

(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
2025 年 7 月 3 日 (03.07.2025)



(10) 国际公布号
WO 2025/137828 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 15/89 (2006.01) C12N 15/85 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01) A01K 67/027 (2024.01)
C12N 15/113 (2010.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/141592

(22) 国际申请日: 2023 年 12 月 25 日 (25.12.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 中国科学院深圳先进技术研究院 (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道1068号 518055 (CN)。

(72) 发明人: 胡昱 (HU, Yu); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道1068号 518055 (CN)。林剑邦 (LIN, Jianbang); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道1068号 518055 (CN)。李梦奇 (LI, Mengqi); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道1068号 518055 (CN)。吴代强

(WU, Daiqiang); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道1068号 518055 (CN)。

(74) 代理人: 深圳市科进知识产权代理事务所 (普通合伙) (SHENZHEN KEJIN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE); 中国广东省深圳市南山区粤兴三道二号虚拟大学园产业化基地A701室 518000 (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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,

(54) Title: GENE POINT MUTATION MOUSE MODEL CONSTRUCTION METHOD

(54) 发明名称: 一种基因点突变小鼠模型构建方法

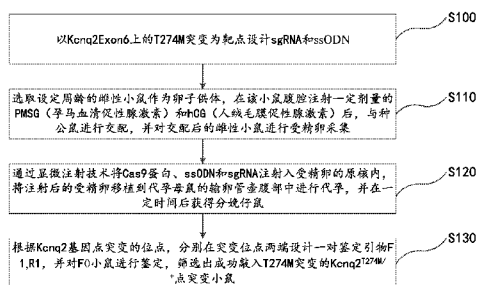


图 1

S100 By taking T274M mutation on Kcnq2 Exon6 as a target, design sgRNA and ssODN
S110 Select a female mouse of a set week age as an ovum donor, inject a certain dose of PMSG (pregnant mare serum gonadotropin) and hCG (human chorionic gonadotropin) into the abdominal cavity of the mouse, then mate the female mouse with a mating male mouse, and collect zygotes of the mated female mouse
S120 Inject Cas9 protein, ssODN and sgRNA into the pronuclei of the zygotes by means of a microinjection technique, transplant the zygotes obtained after injection into the ampulla of the fallopian tube of a surrogate female mouse, and obtain a neonatal mouse after a certain time
S130 Respectively design a pair of identification primers F1, R1 at two ends of a mutation site on the basis of a Kcnq2 gene point mutation site, identify an F0 mouse, and screen out a Kcnq2T274M/+ point mutant mouse in which T274M mutation is successfully knocked

(57) Abstract: The present application discloses a gene point mutation mouse model construction method, comprising: by taking T274M mutation on Kcnq2 Exon6 as a target, designing sgRNA and ssODN; selecting a female mouse of a set week age as an ovum donor, injecting a certain dose of serum gonadotropin and human chorionic gonadotropin into the abdominal cavity of the female mouse, then mating the female mouse with a mating male mouse, and collecting zygotes of the mated female mouse; injecting Cas9 protein, ssODN and sgRNA into the pronuclei of the zygotes by means of a microinjection technique, transplanting the zygotes obtained after injection into the ampulla of the fallopian tube of a surrogate female mouse, and obtaining a neonatal mouse after the pregnant female mouse gives birth; respectively designing a pair of identification primers F1, R1 at two ends of a mutation site on the basis of a Kcnq2 gene point mutation site, identifying the neonatal mouse, and screening out a Kcnq2^{T274M/+} point mutant mouse in which T274M mutation is successfully knocked.



NA, RW, SC, 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, ME, 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))。

(57) 摘要: 本申请公开了一种基因点突变小鼠模型构建方法, 包括: 以Kcnq2 Exon6上的T274M突变为靶点设计sgRNA和ssODN; 选取设定周龄的雌性小鼠作为卵子供体, 在所述雌性小鼠腹腔注射一定剂量的血清促性腺激素和人体绒毛膜促性腺激素后与种公鼠进行交配, 并对交配后的雌性小鼠进行受精卵采集; 通过显微注射技术将Cas9蛋白、ssODN和sgRNA注射入所述受精卵的原核内, 将注射后的受精卵移植到代孕母鼠的输卵管壶腹部中, 并在代孕母鼠分娩后获得仔鼠; 根据Kcnq2基因点突变的位点, 分别在突变位点两端设计一对鉴定引物F1,R1, 并对所述仔鼠进行鉴定, 筛选出成功敲入T274M突变的Kcnq2^{T274M/+}点突变小鼠。

