



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118773199 A

(43) 申请公布日 2024. 10. 15

(21) 申请号 202410894567.1

(22) 申请日 2021.05.06

(30) 优先权数据

63/020,128 2020.05.05 US

63/021,370 2020.05.07 US

(62) 分案原申请数据

202110489495.9 2021.05.06

(83) 生物保藏信息

PTA-125811 2019.04.03

PTA-125812 2019.04.03

PTA-125813 2019.04.03

PTA-125814 2019.04.03

PTA-125815 2019.04.03

PTA-125816 2019.04.03

PTA-125907 2019.04.03

(71) 申请人 吉纳斯公司

地址 美国威斯康辛州53532,迪弗雷斯特,
河道1525号

(72) 发明人 本杰明·比顿 布莱恩·伯格
迪伦·巴恩斯 马修·坎贝尔
安德鲁·马克·奇根
乔纳森·爱德华·莱特纳
马修·斯科特·库尔伯森
威廉·托马斯·克里斯蒂安森

(74) 专利代理机构 北京市安伦律师事务所
11339

专利代理师 韩景漫 郭扬

(51) Int.Cl.

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/89 (2006.01)

C12N 15/873 (2010.01)

A01K 67/0276 (2024.01)

C12R 1/91 (2006.01)

权利要求书1页 说明书78页
序列表(电子公布)

(54) 发明名称

通过对CD163靶向灭活来改善猪类健康的方法

(57) 摘要

本发明涉及用于在动物(包括猪种群的动物)中预防猪繁殖和呼吸障碍综合症(PRRSV)的方法和组合物。本发明教导涉及其中CD163基因的至少一个等位基因已失活的猪,以及用于在基因编辑中失活CD163基因的具体方法和核酸序列。CD163基因的两个等位基因均失活的猪,对猪繁殖和呼吸障碍综合症(PRRSV)具有抵抗力。包含纯合CD163编辑基因的优良系保留了它们的优异特性。

1. 一种编码猪CD163且在外显子7有缺失的分离的核酸序列,其特征在于,所述核酸序列包括SEQ ID NO:453的核苷酸序列,并能赋予猪猪繁殖和呼吸障碍综合症 (PRRSv) 抗性。

2. 一种分离的细胞,其特征在于,所述分离的细胞的基因组包括权利要求1所述的核酸序列。

3. 一种细胞系,其特征在于,所述细胞系包括复数个权利要求2所述的分离的细胞。

4. 根据权利要求3所述的细胞系,其特征在于,所述分离的细胞是成纤维细胞。

5. 根据权利要求2所述的分离的细胞,其特征在于,所述细胞以ATCC编号PTA-125814、PTA-125815、PTA-125816、PTA-125811、PTA-125907、PTA-125812或PTA-125813保藏。

6. 一种用于编辑猪CD163基因的成对的向导RNAs (gRNAs),包括:

包括由SEQ ID NO:249的核酸序列组成的向导序列的gRNA;以及

包括由SEQ ID NO:256的核酸序列组成的向导序列的gRNA。

7. 一种制造猪繁殖和呼吸障碍综合症 (PRRSv) 抗性猪的方法,所述方法包括:

a) 将Cas9以及由SEQ ID NO:249和256的核酸序列组成的成对的gRNAs导入分离的猪受精卵,进而产生基因组包含内源CD163基因的外显子7纯合缺失的受精卵,其中,所述CD163基因包括SEQ ID NO:453的核酸序列;

b) 将步骤a)中获得的所述受精卵植入雌性受体,从所述植入的受精卵获得猪,其中,通过所述植入获得的所述猪具有包含内源CD163基因的经基因修饰的外显子7纯合缺失的基因组,具有包括所述SEQ ID NO: 453的核酸序列的CD163基因,并对PRRSV具有抗性。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,所述方法包括施用Cas9、包括由SEQ ID NO:249的核酸序列组成的向导序列的gRNA以及包括由256的核酸序列组成的向导序列的gRNA。

9. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,所述Cas9和所述gRNAs作为预形成的核糖核蛋白 (RNP) 复合体导入。

10. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,从所述植入获得的所述猪具有以ATCC编号PTA-125814、PTA-125815、PTA-125816、PTA-125811、PTA- 125907、PTA-125812或PTA-125813保藏的细胞系的基因组。

通过对CD163靶向灭活来改善猪类健康的方法

[0001] 本发明专利申请是申请日为2021-05-06、申请号为202110489495.9和发明创造名称为“通过对CD163靶向灭活来改善猪类健康的方法”的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

本申请要求第63/020,128号、申请日为2020年5月5日的美国临时专利申请和第63/021,370号、申请日为2020年5月7日的美国临时专利申请的权益和优先权。第63/020,128号和第63/021,370号申请分别借引用全文并入于此。

[0003] 对以电子方式提交的序列表的引用

序列表的正式副本通过EFS-Web以ASCII格式电子提交,该文件的文件名为“RD-12-2020-US2-SEQLIST”,创建日期为2021年3月10日,大小为137058字节,与专利说明书同时提交。该ASCII格式文件所包含的序列表系专利说明书的一部分并在此通过引用方式完整纳入本申请。

技术领域

本发明涉及改善猪类健康的方法。具体而言,本发明涉及通过对CD163进行靶向多核苷酸编辑来使猪类(*Sus scrofa*)动物和良种系免受猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)感染的方法,用来防止感染并生成有抗性的动物、畜群和细胞系。

背景技术

[0005] 病毒感染是畜牧业发病率和死亡率的主要来源。具体而言,猪繁殖与呼吸综合征(PRRS)是猪共患的感染性疾病,对世界各地的猪产业造成重大经济损失。PRRS出现在所有年龄的猪身上但是主要导致母猪的晚期流产和死产以及小猪的呼吸系统疾病。该疾病的致病物为正链RNA PRRS病毒(PRRSV)。PRRS是北美、欧洲和亚洲最影响经济的家猪疾病,使北美的养猪者每年花费超过6亿美元在该疾病上。

[0006] 目前没有针对急性PRRS的有效治疗方案。这就导致在农场发现PRRS病例时必须利用清群、充分的清洁/消毒以及适当的尸体处理来消灭病毒。在更极端的情况下,整群清群-复育已经被记录为消灭地方性感染种群的PRRSV的有效方法;但是,该方法会导致重大损失。

[0007] PRRSV疫苗的确存在;但是这些疫苗无法控制该疾病,主要是因为该病毒的结构蛋白质中的基因多样性。因此,防止感染在目前是最好的控制手段。作为预防措施,存在PRRSV的农村或地区的农场必须采用严格的控制手段,包括评估后备母猪和公猪的健康状况以及对新增家畜进行45-60天的隔离和适应。

[0008] 近年来,CD163在PRRS发生中可能起到的作用上得到了更多的关注。尽管PRRSV菌株具有显著的异质性,PRRSV菌株全都拥有对CD163阳性细胞的趋性。虽然CD163是病毒受体,但是CD163清道夫受体也参与了单核细胞粘着至内皮细胞。CD163的功能和详细说明已在Onofre,Gabriela等人ACTA MEDICA,2009,52,57-61中提供。

[0009] CD163是一种130kDa的1型膜蛋白,被认为是PRRS病毒的融合受体;它定位于猪的

染色体5。该基本转录物编码具有1076个氨基酸的蛋白。据报告CD163具有五个异构体；这些异构体中的三个显示它们的胞质区具有不同的剪接形式。但是CD163的基因组分子序列一般包括17个为编码肽信号序列的外显子、9个清道夫受体半胱氨酸富集 (SRCR) 域、2个脯氨酸丝氨酸苏氨酸 (PST) 连接体域、胞质域和短胞质尾。CD163已经被描述为PRRSv受体。蛋白质的5域 (SRCR5) 是病毒的作用位点。CD163的外显子7编码作为体外PRRSv作用位点的SRCR5域 (SRCR5)。Burkard (Burkard, C., PLoS Pathog. 2017, 23, 13, e1006206.) 证明了移除CD163外显子7为猪巨噬细胞赋予了PRRSv抗性。但是该工作中所使用的向导 (陈述为包括SEQ ID NOs: 272和273中的PAM的靶向序列) 可能缺少足够的活性或基因编辑特异性来作为商业性育种项目的一部分。Whitworth及其同事的深入工作包括使用SEQ ID NO: 354和SEQ ID NO: 211中所列向导 (包括PAM), 在外显子7中创建123bp缺失 (Whitworth, K.M., Biol. Reprod., 2014, 91, 1-13)。Whitworth等人 (Whitworth, K.M., Nature Biotechnology, 2016, 34, 20-22) 报告了通过敲除CD163的功能来获取具有PRRSv抗性的猪。

[0010] 基因组编辑包括通过删除、插入或替换特定核酸序列来改变基因组。改变可以具有基因特异性或位置特异性。基因组编辑可以利用位点指向 (site-directed) 核酸酶, 例如Cas蛋白质和它们的同源多核苷酸。

[0011] 成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) 和CRISPR相关蛋白质 (Cas) 构成了CRISPR-Cas系统。

[0012] Cas9是示例性的II型CRISPR Cas蛋白质。Cas9是可被tracrRNA/crRNA编译来利用两个不同的核酸内切酶域 (HNH和类RuvC/RNase H域) 以位点特异性的方式切割DNA靶序列 (参见2014年3月6日公布的公布号为2014-0068797的美国专利申请; 亦见Jinek, M., 等人, Science, 337: 816-821 (2012) 及Karvelis等人 Genome Biology (2015) 16: 253)。

[0013] 前述的CD163编辑虽然展示了针对PRRSv的一些效用证明, 但是无法与本发明所公布的编辑一样精确而高效。利用向导编辑CD163基因以获得更好的编辑活性和更少的意外编辑以改善猪群的健康并赋予其PRRSv抗性是有需求的。

发明内容

[0014] 本专利说明书提供并包括经编辑的CD163基因, 这些基因赋予包括经编辑基因的猪PRRSv抗性。

[0015] 在一些具体实施方式中, 本发明提供并包括赋予猪PRRSv抗性的经编辑的CD163基因, 其中该编辑切除了外显子7, 并且经编辑的基因可包括SEQ ID NOs: 426-458和520-555中任一项所列的经修复的基因组序列。在一些构型中, 经编辑的基因可包括选自SEQ ID NOs: 426-458组成的组的经修复的基因组序列。在各种构型中, 经修复的基因序列可包括SEQ ID NO: 426、SEQ ID NO: 427、SEQ ID NO: 428、SEQ ID NO: 429、SEQ ID NO: 430、SEQ ID NO: 431、SEQ ID NO: 432、SEQ ID NO: 433、SEQ ID NO: 434、SEQ ID NO: 435、SEQ ID NO: 436、SEQ ID NO: 437、SEQ ID NO: 438、SEQ ID NO: 439、SEQ ID NO: 440、SEQ ID NO: 441、SEQ ID NO: 442、SEQ ID NO: 443、SEQ ID NO: 444、SEQ ID NO: 445、SEQ ID NO: 446、SEQ ID NO: 447、SEQ ID NO: 448、SEQ ID NO: 449、SEQ ID NO: 450、SEQ ID NO: 451、SEQ ID NO: 452、SEQ ID NO: 453、SEQ ID NO: 454、SEQ ID NO: 455、SEQ ID NO: 456、SEQ ID NO: 457、SEQ ID NO: 458、SEQ ID NO: 520、SEQ ID NO: 521、SEQ ID NO: 522、SEQ ID NO: 523、SEQ ID NO: 524、SEQ ID

NO:525、SEQ ID NO:526、SEQ ID NO:527、SEQ ID NO:528、SEQ ID NO:529、SEQ ID NO:530、SEQ ID NO:531、SEQ ID NO:532、SEQ ID NO:533、SEQ ID NO:534、SEQ ID NO:535、SEQ ID NO:536、SEQ ID NO:537、SEQ ID NO:538、SEQ ID NO:539、SEQ ID NO:540、SEQ ID NO:541、SEQ ID NO:542、SEQ ID NO:543、SEQ ID NO:544、SEQ ID NO:545、SEQ ID NO:546、SEQ ID NO:547、SEQ ID NO:548、SEQ ID NO:549、SEQ ID NO:550、SEQ ID NO:551、SEQ ID NO:552、SEQ ID NO:553、SEQ ID NO:554或SEQ ID NO:555。在各种构型中,该编辑可利用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:229和256、SEQ ID NOs:230和256、SEQ ID NOs:231和256、SEQ ID NOs:237和256、SEQ ID NOs:241和256、SEQ ID NOs:229和258、SEQ ID NOs:230和258、SEQ ID NOs:231和258、SEQ ID NOs:237和258、SEQ ID NOs:241和258、SEQ ID NOs:229和261、SEQ ID NOs:230和261、SEQ ID NOs:231和261、SEQ ID NOs:237和261、SEQ ID NOs:241和261、SEQ ID NOs:219和256、SEQ ID NOs:221和256、SEQ ID NOs:224和256、SEQ ID NOs:227和256、SEQ ID NOs:219和258、SEQ ID NOs:221和258、SEQ ID NOs:224和258、SEQ ID NOs:227和258、SEQ ID NOs:219和261、SEQ ID NOs:221和261、SEQ ID NOs:224和261、SEQ ID NOs:227和261、SEQ ID NOs:249和256、SEQ ID NOs:250和256、SEQ ID NOs:249和258、SEQ ID NOs:250和258、SEQ ID NOs:249和261或SEQ ID NOs:250和261。在各种构型中,该编辑可利用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:229和256、SEQ ID NOs:230和256、SEQ ID NOs:231和256、SEQ ID NOs:241和256、SEQ ID NOs:229和258、SEQ ID NOs:231和258、SEQ ID NOs:241和258、SEQ ID NOs:219和256、SEQ ID NOs:221和256、SEQ ID NOs:224和256、SEQ ID NOs:227和256、SEQ ID NOs:227和258、SEQ ID NOs:221和261、SEQ ID NOs:249和256、SEQ ID NOs:250和256、SEQ ID NOs:249和258或SEQ ID NOs:249和261。

[0016] 在各种构型中,该编辑可利用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:229和256。在各种构型中,该编辑可利用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:230和256。在各种构型中,该编辑可利用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:231和256。在各种构型中,该编辑可利用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:237和256。在各种构型中,该编辑可利用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:241和256。在各种构型中,该编辑可利用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:229和258。在各种构型中,该编辑可利用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:230和258。在各种构型中,该编辑可利用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:231和258。在各种构型中,该编辑可利用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:237和258。在各种构型中,该编辑可利用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:241和258。在各种构型中,该编辑可利用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:229和261。在各种构型中,该编辑可利用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:230和261。在各种构型中,该编辑可利用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:231和261。在各种构型中,该编辑可利用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:237和261。在各种构型中,该编辑可利用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:241和261。在各种构型中,该编辑可利用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:219和256。在各种构型中,该编辑可利

用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:221和256。在各种构型中,该编辑可利用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:224和256。在各种构型中,该编辑可利用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:227和256。在各种构型中,该编辑可利用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:219和258。在各种构型中,该编辑可利用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:221和258。在各种构型中,该编辑可利用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:224和258。在各种构型中,该编辑可利用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:227和258。在各种构型中,该编辑可利用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:219和261。在各种构型中,该编辑可利用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:221和261。在各种构型中,该编辑可利用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:224和261。在各种构型中,该编辑可利用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:227和261。在各种构型中,该编辑可利用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:249和256。在各种构型中,该编辑可利用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:250和256。在各种构型中,该编辑可利用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:249和258。在各种构型中,该编辑可利用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:250和258。在各种构型中,该编辑可利用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:249和261。在各种构型中,该编辑可利用成对的gRNAs来创建,其中成对的gRNAs可以为SEQ ID NOs:250和261。在各种构型中,经修复的基因组序列可以包括SEQ ID NO:453,该编辑可利用SEQ ID NOs:249和256中列出的序列来创建。

[0017] 在各种构型中,本发明提供并包括可包括根据当前教导的CD163基因的猪细胞。在一些构型中,本发明进一步提供和包括可包括复数个所述猪细胞的细胞系。在一些构型中,该细胞系可以为成纤维细胞系。在各种构型中,所述细胞、所述复数个细胞,或细胞系可衍生自PIC系2、PIC系3、PIC系15、PIC系19、PIC系27、PIC系62或PIC系65。本发明进一步提供了可包括复数个所述细胞的胚胎、小猪或成熟的成年猪。

[0018] 本发明还提供了赋予猪PRRSv抗性的经编辑的CD163基因,其中所述编辑创建了终止密码子,这导致了预期的外显子7氨基酸序列,所述外显子7氨基酸序列可选自由506-517组成的组。在各种构型中,该氨基酸序列可被描述在SEQ ID NO:506(Ala His Arg)、SEQ ID NO:507、SEQ ID NO:508、SEQ ID NO:509、SEQ ID NO:510、SEQ ID NO:511、SEQ ID NO:512、SEQ ID NO:513、SEQ ID NO:514、SEQ ID NO:515、SEQ ID NO:516或SEQ ID NO:517中。在各种构型中,预期的外显子7氨基酸序列可以在SEQ ID NO:513中列出。在一些构型中,该编辑可利用gRNAs来创建,该gRNAs选自以下序列组成的组:SEQ ID NOs:351和365、SEQ ID NOs:351和387、SEQ ID NOs:348和390、SEQ ID NOs:348和388、SEQ ID NOs:348和395、SEQ ID NOs:352和365、SEQ ID NOs:352和387、SEQ ID NOs:352和399、SEQ ID NOs:353和365、SEQ ID NOs:353和387、SEQ ID NOs:353和399、SEQ ID NOs:354和390、SEQ ID NOs:354和388、SEQ ID NOs:354和395、SEQ ID NOs:358和361、SEQ ID NOs:358和362、SEQ ID NOs:358和368、SEQ ID NOs:358和384、SEQ ID NOs:358和394、SEQ ID NOs:358和399、SEQ ID NOs:359和390、SEQ ID NOs:359和388、SEQ ID NOs:359和395、SEQ ID NOs:360和368、SEQ ID NOs:360和384、SEQ ID NOs:360和389、SEQ ID NOs:360和394、SEQ ID NOs:360和397、SEQ

ID NOs:361和365、SEQ ID NOs:361和387、SEQ ID NOs:362和390、SEQ ID NOs:362和388、SEQ ID NOs:362和395、SEQ ID NOs:364和365、SEQ ID NOs:364和387、SEQ ID NOs:364和399、SEQ ID NOs:365和368、SEQ ID NOs:365和384、SEQ ID NOs:365和389、SEQ ID NOs:365和394、SEQ ID NOs:365和397、SEQ ID NOs:366和368、SEQ ID NOs:366和384、SEQ ID NOs:366和389、SEQ ID NOs:366和394、and SEQ ID NOs:366和397。在各种构型中,该编辑可利用gRNAs来创建,该gRNAs选自以下序列组成的组:SEQ ID NOs:351和365、SEQ ID NOs:348和390、SEQ ID NOs:348和388、SEQ ID NOs:354和390、SEQ ID NOs:358和394、SEQ ID NOs:362和390,和SEQ ID NOs:366和394。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:351和365。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:351和387。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:348和390。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:348和388。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:348和395。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:352和365。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:352和387。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:352和399。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:353和365。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:353和387。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:353和399。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:354和390。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:354和388。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:354和395。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:358和361。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:358和362。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:358和368。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:358和384。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:358和394。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:358和399。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:359和390。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:359和388。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:359和395。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:360和368。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:360和384。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:360和389。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:360和394。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:360和397。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:361和365。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:361和387。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:362和390。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:362和388。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:362和395。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:364和365。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:364和387。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:364和399。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:365和368。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:365和384。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:365和389。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:365和394。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:365和397。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID

NOs:366和368。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:366和384。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:366和389。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:366和394。在各种构型中,用于创建编辑的gRNAs可以为SEQ ID NOs:366和397。

[0019] 在各种构型中,经编辑的CD163基因可具有选自SEQ ID NOs:459-504组成的组的核酸序列。在各种构型中,经修复的基因可具有以下序列中描述的核酸序列:SEQ ID NO:459,460,461,462,463,464,465,466,467,468,469,470,471,472,473,474,475,476,477,478,479,480,481,482,483,484,485,486,487,488,489,490,491,492,493,494,495,496,497,498,499,500,501,502,503或504。在各种构型中,经修复的基因可具有SEQ ID NO:489中列出的核酸序列。在各种构型中,预期的外显子7氨基酸序列可以在SEQ ID NO:513中列出。在各种构型中,该基因的预期氨基酸序列可以是SEQ ID NO:513,经修复的基因可具有SEQ ID NO:489中列出的核酸序列,该编辑可利用中SEQ ID NOs:362和390列出的序列来创建。

[0020] 本发明提供并包括可包括包括上述的外源终止密码子的经编辑的CD163基因的猪细胞。本发明还提供了可包括复数个包括外源终止密码子的经编辑的CD163基因的细胞的细胞系。在一些构型中,该细胞系可为成纤维细胞系。在各种构型中,该细胞可衍生自PIC系2、PIC系3、PIC系15、PIC系19、PIC系27、PIC系62或PIC系65。本发明还提供并包括胚胎、小猪或成熟的成年猪,这些胚胎、小猪或成熟的成年猪包括可包括包括外源终止密码子的经编辑的CD163基因的复数个细胞。

[0021] 在各种具体实施方式中,本发明提供并包括用于编辑猪CD163基因的成对的gRNAs,该成对的gRNAs具有下列序列号中列出的序列:SEQ ID NOs:229和256、SEQ ID NOs:230和256、SEQ ID NOs:231和256、SEQ ID NOs:237和256、SEQ ID NOs:241和256、SEQ ID NOs:229和258、SEQ ID NOs:230和258、SEQ ID NOs:231和258、SEQ ID NOs:237和258、SEQ ID NOs:241和258、SEQ ID NOs:229和261、SEQ ID NOs:230和261、SEQ ID NOs:231和261、SEQ ID NOs:237和261、SEQ ID NOs:241和261、SEQ ID NOs:219和256、SEQ ID NOs:221和256、SEQ ID NOs:224和256、SEQ ID NOs:227和256、SEQ ID NOs:219和258、SEQ ID NOs:221和258、SEQ ID NOs:224和258、SEQ ID NOs:227和258、SEQ ID NOs:219和261、SEQ ID NOs:221和261、SEQ ID NOs:224和261、SEQ ID NOs:227和261、SEQ ID NOs:249和256、SEQ ID NOs:250和256、SEQ ID NOs:249和258、SEQ ID NOs:250和258、SEQ ID NOs:249和261、SEQ ID NOs:250和261、SEQ ID NOs:351和365、SEQ ID NOs:351和387、SEQ ID NOs:348和390、SEQ ID NOs:348和388、SEQ ID NOs:348和395、SEQ ID NOs:352和365、SEQ ID NOs:352和387、SEQ ID NOs:352和399、SEQ ID NOs:353和365、SEQ ID NOs:353和387、SEQ ID NOs:353和399、SEQ ID NOs:354和390、SEQ ID NOs:354和388、SEQ ID NOs:354和395、SEQ ID NOs:358和361、SEQ ID NOs:358和362、SEQ ID NOs:358和368、SEQ ID NOs:358和384、SEQ ID NOs:358和394、SEQ ID NOs:358和399、SEQ ID NOs:359和390、SEQ ID NOs:359和388、SEQ ID NOs:359和395、SEQ ID NOs:360和368、SEQ ID NOs:360和384、SEQ ID NOs:360和389、SEQ ID NOs:360和394、SEQ ID NOs:360和397、SEQ ID NOs:361和365、SEQ ID NOs:361和387、SEQ ID NOs:362和390、SEQ ID NOs:362和388、SEQ ID NOs:362和395、SEQ ID NOs:364和365、SEQ ID NOs:364和387、SEQ ID NOs:364和399、SEQ ID NOs:365和368、

SEQ ID NOs:365和384、SEQ ID NOs:365和389、SEQ ID NOs:365和394、SEQ ID NOs:365和397、SEQ ID NOs:366和368、SEQ ID NOs:366和384、SEQ ID NOs:366和389、SEQ ID NOs:366和394,或SEQ ID NOs:366和397。在一些构型中,成对的gRNAs可以具有下列序列号中列出的序列:SEQ ID NOs:229和256、SEQ ID NOs:230和256、SEQ ID NOs:231和256、SEQ ID NOs:241和256、SEQ ID NOs:229和258、SEQ ID NOs:231和258、SEQ ID NOs:241和258、SEQ ID NOs:219和256、SEQ ID NOs:221和256、SEQ ID NOs:224和256、SEQ ID NOs:227和256、SEQ ID NOs:227和258、SEQ ID NOs:221和261、SEQ ID NOs:249和256、SEQ ID NOs:250和256、SEQ ID NOs:249和258、SEQ ID NOs:249和261、SEQ ID NOs:351和365、SEQ ID NOs:348和390、SEQ ID NOs:348和388、SEQ ID NOs:354和390、SEQ ID NOs:358和394、SEQ ID NOs:362和390、或SEQ ID NOs:366和394。在各种构型中,成对的gRNAs可以具有SEQ ID NOs:249和256中列出的序列。在各种构型中,成对的gRNAs可以具有SEQ ID NOs:362和390中列出的序列。

[0022] 本发明提供并包括用于编辑猪CD163基因的CRISPR复合体,其包括本发明中的成对的gRNAs。

[0023] 本发明提供并包括一种用于编辑猪CD163基因的方法,该方法包括使用CRISPR-CAS复合体,该CRISPR-CAS复合体包括本发明中的成对的gRNAs。

[0024] 本发明提供并包括一种通过使用CRISPR-CAS复合体来制备PRSSV抗性猪细胞的方法,该CRISPR-CAS复合体包含本发明中的成对的gRNAs。

[0025] 本发明提供并包括一种生产PRSSV抗性猪类动物的方法,包括a)使用包含本发明中的成对的gRNAs的CRISPR复合体,编辑一个或复数个猪细胞的CD163基因;以及b)用所述一个或复数个细胞生产动物。

[0026] 本发明提供并包括根据本发明的细胞系在生产PRRSV抗性动物中的用途。

[0027] 本发明还提供并包括了包括复数个根据本发明的细胞的胚胎、小猪或成熟的成年猪。

[0028] 在各种具体实施方式中,本发明提供并包括一种确定是否存在与SEQ ID NO:453中所列的序列具有90%或95%同一性的经编辑的序列的方法,该方法包含使用以下项进行实时PCR:a)SEQ ID NO:564和SEQ ID NO:558或561中所列的序列的差异标记探针;b)SEQ ID NOs:562和563中所列的引物对;以及c)SEQ ID NOs:556和557或SEQ ID NOs:559和560中所列的引物对。在一些构型中,经编辑的序列可以与SEQ ID NO:453中所列的序列具有100%同一性。在一些构型中,经编辑的序列可以与SEQ ID NO:453中所列的序列具有90%同一性。在一些构型中,经编辑的序列可以与SEQ ID NO:453中所列的序列具有95%同一性。

[0029] 在各种具体实施方式中,本发明提供并包括选自由以下序列组成的组的PCR引物:SEQ ID NO:556、SEQ ID NO:557、SEQ ID NO:559、SEQ ID NO:560、SEQ ID NO:562,和SEQ ID NO:563。在一些构型中,PCR引物可以具有SEQ ID NO:556中所列的序列。在各种构型中,PCR引物可以具有SEQ ID NO:557中所列的序列。在各种构型中,PCR引物可以具有SEQ ID NO:559中所列的序列。在各种构型中,PCR引物可以具有SEQ ID NO:560中所列的序列。在各种构型中,PCR引物可以具有SEQ ID NO:562中所列的序列。在各种构型中,PCR引物可以具有SEQ ID NO:563中所列的序列。

[0030] 在一些具体实施方式中,本发明提供并包括选自由以下序列组成的组的实时PCR探针:SEQ ID NO:558、SEQ ID NO:561,和SEQ ID NO:564。在一些构型中,探针具有SEQ ID NO:558中所列的序列。在各种构型中,探针具有SEQ ID NO:561中所列的序列。在各种构型中,探针具有SEQ ID NO:564中所列的序列。

[0031] 在各种具体实施方式中,本发明提供并包括下列序列中列出的PCR引物在确定是否存在SEQ ID NO:453中所列的经编辑的基因组序列中的用途:a)SEQ ID NOs:556和557以及SEQ ID NOs:562和563或b)SEQ ID NOs:559和560以及SEQ ID NOs:562和563。

[0032] 在各种具体实施方式中,本发明提供并包括下列序列中列出的PCR探针在确定是否存在SEQ ID NO:453中所列的经编辑的基因组序列中的用途:a)SEQ ID NOs:558和564或b)SEQ ID NOs:561和564。

[0033] 在各种具体实施方式中,本发明提供并包括一种创建PRRSv抗性猪的方法,该方法包含编辑猪基因组以包含SEQ ID NO:453中所列的基因组序列。在一些构型中,编辑猪基因组可以包括施用具有SEQ ID NOs:249和256中所列序列的gRNAs。在各种构型中,施用包括向受精卵、胚胎或MII卵母细胞注射包括gRNAs和CAS蛋白的预形成RNP复合体。在各种构型中,猪为PIC™系2(猪改良有限公司,贝辛斯托克,英国)、PIC™系3、PIC™系15、PIC™系19、PIC™系27、PIC™系62或PIC™系65的猪。

[0034] 在各种具体实施方式中,本发明提供并包括一种猪类动物,其包括赋予猪PRRSv抗性的经编辑的基因,其中编辑切除了外显子7,且经编辑的基因包含SEQ ID NO:453中所列的经修复的基因组序列。在一些构型中,编辑可以使用具有SEQ ID NOs:249和256中所列序列的向导RNAs(gRNAs)进行。在各种构型中,该动物可以是PIC™系2、PIC™系3、PIC™系15、PIC™系19、PIC™系27、PIC™系62或PIC™系65的经编辑的动物。在各种构型中,本发明提供并包括从本发明的动物制备的细胞。在各种构型中,本发明提供并包括从根据本发明的细胞制备的细胞系。在一些构型中,该细胞系可以是成纤维细胞系。

[0035] 在一些具体实施方式中,本发明提供并包括一种被编辑以赋予猪PRRSv抗性的CD163基因,其中编辑切除了外显子7,并且经编辑的基因包含SEQ ID NO:453中所列的经修复的基因组序列。在一些构型中,该编辑的创建使用了SEQ ID NOs:249和256中所列序列。在各种构型中,本发明提供了包含根据本发明的CD163基因的猪细胞。在一些构型中,本发明提供了包含复数个根据本发明的细胞的细胞系。在一些构型中,该细胞系可以是成纤维细胞系。在各种构型中,细胞可以分离自PIC系2、PIC系3、PIC系15、PIC系19、PIC系27、PIC系62或PIC系65。

[0036] 在各种具体实施方式中,本发明提供并包括用于编辑猪CD163基因的成对的gRNAs,其包括SEQ ID NOs:249和256中所列的向导序列。

[0037] 在各种具体实施方式中,本发明提供并包括一种创建PRRSv抗性猪的方法,该方法包含编辑猪的基因组以包括SEQ ID NO:453中所列的基因组序列。在一些构型中,编辑猪基因组可以包含施用具有SEQ ID NOs:249和256中所列序列的gRNAs。在一些构型中,施用可以包括向受精卵、胚胎或MII卵母细胞注射包括gRNAs和CAS蛋白的预形成RNP复合体。在各种构型中,猪可以是PIC™系2、PIC™系3、PIC™系15、PIC™系19、PIC™系27、PIC™系62或PIC™系65的猪。

PIC™系27的代表性样本于2019年4月3日保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)

中,并指定了ATCC专利保藏号PTA-125907。

PICTM系19的代表性样本于2019年4月3日保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)中,并指定了ATCC专利保藏号PTA-125811。

