



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104531633 A

(43) 申请公布日 2015.04.22

(21) 申请号 201410656091.4

(22) 申请日 2014.11.18

(71) 申请人 李云英

地址 510000 广东省广州市天河区中山大道
中 45 号美好居 T4

(72) 发明人 李云英

(51) Int. Cl.

C12N 9/22(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

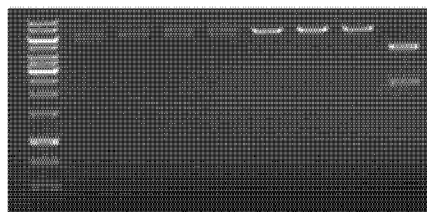
权利要求书1页 说明书10页 附图1页

(54) 发明名称

Cas9-scForkI 融合蛋白及其应用

(57) 摘要

本发明公开一种 Cas9-scForkI 融合蛋白及其应用,属于分子生物学领域,本发明通过基因工程的办法,把失活的 Cas9 蛋白进行改造,用 (G4S)₁₀即 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₁₀是一个 linker,由它连接两个 ForkI,然后和失活的 Cas9 融合成 Cas9-scForkI,该融合蛋白可以序列特异性的进行基因组的编辑,本发明 Cas9-scForkI 融合蛋白做药物筛选或基因修饰更安全,该融合蛋白还可用于基因治疗,本发明和现有技术相比较,设计更加灵活,而且切割活性更高,用作基因敲入的效率更高,蛋白不仅可以用于基因修饰,也可用于基因治疗。



	线性化质粒					线性化质粒		
	-	+	+	+	+	-	+	+
I-TevI ₃₀₁₁ -Cas9 ₆₀₂₂	-	+	+	+	+	-	+	+
tracrRNA	-	-	+	+	+	+	+	+
crRNA	-	-	-	+	+	+	-	+
Mg ²⁺	-	-	-	-	+	-	-	+

1. Cas9-scForkI 融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白为由 SEQ ID NO. 1 所示氨基酸序列组成的蛋白。

2. 编码要求 1 所述的 Cas9-scForkI 融合蛋白的核苷酸序列。

3. 根据权利要求 2 所述的核苷酸序列,其特征在于,所述核苷酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示。

4. 根据权利要求 1 所述的 Cas9-scForkI 融合蛋白,其特征在于,所述的 Cas9 蛋白是失活的 Cas9。

5. 根据权利要求 1 所述的 Cas9-scForkI 融合蛋白,其特征在于,所述的 scForkI 蛋白是由两个 ForkI,中间由一个 (G4S)₁₀连接。

6. 权利要求 1 所述的 Cas9-scForkI 融合蛋白在药物筛选及基因修饰中的应用。

Cas9-scForkI 融合蛋白及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学技术领域,具体涉及一种 Cas9-scForkI 融合蛋白及其应用。

背景技术

[0002] CRISPR-Cas 源自细菌和古细菌的免疫系统,可利用靶点特异性的 RNA 将 Cas9 核酸酶带到基因组上的具体靶点,从而对特定基因位点进行修饰。RNA 导向 Cas9 可以在多种细胞和生物体中发挥功能,在特异位点裂解完整基因组。Cas9 这种基因组编辑的潜能使这项技术已经广泛用于人的细胞系,小鼠,大鼠,多物种的基因敲除及敲入。

[0003] ForkI 是一种限制性核酸内切酶,ForkI 二聚化后就可以对 DNA 进行切割。已经有文献报道,失活的 Cas9 与 ForkI 融合,即 Cas9-ForkI 可用于基因组的编辑。而且 Cas9-ForkI nickase 可以更精确的用于基因组的编辑。但是这两个技术需要设计两个 gRNA 靶向,设计比较复杂。而且 Cas9-ForkI nickase 的切割效率也比较低。本发明用一个失活的 Cas9 蛋白连接两个 ForkI,这两个 ForkI 由 (G4S)₁₀ 连接,该方法设计比较简单,只需要设计一个 gRNA,而且切割活性很高。该方法更适用于介导基因敲入。

发明内容

[0004] 本发明的目的是为了解决现有技术的不足,提供一种 Cas9-scForkI 融合蛋白。本发明通过基因工程的办法,把人源化 Cas9 蛋白进行改造,用 (G4S)₁₀ 即 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₁₀ 是一个 linker,由它连接两个 ForkI 显示,然后和失活的 Cas9 融合成 Cas9-scForkI,该融合蛋白可以序列特异性的进行基因组的编辑。

[0005] 本发明采用的技术方案如下:

Cas9-scForkI 融合蛋白,所述融合蛋白为由 SEQ ID NO. 1 所示氨基酸序列组成的蛋白。

[0006] 编码上述的 Cas9-scForkI 融合蛋白的核苷酸序列。

[0007] 以上核苷酸序列,所述核苷酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示。

[0008] 所述的 Cas9-scForkI 融合蛋白,所述的 Cas9 蛋白是失活的 Cas9。

[0009] 所述的 Cas9-scForkI 融合蛋白,所述的 scForkI 蛋白是由两个 ForkI,中间由一个 (G4S)₁₀ 连接。

[0010] 所述的 Cas9-scForkI 融合蛋白在药物筛选及基因修饰中的应用。

[0011] 本发明与现有技术相比,其有益效果为:本发明通过基因工程的办法,把失活的 Cas9 蛋白进行改造,用 (G4S)₁₀ 即 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₁₀ 是一个 linker,由它连接两个 ForkI,然后和失活的 Cas9 融合成 Cas9-scForkI,该融合蛋白可以序列特异性的进行基因组的编辑。本发明 Cas9-scForkI 融合蛋白做药物筛选或基因修饰更安全,该融合蛋白还可用于基因治疗。

