



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103911346 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 09

(21) 申请号 201410120625. 1

(22) 申请日 2014. 03. 27

(71) 申请人 江苏雄鸣医药科技有限公司

地址 226300 江苏省南通市高新区杏园路
299 号

(72) 发明人 陈实 姜东旭 黎寒

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司 32200

代理人 李纪昌 曹翠珍

(51) Int. Cl.

C12N 5/10(2006. 01)

C12N 15/85(2006. 01)

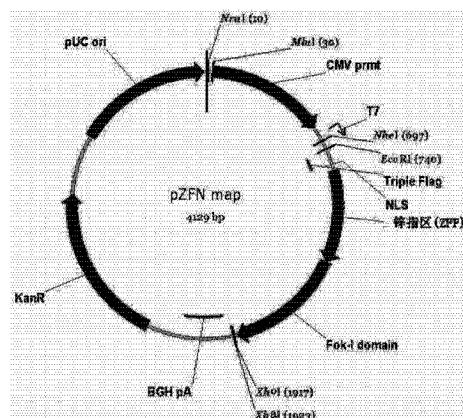
权利要求书1页 说明书6页
序列表2页 附图3页

(54) 发明名称

一种脊髓性肌萎缩症 SMN 基因的敲除方法及细胞模型

(57) 摘要

本发明涉及脊髓性肌萎缩症 SMN 基因的敲除方法及细胞模型。该模型通过如下步骤构建：(1) 构建和设计敲除 SMN 基因的锌指核酶质粒；(2) 将构建好的 SMN 基因 ZFN 敲除质粒用脂质体方法转染进哺乳动物细胞；(3) 利用 ZFN 特异敲除位点的基因组 PCR 产物和 DNA 序列测定以检测 ZFN 基因敲除的有效性；(4) 针对 ZFN 基因敲除有效的细胞，进行单克隆分离并逐一鉴定细胞敲除类型；(5) 对基因敲除细胞株进行 mRNA 水平鉴定；(6) 对基因敲除细胞株进行蛋白表达水平鉴定。本发明的脊髓性肌萎缩症病理细胞模型可用于研究 SMA 致病机理，也可通过检测该细胞模型中 SMN 复合物的蛋白表达水平对药物进行筛选。



1. 一种脊髓性肌萎缩症的细胞模型,其特征在于:是指 SMN1 基因纯合缺失、SMN2 基因杂合缺失的哺乳动物细胞。
2. 一种用于 SMN 基因敲除的表达锌指核酸酶的质粒载体,其特征在于:是指分别插入有如 SEQ ID NO. 2 和 SEQ ID NO. 3 所示碱基序列的质粒。
3. 根据权利要求 2 所述的用于 SMN 基因敲除的表达锌指核酸酶的质粒载体,其特征在于:所述的质粒是指 pAVX。
4. 权利要求 2 或 3 所述的质粒载体在哺乳动物细胞中表达出的锌指核酸酶。
5. 一种基于权利要求 2 或 3 所述的质粒载体的 SMN 基因敲除方法,其特征在于,包括如下步骤:将上述质粒载体转染哺乳动物细胞中,对 SMN 基因进行 PCR 扩增,再对扩增产物测序检测 SMN 基因发生敲除的细胞。
6. 根据权利要求 5 所述的质粒载体的 SMN 基因敲除方法,其特征在于:所述的哺乳动物细胞为 Hela、K562、HEK293、A549、MCF-7 或者 LNCap 中的任一种。
7. 根据权利要求 5 所述的质粒载体的 SMN 基因敲除方法,其特征在于:是采用脂质体 Lipofectamine2000 试剂进行转染。
8. 根据权利要求 5 所述的质粒载体的 SMN 基因敲除方法,其特征在于:PCR 扩增中使用的引物序列如 SEQ ID NO. 4 和 SEQ ID NO. 5 所示。
9. 权利要求 5 所述的 SMN 基因敲除方法所获得的 SMN 基因被敲除的 SMA 病理细胞模型。

一种脊髓性肌萎缩症 SMN 基因的敲除方法及细胞模型

[0001]

技术领域

[0002] 本发明涉及基因工程领域,具体涉及一种脊髓性肌萎缩症 SMN 基因的敲除方法及细胞模型。

[0003]

背景技术

[0004] 脊髓性肌肉萎缩症(Spinal Muscular Atrophy, SMA)是一种常染色体隐形遗传的神经肌肉疾病,病理特征显示为脊髓前角运动神经元变性,患者肢体近端和躯干肌肉无力和萎缩,最终导致呼吸衰竭甚至死亡。其在活产婴儿中发病率为 1/6000~1/10000,人群携带率为 1/40~1/60,居致死性常染色体隐形遗传病的第二位,仅次于囊性纤维化。该病的发生,给患者带来巨大的身心痛苦,同时也给家庭带来沉重的负担。

