(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
2019 年 12 月 19 日 (19.12.2019)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2019/237394 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 15/85 (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/091724

(22) 国际申请日: 2018 年 6 月 16 日 (16.06.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 深圳市博奥康生物科技有限公司 (SHENZHEN BIOCAN TECHNOLOGIES CO., LTD.) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区西丽街道珠光路134号珠光创新科技园1栋509室 毛吉炎, Guangdong 518055 (CN)。

(72) 发明人: 毛吉炎 (MAO, Jiyan); 中国广东省深圳市南山区西丽街道珠光路134号珠光创新科技园1栋509室, Guangdong 518055 (CN)。

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

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

WO 2019/237394 A1

(54) **Title:** METHOD FOR TARGETING KNOCKOUT OF HUMAN ALPS5 GENE USING CRISPR/CAS9 SYSTEM

(54) 发明名称: 一种应用CRISPR/Cas9系统靶向敲除人ALPS5基因的方法

(57) **Abstract:** Provided is a method for targeting knockout of the human ALPS5 gene using the CRISPR/Cas9 system. The method comprises: designing a gRNA that targets the human ALPS5 gene according to the PAM design principle of the gRNA; linking the gRNA to the px459 vector for obtaining a recombinant vector for the targeting knockout of the human ALPS5 gene; transforming the recombinant vector into Jurkat cells; and carrying out the targeting knockout of the human ALPS5 gene.

(57) 摘要: 提供了一种应用CRISPR/Cas9系统靶向敲除人ALPS5基因的方法，该方法按照gRNA的PAM设计原则设计靶向人ALPS5基因的gRNA，将gRNA与px459载体进行连接得到靶向敲除人ALPS5基因的重组载体，转化Jurkat细胞中，靶向敲除人ALPS5基因。

一种应用CRISPR/Cas9系统靶向敲除人ALPS5基因的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学领域，特别涉及一种应用CRISPR/Cas9系统靶向敲除人ALPS5基因的方法。

背景技术

[0002] 人体的抗癌免疫机制包括细胞免疫和体液免疫两个方面，但是以细胞免疫为主，在细胞免疫机制中起主要作用的效应细胞为T细胞，其中CD8+ T细胞是肿瘤免疫中最主要的效应执行细胞。T细胞活化需要双信号识别，肿瘤抗原首先与抗原提呈细胞或者靶细胞上的MHC分子结合后，与T淋巴细胞表面抗原识别受体结合为T细胞活化提供第一信号；T细胞表面的CD28与抗原提呈细胞表面或者靶细胞表面B7分子结合提供第二信号。双信号识别后，T细胞完全活化，活化的T细胞首先自我增殖，产生大量的抗原特异性T细胞，迁移到肿瘤局部起到杀伤作用。活化的T细胞2~3天后ALPS5等负调控分子开始表达上调。

发明概述

技术问题

[0003] ALPS5为跨膜蛋白，属于CD28家族成员。ALPS5的配体为B7家族成员，其与CD28分子竞争性地与B7-1和B7-2结合，抑制活化的T细胞增殖，对免疫起负调控作用，在生理情况下，可以防止免疫过度放大，维持着健康与疾病的动态平衡，但却常常会被肿瘤细胞利用，达到免疫逃逸的目的。因此对ALPS5在肿瘤发生发展中作用的研究可以很好地促进肿瘤治疗领域的发展，但现有技术中缺乏靶向敲除ALPS5基因表达的手段，对相关研究的进展造成了一定的阻碍。

问题的解决方案

技术解决方案

[0004] 针对上述问题，本发明提供一种应用CRISPR/Cas9系统靶向敲除人ALPS5基因

的方法，本发明是这样实现的：

[0005] 一种应用CRISPR/Cas9系统靶向敲除人ALPS5基因的方法，具体步骤如下：

[0006] （1）构建pxALPS5载体，方法如下：

[0007] a.

