



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113957093 B

(45) 授权公告日 2022.09.20

(21) 申请号 202110985540.X

C12N 15/12 (2006.01)

(22) 申请日 2021.08.26

C12N 15/57 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C12N 5/10 (2006.01)

申请公布号 CN 113957093 A

C12N 15/877 (2010.01)

A01K 67/027 (2006.01)

(43) 申请公布日 2022.01.21

(56) 对比文件

(73) 专利权人 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所

CN 107034218 A, 2017.08.11

CN 113604504 A, 2021.11.05

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

刘博奇等.猪传染性胃肠炎病毒特异性受体 APN功能区的初步鉴定.《黑龙江畜牧兽医》.2009, (第11期),

(72) 发明人 李奎 牟玉莲 徐长江 刘志国

(74) 专利代理机构 北京超凡宏宇专利代理事务所(特殊普通合伙) 11463

审查员 刘波

专利代理师 徐乐

(51) Int. Cl.

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

权利要求书2页 说明书8页

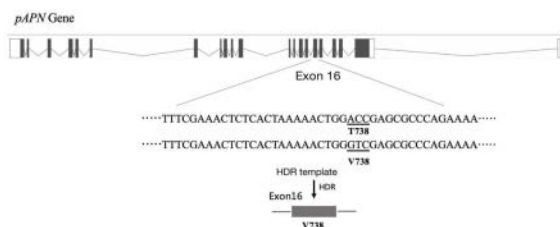
序列表3页 附图3页

(54) 发明名称

用于pAPN基因定点修饰的系统及其应用

(57) 摘要

本发明涉及生物技术领域,具体而言,提供了一种用于pAPN基因定点修饰的系统及其应用。本发明提供用于pAPN基因定点修饰的系统,该系统中含有的第一载体和第二载体可以表达基因编辑蛋白和sgRNA,对pAPN基因的两个靶位点进行有效酶切,利用供体DNA的定点修饰片段替换位于两个靶位点之间的待定点修饰片段,实现pAPN基因第738位氨基酸的精准突变,T738替换为V738。在精确修饰pAPN基因第738位氨基酸的同时,能够避免破坏或改变pAPN基因的其余氨基酸的正常表达,因此在抵抗TGEV感染的基础上,最大程度上保留pAPN蛋白生理活性功能,并且具有适用范围广、基因编辑效率高等优点。



1. 一种用于pAPN基因定点修饰的产品,其特征在于,含有第一载体、第二载体和供体DNA;

所述第一载体包括基因编辑蛋白表达盒和第一sgRNA表达盒;

所述第二载体包括基因编辑蛋白表达盒和第二sgRNA表达盒;

第一sgRNA和第二sgRNA分别靶向pAPN基因的两个靶位点;

所述供体DNA含有pAPN基因第738位氨基酸的定点修饰片段,所述定点修饰片段用于替换pAPN基因待定点修饰片段;

所述pAPN基因待定点修饰片段位于所述两个靶位点之间;

所述pAPN基因定点修饰为pAPN基因T738替换为V738。

2. 根据权利要求1所述的产品,其特征在于,编码所述第一sgRNA为SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列。

3. 根据权利要求1所述的产品,其特征在于,编码所述第二sgRNA为SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列。

4. 根据权利要求1所述的产品,其特征在于,所述pAPN基因定点修饰为将编码pAPN基因第738位氨基酸的ACC替换为GTC。

5. 根据权利要求4所述的产品,其特征在于,所述供体DNA为SEQ ID NO:3所示的核苷酸序列。

6. 根据权利要求1-5任一项所述的产品,其特征在于,所述基因编辑蛋白包括Cas9、Cas9n、Cpf1或C2c2。

7. 根据权利要求6所述的产品,其特征在于,所述基因编辑蛋白为Cas9。

8. 根据权利要求6所述的产品,其特征在于,所述第一载体和第二载体均独立地包括pX330、pX260、pX334、pX335、pX458、pX459、pX461、pX462、pX551或pX552。

9. 根据权利要求8所述的产品,其特征在于,所述第一载体和第二载体均独立地为pX458。

10. 权利要求1-9任一项所述的产品在如下(a) - (c)中的应用,所述应用为非诊断和治疗目的的:

(a) 构建pAPN基因定点修饰的细胞系;

(b) 制备预防猪传染性胃肠炎的产品;

(c) 构建猪传染性胃肠炎抗性猪模型。

11. 一种非诊断和治疗目的的pAPN基因定点修饰的细胞的制备方法,其特征在于,包括向目的细胞导入权利要求1-9任一项所述的产品,得到pAPN基因定点修饰的细胞。

12. 根据权利要求11所述的制备方法,其特征在于,所述目的细胞为猪成纤维细胞。

13. 根据权利要求12所述的制备方法,其特征在于,所述目的细胞为猪胎儿成纤维细胞。

14. 根据权利要求11所述的制备方法,其特征在于,导入的方法包括电穿孔法或脂质体转染法。

15. 根据权利要求11所述的制备方法,其特征在于,导入操作后通过筛选和鉴定,得到pAPN基因定点修饰的细胞。

16. 根据权利要求15所述的制备方法,其特征在于,所述筛选包括通过流式分选筛选单

克隆细胞。

17. 根据权利要求15所述的制备方法,其特征在于,所述鉴定包括测序鉴定。

18. 权利要求11-17任一项所述制备方法得到的细胞。

用于pAPN基因定点修饰的系统及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体而言,涉及一种用于pAPN基因定点修饰的系统及其应用。