[0012] 本发明和现有技术相比较,设计更加灵活。而且切割活性更高,用作基因敲入的效率更高。蛋白不仅可以用于基因修饰,也可用于基因治疗。

附图说明

[0013] 图 1 为 Cas9-scForkI 蛋白活性的验证图；

图 2 为 Cas9-scForkI 蛋白对 Malt1 基因切割活性验证图。

具体实施方式

[0014] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步的详细描述。

[0015] 本领域技术人员将会理解，下列实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件者，按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

[0016] 本发明中，SEQ ID NO. 8 所示序列、引物 Primer_F1、引物 Primer_R1、Malt1 基因的 gRNA 序列、引物 Primer F、引物 Primer R、引物 Primer_F2 和引物 Primer_R2，均购于生工生物工程(上海)股份有限公司；

胶回收采用胶回收试剂盒，购于天根生化科技(北京)有限公司；

hCas9 载体购于 Addgene, Plasmid 41815；

小鼠 ES 细胞，购于 Millipore；

以 SEQ ID NO. 8 所示合成 Cas9-ForkI-(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₁₀-ForkI DNA 序列是委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成的。

[0017] 实施例 1 Cas9-scForkI 融合蛋白的制备

所述的 Cas9-scForkI 融合蛋白的制备方法，包括步骤如下：

第一部分，pCas9-scForkI 真核表达载体的构建：

以 SEQ ID NO. 8 所示合成 Cas9-ForkI-(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₁₀-ForkI DNA 序列，以 Cas9-ForkI-(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₁₀-ForkI DNA 序列为模板，用引物 Primer_F1 :CAGCC TCCGGACTCTAGAGCCACCATGGACAAGAAGTACTC (SEQ ID NO. 3) 和引物 Primer_R1 :AACTCATTA CTAACCGGTTTCATGAGCGGAAATTGATCTCGC (SEQ ID NO. 4)

进行扩增，配置反应体系如表 1 所示：

表 1 反应体系

5×primerSTAR Buffer	10 ul
dNTP (2.5 mM)	4 μ l
TaKaRa Taq HS (5 U/μ l)	0.5ul
Primer_F1 20pmol	1ul
Primer_R1 20pmol	1ul
Cas9-ForkI-(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser) ₁₀ -ForkI (20ng/ul)	1ul
ddH ₂ O	32.5 ul
总计	50 ul

扩增反应程序：98℃ 10s, 61℃ 30s, 72℃, 5min, 共 30 个循环。

[0018] 胶回收 Cas9-ForkI-(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₁₀-Fork 片段，用 XbaI 和 AgeI 酶切 hCas9 载体，胶回收骨架载体。两个片段进行 In-Fusion 反应(Clothech)，转化，克隆鉴定，最终获得 pCas9-scForkI 真核表达载体。该真核表达载体为了在真核细胞内验证该蛋白的切割活性。

[0019] 第二部分, pET-Cas9-scForkI 原核表达载体的构建:

以 Cas9-ForkI-(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)10-ForkI DNA 序列为模板,用引物 Primer_F2: TTGTTAGCAGCCGGATCCATGGACAAGAAGTACTCCATTGGGC (SEQ ID NO.9)和引物 Primer_R2:ATC GAAGGTCGTCATATGTCATTATGAGCGGAAATTGATCTCG (SEQ ID NO.10)

进行扩增,配置反应体系如表 2 所示:

表 2 反应体系

5×primerSTAR Buffer	10 ul
dNTP (2.5 mM)	4 μl
TaKaRa Taq HS (5 U/μl)	0.5ul
Primer_F2 20pmol	1ul
Primer_R2 20pmol	1ul
Cas9-ForkI-(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)10-ForkI (20ng/ul)	1ul
ddH2O	32.5 ul
总计	50 ul

扩增反应程序:98℃ 10s,61℃ 30s,72℃,5min,共 30 个循环。

[0020] 胶回收 Cas9-ForkI-(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)10-Fork 片段,用 BamHI 和 NdeI 酶切 pET-16b 载体,胶回收骨架载体。两个片段进行 In-Fusion 反应(Clothech),转化,克隆鉴定,最终获得 pET-Cas9-scForkI 原核表达载体。该原核表达载体为了表达该蛋白,用于验证该蛋白对 DNA 的切割活性。

[0021] 第三部分, Cas9-scForkI 蛋白的表达与纯化:

重组质粒 pET-Cas9-scForkI 转化大肠杆菌 E. coli BL21。转化菌在 5ml 氨苄抗性的培养基中培养过夜,次日转移入 500ml 相同的培养基中培养,经 IPTG 16℃过夜诱导,收集所得到的 Cas9-scForkI 蛋白菌体,经过高压破碎后离心获得可溶性的上清,进行 Ni 柱亲和和层析。待目的蛋白与 Ni 柱结合之后,先用漂洗液(20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 5%(v/v)甘油,60mM 咪唑, pH8.0)洗涤,之后用洗脱缓冲液(20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 5%(v/v)甘油,500mM 咪唑, pH8.0)洗脱掉蛋白。利用 PD-10 脱盐柱将洗脱组分中的高盐缓冲液置换成含有体积百分比为 20%甘油的 PBS 溶液,之后进行 SDS-PAGE 的检测,所得即为纯化的 Cas9-scForkI 蛋白。

