



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106987604 B

(45) 授权公告日 2021.05.28

(21) 申请号	201710197156.7	C12N 15/85 (2006.01)
(22) 申请日	2017.03.29	C12N 5/10 (2006.01)
(65) 同一申请的已公布的文献号		A01K 67/027 (2006.01)
申请公布号	CN 106987604 A	C12Q 1/6888 (2018.01)
(43) 申请公布日	2017.07.28	C12N 15/11 (2006.01)
(83) 生物保藏信息		(56) 对比文件
CGMCC No.13804	2017.03.01	SG 11201604406 A1,2016.06.29
(73) 专利权人	北京希诺谷生物科技有限公司	CN 105462968 A,2016.04.06
地址	102200 北京市昌平区科技园区超前路37号院16号楼3层310、311、312	CN 106244556 A,2016.12.21
(72) 发明人	赵建平 郑敏 冯冲 李京 李茗瑜 陈奔驰	CN 106244557 A,2016.12.21
(74) 专利代理机构	北京睿阳联合知识产权代理有限公司 11758	WO 2020198509 A3,2020.11.05
代理人	张颖 王朋飞	CN 111778278 A,2020.10.16
(51) Int.Cl.		CN 108148837 A,2018.06.12
C12N 15/89 (2006.01)		US 2019032086 A1,2019.01.31
		US 10576167 B2,2020.03.03
		WO 2015088643 A1,2015.06.18
		审查员 杨兴艳
		权利要求书2页 说明书7页
		序列表3页 附图2页

(54) 发明名称
一种制备动脉粥样硬化疾病模型犬的方法

(57) 摘要
本发明涉及一种制备动脉粥样硬化疾病模型犬的方法,尤其是涉及利用基因敲除技术制备载脂蛋白E (APOE) 基因敲除疾病模型犬的方法。

1. 用于建立表现出动脉粥样硬化表型的APOE基因敲除犬模型的方法,所述方法包括如下步骤:(1)根据犬APOE基因序列,针对外显子的序列确定打靶位点序列;(2)根据步骤(1)确定的打靶位点序列合成sgRNA序列及其互补序列,然后将合成的序列与骨架载体连接构建sgRNA打靶载体;(3)将sgRNA打靶载体体外转录获得sgRNA的mRNA,以及将CRISPR/Cas9体外转录为mRNA;(4)将步骤(3)获得的sgRNA的mRNA和CRISPR/Cas9的mRNA混合后胞质内注射到犬受精卵中;以及(5)将犬受精卵移植到双侧输卵管均进行了冲胚的母犬的一侧输卵管内;

步骤(1)所述外显子为外显子3,所述外显子3的序列如SEQ ID NO:2所示;

所述步骤(1)中所述的打靶位点序列为针对外显子3确定的如下序列:5'-CCGGTGGCAGACTGGCCAGCCC-3'(SEQ ID NO:4),所述外显子3的序列如SEQ ID NO:2所示;

所述步骤(2)中合成的sgRNA序列及其互补序列为:

sgRNA序列:ataGGGCTGGCCAGTCTGCCACCgt (SEQ ID NO:5);以及

sgRNA互补序列:taaaacGGTGGCAGACTGGCCAGCC (SEQ ID NO:6);

所述步骤(5)中将犬受精卵移植到双侧输卵管均进行了冲胚的母犬出血较少的一侧输卵管内。

2. 犬APOE的基因敲除打靶载体,其特征在于所述犬APOE的基因敲除打靶载体由针对犬APOE基因的外显子中的打靶位点序列设计的sgRNA序列及其互补序列以及骨架载体构成;

所述外显子为犬APOE基因的外显子3,所述外显子3的序列如SEQ ID NO:2所示;

所述打靶位点序列为:

5'-CCGGTGGCAGACTGGCCAGCCC-3'(SEQ ID NO:4);

所述sgRNA序列及其互补序列为:

sgRNA序列:ataGGGCTGGCCAGTCTGCCACCgt (SEQ ID NO:5);和

sgRNA互补序列:taaaacGGTGGCAGACTGGCCAGCC (SEQ ID NO:6)。

3. 由权利要求1所述的方法获得的APOE基因敲除犬的体细胞、组织和器官;

所述体细胞包含cctggaccagggaggct (SEQ ID NO:7)所示的序列。

4. APOE基因敲除比格犬耳成纤维细胞BGD-APOEKO-EF0,其保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC),保藏号为CGMCC No.13804,保藏日期为2017年3月1日。

5. 用于检测包含cctggaccagggaggct (SEQ ID NO:7)所示的序列片段的基因组序列的APOE基因敲除犬的引物对,其特征在于所述引物对针对cctggaccagggaggct (SEQ ID NO:7)所示的序列进行设计;

所述引物对的序列如下:

正向引物F:5'-CATTGTTGTCAGGCAGGTAGC-3'(SEQ ID NO:8);和

反向引物R:5'-GAAGGTGCGAGGGATTGA-3'(SEQ ID NO:9)。

6. 用于检测包含cctggaccagggaggct (SEQ ID NO:7)所示的序列片段的基因组序列的APOE基因敲除犬的试剂盒,其特征在于所述试剂盒包含针对cctggaccagggaggct (SEQ ID NO:7)所示序列设计的引物对;

所述引物对的序列如下:

正向引物F:5'-CATTGTTGTCAGGCAGGTAGC-3'(SEQ ID NO:8);和

反向引物R:5'-GAAGGGTGCGAGGGATTGA-3' (SEQ ID NO:9)。

一种制备动脉粥样硬化疾病模型犬的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及利用基因敲除技术制备动脉粥样硬化疾病模型犬的方法,尤其是涉及利用基因敲除技术制备载脂蛋白E基因敲除疾病模型犬的方法。

背景技术

[0002] 动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)是由遗传、环境等多因素导致的老年多发性疾病,是冠心病、脑梗死、外周血管病等心脑血管疾病的主要原因。冠状动脉粥样硬化者若管径狭窄达75%以上,可发生心绞痛、心肌梗死、心律失常,甚至猝死;脑动脉粥样硬化可引起脑缺血、脑萎缩,或造成脑血管破裂出血。

[0003] AS病因复杂,其发病与多种致病因素有关,多发生在大中型弹性血管,肌性动脉壁内膜及内膜下,以脂质沉积、内膜增厚为特征,形成粥样病灶或纤维脂质斑块。在众多的致病因素中,脂质代谢紊乱,尤其是高胆固醇血症与其关系最为密切。载脂蛋白(apolipoprotein,Apo)E是血浆脂蛋白的重要成分,在调节血浆胆固醇水平、脂质的运输和代谢中起重要的作用,是高脂血症、AS等发生、发展的一个重要的分子靶标,尤其在AS的发生发展中起着关键性的作用。

[0004] 近年来AS有逐渐年轻化和上升趋势。因此,需要建立动脉粥样硬化动物模型,从而对其病因和治疗药物进行深入研究。虽然小鼠和大鼠是最常用的动物模型,但是鼠具有AS抗性,而且形成的病理改变虽然与人早期病变相似,不易形成类似人体的后期病变,而且小鼠取血不便。

[0005] 犬是目前基础医学研究和教学中最常用的实验动物之一,尤其在生理、药理和病理生理学等实验研究中起着重要作用。犬在遗传性疾病方面与人类也比较相似。且犬的遗传性疾病少,实验重复性好,血液循环和神经系统发达,消化系统及内脏与人相似,在毒理方面的反应与人类比较接近,尤其适合药理、循环生理、眼科、毒理、外科学等的研究,另外犬性格温顺容易调教,经短期训练能很好地配合实验,被国际医学、生物学界公认为较理想的实验用犬。

[0006] 目前常用的制备犬疾病模型的方法主要包括:饲喂法、机械损伤法及免疫学方法等。由于饲喂法、机械损伤法和免疫学法均为在健康动物基础上,采用特殊的方法诱导其出现疾病表型。但是,这些诱导型的犬动物模型存在无法出现疾病表型、表型持续时间较短或无法模拟人类疾病症状等问题。

[0007] 利用基因工程方法对非人动物进行基因敲除或转基因修饰建立疾病动物模型可以克服上述诱导型动物模型的缺点,但是这些基因敲除或者转基因修饰技术应用最成熟的实验动物是鼠,对于大型哺乳动物的基因敲除或者转基因修饰模型还处于探索阶段。即使牛、羊、猪、猴等大型哺乳动物陆续有报道基因敲除动物模型的建立,由于犬繁殖生理与其他哺乳动物有很大区别,造成对犬卵母细胞及胚胎进行体外操作难度极大,基因敲除或者转基因修饰模型犬的建立难度大为增加。因此,即便对于基因敲除或者转基因修饰疾病模型犬有着大量的需求,世界上鲜有成功建立基因敲除或者转基因修饰疾病模型犬的报道。

动脉粥样硬化病基因敲除或者转基因修饰模型犬更没有相关报道。

[0008] 因此,非常需要建立动脉粥样硬化病基因敲除或者转基因修饰模型犬,这样的基因敲除或者转基因修饰模型犬的疾病症状为原发症状,疾病表型持续时间长,且具有可遗传性,通过自然繁殖即可获得子代疾病模型犬。从而,为心血管疾病的研究和相关的药物研发提供合适的基因敲除或者转基因修饰实验动物模型。

发明内容

[0009] 本发明利用基因敲除修饰技术获得APOE基因敲除修饰犬受精卵,然后将犬受精卵移植到双侧输卵管均进行了冲胚的母犬的一侧输卵管内,制备了APOE基因敲除犬。

[0010] 第一方面,本发明提供了用于建立APOE基因敲除犬模型的方法,所述方法包括如下步骤:(1)利用基因编辑技术获得APOE基因敲除修饰犬受精卵;以及(2)将犬受精卵移植到双侧输卵管均进行了冲胚的母犬的一侧输卵管内制备了APOE基因敲除犬。

[0011] 所述步骤(1)中的基因编辑技术包括:CRISPR,TALEN和ZFN。

[0012] 第二方面,本发明提供了用于建立APOE基因敲除犬模型的方法,所述方法包括如下步骤:(1)根据犬APOE基因序列,针对外显子的序列确定打靶位点序列;(2)根据步骤(1)确定的打靶位点序列合成sgRNA序列及其互补序列,然后将合成的序列与骨架载体连接构建sgRNA打靶载体;(3)将sgRNA打靶载体体外转录获得sgRNA的mRNA,将CRISPR/Cas9体外转录为mRNA;(4)将步骤(3)获得的sgRNA的mRNA和CRISPR/Cas9的mRNA混合后胞质内注射到犬受精卵中;以及(5)将犬受精卵移植到双侧输卵管均进行了冲胚的母犬的一侧输卵管内,从而制备APOE基因敲除犬。

