



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109112162 B

(45) 授权公告日 2021.10.15

(21) 申请号 201811006750.4

审查员 温婧

(22) 申请日 2018.08.30

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109112162 A

(43) 申请公布日 2019.01.01

(73) 专利权人 西南大学

地址 400715 重庆市北碚区天生路2号

(72) 发明人 付彬 徐兴然 彭怡 王柏彬

杨丹 吴慧 杨春丽

(74) 专利代理机构 成都九鼎天元知识产权代理

有限公司 51214

代理人 邓亚君

(51) Int. Cl.

C12N 15/90 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

权利要求书1页 说明书8页

序列表2页 附图3页

(54) 发明名称

利用CRISPR/Cas9技术构建的亨廷顿病原位敲入小鼠模型及构建方法

(57) 摘要

本发明公开了一种利用CRISPR/Cas9技术构建的亨廷顿病原位敲入小鼠模型及构建方法,涉及生物技术领域。该方法其包括:设计gRNA靶点序列对,检测其体外Cas9酶切活性,挑选体外活性合格的gRNA靶点序列对备用;合成Donor DNA;将Cas9 mRNA、Donor DNA以及体外活性合格的gRNA靶点序列对混合均匀,对供体小鼠进行胚胎显微注射,再将胚胎移植到受体小鼠中备孕,繁殖子代即得。本发明不改变小鼠HD基因的表达调控,仅改变其特定致病基因的长度,利用CRISPR/Cas9技术成功构建HD原位敲入小鼠模型,为进一步模拟人类HD缓慢且迟发的发病过程及后续临床治疗研究提供一种新途径。

1. 利用CRISPR/Cas9技术构建亨廷顿病原位敲入小鼠模型的方法,其特征在于,其包括如下步骤:

(1) 设计gRNA靶点序列对,并检测其体外Cas9酶切活性,挑选出体外活性合格的gRNA靶点序列对备用,所述gRNA靶点序列对包括L序列和R序列,所述L序列的碱基序列如SEQ ID NO.1所示,所述R序列的碱基序列如SEQ ID NO.2所示;

(2) 利用全基因合成Donor DNA,所述Donor DNA的碱基序列如SEQ ID NO.3所示,所述Donor DNA中包括150个连续的cag或caa重复;

(3) 将Cas9 mRNA、Donor DNA以及体外活性合格的gRNA靶点序列对混合均匀,对供体小鼠进行胚胎显微注射,再将胚胎移植到受体小鼠中备孕,繁殖子代即得。

2. 根据权利要求1所述的利用CRISPR/Cas9技术构建亨廷顿病原位敲入小鼠模型的方法,其特征在于,为促进胚胎形成,对雌性小鼠进行超数排卵处理,先对其进行激素孕马血清促性腺激素注射,46-48h后,然后对其进行人绒毛膜促性腺激素注射,将注射后的雌鼠和雄鼠进行合笼交配,次日将见栓小鼠取出。

3. 根据权利要求2所述的利用CRISPR/Cas9技术构建亨廷顿病原位敲入小鼠模型的方法,其特征在于,从见栓小鼠的输卵管中取出卵团,分离出胚胎进行体外培养,经体外培养后对胚胎进行显微注射。

4. 根据权利要求3所述的利用CRISPR/Cas9技术构建亨廷顿病原位敲入小鼠模型的方法,其特征在于,显微注射的成份为:浓度为100ng/ $\mu$ L的Cas9 mRNA 1 $\mu$ L,浓度为20ng/ $\mu$ L的L序列和R序列各1 $\mu$ L,浓度为50ng/ $\mu$ L的Donor DNA 8 $\mu$ L,用加入无酶无菌水至总体积为20 $\mu$ L。

5. 根据权利要求4所述的利用CRISPR/Cas9技术构建亨廷顿病原位敲入小鼠模型的方法,其特征在于,所述受体小鼠为7-9周龄的ICR品系雌鼠;移植前一天将发明的受体小鼠与ICR品系结扎雄鼠合笼交配,移植当天挑选见栓受体备用。

6. 根据权利要求5所述的利用CRISPR/Cas9技术构建亨廷顿病原位敲入小鼠模型的方法,其特征在于,见栓受体经麻醉后进行胚胎移植。

## 利用CRISPR/Cas9技术构建的亨廷顿病原位敲入小鼠模型及构建方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其是一种利用CRISPR/Cas9技术构建的亨廷顿病原位敲入小鼠模型及构建方法。