[0022] 实施例 2 Cas9-scForkI 蛋白切割活性的验证

将 Cas9-scForkI 蛋白(300 nM)与线性化的质粒 pDNA3.1, tracrRNA, Mg²⁺, crRNA 不同组分孵育。发现 Cas9-scForkI 蛋白与线性化的质粒 pDNA3.1, tracrRNA, Mg²⁺, gRNA 孵育这一组, DNA 有切割活性。说明 Cas9-scForkI 蛋白(300 nM)有活性。

[0023] 具体如下:体外转录的 tracrRNA 和 crRNA, 95℃变性,然后慢慢冷却到室温。将 Cas9-scForkI 蛋白与线性化和非线性化的质粒 pDNA3.1(200 ng), Mg²⁺, tracrRNA (100 nM), crRNA (100 nM) 不同组分 37℃孵育一个小时。反应的 buffer 为:20 mM HEPES pH 7.5, 150 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 10 mM MgCl₂。反应一个小时后,加入 5X SDS loading buffer (30% glycerol, 1.2% SDS, 250 mM EDTA)电泳。结果显示如图 1 所示,由图 1 可见, Cas9-scForkI 蛋白与线性化的质粒 pDNA3.1, tracrRNA, Mg²⁺, gRNA 孵育这一组, DNA 有切割活性,其他组没有切割活性。

[0024] 实施例 3 Cas9-scForkI 蛋白对 Malt1 基因切割活性的验证

把 Cas9-scForkI 真核表达载体与针对 Malt1 基因的 gRNA :AACTGTGCTGCCGGCAAC

(SEQ ID NO. 5)电转到小鼠 ES 细胞。电转染 24 小时后,挑取克隆,放到 96 孔板培养。等细胞长满后,每孔加入 47.5 μ l ES 细胞裂解液和 2.5 μ l 10 mg/ml 蛋白酶 K,将板置于 56 °C 孵育箱消化过夜。次日每板配制 10 ml 预冷无水乙醇 +150 μ l 5M NaCl 的混合液,室温静置 2 hrs,让 DNA 沉淀,离心,洗脱得到小鼠 ES 细胞基因组 DNA。细胞裂解液配方为: Tris-HCl pH 7.5 (10 mM), EDTA pH 8.0 (10 mM), NaCl (10 mM), 1% SDS。用引物 Primer F: TGCTTTACAAAGTTTCCAGCTGAAG(SEQ ID NO. 6)和引物 Primer R: AACCAACCAACCAACCAGCTAA (SEQ ID NO. 7) 进行扩增,配置反应体系如表 3 所示:

表 3

10 \times Taq Buffer	5 μ l
dNTP (2.5 mM)	4 μ l
TaKaRa Taq (5 U/ μ l)	0.5 μ l
Primer F 20pmol	1 μ l
Primer R 20pmol	1 μ l
基因组 DNA 100ng/ μ l	1 μ l
ddH ₂ O	37.5 μ l
总计	50 μ l

扩增反应程序:95°C 3min,95°C 10s,60°C 30s,72°C 30s,共 30 个循环。

[0025] 回收 PCR 产物送测序,如图 2,结果显示, Cas9-scForkI 蛋白对 Malt1 基因都有切割活性。

[0026] 所述融合蛋白及上述的引物的序列如下所示,部分序列参见表 5:

SEQ ID NO. 1:

```

MDKKYSIGLA IGTVNSVGVAV ITDEYKVPK KFKVLGNTDR HSIKKNLIGA LLFDSGETAE      60
ATRLKRTARR RYTRRKNRIC YLQEIFSNE AKVDDSFHHR LEESFLVEED KKHERHPIFG      120
NIVDEVAYHE KYPTIYHLRK KLVDSTDKAD LRLIYLALAH MIKFRGHFLI EGDLPNDNSD      180
VDKLFILVQ TYNQLFEENP INASGVDAKA ILSARLSKSR RLENLIAQLP GEKKNGLFGN      240
LIALSLGLTP NFKSNFDLAE DAKLQLSKDT YDDDLNLLA QIGDQYADLF LAAKNLSDAI      300
LLSDILRVNT EITKAPLSAS MIKRYDEHHQ DLTLKALVR QQLPEKYKEI FFDQSKNGYA      360
GYIDGGASQE EFYKFIKPIE EKMDGTEELL VKLNREDLLR KQRTFDNGSI PHQIHLGELH      420
AILRRQEDFY PFLKDNREKI EKILTFRIPY YVGPLARGNS RFAWMTRKSE ETITPWNFEE      480
VVDKGASAQS FIERMTNFDK NLPNEKVLPK HSLLYEYFTV YNELTKVKYV TEGMRKPAFL      540
SGEQKKAIVD LLFKTNRKVT VKQLKEDYFK KIECFDSVEI SGVEDRFNAS LGTYHDLLEKI      600
IKDKDFLDNE ENEDILEDIV LTTLTFEDRE MIEERLKYA HLFDDKVMKQ LKRRRYTGWG      660
RLSRKLINGI RDKQSGKTIL DFLKSDGFAN RNFMLIHDD SLTFKEDIQK AQVSGQGDSL      720
HEHIANLAGS PAIKKGILQT VKVDELVKV MGRHKPENIV IEMARENQTT QKGQKNSRER      780
MKRIEEGIKE LGSQILKEHP VENTQLQNEK LYLYYLQNGR DMYVDQELDI NRLSDYDVAA      840
IVPQSFLKDD SIDNKVLTRS DKARGKSDNV PSEEVVKKMK NYWRQLLNAK LITQRKFDNL      900
TKAERGGGLSE LDKAGFIKRQ LVETRQITKH VAQILDSRMN TKYDENDKLI REVKVITLKS      960
KLVSDFRKDF QFYKVVREINN YHHAHDAYLN AVVGTALIKK YPKLESEFVY GDYKVVYDVRK     1020
MIAKSEQEIG KATAKYFFYS NIMNFFKTEI TLANGEIRKR PLIETNGETG EIVWDKGRDF     1080
ATVRKVLSPV QVNIVKKTEV QTGGFSKESI LPKRNSDKLI ARKKDWDPPK YGGFDSPTVA     1140
YSVLVVAKVE KGKSKKLKSV KELLGITIME RSSFEKNPID FLEAKGYKEV KKDLIIKLPK     1200

