



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108697068 B

(45) 授权公告日 2022.02.11

(21) 申请号 201680067024.6

(22) 申请日 2016.09.16

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108697068 A

(43) 申请公布日 2018.10.23

(30) 优先权数据

62/219,927 2015.09.17 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2018.05.16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/052345 2016.09.16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02017/049240 EN 2017.03.23

(73) 专利权人 瑞泽恩制药公司

地址 美国纽约州塔里敦

(72) 发明人 詹尼弗·施马尔 大卫·佛伦杜威

## (54) 发明名称

对用于产生能生育的XY雌性小鼠的多能细胞的选择

## (57) 摘要

提供用于产生F0能生育的XY雌性动物的方法和组合物。方法和组合物涉及制备能够在F0代中产生能生育的雌性XY动物的XY多能或全能动物细胞、体外细胞培养物或胚胎。所述细胞、胚胎和动物可通过使Y染色体的区域沉默来制备。任选地，细胞也可在雌性化培养基诸如低克分子渗透压重量浓度培养基中培养，和/或可被修饰以使Sry蛋白的水平和/或活性降低。也提供用于通过在雌性化培养基中维持XY多能或全能动物细胞来使XY多能或全能动物细胞或源于其的体外细胞培养物、胚胎或动物中的Y染色体的区域沉默的方法和组合物。也提供用于在雌性化培养基中维持XY多能或全能动物细胞的群体和选择在F0代中产生能生育的雌性XY动物的能力增加的细胞或克隆的方法和组合物。也提供用于筛选具

琼科·库诺 家珍·萧

吉斯塔沃·德罗格特 瑥·白  
沃基特克·奥尔巴赫

(74) 专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司 44202

代理人 郝传鑫

(51) Int.CI.

A01K 67/027 (2006.01)

C12N 5/0735 (2006.01)

## (56) 对比文件

WO 0077046 A1, 2000.12.21

WO 2011156723 A1, 2011.12.15

CN 102355814 A, 2012.02.15

WO 2009037337 A1, 2009.03.26

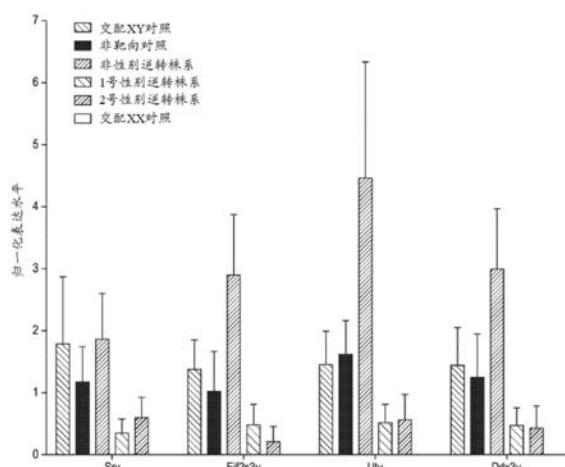
CN 1387401 A, 2002.12.25

审查员 范思婕

权利要求书6页 说明书101页

序列表11页 附图28页

有雌性化活性的化合物或用于使雌性化培养基中的组分的浓度优化的方法和组合物。



1. 一种用于在小鼠XY胚胎干(ES)细胞中筛选具有雌性化活性的靶标化合物的方法,包括:

(a) 在包含基础培养基和适于维持所述小鼠XY ES细胞的多能性但不改变所述小鼠XY ES细胞产生能生育雌性子代的能力的补充物的培养基中培养第一群体的小鼠XY ES细胞和第二群体的小鼠XY ES细胞,其中在靶标化合物存在下培养所述第一群体,并且在不存在所述靶标化合物下培养所述第二群体;以及

(b) 测定所述第一群体的小鼠XY ES细胞和所述第二群体的小鼠XY ES细胞的每一个中的一个或多个所述小鼠XY ES细胞的Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达,借此通过相较于来自所述第二群体的所述一个或多个小鼠XY ES细胞,来自所述第一群体的所述一个或多个小鼠XY ES细胞中的Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的所述一者或多者的表达的至少90%的降低来鉴定雌性化活性,且其中所述雌性化活性导致所述小鼠XY ES细胞在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY小鼠的倾向增加。

2. 如权利要求1所述的方法,其进一步包括:

(c) 基于与来自所述第二群体的一个或多个小鼠XY ES细胞相比,来自所述第一群体的一个或多个小鼠XY ES细胞中的Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的所述一者或多者的表达的至少90%的降低来从所述第一群体选择用于在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY小鼠的供体小鼠XY ES细胞,其中所述能生育的呈表型雌性的XY小鼠在所述F0代中的比例与Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的所述一者或多者的表达和/或活性逆相关。

3. 如权利要求2所述的方法,其中所述方法进一步包括:

(d) 将所述供体小鼠XY ES细胞引入小鼠宿主胚胎中;

(e) 将来自步骤(d)的所述小鼠宿主胚胎引入接受者雌性小鼠中以及孕育所述小鼠宿主胚胎;和

(f) 获得包括呈表型雌性的XY小鼠的F0 XY小鼠子代,其中在达到性成熟后,F0呈表型雌性的XY小鼠能生育且生殖力旺盛。

4. 如权利要求3所述的方法,其中步骤(d)还包括将所述小鼠宿主胚胎培养至胚泡期。

5. 如权利要求2所述的方法,其中步骤(c)包括基于与来自所述第二群体的一个或多个小鼠XY ES细胞相比,来自所述第一群体的一个或多个小鼠XY ES细胞中的Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的表达的至少90%的降低来选择所述供体小鼠XY ES细胞。

6. 如权利要求2所述的方法,其中步骤(b)包括测定所述第一群体中至少两个所述小鼠XY ES细胞的Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的所述一者或多者的表达,并且步骤(c)包括相对于其它测定细胞在步骤(b)中测定的具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的所述一者或多者的最低表达的细胞选作所述供体小鼠XY ES细胞。

7. 如权利要求2所述的方法,其中步骤(c)中的所述供体小鼠XY ES细胞缺乏Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的所述一者或多者的表达。

8. 如权利要求7所述的方法,其中步骤(c)中的所述供体小鼠XY ES细胞缺乏Ddx3y、Uty和Eif2s3y的表达。

9. 如权利要求1-8中任一项所述的方法,其中通过相较于来自所述第二群体的所述一个或多个小鼠XY ES细胞,来自所述第一群体的所述一个或多个小鼠XY ES细胞中的Ddx3y、Uty和Eif2s3y的表达的90%的降低来在步骤(b)中鉴定所述雌性化活性。

10. 如权利要求9所述的方法,其中如果来自所述第一群体的所述一个或多个小鼠XY ES细胞中的Ddx3y、Uty和Eif2s3y的mRNA表达比来自所述第二群体的所述一个或多个小鼠XY ES细胞中的Ddx3y、Uty和Eif2s3y的mRNA表达低至少90%,则在步骤(b)中鉴定出雌性化活性。

11. 如权利要求1-8中任一项所述的方法,其中通过在来自所述第一群体的所述一个或多个小鼠XY ES细胞中缺乏Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的所述一者或多者的表达来在步骤(b)中鉴定所述雌性化活性。

12. 如权利要求11所述的方法,其中通过在来自所述第一群体的所述一个或多个小鼠XY ES细胞中缺乏Ddx3y、Uty和Eif2s3y的表达来在步骤(b)中鉴定所述雌性化活性。

13. 如权利要求1-8中任一项所述的方法,其中在测定步骤(b)之前,在所述靶标化合物的存在下培养所述第一群体至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少7天、至少8天、至少9天、至少10天、至少11天、至少12天、至少13天、至少2周、至少3周或至少4周。

14. 如权利要求1-8中任一项所述的方法,其中步骤(b)中的所述测定在mRNA水平上检测Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的所述一者或多者的表达。

15. 如权利要求1-8中任一项所述的方法,其中所述小鼠XY ES细胞是VGF1小鼠ES细胞。

16. 如权利要求1-8中任一项所述的方法,其中所述小鼠包括C57BL/6品系,其中Y染色体来自C57BL/6品系、129品系或BALB/c品系,或其中所述小鼠是C57BL/6品系和129品系的混合。

17. 如权利要求1-8中任一项所述的方法,其中所述小鼠XY ES细胞在靶标基因组基因座中包含靶向遗传修饰。

18. 如权利要求17所述的方法,其中所述靶向遗传修饰包括插入、缺失、敲除、敲入、点突变或其组合。

19. 一种用于使雌性化培养基中的靶标化合物的浓度优化的方法,其包括:

(a) 在包含基础培养基和适于维持小鼠XY ES细胞的多能性的补充物的培养基中培养第一群体的所述小鼠XY ES细胞和第二群体的所述小鼠XY ES细胞,

其中在第一浓度的所述靶标化合物存在下培养所述第一群体,并且在不同于所述第一浓度的第二浓度的所述靶标化合物存在下培养所述第二群体;以及

(b) 测定所述第一群体的小鼠XY ES细胞和所述第二群体的小鼠XY ES细胞的每一个中的一个或多个所述小鼠XY ES细胞的Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达,并且如果相较于来自所述第二群体的一个或多个小鼠XY ES细胞,来自所述第一群体的一个或多个小鼠XY ES细胞中的Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的所述一者或多者的表达降低,并且如果与在足以维持对照小鼠XY ES细胞的多能性但不改变所述对照小鼠XY ES细胞产生能生育的雌性子代的能力的对照培养基中培养的对照小鼠XY ES细胞相比,来自所述第一群体的所述一个或多个小鼠XY ES细胞中的Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的所述一者或多者的表达降低至少90%,那么选择所述第一浓度。

20. 如权利要求19所述的方法,其进一步包括:

(c) 基于相对于所述对照小鼠XY ES细胞,在来自所述第一群体的一个或多个小鼠XY ES细胞中Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的所述一者或多者的降低至少90%的表达来从所述第一

群体选择用于在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY小鼠的供体小鼠XY ES细胞，其中所述能生育的呈表型雌性的XY小鼠在所述F0代中的比例与Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的所述一者或多者的表达逆相关。

21. 如权利要求20所述的方法，其中所述方法进一步包括：

- (d) 将所述供体小鼠XY ES细胞引入小鼠宿主胚胎中；
- (e) 将来自步骤(d)的所述小鼠宿主胚胎引入接受者雌性小鼠中并孕育所述小鼠宿主胚胎；以及
- (f) 获得包括呈表型雌性的XY小鼠的F0 XY小鼠子代，其中在达到性成熟后，F0呈表型雌性的XY小鼠能生育且生殖力旺盛。

22. 如权利要求21所述的方法，其中步骤(d)还包括将所述小鼠宿主胚胎培养至胚泡期。

23. 如权利要求20所述的方法，其中步骤(c)包括基于相对于对照小鼠XY ES细胞，在来自所述第一群体的一个或多个小鼠XY ES细胞中Ddx3y、Uty和Eif2s3y的降低至少90%的表达来选所述供体小鼠XY ES细胞。

24. 如权利要求20所述的方法，其中步骤(b)包括测定所述第一群体中至少两个所述小鼠XY ES细胞的Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的所述一者或多者的表达，并且步骤(c)包括将相对于其它测定细胞在步骤(b)中测定的具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的所述一者或多者的最低表达的细胞选作所述供体小鼠XY ES细胞。

25. 如权利要求20所述的方法，其中步骤(c)中的所述供体小鼠XY ES细胞缺乏Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的所述一者或多者的表达。

26. 如权利要求25所述的方法，其中步骤(c)中的所述供体小鼠XY ES细胞缺乏Ddx3y、Uty和Eif2s3y的表达。

27. 如权利要求19-26中任一项所述的方法，其中如果相较于来自所述第二群体的所述一个或多个小鼠XY ES细胞，来自所述第一群体的所述一个或多个小鼠XY ES细胞具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y的降低表达，那么在步骤(b)中选择所述第一浓度。

28. 如权利要求27所述的方法，其中如果来自所述第一群体的所述一个或多个小鼠XY ES细胞中的Ddx3y、Uty和Eif2s3y的mRNA表达比所述对照小鼠XY ES细胞中的Ddx3y、Uty和Eif2s3y的mRNA表达低至少90%，则在步骤(b)中选择所述第一浓度。

29. 如权利要求19-26中任一项所述的方法，其中如果来自所述第一群体的所述一个或多个小鼠XY ES细胞缺乏Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的所述一者或多者的表达，那么在步骤(b)中选择所述第一浓度。

30. 如权利要求29所述的方法，其中如果来自所述第一群体的所述一个或多个小鼠XY ES细胞缺乏Ddx3y、Uty和Eif2s3y的表达，那么在步骤(b)中选择所述第一浓度。

31. 如权利要求19-26中任一项所述的方法，其中在测定步骤(b)之前，在所述靶标化合物存在下培养所述第一群体至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少7天、至少8天、至少9天、至少10天、至少11天、至少12天、至少13天、至少2周、至少3周或至少4周。

32. 如权利要求19-26中任一项所述的方法，其中步骤(a)中的包含所述基础培养基和所述补充物的所述培养基是具有大于或等于200m0sm/kg且小于329m0sm/kg的克分子渗透

压重量浓度的低克分子渗透压重量浓度培养基。

33. 如权利要求32所述的方法,其中:

(I) 所述低克分子渗透压重量浓度培养基具有218m0sm/kg至322m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度;

(II) 所述低克分子渗透压重量浓度培养基具有218m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度;

(III) 所述低克分子渗透压重量浓度培养基具有11mS/cm至13mS/cm的电导率;

(IV) 所述基础培养基以50mM至110mM的浓度包含碱金属和卤离子的盐;

(V) 所述基础培养基以50mM至110mM的浓度包含氯化钠;

(VI) 所述基础培养基以17mM至30mM的浓度包含碳酸盐;

(VII) 所述基础培养基以13mM至25mM的浓度包含碳酸氢钠;

(VIII) 所述基础培养基具有85mM至130mM的总体碱金属卤化物盐和碳酸盐浓度;

(IX) 所述基础培养基以87±5mM的浓度包含氯化钠,并且所述低克分子渗透压重量浓度培养基具有261±26m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度;

(X) 所述基础培养基包含浓度是50mM至110mM的碱金属和卤离子的盐和浓度是17mM至30mM的碳酸盐;

(XI) 所述低克分子渗透压重量浓度培养基具有218m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度,并且所述基础培养基包含浓度是50mM至110mM的氯化钠和浓度是13mM至25mM的碳酸氢钠;

(XII) 所述基础培养基以18mM至44mM的浓度包含碳酸盐;

(XIII) 所述基础培养基以50mM至110mM的浓度包含碱金属和卤离子的盐;或

(XIV) 所述基础培养基包含浓度是约3mg/mL的氯化钠和浓度是2.2mg/mL的碳酸氢钠,并且所述低克分子渗透压重量浓度培养基具有216m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度。

34. 如权利要求19-26中任一项所述的方法,其中步骤(b)中的所述测定在mRNA水平上检测Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的所述一者或多者的表达。

35. 如权利要求19-26中任一项所述的方法,其中所述小鼠XY ES细胞是VGF1小鼠ES细胞。

36. 如权利要求19-26中任一项所述的方法,其中所述小鼠包括C57BL/6品系,其中Y染色体来自C57BL/6品系、129品系或BALB/c品系,或其中所述小鼠是C57BL/6品系和129品系的混合。

37. 如权利要求19-26中任一项所述的方法,其中所述小鼠XY ES细胞在靶标基因组基因座中包含靶向遗传修饰。

38. 如权利要求37所述的方法,其中所述靶向遗传修饰包括插入、缺失、敲除、敲入、点突变或其组合。

39. 一种选择供体小鼠XY ES细胞的方法以在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY小鼠的方法,其包括:

(a) 在包含基础培养基和适于维持小鼠XY ES细胞的多能性的补充物的低克分子渗透压重量浓度培养基中培养小鼠XY ES细胞的群体,其中所述低克分子渗透压重量浓度培养基具有大于或等于200m0sm/kg且小于329m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度;

(b) 测定小鼠XY ES细胞的所述群体中的一个或多个所述小鼠XY ES细胞的Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达;和

(c) 基于相对于在足以维持对照小鼠XY ES细胞的多能性但不改变所述对照小鼠XY ES细胞产生能生育的雌性子代的能力的对照培养基中培养的对照小鼠XY ES细胞,在所述供体小鼠XY ES细胞中的Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的所述一者或多者的至少降低90%的表达来选择用于在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY小鼠的供体小鼠XY ES细胞,其中所述能生育的呈表型雌性的XY小鼠在所述F0代中的比例与Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的所述一者或多者的表达逆相关。

40. 如权利要求39所述的方法,其进一步包括:

(d) 将所述供体小鼠XY ES细胞引入小鼠宿主胚胎中;

(e) 将来自步骤(d)的所述小鼠宿主胚胎引入接受者雌性小鼠中并孕育所述小鼠宿主胚胎;以及

(f) 获得包括呈表型雌性的XY小鼠的F0 XY小鼠子代,其中在达到性成熟后,F0呈表型雌性的XY小鼠能生育且生殖力旺盛。

41. 如权利要求40所述的方法,其中步骤(d)还包含将所述小鼠宿主胚胎培养至胚泡期。

42. 如权利要求39-41中任一项所述的方法,其中在测定步骤(b)之前,在所述低克分子渗透压重量浓度培养基中培养所述小鼠XY ES细胞至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少7天、至少8天、至少9天、至少10天、至少11天、至少12天、至少13天、至少2周、至少3周或至少4周。

43. 如权利要求39-41中任一项所述的方法,其中相对于所述对照小鼠XY ES细胞,步骤(c)中的所述供体小鼠XY ES细胞具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y的降低至少90%的表达。

44. 如权利要求43所述的方法,其中如果所述供体小鼠XY ES细胞中的Ddx3y、Uty和Eif2s3y的mRNA表达比所述对照小鼠XY ES细胞中的Ddx3y、Uty和Eif2s3y的mRNA表达低至少90%,则在步骤(c)中选择所述供体小鼠XY ES细胞。

45. 如权利要求39-41中任一项所述的方法,其中:

(I) 所述低克分子渗透压重量浓度培养基具有218m0sm/kg至322m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度;

(II) 所述低克分子渗透压重量浓度培养基具有218m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度;

(III) 所述低克分子渗透压重量浓度培养基具有11mS/cm至13mS/cm的电导率;

(IV) 所述基础培养基以50mM至110mM的浓度包含碱金属和卤离子的盐;

(V) 所述基础培养基以50mM至110mM的浓度包含氯化钠;

(VI) 所述基础培养基以17mM至30mM的浓度包含碳酸盐;

(VII) 所述基础培养基以13mM至25mM的浓度包含碳酸氢钠;

(VIII) 所述基础培养基具有85mM至130mM的总体碱金属卤化物盐和碳酸盐浓度;

(IX) 所述基础培养基以87±5mM的浓度包含氯化钠,并且所述低克分子渗透压重量浓度培养基具有261±26m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度;

(X) 所述基础培养基包含浓度是50mM至110mM的碱金属和卤离子的盐和浓度是17mM至30mM的碳酸盐;

(XI) 所述低克分子渗透压重量浓度培养基具有218m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度,并且所述基础培养基包含浓度是50mM至110mM的氯化钠和浓度是13mM至25mM的碳酸氢钠;

(XII) 所述基础培养基以18mM至44mM的浓度包含碳酸盐；

(XIII) 所述基础培养基以50mM至110mM的浓度包含碱金属和卤离子的盐；或

(XIV) 所述基础培养基包含浓度是约3mg/mL的氯化钠和浓度是2.2mg/mL的碳酸氢钠，并且所述低克分子渗透压重量浓度培养基具有216mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。

46. 如权利要求39-41中任一项所述的方法，其中步骤(b)中的所述测定在mRNA水平上检测Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的所述一者或多者的表达。

47. 如权利要求39-41中任一项所述的方法，其中步骤(b)包括测定小鼠XY ES细胞群体中至少两个所述小鼠XY ES细胞的Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的所述一者或多者的表达，并且步骤(c)包括将相对于其它测定细胞在步骤(b)中测定的具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的所述一者或多者的最低表达的细胞选作所述供体小鼠XY ES细胞。

48. 如权利要求39-41中任一项所述的方法，其中步骤(c)中的所述供体小鼠XY ES细胞缺乏Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的所述一者或多者的表达。

49. 如权利要求48所述的方法，其中步骤(c)中的所述供体小鼠XY ES细胞缺乏Ddx3y、Uty和Eif2s3y的表达。

50. 如权利要求39-41中任一项所述的方法，其中所述小鼠XY ES细胞是VGF1小鼠ES细胞。

51. 如权利要求39-41中任一项所述的方法，其中所述小鼠包括C57BL/6品系，其中Y染色体来自C57BL/6品系、129品系或BALB/c品系，或其中所述小鼠是C57BL/6品系和129品系的混合。

52. 如权利要求39-41中任一项所述的方法，其中所述小鼠XY ES细胞在靶标基因组基因座中包含靶向遗传修饰。

53. 如权利要求52所述的方法，其中所述靶向遗传修饰包括插入、缺失、敲除、敲入、点突变或其组合。

## 对用于产生能生育的XY雌性小鼠的多能细胞的选择

### [0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年9月17日提交的美国申请号62/219,927的权益,所述美国申请出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

### [0003] 通过EFS网以文本文件形式提交的序列表的引用

[0004] 写入文件484387SEQLIST.txt中的序列表是9.17kb,于2016年9月1 6日创建,并且据此以引用的方式并入。

### 技术领域

[0005] 本发明涉及遗传学与组织胚胎学领域,具体涉及提供用于产生F0能生育的XY雌性动物的方法和组合物。

### 背景技术

[0006] 对携带靶向突变的经遗传修饰的小鼠的产生通常用源于雄性胚胎的X Y ES细胞系实现。将ES细胞注射至可为雄性或雌性的胚泡期胚胎中,随后向代孕母体中进行子宫转移导致具有来自宿主胚胎与ES细胞两者的遗传贡献的嵌合F0代幼仔的出生。在这个类型实验方面的一个成功标志是由于XY ES细胞对XX雌性胚胎的发育生殖嵴的定殖以及向雄性状态的转变,F0小鼠中的性别比率有利于雄性的扭转。具有强大ES细胞源性毛色贡献的雄性嵌合体可能产生携带靶向突变的精子,并且因此被视为用以将 ES细胞基因组传递至它们的子代中的良好候选者。尽管雌性嵌合体难得可在不良效率下实现种系传递,但预期它们具有不良ES细胞贡献,并且通常不加以交配以建立突变小鼠品系。

[0007] 为加速产生经遗传修饰的小鼠,我们开发了VELOCIMOUSE<sup>®</sup>方法,其中使注射至8细胞期胚胎中的ES细胞转变成完全ES细胞源性F0代小鼠 (Poueymirou等 (2007) Nat.Biotech.25 (1) :91-99)。因为VELOCIMOUS E<sup>®</sup>方法消除嵌合体,所以所有VELOCIMICE<sup>®</sup>都共有它们所源于的ES细胞的基因型。XY ES细胞将被预期只产生雄性VELOCIMICE<sup>®</sup>。尽管已报道 XY小鼠中的性别逆转,但所述小鼠常常不能生育或具有极低生育性。

[0008] 大多数遗传修饰通过靶向XY ES细胞以产生对两个现有等位基因中的一者的修饰来进行,其中所得供体小鼠ES细胞就遗传修饰而言是杂合的。然而,常常可合乎需要的是获得就遗传修饰而言是纯合的小鼠。因为基本上无包含修饰的完全ES细胞源性雌性小鼠出生于F0代中,所以通常使F0雄性与雌性(例如匹配近交雌性)交配以产生其中至少一个雌性(F1雌性)可能就遗传修饰而言是杂合的一窝。接着使杂合性F1雌性与F1杂合性雄性互交以获得纯合性子代。所述交配要求意味着昂贵和耗时步骤。

### 发明内容

[0009] 提供用于制备能够产生包含能生育的呈表型雌性的XY非人哺乳动物的F0 XY非人

哺乳动物子代的供体非人哺乳动物XY多能细胞的方法和组合物。在一个方面,本发明提供用于在非人哺乳动物XY多能细胞中筛选靶标化合物的雌性化活性的方法,其包括:(a)在包含基础培养基和适于维持所述非人哺乳动物XY多能细胞的多能性的补充物的培养基中培养第一群体的非人哺乳动物XY多能细胞和第二群体的非人哺乳动物XY多能细胞,其中在靶标化合物存在下培养所述第一群体,并且在不存在所述靶标化合物下培养所述第二群体;和(b)测定所述第一群体的非人哺乳动物XY 多能细胞和所述第二群体的非人哺乳动物XY 多能细胞的每一个中的一个或多个所述非人哺乳动物XY多能细胞的Ddx3y、Uty和Eif2s3y 中的一者或多者的表达和/或活性,借此通过相较于来自所述第二群体的所述一个或多个非人哺乳动物XY多能细胞,来自所述第一群体的所述一个或多个非人哺乳动物XY多能细胞中的Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的所述一者或多者的所述表达和/或活性的降低来鉴定雌性化活性。任选地,所述方法进一步包括:(c)基于Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的所述一者或多者的所述表达和/ 或活性来从所述第一群体选择用于在F0代中产生能生育的呈表型雌性的X Y 非人哺乳动物的供体非人哺乳动物XY多能细胞,其中所述能生育的呈表型雌性的XY非人哺乳动物在所述F0代中的比例与Ddx3y、Uty和Eif2s 3y中的所述一者或多者的所述表达和/或活性逆相关。任选地,所述方法进一步包括:(d)将所述供体非人哺乳动物XY多能细胞引入宿主胚胎中;(e) 将来自步骤(d)的所述宿主胚胎引入接受者雌性非人哺乳动物中以及孕育所述宿主胚胎;和(f)获得包括呈表型雌性的XY非人哺乳动物的F0 XY非人哺乳动物子代,其中在达到性成熟后,所述F0呈表型雌性的XY非人哺乳动物能生育,或能生育且生殖力旺盛。

[0010] 在一些所述方法中,步骤(b)中的测定在mRNA水平上检测Ddx3y、Uty 和Eif2s3y中的一者或多者的表达。在一些所述方法中,步骤(b)中的测定在蛋白质水平上检测Ddx3y、Uty 和Eif2s3y中的一者或多者的表达。

[0011] 在一些方法中,通过在来自第一群体的一个或多个非人哺乳动物XY 多能细胞中缺乏Ddx3y、Uty 和Eif2s3y中的一者或多者的表达和/或活性来在步骤(b)中鉴定雌性化活性。在一些方法中,通过相较于来自第二群体的一个或多个非人哺乳动物XY多能细胞,来自第一群体的一个或多个非人哺乳动物XY多能细胞中的Ddx3y、Uty 和Eif2s3y的表达和/或活性的降低来在步骤(b)中鉴定雌性化活性。在一些方法中,通过在来自第一群体的一个或多个非人哺乳动物XY多能细胞中缺乏Ddx3y、Uty 和Eif2s3y的表达和/或活性来在步骤(b)中鉴定雌性化活性。

[0012] 在一些方法中,相对于已在足以维持对照非人哺乳动物XY多能细胞的多能性,但不改变细胞产生能生育雌性子代的能力的培养基中培养的所述对照非人哺乳动物XY多能细胞,步骤(c)中的供体非人哺乳动物XY多能细胞具有Ddx3y、Uty 和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性。在一些方法中,相对于来自第二群体的对照非人哺乳动物XY多能细胞,步骤(c)中的供体非人哺乳动物XY多能细胞具有Ddx3y、Uty 和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性。在一些方法中,相对于对照非人哺乳动物XY多能细胞,步骤(c)中的供体非人哺乳动物XY多能细胞具有Ddx3 y、Uty 和Eif2s3y的降低表达和/或活性。在一些方法中,步骤(b)包括测定第一群体中至少两个非人哺乳动物XY多能细胞的Ddx3y、Uty 和Eif2s3y 中的一者或多者的表达和/或活性,并且步骤(c)包括将相对于其它测定细胞在步骤(b)中测定的具有Ddx3y、Uty 和Eif2s3y中的所述一者或多者的最低表达和/或活性的细

胞选作供体非人哺乳动物XY多能细胞。在一些方法中,步骤(c)中的供体非人哺乳动物XY多能细胞缺乏Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或更多的表达和/或活性。在一些方法中,步骤(c)中的供体非人哺乳动物XY多能细胞缺乏Ddx3y、Uty和Eif2s3y的表达和/或活性。

[0013] 在一些方法中,在测定步骤(b)之前,在靶标化合物存在下培养第一群体至少1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、2周、3周或4周。

[0014] 在一些方法中,多能细胞是胚胎干(ES)细胞。任选地,多能细胞是VG F1小鼠ES细胞。

[0015] 在一些方法中,在不存在靶标化合物下,步骤(a)中的培养基足以维持非人哺乳动物XY多能细胞的多能性,但不改变细胞产生能生育雌性子代的能力。

[0016] 在一些方法中,在不存在靶标化合物下,步骤(a)中的培养基是具有约200m0sm/kg至小于约329m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度的低克分子渗透压重量浓度培养基。任选地,低克分子渗透压重量浓度培养基具有一个或多个以下性质:(I)低克分子渗透压重量浓度培养基具有约218m0sm/kg至约322m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度;(II)低克分子渗透压重量浓度培养基具有约11mS/cm至约13mS/cm的电导率;(IV)基础培养基以约50mM至约110mM的浓度包含碱金属和卤离子的盐;(V)基础培养基以约50mM至约110mM的浓度包含氯化钠;(VI)基础培养基以约17mM至约30mM的浓度包含碳酸盐;(VII)基础培养基以约13mM至约25mM的浓度包含碳酸氢钠;(VIII)基础培养基具有约85mM至约130mM的总体碱金属卤化物盐和碳酸盐浓度;(IX)基础培养基以87±5mM的浓度包含氯化钠,并且低克分子渗透压重量浓度培养基具有261±26m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度;(X)基础培养基包含浓度是约50mM至约110mM的碱金属和卤离子的盐和浓度是约17mM至约30mM的碳酸盐,并且低克分子渗透压重量浓度培养基具有约200m0sm/kg至约329m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度;和(XI)低克分子渗透压重量浓度培养基具有218m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度,并且基础培养基包含浓度是50mM至110mM的氯化钠和浓度是13mM至25mM的碳酸氢钠。任选地,基础培养基以约18mM至约44mM的浓度包含碳酸盐。任选地,基础培养基以约50mM至约110mM的浓度包含碱金属和卤离子的盐。任选地,碳酸盐是碳酸氢钠,碱金属和卤离子的盐是氯化钠,并且低克分子渗透压重量浓度培养基具有约216m0sm/kg至约322m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度。任选地,基础培养基包含浓度是约3mg/mL的氯化钠和浓度是约2.2mg/mL的碳酸氢钠,并且低克分子渗透压重量浓度培养基具有约216m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度。

[0017] 在一些方法中,非人哺乳动物是啮齿动物。任选地,啮齿动物是大鼠或小鼠。在一些方法中,啮齿动物是包括C57BL/6品系的小鼠。任选地,Y染色体来自C57BL/6品系。在一些方法中,啮齿动物是包括129品系的小鼠。任选地,Y染色体来自129品系。任选地,Y染色体来自BALB/c品系。在一些方法中,小鼠不包括129品系。在一些方法中,Y染色体不来自129品系。在一些方法中,啮齿动物是包括C57BL/6品系和129品系的小鼠。

[0018] 在一些方法中,多能细胞在靶标基因组基因座中包含靶向遗传修饰。任选地,靶向遗传修饰包括插入、缺失、敲除、敲入、点突变或其组合。

[0019] 一些方法进一步包括:(g)使F0 XY能生育雌性非人哺乳动物交配以产生子代。任选地,至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或全部的XY子代在表型上是雄性的,并且能生育。任选地,XY

子代都不是呈表型雌性的。任选地，全部XY子代都是在表型上是雄性的，并且能生育。任选地，交配包括使F0 XY能生育雌性非人哺乳动物与同辈F0 XY雄性非人哺乳动物杂交，其中所述F0 XY能生育雌性非人哺乳动物和所述F0 XY雄性非人哺乳动物各自就遗传修饰而言是杂合的，以及获得就所述遗传修饰而言是纯合的F1子代非人哺乳动物。

[0020] 在一些方法中，宿主胚胎是前桑椹胚期胚胎，并且步骤(d)进一步包括将宿主胚胎培养至胚泡期。

[0021] 在一些方法中，其中在引入宿主胚胎中之前，在靶标化合物存在下培养非人哺乳动物XY多能细胞至少1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、2周、3周或4周。

[0022] 在一些方法中，至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的F0 XY子代是在达到性成熟后能生育的呈表型雌性的XY非人哺乳动物。任选地，当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY子代时，对于源于具有D dx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的非人哺乳动物 XY多能细胞的F0 XY子代，是能生育的呈表型雌性的XY动物的F0 XY 子代的百分比更高。

[0023] 在一些方法中，源于供体非人哺乳动物XY多能细胞的全部F0 雌性都具有XY基因型。

[0024] 在一些方法中，至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的源于供体非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性能生育。任选地，当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY子代时，对于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY子代，能生育的F0 XY雌性的百分比更高。

[0025] 在一些方法中，至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的源于供体非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性能够产生具有至少2、3、4、5、6、7、8、9或10只幼仔的各窝。任选地，当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性时，对于源于具有Ddx3y、U ty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性，由F0 XY雌性或能生育的F 0 XY雌性产生的平均同窝仔畜数更高。

[0026] 在一些方法中，至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的源于供体非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性能够在它们的终生中产生至少2、3、4、5、6、7、8、9或10窝。任选地，当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性时，对于源于具有Ddx3y、U ty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性，由F0 XY雌性或能生育的F 0 XY雌性产生的平均终生窝数更高。

[0027] 在一些方法中，当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性时，对于源于

具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性,由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均终生后代数更高。

[0028] 在另一方面,本发明提供用于制备供体非人哺乳动物XY多能细胞的方法,其包括:(a)在包含基础培养基和适于维持非人哺乳动物XY多能细胞的多能性的补充物的低克分子渗透压重量浓度培养基中培养所述非人哺乳动物XY多能细胞的群体,其中所述低克分子渗透压重量浓度培养基具有约200m0sm/kg至小于约329m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度;(b)测定非人哺乳动物XY多能细胞的所述群体中的一个或多个所述非人哺乳动物XY多能细胞的Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达和/或活性;和(c)基于Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的所述一者或多者的所述表达和/或活性来选择用于在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY非人哺乳动物的供体非人哺乳动物XY多能细胞,其中所述能生育的呈表型雌性的XY 非人哺乳动物在所述F0代中的比例与Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的所述一者或多者的所述表达和/或活性逆相关。

[0029] 在一些所述方法中,步骤(b)中的测定在mRNA水平上检测Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达。在一些所述方法中,步骤(b)中的测定在蛋白质水平上检测Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达。

[0030] 在一些方法中,基于相对于已在足以维持对照非人哺乳动物XY多能细胞的多能性,但不改变细胞产生能生育雌性子代的能力的培养基中培养的所述对照非人哺乳动物XY多能细胞,Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达和/或活性降低来选择供体非人哺乳动物XY多能细胞。在一些方法中,相对于对照非人哺乳动物XY多能细胞,供体非人哺乳动物XY多能细胞具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y的降低表达和/或活性。在一些方法中,步骤(b)包括测定非人哺乳动物XY多能细胞的群体中至少两个非人哺乳动物XY多能细胞的Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达和/或活性,并且步骤(c)包括将相对于其它测定细胞在步骤(b)中测定的具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的所述一者或多者的最低表达和/或活性的细胞选作供体非人哺乳动物XY多能细胞。在一些方法中,供体非人哺乳动物XY多能细胞缺乏Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达和/或活性。在一些方法中,供体非人哺乳动物XY多能细胞缺乏Ddx3y、Uty和Eif2s3y的表达和/或活性。

[0031] 在一些方法中,在测定步骤(b)之前,在低克分子渗透压重量浓度培养基中培养非人哺乳动物XY多能细胞至少1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、2周、3周或4周。

[0032] 在一些方法中,多能细胞是胚胎干(ES)细胞。任选地,多能细胞是VG F1小鼠ES细胞。

[0033] 在一些方法中,低克分子渗透压重量浓度培养基具有一个或多个以下性质:(I)低克分子渗透压重量浓度培养基具有约218m0sm/kg至约322m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度;(II)低克分子渗透压重量浓度培养基具有218m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度;(III)低克分子渗透压重量浓度培养基具有约11mS/cm至约13mS/cm的电导率;(IV)基础培养基以约50mM至约110mM的浓度包含碱金属和卤离子的盐;(V)基础培养基以约50mM至约110mM的浓度包含氯化钠;(VI)基础培养基以约17mM至约30mM的浓度包含碳酸盐;(VII)基础培养基以约13mM至约25mM的浓度包含碳酸氢钠;(VIII)基础培养基具有约85mM至约130mM的总

体碱金属卤化物盐和碳酸盐浓度；(IX) 基础培养基以 $87\pm5$ mM的浓度包含氯化钠，并且低克分子渗透压重量浓度培养基具有 $261\pm26$ mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度；(X) 基础培养基包含浓度是约 $50$ mM至约 $110$ mM 的碱金属和卤离子的盐和浓度是约 $17$ mM至约 $30$ mM的碳酸盐，并且低克分子渗透压重量浓度培养基具有约 $200$ mOsm/kg至约 $329$ mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度；和(XI) 低克分子渗透压重量浓度培养基具有 $218$  mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度，并且基础培养基包含浓度是 $50$ mM 至 $110$ mM的氯化钠和浓度是 $13$ mM至 $25$ mM的碳酸氢钠。任选地，基础培养基以约 $18$ mM至约 $44$ mM的浓度包含碳酸盐。任选地，基础培养基以约 $50$ mM至约 $110$ mM的浓度包含碱金属和卤离子的盐。任选地，碳酸盐是碳酸氢钠，碱金属和卤离子的盐是氯化钠，并且低克分子渗透压重量浓度培养基具有约 $216$ mOsm/kg至约 $322$ mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。任选地，基础培养基包含浓度是约 $3$ mg/mL的氯化钠和浓度是约 $2.2$ mg/mL的碳酸氢钠，并且低克分子渗透压重量浓度培养基具有约 $21.6$ mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。

[0034] 在一些方法中，非人哺乳动物是啮齿动物。任选地，啮齿动物是大鼠或小鼠。在一些方法中，啮齿动物是包括C57BL/6品系的小鼠。任选地，Y染色体来自C57BL/6品系。在一些方法中，啮齿动物是包括129品系的小鼠。任选地，Y染色体来自129品系。任选地，Y染色体来自BALB/c 品系。在一些方法中，小鼠不包括129品系。在一些方法中，Y染色体不来自129品系。在一些方法中，啮齿动物是包括C57BL/6品系和129品系的小鼠。

[0035] 在一些方法中，多能细胞在靶标基因组基因座中包含靶向遗传修饰。任选地，靶向遗传修饰包括插入、缺失、敲除、敲入、点突变或其组合。

[0036] 一些方法进一步包括：(d) 将所述供体非人哺乳动物XY多能细胞引入宿主胚胎中；(e) 将来自步骤(d)的所述宿主胚胎引入接受者雌性非人哺乳动物中以及孕育所述宿主胚胎；和(f) 获得包括呈表型雌性的XY非人哺乳动物的F0 XY非人哺乳动物子代，其中在达到性成熟后，所述F0呈表型雌性的XY非人哺乳动物能生育，或能生育且生殖力旺盛。一些方法进一步包括：(g) 使F0 XY能生育雌性非人哺乳动物交配以产生子代。任选地，至少 $5\%$ 、至少 $10\%$ 、至少 $20\%$ 、至少 $30\%$ 、至少 $40\%$ 、至少 $50\%$ 、至少 $60\%$ 、至少 $70\%$ 、至少 $80\%$ 、至少 $90\%$ 、至少 $95\%$ 或全部的XY子代在表型上是雄性的，并且能生育。任选地，XY子代都不是呈表型雌性的。任选地，全部XY子代都是在表型上是雄性的，并且能生育。任选地，交配包括使F0 XY能生育雌性非人哺乳动物与同辈F0 XY雄性非人哺乳动物杂交，其中所述F0 XY能生育雌性非人哺乳动物和所述F0 XY雄性非人哺乳动物各自就遗传修饰而言是杂合的，以及获得就所述遗传修饰而言是纯合的F1子代非人哺乳动物。

[0037] 在一些方法中，宿主胚胎是前桑椹胚期胚胎，并且步骤(d)进一步包括将宿主胚胎培养至胚泡期。

[0038] 在一些方法中，在引入宿主胚胎中之前，在低克分子渗透压重量浓度培养基中培养非人哺乳动物XY多能细胞至少1天、2天、3天、4天、5 天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、2周、3周或4 周。

[0039] 在一些方法中，至少 $5\%$ 、至少 $10\%$ 、至少 $20\%$ 、至少 $30\%$ 、至少 $40\%$ 、至少 $50\%$ 、至少 $60\%$ 、至少 $70\%$ 、至少 $80\%$ 、至少 $90\%$ 或至少 $95\%$ 的F0 XY子代是在达到性成熟后能生育的呈表型雌性的XY非人哺乳动物。任选地，当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或者者的较高表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY子代时，对于源于具有

D dx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的非人哺乳动物 XY多能细胞的F0 XY子代,是能生育的呈表型雌性的XY动物的F0 XY 子代的百分比更高。

[0040] 在一些方法中,源于供体非人哺乳动物XY多能细胞的全部F0雌性都具有XY基因型。

[0041] 在一些方法中,至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的源于供体非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性能生育。任选地,当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY子代时,对于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY子代,能生育的F0 XY雌性的百分比更高。

[0042] 在一些方法中,至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的源于供体非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性能够产生具有至少2、3、4、5、6、7、8、9或10只幼仔的各窝。任选地,当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性时,对于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性,由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均同窝仔畜数更高。

[0043] 在一些方法中,至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的源于供体非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性能够在它们的终生中产生至少2、3、4、5、6、7、8、9或10窝。任选地,当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性时,对于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性,由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均终生窝数更高。

[0044] 在一些方法中,当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性时,对于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性,由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的终生后代平均数更高。

[0045] 在另一方面,本发明提供一种试剂盒,其包括:(a)用于检测非人哺乳动物XY多能细胞中的Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达和/或活性水平的检测试剂;和(b)用于使用所述检测试剂以及使检测与所述非人哺乳动物XY多能细胞在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY非人哺乳动物的预测倾向相关联的说明书。任选地,检测试剂包括用于检测Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达的一个或多个引物组和/或一种或多种探针。

[0046] 在另一方面,本发明提供用于使雌性化培养基中的靶标培养基组分的浓度优化的方法,其包括:(a)在包含基础培养基和适于维持非人哺乳动物 XY多能细胞的多能性的补充物的培养基中培养第一群体的所述非人哺乳动物XY多能细胞和第二群体的所述非人哺乳动物XY多能细胞,其中在第一浓度的所述靶标培养基组分存在下培养所述第一群体,并

且在不同于所述第一浓度的第二浓度的所述靶标培养基组分存在下培养所述第二群体；(b) 测定所述第一群体的非人哺乳动物XY多能细胞和所述第二群体的非人哺乳动物XY多能细胞的每一个中的一个或多个所述非人哺乳动物XY多能细胞的Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达和/或活性；和 (c) 如果相较于来自所述第二群体的所述一个或多个非人哺乳动物XY多能细胞，来自所述第一群体的所述一个或多个非人哺乳动物XY多能细胞中的Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的所述一者或多者的所述表达和/或活性降低，那么选择所述第一浓度。一些所述方法进一步包括：(d) 基于Ddx3y、Uty 和Eif2s3y中的所述一者或多者的所述表达和/或活性来从所述第一群体选择用于在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY非人哺乳动物的供体非人哺乳动物XY多能细胞，其中所述能生育的呈表型雌性的XY非人哺乳动物在所述F0代中的比例与Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的所述一者或多者的所述表达和/或活性逆相关。一些所述方法进一步包括：(e) 将所述供体非人哺乳动物XY多能细胞引入宿主胚胎中；(f) 将来自步骤(e) 的所述宿主胚胎引入接受者雌性非人哺乳动物中以及孕育所述宿主胚胎；和(g) 获得包括呈表型雌性的XY非人哺乳动物的F0 XY非人哺乳动物子代，其中在达到性成熟后，所述F0呈表型雌性的XY非人哺乳动物能生育，或能生育且生殖力旺盛。

[0047] 在一些方法中，步骤(b) 中的测定在mRNA水平上检测Ddx3y、Uty和 Eif2s3y中的一者或多者的表达。在一些方法中，步骤(b) 中的测定在蛋白质水平上检测Ddx3y、Uty 和Eif2s3y中的一者或多者的表达。

[0048] 在一些方法中，如果来自第一群体的一个或多个非人哺乳动物XY多能细胞缺乏Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达和/或活性，那么在步骤(c) 中选择第一浓度。在一些方法中，如果相较于来自第二群体的一个或多个非人哺乳动物XY多能细胞，来自第一群体的一个或多个非人哺乳动物XY多能细胞具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y的降低表达和/或活性，那么在步骤(c) 中选择第一浓度。在一些方法中，如果来自第一群体的一个或多个非人哺乳动物XY多能细胞缺乏Ddx3y、Uty和Eif2s3y的表达和/或活性，那么在步骤(c) 中选择第一浓度。

[0049] 在一些方法中，相对于已在足以维持对照非人哺乳动物XY多能细胞的多能性，但不改变细胞产生能生育雌性子代的能力的培养基中培养的所述对照非人哺乳动物XY多能细胞，步骤(c) 中的供体非人哺乳动物XY多能细胞具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性。在一些方法中，相对于来自第二群体的对照非人哺乳动物XY多能细胞，步骤(c) 中的供体非人哺乳动物XY多能细胞具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性。在一些方法中，相对于对照非人哺乳动物XY多能细胞，供体非人哺乳动物XY多能细胞具有Ddx3y、Uty和E if2s3y的降低表达和/或活性。在一些方法中，步骤(b) 包括测定第一群体的非人哺乳动物XY多能细胞中的至少两个非人哺乳动物XY多能细胞的Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达和/或活性，并且步骤(d) 包括将相对于其它测定细胞，具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的所述一者或多者的最低表达和/或活性的来自步骤(b) 的测定细胞选作供体非人哺乳动物XY多能细胞。在一些方法中，供体非人哺乳动物XY多能细胞缺乏Ddx3y、Uty 和Eif2s3y中的一者或多者的表达和/或活性。在一些方法中，供体非人哺乳动物XY多能细胞缺乏Ddx3y、Uty和Eif2s3y的表达和/或活性。

[0050] 在一些方法中，在测定步骤(b) 之前，在靶标培养基组分存在下培养第一群体和第二群体至少1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、2周、3周或4

周。

[0051] 在一些方法中,多能细胞是胚胎干(ES)细胞。任选地,多能细胞是VG F1小鼠ES细胞。

[0052] 在一些方法中,步骤(a)中的培养基是具有约200mOsm/kg至小于约3 29mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度的低克分子渗透压重量浓度培养基。任选地,低克分子渗透压重量浓度培养基具有一个或多个以下性质:(I)低克分子渗透压重量浓度培养基具有约218mOsm/kg至约322mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度;(II)低克分子渗透压重量浓度培养基具有218mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度;(III)低克分子渗透压重量浓度培养基具有约11mS/cm至约13mS/cm的电导率;(IV)基础培养基以约50mM至约110mM的浓度包含碱金属和卤离子的盐;(V)基础培养基以约50mM至约110mM的浓度包含氯化钠;(VI)基础培养基以约17mM至约30mM的浓度包含碳酸盐;(VII)基础培养基以约13mM至约25mM的浓度包含碳酸氢钠;(VIII)基础培养基具有约85mM至约130mM的总体碱金属卤化物盐和碳酸盐浓度;(IX)基础培养基以87±5mM的浓度包含氯化钠,并且低克分子渗透压重量浓度培养基具有261±26mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度;(X)基础培养基包含浓度是约50mM至约110mM的碱金属和卤离子的盐和浓度是约17mM至约30mM的碳酸盐,并且低克分子渗透压重量浓度培养基具有约200mOsm/kg至约329mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度;和(XI)低克分子渗透压重量浓度培养基具有218mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度,并且基础培养基包含浓度是50mM至110mM的氯化钠和浓度是13mM至25mM的碳酸氢钠。任选地,基础培养基以约18mM至约44mM的浓度包含碳酸盐。任选地,基础培养基以约50mM至约110mM的浓度包含碱金属和卤离子的盐。任选地,碳酸盐是碳酸氢钠,碱金属和卤离子的盐是氯化钠,并且低克分子渗透压重量浓度培养基具有约216mOsm/kg至约322mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。任选地,基础培养基包含浓度是约3mg/mL的氯化钠和浓度是约2.2mg/mL的碳酸氢钠,并且低克分子渗透压重量浓度培养基具有约216mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。

[0053] 在一些方法中,非人哺乳动物是啮齿动物。任选地,啮齿动物是大鼠或小鼠。在一些方法中,啮齿动物是包括C57BL/6品系的小鼠。任选地,Y染色体来自C57BL/6品系。在一些方法中,啮齿动物是包括129品系的小鼠。任选地,Y染色体来自129品系。任选地,Y染色体来自BALB/c品系。在一些方法中,小鼠不包括129品系。在一些方法中,Y染色体不来自129品系。在一些方法中,啮齿动物是包括C57BL/6品系和129品系的小鼠。

[0054] 在一些方法中,多能细胞在靶标基因组基因座中包含靶向遗传修饰。任选地,靶向遗传修饰包括插入、缺失、敲除、敲入、点突变或其组合。

[0055] 一些方法进一步包括:(h)使F0 XY能生育雌性非人哺乳动物交配以产生子代。任选地,至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或全部的XY子代在表型上是雄性的,并且能生育。任选地,XY子代都不是呈表型雌性的。任选地,全部XY子代都是在表型上是雄性的,并且能生育。任选地,交配包括使F0 XY能生育雌性非人哺乳动物与同辈F0 XY雄性非人哺乳动物杂交,其中所述F0 XY能生育雌性非人哺乳动物和所述F0 XY雄性非人哺乳动物各自就遗传修饰而言是杂合的,以及获得就所述遗传修饰而言是纯合的F1子代非人哺乳动物。

[0056] 在一些方法中,宿主胚胎是前桑椹胚期胚胎,并且步骤(e)进一步包括将宿主胚胎培养至胚泡期。

[0057] 在一些方法中,在引入宿主胚胎中之前,在靶标培养基组分存在下培养非人哺乳动物XY多能细胞至少1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、2周、3周或4周。

[0058] 在一些方法中,至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的F0 XY子代是在达到性成熟后能生育的呈表型雌性的XY非人哺乳动物。任选地,当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY子代时,对于源于具有D dx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的非人哺乳动物 XY多能细胞的F0 XY子代,是能生育的呈表型雌性的XY动物的F0 XY 子代的百分比更高。

[0059] 在一些方法中,源于供体非人哺乳动物XY多能细胞的全部F0雌性都具有XY基因型。

[0060] 在一些方法中,至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的源于供体非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性能生育。任选地,当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY子代时,对于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY子代,能生育的F0 XY雌性的百分比更高。

[0061] 在一些方法中,至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的源于供体非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性能够产生具有至少2、3、4、5、6、7、8、9或10只幼仔的各窝。任选地,当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性时,对于源于具有Ddx3y、U ty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性,由F0 XY雌性或能生育的F 0 XY雌性产生的平均同窝仔畜数更高。

[0062] 在一些方法中,至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的源于供体非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性能够在它们的终生中产生至少2、3、4、5、6、7、8、9或10窝。任选地,当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性时,对于源于具有Ddx3y、U ty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性,由F0 XY雌性或能生育的F 0 XY雌性产生的平均终生窝数更高。

[0063] 在一些方法中,当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性时,对于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性,由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均终生后代数更高。

[0064] 在一个方面,本发明提供用于制备供体非人哺乳动物XY多能细胞的方法,其包括:对非人哺乳动物XY多能细胞进行修饰以使Y染色体的区域沉默,并且产生所述供体非人哺乳动物XY多能细胞,其中所述沉默通过除在包含具有约200m0sm/kg至小于约329m0sm/kg的

克分子渗透压重量浓度的基础培养基的低克分子渗透压重量浓度培养基中维持非人哺乳动物XY多能细胞以外的手段来实现，并且其中所述供体非人哺乳动物X Y多能细胞能够产生包含能生育的呈表型雌性的XY非人哺乳动物的F0 X Y非人哺乳动物子代。任选地，多能细胞是胚胎干(ES)细胞。

[0065] 在一些方法中，区域包含Y染色体的短臂的全部或一部分。在一些方法中，区域排除Rbmy簇、Zfy2和Sry中的一者或者者。在一些方法中，区域包含Y染色体的对应于小鼠Y染色体的Sxr<sup>a</sup>区和/或Sxr<sup>b</sup>区的区段的全部或一部分。在一些方法中，区域包含Y染色体的对应于小鼠Y染色体上的缺失间隔1、缺失间隔2和缺失间隔3中的一者或者者的区段的全部或一部分。在一些方法中，区域包含Y染色体的对应于小鼠Y染色体上的缺失间隔2的区段的全部或一部分。在一些方法中，区域包含Y染色体的在 Kdm5d的端粒方向或或在Usp9y的着丝粒方向的部分。在一些方法中，区域在Zfy2、Sry或Rbmy簇的端粒方向。在一些方法中，区域在Zfy2基因的端粒方向。

[0066] 在一些方法中，沉默使由位于Y染色体的短臂的区域上的基因编码的蛋白质的水平和/或活性降低。在一些方法中，Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或者者的水平和/或活性被降低。任选地，Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或者者的水平和/或活性被消除。在一些方法中，Sry和Zfy2中的一者或者者的水平和/或活性被降低。任选地，Sry和Zfy2中的一者或者者的水平和/或活性被消除。

[0067] 在一些方法中，沉默是永久的。在一些方法中，通过以下中的一者或者者来实现沉默：(1) 靶向遗传修饰；(2) 对区域的缺失或破坏；(3) 对从区域内的一个或多个基因转录的mRNA的RNA干扰或反义抑制；(4) 对由区域内的一个或多个基因编码的蛋白质的定向降解；(5) 异染色质介导的沉默；(6) 使Y染色体上的磷酸化形式的组蛋白变体γ H2AX的水平增加；和(7) 使区域内的一个或多个基因的转录降低。任选地，用靶向核酸酶使区域缺失或破坏。任选地，核酸酶是锌指核酸酶(ZFN)、转录活化子样效应物核酸酶(T ALEN)、兆碱基大范围核酸酶(meganuclease)或成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)相关(Cas)蛋白和引导RNA(gRNA)。

[0068] 在一些方法中，沉默发生在至少一个以下时间期间：(1) 在将供体非人哺乳动物XY多能细胞引入宿主胚胎中之后；(2) 在将包含供体非人哺乳动物XY多能细胞的宿主胚胎引入接受者雌性非人哺乳动物中之后；(3) 在进行雄性性别决定程序时的胚胎发育期间；(4) 在直至至少对应于小鼠中的E1 1-E12的发育阶段的胚胎发育期间；(5) 在直至至少对应于小鼠中的E17-E1 9的发育阶段的胚胎发育期间；(6) 在整个胚胎发育中；(7) 在整个卵子发生的时期中；(8) 在卵母细胞发育中的减数分裂前期期间；(9) 在卵母细胞受精之后的前两次细胞分裂期间；和(10) 在卵母细胞排卵后直至受精后前两次细胞分裂。在一些方法中，性别逆转能够被传递至F1子代中。

[0069] 在一些方法中，不在包含具有约200mOsm/kg至小于约329mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度的基础培养基的低克分子渗透压重量浓度培养基中培养非人哺乳动物XY多能细胞。其它方法进一步包括在包含基础培养基和适于维持所培养的非人哺乳动物XY多能细胞的补充物的培养基中培养非人哺乳动物XY多能细胞，其中所述培养基是包含具有约200mOsm/kg至小于约329mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度的基础培养基的低克分子渗透压重量浓度培养基。在一些方法中，区域包括Rbmy簇、Zfy2 和Sry中的一者或者者，并且其

中在包含基础培养基和适于维持所培养的非人哺乳动物XY多能细胞的补充物的培养基中培养非人哺乳动物XY多能细胞，其中所述培养基是包含具有约200mOsm/kg至小于约329mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度的基础培养基的低克分子渗透压重量浓度培养基。任选地，低克分子渗透压重量浓度培养基包含具有以下中的一者或多者的基础培养基：(1) 约218mOsm/kg至约322mOsm/Kg的克分子渗透压重量浓度；(2) 218mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度；(3) 约11mS/cm至约13mS/cm的电导率；(4) 浓度是约50mM至约110mM的碱金属和卤离子的盐；(5) 约50mM至约110mM的氯化钠浓度；(6) 约17mM 至约30mM的碳酸盐浓度；(7) 约13mM至约25mM的碳酸氢钠浓度；(8) 约85mM至约130mM的总体碱金属卤化物盐和碳酸盐浓度；(9)  $87 \pm 5$  mM的氯化钠浓度和 $261 \pm 26$ mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度；(10) 浓度是约50mM至约110mM的碱金属和卤离子的盐、浓度是约17mM至约 30mM的碳酸盐、以及约200mOsm/kg至约329mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度；和(11) 218mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度、50mM至1 10mM的氯化钠浓度、以及13mM至25mM的碳酸氢钠浓度。任选地，在引入宿主胚胎中之前，在低克分子渗透压重量浓度培养基中维持非人哺乳动物XY多能细胞至少1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、2周、3周或4周。