### 背景技术

[0002] 亨廷顿舞蹈症(Huntington's Disease,HD)属于一种神经退行性疾病,随着年龄增长患者会出现神经功能性退化或障碍,主要表现在认知、运动、感官等上的缓慢衰退。研究认为HD的发病原因主要是由于人4号常染色体上Htt(IT15)基因的Exon1内发生谷氨酰胺(CAG)的突变加长,导致亨廷顿突变蛋白(mHTT)错误折叠,引起细胞病变坏死。

[0003] CRISPR/Cas9系统是第三代人工核酸内切酶,该技术构建简单、打靶效率较高、适用物种较为广泛,目前已成为现阶段进行基因编辑研究的热门工具之一。相比前两代系统,CRISPR/Cas9最大优势就是可以在靶点区域的特定位点形成一个单链切口,这不仅可以降低诱导基因修复的非同源末端连接(Non homology end joining,NHEJ)的概率,还可以激活细胞的同源重组修复机制(Homologous recombination,HR)。这种特性既降低了脱靶风险,同时又供给HR需要的目标Donor质粒,大大增加了目的基因突变概率。

[0004] 目前,对于HD疾病模型的构建有很多,包括非人类灵长类动物HD疾病转基因模型的构建,HD疾病敲入猪模型的构建,HD疾病小鼠模型的构建等。由于小鼠HD模型造价相对低廉、模型相对有效等优点,更受研究者的青睐。但在本专利申请之前利用此靶点的小鼠HD模型及其构建方法还未见报道。

### 发明内容

[0005] 本发明的第一发明目的在于:针对上述存在的问题,提供一种利用CRISPR/Cas9技术构建亨廷顿病原位敲入小鼠模型的方法,该方法利用CRISPR/Cas9技术在小鼠Htt(IT15)基因上原位敲入一段包含150Q长度的HD致病基因,成功构建HD敲入小鼠模型。

[0006] 本发明的第二发明目的在于,提供一种HD原位敲入小鼠模型,该模型通过上述方法构建而成,近似的模拟人类HD疾病发病机制,为进一步探究HD的发病机理和HD的治疗方法提供一定的基础。

[0007] 本发明采用的技术方案如下:

[0008] 利用CRISPR/Cas9技术构建亨廷顿病原位敲入小鼠模型的方法,其包括如下步骤:

[0009] (1)设计gRNA靶点序列对,并检测其体外Cas9酶切活性,挑选出体外活性合格的gRNA靶点序列对备用;

[0010] (2)利用全基因合成Donor DNA;

[0011] (3)将Cas9mRNA、Donor DNA以及体外活性合格的gRNA靶点序列对混合均匀,对供体小鼠进行胚胎显微注射,再将胚胎移植到受体小鼠中备孕,繁殖子代即得。

[0012] 本发明的一种利用CRISPR/Cas9技术构建亨廷顿病原位敲入小鼠模型的方法,挑

选出的体外活性合格的gRNA靶点序列包括L序列和R序列,所述L序列的碱基序列如SEQ ID NO.1 所示,所述R序列的碱基序列如SEQ ID NO.2所示。

[0013] 本发明的一种利用CRISPR/Cas9技术构建亨廷顿病原位敲入小鼠模型的方法,所述Donor DNA的碱基序列如SEQ ID NO.3所示,所述Donor DNA中包括150个连续的cag或caa重复。

[0014] 本发明的一种利用CRISPR/Cas9技术构建亨廷顿病原位敲入小鼠模型的方法,为促进胚胎形成,对雌性小鼠进行超数排卵处理,先对其进行激素孕马血清促性腺激素注射,46-48h 后,然后对其进行人绒毛膜促性腺激素注射,将注射后的雌鼠和雄鼠进行合笼交配,次日将见栓小鼠取出。

[0015] 本发明的一种利用CRISPR/Cas9技术构建亨廷顿病原位敲入小鼠模型的方法,从见栓小鼠的输卵管中取出卵团,分离出胚胎进行体外培养,经体外培养后对胚胎进行显微注射。

[0016] 本发明的一种利用CRISPR/Cas9技术构建亨廷顿病原位敲入小鼠模型的方法,显微注射的成份为:浓度为100ng/ $\mu$ L的Cas9mRNA 1 $\mu$ L,浓度为20ng/ $\mu$ L的L序列和R序列各1 $\mu$ L,浓度为50ng/ $\mu$ L的Donor DNA 8 $\mu$ L,用加入无酶无菌水至总体积为20 $\mu$ L。

[0017] 本发明的一种利用CRISPR/Cas9技术构建亨廷顿病原位敲入小鼠模型的方法,所述受体小鼠为7-9周龄的ICR品系雌鼠;移植前一天将发明的受体小鼠与ICR品系结扎雄鼠合笼交配,移植当天挑选见栓受体备用。