一种基因点突变小鼠模型构建方法

技术领域

本申请属于转基因技术领域，特别涉及一种基因点突变小鼠模型构建方法。

背景技术

CRISPR/Cas9是一种由sgRNA (small guide RNA, 小向导RNA) 指导，利用Cas9核酸酶对靶向基因进行编辑的技术。CRISPR/Cas9的工作原理是CRRNA(CRISPR-derived RNA, 基因编辑技术)通过碱基配对与tracrRNA(trans-activating crRNA, 反式激活crRNA)结合形成tracrRNA/crRNA复合物，此复合物会引导Cas9蛋白在与crRNA配对的序列靶位点剪切双链DNA，通过人工设计crRNA和tracrRNA两种RNA，改造成具有引导作用的sgRNA，从而引导Cas9蛋白对DNA的定点切割，并产生一个平末端的双链DNA缺口，进而启动DNA损伤修复机制，主要通过NHEJ (Nonhomologous end joining, 非同源末端连接)或HR (Homologous recombination, 同源重组)的方式将断裂上下游两端的序列连接起来。随着CRISPR/Cas9技术的普及，让基因点突变小鼠模型的构建变得简便且易得。例如，2019年由Milh et al.构建的*Kcnq2*-T274M敲入小鼠，杂合即可表现出自发癫痫。但由于该模型使用的是ES细胞 (Embryonic stem cell, 胚胎干细胞) 打靶技术，得到的阳性小鼠数目不够稳定，且可重复性较差。

发明内容

本申请提供了一种基因点突变小鼠模型构建方法，旨在至少在一定程度上解决现有技术中的上述技术问题之一。

为了解决上述问题，本申请提供了如下技术方案：

一种基因点突变小鼠模型构建方法，包括：

以 *Kcnq2* Exon6 上的 T274M 突变为靶点设计 sgRNA 和 ssODN；

选取设定周龄的雌性小鼠作为卵子供体，在所述雌性小鼠腹腔注射一定剂量的 PMSG 和 hCG 后，与种公鼠进行交配，并对交配后的雌性小鼠进行受精卵采集；

通过显微注射技术将 Cas9 蛋白、ssODN 和 sgRNA 注射入所述受精卵的原核内，将注射后的受精卵移植到代孕母鼠的输卵管壶腹部中，并在代孕母鼠分娩后获得仔鼠；

根据 *Kcnq2* 基因点突变的位点，分别在突变位点两端设计一对鉴定引物 F1,R1，并对所述仔鼠进行鉴定，筛选出成功敲入 T274M 突变的 *Kcnq2*^{T274M/+} 点突变小鼠。

本申请实施例采取的技术方案还包括：所述以 *Kcnq2* Exon6 上的 T274M 突变为靶点设计 sgRNA 和 ssODN，具体为：

设计 sgRNA: CCCGTAGCCAATG GTCGTCA，利用 SpCas9 对 sgRNA 进行检测；

设计

ssODN:GCCCAAGTAACCAGAGCCCCTTACCCCTCAGATCATGCTGA

CGACC ATTGGCTACGG GGACAAGTACCCTCA，同源重组后引入 c.821C>T,822 C>G leads to p.AThr274Met 突变。

本申请实施例采取的技术方案还包括：所述选取设定周龄的雌性小鼠作为卵子供体，具体为：

选取 4-6 周龄的 SPF 级雌性小鼠作为卵子供体。

本申请实施例采取的技术方案还包括：所述在所述雌性小鼠腹腔注射一定

剂量的 PMSG 和 hCG 后，与种公鼠进行交配，并对交配后的雌性小鼠进行受精卵采集，具体为：

在所述雌性小鼠腹腔注射 10 IU 的 PMSG，并在设定间隔时间后在雌性小鼠腹腔注射 0.8 IU 的 hCG，然后使所述雌性小鼠与生殖能力正常的种公鼠进行交配，采集雌性小鼠受精卵，并将所述受精卵进行消化洗涤后存放于设定温度的培养箱中。

本申请实施例采取的技术方案还包括：所述通过显微注射技术将 Cas9 蛋白、ssODN 和 sgRNA 注射入所述受精卵的原核内，将注射后的受精卵移植到代孕母鼠的输卵管壶腹部中之后，还包括：

每隔设定时间对所述代孕母鼠进行体重称量，判断所述受精卵是否怀孕成功。

本申请实施例采取的技术方案还包括：所述在代孕母鼠分娩后获得仔鼠之后，还包括：

在分娩设定时间后对所述仔鼠进行剪尾编号以及 PCR 检测，得到 F0 小鼠。

本申请实施例采取的技术方案还包括：所述根据 *Kcnq2* 基因点突变的位点，分别在突变位点两端设计一对鉴定引物 F1, R1 具体为：

F1: GCCTTGTTTGGCACTAGTATGG, R1: CCTACATCCTTGGAATTATCTAGC。

本申请实施例采取的技术方案还包括：所述对所述仔鼠进行鉴定，筛选出成功敲入 T274M 突变的 *Kcnq2*^{T274M/+} 点突变小鼠：具体为：

对所述 F0 小鼠进行 PCR 引物扩增并送测序，该引物在基因敲除小鼠中扩增的产物为 788 bp；并采用 Sanger 测序对所述 F0 小鼠进行鉴定，将测序结果为

c.821C>T,822 C>G的F0小鼠鉴定为成功敲入T274M突变的*Kcnq2*^{T274M/+}阳性F0小鼠；

将所述 *Kcnq2*^{T274M/+}阳性 F0 小鼠作为父/母本，与野生型小鼠交配获得 F1 小鼠，对所述 F1 小鼠出生设定时间后进行 PCR 引物扩增鉴定，并采用 Sanger 测序对所述 F1 小鼠进行鉴定，将测序结果为 c.821C>T,822 C>G 的 F1 小鼠鉴定为 *Kcnq2*^{T274M/+}阳性 F1 小鼠。