```

YSLFELENGR	KRMLASAGEL	QKGNELALPS	KYVNFLYLAS	HYEKLKGSPE	DNEQKQLFVE	1260
QHKHYLDEII	EQISEFSKRV	ILADANLDKV	LSAYNKHRDK	PIREQAENII	HLFTLTNLGA	1320
PAAFKYFDTT	IDRKRYTSTK	EVLDATLIHQ	SITGLYETRI	DLSQLGGDSR	ADPKKKRKVG	1380
SQLVKSELEE	KKSELRHKLK	YVPHEYIELI	EIARNSTQDR	ILEMKVMEFF	MKVYGYRGKH	1440
LGGSRKPDGA	IYTVGSPIDY	GVIVDTKAYS	GGYNLPIGQA	DEMQRVVEEN	QTRNKHINPN	1500
EWVKVYPSSV	TEFKFLFVSG	HFKGNYKAQL	TRLNHITNCN	GAVLSVEELL	IGGEMIKAGT	1560
LTLEEVRRKF	NNGEINFRSG	GGSGGGGSG	GGSGGGGSG	GGSGGGGSG	GGSGGGGSG	1620
GGSGGGGSG	SQLVKSELEE	KKSELRHKLK	YVPHEYIELI	EIARNSTQDR	ILEMKVMEFF	1680
MKVYGYRGKH	LGGSRKPDGA	IYTVGSPIDY	GVIVDTKAYS	GGYNLPIGQA	DEMQRVVEEN	1740
QTRNKHINPN	EWVKVYPSSV	TEFKFLFVSG	HFKGNYKAQL	TRLNHITNCN	GAVLSVEELL	1800
IGGEMIKAGT	LTLEEVRRKF	NNGEINFRS				1829

SEQ ID NO. 2:

atggacaaga	agtactccat	tgggctcgct	atcggcacaa	acagcgtcgg	ctgggccgtc	60
attacggacg	agtacaaggt	gccgagcaaa	aaattcaaag	ttctgggcaa	taccgatcgc	120
cacagcataa	agaagaacct	cattggcgcc	ctcctgttcg	actccgggga	gacggccgaa	180
gccacgcggc	tcaaaagaac	agcacggcgc	agatataccc	gcagaaagaa	teggatctgc	240
tacctgcagg	agatctttag	taatgagatg	gctaaggtgg	atgactcttt	cttccatagg	300
ctggaggagt	cctttttggt	ggaggaggat	aaaaagcacg	agcggcacc	aatctttggc	360
aatatcgtgg	acgaggtggc	gtaccatgaa	aagtacccaa	cataatatca	tctgaggaag	420
aagctttag	acagtactga	taaggctgac	ttgcggttga	tctatctcgc	gctggcgcac	480
atgatcaaat	ttcggggaca	cttctcctc	gagggggacc	tgaaccacga	caacagcgat	540
gtcgacaaac	tctttatcca	actggttcag	acttacaatc	agcttttcga	agagaaccgg	600
atcaacgcat	ccggagttag	cgccaaagca	atcctgagcg	ctaggctgtc	caaatcccgg	660
cggctcgaaa	acctcatcgc	acagctccct	ggggagaaga	agaacggcct	gtttggtaat	720
cttatcgccc	tgtcactcgg	gctgaccccc	aactttaaat	ctaacttcga	cctggccgaa	780
gatgccaagc	ttcaactgag	caaagacacc	tacgatgatg	atctcgacaa	tctgctggcc	840
cagatcggcg	accagtacgc	agaccttttt	ttggcggcaa	agaacctgtc	agacgccatt	900
ctgctgagtg	atattctgcg	agtgaacacg	gagatcacca	aagctccgct	gagcgcctagt	960
atgatcaagc	gctatgatga	gcaccaccaa	gacttgactt	tgtgaaggc	ccttgctcaga	1020
cagcaactgc	ctgagaagta	caaggaaatt	ttcttcgac	agtctaaaaa	tggctacgcc	1080
ggatacattg	acggcgggagc	aagccaggag	gaattttaca	aatttattaa	gccccatttg	1140
gaaaaaatgg	acggcaccga	ggagctgctg	gtaaagctta	acagagaaga	tctgttgccg	1200
aaacagcgea	ctttcgacaa	tggaagcctc	ccccaccaga	ttcacctggg	cgaactgcac	1260
gctatcctca	ggcggcaaga	ggattttctac	ccctttttga	aagataacag	ggaaaagatt	1320
gagaaaatcc	tcacatttcg	gataccctac	tatgtaggcc	ccctcgcccc	gggaaattcc	1380
agattcgcgt	ggatgactcg	caaatcagaa	gagaccatca	ctccctggaa	cttcgaggaa	1440
gtcgtggata	agggggcctc	tgcccagctc	ttcatcgaaa	ggatgactaa	ctttgataaa	1500
aatctgccta	acgaaaaggt	gcttccctaaa	cactctctgc	tgtacagagta	cttcacagtt	1560
tataacgagc	tcaccaaggt	caaatacgtc	acagaaggga	tgagaaaagcc	agcattcctg	1620

