



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106947780 A

(43)申请公布日 2017.07.14

(21)申请号 201710191095.3

(22)申请日 2017.03.28

(71)申请人 扬州大学

地址 225009 江苏省扬州市大学南路88号

(72)发明人 成勇 张婷

(74)专利代理机构 南京知识律师事务所 32207

代理人 卢亚丽

(51) Int. Cl.

C12N 15/90(2006.01)

C12N 9/22(2006.01)

A01K 67/027(2006.01)

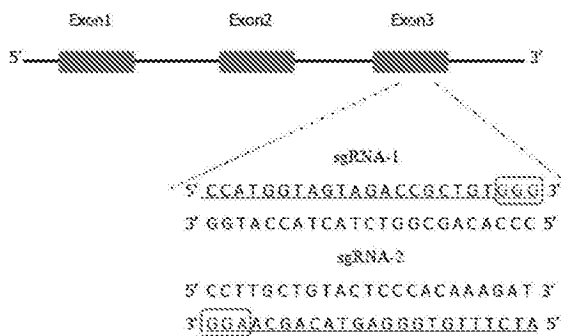
权利要求书1页 说明书22页
序列表6页 附图6页

(54)发明名称

一种兔MSTN基因的编辑方法

(57)摘要

本发明涉及基因工程技术领域,尤其涉及一种兔MSTN基因编辑方法。该方法是利用CRISPR/Cas9在兔MSTN基因座定点实现基因修饰;包括根据兔MSTN基因靶序列位点设计和引导序列、利用引导序列构建2种CRISPR/Cas9二合一质粒mstn-sgRNA1和mstn-sgRNA2、体外转录出sgRNA-1、sgRNA-2和Cas9mRNA并形成两种二合一复合物的分子生物学材料,再利用该分子生物学材料制备转基因兔,诱导MSTN基因编码序列第3外显子4881-4903及4796-4818位核苷酸序列的突变与缺失的步骤。应用本发明方法可实现MSTN基因突变和基因敲除,获得MSTN表达缺失或降低的基因编辑兔,本发明可用于瘦肉型兔基因编辑育种。



1. 一种兔MSTN基因的编辑方法,其特征在于,利用CRISPR/Cas9在兔MSTN基因座定点实现基因修饰;具体是:

(1) 根据如SEQ ID NO.1所示的新西兰兔MSTN基因靶序列,针对4881-4903、4796-4818位核苷酸序列设计sgRNA-1和sgRNA-2的引导序列,

(2) 利用引导序列与YSYCRISPR/Cas9二合一质粒构建试剂盒构建2种CRISPR/Cas9二合一质粒,将它们分别命名为mstn-sgRNA1和mstn-sgRNA2

(3) mstn-sgRNA1和mstn-sgRNA2质粒分别做为PCR扩增sgRNA-1、sgRNA-2和Cas9 mRNA的转录模板,根据转录模板体外转录出sgRNA-1、sgRNA-2和Cas9mRNA;sgRNA-1或sgRNA-2分别与Cas9mRNA的二合一复合物组成了激活新西兰兔MSTN基因4881-4903、4796-4818位核苷酸序列突变及新西兰兔MSTN基因基因敲除的分子生物学材料,

(4) 利用该分子生物学材料制备转基因兔,诱导MSTN基因编码序列第3外显子4881-4903及4796-4818位核苷酸序列的突变与缺失。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述sgRNA-1和sgRNA-2的引导序列为:sgRNA-1的引导序列:5' -CCATGGTAGTAGACCGCTGT-3'

sgRNA-2的引导序列:5' -ATCTTTGTGGGAGTACAGCA-3'。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(3)中sgRNA-1和/或sgRNA-2和Cas9mRNA按1:2-5比例配合使用。

4. 权利要求1所述的方法在瘦肉型转基因兔育种中应用。

一种兔MSTN基因的编辑方法

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程技术领域,尤其涉及一种以CRISPR/Cas9介导的兔MSTN基因编辑方法,应用该技术可实现MSTN基因突变和基因敲除,获得MSTN表达缺失或降低的基因编辑兔,本发明可用于瘦肉型兔基因编辑育种。

背景技术

[0002] 肌肉生长抑制素(myostatin,MSTN)是骨骼肌生长发育的负调控因子,属于转化生长因子 β (transforming growth factor β ,TGF- β)超家族成员,又称生长分化因子8(growth differentiation factor 8,GDF-8)。MSTN属于TGF- β 超家族成员,因此具有TGF- β 超家族典型的结构特征,包括N-末端的分泌信号肽、蛋白酶水解位点(proteolytic processing site,RSRR)和成熟肽区的半胱氨酸结构(cystine knot)。MSTN基因的突变能够引起骨骼肌的广泛性增生与肥大,产生“双肌症状”。目前已研究过的不同哺乳物种间的MSTN基因结构均含3个外显子和2个内含子,并且成熟肽氨基酸序列很保守,氨基酸差异很小,均在3个以内。前两个外显子共同编码N端前肽,第三外显子编码C端多肽。C端多肽含有由9个半胱氨酸构成的半胱氨酸结,该半胱氨酸结对MSTN基因编码蛋白的三维结构的稳定和功能的发挥起到关键作用,其结构的破坏将抑制myostatin的信号传导。皮埃蒙特牛中的双肌表型牛就是由于半胱氨酸(C313Y)突变导致的。

[0003] 小鼠、大鼠、人、猪、鸡、牛、绵羊、狒狒、和斑马鱼等物种的MSTN基因编码序列发生点突变或移码突变,则通常表现出肌肉量显著增加的性状。目前已经在人、牛、绵羊、狗等多种物种中发现了自然发生的MSTN基因的突变,已经发现MSTN基因发生自发突变的有比利时兰牛(Belgian blue)、皮埃蒙特牛(Piedmontese)等,表现出双肌性状,其突变均发生在exon3。

[0004] 发现哺乳动物中MSTN基因均含有3个外显子和2个内含子,完整的MSTN cDNA包括一个ORF(Opening Read Fracture)和编码375个氨基酸残基(小鼠和大鼠为376个氨基酸残基)的核苷酸序列。MSTN是一种分泌型多肽,与TGF- β 超家族有着相似的典型特征:N端作为分泌信号,与TGF β 超家族有着相同的氨基酸序列;C端有由4个氨基酸(RSRR,Arg-Ser-Arg-Arg)组成类胰蛋白酶水解位点;在C端有6个半胱氨酸残基形成“半胱氨酸结”结构,并通过二硫键形成生物学活性二聚体。MSTN成熟肽序列在不同物种上的同源性很高,小鼠、大鼠、人、猪、马、狗,鸡和火鸡的同源性为100%,牛、绵羊,狒狒与山羊相比仅有1~3个碱基的差别。

[0005] MSTN前体蛋白包括信号肽、N端前肽和C端成熟肽,其中成熟肽均为C-末端的109个氨基酸残基。前体蛋白质需经二次蛋白酶解活化,去除信号肽,切割前体蛋白质产生N-端前肽和C-端多肽,C-端多肽通过二硫键相连形成二聚体,构成MSTN成熟蛋白分泌至血液循环,并与N-端前肽以非共价键形式形成LAP(lantency-associated peptide,40kDa)。有人用Myostatin特异性抗体检测到了牛成肌细胞提取物肌肉生长抑制素前体肽(52kDa)的存在和LAP,证明MSTN确实在成肌细胞中合成并且水解加工。

[0006] 对基因组进行定向修饰一直是生物科学家研究的主题,通过对MSTN基因进行突变、缺失、敲除等遗传修饰,获得基因突变动物,一方面可以构建出具有“双肌症状”的动物模型用于生物学研究和疾病机理研究,另一方面可以达到改进肌肉质量和重量的目的,生产具有商业化性质的优良品种家畜。

[0007] 基因组编辑(genome editing)技术是通过插入、缺失或替换的手段对基因组进行定点改造,从而获得能以突变基因代替正常基因来研究基因也能够以正常基因代替突变基因来进行基因治疗的功能的科研技术。这种技术的原理是构建一个人工内切酶,在预定的基因组位置切断DNA,切断的DNA在被细胞内的DNA修复系统修复过程中会产生突变,从而达到定点改造基因组的目的。DNA修复系统主要通过两种途径修复DNA双链断裂(double-strand break,DSB),即非同源末端连接(Non-homologous end joining,NHEJ)和同源重组(homologous recombination,HR)。基因组编辑技术可以通过这两种修复途径来实现三种基因组改造的目的,即基因敲除,基因敲入和定点转基因,因而基因组编辑技术具有广阔的科研和疾病治疗前景。

[0008] 人们一直在寻找简单高效的方法对基因组进行靶向修饰。传统的基因打靶技术依赖于细胞内自然发生的同源染色体随机重组交换,打靶效率极低,通常只有 10^{-6} - 10^{-8} ,未被广泛应用。近年来核酸酶指导的基因组靶向修饰技术发展迅速。这类核酸酶通常由一个DNA识别结构域和一个非特异性核酸内切酶结构域构成,由DNA识别结构域特异的识别靶位点,把核酸酶定位到需要进行编辑的基因组区域,然后由非特异性核酸内切酶切断DNA双链,引起DNA断裂自我修复机制,从而引发基因序列的突变和促进同源重组的发生。

[0009] CRISPR/Cas9系统是细菌长期抵御外来质粒或噬菌体的入侵从而进化出来的一种免疫机制,细菌宿主的CRISPR基因座转录形成前体CRISPRRNA(pre-crRNA),在Cas9和核酸酶(RNase III)的协助下,pre-crRNA被加工成成熟的crRNA,并与相关Cas9蛋白特异性切割外来DNA序列,鉴于此功能,CRISPR/Cas9系统已成为新一代基因编辑技术。

[0010] CRISPR/Cas9是第三代基因编辑技术,与ZFN和TALEN技术相比有明显的优势,因其构建简单、方便,使用时基因编辑效率高,而且成本较低,自2013年起已经迅速成为基因编辑技术的研究热点。CRISPR/Cas9在基因组中的靶点分布频率很高,平均每8个bp就有一个靶点,TALEN的靶点在基因组的分布频率大概是1/125bp,而ZFN的分布频率大概是1/500bp,有时不能用ZFN和TALENs对某些基因组位点进行定点编辑,用CRISPR/Cas系统可以实现该基因组的定点编辑。

[0011] 在细胞相同、载体结构相似和位点相同的情况下,CRISPR/Cas9在人iPS细胞中的定点突变效率是TALEN的2倍以上,并且CRISPR/Cas9产生双等位基因突变的效率更高。CRISPR/Cas系统更具有灵活性,因为TALEN和ZFN技术对不同的靶点需要重新设计,而CRISPR/Cas9只需要改变20bp左右的sgRNA序列。而且还可以将几个sgRNA串联在一起对同一基因的多个位点同时编辑或多个不同基因同时编辑。

[0012] 在动植物新品种培育方面,CRISPR/Cas9具有很大优势。通过构建CRISPR/Cas9载体,体外转录获得RNA后,再显微注射动物受精卵而获得打靶动物。在整个打靶过程中不存在外源DNA的整合,也就避免了传统转基因技术导致的生物安全问题。CRISPR/Cas9为人类基因治疗、新药开发等生物医学研究领域方面提供了一条全新的思路。CRISPR/Cas9技术在基础理论研究、临床治疗和农牧渔业等领域的应用前景必将越来越有广阔,并且将会产生

深远的影响。

发明内容

[0013] 本发明目的在于提供一种兔MSTN基因编辑方法及其在兔MSTN基因exon3第372, 374位半胱氨酸敲除靶位点。

[0014] 本发明中术语兔MSTN基因是指肌肉生成抑制蛋白基因 (myostatin)。

[0015] 为了解决上述问题,本发明采取了如下技术方案:

[0016] 一种兔MSTN基因编辑方法,是利用CRISPR/Cas9在兔MSTN基因座定点实现基因修饰;具体是:

[0017] (1) 根据如SEQ ID NO.1所示的新西兰兔MSTN基因靶序列,针对4881-4903、4796-4818位核苷酸序列设计sgRNA-1和sgRNA-2的引导序列,

[0018] (2) 利用引导序列与YSYCRISPR/Cas9二合一质粒构建试剂盒构建2种CRISPR/Cas9二合一质粒,将它们分别命名为mstn-sgRNA1和mstn-sgRNA2

[0019] (3) mstn-sgRNA1和mstn-sgRNA2质粒分别做为PCR扩增sgRNA-1、sgRNA-2和Cas9mRNA的转录模板,根据转录模板体外转录出sgRNA-1、sgRNA-2和Cas9mRNA;sgRNA-1或sgRNA-2分别与Cas9mRNA的二合一复合物组成了激活新西兰兔MSTN基因4881-4903、4796-4818位核苷酸序列突变及新西兰兔MSTN基因基因敲除的分子生物学材料,