相对于现有技术，本申请实施例产生的有益效果在于：本申请实施例的基因点突变小鼠模型构建方法以 *Kcnq2* Exon6 上的 T274M 突变为靶点设计 sgRNA 和 ssODN，将采用含叠氮非天然氨基酸的 Cas9 蛋白、DBCO 修饰的 ssODN 和筛选所得 gRNA 通过显微注射技术进行注射，基于 CRISPR/Cas9 构建 *Kcnq2*^{T274M/+}点突变敲入小鼠模型，制备简单，可重复率强，在提高编辑效率的同时，能够得到更多数量的 *Kcnq2*^{T274M/+}点突变小鼠。

附图说明

图 1 是本申请实施例的基因点突变小鼠模型构建方法的流程图；

图 2 为本申请实施例的 *Kcnq2*^{T274M/+}小鼠制备策略示意图；

图 3 为本申请实施例的 *Kcnq2*^{T274M/+}小鼠鉴定峰图。

具体实施方式

下面将结合本申请实施例中的附图，对本申请实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅是本申请的一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本申请中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本申请保护的范围。

本申请中的术语“第一”、“第二”、“第三”仅用于描述目的，而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此，限定

有“第一”、“第二”、“第三”的特征可以明示或者隐含地包括至少一个该特征。本申请的描述中，“多个”的含义是至少两个，例如两个，三个等，除非另有明确具体的限定。本申请实施例中所有方向性指示（诸如上、下、左、右、前、后……）仅用于解释在某一特定姿态（如附图所示）下各部件之间的相对位置关系、运动情况等，如果该特定姿态发生改变时，则该方向性指示也相应地随之改变。此外，术语“包括”和“具有”以及它们任何变形，意图在于覆盖不排他的包含。例如包含了一系列步骤或单元的过程、方法、系统、产品或设备没有限定于已列出的步骤或单元，而是可选地还包括没有列出的步骤或单元，或可选地还包括对于这些过程、方法、产品或设备固有的其它步骤或单元。

在本文中提及“实施例”意味着，结合实施例描述的特定特征、结构或特性可以包含在本申请的至少一个实施例中。在说明书中的各个位置出现该短语并不一定均是指相同的实施例，也不是与其它实施例互斥的独立的或备选的实施例。本领域技术人员显式地和隐式地理解的是，本文所描述的实施例可以与其它实施例相结合。

为解决现有技术的不足，本发明中将采用含叠氮非天然氨基酸的 Cas9 蛋白、DBCO 修饰的 ssODN 和筛选所得 sgRNA 通过显微注射技术进行注射，制备简单，HDR 效率高，能够得到更大数量的 *Kcnq2*-T274M 敲入阳性 F0 小鼠。

具体地，请参阅图 1，是本申请实施例的基因点突变小鼠模型构建方法的流程图。本申请实施例的基因点突变小鼠模型构建方法包括以下步骤：

S100：以 *Kcnq2*（基因相关癫痫） Exon6 上的 T274M 突变为靶点设计 sgRNA 和 ssODN；

本步骤中，由于 T274M 突变(c.821C>T,822 C>G leads to p.AThr274Met) 在人群中的发病率更高，因此本申请实施例选取 T274M 突变为靶点。T274M 发生在 Exon6 上，首先设计 sgRNA: CCCGTAGCCAATG GTCGTCA，经体外 SpCas9（一种由 crRNA 和 tracrRNA 共同(或两者融合后形成的 sgRNA)引导的 DNA 内切核酸酶）对 sgRNA 进行检测。同时设

ssODN:GCCCAAGTAACCAGAGCCCCTTACCCCTCAGATCATGCTGACGACC ATTGGCTACGG GGACAAGTACCCTCA, 同源重组后引入 c.821C>T, 822 C>G leads to p.AThr274Met 突变。具体如图 2 所示, 为本申请实施例的 *Kcnq2*^{T274M/+} 小鼠制备策略示意图, 其中, Wild type allele 表示野生臂; ssODN 表示单链寡核苷酸; Targeted allele 表示靶向臂, Exon 表示外显子; Coding region 表示编码区域; Untranslated region 表示非编码区。

