



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106957856 A

(43) 申请公布日 2017. 07. 18

(21) 申请号 201610020704. 4

A01K 67/027(2006. 01)

(22) 申请日 2016. 01. 12

(71) 申请人 中国科学院广州生物医药与健康研究院

地址 510663 广东省广州市广州科学城开源大道 190 号

(72) 发明人 樊娜娜 韩凯 赖良学

(74) 专利代理机构 广州华进联合专利商标代理有限公司 44224

代理人 林青中 万志香

(51) Int. Cl.

C12N 15/85(2006. 01)

C12N 5/10(2006. 01)

C12N 15/06(2006. 01)

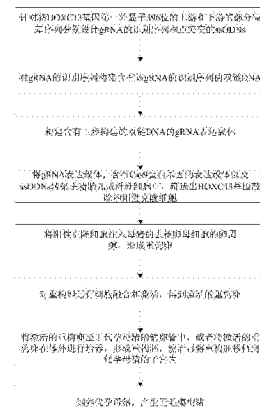
权利要求书2页 说明书10页
序列表3页 附图6页

(54) 发明名称

无毛模型猪的重构卵及其构建方法和模型猪的构建方法

(57) 摘要

本发明涉及一种突变位点可控的无毛模型猪的重构卵及其构建方法和模型猪的构建方法。本发明的无毛模型猪的重构卵及其构建方法和模型猪的构建方法利用 CRISPR/Cas9 和点突变技术, 在 Cas9 在基因特定位点发生切割后, 细胞会以同源重组方式利用提供的 ssODNs 为模板进行精确修复, 通过 CRISPR/Cas9 和 ssODNs 设计可在基因特定位点引入终止密码子, 使基因翻译提前终止, 从而造成基因功能缺失。通过该方法可以精确复制人类疾病基因突变类型, 从而避免由于基因突变方式不同而导致的表型差异。通过上述方法建立的无毛模型猪除毛发缺失, 蹄子发育缺陷及舌丝状乳头发育缺陷外无其他异常, 可用于各种皮肤病学研究 and 外用皮肤药、化妆品测试。其皮肤再经过免疫学改造, 可用于临床皮肤移植。



1. 一种无毛模型猪的重构卵的构建方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤一:针对猪HOXC13基因第一外显子396位及其上游和下游的部分碱基序列分别设计gRNA识别序列和点突变的ssODNs,其中,所述gRNA识别序列的互补序列与所述HOXC13基因第一外显子396位及其上游的部分碱基序列一致,所述ssODNs的碱基序列中与所述HOXC13基因第一外显子396位胞嘧啶对应的碱基为腺嘌呤且其他碱基序列与所述HOXC13基因第一外显子396位的上游和下游的部分碱基序列一致或为相应的同义突变序列;

步骤二:对所述gRNA识别序列构建含有该gRNA识别序列的双链DNA;

步骤三:构建含有步骤二中所述双链DNA的gRNA表达载体;

步骤四:将所述gRNA表达载体、含有Cas9蛋白基因的表达载体以及所述ssODNs转染进猪胎儿成纤维细胞中,筛选出HOXC13基因敲除的阳性克隆细胞;

步骤五:将所述阳性克隆细胞注入母猪的去核卵母细胞的卵周隙,形成重构卵。

2. 如权利要求1所述的无毛模型猪的重构卵的构建方法,其特征在于,所述gRNA识别序列如SEQ ID No.1所示。

3. 如权利要求2所述的无毛模型猪的重构卵的构建方法,其特征在于,所述ssODNs的碱基序列中与所述gRNA识别序列相对应的部分有部分碱基同义突变。

4. 如权利要求3所述的无毛模型猪的重构卵的构建方法,其特征在于,所述ssODNs的碱基序列如SEQ ID No.2所示。

5. 如权利要求1~4中任一项所述的无毛模型猪的重构卵的构建方法,其特征在于,在所述步骤二中,还包括在所述gRNA识别序列及其互补序列的两端加上粘性末端序列的步骤,然后对得到单链DNA进行退火处理构建带有粘性末端的双链DNA。

6. 如权利要求5所述的无毛模型猪的重构卵的构建方法,其特征在于,所述带有粘性末端的双链DNA的两条链的序列分别如SEQ ID No.3和SEQ ID No.4所示。

7. 如权利要求1所述的无毛模型猪的重构卵的构建方法,其特征在于,在所述步骤四中,具体是先将所述gRNA表达载体及含有Cas9蛋白基因的表达载体转化感受态细胞,扩大培养再提取后,与ssODNs一起转染猪胎儿成纤维细胞,经过筛选,获得所述HOXC13基因敲除的阳性克隆细胞。

8. 一种如权利要求1~7中任一项所述的无毛模型猪的重构卵的构建方法构建得到的重构卵。

9. 一种无毛模型猪的构建方法,其特征在于,包括如下步骤:

按照权利要求1-7中任一项所述的无毛模型猪的重构卵的构建方法构建重构卵;

对所述重构卵进行细胞融合和激活,得到激活的重构卵;

将所述激活的重构卵至于代孕母猪的输卵管中,或者将所述激活的重构卵在体外进行培养,形成重构胚,然后再将所述重构胚移植到代孕母猪的子宫内;

饲养所述代孕母猪,产生无毛模型猪。

10. 如权利要求9所述的无毛模型猪的构建方法,其特征在于,对所述重构卵进行细胞融合和激活,得到激活的重构卵,具体包括如下步骤:

将所述重构卵从去核操作液中转至胚胎培养液中待融合与激活;

将所述重构卵进行平衡处理,将平衡好的重构卵移入融合槽内,轻轻拨动重构卵,使卵母细胞与注入的细胞的接触面平行于两条电极,两条电极之间间隔为1mm,然后进行电脉冲

刺激,电融合参数为:120volts/mm、30 μ s、2次;

电脉冲刺激后将重构卵移入胚胎操作液中,筛选出融合成功重构卵。

无毛模型猪的重构卵及其构建方法和模型猪的构建方法

技术领域

[0001] 本发明涉及动物模型构建领域,尤其是涉及一种无毛模型猪的重构卵及其构建方法和模型猪的构建方法。

背景技术

[0002] 生物医学研究离不开动物模型。与人类不同,其他哺乳动物多被有浓密的发毛,不利于皮肤病学研究。建立无毛动物模型,除避免实验过程中因脱毛而造成的皮肤损伤外,主要是可用于皮肤移植、皮肤老化和抗衰老研究、化妆品和皮肤外用药物检测。另外,无毛动物可用作脱发、少发疾病的研究模型。据调查,我国男性脱发的发病率高达25%。随着生活节奏的加快,工作压力的增强,饮食及生活习惯的改变,我国脱发的发病率呈逐年增加的趋势。无毛动物模型,对于加快脱发、少发疾病机理和治疗研究,改善患者生活质量具有重要意义。

