



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109112162 A  
(43)申请公布日 2019.01.01

(21)申请号 201811006750.4

(22)申请日 2018.08.30

(71)申请人 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;

(2) 利用全基因合成Donor DNA;

(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,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。

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,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。

4. 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。

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,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。

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,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。

7. 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,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。

8. 根据权利要求7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。

9. 一种亨廷顿病原位敲入小鼠模型,其特征在于,其采用权利要求1-8中任一项所述的利用CRISPR/Cas9技术构建亨廷顿病原位敲入小鼠模型的方法构建而成。

## 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 gcaggacagcgtgagagatgtgcgggtagtgatgacataa.

[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:ttagtcatccactaccgcac,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

[0042]

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

[0044]

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盘滴中转移到干净的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  $-20^{\circ}\text{C}$  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  $200\mu\text{L}$  缓冲液 GA, 再加入  $20\mu\text{L}$  Proteinase K 溶液, 涡旋混匀后, 置于  $56^{\circ}\text{C}$  水浴过夜。第二天加入  $200\mu\text{L}$  缓冲液 GB, 充分颠倒混匀,  $70^{\circ}\text{C}$  水浴 10min。冷却至室温后, 加入  $200\mu\text{L}$  无水乙醇, 充分震荡混匀 15S, 将混合液全部转入吸附柱 CB3 中,  $12000\text{rpm}$  离心 30S, 弃废液。然后加入  $500\mu\text{L}$  缓冲液 GD (确认已经加过乙醇) 到吸附柱 CB3 中,  $12000\text{rpm}$  离心 30S, 弃废液。再加入  $600\mu\text{L}$  漂洗液 PW (确认已经加过乙醇) 到吸附柱 CB3 中,  $12000\text{rpm}$  离心 30S, 弃废液。重复上一步漂洗步骤一次。 $12000\text{rpm}$  空离 3min 后取出, 将吸附柱放置于新的  $1.5\text{mL}$  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  $50\mu\text{L}$  洗脱液 TE (洗脱液 TE 可事先加热至  $70^{\circ}\text{C}$ ), 盖上盖子充分溶解 5min。 $12000\text{rpm}$  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  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

[0062] Mouse Tail DNA Mini Kit (福际): 剪取  $0.5\text{--}1\text{cm}$  鼠尾, 剪碎后放入  $1.5\text{ml}$  或  $2\text{ml}$  干净的离心管中。鼠尾应尽量剪短成  $1\text{mm}$  左右小段, 以便于后续酶解反应。向离心管中加入  $400\mu\text{l}$  Buffer TL1,  $40\mu\text{l}$  Foregene Protease Plus, 涡旋混匀。置于  $65^{\circ}\text{C}$  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  $400\mu\text{l}$  Buffer TL2, 颠倒混匀, 置于  $65^{\circ}\text{C}$  水浴中 10min,  $12000\text{rpm}$  离心 10min。将上清液转移到离心柱中,  $12000\text{rpm}$  离心 1min, 弃掉废液。加入  $500\mu\text{l}$  Buffer PW,  $12000\text{rpm}$  离心 1min, 弃掉废液。加入  $700\mu\text{l}$  漂洗液 Buffer WB,  $12000\text{rpm}$  离心 1min, 弃掉废液。重复漂洗一次。将离心柱放回收集管中,  $12000\text{rpm}$  空管离心 2min, 去掉离心柱中残余的 Buffer WB。将离心柱移至新的  $1.5\text{ml}$  离心管中, 晾干 30min, 向离心柱膜中间位置滴加  $100\mu\text{l}$  Buffer EB (Buffer EB 可事先放在  $65^{\circ}\text{C}$  水浴中加热), 5min 后  $12000\text{rpm}$  离心 1min。将第 1 次离心得到的溶液重新加回离心柱中, 5min 后  $12000\text{rpm}$  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  $-20^{\circ}\text{C}$  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: gacgacgcatccgcctgtcaattctg;

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

[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

[0068]

PCR 反应体系		PCR 反应条件	
组分	用量	$95^{\circ}\text{C}$	3min
DNA	$2\mu\text{L}$	$94^{\circ}\text{C}$	30sec
11-5F ( $10\mu\text{mol/L}$ )	$1.5\mu\text{L}$	$62^{\circ}\text{C}$	30sec
		35Cycle	



[0069]

11-6R (10 $\mu$ mol/L)	1.5 $\mu$ L	72 $^{\circ}$ C	85sec
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, $\sigma$ 2号和 $\sigma$ 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

[0073]

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 $\sigma$ 5-6 $\sigma$	$\sigma$ 2 $\sigma$ 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。 $\sigma$ 2号和野生型C57雌鼠交配所得到F1代小鼠 $\sigma$ 1号、 $\sigma$ 2号、 $\sigma$ 3号、 $\sigma$ 4号、 $\sigma$ 7号、 $\sigma$ 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