[0013] 优选地,针对外显子2(Exon2:SEQ ID NO:1)、外显子3(Exon3:SEQ ID NO:2)或者外显子4(Exon4:SEQ ID NO:3)的序列确定打靶位点序列。更优选地,针对外显子3(Exon3:SEQ ID NO:2)的序列确定打靶位点序列。

[0014] 优选地,所述步骤(1)中所述的打靶位点序列为:

[0015] 5'-CCGGGTGGCAGACTGGCCAGCCC-3'(SEQ ID NO:4)

[0016] 优选地,所述步骤(2)中合成的sgRNA序列及其互补序列为:

[0017] sgRNA序列:ataGGGCTGGCCAGTCTGCCACCgt(SEQ ID NO:5)

[0018] sgRNA互补序列:taaaacGGTGGCAGACTGGCCAGCC(SEQ ID NO:6)。

[0019] 优选地,所述骨架载体为购自Addgene的T7-gRNA。

[0020] 优选地,所述步骤(5)中将犬受精卵移植到双侧输卵管均进行了冲胚的母犬出血较少的一侧输卵管内。

[0021] 第三方面,在第二方面的步骤(4)中将步骤(3)获得的sgRNA的mRNA和CRISPR/Cas9的mRNA混合后胞质内注射到犬体细胞中,然后将犬体细胞核移植到犬去核卵母细胞中;以及在步骤(5)中将犬去核卵母细胞移植到双侧输卵管均进行了冲胚的母犬的一侧输卵管内,从而制备APOE基因敲除犬。

[0022] 第四方面,本发明提供了犬APOE基因打靶载体,所述犬APOE基因打靶载体由针对犬APOE基因的外显子中的打靶位点序列设计的sgRNA序列及其互补序列以及骨架载体构成。

[0023] 优选地,所述外显子为犬APOE基因的外显子2(Exon2:SEQ ID NO:1)、外显子3

(Exon3:SEQ ID NO:2) 或者外显子4 (Exon4:SEQ ID NO:3)。优选地,所述骨架载体为购自Addgene的T7-gRNA。

[0024] 优选地,所述打靶位点序列为:

[0025] 5'-CCGGGTGGCAGACTGGCCAGCCC-3' (SEQ ID NO:4)

[0026] 优选地,所述sgRNA序列及其互补序列为:

[0027] sgRNA序列:ataGGGCTGGCCAGTCTGCCACCgt (SEQ ID NO:5)

[0028] sgRNA互补序列:taaaacGGTGGCAGACTGGCCAGCC (SEQ ID NO:6)。

[0029] 第五方面,本发明提供了由第一方面至第三方面任一项的方法获得的APOE基因敲除犬的体细胞、组织和器官。

[0030] 优选地,所述体细胞包含cctggaccagggaggct (SEQ ID NO:7) 所示的序列。

[0031] 优选地,所述体细胞为APOE基因敲除比格犬耳成纤维细胞BGD-APOEKO-EF0,保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC),保藏号为CGMCC No.13804,保藏日期为2017年3月1日。

[0032] 第六方面,本发明提供了用于检测包含cctggaccagggaggct (SEQ ID NO:7) 所示的序列片段的基因组序列的APOE基因敲除犬的引物对,所述引物对针对cctggaccagggaggct (SEQ ID NO:7) 所示的序列进行设计。

[0033] 优选地,所述引物对的序列如下:

[0034] 正向引物F:5'-CATTGTTGTCAGGCAGGTAGC-3' (SEQ ID NO:8);

[0035] 反向引物R:5'-GAAGGTTGCGAGGGATTGA-3' (SEQ ID NO:9)。

[0036] 第七方面,本发明提供了用于检测包含cctggaccagggaggct (SEQ ID NO:7) 所示的序列片段的基因组序列的APOE基因敲除犬的试剂盒,所述试剂盒包含针对cctggaccagggaggct (SEQ ID NO:7) 所示序列设计的引物对。

[0037] 优选地,所述引物对的序列如下:

[0038] 正向引物F:5'-CATTGTTGTCAGGCAGGTAGC-3' (SEQ ID NO:8);

[0039] 反向引物R:5'-GAAGGTTGCGAGGGATTGA-3' (SEQ ID NO:9)。

[0040] 第八方面,本发明提供了由第一方面至第三方面任一项的方法获得的APOE基因敲除犬。

[0041] 犬APOE基因共包含4个外显子,其翻译起始位点位于第二外显子。本发明在其第三外显子处进行基因打靶,导致其基因组序列发生移码突变,在第63个氨基酸翻译终止,APOE蛋白无法完整表达,达到了基因敲除的目的。除这个位点外,在犬APOE基因的Exon2、Exon3及Exon4的三个外显子的任意序列处进行基因打靶,造成基因序列发生改变,使其氨基酸翻译提前终止,APOE蛋白无法完整表达,表达不完整的APOE蛋白无法执行原有功能,也可达到敲除犬APOE基因的目的。