[0005] 随着分子生物学和遗传学的发展,现在研究发现:运动神经元存活(SMN)基因是 SMA 的主要致病基因。该基因定位于 5q11.2-13.3。人类染色体组中 SMN 基因有多个拷贝:一个 SMN1(位于端粒侧 SMN)和多个 SMN2(着丝粒侧 SMN)。SMN1 基因的全长转录本 f1-SMN 可以编码一种含有 294 个氨基酸的功能稳定的全长蛋白质(SMN 蛋白)。而 SMN2 较 SMN1 对比来看编码区存在着一个单碱基的 (840C → T) 的变化,这一改变导致细胞剪切机制的选择性的跳跃形成的转录本缺失 7 号外显子,形成一个截短的 mRNA 异构体“Δ 7SMN”,编码不具有生物功能并迅速降解的“截短蛋白质”,只有 10%-20% 的 SMN2 前 mRNA 发生正常剪切表达 SMN(SMN-f1) 蛋白,此为 SMN2 的补偿作用。目前认为,SMN1 基因改变导致 SMN 蛋白水平下调是引起 SMA 发病的根本原因,SMN2 被普遍认为是 SMA 的修饰基因,其拷贝数和剪接效率则与疾病的严重程度相关。约 95% 的患者为 SMN1 纯合缺失或 SMN1 转化为 SMN2 导致 SMN1 缺失。

[0006] 针对 SMN1 基因缺失后为何导致脊髓前角 α 运动神经元变性而患 SMA 疾病,目前机制尚不明确。而 SMA 转基因模型制作迄今技术不成熟且花费巨大。因此,若能应用基因敲除技术特异性敲除 SMN1 基因,体外构建 SMA 病理细胞模型,则能为 SMA 病因及发病机制的深入研究及高通量筛选治疗 SMA 药物提供新的平台。

[0007] 锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)是近年来兴起的一种基因敲除技术,其为一种人工改造的核酸内切酶,由一个人工锌指 DNA 识别域和一个非特异性核酸内切酶构成,锌指结构能特异性地结合 DNA 序列,每个锌指识别三个连续的 DNA 碱基,非特异性核酸内切酶行使剪切功能,两者结合就可在 DNA 特定位点进行定点断裂。与锌指蛋白组相连的非特异性核酸内切酶来自 FokI 翻末端 96 个氨基酸残基组成的 DNA 剪切域。FokI 是来自海床黄杆菌的一种限制性内切酶,只在二聚体状态时才有酶切活性,每个 FokI 单体与一个锌指蛋白组相连构成一个 ZFN,识别特定的位点,当两个识别位点相距恰当的距离时(6~8 bp),两个单体 ZFN 相互作用产生酶切功能,从而达到 DNA 靶向切割目的。针对靶序

列设计 8~10 个锌指结构域, 将这些锌结构域连在 DNA 核酸酶上, 便可实现靶序列的双链断裂 (Double strand break, DSB)。当两个 ZFN 切割靶位点, 制造出双链断裂以后, 细胞的修复机制被激活, 包括同源重组修复和非同源末端连接 (Non-homologous end-joining, NHEJ)。如果 DNA 修复是非同源的末端连接, 将会有大约 70% 的概率通过随机删减或添加可以引起移码突变的碱基, 或无义突变引起蛋白质长度变化, 从而导致基因敲除。到目前为止, 从包括中国专利在内的有关资料检索表明, 利用 ZFNs 技术敲除 SMN 基因, 建立 SMA 疾病的细胞模型, 尚未见到相关报道。

[0008]

发明内容

[0009] 本发明的目的是提供一种用于将脊髓性肌萎缩症 SMN 基因敲除的锌指核酸酶, 及其质粒载体, 以及所得到的细胞模型。本发明应用 ZFN 技术敲除 SMN 基因, 采用脂质体转染方法, 实现了建立脊髓性肌萎缩症 (SMA) 疾病的细胞模型, 可以应用在脊髓性肌萎缩症致病机理的研究中, 同时也为抗脊髓性肌萎缩症药物的高通量筛选提供细胞模型。

[0010] 本发明提供了一种用于 SMN 基因敲除的表达锌指核酸酶的质粒载体, 是指分别插入有如 SEQ ID NO. 2 和 SEQ ID NO. 3 所示碱基序列的质粒。

[0011] 进一步地, 所述的质粒是指 pAVX。

[0012] 进一步地, 所述的碱基序列的下游还连接有 FokI 碱基序列。

[0013] 另一方面, 本发明提供了上述的质粒载体在哺乳动物细胞中表达出的锌指核酸酶。

[0014] 另一方面, 本发明提供了一种用于 SMN 基因敲除方法, 包括如下步骤: 将上述质粒载体转染哺乳动物细胞中, 对 SMN 基因进行 PCR 扩增, 再对扩增产物测序检测 SMN 基因发生敲除的细胞。

[0015] 所述的哺乳动物细胞为 HeLa、K562、HEK293、A549、MCF-7 或者 LNCap 中的任一种。

[0016] 所述的基因敲除方法中, 是采用脂质体 Lipofectamine2000 试剂进行转染。

[0017] 另一方面, 本发明提供了通过上述 SMN 基因敲除方法所制备得到的 SMN 基因被敲除的 SMA 病理细胞模型。

[0018] 进一步地, 上述的细胞模型是指 SMN1 基因纯合缺失、SMN2 基因杂合缺失的哺乳动物细胞。

[0019] 有益效果

本发明建立的脊髓性肌萎缩症 (SMA) 细胞模型, 对于研究 SMN 基因在 SMA 疾病发病的作用机制提供了有力的工具, 通过以此细胞模型为介导, 进而进行相关小分子化合物和基因工程重组蛋白筛选, 获得可显著增加 SMN 蛋白表达量的小分子化合物和基因工程重组蛋白质类药物。筛选方法简单, 成本低廉, 具有良好的稳定性和可靠性。

