



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108690844 B

(45) 授权公告日 2021.10.15

(21) 申请号 201810513348.9

C12N 15/85 (2006.01)

(22) 申请日 2018.05.25

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 107988256 A, 2018.05.04

申请公布号 CN 108690844 A

CN 106011171 A, 2016.10.12

(43) 申请公布日 2018.10.23

Su Yang等.CRISPR / Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease.《The Journal of Clinical Investigation》.2017, 第127卷(第7期),

(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 王彬彬

杨春丽 吴惠 杨丹

审查员 冯晓亮

(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 韩雪

(51) Int.Cl.

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

权利要求书1页 说明书14页

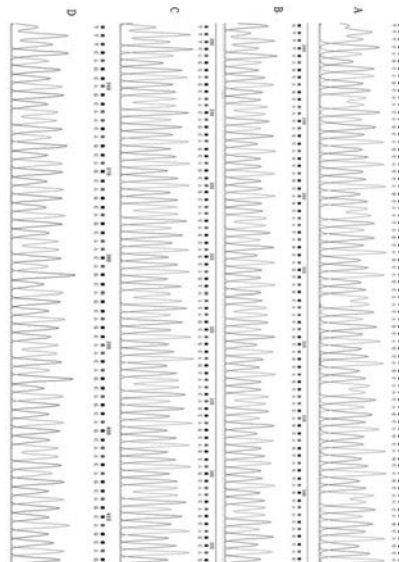
序列表2页 附图7页

(54) 发明名称

HTT的CRISPR/Cas9-gRNA打靶序列对、质粒及HD细胞模型

(57) 摘要

本发明公开了HTT的CRISPR/Cas9-gRNA打靶序列对、质粒及HD细胞模型,涉及生物技术领域。本发明的打靶序列对包括L序列和R序列,L序列的碱基序列如SEQ ID NO.1所示,R序列的碱基序列对如SEQ ID NO.2所示。本发明的打靶质粒包括第一载体质粒和上述的打靶序列对,打靶序列对构建至第一载体质粒中。本发明的HD细胞模型由PolyQ Donor质粒以及上述打靶质粒共转染细胞而得。本发明以分化的神经元细胞为载体构建HD细胞模型,为探索mHtt蛋白在影响或改变分化的神经细胞内环境方面的研究、分化的神经元细胞内由mHtt蛋白引起的各种信号通路、代谢通路及胞内稳态的变化提供了研究平台。



1. 一种 HTT 的 CRISPR/Cas9-gRNA 打靶序列对,其特征在於,其包括 L 序列和 R 序列,所述 L 序列的碱基序列如 SEQIDNO.1 所示,所述 R 序列的碱基序列对如 SEQIDNO.2 所示。

2. 一种 HTT 的 CRISPR/Cas9-gRNA 打靶质粒,其特征在於,其包括第一载体质粒和权利要求 1 所述的 HTT 的 CRISPR/Cas9-gRNA 打靶序列对,所述 HTT 的 CRISPR/Cas9-gRNA 打靶序列对构建至所述第一载体质粒中。

3. 根据权利要求 2 所述的 HTT 的 CRISPR/Cas9-gRNA 打靶质粒,其特征在於,所述载体质粒为 VK001-05。

4. 一种 HD 细胞模型,其特征在於,其由 PolyQDonor 质粒以及权利要求 2 或 3 所述的打靶质粒共转染细胞而得,所述细胞为 CATH-a 细胞,所述 PolyQDonor 质粒由 PolyQ 基因片段构建到 Donor 骨架质粒而成,所述 PolyQ 基因片段选自 Htt150Q、Htt90Q、Htt50Q 或 Htt20Q 中的一种,其中 Htt150Q 的碱基序列如 SEQIDNO.3 所示, Htt90Q 的碱基序列如 SEQIDNO.4 所示, Htt50Q 的碱基序列如 SEQIDNO.5 所示, Htt20Q 的碱基序列如 SEQ ID NO.6 所示。

5. 根据权利要求 4 所述的 HD 细胞模型,其特征在於,所述 PolyQ 基因片段前端和后端分别带有 EcoRI 和-XmaI 酶切位点。

6. 根据权利要求 5 所述的 HD 细胞模型,其特征在於,所述 PolyQDonor 质粒使用 NotI 限制性内切酶酶切成线性质粒,线性质粒与权利要求 2 或 3 所述的打靶质粒共转染细胞。

7. 根据权利要求 6 所述的 HD 细胞模型,其特征在於,转染时, PolyQDonor 质粒以及打靶质粒用转染试剂进行包裹, PolyQDonor 质粒与打靶质粒的总质量与转染试剂之间按照质量体积比为  $\mu\text{g}:\mu\text{L}$  计为 1:2-5, PolyQDonor 质粒与打靶质粒之间的质量比 0.5-2:1。

## HTT的CRISPR/Cas9-gRNA打靶序列对、质粒及HD细胞模型

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其是HTT的CRISPR/Cas9-gRNA打靶序列对、质粒及HD细胞模型。

### 背景技术

[0002] 亨廷顿舞蹈病(Huntington's disease,HD)是一种常染色体显性遗传病,其主要病灶在脑部,尚不清楚其确切的发病机制。HD在临床上主要表现为进行性的运动、认知及精神障碍,但最终导致患者死亡的原因大多都是并发症引起的。目前还没有有效的针对HD的治疗药物和方法,针对HD的治疗主要以缓解病症为主。在疾病的早期、病症不足以影响患者的日常生活时,通常是不需要药物的干预。当患者出现跌倒时,就要考虑药物干预治疗了,首选是多巴胺的消耗药物:四苯喹啉,虽然其可能完全抑制过度运动,并可以有效地抑制HD的舞蹈样运动,但四苯喹啉有加重HD患者抑郁的副作用。另外一方面,当患者出现严重的抑郁时,通常会首选抗抑郁的选择性5-羟色胺再摄取抑制剂西酞普兰。针对HD患者的药物选择要根据患者当前的症状做出不断的调整。根据现在对HD的研究进展,研究者们正在尝试着不同治疗方式的探索。从最新的分子生物学技术领域大致可分为两个方向的探索:第一,试图利用最新基因编辑工具实现对病灶部位组织进行原位病态基因组DNA的纠正;第二、试图将源于病灶的组织细胞在体外进行基因纠正之后再重新输入到患者的病灶部位以期望再次输入的正常细胞能够改善或治愈病灶。

[0003] CRISPR-Cas9(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats CRISPR-associated Cas9)系统是第三代人工核酸内切酶,与锌指核酸内切酶(Zinc finger endonuclease,ZFN)和类转录激活因子效应物核酸酶(Transcription activator-like effector nuclease,TALEN)都可用于各种复杂基因组的定点编辑。改造后的CRISPR/Cas9载体是由gRNA作为引导序列与所编辑DNA以碱基互补配对的方式相结合,这样的方式极大的降低了脱靶的概率,然后gRNA的发卡结构所携带的Cas9蛋白在PAM的作用下识别相应碱基序列,切断DNA双链或单链。基于此种原理,CRISPR/Cas9基因编辑系统相对于稍早的RNAi、Cre/LoxP、ZFN和TALEN系统,具有操作简单方便、效率高、成本低、同时沉默/敲出/突变任意数量的基因等优点。

[0004] 基于CRISPR/Cas9技术的发展,有研究者利用CRISPR/Cas9技术已经完成了载体细胞HEK293和293F HD模型的构建。也有研究者利用CRISPR/Cas9成功的在YAC128转基因HD小鼠模型中实现了对mHTT基因表达的沉默以及基于HD 140Q-KI小鼠模型应用CRISPR/Cas9技术成功下调了mHtt在小鼠纹状体细胞中的表达量。说明CRISPR/Cas9在针对HD的模型构建和疾病发展的干预都有比较好的前景。目前,基于iPSCs和ESCs的HD细胞模型研究较多,但还没有基于分化神经细胞构建HD细胞模型的实验报道。基于iPSCs和ESCs的HD细胞模型研究的主要目的是试图将源于病灶的组织细胞在体外进行基因纠正之后再重新输入到患者的病灶部位以期望再次输入的正常细胞能够改善或治愈病灶(目前还没有试验成功的相关报道)。iPSCs和ESCs的HD细胞模型并不能完整反映HD的发病过程、及其发病过程中分化(功

能) 神经元细胞的内环境变化情况。又因HD是慢性的突变蛋白大量累积后才出现的严重神经疾病症状,其发病需要很长时间突变蛋白的积累且发病后患者一般会有15-20年的生存期,所以iPSCs和ESCs的HD细胞模型的实际应用受到了限制。

## 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HTT的CRISPR/Cas9-gRNA打靶序列对,该序列对在体外以及细胞内对HTT具有剪切活性,为HTT的编辑以及HD的基因治疗的研究提供进一步地依据。

