

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020 年 1 月 9 日 (09.01.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/006787 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 5/10 (2006.01) *C12R 1/91* (2006.01)
C12N 15/867 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/096554

(22) 国际申请日: 2018 年 7 月 21 日 (21.07.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201810733097.5 2018年7月5日 (05.07.2018) CN

(71) 申请人: 浙江大学(ZHEJIANG UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号饲料科学研究所/汪以真, Zhejiang 310058 (CN)。

(72) 发明人: 宗鑫(ZONG, Xin); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号饲料科学研究所/汪以真, Zhejiang 310058 (CN)。汪以真(WANG, Yizhen); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号饲料科学研究所/汪以真, Zhejiang 310058 (CN)。赵婧(ZHAO, Jing); 中国浙江省

杭州市西湖区余杭塘路866号饲料科学研究所/汪以真, Zhejiang 310058 (CN)。

(74) 代理人: 杭州求是专利事务所有限公司(HANGZHOU QIUSHI PATENT OFFICE CO., LTD); 中国浙江省杭州市玉古路147号黄鸿年科技综合大楼215室林松海, Zhejiang 310013 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,

(54) Title: CELL LINE WITH METTL3 GENE KNOCKED OUT AND CONSTRUCTION METHOD THEREFOR, AND INTERFERENCE VECTOR

(54) 发明名称: METTL3基因敲除的细胞系及其构建方法与干扰载体

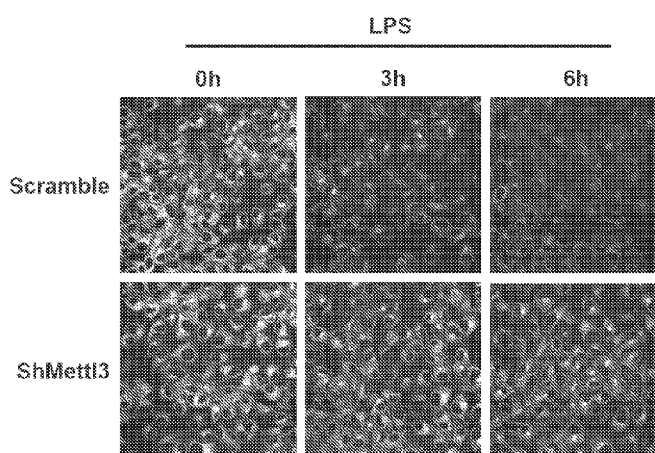


图 4

(57) Abstract: Provided are a pig intestinal tract epithelium cell line with METTL3 gene knocked out and a construction method therefor. Also provided is a gene interference vector for METTL3 from a pig.

(57) 摘要: 提供了一种 METTL3 基因敲除的猪肠道上皮细胞系细胞系及其构建方法。还提供了一种针对猪源METTL3的基因干扰载体。

[见续页]

WO 2020/006787 A1

NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布：

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

METTL3 基因敲除的细胞系及其构建方法与干扰载体

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程领域，涉及一种 METTL3 基因敲除的细胞系及其构建方法与干扰载体。

背景技术

[0002] 我国现在普遍采用集约型模式进行养猪生产，生猪在每个生长环节都会受到病原微生物的感染，容易造成仔猪肠道（屏障）功能损伤，导致养分消化吸收障碍，并往往伴随着抵抗力下降和较严重的腹泻。在主要养分中，又以作为主要能量物质的脂肪酸的吸收利用影响较大。针对这一现象，目前主要采取抗病育种和长期高剂量添加药物两方面的措施。由于抗病育种世代周期长和普及面小等问题难以大范围推广，因此目前普遍采用的措施是长期高剂量添加饲用抗生素和氧化锌，然而其存在的问题也是显而易见的：极易引发细菌耐药性、肉产品残留、扰乱动物肠道微生态区系平衡、环境污染。因此寻求解决这一问题的新方法迫在眉睫。

[0003] m6A 甲基化的修饰主要位于 mRNA 的腺苷 A 第六号氮原子上，是一种动态可逆的 RNA 修饰，Mettl3 作为其甲基转移酶，通常和 Mettl14 形成复合物，执行写入 m6A 的功能。有文章报道，Mettl3 所调控的 RNA 甲基化水平变化参与到生物机体从基因的转录到蛋白质的翻译的整个过程，如敲除 Mettl3 能够显著提高神经胶质瘤干细胞或类干细胞的增殖和自我更新 (Cui et al., 2017); Mettl3 能够介导 m6A 依赖的 cir-RNA 的翻译 (Yang et al., 2017); Mettl3 能够通过 DNA 启动子区域相结合，调控基因转录，发挥着基因转录开关的作用 (Barbieri et al., 2017); 敲除 Mettl3 能够通过阻止炎症相关通路关键因子 MyD88 的剪切，进而阻止炎症反应的发生 (Feng et al., 2018; 江一舟等, 2017); 同时有文章报道 Mettl3 在成脂分化过程中能够通过促进细胞周期进而促进脂肪生成 (Batista et al., 2014)。但是其在脂肪酸吸收转运过程中的作用，尚未报道。

