



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106222203 A

(43)申请公布日 2016.12.14

(21)申请号 201610650202.X

(22)申请日 2016.08.10

(71)申请人 云南纳博生物科技有限公司

地址 650502 云南省昆明市呈贡区七甸工
业园大哨片区

(72)发明人 朱亚楠 相辉 王文 陈垒
陈安利 董扬

(74)专利代理机构 昆明今威专利商标代理有限
公司 53115

代理人 赛晓刚

(51)Int.Cl.

C12N 15/89(2006.01)

C12N 15/113(2010.01)

C07K 14/435(2006.01)

A01K 67/04(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页
序列表4页 附图2页

(54)发明名称

利用CRISPR/Cas技术获得家蚕丝素重链基
因突变体及突变方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种利用CRISPR/Cas技术获
得家蚕丝素重链基因突变体及突变方法和应用。
所述突变方法将cas9mRNA和sgRNA混合后显微注
射到家蚕卵中,PCR鉴定基因型,筛选出杂合子,
杂合子相互交配获得F1代,F1代中出现纯杂合
子,将具有表型的蚕进行基因型检测,将相同基
因型的蚕进行交配,筛选出能稳定遗传到下一
代的纯合子,继而筛选出家蚕丝素重链基因突
变体;sgRNA核心序列针对家蚕丝素重链基因1213
~1236、1274~1297或1349~1372位点设计而
成。本发明快速、高效的获得了有经济价值和科
研价值的实验材料,为家蚕丝胶茧的规模化生产
以及家蚕作为生物反应器表达外源蛋白提供了
新材料。

1. 一种利用CRISPR/Cas技术获得家蚕丝素重链基因突变体的突变方法,其特征在于,将cas9mRNA和sgRNA混合后显微注射到家蚕卵中,PCR扩增后鉴定基因型,筛选出杂合子,将杂合子相互交配获得F1代,F1代中出现纯杂合子,将具有表型的蚕进行基因型检测,将相同基因型的蚕进行交配,筛选出能稳定遗传到下一代的纯合子,继而筛选出家蚕丝素重链基因突变体;

所述sgRNA的核心位点序列针对家蚕丝素重链基因+1213~+1236、+1274~+1297或+1349~+1372碱基位点设计而成。

2. 如权利要求1所述的利用CRISPR/Cas技术获得家蚕丝素重链基因突变体的突变方法,其特征在于,所述sgRNA核心位点序列为CAAGACGTTTCGTTATAACCAcgg、CTCATGAAGACACTTTCGGAtgg或GGGCCATACGTATCAAACAGtgg。

3. 如权利要求1所述的利用CRISPR/Cas技术获得家蚕丝素重链基因突变体的突变方法,其特征在于,所述sgRNA通过以下方法得到:

步骤S1,获得家蚕丝素重链基因碱基序列,设计sgRNA核心位点序列;

步骤S2,在设计好的sgRNA核心位点序列前部加上T7启动子,在sgRNA核心位点序列后部加上与crRNA/tracrRNA互补的序列,得到完整的sgRNA 5'端DNA片段;

步骤S3,人工合成步骤S2中获得的DNA片段和80bp的crRNA/tracrRNA序列,两个片段变性退火延伸生成完整的sgRNA脱氧核苷酸序列;

步骤S4,步骤S3中获得的sgRNA脱氧核苷酸序列在体外转录成sgRNA核苷酸序列。

4. 如权利要求1所述的利用CRISPR/Cas技术获得家蚕丝素重链基因突变体的突变方法,其特征在于,所述cas9mRNA通过以下方法得到:cas9载体采用not1线性化酶酶切,获得线性化的cas9载体,然后应用体外转录试剂盒将线性化cas9载体转录成有翻译活性的cas9mRNA。

5. 如权利要求1所述的利用CRISPR/Cas技术获得家蚕丝素重链基因突变体的突变方法,其特征在于,所述cas9mRNA和sgRNA按1:1浓度混合,cas9mRNA和sgRNA的浓度均在1000ng/ul~2000ng/ul。

6. 一种采用如权利要求1~5所述的突变方法制得的家蚕丝素重链基因突变体,其特征在于,所述家蚕丝素重链基因突变体的外显子部分碱基序列如SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4所示。