tctggagagc	agaagaaagc	tategtggac	ctcctcttca	agacgaaccg	gaaagttacc	1680
gtgaaacagc	tcaaagaaga	ctatctcaaa	aagattgaat	gtttcgactc	tgttgaaatc	1740
agcggagtgg	aggatcgctt	caacgcaccc	ctgggaacgt	atcacgatct	cctgaaaatc	1800
attaaagaca	aggacttctt	ggacaatgag	gagaacgagg	acattcttga	ggacattgtc	1860
ctcaccctta	cgttgtttga	agatagggag	atgattgaag	aacgcttgaa	aacttacgct	1920
catctcttcg	acgacaaagt	catgaaacag	ctcaagaggc	gccgatatac	aggatggggg	1980
cggctgtcaa	gaaaactgat	caatgggatc	cgagacaagc	agagtggaaa	gacaatcctg	2040
gattttctta	agtccgatgg	atctgccaac	cggaacttca	tgcagttgat	ccatgatgac	2100
tctctcacct	ttaaggagga	catccagaaa	gcacaagttt	ctggccaggg	ggacagtctt	2160
cacgagcaca	tcgctaactt	tgcaggtagc	ccagctatca	aaaagggaat	actgcagacc	2220
gttaaggctg	tggatgaact	cgtaaaagta	atgggaaggc	ataagcccga	gaatatacgtt	2280
atcgagatgg	cccagagaaa	ccaaactacc	cagaagggac	agaagaacag	tagggaaagg	2340
atgaagagga	ttgaagaggg	tataaaagaa	ctggggctcc	aatccttaa	ggaacacca	2400
gttgaaaaca	cccagcttca	gaatgagaag	ctctacctgt	actacctgca	gaacggcagg	2460
gacatgtacg	tggatcagga	actggacatc	aatcggctct	ccgactacga	cgtggccgct	2520
atcgtgcccc	agtcttttct	caaagatgat	tctattgata	ataaagtgtt	gacaagatcc	2580
gataaagcta	gaggaagag	tgataacgtc	ccctcagaag	aagttgtcaa	gaaaatgaaa	2640
aattattggc	ggcagctgct	gaacgcaaaa	ctgatcacac	aacggaagtt	cgataatctg	2700
actaaggctg	aacgaggtgg	cctgtctgag	ttggataaag	ccggcttcat	caaaaggcag	2760
cttgttgaga	cacgccagat	caccaagcac	gtggcccaaa	ttctcgattc	acgcatgaac	2820
accaagtacg	atgaaaatga	caaactgatt	cgagaggtga	aagttattac	tctgaagtct	2880
aagctggtct	cagatttcag	aaaggacttt	cagttttata	aggtgagaga	gatcaacaat	2940
taccacatg	cgcatgatgc	ctacctgaat	gcagtggtag	gcactgcact	tatcaaaaaa	3000
tatccaagc	ttgaatctga	atctgtttac	ggagactata	aagtgtacga	tgttaggaaa	3060
atgatcgcaa	agtctgagca	ggaaataggc	aaggccaccg	ctaagtactt	cttttacagc	3120
aatattatga	atcttttcaa	gaccgagatt	acactggcca	atggagagat	tcggaagcga	3180
ccacttatcg	aaacaaacgg	agaaacagga	gaaatcgtgt	gggacaaggg	tagggatttc	3240
gcgacagtcc	ggaaggtcct	gtccatgccg	caggtgaaca	tcgttaaaaa	gaccgaagta	3300
cagaccggag	gcttctccaa	ggaaagtatc	ctcccgaaaa	ggaacagcga	caagctgatc	3360
gcacgcaaaa	aagattggga	ccccaaagaa	tacggcggat	tcgattctcc	tacagtcgct	3420
tacagtgtac	tggttgtggc	caaagtggag	aaaggggaag	ctaaaaaact	caaaagcgtc	3480
aaggaactgc	tgggcatcac	aatcatggag	cgatcaagct	tcgaaaaaaa	ccccatcgac	3540
tttctcgagg	cgaaagata	taaagaggtc	aaaaaagacc	tcatcattaa	gcttccaag	3600
tactctctct	ttgagcttga	aaacggccgg	aaacgaatgc	tcgctagtgc	gggcgagctg	3660
cagaaaggta	acgagctggc	actgccctct	aaatacgtta	atttcttgta	tctggccagc	3720
cactatgaaa	agctcaaagg	gtctcccga	gataatgagc	agaagcagct	gttcgtggaa	3780
caacacaaac	actaccttga	tgagatcacc	gagcaataa	gcgaattctc	caaaagagtg	3840
atcctcgccg	acgtaacct	cgataaggtg	ctttctgctt	acaataagca	cagggataag	3900
cccatcaggg	agcaggcaga	aaacattatc	cacttgttta	ctctgaccac	cttgggcgcg	3960