[0018] 本发明的一种利用CRISPR/Cas9技术构建亨廷顿病原位敲入小鼠模型的方法,见栓受体经麻醉后进行胚胎移植。

[0019] 一种亨廷顿病原位敲入小鼠模型,其采用上述任一利用CRISPR/Cas9技术构建亨廷顿病原位敲入小鼠模型的方法构建而成。

[0020] 综上所述,由于采用了上述技术方案,本发明的有益效果是:

[0021] 本发明提供了利用CRISPR/Cas9技术构建的亨廷顿病原位敲入小鼠模型及构建方法,该方法首先设计合成gRNA靶点序列对和Donor序列,然后将二者与Cas9mRNA混合后进行胚胎显微注射,再将胚胎移植到受体小鼠中备孕,繁殖F0代小鼠,随后繁殖F1、F2、F3代小鼠,对F0、F1、F2、F3代小鼠进行基因型鉴定,结果表明F0代、F1代、F2代及F3代小鼠基因组上均出现150Q的准确敲入,且子代稳定遗传。本发明在不改变小鼠HD基因表达调控的基础上,仅改变其特定致病基因的长度,利用CRISPR/Cas9技术成功构建HD原位敲入小鼠模型,为进一步模拟人类HD缓慢且迟发的发病过程及后续临床治疗研究提供一种新途径。

## 附图说明

[0022] 本发明将通过例子并参照附图的方式说明,其中:

[0023] 图1是F0代小鼠基因型PCR电泳鉴定结果图;

[0024] 图2是F1代小鼠基因型PCR电泳鉴定结果图;

[0025] 图3是F2代小鼠基因型PCR电泳鉴定结果图;

[0026] 图4是F3代小鼠基因型PCR电泳鉴定结果图;

[0027] 图5是子代基因型测序结果图。

[0028] 正确敲入150Q小鼠的电泳条带在1147bp,而未敲入小鼠的电泳条带在718bp。图1-



gaa actggggcggtggcgcacatgactgttgtgaagagaacttggagaggcagagatctctagggttacctcctc  
atcaggcctaagagctgggagt gcaggacagcgtgagagatgtgctggtagtgatgacataa.

[0037] 全序列共计1414bp,其中,下划线部分为150Q。

[0038] 实施例3显微注射

[0039] (1) 显微注射准备

[0040] 根据碱基序列设计上游引物Htt-F:atcctcttgccttggccctcttc;下游引物Htt-R:ttatgtcatccactaccgcac,再以全基因合成好的Donor DNA为模板,按照表1中的PCR反应体系和反应条件进行PCR。将PCR产物经过琼脂糖凝胶纯化回收后,测定其浓度,作为后续显微注射的Donor DNA。按照表2进行显微注射组分的配制,将配制好的组分进行4℃高速离心,10min后取出15μL进行后续显微注射实验。

[0041] 表1Donor DNA的PCR反应体系及反应条件

PCR 反应体系		PCR 反应条件	
组分	用量	温度	时间
KOD FX (TOYOBO, KFX-201)	0.5μL	94℃	2min
dNTPs	5μL	98℃	10 sec
2xBuffer	12.5μL	60℃	30 sec
DNA	2μL	68℃	1min
Primer (F/R)	1μL each	68℃	10 min
Add RNase-free H <sub>2</sub> O to	25μL	16℃	2 min

[0043] 表2显微注射各组分的浓度及用量

组分	浓度	用量
Cas9 mRNA	100ng/μL	1μL
Htt-L3 gRNA	20ng/μL	1μL
Htt-R3 gRNA	20ng/μL	1μL
Donor DNA	50ng/μL	8μL
Add RNase-free H <sub>2</sub> O to	20μL	9μL

[0045] (2) 胚胎供体小鼠的超数排卵处理

[0046] 准备4周龄且身体健康的C57雌鼠、激素孕马血清促性腺激素(PMSG)和人绒毛膜促性腺激素(HCG)。在下午14:30进行PMSG注射,每只雌鼠注射PMSG的浓度为10个单位(10IU/mL),剂量为0.2ml。间隔46-48小时,再进行HCG注射,每只雌鼠注射HCG的浓度为10个单位,剂量为0.2ml。然后将注射后的雌鼠和雄鼠进行合笼交配,次日将见栓老鼠取出。