背景技术

[0002] 猪传染性胃肠炎(transmissible gastroenteritis,TGE)是一种高度接触传染性疾病,主要引起猪腹泻、呕吐、脱水和死亡,其中初生仔猪中死亡率高达100%。因此TGE被认为是危害养猪产业的重要传染病之一。

[0003] pAPN蛋白被认为是TGEV(transmissible gastroenteritis virus)进入细胞的关键受体。至今,已有多个单位成功制备出了pAPN基因敲除猪,且攻毒实验证实pAPN基因敲除可完全抵抗TGEV感染。但是,除了在介导TGEV入侵方面发挥着重要作用外,pAPN在小肠中还发挥水解肽、酰胺等结构中的酰胺键,从而释放不同的N-中性氨基酸的作用。同时pAPN蛋白在其他组织中还参与很多重要的生理过程,例如细胞生长、免疫调节和血压调节等。因此直接对pAPN进行敲除可能影响机体的其他生理功能。

[0004] 因此,开发一种既能够抵抗TGEV感染、又能保持pAPN蛋白正常生理功能的基因编辑猪尤为重要,在猪抗病育种方面具有重要的科学和实际意义。

[0005] 有鉴于此,特提出本发明。

发明内容

[0006] 本发明的第一目的在于提供一种用于pAPN基因定点修饰的系统。

[0007] 本发明的第二目的在于提供上述系统的应用。

[0008] 本发明的第三目的在于提供pAPN基因定点修饰的细胞的制备方法。

[0009] 本发明的第四目的在于提供上述制备方法得到的细胞。

[0010] 本发明的第五目的在于提供pAPN基因定点修饰的基因编辑猪的制备方法。

[0011] 为了实现本发明的上述目的,特采用以下技术方案:

[0012] 一种用于pAPN基因定点修饰的系统,含有第一载体、第二载体和供体DNA;

[0013] 所述第一载体包括基因编辑蛋白表达盒和第一sgRNA表达盒;

[0014] 所述第二载体包括基因编辑蛋白表达盒和第二sgRNA表达盒;

[0015] 第一sgRNA和第二sgRNA分别靶向pAPN基因的两个靶位点;

[0016] 所述供体DNA含有pAPN基因第738位氨基酸的定点修饰片段,所述定点修饰片段用于替换pAPN基因待定点修饰片段;

[0017] 所述pAPN基因待定点修饰片段位于所述两个靶位点之间;

[0018] 所述pAPN基因定点修饰为pAPN基因T738替换为V738。

[0019] 进一步地,编码所述第一sgRNA为SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列;

[0020] 优选地,编码所述第二sgRNA为SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列。

[0021] 进一步地,所述pAPN基因定点修饰为将编码pAPN基因第738位氨基酸的ACC替换为

GTC。

[0022] 进一步地,所述供体DNA为SEQ ID NO:3所示的核苷酸序列。

[0023] 进一步地,所述基因编辑蛋白包括Cas9、Cas9n、Cpf1或C2c2,优选为Cas9。

[0024] 进一步地,所述第一载体和第二载体均独立地包括pX330、pX260、pX334、pX335、pX458、pX459、pX461、pX462、pX551或pX552,优选为pX458。

[0025] 上述系统在如下(a)-(c)中的应用:

[0026] (a) 构建pAPN基因定点修饰的细胞系;

[0027] (b) 制备预防猪传染性胃肠炎的产品;

[0028] (c) 构建猪传染性胃肠炎抗性猪模型。

[0029] 一种pAPN基因定点修饰的细胞的制备方法,包括向目的细胞导入上述系统,得到pAPN基因定点修饰的细胞;

[0030] 优选地,所述目的细胞为猪成纤维细胞,优选为猪胎儿成纤维细胞;

[0031] 优选地,导入的方法包括电穿孔法或脂质体转染法;

[0032] 优选地,导入操作后通过筛选和鉴定,得到pAPN基因定点修饰的细胞;

[0033] 优选地,所述筛选包括通过流式分选筛选单克隆细胞;

[0034] 优选地,所述鉴定包括测序鉴定。

[0035] 上述制备方法得到的细胞。

[0036] 一种pAPN基因定点修饰的基因编辑猪的制备方法,将上述细胞移植入去核的卵母细胞,得到重组克隆胚胎,将所述重组克隆胚胎移植入母体内经妊娠,获得pAPN基因定点修饰的基因编辑猪;

[0037] 或通过显微注射的方法,将上述用于pAPN基因定点修饰的系统显微注射到猪合子期胚胎中,得到pAPN基因修饰胚胎,将所述基因修饰胚胎移植入母体内经妊娠,获得pAPN基因定点修饰的基因编辑猪;

[0038] 优选地,基因编辑猪出生后还包括鉴定的步骤;