PICTM系62的代表性样本于2019年4月3日保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)中,并指定了ATCC专利保藏号PTA-125812。

经CD163编辑的PICTM系65的代表性样本于2019年4月3日保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)中,并指定了ATCC专利保藏号PTA-125813。

经CD163编辑的PICTM系2的代表性样本于2019年4月3日保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)中,并指定了ATCC专利保藏号PTA-125814。

经CD163编辑的PICTM系3的代表性样本于2019年4月3日保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)中,并指定了ATCC专利保藏号PTA-125815。

经CD163编辑的PICTM系15的代表性样本于2019年4月3日保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)中,并指定了ATCC专利保藏号PTA-125816。

具体实施方式

[0038] 本发明的各个方面包括但不限于通过靶向灭活CD163来改善猪类健康的特定方法,它是可变的并为本领域的技术人员所理解。应当被进一步理解的是本发明所用的所有术语都仅仅是为了描述特定方面,而不是为了以任何方式或范围进行限制。举例而言,在说明书和权利要求中使用时,单数形式“a”“an”和“the”可指代复数,除非上下文以其他方式明确的注明。另外,所有的单位、前缀和符号都可以用它们的SI接受形式(SI accepted forms)来表示。说明书内描述的数字范围包括限定该范围的数字并包括所定义的范围内的每一个整数。

[0039] 为了使本申请更加容易被理解,首先对某些术语进行定义。除非另有限定,本发明所使用的所有技术和科学术语的含义与本申请相关的领域内普通技术人员一般理解的含义相同。与本发明所述的方法和材料相似、修改过或等同的许多方法和材料可被用于实施本申请的各个方面,而无需进行过度的实验。本发明已经描述了优选的材料和方法。在描述和主张本申请的各个方面时,下述的术语经从下文的定义。

[0040] 在本发明中,“动物细胞”意为包括但不限于体细胞、培养细胞、配子细胞、血细胞、受精卵和胚胎细胞的细胞。这些动物细胞可以为生殖细胞或非生殖细胞。在本发明中,细胞可以从动物或胚胎中分离并被在组织培养中保持。还包括混合培养物,该混合培养物可包括根据本说明书的基因编辑细胞以及非基因编辑支持细胞或饲养细胞。

[0041] 在本发明中,术语“基因被编辑”、“被基因编辑”和“被基因组编辑”是指利用自然发生或人工设计的核酸内切酶(常常被称为“归巢内切酶”或“靶向内切酶”)实施归巢技术。“基因组编辑”和“基因编辑”是指通过删除、插入或替换具体核酸序列来改变基因组。这种改变可以具有基因或位置特异性,但是无需改变基因序列本身。基因组编辑可使用核酸内切酶(如CRISPR系统)来切核酸,从而生成改变位点。别的核酸内切酶也可以利用并适于使用;但是脱位(off-site)切除和特异性可能是重大问题。在类似CRISPR的系统以及其它系统中,核酸酶可通过与多核苷酸(在此称为“靶序列”)复合以被指引向目标位点,从而导入位点特异性DSB。不受理论的限制,DSB可被内源性非同源性末端接合(NHEJ)机制修复。

[0042] 很多已知的核酸内切酶都适于并已经被适用于基因编辑。基因编辑方法在本领域是已知的,包括成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)系统(如CRISPR/Cas9系统)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALENs)以及包括锌指核酸酶(ZFNs)在内的基因编辑核酸酶。基因被编辑的动物与转基因动物可通过外源性DNA序列-特别是与来自后者中外来物种的序列具有同一性的序列-的并入来辨别。在此,该术语包括并提供引入不超过10个核苷酸的小型删除和插入。该术语还涵盖动物后代,例如通过对初代基因被编辑的动物进行有性杂交或无性繁殖获得的动物后代。

[0043] 在本发明中,术语“修复模板”或“修复序列”是指被导入正在基因组的核酸酶靶向位置进行DSB修复的细胞以引导修复并实现准确和选择性编辑的多核苷酸。修复模板可被用于选择性改变或删除位于具有DSB的基因座的序列并一般包括5'基因组杂交区和3'基因组杂交区。在一个方面,5'基因组杂交区和3'基因组杂交区具有至少80%的同源性。在一个方面,5'基因组杂交区和3'基因组杂交区具有同一性。下文提供了对根据本发明的修复模板的进一步说明。对于删除模板,基因组的连续区域可通过删除一个或一个以上核苷酸来分开。单独碱基的靶向编辑可利用包括基因组连续区域并具有一个或一个以上碱基变化的修复模板来制备,包括添加终止密码子。修复模板与基因组连续区域百分比同一性可利用无缝对齐达到80%至100%之间。在本发明中,修复模板内同一性的核心区的侧翼可以是与目标染色体区域具有80%至100%同源性的侧翼同源区。不受理论限制,核心区同一性可提升修复过程的精确度,而两侧的同源扩展区提升了效率并允许为了编辑进行细胞间基因型变异。

[0044] 在本发明中,术语“野生型”或“WT”是指主导自然猪群或猪系的表型、基因型或基因。当用于比较基因被编辑的细胞和特定系的动物的表型和基因型时,术语“野生型”是指基因未编辑的细胞以及同一系的动物。在一个方面,本发明提供了对类似品种并具有类似基因背景是经编辑的猪和未编辑的猪的比较。在一个方面,本发明提供了对相同种系的经编辑的猪和未经编辑的猪的比较。

[0045] 在本发明中,术语“敲除”是指通过减少或移除其表达来干扰基因功能。可通过在染色体中创造双链断裂(DSB)来实现敲除,双链断裂然后可利用非同源性末端接合(NHEJ)或通过同源介导修复(HDR)进行DNA修复模板或靶向载体的同源性重组来修复。不受理论限制,HDR敲除可通过微同源介导的末端连接提供修复模板来插入、删除或编辑基因组序列来实现。还可以通过替换载体或“打完即走”(hit-and-run)载体或随机插入基因捕获载体导致完全、部分或有条件丧失基因功能来实现敲除。

[0046] 本发明对在核苷酸序列中跨越一定范围的删除的引用包括所列范围内的所有核苷酸。举例而言,从核苷酸“a”到核苷酸“e”中删除5碱基对意为核苷酸“a”、“b”、“c”、“d”和“e”中的每一个都已被删除(“b”“c”“d”位于“a”和“e”之间)。

[0047] 在本发明中,术语“编辑”包括多核苷酸的核苷酸序列(如例如基因、编码DNA序列(CDS)或非编码DNA序列)中相对于野生型序列的改变。术语“编辑”可包括插入、删除、剪接供体位点编辑、点编辑及类似操作。

[0048] 在本发明中,术语“成簇规律间隔短回文重复序列”或“CRISPR”指代利用基因材料的CRISPR片段及其产生的RNA片段和酶来识别和修改其它有机体的基因组中的特定DNA序列的基因编辑系统。CRISPR系统包括I型、II型和III型CRISPR系统。在本发明中,术语

“CRISPR相关蛋白质”或“Cas”指代可与CRISPR要素严格相关并总是靠近CRISPR片段的重复簇出现的蛋白质家族。举例而言,Cas蛋白质可包括但不限于Cas9家族成员蛋白质、Cas6家族成员蛋白质(例如Csy4和Cas6)以及Cas5家族成员蛋白质。Cas蛋白质家族和识别它们的方法的实施例已公开在Haft,Daniel H.,等人,PLoS Comput.Bio.,2005,1,e60中。

[0049] 虽然不受任何特定科学理论的限制,CRISPR核酸酶可与向导RNA(gRNA)形成复合体,向导RNA其与互补目标核酸分子杂交从而引导CRISPR核酸酶前往目标核酸分子。crRNA包括重复序列和可与侵入的病原体中的特定前间隔序列互补的间隔序列。间隔序列可被设计为与真核生物基因组中的靶序列互补。在激活型中,CRISPR核酸酶可与它们各自的crRNAs相关联。本说明书提供并包括crRNA,该crRNA可包括RNA间隔序列,该RNA间隔序列包括SEQ ID NOs:22至271和347至425中的每一个的前20个核苷酸。在本发明中,SEQ ID NOs:22至271和347至425中的每一个,用尿苷替代胸苷并用核糖替代脱氧核糖,提供并包括对应的RNA序列。并且,如本文中所用,SEQ ID NOs包括靶向的基因组序列中存在的PAM(见下文)。本领域的技术人员将认识到靶向该序列的gRNA将不包括PAM,因而也将认识到具有这些SEQ ID NOs中所列序列的gRNA将仅包括前20个核苷酸,因此排除了PAM。

[0050] 一些CRISPR核酸酶,如CasX和Cas9,会需要另一个未编码RNA成分-称为反式激活crRNA(tracrRNA)-从而具有功能活性。包含间隔序列的crRNA可以共价连接至tracrRNA的5'端成为一个核酸分子,我们称之为“单一向导RNA”(sgRNA),其中间隔序列包括选自SEQ ID NOs:22至271中每一个的前20个核苷酸和SEQ ID NOs:347至425中每一个的前20个核苷酸组成的组,如Jinek等人,Science,337,2012,816-821中所述。在本发明中,tracrRNA亦称为“向导RNA主链”或“主链”序列。如本文中所用,gRNA包括单一向导RNA或单独分子,其包含用于与单独的tracrRNA共同使用的、crRNA中的间隔序列。gRNA可引导激活的Cas复合体前往与crRNA中的间隔序列互补的目标位点,在此Cas核酸酶可切割目标位点。crRNA可具有与潜在DNA靶序列具有互补性的区域以及可与tracrRNA形成碱基对氢键来形成二级结构-一般形成至少一个杆状结构-的第二区域。与DNA靶序列具有互补性的区域可以为间隔物或间隔序列。tracrRNA和crRNA可通过许多碱基对氢键来互相作用以形成二级RNA结构。tracrRNA/crRNA和Cas9蛋白质之间形成复合体可导致辅助结合DNA的Cas9蛋白质的构型变化、Cas9蛋白质的核酸内切酶活性以及核酸内切酶Cas9进行的crRNA引导的具有位点特异性的DNA切割(Svitashev等人,Nature Communications,2016,7,113274)。在实践中,20个核苷酸及向导RNA主链可为(可从待体内(细胞中)或体外(通过T7聚合酶)转录的启动子表达的)DNA以形成RNA向导,或者向导RNA主链可以为化学合成的双(crRNA和trRNA)向导或单一向导RNA。

[0051] 对于用来切割双链DNA靶序列的Cas9蛋白质/tracrRNA/crRNA复合体,DNA靶序列可与同源前间区序列邻近基序(PAM)邻近。通过将crRNA设计为具有适当的间隔序列,复合体可被靶向以在关注基因座(例如希望进行序列修改的基因座)进行切除。

[0052] 各种II型CRISPR-Cas系统crRNA和tracrRNA序列以及相关的预期二级结构在本领域内是已知的(参见例如Ran,F.A.,等人,Nature,2015,520,186-191;Fonfara等人,Nucleic Acids Research,2014,42,2577-2590)。Ran等人提出的II型CRISPR-Cas系统也提供在了本发明的一个方面中。

[0053] II型CRISPR-Cas系统的间隔物可根据所使用的Cas蛋白质与位于PAM的5'或3'的

核酸靶序列杂交。PAM基于所使用的Cas多肽可有所不同。举例而言,如果使用来自酿脓链球菌(*S. pyogenes*)的Cas9,那么PAM可以为包括5'-NRR-3'序列的核酸靶序列中的序列,其中R可以为A或G,N为任意核苷酸并且N直接就是被核酸靶结合序列靶向的核酸靶序列的3'。优选地,酿脓链球菌的PAM包括5'-NGG-3'。在另一个实施例中,如果使用来自嗜热链球菌(*S. thermophilus*)CRISPR3(Sther CR3)的Cas9,那么PAM可以为包括5'-nGGnG-3'序列的核酸靶序列中的序列(参见Sapranauskas等人,Nucleic Acids Research,2011,39,9275-9282)。

[0054] 其它的Cas蛋白质识别其它的PAM,而本领域的技术人员可以确定用于任何特定Cas蛋白质的PAM。本领域内适于与根据本说明书的靶向序列一起使用的已知CAS蛋白质和系统越来越多。参见Shah等人,RNA Biol.,2013,10,891-899。下表1提供了CAS系统及其PAM序列的代表性示例。

[0055] 表1:示例性CRISPR/Cas系统

Cas9 种类/变体	PAM 序列	
酿脓链球菌 (SP); SpCas9	3' NGG	Wu 等人, <i>Nat Biotechnol.</i> , 2014, 32, 670-676
SpCas9 D1135E 变体	3' NGG (NAG 结合减少)	Nishimasu 等人, <i>Science</i> , 2018, 361, 1259-1262.
SpCas9 VRER 变体	3' NGCG	Nishimasu 等人 (2018)
SpCas9 EQR 变体	3' NGAG	Nishimasu 等人 (2018)
SpCas9 VQR 变体	3' NGAN or NGNG	Nishimasu 等人 (2018)
金黄色葡萄球菌 (SA); SaCas9	3' NNGRRT 或 NNGRR(N)	Kleinstiver 等人, <i>Nature</i> , 2015, 523, 481-485
氨基酸球菌属 (AsCpf1)和毛螺科菌 (LbCpf1)	5' TTTV	Fagerlund, R.,等人, 2015, <i>Genome Biology</i> , 16, 251
AsCpf1 RR 变体	5' TYCV	Nishimasu 等人, <i>Mol Cell.</i> , 2017, 67, 139-147
LbCpf1 RR 变体	5' TYCV	Nishimasu 等人 (2017)
AsCpf1 RVR 变体	5' TATV	Nishimasu 等人 (2017)
脑膜炎奈瑟球菌 (NM)	3' NNNNGAT	Hou 等人, 2013, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 110, 15644-156449
齿垢密螺旋体 (TD)	3' NAAAAC	Sun 等人, <i>Biotechnol J.</i> , 2018, 13, e1700588
空肠弯曲菌 (Cj)	NNNNRYAC	Kim,等人, <i>Nat Commun.</i> , 2017, 8, 14500.
嗜热链球菌 CR1 (St)	NNAGAAW	Toth 等人, 2016, <i>Biol Direct.</i> , 11, 46
嗜热链球菌 CR3	nGGnG	Müller 等人, <i>Mol Ther.</i> , 2016, 24,636-644

依靠任意CRISPR/CAS系统的方法可具有下文为酿脓链球菌序列提供的NRR (例如

NGG和NAA) PAM序列或可具有为嗜热链球菌序列提供的NGGNG的PAM序列。表3和序列表提供了靶向序列和染色体位置。本领域的技术人员应当理解具有不同PAM要求的已知CAS系统可被设计以识别和利用本发明公开的靶序列。修改的实施例已经呈现在表1中。

[0056] 术语“CRISPR/CasN或“CRISPR/CasN系统”指代用于基因编辑的可设计核酸酶系统,该系统包括CasN(例如Cas2,Cas5,Cas6,Cas9等)蛋白质或其衍生物以及可为CasN提供CRISPR RNA(crRNA)和反式激活RNA(tracrRNA)功能的一个或一个以上非编码RNA。crRNA和tracrRNA可被单独或组合使用以生成“向导RNA”(gRNA)。crRNA或gRNA可提供与基因组目标互补的序列。

[0057] 术语“Cpf1”或“CAS12”指代另一个可设计的2类CRISPR-Cas系统的RNA引导核酸内切酶,其被描述和用于基因编辑(Zetsche等人,Cell,163:759-771,2015)。该系统可使用来自Cpf1蛋白质家族的非特异性核酸内切酶单元,其切割特异性由单一crRNA(缺少tracrRNA)赋予。与Cas9类似,Cpf1编码序列可与本发明所描述的UTR序列融合以改善其稳定性以及因此获得的基因编辑方法的效率。

[0058] 在本发明中,术语“转录激活因子样效应物核酸酶”或“TALENs”指代被设计为实现给定DNA序列靶向修改的核酸酶。TALENs可包括与TALE DNA结合域融合的非特异性DNA切割核酸酶,TALE DNA结合域可被设计以允许靶向基因编辑。“TALE DNA结合域”或“TALE”可为包括一个或一个以上TALE重复域/单元的多肽。重复域可参与TALE与其同源目标DNA序列的结合。单一“重复单元”(亦称为“重复”)的长度可为33-35个氨基酸并表现出与自然生成的TALE蛋白质内的其它TALE重复序列的至少一些序列同源性。“被设计的”DNA结合蛋白质可以为非自然产生的蛋白质,其设计/组成主要是理性规范的结果。TALENs已在Joung等人,Nat.Rev.Mol.Cell.Biol.,2013,14,49-55中被讨论和公开。“选定TALE”可为自然界中未发现的蛋白质,其生产成果主要是来自实证过程如噬菌体展示、相互作用陷阱或杂交选择。本说明书提供并包括对本发明所述的猪使用TALENs。

[0059] “抗性”或“抗病性”指代有机体抵御和/或承受病原体攻击并保持不受影响的程度。有机体可展现完全的抗性,是指它几乎不受病原体的影响。或者,有机体可展现部分抗性,其中病原体影响有机体的程度小于无抗性的对照有机体。抗性可能来自有机体的特定性质,使有机体避免有机体-病原体相互作用的后果。可通过有机体能够避免与病原体相关的疾病症状、或减少临床征象的发生/严重程度、或减少与病原体相关的临床症状来证明抗性。

[0060] 术语“抗性提高”或“易感性降低”指代与给定病原体感染相关的临床征象或临床症状的发生率和/或严重程度的数据的显著降低。举例而言,术语“抗性提高”或“易感性降低”指代相对于具有未修改染色体序列的对照动物、与在CD163基因蛋白质中包括已删除或灭活的染色体序列的动物身上PRRSv感染相关的临床征象或临床症状的发生率和/或严重程度的数据的显著降低。术语“临床症状数据显著降低”意为但不限于受试者中修改组的至少一个临床症状的发生频率以及在某些方面在接受感染剂后临床症状比未修改对照组在数据上至少降低了80%。

[0061] 在本发明中,术语“临床征象的发生和/或严重程度降低”或“临床症状减少”意为相对于其它方面基因背景相似的野生型感染减少组中受感染受试者的数量、减少或消除显示感染临床征象的受试者的数量或降低一个或多个受试者存在的任意临床征象的严重程

度。举例而言,这些术语涵盖在与其它方面相似的背景对比时的任意感染临床征象、肺部病变、病毒血症、抗体生成、病原体负荷降低、病原体脱落、病原体转移减少或PRRS的任意临床征象。未经编辑的CD163猪和经CD163编辑的猪的临床征象的对比可以单独或成群进行。在一个方面,单独的猪没有呈现临床征象。在一个方面,经CD163编辑的猪群呈现更少的临床征象。在一个方面,畜群的规模可以为至少100只动物。在一个方面,根据本说明书的经CD163编辑的猪可具有更少的繁殖综合征的临床征象。在一个方面,经CD163编辑的猪群的早产仔猪数量减少、死胎或僵死小猪数量减少、PRRSv阳性小猪数量减少或者母猪回归工作的延迟缩短。在一个方面,根据本说明书的经CD163编辑的猪中的母猪和后备母猪的临床征象可以更少,包括但不限于更少的厌食症、更少的发烧、更少的嗜睡、更少的肺炎、更少的乳泌缺乏以及更少的皮下及后肢水肿。在一个方面,根据本说明书进行CD163编辑的后备母猪和母猪可具有更少的耳朵及外阴红蓝褪色。在一个方面,经CD163编辑的母猪可显示断奶后更快地回到发情期。本说明书提供并包括经CD163编辑的后备母猪和母猪群的死亡率更低。本说明书还提供和包括肥育猪的临床征象减少。在一个方面经CD163编辑的肥育猪群呼吸系统的临床征象减少,这些临床征象选自发烧、打喷嚏、呼吸增强、呼吸困难、咳嗽、肺炎、嗜睡、眼周水肿以及眼鼻分泌物组成的组。优选地,相对于没有在CD163基因中进行修改并且具有相似背景并且被感染的受试者,这些临床征象在根据本发明的一种或一种以上动物身上减少了至少10%。在一个方面,临床征象在根据本发明的受试者身上减少了至少80%。在另一个方面,临床征象在根据本发明的猪身上减少了至少85%。在又一个方面,临床征象在根据本发明的猪身上减少了至少90%。在再一个方面,临床征象在根据本发明的猪身上减少了至少95%。在根据本发明的各个方面,相对于未编辑CD163的猪,临床征象可被减少80%至100%。

[0062] 本发明中的术语“育种”指代包括选择优秀的雄性动物和优秀的雌性动物用于繁殖下一代后裔的过程。该过程进一步包括结合雄性和雌性配偶子以进行受精。此类结合可通过配对(交配)或通过体外或体内人工方法来发生。此类人工方法可包括但不限于人工授精、手术辅助的人工授精、体外受精、卵母细胞胞浆内单精子注射、透明带钻孔法、受精的卵母细胞体外培养、卵巢转移以及卵巢分割。本发明中所用的术语“育种”还可包括将受精的卵母细胞移入雌性动物的生殖系统以为特定的精英雌性获得更多的后代。

[0063] 在本发明中,“参考序列”是用作序列对比基础的限定序列。参考序列可以为整个指定序列的子集;例如,作为完整长度的启动子序列的片段或整个启动子序列。在一个方面,参考序列可以为Sscrofa11.1参考基因组(基因库存取号:GCA_000003025.6)。

[0064] 本发明所用的与两个或两个以上核苷酸或蛋白质序列相关的术语“同一性百分比”或“相同百分比”是通过以下方式来计算:(i) 在比较窗口期比较两个对得最齐的序列(核苷酸或蛋白质),(ii) 确定(核苷酸序列的)相同核酸碱基或(蛋白质的)氨基酸残基发生在两个序列中的位置的数量以生成匹配位置的数量,(iii) 将匹配位置的数量除以比较窗口期位置的总数量,以及然后(iv) 将该商乘以100%以得到同一性百分比。如果“同一性百分比”是结合参考序列来计算而没有指定特定的比较窗口期,那么同一性百分比可通过将对齐区域的匹配位置的数量除以参考序列的总长度来确定。相应的,为了实现本申请的目的,当两个序列(待查和目标)对得最齐(对齐时允许存在间隙)时,待查序列的“同一性百分比”可等于两个序列之间相同位置的数量除以整个查询序列(或比较窗口期)位置的总数,

然后乘以100%。当序列同一性的百分比被用于蛋白质时,识别到不相同的残基位置的差别常常是保守性氨基酸替换,其中氨基酸残基可被替换为具有相似化学性质的其它氨基酸残基(例如电荷或疏水性)并因此不会改变分子的功能特性。当序列的差别在于保守型替换时,序列同一性百分比可向上调整以校正替换的保守性质。差别在于此类保守型替换的序列被叫做具有“序列相似性”或“相似性”。

[0065] 为了将序列对得最齐以计算它们的同一性百分比,各种成对或多序列对齐算法和程序在本领域内都是已知的,例如ClustalW或基本局部对齐检索工具(BLAST[®],国家医药图书馆,马里兰州贝塞斯达市)等,它们可被用于比较两个或多个核苷酸或蛋白质序列之间的同一性百分比或相似性。虽然别的对齐和比较方法在本领域内是已知的,但是两个序列之间的对齐和同一性百分比(包括上述的同一性百分比范围)可通过ClustalW算法来确定,参见例如Chenna,R.,等人,Nucleic Acids Research,2003,31,3497-3500;Thompson,J.D.,等人,Nucleic Acids Research,1994,22,4673-4680;Larkin MA等人,Bioinformatics,2007,23,2947-2948;以及Altschul,S.F.,等人,J.Mol.Biol.,1990215,403-410。

[0066] 本发明所使用的与序列的同一性可表达为根据两个序列的对齐确定的这两个序列之间的同一性百分比。本说明书提供了可与基因组连续区域具有至少80%同一性的修复模板序列。在一个方面,修复模板可具有与基因组的连续区域具有至少80%同一性的5'区域和3'区域以及与位于目标基因编辑位点侧翼的染色体序列具有同一性的核心区域。

[0067] 本说明书提供并包括但不限于与选自SEQ ID NOs:22至271和347至425组成的组的靶序列100%相同的靶序列。这些靶序列可包括PAM序列,如表1所列的PAM序列。相应的,当并入向导RNA时,在一个方面间隔区域可与选自SEQ ID NOs:22至271中每一个的前20个核苷酸和SEQ ID NOs:347至425中每一个的前20个核苷酸组成的组的序列具有100%的同一性。还包括可具有SEQ ID NOs:22至271中每一个的15至20个核苷酸和SEQ ID NOs:347至425中每一个的15至20个核苷酸的间隔序列(该序列的剩余部分可包括可存在于基因组中但不存在于gRNA分子中的PAM序列)。还包括并提供了可具有靶序列的一个或一个以上错配的向导RNA间隔序列。在一个方面,错配可位于序列靶序列的远端以确保保持核酸内切酶切割位点的同一性。一般地,错配可相对于3'端的核酸酶位点发生在靶序列的5'端。在一个方面,靶序列或自其制备的向导RNA的间隔序列可具有单一错配。在另一个方面,靶序列或自其制备的向导RNA的间隔序列可具有两(2)个错配。在另一个方面,序列或自其制备的向导RNA的间隔序列可具有三(3)个错配。在另一个方面,序列或自其制备的向导RNA的间隔序列可具有四(4)个错配。在某些方面,错配区域可局限于远离PAM序列和切割位点的终端核苷酸。

[0068] 在一个方面,靶序列和gRNA向导的间隔序列与选自SEQ ID NOs:22至271中每一个的前20个核苷酸和SEQ ID NOs:347至425中每一个的前20个核苷酸组成的组的序列具有至少90%的同一性。在另一个方面,RNA向导在序列的3'端的15个核苷酸可具有至少90%的同一性和100%的同一性。在一个方面,靶序列和RNA向导可具有至少95%的同一性。在另一个方面,RNA向导在序列的3'端的15个核苷酸可具有至少95%的同一性或100%的同一性。在一个方面,靶序列和RNA向导可具有至少96%的同一性。在另一个方面,RNA向导在序列的3'端的15个核苷酸可具有至少96%的同一性或100%的同一性。在一个方面,靶序列和RNA

向导可具有至少97%的同一性。在另一个方面, RNA向导在序列的3'端的15个核苷酸可具有至少97%的同一性或100%的同一性。在一个方面, 靶序列和RNA向导可具有至少98%的同一性。在另一个方面, RNA向导在序列的3'端的15个核苷酸可具有至少98%的同一性或100%的同一性。在一个方面, 靶序列和RNA向导可具有至少99%的同一性。在另一个方面, RNA向导在序列的3'端的15个核苷酸可具有至少99%的同一性或100%的同一性。在一个方面, 靶序列和RNA向导可具有至少100%的同一性。本说明书还包括和提供了可包括SEQ ID NOs:22至271中每一个的前15个核苷酸或SEQ ID NOs:347至425中每一个的前15个核苷酸的间隔序列。在一个方面, 该间隔序列可包括SEQ ID NOs:22至271中每一个的前16个核苷酸或SEQ ID NOs:347至425中每一个的前16个核苷酸。在一个方面, 该间隔序列可包括SEQ ID NOs:22至271中每一个的前17个核苷酸或SEQ ID NOs:347至425中每一个的前17个核苷酸。在一个方面, 该间隔序列可包括SEQ ID NOs:22至271中每一个的前18个核苷酸或SEQ ID NOs:347至425中每一个的前18个核苷酸。在一个方面, 该间隔序列可包括SEQ ID NOs:22至271中每一个的前19个核苷酸或SEQ ID NOs:347至425中每一个的前19个核苷酸。

[0069] 本发明在提及猪育种时所使用的“受精”的优选含义涵盖生产可用胚胎的任意技术。受精既可包括对母猪授精, 也包括体外或离体受精。存在三种常用的为母猪授精的方法, 即传统人工授精(AI)、宫腔内授精(IUI)和深度宫腔内授精(DIUI)。这些技术全都依赖于提供通常是新鲜未冷冻的一定剂量的精液来进行授精。体外受精(IVF)可以为收取未受精卵母细胞, 然后在体外(即在实验室中)而不是在体内(即在活的动物体内; 授精已在上文进行了讨论)用精液使这些卵母细胞受精, 如同在进行标准胚胎移植(ET)。受精的卵母细胞或来自卵母细胞贡献者的胚胎然后可被移植入另一个雌性体内(胚胎接收者)。胚胎移植可以认为从一个雌性(胚胎贡献者)收取受精的卵母细胞或胚胎并将这些胚胎移植至繁殖状态与贡献者同步的另一个雌性体内(胚胎接收者)。

[0070] 如Cameron等人(Nat Methods, 2017, 14, 600-606)所述, CRISPR-Cas9系统可被用于在基础研究和生物技术中的基因组编辑。CRISPR和相关技术在基因或基因组编辑上的应用可能伴随有意外的脱靶切割活性以及可能的病原性和其它消极表型结果。为了减少脱靶切割, 最近已经研发了各种全基因组实验方法, 但是某些方法由于细胞环境或恢复相关切割位点的效率不足可能有失偏颇。关于方法, Cameron等人文章中公开的SITE-SEQ[®]测定(Caribou生物科学公司, 加州伯克利)使人能全面列出样本基因组中的Cas9切割位点, 然后探测这些位点以在后续实验中进行细胞脱靶编辑, 方法如下: (1) 抽取并纯化高分子量基因组DNA; (2) 执行Cas9核糖核蛋白体外切割; (3) 碎片化、接头连接(adapter ligation)并亲和纯化以富集Cas9切割碎片以及(4) 为ILLUMINA[®](ILLUMINA[®], 加州圣地亚哥)序列扩增SITE-SEQ[®]库并建立索引(参见Cameron等人, Nat Methods, 2017, 14, 600-606.)。发现和减少潜在脱靶编辑的各种其他方法在基因组编辑领域内是已知的。虽然此类生物信息学工具对于识别合适的靶序列来说是无价的, 但是其误差率一般高于期望值而该方法局限于系统缺少广泛的序列数据时。另外, DSB断裂修复的精确度会有变化, 因而混淆了预测和防止意外脱靶效果的能力。计算机模拟的选定靶序列的进一步测试可识别选定效率高且脱靶切割少的序列。细胞培养系统中的测试结合高通量测序方法可被用于识别表现差的目标构建体。

[0071] 举例而言,II型CRISPR系统,其衍生自酿脓链球菌(*S. pyogenes*),可利用Cas9重构于哺乳动物细胞中,是确定特异性的CRISPR RNA(crRNA),其包括主链序列和选自SEQ ID NOs:22至271中每一个的前20个核苷酸和SEQ ID NOs:347至425中每一个的前20个核苷酸组成的组的序列,以及辅助反式激活RNA(tracrRNA)。术语“脱靶效果”广泛地指代与靶上处理或过程的结果不同及不是为了获取靶上处理或过程的结果的任何影响。脱靶编辑的实施例可包括在非预期位置的双链断裂导致在DNA中插入非预期的核苷酸或修复模板、删除或重新排列。对于一些系统,例如酿脓链球菌和嗜热链球菌CRISPR系统,crRNA和tracrRNA成对物可被融合以生成单一向导RNA(sgRNA)。sgRNA的前20个核苷酸可与目标DNA互补并可以为间隔区域,并且这20个核苷酸可在3'端接上基因组(不是向导)中的前间区序列邻近基序(PAM)。在一个方面,sgRNA的前20个核苷酸和PAM序列可以为选自SEQ ID NOs:22至271和347至425组成的组的序列。相应的,如下表2及SEQ ID NOs:22至271和347至425所提供的,来自酿脓链球菌或嗜热链球菌的Cas核酸酶的具体靶向可伴有将crRNAs与主链序列结合。虽然sgRNA的20个核苷酸的向导序列加上PAM序列(例如23至25个核苷酸)可提供严格控制的靶向和切割,已经发现脱靶切割活性仍然出现在DNA序列上,并带有在sgRNA向导序列的PAM远端部分的3-5个碱基对错配。另外,不同类型的向导RNA结构实际上影响了切割精度、增加或减少脱靶位点上的切割。各种技术以及对脱靶切割的进一步说明已在Zhang等人,Mol Ther Nucleic Acids,2015,4,e264中探讨。对脱靶切割的机制和效果的理解依然贫乏,这表明预测和补偿该效果比较难。但是,结果可能很严重;脱靶切割会最终导致基因不稳定并干扰其它正常基因的功能。

