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, các gen như là các gen kháng sinh hoặc các gen kháng thuốc có thể cho phép lựa chọn casset cảm ứng được chèn một cách thành công. Hơn nữa, sự biểu hiện có thể cảm ứng của gen cụ thể để nghiên cứu chức năng của nó hoặc của các trình tự mà sẽ giao thoa với chức năng của nó có thể là mong muốn. Tương tự, sự biểu hiện của các gen để tăng cường hoặc làm bất tác các chức năng sinh học của tế bào hoặc làm ảnh hưởng đến các tế bào ở phần khác của vi sinh vật có thể là mong muốn, bao gồm biểu hiện của các yếu tố tăng trưởng, các hormone peptit, bao gồm cả insulin v.v.

Về mặt kỹ thuật, sự chèn vào GSH thứ nhất và/hoặc thứ hai có thể xảy ra trên một nhiễm sắc thể, hoặc trên cả hai nhiễm sắc thể. GSH tồn tại ở cùng một ổ gen di truyền trên cả hai nhiễm sắc thể của vi sinh vật lưỡng bội. Việc chèn vào trong phạm vi cả hai nhiễm sắc thể là có lợi do nó có thể cho phép làm tăng mức độ phiên mã từ vật liệu di truyền được chèn vào trong phạm vi casset cảm ứng, do đó đạt được các mức phiên mã đặc biệt cao.

Việc chèn vào các GSH có thể là việc chèn đặc hiệu vật liệu di truyền được kiểm soát vào GSH cụ thể dựa trên sự tạo ra vị trí đặc hiệu theo yêu cầu của các đứt gãy ADN sợi đôi (DSB) ở GSH có thể đạt được. Vật liệu di truyền khi đó có thể được đưa vào có sử dụng cơ chế phù hợp bất kỳ, như là tái tổ hợp tương đồng. Phương pháp bất kỳ để tạo ra DSB đặc hiệu trong bộ gen có thể được sử dụng, nhưng hệ được ưu tiên gồm có CRISPR/Cas9 và các phiên bản được biến đổi của chúng, hệ ZFN và hệ TALEN. Hơn nữa, sự chèn gen mã hóa protein điều hòa phiên mã và/hoặc casset cảm ứng có thể được thiết kế để có thể đảo ngược và vật liệu di truyền được chèn có thể được loại bỏ và/hoặc được thay thế bởi protein điều hòa phiên mã/casset cảm ứng khác nếu thích hợp. Phương pháp thay thế protein điều hòa phiên mã và/hoặc casset cảm ứng tạo nên một phần của sáng chế. Việc thay thế này có thể là hữu dụng khi môi trường nuôi cấy tế bào đã được biến đổi thành công với

một gen mã hóa protein điều hòa phiên mã và/hoặc một cassette cảm ứng, và có mong muốn thay thế gen mã hóa protein điều hòa phiên mã và/hoặc cassette cảm ứng. Điều này là ưu điểm của việc đã chèn thành công và có thể cho phép thực hiện các chèn các đối tượng chèn lớn hơn. Để thực hiện khía cạnh này của sáng chế, các đối tượng chèn có thể gồm có các trình tự có thể phân chia để cho phép loại đi tất cả hoặc một phần của đối tượng chèn từ GSH, như là một phần của đối tượng chèn. Các phương pháp loại bỏ hoặc thay thế được ưu tiên gồm có các cách tiếp cận tái tổ hợp.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến các vectơ phù hợp để thực hiện chèn gen mã hóa protein điều hòa phiên mã và/hoặc cassette cảm ứng vào GSH.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp kiểm soát sự biểu hiện của gen chuyển trong tế bào, phương pháp này bao gồm các bước sau:

a) chèn gen mã hóa protein điều hòa phiên mã đúng vào vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất; và

b) chèn gen chuyển đã được liên kết hoạt động với promotor cảm ứng đúng vào vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ hai, trong đó promotor cảm ứng này được điều tiết bằng protein điều hòa phiên mã;

trong đó các vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất và thứ hai là khác nhau.

Theo khía cạnh này của sáng chế, cassette cảm ứng được mô tả ở trên bao gồm gen chuyển đã được liên kết hoạt động với promotor cảm ứng. Theo khía cạnh này của sáng chế, trình tự di truyền mong muốn được có trong phạm vi cassette cảm ứng là gen chuyển, tốt hơn là gen mã hóa protein. Do đó, phiên mã và dịch mã (biểu hiện) của gen chuyển có thể được kiểm soát trong phạm vi tế bào. Ưu điểm của phương pháp này đó là nó cho phép sự biểu hiện quá mức của gen chuyển, nếu là cần thiết.

Hơn nữa, theo khía cạnh này của sáng chế, gen chuyển giống hệt hoặc khác nữa có thể được chèn vào GSH khác nữa, mà GSH này khác với các GSH thứ nhất và thứ hai. Gen chuyển này được liên kết hoạt động với promotor cảm ứng như được mô tả ở trên.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp kiểm soát sự phiên mã của ARN không mã hóa trong tế bào, phương pháp này bao gồm các bước sau:

a) chèn gen mã hóa protein điều hòa phiên mã đúng vào vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất; và

b) chèn casset cảm ứng đúng vào vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ hai, trong đó casset cảm ứng này bao gồm ADN mã hóa trình tự ARN không mã hóa đã được liên kết hoạt động với promotor cảm ứng và promotor cảm ứng này được điều tiết bằng protein điều hòa phiên mã;

trong đó các vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất và thứ hai là khác nhau.

Hơn nữa, theo khía cạnh này của sáng chế, các casset cảm ứng giống hệt hoặc khác nhau khác nữa có thể được chèn vào GSH khác nữa, mà GSH này khác với các GSH thứ nhất và thứ hai. Casset cảm ứng này có thể bao gồm ADN mã hóa trình tự ARN không mã hóa hoặc trình tự di truyền khác bất kỳ đã được liên kết hoạt động với promotor cảm ứng và promotor cảm ứng này được điều tiết bằng protein điều hòa phiên mã.

Cụ thể hơn, phương pháp này cho phép làm mất tác dụng của gen nội sinh trong tế bào. Do đó, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm sự phiên mã và/hoặc dịch mã của gen nội sinh trong tế bào, phương pháp này bao gồm các bước sau:

a) chèn đ gen mã hóa protein điều hòa phiên mã đúng vào vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất; và

b) chèn casset cảm ứng đúng vào vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ hai, trong đó casset cảm ứng này bao gồm ADN mã hóa trình tự ARN không mã hóa đã được liên kết hoạt động với promotor cảm ứng và promotor này được điều tiết bằng protein điều hòa phiên mã và, trong đó trình tự ARN không mã hóa này kìm hãm sự phiên mã hoặc dịch mã của gen nội sinh;

trong đó các vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất và thứ hai là khác nhau.

Hơn nữa, theo khía cạnh này của sáng chế, các cassette cảm ứng giống hệt hoặc khác nhau khác nữa có thể được chèn vào GSH khác nữa, mà GSH này khác với các GSH thứ nhất và thứ hai. Cassette cảm ứng này có thể bao gồm ADN mã hóa trình tự ARN không mã hóa hoặc trình tự di truyền khác bất kỳ đã được liên kết hoạt động với promoter cảm ứng và promoter này được điều tiết bằng protein điều hòa phiên mã.

Theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ, gen nội sinh có thể mã hóa protein hoặc ARN không mã hóa.

Theo hai khía cạnh trên đây của sáng chế, (các) cassette cảm ứng bao gồm ADN mã hóa ARN không mã hóa, tức là ARN có chức năng nhưng không được dịch mã thành protein. ARN không mã hóa này có thể là ARN phù hợp bất kỳ, như là các loại được mô tả ở trên, nhưng tốt hơn là ARN kẹp tóc ngắn (shARN). Ở khía cạnh sau của sáng chế, ARN không mã hóa có thể tác dụng làm gen mất tác dụng theo cách phù hợp bất kỳ, bằng cách chặn phiên mã hoặc dịch mã gen hoặc kìm hãm sự biểu hiện nói chung. Cuối cùng, biểu hiện của gen này được giảm hoặc được chặn, nhưng chính gen vẫn còn giữ là nguyên vẹn.

Theo cách khác, ARN không mã hóa có mặt trong phạm vi trình tự của cassette cảm ứng có thể bao gồm các ARN mà có thể được sử dụng để làm bất hoạt gen nội sinh trong tế bào, đóng vai trò cơ bản để thay thế hoặc làm tự đứt gãy gen. Các ARN không mã hóa phù hợp mà có thể được sử dụng cho khía cạnh này của sáng chế bao gồm các yếu tố của nền CRISPR/Cas9, cụ thể hơn là các ARN dẫn đường (gARN) mà được điều khiển để tạo đích gen nội sinh.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp làm bất hoạt gen nội sinh trong tế bào, phương pháp này bao gồm các bước sau:

a) chèn gen mã hóa protein điều hòa phiên mã và gen mã hóa Cas9 hoặc dẫn xuất của nó đúng vào vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất; và

b) chèn cassette cảm ứng đúng vào vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ hai, trong đó cassette cảm ứng này bao gồm ARN dẫn đường đã được liên kết hoạt động với promoter cảm ứng và promoter này được điều tiết bằng protein điều hòa phiên mã và, trong đó trình tự gARN này nhắm đến đích là gen nội sinh;

trong đó các vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất và thứ hai là khác nhau.

Hơn nữa, theo khía cạnh này của sáng chế, các casset cảm ứng giống hệt hoặc khác nhau khác nữa có thể được chèn vào GSH khác nữa, mà GSH này khác với các GSH thứ nhất và thứ hai. Casset cảm ứng này có thể bao gồm trình tự di truyền bất kỳ đã được liên kết hoạt động với promotor cảm ứng và promotor này được điều tiết bằng protein điều hòa phiên mã.

Do đó, theo khía cạnh nêu trên của sáng chế, sự phiên mã của gARN được cảm ứng một cách có kiểm soát.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm sự phiên mã và/hoặc dịch mã của gen nội sinh trong tế bào, phương pháp này bao gồm các bước sau:

a) chèn gen mã hóa protein điều hòa phiên mã đúng vào alen thứ nhất của vị trí chèn an toàn về mặt di truyền; và

b) chèn casset cảm ứng đúng vào alen thứ hai của cùng vị trí chèn an toàn về mặt di truyền, trong đó casset cảm ứng này bao gồm ADN mã hóa trình tự ARN không mã hóa đã được liên kết hoạt động với promotor cảm ứng và promotor này được điều tiết bằng protein điều hòa phiên mã và, trong đó trình tự ARN không mã hóa này kìm hãm sự phiên mã hoặc dịch mã của gen nội sinh.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất phương pháp làm bất hoạt gen nội sinh trong tế bào, phương pháp này bao gồm các bước sau:

a) chèn gen mã hóa protein điều hòa phiên mã và gen mã hóa Cas9 hoặc dẫn xuất của nó đúng vào alen thứ nhất của vị trí chèn an toàn về mặt di truyền; và

b) chèn casset cảm ứng đúng vào alen thứ hai của cùng vị trí chèn an toàn về mặt di truyền, trong đó casset cảm ứng này bao gồm ARN dẫn đường đã được liên kết hoạt động với promotor cảm ứng và promotor này được điều tiết bằng protein điều hòa phiên mã và, trong đó trình tự gARN này nhắm đến đích là gen nội sinh.

Các phương pháp làm mất chức năng hoặc bất hoạt đơn bước như thế là mới và có thể tạo nên một phần của sáng chế.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp để lập trình phát triển tế bào gốc đa tiềm năng, phương pháp này bao gồm các bước:

a) chèn gen mã hóa protein điều hòa phiên mã đúng vào vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất; và

b) chèn cassette cảm ứng đúng vào vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ hai, trong đó cassette cảm ứng này bao gồm trình tự di truyền mã hóa yếu tố phiên mã phân dòng chủ đã được liên kết hoạt động với promoter cảm ứng, và promoter cảm ứng này được điều tiết bằng protein điều hòa phiên mã; và

trong đó các vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất và thứ hai là khác nhau.

(Các) cassette cảm ứng khác nữa hoặc bổ sung có thể được chèn vào các GSH khác nữa khác với các GSH thứ nhất và thứ hai.

Việc lập trình phát triển tế bào gốc đa tiềm năng thành các loại tế bào trưởng thành cụ thể có kỳ vọng cao và có thể đạt được sử dụng nền tạo đích kép theo sáng chế. Các phương pháp cụ thể đối với một số dạng tế bào được mô tả dưới đây.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất tế bào cơ từ tế bào gốc đa tiềm năng, phương pháp này bao gồm các bước:

a) chèn gen mã hóa protein điều hòa phiên mã đúng vào vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất; và

b) chèn gen MYOD1 đã được liên kết hoạt động với promoter cảm ứng đúng vào vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ hai, trong đó promoter cảm ứng này được điều tiết bằng protein điều hòa phiên mã, trong đó các vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất và thứ hai là khác nhau,

và nuôi cấy tế bào với sự có mặt của axit retinoic.

Gen MYOD1 là gen mã hóa protein biệt hóa cơ 1. Tốt hơn là, axit retinoic (RA) là RA có cấu tạo hoàn toàn là trans.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất tế bào cơ từ tế bào gốc đa tiềm năng biểu hiện *MYOD1*, phương pháp này bao gồm nuôi cấy tế bào với sự có mặt của axit retinoic.

Tốt hơn là, RA là RA có cấu tạo hoàn toàn là trans. Tốt hơn là, tế bào biểu hiện quá mức MYOD1.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất tế bào thần kinh đệm ít nhánh từ tế bào gốc đa tiềm năng, phương pháp này bao gồm các bước:

a) chèn gen mã hóa protein điều hòa phiên mã đúng vào vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất; và

b) chèn dạng kết hợp bất kỳ của các gen *SOX 10*, *OLIG2*, *NKX2.2*, và *NKX6.2* đã được liên kết hoạt động với promotor cảm ứng đúng vào vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ hai, trong đó promotor cảm ứng này được điều tiết bằng protein điều hòa phiên mã, trong đó các vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất và thứ hai là khác nhau,

Các gen *SOX-10*, *OLIG2*, *NKX2.2*, *NKX6.2* mã hóa yếu tố phiên mã *SOX-10*, *OLIG2*, *NKX2.2*, và *NKX6.2*, tương ứng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 (a-d): Tính hợp lệ của hệ biểu hiện quá mức được tạo đích ở vị trí nằm an toàn hệ gen đối ngẫu được tối ưu hóa. Fig.1(a) thể hiện thiết kế của các vector hướng đích gen đối với ổ gen hROSA26 và AAVS1. *HAR*: dải tương đồng, *SA*: chất nhận mỗi nối, *T2A*: *T2A* tín hiệu bỏ qua ribosom; *Neo*: gen kháng neomycin; *Puro*: gen kháng puromycin. *pA*: tín hiệu polyadenyl hóa; *CAG*: promotor CAG hoạt hóa cơ định; *rtTA*: rtTA thế hệ thứ ba; *TRE*: Yếu tố đáp ứng Tet cảm ứng được; *EGFP*: protein phát huỳnh quang xanh lá cây được tăng cường. Fig.1(b) thể hiện cảm ứng EGFP và động lực giải cứu (1(c)) trong các tế bào hESC biểu hiện EGFP được phát hiện bởi máy đếm dòng tế bào (cường độ huỳnh quang trung bình, MFI). Các kết quả là từ hai sao chép sinh học theo thời điểm và được biểu thị là giá trị trung bình $\pm$ SEM. Tất cả các giá trị là cường độ huỳnh quang từ bình thường đến tối đa sau 5 ngày dùng doxyxyclin (tham chiếu đến ngày 0 trên hình vẽ). Fig.1(d) thể hiện sự đáp ứng liều doxyxyclin đối với sự biểu hiện quá mức EGFP trong các tế bào hESC biểu hiện EGFP tiếp theo là cảm ứng với doxyxyclin trong 5 ngày. Các kết quả là từ hai sao chép sinh học cho mỗi điều kiện, và được biểu thị là giá trị trung bình $\pm$ SEM.

Tất cả các giá trị được thường hóa đến cường độ huỳnh quang tối đa được đo trong thử nghiệm. Các mức biểu hiện EGFP trong các tế bào hPSC biểu hiện CAG-EGFP cơ định được tạo đích GSH và trong các tế bào hPSC biểu hiện TRE-EGFP cảm ứng được được tạo đích GSH đối ngẫu sau cảm ứng với doxyxycilin. Các tế bào hPSC kiểu hoang dại và tế bào TRE-EGFP không cảm ứng có mặt làm các kiểm soát âm tính.

Fig.2 (a-d): Tổng quan của cách tiếp cận thực nghiệm và các kết quả để chuyển hóa nhanh một bước của các tế bào hPSC vào trong tế bào thần kinh (tế bào thần kinh hô hấp gây hít vào) sau điều trị bằng doxyxycilin (dox). Fig.2(a) là ở dạng sơ đồ chuyển hóa này, trong đó tế bào được biến đổi theo sáng chế với NGN2 được cảm ứng để biệt hóa vào trong tế bào thần kinh sau điều trị bằng Dox. Fig.2(b) cho thấy quá trình thời gian lập trình phát triển tạo ra tế bào thần kinh hô hấp gây hít vào từ các tế bào hESC đã được báo cáo bằng cách phân tích RT-PCR định lượng, mà cho thấy mẫu biểu hiện tạm thời của thùy thần kinh (MAP2, SYP), não trước (BRN2, FOXG1) và các gen đánh dấu thần kinh có glutamat (VGLUT2, GRIA4). Tế bào được phân tích ở ngày được chỉ ra của điều trị bằng doxyxycilin. Các giá trị được thể hiện so với gen giữ hốc nội sinh PBGD và bình thường hóa đến các điều kiện đa năng. Các kết quả là từ ba sao chép sinh học theo thời điểm và được biểu thị là giá trị trung bình $\pm$ SEM. Fig.2(c) mô tả định lượng của β III-tubulin (TUBB3) dương tính tế bào thần kinh bằng cách nhuộm màu miễn dịch trong tế bào thần kinh hô hấp gây hít vào được tạo ra từ các tế bào hESC sau một tuần cảm ứng. Các tế bào không biệt hóa được sử dụng làm kiểm soát âm tính (Kiểm soát), và số lượng được thông báo để tạo ra tế bào thần kinh hô hấp gây hít vào trong các tế bào hESC biểu hiện NGN2 mới được phân lập và sau 25 cấy chuyển (+P25). Fig.2(d) là các ảnh chụp tế bào mô tả quá trình thời gian lập trình phát triển tạo ra tế bào thần kinh hô hấp gây hít vào từ các tế bào hESC nhờ các hình ảnh tương phản pha chuỗi mà minh họa những thay đổi hình thái học.

Fig.3 (a-d): Lập trình phát triển các tế bào hPSC thành tế bào cơ vân. Fig.3a thể hiện ở dạng sơ đồ sự chuyển hóa nhanh một bước của các tế bào hPSC thành tế bào cơ vân bằng cách biểu hiện quá mức cảm ứng được của MYOD1 và xử lý với axit retinoic. Fig.3b thể hiện phân tích RT-PCR định lượng của mẫu biểu hiện tạm

thời của tế bào cơ gen đánh dấu các gen trong quá trình tạo ra tế bào cơ vân cảm ứng từ các tế bào hESC. Tất cả các giá trị được thể hiện so với các tế bào hPSC. Các kết quả là từ ba sao chép sinh học theo thời điểm và được biểu thị là giá trị trung bình $\pm$ SEM. Các hình vẽ Fig.3 (c) và (d) thể hiện định lượng của tế bào dương tính với MHC bởi máy đếm dòng tế bào 10 ngày sau cảm ứng thể hiện rằng, các tế bào hPSC biểu hiện OPTi-MYOD1 giữ lại tiềm năng tạo cơ của chúng thậm chí sau khoảng thời gian nuôi cấy mở rộng và cấy chuyển (p) tiếp sau tích hợp được tạo đích của hệ MYOD1. Các tế bào không biệt hóa được sử dụng làm kiểm soát âm tính (Kiểm soát), và các hình vẽ báo cáo đối với việc tạo ra tế bào cơ vân cảm ứng trong các tế bào hESC biểu hiện OPTi-MYOD1 mới được phân lập, hoặc trong cùng tế bào sau 50 cấy chuyển (+P50).

Fig.4 (a-f): thể hiện chiến thuật tạo đích đối với hệ thống biểu hiện quá mức Tet-On được tạo đích GSH đối ngẫu. Fig.4 (a) mô tả biểu đồ tiến trình thử nghiệm đối với việc tạo đích theo trình tự của ổ gen hROSA26 và AAVS1 trong các tế bào hPSC. Dấu hiệu cơ bản: Cas9n: D10A nickaza đột biến Cas9 endonucleaza từ *S. Pyogen* (*gen sinh mủ*); ZFN: nucleaza ngón tay kềm; Neo: neomycin; Puro: puromycin; rtTA: gen hoạt hóa chuyển tetracyclin đảo thế hệ thứ 3;. Điều này mô tả hệ thống biểu hiện EGFP cảm ứng được (i-EGFP) Fig.4(b) mô tả ở dạng sơ đồ hROSA26 chiến thuật tạo đích. Fig.4(c) mô tả chiến thuật tạo đích AAVS1. Dấu hiệu cơ bản đối với các hình vẽ 4(b) và (c): R26-prom: promotor ổ gen ROSA26 (THUMP3-AS1 gen); AAV-prom: promotor ổ gen AAVS1 (PPP1R12C gen); ZFN: nucleaza ngón tay kềm; 5'-HAR/3'-HAR: dải tương đồng ngược dòng/xuôi dòng. SA: chất nhận mỗi nối; T2A: T2A peptit; pA: tín hiệu polyadenyl hóa; CAG: CMV gen tăng cường sớm, promotor lai β -actin ở gà và β -globin ở thỏ; TRE: yếu tố đáp ứng Tet; EGFP: protein phát huỳnh quang xanh lá cây được tăng cường. Fig.4 (d) mô tả ở dạng sơ đồ chiến thuật tạo kiểu gen được sử dụng để nhận diện đúng các dòng hPSC được tạo đích ROSA26 và được tạo đích AAVS1; GSH-prom: promotor GSH (hROSA26 và AAVS1, tương ứng); WT: kiểu hoang dại; Casset cảm ứng: toàn bộ trình tự ngoại sinh được tích hợp sau việc tạo đích. PCR ổ gen: PCR kéo dài qua ổ được tạo đích gen với cả hai đoạn mỗi liên kết ngoại lệ vào hệ gen ADN phía ngoài trình tự hệ gen tương ứng với các dải tương đồng. Lưu ý rằng, do promotor

CAG chứa GC của nó không thể được khuếch đại bởi PCR thông thường. Do đó, sự chèn cassette biểu hiện chứa CAG chính xác dẫn đến thất thoát của sản phẩm PCR sau khi khuếch đại. Sự có mặt của dải kiểu hoang dại chỉ ra sự có mặt của alen không được tạo đích; thất thoát của dải kiểu hoang dại chỉ ra việc tạo đích đồng tiếp hợp. 5'-INT/3'-INT: PCRs: PCR kéo dài qua các vị trí chèn 5'- và 3'-, tương ứng. PCR amplicon kích cỡ đúng chỉ ra tích hợp đúng. 3'BB PCR: PCR kéo dài qua mỗi nối khung chính tạo đích dải tương đồng/vector. Sự có mặt của sản phẩm PCR chỉ ra tích hợp đích-off không đặc hiệu của plasmit thể cho. Fig.4(e) là ảnh gel mà thể hiện các kết quả tạo kiểu gen đối với hROSA26-CAG-rtTA được định hướng tới các tế bào hESC H9 dị tiếp hợp (HET) và đồng tiếp hợp (HOM). Fig.4(f) là ảnh gel mà thể hiện các kết quả tạo kiểu gen đối với AAVS1-TRE-EGFP được chọn được định hướng tới tạo các tế bào hESC H9 dị tiếp hợp (HET) và đồng tiếp hợp (HOM). 1kb+ là 1kb cộng với với thang ADN; WT là các tế bào hESC kiểu hoang dại; PL là plasmit đích; H₂O là nước kiểm soát.

Fig.5 (a-e): Sự phát triển của nền biểu hiện quá mức cảm ứng được được tối ưu hóa (OPTi-OX) dựa vào hPSC tạo đích GSH đối ngẫu. Fig.5(a) thể hiện các tế bào hESC H9 biểu hiện EGFP cảm ứng được được tạo đích GSH đối ngẫu được phân vào trong bốn nhóm thử nghiệm phụ thuộc vào việc xem một hoặc cả hai alen của ổ gen hROSA26 và AAVS1, tương ứng, được tạo đích thành công. Fig.5(b) thể hiện việc phát hiện protein rtTA bằng phương pháp phân tích Western blot trong các tế bào hESC H9 biểu hiện hROSA26-CAG-rtTA dị và đồng tiếp hợp được tạo đích thành công. ESCs ở người mang rtTA thể hệ thứ hai trong vị trí hệ gen ngẫu nhiên có mặt làm các mẫu kiểm soát. α -tubulin: kiểm soát tải. Fig.5(c) mô tả phân tích đếm dòng tế bào đối với các ví dụ đại diện của các tế bào hESC biểu hiện các tế bào hESC biểu hiện EGFP cảm ứng được được tạo đích GSH được đối ngẫu khác nhau được mô tả trên Fig.5(a). Fig.5(d) thể hiện cường độ huỳnh quang trung bình (MFI) của biểu hiện EGFP trong các tế bào hESC biểu hiện EGFP cảm ứng được được tạo đích GSH được đối ngẫu khác nhau được mô tả trên Fig.5(a). Tế bào được phân tích bằng máy đếm dòng tế bào trong các điều kiện soát (không có doxyxyclin, CTR) hoặc sau 5 ngày của điều trị bằng doxyxyclin (DOX). Từng điểm dữ liệu thể hiện dòng vô tính riêng. Các tế bào hESC biểu hiện CAG-EGFP và các tế bào hESCs kiểu hoang dại

có mặt để so sánh. Phân tích thống kê của nhóm được điều trị bằng doxyxycyclin ($n=4-5$, như được chỉ ra) cho thấy rằng các mức biểu hiện EGFP là cao nhất trong dòng vô tính đôi đồng tiếp hợp (ANOVA một đường với thử nghiệm sau-hoc Dunnet; $F(2, 10) = 25,34$, $p=0.0001$; **** $p<0.0001$; ** $p=0,0026$). Điều kiện này được chọn đối với các thử nghiệm khác nữa. Fig.5(e) thể hiện tỷ lệ phần trăm của các tế bào EGFP+ trong i-EGFP hESCs được tạo đích GSH đối ngẫu khác nhau được mô tả trên Fig.5(a).

Fig.6 (a-d): Các đặc tính của nền OPTi-OX trong các tế bào hPSC và trong quá trình biệt hóa lớp phôi. Fig.6(a) mô tả phân tích đếm dòng tế bào của các mức EGFP trong các tế bào hPSC sống được tạo đích thành công và sau khi sự biệt hóa chúng thành ba lớp phôi xử lý sau điều trị với doxyxycyclin trong 5 ngày. Các sự điều chỉnh cần thiết được cài đặt để bao gồm các mức biểu hiện EGFP cảm ứng (DOX,) cao. Quần thể kiểm soát không cảm ứng (CTR) được đặt nằm ngay bên cạnh bên trái trục y. Các hình vẽ Fig.6(b) và Fig.6(c) thể hiện tổng quan của đồ thị từ máy đếm dòng tế bào trong 6(a), gồm có cường độ huỳnh quang trung bình (MFI) và tỷ lệ phần trăm của các tế bào EGFP⁺. Fig.6(d) thể hiện biểu đồ dạng cột của các kết quả định lượng RT-PCR ở các mức biểu hiện EGFP mARN của tế bào gốc đa tiềm năng đồng tiếp hợp và tiếp theo biệt hóa thành ba lớp phôi. WT: kiểu hoang dại;

Fig.7: Các đặc tính của tế bào thần kinh hô hấp gây hít vào ở người. Các kết quả định lượng RT-PCR cho thấy điều phối giảm nhanh của các yếu tố đa năng *NANOG* và *OCT4* khi có điều trị với doxyxycyclin.

Fig.8: phát tín hiệu RA trong quá trình cảm ứng tế bào cơ. Hình vẽ này thể hiện phân tích qPCR của 6 retinoit và thụ thể retinoit trong quá trình cảm ứng tế bào cơ cho thấy biểu hiện của $RAR\alpha$, $RAR\beta$ và tất cả 3 đẳng dạng RXR, nhưng không của $RAR\gamma$ qua toàn bộ quá trình cảm ứng tế bào cơ vẫn cảm ứng. A là α , B là β và G là γ .

Fig.9(a) đến Fig.9(c): Các đặc tính phát triển của các tế bào hESC biểu hiện OPTi-MYOD1 thành tế bào cơ vân cảm ứng ở người. Fig.9(a) thể hiện quá trình thời gian lập trình phát triển các tế bào hPSC biểu hiện OPTi-MYOD1 thành các tế bào cơ cảm ứng. Những thay đổi hình thái học đã được báo cáo với các hình ảnh tương phản pha được tự động hóa mà có được mỗi 30 phút với hệ trôi qua thời gian Nikon

Biostation IM. Thang đo: 200 μ m. Fig.9(b) mô tả các kết quả qPCR thể hiện điều phối giảm nhanh của các yếu tố đa năng *NANOG* và *OCT4* khi có điều trị với doxyxyclin của các tế bào hESC biểu hiện OPTi-NGN2 (đồ thị bên trái). Tất cả năm đẳng dạng chuỗi nặng tế bào cơ đặc hiệu cơ vân chính người (được mã hóa bởi họ gen MYH) được điều tiết tăng mạnh trong quá trình lập trình phát triển tế bào cơ (bên phải đồ thị). Các loại này gồm có hai đẳng dạng mà được biểu hiện trong quá trình phát triển phôi và cơ sau sinh (đẳng dạng phôi MYH3; đẳng dạng sơ sinh MYH8) và ba đẳng dạng mà thường được biểu hiện trong cơ bộ xương người trưởng thành [MYH7 trong các sợi chuyển mạch chậm (typ I); MYH2 trong sợi kháng mệt chuyển mạch nhanh (typ IIa), và MYH1 trong sợi có thể mệt nhanh (typ IIx)]. Ngược lại, MYH4 mà thể hiện đẳng dạng MHC cơ định trong chuyển mạch nhanh, sợi tế bào cơ có thể mệt nhanh ở mèo không được biểu hiện ở lượng đáng kể ở người (<1%) và cũng không cảm ứng qua toàn bộ quá trình thời gian lập trình phát triển. Fig.9(c) mô tả tế bào cơ vân được tạo ra biểu hiện khoảng rộng của protein gen đánh dấu điển hình, gồm có F-Actin (nhìn thấy được thông qua độc tố Phalloidin kết hợp với AlexaFluor488), phân tử bám dính tế bào trung tính (*NCAM*), Desmin (*DES*), Chuỗi nặng Myosin (*MYH*), Titin (*TTN*), α -Actinin (*ACTN2*) và Troponin T (*TNNT*), nhưng không có gen đánh dấu tiền bối nguyên bào cơ *PAX3* và *PAX7*. Tất cả các mẫu được nhuộm màu đối lại với myogenin (*MYOG*). Thang đo: 50 μ m. DAPI: nhuộm màu nhân.

Fig.10: Ba đồ thị này mô tả các kết quả qPCR đối với MYOD1 tổng, MYOD1 nội sinh, và MYOG 2 ngày sau tạo ra các tế bào hPSC biểu hiện OPTi-MYOD1 với các nồng độ khác nhau của doxyxyclin. Các kết quả qPCR được thể hiện 48 giờ sau cảm ứng với các nồng độ khác nhau của doxyxyclin. Biểu hiện được vẽ đồ thị so với gen giữ hốc nội sinh aPBGD.

Fig.11: Mô tả về hệ thống Tet-On. Tet-On gồm có hai thành phần: ở đỉnh cassette gen hoạt hóa được mô tả, trong đó promoter cơ định (cP) điều khiển biểu hiện của rtTA (gen hoạt hóa chuyển tetracyclin đảo). RtTA là protein dung hợp mà gồm có dạng đột biến của sinh vật chưa có nhân điển hình gen chặn Tet (TetR) và vùng gen hoạt hóa chuyển phiên mã VP16 (được tạo ra từ virus herpes đơn giản). Ở đây vùng đáp ứng được mô tả. Nó gồm có promoter cảm ứng (TRE, yếu tố đáp ứng

tetraxylin) và gen quan tâm. TRE là promotor nhân tạo đáp ứng với rtTA. Nó gồm có 7 chuỗi operon Tet (tetO7) và promotor CMV tối thiểu mạnh (mCMV), mà chính nó không hoạt động và chỉ recruits cơ cấu phiên mã ngay khi liên kết của rtTA vào 7 operon Tet. Doxyxycilin, dẫn xuất tetraxycilin, là cần thiết đối với liên kết của đột biến TetR vào TRE, dẫn đến biểu hiện của cassette cảm ứng, trong trường hợp này là EGFP (pA: tín hiệu polyadenyl hóa).

Fig.12 (a-d) Lập trình phát triển các tế bào hPSC thành tế bào thần kinh đệm ít nhánh. Fig.12(a) mô tả ở dạng sơ đồ cách tiếp cận thực nghiệm đối với việc chuyển đổi nhanh của các tế bào hPSC biểu hiện OPTi-OLIG2-SOX10 thành các tế bào phân dòng thần kinh đệm ít nhánh (các i-OPC và các i-OL). Fig.12(b) thể hiện định lượng của tế bào dương tính với BrdU sau 3 chuỗi cấy chuyển mỗi đợt 4 ngày và xung BrdU kèm theo từng đợt kéo dài 4 ngày (P = số lượng cấy chuyển). Fig.12(c) thể hiện phân tích RT-PCR định lượng của mẫu biểu hiện tạm thời của các gen mã hóa đối với protein kết hợp với myelin (CNP, MAG, MBP, MOG, và PLP) trong quá trình tạo ra i-tế bào thần kinh đệm ít nhánh từ các tế bào hPSC. Các tế bào hPSC biểu hiện OPTi-OLIG2-SOX10 được tạo ra trong môi trường tế bào thần kinh đệm ít nhánh được bổ sung với PDGF α và FGF2. Sau một tuần cảm ứng tác nhân gây phân bào được loại đi để tạo khả năng biệt hóa cuối cùng. Tất cả các giá trị được thể hiện so với gen giữ hốc nội sinh PBGD và bình thường hóa đến các điều kiện đa năng. Các kết quả là từ 2-3 sao chép sinh học theo thời điểm và được biểu thị là giá trị trung bình $\pm$ SEM. Fig.12(d) mô tả định lượng của tế bào dương tính với CNP và PLP bằng cách nhuộm màu miễn dịch trong i-tế bào thần kinh đệm ít nhánh được tạo ra từ các tế bào hPSC biểu hiện OPTi-OLIG2-SOX10 sau 20 ngày cảm ứng. Các tế bào không biệt hóa được sử dụng làm kiểm soát âm tính, và các hình vẽ báo cáo đối với i-tế bào thần kinh đệm ít nhánh trong các tế bào hPSC biểu hiện OPTi-NGN2 mới được phân lập và sau 50 cấy chuyển (+P50).

Fig.13 là hình thể hiện ở dạng sơ đồ các nguyên lý của sáng chế. Về cơ bản, hình này mô tả sự chèn vào hai vị trí di truyền khác nhau nằm an toàn ở lõi theo sáng chế. Một lần chèn kiểm soát biểu hiện của trình tự di truyền trong phạm vi cassette cảm ứng trong lần chèn thứ hai. Vật liệu di truyền bổ sung có thể có mặt trong các cấu trúc vector nhiều xistron như được thể hiện. Hơn nữa, lớn hơn hai vị trí di truyền

nằm an toàn có thể được tạo đích, như là nhiều casset cảm ứng hoặc vật liệu di truyền khác có thể được đặt dưới sự kiểm soát của gen điều biến được đặt trong vị trí GSH thứ nhất.

Fig.14 (a đến f) là các hình ảnh của các kết quả thể hiện sự phát triển của hệ thống làm mất tác dụng cảm ứng được dựa vào việc tạo đích GSH đối ngẫu của hSPCs. Fig.14a thể hiện cách tiếp cận thực nghiệm promotor -H1-H1, TO-operon Tet, tetR-gen kìm hãm tetracyclin. Fig.14b là ở dạng sơ đồ thể hiện alen gen chuyển được tạo ra để thu được các tế bào hESC biểu hiện gen chuyển thông báo EGFP mà có thể bị bất hoạt sử dụng EGFP shRNA cảm ứng được. Fig.14c thể hiện biểu hiện EGFP khi không có mặt hoặc có mặt của tetracyclin trong 5 ngày trong các tế bào hESC được tạo đích với các dạng kết hợp được chỉ định của EGFP shRNA cảm ứng được và tetR (STD = kiểu đại tiêu chuẩn, OPT = codon được tối ưu hóa). Các tế bào hESC được tạo đích đôi mà không mang EGFP shRNA được sử dụng làm các kiểm soát âm tính. n.s.= $p>0,05$ (không đáng kể), **= $p>0,01$, ***= $p>0,001$ VS cùng dòng tetR không có tet và không có shRNA. Fig.14d là western blot đại diện đối với tetR trong STD hoặc OPT tetR biểu hiện các tế bào hESC được tạo đích ROSA26. HET= tạo đích dị tiếp hợp, HOM= tạo đích đồng tiếp hợp. các tế bào hESC với STD tetR tích hợp ngẫu nhiên được thể hiện làm tham khảo dương tính, trong khi các tế bào hESC H9 kiểu hoang dại là các kiểm soát âm tính. TUB4A4A là kiểm soát tải. Các lượng protein khác nhau được nạp để tạo thuận tiện cho việc so sánh định lượng. Fig.14(E): EGFP làm mất tác dụng và động lực giải cứu trong các tế bào hESC OPTiKD biểu hiện EGFP được đo bằng máy đếm dòng tế bào (MFI) và qPCR (mARN). Các kết quả là từ 2 nuôi cấy độc lập theo thời điểm. Fig.14(F): Đường cong đáp ứng liều tetracyclin đối với EGFP làm mất tác dụng trong các tế bào hESC OPTiKD biểu hiện EGFP. Nồng độ ức chế nửa tối đa (IC_{50}) được báo cáo. Các kết quả là từ 2 nuôi cấy độc lập cho mỗi liều, và giá trị trung bình được thể hiện.

Fig.15 (a, b và c) thể hiện tính hợp lệ của ổ gen ROSA26 và AAVS1 là sự vững vàng của GSH. Fig.15a thể hiện cách tiếp cận thực nghiệm sau việc tạo ra GSH EGFP, gen thông báo các tế bào hPSC để thử nghiệm biểu hiện GSH trong quá trình biệt hóa. Dây thần kinh, tế bào thần kinh đệm ít nhánh, và tế bào dạng sao thu được trong nuôi cấy dạng khối chứa hỗn hợp của các phả hệ tế bào này, trong khi tất cả

các dạng tế bào khác được tạo ra riêng. Fig.15b là gen thông báo alen gen chuyển ROSA26 và AAVS1 EGFP ở dạng sơ đồ. R26-prom: promotor ở gen ROSA26; AAV-prom: promotor ở gen AAVS1; 5'-HAR/3'-HAR: dải tương đồng ngược dòng/xuôi dòng; SA: chất nhận mỗi nối; T2A: T2A peptit tự phân chia; Neo: kháng neomycin; Puro: kháng puromycin; pA: tín hiệu polyadenyl hóa; CAG: promotor CAG; EGFP: protein phát huỳnh quang xanh lá cây được tăng cường. Fig.15 (C): biểu hiện EGFP khi không có mặt hoặc có mặt của tetracyclin trong 5 ngày trong các tế bào hESC được tạo đích với các dạng kết hợp được chỉ định của EGFP shRNA cảm ứng được và tetR (tetR tiêu chuẩn kiểu hoang dại, STDtetR, hoặc tetR được tối ưu hóa codon, OPTtetR). Các tế bào hESC được tạo đích đôi mà không mang EGFP shRNA được sử dụng làm các kiểm soát âm tính. Các kết quả là từ 2-3 dòng cá thể cho mỗi điều kiện (bảng 1). n.s.= $p>0,05$ (không đáng kể), **= $p<0,01$, ***= $p<0,001$ VS cùng dòng tetR không có tet và không có shRNA (ANOVA với so sánh sau-hoc Holm-Sidak).

Fig.16 (a-d) Tạo ra các tế bào hESC của gen thông báo ROSA26 và AAVS1 EGFP. Fig.16(A): là hình vẽ ở dạng sơ đồ của cách tiếp cận tạo đích ROSA26 và của các chiến thuật tạo kiểu gen được sử dụng để nhận diện dòng được tạo đích đúng. Cas9n: D10A nickaza đột biến Cas9 endonucleaza từ *S. Pyogen* (gen sinh mủ). R26-prom: promotor ở gen ROSA26 (THUMPD3-AS1 gen); 5'-HAR/3'-HAR: dải tương đồng ngược dòng/xuôi dòng; Gen chuyển: vùng được tích hợp sau tạo đích gen; PCR ở gen: sản phẩm PCR của kiểu hoang dại ở gen ROSA26 (chỉ ra alen không được tạo đích); PCR ở gen/ PCR thất thoát alen: sản phẩm PCR của alen được tạo đích/PCR mà thất bại nếu gen chuyển chứa promotor CAG giàu GC (chỉ số của được mong đợi gen chuyển việc tạo đích); 5' INT/3' INT PCR: sản phẩm PCR của vùng tích hợp đầu 5'/đầu 3' ở gen chuyển (chỉ số của được mong đợi gen chuyển việc tạo đích); 5' BB/3' BB PCR: sản phẩm PCR của khung vector đầu 5'/đầu 3' (chỉ số tích hợp plasmid lệch đích không đặc hiệu). Lưu ý rằng, tương tự việc tạo đích và các chiến thuật tạo kiểu gen được áp dụng đối với ở gen việc tạo đích AAVS1. Fig.16(B): ở dạng sơ đồ ROSA26 alen gen chuyển được tạo ra để thử nghiệm chiến thuật tốt nhất đối với EGFP cơ định (protein phát huỳnh quang xanh lá cây được tăng cường) biểu hiện. ENDO-EGFP: EGFP được dẫn động bằng nội sinh ROSA26 promotor (R26-

prom; vectơ hướng đích pR26-Puro_ENDO-EGFP); EF1 α -EGFP: EGFP được dẫn động bằng yếu tố kéo dài 1 α promoter (vectơ hướng đích pR26-Neo_EF1 α -EGFP); CAG-EGFP: EGFP được dẫn động bằng promoter CAG (vectơ hướng đích pR26-Neo_CAG-EGFP); SA: chất nhận mỗi nối; Puro: kháng puromyxin (puromyxin N-axetyltransferaza); Neo: kháng neomycin (neomycin phosphotransferaza II); pA: tín hiệu polyadenyl hóa. Fig.16(C): Máy đếm dòng tế bào định lượng của tỷ lệ phần trăm của tế bào dương tính với EGFP (EGFP+; cổng được thể hiện), và của cường độ huỳnh quang trung bình EGFP (MFI) trong dòng vô tính của gen thông báo hESC đại diện ROSA26-EGFP, hoặc các tế bào hESC H9kiểu hoang dại. Fig.16(D): Tỷ lệ phần trăm của tế bào dương tính với EGFP trong các tế bào hESC chứa gen thông báo ROSA26-EGFP. Các kết quả đối với 3 dòng vô tính với việc tạo đích dị tiếp hợp ROSA26 cho mỗi điều kiện.