[0070] 在一些方法中，非人哺乳动物是啮齿动物。任选地，啮齿动物是大鼠或小鼠。在一些方法中，啮齿动物是包括C57BL/6品系的小鼠。任选地，Y染色体来自C57BL/6品系。在一些方法中，啮齿动物是包括129品系的小鼠。任选地，Y染色体来自129品系。在一些方法中，小鼠不包括129 品系。在一些方法中，Y染色体不来自129品系。在一些方法中，啮齿动物是包括C57BL/6品系和129品系的小鼠。任选地，多能细胞是VGF1小鼠ES细胞。

[0071] 在一些方法中，多能细胞在靶标基因组基因座中包含靶向遗传修饰。任选地，其中靶向遗传修饰包括插入、缺失、敲除、敲入、点突变或其组合。

[0072] 在一些方法中，区域包括Zfy2，并且非人哺乳动物XY多能细胞进一步包含使Sry蛋白的水平和/或活性降低的修饰。任选地，非人哺乳动物是包括C57BL/6品系的小鼠，非人哺乳动物是不包括129品系的小鼠，非人哺乳动物是小鼠，其中Y染色体来自C57BL/6品系，或非人哺乳动物是小鼠，其中Y染色体不来自129品系。任选地，所述方法进一步包括在包含基础培养基和适于维持所培养的非人哺乳动物XY多能细胞的补充物的培养基中培养非人哺乳动物XY多能细胞，其中所述培养基是包含具有约20 0mOsm/kg至小于约329mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度的基础培养基的低克分子渗透压重量浓度培养基。

[0073] 本发明也提供包含通过用于制备供体非人哺乳动物XY多能细胞的任何以上方法来产生的供体非人哺乳动物XY多能细胞的体外培养物。

[0074] 本发明也提供用于产生胚胎的方法，其包括将通过任何以上方法来产生的供体非人哺乳动物XY多能细胞引入宿主胚胎中，其中所述宿主胚胎能够在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY非人哺乳动物。

[0075] 本发明也提供通过用于产生胚胎的以上方法来产生的经修饰的非人哺乳动物胚胎。本发明也提供经修饰的非人哺乳动物胚胎，其包含在它的基因组中具有使Y染色体的区域沉默的修饰的细胞。

[0076] 本发明也提供用于在F0代中制备能生育的呈表型雌性的XY非人哺乳动物的方法，其包括：(a) 向宿主胚胎中引入通过用于制备供体非人哺乳动物XY多能细胞的任何以上方法来产生的供体非人哺乳动物XY多能细胞；(b) 将来自步骤(a)的所述宿主胚胎引入接受

者雌性非人哺乳动物中以及孕育所述宿主胚胎;和(c)获得包括呈表型雌性的XY非人哺乳动物的F0 XY 非人哺乳动物子代,其中在达到性成熟后,所述F0呈表型雌性的XY非人哺乳动物能生育。或者,提供用于在F0代中制备能生育的呈表型雌性的X Y非人哺乳动物的方法,其包括:(a)将经修饰的胚胎引入接受者雌性非人哺乳动物中以及孕育所述胚胎,其中所述胚胎通过以上方法来产生;和(b) 获得包括呈表型雌性的XY非人哺乳动物的F0 XY非人哺乳动物子代,其中在达到性成熟后,所述F0呈表型雌性的XY非人哺乳动物能生育。

[0077] 在一些方法中,至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的F0 XY子代是在达到性成熟后能生育的呈表型雌性的XY非人哺乳动物。在一些方法中,源于供体非人哺乳动物XY多能细胞的全部F0雌性都具有XY 基因型。在一些方法中,至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的源于供体非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性能生育。在一些方法中,至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的源于供体非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性能能够产生具有至少2、3、4、5、6、7、8、9或10只幼仔的各窝。在一些方法中,至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少 90%或至少95%的源于供体非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性能能够在它们的终生中产生至少2、3、4、5、6、7、8、9或10窝。

[0078] 本发明也提供通过用于在F0代中制备能生育的呈表型雌性的XY非人哺乳动物的任何以上方法来产生的能生育的呈表型雌性的XY非人哺乳动物。

[0079] 本发明也提供在F1代中产生就靶标基因组基因座中的靶向遗传修饰而言是纯合的转基因非人哺乳动物的方法,其包括:(a)使通过以上方法来产生的F0 XY能生育雌性与F0 XY雄性非人哺乳动物杂交,其中所述F0 XY能生育雌性非人哺乳动物和所述F0 XY雄性非人哺乳动物各自就所述靶向遗传修饰而言是杂合的;和(b)获得就所述靶向遗传修饰而言是纯合的F1子代非人哺乳动物。任选地,F0 XY雄性是与F0 XY能生育雌性源于相同多能细胞克隆的同辈克隆同胞。

[0080] 本发明也提供用于在F0代中制备能生育的呈表型雌性的XY非人哺乳动物的方法,其包括:(a)通过对非人哺乳动物XY多能细胞进行修饰以使 Y染色体的包含Y染色体的在Sry基因外部的部分的区域沉默来产生供体非人哺乳动物XY多能细胞,其中所述供体非人哺乳动物XY多能细胞进一步包含使Sry蛋白的水平和/或活性降低的修饰;(b)将所述供体非人哺乳动物XY多能细胞引入宿主胚胎中;(c)将步骤(b)的所述宿主胚胎引入接受者雌性非人哺乳动物中以及孕育所述宿主胚胎;和(d)获得包括呈表型雌性的XY非人哺乳动物的F0 XY非人哺乳动物子代,其中在达到性成熟后,所述F0呈表型雌性的XY非人哺乳动物能生育。任选地,多能细胞是胚胎干细胞。

[0081] 在一些方法中,区域包含Y染色体的短臂的全部或一部分;排除Rbm<sup>y</sup>簇、Zfy2和Sry中的一者或者;包含Y染色体的对应于小鼠Y染色体的Sxr<sup>a</sup>区和/或Sxr<sup>b</sup>区的区段的全部或一部分;包含Y染色体的对应于小鼠 Y染色体上的缺失间隔1、缺失间隔2和缺失间隔3中的一者或者的区段的全部或一部分;包含Y染色体的在Kdm5d的端粒方向或在Usp9y的着丝粒方向的部分;或在Zfy2、Sry或Rbmy簇的端粒方向。

[0082] 在一些方法中,沉默使由位于区域中的基因编码的蛋白质的水平和/或活性降低。

任选地,Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的水平和/或活性被降低;Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的水平和/或活性被消除;Sry和Zfy2中的一者或多者的水平和/或活性被降低;或Sry和Zfy2中的一者或多者的水平和/或活性被消除。在一些方法中,沉默是永久的。

[0083] 在一些方法中,通过以下中的一者或多者来实现沉默:(1)靶向遗传修饰;(2)对区域的缺失或破坏;(3)对从区域内一个或多个基因转录的mRNA的RNA干扰或反义抑制;(4)对由区域内的一个或多个基因编码的蛋白质的定向降解;(5)异染色质介导的沉默;(6)使Y染色体上的磷酸化形式的组蛋白变体γH2AX的水平增加;和(7)使区域内的一个或多个基因的转录降低。任选地,用靶向核酸酶使区域缺失或破坏。任选地,核酸酶是锌指核酸酶(ZFN)、转录活化子样效应物核酸酶(TALEN)、兆碱基大范围核酸酶或成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)相关(Cas)蛋白和引导RNA(gRNA)。

[0084] 在一些方法中,沉默发生在至少一个以下时间期间:(1)在将供体非人哺乳动物XY多能细胞引入宿主胚胎中之后;(2)在将包含供体非人哺乳动物XY多能细胞的宿主胚胎引入接受者雌性非人哺乳动物中之后;(3)在进行雄性性别决定程序时的胚胎发育期间;(4)在直至至少对应于小鼠中的E1 1-E12的发育阶段的胚胎发育期间;(5)在直至至少对应于小鼠中的E17-E1 9的发育阶段的胚胎发育期间;(6)在整个胚胎发育中;(7)在整个卵子发生的时期中;(8)在卵母细胞发育中的减数分裂前期期间;(9)在卵母细胞受精之后的前两次细胞分裂期间;和(10)在卵母细胞排卵后直至受精后前两次细胞分裂。在一些方法中,性别逆转能够被传递至F1子代中。

[0085] 在一些方法中,不在包含具有约200mOsm/kg至小于约329mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度的基础培养基的低克分子渗透压重量浓度培养基中培养非人哺乳动物XY多能细胞。其它方法进一步包括在包含基础培养基和适于维持所培养的非人哺乳动物XY多能细胞的补充物的培养基中培养非人哺乳动物XY多能细胞,其中所述培养基是包含具有约200mOsm/kg至小于约329mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度的基础培养基的低克分子渗透压重量浓度培养基。任选地,低克分子渗透压重量浓度培养基包含具有以下中的一者或多者的基础培养基:(1)约218mOsm/kg至约322 mOsm/Kg的克分子渗透压重量浓度;(2)218mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度;(3)约11mS/cm至约13mS/cm的电导率;(4)浓度是约50mM至约110mM的碱金属和卤离子的盐;(5)约50mM至约110mM的氯化钠浓度;(6)约17mM至约30mM的碳酸盐浓度;(7)约13mM至约25 mM的碳酸氢钠浓度;(8)约85mM至约130mM的总体碱金属卤化物盐和碳酸盐浓度;(9)87±5mM的氯化钠浓度和261±26mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度;(10)浓度是约50mM至约110mM的碱金属和卤离子的盐、浓度是约17mM至约30mM的碳酸盐、以及约200mOsm/kg至约3 29mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度;和(11)218mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度、50mM至110mM的氯化钠浓度、以及13mM至25m M的碳酸氢钠浓度。任选地,在引入宿主胚胎中之前,在低克分子渗透压重量浓度培养基中维持非人哺乳动物XY多能细胞至少1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、2周、3周或4周。

[0086] 在一些方法中,非人哺乳动物是啮齿动物、大鼠或小鼠。任选地,小鼠包括C57BL/6品系;小鼠包括129品系;小鼠不包括129品系;小鼠包括C57BL/6品系和129品系;非人哺乳动物是小鼠,其中Y染色体来自C 57BL/6品系;非人哺乳动物是小鼠,其中Y染色体来自129

品系；非人哺乳动物是小鼠，其中Y染色体不来自129品系；或非人哺乳动物是小鼠，并且多能细胞是VGF1小鼠ES细胞。

[0087] 在一些方法中，多能细胞在靶标基因组基因座中包含靶向遗传修饰。任选地，其中靶向遗传修饰包括插入、缺失、敲除、敲入、点突变或其组合。

[0088] 在一些方法中，区域包括Zfy2。任选地，非人哺乳动物是包括C57BL/ 6品系的小鼠，非人哺乳动物是不包括129品系的小鼠，非人哺乳动物是小鼠，其中Y染色体来自C57BL/ 6品系，或非人哺乳动物是小鼠，其中Y 染色体不来自129品系。任选地，所述方法进一步包括在包含基础培养基和适于维持所培养的非人哺乳动物XY多能细胞的补充物的培养基中培养非人哺乳动物XY多能细胞，其中所述培养基是包含具有约200m0sm/kg 至小于约329m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度的基础培养基的低克分子渗透压重量浓度培养基。

[0089] 在一些方法中，至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少 98%或至少99%的F0 XY子代是在达到性成熟后能生育的呈表型雌性的X Y非人哺乳动物。任选地，是能生育的呈表型雌性的XY非人哺乳动物的F 0 XY子代的百分比大于源于不包含Y染色体的包含Y染色体的在Sry基因外部的部分的区域的沉默的非人哺乳动物XY多能细胞的能生育的呈表型雌性的XY非人哺乳动物的百分比。

[0090] 在一些方法中，源于供体非人哺乳动物XY多能细胞的全部F0雌性都具有XY基因型。

[0091] 在一些方法中，至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少 98%或至少99%的源于供体非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性能生育。任选地，能生育的源于供体非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性的百分比大于源于不包含Y染色体的包含Y染色体的在Sry基因外部的部分的区域的沉默的非人哺乳动物XY多能细胞的能生育的F0 XY雌性的百分比。

[0092] 在一些方法中，至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的源于供体非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性能够产生具有至少2、3、4、5、6、7、8、9或10只幼仔的各窝。任选地，由源于供体非人哺乳动物X Y多能细胞的F0 XY雌性产生的平均同窝仔畜数大于由源于不包含Y染色体的包含Y染色体的在Sry基因外部的部分的区域的沉默的非人哺乳动物 XY多能细胞的F0 XY雌性产生的平均同窝仔畜数。

[0093] 在一些方法中，至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的源于供体非人哺乳动物XY多能细胞的F0雌性能够在它们的终生中产生至少2、3、4、5、6、7、8、9或10窝。任选地，由源于供体非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性产生的平均窝数大于由源于不包含Y染色体的包含Y 染色体的在Sry基因外部的部分的区域的沉默的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性产生的平均窝数。任选地，由源于供体非人哺乳动物XY 多能细胞的F0 XY雌性产生的平均终生后代数大于由源于不包含Y染色体的包含Y染色体的在Sry基因外部的部分的区域的沉默的非人哺乳动物X Y多能细胞的F0 XY雌性产生的平均终生后代数。

[0094] 本发明也提供用于在F0代中制备能生育的呈表型雌性的XY非人哺乳动物的方法，其包括：(a)通过对非人哺乳动物XY多能细胞进行修饰以使 Y染色体的区域沉默来产生供

体非人哺乳动物XY多能细胞,其中在低克分子渗透压重量浓度培养基中维持所述非人哺乳动物XY多能细胞,但通过除在所述低克分子渗透压重量浓度培养基中维持所述非人哺乳动物XY 多能细胞以外的手段或除在所述低克分子渗透压重量浓度培养基中维持所述非人哺乳动物XY多能细胞之外也共同采用的手段来实现所述沉默,其中所述低克分子渗透压重量浓度培养基包含基础培养基和适于维持所培养的所述非人哺乳动物XY多能细胞的补充物,其中所述基础培养基具有约2 00m0sm/kg至小于约329m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度;(b) 将所述供体非人哺乳动物XY多能细胞引入宿主胚胎中;(c) 将步骤(b) 的所述宿主胚胎引入接受者雌性非人哺乳动物中以及孕育所述宿主胚胎;和(d) 获得包括呈表型雌性的XY非人哺乳动物的F0 XY非人哺乳动物子代,其中在达到性成熟后,所述F0呈表型雌性的XY非人哺乳动物能生育。任选地,多能细胞是胚胎干(ES) 细胞。

[0095] 在一些方法中,区域包含Y染色体的短臂的全部或一部分;排除Rbm<sup>y</sup>簇、Zfy2和Sry中的一者或者;包含Y染色体的对应于小鼠Y染色体的Sxr<sup>a</sup>区和/或Sxr<sup>b</sup>区的区段的全部或一部分;包含Y染色体的对应于小鼠 Y染色体上的缺失间隔1、缺失间隔2和缺失间隔3中的一者或者者的区段的全部或一部分;包含Y染色体的在Kdm5d的端粒方向或在Usp9y的着丝粒方向的部分;或在Zfy2、Sry或Rbmy簇的端粒方向。

[0096] 在一些方法中,沉默使由位于区域中的基因编码的蛋白质的水平和/或活性降低。任选地,Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或者者的水平和/或活性被降低;Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或者者的水平和/或活性被消除; Sry和Zfy2中的一者或者者的水平和/或活性被降低;或Sry和Zfy2中的一者或者者的水平和/或活性被消除。在一些方法中,沉默是永久的。

[0097] 在一些方法中,通过以下中的一者或者者来实现沉默:(1) 靶向遗传修饰;(2) 对区域的缺失或破坏;(3) 对从区域内的一个或多个基因转录的mRNA的RNA干扰或反义抑制;(4) 对由区域内的一个或多个基因编码的蛋白质的定向降解;(5) 异染色质介导的沉默;(6) 使Y染色体上的磷酸化形式的组蛋白变体 γ H2AX的水平增加;和(7) 使区域内的一个或多个基因的转录降低。任选地,用靶向核酸酶使区域缺失或破坏。任选地,核酸酶是锌指核酸酶(ZFN)、转录活化子样效应物核酸酶(TALEN)、兆碱基大范围核酸酶或成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR) 相关(Cas) 蛋白和引导RNA(gRNA)。

[0098] 在一些方法中,沉默发生在至少一个以下时间期间:(1) 在将供体非人哺乳动物XY多能细胞引入宿主胚胎中之后;(2) 在将包含供体非人哺乳动物XY多能细胞的宿主胚胎引入接受者雌性非人哺乳动物中之后;(3) 在进行雄性性别决定程序时的胚胎发育期间;(4) 在直至至少对应于小鼠中的E1 1-E12的发育阶段的胚胎发育期间;(5) 在直至至少对应于小鼠中的E17-E1 9的发育阶段的胚胎发育期间;(6) 在整个胚胎发育中;(7) 在整个卵子发生的时期中;(8) 在卵母细胞发育中的减数分裂前期期间;(9) 在卵母细胞受精之后的前两次细胞分裂期间;和(10) 在卵母细胞排卵后直至受精后前两次细胞分裂。在一些方法中,性别逆转能够被传递至F1子代中。

[0099] 在一些方法中,低克分子渗透压重量浓度培养基包含具有以下中的一者或者者的基础培养基:(1) 约218m0sm/kg至约322m0sm/Kg的克分子渗透压重量浓度;(2) 218m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度;(3) 约11 mS/cm至约13mS/cm的电导率;(4) 浓度是约50mM至约110mM的碱金属和卤离子的盐;(5) 约50mM至约110mM的氯化钠浓度;(6) 约17 mM至约30mM的

碳酸盐浓度; (7) 约13mM至约25mM的碳酸氢钠浓度; (8) 约85mM至约130mM的总体碱金属卤化物盐和碳酸盐浓度; (9)  $87 \pm 5$ mM的氯化钠浓度和 $261 \pm 26$ mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度; (10) 浓度是约50mM至约110mM的碱金属和卤离子的盐、浓度是约17m M至约30mM的碳酸盐、以及约200mOsm/kg至约329mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度; 和 (11) 218mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度、50 mM至110mM的氯化钠浓度、以及13mM至25mM的碳酸氢钠浓度。任选地, 在引入宿主胚胎中之前, 在低克分子渗透压重量浓度培养基中维持非人哺乳动物XY多能细胞至少1天、2天、3天、4天、5天、6天、7 天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、2周、3周或4周。

[0100] 在一些方法中, 非人哺乳动物是啮齿动物、大鼠或小鼠。任选地, 小鼠包括C57BL/6品系; 小鼠包括129品系; 小鼠不包括129品系; 小鼠包括C57BL/6品系和129品系; 非人哺乳动物是小鼠, 其中Y染色体来自C 57BL/6品系; 非人哺乳动物是小鼠, 其中Y染色体来自129品系; 非人哺乳动物是小鼠, 其中Y染色体不来自129品系; 或非人哺乳动物是小鼠, 并且多能细胞是VGF1小鼠ES细胞。

[0101] 在一些方法中, 多能细胞在靶标基因组基因座中包含靶向遗传修饰。任选地, 其中靶向遗传修饰包括插入、缺失、敲除、敲入、点突变或其组合。

[0102] 在一些方法中, 区域包括Zfy2, 并且非人哺乳动物XY多能细胞进一步包含使Sry蛋白的水平和/或活性降低的修饰。

[0103] 在一些方法中, 至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少 98%或至少99%的F0 XY子代是在达到性成熟后能生育的呈表型雌性的X Y非人哺乳动物。任选地, 是能生育的呈表型雌性的XY非人哺乳动物的F 0 XY子代的百分比大于源于不包含Y染色体的区域的沉默的非人哺乳动物XY多能细胞的能生育的呈表型雌性的XY非人哺乳动物的百分比。

[0104] 在一些方法中, 源于供体非人哺乳动物XY多能细胞的全部F0雌性都具有XY基因型。

[0105] 在一些方法中, 至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少 98%或至少99%的源于供体非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性能生育。任选地, 能生育的源于供体非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性的百分比大于源于不包含Y染色体的区域的沉默的非人哺乳动物XY多能细胞的能生育的F0 XY雌性的百分比。

[0106] 在一些方法中, 至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的源于供体非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性能够产生具有至少2、3、4、5、6、7、8、9或10只幼仔的各窝。任选地, 由源于供体非人哺乳动物X Y多能细胞的F0 XY雌性产生的平均同窝仔畜数大于由源于不包含Y染色体的区域的沉默的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性产生的平均同窝仔畜数。

[0107] 在一些方法中, 至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的源于供体非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性能够在它们的终生中产生至少2、3、4、5、6、7、8、9或10窝。任选地, 由源于供体非人哺乳动物 XY多能细胞的F0 XY雌性产生的平均窝数大于由源于不包含Y染色体的区域的沉默的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性产生的平均窝数。任选地, 由源于供体非人哺

乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性产生的平均终生后代数大于由源于不包含Y染色体的区域的沉默的非人哺乳动物XY 多能细胞的F0 XY雌性产生的平均终生后代数。

[0108] 本发明也提供用于使非人哺乳动物XY多能细胞中的Y染色体的区域沉默的方法，其包括：(a) 在包含基础培养基和适于使所培养的非人哺乳动物XY多能细胞生长的补充物的培养基中在维持多能性下维持所述非人哺乳动物XY多能细胞，其中所述基础培养基具有约200m0sm/kg至小于约 329m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度；和 (b) 测定所述非人哺乳动物XY 多能细胞以鉴定Y染色体的所述区域的沉默。任选地，多能细胞是胚胎干(E S) 细胞。

[0109] 在一些方法中，低克分子渗透压重量浓度培养基包含具有以下中的一者或多者的基础培养基：(1) 约218m0sm/kg至约322m0sm/Kg的克分子渗透压重量浓度；(2) 218m0sm/kg 的克分子渗透压重量浓度；(3) 约11 mS/cm至约13mS/cm的电导率；(4) 浓度是约50mM至约110mM的碱金属和卤离子的盐；(5) 约50mM至约110mM的氯化钠浓度；(6) 约17 mM至约30mM的碳酸盐浓度；(7) 约13mM至约25mM的碳酸氢钠浓度；(8) 约85mM至约130mM的总体碱金属卤化物盐和碳酸盐浓度；(9) 87±5mM的氯化钠浓度和261±26m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度；(10) 浓度是约50mM至约110mM的碱金属和卤离子的盐、浓度是约17m M至约30mM的碳酸盐、以及约200m0sm/kg至约329m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度；和(11) 218m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度、50 mM至110mM的氯化钠浓度、以及13mM至25mM的碳酸氢钠浓度。任选地，在测定之前，在低克分子渗透压重量浓度培养基中维持非人哺乳动物XY多能细胞至少1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9 天、10天、11天、12天、13天、2周、3周或4周。

[0110] 在一些方法中，区域包含Y染色体的短臂的全部或一部分；排除Rbm y簇、Zfy2和Sry中的一者或者；包含Y染色体的对应于小鼠Y染色体的Sxr<sup>a</sup>区和/或Sxr<sup>b</sup>区的区段的全部或一部分；包含Y染色体的对应于小鼠 Y染色体上的缺失间隔1、缺失间隔2和缺失间隔3中的一者或者者的区段的全部或一部分；包含Y染色体的在Kdm5d的端粒方向或在Usp9y的着丝粒方向的部分；或在Zfy2、Sry或Rbmy簇的端粒方向。

[0111] 在一些方法中，沉默使由位于区域中的基因编码的蛋白质的水平和/或活性降低。任选地，Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或者者的水平和/或活性被降低；Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或者者的水平和/或活性被消除； Sry和Zfy2中的一者或者者的水平和/或活性被降低；或Sry和Zfy2中的一者或者者的水平和/或活性被消除。

[0112] 一些所述方法进一步包括：(b) 将所述非人哺乳动物XY多能细胞引入宿主胚胎中；和(c) 将来自步骤(b) 的所述宿主胚胎引入接受者雌性非人哺乳动物中以及孕育所述宿主胚胎。任选地，在引入宿主胚胎中之前，在培养基中维持非人哺乳动物XY多能细胞至少1天、2天、3天、4天、5天、6 天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、2周、3周或4周。

[0113] 本发明也提供用于制备供体非人哺乳动物XY多能细胞的方法，其包括：(a) 在包含基础培养基和适于维持所培养的非人哺乳动物XY多能细胞的补充物的低克分子渗透压重量浓度培养基中维持一个或多个非人哺乳动物XY多能细胞的群体，其中所述基础培养基具有约200m0sm/kg至小于约329m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度；(b) 测定所述一个或多个非人哺乳动物XY多能细胞的Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或者者的表达和/或活性；和(c) 选择具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或者者的降低表达和/ 或活性的供体非人哺乳动物XY多能细胞，其中所述供体非人哺乳动物X Y多能细胞能够在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY非人哺乳动物。任选地，在测定步骤(b) 之前，在低克分子渗透压重量浓度培养

基中维持非人哺乳动物XY多能细胞至少1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、2周、3周或4周。任选地，多能细胞是胚胎干(ES)细胞。

[0114] 在一些方法中，低克分子渗透压重量浓度培养基包含具有以下中的一者或多者的基础培养基：(1) 约218m0sm/kg至约322m0sm/Kg的克分子渗透压重量浓度；(2) 218m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度；(3) 约11 mS/cm至约13mS/cm的电导率；(4) 浓度是约50mM至约110mM的碱金属和卤离子的盐；(5) 约50mM至约110mM的氯化钠浓度；(6) 约17 mM至约30mM的碳酸盐浓度；(7) 约13mM至约25mM的碳酸氢钠浓度；(8) 约85mM至约130mM的总体碱金属卤化物盐和碳酸盐浓度；(9) 87±5mM的氯化钠浓度和261±26m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度；(10) 浓度是约50mM至约110mM的碱金属和卤离子的盐、浓度是约17m M至约30mM的碳酸盐、以及约200m0sm/kg至约329m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度；和(11) 218m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度、50 mM至110mM的氯化钠浓度、以及13mM至25mM的碳酸氢钠浓度。任选地，在测定之前，在低克分子渗透压重量浓度培养基中维持非人哺乳动物XY多能细胞至少1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9 天、10天、11天、12天、13天、2周、3周或4周。

[0115] 在一些方法中，供体非人哺乳动物XY多能细胞具有Ddx3y、Uty和E if2s3y的降低表达和/或活性。在一些方法中，供体非人哺乳动物XY多能细胞缺乏Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达和/或活性。在一些方法中，供体非人哺乳动物XY多能细胞缺乏Ddx3y、Uty和Eif2s3y的表达和/或活性。

[0116] 在一些方法中，非人哺乳动物是啮齿动物。任选地，啮齿动物是大鼠或小鼠。在一些方法中，啮齿动物是包括C57BL/6品系的小鼠。任选地，Y染色体来自C57BL/6品系。在一些方法中，啮齿动物是包括129品系的小鼠。任选地，Y染色体来自129品系。在一些方法中，小鼠不包括129 品系。在一些方法中，Y染色体不来自129品系。在一些方法中，啮齿动物是包括C57BL/6品系和129品系的小鼠。任选地，多能细胞是VGF1小鼠ES细胞。

[0117] 在一些方法中，多能细胞在靶标基因组基因座中包含靶向遗传修饰。任选地，其中靶向遗传修饰包括插入、缺失、敲除、敲入、点突变或其组合。

[0118] 本发明也提供产生胚胎的方法，其包括向宿主胚胎中引入通过用于制备供体非人哺乳动物XY多能细胞的以上方法来产生的具有Ddx3y、Uty和 Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体非人哺乳动物XY多能细胞，其中所述宿主胚胎能够在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY非人哺乳动物。

[0119] 本发明也提供用于在F0代中制备能生育的呈表型雌性的XY非人哺乳动物的方法，其包括：(a) 向宿主胚胎中引入通过用于制备供体非人哺乳动物XY多能细胞的以上方法来产生的具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体非人哺乳动物XY多能细胞；(b) 将来自步骤(a)的所述宿主胚胎引入接受者雌性非人哺乳动物中以及孕育所述宿主胚胎；和(c) 获得包括呈表型雌性的XY非人哺乳动物的F0 XY非人哺乳动物子代，其中在达到性成熟后，所述F0呈表型雌性的XY非人哺乳动物能生育。或者，提供用于在F0代中制备能生育的呈表型雌性的XY非人哺乳动物的方法，其包括：(a) 将胚胎引入接受者雌性非人哺乳动物中以及孕育所述胚胎，其中所述胚胎通过以上方法来产生，并且包含具有Ddx3y、Uty 和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的细胞；和(b) 获得包括呈表型雌性的XY非人哺乳动物的F0 XY非人哺乳动物子代，其中在达到性成熟后，所述F0呈表型雌性的XY非人哺乳动物能生育。任选地，宿主胚胎是前桑椹胚期胚胎。任选地，方法进一

步包括将宿主胚胎培养至胚泡期。

[0120] 在一些方法中,在引入宿主胚胎中之前,在低克分子渗透压重量浓度培养基中维持非人哺乳动物XY多能细胞至少1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、2周、3周或4周。

[0121] 在一些方法中,至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的F0 XY子代是在达到性成熟后能生育的呈表型雌性的XY非人哺乳动物。在一些方法中,当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY子代时,对于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY子代,是能生育的呈表型雌性的XY动物的 F0 XY子代的百分比更高。

[0122] 在一些方法中,源于供体非人哺乳动物XY多能细胞的全部F0雌性都具有XY基因型。

[0123] 在一些方法中,至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的源于供体非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性能生育。在一些方法中,当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY子代时,对于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY子代,能生育的F0 XY雌性的百分比更高。

[0124] 在一些方法中,至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的源于供体非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性能够产生具有至少2、3、4、5、6、7、8、9或10只幼仔的各窝。在一些方法中,当相较于源于具有D dx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性时,对于源于具有Dd x3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的非人哺乳动物X Y多能细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性,由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均同窝仔畜数更高。

[0125] 在一些方法中,至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的源于供体非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性能够在它们的终生中产生至少2、3、4、5、6、7、8、9或10窝。在一些方法中,当相较于源于具有 Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性时,对于源于具有 Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性,由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均终生窝数更高。在一些方法中,当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性时,对于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的非人哺乳动物XY多能细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性,由F0 X Y雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均终生后代数更高。

[0126] 本发明也提供试剂盒,其包括:(a)用于检测非人哺乳动物XY多能细胞中的Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达和/或活性水平的检测试剂;和(b)用于使用所述检测试剂以及使检测与所述非人哺乳动物XY多能细胞在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY

非人哺乳动物的预测倾向相关联的说明书。

## 附图说明

[0127] 图1A提供包括缺失间隔1-7、Sxr<sup>a</sup>区和Sxr<sup>b</sup>区以及被定位以达成Sxr<sup>b</sup>缺失的基因的小鼠Y染色体的示意图。

[0128] 图1B提供小鼠Y染色体的短臂 (Yp) 的示意图。

[0129] 图2显示从源于1823CE6和1823CF11克隆的胚胎解剖的生殖嵴中的Sry水平。分析的胚胎的发育阶段在13至25个尾部体节 (ts) 的范围内。在20ts时的CD1XY胚胎用作阳性对照，并且在20ts时的CD1XX胚胎用作阴性对照。x轴显示ts阶段，并且y轴显示通过对mRNA的TAQMAN®逆转录联用定量聚合酶链式反应 (RT-qPCR) 测量的Sry表达，其相对于Sf1 参照基因的表达加以归一化。当Hprt用作归一化参照基因时，获得相同结果。相对于一个1823CF11ts 14样品绘制归一化表达值，所述样品的值被任意设置为1。

[0130] 图3显示关于图2中的Sry表达显示的相同生殖嵴样品中的相对Ddx3y表达水平，其以相同方式归一化和绘制。

[0131] 图4显示关于图2中的Sry表达显示的相同生殖嵴样品中的相对Eif2s3y表达水平，其以相同方式归一化和绘制。

[0132] 图5A-5D显示关于图2中的Sry表达显示的相同生殖嵴样品中的雄性性别决定基因Sox9 (图5A)、Fgf9 (图5B)、mDhh (图5C) 和Amh (图5D) 的相对表达水平，其以相同方式归一化和绘制。

[0133] 图6A和6B显示关于图2中的Sry表达显示的相同生殖嵴样品中的雌性性别决定基因Foxl2 (图6A) 和Rspo1 (图6B) 的相对表达水平，其以相同方式归一化和绘制。

[0134] 图7显示从源于在KO-DMEM中培养的2个性别逆转XY ES细胞克隆的胚胎解剖的生殖嵴中的Sry的相对表达水平。分析的胚胎的发育阶段在11至34个尾部体节 (ts) 的范围内。使用三个对照：通过交配产生的XY 小鼠胚胎；来自非靶向ES细胞的XY小鼠胚胎；和来自未在KO-DMEM 中进行性别逆转的株系的XY小鼠胚胎。x轴显示ts阶段，并且y轴显示通过对mRNA的TAQMAN®逆转录联用定量聚合酶链式反应 (RT-qPCR) 测量的Sry表达，其相对于Sf1参照基因的表达加以归一化。

[0135] 图8A-C显示从源于在KO-DMEM中培养的2个性别逆转XY ES细胞克隆的胚胎解剖的生殖嵴中的Eif2s3y (图8A)、Uty (图8B) 和Ddx3y (图8 C) 的相对表达水平。分析的胚胎的发育阶段在16至22个尾部体节 (ts) 的范围内。使用三个对照：通过交配产生的XY小鼠胚胎；来自非靶向ES细胞的XY小鼠胚胎；和来自未在KO-DMEM中进行性别逆转的株系的XY小鼠胚胎。x轴显示ts阶段，并且y轴显示通过对mRNA的TAQMAN®逆转录联用定量聚合酶链式反应 (RT-qPCR) 测量的表达，其相对于Sf1参照基因的表达加以归一化。

[0136] 图9显示从源于在KO-DMEM中培养的2个性别逆转XY ES细胞克隆的胚胎解剖的生殖嵴中的Sry、Eif2s3y、Uty和Ddx3y的相对表达。历经在17至20个尾部体节 (ts) 的范围内的胚胎发育阶段对归一化表达水平进行平均化。使用三个对照：通过交配产生的XY小鼠胚胎；来自非靶向ES细胞的XY小鼠胚胎；和来自未进行性别逆转的株系的XY小鼠胚胎。x轴显示ts

阶段，并且y轴显示通过对mRNA的TAQMAN<sup>®</sup>逆转录联用定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)测量的表达，其相对于Sf1参照基因的表达加以归一化。

[0137] 图10A-D显示在出生之后一周，在源于在K0-DMEM中培养的性别逆转XY ES细胞克隆的小鼠中的各种组织中的Ddx3y(图10A)、Uty(图10B)、Eif2s3y(图10C)和Kdm5d(图10D)的相对表达水平。使用两个对照：来自非靶向ES细胞的XY小鼠胚胎；和来自未在K0-DMEM中进行性别逆转的株系的XY小鼠胚胎。x轴显示组织类型，并且y轴显示通过对mRNA的TAQMAN<sup>®</sup>逆转录联用定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)测量的表达，其相对于Gapdh参照基因的表达加以归一化。

[0138] 图11A-B显示在性别决定阶段期间，在雄性生殖腺发育的最早阶段期间开启的基因的相对表达水平。图11A显示从源于在K0-DMEM中培养的2个性别逆转XY ES细胞克隆的胚胎解剖的生殖嵴中的Sox9的相对表达水平，并且图11B显示从源于在K0-DMEM中培养的2个性别逆转XY ES细胞克隆的胚胎解剖的生殖嵴中的Fgf9的相对表达水平。分析的胚胎的发育阶段在12至25个尾部体节(ts)的范围内。使用四个对照：通过交配产生的XY小鼠胚胎；通过交配产生的XX小鼠胚胎；来自非靶向ES细胞的XY小鼠胚胎；和来自未在K0-DMEM中进行性别逆转的株系的XY小鼠胚胎。x轴显示ts阶段，并且y轴显示通过对mRNA的TAQMAN<sup>®</sup>逆转录联用定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)测量的Sox9表达，其相对于Sf1参照基因的表达加以归一化。

[0139] 图12A-B显示在性别决定阶段期间，雄性生殖腺发育标志物的相对表达水平。图11A显示从源于在K0-DMEM中培养的2个性别逆转XY ES细胞克隆的胚胎解剖的生殖嵴中的Dhh的相对表达水平，并且图11B显示从源于在K0-DMEM中培养的2个性别逆转XY ES细胞克隆的胚胎解剖的生殖嵴中的Amh的相对表达水平。分析的胚胎的发育阶段在12至25个尾部体节(ts)的范围内。使用四个对照：通过交配产生的XY小鼠胚胎；通过交配产生的XX小鼠胚胎；来自非靶向ES细胞的XY小鼠胚胎；和来自未在K0-DMEM中进行性别逆转的株系的XY小鼠胚胎。x轴显示ts阶段，并且y轴显示通过对mRNA的TAQMAN<sup>®</sup>逆转录联用定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)测量的Sox9表达，其相对于Sf1参照基因的表达加以归一化。

[0140] 图13显示在性别决定阶段期间，雌性生殖腺发育标志物的相对表达水平。图13显示从源于在K0-DMEM中培养的2个性别逆转XY ES细胞克隆的胚胎解剖的生殖嵴中的Fox12的相对表达水平。分析的胚胎的发育阶段在12至25个尾部体节(ts)的范围内。使用两个对照：通过交配产生的XY小鼠胚胎；和通过交配产生的XX小鼠胚胎。x轴显示ts阶段，并且y轴显示通过对mRNA的TAQMAN<sup>®</sup>逆转录联用定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)测量的Sox9表达，其相对于Sf1参照基因的表达加以归一化。

[0141] 图14A-E显示根据RT-PCR，来自产生XY雄性小鼠与XY雌性小鼠两者的3个亲本F1H4XY胚胎干细胞克隆(亲本克隆979AC7(图14A)、40 48BC4(图14B)和15069CD1(图14C))以及来自仅产生雄性小鼠的2个亲本F1H4XY胚胎干细胞克隆(985AA8(图14D)和1823C11(图14E))的胚胎干细胞亚克隆中的Eif2s3y、Uty和Ddx3y的相对表达水平。表达相对于B2m。Drosha用作对照。

[0142] 图15显示小鼠中性别决定信号传导途径的概要。在小鼠胚胎发生期间，截至性交

后10.5天(dpc),双潜能生殖腺由生殖嵴产生。在XY生殖嵴的体细胞中,Sry(染色体Y上的性别决定区)表达起始于10.5dpc,在11.5dpc达到峰值,并且截至12.5dpc衰退。Sox9(含有SRY框的基因9)表达在少许几小时后被上调以诱导塞尔托利细胞(Sertoli cell)的分化。Sox9表达在11.5-12.5dpc达到峰值,出生后继续表达并由若干正反馈环(包括FGF9(纤维母细胞生长因子9))支撑,并且SOX9随后使包括Amh(抗穆勒氏管激素(anti-Müllerian hormone))的许多雄性特异性基因活化。在12.5dpc,睾丸索已形成,并且睾丸与卵巢之间的形态差异是明显的。在不存在SRY下,诸如Wnt4(无翅型MMTV整合位点家族,成员4)、Rspo1(R-底板反应蛋白1(R-spondin 1))和Fox12(叉头框L2)的基因以雌性特异性方式表达,并且诱导卵巢发育,如通过卵泡抑素(follistatin)和许多其它卵巢特异性基因的表达所表征。

## 具体实施方式

[0143] 在本文中可互换使用的术语“蛋白质”、“多肽”和“肽”包括任何长度的聚合氨基酸形式,包括编码和非编码氨基酸以及化学或生物化学修饰或衍生的氨基酸。所述术语也包括已被修饰的聚合物,诸如具有经修饰肽骨架的多肽。

[0144] 在本文中可互换使用的术语“核酸”和“多核苷酸”包括任何长度的聚合核苷酸形式,包括核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸或其类似物或经修饰形式。它们包括单链、双链和多链DNA或RNA、基因组DNA、cDNA、DNA-RNA杂合物、以及包含嘌呤碱基、嘧啶碱基或其它天然核苷酸碱基、化学修饰的核苷酸碱基、生物化学修饰的核苷酸碱基、非天然核苷酸碱基或衍生的核苷酸碱基的聚合物。

[0145] 术语“基因”是指染色体中的DNA序列,其编码产物(例如RNA产物和/或多肽产物),并且包括被非编码内含子中断的编码区和在5'末端与3'末端两者上邻近于编码区定位的序列,以致基因对应于全长mRNA(包括5'非翻译序列和3'非翻译序列)。术语“基因”也包括其它非编码序列,包括调控序列(例如启动子、增强子和转录因子结合位点)、多聚腺苷酸化信号、内部核糖体进入位点、沉默子、绝缘序列和基质附着区。这些序列可接近于基因的编码区(例如在10kb内),或在远端位点处,并且它们影响基因的转录和翻译的水平或速率。

[0146] 术语“野生型”包括具有如在正常(和突变、患病、改变等相反)状态或情形下所见的结构和/或活性的实体。野生型基因和多肽常常以多种不同形式(例如等位基因)存在。

[0147] “生育性”和“能生育”是指雌性动物交配、怀孕和分娩活产后代的能力。动物仅需要产生一个活产后代以被视为能生育。

[0148] “生殖力”和“生殖力旺盛”是指具有生育性的品质。生殖力可为定量量度,诸如在动物的终生中或在确定的实验时间范围内出生的活体后代的总数。窝数和窝频以及每窝后代的数目也是生殖力的量度。动物可为能生育的,但非生殖力极其旺盛(例如仅有小型的一窝或少许几窝)。

[0149] “包含”或“包括”一个或多个叙述的要素的组合物或方法可包括未明确叙述的其它要素。举例来说,“包含”或“包括”蛋白质的组合物可含有单独或与其它成分组合的所述蛋白质。

[0150] 对值的范围的指定包括所述范围内或界定所述范围的所有整数,以及由所述范围内的整数界定的所有子范围。

[0151] 除非另外根据上下文显而易知,否则术语“约”涵盖在陈述值的标准测量误差界限(例如SEM)内的值。

[0152] 除非上下文另外明确规定,否则单数形式的冠词“一(a/an)”和“这(the)”包括复数个(种)指示物。举例来说,术语“一种Cas蛋白”或“至少一个种Cas蛋白”可包括复数个Cas蛋白,包括其混合物。

[0153] 统计显著意指 $p \leq 0.05$ 。

#### [0154] 1. 概要

[0155] 提供用于产生F0能生育的XY雌性动物的方法和组合物。方法和组合物涉及制备能够在F0代中产生能生育的雌性XY动物的XY多能或全能动物细胞、体外细胞培养物或的胚胎。所述细胞(和源于它们的胚胎以及动物)可通过在雌性化培养基中培养XY多能或全能细胞,以及评估Ddx3y、Uty 和Eif2s3y中的一者或多者的表达和/或活性来制备。动物XY多能或全能细胞克隆在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY动物的倾向与那些克隆中的Ddx3y、Uty和Eif2s3y的表达或活性逆相关。或者,所述细胞(和源于它们的胚胎以及动物)可通过使Y染色体的区域沉默来制备。任选地,细胞也可在雌性化培养基中加以培养,和/或可被修饰以使Sry蛋白的水平和/或活性降低。也提供用于通过在雌性化培养基诸如低克分子渗透压重量浓度培养基中维持XY多能或全能动物细胞来使XY多能或全能动物细胞(或源于其的体外细胞培养物、胚胎或动物)中的Y染色体的区域沉默的方法和组合物。也提供用于在雌性化培养基中维持XY多能或全能动物细胞的群体,以及选择在F0代中产生能生育的雌性XY动物的能力增加的细胞或克隆的方法和组合物。也提供通过评估Ddx3y、Uty 和Eif2s3y中的一者或多者的表达和/或活性来用于筛选具有雌性化活性的化合物或用于使雌性化培养基中的组分的浓度优化的方法和组合物,所述Ddx3y、Uty 和Eif2s3y在XY多能或全能细胞中的表达和/或活性与动物XY多能或全能细胞克隆在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY动物的倾向逆相关。

[0156] 用于制备非人哺乳动物(例如小鼠)的大多数ES细胞系具有雄性XY基因型。由于Y染色体在哺乳动物性别决定中处于显性,所以当将XY ES 细胞引入宿主胚胎中并孕育时,造成第一代(F0)的动物几乎始终是在表型上是雄性的动物,其是含有源于雄性供体ES细胞(XY)的细胞和源于可为雄性(XY)或雌性(XX)的宿主胚胎的细胞的嵌合体。就在F0代中观察的表型雌性而言,这些雌性通常由将XY ES细胞引入雌性XX胚胎中引起,所述引入产生其ES细胞贡献不足以使胚胎生殖嵴雄性化的嵌合体。在大多数情况下,所述雌性嵌合体不产生源于XY ES细胞的卵母细胞,并且因此,不能够将ES细胞基因组传递至下一代中。

[0157] 使用VELOCIMOUSE®方法(参见例如美国专利号7,659,442;7,576,259;和7,294,754;以及Poueymirou等(2007) Nat. Biotech. 25 (1) :91-99;其各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文),有可能获得完全源于供体 ES细胞的F0代小鼠。在正常情况和标准实验条件下,XY供体ES细胞仅产生在表型上是雄性的完全ES细胞源性小鼠,而是XX或XO(已丧失Y 染色体的XY ES细胞)的ES细胞仅产生呈表型雌性的完全ES细胞源性小鼠。为从雄性和雌性完全ES细胞源性小鼠产生具有纯合性靶向突变的小鼠,需要进行后续两代交配以首先产生F1代杂合性雄性和雌性,其在互交时具有在F2代中产生纯合性子代的潜力。

[0158] 具有XY基因型的呈表型雌性的小鼠可由于特定突变而引起。参见例如Love11-Badge等(1990) Development 109:635-646;也参见Colvin等(2001) Cell 104 (6) :875-

889。然而,所述XY雌性小鼠常常无生殖力,或具有极其有限的生育性。

[0159] WO 2011/156723(出于所有目的以引用的方式整体并入本文)提供采用雌性化培养基(例如如本文其它地方公开的低克分子渗透压重量浓度培养基或低盐培养基)来维持所培养的XY供体细胞,以致在将所述XY供体细胞引入宿主胚胎中以及在适合宿主中孕育之后,可在F0群体中产生能生育的XY雌性动物的方法和组合物。所述组合物适用于制备就在靶标基因组基因座处的给定靶向遗传修饰而言是纯合的F1子代。

[0160] 本申请提供用于从XY供体细胞(例如源于在表型上是雄性的鼠的X Y供体细胞)和适合宿主胚胎制备呈表型雌性的能生育的XY非人哺乳动物(例如小鼠)的方法。方法包括在F0代中制备这种非人哺乳动物,此允许在 F0代中形成交配对(雄性F0和雌性F0)。当供体细胞包含杂合性遗传修饰,并且需要就所述遗传修饰而言是纯合的非人哺乳动物时,这是特别适用的。尽管本公开在从供体小鼠XY ES细胞制备呈表型雌性的能生育的XY小鼠的情形下说明本发明,但本文所述的方法和组合物可应用于从任何适合非人哺乳动物细胞(例如诱导多能干(iPS)细胞、ES细胞或多能细胞)和任何适合非人哺乳动物胚胎制备呈表型雌性的XY能生育的非人哺乳动物。

[0161] 本申请提供采用具有使Y染色体的区域沉默的修饰的XY供体细胞来促进产生在解剖学上正常的能生育的以及生殖力旺盛的XY F0雌性的方法和组合物。所述方法和组合物允许在F0代中制备能生育的雌性XY非人动物。方法和组合物可进一步与以组合方式达成的使Sry蛋白的水平和/或活性降低的修饰和/或在本文其它地方公开的雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)中培养组合用于显著增加F0代中的能生育的雌性XY 子代的百分比。这些呈表型雌性的能生育的XY非人哺乳动物包括展现足够的呈表型雌性的特征以进行排卵以及在由排卵产生的卵子的受精后在动物中孕育胚胎(包括孕育胚胎直至足月并生下活产动物)的非人哺乳动物。

[0162] 用于进行高效雄性向雌性别转变的方法对家养动物行业具有价值。举例来说,相比于雄性,雌性小牛对奶牛行业更加具有价值。对于家禽,同样如此。出于交配目的,无论是牛或肉猪或绵羊,优选的是使许多雌性与仅少许公牛、公猪或公绵羊交配。因此,本文提供的各种方法适用于各种在商业上重要的交配行业中。

[0163] 2. 用于在F0代中制备能生育的XY动物的方法和组合物

[0164] 2.1. 制备能够在F0代中产生能生育的XY雌性的XY多能或全能细胞的方法

[0165] 具有XY基因型的呈表型雌性的动物(例如小鼠)可由于特定突变而产生。参见例如 Lovell-Badge等(1990) Development 109:635-646;也参见 Colvin等(2001) Cell 104 (6) : 875-889。然而,所述XY雌性动物常常无生殖力,或如果能生育,那么具有极其不良生殖力。为了在产生就在靶标基因组基因座处的靶向遗传修饰而言是纯合的动物的情形下最适用,需要在X Y雌性中实现性别逆转与生育性两者。通过本文提供的方法和组合物,可制备能够在F0代中产生能生育的XY雌性的XY多能或全能动物细胞或胚胎。所述细胞(和体外细胞培养物、胚胎以及源于它们的动物)可通过使Y 染色体的区域沉默来制备。任选地,细胞也可在雌性化培养基中加以培养,和/或可被修饰以使Sry蛋白的水平和/或活性降低。

[0166] 2.1.1. Y染色体的区域的沉默

[0167] 提供用于对XY动物细胞(例如XY多能或全能细胞诸如XY ES细胞) 进行修饰以使Y 染色体的区域沉默,由此使一些细胞转变成具有发育成能生育的雌性动物的潜力的供体XY

多能或全能细胞,以致细胞可被植入接受者胚胎中并产生能生育的雌性子代的方法和组合物。因此,供体XY多能或全能细胞能够产生包含能生育的呈表型雌性的动物的F0 XY子代。

[0168] 沉默的区域可为Y染色体的任何部分,诸如包含Y染色体的短臂的全部或一部分的区域或通过用如本文其它地方公开的雌性化培养基处理来沉默的区域。沉默也可影响Y染色体的其它部分(例如长臂(Yq)),特别是携带为雄性生育性和精子发生所需的基因的部分。举例来说,区域可包含Sxr<sup>a</sup>区的全部或一部分(例如含有Sry基因的部分),和/或区域可包含小鼠Y染色体的Sxr<sup>b</sup>区的全部或一部分(例如含有Zfy2基因的部分)(参见图1A),或来自其它物种的Y染色体的相应区域(例如人Y染色体的AZFa、AZFb或AZFc区域)的全部或一部分。举例来说,区域可包含Sxr<sup>a</sup>区与Sxr<sup>b</sup>区两者的各部分或全部。Sxr<sup>b</sup>区的边界例如是Zfy1和Zfy2(参见图1A和Maze yrat等(1998)Human Molecular Genetics 7(11):1713-1724,其出于所有目的以引用的方式整体并入本文)。来自其它动物物种的相应区域包括具有一个或多个与小鼠Y染色体上的区域中的基因直系同源或同源的基因的区域。举例来说,人区域的AZFa区与小鼠Y染色体的Sxr<sup>b</sup>区对应,因为各区域含有Uty、Dby(Ddx3y)和Dffry(Usp9y)。参见例如Affara(2001)Expert Rev.Mol.Med.,1月3日;2001:1-16;Mazeyrat等(1998)Human Molecular Genetics 7(11);1713-1724;以及Sargent等(1999)J.Med.Genet. 36:370-377,其各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文。区域也可包含Smy区或Spy区的全部或一部分(参见图1A和Affara(2001)Expert Rev.Mol.Med.,1月3日;2001:1-16)。同样,区域可包含小鼠Y染色体的缺失间隔1、缺失间隔2、缺失间隔3、缺失间隔4、缺失间隔5、缺失间隔6和缺失间隔7或来自其它动物物种的Y染色体的相应区域中的一者或多者的全部或一部分(参见例如图1A和Affara(2001)Expert Rev.Mol.Med.,1月3日;2001:1-16)。举例来说,区域可包含小鼠Y染色体的缺失间隔1、缺失间隔2和缺失间隔3或来自其它动物物种的Y染色体的相应区域中的一者或多者的全部或一部分(参见例如图1A)。在一个实施例中,区域可包含缺失间隔2和缺失间隔3,或缺失间隔2的一部分和缺失间隔3的一部分。

[0169] 区域可包括以下中的一者或多者:Rbmy簇、H2a12y、Sry、Zfy2、Usp 9y、Ddx3y、Uty、Tspy-ps、Eif2s3y、Kdm5d、Uba1y或Zfy1(参见表A)。区域可在Rbmy簇的端粒方向,或可在H2a12y、Sry、Zfy2、Usp9y、Ddx3y、Uty、Tspy-ps、Eif2s3y、Kdm5d、Uba1y或Zfy1的着丝粒方向或端粒方向。举例来说,区域可包含Y染色体的在Kdm5d的端粒方向或在Usp9y 的着丝粒方向的部分,或区域可在Zfy2、Sry或Rbmy簇的端粒方向。区域可排除Rbmy簇、H2a12y、Sry、Zfy2、Usp9y、Ddx3y、Uty、Tspy-ps、Eif2 s3y、Kdm5d、Uba1y或Zfy1中的一者或多者。举例来说,区域可排除Rb my簇、Zfy2和Sry中的一者或多者。同样,区域可包括Y染色体的在Rb my簇、H2a12y、Sry、Zfy2、Usp9y、Ddx3y、Uty、Tspy-ps、Eif2s3y、Kdm5 d、Uba1y或Zfy1中的一者或多者的外部的部分。举例来说,区域可包含Y 染色体的在Rbmy簇、Zfy2和Sry中的一者或多者的外部的部分。

[0170] 表A. 小鼠染色体臂Yp上的基因

符号	名称	MGI ID	ENTREZ ID
<i>Rbmy</i>	RNA 结合基序蛋白, Y 染色体	104732	19657
<i>Gm16501</i> ( <i>H2al2y</i> )	预测基因 16501	3710623	100042840
<i>Sry</i>	染色体 Y 的性别决定区域	98660	21674
<i>Zfy2</i>	Y 染色体关联的锌指蛋白 2	99213	22768
<i>Usp9y</i>	泛素特异性肽酶 9, Y 染色体	1313274	107868
<i>Ddx3y</i>	Y 染色体关联的 DEAD 框多肽 3	1349406	26900
[0171] <i>Uty</i>	遍在转录的三十四肽重复基因, Y 染色体	894810	22290
<i>Tspy-ps</i>	睾丸特异性蛋白-Y 染色体编码, 假基因	1201688	22109
<i>Eif2s3y</i>	Y 染色体关联的真核翻译起始 因子 2, 亚单位 3, 结构基因	1349430	26908
<i>Kdm5d</i>	赖氨酸特异性脱甲基酶 5D	99780	20592
<i>Uba1y</i>	泛素活化酶, 染色体 Y	98891	22202
<i>Zfy1</i>	Y 染色体关联的锌指蛋白 1	99212	22767

[0172] 沉默可使由位于Y染色体上的基因编码的蛋白质的水平和/或活性降低。举例来说, 可使由Rbmy簇、H2al2y、Sry、Zfy2、Usp9y、Ddx3y、Uty、Tspy-ps、Eif2s3y、Kdm5d、Uba1y或Zfy1编码的蛋白质中的一者或多者的水平和/或活性降低。或者, 沉默可导致对位于Y染色体上的基因的表达的消除(即所述基因不表达或细胞缺乏所述基因的可检测表达)。在一些方法中, 举例来说, 在沉默后, Rbmy簇、H2al2y、Sry、Zfy2、Usp9y、Ddx3y、Uty、Tspy-ps、Eif2s3y、Kdm5d、Uba1y或Zfy1中的一者或多者不表达。在一些方法中, 由Ddx3y、Eif2s3y、Uty、Zfy2和Sry编码的蛋白质中的一者或多者的水平和/或活性被降低, 或Ddx3y、Eif2s3y、Uty、Zfy2和Sry中的一者或多者不表达。

[0173] 使区域沉默可包括例如从基因组移除所述区域, 使所述区域内的一个或多个基因的表达降低, 或使由所述区域内的基因编码的一种或多种蛋白质或RNA的活性降低。主题细胞中的表达或活性降低可包括当相较于适当对照细胞时, 表达或活性水平的任何统计显著降低。一般来说, 如果表达或活性在统计上低于尚未被修饰以使Y染色体的区域沉默的适当对照细胞中的表达或活性, 那么表达或活性被降低。这种降低包括相对于尚未被修饰以使Y染色体的区域沉默的对照细胞, 降低至少1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或更大。统计显著性意指 $p \leq 0.05$ 。表达或活性降低可在任何阶段通过任何机理来发生。举例来说, 表达降低可通过直接或间接对区域进行的修饰或通过在转录期间、转录后、翻译期间、或翻译后发生的事件或调控来发生。

[0174] 在一些情况下, 沉默的区域内的基因不表达(例如表达被消除或细胞缺乏基因的可检测表达)。通过本领域中已知的常见技术, 当不进行基因的转录时或当不存在基因的产

物(例如mRNA或蛋白质)的可检测水平时,基因不表达。多肽的表达水平可例如通过测定细胞或生物体中所述多肽的水平来直接测量(例如蛋白质印迹分析、FACS分析、ELISA),或例如通过测量所述多肽的活性来间接测量。在其它情况下,可使用包括例如DNA印迹分析、DNA测序、PCR分析、RNA印迹分析、定量RT-PCR分析、下一代测序(NGS)、微阵列分析或表型分析的方法来测量基因的降低表达和/或活性。