[0072] 本说明书提供并包括可具有在CD163的两个等位基因中进行灭活编辑并可抵抗PRRSv感染的猪。本发明所公开的CD163猪进一步不包括新的序列或多肽,也不包括源自移码或错义突变导致的非本体氨基酸。

[0073] 本发明公开的基因编辑允许保护CD163阳性胎儿(例如具有一个或两个野生型CD163等位基因的胎儿)。只要母兽在她的CD163等位基因中拥有灭活编辑,CD163阳性胎儿在子宫中就可免受PRRSv感染(PCT/US2018/027944)。举例而言,CD163基因的两个等位基因总都具有灭活编辑的母兽可与具有两个野生型CD163等位基因的雄性交配,而所得的杂合胎儿将在子宫内免受PRRSv感染。

[0074] 在一个方面,在CD163的一个等位基因中具有灭活编辑的猪可利用根据本说明书的方法来获得。这些具有杂合CD163等位基因(一个被编辑,另一个是野生型)的猪可与也具有杂合CD163等位基因或纯合编辑CD163等位基因的别的猪育种,而从该育种获得的具有纯合编辑CD163等位基因的后代可被选定具备PRRSv感染抗性。本发明还提供和包括猪类动物和族群以及创造或改进猪类动物和族群的方法,其中动物可被纯合以获得一个或一个以上特定遗传标记或等位基因。在各种方面,本发明提供并包括动物以及创造或改进杂交猪类动物和族群的方法,该方法通过生成能纯合以获得一个或一个以上特定遗传标记或等位基因并将所述动物与被纯合以获得一个或一个以上特定遗传标记或等位基因的其它动物杂交以生产可被纯合以获得一个或一个以上特定遗传标记或等位基因的动物。在一些方面,可能需要多轮杂交和/或回交来获得纯合度以获得每一个特定遗传标记和等位基因。在别的方面,单次杂交就可能足以获得纯合度。

[0075] 本领域内已知的各种技术都可以被用于对基因灭活以创造敲除动物和/或将经编

辑基因导入动物以生产创始动物并创建动物系,其中敲除或核酸构建体可被整合入基因组。此类技术可包括但不限于原核基因微注射法(美国专利号:4,873,191)、逆转录病毒介导基因转移进入生殖细胞系(Van der Putten等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1985,82,6148-1652)、基因瞄准胚胎干细胞(Thompson等人,Cell,1989,56,313-321)、胚胎电穿孔(Lo,Mol.Cell.Biol.,1983,3,1803-1814)、精液介导的基因转移(Lavitrano等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,2002,99,14230-14235;Lavitrano等人,Reprod.Fert.Develop.,2006,18,19-23)以及体细胞(如卵丘或乳腺细胞或成人、胎儿或胚胎干细胞)体外变形,然后进行核移植(Wilmut等人,Nature,1997,385,810-813和Wakayama等人,Nature,1998,394,369-374)。原核基因微注射法、精液介导的基因转移以及体细胞核转移是其他有用的方法。动物可以被进行基因组编辑使它所有的细胞-包括它的生殖细胞系细胞-都具有该编辑。当使用生产在修改时是嵌合体的动物的方法时,该动物可以为嵌合体并还可以同系交配,而基因组被编辑的后代可利用标准方法来生产和选定。如果动物的细胞处于胚泡期,可以利用例如克隆来生产嵌合动物,或者当单个细胞被编辑时可以进行基因组编辑。在一个方面,灭活的敲除编辑可以是纯合性的。

[0076] 在胚胎/受精卵微注射方面,核酸构建体、mRNA、蛋白质、多核苷酸或其组合可被导入受精卵。在一个方面,可使用一个或两个细胞受精卵。一个和两个细胞受精卵可提供含有来自原生质内的精核和卵子的遗传材料的可见核结构。在一个方面,原核阶段受精卵可体外或体内(即通过手术从供体动物的输卵管回收)获得。在另一个方面,体外受精卵利用本领域已知的方法从例如收集的猪卵巢吸取卵泡来生产,参见例如Agung等人,J Reprod Dev.,2013,59,103-106和Appeltant等人,J Reprod Dev.,2016,62,439-449。在一个方面,成熟的卵母细胞可被提供用于体外受精方法。在另一个方面,成熟卵母细胞可用根据本说明书的CRISPR/Cas基因编辑系统来注射。

[0077] 本说明书进一步提供了成熟卵母细胞的体外受精。在一个方面,卵母细胞可如上文所述体外成熟。在另一个方面,可从后备母猪收集成熟卵母细胞。根据已确立的方法来进行体外受精。参见Appeltant等人,J Reprod Dev.,2011,57,9-16和Fowler等人,Reprod Biol.,2018,18,203-211。

[0078] 可通过人工授精和冲洗来获得受精卵或胚胎用于生殖细胞系编辑。收集的受精卵或胚胎然后可利用本发明提供的方法来编辑。在一个方面,线性化核酸构建体、mRNA、蛋白质、多核苷酸或其组合可通过例如电穿孔被注射或以其它方式导入原核之一或受精后受精卵或胚胎的细胞质或受精前的配子细胞。在一个方面,包括Cas核酸酶蛋白和向导RNA的预形成RNP复合体可被制备并注射入胚胎、受精卵或卵母细胞,该向导RNA包括SEQ ID NO:19的主链和选自SEQ ID NOs:22至271和347至425中任一的靶向序列。在另一个方面,包括Cas核酸酶和向导RNA的预形成RNP复合体可被制备并与包括表6所列的SEQ ID NOs:1至13的修复模板一起注射入胚胎、受精卵或卵母细胞,该向导RNA包括SEQ ID NO:19的主链和选自SEQ ID NOs:22至271中每一个的前20个核苷酸和SEQ ID NOs:347至425中每一个的前20个核苷酸组成的组的序列的RNA序列的间隔序列。本说明书还包括并提供可具有表6所述的SEQ ID NOs:1至13的序列的间隔序列和修复模板的组合。在一个方面,注入的受精卵或胚胎可被转移至雌性受体(例如进入雌性受体的输卵管)并允许在雌性受体体内发育以生产转基因或基因编辑动物。在一个方面,该方法进一步提供了体外或体内受精受精卵或胚胎,

其可以在15,000x g条件下被离心机分离5分钟以沉积脂质,实现对原核的查看。可利用EPPENDORF® FEMTOJET® (EPPENDORF®有限公司,德国)注射器来注射受精卵或胚胎,并培养受精卵和胚胎,直至胚泡形成。可记录胚胎切割和胚泡形成的速度和质量。

[0079] 在一个方面,CRISPR/Cas编辑系统和gRNA可作为核酸结构来提供。在另一方面中,Cas核酸酶可作为mRNA、并与包含主链序列和导向序列的向导RNA一起提供,导向序列选自自由每个SEQ ID NOs:22至271的前20个核苷酸和每个SEQ ID NOs:347至425的前20个核苷酸组成的组。在另一方面中,Cas核酸酶可作为mRNA、并与包含主链序列和导向序列的向导RNA以及表6中列出的修复模板一起提供,导向序列选自自由每个SEQ ID NOs:22至271的前20个核苷酸组成的组,修复模板选自自由SEQ ID NOs:1至13组成的组。在又一方面中,基因靶向复合物可通过显微注射编码Cas核酸酶的可转录DNA和包含主链序列和导向序列的向导RNA来提供,导向序列选自自由每个SEQ ID NOs:22至271的前20个核苷酸和每个SEQ ID NOs:347至425的前20个核苷酸组成的组。在根据本说明书的方面中,主链序列可以是SEQ ID NO:19的序列。本说明书还包括并提供了导向序列和修复模板的组合,修复模板可具有SEQ ID NOs:1至13中列出的序列之一。本领域技术人员将理解,可以将核酸酶、gRNA和(可选择地)修复模板序列的各种组合引入卵母细胞、受精卵、囊胚和胚胎中,以实现本发明方法的目标。还应理解,其他主链序列可与SEQ ID NOs:22至271和SEQ ID NOs:347至425的导向序列连同使用,以与其他Cas核酸酶一起使用。任意具有NGG或NGGNG的PAM序列的Cas核酸酶可适于制备用于与本说明书的导向序列组合的主链序列。在各个方面中,所需的编辑可具有SEQ ID NOs:426至505的最终基因组序列。在一些配置中,所需的编辑缺少外显子7,且可具有如SEQ ID NOs:426至458中所述的最终核苷酸序列。在各种配置中,最终基因组序列可包括外源性终止密码子,且可具有如SEQ ID NOs:459-504中所述的最终基因组序列。在各种配置中,这些部分CD163基因可以具有如SEQ ID NOs:506至517中所述的外显子7氨基酸序列。

[0080] 在一方面中,经注射的受精卵或胚胎可被移植到受体雌性(例如,移植到受体雌性的输卵管中),并被允许在受体雌性中发育,以繁育转基因或基因编辑的动物。在一方面中,该方法进一步提供体外或体内受精的受精卵或胚胎,其可在15000×g下用离心机分离5分钟以沉积脂质,从而允许原核的显色。受精卵或胚胎可使用例如

EPPENDORF®FEMTOJET®注射器进行注射,并可培养至囊胚形成。可以记录胚胎卵裂率、囊胚形成率和质量。

[0081] 本说明书提供并包括具有一个或多个胚胎的受体母猪。根据本发明,可向其胚胎注射CRISPR/Cas/gRNA组合。在一方面中,可提供包含Cas核酸酶和向导RNA的预制RNP复合物,其中的向导RNA包含SEQ ID NO:19的主链及选自自由每个SEQ ID NOs:22至271中的前20个核苷酸及每个SEQ ID NOs:347至425中的前20个核苷酸组成的组的间隔区序列。在各个方面中,可以提供两种预形成RNP复合体,其包含Cas核酸酶和向导RNA,其中的向导RNA包含SEQ ID NO:19的主链,每个向导RNA包含选自自由SEQ ID NOs:22至271中每一个的前20个核苷酸和SEQ ID NOs:347至425中每一个的前20个核苷酸组成的组的不同的间隔序列。本发明还提供和包括了可具有一个或多个胚胎的受体母猪,其胚胎注射有预制RNP复合物,该预制RNP复合物可包含Cas核酸酶和向导RNA,向导RNA包含选自自由每个SEQ ID NOs:22至271中的前20个核苷酸及每个SEQ ID NOs:347至425中的前20个核苷酸组成的组的导向序列。在一方面中,可制备预制RNP复合物,并将其与表6中所列的修复模板(SEQ ID NOs:1至

13)一起注射到胚胎、受精卵或卵母细胞中。在一方面中,受体母猪可以是与供体胚胎不同系的母猪。

[0082] 胚胎或受精卵可以手术移植到同步受体的子宫中。通常情况下,可以通过使用导管,将100-200(或150-200)个胚胎或受精卵置入输卵管的壶腹部峡部连接处。术后,可进行实时超声妊娠检查。在一方面,本说明书可包括具有1至100个,但更典型地为30至60个经CRISPR/Cas/gRNA组合处理的胚胎的受体母猪,其中该胚胎可包含经基因编辑的CD163基因,该经基因编辑的CD163基因包含SEQ ID NOs:1至18或426至505的序列。在一方面中,移植的胚胎可包含经编辑细胞的嵌合体。本发明还包括了CD163基因编辑的胚胎,其可以是非嵌合体。

[0083] 改善家畜或家畜群健康的方法可包括修改动物细胞基因组中的靶序列,以形成截短的CD163多肽。本发明还提供并包括可具有截短的CD163多肽的改良动物。在某些方面,预期的截短多肽不包括非天然氨基酸。不受理论限制,截短的基因产物可以在体内被细胞蛋白酶快速消化。在本说明书的一方面中,截短的CD163可导致蛋白质的完全消除。在另一方面中,在体内,截短的CD163可以是不可检测的。在一个方面中,使用免疫荧光标记和FACS分析时,截短的CD163可以是不可检测的。在又一方面中,当使用说明书中提供的任何表达分析方法(包括实施例5中提供的方法)时,截短的CD163可以是不可检测的。在又一方面中,当使用说明书中提供的任何表达分析方法(包括实施例8中提供的方法)时,截短的CD163可以是不可检测的。

[0084] 在另一方面中,经基因编辑的CD163猪可以包含具有不多于25个非天然氨基酸的截短的CD163基因。不受理论的限制,截短的CD163蛋白质可以是不稳定的,并可以在细胞内被靶向降解。相应地,包含非天然氨基酸的CD163蛋白质序列和CD163多肽可以是不可检测的。在另一方面中,预期的截短的CD163蛋白质可包含不多于211个天然蛋白质氨基酸。在一方面中,截短的CD163蛋白质可被预期为包含不多于144个天然蛋白质氨基酸。在一方面中,截短的CD163蛋白质可被预期为包含不多于133个天然蛋白质氨基酸。在又一方面中,截短的CD163蛋白质可被预期为包含不多于129个天然蛋白质氨基酸。在一方面中,截短的CD163蛋白质可被预期为包含不多于113个天然蛋白质氨基酸。在又一个方面中,截短的CD163蛋白质可被预期为包含不多于108个天然蛋白质氨基酸。在另一方面中,截短的CD163蛋白质可被预期为包含不多于93个天然蛋白质氨基酸。在又一个方面中,截短的CD163蛋白质可被预期为包含不多于74个天然蛋白质氨基酸。如本文所提供,截短的CD163蛋白质可包含32至211个天然CD163多肽序列的氨基酸和不多于25个非天然氨基酸,并且在细胞和细胞提取物中可以是不可检测的。

[0085] 在其他方面中,经改变的CD163蛋白质可以具有带有单一氨基酸取代的截短。在某些方面中,经改变的CD163蛋白质可具有不多于1010个氨基酸的预期氨基酸序列。

[0086] 本说明书提供并包括可具有CD163蛋白质的截短的基因编辑CD163猪(例如,CD163参考序列NP_999141的氨基酸1至40)。不受理论限制,信号肽(也称为信号序列)内的截短被相信可导致蛋白质不能转运到细胞膜,多肽随后在细胞内降解。相应地,具有信号肽截短的CD163蛋白质可导致对PRRS_v感染具有抵抗力的CD163无效动物。在一方面中,具有在信号序列中截短的蛋白质的经基因编辑的CD163动物可包含不多于25个非天然氨基酸序列的氨基酸。在一方面中,经基因编辑的猪可以包含不多于天然CD163蛋白质的前39个氨基酸。在一

方面中,经基因编辑的猪可以包含不多于天然CD163蛋白质的前39个氨基酸和不多于15个非天然氨基酸。本说明书还包括和提供了可被预期为包含不多于天然CD163蛋白质的前38个氨基酸的经基因编辑的猪。在一方面中,经基因编辑的猪可以包含不多于天然CD163蛋白质的前38个氨基酸和不多于15个非天然氨基酸。本说明书还包括和提供了可被预期为包含不多于天然CD163蛋白质的前36个氨基酸的经基因编辑的猪。在一方面中,经基因编辑的猪可以包含不多于天然CD163蛋白质的前36个氨基酸和不多于15个非天然氨基酸。使用本领域技术人员已知的方法时,截短的蛋白质可以是不可检测的。

[0087] 在一方面中,经基因编辑的猪可以被预期为包含不多于天然CD163蛋白质的前34个氨基酸和不多于15个非天然氨基酸。在一方面中,经基因编辑的猪可以被预期为包含不多于天然CD163蛋白质的前32个氨基酸和不多于15个非天然氨基酸。使用本领域技术人员已知的方法时,截短的蛋白质可以是不可检测的。

[0088] 此外,本发明提供并包括了CD163蛋白质的截短,其可包括外显子7的缺失(SEQ ID NOs:426-458),外源性终止密码子被引入外显子7的序列(SEQ ID NOs:459-504)。这些截短可以包括包含不多于1010个氨基酸的CD163蛋白质。

[0089] 育种技术可用于从最初的纯合子或杂合子建立者或其他杂合子动物中创造灭活基因的纯合子动物。可以产生纯合子动物。本文所述的经基因编辑的猪可与其他关注的经编辑的猪或野生型猪一起繁殖,以最终产生经编辑的基因的纯或杂合子猪。在一方面中,纯合子动物可以是通过与PICTM优良猪系2、3、15、19、27、62、65及其组合杂交而产生的系中任何一系的动物。在一方面,纯合子动物可以通过系2和系3的动物之间的杂交而制备的杂种动物。

[0090] 基因编辑已经被用来解决包括PRRS在内的各种猪的疾病。在过去的15年中,几种基因编辑技术已经有所发展,这些平台通常可以被设计成在基因组的特定区域引入双链断裂。然后引入的断裂可以由细胞自身的机制来修复。

[0091] 一种修复途径,也就是非同源末端连接(NHEJ),其在所有界的生物中,在进化上是保守的,也是哺乳动物细胞中主要的双链断裂修复途径。该修复过程可导致核苷酸在切割位点处的随机插入或缺失。实际上,可以通过反式提供DNA修复模板,来有利地利用这种不完整的保真度。在一个方面中,可以一起递送携带靶位点的替代等位基因(例如,单碱基多态性,或单碱基或多碱基插入或缺失)的DNA修复模板与基因编辑试剂,通过利用细胞的同源重组机制,该DNA修复模板可以指导修复,产生新的等位基因。在根据本说明书的方面中,可以基于CRISPR/CAS切割的高效部位(例如,表3中的高编辑频率)和引入可导致仅包含野生型序列的截短蛋白质的缺失的能力,来设计和选择DNA修复模板。修复模板可以提高基因编辑的效率和准确性。适用于本申请方法的DNA修复模板可包括SEQ ID NOs:1至13。在一方面中,DNA修复模板可以与如下表6所列的向导序列配对。与转基因不同,根据本说明书进行的基因组编辑不会导致在基因组中引入外源DNA序列。

[0092] 但是,由于这些外源添加的DNA修复模板具有在基因组中随机整合的可能性,因此识别并使用向导对也是有利的,向导对会导致DNA序列的缺失,从而使连接的末端可以在连接的末端处导致框内转译终止密码子的产生;当两个向导的切割位点被NHEJ端对端修复,这种新DNA序列在被转录成mRNA并转译成蛋白质时,会终止CD163蛋白质的产生。尽管会丧失这种终止的CD163蛋白质的功能,常常但并非总是如此,但蛋白质合成的过早终止会带来

不稳定的多肽,这种多肽会被降解,且不能通过普通方法检测。切割CD163基因的外显子7以使连接的末端形成外源性终止密码子的向导对可包括SEQ ID NOs:351和365,SEQ ID NOs:351和387,SEQ ID NOs:348和390,SEQ ID NOs:348和388,SEQ ID NOs:348和395,SEQ ID NOs:352和365,SEQ ID NOs:352和387,SEQ ID NOs:352和399,SEQ ID NOs:353和365,SEQ ID NOs:353和387,SEQ ID NOs:353和399,SEQ ID NOs:354和390,SEQ ID NOs:354和388,SEQ ID NOs:354和395,SEQ ID NOs:358和361,SEQ ID NOs:358和362,SEQ ID NOs:358和368,SEQ ID NOs:358和384,SEQ ID NOs:358和394,SEQ ID NOs:358和399,SEQ ID NOs:359和390,SEQ ID NOs:359和388,SEQ ID NOs:359和395,SEQ ID NOs:360和368,SEQ ID NOs:360和384,SEQ ID NOs:360和389,SEQ ID NOs:360和394,SEQ ID NOs:360和397,SEQ ID NOs:361和365,SEQ ID NOs:361和387,SEQ ID NOs:362和390,SEQ ID NOs:362和388,SEQ ID NOs:362和395,SEQ ID NOs:364和365,SEQ ID NOs:364和387,SEQ ID NOs:364和399,SEQ ID NOs:365和368,SEQ ID NOs:365和384,SEQ ID NOs:365和389,SEQ ID NOs:365和394,SEQ ID NOs:365和397,SEQ ID NOs:366和368,SEQ ID NOs:366和384,SEQ ID NOs:366和389,SEQ ID NOs:366和394,以及SEQ ID NOs:366和397。

[0093] 在一方面中,本发明可涉及在优良猪中的简单、精确且可再生的单一CD163功能缺失编辑,使得该编辑发生在CD163基因的前段。可以基于以下几点考虑和方法,选择单一向导RNA-Cas蛋白质组合和DNA修复模板,来指导优良猪中的特定基因编辑:靠近组织培养物中CD163基因5'端的高效切割,生物信息学检查识别猪基因组中很少错配的向导,生物化学预筛选确定的在靶切割的高特异性,以及在猪胚胎状细胞中的预期位点靶向特定基因编辑的能力。下面详细讨论CD163的特定基因编辑的示例。在一方面中,根据本说明书的特定基因编辑可包括CD163基因,该CD163基因包含选自由SEQ ID NOs:1至18及426至505组成的组的序列。在一方面中,包含经编辑的CD163基因的细胞可包含至少一个等位基因,该等位基因具有选自由SEQ ID NOs:1至18及426至505组成的组的序列。在一方面中,包含CD163基因的两个基因编辑的等位基因的细胞可以在两个等位基因处包含选自由SEQ ID NOs:1至18和426至505组成的组的序列。在一方面中,两个经基因编辑的CD163基因可包含选自由SEQ ID NOs:1至18和426至505组成的组的同一序列(例如,SEQ ID NO:1的两个等位基因或SEQ ID NO:2的两个等位基因,等等)。在一方面中,细胞的基因组可包含经基因编辑的CD163基因,该经基因编辑的CD163基因,每个包含选自由SEQ ID NOs:1至18和426-505组成的组的序列中的一个(例如,SEQ ID NO:1的一个等位基因带有SEQ ID NO:2的一个等位基因,及其所有组合)。

[0094] 本发明还提供并包括了细胞混合物,其可以包含CD163编辑的细胞和非基因编辑的细胞。在一个方面中,混合物可以是胚胎。在另一个方面中,混合物可以是细胞培养物。在又一方面中,细胞混合物不包含生殖细胞。在一方面中,本说明书可提供并包括CD163编辑细胞的组织培养物以及制备这种培养物的方法。根据本说明书的培养物可以包括CD163编辑的细胞的混合物(例如,具有SEQ ID NO:1等位基因的细胞与具有SEQ ID NO:2等位基因的细胞,具有SEQ ID NO:1等位基因的细胞与具有SEQ ID NO:3的等位基因,及其所有组合)。在一方面中,非生殖细胞的组织培养物可包括包含单个CD163编辑的细胞。在另一方面中,培养物中的单个CD163编辑的细胞可以包含一个或两个编辑的等位基因。表2列出了可用于本发明下的产品和方法的核酸内切酶和向导RNA主链序列的具体示例。

[0095] 表2:核酸内切酶和向导主链序列

序列一致性	SEQ ID NO:
向导RNA主链(显示了DNA序列)	19
酿脓链球菌核酸内切酶蛋白质序列	20
嗜热链球菌CR3核酸内切酶蛋白质序列	21

可以对优良猪细胞核系进行测序,并与CD163基因的公共参考进行比对。这些数据可用于开发抗PRRS项目的基因编辑试剂。可以扫描这些序列,以发现保守的RNA向导的CRISPR-Cas9识别位点,该识别位点可分别由3个核苷酸或5个核苷酸的基序,nGG(AGG、CGG、TGG、GGG),nGGnGAGGTG、CGGTG、TGGTG、GGGTG、AGGGG、CGGGG、TGGGG、GGGGG、AGGAG、CGGAG、TGGAG、GGGAG、AGGCG、CGGCG、TGGCG、GGGCG)构成。这种称为PAM序列的基序可以邻近具有20个核苷酸的间隔区序列的3'端,该间隔区序列可用于与RNA进行碱基配对。可以识别合适的位点,并可以制备crRNA向导或单个向导序列,并在下面的表3中显示。

[0096] 尽管不限于任何特定的理论,但当形成复合物时,向导RNA-Cas9蛋白质可以识别供切割的DNA位点,然后可以通过非同源末端连接(随机修复)或DNA模板修复途径(同源定向修复,HDR)来用细胞成分将其修复。

[0097] 可以跨CD163的外显子1至外显子7生成向导RNAs(gRNA)。CD163蛋白质的病毒结合域(域5)中的编辑可以抑制病毒与该蛋白质结合的能力,从而防止病毒被吸收到猪肺巨噬细胞中。当CD163中的编辑在猪中是纯合的时,该动物可以对PRRS感染有抵抗力。本说明书提供并包括gRNA序列,其包括表3中列出的crRNA序列,crRNA序列可以选自由每个SEQ ID NOs:22至271和347至425的前20个核苷酸组成的组。SEQ ID NOs:22至271和347至425显示为DNA序列。相应的RNA对应物,以及一般不包括在gRNAs中的PAM基序的存在,对于本领域技术人员将是显而易见的。本文还提供了可以包含选自由每个SEQ ID NOs:22至271和347至425的前20个核苷酸组成的组的序列的RNA序列。SEQ ID NOs:22至271和347至425可以与gRNA主链序列结合并表达为RNA,该RNA用于制备gRNA,然后与Cas核酸酶混合以制备活性核糖核苷酸蛋白复合物(sgRNP)。然后,可以将sgRNP复合物单独或与选自由SEQ ID NOs:1至13组成的组的修复模板一起注入成熟的卵母细胞、受精卵或早期胚胎中。在切割和模板指导下的修复之后,可以编辑CD163基因以并入修复模板序列,CD163基因编辑的细胞的经编辑的基因组可以包含选自由SEQ ID NOs:1至13组成的组的序列。

[0098] 在一方面中,本发明可包括在优良猪中的简单、精确且可再生的单一CD163功能缺失编辑,使得该编辑发生在CD163基因的前段(外显子1-7)。在一方面中,猪可以具有CD163基因,该CD163基因包含选自由SEQ ID NOs:1至18和426至505组成的组的序列。还包括并提供了可以在包含表8中标志物的基因组区域中包含SEQ ID NOs:1至18和425至505的猪。还包括并提供了可以在包含表8中标志物的基因组区域中包含SEQ ID No.:2的猪。还包括并提供了可以在包含表8中标志物的基因组区域中包含SEQ ID NOs:426-458的猪。还包括并提供了可以在包含表8中标志物的基因组区域中包含SEQ ID NOs:459-504的猪。使用源自这些优良猪的猪胚胎成纤维细胞系,可以测试250种向导RNA和Cas9蛋白质组合,以识别在CD163基因中高效切割并产生编辑的基因编辑对。表3列出了所选择的特定向导和核酸内切酶蛋白质组合,以及靶点的部位,其核酸内切酶活性(平均编辑频率)以及编辑在CD163上的位置。优选较高平均编辑频率的组合,因为它们具有更有效的编辑活性。平均编辑频率大于

1的组合是期望的。在一方面中,组合可以具有大于5的平均编辑频率。在另一方面中,组合可以具有大于10的平均编辑频率。在又一方面中,组合可以具有大于15的平均编辑频率。本发明提供并包括可以具有平均编辑频率大于20的组合。在一方面中,组合可以具有大于25的平均编辑频率。在又一方面中,组合可以具有大于30的平均编辑频率。

[0099] 如表3所示,靶序列之间的平均编辑频率差异很大。而且,靶向重叠序列的序列依Cas蛋白质来源导致不同的编辑频率。例如,SEQ ID NOs:24和25靶向重叠部位,在编辑频率上有10倍的差异。在该位点上,使用这些序列,酿脓链球菌提供了提高近20倍的编辑频率。相反,引入SEQ ID NOs:33和34的RNP,导致Cas蛋白质之间的平均编辑频率无法区分。尽管引入来自酿脓链球菌的Cas9核酸酶的RNP可以提供更优的平均编辑频率,但也并非总是如此。如针对SEQ ID NOs:60和61所示,并入来自嗜热链球菌的Cas9蛋白质的RNP导致更优的编辑频率(例如,3.9对22.0)。相应地,本说明书提供了使用CRISPR/Cas系统靶向CD163的高效向导RNA序列或高效导向序列。在一方面中,RNP可以包含选自每个SEQ ID NOs:22至271和347至425中的前20个核苷酸组成的组的序列。

[0100] 本文中所有位置名称均参考Sscrofa11.1参考基因组(GenBank编号:GCA_000003025.6)。

[0101] 靶位点序列SEQ ID NOs:22至271和347至425可以是猪CD163基因内的编辑靶序列。在每个靶位点序列中,前20个核苷酸可以对应于向导RNA间隔区,剩余的3个或5个核苷酸可以分别是针对酿脓链球菌或嗜热链球菌的PAM序列。SEQ ID NOs:22至271和347至425的前20个碱基对应于DNA等价向导RNA序列,通过适当的脱氧核糖核酸酶碱基代替核糖核酸酶碱基,也可以使用DNA碱基代替RNA碱基用作向导。向导RNA序列可以与酿脓链球菌或嗜热链球菌核酸内切酶配对,以指导猪基因组中CD163基因编码或非编码区内的DNA断裂,这可以导致DNA缺失和/或DNA核苷酸插入。依照表3中公开的靶位点的部位,可以选择成对的向导/核酸内切酶组合,以删除成对的向导/核酸内切酶组合之间的CD163基因区域。

[0102] 靶位点序列SEQ ID NOs:212至271和347至425是可用于设计用于删除CD163基因的外显子7的向导的导向序列。使用酿脓链球菌,配对内含子6靶向向导SEQ ID NOs:212至253和262至271与内含子7靶向向导SEQ ID NOs:254至261,可在CD163基因上造成两个双链断裂,从而导致第7外显子的切除。靶向向导SEQ ID NOs:249和256的配对也可以导致外显子7的切除。一些向导的配对可以将终止密码子引入外显子7中,这些序列包括SEQ ID NOs:351和365,SEQ ID NOs:351和387,SEQ ID NOs:348和390,SEQ ID NOs:348和388,SEQ ID NOs:348和498,SEQ ID NOs:352和365,SEQ ID NOs:352和387,SEQ ID NOs:352和399,SEQ ID NOs:353和365,SEQ ID NOs:353和387,SEQ ID NOs:353和399,SEQ ID NOs:354和390,SEQ ID NOs:354和388,SEQ ID NOs:354和395,SEQ ID NOs:358和361,SEQ ID NOs:358和362,SEQ ID NOs:358和368,SEQ ID NOs:358和384,SEQ ID NOs:358和394,SEQ ID NOs:358和399,SEQ ID NOs:359和390,SEQ ID NOs:359和388,SEQ ID NOs:359和395,SEQ ID NOs:360和368,SEQ ID NOs:360和384,SEQ ID NOs:360和389,SEQ ID NOs:360和394,SEQ ID NOs:360和397,SEQ ID NOs:361和365,SEQ ID NOs:361和387,SEQ ID NOs:362和390,SEQ ID NOs:362和388,SEQ ID NOs:362和395,SEQ ID NOs:364和365,SEQ ID NOs:364和387,SEQ ID NOs:364和399,SEQ ID NOs:365和368,SEQ ID NOs:365和384,SEQ ID NOs:365和389,SEQ ID NOs:365和394,SEQ ID NOs:365和397,SEQ ID NOs:366和368,SEQ ID