[0020] (4) 利用该分子生物学材料制备转基因兔,诱导MSTN基因编码序列第3外显子4881-4903及4796-4818位核苷酸序列的突变与缺失。

[0021] 本发明中,引导序列的设计如下:基因组靶序列SEQ ID NO.1中截获的同源序列(4881-4900位核苷酸)作为sgRNA-1的引导序列,4901-4903位核苷酸作为sgRNA-1的PAM序列,基因组靶序列SEQ ID NO.1的反向互补序列中截获的同源序列(基因组靶序列SEQ ID NO.1的4796-4815位核苷酸反向互补序列)作为sgRNA-2的引导序列,4816-4818位核苷酸反向互补序列作为sgRNA-2的PAM序列:

[0022] sgRNA-1的引导序列:5'-CCATGGTAGTAGACCGCTGT-3'(SEQ ID NO.2)

[0023] sgRNA-1的PAM序列(PAM-1):5'-GGG-3'

[0024] sgRNA-2的引导序列:5'-ATCTTTGTGGGAGTACAGCA-3'(SEQ ID NO.3)

[0025] sgRNA-2的PAM序列(PAM-2):5'-AGG-3'

[0026] 本发明步骤(3)中sgRNA-1和/或sgRNA-2和Cas9mRNA优选按1:2-5比例配合使用。

[0027] 本发明兔MSTN基因定点敲除方法,所述定点敲除方法为编辑兔MSTN基因组靶序列的CRISPR/Cas9基因敲除技术;

[0028] 所述兔MSTN基因靶序列如SEQ ID NO.1所示核苷酸序列,4881-4903及4796-4818核苷酸为设计引导序列位点;

[0029] 所述的CRISPR/Cas9基因编辑工具应用于MSTN基因敲除应用本专利特征性材料:应用mstn-sgRNA1和mstn-sgRNA2质粒体外转录获得sgRNA-1、sgRNA-2,将获得的sgRNA-1和sgRNA-2与Cas9mRNA按1:2-5比例配合使用用于受精卵显微注射,其中mstn-sgRNA1、mstn-sgRNA2、PAM-1、PAM-2、sgRNA-1、sgRNA-2和Cas9mRNA是本专利特征性材料。

[0030] 本发明还公开了所述方法在瘦肉型转基因兔育种中应用。

[0031] 本发明方法能有效地诱导MSTN基因编码序列第3外显子4881-4903及4796-4818位

核苷酸序列的突变与缺失,并产生新西兰兔MSTN表达受阻及肌肉生长加强。

附图说明

- [0032] 图1靶位点在MSTN基因中的相对位置。
- [0033] 图2是sgRNA质粒的鉴定。
- [0034] 图3是sgRNA质粒的测序结果。
- [0035] 图4是sgRNA和Cas9mRNA电泳图。1:sgRNA1;2:sgRNA2;3:Cas9mRNA;M: λ -EcoT14digest DNA marker。
- [0036] 图5是兔受精卵的胞质显微注射。
- [0037] 图6是兔MSTN基因PCR产物电泳图
- [0038] 1:灭菌双蒸水作为空白对照;2:正常阴性兔基因组作为阴性对照;3~9:M1~M7;10~18:M8~M16;M:DL2000DNA marker
- [0039] 图7是M5和正常兔MSTN基因PCR产物测序图谱
- [0040] WT:正常兔测序图谱;M5:双等位基因突变兔测序图谱。
- [0041] 图8是M12和正常兔MSTN基因PCR产物测序图谱
- [0042] WT:正常兔测序图谱;M12:MSTN突变阴性兔测序图谱。
- [0043] 图9是M10和正常兔MSTN基因PCR产物测序图谱
- [0044] WT:正常兔测序图谱;M10:双等位基因突变细胞样品测序图谱。
- [0045] 图10是MSTN突变兔与正常兔的体型对比图
- [0046] WT:正常兔;M3、M5、M6、M10:MSTN基因突变兔。
- [0047] 图11是MSTN基因突变兔肌肉图片
- [0048] A、E:M9MSTN突变兔腿部肌肉;B:M9MSTN突变兔肩臂及后背肌肉;C:M9MSTN突变兔;D:正常阴性兔。
- [0049] 图12是MSTN基因突变兔与正常阴性兔的9-14周龄体重曲线图。
- [0050] 图13是MSTN突变兔基因组PCR产物TA克隆测序结果(sgRNA-2)。其中,靶位点为sgRNA-2,“-”表示碱基缺失,“+”等表示碱基增添,小写字母表示碱基替换,斜体的小写字母表示增添的碱基,“fs”表示读码框发生改变。
- [0051] 图14是MSTN突变兔基因组PCR产物TA克隆测序结果(sgRNA-1)。其中,靶位点为sgRNA-1,“-”表示碱基缺失,“+”等表示碱基增添,小写字母表示碱基替换,加下划线斜体的小写字母表示增添的碱基,“fs”表示读码框发生改变。

具体实施方式

- [0052] 一、CRISPR/Cas9质粒构建及体外转录
- [0053] 1.实验材料
- [0054] 1.1主要仪器及器材
- [0055] 高速台式离心机及低温高速离心机(德国Eppendorf公司);基因扩增仪(S1000型,美国BIO-RAD公司);DNA电泳仪和电泳槽(DYY-6B型,南京新校园生物技术研究);数码凝胶成像系统(GIS-1000型,上海天能科技有限公司);恒温培养摇床(IS-RDV1,南京畅翔仪器设备有限责任公司);隔水式电热恒温培养箱(PYX-DHS-350-BII型,上海跃进医疗器械厂);

电热恒温水槽 (DK60型, 上海精宏实验设备有限公司); 制冰机 (SIM-F124型, 日本三洋公司); 电子天平 (FA1004, 上海天平仪器厂); PH检测仪 (HA405-K2型, 梅特勒-托利多集团上海分公司); 自动双重纯水蒸馏器 (SZ-II型, 上海嘉鹏科技有限公司); 超净工作台 (SJ-CJ-1BQ型, 苏州净化仪器设备厂); -80℃超低温冰箱 (日本三洋公司); 核酸蛋白定量分析仪 (One Drop™ OD-1000+, 基因集团, 上海仪涛生物仪器有限公司); 实验室级超纯水器 (EPED-20TF型, 南京易普易达科技发展有限公司)。

[0056] 1.2分子生物学试剂及试剂盒

[0057] YSYCRISPR/Cas9二合一质粒构建试剂盒及Annealing Buffer购自南京尧顺禹生物科技有限公司、T4DNA Ligase购自Promega公司、Phanta Super-Fidelity DNA polymerase购自南京诺唯赞生物科技有限公司、Endo-free Plasmid Mini Kit I购自OMEGA (货号:D6948-01)、胰蛋白胨 (Tryptone) 及酵母提取物 (Yeast Extract) 购自Oxoid公司、2×Power Taq PCR MasterMix购自BioTeKe (货号:PR1700)、ScriptMAX Thermo T7Transcription Kit (TSK-101) 购自东洋纺生物科技有限公司 (货号:TSK-101)、抗-反向帽类似物 (ARCA) 购自NEB (货号:01.NEB.S1411S)、poly (A) 聚合酶购自NEB (货号:01.NEB.M0276S)、EasyPure PCR Purification Kit及E.coil Trans5α感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司 (货号:CD201-01), 其他试剂均为国产分析纯, 分别购自上海苏懿化学试剂有限公司、南京生兴生物有限公司、国药集团化学试剂有限公司等。

[0058] 1.3主要试剂的配制

[0059] (1) LB液体培养基

[0060] 称取5g蛋白胨、2.5g酵母粉和10g NaCl, 溶于400mL双蒸水, 定容至500mL, 调pH至7.5, 高压灭菌冷却至常温待用。

[0061] (2) LB固体培养基

[0062] 称取1g蛋白胨、0.5g酵母粉、1g NaCl和1g琼脂粉, 溶于90mL双蒸水, 定容至100mL, 高压灭菌, 待温度降至室温, 加入AMP混匀后铺板后待用。

[0063] (3) 氨苄青霉素 (AMP)

[0064] 用4mL灭菌双蒸水溶解1g氨苄青霉素, 配成浓度为250mg/mL的储液, 分装, -20℃保存。

[0065] (4) 质粒提取溶液

[0066] 溶液I: 称取0.30285g Tris、0.37224g Na₂EDTA和0.9008g Glucose, 加90mL双蒸水溶解, 定容至100mL, 调pH至8.0, 高压灭菌, 4℃保存。

[0067] 溶液II: 分别配制0.2M NaOH和1% SDS溶液, 使用是1:1体积混匀。

[0068] 溶液III: 3M NaAc, 以冰醋酸调至pH 5.5。

[0069] (5) 50×TAE贮存液

[0070] 称取242g Tris和37.2g Na₂EDTA·2H₂O, 量取57.1mL HAc, 加双蒸水定容至1L, 室温保存。使用时以双蒸水稀释成1×。

[0071] (6) 50×EB贮存液

[0072] 100mL双蒸水溶解1g溴化乙锭粉末, 配成浓度为10mg/mL的储液, 4℃保存, 使用时以双蒸水稀释成1×。(7) RNaseA溶液

[0073] RNaseA溶于10mmol/L Tris和15mmol/L NaCl混合液中, 配制浓度为10mg/mL, 100℃

煮沸15min, -20℃保存。

[0074] (8) DEPC处理水: 纯水仪制备超纯水, 再双蒸。用双蒸的超纯水配制0.1% DEPC水溶液, 猛烈振摇, 直到瓶底看不到油状颗粒, 37℃摇床过夜, 第二天, 121℃高压40min取出放于超净台内冷却至常温。用无RNase的枪头分装到无RNase的2mL的指形管中, -20℃冻存。

[0075] (9) 无RNase的70%乙醇: 取3mL的DEPC水+7mL的无水乙醇即可。用无RNase的枪头分装到无RNase的2mL的指形管中, -20℃冻存。

[0076] 2. 实验方法

[0077] 2.1mstn-sgRNA1和mstn-sgRNA2质粒构建及鉴定

[0078] 采用YSYCRISPR/Cas9二合一质粒构建试剂盒构建mstn-sgRNA1和mstn-sgRNA2质粒, 以该质粒为模板, 及南京尧顺禹生物科技有限公司提供的引物扩增sgRNA-1和sgRNA-2的转录模板。(引物1、引物2、引物3、引物4见表2-1)

[0079] 表2-1 引物信息

引物名称	引物序列(5'-3')
引物1	TGTAACCGACGGCCAGT (SEQ ID NO.4)
[0080] 引物2	TGGCACCGAGTCGGTGCTTT (SEQ ID NO.5)
引物3	ATTAACCCCTCACTAAAGGGA (SEQ ID NO.6)
引物4	AAAAAAGCACCGACTCGGTGCCAC (SEQ ID NO.7)

[0081] 2.1.1设计sgRNA单链退火引物

[0082] 针对兔MSTN基因的sgRNA-1和sgRNA-2的引导序列设计对应的sgRNA模板, 形式为gNNNNNNNNNNNNNNNNNN [NGG]。“g”为sgRNA模板的首个核苷酸; N为目标基因的特异核苷酸。NGG为PAM序列, 其必须出现在基因组DNA上但不出现在sgRNA模板DNA序列上。若20个核苷酸的sgRNA模板首位不是“g”, 请在首位加上“g”, 此时模板长为21个核苷酸。

[0083] 根据sgRNA模板设计对应的退火引物, 由引物合成公司合成。

[0084] 形式为:

[0085] 正向单链退火引物: TATAgNNNNNNNNNNNNNNNNNN

[0086] 反向单链退火引物: AAACNNNNNNNNNNNNNNNNNNc

[0087] 注意反向单链退火引物NNNNNNNNNNNNNNNNNNc为gNNNNNNNNNNNNNNNNNN的反向互补序列;

[0088] 若20个核苷酸的sgRNA首位为“g”, 则N的个数为19, 正反向单链退火引物均为24个核苷酸长; 若20个核苷酸的sgRNA首位不为“g”, 则在前面加一个“g”, 则N的个数为20, 此时正反向单链退火引物为25个核苷酸长。

[0089] 2.1.2合成sgRNA单链退火引物

[0090] sgRNA-1的单链退火引物(5'-3'):

[0091] 正向单链退火引物: TATAgCCATGGTAGTAGACCGCTGT (SEQ ID NO.8)

[0092] 反向单链退火引物: AAACACAGCGGTCTACTACCATGGc (SEQ ID NO.9)

[0093] sgRNA-2的单链退火引物(5'-3'):

[0094] 正向单链退火引物: TATAgATCTTTGTGGGAGTACAGCA (SEQ ID NO.10)

[0095] 反向单链退火引物: AAAGTCTGTACTCCACAAAGATc (SEQ ID NO.11)

[0096] 2.1.3将正反向两个引物进行退火

[0097] (1) 将单链退火引物溶于超纯水中,至100 μ M

[0098] (2) 在2个PCR管中按下述配方分别组成10 μ L反应体系,反应体系如表1-1。

[0099] 表1-1引物退火体系

	组成成分	体 积
[0100]	Annealing Buffer	8 μ L
	正向单链退火引物	1 μ L
	反向单链退火引物	1 μ L

[0101] (3) 将反应体系混匀,然后快速离心将溶液离心至PCR底部。

[0102] (4) 将混匀后的体系放入PCR仪进行反应,95 $^{\circ}$ C 孵育5min后,以每分钟1.5 $^{\circ}$ C 逐渐从95 $^{\circ}$ C 降至22 $^{\circ}$ C。