[0039] 优选地,所述鉴定包括测序鉴定。

[0040] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0041] 本发明提供用于pAPN基因定点修饰的系统,该系统中含有的第一载体和第二载体可以表达基因编辑蛋白和sgRNA,对pAPN基因的两个靶位点进行有效酶切,利用供体DNA的定点修饰片段替换位于两个靶位点之间的待定点修饰片段,实现pAPN基因第738位氨基酸的精准突变,T738替换为V738。在精确修饰pAPN基因第738位氨基酸的同时,能够避免破坏或改变pAPN基因的其余氨基酸的正常表达,因此在抵抗TGEV感染的基础上,最大程度上保留pAPN蛋白生理活性功能,并且具有适用范围广、基因编辑效率高等优点。

[0042] 利用上述系统得到pAPN基因定点修饰的细胞的制备方法,具有方法操作简单、成本低廉的优势,且细胞中pAPN基因第738位氨基酸被准确修饰。

[0043] 利用上述细胞得到基因编辑猪的制备方法,具有操作方便,普适性强的优势,且制备得到的基因编辑猪具有良好的TGEV抗性同时保留了pAPN蛋白生理活性功能。

附图说明

[0044] 为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对具体

实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施方式,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0045] 图1为本发明实施例1提供的猪pAPN基因T738单氨基酸精确突变模式图;

[0046] 图2为本发明实施例2提供的pAPN基因第738位氨基酸精确修饰过表达猪回肠上皮细胞抵抗TGEV感染,qRT-PCR检测结果图;

[0047] 图3为本发明实施例2提供的pAPN基因第738位氨基酸精确修饰过表达猪回肠上皮细胞抵抗TGEV感染,间接免疫荧光检测结果图;

[0048] 图4为本发明实施例2提供的pAPN基因第738位氨基酸精确修饰过表达猪回肠上皮细胞抵抗TGEV感染,病毒噬斑实验检测结果图;

[0049] 图5为本发明实施例3提供的pAPN基因第738位氨基酸精确修饰的猪成纤维细胞的测序结果图。

具体实施方式

[0050] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员将会理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。

[0051] 除非另有说明,本文中所用的专业与科学术语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外,任何与所记载内容相似或均等的方法或材料也可应用于本发明中。

[0052] 本发明提供一种用于pAPN基因定点修饰的系统,该系统含有第一载体、第二载体和供体DNA,其中,第一载体包括基因编辑蛋白表达盒和第一sgRNA表达盒,第二载体包括基因编辑蛋白表达盒和第二sgRNA表达盒,第一sgRNA和第二sgRNA分别靶向pAPN基因的两个靶位点;供体DNA含有pAPN基因第738位氨基酸的定点修饰片段,该定点修饰片段用于替换pAPN基因待定点修饰片段,pAPN基因待定点修饰片段位于所述两个靶位点之间。pAPN基因定点修饰为pAPN基因T738替换为V738。

[0053] 上述系统中,第一sgRNA和第二sgRNA可靶向目标片段,基因编辑蛋白对目标靶点进行酶切,再利用供体DNA实现序列重组,该系统在不改变pAPN其他氨基酸的情况下对T738进行精确替换,将T738替换为V738。供体DNA为修饰目的靶序列的替换模板,在特异性的识别pAPN基因第738位氨基酸位点附近序列的第一sgRNA和第二sgRNA的引导下,基因编辑蛋白对靶标片段进行酶切并引导供体DNA序列替换细胞中原有的同源片段,从而达到pAPN基因第738位氨基酸精确修饰的目的。本发明提供的系统在精确修饰pAPN基因第738位氨基酸的同时,能够避免破坏或改变pAPN基因的其余氨基酸的正常表达,因此在抵抗TGEV感染的基础上,最大程度上保留pAPN蛋白生理活性功能,并且具有适用范围广、基因编辑效率高等优点,为制备、培育pAPN单氨基酸精确突变的抗TGEV猪新品种提供有力支撑。

[0054] 需要说明的是,基因编辑蛋白能够在多种细胞中进行有效地酶切,并且引导酶切后的序列重组,具有适用范围广、酶切效率高等优点。对基因编辑蛋白的种类不做限定,只要能够实现基因组编辑功能即可。第一sgRNA和第二sgRNA可以实现基因编辑蛋白靶向pAPN基因第738位氨基酸位点附近序列,对其具体序列不做限定,只要能够实现精准靶向功能即可。供体DNA将目标靶片段替换实现序列重组,具体为pAPN基因第738位氨基酸T738替换为

V738,供体DNA具体序列不做限定,可以实现T738替换为V738即可。

[0055] 在优选地实施方式中,编码第一sgRNA为SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列,编码第二sgRNA为SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列。该方案的靶向性更强,修饰更精确。

[0056] 在优选地实施方式中,pAPN基因定点修饰为将编码pAPN基因第738位氨基酸的ACC替换为GTC。该密码子的替换效率更高。供体DNA进一步优选为SEQ ID NO:3所示的核苷酸序列。当选择SEQ ID NO:3所示的核苷酸序列作为供体DNA时,替换掉pAPN基因中的野生型序列后,T738能够被准确替换为V738。

