



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113355323 B

(45) 授权公告日 2023.07.11

(21) 申请号 202110245181.4  
 (22) 申请日 2021.03.05  
 (65) 同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 113355323 A  
 (43) 申请公布日 2021.09.07  
 (66) 本国优先权数据  
 202010151592.2 2020.03.06 CN  
 (73) 专利权人 生物岛实验室  
 地址 511000 广东省广州市海珠区广州国际生物岛螺旋三路6号  
 (72) 发明人 吴光明 陈捷凯 吴凯昕  
 (74) 专利代理机构 北京睿阳联合知识产权代理有限公司 11758  
 专利代理师 张颖

(51) Int.Cl.  
 C12N 15/11 (2006.01)  
 C12N 5/10 (2006.01)  
 C12N 15/57 (2006.01)  
 C12N 15/85 (2006.01)  
 C12N 15/66 (2006.01)  
 C12N 15/113 (2010.01)  
 C12N 15/90 (2006.01)  
 A01K 67/027 (2006.01)

(56) 对比文件  
 US 2014309487 A1, 2014.10.16  
 US 2015376651 A1, 2015.12.31  
 审查员 林海生

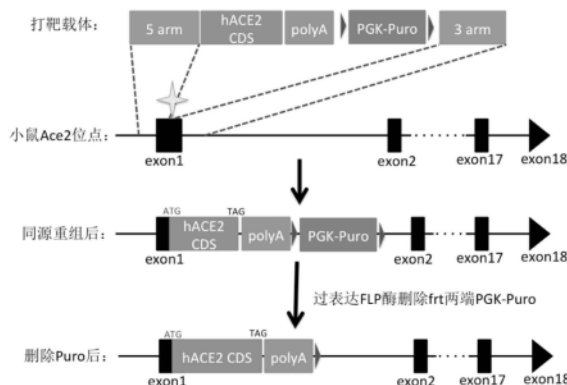
权利要求书2页 说明书27页  
 序列表20页 附图7页

(54) 发明名称

人源化ACE2基因改造小鼠模型的制备方法及应用

(57) 摘要

本发明涉及生物医药领域,尤其涉及一种人源化ACE2基因改造小鼠模型的制备方法及应用。本发明提供了一种打靶载体,所述打靶载体包含5'同源臂序列、人源ACE2基因片段和SV40polyA序列。这种打靶载体,能够特异性的靶向ACE2基因,可用于制备人源化ACE2基因改造小鼠胚胎干细胞模型,再用所述的胚胎干细胞制备得到人源化ACE2基因改造小鼠。本发明得到的这种人源化ACE2基因改造小鼠在RNA水平以及蛋白水平上表达人ACE2。这种人源化ACE2基因改造小鼠对SARS-CoV-2易感。从而成功地获得了对2019-nCoV易感的小鼠,从而能够很好地为2019-nCoV的药物筛选或其他研究提供很好的动物模型,具有很好的现实意义。



1. 一种载体组合,其特征在于,所述载体组合包含:(1)含有如SEQ ID NO:1所示sgRNA的载体;(2)打靶载体,所述打靶载体包含5'同源臂序列、人源ACE2基因片段、SV40 polyA序列和3'同源臂,所述5'同源臂序列如SEQ ID NO:15所示。

2. 如权利要求1所述的载体组合,其特征在于,所述5'同源臂为与在目标基因组基因座处的5'靶序列同源的5'同源臂。

3. 如权利要求1所述的载体组合,其特征在于,所述打靶载体通过如SEQ ID NO:19所示的上游引物和如SEQ ID NO:20所示的下游引物,如SEQ ID NO:21所示的上游引物和如SEQ ID NO:22所示的下游引物,如SEQ ID NO:23所示的上游引物和如SEQ ID NO:24所示的下游引物连接5'同源臂序列、人源ACE2基因片段和SV40 polyA序列,如SEQ ID NO:25所示的上游引物和如SEQ ID NO:26所示的下游引物扩增3'同源臂。

4. 如权利要求1所述的载体组合,其特征在于,所述打靶载体用于将人源ACE2基因的CDS序列插入到动物基因的启动子和5'UTR区域序列后,利用动物目的基因启动子启动人目的基因表达。

5. 如权利要求1所述的载体组合,其特征在于,所述ACE2基因的CDS序列如SEQ ID NO:12所示,所述SV40 polyA序列如SEQ ID NO:14所示,所述SV40 polyA序列位于所述的CDS序列之后。

6. 如权利要求1所述的载体组合,其特征在于,所述3'同源臂为与在目标基因组基因座处的3'靶序列同源的3'同源臂。

7. 如权利要求6所述的载体组合,其特征在于,所述3'同源臂的序列如SEQ ID NO:16所示。

8. 如权利要求7所述的载体组合,其特征在于,所述打靶载体还包含如SEQ ID NO:17所示的筛选标志PGK-Puro。

9. 如权利要求8所述的载体组合,其特征在于,所述打靶载体还包含如SEQ ID NO:18所示的Frt序列。

10. 如权利要求9所述的载体组合,其特征在于,所述打靶载体各个序列片的连接顺序依次为5'同源臂序列、人源ACE2基因片段、SV40 polyA序列、frt序列、PGK-Puro序列、frt序列和3'同源臂序列。

11. 如权利要求4所述的载体组合,其特征在于,所述动物为哺乳动物。

12. 如权利要求11所述的载体组合,其特征在于,所述哺乳动物为啮齿类动物。

13. 如权利要求12所述的载体组合,其特征在于,所述啮齿类动物为鼠。

14. 权利要求1-13任一所述的载体组合在制备基因人源化动物模型中的应用,所述动物为鼠。

15. 一种制备权利要求1-13任一所述的载体组合的方法,其特征在于,包括以下步骤:  
将PCR扩增得到的产物片段5'同源臂、人ACE2 CDS和SV40 polyA使用搭桥PCR法PCR成连续片段5arm-hACE-SV40。

16. 如权利要求15所述的方法,其特征在于,所述PCR反应体系为:

2×Phanta Max Buffer 25 μL;

dNTP Mix 1 μL;

10 μM上游引物 2 μL;

10  $\mu\text{M}$ 下游引物 2  $\mu\text{L}$ ;  
DNA Polymerase 1  $\mu\text{L}$ ;  
5' 同源臂、人ACE2 CDS、SV40 polyA片段各50ng;  
H<sub>2</sub>O至50  $\mu\text{L}$ ;  
PCR扩增反应条件 65  $^{\circ}\text{C}$ 起始,每个循环降0.3  $^{\circ}\text{C}$ 。

17. 如权利要求16所述的方法,其特征在于,所述5' 同源臂片段使用的引物包括如SEQ ID NO:19所示的上游引物和SEQ ID NO:20所示的下游引物;所述人ACE2 CDS片段使用的引物包括如SEQ ID NO:21所示的上游引物和如SEQ ID NO:22所示的下游引物;所述SV40 polyA片段使用的引物包括如SEQ ID NO:23所示的上游引物和如SEQ ID NO:24所示的下游引物。

18. 如权利要求17所述的方法,其特征在于,所述方法还包括以下步骤:

将5arm-hACE-SV40片段进行AgeI+MluI双酶切;3' 同源臂片段进行AscI+HindIII双酶切后分别通过酶切连接的方法连接上去,从而得打靶载体。

19. 如权利要求18所述的方法,其特征在于,所述3' 同源臂片段使用的引物包括如SEQ ID NO:25所示的上游引物和如SEQ ID NO:26所示的下游引物。

20. 一种人源化动物细胞株的构建方法,其特征在于,所述方法中使用了如SEQ ID NO:19所示的上游引物和如SEQ ID NO:20所示的下游引物,所述构建方法包括以下步骤:(1)构建权利要求1-13任一所述的打靶载体;(2)将构建的打靶载体和连接有如SEQ ID NO:1所示的sgRNA的载体导入动物来源的胚胎干细胞中;(3)将步骤(2)中的胚胎干细胞培养成克隆,即得;所述动物为鼠。

21. 如权利要求20所述的构建方法,其特征在于,所述方法包括将人源目的基因导入动物细胞中,使得目的基因在动物细胞内表达人源目的基因的 CDS。

22. 如权利要求21所述的构建方法,其特征在于,所述目的基因为ACE2。

## 人源化ACE2基因改造小鼠模型的制备方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域,尤其涉及一种人源化ACE2基因改造小鼠模型的制备方法及应用。

### 背景技术

[0002] 虽然现阶段已有在Vero E6 cells等细胞模型上感染2019-nCoV进行药物筛选,但细胞模型的单一性远不能比拟动物模型优势。

[0003] 实验动物疾病模型对于研究人类疾病发生的病因、发病机制、开发防治技术和治疗药物是不可缺少的研究工具。常见的实验动物包括小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠(仓鼠)、兔、犬、猴、猪和鱼等。然而,人类和动物的基因和蛋白质序列还是存在不少差异,许多人类蛋白质不能与动物的同源蛋白质结合而产生生物活性,导致许多临床试验的结果也与动物实验的结果不相符。

[0004] 随着基因工程技术的不断发展和成熟,用人类细胞或基因替代或置换动物的内源性同类细胞或基因,以建立更接近人类的生物体系或疾病模型,建立人源化实验动物模型(humanized animal model),已经为临床上新的治疗方法或手段提供了重要工具。其中基因人源化动物模型,即利用基因遗传操作技术,用人类正常或突变基因替换动物同类基因,可在动物体内建立更接近人类的正常或突变,体系的塞因大源化动物模型。因大源化动物不但本身具有重要应用价值,如通过基因人源化还可改进和提升细胞人源化小鼠CN 107815468 A2/28页模型,更重要的是,由于人类基因片段的的存在,动物体内可表达或部分表达含有人类功能的蛋白质,从而大大减少人和动物的临床实验差异,为在动物水平进行药物筛选提供了可能。

[0005] 2019-nCoV与SARS冠状病毒一样都以血管紧张素转化酶2(Angiotensin-converting enzyme 2,ACE2)作为感染人类的关键靶点,其中2019-nCoV除感染人类外还可感染多种哺乳动物如猴子、猪、兔子、白鼬、猩猩等,但小鼠和大鼠除外(Wan,Y.,et al., Receptor recognition by novel coronavirus from Wuhan:An analysis based on decade-long structural studies of SARS.J Virol,2020)。猴子、猪以及兔子等作为动物模型感染2019-nCoV用作药物筛选而言,其生长周期较长且体型较大难以大批量操作,而相对容易大批量操作的小鼠模型却对2019-nCoV不易感。

### 发明内容

[0006] 由于人源ACE2和鼠源ACE2在基因序列上存在一定差异,有文献报道:病毒感染后,人源ACE2较鼠源ACE2对SARS-CoV的敏感性更强,病理症状更为明显。目前的临床研究急需更好的动物模型。

[0007] 已有hACE2转基因小鼠被证实可感染2019-nCoV并出现肺部组织典型致病特征([https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.02.07.939389v3#disqus\\_thread](https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.02.07.939389v3#disqus_thread))。但hACE2转基因小鼠为全身性过表达hACE2小鼠模型,并不能模拟ACE2时空组织表达特征,

本发明人源化ACE2小鼠模型为原小鼠Ace2位点特异性表达hACE2小鼠模型,可模拟原mACE2表达特征,具有组织特异性,更为严谨的模拟人感染2019-nCoV发病过程。

[0008] 所以本公开将通过在小鼠Ace2位点表达人源化ACE2的方法大批量制备2019-nCoV易感小鼠人源化ACE2动物模型来对2019-nCoV进行药物筛选和疾病研究等应用。

[0009] 本发明的目的之一在于提供一种特异性的RNA片段序列。

[0010] 本发明另一个目的在于提供一种特异性的靶向ACE2基因的sgRNA序列。

[0011] 本发明另一个目的在于提供一种特异性的靶向ACE2基因的靶向载体。

[0012] 本发明另一个目的在于提供一种ACE2基因人源化细胞株。

[0013] 本发明另一个目的在于提供一种ACE2基因人源化细胞株的构建方法。

[0014] 本发明另一个目的在于提供一种ACE2基因人源化细胞株。本发明另一个目的在于提供一种基因人源化动物的构建方法。

[0015] 本发明还有一个目的在于提供一种人源化ACE2基因改造小鼠胚胎干细胞模型。

[0016] 一方面,本发明提供了一种引物组合,所述引物组合包括如SEQ ID NO:19所示的上游引物和SEQ ID NO:20所示的下游引物。

[0017] 一些实施例中,所述引物组合还包括如SEQ ID NO:21所示的上游引物和如SEQ ID NO:22所示的下游引物。

[0018] 一些实施例中,所述引物组合还包括如SEQ ID NO:23所示的上游引物和如SEQ ID NO:24所示的下游引物。

[0019] 一些实施例中,所述引物组合还包含如SEQ ID NO:25所示的上游引物和如SEQ ID NO:26所示的下游引物。

[0020] 另一方面,本发明提供了所述引物组合在构建人源化动物细胞模型或动物模型中的应用。

[0021] 另一方面,本发明提供了所述引物组合在制备打靶载体中的应用。

[0022] 另一方面,本发明提供了一种打靶载体,包含5'同源臂序列、人源ACE2基因片段和SV40 polyA序列。所述5'同源臂为与在所述目标基因组基因座处的5'靶序列同源的5'同源臂。

[0023] 一些实施例中,所述打靶载体通过使用所述的引物组合连接5'同源臂序列、人源ACE2基因片段和SV40 polyA序列。

[0024] 一些实施例中,所述靶向载体用于将人源ACE2基因的CDS序列插入到动物基因的启动子和5' UTR区域序列后,利用动物目的基因启动子启动人目的基因表达。

[0025] 一些实施例中,所述5'同源臂序列如SEQ ID NO:15所示,所述ACE2基因的CDS序列如SEQ ID NO:12所示,所述SV40 polyA序列如SEQ ID NO:14所示,所述SV40 polyA序列位于所述的CDS序列之后。

[0026] 一些实施例中,所述打靶载体还包含3'同源臂,所述3'同源臂为与在所述目标基因组基因座处的3'靶序列同源的3'同源臂。

[0027] 一些实施例中,所述打靶载体还包含如SEQ ID NO:17所示的筛选标志PGK-Puro。

[0028] 一些实施例中,所述打靶载体还包含如SEQ ID NO:18所示的Frt序列。

[0029] 一些实施例中,所述打靶载体各个序列片段的连接顺序依次为5'同源臂序列、人源ACE2基因片段、SV40 polyA序列、frt序列、PGK-Puro序列、frt序列和3'同源臂序列。

- [0030] 一些实施例中,所述动物为哺乳动物。
- [0031] 一些实施例中,所述哺乳动物为啮齿类动物。
- [0032] 一些实施例中,所述动物为鼠。
- [0033] 另一方面,本发明提供了所述的打靶载体在制备基因人源化动物模型中的应用。
- [0034] 另一方面,本发明提供了一种制备所述打靶载体的方法,包括以下步骤:将PCR扩增得到的产物片段5'同源臂、人ACE2 CDS和SV40 polyA使用搭桥PCR法PCR成连续片段5arm-hACE-SV40。
- [0035] 一些实施例中,所述PCR反应体系为:2×Phanta Max Buffer 25μL;dNTP Mix 1μL;10μM上游引物2μL;10μM下游引物2μL;DNA Polymerase 1μL;模板链5'同源臂、人ACE2 CDS、SV40 polyA片段各50ng;H<sub>2</sub>O至50μL;PCR扩增反应条件65℃起始,每个循环降0.3℃。
- [0036] 一些实施例中,所述5'同源臂片段使用的引物包括如SEQ ID NO:19所示的上游引物和SEQ ID NO:20所示的下游引物;所述人源ACE2基因片段使用的引物包括如SEQ ID NO:21所示的上游引物和如SEQ ID NO:22所示的下游引物;所述SV40 polyA序列使用的引物包括如SEQ ID NO:23所示的上游引物和如SEQ ID NO:24所示的下游引物。
- [0037] 一些实施例中,所述方法还包括以下步骤:将5arm-hACE-SV40片段进行AgeI+MluI双酶切;3'同源臂片段进行AscI+HindIII双酶切后分别通过酶切连接的方法连接上去,从而得打靶载体。
- [0038] 一些实施例中,所述3'同源臂片段使用的引物包括如SEQ ID NO:25所示的上游引物和如SEQ ID NO:26所示的下游引物。
- [0039] 另一方面,本发明提供了一种人源化动物细胞株的构建方法,所述方法中使用了所述的引物组合。
- [0040] 一些实施例中,所述方法包括将人源目的基因导入动物细胞中,使得目的基因在动物细胞内表达人源目的基因的CDS。
- [0041] 一些实施例中,所述目的基因为ACE2。
- [0042] 一些实施例中,所述动物为哺乳动物。
- [0043] 一些实施例中,所述动物为啮齿类动物。
- [0044] 一些实施例中,所述动物为鼠。
- [0045] 一些实施例中,所述细胞为胚胎干细胞。
- [0046] 一些实施例中,所述构建方法包括以下步骤:(1)构建权利要求1所述的打靶载体;(2)将构建的打靶载体和连接有sgRNA的载体导入动物来源的胚胎干细胞中;(3)将步骤(2)中的胚胎干细胞培养成克隆,即得。
- [0047] 一些实施例中,所述sgRNA包括如SEQ ID NO:1所示的序列。
- [0048] 一些实施例中,所述动物为哺乳动物。
- [0049] 一些实施例中,所述哺乳动物为啮齿类动物。
- [0050] 一些实施例中,所述啮齿类动物为鼠。
- [0051] 另一方面,本发明提供了所述的方法制备得到的ACE2基因人源化动物细胞株。
- [0052] 另一方面,本发明提供了一种基因人源化动物模型的构建方法,包括将所述的人源化动物细胞注入动物体内。
- [0053] 利用本发明的方法成功得到了人源化ACE2基因改造小鼠。

[0054] 在一些实施方式中,所述人源化ACE2基因改造小鼠在RNA水平上表达人ACE2并具有组织特异性。

[0055] 在一些实施方式中,所述人源化ACE2基因改造小鼠在蛋白水平上表达人ACE2并具有组织特异性。

[0056] 在一些实施方式中,本发明研究显示利用本发明的方法获得的人源化ACE2基因改造小鼠对SARS-CoV-2易感。从而成功地获得了对2019-nCoV易感的小鼠,从而能够很好地为2019-nCoV的药物筛选或其他研究提供很好的动物模型。具有很好的现实意义。

[0057] 另一方面,本发明提供了一种人源化鼠或其子孙的组织、体液、细胞、以及它们的破碎物或提取物,所述的人源化鼠是利用权利要求8所述的方法构建的。

[0058] 还有一方面,本发明提供了来源于所述的构建方法得到的人源化动物模型或其后代在制造人类抗体,或者作为药理学、免疫学、微生物学和医学研究的模型系统中的应用,或在生产和利用动物实验疾病模型,用于病原学研究和/或用于开发新的诊断策略和/或治疗策略中的应用,或在筛选、验证、评价或研究ACE2基因功能、ACE2抗体、针对ACE2靶点的药物、药效研究方面的用途。

## 附图说明

[0059] 图1为pX330质粒图谱。

[0060] 图2为pX330-sgRNA1构建测序结果图。

[0061] 图3为pX330-sgRNA2构建测序结果图。

[0062] 图4为pX330-sgRNA1-3切割效率验证结果。

[0063] 图5为pX330-sgRNA3构建测序结果图。

[0064] 图6为人源化ACE2打靶策略示意图。

[0065] 图7为人源化ACE2打靶载体测序结果信息。

[0066] 图8为对比例1中的三片段连接的PCR鉴定图。

[0067] 图9为人源化ACE2小鼠胚胎干细胞基因型的PCR鉴定结果图。

[0068] 图10为删除PGK-Puro后人源化ACE2小鼠胚胎干细胞基因型的PCR鉴定结果图。

[0069] 图11为人源化ACE2基因示意图。

[0070] 图12为本发明获得的人源化ACE2基因改造小鼠。

[0071] 图13显示人源化ACE2基因改造小鼠在RNA水平上表达人ACE2并具有组织特异性。

[0072] 图14的组织免疫荧光结果显示人ACE2在蛋白在人源化ACE2基因改造小鼠组织上特异表达。

[0073] 图15显示本发明人源化ACE2基因改造小鼠对SARS-CoV-2易感。

## 具体实施方式

[0074] 以下通过具体的实施例进一步说明本发明的技术方案,具体实施例不代表对本发明保护范围的限制。其他人根据本发明理念所做出的一些非本质的修改和调整仍属于本发明的保护范围。

[0075] 除非另有定义,本文中所使用的技术与科学术语的定义与本领域技术人员所熟悉的定义相同。此外,任何与所记载内容相似或均等的方法和材料皆可应用于本发明方

法中,具体实施方式中描述了优选的方法和材料。

[0076] 文中所用的“一”和“一种”指语法上不定冠词的释义,表示“一个”、“一种”或“多个”、“多种”(即“至少一个”、“至少一种”)。例如“一要素”指一种或种要素。

[0077] “CDS”是编码序列(Coding sequence)的缩写,“编码序列”是指用于编码基因的多肽产物的任何核苷酸序列。相反,术语“非编码序列”是指不编码基因的多肽产物的任何核苷酸序列。

[0078] 术语“片段”将被理解为指长度比参考核酸短并且在共同部分包含与参考核酸相同的核苷酸序列的核苷酸序列。如果合适的话,根据本发明的这样的核酸片段可以被包含在更大的多核苷酸中,该片段是该更大的多核苷酸的组成成分。这样的片段包括长度在本发明的核酸的至少6、8、9、10、12、15、18、20、21、22、23、24、25、30、39、40、42、45、48、50、51、54、57、60、63、66、70、75、78、80、90、100、105、120、135、150、200、300、500、720、900、1000或1500个连续核苷酸范围内的寡核苷酸,或可选地由这样的寡核苷酸组成。

[0079] 在本说明中,除非上下文另有要求,词语“包含”、“包括”将被理解为是指包括所述的步骤或要素或步骤和要素的集合,但并不排除任何其它的步骤或要素或步骤和要素的集合;即开放式限定。

[0080] “相对应”是指:(a)一多核苷酸具有与参考核苷酸序列的全部或者部分基本上相同或互补的核苷酸序列,或者一多核苷酸编码与肽或者蛋白质中的氨基酸序列完全相同的氨基酸序列;或(b)一肽或多肽具有一种氨基酸序列,该氨基酸序列基本上与参考肽或蛋白质中的氨基酸序列相同。

[0081] 术语“下游”是指位于参考核苷酸序列3'端的核苷酸序列。特别地,下游核苷酸序列通常涉及转录起始点之后的序列。例如,基因的翻译起始密码子位于转录起始位点的下游。

[0082] 术语“上游”是指位于参考核苷酸序列5'端的核苷酸序列。特别地,上游核苷酸通常涉及位于编码序列或转录起始点的5'侧的序列。例如,大部分的启动子位于转录起始位点的上游。

[0083] “启动子”是指能够控制编码序列或功能性RNA的表达的DNA序列。一般而言,编码序列位于启动子序列的3'端。启动子可以整体源自天然基因,或由源自天然发现的不同启动子的不同元件组成,或甚至包括合成的DNA片段。本领域技术人员应该理解的是,不同的启动子可以指导基因在不同的组织或细胞类型中,或在发育的不同阶段,或应答于不同的环境或生理条件进行表达。导致基因在大多数细胞类型中在大多数的时间被表达的启动子通常称为“组成型启动子”。导致基因在特定的细胞类型中被表达的启动子通常称为“细胞特异性启动子”或“组织特异性启动子”。导致基因在特定的发育或细胞分化阶段被表达的启动子通常称为“发育特异性启动子”或“细胞分化特异性启动子”。在将细胞暴露于诱导启动子的药剂、生物分子、化学品、配体、光或类似物,或用这些物质对细胞进行处理之后,被诱导并导致基因被表达的启动子通常被称为“诱导型启动子”或“调控型启动子”。还应该认识的是,因为在大多数情况下,调控序列的准确界限还没有完全限定,所以不同长度的DNA片段可能具有相同的启动子活性。

[0084] 术语“5' UTR”或“5'非编码序列”或“5'非翻译区(UTR)”是指位于编码序列上游(5')的DNA序列。



[0085] 术语“限制性核酸内切酶”和“限制性酶”是指结合并切割双链DNA内的特定核苷酸序列的酶。

[0086] 术语“载体”意指核酸分子,其能转移它已连接的核酸分子。一种载体类型是“质粒”,其指环状双链DNA环,其他DNA区段可连接进去。另一类载体是病毒载体,其中其他DNA区段可连接到病毒基因组内。某些载体能在引入了这些载体的宿主细胞中自我复制(如具有细菌的复制起始点的细菌载体以及游离型哺乳动物载体)。其他载体(如非游离型哺乳动物载体)在引入到宿主细胞中后能够整合到宿主细胞的基因组中,因此随宿主基因组复制。此外,某些载体能够指导表达它们操作地连接的基因。

