

## 牛 *sox2* 基因的克隆及重组反转录病毒载体的构建

辛晓玲<sup>1,2</sup>, 吕长荣<sup>1</sup>, 陈冬梅<sup>1</sup>, 窦忠英<sup>1</sup>

1 西北农林科技大学动物医学院 陕西省农业分子生物学重点实验室 国家干细胞工程技术研究中心陕西分中心, 杨凌 712100

2 河南省农业科学院畜牧兽医研究所, 郑州 450002

**摘要:** 为了构建包含牛 *sox2* 基因编码序列的重组反转录病毒载体, 获得有感染性的病毒颗粒, 本研究以胎牛原始生殖嵴为材料, 用 RT-PCR 方法克隆出牛 *sox2* 基因的开放阅读框序列, 将其亚克隆至 pMD18-T 载体并测序。结果表明获得的基因片段与发表的牛 *sox2* 基因序列(GenBank Accession No. NM-001105463)高度同源; 将测序正确的重组 T 载体用 *EcoR* I 和 *Bgl* II 酶切, 基因片段插入反转录病毒载体 pMSCVneo 的相同酶切位点, 成功构建了重组反转录病毒载体 pMSCV-*sox2*。采用脂质体法用 pMSCV-*sox2* 转染包装细胞 PT67, 同时用 pMIG(含绿色荧光蛋白)作为阳性对照, 经流式细胞仪测定, 该载体转染效率达到 68.3%; 转染后 PT67 细胞经 G418 筛选得到稳定的产毒细胞株, 其病毒滴度达  $8.16 \times 10^7$  CFU/mL, 为下一步特定因子诱导牛体细胞转变为牛 iPS 细胞的研究奠定了基础。

**关键词:** 牛, *sox2* 基因, iPS 细胞, 反转录病毒载体

## Cloning of bovine *sox2* gene and construction of its retrovirus vector

Xiaoling Xin<sup>1,2</sup>, Changrong Lü<sup>1</sup>, Dongmei Chen<sup>1</sup>, and Zhongying Dou<sup>1</sup>

1 Shaanxi Branch of National Stem Cell Engineering & Technology Center, Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, College of Animal Medicine, Northwest A & F University, Yangling 712100, China

2 Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China

**Abstract:** In order to construct the recombinant retrovirus vector of bovine *sox2* gene and obtain infectious retroviral particles, we successfully amplified the ORF (open reading frame) of bovine *sox2* gene from the primordial genital ridges of bovine embryo by RT-PCR. The cDNA of ORF was subcloned to pMD18-T vectors and verified that its sequence was highly homologous to the GenBank counterpart (GenBank Accession No. NM-001105463) by sequencing. The correct fragment was digested by *EcoR* I/*Bgl* II from recombinant pMD18-T vector and inserted into the same restriction sites of retroviral vector pMSCVneo. We got recombinant retrovirus vector pMSCV-*sox2* which was transfected into PT67 by lipofectamine 2000 with pMIG (including green fluorescence protein) as a control. Flow cytometry analysis showed that its transfected efficiency was 68.3%. Subsequently, we established the stable cell strain by G418 selection which could produce virus. Its viral titer was up to  $8.16 \times 10^7$  CFU/mL. This greatly facilitates the further study of bovine induced pluripotent stem cells induced from bovine somatic cells by defined factors.

**Keywords:** bovine, *sox2* gene, iPS cells (induced pluripotent stem cells), retrovirus vector

**Received:** May 10, 2009; **Accepted:** August 18, 2009

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 30671067), Key Science and Technology Program of Shaanxi Province (No. 2006KZ05-G1).

**Corresponding author:** Zhongying Dou. E-mail: douzhongying@china.com

国家自然科学基金(No. 30671067), 陕西省重大科技计划(No. 2006KZ05-G1)资助。

*sox2* 基因在胚胎干细胞多能性维持以及人与小鼠体细胞转变为诱导型多能干细胞 (Induced pluripotent stem cells, iPS cells) 过程中起着重要作用, 从而备受关注。有关研究表明, *sox2* 基因属于 *sox* (Sry-related HMG box-containing) 基因家族<sup>[1]</sup>, *sox* 基因家族编码一组进化上高度保守、结构上与 SRY 相关的转录因子, 其编码的蛋白与 SRY 一样, 包含一个可与 DNA 靶序列特异结合的 HMG 盒 (High-mobility group box)。