NOs:366和384,SEQ ID NOs:366和389,SEQ ID NOs:366和394,或SEQ ID NOs:366和397。

[0103] 针对每个导向序列,表3列出了其SEQ ID NO.,使用的CAS9核酸酶归巢臂的种群,导向序列在猪 (*Sus scrofa*) 基因组 (包括PAM序列) 上的部位,针对胎儿成纤维细胞检测中特定向导的、以平均编辑分数测量的编辑效率,以及靶向CD163上的外显子。

[0104] 表3:靶序列和在猪胎儿成纤维细胞中编辑活性表

SEQ ID NO:	Cas9 核酸酶	靶点部位	平均编辑分数	CD163 上的位置
22	酿脓链球菌	chr5:63300192-63300214	12.9	外显子 1 / 15
23	酿脓链球菌	chr5:63300222-63300244	1.4	外显子 1 / 15
24	酿脓链球菌	chr5:63300236-63300258	5.8	外显子 1 / 15
25	嗜热链球菌	chr5:63300236-63300260	0.3	外显子 1 / 15
26	酿脓链球菌	chr5:63300250-63300272	8.6	外显子 1 / 15
27	酿脓链球菌	chr5:63300251-63300273	0.1	外显子 1 / 15
28	酿脓链球菌	chr5:63300275-63300297	25.7	外显子 1 / 15
29	酿脓链球菌	chr5:63300288-63300310	24.9	外显子 1 / 15
30	酿脓链球菌	chr5:63300293-63300315	12.8	外显子 1 / 15
31	酿脓链球菌	chr5:63300305-63300327	0.4	外显子 1 / 15
32	酿脓链球菌	chr5:63300308-63300330	3.4	外显子 1 / 15
33	嗜热链球菌	chr5:63300308-63300332	3.7	外显子 1 / 15
34	酿脓链球菌	chr5:63300327-63300349	5.3	外显子 1 / 15
35	酿脓链球菌	chr5:63300336-63300358	3.5	外显子 1 / 15
36	酿脓链球菌	chr5:63301950-63301972	14.4	外显子 2 / 15
37	酿脓链球菌	chr5:63301951-63301973	16.3	外显子 2 / 15
38	酿脓链球菌	chr5:63301962-63301984	13.6	外显子 2 / 15
39	酿脓链球菌	chr5:63301981-63302003	3.6	外显子 2 / 15
40	酿脓链球菌	chr5:63301995-63302017	21.8	外显子 2 / 15
41	酿脓链球菌	chr5:63301997-63302019	8.2	外显子 2 / 15
42	嗜热链球菌	chr5:63301997-63302021	10.1	外显子 2 / 15
43	酿脓链球菌	chr5:63303121-63303143	16.4	外显子 3 / 15
44	嗜热链球菌	chr5:63303121-63303145	16.1	外显子 3 / 15
45	酿脓链球菌	chr5:63303129-63303151	31.4	外显子 3 / 15
46	酿脓链球菌	chr5:63303136-63303158	22.8	外显子 3 / 15
47	酿脓链球菌	chr5:63303137-63303159	42.9	外显子 3 / 15
48	嗜热链球菌	chr5:63303137-63303161	10.7	外显子 3 / 15
49	酿脓链球菌	chr5:63303140-63303162	36.7	外显子 3 / 15
50	嗜热链球菌	chr5:63303140-63303164	32.6	外显子 3 / 15
51	酿脓链球菌	chr5:63303158-63303180	21.1	外显子 3 / 15
52	酿脓链球菌	chr5:63303166-63303188	23.6	外显子 3 / 15
53	嗜热链球菌	chr5:63303166-63303190	22.1	外显子 3 / 15
54	酿脓链球菌	chr5:63303169-63303191	40.0	外显子 3 / 15
55	嗜热链球菌	chr5:63303169-63303193	19.5	外显子 3 / 15
56	酿脓链球菌	chr5:63303181-63303203	9.9	外显子 3 / 15
57	嗜热链球菌	chr5:63303181-63303205	10.4	外显子 3 / 15
58	酿脓链球菌	chr5:63303184-63303206	20.6	外显子 3 / 15
59	嗜热链球菌	chr5:63303184-63303208	2.8	外显子 3 / 15
60	酿脓链球菌	chr5:63303189-63303211	3.9	外显子 3 / 15

61	嗜热链球菌	chr5:63303189-63303213	22.0	外显子 3 / 15
62	酿脓链球菌	chr5:63303190-63303212	18.1	外显子 3 / 15
63	酿脓链球菌	chr5:63303191-63303213	23.5	外显子 3 / 15
64	酿脓链球菌	chr5:63303209-63303231	23.6	外显子 3 / 15
65	酿脓链球菌	chr5:63303213-63303235	4.1	外显子 3 / 15
66	酿脓链球菌	chr5:63303214-63303236	16.2	外显子 3 / 15
67	酿脓链球菌	chr5:63303220-63303242	14.6	外显子 3 / 15
68	酿脓链球菌	chr5:63303226-63303248	15.4	外显子 3 / 15
69	酿脓链球菌	chr5:63303243-63303265	21.6	外显子 3 / 15
70	酿脓链球菌	chr5:63303250-63303272	1.5	外显子 3 / 15
71	酿脓链球菌	chr5:63303251-63303273	30.3	外显子 3 / 15
72	酿脓链球菌	chr5:63303278-63303300	20.1	外显子 3 / 15
73	酿脓链球菌	chr5:63303278-63303300	1.5	外显子 3 / 15
74	酿脓链球菌	chr5:63303282-63303304	23.9	外显子 3 / 15
75	酿脓链球菌	chr5:63303283-63303305	20.8	外显子 3 / 15
76	酿脓链球菌	chr5:63303294-63303316	33.8	外显子 3 / 15
77	酿脓链球菌	chr5:63303299-63303321	8.2	外显子 3 / 15
78	酿脓链球菌	chr5:63303305-63303327	6.1	外显子 3 / 15
79	酿脓链球菌	chr5:63303315-63303337	25.2	外显子 3 / 15
80	酿脓链球菌	chr5:63303319-63303341	28.7	外显子 3 / 15
81	酿脓链球菌	chr5:63303338-63303360	4.5	外显子 3 / 15
82	酿脓链球菌	chr5:63303339-63303361	2.8	外显子 3 / 15
83	酿脓链球菌	chr5:63303357-63303379	18.3	外显子 3 / 15
84	酿脓链球菌	chr5:63303358-63303380	26.6	外显子 3 / 15
85	酿脓链球菌	chr5:63303374-63303396	16.1	外显子 3 / 15
86	酿脓链球菌	chr5:63303378-63303400	35.4	外显子 3 / 15
87	嗜热链球菌	chr5:63303378-63303402	40.0	外显子 3 / 15
88	酿脓链球菌	chr5:63303379-63303401	24.4	外显子 3 / 15
89	酿脓链球菌	chr5:63303380-63303402	25.6	外显子 3 / 15
90	酿脓链球菌	chr5:63303406-63303428	28.1	外显子 3 / 15
91	酿脓链球菌	chr5:63303413-63303435	13.7	外显子 3 / 15
92	嗜热链球菌	chr5:63303413-63303437	19.0	外显子 3 / 15
93	嗜热链球菌	chr5:63303419-63303443	15.2	外显子 3 / 15
94	酿脓链球菌	chr5:63303421-63303443	16.5	外显子 3 / 15
95	酿脓链球菌	chr5:63303428-63303450	35.8	外显子 3 / 15
96	酿脓链球菌	chr5:63303441-63303463	3.4	外显子 3 / 15
97	酿脓链球菌	chr5:63306087-63306109	19.8	外显子 4 / 15
98	酿脓链球菌	chr5:63306091-63306113	4.5	外显子 4 / 15
99	嗜热链球菌	chr5:63306091-63306115	3.1	外显子 4 / 15
100	酿脓链球菌	chr5:63306098-63306120	29.9	外显子 4 / 15
101	嗜热链球菌	chr5:63306098-63306122	31.5	外显子 4 / 15
102	酿脓链球菌	chr5:63306101-63306123	29.2	外显子 4 / 15

103	酿脓链球菌	chr5:63306108-63306130	6.9	外显子 4 / 15
104	嗜热链球菌	chr5:63306108-63306132	14.7	外显子 4 / 15
105	酿脓链球菌	chr5:63306116-63306138	21.6	外显子 4 / 15
106	酿脓链球菌	chr5:63306127-63306149	26.4	外显子 4 / 15
107	酿脓链球菌	chr5:63306140-63306162	6.9	外显子 4 / 15
108	酿脓链球菌	chr5:63306144-63306166	35.2	外显子 4 / 15
109	嗜热链球菌	chr5:63306144-63306168	3.3	外显子 4 / 15
110	酿脓链球菌	chr5:63306147-63306169	8.8	外显子 4 / 15
111	嗜热链球菌	chr5:63306147-63306171	3.2	外显子 4 / 15
112	酿脓链球菌	chr5:63306148-63306170	5.2	外显子 4 / 15
113	酿脓链球菌	chr5:63306149-63306171	28.0	外显子 4 / 15
114	酿脓链球菌	chr5:63306193-63306215	9.3	外显子 4 / 15
115	酿脓链球菌	chr5:63306236-63306258	14.2	外显子 4 / 15
116	酿脓链球菌	chr5:63306251-63306273	26.3	外显子 4 / 15
117	嗜热链球菌	chr5:63306251-63306275	4.4	外显子 4 / 15
118	酿脓链球菌	chr5:63306257-63306279	1.3	外显子 4 / 15
119	酿脓链球菌	chr5:63306263-63306285	7.8	外显子 4 / 15
120	酿脓链球菌	chr5:63306273-63306295	35.0	外显子 4 / 15
121	酿脓链球菌	chr5:63306287-63306309	13.4	外显子 4 / 15
122	酿脓链球菌	chr5:63306296-63306318	2.0	外显子 4 / 15
123	酿脓链球菌	chr5:63306315-63306337	31.2	外显子 4 / 15
124	酿脓链球菌	chr5:63306332-63306354	10.1	外显子 4 / 15
125	酿脓链球菌	chr5:63306336-63306358	31.1	外显子 4 / 15
126	嗜热链球菌	chr5:63306336-63306360	52.8	外显子 4 / 15
127	酿脓链球菌	chr5:63306337-63306359	30.3	外显子 4 / 15
128	酿脓链球菌	chr5:63306338-63306360	43.2	外显子 4 / 15
129	酿脓链球菌	chr5:63306364-63306386	2.5	外显子 4 / 15
130	酿脓链球菌	chr5:63306371-63306393	0.2	外显子 4 / 15
131	嗜热链球菌	chr5:63306371-63306395	0.3	外显子 4 / 15
132	酿脓链球菌	chr5:63309028-63309050	4.5	外显子 5 / 15
133	酿脓链球菌	chr5:63309034-63309056	5.1	外显子 5 / 15
134	酿脓链球菌	chr5:63309035-63309057	41.8	外显子 5 / 15
135	嗜热链球菌	chr5:63309035-63309059	21.9	外显子 5 / 15
136	酿脓链球菌	chr5:63309053-63309075	15.1	外显子 5 / 15
137	酿脓链球菌	chr5:63309061-63309083	0.2	外显子 5 / 15
138	酿脓链球菌	chr5:63309077-63309099	15.7	外显子 5 / 15
139	嗜热链球菌	chr5:63309077-63309101	11.2	外显子 5 / 15
140	酿脓链球菌	chr5:63309084-63309106	10.1	外显子 5 / 15
141	嗜热链球菌	chr5:63309084-63309108	23.8	外显子 5 / 15
142	酿脓链球菌	chr5:63309085-63309107	11.3	外显子 5 / 15
143	酿脓链球菌	chr5:63309086-63309108	23.4	外显子 5 / 15
144	酿脓链球菌	chr5:63309094-63309116	13.8	外显子 5 / 15

145	酿脓链球菌	chr5:63309104-63309126	7.8	外显子 5 / 15
146	酿脓链球菌	chr5:63309108-63309130	1.4	外显子 5 / 15
147	酿脓链球菌	chr5:63309109-63309131	7.0	外显子 5 / 15
148	酿脓链球菌	chr5:63309130-63309152	24.8	外显子 5 / 15
149	酿脓链球菌	chr5:63309144-63309166	20.8	外显子 5 / 15
150	酿脓链球菌	chr5:63309145-63309167	0.1	外显子 5 / 15
151	酿脓链球菌	chr5:63309146-63309168	37.4	外显子 5 / 15
152	酿脓链球菌	chr5:63309173-63309195	2.5	外显子 5 / 15
153	酿脓链球菌	chr5:63309173-63309195	2.3	外显子 5 / 15
154	酿脓链球菌	chr5:63309189-63309211	11.5	外显子 5 / 15
155	酿脓链球菌	chr5:63309193-63309215	2.7	外显子 5 / 15
156	酿脓链球菌	chr5:63309194-63309216	10.4	外显子 5 / 15
157	酿脓链球菌	chr5:63309200-63309222	3.8	外显子 5 / 15
158	嗜热链球菌	chr5:63309205-63309229	19.0	外显子 5 / 15
159	酿脓链球菌	chr5:63309207-63309229	21.0	外显子 5 / 15
160	酿脓链球菌	chr5:63309210-63309232	19.0	外显子 5 / 15
161	酿脓链球菌	chr5:63309233-63309255	8.3	外显子 5 / 15
162	酿脓链球菌	chr5:63309250-63309272	13.6	外显子 5 / 15
163	酿脓链球菌	chr5:63309252-63309274	23.0	外显子 5 / 15
164	酿脓链球菌	chr5:63309273-63309295	2.3	外显子 5 / 15
165	嗜热链球菌	chr5:63309273-63309297	34.4	外显子 5 / 15
166	酿脓链球菌	chr5:63309274-63309296	15.1	外显子 5 / 15
167	酿脓链球菌	chr5:63309275-63309297	19.4	外显子 5 / 15
168	嗜热链球菌	chr5:63309284-63309308	14.4	外显子 5 / 15
169	酿脓链球菌	chr5:63309286-63309308	7.0	外显子 5 / 15
170	酿脓链球菌	chr5:63309308-63309330	0.5	外显子 5 / 15
171	嗜热链球菌	chr5:63309308-63309332	2.4	外显子 5 / 15
172	酿脓链球菌	chr5:63309323-63309345	16.0	外显子 5 / 15
173	酿脓链球菌	chr5:63309841-63309863	0.1	外显子 6 / 15
174	酿脓链球菌	chr5:63309857-63309879	8.4	外显子 6 / 15
175	嗜热链球菌	chr5:63309857-63309881	8.0	外显子 6 / 15
176	酿脓链球菌	chr5:63309860-63309882	40.3	外显子 6 / 15
177	嗜热链球菌	chr5:63309860-63309884	32.3	外显子 6 / 15
178	酿脓链球菌	chr5:63309863-63309885	37.2	外显子 6 / 15
179	酿脓链球菌	chr5:63309886-63309908	4.7	外显子 6 / 15
180	嗜热链球菌	chr5:63309886-63309910	3.5	外显子 6 / 15
181	酿脓链球菌	chr5:63309889-63309911	38.1	外显子 6 / 15
182	酿脓链球菌	chr5:63309889-63309911	34.1	外显子 6 / 15
183	嗜热链球菌	chr5:63309889-63309913	17.5	外显子 6 / 15
184	酿脓链球菌	chr5:63309892-63309914	4.9	外显子 6 / 15
185	酿脓链球菌	chr5:63309907-63309929	13.5	外显子 6 / 15
186	酿脓链球菌	chr5:63309911-63309933	5.5	外显子 6 / 15

187	酿脓链球菌	chr5:63309933-63309955	0.7	外显子 6 / 15
188	嗜热链球菌	chr5:63309933-63309957	10.0	外显子 6 / 15
189	酿脓链球菌	chr5:63309934-63309956	6.4	外显子 6 / 15
190	酿脓链球菌	chr5:63309935-63309957	18.7	外显子 6 / 15
191	酿脓链球菌	chr5:63309955-63309977	12.0	外显子 6 / 15
192	酿脓链球菌	chr5:63309963-63309985	5.6	外显子 6 / 15
193	酿脓链球菌	chr5:63309970-63309992	0.5	外显子 6 / 15
194	酿脓链球菌	chr5:63309971-63309993	12.5	外显子 6 / 15
195	酿脓链球菌	chr5:63309977-63309999	5.3	外显子 6 / 15
196	酿脓链球菌	chr5:63310021-63310043	2.2	外显子 6 / 15
197	酿脓链球菌	chr5:63310035-63310057	10.3	外显子 6 / 15
198	酿脓链球菌	chr5:63310038-63310060	0.2	外显子 6 / 15
199	酿脓链球菌	chr5:63310058-63310080	8.2	外显子 6 / 15
200	酿脓链球菌	chr5:63310077-63310099	6.2	外显子 6 / 15
201	酿脓链球菌	chr5:63310078-63310100	8.6	外显子 6 / 15
202	酿脓链球菌	chr5:63310092-63310114	2.7	外显子 6 / 15
203	酿脓链球菌	chr5:63310098-63310120	11.1	外显子 6 / 15
204	嗜热链球菌	chr5:63310098-63310122	8.0	外显子 6 / 15
205	酿脓链球菌	chr5:63310099-63310121	12.2	外显子 6 / 15
206	酿脓链球菌	chr5:63310100-63310122	21.1	外显子 6 / 15
207	嗜热链球菌	chr5:63310100-63310124	0.1	外显子 6 / 15
208	酿脓链球菌	chr5:63310103-63310125	3.3	外显子 6 / 15
209	酿脓链球菌	chr5:63310152-63310174	4.8	外显子 6 / 15
210	酿脓链球菌	chr5:63323061-63323083	32.8	外显子 7 / 15
211	酿脓链球菌	chr5:63323147-63323169	17.0	外显子 7 / 15
212	酿脓链球菌	chr5:63322548-63322570	13.6	内含子 6
213	酿脓链球菌	chr5:63322549-63322571	1.7	内含子 6
214	酿脓链球菌	chr5:63322566-63322588	15.6	内含子 6
215	酿脓链球菌	chr5:63322594-63322616	0.0	内含子 6
216	酿脓链球菌	chr5:63322597-63322619	0.0	内含子 6
217	酿脓链球菌	chr5:63322646-63322668	21.1	内含子 6
218	酿脓链球菌	chr5:63322647-63322669	12.6	内含子 6
219	酿脓链球菌	chr5:63322681-63322703	44.3	内含子 6
220	酿脓链球菌	chr5:63322683-63322705	3.9	内含子 6
221	酿脓链球菌	chr5:63322693-63322715	33.9	内含子 6
222	酿脓链球菌	chr5:63322694-63322716	26.1	内含子 6
223	酿脓链球菌	chr5:63322714-63322736	5.7	内含子 6
224	酿脓链球菌	chr5:63322731-63322753	42.8	内含子 6
225	酿脓链球菌	chr5:63322756-63322778	5.8	内含子 6
226	酿脓链球菌	chr5:63322757-63322779	21.2	内含子 6
227	酿脓链球菌	chr5:63322770-63322792	36.1	内含子 6
228	酿脓链球菌	chr5:63322799-63322821	29.9	内含子 6

229	酿脓链球菌	chr5:63322800-63322822	43.2	内含子 6
230	酿脓链球菌	chr5:63322809-63322831	33.3	内含子 6
231	酿脓链球菌	chr5:63322810-63322832	46.8	内含子 6
232	酿脓链球菌	chr5:63322834-63322856	7.8	内含子 6
233	酿脓链球菌	chr5:63322835-63322857	18.3	内含子 6
234	酿脓链球菌	chr5:63322839-63322861	18.8	内含子 6
235	酿脓链球菌	chr5:63322839-63322861	13.2	内含子 6
236	酿脓链球菌	chr5:63322840-63322862	2.8	内含子 6
237	酿脓链球菌	chr5:63322845-63322867	55.3	内含子 6
238	酿脓链球菌	chr5:63322848-63322870	27.2	内含子 6
239	酿脓链球菌	chr5:63322852-63322874	24.4	内含子 6
240	酿脓链球菌	chr5:63322859-63322881	22.2	内含子 6
241	酿脓链球菌	chr5:63322875-63322897	25.3	内含子 6
242	酿脓链球菌	chr5:63322887-63322909	4.2	内含子 6
243	酿脓链球菌	chr5:63322888-63322910	3.5	内含子 6
244	酿脓链球菌	chr5:63322891-63322913	44.3	内含子 6
245	酿脓链球菌	chr5:63322900-63322922	58.2	内含子 6
246	酿脓链球菌	chr5:63322906-63322928	3.7	内含子 6
247	酿脓链球菌	chr5:63322926-63322948	38.1	内含子 6
248	酿脓链球菌	chr5:63322927-63322949	0.5	内含子 6
249	酿脓链球菌	chr5:63322947-63322969	31.7	内含子 6
250	酿脓链球菌	chr5:63322957-63322979	50.0	内含子 6
251	酿脓链球菌	chr5:63322957-63322979	11.0	内含子 6
252	酿脓链球菌	chr5:63322991-63323013	4.5	内含子 6
253	酿脓链球菌	chr5:63322992-63323014	0.5	内含子 6
254	酿脓链球菌	chr5:63323338-63323360	19.8	内含子 7
255	酿脓链球菌	chr5:63323339-63323361	8.1	内含子 7
256	酿脓链球菌	chr5:63323361-63323383	21.1	内含子 7
257	酿脓链球菌	chr5:63323362-63323384	30.4	内含子 7
258	酿脓链球菌	chr5:63323362-63323384	5.6	内含子 7
259	酿脓链球菌	chr5:63323363-63323385	2.8	内含子 7
260	酿脓链球菌	chr5:63323367-63323389	23.2	内含子 7
261	酿脓链球菌	chr5:63323368-63323390	26.2	内含子 7
262	嗜热链球菌	chr5:63322644-63322668	未试验活性	内含子 6
263	嗜热链球菌	chr5:63322647-63322671	未试验活性	内含子 6
264	嗜热链球菌	chr5:63322678-63322702	未试验活性	内含子 6
265	嗜热链球菌	chr5:63322681-63322705	未试验活性	内含子 6
266	嗜热链球菌	chr5:63322755-63322779	未试验活性	内含子 6
267	嗜热链球菌	chr5:63322807-63322831	未试验活性	内含子 6
268	嗜热链球菌	chr5:63322845-63322869	未试验活性	内含子 6
269	嗜热链球菌	chr5:63322850-63322874	未试验活性	内含子 6
270	嗜热链球菌	chr5:63322955-63322979	未试验活性	内含子 6

271	嗜热链球菌	chr5:63322989-63323013	未试验活性	内含子 6
347	酿脓链球菌	chr5:63323002-63323024	2.1	外显子 7
348	酿脓链球菌	chr5:63323011-63323033	31.9	外显子 7
349	酿脓链球菌	chr5:63323015-63323037	7.7	外显子 7
350	酿脓链球菌	chr5:63323017-63323039	56.5	外显子 7
351	酿脓链球菌	chr5:63323018-63323040	74.3	外显子 7
352	酿脓链球菌	chr5:63323019-63323041	52.3	外显子 7
353	酿脓链球菌	chr5:63323022-63323044	44.0	外显子 7
354	酿脓链球菌	chr5:63323023-63323045	61.6	外显子 7
355	酿脓链球菌	chr5:63323024-63323046	49.4	外显子 7
356	酿脓链球菌	chr5:63323028-63323050	3.1	外显子 7
357	酿脓链球菌	chr5:63323029-63323051	0.8	外显子 7
358	酿脓链球菌	chr5:63323040-63323062	42.4	外显子 7
359	酿脓链球菌	chr5:63323052-63323074	66.7	外显子 7
360	酿脓链球菌	chr5:63323053-63323075	13.4	外显子 7
361	酿脓链球菌	chr5:63323061-63323083	77.9	外显子 7
362	酿脓链球菌	chr5:63323071-63323093	60.8	外显子 7
363	酿脓链球菌	chr5:63323072-63323094	70.6	外显子 7
364	酿脓链球菌	chr5:63323073-63323095	75.2	外显子 7
365	酿脓链球菌	chr5:63323098-63323120	64.4	外显子 7
366	酿脓链球菌	chr5:63323102-63323124	55.0	外显子 7
367	酿脓链球菌	chr5:63323105-63323127	51.2	外显子 7
368	酿脓链球菌	chr5:63323108-63323130	58.3	外显子 7
369	酿脓链球菌	chr5:63323125-63323147	14.5	外显子 7
370	酿脓链球菌	chr5:63323126-63323148	22.6	外显子 7
371	酿脓链球菌	chr5:63323131-63323153	49.9	外显子 7
372	酿脓链球菌	chr5:63323139-63323161	68.9	外显子 7
373	酿脓链球菌	chr5:63323147-63323169	57.4	外显子 7
374	酿脓链球菌	chr5:63323159-63323181	12.9	外显子 7
375	酿脓链球菌	chr5:63323160-63323182	19.7	外显子 7
376	酿脓链球菌	chr5:63323161-63323183	33.6	外显子 7
377	酿脓链球菌	chr5:63323162-63323184	65.3	外显子 7
378	酿脓链球菌	chr5:63323163-63323185	51.4	外显子 7
379	酿脓链球菌	chr5:63323173-63323195	57.6	外显子 7
380	酿脓链球菌	chr5:63323174-63323196	52.1	外显子 7
381	酿脓链球菌	chr5:63323175-63323197	48.2	外显子 7
382	酿脓链球菌	chr5:63323177-63323199	33.7	外显子 7
383	酿脓链球菌	chr5:63323181-63323203	18.3	外显子 7
384	酿脓链球菌	chr5:63323187-63323209	57.0	外显子 7
385	酿脓链球菌	chr5:63323197-63323219	33.3	外显子 7
386	酿脓链球菌	chr5:63323198-63323220	58.3	外显子 7
387	酿脓链球菌	chr5:63323219-63323241	20.7	外显子 7

388	酿脓链球菌	chr5:63323220-63323242	42.2	外显子 7
389	酿脓链球菌	chr5:63323221-63323243	43.4	外显子 7
390	酿脓链球菌	chr5:63323231-63323253	21.8	外显子 7
391	酿脓链球菌	chr5:63323251-63323273	46.8	外显子 7
392	酿脓链球菌	chr5:63323252-63323274	42.6	外显子 7
393	酿脓链球菌	chr5:63323255-63323277	22.8	外显子 7
394	酿脓链球菌	chr5:63323267-63323289	85.4	外显子 7
395	酿脓链球菌	chr5:63323268-63323290	41.1	外显子 7
396	酿脓链球菌	chr5:63323268-63323290	53.6	外显子 7
397	酿脓链球菌	chr5:63323269-63323291	32.1	外显子 7
398	酿脓链球菌	chr5:63323277-63323299	16.6	外显子 7
399	酿脓链球菌	chr5:63323278-63323300	39.0	外显子 7
400	酿脓链球菌	chr5:63323279-63323301	11.7	外显子 7
401	酿脓链球菌	chr5:63323282-63323304	48.9	外显子 7
402	酿脓链球菌	chr5:63323283-63323305	n/a	外显子 7
403	酿脓链球菌	chr5:63323287-63323309	11.6	外显子 7
404	酿脓链球菌	chr5:63323288-63323310	69.3	外显子 7
405	酿脓链球菌	chr5:63323295-63323317	46.0	外显子 7
406	酿脓链球菌	chr5:63323300-63323322	54.2	外显子 7
407	嗜热链球菌	chr5:63323019-63323043	25.5	外显子 7
408	嗜热链球菌	chr5:63323022-63323046	24.7	外显子 7
409	嗜热链球菌	chr5:63323061-63323085	37.8	外显子 7
410	嗜热链球菌	chr5:63323071-63323095	30.4	外显子 7
411	嗜热链球菌	chr5:63323096-63323120	33.4	外显子 7
412	嗜热链球菌	chr5:63323102-63323126	19.8	外显子 7
413	嗜热链球菌	chr5:63323105-63323129	0.6	外显子 7
414	嗜热链球菌	chr5:63323159-63323183	14.8	外显子 7
415	嗜热链球菌	chr5:63323160-63323184	7.8	外显子 7
416	嗜热链球菌	chr5:63323161-63323185	3.6	外显子 7
417	嗜热链球菌	chr5:63323163-63323187	7.9	外显子 7
418	嗜热链球菌	chr5:63323175-63323199	33.8	外显子 7
419	嗜热链球菌	chr5:63323175-63323199	11.5	外显子 7
420	嗜热链球菌	chr5:63323219-63323243	8.1	外显子 7
421	嗜热链球菌	chr5:63323253-63323277	32.6	外显子 7
422	嗜热链球菌	chr5:63323275-63323299	0.2	外显子 7
423	嗜热链球菌	chr5:63323277-63323301	12.3	外显子 7
424	嗜热链球菌	chr5:63323280-63323304	26.0	外显子 7
425	嗜热链球菌	chr5:63323295-63323319	30.5	外显子 7

选择在CD163基因的前段(外显子1-4)切割位点的高效向导RNA-Cas9对,并进一步筛查其中的猪基因组内潜在的脱靶结合。

[0105] 一些实例中,已经观察到使用向导RNA和核酸内切酶可导致DNA在基因组中非预期部位切割。由于dsDNA断裂的修复过程可能是随机的,脱靶切割事件可能在基因组中编码区或调控区导致发生不良变化。因此,在数个单个或成对的向导可以采用相似编辑频率来执行预期编辑的情况下,在选择用于编辑实验的向导或向导对时考虑脱靶切割是有利的。

[0106] 数种用来阐明脱靶的计算方法和生化学方法已经有所发展。计算方法可包括但不限于Cas-OFFinder (Bae, S., 等人, Bioinformatics, 2014, 30, 1473-1475), CRISPR-offinder (Zhao, C., 等人, Int. J. Biol. Sci., 2017, 13, 1470-1478) 和CRISPR-OFF (Alkan, F. 等人, Genome Biol., 2018, 19, 177)。对本领域技术人员来说, 其他计算方法是容易获取的。生化方法可包括但不限于GUIDE-Seq (Tsai, SQ等人, Nat Biotechnol., 2015, 33, 187-197), SITE-SEQ[®] (Cameron, P., 等人, Nat Methods, 2017, 14, 600-606) 和CIRCLE-seq (Tsai, SQ等人, Nat. Methods, 2017, 14, 607-614)。对本领域技术人员来说, 其他生化方法是容易获取的。尽管与生化方法相比, 计算方法相对快速且便宜, 但生化方法已被证明在识别经过验证的脱靶编辑方面更具优势。

[0107] 使用SITE-SEQ[®], 检测如上所述已在猪胎儿成纤维细胞中表现出高频率预期编辑的向导RNA的子集的特异性。在体外使用裸露的gDNA和RNP编辑试剂, SITESEQ[®]可以提供潜在切割位点列表。脱靶切割在细胞环境中可能比在体外生化模拟中更加复杂。有效RNP浓度和由于染色质状态导致的靶点可利用性等其他因素, 可能增加在猪细胞或经编辑的猪中实现的脱靶编辑的数量。幸运的是, 诸如SITE-SEQ[®]的生化方法可以为研究人员提供可以查询的位点列表。可以通过以下方法查询这些位点, 所述方法包括但不限于TOPO克隆和TOPO克隆测序、ILLUMINA[®]扩增子测序、纳米孔测序, 其他NGS测序方法和序列捕获 (Gnirke, A., 等人, Nat. Biotechnol., 2009, 27, 182-189)。