[0003] 外胚叶发育不良症(Ectodermal dysplasias,EDs)是一类由于外胚层发育不良导致皮肤及皮肤附件如汗腺、皮脂腺、毛发、牙齿和甲等发育缺陷的先天性疾病。其中,纯发甲型外胚叶发育不良症(Pure hair and nail ectodermal dysplasia,PHNED)只累及毛发和甲,并无其他外胚层及其他胚层发育不良症状。PHNED有常染色体显性遗传和常染色体隐性遗传两种。其中常染色体隐性遗传型其致病基因定位于17号染色体p12-q21.2和12号染色体p11.1-q21.1两个I型和II型角蛋白基因簇区域,已确定的致病基因包括Keratin85(KRT85)、Keratin 74(KRT74)及HomeoboxC13(HOXC13)等。国内外多个实验室已通过基因分析证实HOXC13基因缺失存在于不同人种的多个PHNED患病家系。HOXC13基因由两个外显子组成,其CDS区为993bp。HOXC13可通过调控角蛋白和角蛋白相关蛋白来调控毛囊发育。与人类PHNED相关的HOXC13功能缺失包括HOXC13基因第355位C缺失(c.355delC;p.Leu119Trpfs*20)导致的移码突变、27.6kb删除导致的第一外显子完全缺失、第404位C替换成A(c.404C>A[p.Ser134*])形成终止密码子TAG和第390位C替换成A(c.390C>A[p.Tyr130*])形成终止密码子TAA导致的翻译提前终止。HOXC13基因功能缺失导致的PHNED,患者除毛发和甲发育缺陷外,无其他异常。

[0004] 由于HOXC13功能缺失只导致毛发和甲发育异常,可通过敲除HOXC13基因建立无毛动物模型。Alan R.Godwin等对小鼠HOXC13基因进行敲除后,建立了HOXC13功能缺失小鼠模型。HOXC13敲除杂合子(HOXC13^{+/-})小鼠与野生型小鼠一样,无任何PHNED症状。HOXC13基因敲除纯合(HOXC13^{-/-})小鼠,全身被毛、触须、肛周毛和眼睫毛缺失和趾甲发育缺陷。除毛发和趾甲缺陷外,HOXC13^{-/-}小鼠还表现出脊柱发育缺陷、存活率降低和营养代谢问题,纯合小鼠比同窝野生型和杂合小鼠体重轻,大部分在出生后7-14天死亡,成年存活率仅10%。大于2周的HOXC13^{-/-}小鼠体重逐渐恢复正常,健康可育。虽然Hoxc13^{-/-}小鼠表现出全身毛发缺失和甲发育缺陷这些与人PHNED相似的症状,但Hoxc13^{-/-}小鼠除毛发和甲发育缺陷外还存在脊柱发育缺陷、存活率降低和营养代谢问题。这可能是由于小鼠与人类遗传背景、代谢指标等方面差异导致的。其他常见的无毛小鼠模型,如裸鼠(nu/nu),除无毛症状外,还存在免疫

功能缺陷;无毛小鼠(hr/hr)免疫系统也存在缺陷;我国培育的豫医无毛小鼠存在1-2月龄发育迟缓问题。

[0005] 猪是生物学实验动物中除灵长类以外和人类进化关系最近的物种,与啮齿类相比,猪在基因表达、解剖生理和代谢指标等方面与人类更为相似。与非人灵长类相比,猪伦理道德限制相对较小,饲养成本较低,是一种较为理想的大动物模型。在皮肤结构方面,与啮齿类、兔和狗相比,猪和人的皮肤组织结构更为相似,皮肤解剖生理特点最接近于人类,猪皮肤和人皮肤对药物渗透性和创伤恢复相似。并且猪寿命为12-15年,比较适合进行长效研究。因此建立无毛克隆猪模型将在皮肤病学研究中发挥重要作用。但迄今为止,尚未有无毛克隆猪的报道。

[0006] 在TALEN、CRISPR/Cas 9等高效基因打靶技术的出现之前,大动物基因定点修饰效率极低,因为在猪等大动物上缺乏胚胎干细胞系(ES),只能对体细胞进行基因打靶后再进行体细胞核移植来进行基因打靶大动物的制作,由于体细胞同源重组效率远远低于胚胎干细胞,对体细胞打靶非常困难。在ZFN、TALEN、CRISPR/Cas 9等高效基因打靶技术出现之前只有几例成功获得基因打靶大动物的报道。在ZFN、TALEN、CRISPR/Cas 9等高效基因打靶技术出现之后,体细胞打靶效率得到极大提高,已经在很多物种实现了基因的定点修饰。其中,CRISPR/Cas 9设计简单、打靶效率高等优点为生命科学带来了革命性进步。CRISPR/Cas是细菌和古细菌在进化过程中形成的一种免疫防御机制,用来对抗入侵的外源DNA。CRISPR簇由前导区、多个保守的重复序列区和多个间隔区组成的特殊DNA重复序列,存在于细胞和古细菌基因组中,间隔区由俘获的外源DNA组成,相当于免疫记忆。在CRISPR簇侧翼,存在CRISPR关联基因(CRISPR associated,Cas),已发现Cas1~Cas10等类型,Cas蛋白具有核酸酶、解螺旋、整合酶和聚合酶等活性,与CRISPR簇共同发挥作用,共同进化,构成了一个高度保守的系统。目前发现的CRISPR/Cas系统有I型、II型和III型三种,其中以II型最为简单研究最为深入,它由Cas9蛋白和向导RNA(gRNA)组成,也就是目前最为常用的CRISPR/Cas9系统。

[0007] CRISPR/Cas9系统工作原理为:当有外源DNA入侵时,CRISPR在其前导区调控下,转录为长的RNA前体(pre-crRNA),与此同时,与其重复序列互补的反式激活crRNA(Trans-activating crRNA,tracrRNA)也被转录出来,并激活Cas9蛋白和双链RNA特异性RNase III核酸酶对pre-crRNA进行切割,最终将pre-crRNA加工成一系列短的含有保守重复序列和间隔区的成熟crRNA;之后,crRNA与tracrRNA通过碱基配对形成tracrRNA/crRNA二聚体,并与Cas9组成复合体,识别结合与crRNA互补的DNA序列并进行切割,其切割位点位于crRNA互补序列下游相邻PAM区(Protospacer-Adjacent motif,PAM),序列为NGG。研究者在体外将crRNA和tracrRNA连接起来,形成一个新的引导RNA(single guide RNA,gRNA),模拟体内crRNA和tracrRNA形成的二聚体结构与Cas9蛋白结合,实现对目的基因的切割功能。自然情况下,如果DNA因环境等因素发生双链断裂(DSB),会激活细胞内修复机制。其修复机制有两种,一种是非同源末端连接(NHEJ),即断裂的DNA末端直接简单的连接起来,NHEJ过程中断裂的DNA末端可能会在外切核酸酶作用下进一步切除,或在重新连接时随机加入一些碱基对,造成基因突变;另一种是同源重组(HDR),同源重组修复通常以同源姐妹染色单体DNA等同源序列为模板进行精确的修复。自然情况下在基因组特定位点DSB概率非常低,所以实现基因的定点修饰非常困难。CRISPR/Cas9能够通过gRNA的设计和Cas9切割实现对基因组特