S110: 选取设定周龄的雌性小鼠作为卵子供体, 在该小鼠腹腔注射一定剂量的血清促性腺激素 (Pregnant Mare Serum Gonadotropin, PMSG) 和人体绒毛膜促性腺激素 (Human Chorionic Gonadotropin, hCG) 后, 与种公鼠进行交配, 并对交配后的雌性小鼠进行受精卵采集;

本步骤中, 选取 4-6 周龄的 SPF (Specific pathogen Free, 指机体内无特定微生物和寄生虫存在的动物) 级雌性小鼠作为卵子供体, 在雌性小鼠腹腔注射 10 IU (International Unit, 医学效价单位) 的 PMSG, 并在设定间隔时间 (48h) 后在小鼠腹腔注射 0.8 IU 的 hCG, 然后使小鼠与生殖能力正常的种公鼠进行交配, 采集小鼠受精卵, 并将受精卵进行消化洗涤后存放于 37℃ 的培养箱中待用。可以理解, 上述周龄、注射参数、间隔时间以及存放温度等参数可根据实际应用场景进行设定。

S120: 通过显微注射技术将 Cas9 蛋白、ssODN 和 sgRNA 注射入受精卵的原核内, 将注射后的受精卵移植到代孕母鼠的输卵管壶腹部中进行代孕, 并在代孕母鼠分娩后获得仔鼠;

本步骤中, 通过显微注射技术将含有叠氮非天然氨基酸的 Cas9 蛋白、DBCO 修饰的 ssODN 和 sgRNA 注射入受精卵的原核内, 再将受精卵移植到代孕母鼠输卵管壶腹部中, 每隔设定时间 (一周) 对代孕母鼠进行体重称量, 判断受精卵是否怀孕成功, 如果怀孕成功, 在注射 19-21 天后代孕母鼠分娩仔鼠, 并在分娩设定时间 (5 天) 后对仔鼠进行剪尾编号以及 PCR (polymerase chain reaction, 聚合酶链反应) 检测, 得到 F0 小鼠 (F0 小鼠是指剪尾鉴定得到的阳

性鼠，即首建鼠)。

S130: 根据 *Kcnq2* 基因点突变的位点，分别在突变位点两端设计一对鉴定引物 F1,R1，并对 F0 小鼠进行鉴定，筛选出成功敲入 T274M 突变的 *Kcnq2*^{T274M/+}点突变小鼠；

本步骤中，小鼠鉴定方式具体为：根据 *Kcnq2* 基因点突变的位点，分别在突变位点两端设计一对鉴定引物 F1,R1，F1: GCCTTGTTTGGCACTAGTATGG，R1: CCTACATCCTTGGAATTATCTAGC；然后对 F0 小鼠进行 PCR 引物扩增并送测序，该引物在基因敲除小鼠中扩增的产物为 788 bp；并采用 Sanger 测序对 F0 小鼠进行鉴定，将测序结果为 c.821C>T,822 C>G 的 F0 小鼠鉴定为成功敲入 T274M 突变的 *Kcnq2*^{T274M/+}阳性 F0 小鼠。选取 *Kcnq2*^{T274M/+}阳性 F0 小鼠作为父/母本进行繁育，将选取的 *Kcnq2*^{T274M/+}阳性 F0 小鼠与野生型小鼠交配获得 F1 小鼠 (f1 小鼠是指两个近交品系动物之间进行有计划交配所获得的第一代小鼠)，在 F1 小鼠出生设定时间 (14 天) 后进行 PCR 引物扩增鉴定小鼠纯杂合，鉴定引物与 F0 小鼠相同，并采用 Sanger 测序对 F1 小鼠进行鉴定，将测序结果为 c.821C>T,822 C>G 的 F1 小鼠鉴定为 *Kcnq2*^{T274M/+}阳性 F1 小鼠。具体如图 3 所示，为本申请实施例的 *Kcnq2*^{T274M/+}小鼠鉴定峰图，其中 WT 表示野生型，KI 表示敲入。利用本申请获得的 *Kcnq2*^{T274M/+}点突变小鼠可用于癫痫疾病的机制与治疗研究，还可以应用于其他有 *Kcnq2* 基因突变引起的疾病研究。

在本申请其他实施例中，还可以通过小鼠胚胎单细胞 (ES 细胞) 打靶技术制备 *Kcnq2*^{T274M/+}点突变小鼠，利用细胞内染色体 DNA 和导入细胞的外源 DNA 在相同序列的区域内发生同源重组现象，在小鼠 ES 细胞中定点破坏内源基因，然后利用 ES 细胞发育的全能性，获得从 ES 细胞发育而来的敲入 *Kcnq2*^{T274M/+}点突变的杂合子小鼠。

为了验证本申请实施例的可行性和有效性，将含叠氮非天然氨基酸的 Cas9 蛋白、DBCO 修饰的 ssODN 和 gRNA 通过显微注射技术注射入约 40 个

受精卵的原核内，分娩出 25 只后代，经鉴定其中 7 只为阳性小鼠。试验结果表明，本申请实施例的 HDR（Homology directed repair，同源介导的双链 DNA 修复）效率高，能够得到更多数量的 *Kcnq2*^{T274M/+} 点突变小鼠。