[0006] 本发明的第二发明目的在于,提供一种含有上述打靶序列对的打靶质粒,该打靶质粒将上述打靶序列对转染进细胞发挥基因编辑活性。

[0007] 本发明的第三发明目的在于,提供一种HD细胞模型,该细胞模型基于分化的神经元细胞,可以清晰地跟踪离体细胞HD发展的过程及其胞内环境的变化,提供了一种优良的用于改善和治疗HD疾病的药物或治疗方式的筛选平台。

[0008] 本发明采用的技术方案如下:

[0009] 一种HTT的CRISPR/Cas9-gRNA打靶序列对,其包括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序列的碱基序列对如SEQ IDNO.2所示。

[0010] 本发明的一种HTT的CRISPR/Cas9-gRNA打靶质粒,其包括第一载体质粒和上述的HTT的CRISPR/Cas9-gRNA打靶序列对,所述HTT的CRISPR/Cas9-gRNA打靶序列对构建至所述第一载体质粒中。

[0011] 本发明的一种HTT的CRISPR/Cas9-gRNA打靶质粒,其特征在于,所述载体质粒为VK001-05。

[0012] 一种HD细胞模型,其由PolyQ Donor质粒以及上述的打靶质粒共转染细胞而得。

[0013] 本发明的一种HD细胞模型,所述PolyQ Donor质粒由PolyQ基因片段构建到Donor骨架质粒而成。

[0014] 本发明的一种HD细胞模型,所述PolyQ基因片段选自Htt150Q、Htt90Q、Htt50Q或Htt20Q中的一种,其中Htt150Q的碱基序列如SEQ ID NO.3所示,Htt90Q的碱基序列如SEQ ID NO.4所示,Htt50Q的碱基序列如SEQ ID NO.5所示,Htt20Q的碱基序列如SEQ ID NO.6所示。

[0015] 本发明的一种HD细胞模型,所述PolyQ基因片段前端和后端分别带有EcoRI和-XmaI酶切位点。

[0016] 本发明的一种HD细胞模型,所述PolyQ Donor质粒使用NotI限制性内切酶酶切成线性质粒,线性质粒与上述的打靶质粒共转染细胞。

[0017] 本发明的一种HD细胞模型,转染时,PolyQ Donor质粒以及打靶质粒用转染试剂进行包裹,PolyQ Donor质粒与打靶质粒的总质量与转染试剂之间的比例为1:2-5( $\mu\text{g}:\mu\text{L}$ ),PolyQ Donor质粒与打靶质粒之间的质量比0.5-2:1。

[0018] 本发明的一种HD细胞模型,其特征在于所述细胞为CATH-a细胞。

[0019] 综上所述,由于采用了上述技术方案,本发明的有益效果是:

[0020] 本发明根据HTT基因设计出一系列CRISPR/Cas9-gRNA打靶序列,经过体外活性检测后,筛选出体外酶切活性均大于95%的Htt-L9和Htt-R9序列,将其配对后构建到VK001-

05为载体得到Htt9号打靶质粒,该打靶质粒在细胞内具有良好的基因编辑活性。

[0021] 本发明还根据Htt-L9和Htt-R9基因组上的相对位置及其周围的碱基特性,设计并合成构建了四种长度的Poly Q基因片段,Poly Q基因片段具有EcoR1和Xma1双酶切位点,以便于将其段构建到Donor骨架质粒,得到NQ Donor质粒。同时,Poly Q基因片段含有双Not1酶切位点,以使NQ Donor质粒线性化。

[0022] 用Htt9号打靶质粒和线性NQ Donor质粒共转染细胞,成功将NQ敲入细胞基因组,随后进行单克隆细胞筛选实验,最终获得了不同长度NQ敲入的单克隆细胞,成功构建了HD细胞模型。

[0023] 本发明以分化的神经元细胞为细胞载体构建HD细胞模型,弥补了现有技术中HD细胞模型的不足。四种不同长度Poly Q的原位敲入,为探索Poly Q长度与HD发病关系(发病时间和发病严重程度)提供了模型基础。本发明采用的细胞为高度分化的神经元细胞,为探索mHtt蛋白在影响或改变分化的神经细胞内环境方面的研究提供了平台。同时,此种细胞模型能够较为近似的模拟分化的神经元细胞内mHtt蛋白慢慢积累并最终导致细胞死亡的过程,为探索更多的关于分化的神经元细胞内由mHtt蛋白引起的各种信号通路、代谢通路以及胞内稳态的变化提供了研究平台。

## 附图说明

[0024] 本发明将通过例子并参照附图的方式说明,其中:

[0025] 图1是本发明实施例1中搭桥PCR的过程示意图;

[0026] 图2是CRISPR/Cas9-gRNA打靶序列体外酶切效率琼脂糖凝胶电泳分析图;

[0027] 图3是Donor质粒设计构建示意图;

[0028] 图4是Donor骨架质粒图谱;

[0029] 图5-图6是NQ Donor质粒的质粒图谱;

[0030] 图7是NQ Donor质粒Not1酶切产物琼脂糖凝胶电泳分析图;

[0031] 图8是细胞转染后,混合细胞的基因组琼脂糖凝胶电泳分析图;

[0032] 图9是正确敲入NQ的单克隆细胞基因组PCR产物TA克隆-菌落PCR产物的琼脂糖凝胶电泳分析图;

[0033] 图10是正确敲入NQ的单克隆细胞基因组中Poly Q敲入区域部分测序峰图。

## 具体实施方式

[0034] 本说明书中公开的所有特征,或公开的所有方法或过程中的步骤,除了互相排斥的特征和/或步骤以外,均可以以任何方式组合。

[0035] 本说明书(包括任何附加权利要求、摘要)中公开的任一特征,除非特别叙述,均可被其他等效或具有类似目的的替代特征加以替换。即,除非特别叙述,每个特征只是一系列等效或类似特征中的一个例子而已。

[0036] 实施例1

[0037] 根据GenBank收录小鼠(C57BL/6J)HTT基因信息:

[0038] Description:huntingtin[Source:MGI Symbol;Acc:MGI:96067]

[0039] Synonyms:IT15,C430023I11Rik,Hdh,HD,htt,huntingtin

[0040] Location:Chromosome 5:34,761,740-34,912,534forward strand.

[0041] Gene ID:15194

[0042] 并综合分析HTT基因组结构和蛋白功能保守区,设计CRISPR靶点(gRNA),靶点序列如下所示:

[0043] HTT-L7:tccgccggcatgacgtcacggg;

[0044] HTT-L8:ccgcgagggttgccgggacgg;

[0045] HTT-L9:caagatggctgagcgccttgg;

[0046] HTT-L10:cattgccttgctgctaagtgg;

[0047] HTT-R7:ttggccatgccagcacgcagg;

[0048] 反向互补:cctgcgtgctgggcatggccaa;

[0049] HTT-R8:taccgcgaccctctggacagg;

[0050] 反向互补:ccctgtccagagggtcgcggtta;

[0051] HTT-R9:cgggaaagcctggcctcagg;

[0052] 反向互补:ccctgaggccaggctttccc;

[0053] HTT-R10:cggctctgtctcctctgagg;

[0054] 反向互补:ccctcagaggagacagagccg。

[0055] 上述序列中,HTT-L7-10以及HTT-R8-10中,序列的最后三位“ngg(n为a/t/c/g中的任意碱基)”为PAM序列。

[0056] 1.gRNA的体外转录

[0057] 首先根据gRNA靶点序列和gRNA模板质粒(G1,由北京唯尚立德生物技术有限公司提供),设计合成F端引物gRNA-F L/Rn以及R端引物gRNA-RP,引物序列如表1所示。然后参照表2所示的反应体系和反应条件以G1为模板做PCR,PCR产物120bp左右,采用EP101-01纯化柱(北京全式金生物技术(TransGen Biotech)有限公司),根据其说明书提供的方法纯化产物(注意使用DEPC H<sub>2</sub>O洗脱DNA)后测定浓度,分别命名为:gRNA-R7、gRNA-R8、gRNA-R9、gRNA-R10。保存纯化产物作为后续体外转录的DNA模板。

[0058] 同时,准备标准品的PCR产物。标准品为VK007-10-VK007-22试剂盒(北京唯尚立德生物科技有限公司)中的gRNA1(g1)和标准gRNA2(g2),其中,gRNA1(g1)引物对分别为试剂盒中提供的g1-FP和本发明提供的gRNA-RP,标准gRNA2(g2)引物对分别为试剂盒提供的g2-FP和本发明提供的gRNA-RP,以标准gRNA片段为模板做PCR,PCR反应体系参考表2所示的PCR反应体系。反应完成后,采用EP101-01纯化柱(北京全式金生物技术(TransGen Biotech)有限公司),根据其说明书提供的方法纯化PCR产物(注意使用DEPC H<sub>2</sub>O洗脱DNA)后测定浓度,命名为标准gRNA1和标准gRNA2,保存备用。