点位点的切割,提高DSB效率,从而启动细胞DNA修复。

[0008] 目前,利用CRISPR/Cas9基因打靶技术构建基因打靶猪技术路线主要为:先利用CRISPR/Cas9对体细胞进行基因打靶,Cas9会在靶位点对目的基因进行切割,从而产生双链断裂,细胞在自身修复机制的作用下,发生非同源末端连接,从而在切割位点随机插入或缺失一些碱基对,造成基因突变;再利用体细胞核移植技术进行克隆猪制作从而获得基因打靶猪。由于此种方法细胞DNA在修复时随机插入或缺失一些碱基对,基因突变形式不受控制。

发明内容

[0009] 基于此,有必要提供一种突变位点可控的无毛模型猪的重构卵及其构建方法和模型猪的构建方法。

[0010] 一种无毛模型猪的重构卵的构建方法,包括如下步骤:

[0011] 步骤一:针对猪HOXC13基因第一外显子396位及其上游和下游的部分碱基序列分别设计gRNA识别序列和点突变的ssODNs,其中,所述gRNA识别序列的互补序列与所述HOXC13基因第一外显子396位及其上游的部分碱基序列一致,所述ssODNs的碱基序列中与所述HOXC13基因第一外显子396位胞嘧啶对应的碱基为腺嘌呤且其他碱基序列与所述HOXC13基因第一外显子396位上游和下游的部分碱基序列一致或为相应的同义突变序列;

[0012] 步骤二:对所述gRNA识别序列构建含有该gRNA识别序列的双链DNA;

[0013] 步骤三:构建含有步骤二中所述双链DNA的gRNA表达载体;

[0014] 步骤四:将所述gRNA表达载体、含有Cas9蛋白基因的表达载体以及所述ssODNs转染进猪胎儿成纤维细胞中,筛选出HOXC13基因敲除的阳性克隆细胞;

[0015] 步骤五:将所述阳性克隆细胞注入母猪的去核卵母细胞的卵周隙,形成重构卵。

[0016] 在其中一个实施例中,所述gRNA识别序列如SEQ ID No.1所示。

[0017] 在其中一个实施例中,所述ssODNs的碱基序列中与所述gRNA识别序列相对应的部分有部分碱基同义突变。

[0018] 在其中一个实施例中,所述ssODNs的碱基序列如SEQ ID No.2所示。

[0019] 在其中一个实施例中,在所述步骤二中,还包括在所述gRNA识别序列及其互补序列的两端加上粘性末端序列的步骤,然后对得到单链DNA进行退火处理构建带有粘性末端的双链DNA。

[0020] 在其中一个实施例中,所述带有粘性末端的双链DNA的两条链的序列分别如SEQ ID No.3和SEQ ID No.4所示。

[0021] 在其中一个实施例中,在所述步骤四中,具体是先将所述gRNA表达载体及含有Cas9蛋白基因的表达载体转化感受态细胞,扩大培养再提取后,与ssODNs一起转染猪胎儿成纤维细胞,经过筛选,获得所述HOXC13基因敲除的阳性克隆细胞。

[0022] 一种使用上述任一实施例所述的无毛模型猪的重构卵的构建方法构建得到的重构卵。

[0023] 一种无毛模型猪的构建方法,包括如下步骤:

[0024] 按照上述任一实施例所述的无毛模型猪的重构卵的构建方法构建重构卵;

- [0025] 对所述重构卵进行细胞融合和激活,得到激活的重构卵;
- [0026] 将所述激活的重构卵至于代孕母猪的输卵管中,或者将所述激活的重构卵在体外进行培养,形成重构胚,然后再将所述重构胚移植到代孕母猪的子宫内;
- [0027] 饲养所述代孕母猪,产生无毛模型猪。
- [0028] 在其中一个实施例中,对所述重构卵进行细胞融合和激活,得到激活的重构卵,具体包括如下步骤:
- [0029] 将所述重构卵从去核操作液中转至胚胎培养液中待融合与激活;
- [0030] 将所述重构卵进行平衡处理,将平衡好的重构卵移入融合槽内,轻轻拨动重构卵,使卵母细胞与注入的细胞的接触面平行于两条电极,两条电极之间间隔为1mm,然后进行电脉冲刺激,电融合参数为:120volts/mm、30 μ s、2次;
- [0031] 电脉冲刺激后将重构卵移入胚胎操作液中,筛选出融合成功的重构卵。
- [0032] 本发明的无毛模型猪的重构卵及其构建方法和模型猪的构建方法,利用CRISPR/Cas9和点突变技术,在Cas9在基因特定位点发生切割后,细胞会以同源重组方式利用提供的ssODNs为模板进行精确修复,通过CRISPR/Cas9和ssODNs设计可在基因特定位点引入终止密码子,使基因翻译提前终止,从而造成基因功能缺失。通过该方法可以精确复制人类疾病基因突变类型,从而避免由于基因突变方式不同而导致的表型差异。

附图说明

- [0033] 图1为一实施方式的无毛模型猪的构建方法的流程示意图;
- [0034] 图2为人和猪HOXC13基因第一外显子的部分序列示意图;
- [0035] 图3为PCR扩增打靶位点后的DNA测序结果示意图,其中,上面为对照组,下面为实验组;
- [0036] 图4a和4b分别代表代孕生出的两窝幼猪示意图,其中“*”表示同窝对照猪;
- [0037] 图5为对无毛克隆猪耳组织HOXC13基因突变型的鉴定结果;
- [0038] 图6为无毛猪的毛囊发育情况示意图;
- [0039] 图7为无毛猪的舌粘膜发育情况;
- [0040] 图8为X光(X-ray)检测骨骼发育情况,其中左侧的为对照组,右侧的为无毛克隆猪;
- [0041] 图9为2月龄内无毛克隆猪体重增加情况示意图。

具体实施方式

[0042] 为了便于理解本发明,下面将参照相关附图对本发明进行更全面的描述。附图中给出了本发明的较佳实施例。但是,本发明可以以许多不同的形式来实现,并不限于本文所描述的实施例。相反地,提供这些实施例的目的是使对本发明的公开内容的理解更加透彻全面。

[0043] 本实施方式通过实验发现,使用Crispr/Cas9技术和点突变技术对PHNED相关基因HOXC13进行敲除,建立纯发甲型外胚叶发育不良(pure hair-nail ectodermal dysplasias,PHNED)的无毛模型猪。本实施方式建立的无毛克隆猪模型,除全身毛发消失、蹄子和舌乳头发育异常外,无其他发育异常现象。该无毛模型猪可作为一种理想的无毛克

隆猪模型用于皮肤领域相关研究。

[0044] 为此,本实施方式提供了一种无毛模型猪的建立方法,利用Crispr/Cas9和点突变技术,将猪HOXC13基因396位点C突变为A,从而引入TAA终止密码子(C.390C>A [p.Tyr130*]),建立HOXC13功能缺失的无毛克隆猪模型。具体的,该方法包括构建无毛模型猪的重构卵、激活重构卵及代孕得到无毛模型猪。