[0020]

附图说明

[0021] 图 1 是用于表达锌指核酸酶的质粒载体的图谱。

[0022] 图 2 是转染后的细胞进行 PCR 扩增后的产物电泳图。

[0023] 图 3 是转染后的细胞进行 PCR 扩增后的产物测序图谱, 测序峰图在 ZFN 切割位点附近产生套峰。

[0024] 图 4 是实施例 1 中得到的 HeLa 细胞株 HS-66 和 HS-1-7 WB 检测结果。

[0025] 图 5 是实施例 4 中 HeLa、HS-66 和 HS-1-7 细胞株的 SMN 复合物核内聚点标记试验的细胞荧光图。

[0026]

具体实施方式

[0027] 下面对本发明的实施例结合附图作详细说明。本实施例在以本发明技术方案为前提下实施, 给出了具体实施方式和具体操作过程, 但本发明的保护范围不限于下述实施例。凡依照本发明公开内容所进行的任何本领域等同替换, 均属于本发明的保护范围。

[0028] 主要试剂及检测试剂盒 :HeLa 细胞, ZFN 敲除 SMN 基因质粒, 购自 sigma 公司 ;转染试剂 Lipofectin2000 购自 Invitrogen 公司 ;DMEM. 胎牛血清 FBS 购自 Hyclone 公司 ;总 RNA 提取试剂 Trizol 为 Invitrogen 产品 ;免抗 SMN(H-195)单克隆抗体为美国 santa cruz 公司产品, 二抗 Anti-Rabbit IgG 为美国 GE 公司产品 ;逆转录试剂盒购自天根生化科技有限公司 其他试剂为进口和国产分析纯试剂。实施例中, 酶切、连接、回收、转化、PCR 扩增等常规实验操作步骤详见《分子克隆 (第三版)》。

[0029] 实施例 1 SMN 基因的敲除

一、SMN 基因 ZFN 质粒敲除设计与构建

根据 ZFN 技术原理, 设计 DNA 靶向识别位点。该位点设计在 SMN1. SMN2 转录本共有第一外显子处, 经过大鼠反复试验, 确定的靶序列信息为 :

TCCGTGCTGTTCCGGCGCggcacAGGCCAGGTGAGGTCGCA (SEQ ID NO. 1)。两端划线部分为 ZFN 结合区, 中间小写字母为 ZFN 切割区。其质粒构建由美国 Sigma 公司完成和鉴定。其 ZFN 质粒具体信息如图 1 所示。

[0030] 所述人工锌指核酸酶表达载体的具体构建方法, 表达载体骨架为 pAVX (Sigma) 该载体含有 pUC ori 启动该质粒在原核细胞中的复制, 具有卡那霉素抗性基因 ; 在多克隆位点上游含有一个广谱启动子 CMV 序列, 能使克隆到该多克隆位点基因高效表达。利用体外化学合成的方法构建锌指蛋白表达元件 (EcoRI-Triple Flag-NLS-ZFP1-BamHI 和 EcoRI-Triple Flag-NLS-ZFP2-BamHI), 表达元件的整体序列分别如 SEQ ID NO. 2 和 SEQ ID NO. 3 所示, 合成的锌指蛋白表达元件两侧分别含有 EcoRI 和 BamHI 酶切位点, 可以利用 EcoRI 和 BamHI 酶切位点分别将锌指蛋白表达域 (ZFP1 和 ZFP2) 克隆到载体 pAVX 的多克隆位点上 ; NLS 是为核定位信号, 可以引导重组 ZFP 进入核区 ; Triple Flag 用于重组蛋白表达的 WB 检测中, 这两种元件中的 ZFP1 和 ZFP2 域是用于表达锌指蛋白, 分别与靶序列的左臂和右臂结合。同样, 再在体外合成 BamHI-FokI-XbaI 基因, 利用 BamHI 和 XbaI 酶切位点将 FokI 内切核酸酶表达元件克隆到该载体上 ZFP 元件的下游位置, 这样将锌指蛋白 DNA 结合域以及 FokI DNA 切割域相互结合, 构成了一个嵌合的限制性核酸内切酶。以此得到两种质粒, 分别用于表达结合在靶序列的左臂和右臂的锌指蛋白酶, 可以将靶序列敲除。

[0031] 将鉴定好的 ZFN 敲除质粒扩增培养, 提取质粒, 纯度要求达到 OD₂₆₀/OD₂₈₀=1.8~2.0 以备转染。

[0032] 二、SMN 基因 ZFN 敲除质粒转染

(1) 接种细胞。转染前一天将 Hela 细胞接种至六孔板内。细胞接种数量视其生长速度而定,一般为 1×10^6 个细胞。转染时要求细胞汇合度为 80 ~ 90%。

[0033] (2) 将分别取实施例 1 中得到的 ZFN 左臂和右臂的质粒载体 DNA $3 \mu\text{g}$ 加至 OPTI-MEM 培养基使其终体积为 $250 \mu\text{l}$,混匀,得到 DNA 悬液。