cctgcagcct	tcaagtactt	cgacaccacc	atagacagaa	agcggtagac	ctctacaaag	4020
gaggtcctgg	acgccacact	gattcatcag	tcaattacgg	ggctctatga	aacaagaatc	4080
gacctctctc	agctcggtag	agacagcagg	gctgacceca	agaagaagag	gaaggtgggt	4140
tccaactcg	tgaagagtga	acttgaggag	aaaaagtcgg	agctcggca	caaattgaaa	4200
tacgtaccgc	atgaatacat	cgaacttate	gaaattgcta	ggaactcgac	tcaagacaga	4260
atccttgaga	tgaagtaaat	ggagttcttt	atgaaggttt	atggataccg	agggaagcat	4320
ctcggtagat	cacgaaaacc	cgacggagca	atctatacgg	tggggagccc	gattgattac	4380
ggagtgatcg	tcgacacgaa	agcctacagc	ggtgggtaca	atcttcccat	cgggcaggca	4440
gatgagatgc	aacgttatgt	cgaagaaaat	cagaccagga	acaacacat	caatccaaat	4500
gagtggtaga	aagtgtatcc	ttcatcagtg	accgagttta	agtttttggt	tgtctctggg	4560
catttcaaag	gcaactataa	ggcccagctc	acacggttga	atcacattac	gaactgcaat	4620
ggtgcggttt	tgtccgtaga	ggaactgctc	attggtggag	aatgatcaa	agcgggaact	4680
ctgacactgg	aagaagtcag	acgcaagttt	aacaatggcg	agatcaattt	ccgctcaggt	4740
ggcggaggtt	caggcggagg	tggatctgga	ggaggcggtt	ccggcggagg	tggttcagga	4800
ggtggaggct	ccggtggagg	tggctcaggt	ggcggaggtt	caggcggagg	tggatctgga	4860
ggaggcggtt	ccggcggagg	tggttcaggt	tccaactcg	tgaagagtga	acttgaggag	4920
aaaaagtcgg	agctcggca	caaattgaaa	tacgtaccgc	atgaatacat	cgaacttate	4980
gaaattgcta	ggaactcgac	tcaagacaga	atccttgaga	tgaagtaaat	ggagttcttt	5040
atgaaggttt	atggataccg	agggaagcat	ctcggtagat	cacgaaaacc	cgacggagca	5100
atctatacgg	tggggagccc	gattgattac	ggagtgatcg	tcgacacgaa	agcctacagc	5160
ggtgggtaca	atcttcccat	cgggcaggca	gatgagatgc	aacgttatgt	cgaagaaaat	5220
cagaccagga	acaacacat	caatccaaat	gagtggtaga	aagtgtatcc	ttcatcagtg	5280
accgagttta	agtttttggt	tgtctctggg	catttcaaag	gcaactataa	ggcccagctc	5340
acacggttga	atcacattac	gaactgcaat	ggtgcggttt	tgtccgtaga	ggaactgctc	5400
attggtggag	aatgatcaa	agcgggaact	ctgacactgg	aagaagtcag	acgcaagttt	5460
aacaatggcg	agatcaattt	ccgctcatga				5490

SEQ ID NO. 8

atggacaaga	agtactccat	tgggctcgat	atcggcacia	acagcgtcgg	ctgggccgctc	60
attacggacg	agtacaaggt	gccgagcaaa	aaattcaaag	tcttgggcaa	taccgatcgc	120
cacagcataa	agaagaacct	cattggcgcc	ctcctgttcg	actccgggga	gacggccgaa	180
gccacgcggc	tcaaaagaac	agcacggcgc	agatataacc	gcagaaagaa	tcggatctgc	240
tacctgcagg	agatctttag	taatgagatg	gctaaggtgg	atgactcttt	cttccatagg	300
ctggaggagt	cttttttggt	ggaggaggat	aaaaagcacg	agcggccacc	aatctttggc	360
aatatcgtgg	acgaggtggc	gtaccatgaa	aagtacccaa	ccatataatca	tctgaggaag	420
aagctttag	acagtactga	taaggctgac	ttgcggttga	tctatctcgc	gctggcgcac	480
atgatcaaat	ttcggggaca	cttccctcgc	gagggggacc	tgaaccacaga	caacagcgcg	540
gtcacaacac	tctttatcca	actggttcag	acttacaatc	agcttttcga	agagaaccgcg	600
atcaacgcac	ccggagttag	cgccaaagca	atcctgagcg	ctaggctgtc	caaatcccgg	660
cggctcgaaa	acctcatcgc	acagctccct	ggggagaaga	agaacggcct	gtttggtaat	720