[0045] 如图1所示,在一实施方式中,该无毛模型猪的构建方法可以包括但不限于如下步骤:

[0046] 步骤一:针对猪HOXC13基因第一外显子396位及其上游和下游的部分碱基序列分别设计gRNA识别序列和点突变的ssODNs。

[0047] gRNA识别序列的互补序列与HOXC13基因第一外显子396位及其上游的部分碱基序列一致。gRNA识别序列的切割位点为PAM序列(NGG,其中N为A、T、C、G碱基中的至少一种)。在一优选的实施方式中,gRNA识别序列如SEQ ID No.1所示。

[0048] ssODNs的碱基序列中与HOXC13基因第一外显子396位胞嘧啶(C)对应的碱基为腺嘌呤(A)且其他碱基序列与HOXC13基因第一外显子396位的上游和下游的部分碱基序列一致或为相应的同义突变序列。

[0049] 在一优选的实施方式中,ssODNs的碱基序列中与gRNA识别序列相对应的部分有部分碱基同义突变,可以避免CRISPR/cas9对靶位点的二次打靶,如在一实施方式中,ssODNs的碱基序列如SEQ ID No.2所示。

[0050] 步骤二:对gRNA识别序列构建含有该gRNA识别序列的双链DNA。

[0051] 在本步骤中,还包括在gRNA识别序列及其互补序列的两端加上粘性末端序列的步骤,然后对得到单链DNA进行退火处理构建带有粘性末端的双链DNA。在一实施方式中,带有粘性末端的双链DNA的两条链的序列分别如SEQ ID No.3和SEQ ID No.4所示。

[0052] 步骤三:构建含有步骤二中双链DNA的gRNA表达载体。

[0053] 步骤四:将gRNA表达载体、含有Cas9蛋白基因的表达载体以及ssODNs转染进猪胎儿成纤维细胞中,筛选出HOXC13基因敲除的阳性克隆细胞。

[0054] 具体在本步骤中,是先将gRNA表达载体及含有Cas9蛋白基因的表达载体转化感受态细胞,扩大培养再提取后,与ssODNs一起转染猪胎儿成纤维细胞,经过筛选,获得HOXC13基因敲除的阳性克隆细胞。

[0055] 步骤五:将阳性克隆细胞注入母猪的去核卵母细胞的卵周隙,形成重构卵。

[0056] 步骤六:对重构卵进行细胞融合和激活,得到激活的重构卵;

[0057] 具体的,对重构卵进行细胞融合和激活,得到激活的重构卵,可以包括但不限于如下步骤:

[0058] 将重构卵从去核操作液中转至胚胎培养液中待融合与激活;

[0059] 将重构卵进行平衡处理,将平衡好的重构卵移入融合槽内,轻轻拨动重构卵,使卵母细胞与注入的细胞的接触面平行于两条电极,两条电极之间间隔为1mm,然后进行电脉冲刺激,电融合参数为:120volts/mm、30 μ s、2次;

[0060] 电脉冲刺激后将重构卵移入胚胎操作液中,筛选出融合成功的重构卵。

[0061] 步骤七:将激活的重构卵至于代孕母猪的输卵管中,或者将激活的重构卵在体外进行培养,形成重构胚,然后再将重构胚移植到代孕母猪的子宫内;

[0062] 步骤八:饲养代孕母猪,产生无毛模型猪。

[0063] 本发明的无毛模型猪的重构卵及其构建方法和模型猪的构建方法利用CRISPR/Cas9和点突变技术,在Cas9在基因特定位点发生切割后,细胞会以同源重组方式利用提供的ssODNs为模板进行精确修复,通过CRISPR/Cas9和ssODNs设计可在基因特定位点引入终止密码子,使基因翻译提前终止,从而造成基因功能缺失。通过该方法可以精确复制人类疾病基因突变类型,从而避免由于基因突变方式不同而导致的表型差异。

[0064] 通过上述方法建立的无毛模型猪除毛发缺失,蹄子发育缺陷及舌丝状乳头发育缺陷外无其他异常,可用于各种皮肤病学研究和外用皮肤药、化妆品测试。其皮肤再经过免疫学改造,可用于临床皮肤移植。

[0065] 以下为一具体的无毛模型猪的构建实施例

[0066] 本实施例主要包括以下步骤:1. CRISPR/Cas9打靶系统及ssODNs的构建;2. 细胞感染与筛选;3. 体细胞核移植;4. 克隆猪表型分析。

[0067] 1. CRISPR/Cas9打靶系统及ssODNs的构建

[0068] (1). 利用CRISPR/Cas9技术,在猪HOXC13基因第一外显子396位点附近设计gRNA识别序列和使396位C突变为A的ssODNs(单链DNA)。

[0069] 如图2所示,猪HOXC13和人HOXC13CDS区同源率为95%,蛋白同源率为98%。由于猪HOXC13CDS序列比人HOXC13CDS 75位多插入6个碱基,人PHNED症HOXC13基因无义突变位点HOXC13c.390C>A[p.Tyr130*],猪HOXC13基因对应位点为396C。

[0070] 部分猪HOXC13基因第一外显子的部分序列如下,对应序列表中SEQ ID No.5。

[0071] 241 ggccgccccgc cggctcccct gggcgcccct caggcgcag tctacacgga catcccggcc

[0072] 301 ccggaggcgg cgcgccagtg cgccccgccg ccggcgcccc ccacctegtc cagcgccacc

[0073] 361 ctgggctacg gctaccggtt cggtggcagc tactacggct gccgcctgtc gcacaacgtg

[0074] 421 aacctgcagc aaaaaccttg cgcctaccac ccgggcgata agtaccgccga gccgtcgggc

[0075] 本实施例根据人HOXC13无义突变位点,将猪HOXC13基因第一外显子396C突变为A,设计点突变的ssODNs和靶位点gRNA识别序列。

[0076] ssODNs设计:ssODNs全长89bp,两侧为同源臂,396位C替换为A,同时为了防止CRISPR/Cas9对靶位点的二次打靶,在gRNA识别位点设计同义突变,其序列如SEQ ID No.2所示,其序列具体分析如下:

[0077] ssODNs(SEQ ID No.2):cacctegtc cagcgccacc ctgggctacg gctaccggtt cggAggAagT taTtaAgget gccgcctgtc gcacaacgtg aacctgcagc,其中,第384位的A、第387位的A、第390位的T以及第393位的T均为同义替换,第396位的A对应猪HOXC13基因第一外显子396位C。

[0078] gRNA识别序列设计:在替换靶位点附近设计gRNA的识别位点使CRISPR/Cas9在靶位点附近特异性识别切割形成DSB,促进以外源ssODNs为模板的同源重组修复。gRNA识别序列如下:

[0079] gRNA识别序列及PAM序列(SEQ ID No.1-ggg):5' gtagtagct gccaccgaac ggg 3' (末端的ggg为PAM序列)。