[0108] 在经编辑的猪成纤维细胞中以及随后在注射的胚胎中筛查生化识别的脱靶位点。在用于生成经编辑的猪时, 不优先考虑具有经过验证的脱靶编辑的向导。使用上文概述的策略, 可以查询使用具有已知脱靶的向导生成的动物是否存在脱靶编辑。可以将确实含有脱靶编辑的动物从育种体系中移除, 也可以通过育种将脱靶编辑移除。该筛查可以包括生物信息学方法, 例如BLAST[®]搜索, 以识别猪基因组中含有与向导RNA的1-5个错配的序列, 从而可以实现脱靶结合。当在计算机算法中允许这些错配时, 基因组中潜在脱靶结合位点的数量在表4中详细显示。

[0109] 表4: 错配检测

位点	部位—Spy 坐标	SEQ ID		错配 ≤ 5	
		SEQ IDSpy	SEQ ID Stherm	位点	Stherm C3
1	chr5:63300236-63300258	19	20	920	142
2	chr5:63300308-63300330	32	33	625	51
3	chr5:63301997-63302019	41	42	506	37
4	chr5:63303121-63303143	43	44	1625	201
5	chr5:63303137-63303159	47	48	474	32
6	chr5:63303140-63303162	49	50	548	49
7	chr5:63303166-63303188	52	53	692	92
8	chr5:63303169-63303191	54	55	782	94
9	chr5:63303181-63303203	56	57	1346	200
10	chr5:63303184-63303206	58	59	1873	382
11	chr5:63303189-63303211	60	61	1642	240
12	chr5:63303378-63303400	86	87	588	53
13	chr5:63303413-63303435	91	92	545	50
14	chr5:63306108-63306130	103	104	480	49
15	chr5:63306144-63306166	108	109	344	21
16	chr5:63306147-63306169	110	111	451	44
17	chr5:63306251-63306273	116	117	1343	65
18	chr5:63306336-63306358	125	126	718	66
19	chr5:63306371-63306393	130	131	1310	131
20	chr5:63309035-63309057	134	135	690	83
21	chr5:63309077-63309099	138	139	949	95
22	chr5:63309084-63309106	140	141	1234	99
23	chr5:63309273-63309295	164	165	418	47
24	chr5:63309308-63309330	170	171	747	95
25	chr5:63309857-63309879	174	175	795	47
26	chr5:63309860-63309882	176	177	736	94
27	chr5:63309886-63309908	179	180	1829	124
28	chr5:63309889-63309911	182	183	1575	94
29	chr5:63309933-63309955	187	188	871	95
30	chr5:63310098-63310120	203	204	533	73
31	chr5:63310100-63310122	206	207	537	53

导致在这些脱靶位点切割的因素之一可能是基因编辑成分是以DNA载体还是RNA-蛋白质复合物的形式传递。当Cas9和向导RNA可以作为单个向导核糖核苷酸蛋白复合物 (sgRNP) 递送而不是通过DNA载体递送时,可以准确地将可能具有少至1或2个碱基错配的位点与预期的靶位点区分。

[0110] 最大化Cas9向导RNA试剂特异性的第二点考虑因素是使用体外生化方法预筛查向导RNA-蛋白质对。一些实验室已经公布了筛查脱靶编辑位点的方法。这些生化方法可以识别纯化的基因组DNA中潜在的脱靶Cas9切割位点。使用这些检测方法,可以用一定范围的sgRNP浓度(从检出限到饱和)消化基因组DNA,从而实现高切割敏感性脱靶位点和低切割敏

感性脱靶位点。参见例如, Cameron等人, SITE-SEQ[®]: A Genome-wide Method to Measure Cas9 Cleavage, Protocol Exchange (2017)。

[0111] 通过脱靶筛查识别的脱靶位点, 可用于指导对细胞中可能的脱靶位点进行的仔细全面的检查, 测量编辑频率和功能性细胞结果。可以筛查几个所选择的向导RNA-Cas蛋白质对, 且该筛查可以证明: 1) 更靠近CD163基因5'端的高效切割, 以及2) 通过生物信息学方法确定的错配序列很少。

[0112] 使用此向导选择标准, 基于猪无精生殖生物中的切割活性, 可以选择几个向导RNA-Cas蛋白质对。可以使用电流加倍猪卵母细胞, 向其注入向导RNA-Cas蛋白质, 使其发育7天, 然后收集, 并在预期的靶位点进行DNA测序。可以识别出几种向导RNA-Cas蛋白质对, 以高频率对无精生殖生物进行编辑。选择该几种向导RNA-Cas蛋白质对, 供进一步发育。

[0113] 本说明书提供并包括用于识别和选择最佳靶位点的方法, 该最佳靶位点用于CRISPR/Cas介导的切割和基因编辑。在一个方面中, 该方法可以包含识别用于编辑的基因组的靶区域; 识别靶区域中的所有20个核苷酸序列; 进行生物信息学筛查, 以识别和移除与猪基因组中非靶位点匹配的序列, 该序列含有1至4个错配并具有基于Cas蛋白质的合适PAM序列; 制备包含向导RNA主链和靶序列的CRISPR/Cas RNP复合物, 将CRISPR/Cas RNP复合物引入培养物中的猪细胞, 确定向导RNA/Cas组合的平均编辑频率。在一方面中, 确定向导RNA/Cas组合的平均编辑频率, 可包含通过PCR扩增靶位点周围的区域, 进行扩增子深度测序, 并将其与未经处理的细胞比较。在一方面中, 该方法提供选择优选的靶序列, 其可以具有至少15的平均编辑频率。还提供了为CRISPR/Cas介导的切割和基因编辑识别和选择最佳靶位点的方法, 其中可以将向导RNA和Cas蛋白质作为表达载体或载体的部分提供。本领域技术人员已知合适的细胞, 其可以包括但不限于预期的猪育种系的原代胎儿成纤维细胞。

[0114] 可以设计多个修复模板, 以生成框内终止密码子。所列的修复模板在与核酸内切酶系统中的适当向导RNA一起使用时, 可在修复后产生框内终止密码子 (TAA、TGA、TAG)。可以使用不同长度的修复模板, 在编辑位点的任一侧具有序列一致性。在一方面中, 修复模板可以在CRISPR/Cas核酸内切酶切割位点的任一侧共享至少15个核苷酸 (例如, 15至15个核苷酸)。在其他方面, 修复模板可以在编辑位点的任一侧共享100个以上的核苷酸 (例如, >100 ~ >100)。修复模板可以是互补DNA (使用末端的突出端) 的单链、双链或交错链。此外, 这些模板不仅限于DNA, 还可以是RNA, 或经修饰的核苷酸 (例如, 肌苷), 或这些碱基的混合物, 且其5'和或3'端受保护, 以防降解。因为存在从末端切割核苷酸的核酸外切酶, 所以用经修饰的碱基保护末端可以在细胞中防止核酸外切酶消化DNA和RNA。不受理论的限制, 增加编辑位点两侧的一致性区域的长度, 可以提高修复过程的效率和特异性 (例如“同源臂”)。本说明书包括并提供了可以针对编辑位点的两侧上的至少25个核苷酸具有100%一致性的修复模板。该核心一致性区域确保了期望的编辑 (例如, SEQ ID NOs: 1至13的缺失) 准确高效。在一个方面中, 核心一致性区域可以是编辑位点侧翼的至少40个核苷酸。在又一个方面中, 核心一致性区域可以是编辑位点两侧上的至少50个核苷酸。在一个方面中, 侧翼核心区域可以包含100%一致性的60个核苷酸。一方面中还包括修复模板, 其可以与编辑位点侧翼的染色体区域相比具有70个一致的核苷酸。在一个方面中, 核心一致性区域可以与编辑位点侧翼的染色体区域相比具有75个一致性核苷酸。在一个方面中, 核心一致性区域可以包含25至40个侧翼核苷酸。在又一个方面中, 核心一致性区域可以包含40至75个侧翼核苷酸。

[0115] 在一些方面中,核心一致性区域可以进一步有靶位点的附加同源性区域(“侧翼同源性区域”)位于其侧翼。如本文所述,在一方面中,侧翼同源性区域可以包含与靶位点的100%一致性。作为示例,如在第2、3、15、19、27、62或65系中发现的,SEQ ID NOs:1至13与靶向编辑位点的任一侧上的CD163区域共享100%的同源性(例如,在核心区域和侧翼同源区域中的100%的同源性)。还包括可以包含SEQ ID NOs:1至13的修复模板,其中核心一致性区域可以包含与预期编辑(例如,碱基50至100)的任一侧上的基因组的25个核苷酸的100%一致性,且核心一致性区域可以有核心区域(例如,SEQ ID NOs:1至18的核苷酸1至49和101至150)任一侧上的基因组的至少80%一致性位于其侧翼。在另一方面中,核心区域可以具有100%的同源性,而侧翼同源性区域可以共享85%的同源性。在又一方面中,核心区域可以具有100%的同源性,而侧翼同源性区域可以共享90%的同源性。在再一方面中,核心区域可以具有100%的同源性,而侧翼同源性区域可以共享95%的同源性。一方面中还包括修复模板,其可以具有100%同源性的核心区域和共享97%同源性的侧翼同源性区域。在一些方面中,侧翼同源性区域可以共享99%同源性。不受理论的限制,增加侧翼同源性区域的长度,被认为可以无需进一步修饰基因组就将预期的CD163编辑引入相关动物。即,特别包括并提供了在其他猪的CD163基因组中引入多态性或变化的特定修复序列。

[0116] 本说明书包括并提供了侧翼同源性区域,其在编辑位点的每侧可具有多于50个核苷酸。在一个方面中,侧翼同源性区域在编辑位点的每侧可具有多于75个核苷酸。在一个方面中,侧翼同源性区域在编辑位点的每侧可具有多于100个核苷酸。还包括了在编辑位点的每侧可具有多于200个核苷酸的侧翼同源性区域。在一些方面中,侧翼同源性区域在编辑位点的每侧可具有30至1000个核苷酸。

[0117] 本说明书包括并提供了位于修复模板的5'和3'端的附加修饰。修复模板不仅限于DNA,还可以是RNA,或经修饰的核苷酸(例如,肌苷),或这些碱基的混合物,且其5'和或3'端受保护,以防降解。因为存在从未端切割核苷酸的核酸外切酶,所以用经修饰的碱基保护末端可以在细胞中防止核酸外切酶消化DNA和RNA。相应地,如本文所述,可以修饰包含侧翼同源性区域的修复模板的5'和3'端,以防止降解。

[0118] 本说明书提供并包括核糖核蛋白(RNP)复合物,其可以包含向导多核苷酸和Cas蛋白质。在一个方面中,Cas蛋白质可以是嗜热链球菌Cas9。在另一个方面中,Cas蛋白质可以是酿脓链球菌中的Cas9。其他合适的Cas蛋白质在本领域是已知的,示例性Cas系统在上表1中有所描述。合适的Cas蛋白质的选择取决于所需的PAM序列组合,识别Cas蛋白质和修饰Pam序列的方法是已知的。类似地,Cas系统在对向导RNA主链序列(例如,tracrRNA序列)的要求上有所不同。在一方面中,RNP复合物可包含Cas蛋白质和向导核苷酸,该向导核苷酸与选自由每个SEQ ID NOs:22至271和347至425中的前20个核苷酸组成的组的RNA序列具有至少98%的序列一致性。在另一方面中,RNP复合物可包含向导RNA,该向导RNA包含选自由每个SEQ ID NOs:22至271和347至425中的前20个核苷酸组成的组的序列。在一方面中,RNP复合物可包含向导多核苷酸,该向导多核苷酸与选自由每个SEQ ID NOs:22至271和347至425中的前20个核苷酸组成的组的序列具有99%一致性。在一方面中,RNP复合物的向导多核苷酸可包含选自由每个SEQ ID NOs:22至271和347至425中的前20个核苷酸组成的组的序列。如本文所述,RNP复合物可包含SEQ ID NOs:22至271和347至425中任一项的序列,该序列与作为sgRNA部分的RNA主链组合。在一方面中,RNP复合物可以在向靶细胞注射前预制,或者

可以分开注射或引入。

[0119] 本说明书中还提供并包括分离的向导RNA,该分离的向导RNA可以包含选自由每个SEQ ID NOs:22至271中的前20个核苷酸和每个SEQ ID NOs:347至425中的前20个核苷酸组成的组的间隔区。在一方面中,Cas蛋白质可以是包含SEQ ID NOs:20或21的蛋白质。

[0120] 本说明书还包括并提供了DNA载体,该DNA载体可编码用于CRISPR/Cas RNP的制备的向导RNA。通常,编码向导RNA的载体可包含选自由每个SEQ ID NOs:22至271或SEQ ID NOs:347至425中的前20个核苷酸组成的组的序列,以及以顺式并作为单个转录单位的部分而布置的向导RNA主链。在合适的细胞中表达后,DNA载体可以产生本说明书中的sgRNA。本领域技术人员普遍知晓合适的表达载体主链,包括启动子、可选择的标志物以及复制起点。在实践中,这20个核苷酸和向导RNA主链可以是DNA(当从启动子表达,在体内(细胞内)或体外(通过T7聚合酶)被转录)以形成RNA向导,或者主链可以是化学合成的双(crRNA和trRNA)向导或单向导RNA。

[0121] 通过使用配对的向导RNA删除位于那些向导之间的基因段,可以配对特定的向导RNA,以切除CD163基因的部分。表5提供了示例性的向导RNA对(列为DNA序列)。列出的不包含外显子7氨基酸序列的向导对移除整个外显子。这些缺失的完整氨基酸序列在SEQ ID NO:553中列出。表5中的所有向导可以通过切除两个向导之间的DNA和在切割位点之间进行NHEJ修复即可创造预期序列,无需使用DNA修复模板。导致产生SEQ ID NOs:506-517中列出的氨基酸序列的向导对可以在由该向导引入的DNA的切割端引入外源性终止密码子。

[0122] 表5示例性向导RNA对

SEQ ID NO: (5')	切割位点(5')	SEQ ID NO: (3')	切割位点(3')	缺失尺寸 (bp)	修复序列 SEQ ID	外显子 7AA SEQ ID
229	63322816	256	63323377	561	426	N/A
230	63322814	256	63323377	562	427	N/A
231	63322826	256	63323377	551	428	N/A
237	63322861	256	63323377	516	429	N/A
241	63322891	256	63323377	486	430	N/A
229	63322816	258	63323378	562	431	N/A
230	63322814	258	63323378	563	432	N/A
231	63322826	258	63323378	552	433	N/A
237	63322861	258	63323378	517	434	N/A
241	63322891	258	63323378	487	435	N/A
229	63322816	261	63323373	558	436	N/A
230	63322814	261	63323373	559	437	N/A
231	63322826	261	63323373	548	438	N/A
237	63322861	261	63323373	513	439	N/A
241	63322891	261	63323373	483	440	N/A
219	63322697	256	63323377	680	441	N/A
221	63322709	256	63323377	668	442	N/A
224	63322747	256	63323377	630	443	N/A
227	63322786	256	63323377	591	444	N/A
219	63322697	258	63323378	681	445	N/A
221	63322709	258	63323378	669	446	N/A
224	63322747	258	63323378	631	447	N/A
227	63322786	258	63323378	592	448	N/A
219	63322697	261	63323373	677	449	N/A
221	63322709	261	63323373	665	450	N/A
224	63322747	261	63323373	627	451	N/A
227	63322786	261	63323373	588	452	N/A
249	63322963	256	63323377	414	453	N/A
250	63322973	256	63323377	404	454	N/A
249	63322963	258	63323378	415	455	N/A
250	63322973	258	63323378	405	456	N/A
249	63322963	261	63323373	411	457	N/A
250	63322973	261	63323373	401	458	N/A
351	63323023	365	63323103	80	459	506
351	63323023	387	63323235	212	460	506
348	63323027	390	63323236	209	461	507
348	63323027	388	63323236	209	462	507
348	63323027	395	63323284	257	463	507

352	63323035	365	63323103	68	464	508
352	63323035	387	63323235	200	465	508
352	63323035	399	63323283	248	466	508
353	63323038	365	63323103	65	467	509
353	63323038	387	63323235	197	468	509
353	63323038	399	63323283	245	469	509
354	63323039	390	63323236	197	470	509
354	63323039	388	63323236	197	471	509
354	63323039	395	63323284	245	472	509
358	63323056	361	63323077	21	473	510
358	63323056	362	63323087	31	474	510
358	63323056	368	63323124	68	475	510
358	63323056	384	63323203	147	476	510
358	63323056	394	63323272	216	477	510
358	63323056	399	63323283	227	478	511
359	63323057	390	63323236	179	479	511
359	63323057	388	63323236	179	480	511
359	63323057	395	63323284	227	481	511
360	63323058	368	63323124	66	482	511
360	63323058	384	63323203	145	483	511
360	63323058	389	63323237	179	484	511
360	63323058	394	63323272	214	485	511
360	63323058	397	63323285	227	486	511
361	63323077	365	63323103	26	487	512
361	63323077	387	63323235	158	488	512
362	63323087	390	63323236	149	489	513
362	63323087	388	63323236	149	490	512
362	63323087	395	63323284	197	491	513
364	63323089	365	63323103	14	492	514
364	63323089	387	63323235	146	493	514
364	63323089	399	63323283	194	494	514
365	63323103	368	63323124	21	495	515
365	63323103	384	63323203	100	496	516
365	63323103	389	63323237	134	497	516
365	63323103	394	63323272	169	498	516
365	63323103	397	63323285	182	499	516
366	63323118	368	63323124	6	500	517
366	63323118	384	63323203	85	501	517
366	63323118	389	63323237	119	502	517
366	63323118	394	63323272	154	503	517
366	63323118	397	63323285	167	504	517
354	63323039	211	63323163	123	505	518

在一些方面中,向导RNA-Cas蛋白质对可进一步包含DNA修复模板。表6列出了创建终止密码子的示例性向导和修复模板。这些和其他向导可以与其他修复模板配对,示例性

地,以生成框内终止密码子,或扰乱、干预、或消除外显子剪接,以干扰CD163 mRNA的转译或处理。其他示例可包括但不限于消除起始ATG密码子,或在使用向导RNA对时编程修复结果,其中当核酸酶对去除CD163中的外显子(例如,对应于域5的外显子7的缺失)后,与随机非同源末端连接相比,修复模板可以提升单个修复结果。不受理论的限制,分析揭示了PAM (nGGnG) 中包括了额外的nG,生物信息学错配可持续减少,,且体外和体内的脱靶切割减少。错配的减少可以包括那些从校准角度来看的错配(无论DNA序列是否与RNA向导序列错配)。见表4。错配可能不是脱靶编辑(分别在体外或体内切割或存在插入缺失),但是脱靶编辑可能是由错配造成得。在最优的方面中,本文公开的方法不在猪中产生脱靶编辑,并且本文公开的猪的基因组中不具有脱靶编辑。

[0123] 表6:用于编辑CD163的外显子2的向导RNA和修复模板

Chr5区域 向导RNA结合 位点的位置	63301998- 02017	63301997- 02016	63303213- 03232	63303283- 03302	63303315- 03334	63303315- 03334	63303338- 03357	63303379- 03398	63303379- 03398	63306148- 06167	63306263- 06282	63306364- 06383	63323147- 23166
修复模板 SEQ ID NO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
向导RNA间隔物 (DNA) SEQ ID NO	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286
向导RNA间隔物 (RNA) SEQ ID NO	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299
WT区域 SEQ ID NO:	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312
WT区域的转译	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325
删除的转译	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338
碱基删除坐标	chr5: 6330 1999- 6330	chr5: 6330 1999- 6330	chr5: 6330 3234- 6330	chr5: 6330 3304- 6330	chr5: 6330 3336- 6330	chr5: 6330 3337- 6330	chr5: 6330 3351- 6330	chr5: 6330 3399- 6330	chr5: 6330 3400- 6330	chr5:6 33061 56- 63306	chr5: 6330 6282- 6330	chr5: 6330 6373- 6330	chr5: 6332 3159- 6332
删除的碱基(#)	CTT GGT C (7)	CTT GGT C (7)	GG (2)	GGC T (4)	G (1)	G (1)	CTT GTC (6)	GGG (3)	GGG (3)	TTC (3)	CTC (3)	CGA TC (5)	CGG C (4)

非同源末端连接 (NHEJ) 修复的随机自然细胞修复过程有时涉及在双链断裂处插入或删除单个或多个核苷酸。作为该修复过程的结果,如果在基因的编码区域中发生双链断裂,则可导致被编码的mRNA的转译阅读框发生移位,直到框内终止密码子终止蛋白质转译为止。尽管相对于未修饰版本的蛋白质产物而言,这种自然且偶然突变的基因的转译可以产生缩短的蛋白质,但是这种新编码的多肽的氨基酸序列将是唯一的,这可能会降低或甚至改良靶标生物内细胞的适应性。在一个方面中,为了阻止移码突变的产生和这组不良多肽的转译,可以筛查经编辑的猪在核酸内切酶切割位点处或其附近的框内转译终止密码子的形成,这是单独且自然发生的NHEJ修复的结果。

[0124] 通过连同使用两个基因内向导RNA和核酸内切酶的切除基因组DNA序列,可以通过NHEJ修复来完成,该NHEJ修复包括但不限于核酸酶切割位点的端对端连接。由于内含子是非编码的,NHEJ修复结果(包括核酸酶切割位点周围的插入缺失)可以完成对DNA预期区域的切除,而该区域可以包括内含子和/或外显子序列。由于某些NHEJ修复结果的发生频率比其他结果高,因此在选择用于基因编辑实验的向导RNA对时考虑修复结果的频率是有利的。

SEQ ID NOs:520-555说明了表7所列向导对在囊胚中观察到的外显子7切除的修复结果。表5列出了这些向导对的计划修复结果。

[0125] 表7囊胚中观察到的修复结果

SEQ ID NO: (5')	SEQ ID NO: (3')	修复结果 SEQ ID
249	261	520
249	261	521
249	261	522
249	261	523
249	261	524
249	261	525
249	261	526
249	261	527
249	256	528
249	256	529
249	256	530
249	256	531
249	256	532
249	256	533
249	256	534
249	256	535
241	258	536
241	258	537
241	258	538
241	258	539
241	258	540

241	258	541
241	258	542
241	258	543
241	258	544
221	261	545
221	261	546
221	261	547
221	261	548
221	261	549
229	256	550
229	256	551
229	256	552
229	256	553
229	256	554
229	256	555

在另一方面中,在基因编辑期间,可以通过包括DNA修复模板与向导RNA-Cas蛋白质对,产生不导致添加新氨基酸的框内终止密码子。在一个方面中,DNA修复模板可以是dsDNA。在另一个方面中,DNA修复模板可以是ssDNA。共引入双链或单链DNA修复模板可用于删除或插入DNA核苷酸,以在核酸内切酶引发的双链断裂位点处或其附近形成框内转译终止密码子(TAA、TGA、TAG)。DNA修复模板可以进一步包含多核苷酸修饰模板,该多核苷酸修饰模板与天然序列相比含有几点核苷酸变化。该多核苷酸修饰模板可以直接编辑靶DNA序列,并且可以与核酸内切酶编辑试剂共转染,以生成具有框内终止密码子的经编辑的CD163基因。在一个方面中,当被转录为mRNA继而转译为蛋白质时,这些经基因编辑的CD163基因中的被编码的蛋白质只能合成缩短且无功能形式的CD163多肽。不受理论的限制,具有更长序列同源性区域的DNA修复模板可以更高效。在某些实施方案中,DNA修复模板可以在DNA修复模板内含有序列一致性(同源臂)的区域,其可以位于序列变化的侧翼,且其范围可以在从少于50个核苷酸到大于1000个核苷酸之间。

[0126] 表6显示了Cas9-蛋白质/向导RNA组合以及DNA修复模板的几个方面。如表6所示,

几种Cas9-蛋白质/向导RNA组合可以与DNA修复模板配对,该DNA修复模板在靶缺失(50个核心同源性碱基和任一侧侧翼同源性区域的50个)的每一侧具有但不限于序列同源性的75个碱基。在一方面中,可以将蛋白质-向导RNA复合物和模板组合转染到细胞中。不受理论的限制,使用DNA修复模板修复双链断裂,可指导框内转译终止密码子的形成,这是断裂位点处或其邻近处的单个或多个核苷酸缺失的结果。通过这种方法获取的动物和细胞证明,可以使用共引入的DNA修复模板来修复猪CD163基因上的核酸内切酶-引导的双链断裂。如本文所述,具有序列SEQ ID NOs:1至13的修复模板可以在外显子2中引入框内转译终止密码子,从而产生缩短且无功能的CD163蛋白质。

[0127] 根据本说明书的DNA修复模板的使用不限于废除CD163的功能。本说明书进一步包括并提供了一种修复模板,其可以指导核苷酸从基因的移除或向基因的添加。在一个方面中,可通过根据本发明方法的编辑,来调节经编码的CD163 mRNA的稳定性或半衰期调节。在又一方面中,可以移除或替换编码负责结合PRRS病毒的成熟蛋白质的氨基酸的DNA序列。在一方面中,CD163的表达和或活性可以被降低至少90%,但不废除。在本发明的一个方面中,本领域技术人员将考虑到一起使用上述间隔区序列和其他修复模板,以允许通过移除碱基和引入碱基或其组合来形成框内终止密码子。

[0128] 本说明书包括并提供衍生自优良猪系,并包含经编辑的CD163基因的猪。在一些方面中,优良猪系可以是PICTM系15、PICTM系17、PICTM系27、PICTM系65、PICTM系14、PICTM系62、PIC337、PIC800、PIC280、PIC327、PIC408、PICTM399、PIC410、PIC415、PIC359、PIC380、PIC837、PIC260、PIC265、PIC210、PICTM系2、PICTM系3、PICTM系4、PICTM系5、PICTM系18、PICTM系19、PICTM系92、PIC95、PICTM CAMBOROUGH[®] (猪改良有限公司,贝辛斯托克,英国)、PIC1070、PICTM CAMBOROUGH[®] 40、PICTM CAMBOROUGH[®] 22、PIC1050、PICTM CAMBOROUGH[®] 29、PICTM CAMBOROUGH[®] 48,或PICTM CAMBOROUGH[®] x54。在各种方面中,优良猪系可以是PICTM优良猪系2、3、15、19、27、62或65。在另一方面中,猪可包含源自优良猪系的经编辑的CD163基因。在一些方面中,猪可以在具有表8至表14所示的基因型的CD163基因组区域中包含经编辑的CD163。表8至表14显示了CD163基因附近的5号染色体上的每个位置,CD163基因中存在单个核苷酸多态性。

[0129] 每个表均显示在该系中是纯合子的等位基因,并提供该系的区别基因特征及其独特的基因组编辑区域。所有基因特征均基于Sscrofa11.1参考基因组(GenBank编号:GCA_000003025.6)。相应地,经编辑的CD163系的传播可以被追踪,包含从该系获取的经编辑的CD163基因的动物也可以被识别。与表8至表14中的系相比,其他系的猪在多个等位基因上是杂合的或具有相反基因型。以这种方式,每个系中基因特征的组合可用于区分属于特定系的猪和不属于特定系的猪。在一方面中,基因特征提供了一代又一代地育种和跟踪CD163经编辑的基因组的方法。在一方面中,可以制备包含具有根据表8至表14的基因特征的CD163经编辑的基因组的后代。

[0130] 表8:系2基因特征

位置	基因型	位置	基因型	位置	基因型	位置	基因型
60306428	C/C	60354925	C/C	63553656	G/G	65411831	C/C
60306527	C/C	60355415	G/G	63558087	G/G	65411848	G/G
60308030	C/C	60355420	T/T	63640722	G/G	65411854	T/T
60320580	C/C	60355448	G/G	63792071	T/T	65411966	C/C
60322529	A/A	60355529	A/A	64009226	C/C	65412729	G/G
60324162	T/T	60355530	A/A	64459105	T/T	65413215	G/G
60327987	C/C	60355774	C/C	64460101	A/A	65413759	C/C
60328009	T/T	60356277	C/C	64527707	A/A	65417199	A/A
60335421	T/T	60356351	C/C	64577968	C/C	65417256	G/G
60338654	G/G	60356575	C/C	64943306	T/T	65417261	A/A
60344946	A/A	60356578	T/T	65242696	T/T	65417273	C/C
60345163	C/C	60356861	G/G	65242725	A/A	65417287	G/G
60345689	G/G	60356885	T/T	65242729	A/A	65417716	G/G
60345715	G/G	60356898	T/T	65242736	G/G	65417797	C/C
60345722	A/A	60356914	C/C	65249484	T/T	65417800	C/C
60345749	G/G	60357001	T/T	65260283	T/T	65419169	G/G
60345775	A/A	60357014	T/T	65269510	C/C	65419410	G/G
60345825	A/A	60358409	C/C	65273886	T/T	65420017	T/T
60346409	G/G	60358449	G/G	65276133	C/C	65420184	G/G
60346607	A/A	60358469	T/T	65277053	T/T	65420415	A/A
60346641	G/G	60358475	T/T	65277156	C/C	65420591	G/G
60346691	T/T	60358551	A/A	65277320	G/G	65420680	C/C
60346734	A/A	60358568	G/G	65280282	A/A	65420681	A/A
60347297	G/G	60358641	T/T	65282683	C/C	65420693	G/G
60350295	C/C	60358704	T/T	65283434	C/C	65420947	G/G
60350343	G/G	60358774	T/T	65283970	C/C	65420949	T/T
60350448	C/C	60368913	C/C	65284829	C/C	65421133	G/G
60350470	T/T	60368916	A/A	65285100	C/C	65421195	G/G
60350475	C/C	60368921	T/T	65285902	G/G	65421255	G/G
60350564	A/A	60368940	G/G	65285914	T/T	65421365	G/G
60350571	A/A	60368963	C/C	65286400	C/C	65421421	C/C
60350572	A/A	60416097	G/G	65294497	T/T	65422005	G/G
60350911	C/C	60543479	C/C	65383805	C/C	65422008	G/G
60351055	G/G	60614797	G/G	65405986	C/C	65422057	T/T
60351604	C/C	60614964	G/G	65410118	C/C	65422141	C/C
60351855	T/T	60920926	G/G	65410147	G/G	65422701	C/C
60351857	C/C	61479206	C/C	65410198	C/C	65422725	C/C
60351972	G/G	61479353	T/T	65410435	C/C	65425730	G/G
60352165	C/C	61653091	C/C	65410440	T/T	65601310	C/C
60352923	C/C	61783688	A/A	65410441	C/C	65602328	C/C
60353408	A/A	62091204	A/A	65410443	C/C	65711602	C/C
60353562	T/T	62416522	A/A	65410447	C/C	65761990	C/C

位置	基因型	位置	基因型	位置	基因型	位置	基因型
60353576	C/C	62476273	C/C	65411265	C/C	66293766	G/G
60353659	T/T	62687883	C/C	65411431	G/G	66296268	A/A
60353721	G/G	63044336	A/A	65411524	C/C		
60354428	G/G	63546615	C/C	65411698	G/G		