[0059] 表1体外转录gRNA模板所需引物

名称	引物序列	名称	引物序列
gRNA-FL7	sssstccgcccgcacgtcacgggg ggg	gRNA-FR7	ssssttgccatgccagcacgcaggg ggg
gRNA-FL8	ssssccgcgagggtgccgggacggg ggg	gRNA-FR8	sssstaccgcgaccctctggacagggg ggg
[0060] gRNA-FL9	sssscaagatggctgagcgccttgggg gg	gRNA-FR9	sssscgggaaagcctggcctcagggg ggg
gRNA-FL1 0	sssscattgccttgctgctaagtggggg g	gRNA-FR1 0	sssscggctctgtctctctgagggggg g
gRNA-NC 1	ssssvvvvvvvvvvvvvvvvgggg	gRNA-NC 2	sssskkkkkkkkkkkkkkkkgggg

[0061] 注:SSSS代表:TAATACGACTCACTATAG;GGG代表:GTTT TAGAGCTAGAAATAGC,红色字体:VVVVVVVVV和KKKKKKKK代表不含gRNA靶点序列和PAM的碱基序列、作阴性空白对照。

[0062] 表2PCR反应体系及条件(50μL体系)

PCR 反应体系		PCR 反应条件
组分	用量	95°C, 3min
gRNA (G1) 质粒	10ng	94°C, 30sec
[0063] gRNA-F L/Rn (10μM)	1.5μL	58°C, 30sec
gRNA-RP (10μM)	1.5μL	72°C, 40sec
2×Pfu Mix	25μL	72°C, 7min
DEPC H <sub>2</sub> O	up to 50μL	16°C, 10min

[0064] 2. CRISPR/Cas9-gRNA体外酶切反应

[0065] 首先,将gRNA打靶序列(包括PAM序列)通过搭桥PCR的方式构建到PCR产物中。如图1所示。图1中,F1和R4为引物对,g2和g3分别为配对的gRNA打靶序列及其反义链,F1、R4、g2、g3均有北京唯尚立德生物科技有限公司提供。gRNA靶点序列分别合成搭桥PCR所需引物如3表所示。

[0066] 以上述DNA S为模板,以(F1和g2-L7);(g3-L7和R4)两个引物对分别做分段PCR、反应体系及PCR条件参考表4,其PCR产物分别命名为:g2-L7C、g3-L7C。然后取等量(25μL)的上述PCR产物、混合均匀,按93°C、3min预变性;93°C、20sec,58-47°C(按不同靶点的T<sub>m</sub>值)、30sec,20-15个循环。完成搭桥PCR、命名为:g2-g3-L7。以g2-g3-L7为模板,最后用F1和R4引物对参照表5反应条件和反应体系,将有效的搭桥PCR产物扩增,采用EP101-01纯化柱(北京全式金生物技术(TransGen Biotech)有限公司),根据其说明书提供的方法纯化PCR产物(注意使用DEPC H<sub>2</sub>O洗脱DNA)后测定浓度,命名为L7,至此L1靶点酶切dsDNA准备完成。按照上述方法依次将L8-10和R7-10靶点酶切dsDNA准备完成,分别命名为:L8、L9、L10、R7、R8、R9、R10。

[0067] 将上述制备的各靶点体外转录gRNA模板和相应的酶切dsDNA按表6体系次序加样,

准备酶切反应。同时,做标准样品标准gRNA1、标准gRNA2的gRNA酶切反应,做阳性对照NC-1、NC-2的酶切反应,做阴性对照的酶切反应。酶切反应的条件为:各反应物充分混合后,37°C反应0.5h,65°C煮5min,琼脂糖凝胶电泳检测分析酶切结果。

[0068] 表3搭桥PCR所需引物对

名称	碱基序列	名称	碱基序列
g2-L7	nnntccgccgcatgacgtcacggg	g2-R7	nnnttgccatgccagcacgcagg
g3-L7	aggcgccgtactgcagtcccmmmm	g3-R7	aaccgtacgggtcgtgctccmmmm
g2-L8	nnnccgcgaggggtgccgggacgg	g2-R8	nnntaccgcgaccctctggacaggg
[0069] g3-L8	ggcgctcccaacggccctgccmmmm	g3-R8	atggcgtgggagacctgtccmmmm
g2-L9	nnncaagatggctgagcgccttgg	g2-R9	nnnccgggaaagcctggcctcaggg
g3-L9	gttctaccgactcgcggaaccmmmm	g3-R9	gcccttcggaccggagtccmmmm
g2L10/	nnnncattgccttctgctaagtgg	g2-R10	Nnnccggctctgtctctctgaggg
g3-L10	gtaacggaacgacgattcaccmmmm	g3-R10	gccgagacagaggagactccmmmm

[0070] 注:引物使用时、F1与g2配对、R4与g3配对,其中:nnnn代表g2引物,mmmm代表g3引物,其尾端都镶嵌合成有相应的靶点序列和互补序列。

[0071] 表4分段PCR反应体系及条件

反应体系		PCR 反应条件
组分	用量	95°C, 3min
模板 DNA S	10ng	94°C, 30sec
F1/R4 (10μM)	1.2μl	58°C, 30sec
g2-L1/g3-L1 (10μM)	1.2μl	72°C, 30sec
2×Pfu Mix	25μL	72°C, 7min
ddH2O	up to 50μL	16°C, 10min

} 35 Cycles

[0073] 表5搭桥PCR产物扩增的PCR反应体系

PCR 反应体系		PCR 反应条件
组分	用量	95°C, 3min
搭桥 PCR 产物	2μL	94°C, 30sec
F1 (10μM)	1.5μL	58°C, 30sec
R4 (10μM)	1.5μL	72°C, 40sec
2×Pfu Mix	25μL	72°C, 7min
DEPC H <sub>2</sub> O	up to 50μL	16°C, 10min

} 35 Cycles

[0075] 表6 Cas9/gRNA体外酶切活性反应体系



组分	1	2	3
Cas9 酶	1U	1U	1U
10X Cas9 buffer	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L
[0076] gRNA (体外转录)	50 ng (样品 gRNA)	50 ng(标准 gRNA1 (g1))	50 ng (标准 gRNA2 (g2))
ddH <sub>2</sub> O	X $\mu$ L	X $\mu$ L	X $\mu$ L
酶切的 dsDNA	50 ng	50 ng (标准 DNA)	50 ng (标准 DNA)
Total	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L

[0077] 根据酶切dsDNA设计长度, gRNA靶点有活性时、dsDNA (740bp) 将被Cas9酶切成280bp和460bp两个条带, gRNA靶点活性越高、dsDNA被切成两段的比例就越高, 反之、这说明gRNA靶点较低。酶切电泳详见图2。

[0078] 标准gRNA1 (g1) 和标准gRNA2 (g2) 经由SSA luciferase进行活性检测, 二者的SSA活性分别为:

[0079] 标准gRNA1 (g1) = 3, 标准gRNA2 (g2) = 10。

[0080] 据此, 本发明对样品gRNA的酶切活性采用如下标准:

[0081] 若样品gRNA的酶切效率 < 标准gRNA1 (g1), 表明样品gRNA靶点活性比较差, 标记为活性不合格;

[0082] 若标准gRNA1 (g1)  $\leq$  样品gRNA的酶切效率  $\leq$  40% - 50%, 标记为活性合格;

[0083] 若标准40% - 50%  $\leq$  样品gRNA的酶切效率  $\leq$  gRNA2 (g2), 标记为活性良好;

[0084] 若样品gRNA的酶切效率  $\geq$  标准gRNA2 (g2), 标记为活性高。

[0085] 样品gRNA的酶切效率由酶切条带的灰度换算而来。具体地, 若NC-1和NC-2均只在750kb左右出现条带, 则表明实验可信, 然后以其为阴性对照的酶切效率为零, 以标准gRNA1在750kb条带的灰度值所代表的酶切效率为30%, gRNA2在750kb条带的灰度值所代表的酶切效率为100%, 换算L7-10和R7-10的酶切效率, 换算结果如表7所示。

[0086] 表7 gRNA体外酶切效率

样品名字	靶序列	体外酶切活性	与标准品对照结果
Htt-L7	tccgccgcatgacgtcacggg	50%	大于 g1 小于 g2
Htt-L8	ccgcgagggtgccgggacgg	80%	大于 g1 小于 g2
Htt-L9	caagatggctgagcgccttg	95%	大于 g1 小于 g2
[0087] Htt-L10	cattgccttgctgtaagtgg	90%	大于 g1 小于 g2
Htt-R7	ttggccatgccagcagcagg	80%	大于 g1 小于 g2
Htt-R8	taccgcgacctctggacaggg	80%	大于 g1 小于 g2
Htt-R9	cgggaaagcctggcctcaggg	95%	大于 g1 小于 g2
Htt-R10	cggctctgtctctctgaggg	95%	大于 g1 小于 g2