cttatcgccc	tgtcactcgg	gctgaccccc	aactttaaat	ctaacttcga	cctggccgaa	780
gatgccaagc	ttcaactgag	caaagacacc	tacgatgatg	atctcgacia	tctgctggcc	840
cagatcggcg	accagtacgc	agaccttttt	ttggcggcaa	agaacctgtc	agacgccatt	900
ctgctgagtg	atattctgcg	agtgaacacg	gagatcacca	aagctccgct	gagcgetagt	960
atgatcaagc	gctatgatga	gcaccaccaa	gacttgactt	tgctgaagge	cettgtcaga	1020
cagcaactgc	ctgagaagta	caaggaaatt	ttcttcgatc	agtctaaaaa	tggetacgcc	1080
ggatacattg	acggcggagc	aagccaggag	gaattttaca	aatttattaa	gcccattctg	1140
gaaaaaatgg	acggcaccga	ggagctgctg	gtaaagctta	acagagaaga	tctgttgccg	1200
aaacagcgca	ctttcgacia	tggaagcatc	ccccaccaga	ttcacctggg	cgaactgcac	1260
gctatcctca	ggcggcaaga	ggattttctac	ccctttttga	aagataacag	ggaaaagatt	1320
gagaaaatcc	tcacatttcg	gataccctac	tatgtaggcc	ccctcgcccc	gggaaattcc	1380
agattcgcgt	ggatgactcg	caaatcagaa	gagaccatca	ctccctggaa	cttcgaggaa	1440
gtcgtggata	agggggcctc	tgcccagtcc	ttcatcgaaa	ggatgactaa	ctttgataaa	1500
aatctgccta	acgaaaaggt	gcttcctaaa	cactctctgc	tgtacgagta	cttcacagtt	1560
tataacgagc	tcaccaaggt	caaatacgtc	acagaaggga	tgagaaagcc	agcattcctg	1620
tctggagagc	agaagaaagc	tatcgtggac	ctcctcttca	agacgaaccg	gaaagttacc	1680
gtgaaacagc	tcaaagaaga	ctatttcaaa	aagattgaat	gtttcgactc	tgttgaaatc	1740
agcggagtgg	aggatcgctt	caacgcattc	ctgggaacct	atcacgatct	cctgaaaatc	1800
attaaagaca	aggacttcct	ggacaatgag	gagaacgagg	acattcttga	ggacattgtc	1860
ctcaccctta	cgttgtttga	agatagggag	atgattgaag	aacgcttgaa	aacttacgct	1920
catctcttcg	acgacaaagt	catgaaacag	ctcaagagge	gccgatatac	aggatggggg	1980
cggctgtcaa	gaaaactgat	caatgggatc	cgagacaagc	agagtggaaa	gacaatcctg	2040
gattttctta	agtccgatgg	atttgccaac	cggaacttca	tgcaattgat	ccatgatgac	2100
tctctcacct	ttaaggagga	catccagaaa	gcacaagttt	ctggccaggg	ggacagtctt	2160
cacgagcaca	tcgctaattc	tgcaagtagc	ccagctatca	aaaagggaat	actgcagacc	2220
gttaaggtcg	tggatgaact	cgtcaaagta	atgggaagge	ataagcccga	gaatattcgtt	2280
atcgagatgg	cccagagaaa	ccaaactacc	cagaagggac	agaagaacag	tagggaaagg	2340
atgaagagga	ttgaagaggg	tataaaagaa	ctggggctcc	aaatccttaa	ggaacacca	2400
gttgaaaaca	cccagcttca	gaatgagaag	ctctacctgt	actacctgca	gaacggcagg	2460
gacatgtacg	tggatcagga	actggacatc	aatcggtctt	ccgactacga	cgtggatcat	2520
atcgtgcccc	agtcttttct	caaagatgat	tctattgata	ataaagtgtt	gacaagatcc	2580
gataaaaata	gaggaagag	tgataacgtc	ccctcagaag	aagttgtcaa	gaaaatgaaa	2640
aattattggc	ggcagctgct	gaacgcaaaa	ctgatcacac	aacggaagtt	cgataatctg	2700
actaaggctg	aacgaggtgg	cctgtctgag	ttggataaag	ccgcttcat	caaaaggcag	2760
cttgttgaga	cacgccagat	caccaagcac	gtggcccaaa	ttctcgattc	acgatgaac	2820
accaagtacg	atgaaaatga	caaactgatt	cgagaggtga	aagttattac	tctgaagtct	2880
aagctggtct	cagatttcag	aaaggacttt	cagttttata	aggtgagaga	gatcaacaat	2940
taccacatg	cgcatgatgc	ctacctgaat	gcagtggtag	gcactgcact	tatcaaaaaa	3000
tatccaagc	ttgaatctga	atttgtttac	ggagactata	aagtgctacg	tgttaggaaa	3060

