



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106957857 A

(43)申请公布日 2017.07.18

(21)申请号 201610854586.7

(22)申请日 2016.09.23

(71)申请人 西北农林科技大学

地址 710000 陕西省杨凌示范区邹城路3号

(72)发明人 王小龙 陈玉林 蔡蓓 牛怡源

马宝华

(51)Int.Cl.

C12N 15/85(2006.01)

A01K 67/027(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

(54)发明名称

一种利用CRISPR/Cas9系统共同敲除山羊MSTN和FGF5基因的方法

(57)摘要

本发明提供了一种利用CRISPR/Cas9系统共同敲除山羊MSTN和FGF5基因的方法。本发明首先获得针对山羊MSTN第二外显子和第三外显子的sgRNA识别区的两段DNA序列,及针对山羊FGF5第一外显子的sgRNA识别区的两段DNA序列,分别设计并合成相应的sgRNA寡核苷酸序列;接着分别构建针对MSTN第二外显子和第三外显子、FGF5第一外显子且含T7启动子的体外转录载体;利用Cas9和sgRNA的体外转录载体获得Cas9 mRNA和sgRNA,可用于生产MSTN和FGF5共同敲除的转基因山羊。

1. 一种利用CRISPR/Cas9系统共同敲除山羊MSTN和FGF5基因的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 构建特异性靶向MSTN第二外显子和第三外显子、FGF5第一外显子的sgRNA的体外转录载体;通过体外转录得到MSTN第二外显子和第三外显子的sgRNA-1M、sgRNA-2M,FGF5第一外显子的sgRNA-1F、sgRNA-2F;

(2) 体外转录Cas9蛋白的体外转录载体,得到Cas9 mRNA;

(3) 将步骤(1)和步骤(2)的sgRNA-1M、sgRNA-2M、sgRNA-1F、sgRNA-2F及Cas9 mRNA纯化后测浓度,将sgRNA-1M、sgRNA-2M、sgRNA-1F、sgRNA-2F和Cas9 mRNA混合,注射入山羊受精卵细胞质中,然后经体外培养后移植入同种雌性山羊输卵管中,用于生产共同敲除MSTN和FGF5的转基因山羊。

2. 根据权利要求1所述的一种利用CRISPR/Cas9系统共同敲除山羊MSTN和FGF5基因的方法,其特征在于,所述的sgRNA-1M、sgRNA-2M、sgRNA-1F、sgRNA-2F与Cas9 mRNA混合后,终浓度为Cas9 mRNA 20ng/ $\mu$ L、sgRNA-1M 5ng/ $\mu$ L、sgRNA-2M 5ng/ $\mu$ L、sgRNA-1F 5ng/ $\mu$ L、sgRNA-2F 5ng/ $\mu$ L。

3. 根据权利要求1所述的一种利用CRISPR/Cas9系统共同敲除山羊MSTN和FGF5基因的方法,其特征在于,所述的sgRNA-1M、sgRNA-2M、sgRNA-1F、sgRNA-2F的DNA序列的体外转录载体为pUC57-T7-gRNA。

4. 根据权利要求1所述的一种利用CRISPR/Cas9系统共同敲除山羊MSTN和FGF5基因的方法,其特征在于,特异性靶向为MSTN第二外显子和第三外显子的两对sgRNA-1M、sgRNA-2M寡核苷酸序列、FGF5第一外显子的两对sgRNA-1F、sgRNA-2F寡核苷酸。

## 一种利用CRISPR/Cas9系统共同敲除山羊MSTN和FGF5基因的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及动物基因工程和遗传修饰领域,具体涉及一种利用CRISPR/Cas9系统共同敲除山羊MSTN和FGF5基因的方法。

### 背景技术

[0002] CRISPR/Cas系统是细菌和古细菌内通过RNA介导的特异性切外源遗传物质的获得性免疫系统,可用来对抗入侵的病毒及外源DNA。CRISPR/Cas9系统通过将入侵噬菌体和质粒DNA的片段整合到CRISPR中,并利用相应的CRISPR RNAs (crRNAs) 来指导同源序列的降解,从而提供免疫性。