根据人ALPS5基因的序列和gRNA的PAM设计规则，设计出靶向ALPS5的gRNA；

[0008] b. Bbs I酶切px459质粒，电泳回收酶切产物；

[0009] c. 用T4 DNA连接酶连接所述靶向ALPS5的gRNA与酶切后的px459载体，获得所述pxALPS5载体；

[0010] d. 将所述pxALPS5载体转化至大肠杆菌NEBStable中，培养并挑取单克隆细菌后进行测序鉴定。

[0011] （2）取测序正确的重组NEBStable大肠杆菌，37℃，250 rpm培养14 h后，利用无内毒素质粒提取试剂盒对所述pxALPS5载体进行提取。

[0012] （3）脂质体转导pxALPS5至受体细胞中，工作浓度嘌呤霉素筛选7 d后对受体细胞进行扩大培养并提取基因组DNA，PCR扩增后电泳回收PCR产物，然后用T7 Endonuclease I对产物进行酶切并进行电泳鉴定。

[0013] 进一步的，所述BBs I酶切体系反应温度为37℃，时间为2 h，酶切体系为：2μg的px459质粒，3μl的10×FastDigest Buffer，3μl的Bbs I，用水补足至30μl。

[0014] 进一步的，所述脂质体选用Lipofectamine 2000。

[0015] 进一步的，所述受体细胞选用Jurkat细胞。

[0016] 进一步的，T7 Endonuclease I反应体系为：1 μl 10 × T7E1 Buffer，1 μl T7 Endonuclease I，1 μg 回收的PCR产物，用水补足至10 μl。反应条件为：37℃水浴1 h。

[0017] 上述的应用CRISPR/Cas9系统靶向敲除人ALPS5基因的方法可用于人的ALPS5基因敲除。

发明的有益效果

有益效果

[0018] 本发明提供的应用CRISPR/Cas9系统靶向敲除人ALPS5基因的方法为深入探索

ALPS5基因的作用提供实验技术平台，可用于与ALPS5基因表达异常相关的药物研究和开发中。

对附图的简要说明

附图说明

[0019] 图1为对照组和实验组Jurkat细胞的T7 Endonuclease I试验结果图。

发明实施例

本发明的实施方式

[0020] 本说明书中公开的所有特征，或公开的所有方法或过程中的步骤，除了互相排斥的特征和/或步骤以外，均可以以任何方式组合。

[0021] 实施例一靶向敲除基因克隆载体的构建

[0022] a.

根据人ALPS5基因的序列和gRNA的PAM设计规则，设计出靶向ALPS5的gRNA，其上游序列为，5'-ACCGATAAAGTCCTTGATTCTGTG

-3'，下游序列为，5'-AAACCACAGAATCAAGGACTTTAT-3'。溶解后，各取5 μl混匀后，95℃加热5 min，然后自然冷却至室温，形成带有Bbs I粘性末端的DNA双链。

[0023] b. Bbs I酶切px459质粒，将酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳，切胶回收并测定浓度。

[0024] c. 用T4 DNA连接酶连接a、b两步获得的产物。然后将连接产物转化至大肠杆菌NEBStable中，测序鉴定。

[0025] 实施例二无内毒素质粒DNA的制备

[0026] 取实施例一中测序鉴定正确的菌株，置于氨苄青霉素浓度为100μg/ml的LB液体培养基中，250 rpm、37℃振荡培养12-16 h。4℃，10000 rpm离心收集菌液，弃上清，收集菌体，然后按照Endo-Free Plasmid Mini Kit试剂盒说明书操作步骤提取质粒，得无内毒素的pxALPS5质粒。

[0027] 实施例三Jurkat细胞的转导

[0028] 转导前一天将Jurkat细胞接种于35mm的培养皿中，接种密度为50%，培养基为含10%胎牛血清(FBS)的DMEM，培养条件为37℃，5%的CO2。转导当天，按照

Lipofectamine 2000试剂盒说明书导入2μg的pxALPS5质粒，转染后48 h，加入1 μg/ml 嘌呤霉素筛选7 d。筛选完成后，将嘌呤霉素的浓度降为0.5 μg/ml继续扩大培养细胞。