[0175] “主题细胞”是其中已实现遗传改变诸如本文公开的遗传修饰的细胞,或是从如此改变的细胞起源,并且包含所述改变的细胞。“对照”或“对照细胞”提供用于测量主题细胞的表型变化的参照点。对照细胞可尽可能与蛋白质的水平和/或活性降低的细胞密切匹配,例外之处是它缺乏导致水平或活性降低的遗传修饰或突变(例如相应细胞可源于相同细胞系)。在其它情况下,对照细胞可包括例如:(a)野生型细胞(即与用于达成导致主题细胞的遗传改变的起始材料具有相同基因型);(b)与起始材料具有相同基因型,但已用无效构建体(即用对目标性状不具有已知作用的构建体,诸如包含标记基因的构建体)遗传修饰的细胞;(c)是主题细胞的非遗传修饰子代的细胞(即对照细胞和主题细胞源于相同细胞系);(d)与主题细胞在遗传上相同,但未暴露于将改变蛋白质水平和/或活性水平的条件或刺激的细胞;或(e)在遗传修饰不导致表达的蛋白质水平和/或活性水平的改变所处的条件下的主题细胞自身。

[0176] 沉默可为永久遗传变化,或可为短暂的。永久遗传变化可为例如在无被采用来使变化逆转的额外步骤(例如通过额外修饰)下保持的变化,而短暂变化可为即使不采用额外步骤来使变化逆转,也仅持续某一时间量的变化(例如通过在雌性化培养基中培养来实现的沉默)。在一些方法中,通过除在本文其它地方公开的雌性化培养基(例如包含具有约200m0sm/kg至小于约329m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度的基础培养基的低克分子渗透压重量浓度培养基)中维持XY多能或全能细胞以外的手段来实现沉默。在其它方法中,通过在本文其它地方公开的雌性化培养基(例如具有约200m0sm/kg至小于约329m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度的低克分子渗透压重量浓度培养基或包含具有约200m0sm/kg至小于约329m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度的基础培养基的低克分子渗透压重量浓度培养基)中培养XY多能或全能细胞来实现沉默。举例来说,沉默可通过以下中的一者或者来实现:(1)靶向遗传修饰,诸如对区域的缺失或破坏;(2)对从区域内的一个或多个基因转录的mRNA的RNA干扰或反义抑制;(3)对由区域内的一个或多个基因编码的蛋白质的定向降解或抑制;(4)异染色质介导的沉默或改变Y染色体上的一个或多个位置中的异染色质形成;(5)使Y染色体上的磷酸化形式的组蛋白变体 $\gamma$ H2AX的水平增加;或(6)使区域内的一个或多个基因的转录降低。靶向遗传修饰和产生它们的方法在本文其它地方公开。沉默也可使用对基因转录物具有特异性的抑制性核酸诸如短干扰核酸(例如短干扰RNA(siRNA)、双链RNA(dsRNA)、微小RNA(miRNA)和短发夹RNA(shRNA))或反义寡核苷酸实现。沉默也可通过使用由区域内的一个或多个基因编码的蛋白质的抑制剂,或通过例如磷酸化、泛素化和苏素化进行的翻译后修饰对它们进行上游调控来实现。改变Y染色体上的异染色质形成也可导致沉默。举例来说,Y染色体的第一区域的缺失可致使第二区域更接近于着丝粒的异染色质结构域,并且导致所述第二区域的沉默。Y染色体上的磷酸化形式的组蛋白变体 $\gamma$ H2AX的水平增加也可导致Y染色体的区域的沉默。已知磷酸化组蛋白 $\gamma$ H2AX与转录阻遏相关联,并且与在减数分裂前期期间XY性体中的X染色体和Y染色体的转录阻遏相关联。参见例如Alton等

(2008) Reproduction 135:241-252。区域内的一个或多个基因的转录降低也可导致Y染色体的区域的沉默。阻遏一个或多个基因的转录可例如使用融合于转录阻遏结构域或表观遗传修饰结构域的DNA结合蛋白来实现(参见例如WO 2014/089290,其出于所有目的以引用的方式整体并入本文)。

[0177] 蛋白质的水平和/或活性降低可通过对编码所述蛋白质的基因或对影响或调控所述蛋白质的水平或活性的基因组基因座的靶向遗传修饰来实现。所述靶向修饰可包括例如添加一个或多个核苷酸,缺失一个或多个核苷酸,取代一个或多个核苷酸,敲除目标多核苷酸或其一部分,敲入目标多核苷酸或其一部分,用异源性核酸序列替换内源性核酸序列,或其组合。举例来说,可使至少1、2、3、4、5、7、8、9、10种或更多个核苷酸变化以形成靶向基因组修饰。各种方法可用于产生靶向遗传修饰。参见例如Wang等(2013)Cell 153:910-918; Mandalos等(2012)PLOS ONE 7:e45768: 1-9;以及Wang等(2013)Nat Biotechnol.31:530-532,其各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文。此外,本文所述的各种方法可用于将靶向遗传修饰引入编码蛋白质的基因或其它基因组基因座中。

[0178] 用于产生使蛋白质的水平和/或活性降低的靶向遗传修饰的各种方法可被使用,并且在本文其它地方公开。

[0179] 对编码蛋白质的基因或对任何其它靶标基因组基因座的靶向遗传修饰可当在本文其它地方公开的雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)(例如促进XY F0能生育的雌性的发育的培养基)中维持细胞(例如ES细胞)时发生。相反,可在不是本文公开的雌性化培养基(例如不是包含具有约200m0sm/kg至小于约329m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度的基础培养基的低克分子渗透压重量浓度培养基)的培养基中培养细胞。或者,对基因或其它靶标基因组基因座的靶向遗传修饰可当在不同培养基中维持细胞,以及随后转移至本文公开的雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度)中时发生。

[0180] 蛋白质的活性和/或水平也可通过向细胞中引入抑制蛋白质的水平或活性的多核苷酸来降低或消除。多核苷酸可通过阻止Sry信使RNA的翻译来直接抑制蛋白质的表达,或通过编码抑制编码蛋白质的基因的转录的多肽来间接抑制蛋白质的表达。或者,通过向细胞中引入编码抑制蛋白质的活性的多肽的序列来降低或消除蛋白质的活性。

[0181] 蛋白质的水平和/或活性也可通过使用使蛋白质的活性和/或水平降低的条件性等位基因来调控。条件性等位基因包括被设计来在所需发育时间和/或在所需目标组织内具有蛋白质的降低水平和/或活性的编码蛋白质的经修饰基因。水平和/或活性降低可相较于缺乏产生条件性等位基因的修饰的对照细胞,或在在所需发育时间活性降低的情况下,相较于之前和/或之后时间,或在所需组织的情况下,相较于所有组织的平均活性。举例来说,条件性等位基因可包括编码蛋白质的基因的条件性无效等位基因,其可在所需发育时间点和/或在特定组织中被切断。这种条件性等位基因可用于产生源于任何基因靶向克隆的能生育的XY雌性。如本文其它地方所述,这种方法使得能够在F1代中产生所需纯合性遗传修饰。所述方法提供快速考察表型,而不必交配以获得F2代。

[0182] 条件性等位基因也可为如US 2011/0104799中所述的多功能性等位基因,所述专利出于所有目的以引用的方式整体并入本文。举例来说,这种条件性等位基因可包含:(a)关于靶标基因的转录呈有义定向的触动序列和呈有义或反义定向的药物选择盒(DSC);(b)呈反义定向的目标核苷酸序列(NSI)和倒位条件性模块(COIN),其利用外显子分割性内含

子和可倒位基因诱捕样模块(参见例如US 2011/0104799,其出于所有目的以引用的方式整体并入本文);和(c)在暴露于第一重组酶后重组以形成(i)缺乏触动序列和D SC,以及(ii)含有呈有义定向的NSI和呈反义定向的COIN的条件性等位基因的可重组单元。

[0183] 编码蛋白质的基因的条件性等位基因可在任何细胞类型中产生,并且不限于XY多能或全能细胞。所述细胞类型以及用以靶向Y染色体上的基因组基因座的非限制性方法在本文其它地方进一步详细讨论。

[0184] 沉默可发生在培养XY多能或全能细胞时,在将供体XY多能或全能细胞引入宿主胚胎中之后,或在将包含供体XY多能或全能细胞的所述宿主胚胎引入接受者雌性动物中之后。沉默也可发生在胚胎发育的不同阶段期间,或在整个胚胎发育中。在一些情况下,沉默在出生之后持续。举例来说,在卵母细胞受精之后,一些沉默可维持直至前两次细胞分裂。由沉默引起的性别逆转也可能被传递至F1子代中。沉默发生所处的时期的一些实例包括以下中的一者或者:(1)在进行雄性性别决定程序时的胚胎发育期间;(2)在直至至少对应于小鼠中的E11-E12的发育阶段的胚胎发育期间(例如对于性别决定或性别逆转重要的发育阶段);(3)在直至至少对应于小鼠中的E17-E19的发育阶段的胚胎发育期间(例如对于胚胎卵母细胞的生育性重要的发育阶段);(4)在整个卵子发生的时期中;(5)在卵母细胞发育中的就在出生之前在胚胎中启始的减数分裂前期期间;(6)在卵母细胞受精之后(例如在它的前两次细胞分裂期间);或(7)在卵母细胞排卵后直至受精后前两次细胞分裂。

[0185] 2.1.2. 在雌性化培养基中培养和维持

[0186] 在各种方法和组合物中采用的促成F0代中的XY能生育雌性的培养基是使得维持多能或全能细胞(例如ES细胞、iPS细胞、XY ES细胞、XY i PS细胞等)的培养基。术语“维持(maintain/maintaining/maintenance)”是指稳定保留本文所述的多能或全能细胞(包括ES细胞或iPS细胞)的至少一种或多种特征或表型。所述表型可包括维持细胞的多能性或全能性、细胞形态、基因表达谱和其它功能特征。术语“维持”也可涵盖使细胞增殖或使所培养的细胞的数目增加。所述术语进一步涵盖容许细胞保持多能,而细胞可或可不继续分裂并增加数目的培养条件。可在各种浓度的二氧化碳中培养细胞。在一个实施例中,在5%二氧化碳中培养细胞。

[0187] 具有使Y染色体的区域沉默的修饰的XY多能或全能细胞可通过在本领域中已知的适合(与添加的补充物一起)用于使所培养的多能或全能细胞(例如ES细胞、iPS细胞、XY ES细胞、XY iPS细胞等)生长或维持所述多能或全能细胞的任何基础培养基(例如DMEM)中培养来维持。所述培养的XY多能或全能细胞(例如ES细胞)由于Y染色体的区域的沉默而具有发育成能生育的雌性动物的潜力,并且保持多能性或全能性,以致细胞可被植入接受者胚胎中并产生能生育的雌性子代。

[0188] 2.1.2.1. 雌性化培养基

[0189] Y染色体的区域的沉默可通过在如以下进一步所定义的雌性化培养基中培养或维持XY多能或全能细胞来实现。同样,具有使Y染色体的区域沉默的进一步修饰的XY多能或全能细胞也可通过在如以下进一步所定义的雌性化培养基中培养来维持。通过在培养基中持续足够时间培养细胞,可使细胞转化成具有发育成能生育的雌性动物的潜力的XY多能或全能细胞,以致细胞可被植入接受者胚胎中并产生能生育的雌性子代。WO 2011/ 156723和Kuno等(2015) Transgenic Res. 24 (1) :19-29(其各自出于所有目的以引用的方式整体并入

本文)提供采用这种雌性化培养基(例如如本文其它地方公开的低克分子渗透压重量浓度培养基或低盐培养基)来维持所培养的XY供体细胞,以致在将所述XY供体细胞引入宿主胚胎中以及在适合宿主中孕育之后,可在F0群体中产生能生育的XY雌性动物的方法和组合物。在一些所述方法中,特定XY多能或全能细胞克隆产生能生育的X Y雌性动物的倾向可为0%至60%,并且这些雌性化作用不可通过使克隆在对照非雌性化培养基中再生长来逆转。所述F0 XY雌性可具有正常雌性外部和内部解剖结构,可完全源于供体细胞而不具有宿主胚胎贡献以及不具有嵌合现象,可在包括性器官的所有组织中都具有一个X染色体和一个Y染色体,并且可具有正常XY雄性核型而不具有可见的染色体畸变。源于在雌性化培养基中培养的XY多能或全能细胞的F0 XY雌性可具有与XX 雌性类似的生育性和生殖力。举例来说,在一些所述方法中,相较于F1 XX雌性对照的约90%,F0 XY雌性具有60-70%的生育性。在一些所述方法中,在9个月的交配测试中,在F0 XY雌性与F1XX雌性之间在生殖力方面不存在差异。

[0190] 在雌性化培养基中培养可导致Y染色体基因的阻遏或沉默(参见实施例1)。举例来说,可使Y染色体的区域沉默,诸如Y染色体的短臂的全部或一部分。尽管对机理的了解不为实践所需,但在Y染色体的短臂上进行的沉默可延伸至雄性性别决定途径的关键调控子,即Sry基因,其未能在小鼠胚胎发育期间在E11-E12的正确时间充分表达,从而导致在双潜能生殖嵴中表达雌性性别决定程序(参见实施例1和图2)。诸如Ddx3y和Eif2s3y的其它基因也可未能表达(参见实施例1以及图3和4)。从那时起,性别逆转的胚胎可如同雌性一样发育直至出生(F0代),接着成长为正常能生育的雌性小鼠,尽管它具有XY基因型。在一些方法中,雌性化培养基诱导的Y染色体沉默不是永久遗传变化,并且不存留至F1代中(即无XY 雌性见于F0 XY雌性的F1子代之中)。

[0191] 尽管对机理的了解不为实践所需,但改变染色质和/或增加Y染色体上的磷酸化形式的组蛋白变体 $\gamma$ H2AX的水平可促进沉默。已知磷酸化组蛋白 $\gamma$ H2AX与转录阻遏相关联,并且与在减数分裂前期期间XY性体中的X染色体和Y染色体的转录阻遏相关联。参见例如Alton等(2008)Reproduction 135:241-252。

[0192] 在一些情况下,在某一克隆的所有细胞之中,初始雌性化培养基诱导的对XY多能或全能细胞中的Y染色体的沉默不是完全的,因此一些用来自所述克隆的细胞注射的胚胎将发育成正常雄性。可使这些F0雄性与它们在遗传上相同的性别逆转雌性克隆同胞交配以在第一(F1)代中产生纯合性遗传修饰小鼠,由此消除将通常为产生纯合性小鼠所需的额外一代(F2) 交配的时间和成本。

[0193] 雌性化培养基可促进XY F0能生育的雌性的发育。因此,当相较于在适当对照培养基(诸如像基于DMEM的培养基)中培养的XY多能或全能细胞时,或当相较于尽管在雌性化培养基中培养,但缺乏用以产生XY雌性小鼠的能力或所述能力降低的XY多能或全能细胞克隆时,在这种培养基中培养可使是在达到性成熟后能生育的呈表型雌性的XY动物的F0 XY子代的百分比;能生育的F0 XY雌性的百分比;或能够产生正常窝数、同窝仔畜数和终生后代数的F0 XY雌性的百分比增加(例如相较于野生型雌性动物)。

[0194] XY多能或全能细胞可进一步包含对靶标基因组基因座的至少一个额外靶向遗传修饰。在包括对至少一个额外靶标基因组基因座进行修饰的方法中,可对于整个靶向过程—例如电穿孔、选择药物抗性集落、筛选靶向突变、扩增和低温保存—或仅对于整个靶向

过程的一个或多个部分，在雌性化培养基中培养XY多能或全能细胞。同样，可在靶向过程之前和/或期间和/或之后，在雌性化培养基中培养细胞。

[0195] “基础培养基”包括例如本领域中已知的适合(与添加的补充物一起)用于使所培养的多能或全能细胞(例如ES细胞、iPS细胞、XY ES细胞、XY iPS细胞等)生长或维持所述多能或全能细胞的基础培养基(例如DMEM)。促进制备能生育的XY雌性的基础培养基(即“雌性化培养基”(例如“低盐培养基”或“低克分子渗透压重量浓度培养基”))不同于通常用于维持所培养的ES细胞的基础培养基。出于一般地讨论基础培养基的目的，不促进制备能生育的XY雌性的基础培养基在这个章节中以及在表1中描述为“DMEM”(例如典型DMEM培养基)。出于讨论促进制备能生育的XY雌性的基础培养基的目的，使用短语“雌性化培养基”(例如“低盐培养基”、“低盐DMEM”、“低克分子渗透压重量浓度培养基”或“低克分子渗透压重量浓度DMEM”)。本文明确表达在通常用于维持所培养的多能或全能细胞的基础培养基(例如DMEM)与促进制备能生育的XY雌性的基础培养基(例如“雌性化培养基”诸如“低盐DMEM”)之间的差异。短语“低盐培养基”为方便起见而使用；适于制备能生育的XY雌性的DMEM展现不限于“低盐”的特征，而是包括本文所述的那些特征。举例来说，可通过改变如本文提供的氯化钠和/或碳酸氢钠浓度来使得表1中所示的DMEM适于制备能生育的XY雌性，所述改变也将导致相较于表1中所示的DMEM，不同的克分子渗透压重量浓度和不同的电导率。基础培养基的一实例是呈各种形式的杜尔贝科氏改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM) (例如Invitrogen DMEM, 目录号1 1971-025; 表1)。适合低盐DMEM可以KO-DMEM<sup>TM</sup>(Invitrogen目录号10829-018)商购获得。当用于维持所培养的用作供体细胞的细胞时，基础培养基通常补充以本领域中已知的许多补充物。所述补充物在本公开中指示为“补充物”或“+补充物”。

[0196] 表1. 用于维持或培养多能和全能细胞的DMEM基础培养基

组分	Mg/L	mM
甘氨酸	30	0.4
L-精氨酸•HCl	84	0.398
L-胱氨酸•2HCl	63	0.201
L-谷氨酰胺	584	4
L-组氨酸•HCl•H <sub>2</sub> O	42	0.2
L-异亮氨酸	105	0.802
L-亮氨酸	105	0.802
L-赖氨酸•HCl	146	0.798

[0197]

[0198]	L-甲硫氨酸	30	0.201
	L-苯丙氨酸	66	0.4
	L-丝氨酸	42	0.4
	L-苏氨酸	95	0.798
	L-色氨酸	16	0.0784
	L-酪氨酸二钠盐二水合物	104	0.398
	L-缬氨酸	94	0.803
	氯化胆碱	4	0.0286
	D-泛酸钙	4	8.39 x 10 <sup>-3</sup>
	叶酸	4	9.07 x 10 <sup>-3</sup>
	烟酰胺	4	0.0328
	吡哆辛•HCl	4	0.0196
	核黄素	0.4	1.06 x 10 <sup>-3</sup>
	硫胺•HCl	4	0.0119
	异肌醇	7.2	0.04
	氯化钙(CaCl <sub>2</sub> ) (无水)	200	1.8
	硝酸铁(Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O)	0.1	2.48 x 10 <sup>-4</sup>
	硫酸镁(MgSO <sub>4</sub> ) (无水)	97.67	0.814
	氯化钾 (KCl)	400	5.33
	D-葡萄糖(右旋糖)	4500	25
	酚红	15	0.0399
<b>DMEM 的 NaCl/NaHCO<sub>3</sub> 含量</b>			
碳酸氢钠(NaHCO <sub>3</sub> )	3700	44.05	
氯化钠(NaCl)	6400	110.34	
<b>低盐 DMEM 的 NaCl/NaHCO<sub>3</sub> 含量</b>			
碳酸氢钠(NaHCO <sub>3</sub> )	<3700	<44.05	
氯化钠(NaCl)	<6400	<110.34	

[0199] “补充物”或短语“+补充物”包括添加至基础培养基中的用于使所培养的多能或全能细胞(例如XY ES细胞或XY iPS细胞)生长或维持所述多能或全能细胞(例如用于维持所培养的供体细胞的多能性或全能性)的要素。举例来说,适于使所培养的多能或全能细胞生长或维持所述多能或全能细胞的培养基补充物包括但不限于胎牛血清(FBS)、谷氨酰胺、抗生素、青霉素和链霉素(例如penstrep)、丙酮酸盐(例如丙酮酸钠)、非必需氨基酸(例如MEM NEAA)、2-巯基乙醇和白血病抑制因子(LIF)。

[0200] 在一些方法中,基础培养基包含一种或多种适于维持所培养的多能或全能细胞

(包括例如XY ES细胞或XY iPS细胞)的补充物,所述细胞在注射至胚胎中以及向代孕母体小鼠中进行子宫内转移之后具有降低的促进雄性性别决定发育程序的能力。对于一些细胞系,培养基是Wnt条件培养基,例如Wnt-3a条件培养基。

[0201] 举例来说,基础培养基可包含一种或多种以下补充物:FBS(90ml F BS/0.5L基础培养基)、谷氨酰胺(2.4毫摩尔/0.5L基础培养基)、丙酮酸钠(0.6毫摩尔/0.5L基础培养基)、非必需氨基酸(<0.1mmol/0.5L基础培养基)、2-巯基乙醇、LIF和一种或多种抗生素。用于维持所培养的在注射至胚胎中以及向代孕母体小鼠中进行子宫内转移之后具有降低的促进雄性性别决定发育程序的能力的多能或全能细胞(包括例如XY ES细胞或XY iPS细胞)的培养基的一个实例包括其中添加以下补充物的约500ml基础培养基:约90ml FBS(例如Hyclone FBS目录号SH30070.03)、约2.4毫摩尔的谷氨酰胺(例如约12ml的200mM谷氨酰胺溶液,例如Invitrogen目录号25030-081)、青霉素:链霉素(例如60,000单位的青霉素G钠和60mg 的硫酸链霉素,伴有约51mg的NaCl;例如约6ml.的Invitrogen pennstr ep,目录号15140-122)、约0.6毫摩尔的丙酮酸钠(例如6ml.的100mM丙酮酸钠,Invitrogen目录号1360-070)、约0.06毫摩尔的非必需氨基酸(例如约6ml.的MEM NEAA,例如来自Invitrogen的MEM NEAA,目录号 1 1 140-050)、约1.2ml.2-巯基乙醇和约1.2微克的LIF(例如约120毫升的106单位/mL LIF制剂;例如约120毫升的Millipore ESGRO<sup>TM</sup>-LIF,目录号ESG1 107)。当组成用于维持用以制备能生育的XY雌性的XY多能或全能细胞(例如XY ES或XY iPS细胞)的基础培养基时,通常以近似相同量采用相同补充物,但基础培养基的组成将不同(不同于DMEM,例如不同于表1中所述的培养基),并且差异对应于本文教导的差异。

[0202] 雌性化培养基的可被改变的其它特征包括克分子渗透压重量浓度、电导率、盐浓度、碱金属和卤离子的盐的浓度、碳酸盐的浓度、总体碱金属卤化物盐和碳酸盐浓度、以及碱金属和卤离子的盐和碳酸盐的摩尔比。举例来说,基础培养基可为低盐培养基(例如具有85-130mM(约5.0至7.6 mg/mL)的NaCl浓度的低盐DMEM)、低克分子渗透压重量浓度培养基(例如具有250-310mOsm/kg或218-322mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度的低克分子渗透压重量浓度DMEM)、或低电导率培养基(例如具有11-13mS /cm的电导率的低电导率DMEM)。

[0203] 基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基的克分子渗透压重量浓度可为例如至多约320、310、300、290、280、275、270、260、250、240、230、220、210或200mOsm/kg。或者,基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基的克分子渗透压重量浓度可为例如至多约340mOsm/ kg或330mOsm/kg。任选地,基础培养基具有至多约340、330、320、310、300、290、280、275、270、260、250、240、230、220、210或200m Osm/kg的克分子渗透压重量浓度,其中在将适于维持非人动物XY多能或全能细胞的多能性或全能性的补充物添加至基础培养基中后,所述克分子渗透压重量浓度不变化超过1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%或25%。举例来说,基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基可具有约200-329、218-322、240-320、250-310、275-295、或260-300mOsm/kg 的克分子渗透压重量浓度。任选地,基础培养基具有约200-329、218-322、240-320、250-310、275-295、或260-300mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度,其中在将适于维持非人动物XY多能或全能细胞的多能性或全能性的补充物添加至基础培养基中后,所述克分子渗透压重量浓度不变化超过 1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%或25%。或者,基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基可具有约214、约216、约200-322、约 200-340、约200-292、约214-322、约216-322、约218-322、约

214-332、约216-332、或约218-332m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度。任选地，基础培养基具有约214、约216、约200-322、约200-340、约200-292、约 214-322、约216-322、约218-322、约214-332、约216-332、或约218-332 m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度，其中在将适于维持非人动物XY多能或全能细胞的多能性或全能性的补充物添加至基础培养基中后，所述克分子渗透压重量浓度不变化超过1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%或25%。举例来说，基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基可具有约270m0sm/kg或218m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度。或者，克分子渗透压重量浓度可为 $218 \pm 22\text{m}0\text{sm}/\text{kg}$ 、 $261 \pm 26\text{m}0\text{sm}/\text{kg}$ 、 $294 \pm 29\text{ m}0\text{sm}/\text{kg}$ 、或 $322 \pm 32\text{m}0\text{sm}/\text{kg}$ 。或者，克分子渗透压重量浓度可为约216 或 214m0sm/kg或 $216 \pm 22\text{m}0\text{sm}/\text{kg}$ 或 $214 \pm 22\text{m}0\text{sm}/\text{kg}$ 。任选地，基础培养基具有约270m0sm/kg、约218m0sm/kg、216m0sm/kg、214m0sm/kg、 $218 \pm 22\text{m}0\text{sm}/\text{kg}$ 、 $261 \pm 26\text{m}0\text{sm}/\text{kg}$ 、 $294 \pm 29\text{m}0\text{sm}/\text{kg}$ 、 $322 \pm 32\text{ m}0\text{sm}/\text{kg}$ 、 $216 \pm 22\text{m}0\text{sm}/\text{kg}$ 或 $214 \pm 22\text{m}0\text{sm}/\text{kg}$ 的克分子渗透压重量浓度，其中在将适于维持非人动物XY多能或全能细胞的多能性或全能性的补充物添加至基础培养基中后，所述克分子渗透压重量浓度不变化超过 1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%或25%。

[0204] 基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基的电导率可为例如至多约10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.0、13.5或14.0mS/cm。举例来说，基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基可展现至多约10 -14mS/cm、约11-13mS/cm、或约12-13mS/cm的电导率。

[0205] 基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基的pH可为例如约6.9 至约7.5、约6.98至约7.41、约7.0至约7.4、约7.05至约7.35、约7.1至约7.3、约7.15至约7.25、约7.18至约7.22、约7.19至约7.23、或约7.2 至约7.22，或pH可为约7.21、约7.17、约7.38、约6.99、约6.98、约7.4 0、约7.41、约7.34或约7.37。

[0206] 一些培养基展现一定浓度的碱金属和卤离子的盐，诸如NaCl。基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基中的碱金属和卤离子的盐的浓度可为例如至多约100、90、80、70、60或50mM。举例来说，对于NaCl，在基础培养基或包含培养基和补充物的培养基中的浓度可为例如至多约5. 8、5.3、4.7、4.1、3.5或2.9mg/mL。举例来说，基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基可包含约50-110、60-105、70-95、80-90、90或85 mM的浓度的碱金属和卤离子的盐。举例来说，对于NaCl，在基础培养基或包含培养基和补充物的培养基中的浓度可为例如约2.9-6.4、3.5-6.1、4.1 -5.6、4.7-5.3、5.3或5.0mg/mL。或者，碱金属和卤离子的盐的浓度可为5 0±5mM、87±5mM、110±5mM、约3mg/mL、约5.1mg/mL或约6.4 mg/mL。

[0207] 一些培养基展现一定浓度的碳酸盐(salt of carbonic acid/carbonate)，诸如钠盐(例如碳酸氢钠)。基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基中的碳酸盐的浓度可为例如至多45、40、35、30、25或20mM。举例来说，对于碳酸氢钠，在基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基中的浓度可为例如至多3.8、3.4、2.9、2.5、2.1或1.7mg/mL。举例来说，基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基可在基础培养基中包含约10-40、18-44、17-30、18-26、13-25、20-30、25-26、18或26mM的浓度的碳酸盐。举例来说，对于碳酸氢钠，在基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基中的浓度可为例如约0.8-3.4、1.5-3.7、1.4-2.5、1.5-2.2、1.1-2.1、1.7-2.5、2.1-2.2、1.5或2.2mg/mL。或者，碳酸盐的

浓度可为 $18\pm 5\text{mM}$ 、 $26\pm 5\text{mM}$ 、约 $1.5\text{mg/mL}$ 或约 $2.2\text{mg/mL}$ 。

[0208] 基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基中的碱金属和卤离子的盐和碳酸盐的浓度总和可为例如至多 $140$ 、 $130$ 、 $120$ 、 $110$ 、 $100$ 、 $90$ 或 $80\text{mM}$ 。举例来说，基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基可包含约 $80$ - $140$ 、 $85$ - $130$ 、 $90$ - $120$ 、 $95$ - $120$ 、 $100$ - $120$ 、或 $115\text{mM}$ 的总浓度的碱金属和卤离子的盐和碳酸盐。

[0209] 基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基中的碱金属和卤离子的盐和碳酸盐的摩尔比可为例如高于 $2.5$ 。举例来说，基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基可具有碱金属和卤离子的盐和碳酸盐的约 $2.6$ - $4.0$ 、 $2.8$ - $3.8$ 、 $3.0$ - $3.6$ 、 $3.2$ - $3.4$ 、 $3.3$ - $3.5$ 、或 $3.4$ 的摩尔比。

[0210] 雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)的一个实例是包含具有一个或多个以下特征的基础培养基的培养基：(a) 约 $200\text{mOsm/kg}$ 至小于约 $329\text{mOsm/kg}$ 的克分子渗透压重量浓度；(b) 约 $11\text{mS/cm}$ 至约 $13\text{mS/cm}$ 的电导率；(c) 浓度是约 $50\text{mM}$ 至约 $110\text{mM}$ 的碱金属和卤离子的盐；(d) 约 $17\text{mM}$ 至约 $30\text{mM}$ 的碳酸盐浓度；和(e) 约 $85\text{mM}$ 至约 $130\text{mM}$ 的总体碱金属卤化物盐和碳酸盐浓度。或者，包含基础培养基和补充物的培养基可具有约 $200\text{mOsm/kg}$ 至小于约 $329\text{mOsm/kg}$ 的克分子渗透压重量浓度或约 $11\text{mS/cm}$ 至约 $13\text{mS/cm}$ 的电导率。

[0211] 雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)的另一实例是包含具有一个或多个以下特征的基础培养基的培养基：(a) 浓度是约 $50\text{mM}$ 至约 $110\text{mM}$ 的碱金属和卤离子的盐；(b) 浓度是约 $17\text{mM}$ 至约 $30\text{mM}$ 的碳酸盐；和(c) 约 $200\text{mOsm/kg}$ 至约 $329\text{mOsm/kg}$ 的克分子渗透压重量浓度。举例来说，基础培养基可以约 $2.9$ - $6.4\text{mg/mL}$ 的浓度包含 $\text{NaCl}$ ，和/或可以约 $1.4$ - $2.5\text{mg/mL}$ 的浓度包含碳酸氢钠。或者，包含基础培养基和补充物的培养基可具有约 $200\text{mOsm/kg}$ 至约 $329\text{mOsm/kg}$ 的克分子渗透压重量浓度。

[0212] 雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)的另一实例是包含具有一个或多个以下特征的基础培养基的培养基：(a) 浓度是约 $50\text{mM}$ 至约 $110\text{mM}$ 的碱金属和卤离子的盐(例如 $\text{NaCl}$ )；(b) 浓度是约 $18\text{mM}$ 至约 $44\text{mM}$ 或约 $18\text{mM}$ 至约 $26\text{mM}$ 的碳酸盐(例如 $\text{NaHCO}_3$ )；和(c) 约 $218\text{mOsm/kg}$ 至约 $322\text{mOsm/kg}$ 的克分子渗透压重量浓度。举例来说，基础培养基可以约 $2.9$ - $6.4\text{mg/mL}$ 的浓度包含 $\text{NaCl}$ ，和/或可以约 $1.5$ - $3.7\text{mg/mL}$ 或 $1.5$ - $2.2\text{mg/mL}$ 的浓度包含碳酸氢钠。或者，包含基础培养基和补充物的培养基可具有约 $218\text{mOsm/kg}$ 至约 $322\text{mOsm/kg}$ 的克分子渗透压重量浓度。

[0213] 雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)的另一实例是包含具有一个或多个以下特征的基础培养基的培养基：(a) 约 $250$ - $310\text{mOsm/kg}$ 的克分子渗透压重量浓度；(b) 约 $11$ - $13\text{mS/cm}$ 的电导率；(c) 浓度是约 $60$ - $105\text{mM}$ 的碱金属和卤离子盐；(d) 约 $20$ - $30\text{mM}$ 的碳酸盐浓度；和(e) 至多约 $85$ - $130\text{mM}$ 的总体碱金属卤化物盐和碳酸盐浓度。或者，包含基础培养基和补充物的培养基可具有约 $250$ - $310\text{mOsm/kg}$ 的克分子渗透压重量浓度。

[0214] 雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)的另一实例是包含具有约 $12$ - $13\text{mS/cm}$ 的电导率和约 $260$ - $300\text{mOsm/kg}$ 的克分子渗透压重量浓度的基础培养基的培养基。或者，包含基础培养基和补充物的培养基可具有约 $12$ - $13\text{mS/cm}$ 的电导率和约 $260$ - $300\text{mOsm/kg}$ 的克分子渗透压重量浓度。任选地，基础培养基进一步在约 $70$ - $95\text{mM}$ (即约 $4.1$ - $5.6\text{mg/mL}$ )的浓度下包含氯化钠，或进一步包含约 $90\text{mM}$   $\text{NaCl}$ (即约 $5.3\text{mg/mL}$ )。任选地，基

础培养基进一步在小于约35mM(即约2.9mg/mL)或约20-30 mM(即约1.7-2.5mg/mL)的浓度下包含碳酸氢钠。

[0215] 雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)的另一实例是包含具有约250-310mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度和约60-105mM的浓度的碱金属和卤离子的盐的基础培养基的培养基。或者,包含基础培养基和补充物的培养基可具有约250-310mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。举例来说,基础培养基可包含约3.5-6.1mg/mL NaCl,伴有约250-310mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度,或基础培养基可包含约3.5-6.1mg/mL NaCl,并且包含基础培养基和补充物的培养基具有约250-310mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。任选地,基础培养基包含约20-30mM的浓度的碳酸盐。举例来说,基础培养基可包含约1.7-2.5mg/mL碳酸氢钠。任选地,碱金属和卤离子的盐和碳酸盐的浓度总和是约80-140mM。任选地,基础培养基的电导率是约12-13mS/cm。或者,包含基础培养基和补充物的培养基的电导率是约12-13mS/cm。

[0216] 雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)的另一实例是包含基础培养基的培养基,所述基础培养基包含约50±5mM NaCl和约26±5mM碳酸盐(例如碳酸氢钠),伴有约218±22mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。或者,包含基础培养基和补充物的培养基可具有约218±22mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。举例来说,培养基可包含基础培养基,所述基础培养基包含约2.6-3.2mg/mL NaCl和约1.8-2.6mg/mL碳酸氢钠,并且基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基可具有约218±22mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。举例来说,基础培养基可包含约3mg/mL NaCl和约2.2mg/mL碳酸氢钠,伴有约218mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。或者,包含基础培养基和补充物的培养基可具有约218mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。

[0217] 雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)的另一实例是包含基础培养基的培养基,所述基础培养基包含约87±5mM NaCl和约18±5mM碳酸盐(例如碳酸氢钠),伴有约261±26mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。或者,包含基础培养基和补充物的培养基可具有约261±26mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。举例来说,基础培养基可包含约4.8-5.4 mg/mL NaCl和约1.1-1.9mg/mL碳酸氢钠,并且基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基可具有约261±26mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。举例来说,基础培养基可包含约5.1mg/mL NaCl和约1.5mg/mL碳酸氢钠,伴有约261mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。或者,包含基础培养基和补充物的培养基可具有约261mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。任选地,基础培养基可进一步包含4.5mg/mL葡萄糖。

[0218] 雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)的另一实例是包含基础培养基的培养基,所述基础培养基包含约110±5mM NaCl和约18±5mM碳酸盐(例如碳酸氢钠),伴有约294±29mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。或者,包含基础培养基和补充物的培养基可具有约294±29mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。举例来说,基础培养基可包含约6.1-6.7 mg/mL NaCl和约1.1-1.9mg/mL碳酸氢钠,并且基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基可具有约294±29mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。举例来说,基础培养基可包含约6.4mg/mL NaCl和约1.5mg/mL碳酸氢钠,伴有约294mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。或者,包含基础培养基和补充物的培养基可具有约294mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。任选地,基础培养基可进一步包含4.5mg/mL葡萄糖。

[0219] 雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)的另一实例是包含基础培养基的培养基,所述基础培养基包含约 $87\pm 5$ mM NaCl和约 $26\pm 5$ mM碳酸盐(例如碳酸氢钠),伴有约 $270\pm 27$ mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。或者,包含基础培养基和补充物的培养基可具有约 $270\pm 27$ mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。举例来说,培养基可包含基础培养基,所述基础培养基包含约 $4.8\sim 5.4$ mg/mL NaCl和约 $1.8\sim 2.6$ mg/mL碳酸氢钠,并且基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基可具有约 $270\pm 27$ mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。举例来说,基础培养基可包含约 $5.1$ mg/mL NaCl和约 $2.2$ mg/mL碳酸氢钠,伴有约 $270\pm 27$ mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。或者,包含基础培养基和补充物的培养基可具有约 $270\pm 27$ mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。作为另一实例,基础培养基可包含约 $5.1$ mg/mL NaCl和约 $2.2$ mg/mL碳酸氢钠,并且基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基可具有约 $275\pm 27$ mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。作为另一实例,基础培养基可包含约 $5.1$ mg/mL NaCl和约 $2.2$ mg/mL碳酸氢钠,并且基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基可具有约 $268\pm 27$ mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。作为另一实例,基础培养基可包含约 $5.1$ mg/mL NaCl和约 $2.2$ mg/mL碳酸氢钠,并且基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基可具有约 $280\pm 27$ mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。任选地,基础培养基可进一步包含 $4.5$ mg/mL葡萄糖。

[0220] 雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)的另一实例是包含基础培养基的培养基,所述基础培养基包含约 $87\pm 5$ mM NaCl、约 $26\pm 5$ mM碳酸盐(例如碳酸氢钠)和约 $86\pm 5$ mM葡萄糖,伴有约 $322\pm 32$ mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。或者,包含基础培养基和补充物的培养基可具有约 $322\pm 32$ mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。举例来说,培养基可包含基础培养基,所述基础培养基包含约 $4.8\sim 5.4$ mg/mL NaCl和约 $1.8\sim 2.6$ mg/mL碳酸氢钠,并且基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基可具有约 $322\pm 32$ mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。举例来说,基础培养基可包含约 $5.1$ mg/mL NaCl、约 $2.2$ mg/mL碳酸氢钠和约 $15.5$ mg/mL 葡萄糖,伴有约 $322\pm 32$ mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。或者,包含基础培养基和补充物的培养基可具有约 $322\pm 32$ mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。

[0221] 雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)的另一实例是包含基础培养基的培养基,所述基础培养基包含 $50\pm 5$ mM NaCl和 $26\pm 5$ mM碳酸盐,伴有 $218\pm 22$ mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。或者,包含基础培养基和补充物的培养基可具有约 $218\pm 22$ mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。举例来说,培养基可包含基础培养基,所述基础培养基包含约 $2.6\sim 3.2$ mg/mL NaCl和约 $1.8\sim 2.6$ mg/mL碳酸氢钠,并且基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基可具有 $218\pm 22$ mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。举例来说,基础培养基可包含约 $3$ mg/mL NaCl和约 $2.2$ mg/mL碳酸氢钠,伴有约 $218\pm 22$ mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。或者,包含基础培养基和补充物的培养基可具有约 $218\pm 22$ mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。或者,基础培养基可包含约 $3$ mg/mL NaCl和约 $2.2$ mg/mL碳酸氢钠,并且基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基可具有约 $216\pm 22$ mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。或者,基础培养基可包含约 $3$ mg/mL NaCl和约 $2.2$ mg/mL碳酸氢钠,并且基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基可具有约 $214\pm 22$ mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度。任选地,基础培养基可进一步包含 $4.5$ mg/mL葡萄糖。

[0222] 雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)的另一实例是包含基础培

养基的培养基,所述基础培养基包含约 $50\pm 5\text{mM}$  NaCl和约 $44\pm 5\text{mM}$ 碳酸盐(例如碳酸氢钠),并且基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基可具有约 $238\pm 24\text{mOsm/kg}$ 的克分子渗透压重量浓度。举例来说,培养基可包含基础培养基,所述基础培养基包含约 $2.6\text{-}3.2\text{mg/mL}$  NaCl和约 $3.3\text{-}4.1\text{mg/mL}$ 碳酸氢钠,并且基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基可具有约 $238\pm 24\text{mOsm/kg}$ 的克分子渗透压重量浓度。举例来说,基础培养基可包含约 $3\text{mg/mL}$  NaCl和约 $3.7\text{mg/mL}$ 碳酸氢钠,并且基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基可具有约 $238\text{mOsm/kg}$ 的克分子渗透压重量浓度。任选地,基础培养基可进一步包含 $4.5\text{mg/mL}$ 葡萄糖。

[0223] 雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)的另一实例是包含基础培养基的培养基,所述基础培养基包含约 $87\pm 5\text{mM}$  NaCl和约 $44\pm 5\text{mM}$ 碳酸盐(例如碳酸氢钠),并且基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基可具有约 $288\pm 29\text{mOsm/kg}$ 的克分子渗透压重量浓度。举例来说,培养基可包含基础培养基,所述基础培养基包含约 $4.8\text{-}5.4\text{mg/mL}$  NaCl和约 $3.3\text{-}4.1\text{mg/mL}$ 碳酸氢钠,并且基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基可具有约 $288\pm 29\text{mOsm/kg}$ 的克分子渗透压重量浓度。举例来说,基础培养基可包含约 $5.1\text{mg/mL}$  NaCl和约 $3.7\text{mg/mL}$ 碳酸氢钠,并且基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基可具有约 $288\text{mOsm/kg}$ 的克分子渗透压重量浓度。任选地,基础培养基可进一步包含 $4.5\text{mg/mL}$ 葡萄糖。

[0224] 雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)的另一实例是包含基础培养基的培养基,所述基础培养基包含约 $3\text{mg/mL}$  NaCl和约 $1.5\text{ mg/mL}$ 碳酸氢钠,并且基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基可具有约 $203\text{mOsm/kg}$ 的克分子渗透压重量浓度。

[0225] 雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)的另一实例是包含基础培养基的培养基,所述基础培养基包含约 $44\text{mM}$ 碳酸氢钠(即约 $3.7\text{mg/mL}$ ),并且基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基可具有约 $290\text{mOsm/kg}$ 的克分子渗透压重量浓度。雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)的另一实例是包含基础培养基的培养基,所述基础培养基包含约 $26\text{mM}$ (即约 $2.2\text{mg/mL}$ )碳酸氢钠,并且基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基可具有约 $264\text{mOsm/kg}$ 的克分子渗透压重量浓度。雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)的另一实例是包含基础培养基的培养基,所述基础培养基包含约 $18\text{mM}$ (即约 $1.5\text{mg/mL}$ )碳酸氢钠,并且基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基可具有约 $292\text{mOsm/kg}$ 的克分子渗透压重量浓度。雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)的另一实例是包含基础培养基的培养基,所述基础培养基包含约 $18\text{mM}$ (即约 $1.5\text{mg/mL}$ )碳酸氢钠,并且基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基可具有约 $251\text{mOsm/kg}$ 的克分子渗透压重量浓度。

[0226] 可使用的其它培养基包括高葡萄糖DMEM培养基(LifeTech),其具有如本文公开的 $\text{NaHCO}_3$ 浓度(例如约 $44\text{mM}$ 、 $26\text{mM}$ 或 $18\text{mM}$ ),并且补充以 $0.1\text{mM}$ 非必需氨基酸、 $1\text{mM}$ 丙酮酸钠、 $0.1\text{mM}$  2-巯基乙醇、 $2\text{m M L-}$ 谷氨酰胺、各自 $50\text{ug/ml}$ 青霉素和链霉素(LifeTech)、 $15\%$ FBS(Hy clone)和 $2000\text{U/ml}$  LIF(Millipore)。

[0227] 雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)的其它实例描述于W0 2011/156723、US 2011/0307968和US 2015/0067901中,所述专利各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文。雌性化培养基的其它实例描述于Kuno等(2015) Transgenic Res. 24

(1) :19-29中,所述文献出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

[0228] 2.1.2.2.选择用于产生能生育的XY雌性动物的能力增强的XY多能或全能细胞或克隆

[0229] 提供用于确定动物XY多能或全能细胞或克隆在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY动物的倾向的方法和组合物。动物XY多能或全能细胞克隆在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY动物的倾向与那些克隆中的 Ddx3y、Uty和Eif2s3y的表达或活性逆相关。这些基因中的一者或者在动物XY多能或全能细胞(例如XY ES细胞)中的表达丧失可预测哪些细胞克隆将在F0代中产生XY雌性动物:观察到的对Ddx3y、Uty和Eif2s3y的沉默程度越大, XY ES细胞克隆在F0代中产生能生育的呈表型雌性的X Y动物的倾向越高(参见例如实施例3)。同样,这些基因中的一者或者在动物XY多能或全能细胞(例如XY ES细胞)中的活性丧失或表达和/或活性降低可预测哪些细胞克隆将在F0代中产生XY雌性动物:观察到的Ddx3y、Uty和Eif2s3y的表达越低,XY ES细胞克隆在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY动物的倾向越高(参见例如实施例3)。换句话说,这些基因中的一者或者的表达和/或活性可为用于预测XY雌性产生的替代标志。

[0230] 这个信息可用于选择在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY动物的倾向较高的动物XY多能或全能细胞。举例来说,当在雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)中维持一个或多个动物XY多能或全能细胞(例如ES细胞)的群体时,这种方法可包括测定一个或多个动物XY多能或全能细胞的Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或者的表达和/或活性,以及选择具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或者的降低表达和/或活性的供体动物XY多能或全能细胞,其中所述供体动物XY多能或全能细胞能够在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY动物。举例来说,这种供体动物XY多能或全能细胞可具有Ddx3y、Uty、Eif2s3y、Ddx3y和Uty、Ddx3y 和Eif2s3y、Uty和Eif2s3y、或Ddx3y、Uty和Eif2s3y的降低表达和/或活性。

[0231] 可接着将供体动物XY多能或全能细胞引入宿主胚胎中,其中所述宿主胚胎能够在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY动物。举例来说,宿主胚胎可为前桑椹胚期胚胎,并且可在引入供体动物XY多能或全能细胞后将宿主胚胎培养至胚泡期。在本文其它地方公开动物、胚胎、用于将供体XY多能或全能细胞引入胚胎中的方法、以及产生F0动物的方法。

[0232] 在本文其它地方公开雌性化培养基(例如基础培养基和适于维持所培养的动物XY多能或全能细胞的补充物,其中基础培养基具有约200m0s m/kg至小于约329m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度)以及用于在所述培养基中维持细胞的方法。

[0233] 可在测定步骤之前和/或在引入宿主胚胎中之前,在培养基中维持动物 XY多能或全能细胞持续各种时间量。举例来说,可在测定步骤和/或引入宿主胚胎中之前,在雌性化培养基中维持动物XY多能或全能细胞至少1 天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12 天、13天、2周、3周或4周。或者,可在测定步骤和/或引入宿主胚胎中之前,在雌性化培养基中维持动物XY多能或全能细胞至多1天、2天、3 天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、2 周、3周或4周。在一些方法中,在雌性化培养基中培养或维持XY多能或全能细胞直至将细胞注射至胚胎中。在其它方法中,在雌性化培养基中培养或维持向其中注射XY多能或全能细胞的胚胎直至被转移至代孕母体中。

[0234] 测定步骤可包括测定克隆自身以及测定Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或者的

表达或活性的水平。或者，测定步骤可包括测定源于克隆的若干亚克隆，以及测定例如具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性或缺乏Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达和/或活性的亚克隆的百分比。或者，测定步骤可包括测定源于克隆的若干亚克隆，以及测定亚克隆之间Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的比较表达和/或活性。Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达和/或活性可被降低，或Ddx3y、Uty和Eif2s3y全部的表达和/或活性都可被降低。或者，供体动物XY多能或全能细胞缺乏Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达和/或活性，或缺乏Ddx3y、Uty和Eif2s3y全部的表达和/或活性。举例来说，可缺乏Ddx3y、Uty和Eif2s3y全部的可检测表达。

[0235] 可在蛋白质水平或mRNA水平上评估表达。多肽的表达水平可例如通过测定细胞或生物体中所述多肽的水平来直接测量(例如蛋白质印迹分析、FACS分析、ELISA)，或例如通过测量所述多肽的活性来间接测量。在其它情况下，可使用包括例如DNA印迹分析、DNA测序、PCR分析、RNA印迹分析、定量RT-PCR分析、下一代测序(NGS)、微阵列分析或表型分析的方法来测量基因的降低表达和/或活性。举例来说，可通过RT-PCR、RNA-seq、数字PCR或用于测量mRNA水平的任何其它适合方法测量mRNA水平来评估基因的表达。作为一个实例，可相对于对照基因诸如B2 m，通过RT-PCR来测量RNA水平。在一些情况下，举例来说，对照基因(例如B2m)与靶标基因之间的 $\Delta Ct$ 可为至少2、至少4、至少6或至少8。同样，在一些情况下，在30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40个循环之后，将不存在靶标基因的可检测RNA。

[0236] 任选地，当测量mRNA或多肽的表达水平时，可进行对照实验以确认存在Y染色体。举例来说，通过使用针对Y染色体上的不同基因组序列的探针，可进行TAQMAN®拷贝数测定以确认存在Y染色体的一个拷贝。所述测定被设计来测量基因组内的拷贝数变化。

[0237] 主题细胞、胚胎或动物中的基因或它编码的蛋白质的表达或活性的降低可包括当相较于适当对照细胞、胚胎或动物、或者对照细胞、胚胎或动物的群体时，表达或活性水平具有任何统计显著降低。一般来说，如果表达或活性在统计上低于源于其的适当对照细胞、胚胎或动物(例如已在不是雌性化培养基的适当对照培养基中培养的动物XY多能细胞，尽管它在雌性化培养基中培养但历史上产生完全雄性小鼠的动物XY多能细胞)中的表达或活性，那么表达或活性被降低。这种降低包括相对于对照细胞，降低至少1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或更大。统计显著性意指 $p \leq 0.05$ 。表达或活性降低可在任何阶段通过任何机理来发生。举例来说，表达降低可通过在转录期间、转录后、翻译期间、或翻译后发生的事件或调控来发生。

[0238] “主题细胞”是已在雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)中培养的细胞，或是从在雌性化培养基中培养的细胞起源的细胞。“对照”或“对照细胞”提供用于测量主题细胞的表型变化的参照点。对照细胞优选尽可能与主题细胞密切匹配(例如相应细胞可源于相同细胞系或相同克隆，或可具有相同基因型)，例外之处是它不在雌性化培养基中培养，或尽管它在雌性化培养基中培养但缺乏产生XY雌性小鼠的能力或所述能力降低。举例来说，对照细胞可包括：(a)与主题细胞具有相同基因型或源于相同细胞系或克隆，但已在不是雌性化培养基的适当对照培养基(例如DMEM或足以维持动物XY多能或全能细胞的多能性或全能性，但不通过给予与它产生能生育的雌性子代的能力来改变细胞的另一类型的培养基)中培养的细胞；(b)在遗传上与主题细胞相同或源于相同细胞系或克隆，但在遗传上未改变或未暴露于将给予与它产生能生育的雌性XY动物的潜力的条件或刺激的动物XY

多能或全能细胞;和(c)在雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)中培养,但尽管它在雌性化培养基中培养但历史上产生完全雄性动物的动物XY多能和全能细胞。

[0239] 在一些实验中,在雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)中维持动物XY多能或全能细胞(例如ES细胞)或克隆的群体,并且测定两个或更多个细胞或克隆的Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达和/或活性。可接着将具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的最低表达和/或活性的细胞或克隆选择为供体动物XY多能或全能细胞或克隆,其中所述供体动物XY多能或全能细胞能够在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY动物。

[0240] 选择具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体动物XY多能或全能细胞可导致作为呈表型雌性的XY动物的F0子代的百分比较高,作为能生育的呈表型雌性的XY动物的F0子代的百分比较高,作为能生育的呈表型雌性的XY动物的F0 XY子代的百分比较高,能生育的F0 XY雌性的百分比较高,F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性的平均终生窝数较高,以及F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性的平均同窝仔畜数较高。在使用本文其它地方公开的方法将供体XY多能或全能动物细胞引入宿主胚胎中以及孕育所述宿主胚胎之后,可由所述细胞产生所述F0子代。

[0241] 增加可为当相较于适当对照时的任何统计显著增加。举例来说,当相较于适当对照时,增加可为至少1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍或5倍。

[0242] 举例来说,通过选择具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体动物XY多能或全能细胞,可使作为呈表型雌性的XY动物的F0子代或F0 XY子代的百分比增加。在一些方法中,当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的XY多能或全能动物细胞的F0子代时,对于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体XY多能或全能动物细胞的F0子代,作为呈表型雌性的XY动物的F0子代或F0 XY子代的百分比更高。

[0243] 通过选择具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体动物XY多能或全能细胞,也可使作为能生育的呈表型雌性的XY动物的F0子代或F0 XY子代的百分比增加。在一些方法中,当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的XY多能或全能动物细胞的F0子代时,对于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体XY多能或全能动物细胞的F0子代,作为能生育的呈表型雌性的XY动物的F0子代或F0 XY子代的百分比更高。

[0244] 通过选择具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体动物XY多能或全能细胞,也可使能生育的F0 XY雌性的百分比增加。在一些方法中,当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的XY多能或全能动物细胞的F0 XY子代时,对于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体XY多能或全能动物细胞的F0 XY子代,能生育的F0 XY雌性的百分比更高。

[0245] 通过选择具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体动物XY多能或全能细胞,也可使能够产生正常窝数和/或正常同窝仔畜数(例如相较于野生型雌性动物)的F0 XY雌性的百分比增加。在一些方法中,当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的XY多能或全能动物细胞的F0 XY子代时,

对于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体XY多能或全能动物细胞的F0 XY子代,能够产生正常窝数和/或正常同窝仔畜数的F0 XY雌性的百分比更高。

[0246] 通过选择具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体动物XY多能或全能细胞,也可使由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均同窝仔畜数增加。在一些方法中,当相较于源于具有 Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性时,对于源于具有Dd x3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性,由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均同窝仔畜数更高。

[0247] 通过选择具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体动物XY多能或全能细胞,也可使由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均终生窝数增加。在一些方法中,当相较于源于具有 D dx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性时,对于源于具有Ddx3 y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性,由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均终生窝数更高。

[0248] 通过选择具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体动物XY多能或全能细胞,也可使由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均终生后代数增加。在一些方法中,当相较于源于具有 Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性时,对于源于具有Dd x3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性,由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均终生后代数更高。

[0249] 也提供用于确定动物XY多能或全能细胞或克隆在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY动物的倾向的试剂盒。所述试剂盒可包括例如针对Dd x3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的检测试剂。检测试剂可测量Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达和/或活性水平。举例来说,检测试剂可用于检测动物多能或全能细胞中的Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的mRNA或蛋白质表达水平。这种检测试剂可包括用于检测动物多能或全能细胞中的Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达的一个或多个引物组和/或一种或多种探针。

[0250] 所述试剂盒也可包括标签。试剂盒通常含有提供使用试剂盒的说明的标签。标签通常是指在试剂盒的制造、运输、销售或使用期间的任何时间附着于或另外随附于试剂盒的任何书面或记录材料。举例来说,术语标签包括宣传散页和小册、包装材料、说明书、音频或视频卡带、计算机磁盘以及直接压印在试剂盒上的文字。

[0251] 所述试剂盒可进一步包括用于使用检测试剂以及使检测与动物XY多能或全能细胞或克隆在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY动物的预测倾向相关联的说明书。

[0252] 2.1.3. 使Sry蛋白的水平和/或活性降低的修饰

[0253] 具有使Y染色体的区域沉默的修饰的XY多能或全能细胞可进一步包含导致Sry蛋

白的水平和/或活性降低的遗传修饰以使一些细胞转变成具有发育成能生育的雌性动物的潜力的XY多能或全能细胞,以致细胞可被植入接受者胚胎中并产生能生育的雌性子代。同样,在如本文其它地方公开的雌性化培养基中培养的XY多能或全能细胞可包含导致Sry蛋白的水平和/或活性降低的遗传修饰,或可达成它们不包含导致Sry蛋白的水平和/或活性降低的遗传修饰。“性别决定区Y”蛋白或“Sry”蛋白是作为DNA结合蛋白的高迁移率族(HMG)框家族的成员的转录因子。Sry是使雄性性别决定启始的睾丸决定因子。来自多种生物体的Sry蛋白的序列是已知的,包括来自小鼠(登记号Q05738);大鼠(GenBank:CAA61882.1)、人(登记号Q\_05066);猫(登记号Q67C50)和马(登记号P36389),其各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