1994 年, Stevanovic 首次克隆出人的 *sox2* 基因, 位于第 3 号染色体的长臂 q 26.3-27 位置<sup>[2]</sup>。1995 年, Yuan 等<sup>[3]</sup>首先从胚胎癌细胞的 cDNA 文库中克隆了小鼠 *sox2* 的全长 cDNA。Hayes 等<sup>[4]</sup>1996 年用带荧光标记的原位杂交方法确定了牛 *sox2* 基因在染色体组中的位置, 但牛 *sox2* 基因的序列直到 2006 年才被提交到 GenBank。牛的 *sox2* 基因定位于第 1 号染色体的 q33 处<sup>[5]</sup>, 为单外显子结构, 其基因全长 1477 bp, 开放阅读框长 963 bp, 编码 320 个氨基酸, 在距 N 末端第 43~114 个氨基酸处是 72 个氨基酸的 HMG-box。与其他的 Sox 蛋白一样, *sox2* 的 HMG-box 以高度亲和力结合特异的 DNA 靶序列 5'-(A/T)(A/T)CAA(A/T)G-3'。

*sox2* 基因是早期胚胎发育和干细胞研究中的一个热点基因, 一般与 Oct-3/4 形成异二聚体对 FGF-4、Utf-1、Fbx15、opn、Nanog 等多个因子及其自身起调控作用, 对胚胎干细胞的维持与增殖起重要作用<sup>[6]</sup>。2006 年, Yamanaka 等<sup>[7]</sup>首次开创性地用反转录病毒将 4 个转录因子 Oct-3/4、Sox2、c-Myc 和 KLF4 导入小鼠胎儿成纤维细胞和成体成纤维细胞, 得到小鼠 iPS 细胞; 随后又用同样的转录因子组合得到人的 iPS 细胞<sup>[8]</sup>。这些细胞与小鼠 ES 细胞在形态、增殖、表面抗原、基因表达和体内外分化等方面基本一致。Yu 等<sup>[9]</sup>将 Oct-3/4、Sox2、Nanog 和 Lin28 转入人成体成纤维细胞也得到人 iPS 细胞。这些研究表明, *sox2* 基因在人、小鼠体细胞转变为 iPS 细胞过程中起着重要作用。

本实验室长期开展人、小鼠以及牛、羊等大家畜的 ES 细胞与有关成体干细胞的分离培养和定向分化方面的工作, 本研究旨在从牛胎儿生殖嵴中克隆牛 *sox2* 基因开放阅读框序列, 并与反转录病毒载

体 pMSCVneo 构建重组真核表达载体, 达到稳定产生包含牛 *sox2* 基因开放阅读框序列的重组反转录病毒的目的。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞株

PT67 细胞和 NIH3T3 细胞由本中心保存。

#### 1.1.2 菌种与载体

TG 菌种、pMIG(MSCV neo-IRES-GFP)质粒和反转录病毒载体 pMSCV-neo 由本中心保存; pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司。

#### 1.1.3 工具酶与其他试剂

内切酶 *EcoR* I、*Bgl* II、T4 DNA 连接酶、LA *Taq* 聚合酶(带 GC buffer)、DL2000 DNA Marker 和 *EcoT*14 I digest DNA Marker 购自 TaKaRa 公司; RevertAid<sup>TM</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Fermentas 公司; Trizol<sup>®</sup> LS Reagent 和转染试剂 Lipofectamine<sup>™</sup>2000 购自 Invitrogen 公司; G418、DMEM 干粉(高糖)与胎牛血清购自 Gibco 公司; DNA 片段快速回收试剂盒购自 BioDev-tech 公司; 小量质粒抽提试剂盒购自 Vigrous 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 牛 *sox2* 基因的克隆

根据已发表牛 *sox2* 基因序列(GenBank Accession No. NM-001105463), 设计合成一对引物, 上游引物 bSox2-F: 5'-CCGGAATTCATGTACAACATGATGGAG-3', 下游引物 bSox2-R: 5'-GAAGATCTTACATGTGCGAGAGGG-3', 在上下游引物的 5'端分别引入内切酶 *EcoR* I 与 *Bgl* I 的识别序列, 并加入保护碱基, 由上海生工生物技术有限公司合成, 下划线部分分别为 *EcoR* 和 *Bgl* I 的酶切位点。