表9:系3基因特征

位置	基因型	位置	基因型	位置	基因型	位置	基因型
60414864	T/T	64555715	G/G	64774093	G/G	66035868	A/A
60415813	C/C	64561148	G/G	64775512	G/G	66042409	C/C
60415854	G/G	64561209	G/G	64775565	C/C	66042542	C/C
60572371	A/A	64561659	G/G	64780089	C/C	66042551	C/C
60663464	C/C	64561828	T/T	64780152	C/C	66042557	A/A
60663499	A/A	64561873	G/G	64780196	C/C	66042563	G/G
61016527	G/G	64561935	C/C	64783169	G/G	66155827	A/A
61442674	T/T	64562021	C/C	64783774	C/C	66155859	A/A
61870484	C/C	64562771	C/C	64783896	G/G	66155863	T/T
61989476	G/G	64563462	G/G	64784000	T/T	66156160	A/A
62510031	G/G	64682243	C/C	64784139	C/C	66156183	G/G
62602514	T/T	64682929	G/G	64784235	T/T	66156533	G/G
63044336	A/A	64685072	T/T	64784410	A/A	66167582	C/C
63345577	G/G	64692673	G/G	64784653	A/A	66167809	C/C
63452493	A/A	64692905	T/T	64784725	C/C	66167823	T/T
63669675	G/G	64693058	T/T	64784844	A/A	66167877	A/A
63754659	T/T	64705228	G/G	64784875	T/T	66167888	C/C
63810627	C/C	64720067	A/A	64785001	A/A	66167905	A/A
63810632	G/G	64722426	T/T	64785078	C/C	66168135	C/C
63810707	T/T	64722539	C/C	64813032	G/G	66168261	C/C
63810733	G/G	64726936	G/G	64819974	C/C	66168311	G/G
63810819	C/C	64729340	C/C	64893099	G/G	66168615	G/G
63810857	C/C	64730596	G/G	64899922	A/A	66168688	G/G
63810861	G/G	64736752	G/G	64934758	C/C	66168742	G/G
64010555	T/T	64761650	G/G	65348500	G/G	66168880	G/G
64010599	A/A	64767369	G/G	65546268	A/A	66168947	T/T
64452338	T/T	64768411	G/G	65546327	G/G	66168952	A/A
64455982	C/C	64769978	T/T	65841270	T/T	66168993	A/A
64457532	T/T	64769989	C/C	65858531	G/G		
64458163	TtT	64770307	G/G	65979134	G/G		
64458711	G/G	64773053	A/A	65985520	C/C		

表10:系15基因特征

位置	基因型	位置	基因型	位置	基因型	位置	基因型
60391943	G/G	61515967	T/T	63367266	G/G	64537982	T/T
60392234	T/T	61759785	C/C	63424311	T/T	64893205	A/A
60394009	A/A	61759821	C/C	63535058	T/T	64916422	G/G
60414796	T/T	61865586	A/A	63653754	G/G	65039734	C/C
60601475	A/A	61867498	C/C	63655538	T/T	65175496	C/C
60630898	A/A	62192420	G/G	63669242	A/A	65177506	G/G
60630910	A/A	62195570	A/A	63669944	C/C	65294016	C/C
60786421	G/G	62196101	C/C	63669946	G/G	65571397	A/A
60787517	G/G	62442547	G/G	63900332	A/A	65573608	T/T
60792231	G/G	62509196	T/T	64138082	C/C	65576707	C/C
60795724	C/C	62675268	G/G	64171653	C/C	65984917	G/G
60915104	C/C	62843969	G/G	64471845	G/G	65984984	T/T
61016227	A/A	62852334	A/A	64472363	A/A	65985058	T/T
61086145	T/T	63025151	A/A	64472504	TfT	65985392	C/C
61275101	C/C	63025152	C/C	64472616	TfT	66042472	C/C
61396087	A/A	63168616	A/A	64523343	A/A	66099282	A/A
61434042	G/G	63266682	T/T	64536599	G/G	66119075	T/T

表11:系19基因特征

位置	基因型	位置	基因型	位置	基因型	位置	基因型
60320100	A/A	61390748	C/C	63174233	T/T	65031621	C/C
60320144	G/G	61465215	T/T	63174257	A/A	65031630	C/C
60320580	C/C	61567329	C/C	63393845	G/G	65031684	T/T
60507836	C/C	61567357	A/A	63393849	T/T	65222383	T/T
60512716	G/G	61567365	A/A	63393851	TfT	65222385	A/A
60564418	A/A	61567410	C/C	63860532	A/A	65242693	C/C
60666662	T/T	61567494	C/C	63861247	A/A	65497229	G/G
60683738	T/T	61567594	G/G	63862368	T/T	65499233	C/C
60782197	T/T	61975156	G/G	64138082	C/C	65502398	G/G
60782278	T/T	61975367	G/G	64171653	C/C	65562917	C/C
60782642	A/A	61975382	A/A	64181448	G/G	65566225	T/T
60782683	G/G	61975388	C/C	64402245	TfT	65567066	T/T
60782756	G/G	62363513	T/T	64455172	G/G	65894449	C/C
60782997	G/G	62367647	G/G	64514012	C/C	65904537	T/T
60783031	C/C	62378299	G/G	64514013	A/A	65959573	A/A
60783198	G/G	62610431	T/T	64522169	G/G	65998062	C/C
61131519	G/G	62952267	T/T	64522173	T/T	66158553	A/A
61131736	C/C	62965473	T/T	64522177	TfT	66158950	C/C
61189029	C/C	63108711	G/G	64522178	C/C	66159103	A/A

61359517	A/A	63109224	T/T	64794635	G/G	66159212	G/G
----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----

表12:系27基因特征

位置	基因型	位置	基因型	位置	基因型	位置	基因型
60347934	A/A	62159353	T/T	62918655	T/T	64582272	A/A
60356984	C/C	62313847	C/C	63042154	C/C	64600735	G/G
60692943	C/C	62315464	A/A	63043261	G/G	65056396	A/A
60693260	G/G	62570257	C/C	63046692	G/G	65056671	T/T
60693769	G/G	62570793	A/A	63433705	G/G	65332987	A/A
60938885	T/T	62571313	T/T	63490990	A/A	65335837	C/C
60960728	A/A	62917536	G/G	63626018	A/A	65390844	A/A
61436306	G/G	62917597	T/T	63626423	T/T	65404042	A/A
61464114	C/C	62917618	C/C	63626826	C/C	65404045	A/A
61468375	G/G	62917629	T/T	63630149	A/A	65404063	C/C
61736415	A/A	62917780	G/G	63631098	C/C	65705261	G/G
61736429	G/G	62917866	T/T	63977777	A/A	65740018	T/T
61757961	G/G	62917889	T/T	63977821	G/G	65740030	A/A
61820110	A/A	62918448	G/G	64460204	C/C	66235840	G/G
61822513	T/T	62918456	A/A	64582243	C/C		
61858837	G/G	62918465	A/A	64582246	G/G		

表13:系62基因特征

位置	基因型	位置	基因型	位置	基因型	位置	基因型
60336383	A/A	61760230	C/C	62483897	T/T	64484177	T/T
60343172	A/A	61927492	T/T	62847072	G/G	64689271	A/A
60345254	G/G	61927506	A/A	62874766	G/G	64758235	C/C
60447765	G/G	62006220	T/T	62897778	A/A	64790188	C/C
60452143	C/C	62115641	T/T	63100290	C/C	64895383	C/C
60452167	T/T	62169134	T/T	63219344	G/G	64991645	A/A
60462769	T/T	62368918	C/C	63361759	G/G	65045805	T/T
60653700	T/T	62471593	C/C	63388357	C/C	65146186	C/C
60654939	A/A	62474001	A/A	63442314	G/G	65368620	C/C
60654943	A/A	62474006	C/C	63590333	T/T	65432698	C/C
61085770	A/A	62474365	A/A	63670724	G/G	65542716	A/A
61108831	G/G	62480042	A/A	63714834	A/A	65637507	G/G
61117357	A/A	62480261	G/G	63792005	T/T	65771614	C/C
61234908	C/C	62480699	A/A	63985848	A/A	65771615	G/G
61331270	A/A	62480892	A/A	63985923	G/G	65772162	T/T
61388824	G/G	62481902	G/G	64131088	C/C	66033248	T/T
61755575	C/C	62482914	T/T	64471400	C/C	66033476	C/C
61759095	C/C	62483893	C/C	64483848	G/G	66033484	C/C

表14: 系65基因特征

位置	基因型	位置	基因型	位置	基因型	位置	基因型
60322300	C/C	60783031	C/C	63383925	A/A	64759492	T/T
60411747	A/A	60783198	G/G	63392495	T/T	64795760	T/T
60412758	G/G	60791719	T/T	63549670	C/C	64797970	A/A
60412775	A/A	60900261	G/G	63593491	G/G	64798690	G/G
60412826	C/C	60911551	A/A	63609938	A/A	64860395	G/G
60413294	G/G	60912669	A/A	63641998	C/C	64860396	C/C
60459719	A/A	61223574	A/A	63678793	G/G	64862131	C/C
60462179	C/C	61486607	C/C	63784770	G/G	65371202	T/T
60492928	A/A	61756324	G/G	63810897	C/C	65371472	G/G
60492938	T/T	61832527	C/C	63810903	C/C	65371901	G/G
60666662	T/T	61895566	C/C	63810920	G/G	65371970	C/C
60722708	C/C	61895833	A/A	63810922	T/T	65372072	A/A
60770183	G/G	62354225	C/C	63810928	G/G	65409493	A/A
60770197	C/C	62364072	G/G	63872757	C/C	65437347	G/G
60777431	C/C	62383525	G/G	63944636	G/G	65573362	T/T
60781592	T/T	62399452	T/T	63944765	C/C	65601655	G/G
60782197	T/T	62404734	A/A	64138639	C/C	65747069	T/T
60782278	T/T	62432982	C/C	64194054	G/G	65843843	A/A
60782642	A/A	62841388	G/G	64242768	T/T	65849424	T/T
60782683	G/G	62931496	T/T	64270989	G/G	66248756	A/A
60782756	G/G	63156406	C/C	64753488	G/G		
60782997	G/G	63156417	T/T	64758888	A/A		
60783006	G/G	63266198	A/A	64758900	C/C		

优良PICTM系2、3、15、19、27、62和65是为优异的商业表型选择的系。在一个方面中，经CD163基因编辑的细胞和动物可以不含野生种群和许多商品畜群中存在的有害等位基因。在某些方面中，经CD163基因编辑的细胞和动物可以不含选自以下各项组成的组合一种或多种有害等位基因：上皮细胞生成不良、黑色素皮肤肿瘤、增殖性皮肤病、异常乳房、脊柱缩短、尾巴怪异、尾巴未充分发育、乏毛症、乏毛症(2)、羊毛状毛、脑积水、Tassels、无腿、三条腿、并趾、多趾、Pulawska因子、虹膜异色、先天性震颤A III、先天性震颤A IV、先天性共济失调、后腿瘫痪、屈膝腿、巨腿症、恶性高热、血友病(von Willebrand病)、白血病、溶血性疾病、水肿、急性呼吸窘迫(“barker”)、佝偻病、25例肾发育不良、肾囊肿、子宫发育不全、猪应激综合症(PSS)、氟烷(HAL)、肩下沉(弓背、曲背、脊柱后凸症)、骨质增生、乳腺发育不良，以及和未充分发育的乳房。如本文所述，制备经CD163基因编辑的动物的改良方法可以避免在有害基因座引入新的突变，或避免在非靶位点生成新的无效等位基因、亚效等位基因、超效等位基因、新效等位基因、反效等位基因突变。后面的这些变化在优良系中可能是特别不受欢迎的，因为它们可以干扰优良性状所涉的基因，这些基因可以由多个基因座在种群中以连续、定量的方式控制。许多这样的数量性状基因座(QTL)是已知的，其通常可以

通过钟形曲线来表征,可以用性状值与观察到的动物数量作图。此类性状多基因遗传特征在公认具有商业重要性的性状(例如但不限于背膘、平均日采食量、终生日增重和眼肌深度)中是常见的。

[0131] 类似地,与繁殖力相关联的性状可以是多基因的,并可以由多个QTL控制。这些性状通常通过目视检查来测定,但是目前方法可以包括超声,来测定背膘厚度(bfp)、眼肌深度(ldp)和肌肉脂肪(uip)。如表15所示,优良系可以具有期望的表型性状,其包括高背膘和眼肌深度,同时还具有高的终生日增重。类似地,优良系的母猪可以多产、产仔量大、死产少,并有足够的乳头来哺育仔猪。

[0132] 表15:期望的表型性状

系	TRT	平均	标准偏差
2	背膘,mm	7.8	1.81
3	背膘,mm	9.44	2.77
15	背膘,mm	8.16	2.03
65	背膘,mm	7.45	1.88
2	平均日采食量,kg	1.99	0.24
3	平均日采食量,kg	2.13	0.25
15	平均日采食量,kg	2.22	0.24
65	平均日采食量,kg	2.2	0.27
2	终生日增重,grams/day	683.83	73.53
3	终生日增重,grams/day	704.23	80.15
15	终生日增重,grams/day	755.61	69.32
65	终生日增重,grams/day	800.6	84.48
2	眼肌深度,mm	65.31	7.09
3	眼肌深度,mm	62.61	7.14
15	眼肌深度,mm	67.17	7.15
65	眼肌深度,mm	81.2	8
2	每窝产仔总数	13.71	3.19
3	每窝产仔总数	15.06	3.41
15	每窝产仔总数	10.39	2.71
65	每窝产仔总数	10.31	2.52
2	每窝死仔数	1.19	1.43
3	每窝死仔数	1.25	1.50
15	每窝死仔数	1.22	1.37
65	每窝死仔数	0.77	1.16
2	乳头数	15.43	1.27
3	乳头数	15.44	1.29

本说明书提供并包括所选优良系的基因编辑猪,其针对CD163敲除编辑可以是纯合的(CD163^{-/-})。在一方面中,该系可以选自由PICTM系2、系3、系15、系19、系27、系62、系65,以及包含本文所述的经编辑的CD163基因的子代组成的组。经基因编辑的系2、3、15、19、27、

62和65可以包含如表8至表14中所示的CD163基因组区域,并且它们之间容易区分,它们与未改良系、与其他优良系之间也容易区分。在根据本说明书的方面中,本说明书中的杂合猪和纯合猪可以没有脱位突变。本说明书提供并包括可具有经编辑的CD163基因的猪和细胞,该经编辑的CD163基因包含SEQ ID NOs:1至18和426至505,所述猪和细胞还可共享包含表8至表14中至少90%的基因型标记的基因特征。本说明书提供并包括可具有经编辑的CD163基因的猪和细胞,该经编辑的CD163基因包含SEQ ID NO:2,且所述猪和细胞共享包含表8至表14中至少90%的基因型标记的基因特征。在一个方面中,经CD163编辑的猪或细胞的基因特征可以共享包含表8至表14中至少95%的基因型标记的基因特征。还包括了经CD163编辑的猪或细胞可以共享包含表8至表14中至少97%的基因型标记的基因特征。在一个方面中,经CD163编辑的猪或细胞可以共享包含表8至表14中至少98%的基因型标记的基因特征。另一方面包括了经CD163编辑的猪或细胞可以共享包含表8至表14中至少99%的基因型标记的基因特征。

[0133] 如本文所述,系2、3、15、19、27、62和65的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,可以保留理想的商业性状,且不存在有害的脱靶突变,还可以包含经编辑的CD163基因,该经编辑的CD163基因包含SEQ ID NOs:1至18和426-505中任一。在本发明的一些方面中,系2、3、15、19、27、62和65的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,可以包含未经编辑的猪系的至少90%的眼肌深度,还可以包含经编辑的CD163基因,该经编辑的CD163基因包含SEQ ID NOs:1至18和426-505中任一。在本发明的一些方面中,系2、3、15、19、27、62和65的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,可以包含未经编辑的猪系的至少90%的终生日增重。在本发明的一些方面中,系2、3、15、19、27、62和65的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,可以包含未经编辑的猪系的至少90%的平均日采食量。本说明书提供并包括可具有经编辑的CD163基因的猪和细胞,该经编辑的CD163基因包含SEQ ID NOs:1至18和426至505,所述猪和细胞还可共享包含表8至表14中至少90%的基因型标记的基因特征。

[0134] 如本文所述,系2、3、15、19、27、62和65的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,可以保留理想的繁殖性状。在本发明的一些方面中,系2、3、15、19、27、62和65的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,包含SEQ ID NOs:1至18或426至505的经基因编辑的CD163^{-/-},该动物和细胞可以包含未经编辑的猪系的至少90%的每窝产仔总数。在本发明的一些方面中,系2、3、15、19、27、62和65的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,包含SEQ ID NOs:1至18或426至505的经基因编辑的CD163^{-/-},该动物和细胞相较于未经编辑的猪系,其可以包含不超过110%的死产仔猪数量。在本发明的一些方面中,系2、3、15、19、27、62和65的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,包含SEQ ID NOs:1至18或426至505的经基因编辑的CD163^{-/-},该动物和细胞相较于未经编辑的猪系,其可以包含不超过90%的平均乳头数。

[0135] 在一个方面中,系2的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,具有SEQ ID NOs:1至18或426至505的经基因编辑的CD163^{-/-},该动物和细胞的背膘可以是未经编辑的系2动物中发现数量的至少90%。在一个方面中,系2的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,其背膘可以是未经编辑的系2动物的至少97%。

[0136] 在一个方面中,系3的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,具有SEQ ID NOs:1至18或426至505的经基因编辑的CD163^{-/-},该动物和细胞的背膘可以是未经编辑的系3动物中发现数量的至少90%。在一个方面中,系3的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,其背膘可

以是未经编辑的系3动物的至少95%。在一个方面中,系3的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,其背膘可以是未经编辑的系2动物的至少97%。

[0137] 在一个方面中,系15的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,具有SEQ ID NOs:1至18或426至505的经基因编辑的CD163^{-/-},该动物和细胞的背膘可以是未经编辑的系15动物中发现数量的至少90%。在一个方面中,系15的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,其背膘可以是未经编辑的系15动物的至少95%。在一个方面中,系15的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,其背膘可以是未经编辑的系2动物的至少97%。

[0138] 在一个方面中,系19的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,具有SEQ ID NOs:1至18或426至505的经基因编辑的CD163^{-/-},该动物和细胞的背膘可以是未经编辑的系19动物中发现数量的至少90%。在一个方面中,系19的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,其背膘可以是未经编辑的系19动物的至少95%。在一个方面中,系19的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,其背膘可以是未经编辑的系2动物的至少97%。

[0139] 在一个方面中,系27的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,具有SEQ ID NOs:1至18或426至505的经基因编辑的CD163^{-/-},该动物和细胞的背膘可以是未经编辑的系27动物中发现数量的至少90%。在一个方面中,系27的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,其背膘可以是未经编辑的系27动物的至少95%。在一个方面中,系27的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,其背膘可以是未经编辑的系2动物的至少97%。

[0140] 在一个方面中,系62的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,具有SEQ ID NOs:1至18或426至505的经基因编辑的CD163^{-/-},该动物和细胞的背膘可以是未经编辑的系62动物中发现数量的至少90%。在一个方面中,系62的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,其背膘可以是未经编辑的系62动物的至少95%。在一个方面中,系62的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,具有SEQ ID NO:2的经基因编辑的CD163^{-/-},该动物和细胞的背膘可以是未经编辑的系62动物中发现数量的至少95%。在一个方面中,系62的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,其背膘可以是未经编辑的系2动物的至少97%。

[0141] 在一个方面中,系65的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,具有SEQ ID NOs:1至18或426至505的经基因编辑的CD163^{-/-},该动物和细胞的背膘可以是未经编辑的系65动物中发现数量的至少90%。在一个方面中,系65的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,其背膘可以是未经编辑的系65动物的至少95%。在一个方面中,系65的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,其背膘可以是未经编辑的系2动物的至少97%。

[0142] 在一个方面中,系2的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,具有SEQ ID NOs:1至18或426至505的经基因编辑的CD163^{-/-},该动物和细胞的每窝产仔总数可以是未经编辑的系2动物中发现数量的至少90%。在一个方面中,系2的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,其每窝产仔总数可以是未经编辑的系2动物的至少95%。在一个方面中,系2的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,其每窝产仔总数可以是未经编辑的系2动物的至少97%。

[0143] 在一个方面中,系3的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,具有SEQ ID NOs:1至18或426至505的经基因编辑的CD163^{-/-},该动物和细胞的每窝产仔总数可以是未经编辑的系3动物中发现数量的至少90%。在一个方面中,系3的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,其每窝产仔总数可以是未经编辑的系3动物的至少95%。在一个方面中,系3的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,其每窝产仔总数可以是未经编辑的系3动物的至少97%。

[0144] 在一个方面中,系15的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,具有SEQ ID NOs:1至18或426至505的经基因编辑的CD163^{-/-},该动物和细胞的每窝产仔总数可以是未经编辑的系15动物中发现数量的至少90%。在一个方面中,系15的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,其每窝产仔总数可以是未经编辑的系15动物的至少95%。在一个方面中,系15的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,其每窝产仔总数可以是未经编辑的系15动物的至少97%。

[0145] 在一个方面中,系19的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,具有SEQ ID NOs:1至18或426至505的经基因编辑的CD163^{-/-},该动物和细胞的每窝产仔总数可以是未经编辑的系19动物中发现数量的至少90%。在一个方面中,系19的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,其每窝产仔总数可以是未经编辑的系19动物的至少95%。在一个方面中,系19的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,其每窝产仔总数可以是未经编辑的系19动物的至少97%。

[0146] 在一个方面中,系27的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,具有SEQ ID NOs:1至18或426至505的经基因编辑的CD163^{-/-},该动物和细胞的每窝产仔总数可以是未经编辑的系27动物中发现数量的至少90%。在一个方面中,系27的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,其每窝产仔总数可以是未经编辑的系27动物的至少95%。在一个方面中,系27的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,其每窝产仔总数可以是未经编辑的系27动物的至少97%。

[0147] 在一个方面中,系62的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,具有SEQ ID NOs:1至18或426至505的经基因编辑的CD163^{-/-},该动物和细胞的每窝产仔总数可以是未经编辑的系62动物中发现数量的至少90%。在一个方面中,系62的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,其每窝产仔总数可以是未经编辑的系62动物的至少95%。在一个方面中,系62的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,其每窝产仔总数可以是未经编辑的系62动物的至少97%。

[0148] 在一个方面中,系65的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,具有SEQ ID NOs:1至18或426至505的经基因编辑的CD163^{-/-},该动物和细胞的每窝产仔总数可以是未经编辑的系65动物中发现数量的至少90%。在一个方面中,系65的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,其每窝产仔总数可以是未经编辑的系65动物的至少95%。在一个方面中,系65的经基因编辑的CD163^{-/-}的动物和细胞,其每窝产仔总数可以是未经编辑的系65动物的至少97%。

[0149] 本说明书提供并包括CD163经编辑的动物,其包含以下各项的种质:PICTM系15、PICTM系17、PICTM系27、PICTM系65、PICTM系14、PICTM系62、PIC337、PIC800、PIC280、PIC327、PIC408、PICTM399、PIC410、PIC415、PIC359、PIC380、PIC837、PIC260、PIC265、PIC210、PICTM系2、PICTM系3、PICTM系4、PICTM系5、PICTM系18、PICTM系19、PICTM系92、PIC95、PICTM CAMBOROUGH[®]、PIC1070、PICTM CAMBOROUGH[®] 40、PICTM CAMBOROUGH[®] 22、PIC1050、PICTM CAMBOROUGH[®] 29、PICTM CAMBOROUGH[®] 48,或PICTM CAMBOROUGH[®] x54。如本文中所用,术语种质包括细胞或细胞核中存在的完整基因组,还包含染色体。术语种质可包括可以从其克隆动物的任意配子、生殖细胞,或任意体细胞。经编辑的种质可以包含具有SEQ ID NOs:426至505中任一经编辑的基因组序列的编辑。经编辑的种质可以包含具有以下序列中任一经编辑的基因组序列的编辑:SEQ ID Nos:426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499、500、501、502、503、504或505。

经编辑的种质可以包含与PICTM系15的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM系17的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM系27的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM系65的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM系14的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM系62的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PIC337的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PIC800的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PIC280的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PIC327的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PIC408的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM399的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PIC410的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PIC415的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PIC359的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PIC380的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PIC837的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PIC260的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PIC265的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PIC210的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM系2的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM系3的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM系4的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM系5的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM系18的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM系19的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM系92的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PIC95的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM CAMBOROUGH[®]的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PIC1070的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM CAMBOROUGH[®] 40的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM CAMBOROUGH[®] 22的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PIC1050的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM CAMBOROUGH[®] 29的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM CAMBOROUGH[®] 48的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM CAMBOROUGH[®] x54的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%的基因组。

[0150] 本说明书提供并包括CD163经编辑的动物,其包含以下各项的种质:PICTM系2、系3、

系15、系19、系27、系62或系65。经编辑的种质可以包含具有SEQ ID NOs:426至505中任一的经编辑的基因组序列的编辑。经编辑的种质可以包含具有以下序列中任一的经编辑的基因组序列的编辑:SEQ ID NOs:426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499、500、501、502、503、504或505。经编辑的种质可以包含具有SEQ ID NO:453中所列的经编辑的基因组序列的编辑。经编辑的种质可以包含与PICTM系2的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%且带有包含SEQ ID NO:453的CD163经编辑序列的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM系3的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%且带有包含SEQ ID NO:453的CD163经编辑序列的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM系15的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%且带有包含SEQ ID NO:453的CD163经编辑序列的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM系19的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%且带有包含SEQ ID NO:453的CD163经编辑序列的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM系27的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%且带有包含SEQ ID NO:453的CD163经编辑序列的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM系62的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%且带有包含SEQ ID NO:453的CD163经编辑序列的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM系65的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%且带有包含SEQ ID NO:453的CD163经编辑序列的基因组。

[0151] 经编辑的种质可以包含具有SEQ ID NO:489中所列的经编辑的基因组序列的编辑。经编辑的种质可以包含与PICTM系2的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%且带有包含SEQ ID NO:489的CD163经编辑序列的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM系3的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%且带有包含SEQ ID NO:489的CD163经编辑序列的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM系15的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%且带有包含SEQ ID NO:489的CD163经编辑序列的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM系19的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%且带有包含SEQ ID NO:489的CD163经编辑序列的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM系27的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%且带有包含SEQ ID NO:489的CD163经编辑序列的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM系62的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%且带有包含SEQ ID NO:489的CD163经编辑序列的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM系65的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%且带有包含SEQ ID NO:489的CD163经编辑序列的基因组。经编辑的种质可以具有SEQ ID NOs:506-517中任一的预期的外显子7氨基酸序列。经编辑的种质可以具有SEQ ID NO:513中所列的预期的外显子7氨基酸序列。

[0152] 经编辑的种质可以包含具有SEQ ID NO:505中所列的经编辑的基因组序列的编辑。经编辑的种质可以包含与PICTM系2的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%且带有包含SEQ ID NO:505的CD163经编辑序列的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM系3的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%且带有包含SEQ ID NO:505的CD163经编辑序列的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM系15的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%且带有包含SEQ ID NO:505的CD163经编辑序列的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM系19的相

似度或同一性为80%、85%、90%、95%且带有包含SEQ ID NO:505的CD163经编辑序列的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM系27的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%且带有包含SEQ ID NO:505的CD163经编辑序列的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM系62的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%且带有包含SEQ ID NO:505的CD163经编辑序列的基因组。经编辑的种质可以包含与PICTM系65的相似度或同一性为80%、85%、90%、95%且带有包含SEQ ID NO:505的CD163经编辑序列的基因组。经编辑的种质可以具有SEQ ID NO:518中所列的预期的外显子7氨基酸序列。

[0153] 本说明书还提供并包括PICTM系2、系3、系15、系19、系27、系62或系65的细胞。在一些具体实施方式中,PICTM系2的细胞可以包含SEQ ID NOs:426至505中任一的经编辑的基因组序列。PICTM系2的细胞可以包含SEQ ID NO:453中所列的经编辑的基因组序列。在一些具体实施方式中,PICTM系3的细胞可以包含SEQ ID NOs:426至505中任一的经编辑的基因组序列。PICTM系3的细胞可以包含SEQ ID NO:453中所列的经编辑的基因组序列。在一些具体实施方式中,PICTM系15的细胞可以包含SEQ ID NOs:426至505中任一的经编辑的基因组序列。PICTM系15的细胞可以包含SEQ ID NO:453中所列的经编辑的基因组序列。在一些具体实施方式中,PICTM系19的细胞可以包含SEQ ID NOs:426至505中任一的经编辑的基因组序列。PICTM系19的细胞可以包含SEQ ID NO:453中所列的经编辑的基因组序列。在一些具体实施方式中,PICTM系27的细胞可以包含SEQ ID NOs:426至505中任一的经编辑的基因组序列。PICTM系27的细胞可以包含SEQ ID NO:453中所列的经编辑的基因组序列。在一些具体实施方式中,PICTM系62的细胞可以包含SEQ ID NOs:426至505中任一的经编辑的基因组序列。PICTM系62的细胞可以包含SEQ ID NO:453中所列的经编辑的基因组序列。在一些具体实施方式中,PICTM系65的细胞可以包含SEQ ID NOs:426至505中任一的经编辑的基因组序列。PICTM系65的细胞可以包含SEQ ID NO:453中所列的经编辑的基因组序列。经编辑的种质可以具有SEQ ID NO:513中所列的预期的外显子7氨基酸序列。

[0154] 本说明书提供并包括可包含杂种动物,其可包含以SEQ ID NOs:1至18和426至505为表征的CD163基因编辑。在一些构型中,基因编辑可以包含SEQ ID NO:453。在一方面中,杂种动物可以是CAMBOROUGH[®] (PICTM英国有限公司,贝辛斯托克,英国) 系的CD163^{-/-}杂种动物。CAMBOROUGH[®]猪是可以通过系2和系3之间杂交而制备的杂种动物。在一方面中,杂种动物可以是具有SEQ ID NO:2经编辑的CD163基因的CAMBOROUGH[®]系的CD163^{-/-}杂种动物。在一方面中,杂种动物可以是具有SEQ ID NOs:426-458经编辑的CD163基因的CAMBOROUGH[®]系的CD163^{-/-}杂种动物。在各种方面中,杂种动物可以是具有SEQ ID NO:453经编辑的CD163基因的CAMBOROUGH[®]系的CD163^{-/-}杂种动物。在一方面中,杂种动物可以是具有SEQ ID NOs:459-504经编辑的CD163基因的CAMBOROUGH[®]系的CD163^{-/-}杂种动物。在各种方面中,杂种动物可以是具有SEQ ID NO:489经编辑的CD163基因序列的CAMBOROUGH[®]系的CD163^{-/-}杂种动物。CAMBOROUGH[®]杂种猪产仔量大,仔猪均匀而强壮。CAMBOROUGH[®]杂种猪的生产期长,死亡率低。CAMBOROUGH[®]CD163^{-/-}杂种猪保留了这些理想的商业性状。在一方面中,无法区分CAMBOROUGH[®]-CD163^{-/-}杂种猪的产仔数与非基因编辑的CAMBOROUGH[®]杂种猪的产仔数。在根据本说明书的方面

中,本说明书中的杂合猪和纯合猪没有脱位突变。

[0155] 本说明书进一步提供并包括用于制备CD163基因编辑的杂种动物的方法。在一个方面中,第一亲本可以包含PICTM系2、系3、系15、系19、系27、系62或系65中之一的CD163基因编辑的公猪、后备母猪或母猪,以与第二亲本杂交。在一个方面中,经基因编辑的第一亲本的基因组可包含选自SEQ ID NOs:1至18或426至505组成的组的序列。在一些方面中,基因组可以包含SEQ ID NO:453。在各种方面中,基因组可以包含SEQ ID NO:489。在各种方面中,基因组可以包含SEQ ID NO:505。在一个方面中,该方法可包含选自PICTM系2、系3、系15、系19、系27、系62或系65中之一的CD163基因编辑的公猪、后备母猪或母猪组成的组的第二亲本。本说明书还提供并包括经CD163编辑的动物的制备方法,该方法可包含杂交PICTM系2、系3、系15、系19、系27、系62或系65中任意一项的子代。