[0254] 用于通过对XY多能或全能细胞进行修饰以使Sry蛋白的水平和/或活性降低来在F0代中制备呈表型雌性的XY动物的方法公开于WO 2015/20 0805和US 2015/0376651中,所述专利各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文。在一些遗传背景下(例如使用具有来自C57BL/6品系的Y染色体的VGB6小鼠ES细胞系),对ES细胞进行修饰以使Sry的水平和/或活性降低以及使用所述细胞来产生F0小鼠会产生呈表型雌性的F0 XY小鼠,但所有小鼠都不能生育或无生殖力。这个不生育性或极其有限的生育性也已由其他人报道。参见例如Kato等(2013)Scientific Reports 3:3136以及Vernet等(2014)Development 141:855-866。然而,在其它遗传背景下(例如使用具有来自129品系的Y染色体的VGF1小鼠ES细胞系),对ES细胞进行修饰以使Sry的水平和/或活性降低以及使用所述细胞来产生F0 小鼠会产生呈表型雌性的F0 XY小鼠,其中大多数能生育。通过进一步在如本文公开的雌性化培养基中培养这些VGF1细胞,甚至更高百分比的呈表型雌性的F0 XY小鼠可为能生育的。参见WO 2015/200805和US 2015 /0376651,其各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

[0255] 对XY多能或全能细胞进行修饰以不仅包含导致Sry蛋白的水平和/或活性降低的遗传修饰而且也包含Y染色体的额外区域的沉默可促进XY F0 能生育的雌性的发育(例如通过增加XY F0雌性产生和/或通过进一步增加 XY F0雌性的生育性和/或生殖力)。当相较于不具有导致Sry蛋白的水平和/或活性降低的遗传修饰的XY多能或全能细胞时,这种修饰组合可使是在达到性成熟后能生育的呈表型雌性的XY动物的F0 XY子代的百分比、能生育的F0 XY雌性的百分比、或能够产生正常窝数和同窝仔畜数(例如相较于野生型雌性动物)的F0 XY雌性的百分比增加。

[0256] 一般来说,如果Sry蛋白的蛋白质水平和/或活性水平在统计上低于尚未被遗传修饰或诱变以抑制Sry蛋白的表达和/或活性的适当对照细胞中的 Sry的蛋白质水平,那么Sry蛋白的水平和/或活性被降低。举例来说,相对于尚未被修饰以具有Sry蛋白的降低水平和/或活性的对照细胞,Sry蛋白的浓度和/或活性降低至少1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或更大。

[0257] “主题细胞”是其中已实现遗传改变诸如本文公开的遗传修饰的细胞,或是从如此改变的细胞起源,并且包含所述改变的细胞。“对照”或“对照细胞”提供用于测量主题细胞的表型变化的参照点。对照细胞可尽可能与Sry 活性降低的细胞密切匹配,例外之处是它缺乏导致活性降低的遗传修饰或突变(例如相应细胞可源于相同细胞系)。在其它情况下,对照细胞可包括例如:(a)野生型细胞(即与用于达成导致主题细胞的遗传改变的起始材料具有相同基因型);(b)与起始材料具有相同基因型,但已用无效构建体(即用对目标性状不

具有已知作用的构建体,诸如包含标记基因的构建体)遗传修饰的细胞;(c)是主题细胞的非遗传修饰子代的细胞(即对照细胞和主题细胞源于相同细胞系);(d)与主题细胞在遗传上相同,但未暴露于将改变Sry蛋白水平和/或活性水平的条件或刺激的细胞;或(e)在遗传修饰不导致表达的Sry蛋白水平和/或活性水平的改变所处的条件下的主题细胞自身。

[0258] Sry多肽的表达水平可例如通过测定细胞或生物体中的Sry多肽的水平来直接测量,或例如通过测量Sry多肽的活性来间接测量。用于测定Sry蛋白的活性的各种方法是已知的。参见Wang等(2013)Cell 153:910-918; Mandalos等(2012)PLOS ONE 7:e45768:1-9;以及Wang等(2013)Nat Biotechnol.31:530-532,其各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

[0259] 在其它情况下,使用包括例如DNA印迹分析、DNA测序、PCR分析、RNA印迹分析、定量RT-PCR分析、下一代测序(NGS)、微阵列分析或表型分析的方法选择具有使Sry多肽的活性和/或水平降低的靶向遗传修饰的细胞。

[0260] Sry蛋白的水平和/或活性降低可通过对Sry基因或对影响或调控Sry蛋白的水平或活性的基因组基因座的靶向遗传修饰来实现。所述靶向修饰可包括例如添加一个或多个核苷酸,缺失一个或多个核苷酸,取代一个或多个核苷酸,敲除目标多核苷酸或其一部分,敲入目标多核苷酸或其一部分,用异源性核酸序列替换内源性核酸序列,或其组合。举例来说,可使至少1、2、3、4、5、7、8、9、10种或更多种核苷酸变化以形成靶向基因组修饰。各种方法可用于产生靶向遗传修饰。参见例如Wang等(2013)Cell 153:910-918;Mandalos等(2012)PLOS ONE 7:e45768:1-9;以及Wang等(2013)Nat Biotechnol.31:530-532,其各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文。此外,本文所述的各种方法可用于将靶向遗传修饰引入Sry基因或其它基因组基因座中。

[0261] 用于产生使Sry蛋白的水平和/或活性降低的靶向遗传修饰的各种方法可被使用,并且在本文其它地方公开。

[0262] 对Sry基因或对任何其它靶标基因组基因座的靶向遗传修饰可当在本文其它地方公开的雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)(例如促进XY F0能生育的雌性的发育的培养基)中维持细胞(例如ES细胞)时发生。或者,对Sry基因或其它靶标基因组基因座的靶向遗传修饰可当在不同培养基中维持细胞,以及任选随后转移至本文其它地方公开的雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)(例如促进XY F0能生育的雌性的发育的培养基)中时发生。

[0263] Sry多肽的活性和/或水平也可通过向细胞中引入抑制Sry多肽的水平或活性的多核苷酸来降低或消除。多核苷酸可通过阻止Sry信使RNA的翻译来直接抑制Sry多肽的表达,或通过编码抑制编码Sry蛋白的基因的转录的多肽来间接抑制Sry多肽的表达。或者,通过向细胞中引入编码抑制Sry多肽的活性的多肽的序列来降低或消除Sry多肽的活性。

[0264] Sry蛋白的水平和/或活性也可通过使用使Sry蛋白的活性和/或水平降低的条件性Sry等位基因来调控。“条件性Sry等位基因”包括被设计来在所需发育时间和/或在所需目标组织内具有Sry蛋白的降低水平和/或活性的经修饰Sry基因。水平和/或活性降低可相较于缺乏产生条件性等位基因的修饰的对照细胞,或在在所需发育时间活性降低的情况下,相较于之前和/或之后时间,或在所需组织的情况下,相较于所有组织的平均活性。举例来说,条件性Sry等位基因可包括Sry的条件性无效等位基因,其可在所需发育时间点和/或

在特定组织中被切断。这种条件性等位基因可用于产生源于任何基因靶向克隆的能生育的XY雌性。如本文其它地方所述，这种方法使得能够在F1代中产生所需纯合性遗传修饰。所述方法提供快速考察表型，而不必交配以获得F2代。

[0265] 条件性Sry等位基因也可为如US 2011/0104799中所述的多功能性等位基因，所述专利出于所有目的以引用的方式整体并入本文。举例来说，这种条件性等位基因可包含：(a) 关于靶标基因的转录呈有义定向的触动序列和呈有义或反义定向的药物选择盒(DSC)；(b) 呈反义定向的目标核苷酸序列(NSI)和倒位条件性模块(COIN)，其利用外显子分割性内含子和可倒位基因诱捕样模块(参见例如US 2011/0104799，其出于所有目的以引用的方式整体并入本文)；和(c) 在暴露于第一重组酶后重组以形成(i) 缺乏触动序列和DSC，以及(ii) 含有呈有义定向的NSI和呈反义定向的COIN的条件性等位基因的可重组单元。

[0266] Sry基因的条件性等位基因可在任何细胞类型中产生，并且不限于XY 多能或全能细胞。所述细胞类型以及用以靶向Y染色体上的基因组基因座的非限制性方法在本文其它地方进一步详细讨论。

[0267] 2.1.4. 组合

[0268] 可使用于对XY多能或全能动物细胞进行修饰以使Y染色体的区域沉默的所提供方法和组合物与涉及在雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)中培养XY多能或全能动物细胞的方法和/或涉及对XY多能或全能动物细胞进行修饰以使Sry蛋白的水平和/或活性降低的方法组合。同样，可使涉及在雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)中培养XY多能或全能动物细胞的方法与用于对XY多能或全能动物细胞进行修饰以使Y染色体的区域沉默的所提供方法和组合物和/或涉及对XY多能或全能动物细胞进行修饰以使Sry蛋白的水平和/或活性降低的方法组合。XY多能或全能细胞可进一步包含对靶标基因组基因座的至少一个额外靶向遗传修饰。

[0269] 在其中在雌性化培养基中培养XY多能或全能细胞的方法中，可对于整个沉默过程或仅对于整个沉默过程的一个或多个部分，在雌性化培养基中培养细胞。也就是说，在其中在雌性化培养基中培养XY多能或全能细胞以及其中通过另一沉默过程来使Y染色体的区域沉默的方法中，可对于整个沉默过程或仅对于整个沉默过程的一个或多个部分，在雌性化培养基中培养细胞。同样，可在沉默过程之前和/或期间和/或之后，在雌性化培养基中培养细胞。在进一步包括在雌性化培养基中维持细胞与使Sry蛋白的水平和/或活性降低两者的方法中，可对于使Sry蛋白的水平和/或活性降低的整个过程或仅对于过程的一个或多个部分，在雌性化培养基中培养细胞。同样，可在使Sry蛋白的水平和/或活性降低的过程之前和/或期间和/或之后，在雌性化培养基中培养细胞。

[0270] 在一些与涉及在雌性化培养基中培养XY多能或全能细胞的方法的所述组合中，可在雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)中维持 XY多能或全能细胞，但通过除在雌性化培养基中维持细胞以外的手段或除在雌性化培养基中维持细胞之外也共同采用的手段来实现Y染色体的区域的沉默。在一些与涉及对XY多能或全能细胞进行修饰以使Sry蛋白的水平和/或活性降低的方法的所述组合中，Y染色体的区域的沉默可为包含Y染色体的在Sry基因外部的部分的区域的沉默。

[0271] 在一个实施例中，除Y染色体上的一个或多个额外基因之外，也使Sry基因沉默。尽管对机理的了解不为实践所需，但Sry的沉默可使所述XY 胚胎中的性别逆转增强(例如

由于生殖腺体细胞中在约11.0dpc的沉默),并且Y染色体上的一个或多个其它基因的沉默可使由性别逆转的XY胚胎产生的XY雌性的生育性和/或生殖力增强(例如由于卵母细胞中在约18.5 dpc以及之后的沉默)。举例来说,可使Zfy2基因与Sry基因两者沉默(例如在来自C57BL品系、C57BL/6品系或除129以外的品系,或具有来自C57 BL品系、C57BL/6品系或除129以外的品系的Y染色体的小鼠XY ES细胞中),并且任选在本文公开的雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)中培养XY多能或全能动物细胞。在一些方法中,Sry的沉默可使X Y胚胎中的性别逆转增强(例如由于生殖腺体细胞中在约11.0dpc的沉默),并且Zfy2的沉默可使XY雌性的生育性和/或生殖力增强(例如由于卵母细胞中在约18.5dpc以及之后的沉默)。

[0272] 所述组合可导致是呈表型雌性的XY动物的F0子代的百分比较高,是能生育的呈表型雌性的XY动物的F0子代的百分比较高,是能生育的呈表型雌性的XY动物的F0 XY子代的百分比较高,能生育的F0 XY雌性的百分比较高,F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性的平均终生窝数较高,以及F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性的平均同窝仔畜数较高。在使用本文其它地方公开的方法将供体XY多能或全能动物细胞引入宿主胚胎中以及孕育所述宿主胚胎之后,可由所述细胞产生所述F0子代。

[0273] 增加可为当相较于适当对照时的任何统计显著增加。举例来说,当相较于适当对照时,增加可为至少1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍或5倍。

[0274] 举例来说,通过使用本文公开的组合,可使是呈表型雌性的XY动物的F0子代或F0 XY子代的百分比增加。在一些方法中,当相较于源于未被修饰以使Sry蛋白的水平和/或活性降低的XY多能或全能动物细胞的F0 子代时,对于源于被修饰以使Y染色体的区域沉默以及进一步被修饰以使 Sry蛋白的水平和/或活性降低的供体XY多能或全能动物细胞的F0子代,是呈表型雌性的XY动物的F0子代或F0 XY子代的百分比更高。同样,在一些方法中,当相较于源于未被修饰以使Y染色体的区域沉默的XY多能或全能动物细胞的F0子代时,对于源于被修饰以使Y染色体的区域沉默以及进一步被修饰以使Sry蛋白的水平和/或活性降低的供体XY多能或全能动物细胞的F0子代,是呈表型雌性的XY动物的F0子代或F0 XY子代的百分比更高。

[0275] 在一些方法中,当相较于源于在适当对照培养基(例如基于DMEM的培养基)中培养的XY多能或全能动物细胞的F0子代时,对于源于被修饰以使Y染色体的区域沉默以及在雌性化培养基中培养的供体XY多能或全能动物细胞的F0子代,是呈表型雌性的XY动物的F0子代或F0 XY子代的百分比更高。同样,在一些方法中,当相较于源于未被修饰以使Y染色体的区域沉默的XY多能或全能动物细胞的F0子代时,对于源于被修饰以使Y染色体的区域沉默以及在雌性化培养基中培养的供体XY多能或全能动物细胞的F0子代,是呈表型雌性的XY动物的F0子代或F0 XY子代的百分比更高。

[0276] 通过使用本文公开的组合,也可使是能生育的呈表型雌性的XY动物的F0子代或F0 XY子代的百分比增加。在一些方法中,当相较于源于未被修饰以使Sry蛋白的水平和/或活性降低的XY多能或全能动物细胞的F0 子代时,对于源于被修饰以使Y染色体的区域沉默以及进一步被修饰以使 Sry蛋白的水平和/或活性降低的供体XY多能或全能动物细胞的F0子代,是能生育的呈表型雌性的XY动物的F0子代或F0 XY子代的百分比更高。同样,在一些方

法中,当相较于源于未被修饰以使Y染色体的区域沉默的 XY多能或全能动物细胞的F0子代时,对于源于被修饰以使Y染色体的区域沉默以及进一步被修饰以使Sry蛋白的水平和/或活性降低的供体XY多能或全能动物细胞的F0子代,是能生育的呈表型雌性的XY动物的F0子代或F0 XY子代的百分比更高。

[0277] 在一些方法中,当相较于源于在适当对照培养基(例如基于DMEM的培养基)中培养的XY多能或全能动物细胞的F0子代时,对于源于被修饰以使Y染色体的区域沉默以及在雌性化培养基中培养的供体XY多能或全能动物细胞的F0子代,是能生育的呈表型雌性的XY动物的F0子代或F0 XY子代的百分比更高。同样,在一些方法中,当相较于源于未被修饰以使Y染色体的区域沉默以及在雌性化培养基中培养的供体XY多能或全能动物细胞的F0子代时,对于源于被修饰以使Y染色体的区域沉默以及在雌性化培养基中培养的供体XY多能或全能动物细胞的F0子代,是能生育的呈表型雌性的XY动物的F0子代或F0 XY子代的百分比更高。

[0278] 通过使用本文公开的组合,也可使能生育的F0 XY雌性的百分比增加。在一些方法中,当相较于源于未被修饰以使Sry蛋白的水平和/或活性降低的XY多能或全能动物细胞的F0 XY子代时,对于源于被修饰以使Y染色体的区域沉默以及进一步被修饰以使Sry蛋白的水平和/或活性降低的供体XY多能或全能动物细胞的F0 XY子代,能生育的F0 XY雌性的百分比更高。同样,在一些方法中,当相较于源于未被修饰以使Y染色体的区域沉默的XY多能或全能动物细胞的F0 XY子代时,对于源于被修饰以使Y染色体的区域沉默以及进一步被修饰以使Sry蛋白的水平和/或活性降低的供体XY多能或全能动物细胞的F0 XY子代,能生育的F0 XY雌性的百分比更高。

[0279] 在一些方法中,当相较于源于在适当对照培养基(例如基于DMEM的培养基)中培养的XY多能或全能动物细胞的F0 XY子代时,对于源于被修饰以使Y染色体的区域沉默以及在雌性化培养基中培养的供体XY多能或全能动物细胞的F0 XY子代,能生育的F0 XY雌性的百分比更高。同样,在一些方法中,当相较于源于未被修饰以使Y染色体的区域沉默的XY多能或全能动物细胞的F0 XY子代时,对于源于被修饰以使Y染色体的区域沉默以及在雌性化培养基中培养的供体XY多能或全能动物细胞的F0 XY子代,能生育的F0 XY雌性的百分比更高。

[0280] 通过使用本文公开的组合,也可使能够产生正常窝数和/或正常同窝仔畜数(例如相较于野生型雌性动物)的F0 XY雌性的百分比增加。在一些方法中,当相较于源于未被修饰以使Sry蛋白的水平和/或活性降低的XY多能或全能动物细胞的F0 XY子代时,对于源于被修饰以使Y染色体的区域沉默以及进一步被修饰以使Sry蛋白的水平和/或活性降低的供体XY多能或全能动物细胞的F0 XY子代,能够产生正常窝数和/或正常同窝仔畜数的F0 XY雌性的百分比更高。同样,在一些方法中,当相较于源于未被修饰以使Y染色体的区域沉默的XY多能或全能动物细胞的F0 XY子代时,对于源于被修饰以使Y染色体的区域沉默以及进一步被修饰以使Sry蛋白的水平和/或活性降低的供体XY多能或全能动物细胞的F0 XY子代,能够产生正常窝数和/或正常同窝仔畜数的F0 XY雌性的百分比更高。

[0281] 在一些方法中,当相较于源于在适当对照培养基(例如基于DMEM的培养基)中培养的XY多能或全能动物细胞的F0 XY子代时,对于源于被修饰以使Y染色体的区域沉默以及在雌性化培养基中培养的供体XY多能或全能动物细胞的F0 XY子代,能够产生正常窝数和/或正常同窝仔畜数的F0 XY雌性的百分比更高。同样,在一些方法中,当相较于源于未被修饰

以使Y染色体的区域沉默的XY多能或全能动物细胞的F0 XY子代时,对于源于被修饰以使Y染色体的区域沉默以及在雌性化培养基中培养的供体XY多能或全能动物细胞的F0 XY子代,能够产生正常窝数和/或正常同窝仔畜数的F0 XY雌性的百分比更高。

[0282] 通过使用本文公开的组合,也可使由F0 XY雌性或能生育的F0 XY 雌性产生的平均同窝仔畜数增加。在一些方法中,当相较于源于未被修饰以使Sry蛋白的水平和/或活性降低的XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性时,对于源于被修饰以使Y染色体的区域沉默以及进一步被修饰以使Sry蛋白的水平和/或活性降低的供体XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性,由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均同窝仔畜数更高。同样,在一些方法中,当相较于源于未被修饰以使Y染色体的区域沉默的XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性时,对于源于被修饰以使Y染色体的区域沉默以及进一步被修饰以使Sry蛋白的水平和/或活性降低的供体XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性,由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均同窝仔畜数更高。

[0283] 在一些方法中,当相较于源于在适当对照培养基(例如基于DMEM的培养基)中培养的XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 X Y雌性时,对于源于被修饰以使Y染色体的区域沉默以及在雌性化培养基中培养的供体XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY 雌性,由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均同窝仔畜数更高。同样,在一些方法中,当相较于源于未被修饰以使Y染色体的区域沉默的 XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性时,对于源于被修饰以使Y染色体的区域沉默以及在雌性化培养基中培养的供体XY 多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性,由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均同窝仔畜数更高。

[0284] 通过使用本文公开的组合,也可使由F0 XY雌性或能生育的F0 XY 雌性产生的平均终生窝数增加。在一些方法中,当相较于源于未被修饰以使Sry蛋白的水平和/或活性降低的XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性时,对于源于被修饰以使Y染色体的区域沉默以及进一步被修饰以使Sry蛋白的水平和/或活性降低的供体XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性,由F0 XY雌性或能生育的 F0 XY雌性产生的平均终生窝数更高。同样,在一些方法中,当相较于源于未被修饰以使Y染色体的区域沉默的XY多能或全能动物细胞的F0 XY 雌性或能生育的F0 XY雌性时,对于源于被修饰以使Y染色体的区域沉默以及进一步被修饰以使Sry蛋白的水平和/或活性降低的供体XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性,由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均终生窝数更高。

[0285] 在一些方法中,当相较于源于在适当对照培养基(例如基于DMEM的培养基)中培养的XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 X Y雌性时,对于源于被修饰以使Y染色体的区域沉默以及在雌性化培养基中培养的供体XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY 雌性,由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均终生窝数更高。同样,在一些方法中,当相较于源于未被修饰以使Y染色体的区域沉默的 XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性时,对于源于被修饰以使Y染色体的区域沉默以及在雌性化培养基中培养的供体XY 多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性,由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均终生窝数更高。

[0286] 通过使用本文公开的组合,也可使由F0 XY雌性或能生育的F0 XY 雌性产生的平均终生后代数增加。在一些方法中,当相较于源于未被修饰以使Sry蛋白的水平和/或活性降低的XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性时,对于源于被修饰以使Y染色体的区域沉默以及进一步被修饰以使Sry蛋白的水平和/或活性降低的供体XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性,由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均终生后代数更高。同样,在一些方法中,当相较于源于未被修饰以使Y染色体的区域沉默的XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性时,对于源于被修饰以使Y染色体的区域沉默以及进一步被修饰以使Sry蛋白的水平和/或活性降低的供体XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性,由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均终生后代数更高。

[0287] 在一些方法中,当相较于源于在适当对照培养基(例如基于DMEM的培养基)中培养的XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 X Y雌性时,对于源于被修饰以使Y染色体的区域沉默以及在雌性化培养基中培养的供体XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY 雌性,由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均终生后代数更高。同样,在一些方法中,当相较于源于未被修饰以使Y染色体的区域沉默的 XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性时,对于源于被修饰以使Y染色体的区域沉默以及在雌性化培养基中培养的供体XY 多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性,由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均终生后代数更高。

[0288] 2.2. 体外细胞培养物以及培养和维持所培养的多能或全能细胞的方法

[0289] 进一步提供包含被修饰以使Y染色体的区域沉默的供体XY多能或全能细胞的体外细胞培养物。也提供包含在如本文其它地方公开的雌性化培养基中培养的供体XY多能或全能细胞的体外细胞培养物。也提供用于维持或培养所述细胞的方法和组合物。细胞可进一步包含使Sry蛋白的水平和/或活性降低的修饰。同样,XY多能或全能细胞可进一步包含对靶标基因组基因座的至少一个额外靶向遗传修饰。

[0290] 提供一种用于维持或培养体外培养物中的XY多能或全能细胞的方法,其中在如本文所述的雌性化培养基存在下维持体外培养物中的所述细胞。同样,提供一种用于维持或培养体外培养物中的XY多能或全能细胞的方法,其中所述细胞包含使Y染色体的区域沉默的修饰,并且在本文所述的条件下维持体外培养物中的所述细胞。维持或培养体外培养物中的XY多能或全能细胞的所述方法诸如在于促进在将非人动物XY ES细胞引入宿主胚胎中后以及在孕育宿主胚胎之后,XY F0能生育的雌性动物的数目增加。

[0291] 尽管本文公开的任何培养基都可用于所述维持或培养方法,但一个非限制性实施例包括在包含基础培养基和适于维持或培养所培养的XY多能或全能细胞的补充物的培养基中进行培养。举例来说,培养基可包括如本文其它地方公开的雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基,其中基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基展现约200mOsm/kg至小于约329mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度)。

[0292] 在雌性化培养基中维持XY多能或全能细胞所处的时期可变化。举例来说,可在引入宿主胚胎中之前,在培养基中维持XY多能或全能细胞持续约或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、或13天或2周、3周或4周的时期(例如在引入宿主胚胎中之前在培养基中维持约或至少3 天、约或至少1周、或约或至少2-4周)。同样,可在引入宿主胚胎中之前,在培养基

中维持XY多能或全能细胞持续至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或13天或2周、3周或4周的时期。或者，可在雌性化培养基（例如促成XY能生育的F0雌性的雌性化培养基）中维持（例如冷冻）XY多能或全能细胞，并且可接着在雌性化培养基（例如促成XY能生育的F0雌性的雌性化培养基）中解冻和维持至少1、2、3、4天或更多天，随后将XY多能或全能细胞引入宿主胚胎中。同样，可在雌性化培养基（例如促成XY能生育的F0雌性的雌性化培养基）中维持（例如冷冻）XY多能或全能细胞，并且可接着在雌性化培养基（例如促成XY能生育的F0雌性的雌性化培养基）中解冻和维持至多1、2、3、4天或更多天，随后将XY多能或全能细胞引入宿主胚胎中。举例来说，可使XY多能或全能细胞在雌性化培养基中传代至少一次，此后使细胞冷冻在雌性化培养基中，此后在雌性化培养基中解冻细胞并使其生长约或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或13天或2周、3周或4周，随后引入宿主胚胎中。

[0293] 在一些方法中，在雌性化培养基中培养或维持XY多能或全能细胞直至将细胞注射至胚胎中。在其它方法中，在雌性化培养基中培养或维持向其中注射XY多能或全能细胞的胚胎直至被转移至代孕母体中。

[0294] 2.3.能够在F0代中产生能生育的XY雌性的胚胎

[0295] 进一步提供一种包含具有至少一个被修饰以使Y染色体的区域沉默的异源性供体多能或全能XY细胞的内细胞群的F0胚胎。同样，进一步提供一种包含具有至少一个在如本文其它地方公开的雌性化培养基中培养或维持的异源性供体多能或全能XY细胞的内细胞群的F0胚胎。异源性供体多能或全能XY细胞可通过本文公开的方法来产生。异源性供体多能或全能XY细胞可进一步包含使Sry蛋白的水平和/或活性降低的修饰。同样，异源性供体多能或全能XY细胞可进一步包含对靶标基因组基因座的至少一个额外靶向遗传修饰。

[0296] 所述胚胎可通过将供体XY多能或全能动物细胞引入宿主胚胎中来产生。举例来说，胚胎可为前桑椹胚期胚胎，并且可在引入供体XY多能或全能细胞之后将胚胎培养至胚泡期。在其中在雌性化培养基（例如低克分子渗透压重量浓度培养基）中培养供体动物XY多能或全能细胞的方法中，可在引入宿主胚胎中之前，在雌性化培养基中维持动物XY多能或全能细胞持续任何时期。举例来说，可在引入宿主胚胎中之前，在雌性化培养基中维持动物XY多能或全能细胞至少1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、2周、3周或4周。或者，可在引入宿主胚胎中之前，在雌性化培养基中维持动物XY多能或全能细胞至多1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、2周、3周或4周。

[0297] 在一些F0胚胎中，异源性供体多能或全能XY细胞和/或宿主胚胎不来自以下中的一者或者：南美原鼠属某些种（Akodon spp.）、林旅鼠属某些种（Myopus spp.）、田鼠属某些种（Microtus spp.）、鼹属某些种（Talpa spp.）。同样，在一些方法中，异源性供体多能或全能XY细胞和/或宿主胚胎不来自正常野生型特征是XY雌性生育性的任何物种。在其中异源性供体多能或全能细胞和/或宿主胚胎包含额外遗传修饰的一些方法中，遗传修饰不是XYY或XXY、Tdy阴性（即Sry阴性）性别逆转、Tdy阳性别性别逆转、X0修饰、非整倍性、 $Fgf9^{-/-}$ 基因型或Sox9修饰。

[0298] 2.4.产生F0能生育的XY雌性和F1子代的方法

[0299] 采用具有包括Y染色体的区域的沉默的修饰的XY多能或全能细胞的各种方法和组合物可用于产生任选包含对靶标基因组基因座的额外靶向遗传修饰的能生育的F0 XY雌性动物。同样，采用在如本文其它地方公开的雌性化培养基中培养或维持的XY多能或全能细胞的各种方法和组合物可用于产生任选包含对靶标基因组基因座的额外靶向遗传修饰的能生育的F0 XY雌性动物。举例来说，通过本文公开的方法产生的F0 XY雌性动物在与野生型动物杂交以产生F1代时可为能生育的。

[0300] 2.4.1.在F0代中制备能生育的雌性XY动物的方法

[0301] 提供用于在F0代中制备能生育的雌性XY动物的方法和组合物。也提供通过所述方法产生的所得能生育的呈表型雌性的XY动物。用于在F0代中制备能生育的呈表型雌性的XY动物的方法可包括(a)将本文其它地方公开的任何经修饰供体XY多能或全能细胞(即能够在F0代中产生能生育的X Y雌性的供体XY多能或全能细胞)引入宿主胚胎中；(b)将来自步骤(a)的所述宿主胚胎引入接受者雌性动物中以及孕育所述宿主胚胎；和(c)获得包括呈表型雌性的XY动物的F0 XY动物子代，其中在达到性成熟后所述F0 呈表型雌性的XY动物能生育。用于在F0代中制备能生育的呈表型雌性的 XY动物的其它方法可包括(a)将本文其它地方公开的任何经修饰胚胎引入接受者雌性动物中以及孕育所述胚胎；和(b)获得包括呈表型雌性的XY动物的F0 XY动物子代，其中在达到性成熟后所述F0呈表型雌性的XY动物能生育。

[0302] 已植入胚胎中的细胞可被称为“供体细胞”，并且已接受细胞的胚胎可被称为“宿主胚胎”。在一些方法中，供体XY多能或全能细胞或宿主胚胎可包含对靶标基因组基因座的至少一个额外靶向遗传修饰。举例来说，采用的XY多能或全能细胞可包含(1)用以使Y染色体的区域沉默的修饰和(2)对一个或多个靶标基因组基因座的一个或多个额外靶向遗传修饰。所述修饰在本文其它地方详细公开。如本文其它地方所概述，可在XY多能或全能细胞中进行至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10种或更多种额外靶向遗传修饰。在所述情况下，F0能生育的雌性XY动物可包含这些额外靶向遗传修饰中的一者或多者。携带经遗传修饰的基因组基因座的动物可通过如本文所述的等位基因修饰(MOA) 测定来鉴定。

[0303] 供体XY多能或全能细胞可与宿主胚胎来自相同品系，或与宿主胚胎来自不同品系。同样，代孕母体可与供体XY多能或全能细胞和/或宿主胚胎来自相同品系，或代孕母体可来自与供体XY多能或全能细胞和/或宿主胚胎的品系不同的品系。

[0304] XY多能或全能细胞的基因型可与宿主胚胎的基因型相同或不同。举例来说，可将XY供体细胞植入XX宿主胚胎中。

[0305] 可采用多种宿主胚胎。可将XY供体细胞植入例如2细胞期、4细胞期、8细胞期、16细胞期、32细胞期或64细胞期宿主胚胎中。举例来说，可将XY多能或全能细胞引入来自相应生物体的前桑椹胚期胚胎(例如8细胞期胚胎)中。参见例如US 7,576,259; US 7,659,442; US 7,294,754; 和 US 2008-0078000 A1，其各自以引用的方式整体并入本文。同样，宿主胚胎可为例如胚泡、前胚泡胚胎、前桑椹胚期、桑椹胚期、未致密桑椹胚期或致密桑椹胚期。或者，宿主胚胎可为聚集的桑椹胚期宿主胚胎。在小鼠的情况下，宿主胚胎期可为例如蒂勒期(Theiler Stage) 1 (TS1)、TS2、TS3、 TS4、TS5或TS6胚胎(例如选自TS1、TS2、TS3和TS4)，参照Theiler (1989) “The House Mouse:Atlas of Mouse Development,” Springer-Verlag,

New York 中所述的蒂勒期。在其中宿主胚胎包含透明带的方法中,可通过透明带中的孔来将供体细胞(例如以及XY ES细胞)引入宿主胚胎中。也可使用无区带胚胎。

[0306] 在一些方法中,供体多能或全能细胞和/或宿主胚胎不来自以下中的一者或者:南美原鼠属某些种、林旅鼠属某些种、田鼠属某些种、鼴属某些种。同样,在一些方法中,供体细胞和/或宿主胚胎不来自正常野生型特征是XY雌性生育性的任何物种。在其中供体细胞和/或宿主胚胎包含额外遗传修饰的一些方法中,遗传修饰不是XYY或XXY、Tdy阴性(即Sry阴性)性别逆转、Tdy阳性性别逆转、X0修饰、非整倍性、 $Fgf9^{-/-}$ 基因型或So x9修饰。

[0307] 核转移技术也可用于产生动物。简要来说,用于核转移的方法可包括以下步骤:(1)使卵母细胞去核;(2)分离待与去核卵母细胞组合的供体细胞或核;(3)将细胞或核插入去核卵母细胞中以形成重构细胞;(4)将重构细胞植入动物的子宫中以形成胚胎;和(5)使胚胎发育。在所述方法中,卵母细胞通常从死亡动物撷取,但它们也可从活体动物的输卵管和/或卵巢分离。可在去核之前使卵母细胞在为本领域普通技术人员所知的多种培养基中成熟。可以为本领域普通技术人员所熟知的许多方式进行卵母细胞去核。通常通过在融合之前将供体细胞显微注射在透明带下来将供体细胞或核插入去核卵母细胞中以形成重构细胞。融合可通过跨越接触/融合平面施加DC 电脉冲(电融合);通过使细胞暴露于融合促进化学物质诸如聚乙二醇;或通过失活病毒诸如仙台病毒(Sendai virus)的方式来诱导。重构细胞通常在使核供体和接受者卵母细胞融合之前、期间和/或之后通过电学和/或非电学手段来活化。活化方法包括电脉冲、化学诱导冲击、通过精子来渗透、增加卵母细胞中的二价阳离子的水平、以及降低卵母细胞中的细胞蛋白质的磷酸化(如通过激酶抑制剂的方式)。活化的重构细胞或胚胎通常在为本领域普通技术人员所熟知的培养基中培养,接着转移至动物的子宫中。参见例如 US 2008/0092249; WO 1999/005266 A2; US 2004/0177390; WO 2008/0 17234 A1; 和美国专利号7,612,250,其各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

[0308] 可孵育包含供体XY多能或全能细胞的宿主胚胎直至胚泡期,接着植入代孕母体中以产生F0动物。可接着在代孕母体中孕育宿主胚胎。

[0309] 在一些方法中,可在植入适合宿主中之前,在促进XY能生育雌性ES 细胞的发育的雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基或低盐基础培养基)中维持包含供体XY多能或全能细胞的宿主胚胎一天、两天、三天或四天或更多天。或者,可在植入适合宿主中之前,在促进XY能生育雌性ES细胞的发育的雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基或低盐基础培养基)中维持包含供体XY多能或全能细胞的宿主胚胎至少一天、两天、三天或四天或更多天或至多一天、两天、三天或四天或更多天。提供的所述方法可促进产生F0能生育的雌性动物。

[0310] 在一些方法中,在将供体非人动物XY多能或全能细胞(例如XY ES 细胞或XY iPS 细胞)引入宿主胚胎中以及孕育所述宿主胚胎后,至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或全部的F0子代或F0 X Y子代是呈表型雌性的XY动物。

[0311] 通过这些方法产生的F0 XY雌性动物的生育性和生殖力可与野生型X X雌性动物类似。在一些方法中,在将供体非人动物XY多能或全能细胞(例如XY ES细胞或XY iPS细胞)引入宿主胚胎中以及孕育所述宿主胚胎后,至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、

70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或全部的F0子代是在达到性成熟后能生育的呈表型雌性的XY动物。

[0312] 在一些方法中,至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或全部的F0 XY子代是在达到性成熟后能生育的呈表型雌性的XY动物。

[0313] 在一些方法中,至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或全部的源于供体XY多能或全能细胞的F0雌性具有XY基因型。

[0314] 在一些方法中,至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或全部的源于供体XY多能或全能细胞的F0雌性能生育。

[0315] 在一些方法中,至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或全部的源于供体XY多能或全能细胞的F0雌性能够产生与野生型X X雌性小鼠类似的窝数和/或每窝幼仔数和/或终生后代数。在一些方法中, F0能生育的XY雌性非人动物可在它的终生期间产生1、2、3、4、5、6、7、8、9或10窝(例如2-6窝)。在一些方法中,至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或全部的源于供体XY多能或全能细胞的F0 雌性能够在它们的终生中产生1、2、3、4、5、6、7、8、9或10窝(例如2 -6窝)。在一些方法中,F0能生育的XY雌性非人动物可产生每窝至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10只后代(即幼仔)(例如每窝4-6只后代)。在一些方法中,至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或全部的源于供体XY多能或全能细胞的F0雌性能够产生具有每窝至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10只后代(即幼仔)(例如每窝4-6只后代)的各窝。举例来说,F0能生育的XY雌性非人动物可产生2-6窝,其中每窝具有至少2、3、4、5或6只后代。在一些方法中,至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或100%的后代是XY能生育雌性后代(例如15%-25%的后代是XY能生育雌性后代)。

[0316] 在其它实施方案中,由所述方法产生的F0子代有约3%、约10%或更多、或约63%或更多源于供体XY多能或全能细胞。

[0317] 本文提供的方法和组合物使至少1%、3%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或更多的F0动物具有靶向遗传修饰(例如导致Y染色体的区域沉默的靶向遗传修饰和/或对另一靶标基因组基因座的靶向遗传修饰)以将遗传修饰传递至F1 子代中。

[0318] 在一些方法中,一个或多个F0代雌性XY非人动物(例如至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或全部的F0代雌性XY非人动物)有至少90%,92%,94%,96%,98%,99%或99.8%源于供体XY多能或全能细胞。举例来说,一个或多个F0雌性XY非人动物可具有100%源于供体XY多能或全能细胞的毛色。宿主胚胎细胞对F0代中的非人雌性XY 动物的贡献可例如通过能够将处于2,000个细胞中的1个细胞(0.05%)检测出的定量测定来确定,并

且雌性XY动物没有组织就宿主胚胎细胞贡献而言是阳性。

[0319] 2.4.2. 使能生育的雌性XY F0代交配的方法

[0320] 在一些方法中,使源于具有使Y染色体的区域沉默的遗传修饰的XY 多能或全能细胞(即XY ES细胞或XY iPS细胞)的所得能生育的XY雌性F0 代与动物杂交以获得F1代后代。F0代雌性XY非人动物可有至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%、至少99%、至少 99.5%或完全源于供体XY多能或全能细胞(例如XY ES细胞)。

[0321] 同样,可使源于由本文公开的任何其它方法(例如通过使用如本文其它地方公开的低克分子渗透压重量浓度培养基或其它雌性化培养基)获得的 XY多能或全能细胞的所得能生育的XY雌性F0代与动物杂交以获得F1 代后代。F0代雌性XY非人动物可有至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%、至少99%、至少99.5%或完全源于供体XY 多能或全能细胞(例如XY ES细胞)。子代(例如F1子代和/或任何或全部其它代子代)可达成至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或全部的XY子代具有正常雄性表型,或具有正常雄性表型并且能生育。在一些情况下,小于20%、小于15%、小于10%、小于5%、小于1%或无XY子代(例如F1子代和/或任何或全部其它代子代)呈表型雌性的。在一些情况下,全部XY子代(例如F1子代和/或任何或全部其它代子代)具有正常雄性表型,或具有正常雄性表型并且能生育。在一些情况下,至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或全部的子代具有基于基因型(即XY或X X)的预期性别表型(即雄性或雌性)。

[0322] F0代雌性XY非人动物可与其交配的非人动物可为也是有至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少 90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%、至少99%、至少 99.5%或完全源于供体XY多能或全能细胞(例如XY ES细胞)的雄性XY非人动物。举例来说,F0雌性XY非人动物和/或雄性XY非人动物可具有 100% 源于供体XY多能或全能细胞的毛色。用于获得F1代后代的交配对可各自在同一F0代中完全源于供体XY多能或全能细胞(例如ES细胞或 iPS细胞)。举例来说,F0 XY雄性可为与F0 XY能生育雌性源于相同XY 多能或全能细胞(例如XY ES细胞)克隆的同辈克隆同胞。F1代子代可是包含完全源于供体ES细胞的基因组。在一些情况下,F0代雄性小鼠和F0 代雌性小鼠杂交产生完全ES细胞源性小鼠的频率是100%。

[0323] 可使用特定引物和/或探针以确定包括Y染色体的区域的沉默的靶向遗传修饰是否存在来分析F1子代的基因型。如果额外靶向遗传修饰存在于F0代中(例如使Sry蛋白的水平和/或活性降低的修饰、或对靶标基因组基因座的一种或多种额外靶向遗传修饰),那么可使用确定所述修饰是否存在的特定引物和/或探针分析F1子代的基因型。可接着鉴定适于所需用途的F1子代。举例来说,可选择缺乏包括Y染色体的区域的沉默的遗传修饰的F1子代,或可选择缺乏包括Y的区域的沉默的遗传修饰,但包含对靶标基因组基因座的至少一个额外靶向遗传修饰的F1子代。在用特定引物和/或探针分析基因型之后,可使就对靶标基因组基因座的额外靶向遗传修饰而言是杂合的,以及缺乏包括Y染色体的区域的沉默的遗传修饰的F1 动物彼此杂交。这种杂交产生就所关注的经遗传修饰的基因组基因座而言是纯

合的,以及不包含用以使Y染色体的区域沉默的遗传修饰的F2子代。

[0324] 进一步提供一种在F1代中产生就对靶标基因组基因座的靶向遗传修饰而言是纯合的转基因非人动物的方法。方法包括(a)使具有包括Y染色体的区域的沉默的修饰的F0 XY能生育雌性非人动物与F0 XY雄性非人动物杂交,其中所述F0 XY能生育雌性非人动物和所述F0 XY雄性非人动物各自就对靶标基因组基因座的靶向遗传修饰而言是杂合的,和(b)获得就对靶标基因组基因座的靶向遗传修饰而言是纯合的F1子代。在一些方法中,F0 XY雄性是与F0 XY能生育雌性源于相同多能或全能细胞克隆的同辈克隆同胞。举例来说,可选择就对靶标基因组基因座的靶向遗传修饰而言是纯合的,但缺乏使Y染色体的区域沉默的修饰的F1子代。如果F0 XY能生育雌性进一步包含使Sry蛋白的水平和/或活性降低的修饰,那么可选择就对靶标基因组基因座的靶向遗传修饰而言是纯合的,但缺乏使Y 染色体的区域沉默的修饰和使Sry蛋白的水平和/或活性降低的修饰中的一者或两者的F1子代。

[0325] 2.5. 用于产生靶向遗传修饰的方法

[0326] 可使用用于产生靶向遗传修饰(例如使Y染色体的区域沉默,使Sry蛋白的水平和/或活性降低,或对如本文其它地方公开的任何额外靶标基因组基因座进行修饰的靶向遗传修饰)的各种方法和组合物。一种产生靶向遗传修饰的手段是通过重组来达成,其包括在两个多核苷酸之间交换遗传信息的任何过程。响应于双链断裂(DSB)的重组主要通过以下两个保守DNA修复途径来发生:非同源性末端接合(NHEJ)和同源性重组(HR)。参见Kaspar ek 和Humphrey (2011) Seminars in Cell&Dev.Biol.22:886-897,其据此出于所有目的以引用的方式整体并入本文。NHEJ包括通过使断裂末端直接彼此连接而无需同源性模板来修复核酸中的双链断裂。由NHEJ达成的对非连续序列的连接可常常在双链断裂的位点附近导致缺失、插入或易位。所述系统例如适用于产生靶向功能丧失遗传修饰。

[0327] 重组也可通过同源性定向修复(HDR)或同源性重组(HR)来发生。HDR 或HR包括可需要核苷酸序列同源性,使用“供体”分子来对“靶标”分子(即经受双链断裂的分子)的修复提供模板,并且导致遗传信息从供体向靶标转移的核酸修复形式。在不希望受任何特定理论束缚下,所述转移可涉及对在断裂的靶标与供体之间形成的异源双链体DNA的错配修正,和/或合成依赖性链退火,其中供体用于再合成将成为靶标的一部分的遗传信息,和/ 或相关过程。在一些情况下,供体多核苷酸、供体多核苷酸的一部分、供体多核苷酸的拷贝、或供体多核苷酸的拷贝的一部分整合至靶标DNA中。用于产生所述靶向遗传修饰的非限制性方法在本文其它地方详细讨论,包括例如使用靶向质粒、小型靶向载体(smallTVEC)或大型靶向载体。也参见 Wang等 (2013) Cell 153:910-918;Mandalos等 (2012) PLOS ONE 7:e45768:1-9;以及Wang等 (2013) Nat Biotechnol.31:530-532,其各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

[0328] 用于产生靶向遗传修饰的方法可包括例如单独或与一种或多种如本文其它地方所述的核酸酶组合使用靶向载体(例如smallTVEC或LTVEC)。参见例如US 2015/0159175、US 2015/0159174、US 2014/0310828、US 2014/0309487和US 2013-0309670,其各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文。同样,用于产生靶向遗传修饰的方法可包括单独或与靶向载体组合使用一种或多种核酸酶。

[0329] 举例来说,提供用于对细胞中的靶标基因组基因座(例如在Y染色体上) 进行修饰的方法,其包括:(a)向所述细胞中引入一种或多种在处于或接近所述靶标基因组基因座的

识别位点处诱导一个或多个切口或双链断裂的核酸酶试剂;和(b)鉴定至少一个在它的基因组中在所述靶标基因组基因座处包含修饰的细胞。

[0330] 用于对细胞中的靶标基因组基因座进行修饰的其它方法包括: (a) 向所述细胞中引入包含由对应于5' 和3' 靶标位点的5' 和3' 同源臂侧接的插入多核苷酸的靶向载体; 和(b) 鉴定至少一个在它的基因组中包含整合在所述靶标基因组基因座处的所述插入多核苷酸的细胞。

[0331] 用于对细胞中的靶标基因组基因座进行修饰的其它方法包括: (a) 向所述细胞中引入: (i) 核酸酶试剂, 其中所述核酸酶试剂在所述靶标基因组基因座内的识别位点处诱导切口或双链断裂; 和(ii) 包含由对应于足够邻近于所述识别位点定位的5' 和3' 靶标位点的5' 和3' 同源臂侧接的插入核酸的靶向载体; 和(c) 鉴定至少一个在所述靶标基因组基因座处包含修饰(例如所述插入核酸的整合)的细胞。

[0332] 使Y染色体的区域沉默的靶向遗传修饰和任何其它靶向遗传修饰(例如使Sry蛋白的水平和/或活性降低的修饰或对任何靶标基因组基因座的靶向遗传修饰)可当在本文其它地方公开的雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)(例如促进XY F0能生育的雌性的发育的培养基)中维持多能或全能XY细胞时发生。或者, 使Y染色体的区域沉默的靶向遗传修饰和/或对任何其它靶标基因组基因座的靶向遗传修饰可当在不同培养基中维持多能或全能XY细胞时发生。任选地, 可随后将细胞转移至本文其它地方公开的雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)(例如促进XY F0能生育的雌性的发育的培养基)中。

[0333] 可同时或依序引入使Y染色体的区域沉默的靶向遗传修饰和任何其它靶向遗传修饰(例如使Sry蛋白的水平和/或活性降低的修饰或对任何其它靶标基因组基因座的靶向遗传修饰)。

#### [0334] 2.5.1. 核酸酶试剂

[0335] 在所需识别位点中诱导切口或双链断裂的任何核酸酶试剂都可用于本文公开的方法和组合物中。可采用天然存在的或天然的核酸酶试剂, 或可采用经修饰或经工程改造的核酸酶试剂(例如从它的天然形式加以工程改造(修饰或获得)以在所需识别位点中进行特异性识别和诱导切口或双链断裂的核酸酶)。

[0336] 一种类型的核酸酶试剂是转录活化子样效应物核酸酶(TALEN)。TAL 效应物核酸酶通过使天然的或工程改造的转录活化子样(TAL)效应物或其功能性部分融合于核酸内切酶(诸如像FokI)的催化结构域来创建。参见W O 2010/079430; Morbitzer等(2010) PNAS 10.1073/pnas.1013133107; Scholze和Boch(2010) Virulence 1:428-432; Christian等 Genetics (2010) 186:757-761; Li等(2010) Nuc. Acids Res. (2010) doi:10.1093/nar/gkq704; 以及Miller等(2011) Nature Biotechnology 29:143-148, 其各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文。适合TAL核酸酶和用于制备适合TAL 核酸酶的方法的实例例如公开于US 2011/0239315A1、US 2011/0269234 A1、US 2011/0145940 A1、US 2003/0232410 A1、US 2005/0208489 A 1、US 2005/0026157 A1、US 2005/0064474 A1、US 2006/0188987 A1 和US 2006/0063231 A1中, 所述专利各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

[0337] 另一类型的核酸酶试剂是锌指核酸酶(ZFN)。在一些ZFN中, ZFN的各单体包含3个或更多个基于锌指的DNA结合结构域, 其中各基于锌指的 DNA结合结构域结合3bp子位点。

在其它ZFN中，ZFN是包含基于锌指的DNA结合结构域可操作地连接于独立核酸酶诸如FokI核酸内切酶的嵌合蛋白。举例来说，核酸酶试剂可包含第一ZFN和第二ZFN，其中所述第一ZFN和所述第二ZFN各自可操作地连接于FokI核酸酶亚单位，其中所述第一ZFN和所述第二ZFN识别靶标DNA序列的各链中由约5-7bp间隔体分隔的两个连续靶标DNA序列，并且其中Fok I核酸酶亚单位进行二聚化以创建产生双链断裂的活性核酸酶。参见例如US20060246567;US20 080182332;US20020081614;US20030021776;WO/2002/057308A2;US2 0130123484;US20100291048;WO/2011/017293A2;以及Gaj等(2013) Trends in Biotechnology, 31 (7) :397-405,其各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

[0338] 另一类型的核酸酶试剂是兆碱基大范围核酸酶。兆碱基大范围核酸酶已基于保守序列基序被分类成四个家族，所述家族是LAGLIDADG、GIY-YIG、H-N-H和His-Cys框家族。这些基序参与金属离子的配位和磷酸二酯键的水解。兆碱基大范围核酸酶以它们的长识别位点以及以容许它们的DNA底物中的一些序列多态性而著称。兆碱基大范围核酸酶结构域、结构和功能是已知的。参见例如Guhan和Muniyappa(2003) Crit Rev Biochem Mol Biol 38:199-248;Lucas等,(2001) Nucleic Acids Res 29:960-9;Jurica和Stoddard,(1999) Cell Mol Life Sci 55:1304-26;Stoddard,(2006) Q Rev Biophys 38:49-95;以及Moure等,(2002) Nat Struct Biol 9:764。

[0339] 核酸酶试剂可进一步包括限制核酸内切酶，其包括I型、II型、III型和IV型核酸内切酶。I型和III型限制核酸内切酶识别特定识别位点，但通常在离开核酸酶结合位点的可变位置处裂解，所述结合位点可远离裂解位点(识别位点)数百个碱基对。在II型系统中，限制活性不依赖于任何甲基酶活性，并且裂解通常发生在结合位点内或附近的特定位点处。大多数II型酶切割回文序列，然而，IIa型酶识别非回文识别位点并在识别位点外部裂解，IIb型酶切割序列两次，其中两个位点均在识别位点外部，并且IIc型酶识别不对称识别位点并在一侧以及在离开识别位点约1-20个核苷酸的确定距离处裂解。IV型限制酶靶向甲基化DNA。限制酶例如于REBASE 数据库(网页在rebase.neb.com处;Roberts等,(2003) Nucleic Acids Res 31:418-20);Roberts等,(2003) Nucleic Acids Res 31:1805-12;以及Belfort等,(2002),Mobile DNA II,第761-783页,Craigie等编,(ASM Press,Washington,DC)中进一步描述和分类，所述参考资料各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

[0340] 核酸酶试剂可进一步包括成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)/CRI SPR相关(Cas)系统或所述系统的组分。CRISPR/Cas系统包括Cas基因的表达中涉及或指导Cas基因的活性的转录物和其它要素。CRISPR/Cas系统利用CRISPR复合物(包含引导RNA(gRNA)与Cas蛋白复合)来对核酸进行定点裂解。参见例如WO/2013/176772A1、WO/2014/065596A1、WO/2014/089290A1、WO/2014/093622A2、WO/2014/099750A2、WO/2013142578A1、WO 2014/131833A1、US 2015/0159175、US 2015/0159174、US 2014/031 0828和US 2014/0309487,其各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

[0341] 诸如Cas9的Cas蛋白通常包含至少一个与引导RNA(gRNA)相互作用的RNA识别或结合结构域以及一个或多个核酸酶结构域。Cas蛋白也可为融合蛋白，例如用以调控基因的转录或表达。举例来说，可使Cas蛋白融合于裂解结构域、表观遗传修饰结构域、转录活化结构域或转录阻遏结构域。参见WO 2014/089290,其出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

Cas9家族成员的实例描述于WO 2014/131833中,所述专利出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

[0342] “引导RNA”或“gRNA”包括结合Cas蛋白,并且使所述Cas蛋白靶向靶标DNA内的特定位置的RNA分子。引导RNA可包含两个区段：“DNA 靶向区段”和“蛋白质结合区段”。一些gRNA包含两个单独RNA分子：(1) “活化RNA”（“反式作用性CRISPR RNA”或“tracrRNA”或“骨架”）；和(2) “靶向RNA”（“CRISPR RNA”或“靶向RNA”或“crRNA”或“crRNA重复序列”）。crRNA包含gRNA的DNA靶向区段(单链)与形成gRNA的蛋白质结合区段的dsRNA双链体的一半的核苷酸链段两者。相应tracrRNA(活化RNA)包含形成gRNA的蛋白质结合区段的dsRNA双链体的另一半的核苷酸链段。crRNA的核苷酸链段与tracrRNA的核苷酸链段互补和杂交以形成gRNA的蛋白质结合结构域的dsRNA双链体。因此,各crRNA可被称为具有相应tracrRNA。

[0343] 其它gRNA是单一RNA分子(单一RNA多核苷酸),其也可被称为“单分子gRNA”、“单引导RNA”或“sgRNA”。参见例如WO/2013/176772A1、WO/2014/065596A1、WO/2014/089290A1、WO/2014/093622A2、WO/2014/099750A2、WO/2013142578A1和WO 2014/131833A1,其各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文。术语“引导RNA”和“gRNA”包括双分子g RNA与单分子gRNA两者。

[0344] crRNA和相应tracrRNA杂交以形成gRNA。crRNA另外提供杂交于靶标DNA中的CRISPR RNA识别序列的单链DNA靶向区段。参见例如Ma li等(2013)Science 339:823-826; Jinnek等(2012)Science 337:816-821; Hwang等(2013)Nat.Biotechnol.31:227-229; Jiang等(2013)Nat.Biotechnol.31:233-239;以及Cong等(2013)Science 339:819-823,其各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文。由Cas9对靶标DNA的位点特异性裂解可发生在由(i) gRNA与靶标DNA之间的碱基配对互补性与(ii) 靶标DNA中的称为原间隔体邻近基序(PAM)的短基序两者决定的位置处。PAM 可侧接于CRISPR RNA识别序列。

#### [0345] 2.5.2. 靶向载体

[0346] 靶向载体可用于将核酸插入物引入基因组靶标基因座中,并且包含所述核酸插入物和侧接于所述核酸插入物的同源臂。靶向载体可呈线性形式或呈环状形式,并且可为单链或双链。为便于引用,同源臂在本文中被称为5' 和3' (即上游和下游) 同源臂。这个术语涉及靶向载体内同源臂相对于核酸插入物的位置。5' 同源臂和3' 同源臂分别对应于靶标基因座内的在本文中被称为“5' 靶标序列”和“3' 靶标序列”的区域。

[0347] 核酸插入物包括待整合在基因组靶标基因座处的DNA区段。在靶标基因座处整合核酸插入物可导致向所述靶标基因座中添加目标核酸序列,使在所述靶标基因座处的目标核酸序列缺失,和/或替换在所述靶标基因座处的目标核酸序列。此外,核酸插入物或在靶标基因座处被替换的相应核酸可具有任何所需长度,包括例如长度在约10个核苷酸至约500kb之间或更长。

[0348] 核酸插入物可包括编码选择标记、报告子基因或一个或多个表达盒或缺失盒的多核苷酸。给定盒可包含目标核苷酸序列、编码选择标记和/或报告子基因的核酸以及影响表达的各种调控组分。

[0349] 插入核酸可包括侧接有位点特异性重组靶标序列(例如loxP、lox511、lox2272、lox66、lox71、loxM2、lox5171、FRT、FRT11、FRT71、attP、att、FRT、rox)的核酸。整个插入核酸可由所述位点特异性重组靶标序列侧接,或插入核酸内的任何目标区域或个别多核苷酸

可由所述位点侧接。举例来说，位点特异性重组位点可侧接于插入核酸内含有的编码选择标记和/或报告子基因的多核苷酸。在插入核酸整合在靶向基因座处之后，可移除位点特异性重组位点之间的序列。