[0057] 在优选地实施方式中,基因编辑蛋白包括Cas9、Cas9n、Cpf1或C2c2,优选为Cas9。第一载体和第二载体均独立地包括pX330、pX260、pX334、pX335、pX458、pX459、pX461、pX462、pX551或pX552,优选为pX458。Cas9、pX458普适性广,通用性较强,且产品成熟度较高,使用其作为基因编辑载体骨架,能够达到更高的酶切效率。

[0058] 在优选地实施方式中,本发明的第一载体和第二载体均为重组质粒,该重组质粒包括基因编辑载体骨架和编码sgRNA的序列,其中基因编辑载体骨架为CRISPR质粒。

[0059] 在一些具体的实施方式中,分别将序列如SEQ ID NO:4-5和SEQ ID NO:6-7所示的寡核苷酸单链退火形成双链,分别与经过酶切的载体骨架连接,筛选获得阳性克隆即得第一载体和第二载体。

[0060] 本发明还提供上述系统在如下(a)-(c)中的应用:

[0061] (a) 构建pAPN基因定点修饰的细胞系;

[0062] (b) 制备预防猪传染性胃肠炎的产品;

[0063] (c) 构建猪传染性胃肠炎抗性猪模型。

[0064] 本发明提供的上述系统可以实现pAPN基因定点修饰。利用该系统可以构建pAPN基因定点修饰的细胞系,而且由于T738是影响TGEV受体活性最重要的一个氨基酸位点,将其点突变后能够阻断pAPN与TGEV的结合,抵抗TGEV的感染,从而极大地增强机体对TGEV的抗性,构建猪传染性胃肠炎抗性猪。便于使用,将其制备成试剂盒等产品形式。

[0065] 本发明还提供一种pAPN基因定点修饰的细胞的制备方法以及制备得到的细胞,该制备方法包括向目的细胞导入本发明的系统,得到pAPN基因定点修饰的细胞。目的细胞优选为猪成纤维细胞,进一步优选为猪胎儿成纤维细胞,相较于其他细胞,猪胎儿成纤维细胞克隆效率更高;导入的方法优选为电穿孔法或脂质体转染法,进一步优选为电穿孔法,转染效率更高。

[0066] 在优选地实施方式中,向目的细胞导入系统后通过筛选和鉴定,得到pAPN基因定点修饰的细胞。筛选优选为通过流式分选筛选单克隆细胞,鉴定单克隆细胞是否为pAPN基因第738位氨基酸精确修饰的细胞,鉴定优选为测序鉴定。

[0067] 在一些实施方式中,可以提取单克隆细胞的DNA,利用SEQ ID NO:8-9所示引物进行PCR扩增,扩增产物通过测序确认细胞是否实现精准修饰。

[0068] 上述pAPN基因定点修饰的细胞可以进一步用于制备基因编辑猪,将细胞移植入去核的卵母细胞,得到重组克隆胚胎,或者通过显微注射的方法,得到pAPN基因修饰胚胎,将重组克隆胚胎或基因修饰胚胎移植入母体内经妊娠,获得pAPN基因定点修饰的基因编辑猪。

[0069] 在优选地实施方式中,基因编辑猪出生后还需要鉴定,优选为测序鉴定。

[0070] 在一些实施方式中,可以提取基因编辑猪的DNA,利用SEQ ID NO:8-9所示引物进行PCR扩增,扩增产物通过测序确认猪是否实现精准修饰。

[0071] 下面通过具体的实施例进一步说明本发明,但是,应当理解为,这些实施例仅仅是用于更详细地说明之用,而不应理解为用于以任何形式限制本发明。

[0072] 主要试剂

[0073] 分离猪胎儿成纤维细胞用的胶原酶type IV购自sigma;

[0074] 细胞培养用的DMEM、FBS、PS、NEAA、Glutamine、Trypsase均购自Gibco;

[0075] 提取细胞和耳组织DNA试剂盒购自天根生化科技有限公司;

[0076] 引物由北京擎科生物科技有限公司合成;

[0077] 用于PCR的KOD FX PCR酶购自TOYOBO。

[0078] 主要仪器

[0079] CO₂培养箱(Thermo Scientific,3111);

[0080] 荧光倒置显微镜(ZEISS,observerA1);

[0081] PCR仪(BIO-RID,C1000 Touch);

[0082] 凝胶成像系统(BIO-RID,Universal Hood II);

[0083] 显微操作系统(Eppendorf,Celltram vario);

[0084] 细胞流式分选仪(BD,Aria III)。

[0085] 实施例1第一载体和第二载体的构建和供体DNA序列设计

[0086] 1.以猪pAPN基因为目标序列,利用sgRNA分析工具CRISPOR(cri_spor.tefor.net)选取靠近T738位点同时分值又较高的打靶位点,如下所示:

[0087] 编码pAPN-sgRNA-1的序列:CTAGAAATACCTCAGGAAGC (SEQ ID NO:1);

[0088] 编码pAPN-sgRNA-2的序列:CGAGCGCCAGAAAATCTGA (SEQ ID NO:2)。

[0089] 为了便于与载体骨架连接,针对pAPN-sgRNA-1和pAPN-sgRNA-2构建如下互补配对的寡聚核苷酸序列:

[0090] pAPN-sgRNA-1-F:caccgCTAGAAATACCTCAGGAAGC (SEQ ID NO:4);