[0003] II型CRISPR/Cas系统即CRISPR/Cas9已经被证明可以在试管中高效切割任意给定的DNA。CRISPR/Cas9与传统的ZFN和TALEN技术相比效率高、序列选择限制小(只需要基因组上出现GG即可),并且其构建过程简单,针对每个基因只需构建合适的sgRNA。但CRISPR/Cas9在哺乳动物细胞中会引起严重的脱靶效应,利用Cas9切口酶加上两个相背着的PAM、距离比较近并且可以结合在不同链上的sgRNA可以大大降低脱靶效率。

[0004] 传统的育种方法存在着育种年限长、一次选择性状数量有限等缺点,分子标记辅助选择仍处于理论发展迅速但是很难应用于生产实践的问题,转基因育种技术与传统育种技术的结合显得尤为重要。与生长相关的重要基因——MSTN,即肌生成抑制素,又称生长/分化因子-8 (GDF-8)。哺乳动物中MSTN基因主要在骨骼肌中表达,该基因在非翻译区的变异位点(A>G)产生了干扰的靶位点,抑制了MSTN基因的翻译过程和调控功能,从而影响了动物肌肉的发育。FGF5即成纤维生长因子5被证明是影响毛发长度的重要因子,通过抑制毛囊毛乳头细胞的活性来阻碍毛发的生长。通过CRISPR/Cas9系统对山羊基因组中抑制肌肉生长的MSTN和抑制羊绒生长的FGF5基因进行共同敲除,生产出肌肉发达、绒毛长的绒、肉兼用型山羊对我国畜牧业的长足发展具有重要意义。

[0005] 肌生成抑制蛋白 (MSTN) 是哺乳动物骨骼肌质量的一个保守的负调节因子。然而,在家畜中是否能够实现MSTN的精确敲除,能否被安全地用来提高产肉性能,目前还未得到证实。

### 发明内容

[0006] 本发明提供了一种利用CRISPR/Cas9系统共同敲除山羊MSTN和FGF5基因的方法。

[0007] 为实现上述目的,本发明采取的技术方案为:

[0008] 一种利用CRISPR/Cas9系统共同敲除山羊MSTN和FGF5基因的方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0009] (1) 构建特异性靶向MSTN第二外显子和第三外显子、FGF5第一外显子的sgRNA的体外转录载体;通过体外转录得到MSTN第二外显子和第三外显子的sgRNA-1M、sgRNA-2M, FGF5第一外显子的sgRNA-1F、sgRNA-2F;

[0010] (2) 体外转录Cas9蛋白的体外转录载体,得到Cas9mRNA;

[0011] (3) 将步骤(1)和步骤(2)的sgRNA-1M、sgRNA-2M、sgRNA-1F、sgRNA-2F及Cas9mRNA纯化后测浓度,混合,注射入山羊受精卵细胞质中,然后经体外培养后移植入同种雌性山羊输卵管中,用于生产共同敲除MSTN和FGF5的转基因山羊。

[0012] 上述所述的sgRNA-1M、sgRNA-2M、sgRNA-1F、sgRNA-2F与Cas9mRNA混合后,终浓度为Cas9mRNA 20ng/ $\mu$ L、sgRNA-1M 5ng/ $\mu$ L、sgRNA-2M 5ng/ $\mu$ L、sgRNA-1F 5ng/ $\mu$ L、sgRNA-2F 5ng/ $\mu$ L。

[0013] 最上面所述的一种利用CRISPR/Cas9系统共同敲除山羊MSTN和FGF5基因的方法,其特征在于,所述的sgRNA-1M、sgRNA-2M、sgRNA-1F、sgRNA-2F的DNA序列的体外转录载体为体外转录载体Puc57-T7-gRNA。