[0350] 同源臂和靶标序列“对应”，或彼此“对应”，此时两个区域彼此共有足以充当同源性重组反应的底物的序列同一性水平。术语“同源性”包括DNA序列与相应序列同一或共有与相应序列的序列同一性。给定靶标序列与见于靶向载体上的相应同源臂之间的序列同一性可为允许发生同源性重组的任何程度的序列同一性。此外，同源臂与相应靶标序列之间具有同源性的相应区域可具有足以促进在裂解的识别位点处进行同源性重组的任何长度。举例来说，给定同源臂和/或相应靶标序列可包含具有同源性的相应区域，其长度例如是约5kb至约300kb或更长，以使所述同源臂具有足以经受与细胞的基因组内的相应靶标序列的同源性重组的同源性。

[0351] 核酸酶试剂(例如CRISPR/Cas系统)可与靶向载体组合采用以有助于对靶标基因座的修饰。所述核酸酶试剂可促进靶向载体与靶标基因座之间的同源性重组。当核酸酶试剂与靶向载体组合采用时，所述靶向载体可包含对应于5'和3'靶标序列的5'和3'同源臂，所述靶标序列足够邻近于核酸酶裂解位点定位以便在所述核酸酶裂解位点处产生切口或双链断裂后促进在靶标序列与同源臂之间发生同源性重组事件。如果距离诸如在于在识别位点处产生切口或双链断裂后促进在5'和3'靶标序列与同源臂之间发生同源性重组事件，那么靶向基因座内的对应于靶向载体的5'和3'同源臂的靶标序列“足够邻近于核酸酶裂解位点定位”。

[0352] 相较于单独使用靶向载体，组合使用靶向载体(包括例如大型靶向载体(LTVEC)或小型靶向载体(smallTVEC))与核酸酶试剂可导致靶向效率增加。

#### [0353] 2.5.2.1. 小型靶向载体 (SmallTVEC)

[0354] 一些方法利用小型靶向载体或smallTVEC。使用smallTVEC来对Y染色体产生靶向遗传修饰的实施例例如公开于WO 2015/200805和US 2015/0376651中，所述专利各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文。“smallTVEC”包括包含短同源臂的靶向载体。smallTVEC上的同源臂的长度可为例如约400bp至约1000bp。smallTVEC的同源臂可具有足以促进与相应靶位点的同源性重组事件的任何长度，包括例如约400bp至约500bp、约500bp至约600bp、约600bp至约700bp、约700bp至约800bp、约800bp至约900bp、或约900bp至约1000bp。smallTVEC上的同源臂的优选长度是约700bp至约800bp。smallTVEC的5'同源臂和3'同源臂的总和可为例如约0.5kb至约10kb。在所述方法中，相较于具有较长同源臂的靶向载体，同源臂的较短长度可使靶向效率增加。归因于Y染色体具有高度重复序列的性质，所以smallTVEC的短臂可允许在Y染色体上达成高度特异性靶向。

#### [0355] 2.5.2.2. 大型靶向载体 (LTVEC)

[0356] 一些靶向载体是“大型靶向载体”或“LTVEC”，其包括包含对应于和源于大于通常由意图在细胞中进行同源性重组的其它方法使用的那些核酸序列的核酸序列的同源臂的靶向载体。使用LTVEC产生靶向遗传修饰的实施例例如公开于WO 2015/088643、US 2015/0159175、US 2015/0159174、US 2014/0310828、US 2014/0309487和US 2013-0309670中，所述专利各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文。LTVEC也包括包含具有大于通常由意图在细胞中进行同源性重组的其它方法使用的那些核酸序列的核酸序列的核酸插入

物的靶向载体。举例来说,LTVEC使得有可能修饰由于它们的大小限制而不能被传统基于质粒的靶向载体容纳的大型基因座。举例来说,靶向基因座可为(即5'和3'同源臂可对应于)细胞的不可使用常规方法靶向或在不存在由核酸酶试剂(例如Cas蛋白)诱导的切口或双链断裂下仅可不正确靶向或仅可以显著较低效率靶向的基因座。

[0357] LTVEC的实例包括源于细菌人工染色体(BAC)、人人工染色体或酵母人工染色体(YAC)的载体。LTVEC和用于制备它们的方法的非限制性实例例如描述于美国专利号6,586,251;美国专利号6,596,541;美国专利号7,105,348;和WO 2002/036789中,所述专利各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文。LTVEC可呈线性形式或呈环状形式。

[0358] LTVEC可具有任何长度,包括例如至少10kb或约50kb至约400kb或更长。LTVEC的大小可太大以致不能通过常规测定例如DNA印迹和长程(例如1kb至5kb)PCR来筛选靶向事件。5'同源臂和3'同源臂的总和可为例如至少10kb(各同源臂可在例如约5kb至约200kb的范围内)。LTVEC和核酸插入物可被设计来允许在靶标基因座处缺失例如约5kb至约3Mb(例如约500kb或更大)的长度。同样,LTVEC和核酸插入物可被设计来允许向靶标基因座中插入长度例如在约5kb至约400kb或更大的范围内的外源性核酸序列。

#### [0359] 2.5.3. 将组分引入细胞中

[0360] 本文提供用以允许将核酸引入细胞中的各种方法和组合物。在一些情况下,用于引入核酸的系统允许在特定基因组基因座处达成靶向整合。所述系统采用多种组分,并且为便于引用,术语“靶向基因组整合系统”一般地包括为整合事件所需的所有组分(例如核酸酶试剂、核酸酶裂解位点、插入DNA多核苷酸、靶向载体、靶标基因组基因座和目标多核苷酸中的一者或者者)。

[0361] 本文提供的方法可包括向细胞中引入一种或多种包含靶向基因组整合系统的一个或多个组分的多核苷酸或多肽构建体。“引入”包括以序列进入细胞的内部的方式向细胞呈递序列(多肽或多核苷酸)。本文提供的方法不取决于用于将核酸或蛋白质引入细胞中的特定方法,只是为了核酸或蛋白质进入至少一个细胞的内部。用于将核酸和蛋白质引入各种细胞类型中的方法在本领域中是已知的,并且包括例如稳定转染方法、短暂转染方法和病毒介导的方法。

[0362] 转染方案以及用于将多肽或多核苷酸序列引入细胞中的方案可变化。非限制性转染方法包括基于化学的转染方法,使用脂质体;纳米粒子;磷酸钙(Graham等(1973)Virology 52(2):456-67,Bacchetti等(1977)Proc Natl Acad Sci USA 74(4):1590-4,以及Kriegler,M(1991).Transfer and Expression:A Laboratory Manual.New York:W.H.Freeman and Company.第96-97页);树枝状聚合物;或阳离子聚合物诸如DEAE-右旋糖苷或聚乙烯亚胺。非化学方法包括电穿孔、声致穿孔和光学转染。基于粒子的转染包括使用基因枪或磁体辅助转染(Bertram(2006)Current Pharmaceutical Biotechnology 7,277-28)。病毒方法也可用于转染。

[0363] 在一些情况下,将核酸或蛋白质引入细胞中由电穿孔、细胞质内注射、病毒感染、腺病毒、慢病毒、逆转录病毒、转染、脂质介导的转染或Nucleofection<sup>TM</sup>介导。

[0364] 将核酸或蛋白质引入细胞中可一次或历经一段时期多次进行。举例来说,引入可历经一段时期至少两次,历经一段时期至少三次,历经一段时期至少四次,历经一段时期至少五次,历经一段时期至少六次,历经一段时期至少七次,历经一段时期至少八次,历经一

段时期至少九次,历经一段时期至少十次,至少十一次,历经一段时期至少十二次,历经一段时期至少十三次,历经一段时期至少十四次,历经一段时期至少十五次,历经一段时期至少十六次,历经一段时期至少十七次,历经一段时期至少十八次,历经一段时期至少十九次,或历经一段时期至少二十次进行。

[0365] 当将核酸酶试剂与靶向载体(例如LTVEC)两者引入细胞中时,它们可被同时引入。或者,核酸酶试剂可与靶向载体分开引入。举例来说,核酸酶试剂可在引入靶向载体之前引入,或它可在引入靶向载体之后引入。

#### [0366] 2.5.4. 修饰的类型

[0367] 各种类型的靶向遗传修饰可用于使Y染色体的区域沉默(例如通过使Y染色体的区域缺失或破坏)。举例来说,蛋白质的水平和/或活性降低可通过对编码所述蛋白质的基因或对影响或调控所述蛋白质的水平或活性的基因组基因座的靶向遗传修饰来实现。所述靶向修饰可包括例如添加一个或多个核苷酸,缺失一个或多个核苷酸,取代一个或多个核苷酸,点突变,敲除目标多核苷酸或其一部分,敲入目标多核苷酸或其一部分,用异源性、外源性或直系同源核酸序列替换内源性核酸序列,结构域调换,外显子调换,内含子调换,调控序列调换,基因调换或其组合。举例来说,可使至少1、2、3、4、5、7、8、9、10个或更多个核苷酸变化以形成靶向基因组修饰。缺失、插入或替换可具有任何大小,如本文其它地方所公开。各种方法可用于产生靶向遗传修饰。参见例如Wang等(2013)Cell 153:910-918; Mandalos等(2012)PLOS ONE 7:e45768:1-9;以及Wang等(2013)Nat Biotechnol.31:530-532,其各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

[0368] Y染色体上的缺失可为缺失任何核酸序列,诸如与生育性/不生育性或与性发育相关的基因。Y染色体上的缺失可包括缺失多个基因。举例来说,可使1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个基因缺失。如果使用两种核酸酶试剂,那么可使在它们的相应识别位点之间的序列缺失。缺失可例如在约5kb至约10kb、约10kb至约20kb、约20kb至约40kb、约40kb至约60kb、约60kb至约80kb、约80kb至约100kb、约100kb至约150kb、约150kb至约200kb、约200kb至约300kb、约300kb至约400kb、约400kb至约500kb、约500kb至约600kb、约600kb至约700kb、约700kb至约800kb、约800kb至约900kb、约900kb至约1Mb、约500kb至约1Mb、约1Mb至约1.5Mb、约1.5Mb至约2Mb、约2Mb至约2.5Mb、或约2.5Mb至约3Mb的范围内。举例来说,缺失可大于500kb,可为约500kb至约600kb,或约500kb。

[0369] 同样,Y染色体的破坏可为破坏任何核酸序列,诸如与生育性/不生育性或与性发育相关的基因。Y染色体的破坏可包括破坏多个基因。举例来说,可破坏1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个基因。内源性核酸序列的破坏可例如在由核酸酶产生的双链断裂通过非同源性末端接合(NHEJ)介导的DNA修复来修复时产生,所述DNA修复产生包含核酸序列的插入或缺失的突变等位基因,并且由此导致对那个基因组基因座的破坏。破坏的实例包括改变调控元件(例如启动子或增强子),错义突变,无义突变,框移突变,截短突变,无效突变,或插入或缺失少数核苷酸(例如导致框移突变)。破坏可导致等位基因的失活(即功能丧失)或丧失。

#### [0370] 2.5.5. 鉴定具有靶向修饰的细胞

[0371] 各种方法可用于鉴定具有靶向修饰诸如缺失或插入的细胞。所述方法可包括鉴定一个在靶标基因座处(例如在第一CRISPR RNA识别序列与第二CRISPR RNA识别序列之间)

具有靶向修饰的细胞。可进行筛选以鉴定具有经修饰基因组基因座的所述细胞。

[0372] 筛选步骤可包括用于评估亲本染色体的等位基因修饰(MOA)的定量测定。举例来说,定量测定可通过定量PCR诸如实时PCR(qPCR)来进行。实时PCR可利用识别靶标基因座的第一引物组和识别非靶向参照基因座的第二引物组。引物组可包含识别扩增的序列的荧光探针。

[0373] 适合定量测定的其它实例包括荧光介导的原位杂交(FISH)、比较基因组杂交、等温DNA扩增、与固定化探针定量杂交、Invader Probes<sup>®</sup>、MM P测定、Taqman<sup>®</sup>分子信标或Eclipse<sup>TM</sup>探针技术(参见例如US2005/0144 655,其出于所有目的以引用的方式整体并入本文)。

[0374] 2.6. 细胞和动物

[0375] 在以上方法和组合物(例如细胞、胚胎)的情况下动物可包括任何动物,包括哺乳动物、鱼和鸟。哺乳动物包括例如人、非人哺乳动物、非人灵长类动物(例如猴、狨猴、恒河猴和猿)、啮齿动物(例如小鼠、大鼠、仓鼠和豚鼠)、家畜或农业哺乳动物(例如山羊、公牛、鹿、野牛、马科动物物种诸如马、牛科动物物种诸如母牛和阉牛、羊科动物物种诸如绵羊、以及猪科动物物种诸如猪和公猪)、以及驯化哺乳动物(例如猫、狗、兔和雪貂)。鸟包括例如鸡、火鸡、鸵鸟、鹅和鸭。非人动物可为除人以外的任何动物。举例来说,非人动物可为非人哺乳动物、啮齿动物、小鼠、大鼠、仓鼠、猴、农业哺乳动物、家养哺乳动物、鱼或鸟。

[0376] 在以上方法和组合物的情况下多能细胞包括具有发育成超过一种分化细胞类型的能力的任何未分化细胞。举例来说,在以上方法和组合物的情况下多能细胞可为胚胎干(ES)细胞或诱导多能干(iPS)细胞。ES细胞包括在引入胚胎中后能够促发发育胚胎的任何组织的胚胎源性全能或多能细胞。或者,它们可为成体干细胞或发育受限的祖细胞。多能细胞可来自任何动物。举例来说,多能细胞可为人ES细胞、非人ES细胞、哺乳动物ES细胞、非人哺乳动物ES细胞、啮齿动物ES细胞、小鼠ES细胞、大鼠ES细胞或仓鼠ES细胞。

[0377] 对于适合的可遗传修饰多能细胞不可易于获得的那些哺乳动物,其它方法用于使体细胞重新编程以获得多能细胞,诸如通过向体细胞(例如纤维母细胞)中引入包括但不限于Oct3/4、Sox2、KLF4、Myc、Nanog、LIN28 和Gli1的多能性诱导因子的组合。

[0378] 小鼠多能细胞、全能细胞或宿主胚胎可来自任何小鼠品系,包括例如近交系、杂交系和远交系。小鼠品系的实例包括129品系、C57BL品系(例如C57BL/6品系)、129和C57BL/6的混合(例如50%129和50%C57BL/6)、BALB/c品系和Swiss Webster品系。129品系的实例包括129P1、129 P2、129P3、129X1、129S1(例如12951/SV、12951/SvIm)、129S2、129S4、129S5、12959/SvEvH、129S6(129/SvEvTac)、129S7、129S8、129T1和1 29T2(参见例如Festing等(1999)Revised nomenclature for strain 129mice,Mammalian Genome 10: 836)。C57BL品系的实例包括C57BL/A、C57 BL/An、C57BL/GrFa、C57BL/KaLwN、C57BL/6、C57BL/6J、C57BL/6By J、C57BL/6NJ、C57BL/10、C57BL/10ScSn、C57BL/10Cr和C57BL/01a。小鼠可为以上提及的129品系(例如129S6(129/SvEvTac)品系)和以上提及的C57BL/6品系的混合,一个或多个以上提及的129品系的混合,或一个或多个以上提及的C57BL品系的混合。小鼠也可来自排除129品系的品系。举例来说,本文提供的方法中采用的小鼠或小鼠细胞可为129品系和C57 BL/6品系的混合,BALB/c品系和C57BL/6品系的混合,129品系和BAL B/c品系的混合,或BALB/c品系、C57BL/6品系和129品系的混合。举例来说,本文提供的方法中

采用的小鼠或小鼠细胞可至少部分来自BALB/c 品系(例如至少约25%、至少约50%、至少约75%源于BALB/c品系,或约 25%、约50%、约75%或约100%源于BALB/c品系)。在一个实施例中,小鼠或小鼠细胞可具有包含50%BALB/c、25%C57BL/6和25%129的品系。或者,小鼠或小鼠细胞可包括排除BALB/c的品系或品系组合。

[0379] 小鼠XY多能细胞中的Y染色体可来自任何品系。举例来说,小鼠X Y多能细胞(例如小鼠XY ES细胞)中的Y染色体可来自129品系或C57BL/6品系(例如C57BL/6品系)。或者,Y染色体可来自BALB/c品系。具有来自129品系的Y染色体的小鼠XY ES细胞的一实例是VGF1小鼠ES细胞。VGF1(也称为F1H4)小鼠ES细胞源于通过使雌性C57BL/6NTac小鼠与雄性129S6/SvEvTac小鼠杂交产生的杂交胚胎。因此,VGF1ES细胞含有来自129S6/SvEvTac小鼠的Y染色体。参见例如Auerbach,W.等(2000) Bio techniques 29,1024-1028,1030,1032,其出于所有目的以引用的方式整体并入本文。或者,小鼠XY多能细胞中的Y染色体不来自129品系(例如来自C57BL/6品系)。VGB6ES细胞系源于由具有C57BL/6NTac品系的雄性小鼠和雌性小鼠交配产生的单一雄性(XY)胚泡胚胎。

[0380] 大鼠多能细胞、全能细胞或宿主胚胎可来自任何大鼠品系,包括例如近交系、杂交系和远交系。大鼠品系的实例包括ACI大鼠品系、Dark Ago uti(DA)大鼠品系、Wistar大鼠品系、LEA大鼠品系、Sprague Dawley(S D)大鼠品系或Fischer大鼠品系诸如Fisher F344或Fisher F6。大鼠多能细胞、全能细胞或宿主胚胎也可从源于两个或更多个以上叙述的品系的混合的品系获得。举例来说,大鼠多能细胞、全能细胞或宿主胚胎可源于选自 DA品系和ACI品系的品系。ACI大鼠品系被表征为具有黑色环纹,具有白色腹部和足部以及RT1<sup>av1</sup>单倍型。所述品系可从包括Harlan Laboratorie s的多种来源获得。来自ACI大鼠的大鼠ES细胞系的一实例是ACI.G1大鼠ES细胞。Dark Agouti(DA)大鼠品系被表征为具有环纹皮毛和RT1<sup>av1</sup>单倍型。所述大鼠可从包括Charles River和Harlan Laboratories的多种来源获得。来自DA大鼠的大鼠ES细胞系的实例是DA.2B大鼠ES细胞系或 DA.2C大鼠ES细胞系。大鼠品系的其它实例例如提供于US 2014/023593 3、US 2014/0310828和US 2014/0309487中,所述专利各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

[0381] 在一些方法和组合物的情况下,动物不来自以下中的一者或多者:南美原鼠属某些种、林旅鼠属某些种、田鼠属某些种和鼴属某些种。同样,在一些方法和组合物的情况下,动物不是正常野生型特征是XY雌性生育性的任何物种。

[0382] 3.筛选化合物的方法

[0383] 提供用于筛选当在化合物存在下培养动物XY多能或全能细胞或克隆时,对所述细胞或克隆具有雌性化活性(也就是使所述细胞或克隆在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY动物的倾向增加)的化合物的方法和组合物。动物XY多能或全能细胞克隆在F0代中产生能生育的呈表型雌性的X Y动物的倾向与那些克隆中的Ddx3y、Uty和Eif2s3y的表达或活性逆相关。这些基因中的一者或多者在动物XY多能或全能细胞(例如XY ES细胞)中的表达丧失可预测哪些细胞克隆将在F0代中产生XY雌性动物:观察到的对Ddx3y、Uty和Eif2s3y的沉默程度越大,XY ES细胞克隆在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY动物的倾向越高(参见例如实施例3)。同样,这些基因中的一者或多者在动物XY多能或全能细胞(例如XY ES细胞)中的活性丧失或表达和/或活性降低可预测哪些细胞克隆将在F0代中产生XY 雌性动物:观察到的Ddx3y、Uty和Eif2s3y的表达越低,XY ES细胞克隆在F0代中产生能生育的呈表型雌

性的XY动物的倾向越高(参见例如实施例3)。换句话说,这些基因中的一者或更多的表达和/或活性可为用于预测 XY雌性产生的替代标志。

[0384] 这个信息可用于筛选产生在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY动物的倾向较高的动物XY多能或全能细胞的化合物。举例来说,这种方法可包括在包含基础培养基和适于维持细胞的多能性或全能性的补充物的培养基中培养第一群体的非人动物XY多能或全能细胞和第二群体的非人动物XY多能或全能细胞,其中在靶标化合物存在下培养所述第一群体,并且在不存在所述靶标化合物下培养所述第二群体。方法可接着进一步包括测定第一群体和第二群体的每一个中的一个或多个非人动物XY多能或全能细胞的Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或更多的表达和/或活性,借此通过相较于来自第二群体的一个或多个细胞,来自第一群体的一个或多个细胞中的Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或更多的表达和/或活性的降低来鉴定雌性化活性。也就是说,方法可进一步包括测定第一群体和第二群体的每一个中的一个或多个非人动物XY多能或全能细胞的Ddx3y、Uty和Eif 2s3y中的一者或更多的表达和/或活性,接着如果相较于来自第二群体的一个或多个细胞,来自第一群体的一个或多个细胞中的Ddx3y、Uty和Eif2s3 y中的一者或更多的表达和/或活性降低,那么选择靶标化合物。表达和/或活性降低可为Ddx3y、Uty、Eif2s3y、Ddx3y和Uty、Ddx3y和Eif2s3y、Ut y和Eif2s3y、或Ddx3y、Uty和Eif2s3y的表达和/或活性降低。

[0385] 可被筛选的化合物的实例包括抗体、抗原结合蛋白、位点特异性DNA 结合蛋白(例如CRISPR-Cas复合物、CRISPRi文库、CRISPRa文库)、多肽、 $\beta$ 转角模拟物、多糖、磷脂、激素、前列腺素、类固醇、芳族化合物、杂环化合物、苯并二氮呡、寡聚N-取代的甘氨酸以及寡氨基甲酸酯。化合物的大型组合文库可通过WO 1995/012608、WO 1993/006121、WO 1994/008051、WO 1995/035503和WO 1995/030642中所述的编码合成文库(ESL) 方法来构建,所述专利各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文。肽文库也可通过噬菌体展示方法来产生。参见例如US 5,432,018,其出于所有目的以引用的方式整体并入本文。靶向不同基因的CRISPR-Cas系统的引导RNA的文库的使用例如公开于WO 2014/204727、WO 2014/093701、WO 2015/065964、WO 2016/011080、Shalem等(2014) 343 (6166) :84-87 (基因组规模CRISPR-Cas9敲除(GeCKO) 文库) 以及Konermann等(2015) 5 17 (7536) :583-588(CRISPR/Cas9协同活化介体(SAM) 汇合文库) 中,所述专利和文献各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

[0386] 可在靶标化合物存在下培养第一群体的细胞任何时长。举例来说,可在测定之前,在靶标化合物存在下培养第一群体的细胞至少1天、2天、3 天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、2 周、3周或4周。

[0387] 培养基可为足以维持细胞的多能性或全能性,但不改变细胞产生能生育雌性子代的能力的培养基。或者,培养基可为雌性化培养基。在本文其它地方公开雌性化培养基(例如基础培养基和适于维持所培养的动物XY多能或全能细胞的补充物,其中基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基具有约200m0sm/kg至小于约329m0sm/kg的克分子渗透压重量浓度)以及用于在所述培养基中维持细胞的方法。

[0388] 靶标化合物的雌性化活性可以许多方式鉴定。举例来说,雌性化活性可通过在来自第一群体的细胞中缺乏Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或更多的表达和/或活性来鉴定。或者,雌性化活性可通过相较于来自第二群体的细胞,来自第一群体的细胞中的Ddx3y、Uty

和Eif2s3y全部的表达和/或活性降低来鉴定。或者，雌性化活性可通过在来自第一群体的细胞中缺乏 Ddx3y、Uty和Eif2s3y全部的表达和/或活性来鉴定。以下进一步详细讨论用于评估表达和/或活性的方法。

[0389] 一些筛选方法可进一步包括基于Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达和/或活性来从第一群体选择用于在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY非人动物的供体非人动物XY多能或全能细胞，其中所述能生育的呈表型雌性的XY非人动物在所述F0代中的比例与Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达和/或活性逆相关。

[0390] 可接着将供体动物XY多能或全能细胞引入宿主胚胎中，其中所述宿主胚胎能够在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY动物。举例来说，宿主胚胎可为前桑椹胚期胚胎，并且可在引入供体动物XY多能或全能细胞后将宿主胚胎培养至胚泡期。在本文其它地方公开动物、胚胎、用于将供体XY多能或全能细胞引入胚胎中的方法、以及产生F0动物的方法。

[0391] 可在测定步骤之前和/或在引入宿主胚胎中之前，在培养基中维持动物 XY多能或全能细胞持续各种时间量。举例来说，可在测定步骤和/或引入宿主胚胎中之前，在雌性化培养基中维持动物XY多能或全能细胞至少1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、2周、3周或4周。或者，可在测定步骤和/或引入宿主胚胎中之前，在雌性化培养基中维持动物XY多能或全能细胞至多1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、2周、3周或4周。在一些方法中，在雌性化培养基中培养或维持XY多能或全能细胞直至将细胞注射至胚胎中。在其它方法中，在雌性化培养基中培养或维持向其中注射XY多能或全能细胞的胚胎直至被转移至代孕母体中。

[0392] 可在测定来自第一群体的一个或多个细胞的Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达和/或活性之后选择供体细胞。测定步骤可包括测定细胞或克隆自身，以及测定Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达和/或活性的水平。或者，测定步骤可包括测定源于克隆的若干亚克隆，以及测定例如具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性或缺乏Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达和/或活性的亚克隆的百分比。或者，测定步骤可包括测定源于克隆的若干亚克隆，以及测定亚克隆之间Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的比较表达和/或活性。Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达和/或活性可被降低，或Ddx3y、Uty和Eif2s3y全部的表达和/或活性都可被降低。或者，供体动物XY多能或全能细胞缺乏Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达和/或活性，或缺乏Ddx3y、Uty和Eif2s3y全部的表达和/或活性。举例来说，可缺乏Ddx3y、Uty和Eif2s3y全部的可检测表达。

[0393] 可在蛋白质水平或mRNA水平上评估表达。多肽的表达水平可例如通过测定细胞或生物体中所述多肽的水平来直接测量(例如蛋白质印迹分析、FACS分析、ELISA)，或例如通过测量所述多肽的活性来间接测量。在其它情况下，可使用包括例如DNA印迹分析、DNA测序、PCR分析、RNA印迹分析、定量RT-PCR分析、下一代测序(NGS)、微阵列分析或表型分析的方法来测量基因的降低表达和/或活性。举例来说，可通过RT-PCR、RNA-seq、数字PCR或用于测量mRNA水平的任何其它适合方法测量 mRNA水平来评估基因的表达。作为一个实例，可相对于对照基因诸如B2 m，通过RT-PCR来测量RNA水平。在一些情况下，举例来说，对照基因(例如B2m)与靶标基因之间的 $\Delta Ct$ 可为至少2、至少4、至少6或至少8。同样，在一些情况下，在30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40个循环之后，将不存在靶标基因的可检测RNA。

[0394] 任选地,当测量mRNA或多肽的表达水平时,可进行对照实验以确认存在Y染色体。举例来说,通过使用针对Y染色体上的不同基因组序列的探针,可进行TAQMAN<sup>®</sup>拷贝数测定以确认存在Y染色体的一个拷贝。所述测定被设计来测量基因组内的拷贝数变化。

[0395] 主题细胞、胚胎或动物中的基因或它编码的蛋白质的表达或活性的降低可包括当相较于适当对照细胞、胚胎或动物、或者对照细胞、胚胎或动物的群体时,表达或活性水平具有任何统计显著降低。一般来说,如果表达或活性在统计上低于源于其的适当对照细胞、胚胎或动物(例如已在不是雌性化培养基的适当对照培养基中培养的动物XY多能细胞、尽管它在雌性化培养基中培养但历史上产生完全雄性小鼠的动物XY多能细胞)中的表达或活性,那么表达或活性被降低。这种降低包括相对于对照细胞,降低至少1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或更大。统计显著性意指 $p \leq 0.05$ 。表达或活性降低可在任何阶段通过任何机理来发生。举例来说,表达降低可通过在转录期间、转录后、翻译期间、或翻译后发生的事件或调控来发生。

[0396] “主题细胞”是已在雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)中培养的细胞,或是从在雌性化培养基中培养的细胞起源的细胞。“对照”或“对照细胞”提供用于测量主题细胞的表型变化的参照点。对照细胞优选尽可能与主题细胞密切匹配(例如相应细胞可源于相同细胞系或相同克隆,或可具有相同基因型),例外之处是它不在雌性化培养基中培养,或尽管它在雌性化培养基中培养但缺乏产生XY雌性小鼠的能力或所述能力降低。举例来说,对照细胞可包括:(a)与主题细胞具有相同基因型或源于相同细胞系或克隆,但已在不是雌性化培养基的适当对照培养基(例如DMEM或足以维持动物XY多能或全能细胞的多能性或全能性,但不通过给予它产生能生育的雌性子代的能力来改变细胞的另一类型的培养基)中培养的细胞;(b)在遗传上与主题细胞相同或源于相同细胞系或克隆,但在遗传上未改变或未暴露于将给予它产生能生育的雌性XY动物的潜力的条件或刺激的动物XY多能或全能细胞;和(c)在雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)中培养,但尽管它在雌性化培养基中培养但历史上产生完全雄性动物的动物XY多能和全能细胞。举例来说,对照细胞可为已在足以维持细胞的多能性或全能性,但不改变细胞产生能生育雌性子代的能力的培养基中培养的动物XY多能或全能细胞。任选地,表达和/或活性降低可相对于来自第二群体的对照非人动物XY多能或全能细胞。

[0397] 在一些实验中,测定第一群体中的两个或更多个细胞或克隆的Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达和/或活性。可接着将具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的最低表达和/或活性的细胞或克隆选择为供体动物XY多能或全能细胞或克隆,其中所述供体动物XY多能或全能细胞能够在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY动物。

[0398] 选择具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体动物XY多能或全能细胞可导致是呈表型雌性的XY动物的F0子代的百分比较高,是能生育的呈表型雌性的XY动物的F0子代的百分比较高,是能生育的呈表型雌性的XY动物的F0 XY子代的百分比较高,能生育的 F0 XY雌性的百分比较高,F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性的平均终生窝数较高,以及F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性的平均同窝仔畜数较高。在使用本文其它地方公开的方法将供体XY多能或全能动物细胞引入宿主胚胎中以及孕育所述宿主胚胎之后,可由所述细胞产生所述F0子代。

[0399] 增加可为当相较于适当对照时的任何统计显著增加。举例来说,当相较于适当对

照时,增加可为至少1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍或5倍。

[0400] 举例来说,通过选择具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体动物XY多能或全能细胞,可使作为呈表型雌性的XY动物的F0子代或F0 XY子代的百分比增加。在一些方法中,当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的XY多能或全能动物细胞的F0子代时,对于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体XY多能或全能动物细胞的F0子代,作为呈表型雌性的XY动物的F0子代或F0 XY子代的百分比更高。

[0401] 通过选择具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体动物XY多能或全能细胞,也可使作为能生育的呈表型雌性的XY动物的F0子代或F0 XY子代的百分比增加。在一些方法中,当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的XY多能或全能动物细胞的F0子代时,对于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体XY多能或全能动物细胞的F0子代,作为能生育的呈表型雌性的XY动物的F0子代或F0 XY子代的百分比更高。

[0402] 通过选择具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体动物XY多能或全能细胞,也可使能生育的F0 XY雌性的百分比增加。在一些方法中,当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的XY多能或全能动物细胞的F0 XY子代时,对于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体XY多能或全能动物细胞的F0 XY子代,能生育的F0 XY雌性的百分比更高。

[0403] 通过选择具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体动物XY多能或全能细胞,也可使能够产生正常窝数和/或正常同窝仔畜数(例如相较于野生型雌性动物)的F0 XY雌性的百分比增加。在一些方法中,当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的XY多能或全能动物细胞的F0 XY子代时,对于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体XY多能或全能动物细胞的F0 XY子代,能够产生正常窝数和/或正常同窝仔畜数的F0 XY雌性的百分比更高。

[0404] 通过选择具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体动物XY多能或全能细胞,也可使由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均同窝仔畜数增加。在一些方法中,当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性时,对于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性,由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均同窝仔畜数更高。

[0405] 通过选择具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体动物XY多能或全能细胞,也可使由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均终生窝数增加。在一些方法中,当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性时,对于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性,由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均终生

窝数更高。

[0406] 通过选择具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或更多的降低表达和/或活性的供体动物XY多能或全能细胞,也可使由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均终生后代数目增加。在一些方法中,当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或更多的较高表达和/或活性的XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性时,对于源于具有 Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或更多的降低表达和/或活性的供体XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性,由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均终生后代数目更高。

[0407] 4. 使雌性化培养基中的组分的浓度优化的方法

[0408] 提供用于使雌性化培养基中的组分的浓度优化以达成对动物XY多能或全能细胞或克隆的雌性化活性增加(即细胞或克隆在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY动物的倾向增加)的方法和组合物。动物XY多能或全能细胞克隆在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY动物的倾向与那些克隆中的Ddx3y、Uty和Eif2s3y的表达或活性逆相关。这些基因中的一者或者在动物XY多能或全能细胞(例如XY ES细胞)中的表达丧失可预测哪些细胞克隆将在F0代中产生XY雌性动物:观察到的对Ddx3y、Uty和Eif2s3y的沉默程度越大,XY ES细胞克隆在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY动物的倾向越高(参见例如实施例3)。同样,这些基因中的一者或者在动物XY多能或全能细胞(例如XY ES细胞)中的活性丧失或表达和/或活性降低可预测哪些细胞克隆将在F0代中产生XY雌性动物:观察到的 Ddx3y、Uty和Eif2s3y的表达越低,XY ES细胞克隆在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY动物的倾向越高(参见例如实施例3)。换句话说,这些基因中的一者或者的表达和/或活性可为用于预测XY雌性产生的替代标志。

[0409] 这个信息可用于筛选培养基组分的最优浓度以具有增加的雌性化作用以及产生在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY动物的倾向较高的动物 XY多能或全能细胞。举例来说,这种方法可包括在包含基础培养基和适于维持细胞的多能性或全能性的补充物的培养基中培养第一群体的非人动物 XY多能或全能细胞和第二群体的非人动物XY多能或全能细胞,其中在第一浓度的靶标培养基组分存在下培养所述第一群体,并且在不同于所述第一浓度的第二浓度的靶标培养基组分存在下培养所述第二群体。第一浓度可高于或低于第二浓度。方法可接着进一步包括测定第一群体和第二群体的每一个中的一个或多个非人动物XY多能或全能细胞的Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或更多的表达和/或活性。如果相较于来自第二群体的一个或多个细胞,来自第一群体的一个或多个细胞中的Ddx3y、Uty和Eif2s3y 中的一者或更多的表达和/或活性降低,那么可接着选择第一浓度。表达和/或活性降低可为Ddx3y、Uty、Eif2s3y、Ddx3y和Uty、Ddx3y和Eif2s3y、Uty和Eif2s3y、或Ddx3y、Uty和Eif2s3y的表达和/或活性降低。

[0410] 浓度可被改变的培养基组分的实例包括碱金属和卤离子的盐(氯化钠)、碳酸盐(例如碳酸氢钠)、葡萄糖、胎牛血清(FBS)、谷氨酰胺、抗生素、青霉素和链霉素(例如penstrep)、丙酮酸盐(例如丙酮酸钠)、非必需氨基酸(例如MEM NEAA)、2-巯基乙醇和白血病抑制因子(LIF)。浓度可被改变的其它培养基组分列于表1中。在本文其它地方进一步详细讨论典型培养基组分。

[0411] 可在靶标化合物存在下培养第一群体的细胞任何时长。举例来说,可在测定之前,

在靶标化合物存在下培养第一群体的细胞至少1天、2天、3 天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、2 周、3周或4周。

[0412] 培养基可为足以维持细胞的多能性或全能性,但不改变细胞产生能生育雌性子代的能力的培养基。或者,培养基可为雌性化培养基。在本文其它地方公开雌性化培养基(例如基础培养基和适于维持所培养的动物XY多能或全能细胞的补充物,其中基础培养基或包含基础培养基和补充物的培养基具有约200mOsm/kg至小于约329mOsm/kg的克分子渗透压重量浓度)以及用于在所述培养基中维持细胞的方法。

[0413] 第一浓度的培养基组分的雌性化活性可以许多方式鉴定。举例来说,如果来自第一群体的细胞缺乏Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达和/或活性,那么可选择第一浓度。或者,如果相较于来自第二群体的细胞,来自第一群体的细胞具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y全部的降低表达和/或活性,那么可选择第一浓度。或者,如果来自第一群体的细胞缺乏Ddx3y、Uty和Eif2s3y全部的表达和/或活性,那么可选择第一浓度。以下进一步详细讨论用于评估表达和/或活性的方法。

[0414] 一些筛选方法可进一步包括基于Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达和/或活性来从第一群体选择用于在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY非人动物的供体非人动物XY多能或全能细胞,其中所述能生育的呈表型雌性的XY非人动物在所述F0代中的比例与Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达和/或活性逆相关。

[0415] 可接着将供体动物XY多能或全能细胞引入宿主胚胎中,其中所述宿主胚胎能够在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY动物。举例来说,宿主胚胎可为前桑椹胚期胚胎,并且可在引入供体动物XY多能或全能细胞后将宿主胚胎培养至胚泡期。在本文其它地方公开动物、胚胎、用于将供体XY多能或全能细胞引入胚胎中的方法、以及产生F0动物的方法。

[0416] 可在测定步骤之前和/或在引入宿主胚胎中之前,在培养基中维持动物 XY多能或全能细胞持续各种时间量。举例来说,可在测定步骤和/或引入宿主胚胎中之前,在雌性化培养基中维持动物XY多能或全能细胞至少1 天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12 天、13天、2周、3周或4周。或者,可在测定步骤和/或引入宿主胚胎中之前,在雌性化培养基中维持动物XY多能或全能细胞至多1天、2天、3 天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、2 周、3周或4周。在一些方法中,在雌性化培养基中培养或维持XY多能或全能细胞直至将细胞注射至胚胎中。在其它方法中,在雌性化培养基中培养或维持向其中注射XY多能或全能细胞的胚胎直至被转移至代孕母体中。

[0417] 可在测定来自第一群体的一个或多个细胞的Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达或活性之后选择供体细胞。测定步骤可包括测定细胞或克隆自身,以及测定Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达或活性的水平。或者,测定步骤可包括测定源于克隆的若干亚克隆,以及测定例如具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性或缺乏Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达和/或活性的亚克隆的百分比。或者,测定步骤可包括测定源于克隆的若干亚克隆,以及测定亚克隆之间Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的比较表达和/或活性。Ddx3y、 Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达和/或活性可被降低,或Ddx3y、Uty 和Eif2s3y全部的表达和/或活性都可被降低。或者,供体动物XY多能或全能细胞缺乏Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达和/或活性,或缺乏Ddx3y、Uty和Eif2s3y全部的表达和/或活性。举例来说,可缺乏Ddx3y、 Uty和

Eif2s3y全部的可检测表达。

[0418] 可在蛋白质水平或mRNA水平上评估表达。多肽的表达水平可例如通过测定细胞或生物体中所述多肽的水平来直接测量(例如蛋白质印迹分析、FACS分析、ELISA),或例如通过测量所述多肽的活性来间接测量。在其它情况下,可使用包括例如DNA印迹分析、DNA测序、PCR分析、RNA印迹分析、定量RT-PCR分析、下一代测序(NGS)、微阵列分析或表型分析的方法来测量基因的降低表达和/或活性。举例来说,可通过RT-PCR、RNA-seq、数字PCR或用于测量mRNA水平的任何其它适合方法测量mRNA水平来评估基因的表达。作为一个实例,可相对于对照基因诸如B2 m,通过RT-PCR来测量RNA水平。在一些情况下,举例来说,对照基因(例如B2m)与靶标基因之间的 $\Delta Ct$ 可为至少2、至少4、至少6或至少8。同样,在一些情况下,在30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40个循环之后,将不存在靶标基因的可检测RNA。

[0419] 任选地,当测量mRNA或多肽的表达水平时,可进行对照实验以确认存在Y染色体。举例来说,通过使用针对Y染色体上的不同基因组序列的探针,可进行TAQMAN®拷贝数测定以确认存在Y染色体的一个拷贝。所述测定是熟知的,并且被设计来测量基因组内的拷贝数变化。

[0420] 主题细胞、胚胎或动物中的基因或它编码的蛋白质的表达或活性的降低可包括当相较于适当对照细胞、胚胎或动物、或者对照细胞、胚胎或动物的群体时,表达或活性水平具有任何统计显著降低。一般来说,如果表达或活性在统计上低于源于其的适当对照细胞、胚胎或动物(例如已在不是雌性化培养基的适当对照培养基中培养的动物XY多能细胞、尽管它在雌性化培养基中培养但历史上产生完全雄性小鼠的动物XY多能细胞)中的表达或活性,那么表达或活性被降低。这种降低包括相对于对照细胞,降低至少1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或更大。统计显著性意指 $p \leq 0.05$ 。表达或活性降低可在任何阶段通过任何机理来发生。举例来说,表达降低可通过在转录期间、转录后、翻译期间、或翻译后发生的事件或调控来发生。

[0421] “主题细胞”是已在雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)中培养的细胞,或是从在雌性化培养基中培养的细胞起源的细胞。“对照”或“对照细胞”提供用于测量主题细胞的表型变化的参照点。对照细胞优选尽可能与主题细胞密切匹配(例如相应细胞可源于相同细胞系或相同克隆,或可具有相同基因型),例外之处是它不在雌性化培养基中培养,或尽管它在雌性化培养基中培养但缺乏产生XY雌性小鼠的能力或所述能力降低。举例来说,对照细胞可包括:(a)与主题细胞具有相同基因型或源于相同细胞系或克隆,但已在不是雌性化培养基的适当对照培养基(例如DMEM或足以维持动物XY多能或全能细胞的多能性或全能性,但不通过给与它产生能生育的雌性子代的能力来改变细胞的另一类型的培养基)中培养的细胞;(b)在遗传上与主题细胞相同或源于相同细胞系或克隆,但在遗传上未改变或未暴露于将给与它产生能生育的雌性XY动物的潜力的条件或刺激的动物XY多能或全能细胞;和(c)在雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)中培养,但尽管它在雌性化培养基中培养但历史上产生完全雄性动物的动物XY多能和全能细胞。举例来说,对照细胞可为已在足以维持细胞的多能性或全能性,但不改变细胞产生能生育雌性子代的能力的培养基中培养的动物XY多能或全能细胞。任选地,表达和/或活性降低可相对于来自第二群体的对照非人动物XY多能或全能细胞。

[0422] 在一些实验中,测定第一群体中的两个或更多个细胞或克隆的Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的表达和/或活性。可接着将具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的最低表达和/或活性的细胞或克隆选择为供体动物XY多能或全能细胞或克隆,其中所述供体动物XY多能或全能细胞能够在F0代中产生能生育的呈表型雌性的XY动物。

[0423] 选择具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体动物XY多能或全能细胞可导致是呈表型雌性的XY动物的F0子代的百分比较高,是能生育的呈表型雌性的XY动物的F0 XY子代的百分比较高,能生育的 F0 XY雌性的百分比较高,F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性的平均终生窝数较高,以及F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性的平均同窝仔畜数较高。在使用本文其它地方公开的方法将供体XY多能或全能动物细胞引入宿主胚胎中以及孕育所述宿主胚胎之后,可由所述细胞产生所述F0子代。

[0424] 增加可为当相较于适当对照时的任何统计显著增加。举例来说,当相较于适当对照时,增加可为至少1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍或 5倍。

[0425] 举例来说,通过选择具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体动物XY多能或全能细胞,可使是呈表型雌性的X Y动物的F0子代或F0 XY子代的百分比增加。在一些方法中,当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的X Y多能或全能动物细胞的F0子代时,对于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y 中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体XY多能或全能动物细胞的F 0子代,是呈表型雌性的XY动物的F0子代或F0 XY子代的百分比更高。

[0426] 通过选择具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体动物XY多能或全能细胞,也可使是能生育的呈表型雌性的X Y动物的F0子代或F0 XY子代的百分比增加。在一些方法中,当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的X Y多能或全能动物细胞的F0子代时,对于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y 中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体XY多能或全能动物细胞的F 0子代,是能生育的呈表型雌性的XY动物的F0子代或F0 XY子代的百分比更高。

[0427] 通过选择具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体动物XY多能或全能细胞,也可使能生育的F0 XY雌性的百分比增加。在一些方法中,当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的XY多能或全能动物细胞的F0 XY子代时,对于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体XY多能或全能动物细胞的F0 XY子代,能生育的F0 XY雌性的百分比更高。

[0428] 通过选择具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体动物XY多能或全能细胞,也可使能够产生正常窝数和/或正常同窝仔畜数(例如相较于野生型雌性动物)的F0 XY雌性的百分比增加。在一些方法中,当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的XY多能或全能动物细胞的F0 XY子代时,对于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体X Y多能或全能动物细胞的F0 XY子代,能够产生正常窝数和/或正常同窝仔畜数的F0 XY雌性的百分比更高。

[0429] 通过选择具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体

动物XY多能或全能细胞,也可使由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均同窝仔畜数增加。在一些方法中,当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性时,对于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性,由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均同窝仔畜数更高。

[0430] 通过选择具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体动物XY多能或全能细胞,也可使由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均终生窝数增加。在一些方法中,当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性时,对于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性,由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均终生窝数更高。

[0431] 通过选择具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体动物XY多能或全能细胞,也可使由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均终生后代数增加。在一些方法中,当相较于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的较高表达和/或活性的XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性时,对于源于具有Ddx3y、Uty和Eif2s3y中的一者或多者的降低表达和/或活性的供体XY多能或全能动物细胞的F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性,由F0 XY雌性或能生育的F0 XY雌性产生的平均终生后代数更高。

[0432] 5. 其它应用

[0433] 也提供用于通过在如本文其它地方公开的雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)中维持XY多能或全能动物细胞来使XY多能或全能动物细胞(或源于其的体外细胞培养物、胚胎或动物)中的Y染色体的区域沉默,以及测定所述XY多能或全能细胞以鉴定Y染色体的所述区域的沉默的方法和组合物。所述方法可例如适用于其中靶向修饰将用于降低或消除基因的表达的情形下(例如用以抑制由基因编码的蛋白质的活性的敲除)。通过用雌性化培养基培养达成的沉默需要的时间少于产生特定靶向修饰,并且因此是一种用以实现沉默的更高效手段。

[0434] 在本文其它地方公开雌性化培养基的实例以及它们的组分和特征。同样,在本文其它地方公开用于在雌性化培养基中培养XY多能或全能细胞的时机和时长的实例。

[0435] 在雌性化培养基中培养导致Y染色体基因的阻遏或沉默。举例来说,可使Y染色体的区域沉默,诸如Y染色体的短臂的全部或一部分。在Y染色体的短臂上进行的沉默可延伸至雄性性别决定途径的关键调控子,即Sr y基因,其未能在小鼠胚胎发育期间在E11-E12的正确时间充分表达,从而导致在双潜能生殖嵴中表达雌性性别决定程序(参见实施例1和图2)。诸如Ddx3y和Eif2s3y的其它基因也可未能表达(参见实施例1以及图3和4)。从那时起,性别逆转的胚胎可如同雌性一样发育直至出生(F0代),接着成长为正常能生育的雌性小鼠,尽管它具有XY基因型。在一些方法中,雌性化培养基诱导的Y染色体沉默不是永久遗传变化,并且不存留至F1代中(即无XY雌性见于F0 XY雌性的F1子代之中)。

[0436] 除在Y染色体的短臂的全部或一部分内或包括Y染色体的短臂的全部或一部分之

外,在本文其它地方也公开Y染色体的可通过雌性化培养基来沉默的其它区域。沉默的区域也可包括长臂(Yq),特别是Y染色体上的为精子发生所需的其它基因。举例来说,区域可包含Sxr<sup>a</sup>区的全部或一部分(例如含有Sry基因的部分),和/或区域可包含小鼠Y染色体的Sxr<sup>b</sup>区的全部或一部分(例如含有Zfy2基因的部分)(参见图1A),或来自其它物种的Y染色体的相应区域(例如人Y染色体的AZFa、AZFb或AZFc区域)的全部或一部分。举例来说,区域可包含Sxr<sup>a</sup>区与Sxr<sup>b</sup>区两者的各部分或全部。Sxr<sup>b</sup>区的边界例如是Zfy1和Zfy2(参见图1A和Mazeyrat等(1998)Human Molecular Genetics 7(11):1713-1724,其出于所有目的以引用的方式整体并入本文)。来自其它动物物种的相应区域包括具有一个或多个与小鼠Y染色体上的区域中的基因直系同源或同源的基因的区域。举例来说,人区域的AZFa区与小鼠Y染色体的Sxr<sup>b</sup>区对应,因为各区域含有Uty、Dby(Ddx3y)和Dffry(Usp9y)。参见例如Affara(2001)Expert Rev.Mol.Med.,1月3日;2001:1-16;Mazeyrat等(1998)Human Molecular Genetics 7(11);1713-1724;以及Sargent等(1999)J.Med.Genet.36:370-377,其各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文。区域也可包含Smy区或Spy区的全部或一部分(参见图1A和Affara(2001)Expert Rev.Mol.Med.,1月3日;2001:1-16)。同样,区域可包含小鼠Y染色体的缺失间隔1、缺失间隔2、缺失间隔3、缺失间隔4、缺失间隔5、缺失间隔6和缺失间隔7或来自其它动物物种的Y染色体的相应区域中的一者或多者的全部或一部分(参见例如图1A和Affara(2001)Expert Rev.Mol.Med.,1月3日;2001:1-16)。举例来说,区域可包含小鼠Y染色体的缺失间隔1、缺失间隔2和缺失间隔3或来自其它动物物种的Y染色体的相应区域中的一者或多者的全部或一部分(参见例如图1A)。在一个实施例中,区域可包含缺失间隔2和缺失间隔3,或缺失间隔2的一部分和缺失间隔3的一部分。

[0437] 区域可包括Rbmy簇、H2a12y、Sry、Zfy2、Usp9y、Ddx3y、Uty、Tspy-ps、Eif2s3y、Kdm5d、Uba1y或Zfy1中的一者或多者。区域可在Rbmy簇的端粒方向,或可在H2a12y、Sry、Zfy2、Usp9y、Ddx3y、Uty、Tspy-ps、Eif2s3y、Kdm5d、Uba1y或Zfy1的着丝粒方向或端粒方向。举例来说,区域可包含Y染色体的在Kdm5d的端粒方向或在Usp9y的着丝粒方向的部分,或区域可在Zfy2、Sry或Rbmy簇的端粒方向。区域可排除Rbmy簇、H2a12y、Sry、Zfy2、Usp9y、Ddx3y、Uty、Tspy-ps、Eif2s3y、Kdm5d、Uba1y或Zfy1中的一者或多者。举例来说,区域可排除Rbmy簇、Zfy2和Sry中的一者或多者。同样,区域可包括Y染色体的在Rbmy簇、H2a12y、Sry、Zfy2、Usp9y、Ddx3y、Uty、Tspy-ps、Eif2s3y、Kdm5d、Uba1y或Zfy1中的一者或多者的外部的部分。举例来说,区域可包含Y染色体的在Rbmy簇、Zfy2和Sry中的一者或多者的外部的部分。

[0438] 沉默可使由位于Y染色体上的基因编码的蛋白质的水平和/或活性降低。举例来说,可使由Rbmy簇、H2a12y、Sry、Zfy2、Usp9y、Ddx3y、Uty、Tspy-ps、Eif2s3y、Kdm5d、Uba1y或Zfy1编码的蛋白质中的一者或多者的水平和/或活性降低。或者,沉默可导致对位于Y染色体上的基因的表达的消除(即所述基因不表达)。在一些方法中,举例来说,在沉默后,Rbmy簇、H2a12y、Sry、Zfy2、Usp9y、Ddx3y、Uty、Tspy-ps、Eif2s3y、Kdm5d、Uba1y或Zfy1中的一者或多者不表达。在一些方法中,由Ddx3y、Eif2s3y、Zfy2和Sry编码的蛋白质中的一者或多者的水平和/或活性被降低,或Ddx3y、Eif2s3y、Zfy2和Sry中的一者或多者不表达。

[0439] 主题细胞、胚胎或动物中的表达或活性的降低可包括当相较于适当对照细胞、胚胎或动物时,表达或活性水平具有任何统计显著降低。一般来说,如果表达或活性在统计上

低于源于其的适当对照细胞、胚胎或动物(例如已在不是雌性化培养基的适当对照培养基中培养的动物XY多能细胞、尽管它在雌性化培养基中培养但历史上产生完全雄性小鼠的动物XY多能细胞)中的表达或活性,那么表达或活性被降低。这种降低包括相对于对照细胞,降低至少1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或更大。统计显著性意指 $p \leq 0.05$ 。

[0440] “主题细胞”是已在雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)中培养的细胞,或是从在雌性化培养基中培养的细胞起源的细胞。“对照”或“对照细胞”提供用于测量主题细胞的表型变化的参照点。对照细胞优选尽可能与主题细胞密切匹配(例如相应细胞可源于相同细胞系或相同克隆,或可具有相同基因型),例外之处是它不在雌性化培养基中培养,或尽管它在雌性化培养基中培养但缺乏产生XY雌性小鼠的能力或所述能力降低。举例来说,对照细胞可包括:(a)与主题细胞具有相同基因型或源于相同细胞系或克隆,但已在不是雌性化培养基的适当对照培养基(例如DMEM或足以维持动物XY多能或全能细胞的多能性或全能性,但不通过给予它产生能生育的雌性子代的能力来改变细胞的另一类型的培养基)中培养的细胞;(b)在遗传上与主题细胞相同或源于相同细胞系或克隆,但在遗传上未改变或未暴露于将给予它产生能生育的雌性XY动物的潜力的条件或刺激的动物XY多能或全能细胞;和(c)在雌性化培养基(例如低克分子渗透压重量浓度培养基)中培养,但尽管它在雌性化培养基中培养但历史上产生完全雄性动物的动物XY多能和全能细胞。

[0441] 表达或活性降低可在任何阶段通过任何机理来发生。举例来说,表达降低可通过直接或间接对区域进行的修饰或通过在转录期间、转录后、翻译期间、或翻译后发生的事件或调控来发生。

[0442] 尽管对机理的了解不为实践所需,但改变染色质和/或增加Y染色体上的磷酸化形式的组蛋白变体 $\gamma$ H2AX的水平可促进沉默。已知磷酸化组蛋白 $\gamma$ H2AX与转录阻遏相关联,并且与在减数分裂前期期间XY性体中的X染色体和Y染色体的转录阻遏相关联。参见例如Alton等(2008)Reproductive Biology and Endocrinology 6:241-252。

[0443] 沉默可发生在培养XY多能或全能细胞时,在将供体XY多能或全能细胞引入宿主胚胎中之后,或在将包含供体XY多能或全能细胞的所述宿主胚胎引入接受者雌性动物中之后。沉默也可发生在胚胎发育的不同阶段期间,或在整个胚胎发育中。在一些情况下,沉默在出生之后持续。举例来说,在卵母细胞受精之后,一些沉默可维持直至前两次细胞分裂。由沉默引起的性别逆转也可能被传递至F1子代中。沉默发生所处的时期的一些实例包括以下中的一者或多者:(1)在进行雄性性别决定程序时的胚胎发育期间;(2)在直至至少对应于小鼠中的E11-E12的发育阶段的胚胎发育期间(例如对于性别决定或性别逆转重要的发育阶段);(3)在直至至少对应于小鼠中的E17-E19的发育阶段的胚胎发育期间(例如对于胚胎卵母细胞的生育性重要的发育阶段);(4)在整个卵子发生的时期中;(5)在卵母细胞发育中的就在出生之前在胚胎中启动的减数分裂前期期间;(6)在卵母细胞受精之后(例如在它的前两次细胞分裂期间);或(7)在卵母细胞排卵后直至受精后前两次细胞分裂。

[0444] 本领域中已知的任何手段都可用于测定细胞的Y染色体的区域的沉默。举例来说,沉默的区域内的基因可不表达(例如表达被消除或细胞缺乏基因的可检测表达)。通过本领域中已知的常见技术,当不进行基因的转录时或当不存在基因的产物(例如mRNA或蛋白质)的可检测水平时,基因不表达。多肽的表达水平可例如通过测定细胞或生物体中所述多肽

的水平来直接测量(例如蛋白质印迹分析、FACS分析、ELISA),或例如通过测量所述多肽的活性来间接测量。在其它情况下,可使用包括例如DNA印迹分析、DNA测序、PCR分析、RNA印迹分析、定量RT-PCR分析、下一代测序(NGS)、微阵列分析或表型分析的方法来测量基因的降低表达和/或活性。测定也可包括鉴定Y染色体上的哪些区域、子区域或基因被沉默。

[0445] 以上或以下引用的所有专利申请、网站、其它出版物、登记号等都出于所有目的以引用的方式整体并入本文,所述引用的程度就好像明确地和个别地指示将各个别条目都如此出于所有目的以引用的方式整体并入本文一样。如果在不同时间有序列的不同版本与登记号相关联,那么意指的是在本申请的有效申请日期时与所述登记号相关联的版本。有效申请日期意指实际申请日期或涉及所述登记号的优先权申请的申请日期(如果可适用)的早先日期。同样,如果在不同时间有出版物、网站等的不同版本被公布,那么除非另外指示,否则意指的是在申请的有效申请日期时最新近公布的版本。除非另外明确指示,否则本发明的任何特征、步骤、要素、实施方案或方面都可与任何其它特征、步骤、要素、实施方案或方面组合使用。尽管本发明已出于明晰和理解的目的通过说明和举例的方式相当详细地加以描述,但将明显的是某些变化和修改可在随附权利要求的范围内加以实施。