[0029] 实施例四 **T7 Endonuclease I**试验检测转导效果

[0030] 分别取未经处理的Jurkat细胞和导入pxALPS5质粒的Jurkat细胞接种至六孔板，待细胞长满后，提取基因组DNA，然后应用高保真PCR酶PrimeSTAR HS扩增基因编辑预期发生的位点，电泳回收PCR产物。

[0031] PCR产物经重退火后，用T7 Endonuclease I在37℃酶切1 h，然后进行琼脂糖凝胶电泳，结果如图1所示，与对照组相比，实验组出现了2条明显的切割条带，说明所述靶向ALPS5基因的gRNA序列引导CRISPR/Cas9系统成功对人ALPS5基因进行编辑。

[0032] 上述说明是针对本发明较佳可行实施例的详细说明，但实施例并非用以限定本发明的专利申请范围，凡本发明所提示的技术精神下所完成的同等变化或修饰变更，均应属于本发明所涵盖专利范围。

工业实用性

[0033] 本发明提供的应用CRISPR/Cas9系统靶向敲除人ALPS5基因的方法为深入探索ALPS5基因的作用提供实验技术平台，可用于与ALPS5基因表达异常相关的药物研究和开发中。

权利要求书

[权利要求 1] 一种应用CRISPR/Cas9系统靶向敲除人ALPS5基因的方法，其特征在于：包括如下步骤：

（1）构建pxALPS5载体，方法如下：

A.

根据人ALPS5基因的序列和gRNA的PAM设计规则，设计出靶向ALPS5的gRNA；

B. Bbs I酶切px459质粒，电泳回收酶切产物；

C. 用T4 DNA连接酶连接所述靶向ALPS5的gRNA与酶切后的px459载体，获得所述pxALPS5载体；

D. 将所述pxALPS5载体转化至大肠杆菌NEBStable中，培养并挑取单克隆细菌后进行测序鉴定。

（2）取测序正确的重组NEBStable大肠杆菌，37℃，250 rpm培养14 h后，利用无内毒素质粒提取试剂盒对所述pxALPS5载体进行提取。

（3）脂质体转导pxALPS5至受体细胞中，工作浓度嘌呤霉素筛选7 d后对受体细胞进行扩大培养并提取基因组DNA，PCR扩增后电泳回收PCR产物，然后用T7 Endonuclease I对产物进行酶切并进行电泳鉴定。

[权利要求 2] 根据权利要求1所述的应用CRISPR/Cas9系统靶向敲除人ALPS5基因的方法，其特征在于，所述靶向ALPS5的gRNA的上游序列为，5’-ACCGATAAAGTCCTTGATTCTGTG

-3’，下游序列为，5’-AAACCACAGAATCAAGGACTTTAT-3’。

[权利要求 3] 根据权利要求1所述的应用CRISPR/Cas9系统靶向敲除人ALPS5基因的方法，其特征在于，所述脂质体选用Lipofectamine 2000。

[权利要求 4] 根据权利要求1所述的应用CRISPR/Cas9系统靶向敲除人ALPS5基因的方法，其特征在于，所述受体细胞选用Jurkat细胞。

[权利要求 5] 根据权利要求1-4所述任意一项应用CRISPR/Cas9系统靶向敲除人ALPS5基因的方法，其特征在于，所述应用CRISPR/Cas9系统靶向敲除人

ALPS5基因的方法可用于人的ALPS5基因敲除。

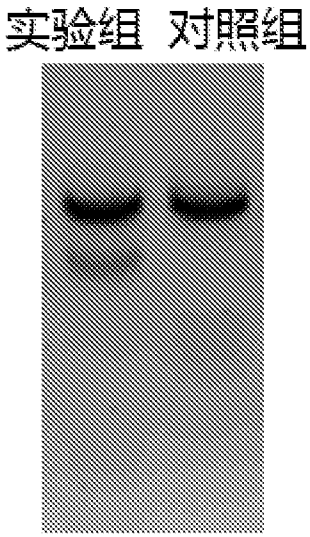


图 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/091724

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/85(2006.01)i; C12N 15/113(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)