[0047] (3) 胚胎获取及体外培养

[0048] 准备胚胎培养基,置于37℃、CO<sub>2</sub>浓度为5%的培养箱中。将见栓老鼠处以安乐死后,将其腹腔抛开,用剪刀将输卵管剪下,置于胚胎培养基中。在一个平皿上准备3个100uL的胚胎培养基液滴,放置在显微镜载物台上,再用尖镊将放置在液滴中的输卵管划破,然后将卵团取出。用透明质酸酶进行消化,去除多余颗粒细胞,将卵清洗干净后放在液体培养基中进行培养。

[0049] (4) 显微注射

[0050] 显微注射采用Narishige NT-88-V3显微操作系统:接通仪器电源并打开开关。打

开显微操作仪的灯光,调整合适的亮度后再打开温台开关。打开操作臂的开关,将固定针、注射针的固定臂上升。用拉针仪拉取注射针,并用移液枪吸取注射组分放入注射针中,然后将注射针、固定针放入固定针杆中并固定在操作臂上。用石蜡油将培养基进行覆盖后,将培养皿放在操作平台上,调整操作平台使营养液滴处于视野中央,用口吸管将胚胎转移至培养皿中等待注射。将注射针、固定针下降,调整焦距并对注射针、固定针微调,使注射针、固定针处于同一平面的视野正中。打开注射气泵,调整注射压力、注射时间至合适的目标值。将胚胎固定在固定针上,调整焦距,将注射针扎入胚胎,点击鼠标完成注射。操作完毕,上升注射针、固定针固定臂,取下注射针、固定针,关闭注射泵、光源、操作臂开关、温台等,最后拔掉电源。

[0051] 实施例4胚胎移植

[0052] (1) 受体小鼠准备

[0053] 选取ICR品系的7-9周龄雌鼠作为受体。在移植前一天挑选发情的雌鼠(ICR 7-9w)与ICR 结扎雄鼠合笼交配,第二天挑选见栓受体备用。

[0054] (2) 胚胎移植

[0055] 将受体雌鼠腹腔注射0.5mL麻药,放在一个干净盒子中,等其麻醉。取一个培养皿,用移液枪在培养皿中点上四个干净的M2液(M2培养液)滴。用移植针将胚胎从培养皿滴中转移到干净的M2滴中,更换干净的移植针后,将胚胎在剩余三个干净的M2液滴中清洗。判断小鼠是否进入麻醉状态,若进入麻醉状态即可开始进行手术,反之依据情况补打麻药。用婴儿理发器除去小鼠两侧脊部偏下方毛发,并用70%的酒精进行消毒。用移植针吸取M2(可分为三段),在前端做两个气泡后吸入胚胎,然后在胚胎前端再做一个气泡,吸好后将移植针放在一旁备用。在脊腰中央纵向处剪开皮肤,开口约为0.7cm,用直剪对皮肤做钝性分离,见到肌肉层,透过肌肉层可见白色脂肪垫位于脊柱两侧约1cm处,剪开肌肉层见到脂肪垫,将脂肪垫用直镊轻轻提起,用脂肪夹夹住脂肪向左旋转。在显微镜下观察输卵管,观察到在输卵管上有一段膨大部为壶腹部,移植剪口位置在壶腹部后方的第一个拐弯处,用尖镊轻轻提起输卵管,显微剪轻轻在拐弯处剪一个口,将吸好胚胎的移植针轻轻从剪口处插入,将胚胎慢慢吹入壶腹部。将脂肪夹松开,把输卵管和卵巢重新放回受体雌鼠体内。缝合皮肤和肌肉层,放入准备好的鼠盒内,送到动物饲养间进行喂养。移植后的小鼠预计20天后出生F0代。

[0056] 实施例5小鼠出生、繁殖情况及其基因型鉴定

[0057] (1) 小鼠出生及繁殖情况

[0058] 对F0代小鼠的出生日期、出生只数、性别等进行记录,用耳标对其进行标记。待基因型正确的F0代小鼠性成熟后,与野生型C57小鼠交配,繁殖得到F1代小鼠,记录F0代小鼠的交配日期及F1代小鼠相关信息,用耳标对其进行标记。待基因型正确的F1代小鼠性成熟后,与野生型C57小鼠交配,繁殖得到F2代小鼠,记录F2代小鼠相关信息,用耳标对其进行标记。待基因型正确的F2代小鼠性成熟后,在F2代小鼠之间进行交配,繁殖得到F3代小鼠。

[0059] (2) 小鼠基因型鉴定

[0060] 采用血液/组织/细胞基因组提取试剂盒(天根生化科技有限公司,货号:DP304-02)和Mouse Tail DNA Mini Kit(成都福际生物技术有限公司,货号:DE-05211)对小鼠基因组进行提取,并将DNA保存至-20℃冰箱中。

