(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
2017 年 1 月 5 日 (05.01.2017)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2017/000302 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 15/85 (2006.01) *C12N 5/0735* (2010.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2015/083165

(22) 国际申请日: 2015 年 7 月 2 日 (02.07.2015)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: **中国科学院上海生命科学研究院 (SHANGHAI INSTITUTES FOR BIOLOGICAL SCIENCES, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES)** [CN/CN]; 中国上海市上海市岳阳路 319 号, Shanghai 200031 (CN)。

(72) 发明人: **李劲松 (LI, Jinsong)**; 中国上海市上海市岳阳路 320 号, Shanghai 200031 (CN)。 **吴宇轩 (WU, Yuxuan)**; 中国上海市上海市岳阳路 320 号, Shanghai 200031 (CN)。 **钟翠青 (ZHONG, Cuiqing)**; 中国上海市上海市岳阳路 320 号, Shanghai 200031 (CN)。 **尹奇 (YIN, Qi)**; 中国上海市上海市岳阳路 320 号, Shanghai 200031 (CN)。 **谢振飞 (XIE, Zhenfei)**; 中国上海市上海市岳阳路 320 号, Shanghai 200031 (CN)。 **白梅竹 (BAI, Meizhu)**; 中国上海市上海市岳阳路 320 号, Shanghai (CN)。

(74) 代理人: **上海光华专利事务所 (J.Z.M.C.PATENT AND TRADEMARK LAW OFFICE)**; 中国上海市杨浦区国定路 335 号 5022 室余明伟, Shanghai 200092 (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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, 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))。

(54) Title: ANDROGENETIC HAPLOID EMBRYONIC STEM CELL, AND PREPARATION METHOD AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种孤雄单倍体胚胎干细胞及其制备与应用

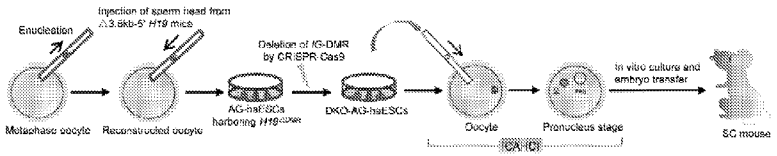


图 1A

(57) Abstract: An androgenetic haploid embryonic stem cell in which H19 DMR and IG-DMR thereof have been knocked out, method of preparing the androgenetic haploid embryonic stem cell, and use of the androgenetic haploid embryonic stem cell in constructing a genetically modified semi-cloned animal and a library of a genetically modified semi-cloned animal. The androgenetic haploid embryonic stem cell can obtain characteristics resembling a round spermatid, and on injection into an egg a viable SC mouse can be stably obtained. The invention can be effectively used in multi-gene genetic manipulation, advancing the acquisition of animals with multiple genetic modifications.

(57) 摘要: 一种孤雄单倍体胚胎干细胞，所述孤雄单倍体胚胎干细胞的 H19 DMR 及 IG-DMR 被敲除。所述孤雄单倍体胚胎干细胞的制备方法，以及所述孤雄单倍体胚胎干细胞在构建基因改造半克隆动物及基因改造半克隆动物文库中的用途。所述孤雄单倍体胚胎干细胞能够获得球形精子类似的特性，注射到卵子中能稳定地获得存活的 SC 小鼠，且能有效地用于多基因遗传操作，进一步得到携带多基因遗传修饰的动物。

WO 2017/000302 A1

一种孤雄单倍体胚胎干细胞及其制备与应用

技术领域

本发明涉及生物技术，特别是涉及一种孤雄单倍体胚胎干细胞及其制备与应用。

背景技术

全基因组水平的隐性基因筛选是鉴定基因在特定生物学过程所起功能的一种极其有效和强大的方法。这种策略已经成功地在低等生物比如酿酒酵母、线虫得以运用。在哺乳动物中，由于基因组的二倍体性，这种功能筛选显得异常的困难（Shi, L., Yang, H., and Li, J. (2012). Haploid embryonic stem cells: an ideal tool for mammalian genetic analyses. Protein & cell 3, 806-810）。通过靶向 mRNA 水平的 RNA 干扰（RNAi）手段目前已经成为哺乳类细胞全基因组范围内进行基因功能丧失筛选的最佳方案。然而，这种方法常常无法有效抑制基因的表达，同时还存在着脱靶效应（Kaelin, W.G., Jr. (2012). Molecular biology. Use and abuse of RNAi to study mammalian gene function. Science 337,421 -422）。最近，来源于细菌的 CRISPR-Cas9 系统已经成功运用于小鼠和人细胞水平的基因功能缺失的筛选中。然而，CRISPR-Cas9 介导的全基因组水平筛选仅使用于细胞水平，而将研究只局限于细胞水平的表型分析。为此，就如同目前在低等生物如酵母线虫所做的那样，如何在哺乳动物系统中实现对范围更广的生物学过程进行高效、大规模、功能缺失的筛选途径。

哺乳动物单倍体胚胎干细胞（haESCs）的获得（Elling, U., Taubenschmid, J., Wirnsberger, G., O'Malley, R., Demers, S.P., Vanhaelen, Q., Shukalyuk, A.I., Schmauss, G., Schramek, D., Schnuetgen, F., et al. (2011). Forward and reverse genetics through derivation of haploid mouse embryonic stem cells. Cell Stem Cell 9, 563-574; Leeb, M., and Wutz, A. (2011). Derivation of haploid embryonic stem cells from mouse embryos. Nature 479, 131 -134），为遗传学分析提供了一种很理想的工具。孤雄单倍体胚胎干细胞（AG-haESCs）的整个基因组是来源于精子，其能够通过注射到成熟的 MII 卵子（intracytoplasmic AG-haESCs injection, ICAHCI）的方式实现重构胚胎的全程发育，进而获得存活的动物个体，我们将其称为半克隆动物。我们推断，如果孤雄单倍体胚胎干细胞能够通过 ICAHCI 高效稳定地产生半克隆小鼠的话，那么其作为受精的媒介携带基因组水平的 CRISPR-Cas9 敲除文库，就能筛选出参与特定发育过程的重要基因。

然而，之前的研究显示出生存活的半克隆小鼠效率非常低（半克隆小鼠的出生效率为 4.5%，半克隆大鼠的为 1%），同时有大约 50%的半克隆小鼠呈现出发育阻滞的表型，并且出生后不久就死去。更者，随着 AG-haESCs 长期的培养，半克隆小鼠的整体出生率出现急速下降，特别是进行基因操作所导致的额外培养过程。

其中一个可能的原因是印记基因的异常表达。这些以双亲来源特异表达方式的印记基因，被认为单亲胚胎发育的一个重要障碍，因此胚胎的正常生长和发育同时需要母本和父本的基因组。目前，大约有 150 个小鼠印记基因已经被鉴定出来。大部分都位于一个很大的基因簇中，并且通过差异性甲基化区域（DMR）进行调控（Bartolomei, M.S. (2009). Genomic imprinting: employing and avoiding epigenetic processes. Genes & development 23, 2124-2133）。和这一假说

一致，有研究表明，父源表达抑制的印记基因 *H19*，其所在差异性甲基化区域（DMR）在孤雄单倍体胚胎干细胞和生长阻滞的半克隆小鼠中均一致地发生了印记的异常擦除（Yang, H., Shi, L., Wang, B.A., Liang, D., Zhong, C., Liu, W., Nie, Y., Liu, J., Zhao, J., Gao, X. , et al. (2012). Generation of genetically modified mice by oocyte injection of androgenetic haploid embryonic stem cells. Cell 149, 605-617）。母源表达的 *H19* 基因与父源表达的 *Igf2* 相邻，它们被同一个 DMR 调控着，这个 DMR 在父本等位基因中发生 DNA 甲基化，并且作为 CTCF 依赖的绝缘子只允许母源等位基因进行表达。这一 DMR 的甲基化状态决定着 *H19*（*H19* 表达，DMR 去甲基化，绝缘子活化）和 *Igf2*（*Igf2* 表达，DMR 甲基化，绝缘子失活）是否表达。有趣的是，*H19* 基因或者其 DMR 的敲除对于小鼠来说并没有任何严重的表型（Leighton, P.A., Ingram, R.S., Eggenschwiler, J., Efstratiadis, A., and Tilghman, S.M. (1995). Disruption of imprinting caused by deletion of the H19 gene region in mice. Nature 375, 34-39； Thorvaldsen, J.L., Mann, M.R., Nwoko, O., Duran, K.L., and Bartolomei, M.S. (2002). Analysis of sequence upstream of the endogenous H19 gene reveals elements both essential and dispensable for imprinting. Molecular and cellular biology 22, 2450-2462）。目前，有关于采用完全成熟的卵子和基因改造的未成熟卵子获得的重构胚的相关研究（Kono, T., Obata, Y., Wu, Q., Niwa, K., Ono, Y., Yamamoto, Y., Park, E.S., Seo, J.S., and Ogawa, H. (2004). Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood. Nature 428, 860-864；Kawahara, M., Wu, Q., Takahashi, N., Morita, S., Yamada, K., Ito, M., Ferguson-Smith, A.C., and Kono, T. (2007). High-frequency generation of viable mice from engineered bi-maternal embryos. Nature biotechnology 25, 1045-1050）。然而未成熟的卵子由于不能在体外培养扩增，因此导致其无法在体外完成基因改造，并且由于完全成熟的卵子和基因改造的未成熟卵子获得重构胚的技术操作难度高，所以应用价值不大。

发明内容

鉴于现有技术半克隆动物出生率低下的缺点，本发明的目的在于提供一种可提高半克隆动物出生率的孤雄单倍体胚胎干细胞及其应用。

导致出生率极有可能的原因是孤雄单倍体本身的印记状态出现了异常。通过实验，惊讶的发现，将 *H19-Igf2* 和 *Dlk1-Dio3* 两个印记簇的差异性甲基化区域（DMR）敲除可以重新建立起孤雄单倍体胚胎干细胞球形精子相类似的特性。将这种两个 DMR 敲除的孤雄单倍体胚胎干细胞命名为 DKO-AG-haESCs。这种 DKO-AG-haESCs 能够高效地获得半克隆小鼠（大约有 20%的 SC 小鼠出生率），并且通过在体外对孤雄单倍体胚胎干细胞进行基因操作后仍能够稳定地产生多基因修饰的半克隆动物。更让人兴奋的是，这种 DKO-AG-haESCs 只需要在体外细胞水平上转染稳定表达的 sgRNA 文库和 Cas9 就能够有效地一步法获得大量的突变动物。这些实验结果表明 DKO-AG-haESCs 可以作为一个中间体通过携带 sgRNA 文库的方式在个体水平上实现基因的突变，因此可进一步运用到动物个体水平上基于基因突变的大规模筛选上。

本发明第一方面提供了一种孤雄单倍体胚胎干细胞，所述孤雄单倍体胚胎干细胞的 H19 DMR 及 IG-DMR 基因被敲除。

本发明第二方面提供了所述孤雄单倍体胚胎干细胞的制备方法，包括将孤雄单倍体胚胎干细胞的 H19 DMR 及 IG-DMR 敲除获得所述孤雄单倍体胚胎干细胞。

本发明第三方面提供了所述孤雄单倍体胚胎干细胞的用途，为用于构建基因改造的半克

隆动物。

本发明第四方面提供了一种构建基因改造半克隆动物的方法，将 H19 DMR 及 IG-DMR 双敲除孤雄单倍体胚胎干细胞与卵细胞结合获得半克隆胚胎，培育所述半克隆胚胎获得半克隆动物。

本发明第五方面提供了一种基因改造动物，由前述方法构建获得，或者为前述方法构建的半克隆动物的有性繁殖后代。

本发明第六方面提供了一种本发明的孤雄单倍体胚胎干细胞及 sgRNA 慢病毒文库构建基因改造半克隆动物文库的方法。

本发明第七方面提供了一种基因改造半克隆动物文库，为采用前述方法构建获得。

本发明的有益效果：

（1）、现有的研究表明：从单倍体囊胚建立的 AG-haESCs 能够通过 ICAHCI 技术获得半克隆动物。然而 AG-haESCs 经过长期的培养传代特别是体外基因操作之后无法产生存活的 SC 动物，可能的原因是是由于雄性印记的丢失。本发明发现通过敲除 *H19* 和 *IG*-DMR 的敲除 AG-haESCs 能够获得球形精子类似的特性。AG-haESCs 注射到卵子中能够以约 20%的效率稳定地获得存活的 SC 小鼠，是早期代数 WT AG-haESCs 效率的约 10 倍高（Yang et al., 2012）。重要的是，本发明还发现 DKO-AG-haESCs 能有效地用于多基因遗传操作，进一步通过 ICAHCI 得到携带多基因遗传修饰的 SC 小鼠。更者，结合 sgRNA 文库，DKO-AG-haESCs 能高效地用于一步产生杂合和纯合的突变小鼠，为在动物个体水平上实现基于基因敲除的筛选提供进一步的证据。

（2）、DKO-AG-haESCs 相比目前已有的获得基因修饰动物的方法有几方面的优势。首先，目前的研究报道了直接注射 Cas9 mRNA 和 sgRNA 到受精卵一步法获得转基因或内源基因突变的小鼠。这一方法展示了 CRISPR-Cas9 技术在制备基因修饰动物上强大的潜力。然而，目前观察到的基因操作动物存在极高比率的嵌合现象，这大大地增加了 F1 代动物表型分析的难度。相比，DKO-AG-haESCs 介导的基因编辑技术提供了一套独特的系统，基因修饰的 DKO-AG-haESCs 可能得到很好的分析和筛选，以确保产生的 SC 动物能够出现预期的遗传学形状，这样就能大大避免嵌合现象的发生。第二，用传统的二倍体胚胎干细胞注射到囊胚中获得基因修饰的小鼠需要通过嵌合小鼠的生殖系传递。然而，生殖系传递这一步往往非常耗时。更严重的是，针对多基因修饰的二倍体胚胎干细胞，在生殖系传递的过程中会出现后代发生性状分离的现象，只有一小部分的后代可能囊括了所有想要的基因修饰。而 DKO-AG-haESCs 能够实现完全一步获得多基因修饰的 F0 小鼠。第三，通过将二倍体胚胎干细胞注射到四倍体囊胚（也称四倍体补偿技术）的方法能够一步得到全部 ESC 来源的小鼠。这一方法也被广泛使用，是检验重编程细胞例如诱导多能性胚胎干细胞（iPSCs）和核移植胚胎干细胞（ntESCs）多能性的最严格标准。然而，胚胎干细胞或诱导多能胚胎干细胞来源的动物出生效率非常低，可能是由于二倍体胚胎干细胞表观遗传的不稳定性。而 DKO-AG-haESCs 经过长期的体外培养特别是遗传操作后仍能稳定高效地获得。第四，ICAHCI 技术和 ROSI 相似，ROSI 这一项技术已经在不同的哺乳动物中很成熟，包括非人灵长类和人。目前食蟹猴来源的单倍体胚胎干细胞系已经成功建立，ICAHCI 技术或许在不久的将来可以用于高效快速地获得基因修饰的非人灵长类动物。最后，DKO-AG-haESCs 可以通过 sgRNA

文库获得大量基因突变的动物。很显然，针对大规模获得突变动物，这种方法相比直接往胚胎里注射质粒或 mRNA 的方法更加简单省力，因为携带持续表达 Cas9 和 sgRNA 文库的 DKO-AG-haESCs 系可以反复作为注射的供体，以持续高效地产生不同的基因突变动物。这些不同的突变动物可以简单快速地通过一份通用引物 PCR 鉴定 sgRNA 的插入（就像是突变动物的条形码）。相反，通过直接往胚胎注射质粒或 mRNA 的方法需要将每次独立注射的 sgRNA 单独分开准备。获得的突变动物需要分开养殖，后续的鉴定需要针对特定的基因使用相应的引物。可以设想，针对适当的 sgRNA 文库，例如通过细胞水平高通量分析所得到的一些差异表达基因，可以做成一个 sgRNA 的亚文库，或许这些基因将参与到发育过程的某个特定阶段。利用 DKO-AG-haESCs 这一方案，可以快速有效地在个体水平上筛选出与这发育过程相关的重要基因。

（3）、DKO-AG-haESCs 介导 SC 动物的获得，是产生携带有基因家族里多基因突变或多个基因敲入等基因修饰动物模型的一种有效而简单的方法。更者，结合 sgRNA 文库，DKO-AG-haESCs 能够一步获得大规模的基因突变动物。虽然 DKO-AG-haESCs 能如此高效获得 SC 动物存在的机制仍让人好奇，但是这种方法或许能够促进我们对发育学过程和复杂疾病进行更深入的探究。

附图说明

图1A 携带 2 个 DMR 敲除的 AG-haESCs 卵胞浆内注射（ICAHCI）获得 SC 小鼠的示意图。

图1B *H19*$^{\Delta DMR}$ 精子注射到去核 MII 卵获得孤雄单倍体胚胎。

图1C 孤雄单倍体囊胚建立的其中一株孤雄单倍体胚胎干细胞。

图1D 经过多次流式富集单倍体后建立的 *H19*$^{\Delta DMR}$ 孤雄单倍体胚胎干细胞（*H19*$^{\Delta DMR}$-AGH-1）

图1E *H19*$^{\Delta DMR}$-AGH-1（p8）通过 ICAHCI 获得 SC 小鼠。

图1F 敲除 *IG*-DMR 的 sgRNA 序列示意图

图1G 获得 *H19*$^{\Delta DMR}$-*IG*$^{\Delta DMR}$-AGH-1 细胞系。左侧：收集 mCherry 阳性的细胞铺至培养板中。右侧：建立好的 *H19*$^{\Delta DMR}$-*IG*$^{\Delta DMR}$-AGH 细胞系（*H19*$^{\Delta DMR}$-*IG*$^{\Delta DMR}$-AGH-4）

图1H *H19*$^{\Delta DMR}$-*IG*$^{\Delta DMR}$-AGH-4（p29）通过 ICAHCI 获得 SC 小鼠。

图S1A *H19*$^{\Delta DMR}$-AGH 细胞系的基因型鉴定。

图S1B *H19*$^{\Delta DMR}$-AGH 细胞重构的胚胎有 80%以上能达到 2-细胞，和球形精子注射（ROSI）的发育效率相似。

图S1C *H19*$^{\Delta DMR}$-AGH-1、2、3 细胞系通过 ICAHCI 获得 SC 小鼠。星号代表出生阻滞的 SC 小鼠。

图S1D 对 *H19*$^{\Delta DMR}$-AGH 细胞来源的 SC 小鼠进行基因型鉴定。

图S1E *H19*$^{\Delta DMR}$-AGH 细胞来源的正常和阻滞型 SC 小鼠对其不同的器官进行印记基因（*Gtl2* 和 *Dlk1*）的表达分析。

图S1F 在生长阻滞型 SC 小鼠中，*IG*-DMR 的印记甲基化出现严重的擦除。

图S1G 生长阻滞和正常的 SC 小鼠 *IG*-DMR 的 *Cobra* 分析。

图S1H *H19*$^{\Delta DMR}$-AGH 细胞系的 *IG*-DMR 甲基化状态。

图2A *IG*$^{\Delta DMR}$-AGH-1 细胞系（p17）获得的半克隆小鼠，星号代表生长阻滞型小鼠，出生后不久会死。

图2B *IG*$^{\Delta DMR}$-AGH-1 细胞系获得的正常 SC 小鼠和异常 SC 小鼠的 *H19* DMR 甲基化状态。

图2C *H19* DMR 敲除的 sgRNAs 设计示意图。

图2D 所获得的 *H19*$^{\Delta DMR}$-*IG*$^{\Delta DMR}$-AGH-OG3 细胞系基因型鉴定，这些细胞系是在 AGH-OG3 细胞系上敲除 *H19* 和 *IG*- DMRs 所获得。

图2E DKO-AG-haESCs 获得的 SC 小鼠交配后所产生后代的基因型鉴定，只要携带 *IG*- DMR 的后代在出生前或出生后不久便会死去。

图2F 通过 RNA-seq 分析 DKO-AG-haESCs 的基因表达谱。基因的表达谱是将所有基因的表达进行聚类。这三株 DKO-AG-haESCs 细胞系表现出和对照组 AG-haESCs 相似的基因表达谱，但是与球形精子极其不同。为了避免单倍体二倍体化对表达谱的影响，我们均通过 FACS 收集 G0/G1 的细胞进行 RNA-seq。

图2G DKO-AG-haESCs 的印记基因表达谱。三株不同的 DKO-AG-haESCs 表达谱与对照组 AG-haESCs 相似，但与小鼠的球形精子不同。

图2H 通过 RRBS 分析 DKO-AG-haESCs 的甲基化情况。

图S2A 对 *H19*$^{\Delta DMR}$-AGH 细胞敲除 *IG*-DMR 所获得的 *H19*$^{\Delta DMR}$-*IG*$^{\Delta DMR}$-AGH 细胞系进行基因型鉴定。

图S2B DKO-AG-haESCs 细胞系（*H19*$^{\Delta DMR}$-*IG*$^{\Delta DMR}$-AGH-4）的测序结果。

图S2C *H19*$^{\Delta DMR}$-*IG*$^{\Delta DMR}$-AGH 细胞 ICAHCI 获得的 2-细胞胚胎。

图S2D SC 小鼠的基因型鉴定。*H19*$^{\Delta DMR}$-*IG*$^{\Delta DMR}$-AGH-4 来源的 SC 小鼠均存在 *H19* 和 *IG* DMR 敲除。

图S2E *IG*$^{\Delta DMR}$-AGH-2（p8）获得的 SC 小鼠。

图S2F *IG*$^{\Delta DMR}$-AGH 细胞的 *H19* DMR 甲基化状态。

图S2G $IG^{\Delta DMR}$-AGH-2 得到的正常和生长阻滞型 SC 小鼠其 *H19* DM 的 R 甲基化状态。

图S2H DKO-AG-haESCs 细胞系（$IG^{\Delta DMR}$-$H19^{\Delta DMR}$-AGH-2）的测序分析。

图S2I $IG^{\Delta DMR}$-$H19^{\Delta DMR}$-AGH-2 细胞（p24）ICAHCI 获得 SC 小鼠。

图S2J $IG^{\Delta DMR}$-$H19^{\Delta DMR}$-AGH-2 来源的 SC 小鼠进行基因型鉴定。

图3A *Tet1*、*Tet12* 和 *Tet13* sgRNA 示意图

图3B FACS 收集 *mCherry* 阳性的细胞，铺到培养皿中以获得 *Tet* 家族基因突变的 DKO-AG-haESCs

图3C 获得 Tet-TKO-DAH 细胞系。

图3D Tet-TKO-DAH 细胞系中 *Tet1*、*Tet2* 和 *Tet3* 的测序。

图3E Tet-TKO-DAH-1 和 Tet-TKO-DAH-2 细胞系获得 SC 小鼠进行 *Tet1*、*Tet2* 和 *Tet3* 基因的 PCR 产物测序。

图3F *p53*、*p63* 和 *p73* sgRNA 示意图。

图3G p53-TKO-DAH-2 细胞系中 *p53*、*p63* 和 *p73* 测序。

图3H *Tet1-EGFP*、*Tet2-mCherry*、*Tet1-ECFP* 双链 DNA 载体的示意图。*EGFP*、*mCherry*、*ECFP* 分别融合到 *Tet1*、*Tet12* 和 *Tet13* 的终止密码子处。

图3I Tet-TKO-DAH-1 细胞系的基因型鉴定。

图S3A 在 WT-AG-haESCs（AGH-OG3）上敲除 *H19* 和 *IG*- DMR 获得的 2 株 DKO-AG-haESCs 细胞系（$H19^{\Delta DMR}$-$IG^{\Delta DMR}$-AGH-OG3-1 和 $H19^{\Delta DMR}$-$IG^{\Delta DMR}$-AGH-OG3-1）测序分析。

图S3B $H19^{\Delta DMR}$-$IG^{\Delta DMR}$-AGH-OG3-1（p26）通过 ICAHCI 获得 SC 小鼠。

图S3C 对 $H19^{\Delta DMR}$-$IG^{\Delta DMR}$-AGH-OG3-2 细胞系获得的 SC 小鼠进行基因型鉴定。

图S3D DKO-AG-haESCs 和正常 AG-haESCs 印记基因（*H19, Igf2, Gtl2* 和 *Dlk1*）的表达分析。*H19* 和 *IG*- DMR 敲除后，AGH-OG-3 的 *H19* 和 *Gtl2* 表达水平出现下调。相反，*Igf2* 和 *Dlk1* 的表达水平则出现上调。

图S3E *H19* 和 *Gtl2* 的 bigwig track。RNA-seq 结果显示：相比于 WT-AG-haESCs，DKO-AG-haESCs 的 *H19* 和 *Gtl2* 表达水平要更低。

图S3F *H19-Igf2* 和 *Dlk1-Dio3* 印记簇区域的甲基化水平。

图S3G DKO-AG-haESCs、WT-AG-haESCs 和球形精子的印记基因甲基化状态。

图4A 携带 sgRNA 文库的 DKO-AG-haESCs 经 ICAHCI 获得大量杂合突变 SC 小鼠的示意图。

图4B 代表 Cas9 成功转入表达的 *mCherry* 阳性单倍体用 FACS 的方法进行富集，并用于后续的 ICAHCI。

图4C 对单细胞来源的单倍体克隆进行 sgRNA PCR 鉴定。所有检测的细胞克隆均带有 sgRNA.

