



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109868275 A

(43)申请公布日 2019.06.11

(21)申请号 201910183972.1

C12N 5/10(2006.01)

(22)申请日 2019.03.12

A01K 67/027(2006.01)

(71)申请人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72)发明人 刘国世 李广栋 张鲁 连正兴

吕东颖 姚昱君 吴昊 朱天奇

姬鹏云

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

11002

代理人 王文君 黄爽

(51)Int.Cl.

C12N 15/113(2010.01)

C12N 15/85(2006.01)

C12N 15/90(2006.01)

C12N 15/12(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

序列表4页 附图8页

(54)发明名称

CRISPR/Cas9介导的羊FGF5基因敲除和定点整合MTNR1A基因的方法

(57)摘要

本发明提供一种CRISPR/Cas9介导的羊FGF5基因敲除和定点整合MTNR1A基因的方法。将特异靶向羊FGF5基因第三外显子的CRISPR/Cas9打靶载体和基因同源重组载体共同转入羊胎儿成纤维细胞中,获得羊FGF5基因敲除且定点整合MTNR1A基因的细胞。本发明通过核转的方式将供体载体和打靶载体共转染羊胎儿成纤维细胞,通过Gibson Assembly方法构建的无标记供体载体中CYP17启动子可以使MTNR1A实现在羊卵巢组织中特异性表达。分离鉴定出的阳性单克隆细胞株可作为体细胞核移植的核供体获得克隆胚胎,进而为培育生殖系统局部强化褪黑素信号且多产毛的转基因克隆羊打下坚实基础。

1. 基于CRISPR/Cas9技术特异靶向羊FGF5基因的sgRNA,其RNA序列如SEQ ID NO:1所示。
2. 含有权利要求1所述sgRNA的CRISPR/Cas9打靶载体;  
优选地,骨架载体为PX458。
3. 基于CRISPR/Cas9技术开发的羊FGF5基因编辑载体,其特征在于,包括权利要求2所述的CRISPR/Cas9打靶载体和基因同源重组载体;其中,所述基因同源重组载体包含目的基因或目的基因表达盒,以及用于将所述目的基因通过同源末端修复定点插入羊FGF5基因第三外显子中的元件序列。
4. 根据权利要求3所述的羊FGF5基因编辑载体,其特征在于,所述目的基因为MTNR1A。
5. 根据权利要求4所述的羊FGF5基因编辑载体,其特征在于,所述目的基因表达盒的结构为:卵巢特异性启动子CYP17-MTNR1A-bGH poly (A)。
6. 根据权利要求3所述的羊FGF5基因编辑载体,其特征在于,所述元件序列包括用于羊FGF5基因打靶位点同源重组的左、右同源臂,其核苷酸序列分别如SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4所示。
7. 根据权利要求6所述的羊FGF5基因编辑载体,其特征在于,所述基因同源重组载体包含如下结构:左同源臂-卵巢特异性启动子CYP17-MTNR1A-bGH poly (A)-右同源臂;  
优选地,所述目的基因及元件序列来自同一物种。
8. 羊FGF5基因敲除且定点整合MTNR1A基因的细胞,其特征在于,将权利要求3-7任一项所述羊FGF5基因编辑载体导入羊胎儿成纤维细胞中得到。
9. 权利要求1所述的靶向羊FGF5基因的sgRNA、权利要求2所述的CRISPR/Cas9打靶载体、权利要求3-7任一项所述的羊FGF5基因编辑载体或权利要求8所述的细胞在制备基因编辑克隆羊中的应用。
10. CRISPR/Cas9介导的羊FGF5基因敲除和定点整合MTNR1A基因的方法,其特征在于,将权利要求2所述的CRISPR/Cas9打靶载体和基因同源重组载体共同转入羊胎儿成纤维细胞中,获得羊FGF5基因敲除且定点整合MTNR1A基因的细胞;  
其中,所述基因同源重组载体的定义同权利要求3-7任一项所述。

## CRISPR/Cas9介导的羊FGF5基因敲除和定点整合MTNR1A基因的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程技术领域,具体地说,涉及CRISPR/Cas9介导的羊FGF5基因敲除和定点整合MTNR1A基因的方法。

### 背景技术

[0002] 繁殖性状是养殖业的重要经济性状,有效改良羊的繁殖性状是提高养羊业水平的关键之一。优质肉用品种繁殖力偏低,通过传统的纯种选育和改良杂交手段提高羊繁殖力的进展缓慢。近些年国内外学者对羊的分子遗传基础进行了大量研究,在分子水平上寻找并定位影响羊繁殖机理的主效基因,为精确的育种改良奠定了基础。目前发现的高繁殖力候选基因有:BMPR-1B、BMP15、GDF9和褪黑素受体MTNR1A等,分别影响多胎性、卵泡的生长分化、胚胎发育和系统分化以及早期胚胎发育和繁殖节律。

[0003] 褪黑素(Melatonin,MT)是一种重要的内分泌激素,尤其在羊等季节性发情动物的繁殖调控中发挥关键作用。前期国内外多个课题组深入研究了褪黑素调控排卵的作用机制,首次发现卵母细胞线粒体是褪黑素合成的主要细胞器。并进一步证实在自然状态下,线粒体合成褪黑素是卵母细胞成熟过程中抵御排卵应激损伤的有效途径。此外,还在国际上首次报道了发情后促黄体素(LH)诱导卵巢合成褪黑素以及颗粒细胞褪黑素I型受体(MTNR1A)剧增,通过卵泡局部褪黑素信号(MT/MTNR1A)调控颗粒细胞黄体化、促进孕酮分泌。还发现在排卵过程中,褪黑素激活MTNR1A受体,通过下游途径促进细胞外基质重塑和血管形成,从而促进黄体分泌功能,提高妊娠率和产仔数。在发情配种时通过外源褪黑素处理,显著提高了羊、牛的受胎率及产仔数。

[0004] 基因组靶向敲入是指将特定的外源核酸序列转入细胞或个体基因组中的特定位点,以实现条件性基因敲除、单碱基或序列替换、细胞或基因标记等多种精确的基因组靶向修饰。不同于基因敲除,基因插入要考虑基因组上的插入位点。此前研究发现靶向敲除对哺乳动物的毛发生长具有抑制作用成纤维细胞生长因子5(fibroblast growth factor 5, FGF5)后动物的产毛量显著增加。考虑到动物生产中的经济价值,选择将FGF5作为靶点来导入目的基因。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供CRISPR/Cas9介导的羊FGF5基因敲除和定点整合MTNR1A基因的方法。

[0006] 本发明构思如下:利用CRISPR/Cas9技术,以羊FGF5基因为靶点,定点插入褪黑素受体MTNR1A,利用性腺类固醇合成启动子CYP17使其在卵巢组织中特异性过表达。获得的阳性细胞株可作为体细胞核移植的核供体,进而培育出高繁殖力的基因编辑克隆羊。

[0007] 为了实现本发明目的,第一方面,本发明提供一种基于CRISPR/Cas9技术特异靶向羊FGF5基因的sgRNA,其RNA序列如SEQ ID NO:1所示。编码所述sgRNA的DNA序列如SEQ ID

NO:2所示。

[0008] 第二方面,本发明提供含有上述sgRNA的CRISPR/Cas9打靶载体。

[0009] 优选地,骨架载体为PX458。

[0010] 第三方面,本发明提供一种不含任何真核筛选标记的生物安全性更高的供体载体,该载体含有卵巢特异性启动子CYP17,目的基因褪黑素受体MTNR1A,转录终止信号为bGH poly (A) signal,用于FGF5打靶位点同源重组的左、右同源臂序列,其核苷酸序列分别如SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4所示。

[0011] 优选地,可采用Gibson Assembly法构建供体载体,通过无缝连接,克服了在序列长度大、连接片段多的情况下,采用传统的酶切连接法无合适酶切位点可用的弊端。