[0061] 血液/组织/细胞基因组提取试剂盒(天根):在小鼠出生3周后剪其鼠尾,收集鼠

尾,并做好标记,将鼠尾减碎后,加入200 $\mu$ L缓冲液GA,再加入20 $\mu$ L Proteinase K溶液,涡旋混匀后,置于56 $^{\circ}$ C水浴过夜。第二天加入200 $\mu$ L缓冲液GB,充分颠倒混匀,70 $^{\circ}$ C水浴10min。冷却至室温后,加入200 $\mu$ L无水乙醇,充分震荡混匀15S,将混合液全部转入吸附柱CB3中,12000rpm离心30S,弃废液。然后加入500 $\mu$ L缓冲液GD(确认已经加过乙醇)到吸附柱CB3中,12000rpm离心30S,弃废液。再加入600 $\mu$ L漂洗液PW(确认已经加过乙醇)到吸附柱CB3中,12000rpm离心30S,弃废液。重复上一步漂洗步骤一次。12000rpm空离3min后取出,将吸附柱放置于新的1.5mL EP管中(EP管可提前写好标记),打开吸附柱盖子晾干30min。然后向吸附柱中悬空加入50 $\mu$ L洗脱液TE(洗脱液TE可事先加热至70 $^{\circ}$ C),盖上盖子充分溶解5min。12000rpm离心2min后取出,测基因组的浓度,若没问题,弃吸附柱,将提取的基因组置于-20 $^{\circ}$ C冰箱保存。

[0062] Mouse Tail DNA Mini Kit(福际):剪取0.5-1cm鼠尾,剪碎后放入1.5ml或2ml干净的离心管中。鼠尾应尽量剪短成1mm左右小段,以便于后续酶解反应。向离心管中加入400 $\mu$ l Buffer TL1,40 $\mu$ l Foregene Protease Plus,涡旋混匀。置于65 $^{\circ}$ C水浴中2-3h,其间可涡旋混匀以帮助鼠尾酶解,直至只剩毛发和骨骼为止。涡旋时间不宜过长,每次5秒钟即可,长时间的剧烈涡旋会导致基因组DNA断裂。酶解完成后,冷却至室温,再加入400 $\mu$ l Buffer TL2,颠倒混匀,置于65 $^{\circ}$ C水浴中10min,12000rpm离心10min。将上清液转移到离心柱中,12000rpm离心1min,弃掉废液。加入500 $\mu$ l Buffer PW,12000rpm离心1min,弃掉废液。加入700 $\mu$ l漂洗液Buffer WB,12000rpm离心1min,弃掉废液。重复漂洗一次。将离心柱放回收集管中,12000rpm空管离心2min,去掉离心柱中残余的Buffer WB。将离心柱移至新的1.5ml离心管中,晾干30min,向离心柱膜中间位置滴加100 $\mu$ l Buffer EB(Buffer EB可事先放在65 $^{\circ}$ C水浴中加热),5min后12000rpm离心1min。将第1次离心得到的溶液重新加回离心柱中,5min后12000rpm离心1min。测定基因组浓度,若没问题,弃离心柱,将提取的基因组置于-20 $^{\circ}$ C冰箱保存。

[0063] 根据150Q Donor片段在小鼠基因组的敲入位点,设计了相应的引物:

[0064] 上游引物11-5F:gacgacgcacatccgcctgtcaattctg;

[0065] 下游引物11-6R:ctccagaagagagaaacaagttcgttc。

[0066] 按照表3所示的PCR反应体系及条件进行小鼠基因型鉴定,将PCR产物纯化回收后进行TA-克隆,挑选单菌落进行测序,进一步验证基因型是否正确。

[0067] 表3小鼠基因型鉴定的PCR反应体系及反应条件

PCR 反应体系		PCR 反应条件	
组分	用量	95 $^{\circ}$ C	3min
[0068] DNA	2 $\mu$ L	94 $^{\circ}$ C	30sec
	11-5F (10 $\mu$ mol/L)	1.5 $\mu$ L	62 $^{\circ}$ C
			30sec } 35Cycle
	11-6R (10 $\mu$ mol/L)	1.5 $\mu$ L	72 $^{\circ}$ C
[0069] TSE101 Mix (green)	Up to 50 $\mu$ L	72 $^{\circ}$ C	10min

[0070] (3) F0代小鼠基因型鉴定结果

[0071] 如表4所示,经过显微注射和胚胎移植后,共有6只F0代小鼠出生。经过PCR电泳鉴

定,鉴定结果如图1所示。图1中,M为marker泳道,1-6分别为6只F0代小鼠的编号。由电泳结果可以确定,♂2号和♂3号小鼠基因型正确。待其性成熟后,与野生型健康的C57雌鼠进行交配,培育F1代小鼠。