[0091] pAPN-sgRNA-1-R:aaacGCTTCCTGAGGTATTTCTAGc (SEQ ID NO:5);

[0092] pAPN-sgRNA-2-F:caccgCGAGCGCCAGAAAATCTGA (SEQ ID NO:6);

[0093] pAPN-sgRNA-2-R:aaacTCAGATTTTCTGGGCGCTCGc (SEQ ID NO:7)。

[0094] 根据sgRNA序列设计得到供体DNA,具体序列如下:

[0095] pAPN-dsODN序列:CCTTTGAGCACAGTCTGGCCTTGTGCGAGGCCTTTAGCCTCTGGCCTCTTGCT
CCTGTAGCCATTAGCTCTTGCTACATCTGCCACCCACATCAGAGGCTCCATGGGTCTCCAGATGACTCAGGCATG
AGTCTCTTCTTTGAAGCTATTTTTAGGGCTGCATCCTCGGCATGTGGAGGTTCCAAGCTAGGGGTTGAATCGGAG
CTGTAGCCGCCAGCCTACACCACAGCCACAGCAACACGGGATCCGAGCCACATCTGCGACCTACACCACAGCTCAC
AGCAATGCCAGATCCTTAACCCACTGAGTGGGGCCAGGGTTGAACCCATGTCCTCATGTTTCCCAGTCAGATTCTG
TTCTGCTGTGCCATGACGGAACTCTGGAACCTCCTCTTTGAAGCTCTTTATGTTTTGTTCTTGTTTTTTGT
GTTTTTCTAGAAATACCTCAGGAAGCAAGTCGAACCCCTCTTCCAACATTTGAAACTCTCACTAAAACTGGGTC
GAGCGCCAGAAACTTAATGGACCAGTGAGTATGAGCTCGCTTGGTCTGGAGATCATGGGTGGTGCAGGTAGCCT
GACCTGGGGGCCATAGCAAGTCCAGCAGCATCCTCTCTGGAGCTCCCAACTCCTGGCCGACCAGGGCCACAGTC
AGGGAGAGCGACCCCTCCAACCCACTCCCGCCCCAGGAGTAGGGACTCTGCTCTGAGGCTCTGTGTGGCCTAT

GAACCATCTGGCCTCTTTGGGCAAAGGACCAAACCTGAACCTCTGAGGGTCCCTCACCCGCATGGTGAGGTTCTAGG
TGTTAAAGCTGGGGCTGGAGCCTGTGCCAGCCCTCCCCAGGCTGCCAAGGGCAAGAAGCAAAGAAGGGAACCCAA
AGGTGGCTGGTGGCTATACCTGCAGAGTGCGGGTCTGCCTCCCTGTTGGGAGTTGTGTGTCAGCAGGGGAGTCTT
GGTCAGCGTCAGGTCCAGGCGTGCTGACAGAGTGT (SEQ ID NO:3)。

[0096] 所示的dsODN序列作为双链donor序列,当双链donor序列替换掉野生型序列后, T738被成功替换为V738。猪pAPN基因T738单氨基酸精确突变模式图如图1所示。

[0097] 2. 构建第一载体和第二载体,分别命名为pX458-pAPN-sgRNA-1和pX458-pAPN-sgRNA-2:

[0098] 将步骤1中pAPN-sgRNA-1-F与pAPN-sgRNA-1-R、pAPN-sgRNA-2-F与pAPN-sgRNA-2-R分别在98℃条件下处理10min,然后自然冷却至室温的条件下对其进行退火。

[0099] 用限制性内切酶Bbs I对含有Cas9序列的PX458骨架载体在37℃条件下酶切2h,切胶回收线性化片段。

[0100] 将上述的退火双链片段与载体线性片段混匀16℃连接1h,转化到Top10或DH5α的感受态细胞,在含氨苄的LB平板上涂布生长,然后挑取单菌落扩大培养并测序。测序引物如下:

[0101] U6-FWD:GAGGGCCTATTTCCCATGATT (SEQ ID NO:10)。

[0102] 序列正确后经培养提取得到第一载体 (pX458-pAPN-sgRNA-1质粒) 和第二载体 (pX458-pAPN-sgRNA-2质粒),用于后续的细胞转染。质粒提取采用质粒去内毒素大提试剂盒 (Endo-Free Plasmid Maxi Kit)。

[0103] 实施例2 pAPN基因第738位氨基酸精确修饰过表达猪回肠上皮细胞的建立及功能验证

[0104] 1. 建立

[0105] 将pAPN基因敲除的猪回肠上皮细胞 (Immortal Pig Intestinal-2I Knock Out, IPI-2I-KO) 复苏至10cm平皿中,当细胞达到70-80%汇合度时即可进行细胞转染。

[0106] 将野生型pAPN基因CDS序列和第738位氨基酸精确修饰的pAPN基因CDS序列分别连接到PLVX载体骨架中,分别命名为PLVX-WT和PLV X-738。

[0107] 将PLVX-WT、PLVX-738和PLVX载体,利用Lipofectamine-3000脂质体转染试剂转入到IPI-2I-KO细胞,成功获得精确修饰过表达细胞,分别命名为IPI-2I-WTOE、IPI-2I-738OE和IPI-2I-vector,用作TGEV感染试验时的供体细胞。