[0156] 在一方面中,本说明书提供了系2、3、15和65(分别是表8、表9、表10,和表14)的杂合猪,其可具有在敲除编辑中成功编辑的CD163基因的至少一个拷贝。这些经编辑的猪可以表现出健康的表型,并且没有由编辑带来的明显有害影响。在另一方面中,说明书提供系19、27和62(分别是表11、表12,和表13)的猪,可以使用本文公开的方法编辑上述猪,以生成具有健康表型的经编辑的猪。可以将杂合猪与相应系的未经编辑的动物杂交,以产生F1杂合猪。在一个实施方案中,系2、3、15和65的杂合猪可以与系2、3、15和65的第二杂合猪杂交,并且可以用孟德尔(Mendelian)比例生产纯合的经CD163编辑的猪。值得注意的是,基因编辑可以是唯一的,并且可以使用SEQ ID NOs:1至18和426至505对其进行识别,且基因编辑共享包含表8至表14中至少90%的基因型标记的基因特征,从而实现任何后代中的CD163基因编辑的基因组的检测和育种。在一方面中,基因特征可以共享表8至表14的95%或更多的基因型标记。在另一方面中,基因特征可以共享表8至表14的97%或更多的基因型标记。还包括了可以共享表8至表14的98%或更多的基因型标记的基因特征。重要的是,C利用表8至表14的基因型标记进行的D163编辑与可识别的基因组区域的结合,可以实现具有期望编辑的任何子代动物的制备以及在任意数量的后代中进行的经编辑区域的跟踪。在根据本说明书的方面中,本说明书中的杂合猪和纯合猪可以没有脱位突变。

[0157] 本说明书提供并包括可从猪优良系获得的胚胎或受精卵。在一个方面中,胚胎或受精卵可获自选自PICTM系2、系3、系15、系19、系27、系62或系65组成的组的优良猪系。在一个方面中,胚胎或受精卵可以是冷冻的胚胎或受精卵。在另一个方面中,胚胎或受精卵可以是冷冻囊胚。如本文所述,可以用从发情期同步的后备母猪收集的离体成熟卵母细胞制备胚胎。可以从离体成熟的卵母细胞去除周围的卵丘细胞,并用洗涤过的公猪精子培养孵育。培养后,可以向推定的受精卵显微注射包含CRISPR-Cas核酸内切酶和向导RNA组合的RNP混合物,向导RNA组合包含表3中列出的SEQ ID NOs:22至271或347至425的前20个核苷酸。注射的胚胎可以在1至4细胞期移植到代孕雌性。在一方面中,RNP混合物可进一步包括表6中所列的修复模板(SEQ ID NOs:1至13)。在一个方面中,注射的受精卵可以在全身麻醉下通过中线剖腹手术植入发情期同步、未交配的代孕雌性的输卵管(每个代孕接受40-60个注射胚胎)。

[0158] 本说明书提供并包括可以是CD163^{-/-}的所选优良系的基因编辑猪。在一方面中,该系可以是PICTM系15、PICTM系17、PICTM系27、PICTM系65、PICTM系14、PICTM系62、PIC337、PIC800、PIC280、PIC327、PIC408、PICTM399、PIC410、PIC415、PIC359、PIC380、PIC837、

PIC260、PIC265、PIC210、PICTM系2、PICTM系3、PICTM系4、PICTM系5、PICTM系18、PICTM系19、PICTM系92、PIC95、PICTM CAMBOROUGH[®]、PIC1070、PICTM CAMBOROUGH[®] 40、PICTM CAMBOROUGH[®] 22、PIC1050、PICTM CAMBOROUGH[®] 29、PICTM CAMBOROUGH[®] 48, 或 PICTM CAMBOROUGH[®] x54。在一方面中, 该系可以选自由PICTM系2、系3、系15、系19、系27、系62、系65, 以及包含本文所述的经编辑的CD163基因的子代组成的组。经基因编辑的系2、3、15、19、27、62和65包含如上面的表8至表14所示的CD163基因组区域, 并且它们之间容易区分, 它们与未改良系、与其他优良系之间也容易区分。类似地, 可以识别包含如表8至表14所示的CD163^{-/-}基因组区域的系2、3、15、19、27、62和65的子代。因此, 本说明书提供可具有CD163^{-/-}基因组区域的子代猪。

[0159] 本说明书提供并包括包含本发明的经编辑CD163基因的杂种猪系。在一些方面中, 该杂种猪系可以通过杂交经编辑的PICTM系和至少一个其他经编辑的PICTM系来生产。在一些方面中, 该猪系可以通过连续杂交以引入三个或更多个猪系的种质来生产。在一个方面中, 该系可以是PICTM系15、PICTM系17、PICTM系27、PICTM系65、PICTM系14、PICTM系62、PIC337、PIC800、PIC280、PIC327、PIC408、PICTM399、PIC410、PIC415、PIC359、PIC380、PIC837、PIC260、PIC265、PIC210、PICTM系2、PICTM系3、PICTM系4、PICTM系5、PICTM系18、PICTM系19、PICTM系92、PIC95、PICTM CAMBOROUGH[®]、PIC1070、PICTM CAMBOROUGH[®] 40、PICTM CAMBOROUGH[®] 22、PIC1050、PICTM CAMBOROUGH[®] 29、PICTM CAMBOROUGH[®] 48, 或 PICTM CAMBOROUGH[®] x54。

[0160] 在各种方面中, PICTM系65以商品名PIC337销售。在各种方面中, PICTM系62以商品名PIC408销售。在各种方面中, 通过杂交PICTM系15和17所得的杂交猪以商品名PIC800或PIC280销售。在各种方面中, PICTM系27以商品名PIC327销售。在各种方面中, 通过杂交PICTM系65和PICTM系62创造的杂种动物以商品名PIC399、PIC410或PIC415销售。在各种方面中, 通过杂交PICTM系65和PICTM系27创造的杂种动物以商品名PIC359销售。在各种方面中, 通过将PICTM系800猪 (PICTM系15和PICTM系17的杂种动物) 杂交至PICTM系65猪制备的杂种动物以商品名PIC380或PIC837销售。在各种方面中, PICTM系14以商品名PIC260销售。在各种方面中, 通过杂交PICTM系14和PICTM系65创造的杂种动物以商品名PIC265销售。在各种方面中, 通过杂交PICTM系2和PICTM系3创造的杂种动物以商品名PIC210、PICTM CAMBOROUGH[®], 和PIC1050销售。在各种方面中, PICTM系3和PICTM系92的杂种动物以商品名PIC95销售。在各种方面中, 通过杂交PICTM系19和PICTM系3得到的杂种动物以商品名PIC1070销售。在各种方面中, 通过杂交PICTM系18和PICTM系3创造的杂种动物以商品名PICTM CAMBOROUGH[®] 40销售。在各种方面中, 通过杂交PICTM系19和PIC1050 (其本身是PICTM系2和3的杂种动物) 创造的杂种动物以商品名PICTM CAMBOROUGH[®] 22销售。在各种方面中, 通过杂交PICTM系2和PIC1070 (其本身是PICTM系19和3的杂种动物) 创造的杂种动物以商品名PICTM CAMBOROUGH[®] 29销售。在各种方面中, 通过杂交PICTM系18和PIC1050 (其本身是PICTM系2和3的杂种动物) 创造的杂种动物以商品名PICTM CAMBOROUGH[®] 48销售。在各种方面中, 通过杂交PICTM系4和PICTM系5创造的杂种动物以商品名PICTM CAMBOROUGH[®] x54销售。本发明提供并包括包含本发明的CD163编辑的任意上述系的猪或杂种动物。

[0161] 在各种方面中,本发明提供并包括包含经编辑的CD163基因的猪,该经编辑的CD163基因包含SEQ ID NOs:453、489或505中所列的经编辑序列,其中该猪可以是以下系的猪:PIC™系15、PIC™系17、PIC™系27、PIC™系65、PIC™系14、PIC™系62、PIC™系2、PIC™系3、PIC™系4、PIC™系5、PIC™系18、PIC™系19、PIC™系92,或可以是两个或更多个上述系的杂交。在各种方面中,杂交猪可以是PIC™系15和PIC™系17、PIC™系65和PIC™系62、PIC™系65和PIC™系27的杂交,PIC™系15和PIC™系17的连续杂交,其中杂交后代接着杂交至PIC™系65,PIC™系14和PIC™系65、PIC™系2和PIC™系3、PIC™系3和PIC™系92、PIC™系19和PIC™系3、PIC™系18和PIC™系3的杂交,PIC™系2和PIC™系3的杂交猪与PIC™系19猪的连续杂交,PIC™系19和PIC™系3的杂交猪与PIC™系2猪的连续杂交,将PIC™系2和PIC™系3的杂种动物杂交至PIC™系18猪的连续杂交,或PIC™系4和PIC™系5的杂交。

[0162] 在各种方面中,包含经编辑的CD163基因的杂交系可以通过杂交2、3、15、19、27、62或65中的两个或多个系来生产。在一些方面中,包含经编辑的CD163基因的杂交系可以是CAMBOROUGH®系。CAMBOROUGH®猪是可以通过系2和系3之间的杂交制备的杂种动物。在各种方面中,杂交系可以包含包括经编辑的CD163基因的PIC™837杂交系。PIC™837猪是可以通过将PIC™系800猪杂交至PIC™系65猪来制备的杂种动物。

[0163] 本说明书提供并包括杂种CD163^{-/-}子代系,其包含可从系2、3、15、19、27、62或65获得的一个CD163^{-/-}基因组区域以及可从选自系2、3、15、19、27、62或65的不同系获得的第二个CD163^{-/-}基因组区域。在一方面中,杂种CD163^{-/-}子代系可包含根据表8的基因组区域中的CD163^{-/-}等位基因和根据表10的基因组区域中的CD163^{-/-}等位基因。在一方面中,杂种CD163^{-/-}子代系可包含根据表8的基因组区域中的CD163^{-/-}等位基因和根据表14的基因组区域中的CD163^{-/-}等位基因。在一方面中,杂种CD163^{-/-}子代系可包含根据表9的基因组区域中的CD163^{-/-}等位基因和根据表10的基因组区域中的CD163^{-/-}等位基因。在一方面中,杂种CD163^{-/-}子代系可包含根据表9的基因组区域中的CD163^{-/-}等位基因和根据表14的基因组区域中的CD163^{-/-}等位基因。

[0164] 本说明书提供并包括杂种动物,其可包含以SEQ ID NOs:1至18和426至505为表征的CD163基因编辑。在一方面中,包含CD163基因编辑的杂种动物可由SEQ ID NO:2表征。在一方面中,包含CD163基因编辑的杂种动物可由SEQ ID NOs:426-458表征。在一个方面中,包含CD163基因编辑的杂种动物可由SEQ ID NO:453表征。在一方面中,包含CD163基因编辑的杂种动物可由SEQ ID NOs:459-504表征。在一方面中,包含CD163基因编辑的杂种动物可由SEQ ID NO:489表征。在一方面中,杂种动物可以是CAMBOROUGH®系的CD163^{-/-}杂种动物。CAMBOROUGH®猪是可以通过系2和系3之间杂交而制备的杂种动物。

[0165] 在各种方面中,杂种猪可包含根据表8的基因组区域中的SEQ ID NO:2和根据表10的基因组区域中的SEQ ID NO:2。在一个方面中,杂种猪可包含根据表8的基因组区域中的SEQ ID NO:453和根据表10的基因组区域中的SEQ ID NO:453。在一个方面中,杂种猪可包含根据表8的基因组区域中的SEQ ID NO:489和根据表10的基因组区域中的SEQ ID NO:489。在一方面中,杂种CD163^{-/-}子代系可包含根据表8的基因组区域中的SEQ ID NO:2和根据表14的基因组区域中的SEQ ID NO:2。在一个方面中,杂种CD163^{-/-}子代系可包含根据表8的基因组区域中的SEQ ID NO:453和根据表14的基因组区域中的SEQ ID NO:453。在一个方

面中,杂种CD163^{-/-}子代系可包含根据表8的基因组区域中的SEQ ID NO:489和根据表14的基因组区域中的SEQ ID NO:489。在一方面中,杂种CD163^{-/-}子代系可包含根据表9的基因组区域中的SEQ ID NO:2和根据表10的基因组区域中的SEQ ID NO:2。在一方面中,杂种CD163^{-/-}子代系可包含根据表9的基因组区域中的SEQ ID NO:453和根据表10的基因组区域中的SEQ ID NO:453。在一方面中,杂种CD163^{-/-}子代系可包含根据表9的基因组区域中的SEQ ID NO:489和根据表10的基因组区域中的SEQ ID NO:489。在一方面中,杂种猪可包含根据表8的基因组区域中的SEQ ID NO:2和根据表10的基因组区域中的SEQ ID NO:2。在一方面中,杂种猪可包含根据表8的基因组区域中的SEQ ID NO:453和根据表10的基因组区域中的SEQ ID NO:453。在一方面中,杂种猪可包含根据表8的基因组区域中的SEQ ID NO:489和根据表10的基因组区域中的SEQ ID NO:489。在一方面中,杂种CD163^{-/-}子代系可包含根据表8的基因组区域中的SEQ ID NO:2和根据表14的基因组区域中的SEQ ID NO:2。在一方面中,杂种CD163^{-/-}子代系可包含根据表8的基因组区域中的SEQ ID NO:453和根据表14的基因组区域中的SEQ ID NO:453。在一方面中,杂种CD163^{-/-}子代系可包含根据表8的基因组区域中的SEQ ID NO:489和根据表14的基因组区域中的SEQ ID NO:489。在一方面中,杂种CD163^{-/-}子代系可包含根据表9的基因组区域中的SEQ ID NO:2和根据表10的基因组区域中的SEQ ID NO:2。在一方面中,杂种CD163^{-/-}子代系可包含根据表9的基因组区域中的SEQ ID NO:453和根据表10的基因组区域中的SEQ ID NO:453。在一方面中,杂种CD163^{-/-}子代系可包含根据表9的基因组区域中的SEQ ID NO:489和根据表10的基因组区域中的SEQ ID NO:489。在根据本说明书的方面中,本说明书中的杂合猪和纯合猪可以没有脱位突变。

[0166] 在一方面中,杂种动物可以是 **CAMBOROUGH[®]** 系的CD163^{-/-}杂种动物。**CAMBOROUGH[®]**猪是可以通过系2和系3之间杂交而制备的杂种动物。在一方面中,杂种猪可包含根据表8的基因组区域中的SEQ ID NOs:426至505和根据表10的基因组区域中的SEQ ID NOs:426至505。在一方面中,杂种猪可包含根据表8的基因组区域中的SEQ ID NO:453和根据表10的基因组区域中的SEQ ID NO:453。在一方面中,杂种猪可包含根据表8的基因组区域中的SEQ ID NO:489和根据表10的基因组区域中的SEQ ID NO:489。在一方面中,杂种CD163^{-/-}子代系可包含根据表8的基因组区域中的SEQ ID NOs:426至505和根据表14的基因组区域中的SEQ ID NOs:426至505。在一方面中,杂种CD163^{-/-}子代系可包含根据表8的基因组区域中的SEQ ID NO:453和根据表14的基因组区域中的SEQ ID NO:489。在一方面中,杂种CD163^{-/-}子代系可包含根据表8的基因组区域中的SEQ ID NO:489和根据表14的基因组区域中的SEQ ID NO:453。在一方面中,杂种CD163^{-/-}子代系可包含根据表9的基因组区域中的SEQ ID NO:426至505和根据表10的基因组区域中的SEQ ID NO:426至505。在一方面中,杂种CD163^{-/-}子代系可包含根据表9的基因组区域中的SEQ ID NO:453和根据表10的基因组区域中的SEQ ID NO:453。在一方面中,杂种CD163^{-/-}子代系可包含根据表9的基因组区域中的SEQ ID NO:489和根据表10的基因组区域中的SEQ ID NO:489。

[0167] 在各种方面,PIC[™]系2、PIC[™]系3、PIC[™]系15、PIC[™]系19、PIC[™]系27、PIC[™]系62或PIC[™]系65的经编辑猪可以具有包含SEQ ID NO:518中所列预期的氨基酸序列的CD163基因。在各种方面中,经编辑的CD163基因可以具有SEQ ID NO:505中所列的123bp缺失。在各种构型中,该缺失可以具有AHRKPRLV-----TVVSLGG AHFGEGSGQIWAEFQCEGHESHL SLCPVAPRPDGTCSHSRDVGVCVCS (SEQ ID NO:518)的外显子7氨基

酸序列。在各种方面中,具有包含SEQ ID NO:518中所列的氨基酸序列的经编辑CD163基因的猪可以是两个PICTM系之间的杂种后代。在各种方面中,该猪可以具有包含SEQ ID NO:505中所列的核酸序列的经编辑CD163外显子7序列。在各种方面中,该猪可以是PICTM系2和PICTM系3之间杂交的后代。在根据本说明书的方面中,本说明书中的杂合猪和纯合猪可以没有脱位突变。

[0168] 重要的是,本说明书中的CD163编辑猪和细胞保留了其理想的商业表型。经编辑的猪可以表现出健康的表型,并且没有由编辑带来的明显急性有害影响。在一个方面中,系2、3、15、19、27、62和65的猪可以保留如表15所示的商业上的理想表型。

[0169] 改善现有家畜群健康的方法可以包括使用上述方法修改CD163基因座。在一个方面中,该方法可包含将核酸内切酶或编码该核酸内切酶的多核苷酸,以及向导多核苷酸引入猪细胞,该向导多核苷酸包含选自每个SEQ ID NOs:22至271的前20个核苷酸或每个SEQ ID NOs:347至425的前20个核苷酸组成的组的序列,在允许核酸内切酶作用于DNA的靶序列处或其附近条件下培养细胞,从而在靶位点处或其附近诱导重组、同源性定向修复或非同源性末端连接,识别在所述靶序列具有修饰的至少一个细胞,并用动物细胞产生动物。在本说明书的方面中,核酸内切酶可以是向导RNA和来自嗜热链球菌的Cas蛋白质的RNP复合物。在另一方面中,核酸内切酶可以是向导RNA和来自酿脓链球菌的Cas蛋白质的RNP复合物。

[0170] 在一方面中,该方法可进一步包含向细胞提供修复向导,该修复向导包含选自SEQ ID NOs:1至13的核苷酸50至100组成的组的序列。在另一方面中,修复向导可包含选自SEQ ID NOs:1至13的核苷酸50至150组成的组的序列,还可相比SEQ ID NOs:1至13的核苷酸1至49和101至150包含85%同源性。在一个方面中,修复向导可包含选自SEQ ID NOs:1至13组成的组的序列。如本文所述,用于改善现有畜群健康的方法保留了上述理想商业表型。在一方面中,理想商业表型可以是在具有相似遗传背景的未编辑猪群中观察到的表型的至少90%。

[0171] 通过常规育种或包括人工授精的方法,将CD163基因编辑座引入畜群。为了制备纯合动物,可以在具有至少一个基因编辑的CD163基因座(包含SEQ ID NOs:1到18或426到505的序列)的亲本之间进行杂交,并且可以选择纯合子代(以1:4孟德尔比率存在)。如本文所述,亲本和一个基因编辑的CD163基因座的组合可适用于改良畜群。进一步育种具有CD163基因编辑基因座的动物,可以改善畜群的健康,直到畜群中所有动物都包含所述CD163基因编辑基因座。值得注意的是,在将畜群完全育种为CD163基因编辑畜群之前,畜群的健康状况就可以得到显著改善。具体而言,如上所述,在抗PRRSv基因编辑的CD163母猪中,猪胎儿本身就针对PRRSv受保护。此外,本领域的普通技术人员将知晓,随着纯合CD163编辑动物的数量增加,传播PRRSv的合适猪载体将减少(例如,发展了群体免疫)。相应地,本发明方法可提供通过引入群体免疫来改善畜群。

[0172] 检测所需编辑的一种有用方法是使用实时PCR。与关注区侧翼相接的PCR引物以及专门退火至关注区的探针。探针标记有荧光团和猝灭剂。在PCR反应中,引物和探针以取决于序列的方式杂交至关注区的互补DNA链。因为探针是完整的,荧光团和猝灭剂非常接近,猝灭剂吸收荧光团发出的荧光。聚合酶从引物向外延伸,开始DNA合成。聚合酶到达探针时,聚合酶的核酸外切酶活性切割杂交的探针。切割的结果是,荧光团与猝灭剂分离并发出荧

光。该荧光由实时仪器检测。针对每个PCR循环重复这些步骤,实现特定产物的检测。

[0173] 在本申请中,设计了单独的三组引物和探针。第一组引物(SEQ ID NOs:556和557)与包含SEQ ID NO:249的未经编辑的基因组序列侧翼相接,探针(SEQ ID NO:558)与所述引物中间的未经编辑的基因组DNA结合。第二组引物(SEQ ID NOs:559和560)与包含SEQ ID NO:256的未经编辑的基因组序列侧翼相接,探针(SEQ ID NO:561)所述引物中间的未经编辑的基因组DNA结合。最后一组引物(SEQ ID NO:562和563)与期望的外显子7缺失编辑侧翼相接,该期望的外显子7缺失编辑通过切除SEQ ID NO:249和SEQ ID NO:256的切割位点之间的序列来创建。探针(SEQ ID NO:564)设计为在这些引物中间与期望的编辑结合。然后使用商业实时PCR试剂盒来探查各种动物中的期望编辑。存在各种商业实时PCR试剂盒,包括但不限于,例如IDT的PRIMETIME[®]、应用生物系统公司的TAQMAN[®](罗氏分子系统公司,普莱曾顿,加利福尼亚),以及Qiagen和Bio-Rad的各种试剂盒。本领域技术人员将认识到,任意此类试剂盒均可与本发明的引物和方法一起使用来实现类似的结果。

实施例

[0174] 实施例1

本实施例说明了猪细胞中猪CD163基因敲除的靶位点选择。

[0175] 使用链球菌Cas9/gRNA RNA引导的DNA核酸内切酶在猪CD163基因(SsCrofa11.1, GenBank编号:GCA_000003025.6)中生成DNA序列插入、缺失及其组合,借此单独或成对递送向导RNA和蛋白质组合,使得CD163基因中的序列改变减少或废除CD163信使RNA或蛋白质的功能、稳定性或表达。筛查从转译起始位点上游120个核苷酸(chr5:63300192)到CD163外显子7下游59个核苷酸(chr5:63323390)的CD163基因序列,以找出具有相邻nGG或nGGnG PAM序列的向导RNA结合位点,这些位点分别是源于酿脓链球菌或嗜热链球菌CRISPR3(嗜热链球菌CR3)的Cas9蛋白质切割所需的,Cas9蛋白质的序列在随本文提交的序列列表中,如表2所示。表3显示了用于编辑的靶位点的DNA序列、靶位点在CD163基因上的部位和编辑活性(按实施例3所述测定)。向导RNA分子与靶具有相同序列,向导RNA分子具有相应的RNA核苷酸,没有PAM序列(酿脓链球菌为nGG,嗜热链球菌为nGGnG)。向导多核苷酸分子也可以由DNA碱基或DNA和RNA碱基的混合物组成。靶位点序列在随本文提交的序列列表中列为SEQ ID NOs:22至271和347至425。所示靶位点序列在猪种质中是保守的,并经过了DNA测序的筛查。

[0176] 实施例2

本实施例说明了向猪胎儿成纤维细胞递送向导RNA/Cas9核酸内切酶的核转染。

[0177] 为了测试活体细胞中产生经编辑的猪CD163等位基因的DNA切割活性,将靶向表3中所列的序列的CRISPR-Cas核酸内切酶和向导RNA核转染到猪胎儿成纤维细胞中。用28-35天大的胎儿制备猪胎儿成纤维细胞(PFF)细胞系,将3.2 μ g Cas9蛋白质(酿脓链球菌或嗜热链球菌)和2.2 μ g体外转录的单向导RNA在水中混合成总体积为2.23 μ l,然后使用Lonza电转化仪将其核转染到PFF细胞中。在核转染的制备中,使用胰蛋白酶表达(重组胰蛋白酶)收集PFF细胞。在此基础上,从细胞中移出培养基,用HBSS或DPBS洗涤培养基一次,并在38.5 $^{\circ}$ C下在有胰蛋白酶的情况下培养3-5分钟。然后用完全培养基收集细胞。通过离心(300x g室温下五分钟)将细胞造粒,丢弃上清液,然后将细胞重新悬浮在10mL PBS中得到单细胞悬浮液,使用台盼蓝染色法获得计数细胞。

[0178] 通过离心(300x g室温下五分钟)将适当量的细胞造粒,弃去上清液,将细胞以

7.5x10⁶细胞/ml的终浓度重新悬浮于核转染缓冲液P3中。使用多通道移液管将20μl细胞悬浮液添加到含有RNP混合物的核转染板的每个孔中,然后轻轻混合以重新悬浮细胞。将RNP/细胞混合物移植到核转染板中,用程序CM138(由制造商供应)进行核转染。80μl温胚胎成纤维细胞培养基(EFM)(杜氏改良Eagle培养基DMEM),其中含有2.77mM葡萄糖、1.99mM L-谷氨酰胺和0.5mM丙酮酸钠,并补充有100μM 2-巯基乙醇、1X Eagle极限必需培养基非必需氨基酸(MEM NEAA)、100μg/mL青霉素-链霉素,以及12%胎牛血清。在核转染后将上述培养基加入每孔。通过移液轻轻混合悬浮液,然后将100μl转移到12孔板中,该孔板含有在38.5℃下预培养的900μl EFM。然后将该孔板在38.5℃、5%的CO₂下培养48小时。核转染48小时后,用转染PFF细胞和对照PFF细胞制备基因组DNA,将15μl的QUICKEXTRACT™DNA提取液(Lucigen,威斯康星麦迪逊)添加至经过造粒的细胞,然后通过37℃下培养10分钟、在65℃下培养8分钟、在95℃下培养5分钟来使其溶解,然后以4℃保存溶解产物,直到用于DNA测序。

[0179] 实施例3

此实施例说明定向至猪CD163的向导RNA/Cas9组合的编辑频率。

[0180] 通过将向导RNAs复合的Cas9蛋白质递送至胎儿成纤维细胞,将核苷酸序列改变引入猪CD163基因,如实施例2中所述。

[0181] 为了评估由向导RNA/Cas核酸内切酶系统介导的在猪CD163基因组靶位点处的DNA双链切割,通过PCR扩增靶位点周围约250bp的基因组DNA区域,然后通过扩增子深度测序检查PCR产物是否存在编辑。转染3次后,提取PFF基因组DNA,如实施例2中所述。用NEB Q5聚合酶对预期靶位点周围的区域进行PCR扩增,并添加扩增子特异性条形码所需的序列,通过两轮PCR,使用尾引物进行ILLUMINA®(ILLUMINA®,加利福尼亚州圣地亚哥)测序。在ILLUMINA® MISEQ®个人测序仪(ILLUMINA®,加利福尼亚州圣地亚哥)上深度测序所得的PCR扩增物。通过对比对照实验(其中Cas9蛋白质和向导RNA没有进行转染)或参考基因组,检查所得的读长在预期切割位点是否存在编辑。为了计算靶位点的NHEJ编辑频率,用Cas9蛋白质、向导RNA组合、总编辑读长(与对照处理或参考基因组的DNA序列相比时,扩增子序列含有插入或缺失)除以与条形码和正向引物完全匹配的适当长度的总读长(野生型加经编辑读长)。总读长的平均数为每个样本约7000,NHEJ活性在表3中表示为平均(n=3)编辑分数。如表3所示,从0到58.2%的读长含有编辑,所有组合的平均编辑频率约为16%。本实施例表明,在胎儿成纤维细胞中,猪CD163基因的核苷酸序列是通过双链断裂的刺激来编辑的,这种双链断裂的介导是通过转染来自酿脓链球菌或嗜热链球菌、并与各种向导RNA复合的Cas9蛋白质实现的。

[0182] 实施例4

本实施例说明了使用DNA修复模板生成框内终止密码子。

[0183] 在与Cas9蛋白质和向导RNA共递送时,DNA修复模板用于在猪CD163基因中引入终止密码子。生成表6中公开的核酸内切酶-向导复合物和修复模板,并将其用于编辑囊胚中的CD163基因。通过实施例5的方法验证碱基缺失。

[0184] 实施例5

本实施例说明了经编辑的动物基因组的分子特征。

[0185] 组织样本取自已经根据本文实施例编辑其基因组的动物。尾巴、耳朵切口或血液

样本是适合的组织类型。在取样后1小时内,将组织样本在-20℃下冷冻,以保持组织样本中DNA的完整性。

[0186] 经过裂解缓冲液中的蛋白酶K消化后,从组织样本提取DNA。在两个不同的序列平台上进行表征,短序列读长使用ILLUMINA®平台,长序列读长使用牛津NANOPORE™平台(牛津NANOPORE™技术,英国牛津)。

[0187] 对于短序列读长来说,采用两步PCR来扩增和测序相关区域。第一步是基因座特异性PCR,它使用与供应商特异性引物组合的基因座特异性引物,来扩增DNA样本中的相关基因座。第二步将测序索引和衔接子序列附接到第一步中的扩增子上,以便进行测序。

[0188] 选择用于第一步PCR的基因座特异性引物,以便它们扩增<300bp的区域,使得ILLUMINA®成对末端测序读长可以跨越扩增片段。如果缺失或自然发生的点突变阻止引物正确结合,则优选多个扩增子来提供冗余。使用ILLUMINA®测序平台(MISEQ®, ILLUMINA®, 美国加利福尼亚州圣地亚哥)生成扩增子的序列数据。分析序列读长,以表征编辑过程的结果。

[0189] 对于长序列读长来说,采用两步PCR来扩增和测序相关区域。第一步是基因座特异性PCR,它使用与供应商特异性衔接子组合的基因座特异性引物,来扩增DNA样本中的相关基因座。第二步PCR将测序索引附接到第一步PCR中的扩增子上,以使DNA准备好制备测序库。第二步PCR产物借助供应商试剂盒经历了一系列化学反应,来处理DNA末端,并与含有运动蛋白质的衔接子连接,以允许进入孔进行基于DNA链的测序。

[0190] 针对第一步PCR范围的基因座特异性引物被设计为扩增CD163基因的不同区域,经扩增的区域长度不同。然后将标准化的DNA与供应商提供的加样缓冲液混合,并将其加样到NANOPORE™流动池中。

[0191] 虽然长序列读长的每碱基准确度低于短读长,但对于观察靶位点周围序列的长范围背景非常有用。

[0192] 实施例6

本实施例说明了使猪具有经编辑CD163基因的方法,该经编辑CD163基因赋予PRRSv抵抗力。

[0193] 分离猪卵母细胞,使其受精,然后编辑所得的受精卵,以生成经基因编辑的猪。

[0194] 将CD163 RNP复合物显微注射到体内或体外受精的猪单细胞受精卵的细胞质中,接着孵化这些受精卵,以生成经编辑的多细胞胚胎,将其经标准方法移植至代孕后备母猪,以生产经基因编辑的猪。为了制备胚胎供体和代孕,PIC™系2、系3、系15和系65中的发育期后备母猪接受14日0.22%烯丙孕素溶液(20-36mg/动物)疗法,使其发情期同步。在Matrix的最后一次给药后36小时施用PMSG来诱导卵泡生长,在PMSG施用后82小时施用hCG来诱导排卵。为了生成体内受精的受精卵,接着用来自相应PIC™系的公猪精液来人工授精(AI)静立反射状态下的雌性。人工授精后12-24小时,通过用补充有0.3% BSA(w/v)的无菌TL-HEPES培养基逆行冲洗输卵管,手术收回源自体内的受精卵。受精的受精卵接受单一的2-50微微升(p1)的靶向CD163的Cas9蛋白质和向导RNA复合物(25-50ng/μl和12.5-35ng/μl)的细胞质注射,并在PZM5培养基中培养(Yoshioka, K., 等人, Biol. Reprod., 2002, 60:112-119; Suzuki, C., 等人, Reprod. Fertil., Dev., 2006 18, 789-795; Yoshioka, K.,