图4D 对细胞克隆中不同的突变基因进行测序。检测的克隆均存在目的基因的修饰。

图4E 来源于携带 sgRNA 文库 DKO-AG-haESCs 的 SC 小鼠。

图4F SC 小鼠 sgRNA 的 PCR 鉴定。

图4G SC 小鼠不同目的基因的突变测序。所有检测的 SC 小鼠均存在目的基因的修饰。

图S4A Tet-TKO-DAH-3 细胞系 *Tet1*、*Tet12* 和 *Tet13* 的测序。

图S4B Tet-TKO-DAH-3（p36）经 ICAHCI 获得 SC 小鼠。

图S4C p53-TKO-DAH-1 细胞系 *p53*、*p63* 和 *p73* 的测序。

图S4D p53-TKO-DAH-1 细胞系(p44)ICAHCI 获得 SC 小鼠。

图S4E 分别从 p53-TKO-DAH-1 和 p53-TKO-DAH-2 细胞系得到 SC 小鼠对 *p53*、*p63* 和 *p73* 基因进行测序。

图5A 携带持续表达 Cas9 和 sgRNA 文库的 DKO-AG-haESCs 经 ICAHCI 获得大量双等位基因突变 SC 小鼠的示意图。

图5B 单细胞来源的细胞克隆 Cas9 的 PCR 分析。所有检测的细胞克隆均含有 Cas9 转基因。

图5C 单细胞来源的细胞克隆 Cas9 的定量 PCR 分析。

图5D 对单细胞来源的细胞克隆进行 sgRNA PCR 鉴定。

图5E 来源于携带持续表达 Cas9 和 sgRNA 文库 DKO-AG-haESCs 的 SC 小鼠。

图5F PCR 鉴定 SC 小鼠的 sgRNA。

图5G 携带持续表达 Cas9 和 sgRNA 文库的 DKO-AG-haESCs 经 ICAHCI 获得双等位基因突变 SC 小鼠。以 *Polm* 双等位基因突变的 SC 小鼠为例。

图5H 通过 TA 克隆和测序分析 *Polm* 基因在鼠尾的突变情况。26 个检测的克隆中有 24 个发生了移码突变。

图5I 7只双等位基因突变SC小鼠的TA克隆测序结果总结。超过80%的克隆发生插入缺失突变。

图5J *Scube1*双等位基因突变的SC小鼠对其不同的器官进行TA克隆和测序分析。

图S5A *Tet1-EGFP*、*Tet2-mCherry* 和 *Tet3-ECFP*外源双链载体的示意图。

图S5B *Tet1-EGFP*敲入的DKO-AG-haESCs基因型鉴定。

图S5C *Tet3-ECFP*敲入的DKO-AG-haESCs基因型鉴定。

图S5D Tet1&3-KI-DAH-1细胞系的基因型鉴定。

图S5E Tet1&3-KI-DAH-1细胞系 *Tet1-EGFP* 和 *Tet-ECFP* 的测序。

图S5F Tet1&3-KI-DAH-1细胞系(p40)经ICAHCI获得的SC小鼠已长成3周大。

图S5G Tet1&3-KI-DAH-1细胞系获得的SC小鼠基因型鉴定。

图S5H Tet-TKI-DAH-1细胞系中 *Tet2-mCherry* 测序。

图S5I Tet-TKI-DAH-2细胞系(p50)获得SC小鼠。

图S5J Tet-TKI-DAH-1细胞系获得SC小鼠的基因型鉴定。

图S6A 瞬转pX330-mCherry质粒并携带sgRNA的单倍体细胞注射到成熟的卵细胞，接着向重构的卵细胞注射Cas9 mRNA（此方案命名：Lenti-sgRNA+pX330+Cas9 injection）。

图S6B 单细胞来源的单倍体ES克隆PCR鉴定其sgRNA插入。

图S6C 携带sgRNA文库的DKO-AG-haESCs获得SC小鼠。

图S6D SC小鼠的sgRNA PCR鉴定。

图S6E 携带sgRNA文库的DKO-AG-haESCs注射到卵细胞，接着向SC胚胎中注射Cas9 mRNA。以携带 *Slco5a1* 基因双等位基因突变的SC小鼠为例。

图S6F *Slco5a1*基因的鼠尾TA克隆和测序分析。检测的20个克隆里有18个发生插入缺失突变。

图S6G 4只双等位基因突变小鼠TA克隆和测序的总结分析。

具体实施方式

本发明首先提供了一种孤雄单倍体胚胎干细胞，所述孤雄单倍体胚胎干细胞的H19 DMR及IG-DMR被敲除。

所述孤雄单倍体胚胎干细胞的整个基因组来源于精子，具有干细胞的自我复制能力与多

能性，能取代精子与卵母细胞结合支持胚胎的完全发育。

所述 H19 DMR 是指：*H19-Igf2* 印记簇内的一段甲基化差异区域（DMR：differentially methylated region）。H19 DMR 的具体位置与序列可根据现有的甲基化测序或同源序列分析预测等方法明确。已知人 H19 DMR 定位于染色体 11p15.5 区，鼠 H19 DMR 则位于 7 号染色体远端，位于 H19 和 Igf2 两个基因之间，H19 基因的上游的 2kb 到 4kb 位置。H19 DMR 在父本等位基因上呈甲基化状态，导致 CTCF 蛋白无法结合到这段甲基化区域上，使 H19 下游的增强子不需要逾越 CTCF 这一障碍，进而达到增强上游的 Igf2 的表达并且降低 H19 的表达。而在母本等位基因上呈去甲基化状态，CTCF 蛋白能够结合到这段未甲基化的区域，因此 H19 下游的增强子只能增强 H19 的表达，但是对上游的 Igf2 无法调控。如果将父本 H19 DMR 敲除的话，那么 H19 下游的增强子就能上调 Igf2 的表达。由于孤雄单倍体是父本来源，理论上应当处于完全甲基化的状态，但是研究发现，体外培养的孤雄单倍体 H19 DMR 的甲基化出现异常擦除，成为去甲基化状态，导致 H19 的表达异常上调而 Igf2 的表达被下调，本发明敲除了 H19 DMR，纠正了这种 H19 表达上调 Igf2 表达下调的异常状态。

所述 IG-DMR 是指：*Dlk-Dio3* 印记簇内的一段甲基化差异区域（DMR：differentially methylated region）。IG DMR 的具体位置与序列可根据现有的甲基化测序或同源序列分析预测等方法明确。已知小鼠的 IG-DMR 位于 12 号染色体上，处在印记簇中 Dlk1 和 Gtl2 2 个基因之间 4.15kb 的一段重复序列，人的则位于 14 号染色体上（14q32.2）。IG-DMR 在父本等位基因中，这段区域发生 DNA 甲基化，这一印记簇的基因 Gtl2 以及一些 mircroRNA 不表达，但是基因 Rtl1、Dlk1 和 Dio3 则表达。在母本等位基因中，这段区域不发生 DNA 甲基化（去甲基化状态），因此 Gtl2 以及一些 mircroRNA 进行表达，但是基因 Rtl1、Dlk1 和 Dio3 则不表达。在孤雄单倍体（父本来源）和出生异常的 SC 动物中，研究发现本应该是甲基化状态的 IG-DMR，其甲基化出现异常擦除，从而导致基因 Rtl1、Dlk1 和 Dio3 的沉默，Gtl2 以及一些 mircroRNA 的异常激活。

进一步的，所述孤雄单倍体胚胎干细胞除了 H19 DMR 及 IG-DMR 敲除之外，还经过其他基因改造。

基因改造具体是指通过生物或化学或物理的手段使基因相比改造前在结构上发生变化。这种变化主要是指碱基对组成的变化，包括但不限于一个或多个碱基对的替换、增添、缺失引起的改变。

在一优选例中，列举了对 Tet1、Tet2、Tet3 、p53 家族的基因改造。

所述孤雄单倍体胚胎干细胞来源于哺乳动物，可以为人或非人哺乳动物。较佳的，所述孤雄单倍体胚胎干细胞来源于啮齿动物，如兔、鼠，鼠可以为小鼠、大鼠。在优选的实施例中，所述孤雄单倍体胚胎干细胞来源于小鼠。

相比 H19 DMR 及 IG-DMR 未同时敲除的孤雄单倍体胚胎干细胞，本发明的孤雄单倍体胚胎干细胞构建半克隆动物的出生率更高。

本发明还提供了所述孤雄单倍体胚胎干细胞的制备方法，包括将孤雄单倍体胚胎干细胞的 H19 DMR 及 IG-DMR 敲除获得所述孤雄单倍体胚胎干细胞。

可以采用现有的基因编辑方法敲除所述 H19 DMR 及 IG-DMR。在优选的实施例中，采用 CRISPR/Cas9 介导的基因操作敲除 H19 DMR 及 IG-DMR。还可采用其他方法实现基因敲

除，并不限于实施例所列举的方式。

基于 H19 DMR 的敲除，H19 DMR 的完整序列从染色体 DNA 中去除；基于 IG DMR 的敲除， IG-DMR 的完整序列从染色体 DNA 中被去除。

在一实施例中，先构建 H19 DMR 敲除的孤雄单倍体胚胎干细胞，并在此基础上进一步敲除 IG-DMR。在另一个实施例中，先构建 IG-DMR 敲除的孤雄单倍体胚胎干细胞，并在此基础上进一步敲除 H19 DMR。在另一个实施例中，直接构建 H19 DMR 及 IG-DMR 同时敲除的孤雄单倍体胚胎干细胞。

进一步的，所述孤雄单倍体胚胎干细胞还经其他基因改造。

所述的其他基因改造是指除 H19 DMR 及 IG-DMR 双敲除以外的基因改造。所述其他基因改造可以是单个目标基因的改造或者为多个感兴趣目标基因的改造。感兴趣目标基因并不特指，可以根据研究需要设定并改造。例如，可以是一个、两个、三个以上目标基因的改造。由于本发明 H19 DMR 及 IG-DMR 双敲除的孤雄单倍体胚胎干细胞可在体外传代，因此理论上可以不断对其进行基因改造，对于目标基因的改造数量可以按照需要操作，没有特别限制。

所述基因改造包括但不限于目标基因的敲入、目标基因的敲除等。目标基因的敲入、目标基因的敲除可以采用基因打靶、同源重组等技术来完成，包括但不限于基于 ZFN（锌指核酸酶）、TALEN（转录激活样效应因子核酸酶）和 CRISPR/Cas9（成簇规律间隔短回文重复技术）等的基因操作。

在一实施例中，将 H19 DMR 及 IG-DMR 双敲除的孤雄单倍体胚胎干细胞进一步经单次或多次基因改造获得 H19 DMR 及 IG-DMR 双敲除且经其他基因改造的孤雄单倍体胚胎干细胞。或者，也可以先对孤雄单倍体胚胎干细胞进行基因改造，而后将基因突变的孤雄单倍体胚胎干细胞的 H19 DMR 及 IG-DMR 敲除。除以上列举，凡是可以实现 H19 DMR 及 IG-DMR 双敲除及其他基因突变的其他生物技术手段均可用于构建 H19 DMR 及 IG-DMR 双敲除且经其他基因改造的孤雄单倍体胚胎干细胞。

本发明还提供了所述孤雄单倍体胚胎干细胞的用途，为用于构建基因改造的半克隆动物。

进一步的，以所述孤雄单倍体胚胎干细胞替代精子作为受精媒介用于构建基因改造的动物。

本发明还提供了一种构建基因改造半克隆动物的方法，将 H19 DMR 及 IG-DMR 双敲除孤雄单倍体胚胎干细胞与卵细胞结合获得半克隆胚胎，培育所述半克隆胚胎获得半克隆动物。

一般情况下，所述卵细胞与所述孤雄单倍体胚胎干细胞来源于同类动物，较佳的，为同种动物。

半克隆胚胎具体可以 H19 DMR 及 IG-DMR 双敲除的孤雄单倍体胚胎干细胞为 ICAHCI 的供体，采用 ICAHCI 法获得半克隆胚胎。

进一步的，可采用胚胎移植的方法在合适的母体内培育所述半克隆胚胎获得半克隆动物。

在一优选的实施例中，所述合适的母体选用假孕 ICR 母鼠。

进一步的，所述孤雄单倍体胚胎干细胞经其他基因改造。

本发明还提供了一种基因改造动物，由前述方法构建获得，或者为前述方法构建的半克隆动物的有性繁殖后代。

本发明所述半克隆动物可以为非人哺乳动物。较佳的，所述半克隆动物为啮齿动物，如

兔、鼠。在优选的实施例中，所述半克隆动物为小鼠。

本发明还提供了构建基因改造半克隆动物文库的方法，包括下列步骤：

1）以 sgRNA 慢病毒文库质粒制备的病毒颗粒感染本发明的孤雄单倍体胚胎干细胞，获得携带 sgRNA 文库的孤雄单倍体胚胎干细胞文库；

2）以携带 sgRNA 文库的孤雄单倍体胚胎干细胞库中的孤雄单倍体胚胎干细胞作为 ICAHCI 的供体，利用表达 Cas9 的载体和/或 Cas9 的 mRNA，采用 ICAHCI 法获得半克隆胚胎文库；

3）培育所述半克隆胚胎文库中的胚胎获得半克隆动物文库。

所述 sgRNA 慢病毒文库质粒包含数个表达不同 sgRNA 的慢病毒载体。sgRNA 慢病毒文库可以利用现有技术构建，也可采购现有的 sgRNA 慢病毒文库质粒。具体的，可以将针对不同基因所设计的 sgRNA 克隆入慢病毒载体获得。所述 sgRNA 可以根据自己所感兴趣的基因进行设计。

在一优选实施例中，采用的为商购的小鼠全基因组的 sgRNA 慢病毒文库。

具体的，步骤 2）可选自以下任一：

方法 A：

向携带 sgRNA 文库的孤雄单倍体胚胎干细胞文库进一步转染表达 Cas9 的质粒，将获得的孤雄单倍体胚胎干细胞作为 ICAHCI 的供体，采用 ICAHCI 法获得半克隆胚胎。

方法 B：

以携带 sgRNA 文库的孤雄单倍体胚胎干细胞文库的孤雄单倍体胚胎干细胞作为 ICAHCI 的供体，采用 ICAHCI 法注入成熟卵子，再向重构的卵子注入 Cas9 mRNA 获得半克隆胚胎。

方法 C：

向携带 sgRNA 文库的孤雄单倍体胚胎干细胞文库进一步转染表达 Cas9 的质粒，将获得的孤雄单倍体胚胎干细胞作为 ICAHCI 的供体，采用 ICAHCI 法注入成熟卵子，再向重构的卵子注入 Cas9 mRNA 获得半克隆胚胎，再经胚胎移植获得半克隆动物。

上述方法 A 和 C 中所述表达 Cas9 的质粒可将表达 Cas9 的基因克隆入表达质粒构建。在一优选实施例中，所述表达 Cas9 的质粒为 pX330-mCherry 质粒。可用于构建表达 Cas9 的质粒并不限于 pX330 质粒。所述表达质粒只需要适合在哺乳动物细胞中进行外源基因的表达即可。

本发明还提供了另一种构建基因改造半克隆动物文库的方法，包括下列步骤：

1） 以表达 Cas9 的慢病毒颗粒和 sgRNA 慢病毒文库制备的慢病毒颗粒感染本发明的孤雄单倍体胚胎干细胞，获得携带 sgRNA 文库以及 Cas9 持续表达的孤雄单倍体胚胎干细胞文库；

2）以携带 sgRNA 文库以及 Cas9 持续表达的孤雄单倍体胚胎干细胞文库中的孤雄单倍体胚胎干细胞作为 ICAHCI 的供体，采用 ICAHCI 法获得半克隆胚胎文库；

3）培育所述半克隆胚胎文库中的胚胎获得半克隆动物文库。

所述表达 Cas9 的病毒颗粒可采用现有技术，将表达 Cas9 的编码基因克隆入慢病毒载体然后进行慢病毒包装获得，表达 Cas9 的慢病毒载体可商购获得。

所述半克隆动物文库包含数个基因突变的半克隆动物。所述动物可以是杂合子或双等位

基因突变的突变动物。

进一步的，可采用胚胎移植的方法在合适的母体内培育所述半克隆胚胎获得半克隆动物。

在一优选实施例中，所述合适的母体可选用假孕 ICR 母鼠。

本发明还提供了一种基因改造半克隆动物文库，为采用前述方法构建获得。

本发明的基因改造半克隆动物文库可在下属个体水平进行基因的遗传筛选。

本发明所述半克隆动物文库可以为非人哺乳动物文库。较佳的，所述半克隆动物文库为啮齿动物文库，如兔文库、鼠文库。在优选的实施例中，所述半克隆动物文库为小鼠文库。

以下通过特定的具体实例说明本发明的实施方式，本领域技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点与功效。本发明还可以通过另外不同的具体实施方式加以实施或应用，本说明书中的各项细节也可以基于不同观点与应用，在没有背离本发明的精神下进行各种修饰或改变。

当实施例给出数值范围时，应理解，除非本发明另有说明，每个数值范围的两个端点以及两个端点之间任何一个数值均可选用。除非另外定义，本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、材料外，根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载，还可以使用与本发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实现本发明。

除非另外说明，本发明中所公开的实验方法、检测方法、制备方法均采用本技术领域常规的分子生物学、生物化学、染色质结构和分析、分析化学、细胞培养、重组DNA技术及相关领域的常规技术。这些技术在现有文献中已有完善说明。

简写：

AG-haESCs：孤雄单倍体胚胎干细胞

DKO-AG-haESCs：H19 DMR 及 IG-DMR 双敲除的孤雄单倍体胚胎干细胞

1.实验材料与方法

1．1 材料和试剂

细胞培养基（DMEM）、胎牛血清（FBS）、血清替代物（KSR）、胰酶、Opti-MEM、DPBS、Lipofectamine 2000 购自 Life Technologies 公司；限制性内切酶、T4 连接酶购自 NEB 公司；Taq 酶和 dNTPs 购自 TaKaRa 公司；CDNA 反转录试剂盒、荧光定量试剂 SYBR-Green 购自 TOYOBO 公司；寡聚核苷酸由上海 generay 公司合成。

HEPES-CZB 培养液：

H-CZB Stock 98.5ml 、Hepes.2Na(sigma, CAT#H0763) 或 ICN 520mg 或 Hepes（sigma,CAT#H4034）476mg、$NHCO_3$ 42mg 、$CaCl_2{\cdot}2H_2O$ 100×stock 1ml 、Pyruvate 3.0mg、Glutamin 200×stock 0.5ml 调整 pH 至 7.4，混匀过滤

H-CZB stock :

CZB stock 500ml, PVA(sigma,P8136)50mg、CZB stock: H_2O 985ml、NaCl(sigma, CAT#S5886) 4760mg、KCL(sigma,CAT#P5405) 360mg、$MgSO_4{\cdot}7H_2O$(sigma,CAT#M1880) 290mg、EDTA·2Na(sigma,CAT#E6635) 40mg、Na-Lactate(sigma,CAT#L7900) 5.3ml、D-Glucose(sigma,CAT#G6152) 1000mg、KH2PO4(sigma,CAT#P5655) 160mg

激活液：10mM Sr2+,5ng/ml Trichostatin A(TSA)

KSOM 培养液(KSOM+AA with glucose)： millipore, CAT#MR-106-D

ESC 培养基：

DMEM(millipore,CAT#SLM-220-M) 75%、20%血清替代物 KSR（Gibco, CAT#10828-028）、1,500 U/ml LIF(Millopre, CAT#ESG1107)、3M CHIR99021(Stemgent,CAT#04-0004)和 1M PD0325901 (Stemgent,CAT#04-0006)

Acid Tyrode 溶液： sigma,CAT#T1788

CZB 培养液：

CZB stock 99ML、$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 100×stock 1ml、Pyruvate 3.0mg、Glutamin 200×stock 0.5ml、BSA 500mg

pX330-*mCherry*：

px330（addgene）质粒用 NotI 进行酶切，然后将从 *pmCherry-C1* (Clontech)上扩增好的 CMV-mcherry-pA 片段插入进酶切过的 px330 质粒获得。

扩增所用引物：

mCherry-F: ATTTGCGGCCGCATAGTAATCAATTACGGG

mCherry-R: ATTTGCGGCCGCATGCAGTGAAAAAAATGC

小鼠的 sgRNA 慢病毒文库：Addgene 公司

Cas9 的病毒质粒：Addgene 公司提供

Cas9 的 mRNA:

参考 Wang, H., Yang, H., Shivalila, C.S., Dawlaty, M.M., Cheng, A.W., Zhang, F., and Jaenisch, R. (2013). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. Cell 153,910-918.的记载获得

球形精子：

将小鼠睾丸用胶原酶 IV 消化 20min 后，用胰酶消化 10min,然后通过 FACS（流式分选）得到小鼠的球形精子。

1.2 试验动物

所有的动物使用流程都是按照中科院上海生命科学研究院生化与细胞所的动物轮流手册。

H19 Δ3.8kb KO 小鼠（C57/B6 背景, 纯合）：参考文献构建（Thorvaldsen, J.L., Mann, M.R., Nwoko, O., Duran, K.L., and Bartolomei, M.S. (2002). Analysis of sequence upstream of the endogenous H19 gene reveals elements both essential and dispensable for imprinting. Molecular and cellular biology 22, 2450-2462.）

IG-DMR KO 小鼠（C57/B6 背景, 杂合）：参考文献构建（ Lin, S.P., Youngson, N., Takada, S., Seitz, H., Reik, W., Paulsen, M., Cavaille, J., and Ferguson-Smith, A.C. (2003). Asymmetric regulation of imprinting on the maternal and paternal chromosomes at the Dlk1 -Gtl2 imprinted cluster on mouse chromosome 12. Nature genetics 35, 97-102，）

B6D2F1 （C57BL/6 X DBA2）雌性小鼠：用 C57BL/6 品系的母鼠和 DBA2 品系的公鼠交配后得到的雌性后代。

假孕 ICR 母鼠： ICR 成年鼠购于斯莱克，将 ICR 成年母鼠与结扎的 ICR 公鼠交配即得到 ICR 假孕母鼠

1.3 孤雄单倍体胚胎干细胞系的建立

按照已报道的方法构建（Yang, H., Shi, L., Wang, B.A., Liang, D., Zhong, C., Liu, W., Nie, Y., Liu, J., Zhao, J., Gao, X. , et al. (2012). Generation of genetically modified mice by oocyte injection of androgenetic haploid embryonic stem cells. Cell 149, 605-617，）。

方法：

去掉 MII 卵子的细胞核注入相应的精子头。小鼠 MII 卵在人绒毛膜促性腺激素（HCG）处理的 14 小时后进行收集，然后利用 Piezo 针在含有 5ug/ml 细胞松弛素 B（CB）的 HEPES-CZB 培养液中去核。去核后，单个的精子头注入到卵胞质中。重构的胚胎在 CZB 培养液中培养 1 小时，然后转入到含 1mM Sr^{2+}的激活液进行激活。激活之后，所有的重构胚胎转到含有氨基酸的 KSOM 培养液于 37°C，5%CO_2 条件下进行培养。3.5 天后到达桑葚或囊胚阶段的重构胚胎种植到 ESC 培养基中。

重构胚胎透明带由 Acid Tyrode 溶液进行消化去除。每个转移到铺有小鼠成纤维细胞滋养层的 96 孔板孔中，并且用含有 20%血清替代物（KSR）、1,500 U/ml LIF、3M CHIR99021 和 1M PD0325901 的 ESC 培养基进行培养。培养 4-5 天后，细胞克隆由胰酶消化并传到铺有新鲜滋养层的 96 孔板中。细胞进一步扩大培养，传代到 48 孔板并进一步至 6 孔板中，日常的细胞维持仅在 6 孔板中即可。为了分选出单倍体细胞，胚胎干细胞胰酶消化后，用 PBS（GIBCO）洗一遍，然后在含有 15 μg/ml Hoechst 33342 的 ESC 培养基。水浴 30min。随后，通过流式分选仪 BD FACS AriaII 分选收集出单倍体 1N 峰形的细胞进行后续的培养获得孤雄单倍体胚胎干细胞系。

1.4 CRISPR-Cas9 介导的基因操作

CRISPR-Cas9 质粒构建：将合成好的 sgRNA 的正向寡核苷酸链和反向寡核苷酸链进行退火获得双链寡核苷酸链（本发明中 sgRNA 序列均指 sgRNA 的正向寡核苷酸链序列）然后与 BbsI（New England Biolabs）酶切好的 pX330-*mCherry* 进行连接。构建好的相应质粒按照说明书用 Lipofectamine 2000（Life Technologies）转染到孤雄单倍体胚胎干细胞中。转染 48 小时之后，通过流式（FACS AriaII, BD Biosciences）将带有红色荧光蛋白的单倍体细胞分选出来后，以较低的密度铺下。生长 4-5 天后，挑取单克隆进行后续的建系。最后通过 PCR 目的基因进行测序的方法获得相应基因突变的细胞系。

如涉及基因的敲入，则需构建双链的 DNA 供体。

双链 DNA 供体制备：

扩增到编码 *EGFP*、*mCherry* 或 *ECFP* 的序列，然后相应地连接到 pMD19-T 载体上得到 pMD19-T-EGFP/mCherry/ECFP。随后，将目的基因的左右同源臂相应地插入到 pMD19-T-EGFP/mCherry/ECFP 的载体上。

1.5 病毒的制备和双敲孤雄单倍体胚胎干细胞（DKO-AG-haESCs）的病毒感染

小鼠的 sgRNA 病毒文库和 Cas9 的病毒质粒已有报道（Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A. , et al. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science 339, 819-823; Koike-Yusa, H., Li, Y., Tan, E.P., Velasco-Herrera Mdel, C., and Yusa, K. (2014). Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. Nature biotechnology 32, 267-273,

2014），本发明所用小鼠 sgRNA 病毒文库和 Cas9 的病毒质粒由 Addgene 公司提供。为了制备病毒，HEK293T 提前传代到 10cm 培养皿中，用 Lipofectamine® 2000 Reagent （Invitrogen，Life Technologies）转染 3ug 的病毒质粒（sgRNA 慢病毒文库或 Cas9 慢病毒）和 9 μg of ViraPower Lentiviral Packaging Mix 慢病毒包装混合物 （Invitrogen）转染到 HEK293T 细胞中。转染 72 小时后收集上清，用慢病毒浓缩液 Lenti-Concentin virus precipitation solution （SBI）进行浓缩，随后就可以保存到-80°C。

Cas9 慢病毒感染：用 8 ug/ml polybrene （Sigma）和包装好的 Cas9 慢病毒感染含 10^8 个 DKO-AG-haESCs 的细胞悬液 48 小时，然后用 10ug/ml 的 blasticidin （Sigma）进行加药筛选 3 天，剩余的抗药克隆即为 Cas9 慢病毒整合的细胞系。

sgRNA 慢病毒文库感染：用 8 ug/ml polybrene （Sigma）和包装好的 CRISPR-sgRNA 文库慢病毒感染含 10^8 个 DKO-AG-haESCs 的细胞悬液，48 小时之后换成 1ug/ml puromycin （Invitrogen)）的培养基进行药物筛选，筛选 2 天后得到的阳性即为携带 sgRNA 文库慢病毒整合的细胞系。

Cas9 慢病毒与 sgRNA 文库慢病毒双感染：

先制备 Cas9 慢病毒整合的细胞系，而后进一步感染 sgRNA 慢病毒文库，以 1ug/ml puromycin （Invitrogen)）的培养基进行药物筛选，筛选 2 天后得到的阳性即为 Cas9 慢病毒和 sgRNA 文库慢病毒整合的细胞系。

如果 DKO-AG-haESCs 细胞系只感染了 sgRNA 慢病毒文库，那么细胞就没有 Cas9 的表达，这个时候我们需要再细胞水平上进行 pX330-*mCherry* 质粒的转染，以实现基因组的编辑。

1.6 亚硫酸盐甲基化测序

1） 将小鼠的 DNA 与 15ul 2% LMP agarose（低熔点琼脂糖）包成 beads，加入 460 ul DNA digestion buffer，再加入 40 ul proteinase K 到每个样品，50℃过夜孵育消化样品。