[0012] 第四方面,本发明提供一种基于CRISPR/Cas9技术开发的羊FGF5基因编辑载体,包括上述CRISPR/Cas9打靶载体和基因同源重组载体。

[0013] 其中,所述基因同源重组载体包含目的基因或目的基因表达盒,以及用于将所述目的基因通过同源末端修复定点插入羊FGF5基因第三外显子中的元件序列。

[0014] 所述目的基因为MTNR1A。

[0015] 所述目的基因表达盒的结构为:卵巢特异性启动子CYP17-MTNR1A-bGH poly (A)。

[0016] 所述元件序列包括用于羊FGF5基因打靶位点同源重组的左、右同源臂,其核苷酸序列分别如SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4所示。

[0017] 进一步地,所述基因同源重组载体包含如下结构:左同源臂-卵巢特异性启动子CYP17-MTNR1A-bGH poly (A)-右同源臂。

[0018] 本发明中,所述目的基因及元件序列来自同一物种。在转基因过程中保证导入的始终是羊本身的基因,相当于只增加了其基因组中原有基因的拷贝数,避免导入异种基因表达异源蛋白可能带来的安全性问题。

[0019] 第五方面,本发明提供羊FGF5基因敲除且定点整合MTNR1A基因的细胞,将上述羊FGF5基因编辑载体导入(CRISPR/Cas9打靶载体和基因同源重组载体共转染)羊胎儿成纤维细胞中得到。

[0020] 在本发明的一个具体实施方式中,所述CRISPR/Cas9打靶载体和供体载体(基因同源重组载体)的共转染方式为核转,相比传统的转染方式,其转染效率更高。

[0021] 第六方面,本发明提供SEQ ID NO:1所示靶向羊FGF5基因的sgRNA、含有所述sgRNA的CRISPR/Cas9打靶载体、所述羊FGF5基因编辑载体或所述羊FGF5基因敲除且定点整合MTNR1A基因的细胞在制备基因编辑克隆羊中的应用。

[0022] 第七方面,本发明提供CRISPR/Cas9介导的羊FGF5基因敲除和定点整合MTNR1A基因的方法,将所述CRISPR/Cas9打靶载体和基因同源重组载体共同转入羊胎儿成纤维细胞中,获得羊FGF5基因敲除且定点整合MTNR1A基因的细胞。

[0023] 借由上述技术方案,本发明至少具有下列优点及有益效果:

[0024] (一)本发明提供了既敲除羊FGF5基因又过表达MTNR1A基因的羊胎儿成纤维细胞,为获得多产毛和高繁殖力的新品种基因编辑克隆羊奠定基础。

[0025] (二)应用CRISPR/Cas9技术筛选出的单克隆阳性细胞系,实现了目的基因的定点整合,规避了标记基因及目的基因的随机整合对基因组的“污染”,避免了可能由此引发的基因功能异常及生物安全性等问题。

[0026] (三) 本发明通过核转的方式将供体载体和打靶载体共转染羊胎儿成纤维细胞, 通过Gibson Assembly方法构建的无标记供体载体中CYP17启动子可以使MTNR1A实现在羊卵巢组织中特异性表达。分离鉴定出的阳性单克隆细胞株可作为体细胞核移植的核供体获得克隆胚胎, 进而为培育生殖系统局部强化褪黑素信号且多产毛的转基因克隆羊打下坚实基础。

### 附图说明

[0027] 图1为本发明实施例1中羊FGF5基因打靶位点示意图。

[0028] 图2为本发明实施例1中打靶载体谱图。

[0029] 图3为本发明实施例2中MTNR1A定点插入FGF5靶点示意图。

[0030] 图4为本发明实施例2中MTNR1A供体载体构建示意图。

[0031] 图5为本发明实施例2中MTNR1A供体载体片段PCR扩增产物电泳图。

[0032] 图6为本发明实施例3中打靶载体和供体载体共转染图。

[0033] 图7为本发明实施例4中流式细胞仪分选图。

[0034] 图8为本发明实施例4中细胞单克隆形成图。

[0035] 图9为本发明实施例4中前14株细胞靶点附近的扩增结果图; 黑框圈出的表示该株细胞可能是纯合敲入或发生了大片段敲除。

[0036] 图10为本发明实施例4中利用跨上游同源臂和CYP17启动子的引物5' junction long 1-1777bp扩增结果图。

[0037] 图11为本发明实施例4中利用跨MT1和下游同源臂的引物3' junction long1-1628bp扩增结果图。

[0038] 图12为本发明实施例4中利用跨上游同源臂和CYP17启动子的引物5' junction long 2-1540bp扩增结果图。

[0039] 图13为本发明实施例4中利用跨MT1和下游同源臂的引物3' junction long2-1378bp扩增结果图。

[0040] 图14为本发明实施例4中后18株细胞靶点附近的扩增结果图。

[0041] 图15为本发明实施例4中利用跨上游同源臂和CYP17启动子的引物5' junction long 1-1777bp扩增结果图, 红框圈出的表示该株细胞可能是杂合敲入。

[0042] 图16为本发明实施例4中利用跨MT1和下游同源臂的引物3' junction long1-1628bp扩增结果图, 黑框圈出的表示该株细胞可能是杂合敲入。

[0043] 图17为本发明实施例4中在第一对引物鉴定结果的基础上筛选出疑似阳性的13#、14#、15#细胞株利用跨上游同源臂和CYP17启动子的引物5' junction long2-1540bp-Upstream (U) 和跨MT1和下游同源臂的引物3' junction long2-1378bp-Downstream (D) 扩增结果图; 红框圈出的表示该株细胞可能是杂合敲入。

### 具体实施方式

[0044] 以下实施例用于说明本发明, 但不用来限制本发明的范围。若未特别指明, 实施例均按照常规实验条件, 如Sambrook等分子克隆实验手册 (Sambrook J&Russell DW, Molecular Cloning:a Laboratory Manual, 2001), 或按照制造厂商说明书建议的条件。

[0045] 实施例1CRISPR/Cas9打靶载体的构建

[0046] 打靶位点位于羊FGF5基因 (NM\_001246263.2) 第三外显子中,对应的打靶位置如图1所示,其中,sgRNA序列中识别该靶点的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示,编码该上述序列的DNA序列如SEQ ID NO:2所示。根据上述靶点序列,设计相应的引物序列,由生工生物公司合成,纯化方式为HPLC,具体序列见表1。

[0047] 表1羊FGF5基因打靶序列引物

[0048]

核苷酸名称	序列(5'-3')
Ovis aries-FGF5-sgRNA-F	caccgAGGTTCCCCTTCCGCACCT
Ovis aries-FGF5-sgRNA-R	aaacAGGTGCGGAAAGGGGAACCTc

[0049] Oligo核酸序列的形成:将引物稀释成100 $\mu$ M,磷酸化退火,体系:Ovis aries-FGF5-sgRNA-F (100 $\mu$ M) 1 $\mu$ L, Ovis aries-FGF5-sgRNA-R (100 $\mu$ M) 1 $\mu$ L, T4ligation buffer, 10 $\times$ , 1 $\mu$ L, T4PNK 1 $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 6 $\mu$ L, 总体积10 $\mu$ L。反应程序如下:37 $^{\circ}$ C 30min;95 $^{\circ}$ C 5min,PCR仪内每分钟降5~25 $^{\circ}$ C。反应结束后250倍稀释,载体PX458用BbsI内切酶进行酶切。16 $^{\circ}$ C连接过夜。连接反应结束后,使用PlasmidSafe exonuclease去除线性DNA残基。37 $^{\circ}$ C 30min,70 $^{\circ}$ C 30min。之后保存到-20 $^{\circ}$ C,可保存至少一周。

[0050] 该步所得产物可直接用于转化大肠杆菌,推荐使用Stb13感受态细胞。采取热击的方法:取2 $\mu$ L PlasmidSafe后的质粒,加入到20 $\mu$ L感受态细胞中,冰上10min,热击42 $^{\circ}$ C,30s,立即置于冰上2min,加入100 $\mu$ L SOC,直接涂板。使用含有Amp100的LB平板。37 $^{\circ}$ C过夜。第二天观察,对照板应无克隆,而含sgRNA插入的平板中长有克隆。挑取单克隆摇菌12h,菌液送北京擎科生物公司进行测序。验证质粒构建正确后,大提质粒,进行后续转染细胞实验。打靶载体图谱如图2所示。