[0108] 2. 功能验证

[0109] 将上述获得的IPI-2I-WTOE、IPI-2I-738OE和IPI-2I-vector细胞进行TGEV感染试验。

[0110] 分别在IPI-2I-KO (Mock组)、IPI-2I-WTOE、IPI-2I-738OE和IPI-2I-vector细胞接种TGEV病毒株 (MOI=1),:

[0111] (1) 感染12h后收集细胞,利用qRT-PCR检测TGEV基因组在细胞中拷贝数,提取RNA检测细胞中TGEV病毒拷贝数。qRT-PCR结果如图2,结果表明,TGEV基因组RNA在IPI-2I-WTOE细胞上大量复制,与IPI-2I-WTOE细胞相比较,IPI-2I-738OE细胞中TGEV基因组RNA拷贝数极显著降低 (**P<0.001)。

[0112] (2) 感染12h后进行间接免疫荧光检测,IFA结果如图3所示,结果表明,IPI-2I-

WTOE细胞接毒后,细胞中TGEV大量感染,与IPI-2I-WTOE细胞相比较,IPI-2I-7380E细胞中TGEV感染量明显减少。

[0113] 分别在IPI-2I-WTOE、IPI-2I-7380E和IPI-2I-vector细胞接种TGEV病毒株(MOI=1)。利用病毒噬斑实验检测细胞中TGEV病毒滴度,感染12h后收集细胞上清液,随后利用LLC-PK1细胞分别检测上清液中TGEV病毒滴度。病毒噬斑结果如图4所示,结果表明,细胞接毒后,IPI-2I-WTOE细胞中TGEV滴度较高,与IPI-2I-WTOE细胞相比,IPI-2I-7380E细胞中病毒滴度显著降低(**P<0.01)。

[0114] 综上所述结果表明,pAPN基因第738位氨基酸精确修饰过表达猪回肠上皮细胞可以有效抵抗TGEV感染,说明pAPN基因第738位为TGEV感染的关键位点,pAPN基因第738位氨基酸精确修饰后可有效抵抗TGEV感染。

[0115] 实施例3 pAPN基因第738位氨基酸精确修饰猪成纤维细胞单克隆的建立

[0116] 1. 猪胎儿成纤维细胞的制备

[0117] 将猪35日龄胚胎去除头、尾、四肢、内脏和骨头,并将血液清理干净。用弯头眼科剪持续剪切胎儿30min保证充分剪碎,将剪碎的胎儿组织用剪头的蓝枪头吸取到15mL离心管中,加入5mL完全培养基,自然沉降数分钟后除去上面溶液,并在下层组织块中加入几滴胎牛血清,用尖端1cm处弯曲的15cm玻璃巴氏管吸出,平铺于两个T75培养瓶中,瓶底朝上放置,并在对侧加入15mL全培养液,于6-8h后小心翻转培养瓶,将组织块浸入培养液中,每两天换一次液,待细胞长满T75培养瓶后冻存备用。其中,猪为中国农业科学院北京畜牧兽医研究所基地猪场饲养的猪。

[0118] 2. 细胞转染

[0119] 转染前一天将原代猪胎儿成纤维细胞复苏至10cm平皿中,当细胞达到70-80%汇合度时即可进行细胞转染。将5 μ g pX458-pAPN-sgRNA-1质粒、5 μ g pX458-pAPN-sgRNA-2质粒和5 μ g pAPN-dsODN共转染入猪胎儿成纤维细胞中,转染步骤严格按照Basic Primary Fibroblasts Nucleofector Kit (Lonza) 试剂盒说明书进行操作。

[0120] 3. 阳性单克隆细胞的筛选

[0121] 电转36h后,将细胞收集起来,通过流式分选仪分选单个阳性细胞到96孔板中并进行培养,每3天更换一次培养液。分选后的细胞大约培养10天左右,可以观察到96孔板中的细胞长满,然后将长满的单克隆细胞进行传代培养至48孔板,待48孔板细胞长满,取部分细胞用于提取基因组鉴定基因型。

[0122] 4. 阳性单克隆细胞的鉴定

[0123] 对所挑取的细胞单克隆进行鉴定:以提取的细胞基因组为模板,用核苷酸序列如SEQ ID NO:8 (pAPN-TY-F2序列:CAAGGATTTGTGGAG GAGAA)和SEQ ID NO:9 (pAPN-TY-R2序列:GCTGAGCGGAGTTT GTCG)所示的上下游引物对提取的DNA基因组进行扩增,扩增出1443bp片段。扩增条件为94 $^{\circ}$ C 5min;98 $^{\circ}$ C 30s,62.6 $^{\circ}$ C 30s,68 $^{\circ}$ C 100s,34个循环;72 $^{\circ}$ C,5min。2%琼脂糖凝胶电泳观察条带,PCR产物送北京天一辉远公司测序。根据测序,筛选pAPN基因第738位氨基酸精确修饰的猪成纤维细胞用作核移植时的供体细胞。