[0103] 2.1.4将退火产物与线性化的YSYCRISPR/Cas9二合一质粒连接

[0104] (1) 在PCR管中按下述配方组成10 μ L反应体系,反应体系如表1-2。表1-2DNA连接体系

	组成成分	体 积
[0105]	5 \times T4 连接缓冲液	2 μ L
	T4 连接酶	1 μ L
	YSYCRISPR/Cas9 二合一质粒(线性化)	1 μ L
	退火产物	0.5 μ L
	H ₂ O	5.5 μ L

[0106] (2) 混匀,然后将混合液快速离心至PCR管底部。

[0107] (3) 16 $^{\circ}$ C 过夜或室温孵育30min。

[0108] (4) 从-80 $^{\circ}$ C 冰箱中取出Trans5 α 感受态大肠杆菌,立即置于冰上。

[0109] (5) 待感受态细胞解冻后,将50 μ L感受态细胞轻轻加入10 μ L的(1)中的连接产物即可,不需要吸打混匀,冰浴30min。

[0110] (6) 42 $^{\circ}$ C 水浴热激45s,后立即置于冰上孵育2min,不要晃动离心管。

[0111] (7) 加入100 μ L LB培养基(无抗生素,室温),于37 $^{\circ}$ C 恒温摇床培养40min~1h(盖紧管盖)。

[0112] (8) 取所有菌液均匀涂布于含50 μ g/mL氨苄青霉素的LB琼脂板上,倒置于恒温培养箱中37 $^{\circ}$ C 培养过夜(14~18h)。

[0113] 2.1.5转化平板的菌落PCR鉴定

[0114] (1) 准备3个1.5mL的EP管,每管加入20 μ L含50 μ g/mL氨苄的LB液。

[0115] (2) 用高压灭菌处理过的枪头从LB琼脂板上挑取单克隆直接放入准备好的EP管中。每个板上挑取3个克隆。

[0116] (3) 盖紧管盖后,涡旋振荡EP管。

[0117] (4) 准备3个0.2mL的PCR管,在每一个管中按下列方法分别制备10 μ LPCR反应体系,按如下体系加样,反应体系如表1-3。

[0118] 表1-3 PCR体系

组成成分	体 积
2×Power Taq PCR MasterMix	5.0μL
引物 3 (5μM)	0.5μL
反向单链退火引物 (5μM)	0.5μL
含单克隆细菌的 LB 液	0.5μL
H ₂ O	3.5μL

[0120] PCR反应条件:95℃预变性2min;94℃变性30sec,56℃退火30sec,72℃延伸30sec,重复35个循环;72℃再延伸10min,20℃5min;结束反应。

[0121] (5) 2%琼脂糖凝胶电泳,阳性克隆应出现113bp的条带。

[0122] 2.1.6菌液测序

[0123] 送经PCR验证有阳性条带的菌液去测序(测序引物选用引物3),确认sgRNA-1和sgRNA-2的引导序列(去除PAM位点)和骨架序列确实在质粒中;同时,将同样的菌接种在10mL含氨苄青霉素的LB管中,37℃条件下摇菌过夜,以用来后续小量提取质粒及保存菌种用,将确认含有sgRNA-1和sgRNA-2的引导序列(去除PAM位点)和骨架序列的质粒分别命名为mstn-sgRNA1和mstn-sgRNA2。

[0124] 骨架序列:gtttttagagctagaaatagcaaggttaaataaggctagtcggttatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgctttttt (SEQ ID NO.12) 2.1.7mstn-sgRNA1和mstn-sgRNA2质粒DNA的小量制备

[0125] 使用OMEGA的小提试剂盒提取阳性质粒,操作步骤如下:

[0126] (1) 1.5~5ml菌液以1000g/min,离心1min,室温下操作。

[0127] (2) 除去上清,加入250μL Solution I (预先加好RNase A),并充分重悬沉淀。

[0128] (3) 向重悬液中加入250μL Solution II轻柔混匀使细菌充分裂解。

[0129] (4) 向混合液中加入125μL冰预冷的Buffer N3并轻柔充分混匀直至出现白色絮状混合物。

[0130] (5) 4℃或室温以12000g/min,离心10min。

[0131] (6) 小心地将上清吸入到1.5mL离心管中,尽量不要吸到沉淀。再加入0.1倍体积的ETR Solution。颠倒混匀7~8次,并置于冰上10min。

[0132] (7) 将(6)中溶液放于42℃孵育5min。25℃条件下以12000g/min离心3min。

[0133] (8) 吸取上清液至新的1.5mL离心管中,加入0.5倍体积的无水乙醇,并轻轻颠倒混匀6~7次。并室温静置1~2min。

[0134] (9) 吸取(8)中的混合液700μL至DNA结合柱中,室温下以10000g/min离心1min。

[0135] (10) 弃去流出液,向结合柱中加入500μL Buffer HB,室温下以10000g/min离心1min。

[0136] (11) 弃去流出液,向结合柱中加入700μL DNA Wash Buffer,10000g/min离心1min,弃去流出液。

[0137] (12) 再重复步骤(11)。

[0138] (13) 以最大速度空离结合柱(≥ 13000 g/min)离心2min。

[0139] (14) 将结合柱放入1.5mL离心管中,加入30~50 μ L的无内毒素的Elution Buffer或水,以最大速度离心结合柱(≥ 13000 g/min)离心1min。

[0140] 2.2mstn-sgRNA1和mstn-sgRNA2质粒体外转录

[0141] 2.2.1制备sgRNA和cas9转录模板

[0142] (1) 制备sgRNA1转录模板:在PCR管中按下述配方组成50 μ L PCR反应体系,反应体系如表1-4。

[0143] 表1-4 PCR体系

	组成成分	体 积
	5 \times SF Buffer	10 μ L
	dNTP (10Mm Each)	1 μ L
[0144]	mstn-sgRNA1 质粒 (10ng/ μ L)	1 μ L
	引物 3 (5 μ M)	4 μ L
	引物 4(5 μ M)	4 μ L
	DNA 聚合酶(1u/ μ L)	1 μ L
	H ₂ O	29 μ L

[0145] PCR反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性30sec;95 $^{\circ}$ C变性5sec,52 $^{\circ}$ C退火10sec,72 $^{\circ}$ C延伸5sec,重复30个循环;72 $^{\circ}$ C再延伸5min;结束反应。

[0146] (2) 制备sgRNA2转录模板:相关PCR试剂为Vazyme Phanta Super-Fidelity DNA polymerase,在PCR管中按下述配方组成50 μ L PCR反应体系,反应体系如表1-5。

[0147] 表1-5 PCR体系

	组成成分	体 积
	5 \times SF Buffer	10 μ L
	dNTP (10Mm Each)	1 μ L
[0148]	mstn-sgRNA2 质粒 (10ng/ μ L)	1 μ L
	引物 3 (5 μ M)	4 μ L
	引物 4 (5 μ M)	4 μ L
	DNA polymerase(1u/ μ L)	1 μ L
	H ₂ O	29 μ L

[0149] PCR反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性30sec;95 $^{\circ}$ C变性5sec,52 $^{\circ}$ C退火10sec,72 $^{\circ}$ C延伸5sec,重复30个循环;72 $^{\circ}$ C再延伸5min;结束反应。

[0150] (3) 制备cas9转录模板:在PCR管中按下述配方组成50 μ L PCR反应体系,反应体系如表1-6。

[0151] 表1-6 PCR体系

	组成成分	体 积
[0152]	5 \times SF Buffer	10 μ L
	dNTP (10Mm Each)	1 μ L

	mstn-sgRNA1 或 mstn-sgRNA2 质粒 (10ng/ μ L)	1 μ L
	引物 1(5 μ M)	4 μ L
[0153]	引物 2(5 μ M)	4 μ L
	DNA polymerase(1u/ μ L)	1 μ L
	H ₂ O	29 μ L

[0154] PCR反应条件:95℃预变性30sec;95℃变性10sec,56℃退火15sec,72℃延伸68sec,重复34个循环;72℃再延伸5min;结束反应。

[0155] 2.2.2纯化sgRNA转录模板和cas9转录模板

[0156] 用TRANSGEN PCR纯化试剂盒分别纯化sgRNA1、sgRNA2和cas9转录模板:

[0157] (1) 100 μ L PCR产物加入5倍体积的BB,混匀加入离心柱中(可静置1min),10000g/min,离心1min,弃去流出液。

[0158] (2) 加入650 μ L WB,10000g/min,离心1min,弃去流出液。(重复一次)

[0159] (3) 10000g/min,离心1min,去除残留的WB,并开盖挥发酒精。

[0160] (4) 向离心柱加入60~70℃预热的30~50 μ L的DEPC处理水,室温静置1min,10000g/min,离心1min。(5) 核酸蛋白定量分析仪测纯化PCR产物溶度及OD值,分装纯化后的PCR产物,5 μ L/管,-20℃冻存。2.3以2.2.2中的PCR产物为模板转录mRNA

[0161] 2.3.1转录并纯化sgRNA

[0162] (1) 冰上解冻ScriptMAX Thermo T7Transcription Kit (TSK-101) 试剂盒中的相关液体,并表1-7体系加样,加完样后将样品充分混匀,40℃孵育4h。

[0163] 孵育结束后,加入1 μ L TURBO DNase,充分混匀后37℃孵育15min。表1-7体外转录体系

	组成成分	体 积
	10×Basal reaction	2 μ L
	5×Accelerate solution	4 μ L
[0164]	rNTP	4.5 μ L
	RNase inhibitor	0.5 μ L
	PCR 产物 (mstn-sgRNA 1 或 mstn-sgRNA 1)	- μ L
	T7 RNA 聚合酶	1 μ L
	水 (无核酸酶)	补至 20 μ L

[0165] (2) 纯化转录产物:

[0166] a、上述转录产物中加入30 μ L Nuclear-free water和30 μ L LiCl溶液,混匀,-20℃放置至少30min;

[0167] b、4℃,16000g/min,离心15min;

[0168] c、除上清,1mL 70%乙醇(无RNase水配制)清洗沉淀,16000g/min,离心15min;

[0169] d、除去70%乙醇,超净台放置5~10min,无RNase水溶解沉淀;

[0170] e、核酸蛋白定量分析仪测溶度,无RNase水稀释至20ng/ μ L,分装成5 μ L/管,-80℃

冻存备用。

[0171] 2.3.2转录并纯化cas9mRNA

[0172] (1) 冰上解冻ScriptMAX Thermo T7Transcription Kit (TSK-101) 试剂盒中的相关液体,并按表1-8体系加样,加完样后将样品充分混匀,40℃孵育4h

[0173] 表1-8体外转录体系

	组成成分	体 积
	10×Basal reaction	2μL
	5×Accelerate solution	4μL
	rNTP	4.5μL
[0174]	RNAse inhibitor	0.5μL
	PCR 产物 (mstn-sgRNA 1 或 mstn-sgRNA 2)	-μL
	T7 RNA 聚合酶	1μL
	ARCR(20mM)	4.5μL
	水 (无核酸酶)	补至 20μL

[0175] 孵育结束后,加入1μL TURBO DNase,充分混匀后37℃孵育15min。

[0176] (2) cas9mRNA加poly A。冰上解冻E.coil polymerase试剂盒中的相关试剂,按表1-9体系加样,加完样后将样品充分混匀,37℃孵育45min。

[0177] 表1-9加polyA体系

	组成成分	体 积
	ATP solution	3μL
[0178]	10×Buffer	16μL
	poly A polymerase	2μL
	2.3.2(1)获得的反应产物	21μL
	Nuclear-free water	补至 160μL

[0179] (3) 纯化转录产物:

[0180] a、向2.3.2(2)中孵育结束的转录产物中加入40μL Nuclear-free water和120μL LiCl溶液,混匀,-20℃放置至少30min;

[0181] b、4℃,13000g/min,离心15min;

[0182] c、除上清,1mL 70%乙醇(无RNase水配制)清洗沉淀,13000g/min,离心15min;

[0183] d、除去70%乙醇,超净台放置5~10min,无RNase水溶解沉淀;

[0184] e、核酸蛋白定量分析仪测溶度,无RNase水稀释至80ng/μL,分装成5μL/管,-80℃冻存备用。

[0185] 3. 设计要求和鉴定分析

[0186] 3.1MSTN基因敲除位点设计要求

[0187] 靶位点在兔MSTN基因第三外显子上的相对位置如图1,sgRNA的引导序列一般为20bp,PAM序列(NGG),这是设计靶序列所必须的。给设计的sgRNA-1和sgRNA-2的引导序列添加粘性末端(TATAg),即可合成sgRNA-1和sgRNA-2正反向单链退火引物,形式为:

[0188] 正向单链退火引物:TATAgNNNNNNNNNNNNNNNNNN

[0189] 反向单链退火引物:AAACNNNNNNNNNNNNNNNNNNc

[0190] 注意反向单链退火引物NNNNNNNNNNNNNNNNNNc为gNNNNNNNNNNNNNNNNNN的反向互补序列;