2）TE 洗 3 遍后，用 bisulfite 溶液与 beads 反应，50℃孵育 4h-8h。

3）以 beads 为模板进行巢式 PCR，PCR 产物进行回收后与 PMD19-T 载体进行连接，转化，涂板

4）每个样品挑取 10 个菌落进行测序。

若采用 EZ DNA methylation Gold kit （ZYMO Research）试剂盒，只需要准备好相应量的 DNA，然后后续的所有过程根据试剂盒的步骤进行操作即可。得到的试剂盒回收产物，以此为模板进行 PCR，产物回收，与 PMD19-T 载体进行连接，转化，涂板。选取平板的 10 个菌液进行测序。

1.7 荧光定量 PCR

细胞或器官的总量 RNA 用 Trizol reagent（Invitrogen)抽提，然后用 1ug 的总 RNA 用 First Strand cDNA Synthesis kit（TOYOBO)进行反转录成 cDNA。实时荧光定量 PCR 反应用 SYBR Green Realtime PCR Master Mix （TOYOBO），并在 Bio-Rad CFX96 仪器上完成，每组样品设立 3 个重复。所有的基因表达水平均以管家基因 *Gapdh* 的表达水平为内参。

1.8 Cobra Assay

1）取 100ng 的样品 DNA，与 *Taq*I 快速限制性内切酶(fementas 公司)（T/CGA）进行酶切反应 15min。

2）进行琼脂糖凝胶电泳，即可。

1.9 ICAHCI、 ROSI 和胚胎移植构建半克隆小鼠

胞浆内孤雄单倍体胚胎干细胞注射(intracytoplasmic AG-haESCs injection, ICAHCI)：

为获得半克隆（SC）胚胎，将 AG-haESCs 用含有 0.05 μg/ml 秋水仙素的培养基处理 8h 以将细胞同步到 M 期，然后进行卵胞浆注射。消化好的 AG-haESCs 用 HEPES-CZB 培养液洗 3 遍，然后用 3% (w/v) 聚乙烯吡咯烷酮（polyvinylpyrrolidone，PVP）的 HEPES-CZB 培养液重悬。用 Piezo 显微操作仪将每个 M 期的 AG-haESCs 的细胞核注入 MII 卵子中。重构好的胚胎先在 CZB 培养液中培养 1h，然后用不含 CB 的激活液激活 5-6h。激活之后，所有的重构胚胎在 KSOM 培养液于 37°C，5%CO_2 条件下进行培养。ICAHCI 胚胎在 KSOM 培养液中培养 24h 就能到达 2 细胞期胚胎。

ROSI（球形精子注射）：

按照已报道的方法（Kishigami, S., Wakayama, S., Nguyen, V.T., and Wakayama, T. (2004). Similar time restriction for intracytoplasmic sperm injection and round spermatid injection into activated oocytes for efficient offspring production. Biology of reproduction 70, 1863-1869）进行操作。

由 ICAHCI 或 ROSI 获得的每 15-20 个 2 细胞胚胎）移入到 0.5dpc（交配后 0.5 天）假孕 ICR 小鼠的每个子宫中。母鼠在怀孕 19.5 天后进行剖腹产或自然生产。剖腹产是针对 WT AG-haESCs 或单个 DMR 敲除的 AG-haESCs 所获得的重构胚胎，到期的胎儿快速从母鼠的子宫中剥离出来。针对 ROSI 或 DKO-AG-haECs 所得到的胚胎，怀孕 19.5 天的母鼠可以进行自然生产。清除掉出生小鼠身上的液体后，小鼠放在有氧气的温箱中，而存活的小鼠则后续由代孕母鼠进行养育。

1.10 RNA-seq 和基因表达分析

总 RNA 的 RNA-seq 建库是根据 illumina 官方的 TreSeq RNA Sample Prep v2 Guide 进行的。完成后在中科院-马普学会计算生物学研究所计算组学中心的 Illumina HiSeq 2000 仪器上进行深度测序。2 个 WT AG-haESCs、$H19^{\Delta DMR}$-$IG^{\Delta DMR}$-AGH、$H19^{\Delta DMR}$-$IG^{\Delta DMR}$-AGH-OG3、$IG^{\Delta DMR}$-$H19^{\Delta DMR}$-AGH 以及球形精子共 6 个样本进行后续的分析

基因表达量使用的 RPKM，具体的算法是和（Yang, L., Duff, M.O., Graveley, B.R., Carmichael, G.G., and Chen, L.L. (2011). Genomewide characterization of non-polyadenylated RNAs. Genome biology 12, R16）一致。

计算差异表达基因的 p-value 时使用的是（Yang et al., Genome boil 2011）中 waldscore 计算的方法，选择 abs（waldscore）>1.96（即 p-value<0.05），然后筛选差异表达基因 。

1.11 RRBS（简化表观亚硫酸氢盐测序）

RRBS 的建库是 R 是根据 Illumina 官方的标准 protocol 制备的。然后用 Illumina HiSeq 2000 进行测序（Gu, H., Smith, Z.D., Bock, C., Boyle, P., Gnirke, A., and Meissner, A. (2011). Preparation of reduced representation bisulfite sequencing libraries for genome-scale DNA methylation profiling. Nature protocols 6, 468-481.）。所有的测序读值与小鼠的基因组进行比对分析。

1.12 基因型鉴定方法

抽提好的基因组 DNA 用相应的引物进行 PCR，然后 PCR 产物进一步进行琼脂糖凝胶电泳分析。

实施例 1

基于 *H19* DMR 单敲除的孤雄单倍体胚胎干细胞系构建半克隆小鼠

A.构建孤雄单倍体胚胎干细胞系：

精子来源：*H19* Δ3.8kb KO 小鼠（C57/B6 背景, 纯合）；

卵子来源：B6D2F1 （C57BL/6 X DBA2）雌性小鼠

采用前述 1.3 的方法，将 *H19* Δ3.8kb 小鼠的单倍体精子头注入去核的卵细胞（图 1A），获得重构的囊胚，构建孤雄单倍体胚胎干细胞系。从 250 颗重构的囊胚中建立了 3 株单倍体细胞系（命名为 $H19^{\Delta DMR}$-AGH-1 、$H19^{\Delta DMR}$-AGH-2、 $H19^{\Delta DMR}$-AGH-3）（图 1B-1D）。

B.构建半克隆小鼠：

采用前述 1.9 的方法，用 $H19^{\Delta DMR}$-AGH 细胞作为 ICAHCI 的供体，利用这 3 株 $H19^{\Delta DMR}$-AGH 细胞系将重构的 1443 颗 2-细胞胚胎移植到假孕母鼠中。最后，通过将怀孕 19.5 天的母鼠进行剖腹产，得到了 86 只健康存活的半克隆小鼠和 39 只生长阻滞的小鼠（图 1E，表 1）。正常半克隆小鼠的出生效率大约为 5.9%，然而，$H19^{\Delta DMR}$-AGH 重构的胚胎依旧有约 2.7%的半克隆小鼠发育不正常。

以野生型 AG-haESCs 作为 ICAHCI 的供体构建半克隆小鼠。正常半克隆小鼠的出生效率大约为 0.7-1.8%。

C. *Gtl2* 表达检测

采用前述 1.7 的方法通过荧光定量 PCR 检测 $H19^{\Delta DMR}$-AGH 来源的生长阻滞型小鼠主要器官中是否也出现 *Gtl2* 的异常高表达。

荧光定量用 PCR 引物序列：

Gtl2-F：TTGCACATTTCCTGTGGGAC

Gtl2-R：AAGCACCATGAGCCACTAGG

试验结果表明，相比于正常小鼠，生长阻滞型半克隆小鼠在大部分检测的器官中，均出现了 *Gtl2* 的高表达（图 S1E）。

D. 甲基化分析

实验方法：采用前述 1.6 和 1.8 的方法分析

所用引物：

IG DMR-BS-OF：

TTAAGGTATTTTTTATTGATAAAATAATGTAGTTT

IG DMR-BS-OR ：

CCTACTCTATAATACCCTATATAATTATACCATAA

IG DMR-BS-IF ：

TTAGGAGTTAAGGAAAAGAAAGAAATAGTATAGT

IG DMR-BS-IR ：

TATACACAAAAATATATCTATATAACACCATACAA

甲基化分析的结果显示生长阻滞型的半克隆小鼠在 *Dlk1-Gtl2* 印记簇的甲基化差异位点 *IG*-DMR 区域出现明显的低甲基化（图 S1F-G）。有趣的是，*H19*$^{\Delta DMR}$-AGH 后期代数（*H19*$^{\Delta DMR}$-AGH-1，p16）相比于它的早期代数（*H19*$^{\Delta DMR}$-AGH-1，p7）出现了 *IG*-DMR 甲基化印记更加严重的丢失，最后产生生长阻滞型小鼠的比率也明显升高（图 S1H，表 S1）。说明 *Gtl2* 的异常表达可能是导致 *H19*$^{\Delta DMR}$-AGH 细胞获得的半克隆小鼠发育失败的另外一个重要因素。

实施例 2

基于 *H19* DMR 及 *IG*-DMR 双敲除的孤雄单倍体胚胎干细胞系构建半克隆小鼠

A．*H19* DMR 及 *IG*-DMR 双敲除的孤雄单倍体胚胎干细胞系构建：

采用前述 1.4 的方法构建。

在 *Dlk1 和 Gtl2* 之间设计了敲除 4.15kb *IG*-DMR 的 2 个 sgRNA（命名为 *IG*-DMR-sgRNA1 和 *IG*-DMR-sgRNA2）（图 1F）。

IG-DMR-sgRNA1 序列： CGTACAGAGCTCCATGGCAC（SEQ ID NO:1）

IG-DMR-sgRNA2 序列： CTGCTTAGAGGTACTACGCT（SEQ ID NO:2）

构建表达 Cas9 和 *IG*-DMR-sgRNAs 的质粒 pX330-*mCherry*，转染到 *H19*$^{\Delta DMR}$-AGH 细胞中，最终获得了 71 个孤雄单倍体胚胎干细胞系。目的基因 PCR 产物测序（*IG*-DMR deletion check–F: TGTGCAGCAGCAAAGCTAAG *IG*-DMR deletion check–R: ATACGATACGGCAACCAACG）发现有 58 个细胞系的 *IG*-DMR 得到了成功的敲除（命名 *H19*$^{\Delta DMR}$-*IG*$^{\Delta DMR}$-AGH-1 到 *H19*$^{\Delta DMR}$-*IG*$^{\Delta DMR}$-AGH-58）（图 1G，S2A 和 S2B）。对 *H19*$^{\Delta DMR}$-*IG*$^{\Delta DMR}$-AGH-2 进行脱靶分析显示总共 22 个潜在的脱靶位点均没有发生突变（表 S2），这些位点的预测是根据之前报道的软件对整个小鼠基因组进行搜索（Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E.J., Wu, X., Shalem, O., et al. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Nature biotechnology 31, 827-832）。

B.构建半克隆小鼠：

采用前述 1.9 的方法，用 *H19*$^{\Delta DMR}$-*IG*$^{\Delta DMR}$-AGH 细胞作为 ICAHCI 的供体构建半克隆小鼠，结果显示有 22.3%的半克隆胚胎都能发育到期（图 1H，图 S2C，表 1，表 S1），与我们实验室（表 1）或其他实验室报道（Kishigami, S., Wakayama, S., Nguyen, V.T., and Wakayama, T. (2004). Similar time restriction for intracytoplasmic sperm injection and round spermatid injection into activated oocytes for efficient offspring production. Biology of reproduction 70, 1863-1869.）的 ROSI 出生率相似。更者，相比于野生型 AG-haESCs 和 *H19*$^{\Delta DMR}$-AGH 通过 ICAHCI 所获得的半克隆小鼠需要进行剖腹产，而 *H19*$^{\Delta DMR}$-*IG*$^{\Delta DMR}$-AGH-2 重构的胚胎移植到假孕母鼠后，假孕母鼠能够进行自然生产，而且出生的半克隆小鼠均健康地活着。这些数据说明 *H19*$^{\Delta DMR}$-AGH 细胞通过敲除 *IG*-DMR 后成功建立起类似球形精子的特性，并且高效地产生半克隆小鼠。

实施例 3

基于 *IG*-DMR 单敲除的孤雄单倍体胚胎干细胞系构建半克隆小鼠

A.构建孤雄单倍体胚胎干细胞系：

精子来源：*IG*-DMR KO 小鼠；

卵子来源：B6D2F1 （C57BL/6 X DBA2）雌性小鼠

采用前述 1.3 的方法，将 *IG*-DMR KO 小鼠的单倍体精子头注入去核的卵细胞，获得重构的囊胚，构建孤雄单倍体胚胎干细胞系。在总共建立的 8 株单倍体细胞系中，有 2 株细胞系是携带 *IG*-DMR 敲除（命名为 $IG^{\Delta DMR}$-AGH-1 和 $IG^{\Delta DMR}$-AGH-2）

B.构建半克隆小鼠：

采用前述 1.9 的方法，用 $IG^{\Delta DMR}$-AGH 细胞作为 ICAHCI 的供体构建半克隆小鼠，发现 $IG^{\Delta DMR}$-AGH 细胞并不是产生半克隆小鼠的有效供体（表 1、表 S1），并且很难得到健康正常的 SC 小鼠（499 个移植的胚胎只获得了 4 只正常的 SC 小鼠）（图 2A、S2E）。更者，大部分的小鼠都属于生长阻滞型。

C.甲基化分析

实验方法：采用前述 1.6 和 1.8 的方法分析

所用引物：

H19 DMR-BS-OF :5' GAGTATTTAGGAGGTATAAGAATT 3'

H19 DMR-BS-OR: 5' ATCAAAAACTAACATAAACCCCT 3'

H19 DMR-BS-IF :5' GTAAGGAGATTATGTTTATTTTTGG 3'

H19 DMR-BS-IR: 5' CCTCATTAATCCCATAACTAT 3'

结果显示，$IG^{\Delta DMR}$-AGH 细胞系的 *H19* DMR 甲基化出现擦除，并且在生长阻滞的小鼠中完全丢失其甲基化（图 2B、S2F 和 S2G）。

实施例 4

基于 *H19* DMR 及 *IG*-DMR 双敲除的孤雄单倍体胚胎干细胞系构建半克隆小鼠

A． *H19* DMR 及 *IG*-DMR 双敲除的孤雄单倍体胚胎干细胞系构建：

采用前述 1.4 的方法构建。

敲除 *H19* 的Δ3.8kb DMR 的 sgRNA 序列：

H19-3.8K sgRNA-1: CATGAACTCAGAAGAGACTG（SEQ ID NO:3）

H19-3.8K sgRNA-2: AGGTGAGAACCACTGCTGAG（SEQ ID NO:4）

通过 CRISPR-Cas9 的方法在前述实施例来源的 $IG^{\Delta DMR}$-AGH 细胞系中敲除 *H19* 的Δ3.8kb DMR（参考 Thorvaldsen, J.L., Mann, M.R., Nwoko, O., Duran, K.L., and Bartolomei, M.S. (2002). Analysis of sequence upstream of the endogenous H19 gene reveals elements both essential and dispensable for imprinting. Molecular and cellular biology 22, 2450-2462），并成功获得了 13 株 DKO-AG-haESC 细胞系（命名为 $IG^{\Delta DMR}$-$H19^{\Delta DMR}$-AGH-1 到 $IG^{\Delta DMR}$-$H19^{\Delta DMR}$-AGH-13）（图 2C、S2H 和表 S2）。

B.构建半克隆小鼠：

采用前述 1.9 的方法，用前述其中 2 株细胞作为 ICAHCI 的供体构建半克隆小鼠，结果

显示与 *H19*$^{\Delta DMR}$-*IG*$^{\Delta DMR}$-AGH 细胞获得健康 SC 小鼠的能力极为相似（图 S2I、2J 和表 1、表 S1）。

实施例 5

基于 *H19*-DMR 及 *IG*-DMR 双敲除的孤雄单倍体胚胎干细胞系构建半克隆小鼠

A．*H19*-DMR 及 *IG*-DMR 双敲除的孤雄单倍体胚胎干细胞系构建：

初始细胞：WT-AG-haESCs 细胞系 AGH-OG-3 的第 21 代 AGH-OG-3 细胞

已有报道表明，该细胞系第 22 代已经基本上丧失获得健康的半克隆小鼠的能力（Yang, H., Shi, L., Wang, B.A., Liang, D., Zhong, C., Liu, W., Nie, Y., Liu, J., Zhao, J., Gao, X. , et al. (2012). Generation of genetically modified mice by oocyte injection of androgenetic haploid embryonic stem cells. Cell 149, 605-617）

将 sgRNA 的 oligo 进行退火，然后将 *H19* 和 *IG*-DMR 的 sgRNA 分别与 BbsI 酶切的 px330-mCherry 质粒进行连接转化。将测序正确的菌液进行质粒抽提，以备后续转染。

将第 21 代的 AGH-OG-3 细胞系中转入上述获得的质粒：

最终获得了 12 株同时敲出了 *H19* 和 *Gtl2* DMR 的孤雄单倍体胚胎干细胞系（命名 *H19*$^{\Delta DMR}$-*IG*$^{\Delta DMR}$-AGH-OG3-1 到 *H19*$^{\Delta DMR}$-*IG*$^{\Delta DMR}$-AGH-OG3-12）（图 2D、S3A 和表 S2）。

B.构建半克隆小鼠：

采用前述 1.9 的方法，用前述 *H19*$^{\Delta DMR}$-*IG*$^{\Delta DMR}$-AGH-OG3 细胞作为 ICAHCI 的供体构建半克隆小鼠。让人兴奋的是，通过将其中的 2 株细胞系注入到 MII 卵子中，大约有 17%的半克隆胚胎能够发育到期（图 S3B、S3C、表 1 和表 S1）。这说明之前已经完全丧失获得 SC 小鼠能力的 WT-AG-haESCs 在敲除 *H19*-DMR 和 *IG*-DMR 之后能够重新获得其球形精子类似的特性。

实施例 6

3 种类型的 DKO-AG-haESCs 获得的 SC 小鼠基因型确定

基因型鉴定方法：采用前述 1.12 的方法

H19-DMR deletion check –F2：GTGGTTAGTTCTATATGGGG

H19-DMR deletion check –R2：TCTTACAGTCTGGTCTTGGT

IG-DMR deletion check–F: TGTGCAGCAGCAAAGCTAAG

IG-DMR deletion check–R: ATACGATACGGCAACCAACG

采用前述实施例 2、4、5 的三种方法，构建的三种类型 *H19*-DMR 及 *IG*-DMR 双敲除的孤雄单倍体胚胎干细胞系，总获得了 402 只 SC 小鼠，移植的胚胎达到 20.2%的小鼠出生效率。这些 DKO-AG-haESCs 来源的 SC 小鼠能够长大成年，并且能够产生后代。对 7 窝里 33 只新生小鼠后代进行基因型鉴定发现：13 只携带有 *H19*-DMR 敲除，11 只为 WT（图 2E）。而另外的 9 只小鼠有 6 只为 *IG*-DMR 敲除，3 只为 *H19* 和 *Gtl2* DMR 双敲除。这 9 只小鼠出生不久便死去，这和之前报道的 *IG*-DMR 母系遗传会出现出生前或出生后致死的表型相一致（Lin, S.P., Youngson, N., Takada, S., Seitz, H., Reik, W., Paulsen, M., Cavaille, J., and Ferguson-Smith, A.C. (2003). Asymmetric regulation of imprinting on the maternal and paternal chromosomes at the Dlk1 -Gtl2 imprinted cluster on mouse chromosome 12. Nature genetics 35, 97-102）。

实施例 7

AG-haESCs 的基因表达检测及甲基化分析

采用前述 1.10 和 1.7 的方法分别进行 RNA-seq 及基因表达分析。

试剂：SYBR-Green（TOYOBO）

Q-PCR 所用引物：

Gapdh-F：CACTCTTCCACCTTCGATGC

Gapdh-R：CTCTTGCTCAGTGTCCTTGC

Igf2-F：CTAAGACTTGGATCCCAGAACC

Igf2-R：GTTCTTCTCCTTGGGTTCTTTC

Gtl2-F：TTGCACATTTCCTGTGGGAC

Gtl2-R：AAGCACCATGAGCCACTAGG

Dlk-F: ACTTGCGTGGACCTGGAGAA

Dlk-R: CTGTTGGTTGCGGCTACGAT

H19-F: CATGTCTGGGCCTTTGAA

H19-R: TTGGCTCCAGGATGATGT

采用前述 1.11 的方法进行全基因组甲基化水平分析

Q-PCR 的结果显示在 DKO-AG-haESCs 中 *H19* 和 *Gtl2* 的表达发生了下调，而 *Igf2* 和 *Dlk1* 的表达则上调（图 S3D）。比较了 DKO-AG-haESCs 和正常的 AG-haESCs 以及球形精子的基因表达谱。基于 RNA-seq 的数据进行聚类发现 DKO-AG-haESCs 与 WT-AG-haESCs 表达谱有极高的相似性，但与球形精子相距甚远（图 2F、S3E）。进一步分析 DKO-AG-haESCs 和 WT-AG-haESCs 的印记基因表达谱，发现 DKO-AG-haESCs 和 WT-AG-haESCs 所有的印记基因都有极其相似的表达水平（图 2G）。为了进一步评估其表观遗传，进行了简化的表观亚硫酸氢盐测序（RRBS）从全基因组水平范围内看其甲基化水平。正如图 2H、S3F 和 S3G 所显示，*H19* 和 *Gtl2* DMRs 的敲除并没有改变所有检测到基因和印记基因启动子区域的甲基化水平。总之，我们的结果显示 *H19* 和 *Gtl2* DMRs 是 AG-haESCs 获得球形精子类似特性的两大主要障碍。

实施例 8

携带多基因修饰的 DKO-AG-haESCs 产生半克隆小鼠

A. 携带多基因修饰的 DKO-AG-haESCs 构建：

采用前述 1.4 的方法构建。

初始细胞：DKO-AG-haESCsTET 家族基因敲除采用实施例 4 制备的 DKO-AG-haESCs，p53 家族基因敲除采用实施例 2 制备的 DKO-AG-haESCs）

突变目标：*Tet1*、*Tet2*、*Tet3* 、*p53* 家族突变

构建过程：

Tet-TKO-DAH 的构建过程：

将 *Tet1*、*Tet2*、*Tet3* 的 sgRNA 分别退火，然后分别连接到 BbsI 酶切的 px330-mCherry 质

粒上，通过测序挑出连入 sgRNA 的阳性质粒。

Tet1 sgRNA 序列：GGCTGCTGTCAGGGAGCTCA（SEQ ID NO:5）

Tet2 sgRNA 序列：GAAAGTGCCAACAGATATCC（SEQ ID NO:6）

Tet3 sgRNA 序列：AAGGAGGGGAAGAGTTCTCG（SEQ ID NO:7）

将表达 *Tet1*、*Tet2*、*Tet3* 的 sgRNA 的质粒共同转入 DKO-AG-haESCs 细胞系中，分选出 mCherry 阳性的细胞，铺到培养皿中。生长 5 天后，挑取克隆，传代扩增。建立好的细胞系通过 PCR 产物测序鉴定 *Tet1*、*Tet2*、*Tet3* 的突变情况。

测序引物：

Tet1 check- F：GCCCCTGTTGTCTTATACGTT

Tet1 check- R：CATTCGCCTCAGGACCAC

Tet2 check- F：CCGCCACAAGAAAATATGTCC

Tet2 check- R：AGCTAACTCTGGCAAACACC

Tet3 check- F：CAGAGTGGCCTCAGTTTCCC

Tet3 check- R：ACAACTTTTACCCAGGAGTCACAC

p53-TKO-DAH 的构建过程：

将 *p53*、*p63*、*p73* 的 sgRNA 分别退火，然后分别连到 BbsI 酶切的 px330-mCherry 质粒上，通过测序挑出连入 sgRNA 的阳性质粒。

*p*53 sgRNA 序列: CACCTGGGCTTCCTGCAGTC（SEQ ID NO:8）

*p*63 sgRNA 序列: TGGGCCCGGGTAATCTGTGT（SEQ ID NO:9）

*p*73 sgRNA 序列: TGTCGATAGGAGTCAACCAA（SEQ ID NO:10）

将表达 *p53*、*p63*、*p73* 的 sgRNA 的质粒共同转入 DKO-AG-haESCs 细胞系中，分选出 mCherry 阳性的细胞，铺到培养皿中。生长 5 天后，挑取克隆，传代扩增。建立好的细胞系通过 PCR 产物测序鉴定 *p53*、*p63*、*p73* 的突变情况。

P53 check- F: CCCCTGTCATCTTTTGTCCCT

P53 check- R: AAGAGAGTTCCACGTCCCCTG

P63 check- F: CACACCAAATAATGCCAATT

P63 check- R: CAGACTCTCTTACCGTCCAG

P73 check- F: GACCCACTTCTAAACCTGCC

P73 check- R: CCATACCTCCTGTGCTCCTG

B. 构建半克隆小鼠：

采用前述 1.9 的方法，用前述构建的细胞作为 ICAHCI 的供体构建半克隆小鼠。

C. 结果

本实例用 CRISPR-Cas9 的方法在 DKO-AG-haESCs 突变 *Tet1*、*Tet2* 和 *Tet3*。将构建好表达 Cas9 以及 *Tet1*、*2* 和 *3* 3 个 sgRNAs（图 3A）（参考 Wang, H., Yang, H., Shivalila, C.S., Dawlaty, M.M., Cheng, A.W., Zhang, F., and Jaenisch, R. (2013). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. Cell 153,910-918）的质粒转入 DKO-AG-haESCs 中，最终建立了 56 株 DKO-AG-haESCs，*Tet1*、*2* 和 *3* 基因的 PCR

产物测序发现有 18 株成功地发生了三基因的突变（命名为 Tet-TKO-DAH-1 到 Tet-TKO-DAH-18）（图 3B-D 和 S4A）。其中 4 株细胞系的 ICAHCI 结果表明能够以相应的效率获得 *Tet1*、*2* 和 *3* 突变的 SC 小鼠（图 3E、S4B、表 1 和表 S3）。*p53* 家族突变的 DKO-AG-haESCs 通过 ICAHCI 也能有效地获得相应的 SC 小鼠（图 S4D、S4E、表 1 和表 S3）。这些结果显示：WT-AG-haESCs 在体外进行基因操作后无法获得存活的 SC 小鼠，但是 DKO-AG-haESCs 在基因编辑操作之后仍能够有效稳定地产生半克隆小鼠。