[0014] 最上面所述的一种利用CRISPR/Cas9系统共同敲除山羊MSTN和FGF5基因的方法,其特征在于,特异性靶向为MSTN第二外显子和第三外显子的两对sgRNA-1M、sgRNA-2M寡核苷酸序列、FGF5第一外显子的两对sgRNA-1F、sgRNA-2F寡核苷酸。

[0015] 本发明还提供了上述利用CRISPR/Cas9系统共同敲除山羊MSTN和FGF5基因的方法的下列应用:

[0016] (1) 将sgRNA-1M、sgRNA-2M共同或单独与Cas9mRNA同时转染至细胞,用于研究MSTN基因的功能;

[0017] (2) 将sgRNA-1M、sgRNA-2M共同或单独与Cas9mRNA同时注射入受精卵,然后通过胚胎移植用于生产靶向敲除MSTN基因的转基因山羊;

[0018] (3) 将sgRNA-1M、sgRNA-2M共同或单独与Cas9mRNA同时转染至细胞,筛选后用阳性细胞作为供核细胞通过核移植的方法生产靶向敲除MSTN基因的转基因山羊;

[0019] (4) 将sgRNA-1F、sgRNA-2F共同或单独与Cas9mRNA同时转染至细胞,用于研究FGF5基因的功能;

[0020] (5) 将sgRNA-1F、sgRNA-2F共同或单独与Cas9mRNA同时注射入受精卵,然后通过胚胎移植用于生产靶向敲除FGF5基因的转基因山羊;

[0021] (6) 将sgRNA-1F、sgRNA-2F共同或单独与Cas9mRNA同时转染至细胞,筛选后用阳性细胞作为供核细胞通过核移植的方法生产靶向敲除FGF5基因的转基因山羊。

[0022] (7) 将sgRNA-1M、sgRNA-2M、sgRNA-1F、sgRNA-2F与Cas9mRNA同时注射入受精卵,然后通过胚胎移植用于生产共同敲除MSTN基因和FGF5基因的转基因山羊;

[0023] (8) 将sgRNA-1M、sgRNA-2M、sgRNA-1F、sgRNA-2F与Cas9mRNA同时转染至细胞,筛选后用阳性细胞作为供核细胞通过胚胎移植用于生产共同敲除MSTN基因和FGF5基因的转基因山羊;

[0024] (9) 将sgRNA-1M、sgRNA-2M、sgRNA-1F、sgRNA-2F中任意两个或两个以上sgRNA与Cas9mRNA同时注射入受精卵,然后通过胚胎移植用于生产特异靶向敲除的转基因山羊;

[0025] (10) 将sgRNA-1M、sgRNA-2M、sgRNA-1F、sgRNA-2F中任意两个或两个以上sgRNA与Cas9mRNA同时转染至细胞,筛选后用阳性细胞作为供核细胞通过胚胎移植用于生产特异靶向敲除的转基因山羊。

[0026] 此系统的工作原理是crRNA (CRISPR-derived RNA) 通过碱基配对与tracrRNA (trans-activating RNA) 结合形成tracrRNA/crRNA复合物,此复合物引导核酸酶Cas9蛋白

在与crRNA配对的序列靶位点剪切双链DNA。而通过人工设计这两种RNA,可以改造形成具有引导作用的sgRNA (singleguide RNA),足以引导Cas9对DNA的定点切割。作为一种RNA导向的dsDNA结合蛋白,Cas9效应物核酸酶是已知的第一个统一因子(unifying factor),能够共定位RNA、DNA和蛋白,从而拥有巨大的改造潜力。将蛋白与无核酸酶的Cas9 (Cas9nuclease-null)融合,并表达适当的sgRNA,可靶定任何dsDNA序列,而sgRNA的末端可连接到目标DNA,不影响Cas9的结合。因此,Cas9能在任何dsDNA序列处带来任何融合蛋白及RNA,这为生物体的研究和改造带来巨大潜力。

[0027] 本发明的基因序列:

[0028] 1、利用CRISPR/Cas9系统共同敲除山羊MSTN和FGF5基因的方法,针对山羊MSTN第二外显子和第三外显子、FGF5第一外显子特异性靶位点序列,其特征在于,其在基因组中的位置如表1所示。

[0029]

sgRNA	Targeting site	Location	Strand
sgRNA-1M	GTCTCAGATATA	Chr2:6316212-631	-
	TCCACAGTTGG	6234	

[0030]

sgRNA-2M	GGATTTTGAAG	Chr2:6318642-631 8664	+
	CTTTTGGATGG		
	G		
sgRNA-1F	GGCTGCCACGG	Chr6:92103586-92 103608	+
	AGAGGAACCC		
	GG		
sgRNA-2F	GGCAGCCTCTA	Chr6:92103755-92 103777	+
	CTGCAGAGTGG		
	G		

[0031] 表1

[0032] 2、特异性靶向MSTN第二外显子和第三外显子的两对sgRNA-1M、sgRNA-2M寡核苷酸序列、FGF5第一外显子的两对sgRNA-1F、sgRNA-2F寡核苷酸序列,其特征在于,其靶向位点如表1所示,其碱基序列如表2所示。

[0033]

SgRNA-1M top strand	TAGGTCTCAGATATATCCACAGT
SgRNA-1M bottom strand	AAACACTGTGGATATATCTGAGA

SgRNA-2M top strand	TAGGATTTTGAAGCTTTTGGAT
SgRNA-2M bottom strand	AAACATCCAAAAGCTTCAAAAT
SgRNA-1F top strand	TAGGCTGCCACGGAGAGGAACC
SgRNA-1F bottom strand	AAACGGTTCCTCTCCGTGGCAG
SgRNA-2F top strand	TAGGCAGCCTCTACTGCAGAGT
SgRNA-2F bottom strand	AAACACTCTGCAGTAGAGGCTG

[0034] 表2

[0035] 3、利用CRISPR/Cas9系统共同敲除山羊MSTN和FGF5基因的方法,表3为MSTN和FGF5目的片段检测及扩增所用引物序列;

[0036]

Gene	Name of primer	Sequence	Amplicon (bp)
MSTN	MSTN E2 Forward	GACATGGAGGCGTTCGTTTCATT	422
	MSTN E2 Reverse	CTGGGAAGGTTACAGCAAGATCA	
	MSTN E3 Forward	TAGAAGTCAAGGTAACAGACAC	509
	MSTN E3 Reverse	GTTTCATATACTGTAGCTTGTGC	
FGF5	FGF5 Forward	CCAACCCTGCAAGATGCACTTA	528
	FGF5 Reverse	TTCTGGAGGAGAGCAAGCAACT	

[0037] 表3

### 具体实施方式

[0038] 为了使本发明的目的及优点更加清楚明白,以下结合实施例对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0039] 本发明实施例提供了一种利用CRISPR/Cas9系统共同敲除山羊MSTN和FGF5基因的方法,包括以下步骤:

[0040] (1) 构建特异性靶向MSTN第二外显子和第三外显子、FGF5第一外显子的sgRNA的体外转录载体;通过体外转录得到MSTN第二外显子和第三外显子的sgRNA-1M、sgRNA-2M, FGF5第一外显子的sgRNA-1F、sgRNA-2F;

[0041] (2) 体外转录Cas9蛋白的体外转录载体,得到Cas9mRNA;

[0042] (3) 将步骤(1)和步骤(2)的sgRNA-1M、sgRNA-2M、sgRNA-1F、sgRNA-2F及Cas9mRNA纯化后测浓度,将sgRNA-1M、sgRNA-2M、sgRNA-1F、sgRNA-2F和Cas9mRNA混合,注射入山羊受精卵细胞质中,然后经体外培养后移植入同种雌性山羊输卵管中,用于生产共同敲除MSTN和FGF5的转基因山羊。