[0034] (3) 将 Lipofectamine2000 放置于 4℃冰盒架子或者冰上,使用前低转速离心,取 $10 \mu\text{l}$ 的 Lipofectamine2000 加至另外 $240 \mu\text{l}$ 的 OPTI-MEM 中,轻轻混匀,此步骤操作要迅速以免脂质体在室温下暴露时间过长影响后面转染效率,而后将混合物室温静置 5 分钟。

[0035] (4) 将 DNA 悬液($250 \mu\text{l}$) 和 Lipofectamine2000($250 \mu\text{l}$) 悬液混合,总体积 $500 \mu\text{l}$,轻轻混匀,室温静置 20 分钟。

[0036] (5) 将 DNA 和 Lipofectamine2000 混合液加至六孔板的孔内,前后左右晃动孔板混匀,置于培养箱中培养。

[0037] (6) 转染 $4 \sim 6$ 小时后细胞换液,换成含抗生素正常培养基,六孔板容量每孔 2ml 培养基。

[0038] (7) 转染细胞 $48 \sim 72\text{h}$ 后,收集 $5/6$ 的细胞,用于基因敲除验证的基因组提取。剩余部分直接分散为细胞悬液,分入 96 孔板中分离单克隆。

[0039] 三、ZFN 敲除 SMN 基因有效性的检测

针对 ZFN 特异敲除位点上下游设计引物,其序列为:

SMN Knockout-F : 5' -GGGCGATAACCACTCGTAGA-3' (SEQ ID NO. 4)

SMN Knockout-R : 5' -AAGACGTAGAAAACGCGGA-3' (SEQ ID NO. 5)

收集转染 $48 \sim 72$ 小时的 Hela 细胞:提取全基因组,步骤如下:

(1) 将细胞转移到 1.5ml EP 管中,加入 $20 \mu\text{l}$ 蛋白酶 K 和 $220 \mu\text{l}$ 裂解液 QS。 65°C 温浴 $10\text{--}15\text{min}$ 。溶液应呈黑色。简短离心以去除管盖内壁的水珠。

[0040] (2) 加入 $220 \mu\text{l}$ 无水乙醇,上下来回颠倒混匀。此时可能出现絮状沉淀,将溶液及絮状沉全部淀转移到纯化柱中。 $12,000 \text{ rpm}$ 离心 1min ,弃滤液。

[0041] (3) 加入 $500 \mu\text{l}$ 去蛋白液 PS。 $12,000 \text{ rpm}$ 离心 1min ,弃滤液。

[0042] (4) 加入 $500 \mu\text{l}$ 漂洗液 PE。 $12,000 \text{ rpm}$ 离心 1min ,弃滤液。

[0043] (5) 加入 $500 \mu\text{l}$ 漂洗液 PE。 $12,000 \text{ rpm}$ 离心 1min ,弃滤液。

[0044] (6) $12,000 \text{ rpm}$ 离心 3min ,以彻底去除纯化柱中残留的液体。

[0045] (7) 将纯化柱置于新的 1.5 ml 离心管中。向纯化柱中央处,悬空滴加 $30 \sim 100 \mu\text{l}$ 纯化液 TE。室温放置 2min 。

[0046] (8) $12,000 \text{ rpm}$ 离心 2min ,管底即为细胞基因组 DNA。 -20°C 保存。

[0047] 提取到的转染细胞基因组,使用 SMN Knockout-F 和 SMN Knockout-R 引物进行 PCR,其扩增条件为:

94°C 5min;

94°C 45s, 54°C 30s, 72°C 45s,($30 \sim 35$ 个循环);

72°C 5min。

[0048] 1% 琼脂糖凝胶电泳后经凝胶成像系统检测,PCR 扩增 ZFN 作用靶位点片段长度为 367 bp ,如附图 2 所示,经琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收目的片段连接 T 载体,转化感受

态细胞 E. coli. DH5 α 12 h 后测定靶 DNA 序列以统计 PCR 产物片段中的突变比例和突变类型。如附图 3 所示, 片段测序出现套峰, 认为 ZFN 在此过程中对靶基因产生切割作用, 说明在靶向敲出区域存在着敲出后的移码突变修复。

[0049] 再通过有限稀释法进行单克隆分离。

四、鉴定单克隆 SMN 基因敲除的突变类型

培养于 96 孔板中的细胞克隆长至 80 ~ 90% 汇合度时, 消化、收集细胞后一部分冻存, 提取其余细胞的基因组 DNA, 共选用 17 个细胞株, 通过 PCR 扩增 ZFNs 作用靶位点上下游 367bp, 判断单克隆在基因组水平上经 ZFN 作用后的改变, 并进行 T-A 克隆后通过 DNA 测序鉴定敲除区域是否有细胞修复机制对 DSB 双链断裂产生的插入和缺失。

[0051] 本实施例中, 在采用的 17 株单克隆细胞中, 经单克隆 PCR 片段的测序检测, 证实有 5 株存在 SMN 基因突变的细胞。

实施例 2 SMN 基因敲除细胞株 mRNA 表达鉴定

对于鉴定 SMN 敲除有效的细胞, 提取 RNA, 方法参见 Trizol 试剂盒说明书, 总 RNA 提取后, 用无 RNAase 活性的 DNase 消化以去除痕量基因组 DNA, 经紫外分光光度计测定 RNA 含量, 电泳检测确定 RNA 质量; cDNA 的合成按照 Tiangen 公司的逆转录试剂盒说明书进行。针对 SMN1 、SMN2 第七个外显子中的 (C → T) 不同设计引物, 以 SMN1 、SMN2 不相同的转录本为模板进行 RT-PCR 根据半定量的情况初步确定 SMN1 、SMN2 缺失情况。