[0446] 序列简述

[0447] 使用标准核苷酸碱基字母缩写和氨基酸三字母代码显示随附序列表中所列的核苷酸和氨基酸序列。核苷酸序列遵循在序列的5'末端开始,并且前进(即在各行中从左至右)直至3'末端的标准惯例。仅显示各核苷酸序列的一个链,但互补链应被理解为通过对所显示链的任何提及来包括。氨基酸序列遵循在序列的氨基末端开始,并且前进(即在各行中从左至右)直至羧基末端的标准惯例。

[0448] 表2.序列描述

SEQ ID NO	类型	描述
1	DNA	<i>mHPRT1</i> 探针
2	DNA	<i>mHPRT1</i> 正向引物
3	DNA	<i>mHPRT1</i> 反向引物
4	DNA	<i>mSox9</i> 探针
5	DNA	<i>mSox9</i> 正向引物
6	DNA	<i>mSox9</i> 反向引物
7	DNA	<i>mRspo1</i> 探针
8	DNA	<i>mRspo1</i> 正向引物
9	DNA	<i>mRspo1</i> 反向引物
10	DNA	<i>mDhh</i> 探针
11	DNA	<i>mDhh</i> 正向引物
12	DNA	<i>mDhh</i> 反向引物
13	DNA	<i>mGata4</i> 探针
14	DNA	<i>mGata4</i> 正向引物
15	DNA	<i>mGata4</i> 反向引物
16	DNA	<i>mFgf9</i> 探针
17	DNA	<i>mFgf9</i> 正向引物
18	DNA	<i>mFgf9</i> 反向引物
19	DNA	<i>mSry</i> 探针
20	DNA	<i>mSry</i> 正向引物
21	DNA	<i>mSry</i> 反向引物
22	DNA	<i>mSfl</i> 探针
23	DNA	<i>mSfl</i> 正向引物
24	DNA	<i>mSfl</i> 反向引物
25	DNA	<i>mWnt4</i> 探针
26	DNA	<i>mWnt4</i> 正向引物

[0449]

SEQ ID NO	类型	描述
27	DNA	<i>mWnt4</i> 反向引物
28	DNA	<i>mAfh</i> 探针
29	DNA	<i>mAfh</i> 正向引物
30	DNA	<i>mAfh</i> 反向引物
31	DNA	<i>mNr0b1</i> 探针
32	DNA	<i>mNr0b1</i> 正向引物
33	DNA	<i>mNr0b1</i> 反向引物
34	DNA	<i>mFoxl2</i> 探针
35	DNA	<i>mFoxl2</i> 正向引物
36	DNA	<i>mFoxl2</i> 反向引物
37	DNA	<i>mDdx3y</i> 探针
38	DNA	<i>mDdx3y</i> 正向引物
39	DNA	<i>mDdx3y</i> 反向引物
40	DNA	<i>mEif2s3y</i> 探针
41	DNA	<i>mEif2s3y</i> 正向引物
42	DNA	<i>mEif2s3y</i> 反向引物
43	DNA	靶向 <i>Sry</i> 的 TALEN 的上游识别序列
44	DNA	靶向 <i>Sry</i> 的 TALEN 的下游识别序列
45	DNA	X 染色体引物 1
46	DNA	X 染色体引物 2
47	DNA	X 染色体探针
48	DNA	Y 染色体引物 1
49	DNA	Y 染色体引物 2
50	DNA	Y 染色体探针

[0451] 实施例

[0452] 实施例1.从XY ES细胞产生能生育且生殖力旺盛的F0 XY雌性小鼠材料和方法

[0453] ES细胞培养:此处描述的所有结果都来自用VGF1(即我们的C57BL/6NTac/129S6SvEv F1杂交XY ES细胞系)进行的实验(Poueymirou等(2007)Nat.Biotechnol.25:91-99;Valenzuela等(2003)Nat.Biotechnol.21:652-659)。如先前所述培养ES细胞(Matise等(2000)Production of targeted embryonic stem cell clones.Joyner AL(编)Gene targeting:a practical approach.Oxford University press,New York,第101-132页)。具有表3中指示的NaHCO<sub>3</sub>浓度的定制高葡萄糖DMEM培养基(LifeTech)补充以

0.1 mM非必需氨基酸、1mM丙酮酸钠、0.1mM 2-巯基乙醇、4mM L-谷氨酰胺、100U/ml青霉素和100μg/ml链霉素(Life Technologies)、15%FBS(Hyclone)和2,000U/ml白血病抑制因子(LIF, Millipore)。培养基的克分子渗透压重量浓度用单样渗压计(Advanced Instruments Inc., 3250型)测量。对于电穿孔,我们使溶解于120μl电穿孔缓冲液(Millipore)中的1.5μg靶向载体DNA与7.5x 10<sup>6</sup>个ES细胞混合,并且转移至BTX多壁电穿孔板(Harvard Apparatus)中。在电穿孔之后,将细胞在冰上孵育10分钟,随后涂铺在两个15cm凝胶化培养皿上。在电穿孔之后48小时添加选择培养基,并且此后每日更换。在电穿孔之后10天挑选集落,并且转移至96孔板的含有胰蛋白酶的各个孔中,此后将细胞涂铺于凝胶化96孔板中。3天后,再次用胰蛋白酶处理细胞,并且将各孔的内含物的三分之二冷冻,而将剩余三分之一转移至新板中以进行DNA提取。

[0454] ES细胞筛选、小鼠基因型分析以及X染色体和Y染色体计数:我们使用等位基因丧失方法(Frendewey等(2000)Methods Enzymol.476:295-3 07)来鉴定被正确靶向的ES细胞克隆以及测定小鼠等位基因基因型。我们通过以下TAQMAN®定量PCR(qPCR)测定(Biosearch Technologies)来测定X染色体和Y染色体计数:对于X,引物(5' -3')GGAGGGTAGCACGGG AAGAAG (SEQ ID NO:45)和GCTGGCTACCCACTTGATTGG (SEQ ID NO:46)以及探针TCAAGCAGTCTCTCCCAGCTAACCTCCCT (SEQ ID NO:47);并且对于Y,引物GATCAGCAAGCAGCTGGGAT (SEQ ID NO:48)和CTCCTGGAAAAAGGGCCTTT (SEQ ID NO:49)以及探针CA GGTGGAAAAGCCTTACAGAAGCCGA (SEQ ID NO:50)。针对由Swiss Webster品系携带并且不存在于VGF1ES细胞基因组中的酪氨酸酶基因中的白化突变的qPCR测定对宿主胚胎贡献进行定量。这个测定中的检测限是2,000个单倍体基因组等效物中的约一个白化等位基因(Poueymirou等(2007)Nat.Biotechnol.25:91-99)。将经解剖脾送至Van Andel Institute (Grand Rapids, Michigan)以进行光谱核型分析(SKY)。

[0455] 显微注射:在注射当天,用胰蛋白酶处理ES细胞,并且再混悬于无L IF的ES细胞培养基中。在显微注射之前,使冷冻8细胞Swiss Webster胚胎(Charles River Laboratories)在37°C下于7.5%CO<sub>2</sub>中在KSOM培养基(M illipore)中解冻和孵育90分钟。如先前所述进行将ES细胞注射至8细胞胚胎中(Poueymirou等(2007)Nat.Biotechnol.25:91-99)。在注射之后,将胚胎培养过夜,并且转移至性交后2.5天的假妊娠接受者雌性小鼠中。

#### [0456] 结果

[0457] 为使用于交配研究与表型分型研究两者的VELOCIMICE®的产率优化,我们在基因靶向实验期间以及在8细胞胚胎注射之前测试多种ES细胞培养基。我们评估的一个组分是称为Knockout TM DMEM(KO-DMEM, Life Technologies)的基础培养基。最初,似乎相较于在用标准DMEM(杜尔贝科氏改良伊格尔培养基)制备的培养基中维持的细胞,在用KO-DMEM制备的培养基中生长的ES细胞表现不良,因为我们获得较少雄性VELOCIMICE®。但我们也观察到雌性VELOCIMICE®大幅增加:由注射源于针对34个不同基因的靶向实验的78个克隆产生的VELOCIMICE®中的31%是雌性(表3,KO-DMEM)。对记录在我们的关于注射超过500个在常规DM EM培养基中生长的靶向ES细胞克隆的小鼠产生

数据库中的结果的回顾比较揭示所有 VELOCIMICE® 中仅 1% 被鉴定为雌性 (表3, DMEM)。罕见雌性 VELOCIMICE® 尚未被交配, 并且未进一步探究。尽管由在 KO-DMEM 培养基中生长的 XY ES 细胞克隆获得的雌性的发生率较高, 但由这个实验获得的雄性和雌性 VELOCIMICE® 的 18% 总产率与我们的在克隆于 DMEM 培养基中获得的情况下的历史经验相同 (表3, KO-DMEM 和 DMEM)。

[0458] 在 KO-DMEM 中生长的 ES 细胞克隆以在 0 至 60% 的范围内的比例产生雌性 VELOCIMICE®。产生雌性 VELOCIMICE® 的倾向为各克隆所特有。不产生雌性的克隆在重复显微注射的情况下维持这个性状, 而产生雌性的克隆在重复显微注射实验中倾向于产生近似相同比例的雌性。为了解我们是否可改变克隆产生雌性 VELOCIMICE® 的能力, 我们进行培养基交换实验。使来自其中持续整个靶向过程—电穿孔、选择药物抗性集落、筛选靶向突变、扩增和低温保存—使 ES 细胞在基于 DMEM 或基于 KO-DMEM 的培养基中生长和维持的基因靶向实验的 ES 细胞克隆在相反培养基 (opposite medium) 中解冻和生长 3 天以为向 8 细胞胚胎中显微注射作准备。在 KS OM 中过夜孵育以使胚胎分化成胚泡之后, 将它们转移至代孕母体中。我们对产生的 XY 雌性在活产 VELOCIMICE® 之中的比例评分。

[0459] 表3. 培养基配方对 XY 雌性 VELOCIMICE® 的产生的影响

基础培养基					产生的 VELOCIMICE®				
	基础培养基的 克分子渗透压 重量浓度(mOs m/kg)	NaHCO <sub>3</sub> 浓 度 (mM) (mg/mL)	注射 的克 隆	转移 的胚 胎	雄性 (%)	雌性 (%)	总 计	效 率 % <sup>d</sup>	
[0460]	KO-DMEM	275 <sup>b</sup>	N/A <sup>a</sup>	78	4754	617 (69)	277 (31)	894	18
	DMEM	340 <sup>b</sup>	44 mM 3.7 mg/mL	553	21419	3792 (99)	42 (1.1)	383 4	18
	mDMEM-1	290 <sup>c</sup>	44 mM 3.7 mg/mL	6	250	33 (94)	2 (5.7)	35	14
	mDMEM-2	264 <sup>c</sup>	26 mM 2.2 mg/mL	4	200	26 (72)	10 (28)	36	18
	mDMEM-3	292 <sup>c</sup>	18 mM 1.5 mg/mL	4	200	35 (71)	14 (29)	49	24
	mDMEM-4	251 <sup>c</sup>	18 mM 1.5 mg/mL	4	200	33 (66)	17 (34)	50	25

[0461] <sup>a</sup>不可用

[0462] <sup>b</sup>根据供应商的分析证书的平均值

[0463] <sup>c</sup>测量值

[0464] <sup>d</sup>产生的VELOCIMICE<sup>®</sup>与转移的胚胎的表示为百分比的比率

[0465] 对于DMEM向KO-DMEM转换,我们选择来自在DMEM培养基中进行的五个不同基因靶向实验的11个克隆,并且使它们在KO-DMEM或D MEM(作为对照)中解冻和生长。由从DMEM转换成KO-DMEM的ES细胞转移的约400个胚胎产生105只活产VELOCIMICE<sup>®</sup>,其中仅2只(1.9%)是雌性(表4,在DMEM中靶向,在KO-DMEM中解冻),这类似于由用在 DMEM中维持的ES细胞注射的对照胚胎产生的雌性的比例(2.4%)(表4,在DMEM中靶向,在DMEM中解冻)。对于互换实验,我们选择来自在K 0-DMEM中进行的靶向实验的3个克隆,并且使它们在DMEM或KO-D MEM(作为对照)中解冻和生长。由从KO-DMEM转换成DMEM的ES细胞转移的300个胚胎产生41只VELOCIMICE<sup>®</sup>,其中8只(20%)是雌性(表4,在KO-DMEM中靶向,在DMEM中解冻),这类似于由用在KO-DMEM中维持的ES细胞注射的对照胚胎产生的雌性VELOCIMICE<sup>®</sup>的比例(18%)(表4,在KO-DMEM中靶向,在KO-DMEM中解冻)。

[0466] 表4.转换培养基配方对XY雌性VELOCIMICE<sup>®</sup>的产生的影响

在不同阶段的基础培养基		注射的 克隆	转移的 胚胎	产生的 VELOCIMICE <sup>®</sup>			
靶向 <sup>a</sup>	解冻和生长 以进行注射			雄性 (%)	雌性 (%)	总计	效率% <sup>b</sup>
DMEM	KO-DMEM	11	388	103 (98)	2 (1.9)	105	27
DMEM	DMEM	11	413	41 (98)	1 (2.4)	42	10
KO-DMEM	KO-DMEM	3	300	69 (82)	15 (18)	84	28
KO-DMEM	DMEM	3	300	33 (80)	8 (20)	41	14

[0468] <sup>a</sup>解冻ES细胞、生长、电穿孔、药物选择、筛选、扩增和低温保存靶向克隆

[0469] <sup>b</sup>产生的VELOCIMICE<sup>®</sup>与转移的胚胎的表示为百分比的比率

[0470] 这些结果指示在基于DMEM的培养基中获得的克隆维持低频率的雌性VELOCIMICE<sup>®</sup>产生,这类似于我们的历史经验(表3,DMEM),并且我们不可通过简短暴露于KO-DMEM来使这个频率增加。类似地,在基于K 0-DMEM的培养基中获得的克隆产生较高频率的雌性VELOCIMICE<sup>®</sup>,并且简短暴露于DMEM不使XY克隆产生雌性的倾向降低。在两个实验臂中,无论在DMEM中还是在KO-DMEM中获得,相较于在DMEM培养基中解冻的那些克隆(10% 和 14%),在解冻之后暴露于KO - DMEM的克隆都具有更高和类似的总体VELOCIMOUSE<sup>®</sup>产生效率(27% 和 28%)。

[0471] 完全源于XY ES细胞的在解剖学上正常的雌性:为消除作为对雌性VELOCIMOUSE<sup>®</sup>现象的解释的嵌合现象,我们通过对尾部活检物进行的qPCR测定来确

认根据毛色贡献在表观上完全ES细胞来源的所有雌性都是真实VELOCIMICE<sup>®</sup>,所述测定显示无遗传贡献来自向其中注射ES细胞的Swiss Webster 8细胞宿主胚胎(Poueymirou等(2007)Nat.Biotechnol.25:9 1-99)。我们已知雌性VELOCIMICE<sup>®</sup>可源于仅产生雌性VELOCIMICE的X 0 ES细胞,但这个可能性通过qPCR染色体计数测定而消除,所述测定确定雌性VELOCIMICE<sup>®</sup>(此后称为XY雌性)具有X和Y各自的一个拷贝。XY qPCR结果由对取自5个XY雌性的脾细胞的SKY确认,其也揭示正常常染色体计数,不具有可检测易位或缺失。

[0472] 对15个XY雌性的腹腔的检查确认由所有XY雌性在它们的延伸至内部器官的外生殖器中展现的正常雌性解剖结构。所有都显示正常雌性生殖器官,未指示两性畸形、卵巢或其它不完全雌性性发育征象。它们具有正常输卵管和良好血管化子宫角,并且似乎具有伴有暗示活性排卵过程的血体的功能性卵巢。此外,我们发现XY雌性具有落在于通过交配获得的野生型雌性小鼠中所见的数值范围内的体重和血清化学概况。

[0473] 为消除雌性性器官中的组织特异性宿主胚胎嵌合现象的可能性,我们进行针对Swiss Webster宿主胚胎标志物以及针对从考查正常解剖结构的1 5个XY雌性解剖的组织上的X染色体和Y染色体的qPCR测定。对于所有小鼠,我们都发现无宿主胚胎贡献,并且X染色体和Y染色体各自一个拷贝处于包括卵巢、输卵管和子宫的所有组织中。我们推断XY雌性具有正常雄性核型,完全源于注射的XY ES细胞,并且不显示来自宿主胚胎的可检测遗传贡献。它们呈现不可与正常雌性小鼠区分的外部和内部解剖结构。

[0474] 性别逆转的XY雌性能生育且生殖力旺盛:为测试XY雌性的生育性,我们使源于多个独立XY基因靶向ES细胞克隆的119个雌性F0 VELOCI MICE<sup>®</sup>(50% C57BL/6N:50% 129SvEvS6)与野生型C57BL/6NTac雄性交配。63% (75) 的XY雌性产生至少一窝。这个生育性水平,尽管低于我们在源于相同亲本ES细胞系的F1代(75% C57BL/6N:25% 129SvEvS6) XX雌性的生产交配时观察的约90% 生育性,但相较于先前描述的雄性向雌性性别逆转的情况,是异常较高的。为比较XY雌性与通过正常交配产生的X X雌性的生殖力,我们使C57BL/6NTac雄性与18个XY雌性或与14个野生型XX F1雌性交配。历经9个月时期,我们未观察到XY雌性母体与X X对照之间就生殖力的三个量度—每个雌性产生的幼仔和窝以及同窝仔畜数而言的显著差异(表5)。

[0475] 表5.XY雌性VELOCIMICE<sup>®</sup>相较于XX雌性的交配结果

雌性类型	活产小鼠		窝		
	总计	每个雌性 (平均值±SD) <sup>b</sup>	总计	每个雌性 (平均值±SD)	同窝仔畜数(平均值±SD)
F0 XY 雌性 (n=18)	537	30 ± 15	84	4.7 ± 1.7	6.4 ± 2.8
WT <sup>a</sup> F1 XX 雌性(n=14)	451	32 ± 23	70	5.0 ± 2.6	6.0 ± 3.1

[0476]

[0477] <sup>a</sup>野生型

[0478] <sup>b</sup>标准偏差

[0479] 雄性向雌性性别逆转性状不被传递至F1代中:为测试XY雌性性状的遗传,我们对由XY雌性与C57BL/6NTac雄性之间的交配获得的394个F<sub>1</sub>子代中的X染色体和Y染色体计数进行定量。我们发现呈表型雌性的子代都不具有XY基因型,并且所有具有至少一个Y染色体的小鼠都在表型上是雄性的。然而,我们的确观察到雄性(260)是雌性(134)的两倍多,以及在雄性小鼠与雌性小鼠两者中均具有异常性染色体计数。异常雄性核型(X XY和XYY)已在由通过胚泡注射XY ES细胞产生的雌性嵌合体的交配获得的F1子代中报道(Bronson等(1995) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:312 0-3123),并且与不生育性相关联。我们也发现XY雌性的XXY和XYY雄性F1子代不能生育,具有无精子或精子计数极低的极小睾丸。

[0480] 促进从XY ES细胞产生XY雌性的培养基条件:相比于在常规DME M培养基中生长的克隆(表3),在基于KO-DMEM的培养基中生长的ES细胞具有的在注射至8细胞胚胎中之后产生XY雌性的倾向高得多(表3)。供应商的说明书指示这些基础培养基之间的克分子渗透压重量浓度差:KO- DMEM的约275mOsm/kg相较于DMEM的约340mOsm/kg。因此,我们通过改变盐和糖组分的浓度来制备测量克分子渗透压重量浓度降低的改良形式的DMEM(mDMEM),接着评价在改良培养基中产生的靶向ES细胞的VELOCIMOUSE<sup>®</sup>产生(表3)。在其它实验中,测试不同克分子渗透压重量浓度、盐浓度和碳酸盐浓度对XY ES细胞和由那些ES细胞产生的F0 小鼠的影响。在218与322mOsm/kg之间的克分子渗透压重量浓度下,在碱金属和卤离子的盐(例如NaCl)的3.0至6.4mg/mL(约51.3mM至约10 9.5mM)的浓度下,以及在碳酸盐(例如NaHCO<sub>3</sub>)的1.5-3.7mg/mL(约17. 9mM至约44.0mM)的浓度下,成功产生能生育的F0 XY雌性(表6和7)。对于表7中的第2行(DMEM),基础培养基的典型克分子渗透压重量浓度是337-341或340-341mOsm/kg,并且完全培养基(DMEM加15%FBS、青霉素/链霉素、非必需氨基酸、丙酮酸钠、β-巯基乙醇、L-谷氨酰胺和LI F)的典型克分子渗透压重量浓度在329-338mOsm/kg之间。对于表7中的第1行(KO-DMEM),基础培养基的典型克分子渗透压重量浓度在271-278 mOsm/kg之间,并且完全培养基(KO-DMEM基础培养基加15%FBS、青霉素/链霉素、非必需氨基酸、丙酮酸钠、β-巯基乙醇、L-谷氨酰胺和LIF) 的典型克分子渗透压重量浓度在278-280mOsm/kg之间。对于表7中的第 4行(低NaCl基础培养基),基础培养基的典型克分子渗透压重量浓度是20 0mOsm/kg,并且完全培养基的典型克分子渗透压重量浓度是约216mOsm/kg。

[0481] 无论其它盐的浓度、测量克分子渗透压重量浓度或pH如何,变化始终与XY雌性的产生的变化相关联的唯一组分是碳酸氢钠。当比较我们测试的四种改良培养基时,观察到碳酸氢钠浓度的影响。在基因靶向实验中使用具有的碳酸氢钠浓度等于DMEM培养基的碳酸氢钠浓度(44mM)的基于 mDMEM-1的培养基(表3)产生的ES细胞产生低比例(5.7%)的XY雌性,尽管测量的克分子渗透压重量浓度相较于DMEM培养基被降低。使碳酸氢钠浓度降低至低于DMEM的碳酸氢钠浓度(对于mDMEM-2是26mM,并且对于mDMEM-3和mDMEM-4是18mM)产生平均30%XY雌性(表3),这类似于我们在KO-DMEM的情况下观察的比例。mDMEM-4培养基具有最低克分子渗透压重量浓度,并且产生最高XY雌性比例(34%)与最高总体VELOCIMOUSE<sup>®</sup>产生效率(25%)两者。但低克分子渗透压重量浓度并不始终与高XY雌

性频率相关联。mDMEM-1培养基和mDMEM-3培养基具有几乎相同的克分子渗透压重量浓度，但促成极其不同比例的XY雌性。一般来说，我们观察到在培养基产生XY雌性的倾向与完全ES细胞源性F0 小鼠的产率之间存在直接关联。

[0482] 表6. 克分子渗透压重量浓度、盐和碳酸盐对ES细胞源性幼仔和F0 XY雌性的影响

培养基	完全培养基的克分子渗透压重量浓度(mOsm/kg)	NaCl (mg/mL)(mM)	NaHCO <sub>3</sub> (mg/mL)(mM)	葡萄糖 (mg/mL)	ES 源性幼仔/总幼仔	ES 源性幼仔	
						XY 雄性	XY 雌性
[0483]	DMEM	329	6.4 mg/mL 110 mM	3.7 mg/mL 44 mM	4.5	13/58 (22.4%)	13/13 (0%)
	DMEM-LS/LC	270	5.1 mg/mL 87 mM	2.2 mg/mL 26 mM	4.5	36/71 (50.7%)	26/36 (27.8%)
	DMEM-LS/LC/HG	322	5.1 mg/mL 87 mM	2.2 mg/mL 26 mM	15.5	20/50 (40%)	17/20 (15%)
	DMEM-VLS/LC	218	3.0 mg/mL 51 mM	2.2 mg/mL 26 mM	4.5	53/58 (91.4%)	35/53 (34%)
	DMEM-LS/VLC	261	5.1 mg/mL 87 mM	1.5 mg/mL 18 mM	4.5	50/57 (87.7%)	33/50 (34%)
	DMEM-VLC	294	6.4 mg/mL 110 mM	1.5 mg/mL 18 mM	4.5	49/68 (72.1%)	35/49 (28/6%)

[0484] 表7. 克分子渗透压重量浓度、盐和碳酸盐对ES细胞源性幼仔和F0 XY雌性的影响

基础培养基	NaCl (mg/mL) (mM)	NaHCO <sub>3</sub> (m g/mL) (mM)	完全培 养基的 克分子 渗透压 重量浓 度(mOs m/kg)	pH	注 射 的 克 隆 数	转 移 的 胚 胎 数	雄性 Veloci Mice (%)	雌性 Ve lociMic e (%)	Velo ciMi ce/胚 胎%	
[0485]	KO-DMEM	5.1 mg/mL (87 mM)	2.2 mg/mL (26 mM)	275	7.17	22	988	131 (28.4%)	52 (28.4%)	18.5
	DMEM	6.4 mg/mL (110 mM)	3.7 mg/mL (44 mM)	332	7.38	32	152 5	149 (4.5%)	7 (4.5%)	10.2
	KO-DMEM+ 葡萄糖	5.1 mg/mL (87 mM)	2.2 mg/mL (26 mM)	322		4	200	17 (15.0%)	3 (15.0%)	10.0
	低 NaCl	3.0 mg/mL (51 mM)	2.2 mg/mL (26 mM)	216	7.21	8	300	63 (28.4%)	25 (28.4%)	29.3
	低 NaHCO <sub>3</sub>	5.1 mg/mL (87 mM)	1.5 mg/mL (18 mM)	261		4	200	33 (34.0%)	17 (34.0%)	25.0
	高 NaCl -低 NaHCO <sub>3</sub>	6.4 mg/mL (110 mM)	1.5 mg/mL (18 mM)	294	6.99	4	200	35 (28.6%)	14 (28.6%)	24.5
	低 NaCl -低 NaHCO <sub>3</sub>	3.0 mg/mL (51 mM)	1.5 mg/mL (18 mM)	203	6.98					
	KO-DMEM + NaHCO <sub>3</sub>	5.1 mg/mL (87 mM)	3.7 mg/mL (44 mM)	288	7.40	4	100	20 (0%)	0 (0%)	20.0
	低 NaCl + N aHCO <sub>3</sub>	3.0 mg/mL (51 mM)	3.7 mg/mL (44 mM)	238	7.41	4	100	17 (10.5%)	2 (10.5%)	19.0
	KO-DME M, 于 5% C O <sub>2</sub> 中	5.1 mg/mL (87 mM)	2.2 mg/mL (26 mM)	268	7.34	4	100	21 (27.6%)	8 (27.6%)	29.0
	低 NaCl, 于 5% CO <sub>2</sub> 中	3.0 mg/mL (51 mM)	2.2 mg/mL (26 mM)	214	7.37	3	75	40 (13.0%)	6 (13.0%)	61.3

[0486] 对由使同基因XY雄性和雌性VELOCIMICE<sup>®</sup>交配获得的小鼠进行表型分型:作为说明能生育且生殖力旺盛的XY雌性的价值的实例,我们针对两个基因(即Ctsk,其编码作为对于骨体内平衡至关重要的半胱氨酸蛋白酶的组织蛋白酶K;和Cldn7,其编码作为紧密连接的主要组分的封闭连接蛋白-7(claudin-7)),将由使杂合性同基因XY雄性和雌性VELOCIMICE<sup>®</sup>交配获得的F1代敲除小鼠的表型与由常规交配获得的F2代敲除小鼠的那些表型进行比较。对于两者,我们均用与起始密码子同框融合的编码β-半乳糖苷酶报告子、继之以新霉素磷酸转移酶药物选择盒替换整个编码区的序列。我们通过使F0 XY雌性与它们的克隆同胞XY雄性VELOCIMICE<sup>®</sup>交配来产生野生型(+/+)、杂合性(+-)和纯合性敲除(-/-)小鼠的F1代研究同辈。对于Cldn7敲除,我们通过使雄性F0 VELOCIMICE<sup>®</sup>与C57BL/6NTa c雌性杂交以产生F1杂合性小鼠来产生额外常规交配对照组,接着使这些小鼠

互交以产生F2研究同辈。

[0487] 与对Ctsk敲除小鼠的先前报道一致,我们发现通过XY雌性交配产生的Ctsk<sup>-/-</sup>小鼠有活力且能生育,但相较于它们的Ctsk<sup>+/+</sup>同窝仔畜,它们表现许多骨缺陷,包括BMD显著增加以及股骨小梁在雌性中的滞留增加。如根据先前报道的Cldn7敲除所预期,来自常规交配方案与XY雌性交配方案两者的Cldn7<sup>-/-</sup>小鼠均是矮小的,并且在出生之后数天死亡。在活产小鼠之中,我们观察到通过常规交配(Cldn7<sup>+/+</sup>,32;Cldn7<sup>+/-</sup>,74;Cldn7<sup>-/-</sup>,13; P=4.2x 10<sup>-7</sup>, $\chi^2$ 检验)以及通过XY雌性交配(Cldn7<sup>+/+</sup>,54;Cldn7<sup>+/-</sup>,1 08;Cldn7<sup>-/-</sup>,24;P=9.2x 10<sup>-4</sup>, $\chi^2$ 检验)产生的纯合性突变小鼠的数目均降低,从而指示不完全外显胚胎致死性(penetrant embryonic lethality)。与肾缺陷一致以及与公开的突变小鼠相同,来自常规交配方案与XY雌性交配方案两者的Cldn7<sup>-/-</sup>新生幼畜均未能适当调控血浆钾离子。除匹配的生长和肾功能表型之外,我们也观察到在来自XY雌性交配组与常规交配组两者的杂合子的主要成体器官中,β-半乳糖苷酶整装表达样式相同。

[0488] 讨论

[0489] 无论由不相容遗传背景(Eicher等(1982)Science 217:535-537;Taketo - Hosotani等(1989)Development 107:95-105)还是为性别决定所需的基因中的突变(Bagheri-Fam等(2008)Dev.Biol.314:71-83;Barriouuevo等(2006)Biol.Reprod.74: 195-201;Bogani等(2009)PLoS Biol 7:e100019 6;Chaboissier等(2004)Development 131:1891-1901;Colvin等(2001)Cell 104:875-889;Gierl等(2012)Dev.Cell 23:1032-1042;Hammes等(2001)Cell 106:319-329;Katoh-Fukui等(1998)Nature 393:688-692;Meeks 等(2003)Nat.Genet.34:32-33;Tevosian等(2002)Development 129:462 7-4634;Warr等(2012)Dev.Cell 23:1020-1031)引起,小鼠中的雄性向雌性性别逆转几乎始终伴有不生育性。一些携带主要雄性性别决定基因Sry 中的突变的XY雌性能生育,但具有小型不常见各窝和短暂停殖寿命(Love 11-Badge和Robertson(1990)Development 109:635-646)。新近地,报道携带Sry的通过用转录活化子样效应物核酸酶(TALEN)定向靶向来产生的41 碱基对(bp)缺失的XY雌性小鼠具有类似较低的生育性和生殖力(Wang等 (2013) Nat.Biotechnol.31:530-532)。在TALEN诱导的Sry突变的另一实例中,发现携带2bp缺失的单一XY雌性小鼠无生殖力(Kato等(2013)Sci.Rep.3:3136)。

[0490] 与这些生育性受损情况鲜明对比的是,由基因靶向ES细胞产生的XY 雌性VELOCIMICE®显示可似乎与预期相反的空前高水平的生育性和正常生殖力。除正常20X配子之外,XY雌性也可产生异常20Y、190和21XY 卵型,后述两者由减数分裂I中的解释XY雌性的F1子代中的XXY、XY Y和XO性染色体核型的不分离事件所致。因此,有可能的是XY 雌性可具有降低数目的有活力且具有功能性的卵。实际上,各种F1性染色体核型的比例与假定源于三种异常配子类型的四种类型的有活力的受精子代有25 -30%损失的模型最佳拟合(通过 $\chi^2$ 分析)。这种损失将导致从所有卵型损失仅20%,此将不可能导致我们可在我们的9个月交配测试中辨别的生殖力差异。

[0491] 此处描述的XY雌性的高生育性和生殖力表明雄性向雌性性别逆转的独特机理。缺乏XY雌性性状的可传递性指示性别逆转是短暂事件,其中基因靶向ES细胞克隆中的一些细胞获得使它们注定有利于产生XY雌性的表观遗传标志或某一其它生理变换。无论ES细胞已获得什么标志或变化,它都似乎是固定的和稳定的。产生XY雌性的倾向为各基因靶向XY ES

细胞克隆所特有。各自通常在重复注射实验中产生可再现比例的XY雌性，并且个别克隆不能通过在基因靶向过程之后使它们转换至不同培养条件来被‘雌性化’或‘雄性化’。XY雌性现象的特征是它仅影响已贯穿整个基因靶向过程—解冻、生长、传代、电穿孔、抗生素选择、扩增和冷冻—在雌性化培养基中维持的ES细胞，从而表明基因靶向过程的应激可能不时诱导对 XY ES细胞赋予‘雌性化’特性的表观遗传标志。

[0492] 我们首先在我们使我们的根据DMEM的高渗基础培养基(>300m0sm o1/kg)转换成等渗(275-295m0sm o1/kg)KO-DMEM之后观察到大量XY雌性。细胞通过使MAP激酶途径活化来对渗透应力起应答，并且作为MAP 激酶途径的成员的Map3k4和Gadd45c中或通过MAP激酶来进行信号传导的胰岛素途径中的突变可导致Sry的表达降低，并且不能诱导未分化的生殖嵴(indifferent genital ridge)中的睾丸发育。在高渗培养基中培养ES细胞可能刺激MAP激酶途径，并且促成在细胞已扩增至发育胚胎中之后使雄性分化强化的生理或表观遗传环境。相反，在渗透培养基或略微低渗培养基中培养ES细胞可能减弱通过MAP激酶途径进行的信号传导，因此模拟性别逆转突变的作用。

[0493] 除雄性向雌性性别逆转现象牵涉于对性别决定的理解之外，我们在此处描述的所述性别逆转现象对于产生经遗传修饰的小鼠也具有重要实际影响。因为XY雌性能生育且生殖力旺盛，所以我们可使用F0同胞互交来产生F1纯合性敲除小鼠，其表型使在我们的实验室中或描述于公开报道中的通过自然交配方案产生的那些表型再现。即使当排除携带异常性染色体核型的小鼠时，仍然有足够的正常F1XX雌性和XY雄性用于研究同辈的组合。相比于从XO ES细胞克隆产生能生育的雌性，我们的培养方法更快且更容易，因为不需要进行亚克隆以及筛选罕见Y染色体丧失。对促进性别转变的条件和作为原因的分子机理的进一步探究可使得能够开发用于从任何靶向ES细胞克隆可靠、可预测和有效产生雄性VELOCIMICE<sup>®</sup>与雌性V ELOCIMICE<sup>®</sup>两者的改进方法。

[0494] 实施例2. 源于在低克分子渗透压重量浓度培养基中培养的XY ES细胞的胚胎中的Ddx3y (Dby)、Eif2s3y和Sry的表达被沉默或降低

[0495] 将处于性交后11.5天(dpc)发育阶段的胚胎解剖，其中使用蒂勒分期来确定它们的近似阶段。因为一窝内的妊娠龄期广泛不同，所以通过从后肢芽后部至尾部末端对尾部体节(ts)的数目进行计数来实现对个别胚胎的更精确分期。使用这个技术，具有8个尾部体节的胚胎是10.5dpc，18个尾部体节是11.5dpc，并且30个尾部体节是12.5dpc(根据Hacker, Capel, Goodfellow和Love11-Badge, Devel 1995)。

[0496] 在B6小鼠中，Sry被报道在约13ts时可检测，在约17-18ts时达到峰值，并且截至在约27ts时衰退。从小鼠获取具有12-27之间的ts的胚胎以捕集Sry的完全时程。从处于这些阶段的胚胎解剖生殖嵴(含有生殖腺和邻近中肾)，与体壁和后肾(发育肾)分离，并且保存在Trizol中以进行RNA 纯化。

[0497] Y染色体上的性别决定基因(Sry)负责使哺乳动物中的雄性性别决定启始。这个基因在狭窄发育窗口(在小鼠中是约11.5dpc)期间在生殖腺中的有限细胞群体中表达。在这个窗口期间，Sry使为生殖腺变成睾丸以及生物体获得雄性命运所需的所有变化启始。然而，如果Sry表达在这个窗口期间被降低，或甚至在少许几小时后表达，那么XY个体产生卵巢，变成雌性，并且被视为性别逆转。

[0498] 为确定为何一些XY克隆产生性别逆转的小鼠，我们使用RT-PCR来测定雄性与雌性

两者中的早期性别决定标志物的表达水平。在雄性途径中,我们考察雄性性别决定的启始中涉及的基因:Sry、Sox9(被提出是Sry的直接靶标;为睾丸发育的启始和维持所必需),抑制雌性途径的各个方面中涉及的基因(Fgf9),以及作为早期睾丸分化的良好标志物的基因(Dhh和Am h)。在雌性途径中,我们考察在极早期雌性发育中具有活性的基因(Foxl2)以及抑制雄性途径的各个方面中涉及的基因(Rspo1)。参见图15。

[0499] 为制备用于RT-PCR的样品,使组织在TRIzol中均质化,并且氯仿用于相分离。根据制造商说明书,使用用于微阵列总RNA分离试剂盒的MagMAX™-96(属于Life Technologies的Ambion,目录号AM1839)纯化含有总RNA的水相。使用来自以上所列的MagMAX试剂盒(属于Life Technologies的Ambion,目录号AM1839)的MagMAX™Turbo™DNA酶缓冲液和TURBO DNA酶移除基因组DNA。使用SuperScript® VILO™主混合物(属于Life Technologies的Invitrogen,目录号11755500)使mRNA逆转录成cDNA。使用ABI 7900HT序列检测系统(Applied Biosystems),用TAQ MAN®基因表达主混合物(属于Life Technologies的Applied Biosystems,目录号4370074)扩增cDNA。循环条件由在95℃下10分钟,继之以40个循环的95℃持续3秒和60℃持续30秒组成。Hprt用作内部对照基因以使任何cDNA输入差归一化。在 $\Delta\Delta CT$ 比较分析方法中,参照样品是所有其它样品都与其进行比较的1号。所有探针都用作为报告子的6FAM和作为猝灭剂的BHQ1标记。序列显示于表8中。

[0500] 表8.RT-PCR引物和探针

基因	探针或引物	序列(5'至 3')	SEQ ID NO
[0501]	mHPRT1	探针	TGGGAGGCCATCACATTGTGGC
	mHPRT1	正向	TGCTCGAGATGTCATGAAGGA
	mHPRT1	反向	CCAGCAGGTCAAGAAAGAAC
	mSox9	探针	CGCTGACCATCAGAACTCCGGCT
	mSox9	正向	ACCCGCTCGCAATAACGACTA
	mSox9	反向	CCGGCTGCGTGACTGTAG
	mRspo1	探针	TAGGACCTACCTGGGCACAGTGA

基因	探针或引物	序列(5'至 3')	SEQ I D NO
<i>mRspo1</i>	正向	CAACAGGGCCACTCACATCAG	8
<i>mRspo1</i>	反向	GCACTGTACTCTTCCACAGGTATC	9
<i>mDhh</i>	探针	ATCGGTCAAAGCTGATAACTCACTGGC	10
<i>mDhh</i>	正向	AGTCCCAGCAACCACATCCA	11
<i>mDhh</i>	反向	AGCGCACCGTGGCATTCC	12
<i>mGata4</i>	探针	TGCAATGCCTGTGGCCTCTATCA	13
<i>mGata4</i>	正向	TGGGACGGGACACTACCT	14
<i>mGata4</i>	反向	CGGTTGATGCCGTTCATCTTG	15
<i>mFgf9</i>	探针	AAACATGTGGACACCGGAAGGAGA	16
<i>mFgf9</i>	正向	CAACACCTACTCTTCCAACCTCTA	17
<i>mFgf9</i>	反向	GGAGTCCCCTGCCTTATTAAATGC	18
<i>mSry</i>	探针	TTTACAGCCTGCAGTTGCCTCAACA	19
<i>mSry</i>	正向	GGCTAAAGTGTACAGAGGAGTG	20
<i>mSry</i>	反向	TCCAGTCTTGCCCTGTATGTGATG	21
<i>mSf1</i>	探针	CTACCTCTGGCCTGCCACCAC	22
<i>mSf1</i>	正向	TCCTGTCCTGCATCTGTG	23
<i>mSf1</i>	反向	GGAGCAGCAGGTCTTGGTG	24
<i>mWnt4</i>	探针	CAGTTCAAGCCACATACAGATGAGGACC	25
<i>mWnt4</i>	正向	CGCTGGTGCCTCGGAATG	26
<i>mWnt4</i>	反向	CGGATGTCCTGCTCACAGAAG	27
<i>mAmh</i>	探针	TCAACCAAGCAGAGAACGGGCCA	28
<i>mAmh</i>	正向	GCTCGGGCCTCATCTTAACC	29
<i>mAmh</i>	反向	GCAGGAATCAGAGCCAAATAGAAAG	30
<i>mNr0b1</i>	探针	TGCTCACTAGCGCTCAGCAAACG	31
<i>mNr0b1</i>	正向	AGGCAGGGCAGCATCTTATACAG	32
<i>mNr0b1</i>	反向	CACTCGCCTCTGCGATGTG	33
<i>mFoxl2</i>	探针	TCACTCTGTCCGGCATCTACCA	34
<i>mFoxl2</i>	正向	CGAGAGCGCCGAGAACAG	35
<i>mFoxl2</i>	反向	GAACGGGAACCTGGCTATGATG	36
<i>mDdx3y</i>	探针	TCAGCAGATTGGGACTTAGAACGT	37
<i>mDdx3y</i>	正向	GTGTATGGTGGTGGCTGATACTGT	38
<i>mDdx3y</i>	反向	CGTCCTGGTGTGGCAACTAAC	39
<i>mEif2s3y</i>	探针	AGCTGGTAATGAATCTTGCCTCAACC	40
<i>mEif2s3y</i>	正向	TGGATGCAGCTTTCTGTTGA	41
<i>mEif2s3y</i>	反向	TGGCAGCCAGGTGTTCAAG	42

[0503] 为使RT-PCR样品归一化,我们使用一般性管家基因(Hprt)以及在这些阶段时为生殖嵴所特有并且以相等水平在两性中表达的基因(Sf1和Gata4)。

[0504] 先前实验指示Y染色体上的通常在ES细胞中表达的两个基因在来自性别逆转品系的ES细胞中被下调(Ddx3y和Eif2s3y;参见图1)。这些基因在Y染色体的短臂上的Sxr<sup>b</sup>区中。通过缺失研究,已知这个区域对精子发生至关重要,但不涉及于性别决定中。这两个基因均在这个发育时期期间在雄性生殖腺中但不在卵巢中表达(来自GUDMAP.org的昂飞(affymetrix)数据);因此,我们使用针对这些基因的探针来显示除性别决定中涉及的那些基因之外,产生性别逆转的过程是否影响Y染色体的其它基因的表达。

[0505] 两个克隆用于这个实验:1823CF11历史上在F0代中仅产生雄性VELOCIMICE<sup>®</sup>,而1823CE6已在F0代中产生88%雌性XY VELOCIMICE<sup>®</sup>(性别逆转)。使两个克隆均在它们的整个分离和扩增中在基于KO-DMEM的培养基中在相同条件下生长。由各克隆产生11窝VELOCIMICE<sup>®</sup>:使来自各自的2窝达到足月以验证性别逆转的程度,保留来自各克隆的9窝用于生殖嵴收集(参见表9)。根据各克隆的被允许达到足月以致可辨别后代性别的各窝,克隆CF11产生11只XY雄性VELOCIMICE<sup>®</sup>,并且无XY雌性VELOCIMICE<sup>®</sup>,外加2个雄性嵌合体和1个雌性嵌合体。克隆CE6产生2个XY雄性VELOCIMICE<sup>®</sup>和6个XY雌性VELOCIMICE<sup>®</sup>,外加3个雄性嵌合体和6个雌性嵌合体。

[0506] 尽管对于各克隆,使胚泡注射和解剖起始时间定于一天的相同时间,但相较于CF11,性别逆转的CE6克隆的各窝在发育方面提前(参见表10)。举例来说,在8:30AM和9:30AM获取的CF11各窝具有起始于12-13ts的体节范围,而在这个时间的CE6各窝具有16-20ts的体节范围。总之,这代表CE6超过CF11提前约8小时,并且意味着在这个实验中,在CE6株系中,Sry表达的最早阶段不可测量。然而,在17-18ts时的Sry表达峰时仍然得以体现。

[0507] 表9.生殖嵴样品的收集

	1823CF11	1823CE6
妊娠窝数	11	11
胚胎数	71	68
尾部体节范围	12-27	16-25 (无早期 ts)

[0509] 表10.收集生殖嵴样品的定时和发育阶段

时间	1823CF11	1823CE6
8:00	-	2 窝 17-22 ts
8:30	1 窝 12-16 ts	1 窝 20-24 ts
9:00	-	2 窝 16-20ts
9:30	2 窝 13-23 ts	-
10:00	-	2 窝 20-24 ts
11:00	2 窝 14-22 ts	-
12:30	-	1 窝 21-23 ts
1:00	1 窝 18-21 ts	-
2:30	-	1 窝 18-25 ts
3:00	1 窝 17-22 ts	-
4:00	1 窝 22 ts	-
5:00	1 窝 21-27 ts	-

[0510] [0511] 对于对照,我们也在性别决定窗口(20ts)期间收集来自远交系CD1的生殖嵴。来自这个远交系的XY样品在这个时间应表达高水平的Sry,并且充当强阳性对照。XX样品不具有Y染色体,并且因此是Sry,Y染色体上的基因和雄性途径的其它标志物的阴性对照。

[0512] 产生胚泡的VELOCIMOUSE®方法主要产生完全源于注射ES细胞的小鼠,但仍然产生较低数目的宿主源性胚胎以及宿主与ES细胞两者的嵌合体。为从考虑中消除那些样品,我们使用PCR来寻找存在的不同酪氨酸酶等位基因,其是在宿主胚泡品系Swiss Webster(TyrMut)中突变并且在F1 H4ES细胞(TyrWt)中具有功能性的毛色基因。如果样品具有大于或等于0.5的TyrMut,或小于或等于1.5的TyrWt水平,以及大于TyrWt 20%的T yrMut,那么它们被消除。

[0513] 为使RT-PCR数据相对于各样品中的生殖腺组织的量进行归一化,我们考查在两性的生殖腺中特异性表达的以下两个基因的水平:Sf1和Gata4。跨越我们考查的发育阶段,相对于管家基因Hprt,Sf1在生殖腺中具有相对恒定表达,并且因此用作随后样品中的归一化基因。Gata4似乎在早期阶段具有增加的水平,因此未用作归一化基因。

[0514] 如图2中所示,在正常性别决定窗口中,在来自CF11株系的生殖腺中, Sry表达可

检测。图2中的Sry表达相对于Sf1加以显示,其是在这个阶段两性的生殖嵴中的体细胞标志物。当Sry表达相对于Hprt表达加以归一化时,观察到类似结果(数据未显示)。在20ts时的CD1XY和XX样品用作对照(CD1XY作为Sry表达的阳性对照,并且CD1XX作为阴性对照)。如图2中所示,Sry表达起始于约13ts时变得可检测,在约16-17ts时达到峰值,并且截至约25ts时衰退。然而,在源于性别逆转CE6克隆的生殖腺中,在考查的所有性别决定阶段(16-25ts)期间,Sry表达都基本上不可检测。来自CE6克隆的大多数生殖腺甚至在40个循环之后也不具有可检测CT值。

[0515] Y染色体基因Ddx3y和Eif2s3y在这个阶段如所预期在CF11生殖腺中表达,但在来自性别逆转的CE6克隆的生殖腺中基本上不可检测,如图3 和图4中所示。图3显示CE6和CF11中相对于Sf1的Ddx3y表达。图4 显示CE6和CF11中相对于Sf1的Eif2s3y表达。XY CD1和XX CD1分别用作阳性对照和阴性对照(20ts)。连同关于Sry表达的数据一起,这些数据指示Y染色体上的三个无关基因在性别逆转的克隆(CE6) 中被强烈阻遏,从而表明在性别逆转的克隆中,大部分的Y染色体可被沉默。

[0516] 图5A、5B、5C和5D显示当相较于非性别逆转的CF11克隆时,在来自性别逆转的CE6克隆的生殖腺中,在Sry下游的雄性性别决定和睾丸发育的标志物被降低。图5A显示相对于Sf1的Sox9表达,图5B显示相对于 Sf1的Fgf9表达,图5C显示相对于Sf1的mDhh表达,并且图5D显示相对于Sf1的Amh表达。XY CD1和XX CD1分别用作阳性对照和阴性对照 (20ts)。

[0517] 图6A和6B显示相较于非性别逆转的CF11克隆,在来自性别逆转的 SE6克隆的生殖腺中的雌性性别决定和卵巢发育的标志物。图6A显示相对于Sf1的Fox12表达,并且图6B显示相对于Sf1的Rspo1表达。XY CD1 和XX CD1分别用作阳性对照和阴性对照 (20ts)。雌性性别决定和卵巢发育的标志物通常在稍微迟于这些阶段的阶段被引发,然而,一种最早卵巢发育标志物(Fox12) 在来自性别逆转的CE6克隆的生殖腺中被强烈增加。在性别逆转的样品中,卵巢标志物Rspo1也略微上行。小差异可简单归因于这个阶段太早以致不能检测大部分卵巢特异性发育。

[0518] 因为克隆1823CE6稍后被证明已在某一时间点丧失它的Y染色体,所以使用额外XY ES细胞克隆如上重复表达实验,所述克隆包括一个中度性别逆转株系和一个强烈性别逆转株系以确信两者在实验中的所有时点都仍然具有Y染色体。使克隆在它们的整个分离和扩增中在基于KO-DMEM的培养基中在相同条件下生长。如以下进一步详细所说明,这些实验确实在 XY ES细胞性别逆转株系中,Sry、Y染色体基因和雄性性别决定基因的表达被降低,并且当相较于产生较小频率的性别逆转的株系时,在产生最高频率的性别逆转的株系中倾向于被更强烈阻遏。此外,这些实验证明Y染色体基因是报告性别逆转现象的良好方式,因为它们在小鼠发育期间在性别逆转的株系中以及在出生之后在测试的所有器官中始终被阻遏。此外,在一个从未进行性别逆转的XY ES细胞系中,观察到大多数Y染色体基因和雄性性别决定基因具有异常高水平。

[0519] 在图7中,Sry表达在性别决定期间在生殖腺中测量。使用三个对照株系:通过交配产生的XY小鼠胚胎;来自非靶向XY ES细胞的XY小鼠胚胎;和来自不进行性别逆转的XY ES细胞系(1823-CF11)的XY小鼠胚胎。这些对照显示正常Sry表达时程,其中在约14ts时启始,在17-18ts时达到峰值,并且截至26ts时丧失。两个性别逆转株系显示在这个关键时期期间,Sry表达显著较小。1号株系是强烈性别逆转株系(平均86%XY雌性),并且相比于2号株

系(15069-CD1;45%XY雌性),历经这个时程具有更小 Sry表达。XX小鼠胚胎不具有任何表达(归因于缺乏Y染色体),并且充当阴性对照。

[0520] 图8A-C显示在性别决定期间在生殖嵴中Y染色体上的以下三个基因的表达水平:Eif2s3y(图8A);Uty(图8B);和Ddx3y(图8C)。所有三者都在从非性别逆转XY ES细胞系产生的小鼠胚胎中显示最强烈表达,在对照(通过交配产生的XY小鼠胚胎和来自非靶向XY ES细胞的XY小鼠胚胎)中显示中等水平,并且在从两个性别逆转XY ES细胞系产生的XY小鼠胚胎中显示最低水平,从而指示除仅仅Sry之外,Y染色体上的多个基因也受这个过程的影响。图9显示图7和8A-C中的只是加以精简的相同数据,其显示在胚胎生殖嵴中测定的所有4个Y染色体基因的平均值。

[0521] 为确定Y染色体基因的表达是否在出生之后在从性别逆转株系产生的小鼠中仍然被阻遏,测定在出生之后一周,在从非靶向XY ES细胞系、非性别逆转XY ES细胞系和性别逆转株系产生的小鼠中的多个器官中的Ddx3y(图10A);Uty(图10B);Eif2s3y(图10C)和Kdm5d(图10D)的表达水平。测试生殖腺、肾、心脏、肝和爪中的表达水平。图10A-D显示在出生之后,Y染色体基因在从性别逆转株系产生的小鼠中在多个器官中仍然被阻遏,并且这些基因的表达水平低于来自非靶向XY ES细胞的小鼠中以及来自不进行性别逆转的XY ES细胞系的小鼠中的水平。

[0522] 图11A(Sox9)和11B(Fgf9)显示当相较于非性别逆转XY ES细胞系、非靶向对照XY ES细胞系和通过交配产生的XX小鼠胚胎时,在来自从性别逆转XY ES细胞系产生的小鼠胚胎的生殖腺中,在Sry下游的雄性性别决定和睾丸发育的标志物被降低。通过交配产生的XY小鼠胚胎用作额外对照。Sox9与Fgf9两者均是雄性途径中的关键早期基因,并且两者均大约在生殖腺中的Sry表达达到峰值时(16-18ts)被上调,以及为雄性睾丸发育所必需。Sox9和Fgf9水平在来自不进行性别逆转的株系的生殖腺中最高,在对照(通过交配产生的XY小鼠胚胎和来自非靶向XY ES细胞的小鼠胚胎)中中等,并且在通过交配产生的XX小鼠胚胎中最低。XX小鼠胚胎用于指示在这个时期期间Sox9和Fgf9的雌性表达水平。从两个性别逆转株系产生的小鼠胚胎中的表达水平落在XX与XY对照之间,其中在Sox9诱导时期期间,1号更强烈逆转株系相比于2号显示更低水平。

[0523] Dhh和Amh是在睾丸发育期间被强烈和特异性上调并且在卵巢发育期间不存在的睾丸发育标志物。参见图15。在来自雄性对照(来自不进行性别逆转的株系的XY小鼠胚胎、通过交配产生的XY小鼠胚胎和来自未靶向ES细胞的XY小鼠胚胎)的生殖腺中,这两个基因被最高表达。从两个性别逆转株系产生的小鼠具有落在XX与XY交配对照之间的表达水平,其中1号更强烈逆转株系相比于2号显示更低、更接近于雌性的水平(图12A(Dhh)和12B(Amh))。

[0524] Foxl2是最早雌性发育标志物,并且在雌性生殖腺中在21-23ts之间被强烈上调。参见图15。如图13中所示,这个基因在从两个性别逆转XY ES细胞系产生的小鼠中的表达水平落在XX与XY交配对照之间。

[0525] 实施例3.XY ES细胞克隆中的Ddx3y(Dby)、Eif2s3y和Uty表达缺乏或降低与从那些XY ES细胞克隆产生能生育的XY F0雌性小鼠相关联

[0526] 表11显示在将由在VGF1ES细胞系中进行基因靶向获得的XY ES细胞克隆显微注射至8细胞胚胎中之后,所述XY ES细胞克隆产生雌性VELOCIMICE<sup>®</sup>的倾向。所有克隆

都在整个靶向和显微注射过程中在基于K0-DMEM的培养基中维持和培养。根据这个克隆样品，明显的是产生XY 雌性VELOCIMICE<sup>®</sup>的能力具有克隆特异性，并且在0-60%的范围内。这些结果可在多个显微注射实验中再现：不产生雌性的克隆在重复显微注射的情况下维持这个性状，而产生雌性的克隆在重复显微注射实验中倾向于产生近似相同比例的雌性。所述效应不可通过使克隆在基于DMEM的培养基中再生长来逆转。使来自其中持续整个靶向过程-电穿孔、选择药物抗性集落、筛选靶向突变、扩增和低温保存-使ES细胞在基于DMEM或基于K0-DMEM的培养基中生长和维持的基因靶向实验的ES细胞克隆，在相反培养基中解冻和生长3天以为向8细胞胚胎中显微注射作准备。在基于D MEM的培养基中获得的克隆维持低频率的雌性VELOCIMICE<sup>®</sup>产生，并且这不可通过简短暴露于K0-DMEM来增加。同样，在基于K0-DMEM的培养基中获得的克隆产生较高频率的雌性VELOCIMICE<sup>®</sup>，并且简短暴露于DMEM不使XY克隆产生雌性的倾向降低。

[0527] 表11. 在源于在K0-DMEM中培养的XY ES细胞的XY雌性VELOCIMICE<sup>®</sup>的产生方面的克隆性变化

注射的克隆	雄性 VELOCIMICE <sup>®</sup>	雌性 VELOCIMICE <sup>®</sup>	雌性的比 例(%)
DG4	8	4	33
EC2	3	1	25
ED1	12	2	14
EH2	10	0	0
EH3	6	0	0
NB1	6	2	25
ND1	8	4	33
NF2	13	7	35
NF3	12	6	33
NG4	11	9	45
NG5	4	6	60
HN2	4	1	20

[0528]

[0529] 接着比较雌性化基因靶向的XY ES细胞克隆相对于非雌性化基因靶向的XY ES细胞克隆的基因表达概况（参见表12）。使用4个ES细胞克隆，并且各自以完全相同方式加以处理。所有4个克隆都源于在整个过程中在相同基于K0-DMEM的培养基中生长的VGF1细胞，所述过程包括初始解冻、用靶向载体电穿孔、选择药物抗性克隆以及冷冻。两个克隆在多次显微注射的情况下不产生XY雌性VELOCIMICE<sup>®</sup>；两个克隆在重复显微注射的情况下产生>50%XY雌性VELOCIMICE<sup>®</sup>。当相较于非雌性化ES细胞时，雌性化ES细胞中的Y染色体基因Ddx3y、Uty和Eif2s3y的表达水平低10-20倍。除Y染色体以外的染色体上的两个基因