实施例 9

DKO-AG-haESCs 进行基因编辑并产生半克隆小鼠

A. DKO-AG-haESCs 基因编辑细胞系的构建

初始细胞：DKO-AG-haESCs（是实施例 4 制备）

构建过程：

Tet1&3-KI-DAH 的构建过程：

将 Tet1 和 Tet3 的 sgRNA 分别退火，然后连到 BbsI 酶切的 px330-mCherry 质粒上，通过测序挑出连入 sgRNA 的阳性质粒。针对 Tet1-EGFP 和 Tet3-ECFP 供体的制备，分别以 pEGFP-N1 质粒和 pECFP-N1 质粒为模板，（引物为：P2A-fluorescence F：GCCACGAAGCAAGCAGGAGATGTTGAAGAAAACCCCGGGCCTGTGAGCAAGGGCGAGGAG

P2A-fluorescence R ：CTTGTACAGCTCGTCCATG）扩增到编码 EGFP、或 ECFP 的序列，然后相应地连接到 pMD19-T 载体的多克隆位点上，获得 pMD19-T-EGFP /ECFP 的载体。随后，将目的基因的左右同源臂相应地插入到 pMD19-T-EGFP /ECFP 的载体中 EGFP 或 ECFP 基因的两侧。

同源臂序列如下：

TET1 LA（左同源臂）：（SEQ ID NO:11）

TET1 RA（右同源臂）：（SEQ ID NO:12）

TET3 LA（左同源臂）：（SEQ ID NO:13）

TET3 RA（右同源臂）：（SEQ ID NO:14）

将 *Tet1* 和 *Tet3* 的 sgRNA 质粒与 *Tet1-EGFP 和 Tet3-ECFP 供体这 4 个质粒*共同转入 DKO-AG-haESCs 细胞系中，分选出 mCherry 阳性的细胞，铺到培养皿中。生长 5 天后，挑取克隆，传代扩增。建立好的细胞系通过 PCR 的方法鉴定 *Tet1-EGFP 和 Tet3-ECFP* 的敲入情况。双敲入的细胞命名为 Tet1&3-KI-DAH。

以下为 PCR 鉴定引物：

Tet1 LA-F：TTTGTGTCTATGAACTACCAGTGAG

Tet1 LA-F：CAGGCCCGGGGTTTTCTTC

Tet1 RA-F：CAACGAGAAGCGCGATCACA

Tet1 RA-F：TTTTGACTGATCCCAATTTGCCT

Tet3 LA-F：TGTTCACTGGTGAAGGCCAG

Tet3 LA-F：GAACAGCTCCTCGCCCTTG

Tet3 RA-F：TGAGCAAAGACCCCAACGAG

Tet3 RA-R: ATCGACAAACTTTGGGGCGA

Tet-TKI-DAH 的构建过程：

将 *Tet2* 的 sgRNA 退火，然后连到 BbsI 酶切的 px330-mCherry 质粒上，通过测序挑出连入 sgRNA 的阳性质粒。

针对 Tet2-mCherry 供体的制备，以 pmCherry-N1 为模板， P2A-fluorescence F：GCCACGAAGCAAGCAGGAGATGTTGAAGAAAACCCCGGGCCTGTGAGCAAGGGCGAGGAG；P2A-fluorescence R ：CTTGTACAGCTCGTCCATG 为引物扩增到编码 *mCherry* 的序列，然后连接到 pMD19-T 载体上。随后，将目的基因的左右同源臂相应地插入到 pMD19-T-mCherry 的载体上 mCherry 序列的两侧。

TET2 LA（左同源臂）：（SEQ ID NO:15）

TET2 RA（右同源臂）：（SEQ ID NO:16）

将 *Tet2 的* sgRNA 质粒与 *Tet2*- mCherry *供体这 2 个质粒*共同转入 Tet1&3-KI-DAH 细胞系中，分选出 mCherry 阳性的细胞，铺到培养皿中。生长 5 天后，挑取克隆，传代扩增。建立好的细胞系通过 PCR 的方法鉴定 *Tet2*- mCherry 的敲入情况。阳性的细胞克隆即为 Tet-TKI-DAH 细胞系。

鉴定引物：

Tet2 LA-F：CACACCCTTCACCAACAGACG

Tet2 LA-R：ATCTCGAACTCGTGGCCGTT

Tet2 RA-F：AAGACCACCTACAAGGCCAAG

Tet2 RA-R：GGTAGGCAAAGTGCTTTTCTAAGAC

B. 构建半克隆小鼠：

采用前述 1.9 的方法，用前述构建的细胞作为 ICAHCI 的供体构建半克隆小鼠。

C. 结果

本实例获得内源 *Tet1*、*Tet12* 和 *Tet3* 敲入不同荧光报告基团的 DKO-AG-haESCs。首先，向 DKO-AG-haESCs 转入同时表达 Cas9 和 Tet1、Tet3 sgRNA（图 3A）的质粒以及分别在 Tet1 和 Tet3 最后一个终止子融合了 EGFP 和 ECFP 报告基团的双链 DNA 供体载体（图 3H 和 S5A）。总共 150 个 DKO-AG-haESCs 细胞系中，分别获得了 10 株 *Tet1-EGFP* 敲入和 7 株 *Tet3-ECFP* 敲入的细胞系（图 S5B 和 S5C）。其中有一株细胞系同时携带 *Tet1-EGFP* 和 *Tet3-ECFP* 敲入，命名为 Tet1&3-KI-DAH-1（图 S5D 和 S5E）。ICAHCI 结果显示携带 *Tet1-EGFP* 和 *Tet3-ECFP* 敲入的 DKO-AG-haESCs 与 WT DKO-AG-haESCs 有着相似的半克隆小鼠出生能力（图 S5F、S5G、表 1 和表 S3）。接下来，往 Tet1&3-KI-DAH-1 细胞系中转入表达 Cas9 和 Tet2 sgRNA 的质粒以及在 Tet2 基因最后一个终止子融合了 *mCherry* 报告基团的双链 DNA 供体载体（图 3A 和 3H）。从建立的 130 株细胞系，我们鉴定出了 8 株 *Tet2-RFP* 敲入的单倍体细胞系（命名 Tet-TKI-DAH-1 to Tet-TKI-DAH-8）（图 3I 和 S5H）。最后，通过 ICAHCI 的方法验证 Tet-TKI-DAH 细胞系的发育潜能。相一致地，Tet-TKI-DAH 能够通过注射到卵子里高效地获

得存活的半克隆小鼠（图 S5S、S5J、表 1 和表 S3）。总之，这些结果表明：利用 DKO-AG-haESCs 进行多基因遗传操作然后通过 ICAHCI 获得相应遗传学特性的 SC 小鼠是一种可行的途径。

实施例 10

携带 sgRNA 文库的 DKO-AG-haESCs 大规模获得杂合突变的 SC 小鼠

A. 携带 sgRNA 文库的 DKO-AG-haESCs 的构建

初始细胞：$IG^{\Delta DMR}$-$H19^{\Delta DMR}$-AGH-1

采用前述 1.5 的方法进行病毒制备及用全基因组 sgRNA 慢病毒文库感染 DKO-AG-haESCs 后，转染表达 Cas9 的 pX330-mCherry 质粒，最终构建获得携带 sgRNA 文库的 DKO-AG-haESCs。

B. 构建半克隆小鼠：

采用前述 1.9 的方法，用前述构建的细胞作为 ICAHCI 的供体构建半克隆小鼠。

半克隆小鼠携带 sgRNA 情况检测：

sgRNA 的检测是通过特定引物 PCR 扩增，然后琼脂糖凝胶电泳跑胶看是否有条带。

Lenti-sg-F ： GTTACTCGAGCCAAGGTCGG

Lenti-sg-R ： GACTCGGTGCCACTTTTTCA

等位基因突变检测：

根据 sgRNA 测序鉴定出插入相应的基因，然后在目的基因 sgRNA 附近常规方法设计上下游引物，PCR，然后测序。

C. 结果

目前，全基因组水平的 sgRNA 文库已经成功建立，并且运用于人和小鼠细胞水平的基因功能缺失筛选中（Koike-Yusa, H., Li, Y., Tan, E.P., Velasco-Herrera Mdel, C., and Yusa, K. (2014). Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. Nature biotechnology 32, 267-273）。本试验证明，DKO-AG-haESCs 能够携带 sgRNA 文库，能通过 ICAHCI 简单地一步法获得大量的突变小鼠模型（图 4A）（这一方法命名为 Lenti-sgRNA+pX330）。本试验使用刚建立好并且比较清楚的小鼠慢病毒文库。这个文库针对 19,150 小鼠编码蛋白的基因设计了 87,897 个 sgRNA。1.0× 10^7 FACS 富集的单倍体细胞系 $IG^{\Delta DMR}$-$H19^{\Delta DMR}$-AGH-1 用全基因组 sgRNA 慢病毒文库进行感染。2 天之后，这些感染的细胞用 puromycin 处理 7 天，随后转染表达 Cas9 的 pX330-mCherry 质粒。表达 *mCherry* 的单倍体细胞指示着 Cas9 的成功转染表达，这种单倍体进行 FACS 富集后用于进行 ICAHCI 实验（图 4B）。为了检测单倍体的基因是否被 CRISPR-Cas9 诱导突变，随机挑取了 7 个单倍体细胞克隆。所有检测的细胞克隆携带有一个 sgRNA，DNA 测序也发现这些目的基因被突变，这说明单倍体细胞能成功地用 CRISPR-Cas9 诱导的基因突变。

通过 3 次独立 ICAHCI 实验，获得了 114 只半克隆小鼠（图 4E 和表 2），其中有 82 只小鼠携带有一个 sgRNA（图 4F）。sgRNA 的 PCR 产物测序发现 43 只 SC 小鼠携带有目的基因一个等位基因的突变，其中有 39 个是携带导致移码的插入或敲除突变（indel）进而造成一个等位基因的功能缺失（图 4G）。有趣地，所有的突变都是一种基因型，说明单倍体细胞在 Cas9 的瞬时表达后实现了基因的突变。而剩余的 39 只，虽然携带一个 sgRNA，但是在需要突变

的位点没有出现 DNA 切割，这个效率和之前在人细胞（Zhou, Y., Zhu, S., Cai, C., Yuan, P., Li, C., Huang, Y., and Wei, W. (2014). High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. Nature 509, 487-491）或小鼠胚胎（Wu, Y., Liang, D., Wang, Y., Bai, M., Tang, W., Bao, S., Yan, Z., Li, D., and Li, J. (2013). Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. Cell Stem Cell 13, 659-662）中所观察到的相一致。这些数据说明携带 sgRNA 文库的 DKO-AG-haESCs 瞬时转染表达 Cas9 通过 ICAHCI 可以实现遗传突变向 SC 小鼠的引入，最终一步获得大量杂合突变的小鼠。

实施例 11

DKO-AG-haESCs 一步法获得 sgRNA 介导的双等位基因突变小鼠

A. 携带 sgRNA 的单倍体细胞的构建

初始细胞：$IG^{\Delta DMR}$-$H19^{\Delta DMR}$-AGH-1

用携带 CRISPR-sgRNA 的慢病毒文库采用 1.5 的方法感染 DKO-AG-haESCs 得到携带 sgRNA 文库慢病毒整合的细胞系。

B. 构建半克隆小鼠：

通过 ICAHCI 将携带 sgRNA 的单倍体的细胞核注入成熟的卵子，然后再向重构的卵子里胞浆注射注入 Cas9 mRNA（这种方案命名为：Lenti-sgRNA+Cas9 injection）。而后胚胎移植构建半克隆小鼠。

半克隆小鼠 sgRNA 检测：参考实施例 9 的方法。

等位基因突变检测：参考实施例 9 的方法。此外，还将目的基因的 PCR 产物连入 pMD19-T 载体中，然后挑克隆测序。

C. 结果

本实验通过 ICAHCI 将携带 sgRNA 的单倍体注入成熟的卵子，然后再向重构的卵子里注入 Cas9（这种方案命名为：Lenti-sgRNA+Cas9 injection）。总共出生了 45 只携带一个 sgRNA 的 SC 小鼠，其中有 22 只发生了基因突变（表 2）。目的基因的 PCR 产物测序发现有 10 只小鼠只有单个等位基因的修饰，而另外 12 只则是双等位基因突变（占所有出生 SC 小鼠的 23.5%）。将 7 只双等位基因突变的 SC 小鼠进行 TA 克隆测序分析发现大约 63%的克隆都是携带插入缺失突变（表 S4）。

实施例 12

DKO-AG-haESCs 一步法获得 sgRNA 介导的双等位基因突变小鼠

A. 采用实施例 10A 的方法构建携带 sgRNA 的单倍体细胞，再将 pX330-mCherry 质粒瞬转进携带 sgRNA 的单倍体细胞。

B. 构建半克隆小鼠：

通过 ICAHCI 将 A 中获得单倍体细胞的细胞核注射到卵子之后接着再用胞浆注射的方法注入 Cas9 mRNA，而后胚胎移植构建半克隆小鼠。

半克隆小鼠 sgRNA 检测：参考实施例 9 的方法。

等位基因突变检测：参考实施例 11 的方法。

C．结果

本试验将 pX330-mCherry 质粒瞬转进携带 sgRNA 的单倍体细胞，注射到卵子之后接着再注入 Cas9 mRNA（图 S6A 和 S6B）（这种方案命名为：Lenti-sgRNA+pX330+Cas9 injection）。总共获得 27 只携带一个 sgRNA 的 SC 小鼠，22 只携带基因突变（图 S6C、S6D 和表 2），其中的突变小鼠中有 13 只携带有双等位基因突变（图 S6E）（占所有 SC 小鼠的 41.9%），另外 9 只小鼠为单等位基因突变。对其中的 5 只双等位基因突变小鼠进行 TA 克隆和测序结果显示约 79%的克隆都是存在插入缺失突变（图 S6F、S6G 和表 S4）

实施例 13

DKO-AG-haESCs 一步法获得 sgRNA 介导的双等位基因突变小鼠

A. Cas9 和 sgRNA 文库持续表达的 DKO-AG-haESCs 的构建

初始细胞：$IG^{\Delta DMR}$-$H19^{\Delta DMR}$-AGH-1

采用 Lenti-Cas9+lenti-sgRNA 法构建细胞系的具体步骤：采用 1.5 中“Cas9 慢病毒与 sgRNA 文库慢病毒双感染”的方法制备。

Cas9 慢病毒和 sgRNA 文库慢病毒整合的细胞系进一步进行流式分选富集单倍体，以用于后续的 ICAHCI 操作。

B. 构建半克隆小鼠：

采用前述 1.9 的方法，将 Cas9 和 sgRNA 文库持续表达的 DKO-AG-haESCs 作为 ICAHCI 的供体构建半克隆小鼠。

等位基因突变检测：参考实施例 11 的方法。

鉴定小鼠突变情况的引物举例：

Polm check-F：TCCGATGGGAAGCCAAAAGC

Polm check-R：CGTACCGCAACCGCGAAGTA

Scube1 check-F：CCATAATAATCCACTTCCAT

Scube1 check-R: CCAACCCCTGTCCACTACCT

C. 结果

本试验通过两轮药物筛选获得 Cas9 和 sgRNA 文库持续表达的 DKO-AG-haESCs，然后用 ICAHCI 技术产生 SC 小鼠（图 5A-D）（这一方案命名：Lenti-Cas9+lenti-sgRNA）。ICAHCI 重构的 1453 颗胚胎中有 272 颗（18.7%）发育到期（图 5E），基本上和 WT DKO-AG-haESCs 或携带不同基因修饰的 DKO-AG-haESCs 有相似的出生效率（表 2），这说明 DKO-AG-haESCs 经过多次基因遗传操作后仍不影响其获得 SC 小鼠的能力。总共有 224 只 SC 小鼠携带一个 sgRNA，并用于后续的基因型分析（图 5F 和表 2）。结果显示有 143 只 SC 小鼠发生基因突变，其中有 83 只是双等位基因突变小鼠（图 5G）。获得了 60 只单等位基因突变的 SC 小鼠，虽然推测这些小鼠的 Cas9 应该是处于持续表达的，但由于病毒载体的沉默导致在 SC 小鼠发育的不同阶段出现 Cas9 的转录沉默。通过对 26 只双等位基因突变的 SC 小鼠进行 TA 克隆和测序显示约 66.3%的克隆都是发生了插入缺失突变（图 5H、I）。为了进一步确定 SC 小鼠整个身体的突变效率，分析了 4 只 SC 小鼠不同器官（包括大脑、心脏、肾脏、肝脏和肺）的基因突变情况，发现这些器官均为双等位基因突变。最后对一只携带 Scube1 基因突变 SC 小鼠

的不同器官进行 TA 克隆和测序。结果显示有约 80%的克隆都发生插入缺失突变（图 5J）。有趣地，这只 SC 小鼠在出生一小时内便死去，这和之前的关于 Scube1 突变小鼠出生后不久死去的研究报道相一致（Tu, C.F., Yan, Y.T., Wu, S.Y., Djoko, B., Tsai, M.T., Cheng, C.J., and Yang, R.B. (2008). Domain and functional analysis of a novel platelet-endothelial cell surface protein, SCUBE1. The Journal of biological chemistry 283, 12478-12488）。总之，上述实验结果为利用携带 sgRNA 文库的 DKO-AG-haESCs 获得大量突变小鼠进而实现小鼠水平上基于基因敲除的大规模筛选这一可能提供了充分的证据，大大简化 DKO-AG-haESCs 介导的基于基因敲除的筛选过程。

表 1、ICAHCI 胚胎体内发育的情况汇总

供体细胞型	单倍体 ES 细胞系	细胞代数	胚胎移植数量	生长阻滞的小鼠数量(%占胚胎移植数量的百分比)	正常小鼠数量(%占胚胎移植数量的百分比)
Single DMR KO AG-haESCs	*H19*$^{\Delta DMR}$-AGH Cells	p8-p17	1443	39 (2.7)	86 (5.9)[c]
	IG$^{\Delta DMR}$-AGH Cells	p8-p23	499	12 (2.4)	4 (0.8)[d]
DKO-AG-haESCs	*H19*$^{\Delta DMR}$-*IG*$^{\Delta DMR}$-AGH Cells	p19-p33	939	4 (0.4)	210 (22.4)
	IG$^{\Delta DMR}$-*H19*$^{\Delta DMR}$-AGH Cells	p24-p28	544	5 (0.9)	105 (19.3)
	H19$^{\Delta DMR}$-*IG*$^{\Delta DMR}$-AGH-OG3 Cells	p26-p37	510	1 (0.2)	87 (17.1)
	Subtotal	p19-p37	1993	10 (0.5)	402 (20.2)[e]
DKO-AG-haESCs 携带 *Tet 1*, *2* and *3* 三突变	Tet-TKO-DAH Cells	p35-p37	407	4 (1)	59 (14.5)
DKO-AG-haESCs 携带 *p53*, *63* and *73* 三突变	p53-TKO-DAH Cells	p41-p46	660	2 (0.3)	111 (16.7)
DKO-AG-haESCs 携带	Tet1&3-KI-DAH-1	p40-p47	138	1 (0.7)	21 (15.2)

Tet1 and *3* 敲入					
DKO-AG-haESCs 携带 *Tet1*, *2* and *3* 敲入	Tet-TKI-DAH-1	p47-p51	874	6 (0.7)	151 (17.3)
WT AG-haESCs	AGH Cells[a]	p9-p20	294	3 (1.0)	2 (0.7)
	AGH-OG-3 Cells[b]	p12-p26	379	6 (1.6)	7 (1.8)
	球形精子		125	0	28 (22.4)

a: AG-haESCs ：本发明制备。见方法1.3

b: AG-haESCs ：来源于现有技术 (Yang, H., Shi, L., Wang, B.A., Liang, D., Zhong, C., Liu, W., Nie, Y., Liu, J., Zhao, J., Gao, X. , et al. (2012). Generation of genetically modified mice by oocyte injection of androgenetic haploid embryonic stem cells. Cell 149, 605-617)是该文献发表者馈赠

c: $H19^{\Delta DMR}$-AGH Cells 相比 WT AG-haESCs $p<0.05$

d: $IG^{\Delta DMR}$-AGH Cells 相比 WT AG-haESCs $p>0.05$

e: DKO-AG-haESCs 相比 WT AG-haESCs $p<0.001$

表 S1 不同 AG-haESCs ICAHCI 胚胎的体内发育情况

供体细胞型	单倍体 ES 细胞系	细胞代数	胚胎移植数量	生长阻滞的小鼠数量(%占胚胎移植数量的百分比)	正常小鼠数量(%占胚胎移植数量的百分比)
H19-DMR KO AG-haESCs	$H19^{\Delta DMR}$-AGH-1	p8	375	10 (2.7)	10 (2.7)
		p9	180	9 (5.0)	13 (7.2)
	$H19^{\Delta DMR}$-AGH-2	p8	210	5 (2.4)	6 (2.9)
		p9	116	2 (1.7)	4 (3.4)
		p11	123	3 (2.4)	3 (2.4)
	$H19^{\Delta DMR}$-AGH-3	p8	271	1 (0.4)	29 (10.7)
		p17	168	9 (5.4)	21 (12.5)
IG-DMR KO AG-haESCs	$IG^{\Delta DMR}$-AGH-1	p14	84	0	0
		p15	100	4 (4)	0
		p17	54	4 (7.4)	1 (1.9)
		p23	81	1 (1.2)	0
	$IG^{\Delta DMR}$-AGH-2	p8	180	3 (1.7)	3 (1.7)
$H19^{\Delta DMR}$-$IG^{\Delta DMR}$-AGH Cells	$H19^{\Delta DMR}$-$IG^{\Delta DMR}$-AGH -1	p19	175	1 (0.6)	44 (25.1)
	$H19^{\Delta DMR}$-*I*	p19	245	2 (0.8)	56 (22.9)

	$G^{\Delta DMR}$-AGH-2				
	$H19^{\Delta DMR}$-$IG^{\Delta DMR}$-AGH-3	p29	204	0	46 (22.5)
	$H19^{\Delta DMR}$-$IG^{\Delta DMR}$-AGH-4	p29	165	1 (0.6)	32 (19.4)
		p33	150	0	32 (21.3)
$IG^{\Delta DMR}$-$H19^{\Delta DMR}$-AGH Cells	$IG^{\Delta DMR}$-$H19^{\Delta DMR}$-AGH-1	p24	120	1 (0.8)	26 (21.7)
	$IG^{\Delta DMR}$-$H19^{\Delta DMR}$-AGH-2	p24	180	2 (1.1)	47 (26.1)
		p28	244	2 (1.3)	32 (22.2)
$IG^{\Delta DMR}$-$H19^{\Delta DMR}$-AGH-OG3 Cells	$IG^{\Delta DMR}$-$H19^{\Delta DMR}$-AGH-OG3-1	p26	118	0	17 (14.4)
	$IG^{\Delta DMR}$-$H19^{\Delta DMR}$-AGH-OG3-2	p30	192	1 (0.5)	36 (18.8)
		p37	200	0	34 (17)
WT AG-haESCs	AGH-OG-3[a]	p12	82	0	1 (1.2)
		p20	93	4 (4.3)	0
		p24	140	2 (1.4)	5 (3.6)
		p26	64	0	1 (0.9)
	AGH-2[b]	p19	114	0	1 (0.9)
		p20	62	3 (4.8)	0
	AGH-3[b]	p9	118	0	1 (1.2)

a: AG-haESCs ： 参考现有技术自制.

b: AG-haESCs ：来源于现有技术 (Yang, H., Shi, L., Wang, B.A., Liang, D., Zhong, C., Liu, W., Nie, Y., Liu, J., Zhao, J., Gao, X. , et al. (2012). Generation of genetically modified mice by oocyte injection of androgenetic haploid embryonic stem cells. Cell 149, 605-617)

表 S3 基因修饰的 DKO-AG-haESCs ICAHCI 胚胎的体内发育情况

供体细胞型	单倍体 ES 细胞系	细胞代数	胚胎移植数量	生长阻滞的小鼠数量(%占胚胎移植数量的百分比)	正常小鼠数量(%占胚胎移植数量的百分比)
DKO-AG-haESCs Carrying *Tet1*, *2* and *3*	Tet-TKO-DAH-1	p37	131	2 (1.5)	17 (13)
	Tet-TKO-DAH-2	p37	54	0	9 (16.7)

Mutations	Tet-TKO-DAH-3	p36	174	1 (0.6)	27 (15.5)
	Tet-TKO-DAH-4	p35	48	1 (2.1)	6 (12.5)
DKO-AG-haESCs 携带 *p53*, *p63* and *p73* 突变	p53-TKO-DAH-1	p42	182	1 (0.5)	34 (18.7)
		p44	186	0	32 (17.2)
	p53-TKO-DAH-2	p41	154	0	23 (14.9)
		p42	48	1 (2.1)	8 (16.7)
	p53-TKO-DAH-3	p46	90	0	14 (15.6)
DKO-AG-haESCs 携带 *Tet1* and *3* 敲入	Tet1&3-KI-DAH-1	p40	58	1 (1.7)	10 (17.2)
		p47	80	0	11 (13.8)
DKO-AG-haESCs 携带 *Tet1*, *2* and *3* 敲入	Tet-TKI-DAH-1	p47	48	1 (2.1)	8 (16.7)
		p49	174	0	32 (19)
	Tet-TKI-DAH-2	p47	96	3 (3)	10 (10.4)
		p50	136	1 (0.7)	22 (16.2)
	Tet-TKI-DAH-3	p49	48	0	8 (16.7)
	Tet-TKI-DAH-4	p50	102	1 (1.0)	14 (13.7)
	Tet-TKI-DAH-5	p51	174	0	39 (22.4)
	Tet-TKI-DAH-6	p51	96	0	18 (18.8)

表 2 **携带 sgRNA 文库的 DKO-AG-haESCs ICAHCI 胚胎的体内发育情况汇总**

策略	胚胎移植数量	SC 小鼠数量(%占胚胎移植数量的百分比)	未携带 sgRNA 的 SC 小鼠数量	携带 sgRNA 的 SC 小鼠数量(n>2)	携带一个 sgRNA 的 SC 小鼠数量	双等位基因突变 SC 小鼠数量	单等位基因突变 SC 小鼠数量
Lenti-sgRNA+pX330	580	114 (19.7)	11	21	82	0	43
Lenti-sgRNA+Cas9 injection	306	51 (16.7)	0	4	47	12	10
Lenti-sgRNA+pX33	238	31 (13.5)	3	1	27	13	9

0+Cas9 injection							
Lenti-Cas 9+lenti-sg RNA	1453	272 (18.7)	22	13	237	83	60

以上的实施例是为了说明本发明公开的实施方案，并不能理解为对本发明的限制。此外，本文所列出的各种修改以及发明中方法、组合物的变化，在不脱离本发明的范围和精神的前提下对本领域内的技术人员来说是显而易见的。虽然已结合本发明的多种具体优选实施例对本发明进行了具体的描述，但应当理解，本发明不应仅限于这些具体实施例。事实上，各种如上所述的对本领域内的技术人员来说显而易见的修改来获取发明都应包括在本发明的范围内。