[0042] 本发明利用基因编辑技术,根据犬APOE基因序列的外显子选择打靶位点序列,并且根据打靶位点序列构建了sgRNA打靶载体和CRISPR/Cas9表达载体,然后将体外转录获得的sgRNA的mRNA和CRISPR/Cas9的mRNA胞质注射到犬受精卵中,然后犬受精卵移植到双侧输卵管均进行了冲胚的母犬的一侧输卵管内,从而制备APOE基因敲除犬。这是世界上首次成功获得了APOE基因敲除犬。而且,在将受精卵移植到输卵管之前对双侧输卵管均进行了冲胚,增加了转基因受精卵的数量,相比于只对一侧输卵管进行冲胚相比,避免了不冲卵一侧

输卵管中的胚对基因敲除胚的着床的影响,因此大幅度提高了受精卵的利用效率和转基因犬的成活率。

[0043] 此外,本发明获得的APOE基因敲除犬,将为医学研究提供具有巨大应用价值的疾病动物模型,为推动心血管疾病的研究和心血管疾病药物的筛选奠定基础。

[0044] 缩略语和关键术语定义:

[0045] APOE:载脂蛋白E,是载脂蛋白的一种,主要在肝脏以及脑组织中合成,是神经系统以及血浆脂蛋白的构成成分。其通过与低密度脂蛋白受体结合摄取低密度脂蛋白,参与了血液中胆固醇和甘油三酯的代谢过程。人APOE基因位于第19对染色体长臂上,长37kb,该基因包含4个外显子和3个内含子。其cDNA长为1.63kb,基因的最初产物为含317个氨基酸的蛋白质,被一个含18个氨基酸的信号肽裂解后,变成由299个氨基酸组成的成熟蛋白。犬APOE位于犬1号染色体,基因全长2788bp,共有4个外显子,6个编码蛋白的CDS区,编码323个氨基酸。

[0046] ICI:胞质内注射,是指通过显微操作,利用显微注射针将基因注射入受精卵胞质内。

[0047] AS:动脉粥样硬化,脂质代谢障碍为动脉粥样硬化的病变基础,其特点是受累动脉病变从内膜开始,一般先有脂质和复合糖类积聚、出血及血栓形成,进而纤维组织增生及钙质沉着,并有动脉中层的逐渐蜕变和钙化,导致动脉壁增厚变硬、血管腔狭窄。病变常累及大中肌性动脉,一旦发展到足以阻塞动脉腔,则该动脉所供应的组织或器官将缺血或坏死。由于在动脉内膜积聚的脂质外观呈黄色粥样,因此称为动脉粥样硬化。

附图说明

[0048] 图1:是犬APOE基因打靶位点序列的示意图。

[0049] 图2:显示了野生型犬APOE基因Exon3序列与编号161207的APOE基因敲除犬APOE基因Exon3突变序列。

[0050] 图3:图示了APOE基因突变类型的序列比较。

[0051] 图4:图示了APOE基因编辑犬的测序峰图。

具体实施方式

[0052] 下面结合实施例及说明书附图对本发明的技术方案做进一步描述。这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限定本发明的保护范围。

[0053] 实施例1:转基因打靶载体的构建、体外转录及验证

[0054] 根据NCBI提供的犬APOE基因序列信息,基于犬APOE基因Exon3选择打靶位点序列5'-CCGGGTGGCAGACTGGCCAGCCC-3'(SEQ ID NO:4)(参见图1),识别该位点的sgRNA序列为5'-GGGCTGGCCAGTCTGCCACC-3'(SEQ ID NO:10)。构建载体时,将骨架载体T7-gRNA(购自Addgene)用BbsI进行酶切,用于后续实验;设计sgRNA序列:ataGGGCTGGCCAGTCTGCCACCgt(SEQ ID NO:5)和sgRNA互补序列:taaaacGGTGGCAGACTGGCCAGCC(SEQ ID NO:6);将sgRNA序列和sgRNA互补序列进行退火连接,之后再与酶切好的T7-gRNA质粒连接。经PCR扩增T7-sgRNA质粒并回收PCR产物,利用体外转录试剂盒对T7-sgRNA的PCR产物进行体外转录。

[0055] 首先对CRISPR/Cas9的质粒进行线性化,反应体系为:30μg质粒,5μL限制性内切酶

Afl1II;10 μ L的10 $\times$ Buffer及ddH₂O,总体积为100 μ L。然后加入100 μ L酚:仿:异戊醇(25:24:1)纯化线性化质粒DNA,12000g离心5min;吸取50 μ L上清至无Rnase的1.5ml离心管内,加入1/10体积醋酸钠和3倍体积无水乙醇沉淀质粒DNA,12000g离心5min;弃上清,尽量吸弃残留的上清,加150 μ L 70%乙醇洗涤质粒,12000g离心5min;空气中干燥3-5min,用15 μ L无RNase的ddH₂O溶解DNA,测定浓度。

[0056] 体外转录mRNA试剂盒法(Ambion):