Fig.17. Tính hợp lệ của nền làm mất tác dụng cảm ứng được được tối ưu hóa sau biệt hóa hPSC. Đồ thị thể hiện biểu hiện EGFP được đo bằng qPCR khi không có mặt (CTR) hoặc sự có mặt của tetracyclin trong 5 ngày (TET) trong các dạng tế bào được chỉ ra được tạo ra từ các tế bào hESC OPTiKD (iKD) và sOPTiKD (siKD) biểu hiện EGFP. Các mức EGFP được thông báo so với các điều kiện soát trong cùng dòng đối với từng phả hệ riêng. Các chữ viết tắt chỉ ra các phả hệ được mô tả trên Fig.15 (pluri: không khác nhau). Các kết quả là từ hai nuôi cấy độc lập cho mỗi điều kiện.

Fig.18 (a-d). Sự phát triển của nền làm chất bất hoạt CRISPR/Cas9 cảm ứng được được tối ưu hóa trong các tế bào hPSC. Fig.18a thể hiện cách tiếp cận thực nghiệm để tạo ra cảm ứng được làm bất hoạt các tế bào hPSC (iKO). Fig.18b mô tả ở dạng sơ đồ quy trình nhân dòng vô tính để tạo ra các vectơ hướng đích AAVS1 với cassette gARN cảm ứng được. Fig.18c thể hiện alen gen chuyển được tạo ra để thu được các tế bào hESC biểu hiện gen chuyển thông báo EGFPd2 mà có thể bị bất hoạt bởi CRISPR/Cas9 sử dụng EGFP gARN cảm ứng được (các tế bào hESC sOPTiKO biểu hiện EGFP). Bsd: kháng blastixidin; EGFPd2: EGFP không ổn định. Fig.18 (d): Máy đếm dòng tế bào định lượng của động lực làm bất hoạt EGFPd2 cảm ứng được trong tế bào sOPTiKO từ Fig.19c (gARN 2-TO) và b(gARN 3-2TO). Tỷ lệ phần

trăm của tế bào dương tính với EGFP phát hiện/quan trắc hàng ngày sau khi bổ sung tetracyclin. Các kết quả là từ 2 nuôi cấy độc lập.

Fig.19 (a-e): Sự phát triển của nền làm chất bất hoạt CRISPR/Cas9 cảm ứng được được tối ưu hóa trong các tế bào hESC. (A-D) mô tả máy đếm dòng tế bào đại diện biểu hiện EGFPd2 trong EGFPd2 đồng tiếp hợp các tế bào hESC sOPTiKO mang các dạng kết hợp được chỉ định của gARN (2 hoặc 3) và promoter cảm ứng (a đến hoặc 2TO, tham khảo Fig.19 e). Các vector hướng đích: pAAV-Puro_siKOEgFP-2 (19a), pAAV-Puro_siKO-2TO-EGFP-2 (19b), pAAV-Puro_siKO-EGFP-3 (19c), pAAV-Puro_siKO-2TO-EGFP-3 (19d). Tế bào được nuôi cấy trong sự có mặt của tetracyclin (TET) trong 5 ngày, hoặc được duy trì trong các điều kiện soát (CTR) khi không có mặt tetracyclin. Lưu ý rằng, công thức mô đã được bình thường hóa sao cho diện tích dưới đường cong bằng với 1 (100%) đối với tất cả các mẫu được thể hiện, để tạo thuận tiện cho việc so sánh trực tiếp bằng mắt. Fig.19(e): Trình tự nucleotit của các promoter H1 Pol III cảm ứng được đối với sOPTiKO hệ thống chứa một hoặc hai operon Tet (H1-TO và H1-2TO, tương ứng). Dấu hiệu trình tự cơ bản được tô màu. Enzym giới hạn cắt các vị trí được sử dụng cho gARN nhân dòng vô tính được thể hiện (Fig.18B). DSE: yếu tố trình tự xa; PSE: yếu tố trình tự gần; TETO2: operon Tet; +1: vị trí bắt đầu của ARN phiên mã.

Các hình vẽ từ Fig.20 đến Fig.33 là các hình ảnh của bản đồ các plasmit khác nhau được sử dụng trong phạm vi các ví dụ của sáng chế. Các bản đồ này là:

20) pSpCas9n(BB)_R26-R

21) pSpCas9n(BB)_R26-L

22) pR26_CAG_EGFP

23) pR26_CAG_rtTA

24) pZFN-AAVS1-L-ELD (nucleaza ngón tay kềm bên trái)

25) pZFN-AAVS1-R-KKR (nucleaza ngón tay kềm bên phải)

26) pAAV_CAG_EGFP (thể cho)

27) pR26-Neo_CAG-OPTtetR (tạo đích hROSA26 của tetR được tối ưu hóa codon)

- 28) pAAV-Puro_iKD (tạo đích AAVS1 của shARN cảm ứng được)
- 29) pAAV-Neo_CAG-Cas9 (tạo đích AAVS1 của Cas9)
- 30) pAAV-Puro_siKO (tạo đích AAVS1 của gARN cảm ứng được,)
- 31) pAAV-Puro_siKO-2TO (tạo đích AAVS1 của gARN cảm ứng được, phiên bản với 2 operon Tet trong promoter)
- 32) pAAV_TRE-EGFP (EGFP biểu hiện quá mức cảm ứng được, được gắn vào)
- 33) pAAV_TRE-MYOD1 (MYOD1 biểu hiện quá mức cảm ứng được đối với cơ)

Mô tả chi tiết sáng chế

Các tác giả sáng chế đã phát triển phương pháp mà là hữu dụng đối với cảm ứng được phiên mã của trình tự di truyền có mặt trong phạm vi cassette cảm ứng trong tế bào có nhân điển hình, và đặc biệt là tế bào gốc đa tiềm năng và thể hệ con của chúng.

Sáng chế áp dụng được cụ thể cho lập trình phát triển tế bào gốc đa tiềm năng, nhờ biểu hiện quá mức của cassette cảm ứng trong phạm vi tế bào mầm mà khởi đầu sự phát triển của dạng tế bào trưởng thành cụ thể. Hơn nữa, còn áp dụng được cụ thể cho làm mất tác dụng hoặc làm bất hoạt của nội sinh chức năng trong phạm vi tế bào để nghiên cứu thoát của chức năng hoặc làm thay đổi các chức năng của tế bào hoặc tập tính trong các tế bào này. Làm mất tác dụng hoặc làm bất hoạt có thể áp dụng cho các gen mã hóa protein hoặc cho các ADN mã hóa trình tự ARN không mã hóa. Một cách có thể được tạo đích bằng phương pháp theo sáng chế là bằng cách làm bất hoạt hoặc làm mất tác dụng.

Phương pháp này là dựa trên ít nhất việc tạo đích kép của vị trí nằm an toàn trong bộ gen của tế bào mầm, với hệ thống đối với cảm ứng phiên mã tách rời trên hai hoặc nhiều GSH. Tuy nhiên, phương pháp này không chỉ giới hạn ở tế bào mầm, và có thể được sử dụng để làm biến đổi bộ gen của dạng tế bào bất kỳ, ví dụ trong việc nghiên cứu hoặc trong việc chữa bệnh bằng gen. Ở phương pháp theo sáng chế, một GSH được biến đổi để chứa gen điều tiết phiên mã mà là cần thiết để cảm ứng

phiên mã của trình tự di truyền có mặt trong phạm vi casset cảm ứng được chèn vào GSH khác ở phần khác nào đó trong bộ gen. Gen điều tiết phiên mã tốt hơn là được biểu hiện cơ định. Được ưu tiên là, cơ chất/tác nhân ngoại sinh cần được cung cấp để kiểm soát hoạt tính của protein điều hòa phiên mã và do đó kiểm soát biểu hiện của casset cảm ứng. Do ít nhất hai GSH riêng rẽ được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế, có tổng số là bốn ổ gen có thể chèn, do từng GSH tồn tại trên cả hai nhiễm sắc thể của vi sinh vật lưỡng bội. Điều này làm tăng lượng của phiên mã có thể từ tế bào nếu tất cả các bốn ổ gen được biến đổi sử dụng phương pháp theo sáng chế. Một ví dụ về các kết quả khác nhau của việc chèn đúng đích được thể hiện trên Fig.5a. Hơn nữa, phương pháp theo sáng chế sử dụng ít nhất hai vị trí GSH khác nhau. Được hiểu rằng, các vị trí GSH khác nữa có thể được sử dụng để đưa vào các gen điều tiết phiên mã khác nữa, casset cảm ứng hoặc vật liệu di truyền bất kỳ khác gồm có, nhưng không chỉ giới hạn ở, gen đánh dấu có thể lựa chọn, kháng sinh hoặc các gen kháng thuốc, các gen liên quan đến hệ CRISPR/Cas9 hoặc các gen có chức năng chưa được biết đến.

Do đó, sáng chế đề cập đến phương pháp kiểm soát sự biểu hiện của trình tự di truyền được đưa vào trong tế bào, phương pháp này bao gồm các bước sau:

a) chèn trình tự di truyền mã hóa protein điều hòa phiên mã đúng vào vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất; và

b) chèn casset cảm ứng đúng vào vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ hai, trong đó casset cảm ứng này bao gồm trình tự di truyền được liên kết hoạt động với promotor cảm ứng, và promotor được điều tiết bằng protein điều hòa phiên mã;

trong đó các vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất và thứ hai là khác nhau.

Hơn nữa, theo khía cạnh này của sáng chế, các casset cảm ứng đồng dạng hoặc khác nhau khác nữa có thể được chèn vào GSH khác nữa, mà là khác với GSH thứ nhất và thứ hai. Casset cảm ứng này là như được mô tả ở đây.

Việc chèn đặc hiệu nằm trong phạm vi vị trí chèn an toàn về mặt di truyền là được ưu tiên trên bộ gen tích hợp ngẫu nhiên, do điều này được mong đợi là biến đổi an toàn hơn của bộ gen, và ít có khả năng dẫn đến tác dụng phụ không mong muốn

như là bất hoạt biểu hiện gen tự nhiên hoặc gây ra đột biến mà dẫn đến các dạng tế bào ung thư.

Vị trí chèn an toàn về mặt di truyền (GSH) là ổ gen trong phạm vi bộ gen, trong đó gen hoặc vật liệu di truyền khác có thể được chèn vào không có ảnh hưởng độc hại bất kỳ trên tế bào hoặc trên vật liệu di truyền được chèn. Có lợi nhất là vị trí GSH trong đó sự biểu hiện của gen được chèn không bị làm xáo trộn bằng cách biểu hiện bất kỳ thấy rõ hoàn toàn từ các gen lân cận và biểu hiện của cassette cảm ứng làm giảm thiểu can thiệp bất kỳ với lập trình phiên mã nội sinh. Chỉ tiêu chính thức hơn đã được đề xuất là hỗ trợ trong việc xác định để xem ổ gen cụ thể là vị trí GSH trong tương lai (Papapetrou *et al*, 2011, *Nature Biotechnology*, 29(1), 73–8. doi:10.1038/nbt.1717.). Các chỉ tiêu này gồm có vị trí mà là (i) 50 kb hoặc lớn hơn từ đầu 5' của bất kỳ gen, (ii) 300 kb hoặc lớn hơn từ bất kỳ gen liên quan đến ung thư, (iii) 300 kb hoặc lớn hơn từ bất kỳ microARN (miARN), (iv) nằm ở ngoài đơn vị phiên mã và (v) nằm ở ngoài các vùng siêu bảo toàn (UCR). Không thể cần thiết thỏa mãn tất cả các chỉ tiêu được đề xuất này, do GSH đã được nhận diện không thỏa mãn tất cả các chỉ tiêu. Hiểu rằng, GSH phù hợp sẽ thỏa mãn ít nhất 2, 3, 4 hoặc tất cả các chỉ tiêu này.

Các vị trí khác nữa có thể được nhận diện bằng cách tìm kiếm các vị trí nơi mà virus theo bản năng tích hợp không có đứt gãy biểu hiện gen tự nhiên.

Vị trí GSH phù hợp bất kỳ có thể được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế, trên cơ sở mà vị trí cho phép chèn vật liệu di truyền mà không gây ảnh hưởng độc hại đến tế bào và cho phép việc phiên mã vật liệu di truyền được chèn vào. Những người có trình độ trung bình trong lĩnh vực tương ứng có thể sử dụng chỉ tiêu được đơn giản hóa này để nhận diện GSH phù hợp, và/hoặc chỉ tiêu chính thức hơn được đưa ra trên đây.

Đối với bộ gen người, một vài vị trí GSH đã được nhận diện, và các vị trí này gồm có ổ gen AAVS1, ổ gen hROSA26 và gen CLYBL. Gen CCR5 và gen HPRT có còn được tranh luận là có thể là các GSH, và việc điều tra hơn nữa có thể nhận diện một hoặc nhiều trong số các vị trí này làm các GSH trong bộ gen người.

Ổ gen ở vị trí tích hợp 1 của virus liên quan adeno (AAVS1) nằm ở trong phạm vi protein phosphatase 1, cơ cấu phụ điều tiết gen 12C (PPP1R12C) gen trên nhiễm sắc thể người 19, mà được biểu hiện tương đồng và phân bố rộng rãi trong mô người. Vị trí này dùng làm ổ gen tích hợp đặc hiệu đối với AAV huyết hơn là typ 2, và do đó được nhận diện có thể là GSH. AAVS1 đã chứng tỏ được là môi trường thuận tiện đối với phiên mã, do nó bao gồm cấu trúc nhiễm sắc thể mở và tác nhân cách ly nhiễm sắc thể bẩm sinh mà có khả năng kháng cassette cảm ứng chống bất hoạt. Không có tác dụng phụ được biết trên tế bào dẫn đến từ đứt gãy của gen PPP1R12C. Hơn nữa, cassette cảm ứng được chèn vào vị trí này vẫn còn giữ là hoạt động phiên mã trong nhiều dạng tế bào khác nhau. AAVS1 do đó được xem là GSH và đã được sử dụng rộng rãi để truyền được tạo đích gen trong bộ gen người.

Vị trí hROSA26 đã được nhận diện trên cơ sở của tương đồng trình tự với GSH từ chuột (vị trí nhận tách được tạo hướng đảo ROSA26 #26). Mặc dù vị trí tương đồng ortho đã được nhận diện ở người, vị trí này không thường được sử dụng cho cassette cảm ứng xen đoạn. Các tác giả sáng chế đã phát triển hệ đích đặc biệt là đối với vị trí hROSA26 và do đó có khả năng chèn vật liệu di truyền vào trong ổ gen này, ổ gen hROSA26 ở trên nhiễm sắc thể 3 (3p25,3), và có thể được tìm thấy trong phạm vi cơ sở dữ liệu Ensembl (GenBank:CR624523). Tọa độ chính xác của hệ gen của vị trí tích hợp là 3:9396280-9396303: Ensembl. Vị trí tích hợp nằm trong phạm vi khung đọc mở (ORF) của *THUMPD3* long ARN không mã hóa (sợi đảo). Do vị trí hROSA26 có promoter nội sinh, vật liệu di truyền được chèn có thể có ưu điểm của promoter nội sinh đó, hoặc theo cách khác có thể được chèn được liên kết hoạt động vào promoter.

Intron 2 của gen dạng Citrate Lyase Bke (CLYBL), trên sợi dài của Nhiễm sắc thể 13, được nhận diện là GSH phù hợp do nó là một trong số dấu vết nóng tích hợp được nhận diện của phiC31 integrase có nguồn gốc từ thể thực khuẩn. Nghiên cứu chỉ ra rằng, ngẫu nhiên được chèn vào ổ gen này là ổn định và được biểu hiện. Đã chứng tỏ được rằng, việc chèn cassette cảm ứng ở GSH này không làm xáo trộn biểu hiện gen cục bộ (Cerbib *et al*, 2015, PLOS Một, DOI:10.1371). CLYBL do đó đề xuất GSH mà có thể là phù hợp để sử dụng trong sáng chế.

CCR5, mà nằm ở trên nhiễm sắc thể 3 (vị trí 3p21,31) là gen mà mã hóa đối với đồng thụ thể chính HIV-1. Quan tâm trong việc sử dụng vị trí này làm GSH xuất hiện từ đột biến 0 trong gen này mà xuất hiện là không có tác dụng phụ, nhưng đưa đến HIV-1 kháng nhiễm trùng. Nucleaza ngón tay kềm mà đích exon thứ ba đã được phát triển, do đó cho phép để chèn vật liệu di truyền vào ổ gen này. Đưa ra là, chức năng tự nhiên của *CCR5* vẫn chưa được làm sáng tỏ, vị trí vẫn còn giữ là GSH giả định mà có thể có tính hữu dụng đối với sáng chế.

Gen hypoxantin-guanin phosphoribosyltransferaza (HPRT) mã hóa enzym transferaza mà đóng vai trò chủ đạo trong việc tạo ra purin nucleotit thông qua con đường lấy lại purin. Do đó, cần việc khác nữa là đảm bảo việc chèn ở vị trí này không đứt gãy chức năng của tế bào bình thường. Tuy nhiên, nó đã được xem xét làm vị trí GSH. Việc chèn ở vị trí này có thể áp dụng tốt hơn là cho dạng tế bào trưởng thành, như là biến đổi cho việc chữa bệnh bằng gen.

GSH trong các vi sinh vật khác đã được nhận diện và gồm có các ổ gen *ROSA26*, *HRPT* và *Hipp11* (*H11*) ở chuột. Bộ các gen ở động vật có vú có thể gồm có các vị trí GSH dựa trên các vị trí attP giả. Đối với các vị trí này, *hiC31* integraza, recombinaza có nguồn gốc thực khuẩn *Streptomyces*, đã được phát triển làm dụng cụ xen đoạn không virus, bởi vì nó có khả năng tích hợp plasmit chứa cassette cảm ứng mang vị trí attB vào trong các vị trí attP giả.

GSH cũng có mặt trong bộ các gen của thực vật, và biến đổi của các tế bào thực vật có thể tạo nên một phần của sáng chế. GSH đã được nhận diện trong bộ các gen của lúa (*Cantos et al*, *Front. Plant Sci.*, 26 June 2014, Volume 5, Article 302, <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2014.00302>).

Trong phương pháp theo sáng chế, việc chèn xảy ra ở GSH khác, do đó ít nhất hai GSH là cần thiết đối với phương pháp theo sáng chế. GSH thứ nhất được biến đổi bằng cách chèn protein điều hòa phiên mã. GSH thứ hai được biến đổi bởi sự chèn cassette cảm ứng mà bao gồm trình tự di truyền được liên kết hoạt động với promoter cảm ứng. Vật liệu di truyền khác còn có thể được chèn với một hoặc cả hai trong số các yếu tố này. Trình tự di truyền được liên kết hoạt động với promoter cảm ứng trong phạm vi cassette cảm ứng tốt hơn là trình tự ADN. (Các) trình tự di truyền của cassette cảm ứng tốt hơn là mã hóa phân tử ARN, và do đó có khả năng được sao

chép. Phiên mã được kiểm soát có sử dụng promotor cảm ứng. Phân tử ARN có thể là trình tự bất kỳ, nhưng tốt hơn là mRNA mã hóa protein, shRNA hoặc gARN.

GSH thứ nhất có thể là vị trí GSH phù hợp bất kỳ. Tùy ý, nó là GSH với promotor nội sinh mà được biểu hiện cơ định; mà sẽ dẫn đến protein điều hòa phiên mã được biểu hiện cơ định được chèn vào. GSH phù hợp là vị trí hROSA26 đối với tế bào ở người. Theo cách khác, protein điều hòa phiên mã được chèn vào được liên kết hoạt động vào promotor, tốt hơn là promotor cơ định. Promotor cơ định có thể được sử dụng kết hợp với việc chèn vào vị trí hROSA26.

Protein điều hòa phiên mã là protein mà liên kết vào ADN, tốt hơn là trình tự đặc hiệu với vị trí ADN nằm trong hoặc gần promotor, và hoặc là tạo thuận tiện cho liên kết của cơ cấu phiên mã vào promotor, và do đó phiên mã của trình tự ADN (hoạt hóa phiên mã) hoặc chặn quy trình này (chất kìm hãm phiên mã). Các thực thể này còn được biết đến là các yếu tố phiên mã.

Trình tự ADN mà protein điều hòa phiên mã liên kết vào được gọi là yếu tố phiên mã-vị trí liên kết hoặc yếu tố đáp ứng, và các loại này được tìm thấy trong hoặc gần promotor của được điều tiết trình tự ADN.

Protein hoạt hóa phiên mã liên kết vào yếu tố đáp ứng và khởi đầu biểu hiện gen. Các protein này được ưu tiên trong phương pháp theo sáng chế để kiểm soát biểu hiện cassette cảm ứng.

Protein chặn phiên mã liên kết vào yếu tố đáp ứng và ngăn ngừa biểu hiện gen.

Protein điều hòa phiên mã có thể được hoạt hóa hoặc được bất hoạt bởi nhiều cơ chế gồm có liên kết của cơ chất, tương tác với các yếu tố phiên mã khác (ví dụ, đồng hoặc dị lưỡng phân) hoặc các protein đồng điều tiết, phosphoryl hóa, và/hoặc metyl hóa. Gen điều tiết phiên mã có thể được kiểm soát bằng cách hoạt hóa hoặc bất hoạt.

Nếu protein điều hòa phiên mã là protein hoạt hóa phiên mã, được ưu tiên là protein hoạt hóa phiên mã đòi hỏi hoạt hóa. Việc hoạt hóa này có thể là thông qua các phương cách phù hợp bất kỳ, nhưng được ưu tiên là protein điều hòa phiên mã được hoạt hóa thông qua việc bổ sung vào tế bào của cơ chất ngoại sinh. Việc cung

cấp cơ chất ngoại sinh đến tế bào có thể được kiểm soát, và do đó hoạt động của protein điều hòa phiên mã có thể được kiểm soát. Theo cách khác, cơ chất ngoại sinh có thể được cung cấp để làm bất hóa protein điều hòa phiên mã, và khi đó phản cung cấp được loại đi để làm hoạt hóa protein điều hòa phiên mã.

Nếu protein điều hòa phiên mã là protein chặn phiên mã, được ưu tiên là protein chặn phiên mã đòi hỏi bất hoạt. Do đó, cơ chất được cung cấp để ngăn ngừa protein chặn phiên mã chặn phiên mã, và do đó phiên mã được cho phép.

Protein điều hòa phiên mã phù hợp bất kỳ có thể được sử dụng, tốt hơn là loại mà hoạt hóa hoặc làm bất hoạt. Được ưu tiên là, cơ chất ngoại sinh có thể được cung cấp để kiểm soát protein điều hòa phiên mã. Protein điều hòa phiên mã này còn được gọi là protein điều hòa phiên mã cảm ứng được.

Hoạt hóa Phiên mã Được kiểm soát tetracyclin là phương pháp biểu hiện gen cảm ứng được nơi mà phiên mã đảo ngược xoay sang on hoặc off với sự có mặt của kháng sinh tetracyclin hoặc một trong số các dẫn xuất của nó (ví dụ, doxycyclin mà là ổn định hơn). Trong hệ thống này, protein hoạt hóa phiên mã là protein hoạt hóa phiên mã đáp ứng tetracyclin (rtTa) hoặc dẫn xuất của chúng. Protein rtTA có khả năng liên kết vào ADN ở trình tự gen vận hành TetO đặc hiệu. Một vài phần lặp lại của trình tự TetO này được đặt ngược dòng của promotor tối thiểu (như là promotor CMV), mà cùng tạo thành yếu tố đáp ứng tetracyclin (TRE). Có hai dạng của hệ này, phụ thuộc vào việc xem có hay không việc bổ sung tetracyclin hoặc dẫn xuất làm hoạt hóa (Tet-On) hoặc làm bất hóa (Tet-Off) protein rtTA.

Trong hệ thống Tet-Off, tetracyclin hoặc dẫn xuất của chúng liên kết rtTA và làm bất hóa rtTA, làm cho nó không có khả năng liên kết vào trình tự TRE, nhờ đó ngăn chặn phiên mã của các gen được kiểm soát TRE. Hệ thống này lần đầu tiên được mô tả trong tài liệu Bujard, *et al* (1992). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89 (12): 5547–51.

Hệ thống Tet-On gồm có hai thành phần; (1) protein hoạt hóa phiên mã đáp ứng tetracyclin được biểu hiện cơ định (rtTa) và promotor cảm ứng nhạy rtTa (Yếu tố đáp ứng Tet, TRE). Hệ thống này có thể được liên kết bởi tetracyclin hoặc các dẫn xuất ổn định hơn của nó, gồm có doxycyclin (dox), dẫn đến làm bất hoạt rtTa, cho

phép nó liên kết vào trình tự TRE và cảm ứng biểu hiện của các gen được kiểm soát TRE. Việc sử dụng hệ này có thể được ưu tiên trong phương pháp theo sáng chế. Hệ thống này được mô tả trên Fig.11.

Do đó, protein điều hòa phiên mã có thể là protein hoạt hóa phiên mã đáp ứng tetracyclin (rtTa) protein, mà có thể được hoạt hóa hoặc được bất hoạt bằng kháng sinh tetracyclin hoặc một trong số các dẫn xuất của nó, mà được cung cấp ngoại sinh. Nếu protein điều hòa phiên mã là rtTA, khi đó promotor cảm ứng được chèn vào vị trí GSH thứ hai gồm có yếu tố đáp ứng tetracyclin (TRE). Cơ chất được cung cấp từ bên ngoài là kháng sinh tetracyclin hoặc một trong số các dẫn xuất của nó.

Các dạng biến thiên và các protein được biến đổi rtTAs có thể được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế, các loại này gồm có dạng chuyển hoạt hóa Tet-On Tiền bộ (còn được biết đến là rtTA2S-M2) và Tet-On 3G (còn được biết đến là rtTA-V16, được tạo ra từ rtTA2S-S2).

Yếu tố đáp ứng tetracyclin (TRE) thường gồm có 7 phần lặp lại của trình tự TetO vi khuẩn 19bp được phân tách bởi trình tự đoạn đệm, cùng với promotor tối thiểu. Các dạng biến thiên và các dạng biến đổi của trình tự TRE là có thể, do promotor tối thiểu có thể là promotor phù hợp bất kỳ. Tốt hơn là, promotor tối thiểu thể hiện không có hoặc các mức biểu hiện tối thiểu khi không có mặt liên kết rtTa. Promotor cảm ứng được chèn vào GSH thứ hai do đó có thể bao gồm TRE.

Hệ thống được biến đổi dựa trên kiểm soát tetracyclin là T-REx™ System (ThermoFisher Scientific), trong đó protein điều hòa phiên mã là protein chặn phiên mã, TetR. Các ngăn của hệ này gồm có (i) promotor cảm ứng bao gồm promotor sớm gần với cytomegalovirus ở người (CMV) và hai vị trí thao tác tetracyclin gen điều khiển 2 (TetO2), và gen chặn Tet (TetR). Trình tự TetO2 consist của 2 sao chép của the19 trình tự nucleotit, 5'-TCCCTATCAGTGATAGAGA-3' được phân tách bởi 2 bazơ cặp đoạn đệm. Khi không có mặt tetracyclin, gen chặn Tet hình thành đồng lượng phân mà liên kết với extremely ái lực cao vào từng trình tự TetO2 trong promotor cảm ứng, và ngăn ngừa phiên mã từ promotor. Một khi được bổ sung, tetracyclin liên kết với ái lực cao vào từng gen chặn Tet đồng lượng phân làm cho nó không có khả năng liên kết vào gen điều khiển Tet. Gen chặn Tet: phức tetracyclin khi đó tách ra từ gen điều khiển Tet và cho phép cảm ứng biểu hiện.

Trong ví dụ này, protein điều hòa phiên mã là TetR và promoter cảm ứng bao gồm hai TetO2 vị trí. Cơ chất được cung cấp từ bên ngoài là TetRaxyclin hoặc dẫn xuất của chúng.

Sáng chế còn đề cập đến tetR được tối ưu hóa codon (OPTtetR). Dấu hiệu này có thể được sử dụng trong phương pháp bất kỳ được mô tả ở đây, hoặc đối với sử dụng bổ sung bất kỳ nơi mà việc xúc tiến cảm ứng được là mong muốn. Thực thể này được tạo ra với sử dụng việc tối ưu hóa nhiều thông số của trình tự cADN của tetR vi khuẩn. OPTtetR cho phép làm tăng 10 lần về biểu hiện tetR khi so với trình tự tiêu chuẩn (STDtetR).

Biểu hiện OPTtetR đồng tiếp hợp của tetR là đủ để ngăn ngừa rò rỉ shRNA trong khi bảo tồn cảm ứng làm mất tác dụng trong các ví dụ. Trình tự đối với OPTtetR được bao gồm ở đây, với trình tự tiêu chuẩn được thể hiện làm so sánh. Trình tự với ít nhất 75%, 80%, 85% hoặc 90% tương đồng đối với trình tự này do đó là cần thiết bảo hộ, cụ thể hơn 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 hoặc 99% tương đồng. Các gốc được thể hiện là thay đổi giữa STDtetR và OPTtetR đã được chỉ ra trong trình tự, và được ưu tiên là các gốc này không thay đổi trong dẫn xuất bất kỳ của OPTtetR do các gốc này được xem là quan trọng đối với các đặc tính được tăng cường. Dẫn xuất bất kỳ sẽ tùy ý giữ lại các biến đổi này ở các vị trí được chỉ ra.

Các hệ thống biểu hiện cảm ứng được khác là đã được biết đến và có thể được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế. Các hệ này gồm có Hệ cảm ứng được Kiểm soát Hoàn toàn từ hãng Agilent Technologies. Điều này là dựa trên ecdyzon hocmon côn trùng hoặc ponasteron A tương tự của nó (ponA) mà có thể làm hoạt hóa phiên mã ở tế bào động vật có vú mà được chuyển nhiễm với cả hai gen đối với ecdyzon của thụ thể *Drosophila melongaster* (EcR) và promoter cảm ứng bao gồm vị trí liên kết đối với thụ thể ecdyzon. EcR là thành viên của họ thụ thể retinoit-X (RXR) của thụ thể **nhân**. Ở người, EcR hình thành dị lượng phân với RXR mà liên kết vào yếu tố đáp ứng ecdyzon (EcRE). Khi không có mặt PonA, phiên mã bị đàn áp bởi dị lượng phân.

Do đó, protein điều hòa phiên mã có thể là protein chặn, như là thụ thể ecdyzon hoặc dẫn xuất của chúng. Các ví dụ về loại sau gồm có thụ thể tổng hợp VgEcR từ hãng Agilent Technologies mà là dung hợp của EcR, vùng liên kết ADN

của thụ thể glucocorticoid và vùng hoạt động phiên mã của Virus herpes đơn giản VP16 (Herpes Đơn giản Virus VP16). Promotor cảm ứng bao gồm trình tự EcRE hoặc các phiên bản được biến đổi của nó cùng với promotor tối thiểu. Các phiên bản được biến đổi gồm có trình tự ghi nhận E/GRE từ hãng Agilent Technologies, trong đó đột biến đã được tạo ra cho trình tự. Trình tự ghi nhận E/GRE bao gồm các yếu tố ghi nhận một nửa vị trí được đảo ngược đối với thụ thể retinoid-X (RXR) và các vùng liên kết GR. Trong tất cả các đổi chỗ, cơ chất được cung cấp từ bên ngoài là dexamethasone, mà loại đi tác dụng đàn áp của EcR hoặc các dẫn xuất của chúng trên promotor cảm ứng, và cho phép việc phiên mã diễn ra.

Theo cách khác, hệ cảm ứng được có thể được dựa trên mifepriston steroid tổng hợp làm cơ chất được cung cấp từ bên ngoài. Trong bối cảnh này, protein điều hòa phiên mã lai được chèn vào dựa trên miền liên kết với ADN từ protein GAL4 của nấm men, miền liên kết với phối tử được cắt ngắn (LBD) từ thụ thể progesteron của người và miền hoạt động (AD) từ NF- κ B của người. Protein điều hòa phiên mã lai này có được từ Thermofisher Scientific (với tên thương mại là Gene SwitchTM). Mifepriston làm hoạt hóa protein lai, và cho phép việc phiên mã từ promotor cảm ứng mà bao gồm trình tự hoạt động ngược dòng GAL4 (UAS) và hộp adenovirus E1b TATA. Hệ thống này được mô tả trong tài liệu Wang, Y. *et al* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 8180-8184.

Do đó, protein điều hòa phiên mã có thể là protein điều tiết phù hợp bất kỳ, hoặc là protein hoạt hóa hoặc protein chặn. Protein hoạt hóa phiên mã phù hợp là protein hoạt hóa phiên mã đáp ứng tetracycline (rtTa) hoặc protein điều hòa phiên mã lai Gen Chuyển mạch. Protein chặn phù hợp gồm có phiên bản Tet-Off của rtTA, TetR hoặc EcR. Protein điều hòa phiên mã có thể được biến đổi hoặc được tạo dẫn xuất như cần thiết.

Promotor cảm ứng có thể bao gồm các yếu tố mà là phù hợp để liên kết hoặc tương tác với protein điều hòa phiên mã. Tương tác của protein điều hòa phiên mã với promotor cảm ứng tốt hơn là được kiểm soát bằng cơ chất được cung cấp từ bên ngoài.

Cơ chất được cung cấp từ bên ngoài có thể là bất kỳ phù hợp cơ chất mà liên kết vào hoặc tương tác với protein điều hòa phiên mã. Phù hợp cơ chất gồm có tetracyclin, ponasteron A và mifepriston.

Do đó, việc chèn gen mã hóa protein điều hòa phiên mã vào GSH thứ nhất để xuất cơ chế kiểm soát đối với biểu hiện của cassette cảm ứng mà được liên kết hoạt động với promoter cảm ứng và được chèn vào GSH thứ hai khác với GSH thứ nhất.

Gen mã hóa protein điều hòa phiên mã có thể được tạo ra để được chèn với vật liệu di truyền khác. Vật liệu này gồm có các gen cho các phân tử gen đánh dấu hoặc gen thông báo, như là các gen mà cảm ứng các đặc tính nhận diện được bằng mắt gồm có các protein phát huỳnh quang và phát sáng. Các ví dụ gồm có gen mà mã hóa protein phát huỳnh quang xanh lá cây ở con sứa (GFP), mà làm cho tế bào mà biểu hiện nó để phát sáng xanh lá cây dưới ánh sáng xanh da trời/UV, luciferaza, mà xúc tác phản ứng với luxiferin để tạo ra ánh sáng, và protein phát huỳnh quang đỏ từ gen dsRed. Gen đánh dấu hoặc gen thông báo này là hữu dụng, do sự có mặt của protein gen thông báo khẳng định biểu hiện protein từ GSH thứ nhất, chỉ ra sự chèn vào thành công. Gen đánh dấu có thể lựa chọn còn có thể gồm có các gen kháng với kháng sinh hoặc các thuốc khác. Các gen đánh dấu hoặc các trình tự gen thông báo còn có thể được đưa vào mà tạo khả năng nghiên cứu biểu hiện của nội sinh (hoặc các gen ngoại sinh). Loại này gồm có protein Cas, gồm có protein CasL, Cas9 mà có khả năng cắt các gen quan tâm, cũng như protein Cas-Fusion mà là trung gian làm thay đổi trong biểu hiện của các gen khác, ví dụ bằng cách tác động như loại tăng cường hoặc chặn phiên mã. Hơn nữa, biểu hiện không cảm ứng được của các dụng cụ phân tử có thể là mong muốn, gồm có dụng cụ di truyền thị giác, protein dung hợp thụ thể nhân, như là hệ cảm ứng được tamoxifen ERT, và thụ thể thiết kế được hoạt hóa ngoại lệ bởi thuốc thiết kế. Hơn nữa, trình tự mà mã hóa các yếu tố phát tín hiệu mà làm thay đổi chức năng của cùng tế bào hoặc của tế bào lân cận hoặc tế bào thậm chí là ở xa trong vi sinh vật, gồm có hormone các yếu tố autocrin hoặc paracrin có thể được đồng biểu hiện từ cùng GSH làm protein điều hòa phiên mã.

Ngoài ra, vật liệu di truyền khác nữa có thể gồm có trình tự mã hóa đối với ARN không mã hóa, như được trình bày ở đây. Các ví dụ về vật liệu này di truyền gồm có các gen đối với miARN, mà có thể có chức năng làm chuyển mạch di truyền.

Được ưu tiên là, gen mã hóa protein điều hòa phiên mã được liên kết hoạt động vào promotor cơ định. Theo cách khác, GSH thứ nhất có thể được chọn sao cho có promotor cơ định hơn là còn có thể điều khiển biểu hiện của gen mã hóa protein điều hòa phiên mã và vật liệu di truyền kết hợp bất kỳ. Promotor cơ định đảm bảo biểu hiện gen được duy trì và ở mức cao. Promotor cơ định thường được sử dụng, gồm có promotor β -actin của người (ACTB), cytomegalovirus (CMV), yếu tố kéo dài-1 α , (EF1 α), phosphoglycerate kinase (PGK) và ubiquitinC (UbC). Promotor CAG là promotor tổng hợp mạnh thường được sử dụng để điều khiển các mức biểu hiện gen cao và được tạo cấu trúc từ các trình tự sau: (C) yếu tố gen tăng cường sớm cytomegalovirus (CMV), (A) promotor, exon thứ nhất và intron thứ nhất của gen β -actin ở gà, và (G) chất nhận mỗi nối của gen β -globin ở thỏ.

Hơn nữa, gen điều tiết phiên mã, cùng với vật liệu di truyền bất kỳ khác nữa có thể được tạo ra cùng với các trình tự phân chia được. Các trình tự này là các trình tự mà được ghi nhận bởi thực thể có khả năng cắt đặc hiệu ADN, và gồm có các vị trí giới hạn, mà là các trình tự đích đối với các enzym giới hạn hoặc các trình tự để công nhận bởi các thực thể phân chia ADN khác, như là nucleaza, recombinaza, ribozym hoặc các kết cấu nhân tạo. Ít nhất một trình tự phân chia được có thể có mặt, nhưng tốt hơn là hai hoặc nhiều có mặt. Các trình tự có thể phân chia này có thể là ở điểm phù hợp bất kỳ trong đối tượng chèn, như là một phần của đối tượng chèn được chọn, hoặc tất cả đối tượng chèn, có thể được loại đi một cách lựa chọn từ GSH. Do đó, phương pháp có thể còn đề cập đến việc loại đi và/hoặc thay thế đối tượng chèn hoặc một phần của nó từ GSH. Do đó, các vị trí phân chia có thể tạo sườn một phần/toàn bộ đối tượng chèn mà nó có thể được mong muốn để loại đi. Gen điều tiết phiên mã và/hoặc vật liệu di truyền khác nữa có thể được loại đi nhờ sử dụng phương pháp này.

Một phần của đối tượng chèn có thể là phần bất kỳ lên đến 99% của đối tượng chèn, tức là 1-99%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% hoặc nhỏ hơn 10%.

Có thể ưu tiên là, một phần của đối tượng chèn tạo sườn bởi các vị trí phân chia gồm có promotor cơ định. Theo cách khác, promotor cơ định không được có mặt ở phần được tạo sườn bởi các trình tự phân chia được.

Trình tự phân chia được ưu tiên là vị trí loxP đối với Cre recombinaza do nó cho phép thay thế trực tiếp đối tượng chèn được loại đi. Theo cách khác hoặc ngoài ra, trình tự phân chia được là vị trí rox đối với Dre recombinaza.

Được ưu tiên là, sự chèn ở GSH thứ nhất xuất hiện ở cả hai ổ gen trong bộ gen, do đó từng alen được biến đổi xen đoạn. Điều này cho phép biểu hiện lớn hơn từ gen mã hóa gen điều tiết phiên mã và vật liệu di truyền kết hợp bất kỳ.

GSH thứ hai có thể là vị trí GSH phù hợp bất kỳ. Có thể ưu tiên là, vị trí GSH thứ hai không kết hợp với promotor nội sinh, sao cho biểu hiện của casset cảm ứng được chèn vào chỉ dưới sự kiểm soát của protein điều hòa phiên mã.

Casset cảm ứng gồm có trình tự di truyền mong muốn, tốt hơn là trình tự ADN, mà được chuyển vào trong tế bào. Việc đưa casset cảm ứng vào trong bộ gen có tiềm năng làm thay đổi kiểu hình của tế bào đó, hoặc là bằng cách bổ sung trình tự di truyền mà cho phép biểu hiện gen hoặc làm mất tác dụng/làm bất hoạt biểu hiện nội sinh. Phương pháp theo sáng chế đề xuất đối với kiểm soát phiên mã được của (các) trình tự di truyền trong phạm vi casset cảm ứng trong tế bào.

Trình tự di truyền mong muốn để chèn tốt hơn là trình tự ADN mà mã hóa phân tử ARN. Phân tử ARN có thể là trình tự bất kỳ, nhưng tốt hơn là ARN mã hóa hoặc không mã hóa. ARN mã hóa hoặc truyền tin mã hóa đối với trình tự polypeptit, và phiên mã của ARN này dẫn đến biểu hiện của protein trong phạm vi tế bào. ARN không mã hóa có thể là chức năng và có thể gồm có, không giới hạn: MicroARN, ARN nhiễu nhỏ, ARN tương tác Piwi, ARN đối nghĩa, các nuclear ARN nhỏ, các nucleolar ARN nhỏ, các ARN Thân Cajal nhỏ, Y ARN, ARN tăng cường, ARN dẫn đường, Ribozym, các ARN dạng kẹp tóc nhỏ, các ARN tạm thời nhỏ, ARN tác động qua, ARN nhiễu nhỏ và ARN truyền tin dưới bộ gen. ARN không mã hóa còn có thể được biết đến là ARN chức năng. Một vài dạng của ARN là gen điều tiết trong tự nhiên, và, ví dụ, có thể biểu hiện gen điều phối xuôi dòng bằng cách bổ trợ vào một phần của mARN hoặc ADN của gen. MicroARN (miRNA; 21-22 nucleotit) được

tìm thấy trong sinh vật có nhân điển hình và tác động thông qua can thiệp ARN (RNAi), nơi mà phức thực hiện của miRNA và các enzym có thể phân chia mARN hỗ trợ, chặn mARN để khỏi bị dịch mã, hoặc xúc tiến sự thoái triển của nó. Một dạng khác của ARN, ARN nhiễu nhỏ (siRNA; 20-25 nucleotit) tác động thông qua can thiệp ARN theo cách tương tự với miRNA. Một vài miRNA và siRNA có thể làm cho các gen tạo đích để được methyl hóa, nhờ đó làm giảm hoặc làm tăng phiên mã của các gen này. Động vật có ARN tương tác Piwi (piRNA; 29-30 nucleotit) mà là hoạt hóa trong tế bào mầm và được xem là bảo vệ chống lại hạt chuyển/gen nhảy. Nhiều sinh vật chưa có nhân điển hình có ARN CRISPR, hệ thống gen điều tiết tương tự với can thiệp ARN, và hệ thống này gồm có ARN dẫn đường (gARN). ARN đối nghĩa lan rộng; phần lớn là điều phối xuôi dòng gen, nhưng một ít là gen hoạt hóa của phiên mã. ARN đối nghĩa có thể tác động bằng cách liên kết vào mARN, hình thành ARN sợi đôi mà bị suy thoái do enzym. Có nhiều ARN dài không mã hóa mà điều phối các gen trong sinh vật có nhân điển hình, một ARN này là Xist, mà bao bọc một X nhiễm sắc thể ở động vật có vú giống cái và bất hoạt nó. Do đó, có vô số ARN chức năng mà có thể được dùng trong phương pháp theo sáng chế.