[0051] 实施例2供体载体的构建

[0052] 如图3所示,要将MTNR1A定点插入FGF5靶点,需利用同源末端修复(Homology directed repair,HDR)的方式将带同源臂的基因座插入靶位点。由于供体载体的构建需要将四个长片段克隆到一个目的载体中,加上酶切位点的不确定性,难以保证每个片段都能合适的拼接,因此采用基于同源重组的Gibson Assembly,其能够将更多个长片段高效无缝的拼接在一起,不受酶切位点的限制。

[0053] 供体载体的构建过程如图4所示,需要将上游同源臂5-HA、CYP17-promoter、MTNR1A (MT1) -bGH poly (A) signal、下游同源臂3-HA一并连入骨架载体pUC57-Amp中,其中上、下游同源臂和CYP17启动子从羊基因组上克隆,MTNR1A (MT1) -bGH poly (A) signal克隆自实验室保存的载体,每个片段根据Gibson Assembly引物设计原则设计引物,引物序列如表2所示:

[0054] 表2供体载体各片段扩增引物

[0055]

引物名称	序列(5'-3')
5-HA -FOR	ccagtgaattgacgcgtattgggatTCGAGATTTAAATGAGCTCGAGCATTTTCAAG
5-HA -REV	AGAAACAAGATCCTGGCTTGACGGGATTAGGTGGT
CYP17 -FOR	CCGTCAAGCCAGGATCTTGTCTCAGGTAAGTGC
CYP17 -REV	GCCCCGCCATTGCAAGAAGGCC
MT1-bGH poly(A)-FOR	CTTCTTGCAATGGCGGGGCGG
MT1-bGH poly(A)-REV	ACTTGAGTCGCCCATAGAGCCCACCGCAT

[0056]

3-HA -FOR	GGCTCTATGGGCGACTCAAGTTTCGCTTTGGTTAAGACTGAC
3-HA -REV	ggcgcgccattgggatTGCTCCCTGTGGATCTATACAGTGTAGA

[0057] 各片段的扩增体系为:高保真DNA聚合酶PrimeSTAR MAX DNA Polymerase (R045A, Takara) 0.5 $\mu$ l, dNTP mix (2.5mM each) 25 $\mu$ l, GC Buffer II (RR02AG, Takara) 8 $\mu$ l, 正向引物 1 $\mu$ l, 反向引物 1 $\mu$ l, 羊基因组模板 2 $\mu$ l, 11.5 $\mu$ l H<sub>2</sub>O。扩增条件为:98 $^{\circ}$ C 预变性 2min; 98 $^{\circ}$ C 10s, 65 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 45s, 35个循环; 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 10min, 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增结果如图5所示。

[0058] PCR产物纯化:电泳后将凝胶置于紫外灯下,将目的条带分离,回收提纯DNA,操作如下:(1)在紫外灯下分离目的凝胶片段,置于干净EP管中,称其质量。胶块体积换算公式:1 $\mu$ L = 1mg。(2)向EP管内加入3倍体积的DR-1Buffer,震荡混合后放入45 $^{\circ}$ C水浴锅中使胶块充分溶解,时间为8-10min。(3)取出平衡柱Spin Column和收集管Collection Tube,并按要求正确安置好。将(2)中溶液转入Spin Column管内,而后12000rpm离心1min,重复离心一次。(4)吸取Rinse A 500 $\mu$ L加入到Spin Column中,离心条件同上。(5)吸取已添加过无水乙醇 Rinse B 700 $\mu$ L加入Spin Column,离心条件同上,弃滤液,重复离心一次。(6)继续离心,条件不变,时间为2min。(7)取一新的Collection Tube,将Spin Column安放好,并向Spin Column中加入Rnase-free ddH<sub>2</sub>O 25 $\mu$ L,室温条件下静置1-2min。(8)12000rpm离心1min使得DNA洗脱到Collection Tube中,-20 $^{\circ}$ C保存。

[0059] 左、右同源臂的核苷酸序列分别如SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4所示,CYP17启动子的核苷酸序列如SEQ ID NO:5所示,MTNR1A (MT1)-bGH poly(A)的核苷酸序列如SEQ ID NO:6所示。

[0060] 各纯化片段采用全式金pEASY-Uni Seamless Cloning and Assembly Kit (CU101-1),按照说明书进行无缝拼接。

[0061] 实施例3细胞转染

[0062] 1、常规方法制备胎儿成纤维细胞。

[0063] 2、采用核转方式。

[0064] 用核转染-Amaxa™ Basic Nucleofector™ Kit for Primary Mammalian Fibroblasts (Lonza), 采用Nucleofector™ 2b的程序V-024进行转染, 供体质体和打靶载体各10微克, 转染的步骤参见试剂盒说明书。转染情况见图6。

[0065] 实施例4阳性细胞克隆的筛选及鉴定

[0066] 核转后的细胞培养48小时后, 经过流式细胞仪分选, 分选情况如图7所示。经过数天培养后96孔板可见有单克隆出现, 单细胞克隆团见图8, 挑取单克隆细胞至48孔板继续培养。

[0067] 取扩大培养的单克隆细胞, 采用天根试剂盒提取DNA, 利用表3引物进行阳性克隆鉴定。其中, 首先用靶点附近引物进行初步鉴定, 鉴定是否为纯合敲入, 因为插入片段总长度接近4000bp, 普通PCR无法扩出, 若在靶点附近没扩出条带则有可能发生了同源重组(也有可能在该位点发生了大片段敲除), 为去除供体质粒残留及NHEJ介导的随机插入的影响, 再进一步用跨同源臂的junction PCR引物(为保证准确鉴定, 共设计两对引物long 1和long 2, 5'跨同源臂上游和CYP17启动子, 3'跨MT1和同源臂下游)进行基因表达框上、下游的扩增来确定是否有定点插入。若用靶点附近引物能扩出短条带(641bp), 则会出现两种情况, 一种是该位点没有进行定点整合, 另一种是DNA的一条链发生了定点整合而另一条未发生, 即为杂合敲入。

[0068] 表3阳性克隆鉴定引物

[0069]

引物名称	序列(5'-3')
Ovis aries-靶点附近-641bp-F	TAGGCCAAATTTACAGATGACTGC
Ovis aries-靶点附近-641bp-R	AATACATAGTCCTCACC GTT G
5' junction long 1-1777bp-F	TTTGGCACCATCTTGCGCTCT
5' junction long 1-1777bp-R	CCTTGTAAGCAGGCTGTCTCGTT
3' junction long 1-1628bp-F	CGCAAACCCTCTCCATTAATAGCC
3' junction long 1-1628bp-R	AGTTTCCCATGTCACATAGCCA
5' junction long 2-1540bp-F	GCTTCCTGATGACCTGTGAACA
5' junction long 2-1540bp-R	GGAGTCAGAGGTATGAGCTGGA
3' junction long 2-1378bp-F	CAGCCTCGACTGTGCCTTCT
3' junction long 2-1378bp-R	ATCTCCTTCGGTTCTCCGTGTT

[0070] 结果共长出14+18株单克隆。其中, 前14株的鉴定结果见图9-图13, 图9中靶点附近的扩增结果显示8#、10#和12#未扩出产物, 有可能是纯合敲入, 但经2对跨同源臂的引物鉴定都未扩出目的条带(图10和11位第一对引物鉴定结果, 图12和13为第二对引物鉴定结果), 证明8#、10#和12#为大片段敲除, 这14株细胞中都未发生定点整合。

[0071] 后18株鉴定结果见图14-图17, 其中, 图14中靶点附近的扩增结果显示这18株细胞都能扩出条带, 说明没有纯合敲入。后经2对跨同源臂的引物鉴定发现, 只有14#细胞株成功扩增出了上游和下游目的片段, 因此14#细胞株为一条链发生了定点整合的杂合阳性细胞株。