[0191] sgRNA-1的单链退火引物(5'-3'):

[0192] 正向单链退火引物:TATAgCCATGGTAGTAGACCGCTGT

[0193] 反向单链退火引物:AAACACAGCGGTCTACTACCATGGc

[0194] sgRNA-2的单链退火引物(5'-3'):

[0195] 正向单链退火引物:TATAgATCTTTGTGGGAGTACAGCA

[0196] 反向单链退火引物:AAACTGCTGTACTCCCACAAAGATc

[0197] 3.2mstn-sgRNA1和mstn-sgRNA2质粒构建及鉴定

[0198] 合成sgRNA-1,sgRNA-2的正反向单链退火引物后,分别退火,退火产物与YSYCRISPR/Cas9二合一质粒载体连接,构建成CRISPR/Cas9二合一质粒,连接产物转化感受态,涂布氨苄琼脂板,隔夜生长后挑取单克隆菌落做菌体PCR,PCR产物电泳出现113bp大小条带的即为阳性克隆(如图1-2)。为进一步确定CRISPR/Cas9二合一质粒的正确性,将扩增出阳性条带的菌液测序,进行序列比对,鉴定正确连接的CRISPR/Cas9二合一质粒

[0199] 由图2显示,1、2、3和6泳道均出现113bp的阳性条带,分别将菌液测序,然后与兔MSTN基因的所设计的sgRNA-1和sgRNA-2的引导序列比对,结果均一致,如图3。最终成功获得能够识别兔MSTN基因sgRNA-1和sgRNA-2靶位点的质粒,将它们分别命名mstn-sgRNA1和mstn-sgRNA2。

[0200] 4.mstn-sgRNA1和mstn-sgRNA2质粒体外转录

[0201] 以mstn-sgRNA1,mstn-sgRNA2质粒为模板PCR扩增sgRNA-1、sgRNA-2(引物3和引物4)及Cas9mRNA(引物1和引物2)的转录模板,其大小分别为224bp,224bp及4343bp。以PCR产物为转录模板,在T7RNA聚合酶的作用下,体外转录sgRNA-1,sgRNA-2及Cas9mRNA。其中Cas9mRNA在细胞内需翻译成Cas9蛋白,因此需在体外加上ARCA帽和poly A结构来促进细胞内翻译及防止mRNA降解。由图4显示1、2泳道为体外转录的sgRNA-1,sgRNA-2,3泳道为体外转录并加ARCA帽和poly A结构的Cas9mRNA。

[0202] 二、MSTN基因突变兔的制备

[0203] 1.材料

[0204] 1.1实验动物

[0205] 本专利所用实验动物可以是普通级新西兰白兔或其它品种家兔,雌兔6~8月龄,体重3.5~5kg,种公兔10~12月龄。饲养条件:室温18~25℃、湿度40%~50%、换气良好,一天饲喂两次,每次添加80g颗粒饲料,并提供充足的饮用水。

[0206] 1.2主要仪器

[0207] 体视显微镜(厦门麦克奥迪公司;TMS,NIKON,Japan);荧光倒置显微镜和显微操作仪(Leica公司,德国;Eppendorf TransferMan NK2公司;IX-71,Olympus,日本);拉针仪

(MODEL P-97, INSTRUMENT, USA); CO₂培养箱(MCO-18M ThermoForma); 基因扩增仪(S1000型, 美国BIO-RAD公司); 超净工作台(SJ-CJ-1BQ型, 苏州净化仪器设备厂); DNA电泳仪和电泳槽(DYY-6B型, 南京新校园生物技术研究); 数码凝胶成像仪(GIS-1000型, 上海天能科技有限公司); 制冰机(SIM-F124型, 日本三洋公司); 隔水式电热恒温培养箱(PYX-DHS-350-BII型, 上海跃进医疗器械厂); 电子天平(FA1604, 上海精密天平); PH检测仪(HA405-K2型, 梅特勒-托利多集团上海分公司); 电恒温干燥箱(MICRO-4HYBAID); 台式高速冷冻离心机(Biofuge公司, 德国; Eppendorf公司, 德国); 低速台式离心机(80-2型, 上海医疗器械有限公司手术器械厂); 实验室级超纯水器(EPED-20TF型, 南京易普易达科技发展有限公司); 电热恒温水槽(DK600型, 上海精宏实验设备有限公司); 移液器(Eppendorf公司, 德国); 普通冰箱(青岛海尔公司); -80℃超低温冰箱(日本三洋公司); 恒温培养摇床(IS-RDV1, 南京畅翔仪器设备有限责任公司); 核酸蛋白定量分析仪(One Drop™ OD-1000+, 基因集团, 上海仪涛生物仪器有限公司); 超声波清洗器(KQ-300DE型, 昆山市超声仪器有限公司)。

[0208] 1.3主要器材

[0209] 小动物常规保定架, 玻璃毛细管(DCG-10, DC-10型, Narishige, 日本), 注射器, 硅化平皿和玻片, 自制移卵管和吸管, 胚胎培养方杯, 接卵杯等, 台秤。

[0210] 1.4主要试剂及药品

[0211] NaH₂CO₃、KCl、KH₂PO₄、K₂HPO₄、Na₂HPO₄、EDTANa₂、NaCl等细胞测试级试剂(均购自Sigma公司); M16(M7292-100ML, Sigma公司); M2(M7167-100ML, Sigma公司); FSH(110044629, 宁波市三生药业有限公司); HCG(091217B, 丽珠集团丽珠制药厂); Penicillin-streptomycin(PS)和Fetal Bovine Serum(FBS)购自HyClone公司; pGEM-T Easy Vector(A1360, Promega) T-4ligase(购自Promega公司); DNA聚合酶(DNA polymerase)、dNTP、DNA Marker(DL2000)均购自宝生物工程(大连)有限公司, 实验中其他试剂均为国产分析纯, 分别购自南京生兴生物有限公司, 上海生工生物有限公司, 南京诺唯赞生物有限公司, 等。

[0212] 1.5主要试剂配制

[0213] (1) 冲卵液

[0214] 称取10g NaCl、0.25g KH₂PO₄、0.25g KCl和1.44g Na₂HPO₄, 加900双蒸水溶解后定容至1000mL, 高压灭菌, 分装50mL/瓶, -4℃保存。

[0215] (2) 组织裂解液

[0216] 称取2.4228g Tris-Base、7.444g EDTANa₂和1g SDS, 加150mL灭菌双蒸水溶解后定容至200mL, 高压灭菌, 分装, -20℃保存。

[0217] (3) LB液体培养基

[0218] 称取5g蛋白胨、2.5g酵母粉和10g NaCl, 溶于400mL双蒸水, 定容至500mL, 调pH至7.5, 高压灭菌冷却至常温待用。

[0219] (4) LB固体培养基

[0220] 称取1g蛋白胨、0.5g酵母粉、1g NaCl和1g琼脂粉, 溶于90mL双蒸水, 定容至100mL, 高压灭菌, 待温度降至室温, 加入AMP混匀后铺板后待用。

[0221] (5) 氨苄青霉素(AMP)

[0222] 用4mL灭菌双蒸水溶解1g氨苄青霉素, 配成浓度为250mg/mL的储液, 分装, -20℃保

存。

[0223] (6) X-gal溶液

[0224] 称取20mg X-gal粉末加入到1mL二甲基甲酰胺溶液混匀,分装,避光于-20℃保存。

[0225] (7) IPTG溶液

[0226] 称取2g IPTG粉末,加入双蒸水,定容到10mL。分装,避光于-20℃保存。

[0227] (8) 质粒提取溶液

[0228] 溶液I:称取0.30285g Tris、0.37224g EDTANa₂和0.9008g Glucose,加90mL双蒸水溶解,定容至100mL,调pH至8.0,高压灭菌,4℃保存。

[0229] 溶液II:分别配制0.2M NaOH和1%SDS溶液,使用是1:1体积混匀。

[0230] 溶液III:3M NaAc,以冰醋酸调至pH5.5。

[0231] 2.方法

[0232] 2.1供体兔超数排卵与供受体同期发情

[0233] 每组实验挑取两只未发情的母兔作为超排供体兔,母兔外阴泛白,略干燥可认为未发情。采用连续6次FSH剂量递减法对每只供体母兔的腿部肌肉注射FSH,FSH的总量为60IU,上下午各注射一次(8:00和20:00),递减依次为15IU、15IU、10IU、10IU、5IU、5IU。在最后一次注射FSH 12h后,每只供体兔耳缘静脉注射100IU hCG,随之与正常公兔配种。

[0234] 供体兔配种完成后随即挑选受体母兔2~4只作为受体,发情良好母兔作为受体移植怀孕率高。为保证与供体兔同步发情,每只受体兔耳缘静脉注射100IUhCG,作为受体兔。将供受体兔均做饥饿处理。

[0235] 2.2回收供体兔受精卵

[0236] 供体兔注射hCG后18~20h,常规输卵管伞部回收受精卵,在体视显微镜下捡取受精卵,计数并移至M16培养液中,置于38℃、5%CO₂、饱和湿度培养箱中培养。

[0237] 2.3mRNA显微注射兔受精卵

[0238] (1) 制备显微注射针(距针尖50μm处直径10~15μm,针口0.5μm~1.5μm),及制备持卵固定针(外径120~150μm,内径10~20μm)。

[0239] (2) 从-80℃超低温冰箱取出分装好的cas9mRNA和sgRNA,等体积混合,cas9mRNA和sgRNA终浓度分别为40ng/μL和10ng/μL。

[0240] (3) 在倒置显微镜上组装好注射针与固定针,用无RNase的虹吸管吸取cas9mRNA和sgRNA mRNA混合物注入注射针内,然后调试焦距,使注射针在视野内清晰可见。

[0241] (4) 将受精卵移至M2操作液滴中,调整显微镜直到视野内可清楚地观察到受精卵。

[0242] (5) 轻轻落下注射针及固定针,对准卵表面调焦,与受精卵基本在同一平面。

[0243] (6) 固定针轻柔地固定受精卵,注射针尖对准卵中心位置调焦,使针尖清晰可见,然后小心地刺入受精卵的胞质。

[0244] (7) 注射器稍稍施加压力,观察到注射针尖有液体流出,即完成了一次完射,重复该过程直至所有受精卵注射完毕,如图5。

[0245] 2.4胚胎移植

[0246] 常规胚胎移植,移植前需观察显微注射卵的存活率,剔除死卵和状态不好的卵。输卵管和卵巢,观察卵巢是否有排卵点或者滤泡即可移植。胚胎移入输卵管,在输卵管壶腹部注入受精卵。一般情况下,母兔怀孕30天左右会自然分娩,常规母兔产后护理及仔兔哺乳。

[0247] 3.技术效果判定和基因突变检测

[0248] 3.1MSTN基因突变检测

[0249] 3.1.1兔基因组的提取

[0250] (1) 出生后2~3周的仔兔无菌剪取耳尖组织,并剪取正常兔耳组织,放入指形管内并剪碎,加入750 μ L

[0251] 组织裂解液和7.5 μ L蛋白酶K (25mg/mL), 55 $^{\circ}$ C旋转消化,直至肉眼观察不到组织块为止。

[0252] (2) 12000rpm离心,10min,取黏稠上清于另一洁净指形管,加入750 μ L苯酚,颠倒混匀,12000rpm

[0253] 离心,10min。

[0254] (3) 取上清于另一洁净指形管。

[0255] (4) 加入750 μ L 1:1的苯酚:氯仿混合物,颠倒混匀,12000rpm离心,10min。

[0256] (5) 取上清于另一洁净指形管中,加入750 μ L氯仿,颠倒混匀,12000rpm离心,10min。

[0257] (6) 取上清于另一洁净指形管中,加入预冷的无水乙醇1mL,颠倒混匀,沉淀基因组DNA(白色絮状)。(7) 挑取白色DNA团块,加入1mL 70%乙醇充分洗涤,12000rpm离心,5min。

[0258] (8) 弃上清,沉淀物质经37 $^{\circ}$ C烘干。

[0259] (9) 根据基因组的量加入20~50 μ L灭菌双蒸水溶解,-20 $^{\circ}$ C保存备用。

[0260] 3.1.2仔兔MSTN基因PCR检测与测序

[0261] 为了方便可靠地检测兔的MSTN基因敲除情况,应用软件Primer5.0针对兔MSTN基因突变位点设计引物,引物信息见表2-1。

[0262] 表2-1引物信息

引物名称	引物序列(5'-3')	碱基数	退火温度
[0263] CAS9SG123-1	CTTATCGTTCCTTTCTTT (SEQ ID NO.13)	18	48.2 $^{\circ}$ C
CAS9SG123-2	CCTATAGCCTATGGTACA (SEQ ID NO.14)	18	52.7 $^{\circ}$ C

[0264] 按表2-2制备PCR反应体系,

[0265] 表2-2 PCR体系

组成成份	体 积
10 \times PCR buffer(Mg ²⁺)	5.0 μ L
dNTP Mixture (10mM)	2.5 μ L
[0266] CAS9SG123-1 (20 μ M)	0.5 μ L
CAS9SG123-2 (20 μ M)	0.5 μ L
rTaq 酶(5U/ μ L)	0.5 μ L
模板(仔兔基因组, 25ng/ μ L)	3.0 μ L
H ₂ O	Up to 50.0 μ L