发明内容

[0004] 为了克服现有技术的不足，本发明提供了一种 METTL3 基因敲除的细胞系及其构建方法与干扰载体。

[0005] 一种 METTL3 基因敲除的细胞系的构建方法，利用 m6A 甲基转移酶基因 Mettl3 在通过基因编辑方法获得耐受 LPS 刺激导致脂肪酸吸收障碍的猪肠道上皮细胞系。

[0006] 所述的建立方法，包括以下步骤：

- 1) 根据所述的 m6A 甲基转移酶基因 Mettl3 设计 shRNA，所述的 Mettl3 序列如 SEQ ID NO.1 所示，所述的 shRNA 序列如 SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3 所示；
- 2) 针对 m6A 甲基转移酶基因 Mettl3 shRNA 进行磷酸化；
- 3) 将磷酸化的 Mettl3 shRNA 连接到慢病毒表达载体获得 Mettl3 shRNA 慢病毒表达载体；
- 4) 以 293A 细胞作为受体，将步骤 3) 获得的 Mettl3 shRNA 慢病毒表达载体进行慢病毒包装；
- 5) 将步骤 4) 获得的 Mettl3 shRNA 慢病毒感染肠道上皮细胞，利用嘌呤霉素进行筛选，获得基因编辑敲除 m6A 甲基转移酶基因 Mettl3 的肠道上皮细胞。

[0007] 所述的 Mettl3 shRNA 慢病毒表达载体的构建方法具体如下：对 shRNA 慢病毒表达载体利用 BbsI 进行酶切，并进行胶回收获得线性载体；以步骤 2) 获得磷酸化的 Mettl3 shRNA，采用 T4 连接酶，连接到 pRSI9-U6 慢病毒表达载体。

[0008] 一种根据所述的建立方法得到的耐受 LPS 刺激导致脂肪酸吸收障碍的肠道上皮细胞系。

[0009] 一种针对猪源 m6A 甲基转移酶基因 Mettl3 的基因干扰载体，

所述的干扰载体是将针对所述的 m6A 甲基转移酶基因 Mettl3 设计 shRNA，插入到 shRNA 慢病毒表达载体所得，用于敲除肠道上皮细胞内 Mettl3 的表达。

[0010] 本发明的有益效果为：

本发明公开了 Mettl3 基因的一种新功能，参与调控肠道上皮细胞脂肪酸吸收转运，并提供了通过基因编辑手段改善 LPS 刺激导致的脂肪酸吸收障碍的方法。Mettl3 能够调控肠道上皮细胞脂肪酸吸收为首次报道。转录水平和蛋白水平分析表明进行基因编辑的肠道上皮细胞 Mettl3 表达量显著降低。脂肪酸吸收功能验证实验表明进行基因编辑的肠道上皮细胞能够耐受 LPS 刺激导致的脂肪酸吸收障碍。本发明不仅为研究 Mettl3 在脂肪酸吸收过程中的作用奠定基础，还利用基因编辑的方法改善了 LPS 刺激导致的脂肪酸吸收障碍。

附图说明

[0011] 图 1 为 PCR 鉴定 Mettl3 shRNA 慢病毒表达载体琼脂糖凝胶电泳图 (Agarose gel electrophoresis)；

图 2 为 pRSI9-U6 慢病毒载体的示意图；

图 3A 为 Mettl3 shRNA 慢病毒侵染上皮细胞之后 Mettl3 的蛋白表达水平 Western-blot 图；图 3B 为基因编辑后的肠道上皮细胞 Mettl3 的转录水平；数据平均值代表 3 个生物学重复，误差线表示标准误差(SE)。显著性分析*表示 $p < 0.05$ ，**表示 $p < 0.01$ 。

[0012] 图 4 为激光共聚焦检测基因编辑肠道上皮细胞的脂肪酸吸收情况图。

[0013] 图 5 为流式细胞法检测基因编辑肠道上皮细胞的脂肪酸吸收情况，左部分是不同处理组脂肪酸的吸收情况图，右部分是对左图的量化统计；数据平均值代表 3 个生物学重复。误差线表示标准误差(SE)。显著性分析*表示 $p < 0.05$ ，**表示 $p < 0.01$ 。