[0072] 本发明通过CRISPR/Cas9技术在FGF5靶点成功插入了褪黑素受体MTNR1A基因, 获



得的阳性细胞株可作为体细胞核移植的核供体,进而培育出高繁殖力的基因编辑克隆羊。

[0073] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之做一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

## 序列表

<110> 中国农业大学

<120> CRISPR/Cas9介导的羊FGF5基因敲除和定点整合MTNR1A基因的方法

<130> KHP191110945.1

<160> 6

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

aggugcggaa aggggaaccu 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

aggttcccct ttccgcacct 20

<210> 3

<211> 1074

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

tcgagattta aatgagctcg agcattttca agggcagatg tgtgcgtgcg tgcgtgcgtg 60  
 cgtgcgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtataga gggaaagaga gtgatatctg 120  
 cctgaagtgt tgctattaac tctaaaaggt aatTTTTTtC ttcttggcat caaatagact 180  
 ctccctgtatc actgtgtgag gatgaatTTT tttcctaaag aactctaaca cgtgcaatat 240  
 taatagggcc atatgctacc cttttctcag caccaggaag cacactgatg agactgaaaa 300  
 cttattctta tttcaaaggg taacatgacc ccatttctct gaatgaattc atgttttacc 360  
 aggcaattgt ttcttagtaa tatagtacta tttactttct tgatggttta ggagggggaa 420  
 aaaaatctta cgttaaaagt caaatTTTTa actaaaattt tcaaagtatg ttaaaaagag 480  
 taacagaatt taaatatatt gaattctctg ttttttaata tacactgata ttatttcaca 540  
 attgcataat tcgtagtaaa caacaagcat tacaagatg aatgaagtag gaatatagaa 600  
 atgaaaatag taattttaaa gcaactttaa aagaagcaaa tgtgtcttca taaagagaat 660  
 ggagtcggag cgcaggggcc agtggaaattc ttgtttttct tatagtccaa gacttcttta 720  
 tattacatgc tgaaaatatt atcaactgett gaatttctc ctctcttct tttttttttt 780  
 tttttttttc cctgtaggcc aaatttacag atgactgcaa gttcaggag cgatttcaag 840  
 aaaacagcta taataacctat gcctccgca tacacagaac tgaaaagact gggcgggagt 900

ggtacgtggc cctgaacaag agaggggaagg ctaaacgggg ctgcagcccc cgggttaaac 960  
 ctcagcacgt ctctaccac tttctgcaa gattcaagca atcggagcag ccggaacttt 1020  
 ctttcacagt tactgttccc gaaaagaaaa aaccacctaa tcccgtcaag ccag 1074

<210> 4

<211> 1059

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

gcgactcaag tttcgctttg gttaagactg actttggttt tgtgagaaac catggagtct 60  
 cctcaggagt ttctgtagct gtcttttagc ctctgaaggc aacttcttgg acacagcttc 120  
 agctatgtac tgcaactgat tgaagtcagg tcatttgttt cagtttgact gaaacaaaac 180  
 tgtttgctga tagtaactga actggaattc tttgtacca tatagggagt tcacgacgac 240  
 ataaagccct ttgctttatg cttggtgcat acagggattc tttttcggaa agttcaacgg 300  
 tgaggactat gtatttttct gacttttaca gatcaacctg aagaaaacac acatgataca 360  
 tttttatttt tggtttccaa agaatatatt gatggagata aaagtatttt attagctttt 420  
 gttttttggt ttttttaaaa gtacctctgc attgagcata ttttcttact tttattattt 480  
 ctaattgata agatatgaaa caaccatttt aatgcagttt atgaattata aatatgttta 540  
 tagaccattt ttaacatgtg gatttctttt tcattgttct cattcattgc acttttaatt 600  
 tttattatga ttatttttct accatacctc agatcatgta agtttaattt tacatcttaa 660  
 aatgtttaaa ttctcttcaa cagcaccaa ggctcaactt gtgtttgtgt gtgtgtgtga 720  
 gtgtgtgtaa attcatgatt ttatatggaa tcctgtctct gtggtggctg gctataatgg 780  
 gttagaagta aggagaaaat ataaggactt tttggtggaa ttaaagtgtg aggtaaggaa 840  
 aatgattaga gatacagagt cactgagtgt gcagtgttta ttgatagcta attctgcctt 900  
 gccttcactt ctcatthtat ctacccctg ccctcatttt ttaaagctgg aggaatacat 960  
 tttattctgt ccatcaagca tagactatga aaccagagtg cttaaatac ctcttctatg 1020  
 accttttgct atctacactg tatagatcca caggagca 1059

<210> 5

<211> 2480

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

gatcttgttt ctcaggtact gccccttgc caccctcttc aagtctgcaa tcaagacat 60  
 ctcacacact gcacctcttt tagcttccac gtgtttgact cactgctct cccttccaac 120  
 ggtgcccttc ctcccccttc ccctgctc tgcttataa gtcatectaa tctctcttc 180  
 aaggetttagc tcaaatcccc ttgctttcat gaagactact ccagctcata cctctgactc 240  
 caaatggccc taaaagtctg aacaacattt gaactgttga agtagtgggc aacgagacag 300  
 cctgctttac aaggccttgt ggattcatct ttatctgag ctccctgccc tgctgccttc 360  
 ctgcttaatt ccagcagccc ttatacaagt caatactctt caaagtatga aactggcag 420  
 atcaccccca gagaggggca gaaattccat ctctcacctt tgcgagtctc actcagtagg 480

tcatggttac ttgcctgagg acccacctcc tctacgatga atgacatcag gagtcacctt 540  
 ggtgatgact gacactctct tgtgactgtg cttttacctg gttttatcaa atcattgata 600  
 aatactgatt gagccactga aggtgtacag cagaagatga ggattttgtt tgtaggaag 660  
 atatactaata aagaactcag aaaaacgagg aaggcctttt gacacaacaa tgattctggt 720  
 gaatactgaa tgagcatgta cttcatgtca ggcagcactt ctacatgcat tatcttagtg 780  
 agtcacaaca gccttaagaa gtatatccca gggcttcctt ggtgactcag tggtaaagaa 840  
 tccgcctgcc aacgcaggag acacagtctt ttgatccctg atccaggaag atcccacatg 900  
 ctatgcagca actaagccca tgcagcacia ctactgagcc tgtgctctag agcccgggag 960  
 ctgcagctac taccctatgt gcagcageta ctggagcctg agtcccctgg gttccacaag 1020  
 agaagccact gcaatgagaa gcctccccac tgcaactaga gtagcccctg ctaccacaaa 1080  
 gtagaggaaa gtctgcacaa caatgaggat ccagtcaaca gtaaataaac tgttttaaaa 1140  
 taaacattaa actttttaa aaagatgtta ttcccattat agaggaggaa actgaaactt 1200  
 aaaacaggta agtaaccata aagttactat ctgaccagct gattccactt ttaggtattt 1260  
 accaccccc aattgaaaa cagagacca agtagatact atgttcatgc tgtggacatg 1320  
 tacacccatg tccatagcag cgttattcac agtagccaaa agtggaaca acctaagtgt 1380  
 ccatcaactg atgaatgaag aaacaaatgg tggatatacc acttaacaga atgttgttca 1440  
 gtcacaaaaa ggcatggagg ggccttacct tgtagtccag tggctaagat tctacacttc 1500  
 taatgcagga ggctcaggtc caatccctgg ccagggaatc agaaccaca tgctgcaatg 1560  
 aagactgcag atcttgagta ctgcagctaa ctcccagcac aaccaataa acaaatattt 1620  
 agaaaatgaa tgaagtctg acatatgcta caaagtagat gaacctgaa aacatcatgc 1680  
 ctagagaaac aagccagtca caaaagacca aatgctatat gattccactt acgtgaaata 1740  
 ggcatattca cagacagatt agagcttacc agggactggg gggaggggaa gggggagtta 1800  
 ttgcttcatg gatatacttt ctgtttgggg ttgtgaaaac agttttggaa gtagacagcg 1860  
 gtgatggctg tacaacaact gtgaagcata ttcagtgcta ctgaattgta cactcaaatg 1920  
 gtaaaactca tgctaaacct ttaaagtcata atagctagag agcggttaag ctagaatttg 1980  
 agcctaaacc catctaacia cagggccctt gctcttgacg caaaggtttc actccccctg 2040  
 gcaaaagcag caactaggaa taaagagaac tggattcttg tcatcactat ctgtgtgact 2100  
 ttattcaagc ctgactctgg gaggcctcac tttctcagc tgataaaatt ggatagctgt 2160  
 ctgttgattg tgatttcata gtacagagag tcccagccg tgattcctga cccagatata 2220  
 atttgcttct ggctactctt ggagacgttg atggacaggg agcaaggac agggactagc 2280  
 tgtctgtgcc cttacctagc cctccctta ggggtgtgcc ctggtgtgga gccagctctt 2340  
 gaaagaaacc tcctctcccc ttcctctccc attctgggag aggactactg gctgtgctcc 2400  
 aggataaact tccaccaagg cgagcaataa cataaagtcaggagaaggt caggggagcc 2460  
 cttaaaaagg ccttcttgca 2480