Do đó, cassette cảm ứng có thể gồm có trình tự di truyền mà là gen mã hóa protein. Gen này có thể có mặt tự nhiên trong tế bào, hoặc có thể xuất hiện tự nhiên trong tế bào, nhưng biểu hiện kiểm soát được của gen đó là cần thiết. Theo cách khác, cassette cảm ứng có thể là phiên bản được đột biến, được biến đổi hoặc phiên bản đúng của gen thể hiện trong tế bào, cụ thể đối với các mục đích chữa bệnh bằng gen hoặc tạo thành của mô hình bệnh. Do đó, cassette cảm ứng có thể gồm có gen chuyển từ vi sinh vật khác của cùng loài (tức là phiên bản gây bệnh/đột biến của gen từ con người, hoặc gen kiểu hoang dại từ con người) hoặc từ loài khác.

Theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ, trình tự di truyền có mặt trong phạm vi cassette cảm ứng có thể là trình tự tổng hợp.

Cassette cảm ứng có thể gồm có trình tự di truyền phù hợp bất kỳ mà được mong muốn để chèn vào trong bộ gen của tế bào. Do đó, trình tự di truyền có thể là gen mà mã hóa đối với trình tự bờ sản phẩm protein mà được sao chép vào trong axit ribonucleic (ARN) mà có chức năng (như là các nuclear ARN nhỏ (snARN), ARN

đối nghĩa, micro ARN (miARN), ARN nhiễu nhỏ (siARN), ARN chuyển (tARN) và ARN không mã hóa (ncARN) khác, gồm có CRISPR-RNA (crARN) và ARN dẫn đường (gARN).

Do đó, casset cảm ứng có thể gồm có trình tự di truyền bất kỳ, phiên mã của nó được mong muốn để kiểm soát trong phạm vi tế bào. Trình tự di truyền được chọn sẽ phụ thuộc vào dạng tế bào và việc sử dụng tế bào đó sẽ được đặt sau biến đổi, như được trình bày hơn nữa dưới đây.

Ví dụ, đối với phương pháp chữa bệnh bằng gen, có thể mong muốn đề xuất gen kiểu hoang dại trình tự làm thành phần của casset cảm ứng. Trong bối cảnh này, trình tự di truyền có thể là gen mã hóa protein bất kỳ của người hoặc động vật. Các ví dụ về các gen mã hóa protein gồm có gen β -globin ở người, gen lipoprotein lipaza ở người (LPL), protein Rab escort 1 ở người được mã hóa bởi gen *CHM* và nhiều loại khác. Theo cách khác, casset cảm ứng có thể biểu hiện các yếu tố tăng trưởng, gồm có BDNF, GDF, NGF, IGF, FGF và/hoặc các enzym mà có thể phân chia các tiền peptit để hình thành các dạng hoạt hóa. Chữa bệnh bằng gen còn có thể đạt được bằng cách biểu hiện của casset cảm ứng gồm có trình tự di truyền mã hóa ARN đối nghĩa, miARN, siRNA hoặc dạng bất kỳ của ARN mà can thiệp với biểu hiện của gen khác trong phạm vi tế bào.

Theo cách khác, tế bào nên là tế bào mầm, casset cảm ứng có thể gồm có trình tự di truyền mã hóa gen điều hòa chủ đặc hiệu phá hệ chủ đạo, được viết tắt ở đây là gen điều hòa chủ. Gen điều hòa chủ có thể là một hoặc nhiều trong số: các yếu tố phiên mã, các gen điều tiết phiên mã, thụ thể xytokin hoặc các phân tử phát tín hiệu và tương tự. Gen điều hòa chủ là gen được biểu hiện mà ảnh hưởng đến phá hệ của tế bào biểu hiện nó. Nó có thể là loại mà mạng của gen điều hòa chủ là cần thiết đối với phá hệ của tế bào cần được xác định. Như được sử dụng ở đây, gen điều hòa chủ mà được biểu hiện ở khởi đầu của phá hệ phát triển hoặc dạng tế bào, các phần tham gia trong đặc trưng của phá hệ đó bằng cách điều tiết nhiều gen xuôi dòng hoặc là trực tiếp hoặc thông qua dòng thác/hàng loạt những thay đổi biểu hiện gen. Nếu gen điều hòa chủ được biểu hiện, nó có khả năng đặc trưng lại thiên mệnh/số phận của tế bào được trù định để hình thành các phá hệ khác. Các ví dụ về gen điều hòa chủ gồm

có yếu tố phiên mã do cơ MyoD và yếu tố phiên mã tạo máu SCL. Cụ thể, gen điều hòa chủ gồm có, nhưng không chỉ giới hạn ở:

Các phả hệ thần kinh: Tế bào thần kinh đệm ít nhánh: SOX10, OLIG2, NKX2.2., NKX6.2; Tế bào dạng sao: NFIA, NFIB, và SOX9; Dây thần kinh: Ascl1, neurogenin, và NeuroD, Pax6, Neurog2, Ascl1, Dlx2, và NeuroD1; Tế bào tạo máu, gồm có Erythrocyte và Megakaryocyte: GATA1, FLI1 và TAL1

Các phả hệ trung mô: Bộ xương cơ: MYOD; **Tế bào cơ tim**: Gata4, Mef2c, Baf60c và Tbx5; Xương: L-Myc (RXOL) Runx2, Osterix, Oct4; Cartilage: c-Myc Klf4, SOX9; và tế bào mỡ Brown: C/EBP- β và c-Myc

Nội bì

Các dạng tế bào tụy: PDX1 và GATA6.

Tế bào mầm: Ngoại phôi bì SC: Oct4, Sox2, Klf4 và c-Myc

Theo cách khác hoặc ngoài ra, trình tự di truyền hoặc vật liệu di truyền khác nữa có thể là các gen chức năng của nó đòi hỏi việc điều tra, như là biểu hiện kiểm soát được có thể xem ở tác dụng của biểu hiện trên tế bào; gen có thể gồm có các yếu tố tăng trưởng và/hoặc các xytokin để đối với tế bào để được sử dụng trong ghép tế bào; và/hoặc hoặc gen có thể là các thành phần của thử nghiệm gen thông báo.

Hơn nữa, trình tự di truyền có thể mã hóa ARN không mã hóa, chức năng của nó là làm mất tác dụng biểu hiện của gen nội sinh hoặc ADN mã hóa trình tự ARN không mã hóa trong tế bào. Theo cách khác, trình tự di truyền có thể mã hóa ARN dẫn đường đối với hệ CRISPR-Cas9 để tác động vào gen nội sinh làm bất hoạt.

Do đó, phương pháp theo sáng chế còn đề cập đến phương pháp làm mất khả năng gen biểu hiện nội sinh trong phạm vi tế bào. Phương pháp như được mô tả trên đây, và casset cảm ứng bao gồm trình tự di truyền mã hóa ARN không mã hóa được liên kết hoạt động với promotor cảm ứng, trong đó ARN không mã hóa ngăn chặn việc biểu hiện của gen nội sinh này. ARN không mã hóa có thể chặn biểu hiện gen bằng các phương cách phù hợp bất kỳ gồm có can thiệp ARN và ARN đối nghĩa. Do đó, trình tự di truyền có thể mã hóa shRNA mà có thể can thiệp với ARN truyền tin đối với gen nội sinh.

Việc cảm ứng trong gen biểu hiện nội sinh có thể là cảm ứng một phần hoặc toàn bộ, tức là biểu hiện có thể là 50, 55, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 hoặc 100% được giảm so với tế bào trước khi cảm ứng phiên mã của ARN không mã hóa.

Phương pháp theo sáng chế còn đề cập đến phương pháp làm mất chức năng/bất hoạt gen nội sinh trong phạm vi tế bào, nhờ vào hệ thống CRISPR-Cas9, mặc dù hệ thống phù hợp bất kỳ khác để làm bất hoạt gen có thể được sử dụng. Trong bối cảnh này, được ưu tiên là các gen Cas9 được biểu hiện cơ định, và do đó được có mặt trong GSH thứ nhất với gen đối với gen điều tiết phiên mã. Trình tự di truyền mã hóa gARN có thể có mặt trong cassette cảm ứng, mà được chèn vào GSH thứ hai. gARN là ARN tổng hợp ngắn được tạo thành từ trình tự giàn giáo cần thiết đối với liên kết Cas9 và trình tự đích xấp xỉ 20 nucleotit mà xác định lên đích ở hệ gen để được biến đổi. Do đó, đích ở hệ gen của Cas9 có thể được thay đổi bằng cách đơn giản thay đổi trình tự đích thể hiện trong gARN. Mặc dù việc sử dụng chủ yếu của hệ này là để thiết kế gARN nhằm tạo đích gen nội sinh để làm bất hoạt gen, nó còn có thể được biến đổi để làm hoạt hóa bằng điện hoặc chặn các gen đích, tinh chế các vùng đặc hiệu của ADN, và thậm chí hình ảnh ADN. Tất cả các sử dụng có thể được dự tính.

Cassette cảm ứng gồm có trình tự di truyền được liên kết hoạt động với promoter cảm ứng. "Promoter" là trình tự nucleotit mà khơi mào và điều phối phiên mã của polynucleotit. "Promoter cảm ứng" là trình tự nucleotit nơi mà biểu hiện của trình tự di truyền được liên kết hoạt động vào promoter được kiểm soát bởi chất phân tích, đồng yếu tố, protein điều tiết, v.v.. Trong trường hợp của sáng chế, việc kiểm soát được thực hiện bởi protein điều hòa phiên mã. Hàm ý là thuật ngữ "promoter" hoặc "yếu tố kiểm soát" gồm có vùng promoter toàn bộ độ dài và các đoạn chức năng (ví dụ, kiểm soát phiên mã hoặc dịch mã) của các vùng này. "Được liên kết hoạt động" là để chỉ cách sắp xếp các yếu tố, trong đó các thành phần được mô tả như vậy được tạo cấu hình sao cho thực hiện các chức năng thông thường của chúng. Do đó, promoter đưa ra được liên kết hoạt động vào trình tự di truyền có khả năng thực hiện việc biểu hiện của trình tự đó khi các enzym đúng có mặt. Promoter không cần tiếp giáp với trình tự, chỉ cần là nó hoạt động để điều khiển biểu hiện của nó. Do đó, ví

dụ, can thiệp vào trình tự phiên mã vẫn chưa được dịch mã có thể có mặt giữa trình tự promotor và trình tự di truyền và trình tự promotor có thể vẫn được xem là "được liên kết hoạt động" vào trình tự di truyền. Do đó, thuật ngữ "được liên kết hoạt động" hàm ý là gồm có việc tạo khoảng cách hoặc định hướng bất kỳ của yếu tố promotor và trình tự di truyền trong casset cảm ứng mà cho phép khơi mào phiên mã của casset cảm ứng ngay khi ghi nhận có yếu tố promotor bởi phức phiên mã.

Hơn nữa, vật liệu di truyền khác còn có thể được liên kết hoạt động với promotor cảm ứng. Vật liệu di truyền khác nữa có thể gồm có các gen, trình tự mã hóa đối với ARN, vật liệu di truyền, như là các gen đánh dấu hoặc gen thông báo. Vật liệu di truyền bổ sung này đã được trình bày ở phần trước. Trong một vài bối cảnh, có thể mong muốn là gồm có gen tự sát trong casset cảm ứng, trình tự di truyền tự nó không nên là gen tự sát để chữa bệnh ung thư bằng gen. Gen tự sát có thể sử dụng cùng promotor cảm ứng trong phạm vi casset cảm ứng, hoặc nó có thể là promotor cảm ứng riêng để cho phép kiểm soát riêng rẽ. Gen này có thể là hữu dụng trong các tính huống chữa bệnh bằng gen nơi mà có mong muốn tạo khả năng hủy hoại tế bào được chuyển nhiễm nếu thỏa mãn một số điều kiện. Gen tự sát là các gen mà biểu hiện protein mà làm cho tế bào trải qua chết theo chương trình, hoặc theo cách khác có thể đòi hỏi đồng yếu tố hoặc đồng thuốc cung cấp từ bên ngoài để hoạt động. Đồng yếu tố hoặc đồng thuốc có thể được chuyển hóa bằng sản phẩm của gen tự sát vào trong thực thể độc tế bào cao.

Hơn nữa, casset cảm ứng có thể gồm có các trình tự phân chia được. Các trình tự này là các trình tự mà được ghi nhận bởi thực thể có khả năng cắt đặc hiệu ADN, và gồm có các vị trí giới hạn, mà là các trình tự đích đối với các enzym giới hạn hoặc trình tự để ghi nhận bởi các thực thể phân chia ADN khác, như là nucleaza, recombinaza, ribozym hoặc các kết cấu nhân tạo. Ít nhất một trình tự phân chia được có thể có mặt, nhưng tốt hơn là hai hoặc nhiều có mặt. Các trình tự phân chia được được này có thể là ở điểm phù hợp bất kỳ trong casset, như là một phần được chọn của casset, hoặc toàn bộ casset, có thể được loại đi một cách lựa chọn từ GSH. Do đó, phương pháp có thể còn đề cập đến việc loại đi và/hoặc thay thế casset hoặc một phần của nó khỏi GSH. Do đó, các vị trí phân chia có thể tạo sườn một

phần/toàn bộ các trình tự di truyền mà nó có thể được mong muốn để loại đi. Phương pháp có thể dẫn đến việc loại đi casset cảm ứng và/hoặc vật liệu di truyền khác nữa.

Một phần của casset có thể là phần bất kỳ lên đến 99% của casset, tức là 1-99%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% hoặc nhỏ hơn 10%.

Có thể ưu tiên là, một phần của đối tượng chèn được tạo sườn bởi các vị trí phân chia gồm có promotor đã được liên kết hoạt động vào trình tự di truyền. Theo cách khác, promotor đã được liên kết hoạt động vào trình tự di truyền không được có mặt ở phần được tạo sườn bởi các trình tự phân chia được.

Trình tự phân chia được ưu tiên là vị trí loxP đối với Cre recombinaza do nó cho phép thay thế trực tiếp đối tượng chèn được loại đi. Theo cách khác hoặc ngoài ra vị trí phân chia có thể là vị trí rox đối với Dre recombinaza.

Protein điều hòa phiên mã và casset cảm ứng, cùng với vật liệu di truyền kết hợp bất kỳ, được chèn vào GSH khác trong phạm vi bộ gen của tế bào.

Việc chèn vào vị trí GSH tốt hơn là đặc hiệu là trong phạm vi trình tự của GSH như được mô tả trên đây. Kỹ thuật phù hợp bất kỳ để chèn polynucleotit vào trong trình tự đặc hiệu có thể được sử dụng, và một vài được mô tả trong kỹ thuật hiện nay. Các kỹ thuật phù hợp gồm có phương pháp bất kỳ mà đưa đứt gãy vào khu vực mong muốn và cho phép tái tổ hợp của vector vào trong khe. Do đó, bước cốt yếu thứ nhất để biến đổi hệ gen đặc hiệu vị trí được tạo đích là tạo ra đứt gãy ADN sợi đôi (DSB) ở ổ gen của hệ gen để được biến đổi. Cơ chế sửa chữa tế bào khác biệt có thể được khai thác để sửa chữa DSB và để đưa vào trình tự mong muốn, và các cơ chế này là sửa chữa nối đầu không tương đồng (NHEJ), mà có thiên hướng hơn về lỗi; và sửa chữa tái tổ hợp tương đồng (HR) có trung gian là khuôn ADN thể cho, mà có thể được sử dụng để chèn casset cảm ứng.

Một vài kỹ thuật hiện có để cho phép tạo ra DSB đặc hiệu vị trí theo yêu cầu trong bộ gen. Nhiều kỹ thuật này đòi hỏi việc sử dụng endonucleaza theo yêu cầu, như là nucleaza ngón tay kềm (ZFNs), nucleaza tác dụng như gen hoạt hóa phiên mã (TALEN) hoặc phần lắp lại đoạn gấp đôi ngăn giữa các khoảng không đều được tạo cụm/ hệ thống (CRISPR/Cas9) của protein kết hợp CRISPR (Gaj, T, *et al* "ZFN,

TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering,” Trends Biotechnol, 31:397–405, July 2013).

Nucleaza ngón tay kềm là các enzym nhân tạo mà được tạo ra bằng cách dung hợp vùng liên kết ADN ngón kềm vào vùng nucleaza của enzym giới hạn FokI. Loại sau có vùng phân chia không đặc hiệu mà phải tạo lưỡng phân để phân chia ADN. Điều này có nghĩa là hai monome ZFN là cần thiết để cho phép lưỡng phân vùng FokI và phân chia ADN. Vùng liên kết ADN có thể được thiết kế để tạo trình tự đích hệ gen quan tâm bất kỳ, là dần hàng nối tiếp của ngón kềm Cys2His2, từng loại trong số đó thừa nhận ba nucleotit tiếp giáp trong trình tự đích. Hai vị trí liên kết được phân tách bởi 5-7bp để cho phép lưỡng phân tối ưu vùng FokI. Do đó, enzym có khả năng phân chia ADN đặc hiệu vị trí, và đặc hiệu đích là tăng bằng cách đảm bảo rằng, hai trường hợp liên kết ADN gần phải xuất hiện để đạt được đứt gãy sợi đôi.

Nucleaza tác dụng như gen hoạt hóa phiên mã, hoặc TALEN, là yếu tố phiên mã/nucleaza lưỡng phân. Chúng được tạo ra bằng cách dung hợp vùng liên kết ADN tác dụng TAL vào vùng phân chia ADN (nucleaza). Tác dụng kiểu gen hoạt hóa phiên mã (TALEs) có thể được thiết kế để liên kết theo thực tế trình tự ADN mong muốn bất kỳ, so khi được kết hợp với nucleaza, ADN có thể được cắt ở các khu vực đặc hiệu. Yếu tố tác dụng TAL là các protein mà được tiết ra bởi vi khuẩn *Xanthomonas*, vùng liên kết ADN của chúng chứa trình tự 33–34 axit amin bảo toàn được lặp lại cao với phân kỳ axit amino thứ 12 và thứ 13. Hai vị trí này biến thiên cao và thể hiện mối tương quan mạnh với ghi nhận nucleotit đặc hiệu. Mối quan hệ dễ dàng này giữa trình tự axit amin và ghi nhận ADN được cho phép đối với thiết kế của vùng liên kết ADN đặc hiệu bằng cách chọn dạng kết hợp của các đoạn lặp lại chứa các gốc thích hợp ở hai vị trí biến thiên được. Do đó, TALEN được dựng lên từ việc dần hàng của 33 đến 35 modul axit amin, từng loại trong số đó hướng đích nucleotit đơn. Bằng cách chọn việc dần hàng của modul, hầu hết là trình tự bất kỳ có thể được tạo đích. Lại nữa, nucleaza được sử dụng có thể là FokI hoặc dẫn xuất của chúng.

Ba dạng cơ chế CRISPR đã được nhận diện, trong số đó dạng II được nghiên cứu nhiều nhất. Hệ CRISPR/Cas9 (dạng II) sử dụng nucleaza Cas9 để tạo ra

đứt gãy sợi đôi trong ADN ở vị trí được xác định bởi ARN dẫn đường ngắn. Hệ CRISPR/Cas là hệ miễn dịch của sinh vật chưa có nhân điển hình mà cho sự kháng đối với các yếu tố di truyền lạ. CRISPR là các đoạn ADN của sinh vật chưa có nhân điển hình chứa các phần lặp lại của trình tự bazơ ngắn. Từng phần lặp lại được tiếp theo bởi các đoạn ngắn là "đoạn ADN đệm nguyên sinh" từ những phần để lộ trước đó đến các yếu tố di truyền lạ. Các đoạn đệm CRISPR nhận diện và cắt các yếu tố di truyền ngoại sinh sử dụng can thiệp ARN. Đáp ứng miễn dịch CRISPR xuất hiện thông qua hai bước: Phát sinh sinh học CRISPR-RNA (crARN) và can thiệp được dẫn đường bởi crARN bất kỳ. Phân tử CrARN được tạo thành từ trình tự biến thiên được sao chép từ đoạn ADN đệm nguyên sinh và phần lặp lại CRISP. Từng phân tử crARN khi đó lai với ARN thứ hai, được biết đến là ARN CRISPR hoạt hóa chéo (tracrARN) và cùng với hai loại này cuối cùng tạo phức với nucleaza Cas9. Phần được mã hóa đoạn ADN đệm nguyên sinh của crARN điều khiển Cas9 để phân chia trình tự ADN đích bổ trợ, nếu chúng liên kề với trình tự ngắn được biết đến là loại liên kề đoạn đệm nguyên sinh (PAMs). Hệ tự nhiên này đã được thiết kế và được khai thác để đưa vào DSB làm đứt gãy ở các vị trí đặc hiệu trong hệ gen ADN, trong số nhiều ứng dụng khác. Cụ thể, Hệ CRISPR dạng II từ *Streptococcus pyogenes* có thể được sử dụng. Ở dạng đơn giản nhất của nó, hệ CRISPR/Cas9 bao gồm hai thành phần mà được phân phối đến tế bào để tạo ra sắp xếp bộ gen: nucleaza Cas9 chính nó và các ARN dẫn đường (gARN) nhỏ. gARN là dung hợp của crARN đặc hiệu vị trí theo yêu cầu (được hướng đến các trình tự đích) và tracrARN được tiêu chuẩn hóa.

Một khi DSB đã được tạo ra, khuôn mẫu thể cho có tương đồng với ổ được tạo đích gen được cung cấp; DSB có thể được sửa chữa bằng quy trình sửa chữa được điều khiển tương đồng (HDR) cho phép tạo xen đoạn chính xác.

Các dẫn xuất của hệ này là cũng có thể. Các dạng đột biến của Cas9 là có được, như là Cas9D10A, chỉ với hoạt tính nickaza. Điều này có nghĩa là nó chỉ phân chia một sợi ADN, và không làm hoạt hóa NHEJ. Thay vào đó, khi được tạo ra với khuôn mẫu sửa chữa tương đồng, việc sửa chữa ADN được tiến hành chỉ nhờ con đường HDR trung thành cao. Cas9D10A (Cong L., *et al.* (2013) *Science*, 339, 819–823) có thể được sử dụng trong các phức Cas9 được tạo cặp được thiết kế để tạo ra

các điểm đứt ADN liên kết kết hợp với hai sgARNs bổ trợ vào các vùng phụ cận trên các sợi đối diện của vị trí đích, mà có thể là đặc biệt có lợi.

Các yếu tố để tạo ra đứt gãy ADN sợi đôi có thể được đưa vào trong một hoặc nhiều vector như là các plasmid để biểu hiện trong tế bào.

Do đó, phương pháp bất kỳ để tạo ra đặc hiệu, được tạo đích đứt gãy sợi đôi trong bộ gen để tác dụng việc chèn gen/casset cảm ứng có thể được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế. Có thể ưu tiên là, phương pháp để chèn gen/casset cảm ứng sử dụng bất kỳ một hoặc nhiều trong số ZFNs, TALEN và/hoặc hệ CRISPR/Cas9s hoặc dẫn xuất bất kỳ của chúng.

Một khi DSB đã được tạo ra bằng phương cách thích hợp bất kỳ, gen/casset cảm ứng để chèn có thể được cung cấp theo cách phù hợp bất kỳ như được mô tả dưới đây. Gen/casset cảm ứng và vật liệu di truyền kết hợp hình thành thể cho ADN để sửa chữa ADN ở DSB và được chèn sử dụng cơ cấu/quy trình sửa chữa tế bào tiêu chuẩn. Đứt gãy được khơi mào như thế nào sẽ làm thay đổi con đường/quy trình nào được sử dụng để sửa chữa hư hỏng, như được nêu ra trên đây.

Protein điều hòa phiên mã và casset cảm ứng có thể được cung cấp đối với phương pháp theo sáng chế trên các vector riêng rẽ. "Vector" là phân tử axit nucleic, như là phân tử ADN, mà được sử dụng làm phương tiện để mang nhân tạo vật liệu di truyền vào trong tế bào. Vector thường là trình tự axit nucleic mà có xen đoạn (như là casset cảm ứng hoặc gen đối với protein điều hòa phiên mã) và trình tự lớn hơn mà dùng làm "khung" của vector. Vector có thể là ở định dạng phù hợp bất kỳ, gồm có các plasmid, vòng nhỏ, hoặc ADN mạch thẳng. Vector bao gồm ít nhất gen đối với gen điều tiết phiên mã hoặc casset cảm ứng được liên kết hoạt động với promotor cảm ứng, cùng với trình tự tối thiểu để tạo khả năng chèn các gen vào GSH thích đáng/liên quan. Tùy ý, các vector cũng có gốc sao chép (ori) mà cho phép khuếch đại vector, ví dụ trong vi khuẩn. Ngoài ra, hoặc theo cách khác, vector gồm có gen đánh dấu có thể lựa chọn như là các gen kháng kháng sinh, các gen đối với các gen đánh dấu mang màu và gen tự sát.

Các ví dụ về các vector được sử dụng trong các ví dụ được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig.20 đến Fig.33.

Tế bào được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế có thể là tế bào ở người hoặc động vật bất kỳ. Tốt hơn là, tế bào động vật có vú, như là tế bào từ loại gặm nhấm, như là chuột và chuột cống; thú có túi như là chuột túi và gấu túi; động vật linh trưởng không phải người như là khỉ Bonobo, tinh tinh, loài vượn cáo, vượn và khỉ không đuôi; loài lạc đà như là lạc đà và lạc đà không bướu; động vật nuôi như là ngựa, lợn, gia súc, trâu, bò sừng bizon, dê, cừu, hươu nai, tuần lộc/nai tuyết, lừa, bò Banten, bò Tây tạng, gà, vịt và gà tây; động vật trong nhà như là mèo, chó, thỏ và chuột lang. Tế bào tốt hơn là tế bào ở người. Trong một vài khía cạnh, tế bào tốt hơn là loại từ động vật nuôi.

Dạng tế bào được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế sẽ phụ thuộc vào ứng dụng của tế bào một khi chèn vật liệu di truyền vào vị trí GSH là hoàn thiện.

Khi mà mục đích là để tạo ra dạng tế bào trưởng thành từ tế bào tiền bối, tế bào mà được biến đổi là tế bào mầm, tốt hơn là tế bào gốc đa tiềm năng. Tế bào gốc đa tiềm năng có tiềm năng để biệt hóa thành hầu hết là tế bào bất kỳ trong thân. Có một vài nguồn của tế bào gốc đa tiềm năng. Tế bào gốc phôi (tế bào ES) là tế bào gốc đa tiềm năng được tạo ra từ khối tế bào ở trong của túi phôi/túi mầm, phôi cấy sớm giai đoạn sớm. Tế bào gốc đa tiềm năng cảm ứng (iPSCs) là tế bào từ người trưởng thành mà đã được lập trình lại theo cách di truyền vào trạng thái giống tế bào gốc phôi bằng cách thúc ép biểu hiện các gen và các yếu tố quan trọng để giữ lại các đặc tính xác định của tế bào gốc phôi. Vào năm 2006 đã có báo cáo chuyên ngành rằng, việc đưa vào bốn gen đặc hiệu mã hóa các yếu tố phiên mã có thể chuyển hóa tế bào từ người trưởng thành vào trong tế bào gốc đa tiềm năng (Takahashi, K; Yamanaka, S (2006), Cell 126 (4): 663–76), nhưng công việc tiếp theo đã làm giảm/làm thay đổi số lượng các gen mà là cần thiết. Ngày 3-4 tháng 10, một vài thành viên của họ gen Sox đã được nhận diện là các gen điều tiết phiên mã cốt yếu tiềm năng, cần thiết có trong quy trình cảm ứng. Các gen bổ sung gồm có một vài thành viên của họ Klf, họ Myc, Nanog, và LIN28, có thể làm tăng hiệu quả cảm ứng. Các ví dụ về các gen mà có thể có mặt trong các yếu tố lập trình lại gồm có Oct3/4, Sox2, Sox1, Sox3, Sox15, Sox17, Klf4, Klf2, c-Myc, N-Myc, L-Myc, Nanog, Lin28, Fbx15, ERas, EMEO15-2, Tcl1, beta-catenin, Lin28b, Sall1, Sall4,

Esrrb, Nr5a2, Tbx3 và Glis1, và các yếu tố lập trình lại này có thể được sử dụng riêng, hoặc ở dạng kết hợp của hai hoặc nhiều loại trong số chúng.

Khi mà mục đích là để tạo ra tế bào mầm với làm gen mất tác dụng hoặc làm mất khả năng để nghiên cứu hơn nữa, như là phát triển hoặc gen chức năng nghiên cứu, tế bào mà được biến đổi có thể là tế bào mầm, tốt hơn là tế bào gốc đa tiềm năng, hoặc dạng tế bào trưởng thành. Nguồn của tế bào gốc đa tiềm năng đã được trình bày trên đây.

Nếu tế bào được biến đổi bằng cách chèn casset cảm ứng để được sử dụng cho người bệnh, có thể ưu tiên là, tế bào là iPSC được tạo ra từ người đó. Việc sử dụng này của tế bào cùng nguồn/tự thể sẽ loại đi sự cần thiết khớp/phù hợp với tế bào ở người nhận. Theo cách khác, iPSC có trên thị trường có thể được sử dụng, như là các loại có được từ WiCell® (WiCell Research Institute, Inc, Wisconsin, US). Theo cách khác, tế bào có thể là tế bào mầm đặc hiệu mô mà còn có thể cùng nguồn/tự thể hoặc được cho. Tế bào phù hợp gồm có tế bào mầm ngoại phôi bì, tế bào mầm thần kinh nhân tạo và tế bào mầm đặc hiệu mô khác.

Theo một số phương án, có thể ưu tiên là, tế bào được sử dụng là tế bào gốc phôi hoặc dòng tế bào mầm. Nhiều dòng tế bào gốc phôi hiện đã có, ví dụ, WA01(H1) và WA09(H9) có thể có được từ WiCell, và KhES-1, KhES-2, và KhES-3 có thể có được từ Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University (Kyoto, Japan)..

Có thể ưu tiên là, tế bào gốc phôi được tạo ra không có phá hủy phôi, cụ thể khi mà tế bào là của con người, do kỹ thuật này là dễ dàng có được (Chung, Young *et al.*, Cell Stem Cell , Volume 2 , Issue 2 , 113 - 117). Dòng tế bào mầm mà đã được tạo thành không hủy hoại phôi cũng có được. Theo một khía cạnh, sáng chế không còn đề cập đến phương pháp bất kỳ mà đòi hỏi phá hủy phôi người.

Khía cạnh được ưu tiên của sáng chế là lập trình phát triển tế bào gốc đa tiềm năng vào trong dạng tế bào trưởng thành. Do đó, phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng cho sản xuất dạng tế bào trưởng thành từ tế bào gốc đa tiềm năng. Theo khía cạnh này của sáng chế, casset cảm ứng để chèn vào trong GSH thứ hai tốt hơn là một hoặc nhiều gen điều hòa chủ như được trình bày trên đây. Casset cảm

ứng này có thể tạo khả năng cho tế bào được lập trình vào cụ thể phả hệ, và các cassette cảm ứng khác sẽ được sử dụng để điều khiển sự biệt hóa thành dạng tế bào trưởng thành. Dạng bất kỳ của tế bào trưởng thành được dự tính, gồm có, nhưng không chỉ giới hạn ở, tế bào thần kinh, tế bào cơ, tế bào xương, tế bào sụn, tế bào biểu mô, tế bào tiết, và/hoặc tế bào máu.

Các tác giả sáng chế đã phát triển phương pháp nhanh, hiệu quả và có quy mô lớn để tạo ra gần như dạng tế bào bất kỳ trưởng thành. Phương pháp đơn giản và rẻ tiền này sẽ có giá trị cụ thể đối với thuốc tái sinh. Các kỹ thuật lập trình phát triển trước đây sử dụng hệ thống Tet-On, nhưng cố gắng để gồm có tất cả các vật liệu vào trong một vectơ/vị trí (Tet-On all-in-one) hoặc cố gắng để chèn cassette cảm ứng vào trong một alen AAVS1 và hệ thống kiểm soát vào trong alen AAVS1 khác (DeKolver *et al*, 2010, *Genome Res.*, 20, 1133-43 and Qian *et al*, 2014, *Stem Cells*, 32, 1230-8). Ngạc nhiên là, phương pháp tạo đích GSH đối ngẫu được phát triển và được mô tả ở đây có nhiều ưu điểm chưa từng thấy. Không có tiềm năng promoter can thiệp bất kỳ giữa gen được chèn vào GSH thứ nhất và trình tự di truyền của cassette cảm ứng được chèn vào GSH thứ hai. Thứ hai, nó cho phép đối tượng chèn có vết nứt lớn từ các vectơ, do cần ít vật liệu hơn để được chèn vào ở từng vị trí. Thứ ba, phương pháp tối đa hóa số lượng sao chép được chèn vào an toàn. Thứ tư, nó tạo khả năng linh hoạt thiết kế hơn. Cuối cùng, nó cho phép vật liệu di truyền bổ sung để được chèn vào, gồm có gen thông báo và chuyển mạch miRNA. Phương pháp theo sáng chế đã được thể hiện là cách thức mạnh mẽ và hiệu quả để sản xuất tế bào trưởng thành từ tế bào đa tiềm năng.

Một khi gen đã được chèn vào GSH thứ nhất và cassette cảm ứng bao gồm gen chuyển đã được chèn vào GSH thứ hai, tế bào gốc đa tiềm năng có thể được nuôi cấy để tạo khả năng cho lập trình phát triển diễn ra. Các điều kiện nuôi cấy này có thể là đặc hiệu đối với dạng tế bào gốc đa tiềm năng được sử dụng, hoặc có thể phụ thuộc vào dạng tế bào trưởng thành cuối cùng. Cho dù các điều kiện nuôi cấy nào được sử dụng, cơ chất ngoại sinh sẽ kiểm soát biểu hiện của trình tự di truyền trong phạm vi cassette cảm ứng; và có thể hoặc là được cung cấp liên tục và khi đó được loại đi để cảm ứng phiên mã hoặc được cung cấp làm phiên mã cần thiết, phụ thuộc vào cách tác động của nó, như đã trình bày trên đây.

Nếu mục đích là để lập trình tế bào mầm, có thể là có lợi để tạo ra tế bào đó với thúc đẩy ngoại bào để hỗ trợ cho việc biệt hóa kết hợp với cung cấp cassette cảm ứng mã hóa gen điều hòa chủ. Các chiến thuật lập trình lại tế bào có thể được tăng cường bằng cách kết hợp gen điều hòa chủ hoặc biểu hiện quá mức yếu tố phiên mã với ám hiệu phát tín hiệu ngoại bào. Do đó, nó có thể có khả năng thực hiện sàng lọc hệ thống đối với các yếu tố tiền biệt hóa bằng cách điều biến dòng thác phát tín hiệu chính mà có liên quan trong sự phát triển trong số dạng tế bào trưởng thành cụ thể đó. Minh họa cho điều này có thể thấy được trong Ví dụ 3.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất tế bào cơ từ tế bào gốc đa tiềm năng, phương pháp này bao gồm các bước:

a) chèn gen mã hóa protein điều hòa phiên mã đúng vào vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất; và

b) chèn gen MYOD1 được liên kết hoạt động với promoter cảm ứng đúng vào vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ hai, trong đó promoter cảm ứng này được điều tiết bằng protein điều hòa phiên mã, trong đó các vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất và thứ hai là khác nhau,

và nuôi cấy tế bào với sự có mặt của axit retinoic.

Gen MYOD1 là gen mã hóa protein biệt hóa cơ 1. Tốt hơn là, axit retinoic (RA) là RA có cấu tạo hoàn toàn là trans.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất tế bào cơ từ tế bào gốc đa tiềm năng biểu hiện *MYOD1*, phương pháp này bao gồm việc nuôi cấy tế bào với sự có mặt của axit retinoic.

Tốt hơn là, RA là RA có cấu tạo hoàn toàn là trans. Tốt hơn là, tế bào là MYOD1 biểu hiện quá mức.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất tế bào cơ từ tế bào thần kinh đệm ít nhánh từ tế bào gốc đa tiềm năng, phương pháp này bao gồm các bước:

a) chèn gen mã hóa protein điều hòa phiên mã đúng vào vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất; và

b) chèn gen SOX 10 đã được liên kết hoạt động với promotor cảm ứng đúng vào vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ hai, trong đó promotor cảm ứng này được điều tiết bằng protein điều hòa phiên mã, trong đó các vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất và thứ hai là khác nhau,

và nuôi cấy tế bào với sự có mặt của axit retinoic.

Tế bào được sử dụng cho phương pháp này có thể là tế bào động vật hoặc tế bào ở người. Nếu tế bào là của động vật, được ưu tiên là động vật là động vật nuôi như xác định trên đây.

Gen SOX-10 mã hóa yếu tố phiên mã SOX-10. Tốt hơn là, axit retinoic (RA) là RA có cấu tạo hoàn toàn là trans.

Khi mà tế bào được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế là loại đa tiềm năng, tế bào tạo thành có thể là tế bào mầm đặc hiệu giới hạn phả hệ, tế bào tiền bối hoặc dạng tế bào trưởng thành với các đặc tính mong muốn, bằng cách biểu hiện của gen điều hòa chủ. Tế bào mầm đặc hiệu giới hạn phả hệ, tiền bối hoặc tế bào trưởng thành này có thể được sử dụng theo cách phù hợp bất kỳ. Ví dụ, tế bào trưởng thành có thể được sử dụng trực tiếp để ghép vào trong cơ thể người hoặc động vật, là thích hợp đối với dạng tế bào. Theo cách khác, tế bào có thể hình thành vật liệu thử nghiệm để nghiên cứu, gồm có tác dụng của thuốc trên biểu hiện gen và tương tác của thuốc với gen cụ thể. Tế bào để nghiên cứu có thể đòi hỏi việc sử dụng cassette cảm ứng với trình tự di truyền có chức năng chưa được biết đến, để nghiên cứu biểu hiện kiểm soát được của trình tự di truyền đó. Ngoài ra, nó có thể có khả năng là tế bào để được sử dụng để tạo ra các lượng lớn vật liệu mong muốn, như là các yếu tố tăng trưởng hoặc các xytokin.

Theo khía cạnh khác, tế bào có thể được sử dụng trong công nghệ mô. Công nghệ mô đòi hỏi tạo ra mô mà có thể được sử dụng để thay thế mô hoặc thậm chí toàn bộ cơ quan của con người hoặc động vật. Phương pháp công nghệ mô là đã được biết đến đối với những người có trình độ trung bình trong lĩnh vực tương ứng, nhưng gồm có việc sử dụng của giàn giáo (nền ngoại bào) ngay khi tế bào đó được áp dụng để tạo ra mô/cơ quan. Các phương pháp này có thể được sử dụng để tạo ra “nhân tạo” khí quản, bàng quan, gan, tụy, dạ dày, ruột, mạch máu, cơ tim, xương,

tủy xương, mô niêm mạc, dây thần kinh, cơ, da, thận hoặc mô hoặc cơ quan bất kỳ khác. Phương pháp tạo mô có thể gồm có sản xuất các phần phụ trợ, một cách khác đã được biết đến là in ba chiều (3D), mà có thể đòi hỏi in trực tiếp tế bào để tạo ra mô. Do đó, sáng chế đề xuất phương pháp tạo mô sử dụng tế bào được sản xuất ra như được mô tả trong khía cạnh bất kỳ của sáng chế.

Mô được tạo ra với việc sử dụng tế bào được tạo ra theo phương pháp của sáng chế có thể được sử dụng cho việc ghép vào trong cơ thể người hoặc động vật. Theo cách khác, nếu tế bào là từ động vật, mô có thể được sử dụng cho *in vitro*/thịt được nuôi cấy. Dạng tế bào chủ yếu đối với thịt được nuôi cấy là tế bào cơ. Tuy nhiên, mô này có thể đòi hỏi việc sử dụng dạng kết hợp của các dạng tế bào được tạo ra theo phương pháp của sáng chế. Các loại này có thể là tế bào cơ (các tế bào của cơ), tế bào mạch máu, tế bào máu và tế bào mỡ (tế bào chất béo). Nếu mục đích của mô được thiết kế là đối với thịt được nuôi cấy, khi đó tế bào có thể được lấy từ động vật nuôi.

Phương pháp theo sáng chế còn có thể được thực hiện trên tế bào mà không phải là tế bào gốc đa tiềm năng, vì các lý do khác nhau, gồm có việc nghiên cứu, chữa bệnh bằng gen gồm có vacxin di truyền, sản xuất mô hình bệnh *in vitro* và sản xuất mô hình *in vivo* không phải của người.

Do đó, tế bào được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế có thể ở dạng bất kỳ của tế bào mầm từ người trưởng thành; các tế bào này là các tế bào không chuyên biệt mà có thể phát triển thành nhiều, nhưng không phải tất cả, dạng tế bào. Tế bào mầm từ người trưởng thành là các tế bào không biệt hóa được tìm thấy qua toàn bộ thân mà phân chia để bổ sung cho các tế bào chết và tái tạo mô bị hư hỏng. Còn được biết đến là có tế bào gốc trưởng thành, chúng không đa tiềm năng. Tế bào mầm từ người trưởng thành đã được nhận diện trong nhiều cơ quan và mô, gồm có não, tủy xương, máu ngoại vi, mạch máu, bộ xương cơ, da, răng, tim, ruột, gan, biểu bì buồng trứng, và tinh hoàn. Để ghi nhận tế bào là tế bào gốc trưởng thành, những người có trình độ trung bình trong lĩnh vực tương ứng phải chứng tỏ rằng, tế bào mầm đơn từ người trưởng thành có thể tạo ra dòng của tế bào đồng dạng di truyền mà khi đó cho sự xuất hiện đến tất cả các dạng tế bào của mô được biệt hóa thích hợp. Để khẳng định bằng thử nghiệm rằng, giả định tế bào mầm từ người

trưởng thành đúng là tế bào mầm, tế bào phôi hoặc là làm xuất hiện tế bào đồng dạng di truyền này trong môi trường nuôi cấy, hoặc quần thể tinh khiết của các tế bào này phải phục hồi quần thể mô sau khi ghép vào động vật. Các dạng tế bào phù hợp gồm có, nhưng không chỉ giới hạn ở, tế bào thần kinh, mầm trung mô và nội bì và tiền tế bào.

Theo cách khác, tế bào được sử dụng có thể là dạng tế bào trưởng thành. Dạng tế bào này được biệt hóa và được đặc trưng và không có khả năng phát triển thành dạng tế bào khác. Dạng tế bào trưởng thành gồm có, nhưng không chỉ giới hạn ở, tế bào thần kinh, tế bào cơ, tế bào xương, tế bào sụn, tế bào biểu mô, tế bào tiết, và/hoặc tế bào máu. Dạng tế bào trưởng thành có thể là tế bào bất kỳ từ cơ thể người hoặc động vật.