[0087] 一些载体本发明称为“重组表达载体”(或简称为“表达载体”)是指被设计成使得插入的核酸序列在转化入宿主后能够表达的载体、质粒或媒介。总的来说,重组DNA技术所使用的表达载体经常是质粒形式。本说明书的“质粒”和“载体”交换使用,因为质粒是载体最普遍使用的形式。但是,本发明意包括这种表达载体的其他形式,如病毒载体(如复制缺陷型反转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒),其充当同等作用。

[0088] 术语“质粒”是指染色体外元件,它们常常携带不是作为细胞的中心代谢的一部分的基因,并且常常是环状双链DNA分子的形式。这样的元件可以是来自任何来源的自主复制序列、基因组整合序列、噬菌体或核苷酸序列,线性、环状或超螺旋的,单链或双链DNA或RNA,其中许多核苷酸序列已经被连接入或重组入独特的结构中,该结构能够将针对所选的基因产物的启动子片段和DNA序列以及合适的3'端非翻译序列导入细胞。

[0089] “靶向载体”或“打靶载体”是含有邻接所需遗传修饰的、与内源染色体核酸序列“同源的”序列的DNA构建体。所述侧翼同源序列(称为“同源臂”)借助所述同源臂和相应的内源序列之间存在的同源性,指导所述打靶载体定位于所述基因组中的特定染色体位置,并且通过称为“同源重组”的过程引入所述所需的遗传修饰。“靶向载体”和“打靶载体”某些时候可以通用。采用靶向载体以将插入核酸引入大鼠、真核、非大鼠真核、哺乳动物、非人类哺乳动物、人类、啮齿动物、非大鼠啮齿动物、小鼠或仓鼠核酸的靶基因座中。所述靶向载体包含所述插入核酸且进一步包含5'同源臂和3'同源臂,其侧接所述插入核酸。侧接所述插入核酸的同源臂对应于在大鼠、真核、非大鼠真核、哺乳动物、非人类哺乳动物、人类、啮齿动物、非大鼠啮齿动物、小鼠或仓鼠核酸的靶基因座内的区域。为了便于提及,在靶基因组基因座内的相应同源基因组区在本文中称为“靶位点”。例如,靶向载体可包含由与第一靶位点和第二靶位点互补的第一同源臂和第二同源臂侧接的第一插入核酸。因而,所述靶向载体由此有助于经由在细胞的基因组内的同源臂和互补靶位点之间发生的同源重组事件将插入核酸整合到大鼠、真核、非大鼠真核、哺乳动物、非人类哺乳动物、人类、啮齿动物、非大鼠啮齿动物、小鼠或仓鼠核酸的靶基因座中。

[0090] 在一个实施方案中,所述大鼠、真核、非大鼠真核、哺乳动物、非人类哺乳动物、人类、啮齿动物、非大鼠啮齿动物、小鼠或仓鼠核酸的靶基因座包含与5'同源臂互补的第一核酸序列和与3'同源臂互补的第二核酸序列。

[0091] 载体可以通过本领域已知的方法导入期望的宿主细胞,例如转染、电穿孔、微注射、转导、细胞融合、DEAE葡聚糖、磷酸钙沉淀、脂转染(溶酶体融合)、使用基因枪或DNA载体转运蛋白(参见例如Wu et al.,1992,J.Biol.Chem.267:963-967;Wu和Wu,1988,J.Biol.Chem.263:14621-14624;和Hartmut et al.,1990年3月15日提交的加拿大专利申

请2,012,311)。

[0092] 术语“转染”是指细胞摄取外源或异源RNA或DNA。当外源或异源RNA或DNA已被引入细胞内时,该细胞便被这样的RNA或DNA“转染”。当转染的RNA或DNA影响表型变化时,该细胞便被外源或异源RNA或DNA“转化”。转化RNA或DNA可以被整合入(共价连接入)构成细胞基因组的染色体DNA。

[0093] 术语“同源性”或“同源的”指序列例如核苷酸或氨基酸序列的两条序列经最佳比对和比较具有至少约75%的核苷酸或氨基酸、至少约80%的核苷酸或氨基酸、至少约90-95%的核苷酸或氨基酸,例如超过97%的核苷酸或氨基酸是相同的。本领域技术人员将理解,对于最佳基因靶向而言,靶向构建体应含有与内源性DNA序列同源的臂(即“同源臂”);因此,能够在靶向构建体与被靶向的内源性序列之间发生同源重组。

[0094] 如本文中所示,在两个区彼此共有足够水平的序列同一性时同源臂和靶位点(即同源基因组区)彼此互补,从而充当用于同源重组反应的底物。“同源性”是指DNA序列与相应或“互补”序列相同或共有序列同一性。在给定靶位点和在靶向载体上发现的相应同源臂之间的序列同一性可为允许同源重组发生的任何程度的序列同一性。例如,靶向载体的同源臂(或其片段)与靶位点(或其片段)共有的序列同一性的量可为至少51%、53%、57%、60%、65%、70%、75%、80%、83%、85%、87%、89%、91%、93%、95%、97%、98%、99%或100%序列同一性,因此所述序列经历同源重组。此外,在同源臂和互补靶位点之间同源的互补区可具有足以促进在裂解的识别位点处同源重组的任何长度。因此同源臂与在细胞的基因组内的相应靶位点具有足以进行同源重组的同源性。为了便于提及,同源臂在本文中作为5'同源臂和3'同源臂提到。该术语涉及在靶向载体中同源臂与插入核酸的相对位置。

[0095] 一些实施例中,所述靶向载体的同源臂可具有足以促进与相应靶位点的同源重组事件的任何长度,包括例如至少5-10kb、5-15kb、10-20kb、20-30kb、30-40kb、40-50kb、50-60kb、60-70kb、70-80kb、80-90kb、90-100kb、100-110kb、110-120kb、120-130kb、130-140kb、140-150kb、150-160kb、160-170kb、170-180kb、180-190kb、190-200kb长或更长。如下文进一步详细概述,靶向载体可采用更大长度的靶向臂。在一个特定的实施方案中5'同源臂和3'同源臂的总和为至少10kb或5'同源臂和3'同源臂的总和为至少约16kb-约100kb或约30kb-约100kb,在其它实施方案中,所述ACE2的5'同源臂和3'同源臂的总和的尺寸为约10kb-约150kb、约10kb-约100kb、约10kb-约75kb、约20kb-约150kb、约20kb-约100kb、约20kb-约75kb、约30kb-约150kb、约30kb-约100kb、约30kb-约75kb、约40kb-约150kb、约40kb-约100kb、约40kb-约75kb、约50kb-约150kb、约50kb-约100kb、或约50kb-约75kb、约10kb-约30kb、约20kb-约40kb、约40kb-约60kb、约60kb-约80kb、约80kb-约100kb、约100kb-约120kb或约120kb-约150kb。

[0096] 本文中的某些实施例涉及人源化基因编辑哺乳动物,所述人源化基因编辑哺乳动物的基因组包括编码人的全长ACE2蛋白的多聚核糖核酸。例如,所述多聚核糖核酸可操作地连接至启动子多聚核糖核酸。在一些实施例中,人源化基因编辑哺乳动物不表达全部的部分的编码人源化基因编辑哺乳动物的内源性ACE2蛋白的多聚核糖核酸,并且所述编码人ACE2蛋白的多聚核糖核酸包括人ACE2蛋白基因的修饰。

[0097] 一些实施例中,所述细胞为多潜能细胞、非多潜能细胞、哺乳动物细胞、人类细胞、非人类哺乳动物细胞、啮齿动物细胞、小鼠细胞、仓鼠细胞、非人类多潜能细胞、人类多潜能

细胞、啮齿动物多潜能细胞或成纤维细胞或肺细胞。

[0098] 在一些上述方法中,所述细胞为原代细胞或永生化细胞。在一些上述方法中,所述啮齿动物多潜能细胞为小鼠或大鼠胚胎干(ES)细胞。

[0099] 在一些上述方法中,所述动物细胞或所述人类细胞为原代细胞或永生化细胞。在一些上述方法中,所述动物细胞或所述人类细胞为多潜能细胞。在一些上述方法中,所述动物多潜能细胞为小鼠胚胎干(ES)细胞。在一些上述方法中,所述人类多潜能细胞为人类胚胎干(ES)细胞、人类成人干细胞、发育受限的人类祖细胞或人类诱导的多潜能干(iPS)细胞。

[0100] 一些实施例中,本文中的某些实施例提供人源化基因编辑的细胞,尤其是还提供分离的人类和非人类全能或多潜能干细胞,尤其是小鼠胚胎干细胞,其能够在一种或多种体外连续基因修饰之后维持多潜能性且能够经由种系将所述靶向基因修饰传递到后代。

[0101] 本文使用的术语“胚胎干细胞”或“ES细胞”包括在引入胚胎中后能够促进发育胚胎的任何组织的源自胚胎的全能或多潜能细胞。本文使用的术语“多潜能细胞”包括具有发育成多于一种类型的分化细胞的能力的未分化细胞。术语“非多潜能细胞”包括不是多潜能细胞的细胞。

[0102] 在一些上述方法中,所述靶向基因编辑同时包括在所述目标基因组基因座处缺失内源核酸序列或在所述目标基因组基因座处插入所述核酸。

[0103] 一些实施例中,所述基因修饰或基因编辑包括对细胞(例如,真核细胞、非大鼠真核细胞、哺乳动物细胞、类细胞、非人类哺乳动物细胞、多潜能细胞、非多潜能细胞、非人类多潜能细胞、人类多潜能细胞、人类ES细胞、人类成人干细胞、发育受限的人类祖细胞、人类iPS细胞、人类细胞、啮齿动物细胞、非大鼠啮齿动物细胞、大鼠细胞、小鼠细胞、仓鼠细胞、成纤维细胞或中国仓鼠卵巢(CHO)细胞)独立地实施的两种或多种修饰。第一修饰可通过电穿孔或本领域已知的任何其他方法实现。随后,采用合适的第二核酸构建体对同一细胞基因组进行第二修饰。所述第三修饰可通过第二电穿孔或本领域已知的任何其它方法实现。在各种实施方案中,在同一细胞的第一基因修饰和第二基因修饰之后,可使用例如连续电穿孔或本领域已知的任何其它合适方法(连续地)实现第三基因修饰、第四基因修饰、第五基因修饰、第六基因修饰等连修饰(一种基因修饰跟着另一基因修饰)。

[0104] 一些实施例中,本发明是打靶载体同源重组方法进行基因的编辑,将外源核酸插入内源基因组中。

[0105] 一些实施例中,所述插入核酸包含插入同源或直系同源人类核酸序列或用其替换真核、非大鼠真核、哺乳动物、人类或非人类哺乳动物核酸序列。

[0106] 一些实施例中,所述给定插入的多核苷酸可来自任何生物体,包括例如啮齿动物、非大鼠啮齿动物、大鼠、小鼠、仓鼠、哺乳动物、非人类哺乳动物、真核生物、非大鼠真核生物、人类、农业动物或家养动物。

[0107] 在特定的实施方案中,所述插入核酸可包含来自大鼠的核酸,其可包含基因组DNA的片段、cDNA、调控区或其任何部分或组合。在其它实施方案中,所述插入核酸可包括来自真核生物、非大鼠真核生物、哺乳动物、人类、非人类哺乳动物、啮齿动物、非大鼠啮齿动物、人类、大鼠、小鼠、仓鼠、兔、猪、牛、鹿、绵羊、山羊、小鸡、猫、狗、白兔、灵长类动物(例如,狨猴、恒河猴)、家养哺乳动物或农业哺乳动物或任何其它目标生物体的核酸。如在本文中更

详细地概述,在各种方法和组合物中采用的插入核酸可引起目标靶基因座的“人源化”。

[0108] 在一个实施方案中,所述基因修饰为添加核酸序列。在一个实施方案中,所述插入核酸包含在编码序列中的基因修饰。在一个实施方案中,所述基因修饰包括编码序列的缺失突变。在一个实施方案中,所述基因修饰包括两种内源编码序列的融合。在一个实施方案中,所述插入核酸包含插入同源或直系同源人类核酸序列或用其替换真核、非大鼠真核、哺乳动物、人类或非人类哺乳动物核酸序列。在一个实施方案中,所述插入核酸包含在包含相应小鼠DNA序列的内源小鼠基因编码区插入同源或直系同源人类核酸序列或用其替换小鼠DNA序列。在一个实施方案中,所述插入核酸包含在包含相应小鼠DNA序列的内源小鼠基因编码区插入同源或直系同源人类核酸序列或用其替换小鼠DNA序列。在一个实施方案中,利用打靶载体,针对小鼠Ace2位点,在紧接mAce2的EXON1 CDS起始ATG位点插入hACE2序列。

[0109] 在一个实施方案中,所述靶向载体的核酸序列可包含在整合到基因组中时将生成哺乳动物、人类或非人类哺乳动物ACE2基因座的区域的基因修饰的多核苷酸,其中在ACE2基因座处的基因修饰引起ACE2活性减小、ACE2活性增加或ACE2活性调整。在一个实施方案中,产生ACE2基因被完全替换。

[0110] 在一个实施方案中,所述插入核酸可包含调控元件,包括例如启动子、增强子或转录。

[0111] 一些实施例中,给定插入的多核苷酸和/或哺乳动物、人类细胞或非人类哺乳动物基因座的相应替换区可为编码区、内含子、外显子、未转译区、调控区、启动子或增强子或其任何组合。

[0112] 本文提供允许将一种或多种目标多核苷酸靶向整合到靶基因座中的方法,如上概述,引入序列,由此产生的基因编辑细胞。“引入”以使得序列进入细胞内部的方式而将序列呈递到细胞中(多肽或多核苷酸)。

[0113] 来自任何生物体的任何细胞都可用于本文提供的方法中。在特定的实施方案中,所述细胞来自真核生物、非大鼠真核生物、哺乳动物、非人类哺乳动物、人类、啮齿动物、非大鼠啮齿动物、大鼠、小鼠或仓鼠。在特定的实施方案中,所述细胞为真核细胞、非大鼠真核细胞、多潜能细胞、非多潜能细胞、非人类多潜能细胞、非人类哺乳动物细胞、人类多潜能细胞、人类ES细胞、人类成人干细胞、发育受限的人类祖细胞、人类诱导的多潜能细胞(iPS)细胞、哺乳动物细胞、人类细胞、成纤维细胞、啮齿动物细胞、非大鼠啮齿动物细胞、大鼠细胞、小鼠细胞、小鼠ES细胞、仓鼠细胞或CHO细胞。

[0114] 在一些实施方案中,在所述方法中采用的细胞具有稳定地并入其基因座中的DNA构建体。“稳定地并入”或“稳定地引入”是指将多核苷酸引入细胞中,因此核苷酸序列整合到细胞的基因组中且能够由其子代遗传。

[0115] 在一个实施方案中,向细胞中引入一种或多种多核苷酸通过电穿孔、胞浆内注射、病毒感染、腺病毒、慢病毒、反转录病毒、转染、脂质介导的转染介导,或者经由Nucleofection™介导。

[0116] 在一个实施例中,所述表达构建体与所述被引入的核酸一起引入。

[0117] 在一个实施方案中,向所述细胞中引入所述一种或多种多核苷酸可经一段时间执行多次。在一个实施方案中,向所述细胞中引入所述一种或多种多核苷酸可经一段时间执行至少两次,经一段时间执行至少三次,经一段时间执行至少四次,经一段时间执行至少五

次,经一段时间执行至少六次,经一段时间执行至少七次,经一段时间执行至少八次,经一段时间执行至少九次,经一段时间执行至少十次,经一段时间执行至少十一次,经一段时间执行至少十二次,经一段时间执行至少十三次,经一段时间执行至少十四次,经一段时间执行至少十五次,经一段时间执行至少十六次,经一段时间执行至少十七次,经一段时间执行至少十八次,经一段时间执行至少十九次或经一段时间执行至少二十次。

[0118] 在一个实施方案中,所述靶向载体(含有引入核酸)与表达载体(含有sgRNA)同时引入细胞中。

[0119] 在一个实施例中,进一步提供用于制造人源化非人类动物的方法,其包括:(a)用包含插入核酸的靶向载体修饰多潜能细胞的基因组以形成供体细胞,所述插入核酸包含人类核酸序列;(b)将所述供体细胞引入宿主胚胎中;和(c)在代孕母体中孕育所述宿主胚胎,其中所述代孕母体生成包含所述人类核酸序列的子代。在一个实施方案中,所述供体细胞引入处于胚泡段或处于前桑椹胚阶段(即,4-细胞阶段或8-细胞阶段)的宿主胚胎中。在更进一步的实施方案中,所述基因修饰能够经由种系传递。

[0120] 在一个特定实施例中,提供了用于制造人源化小鼠的方法,所述方法包括:(a)将包含ACE2基因片段的靶向载体与连接有sgRNA的表达载体引入小鼠胚胎细胞中,形成基因编辑的供体细胞;(b)将所述供体细胞引入小鼠胚胎中;和(c)在代孕母体中孕育所述小鼠胚胎,其中所述代孕母体生成包含所述人类ACE2序列的子代。

[0121] 实施例1 Ace2基因sgRNA 1及pX330-sgRNA质粒构建

[0122] 合成识别靶位点的sgRNA1序列。

[0123] sgRNA1序列(SEQ ID NO:1):5'-tactgctcagtcacctcaccgagg-3'

[0124] 针对sgRNA位点引入BbsI酶切位点合成sgRNA的上下游退火引物进行后续退火实验。合成sgRNA1的上下游单链引物序列如下:

[0125] 上游:5'-caccgtactgctcagtcacctcaccg-3'(SEQ ID NO:6)

[0126] 下游:5'-aaaccggtgagggactgagcagtac-3'(SEQ ID NO:7)

[0127] pX330质粒来源:pX330载体图谱,参见图1。该质粒骨架来源淼灵质粒平台,货号P0123。

[0128] 将上述sgRNA退火引物经退火后分别连接至pX330质粒(质粒先用BbsI线性化),获得表达载体pX330-sgRNA1。

[0129] 具体的连接反应体系如表1所示。

[0130] 表1连接反应体系

[0131]

sgRNA退火产物	1 $\mu$ L (0.5 $\mu$ M)
pX330-sgRNA载体	1 $\mu$ L (20ng)
T4 DNA Ligase	1 $\mu$ L (5U)
10 $\times$ T4 DNA Ligase buffer	1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	补至10 $\mu$ L

[0132] 反应条件为:16 $^{\circ}$ C连接30min以上,转化至30 $\mu$ L TOP10感受态细胞中,然后取200 $\mu$ L涂布于Amp抗性的平板,37 $^{\circ}$ C培养至少12小时后挑选2个克隆接种含有Amp抗性的LB培养基(5mL)中,37 $^{\circ}$ C,250rpm摇培至少12小时。

[0133] 随机挑选的克隆送测序公司进行测序验证,测序结果如图2所示,选择连接正确的

表达载体pX330-sgRNA1进行后续实验。

[0134] 实施例2 Ace2基因sgRNA2及pX330-sgRNA2质粒构建

[0135] 合成识别靶位点的sgRNA2序列。

[0136] sgRNA2-序列(SEQ ID NO:2):5'-cttggcattttcctcggtaggg-3'

[0137] 针对sgRNA位点引入BbsI酶切位点合成sgRNA的上下游退火引物进行后续退火实验。合成sgRNA2的上下游单链引物序列如下:

[0138] 上游:5'-caccgcttggcattttcctcggtag-3' (SEQ ID NO:4)

[0139] 下游:5'-aaactcaccgaggaaaatgccaaagc-3' (SEQ ID NO:5)

[0140] pX330质粒来源:pX330载体图谱,参见图1。该质粒骨架来源淼灵质粒平台,货号P0123。

[0141] 将上述sgRNA退火引物经退火后分别连接至pX330质粒(质粒先用BbsI线性化),获得表达载体pX330-sgRNA2。

[0142] 具体的连接反应体系如表2所示。

[0143] 表2连接反应体系

[0144] sgRNA退火产物	1 $\mu$ L (0.5 $\mu$ M)
pX330-sgRNA载体	1 $\mu$ L (20ng)
T4 DNA Ligase	1 $\mu$ L (5U)
10 $\times$ T4 DNA Ligase buffer	1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	补至10 $\mu$ L

[0145] 反应条件为:16 $^{\circ}$ C连接30min以上,转化至30 $\mu$ L TOP10感受态细胞中,然后取200 $\mu$ L涂布于Amp抗性的平板,37 $^{\circ}$ C培养至少12小时后挑选2个克隆接种含有Amp抗性的LB培养基(5mL)中,37 $^{\circ}$ C,250rpm摇培至少12小时。

[0146] 随机挑选的克隆送测序公司进行测序验证,测序结果如图3所示,选择连接正确的表达载体pX330-sgRNA2进行后续实验。

[0147] 实施例3 pX330-sgRNA切割效率鉴定

[0148] 分别将2 $\mu$ g实施例1、实施例2制备的pX330-sgRNA质粒利用脂质体3000(Lipofectamine 3000, invitrogen, 货号L3000001)方法转染进小鼠胚胎干细胞,具体转染操作参考Lipofectamine 3000试剂操作说明。收取转染两天后的小鼠胚胎干细胞,用细胞基因组提取试剂盒进行基因组提取(天根, DP304-02)。随后在基因组切割位点两侧设计PCR上下游引物,上游引物(5arm-sgF:ggttttgatttgccataaaatgtagc (SEQ ID NO:10))和下游引物(3arm-sgR:attcccaggtccagtttcacctaag (SEQ ID NO:11))对提取所得基因组进行PCR反应(使用诺唯赞Phanta Max Super-FidelityDNAPolymerase)。然后利用T7核酸内切酶I (T7EI) (Biolabs, M0302L)进行pX330-sgRNA切割效率验证,原理T7核酸内切酶I可识别并切割不完全配对DNA。

[0149] T7 EI实验具体操作步骤:

[0150] 将上述从各转染pX330-sgRNA1和pX330-sgRNA2的细胞提取基因组,通过5arm-sgF+3arm-sgR扩增得到的PCR产物进行回收(天根, DP214-02),取1 $\mu$ g进行退火反应,体系如下所示:

[0151] 表3

[0152]	PCR产物	1μg
	Buffer 2	2μL
	H <sub>2</sub> O	补至20μL
	反应条件	水浴锅煮沸10min后自然冷却

[0153] 然后往退火产物中加入1μL T7核酸内切酶I于37℃反应30min,后直接跑胶验证。跑胶结果如图4所示。实施例1、实施例2的sgRNA1和sgRNA2其切割条带亮度较强(sgRNA1可切割成约376bp和581bp两条带,sgRNA2可切割成约371bp和586bp两条带),具有较高切割效率。

[0154] 由于切割效率主要通过图显示,为了显现实施例1、2的方案的效果,图4中同时列举了另一sgRNA(指代为sgRNA3)的切割效率。

[0155] 所列举的sgRNA3序列(SEQ ID NO:3):5'-caagtgaactttgataagacagg-3'

[0156] 合成sgRNA3的上下游单链引物序列如下:

[0157] 上游:5'-caccgcaagtgaactttgataagac-3'(SEQ ID NO:8)

[0158] 下游:5'-aaacgtcttatcaaagttcacttgc-3'(SEQ ID NO:9)

[0159] 其余步骤如同实施例1。随机挑选克隆送测序公司进行测序验证,测序结果如图5所示,选择连接正确的表达载体pX330-sgRNA3进行后续实验。

[0160] 由于其他的sgRNA及pX330-sgRNA质粒构建非本发明实施例的重点,因此不作过多赘述和列举。

[0161] 实施例4打靶载体的设计

[0162] 将人ACE2基因(Gene ID:ID:59272)CDS蛋白编码序列(基于NCBI登录号为NM\_001371415.1→NP\_001358344.1的转录本,其CDS序列如hACE2-CDS SEQ ID NO:12所示,蛋白序列如hACE2-protein SEQ ID NO:13所示)插入到鼠Ace2的启动子和5' UTR区域序列后,利用鼠Ace2启动子启动人ACE2基因表达。同时,插入的人ACE2 CDS序列后加上SV40 polyA序列信号(SV40-polyA序列如SEQ ID NO:14所示)终止信号加强人ACE2 mRNA转录停止。

[0163] hACE2-CDS序列如下(SEQ ID NO:12):