[0088] 由表7可知, Htt-L8、Htt-L9、Htt-L10、Htt-R7、Htt-R8、Htt-R9、Htt-R10与标准品

对照,体外酶切活性合格。

#### [0089] 实施例2

[0090] 本实施例提供HTT的CRISPR/Cas9-gRNA打靶质粒及其构建方法,该打靶质粒由一对打靶序列对构建到载体质粒而得到。该打靶序列对由L序列和R序列构成,才能实现对目的基因的(dsDNA)正义链和反义链同时切断,以实现利用HR将目的基因敲入靶点。根据实施例1中体外活性检测结果,Htt-L9和Htt-R9靶点的活性均在95%左右,说明Htt-L9和Htt-R9靶点配对构成的打靶质粒有较高的体内基因编辑活性,所以本实施例中选择Htt-L9和Htt-R9构成打靶序列对,并将该打靶序列对构建到载体质粒中。载体质粒为适用于哺乳动物和/或哺乳动物细胞的载体质粒,为了便于敲入基因表型的检测,优选地,载体质粒上不带有任意筛选标记。

[0091] 本实施例中采用VK001-05质粒,购自北京唯尚立德生物科技有限公司,并采用该公司相应的CRISPR/Cas9快速构建试剂盒Cat VK001-05构建打靶质粒。本实施例中构建成功打靶质粒,命名为Htt9号。

[0092] Htt9号打靶质粒构建成功后,需要进行转化保存、活化扩增、提取无内毒素Htt9号质粒,转化时所用感受态细胞为DH5 $\alpha$ ,具体操作均为本领域常规技术手段,本文不进行赘述。

#### [0093] 实施例3

[0094] 本实施例中,根据Htt9号质粒的L靶点和R靶点的碱基序列及其相对位置设计并通过Gibson克隆构建NQ(150Q、90Q、50Q、20Q) Donor质粒。Donor质粒设计构建示意图如图3所示。图3中,PCR片段4分别与PCR片段1和3之间的酶切位点为Not1酶切位点(原图中以黄色代表),PCR片段1与PCR片段2之间为EcoR1和Xma1酶切位点(原图中以红色代表),PCR片段2和PCR片段3之间为FRT(定向重组酶识别位点)位点(原图中以蓝色代表)。

#### [0095] 1. 提取CATH-a细胞基因组DNA

[0096] CATH-a(ATCC CRL-11179)购自北京贝纳创联生物技术研究院,有本实验冻存。冻存的细胞复苏,交汇度达到90%时,消化,按照1:3进行传代,传代细胞交汇度达到90%,按照细胞基因组提取试剂盒(DP304,天根生化科技有限公司)分别提取其基因组DNA备用。细胞的复苏以及传代培养为本领域常规技术手段,本文不进行赘述。

#### [0097] 2. Donor质粒分段扩增

[0098] (1) Donor质粒同源臂前段扩增(PCR片段1扩增)

[0099] 模板:CATH-a细胞基因组DNA

[0100] 引物:

[0101] Htt9-FP1:gcggccgcagagctgctttgggtttcggg(系列中含有Not1酶切位点);

[0102] Htt9-RP1:

[0103] gcgcggggccccgggaaggcaatgaattcggggctctgcgcggcaggcagaagcggaaggaaggcgctcagccatc;

[0104] Htt9-RP1反向互补:

[0105] catggctgagcgccttccttcgcttctgcctgcccgcgcagagccccgaattcattgccttcccgggc cccgcgc(序列中含有EcoR1&Xma1位点)。

[0106] PCR片段1扩增的反应体系及条件如表8所示。

## [0107] 表8 PCR片段1扩增反应体系及条件

PCR 反应体系		PCR 反应条件
组分	用量	
		95°C, 3min
		94°C, 30sec
[0108] DNA (CATH-a)	10ng	58°C, 30sec
Htt9-FP1 (10μM)	1.5μL	72°C, 30sec
Htt9-RP1 (10μM)	1.5μL	72°C, 7min
TSE101 Mix	Up to 50μL	16°C, 10min

} 35 Cycles

## [0109] (2) Donor质粒细胞筛选药物抗性 (Puro) 和GFP荧光标记扩增 (PCR片段2扩增)

[0110] Htt9-FP2-1:

[0111] ccgaattcattgccttcccgggccccgcgccctggcctgcgtgctgggcatggccaacactgttccctgtccagagggt (序列中含有EcoR1&amp;Xma1位点);

[0112] Htt9-FP2-2:

[0113] ctgttccctgtccagagggtcgcggtacctggctgagaagttcctattctctagaaagtataggaacttctatacgcgccccagctgg (序列中含有定向重组酶识别位点FRT);

[0114] Htt9-RP2:

[0115] gggcccggccgggaaagcctggccgaagttcctatactttctagagaataggaacttcagttatacgcgccc;

[0116] Htt9-RP2反向互补:

[0117] gggcgcgtataactgaagttcctattctctagaaagtataggaacttcggccaggctttcccggccgggcc (序列中含有FRT)。

[0118] 首先,以质粒FRT-pGK-PURO-T2A-GFP-FRT-flloxP-DTA (购自北京唯尚立德生物科技有限公司) 为模板,Htt9-FP2-2+Htt9-RP2为引物,参照表9所示的反应体系及条件进行PCR,PCR产物命名为PCR片段2-1。

[0119] 然后,以PCR片段2-1为模板,Htt9-FP2-1+Htt9-RP2为引物,参照表9反应体系及条件进行PCR,PCR产物即为PCR片段2 (Donor质粒中的Puro和GFP细胞筛选标记)。

## [0120] 表9 PCR片段2扩增反应体系及条件

PCR 反应体系		PCR 反应条件
组分	用量	
		95°C, 3min
		94°C, 30sec
[0121] 质粒模板	10ng	58°C, 30sec
Htt9-FP2-2/Htt9-FP2-1	1.5μL	72°C, 3min
(10μM)		72°C, 7min
Htt9-RP2 (10μM)	1.5μL	16°C, 10min
TSE101 Mix	Up to 50μL	

} 35 Cycles

## [0122] (3) Donor质粒同源臂后段扩增 (PCR片段3扩增)

[0123] 模板:CATH-a细胞基因组DNA;

[0124] 引物:

- [0125] Htt9-FP3:ggaacttcggccaggctttcccggccgggcccctcgtc (序列中含有FRT) ;  
 [0126] Htt9-RP3:gcgccgctagtaaaattcattccccggtg (序列中含有Not1位点)  
 [0127] PCR片段3扩增的反应体系及条件如表10所示。  
 [0128] 表10同源臂后段PCR片段3扩增反应体系及条件

PCR 反应体系		PCR 反应条件
组分	用量	
		95°C, 3min
	DNA (CATH-a)	10ng
[0129]	Htt9-FP3 (10μM)	1.5μL
	Htt9-RP3 (10μM)	1.5μL
	TSE101 Mix	Up to 50μL
		94°C, 30sec 58°C, 30sec 72°C, 30sec 72°C, 7min 16°C, 10min

- [0130] (4) 载体质粒骨架扩增 (PCR片段4)  
 [0131] 模板: 质粒pMV (无锡青兰生物科技有限公司提供)  
 [0132] 引物:  
 [0133] pMV-FP:gctcagttttcaccggggaatgaattttactagcggccgcagatctacggaccactagtttag (序列中含有Not1位点) ;  
 [0134] pMV-RP:ggagctcggaacccgaaacccaaagcagctctgcgccgcgcccattcgcccagagacgc ;  
 [0135] pMV-RP反向互补:  
 [0136] gcgtctctgggcaattgggcgcgccgcagagctgctttgggtttcgggttccgagctcc (序列中含有Not1位点)。  
 [0137] PCR片段4扩增的反应体系及条件如表11所示。  
 [0138] 表11载体质粒骨架PCR片段4扩增反应体系及条件

PCR 反应体系		PCR 反应条件
组分	用量	
		95°C, 3min
	DNA (CATH-a)	10ng
[0139]	pMV-FP (10μM)	1.5μL
	pMV-RP (10μM)	1.5μL
	TSE101 Mix	Up to 50μL
		94°C, 30sec 58°C, 30sec 72°C, 3-5min 72°C, 7min 16°C, 10min