CNABS, TWABS, HKABS, MOABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, TWTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, WEB OF SCIENCE: 基因编辑, 敲除, 载体, 脂质体, CRISPR, jurkat, CD28, gRNA, ALPS5, CTLA4, CTLA-4, px459, lipofectamine, knock out, liposome.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 107815468 A (BEIJING BIOCYTOGEN CO., LTD.) 20 March 2018 (2018-03-20) see claims 1-19	1-5
Y	CN 106434663 A (ZUNYI MEDICAL UNIVERSITY) 22 February 2017 (2017-02-22) see claims 1-3	1-5
A	CN 106995821 A (SHENZHEN CHILDREN"S HOSPITAL) 01 August 2017 (2017-08-01) see entire document	1-5
A	CN 107847524 A (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 27 March 2018 (2018-03-27) see description, paragraph 101, and table 1	1-5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
08 March 2019	**27 March 2019**

Name and mailing address of the ISA/CN	Authorized officer
State Intellectual Property Office of the P. R. China **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing** **100088** **China**	
Facsimile No. **(86-10)62019451**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2018/091724

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	107815468	A	20 March 2018	None			
CN	106434663	A	22 February 2017	None			
CN	106995821	A	01 August 2017	None			
CN	107847524	A	27 March 2018	MX	2017012407	A	07 March 2018
				EP	3273976	A4	19 December 2018
				KR	20180020125	A	27 February 2018
				IL	254734	D0	30 November 2017
				US	2016348073	A1	01 December 2016
				AU	2016243583	A1	16 November 2017
				JP	2018510657	A	19 April 2018
				WO	2016160721	A1	06 October 2016
				BR	112017020750	A2	26 June 2018
				CA	2984237	A1	06 October 2016
				EP	3273976	A1	31 January 2018

国际检索报告

国际申请号 PCT/CN2018/091724

A. 主题的分类

C12N 15/85(2006.01)i; C12N 15/113(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）)

CNABS, TWABS, HKABS, MOABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, TWTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, WEB OF SCIENCE:基因编辑，敲除，载体，脂质体，CRISPR，jurkat，CD28，gRNA，ALPS5，CTLA4，CTLA-4，px459,lipofectamine,knock out,liposome.

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	CN 107815468 A (北京百奥赛图基因生物技术有限公司) 2018年 3月 20日 (2018-03-20) 参见权利要求1-19	1-5
Y	CN 106434663 A (遵义医学院) 2017年 2月 22日 (2017-02-22) 参见权利要求1-3	1-5
A	CN 106995821 A (深圳市儿童医院) 2017年 8月 1日 (2017-08-01) 参见全文	1-5
A	CN 107847524 A (哈佛学院校长同事会) 2018年 3月 27日 (2018-03-27) 参见说明书第101段，表1	1-5

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

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

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

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

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

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

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2019年 3月 8日	2019年 3月 27日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	李肖蕖
传真号 (86-10)62019451	电话号码 62411615

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2015年1月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2018/091724

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	107815468	A	2018年 3月 20日	无			
CN	106434663	A	2017年 2月 22日	无			
CN	106995821	A	2017年 8月 1日	无			
CN	107847524	A	2018年 3月 27日	MX	2017012407	A	2018年 3月 7日
				EP	3273976	A4	2018年 12月 19日
				KR	20180020125	A	2018年 2月 27日
				IL	254734	D0	2017年 11月 30日
				US	2016348073	A1	2016年 12月 1日
				AU	2016243583	A1	2017年 11月 16日
				JP	2018510657	A	2018年 4月 19日
				WO	2016160721	A1	2016年 10月 6日
				BR	112017020750	A2	2018年 6月 26日
				CA	2984237	A1	2016年 10月 6日
				EP	3273976	A1	2018年 1月 31日