[0164] atgtcaagctcttctggtccttctcagccttggtgctgtaactgctgctcagtcaccattgagga  
acaggccaagacatTTTTGGACAAGTTTAAACCACGAAGCCGAAGACCTGTTCTATCAAAGTTCACTTGCTTCTTGG  
aattataacaccaatattactgaagagaatgtccaaaacatgaataatgctggggacaaatggtctgcctTTTTAA  
aggaacagtcacacttgcccaaatgtatccactacaagaaattcagaatctcacagtcagcttcagctgcaggc  
tcttcagcaaaatgggtcttcagtgctctcagaagacaagagcaaacggttgacacaattctaaatacaatgagc  
accatctacagtactggaaaagtttgtaaccagataatccacaagaatgcttattacttgaccaggtttgaatg  
aaataatggcaaacagtttagactacaatgagaggctctgggcttgggaaagctggagatctgaggtcggcaagca  
gctgaggccattatatgaagagtatgtggtcttgaaaatgagatggcaagagcaaatcattatgaggactatggg  
gattattggagaggagactatgaagtaaatgggtagatggctatgactacagccggccagttgattgaagatg  
tggaacatacctttgaagagattaaaccattatatgaacatcttcatgcctatgtgaggggcaaatgattgaatgc  
ctatccttctatatcagtccaattggatgcctccctgctcatttgcttggtgatatgtgggtagattttggaca  
aatctgtactctttgacagttccctttggacagaaaccaaacatagatgttactgatgcaatggtggaccaggcct  
gggatgcacagagaatattcaaggaggccgagaagttctttgtatctgttggtcttctaataatgactcaaggatt  
ctgggaaaattccatgctaacggaccaggaaatgttcagaaagcagctctgcatccacagcttgggacctgggg

aagggcgacttcaggatccttatgtgcacaaaggtgacaatggacgacttctgacagctcatcatgagatggggc  
 atatccagtatgatatggcatatgctgcacaaccttttctgctaagaaatggagctaataaggattccatgaagc  
 tgttggggaaatcatgtcactttctgcagccacacctaagcatttaaataccattggcttctgtcaccgatttt  
 caagaagacaatgaaacagaaataaacttctgctcaacaagcactcacgattgttgggactctgccatttactt  
 acatgttagagaagtggaggtggatggcttttaaaggggaaattcccaaagaccagtggatgaaaaagtggtgga  
 gatgaagcgagagatagttgggggtgggaacctgtgccccatgatgaaacatactgtgaccccgcatctctgttc  
 catgtttctaatagtattactcattcattcgatattacacaaggacctttaccaattccagtttcaagaagcacttt  
 gtcaagcagctaaacatgaaggcctctgcacaaatgtgacatctcaaactctacagaagctggacagaaactggt  
 caatatgctgaggcttgaaaaatcagaacctggacctagcattggaaaaatggtgtaggagcaaagaacatgaat  
 gtaaggccactgctcaactactttgagcccttatttacctggctgaaagaccagaacaagaattcttttgtgggat  
 ggagtaccgactggagtccatatgcagaccaaagcatcaaagtgaggataagcctaaaatcagctcttgagataa  
 agcatatgaatggaacgacaatgaaatgtacctgttccgatcatctgttgcataatgctatgaggcagtacttttta  
 aaagtaaaaaatcagatgattctttttggggaggaggatgtgcgagtggttaatttgaaccaagaatctccttta  
 atttctttgtcactgcacctaaaaatgtgtctgatatacttcttagaactgaagttgaaaaggccatcaggatgtc  
 ccggagccgtatcaatgatgcttccgctctgaatgacaacagcctagagtttctggggatacagccaacacttgg  
 cctcctaaccagccccctgtttccataggctgattgtttttggagttgtgatgggagtgatagtggttggcattg  
 tcatctgatcttactgggatcagagatcggagaagaaaaataaagcaagaagtggagaaaatccttatgcctc  
 catcgatattagcaaaggagaaaaataatccaggattccaaaacactgatgatgttcagacctccttttag

[0165] hACE2-protein序列如下 (SEQ ID NO:13) :

[0166]

```

      10   20   30   40   50
MSSSSWLLLS LVAVTAAQST IEEQAKTFLD KFNHEAEDLF YQSSLASWNY
      60   70   80   90  100
NTNITEENVQ NMNNAQDKWS AFLKEQSTLA QMYPLQEIQN LTVKLQLQAL
     110  120  130  140  150
QQNGSSVLSE DSKRNLNTIL NTMSTIYSTG KVCNPDNPQE CLLLEPGLNE
     160  170  180  190  200
IMANSLDYNE RLWAWESWRS EVGKQLRPLY EEYVVLKNEM ARANHYEDYG
     210  220  230  240  250
DYWRGDYEVN GVDGYDYSRG QLIEDVEHTF EEIKPLYEHL HAYVRAKLMN
     260  270  280  290  300
AYPSYISPIG CLPAHLLGDM WGRFWTNLYS LTVFPQKPN IDVTDAMVDQ
     310  320  330  340  350
AWDAQRFKE AEKFFVSVGL PNMTQGFVEN SMLTDPGNVQ KAVCHPTAWD
     360  370  380  390  400
LGKGDFRILM CTKVTMDDFL TAHHEMGHIQ YDMAYAAQPF LLRNGANEGF
     410  420  430  440  450
HEAVGEIMSL SAATPKHLKS IGLLSPDFQE DNETEINFL KQALTIVGTL
     460  470  480  490  500
PFTYMLEKWR WMVFKGEIPK DQWMKKWEM KREIVGVVEP VPHDETYCDP
     510  520  530  540  550
ASLFHVSNDY SFIRYYTRL YQFQFEALC QAAKHEGPLH KCDISNSTEA
     560  570  580  590  600
GQKLFNMLRL GKSEPWTAL ENVVGAKNMN VRPLLNYFEP LFTWLKDQNK

```



```

        610   620   630   640   650
NSFVGSWTDW SPYADQSIKV RLSLKSALGD KAYEWNDNEM YLFRSSVAYA
        660   670   680   690   700
MRQYFLKVKV QMILFGEDV RVANLKPRI FNFVVTAPKN VSDIIPRTEV
        710   720   730   740   750
[0167] EKAIRMSRSR INDAFRLNDN SLEFLGIQPT LGPPNQPPVS IWLIVFGVVM
        760   770   780   790   800
GVIVVGIVIL IFTGIRDRKK KNKARSGENP YASIDISKGE NNPGFQNTDD
) VQTSF

```

[0168] SV40 polyA序列 (SEQ ID NO:14) :

[0169] aacttgttttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatagcatcacaatttcacaaataaagc  
atTTTTTTcactgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatctta

[0170] 根据序列设计,发明人进一步的设计了如图6所示的打靶方案和包含5'同源臂(5arm)、人ACE2基因片段、3'同源臂(3arm)的载体。其中5'同源臂为NCBI登录号为AC091606.8的第125683-126652位核苷酸(5'同源臂序列如SEQ ID NO:15所示),3'同源臂为NCBI登录号为AC091606.8的第126796-127766位核苷酸(3'同源臂序列如SEQ ID NO:16所示)。同时,PGK-嘌呤霉素异种基因包也被插入载体用做筛选需要,嘌呤霉素抗性基因(PGK-puro,SEQ ID NO:17)表达框两端设计有一对同向的frt位点(SEQ ID NO:18),因此可以利用FLP重组酶去除从而解决转基因引起的安全问题。构建的载体被进行完全序列验证。在靶向之前,通过AgeI,所述载体被线性化(打靶载体示意图和打靶策略示意图如图6所示)。

[0171] 5'同源臂序列(SEQ ID NO:15) :

[0172] ccctatggagtgagagaagagcttataatTTTTTaaatgggcagagaaatgaatttttttaatttt  
tagagacagggtttctttgtatagctctagctgtctttgattggtagacaaaagctgtcctcaaactcagagatctt  
ccttcctttgtctcctgagtgctgggattaaaggcatggaccaccactgccctgccccattctctccattaatttt  
aagtgaatgcttgcaaaagctcacttctttggtgaacagcttcttttacaataagtacctttgccttcgttttta  
taggattcttaaaaagaaaaaaagattcagccaggtggttgtggtgcacaccttaatcccagcagtcaggaggc  
agaggaaagcagatctcttgagtttgaggctagcctagctctacagagggagttccaggacagccaaggctacagag  
aggaactgtctaaaaacaccaagaaagagagaaaggagagagggagaggatggatagcttattgatagaattgtca  
gaaaaggctataagttccaatagtgtcccatgatttctaagcttagccctttctgttatagtaaaatcatagtac  
accctcctcctccagtgatctttaacagcttttaaggaacatattaactaaatgtccaggttttgatttgccat  
aaaatgtagcaaaagctaaggttttctaggattaatgaataacatgtctttatattagtttacttaaaaaaatcatt  
ctaaaatatctgtttacatatctgtcctctccaggattaacttcatattggtccagcagcttgtttactgttctct  
tctgtttcttctctgcttttttttcttctctctcagtgcccaaccaagttcaaaggctgatgagagagaaaa  
actcatgaagagattttactctagggaaagttgctcagtggtggatccttgccgcacggggaaag

[0173] 3'同源臂序列(SEQ ID NO:16) :

[0174] GaattataactaacttactgaagaaatgcccAAAagatggtaagttcttgaggctaccagggg  
gttattgattgcttcttaaagatcagaattactgcctataaaactggataaggaaatcatagagatctctcaagtg  
tgaggatgagtgactgcctctgtagctctgatccttagtctccagatggctaaattcaattgaccttagagttcat

ctggaaaattgttatgaatgaattatttgccagattccaagatgagtgaaaatgtttaataaagttgccatcac  
tattctcattatatttggatgtaaagcattcatggaatgttctaagtcgttattgagccaataattttcttttag  
cttataatgccaacaggtctatccgagaactacaaatgacatattaactgaaaaatgcaactggggtttactgaag  
gcagcagcttagtaattaaggtaacatggcttaggtgaaactggacctgggaattccttctttcattgacacaga  
gctctgaggaatttccaaggtcacagaagaaaagctataattaacttagtccccaaaaatctcagcctactctgg  
gaaagcagcatattttgtttgacaagtgaaggacttagaacttttttttctcactgatcctgaagtgcctttt  
aagtatagtttaagtggtggaaaattgagcaactatttaagaaaagactcttttttttcttctccagcaatgcttt  
ccttcaaacggtagcttcaaaacttctgtcttttaaatgatcagggggctgtgtgtttaattattgccattca  
tagaacagagtggtctgaggatgctgtttcctttgaaattctatgccccctcccagttttctaaaatttaagaa  
accacagagactttgacaatgtagttgccaaatgagttgcttttaactgctctaataagtttggcttt

[0175] PGK-puro序列(SEQ ID NO:17) :

[0176] Gggtaggggagggcgttttccaagcagctctggagcatgcgcttttagcagccccgctgggcacttgg  
cgctacacaagtggcctctggcctcgacacattccacatccccggtaggcgccaaccggctccgttctttgggtg  
gcccccttcgcccacttctactctctccctagtcaggaagttccccccgccccgcagctcgcgtcgtgcaggac  
gtgacaaatggaagtagcagctcactagctcgtgcagatggacagcaccgctgagcaatggaagcgggtaggc  
ctttggggcagcggccaatagcagctttgctccttcgctttctgggctcagaggctgggaaggggtgggtccgggg  
gcgggctcaggggcccggctcaggggcccgggcccgaaggtcctccggagggccgcttctgcacgcttca  
aaagcgcacgtctgccgcgtgttctctcttctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctc  
atgaccgagtacaagcccaggtgcgctcgcaccgccgacgacgtccccagggccgtacgcaccctcggccgcg  
cgttcgcccactaccccgccacgcgccacaccgctcgatccggaccgccacatcgagcgggtcaccgagctgcaaga  
actcttctcctcagcgcgctcgggctcgacatcggaaggtgtgggtcgcggacgacggcggcgggtggcggtctgg  
accacgccggagagcgtcgaagcggggcggtgttcgccgagatcggcccgcgcatggccgagttgagcggttccc  
ggctggccgcgagcaacagatggaaggcctcctggcgccgcaccggcccgaaggagcccgcgtgggttctggccac  
cgctcggcgtctcggccgaccaccagggaaggtctgggcagcggcgtcgtgctccccggagtgaggcggccgag  
cgcgccgggggtgcccgccttctggagacctccgcgccccgcaacctccccctctacgagcggctcggcttaccg  
tcaccgccgacgtcgaggtgcccgaaggaccgcgacctggtgcatgaccgcaagcccgggtgcctga

[0177] Frt序列(SEQ ID NO:18) :gaagttcctatttctctagaaagtataggaacttc

[0178] 载体构建过程如下:

[0179] 设计扩增5'同源臂的搭桥片段的上游引物(5arm-pcrF:tcgcacacattccacatccac  
cggtccctatggagtggagaagagtctta (SEQ ID NO:19)) 和与其匹配的下游引物(5arm-pcrR:g  
aaggagccaggaagagcttgacatctttccccgtgcgccaagatcc (SEQ ID NO:20));

[0180] 设计扩增人ACE2 CDS的搭桥片段的上游引物(hACE2-F:ggatcttggcgcacggggaaa  
gatgtcaagctcttctggtctcttc (SEQ ID NO:21)) 和与其匹配的下游引物(hACE2-R:cattat  
aagctgcaataaacaagttctaaaaggaggtctgaacatcatc (SEQ ID NO:22));

[0181] 设计扩增SV40 polyA的搭桥片段的上游引物(SV40-F:gatgatgttcagacctcctttt  
agaacttgttttattgcagcttataatg (SEQ ID NO:23)) 和与其匹配的下游引物(SV40-R:AGAGAA  
TAGGAACTTCGCACGCGTtaagatacattgatgagtttgac (SEQ ID NO:24));

[0182] 设计扩增3'同源臂片段的上游引物(3arm-pcrF:tacgaagttatGtcgacgcGGCGGCC  
gaattataactaacattactg (SEQ ID NO:25)) 和与其匹配的下游引物(3arm-pcrR:tatgacc

atgattacgcccaagcttaagaccaaactatttagagcagttaaaagc (SEQ ID NO:26))。5' 同源臂与3' 同源臂的扩增模板为C57BL6/J小鼠基因组,人ACE2的扩增模板为人肺细胞cDNA。PCR反应体系(使用诺唯赞Phanta Max Super-FidelityDNAPolymerase)和条件见表4:

[0183] 表4PCR反应体系(50 $\mu$ L)

	2 $\times$ Phanta Max Buffer	25 $\mu$ L
	dNTP Mix	1 $\mu$ L
	上游引物 (10 $\mu$ M)	2 $\mu$ L
[0184]	下游引物 (10 $\mu$ M)	2 $\mu$ L
	Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase	1 $\mu$ L
	模板	5'同源臂、人 ACE2 CDS、SV40 polyA 片段各
		50 ng
[0185]	H <sub>2</sub> O	补足 50 $\mu$ L
	PCR 扩增反应条件	65 $^{\circ}$ C起始, 每个循环降 0.3 $^{\circ}$ C

[0186] 如是,将PCR扩增得到的产物片段5' 同源臂、人ACE2 CDS、SV40 polyA使用搭桥PCR (overlap PCR) 搭配Touch down PCR方法PCR成连续片段5arm-hACE-SV40;以及PCR扩增得到的3' 同源臂回收后直接用于构建同源重组打靶载体,构建过程如下:

[0187] 1. 将5arm-hACE-SV40片段进行AgeI+MluI双酶切;3' 同源臂片段进行AscI+HindIII双酶切后分别通过酶切连接的方法连接上去,从而得打靶载体。2. 通过酶切鉴定后将获得的阳性打靶载体送去测序鉴定,经测序公司验证序列正确(如图7),从而成功获得人源化ACE2打靶载体,序列如下:

[0188] 整个打靶载体序列(SEQ ID NO:27):

[0189] tcgcgcgtttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccgagacggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgctcagcgggtgttggcgggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcacatatgtaccggtaggggagcgttttccaaggcagctctggagcatgcgcttttagcagccccgctgggcacttggcgctacacaagtggcctctggcctcgcacacattccacatccaccggtccctatggagtggagaagagtcttataatTTTTTaaatgggcagagaaatgaatttttttaatttttagagacagggtttcttgtatagctctagctgtctttgattggttagacaaagctgtcctcaaactcagagatcttccttctttgtctcctgagtgtgggattaaaggcatggaccaccactgccctgccccattctctccattaaTTTTAAGTGAATGCTTCAAAAAGCTCCTTCTTGGTGAACAGCTTCTTTACAAAATAAGTACTTTGCCTTCGTTTATATAGGATCTTAAAAAGAAAAAAGATTCCAGCCAGGTGGTTGTGGTGCACACCTTAAATCCAGCAGTCAGGAGGCAGAGGAAAGCAGATCTCTTGAGTTTGAGGCTAGCCTAGTCTACAGAGGGAGTTCAGGACAGCCAAGGCTACAGAGAGGAAGTGTCTAAAAACACCAAGAAAGAGAGAAAGGAGAGAGGGAGAGGATGGATAGCTTATTGATAGAATTGTCAGAAAAGGCTATAAGTCCAATATGTGTCCCATGATTTCTAAGTCTAGCCCTTTCTGTTATAGTAAAATCATAGTACACCCTCCTCCTCCAGTGATCTTTAACAGCTTTTAAAGAACATATAACTAAATGTCCAGGTTTTGATTTGGCCATAAATGTTAGCAAAGCTAAGTTTTCTAGGATTAATGAATAACATGTCTTTATTTAGTTTACTTAAAAAATCATTCTAAAATATCTGTTTACATATCTGTCTCTCCAGGATTAACCTCATATTGGTCCAGCAGCTTGTCTTACTGTT

ctcttctgtttcttcttctgcttttttttcttcttctcagtgcccaaccaagttaaaggctgatgagagag  
 aaaaactcatgaagagattttactctagggaaagttgctcagtgatgggatcttggcgacgggaaagatgtca  
 agctcttctctggctccttctcagccttgttgctgtaactgctgctcagtcaccattgaggaacaggccaagacat  
 ttttggacaagtttaaccacgaagccgaagacctgttctatcaaagttcacttgcttcttggattataacaccaa  
 tattactgaagagaatgtccaaaacatgaataatgctggggacaaaatggctctgcctttttaaggaacagtccaca  
 cttgcccnaatgtatccactacaagaattcagaatctcacagtcagcttcagctgcaggctcttcagcaaaatg  
 ggtcttcagtgctctcagaagacaagagcaaacggttgaacacaattctaaatacaatgagcaccatctacagtac  
 tggaaaagtttgaaccagataatccacaagaatgcttattacttgaaccaggtttgaatgaataatggcaaac  
 agtttagactacaatgagaggctctgggcttgggaaagctggagatctgaggctggcaagcagctgaggccattat  
 atgaagagtatgtggtcttgaanaatgagatggcaagagcaaatcattatgaggactatggggattattggagagg  
 agactatgaagtaaatgggtagatggctatgactacagccgcgccagttgatgaagatgtggaacataccttt  
 gaagagattaaccattatatgaacatcttcatgcctatgtgagggcaaatgatgaatgcctatccttctctata  
 tcagtcnaattggatgcctcctgctcatttgccttggatgatgtgggtagattttggacaaatctgtactcttt  
 gacagttccctttggacagaaaccaacatagatgttactgatgcaatggaggaccaggctgggatgcacagaga  
 atattcaaggaggccgagaagttcttctgtatctgttggctcttctaatatgactcaaggattctgggaaaattcca  
 tgctaaccggaccaggaaaatgtcagaaagcagctctgccatcccacagcttgggacctggggaagggcgacttcag  
 gatccttatgtgcacaaaggtgacaatggacgacttctgacagctcatcatgagatggggcatatccagtatgat  
 atggcatatgctgcacaacctttctgctaagaaatggagctaataagagattccatgaagctgttggggaatca  
 tgtcactttctgcagccacacctaagcattttaaataccattggctcttctgtcaccgattttcaagaagacaatga  
 aacagaaataaacttctgctcaacaagcactcacgattgttgggactctgccatttacttacatgttagagaag  
 tggaggtgatggtctttaaaggggaaattcccaagaccagtgatgaaaaagtggtgggagatgaagcgagaga  
 tagttggggtggtggaacctgtgccccatgatgaacatactgtgaccccgcatctctgttccatgtttctaataga  
 ttactcattcattcgatattacacaaggacctttaccaattccagtttcaagaagcactttgtcaagcagctaaa  
 catgaaggccctctgcacaaatgtgacatctcaactctacagaagctggacagaaactgttcaatatgctgaggc  
 ttggaaaatcagaacctggacctagcattggaaaatgtttaggagcaaaagacatgaatgtaaggccactgct  
 caactactttgagcccttatttacctggctgaaagaccagaacaagaattcttttgggatggagtaccgactgg  
 agtccatatgcagaccaaagcatcaaagtgaggataagcctaaaatcagctcttggagataaagcatatgaatgga  
 acgacaatgaaatgtacctgttccgatcatctgttgcataatgctatgaggcagctcttttaaaagtaaaaaatca  
 gatgattcttttggggaggaggatgtgagagtggttaatttgaaccaagaatctcctttatttcttctgact  
 gcacctaaaaatgtgtctgatatacttcttagaactgaagttgaaaaggccatcaggatgtcccggagccgtatca  
 atgatgctttccgtctgaatgacaacagccttagagtttctggggatacagccaacacttggacctcctaaccagcc  
 cctgtttccatatggctgattgttttggagttgtgatgggagtgatagtggttggcattgtcactctgatcttc  
 actgggatcagagatcggaagaagaaaaataaagcaagaagtgagaaaaatccttatgctccatcgatattagca  
 aaggagaaaaataatccagattccaaaacactgatgatgttcagacctccttttagaacttgtttattgcagctta  
 taatggttacaaataaagcaatagcatcacaatttcacaaataaagcatttttttactgcattctagttgtggt  
 ttgtccaaactcatcaatgtatcttaacgcgtgcaagttcctattctctagaaagtataggaacttcatcgatac  
 cgggtaggggaggcgcttttcccaaggcagctctggagcatgcgcttttagcagccccgctgggcacttggcgctaca  
 caagtggcctctggcctgcacacattccacatccccggtagggcceaaccggctccgttctttggtggccccctt  
 cgcgccaccttctactcctcccctagtcaggaagttcccccccgccccgcagctcgcgtcgtgcaggacgtgacaa



agtgggtggcctaactacggctacactagaagaacagtatttgggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcgg  
 aaaaagagttggtagctcttgatccggcaacaaccaccgctggttagcggtggtttttttggttgcaagcagcag  
 attacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaa  
 actcacgttaagggtatttgggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaattaaaaatgaag  
 ttttaaatcaatctaaagtatataatgagtaaacttgggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatc  
 tcagcgatctgtctatttctgctcatccatagttgcctgactccccgctgctgtagataactacgatacgggagggt  
 taccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaacca  
 gccagccggaaggccgagcgcagaagtggctcctgcaactttatccgcctccatccagtttataattggtgcccgg  
 gaagctagagtaagtagtctgccagttaatagtttgcgcaacggttggccattgctacaggcatcgtggtgtcac  
 gctcgtcgttttgggtatggcttcattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatggtgtg  
 caaaaaagcgggttagctccttcgggtcctccgatcgttgtcagaagtaagttggccgcagtggtatactcatggtt  
 atggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaacca  
 agtcattctgagaatagtgatgcccgcaccgagttgctcttgcggcgctcaatacgggataataccgcgccaca  
 tagcagaactttaaaagtgtcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttg  
 agatccagttcagatgtaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatcttttactttaccagcgtttctgggt  
 gagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaagggaataaggcgacacggaaatggtgaatactcatactctt  
 cttttttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaa  
 aataaacaataggggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaccattattatcatga  
 cattaacctataaaaataggcgtatcacgaggccctttcgtc

[0190] 对比例1

[0191] 将PCR扩增得到的产物片段5'同源臂、人ACE2 CDS、SV40 polyA使用搭桥PCR (overlap PCR) 方法PCR成连续片段5arm-hACE-SV40, PCR反应条件如表5所示, 其余条件同实施例4。

[0192] 表5 PCR反应体系 (50 $\mu$ L)

	2 $\times$ Phanta Max Buffer	25 $\mu$ L
	dNTP Mix	1 $\mu$ L
	上游引物 (10 $\mu$ M)	2 $\mu$ L
	下游引物 (10 $\mu$ M)	2 $\mu$ L
[0193]	Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase	1 $\mu$ L
	模板	5'同源臂、人 ACE2 CDS、SV40 polyA 片段各 50ng
	H <sub>2</sub> O	补至 50 $\mu$ L
	PCR 扩增反应条件	65 $^{\circ}$ C

[0194] 结果如图8所示, 并未能扩增出3片段连接片段。

[0195] 实施例5人源化ACE2小鼠胚胎干细胞的获得

[0196] 其中一个实施方式中, 人源化ACE2小鼠胚胎干细胞的获得可按照如下方法进行:

[0197] C57BL6/J小鼠胚胎干细胞(所述的胚胎干细胞来源于已确立的胚胎干细胞系)从

液氮冻存细胞库中复苏,特别使用代数为p10以内的小鼠胚胎干细胞,在6cm培养皿中培养生长3天。

[0198] 通过配套使用Nucleofector™ IIs/2b电转仪以及Mouse ES Cell Nucleofector® Kit (Lonza, VPH-1001) 小鼠胚胎干细胞电转试剂盒,使用A023程序,约 $2 \times 10^6$ 个细胞被电穿孔,并且所述电转过程含有3 $\mu$ g线性化打靶载体以及1 $\mu$ g pX330-sgRNA1的100 $\mu$ L电转缓冲液中进行。所述转染细胞被种到3个6孔板的孔中,然后恢复36小时。恢复后,1 $\mu$ g/mL嘌呤霉素(默克公司)被加入到细胞培养基中。

[0199] 经过3-4天的筛选后,通过使用玻璃拉针吸取单克隆的方式挑取并培养嘌呤霉素抗性小鼠胚胎干细胞克隆进96孔板中培养。第二天将单克隆通过胰酶消化并分成两份培养,其中一份细胞在10 $\mu$ L的NP 40裂解缓冲液中于56 $^{\circ}$ C下单独地裂解60分钟,随后在95 $^{\circ}$ C下裂解10分钟。

[0200] 其中,小鼠胚胎干细胞培养具体步骤:提前一天准备饲养层feeder细胞,按照需求铺在不同的孔板中,过夜培养形成单层。其中饲养层feeder细胞为经丝裂霉素C(MMC)法处理制备的小鼠胚胎成纤维细胞。使用含有LIF和2i(chir99021和pD0325901inhibitor)的mES培养基培养,每天更换新鲜培养基,可根据细胞的长势适当增加培养基,一般3天传一代,传代时用0.25%胰酶消化,按照6厘米盘30万、6孔板10万每孔左右的密度种植。

[0201] mES+LIF+2i培养基组成为:Knockout DMEM(1 $\times$ ,gibco)+15%FBS(FRONT BIOMEDICAL,0.22 $\mu$ m Millipore滤器过滤)+GlutaMAX(100 $\times$ ,gibco)+NEAA(100 $\times$ ,gibco)+P/S(P:50units,S:50mg/ml,Hyclone)+ $\beta$ -mercaptoethanol(gibco,使用浓度0.1mM)+LIF(1000units/ml,Millipore)+CHIR99021(GSK3 $\beta$ 抑制剂,使用浓度3 $\mu$ M)+PD0325901(MEK抑制剂,使用浓度1 $\mu$ M)。

[0202] NP40裂解液的组成为:10mL TE(20mM Tris pH8.0,150mM NaCl,2mM EDTA)+0.5% NP40+10 $\mu$ L蛋白酶K(10mg/mL)。

[0203] 上述方法中的pX330-sgRNA1替换成pX330-sgRNA2或pX330-sgRNA3,其他步骤同pX330-sgRNA1。

[0204] pX330-sgRNA1、pX330-sgRNA2和pX330-sgRNA3搭配打靶载体打靶效果如表6所示。

[0205] 表6. sgRNA1-3搭配打靶载体打靶效果(存活克隆数)

[0206] pX330-sgRNA1	pX330-sgRNA2	pX330-sgRNA3
231	187	43

[0207] 实施例6人源化ACE2小鼠胚胎干细胞基因型鉴定

[0208] 将实施例5最后得到的细胞裂解物用作基因型鉴定PCR筛选模板。通过使用Phanta Max Super-FidelityDNAPolymerase试剂(诺唯赞公司),根据制造商的说明书实施PCR筛选。PCR分析用于定向插入小鼠Ace2位点的具有5'同源臂和3'同源臂的HDR。由于ACE2基因位于X染色体上,使用的小鼠胚胎干细胞为XY雄性,所以不存在双等位基因靶向发生。

[0209] 鉴定定向插入引物的上游位于嘌呤霉素抗性内部(Puro-F:aacctcccccttctacgagc(SEQ ID NO:28)),与其配对的引物下游位于3'同源臂的外侧(3arm-outR:tacagccaggatctggatgtcagc(SEQ ID NO:29))。如果重组载体插入位置正确,则应出现一条长度应为1504bp的条带。此时小鼠胚胎干细胞Ace2位点基因组序列替换为SEQ ID NO:30:

[0210] ccctatggagtgagagaagagtcttataatTTTTTaaatgggcagagaaatgaatttttttaatttt

tagagacagggtttctttgtatagctctagctgtctttgattggttagacaaagctgtcctcaaactcagagatctt  
ccttcctttgtctcctgagtgctgggattaaaggcatggaccaccactgccctgccccattctctcattaat  
aagtgaatgcttgcaaaagctcacttctttggtgaacagcttctttacaataagtacctttgccttcgtttta  
taggattcttaaaaagaaaaaaagattcagccaggtggttgtggtgcacaccttaatcccagcagtcaggaggc  
agaggaaagcagatctcttgagtttgaggctagcctagtctacagagggagttccaggacagccaaggctacagag  
aggaactgtctaaaaacaccaagaaagagagaaaggagagaggatggatagcttattgatagaattgtca  
gaaaaggctataagtccaatatgtgtcccatgatttctaagtctagccctttctgttatagtaaaatcatagtac  
accctcctcctccagtgatctttaacagcttttaaggaacatattaactaaatgtccagggttttgatttgccat  
aaaatgtagcaaaagctaaggttttctaggattaatgaataacatgtctttatttagtttacttaaaaaatcatt  
ctaaaatatctgtttacatatctgtcctcctccaggattaacttcatattggtccagcagcttgtttactgttctct  
tctgtttcttcttctgcttttttttcttcttctcagtgcccaaccaagttcaaaggctgatgagagagaaaa  
actcatgaagagattttactctagggaaagttgctcagtggtatgggatcttggcgcacggggaaagatgtcaagct  
cttcttggtccttctcagccttgttgctgtaactgctgctcagtcaccatgaggaacaggccaagacattttt  
ggacaagtttaaccacgaagccgaagacctgttctatcaaagttcacttgccttcttgaattataacaccaatatt  
actgaagagaatgtccaaaacatgaataatgctggggacaaatggtctgccttttaaggaacagtcacacttg  
cccaaatgtatccactacaagaaattcagaatctcacagtcagcttcagctgcaggctcttcagcaaatgggtc  
ttcagtgctctcagaagacaagagcaaacggttgaacacaattctaaatacaatgagcaccatctacagtactgga  
aaagtttgtaaccagataatccacaagaatgcttattacttgaaccaggtttgaatgaaataatggcaaacagtt  
tagactacaatgagaggctctgggcttgggaaagctggagatctgaggtcggcaagcagctgaggccatttatga  
agagtatgtggtcttgaaaaatgagatggcaagagcaaatcattatgaggactatggggattattggagaggagac  
tatgaagtaaatgggtagatggctatgactacagccgcgccagttgattgaagatgtggaacatacctttgaag  
agattaaccattatatgaacatcttcatgcctatgtgagggcaaagttgatgaatgcctatccttctatatcag  
tccaattggatgcctccctgctcatttgcttgggtgatatgtgggtagattttggacaaatctgtactctttgaca  
gttccctttggacagaaaccaacatagatgttactgatgcaatggtggaccaggcctgggatgcacagagaatat  
tcaaggaggccgagaagttctttgtatctgttggtcttctaatatgactcaaggattctgggaaaattccatgct  
aacggaccaggaatgttcagaaagcagctctgcatccacagcttgggacctggggaaggcgacttcaggatc  
cttatgtgcacaaaggtgacaatggacgacttctgacagctcatcatgagatggggcatatccagtatgatatgg  
catatgctgcacaaccttttctgctaagaaatggagctaataagagattccatgaagctgttggggaatcatgct  
actttctgcagccacacctaagcatttaaaatccattggcttctctgtcaccggattttcaagaagacaatgaaca  
gaaataaacttctgctcaacaagcactcacgattgttgggactctgccatttacttacatgttagagaagtgga  
ggtggatggtctttaaagggaattcccaagaccagtggtatgaaaaagtggtgggagatgaagcgagagatagt  
tggggtggtggaacctgtgccccatgatgaaacatactgtgaccccgatctctgttccatgtttctaattgattac  
tcattcattcgatattacacaaggacctttaccaattccagtttcaagaagcactttgtcaagcagctaaacatg  
aagccctctgcacaaatgtgacatctcaaactctacagaagctggacagaaactgttcaatatgctgaggcttgg  
aaaatcagaacctggaccttagcattggaaaatgttgtaggagcaagaacatgaatgtaaggccactgctcaac  
tactttgagcccttatttacctggctgaaagaccagaacaagaattcttttggtggatggagtaccgactggagtc  
catatgcagaccaagcatcaaagtgaggataagcctaaaatcagctcttggagataaagcatatgaatggaacga  
caatgaaatgtacctgttccgatcatctgttgcatatgctatgagggcagtttttaaaagtaaaaaatcagatg  
attctttttggggaggaggatgtgagtggttaatttgaaccaagaatctcctttaatttctttgtcactgcac



ctaaaaatgtgtctgatatcattcctagaactgaagttgaaaaggccatcaggatgtcccggagccgtatcaatga  
 tgctttccgtctgaatgacaacagcctagagtttctggggatacagccaacacttggacctcctaaccagccccct  
 gtttccatatggctgattgtttttggagttgtgatgggagtgatagtggttggcattgtcatcctgatcttactg  
 ggatcagagatcggagaagaaaaataaagcaagaagtggagaaaatccttatgcctccatcgatattagcaaagg  
 agaaaataatccaggattccaaaacactgatgatgttcagacctcttttagaacttgtttattgcagcttataat  
 ggttacaataaagcaatagcatcacaatttcacaaataaagcatttttttactgcattctagttgtggtttgt  
 ccaaactcatcaatgtatcttaacgcgtgcaagttcctattctctagaaaagtataggaacttcatcgataccggg  
 taggggagggcgttttcccaggcagtctggagcatgcgcttttagcagccccgctgggcaacttggcgctacacaag  
 tggcctctggcctcgcacacattccacatccccggtaggcgccaaccggctccgttctttggggcccttcgcg  
 ccaccttctactcctccccctagtcaggaagttccccccgccccgcagctcgcgctgtgcaggacgtgacaaatgg  
 aagtagcacgtctcactagctcgtgcagatggacagcaccgctgagcaatggaagcgggtaggccttggggcgag  
 cggccaatagcagctttgctccttcgctttctgggctcagaggctgggaaggggtgggtccgggggagggtcagg  
 ggggggctcaggggaggggcgggcgccccgaaggtcctccggaggcccgcatctgcacgcttcaaaagcgcacgt  
 ctgcccgcgtgttctcctcttctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct  
 caagcccacggtgcgctcgcaccgcgacgacgtccccagggcgtacgcacctcgcgcgcgcttcgcccagc  
 tccccgccacgcgccacaccgtcgatccggaccgccacatcgagcgggtcaccgagctgcaagaactcttctca  
 cgcgcgctcgggctcgacatcggcaaggtgtgggtcgcggacgacggcgcccggtggcggtctggaccacgccgga  
 gagcgtcgaagcggggcggtgttcgcccagatcggcccgcgcatggccgagttgagcgggtcccggtggccgcg  
 cagcaacagatggaaggcctcctggcgccgaccggcccaaggagcccgcgtggttctggccaccgtcggcgctc  
 cgcccgaccaccagggcaaggtctgggcagcgcctcgtgctccccggagtggaggcggccgagcgcgcccgggt  
 gcccgccttctggagacctcgcgccccgcaacctcccccttctacgagcggctcggcttaccgtcaccgccgac  
 gtcgaggtgcccgaaggaccgcgacctggtgcatgaccgcaagcccgggtgcctgaggtacctctcatgctggag  
 ttcttcgcccaccccaacttgtttattgcagcttataatggttacaataaagcaatagcatcacaatttcacaa  
 ataaagcatttttttactgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcagatgaagttc  
 ctattctctagaaaagtataggaacttctaacctcccgggtgacagataacttcgtataatgtatgctatacgaagt  
 tatgtcgacgcggcgcgccgaattataataactaacttactgaagaaaatgcccaaaagatggtaagttcttgagg  
 ctaccagggggttattgattgcttcttaagatcagaattactgcctataaaactggataaggaaatcatagaga  
 tctctcaagtgtgaggatgagtgactgcctctgtagctctgatcctagctcccagatggctaaattcaattgacc  
 ttagagttcatctgaaaaattgttatgaatgaatttttgcccagattccaaagatgagtgaaaatgtttaataaa  
 gttgccatcactattctcattatatttggtatgtaaagcattcatgaaaatgttctaagtcgttattgagccaata  
 attttcttttagcttataatgccaacaggtctatccgagaactacaaatgacatattaactgaaaaatgcaactggg  
 gtttactgaaggcagcagcttagtaattaaggtaaccatggcttaggtgaaactggacctgggaattccttctttc  
 attgacacagagctctgaggaatttccaaaggtcacagaagaaaagctataattaaactagtccecaaaaaatctca  
 gcctactctgggaaagcagcatattttgtttgacaagtgaaggacttagaacttttttttctcactgatcctg  
 aagtgccttttaagtatagttaagtgggtgaaaaattgagcaactatttaagaaaagactctttttttcttcttcc  
 agcaatgctttcttcaaaacggtagcttcaaaacttctgtcttttaaatgatcaggggctgtgtgttttaatt  
 attgccattcatagaacagagtggtctgaggatgcctgtttctttgaaattctatgccccctcccagttttcta  
 aaatttaagaaaccacagagactttgacaatgtagttgccaaatgagttgcttttaactgctctaataagtttggtc  
 tt(seq id no:30)

[0211] PCR鉴定结果见图9,共鉴定了14株克隆,其中标注\*号为阳性克隆,同时PCR产物经测序结果匹配一致。此PCR结果阳性的小鼠胚胎干细胞克隆为成功编辑的人源化小鼠胚胎干细胞模型,但其中还保留有PGK-Puro筛选标志,由于PGK-Puro两端具有一对同向的frt位点,因此可以利用FLP重组酶去除从而解决转基因引起的安全问题。

[0212] PGK-Puro筛选标志的删除方法如下:

[0213] 将上述PCR结果阳性的小鼠胚胎干细胞继续培养至6cm盘,通过配套使用Nucleofector™ IIs/2b电转仪以及Mouse ES Cell Nucleofector® Kit (Lonza, VPH-1001)小鼠胚胎干细胞电转试剂盒,使用A023程序,约 $2 \times 10^6$ 个细胞被电穿孔,并且所述电转过程含有pPGK-FLPo质粒(Addgene, 13793)的100 $\mu$ L电转缓冲液中进行。所述转染细胞被种到6个12孔板的孔中,3天后,采取玻璃拉针吸取单克隆的方式挑取小鼠胚胎干细胞克隆进96孔板中培养,第二天将单克隆消化传代一分为二,一份进行嘌呤霉素筛选,一份正常培养。若成功删除PGK-Puro抗性筛选标志,则嘌呤霉素筛选后细胞不耐受死亡。嘌呤霉素不耐受相对应的克隆可使用上游引物(hACE2-F:tgatagtggttgccattgt (SEQ ID NO:31))和下游引物(3arm-outR:tacagccaggatctggatgtcagc (SEQ ID NO:29))进行基因组基因型PCR鉴定。若成功删除PGK-Puro筛选标志,则PCR产物长度为1532bp,删除PGK-Puro前的PCR产物长度为2863bp。基因型鉴定结果如图9所示,跑胶条带在1500bp处的为成功删除PGK-puro后的克隆,条带在3000bp处的为删除前克隆。嘌呤霉素不耐受相对应的克隆则为最终成功编辑为人源化ACE2打靶的小鼠胚胎干细胞,也就是小鼠胚胎干细胞最终获得如图10所示的人源化ACE2基因。最终删除PGK-puro后小鼠胚胎干细胞Ace2位点基因组序列替换为SEQ ID NO:32,如下所示:

[0214] ccctatggagtgagagaagagctttataatTTTTTaaatgggcagagaaatgaatttttttaatttttagagacagggtttctttgtatagctctagctgtctttgattggtagacaaagctgtcctcaaactcagagatcttccttctttgtctcctgagtgctgggattaaaggcatggaccaccactgccctgccccattctctcattaatttt aagtgaatgcttgcaaaagctcacttctttggtgaacagcttctttacaaataagtacctttgccttcgttttta taggattcttaaaaagaaaaaaagattcagccaggtggttgtggtgcacaccttaatcccagcagtcaggaggc agaggaaagcagatctcttgagtttgaggctagcctagtctacagagggagttccaggacagccaaggctacagag aggaactgtctaaaaacaccaagaaagagagaaaggagagaggagaggatggatagcttattgatagaattgtca gaaaaggctataagttccaatatgtgtcccatgatttctaagcttagccctttctgttatagtaaaatcatagtac accctcctcctccagtgatctttaacagcttttaaggaacatattaactaaatgtccaggttttgatttgccat aaaatgtagcaaaagctaaggtttcttaggattaatgaataacatgtctttatttagtttacttaaaaaaatcatt ctaaaatatctgtttacatatctgtcctctccaggattaacttcatattgggtccagcagcttgtttactgttctct tctgtttcttcttctgcttttttttcttcttctcagtgcccaaccaagttcaaaggctgatgagagagaaaa actcatgaagagattttactctagggaaagttgctcagtgatgggatcttggcgcacggggaaagatgtcaagct ctctctggctccttctcagccttgttgctgtaactgctgctcagtcaccattgaggaacaggccaagacatTTTT ggacaagtttaaccacgaagccgaagacctgttctatcaaagttcacttgcttcttgaattataacaccaatatt actgaagagaatgtccaaaacatgaataatgctggggacaaatgggtctgccttttaaggaacagttccacacttg cccaaatgtatccactacaagaaattcagaatctcacagtcagcttcagctgcaggtcttccagcaaaatgggtc tttagtgctctcagaagacaagagcaaacggttgaacacaattctaaatacaatgagcaccatctacagtactgga aaagtttgaaccagataatccacaagaatgcttattacttgaaccaggttgaatgaataatggcaaacagtt

tagactacaatgagaggctctgggcttgggaaagctggagatctgaggtcggcaagcagctgaggccattatatga  
agagtatgtggtcttgaaaaatgagatggcaagagcaaatcattatgaggactatggggattattggagaggagac  
tatgaagtaaatgggtagatggctatgactacagccgcgccagttgattgaagatgtggaacatacctttgaag  
agattaaaccattatatgaacatcttcatgcctatgtgagggcaaagttgatgaatgcctatccttcctatatcag  
tccaattggatgcctccctgctcatttgcttggatgatgtgggtagattttggacaaatctgtactctttgaca  
gttccctttggacagaaaccaaactagatgttactgatgcaatggtggaccaggcctgggatgcacagagaatat  
tcaaggaggccgagaagttctttgtatctgttggcttccctaataatgactcaaggattctgggaaaattccatgct  
aacggaccaggaaatgttcagaaagcagctgcatcccacagcttgggacctggggaagggcgacttcaggatc  
cttatgtgcacaaaggtgacaatggacgacttctgacagctcatcatgagatggggcatatccagtatgatatgg  
catatgctgcacaacctttctgctaagaaatggagctaataagagattccatgaagctgttggggaatcatgct  
actttctgcagccacacctaagcatttaaaatccattggcttctctgtcaccggattttcaagaagacaatgaaaca  
gaaataaacttctgctcaacaagcactcacgattgttgggactctgccatttacttacatgttagagaagtgga  
ggtggatggtctttaaaggggaaattcccaaagaccagtggatgaaaaagtggtgggagatgaagcgagagatagt  
tggggtggtggaacctgtgccccatgatgaacatactgtgacccccgatctctgttccatgtttctaatagttac  
tcattcattcgatattacacaaggacctttaccaattccagtttcaagaagcactttgtcaagcagctaaacatg  
aaggccctctgcacaaatgtgacatctcaaactctacagaagctggacagaaactgttcaatatgctgaggcttgg  
aaaatcagaacctggacctagcattggaaaatgtttagtaggagcaagaacatgaatgtaaggccactgctcaac  
tactttgagcccttatttacctggctgaaagaccagaacaagaattctttgtgggatggagtaccgactggagtc  
catatgcagaccaaagcatcaaagtgaggataagcctaaaatcagctcttggagataaagcatatgaatggaacga  
caatgaaatgtacctgttccgatcatctgttgcataatgctatgaggcagctctttaaagtaaaaaatcagatg  
attctttttggggaggaggatgtgcgagtggctaatttgaaccaagaatctcctttaaattctttgtcactgcac  
ctaaaaatgtgtctgatatcattcctagaactgaagttgaaaaggccatcaggatgtcccggagccgtatcaatga  
tgctttccgtctgaatgacaacagcctagagtttctggggatacagccaacacttggacctcctaaccagccccct  
gtttccatattggctgattgtttttggagttgtgatgggagtgatagtggttggcattgtcatcctgatcttactg  
ggatcagagatcggagaagaaaaataaagcaagaagtggagaaaaatccttatgcctccatcgatattagcaaagg  
agaaaataatccaggattccaaaactgatgatgttcagacctccttttagaacttgtttattgcagcttataat  
ggttacaaataaagcaatagcatcacaatttcacaaataaagcatttttttactgcattctagttgtggtttgt  
ccaaactcatcaatgtatcttaacgctgcaagttcctattctctagaaagtataggaacttctaacctcccggg  
tgacagataacttctgataatgtatgctatacgaagttatgtcgacgcggcgccgaattataataactaacatta  
ctgaagaaaatgcccaaaagatggtaagttctttaggctaccagggggttattgattgcttcttaaagatcagaa  
ttactgcctataaaaactggataaggaaatcatagagatctctcaagtgtaggatgagtgactgcctctgtagctc  
tgatcctagctctccagatggctaaattcaattgaccttagagttcatctggaaaattgttatgaatgaattattt  
gcccagattccaaagatgagtgaatgttttaataaagttgccatcactattctcattatatttggtatgtaaagc  
attcatggaaatgttctaagtcgttattgagccaataattttcttttagcttataatgccaacaggtctatccgaga  
actacaaatgacatattaactgaaaaatgcaactggggtttactgaaggcagcagcttagtaattaaggtaacat  
ggcttaggtgaaactggacctgggaattccttctttcattgacacagagctctgaggaatttccaaaggtcacaga  
agaaaagctataatataactagtcccaaaaaatctcagcctactctgggaaagcagcatattttgtttgacaagtg  
caaggacttagaacttttttttctcactgatcctgaagtgccttttaagtatagttaagtggtggaatggag  
caactatttaagaaaagactctttttttcttcttccagcaatgctttccttcaaacggtagcttcaaaccttcc

tgtcttttaaatgatcagggggctgtgtgttttaattattgcccattcatagaacagagtgggtctgaggatgcctg  
 tttcctttgaaattctatgccccctcccagttttctaaaatttaagaaaccacagagactttgacaatgtagtgtgc  
 caaatgagttgcttttaactgctctaataagtttggtctt(seq id no:32)

[0215] 实施例7人源化ACE2基因改造小鼠的形成

[0216] 1、腹腔注射7.5单位PMSG到4-10周龄B6C3F1雌鼠,48小时后注射hCG并与CD1种公鼠合笼,次日早上检查雌鼠阴栓并将有阴栓的雌鼠挑出,记录雌鼠相应的受精时间。

[0217] 2、下一日将孕鼠进行颈椎脱臼法安乐死,70%酒精消毒小鼠腹部,用辅料镊子和眼科剪刀剪开腹部皮肤和肌肉层,打开腹腔。用镊子抓住一个子宫角的上部,用剪刀在靠近输卵管的膜上开一个小口,将输卵管和卵巢连接处剪断,将输卵管和附带的子宫移至35mm培养皿中,用镊子固定好输卵管伞口端,用装填好M2培养液(Hogan, B. (1994). Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual, 2nd edn (Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press).)的冲洗针轻轻插入伞口,用0.1mL的M2培养液冲洗输卵管,用移卵管收集冲出的胚胎并用M2清洗3次,收集E1.5的小鼠2-细胞胚胎。

[0218] 3、对收集到的小鼠胚胎放入含0.1mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1mM CaCl<sub>2</sub>和0.3%牛血清白蛋白的0.3M甘露醇(Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO)中,用Cellfusion CF-150/B电融合仪和250-um融合槽(BLS Ltd., Budapest, Hungary)进行60V 50微秒直流电融合,获得4倍体胚胎;放入KSOM培养基(Summers, M.C., McGinnis, L.K., Lawitts, J.A., Raffin, M., and Biggers, J.D. (2000). IVF of mouse ova in a simplex optimized medium supplemented with amino acids. Hum Reprod 15, 1791-1801.),于CO<sub>2</sub>培养箱中培养24小时后用酸性台氏液(Sigma-Aldrich, T1788)去掉透明带,与胚胎干细胞(即本申请制备的人源化ACE2小鼠胚胎干细胞)聚集,形成嵌合体胚胎(Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., and Roder, J.C. (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 90, 8424-8428.)。