atgatcgcaa	agtctgagca	ggaaataggc	aaggccaccg	ctaagtactt	cttttacagc	3120
aatattatga	atTTTTTcaa	gaccgagatt	acactggcca	atggagagat	tcggaagcga	3180
ccacttatcg	aaacaaacgg	agaaacagga	gaaatcgtgt	gggacaaggg	tagggatttc	3240
gcgacagtcc	ggaaggtcct	gtccatgccg	caggtgaaca	tcgttaaaaa	gaccgaagta	3300
cagaccggag	gcttctccaa	ggaaagtatc	ctccccaaaa	ggaacagcga	caagctgatc	3360
gcacgcaaaa	aagattggga	ccccaaagaa	tacggcggat	tcgattctcc	tacagtcgct	3420
tacagtgtac	tggttgtggc	caaagtggag	aaaggggaagt	ctaaaaaact	caaaagcgtc	3480
aaggaactgc	tgggcatcac	aatcatggag	cgatcaagct	tcgaaaaaaa	ccccatcgac	3540
tttctcgagg	cgaaaggata	taaagaggtc	aaaaaagacc	tcatcattaa	gcttcccaag	3600
tactctctct	ttgagcttga	aaacggccgg	aaacgaatgc	tcgctagtgc	gggcgagctg	3660
cagaaaggta	acgagctggc	actgccctct	aaatacgta	atttcttgta	tctggccagc	3720
cactatgaaa	agctcaaagg	gtctcccga	gataatgagc	agaagcagct	gttcgtggaa	3780
caacacaaac	actaccttga	tgagatcatc	gagcaaataa	gcgaattctc	caaaagagtg	3840
atcctcgccg	acgctaacct	cgataagggtg	ctttctgctt	acaataagca	cagggataag	3900
cccatcaggg	agcaggcaga	aaacattatc	cacttgttta	ctctgaccaa	cttgggcgcg	3960
cctgcagcct	tcaagtactt	cgacaccacc	atagacagaa	agcggtacac	ctctacaaag	4020
gaggtcctgg	acgccacact	gattcatcag	tcaattacgg	ggctctatga	aacaagaatc	4080
gacctctctc	agctcgggtg	agacagcagg	gctgacccca	agaagaagag	gaaggtgggt	4140
tcccaactcg	tgaagagtga	acttgaggag	aaaaagtcgg	agctgcggca	caaattgaaa	4200
tacgtaccgc	atgaatacat	cgaacttatac	gaaattgcta	ggaactcgac	tcaagacaga	4260
atccttgaga	tgaaggtaat	ggagttcttt	atgaaggttt	atggataccg	agggaagcat	4320
ctcgggtgat	cacgaaaacc	cgacggagca	atctatacgg	tggggagccc	gattgattac	4380
ggagtgatcg	tcgacacgaa	agcctacagc	ggtgggtaca	atcttcccat	cgggcaggca	4440
gatgagatgc	aacgttatgt	cgaagaaaat	cagaccagga	acaacacat	caatccaaat	4500
gagtgggtga	aagtgtatcc	ttcatcagtg	accgagttta	agtttttggt	tgtctctggg	4560
catttcaaag	gcaactataa	ggcccagctc	acacggttga	atcacattac	gaactgcaat	4620
ggtgcggttt	tgtccgtaga	ggaactgctc	attggtggag	aatgatcaa	agcgggaact	4680
ctgacactgg	aagaagtcag	acgcaagttt	aacaatggcg	agatcaattt	ccgctcaggt	4740
ggcggaggtt	caggcggagg	tggatctgga	ggaggcggtt	ccggcggagg	tggttcagga	4800
ggtggaggct	ccggtggagg	tggctcaggt	ggcggaggtt	caggcggagg	tggatctgga	4860
ggaggcggtt	ccggcggagg	tggttcaggt	tcccaactcg	tgaagagtga	acttgaggag	4920
aaaaagtcgg	agctcggca	caaattgaaa	tacgtaccgc	atgaatacat	cgaacttatac	4980
gaaattgcta	ggaactcgac	tcaagacaga	atccttgaga	tgaaggtaat	ggagttcttt	5040
atgaaggttt	atggataccg	agggaagcat	ctcgggtgat	cacgaaaacc	cgacggagca	5100
atctatacgg	tggggagccc	gattgattac	ggagtgatcg	tcgacacgaa	agcctacagc	5160
ggtgggtaca	atcttcccat	cgggcaggca	gatgagatgc	aacgttatgt	cgaagaaaat	5220
cagaccagga	acaacacat	caatccaaat	gagtgggtga	aagtgtatcc	ttcatcagtg	5280
accgagttta	agtttttggt	tgtctctggg	catttcaaag	gcaactataa	ggcccagctc	5340
acacggttga	atcacattac	gaactgcaat	ggtgcggttt	tgtccgtaga	ggaactgctc	5400

attggtggag aatgatcaa agcgggaact ctgacactgg aagaagtcag acgcaagttt 5460
 aacaatggcg agatcaattt ccgctcataa tga 5493

表 4 引物序列

	序列	SEQ ID NO.
引物 Primer_F1	CAGCCTCCGGACTCTAGAGCCACCATGGACAAGAAGTACTC	3
引物 Primer_R1	AACTCATTACTAACCGGTTTCATGAGCGGAAATTGATCTCGC	4
Malt1 基因的 gRNA 序列	AACTGTGCTGCCGGCAAC	5
引物 primer F	TGCTTTACAAAGTTTCCAGCTGAAG	6
引物 Primer R	AACCAACCAACCAACCAGCTAA	7
引物 Primer_F2	ttgttagcag ccgatccat ggacaagaag tactccattg ggc	9
引物 Primer_R2	atcgaaggtc gtcatatgtc attatgagcg gaaattgac tcg	10



	线性化质粒					线性化质粒		
I-TevI _{M2201} -Cas9 _{M211}	-	+	+	+	+	-	+	+
tracrRNA	-	-	+	+	+	+	+	+
crRNA	-	-	-	+	+	+	-	+
Mg ²⁺	-	-	-	-	+	-	-	+

图 1

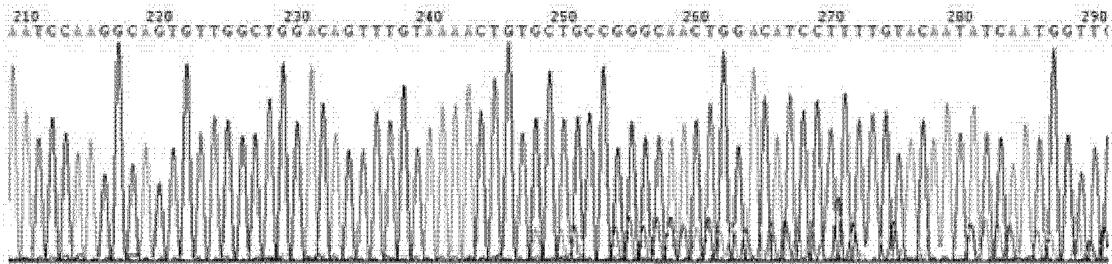


图 2