基于上述，本申请实施例的基因点突变小鼠模型构建方法以 *Kcnq2* Exon6 上的 T274M 突变为靶点设计 sgRNA 和 ssODN，将采用含叠氮非天然氨基酸的 Cas9 蛋白、DBCO 修饰的 ssODN 和筛选所得 gRNA 通过显微注射技术进行注射，基于 CRISPR/Cas9 构建 *Kcnq2*^{T274M/+} 点突变敲入小鼠模型，制备简单，在提高编辑效率的同时，能够得到更多数量的 *Kcnq2*^{T274M/+} 点突变小鼠。利用本申请获得的 *Kcnq2*^{T274M/+} 点突变小鼠可用于癫痫疾病的机制与治疗研究，还可以应用于其他有 *Kcnq2* 基因突变引起的疾病研究。

在本申请所提供的几个实施例中，应该理解到，所揭露的系统，装置和方法，可以通过其它的方式实现。例如，以上所描述的系统实施例仅仅是示意性的，例如，单元的划分，仅仅为一种逻辑功能划分，实际实现时可以有另外的划分方式，例如多个单元或组件可以结合或者可以集成到另一个系统，或一些特征可以忽略，或不执行。另一点，所显示或讨论的相互之间的耦合或直接耦合或通信连接可以是通过一些接口，装置或单元的间接耦合或通信连接，可以是电性，机械或其它的形式。

另外，在本申请各个实施例中的各功能单元可以集成在一个处理单元中，也可以是各个单元单独物理存在，也可以两个或两个以上单元集成在一个单元中。上述集成的单元既可以采用硬件的形式实现，也可以采用软件功能单元的形式实现。以上仅为本申请的实施方式，并非因此限制本申请的专利范围，凡是利用本申请说明书及附图内容所作的等效结构或等效流程变换，或直接或间接运用在其他相关的技术领域，均同理包括在本申请的专利保护范围内。

权利要求

1、一种基因点突变小鼠模型构建方法，其特征在于，包括：

以 *Kcnq2* Exon6 上的 T274M 突变为靶点设计 sgRNA 和 ssODN；

选取设定周龄的雌性小鼠作为卵子供体，在所述雌性小鼠腹腔注射一定剂量的 PMSG 和 hCG 后，与种公鼠进行交配，并对交配后的雌性小鼠进行受精卵采集；

通过显微注射技术将 Cas9 蛋白、ssODN 和 sgRNA 注射入所述受精卵的原核内，将注射后的受精卵移植到代孕母鼠的输卵管壶腹部中，并在代孕母鼠分娩后获得仔鼠；

根据 *Kcnq2* 基因点突变的位点，分别在突变位点两端设计一对鉴定引物 F1,R1，并对所述仔鼠进行鉴定，筛选出成功敲入 T274M 突变的 *Kcnq2*^{T274M/+} 点突变小鼠。

2、根据权利要求 1 所述的基因点突变小鼠模型构建方法，其特征在于，所述以 *Kcnq2* Exon6 上的 T274M 突变为靶点设计 sgRNA 和 ssODN，具体为：

设计 sgRNA: CCCGTAGCCAATG GTCGTCA，利用 SpCas9 对 sgRNA 进行检测；

设计
ssODN:GCCCAAGTAACCAGAGCCCCTTACCCCTCAGATCATGCTGA CGACC
ATTGGCTACGG GGACAAGTACCCTCA，同源重组后引入 c.821C>T,822 C>G
leads to p.AThr274Met 突变。

3、根据权利要求 2 所述的基因点突变小鼠模型构建方法，其特征在于，所述选取设定周龄的雌性小鼠作为卵子供体，具体为：

选取 4-6 周龄的 SPF 级雌性小鼠作为卵子供体。

4、根据权利要求 3 所述的基因点突变小鼠模型构建方法，其特征在于，所述在所述雌性小鼠腹腔注射一定剂量的 PMSG 和 hCG 后，与种公鼠进行交配，并对交配后的雌性小鼠进行受精卵采集，具体为：

在所述雌性小鼠腹腔注射 10 IU 的 PMSG，并在设定间隔时间后在雌性小鼠腹腔注射 0.8 IU 的 hCG，然后使所述雌性小鼠与生殖能力正常的种公鼠进行交配，采集雌性小鼠受精卵，并将所述受精卵进行消化洗涤后存放于设定温度的培养箱中。

5、根据权利要求 1 至 4 任一项所述的基因点突变小鼠模型构建方法，其特征在于，所述通过显微注射技术将 Cas9 蛋白、ssODN 和 sgRNA 注射入所述受精卵的原核内，将注射后的受精卵移植到代孕母鼠的输卵管壶腹部中之后，还包括：