[0072] 表4 F0代小鼠出生情况

注射日期	注射卵数	移植卵数	受体只数	出生日期	只数	性别编号	鉴定结果	备注
2017/6/13	47	44	2	--				未孕
2017/8/02	84	56	2	2017/8/21	6	1-4♂ 5-6♀	♂2 ♂3	后续交配
2017/8/22	70	64	3	--				未孕

[0074] (4) F1代小鼠基因型鉴定结果

[0075] 如表5所示,经交配后,共有20只F1代小鼠出生。经过PCR电泳和测序鉴定,电泳结果如图2所示,测序结果见图5。图2中,M为marker泳道,F1-3至F1-9分别为基因型正确的F1代小鼠的编号。♂2号和野生型C57雌鼠交配所得F1代小鼠♂1号、♂2号、♂3号、♂4号、♀7号、♀9号基因型正确。待其性成熟后,与野生型健康的C57小鼠进行交配,培育F2代小鼠。

[0076] 表5 F1代小鼠出生情况

F0代	交配日期	出生日期	只数	性别编号	鉴定结果	备注
2♂x C57♀	2017/10/20	2017/11/16	10	1-6♂7-10♀	♂1、♂2 ♂3、♂4 ♀7、♀9	后续交配
3♂x C57♀	2017/10/20	2017/11/16	10	1-6♂7-10♀	无阳性	处死

[0078] (5) F2代小鼠基因型鉴定结果

[0079] 如表6所示,经过两个月不连续交配后,截至2018年4月30日,共有81只F2代小鼠出生。经过PCR电泳和测序鉴定,电泳结果如图3所示,测序结果见图5。图3中,M为marker泳道,F2-5至F2-82分别为基因型正确的F2代小鼠的编号。在F2代小鼠中,一共有雄性22只、雌性23只基因型正确。

[0080] 表6 F2代小鼠出生情况

F1代	交配日期	出生日期	只数	鉴定结果
1♂x C57♀	2018/02/02	2018/02/25	共出生 30 只 ♂14 只♀16 只	♂2、4、7、10、 24、28、45、47、 50、51、52、53、 55、56、57、58、 60、63、69、72、 74、75
2♂x C57♀	2018/02/02	2018/02/25		
7♀x C57♂	2018/02/02	2018/02/28		
9♀x C57♂	2018/02/02	2018/02/28	共出生 28 只 ♂12 只♀16 只	♀12、16、20、 25、33、34、36、 38、39、40、43、 44、46、48、64、 65、67、76、77、 78、79、81、82
1♂x C57♀	2018/02/10	2018/03/08		
2♂x C57♀	2018/02/10	2018/03/10		
7♀x C57♂	2018/03/24	2018/04/15	共出生 23 只 ♂12 只♀11 只	
9♀x C57♂	2018/03/24	2018/04/15		
1♂x C57♀	2018/04/08	2018/04/30		
2♂x C57♀	2018/04/08	2018/04/30		

[0082] (6) F3代小鼠基因型鉴定结果

[0083] 将F2代小鼠进行相互交配,培育出F3代小鼠。截至2018年7月1日,共有18只F3代小鼠出生,具体情况如表7所示。经过PCR电泳和测序鉴定,电泳结果如图4所示,测序结果见图5。图4中,M为marker泳道,F3-93至F3-100分别为基因型正确的F3代小鼠的编号。共有11只F3代小鼠基因型正确,其中雄性8只、雌性3只。但这11只小鼠中并没有纯合子,故2018年7月31日将F2代基因型正确的小鼠再次进行交配。

[0084] 表7 F3代小鼠出生情况

F2代	交配日期	出生日期	只数	性别编号	鉴定结果
20♀x47♂	2018/06/06	2018/07/01	2	♀83、♀84	无阳性
40♀x24♂	2018/06/06	2018/06/27	3	♀85、♂86、♀87	85、86、87 均为杂合子
34♀x24♂	2018/06/06	2018/06/29	3	♀88、♀89、♀90	无阳性
[0085] 12♀x47♂	2018/06/06	2018/07/01	5	♂91、♀92、♂93、♀94、 ♂95	91、93、95 均为杂合子
48♀x2♂	2018/06/06	2018/06/29	3	♂96、♂97、♂98	96、97、98 均为杂合子
36♀x4♂	2018/06/06	2018/07/01	2	♀99、♂100	99、100 均为杂合子