[0077]

F0代	交配日期	出生日期	只数	性别编号	鉴定结果	备注
2 $\sigma$ xC57 $\sigma$	2017/10/20	2017/11/16	10	1-6 $\sigma$ 7-10 $\sigma$	$\sigma$ 1、 $\sigma$ 2 $\sigma$ 3、 $\sigma$ 4 $\sigma$ 7、 $\sigma$ 9	后续交配
3 $\sigma$ xC57 $\sigma$	2017/10/20	2017/11/16	10	1-6 $\sigma$ 7-10 $\sigma$	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

[0081]

F1 代	交配日期	出生日期	只数	鉴定结果
1♂xC57♀	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、
2♂xC57♀	2018/02/02	2018/02/25		
7♀xC57♂	2018/02/02	2018/02/28		
9♀xC57♂	2018/02/02	2018/02/28		
1♂xC57♀	2018/02/10	2018/03/08	共出生 28 只 ♂12 只♀16 只	60、63、69、72、 74、75
2♂xC57♀	2018/02/10	2018/03/10		
7♀xC57♂	2018/03/24	2018/04/15	共出生 23 只 ♂12 只♀11 只	♀12、16、20、 25、33、34、36、 38、39、40、43、 44、46、48、64、 65、67、76、77、 78、79、81、82
9♀xC57♂	2018/03/24	2018/04/15		
1♂xC57♀	2018/04/08	2018/04/30		
2♂xC57♀	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

[0085]

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
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。

## SEQUENCE LISTING

<110> 西南大学

<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

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

caagatggct gagegccttg g 21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

cgggaaagcc tggcctcagg g 21

<210> 3

<211> 1414

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

atcctcttgc ttggccctct tcactaaggg gggctggctt ttgcgggaag gggcggggcc 60  
 acatcggcgg ggcgagagt cttaaactag cagaggcccc gcaggcctgc gtcctgactt 120  
 cgggaaagag gacgacgcat ccgctgtca attctgctgg tctggcgtgg cctcgtctcc 180  
 gccggcatga cgtcacggga cgcactcgcc gcgagggttg ccgggacggg cccaagatgg 240  
 ctgagcgcct tccttccgct tctgcctgcc gcgcagagcc ccattcattg ccttgctgct 300  
 aagtggcgcc gcgtagtgcc agtaggctcc aagtcttcag ggtctgtccc atcgggcagg 360  
 aagccgtcat ggcaaccctg gaaaagctga tgaaggcttt cgagtcgctc aagtcgtttc 420  
 agcagcaaca gcagcagcag caacagcagc agcaacagca gcagcaacag cagcagcagc 480  
 aacagcagca gcaacagcag cagcagcagc agcaacagca gcagcagcaa cagcagcagc 540  
 agcagcagca acagcagcag cagcagcaac agcaacagca gcagcagcag cagcaacagc 600  
 agcagcagca acagcagcag caacagcagc agcagcaaca gcagcagcaa cagcagcagc 660  
 aacagcagca gcagcagcag caacagcagc agcagcagca acagcagcag cagcaacagc 720  
 agcagcagca gcaacagcag cagcagcaac agcagcagca gcaacagcag cagcaacagc 780  
 agcaacagca gcagcagcag cagcagcaac agcagcagca gcagcaacag cagcagcaac 840  
 agcagcaaca gcagcagcaa cagcagcagc caccgccgca ggcgccgccg ccaccgccgc 900  
 cgccgcctcc gcctcaacc cctcagccgc cgctcaggg gcagccgccg ccgccaccac 960

---

cgccgctgcc aggtccggca gaggaaccgc tgcaccgacc gtgagtccgg gcgcccgcagc 1020  
tcccgcccg gccccgcgcc cctggcctgc gtgctgggca tggccaacac tgttccctgt 1080  
ccagagggtc gcggtacctg gctgaggcca ggctttccc gcccgggccc tcgtcttgcg 1140  
gggtctctgg cctccctcag aggagacaga gccgggtcag gccagccagg gactcgctga 1200  
ggggcgtcac gactccagtg cttcgcctg tcccagtttg cgaagttagg gaacgaactt 1260  
gtttctctct tctggagaaa ctggggcggt ggcgcacatg actgttgtga agagaacttg 1320  
gagaggcaga gatctctagg gttacctct catcaggcct aagagctggg agtgcaggac 1380  
agcgtgagag atgtgcgggt agtggatgac ataa 1414