采集 4~6 周龄牛胎儿原始生殖嵴, 用 Trizol 试剂从原始生殖细胞(Primordial genital cells, PGC)中提取总 mRNA, 经反转录得到 cDNA, 以 bSox2-F 与 bSox2-R 为引物进行 RT-PCR 反应。反应参数为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 45 s, 54°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 循环 35 次; 72°C 再延伸 10 min。预期 PCR 产物长度应为 963 bp。

### 1.2.2 pMD18-T 载体克隆与测序

PCR 产物经快速回收,回收产物(目的片段)和 pMD18-T 载体在 T4 DNA 连接酶作用下于 16 连接过夜。将连接产物转化感受态菌 TG I, 菌液与 IPTG 和 X-gal 按比例混匀后涂布于含 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素的 LB 平皿上筛选,挑取大小均匀的白斑摇菌,按照质粒抽提试剂盒说明书小量提取质粒,经 *EcoR* 与 *Bgl* 双酶切和 *EcoR* I 单酶切鉴定,将获得的阳性克隆质粒(命名为 pT-sox2)送 TaKaRa 生物公司(大连)测序。用 DNASTar 对所克隆 *sox2* 基因序列与 GenBank 中的序列进行同源性比较分析。

### 1.2.3 pMSCV-sox2 的构建与鉴定

将反转录病毒载体质粒 pMSCVneo 和测序正确的 pT-sox2 用内切酶 *EcoR* 与 *Bgl* 双酶切,琼脂糖凝胶电泳,回收反转录病毒载体 pMSCVneo 和 *sox2* 基因的 DNA 片段, T4 DNA 连接酶连接过夜,连接产物转化感受态菌 TG I, 经含氨苄青霉素(60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的 LB 平皿筛选克隆、提取质粒后,用 *EcoR* 与 *Bgl* 双酶切和 *EcoR* 单酶切鉴定,再送 TaKaRa 生物公司(大连)测序。测序正确的菌株于 37°C 扩增摇菌 100 mL,提取重组反转录病毒表达载体阳性质粒(命名为 pMSCV-sox2, 简写 pMS),测定其核酸浓度,备用。

### 1.2.4 PT67 和 NIH3T3 的 G418 最小致死量测定

将 PT67 和 NIH3T3 以每孔 1000 个细胞接种 24 孔板,每孔分别加入含 0、100、200、300、400、500、600、700  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G418 的培养液,每个浓度梯度作 3 孔重复。期间每 3 天换液,培养 2 周后,所有细胞全部死亡的孔所对应的 G418 浓度即是 PT67 和 NIH3T3 细胞的 G418 最小致死量。

### 1.2.5 病毒颗粒的包装及产毒细胞株的建立

包装细胞 PT67 的培养液为含双抗和 15%胎牛血清的高糖 DMEM,转染前一天将 PT67 细胞按照  $2 \times 10^5/\text{孔}$  接种于 6 孔板,培养 24 h 后用于转染(约 90% 贴壁融合)。用 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 将 pMS 质粒转染 PT67 包装细胞,转染前 6 h,PT67 换无双抗无血清的高糖 DMEM 培养液培养。将 4  $\mu\text{g}$  pMS 质粒和 10  $\mu\text{L}$  Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 分别用 250  $\mu\text{L}$  Opti-MEM<sup>®</sup> I Reduced Serum Medium 进行稀释,室温孵育 5 min,

将二者轻轻混匀,在室温下再孵育 20 min。最后将 DNA 与脂质体的混合物逐滴加至培养孔内,轻轻混匀,在 5%  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度下 37°C 培养。4~6 h 后换成含有 15% FBS 的 DMEM(高糖型)培养液继续培养。

转染 48 h 后按 1:10 传代,第 2 天培养液中添加一定浓度的 G418 进行筛选,2 周后抗性细胞克隆出现,选取 2~3 个形态良好的细胞克隆,用细胞刮子小心刮去其周围的杂散细胞,将细胞克隆传代扩增,细胞生长至完全融合时收集病毒上清,0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤备用。