[0053] 然而我们发现外显子上的碱基缺失和碱基的插入并没有影响 SMN1 、SMN2 所转录的 RNA 的稳定性。通过这一结论我们又在 SMN1 和 SMN2 都具有的全长转录本 transcript variant d、transcript variant b 进行设计引物, 其序列为

SMN cDNAbd-F :5' -GAAGTTACTACAAGCGGTCTC-3' (SEQ ID NO. 6)

SMN cDNAbd-R :5' -GCTCTATGCCAGCATTTCTCCT-3' (SEQ ID NO. 7)

RT-PCR 后进行 T-A 克隆, 测序后利用第七个外显子 (C → T) 的点突变以区别 SMN1 、SMN2 突变情况。根据这种方式我们得到了两株 SMN1-/- SMN2+/- 基因型的 HeLa 细胞株。称之为 HS-66 和 HS-1-7。

[0054] 例如: HS-66 细胞的突变情况如下:

野生型的 SMN1 位点的部分序列是:

AGCGGCGGCAGTGGTGGCGGCCGTCCCGGAGCAG [GAGGATTCCGTGCTGTTCCGGCGCGCACAGGCCA] GAG CGATGATTCTGACATTGGGATGATACAGC

在 HS-66 细胞的 SMN1 的位点上缺少上述括号 [] 中的序列段, 共 35 个 bp, 同时在缺失的位置处插入了 103 个 bp 的插入段。

[0055] AGCGGCGGCAGTGGTGGCGGCCGTCCCGGAGCAG : : : : : : (-35) : : : : : : : : : : : : GAGCGATGA TTCTGACATTGGGATGATACAG ;

插入段是:

ACAACTCCAGTGAGCGGATCGACTTGATGCTGTCCTGGAGGCTGCGGAAGGAGAGTTGGCCGGAAGAACGGGTG CTGAGAGCGCTAATAGGGAGACTGCAGTGG

在 HS-66 细胞的 SMN1 的另一个等位基因上, 存在有 4 个 bp 的缺失, 序列是:

GGATTCCGTGCTGTTCCGGCGCG : : (-4) : : AGGCCAGAGCGATGATTCTGACATTGGGATGATACAGCA

野生型的 SMN2 位点的部分序列是:

AGCGGCCGCAGTGGTGGCGCGTCCCGGAGCAG [GAGGATTCCGTGCTGTTCCGGCGCGCACAGGCCA] GAG
CGATGATTCTGACATTGGGATGATAACAGC

在 HS-66 细胞的 SMN2 的位点上缺少上述括号 [] 中的序列段, 共 35 个 bp, 同时在缺失的位置处插入了 103 个 bp 的插入段。

[0056] AGCGGCCGCAGTGGTGGCGCGTCCCGGAGCAG :::::::::: (-35) :::::::::: GAGCGATGATTCT
GACATTGGGATGATAACAG

插入段是 :

ACAACCTCCAGTGAGCGGATCGACTTGATGCTGTCCTGAGGCTGCGGAAGGAGAGTTGGGCCGGAAGAACGGTG
CTGAGAGCGCTAATAGGGAGACTGCACTGG

在 SMN2 的另一个等位基因上, 未发现有突变的情况发生。

[0057] 实施例 3 Western blot 检测 SMN 蛋白表达

对于得到的两株 SMN1/- SMN2/- 基因型 HeLa 细胞株 HS-66 和 HS-1-7 待其在 60mm 细胞培养皿中长至 80 ~ 90% 时, 胰酶消化, 裂解细胞, 提取蛋白, 用酶标仪测定蛋白浓度, 取 45ug 上样 SDS-PAGE 电泳, 用 10% 分离胶, 5% 浓缩胶, PVDF 膜湿转, 转膜时间 1h, 兔抗 SMN Antibody 单抗孵育 1h, Goat-Anti-rabbit 二抗孵育 1h, ECL 荧光检测, 显影定影并拍照。如附图 4 所示, 跟正常 HeLa 细胞比较其 SMN 基因敲除细胞表达 SMN 蛋白的量明显降低。

[0058] 实施例 4 细胞中 SMN 复合物核内聚点检测

采用实施例 2 中得到的 HS-66 和 HS-1-7 细胞株, 以 Gemin3 为 SMN 蛋白复合物细胞核内聚点标记物, 如图 5 所示, 第 1 列为 DAPI 细胞核染色, 第 2 列 gemin3 染色, 第 3 列为叠图, 即双染色全图。可以看出, 在第一排的 HeLa 细胞中, SMN 复合物聚点数正常, 而在敲除细胞株 HS66 和 HS-1-7 中, 核内聚点数大大下降甚至消失不见, 与病理特征相同。