[0057] 体外转录体系为:1 μ g线性化质粒DNA,10 μ L的2 $\times$ NTP/CAP,2 μ L的10 $\times$ Buffer,2 μ L的RNA合成酶及ddH₂O,总体积为20 μ L。混匀后37 $^{\circ}$ C孵育1hr;加入1 μ L TURBO DNA酶,消化质粒模板,37 $^{\circ}$ C孵育30min。然后将20 μ L体外转录产物,20 μ L的10 $\times$ Reaction Buffer,10 μ L的ATP(10mM),2.5 μ L的RNA酶抑制剂,2 μ L的Poly(A)聚合酶及无核酸酶ddH₂O混合,配制总体积为100 μ L的体外转录mRNA加polyA体系,37 $^{\circ}$ C孵育1hr。孵育后,向反应体系中加入350 μ L结合缓冲液,吹吸混匀;然后加入250 μ L无水乙醇,混合均匀;再将样品转移到mRNA纯化柱中,10000g室温离心1min;弃掉滤液,重新装好柱子,500 μ L洗脱液漂洗柱子,10000g室温离心1min;重复漂洗一次,弃掉滤液,空柱离心1min将蛋白质等杂质洗脱掉;然后将柱子放入一个新的离心管中,加入50 μ L RNA洗脱液到柱子中央位置,盖好盖子65 $^{\circ}$ C孵育10min,10000g室温离心1min;检测RNA质量及浓度。

[0058] 将CRISPR的sgRNA及Cas9的mRNA进行混合,使sgRNA的终浓度为20ng/ μ L、Cas9的终浓度为200ng/ μ L,置于-80 $^{\circ}$ C保存,用于胞质注射。

[0059] 将构建完成的sgRNA与Cas9质粒共转至犬皮肤成纤维细胞,然后采用G418进行筛选。将筛选获得的细胞克隆提取DNA作为模板,并采用如下的引物对进行PCR,扩增sgRNA识别切割靶点上下游共计660bp的DNA片段:

[0060] 正向引物F:5'-CATTGTTGTCAGGCAGGTAGC-3'(SEQ ID NO:8);

[0061] 反向引物R:5'-GAAGGGTGCGAGGGATTGA-3'(SEQ ID NO:9)。

[0062] 将PCR扩增得到的目的片段进行DNA测序,判断载体的打靶效率。经过转染及筛选,共获得细胞克隆30个,PCR测序结果显示,其中26个细胞克隆在打靶位点区域发生了基因突变,突变效率为86.7%,证明载体构建准确打靶效率较高,可用于APOE基因敲除犬的制备。

[0063] 实施例2:APOE基因敲除犬胚胎移植

[0064] 共计13只自然发情的比格母犬,作为受精卵供体同时作为胚胎移植受体进行实验。对所有母犬采集血液检测血清中孕酮浓度,当孕酮浓度达到4-7ng/mL时可以确定为排卵期,排卵后48h进行自然交配,然后冲取受精胚胎,13只母犬累计获得受精卵65枚。收集受精卵后,采用含有0.1%透明质酸酶的TCM199培养基脱去卵丘颗粒细胞,然后放入HEPES缓冲的TCM199培养基(HM,GIBCO11150)微滴中,再放到装有显微操作仪的倒置显微镜上。利用显微注射针吸取含有以体积计1:1的实施例1制备的sgRNA的mRNA和Cas9的mRNA的混合液,然后注射到受精卵的胞质中。用10mL含有10%胎牛血清的HEPES缓冲的TCM199培养基(HM,GIBCO11150)冲洗输卵管,冲卵液由输卵管伞部结扎的注射针处流出并收集到10mL离心管中。

[0065] 胞质注射完成后,将胚胎装入胚胎移植管中,将胚胎移植管中的胚胎从伞部注射到冲胚时出血较少一侧的输卵管内。

[0066] 表1:胚胎移植结果

	受体犬编号	移植受精卵数	产仔数	基因敲除犬数
[0067]	FRA1115	8	0	0
	FRA1121	4	0	0
	FRA1126	5	0	0
	FRA1118	1	0	0
	FRA1124	5	4	1
	FRA1123	6	1	0
	FRA1129	7	1	0
	FRA1024	8	0	0
	FRA1130	6	2	0
	FRA1139	2	1	0
	FRA1137	2	6	1
[0068]	FRA1140	8	0	0
	FRA1146	3	1	0
	合计	65	13	2

[0069] 从上表1可以看出,13只比格母犬,移植受精卵65枚,共产仔13只,获得的基因敲除犬为2只,检测和验证试验参见以下的实施例。

[0070] 实施例3:APOE基因敲除犬基因突变检测

[0071] 幼犬出生后,采集耳组织及尾组织用于鉴定。组织块在离心管内剪碎后,再加入蛋白酶K水浴56℃裂解1~3h。然后用移液枪吸取Genomic Lysis Buffer 700μL,加入裂解体系,上下颠倒混合均匀,10000g,离心1min。用移液器吸取上清液至纯化柱,10000g,室温静置1min,离心1min。换取新的收集管,向离心柱内加入200μL的DNA Pre-Wash Buffer,10000g,室温静置1min,离心1min,弃废液。向离心柱中加入400μL的g-DNA Wash Buffer,10000g,室温静置1min,离心1min,弃废液。将纯化柱和收集管重新离心,10000g,离心2min。将纯化柱更换至新的1.5mL离心管内,加入50μL的Elution Buffer洗脱DNA,室温放置2min。12000rpm,离心1min,得到的溶液为犬基因组DNA。

[0072] 以犬基因组DNA作为模板进行PCR,引物为:

[0073] 正向引物F:5'-CATTGTTGTCAGGCAGGTAGC-3' (SEQ ID NO:8);