Các dạng tế bào gốc trưởng thành và dạng tế bào trưởng thành có thể được biến đổi theo sáng chế và khi đó được sử dụng cho các ứng dụng như là chữa bệnh bằng gen hoặc vaccin di truyền. Chữa bệnh bằng gen có thể được xác định là việc chèn có chủ định ADN lạ vào trong nhân của tế bào với mong muốn chữa bệnh. Định nghĩa này gồm có việc dự phòng gen hoặc các gen cho tế bào để tạo ra phiên bản kiểu đại của gen lỗi, bổ sung các gen đối với phân tử ARN mà can thiệp với biểu hiện gen đích (mà có thể là có nhược điểm), việc dự phòng gen tự sát (như là các enzym virus herpes đơn giản thymidin kinaza (HSV-tk) và xytosin deaminaza (CD) mà chuyển hóa tiền dược chất ganciclovir không gây hại (GCV) thành thuốc độc tế bào), vaccin ADN để tạo miễn dịch hoặc chữa bệnh ung thư (gồm có chữa bệnh miễn dịch nhận tế bào) và dự phòng các gen bất kỳ khác cho tế bào đối với các mục đích chữa bệnh.

Điện hình là, phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để chèn trình tự di truyền mong muốn đối với phiên mã trong tế bào, tốt hơn là biểu hiện, cụ thể là trong vaccin ADN. Vaccin ADN điện hình mã hóa dạng được biến đổi của ADN vi sinh vật gây nhiễm. Vaccin ADN được dùng cho đối tượng nơi mà chúng khi đó biểu hiện protein được chọn của vi sinh vật gây nhiễm, khơi mào đáp ứng miễn dịch chống lại mà protein đó là yếu tố bảo vệ điện hình. Vaccin ADN còn có thể mã hóa khối u kháng nguyên trong cách tiếp cận chữa bệnh miễn dịch ung thư.

Vaccin ADN có thể bao gồm trình tự axit nucleic mã hóa kháng nguyên để điều trị hoặc ngăn ngừa nhiều tình trạng bệnh gồm có, nhưng không chỉ giới hạn ở, ung thư, dị ứng, độc tính và nhiễm trùng bởi tác nhân gây bệnh như là, nhưng không chỉ giới hạn ở, nấm, virus gồm có virus u nhú ở người (HPV), HIV, HSV2/HSV1, virus cúm (dạng A, B và C), virus chất xám (gây bại liệt), virus RSV, Rhinovirus, Rotavirus, virus Hepatitis A, virus sởi, virus cận cúm, virus quai bị, virus Varicella-Zoster (thủy đậu - ecpet), Cytomegalovirus (virus cự bào), Epstein- Barr virus, Adenovirus, virus Rubella (sởi), virus u limphô dạng I tế bào T ở người (HTLV-I), virus viêm gan B (HBV), virus viêm gan C (HCV), virus viêm gan D, virus Pox (phát ban), virus Zika, Marburg và Ebola (sốt xuất huyết do virus); vi khuẩn gồm có Meningococcus (màng não cầu khuẩn), cúm Haemophilus (dạng b); và tác nhân gây bệnh là ký sinh trùng. Vaccin ADN có thể bao gồm trình tự axit nucleic mã hóa kháng nguyên từ tác nhân gây bệnh phù hợp bất kỳ. Kháng nguyên có thể là từ tác nhân gây bệnh đáp ứng với bệnh ở người hoặc thú y và cụ thể có thể là từ tác nhân gây bệnh là virus.

Vaccin ADN được chèn vào GSH còn có thể bao gồm trình tự axit nucleic mã hóa kháng nguyên khối u. Các ví dụ về kháng nguyên liên quan đến khối u gồm có, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng nguyên chống ung thư như là thành viên của họ MAGE (MAGE 1, 2, 3 v.v.), NY-ESO-I và SSX-2, kháng nguyên biệt hóa như là tyrosinaza, gp100, PSA, Her-2 và CEA, kháng nguyên tự đột biến và kháng nguyên virus khối u như là E6 và/hoặc E7 từ dạng HPV gây ung thư. Các ví dụ khác nữa về kháng nguyên khối u cụ thể gồm có MART-I, Melan-A, p97, β -HCG, GaINAc, MAGE-I, MAGE-2, MAGE-4, MAGE-12, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC18, CEA, DDC, P1A, EpCam, melanoma kháng nguyên gp75, Hker 8, kháng nguyên u hắc sắc tố khối lượng phân tử cao, K1 9, Tyrl, Tyr2, thành viên của họ gen pMel 17, c-Met, PSM (kháng nguyên muxin tuyến tiền liệt), PSMA (kháng nguyên màng đặc hiệu tuyến tiền liệt), protein tiết tuyến tiền liệt, alpha-fetoprotein, kháng nguyên CA 125, CA 19,9, TAG-72, BRCA-I và BRCA-2.

Trình tự di truyền được chèn có thể tạo ra các dạng khác của phân tử ADN chữa bệnh. Ví dụ, phân tử ADN này có thể được sử dụng để biểu hiện chức năng gen trong đó đối tượng có rối loạn di truyền bị gây ra bởi phiên bản rối loạn chức năng

của gen đó. Các ví dụ về các bệnh này gồm có loạn dưỡng cơ Duchenne, xơ nang, bệnh Gaucher, và thiếu hụt adenosin deaminaza (ADA). Các bệnh khác mà chữa bệnh bằng gen có thể là hữu dụng gồm có bệnh viêm, tự miễn, bệnh mạn tính và bệnh gây nhiễm, gồm có các rối loạn như là AIDS, ung thư, bệnh thần kinh, bệnh tim mạch, tăng cholesterolon huyết, rối loạn huyết mạch khác nhau gồm có các loại bệnh thiếu máu khác nhau, bệnh thiếu máu Địa Trung Hải và máu loãng khó đông, và tràn khí. Để điều trị khối u rắn, các gen mã hóa peptit độc (tức là, tác nhân hóa trị liệu như là rixin, độc tố bệnh bạch cầu và yếu tố nọc độc rắn mang bạch), các gen chặn khối u như là p53, các gen mã hóa đối với trình tự mARN mà là đối nghĩa với gen tạo khối u biến nạp, peptit chống khối u như là yếu tố hoại tử khối u (TNF) và các xytokin khác, hoặc đột biến âm tính vượt trội của gen tạo khối u biến nạp, có thể được biểu hiện.

Dạng khác của phân tử ADN chữa bệnh cũng được dự tính. Ví dụ, phân tử ADN mà được sao chép thành dạng ARN hoạt động, không mã hóa, ví dụ ARN nhiễu nhỏ (siARN) có thể được chèn vào. Do đó, phương pháp theo sáng chế còn đề cập đến phương pháp làm mất khả năng gen biểu hiện nội sinh hoặc làm mất chức năng/bất hoạt gen nội sinh sử dụng ARN không mã hóa trong phạm vi cassette cảm ứng.

Do đó, phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để chèn đặc hiệu và ổn định trình tự di truyền trong phạm vi cassette cảm ứng mà có thể được phiên mã có kiểm soát. Phương pháp này có nhiều ưu điểm ở các dạng tế bào gốc trưởng thành và dạng tế bào trưởng thành. Nó cho phép các cách tiếp cận chữa bệnh bằng gen được điều tiết gần hơn, đảm bảo rằng, các gen quan trọng không bị đứt gãy và cho phép việc biểu hiện của cassette cảm ứng là xoay sang off nếu tác dụng phụ bất kỳ xuất hiện. Nó cũng cho phép đối với gen nội sinh được điều tiết gần làm mất tác dụng hoặc làm bất hoạt, khảo sát chức năng và sự phát triển của gen.

Sáng chế còn đề cập đến tế bào được sản xuất ra bằng phương pháp theo sáng chế. Tế bào có thể được xác định như được biến đổi ở vị trí nằm an toàn thứ nhất của hệ gen để gồm có protein điều hòa phiên mã và ở vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ hai để gồm có trình tự di truyền được liên kết hoạt động với promoter cảm ứng mà được điều tiết bằng protein điều hòa phiên mã. Hai GSH là khác nhau và khác

biệt. Tốt hơn là tế bào là đồng tiếp hợp ở cả hai vị trí chèn. Tất cả các yếu tố là như được mô tả trên đây.

Tế bào được sản xuất ra theo phương pháp bất kỳ trong các phương pháp phương pháp theo sáng chế có ứng dụng trong phương pháp chẩn đoán và chữa bệnh. Tế bào có thể được sử dụng *in vitro* để nghiên cứu sự phát triển của tế bào, đề xuất các hệ thử nghiệm đối với thuốc mới, tạo khả năng cho phương pháp sàng lọc là phát triển, cơ chế chữa bệnh dùng scrutiniza, đề xuất các thử nghiệm chẩn đoán bệnh và tương tự. Việc sử dụng này tạo nên một phần của sáng chế. Theo cách khác, tế bào có thể là được cấy ghép vào trong người bệnh hoặc động vật bị bệnh cho các mục đích chẩn đoán bệnh hoặc chữa bệnh. Việc sử dụng tế bào trong chữa bệnh cũng được bao gồm trong sáng chế. Tế bào có thể là alen lặn (tức là tế bào trưởng thành loại đi, được biến đổi và quay trở về cùng cá thể) hoặc từ thể cho (gồm có dòng tế bào mầm).

Tất cả các tài liệu tham khảo được đưa ra trong bản mô tả này được kết hợp ở đây để tham khảo.

Trình tự

AAVS1 - mã hiệu S51329.1 tại ngân hàng gen (GenBank) của NCBI

SEQ ID No 1 : trình tự Tet02 19n

SEQ ID No 2 : trình tự hệ gen có vị trí chèn hROSA

SEQ ID No 3 : STDtetR-nls (nucleotit) và SEQ ID No 4 - STDtetR-nls (axit amin)

SEQ ID No 5 : OPTtetR-nls (nucleotit) và SEQ ID No 6 - OPTtetR-nls (axit amin)

SEQ ID No từ 7 đến 80: Các đoạn môi từ bảng 3.

SEQ ID No 81: Fig.18B AAVS1 FWD; SEQ ID No 82: Fig.18B AAVS1 REV

SEQ ID No 83: Fig.18B đoạn đệm FWD; SEQ ID No 84: Fig.18B đoạn đệm REV

SEQ ID No 85: Fig.19EHI POL3 FWD; SEQ ID No 82: Fig.19E HI POL3
REV

Đây là trình tự hệ gen có vị trí chèn hROSA26; nó gồm có dải tương đồng ở vị trí 5', vị trí cắt (nét đậm), và dải tương đồng ở vị trí 3': (SEQ ID No 2)

GCTCGAAACCGGACGGAGCCATTGCTCTCGCAGAGGGAGGAGCGC
TTCCGGCTAGCCTCTTGTCGCCGATTGGCCGTTTCTCCTCCCGCCGTGTGT
GAAAACACAAATGGCGTATTCTGGTTGGAGTAAAGCTCCTGTCAGTTACG
CCGTCGGGAGTACGCAGCCGCTTAGCGACTCTCGCGTTGCCCCCTGGGTG
GGGCGGGTAGGTAGGTGGGGTGTAGAGATGCTGGGTGTGCGGGCGCGGC
CGGCCTCCTGCGGCGGGAGGGGAGGGTCAGTGAAATCGGCTCTGGCGCG
GGCGTCCTCCCACCCTCCCCTTCCTTCGGGGGAGTCGGTTTACCCGCCGC
CTGCTTGTCTTCGACACCTGATTGGCTGTCGAAGCTGTGGGACCGGGCCC
TTGCTACTGGCTCGAGTCTCACATGAGCGAAACCACTGCGCGGGGCGCG
GGGGTGGCGGGGAGGCGGGCGTTGGTACGGTCCTCCCCGAGGCCGAGCG
CCGCAGTGTCTGGCCCCGCGCCCCCTGCGCAACGTGGCAGGAAGCGCGCG
CTGGAGGCGGGGGCGGGCTGCCGGCCGAGACTTCTGGATGGCGGCGGCC
GCGGCTCCGCCCCGGGTTCACCGCCTGAAGGGCGAGACAAGCCCGAC
CTGCTACAGGCACTCGTGGGGGTGGGGGAGGAGCGGGGGTCGGTCCGGC
TGGTTTGTGGGTGGGAGGCGCTTGTCTCCAAAAACCGGCGCGAGCTGC
AATCCTGAGGGAGCTGCGGTGGAGGAGGTGGAGAGAAGGCCGCACCCTT
CTGGGCAGGGGGAGGGGAGTGCCGCAATACCTTTATGGGAGTTCTCTGC
TGCCTCCCGTCTTGTAAGGACCGCCCTGGGCCTGGAAGAAGCCCTCCCTC
CTTTCCTCCTCGCGTGATCTCGTCATCGCCTCCATGTCGAGTCGCTTC
TCGATTATGGGCGGGATTCTTTTGCCTAGGCTTAAGGGGCTAACTTGGTC
CCTGGGCGTTGCCCTGCAGGGGAGTGAGCAGCTGTAAGATTTGAGGGGC
GACTCCGATTAGTTTATCTTCCCACGGACTAGAGTTGGTGTGCGAGGTTAT
TGTAATAAGGGTGGGGTAGGGAAATGGAGCTTAGTCATTACCTGGGGC
TGATTTTATGCAACGAGACTGCGGATTATCACTACTTATCATTTTTGGAG
CATTTTTCTAGAGACAGACATAAAGCATGATCACCTGAGTTTTATACCAT
TTGAGACCCTTGCTGCACCACCAAAGTGTAGCATCAGGTAAATCTTAAT
AGAAAAATTTTAGCTTTTGCTTGAGAAACCAGTGCTTCCCTCCCTCACCC

TCTCTCCCCAGGCTCTCTACCCCTTTGCATCCCTACCAGGCATCTTAGCAA
 CTCTCACTCATACTTGATCCCATTTTCCATTTGTTGTACTTGCTCCTCTAGT
 ATTCAGACATAGCACTAGCTTTCTCCCTCTCTTGATCTTGGGTAGCCTGGT
 GTCTCGCGAAACCAGACAGATTGGTTCCACCACAAATTAAGGCTTGAGC
 TGGGGCTTGACTCTTACCCAGCAGTGCTTTTATTCCTCCCTAGTTCACGTT
 CTTAAATGTTTATCTTGATTTTTCATTTTATCCTTTTTCTTCTAGCTGGGATTC
 TGTCCCTGACCGTCTTCACAGTCCAGGTGATCTTGACTACTGCTTTACAG
 AGAATTGGATCTGAGGTTAGGCAACATCTCCCTTTTTCTTCCTCTAAATAC
 CTCTCATTCTGTTCTTACCAGTTAGTAACTGATCTCAGATGCCTGTGTGA
 TAGCTTCC

STDtetR-nls: (SEQ ID No 3 và 4)

Trình tự nucleotit và trình tự axit amin của protein kìm hãm nhạy với tetracyclin (tetR) chứa tín hiệu cục bộ nhân SV40 đầu tận cùng N (nls, được tô màu màu ghi). Trình tự được báo cáo hoặc là trước khi hoặc sau khi tối ưu hóa codon (STDtetR và OPTtetR, tương ứng). Phần đánh dấu chấm chỉ ra đột biến cùng nghĩa được đưa vào trong OPTtetR.

ATGCCAAAAAGAAGAGGAAGGTATCTAGATTAGATAAAAGTAAAGTGATTAAACAGCGCATTAGAGC
 M P K K K R K V S R L D K S K V I N S A L E L
 TGCTTAATGAGGTCGGAATCGAAGGTTTAAACAACCCGTAAACTCGCCCAGAAGCTAGGTGTAGAGCA
 L N E V G I E G L T T R K L A Q K L G V E Q
 GCCTACATTGTATTGGCATGTAAAAAATAAGCGGGCTTTGCTCGACGCCTTAGCCATTGAGATGTTA
 P T L Y W H V K N K R A L L D A L A I E M L
 GATAGGCACCATACTCACTTTTGCCCTTTAGAAAGGGGAAAGCTGGCAAGATTTTTTACGTAATAACG
 D R H H T H F C P L E G E S W Q D F L R N N A
 CTAAGAGTTTTAGATGTGCTTTACTAAGTCATCGCGATGGAGCAAAAGTACATTTAGGTACACGGCC
 K S F R C A L L S H R D G A K V H L G T R P
 TACAGAAAAACAGTATGAAACTCTCGAAAATCAATTAGCCTTTTTATGCCAACAAAGGTTTTTCACTA
 T E K Q Y E T L E N Q L A F L C Q Q G F S L
 GAGAATGCATTATATGCACTCAGCGCTGTGGGGCATTTTACTTTAGGTTGCGTATTGGAAGATCAAG
 E N A L Y A L S A V G H F T L G C V L E D Q E
 AGCATCAAGTCGCTAAAGAAGAAAGGGAAACACCTACTACTGATAGTATGCCGCCATTATTACGACA
 H Q V A K E E R E T P T T D S M P P L L R Q
 AGCTATCGAATTATTTGATCACCAAGGTGCAGAGCCAGCCTTCTTATTCGGCCTTGAATTGATCATA
 A I E L F D H Q G A E P A F L F G L E L I I
 TGCGGATTAGAAAAACAACCTTAAATGTGAAAGTGGGTCTCCGCGGTAA
 C G L E K Q L K C E S G S P R *

Trình tự đối với tetR được tối ưu hóa: OPTtetR-nls (SEQ ID No 5 và 6):

```

ATGCCCAAGAAAAAGCGGAAGGTGTCCCGGCTGGACAAGAGCAAAGTGATCAACAGCGCCCTGGAAC
M P K K K R K V S R L D K S K V I N S A L E L
TGCTGAACGAAGTGGGCATCGAGGGCCTGACCACCCGGAAGCTGGCCAGAACTGGGCTGGAACA
L N E V G I E G L T T R K L A Q K L G V E Q
GCCCACCTGTACTGGCACGTGAAGAACAAGCGGGCCCTGCTGGACGCCCTGGCCATCGAGATGCTG
P T L Y W H V K N K R A L L D A L A I E M L
GACCGGCACCAACACACTTTTGCCCCCTGGAAGGCGAAAGCTGGCAGGACTTCCTGCGGAACAACG
D R H H T H F C P L E G E S W Q D F L R N N A
CCAAGAGCTTCAGATGCGCCCTGCTGAGCCACCGGGAGCGGCCAAAGTGACCTGGGCACCGAGACC
K S F R C A L L S H R D G A K V H L G T R P
CACCAGAAAGCAGTACGAGACACTGGAAAACAGCTGGCCTTCCTGTGCCAGCAGGGCTTCAGCCTG
T E K Q Y E T L E N Q L A F L C Q Q G F S L
GAAAACGCCCTGTACGCCCTGAGCGCGCTGGGCCACTTTACCCTGGGCTGCGTGCTGGAAGATCAGG
E N A L Y A L S A V G H F T L G C V L E D Q E
AACACAGGTCGCCAAAGAGGAAAGAGAGACACCCACCGACAGCATGCCCCCTGCTGAGACA
H Q V A K E E R E T P T T D S M P P L L R Q
GGCCATCGAGCTGTTGATCATCAAGGCGCGGAGCCCGCCTTCCTGTTGCGCCTGGAAGTATCATC
A I E L F D H Q G A E P A F L F G L E L I I
TGCGGCTCGAGAAGCAGCTGAAGTGCGAGAGCGGCTCCCCAGATGA
C G L E K Q L K C E S G S P R *

```

Ví dụ thực hiện sáng chế

Tiếp theo, sáng chế được mô tả thông qua các ví dụ, mà không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Vật liệu và phương pháp được sử dụng trong các ví dụ:

Môi trường nuôi cấy duy trì hPSC và biệt hóa lớp phôi

Môi trường nuôi cấy HESC không có nạp liệu và huyết thanh (H9 line; WiCell) và hiPSC (Cheung et al, Nat. Biotechnol. 30, 165–173 (2012)) được tạo ra. Cụ thể, tế bào được đặt trên các đĩa môi trường nuôi cấy được phủ môi trường gelatin/MEF [môi trường MEF được tạo thành từ Advanced DMEM/F12 (90%, Gibco), huyết thanh bào thai bò (10%, Gibco), L-Glutamin (1mM, Gibco), 2-Mercaptoethanol (0,1mM, Sigma-Aldrich) và Penixilin/Streptomycin (1%, Gibco)], và được nuôi cấy trong được xác định hóa học môi trường [CDM, được tạo thành từ IMDM (50%, Gibco), F12 (50%, Gibco), lipit đậm đặc (100x, Gibco), monothioglycerol (450µM, Sigma-Aldrich), insulin (7µg/ml, Roche), transferrin (15µg/ml, Roche), phần xuất albumin huyết thanh bò V (5 mg/ml), và Penixilin/Streptomycin (1%)] được bổ sung với 10ng/ml Activin-A và 12ng/ml FGF2. Tế bào được cấy chuyển trong các cụm nhỏ sử dụng collagenaza mỗi 5-6 ngày.

Sự biệt hóa các tế bào hPSC thành các lớp phôi được tạo cảm ứng trong môi trường nuôi cấy hESC bám dính theo quy trình biệt hóa được hướng dẫn trên đây đối với nội bì, trung phôi bì tấm bên, và ngoại bì thần kinh (Touboul, T. *et al.* Hepatology 51, 1754–1765 (2010), Cheung *et al.*, (2012) and Douvaras, P. *et al.* Stem Cell Reports 3, 250–259 (2014)). Cụ thể, nội bì cuối cùng được tạo ra bằng cách nuôi cấy các tế bào hPSC 3 ngày trong CDM-PVA (không có insulin) được bổ sung với FGF2 (20ng/ml), Activin-A (100ng/ml), BMP4 (10ng/ml, Marko Hyvonen, Dept. of Biochemistry, University of Cambridge), và LY-294002 (10 μ M, Promega) 3. Để tạo thành ngoại bì thần kinh, các tế bào hPSC được nuôi cấy 6 ngày trong CDM-BSA được bổ sung với SB-431542 (10 μ M, Tocris), LDN-193189 (0,1 μ M, Tocris) và RA (0,1 μ M, Sigma) 4. Trung phôi bì tấm bên thu được bằng cách nuôi cấy các tế bào hPSC 36 giờ trong CDMPVA được bổ sung với FGF2 (20ng/ml), 10ng/ml BMP4 (R&D), và LY294002 (10 μ M), và 3,5 ngày tiếp theo trong CDM-PVA được bổ sung với FGF2 (20ng/ml) và BMP4 (50ng/ml).

Biệt hóa các tế bào hESC.

Sự biệt hóa được khơi mào trong môi trường nuôi cấy bám dính của các tế bào hESC 48 giờ sau cấy chuyển. Việc thay môi trường thường được thực hiện hàng ngày, và điều chỉnh thể tích đối với mật độ tế bào. Dạng tế bào trưởng thành thu được sử dụng phương pháp trên đây được mô tả trong kỹ thuật hiện nay. Dạng tế bào trưởng thành thu được gồm có tế bào thần kinh, tế bào xương, tế bào sụn, cơ trơn, nguyên bào sợi cơ tim, tế bào cơ tim, ruột, tụy, tế bào gan, tế bào mật hoặc phổi.

Cấu trúc tạo đích gen và nhân dòng vô tính phân tử

Thiết kế và tạo cấu trúc các plasmit biểu hiện hROSA26 gARN và Cas9n được mô tả ở đây: chiến thuật dựa trên CRISPR/Cas9n để tạo đích đặc hiệu ở gen hROSA26 và để chèn cassette cảm ứng sử dụng tái tổ hợp tương đồng. Để cảm ứng DSB hệ gen ở vị trí tích hợp đúng, hệ CRISPR/Cas9 nickaza được thiết kế. Ngược lại với Cas9 nucleaza kiểu hoang dại thường được sử dụng mà được cho phép bởi gARN đơn tới vị trí đích ở hệ gen của nó, Cas9 nickaza đột biến D10A (Cas9n) được điều khiển bởi cặp gARN được thiết kế thích hợp để đưa vào đồng thời phân cắt tạo sợi đơn trên cả hai sợi của ADN đích. Chiến thuật này nhân đôi một cách hiệu quả số lượng bazơ cần thiết để sắp xếp bộ gen và nhờ đó làm tăng tính đặc hiệu. Phần mềm

dựa trên mạng “CRISPR Design Tool” được sử dụng để xác định các vị trí đích tiềm năng đối với nucleaza được dẫn đường crARN mà gần với vị trí tích hợp. Trong phạm vi căng ra của trình tự gồm 250 bp quanh vị trí đích (125 bp trên từng vị trí của vị trí tích hợp thực tế), chỗ đặt đỉnh tạo ra cặp gARN mà đạt tới một cách tổng thể điểm số “chất lượng cao” là 97, không có tác dụng lệch đích được dự tính. gARN [gARN-A 5'-GTTCGAGTCGCTTCTCGATTA-(TGG)-3' và gARN-B 5'-GGCGATGACGAGATCACGCG-(AGG)-3' (các vị trí PAM trong dấu ngoặc đơn) được tổng hợp mới và được buộc vào trong vector biểu hiện. Các plasmit mã hóa cuối đối một trong hai gARN, tương ứng, và đột biến Cas9n D10A (tham khảo các hình vẽ Fig.20 và Fig.21).

Plasmit thể cho được tạo cấu trúc mà dùng làm khuôn mẫu ADN để tạo thuận tiện cho việc sửa chữa được điều khiển tương đồng của Cas9n-cảm ứng DSB. Hai dải tương đồng hROSA26 được tạo ra bằng cách khuếch đại PCR hiệu năng cao. Hệ gen ADN mà được phân lập từ các tế bào hESC H9 được dùng làm khuôn mẫu. Các dải tương đồng 5' và 3' có độ dài bằng 904bp và 869bp, tương ứng. Cả hai tiếp theo được chèn vào nhiều vị trí nhân dòng vô tính của vector pUC19. Để tạo đích ở gen hROSA26, tế bào được chuyển nhiễm với plasmit, hai cấu trúc gARN/Cas9n và plasmit thể cho EGFP (Fig.22)

Vector hướng đích pR26_CAG-rtTA (Fig.23) được tạo cấu trúc bằng cách nhân dòng vô tính trình tự mã hóa của rtTA thể hệ thứ ba (được khuếch đại PCR từ pLVX-Tet3G) vào các vị trí BamHI/MluI của pR26_CAG-EGFP do đó thay thế trình tự EGFP. Các plasmit biểu hiện AAVS1 ZFN là quà tặng của Tiến sĩ Kosuke Yusa (Wellcome-Trust Sanger Institute). Vector hướng đích EGFP AAVS1 cảm ứng được được tạo cấu trúc bằng Gibson Assembly (New England Biolabs) trong đó ba phần chèn được gán vào các vị trí EcoRI/HindIII của nhiều vị trí nhân dòng vô tính của vector pUC19 (Thermo Fisher Scientific): phần chèn thứ nhất gồm có dải tương đồng AAVS1 ngược dòng, chất nhận mỗi nối, vị trí T2A và cassette kháng puromyxin (được khuếch đại PCR từ pTRE-EGFP; addgen 22074, được ký gửi bởi Rudolf Jaenisch). Phần chèn thứ hai gồm có promoter TRE3G cảm ứng được (được khuếch đại PCR từ pLVX-TRE3G). Phần chèn thứ ba gồm có cassette biểu hiện EGFP và dải tương đồng AAVS1 xuôi dòng (được khuếch đại PCR từ pTRE-EGFP; addgen

22074, được ký gửi bởi Rudolf Jaenisch). Plasmid tạo thành được gọi là pAAV_TRE-EGFP (Fig.32). Các vector hướng đích pAAV_TRE-NGN2 và pAAV_TRE-MYOD1(Fig.33) được tạo cấu trúc bằng cách nhân dòng vô tính trình tự mã hóa NGN2 và MYOD1, tương ứng (NGN2: được khuếch đại PCR từ pLVX-TRE-NGN2, quà tặng từ Ogan Brüstle; MYOD1: được khuếch đại PCR từ plasmid cADN có trên thị trường, Open Biosystems MHS6278-202832821, Số đăng ký: BC064493, Clone ID: 5022419) vào các vị trí SpeI/EcoRI của pAAV_TRE-EGFP, do đó thay thế trình tự EGFP.

Các plasmid khác nữa cũng được tạo ra có sử dụng phương pháp tương tự, và tất cả các plasmid được sử dụng được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig.20 đến Fig.33. Các plasmid này hoặc là được tạo ra hoặc được cho tặng. Các plasmid được sử dụng trong các ví dụ gồm có (theo thứ tự của các hình vẽ từ Fig.20 đến Fig.33): pSpCas9n(BB),_R26-R, pSpCas9n(BB) (dạng kết hợp của hai loại plasmid này được dự tính để tạo ra đứt gãy sợi đôi đặc hiệu trong intron giữa các exon 1 và 2 của THUMPDS3-AS1 trên nhiễm sắc thể 3 (ổ gen ROSA26)), _R26-L pR26_CAG_EGFP, pR26_CAG_rtTA, pZFN-AAVS1-L-ELD (nucleaza ngón tay kẽm bên trái), pZFN-AAVS1-R-KKR (nucleaza ngón tay kẽm bên phải), pAAV_CAG_EGFP (thể cho), pR26-Neo_CAG-OPTtetR (tạo đích hROSA26 của tetR được tối ưu hóa codon), pAAV-Puro_iKD (tạo đích AAVS1 của shARN cảm ứng được), pAAV-Neo_CAG-Cas9 (tạo đích AAVS1 của Cas9), pAAV-Puro_siKO (tạo đích AAVS1 của gARN cảm ứng được), pAAV-Puro_siKO-2TO (tạo đích AAVS1 của gARN cảm ứng được, phiên bản với 2 operon Tet trong promoter), pAAV_TRE-EGFP (EGFP biểu hiện quá mức cảm ứng được, được gắn vào) và pAAV_TRE-MYOD1 (MYOD1 biểu hiện quá mức cảm ứng được đối với cơ).

Tạo đích gen

Việc tạo đích của ổ gen hROSA26 và AAVS1 để làm mất tác dụng và làm bất hoạt gen được thực hiện bằng công nghệ Nucleofection (biến nạp trực tiếp vào nhân tế bào). Tế bào gốc đa tiềm năng ở người (PSCs) được phân ly thành các tế bào đơn lẻ với TrypLE Select (Gibco), và 2×10^6 tế bào được biến nạp trực tiếp vào nhân (100µl thể tích phản ứng; tổng bằng 12µg của ADN, mà được chia đều giữa hai plasmid gARN/Cas9n và vector hướng đích) sử dụng Kit Lonza P3 Primary Cell 4D-

Nucleofector X và chu trình CA-137 của Lonza 4D-Nucleofector System. Các tế bào hPSC được biến nạp trực tiếp vào nhân được đặt lên trên phân kháng đa thuốc được chiếu xạ (DR4) nguyên bào sợi từ phôi chuột và được nuôi cấy trong môi trường KSR [được tạo thành từ Advanced DMEM/F12 (80%), chất thay thế huyết thanh để làm mất khả năng (20%, Gibco), L-Glutamin (1 mM), 2-Mercaptoetanol (0,1 mM) và Penixilin/Streptomycin (1%)] được bổ sung với FGF2 (4ng/ml, Department of Biochemistry, University of Cambridge). Y-27632 (5 μ M, Tocris) được bổ sung trong 24 giờ trước khi và sau khi biến nạp trực tiếp vào nhân để xúc tiến việc sống sót của tế bào. Sau 3-6 ngày, các tế bào hPSC kháng neomycin được chọn bằng cách bổ sung G418 (50 μ g/ml, Sigma-Aldrich) trong 7-10 ngày. Tiếp theo, lấy riêng dòng vô tính, để lan rộng trong các điều kiện không có nạp liệu và cuối cùng được phân tích bằng cách tạo kiểu gen.

Việc tạo đích của ổ gen AAVS1 còn được thực hiện bằng cách biến nạp trực tiếp vào mỡ. PSC của người được gieo trong các điều kiện không có nạp liệu trong các đĩa 6 giếng, và được chuyển nhiễm 48 giờ sau cấy chuyển. Việc truyền nhiễm được thực hiện trong Opti-MEM (Gibco) được bổ sung với sản phẩm Lipofectamine 2000 (10 μ l/well, Thermo Fisher Scientific) và tổng của 4 μ g ADN (được chia đều giữa hai plasmid AAVS1 ZFN và vector hướng đích) trong 24 giờ. Sau 3-5 ngày, các tế bào hPSC kháng được chọn bằng cách bổ sung puromycin (1 μ g/ml, Sigma-Aldrich) trong 5-8 ngày. Tiếp theo, lấy riêng dòng vô tính, để lan rộng và được phân tích bằng cách tạo kiểu gen. Kháng sinh kháng có thể được sử dụng để chọn các dòng vô tính.

Dòng vô tính hPSC kháng thuốc từ các thử nghiệm tạo đích được sàng lọc bởi PCR bộ gen để xác nhận việc tích hợp cassette cảm ứng đặc hiệu vị trí, để xác định số lượng alen được tạo đích, và để loại trừ các tích hợp lệch đích. PCR được thực hiện bằng thiết bị LongAmp Taq DNA Polymerase (New England Biolabs). Bảng 2 liệt kê ra các dạng kết hợp đoạn môi được sử dụng cho các vector hướng đích khác nhau. Các kết quả của tất cả các thử nghiệm tạo đích được tổng kết trong Bảng 1. Phân tích kiểu nhân được thực hiện bằng kỹ thuật tạo dải G tiêu chuẩn (Medical Genetics Service, Cambridge University Hospitals). Để chuẩn bị PSC của người được tạo đích cho phân tích nhiễm sắc thể, tế bào được ủ trong môi trường nuôi cấy mới được bổ

sung với Y-27632 (5 μ M, Tocris) và KaryoMAX Colcemid (100ng/ml, Gibco) trong 4 giờ ở +37°C. Tiếp theo, thu hoạch tế bào là tế bào đơn, rửa, và tạo viên cho chúng. Sự phồng lên của nhân và sự lan rộng của nhiễm sắc thể đạt được bằng cách xử lý với dung dịch 0,055M KCl nhược trương trong 5-10 phút. Cuối cùng, cố định tế bào bằng metanol và axit axetic băng giá (tỷ lệ 3:1).

Đối với OPTiKD, việc tạo đích AAVS1 được thực hiện bằng cách biến nạp trực tiếp vào mỡ như được mô tả trên đây. Cụ thể, các tế bào hPSC được gieo không có nạp liệu trong các đĩa 6 giếng, và được chuyển nhiễm 48 giờ sau cấy chuyển tế bào với 4 μ g ADN (được chia đều giữa hai plasmid AAVS1 ZFN và vector hướng đích) sử dụng 10 μ l cho mỗi giếng sản phẩm Lipofectamine 2000 trong môi trường Opti-MEM (Gibco) trong 24 giờ, tất cả theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau 4 ngày, 1 μ g ml⁻¹ Puromyxin được bổ sung vào môi trường nuôi cấy, và lấy riêng dòng vô tính và để lan rộng sau 7-10 ngày lựa chọn.

Đối với vị trí đơn OPTiKO, việc tạo đích AAVS1 được thực hiện bằng công nghệ Nucleofection. các tế bào hESC được xử lý sơ bộ trong 16 giờ với 10 μ M Y-27632 (Tocris) được chia ra thành các cụm gồm 2-8 tế bào sử dụng Accutaza (Gibco), và 2 x 10⁶ tế bào được biến nạp trực tiếp vào nhân trong 100 μ l với tổng bằng 12 μ g ADN (từng 4 μ g đối với hai ZFN plasmid, và từng 2 μ g đối với hai vector hướng đích) sử dụng Kit Lonza P3 Primary Cell 4D-Nucleofector X và chu trình CA-137 trên hệ thống Lonza 4D-Nucleofector, tất cả theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các tế bào hESC đã được biến nạp trực tiếp vào nhân được đặt lên trên lớp nạp liệu của nguyên bào sợi từ phôi chuột DR4 được chiếu xạ (kháng puromyxin và neomycin) và được nuôi cấy trong môi trường KSR được bổ sung với 4 ng ml⁻¹ FGF2 và 10 μ M Y-27632 (việc này chỉ kéo dài 24 giờ đầu). Sau 4 ngày, các khuẩn lạc hPSC mang cả hai gen kháng puromyxin và neomycin được chọn trong 7-10 ngày với 25 μ g ml⁻¹ của Geneticin (G418 Sulfate, Gibco) và 0,5 μ g ml⁻¹ Puromyxin. Khi đó nhặt ra riêng dòng vô tính và để lan rộng trong các điều kiện không có nạp liệu.

Các tế bào hESC biểu hiện AAVS1-EGFP, ROSA26-EGFP, ROSA26-STDtetR, ROSA26-OPTtetR, và ROSA26-EGFPd2 được tạo ra bằng cách biến nạp trực tiếp vào mỡ (ổ gen AAVS1) hoặc biến nạp trực tiếp vào nhân (ổ gen ROSA26)

của các vector hướng đích với các cặp AAVS1 ZFN hoặc ROSA26 CRISPR/Cas9n (như được mô tả trên đây). $2\mu\text{g ml}^{-1}$ Blastixidin S-HCl (Gibco) được sử dụng cho pR26-Bsd_CAG-EGFPd2 plasmit. Tạo ra các tế bào hESC biểu hiện quá mức EGFP cảm ứng được mang gen chuyển ROSA26-rtTA và AAVS1-TRE-EGFP được mô tả ở phần khác nào đó. Cụ thể, tế bào liên tục được tạo đích gen, trước tiên là bằng công nghệ Nucleofection của pR26-Neo_CAG-rtTA với các plasmit ROSA26 CRISPR/Cas9n, sau đó bằng cách biến nạp trực tiếp vào mỡ của pAAVPuro_TRE-EGFP với plasmit AAVS1 ZFN.

Các dòng vô tính hPSC được tạo đích gen được sàng lọc bởi PCR bộ gen để xác nhận việc tạo đích đặc hiệu vị trí, xác định số lượng alen được tạo đích, và loại trừ các tích hợp lệch đích của plasmit tạo đích (tham khảo Fig.16A).

Biểu hiện quá mức casset cảm ứng

Biểu hiện quá mức của casset cảm ứng (EGFP, NGN2, MYOD1 và OLIG2-SOX10, tương ứng) được tạo ra bằng cách bổ sung doxyxycyclin hyclat (Sigma-Aldrich) vào môi trường nuôi cấy. Trừ khi được nêu cụ thể khác đi, doxyxycyclin được sử dụng ở nồng độ cuối bằng $1\mu\text{g/ml}$. Môi trường chứa doxyxycyclin được giữ để tránh ánh sáng, và thay đổi 24 giờ một lần. Tế bào biểu hiện EGFP ở đây được gọi là OPTi-EGFP, các loại biểu hiện NGN2 được gọi là OPTi-NGN2, tế bào biểu hiện MYOD1 được gọi là OPTi-MYOD1 và tế bào biểu hiện OLIG2-SOX10 được gọi là OPTi-OLIG2-SOX10.

Gen cảm ứng được làm bất hoạt và làm mất tác dụng

Trừ khi được mô tả theo cách khác trên các hình vẽ hoặc các ví dụ, tetraxycyclin hydroclorua (sigma-Aldrich) được sử dụng ở nồng độ $1\mu\text{g ml}^{-1}$ để tạo cảm ứng làm gen mất tác dụng hoặc làm bất hoạt.

Tạo ra tế bào thần kinh

Tế bào OPTi-NGN2 đa tiềm năng được phân ly thành các tế bào đơn lẻ với TrypLE và được đặt lên trên đĩa được phủ Matrigel ($35\mu\text{g/cm}^2$, Scientific Laboratory Supplies) ở mật độ bằng 75.000 tế bào trên một giếng của đĩa 12 giếng. Lập trình phát triển được khơi mào 24-48 giờ sau tách rời. Trừ khi được nêu khác đi, cảm ứng được thực hiện trong DMEM/F12 (Gibco) được bổ sung với Glutamax (100x,

Gibco), axit amin không cơ bản (100x, Gibco), 2-Mercaptoetanol (50 μ M), Penixilin/Streptomycin (1%), và doxyxyclin (1 μ g/ml). Sau 2 ngày cảm ứng, chuyển mạch môi trường sang Neurobasal-môi trường được bổ sung với Glutamax (100x), B27 (50x, Gibco), BDNF (10ng/ml, Peprotech), NT3 (10ng/ml, R&D Systems), Penixilin/Streptomycin (1%), và doxyxyclin (1 μ g/ml).

Tạo ra tế bào cơ vân

Tế bào OPTi-MYOD1 đa tiềm năng được phân ly thành các tế bào đơn với TrypLE và được đặt lên trên đĩa được phủ môi trường gelatin/MEF ở mật độ bằng 100.000 tế bào trên một giếng của đĩa 12 giếng. Lập trình phát triển được khơi mào 24-48 giờ sau tách rời. Trừ khi được nêu khác đi, cảm ứng được thực hiện trong DMEM (Sigma-Aldrich) được bổ sung với L-Glutamin (2 mM), 2-Mercaptoetanol (50 μ M), Penixilin/Streptomycin (1%), insulin (7 μ g/ml), axit retinoic tất cả các trans (1 μ M, Sigma-Aldrich), và doxyxyclin (1 μ g/ml). Sau 5 ngày cảm ứng, môi trường được bổ sung với CHIR99021 (3 μ M, Tocris) và huyết thanh ngựa được bất hoạt bằng nhiệt (2%, Gibco) để tăng cường sự trưởng thành.

Tạo ra tế bào thần kinh đệm ít nhánh

Các tế bào hPSC OPTi-OX biểu hiện OLIG2-2A-SOX10 đa tiềm năng được nuôi tăng trưởng trong các khuẩn lạc trên các đĩa môi trường nuôi cấy được phủ gelatin/MEF. Trước khi bắt đầu cảm ứng, chúng được xử lý với SB và LDN qua đêm. Ngày hôm sau, cảm ứng được khơi mào trong CDM được bổ sung với doxyxyclin (1 μ g/ml) và RA (0,1 μ M). Một ngày sau cảm ứng, tế bào được tách rời trong CDM được bổ sung với RA (0,1 μ M), PM (1 μ M), và Y-27632 (5 μ M), PDGFaa (20ng/ml, Peprotech), FGF2 (5ng/ml) lên trên đĩa môi trường nuôi cấy được phủ PDL/laminin (100.000 tế bào trên một giếng của đĩa 12 giếng). Ngày hôm sau, tế bào chuyển mạch sang môi trường tế bào thần kinh đệm ít nhánh được tạo thành từ DMEM/F12, được bổ sung với Glutamax (100x), axit amin không cơ bản (100x), 2-Mercaptoetanol (1000x), Penixilin-Streptomycin (100x), N2 Supplement (100x), B27 Supplement (50x), Insulin 7 μ g/ml (Marko Hyvonen), T3 60ng/ml (Sigma), Biotin 100ng/ml (Sigma), db-cAMP 1 μ M (Sigma). Môi trường tế bào thần kinh đệm ít nhánh được bổ sung với dox (1 μ g/ml), PDGFaa (20ng/ml), FGF2 (5ng/ml), RA (0,1 μ M) và PM (1 μ M). 7 ngày sau cảm ứng RA và PM được loại đi. Giữ tế bào cảm

ứng trong trạng thái tăng sinh, tế bào được cấy chuyển 4 ngày một lần (75.000 tế bào trên một giếng của đĩa 24 giếng) với sự có mặt liên tục của tác nhân gây phân bào PDGF $\alpha\alpha$ và FGF2. Để biệt hóa tế bào tiền thân của tế bào thần kinh đệm ít nhánh tăng sinh, PDGF $\alpha\alpha$ và FGF2 được loại đi. NT3 tái tổ hợp ở người (5ng/ μ l, R&D Systems) được bổ sung để tăng cường việc sống sót của tế bào.