[0043] 其中所述的sgRNA-1M、sgRNA-2M、sgRNA-1F、sgRNA-2F与Cas9mRNA混合后,终浓度为Cas9mRNA 20ng/ $\mu$ L、sgRNA-1M 5ng/ $\mu$ L、sgRNA-2M5ng/ $\mu$ L、sgRNA-1F 5ng/ $\mu$ L、sgRNA-2F

5ng/ $\mu$ L。

[0044] 所述的sgRNA-1M、sgRNA-2M、sgRNA-1F、sgRNA-2F的DNA序列的体外转录载体为Puc57-T7-gRNA。

[0045] 特异性靶向为MSTN第二外显子和第三外显子的两对sgRNA-1M、sgRNA-2M寡核苷酸序列、FGF5第一外显子的两对sgRNA-1F、sgRNA-2F寡核苷酸。

[0046] 步骤一：针对MSTN基因和FGF5基因的CRISPR/Cas9系统的构建

[0047] 1、根据NCBI中山羊基因组序列，选择山羊基因组中MSTN基因第二外显子和第三外显子作为靶位点设计sgRNA-1M、sgRNA-2M，FGF5基因的第一外显子作为靶位点设计sgRNA-1F、sgRNA-2F，其靶位点序列如表1所示，sgRNA序列如表2所示。

[0048]

sgRNA	Targeting site	Location	Strand
sgRNA-1M	GTCTCAGATATATC	Chr2:6316212-63	-
	CACAGTTGG	16234	
sgRNA-2M	GGATTTTGAAGCTT	Chr2:6318642-63	+
	TTGGATGGG	18664	
sgRNA-1F	GGCTGCCACGGAG	Chr6:92103586-9	+
	AGGAACCCGG	2103608	
sgRNA-2F	GGCAGCCTCTACT	Chr6:92103755-9	+
	GCAGAGTGGG	2103777	

[0049] 表1

[0050]

SgRNA-1M top strand	TAGGTCTCAGATATATCCACAGT
---------------------	-------------------------

[0051]

<b>SgRNA-1M bottom strand</b>	<b>AAACACTGTGGATATATCTGAGA</b>
<b>SgRNA-2M top strand</b>	<b>TAGGATTTTGAAGCTTTTGGAT</b>
<b>SgRNA-2M bottom strand</b>	<b>AAACATCCAAAAGCTTCAAAT</b>
<b>SgRNA-1F top strand</b>	<b>TAGGCTGCCACGGAGAGGAACC</b>
<b>SgRNA-1F bottom strand</b>	<b>AAACGGTTCCTCTCCGTGGCAG</b>
<b>SgRNA-2F top strand</b>	<b>TAGGCAGCCTCTACTGCAGAGT</b>
<b>SgRNA-2F bottom strand</b>	<b>AAACACTCTGCAGTAGAGGCTG</b>

[0052] 表2

[0053] 2、含有特定sgRNA序列的pUC57-T7-gRNA载体的构建：(1) 设计并合成识别MSTN基因第二外显子和第三外显子的sgRNA-1M、sgRNA-2M及识别FGF5基因的第一外显子作为靶位点设计sgRNA-1F、sgRNA-2F；(2) 合成后的sgRNA-1M、sgRNA-2M、sgRNA-1F、sgRNA-2F成对寡核苷酸分别进行体外退火；(3) 将sgRNA-1M、sgRNA-2M、sgRNA-1F、sgRNA-2F通过BsaI位点进行酶切、连接，插入到pUC57-T7-gRNA中，分别命名为pUC57-T7-sgRNA-1M、pUC57-T7-sgRNA-2M、pUC57-T7-sgRNA-1F、pUC57-T7-sgRNA-2F；

[0054] 针对MSTN基因和FGF5基因的CRISPR/Cas9系统即为：体外转录载体pUC57-T7-sgRNA-1M、pUC57-T7-sgRNA-2M、pUC57-T7-sgRNA-1F、pUC57-T7-sgRNA-2F和pST1374-NLS-flag-linker-Cas9。