[0080] (2). 对gRNA识别序列构建含有该gRNA识别序列的双链DNA。

[0081] 在gRNA识别序列及其互补序列的两端加上粘性末端序列,然后对得到的单链DNA

序列进行退火处理构建带有粘性末端的双链DNA。

[0082] 带有粘性末端的双链DNA的两条链的序列分别如SEQ ID No.3(5'-cacc-gtagtagctgccaccgaac-3')和SEQ ID No.4(5'-aac-gttcgggtggcagctactac-3')所示。

[0083] (3).将带粘性末端的双链DNA序列连接入经BbsI酶切的U6-gRNA克隆载体中,得到gRNA表达载体。

[0084] U6-gRNA克隆载体改造自质粒gRNA-GFP-T1(购自Addgene公司,产品目录号为41819),通过在gRNA-GFP-T1质粒中引入2个BbsI酶切位点,得到U6-gRNA克隆载体。

[0085] 以SP6测序引物对其进行测序,测序结果如下所示,证明序列连接正确。

[0086]

```
tgtacaaaaagcaggctttaaaggaaccaattcagtcgactggatccggtaccaaggtcgggcaggaagagggcct
at t t c c a t g a t t c c t t c a t a t t t g c a t a t a c g a t a c a a g g c t g t t a g a g a t a a t t a g a a t t a t t g a c t g t a a
a c a c a a g a t a t t a g t a c a a a t a c g t g a c g t a g a a g t a a t a a t t t c t t g g g t a g t t t g c a g t t t t a a a t t a t g t
t t t a a a t g g a c t a t c a t a t g e t t a c c g t a a c t t g a a a g t a t t t c g a t t t c t t g g c t t t a t a t a t c t t g t g g a a a g g
a c g a a a c a c c g t a g t a g c t g c c a c c g a a c g t t t t a g a g c t a g a a a t a g c a a g t t a a a a t a a g g c t a g t c c g t t a t c a
a c t t g a a a a a g t g g c a c c g a g t c g g t g c t t t t t t c t a g a c c a g c t t t c t t g t a c a a a g t t g g c a t t a ( S E Q   I D
N o . 6 ) .
```

[0087] 2. 细胞转染与筛选

[0088] 将gRNA表达载体和Cas9表达载体(含有Cas9蛋白基因的表达载体,CMV-Cas9,购自Addgene公司,产品目录号为41815)转化感受态细胞扩大培养再提取后,与ssODNs一起转染35天巴马猪胎儿成纤维细胞,其中gRNA表达载体5 μ g,Cas9表达载体10 μ g,电转参数为1350v,30ms,1plus,电转仪器为NeonTMTransfection System。

[0089] 将电转细胞种在10cm培养皿中,共分15个10cm培养皿进行培养,培养基为含15%FBS的DMEM培养基,第二天加800 μ g/mL G418进行筛选,并每3天进行换液;经过9天筛选,获得细胞克隆,以克隆环挑取细胞克隆于48孔板中进行培养。待细胞长满后,取十分之一细胞,提取基因组,PCR扩增打靶位点并对PCR产物进行DNA测序,PCR引物:上游:5'ACTGCCGCGACCTACTTC3'(SEQ ID No.7),下游:5'CTGACTGTCCAGCCGTT3'(SEQ ID No.8),PCR程序为:98 $^{\circ}$ C预变性3min,98 $^{\circ}$ C变性10s,60 $^{\circ}$ C退火20s,72 $^{\circ}$ C延伸10s,35个循环,72 $^{\circ}$ C终延伸2min。将PCR产物进行1%电泳鉴定后送艾基生物测序。将测序结果与wt序列(野生序列)进行比对,获得HOXC13基因396位C替换为A的阳性细胞克隆(HOXC13^{-/-}-PFF),结果如图3所示。

[0090] 3. 体细胞核移植

[0091] 以HOXC13^{-/-}-PFF作为供体细胞进行体细胞核移植,获得HOXC13基因敲除克隆胚胎;核移植第二天将克隆胚胎通过输卵管移植于同期发情的受体母猪,妊娠到期后获得克隆猪。提取克隆猪基因组,对HOXC13基因片段进行PCR后测序,获得HOXC13^{-/-}克隆猪。

[0092] 猪卵母细胞的体外成熟:

[0093] 从屠宰场收集猪卵巢(刚从猪体内取出,尚有体温)置于39 $^{\circ}$ C加有青霉素、链霉素的0.9%的生理盐水中,带回实验室。用39 $^{\circ}$ C预热的生理盐水将卵巢冲洗两遍后置于39 $^{\circ}$ C水浴生理盐水中。用带有12号针头的10mL注射器吸取卵泡中的卵母细胞和卵泡液于39 $^{\circ}$ C水浴的50mL离心管中。待所有卵巢抽取完毕后,将装有卵母细胞和卵泡液的50mL离心管带入细

胞间,于39℃温箱中静置5min后弃上清,用洗卵液PVA-TL-HEPES(称取6.6633g NaCl、0.2386g KCl、0.1680g NaHCO₃、0.0408g NaH₂PO₄、0.1017g MgCl₂·6H₂O、2.3830g Hepes(4-羟乙基哌嗪乙磺酸,H3784),0.0650g Penicillin(青霉素,P3032),0.0100g pHenol Red(苯酚红,5530),0.2940g CaCl₂·2H₂O,0.1000g Polyvinyl alcohol(PVA,聚乙烯醇P8136),2.1860g Sorbitol(山梨糖醇,S1876),0.0250gGentamicin(庆大霉素),0.0220g Sodium pyruvate(丙酮酸钠,P4562),加998.132mL Milli Q15H₂O(超纯水)后再加1.868mL Na Lactate(乳酸钠,L7900),溶解后调节pH为7.2-7.4,渗透压为295-310mOsm)清洗3遍后,置于新的洗卵液中。在体视镜下挑取卵丘卵母细胞复合物,并将卵丘卵母细胞复合物在平衡好的成熟液(TCM-199(Gibco公司)加3.05mM D-glucose(D-葡萄糖,G7021),0.91mM Sodium pyruvate(丙酮酸钠,P4562),0.1%PVA(Sigma,P8136),75μg/mL Penicillin(Sigma,P3032),50μg/mLStreptomycin(链霉素,S1277),0.5μg/mL Luteinizing hormone(LH,促黄体激素,L5269),10ng/mL Epidermal growth factor(EGF,表皮生长因子,S4127),0.5μg/mL Follicle stimulating hormone(FSH,促卵泡激素,F2293),0.57mM Cysteine(半胱氨酸,C8152),10%卵泡液。)清洗3遍后,转移至提前平衡好的成熟液中于5%CO₂、饱和湿度、39℃条件下培养。4孔板每空放置40-70枚卵丘卵母细胞复合物。体外成熟培养42-44h后,将卵丘卵母细胞复合物转移入39℃预热的去卵丘操作液(0.030g Hyaluronidase(透明质酸酶,H3506),5.46g Mannitol(甘露醇,M9647),0.001g BSA(牛血清白蛋白,A8022),5mL PVA-TL-Hepes洗卵液,95mL Milli Q H₂O),涡旋震荡5min,至卵丘细胞脱落。将消化后的卵母细胞转移入盛有胚胎操作液(9.500g TCM-199(Gibco公司),0.050gNaHCO₃,0.750g Hepes(H3784),0.050g Penicillin(P3032),0.060g Streptomycin(S1277),101.755g NaCl,3.00g BSA,1000mL Milli Q H₂O,溶解后调节pH为7.2-7.4,渗透压为295-310mOsm)的35mm培养皿中。在体式镜下挑取已经释放第一极体的成熟卵母细胞,并放入盛有操作液的35mm皿中,置于39℃温箱中待用。