PCR định lượng thời gian thực (qPCR)

Chiết RNA sử dụng Kit GenElute Mammalian Total RNA Miniprep và bộ thử nghiệm On-Column DNase I Digestion Set (Sigma-Aldrich). Tổng hợp cADN được thực hiện với Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific). Hỗn hợp Applied Biosystems SYBR Green PCR Master Mix được sử dụng cho qPCR. Các mẫu được chạy trên máy Applied Biosystems 7500 fast PCR. Tất cả các mẫu được phân tích trong kỹ thuật sao chép và bình thường hóa cho gen Porphobilinogen Deaminaza 1 (PBGD) nằm trong hốc. Các kết quả được phân tích với phương pháp $\Delta\Delta C_t$. Tham khảo Bảng 3 đối với trình tự đoạn mồi.

Phương pháp đếm dòng tế bào

Để phân tích biểu hiện EGFP, các tế bào được thu hoạch với TrypLE Select (Gibco) trong 5-10 phút ở 37°C để thu được dung dịch huyền phù tế bào đơn. Sau khi rửa với PBS, tế bào được tạo lại huyền phù trong PBS lạnh dùng nước đá, được bổ sung với DAPI (10 μ g/ml), và được ủ trong 5 phút trên đá lạnh.

Tế bào được phân tích sử dụng máy đếm dòng tế bào Cyan ADP để xác định các mức của biểu hiện EGFP của các tế bào sống (âm tính với DAPI). Để nhuộm màu và phân tích biểu hiện của chuỗi nặng myosin, thu hoạch tế bào với TrypLE Select (như đối với phân tích biểu hiện EGFP), rửa một lần với PBS, và cố định và thấm với dung dịch Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences). Tiếp theo, tế bào được rửa và được chặn trong chất đệm Perm/Wash (BD Biosciences) được bổ sung với 3% albumin huyết thanh bò (BSA) ở +4°C qua đêm.

Việc nhuộm màu với kháng thể kháng MYH kết hợp PE (bảng 4) được tiến hành trong chất đệm Perm/Wash trong 1 giờ ở +4°C trong bóng tối. Sau ba lần rửa với chất đệm Perm/Wash, tế bào được phân tích với máy đếm dòng tế bào Cyan

ADP để xác định các mức biểu hiện MHC. Việc phân tích dữ liệu được thực hiện với FlowJo (v10) và Graphpad Prism (v6).

Phương pháp Western blot

203. Chiết protein toàn tế bào với CelLytic M (Sigma-Aldrich) được bổ sung với chất ức chế Proteaza hoàn thiện (Roche), và tiếp theo định lượng bằng cách sử dụng Kit Định lượng Nhanh Protein (Sigma-Aldrich). Thực hiện điện di protein với chất đệm NuPAGE LDS Sample Buffer và 4-12% NuPAGE Bis-Tris Precast Gels (Invitrogen). Sau khi chuyển protein lên trên PVDF, màng được chặn với PBS được bổ sung với 0,05% Tween-20 (PBST) 4% sữa trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, và được ủ với kháng thể sơ cấp qua đêm trong sữa PBST 4%. Màng được rửa với PBST, được ủ với kháng thể thứ cấp kết hợp với HRP (Sigma-Aldrich) trong sữa PBST 4%, được ủ với chất nền Pierce ECL2 Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific), và được để lộ ra màng X-Ray Super RX Films (Fujifilm).

Hóa miễn dịch tế bào

Cố định tế bào trong paraformaldehyt 4% (được pha loãng trong PBS) trong 20 phút ở nhiệt độ trong phòng và tiếp theo rửa ba lần với PBS. Tế bào khi đó được chặn với 10% huyết thanh lừa (Sigma-Aldrich) và được thấm với 0,3% Triton X-100 (được pha loãng trong PBS) trong 20 phút ở nhiệt độ trong phòng. Tiếp theo, tế bào được ủ với kháng thể sơ cấp được pha loãng thích hợp (quy trình thử nghiệm bổ sung) trong 2% huyết thanh lừa và 0,1% Triton X-100 (được pha loãng trong PBS) ở 4°C qua đêm. Triton-X được bỏ qua ở tất cả các bước khi nhuộm màu kháng nguyên bề mặt PDGFRA, A2B5, và O4. Sau ba lần rửa với PBS, tế bào được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng với kháng thể thứ cấp kết hợp với fluorophore lừa tương ứng (Alexa Fluor 488, 555, 568, và/hoặc 647) trong PBS được bổ sung với 1% huyết thanh lừa. Quan sát nhân với 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI, Thermo Fisher Scientific). Tạo hình ảnh biểu hiện EGFP và nhuộm màu miễn dịch sử dụng kính hiển vi cùng tiêu điểm Zeiss LSM 700 (Leica). Tỷ lệ phần trăm của tế bào dương tính với β III-tubulin được tính bằng cách xác định biểu hiện β III-tubulin trong ít nhất 50 tế bào dương tính với DAPI được chọn ngẫu nhiên trong 3 trường quan sát của 3 sao chép sinh học sử dụng kính hiển vi Olympus IX71 được đảo ngược.

Phân tích thống kê được thực hiện với Graphpad Prism (v6). Số lượng sao chép, thử nghiệm thống kê được sử dụng, và các kết quả thử nghiệm được thể hiện trên các hình vẽ. Trừ khi được nêu cụ thể khác đi, dữ liệu được thể hiện là giá trị trung bình $\pm$ SEM.

Ví dụ 1: Tạo đích kép của EGFP

Để phát triển nền biểu hiện quá mức cảm ứng được trong các tế bào hPSC, các tác giả sáng chế đã tạo đích liên tục hai thành phần của hệ thống Tet-On vào hai GSH khác nhau. Tạo đích rtTA thế hệ thứ ba được biểu hiện cơ định vào trong ổ gen ROSA26 (hROSA26) ở người bằng cách sử dụng chiến thuật tạo đích dựa trên CRISPR/Cas9n và cassette cảm ứng EGFP được cảm ứng được chèn vào AAVS1 (Fig.1a; các hình vẽ từ Fig.4a- đến Fig.4c). Tạo đích cả hai hROSA26 và AAVS1 có hiệu quả cao (tham khảo các hình vẽ từ Fig.4d đến Fig.4f, Bảng 1) và không ảnh hưởng đến tính ổn định hệ gen hPSC, tự làm mới, và biệt hóa (dữ liệu không được thể hiện), do đó ủng hộ chống lại độc tính tế bào phụ thuộc rtTA.

Khi đó, các tác giả sáng chế chọn dòng vô tính được tạo đích GSH đối ngẫu mà tiến hành hoặc là một hoặc hai sao chép của từng cassette trong số hai cassette cảm ứng (Fig.5a). Việc tạo đích đồng tiếp hợp của rtTA dẫn đến các mức protein rtTA cao hơn khoảng 2 lần (Fig.5b), và các mức EGFP cũng tăng đáng kể sau cảm ứng, khi so với biểu hiện rtTA dị tiếp hợp (tham khảo các hình vẽ từ Fig.5c đến Fig.5e). Ngoài ra, dòng vô tính với việc tạo đích đồng tiếp hợp của cassette cảm ứng EGFP thể hiện các mức EGFP tương đồng cao hơn và lớn hơn so với dòng có tạo đích dị tiếp hợp (tham khảo các hình vẽ từ Fig.5c đến Fig.5e). Quan trọng là, tất cả các dòng được tạo đích đúng thể hiện biểu hiện EGFP cảm ứng được mạnh mẽ, mà ít nhất cao hơn 20 lần so với promoter cơ định CAG mạnh (Fig.1b, các hình vẽ từ Fig.5c đến Fig.5e). Tóm lại, các kết quả này hỗ trợ cho giả thuyết ban đầu là việc tạo đích hai sao chép của cả hai yếu tố của hệ thống Tet-On sẽ dẫn đến biểu hiện tối đa sau cảm ứng. Đỉnh của các mức EGFP đạt được khoảng 4 ngày sau cảm ứng, và biểu hiện đảo ngược nhanh ngay khi loại bỏ doxyxyclin (Fig.1c). Hơn nữa, biểu hiện EGFP có thể được chuẩn độ bằng cách điều chỉnh liều của doxyxyclin (Fig.1d). Quan trọng là, biểu hiện EGFP cảm ứng được không chỉ có hiệu quả cao trong các tế bào hPSC, mà cả trong quá trình biệt hóa thành lớp phôi (dữ liệu ảnh màu không được thể hiện, dữ

liệu trên các hình vẽ từ Fig.6a đến Fig.6d). Cuối cùng, và phù hợp với kiểm soát phiên mã chặt chẽ đã được biết đến của hệ thống Tet-On thế hệ thứ 3, không có biểu hiện cơ bản phát hiện được của EGFP mRNA hoặc protein khi không có mặt doxyxyclin như được xác định bởi máy đếm dòng tế bào và qPCR, tương ứng (Fig.1b, Fig.6d). Nhìn chung, các kết quả này cho thấy rằng, việc tạo đích GSH đối ngẫu của hệ thống Tet-On là chiến thuật mạnh đối với biểu hiện tối ưu của cassette cảm ứng trong các tế bào hPSC và các dẫn xuất của chúng.

Ví dụ 2: Tạo các tế bào thần kinh vỏ não hướng kích thích từ tế bào hESC và tế bào hiPSC

Các nghiên cứu trước đây đã thể hiện rằng, các tế bào này có thể dễ dàng được tạo ra bởi virus lây nhiễm chậm biểu hiện quá mức của bất kỳ của pro-thần kinh bHLH-các yếu tố (ASCL1, NGN2, hoặc NEUROD1) trong các tế bào hPSC. Do đó, đã tạo ra các tế bào hPSC biểu hiện OPTi- NGN2 (Fig.2a, Bảng 1). Sự cảm ứng NGN2 dẫn đến điều phối giảm nhanh của các yếu tố đa năng (Fig.7) và khơi mào chương trình phiên mã thần kinh (Fig.2b). Tế bào được cảm ứng thể hiện các quy trình thần kinh sớm ở mức ba ngày sau cảm ứng (dữ liệu không được thể hiện). Sau một tuần, tất cả các tế bào hiển thị hình thái học thần kinh và protein gen đánh dấu thùy thần kinh được biểu hiện, như là β III-tubulin và MAP2 (Fig.2c). cảm ứng mạnh được bộc lộ RT-PCR định lượng của các gen đánh dấu não trước thông thường như là *BRN2* và *FOXG1*, và của tế bào thần kinh có glutamat gồm có *GRIA4* và *VGLUT2* (Fig.2b), chỉ số nhận diện thần kinh vỏ não hướng kích thích. Tóm lại, các kết quả này cho thấy sự cải thiện mạnh ở cả hai yếu tố, đó là tốc độ và hiệu quả trong việc tạo ra dây thần kinh so với quy trình biệt hóa hPSC truyền thống, và tăng cơ bản về hiệu quả và độ tinh khiết so với cả hai giao thức sự chuyển biệt hóa và lập trình phát triển dựa trên virus lây nhiễm chậm. Các kết quả tương tự thu được với các tế bào hiPSC biểu hiện OPTi-NGN2, khẳng định tính mạnh mẽ của phương pháp này. Cuối cùng, không quan sát thấy việc giảm bất kỳ về hiệu quả của cảm ứng thần kinh trên khoảng thời gian nuôi cấy mở rộng của các tế bào hPSC biểu hiện Opti-NGN2 (>25 cấy chuyên, Fig.2c). Nhìn chung, các kết quả thu được cho thấy rằng các tế bào hPSC biểu hiện OPTi-NGN2 có thể được sử dụng làm nguồn không cạn kiệt để tạo

ra dây thần kinh gần với tiền đình, không có virus, bước đơn, nhanh và với quy mô lớn.

Ví dụ 3: Tạo ra tế bào cơ vân

Yếu tố phiên mã MYOD1 được biết đến để tạo ra sự chuyển biệt hóa cho cơ khi được biểu hiện quá mức trong các dạng tế bào gốc sinh dưỡng khác nhau, tuy nhiên, khả năng của các tế bào hPSC trải qua lập trình phát triển cho cơ được tạo cảm ứng MYOD1 hiện còn đang tranh cãi. Mặc dù đã tạo ra các tế bào hPSC biểu hiện OPTi -MYOD1 (Bảng 1), nhưng nhận thấy rằng, cảm ứng biểu hiện MYOD1 sau điều trị bằng doxyxycyclin dẫn đến chết gần như hoàn toàn tế bào trong phạm vi 3-5 ngày trong khoảng rộng của các điều kiện nuôi cấy mà được đề xuất trên đây để tạo thuận tiện cho việc chuyển hóa của các tế bào hPSC thành tế bào cơ vân. Như đã biết đến rộng rãi rằng, các chiến thuật lập trình lại tế bào có thể được tăng cường bằng cách kết hợp biểu hiện quá mức yếu tố phiên mã với ám hiệu phát tín hiệu ngoại bào, các tác giả sáng chế đã thực hiện sàng lọc hệ thống đối với các yếu tố tiền tạo cơ bằng cách điều biến dòng thác phát tín hiệu chính mà có liên quan trong hình thành via thô, tạo thân/đốt, và tạo cơ. Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng, việc bổ sung axit retinoic có cấu tạo trans hoàn toàn (RA) kết hợp với biểu hiện quá mức MYOD1 dẫn đến chuyển hóa nhanh và gần như hoàn toàn thành tế bào cơ dương tính với cả hai gen tổng hợp chuỗi nặng myogenin và myosin (MHC) ngày 5 sau cảm ứng. Tác dụng của RA là phụ thuộc nồng độ và có trung gian thông qua dạng thụ thể RA $RAR\alpha$ và $RAR\beta$, nhất quán với mẫu biểu hiện của thụ thể RA trong quá trình tạo cơ phát triển (Fig.8). Tác dụng này được xem là độc lập với cơ chế MYOD1 biểu hiện quá mức. Tế bào cơ vân được tạo ra được thể hiện kiểu hình con suốt thông thường, có hình dạng kéo dài, trải qua dung hợp tế bào tăng cường và thể hiện biểu hiện gen đánh dấu tạo cơ mạnh trên cả hai mRNA và các mức protein (Fig.3b, Fig.9a-9c). Việc bổ sung axetylcholin ở các nồng độ nanomol (ACh) hoặc carbachol đối kháng thụ thể ACh lựa chọn dẫn đến cơ hoàn toàn sợi cơ, thể hiện chức năng của cảm ứng tế bào cơ. Các kết quả tương tự thu được với Opti-MYOD1 hiPSCs (dữ liệu không được thể hiện). Quan trọng là, hiệu quả cảm ứng cơ không giảm trên khoảng thời gian nuôi cấy mở rộng (>50 cấy chuyển, Fig.3d), do đó thể hiện tính mạnh mẽ và khả năng tái tạo của phương pháp này. Cuối cùng, các tác giả

sáng chế nhận thấy rằng, các mức của casset cảm ứng với MYOD1 tương quan có lợi với hiệu quả chuyển hóa, mà đánh dấu tầm quan trọng của việc phân phối gen mạnh mẽ và tính ưu việt của phương pháp này trên các cách tiếp cận lập trình lại có trung gian là virus dạng đậu (Fig.10). Nói chung, chiến thuật lập trình phát triển OPTi-MYOD1 nhanh hơn khoảng 7 lần và hiệu quả cao hơn khoảng 5 lần so với quy trình biệt hóa hiện nay của các tế bào hPSC thành tế bào cơ vân. So với quy trình lập trình phát triển trước đây (Tanaka, A. *et al. PLoS One* **8**, e61540 (2013) and Abujarour, R. *et al. Stem Cells Transl. Med.* **3**, 149–60 (2014)) là hiệu quả hơn (>95% đối lại 30-80%), không có casset cảm ứng được chèn ngẫu nhiên, được xác định hóa học, tái tạo được toàn bộ, và có quy mô lớn hơn.

Các phát hiện này cho thấy rằng, phương pháp kiểm soát biểu hiện casset cảm ứng trong các tế bào hPSC này có thể được sử dụng làm nguồn không cạn kiệt để sản xuất hiệu quả cao và quy mô lớn quần thể tế bào tương đồng. Tốc độ cảm ứng và độ tinh khiết của tế bào đích mong muốn hiện là hơn hẳn các phương pháp khác.

Ví dụ 4: Tạo ra tế bào tiền thân của tế bào thần kinh đệm ít nhánh và tế bào thần kinh đệm ít nhánh

Các tế bào hPSC biểu hiện OPTi-OX mang SOX10 cảm ứng được hoặc là riêng hoặc ở dạng kết hợp với OLIG2 ở dạng casset biểu hiện bixistron. Mặc dù tế bào được cảm ứng với SOX10 riêng biểu hiện mạnh mẽ gen đánh dấu O4, là tế bào tiền thân của tế bào thần kinh đệm ít nhánh (OPC) sau 10 ngày cảm ứng, các tế bào này thất bại trong việc biệt hóa hơn nữa thành tế bào biểu hiện myelin và chết theo tiến triển. Ngược lại, tế bào biểu hiện quá mức hai lần OLIG2-SOX10 dễ dàng tiến triển từ giai đoạn tiền bồi dưỡng tính với O4 thành kiểu hình dương tính với CNP/MBP trưởng thành ở 20 ngày sau cảm ứng. Hơn nữa, phân tích biểu hiện protein gen đánh dấu bổ sung khẳng định rằng, các tế bào hPSC biểu hiện OPTi-OLIG2-SOX10 tạo ra trong môi trường tế bào thần kinh đệm ít nhánh (Douvaras *et al.* 2014) được bổ sung với tác nhân gây phân bào PDGF α và FGF2 trước tiên trải qua giai đoạn kiểu OPC, trong đó chúng tăng sinh cao và trong đó chúng đồng biểu hiện PDGFRA, A2B5, và O4. Các tế bào này tăng sinh cao và có thể được duy trì đối với ít nhất ba cây chồi (Fig.12b) bằng cách nuôi cấy chúng với sự có mặt của tác nhân gây phân bào. Do đó, gọi tên các tế bào này là i-OPCs, đối với OPC được

cảm ứng. Rõ ràng là, sau khi loại đi tác nhân gây phân bào và với sự có mặt liên tục của doxyxyclin, i-OPCs dễ dàng được biệt hóa trong khoảng một tuần thành tế bào thần kinh đệm ít nhánh trưởng thành biểu hiện các protein myelin chính CNP, PLP, MAG, MOG và MBP (các hình vẽ từ Fig.12c đến Fig.12d) mà có khả năng hình thành vỏ myelin (dữ liệu không được thể hiện). Tóm lại, các kết quả này cho thấy rằng sáng chế cho phép phát triển của quy trình lập trình phát triển hPSC nhanh và mạnh mẽ để tạo ra tế bào tiền thân của tế bào thần kinh đệm ít nhánh và tế bào thần kinh đệm ít nhánh.

Bảng 1: Tổng quan của các kết quả tạo kiểu gen:

Ô gen	Dòng tế bào	Gen chuyển	Số dòng vô tính nhất ra	số dòng vô tính không tích hợp đúng đích (a)	số dòng vô tính HET + lệch đích (b)	số dòng vô tính HOM + lệch đích (b)	số dòng vô tính HET (c)	số dòng vô tính HOM (c)	Hiệu quả không lệch đích [%] (d)	Hiệu quả tổng [%] (e)
ROSA26	H9	rtTA	23/27/60*	2/3/1*	7/13/36*	5/3/6*	8/8/14*	1/0/3*	39/30/28*	91/89/98*
ROSA26	iPSC	rtTA	48	8	11	2	25	2	56	83
AAVS1	H9	EGFP	12/12/24*	2/1/2*	0/0/0*	4/5/11*	0/1/4*	6/5/7*	50/50/46*	83/92/92*
AAVS1	H9	NGN2	6	0	0	0	0	6	100	100
AAVS1	iPSC	NGN2	3	0	0	2	1	0	33	100
AAVS1	H9	MYOD1	12	2	0	3	0	7	58	75
AAVS1	iPSC	MYOD1	3	0	1	1	0	1	33	100

(a) Việc tạo đích không chính xác: không có bằng chứng của việc tạo đích (không có dải trong PCR tích hợp 5'- và 3' và sự có mặt của dải WT trong PCR ổ gen) hoặc bằng chứng của việc tạo đích, nhưng kích cỡ không đúng của PCR tích hợp 5'- hoặc 3'.

(b) Tích hợp đúng đích chính xác với tích hợp ngẫu nhiên bổ sung của plasmit (dải trong PCR khung 3').

(c) Tích hợp đúng đích chính xác (HET, dị tiếp hợp; HOM, đồng tiếp hợp).

(d) Tỷ lệ phần trăm của dòng vô tính với tích hợp đúng đích chính xác (không có tích hợp lệch đích bổ sung)

(e) Tỷ lệ phần trăm của dòng vô tính với tích hợp đúng đích chính xác (có hoặc không có tích hợp lệch đích bổ sung)

* Ba số là từ ba thử nghiệm tạo đích khác nhau trong các tế bào hESC.

Bảng 2:

Liệt kê đoạn môi được sử dụng cho tạo kiểu gen PCR

ổ gen	Dạng PCR	Vị trí liên kết đoạn môi	Trình tự đoạn môi
hROSA26	ổ gen PCR	Bộ gen (5')	GAGAAGAGGCTGTGCTTCGG
		Bộ gen (3')	ACAGTACAAGCCAGTAATGGAG
	5'-INT PCR	Bộ gen (5')	GAGAAGAGGCTGTGCTTCGG
		Chất nhận môi nối	AAGACCGCGAAGAGTTTGTCC
	3'-INT PCR	rtTA	GAAACTCGCTCAAAAGCTGGG
		Bộ gen (3')	ACAGTACAAGCCAGTAATGGAG
	3'-BB PCR	rtTA	GAAACTCGCTCAAAAGCTGGG
		Khung vector (3')	TGACCATGATTACGCCAAGC
AAVS1	ổ gen PCR	Bộ gen (5')	CTGTTTCCCCTTCCCAGGCAGGTCC
		Bộ gen (3')	TGCAGGGGAACGGGGCTCAGTCTGA
	5'-INT PCR	Bộ gen (5')	CTGTTTCCCCTTCCCAGGCAGGTCC
		Puromycin	TCGTCGCGGGTGGCGAGGCGCACCG
	3'-INT PCR	Casset cảm ứng	trình tự đặc hiệu casset cảm ứng
		Bộ gen (3')	TGCAGGGGAACGGGGCTCAGTCTGA
	3'-BB PCR	Casset cảm ứng	trình tự đặc hiệu casset cảm ứng
		Khung vector (3')	ATGCTTCCGGCTCGTATGTT

Bảng 3: Liệt kê đoạn môi đối với PCR định lượng

Gen	Định hướng	Trình tự đoạn môi
CNP	Xuôi	TCCTCATCATGAACAGAGGCTT
	Ngược	AAACTGCAGCTCAGGCTTGT
DES	Xuôi	CCAACAAGAACAACGACGCC
	Ngược	ATCAGGGGAATCGTTAGTGCCC
DMD	Xuôi	TGGTGGGAAGAAGTAGAGGACT
	Ngược	TGCTGCTTCCCAAACCTTAGA
EGFP	Xuôi	CCCGACAACCACTACCTGAG
	Ngược	GTCCATGCCGAGAGTGATCC

<i>FOXG1</i>	Xuôi	TGCCAAGTTTTACGACGGGA
	Ngược	GGGTTGGAAGAAGACCCCTG
<i>GRIA4</i>	Xuôi	GGCCAGGGAATTGACATGGA
	Ngược	AACCAACCTTTCTAGGTCCTGTG
<i>HMBS (PBGD)</i>	Xuôi	ATTACCCCGGGAGACTGAAC
	Ngược	GGCTGTTGCTTGGACTTCTC
<i>MAG</i>	Xuôi	CAGAAGACGTCCCCAACTCA
	Ngược	CCTCGGGAGGCTGAAATCATAA
<i>MAP2</i>	Xuôi	AGACTGCAGCTCTGCCTTTAG
	Ngược	AGGCTGTAAGTAAATCTTCCTCC
<i>MBP</i>	Xuôi	TGGTGATGGAGATGTCAAGCAGGT
	Ngược	GCTGTGGTTTGGAAACGAGGTTGT
<i>MOG</i>	Xuôi	AGAGATAGAGAATCTCCACCGGA
	Ngược	TGATCAAGGCAACCAAGGGTC
<i>MYH1</i>	Xuôi	CACACTAGTTTCACAGCTCTCG
	Ngược	CAGGGCACTCTTGGCCTTTA
<i>MYH2</i>	Xuôi	GGAAGCTCTGGTGTCTCAGTT
	Ngược	CAGGGCGTTCTTGGCTTTTAT
<i>MYH3</i>	Xuôi	GCTGCATACCCAGAACACCA
	Ngược	CCCTGCTGGCATCTTCTACC
<i>MYH4</i>	Xuôi	TCGCATTTGTCAGCCAAGGG
	Ngược	TGAAACCCAGGATGTCCACAG
<i>MYH7</i>	Xuôi	GAGACTGTCGTGGGCTTGTA
	Ngược	GCCCTTCTCAATAGGCGCATC
<i>MYH8</i>	Xuôi	TGAAGCAGATAGCAGCGCGA
	Ngược	CGTACGAAGTGAGGGTGTGT
<i>MYOD1 (nội sinh)</i>	Xuôi	GCCGCTTTCCTTAACCACAA
	Ngược	CTGAATGCCCACCCACTGTC
<i>MYOD1</i>	Xuôi	CGACGGCATGATGGACTACA
	Ngược	TAGTAGGCGCCTTCGTAGCA
<i>NANOG</i>	Xuôi	AGCAGATGCAAGAACTCTCCAA
	Ngược	TGAGGCCTTCTGCGTCACAC
<i>NEUROG2 (NGN2)</i>	Xuôi	TGTTGTCGTCAAATCCGAGACCT
	Ngược	CGATCCGAGCAGCACTAACA
<i>PAX6</i>	Xuôi	CGAGATTTCAGAGCCCCATA
	Ngược	AAGACACCACCGAGCTGATT
<i>PLP</i>	Xuôi	AACAGCTGAGTTCCAAATGACC
	Ngược	ACGGCAAAGTTGTAAGTGGC
<i>POU3F2 (BRN2)</i>	Xuôi	ACCCGCTTTATCGAAGGCAA
	Ngược	CCTCCATAACCTCCCCCAGA
<i>POU5F1 (OCT4)</i>	Xuôi	GTGGAGGAAGCTGACAACAA
	Ngược	ATTCTCCAGGTTGCCTCTCA
<i>RYR1</i>	Xuôi	CAATCGCCAGAACGGAGAGA
	Ngược	GTCGTGTTCCCTGTCTGTGT
<i>SLC17A6 (VGLUT2)</i>	Xuôi	GTAGACTGGCAACCACCTCC
	Ngược	CCATTCCAAAGCTTCCGTAGAC

<i>SYP</i>	Xuôi	ACCTCGGGACTCAACACCTCGG
	Ngược	GAACCACAGGTTGCCGACCCAG
<i>SYN1</i>	Xuôi	CCCTGGGTGTTTGCCCAGAT
	Ngược	ACCACGGGGTACGTTGTACT
<i>TUBB3</i>	Xuôi	CAACCAGATCGGGGCCAAGTT
	Ngược	CCGAGTCGCCCACGTAGTT

Bảng 4: Liệt kê kháng thể

Kháng nguyên	Loài	Isoform (đăng dạng)	Loại dòng vô tính	Công ty	Số lô hàng	Pha loãng
A2B5	chuột	IgM	đơn dòng vô tính	Millipore	MAB312	1:300
ACTN2 (α -actinin)	chuột	IgG1	đơn dòng vô tính	Sigma	A7811	1:200
BrdU	chuột	IgG1	đơn dòng vô tính	BD Bio	347580	1:100
CNP	chuột	IgG1	đơn dòng vô tính	Abcam	ab6319	1:500
DES (desmin)	thỏ	IgG	đơn dòng vô tính	Abcam	ab32362	1:500
EOMES	thỏ	IgG	đa dòng vô tính	Abcam	ab23345	1:200
MAG	chuột	IgG1	đơn dòng vô tính	Abcam	ab89780	1:400
MAP2	chuột	IgG1	đơn dòng vô tính	Sigma	M4403	1:200
MBP	Rat	IgG2a	đơn dòng vô tính	Millipore	MAB386	1:200
MYOD1	thỏ	IgG	đơn dòng vô tính	Abcam	ab133627	1:250
MYOG (myogenin)	chuột	IgG1	đơn dòng vô tính	DSHB	F5D	1:100
MYOG (myogenin)	thỏ	IgG	đơn dòng vô tính	Abcam	ab124800	1:500
MYH (myosin	chuột	IgG2b	đơn dòng vô tính	DSHB	MF20	1:100

chuỗi nặng)						
MYH-PE	chuột	IgG2b	đơn dòng vô tính	BD Biosc.	564408	1:20 (Dòng)
NANOG	dê	IgG	đa dòng vô tính	R&D	AF1997	1:200
NCAM	chuột	IgG1	đơn dòng vô tính	DSHB	5,1H11	1:100

Ví dụ 5: Hệ thống làm mất tác dụng cảm ứng được TET-ON

Phát triển nền làm mất tác dụng cảm ứng được được tối ưu hóa trong các tế bào hPSC.

Tạo ra dòng hESC trong đó gen chuyển EGFP có thể bị bất hoạt theo cách cảm ứng được (Fig.14B). Để làm điều này, tạo đích: (1) cassette biểu hiện CAG-tetR trong ổ gen ROSA26; và (2) gen chuyển CAG-EGFP cùng với cassette EGFP shRNA cảm ứng trong ổ gen AAVS1 (Fig.14A,B). Để biểu hiện các mức cao hơn của protein tetR để kìm hãm mạnh hơn sự biểu hiện shRNA khi không có mặt tetracyclin. Để làm điều này, thực hiện ARN nhiều thông số và tối ưu hóa codon của cADN ở tetR vi khuẩn, và sử dụng tetR được tối ưu hóa codon (OPTtetR) tạo thành để tạo ra dòng hESC bị mất tác dụng EGFP cảm ứng được mới (Fig.14B). Việc biến đổi này cho phép làm tăng 10 lần về biểu hiện tetR khi so với trình tự tiêu chuẩn (STDtetR; Fig.14D). Hơn nữa, biểu hiện đồng tiếp hợp của OPTtetR là đủ để ngăn ngừa hoàn toàn rò rỉ shRNA trong khi bảo tồn toàn bộ cảm ứng làm mất tác dụng hiệu quả (Fig.14C). Lưu ý rằng, việc làm mất tác dụng cảm ứng được là nhanh, đảo ngược được, và đáp ứng liều (Fig.14E, Fig.14F). Cuối cùng, các tế bào hESC cảm ứng được hiển thị kiểu nhân bình thường (dữ liệu không được thể hiện), thể hiện rằng, việc thiết kế bộ gen cần thiết tạo ra các dòng này không làm thay đổi tính ổn định di truyền của chúng.

Dựa vào các kết quả khích lệ này, xác nhận tính hợp lệ hơn nữa cho phương pháp này trong bối cảnh của gen nội sinh bằng cách tạo ra các tế bào hESC mang shRNAs cảm ứng được chống lại POU5F1/OCT4 hoặc B2M (dữ liệu không được thể hiện). Rõ ràng là, tất cả các dòng phụ được phân tích (6 đối với từng gen) thể hiện có việc làm mất tác dụng cảm ứng được mạnh mẽ không có rò rỉ shRNA đáng

kể. Chuẩn độ tetracyclin đã nhận diện các nồng độ tối ưu cho việc làm mất tác dụng OCT4 một phần hoặc toàn bộ. Như mong đợi, giảm mạnh về OCT4 đặc biệt là dẫn đến thất thoát của tính đa năng và tạo ra ngoại bì thần kinh và các gen đánh dấu nội bì cuối cùng. Các kết quả tương tự thu được với 20 dòng phụ hESC làm mất tác dụng cảm ứng được OCT4 bổ sung, khẳng định tính mạnh mẽ và khả năng tái tạo của phương pháp này. Quan trọng là, việc tạo ra các tế bào hESC với làm mất tác dụng được điều tiết mạnh và chặt chẽ có hiệu quả như là phân tích kiểu hình có thể được thực hiện ngay lập tức sau khi chọn kháng sinh trên hỗn hợp quần thể của tế bào, nhờ đó bỏ qua toàn bộ việc cần nhặt ra riêng các khuẩn lạc đối với phân lập dòng vô tính. Nhìn chung, các kết quả này chứng minh rằng, việc tạo đích kép của các GSH với hệ thống làm mất tác dụng cảm ứng được được tối ưu hóa là phương pháp tiềm năng để kiểm soát biểu hiện gen trong các tế bào hPSC. Cách tiếp cận này sau đây được gọi là OPTiKD, là dạng viết tắt của “OPTimized inducible KnockDown”, có nghĩa là làm mất tác dụng cảm ứng được được tối ưu hóa (Fig.14A).

Ví dụ 6

Khả năng làm cho gen bị mất tác dụng trong nhiều tế bào được biệt hóa khác nhau sẽ thể hiện tiến bộ rõ rệt so với hệ thống trước đó để làm mất tác dụng gen cảm ứng được. Để thử nghiệm toàn diện khả năng này, tác giả sáng chế đã phân tích tính hiệu quả của nền OPTiKD để làm cho gen chuyển EGFP mất tác dụng trong các tế bào hPSC được biệt hóa thành ba lớp phôi, cũng như trong bảng gồm 13 dạng tế bào được biệt hóa hoàn toàn (Fig.15A). Đối với cả hai phương pháp, phân tích qPCR cho thấy là đã làm mất tác dụng mạnh và cảm ứng được của phiên mã EGFP trong tất cả các phả hệ được thử nghiệm (Fig.17). Quan sát bằng kính hiển vi khẳng định có giảm mạnh về biểu hiện protein EGFP, và kết quả đếm dòng tế bào thể hiện giảm mạnh EGFP huỳnh quang bởi lớn hơn hơn là 70% đối với phần lớn các phả hệ (dữ liệu không được thể hiện).

Ví dụ 7

Phát triển của nền làm bất hoạt CRISPR/Cas9 cảm ứng được được tối ưu hóa trong các tế bào hPSC.

Tác giả sáng chế chú trọng đến việc phát triển cách tiếp cận làm bất hoạt cảm ứng được. Phương pháp CRISPR/Cas9 cảm ứng được hiện nay nằm ở biểu hiện quá mức có điều kiện của Cas9 với sự có mặt của gARN được biểu hiện cơ định. Trong trường hợp này, kiểm soát của Cas9 biểu hiện quá mức đạt được bằng phương pháp Tet-On, trong đó sau điều trị bằng doxyxycyclin, gen chuyển hoạt hóa ngược được kiểm soát tetraxycyclin (rtTA) làm hoạt hóa promotor yếu tố đáp ứng tetraxycyclin phụ thuộc Pol II (TRE) (dung hợp giữa nhiều operon Tet và promotor CMV tối thiểu). Trong khi nền Tet-On này đã được áp dụng thành công cho một số dạng tế bào ở người, quan sát được rằng, hệ cảm ứng được này bị bất hoạt trong quá trình biệt hóa hPSC thành nhiều phả hệ (gồm có tế bào cơ tim, tế bào gan, và tế bào cơ trơn), thậm chí sau việc tạo đích vào trong AAVS1 GSH (dữ liệu không được thể hiện). Đã khám phá ra khả năng phát triển phương pháp thay thế và cải thiện bằng cách kết hợp Cas9 được điều khiển bởi promotor CAG được biểu hiện cơ định với cassette gARN cảm ứng được dựa vào một loại phát triển đối với biểu hiện shRNA cảm ứng được (Fig.18A, Fig.18B). Do đó, đã tạo ra các dòng các tế bào hESC trong đó gen thông báo phát huỳnh quang có thể bị bất hoạt theo cách cảm ứng được (Fig.18C). Để làm điều này, đã tạo đích ROSA26-EGFPd2 cho gen thông báo các tế bào hESC với cả hai EGFP gARN cảm ứng được và Cas9 cơ định trong ổ gen AAVS1, từng gen chuyển được tích hợp vào trong một trong số hai alen. Cách tiếp cận tạo đích kép này là nhanh (<2 tuần) và hiệu quả (>90% của dòng chứa cả hai gen chuyển. Rõ ràng là, khi dòng phụ được nhân dòng riêng được tăng trưởng với sự có mặt của tetraxycyclin, quan sát được biểu hiện EGFPd2 giảm trong tất cả các dòng được tạo đích, và tế bào đồng tiếp hợp EGFPd2 thể hiện thất thoát gần tương đồng của ít nhất một bản sao của gen thông báo sớm ở mức có thể là 5 ngày sau cảm ứng tetraxycyclin như thể hiện là giảm 50% về EGFPd2 huỳnh quang). Việc xử lý kéo dài với tetraxycyclin dẫn đến thất thoát toàn bộ tiến triển của EGFPd2 huỳnh quang trong lên đến 75% tế bào đồng tiếp hợp EGFPd2 (dữ liệu không được thể hiện). Thú vị là, đồng biểu hiện của hoặc là hai hoặc ba sao chép của cùng cassette EGFP gARN từ cùng ổ gen AAVS1 là đủ để làm tăng đáng kể tốc độ và hiệu quả của EGFPd2 cảm ứng được bị làm bất hoạt trong tất cả các dòng phụ được nhân dòng được phân tích. Ví dụ, tạo ra đồng thời ba sao chép của cùng gARN dẫn đến hiệu quả bất hoạt rõ rệt 95% sau xử lý tetraxycyclin. Quan trọng là, các tế bào hESC làm bất hoạt EGFPd2 cảm

ứng được không thể hiện sự giảm đáng kể bất kỳ cũng không ở tỷ phần của tế bào dương tính EGFPd2 cũng không trong huỳnh quang của chúng sau quá trình nuôi cấy kéo dài khi không có mặt tetracyclin, thậm chí khi một vài sao chép gARN được sử dụng. Điều này cho thấy rằng, biểu hiện gARN cảm ứng được được kiểm soát chặt chẽ. Cuối cùng, thử nghiệm gARN bổ sung chống lại EGFPd2 bộc lộ rằng, tốc độ và hiệu quả của yếu tố cảm ứng được làm bất hoạt mạnh nằm ở gARN. Thực tế, trình tự tối ưu được cho phép lên đến 90% bị bất hoạt chỉ sau 2 ngày cảm ứng. Lưu ý rằng, gARN hiệu quả nhất còn dẫn đến EGFPd2 bất hoạt không kiểm soát được, nhưng hạn chế này là tránh được bằng cách đơn giản bổ sung Operon Tet thứ hai vào promotor H1 cảm ứng được để đảm bảo kiểm soát phiên mã thậm chí chặt chẽ hơn. Tóm lại, các kết quả này thể hiện rằng, hệ thống làm mất tác dụng có thể dễ dàng được định lại mục đích để hỗ trợ biểu hiện gARN cảm ứng được và cho phép hoạt tính được kiểm soát chặt chẽ của CRISPR/Cas9 trên khoảng rộng của tiềm năng gARN. Theo chúng tôi, đây là cách tiếp cận CRISPR/Cas9 có điều kiện đầu tiên dựa vào biểu hiện gARN cảm ứng được.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp thực hiện ngoài cơ thể sống để kiểm soát sự phiên mã trình tự di truyền trong tế bào, phương pháp này bao gồm:

a) chèn gen mã hóa protein điều hòa phiên mã đúng vào vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất; và

b) chèn cassette cảm ứng đúng vào vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ hai, trong đó cassette cảm ứng này bao gồm trình tự di truyền được liên kết hoạt động với promoter cảm ứng, và promoter này được điều tiết bằng protein điều hòa phiên mã;

trong đó các vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất và thứ hai là khác nhau, và

trong đó phương pháp này không bao gồm quy trình sửa đổi bản dạng di truyền dòng mầm của con người.

2. Phương pháp thực hiện ngoài cơ thể sống theo điểm 1, trong đó trình tự di truyền là gen chuyển hoặc mã hóa ARN không mã hóa.

3. Phương pháp thực hiện ngoài cơ thể sống theo điểm 1 hoặc 2, trong đó hoạt tính của protein điều hòa phiên mã được kiểm soát bởi cơ chất được cung cấp từ bên ngoài.

4. Phương pháp thực hiện ngoài cơ thể sống theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó protein điều hòa phiên mã được biểu hiện cơ định.

5. Phương pháp thực hiện ngoài cơ thể sống theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên đây, trong đó protein điều hòa phiên mã được chọn từ bất kỳ một trong số: protein hoạt hóa phiên mã đáp ứng tetracyclin (rtTa), gen kìm hãm tetracyclin (TetR), thụ thể tổng hợp VgEcR hoặc protein điều hòa phiên mã lai bao gồm miền liên kết với ADN từ protein GAL4 của nấm men, miền liên kết với phối tử được cắt ngắn từ thụ thể progesteron của người và miền hoạt động từ NF- κ B của người.

6. Phương pháp thực hiện ngoài cơ thể sống theo điểm 5, trong đó hoạt tính của tTA được kiểm soát bởi tetracyclin hoặc dẫn xuất của nó, tùy chọn doxycyclin, và trong đó promoter cảm ứng bao gồm yếu tố đáp ứng tetracyclin (Tet Responsive Element - TRE).

7. Phương pháp thực hiện ngoài cơ thể sống theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên đây, trong đó các vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất và thứ hai được chọn từ bất kỳ hai trong số ổ gen hROSA26, ổ gen AAVS1, gen *CLYBL*, hoặc gen *CCR5*.

8. Phương pháp thực hiện ngoài cơ thể sống theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên đây, trong đó vật liệu di truyền bổ sung được chèn vào tại vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất và/hoặc thứ hai, tùy chọn một hoặc nhiều trong số các loại sau:

- a) gen tự sát;
- b) gen đánh dấu có thể lựa chọn;
- c) gen thông báo; và/hoặc
- d) gen đối với ARN không mã hóa.

9. Phương pháp thực hiện ngoài cơ thể sống theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên đây, trong đó tế bào được chọn từ tế bào gốc đa tiềm năng, tế bào gốc trưởng thành hoặc tế bào trưởng thành.

10. Phương pháp thực hiện ngoài cơ thể sống theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên đây, trong đó tế bào là tế bào ở người, thú có túi, động vật linh trưởng không phải con người, lạc đà hoặc động vật nuôi.

11. Phương pháp thực hiện ngoài cơ thể sống theo điểm 1 hoặc điểm 2, trong đó phương pháp này là để lập trình cho tế bào gốc đa tiềm năng biệt hóa thành tế bào trưởng thành xác định.

12. Phương pháp thực hiện ngoài cơ thể sống theo điểm 1 hoặc điểm 2, trong đó tế bào là tế bào gốc đa tiềm năng và trình tự di truyền là gen chuyển đổi với một hoặc nhiều gen điều hòa chủ, tùy chọn là yếu tố phiên mã, và tùy chọn trong đó sự phiên mã trình tự di truyền dẫn đến việc lập trình phát triển của tế bào để tạo thành dạng tế bào trưởng thành xác định.

13. Phương pháp thực hiện ngoài cơ thể sống theo điểm 1, trong đó phương pháp này dùng để chèn trình tự di truyền cho các mục đích chữa bệnh bằng gen, trong đó tùy chọn là trình tự di truyền mã hóa protein bao gồm protein kiểu đại, protein biến đổi, kháng nguyên, enzym, gen đánh dấu có thể lựa chọn hoặc phân tử ARN không mã hóa.

14. Tế bào được tạo ra bằng phương pháp theo điểm 1.

15. Tế bào với bộ gen đã được biến đổi bao gồm gen mã hóa protein điều hòa phiên mã được chèn vào vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất; và cassette cảm ứng bao gồm trình tự di truyền được liên kết hoạt động với promoter cảm ứng được chèn vào vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ hai, trong đó promoter cảm ứng này được điều tiết bằng protein điều hòa phiên mã và các vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất và thứ hai là khác nhau.