SEQUENCE LISTING

<110> 江苏雄鸣医药科技有限公司
 <120> 一种脊髓性肌萎缩症基因的敲除方法及细胞模型
 <130>
 <160> 7
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> smn 片段
 <400> 1
 tccgtgtgt tccggcgccg cacaggccag gtgaggtcgc a 41
 <210> 2
 <211> 731
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 2
 gaattcgcct agagatctgg cggcggagag ggcagaggaa gttttctaac ctgcgggtgac 60
 gtggaggaga atcccgcccc taggaccatg gactacaag accatgacgg tgattataaa 120
 gatcatgaca tcgattacaa ggatgacgat gacaagatgg cccccaagaa gaagaggaag 180
 gtcggcattc atgggttacc cgccgctatg gctgagaggc cttccagtgc tcgaatctgc 240
 atgcgttaact tcagtcagtc cggcgacctg acccgccaca tccgcaccca caccggcgag 300
 aagccttttgc cctgtgacat ttgtggagg aaatttgccg acaccggcgc ccgcctgaag 360
 cataccaaga tacacacggg cagccaaaag cccttccagt gtcgaatctg catgcgtaac 420
 tttagtcgct ccgccaacctt ggcccgcac atccgcaccc acaccggcga gaagcctttt 480
 gcctgtgaca ttgtggagg gaaatttgcc acctccggcc acctgtcccg ccataccaag 540
 atacacacgg gatctcagaa gcccttccag tgtcgaatct gcatgcgtaa cttcagtctg 600
 tccggcgacc tgaccgcacc catccgcacc cacaccggcg agaagccttt ttgcctgtga 660
 catttgtggg aggaaaattt gcccgccgcc agcacctgga cgcccatacc aagatacacc 720
 tgcggggatc c 731
 <210> 3
 <211> 651
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 3
 gaattcgccttggactacaa agaccatgac ggtgattata aagatcatga catcgattac 60
 aaggatgacg atgacaagat ggcccccaag aagaagagga aggtcggcat ccacgggta 120
 cccggcccta tggctgagag gcccttccag tgtcgaatct gcatgcgtaa cttcagtctg 180

tccggccacc tggcccgcaca	cacccgcacc cacaccggcg agaagcctt tgcctgtgac	240
atttgtggaa gggaaatttc	cgactcctcc aaccgcgagg cccatcacaa gatacacacg	300
ggcagccaaa agcccttcca	gtgtcgaatc tgcatgcgt acttcagtcg ctccgacaac	360
ctgtccgtgc acatccgcac	ccacaccggc gagaagcctt ttgcctgtga catttgtgg	420
aggaaatttg cccagtcctc	cgacctgcgc cgccatacca agatacacac gggatctcag	480
aagcccttcc agtgtcgaat	ctgcattgcgt aacttcagtc gtagtgacac cctgagccag	540
cacatccgca cccacacagg	cgagaagcct tttgcctgtg acatttgtgg gaggaaattt	600
ggccacaaca gccaccgcac	aaagcataacc aagatacacc tgcggggatc c	651
<210> 4		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 4		
ggcgataac cactcgatag		20
<210> 5		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 5		
aagacgtaga aaaacgcgga		20
<210> 6		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 6		
gaagttacta caagcggtcc tc		22
<210> 7		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 7		
gctctatgcc agcatttctc ct		22