(Col10a1和Tm4sf1) 用作对照。

[0530] 表12. 雌性化基因靶向的XY ES细胞克隆相对于非雌性化基因靶向的XY ES细胞克隆中的基因表达比较

基因	雌性克隆相对于雄性克隆中的 相对表达比率	染色体
<i>Col10a1</i>	2.41	10
<i>Tm4sf1</i>	1.76	3
<i>Ddx3y</i>	0.10	Y
<i>Uty</i>	0.07	Y
<i>Eif2s3y</i>	0.05	Y

[0531] [0532] 在另一实验中,选择在K0-DMEM培养基中同等获得的5个基因靶向的ES细胞克隆用于亚克隆实验。克隆985-AA8和1823-CF11在三个单独显微注射实验中仅产生雄性VELOCIMICE<sup>®</sup>,而克隆15069-CD1、4048-BC 4和979-AC7在重复显微注射的情况下产生平均30%与50%之间的XY雌性VELOCIMICE<sup>®</sup> (参见表13)。使ES细胞克隆从液氮储存中解冻,并且亚克隆至两个重复96孔板中,将其中一者储存在-150°C下,而使另一者于两个其它板上生长和传代以进行DNA和RNA制备。DNA板用于筛选Y 染色体丧失,而RNA板用于通过RT-qPCR来考查Eif2s3y、Uty和Ddx3y 的表达。如表13中所示,克隆产生XY雌性VELOCIMICE<sup>®</sup>的倾向与不具有Eif2s3y、Uty和Ddx3y的表达或具有Eif2s3y、Uty和Ddx3y的降低表达的亚克隆的百分比成正比,从而指示亚克隆中的Y染色体基因表达丧失可预测克隆将产生XY雌性VELOCIMICE<sup>®</sup>的可能性:Eif2s3y、Uty和Ddx3y 的表达被沉默的亚克隆的比例越大,亲本ES细胞克隆产生XY雌性VELOCIMICE<sup>®</sup>的倾向越高。

[0533] 表13. XY ES细胞克隆中缺乏Eif2s3y、Uty和Ddx3y的表达与从那些克隆产生雌性VELOCIMICE<sup>®</sup>相关联并且预测所述产生

注射的克隆	雄性 VELOCIMI CE <sup>®</sup>	雌性 VELOCIMI CE <sup>®</sup>	雌性的比例(%)	缺乏 Eif2s3y、Uty、Ddx3y 的表达的亚克隆的百分比
15069-CD1	17	16	48.5	65.6
	2	2	60.0	
4048-BC4	14	13	48.1	56.2
	3	1	25.0	
[0534] 979-AC7	11	12	52.2	18.8
	8	1	11.1	
985-AA8	14	0	0.0	6.3
	11	0	0.0	
	7	0	0.0	
1823-CF11	7	0	0.0	4.2
	4	0	0.0	
	8	0	0.0	
	11	0	0.0	

[0535] 为产生表13的上部中的数据,将来自产生雌性XY小鼠与雄性XY小鼠两者的3个亲本XY ES细胞系的亚克隆提交以进行Eif2s3y、Uty和Ddx 3y基因表达的RNA分析。测试的3个部分性别逆转克隆包括979-AC7、4 048-BC4和15069-CD1。测试各自的32个亚克隆,包括克隆979-AC7的亚克隆A1-A4、B1-B4、C1-C4、D1-D4、E1-E4、F1-F4、G1-G4和H1-H4,克隆4048-BC4的亚克隆A5-A8、B5-B8、C5-C8、D5-D8、E5-E8、F5-F8、 G5-G8和H5-H8,以及克隆15069-CD1的亚克隆A9-A12、B9-B12、C9-C 12、D9-D12、E9-E12、F9-F12、G9-G12和H9-H12。Drosha的表达用作对照,并且相对于B2m表达来测定各基因的表达。RT-PCR结果以 $\Delta Ct$ (目标基因-B2m)形式显示于图14A-C中。负 $\Delta Ct$ 指示相对表达较高,并且正 $\Delta Ct$ 指示相对表达较低。如图14A中所示,在克隆979-AC7的32个亚克隆中的6个(18.8%)中,未检测到Eif2s3y、Uty或Ddx3y的表达。如图14B 中所示,在克隆4048-BC4的32个亚克隆中的18个(56.2%)中,未检测到E if2s3y、Uty或Ddx3y的表达。如图14C中所示,在克隆15069-CD1的32 个亚克隆中的22个中,未检测到Eif2s3y、Uty或Ddx3y的表达。然而,对 32个亚克隆的随后分析指示32个亚克隆中的一个—克隆D9—已丧失Y染色体,这意味着15069CD1的32个亚克隆中的21个(65.6%)具有Y染色体,但不具有Eif2s3y、Uty或Ddx3y的可检测表达。用针对Y染色体上的以下两个基因的探针进行拷贝数测定来对Y染色体的存在进行评估:Sry 和Eif2s3y。克隆979-AC7的所有32个亚克隆、克隆4048-BC4的所有32 个亚克隆以及克隆15069-CD1的32个亚克隆中的31个由拷贝数测定确认具有一个拷贝的Y染色体。

[0536] 为产生表13的下部中的数据,将来自仅产生雄性XY小鼠的2个亲本 XY ES细胞系的亚克隆提交以进行Eif2s3y、Uty和Ddx3y基因表达的RN A分析。测试的2个克隆包括985-AA8和1823-CF11。测试各自的48个亚克隆,包括克隆985-AA8的亚克隆A1-A6、B1-B6、C1-C6、D1-D6、E1- E6、F1-F6、G1-G6和H1-H6,以及克隆1823-CF11的亚克隆A7-A12、B7 -B12、C7-

C12、D7-D12、E7-E12、F7-F12、G7-G12和H7-H12。Drosha 的表达用作对照，并且相对于B2m表达来测定各基因的表达。RT-PCR结果以  $\Delta Ct$  (目标基因-B2m) 形式显示于图14D-E中。负  $\Delta Ct$  指示相对表达较高，并且正  $\Delta Ct$  指示相对表达较低。如图14D中所示，在克隆985-AA8的 48 个亚克隆中的3个(6.25%；克隆A4、F6和H3) 中，未检测到Eif2s3y、Uty或Ddx3y的表达。显示2个其它985-AA8亚克隆—D1和F2—已丧失Y染色体。如图14E中所示，在克隆1823-CF11的48个亚克隆中的2个(4.16%；克隆A9和E8) 中，未检测到Eif2s3y、Uty或Ddx3y的表达。显示一个其它1823-CF11亚克隆—C12—已丧失Y染色体。用针对Y染色体上的下一个基因的探针进行拷贝数测定来对Y染色体的存在进行评估：Sry。通过拷贝数测定确认在985AA8的48个亚克隆中的46个以及1823CF11 的48个亚克隆中的47个中存在一个拷贝的Y染色体。

[0537] 实施例4. 用Y染色体基因Sry中的TALEN诱导突变使F0 XY雌性的生育性增加

[0538] 用大型靶向载体(LTVEC) 对Sry产生包括lacZ替换等位基因的靶向缺失，所述大型靶向载体包含由38kb和37kb的同源臂侧接的包含与Sry 起始密码子同框融合的lacZ以及新霉素抗性基因的插入盒，并且基于来自 bMQ文库(129S7/SvEv Brd-Hprt b-m2) 的BAC。LTVEC(参见NIH KOMP 项目VG12778LTVEC(可通过因特网在万维网(www) 上在URL“[velocigene.com/komp/detail/12778](http://www.velocigene.com/komp/detail/12778)”处获得)) 在它的同源臂中包含用于Sry的表达的所有已知控制元件。它的lacZ编码的β-半乳糖苷酶充当Sry基因的组织特异性和发育阶段特异性表达的报告子。通过用靶向载体正确靶向Sry基因产生的等位基因包含Sry编码序列的缺失以及用插入盒进行的替换。靶向载体用于靶向VGB6(也称为B6A6) C57BL/6与VGF1(也称为F1H4) C57B L6/129F1杂交ES细胞系两者中的Sry基因。VGF1(F1H4) 小鼠ES细胞源于通过使雌性C57BL/6NTac小鼠与雄性129S6/SvEvTac小鼠杂交产生的杂交胚胎。因此，VGF1ES细胞含有来自129S6/SvEvTac小鼠的Y染色体。由VGF1细胞系产生的雌性XY小鼠含有源于129S6/SvEvTac小鼠的Y染色体。

[0539] 我们获得被设计来靶向Sry基因中的HMG框DNA结合基序编码序列的一部分的TALEN(上游识别序列：5'-TCCCGTGGTGAGAGGCAC-3' (SEQ ID NO:43)；下游识别序列：5'-TATTTGCATGCTGGAT-3' (SEQ ID NO:44))。TALEN-1在多个实验中在Sry基因座处产生NHEJ突变方面具有活性。

[0540] 通过TALEN的作用在Sry基因中产生推测是对双链DNA断裂的非同源性末端接合(NHEJ) 修复的结果的缺失突变。产生均具有TALEN诱导突变的VGB6小鼠ES细胞与VGF1小鼠ES细胞两者。表14含有所有克隆的清单和它们携带的缺失突变大小以及它们是否在Sry基因座处具有lacZ-neo LTVEC插入盒。表14也包括通过将Sry突变ES细胞克隆显微注射至 8 细胞胚胎中产生的F0代VELOCIMICE®的结果，以及在Sry基因中具有突变的XY雌性VELOCIMICE®(性别逆转的雌性)的交配结果。

[0541] 所有源于VGB6ES细胞的具有Sry突变的VELOCIMICE®都是雌性，如对于Sry失活所预期。如表14中所示，Sry突变雌性B6 VELOCIMICE®在测试交配时无生殖力，此与关于Sry突变的文献一致。由于无生殖力，所以未通过将突变等位基因传递至F1子代中来正式确认LTVEC靶向(即克隆具有正确靶向Sry缺失和lacZ-neo插入)。然而，我们的数据证明与VGF 1克隆极其不同的结果。

[0542] 不同于不能在KO-DMEM样低渗透强度培养基中维持以及保留产生小鼠的能力的

VGB6ES细胞,VGF1细胞可在K0-DMEM样低渗透强度培养基中维持。因此,进行实验以确定在Sry中具有突变的VGF1XY ES细胞是否可通过培养基来雌性化(即确定它们是否不同于VGB6Sry突变YES细胞而可产生一些能生育的XY Sry突变雌性)。首先,照常在我们的K 0-DMEM样低渗透强度雌性化生长培养基中维持VGF1ES细胞:在这个培养基中生长的一些显微注射XY克隆将产生能生育的XY雌性,尽管它们不携带突变。举例来说,克隆TH4(数据未显示)不具有Sry突变,但产生2个雌性和6个雄性VELOCIMICE<sup>®</sup>。

[0543] 显微注射具有TALEN诱导的在5bp至超过1kb的范围内的小型缺失的6个VGF1ES细胞克隆。在K0-DMEM样低渗透强度生长培养基中生长的VGF1ES细胞中,未观察到LTVEC靶向(即克隆具有正确靶向Sry 缺失和lacZ-neo插入)。所有都产生雌性VELOCIMICE<sup>®</sup>,使其中32个交配。值得注意的是,所有Sry突变XY雌性VELOCIMICE<sup>®</sup>都能生育;各自产生至少一窝(表14)。许多Sry突变XY雌性产生具有正常同窝仔畜数的多窝,而一些XY雌性仅产生小型的一窝或两窝。在由这些交配获得的299 只已被基因分型的F1小鼠之中,约半数(146,49%)是正常XY雄性或正常 XX雌性。174只(58%)F1小鼠是表型雌性,而125只(42%)是表型雄性。26个雌性(15%的雌性,8.6%的总体F1代)是遗传有突变Sry等位基因的X Y 雌性。由于与XY卵母细胞相关的减数分裂不分离事件,所以在Sry突变XY雌性VELOCIMICE<sup>®</sup>的F1子代中观察到许多异常基因型—XXY、X YY、XO、XXYY—其中一些包括突变Sry等位基因。

[0544] 表14也报告源于具有Sry的突变的在常规基于DMEM的培养基中生长的ES细胞的XY 雌性的生育性结果。出乎意料的是,相较于用在基于K 0-DMEM的培养基中生长的ES细胞进行的类似实验的结果,在基于DME M的培养基中进行的LTVEC靶向产生具有正确靶向的Sry 缺失和lacZ-neo插入(即TALEN辅助的LTVEC靶向缺失-替换)的克隆。源于4个靶向克隆的10个XY<sub>Sry(lacZ)</sub> 雌性中的9个在交配后产生活产幼仔—90%生育率。

[0545] 表14.Sry靶向结果:TALEN+LTVEC

克隆	ES 细胞系	培养基	等位基因描述	F0 XY 雌性	交配的 XY 雌性	能生育的 XY 雌性	生育率 (%)
[0546]	D-E11	VGB6	VGB6 特异性培养基	303 bp 缺失 + 50 bp 倒位	1	-	-
	D-G5	VGB6	VGB6 特异性培养基	627 bp 缺失	11	8	0
	E-D4	VGB6	VGB6 特异性培养基	<i>lacZ-neo</i> 靶向(?)	2	-	-
	E-G7	VGB6	VGB6 特异性培养基	<i>lacZ-neo</i> 靶向(?)	16	7	0
	T-B1	VGF1	KO-DMEM	11 bp 缺失	2	2	2
	T-C2	VGF1	KO-DMEM	5 bp 缺失	8	8	8
	U-A5	VGF1	KO-DMEM	15 bp 缺失	4	4	4
	U-B5	VGF1	KO-DMEM	1201 bp 缺失	4	4	4
	U-E12	VGF1	KO-DMEM	9 bp 缺失	8	7	7
	W-E11	VGF1	KO-DMEM	>1.2 kb 缺失	7	7	7
	X-C4	VGF1	DMEM	<i>lacZ-neo</i> 靶向	5	3	3
	X-E10	VGF1	DMEM	<i>lacZ-neo</i> 靶向	1	1	1
	X-F3	VGF1	DMEM	<i>lacZ-neo</i> 靶向	5	3	3
	X-G3	VGF1	DMEM	<i>lacZ-neo</i> 靶向	9	3	2
							67

[0547] 为挽救源于VGB6XY ES细胞的具有Sry突变的VELOCIMICE®的生育性,或为增加源于在常规基于DMEM的培养基中生长的VGF1ES细胞的具有Sry突变的VELOCIMICE®的生育性或生殖力,使XY ES细胞中的 Y染色体的额外区域沉默。此类额外沉默也可使XY雌性的产生增加。在一个实施例中,如上对于靶向Sry基因所述,通过用核酸酶(例如ZFN、TALEN、兆碱基大范围核酸酶或CRISPR-Cas核酸酶)和/或靶向载体诸如LT VEC产生的靶向遗传修饰来使Zfy2基因沉默。

#### [0548] 实施例5.ES细胞中的Y染色体基因表达

[0549] 为确定哪些Y染色体基因在小鼠胚胎干(ES)细胞中表达以及可为性别逆转标志物的候选物,对F1H4ES细胞进行RNA-seq分析。如表15中所示,在F1H4ES细胞中,Eif2s3y、Ddx3y、Erdr1、Kdm5d、Uty、Ubely1、Zfy1、Zfy2、Rbmy1a1、Sly、Usp9y、LOC100041346具有可检测表达水平。在F1H4ES细胞中,Sry不具有可检测表达水平。

[0550] 表15.由F1H4胚胎干细胞获得的RNA-seq数据

[0551]

基因	染色体	链	ES 细胞平均相对表达
Eif2s3y	chrY	+	28.28
Ddx3y	chrY	-	14.68
Erdr1	chrY	+	9.47
Kdm5d	chrY	+	4.57
Uty	chrY	-	4.40
Ubel1y1	chrY	+	1.31
Zfy1	chrY	-	1.25
Zfy2	chrY	-	0.54
Rbmy1a1	chrY	+	0.09
Sly	chrY	+	0.05
Usp9y	chrY	-	0.04
LOC100041346	chrY	+	0.03
Ssty1	chrY	+	0.00

[0552]

基因	染色体	链	ES 细胞平均相对表达
Sry	chrY	-	0.00
Tspy-ps	chrY	-	0.00
Ssty2	chrY	+	0.00
Rbm31y	chrY	+	0.00
LOC380994	chrY	-	0.00
LOC382133	chrY	+	0.00
MGC107098	chrY	-	0.00
LOC434960	chrY	+	0.00
Gm6026	chrY	+	0.00
LOC100039574	chrY	-	0.00
LOC100039614	chrY	+	0.00
LOC100039753	chrY	-	0.00
LOC100039810	chrY	-	0.00
LOC100040022	chrY	-	0.00
LOC100040031	chrY	+	0.00
LOC100040160	chrY	-	0.00
LOC100040223	chrY	+	0.00
LOC100040786	chrY	-	0.00
LOC100040911	chrY	-	0.00
LOC100041014	chrY	-	0.00
LOC100041033	chrY	-	0.00
LOC100041223	chrY	+	0.00
LOC100041256	chrY	-	0.00
LOC100041550	chrY	+	0.00
LOC100042428	chrY	+	0.00
Gm16501	chrY	+	0.00

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 詹尼弗·施马尔
- [0003] 大卫·佛伦杜威
- [0004] 琼科·库诺
- [0005] 家珍·萧
- [0006] 古斯塔沃·德罗格特
- [0007] 瑜·白
- [0008] 沃基特克·奥尔巴赫
- [0009] <120> 对用于产生能生育的XY雌性小鼠的多能细胞的选择
- [0010] <130> 057766-484387
- [0011] <150> US 62/219,927
- [0012] <151> 2015-09-17
- [0013] <160> 50
- [0014] <170> 用于Windows 4.0版FastSEQ
- [0015] <210> 1
- [0016] <211> 22
- [0017] <212> DNA
- [0018] <213> 人工序列
- [0019] <220>
- [0020] <223> mHPRT1探针
- [0021] <400> 1
- [0022] tgggaggcca tcacattgtg gc 22
- [0023] <210> 2
- [0024] <211> 21
- [0025] <212> DNA
- [0026] <213> 人工序列
- [0027] <220>
- [0028] <223> mHPRT1正向引物
- [0029] <400> 2
- [0030] tgctcgagat gtcataagg a 21
- [0031] <210> 3
- [0032] <211> 20
- [0033] <212> DNA
- [0034] <213> 人工序列
- [0035] <220>
- [0036] <223> mHPRT1反向引物
- [0037] <400> 3
- [0038] ccagcaggc agcaaagaac 20

- [0039] <210> 4
- [0040] <211> 23
- [0041] <212> DNA
- [0042] <213> 人工序列
- [0043] <220>
- [0044] <223> mSox9探针
- [0045] <400> 4
- [0046] cgctgaccat cagaactccg gct 23
- [0047] <210> 5
- [0048] <211> 20
- [0049] <212> DNA
- [0050] <213> 人工序列
- [0051] <220>
- [0052] <223> mSox9正向引物
- [0053] <400> 5
- [0054] acccgctcgc aatacgacta 20
- [0055] <210> 6
- [0056] <211> 18
- [0057] <212> DNA
- [0058] <213> 人工序列
- [0059] <220>
- [0060] <223> mSox9反向引物
- [0061] <400> 6
- [0062] ccggctgcgt gactgttag 18
- [0063] <210> 7
- [0064] <211> 23
- [0065] <212> DNA
- [0066] <213> 人工序列
- [0067] <220>
- [0068] <223> mRspo1探针
- [0069] <400> 7
- [0070] taggacctac ctggcacag tga 23
- [0071] <210> 8
- [0072] <211> 21
- [0073] <212> DNA
- [0074] <213> 人工序列
- [0075] <220>
- [0076] <223> mRspo1正向引物
- [0077] <400> 8

- [0078] caacagggcc actcacatca g 21  
[0079] <210> 9  
[0080] <211> 24  
[0081] <212> DNA  
[0082] <213> 人工序列  
[0083] <220>  
[0084] <223> mRspo1反向引物  
[0085] <400> 9  
[0086] gcactgtact cttccacagg tatac 24  
[0087] <210> 10  
[0088] <211> 27  
[0089] <212> DNA  
[0090] <213> 人工序列  
[0091] <220>  
[0092] <223> mDhh探针  
[0093] <400> 10  
[0094] atcggtaaaa gctgataact cactggc 27  
[0095] <210> 11  
[0096] <211> 19  
[0097] <212> DNA  
[0098] <213> 人工序列  
[0099] <220>  
[0100] <223> mDhh正向引物  
[0101] <400> 11  
[0102] agtcccccaa ccacatcca 19  
[0103] <210> 12  
[0104] <211> 19  
[0105] <212> DNA  
[0106] <213> 人工序列  
[0107] <220>  
[0108] <223> mDhh反向引物  
[0109] <400> 12  
[0110] agcgcaccgt ggcatattcc 19  
[0111] <210> 13  
[0112] <211> 23  
[0113] <212> DNA  
[0114] <213> 人工序列  
[0115] <220>  
[0116] <223> mGata4探针

- [0117] <400> 13
- [0118] tgcaatgcct gtggcctcta tca 23
- [0119] <210> 14
- [0120] <211> 18
- [0121] <212> DNA
- [0122] <213> 人工序列
- [0123] <220>
- [0124] <223> mGata4正向引物
- [0125] <400> 14
- [0126] tgggacggga cactacct 18
- [0127] <210> 15
- [0128] <211> 21
- [0129] <212> DNA
- [0130] <213> 人工序列
- [0131] <220>
- [0132] <223> mGata4反向引物
- [0133] <400> 15
- [0134] cggttgatgc cgttcatctt g 21
- [0135] <210> 16
- [0136] <211> 24
- [0137] <212> DNA
- [0138] <213> 人工序列
- [0139] <220>
- [0140] <223> mFgf9探针
- [0141] <400> 16
- [0142] aaacatgtgg acaccggaag gaga 24
- [0143] <210> 17
- [0144] <211> 24
- [0145] <212> DNA
- [0146] <213> 人工序列
- [0147] <220>
- [0148] <223> mFgf9正向引物
- [0149] <400> 17
- [0150] caacacctac tttccaacc tcta 24
- [0151] <210> 18
- [0152] <211> 23
- [0153] <212> DNA
- [0154] <213> 人工序列
- [0155] <220>

- [0156] <223> mFgf9反向引物  
[0157] <400> 18  
[0158] ggagtcggcgt ccttatttaa tgc 23  
[0159] <210> 19  
[0160] <211> 25  
[0161] <212> DNA  
[0162] <213> 人工序列  
[0163] <220>  
[0164] <223> mSry探针  
[0165] <400> 19  
[0166] ttacagcct gcagttgcct caaca 25  
[0167] <210> 20  
[0168] <211> 23  
[0169] <212> DNA  
[0170] <213> 人工序列  
[0171] <220>  
[0172] <223> mSry正向引物  
[0173] <400> 20  
[0174] ggctaaagtgc acatggatgtt gtg 23  
[0175] <210> 21  
[0176] <211> 23  
[0177] <212> DNA  
[0178] <213> 人工序列  
[0179] <220>  
[0180] <223> mSry反向引物  
[0181] <400> 21  
[0182] tccagtcttg cctgtatgtt atg 23  
[0183] <210> 22  
[0184] <211> 22  
[0185] <212> DNA  
[0186] <213> 人工序列  
[0187] <220>  
[0188] <223> mSf1探针  
[0189] <400> 22  
[0190] ctacctctgg gcctgccacc ac 22  
[0191] <210> 23  
[0192] <211> 19  
[0193] <212> DNA  
[0194] <213> 人工序列

- [0195] <220>
- [0196] <223> mSf1正向引物
- [0197] <400> 23
- [0198] tcctgtccct gcatctgtg 19
- [0199] <210> 24
- [0200] <211> 19
- [0201] <212> DNA
- [0202] <213> 人工序列
- [0203] <220>
- [0204] <223> mSf1反向引物
- [0205] <400> 24
- [0206] ggagcagcag gtcttggtg 19
- [0207] <210> 25
- [0208] <211> 28
- [0209] <212> DNA
- [0210] <213> 人工序列
- [0211] <220>
- [0212] <223> mWnt4探针
- [0213] <400> 25
- [0214] cagttcaagg cacatacaga tgaggacc 28
- [0215] <210> 26
- [0216] <211> 18
- [0217] <212> DNA
- [0218] <213> 人工序列
- [0219] <220>
- [0220] <223> mWnt4正向引物
- [0221] <400> 26
- [0222] cgctggtgcc tcggaatg 18
- [0223] <210> 27
- [0224] <211> 21
- [0225] <212> DNA
- [0226] <213> 人工序列
- [0227] <220>
- [0228] <223> mWnt4反向引物
- [0229] <400> 27
- [0230] cgatgtccct gtcacagaa g 21
- [0231] <210> 28
- [0232] <211> 23
- [0233] <212> DNA

- [0234] <213> 人工序列
- [0235] <220>
- [0236] <223> mAmh探针
- [0237] <400> 28
- [0238] tcaaccaagc agagaaggta cca 23
- [0239] <210> 29
- [0240] <211> 20
- [0241] <212> DNA
- [0242] <213> 人工序列
- [0243] <220>
- [0244] <223> mAmh正向引物
- [0245] <400> 29
- [0246] gctcgccgcct catcttaacc 20
- [0247] <210> 30
- [0248] <211> 25
- [0249] <212> DNA
- [0250] <213> 人工序列
- [0251] <220>
- [0252] <223> mAmh反向引物
- [0253] <400> 30
- [0254] gcgggaatca gagccaaata gaaag 25
- [0255] <210> 31
- [0256] <211> 23
- [0257] <212> DNA
- [0258] <213> 人工序列
- [0259] <220>
- [0260] <223> mNr0b1探针
- [0261] <400> 31
- [0262] tgctcactag cgctcagcaa acg 23
- [0263] <210> 32
- [0264] <211> 23
- [0265] <212> DNA
- [0266] <213> 人工序列
- [0267] <220>
- [0268] <223> mNr0b1正向引物
- [0269] <400> 32
- [0270] aggcatggca gcatcttata cag 23
- [0271] <210> 33
- [0272] <211> 19

- [0273] <212> DNA
- [0274] <213> 人工序列
- [0275] <220>
- [0276] <223> mNr0b1反向引物
- [0277] <400> 33
- [0278] cactcgccctc tgcgatgtg 19
- [0279] <210> 34
- [0280] <211> 22
- [0281] <212> DNA
- [0282] <213> 人工序列
- [0283] <220>
- [0284] <223> mFox12探针
- [0285] <400> 34
- [0286] tcactctgtc cgccatctac ca 22
- [0287] <210> 35
- [0288] <211> 18
- [0289] <212> DNA
- [0290] <213> 人工序列
- [0291] <220>
- [0292] <223> mFox12正向引物
- [0293] <400> 35
- [0294] cgagagcgcc gagaagag 18
- [0295] <210> 36
- [0296] <211> 22
- [0297] <212> DNA
- [0298] <213> 人工序列
- [0299] <220>
- [0300] <223> mFox12反向引物
- [0301] <400> 36
- [0302] gaacgggaac ttggctatga tg 22
- [0303] <210> 37
- [0304] <211> 25
- [0305] <212> DNA
- [0306] <213> 人工序列
- [0307] <220>
- [0308] <223> mDdx3y探针
- [0309] <400> 37
- [0310] tcagcagatt cgggacttag aacgt 25
- [0311] <210> 38

- [0312] <211> 23
- [0313] <212> DNA
- [0314] <213> 人工序列
- [0315] <220>
- [0316] <223> mDdx3y正向引物
- [0317] <400> 38
- [0318] gtgtatggtg gtgctgatac tgt 23
- [0319] <210> 39
- [0320] <211> 21
- [0321] <212> DNA
- [0322] <213> 人工序列
- [0323] <220>
- [0324] <223> mDdx3y反向引物
- [0325] <400> 39
- [0326] cgtcctggtg tggcaactaa c 21
- [0327] <210> 40
- [0328] <211> 27
- [0329] <212> DNA
- [0330] <213> 人工序列
- [0331] <220>
- [0332] <223> mEif2s3y探针
- [0333] <400> 40
- [0334] agctggtaat gaatcttgc tcataacc 27
- [0335] <210> 41
- [0336] <211> 21
- [0337] <212> DNA
- [0338] <213> 人工序列
- [0339] <220>
- [0340] <223> mEif2s3y正向引物
- [0341] <400> 41
- [0342] tggatgcagc tcttcgttt a 21
- [0343] <210> 42
- [0344] <211> 18
- [0345] <212> DNA
- [0346] <213> 人工序列
- [0347] <220>
- [0348] <223> mEif2s3y反向引物
- [0349] <400> 42
- [0350] tggcagccag gtgttcag 18

- [0351] <210> 43
- [0352] <211> 18
- [0353] <212> DNA
- [0354] <213> 人工序列
- [0355] <220>
- [0356] <223> 靶向Sry的TALEN的上游识别序列
- [0357] <400> 43
- [0358] tcccggtggtg agaggcac 18
- [0359] <210> 44
- [0360] <211> 18
- [0361] <212> DNA
- [0362] <213> 人工序列
- [0363] <220>
- [0364] <223> 靶向Sry的TALEN的下游识别序列
- [0365] <400> 44
- [0366] tattttgcat gctgggat 18
- [0367] <210> 45
- [0368] <211> 21
- [0369] <212> DNA
- [0370] <213> 人工序列
- [0371] <220>
- [0372] <223> X染色体引物1
- [0373] <400> 45
- [0374] ggagggtagc acgggaagaa g 21
- [0375] <210> 46
- [0376] <211> 21
- [0377] <212> DNA
- [0378] <213> 人工序列
- [0379] <220>
- [0380] <223> X染色体引物2
- [0381] <400> 46
- [0382] gctggctacc cacttgattg g 21
- [0383] <210> 47
- [0384] <211> 29
- [0385] <212> DNA
- [0386] <213> 人工序列
- [0387] <220>
- [0388] <223> X染色体探针
- [0389] <400> 47

- [0390] tcaaggcgtc tctcccgact aacccccc 29
- [0391] <210> 48
- [0392] <211> 20
- [0393] <212> DNA
- [0394] <213> 人工序列
- [0395] <220>
- [0396] <223> Y染色体引物1
- [0397] <400> 48
- [0398] gatcagcaag cagctggat 20
- [0399] <210> 49
- [0400] <211> 20
- [0401] <212> DNA
- [0402] <213> 人工序列
- [0403] <220>
- [0404] <223> Y染色体引物2
- [0405] <400> 49
- [0406] ctccctggaaa aaggcccttt 20
- [0407] <210> 50
- [0408] <211> 27
- [0409] <212> DNA
- [0410] <213> 人工序列
- [0411] <220>
- [0412] <223> Y染色体探针
- [0413] <400> 50
- [0414] caggtggaaa agcttacag aagccga 27