[0014] 图 6 为紫外分光法检测基因编辑肠道上皮细胞的脂肪酸吸收情况；数据平均值代表 3 个生物学重复。误差线表示标准误差(SE)。显著性分析*表示 $p < 0.05$ ，**表示 $p < 0.01$ 。

[0015] 图 7 为转入 Mettl3 质粒对基因编辑敲除 Mettl3 基因的肠道上皮细胞脂肪酸吸收的影响。

具体实施方式

[0016] 以下结合附图和实施例对本发明做进一步的阐述。

[0017] 实施例 1 Mettl3 shRNA 慢病毒表达载体的获得

本发明中的 Mettl3 shRNA 是利用在线的 shRNA 设计工具：<http://www.broadinstitute.org/rnai/public/seq/search>，根据所述的 m6A 甲基转移酶基因 Mettl3 设计；其中，Mettl3 基因序列如 SEQ ID NO. 1 所示，shRNA 序列包括上游序列 P1，下游序列 P2，如下所示：

P1 (上游序列): ACCGG GAGATCCTAGAACTATTAAAT CTCGAG ATTTAATAGTTCTAG GATCTC TTTTGTG (SEQ ID NO.2);

P2 (下游序列): CGAACAAAAA GAGATCCTAGAACTATTAAAT CTCGAG ATTTAATAGTTCTAG GATCTC C (SEQ ID NO.3)。

[0018] 并利用 T4 Polynucleotide Kinase, 37 ° C 反应 30 分钟后, 95 ° C 反应 2 分钟, 然后自然冷却至室温, 对 Mettl3 shRNA 进行磷酸化。

[0019] 对 shRNA 慢病毒表达载体利用 BbsI 进行酶切, 并进行胶回收获得线性载体; 以获得磷酸化的 Mettl3 shRNA, 采用 T4 连接酶, 室温孵育 2 小时, 将其连接到 pRSI9-U6 慢病毒表达载体上, 通过热激法转化大肠杆菌 DH5 α 菌株, 提取质粒进行 PCR 鉴定, 引物序列如下所示,

Forward: 5'-GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC-3' (SEQ ID NO.4),

Reverse: 5'-ACAGTCCGAAACCCCAAACGCACGAA-3' (SEQ ID NO.5)。

[0020] 反应条件为反应条件 94℃预 变性 3 min, 94℃变性 15s, 56℃退火 30s, 72℃延伸 2min, 25 个反应循环, 获得阳性克隆, 如图 1 所示, 所挑克隆 PCR 产物均大于阴性对照组, 表明 Mettl3 的 shRNA 确实插入到如图 2 所示的 pRSI9-U6 慢病毒表达载体上。

[0021] 实施例 2 Mettl3 shRNA 慢病毒的包被

将 2 μg 实施例 1 中的方法获得的 Mettl3 shRNA 慢病毒表达质粒, 利用脂质体 Lipo2000, 同时转入慢病毒元件 0.25 μg VsVg 和 1 μg PsPax; 24 小时后换成 1.5ml 完全培养基; 48 小时后收集病毒, 获得 Mettl3 shRNA 的慢病毒。

[0022] 实施例 3 基因编辑肠道上皮细胞系的获得

将 500 μl 实施例 2 中的方法获得的 Mettl3 shRNA 慢病毒加入到肠道上皮细胞 IPEC-J2 中, 24 小时后换成完全培养基, 48 小时后加入 4 μg/ml 嘌呤霉素进行筛选, 至通过荧光定量 PCR 及 Western-blot 法验证获得基因编辑敲除 Mettl3 基因的肠道上皮细胞。如图 3A-3B 所示, 与空载体组相比, Mettl3 shRNA 慢病毒侵染组的肠道上皮细胞 Mettl3 的表达水平显著降低。

[0023] 实施例 4 激光共聚焦法分析基因编辑肠道上皮细胞的脂肪酸吸收情况

用实施例 3 中的方法获得的基因编辑敲除 Mettl3 基因的肠道上皮细胞, 以正常细胞(Scramble)作为对照, 分别用 100 μg/ml 脂多糖 LPS 刺激 0 小时, 3 小时, 6 小时后; 加入 Bodipy 标记的脂肪酸, 37℃孵育 5min, 激光共聚焦检测脂肪酸的吸收情况。结果表明基因编辑敲除 Mettl3 基因的肠道上皮细胞对 LPS 刺激导致的脂肪酸吸收障碍的耐受显著高于正常细胞, 如图 4 所示, 分别针对对照组和 Mettl3 基因编辑后的肠道上皮细胞进行 LPS 刺激处理, 结果表明, 对照组在 LPS 刺激条件下, 脂肪酸的吸收明显受阻, 但是 Mettl3 基因编辑后的肠道上皮细胞则表面出明显的耐受。