- [0140] PCR片段1、PCR片段2、PCR片段3、PCR片段4的PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳后,按照试剂盒 (DP209-03,天根生化科技 (北京) 有限公司) 说明书进行回收。  
 [0141] 3. 构建Donor骨架质粒  
 [0142] 取纯化回收后的PCR片段1+PCR片段2+PCR片段3+PCR片段4做Gibson组装。构建出Donor骨架质粒,命名为pMV-HttN-Q-L9R9。通过Gibson克隆构建完成的Donor骨架质粒图谱如图4所示。  
 [0143] 4. pMV-HttN-Q基因片段质粒的设计  
 [0144] (1) 合成NQ并构建pMV-HttNQ质粒

[0145] 合成NQ (Htt150Q、Htt90Q、Htt50Q、Htt20Q), Htt150Q、Htt90Q、Htt50Q、Htt20Q的基因序列分别如SEQ ID NO.3-6所示。NQ前端和后端分别含有EcoRI (GAATTC) -XmaI (CCCGGG) DNA片段,合成的NQ片段构建到pMV质粒上得到pMV-HttNQ质粒以便于保存,该步骤委托无锡青兰生物科技有限公司合成。

[0146] (2) 构建pMV-HttNQ-L9R9Donor质粒

[0147] 将pMV-HttNQ质粒按照本领域常规技术手段进行转化、保存,并提取无内毒素质粒,用EcoRI+XmaI限制性内切酶进行酶切,反应体系和条件如表12所示,酶切后的产物琼脂糖电泳,按照试剂盒 (DP209-03,天根生化科技(北京)有限公司)说明书进行回收。150Q目标产物约为745bp、90Q目标产物约为565bp、50Q目标产物约为445bp、20Q目标产物约为355bp。同时、按照上述条件制备Donor骨架质粒的EcoRI+XmaI酶切产物,并将其纯化回收备用。

[0148] 将pMV-HttNQ酶切目的产物分别克隆到Donor骨架质粒的酶切产物中,反应体系和反应条件如表13所示,由此得到NQ Donor质粒,分别命名为:pMV-Htt150Q-L9R9、pMV-Htt90Q-L9R9、pMV-Htt50Q-L9R9、pMV-Htt20Q-L9R9,其质粒图谱如图5-图6所示。图5中,A、B分别是pMV-Htt150Q-L9R9、pMV-Htt90Q-L9R9的质粒图谱;图6中,C、D分别是pMV-Htt50Q-L9R9、pMV-Htt20Q-L9R9的质粒图谱,红色部分是敲入PolyQ片段,两个NotI位点将Donor质粒酶切成线性DNA片段,Donor线性片段内含有GFP荧光标记和Puro药物抗性标记,以便进行敲入细胞单克隆的筛选。

[0149] 将pMV-HttNQ-L9R9Donor质粒按本领域常规技术手段进行转化、保存,并提取物内毒素质粒,然后用NotI限制性内切酶验证NQ Donor质粒。正确构建的NQ Donor质粒在完全酶切后,琼脂糖电泳会有两条带(4000bp+2000bp左右)。按表14所示的反应体系及条件进行酶切,酶切产物琼脂糖凝胶电泳分析。

[0150] 表12 pMV-HttNQ酶切验证反应体系及反应条件

	反应体系	反应条件
[0151]	组分	用量
	pMV-HttNQ 质粒	1 $\mu$ g
	10 $\times$ QuickCut Buffer	5 $\mu$ L
[0152]	QuickCut EcoRI/XmaI	1 $\mu$ L
	DEPC H <sub>2</sub> O	Up to 50 $\mu$ L
		37 $^{\circ}$ C、2h 酶切
		60 $^{\circ}$ C、15min 灭活酶

[0153] 表13 pMV-HttNQ-L9R9克隆反应体系及反应条件

	反应体系	反应条件
[0154]	组分	用量
	pMV-HttNQ 酶切目的 DNA 片段	2.5 $\mu$ L
	pMV-HttNQ-L9R9 酶切产物	2.5 $\mu$ L
	Solution 1	5 $\mu$ L
		16 $^{\circ}$ C、2h 或过夜连接

[0155] 表14酶切反应体系及条件

反应体系		反应条件
组分	用量	
[0156] HttNQ-L9R9 质粒	1 $\mu$ g	
10 $\times$ QuickCut Buffer	5 $\mu$ L	37 $^{\circ}$ C、2h 酶切
QuickCut NotI	1 $\mu$ L	60 $^{\circ}$ C、15min 灭活酶
DEPC H <sub>2</sub> O	Up to 50 $\mu$ L	

[0157] NQ Donor质粒NotI酶切产物琼脂糖凝胶电泳结果如图7所示。图7中,NQ、150Q、90Q、50Q、0Q分别代表pMV-HttNQ-L9R9、pMV-Htt150Q-L9R9、pMV-Htt90Q-L9R9、pMV-Htt50Q-L9R9、pMV-Htt20Q-L9R9质粒,可见NQ Donor质粒在NotI酶切后被切成两段,从而证明pMV-HttNQ-L9R9、pMV-Htt150Q-L9R9、pMV-Htt90Q-L9R9、pMV-Htt50Q-L9R9、pMV-Htt20Q-L9R9构建成功。

[0158] 实施例4

[0159] 1.Htt9号打靶质粒的扩增与提取

[0160] 按照本领域常规技术手段扩增并提取Htt9号打靶质粒的无内毒素质粒,保存备用。

[0161] 2.细胞转染

[0162] (1)取CATH-a细胞,按照本领域常规技术手段复苏、培养、传代后接种于六孔板中,用完全培养基培养至交汇度为80%左右,换成无血清和无抗生素的DMEM-H(DMEM高糖培养基)。

[0163] (2)取Via-Fect<sup>TM</sup> Transfection Reagent(Via-Fect,Promega公司)、Htt9号质粒以及4种酶切呈线性的pMV-HttNQ-L9R9质粒,将Htt9号质粒分别与4种线性pMV-HttNQ-L9R9质粒按照1:0.5-2的比例混合得到转染质粒,按照转染质粒与转染试剂的比例为1:3(mg: $\mu$ L)混合,保持总体积为300 $\mu$ L。按照表15体系进行Via-Fect与CRISPR/Cas9质粒的包装,均匀混后室温孵育15-20min,加入到六孔板中:

[0164] 表15 Via-Fect转染试剂包裹CRISPR/Cas9和nDonor质粒体系

	Donor/体积	Htt9	Via-Fect/ $\mu$ L	DMEM-H/ $\mu$ L
	pMV-Htt150Q/14 $\mu$ L	5 $\mu$ L	9 $\mu$ L	272 $\mu$ L
[0165]	pMV-Htt90Q/10 $\mu$ L	5 $\mu$ L	9 $\mu$ L	276 $\mu$ L
	pMV-Htt50Q/8 $\mu$ L	5 $\mu$ L	9 $\mu$ L	274 $\mu$ L
	pMV-Htt20Q/8 $\mu$ L	5 $\mu$ L	9 $\mu$ L	274 $\mu$ L

[0166] 注:Via-Fect转染试剂与质粒混合的时应使用无血清、无抗生素的DMEM-H培养基,pMV-HttNQ为酶切呈线性的目的Donor。

[0167] (3)转染48h后向培养基中加入FBS使其浓度达到10%左右。转染达到72h后,更换新的DMEM-H完全培养基,向其中加入Puro使其浓度达到2.5 $\mu$ g/mL,进行药物筛选48-72h,移去培养基,观察转染成功细胞的个数及其状态,更换新的含Puro 2.0 $\mu$ g/mL完全培养基继续药物筛选培养。

[0168] (4)待细胞数量足够提取基因组DNA时,按照细胞基因组提取试剂盒(DP304,天根生化科技有限公司)分别提取其DNA。提取的DNA进行凝胶电泳分析。

[0169] 凝胶电泳结果如图8所示。图8中,A泳道为Htt9@150Q Donor质粒,B泳道为Htt9@90Q Donor,C泳道为Htt9@50Q Donor,D泳道为Htt9@20Q Donor,E泳道为正常细胞DNA。A、B、C、D正确敲入的理论长度分别是1668bp,1488bp,1368bp,1268bp。图8中,A、B、C、D泳道均表现出一个或两个较宽的模带,其中各个泳道均在正确敲入大小的位置有条带,需进行单细胞克隆的筛选。

[0170] 3.NQ单克隆细胞的筛选

[0171] (1)用荧光倒置显微镜观察并选取Htt9和pMV-Htt150Q共转染的细胞单元,命名为F0代,培养10-15天,按照本领域常操作消化,单细胞接种于90mm<sup>2</sup>细胞培养皿中,控制细胞的密度在10-20%左右。

[0172] (2)细胞过夜培养贴壁后加入Puro,浓度维持在2.0μg/mL,此细胞命名为F1A(A:150Q;B、C、D依次为90Q、50Q、20Q)。F1A细胞培养7-15天,每天需要观察细胞的生长状态,更换细胞培养基,当形成20-30个细胞时选取单克隆细胞群落。