16. Phương pháp thực hiện ngoài cơ thể sống để sản xuất tế bào cơ từ tế bào gốc đa tiềm năng, phương pháp này bao gồm các bước:

a) chèn gen mã hóa protein điều hòa phiên mã đúng vào vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất; và

b) chèn gen *MYOD1* được liên kết hoạt động với promoter cảm ứng đúng vào vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ hai, trong đó promoter cảm ứng này được điều tiết bằng protein điều hòa phiên mã; trong đó các vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất và thứ hai là khác nhau,

và nuôi cấy các tế bào này trong môi trường có mặt axit retinoic,

trong đó phương pháp này không bao gồm quy trình sửa đổi bản dạng di truyền dòng mầm của con người.

17. Phương pháp thực hiện ngoài cơ thể sống để sản xuất tế bào thần kinh đệm ít nhánh từ tế bào gốc đa tiềm năng, phương pháp này bao gồm các bước:

a) chèn gen mã hóa protein điều hòa phiên mã đúng vào vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất; và

b) chèn gen *SOX-10* được liên kết hoạt động với promoter cảm ứng vào vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ hai, trong đó promoter cảm ứng này được điều tiết bằng protein điều hòa phiên mã; trong đó các vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất và thứ hai là khác nhau,

và nuôi cấy các tế bào này trong môi trường có mặt axit retinoic,

trong đó phương pháp này không bao gồm quy trình sửa đổi bản dạng di truyền dòng mầm của con người.

18. Phương pháp thực hiện ngoài cơ thể sống để làm giảm sự phiên mã và/hoặc sự dịch mã của gen nội sinh trong tế bào, phương pháp này bao gồm các bước sau:

a) chèn gen mã hóa protein điều hòa phiên mã đúng vào vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất; và

b) chèn cassette cảm ứng đúng vào vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ hai, trong đó cassette cảm ứng này bao gồm ADN mã hóa trình tự ARN không mã hóa được liên kết hoạt động với promoter cảm ứng và promoter cảm ứng này được điều tiết bằng protein điều hòa phiên mã và trong đó trình tự ARN không mã hóa này kìm hãm việc phiên mã hoặc dịch mã của gen nội sinh;

trong đó các vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất và thứ hai là khác nhau, và

trong đó phương pháp này không bao gồm quy trình sửa đổi bản dạng di truyền dòng mầm của con người.

19. Phương pháp thực hiện ngoài cơ thể sống để làm bất hoạt gen nội sinh trong tế bào, phương pháp này bao gồm các bước sau:

a) chèn gen mã hóa protein điều hòa phiên mã và gen mã hóa Cas9 đúng vào vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất; và

b) chèn cassette cảm ứng đúng vào vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ hai, trong đó cassette cảm ứng này bao gồm ARN dẫn đường được liên kết hoạt động với promoter cảm ứng và promoter cảm ứng này được điều tiết bằng protein điều hòa phiên mã và trong đó trình tự gARN này nhắm đến đích là gen nội sinh;

trong đó các vị trí chèn an toàn về mặt di truyền thứ nhất và thứ hai là khác nhau, và

trong đó phương pháp này không bao gồm quy trình sửa đổi bản dạng di truyền dòng mầm của con người.

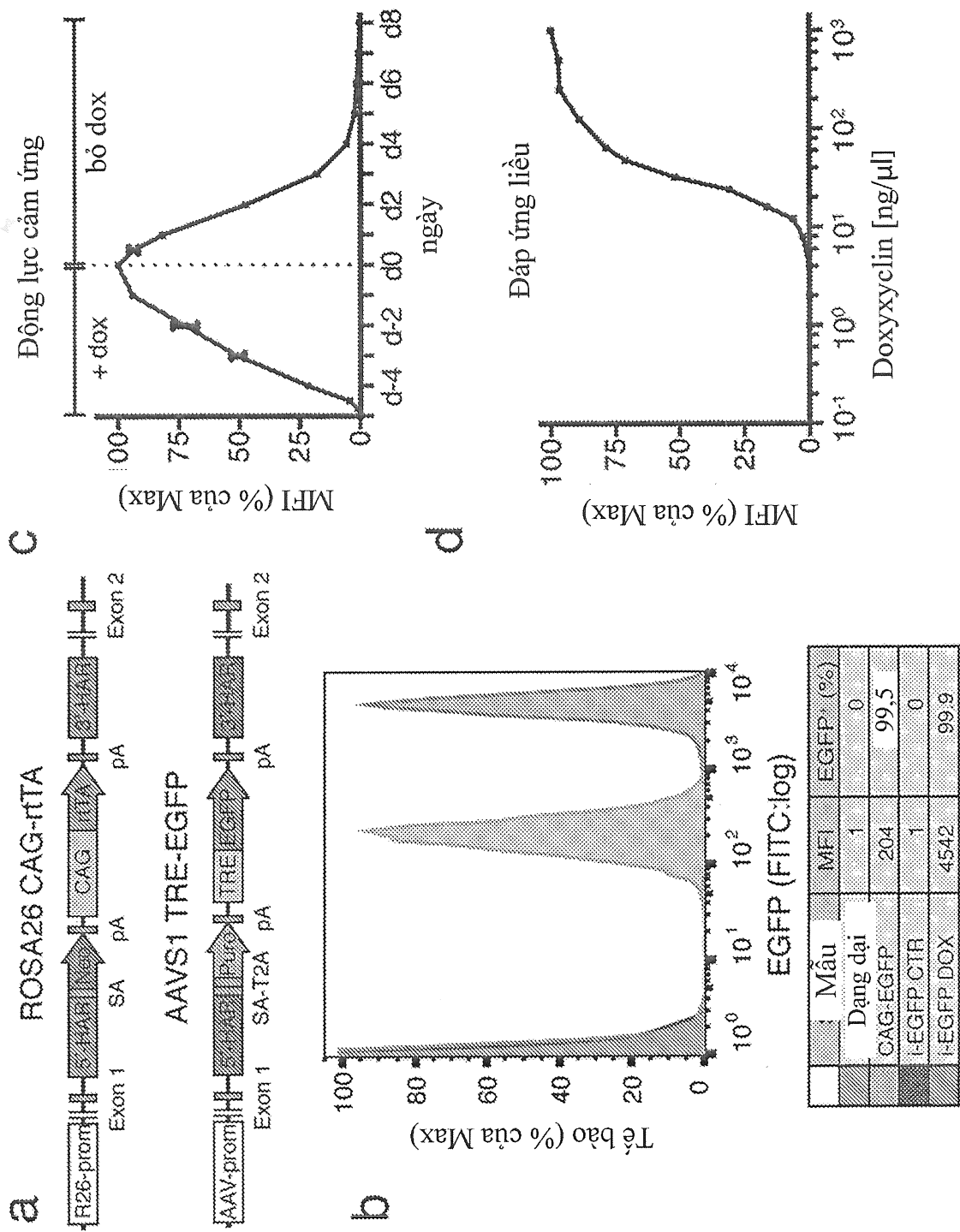


Fig. 1

2/34

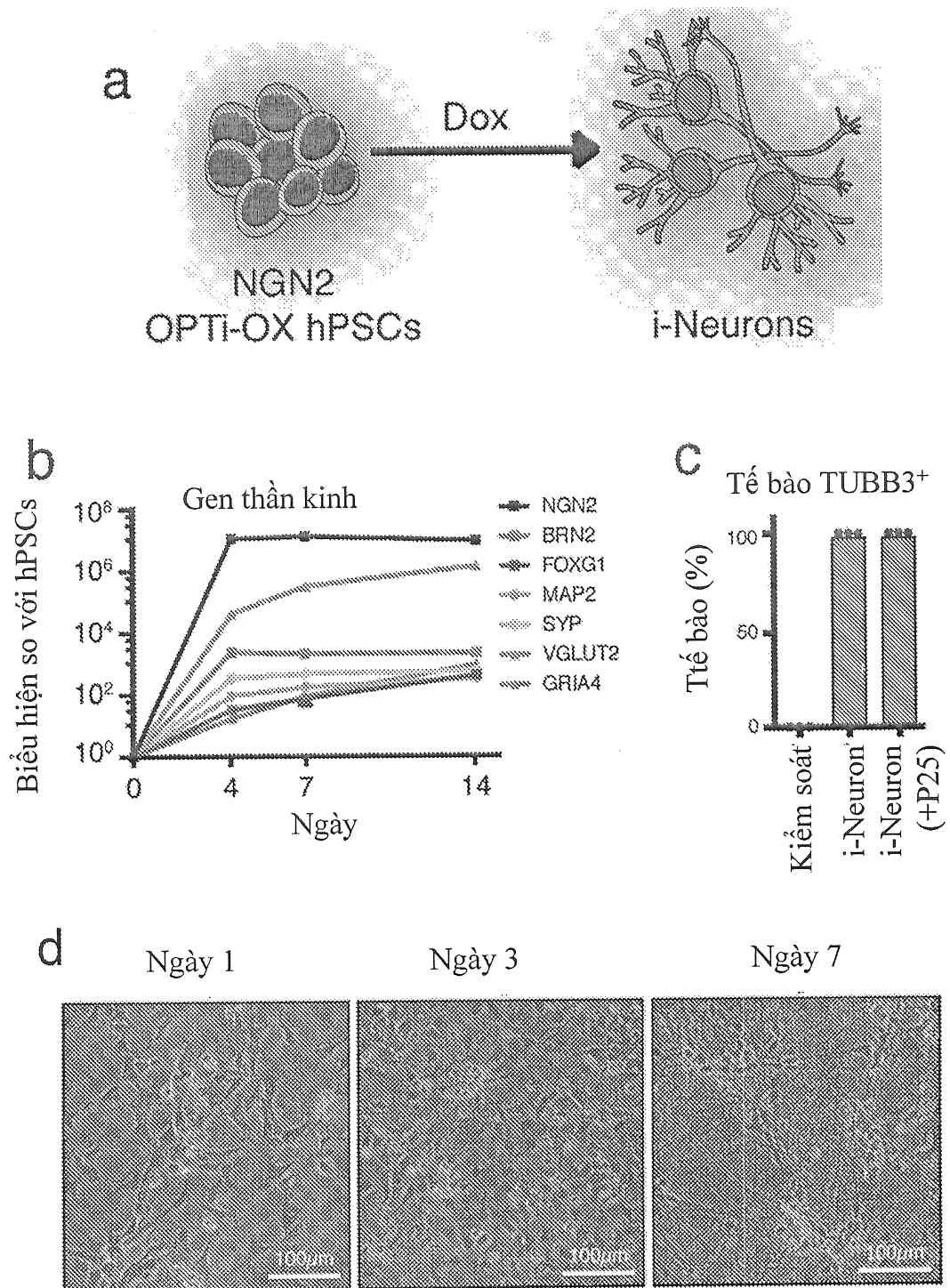
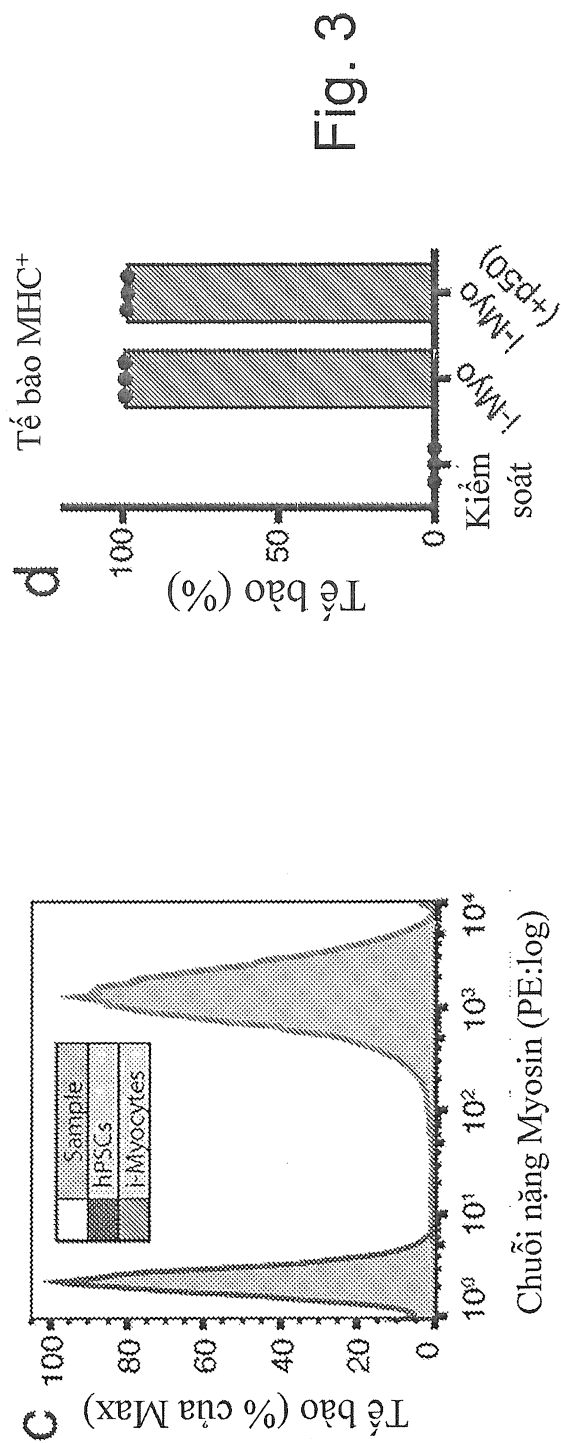
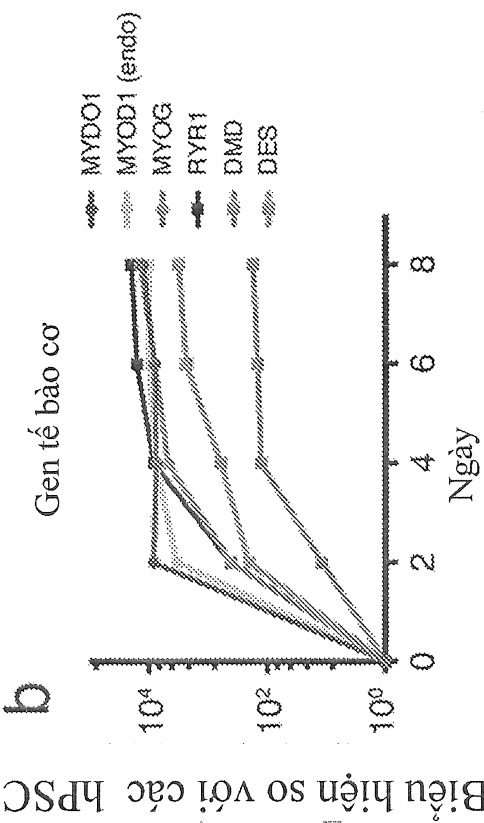


Fig. 2



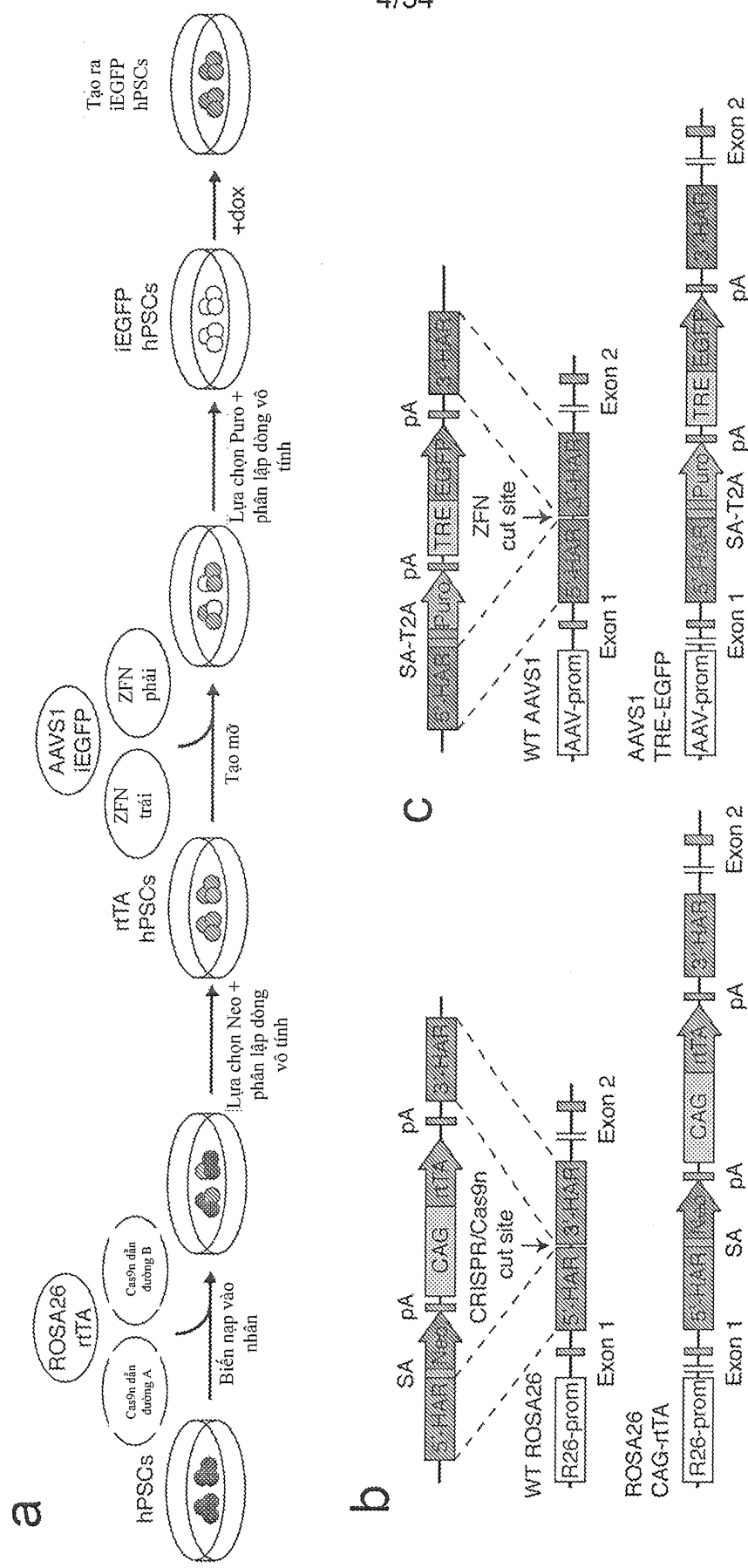


Fig. 4

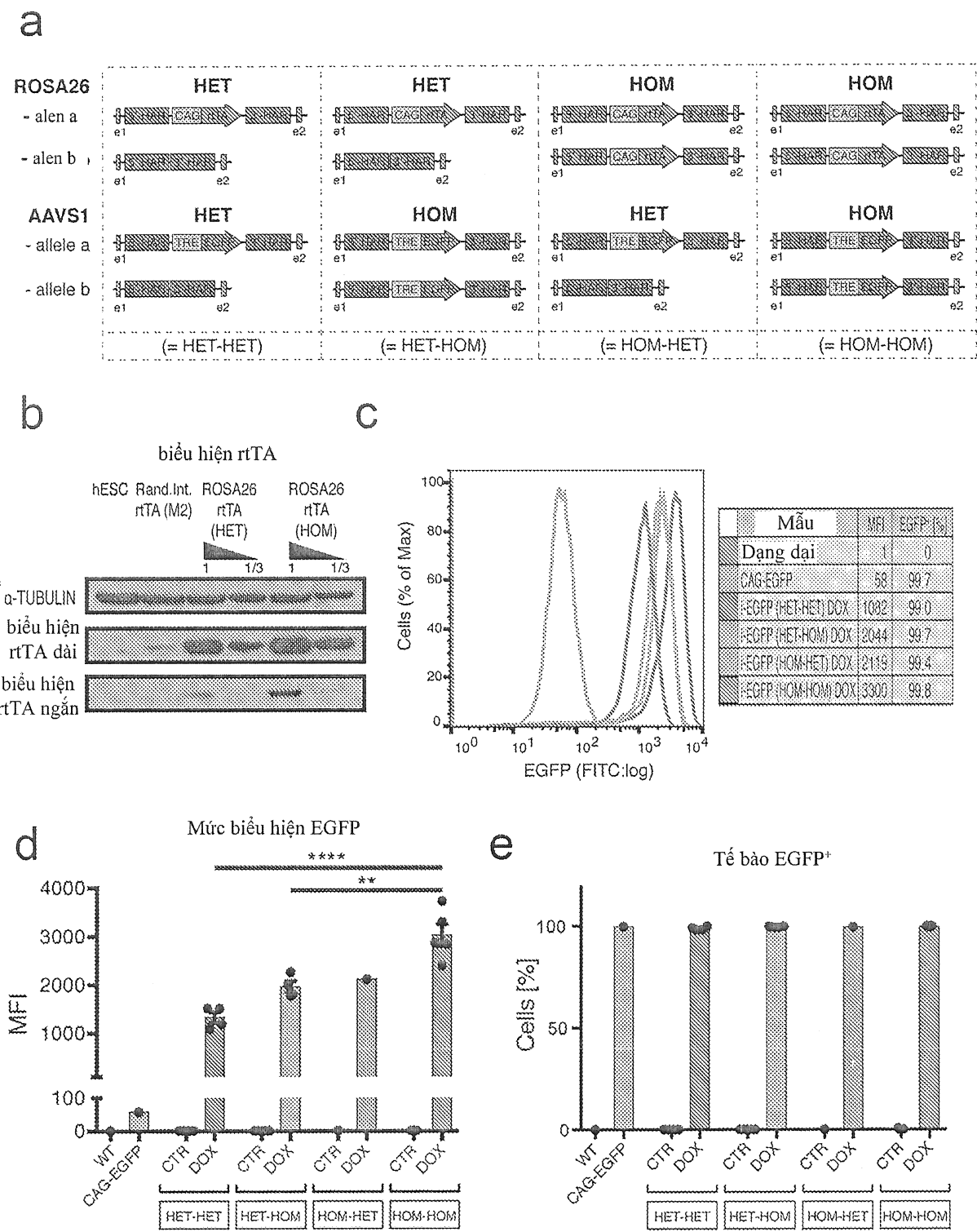


Fig. 5

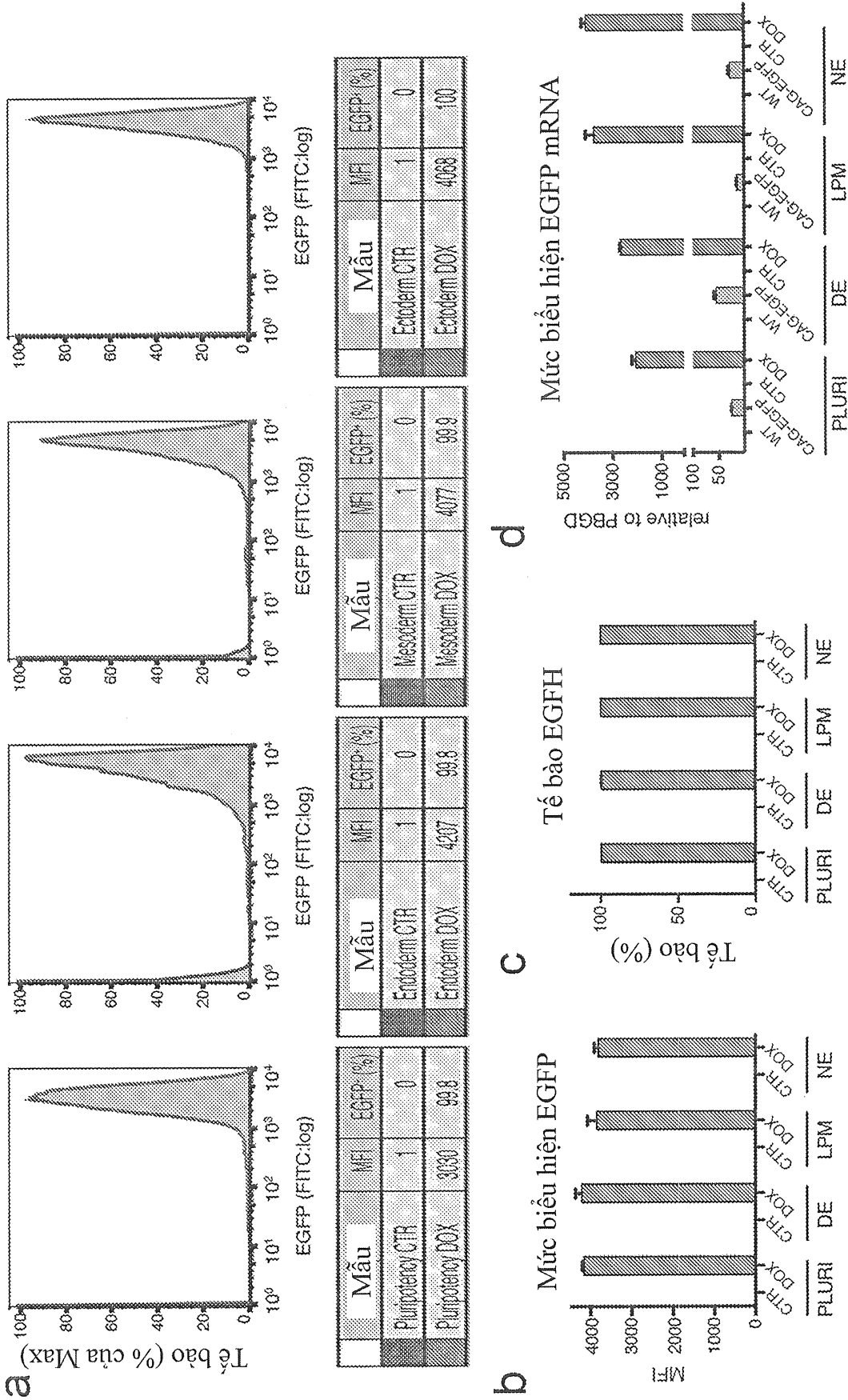


Fig. 6

8/34

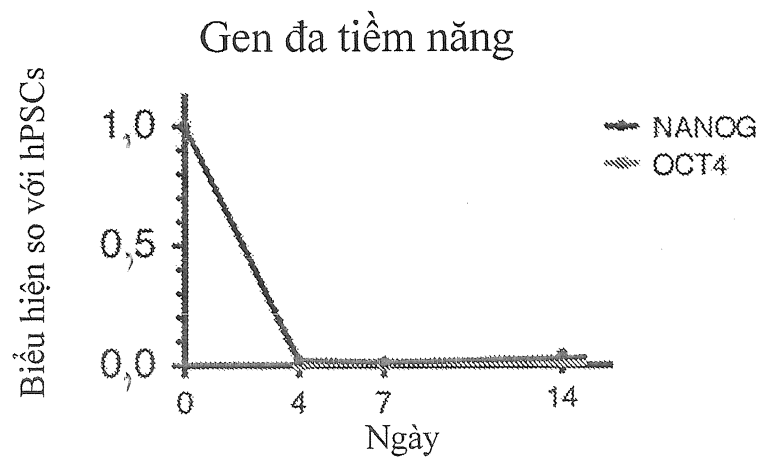


Fig. 7

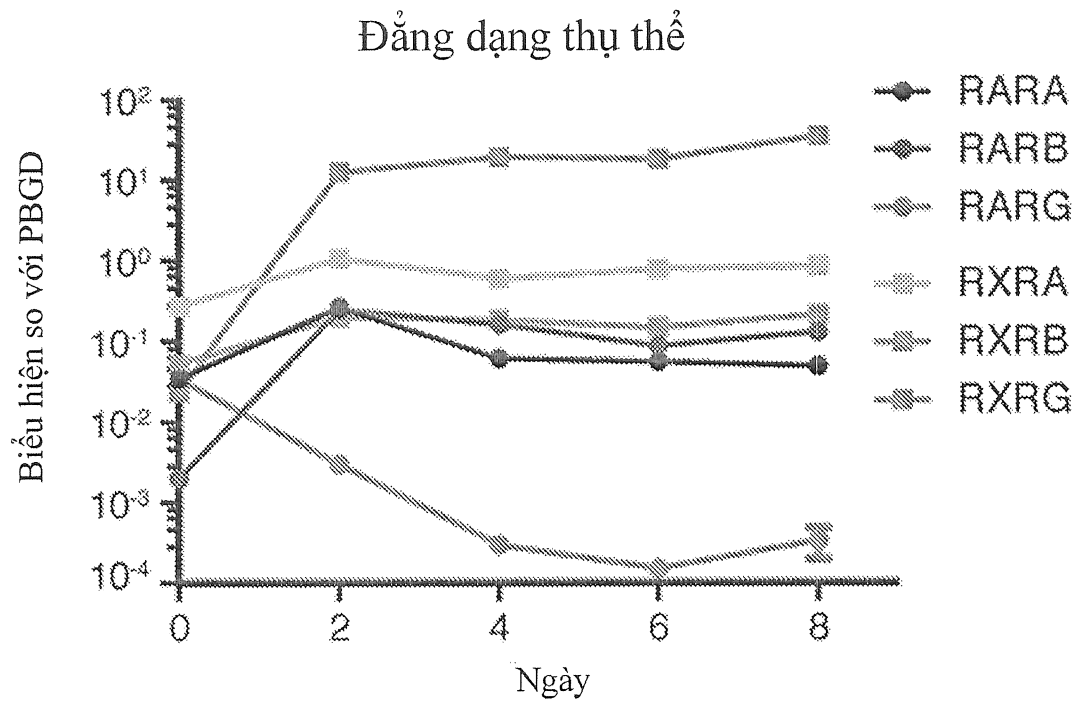


Fig. 8

ế

9/34

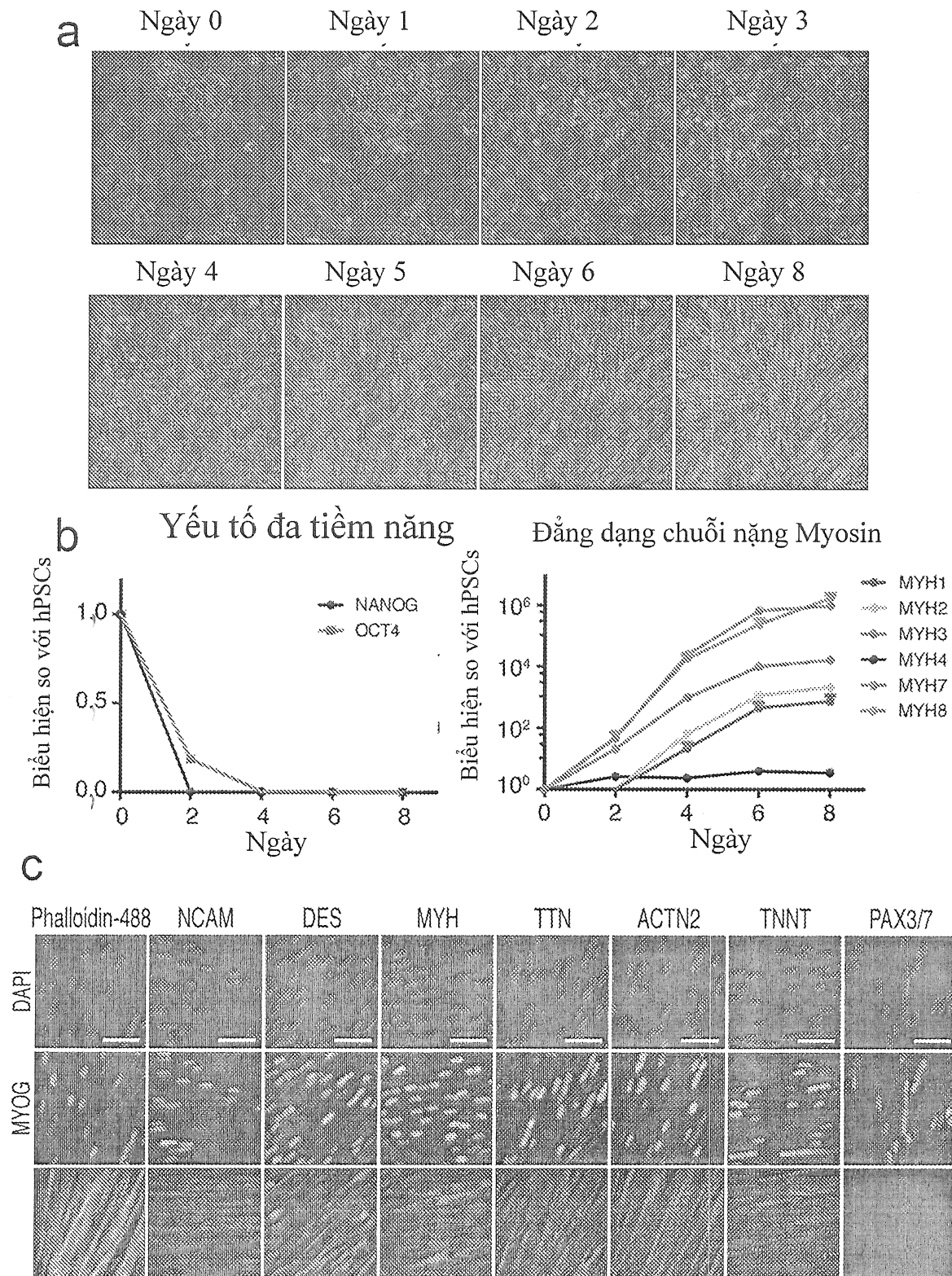


Fig. 9

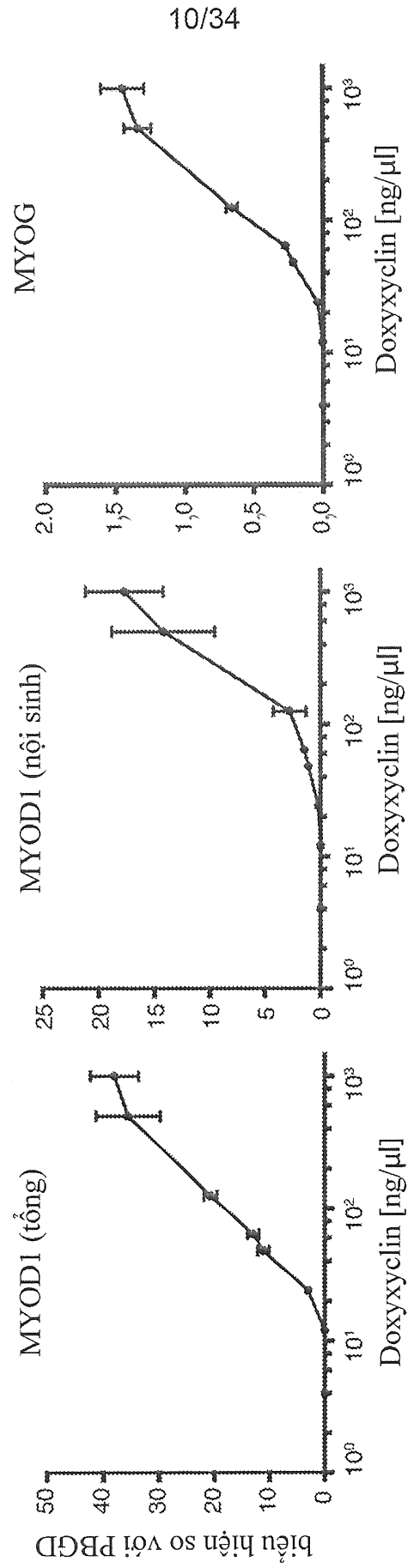


Fig. 10

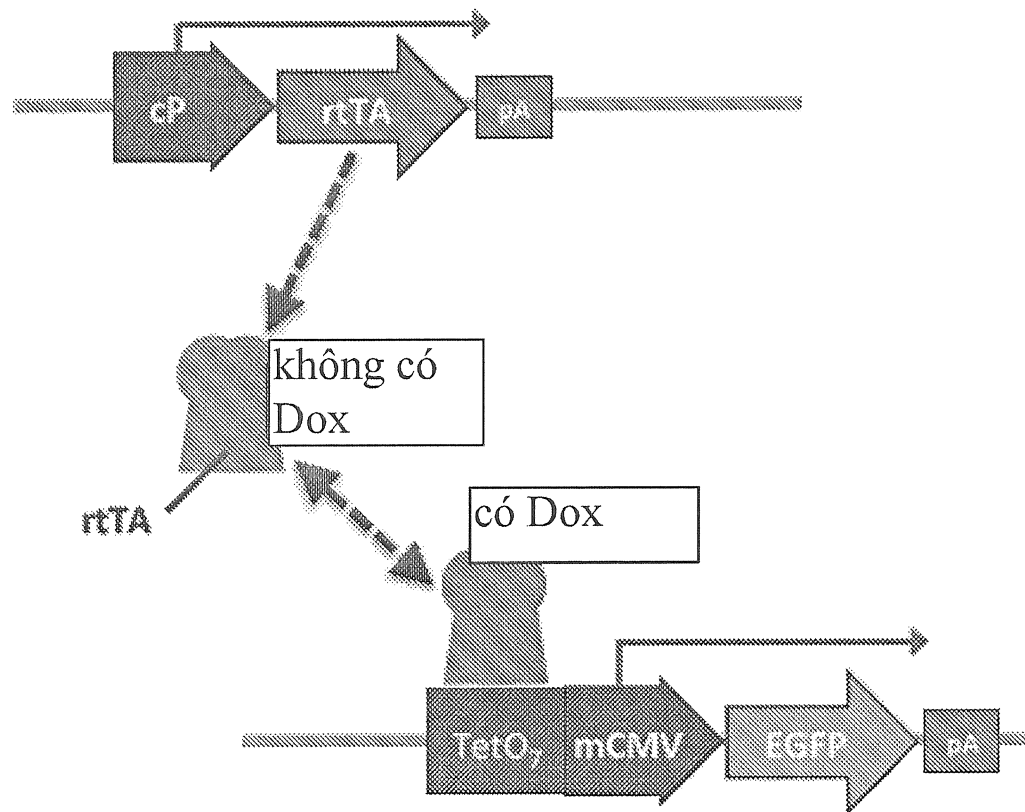


Fig. 11

12/34

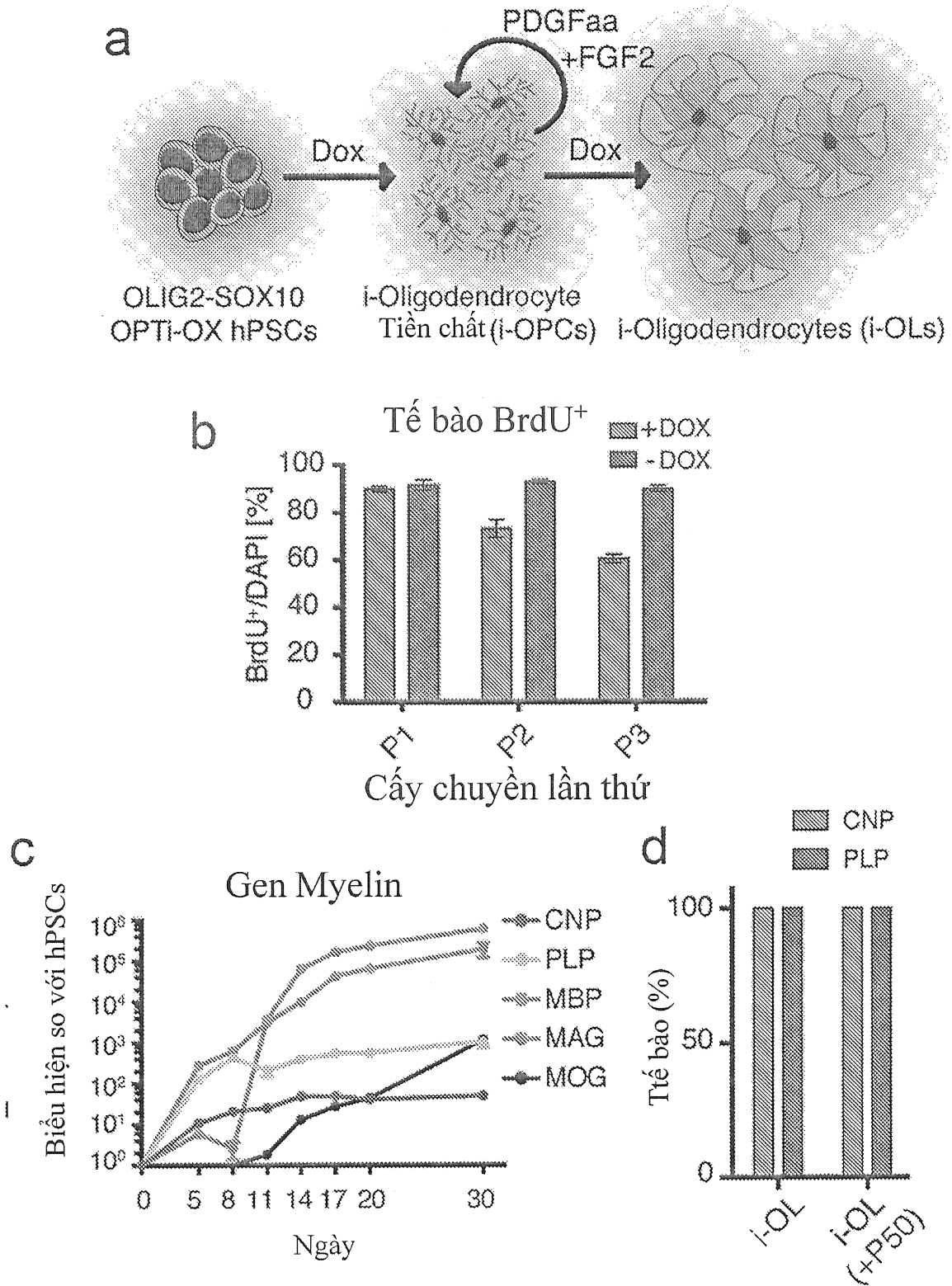
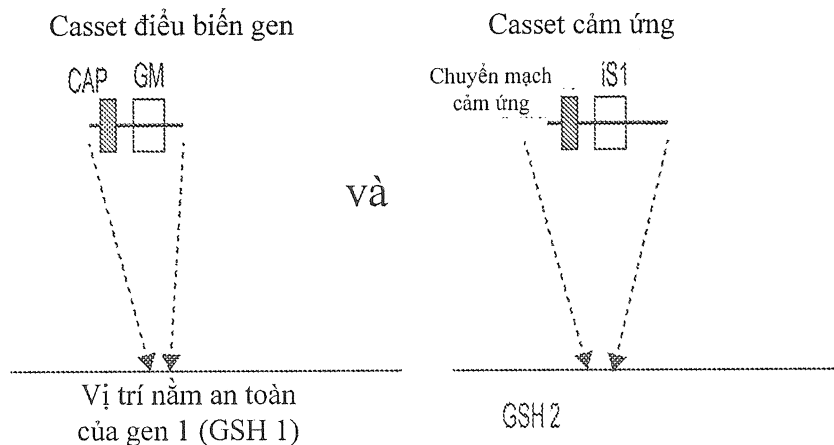