转染时以 pMIG 质粒作为对照,pMIG 菌液复苏扩增后抽提质粒,经单双酶切鉴定正确后用于转染。在荧光显微镜下观察转染细胞有无荧光,用流式细胞仪测定 pMIG 转染 PT67 包装细胞的效率。病毒上清 25 000 r/min 超速离心浓缩后,扫描电镜观察病毒颗粒的形态。

### 1.2.6 测定重组病毒滴度

用 NIH3T3 测定重组病毒滴度,将 NIH3T3 细胞接种于 24 孔板,至细胞 80%~90% 融合时,将重组反转录病毒上清做 10 倍连续稀释(原液,  $1 \times 10^0$ 、 $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ ),每孔 0.6 mL 病毒液,并加入终浓度 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 polybrene 感染,每个稀释度 3 孔重复,再设 3 孔空白对照。第 3 天用一定浓度 G418 筛选,期间换液,2 周后观察阳性克隆出现情况,计数出现阳性克隆的最大稀释度对应孔中的克隆数,反转录病毒滴度为克隆形成单位(Colony forming units, CFU)/mL = 阳性克隆个数  $\times$  出现阳性克隆的最大稀释度/0.6 mL。

## 2 结果

### 2.1 牛 *sox2* 基因的克隆与测序

用 4~6 周龄牛胎儿 PGC 克隆牛 *sox2* 基因开放阅读框序列,预期 PCR 产物长度应为 963 bp。由于牛 *sox2* 基因的 G、C 碱基含量达到 65%,所以采用扩增复杂二级结构模板专用的 LA *Taq* 聚合酶(带 GC buffer)进行 PCR 扩增,得到预期长度的扩增片段。

所得扩增片段测序后,与已发表的牛 *sox2* 基因序列(GenBank Accession No. NM-001105463)进行同

源性比较分析, 核苷酸序列一致性为 99.6%, 证明所克隆片段为牛 *sox2* 基因开放阅读框序列。克隆片段有 4 个碱基的突变, 其中 132 位与 133 位之间多出 GGC 三个碱基, 474 位 G → A, 对应氨基酸同源率为 99.7%, 其中 132 位与 133 位之间对应多出一个甘氨酸, 474 位则为同义突变。

## 2.2 pMS 的构建与鉴定

目的基因 *sox2* 开放阅读框序列和反转录病毒载体 pMSCVneo 连接后得到 pMS 阳性质粒(图 1), 经 *EcoR* I 单酶切和 *EcoR* I/*Bgl* II 双酶切鉴定正确, 再次测序后进行序列比对, 与 pT-*sox2* 质粒中的 *sox2* 基因序列完全一致。

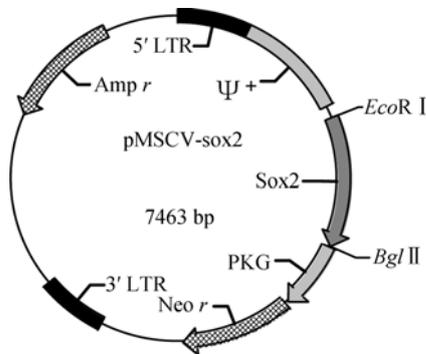


图 1 pMS 质粒结构示意图

Fig. 1 Structure of the recombinant plasmid pMS.

## 2.3 产毒细胞株的建立及包装效率

经 G418 最小致死量测定, PT67 的 G418 最小致死量为 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。pMS 质粒转染后, PT67 细胞经 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G418 筛选 2 周, 得到含 pMS 质粒并能稳定传代的阳性细胞株(图 2A, 2B); 用含有绿色荧光蛋白基因(GFP)的反转录病毒载体质粒——pMIG 作为阳性对照转染 PT67 细胞, 转染 48 h 后在荧光显微镜下观察, 发现部分细胞有荧光(图 2C)。用流式细

胞仪分析, 干细胞反转录病毒重组载体的转染效率约为 68.3% (图 2E)。将病毒上清置于扫描电镜下放大 100 000 倍观察, 可以看到这种干细胞反转录病毒具有典型的病毒颗粒形态(图 2D)。