7. 一种如权利要求6所述的家蚕丝素重链基因突变体在制备丝胶蛋白中的应用。

8. 一种采用如权利要求1~5所述的突变方法在获得丝胶茧或裸蛹中的应用。

利用CRISPR/Cas技术获得家蚕丝素重链基因突变体及突变方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及家蚕育种和基因工程技术领域,尤其涉及一种利用CRISPR/Cas技术获得家蚕丝素重链基因突变体及突变方法和应用。

背景技术

[0002] 家蚕(*Bombyx mori*),鳞翅目蚕蛾科,是由古代野桑蚕驯化而成的绢丝昆虫。以家蚕丝为载体原料的丝绸,是中国古老文化的象征,对促进世界人类文明的发展作出了不可磨灭的贡献。现今,蚕丝业仍是我国特色的经济产业,在世界丝绸业中占有非常重要的地位。蚕丝强韧、柔软、光滑、富有弹性,又具有良好的吸湿性和透气性,因而一直以来绝大部分蚕丝都被用作纺织材料。随着技术的不断革新,现在,蚕丝除作纺织原料外,还可被应用于化妆品、食品、医疗用品、生化用品等领域,用途不断扩大,产品日益增多。

[0003] 蚕丝是由丝素蛋白(Fibroin)和丝胶蛋白(Sericin)两部分组成,丝胶蛋白包在丝素蛋白的外部,约占重量的25%。当熟蚕吐丝时,借丝胶蛋白的胶粘作用使丝素纤维合并合成茧丝,并相互胶着构成紧密不乱的茧层,保持蚕茧的形状。因此丝胶蛋白不仅在茧丝形成过程中起着极为重要的作用,而且在煮茧、缫丝工艺以及丝绸的理化学改性处理等方面具有重要的实用价值。丝胶在茧丝中虽然占有很大的比重,但丝胶在煮茧、缫丝或精炼时,已有相当部分被去除了,而去掉的部分很难被再利用,就目前的技术水平,与丝素蛋白相比,丝胶的利用尚存在很大的困难。因此,获得纯天然未被破坏的丝胶蛋白显得尤为重要。

[0004] 随着科技的发展,以及人们的日益需要,家蚕强大的蛋白质合成功能让研究生物反应器的生物学家把目光转移到了家蚕上,多次尝试利用转基因的方法在家蚕中表达外源活性蛋白,但是由于家蚕本身的丝素蛋白表达量很高造成外源蛋白表达量相对较低且难以分离,所以家蚕作为生物反应器的研究多年来进展并不大。

[0005] 随着生物分子学的发展,科学家逐渐开始对家蚕进行遗传改造,适用于家蚕的遗传操作技术包括转座子介导的转基因、锌指蛋白核酸酶系统(Zinc Finger Nuclease, ZFN)、TALEN系统(Transcription activator-like effector nucleases)、CRISPR/Cas(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)系统。但是锌指蛋白核酸酶系统(Zinc Finger Nuclease, ZFN)、TALEN系统(Transcription activator-like effector nucleases)具有耗时长,构建困难的缺点。

[0006] 申请号为CN201110319637.3的中国专利公开了一种家蚕丝素重链基因突变序列及突变的方法和应用。该发明利用锌指核酸酶技术,对家蚕丝素重链基因进行了敲除,获得了包括在丝素重链基因N端非重复区域部分缺失、部分碱基突变或小片段插入的一系列突变家蚕品系。此专利应用的锌指核酸酶技术耗时长,操作复杂,构建困难;通过此专利给出的突变序列图可以看出其造成的突变大多数没有造成移码突变,有意义突变效率较低。

发明内容

[0007] 针对现有技术的不足,本发明公开了一种利用CRISPR/Cas技术获得家蚕丝素重链基因突变体及突变方法和应用。本发明应用CRISPR/Cas9基因编辑技术对家蚕丝素重链基因进行特异性敲除,获得家蚕丝素突变体,所述家蚕丝素突变体只分泌丝胶蛋白,而不产生丝素蛋白。