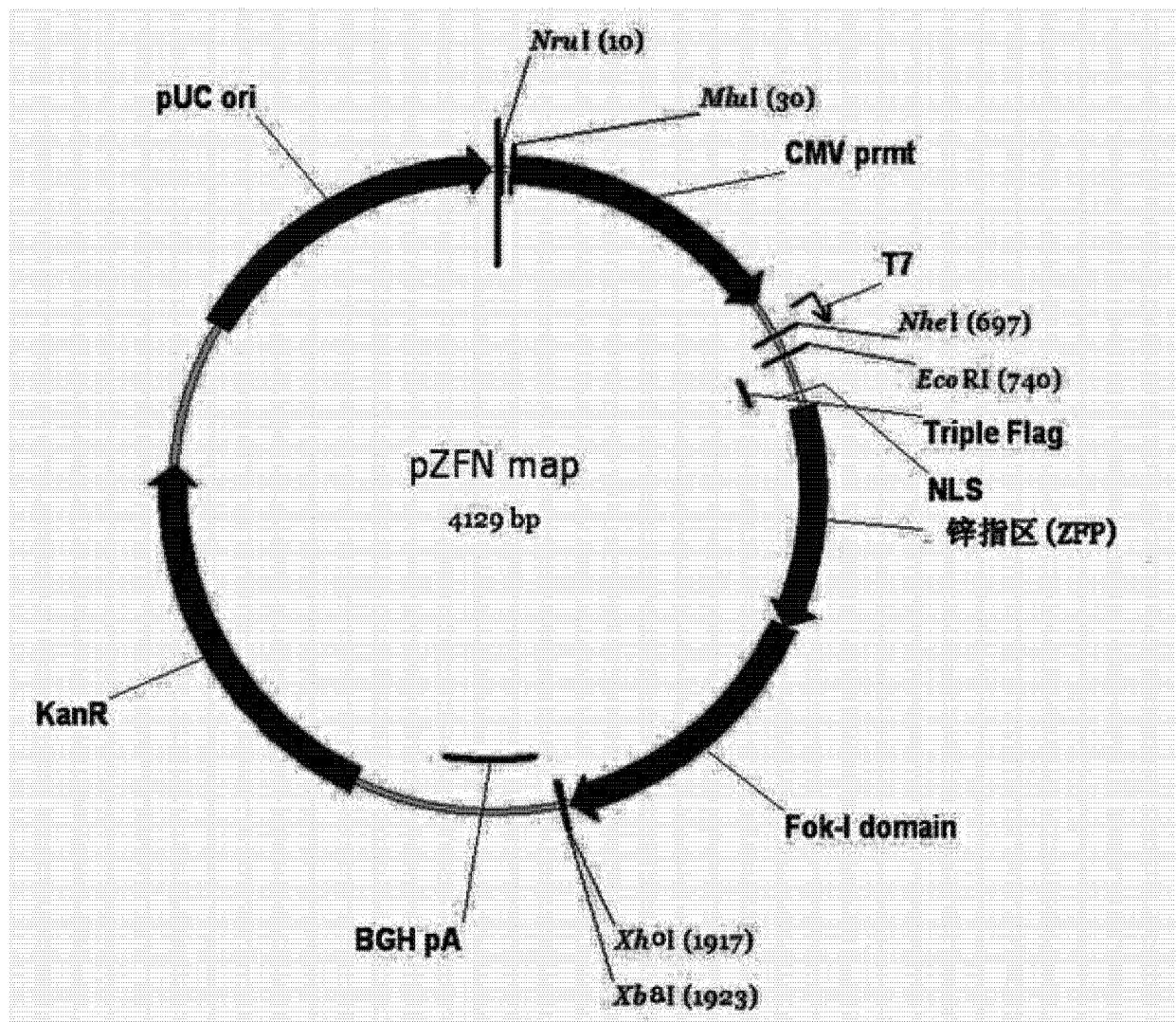


图 1

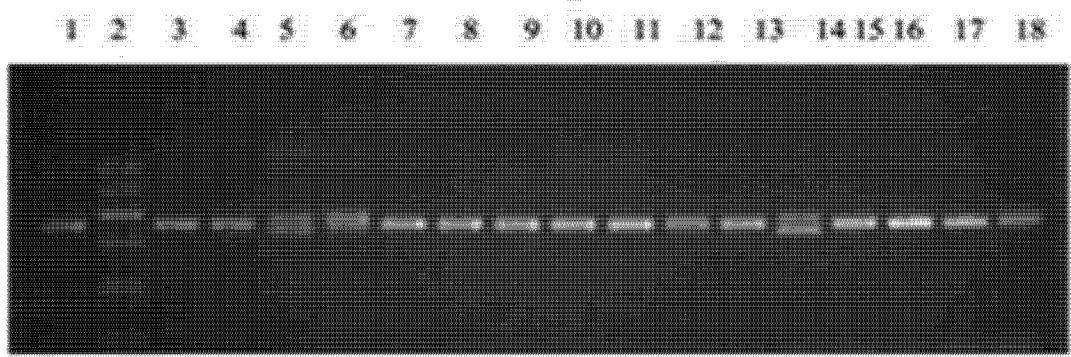


图 2

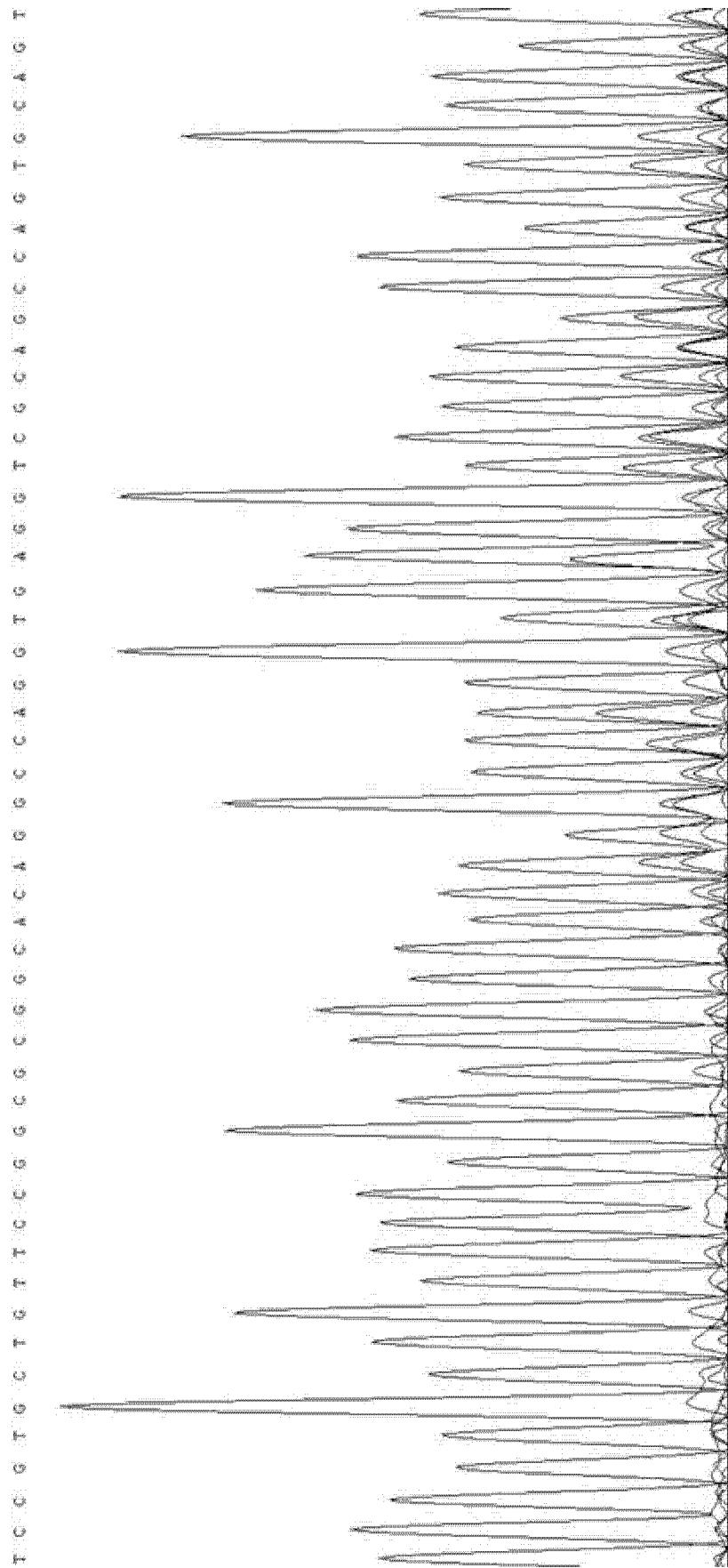