## 2.4 重组病毒滴度测定

经测定, NIH3T3 细胞的 G418 最小致死量为 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。如图 3 所示, 用 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G418 筛选 2 周后, 空白对照孔中的 NIH3T3 细胞全部死亡; 不同

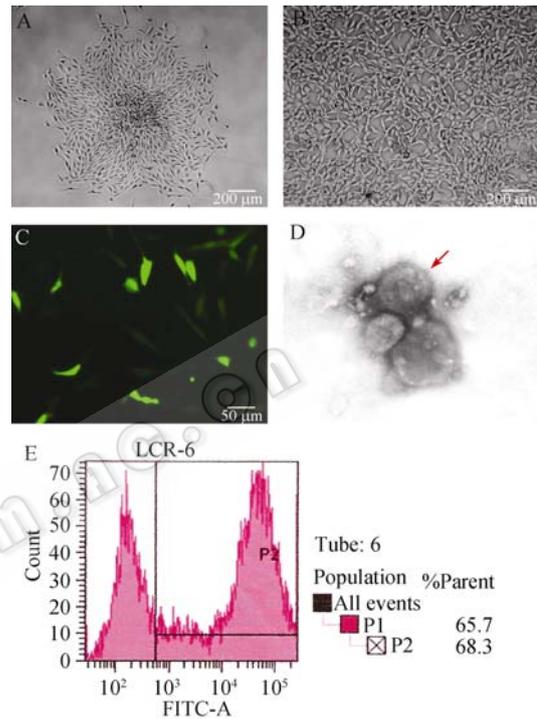


图 2 产毒细胞株的建立

Fig. 2 Establishment of cell line which can package retrovirus granules. (A) The positive clones by G418 selection for two weeks. (B) The cell line after amplification of positive clones. (C) After pMIG as a positive control transfected PT67, some cells show green fluorescence. (D) Scanning electron micrographs of stem cell-retroviral MSCV (100 000 $\times$ ). (E) Flow cytometry analysis of pMIG transfected PT67. Scale bars, 200  $\mu\text{m}$  (A, B) and 50  $\mu\text{m}$  (C).

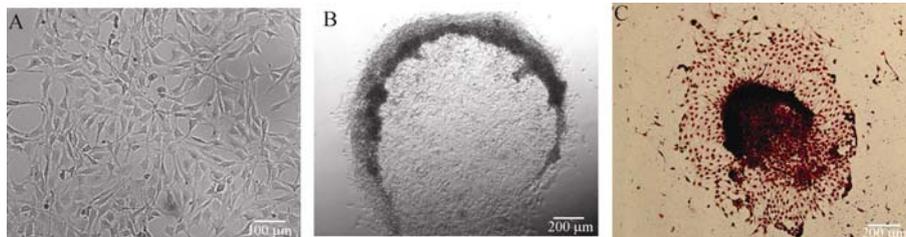


图 3 MSCV-*sox2* 病毒滴度测定

Fig. 3 MSCV-*sox2* virus titer detection. (A) The normal 3T3 Cell morphology. (B) The pie-like positive clones of infected 3T3 after G418 selection for 2 weeks. (C) The other morphology of positive clones by Giemsa stain. Scale bars, 100  $\mu\text{m}$  (A) and 200  $\mu\text{m}$  (B, C).

浓度病毒梯度所感染的孔中,原液孔中出现的阳性克隆数最多,这些克隆有的呈边缘卷起的圆饼状,有的中间细胞堆叠发黑而边缘细胞分散;出现有阳性克隆的最大稀释度为  $1 \times 10^6$ , 3个重复孔计数阳性克隆,平均每孔有 49 个克隆,经计算,MSCV-sox2 病毒滴度为  $8.16 \times 10^7$  CFU/mL。