[0024] 实施例 5 流式细胞分析法基因编辑肠道上皮细胞的脂肪酸吸收情况

用实施例 3 中的方法获得的基因编辑敲除 Mettl3 基因的肠道上皮细胞, 以正常细胞(Scramble)作为对照, 分别用 100 μg/ml 脂多糖 LPS 刺激 0 小时, 3 小时, 6 小时后; 加入 Bodipy 标记的脂肪酸, 37℃孵育 5min, 流式细胞仪(波长 488nm)检测脂肪酸的吸收情况。结果表明基因编辑敲除 Mettl3 基因的肠道上皮细胞对 LPS 刺激导致的脂肪酸吸收障碍的耐受显著高于正常细胞。如图 5 所示, 分别针对对照组(Scramble)和 Mettl3 基因编辑后的肠道上皮细胞(shMettl3)进行 LPS 刺激处理 0 小时, 3 小时, 6 小时。流式细胞法检测细胞荧光标记脂肪酸的吸收情况。

[0025] 实施例 6 紫外分光法检测基因编辑肠道上皮细胞的脂肪酸吸收情况

分别将正常的和基因编辑的 IPCE-J2 细胞种植明胶包被、96 孔、黑色、透明底板, 过夜培

养后,用无 FBS 培养基对血清进行饥饿培养至少 8 小时,用 1mg/ml LPS 处理 0 小时、3 小时、6 小时,然后用磷酸盐缓冲盐水(PBS)进行短暂洗涤。同时在 PBS 中加入 BodiPy FA(分子探针 γ -D3823)和无脂肪酸牛血清白蛋白(BSA)(2:1 摩尔比)在 37℃水浴中预孵育 10 分钟;加入细胞后在 37℃下孵育 5 分钟,用加入 0.5%BSA 的 PBS 洗涤 2 次,每次 2min,为了抑制细胞外荧光,加入 0.4%台盼蓝(每孔 50 μ L),并用紫外分光光度计立即测量细胞内荧光(激发 488 nm,发射 515 nm, cut-off 495 nm)。如图 6 所示,分别针对对照组(Scramble)和 Mettl3 基因编辑后的肠道上皮细胞(shMettl3)进行 LPS 刺激处理 0 小时,3 小时,6 小时。紫外分光法检测细胞荧光标记脂肪酸的吸收情况。

[0026] 实施例 7 转入 Mettl3 质粒对基因编辑敲除 Mettl3 基因的肠道上皮细胞脂肪酸吸收的影响

用实施例 3 中的方法获得的基因编辑敲除 Mettl3 基因的肠道上皮细胞,用 Lipo2000 分别转入 pcDNA3.1 空质粒和 Mettl3 质粒,24 小时后,分别用 100 μ g/ml 脂多糖 LPS 刺激 0 小时,3 小时,6 小时后;加入 Bodipy 标记的脂肪酸,37℃孵育 5min,流式细胞仪(波长 488nm)检测脂肪酸的吸收情况。结果表明相比于空载体组,转入 Mettl3 质粒组在 LPS 刺激下脂肪酸吸收水平显著降低,表明确实是 Mettl3 在耐受脂肪酸吸收障碍中发挥着重要作用。如图 7 所示,对基因编辑敲除 Mettl3 基因的肠道上皮细胞转入 pcDNA3.1 空质粒和 Mettl3 质粒后,进行 LPS 刺激处理 0 小时,3 小时,6 小时。激光共聚焦法检测细胞荧光标记脂肪酸的吸收情况。