序列表

<110> 中国科学院上海生命科学研究院
<120> 一种孤雄单倍体胚胎干细胞及其制备与应用
<130> 140709
<160> 16
<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> IG-DMR-sgRNA1 序列
<400> 1
cgtacagagc tccatggcac 20

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> IG-DMR-sgRNA2 序列
<400> 2
ctgcttagag gtactacgct 20

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> H19-3.8K sgRNA-1 序列
<400> 3
catgaactca gaagagactg 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> H19-3.8K sgRNA-2 序列
<400> 4
aggtgagaac cactgctgag 20

<210> 5
<211> 20

<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Tet1 sgRNA 序列
<400> 5
ggctgctgtc agggagctca 20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Tet2 sgRNA 序列
<400> 6
gaaagtgcca acagatatcc 20

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Tet3 sgRNA 序列
<400> 7
aaggagggga agagttctcg 20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> p53 sgRNA 序列
<400> 8
cacctgggct tcctgcagtc 20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> p63 sgRNA 序列
<400> 9
tgggcccggg taatctgtgt 20

<210> 10
<211> 20

<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> p73 sgRNA 序列
<400> 10
tgtcgatagg agtcaaccaa 20

<210> 11
<211> 895
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> TET1 LA 左同源臂序列
<400> 11
aagcttaagg ttcacacaac actaagagct tttcatcagc ctcatctact tctcacctag 60
tgaaagacga atctacagac ttctgtcccc tgcaggcttc ctccgcagaa acatctacct 120
gtacgtacag taaaacagcc tcaggtgggt ttgcagaaac aagtagtatt ctccactgca 180
caatgccttc tggagcacac agtggtgcta atgcagctgc tggggaatgt actggaacgg 240
tgcagcctgc cgaggtggct gctcatcctc accagtctct tcccacagcc gattctcccg 300
ttcatgctga gcctctcact agtccatctg agcagctaac ttctaaccag tcaaaccagc 360
agctccctct cctcagcaat tctcagaaac tggcttcctg tcaggtggaa gatgagcggc 420
accctgaagc ggatgagcct cagcaccccg aggacgataa cttgcctcaa cttgatgaat 480
tctggtcaga cagtgaggag atctacgccg atccttcctt tggtggcgtg gcgatagcac 540
ccattcacgg ctcggtgctc attgagtgcg ctcggaagga gcttcatgct accacctctt 600
tgcgctcccc caaacgaggg gtccctttc gtgtgtccct tgtattctac cagcacaaaa 660
gcctaaacaa gcctaatcat ggttttgata tcaacaaaat taagtgtaaa tgcaaaaaag 720
taacgaaaaa aaagcccgca gaccgggagt gtcctgatgt atcccccgaa gccaatttat 780
cacaccaaat tccttctcga gttgcatcaa ccttaacccg agacaatgtt gttaccgtgt 840
ccccatactc tctcactcat gttgcgggac cctacaatcg ttgggtcgcg tcgac 895

<210> 12
<211> 803
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> TET1 RA 右同源臂序列
<400> 12
taaaggcttc tctcatgtaa tgcctttgct aatgtggtgt agtgggtatt tttgtttgtt 60
tgtttgtttt cttttgtttt tttgtttttt ccggtgctgt taaaaagaaa gtcattctgt 120
tgtttactgt agctttgttt cgcccatttc aactccgacg taaatattaa aaaaaaaaaa 180
agggtgaata cttaactgtg attacatttt gagaattggt agaaggtgaa cattttcagc 240
aaaaataaac tttttatagt tttaaatact taaaggaaca tcttggttag gtgttggcca 300
tgctagaacc atagagtctg gtgctttccc ccgggtttgt ttactattca gagggtttat 360
aacaggttcc tgcaataaga agtaaagacc aagatgtagt gttaactcta cacagttcct 420
ggtgctttaa ccacatcaac acacggagtg atgagctgag tgattgtttt ctggtgccat 480

tgctcaagcc tcttccaatc attgccatcg tgtctgcaca tttctttgaa gtaaaccaat 540
gaaatgcttt ttctcttaaa acatttctcc tatataaagt agttctctat tctcatgatg 600
gttggaagct gttcgctaac tataaatgta tatattttaa aaagcacttt ctacttttaa 660
gagtaacttg aaatagtata gtagcagaat cctattgtct attatgtgtg catatttgaa 720
taccagagaa gtcatttgtt cttgctctgt agagtcccat cccgttaacc tcagcctgta 780
ctcaaataac acacggcttc tgt 803

<210> 13
<211> 809
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> TET3 LA 左同源臂序列
<400> 13
ctggtcccag cctaactgag aagccatggg ggatgggaac cggggatttc aaccccgccc 60
tgaaaggtgg acctgggttc caagacaagt tgtggaatcc tgtgaaggtg gaggagggca 120
ggattcccac accgggggcc aacccgctag acaaagcctg gcaagccttt ggcatgccct 180
tgagctccaa cgagaagcta tttggggccc tgaagtcaga ggagaaactg tgggatccct 240
tcagcctgga ggaggggaca gctgaggagc cccccagcaa gggggtggtg aaggaagaga 300
agagtggacc cacagtggaa gaggacgagg aggaactgtg gtcggacagt gaacacaact 360
tcctggatga gaacataggc ggggtggccg tggcccccgc ccattgctcc atcctcatcg 420
agtgtgcccg gcgagagctg catgccacca ctccactcaa aaaacccaac cgctgccacc 480
ccacccgcat ctcgctggtc ttctaccaac acaagaacct caaccagccc aaccacgggc 540
tggcgctctg ggaggccaag atgaagcagc tggcggaacg ggcgcggcag cggcaagagg 600
aggccgcacg cctgggcctg ggccagcagg aggccaagct ctacgggaag aagcgaaaat 660
ggggggggtgc tatggtggct gagccccagc acaaagaaaa gaaggggggct atccctaccc 720
ggcaggcgct ggccatgccc acagactccg cggtcaccgt gtcctcttac gcctacacaa 780
aggtcactgg cccctacagc cgctggatc 809

<210> 14
<211> 837
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> TET3 RA 右同源臂序列
<400> 14
taggtgccag gagccagcgt acctcagcgt cgggcccggc ccgagctgct ctgtggtgct 60
tttgccctca tgcccggggg cgggttgggg gtgcagaagt ctctctatat ctacatatat 120
ggatatgctt atcatatata tgtatttatg gtccaaacct cagaactgac ccgccctccc 180
tcctcttctt ccccagcact ttgaagaaac tacggctgtc gggtgatttt ttttttttt 240
tgatcttaat atttatatct ccacgtttta tttttcccct tgttttgagg gggcttttat 300
tttccttttg tttttaaaac tttatccttg tatatcacaa taatggaaag aaagtttata 360
gtgtcctttc acaaaggagc gtagttttaa aattccattt aaaatatgta tttattgggt 420
ttttttaaag caacaatagt aatgggttac aggtgggcag gaaaggccgg cagtgcttcc 480
tgcctggcaa gcccagcctc ctgggggctg caggctctct cagccatctg ccccacaaac 540

caaggttagc atgtagccct ggtctatccc tccttcccac aggctgggga gccttttggg 600
accaccccgt tctcctctgt ggaatggggg aagctgcaga catctggggg cctggcctgg 660
aaatgctggt gttagatatc cccagaaacc aggttggaag tagacagctt caagcttgct 720
agtctccaca ctgaatcctc tctgtccgtt atttaccaag tcatatgatg tcctggttcg 780
ctaggcagca cctcaagctg gagcaggagt cgagaggctc cgaggagctc ttctcgt 837

<210> 15
<211> 824
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> TET2 LA 左同源臂序列
<400> 15
caaatgtaca ccacctagca acgttttctc cttaccccac ccccaagatg gatagtcatt 60
tcatgggagc tgcctccaga tcaccataca gccacccaca cactgactac aaaaccagtg 120
agcatcatct accctctcac acgatctaca gctacacggc agcagcttcg gggagcagtt 180
ccagccacgc cttccacaac aaggagaatg acaacatagc caatgggctc tcaagagtgc 240
ttccagggtt taatcatgat agaactgctt ctgcccaaga actattatac agtctgactg 300
gcagcagtca ggagaagcag cctgaggtgt caggccagga tgcagctgct gtgcaggaaa 360
ttgagtattg gtcagatagt gagcacaact ttcaggatcc ttgcattgga ggggtggcta 420
tagctccaac tcatgggtca attcttattg agtgtgcaaa gtgtgaggtt catgccacaa 480
ccaaagtaaa cgatcccgac cggaatcacc ccaccaggat ctcacttgta ctgtataggc 540
ataagaattt gtttctacca aaacattgtt tggctctctg ggaagccaaa atggctgaaa 600
aggcccggaa agaggaagag tgcggaaaga atggatcaga ccacgtgtct cagaaaaatc 660
atggcaaaca ggaaaagcgt gagcccacag ggccacagga acccagttac ctgcgtttca 720
tccagtctct tgctgagaac acagggtctg tgactacgga ttctaccgtg actacatcac 780
catatgcttt cactcaggtc acagggcctt acaacacatt tgta 824

<210> 16
<211> 792
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> TET2 RA 右同源臂序列
<400> 16
tgacgctggc cattaggcca gaccaccaag gacgacctgt gagcagtatg tctttcatgg 60
catgggccgt agggacaggt cacagcatct gtgacaaatg cagtgtgtgt ttgtgtgtat 120
gtttattggg gggggctgt cagctcacca gcaaaatagt ttattttatc attatattta 180
atctctcccg tggtccatgg tggcattcag gaagagcatc ctatgcaagg gcacagtggg 240
aaggaagcgc tggacatttg tcttgaaaac cactggttct cttattggct gaggtcatgc 300
gtgtgccatg cccctcagca ctctacacgt aactgcttct agtactcagc gtgtgtaacc 360
gtgggacaca gcgctgtagt agagcagttg caggatcatc tggtgctgac gtatgatgta 420
ctgaagaaat actggaacta agacttttta acatgcaggt tttttactgt aatcttaata 480
acttatttat caaagtagct acagaaagct taagtgaata atggcaaaac actgaatctg 540
tttgggtgtt aacattaaat ggtgctacaa atggtgtttt taatagctga aaaatcaatg 600

ccttctatca tctagccagt gtggtcgagg gccctggagg cactggggta cctctgattt 660
tacatttcta tcttaattat tcagcttagt ttttaaaatg tggacatttc aaaggcctct 720
ggattgtagt tatccaccga tgtccttgta ggactataat gtatagatat gcacacttac 780
acatgtgtac tg 792

权利要求书

1. 一种孤雄单倍体胚胎干细胞，所述孤雄单倍体胚胎干细胞的 H19 DMR 及 IG-DMR 被敲除。
2. 如权利要求 1 所述孤雄单倍体胚胎干细胞，其特征在于，所述孤雄单倍体胚胎干细胞来源于哺乳动物，较优选来源于啮齿动物，优选来源于鼠，最优选来源于小鼠。
3. 一种孤雄单倍体胚胎干细胞的制备方法，包括将孤雄单倍体胚胎干细胞的 H19 DMR 及 IG-DMR 敲除获得所述孤雄单倍体胚胎干细胞。
4. 如权利要求 3 所述的孤雄单倍体胚胎干细胞的制备方法，其特征在于，采用 CRISPR/Cas9 介导的基因操作敲除 H19 DMR 及 IG-DMR。
5. 如权利要求 3 所述的孤雄单倍体胚胎干细胞的制备方法，其特征在于，还包括对所述孤雄单倍体胚胎干细胞进行了单个或者多个感兴趣目标基因的改造。
6. 如权利要求 1 或 2 所述孤雄单倍体胚胎干细胞的用途，为用于构建基因改造的半克隆动物。
7. 一种构建基因改造半克隆动物的方法，包括：将 H19 DMR 及 IG-DMR 被敲除的孤雄单倍体胚胎干细胞与卵细胞结合获得半克隆胚胎，培育所述半克隆胚胎获得半克隆动物。
8. 如权利要求 7 所述构建基因改造半克隆动物的方法，其特征在于，以 H19 DMR 及 IG-DMR 被敲除的孤雄单倍体胚胎干细胞为 ICAHCI 的供体，采用 ICAHCI 法获得半克隆胚胎。
9. 如权利要求 7 所述构建基因改造半克隆动物的方法，其特征在于，所述 H19 DMR 及 IG-DMR 被敲除的孤雄单倍体胚胎干细胞的单个或者多个感兴趣目标基因经改造。
10. 如权利要求 7 所述基因改造动物，其特征在于，所述半克隆动物为非人哺乳动物，较优选为啮齿动物，更优选为鼠，最优选为小鼠。
11. 一种基因改造动物，为由权利要求 7-10 任一权利要求所述方法构建获得的半克隆动物，或者为权利要求 7-10 任一权利要求所述方法构建的半克隆动物的有性繁殖后代。
12. 一种构建基因改造半克隆动物文库的方法，选自以下任一：

    方法一，包括下列步骤：

    1）以 sgRNA 慢病毒文库质粒制备的病毒颗粒感染权利要求 1 所述的孤雄单倍体

胚胎干细胞，获得携带 sgRNA 文库的孤雄单倍体胚胎干细胞文库；

2）以携带 sgRNA 文库的孤雄单倍体胚胎干细胞库中的孤雄单倍体胚胎干细胞作为 ICAHCI 的供体，利用表达 Cas9 的载体和/或 Cas9 的 mRNA，采用 ICAHCI 法获得半克隆胚胎文库；

3）培育所述半克隆胚胎文库中的胚胎获得半克隆动物文库；

方法二，包括下列步骤：

1）以表达 Cas9 的慢病毒颗粒和 sgRNA 慢病毒文库制备的病毒颗粒感染权利要求 1 所述的孤雄单倍体胚胎干细胞，获得携带 sgRNA 文库以及 Cas9 持续表达的孤雄单倍体胚胎干细胞文库；

2）以携带 sgRNA 文库以及 Cas9 持续表达的孤雄单倍体胚胎干细胞文库中的孤雄单倍体胚胎干细胞作为 ICAHCI 的供体，采用 ICAHCI 法获得半克隆胚胎文库；

3）培育所述半克隆胚胎文库中的胚胎获得半克隆动物文库。

13. 如权利要求 12 所述构建基因改造半克隆动物文库的方法，其特征在于，所述方法一中的步骤 2）可选自以下任一：

方法 A：

向携带 sgRNA 文库的孤雄单倍体胚胎干细胞文库进一步转染表达 Cas9 的质粒，将获得的孤雄单倍体胚胎干细胞作为 ICAHCI 的供体，采用 ICAHCI 法获得半克隆胚胎。

方法 B：

以携带 sgRNA 文库的孤雄单倍体胚胎干细胞文库的孤雄单倍体胚胎干细胞作为 ICAHCI 的供体，采用 ICAHCI 法注入成熟卵子，再向重构的卵子注入 Cas9 mRNA 获得半克隆胚胎。

方法 C：

向携带 sgRNA 文库的孤雄单倍体胚胎干细胞文库进一步转染表达 Cas9 的质粒，将获得的孤雄单倍体胚胎干细胞作为 ICAHCI 的供体，采用 ICAHCI 法注入成熟卵子，再向重构的卵子注入 Cas9 mRNA 获得半克隆胚胎。