Fig. 12

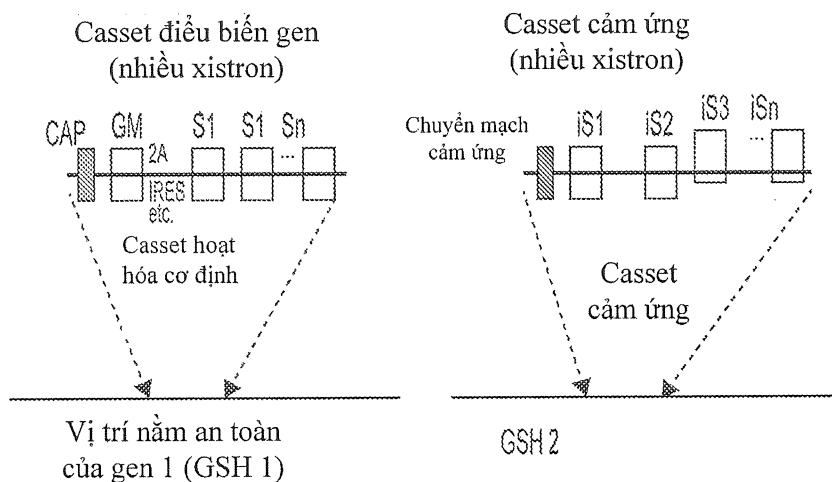
13/34

CAP=Gen khởi đầu hoạt hóa cơ định
 GM=Tác nhân điều biến gen (ví dụ, rtTA)
 S1-n=Trình tự gen được biểu hiện cơ định 1-n
 -S1-n=Trình tự gen được biểu hiện cảm ứng

Sáng chế cơ bản



Mở rộng đến cấu trúc vectơ nhiều xistron



Mở rộng đến cấu trúc nhiều GSH

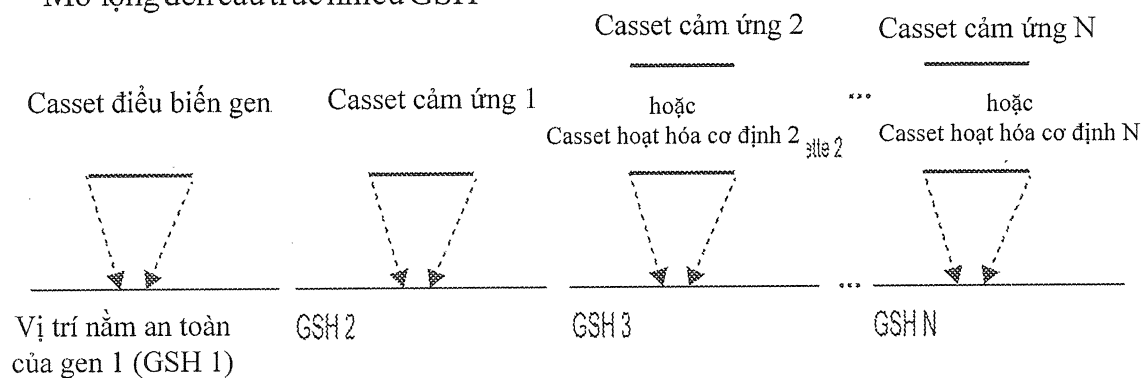


Fig. 13

Biểu hiện so với hPSCs

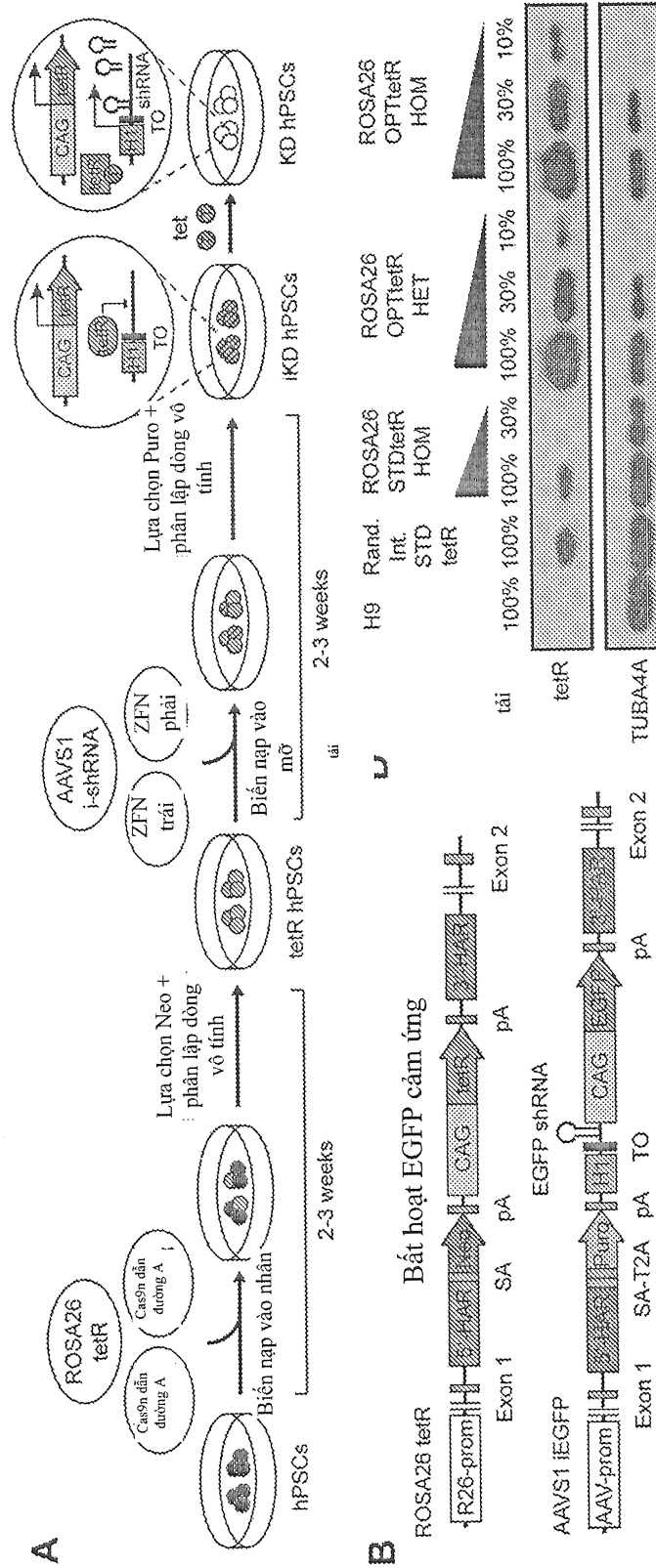
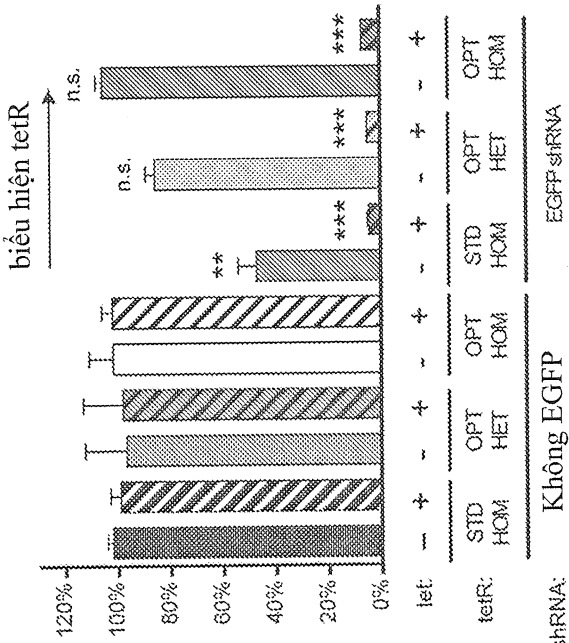
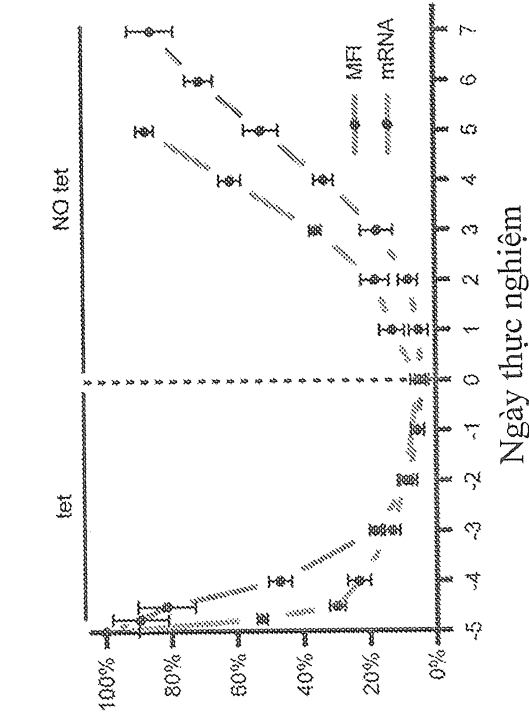


Fig. 14

EGFP MFI so với không có shARN



biểu hiện EGFP so với không có tet (EGFP OPTIKD)



F

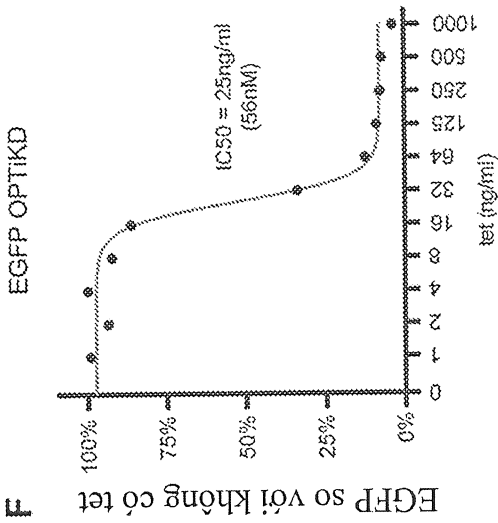


Fig. 14 (tiếp tục)

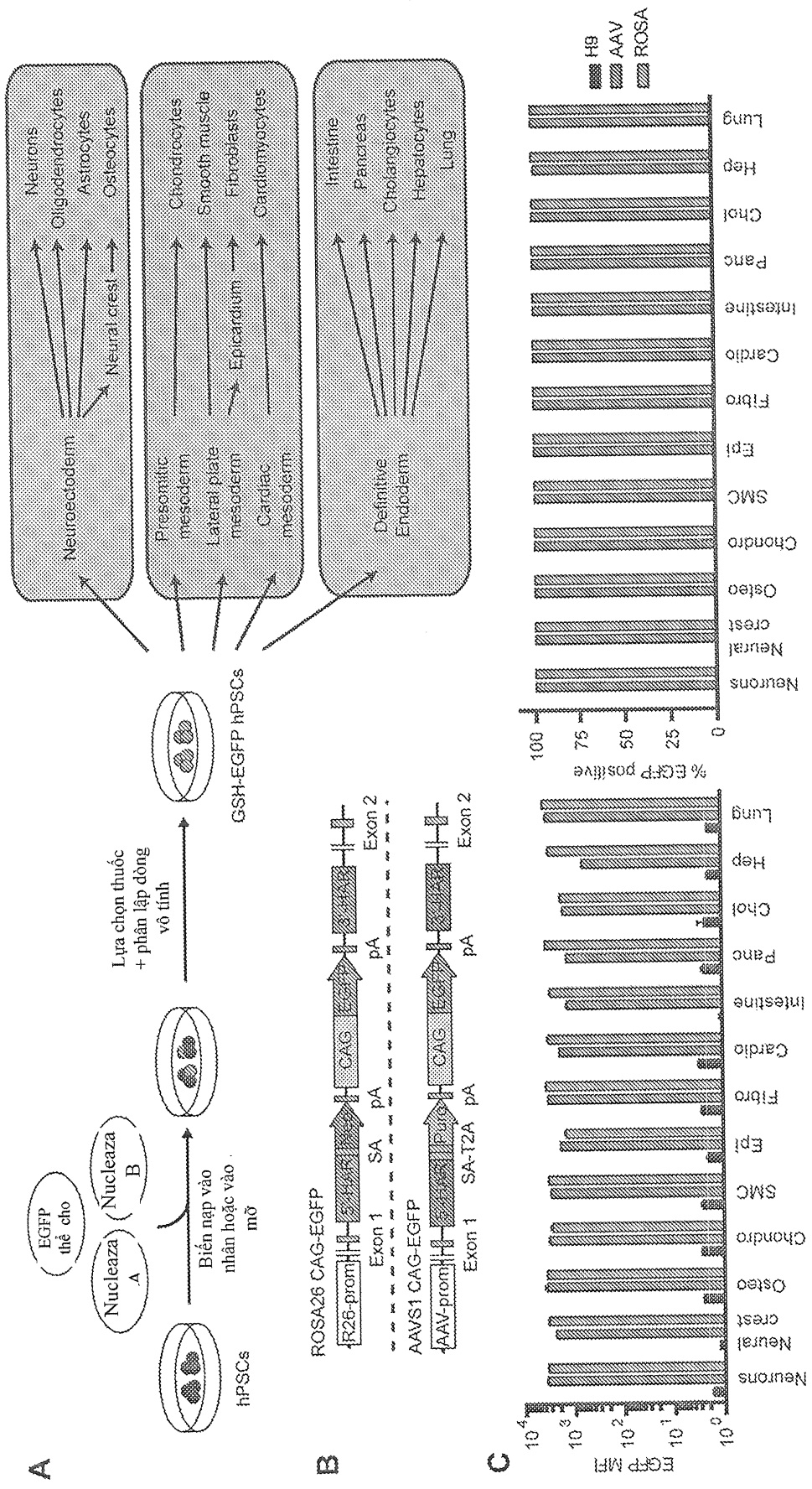


Fig. 15

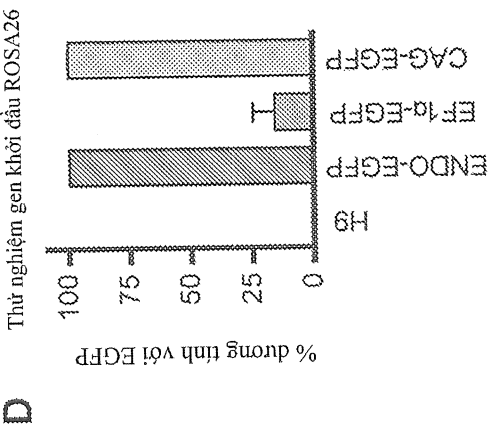
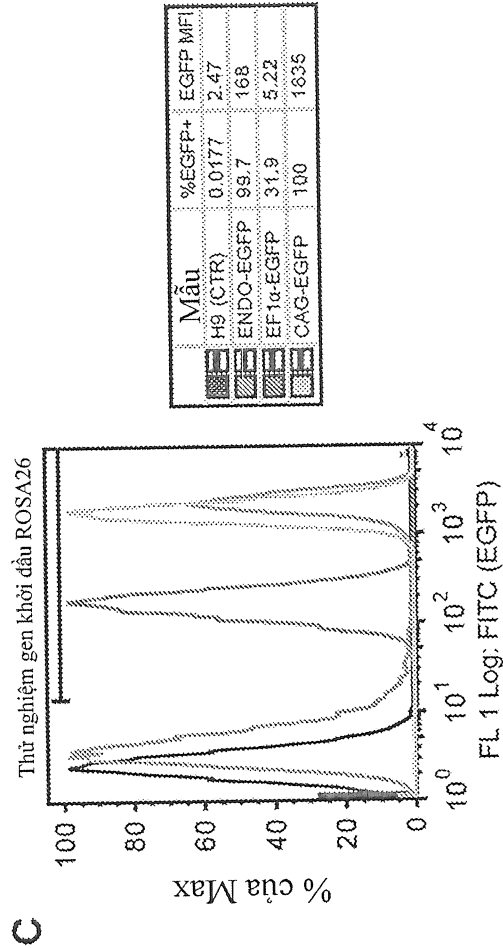
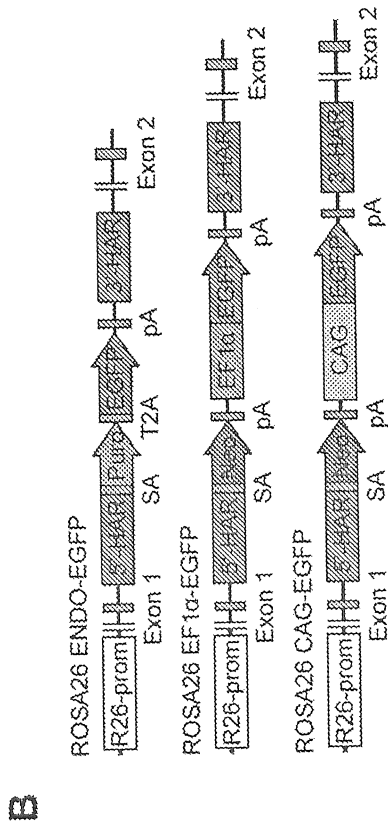
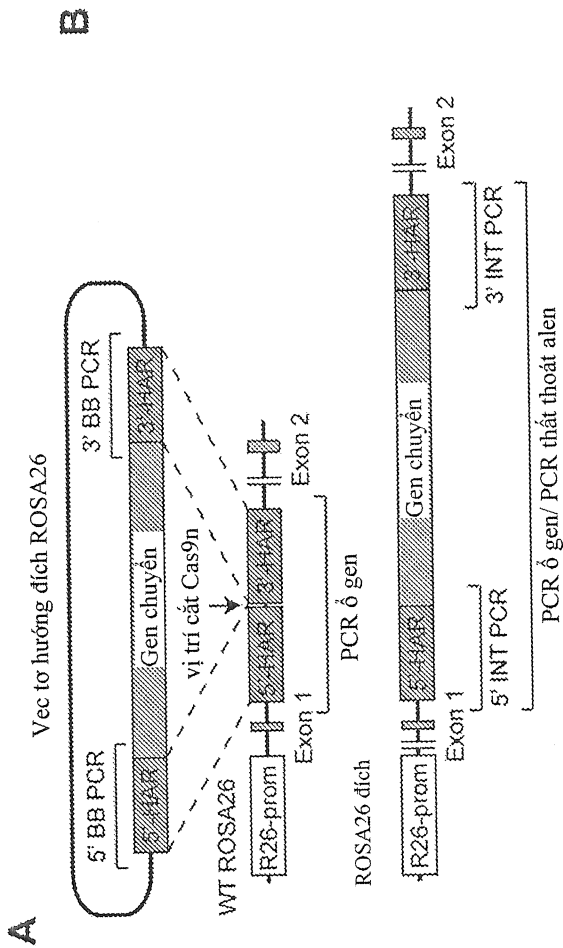