权 利 要 求 书

1. 一种 METTL3 基因敲除的细胞系的构建方法，其特征在于，利用 m6A 甲基转移酶基因 Mettl3 在通过基因敲除方法获得耐受 LPS 刺激导致脂肪酸吸收障碍的猪肠道上皮细胞系。
2. 根据权利要求 1 所述的建立方法，其特征在于，包括以下步骤：
 - 1) 根据所述的 m6A 甲基转移酶基因 Mettl3 设计 shRNA，所述的 Mettl3 序列如 SEQ ID NO.1 所示，所述的 shRNA 序列如 SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3 所示；
 - 2) 针对 m6A 甲基转移酶基因 Mettl3 shRNA 进行磷酸化；
 - 3) 将磷酸化的 Mettl3 shRNA 连接到慢病毒表达载体获得 Mettl3 shRNA 慢病毒表达载体；
 - 4) 以 293A 细胞作为受体，将步骤 3) 获得的 Mettl3 shRNA 慢病毒表达载体进行慢病毒包被；
 - 5) 将步骤 4) 获得的 Mettl3 shRNA 慢病毒感染肠道上皮细胞，利用嘌呤霉素进行筛选，获得基因编辑敲除 m6A 甲基转移酶基因 Mettl3 的肠道上皮细胞。
3. 根据权利要求 1 所述的建立方法，其特征在于，所述的 Mettl3 shRNA 慢病毒表达载体的构建方法具体如下：对 shRNA 慢病毒表达载体利用 BbsI 进行酶切，并进行胶回收获得线性载体；以步骤 2) 获得磷酸化的 Mettl3 shRNA，采用 T4 连接酶，连接到 pRSI9-U6 慢病毒表达载体。
4. 一种根据权利要求 1 所述的建立方法得到的耐受 LPS 刺激导致脂肪酸吸收障碍的猪肠道上皮细胞系。
5. 一种针对猪源 m6A 甲基转移酶基因 Mettl3 的基因干扰载体，其特征在于，所述的干扰载体是将针对所述的 m6A 甲基转移酶基因 Mettl3 设计 shRNA，插入到 shRNA 慢病毒表达载体所得，用于敲除肠道上皮细胞内 Mettl3 的表达。