[0173] (3)选出3-5个单克隆群落,荧光显微镜下确定单克隆群落中不存在没有荧光的细胞,标记处单克隆细胞群落的大致位置,并在荧光下确认所选择细胞群落的确定位置。按照上述方法将所有细胞的单克隆群落挑选完毕。

[0174] (4)将标记的F1A细胞用PBS洗涤两次,取灭菌后的克隆环(6×8mm),涂抹灭菌后的凡士林,在标记的细胞群落周围涂抹凡士林,然后用克隆环套住标记细胞群落黏在培养皿上,向克隆环内加入约50μL的胰蛋白酶消化液,培养箱内放置3-5min。

[0175] (5)将消化下来的细胞接种到60mm<sup>2</sup>的培养皿内,命名为F2A,将F2A以单细胞状态接种,维持3mL的完全培养基培养,贴壁8h后加入Puro,浓度维持在2.0μg/mL继续药物筛选培养,每天需要观察细胞的生长状态,每隔2-3天更换细胞培养基,产生20-30个细胞群落时选取单克隆细胞群落。

[0176] (6)重复上述步骤(3)-(4)。

[0177] (7)将消化下来的细胞接种到24孔板中培养,命名为F3A,培养5-7天,胰蛋白酶消化接种于6孔板,待细胞数量足够提取基因组DNA时,提取细胞基因组DNA。

[0178] 4.NQ单克隆细胞的基因组DNA的鉴定

[0179] 设计上游和下游引物,引物系列见表16。用上述筛选单克隆细胞的基因组DNA为模板,以表16的引物,按照表17所示的反应体系及反应条件进行PCR反应,PCR产物琼脂糖凝胶电泳后凝胶成像,分析条带大小,选取条带大小接近理论值的单克隆细胞的PCR产物纯化回收、TA克隆、挑选单克隆菌落PCR鉴定并测序。

[0180] 表16 NQ单克隆细胞DNA鉴定引物

	引物	序列
[0181]	yzd-1F	ccacggatcataaagggttcttgg
	yzd-4F	ctgcttgaaaccttctcagccttc
	yzd-2R	tgcategcattgctgagtaggtgc

[0182] 表17 NQ单克隆细胞DNA鉴定反应体系及条件

PCR 反应体系		PCR 反应条件
组分	用量	95°C, 3min
[0183]	转染后细胞 DNA	10ng
	yzd-1F/4F (10μM)	1.5μL
	yzd-2R (10μM)	1.5μL
	TSE101 Mix	Up to 50μL
		35 Cycles

[0184] 以表17所示的PCR反应体系及反应条件,分别使用引物对(yzd-4F@yzd-2R),以筛选获得单克隆细胞的基因组DNA为模板做PCR反应,PCR产物分别进行琼脂糖凝胶电泳。根据凝胶电泳结果以及NQ的理论长度:A(150Q)理论长度1738bp;B(90Q)理论长度1557bp;C(50Q)理论长度1436bp;D(20Q)理论长度1346bp,挑选出正确敲入的单克隆细胞(凝胶电泳图未提供)。

[0185] 在正确敲入NQ的单克隆细胞中,选取A3104D(A代表150Q Donor敲入,D代表是以基因组DNA为模板,3104是筛选细胞的编号),B3622D,C2426D,D3431D四个的基因组DNA为模板,参照表17所示的PCR反应体系及条件,分别使用引物对(yzd-4F@yzd-2R)进行PCR反应,将PCR反应产物经琼脂糖凝胶电泳后切胶纯化回收,TA克隆,蓝白斑筛选,挑选白色单克隆转化子在含有60μg/ml的LB液体培养基中(1.5ml EP管中培养)220rpm,37°C培养4h后,参照表17所示的PCR反应体系及反应条件进行菌落PCR(使用引物:yzd-4F@yzd-2R)。

[0186] 菌落PCR产物琼脂糖凝胶电泳如图9所示。图9中,A图是A3104D细胞基因组DNA PCR产物经TA克隆-单克隆转化子菌落PCR鉴定电泳结果,理论长度1738bp;B图是B3622D细胞基因组DNA PCR产物经TA克隆-单克隆转化子菌落PCR鉴定电泳结果,理论长度1557bp;C图是C2426D细胞基因组DNA PCR产物经TA克隆-单克隆转化子菌落PCR鉴定电泳结果,理论长度1436bp;D图是D3431D细胞基因组DNA PCR产物经TA克隆-单克隆转化子菌落PCR鉴定电泳结果,理论长度1346bp。由图9可知,电泳条带大小完全符合HD NQ正确敲入的理论长度。

[0187] 对正确敲入的NQ进行鉴定,其确定是是否发生突变(包括无义突变、终止突变等),鉴定结果如图10所示。图10为敲入CAG重复区域部分峰型图,A、B、C、D分别是A3104D、B3622D、C2426D、D3431D的测序峰图(主要展示了PolyQ敲入区域部分峰型图),图峰型单一、没有杂峰,所选单克隆细胞PolyQ(CAG,CAA)敲入正确,成功构建HD细胞模型。

[0188] 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> HTT的CRISPR/Cas9-gRNA打靶序列对、质粒及HD细胞模型
- [0004] <160> 6
- [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 gagegccttg 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> 450
- [0020] <212> DNA
- [0021] <213> 人工序列
- [0022] <400> 3
- [0023] cagcagcaac agcagcagca gcaacagcag cagcaacagc agcagcaaca gcagcagcag 60
- [0024] caacagcagc agcaacagca gcagcagcag cagcaacagc agcagcagca acagcagcag 120
- [0025] cagcagcagc aacagcagca gcagcagcaa cagcaacagc agcagcagca gcagcaacag 180
- [0026] cagcagcagc aacagcagca gcaacagcag cagcagcaac agcagcagca acagcagcag 240
- [0027] caacagcagc agcagcagca gcaacagcag cagcagcagc aacagcagca gcagcaacag 300
- [0028] cagcagcagc agcaacagca gcagcagcaa cagcagcagc agcaacagca gcagcaacag 360
- [0029] cagcaacagc agcagcagca gcagcagcaa cagcagcagc agcagcaaca gcagcagcaa 420
- [0030] cagcagcaac agcagcagca acagcagcag 450
- [0031] <210> 4
- [0032] <211> 270
- [0033] <212> DNA
- [0034] <213> 人工序列
- [0035] <400> 4
- [0036] cagcagcaac agcagcagca gcaacagcag cagcaacagc agcagcaaca gcagcagcag 60
- [0037] caacagcagc agcaacagca gcagcagcag cagcaacagc agcagcagca acagcagcag 120
- [0038] cagcagcagc aacagcagca gcagcagcaa cagcaacagc agcagcagca gcagcaacag 180

- [0039] cagcagcagc aacagcagca gcaacagcag cagcagcaac agcagcagca acagcagcag 240
- [0040] caacagcagc agcagcagca gcaacagcag 270
- [0041] <210> 5
- [0042] <211> 150
- [0043] <212> DNA
- [0044] <213> 人工序列
- [0045] <400> 5
- [0046] cagcagcaac agcagcagca gcaacagcag cagcaacagc agcagcaaca gcagcagcag 60
- [0047] caacagcagc agcaacagca gcagcagcag cagcaacagc agcagcagca acagcagcag 120
- [0048] cagcagcagc aacagcagca gcagcagcaa 150
- [0049] <210> 6
- [0050] <211> 60
- [0051] <212> DNA
- [0052] <213> 人工序列
- [0053] <400> 6
- [0054] cagcagcaac agcagcagca gcaacagcag cagcaacagc agcagcaaca gcagcagcag 60