[0094] 供体细胞准备:

[0095] 培养的阳性克隆细胞用0.05%胰蛋白酶于39℃消化3分钟,用含15%FBS的DMED终止消化,之后以1000转/分钟的速率离心3分钟,弃上清,用胚胎操作液重悬细胞待用。

[0096] 去核和细胞注射:

[0097] 将成熟的卵母细胞放入含7.5μg/mL CB的去核操作液中,用盲吸法将第一极体和附近胞质去除以达到去核的目的。吸取一个供体细胞注射入去核卵母细胞的卵周隙中,并轻轻挤压卵母细胞,使卵母细胞膜与供体细胞膜接触。将重构卵放入平衡好的胚胎培养液PZM3中,38.5℃培养箱中放置,待融合与激活。

[0098] 重构卵的融合与激活:

[0099] 将重构卵从胚胎培养液中转至操作液中待融合与激活,融合前将重构卵转移至融合激活液(0.3M Mannitol(M9647),1.0mM CaCl₂·2H₂O,0.1mM MgCl₂·6H₂O,0.5mM Hepes(H3784))进行平衡,将平衡好的重构卵移入融合槽内,用毛细玻璃针轻轻拨动重构胚胎,使卵母细胞与供体细胞的接触面平行于两条电极,两条电极之间间隔为1mm,然后进行电脉冲刺激,电融合参数为:120volts/mm、30μs、2次。重构卵融合的同时即激活。电脉冲刺激后将重构卵移入胚胎操作液中,置39℃半小时后,在体式镜下用毛细玻璃针拨动重构卵,检查供体细胞是否已经融合入卵母细胞,将融合的重构卵在平衡好的胚胎培养液PZM-3中洗三遍

后,放入新的平衡好的PZM-3中,并置于5%CO₂、饱和湿度、39℃条件下培养。

[0100] 胚胎移植:

[0101] 核移植后第二天进行胚胎移植。选择胚胎移植当天或者前一天发情的大白猪为代孕受体。

[0102] 将培养中的胚胎从胚胎培养液转移入盛有平衡好胚胎培养液PZM-3的指头管中,放入38.5℃恒温胚胎运输箱中运输至猪场手术室。对受体猪注射氯胺酮进行诱导麻醉,异氟烷呼吸麻醉维持。在倒数第一对和倒数第二对乳头之间开口8cm左右,找到子宫后顺着子宫输卵管方向找到卵巢,将卵巢输卵管慢慢牵出腹腔,观察卵巢排卵情况,并找到输卵管的伞部用镊子进行固定。将胚胎洗出放入盛有胚胎操作液的小皿中,并将胚胎吸入胚胎移植管中,将装有胚胎的移植管从输卵管伞部慢慢伸入输卵管,将胚胎推入输卵管。胚胎移植完成后,将输卵管伞重新包回卵巢,将卵巢输卵管送回腹腔。以生理盐水冲洗创口后进行缝合,首先缝合腹膜和肌肉层,肌肉层缝合完成后,涂撒青链霉素,再缝合皮肤层。手术后肌肉注射青链霉素防止创口感染发炎,并进行术后护理。胚胎移植后24-26天进行B超监测妊娠情况,并对怀孕受体每隔一周进行一次B超监测,追踪克隆胚胎发育情况。妊娠114天后,分娩获得克隆猪。

[0103] 4.HOXC 13^{-/-}克隆猪表型分析

[0104] 1)毛囊和蹄发育情况检测

[0105] 通过皮肤病理切片对HOXC 13^{-/-}克隆猪毛囊发育情况进行检测;对HOXC 13^{-/-}克隆猪蹄发育进行观察。

[0106] 2)其他发育情况

[0107] 由于HOXC13^{-/-}小鼠存在骨骼发育异常和两周龄内发育迟缓问题,本实施例以X-ray对HOXC 13^{-/-}克隆猪骨骼发育情况进行了检查,并对HOXC 13^{-/-}克隆猪两月龄内体重进行检测,以观察其有无同HOXC13^{-/-}小鼠存在的异常现象。

[0108] 本实施例通过CRISPR/Cas9和点突变技术,可以将HOXC13基因特定位点进行精确突变,克服了因随机插入和缺失片段造成的基因突变类型的不确定性。本实施例通过实验证实了猪HOXC13基因与人类HOXC13基因功能的一致性。在猪上通过HOXC13基因突变可造成与人类PHNED相同的症状。

[0109] 5.实验结果

[0110] (1).HOXC13基因396位发生C-A替换的阳性克隆率

[0111] 将5μg gRNA载体、10μg Cas9表达载体和5μg ssODNs共转染猪胎儿成纤维细胞后,以G418筛选9天后挑取克隆171个,经PCR扩增靶位序列后测序,共获得HOXC13突变克隆137个,发生396位C-A替换克隆32个,发生396位双等位C-A替换克隆14个(8.19%),结果如下表1所示。

[0112] 表1

[0113]

Colonies	No. of modified Colonies(%)	No. of 396 C-A Modified Colonies(%)	No. of 396 C-A Biallelic Modified Colonies(%)
171	137 (80.12%)	32 (18.71%)	14 (8.19%)

[0114]

[0115] (2).以HOXC13基因396位发生双等位C-A替换的阳性克隆进行核移植获得HOXC13功能缺失克隆猪

[0116] 以阳性克隆细胞进行核移植,移植代孕受体10头,其中怀孕4头,有两头受体妊娠到期,其中一头生2头无毛克隆猪,另外一头生6头无毛克隆猪,共获得无毛克隆猪8头,结果如图4a和4b所示。

[0117] (3).无毛克隆猪鉴定

[0118] 取出生无毛克隆猪耳组织,提取DNA,对靶位点进行PCR、测序,鉴定HOXC13基因突变型如图5所示。从图5可以看出,有5头无毛克隆猪HOXC13基因型为在发生双等位396位C-A替换(C-A/C-A),有2头无毛克隆猪HOXC13基因型为单等位基因396位C-A替换和单等位基因396位C-A替换下游增加一个碱基(C-A/C-A,+1),有1头基因型为双等位基因敲除40个碱基($\Delta 22, \Delta 18 / \Delta 22, \Delta 18$)。

[0119] (4).无毛克隆猪表型鉴定

[0120] 通过皮肤病理切片对HOXC13基因敲除猪毛囊发育情况进行了检测,由于HOXC13表达于舌面丝状乳头,同时也对舌面丝状乳头结构进行了检测。如图6和图7所示,由病理切片可以看出HOXC13敲除后,毛囊数量明显减少,毛囊发育不成熟,舌粘膜表面丝状乳头消失。