[0086] 由此可见,本发明在不改变小鼠HD基因表达调控的基础上,仅改变其特定致病基因的长度,利用CRISPR/Cas9技术成功构建HD原位敲入小鼠模型,且子代稳定遗传,为进一步模拟人类HD缓慢且迟发的发病过程及后续临床治疗研究提供一种新的途径。

[0087] 本发明并不局限于前述的具体实施方式。本发明扩展到任何在本说明书中披露的新特征或任何新的组合,以及披露的任一新的方法或过程的步骤或任何新的组合。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 西南大学
- [0003] <120> 利用CRISPR/Cas9技术构建的亨廷顿病原位敲入小鼠模型及构建方法
- [0004] <160> 3
- [0005] <170> PatentIn version 3.5
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 21
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人工序列
- [0010] <400> 1
- [0011] caagatggct gagcgccttg g 21
- [0012] <210> 2
- [0013] <211> 21
- [0014] <212> DNA
- [0015] <213> 人工序列
- [0016] <400> 2
- [0017] cgggaaagcc tggcctcagg g 21
- [0018] <210> 3
- [0019] <211> 1414
- [0020] <212> DNA
- [0021] <213> 人工序列
- [0022] <400> 3
- [0023] atcctcttgc ttggcctct tctaagg gggctggctt ttgcgggaag gggcggggcc 60
- [0024] acatcggcgg ggcgagagt cttaactag cagaggccc gcaggcctgc gtcctgactt 120
- [0025] cgggaaagag gacgacgat ccgctgtca attctgcggg tctggcgtgg cctcgtctcc 180
- [0026] gccgcatga cgtaacgga cgaactgcc gcgagggtt cgggacggg cccaagatgg 240
- [0027] ctgagcgcct tcctccgct tctgcctgcc gcgcagagcc ccattcattg ccttgctgct 300
- [0028] aagtggcgcc gcgtagtgcc agtaggctcc aagtcttcag ggtctgtccc atcgggcagg 360
- [0029] aagccgcat ggcaaccctg gaaaagtga tgaaggcttt cgagtcgctc aagtcgtttc 420
- [0030] agcagcaaca gcagcagcag caacagcagc agcaacagca gcagcaacag cagcagcagc 480
- [0031] aacagcagca gcaacagcag cagcagcagc agcaacagca gcagcagcaa cagcagcagc 540
- [0032] agcagcagca acagcagcag cagcagcaac agcaacagca gcagcagcag cagcaacagc 600
- [0033] agcagcagca acagcagcag caacagcagc agcagcaaca gcagcagcaa cagcagcagc 660
- [0034] aacagcagca gcagcagcag caacagcagc agcagcagca acagcagcag cagcaacagc 720
- [0035] agcagcagca gcaacagcag cagcagcaac agcagcagca gcaacagcag cagcaacagc 780
- [0036] agcaacagca gcagcagcag cagcagcaac agcagcagca gcagcaacag cagcagcaac 840
- [0037] agcagcaaca gcagcagcaa cagcagcagc caccgccgca ggcgccgccc ccaccgccg 900
- [0038] cgccgcctcc gcctcaacc cctcagccgc cgcctcagg gcagccgccc ccgccaccac 960
- [0039] cgccgctgcc aggtccgga gaggaaccgc tgcaccgacc gtgagtccgg gcgccgcagc 1020
- [0040] tcccgccgg gccccgccc cctggcctgc gtgctgggca tggccaacac tgttcctgt 1080
- [0041] ccagagggtc gcggtacctg gctgaggcca ggctttccc gcccgggccc tcgtcttgcg 1140

---

[0042] gggctctctgg cctccctcag aggagacaga gccgggtcag gccagccagg gactcgctga 1200  
[0043] ggggcgtcac gactccagtg ctttcgccgt tcccagttg cgaagttagg gaacgaactt 1260  
[0044] gtttctctct tctggagaaa ctggggcggg ggcgcacatg actgttgtga agagaacttg 1320  
[0045] gagaggcaga gatctctagg gttacctcct catcaggcct aagagctggg agtgcaggac 1380  
[0046] agcgtgagag atgtgcgggt agtggatgac ataa 1414