[0124] 5. 实验结果

[0125] 测序结果显示,本实施例成功的获得了多株pAPN基因第738位氨基酸精确修饰的猪成纤维细胞,其效率为2.3%。阳性细胞的测序结果如图5所示。

[0126] 实施例4体细胞核移植技术制备pAPN基因第738位氨基酸精确修饰的基因编辑猪

[0127] 以实施例3获得的纯合基因编辑的阳性细胞作为核移植供体细胞,以体外成熟40h的去核后的猪卵母细胞为核移植受体细胞,将核移植供体细胞移入卵母细胞,经电融合与激活,构建成重组克隆胚胎,挑选发育状态良好的克隆重组胚胎用手术法移入自然发情的经产大白母猪子宫内进行妊娠,其中手术法胚胎移植步骤为:受体母猪静脉注射舒泰(Zoletil)麻醉剂进行诱导麻醉,注射剂量为5mg/kg体重。麻醉后将受体母猪移至手术架上仰卧保定,并进行呼吸麻醉(异氟烷浓度为3%~4%)。受体母猪腹中线做一个长约10cm的手术切口,曝露卵巢、输卵管及子宫,用胚胎移植玻璃管沿输卵管伞部进入约5cm,将发育状态良好克隆重组胚胎移植到输卵管壶腹部-峡部结合处。胚胎移植后,技术人员定期观察,并用B型超声波检查受体母猪妊娠情况。

[0128] 小猪出生后,剪取耳组织并提取基因组DNA,使用上述SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9的核苷酸序列进行PCR扩增,PCR扩增产物测序检测基因型。

[0129] 尽管已用具体实施例来说明和描述了本发明,然而应意识到,在不背离本发明的精神和范围的情况下可以作出许多其它的更改和修改。因此,这意味着在所附权利要求中包括属于本发明范围内的所有这些变化和修改。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所
- [0003] <120> 用于pAPN基因定点修饰的系统及其应用
- [0004] <160> 10
- [0005] <170> PatentIn version 3.5
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 20
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人工序列
- [0010] <400> 1
- [0011] ctagaaatac ctcaggaagc 20
- [0012] <210> 2
- [0013] <211> 20
- [0014] <212> DNA
- [0015] <213> 人工序列
- [0016] <400> 2
- [0017] cgagcgccca gaaaatctga 20
- [0018] <210> 3
- [0019] <211> 1000
- [0020] <212> DNA
- [0021] <213> 人工序列
- [0022] <400> 3
- [0023] cctttgagca cagtctggcc ttgtgcgagg cctttagcct ctggcctctt gctcctgtag 60
- [0024] ccattagctc ttgctacatc tgcccaccca catcagagge tccatgggtc tccagatgac 120
- [0025] tcaggcatga gtctcttctt tgaagctatt tttagggtcg catcctcggc atgtggaggt 180
- [0026] tccaagcta ggggttgaat cggagctgta gccgccagcc tacaccacag ccacagcaac 240
- [0027] acgggatccg agccacatct gcgacctaca ccacagctca cagcaatgcc agatccttaa 300
- [0028] cccactgagt ggggccaggg ttgaacctat gtcctcatgt ttcccagtca gattcgtttc 360
- [0029] tgctgtgcca tgacgggaac tctggaactt cctctttgaa gctctttatg ttttgttctt 420
- [0030] gttttttggt tttgtttttc tagaaatacc tcaggaagca agtcgaacct ctcttccaac 480
- [0031] atttcgaaac tctcactaaa aactgggtcg agcgcccaga aaacttaatg gaccagttag 540
- [0032] tatgagctcg cttgggtctgg agatcatggg tgggtcaggt agcctgacct gggggcccat 600
- [0033] agcaagtcca gcagcatcct ctctggagct cccaactcct ggccggacca gggccacagt 660
- [0034] cagggagagc gaccctccc aaccccactc cggccccag gagtagggac tctgctctga 720
- [0035] ggctctgtgt ggcctatgaa ccatctggcc tctttgggca aaggacaaa ctgaacctct 780
- [0036] gagggtcctt caccgcgatg gtgaggttct aggtgttaaa gctggggctg gagcctgtgc 840
- [0037] cagccctccc caggctgccc aagggaaga agcaaagaag ggaacccaaa ggtggctggt 900
- [0038] gggctatacc tgcagagtgc gggctctgct ccctgttggg agttgtgtgt cagcagggga 960

[0039] gtcttggtca gcgtcaggtc caggcgtgct gacagagtgt 1000
[0040] <210> 4
[0041] <211> 25
[0042] <212> DNA
[0043] <213> 人工序列
[0044] <400> 4
[0045] caccgctaga aatacctcag gaagc 25
[0046] <210> 5
[0047] <211> 25
[0048] <212> DNA
[0049] <213> 人工序列
[0050] <400> 5
[0051] aaacgcttcc tgaggtatatt ctage 25
[0052] <210> 6
[0053] <211> 25
[0054] <212> DNA
[0055] <213> 人工序列
[0056] <400> 6
[0057] caccgcgagc gccagaaaa tctga 25
[0058] <210> 7
[0059] <211> 25
[0060] <212> DNA
[0061] <213> 人工序列
[0062] <400> 7
[0063] aaactcagat tttctgggcg ctcgc 25
[0064] <210> 8
[0065] <211> 20
[0066] <212> DNA
[0067] <213> 人工序列
[0068] <400> 8
[0069] caaggatttg tggaggagaa 20
[0070] <210> 9
[0071] <211> 18
[0072] <212> DNA
[0073] <213> 人工序列
[0074] <400> 9
[0075] gctgagcgga gtttgtcg 18
[0076] <210> 10
[0077] <211> 21