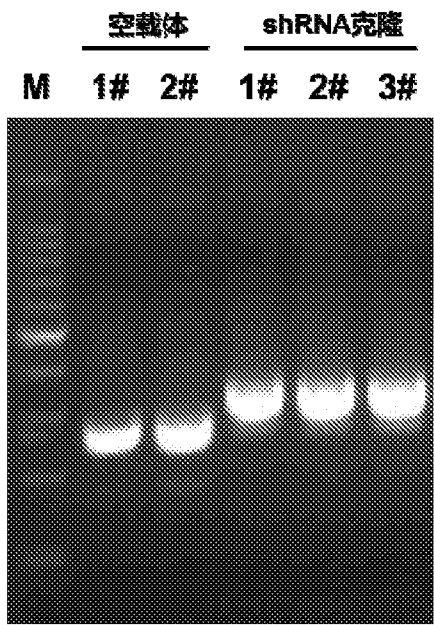


图 1

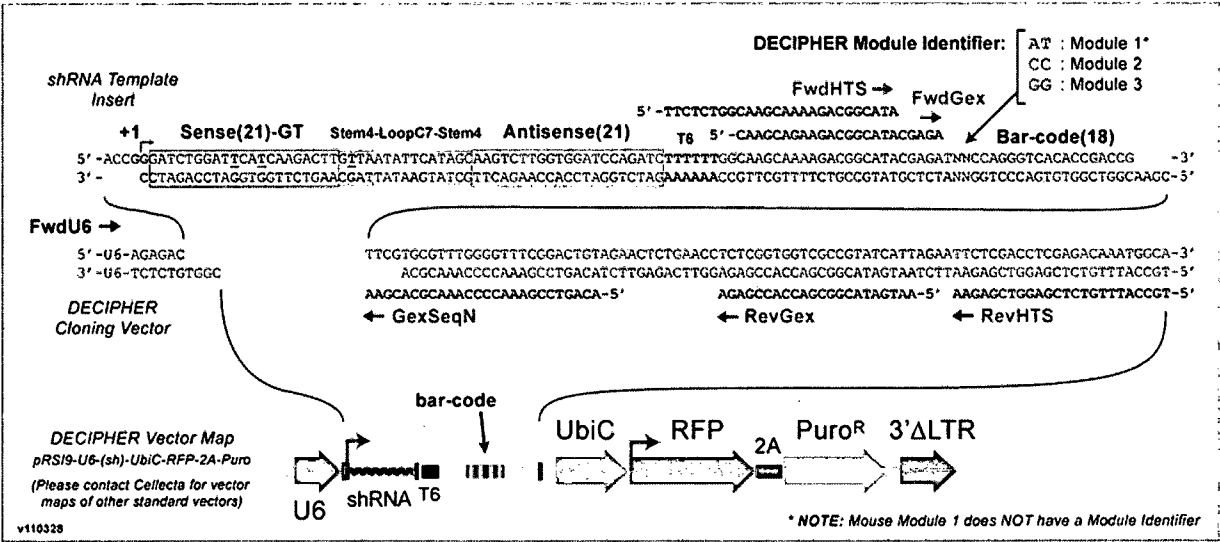


图 2

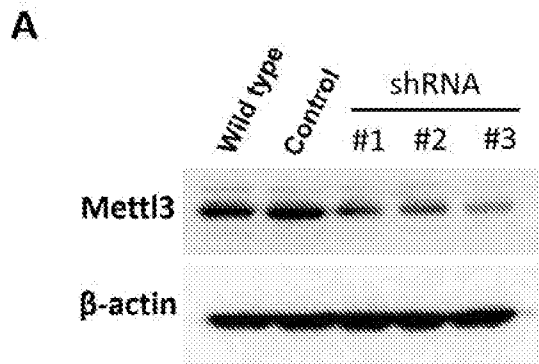


图 3A

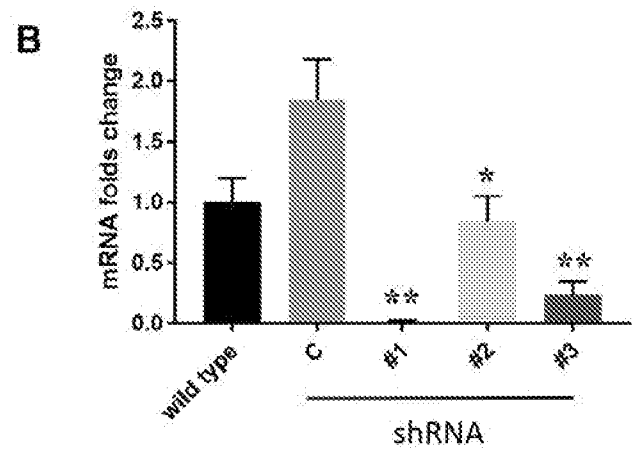


图 3B

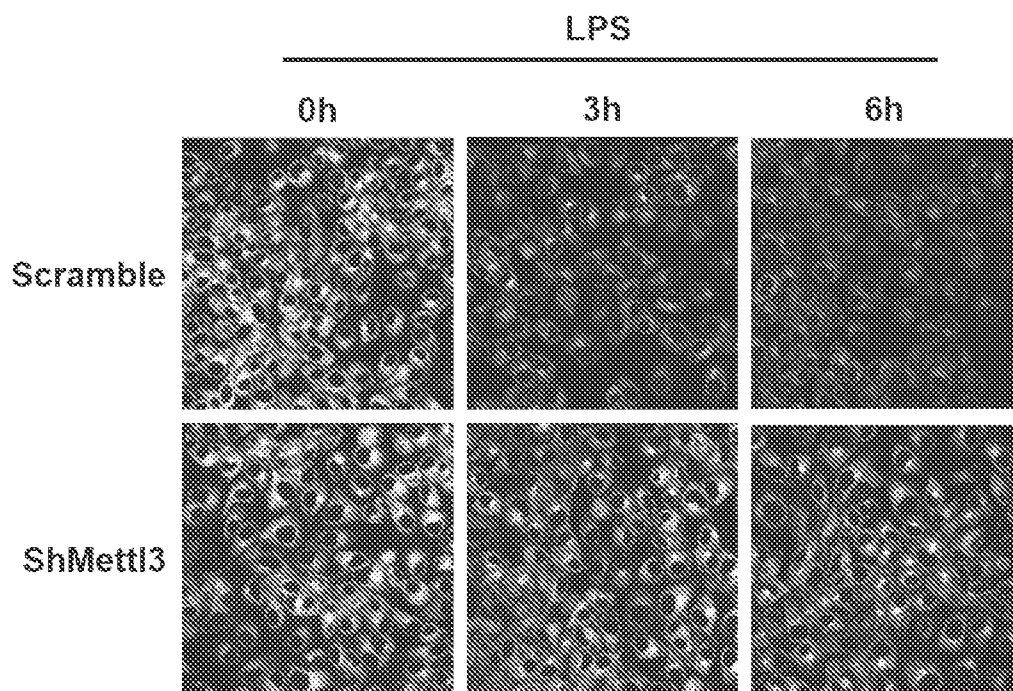


图 4

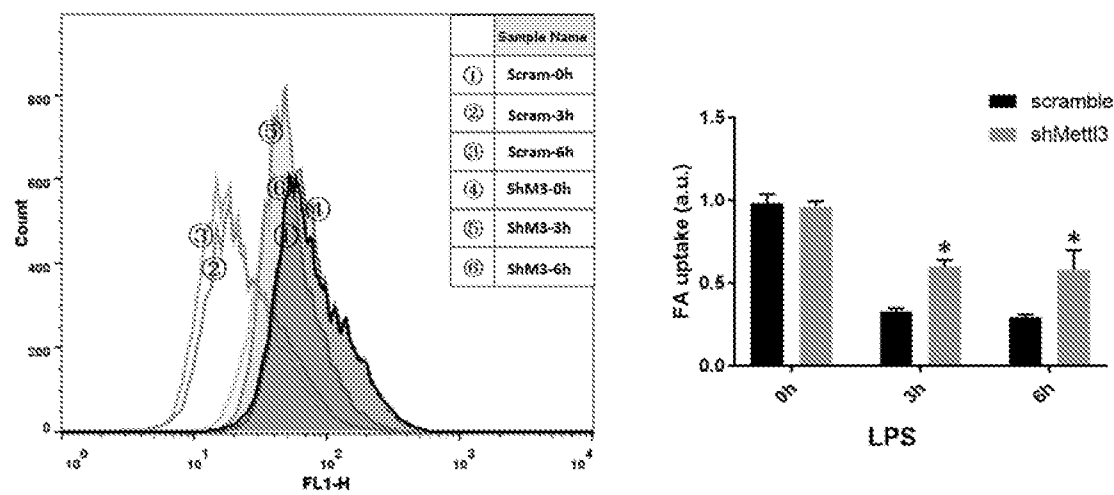


图 5

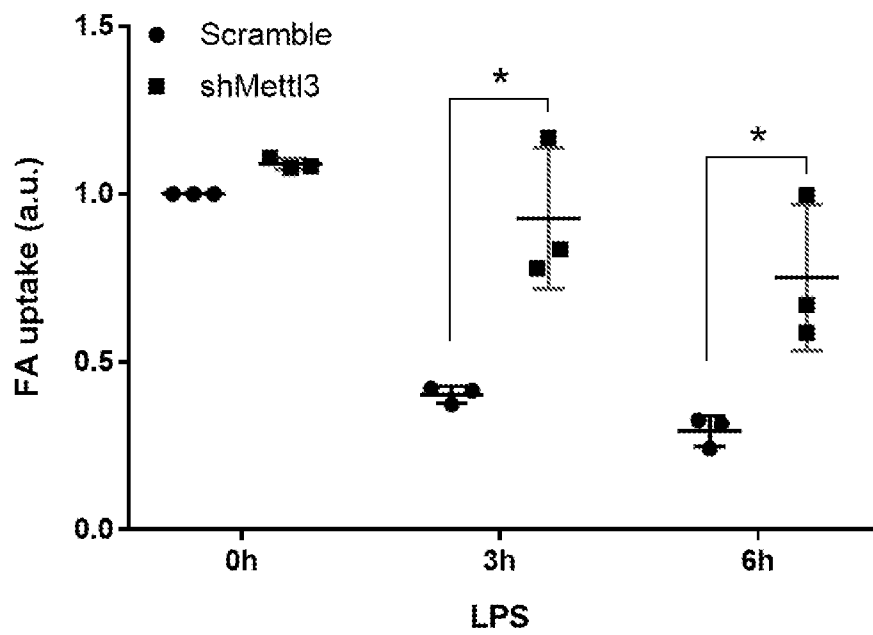


图 6

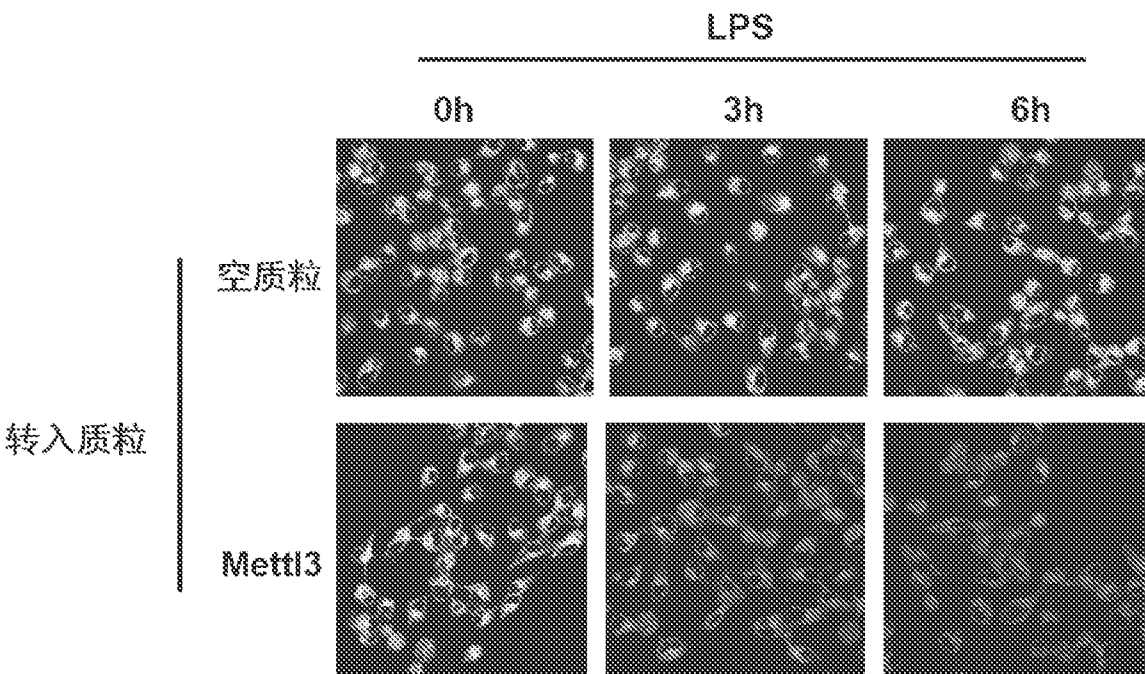


图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/096554

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/867(2006.01)i; C12R 1/91(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, CNKI, ISI WEB OF SCIENCE: M6A甲基转移酶, 猪, 肠道上皮细胞, 敲除, 干扰, METTL3, PIG, INTESTINAL EPITHELIAL CELL, KNOCKOUT, INTERFERE, SHRNA; GenBank+EMBL+中国专利生物序列检索系统, GenBank+EMBL+Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System: 关于SEQ ID NOs:1-3的检索, search on SEQ ID NOs:1-3

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MA, Ziyu et al. "METTL3对猪干细胞多能基因表达的调控作用 (METTL3 Regulates Expression of Pluripotent Genes in Porcine Pluripotent Stem Cells)" <i>生物工程学报 (Chinese Journal of Biotechnology)</i> , Vol. 34, No. 3, 25 March 2018 (2018-03-25), ISSN: 1000-3061, pages 369-378, see the abstract, and Materials and Methods	1-5