[0055] 步骤二：体外转录

[0056] 利用构建好的载体pUC57-T7-sgRNA-1M、pUC57-T7-sgRNA-2M、pUC57-T7-sgRNA-1F、pUC57-T7-sgRNA-2F和Cas9mRNA的体外转录载体pST1374-NLS-flag-linker-Cas9进行以T7启动子介导的体外转录。(1) 将pUC57-T7-sgRNA-1M、pUC57-T7-sgRNA-2M、pUC57-T7-sgRNA-1F、pUC57-T7-sgRNA-2F分别用Dra I线性化，pST1374-NLS-flag-linker-Cas9用Age I线性化；(2) 用MEGAscript kit (Ambion) 试剂盒按照说明书进行pUC57-T7-sgRNA-1M、pUC57-T7-sgRNA-2M、pUC57-T7-sgRNA-1F、pUC57-T7-sgRNA-2F、pST1374-NLS-flag-linker-Cas9的体外转录；(3) 用MEGAClear kit (Ambion) 试剂盒按照说明书进行sgRNA-1M、sgRNA-2M、sgRNA-1F、sgRNA-2F、Cas9mRNA的纯化。

[0057] 步骤三：利用针对MSTN基因和FGF5基因的CRISPR/Cas9系统mRNA生产共同敲除MSTN基因和FGF5基因的基因打靶山羊

[0058] 1、原核注射及胚胎移植

[0059] 从经过同期发情后自然交配的供体母山羊体内通过手术收集处于单细胞阶段的胚胎(大约在受精后14h)，利用显微注射仪将预混好的sgRNA-1M、sgRNA-2M、sgRNA-1F、sgRNA-2F、Cas9mRNA混合物(混合后终浓度为Cas9mRNA 20ng/ $\mu$ L，sgRNA-1M、sgRNA-2M、sgRNA-1F、sgRNA-2F 5ng/ $\mu$ L)注射入山羊受精卵的细胞质中。注射后的受精卵转移至Quinn's Advantage Cleavage Medium (Sage Biopharma, NJ, USA) 体外37 $^{\circ}$ C培养24h，然后

移植至受体母羊的输卵管壶腹部与峡部连接处,生产共同敲除MSTN基因和FGF5基因的基因打靶山羊。

[0060] 2、共同敲除MSTN基因和FGF5基因的基因打靶山羊的鉴定

[0061] 受体母羊生产后,待羔羊长至1周龄后采羔羊的血样,提取羔羊血液基因组DNA。以羔羊血液基因组为模版,分别设计针对MSTN基因第二外显子和第三外显子的引物,针对FGF5基因第一外显子的引物。序列如表3,进行扩增,对获得的PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测并进行产物体系回收,回收后的PCR产物进行T7EN1酶切,酶切完后进行电泳检测,检测结果显示两条或多条条带的可能为基因打靶成功;将回收后的PCR产物送测序并进行序列分析,结合T7EN1酶切结果和测序结果分析确定阳性个体;对阳性个体的PCR产物克隆至T载体,转化后挑取阳性克隆再次进行测序,根据测序结果更深一步确定基因敲除成功的阳性个体及阳性个体中碱基的变化方式。

[0062]

Gene	Name of primer	Sequence	Amplicon (bp)
MSTN	MSTN E2 Forward	GACATGGAGGCGTTCGTTTCATT	422
	MSTN E2 Reverse	CTGGGAAGGTTACAGCAAGATCA	
	MSTN E3 Forward	TAGAAGTCAAGGTAACAGACAC	509
	MSTN E3 Reverse	GTTTCATATACTGTAGCTTGTGC	
FGF5	FGF5 Forward	CCAACCCTGCAAGATGCACTTA	528
	FGF5 Reverse	TTCTGGAGGAGAGCAAGCAACT	

[0063] 表3

[0064] 以上虽然已经用一般性说明、具体实施方式对本发明做了详尽的描述,但其仅为本发明的优选实施方式。应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。