[0008] 本发明的技术方案如下:一种利用CRISPR/Cas技术获得家蚕丝素重链基因突变体的突变方法,将cas9mRNA和sgRNA混合后显微注射到家蚕卵中,PCR扩增后鉴定基因型,筛选出杂合子,将杂合子相互交配获得F1代,F1代中出现纯杂合子,将具有表型的蚕进行基因型检测,将相同基因型的蚕进行交配,筛选出能稳定遗传到下一代的纯合子,继而筛选出家蚕丝素重链基因突变体;

[0009] 所述sgRNA的核心位点序列针对家蚕丝素重链基因+1213~+1236、+1274~+1297或+1349~+1372碱基位点设计而成。

[0010] 所述sgRNA核心位点序列为CAAGACGTTCTGTTATAACCAcgg、CTCATGAAGACACTTCCGAtgg或GGGCCATACGTATCAAACAGtgg;核心位点序列最后三个碱基为PAM位点。

[0011] 所述sgRNA通过以下方法得到:

[0012] 步骤S1,获得家蚕丝素重链基因碱基序列,设计潜在sgRNA核心位点序列;

[0013] 步骤S2,在设计好的sgRNA核心位点序列前部加上T7启动子序列,在sgRNA核心位点序列后部加上与crRNA/tracrRNA互补的序列,得到完整的sgRNA5'端DNA片段;

[0014] 步骤S3,人工合成步骤S2中获得的DNA片段和80bp的crRNA/tracrRNA序列,两个片段变性退火延伸生成完整的sgRNA DNA序列;

[0015] 步骤S4,步骤S3中获得的sgRNA脱氧核苷酸序列在体外转录成sgRNA核苷酸序列,本发明提供的sgRNA在丝素重链基因靶点上不易脱靶。

[0016] 所述cas9mRNA通过以下方法得到:将cas9载体采用not1线性化酶酶切,获得线性化的cas9载体,然后应用体外转录试剂盒,cas9载体转录成有翻译活性的cas9mRNA。

[0017] 进一步地,所述cas9mRNA和sgRNA按1:1浓度混合,cas9mRNA和sgRNA的浓度均为1000ng/ul~2000ng/ul。

[0018] 本发明还提供采用所述的突变方法制得的家蚕丝素重链基因突变体,所述突变体的外显子部分碱基序列如SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4所示。

[0019] 本发明还提供所述家蚕丝素重链基因突变体在制备丝胶蛋白中的应用。

[0020] 本发明还提供采用所述突变方法在获得丝胶茧或裸蛹中的应用。

[0021] 本发明的机理如下:本发明应用CRISPR/Cas9基因编辑技术对家蚕进行了丝素重链基因敲除,首先确定多化品系nistari家蚕丝素重链基因确定序列,根据序列设计sgRNA靶位点,然后加上启动子和crRNA/tracrRNA保守序列,体外转录成sgRNA核苷酸序列;线性化cas9载体,得到cas9mRNA,将sgRNA和cas9mRNA共同注射到家蚕卵中,cas9mRNA在家蚕中进行表达得到cas9蛋白,sgRNA引导cas9蛋白到指定靶点,对基因进行定点切割,通过非同源重组的方式对丝素重链进行再编辑,影响家蚕丝素重链基因的正常表达,从而影响丝素蛋白的分泌,只产生丝胶蛋白。本发明通过筛选获得了三种不同的重链敲除突变基因型,分别表现为丝胶茧或裸蛹,提供新的获得丝胶茧或裸蛹的方法。丝胶茧为丝胶蛋白低成本、高效益、大规模生产提供了新的可能;并为家蚕作为生物反应器高效表达外源蛋白提供可能。

裸蛹为以家蚕为对象导入优良外源丝素蛋白,进而为家蚕茧丝的遗传改良提供有效的受体材料。

[0022] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:本发明应用CRISPR/Cas9基因编辑技术快速、高效的获得了表型明显的有经济价值和科研价值的实验材料,为家蚕丝胶茧的规模化生产以及家蚕作为生物反应器表达外源蛋白提供了一种新的材料。本发明提供的突变体的茧层中不含有丝素蛋白,能够用于生产丝胶蛋白。