[0074] 反向引物R:5'-GAAGGGTGCGAGGGATTGA-3' (SEQ ID NO:9),

[0075] 扩增sgRNA识别切割靶点上下游共计660bp的DNA片段。将PCR扩增得到的目的片段进行DNA测序,与NCBI数据库提供的犬APOE基因序列进行比对,判断APOE基因的突变类型。

[0076] 经过测序及序列信息比对,13只幼犬中有1公1母2只犬在APOE基因Exon3靶位点除发生突变,其中1只公犬(编号161207)的突变类型为删除34bp同时插入17bp,为APOE基因纯合双敲除,导致APOE蛋白自第37个氨基酸开始突变,至第63个氨基酸翻译终止;另外1只母犬(编号170111)为一侧删除33bp,另一侧删除51bp的杂合突变。图2显示了野生型犬APOE基

因Exon3序列 (SEQ ID NO:2) 与编号161207的APOE基因敲除犬APOE基因Exon3突变序列 (SEQ ID NO:11), 可以看出删除34bp同时插入17bp, APOE基因敲除犬APOE基因Exon3突变序列加粗部分表示增加的17bp。具体而言, 相应位点突变前的序列为tggagccagaggccgggtggcagactggccagcc (SEQ ID NO:12), 突变后的序列为cctggaccagggaggct (SEQ ID NO:7)。

[0077] 图3显示了野生型犬APOE基因Exon3第641位核苷酸至第720位核苷酸序列与相应的编号161207的APOE基因敲除犬耳组织和尾部组织APOE基因Exon3的对应序列, 以及编号170111的APOE基因敲除犬耳组织和尾部组织APOE基因Exon3的对应序列的对比 (框内为靶向序列; 数字编号后缀字母E为耳组织, W为尾部组织; 数字A和B表示编号为170111敲除狗发生APOE杂合敲除等位基因编号)。

[0078] 编号161207的APOE基因敲除比格公犬的耳成纤维细胞BGD-APOEKO-EF0, 保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC), 保藏号为CGMCC No.13804, 保藏日期为2017年3月1日。

[0079] 图4显示了APOE基因编辑犬的测序峰图。图中数字为犬编号, 字母E为耳组织, 字母W为尾组织; 161206E/W分别为野生型犬耳组织及尾组织, 图中框标注的是野生型基因靶位点区域 (参见图4A和4B); 161207E/W分别为APOE基因突变公犬耳组织及尾组织, 图中框标注的是突变序列信息 (参见图4C和4D); 170111E/W分别为APOE基因突变母犬耳组织及尾组织, A、B为杂合突变等位基因编号, 箭头指示部分为突变区域 (参见图4E-4H)。

[0080] 实施例4: APOE基因敲除犬的血脂检测

[0081] APOE基因敲除犬 (161207) 3月龄时, 采集血液离心分离血清, 对其血液中总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白及低密度脂蛋白含量进行检测。结果显示, 与阴性犬 (161205和161206) 相比APOE基因敲除犬的血清中总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白及低密度脂蛋白的含量均明显高于对照组 (参见下表2)。可以看出, 敲除APOE基因造成基因敲除犬脂类代谢出现障碍, 导致血脂含量的显著升高, 从而进一步验证了本发明获得了APOE基因敲除犬。

[0082] 表2: APOE基因敲除犬血脂检测结果

检查项目	犬编号		
	161207 (APOE ^{-/-})	161205(WT)	161206(WT)
总胆固醇(mmol/L)	22.92	7.225	8.25
甘油三酯(mmol/L)	2.25	1.505	0.86
高密度脂蛋白(mmol/L)	8.80	5.535	6.08
低密度脂蛋白(mmol/L)	13.10	1.15	1.78

[0001]	SEQUENCE LISTING
[0002]	<110> 北京希诺谷生物科技有限公司
[0003]	<120> 一种制备动脉粥样硬化疾病模型犬的方法
[0004]	<130> PN2178XN66CN
[0005]	<160> 12
[0006]	<170> PatentIn version 3.5
[0007]	<210> 1
[0008]	<211> 43
[0009]	<212> DNA
[0010]	<213> Canis lupus
[0011]	<400> 1
[0012]	atgaaggttc tgtgggctgc gctggtggtc acgctcctgg cag 43
[0013]	<210> 2
[0014]	<211> 211
[0015]	<212> DNA
[0016]	<213> Canis lupus
[0017]	<400> 2
[0018]	gatgctgggc cgatgtgcag ccggagccgg agctggagcg cgagctggag ccgaaggtcc 60
[0019]	agcaggagct ggagccagag gccgggtggc agactggcca gccctgggag gcggcgctgg 120
[0020]	cccgtttctg ggattacctg cgctgggtgc agacgctgtc tgaccaggtg caagagggcg 180
[0021]	tgctcaacac ccaggtcacc caggaactga c 211
[0022]	<210> 3
[0023]	<211> 718
[0024]	<212> DNA
[0025]	<213> Canis lupus
[0026]	<400> 3
[0027]	ggcgctgatg gatgagacca tgaaggaggt gaaggcctac aaggcggagc tggacgagca 60
[0028]	gctgggcccc atgacctcg agacgcaggc ccgcgtggcc aaggagctgc aggcggcgca 120
[0029]	ggccccgctg cgctcggaca tggaggacgt gcgcaaccgc ctgacgcagt accgcggcga 180
[0030]	gctgcaggcc atgctgggcc agagcagcga ggagctgcgg gcgcgcttcg cctcccacat 240
[0031]	gcgcaagctg cgcaagcggg tgctgcggga cgccgaggac ctgcagaggc gcctggccgt 300
[0032]	ctacaaggcc ggcgtgcgcg aggggtgccga gcgcagcgtg agcagcatcc gcgagcgct 360
[0033]	ctggccgctg ctggagcagg cccgcgagcg caacgccaaag gtgggcgccc tggccacgca 420
[0034]	gccgtgtctc gagegggcgg acgccctggg ccagcagctg cgcgggcagc tggaggagat 480
[0035]	gagcagccgg gcccgcggcc acctggagga gatgcgcgag cagatacagg aggtgcgggt 540
[0036]	gaagatggag gagcaggccg accagatacg ccaaaaggcc gaggccttcc aggcgcgcct 600
[0037]	caagagctgg ttcgagcccc tgctggaaga catgcagcgc cagtgggacg ggctggtgga 660
[0038]	gaaggtgcag gcggccgtgg ccaccatccc cacctctaag cctgtggagg aacctatga 718