Fig. 16

18/34

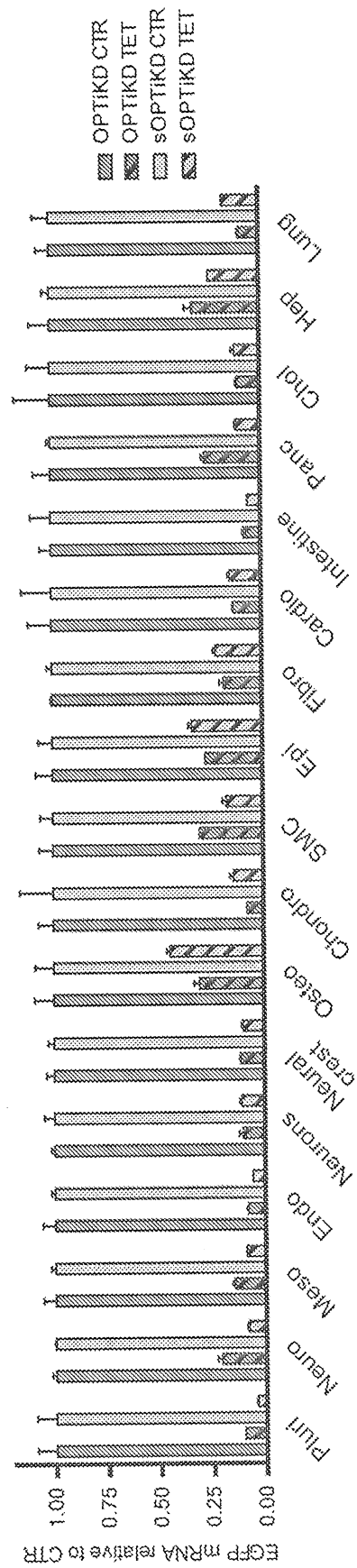


Fig. 17

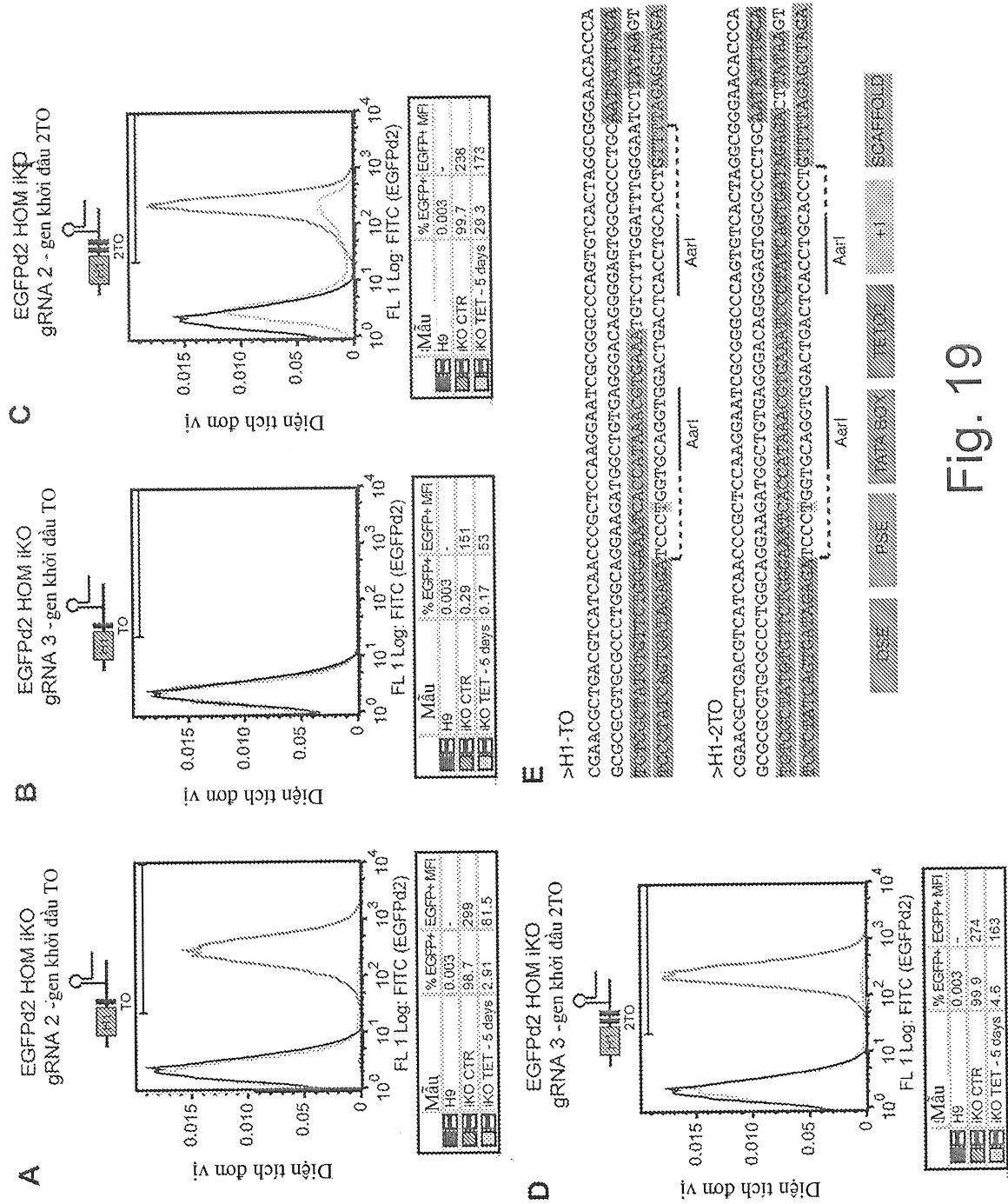


Fig. 19

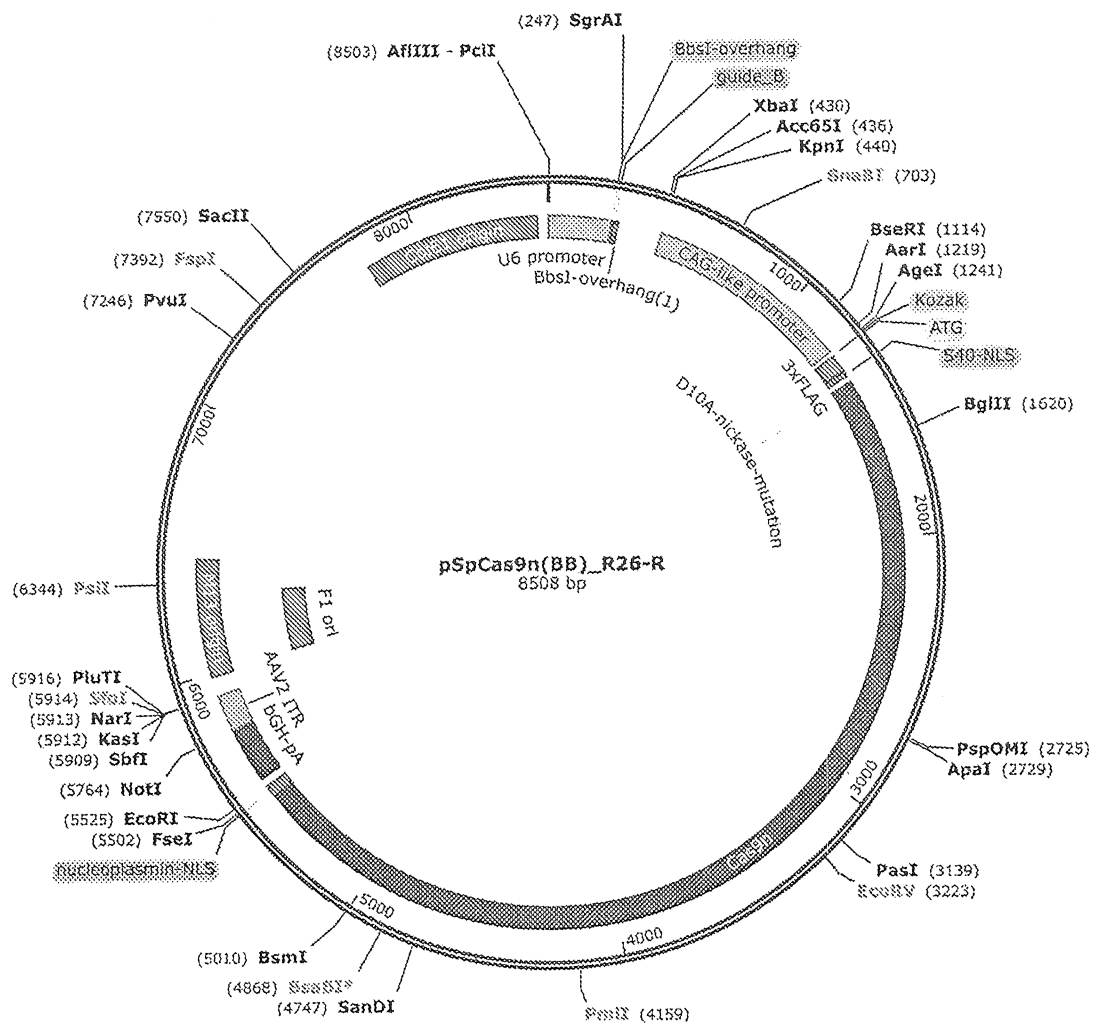


Fig. 20

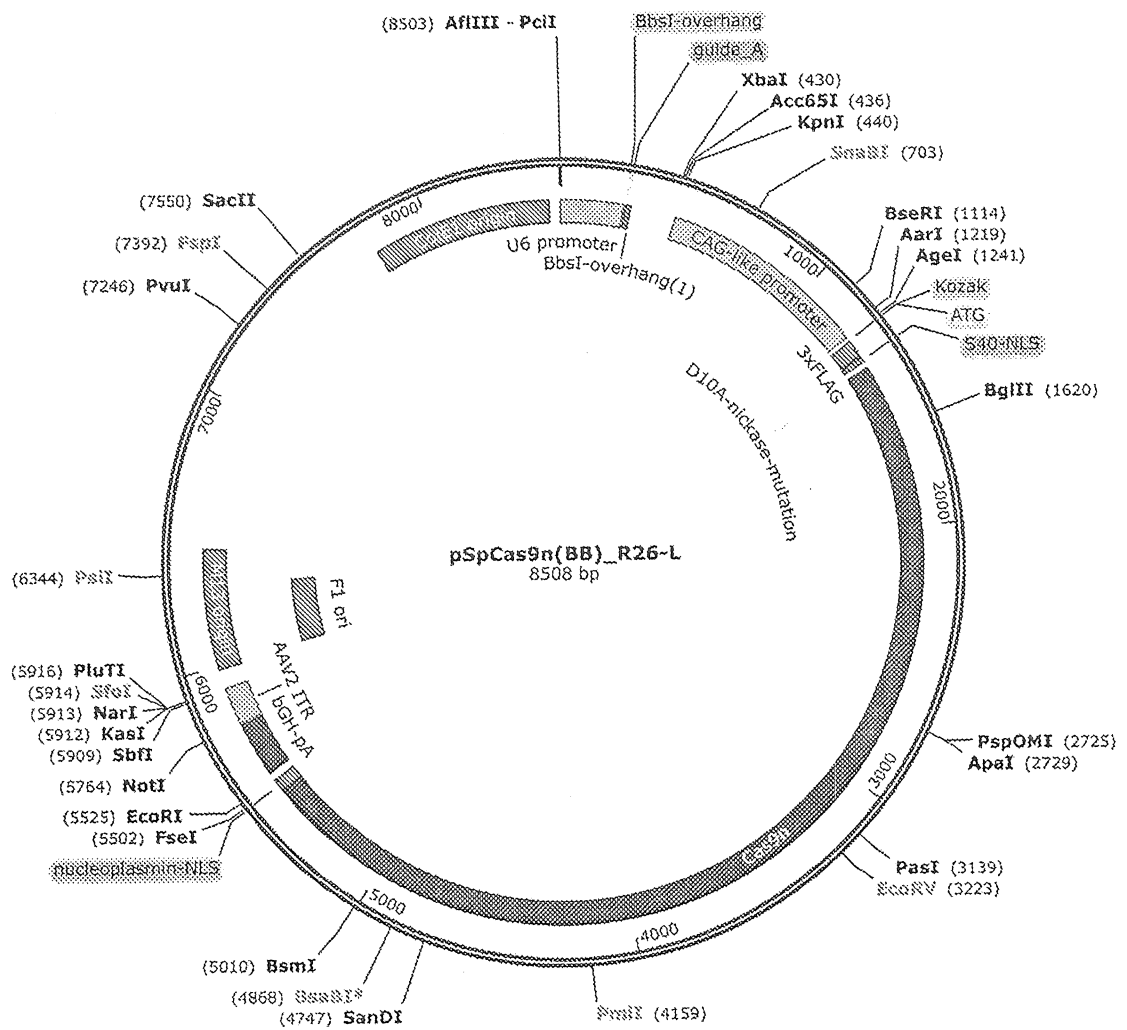


Fig. 21

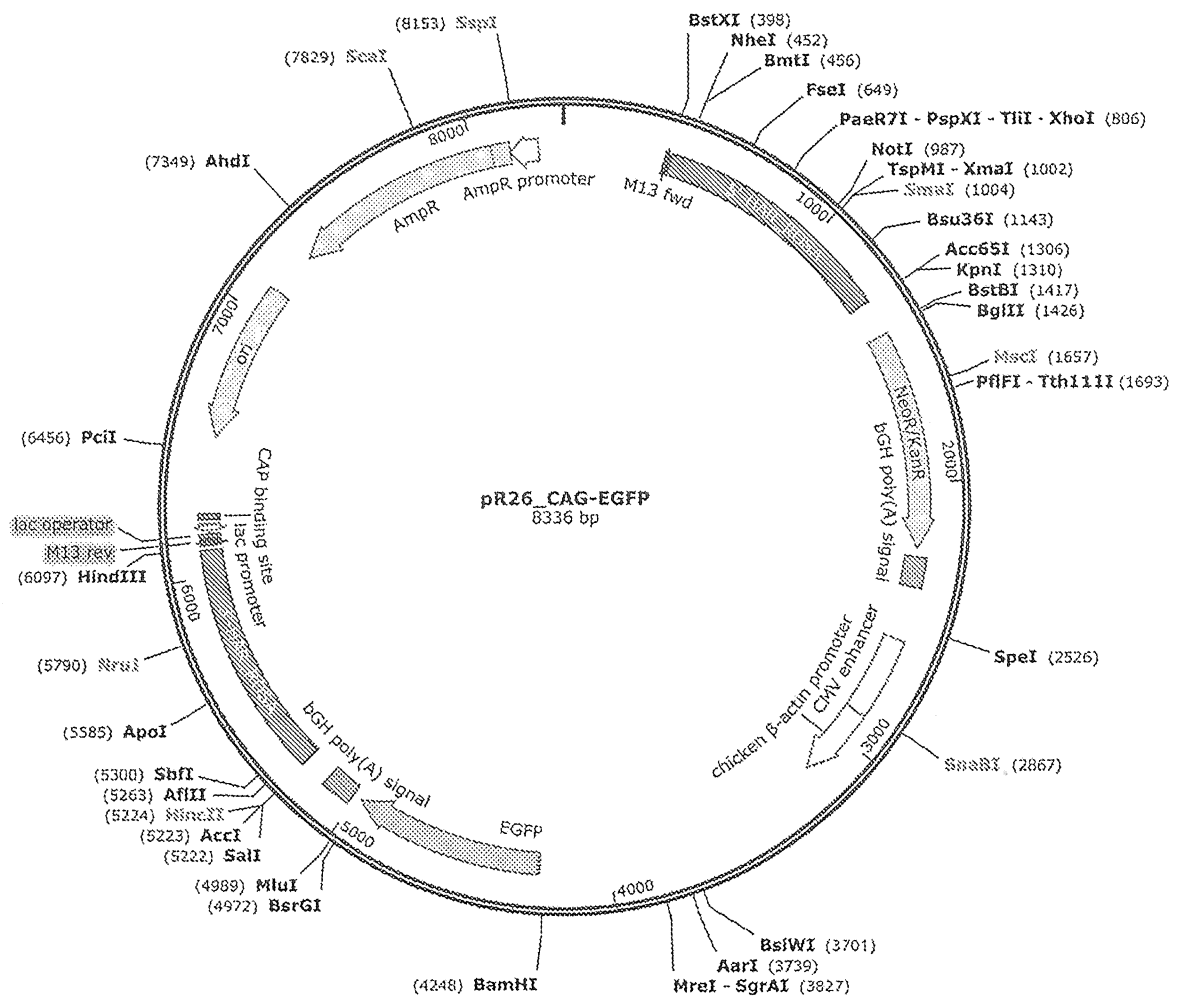


Fig. 22

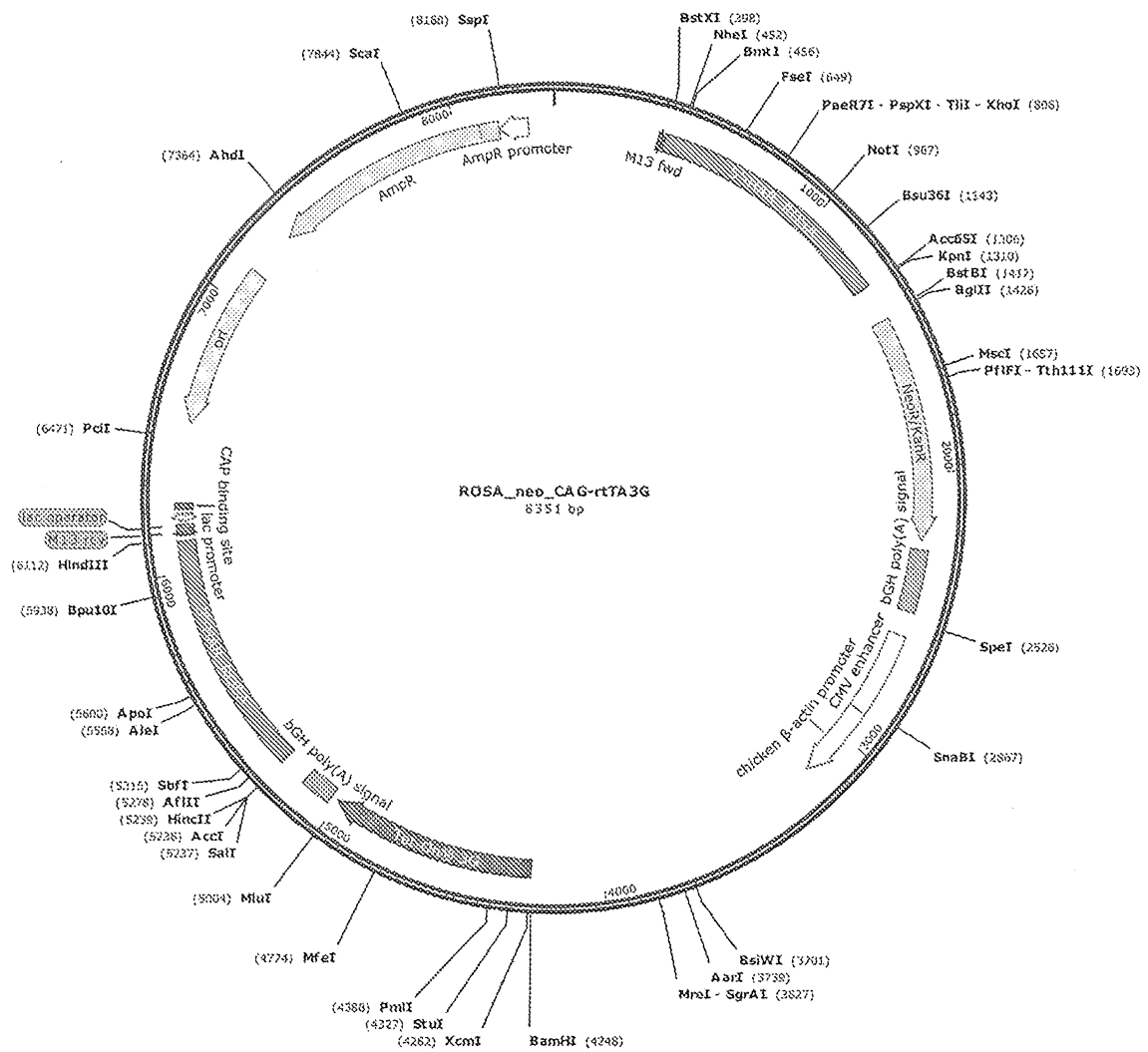


Fig. 23

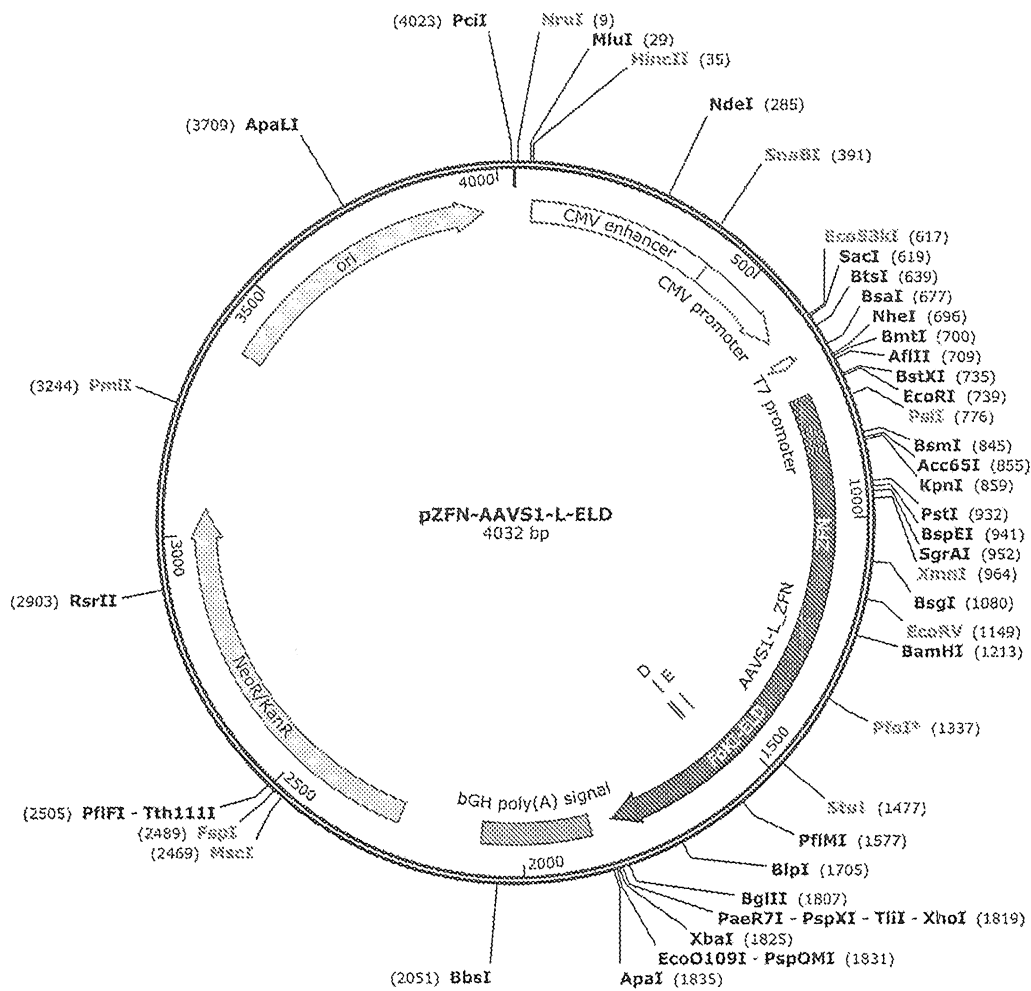


Fig. 24

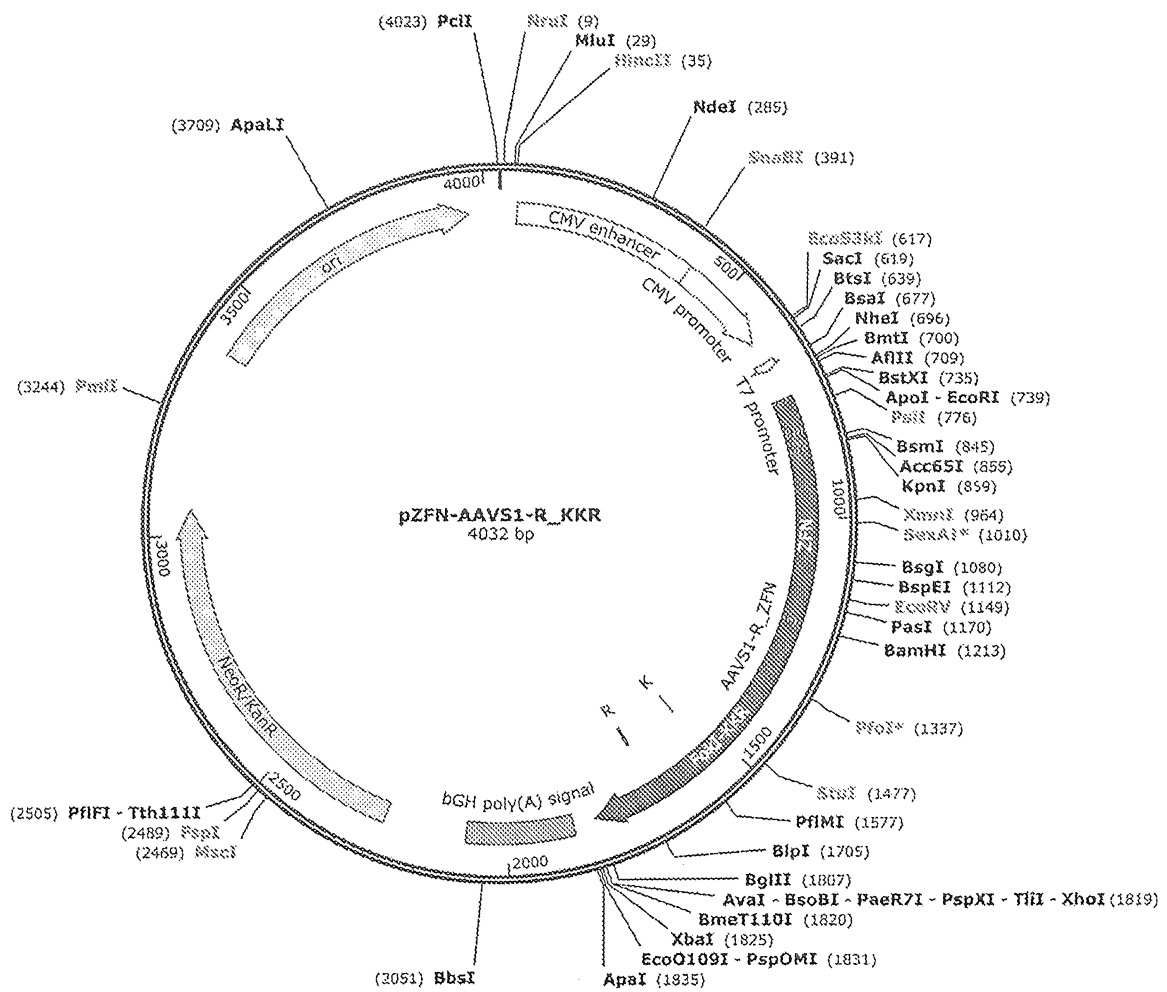


Fig. 25

27/34

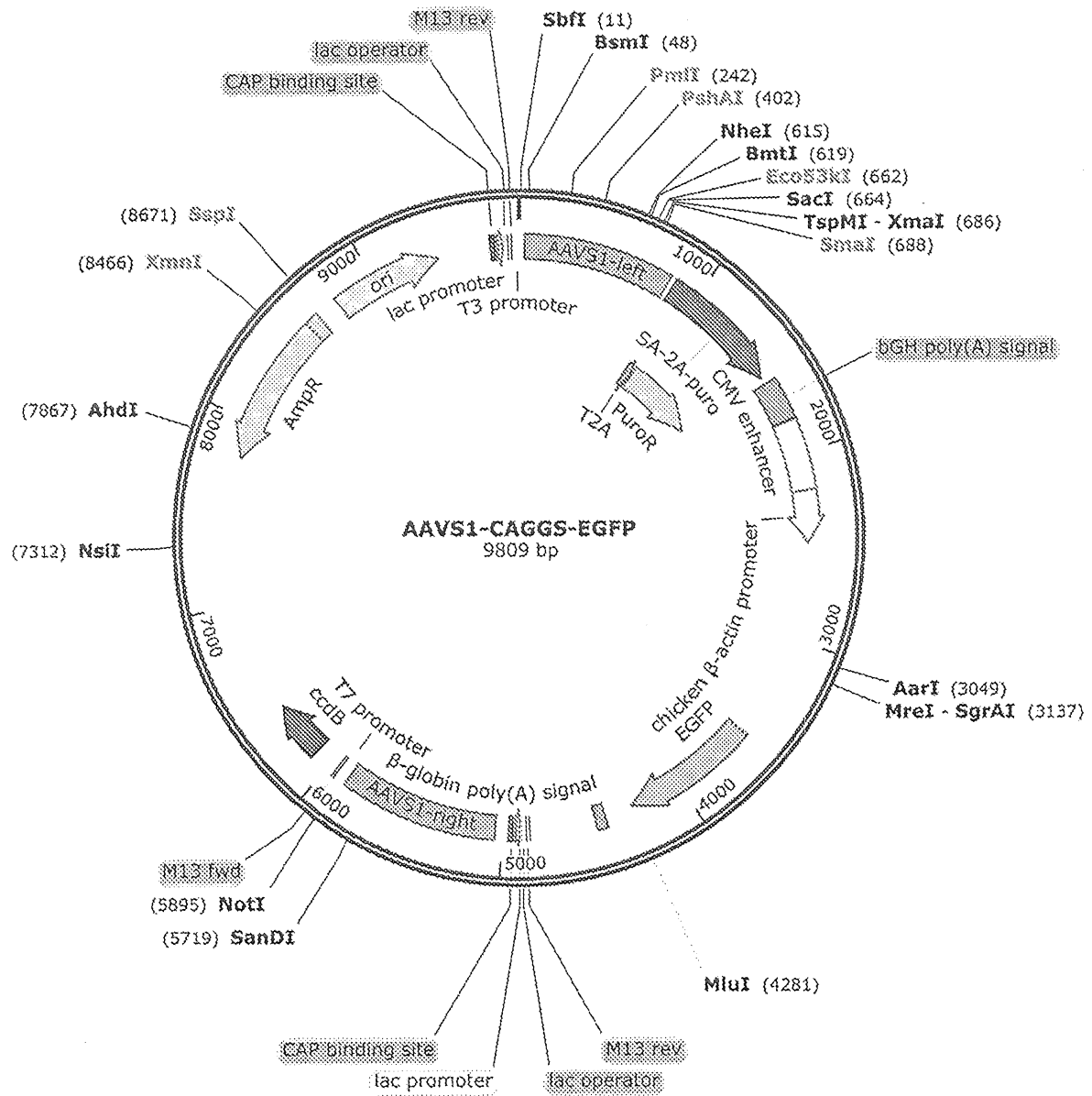


Fig. 26



Fig. 27

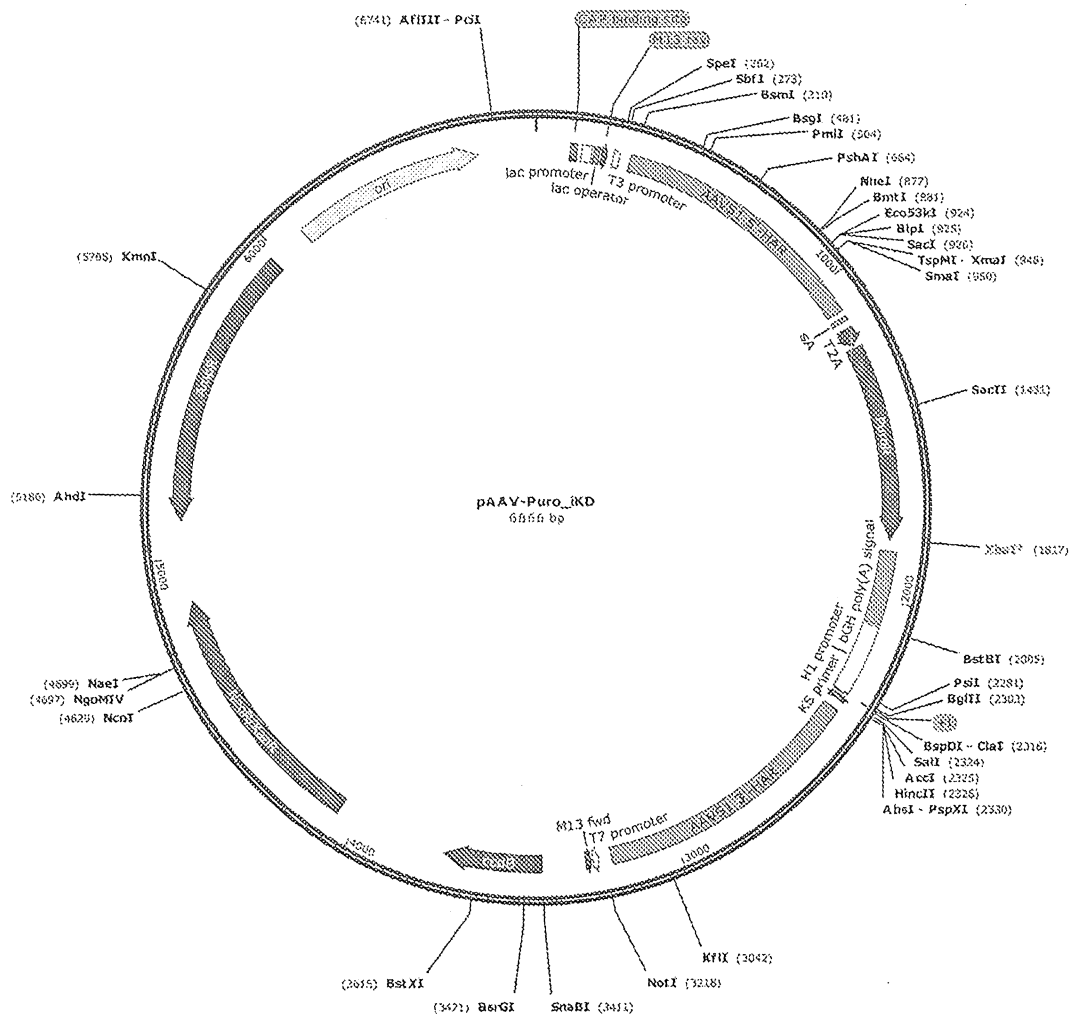


Fig. 28

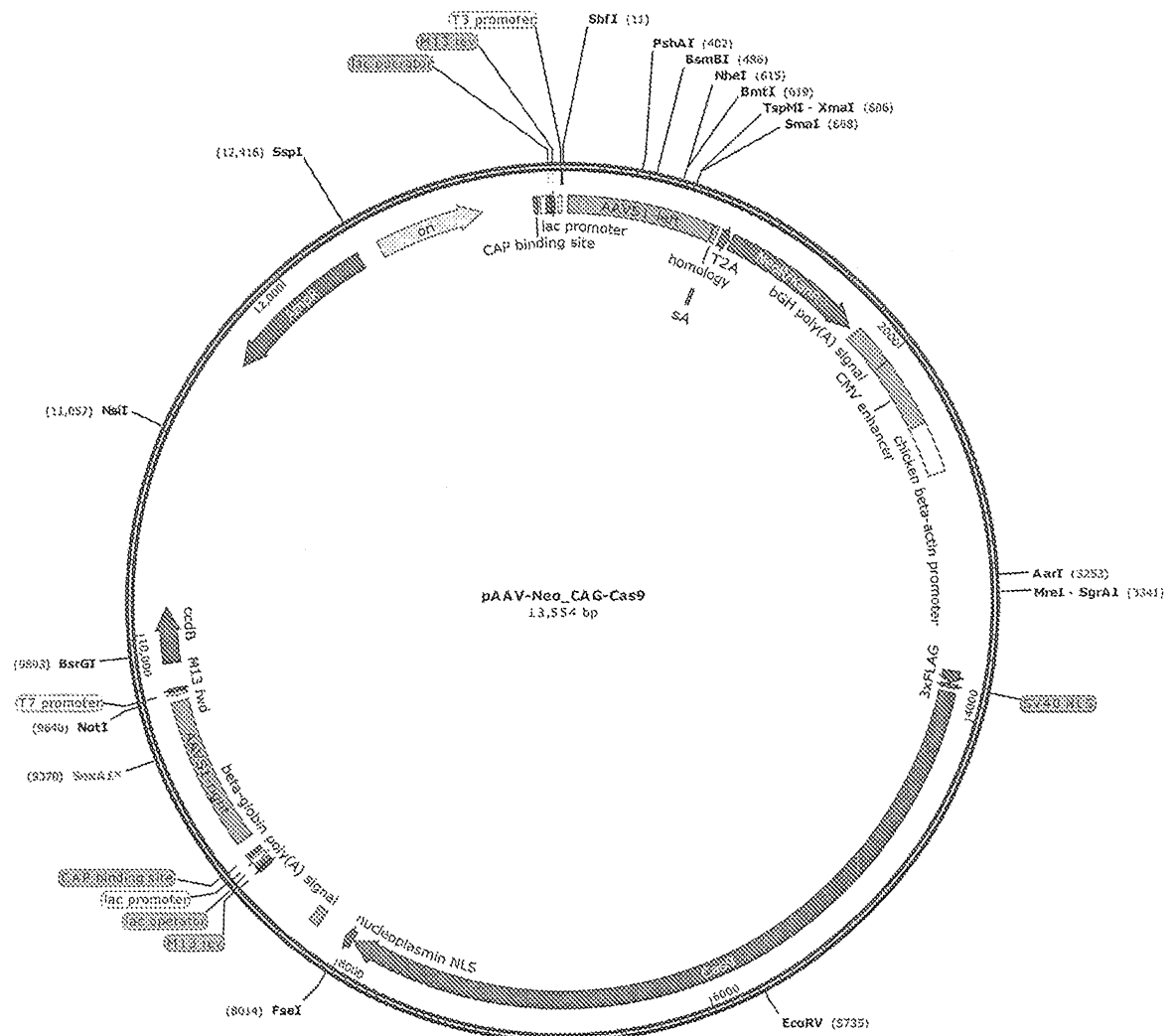


Fig. 29



Fig. 30

32/34

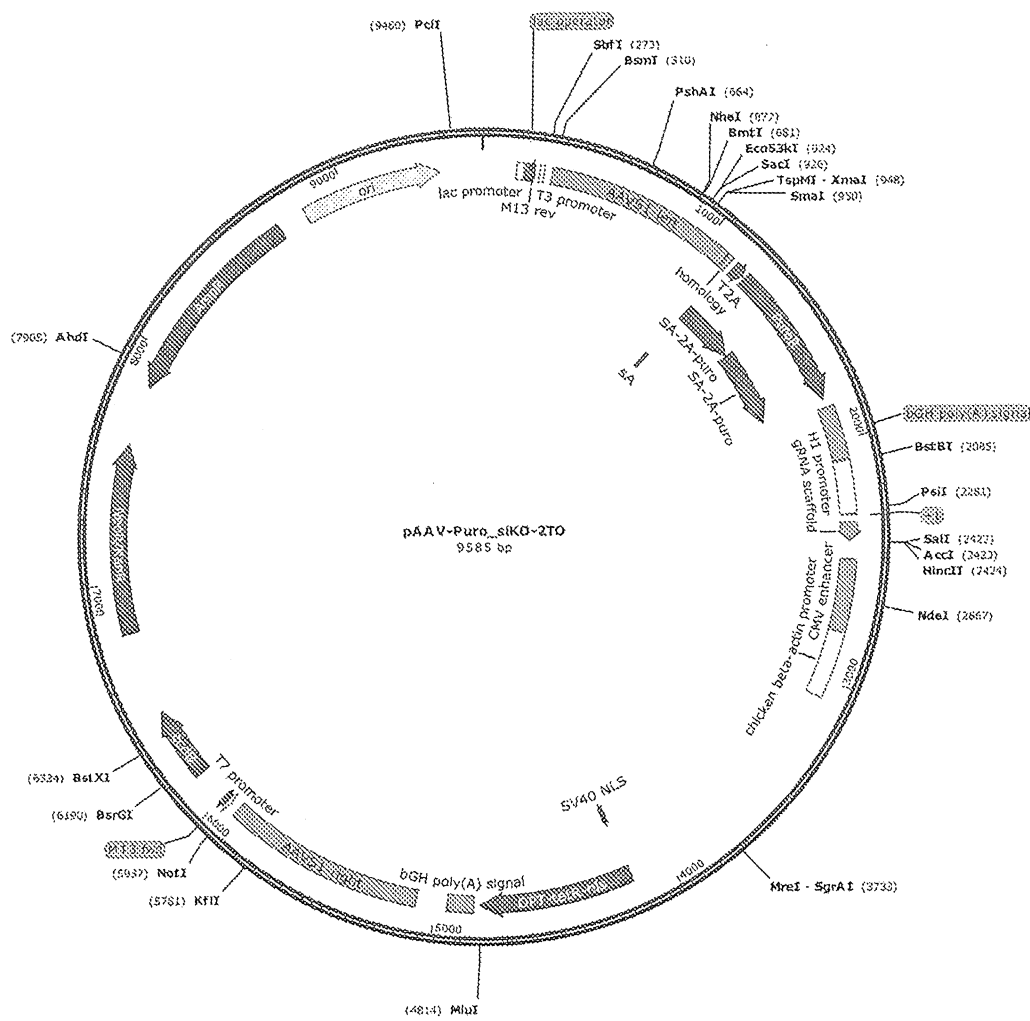


Fig. 31

33/34

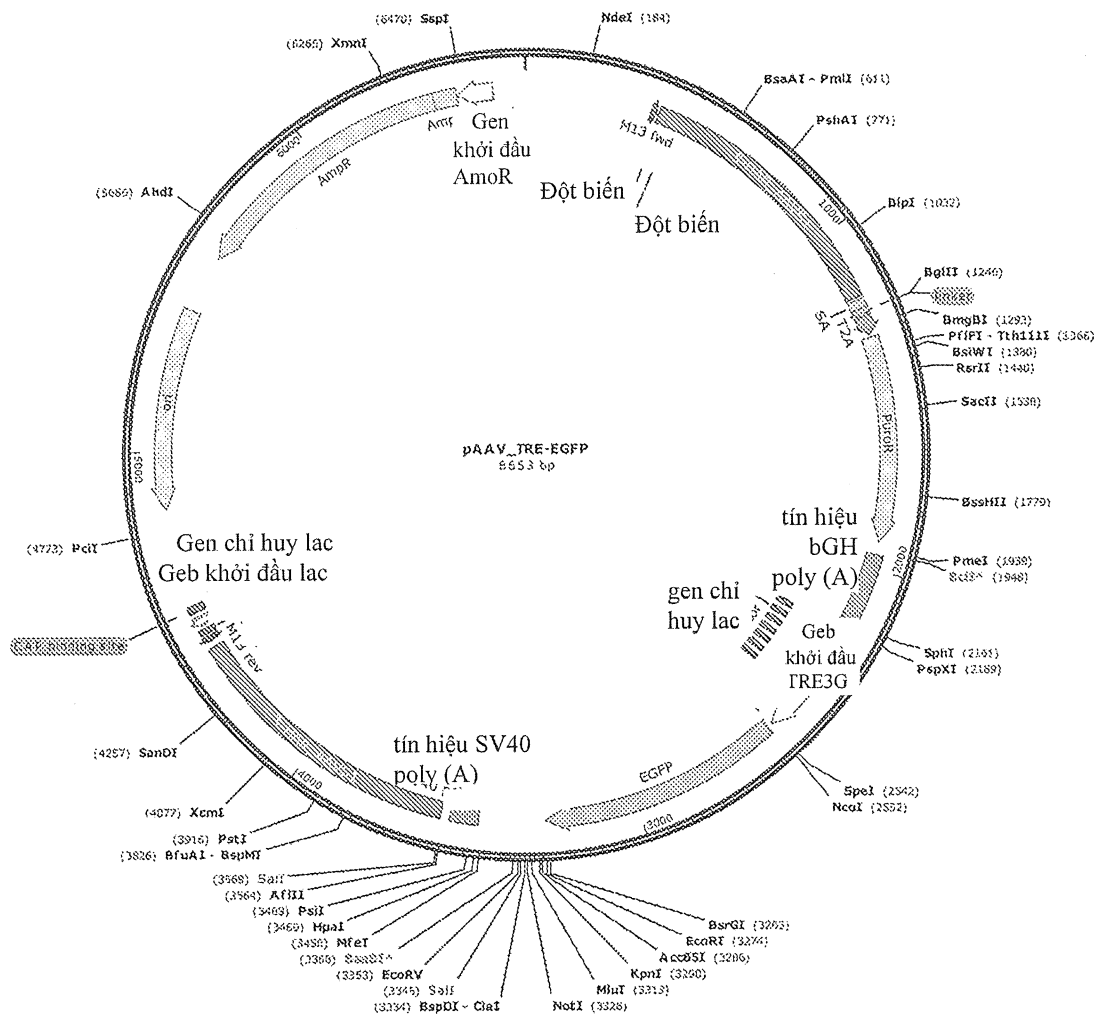


Fig. 32

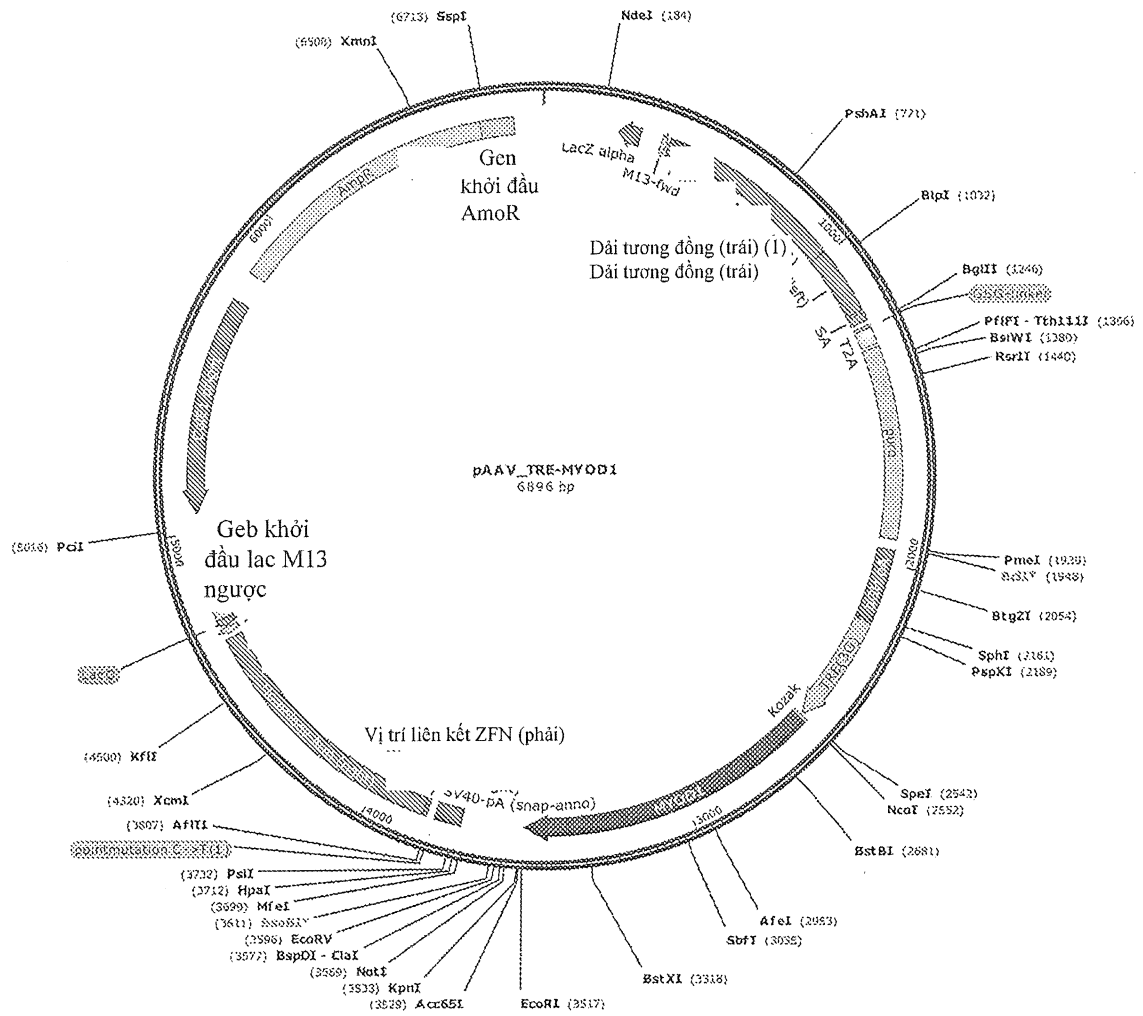


Fig. 33

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Cambridge Enterprise Ltd

<120> Phương pháp thực hiện ngoài cơ thể sống để kiểm soát sự phiên mã trình tự di truyền trong tế bào, tế bào được tạo ra bằng phương pháp này và phương pháp thực hiện ngoài cơ thể sống để sản xuất tế bào cơ hoặc tế bào thần kinh đệm ít nhánh

<130> P8072W01

<150> GB1619876.4

<151> 2016-11-24

<160> 86

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> TetO2 19 trình tự nucleotit

<400> 1

tccctatcag tgatagaga

19

<210> 2

<211> 1797

<212> ADN

<213> người tinh khôn

<400> 2

gctcgaaacc ggacggagcc attgctctcg cagagggagg agcgcttccg gctagcctct	60
tgctgccgat tggccgtttc tcctcccgcc gtgtgtgaaa acacaaatgg cgtattcttg	120
ttggagtaaa gctcctgtca gttacgccgt cgggagtagc cagccgctta gcgactctcg	180
cgttgcccc tgggtggggc gggtaggtag gtggggtgta gagatgctgg gtgtgcgggc	240
gcggccggcc tcctgcggcg ggaggggagg gtcagtgaaa tcggctctgg cgcgggcgtc	300
ctcccaccct ccccttcctt cgggggagtc ggtttaccog ccgcctgctt gtcttcgaca	360
cctgattggc tgtcgaagct gtgggaccgg gcccttgcta ctggctcgag tctcacatga	420
gcgaaaccac tgcgcggggc gcgggggtgg cggggaggcg ggcgttggtta cggtcctccc	480
cgaggccgag cgccgcagtg tctggccccg cggccctgcg caacgtggca ggaagcgcgc	540
gctggaggcg ggggcgggct gccggccgag acttctggat ggcggcggcc gcggctccgc	600
cccgggttcc caccgcctga agggcgagac aagcccgacc tgctacaggc actcgtgggg	660
gtgggggagg agcgggggtc ggtccggctg gtttgtgggt gggaggcgct tgttctccaa	720
aaaccggcgc gagctgcaat cctgagggag ctgcggtgga ggaggtggag agaaggccgc	780
acccttctgg gcagggggag gggagtgccg caataccttt atgggagttc tctgctgcct	840

cccgtcttgt aaggaccgcc ctgggcctgg aagaagccct ccctcctttc ctccctcgct 900
 gatctcgta tcgcctccat gtgcagtcgc ttctcgatta tgggcgggat tcttttgcct 960
 aggccttaagg ggctaacttg gtccctgggc gttgccctgc aggggagtg gcagctgtaa 1020
 gatttgaggg ggcactccga ttagtttatc ttcccacgga ctagagttgg tgcgaggtt 1080
 attgtaataa ggggtgggta gggaaatgga gcttagtcat tcacctgggg ctgattttat 1140
 gcaacgagac tgcggattat cactacttat catttttggg gcatttttct agagacagac 1200
 ataaagcatg atcacctgag ttttatacca ttgagaccc ttgctgcacc accaaagtgt 1260
 agcatcaggt taaatcttaa tagaaaaatt ttagcttttg cttgagaaac cagtgccttc 1320
 ctccctcacc ctctctcccc aggcctctcta cccctttgca tccctaccag gcactcttagc 1380
 aactctcact catacttgat cccattttcc atttggtgta cttgctcctc tagtattcag 1440
 acatagcact agctttctcc ctctcttgat cttgggtagc ctggtgtctc gcgaaaccag 1500
 acagattggt tccaccacaa attaaggctt gagctggggc ttgactctta cccagcagtg 1560
 cttttattcc tccctagttc acgttcttaa atgtttatct tgattttcat tttatccttt 1620
 ttcccttagct gggattctgt cctgaccgt cttcacagtc caggtgatct tgactactgc 1680
 tttacagaga attggatctg aggttaggca acatctccct tttcttccct ctaaatacct 1740
 ctcatctctg ttcttaccag ttagtaactg atctcagatg cctgtgtgat agcttcc 1797

<210> 3
 <211> 651
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> STDtetR-nls

<400> 3
 atgccaaaaa agaagaggaa ggtatctaga ttagataaaa gtaaagtgat taacagcgca 60
 ttagagctgc ttaatgaggt cggaatcgaa ggtttaacaa cccgtaaact cgcccagaag 120
 ctaggtgtag agcagcctac attgtattgg catgtaaaaa ataagcgggc tttgctcgac 180
 gccttagcca ttgagatggt agataggcac catactcact tttgcccttt agaaggggaa 240
 agctggcaag attttttacg taataacgct aaaagtitta gatgtgcttt actaagtcac 300
 cgcgatggag caaaagtaca tttaggtaca cggcctacag aaaaacagta tgaaactctc 360
 gaaaatcaat tagccttttt atgccaacaa ggtttttcac tagagaatgc attatatgca 420
 ctcagcgctg tggggcattt tacttttaggt tgcgtattgg aagatcaaga gcatcaagtc 480
 gctaaagaag aaagggaaac acctactact gatagtatgc cgccattatt acgacaagct 540

atcgaattat ttgatcacca aggtgcagag ccagccttct tattcggcct tgaattgatc 600
 atatgcggat tagaaaaaca acttaaatgt gaaagtgggt ctccgcggta a 651

<210> 4
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> STDtetR-nls

<400> 4

Met Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ser Arg Leu Asp Lys Ser Lys Val
 1 5 10 15

Ile Asn Ser Ala Leu Glu Leu Leu Asn Glu Val Gly Ile Glu Gly Leu
 20 25 30

Thr Thr Arg Lys Leu Ala Gln Lys Leu Gly Val Glu Gln Pro Thr Leu
 35 40 45

Tyr Trp His Val Lys Asn Lys Arg Ala Leu Leu Asp Ala Leu Ala Ile
 50 55 60

Glu Met Leu Asp Arg His His Thr His Phe Cys Pro Leu Glu Gly Glu
 65 70 75 80

Ser Trp Gln Asp Phe Leu Arg Asn Asn Ala Lys Ser Phe Arg Cys Ala
 85 90 95

Leu Leu Ser His Arg Asp Gly Ala Lys Val His Leu Gly Thr Arg Pro
 100 105 110

Thr Glu Lys Gln Tyr Glu Thr Leu Glu Asn Gln Leu Ala Phe Leu Cys
 115 120 125

Gln Gln Gly Phe Ser Leu Glu Asn Ala Leu Tyr Ala Leu Ser Ala Val
 130 135 140

Gly His Phe Thr Leu Gly Cys Val Leu Glu Asp Gln Glu His Gln Val
 145 150 155 160

Ala Lys Glu Glu Arg Glu Thr Pro Thr Thr Asp Ser Met Pro Pro Leu
 165 170 175

Leu Arg Gln Ala Ile Glu Leu Phe Asp His Gln Gly Ala Glu Pro Ala
 180 185 190

Phe Leu Phe Gly Leu Glu Leu Ile Ile Cys Gly Leu Glu Lys Gln Leu
 195 200 205

Lys Cys Glu Ser Gly Ser Pro Arg
 210 215

<210> 5
 <211> 651
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> OPTtetR

<400> 5
 atgcccaaga aaaagcggaa ggtgtcccgg ctggacaaga gcaaagtgat caacagcgcc 60
 ctggaactgc tgaacgaagt gggcatcgag ggccctgacca cccggaagct ggcccagaaa 120
 ctgggcgtgg aacagcccac cctgtactgg cacgtgaaga acaagcgggc cctgctggac 180
 gccctggcca tcgagatgct ggaccggcac cacacacact ttgccccct ggaaggcgaa 240
 agctggcagg acttctctgcg gaacaacgcc aagagcttca gatgcgccct gctgagccac 300
 cgggacggcg ccaaagtgca cctgggcacc agaccaccg agaagcagta cgagacactg 360
 gaaaaccagc tggccttcct gtgccagcag ggcttcagcc tggaaaacgc cctgtacgcc 420
 ctgagcgccg tgggccactt taccctgggc tgcgtgctgg aagatcagga acaccaggtc 480
 gccaaagagg aaagagagac acccaccacc gacagcatgc cccccctgct gagacaggcc 540
 atcgagctgt tcgatcatca aggcgccgag cccgccttcc tgttcggcct ggaactgac 600
 atctgcggcc tcgagaagca gctgaagtgc gagagcggct cccccagatg a 651

<210> 6
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> OPTtetR

<400> 6

Met Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ser Arg Leu Asp Lys Ser Lys Val
 1 5 10 15

Ile Asn Ser Ala Leu Glu Leu Leu Asn Glu Val Gly Ile Glu Gly Leu
 20 25 30

Thr Thr Arg Lys Leu Ala Gln Lys Leu Gly Val Glu Gln Pro Thr Leu
35 40 45

Tyr Trp His Val Lys Asn Lys Arg Ala Leu Leu Asp Ala Leu Ala Ile
50 55 60

Glu Met Leu Asp Arg His His Thr His Phe Cys Pro Leu Glu Gly Glu
65 70 75 80

Ser Trp Gln Asp Phe Leu Arg Asn Asn Ala Lys Ser Phe Arg Cys Ala
85 90 95

Leu Leu Ser His Arg Asp Gly Ala Lys Val His Leu Gly Thr Arg Pro
100 105 110

Thr Glu Lys Gln Tyr Glu Thr Leu Glu Asn Gln Leu Ala Phe Leu Cys
115 120 125

Gln Gln Gly Phe Ser Leu Glu Asn Ala Leu Tyr Ala Leu Ser Ala Val
130 135 140

Gly His Phe Thr Leu Gly Cys Val Leu Glu Asp Gln Glu His Gln Val
145 150 155 160

Ala Lys Glu Glu Arg Glu Thr Pro Thr Thr Asp Ser Met Pro Pro Leu
165 170 175

Leu Arg Gln Ala Ile Glu Leu Phe Asp His Gln Gly Ala Glu Pro Ala
180 185 190

Phe Leu Phe Gly Leu Glu Leu Ile Ile Cys Gly Leu Glu Lys Gln Leu
195 200 205

Lys Cys Glu Ser Gly Ser Pro Arg
210 215

<210> 7
<211> 20
<212> ADN
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> hROSA26 Locus PCR

<400> 7
gagaagaggc tgtgottcgg

<210> 8
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> hROSA26 Locus PCR

 <400> 8
 acagtacaag ccagtaatgg ag 22

 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> hROSA26 5'-INT PCR

 <400> 9
 gagaagaggc tgtgcttcgg 20

 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> hROSA26 5'-INT PCR

 <400> 10
 aagaccgcga agagtttgtc c 21

 <210> 11
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> hROSA26 3'-INT PCR

 <400> 11
 gaaactcgct caaaagctgg g 21

 <210> 12
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> hROSA26 3'-INT PCR

 <400> 12
 acagtacaag ccagtaatgg ag 22

<210> 13
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> hROSA26 3'-BB PCR

 <400> 13
 gaaactcgct caaaagctgg g 21

 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> hROSA26 3'-BB PCR

 <400> 14
 tgaccatgat tacgccaaagc 20

 <210> 15
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> PCR ở gen AAVS1

 <400> 15
 ctgtttcccc ttcccaggca ggtcc 25

 <210> 16
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> PCR ở gen AAVS1

 <400> 16
 tgcaggggaa cgggggtcag tctga 25

 <210> 17
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> AAVS1 5'-INT PCR

 <400> 17
 ctgtttcccc ttcccaggca ggtcc 25

<210> 18
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> AAVS1 5'-INT PCR

 <400> 18
 tcgtcgcggg tggcgaggcg caccg 25

 <210> 19
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> AAVS1 3'-INT PCR

 <400> 19
 tgcaggggaa cggggctcag tctga 25

 <210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> AAVS1 3'-BB PCR

 <400> 20
 atgcttccgg ctcgtatggt 20

 <210> 21
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> CNP Fw

 <400> 21
 tcctcatcat gaacagaggc tt 22

 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> CNP Rev

 <400> 22
 aaactgcagc tcaggcttgt 20

<210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> DES Fw

<400> 23
 ccaacaagaa caacgacgcc 20

<210> 24
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> DES Rev

<400> 24
 atcagggaaat cgtagtgcc c 21

<210> 25
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> DMD Fw

<400> 25
 tgggtgggaag aagtagagga ct 22

<210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> DMD Rev

<400> 26
 tgctgcttcc caaacttaga 20

<210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> EGFP Fw

<400> 27
 cccgacaacc actacctgag 20

<210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> EGFP Rev

<400> 28
 gtccatgccg agagtgatcc 20

<210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> FOXG1 Fw

<400> 29
 tgccaagttt tacgacggga 20

<210> 30
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> FOXG1 Rev

<400> 30
 gggttggaag aagaccctg 20

<210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> GRIA4 Fw

<400> 31
 ggccaggga ttgacatgga 20

<210> 32
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> GRIA4 Rev

<400> 32
 aaccaacctt tctaggctct gtg 23

<210> 33
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> HMBS (PBGD) Fw

 <400> 33
 attaccccg gagactgaac 20

 <210> 34
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> HMBS (PBGD) Rev

 <400> 34
 ggctgttgct tggacttctc 20

 <210> 35
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> MAG Fw

 <400> 35
 cagaagacgt ccccaactca 20

 <210> 36
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> MAG Rev

 <400> 36
 cctcgggagg ctgaaatcat aa 22

 <210> 37
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> MAP2 Fw

 <400> 37
 agactgcagc tctgccttta g 21

<210> 38
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> trình.tự nhân tạo

 <220>
 <223> MAP2 Rev

 <400> 38
 aggctgtaag taaatcttcc tcc 23

 <210> 39
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> MBP Fw

 <400> 39
 tggatgatgga gatgtcaagc aggt 24

 <210> 40
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> MBP Rev

 <400> 40
 gctgtggttt ggaaacgagg ttgt 24

 <210> 41
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> MOG Fw

 <400> 41
 agagatagag aatctccacc gga 23

 <210> 42
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> MOG Rev

 <400> 42
 tgatcaaggc aaccaagggt c 21

<210> 43
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MYH1 Fw

<400> 43
 cacactagtt tcacagctct cg 22

<210> 44
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MYH1 Rev

<400> 44
 cagggcactc ttggccttta 20

<210> 45
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MYH2 Fw

<400> 45
 ggaagctctg gtgtctcagt t 21

<210> 46
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MYH2 Rev

<400> 46
 cagggcggttc ttggctttta t 21

<210> 47
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MYH3 Fw

<400> 47
 gctgcatacc cagaacacca 20

<210> 48
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MYH3 Rev

<400> 48
 ccctgctggc atcttctacc 20

<210> 49
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MYH4 Fw

<400> 49
 tcgcatttgt cagccaaggg 20

<210> 50
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MYH4 Rev

<400> 50
 tgaaaccag gatgtccaca g 21

<210> 51
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MYH7 Fw

<400> 51
 gagactgtcg tgggcttgta 20

<210> 52
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MYH7 Rev

<400> 52
 gcccttctca ataggcgcat c 21

<210> 53
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MYH8 Fw

<400> 53
 tgaagcagat agcagcgcca 20

<210> 54
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MYH8 Rev

<400> 54
 cgtacgaagt gaggggtgtgt 20

<210> 55
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MYOD1 (n?i sinh) Fw

<400> 55
 gccgctttcc ttaaccacaa 20

<210> 56
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MYOD1 (n?i sinh) Rev

<400> 56
 ctgaatgccc acccactgtc 20

<210> 57
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MYOD1 Fw

<400> 57
 cgacggcatg atggactaca 20

<210> 58
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MYOD1 Rev

<400> 58
 tagtaggcgc cttcgtagca 20

<210> 59
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> NANOG Fw

<400> 59
 agcagatgca agaactctcc aa 22

<210> 60
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> NANOG Rev

<400> 60
 tgaggccttc tgcgtcacac 20

<210> 61
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> NEUROG2 (NGN2) Fw

<400> 61
 tgttcgtcaa atccgagacc t 21

<210> 62
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> NEUROG2 (NGN2) Rev

<400> 62
 cgatccgagc agcactaaca 20

<210>	63	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	PAX6 Fw	
<400>	63	
	cgagatttca gagccccata	20
<210>	64	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	PAX6 Rev	
<400>	64	
	aagacaccac cgagctgatt	20
<210>	65	
<211>	22	
<212>	ADN	
<213>	trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	PLP Fw	
<400>	65	
	aacagctgag ttccaaatga cc	22
<210>	66	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	PLP Rev	
<400>	66	
	acggcaaagt tgtaagtggc	20
<210>	67	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	POU3F2 (BRN2) Fw	
<400>	67	
	acccgcttta tcgaaggcaa	20

<210> 68
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> POU3F2 (BRN2) Rev

<400> 68
 cctccataac ctccccaga 20

<210> 69
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> POU5F1 (OCT4) Fw

<400> 69
 gtggaggaag ctgacaacaa 20

<210> 70
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> POU5F1 (OCT4) Rev

<400> 70
 attctccagg ttgcctctca 20

<210> 71
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> RYR1 Fw

<400> 71
 caatcgccag aacggagaga 20

<210> 72
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> RYR1 Rev

<400> 72
 gtcgtgttcc ctgtctgtgt 20

<210> 73
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> SLC17A6 (VGLUT2) Fw

 <400> 73
 gtagactggc aaccacctcc 20

 <210> 74
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> SLC17A6 (VGLUT2) Rev

 <400> 74
 ccattccaaa gcttccgtag ac 22

 <210> 75
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> SYP Fw

 <400> 75
 acctcgggac tcaacacctc gg 22

 <210> 76
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> SYP Rev

 <400> 76
 gaaccacagg ttgccgaccc ag 22

 <210> 77
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> SYN1 Fw

 <400> 77
 ccctgggtgt ttgccagat 20

<210> 78
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> SYN1 Rev

 <400> 78
 accacggggt acgttgact 20

 <210> 79
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> TUBB3 Fw

 <400> 79
 caaccagatc ggggccaaagt t 21

 <210> 80
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> TUBB3 Rev

 <400> 80
 ccgagtcgcc cacgtagtt 19

 <210> 81
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> vecto hướng đích AAVS1 Fw

 <400> 81
 gtgatagaga tccctgggtgc aggtggactg actcacctgc acctgtttta ga 52

 <210> 82
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> vectơ hướng đích AAVSI Rev

 <400> 82
 actaaaacag gtgcaggtga gtcagtccac ctgcaccagg gatctctatc ac 52

<210> 83
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 20 bp đoạn đệm Fw

<220>
 <221> đặc tính lỗi
 <222> (5)..(24)
 <223> n = a hoặc g hoặc c hoặc t, chưa biết hoặc khác nữa

<400> 83
 tcccnnnnnn nnnnnnnnnn nnnn

24

<210> 84
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 20bp đoạn đệm Rev

<220>
 <221> đặc tính lỗi
 <222> (5)..(24)
 <223> n = a hoặc g hoặc c hoặc t, chưa biết hoặc khác nữa

<400> 84
 aaacnnnnnn nnnnnnnnnn nnnn

24

<210> 85
 <211> 268
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> H1 POLIII gen khởi đầu H1-TO

<400> 85
 cgaacgctga cgctcatcaac ccgctccaag gaatcgcggg ccagtggtca ctaggcggga 60
 acaccagcg cgcgtgcgcc ctggcaggaa gatggctgtg agggacaggg gagtggcgcc 120
 ctgcaatatt tgcattgtcgc tatgtgttct gggaaatcac cataaacgtg aaatgtcttt 180
 ggatttggga atcttataag ttccctatca gtgatagaga tccctggtgc aggtggactg 240
 actcacctgc acctgtttta gagctaga 268

<210> 86
 <211> 268

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> H1 POLIII gen khởi đầu H1-2TO

<400> 86

cgaacgctga cgtcatcaac ccgctccaag gaatcgcggg cccagtgtca ctaggcggga	60
acaccagcg cgcgtgcgcc ctggcaggaa gatggctgtg agggacaggg gagtggcgcc	120
ctgcaatatt tgcattgtcg tatgtgttct gggaaatcac cataaacgtg aaatccctat	180
cagtgataga gacttataag ttccctatca gtgatagaga tccctggtgc aggtggactg	240
actcacctgc acctgtttta gagctaga	268