附图说明

[0023] 图1为sgRNA原理图;前一部分横线标出的序列为T7启动子,中间部分为sgRNA靶位点序列,后面80bp横线标出的省略了中间部分的序列为crRNA/tracrRNA序列;

[0024] 图2为丝素重链起作用sgRNA模版序列图;

[0025] 图3为丝素重链基因突变体检测上、下游引物序列;

[0026] 图4为三种插入突变型插入位点图;

[0027] 第一行为野生型序列第二、三、四行分别为三种插入类型,下划线部分为插入的碱基;

[0028] 图5为野生型和突变型蚕茧图;

[0029] 上图为野生型蚕茧与裸蛹对照图,下图为丝胶茧与裸蛹对照图,右图为丝胶茧放大图;

[0030] 图6为野生型和突变型五龄丝腺第三天解剖图;左图为野生型家蚕丝腺,右图为突变型家蚕丝腺;

具体实施方式

[0031] 下面结合附图和具体实施例对本发明的技术方案做进一步详细说明。

[0032] 实施例1

[0033] 蚕丝素重链基因部分碱基序列(+1201位碱基~+1600位碱基)如SEQ ID NO:1所示。

[0034] 从ncbi数据库中获得家蚕丝素重链基因(基因编号为AF226688),设计引物验证基因序列后获得Nistari丝素重链基因型。应用在线软件CRISPRdirect设计20bd的sgRNA核心序列,筛选出+1213~+1236、+1274~1297和+1349~+1372三个碱基位点合成序列(CAAGACGTTTCGTTATAACCAcgg,CTCATGAAGACACTTCCGAtgg,GGGCCATACGTATCAAACAGtgg)分别在前面加上gaaattaatacgactcactata T7启动子序列,和与crRNA/tracrRNA互补的片段gttttagagctagaaatagc,人工合成为62bp的前引物,与后引物crRNA/tracrRNA经过PCR程序,获得完整的sgRNA序列,见图1~图3。

[0035] 采用的试剂如表1所示。

[0036] 表1

[0037]

试剂	体系
ddH2O	67μL
5X HF buffer	20μL

10mM dNTPs	2 μ L
Pfsion DNA polymerase	1 μ L
CRISPR F(10 μ M)	5 μ L
CRISPR R(10 μ M)	5 μ L
total	100 μ L

[0038] PCR反应条件如表2所示。

[0039] 表2

	步骤	温度	时间
	预变性	98 $^{\circ}$ C	2 min
	变性	98 $^{\circ}$ C	30 s
[0040]	退火	60 $^{\circ}$ C	30 s
	延伸	72 $^{\circ}$ C	30 s
	终延伸	72 $^{\circ}$ C	2 min
	保持	10 $^{\circ}$ C	∞

[0041] 应用qaigen公司的Min elute PCR纯化试剂盒对PCR产物进行纯化,PCR纯化获得完整的sgRNA序列。具体步骤如下:

[0042] 1、100 μ L PCR产物,加500 μ L buffer PB,混匀;

[0043] 2、加入准备好的离心柱中,放置1min,17900G离心1min;

[0044] 3、倒掉废液,加入750 μ L buffer PE 17900G离心1min;

[0045] 4、空管离心1min;

[0046] 5、换新的1.5EP管加10 μ L灭菌水,静置1min,离心1min。获得的sgRNA序列即可作为体外转录模版。

[0047] sgRNA体外转录

[0048] 具体操作步骤参见MAXIscript[®]T7Transcription Kit(北京华夏远洋科技有限公司)

[0049] 按照下表反应体系加入相应试剂,如表3所示。

[0050] 表3

[0051]

试剂	体系
Nuclease-free Water	to 20 μ L
DNA template	1 μ g
10X Transcription Buffer	2 μ L
10mM ATP	1 μ L

10mM ACP	1 μ L
10mM AGP	1 μ L
10mM AUP	1 μ L
T7Enzyme Mix	2 μ L

[0052] 混匀,37 $^{\circ}$ C孵育4h,

[0053] 加入1 μ L TURBO DNase,混匀,37 $^{\circ}$ C孵育15min,

[0054] 加入30 μ L水使反应体积达到50 μ L,加入5 μ L 5M Ammonium Acetate(乙酸铵),混匀,加入3倍体积100%ethanol(乙醇),混匀,放置-20 $^{\circ}$ C 2h,4 $^{\circ}$ C离心30min,倒掉上清,用70%乙醇洗涤一次,倒掉上清,将沉淀晾干,加入适量水溶解,即为可用于注射的sgRNA,放入-80 $^{\circ}$ C冰箱备用。