[0039]	<210> 4
[0040]	<211> 23
[0041]	<212> DNA
[0042]	<213> Canis lupus
[0043]	<400> 4
[0044]	ccgggtggca gactggccag ccc 23
[0045]	<210> 5
[0046]	<211> 25
[0047]	<212> DNA
[0048]	<213> 人工序列
[0049]	<400> 5
[0050]	atagggtgg ccagtctgcc accgt 25
[0051]	<210> 6
[0052]	<211> 25
[0053]	<212> DNA
[0054]	<213> 人工序列
[0055]	<400> 6
[0056]	taaaacggtg gcagactggc cagcc 25
[0057]	<210> 7
[0058]	<211> 17
[0059]	<212> DNA
[0060]	<213> Unknown
[0061]	<220>
[0062]	<223> Unknown
[0063]	<400> 7
[0064]	cctggaccag ggaggct 17
[0065]	<210> 8
[0066]	<211> 21
[0067]	<212> DNA
[0068]	<213> Artificial sequence
[0069]	<220>
[0070]	<223> Aritificial sequence
[0071]	<400> 8
[0072]	cattgttgte aggcaggtag c 21
[0073]	<210> 9
[0074]	<211> 19
[0075]	<212> DNA
[0076]	<213> Artificial sequence
[0077]	<220>

[0078]	<223> Aritificial sequence
[0079]	<400> 9
[0080]	gaagggtgcg agggattga 19
[0081]	<210> 10
[0082]	<211> 20
[0083]	<212> DNA
[0084]	<213> Unknown
[0085]	<220>
[0086]	<223> Unknown
[0087]	<400> 10
[0088]	gggctggcca gtctgccacc 20
[0089]	<210> 11
[0090]	<211> 194
[0091]	<212> DNA
[0092]	<213> Unknown
[0093]	<220>
[0094]	<223> Unknown
[0095]	<400> 11
[0096]	gatgctgggc cgatgtgcag ccggagccgg agctggagcg cgagctggag ccgaaggtcc 60
[0097]	agcaggagcc ctggaccagg gaggctctgg gaggcggcgc tggcccgtt ctgggattac 120
[0098]	ctgcgctggg tgcagacgct gtctgaccag gtgcaagagg gcgtgctcaa caccaggtc 180
[0099]	accaggaac tgac 194
[0100]	<210> 12
[0101]	<211> 17
[0102]	<212> DNA
[0103]	<213> Unknown
[0104]	<220>
[0105]	<223> Unknown
[0106]	<400> 12
[0107]	cctggaccag ggaggct 17

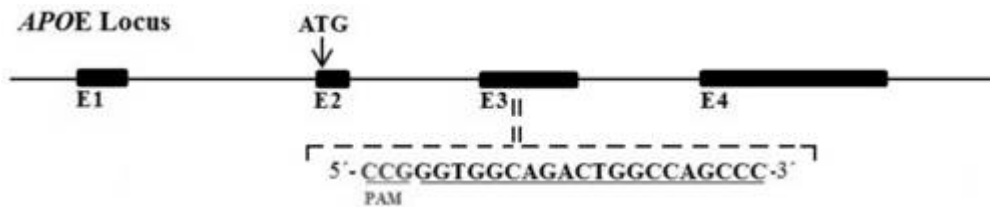


图1

野生型犬 APOE 基因 Exon3 序列:

gatgctgggcccgatgtgcagccggagccggagctggagcgcgagctggagccgaaggtccagcaggagctgg
agccagaggccgggtggcagactggccagccctgggagcgcgctggcccgttctgggattacctgcgctgg
gtgcagacgctgtctgaccaggtgcaagagggcgtgctcaacaccaggtcaccaggaactgac (SEQ ID
NO:2)

APOE 基因敲除犬 APOE 基因 Exon3 突变序列:

gatgctgggcccgatgtgcagccggagccggagctggagcgcgagctggagccgaaggtccagcaggagccct
ggaccagggaggctctgggagggcgcgctggcccgttctgggattacctgcgctgggtgcagacgctgtctga
ccaggtgcaagagggcgtgctcaacaccaggtcaccaggaactgac (SEQ ID NO: 11)