图 3

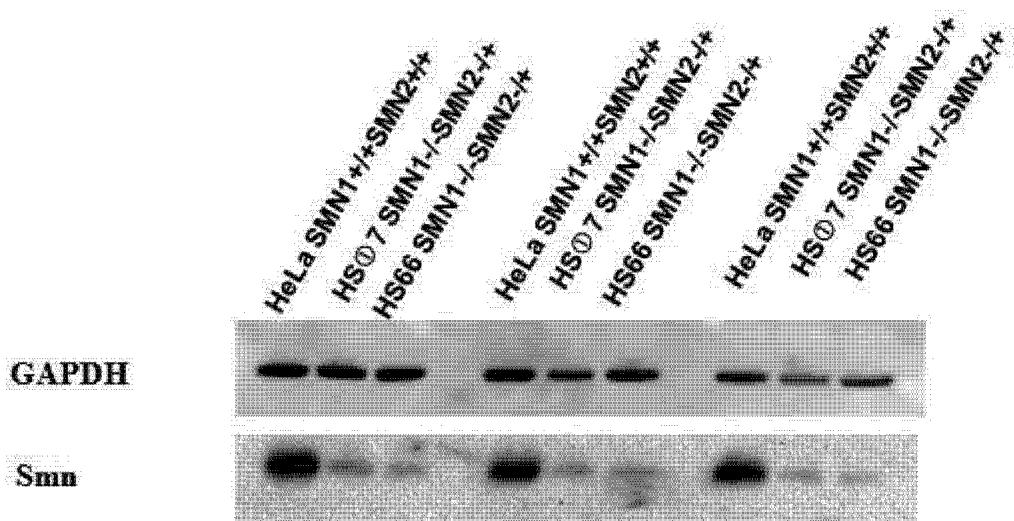


图 4

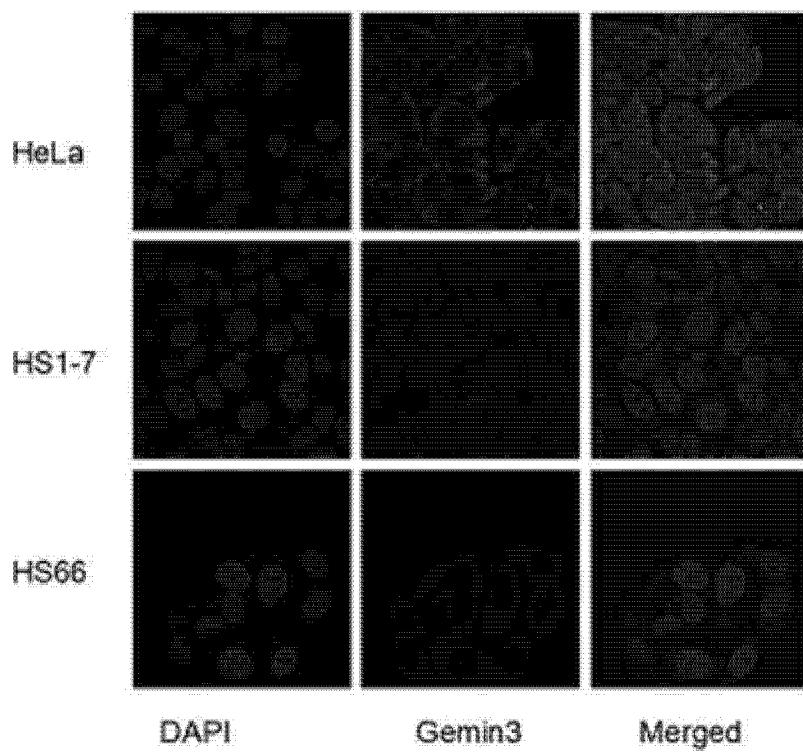


图 5