每隔设定时间对所述代孕母鼠进行体重称量，判断所述受精卵是否怀孕成功。

6、根据权利要求 5 所述的基因点突变小鼠模型构建方法，其特征在于，所述在代孕母鼠分娩后获得仔鼠之后，还包括：

在分娩设定时间后对所述仔鼠进行剪尾编号以及 PCR 检测，得到 F0 小鼠。

7、根据权利要求 6 所述的基因点突变小鼠模型构建方法，其特征在于，所述根据 *Kcnq2* 基因点突变的位点，分别在突变位点两端设计一对鉴定引物 F1, R1 具体为：

F1: GCCTTGTTTGGCACTAGTATGG , R1: CCTACATCCTTGGAATTATCTAGC。

8、根据权利要求7所述的基因点突变小鼠模型构建方法，其特征在于，所述对所述仔鼠进行鉴定，筛选出成功敲入T274M突变的*Kcnq2*^{T274M/+}点突变小鼠：具体为：

对所述F0小鼠进行PCR引物扩增并送测序，该引物在基因敲除小鼠中扩增的产物为788 bp；并采用Sanger测序对所述F0小鼠进行鉴定，将测序结果为c.821C>T,822 C>G的F0小鼠鉴定为成功敲入T274M突变的*Kcnq2*^{T274M/+}阳性F0小鼠；

将所述*Kcnq2*^{T274M/+}阳性F0小鼠作为父/母本，与野生型小鼠交配获得F1小鼠，对所述F1小鼠出生设定时间后进行PCR引物扩增鉴定，并采用Sanger测序对所述F1小鼠进行鉴定，将测序结果为c.821C>T,822 C>G的F1小鼠鉴定为*Kcnq2*^{T274M/+}阳性F1小鼠。