[0219] 4、于CO<sub>2</sub>培养箱中培养过夜,移植到E2.5天的假孕鼠子宫,17天后在将代孕鼠颈椎脱臼法安乐死后进行剖腹手术,存活和呼吸的新生鼠放入代乳鼠笼内,21天后断奶,获得完全来自胚胎干细胞的转基因小鼠,即得人源化ACE2基因改造小鼠(图12)。

[0220] 相应的培养基配方如表7所示。

[0221] 表7培养基配方

培养基	KSOM (200 mL)	M2(200 mL)
EDTA(disodium 0.01mM)	0.00076 g	/
NaCl	1.119 g	1.1068 g
KCl	0.037 g	0.070 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.71 mM	1.71 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.0095 g	0.032 g
MgSO <sub>4</sub>	0.00482 g	0.0283 g
NaHCO <sub>3</sub>	0.420 g	0.070 g
Na lactate	0.280 mL	0.62 mL
Na pyruvate	0.0044 g	0.0073 g

[0222]

[0223]	Glucose	0.0072 g	0.1 g
	Pen/Strep/Glu	1 mL	2 mL
	HEPES	/	0.994 g
	EDTA (100mM)	/	200 $\mu$ L
	Gentamycin	/	200 $\mu$ L
	Phenol red (0.5%)	20 $\mu$ L	100 $\mu$ L
	BSA	0.2 g	0.8 g
	水	加水至 200 mL	加水至 200 mL

[0224] 实施例8人源化ACE2基因改造小鼠的hACE2表达验证

[0225] 取一只野生型小鼠以及一只人源化ACE2基因改造小鼠(实施例7制备得到的)的小肠、肺以及肾脏样品,用于RNA提取以及qPCR验证hACE2基因表达情况。组织样品加入Trizol试剂裂解。每毫升的Trizol裂解液中加入200 $\mu$ l氯仿,剧烈震荡后静置至分层,重复操作3次后,4 $^{\circ}$ C,14000rpm离心15min,取上清400 $\mu$ l至预冷的400 $\mu$ l异丙醇中,颠倒混匀,冰上静置5min,4 $^{\circ}$ C,14000rpm离心10min,在EP管底部可见白色沉淀,为RNA。

[0226] 弃上清,加入预冷的70%乙醇溶液,洗涤一次,离心,去掉乙醇,将RNA晾干至无色透明,按照沉淀多少,加入适量RNase-free H<sub>2</sub>O,60 $^{\circ}$ C水浴至完全溶解。分别取1 $\mu$ l,用10mM Tris-HCl (pH 7.5)以及H<sub>2</sub>O稀释50倍测定纯度及浓度,OD260/280的值为2.0左右为宜。提完的RNA存放于-80 $^{\circ}$ C,可长期保存。

[0227] 取2 $\mu$ g RNA进行反转,体系如表8所示。反转得到的cDNA样品稀释30倍后,进一步用来做荧光定量PCR检测基因表达情况,hACE2检测qPCR引物如下(hACE2-qF:GGTCTTCAGTGCTCTCAG (SEQ ID NO:33);hACE2-qR:GCATTCTTGTGGATTATCTGG (SEQ ID NO:34)),并可见人源化ACE2基因改造小鼠在RNA水平上表达人ACE2并具有组织特异性(图13)。

[0228] 表8

[0229]	Total RNA	2 $\mu$ g
	dNTP	3 $\mu$ L
	Oligo 18T	3 $\mu$ L
	反转酶	1 $\mu$ L
	H <sub>2</sub> O	18 $\mu$ l (包括所述 RNA 的体积)

[0230] 另外再取人源化ACE2基因改造小鼠的小肠、肺以及睾丸组织进行免疫荧光组织蛋白水平验证人ACE2表达情况。将小鼠组织在4%PFA中于4 $^{\circ}$ C固定过夜。第二天,将组织在PBS中漂洗3次,并在4 $^{\circ}$ C在PBS中的30%蔗糖中冷冻保护过夜。然后将组织在30%蔗糖/PBS和O.C.T.按1:1混合物中孵育2-4小时。冷冻嵌入培养基(Sakura,目录号4583)。接下来,将组织从蔗糖/OCT混合物中转移到低温模具中,并用O.C.T.填充。将包埋的组织在干冰上冷冻,然后保存在-80 $^{\circ}$ C直至低温恒温器切片。使用低温恒温器将冷冻的类器官组织切成20 $\mu$ m切片,并收集在superfrost Ultra Plus载玻片上。将切片干燥过夜,然后用于免疫荧光。在室温下,将4%PFA直接后固定在载玻片上10分钟,然后在PBS中洗涤3x10次。使用疏水性PAP笔勾勒出组织区域的轮廓。使用含0.05%叠氮化钠的5%BSA/0.3%TX100的PBS封闭,并在室温下孵育30分钟。然后将组织与抗ACE2抗体(ET1611-58,Huabio)在4 $^{\circ}$ C孵育过夜。PBS洗涤

后,二抗(A11004,Invitrogen)孵育1小时,然后DAPI 2分钟。最后,将盖玻片安装在载玻片上进行观察,可从组织免疫荧光结果中看出人ACE2在蛋白表达水平上在人源化ACE2基因改造小鼠组织上特异表达(图14)。

[0231] 实施例9 SARS-CoV-2感染人源化ACE2基因改造小鼠

[0232] 人源化ACE2基因改造小鼠通过滴鼻吸入 $30\mu\text{l}$  DMEM,内含 $2\times 10^6\text{TCID}_{50}$ 病毒载量的SARS-CoV-2,对照组则滴入 $30\mu\text{L}$  DMEM。分别在D1、D3、D5、D6、D7以及D9取感染小鼠的肺、气道和小肠组织用Trizol裂解并进行RNA提取以及荧光定量PCR检测SARS-CoV-2病毒滴度, RNA提取方法同上述hACE2表达检测实施例一致。提取得到的组织RNA将使用THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit(Toyobo)试剂盒对SARS-CoV-2的核蛋白N基因进行检测。荧光定量PCR检测所用到的引物如下:正向引物:5' -GGGGAAGTTCTCCTGCTAGAAT-3' (SEQ ID NO:35);反向引物:5' -CAGACATTTTGCTCTCAAGCTG-3' (SEQ ID NO:36),TaqMan探针序列为5' -FAM-TTGCTGCTGCTTGACAGATT-TAMRA-3' (SEQ ID NO:37),结果可见人源化ACE2基因改造小鼠经SARS-CoV-2感染后肺、气道及小肠在D1、D3病毒载量达到顶峰,随之下降,表明本人源化ACE2基因改造小鼠对SARS-CoV-2易感(图15)。而对照组小鼠并未检测到病毒。图15中的折线表示平均值。

		序列表	
[0001]			
[0002]	<110>	生物岛实验室	
[0003]	<120>	人源化ACE2基因改造小鼠模型的制备方法及应用	
[0004]	<150>	202010151592.2	
[0005]	<151>	2020-03-06	
[0006]	<160>	37	
[0007]	<170>	SIPOSequenceListing 1.0	
[0008]	<210>	1	
[0009]	<211>	23	
[0010]	<212>	DNA	
[0011]	<213>	Natural sequence	
[0012]	<220>		
[0013]	<223>	sgRNA1序列	
[0014]	<400>	1	
[0015]		tactgctcag tccctcaccg agg	23
[0016]	<210>	2	
[0017]	<211>	23	
[0018]	<212>	DNA	
[0019]	<213>	Natural sequence	
[0020]	<220>		
[0021]	<223>	sgRNA2序列	
[0022]	<400>	2	
[0023]		cttggcattt tcctcggatga ggg	23
[0024]	<210>	3	
[0025]	<211>	23	
[0026]	<212>	DNA	
[0027]	<213>	Natural sequence	
[0028]	<220>		
[0029]	<223>	sgRNRA3序列	
[0030]	<400>	3	
[0031]		caagtgaact ttgataagac agg	23
[0032]	<210>	4	
[0033]	<211>	25	
[0034]	<212>	DNA	
[0035]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0036]	<220>		
[0037]	<223>	合成sgRNA2的上游单链引物序列	
[0038]	<400>	4	
[0039]		caccgcttgg cattttcctc ggtga	25
[0040]	<210>	5	
[0041]	<211>	25	

[0042]	<212> DNA	
[0043]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0044]	<220>	
[0045]	<223> 合成sgRNA2的下游单链引物序列	
[0046]	<400> 5	
[0047]	aaactcaccg aggaaaatgc caagc	25
[0048]	<210> 6	
[0049]	<211> 25	
[0050]	<212> DNA	
[0051]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0052]	<220>	
[0053]	<223> 合成sgRNA1的上游单链引物序列	
[0054]	<400> 6	
[0055]	caccgtactg ctcagtcct caccg	25
[0056]	<210> 7	
[0057]	<211> 25	
[0058]	<212> DNA	
[0059]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0060]	<220>	
[0061]	<223> 合成sgRNA1的下游单链引物序列	
[0062]	<400> 7	
[0063]	aaaccggtga gggactgagc agtac	25
[0064]	<210> 8	
[0065]	<211> 25	
[0066]	<212> DNA	
[0067]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0068]	<220>	
[0069]	<223> 合成sgRNA3的上游单链引物序列	
[0070]	<400> 8	
[0071]	caccgcaagt gaactttgat aagac	25
[0072]	<210> 9	
[0073]	<211> 25	
[0074]	<212> DNA	
[0075]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0076]	<220>	
[0077]	<223> 合成sgRNA3的下游单链引物序列	
[0078]	<400> 9	
[0079]	aaacgtctta tcaaagttca cttgc	25
[0080]	<210> 10	
[0081]	<211> 28	
[0082]	<212> DNA	
[0083]	<213> Natural sequence	



[0084]	<220>		
[0085]	<223>	5arm-sgF	
[0086]	<400>	10	
[0087]		ggttttgatt tggccataaa atgttagc	28
[0088]	<210>	11	
[0089]	<211>	25	
[0090]	<212>	DNA	
[0091]	<213>	Natural sequence	
[0092]	<220>		
[0093]	<223>	3arm-sgR	
[0094]	<400>	11	
[0095]		attcccaggt ccagtttcac ctaag	25
[0096]	<210>	12	
[0097]	<211>	2418	
[0098]	<212>	DNA	
[0099]	<213>	Natural sequence	
[0100]	<220>		
[0101]	<223>	hACE2-CDS序列	
[0102]	<400>	12	
[0103]		atgtcaagct cttcctggct ctttctcagc cttgttgetg taactgetgc tcagtccacc	60
[0104]		attgaggaac aggccaaagac atttttggac aagtttaacc acgaagccga agacctgttc	120
[0105]		tatcaaagtt cacttgcttc ttggaattat aacaccaata ttactgaaga gaatgtccaa	180
[0106]		aacatgaata atgctgggga caaatggtct gcctttttaa aggaacagtc cacacttgcc	240
[0107]		caaatgtatc cactacaaga aattcagaat ctcacagtca agcttcagct gcaggctctt	300
[0108]		cagcaaaatg ggtcttcagt gctctcagaa gacaagagca aacggttgaa cacaattcta	360
[0109]		aatacaatga gcaccatcta cagtactgga aaagtttcta acccagataa tccacaagaa	420
[0110]		tgcttattac ttgaaccagg tttgaatgaa ataatggcaa acagtttaga ctacaatgag	480
[0111]		aggctctggg cttgggaaag ctggagatct gaggtcggca agcagctgag gccattatat	540
[0112]		gaagagtatg tggctctgaa aatgagatg gcaagagcaa atcattatga ggactatggg	600
[0113]		gattattgga gaggagacta tgaagtaaat ggggtagatg gctatgacta cagccgcggc	660
[0114]		cagttgattg aagatgtgga acataccttt gaagagatta aaccattata tgaacatctt	720
[0115]		catgctatg tgagggcaaa gttgatgaat gcctatcctt cctatatcag tccaattgga	780
[0116]		tgctccctg ctcaattgct tggatgatg tgggtagat tttggacaaa tctgtactct	840
[0117]		ttgacagttc cttttggaca gaaaccaaac atagatgta ctgatgcaat ggtggaccag	900
[0118]		gcctgggatg cacagagaat attcaaggag gccgagaagt tctttgtatc tgttggctct	960
[0119]		cctaataatga ctcaaggatt ctgggaaaat tccatgctaa cggaccagg aatgttcag	1020
[0120]		aaagcagtct gccatccac agcttgggac ctggggaagg gcgacttcag gatccttatg	1080
[0121]		tgcacaaagg tgacaatgga cgacttctg acagctcctc atgagatggg gcatatccag	1140
[0122]		tatgatatgg catatgctgc acaaccttt ctgctaagaa atggagctaa tgaaggattc	1200
[0123]		catgaagctg ttggggaat catgtcactt tctgcagcca cacctaagca tttaaatcc	1260
[0124]		attggtcttc tgtcacccga ttttcaagaa gacaatgaaa cagaaataaa cttcctgctc	1320
[0125]		aaacaagcac tcacgattgt tgggactctg ccatttactt acatgttaga gaagtggagg	1380

[0126]	tgatggtct ttaaagggga aattccaaa gaccagtga tgaaaaagt gtgggagatg	1440
[0127]	aagcagaga tagttgggt ggtggaacct gtgcccatg atgaaacata ctgtgacccc	1500
[0128]	gcattctgt tccatgttc taatgattac tcattcattc gatattacac aaggaccett	1560
[0129]	taccaattcc agtttcaaga agcactttgt caagcagcta aacatgaagg ccctctgca	1620
[0130]	aatgtgaca tctcaactc tacagaagct ggacagaaac tgttcaatat gctgaggctt	1680
[0131]	ggaaaatcag aaccctggac cctagcattg gaaaatgtg taggagcaaa gaacatgaat	1740
[0132]	gtaaggccac tgctcaacta ctttgagccc ttatttacct ggctgaaaga ccagaacaag	1800
[0133]	aattcttttg tgggatggag taccgactgg agtccatag cagaccaaag catcaaagt	1860
[0134]	aggataagcc taaaatcagc tcttgagat aaagcatatg aatggaacga caatgaaatg	1920
[0135]	tacctgttcc gatcatctgt tgcatatgct atgaggcagt actttttaa agtaaaaaat	1980
[0136]	cagatgattc ttttgggga ggaggatgt cgagtggcta atttgaaacc aagaatctcc	2040
[0137]	tttaatttct ttgtcactgc acctaaaaat gtgtctgata tcattcctag aactgaagt	2100
[0138]	gaaaagcca tcaggatgtc ccggagccgt atcaatgatg ctttccgtct gaatgacaac	2160
[0139]	agcctagagt ttctgggat acagccaaca cttggacctc ctaaccagcc ccctgtttcc	2220
[0140]	atatggctga ttgttttg agttgtgatg ggagtgatag tggttggcat tgtcatcctg	2280
[0141]	atcttactg ggatcagaga tcggaagaag aaaaataaag caagaagtgg agaaaatcct	2340
[0142]	tatgcctcca tcgatattag caaaggagaa aataatccag gattccaaa cactgatgat	2400
[0143]	gttcagacct ctttttag	2418
[0144]	<210> 13	
[0145]	<211> 805	
[0146]	<212> PRT	
[0147]	<213> Natural sequence	
[0148]	<220>	
[0149]	<223> hACE2-protein序列	
[0150]	<400> 13	
[0151]	Met Ser Ser Ser Ser Trp Leu Leu Leu Ser Leu Val Ala Val Thr Ala	
[0152]	1 5 10 15	
[0153]	Ala Gln Ser Thr Ile Glu Glu Gln Ala Lys Thr Phe Leu Asp Lys Phe	
[0154]	20 25 30	
[0155]	Asn His Glu Ala Glu Asp Leu Phe Tyr Gln Ser Ser Leu Ala Ser Trp	
[0156]	35 40 45	
[0157]	Asn Tyr Asn Thr Asn Ile Thr Glu Glu Asn Val Gln Asn Met Asn Asn	
[0158]	50 55 60	
[0159]	Ala Gly Asp Lys Trp Ser Ala Phe Leu Lys Glu Gln Ser Thr Leu Ala	
[0160]	65 70 75 80	
[0161]	Gln Met Tyr Pro Leu Gln Glu Ile Gln Asn Leu Thr Val Lys Leu Gln	
[0162]	85 90 95	
[0163]	Leu Gln Ala Leu Gln Gln Asn Gly Ser Ser Val Leu Ser Glu Asp Lys	
[0164]	100 105 110	
[0165]	Ser Lys Arg Leu Asn Thr Ile Leu Asn Thr Met Ser Thr Ile Tyr Ser	
[0166]	115 120 125	
[0167]	Thr Gly Lys Val Cys Asn Pro Asp Asn Pro Gln Glu Cys Leu Leu Leu	

[0168]	130	135	140
[0169]	Glu Pro Gly Leu Asn Glu Ile Met Ala Asn Ser Leu Asp Tyr Asn Glu		
[0170]	145	150	155 160
[0171]	Arg Leu Trp Ala Trp Glu Ser Trp Arg Ser Glu Val Gly Lys Gln Leu		
[0172]		165	170 175
[0173]	Arg Pro Leu Tyr Glu Glu Tyr Val Val Leu Lys Asn Glu Met Ala Arg		
[0174]		180	185 190
[0175]	Ala Asn His Tyr Glu Asp Tyr Gly Asp Tyr Trp Arg Gly Asp Tyr Glu		
[0176]		195	200 205
[0177]	Val Asn Gly Val Asp Gly Tyr Asp Tyr Ser Arg Gly Gln Leu Ile Glu		
[0178]		210	215 220
[0179]	Asp Val Glu His Thr Phe Glu Glu Ile Lys Pro Leu Tyr Glu His Leu		
[0180]		225	230 235 240
[0181]	His Ala Tyr Val Arg Ala Lys Leu Met Asn Ala Tyr Pro Ser Tyr Ile		
[0182]		245	250 255
[0183]	Ser Pro Ile Gly Cys Leu Pro Ala His Leu Leu Gly Asp Met Trp Gly		
[0184]		260	265 270
[0185]	Arg Phe Trp Thr Asn Leu Tyr Ser Leu Thr Val Pro Phe Gly Gln Lys		
[0186]		275	280 285
[0187]	Pro Asn Ile Asp Val Thr Asp Ala Met Val Asp Gln Ala Trp Asp Ala		
[0188]		290	295 300
[0189]	Gln Arg Ile Phe Lys Glu Ala Glu Lys Phe Phe Val Ser Val Gly Leu		
[0190]		305	310 315 320
[0191]	Pro Asn Met Thr Gln Gly Phe Trp Glu Asn Ser Met Leu Thr Asp Pro		
[0192]		325	330 335
[0193]	Gly Asn Val Gln Lys Ala Val Cys His Pro Thr Ala Trp Asp Leu Gly		
[0194]		340	345 350
[0195]	Lys Gly Asp Phe Arg Ile Leu Met Cys Thr Lys Val Thr Met Asp Asp		
[0196]		355	360 365
[0197]	Phe Leu Thr Ala His His Glu Met Gly His Ile Gln Tyr Asp Met Ala		
[0198]		370	375 380
[0199]	Tyr Ala Ala Gln Pro Phe Leu Leu Arg Asn Gly Ala Asn Glu Gly Phe		
[0200]		385	390 395 400
[0201]	His Glu Ala Val Gly Glu Ile Met Ser Leu Ser Ala Ala Thr Pro Lys		
[0202]		405	410 415
[0203]	His Leu Lys Ser Ile Gly Leu Leu Ser Pro Asp Phe Gln Glu Asp Asn		
[0204]		420	425 430
[0205]	Glu Thr Glu Ile Asn Phe Leu Leu Lys Gln Ala Leu Thr Ile Val Gly		
[0206]		435	440 445
[0207]	Thr Leu Pro Phe Thr Tyr Met Leu Glu Lys Trp Arg Trp Met Val Phe		
[0208]		450	455 460
[0209]	Lys Gly Glu Ile Pro Lys Asp Gln Trp Met Lys Lys Trp Trp Glu Met		

[0210]	465	470	475	480
[0211]	Lys Arg Glu Ile Val Gly Val Val Glu Pro Val Pro His Asp Glu Thr			
[0212]		485	490	495
[0213]	Tyr Cys Asp Pro Ala Ser Leu Phe His Val Ser Asn Asp Tyr Ser Phe			
[0214]		500	505	510
[0215]	Ile Arg Tyr Tyr Thr Arg Thr Leu Tyr Gln Phe Gln Phe Gln Glu Ala			
[0216]		515	520	525
[0217]	Leu Cys Gln Ala Ala Lys His Glu Gly Pro Leu His Lys Cys Asp Ile			
[0218]		530	535	540
[0219]	Ser Asn Ser Thr Glu Ala Gly Gln Lys Leu Phe Asn Met Leu Arg Leu			
[0220]	545	550	555	560
[0221]	Gly Lys Ser Glu Pro Trp Thr Leu Ala Leu Glu Asn Val Val Gly Ala			
[0222]		565	570	575
[0223]	Lys Asn Met Asn Val Arg Pro Leu Leu Asn Tyr Phe Glu Pro Leu Phe			
[0224]		580	585	590
[0225]	Thr Trp Leu Lys Asp Gln Asn Lys Asn Ser Phe Val Gly Trp Ser Thr			
[0226]		595	600	605
[0227]	Asp Trp Ser Pro Tyr Ala Asp Gln Ser Ile Lys Val Arg Ile Ser Leu			
[0228]		610	615	620
[0229]	Lys Ser Ala Leu Gly Asp Lys Ala Tyr Glu Trp Asn Asp Asn Glu Met			
[0230]	625	630	635	640
[0231]	Tyr Leu Phe Arg Ser Ser Val Ala Tyr Ala Met Arg Gln Tyr Phe Leu			
[0232]		645	650	655
[0233]	Lys Val Lys Asn Gln Met Ile Leu Phe Gly Glu Glu Asp Val Arg Val			
[0234]		660	665	670
[0235]	Ala Asn Leu Lys Pro Arg Ile Ser Phe Asn Phe Phe Val Thr Ala Pro			
[0236]		675	680	685
[0237]	Lys Asn Val Ser Asp Ile Ile Pro Arg Thr Glu Val Glu Lys Ala Ile			
[0238]		690	695	700
[0239]	Arg Met Ser Arg Ser Arg Ile Asn Asp Ala Phe Arg Leu Asn Asp Asn			
[0240]	705	710	715	720
[0241]	Ser Leu Glu Phe Leu Gly Ile Gln Pro Thr Leu Gly Pro Pro Asn Gln			
[0242]		725	730	735
[0243]	Pro Pro Val Ser Ile Trp Leu Ile Val Phe Gly Val Val Met Gly Val			
[0244]		740	745	750
[0245]	Ile Val Val Gly Ile Val Ile Leu Ile Phe Thr Gly Ile Arg Asp Arg			
[0246]		755	760	765
[0247]	Lys Lys Lys Asn Lys Ala Arg Ser Gly Glu Asn Pro Tyr Ala Ser Ile			
[0248]		770	775	780
[0249]	Asp Ile Ser Lys Gly Glu Asn Asn Pro Gly Phe Gln Asn Thr Asp Asp			
[0250]	785	790	795	800
[0251]	Val Gln Thr Ser Phe			