[0267] PCR反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性5min;94 $^{\circ}$ C变性50sec,48 $^{\circ}$ C退火45sec,72 $^{\circ}$ C延伸1min,共33个循环;72 $^{\circ}$ C再延伸10min,4 $^{\circ}$ C保存。

[0268] 取5 μ LPCR产物于1.0%的琼脂糖凝胶电泳,初步判定仔兔MSTN基因突变情况。

[0269] 为了进一步验证所获得的仔兔的MSTN基因是否发生突变,将PCR产物进行序列测定,并应用DNASar序列分析软件与扩增模板标准序列作比对,用Chromas软件观察测序峰图套峰情况。

[0270] 3.1.3仔兔MSTN基因PCR扩增产物TA克隆

[0271] 为鉴定MSTN基因突变阳性兔的突变类型,进一步将PCR产物测序结果显示为MSTN基因突变PCR产物与pGEM-T克隆载体连接。连接pGEM-T克隆载体前用TRANSGEN PCR纯化试剂盒纯化PCR产物。纯化获得的PCR产物与pGEM-T克隆载体按如下公式进行量的计算:

$$[0272] \quad \frac{(\text{载体质量 ng} \times \text{插入片段 kb})}{\text{载体大小 kb}} \times \frac{\text{插入片段}}{\text{载体}} \times \boxed{\text{的摩尔比}}$$

$$= \text{插入片段 ng}$$

[0273] 按照连接酶体系说明,制备反应体系,反应体系见表2-3:

[0274] 表2-3 DNA连接体系

	组成成分	体 积
	T4 DNA ligase 10×Buffer	1μL
[0275]	T vector (50ng/μl)	1μL
	T4 DNA ligase	1μL
	仔兔基因组 PCR 产物	0.3μL
	H ₂ O	补至 10μL

[0276] 反应条件:4℃连接过夜。

[0277] 3.2本专利技术产生的效益及生产性能提高评判

[0278] 3.2.1评判方法

[0279] 从9周龄起逐日称取实验组兔(M1~M11)和正常阴性兔(WT1~WT10)的体重。做好记录。

[0280] 用SPSS 20.0统计软件分别计算出9~14周龄的雄兔(包括MSTN突变雄兔和正常阴性雄兔)、雌兔(包括MSTN突变雌兔和正常阴性雌兔)和MSTN突变兔(包括雄兔和雌兔)的体重周增量进行系统方差分析并进行Duncan氏法进行多重比较,以P<0.05为差异显著性判断标准。

[0281] 最初实验设计目的是制备具有双肌表型的MSTN基因突变兔。为了尽可能的使突变的MSTN基因降或丧失生物活性,而且尽可能的使得对MSTN基因的功能产生抑制作用,同时考虑到N-端的266个氨基酸发挥功能前是被切除的,避免将突变设计在切除的266个氨基酸内而造成对成熟肽功能无影响的情况发生,因此将MSTN基因靶位点设计在成熟肽区域。考虑到后期仔兔MSTN基因突变检测情况,用DNASar软件分析兔MSTN基因成熟肽区酶切位点,由于常用酶切位点稀少,且设计CRISPR/Cas9靶位点需要PAM序列,因此并未找适合于后期突变检测的常用酶切位点的靶位点,使得后期的初步检测只能使用基因测序手段。

[0282] 3.2.2本技术获得效果与设计的一致性

[0283] 用设计的一对引物(CAS9SG123-1和CAS9SG123-2)对正常兔MSTN基因进行扩增,得到的目的条带大小为498bp,同样对本实验所获得的16只仔兔MSTN基因进行扩增,然后1%

凝胶电泳,EB染色,紫外光下拍照观察,实验结果见图6。若MSTN基因缺失或增添条带较大,与正常条带对比即可区别开来,即能初步判定仔兔MSTN基因突变情况。对于缺失或增添条带或仅仅发生碱基置换的情况,只有通过后续的PCR产物测序或PCR产物TA克隆后测序来鉴定。观察MSTN基因PCR电泳图发现,第6、8、12泳道的电泳条带明显小于第2泳道的正常对照条带,其余泳道条带大小变化无法肉眼识别,只能后续基因测序判定。所获得的仔兔中有3个仔兔可初步判定为MSTN基因敲除成功,为进一步鉴定所获兔基因突变情况,将获得的16只仔兔及正常对照兔的PCR产物测序。

[0284] 16只仔兔及正常兔的MSTN基因组PCR产物测序完成后结果显示:M1~M9、M11和M13~M16的PCR产物测序峰图显示套峰,M1~M7的测序图谱在sgRNA-1位点附近存在多种碱基信号,M8~M9、M11和M13~M16的测序图谱在sgRNA-2位点附近存在多种碱基信号,表明M1~M9、M11和M13~M16兔的MSTN基因存在突变,为MSTN基因突变兔。如图7,8,9。

[0285] M5兔PCR测序图谱出现套峰结构,与正常兔的PCR测序图谱对比发现多个碱基突变,图中黑色箭头所指表示碱基置换,黑色三角所指表示碱基缺失,由图9对比可见,M5产生了两个碱基置换:T→A和G→A,一个碱基缺失。正常兔、M10和M12的PCR产物测序峰图未见套峰结构。通过M10和M12的PCR产物测序结果与正常兔MSTN基因组比对,发现M12的测序序列与正常兔序列一致,即M12兔未发现MSTN基因突变,为MSTN基因突变阴性兔。

[0286] M10测序序列与正常兔MSTN基因组后发现其缺失136bp,6个碱基置换,而测序峰图只有单一的碱基信号,表明M10的MSTN基因的两条染色体突变情况一致,即M10为纯合子,M10与正常兔峰图对比情况见图9,黑色箭头所指的碱基表示置换碱基位置,M12与正常兔的PCR产物测序峰图对比可见,两者结果一致,未见套峰。

[0287] 应用本技术产生的仔兔MSTN基因组PCR产物测序无法鉴定MSTN基因的两条等位基因的突变情况。因此,将仔兔MSTN基因组PCR产物插入TA载体,通过TA克隆测序鉴定每个MSTN基因突变兔的两条等位基因的突变类型。结果显示,15只MSTN基因突变兔的突变类型有基因缺失、基因插入、碱基替换,主要以基因缺失为主,缺失碱基数在1~169bp之间,部分仔兔的MSTN基因缺失同时还存在碱基替换或(和)碱基插入,共获得10只MSTN突变兔,详见图13和图14。

[0288] M1~M6的MSTN基因组PCR产物TA克隆测序结果显示这6只仔兔MSTN基因的两条染色体均发生突变,碱基突变情况详见表2-4,表明mstn-sgRNA1质粒在兔MSTN基因所设计sgRNA-1靶位点是有活性的,且敲除效率极高,达到了100%。表2-4除了M6的第二条染色体上的MSTN序列外其余序列均因靶位点突变造成阅读框移码。M1一条MSTN基因缺失10bp,另一条缺失2bp,替换3个bp,造成M1兔的MSTN两条等位基因编码的第372,374位半胱氨酸均缺失,一条染色体的MSTN基因编码的第375位氨基酸成为半胱氨酸。M2兔的一条MSTN基因缺失52bp,使得MSTN基因编码的第372,374位半胱氨酸缺失,第361位氨基酸成为半胱氨酸,另一条缺失2bp,替换1个bp,也使得MSTN基因编码的第372,374位半胱氨酸缺失,移码突变后,第378位氨基酸成了半胱氨酸。M3兔的一条MSTN基因缺失26bp,另一条增添7bp,替换1个bp,使M3兔的MSTN两条等位基因编码的第372,374位半胱氨酸均缺失。M5兔的一条MSTN基因替换5个bp,插入31个bp,另一条缺失1个bp,替换1个bp,翻译后,两条MSTN基因编码的第372,374位半胱氨酸均缺失,后者编码的第378位氨基酸成为半胱氨酸。M6兔的一条MSTN基因缺失10个bp,另一条缺失9个bp,两条MSTN基因编码的第372,374位半胱氨酸均缺失,后者未发生移

码突变,仅仅缺失了3个氨基酸,包含2个半胱氨酸,前者发生移码突变,除了缺失2个半胱氨酸,第375位成为半胱氨酸。M4两条MSTN基因均缺失较多,一条缺失159bp,替换1bp,另一条缺失169bp,使得两条MSTN基因编码的第339、340、372、374位半胱氨酸均缺失,后者所编码的第322位氨基酸成为半胱氨酸。mstn-sgRNA1质粒在兔MSTN基因所设计sgRNA-1靶位点是针对第372位半胱氨酸的,M1~M6的MSTN基因组PCR产物TA克隆测序结果可知,M1~M6兔MSTN两条等位基因编码的第372、374位半胱氨酸均缺失,达到sgRNA-1靶位点设计目的,又由于M1、M2、M4、M5、M6兔的一条或两条基因移码突变,形成新的半胱氨酸,但与野生型MSTN基因编码的氨基酸序列相比,形成的新的半胱氨酸与预先设计敲除的半胱氨酸位点是不同的。

[0289] M8~M11的MSTN基因组PCR产物TA克隆测序结果显示这4只仔兔MSTN基因的两条染色体均发生突变,碱基突变情况详见表2-6,表2-6除了M9-1和M11-1外其余序列均因靶位点突变造成阅读框移码。M10兔是MSTN基因突变纯合子兔,它的MSTN基因的两条等位基因均缺失136bp,替换6bp,造成MSTN基因编码到第290位氨基酸即停止翻译,导致剩余的85位氨基酸丢失,其中包括第309、313、339、340、372、374位半胱氨酸。M8兔的一条MSTN基因增添2bp,另一条缺2bp,替换2bp,分别使得两条基因编码的第340、372、374位半胱氨酸缺失,第346、351位成为半胱氨酸和第340位半胱氨酸缺失。M9兔的一条MSTN基因缺失12个bp,另一条插入1bp,1个碱基替换,前者使得MSTN基因编码的第339、340位半胱氨酸缺失,后者使得第340、372、374位半胱氨酸缺失。M11一条MSTN基因缺失3个bp,另一条增添1bp,前者使得MSTN基因编码的第339位半胱氨酸缺失,后者使得第340位半胱氨酸缺失。由以上测序结果的氨基酸翻译结果来看,M8~M11兔MSTN两条等位基因编码的第309、340、372、374位半胱氨酸均有不同程度的缺失,表明mstn-sgRNA2质粒在兔MSTN基因所设计sgRNA-2靶位点是有活性的,而且活性较高,达到了88.9%。

[0290] 以上数据表明:本专利技术用于制备MSTN基因编辑兔与设计要求是完全一致的,技术效果是可行、可靠和精准的。

[0291] 3.2.3本技术的生产性能分析

[0292] 家兔在2~3月龄处于生长旺盛期,选取MSTN基因突变兔和正常阴性兔9~14周龄的生长阶段用于比较MSTN基因突变兔和正常阴性兔的生产性能差异。

[0293] MSTN基因突变兔及正常兔的体型对比

[0294] 采集部分MSTN突变兔与正常兔的体型对比照片,如图10,M3、M5、M6和M10的肩部及臀部与正常兔相比均显得宽阔且结实;图11为剥离M9兔便可看到丰满的肌肉。

[0295] M9兔在18周龄因麻醉不当死亡,对其进行剥离皮毛观察,可见其周身多处肌肉组织丰满,表现出双肌表型,从图2-9中A、C、E可见M9丰满的后躯肌肉和健美的臂部及肩背部肌肉。而D代表周龄相接近的正常阴性兔,其肌肉组织丰满度与M9差异明显,不表现双肌表型。

[0296] MSTN基因突变兔及正常兔在9~14周龄的体重增长情况

[0297] 在保持MSTN基因突变兔和正常阴性兔饲养管理水平一致的情况下,从9周龄起逐日称取MSTN基因突变兔和正常阴性兔的体重,一直称到14周龄。做好记录。算出MSTN基因突变兔和正常阴性兔的每周的平均体重。并整理成表格,如表2-6和2-7。

[0298] 表2-6 MSTN基因突变兔9~14周龄体重表(单位:g/只)

编号	周龄					
	9	10	11	12	13	14
M1	1418	1638	1893	2116	2402	2510
M2	1383	1668	1840	2146	2404	2623
M3	1359	1604	1869	2083	2329	2510
M4	1079	1280	1485	1794	2061	2256
M5	1082	1272	1512	1754	2035	2210
M6	1358	1598	1852	2165	2422	2614
M8	1346	1550	1775	2033	2315	2501
M10	1112	1314	1488	1654	1853	2106

[0300] 表2-7正常阴性兔9~14周龄体重表(单位:g/只)

编号	周龄					
	9	10	11	12	13	14
WT1	1094	1291	1415	1651	1764	1901
WT2	1100	1288	1409	1585	1761	1864
WT3	1108	1322	1464	1692	1917	2022
WT4	1324	1467	1670	1842	1977	2121
WT5	1398	1588	1823	2049	2088	2267
WT6	893	1099	1233	1386	1546	1604
WT7	1314	1457	1550	1686	1778	1913
WT8	1269	1492	1652	1829	2011	2189
WT9	1217	1434	1646	1808	1987	2037
WT10	1261	1402	1562	1743	1875	2088