<210> 6

<211> 1369

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 6

atggcggggc ggctgtgggg ctgcccgggc gggaccccca agggcaacgg cagcagcgcg 60  
ctgctcaacg tctcgcaggc ggcgcccggc gccggggacg gtgtgcggcc gcggccctcg 120  
tggctggccg ccaccctcgc ctccatcctc atcttcacca tcgtggtgga catcgtgggc 180  
aacctcctgg tggctcctgtc cgtgtatcgg aacaagaagc tgaggaacgc agggaatgtg 240  
tttgtggtga gcctggcagt tgcagacctg ctggtggccg tgtatccgta ccccttggcg 300  
ctggcgtcta tagttaacaa tgggtggagc ctgagctccc tgcattgcca acttagtggc 360  
ttcctgatgg gcttgagcgt catcgggtcc gtttcagca tcaactggaat tgccatcaac 420  
cgctattgct gcatctgcca cagcctcaga tacggcaagc tgtatagcgg cacgaattcc 480  
ctctgctacg tgttctgat ctggacgtg acgctcgtgg cgatcgtgcc caacctgtgt 540  
gtggggaccg tgcagtaaga cccgaggatc tattctgta ctttcagca gtccgtcagc 600  
tcagcctaca cgategccgt ggtggtgttc catttcatag ttccgatgct cgtagtcgtc 660  
ttctgttacc tgagaatctg ggccctggtt cttcaggtea gatggaaggt gaaaccggac 720  
aacaaccgga aactgaagcc ccaggacttc aggaatcttg tcaccatggt tgtggttttt 780  
gtcctctttg ccatttgctg ggtcctctg aacttcattg gtctcgttgt ggctcggac 840  
cccgccagca tggcaccag gatccccgag tggctgtttg tggctagtta ctatatggca 900  
tatttcaaca gctgcctcaa tgcgatcata tatggactac tgaacaaaa tttcaggcag 960  
gaatacagaa aaattatagt ctcatgtgt accaccaaga tgttctttgt ggatagctcc 1020  
aatcatgtag cagatagaat taaacgcaa cctctccat taatagcaa ccataaccta 1080  
ataaagggtg actctgttta actcgagtct agagggccg tttaaaccg ctgatcagcc 1140  
tcgactgtgc cttctagtgt ccagccatct gttgtttgcc cctccccctg gccttccttg 1200  
accctggaag gtgccactcc cactgtcctt tcctaataaa atgaggaaat tgcacgcat 1260  
tgtctgagta ggtgtcattc tattctgggg ggtggggtgg ggcaggacag caagggggag 1320  
gattgggaag acaatagcag gcatgctggg gatgcggtgg gctctatgg 1369