[0121] 由于小鼠HOXC13基因敲除后,除导致与人类PHNED相似的毛发缺失和趾发育缺陷外,还存在存活率低、骨骼发育异常及2周龄内小鼠发育迟缓体重偏轻问题,因此本实施例对无毛克隆猪骨骼进行了X-ray检测,出生两月龄内无毛克隆猪进行了每周体重测量。结果如图8和图9所示,结果表明与同窝对照猪相比,无毛克隆猪体重正常,也不存在骨骼发育异常现象。由于代孕母猪母性较差,无毛克隆猪出生后1-3天内被母猪压死4头,一月龄死亡1头,目前共存活3头,已6月龄,存活率为37.5%。除去被母猪压死4头的非正常死亡猪,本实施例获得的无毛克隆猪存活率为75%,远高于HOXC13基因敲除小鼠存活率。

[0122] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。

[0123] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

SEQUENCE LISTING

- <110> 中国科学院广州生物医药与健康研究院
- <120> 无毛模型猪的重构卵及其构建方法和模型猪的构建方法
- <160> 8
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 19
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <400> 1
- [0001] gtagtactg ccaccgaac 19
- <210> 2
- <211> 89
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <400> 2
- cacctgtcc agcgccacc tgggtacgg ctacccttc ggaggaagt affaaggctg 60
- ccgcctgtcg cacaacgtga accfcgagc 89
- <210> 3
- <211> 23
- <212> DNA
- <213> 人工序列

	<400> 3	
	caccgtagta gctgccaccg aac	23
	<210> 4	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 4	
	aaacgtcgg tggcagctac tac	23
	<210> 5	
	<211> 240	
	<212> DNA	
[0002]	<213> 天然序列	
	<400> 5	
	ggcgcgccgc cggctccctt gggcgcccct cagggcgcag tctacacgga catccggcc	60
	ccggaggcgg cgcgccagtg cgccccccg ccggcgccc ccactctgtc cagcgcacc	120
	ctgggctacg gctaccggtt cggctggcagc taclacggct gcgcctgtc gcacaacgtg	180
	aacctgcagc aaaaacctg cgctaccac ccggcgata agtacccga gccgtcggc	240
	<210> 6	
	<211> 454	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 6	
	tgtaca meta agcaggettt aaaggaacca altcagtcga ctggatccgg taccaaggtc	60
	gggcaggaag agggcctatt tcccatgatt ccttcatatt tgcatafacg atacaaggct	120
	gttagagaga taattagaat taattgact gtaaacacaa agataltagt acaaaatagc	180

	tgacgtagaa agtaataatt tcttgggtag ttgcagttt taaaattatg ttttaaagt	240
	gactatcata tgcttaccgt aactgaaag tatttcgatt tcttgcttt atatatctg	300
	tggaaaggac gaaacaccgt agtagctgcc accgaacgtt ttagagctag aaatagcaag	360
	ttaaaataag gctagtcctg tatcaacttg aaaaagtggc accgagtcgg tgctttttt	420
	ctagaccag cttctctgta caaagttggc atta	454
	<210> 7	
	<211> 18	
	<212> DNA	
[0003]	<213> 人工序列	
	<400> 7	
	actgccgcga cctacttc	18
	<210> 8	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 8	
	ctgactgtcc cagccgtt	18

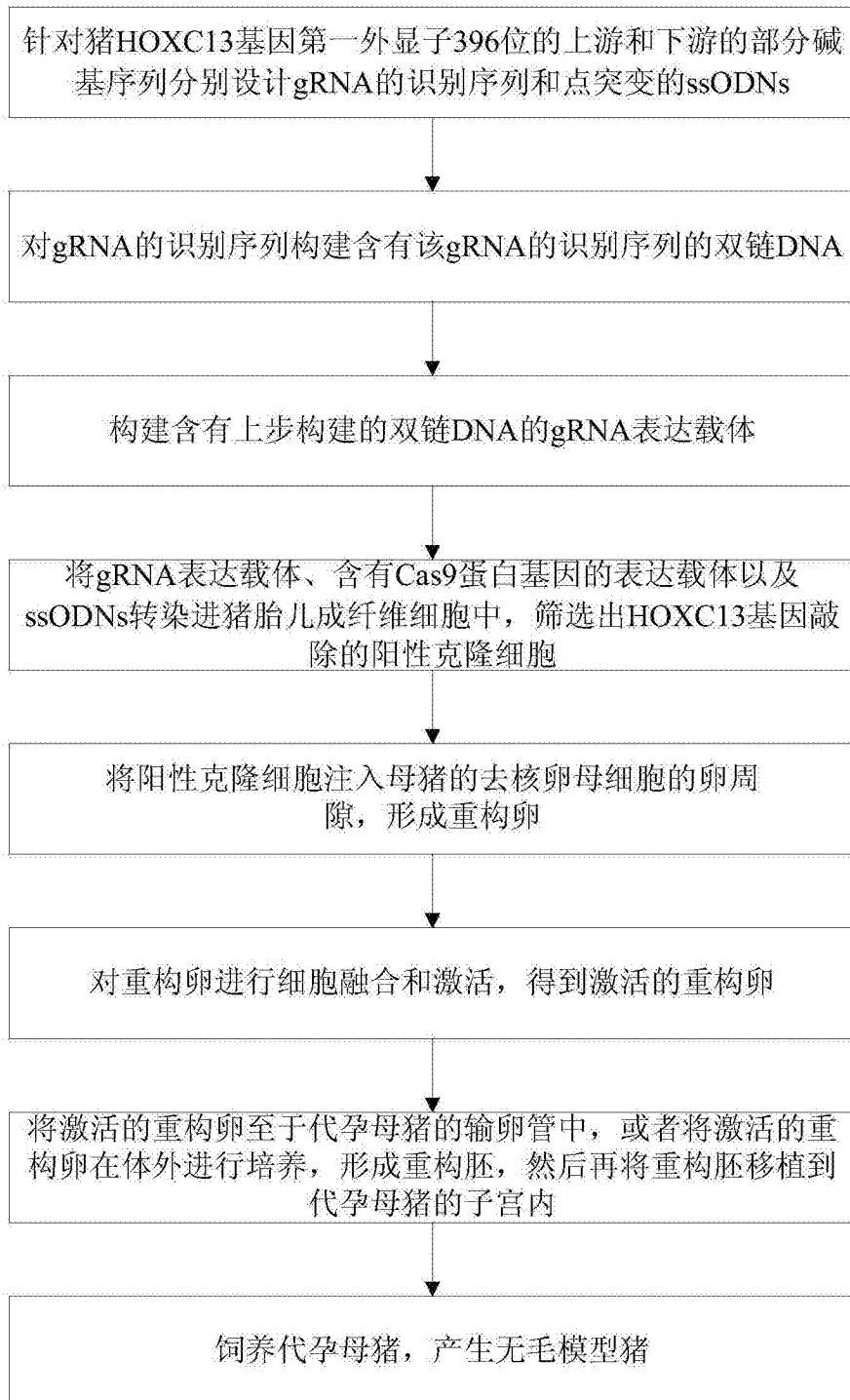


图1



图4a



图4b

Piglet	Genotypes	
	CTA ████ GTTCGGTGGCAGCTACTACGGCTG	WT
242-1,2 243-2,5,6	CTACCCGTTCCGGAGGAAGTTATTAAGGCTG	C-A/C-A
243-3,4	CTACCCGTTCCGGAGGAAGTTATTAAGGCTG CTACCCGTTCCGGAGGAAGTTATTAACGGCTG	C-A/C-A,+1
243-1	GCC-//CCCCAC//GGCTAC-//TACGGCTG CTACCCGTT//CGGTGGCAGCTACTACGGCTG	$\Delta 22, \Delta 18/+451$