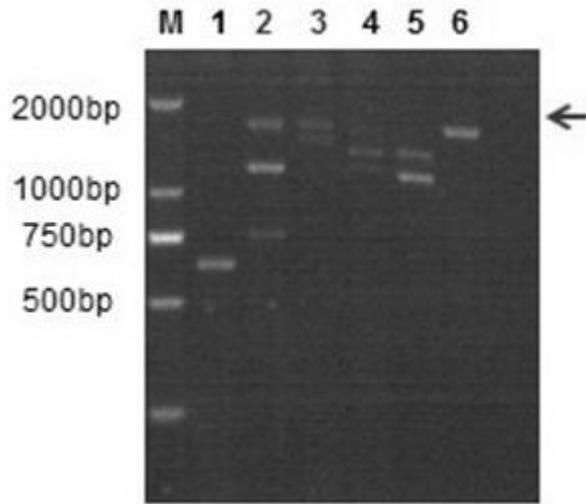


图1

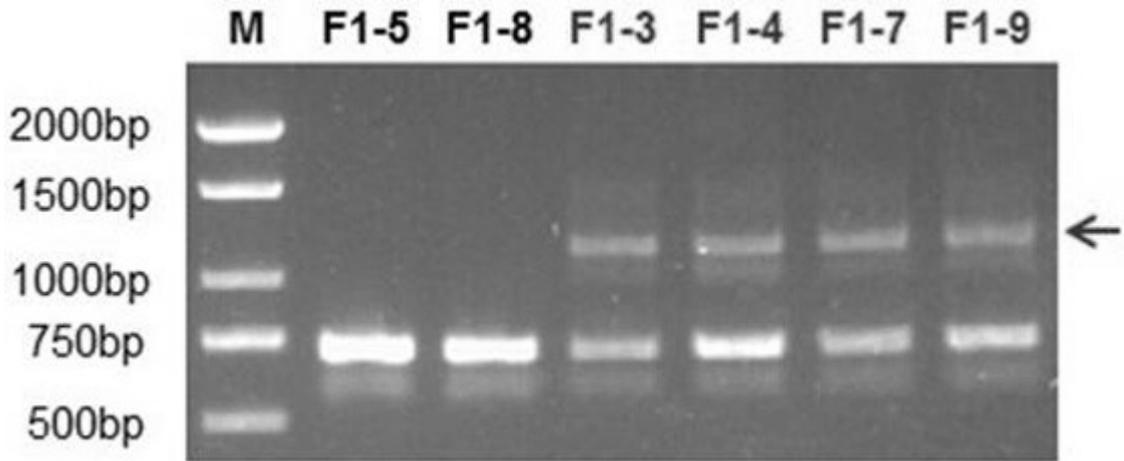


图2

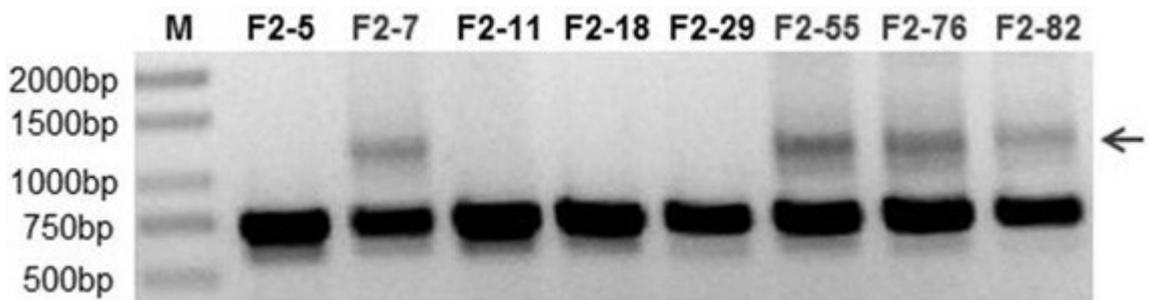


图3

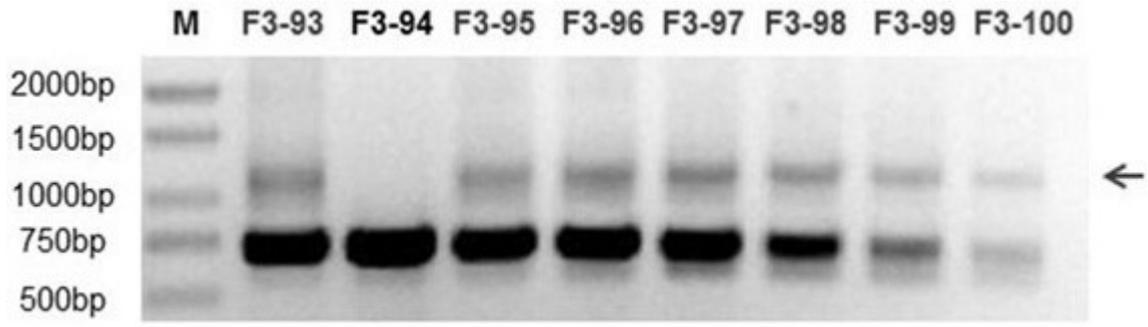


图4