[0302] 用SPSS 21.0软件对MSTN基因突变兔与正常阴性兔在9~14周龄的体重周增量进行系统方差分析。该试验中,将总变异分解成处理(MSTN基因突变与正常阴性兔)、性别、周龄(9、10、11、12、13、14周龄)、处理与周龄的相互作用、性别与周龄的相互作用、处理与性别间的相互作用以及处理、周龄与性别的相互作用。

[0303] 表2-8 MSTN基因突变兔与正常阴性兔9~14周龄体重变化方差表

变异来源	自由度(df)	平方和(SS)	均方(MS)	F
------	---------	---------	--------	---

	处 理	1	110997.57	110997.57	68.57**
	性 别	1	5735.35	5735.35	3.54
	周 龄	4	45986.57	11496.64	7.102**
	处理*周龄	4	9099.60	2274.90	1.405
[0305]	性别*周龄	4	7512.27	1878.07	1.160
	处理*性别	1	634.15	634.15	0.392
	处理*周龄*性别	4	2299.25	574.82	0.36
	误 差	70	113321.28	1618.88	
	总 计	89	291354.05		

[0306] 查F表,当 $df_1=1, df_2=70$ 时, $F_{0.05}(1,60)=4.00, F_{0.05}(1,80)=3.96$;当 $df_1=1, df_2=70$ 时, $F_{0.01}(1,60)=7.08, F_{0.01}(1,80)=6.96$;当 $df_1=4, df_2=70$ 时, $F_{0.05}(4,60)=2.53, F_{0.05}(4,80)=2.49$;当 $df_1=4, df_2=70$ 时, $F_{0.01}(4,60)=3.65, F_{0.01}(4,80)=3.56$ 。

[0307] 由表2-8可知处理(MSTN基因突变与正常阴性兔)的 $F>F_{0.01}$,表明MSTN基因突变与正常阴性兔在体重增长方面存在极显著差异;因为9~14周龄正为兔生长旺盛期,周龄的 F 必然大于 $F_{0.01}$,性别、周龄(9、10、11、12、13、14周龄)、处理与周龄的相互作用、性别与周龄的相互作用、处理与性别间的相互作用以及处理、周龄与性别的相互作用的 $F<F_{0.05}$,表明,性别,周龄及处理之间的相互作用不显著,表明MSTN基因突变兔与正常阴性兔在体重增长方面的极显著差异是由MSTN基因突变的因素造成。

[0308] 同时运用Duncan法对MSTN基因突变兔和正常阴性兔进行多重比较以及对MSTN基因突变兔的不同个体进行多重比较,结果以体重周增量平均值和标准差表示。

[0309] 表2-9雄兔9~14周龄体重平均周增长表(单位:g/只)

	雄兔编号	14周龄体重	9周龄至14周龄体重增量	体重平均周增量
	M2	2623	1240	248.14±48.03 ^{ab}
	M6	2614	1256	251.14±42.86 ^a
	M8	2501	1155	231.09±39.06 ^{ab}
[0310]	WT1	1901	807	161.40±52.77 ^d
	WT2	1864	764	152.86±37.91 ^d
	WT3	2022	914	182.77±55.86 ^{cd}
	WT4	2121	797	159.34±28.23 ^d
	WT5	2267	869	173.86±70.84 ^{cd}

[0311] 注:不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),有相同小写字母表示差异不显著。

[0312] 由表2-9、2-10可知MSTN基因突变雄兔(M2、M6和M8)与正常阴性雄兔(WT1~WT5)在9~14周龄的体重平均周增量存在显著差异,同样MSTN基因突变雌兔(M1、M3、M4和M5)与正常阴性雌兔(WT6~WT10)在9~14周龄的体重平均周增量存在显著差异,M10与正常阴性雌兔(WT6,WT8~WT10)在9~14周龄的体重平均周增量虽然差异不显著,但体重平均周增量的

平均值均高于正常阴性雌兔组。通过MSTN基因突变兔的9~14周龄的体重平均周增量的多重比较发现(见表2-11),不论是雄性或雌性MSTN基因突变兔,它们的9~14周龄的体重平均周增量差异不显著。

[0313] 为整体分析MSTN基因突变兔和正常阴性兔的两个群体的体重生长趋势及两者的生长差异性,同时考虑性别对MSTN基因突变兔和正常阴性兔个体的影响,因此分析同种性别的MSTN基因突变兔和正常阴性兔的体重生长情况,按表2-7和2-8分别整理出雌雄MSTN基因突变兔和雌雄阴性兔9~14周龄平均体重情况,整理数据见表2-13,并依据表2-13的数据计算出MSTN基因突变兔与正常阴性兔的每周的增重率见表2-14。

[0314] 表2-10雌兔9~14周龄体重平均周增长表(单位:g/只)

雌兔编号	14周龄体重	9周龄至14周龄体重增量	体重平均周增量
M1	2510	1092	218.46±67.12 ^{ab}
M3	2510	1151	230.23±33.00 ^{ab}
M4	2256	1177	235.29±50.38 ^a
M5	2210	1128	225.60±43.00 ^{ab}
[0315] M10	2106	994	198.71±34.25 ^{bc}
WT6	1604	711	142.26±54.01 ^{cd}
WT7	1913	600	119.97±25.02 ^d
WT8	2189	920	183.97±23.00 ^{cd}
WT9	2037	820	164.09±67.54 ^{cd}
WT10	2088	827	165.34±32.28 ^{cd}

[0316] 注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),有相同小写字母表示差异不显著。

[0317] 表2-11 MSTN基因突变兔9~14周龄体重平均周增长表(单位:g/只)

[0318] Table2-12 The MSTN gene mutation rabbit s'average weekly growth of body weight from 9to 14weeks old(unit:g/each)

MSTN 基因突 变兔编号	14周龄体重	9周龄至14周龄体重增量	体重平均周增量
M1	2510	1092	218.46±67.12
M3	2510	1151	230.23±33.00
[0319] M4	2256	1177	235.29±50.38
M5	2210	1128	225.60±43.00
M10	2106	994	198.71±34.25
M2	2623	1240	248.14±48.03
M6	2614	1256	251.14±42.86
M8	2501	1155	231.09±39.06

[0320] 注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),有相同小写字母或不标字母表示差异不显著。

[0321] 表2-12 MSTN基因突变兔与正常阴性的9~14周龄平均体重情况(单位:g/只)

[0322]	\ 性别		周龄						
			9	10	11	12	13	14	
	MSTN 突变兔♂		1362.14	1605.62	1825.57	2114.57	2380.33	2579.42	
	阴性兔♂		1204.86	1391.20	1556.49	1763.80	1925.34	2035.09	
[0323]	MSTN 突变兔♀		1210.11	1421.57	1649.34	1880.10	2135.80	2318.40	
	阴性兔♀		1190.66	1376.51	1528.69	1690.54	1839.37	1966.29	

[0324] 表2-13相同性别MSTN基因突变兔比正常阴性兔的9~14周龄体重增重率

	9	10	11	12	13	14
[0325] ♂+/♂-	13.05%	15.41%	17.29%	19.89%	23.63%	26.74%
♀+/♀-	1.63%	3.27%	7.89%	11.21%	16.12%	17.91%

[0326] 注：♂+/♂-表示雄性MSTN基因突变兔比雄性正常阴性兔体重增重率

[0327] ♀+/♀-表示雌性MSTN基因突变兔比雌性正常阴性兔体重增重率

[0328] 从表2-12及图12可以看出在同一周龄段雄性MSTN基因突变兔平均体重数值均比雄性正常阴性兔大,同样雌性MSTN基因突变兔平均体重均比雌性正常阴性兔大,表明在同一生长期MSTN基因突变兔体重值比正常阴性兔的大。从表2-13可看出在9~14周龄雄性MSTN基因突变兔的平均体重比雄性正常阴性兔增重13.05~26.74%,雌性MSTN基因突变兔的平均体重比雌性正常阴性兔增重1.63~17.91%,到14周龄时雌雄MSTN基因突变兔的平均体重比雌雄正常阴性兔增重17.91%和26.74%。由图2-9和表2-14可看出在9~14周龄阶段MSTN基因突变兔与正常阴性兔体重均随着时间延伸而不断增加,且相同性别的MSTN基因突变兔与正常阴性兔的体重周增重率在9~14周龄间的增加趋势越发明显。

[0329] 以上数据表明:本专利技术可以实现兔MSTN特定位点的基因突变,设计的突变位点可实现肌肉增长加速和个体肌肉总体含量显著提高的目的,在畜牧生产和品种改良方面有较高的应用价值。

SEQUENCE LISTING

<110> 扬州大学

<120> 一种兔MSTN基因的编辑方法

<130>

<160> 14

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 6980

<212> DNA

<213> 新西兰兔

<400> 1

```

atgcaaaaac tgcaaatcta tgtttatatt tacctgttta tgctgatcgt ggctggceca 60
gtggatctaa atgaaaacag tgagcaaaaa gaaaatgtgg aaaaagacgg gctgtgtaat 120
gcatgcactt ggagacaaaa cagtaaatat tcaagaatag aagccataaa gattcaaate 180
ctcagtaaac ttcgctgga aacagctcct aacatcagca aagatgctat aagacaactt 240
ttacceaaag ctctccaact ccgggaactg attgatcagt acgacgttca gagggatgac 300
agcagtgatg gctctttgga agatgacgat tatcacgcta cgacggaaac aatcattact 360
atgcctaccg agtgaagta gtcctattag tgtatgtcaa cagttctgct gactgttggt 420
ctagtgttta tgggaaacag atctattttc aggetctttt aataagetgt cagcttttat 480
gtaagaagca ggaaagacag tctcttcttt tcaagatttt gtgagaaata tgttgaaact 540
gaaatctgtc aactgtctg tttccttaaa aagctaaaaa gctaaaagat aaaaagcttg 600
cacagcgta atattatcta gttaattgg caaatacagc atgettatgc cttcacagcc 660
tcataccaac cagcaaggcg aggactggca gatactacag caatgttaaa aactcacagg 720
gaattttata agtgcacttg taaacaaaaa tatgcattta ttacaataag cttttcacta 780
gtaataaaga aaggaaggaa ctgctagaa ttttaagctt ctttgagcac tgctgaacac 840
ctccagtgat ttctgttatt ccaaactcct tcacagtgtt ttgtgtgctt cacagattaa 900
aatgtttcct ttcggaggct attacactga ggagcaagaa aatattttta atactttatg 960
tattagtaag agcaatgacg aaataaacgg tgacttcaaa ttcagaaaat gtctaggaaa 1020
taaacacttc agttgggcaa gttacggctc ctgaagctct ctcgtacctt gaccatgggt 1080
ctattgttgg cagtactgag tgtgtgtatt tccaagcagg cgtactgctt aataaccttc 1140
gcgaatattt cattcttcat aatggaacga ctattacctg tagtatacaac gttgctcctg 1200
gaagaaaatg tatttctac aattcctctt tcggtaggct cgaaagaata ctttcaccgg 1260
gaaagggaaa cagacacctt gacagagaag gcacggcaag aatgattttg aggccatgtg 1320
tctgtgatct tgetttaaca cagttctttg taagetttta accggactca aaacagtttc 1380
atagtattgt ttcccttatt cagtaatcag attacagtgc acaaataat tttcctttta 1440
gaatttctta ccaaatagtg ctggagtaga ttgaccttat ttatcaatga tttttgaaag 1500
ccaaaagaat ttgttcatgc ttgtctttag aatgacagct cagacataaa ggcaaacttt 1560
tgagacagcc tgaatataac atcaaacttc tctcctaatt acttgcttag ttttgtttct 1620