突变前序列:

tggagccagaggccgggtggcagactggccagcc (SEQ ID NO:12)

突变后序列:

cctggaccagggaggct (SEQ ID NO: 7)

图2

	650	660	670	680	690	700	710	720	
Wild type.seq	TGGAGCGCGAGCTGGAGCCGAAGGTCAGCAGGAGCTGGAGCCAGAGG	CCGGGTGGCAGACTGGCCAGCCC	TTGGAGGGCG	313					
161207E.seq	TGGAGCGCGAGCTGGAGCCGAAGGTCAGCAGGAGCC	-----CTGGAC--CAGGGAGGC	---TC	TTGGAGGGCG	294				
161207W.seq	TGGAGCGCGAGCTGGAGCCGAAGGTCAGCAGGAGCC	-----CTGGAC--CAGGGAGGC	---TC	TTGGAGGGCG	295				
170111E-A.seq	TGGAGCGCGAGCTGGAGCCGAAGGTCAGCAGGAGCC	-----C	---TTGGAGGGCG	330					
170111E-B.seq	TGGAGCGCGAGCTGGAGCCGAAGG	-----	---AGGCG	330					
170111W-A.seq	TGGAGCGCGAGCTGGAGCCGAAGGTCAGCAGGAGCC	-----C	---TTGGAGGGCG	330					
170111W-B.seq	TGGAGCGCGAGCTGGAGCCGAAGG	-----	---AGGCG	330					

图3

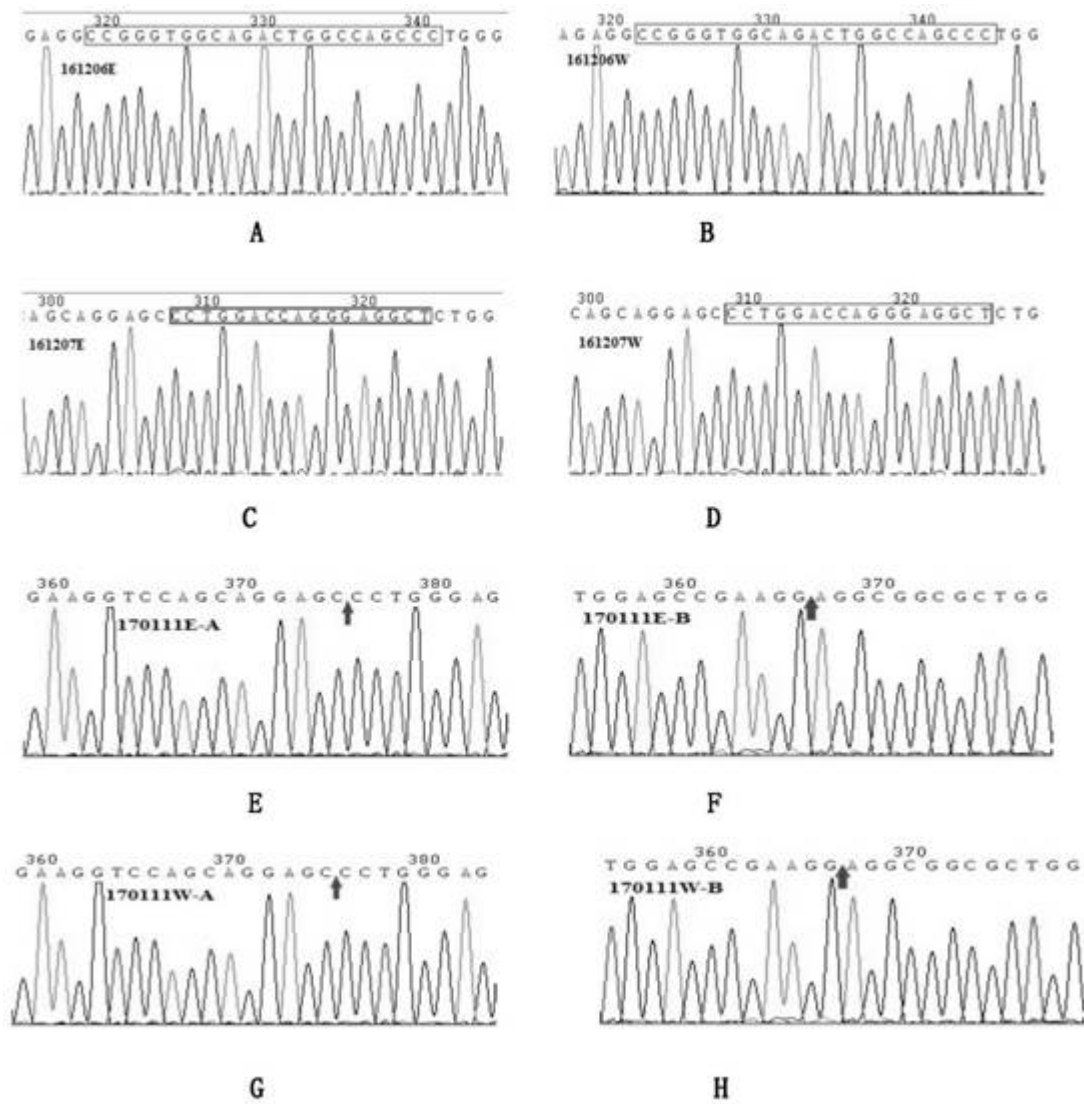


图4