14. 如权利要求 13 所述的构建基因改造半克隆动物文库的方法，其特征在于，所述表达 Cas9 的质粒为 pX330-mCherry 质粒。

15. 如权利要求 12 所述的构建基因改造半克隆动物文库的方法，其特征在于，所述半克隆动物文库中的动物为杂合子和/或双等位基因突变的动物。

16. 如权利要求 12 所述的构建基因改造半克隆动物文库的方法，其特征在于，所述半

克隆动物文库为非人哺乳动物文库，较优选为啮齿动物文库，更优选为鼠文库，最优选为小鼠文库。

17. 一种基因改造半克隆动物文库，由权利要求 12-16 任一权利要求所述的构建基因改造半克隆动物文库的方法构建获得。

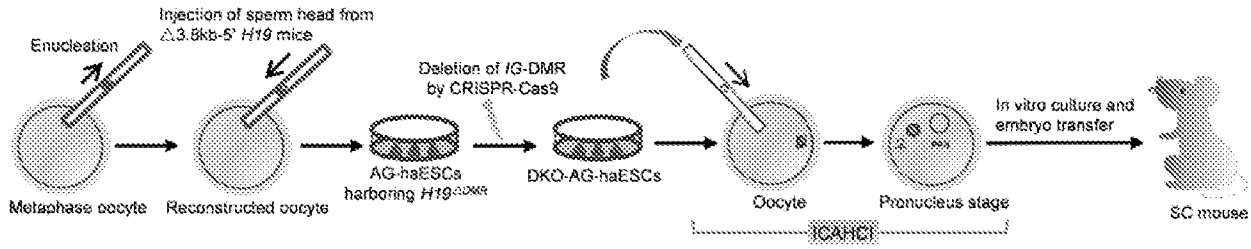


图 1A

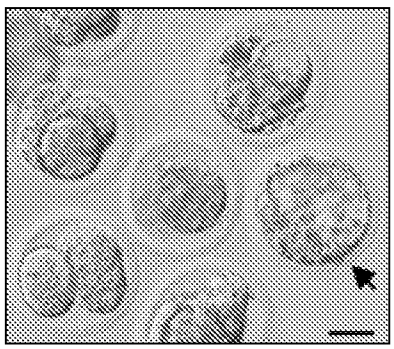


图 1B

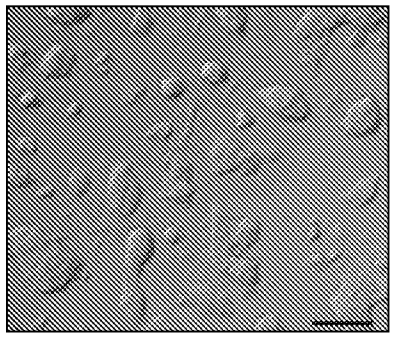


图 1C

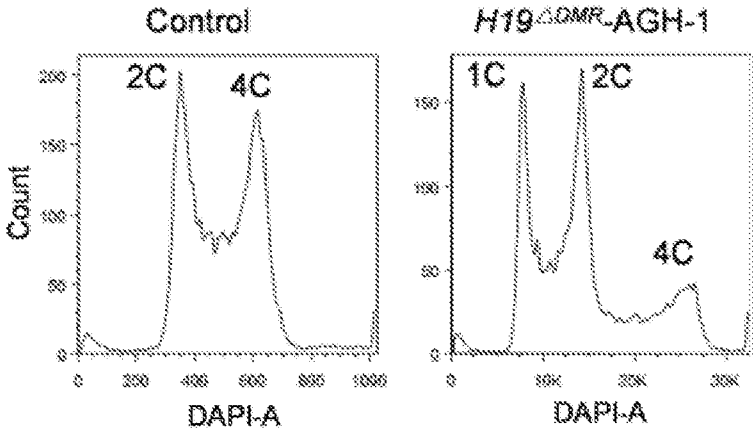


图 1D

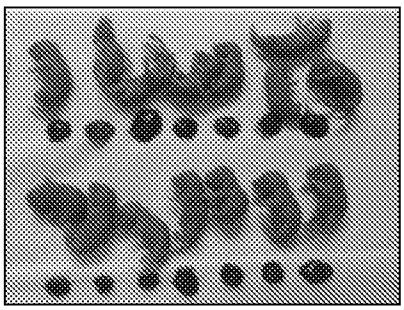


图 1E

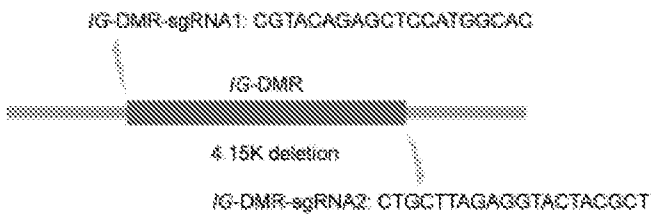


图 1F

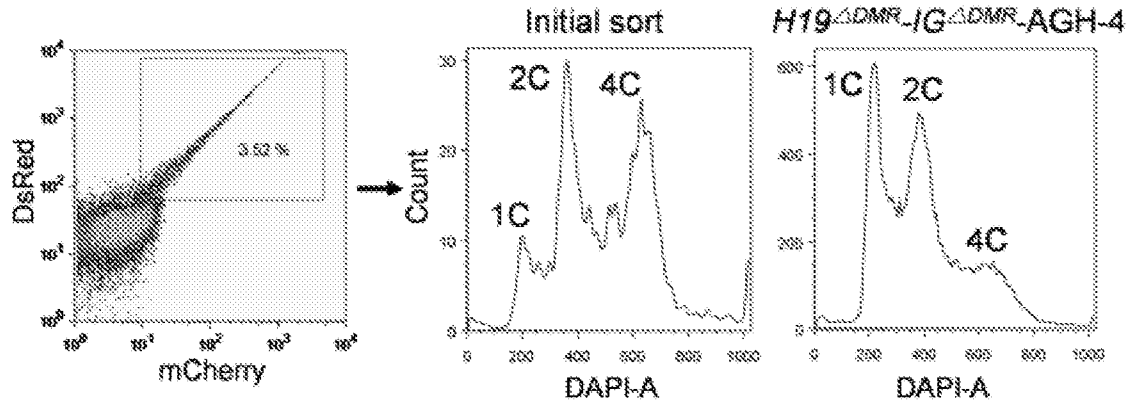


图 1G

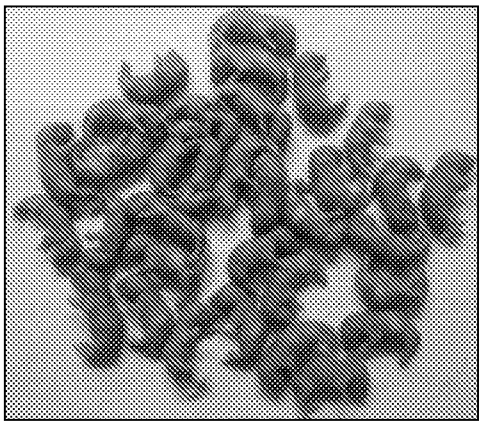


图 1H

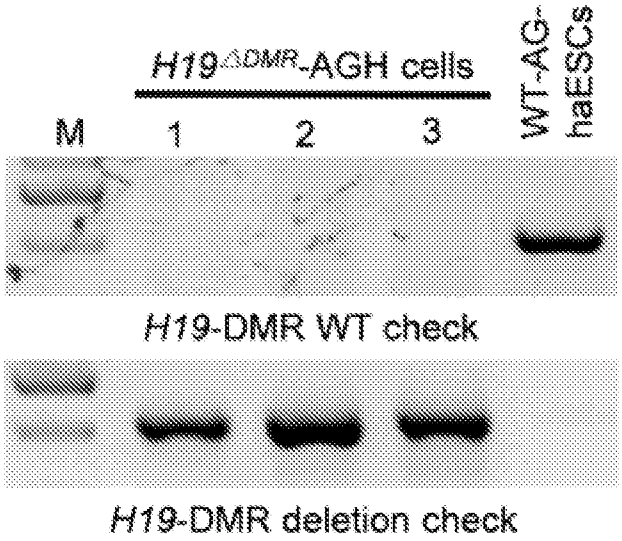


图 S1A

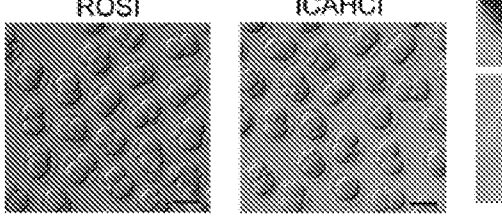


图 S1B

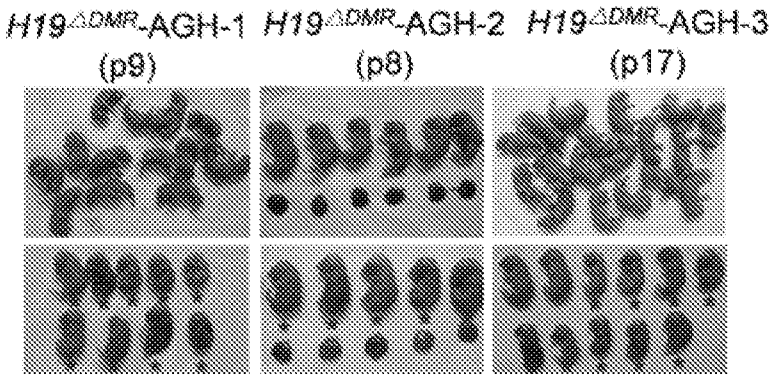


图 S1C

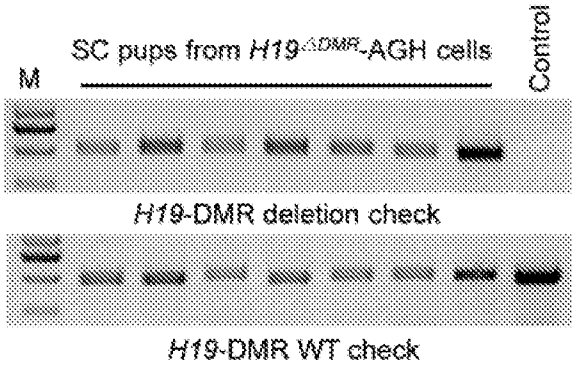


图 S1D

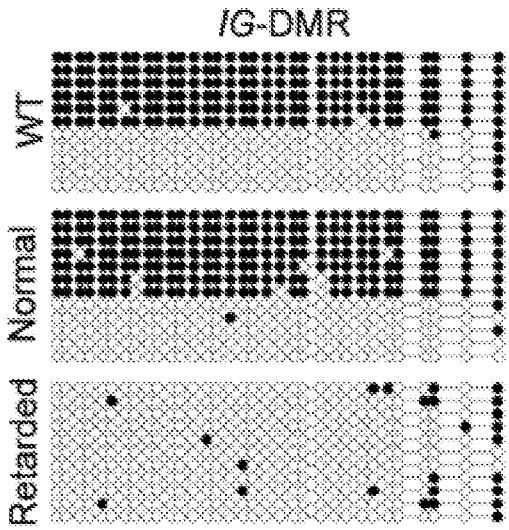


图 S1F

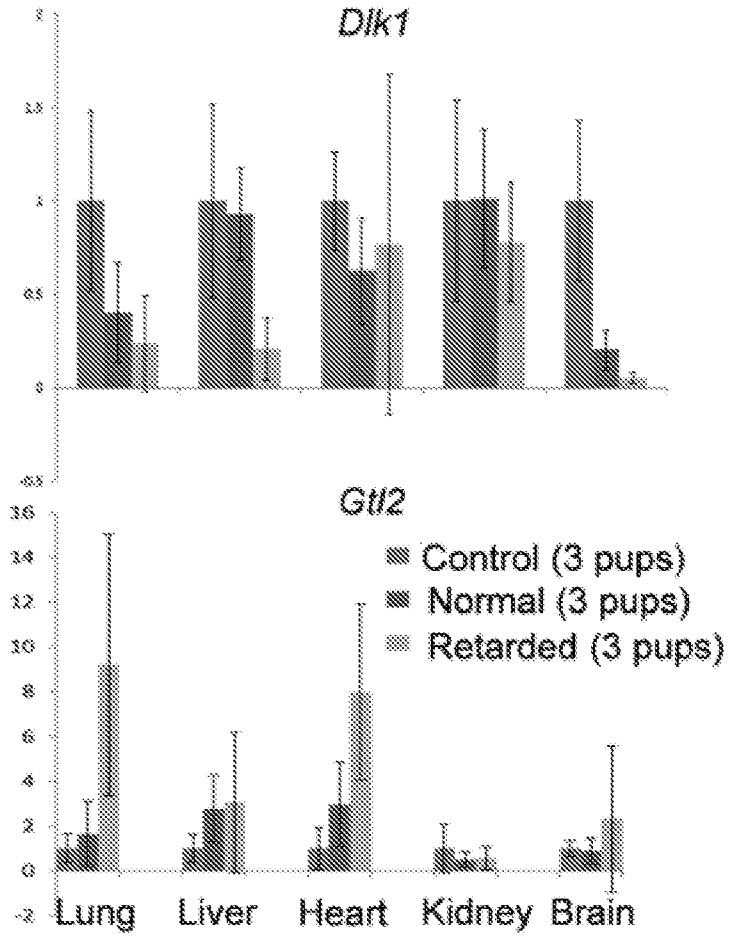


图 S1E

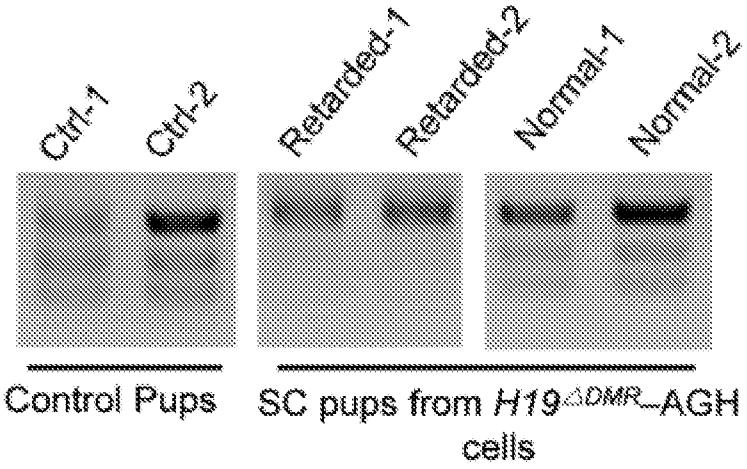


图 S1G

图 2A

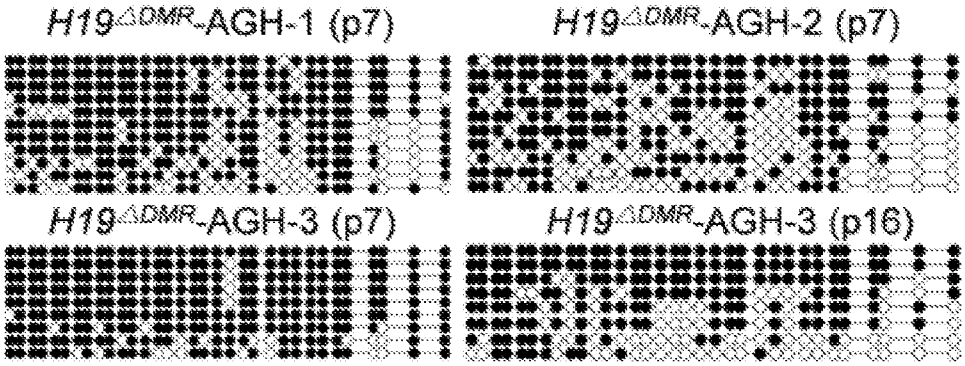


图 S1H

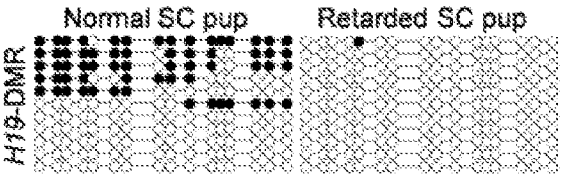


图 2B

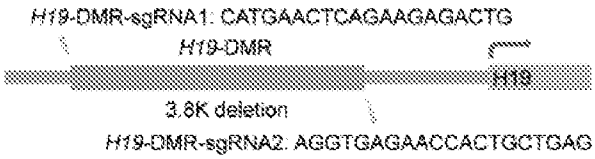


图 2C

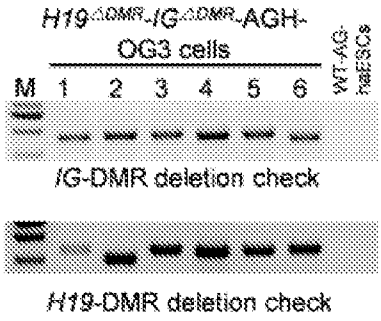

H19△DMR-IG△DMR-AGH-OG3 cells
M 1 2 3 4 5 6
WT-AG-haESCs
IG-DMR deletion check
H19-DMR deletion check

图 2D

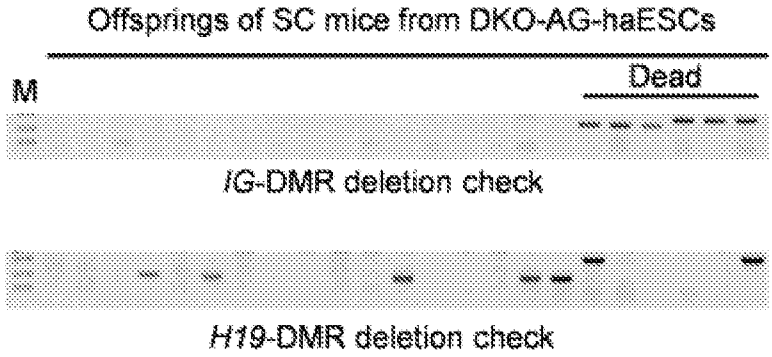

Offsprings of SC mice from DKO-AG-haESCs
M
Dead
IG-DMR deletion check
H19-DMR deletion check

图 2E

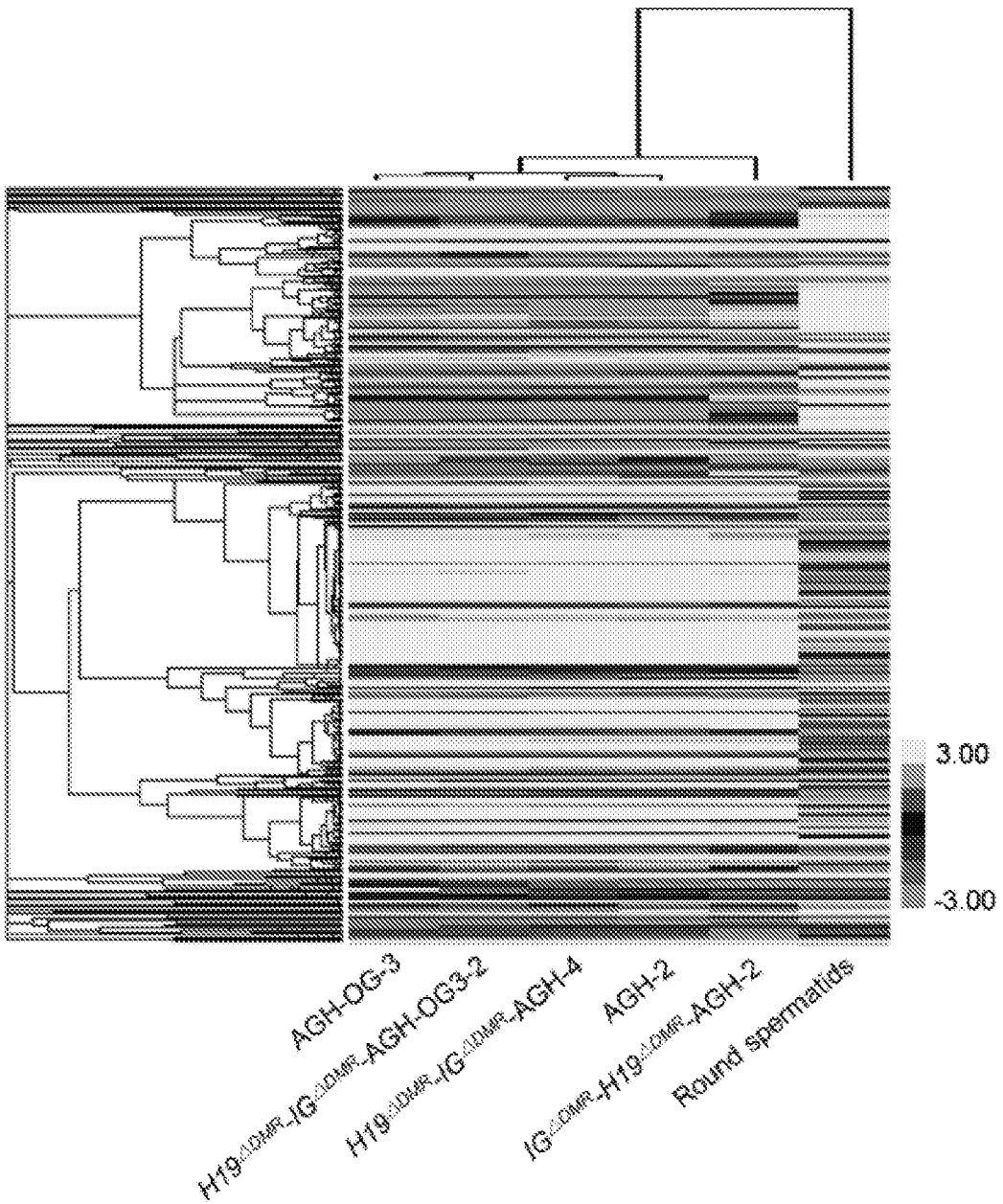

3.00
-3.00
AGH-OG-3
H19△DMR-IG△DMR-AGH-OG3-2
H19△DMR-IG△DMR-AGH-4
AGH-2
IG△DMR-H19△DMR-AGH-2
Round spermatids

图 2F

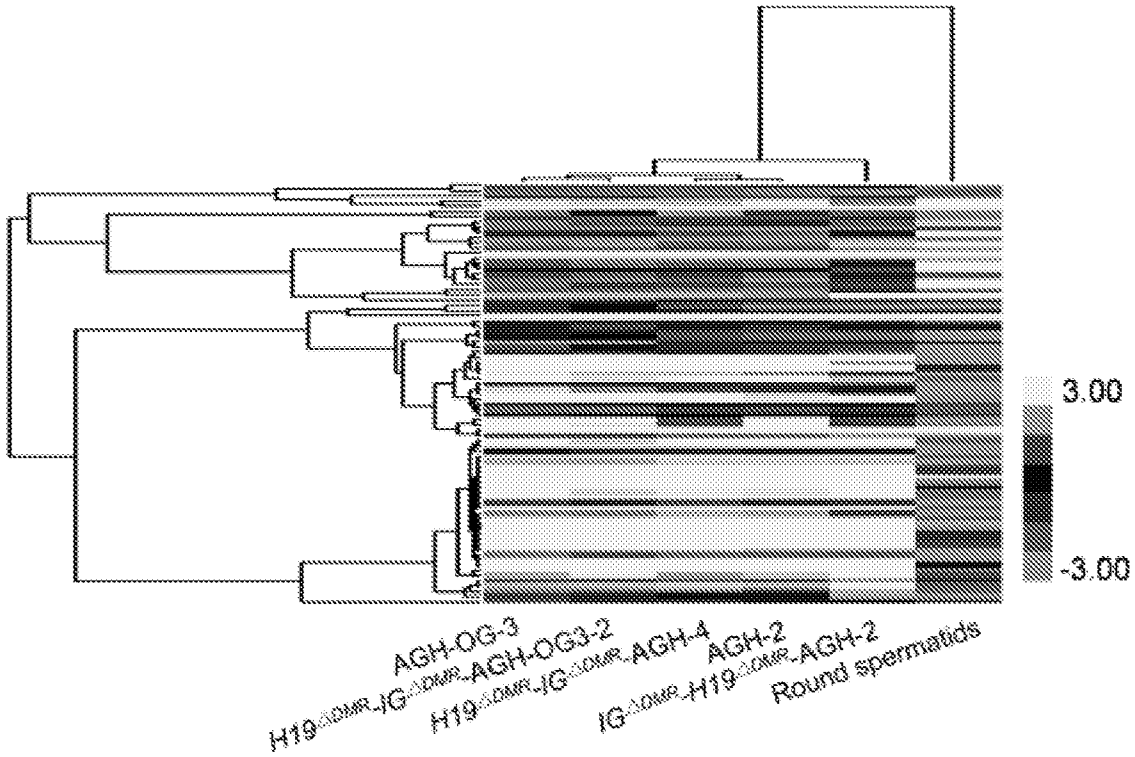

3.00
-3.00
AGH-OG-3
H19△DMR-IG△DMR-AGH-OG3-2
H19△DMR-IG△DMR-AGH-4
AGH-2
IG△DMR-H19△DMR-AGH-2
Round spermatids

图 2G

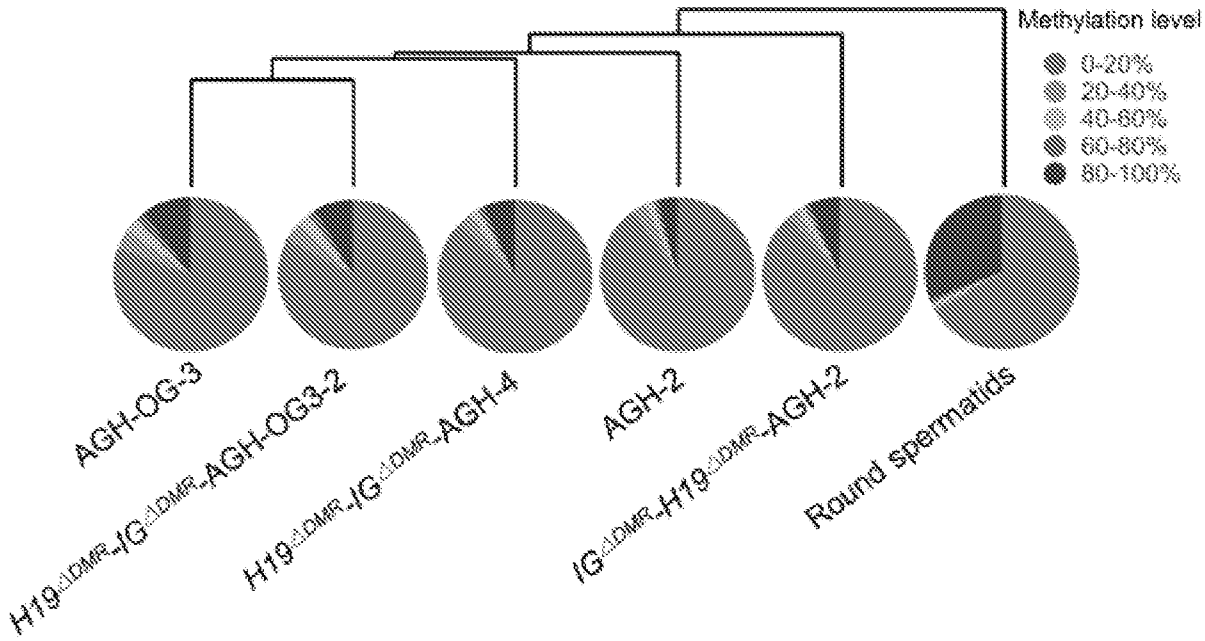

Methylation level
0-20%
20-40%
40-60%
60-80%
80-100%
AGH-OG-3
H19△DMR-IG△DMR-AGH-OG3-2
H19△DMR-IG△DMR-AGH-4
AGH-2
IG△DMR-H19△DMR-AGH-2
Round spermatids