```

ttaaaaggat attcctgagc caaaacctcc cggaaatact atatthtteta ctgtttccta 1680
 aggctcagta agttgctcag tgcgtcttgt ccccaggtaa ttcaggcctg ggggaagggt 1740
 tccttcttcc agactgatcg gtacagctgc tccgtcagcg taactactca gattcccaaa 1800
 gaattctaag tggatgttcc tccacagtg tctttgttct ctctaatacat catcattttc 1860
 aaatttcate cactgctcat tccttcccag aattttcctt agcctgcagt tccttggag 1920
 gggagcagat tcttcacaaa tggttgaaag tacctatgtc taaagaattc tgaaaagcca 1980
 gactaattat tttccttgat attttctcgg tattatgaat gaagttttac ctagtatttc 2040
 atttacatat gcatgcatta tcccaataga aaaaataccc aactattagt aaggagggat 2100
 tttgttaact tattaatgaa aaataatttc aggaactctt gtcttattcg tttatagctg 2160
 attttctaata gcaagtggaa ggaaaacceca aatgttgctt ctttaaattt agctctaaaa 2220
 tacaatacaa taaagtagta aaggcacaac tatggatata tctgagaccg gtgaagactc 2280
 ctacaacagt gtttgtgcaa atcctgagge tcatcaaacc tatgaaagac ggtacaagg 2340
 atactggaat ccgatctctg aaacttgaca tgaaccagc cactgggtatt tggcagagca 2400
 ttgatgtgaa gacagtgttg caaaattgge tcaacaacc tgaatccaac ttaggcattg 2460
 aaatcaaagc tttagatgag aatggctatg atcttctctg aaccttccca ggaccaggag 2520
 aagatgggct ggtaagtgat aactgaaaag aacctctag taaccttgtt atgtttttgt 2580
 tcctaataatg aatgaataaa agtgggaaac aactaccgat ttcctatgct catgagccag 2640
 acaaaggat cttactccaa tggtagccct gtaccaata aaagtagtg tccaatttca 2700
 tatcctatga aaaactccct tgataccctt cgtttgcag agagtttata aaaacaatta 2760
 taccatgggt cttacttct taagaagttc ttttgaattg agaatgaaat ataaactgct 2820
 tttcattgat atgctacatg cttatatgaa taaaatatga actgtatata atgaattcca 2880
 gttcataccc caaaaatcag acttttctt tctctccaa aggttgccaa atgtgttgac 2940
 aagttctggc ttagtataaa gcaagaaaaa aacctactt tagtctgctt ctttttatct 3000
 ctgtctttca aataaaatga aaaaatgtaa agcatcataa tgaaagtaaa atactttcat 3060
 ttgtagcaat taactaatta gtataaaaat tatattataa taaatatatt atatttaagg 3120
 tccctaattg taagcatgtt cttacttga tgcacttatc tatggattat tatgtgaaat 3180
 acctctaaag gacagtttta gtttctaagc cagttagctt ttaccactta acttatttct 3240
 aagctggttt agcattcttg cacaagaatt tgacaactaa cttagtatca ggcaaaatag 3300
 atggcaatat tttgcatatt ataaaatgaa taaaactat tttaaaacct agcataaatt 3360
 tagggctact cttttggcct atctatgtt ctgtttactt ctgctttcaa aaacttattt 3420
 aatatgacaa tattttttca tggacatcta ctgacataat tttcaataga atatacttat 3480
 aaaaatgaac attagttatc tttttaatct ctaactggte ttgtttataa acattatata 3540
 ataagtaaat cagatctatt tcaaatgaaa acattctta aaagactata caattttcta 3600
 aatgacttgt tttcttata tgtattaatt taaatgctat gaattccca aaataacatt 3660
 ggtttggact gggttaaata acagtaacta tcacatctgt tttcatttta ataaaggaca 3720
 aaagctatta tcaattattt aaaaaageat tttttttac aagtagtate ttaatgatca 3780
 aagttgatga tatcacagct ttttaattatt aaacacgtgg ttaatatggg gcattcttat 3840
 ctttccatat aatacagaac aaaatctcaa atgcattaga agactgggag agtgacagta 3900
 ctaacaaatg attatatgaa tatgtgaatg aaaacattct gcaacaccta cttttctgaa 3960

tttttctcat aggggttctc ttttcagtcc aatatacaca tcaccacett catcaatcac 4020
 ttagctttct tttccatta taacttatac actgctggga ggtagcteta gctttaatac 4080
 ccaagtttcc ctgagtaaag atccacagat acagaggata gatgactata ctcatccctc 4140
 caggaatcat ctcacatatt tggccaacat attgaatcaa cgcattgtgaa gagaaggagc 4200
 ccattctttt ctctctctgc ctctccttcc acctccccct ccctttctcg ccagacagat 4260
 tttcaggaca tctatcatgt gctaggcagt tggatactac aactaggggac aacaaaaatt 4320
 aaaagcacat agaactggcc tcagggggat ttgcattact gctataatct ttgagctatg 4380
 aggggaaaaat caaaactatt ataaatcaaa tccttagtat gatgcctttt aaatataaag 4440
 gtattccaag caaaatgatt ctttttctt aaggtaaaaa aagtgcctta gaataaattg 4500
 atatacttat cgttctttcc ttttcacaca gaatcccttt ttagaggtea aggtaacgga 4560
 cacaccaaaa agatccagaa gagatttttg tcttgactgt gatgagcact caacagaatc 4620
 acgatgctgt cgctaccctc taactgtgga ttttgaagct tttggatggg attggattat 4680
 tgcgccaag agatacaagg ccaattaactg ctctggagag tgtgaatttg tgtttttaca 4740
 aaagtatcct catactcacc ttgtacacca agcaaaccct agaggttcag caggctcctg 4800
 ctgtactccc acaaagatgt ctccaattaa tatgtatat tttaatggca aagaacaaat 4860
 aatatatggg aaaattccag ccatggtagt agaccgctgt ggggtgctcat gagatttgca 4920
 tttggttttt aacttcctaa aacatggaag gtcttcccct caacaatttt gaaactgtga 4980
 aattatgtac cataggctat aggcctagag tatgtatag tcaacttaac acaagttaca 5040
 gtgtatgaac taaaagagag aatacatgca atggttgga ttttaaccate aaaataaatc 5100
 atacaatagg aagttttatg atttcagag tttttgaact agaaggagat caaattatat 5160
 ttacattcaa ctatgttaca acctaatcaa aaaagtaaag caattctct tgtgttctga 5220
 tgaatcaaag gagtatgtgt taaagtttat ttctttgcag ttttgtttaa tatttacagc 5280
 aaaatccatg tatagtattg gtaaaatgca ggactgttat atgcatcat ttgaatcacc 5340
 cttaaacact tgaactttta ttttatgata gcatacttgg taagataaaa ttccacaaaa 5400
 atagggatgg tctaccatat gcaagtttcc attcctatta tgattggtac catacattaa 5460
 caatccatgc caatgggtct aggataatag gctggatgac tgggtttatc aggatttcaa 5520
 atataaaaaca ttcggtaaaa tgagtttctc ctttttccag gtgcattttc atacatctcc 5580
 aaatgaggaa tagattttct ttaatcaaa aaggatcatt tttctagagg tcaactttga 5640
 attctgtagc atattggagg aactatacta tattaagagg cagccaaata atattaattt 5700
 taaatgaaat ttttaagacca cagctgctt ttgcaaacct gcagttttta tgacaaaata 5760
 atggaaatga ttatatcaat attgtataaa aagactttta aacaattgca tttatgtaat 5820
 atgtatacaa tattgttttg taaataaatg tctcttttt tttttacttt ggtatatttt 5880
 tacactaagg acatttcaaa ttaagtatta aggcacaaaa atgtatcaca gaaaagcaat 5940
 tgctcatatt tcagagcaaa ttagcagatt aaatagtggc cttaaaacac catatgttaa 6000
 tggtagatg gttatattac aatcatttta tttttttta cattattaac attcactatg 6060
 gattcataat gactgtataa tgtgaatgtg gaatttcaat ggtttactgt cattgtatcc 6120
 aaatctcaac gttccattat tttaatatgt ataattttac taagtatctc aaaatgatta 6180
 actccattat ctgaaatgaa gaataataaa ctgatgacat ctcaacaaaa actgttactt 6240
 tattttataa tttgataatg aatataatgc tgcatttgtt tacttctatt ctgtaaattg 6300

ggatttttgt caatcaaatt cattgtactt atgactaggt gaaattattt cttacatcta 6360
 atatgtagac actattcaaa ttttattaaa gttttccat ttttagaaaa atgtgttata 6420
 aaattatggt ataatgatga attctagatt tctgattttc actctattat aagcctaag 6480
 ttttagaaca aaagtttgac ttgagaattt taggtctggt gctcaagttc tcacaagtaa 6540
 aattcctggt gaattggctt tggcaagtt tctttacaca tacaaggca aggactagtt 6600
 atatctgttt catttctctt tatcttgacc tgaaaactat ttatatgttt tcataggttc 6660
 aatttccaaa tgcattgcag ttggcaagga tatatggtec tagagttaca agttcttctg 6720
 aagccacagg gacacagggg agctacgtct ttttctagc actaatgata ctggtacctt 6780
 catttgagct ttggaagcat taattttcaa attgaatagc aaaaccatta aaaatcactt 6840
 agaaatcatt aaatgtgata ttatacataa atatTTTTga agtgatatct cctctccact 6900
 cccatcact ttagcaactt agttataaag caatgactat tttactgtta gggttcctaa 6960
 ataatccaca attaatggca 6980

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

ccatgtagt agaccgctgt 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

atctttgtgg gactacagca 20

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

tgtaaacga cggccagt 18

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

tggcaccgag tcggtgcttt 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列	
<400> 6	
attaaccctc actaaaggga	20
<210> 7	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 7	
aaaaaaagca ccgactcggg gccac	25
<210> 8	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 8	
tatagccatg gtagtagacc gctgt	25
<210> 9	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 9	
aaacacagcg gtctactacc atggc	25
<210> 10	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 10	
tatagatcctt tgtgggagta cagca	25
<210> 11	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 11	
aaactgctgt actcccacaa agatc	25
<210> 12	
<211> 82	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 12	
gttttagagc tagaaatagc aagttaaaat aaggctagtc cgttatcaac ttgaaaaagt	60

ggcaccgagt cggtgctttt tt	82
<210> 13	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 13	
cttatcggtc tttccttt	18
<210> 14	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 14	
cctatagcct atggtaca	18

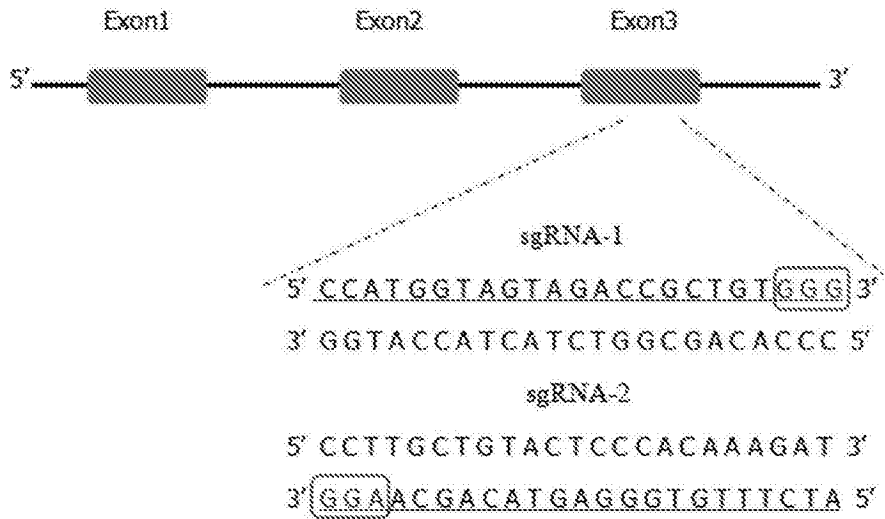


图1

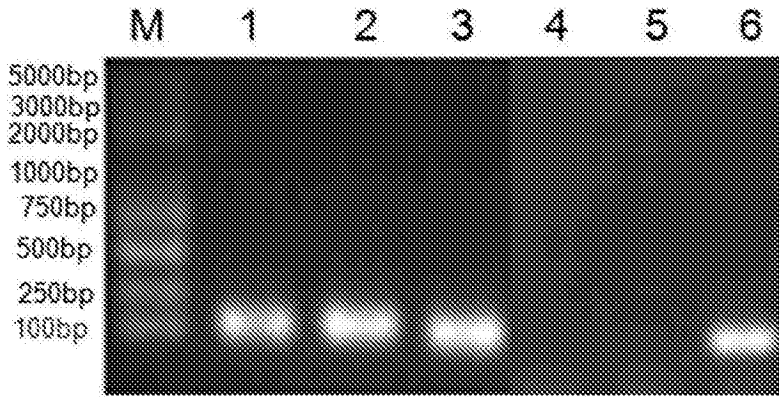


图2

mstn-sgRNA1

Consensus	GCATCAGTATAGCCCTGCTATAGACCCCTGTGTTTAAAGCTAABAAATTAAGCTATGTCGGTATGCACTTCAAAAAGTGTACCGGATCGGTTT
2 Sequences	30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130
g2.seq	-----CCATGGTAGTAGACCGCTGTGGG
E64-R1507061	GACTGCACATAGGCTATGATATAGACCCCTGCTGTTTAAAGCTAABAAATTAAGCTATGTCGGTATGCACTTCAAAAAGTGTACCGGATCGGTTT

mstn-sgRNA2

Consensus	GCTTAAATGACTACTATATATCTTTTGGAGTACACAGTTTATAGAGCTAGAAATGCAATTTAAATTAAGCTATGTCGGTATGCACTTCAAAAAGTGTACCGGATCGGTTT
2 Sequences	30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140
g2.seq	-----CCTTGCTGTACTCCCACAAAGAT
F11-R1506390	GCTTAAATGACTACTATATATCTTTTGGAGTACACAGTTTATAGAGCTAGAAATGCAATTTAAATTAAGCTATGTCGGTATGCACTTCAAAAAGTGTACCGGATCGGTTT