[0252]		805	
[0253]	<210>	14	
[0254]	<211>	122	
[0255]	<212>	DNA	
[0256]	<213>	Natural sequence	
[0257]	<220>		
[0258]	<223>	SV40 polyA序列	
[0259]	<400>	14	
[0260]	aacttg	tta ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca	60
[0261]	aataaagcat	tttttccact gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct	120
[0262]	ta		122
[0263]	<210>	15	
[0264]	<211>	970	
[0265]	<212>	DNA	
[0266]	<213>	Natural sequence	
[0267]	<220>		
[0268]	<223>	5' 同源臂序列	
[0269]	<400>	15	
[0270]	ccctatggag	tggagaagag tcttataaatt ttttaaattgg gcagagaaat gaatttattt	60
[0271]	ttaattttta	gagacagggt ttctttgat agctctagct gtctttgatt ggtagacaaa	120
[0272]	gctgtcctca	aactcagaga tcttccttc tttgtctcct gagtgtctggg attaaaggca	180
[0273]	tggaccacca	ctgccctgcc ccattctctc cattaatttt aagtgaatgc ttgcaaaagc	240
[0274]	tcacttcttt	ggtgaacagc ttcctttaca aataagtacc tttgccttcg tttttatagg	300
[0275]	attcttaaaa	agaaaaaaaa gattcagcca ggtggtttgt gtgcacacct ttaatcccag	360
[0276]	cagtcaggag	gcagaggaaa gcagatctct tgagtttgag gctagcctag tctacagagg	420
[0277]	gagttccagg	acagccaagg ctacagagag gaactgtcta aaaacaccaa gaaagagaga	480
[0278]	aaggagagag	ggagaggatg gatagcttat tgatagaatt gtcagaaaag gctataagtt	540
[0279]	ccaatatgtg	tcccatgatt tctaagtcta gccctttctg ttatagtaa atcatagtac	600
[0280]	accctcctcc	tccagtgtat ctttaacagc ttttaaggaa catattaact aaatgtccag	660
[0281]	gttttgattt	ggccataaaa tgttagcaaa gctaaggttt tctaggatta atgaataaca	720
[0282]	tgtctttatt	tagtttactt aaaaaaatca ttctaaaata tctgtttaca tatctgtcct	780
[0283]	ctccaggatt	aacttcatat tgggtccagca gcttgtttac tgttctcttc tgtttcttct	840
[0284]	tctgcttttt	tttcttctc ttctcagtc ccaaccaag ttcaaaggct gatgagagag	900
[0285]	aaaaactcat	gaagagattt tactctaggg aaagttgctc agtggatggg atcttggcgc	960
[0286]	acggggaaag		970
[0287]	<210>	16	
[0288]	<211>	971	
[0289]	<212>	DNA	
[0290]	<213>	Natural sequence	
[0291]	<220>		
[0292]	<223>	3' 同源臂序列	
[0293]	<400>	16	

[0294]	gaattataat actaacatta ctgaagaaaa tgcccaaaag atggtaagtt cttgaggcta	60
[0295]	cccagggggt tattgattgc ttcttaaaga tcagaattac tgcctataaa actggataag	120
[0296]	gaaatcatag agatctctca agtgtgagga tgagtgactg cctctgtage tctgatccta	180
[0297]	gtctcccaga tggctaaatt caattgacct tagagtcat ctggaaaatt gttatgaatg	240
[0298]	aattatttgc ccagattcca aagatgagtg aaaatgttta ataaagttgc catcactatt	300
[0299]	ctcattatat ttggtatgta aagcattcat ggaaatgttc taagtcgta ttgagccaat	360
[0300]	aattttcttt agcttataat gccaacaggt ctatccgaga actacaaatg acatattaac	420
[0301]	tgaaaaatgc aactgggggt tactgaaggc agcagcttag taattaaggt aaccatggct	480
[0302]	taggtgaaac tggacctggg aattccttct ttattgaca cagagctctg aggaatttcc	540
[0303]	aaagtcaca gaagaaaagc tataattaa ctagtcccaa aaaatctcag cctactctgg	600
[0304]	gaaagcagca tattttgttt gacaagtga aggacttaga actttttttt ttctactga	660
[0305]	tcctgaagtg ctttttaagt atagttaagt ggtggaaaat tgagcaacta ttttaagaaa	720
[0306]	gactcttttt tttctcttc cagcaatgct ttcttcaaa acggtagctt caaaacttcc	780
[0307]	tgtcttttaa atgatcaggg ggctgtgtgt ttaaattatt gccattcata gaacagagtg	840
[0308]	ggtctgagga tgcctgttcc ctttgaatt ctatgcccc tcccagtttt ctaaaattta	900
[0309]	agaaaccaca gagacttga caatgtagtt gccaatgag ttgcttttaa ctgctcta	960
[0310]	agtttggctct t	971
[0311]	<210>	17
[0312]	<211>	1124
[0313]	<212>	DNA
[0314]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0315]	<220>	
[0316]	<223>	PGK-puro序列
[0317]	<400>	17
[0318]	gggtagggga ggcgcttttc ccaaggcagt ctggagcatg cgcttttagca gccccgctgg	60
[0319]	gcacttggcg ctacacaagt ggctctggc ctgcacaca ttccacatcc cccggtagge	120
[0320]	gccaaaccggc tccgttcttt ggtggcccct tcgcccacc ttctactcct ccctagtca	180
[0321]	ggaagtccc cccgccccg cagctcgcgt cgtgcaggac gtgacaaatg gaagtagcac	240
[0322]	gtctactag tctcgtcag atggacagca ccgctgagca atggaagcgg gtaggccttt	300
[0323]	ggggcagcgg ccaatagcag ctttgcctct tcgctttctg ggctcagagg ctgggaagg	360
[0324]	gtgggtccgg ggcgggctc agggcgggc tcagggcggg ggcgggcgcc cgaaggtcct	420
[0325]	ccggaggccc ggcattctgc acgcttcaaa agcgcacgtc tgccgcgctg ttctcctct	480
[0326]	cctcatctcc gggcctttcg acctgcagcc caagctagct taccatgacc gactacaagc	540
[0327]	ccacggtgcg cctcgcacc cgcgacgac tccccaggc cgtacgcacc ctgcgcccg	600
[0328]	cgttcgccga ctacccgcc acgcgccaca ccgtcgatcc ggaccgccac atcgagcggg	660
[0329]	tcaccgagct gcaagaactc ttctcaccgc gcgtcgggct cgacatcggc aaggtgtggg	720
[0330]	tcgcgacga cggcgccggt gtggcggtct ggaccagcc ggagagcgtc gaagcggggg	780
[0331]	cggtgttgc cgagatcggc ccgcgatgg ccgagttgag cggttccccg ctggccgcgc	840
[0332]	agcaacagat ggaaggctc ctggcgccgc accggcccaa ggagcccgcg tggttcctgg	900
[0333]	ccaccgtcgg cgtctcggc gaccaccagg gcaagggtct gggcagcgc gtcgtgtctc	960
[0334]	ccggagtgga ggcggccgag cgcgccggg tgccccctt cctggagacc tccgcggccc	1020
[0335]	gcaacctccc cttctacgag cggctcggct tcaccgtcac cgccgacgtc gaggtgccc	1080

[0336]	aaggaccgcg cacctggtgc atgacccgca agcccggtgc ctga	1124
[0337]	<210> 18	
[0338]	<211> 34	
[0339]	<212> DNA	
[0340]	<213> Natural sequence	
[0341]	<220>	
[0342]	<223> Frt序列	
[0343]	<400> 18	
[0344]	gaagttccta ttctctagaa agtataggaa cttc	34
[0345]	<210> 19	
[0346]	<211> 50	
[0347]	<212> DNA	
[0348]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0349]	<220>	
[0350]	<223> 5arm-pcrF	
[0351]	<400> 19	
[0352]	tcgcacacat tccacatcca ccggtcccta tggagtggag aagagtctta	50
[0353]	<210> 20	
[0354]	<211> 47	
[0355]	<212> DNA	
[0356]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0357]	<220>	
[0358]	<223> 5arm-pcrR	
[0359]	<400> 20	
[0360]	gaaggagcca ggaagagctt gacatcttcc cccgtgcgcc aagatcc	47
[0361]	<210> 21	
[0362]	<211> 47	
[0363]	<212> DNA	
[0364]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0365]	<220>	
[0366]	<223> hACE2-F	
[0367]	<400> 21	
[0368]	ggatcttggc gcacggggaa agatgtcaag ctcttctgg ctccttc	47
[0369]	<210> 22	
[0370]	<211> 49	
[0371]	<212> DNA	
[0372]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0373]	<220>	
[0374]	<223> hACE2-R	
[0375]	<400> 22	
[0376]	cattataagc tgcaataaac aagttctaaa aggaggtctg aacatcatc	49
[0377]	<210> 23	

[0378]	<211>	49	
[0379]	<212>	DNA	
[0380]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0381]	<220>		
[0382]	<223>	SV40-F	
[0383]	<400>	23	
[0384]		gatgatgttc agacctcctt ttagaacttg tttattgcag cttataatg	49
[0385]	<210>	24	
[0386]	<211>	48	
[0387]	<212>	DNA	
[0388]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0389]	<220>		
[0390]	<223>	SV40-R	
[0391]	<400>	24	
[0392]		agagaatagg aacttcgcac gcgttaagat acattgatga gtttggac	48
[0393]	<210>	25	
[0394]	<211>	50	
[0395]	<212>	DNA	
[0396]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0397]	<220>		
[0398]	<223>	3arm-pcrF	
[0399]	<400>	25	
[0400]		tacgaagtta tgtcgcgcg gcgcgccgaa ttataatact aacattactg	50
[0401]	<210>	26	
[0402]	<211>	53	
[0403]	<212>	DNA	
[0404]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0405]	<220>		
[0406]	<223>	3arm-pcrR	
[0407]	<400>	26	
[0408]		tatgaccatg attacgcaa gcttaagacc aaactattag agcagttaa agc	53
[0409]	<210>	27	
[0410]	<211>	8470	
[0411]	<212>	DNA	
[0412]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0413]	<220>		
[0414]	<223>	打靶载体序列	
[0415]	<400>	27	
[0416]		tgcgcggttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctccc gagacggtca	60
[0417]		cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagccc tcagggcgcg tcagcgggtg	120
[0418]		ttggcgggtg tcgggctgg cttactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
[0419]		accatatgta ccgggtaggg gaggcgttt tccaaggca gtctggagca tgcgctttag	240



[0420]	cagccccgct gggcacttgg cgctacacaa gtggcctctg gcctcgcaca cattccacat	300
[0421]	ccaccgggtcc ctatggagtg gagaagagtc ttataatttt ttaaattgggc agagaaatga	360
[0422]	atattttttt aatttttaga gacagggttt ctttgtatag ctctagctgt ctttgattgg	420
[0423]	tagacaaagc tgtcctcaaa ctacagagatc ttccttcctt tgtctcctga gtgctgggat	480
[0424]	taaaggcatg gaccaccact gccctgcccc attctctcca ttaattttta gtgaatgctt	540
[0425]	gcaaaaagtc acttctttgg tgaacagctt cttttacaaa taagtacctt tgccttcggt	600
[0426]	tttataggat tcttaaaaag aaaaaaaga ttcagccagg tggttgtggt gcacacctt	660
[0427]	aatcccagca gtcaggaggc agaggaaagc agatctcttg agtttgagge tagcctagtc	720
[0428]	tacagagga gttccaggac agccaaggct acagagagga actgtctaaa aacaccaaga	780
[0429]	aagagagaaa ggagagaggg agaggatgga tagcttattg atagaattgt cagaaaaggc	840
[0430]	tataagttcc aatatgtgtc ccatgatttc taagtctagc ctttctgtt atagtaaaat	900
[0431]	catagtacac cctcctcctc cagtgtatct ttaacagctt ttaaggaaca tattaactaa	960
[0432]	atgtccaggt tttgatttgg ccataaaatg ttagcaaagc taaggtttcc taggattaat	1020
[0433]	gaataacatg tctttattta gtttacttaa aaaaatcatt ctaaaatc tgtttacata	1080
[0434]	tctgtcctct ccaggattaa ctcatattg gtccagcagc ttgtttactg ttctcttctg	1140
[0435]	tttctctctc tgcctttttt ttctctctct ctacgtgcc aaccaagtt caaaggctga	1200
[0436]	tgagagagaa aaactcatga agagatttta ctctaggaa agttgctcag tggatgggat	1260
[0437]	cttggcgcac ggggaaagat gtcaagctct tcctggctcc ttctcagcct tgttgctgta	1320
[0438]	actgtctctc agtccaccat tgaggaacag gccaaagacat ttttgacaa gtttaaccac	1380
[0439]	gaagccgaag acctgttcta tcaaagttca cttgcttctt ggaattataa caccaatatt	1440
[0440]	actgaagaga atgtccaaaa catgaataat gctggggaca aatggctctgc ctttttaag	1500
[0441]	gaacagtcca cacttgccca aatgtatcca ctacaagaaa ttcagaatct cacagtcaag	1560
[0442]	cttcagctgc aggctcttca gcaaaatggg tcttcagtgc tctcagaaga caagagcaaa	1620
[0443]	cggttgaaca caattctaaa tacaatgagc accatctaca gtactggaaa agtttgtaac	1680
[0444]	ccagataatc cacaagaatg cttattactt gaaccaggtt tgaatgaaat aatggcaaac	1740
[0445]	agtttagact acaatgagag gctctgggct tgggaaagct ggagatctga ggtcggcaag	1800
[0446]	cagctgaggc cattatatga agagtatgtg gtcttgaaaa atgagatggc aagagcaaat	1860
[0447]	cattatgagg actatgggga ttattggaga ggagactatg aagtaaattgg ggtagatggc	1920
[0448]	tatgactaca gccgcggcca gttgattgaa gatgtggaac atacctttga agagattaa	1980
[0449]	ccattatatg aacatcttca tgcctatgtg agggcaaagt tgatgaatgc ctatccttcc	2040
[0450]	tatatcagtc caattggatg cctcctgct catttgcttg gtgatatgtg gggtagattt	2100
[0451]	tggacaaatc tgtactcttt gacagttccc tttggacaga aaccaaacat agatgttact	2160
[0452]	gatgcaatgg tggaccaggc ctgggatgca cagagaatat tcaaggaggc cgagaagttc	2220
[0453]	tttgtatctg ttggtcttcc taatatgact caaggattct gggaaaattc catgctaacg	2280
[0454]	gaccaggaa atgttcagaa agcagtctgc catccacag cttgggacct ggggaagggc	2340
[0455]	gacttcagga tccttatgtg cacaaagggtg acaatggacg acttctctgac agctcatcat	2400
[0456]	gagatggggc atatccagta tgatatggca tatgtctcac aacctttct gctaagaaat	2460
[0457]	ggagetaatg aaggattcca tgaagctgtt ggggaaatca tgtcacttcc tgcagccaca	2520
[0458]	cctaagcatt taaaatccat tggctctctg tcacccgatt ttcaagaaga caatgaaaca	2580
[0459]	gaaataaact tcctgtctca acaagcactc acgattgttg ggactctgcc atttacttac	2640
[0460]	atgttagaga agtggagggtg gatggtcttt aaaggggaaa ttcccaaaga ccagtggatg	2700
[0461]	aaaaagtggt gggagatgaa gcgagagata gttgggggtg tggaacctgt gccccatgat	2760

[0462]	gaaacatact	gtgacccgc	atctctgttc	catgtttcta	atgattactc	attcattcga	2820
[0463]	tattacacaa	ggaccttta	ccaattccag	tttcaagaag	cactttgtca	agcagctaaa	2880
[0464]	catgaaggcc	ctctgcacaa	atgtgacatc	tcaaaacteta	cagaagctgg	acagaaactg	2940
[0465]	ttcaatatgc	tgaggcttgg	aaaatcagaa	ccctggacc	tagcattgga	aaatgttgta	3000
[0466]	ggagcaaaga	acatgaatgt	aaggccactg	ctcaactact	ttgagccctt	atctacctgg	3060
[0467]	ctgaaagacc	agaacaagaa	ttcttttgtg	ggatggagta	ccgactggag	tccatatgca	3120
[0468]	gaccaaagca	tcaaagtgag	gataagccta	aaatcagctc	ttggagataa	agcatatgaa	3180
[0469]	tggaacgaca	atgaaatgta	cctgttccga	tcatctgttg	catatgctat	gaggcagtac	3240
[0470]	ttttaaaag	taaaaaatca	gatgattctt	tttggggagg	aggatgtgcg	agtggtctaat	3300
[0471]	ttgaaaccaa	gaatctcctt	taatttcttt	gtcactgcac	ctaaaaatgt	gtctgatatc	3360
[0472]	attcctagaa	ctgaagtga	aaaggccatc	aggatgtccc	ggagccgtat	caatgatgct	3420
[0473]	ttccgtctga	atgacaacag	cctagagttt	ctggggatac	agccaacact	tggacctcct	3480
[0474]	aaccagcccc	ctgtttccat	atggctgatt	gtttttggag	ttgtgatggg	agtgatagtg	3540
[0475]	gttggcattg	tcatcctgat	cttcaactggg	atcagagatc	ggaagaagaa	aaataaagca	3600
[0476]	agaagtggag	aaaatcctta	tgcctccatc	gatattagca	aaggagaaaa	taatccagga	3660
[0477]	ttccaaaaca	ctgatgatgt	tcaaacctcc	ttttagaact	tgtttattgc	agcttataat	3720
[0478]	ggttacaaat	aaagcaatag	catcacaat	ttcacaata	aagcattttt	ttcactgcat	3780
[0479]	tctagtgtg	gtttgtccaa	actcatcaat	gtatcttaac	gcgtgcgaag	ttcctattct	3840
[0480]	ctagaaagta	taggaacttc	atcgataaccg	ggtaggggag	gcgcttttcc	caaggcagtc	3900
[0481]	tggagcatgc	gctttagcag	ccccgtggg	cacttggcgc	tacacaagtg	gcctctggcc	3960
[0482]	tcgcacacat	tccacatccc	ccggtaggcg	ccaaccgct	ccgttctttg	gtggccccctt	4020
[0483]	cgcgccacct	tctactctc	ccctagtcag	gaagtcccc	cccggcccgc	agctcgcgtc	4080
[0484]	gtgcaggacg	tgacaaatgg	aagtagcacg	tctcaactagt	ctcgtgcaga	tggacagcac	4140
[0485]	cgctgagcaa	tggaagcggg	taggcctttg	gggcagcggc	caatagcagc	tttgcctcctt	4200
[0486]	cgctttctgg	gctcagaggc	tgggaagggg	tgggtccggg	ggcgggctca	ggggcgggct	4260
[0487]	cagggcgggg	gcgggcgccc	gaaggtctc	cggaggcccg	gcattctgca	cgcttcaaaa	4320
[0488]	gcgcacgtct	gccgcgctgt	tctcctctc	ctcatctccg	ggcctttcga	cctgcagccc	4380
[0489]	aagctagctt	accatgaccg	agtacaagcc	cacggtgcgc	ctcgccacc	gcgacgacgt	4440
[0490]	ccccagggcc	gtacgcaccc	tcgccgcgc	gttcgccgac	taccccgcca	cgcgccacac	4500
[0491]	cgctgatccg	gaccgccaca	tcgagcgggt	caccgagctg	caagaactct	tcttcacgcg	4560
[0492]	cgctgggctc	gacatcgga	aggtgtgggt	cgcgagcagc	ggcgcccgcg	tggcggctctg	4620
[0493]	gaccacgccg	gagagcgtcg	aagcgggggc	ggtgttcgcc	gagatcggcc	cgcgcatggc	4680
[0494]	cgagttgagc	ggttcccggc	tggccgcgca	gcaacagatg	gaaggcctcc	tggcggcgca	4740
[0495]	ccggcccaag	gagcccgcgt	ggttctctggc	caccgtcggc	gtctcgccc	accaccaggg	4800
[0496]	caagggtctg	ggcagcgccg	tcgtgctccc	cggagtggag	gcggccgagc	gcgcccgggt	4860
[0497]	gcccgccttc	ctggagacct	ccgcgccccg	caacctcccc	ttctacgagc	ggctcggett	4920
[0498]	caccgtcacc	gccgacgtcg	aggtgcccga	aggaccgcgc	acctggtgca	tgaccgcaa	4980
[0499]	gcccgggtgc	tgaggtacct	ctcatgctgg	agttcttcgc	ccaccccaac	ttgtttattg	5040
[0500]	cagcttataa	tggttacaaa	taaagcaata	gcatacaaaa	tttcacaaat	aaagcatttt	5100
[0501]	tttcaactgca	ttctagtgtg	ggtttgtcca	aactcatcaa	tgtatcttat	catcgatgaa	5160
[0502]	gttctatttc	tctagaaagt	ataggaactt	ctaactccc	gggtgacaga	taacttcgta	5220
[0503]	taatgtatgc	tatacgaagt	tatgtcgacg	cggcgcgccc	aattataata	ctaacattac	5280

[0504] tgaagaaaat gcccaaaaga tggttaagttc ttgaggctac ccaggggggtt attgattgct 5340  
[0505] tcttaaagat cagaattact gcctataaaa ctggataaag aatcataga gatctctcaa 5400  
[0506] gtgtgaggat gactgactgc ctctgtagct ctgatcctag tctcccagat ggctaaattc 5460  
[0507] aattgacctt agagttcatc tggaaaattg ttatgaatga attatttgcc cagattccaa 5520  
[0508] agatgagtga aatgtttaa taaagttgcc atcactatc tcattatatt tggatgtaa 5580  
[0509] agcattcatg gaaatgttct aagtcgttat tgagccaata attttcttta gcttataatg 5640  
[0510] ccaacaggtc tatccgagaa ctacaaatga catattaact gaaaaatgca actgggggtt 5700  
[0511] actgaaggca gcagcttagt aattaagta accatggctt aggtgaaact ggacctggga 5760  
[0512] attccttctt tcattgacac agagctctga ggaattcca aaggtcacag aagaaaagct 5820  
[0513] ataattaaac tagtcccaaa aatctcagc ctactctggg aaagcagcat attttgttg 5880  
[0514] acaagtcaa ggacttagaa ctttttttt tctcactgat cctgaagtgc cttttaagta 5940  
[0515] tagttaagtg gtggaaaatt gagcaactat ttaagaaaag actctttttt ttcttcttcc 6000  
[0516] agcaatgctt tccttcaaaa cggtagcttc aaaacttctt gtcttttaaa tgatcagggg 6060  
[0517] gctgtgtgtt taaattattg ccattcatag aacagagtgg gtctgaggat gcctgtttcc 6120  
[0518] tttgaaatc tatgccccct cccagtttc taaaatttaa gaaaccacag agactttgac 6180  
[0519] aatgtagttg ccaatgagt tgcttttaac tgctctaata gtttggtctt aagcttggcg 6240  
[0520] taatcatggt catagctgtt tctgtgtga aattgttacc cgctcacaat tccacacaac 6300  
[0521] atacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tgggggtgcct aatgagttag ctaactcaca 6360  
[0522] ttaattgctg tgcgctcact gcccgcttc cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcat 6420  
[0523] taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgctc ttccgcttcc 6480  
[0524] tcgctcactg actcgtcgtg ctcggtcgtt cggctcgggc gagcggatc agctcactca 6540  
[0525] aaggcgtaa tacggttacc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca 6600  
[0526] aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaa aaggccgctt tgctggcgtt tttccatagg 6660  
[0527] ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaaccgg 6720  
[0528] acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct cctcgtcgtg ctctcctgtt 6780  
[0529] ccgacctgc cgttaccgg atacctgtcc gcctttctcc ctccgggaag cgtggcgtt 6840  
[0530] tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc 6900  
[0531] tgtgtgcaac aacccccgt tcagcccagc cgctcgcct tatccgtaa ctatcgtctt 6960  
[0532] gactcaaac cggtaaagaca cgacttatcg ccaactggcag cagccactgg taacaggatt 7020  
[0533] agcagagcga ggtatgtagg cgggtctaca gatttctga agtggtggcc taactacggc 7080  
[0534] taaactagaa gaacagtatt tggatctgc gctctgctga agccagttac ctccgaaaa 7140  
[0535] agagttggtg gctcttgatc cggcaaaaa accaccgtg gtagcggtag tttttttgtt 7200  
[0536] tgcaagcagc agattacgag cagaaaaaaa ggatctcaag aagatcctt gatctttctt 7260  
[0537] acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt catgagatta 7320  
[0538] tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaat gaagttttaa atcaatctaa 7380  
[0539] agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc 7440  
[0540] tcagcagctt gtctatttcg tcatccata gttgcctgac tcccgtcgtg gtagataact 7500  
[0541] acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtctgcaa tgataccgag agaccacgc 7560  
[0542] tcaccgctc cagatttacc agcaataaac cagccagccg gaaggccga gcgcagaagt 7620  
[0543] ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgccggga agctagagta 7680  
[0544] agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttgttcca ttgctacagg catcgtggtg 7740  
[0545] tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcatc agctccggtt ccaacgac aaggcgagtt 7800