J.Reprod.Dev.2008,54,208-213)。注射的受精卵可以在全身麻醉下通过中线剖腹手术植入发情期同步、未交配的代孕雌性的输卵管(每个代孕接受20-60个注射胚胎)。

[0195] 用于基因编辑的体外受精胚胎来自未受精的PICTM卵母细胞。从中等大小(3-6毫米)的卵泡收集发情期同步的PICTM后备母猪的未成熟卵母细胞。接着选择具有均匀的深色细胞质和完整的周围卵丘细胞的卵母细胞,以供成熟。将卵丘卵母细胞复合物置于含有500 μ l成熟培养基、带3.05mM葡萄糖的TCM-199(Invitrogen)、0.91mM丙酮酸钠、0.57mM半胱氨酸、10ng/ml EGF、0.5 μ g/ml促黄体素(LH)、0.5 μ g/ml FSH、10ng/ml庆大霉素(Sigma)和10%卵泡液的孔中,在38.5℃下、5%的CO₂及湿润的空气中放置42-44小时。成熟结束时,通过在存在0.1%透明质酸酶的情况下涡旋3分钟,从卵母细胞中移出周围卵丘细胞。然后,将体外成熟的卵母细胞,以25-30个卵母细胞组成的组置于100 μ l小滴的IVF培养基(含113.1mM NaCl、3mM KCl、7.5mM CaCl₂、11mM葡萄糖、20mM Tris、2mM咖啡因、5mM丙酮酸钠,以及2mg/ml牛血清白蛋白(BSA)的改良Tris缓冲液培养基)中,并使用新鲜稀释的公猪精液根据既定方案进行受精(Abeydera,Biol.Reprod.,57:729-734,1997)。将1ml稀释的精液与含有1mg/ml BSA的Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(DPBS)混合至最终体积10ml,并在1000 $\times$ g、25℃下离心4分钟,在DPBS中洗涤精子三次。在最后一次洗涤后,将精子重新悬浮在mTBM培养基中,并以1 $\times$ 10⁵精子/ml的最终浓度将其加入卵母细胞,在38.5℃、5%CO₂下共培养4-5小时。在体外受精后5小时显微注射推定的受精卵,并在18-42小时(1-4细胞期)后将其移植到代孕雌性。每个代孕接受20-60个注射胚胎。在胚胎移植后28天,通过没有再发情(21天)和超声波扫描检查,确认怀孕。

[0196] 为了确定猪胚胎中Cas9-向导RNA靶向基因编辑的频率,将未注射的对照受精卵和注射的体外受精生成的多余受精卵在PZM3或PZM5培养基中、在38.5℃下培育5-7天。在培育后第7天收集囊胚,分离基因组DNA,供下一代测序。

[0197] 实施例7

本实施例说明了基因编辑猪的产生和特性。

[0198] 通过实施例6中所述方法编辑PICTM系2、3、15和65的动物。使用实施例5中所述方法确认成功的编辑。成纤维细胞细胞系在经胶原酶处理的耳朵切口样本中生长,耳朵切口样本提取自经编辑的动物,并将成纤维细胞细胞系保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)中。ATCC的地址为美国弗吉尼亚州20110-2209马纳萨斯,大学大道10801。经CD163编辑的PICTM系2的代表性样本于2019年4月3日保藏在ATCC中,并指定了ATCC专利保藏号PTA-125814,分类命名为成纤维细胞L02_E1_FGA11994(Fibroblast cells L02_E1_FGA11994)。经CD163编辑的PICTM系3的代表性样本于2019年4月3日保藏在ATCC中,并指定了ATCC专利保藏号PTA-125815,分类命名为成纤维细胞L03_E1_FGA11984(Fibroblast cells L03_E1_FGA11984)。经CD163编辑的PICTM系15的代表性样本于2019年4月3日保藏在ATCC中,并指定了ATCC专利保藏号PTA-125816,分类命名为成纤维细胞L15_E0_FGA10157(Fibroblast cells L15_E0_FGA10157)。经CD163编辑的PICTM系65的代表性样本于2019年4月3日保藏在ATCC中,并指定了ATCC专利保藏号PTA-125813,分类命名为成纤维细胞L65_E1_FGA11521(Fibroblast cells L65_E1_FGA11521)。每次交存均根据《布达佩斯条约》进行。确认各系中的代表性动物均具有杂合编辑,如表16所示。

[0199] 表16:经验证的基因编辑动物

系号	CD163 等位基因 1	CD163 等位基因 2	ATCC 保藏号
2	野生型序列	缺失的核苷酸 chr5: 63301999-63302005	PTA-125814
3	野生型序列	缺失的核苷酸 chr5: 63301999-63302005	PTA-125815
15	野生型序列	缺失的核苷酸 chr5: 63301999-63302005	PTA-125816
65	野生型序列	缺失的核苷酸 chr5: 63301999-63302005	PTA-125813

表16中的每只动物都表现出健康的表型,并缺失染色体5中的核苷酸63301999-63302005(在外显子2中)。

[0200] 额外的细胞系在经胶原酶处理的耳朵切口样本中生长,耳朵切口样本来自PICTM系19/27和62的未编辑动物,并将额外的细胞系保藏在ATCC中。PICTM系19的代表性样本于2019年4月3日保藏在ATCC中,并指定了ATCC专利保藏号PTA-125811,分类命名为成纤维细胞L19_WXA13324(Fibroblast cells L19_WXA13324)。PICTM系27的代表性样本于2019年4月3日保藏在ATCC中,并指定了ATCC专利保藏号PTA-125907,分类命名为成纤维细胞L27_HXA25437(Fibroblast cells L27_HXA25437)。PICTM系62的代表性样本于2019年4月3日保藏在ATCC中,并指定了ATCC专利保藏号PTA-125812,分类命名为成纤维细胞L62_NAA17880(Fibroblast cells L62_NAA17880)。每次交存均根据《布达佩斯条约》进行。使用常规的克隆方法,从以PTA-125811、PTA-125812和PTA-125907保藏的细胞系中生成动物,并使用实施例6的方法编辑生成的动物,以生成经编辑的系。

[0201] 分析每个保藏的PICTM系(2、3、15、19、27、62和65)的CD163基因附近的单核苷酸多态性(SNP),选择能够区分各系的每个系的SNP曲线图。用于定义系特征的起始数据集是7个保藏的PICTM系中的330个全基因组测序动物的集合。提取以CD163基因为中心的染色体5的6Mb区域以获取特征,并检查该区域中每个核苷酸的系内和系之间的差异,以识别共同形成该系的特征的相对少量的SNPs。

[0202] 为了有望被纳入到给定系的特征中,对每个染色体位置实行以下标准:序列覆盖须存在于该系中90%的动物中;7个系中的至少5个系须符合上述要求;且所有具有靶向系数据的动物都必须已经具有相同的纯合基因型。对于每个其他系来说,针对该系的所有测序动物计算出该基因型的基因型频率。对其他6个系中最高和最低每系基因型频率之间的差异实行至少30%截断(即,6个系内必须存在基因型频率的分布)。

[0203] 用于区分能力和均匀分布的度量组合用于选择可以定义每系的基因型子集。表8至表14提供了染色体5上的SNPs位置,每个猪系中针对该位置的纯合等位基因是固定的。这些纯合等位基因组将每个猪系与其他系区分开。所列基因型表明哪个等位基因在每个位置是纯合的,如表8至表14所示。

[0204] 实施例8

本实施例比较了从野生型和经基因编辑猪分离的免疫细胞对PRRSv的不同抵抗力

水平。

[0205] 根据先前实施例所述方法,对从经编辑的和野生型动物(每个有和没有CD163基因编辑)中回收的单核细胞源性巨噬细胞(**MoMØs**)进行CD163表面表达分析。测试的编辑显示在表17中。4个编辑包含如表所示的各种大小的缺失,第5个编辑包含2个碱基对插入;表15中的所有编辑都在外显子2中。所有缺失或插入导致截短的CD163多肽。使用克隆2A10/11

(小鼠抗猪CD163单克隆抗体),通过免疫荧光标记和FACS分析,评估CD163表达。从细胞表面表达分析可以明显看出,经CD163编辑的细胞**MoMØs**在细胞表面缺乏功能性表位。

[0206] 表17:针对蛋白质表达测试的CD163基因编辑

区域 Chr5 向导 RNAs 结合位点 的部位	63301997 - 02016	63301997 - 02016	63301997 - 02016	63301997 - 02016	63301997 - 02016
SEQ ID NO	14	15	16	17	18
向导 RNA 间隔 区(DNA) SEQ ID NO	42	42	42	42	42
向导 RNA 间隔 区(RNA) SEQ ID NO	288	288	288	288	288
缺失的转译	339	340	341	342	343
碱基缺失或插 入坐标	chr5:6330201 2-63302013	chr5:6330200 9-63302041	chr5:6330201 2-63302013	chr5:6330200 5-63302020	chr5:6330201 1-63302020
缺失或插入的 碱基(#)	TC (2 bp 缺失)	SEQ ID NO: 344; (33 bp 缺 失)	TC (2 bp 插 入)	SEQ ID NO: 345; (16 bp 缺 失)	SEQ ID NO: 346; (10 bp 缺 失)

为了测试纯合编辑细胞中对CD163进行的两个碱基对的缺失编辑针对PRRSv的病毒性感染,用PRRSv 1型和2型感染**MoMØs**。感染后二十四(24)小时后,在显微镜视场中,对细胞进行计数,以确定含有复制PRRSv的细胞数。结果发现CD163纯合编辑的**MoMØ**细胞对PRRSv 1型和2型均不受纳。

[0207] 实施例9

本实施例说明了使用两个向导从猪成纤维细胞中猪CD163中去除外显子7。

[0208] 为了去除编码成熟CD163多肽SRCR5的CD163外显子7DNA序列,检查位于CD163外显

子7上游450bp和下游59bp的内含子区域内的DNA序列,寻找酿脓链球菌 (NGG) 和嗜热链球菌 (NGGNG) Cas9蛋白质和向导RNA识别位点。在内含子6的450bp内识别出48个位点,在内含子7的59bp内识别出10个位点。首次在猪胎儿成纤维细胞中使用单向导测试了这58个位点结合Cas9和向导RNAs以指导基因编辑的能力。这些单向导RNA-Cas9蛋白质的子集一在间隔区识别位点生成高频率编辑的向导RNA作为向导对被进一步测试,以检测它们去除CD163外显子7的能力。如实施例2所述,通过核转染将向导引入猪胎儿成纤维细胞:将每个向导制备为RNP,然后在转染前将两组复合物结合,总体积为2.23 μ l。如实施例3所述,确定向导对的编辑频率。NHEJ介导修复使核酸内切酶切割位点聚集到一起,导致CD163外显子7缺失,NHEJ介导修复的频率如表18所示。

[0209] 表18使用成对向导RNA在猪胎儿成纤维细胞中导致CD163外显子7缺失的端对端修复频率

SEQ ID NO: (5')	切割位点 (5')	SEQ ID NO: (3')	切割位点 (3')	缺失尺寸 (bp)	期望修复结果 (%)
229	63322816	256	63323377	561	23.3
230	63322814	256	63323377	562	24.7
231	63322826	256	63323377	551	15.3
237	63322861	256	63323377	516	20.7
241	63322891	256	63323377	486	20.0
229	63322816	258	63323378	562	5.3
230	63322814	258	63323378	563	7.0
231	63322826	258	63323378	552	4.3
237	63322861	258	63323378	517	15.7
241	63322891	258	63323378	487	5.7
229	63322816	261	63323373	558	15.0
230	63322814	261	63323373	559	18.0
231	63322826	261	63323373	548	0.0
237	63322861	261	63323373	513	12.0
241	63322891	261	63323373	483	14.0
219	63322697	256	63323377	680	28.0
221	63322709	256	63323377	668	33.7
224	63322747	256	63323377	630	27.0
227	63322786	256	63323377	591	22.7
219	63322697	258	63323378	681	7.7
221	63322709	258	63323378	669	13.0
224	63322747	258	63323378	631	7.3
227	63322786	258	63323378	592	6.3
219	63322697	261	63323373	677	14.5
221	63322709	261	63323373	665	20.7
224	63322747	261	63323373	627	14.7
227	63322786	261	63323373	588	11.3

249	63322963	256	63323377	414	38.0
250	63322973	256	63323377	404	36.7
249	63322963	258	63323378	415	20.3
250	63322973	258	63323378	405	14.7
249	63322963	261	63323373	411	17.7
250	63322973	261	63323373	401	11.7

对于期望的编辑切除向导的编辑频率范围广。

[0210] 实施例10

本实施例说明了使用双向导RNA在猪囊胚中切除外显子7。附加测试在猪胎儿成纤维细胞中筛查的向导子集,测试它们从猪囊胚去除CD163外显子7的能力。对将在猪胚胎中测试的向导子集的选择基于以下两项的组合:它们在猪成纤维细胞中生成外显子7缺失的功效,配对中每个向导的少量脱靶编辑(参见具体实施方式)。如上所述,生成经编辑的猪胚胎。简而言之,如实施例6所述,对从屠宰场卵巢中回收的卵母细胞进行体外受精。在受精后4-5小时,使用FEMTOJET® 4i微型注射器(Eppendorf;德国汉堡)的单冲量将sgRNP溶液注射到推定的受精卵的细胞质中,设置值为 $p_i=200\text{ hPa}$, $t_i=0.25\text{ s}$, $p_c=15\text{ hPa}$ 。将外径1.2mm、内径为0.94mm的玻璃毛细移液管(Sutter Instrument,美国加利福尼亚州94949诺瓦托)拉至 $<0.5\mu\text{m}$ 的针细管。在配备有Narishige (Narishige International USA,美国纽约阿米提维尔)显微操纵器的倒置显微镜的加热镜台上,在供有3mg/ml BSA(Proliant)的TL-Hepes (ABT360, LLC)中进行显微注射。注射后,在PZM5(日本东京Cosmo Bio株式会社)中,在5% CO_2 、5% O_2 、90% N_2 的培养箱环境中培育推定的受精卵7天。如实施例3所述,确定囊胚的编辑频率。端对端NHEJ修复导致CD163外显子7缺失,端对端NHEJ修复的频率如表19所示。

[0211] 表19使用成对向导RNAs在猪胚胎中导致CD163外显子7缺失的端对端修复频率

SEQ ID NO: (5')	切割位点 (5')	SEQ ID NO: (3')	切割位点 (3')	缺失尺寸 (bp)	期望修复结果 (%)
229	63322816	256	63323377	561	38.0
230	63322814	256	63323377	562	21.0
231	63322826	256	63323377	551	24.0
241	63322891	256	63323377	486	29.0
229	63322816	258	63323378	562	7.0
231	63322826	258	63323378	552	12.0
241	63322891	258	63323378	487	20.0
219	63322697	256	63323377	680	35.0
221	63322709	256	63323377	668	36.0
224	63322747	256	63323377	630	24.0
227	63322786	256	63323377	591	0.0
227	63322786	258	63323378	592	0.0
221	63322709	261	63323373	665	15.0
249	63322963	256	63323377	414	44.0
250	63322973	256	63323377	404	14.0
249	63322963	258	63323378	415	7.0
249	63322963	261	63323373	411	53.0

本实施例表明,数个向导对可用于删除CD163外显子7,但其效率可因向导对和细胞类型不同大大不同。

[0212] 实施例11

本实施例说明了使用两个向导将不成熟的终止密码子引入猪CD163的外显子7。

[0213] 利用生物信息学方法筛查CD163外显子7内的向导,以筛查在NHEJ过程中这些向导产生的切割被连接在一起时上述向导生成框内终止密码子的能力。如实施例2所述,在猪胎儿成纤维细胞中测试生物信息学预测:在转染前,将向导单独复合,然后结合向导,总体积为2.23 μ l。如实施例3所述,确定编辑频率。端对端NHEJ修复导致CD163外显子7中不成熟的终止密码子的引入,端对端NHEJ修复的频率如表20所示。

[0214] 表20在猪胎儿成纤维细胞中向CD163外显子7缺失引入终止密码子的端对端修复频率

SEQ ID NO: (5')	切割位点 (5')	SEQ ID NO: (3')	切割位点 (3')	缺失尺 寸 (bp)	期望修复结 果 (%)
351	63323023	365	63323103	80	50.5
351	63323023	387	63323235	212	1.0
348	63323027	390	63323236	209	53.5
348	63323027	388	63323236	209	50.0
348	63323027	395	63323284	257	31.0
352	63323035	365	63323103	68	29.0
352	63323035	387	63323235	200	12.5
352	63323035	399	63323283	248	21.0
353	63323038	365	63323103	65	21.0
353	63323038	387	63323235	197	6.0
353	63323038	399	63323283	245	11.0
354	63323039	390	63323236	197	55.5
354	63323039	388	63323236	197	18.0
354	63323039	395	63323284	245	17.0
358	63323056	361	63323077	21	0.0
358	63323056	362	63323087	31	4.0
358	63323056	368	63323124	68	37.0
358	63323056	384	63323203	147	34.0
358	63323056	394	63323272	216	56.0
358	63323056	399	63323283	227	34.0
359	63323057	390	63323236	179	13.0
359	63323057	388	63323236	179	3.0
359	63323057	395	63323284	227	4.0
360	63323058	368	63323124	66	7.5
360	63323058	384	63323203	145	6.0
360	63323058	389	63323237	179	0.0

360	63323058	394	63323272	214	16.5
360	63323058	397	63323285	227	0.0
361	63323077	365	63323103	26	42.0
361	63323077	387	63323235	158	0.0
362	63323087	390	63323236	149	45.0
362	63323087	388	63323236	149	17.5
362	63323087	395	63323284	197	22.5
364	63323089	365	63323103	14	0.0
364	63323089	387	63323235	146	14.5
364	63323089	399	63323283	194	35.5
365	63323103	368	63323124	21	0.0
365	63323103	384	63323203	100	17.0
365	63323103	389	63323237	134	0.0
365	63323103	394	63323272	169	32.5
365	63323103	397	63323285	182	1.0
366	63323118	368	63323124	6	0.0
366	63323118	384	63323203	85	29.0
366	63323118	389	63323237	119	14.0
366	63323118	394	63323272	154	48.5
366	63323118	397	63323285	167	10.0
354	63323039	211	63323163	123	29.0

本实施例说明了被设计用于引入终止密码子的向导对在猪成纤维细胞中具有多种编辑效率。

[0215] 实施例12

本实施例说明了在猪囊胚中引入终止密码子的向导的编辑效率。

[0216] 附加测试在猪胎儿成纤维细胞中筛查的向导子集,测试它们向猪胚胎的CD163外显子7引入不成熟的终止密码子的能力。对将在猪胚胎中测试的向导子集的选择基于以下两项的组合:它们向猪成纤维细胞的CD163外显子7引入不成熟的终止密码子的功效,上述配对中每个向导缺乏观察到的脱靶。如实施例3所述,确定编辑频率。端对端NHEJ修复导致CD163外显子7中不成熟的终止密码子的引入,端对端NHEJ修复的频率如表21所示。

[0217] 表21在猪囊胚中向CD163外显子7缺失引入终止密码子的端对端修复频率

SEQ ID NO: (5')	切割位点 (5')	SEQ ID NO: (3')	切割位点 (3')	缺失尺寸 (bp)	期望修复结果 (%)
351	63323023	365	63323103	80	39.6
348	63323027	390	63323236	209	31
348	63323027	388	63323236	209	35.4
354	63323039	390	63323236	197	30.4
358	63323056	394	63323272	216	29.2
362	63323087	390	63323236	149	31
366	63323118	394	63323272	154	33
354	63323039	211	63323163	123	27.4

本实施例说明可用于向CD163的外显子7引入不成熟的终止密码子的向导对具有多种编辑效率。

[0218] 实施例13

本实施例说明了NHEJ修复的可变修复结果。

[0219] 如实施例9所述,测试了被设计用于删除CD163外显子7的向导RNA子集,以测试其在猪囊胚中删除外显子7编码区和侧翼区的能力。如实施例3所述,确定囊胚的编辑频率。在本实施例中,针对5个向导RNA对表7显示了作为NHEJ介导修复的结果的在猪体内囊胚中观察到的DNA序列子集。已知除了更复杂的NHEJ介导修复DNA序列,简单的核苷酸缺失也会发生,更复杂的NHEJ介导修复DNA序列含有缺失、插入、重排、倒位及其任何组合。不受理论的限制,这些不同的修复结果也是猪囊胚中使用单个和成对向导对DNA进行核酸内切酶切割的结果。表7还显示与每个修复结果关联的观察到的DNA序列的频率在向导RNA对之间有所变化。在某些情况下,但并非所有情况下,与成对向导RNA切割位点的端对端连接关联的DNA序列频率是修复结果中最高的代表。对于一些向导RNA对,有单一的主导DNA修复结果,而对于其他向导RNA对,有发生频率相同的DNA修复结果。针对这5个向导RNA对显示的大多数DNA修复结果都导致与SRCR 5域相对应的CD163外显子7DNA序列的缺失。因此,使用哪一向导RNA对来生成编辑猪的决定,在很大程度上取决于种群中对多个等位基因的耐受性。

[0220] 本实施例表明,在使用两个内含子向导RNA删除基因组DNA时产生的NHEJ介导修复结果在向导RNA对之间有所变化,不仅表现在DNA断裂的连接方式上,还表现在这些连接的频率上。筛查成纤维细胞或胚胎中的向导RNA对,观察单或双向导RNA的DNA修复结果,有利于编辑动物的生成。

[0221] 实施例14

本实施例说明用于认定细胞中是否存在SEQ ID NO:249中所列间隔序列和/或期望的外显子7切除编辑的实时PCR检测。

[0222] 为该检测设计了两组引物和两个探针。一组引物设计为与未经编辑的基因组中SEQ ID NO:249中所列的间隔序列侧翼相接。这些引物的序列在SEQ ID NOs:556和557中列出。序列为SEQ ID NO:558的、标记有HEX荧光部分的探针被设计为退火至PCR引物中间的未经编辑的基因组。另一组引物具有SEQ ID NOs:562和563中所列的序列,设计为与期望的编

辑序列侧翼相接。具有SEQ ID NO:564中所列序列、标记有FAM荧光部分的探针设计为,退火至涵盖编辑的连接区的核苷酸。实时PCR的执行使用两组引物和从具有已知等位基因地位(野生型、纯合子或杂合子)的猪的尾巴和/或耳朵样本提取的基因组DNA。混合5 μ l的2x PRIMETIME® Master Mix(Integrated DNA Technologies,科拉维尔,爱荷华州)和0.5 μ l的每个引物(10 μ M)、0.5 μ l的每个探针(2.5 μ M),以及2 μ l的基因组DNA。执行PCR,在95°C下最初变性3分钟,然后循环35次:95°C 15秒,64°C 30秒,72°C 30秒。在72°C下进行两分钟的最后延长,然后在4°C下在循环仪中进行反应。测量并荧光用作图,正如预期,纯合子靠近y轴(代表FAM部分波长),杂合子靠近图表中心聚集,野生型猪靠近X轴聚集(代表HEX部分波长)。因此,该检测成功基于SEQ ID NO:249中所列间隔序列检测了编辑。

[0223] 实施例15

本实施例说明用于认定细胞中是否存在SEQ ID NO:256中所列间隔序列和/或期望的外显子7切除编辑的实时PCR检测。

[0224] 为该检测设计了两组引物和两个探针。一组引物与SEQ ID NO:256中所列的间隔序列侧翼相接。这些引物的序列在SEQ ID NOs:559和560中列出。具有SEQ ID NO:561中所列序列、标记有HEX荧光部分的探针设计为退火至间隔序列的未经编辑版本。另一组引物和探针设计为靶向期望的编辑,在实施例14中有所描述(SEQ ID NOs:562-564)。按照实施例14所述执行实时PCR,但使用本实施例中的引物和探针。用图表记录荧光,正如预期,纯合子靠近y轴(代表FAM部分),杂合子靠近图表中心聚集,野生型猪靠近X轴聚集(代表HEX部分)。因此,该检测成功基于SEQ ID NO:256中所列间隔序列检测了编辑。

[0225] 实施例16

本实施例说明在先公开的向导对和本发明的向导对之间的细胞中CD163 CRISPR-CAS gRNA活性对比。

[0226] 如实施例2所述,每对向导都在猪成纤维细胞中测试。并且,如实施例10所述,每对向导还在猪囊胚中测试。结果显示在下文表22中。

[0227] 表22猪细胞中的比较活性

向导对 SEQ ID NOs:	来源	期望修复成纤维细胞%	期望修复囊胚%
272 和 273	Burkard 2017	6	20
249 和 256	本发明	38	44
354 和 211	Whitworth 2014	17	n.d.
362 和 390	本发明	45	31

这些数据说明,与在先文献中公开的向导相比,在具有期望编辑的细胞百分比方面,本发明的向导提供至少两倍的提升。因此,本发明的向导比在先文献中公开的向导更有效。

[0228] 实施例17

本实施例说明受PRRSv I型攻击的CD163经编辑的猪。

[0229] 如实施例6所述,用SEQ ID NOs:249和256中列出的向导来编辑PIC™系2的猪。如实

施例5中所述确认编辑。接着杂交经编辑的猪,以创造针对编辑而言纯合的猪。向这些纯合的经编辑猪接种3ml具有 10^4 至 10^5 个病毒粒子($4-5 \log \text{TCID}_{50}$)的PRRSv I型(SD13-15)。用21计量针肌肉注射施用1.5ml。剩余的1.5ml鼻内施用。在第0日(该日接种前)、第3日、第5日、第10日、第14日、第21日获取血清样本。实时PCR使用TETRACORE® EZ-PRRSV MPX 4.0 Master Mix和Enzyme with ROX (TETRACORE®, 罗克韦尔, 马里兰州), 根据制造商说明, 确定血清样本中是否存在病毒。实时PCR EU调整计数显示在表23中。已经使用本领域已知的标准方法对计数进行转化, 来使数据更加易懂——数字越高, 表示检测到的病毒越多。

[0230] 表23I型PRRSv攻击的实时PCR EU调整计数

动物	CD163	第0日	第3日	第5日	第10日	第14日	第21日
2	WT	0	19.8	22.6	20	19.6	18.3
4	WT	0	17	17.7	18.6	16.8	17.5
5	WT	0	18.9	21.5	17.3	14.2	13.6
6	WT	0	15.8	19.7	15.6	14.5	13.4
17	WT	0	17.1	17.8	18.5	18	15.8
18	WT	0	15.8	17.9	17	16.8	15
20	WT	0	17.2	20.3	18.8	17	12.8
3	编辑	0	0	0	0	0	0
7	编辑	0	0	0	0	0	0
14	编辑	0	0	0	0	0	0
19	编辑	0	0	0	0	0	0

整个实验过程中, 经编辑动物的血清中没有检测到PRRSv。

[0231] 还使用IDEXX PRRS X3抗体测试试剂盒对血清样本进行了ELISA测试; 该测试由官方认可的兽医诊断实验室执行。结果显示为样本: 阳性比例。大于等于0.40的比例被视为是阳性。表24显示了每个样本的比例。

[0232] 表24I型PRRSv攻击的ELISAS/P结果

动物	CD163	第0日	第3日	第5日	第10日	第14日	第21日
2	WT	0.0	0.0	0.0	0.5	0.6	1.4
4	WT	0.0	0.0	0.0	0.1	0.2	0.8
5	WT	0.0	0.0	0.0	0.9	1.3	1.8
6	WT	0.0	0.0	0.0	1.3	1.3	1.9
17	WT	0.0	0.0	0.0	0.2	0.2	1.1
18	WT	0.0	0.0	0.0	0.3	0.3	1.4
20	WT	0.0	0.0	0.0	0.3	0.4	1.2
3	编辑	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
7	编辑	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
14	编辑	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
19	编辑	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

经编辑的猪没有任何阳性比例。相比之下, 到第21日为止, 所有野生型猪均具有阳性比例。这进一步说明了经编辑猪的血清中没有PRRSv传播。

[0233] 该实施例说明了用SEQ ID NOs:249和256的向导编辑过的猪对PRRSv I型病毒感染具有抗性。

[0234] 实施例18

本实施例说明受PRRSv II型攻击的CD163经编辑的猪。如实施例6中所述,用SEQ ID NOs:249和256中列出的向导来编辑PIC™系2和3的猪。如实施例5中所述确认编辑。接着杂交经编辑的猪,以创造针对编辑而言纯合的猪。向这些纯合的经编辑猪接种3ml具有 10^4 至 10^5 个病毒粒子(4-5log TCID₅₀)的PRRSv II型(NVSL 97-7895)。用21计量针肌肉注射施用1.5ml。剩余的1.5ml鼻内施用。在第0日(该日接种前)、第3日、第5日、第10日、第14日、第21日获取血清样本。实时PCR使用TETRACORE®EZ-PRRSV MPX 4.0Master Mix和Enzyme with RvX,根据制造商说明,确定血清样本中是否存在病毒。实时PCR的NA调整计数显示在表25中。对数字进行了转化以使其更加易懂——计数越高,存在越多病毒。

[0235] 表25II型PRRSv攻击的实时PCR NA调整计数

动物	CD163	第0日	第3日	第5日	第10日	第14日	第21日
21	WT	0.0	18.4	22.0	21.9	18.0	16.1
23	WT	0.0	16.4	22.0	21.8	20.0	19.7
25	WT	N/A	17.2	21.2	21.9	19.2	19.8
30	WT	0.0	16.2	17.8	21.4	21.1	17.6
33	WT	0.0	18.5	N/A	21.8	18.5	15.3
35	WT	N/A	17.0	22.9	21.8	20.5	20.9
36	WT	0.0	16.7	21.4	21.9	19.9	17.4
38	WT	0.0	16.0	18.1	20.2	20.9	9.4
24	编辑	N/A	1.9	0.0	0.0	0.0	0.0
37	编辑	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

经编辑的猪相比野生型猪几乎没有病毒计数。

[0236] 还使用IDEXX PRRS X3抗体测试试剂盒对血清样本进行了ELISA测试;该测试由官方认可的兽医诊断实验室执行。结果显示为样本:阳性比例。大于等于0.40的比例被视为是阳性。表26显示了每个样本的比例。

[0237] 表26II型PRRSv攻击的ELISAS/P比例

动物	编辑	第0日	第3日	第5日	第10日	第14日	第21日
21	WT	0.0	0.0	0.0	1.7	2.0	1.9
23	WT	0.0	0.0	0.0	1.2	1.7	1.9
25	WT	N/A	0.0	0.0	1.2	1.6	1.7
30	WT	0.0	0.0	0.0	0.4	0.6	0.6
33	WT	0.0	0.0	N/A	0.7	0.6	0.7
35	WT	N/A	0.0	0.0	1.3	1.3	1.4
36	WT	0.0	0.0	0.0	1.2	1.5	1.8
38	WT	0.0	0.0	0.0	0.5	0.9	1.0
24	编辑	N/A	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1
37	编辑	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

经编辑的猪不具有任何阳性比例。相比之下,到第10日为止,所有野生型猪均具有阳性比例。整体来说,这些数据说明了经编辑猪的血液中没有病毒传播。

[0238] 该实施例说明了具有经过SEQ ID NOs:249和256编辑的CD163基因的猪对PRRSv II型感染具有抗性。

[0239] 每一上文中引用和应用的内容均通过引用全文并入于此。在详细描述了本发明之后,显而易见的是,在不脱离所附权利要求书中界定的教导之范围的情况下,可以进行修改和变化。