图 2H

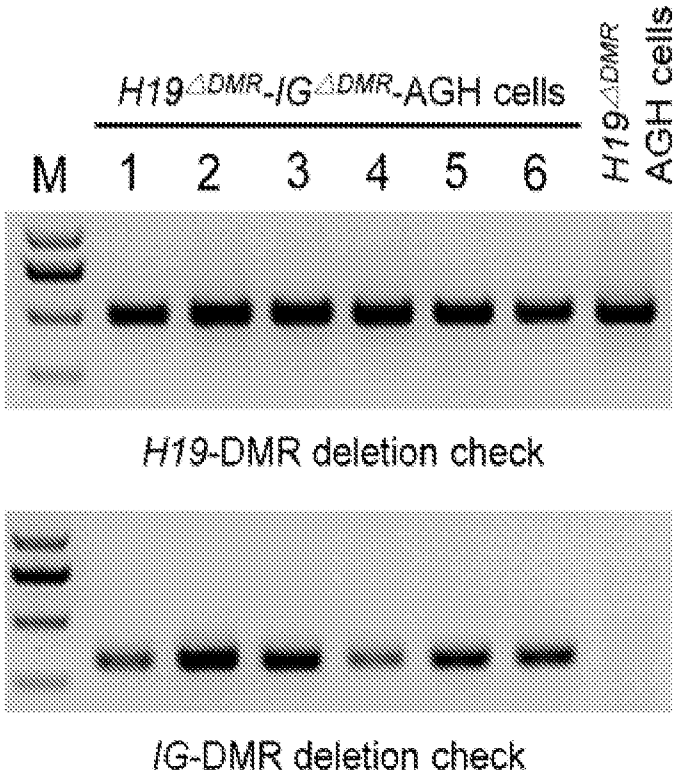


图 S2A

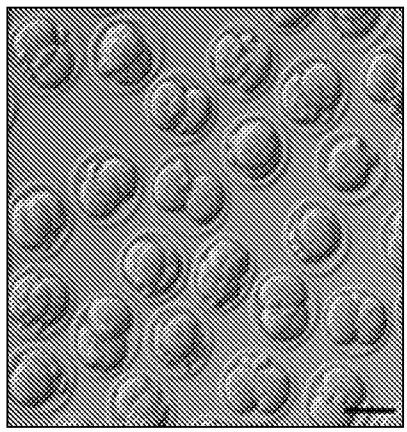


图 S2C

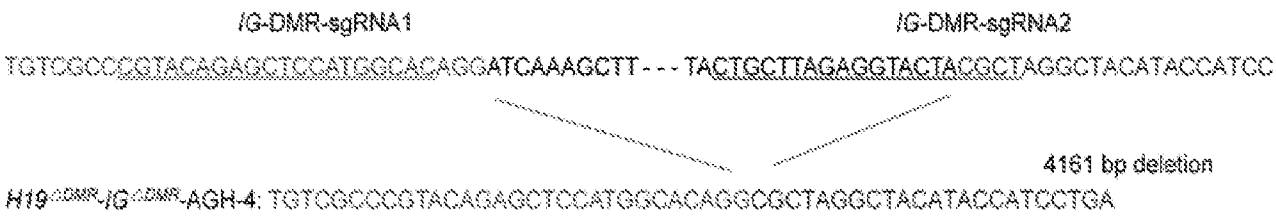


图 S2B

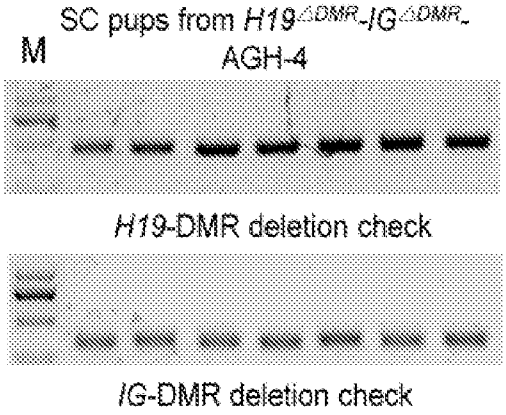


图 S2D

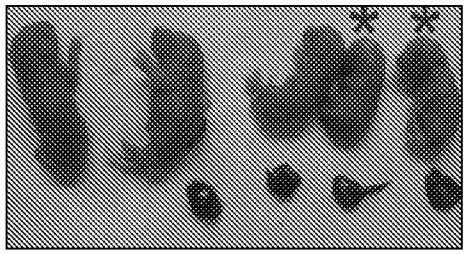


图 S2E

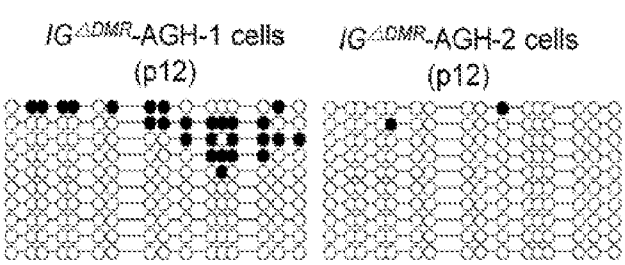


图 S2F

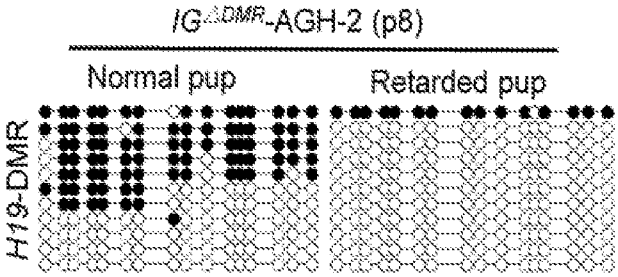


图 S2G

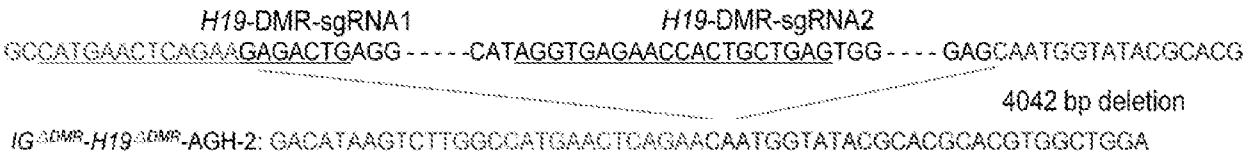


图 S2H

图 S2I

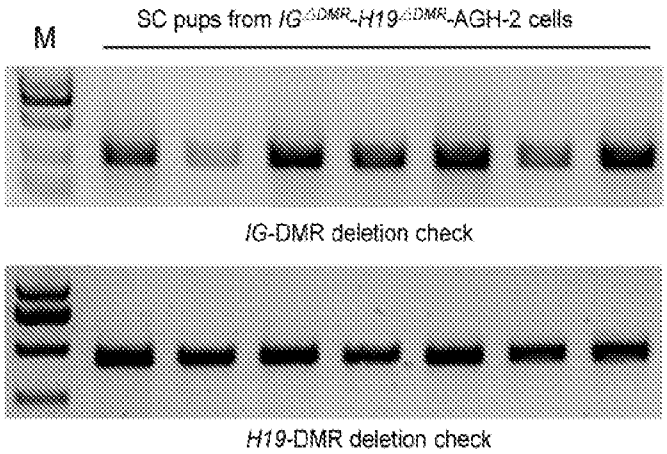


图 S2J

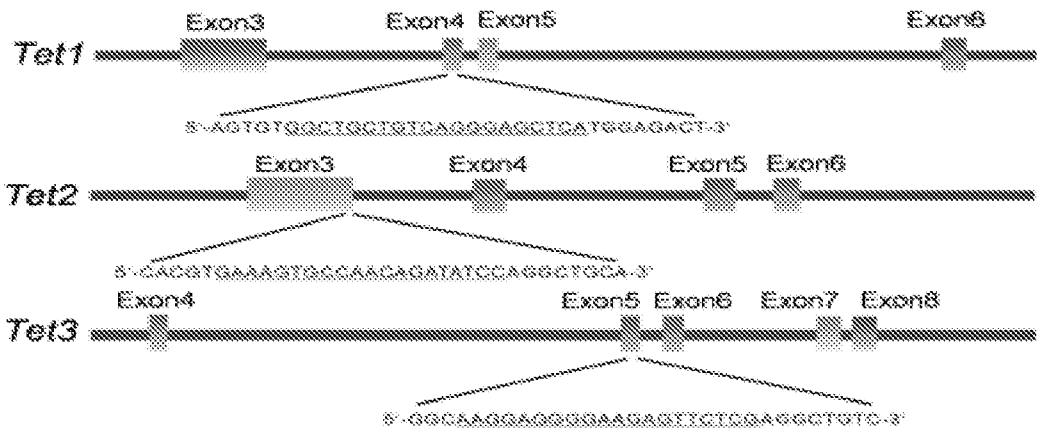


图 3A

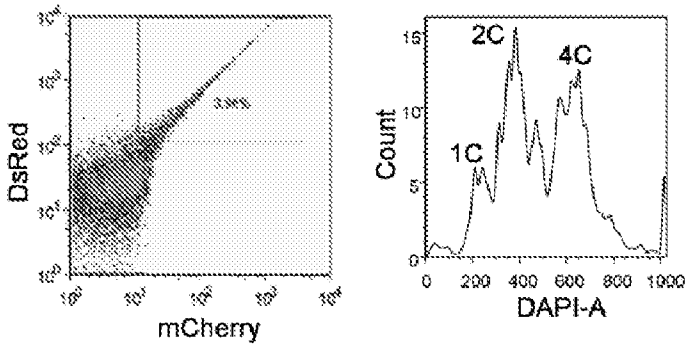


图 3B

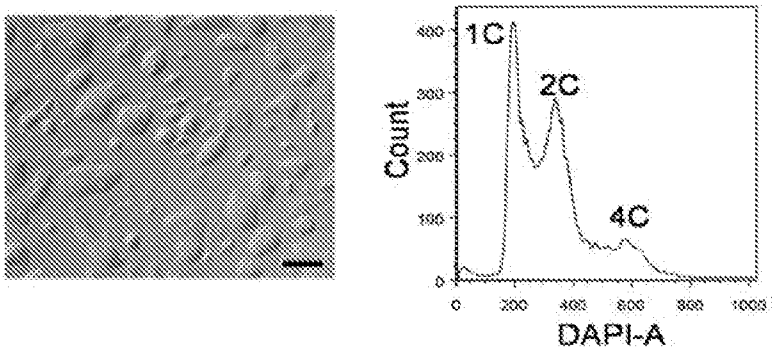


图 3C

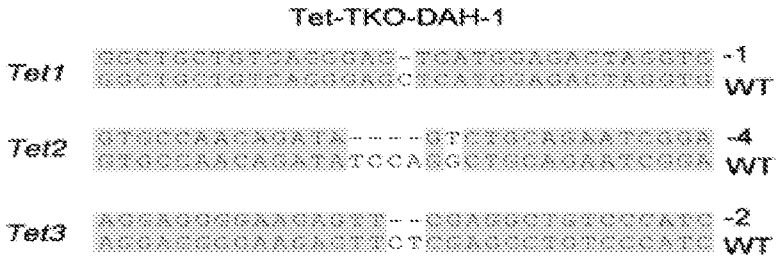


图 3D

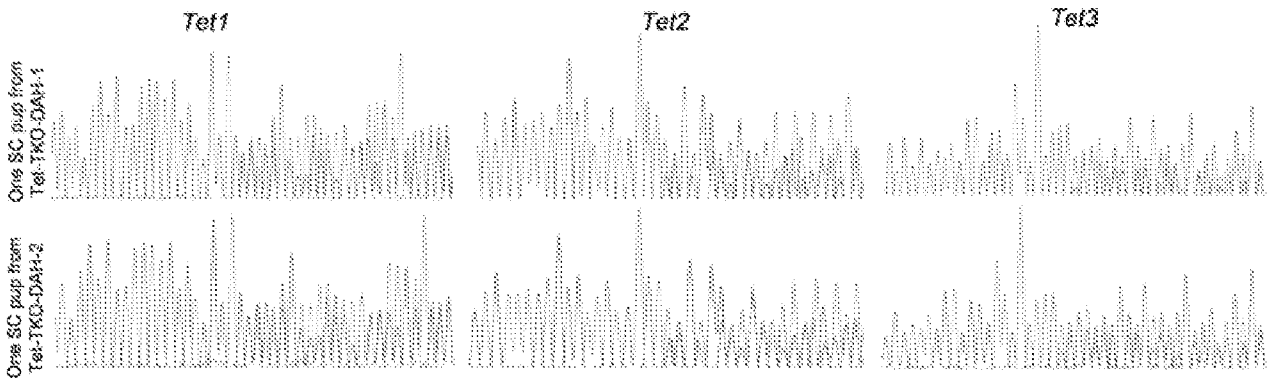


图 3E

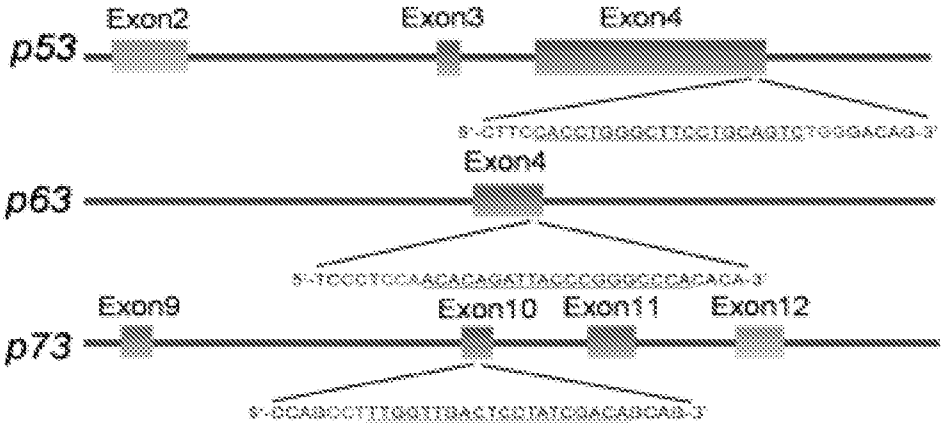


图 3F

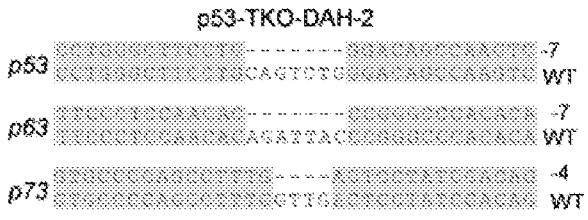


图 3G

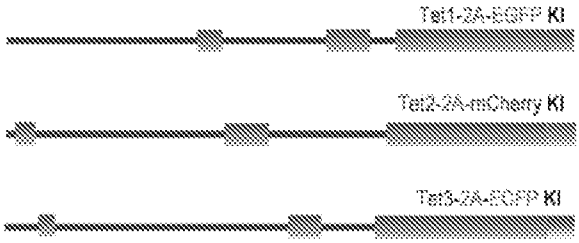


图 3H

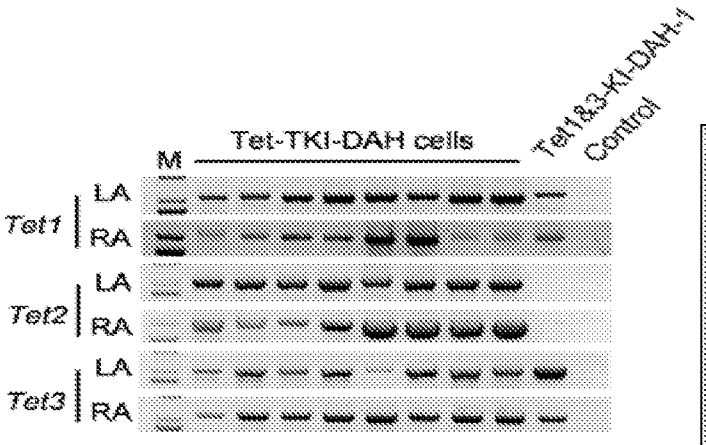


图 3I

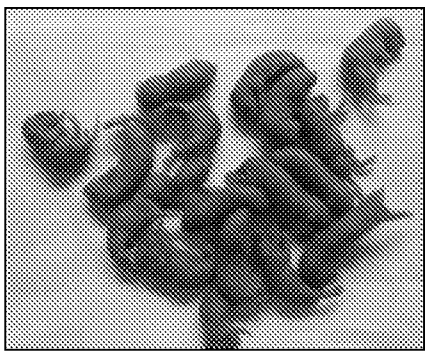


图 S3B

H19$^{\Delta DMR}$/*IG*$^{\Delta DMR}$-AGH-OG3-1 (*IG* KO): GTTTGCCGTTTTCAGGATGGTATGTACCCTACCCATGGAGCTCTGTACGGGCGACATGA 4170 bp deletion
H19$^{\Delta DMR}$/*IG*$^{\Delta DMR}$-AGH-OG3-1 (*H19* KO): TCAAGGGCTGACCAGTCATGACCACTCATCATGGCCAAGACTTATGTCCTAAACTCACA 3896 bp deletion
H19$^{\Delta DMR}$/*IG*$^{\Delta DMR}$-AGH-OG3-2 (*IG* KO): TGTGTGTGTGTGTACATACAAGCCTACATGTATCTCTGTACGGGCGACATGAGCATGAC 4221 bp deletion
H19$^{\Delta DMR}$/*IG*$^{\Delta DMR}$-AGH-OG3-2 (*H19* KO): GGAGGACTCAAGGGCTGACCAGTCATGACCACTTCTGAGTTCATGGCCAAGACTTATG 3904 bp deletion

图 S3A

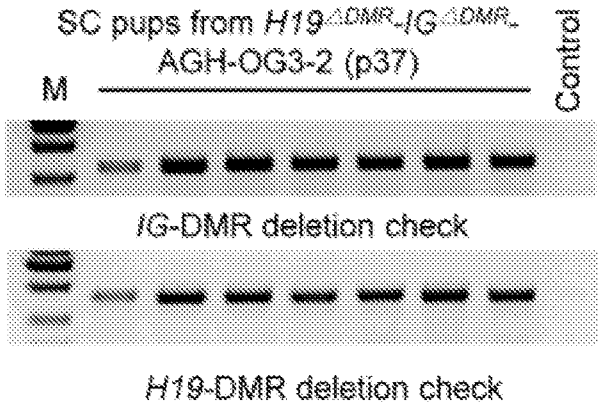


图 S3C

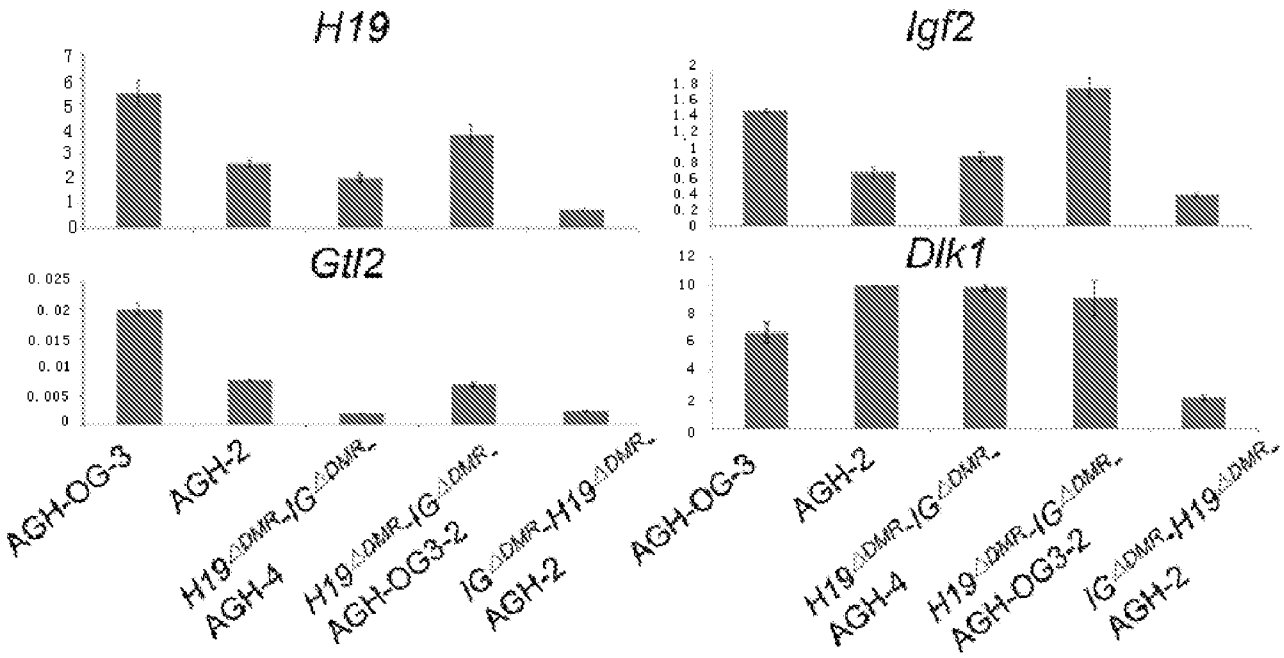


图 S3D

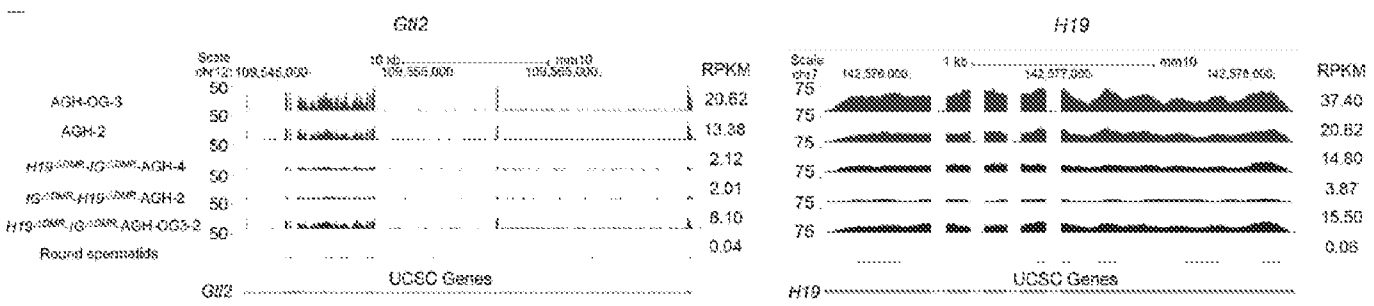


图 S3E

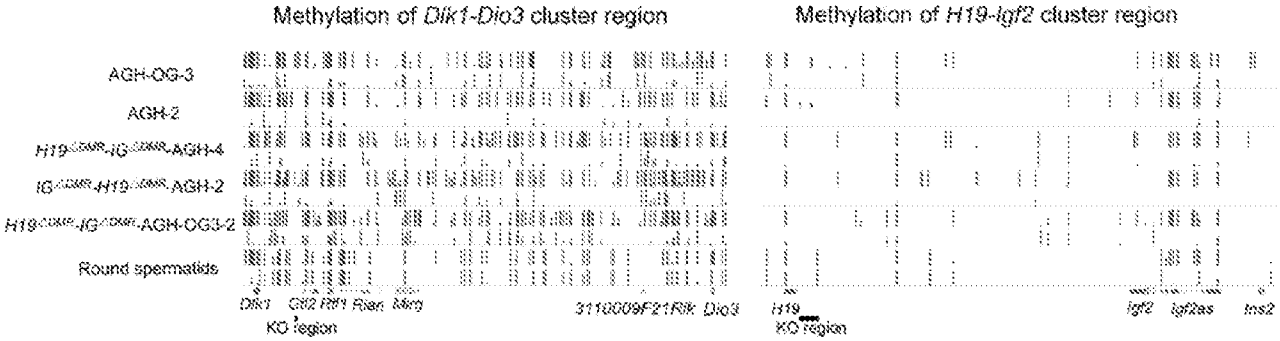

Methylation of Dlk1-Dio3 cluster region
Methylation of H19-Igf2 cluster region
AGH-OG-3
AGH-2
H19DMR-IG DMR-AGH-4
IG DMR-H19 DMR-AGH-2
H19DMR-IG DMR-AGH-OG3-2
Round spermatids
Dlk1 Gtl2 Rtl1 Rian Mirg
3110009F21Rik Dio3
KO region
H19
Igf2 Igf2as Ins2
KO region

图 S3F

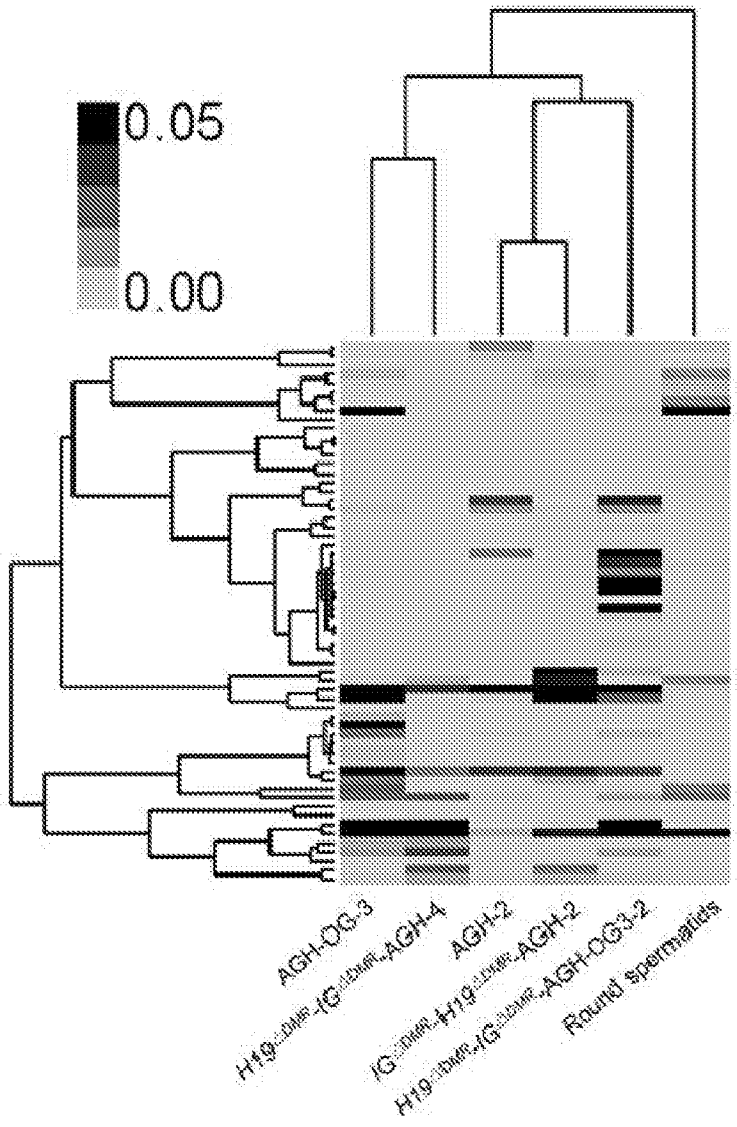

0.05
0.00
AGH-OG-3
H19DMR-IG DMR-AGH-4
AGH-2
IG DMR-H19 DMR-AGH-2
H19DMR-IG DMR-AGH-OG3-2
Round spermatids