[0055] cas9mRNA体外转录

[0056] 使用NotI(NEB)酶对cas9质粒进行线性化

[0057] Cas9线性化体系,如表4所示。

[0058] 表4

[0059]	试剂	体系
	Cas9	10ug

[0060]	10X NEB buffer	5 ul
	<i>NotI</i> 酶	1 ul
	Add H2O to	50 ul

[0061] 割胶回收,应用qiaagen公司的胶回收试剂盒(QIAquick[®]Gel Extraction Kit)进行回收,具体步骤参见试剂说明书,获得的线性化质粒即可作为体外转录模版。

[0062] 体外转录

[0063] 具体步骤参见mMESSAGE mMACHINE[®]T7Kit with Manual说明书按照下表反应体系加入相应试剂,如表5所示。

[0064] 表5

[0065]

试剂	体系
Nuclease-free Water	to 20 μL
2X NTP/CAP	10 μL
10X Reaction Buffer	2 μL
linear template DNA†	1 μg
Enzyme Mix	2 μL

[0066] 混匀,37℃孵育3h,

[0067] 加入1 μL TURBO DNase,混匀,37℃孵育15min,

[0068] 加入30 μL 水使反应体积达到50 μL ,加入30 μL LiCl Precipitation Solution,混匀,-20℃放置2h,4℃离心15min,倒掉上清,用70%乙醇洗涤一次,倒掉上清,将沉淀晾干,加入适量水溶解,即为可用于注射的具有转录活性的cas9mRNA,放入-80℃冰箱备用。

[0069] 显微注射实验前准备

[0070] 在显微注射前一天要将所有在实验中要用到的东西进行灭菌或消毒,如灭好多瓶双蒸水,注射所用针,消毒棉,注射后孵化盒等,对显微注射室内进行紫外消毒。将产卵纸上涂上胶水,晾干备用。

[0071] 注射卵的制备

[0072] 交配用的蛾子应提前放入冰箱过夜后再从冰箱中拿出,产卵时要制造黑暗环境,且温度不能太低,并应保持在25~28℃。当看到母蛾状态不好或蚕卵状态不好时应主动将整个蛾圈丢掉。

[0073] 显微注射预实验

[0074] 将按1:1混合好的cas9和sgRNA注射到已经准备好的卵中,放入37℃培养2到3天,取100~200颗注射卵提取基因组,PCR检测,筛选工作效率高的位点用于后期显微注射。经检测,第一位点和第三位点均能工作,但是第三位点效果更高一点,接下来进行正式试验的时候就选择了第三位点即+1349~+1372这个位置作为靶位点进行基因敲除。所给示意图亦全部应用第三位点即+1349~+1372位点作为说明。

[0075] 显微注射

[0076] 将在黑暗环境下产在事先涂有胶水的蚕卵纸上的卵一起放入灭过菌的双蒸水中,浸泡五到十分钟,直到能用共线笔轻易扫下,然后用清水洗涤3遍或更多,直至卵被洗干净,然后将卵按照厚的一面朝向注射的一面将卵摆放整齐,吹干,沾胶二次固定,再吹干后用显微注射仪的双针系统进行显微注射已经混合好的cas9和sgRNA混合物,cas9和sgRNA的浓度应尽可能的高,最好能达到1000ng/ μl 以上,在注射的时候伤口应尽量小,将伤害降到最低。注射的时候朝厚的一面的中间部位注射,以提高成活率,和敲除效率。