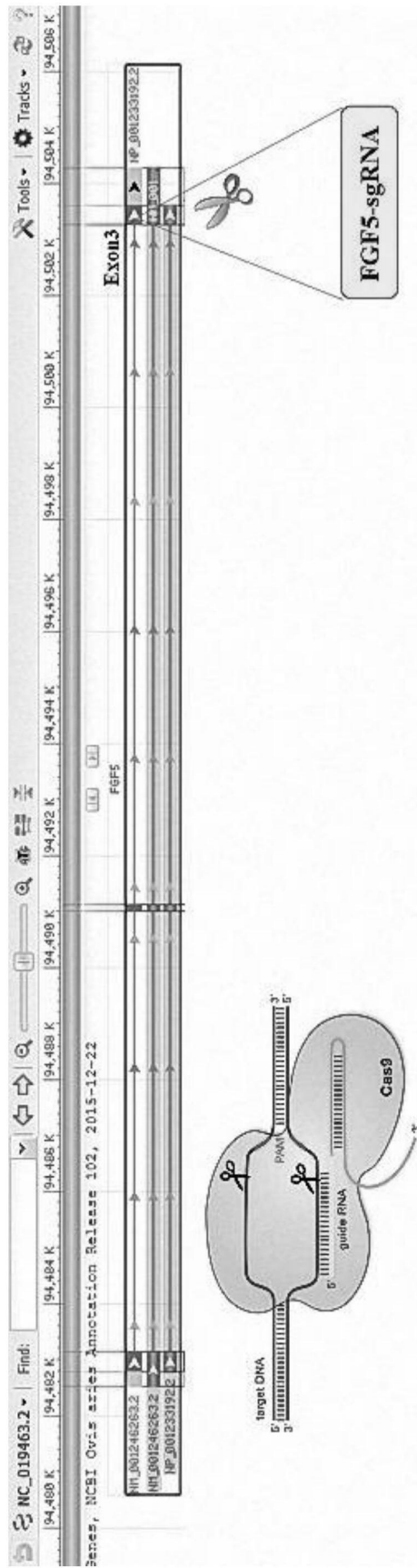


图1

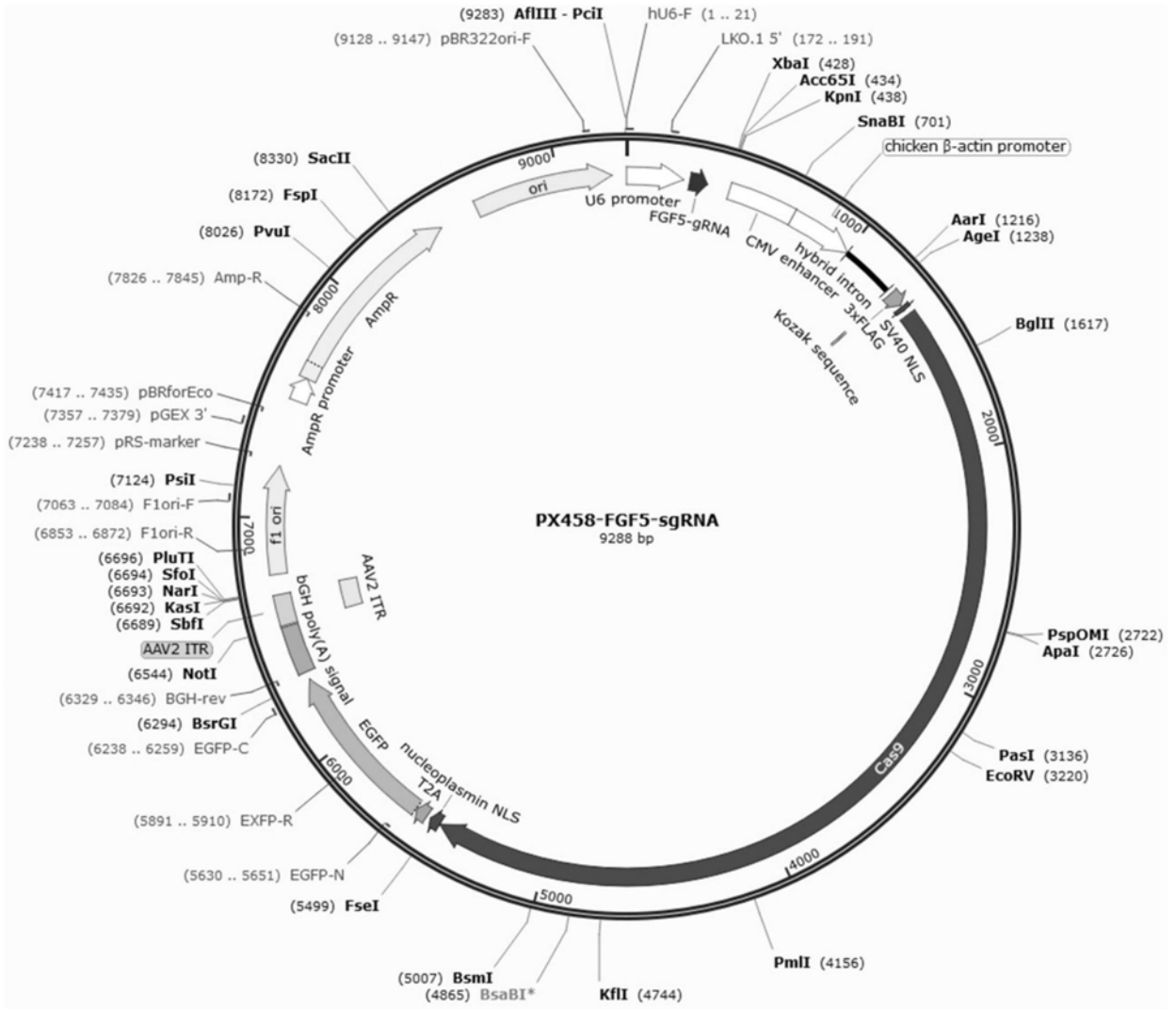


图2

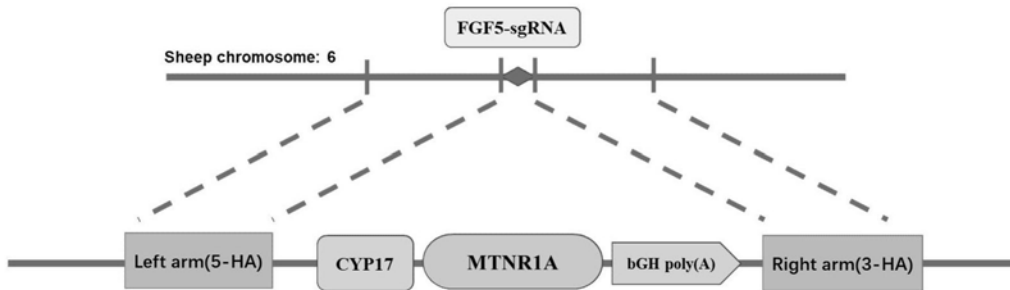


图3

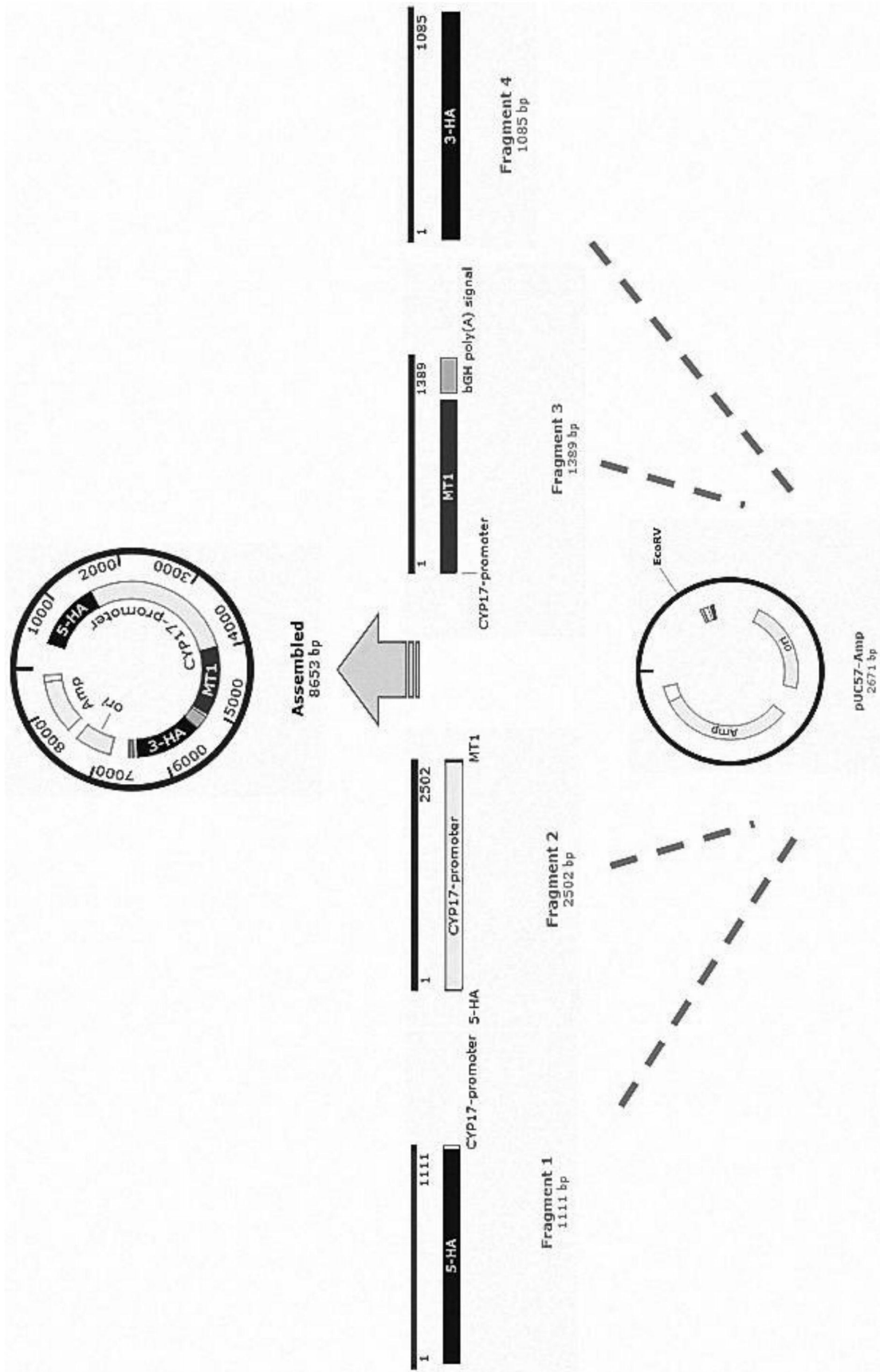


图4



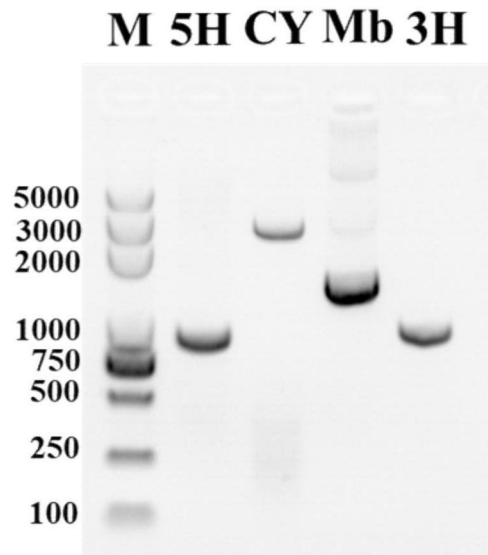


图5

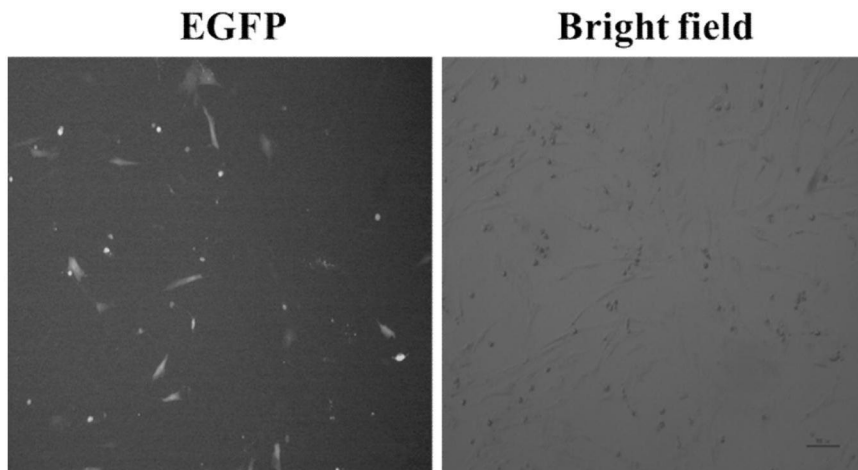