### 3 讨论

*sox2* 基因在早期胚胎和胚外外胚层的多能性细胞中表达<sup>[10]</sup>;在体外,*sox2* 基因则在未分化的胚胎干细胞(ES 细胞)、胚胎癌细胞(EC 细胞)、原始生殖细胞(PGC)和神经干细胞等体外培养细胞中表达,但随着这些细胞的分化表达下调<sup>[11]</sup>。本实验以取材方便的胎牛原始生殖嵴为材料提取总 RNA,成功克隆出牛 *sox2* 基因开放阅读框序列。值得一提的是,由于牛 *sox2* 基因的 G、C 碱基含量达到 65%,存在较复杂的二级结构,用普通的 *Taq* DNA 聚合酶进行 PCR 扩增,得到的基因片段测序后发现有许多点突变,并有较大段核苷酸缺失,不能用于后续研究;在采用扩增复杂二级结构模板专用的 LA *Taq* 聚合酶(带 GC buffer)进行 PCR 扩增后,得到的扩增片段与已发表的牛 *sox2* 基因序列(GenBank Accession No. NM-001105463)进行同源性比较分析,有 4 个碱基的突变,其中 474 位 G A 为同义突变;而 132 位与 133 位之间多出 GGC 三个碱基,使对应氨基酸序列在第 44 位与 45 位之间多出一个甘氨酸,但并不影响其他氨基酸的编码。由于牛 *sox2* 基因开放阅读框编码的 320 个氨基酸中,在距 N 末端第 43~114 个氨基酸处是 72 个氨基酸的 HMG-box,这个多出的甘氨酸位于 HMG-box 偏 N 末端处,对转录因子 Sox2 的 DNA 结合能力有什么影响仍有待后续研究。

本实验成功构建了含牛 *sox2* 基因的重组反转录病毒载体 pMSCV-sox2。pMSCVneo 载体可用 PT67 细胞进行包装,拥有新霉素抗性基因(Neor),其 5 长末端重复结构(5 LTR)可使目标基因在干细胞和其他哺乳动物细胞中高效表达<sup>[12]</sup>。因此,pMSCVneo 能感染多种动物和人类的不同类型的细胞而无严格的种间组织特异性,是一种理想的多嗜性反转录病毒载体。

外源性 Sox2 转录因子与其他因子组合,可以将哺乳动物体细胞诱导为 iPS 细胞,但到目前为止,体细胞核重编程为 iPS 细胞的分子机理及 Sox2 转录因子在此过程中起何具体作用仍不清楚,可能与 Sox2 和 Oct4 共同调控大量与胚胎干细胞相关基因的表达有直接的关系。Yamanaka<sup>[13]</sup>提出了一个模型,对 iPS 细胞诱导中外源转录因子可能起到的作用进行了描述,他认为 c-Myc 起到打开染色体结构,促进细胞增殖的作用,但同时, c-Myc 还导致细胞的衰老和凋亡,而 Klf4 则阻断了细胞衰老和凋亡的过程,Oct4 促使细胞向 ES 细胞方向发展,在 Sox2 的共同作用下,调控细胞一系列基因的表达,使细胞获得多能性状态。

除了经典的四因子组合,人们尝试减少某些因子,看能否诱导得到 iPS 细胞。George Daley 等<sup>[14]</sup>证明,将 Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 组合中的 Sox2 去掉,就不能得到 iPS 细胞。Huangfu 等<sup>[15]</sup>用一种组蛋白乙酰基转移酶抑制剂——丙戊酸(Valproic acid, VPA)先期处理人成年体细胞,仅用 Oct4 和 Sox2 两个因子诱导成功得到 iPS 细胞,受到科学界的极大重视,认为该项研究开启了用化学品使体细胞核重编程的先河,也为 iPS 细胞诱导的分子机制提供了一个了解的渠道。Jeong BK 等<sup>[16]</sup>用 Oct4 分别与 Klf4 或 c-Myc 组合,以二因子成功诱导小鼠神经干细胞转变为 iPS 细胞,此实验虽然未使用 Sox2 因子,但证实小鼠神经干细胞本身高水平表达内源 Sox2 因子。由于小鼠神经干细胞同时高水平表达 Klf4 和 c-Myc 因子,Jeong BK 等<sup>[17]</sup>又尝试仅以 Oct4 的外源性表达来诱导小鼠神经干细胞,成功得到 iPS 细胞,这些细胞在体外可分化为神经干细胞、心肌细胞和生殖细胞,体内分化能生成畸胎瘤并得到嵌合体。这些研究表明,尽管人们可以用不包含 Sox2 因子在内的一因子或二因子组合来获得 iPS 细胞,但靶细胞必须有内源性 *sox2* 基因的表达作为补偿。由此可见,在人和小鼠的体细胞转变为 iPS 细胞过程中,*sox2* 基因确实起着非常重要的作用。