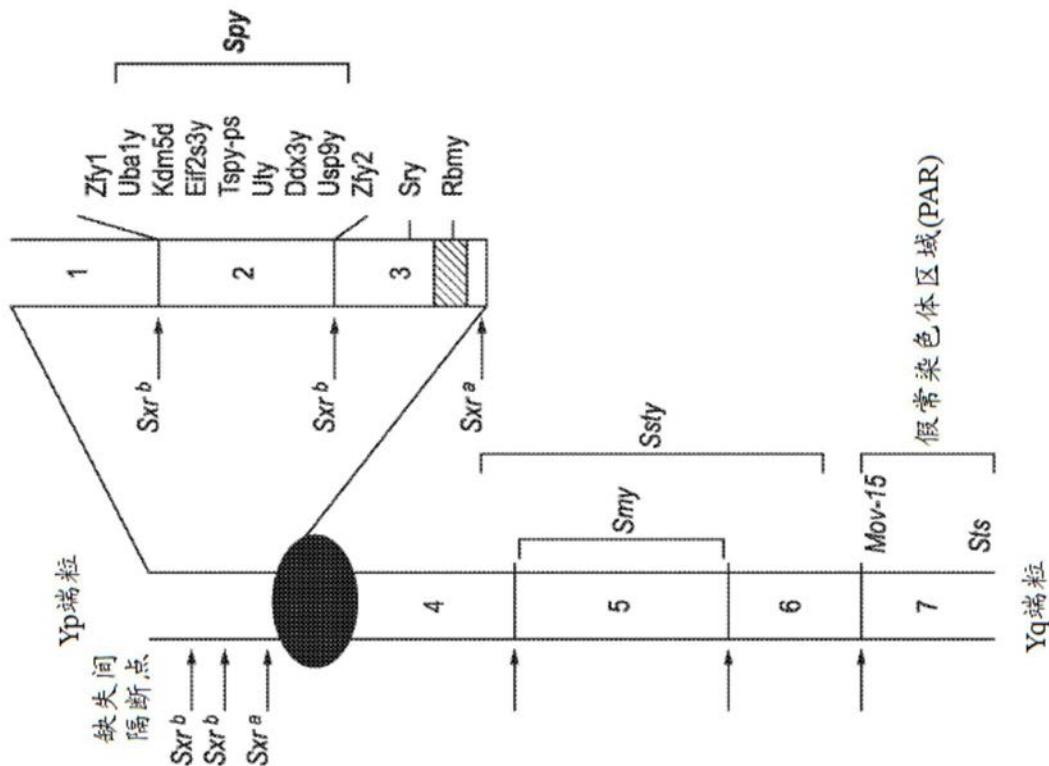


图1A

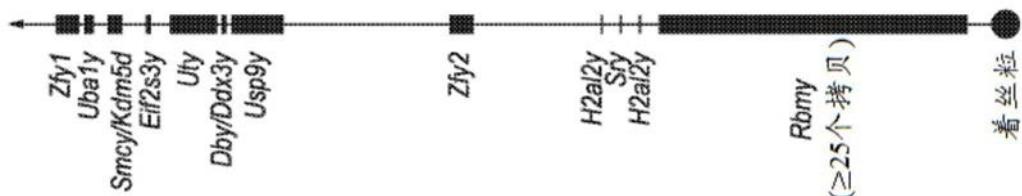


图1B

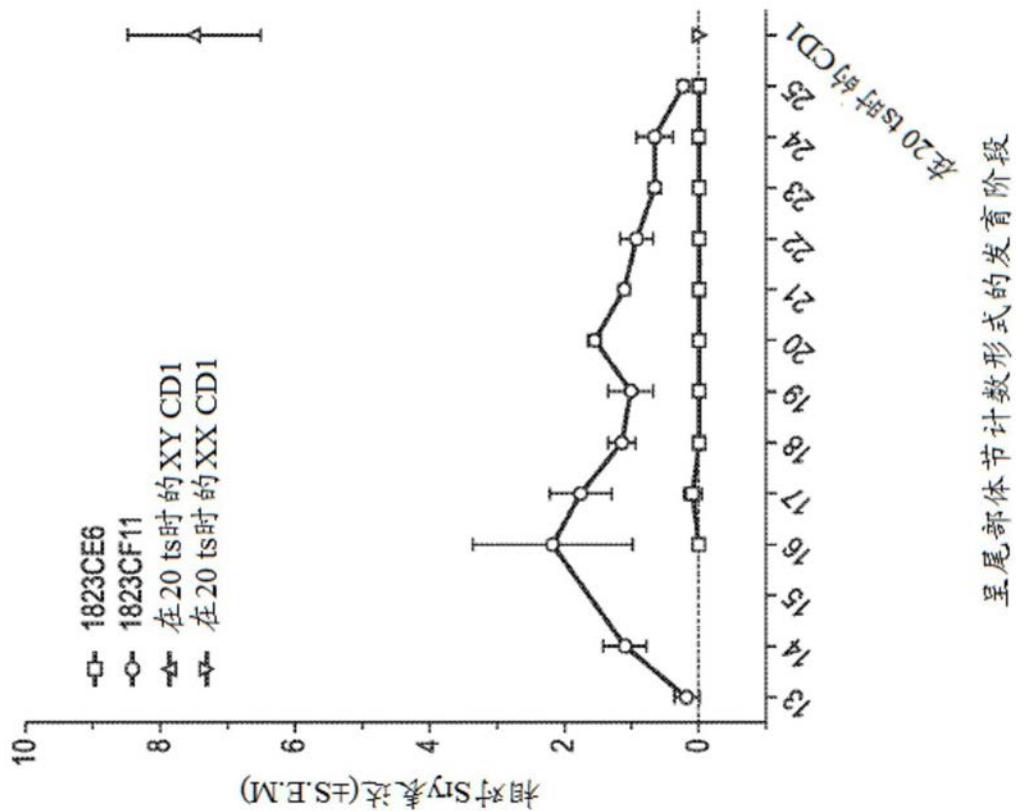


图2

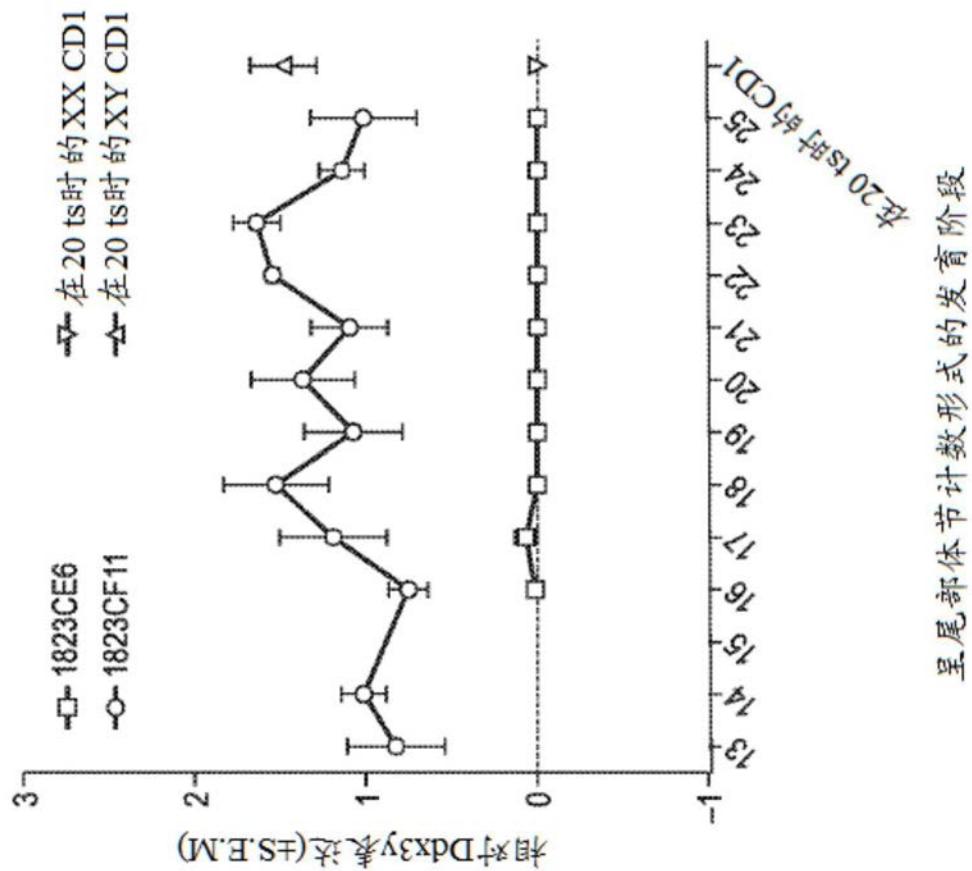


图3

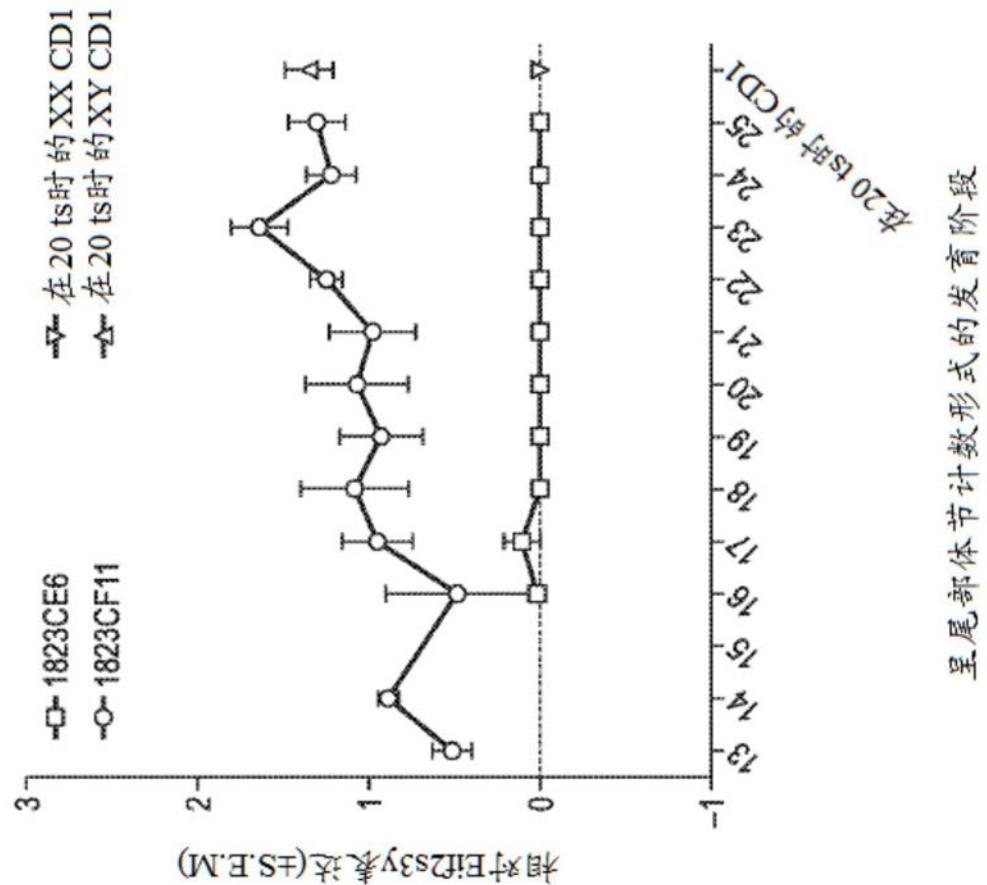


图4

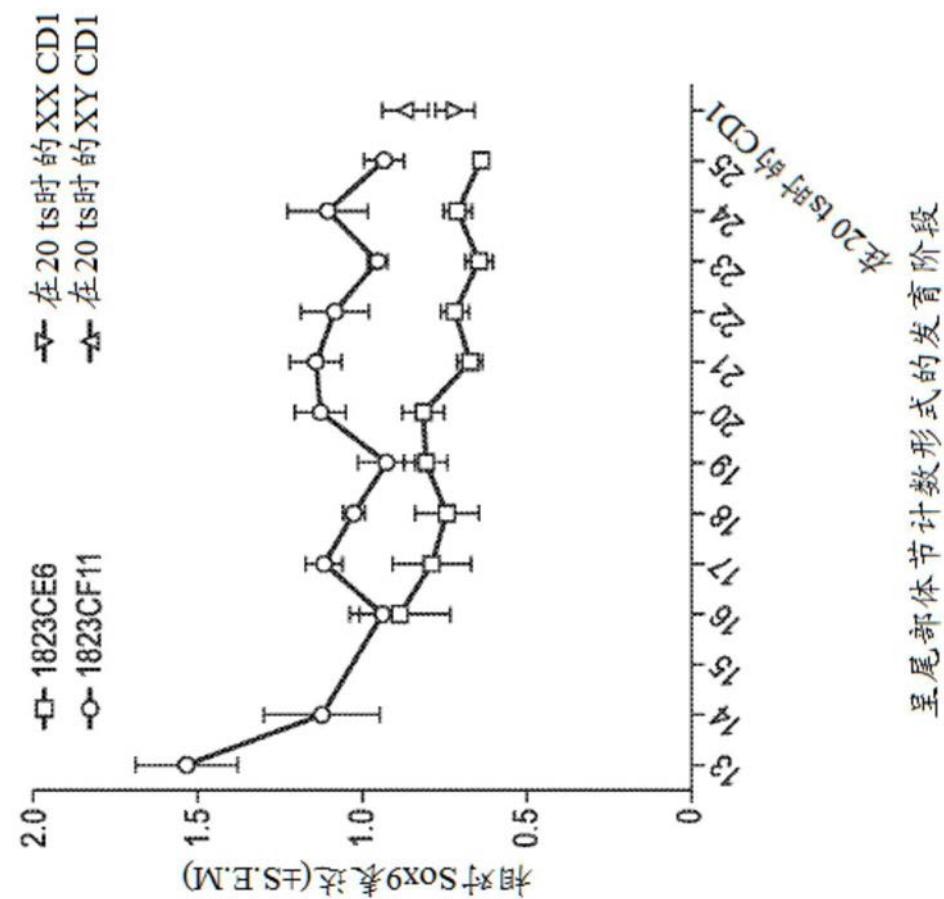


图5A

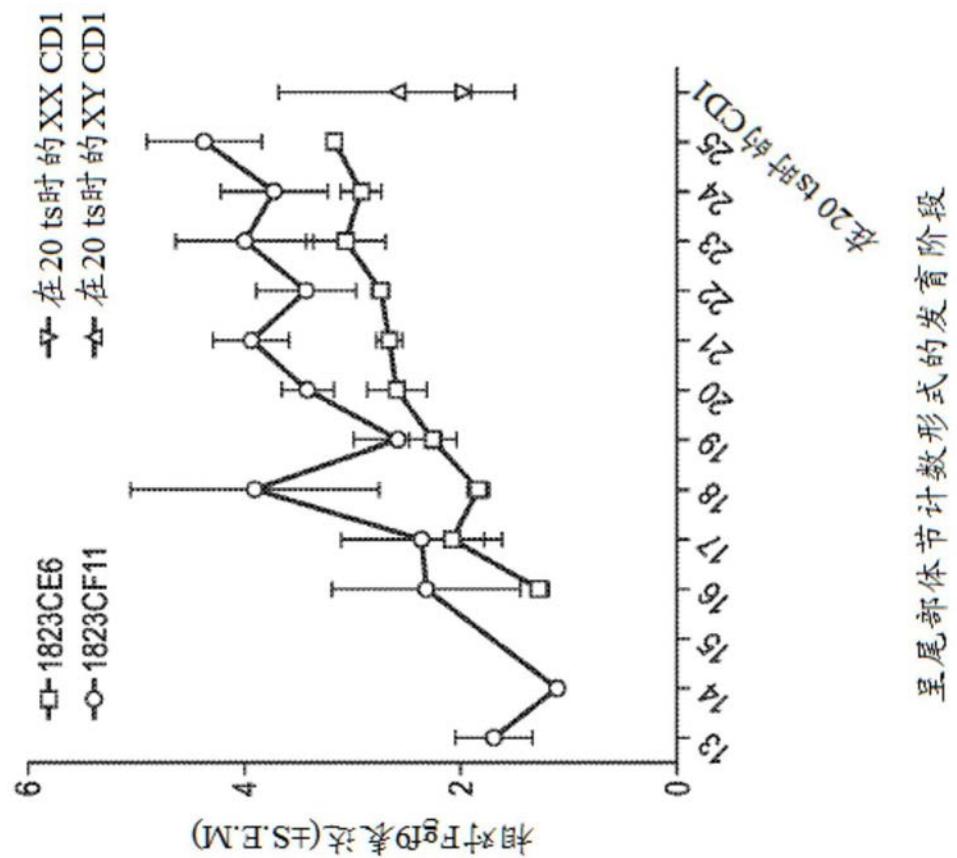


图5B

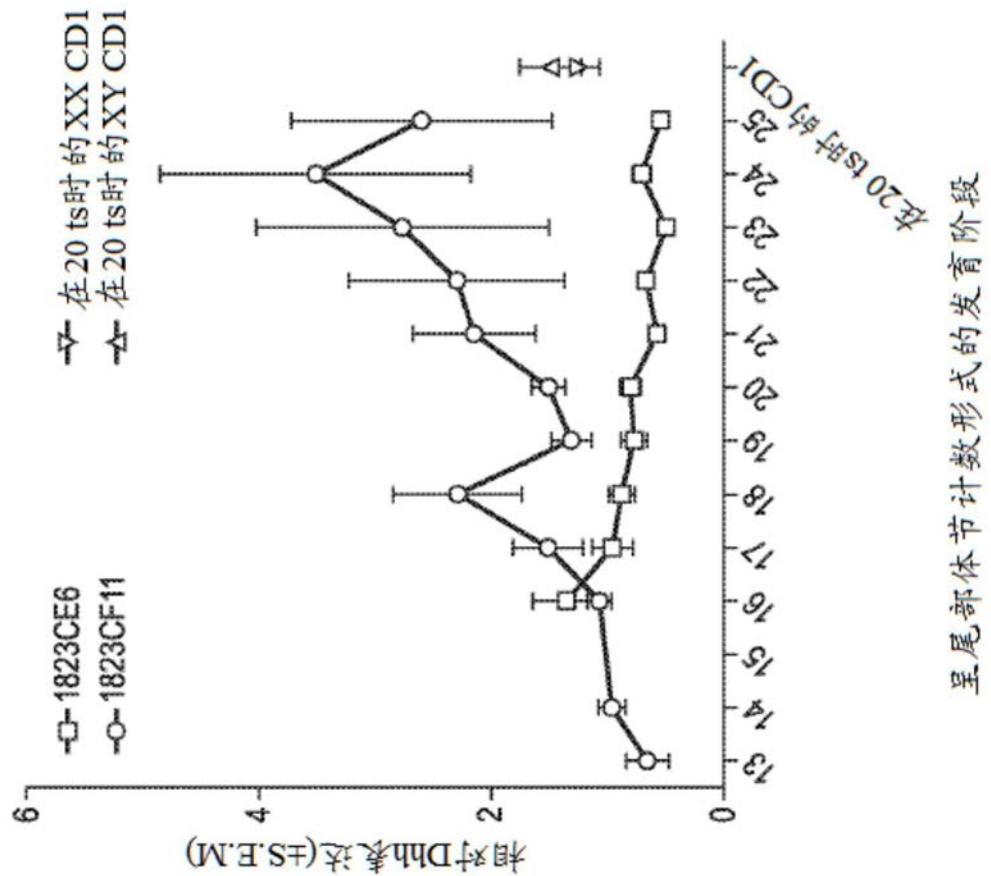


图5C

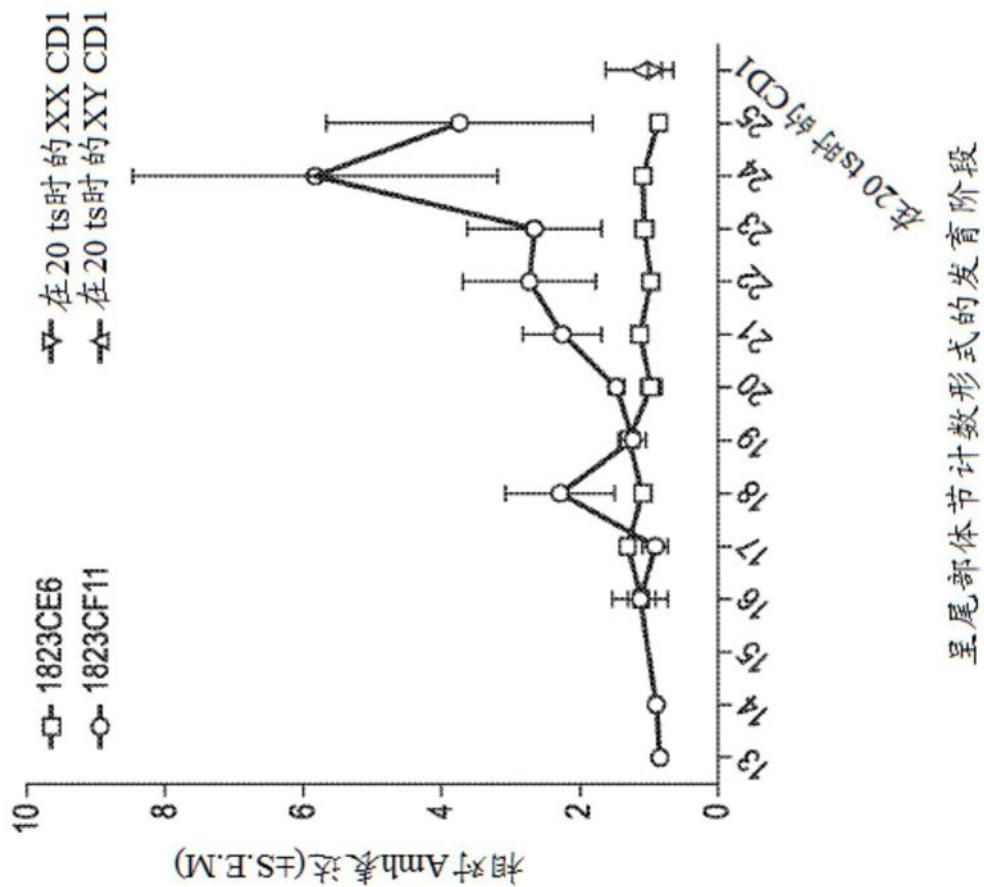


图5D

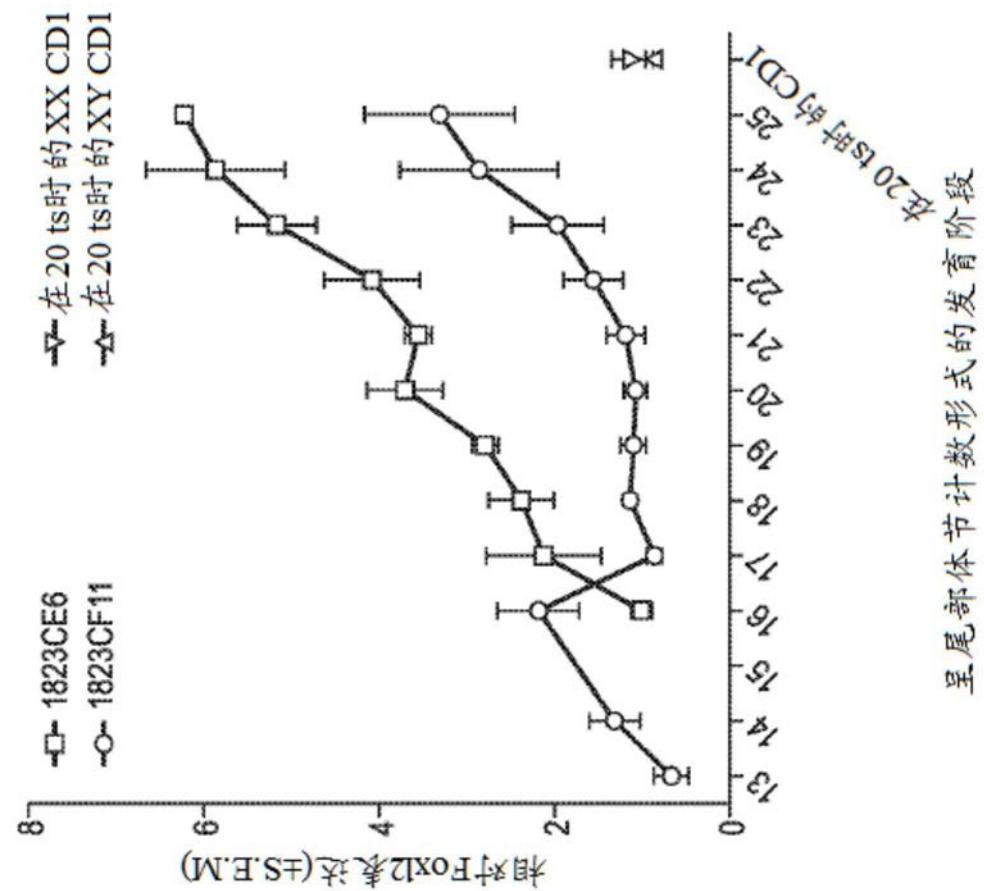


图9A

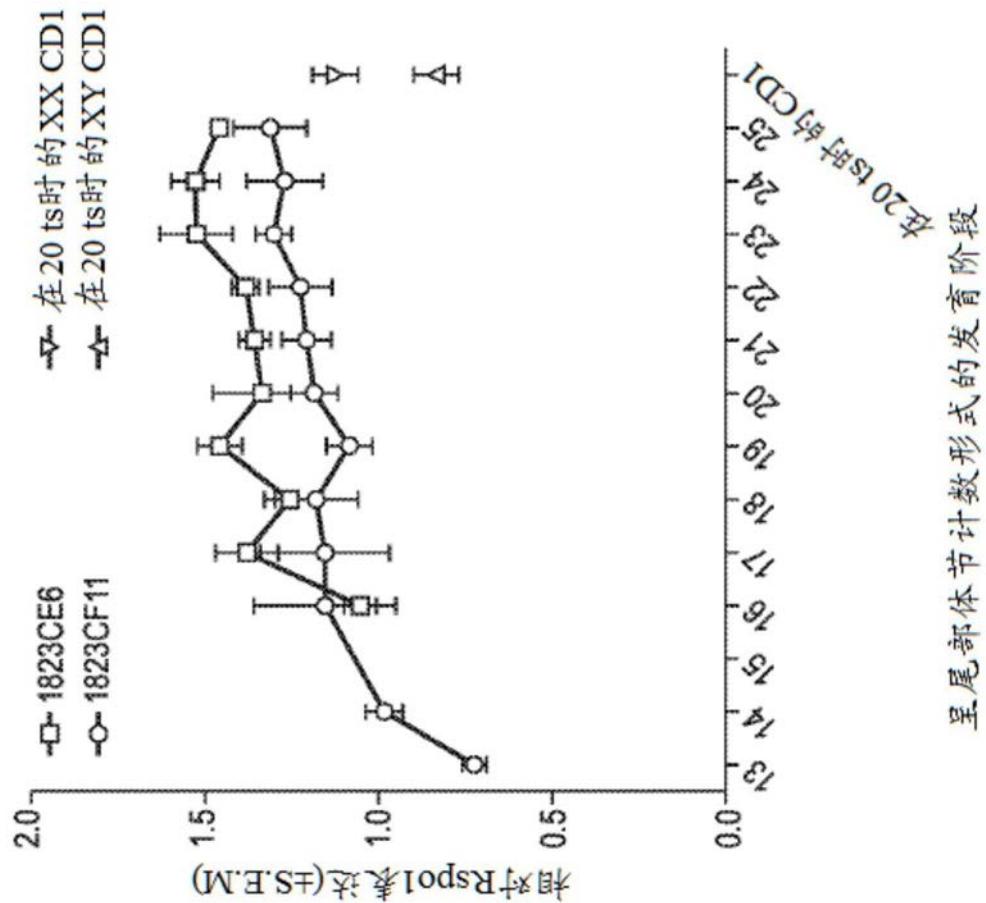


图6B

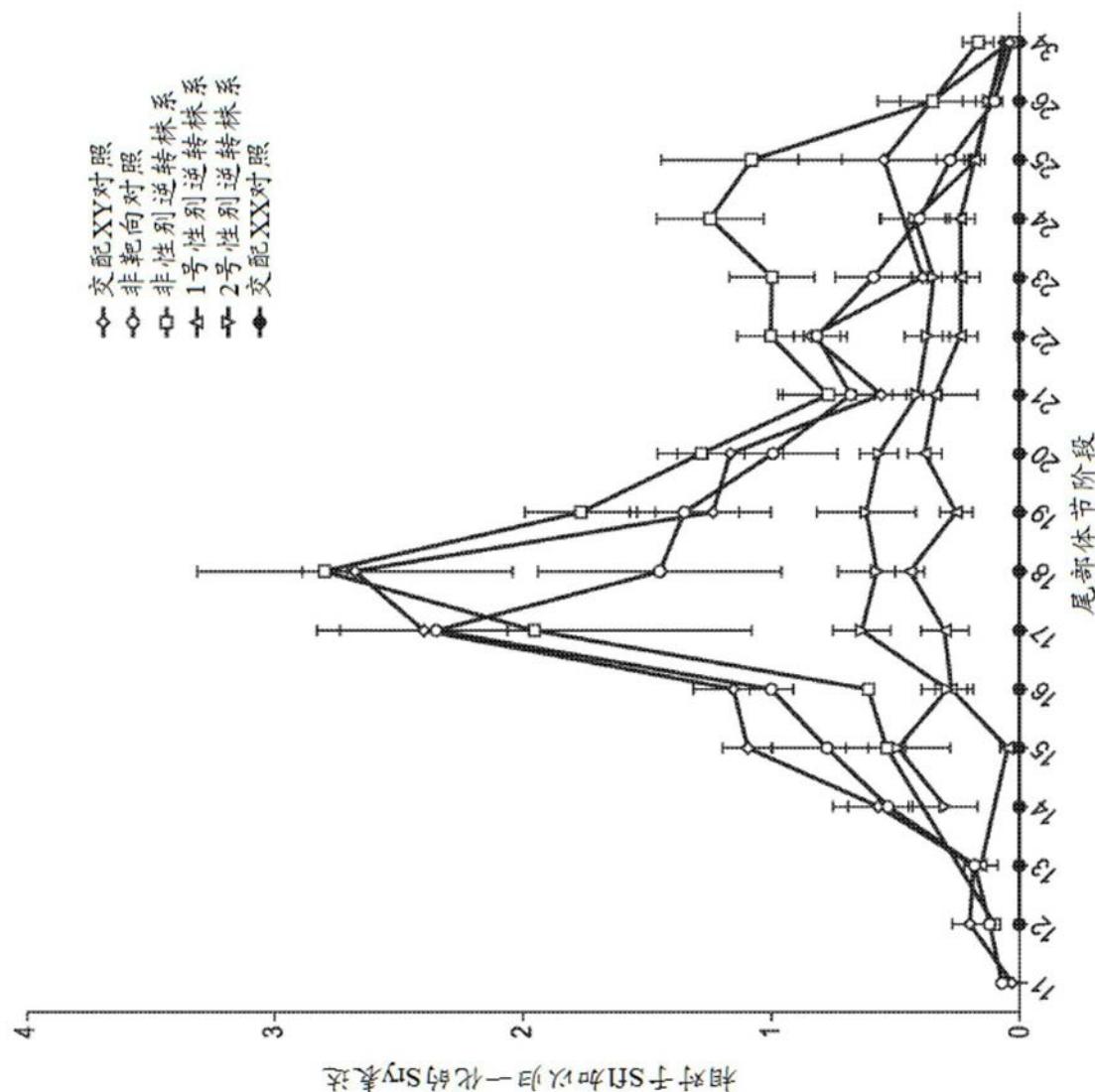


图7

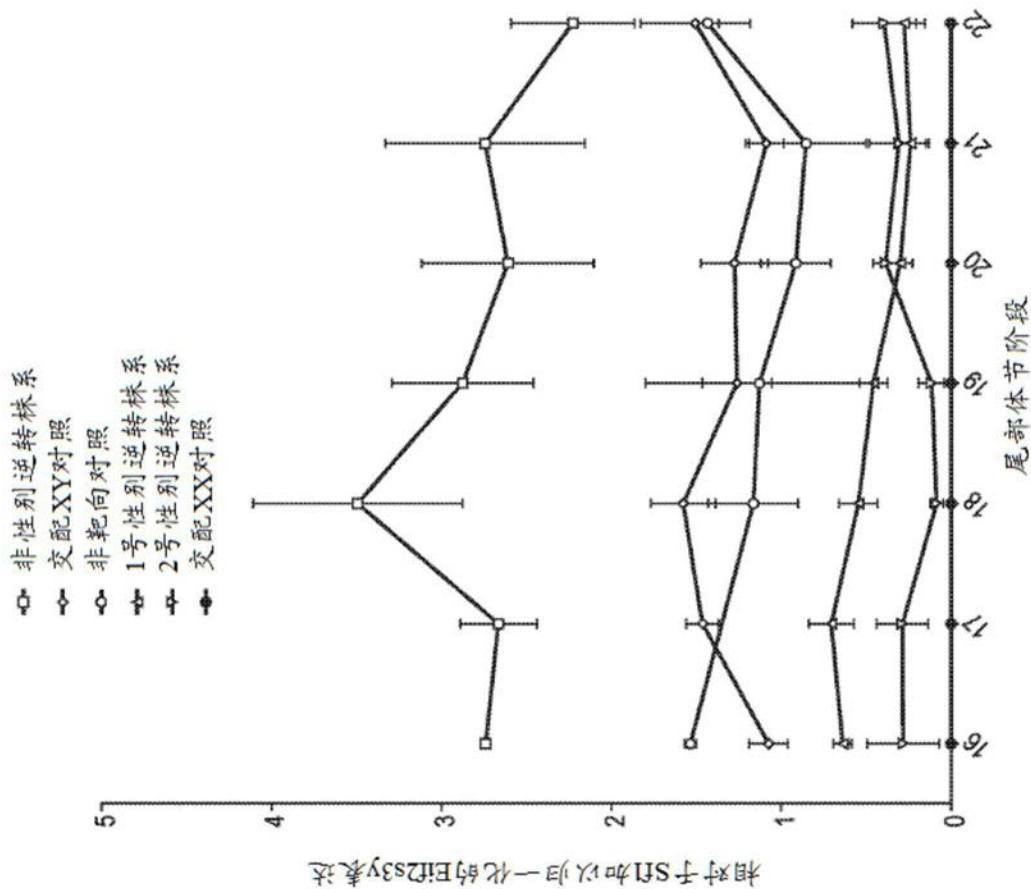


图8A

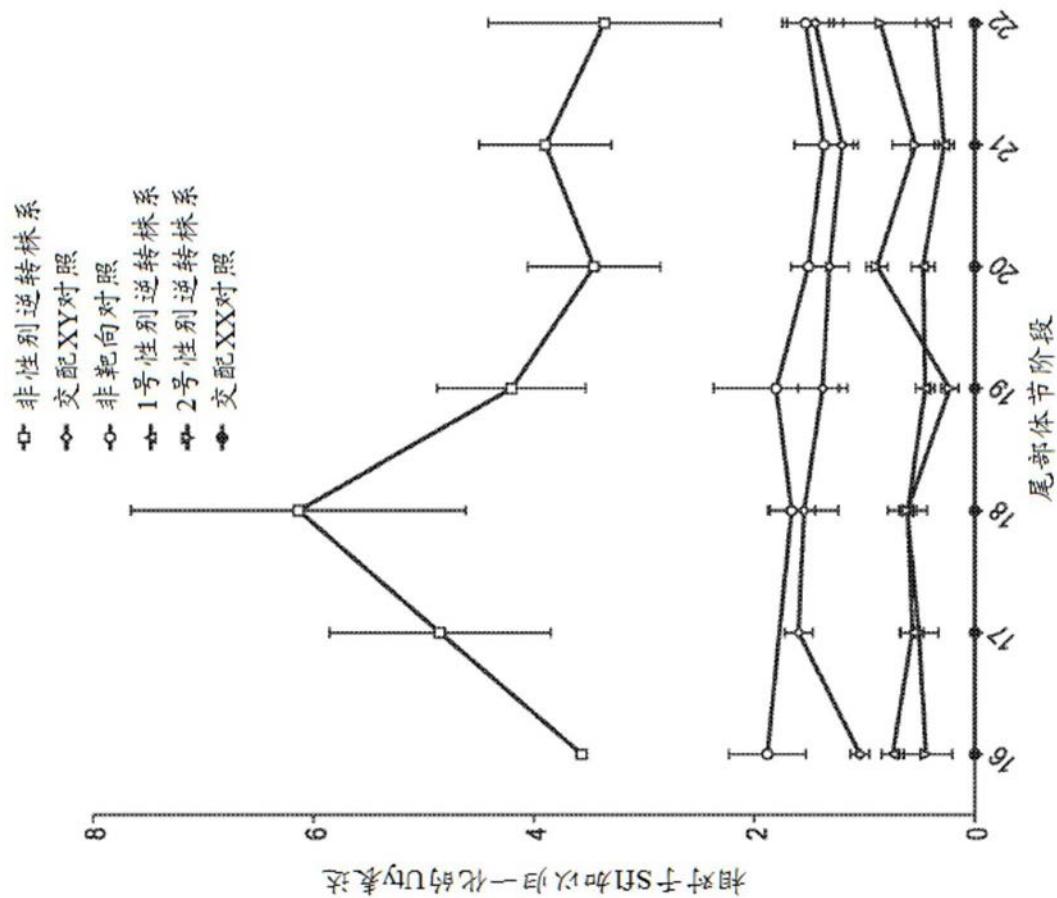


图8B

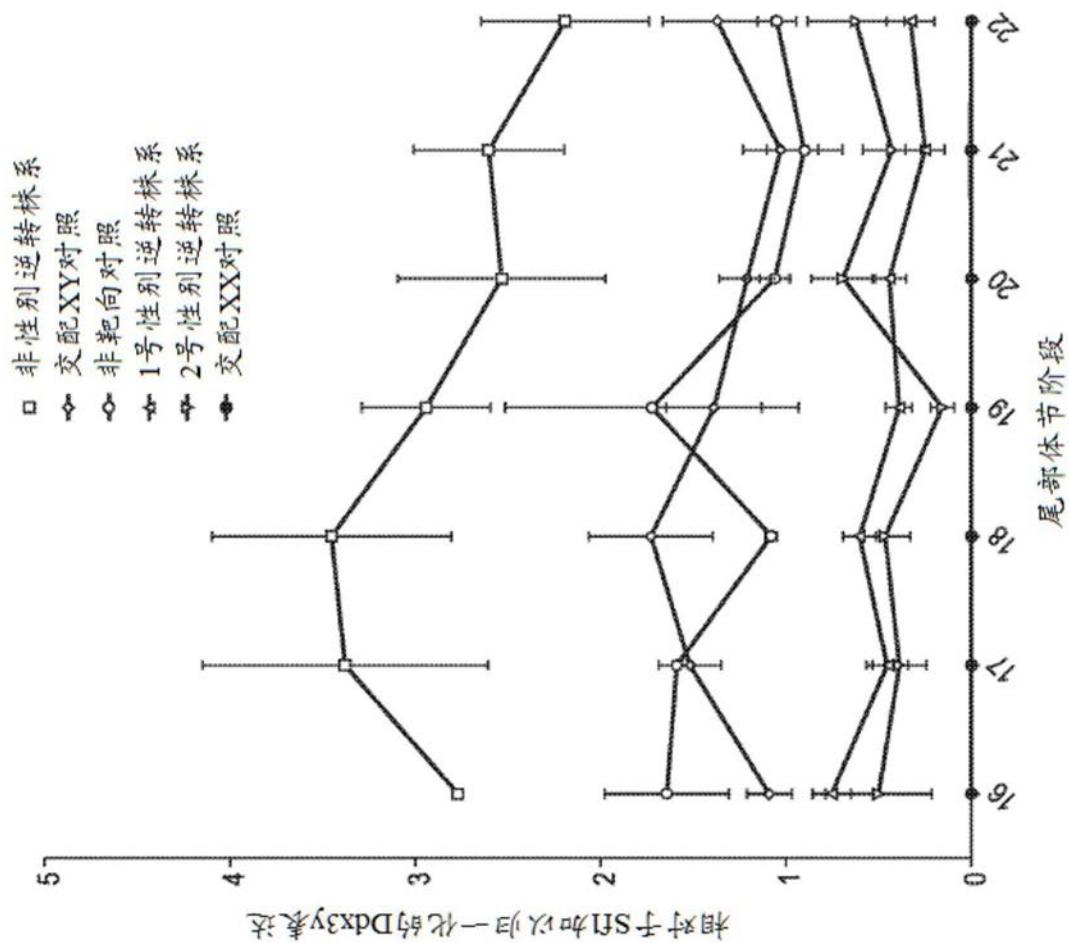


图8C

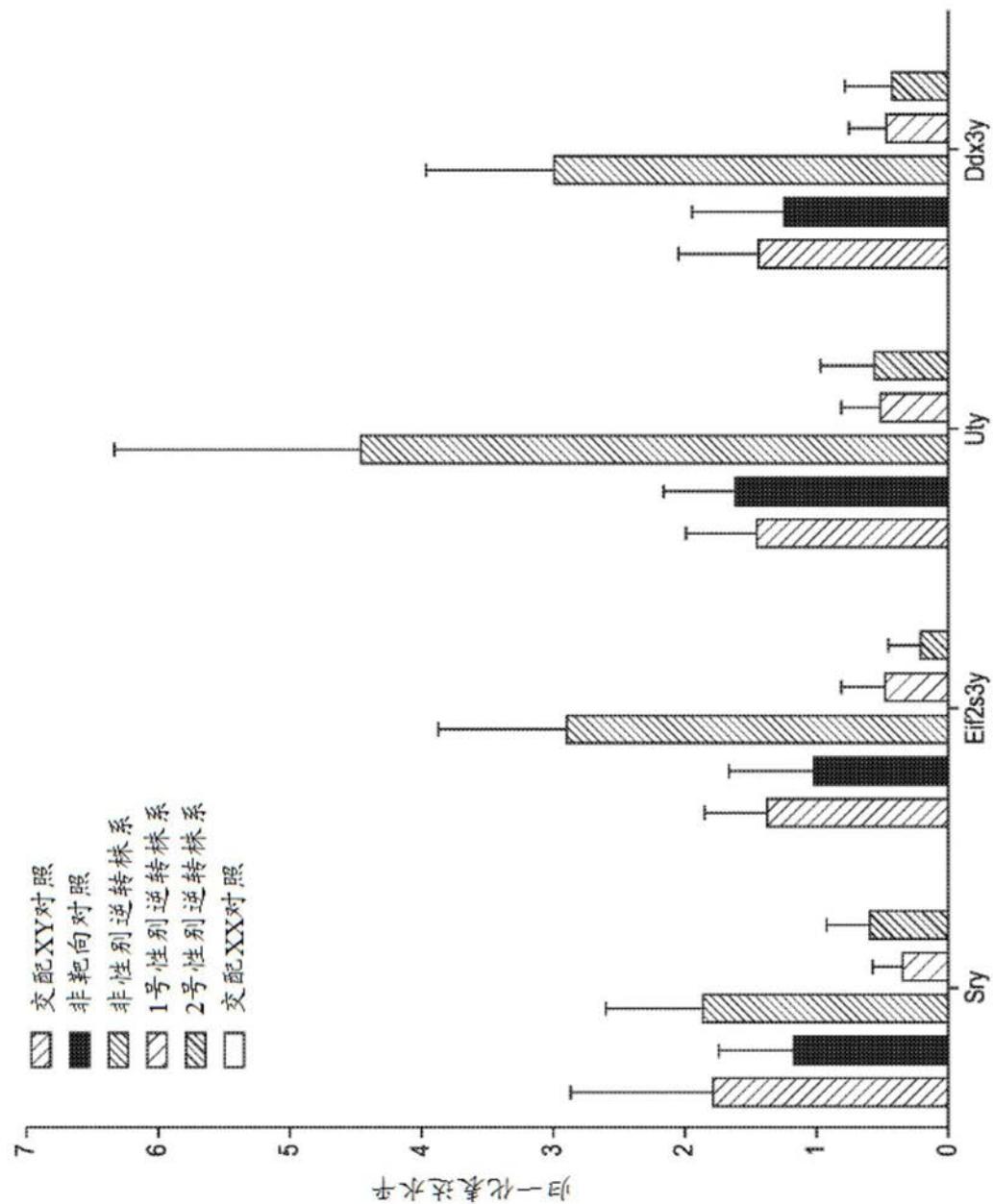


图9

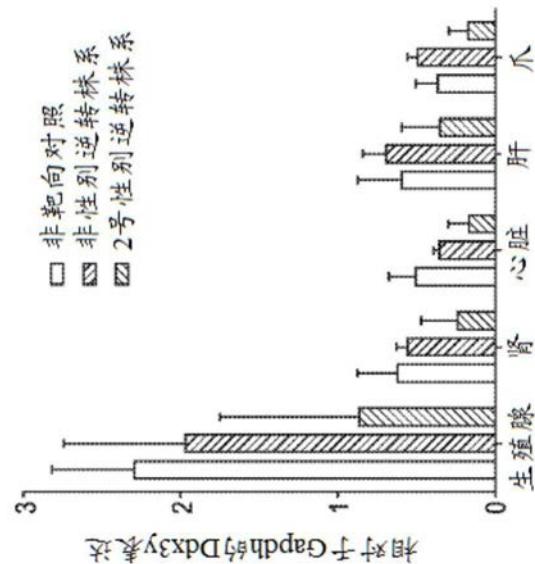


图 10A

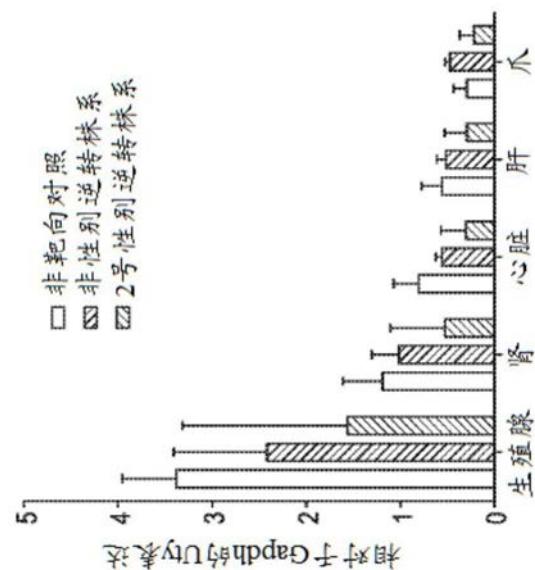


图 10B

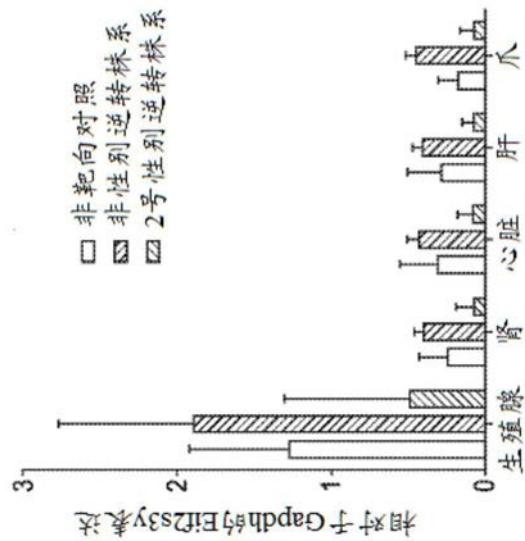


图 10C

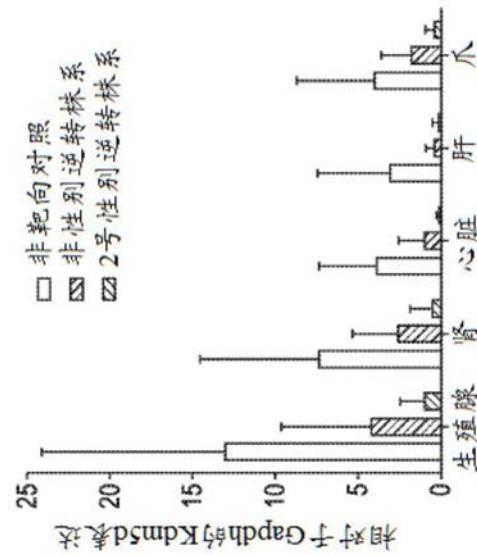


图 10D

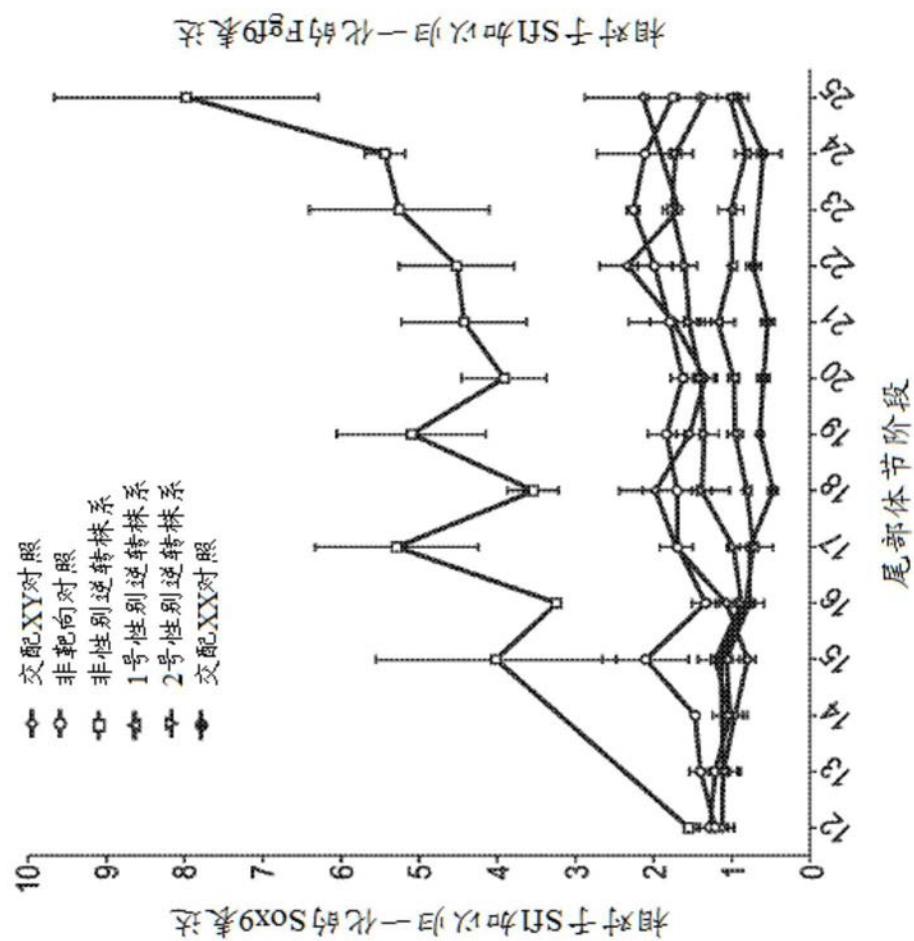


图11A

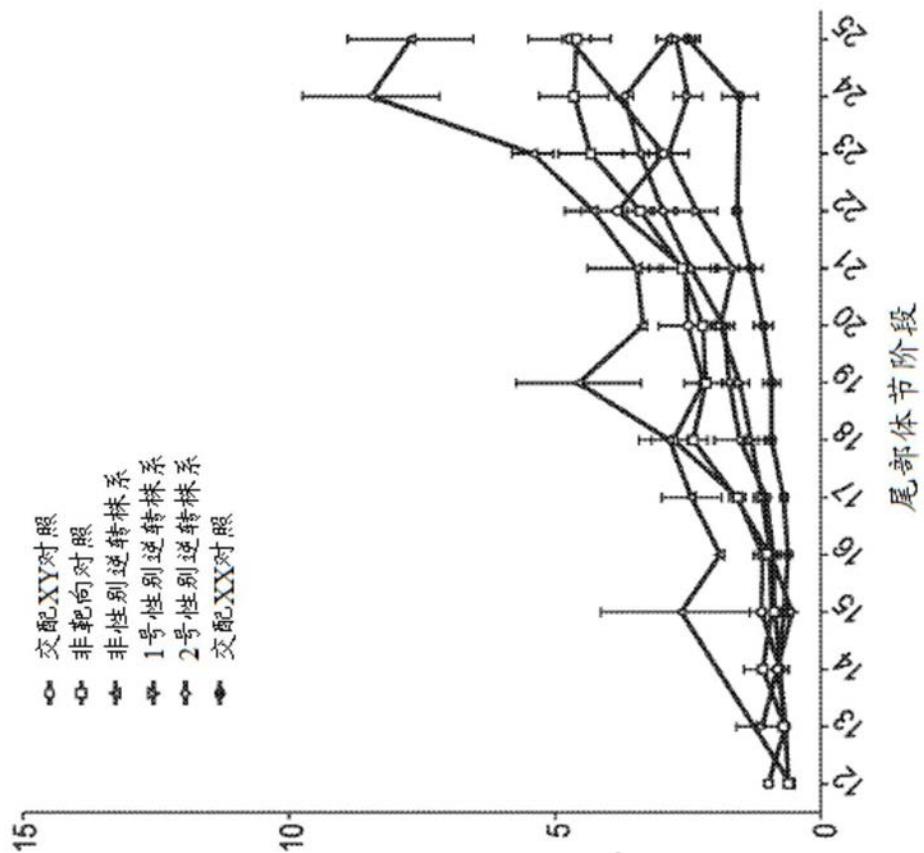


图11B

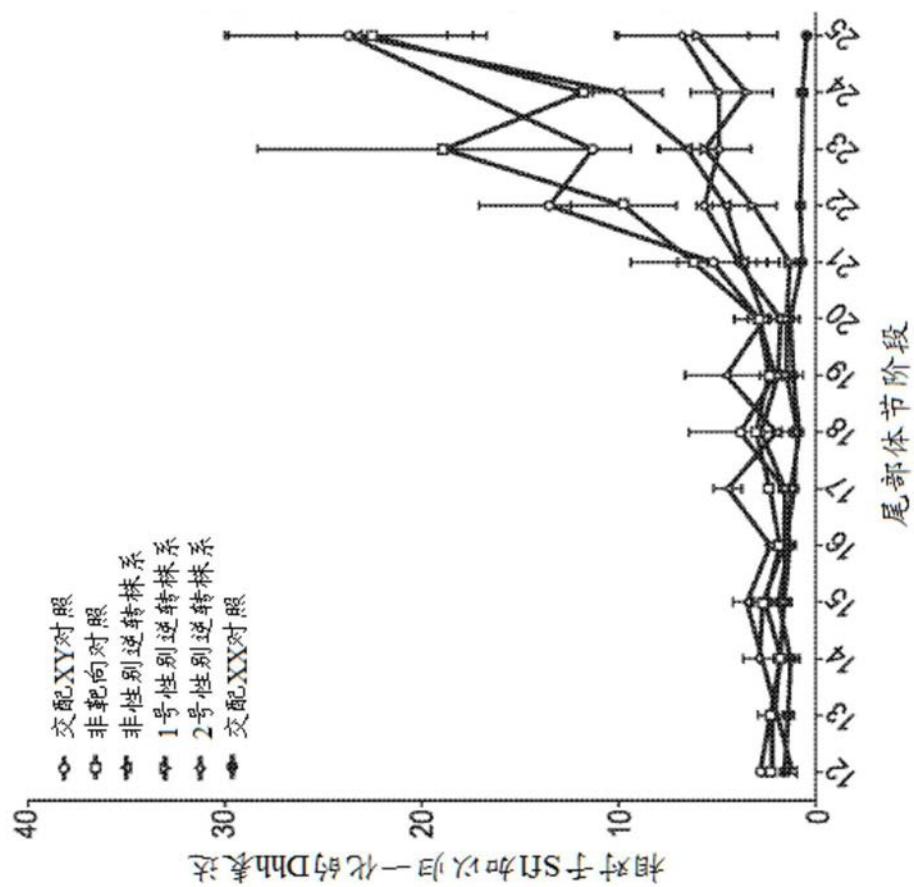


图12A

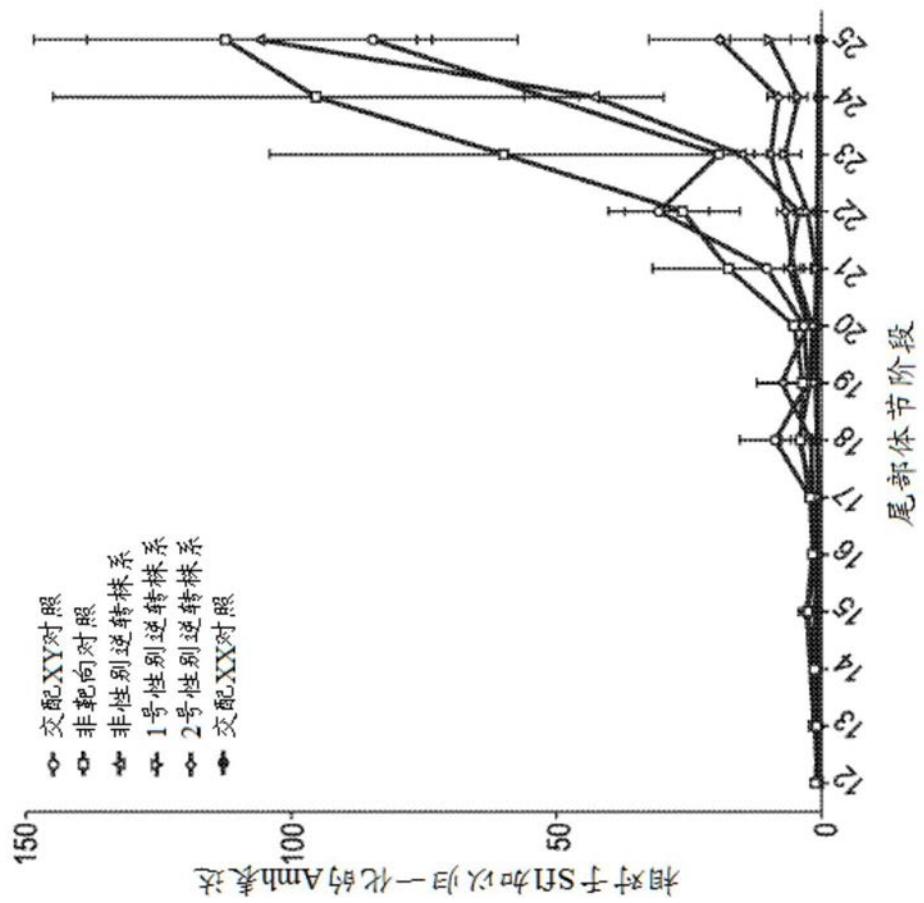


图12B

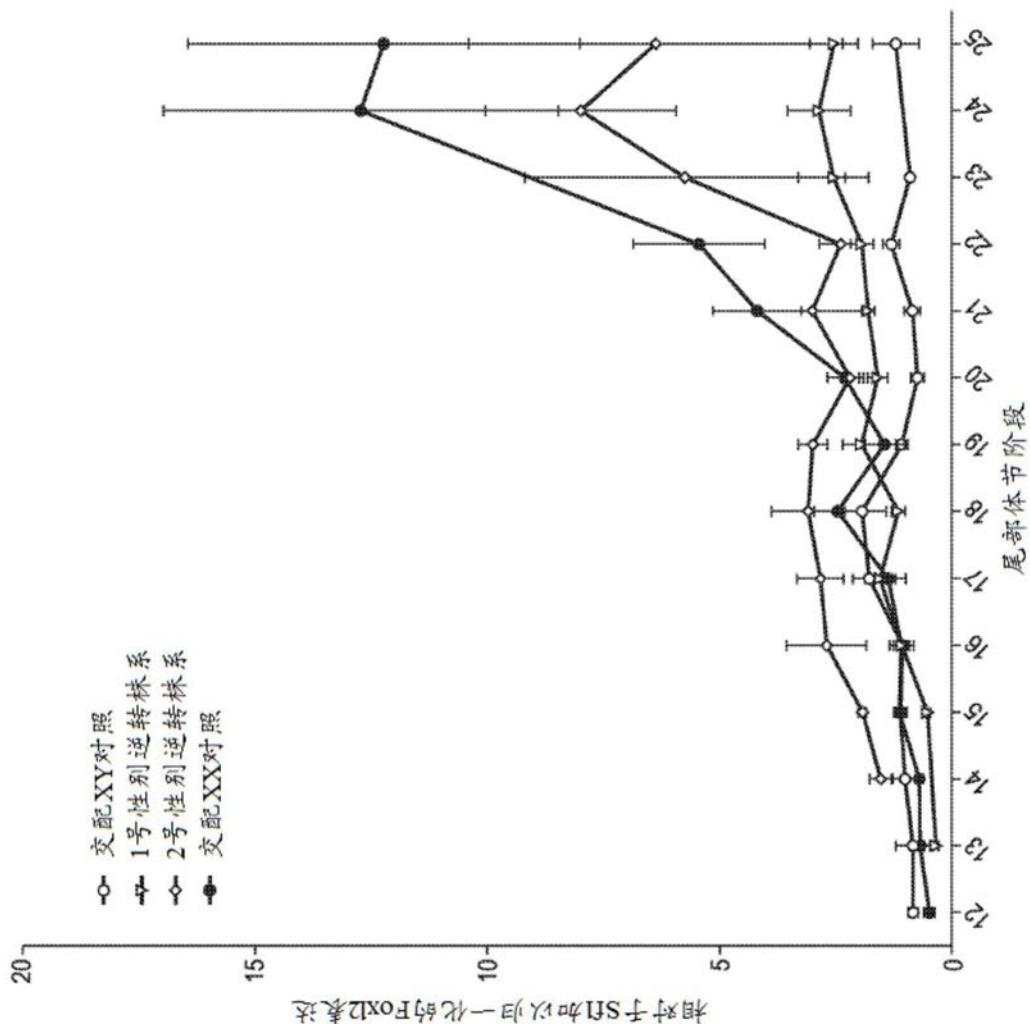


图13

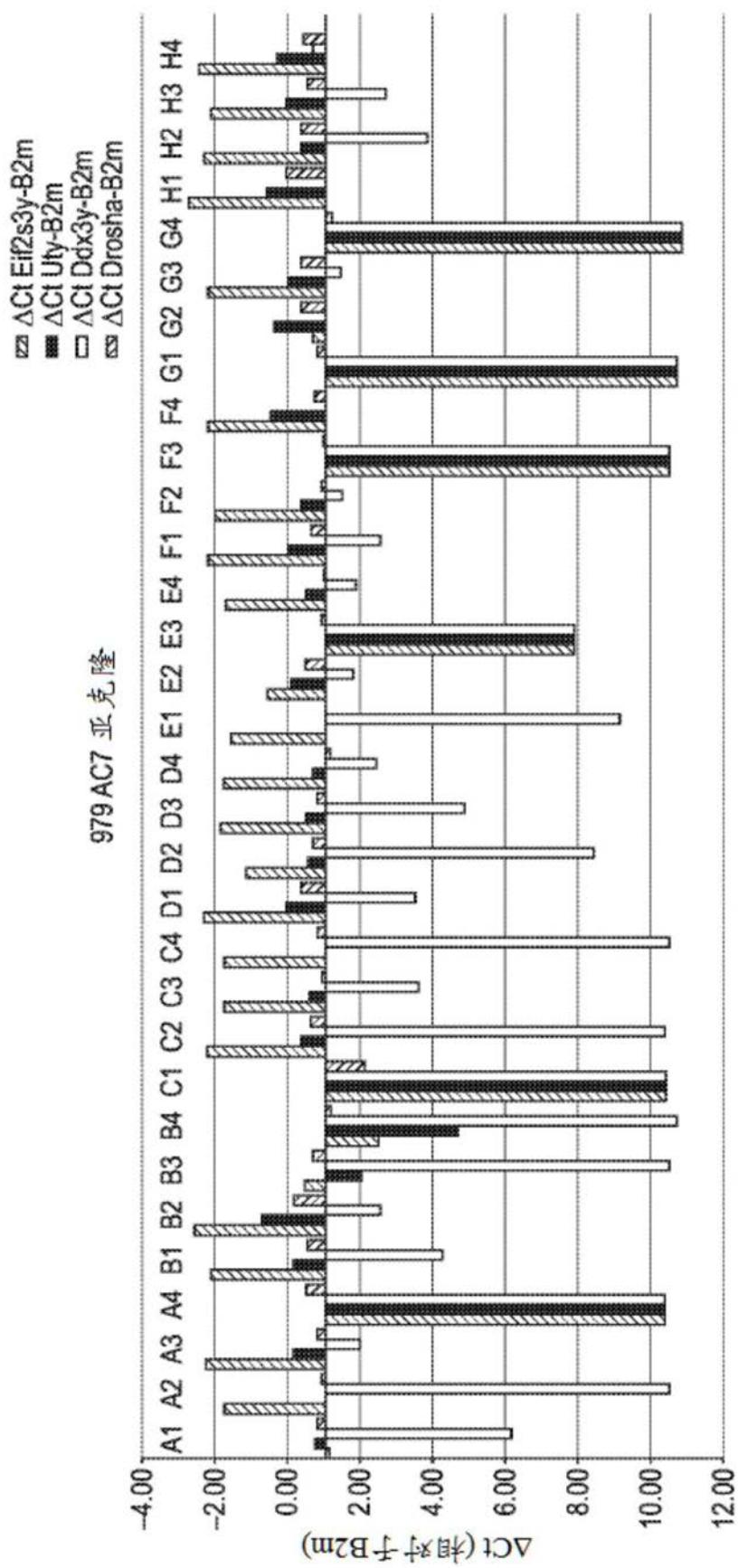


图14A

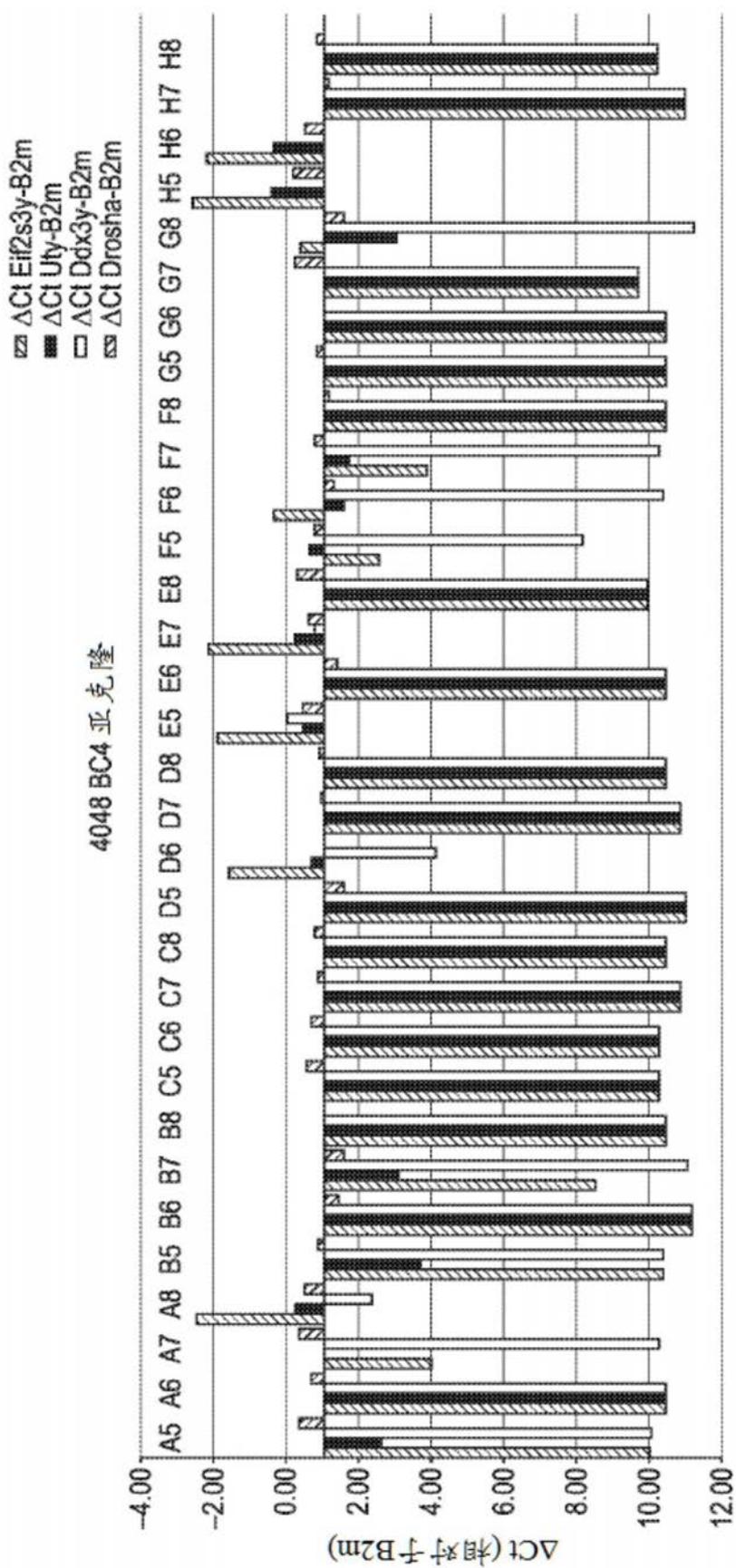


图14B

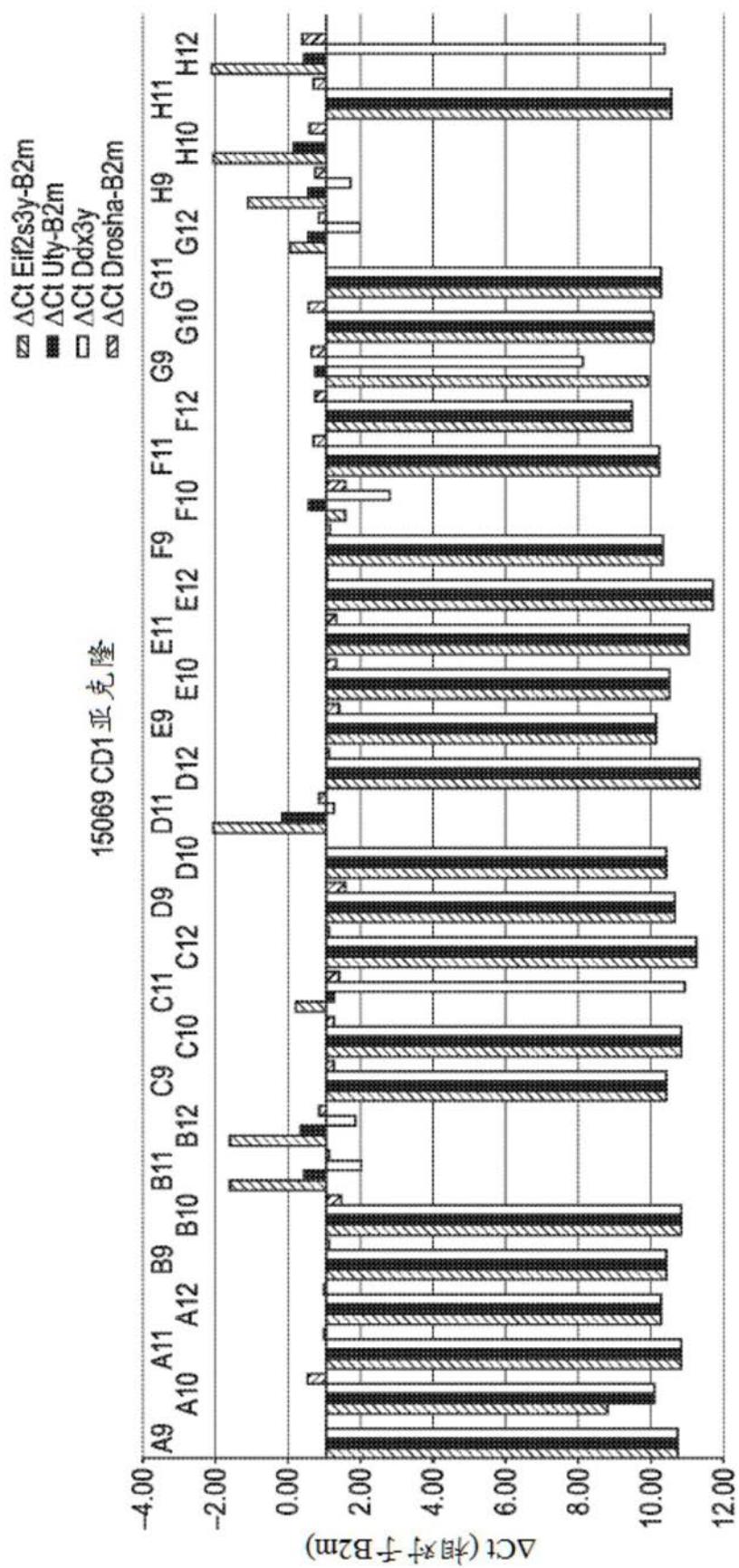


图14C

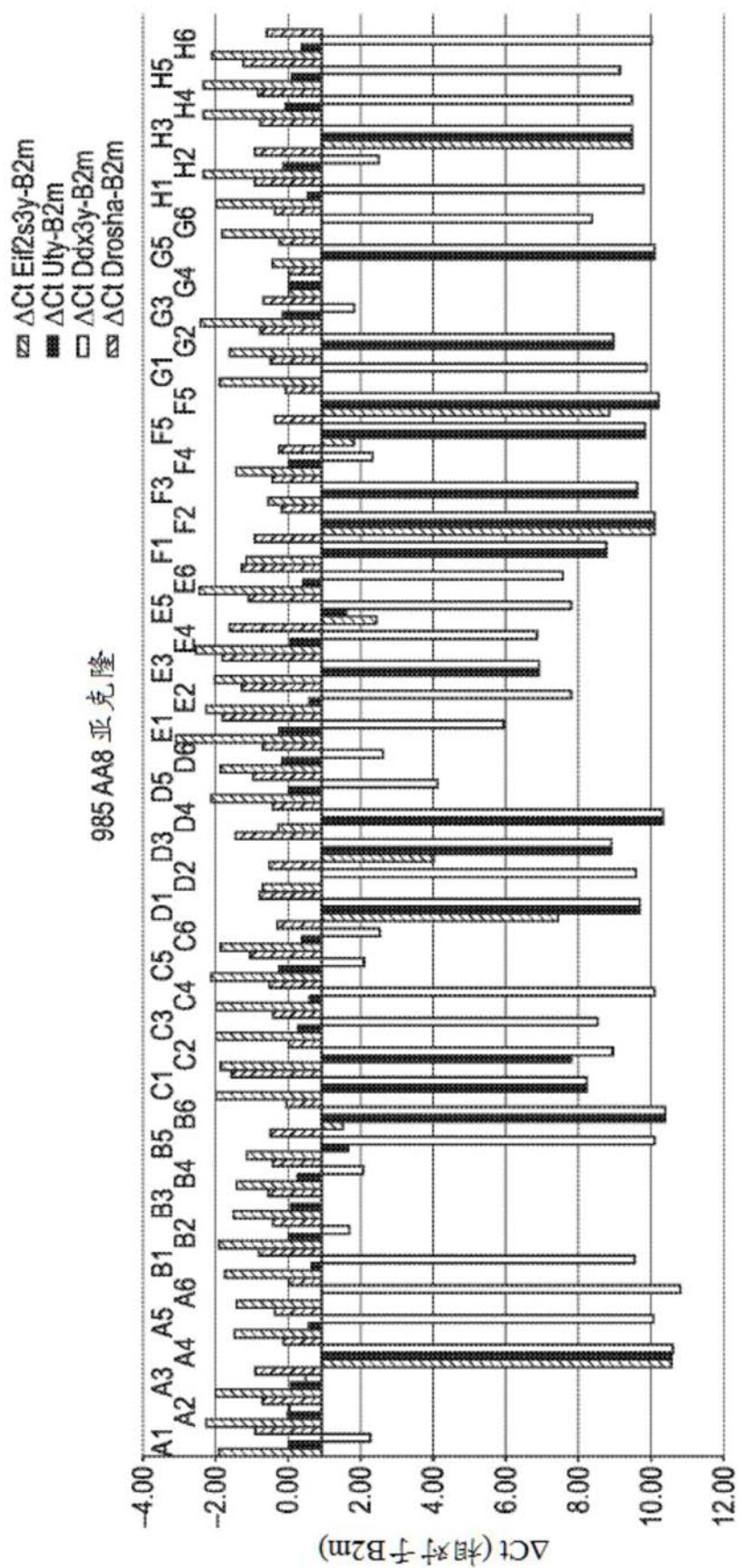


图14D

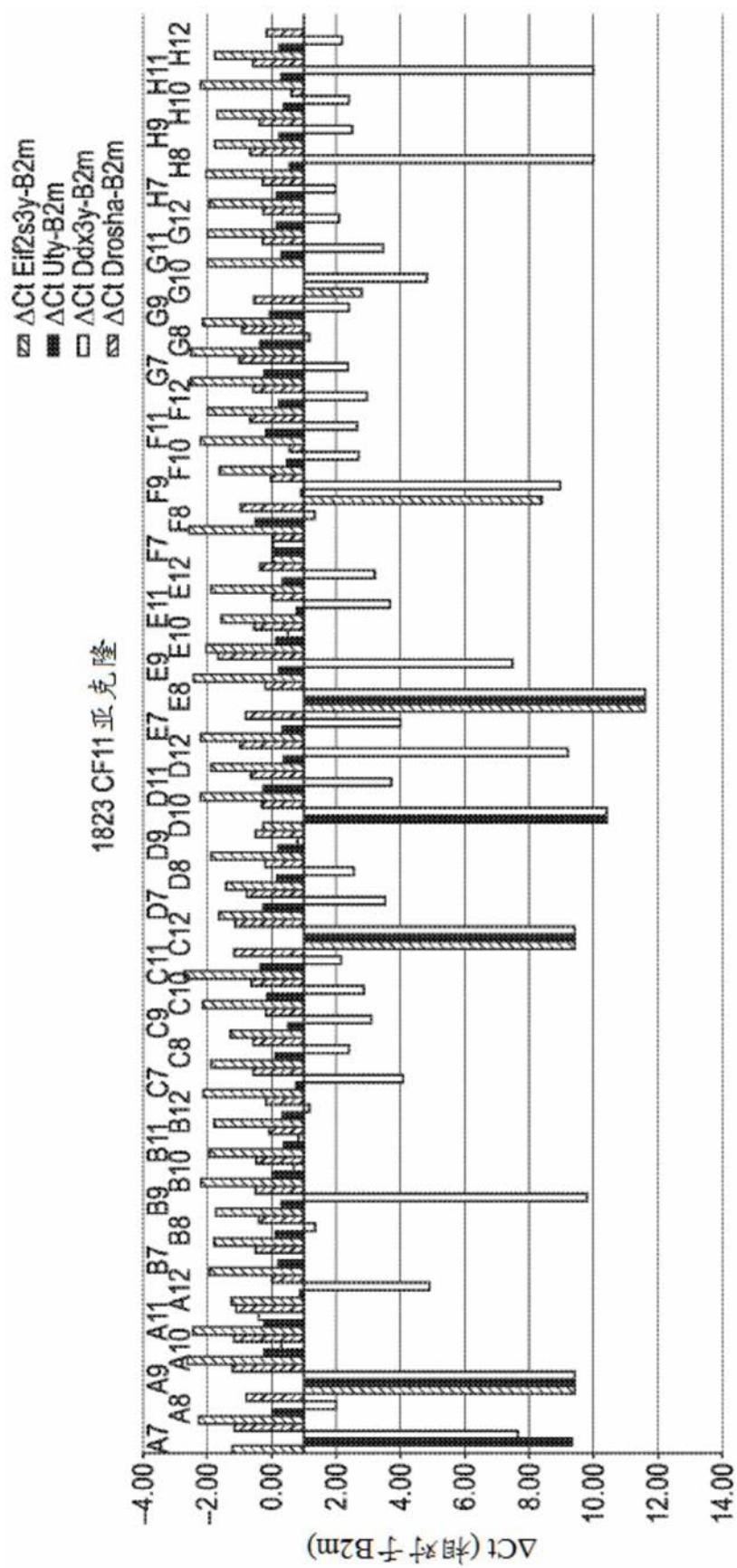


图14E

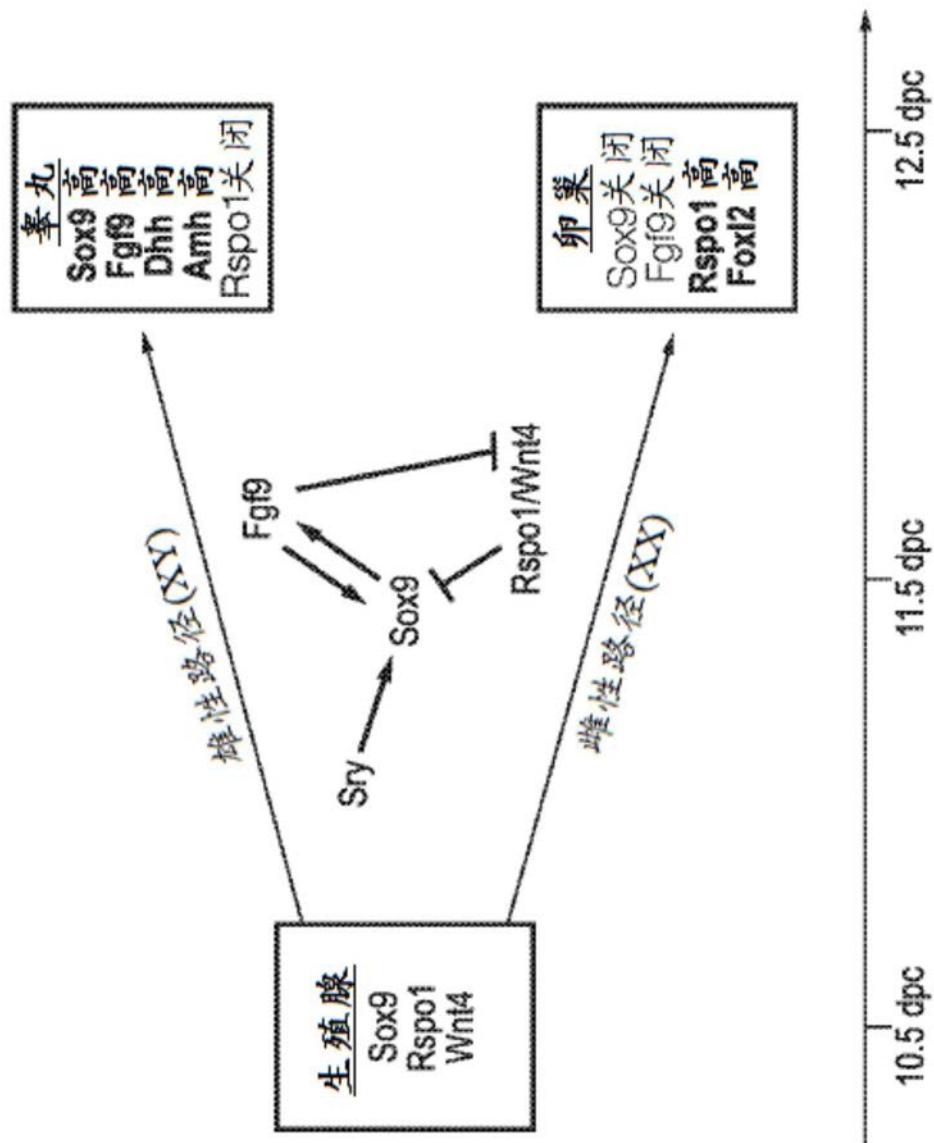


图15