图3

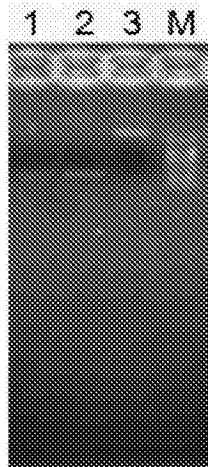


图4

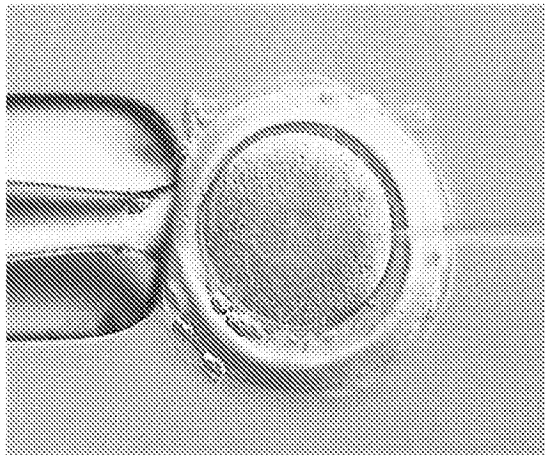


图5



图6

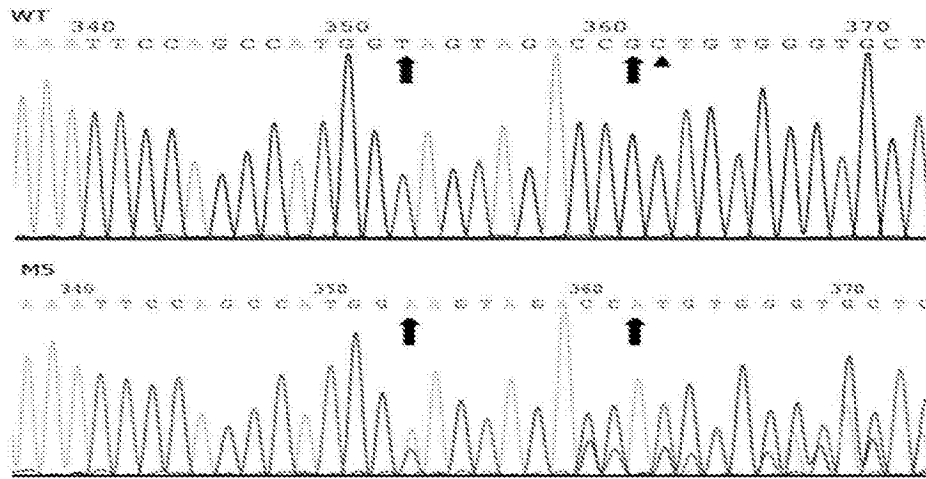


图7

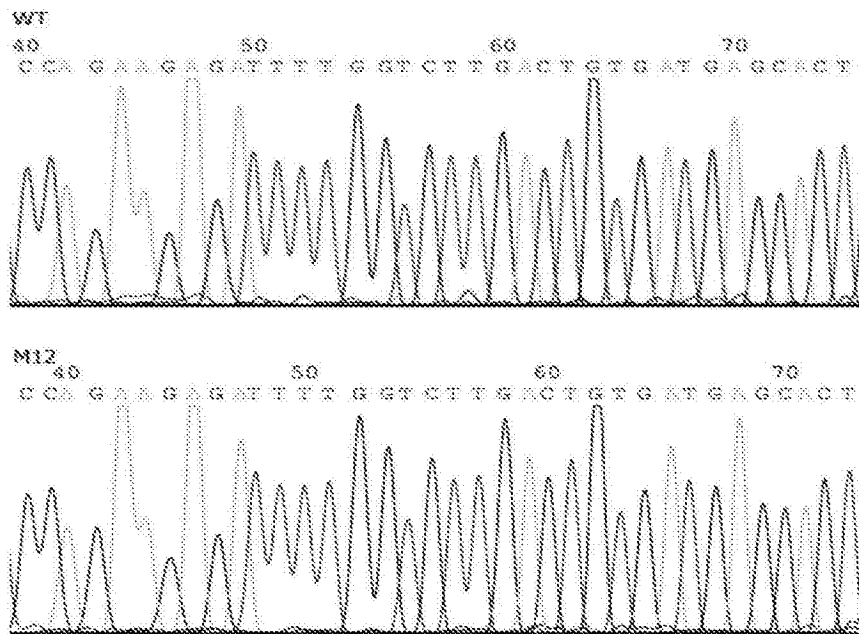


图8

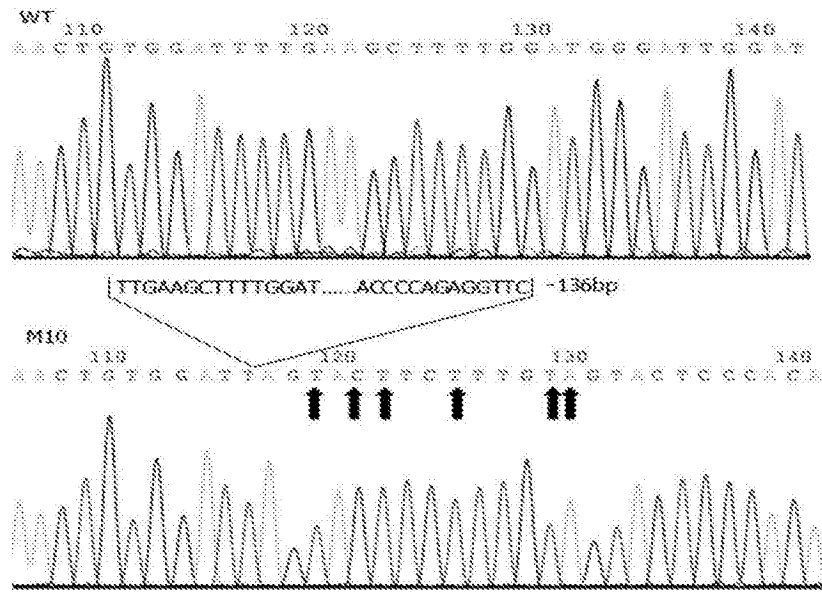


图9

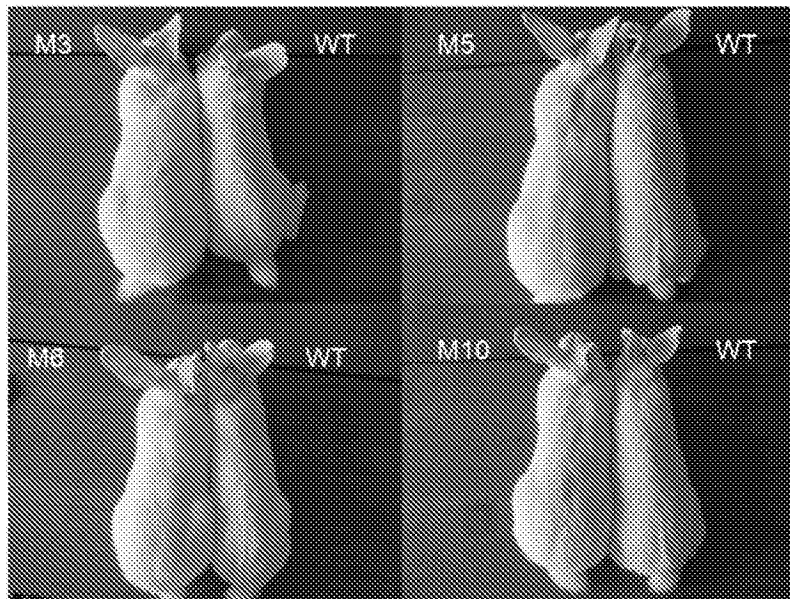


图10

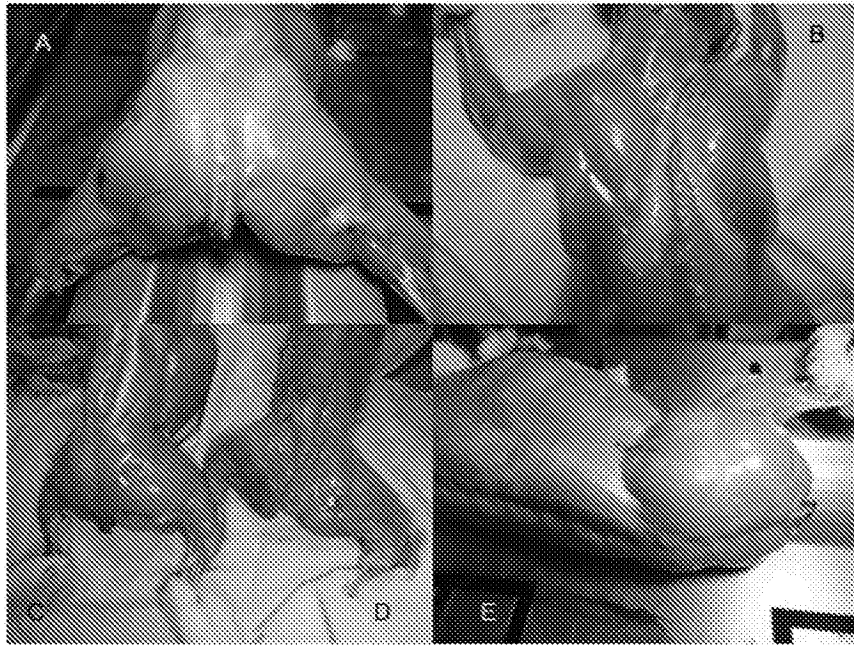


图11

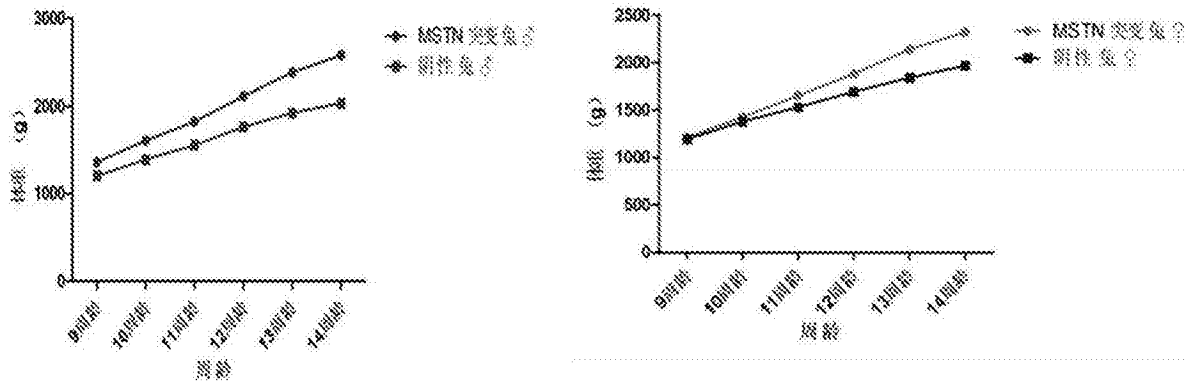


图12

编号	sgRNA2	PAM	突变结果
WT	AAAGAACAAATAATATATGGGAAAATTCCAGCCATGGTAGTAGACCGCTGT	GGG TGCTCATGAGA	WT
M1	AAAGAACAAATAATATATGGGAAAATTCCAGCCATGGTAGT-----	GGG TGCTCATGAGA	-10 bp,fs -2 bp,fs
M2	AAAGAACA-----TGAGA	GGG TGCTCATGAGA	-52 bp,fs -1 bp,fs
M3	AAAGAACAAATAATATATGGGAAAATTCCAGCCATG-----AGA	GGG TGCTCATGAGA	+26 bp,fs +7 bp,fs
M4	-----A	GGG TGCTCATGAGA	-159 bp,fs -169 bp,fs
M5	AAAGAACAAATAATATATGGGAAAATTCCAGCCATGGaAGTAGACC _a -TGT	GGG TGCTCATGAGA	-1 bp,fs +31 bp,fs
M6	AAAGAACAAATAATATATGGGAAAATTCCAGCCATGGTAGT-----	GGG TGCTCATGAGA	-10 bp,fs -9 bp
M7	AAAGAACAAATAATATATGGGAAAATTCCAGCCATG-----AGA		-26 bp,fs, biallelic

图13

编号	PAM	sgRNA1	突变结果
WT	GTACACCAAGCAAACCCAGAGGTTCCAGCAGGT	CCT TGCTGTACTCCCACAAAGATGTCTCCA	WT
M8	GTACACCAAGCAAACCCAGAGGTTCCAGCAGGT	CCT TGCT _e GTACTCCCACAAAGATGTCTCCA	+2 bp,fs -2 bp,fs
M9	GTACACCAAGCAAACCCAGAGGTTCCAGCAGGT	CC -----CACAAAGATGTCTCCA	-12 bp +1 bp,fs
M10	-----AG _i Act	C TTG _t aGTACTCCCACAAAGATGTCTCCA	-136 bp, biallelic
M11	GTACACCAAGCAAACCCAGAGGTTCCAGCAGGT	CCT TG-----TACTCCCACAAAGATGTCTCCA	-3 bp,fs +1 bp,fs

图14