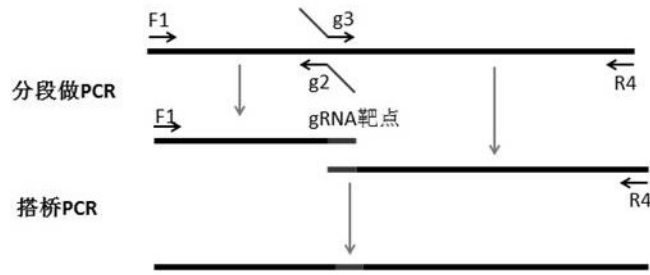


图1

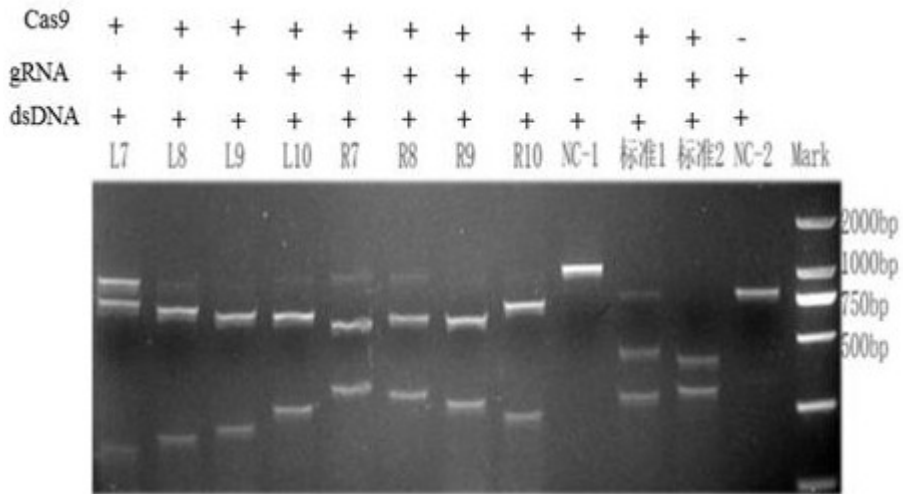


图2

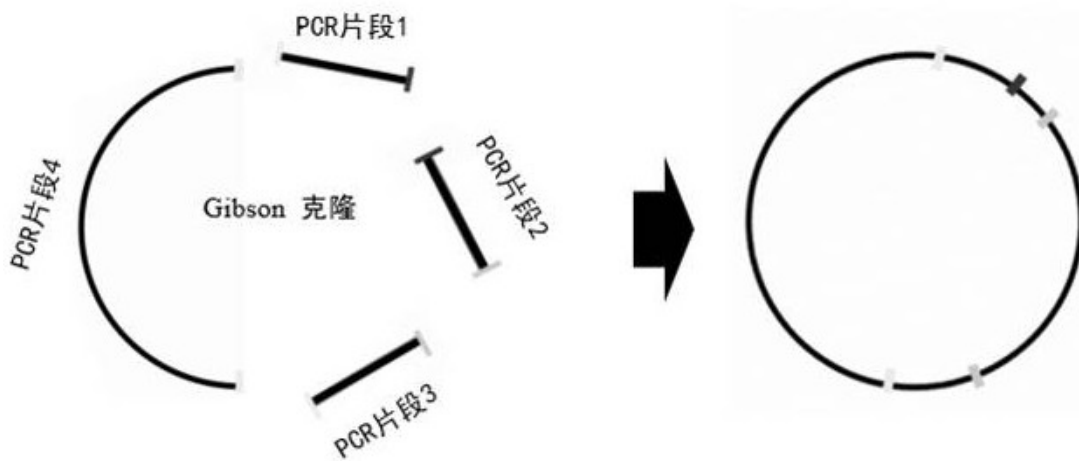


图3

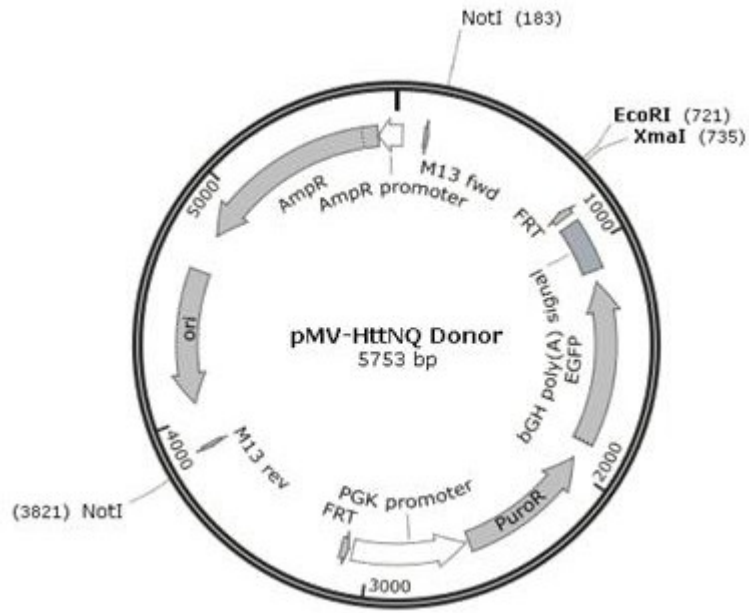


图4

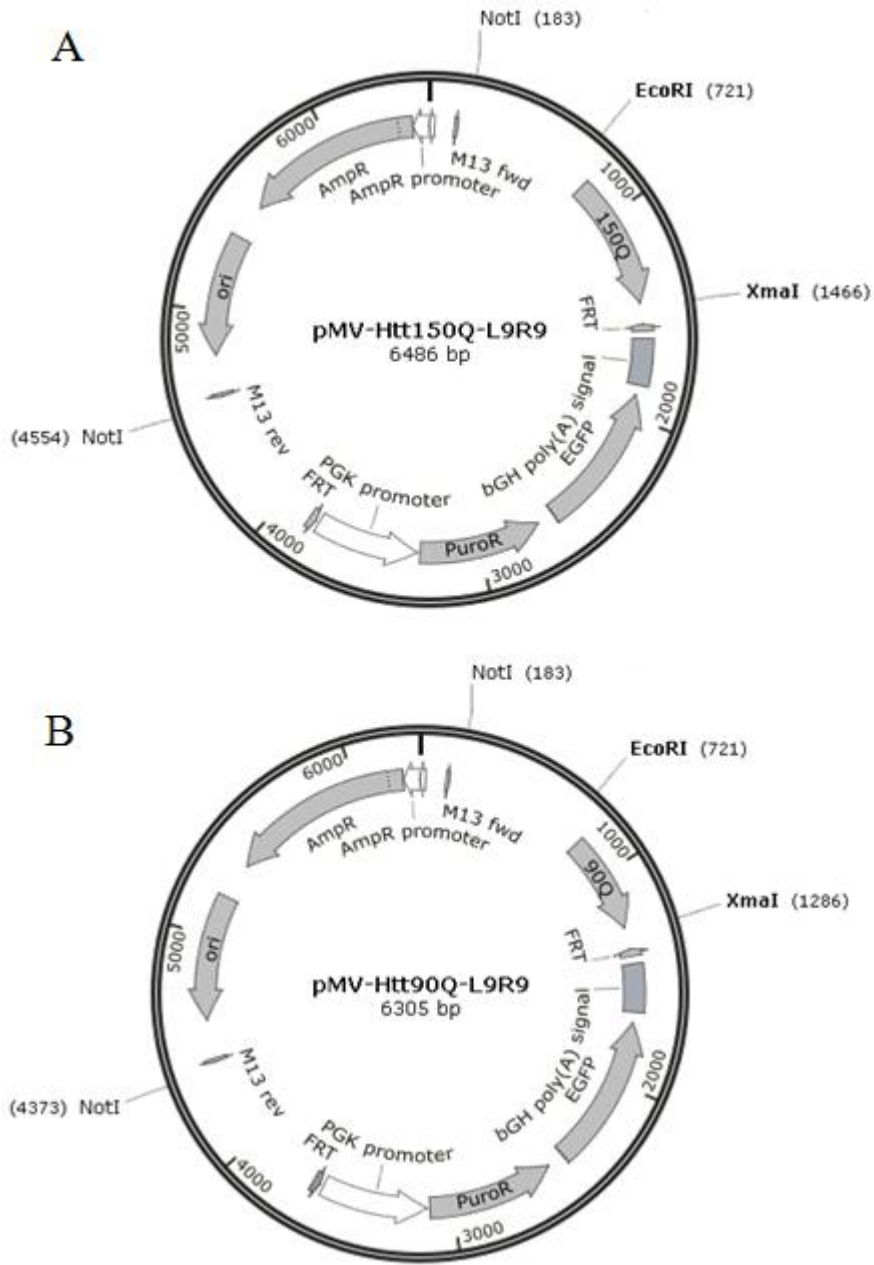