A	CN 107349217 A (SHENZHEN UNIVERSITY) 17 November 2017 (2017-11-17) see entire document	1-5
A	YANG, Fan et al. "人膀胱癌细胞RNA甲基转移酶双基因敲除模型构建与鉴定 (Construction and Identification of a Double Gene Knockout Cell Model for RNA Methyltransferase-like in Human Bladder Cancer Cells)" <i>中国职业医学 (China Occupational Medicine)</i> , Vol. 44, No. 6, 31 December 2017 (2017-12-31), ISSN: 2095-2619, pp. 664-670, see entire document	1-5



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

01 April 2019

Date of mailing of the international search report

09 April 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/096554

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/096554

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 107349217 A	17 November 2017	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/096554

A. 主题的分类

C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/867(2006.01)i; C12R 1/91(2006.01)n

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N; C12R

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, CNKI, ISI WEB OF SCIENCE: M6A 甲基转移酶, 猪, 肠道上皮细胞, 敲除, 干扰, METTL3, PIG, INTESTINAL EPITHELIAL CELL, KNOCKOUT, INTERFERE, SHRNA; GenBank+EMBL+中国专利生物序列检索系统: 关于 SEQ ID NOs: 1-3 的检索

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	马子玉 等. "METTL3对猪干细胞多能基因表达的调控作用" 生物工程学报, 第34卷, 第3期, 2018年 3月 25日 (2018 - 03 - 25), ISSN: 1000-3061, 第369-378页, 参见摘要和材料与方法部分	1-5
A	CN 107349217 A (深圳大学) 2017年 11月 17日 (2017 - 11 - 17) 参见全文	1-5
A	杨帆 等. "人膀胱癌细胞 RNA 甲基转移酶双基因敲除模型构建与鉴定" 中国职业医学, 第44卷, 第6期, 2017年 12月 31日 (2017 - 12 - 31), ISSN: 2095-2619, 第664-670页, 参见全文	1-5

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2019年 4月 1日

国际检索报告邮寄日期

2019年 4月 9日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局 (ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

受权官员

吴汀晨

传真号 (86-10)62019451

电话号码 86-(010)-62089319

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/096554

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 107349217 A	2017年 11月 17日	无	