图6

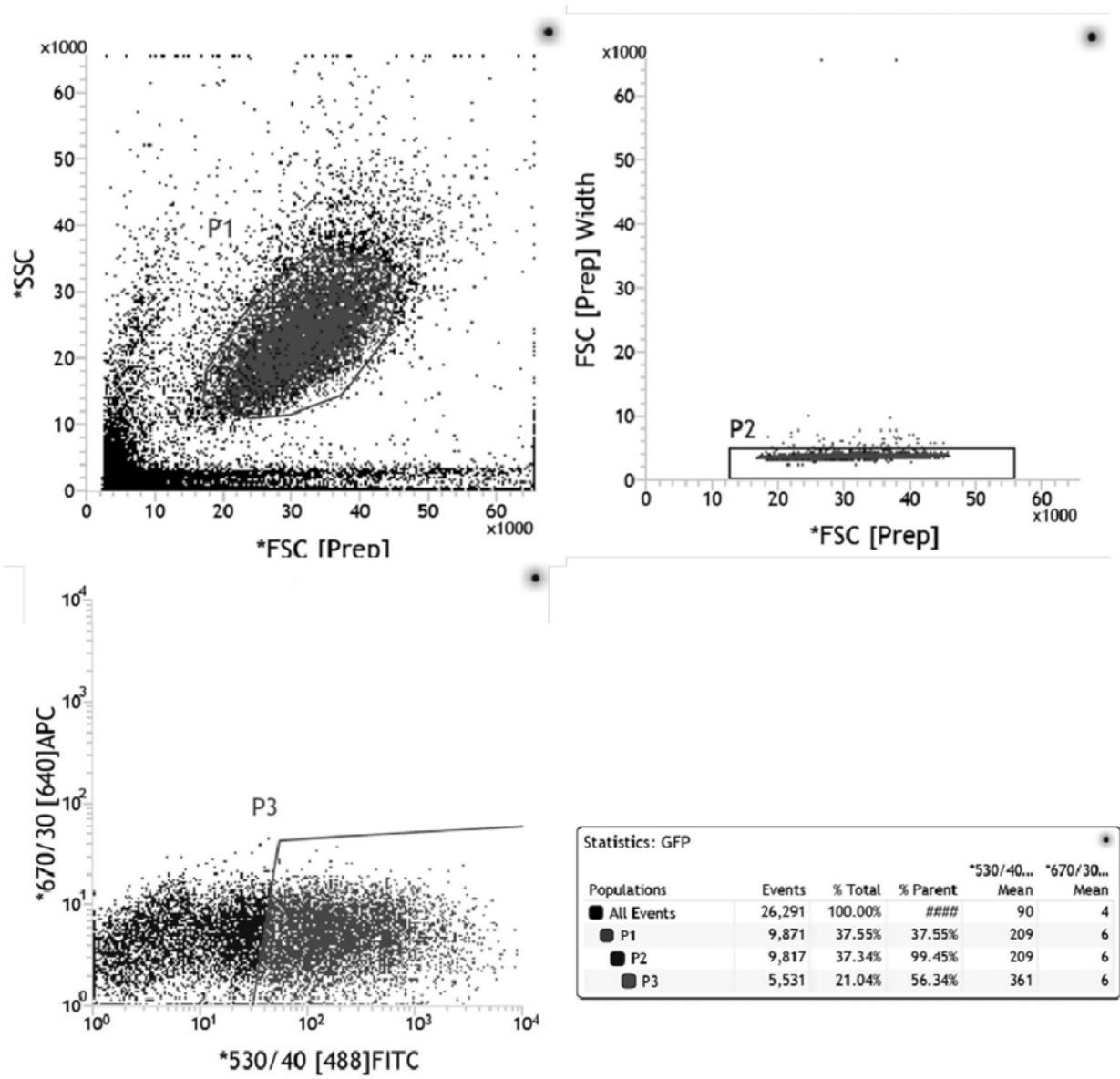


图7

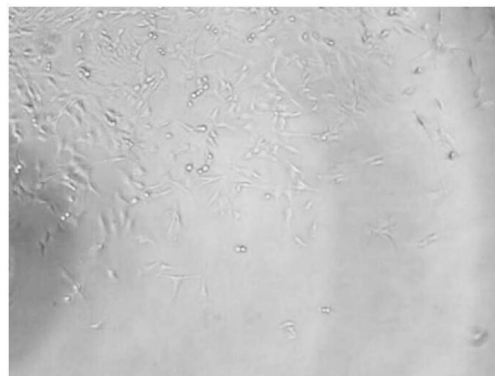


图8

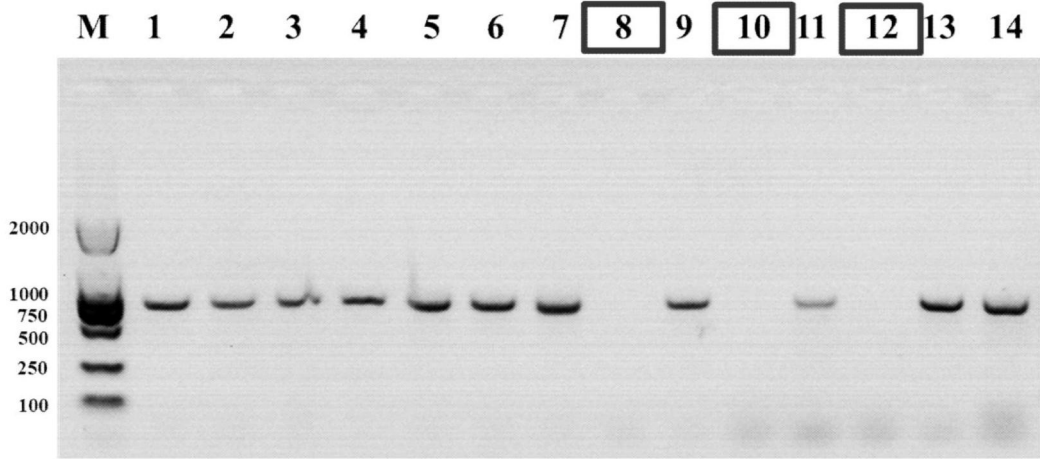


图9

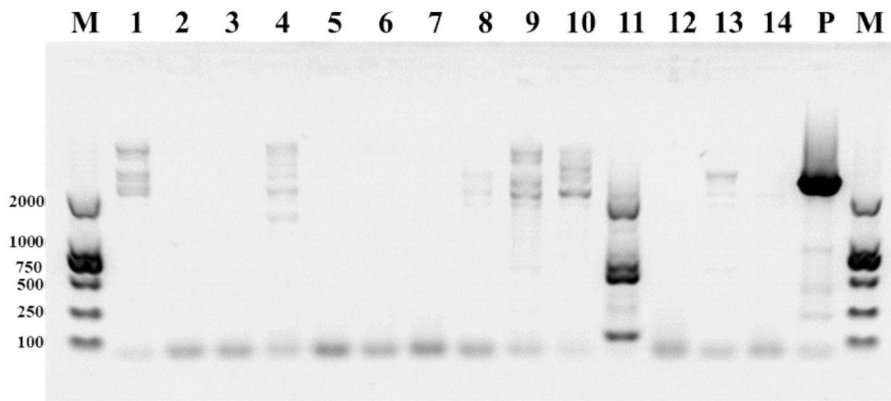


图10

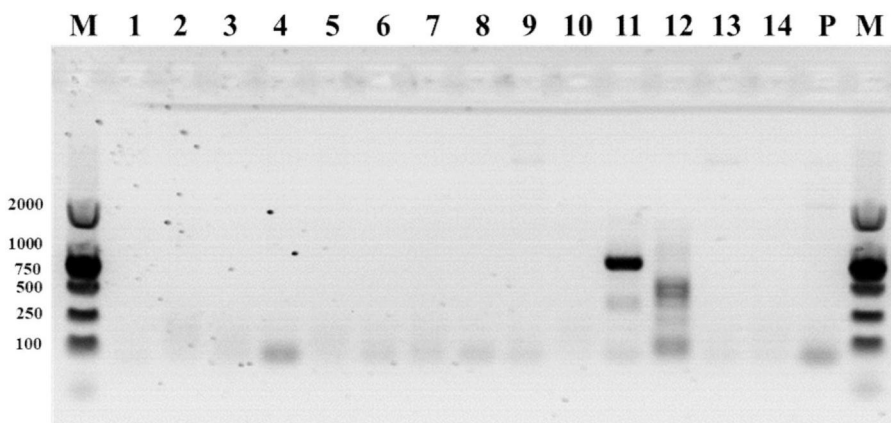


图11