图5

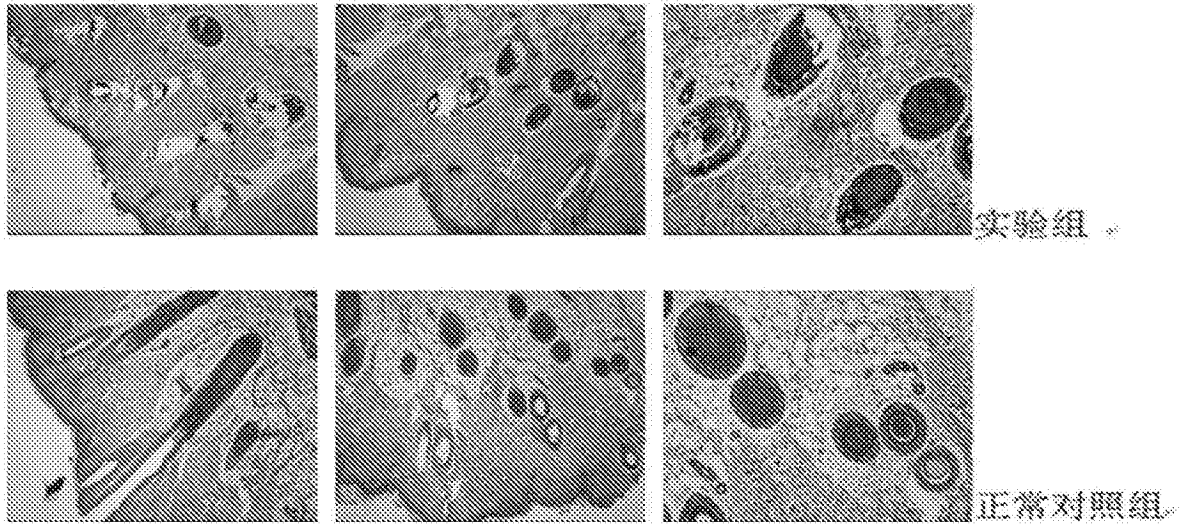


图6

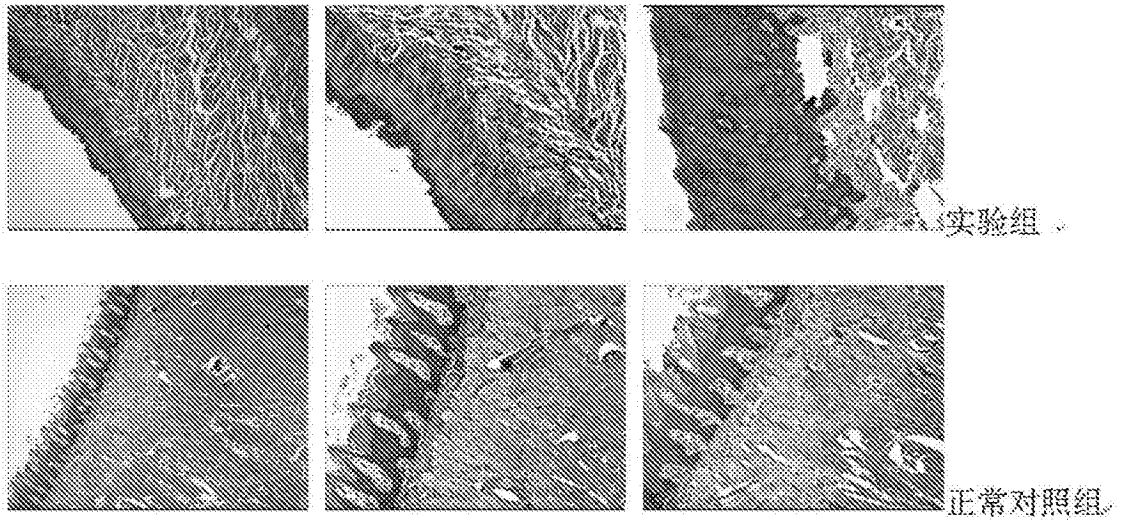


图7



图8

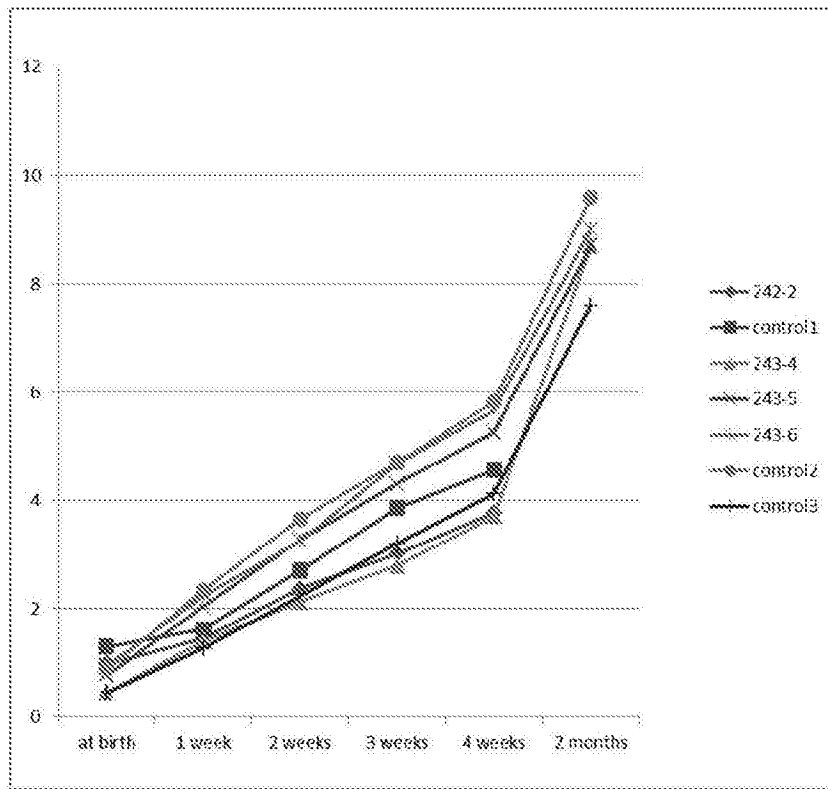


图9