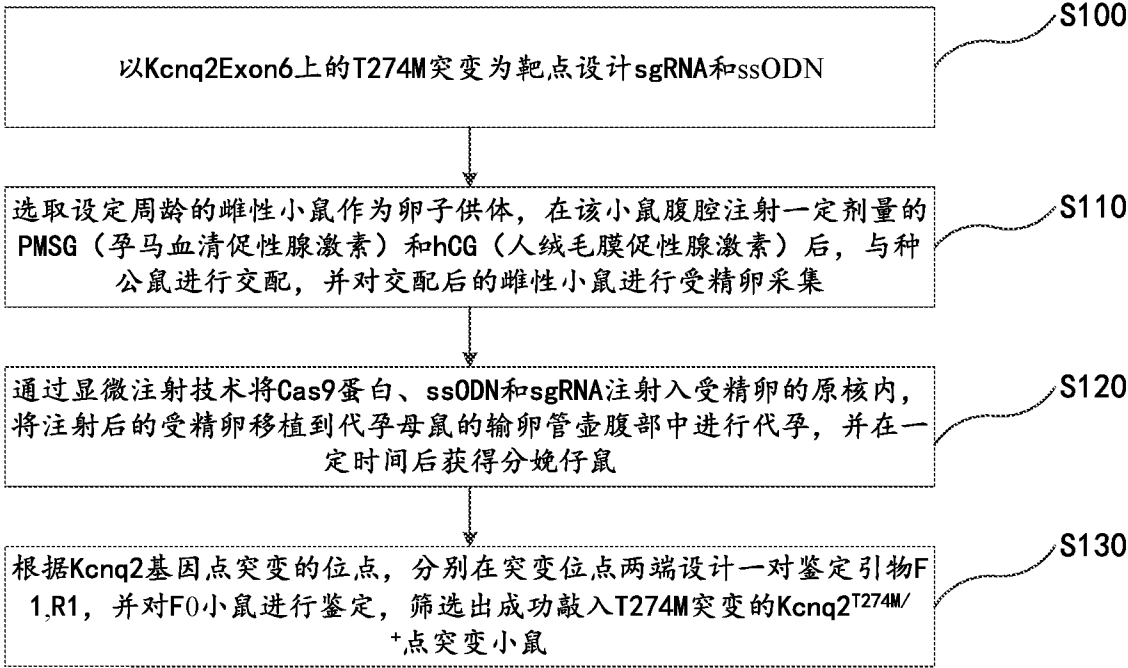


图 1

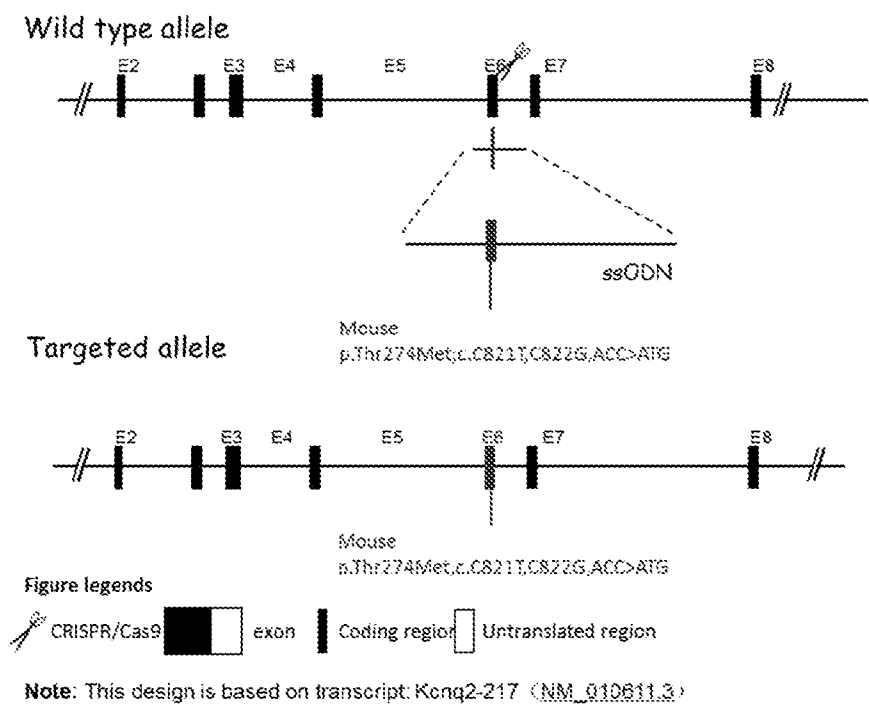
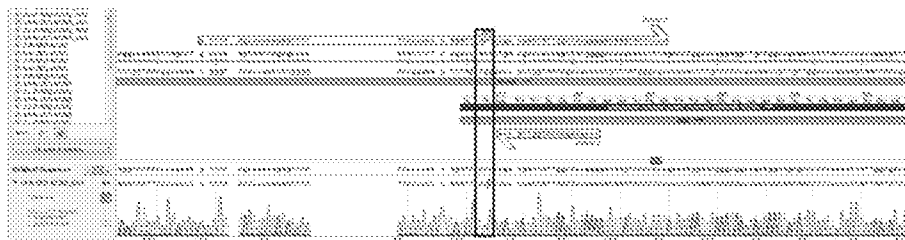


图 2

Sanger测序(Red: T; Green: A; Blue: C; Black: G)

24#, 典型WT, ACC没有被编辑



23#, 典型KI, ACC被编辑为ATG(双峰表示是杂合)

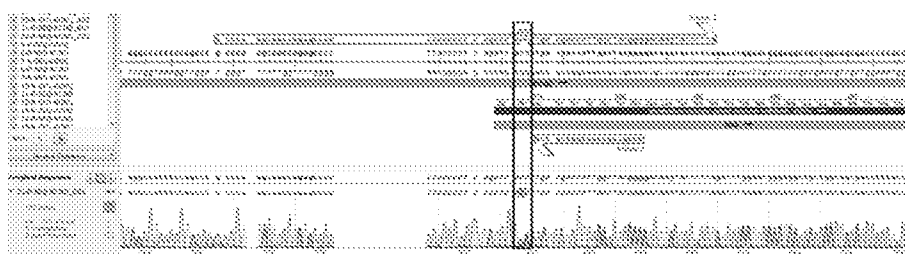


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/141592

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/89(2006.01)i; C12N15/12(2006.01)i; C12N15/113(2010.01)i; C12N15/85(2006.01)i; A01K67/027(2024.01)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) IPC: C12N,A01K 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) DWPI, CNTXT, ENTXTC, ENTXT, CNKI, 万方, WANFANG, ISI Web of Science, Pubmed, Elsevier Science, 中国专利生物序列检索系统, China Patents Biological Sequence Search System, Genbank, EMBL: 小鼠模型, Kcnq2, EXON6, T274M, 外显子6, 6号外显子, Thr274Met, sgRNA, ssODN, PMSG, HCG, CRISPR/Cas9, 受精卵, 显微注射, fertilized egg, zygote, mouse model, microinjection, CCCGTAGCCAATG GTCGTCA, GCCCAAGTAACCA GAGCCCCTTACCCCTCAGATCATGCTGA CGACCATTGGCTACGG GGACAAGTACCCTCA, GCCTTGTTGGC ACTAGTATGG, CCTACATCCTTGAATTATCTAGC.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MILH, M. et al. "A Knock-in Mouse Model for KCNQ2-related Epileptic Encephalopathy Displays Spontaneous Generalized Seizures and Cognitive Impairment" <i>Epilepsia</i> , Vol. 61, No. 5, 02 April 2020 (2020-04-02), pages 868-878 see abstract	1-8
Y	CN 114262709 A (XUANWU HOSPITAL, CAPITAL MEDICAL UNIVERSITY) 01 April 2022 (2022-04-01) see description, paragraphs 11 and 45-89	1-8
Y	CN 106929533 A (XINHUA HOSPITAL AFFILIATED TO SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE) 07 July 2017 (2017-07-07) see description, paragraphs 43-74	8
Y	CN 115843747 A (JILIN UNIVERSITY) 28 March 2023 (2023-03-28) see description, paragraphs 7-24	8
☒ 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 26 August 2024		Date of mailing of the international search report 19 September 2024
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/141592