-
- [0078] <212> DNA
[0079] <213> 人工序列
[0080] <400> 10
[0081] gagggcctat ttcccatgat t 21

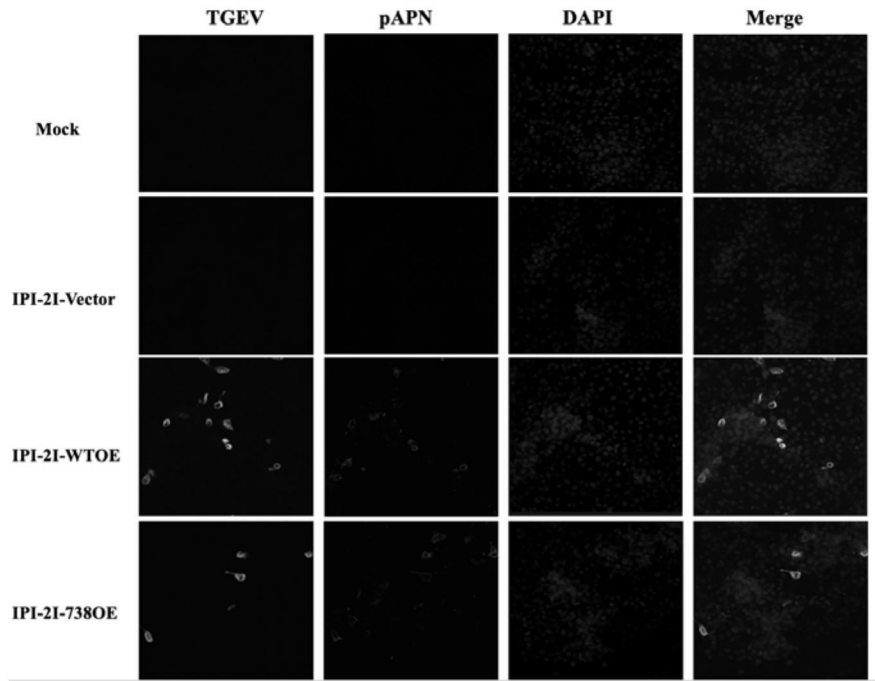


图3

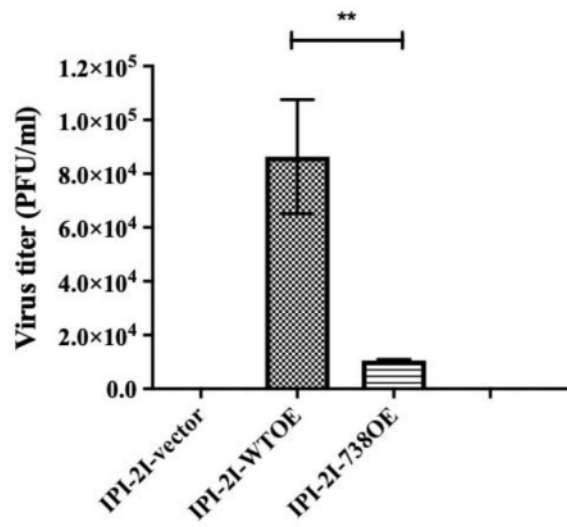


图4

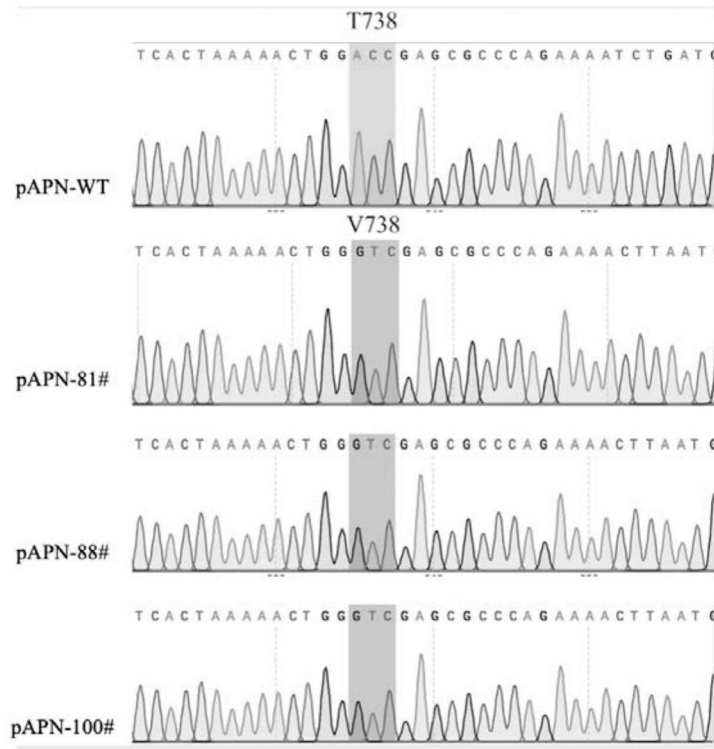


图5