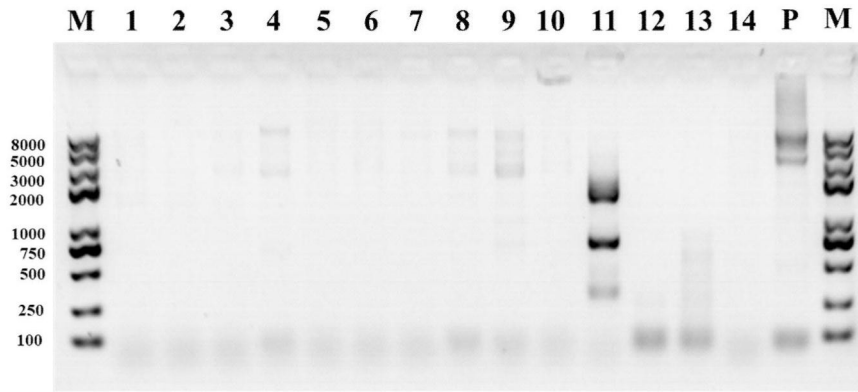


图12

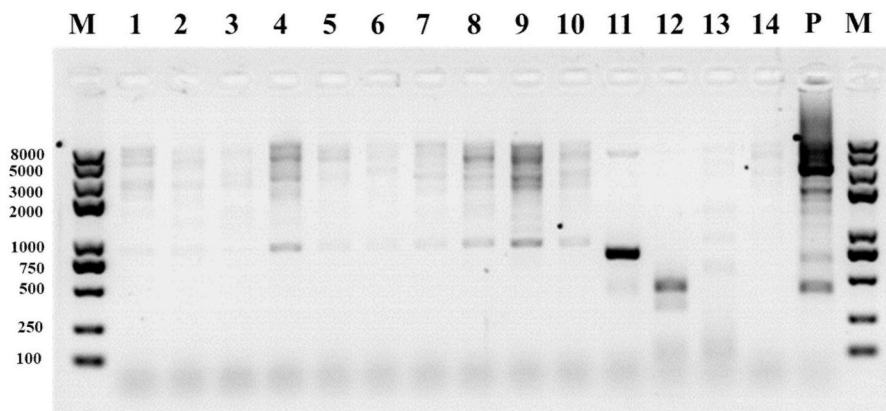


图13

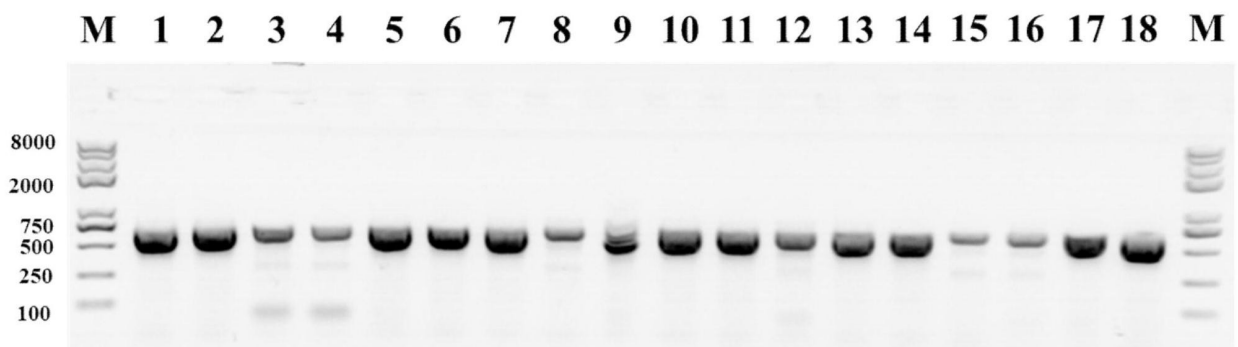


图14

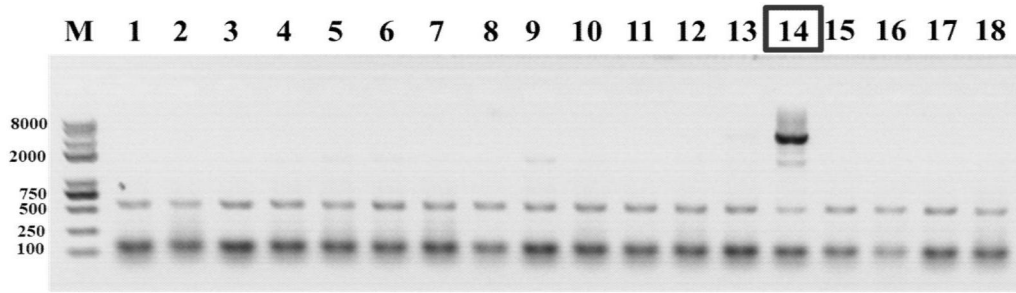


图15

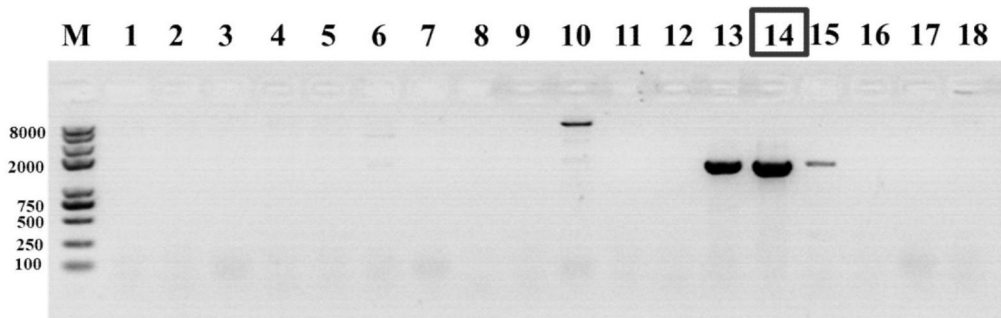


图16

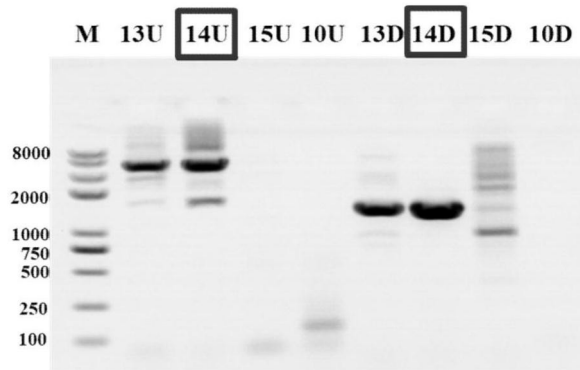


图17