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 113881708 A (TSINGHUA UNIVERSITY) 04 January 2022 (2022-01-04) see abstract	1-8
A	WO 2018219093 A1 (NANJING AGRICULTURAL UNIVERSITY) 06 December 2018 (2018-12-06) see abstract	1-8
A	WO 2006096648 A2 (UNIVERSITY OF UTAH RESEARCH FOUNDATION; SINGH, NANDA A.; LEPPERT, MARK F.; WHITE, H. STEVE; WILCOX, KAREN S.; OTTO, JAMES) 14 September 2006 (2006-09-14) see abstract	1-8
A	BRUN, L. et al. "Mouse Models of Kcnq2 Dysfunction" <i>Epilepsia</i> , Vol. 63, No. 11, 27 September 2022 (2022-09-27), pages 2813-2826 see abstract, and page 2814, right-hand column, last paragraph to page 2815	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/141592

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	114262709	A	01 April 2022	None			
CN	106929533	A	07 July 2017	None			
CN	115843747	A	28 March 2023	None			
CN	113881708	A	04 January 2022	WO	2022148078	A1	14 July 2022
WO	2018219093	A1	06 December 2018	GB	201918320	D0	29 January 2020
				GB	2578026	A	15 April 2020
				GB	2578026	A8	22 July 2020
				GB	2578026	B	23 November 2022
WO	2006096648	A2	14 September 2006	WO	2006096648	A3	05 July 2007

A. 主题的分类

C12N15/89(2006.01)i; C12N15/12(2006.01)i; C12N15/113(2010.01)i; C12N15/85(2006.01)i; A01K67/027(2024.01)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)

IPC: C12N,A01K

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))

DWPI,CNXTX,ENTXT,ENTXT,CNKI,万方,ISI Web of Science,Pubmed,Elsevier Science,中国专利生物序列检索系统, Genbank,EMBL:小鼠模型,Kcnq2,EXON6,T274M,外显子6,6号外显子,Thr274Met,sgRNA,ssODN,PMSG,HCG,CRISPR/Cas9,受精卵,显微注射,fertilized egg,zygote,mouse model,microinjection,CCCGTAGCCAATG GTCGTCA, GCCCAAGTAACCAGAGCCCTTACCCCTCAGATCATGCTGA CGACCATTGGCTACGG GGACAAGTACCC TCA,GCCTTGTTTGGCACTAGTATGG,CCTACATCCTTGAATTATCTAGC.

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	MILH, Mathieu等. "A knock-in mouse model for KCNQ2-related epileptic encephalopathy displays spontaneous generalized seizures and cognitive impairment" Epilepsia., 第61卷, 第5期, 2020年4月2日 (2020 - 04 - 02), 第868-878页 参见摘要	1-8
Y	CN 114262709 A (首都医科大学宣武医院) 2022年4月1日 (2022 - 04 - 01) 参见说明书第11、45-89段	1-8
Y	CN 106929533 A (上海交通大学医学院附属新华医院) 2017年7月7日 (2017 - 07 - 07) 参见说明书第43-74段	8
Y	CN 115843747 A (吉林大学) 2023年3月28日 (2023 - 03 - 28) 参见说明书第7-24段	8
A	CN 113881708 A (清华大学) 2022年1月4日 (2022 - 01 - 04) 参见摘要	1-8

☒ 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

"D" 申请人在国际申请中引证的文件

"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

2024年8月26日

国际检索报告邮寄日期

2024年9月19日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

马颖

电话号码 (+86) 010-62411543

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

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
A	WO 2018219093 A1 (UNIV NANJING AGRICULTURAL) 2018年12月6日 (2018 - 12 - 06) 参见摘要	1-8
A	WO 2006096648 A2 (UNIV UTAH RES FOUND;SINGH NANDA A;LEPPERT MARK F;WHITE H STEVE;WILCOX KAREN S;OTTO JAMES;) 2006年9月14日 (2006 - 09 - 14) 参见摘要	1-8
A	BRUN, Lucile等. "Mouse models of Kcnq2 dysfunction" Epilepsia., 第63卷, 第11期, 2022年9月27日 (2022 - 09 - 27), 第2813-2826页 参见摘要及第2814页右栏最后一段至2815页	1-8

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/141592

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	114262709	A	2022年4月1日	无			
CN	106929533	A	2017年7月7日	无			
CN	115843747	A	2023年3月28日	无			
CN	113881708	A	2022年1月4日	WO	2022148078	A1	2022年7月14日
WO	2018219093	A1	2018年12月6日	GB	201918320	D0	2020年1月29日
				GB	2578026	A	2020年4月15日
				GB	2578026	A8	2020年7月22日
				GB	2578026	B	2022年11月23日
WO	2006096648	A2	2006年9月14日	WO	2006096648	A3	2007年7月5日