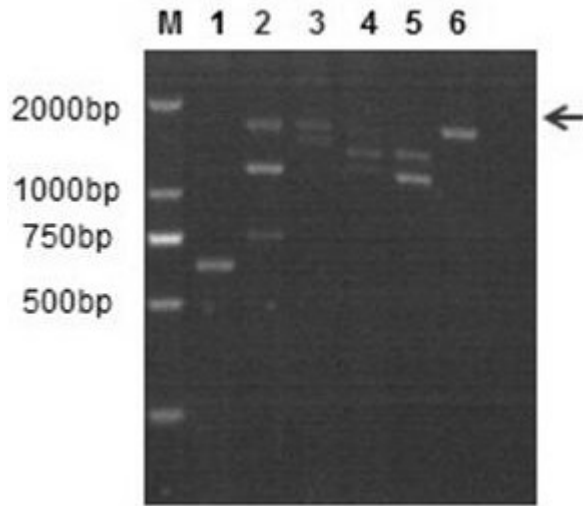


图1

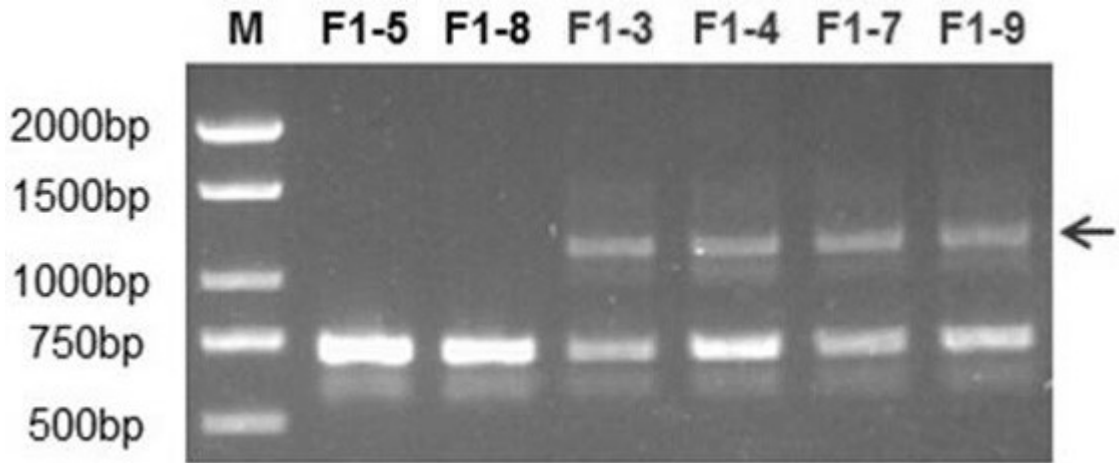


图2

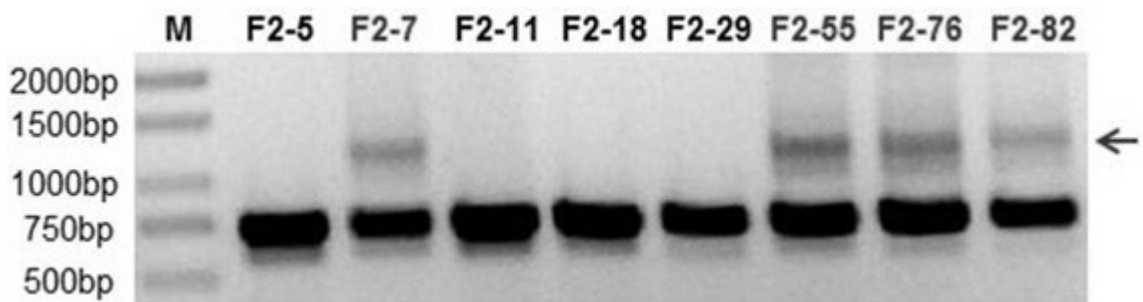


图3

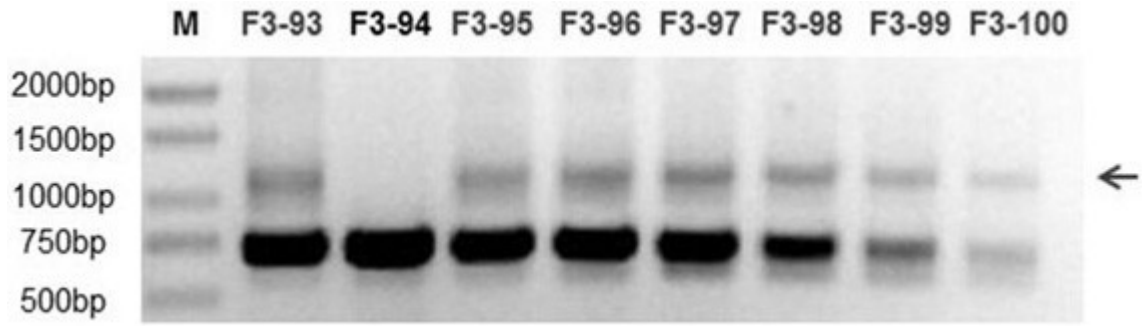


图4