总之,本实验成功地从胎牛原始生殖嵴中克隆出牛 *sox2* 基因开放阅读框序列,其核苷酸序列和对应的氨基酸序列与发表的牛 *sox2* 基因序列高度同源,

并与反转录病毒载体 pMSCVneo 成功构建 pMSCV-sox2 真核表达载体, 以含 EGFP 的 pMIG 作为阳性对照, 分别转染包装细胞 PT67, 转染效率达到 68.3%; 用 NIH3T3 细胞测定 MSCV-sox2 病毒滴度达到  $8.16 \times 10^7$  CFU/mL, 完全可以满足感染哺乳动物细胞的要求, 为下一步诱导牛成体细胞转变为牛 iPS 细胞打下了坚实的基础。

## REFERENCES

- [1] Gubbay J, Collignon J, Koopman P, *et al.* A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*, 1990, **346**: 245–250.
- [2] Stevanovic M, Zuffardi O, Collignon J, *et al.* The cDNA sequence and chromosomal location of the human SOX2 gene. *Mammal Genome*, 1994, **5**: 640–642.
- [3] Yuan HB, Corbi N, Basilico C, *et al.* Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev*, 1995, **9**: 2635–2645.
- [4] Hayes H, Le Chalony C, Goubin G, *et al.* Localization of ZNF164, ZNF146, GGTA1, SOX2, PRLR and EEF2 on homoeologous cattle, sheep and goat chromosomes by fluorescent in situ hybridization and comparison with the human gene map. *Cytogenet Cell Genet*, 1996, **72**(4): 342–346.
- [5] Harley VR, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. Definition of a consensus DNA binding site for SRY. *Nucl Acids Res*, 1994, **22**: 1500–1501.
- [6] Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, *et al.* Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev*, 2003, **17**: 126–140.
- [7] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, **126**: 663–676.
- [8] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, **131**: 861–872.
- [9] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, **318**: 1917–1920.
- [10] Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, *et al.* Multipotent cell lineages in early mouse development depend on Sox2 function. *Genes Dev*, 2003, **17**: 126–140.
- [11] Yuan HB, Corbi N, Basilico C, *et al.* Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev*, 1995, **9**: 2635–2645.
- [12] Miller AD, Chen F. Retrovirus packaging cells based on 10A1 murine leukemia virus for production of vectors that use multiple receptors for cell entry. *J Virol*, 1996, **70**(8): 5564–5571.
- [13] Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2007, **1**: 39–49.
- [14] Park IH, Zhao R, West JA, *et al.* Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 2008, **451**: 141–146.
- [15] Huangfu D, Osafune K, Maehr R, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol*, 2008, **26**(11): 1269–1275.
- [16] Jeong BK, Holm Z, Guangming W, *et al.* Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature*, 2008, **454**: 646–650.
- [17] Jeong BK, Vittorio S, Guangming W, *et al.* Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*, 2009, **136**: 411–419.

## 快 讯

### 裴钢院士：举全国之力试验大动物干细胞

在 9 月 17 日召开的第二次中国科协论坛“2009 年中国干细胞研究高层战略研讨会”上, 本论坛首席科学家裴钢院士在作“干细胞研究战略”的报告时说, 中国研究干细胞的动物模型, 不能仅停留在小鼠等小动物上, 今后要举全国之力试验大动物——猪、猴子干细胞。

从 1999 年 12 月份, 被评为世界十大科学之首的干细胞研究, 到今年正好 10 年, 它是现代生物学中最受关注的领域, 也是当今国际生命科学和生命技术研究的前沿和制高点。

我国从小鼠、大鼠、兔子、猪到猴子, 这些研究大小不同干细胞的经历, 都是一项项开创性地事业。他说: “在过去的生命科学史上, 谁能够试验某种模式生物, 谁就能占有领先地位……中国干细胞研究领域, 就是要利用世界新的发展浪潮和学术前沿, 使中国生命科学领域能够走向世界前列。”

本次论坛围绕着干细胞领域的发展及未来前景等问题进行深入地研讨, 由裴钢院士主持。参加本次论坛的都是当前国内干细胞研究前沿领域的专家、学者、院士。

来源: 光明日报

Journals.im.ac.cn