图 S3G

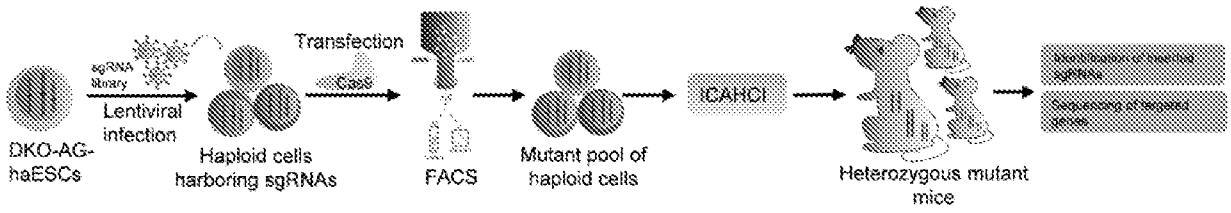


图 4A

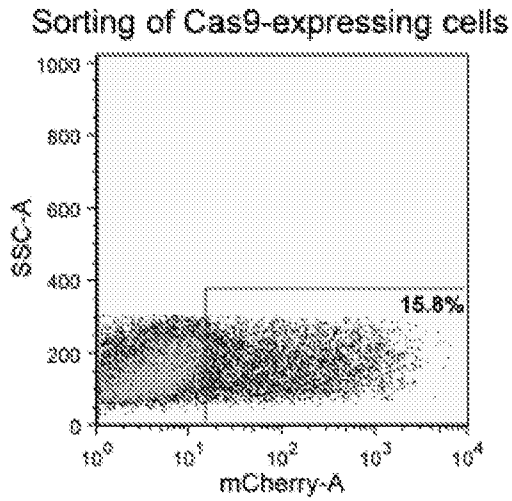


图 4B

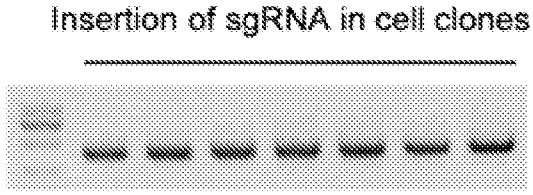


图 4C

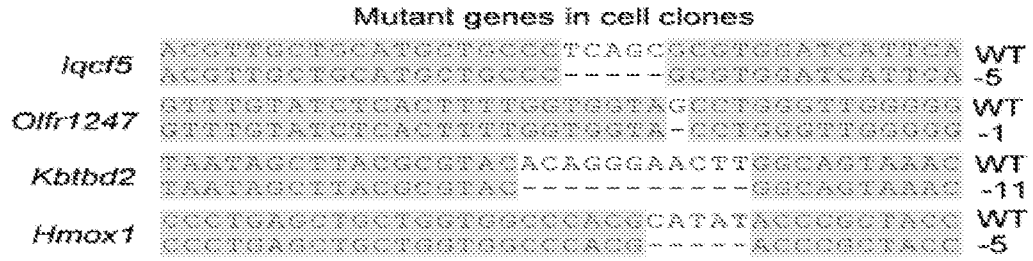


图 4D

图 4E

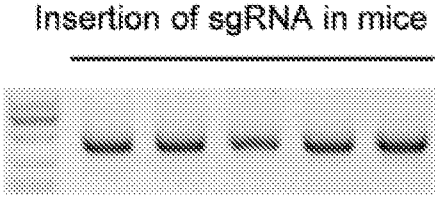


图 4F

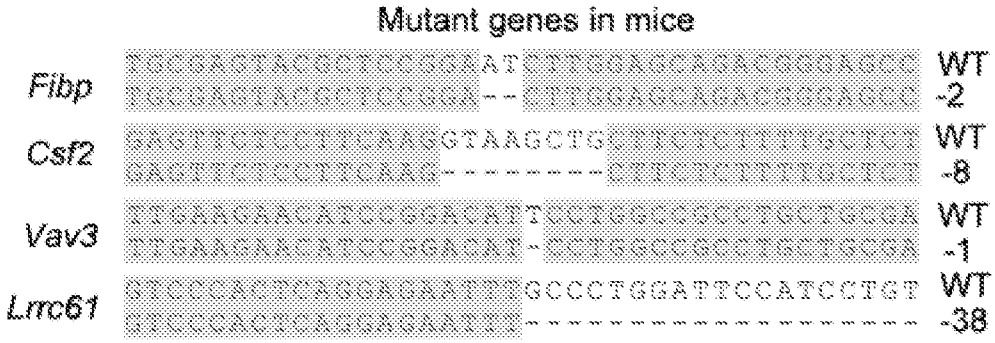


图 4G

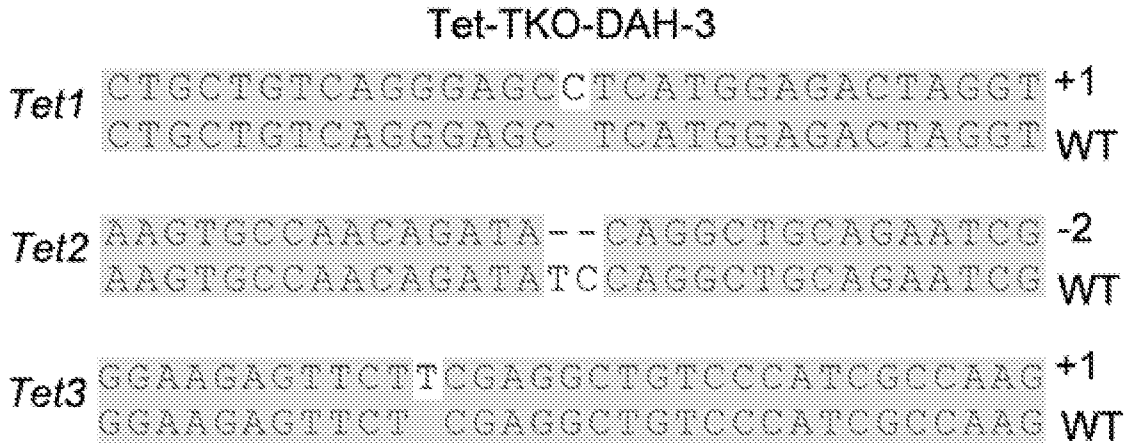


图 S4A

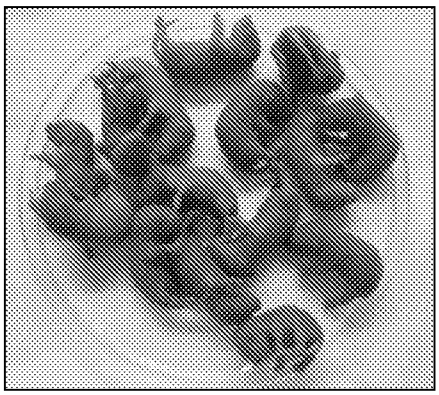


图 S4B

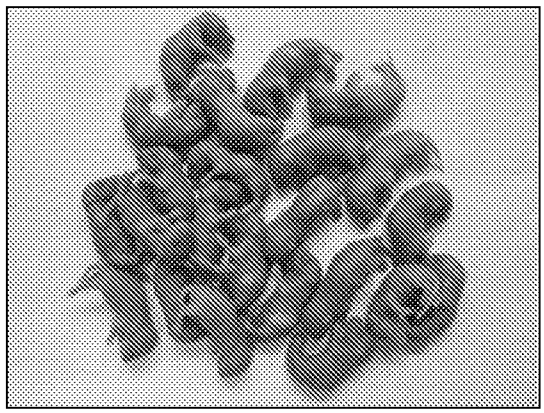


图 S4D

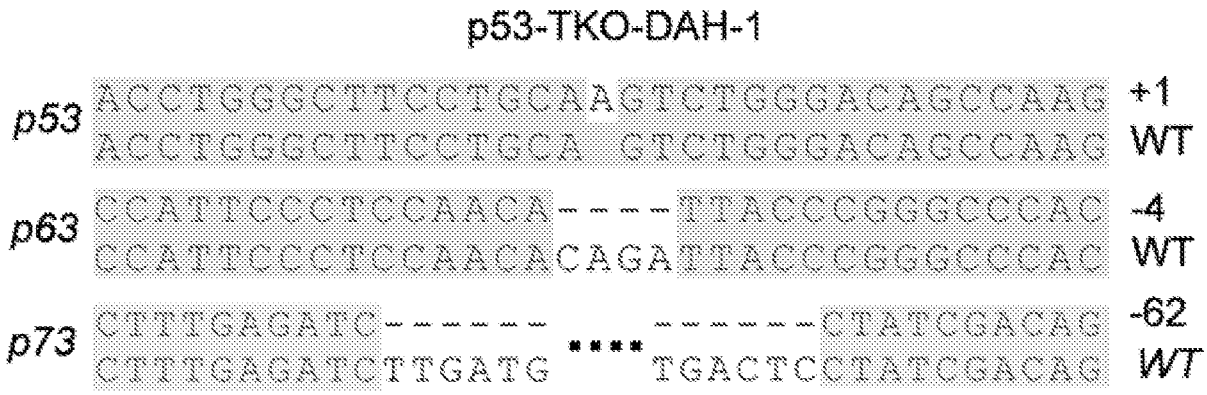


图 S4C

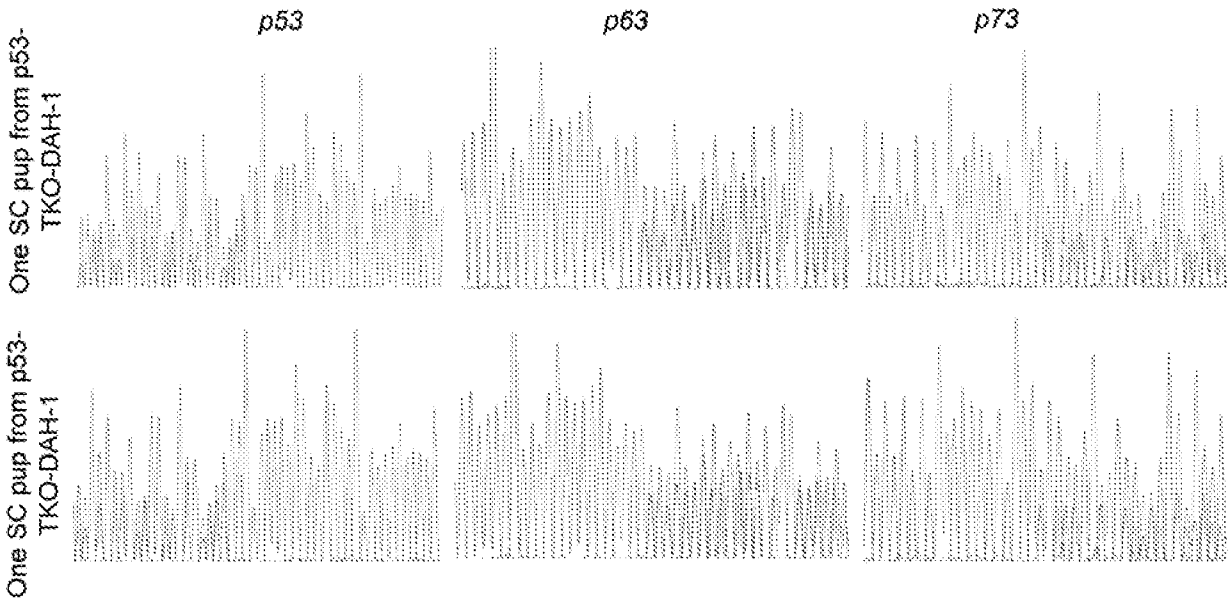


图 S4E

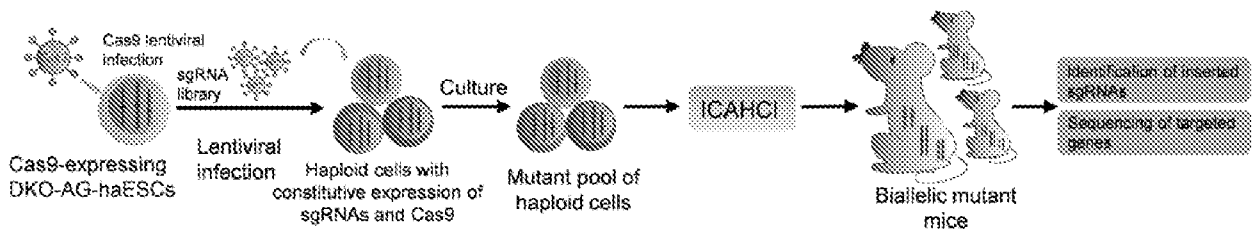


图 5A

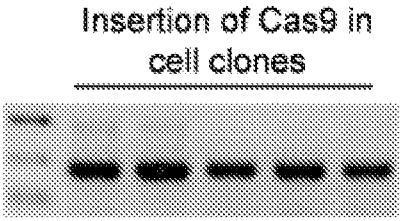


图 5B

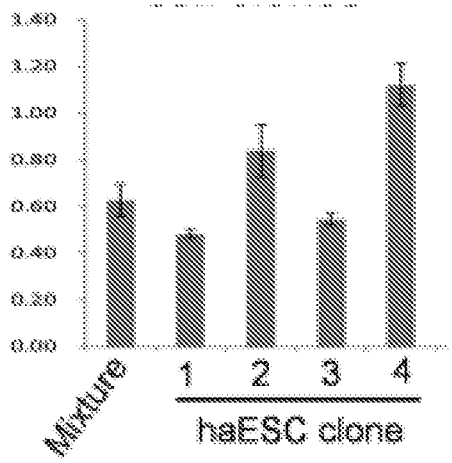


图 5C

图 5D

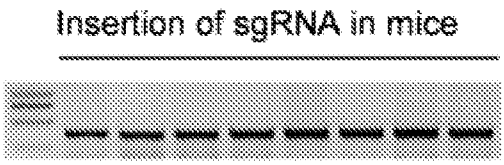


图 5F

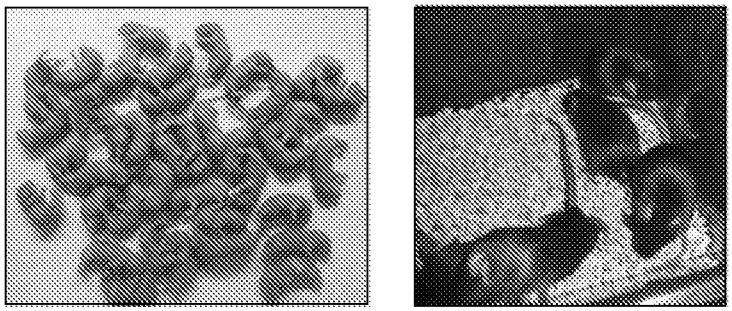


图 5E

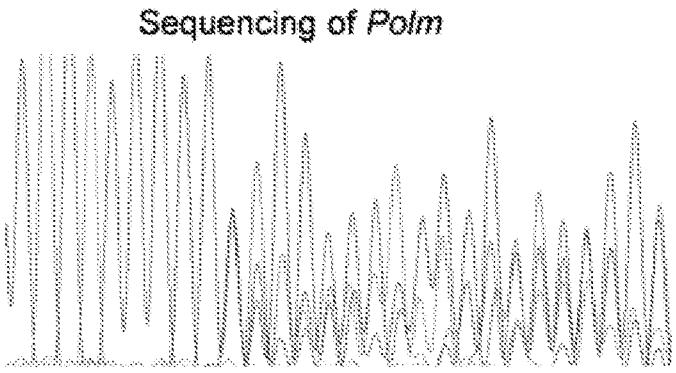


图 5G

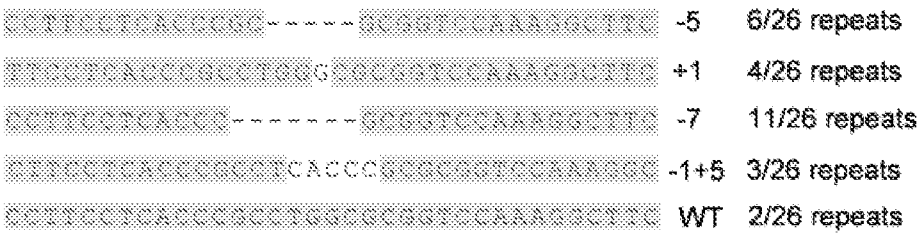


图 5H

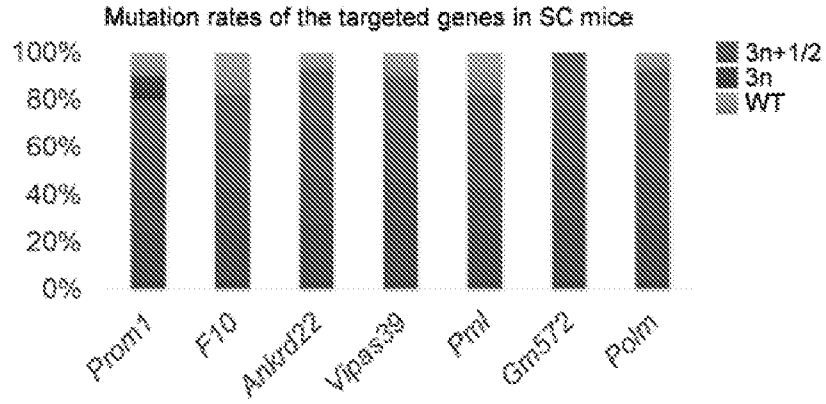


图 5I

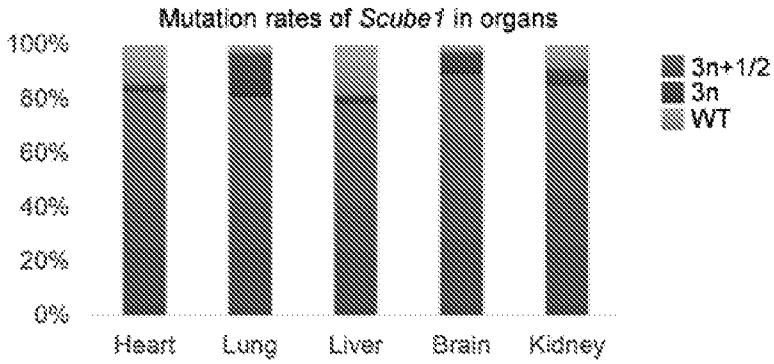


图 5J

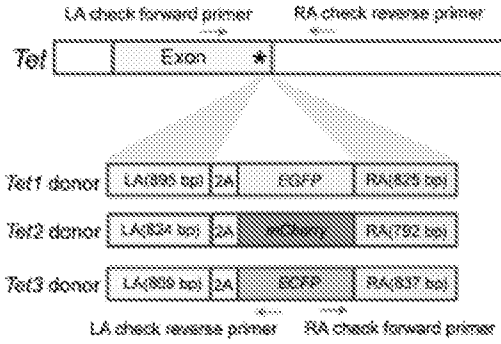


图 S5A

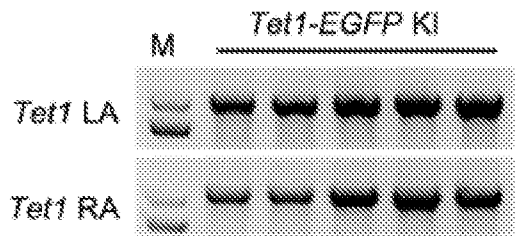


图 S5B

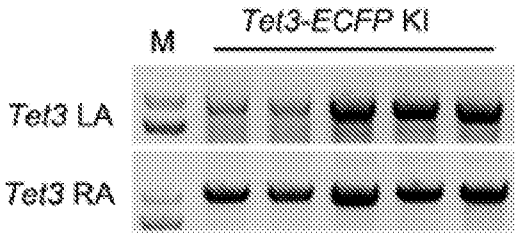


图 S5C

图 S5D

Sequencing of *Tet1-EGFP*

TGTGTCTATGAACTACCAGTGAGATAGTTTTTTGTTTTTTGTTTTTTTGTTTTGTTTTTC
AAGGTTCACACAACACTAAGAGCTTTTCATCAGCCTCATCTACTTCTCACCTAGTGAA
. . . . . .
GCATCAACCTTAACCCGAGACAATGTTGTTACCGTGTCCCCATACTCTCTCACTCATG
TTGCGGGACCCTACAATCGTTGGGTCGCGTCGACGATTGCCACGAAGCAAGCAGGA
GATGTTGAAGAAAACCCCGGGCCTGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGG
TGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGT
. . . . . .
CCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCGGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAG
CGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCAT
GGACGAGCTGTACAAGAATCTCTAGAGCTAAAGGCTTCTCTCATGTAATGCCTTTGCT
AATGTGGTGTAGTGGGTATTTTTGTTTGTTTGTTTGTTTTGTTTTGTTTTTTTGTTTTTT
CCGGTGCTGTTAAAAAGAAAGTCATTCTGTTGTTTACTGTAGCTTTGTTTCGCCCATT
. . . . . .
GTTCTTGCTCTGTAGAGTCCCATCCCGTTAACCTCAGCCTGTACTCAAATAACACACG
GCTTCTGTTCTTTACTTATAGAATAGAGGCTCTCTAAAAAAAAAAAATTTAAATACAAGAT
GCTACCAATATCAATTTTCCCTCTTTAACTAGAAAAAATATTGTCTTCTGAAGTCACCTC

Sequencing of *Tet3-ECFP*

GCTTCGAGGCAAGCCATGGAGCCCCTGCAAGTTTGGGAACGGCACCTCTGCCTTGA
CTGGTCCCAGCCTAACTGAGAAGCCATGGGGGATGGGAACCGGGGGATTTCAACCCC
. . . . . .
GCAGGCGCTGGCCATGCCCACAGACTCCGCGGTCACCGTGTCCTCTTACGGCTACA
CAAAGGTCACTGGCCCCTACAGCCGCTGGATCGCGTCGACGATTGCCACGAAGCAA
GCAGGAGATGTTGAAGAAAACCCCGGGCCTGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCA
CCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTT
. . . . . .
GAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCT
CGGCATGGACGAGCTGTACAAGAATCTCTAGAGCTAGGTGCCAGGAGCCAGCGTAC
CTCGGCCCCGCCCCGAGCTGCTCTGTGGTGCTTTTGCCCTCATGCCCCGGGGCCCG
. . . . . .
TGGTTCGCTAGGCAGCACCTCAAGCTGGAGCAGGAGTCGAGAGGCTCCGAGGAGC
TCTTCTCGTCCCGTTGATAAAGCCGGTGAGTACTGGGCCGAAAGGAAGCTTAGTGG
CAGTTTTCTTAAAAATCGCCCCAAAGTTTGTCGATACTGAAAAAGGGCTACTGTATCTA

图 S5E

图 S5F

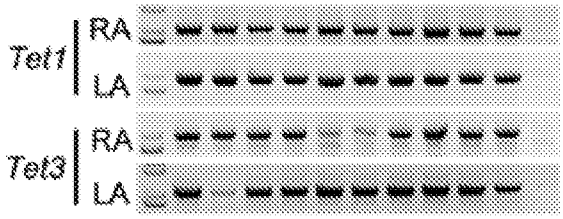
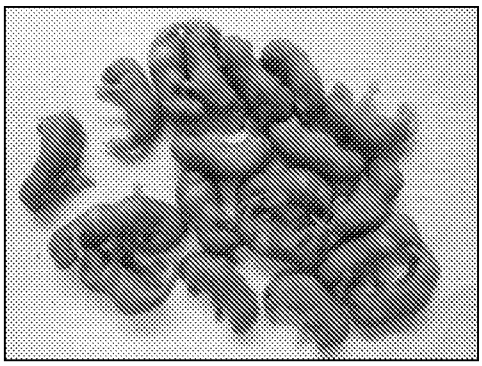


图 S5G

Sequencing of *Tet2-mCherry*

AGATGCCTTCACTACTAACTCCACCCTAAAACCAAATGTACACCACCTAGCAACGTTT
TCTCCTTACCCCACCCCCAAGATGGATAGTCATTTCATGGGAGCTGCCTCCAGATCA
ACAGGGTCTGTGACTACCGATTCTACCGTGACTACATCACCATATGCTTTCACTCAGG
TCACAGGGCCTTACAACACATTTGTAGCGTCGACGATTGCCACGAAGCAAGCAGGA
GATGTTGAAGAAAACCCCGGCCCTGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCAT
CATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACG
CGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCAT
CGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGGCGGCATGGACGA
GCTGTACAAGAATCTCTAGAGCTGACGCTGGCCATTAGCCCAGACCACCAAGGACG
ACCTGTGAGCAGTATGTCTTTCATGGCATGGGCGTAGGGACAGGTCACAGCATCT
ATCTTAATTATTCAGCTTAGTTTTTAAAATGTGGACATTTCAAAGGCCTCTGGATTGTAG
TTATCCACCGATGTCCTTGTAGGACTATAATGTATAGATATGCACACTTACACATGTGTA
CTGAAATATTTTAAGTTGTGTCTTAGAAAAGCACTTTGCCTACC

图 S5H



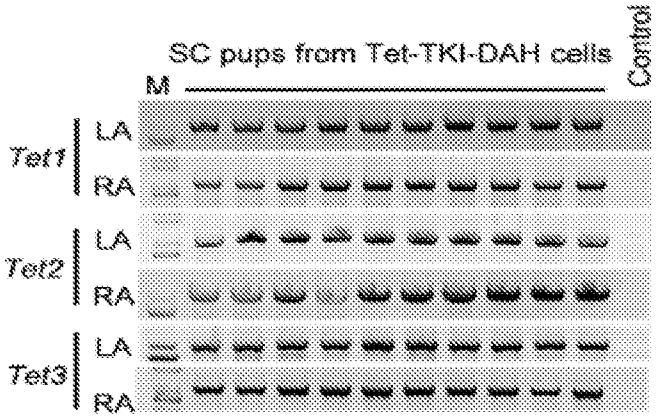


图 S5I

图 S5J

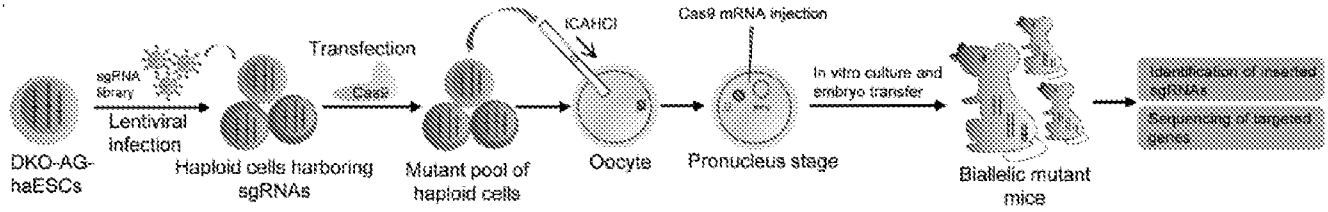


图 S6A

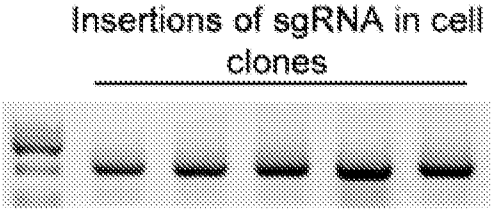


图 S6B

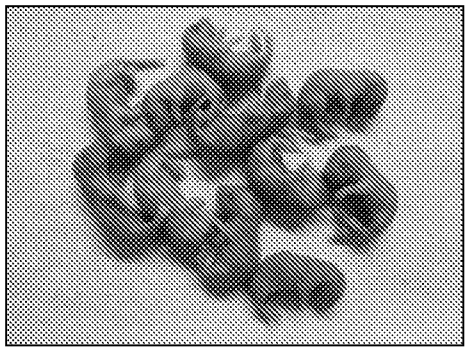


图 S6C

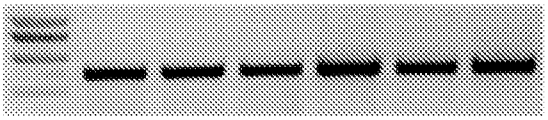


图 S6D

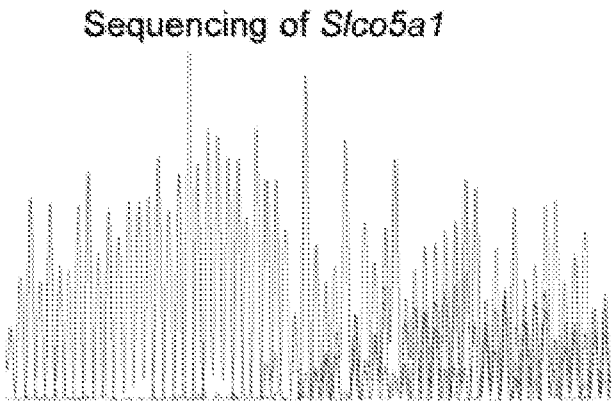


图 S6E

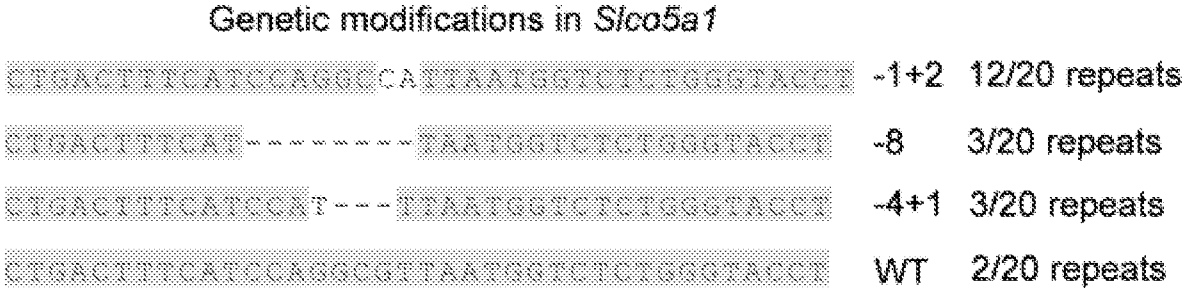


图 S6F

Mutation rates of the targeted genes in SC mice
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
3n+1/2
3n
WT
Wdr47
Hyal2
Xlr3c
Slco5a1

图 S6G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2015/083165

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/85 (2006.01) i; C12N 5/0735 (2010.01) i

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

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)

CNPAT, WPI, EPODOC, CNKI, PubMed: Androgenetic Haploid Embryonic Stem Cells, AG-haESCs, CRISPR, ICAHCI, H19, Gtl2, Dlk, Dio3, DMR, knockout, sgRNA, CRISPR?Cas9, imprint+, library

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YANG, H. et al., "Generation of Genetically Modified Mice by Oocyte Injection of Androgenetic Haploid Embryonic Stem Cells", CELL, vol. 149, 27 April 2012 (27.04.2012), pages 605-617, and S1-S6	1-17
Y	KAWAHARA, M. et al., "High-frequency generation of viable mice from engineered bi-maternal embryos", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 25, no. 9, 19 August 2007 (19.08.2007), pages 1045-1050	1-17
Y	LI, W. et al., "Genetic Modification and Screening in Rat Using Haploid Embryonic Stem Cells", CELL STEM CELL, vol. 14, 06 March 2014 (06.03.2014), pages 404-414	1-17
Y	CHEN, S.D. et al., "Genome-wide CRISPR Screen in a Mouse Model of Tumor Growth and Metastasis", CELL, vol. 160, 12 March 2015 (12.03.2015), pages 1246-1260	12-17

☒ 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	Date of mailing of the international search report
16 March 2016 (16.03.2016)	**24 March 2016 (24.03.2016)**
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer **ZHANG, Ying** Telephone No.: (86-10) **62413783**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2015/083165

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ZHONG, Cuiqing et al., "Establishment of androgenetic haploid embryonic stem cells used for substituting sperm", CHINESE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 35, no. 4, 01 April 2013 (01.04.2013), pages 397-400	1-17
Y	CN 103361304 A (SHANGHAI INSTITUTES FOR BIOLOGICAL SCIENCES, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES), 23 October 2013 (23.10.2013), claims 1-16, and embodiments 1-6	1-17
A	LIANG, Dan et al., "Progress of CRISPR-Cas9 in stem cell research", CHINESE BULLETIN OF LIFE SCIENCES, vol. 27, no. 1, 31 January 2015 (31.01.2015), pages 93-98	1-17
A	LIN, S.P. et al., "Asymmetric regulation of imprinting on the maternal and paternal chromosomes at the Dlk1-Gtl2 imprinted cluster on mouse chromosome 12", NATURE GENETICS, vol. 35, no. 1, 24 August 2003 (24.08.2003), pages 97-102	1-17
A	THORVALDSEN, J.L. et al., "Analysis of Sequence Upstream of the Endogenous H19 Gene Reveals Elements Both Essential and Dispensable for Imprinting", MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 22, no. 8, 30 April 2002 (30.04.2002), pages 2450-2462	1-17
A	WO 2013/159313 A1 (INSTITUTE OF ZOOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES), 31 October 2013 (31.10.2013), the whole document	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2015/083165

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 103361304 A	23 October 2013	CN 103361304 B	30 September 2015
		WO 2013143467 A1	03 October 2013
WO 2013/159313 A1	31 October 2013	None	

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2015/083165

A. 主题的分类

C12N 15/85(2006.01)i; C12N 5/0735(2010.01)i

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

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））

CNPAT, WPI, EPODOC, CNKI, PubMed, Androgenetic Haploid Embryonic Stem Cells, AG-haESCs, CRISPR, ICAHCI, H19, Gt12, Dlk, Dio3, DMR, knockout, sgRNA, CRISPR?Cas9, imprint+, 印记，敲除，文库，孤雄单倍体胚胎干细胞

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
Y	YANG, H. 等, . "Generation of Genetically Modified Mice by Oocyte Injection of Androgenetic Haploid Embryonic Stem Cells, " Cell, , 第149卷, 2012年 4月 27日 (2012-04-27), 第605-617页, S1-S6	1-17
Y	KAWAHARA, M. 等, . "High-frequency generation of viable mice from engineered bi-maternal embryos, " NATURE BIOTECHNOLOGY, , 第25卷, 第9期, 2007年 8月 19日 (2007-08-19), 第1045-1050页	1-17
Y	LI, W. 等, . "Genetic Modification and Screening in Rat Using Haploid Embryonic Stem Cells, " Cell Stem Cell, , 第14卷, 2014年 3月 6日 (2014-03-06), 第404-414页	1-17
Y	CHEN, S. D.等, . "Genome-wide CRISPR Screen in a Mouse Model of Tumor Growth and Metastasis, " Cell, , 第160卷, 2015年 3月 12日 (2015-03-12), 第1246-1260页	12-17

☑ 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	国际检索报告邮寄日期
2016年 3月 16日	2016年 3月 24日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 张颖 电话号码 (86-10)62413783

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
Y	钟翠青 等，. "代替精子使用的孤雄单倍体胚胎干细胞的建立，" 中国细胞生物学学报，，第35卷，第4期，2013年 4月 1日 (2013-04-01)，第397-400页	1-17
Y	CN 103361304 A (中国科学院上海生命科学研究院) 2013年 10月 23日 (2013-10-23) 权利要求1-16，实施例1-6	1-17
A	梁丹 等，. "CRISPR-Cas9技术在干细胞中的应用，" 生命科学，，第27卷，第1期，2015年 1月 31日 (2015-01-31)，第93-98页	1-17
A	LIN, S.P.等，. "Asymmetric regulation of imprinting on the maternal and paternal chromosomes at the Dlk1-Gtl2 imprinted cluster on mouse chromosome 12，" NATURE GENETICS，，第35卷，第1期，2003年 8月 24日 (2003-08-24)，第97-102页	1-17
A	THORVALDSEN, J.L.等，. "Analysis of Sequence Upstream of the Endogenous H19 Gene Reveals Elements Both Essential and Dispensable for Imprinting，" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY，，第22卷，第8期，2002年 4月 30日 (2002-04-30)，第2450-2462页	1-17
A	WO 2013/159313 A1 (中国科学院动物研究所) 2013年 10月 31日 (2013-10-31) 全文	1-17

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2015/083165

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	103361304	A	2013年 10月 23日	CN	103361304	B	2015年 9月 30日
				WO	2013143467	A1	2013年 10月 3日
WO	2013/159313	A1	2013年 10月 31日		无		