图5

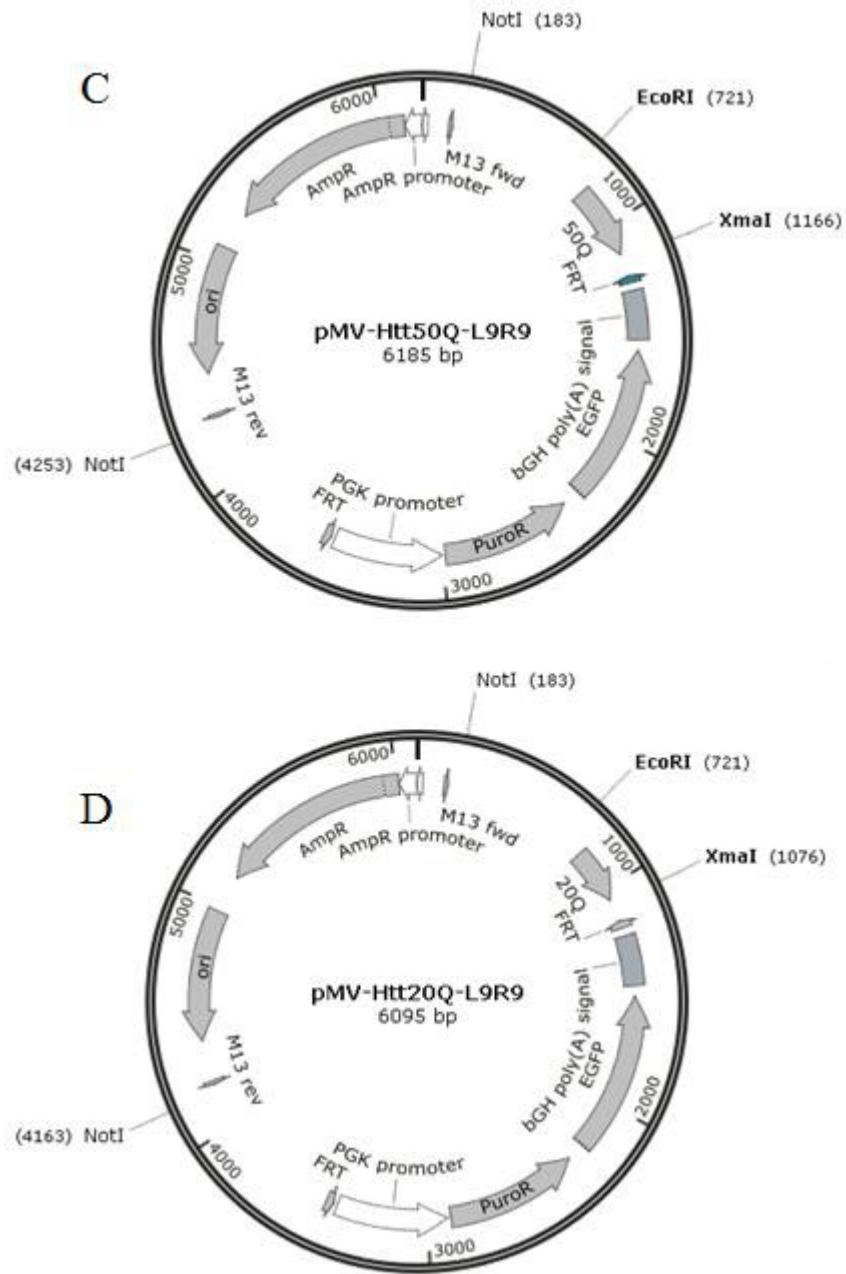


图6

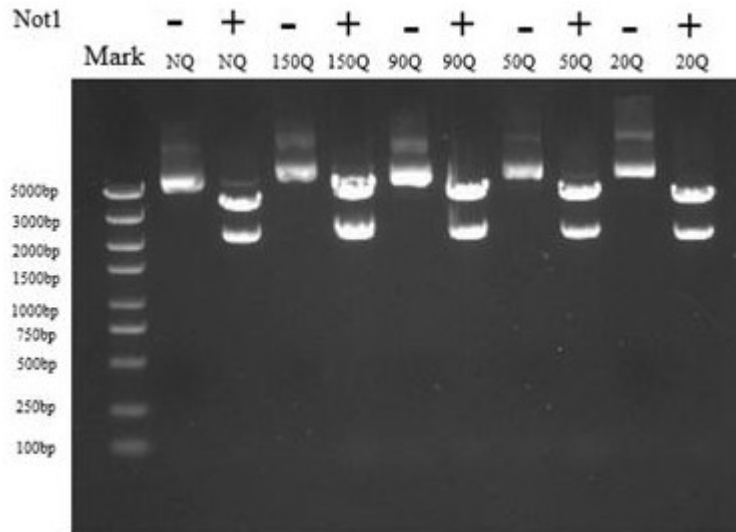


图7

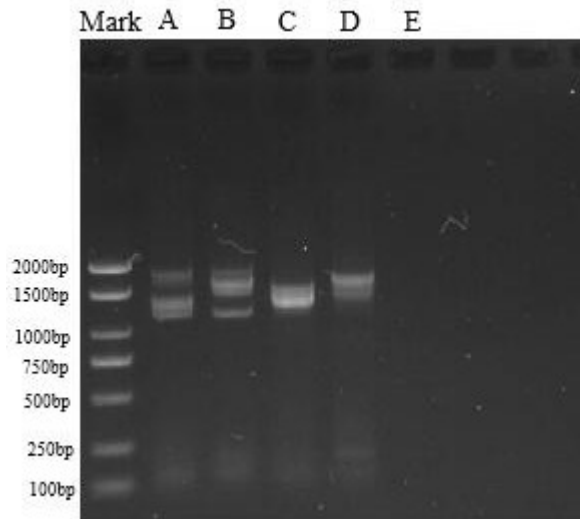


图8

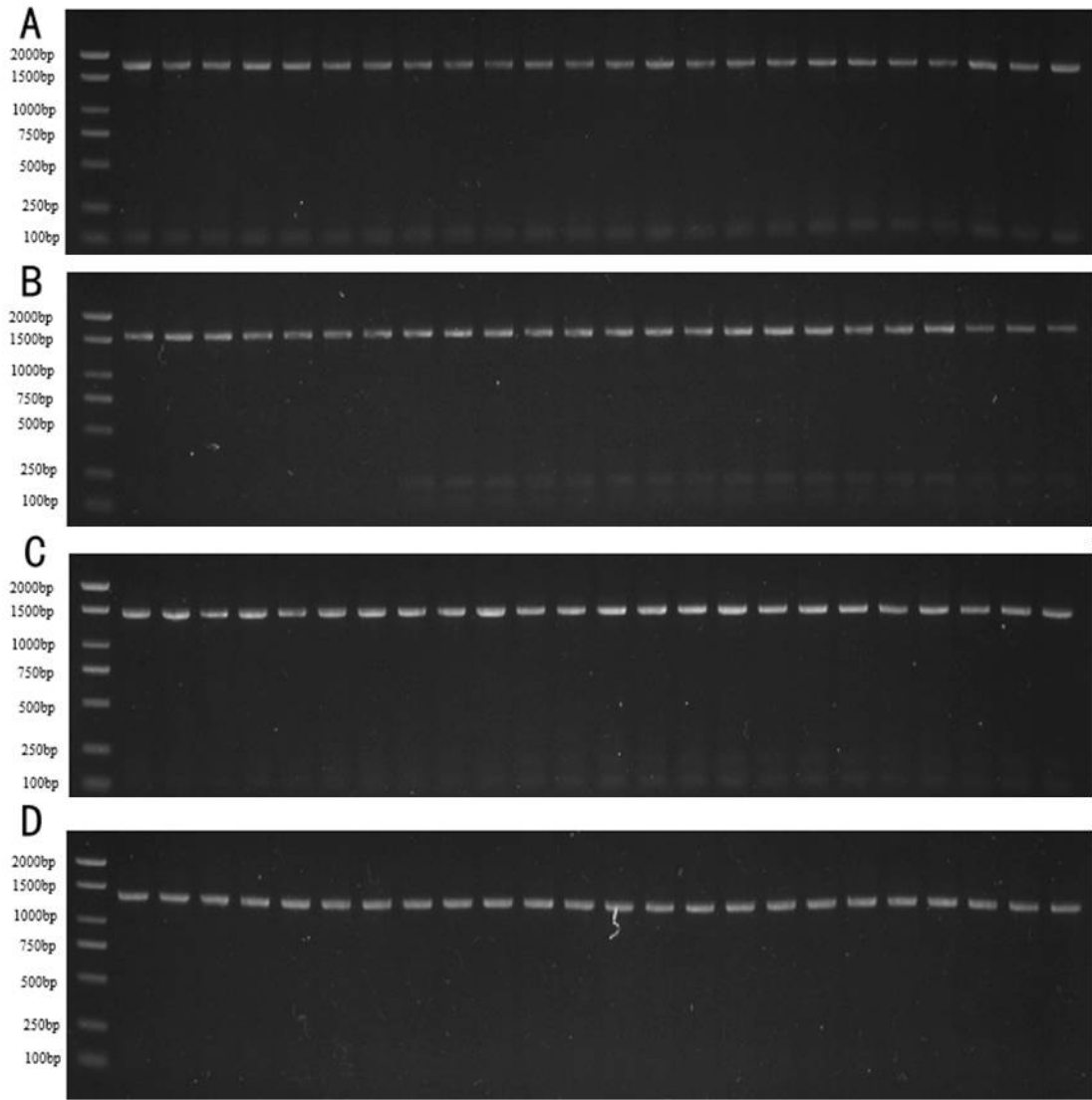


图9