[0546]	acatgatccc ccatgttggtg caaaaaagcg gttagctcct tcggctctcc gatcgttgtc	7860
[0547]	agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg cagcactgca taattctctt	7920
[0548]	actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactgggt agtactcaac caagtcattc	7980
[0549]	tgagaatagt gtatgcggcg accgagittgc tcttgcccgg cgtcaatacg ggataatacc	8040
[0550]	gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa aacgttcttc ggggcgaaaa	8100
[0551]	ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt aaccctctcg tgcaccaac	8160
[0552]	tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaac aggaaggcaa	8220
[0553]	aatgcccaa aaaaggaat aagggcgaca cggaaatgt gaatactcat actcttctt	8280
[0554]	tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca tgagcggata catatttgaa	8340
[0555]	tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat ttccccgaa agtgccacct	8400
[0556]	gagcttaag aaaccattat tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg tatcacgagg	8460
[0557]	ccctttctgc	8470
[0558]	<210> 28	
[0559]	<211> 19	
[0560]	<212> DNA	
[0561]	<213> Natural sequence	
[0562]	<220>	
[0563]	<223> Puro-F	
[0564]	<400> 28	
[0565]	aacctcccct tctacgagc	19
[0566]	<210> 29	
[0567]	<211> 24	
[0568]	<212> DNA	
[0569]	<213> Natural sequence	
[0570]	<220>	
[0571]	<223> 3arm-outR	
[0572]	<400> 29	
[0573]	tacagccagg atctggatgt cagc	24
[0574]	<210> 30	
[0575]	<211> 5922	
[0576]	<212> DNA	
[0577]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0578]	<220>	
[0579]	<223> 鼠胚胎干细胞Ace2位点基因组替换序列	
[0580]	<400> 30	
[0581]	ccctatggag tggagaagag tcttataatt ttttaaatgg gcagagaaat gaatttattt	60
[0582]	ttaattttta gagacagggt ttctttgat agctctagct gtctttgatt ggtagacaaa	120
[0583]	gctgtcctca aactcagaga tcttcttcc tttgtctcct gagtgtctggg attaaaggca	180
[0584]	tggaccacca ctgccctgcc ccattctctc cattaatttt aagtgaatgc ttgcaaaagc	240
[0585]	tcacttcttt ggtgaacagc ttctttaca aataagtacc tttgccttcg tttttatagg	300
[0586]	attcttaaaa agaaaaaaaa gattcagcca ggtggttggtg gtgcacacct ttaatcccag	360
[0587]	cagtcaggag gcagaggaaa gcagatctct tgagtttgag gctagcctag tctacagagg	420

[0588]	gagttccagg acagccaagg ctacagagag gaactgtcta aaaacaccaa gaaagagaga	480
[0589]	aaggagagag ggagaggatg gatagcttat tgatagaatt gtcagaaaag gctataagtt	540
[0590]	ccaatatgtg tcccatgatt tctaagtcta gccctttctg ttatagtaaa atcatagtac	600
[0591]	accctcctcc tccagtgtat ctttaacagc ttttaaggaa catattaact aaatgtccag	660
[0592]	gttttgattt ggccataaaa tgttagcaaa gctaaggttt tctaggatta atgaataaca	720
[0593]	tgtctttatt tagtttactt aaaaaaatca ttctaaaata tctgtttaca tatctgtcct	780
[0594]	ctccaggatt aacttcatat tgggccagca gcttgtttac tgttctcttc tgtttcttct	840
[0595]	tctgcttttt ttttctctc ttctcagtgc ccaacccaag ttcaaaggct gatgagagag	900
[0596]	aaaaactcat gaagagattt tactctaggg aaagttgctc agtggatggg atcttggcgc	960
[0597]	acggggaaag atgtcaagct cttcctggct ctttctcagc cttgttgctg taactgctgc	1020
[0598]	tcagtcacc attgaggaac aggccaagac atttttggac aagtttaacc acgaagccga	1080
[0599]	agacctgtc tatcaaagtt cacttgcttc ttggaattat aacaccaata ttactgaaga	1140
[0600]	gaatgtcaa aacatgaata atgctgggga caaatggtct gcctttttaa aggaacagtc	1200
[0601]	cacacttgcc caaatgtatc cactacaaga aattcagaat ctcacagtca agcttcagct	1260
[0602]	gcaggtctt cagcaaaatg ggtcttcagt gctctcagaa gacaagagca aacggttga	1320
[0603]	cacaattcta aatacaatga gcaccatcta cagtactgga aaagtttgta acccagataa	1380
[0604]	tccacaagaa tgcttattac ttgaaccagg tttgaatgaa ataatggcaa acagttttaga	1440
[0605]	ctacaatgag aggtcttggg cttgggaaag ctggagatct gaggtcggca agcagctgag	1500
[0606]	gccattatat gaagagtatg tggcttgaa aaatgagatg gcaagagcaa atcattatga	1560
[0607]	ggactatggg gattattgga gaggagacta tgaagtaaat ggggtagatg gctatgacta	1620
[0608]	cagccgccc cagttgattg aagatgtgga acatacctt gaagagatta aaccattata	1680
[0609]	tgaacatctt catgcctatg tgagggcaaa gttgatgaat gcctatcctt cctatatcag	1740
[0610]	tccaattgga tgctcctctg ctcatcttct tgggtgatag tgggtagat tttggacaaa	1800
[0611]	tctgtactct ttgacagtc ctttggaca gaaaccaaac atagatgtta ctgatgcaat	1860
[0612]	ggtggaccag gcctgggatg cacagagaat attcaaggag gccgagaagt tctttgtatc	1920
[0613]	tgttggtctt cctaataatga ctcaaggatt ctgggaaaat tccatgctaa cggaccag	1980
[0614]	aaatgttcag aaagcagtct gccatcccac agcttgggac ctggggaagg gcgacttcag	2040
[0615]	gatccttatg tgcaaaaagg tgacaatgga cgacttctg acagctcctc atgagatggg	2100
[0616]	gcataatccag tatgatatgg catatgetgc acaaccttt ctgctaagaa atggagctaa	2160
[0617]	tgaaggattc catgaagctg ttggggaat catgtcactt tctgcagcca cacctaagca	2220
[0618]	tttaaaatcc atttggcttc tgccaccga ttttcaagaa gacaatgaaa cagaaataaa	2280
[0619]	cttctgctc aaacaagcac tcacgattgt tgggactctg ccatttactt acatgtttaga	2340
[0620]	gaagtggagg tggatggtct ttaaagggga aattccaaa gaccagtgga tgaaaaagt	2400
[0621]	gtgggagatg aagcgagaga tagttgggt ggtggaacct gtgccccatg atgaaacata	2460
[0622]	ctgtgacccc gcatctctgt tccatgttcc taatgattac tcattcattc gatattacac	2520
[0623]	aaggaccctt taccaattcc agtttcaaga agcactttgt caagcagcta aacatgaagg	2580
[0624]	ccctctgcac aatgtgaca tctcaaacct tacagaagct ggacagaaac tgttcaatat	2640
[0625]	gctgaggctt ggaaaatcag aacctggac cctagcattg gaaaatgttg taggagcaaa	2700
[0626]	gaacatgaat gtaaggccac tgctcaacta ctttgagccc ttatttacct ggctgaaaga	2760
[0627]	ccagaacaag aattcttttg tgggatggag taccgactgg agtccatag cagaccaaag	2820
[0628]	catcaaagtg aggataagcc taaaatcagc tcttgagat aaagcatatg aatggaacga	2880
[0629]	caatgaaatg tacctgttcc gatcatctgt tgcatatgct atgaggcagt actttttaa	2940

[0630]	agtaaaaaat	cagatgattc	tttttgggga	ggaggatgtg	cgagtggcta	at ttgaaacc	3000
[0631]	aagaatctcc	ttaattttct	ttgtcactgc	acctaaaaat	gtgtctgata	tcattcctag	3060
[0632]	aactgaagtt	gaaaaggcca	tcaggatgtc	cgggagccgt	atcaatgatg	ctttccgtct	3120
[0633]	gaatgacaac	agcctagagt	ttctggggat	acagccaaca	cttgaccctc	ctaaccagcc	3180
[0634]	ccctgtttcc	atatggctga	ttgtttttgg	agttgtgatg	ggagtgatag	tggttggcat	3240
[0635]	tgtcatcctg	atcttcactg	ggatcagaga	tcggaagaag	aaaaataaag	caagaagtgg	3300
[0636]	agaaaatcct	tatgcctcca	tcgatattag	caaaggagaa	aataatccag	gattccaaaa	3360
[0637]	cactgatgat	gttcagacct	ccttttagaa	cttgtttatt	gcagcttata	atggttacia	3420
[0638]	ataaagcaat	agcatcacia	at ttcacaaa	taaagcattt	ttttcactgc	attctagtgt	3480
[0639]	tggtttgtcc	aaactcatca	atgtatctta	acgcgtgcga	agttcctatt	ctctagaaag	3540
[0640]	tataggaact	tcacgatac	cgggtagggg	aggcgtttt	cccaaggcag	tctggagcat	3600
[0641]	gcgttttagc	agccccgtg	ggcacttggc	gctacaciaag	tggcctctgg	cctcgcacac	3660
[0642]	attccacatc	ccccgttagg	cgccaaccgg	ctccgttctt	tgggtgcccc	ttcgcgccac	3720
[0643]	cttctactcc	tcccctagtc	aggaagtcc	ccccgcccc	gcagctcgcg	tcgtgcagga	3780
[0644]	cgtgacaaat	ggaagtagca	cgtctcacta	gtctcgtgca	gatggacagc	accgctgagc	3840
[0645]	aatggaagcg	ggttagcctt	tggggcagcg	gccaatagca	gctttgctcc	ttcgttttct	3900
[0646]	gggctcagag	gctgggaagg	ggtgggtccg	ggggcgggct	caggggcggg	ctcaggggcg	3960
[0647]	gggcgggcgc	ccgaaggtcc	tccggaggcc	cggcattctg	cacgcttcaa	aagcgcacgt	4020
[0648]	ctgccgcgct	gttctcctct	tcctcatctc	cgggcctttc	gacctgcagc	ccaagctagc	4080
[0649]	ttaccatgac	cgagtacaag	cccacggtgc	gcctcgccac	ccgcgacgac	gtccccaggg	4140
[0650]	ccgtacgac	cctcgcgcc	gcgttcgcc	actaccccc	cacgcgccac	accgtcgatc	4200
[0651]	cggaccgcca	catcgagcgg	gtcaccgagc	tgcaagaact	cttctcacg	cgcgtcgggc	4260
[0652]	tcgacatcgg	caaggtgtgg	gtcgcggacg	acggcgccgc	ggtggcggtc	tggaccacgc	4320
[0653]	cggagagcgt	cgaagcgggg	gcggtgttcg	ccgagatcgg	cccgcgatg	gccgagttga	4380
[0654]	gcggttcccg	gctggcccg	cagcaacaga	tggaaggcct	cctggcgccg	caccggccca	4440
[0655]	aggagcccgc	gtggttctcg	gccaccgtcg	gcgtctcgcc	cgaccaccag	ggcaagggtc	4500
[0656]	tgggcagcgc	cgctcgtctc	cccggagtgg	aggcggccga	gcgcgccggg	gtgcccgcct	4560
[0657]	tcttgagac	ctccgcgcc	cgcaacctcc	ccttctacga	gcggctcggc	ttcaccgtca	4620
[0658]	ccgccgacgt	cgaggtgccc	gaaggaccgc	gcacctggtg	catgaccgcg	aagccccggtg	4680
[0659]	cctgaggtac	ctctcatgct	ggagttcttc	gcccaccca	acttgtttat	tgcagcttat	4740
[0660]	aatggttaca	aataaagcaa	tagcatcaca	aatttcacia	ataaagcatt	tttttactg	4800
[0661]	cattctagtgt	gtggtttgtc	caaactcatc	aatgtatctt	atcatcgatg	aagttcctat	4860
[0662]	tctctagaaa	gtataggaac	ttctaacctc	ccgggtgaca	gataacttcg	tataatgtat	4920
[0663]	gctatacгаа	gttatgtcga	cgcggcgcgc	cgaattataa	tactaacatt	actgaagaaa	4980
[0664]	atgccccaaa	gatggtaaat	tcttgaggct	accaggggg	ttattgattg	cttcttaaag	5040
[0665]	atcagaatta	ctgcctataa	aactggataa	ggaaatcata	gagatctctc	aagtgtgagg	5100
[0666]	atgagtgact	gcctctgtag	ctctgatcct	agtctcccag	atggctaaat	tcaattgacc	5160
[0667]	ttagagtcca	tctggaaaat	tgttatgaat	gaattatttg	cccagattcc	aaagatgagt	5220
[0668]	gaaaatgttt	aataaagttg	ccatcactat	tctcattata	tttggtatgt	aaagcattca	5280
[0669]	tggaaatggt	ctaagtcggt	attgagccaa	taattttctt	tagcttataa	tgccaacagg	5340
[0670]	tctatccgag	aactacaaat	gacatattaa	ctgaaaaatg	caactggggt	ttactgaagg	5400
[0671]	cagcagctta	gtaattaagg	taaccatggc	ttaggtgaaa	ctggacctgg	gaattccttc	5460

[0672]	tttcattgac acagagctct gaggaatttc caaaggcac agaagaaaag ctataattaa	5520
[0673]	actagtccca aaaaatctca gcctactctg ggaaagcagc atatdddgtt tgacaagtgc	5580
[0674]	aaggacttag aacttdtttt tttctcactg atcctgaagt gccttdttaag tatagttaag	5640
[0675]	tggtggaaaa ttgagcaact atttaagaaa agactctttt tttcttctt ccagcaatgc	5700
[0676]	tttccttcaa aacggtagct tcaaaacttc ctgtctttda aatgatcagg gggctgtgtg	5760
[0677]	tttaaattat tgccattcat agaacagagt gggctctgagg atgcctgttt ctttdgaaat	5820
[0678]	tctatgcccc ctcccagttt tctaaaattt aagaaaccac agagacttdg acaatgtagt	5880
[0679]	tgccaaatga gttgcttdta actgctctaa tagtdttggtc tt	5922
[0680]	<210>	31
[0681]	<211>	19
[0682]	<212>	DNA
[0683]	<213>	Natural sequence
[0684]	<220>	
[0685]	<223>	hACE2-F
[0686]	<400>	31
[0687]	tgatagtggg tggcattgt	19
[0688]	<210>	32
[0689]	<211>	4591
[0690]	<212>	DNA
[0691]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0692]	<220>	
[0693]	<223>	最终删除PGK-puro后小鼠胚胎干细胞Ace2位点基因组替换序列
[0694]	<400>	32
[0695]	ccctatggag tggagaagag tcttataatt ttdtaaatgg gcagagaaat gaattdattt	60
[0696]	tdaatttdta gagacagggt tcttdtgat agctctagct gtcttdgatt ggtagacaaa	120
[0697]	gctgtcctca aactcagaga tcttcttcc ttdgtctct gagtgctggg attaaaggca	180
[0698]	tggaccacca ctgccctgcc ccattctctc cattaattdt aagtgaatgc ttgcaaaagc	240
[0699]	tdacttdctt ggtgaacagc ttdcttdaca aataagtacc ttdgccttcg ttdtdatagg	300
[0700]	attcttaaaa agaaaaaaa gattcagcca ggtggttdtg gtgcacacct tdaatcccag	360
[0701]	cagtcaggag gcagaggaaa gcagatctct tgagtdtgag gctagcctag tctacagagg	420
[0702]	gagtdccagg acagccaagg ctacagagag gaactgtcta aaacaccaa gaaagagaga	480
[0703]	aaggagagag ggagaggatg gatagcttat tgatagaatt gtcagaaaag gctataagtt	540
[0704]	ccaatatgtg tcccattgatt tctaagtcta gcccttdctg ttdatagtda atcatagtdc	600
[0705]	accctctctc tccagtgtat ttdtaacagc ttdtaaggaa catattdact aatgtccag	660
[0706]	gtdtdgattt ggccataaaa tgtdtagcaa gctaaggtdt tctaggatta atgaataaca	720
[0707]	tgtcttdatt tagtdtactt aaaaaatca ttdtaaaata tctgtdtdca tatctgtctc	780
[0708]	ctccaggatt aacttdatat tggtdccagca gcttdgtdtac tgdtdcttc tgdtdctct	840
[0709]	tctgcttdtt ttdctctctc ttdctagtdc ccaacccaag ttdcaaggct gatgagagag	900
[0710]	aaaaactcat gaagagattt tactctaggg aaagtdgctc agtdgatggg atcttdggcgc	960
[0711]	acggggaag atgtcaagct ttdcttdgct ctdctcagc ctdgtdgctg taaactgtdc	1020
[0712]	tdagtdccacc attgaggaac aggccaagac attdtdggac aagtdtdaac acgaagccga	1080
[0713]	agactgttdc tacaagtdt cacttdgctc ttdggaattat aacaccaata ttdactgaaga	1140

[0714]	gaatgtccaa	aacatgaata	atgctgggga	caaatggtct	gcctttttaa	aggaacagtc	1200
[0715]	cacacttgcc	caaatgtatc	cactacaaga	aattcagaat	ctcacagtca	agcttcagct	1260
[0716]	gcaggetctt	cagcaaaatg	ggtcttcagt	gctctcagaa	gacaagagca	aacggttgaa	1320
[0717]	cacaattcta	aatacaatga	gcaccatcta	cagtactgga	aaagtttgta	accagataa	1380
[0718]	tccacaagaa	tgcttattac	ttgaaccagg	tttgaatgaa	ataatggcaa	acagtttaga	1440
[0719]	ctacaatgag	aggctctggg	cttgggaaag	ctggagatct	gaggtcggca	agcagctgag	1500
[0720]	gccattatat	gaagagtatg	tggtcttgaa	aaatgagatg	gcaagagcaa	atcattatga	1560
[0721]	ggactatggg	gattattgga	gaggagacta	tgaagtaaat	ggggtagatg	gctatgacta	1620
[0722]	cagccgcggc	cagttgattg	aagatgtgga	acataccttt	gaagagatta	aaccattata	1680
[0723]	tgaacatctt	catgcctatg	tgagggcaaa	gttgatgaat	gcctatcctt	cctatatcag	1740
[0724]	tccaattgga	tgctctcctg	ctcatttgct	tggtgatatg	tgggtagat	tttgacaaa	1800
[0725]	tctgtactct	ttgacagttc	cctttggaca	gaaaccaaac	atagatgta	ctgatgcaat	1860
[0726]	ggtggaccag	gcctgggatg	cacagagaat	attcaaggag	gccgagaagt	tctttgtatc	1920
[0727]	tgttggtctt	cctaatatga	ctcaaggatt	ctgggaaat	tccatgctaa	cggaccagg	1980
[0728]	aatgttcag	aaagcagtct	gccatcccac	agcttgggac	ctggggaagg	gcgacttcag	2040
[0729]	gatccttatg	tgcaaaaagg	tgacaatgga	cgacttctg	acagctcctc	atgagatggg	2100
[0730]	gcatatccag	tatgatatgg	catatgctgc	acaacctttt	ctgctaagaa	atggagctaa	2160
[0731]	tgaaggattc	catgaagctg	ttggggaaat	catgtcactt	tctgcagcca	cacctaagca	2220
[0732]	tttaaaatcc	attggtcttc	tgacaccgca	ttttcaagaa	gacaatgaaa	cagaaataaa	2280
[0733]	cttctgctc	aaacaagcac	tcacgattgt	tgggactctg	ccatttactt	acatgttaga	2340
[0734]	gaagtggagg	tggtatggtc	ttaaagggga	aattcccaaa	gaccagtgga	tgaaaaagtg	2400
[0735]	gtgggagatg	aagcgagaga	tagttggggt	ggtggaacct	gtgccccatg	atgaaacata	2460
[0736]	ctgtgacccc	gcatctctgt	tccatgttcc	taatgattac	tcattcattc	gatattacac	2520
[0737]	aaggaccctt	taccaattcc	agtttcaaga	agcactttgt	caagcagcta	aacatgaagg	2580
[0738]	ccctctgcac	aatgtgaca	tctcaaactc	tacagaagct	ggacagaaac	tgttcaatat	2640
[0739]	gctgaggctt	ggaaaatcag	aaccctggac	cctagcattg	gaaaatgttg	taggagcaaa	2700
[0740]	gaacatgaat	gtaaggccac	tgctcaacta	ctttgagccc	ttatttacct	ggctgaaaga	2760
[0741]	ccagaacaag	aattcttttg	tgggatggag	taccgactgg	agtccatgat	cagaccaaag	2820
[0742]	catcaaagtg	aggataagcc	taaaatcagc	tcttgagatg	aaagcatatg	aatggaacga	2880
[0743]	caatgaaatg	tacctgttcc	gatcatctgt	tgcatatgct	atgaggcagt	acttttttaa	2940
[0744]	agtaaaaaat	cagatgattc	tttttgggga	ggaggatgtg	cgagtggcta	atgtgaaacc	3000
[0745]	aagaatctcc	tttaatttct	ttgtcactgc	acctaaaaat	gtgtctgata	tcattcctag	3060
[0746]	aactgaagtt	gaaaaggcca	tcaggatgtc	ccggagccgt	atcaatgatg	ctttccgtct	3120
[0747]	gaatgacaac	agcctagagt	ttctggggat	acagccaaca	cttggacctc	ctaaccagcc	3180
[0748]	ccctgtttcc	atatggctga	ttgtttttgg	agttgtgatg	ggagtgatag	tggttggcat	3240
[0749]	tgatcctctg	atcttactg	ggatcagaga	tcggaagaag	aaaaataaag	caagaagtgg	3300
[0750]	agaaaaatcct	tatgcctcca	tcgatattag	caaaggagaa	aataatccag	gattccaaaa	3360
[0751]	cactgatgat	gttcagacct	ccttttagaa	cttgtttatt	gcagcttata	atggttacia	3420
[0752]	ataaagcaat	agcatcacia	atctcaciaa	taaagcattt	ttttcactgc	attctagtgt	3480
[0753]	tggtttgtcc	aaactcatca	atgtatctta	acgcgtgcga	agttcctatt	ctctagaaag	3540
[0754]	tataggaact	tctaacctcc	cgggtgacag	ataactcgt	ataatgatg	ctatacgaag	3600
[0755]	ttatgtcgac	gcggcgcgcc	gaattataat	actaacatta	ctgaagaaaa	tgcccaaaag	3660



[0756]	atggtaagtt cttgaggcta cccagggggt tattgattgc ttcttaaaga tcagaattac	3720
[0757]	tgcctataaa actggataag gaaatcatag agatctctca agtgtgagga tgagtgactg	3780
[0758]	cctctgtagc tctgatccta gtctcccaga tggctaaatt caattgacct tagagttcat	3840
[0759]	ctggaaaatt gttatgaatg aattatttgc ccagattcca aagatgagtg aaaatgttta	3900
[0760]	ataaagttgc catcactatt ctcatatat ttggtatgta aagcattcat ggaaatgttc	3960
[0761]	taagtcgta ttgagccaat aattttcttt agcttataat gccaacaggt ctatccgaga	4020
[0762]	actacaaatg acatattaac tgaaaaatgc aactgggggt tactgaaggc agcagcttag	4080
[0763]	taattaaggt aaccatggct taggtgaaac tggacctggg aattccttct ttcatgaca	4140
[0764]	cagagctctg aggaatttcc aaaggtcaca gaagaaaagc tataattaa ctagtcccaa	4200
[0765]	aaaatctcag cctactctgg gaaagcagca tattttgttt gacaagtgcaggacttaga	4260
[0766]	actttttttt ttctactga tcctgaagtg ctttttaagt atagttaagt ggtggaaaat	4320
[0767]	tgagcaacta tttaagaaaa gactcttttt tttcttctc cagcaatget ttcttcaaa	4380
[0768]	acggtagctt caaaacttcc tgtcttttaa atgatcaggg ggctgtgtgt ttaaattatt	4440
[0769]	gccattcata gaacagagtg ggtctgagga tgcctgttcc ctttgaaatt ctatgcccc	4500
[0770]	tcccagtttt ctaaaattta agaaaccaca gagacttga caatgtagtt gccaaatgag	4560
[0771]	ttgettttaa ctgctetaat agtttggctct t	4591
[0772]	<210>	33
[0773]	<211>	18
[0774]	<212>	DNA
[0775]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0776]	<220>	
[0777]	<223>	hACE2-qF
[0778]	<400>	33
[0779]	ggtcttcagt gctctcag	18
[0780]	<210>	34
[0781]	<211>	21
[0782]	<212>	DNA
[0783]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0784]	<220>	
[0785]	<223>	hACE2-qR
[0786]	<400>	34
[0787]	gcattcttgt ggattatctg g	21
[0788]	<210>	35
[0789]	<211>	22
[0790]	<212>	DNA
[0791]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0792]	<220>	
[0793]	<223>	正向引物
[0794]	<400>	35
[0795]	ggggaacttc tcctgctaga at	22
[0796]	<210>	36
[0797]	<211>	22

---

[0798]	<212>	DNA	
[0799]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0800]	<220>		
[0801]	<223>	反向引物	
[0802]	<400>	36	
[0803]		cagacat ttt gctctcaagc tg	22
[0804]	<210>	37	
[0805]	<211>	20	
[0806]	<212>	DNA	
[0807]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0808]	<220>		
[0809]	<223>	TaqMan 探针	
[0810]	<400>	37	
[0811]		ttgctgctgc ttgacagatt	20

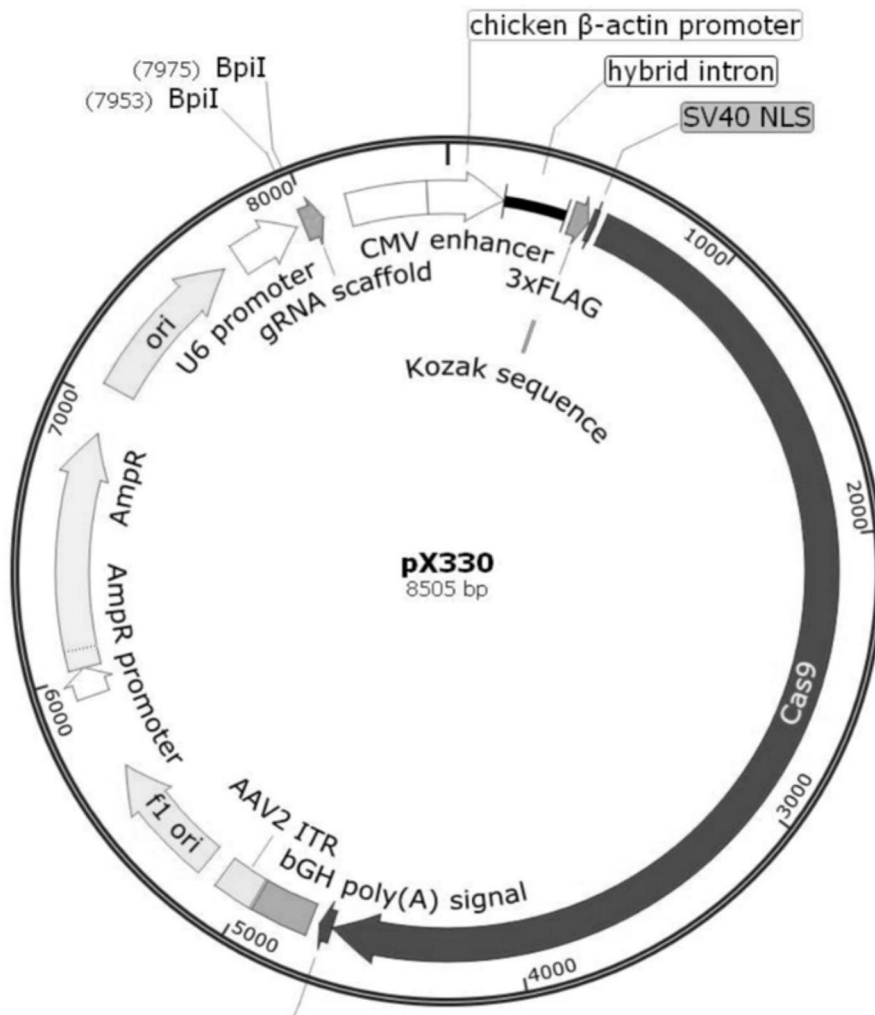


图1

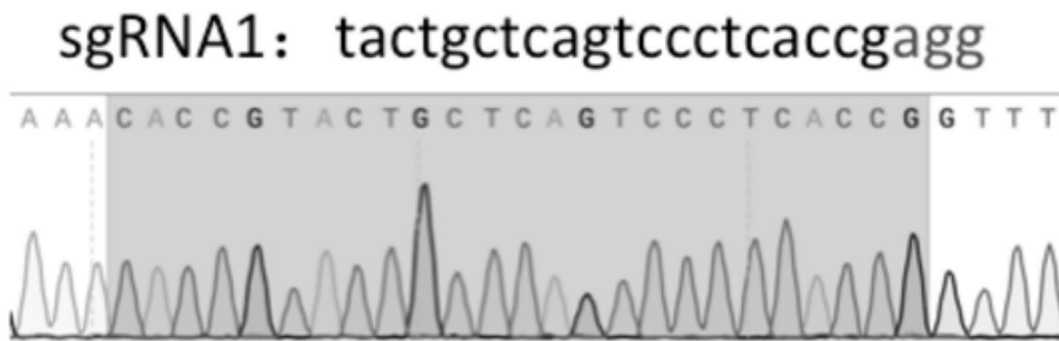


图2

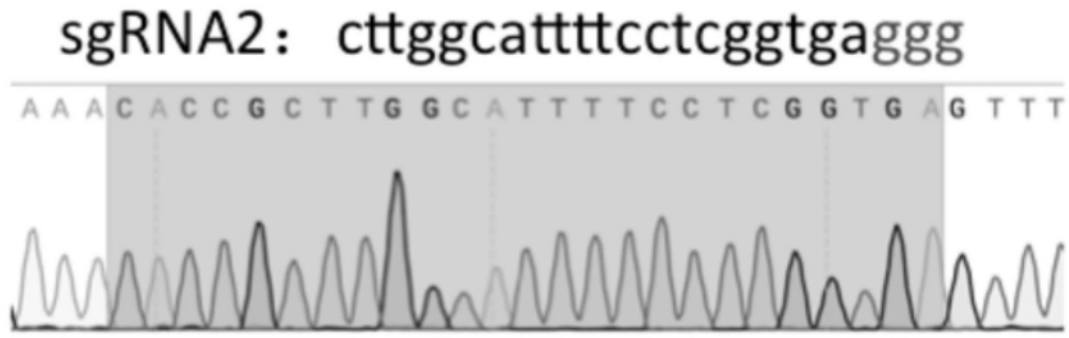


图3

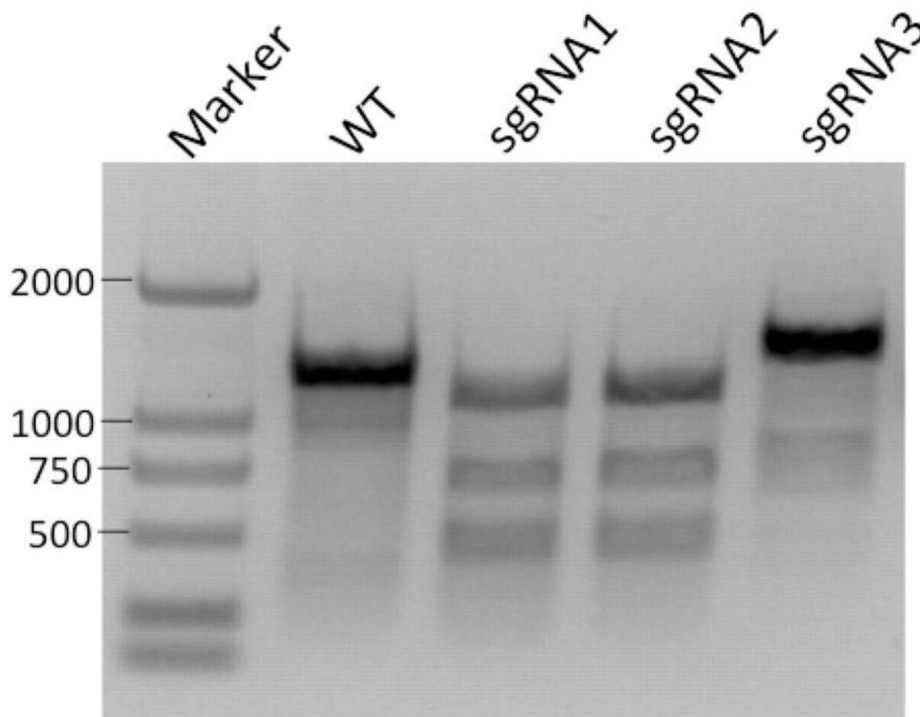


图4

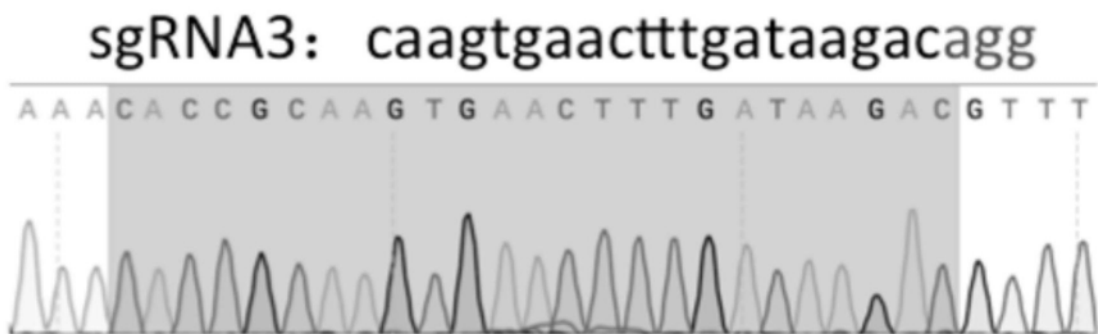


图5

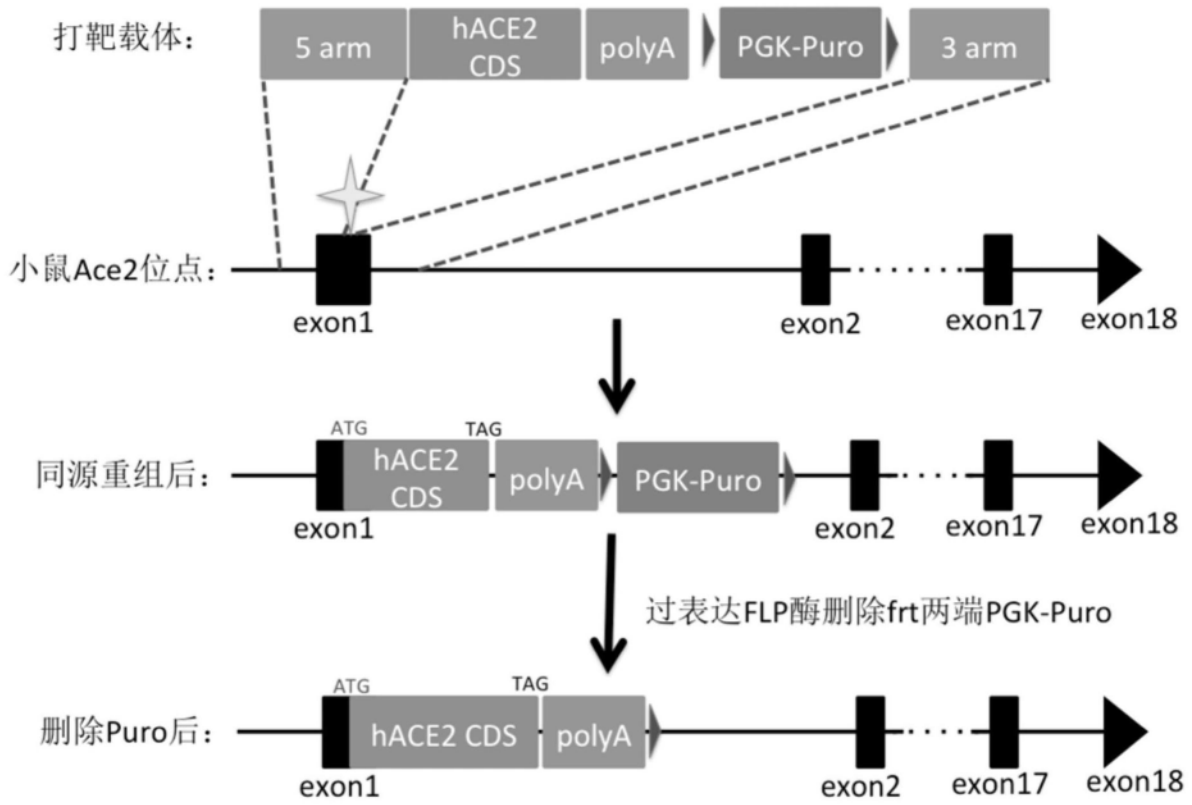


图6

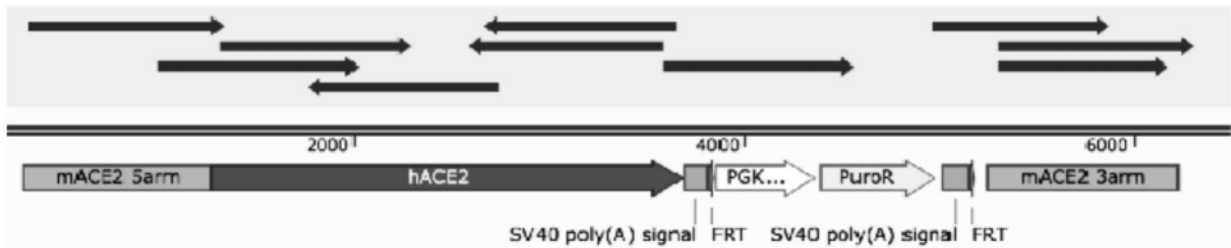


图7

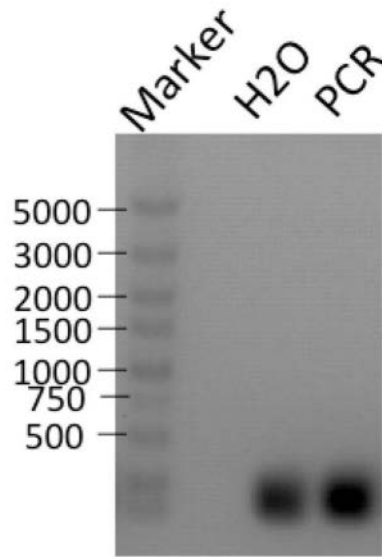


图8

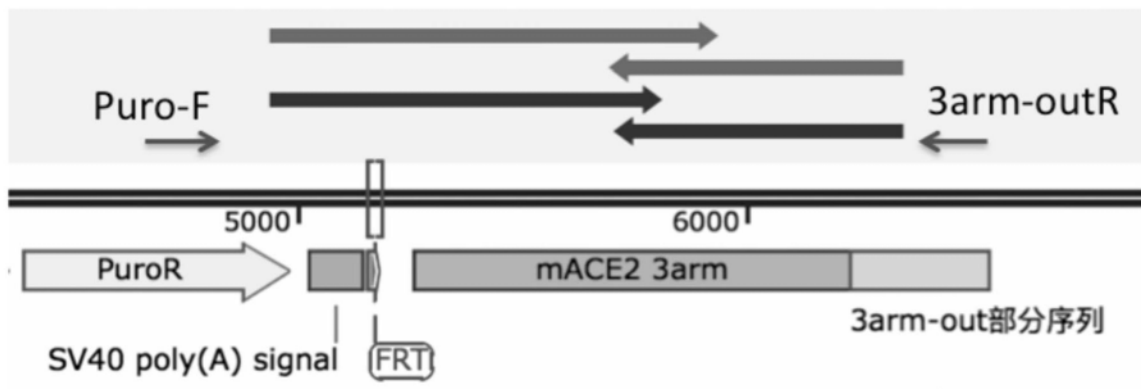
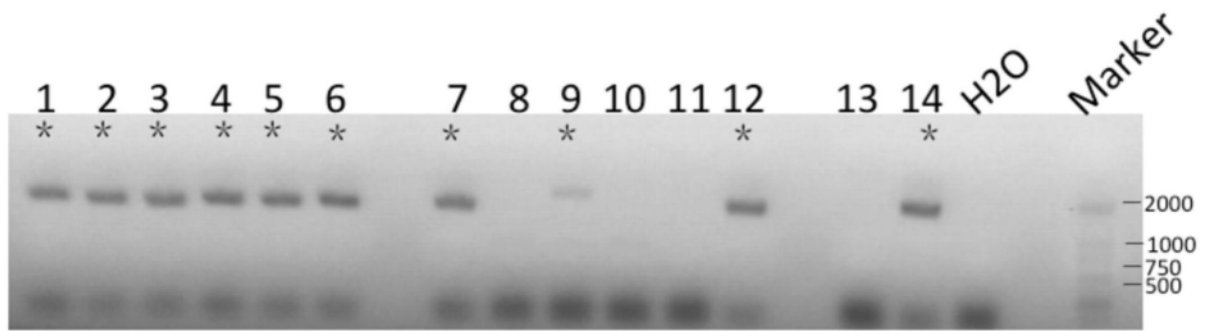


图9

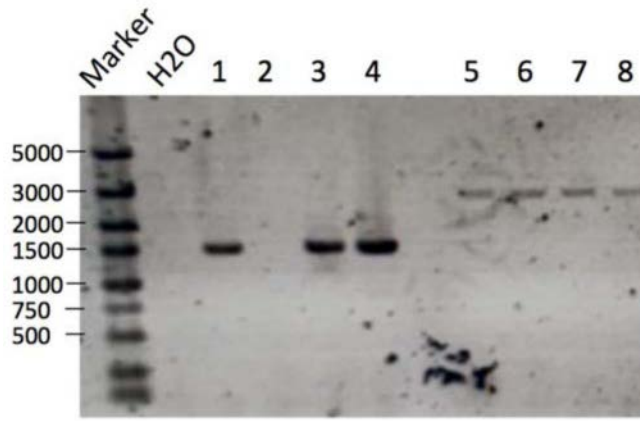


图10

人源化ACE2基因



图11

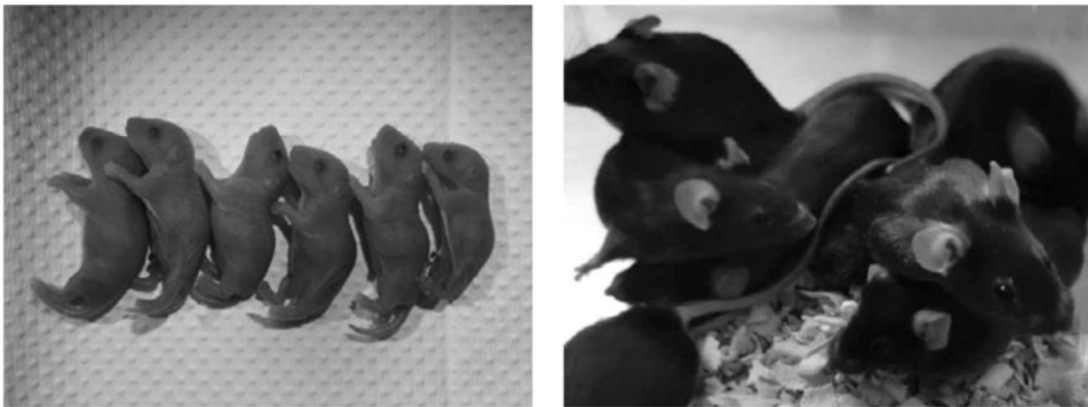


图12

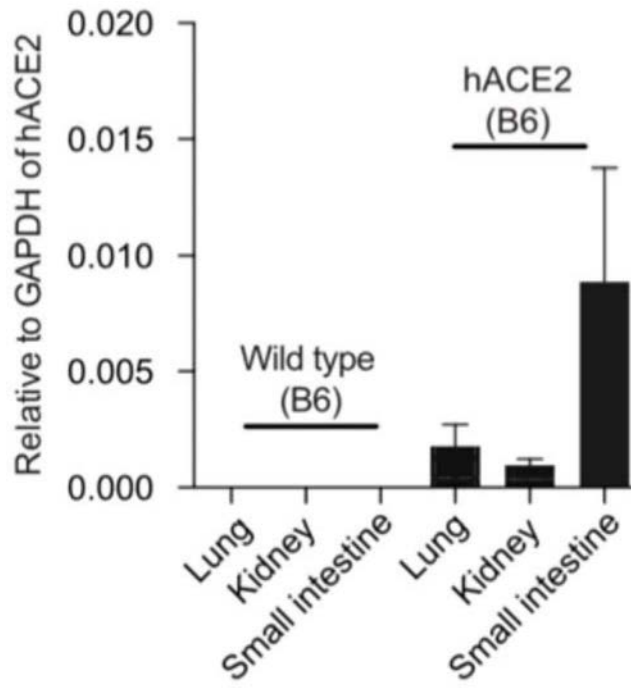


图13

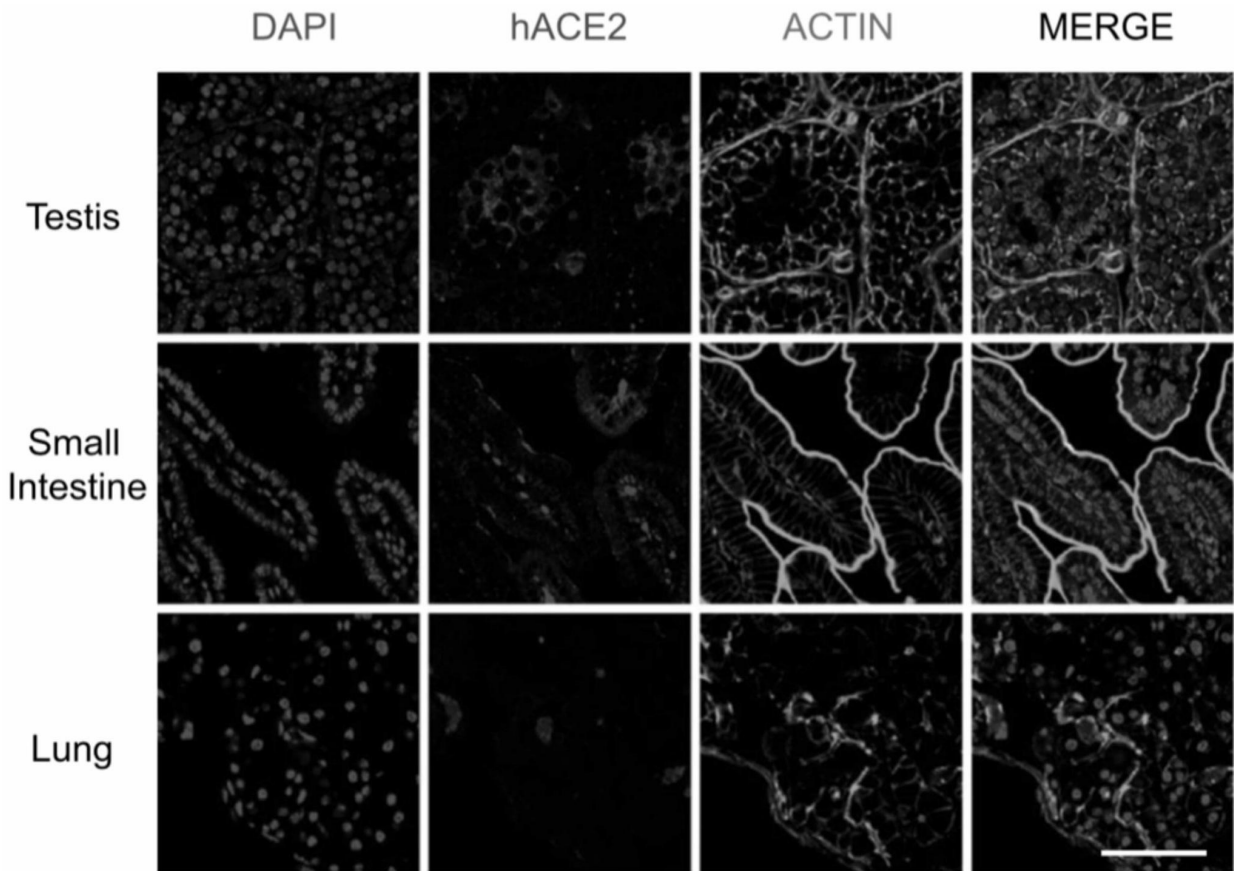


图14



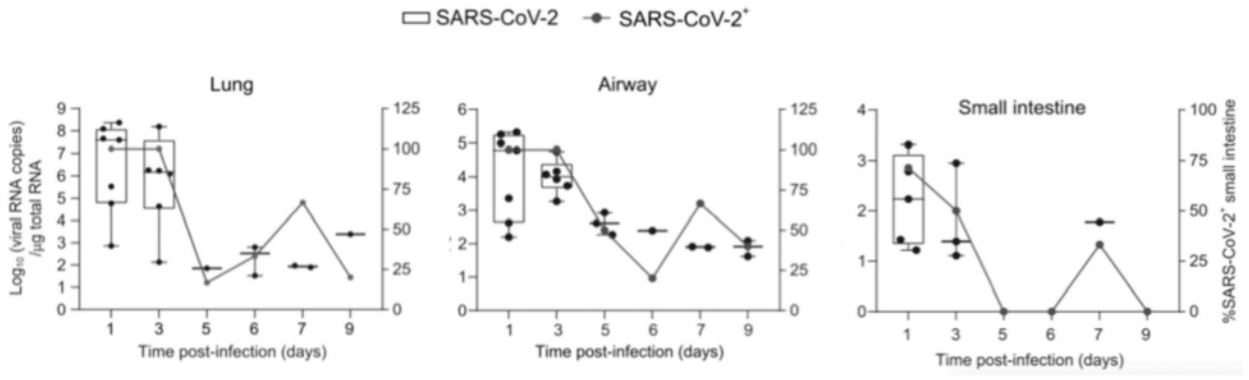


图15