[0077] 显微注射后突变个体筛选

[0078] 共注射Nistari品系家蚕卵630颗,由于注射浓度比较大(1500ng/u1),所以孵化率较低,对未孵化的家蚕提取基因组,PCR克隆检测,挑取12个有效克隆,克隆数据显示均为基因敲除或敲入,即未孵化个体敲除率达到了100%,而后对成功孵化个体二龄蚕褪亦进行基因组提取,PCR,克隆检测,发现11个有效克隆里有6个均显示有基因敲除或敲入,阳性率达到55.6%,随后随机取30头成功结茧的蚕五龄蚕褪提取基因组,进行PCR检测,获得20个有效序列,其中有7条序列在靶位点区域以及后部序列显示杂峰,将这七个个体进行交配,获得六个有效蛾圈,但是由于突变体很弱又处于冬季,饲养条件不适宜,六个蛾圈只有20个成功化蛹,且只有七个成功交配,后代全部饲养,且进行了基因型检测,发现均照成了移码突变。突变类型见图4,具体实验结果统计见下表6。

[0079] 表6

[0080]	注射卵	孵化	孵化率	发育未孵化		
				阳性率	孵化蚕阳性率	结茧蚕阳性率
	630	79	12.5%	100.0%	55.6%	36.0%

[0081] 确定突变个体序列,获得纯合突变体

[0082] f1代个体五龄第4到5天的时候,蚕开始吐丝结茧,这期间出现了大量裸蛹和丝胶茧,在蚕成功化蛹第三天将裸蛹的蚕褪以及丝胶茧蚕的蚕褪分别单个收集,提取基因组,PCR检测,克隆测序,确定基因型,保留造成移码突变基因型个体,且相同基因型个体之间交配,获得f2代,f2代蛾圈饲养到化蛹阶段后,继续挑选表型明显的裸蛹和丝胶茧提取基因组,PCR测序,PCR测序为单峰且相对于野生型基因型造成了移码突变的即为纯合个体,将相同基因型的纯合子相互交配,即可得到纯合突变体蛾圈,完成筛选,续代培养即可,获得三种丝素重链插入突变型,见图4。

[0083] 获得具体步骤三种丝素重链插入突变型为:应用天根血液/组织提取试剂盒,提取DNA,应用先前确定基因片段序列的引物(bmhseq2f TTCCGACGGTAACGAGTCCA bmhseq2r CTACTCCTTGTCCTACCCAG)作为PCR引物,用前引物(bmhseq2f TTCCGACGGTAACGAGTCCA)进行PCR测序引物。克隆应用PMD19-T载体作为骨架载体,检测引物为M13通用引物,获得的序列应用SeqMan软件进行分析。PCR程序具体如下(mix为康为试剂的产品),所用到的试剂如表7所示。

[0084] 表7

[0085]

试剂	体系
2×Taq MasterMix(Dye)	25μl
Forward Primer,10μM	2μl
Reverse Primer,10μM	2μl
Template DNA	4ul
ddH2O	17ul

[0086] PCR反应条件如表8所示。

[0087] 表8

步骤	温度	时间
预变性	94℃	2 min
变性	94℃	30 s
退火	55-65℃	30 s
延伸	72℃	30 s
终延伸	72℃	2 min

[0090] PCR结束后然后进行测序。

[0091] 克隆载体应用Takara的pMDTM19-T Vector Cloning Kit

[0092] 克隆体系如表9所示。

[0093] 表9

[0094]

试剂	体系
Solution I	5ul
T Vector	0.5ul
PCR产物	4.5ul

[0095] 16℃过夜连接,而后转入大肠杆菌,具体方法如下:

[0096] 1、从-70℃冰箱中取100μl感受态细胞悬液置冰上。

[0097] 2、加入上述质粒DNA溶液(10μl全部加入),轻轻摇匀,冰上放置30分钟。

[0098] 3、42℃水浴中热击50秒,热击后迅速置于冰上冷却2分钟。

[0099] 4、向管中加入500u1LB液体培养基(不含Amp),混匀后37℃振荡培养1小时,使细菌恢复正常生长状态,并表达质粒编码的抗生素抗性基因(Amp^r)。

[0100] 5、将上述菌液摇匀后取100μl涂布于含Amp的筛选平板上,正面向上放置半小时,待菌液完全被培养基吸收后倒置培养皿,37℃培养12小时。

[0101] 6、克隆测序。

[0102] 可稳定遗传个体表型观察及五龄蚕丝腺表型

[0103] 丝素重链突变个体在蚁蚕期过后的整个成虫期均表现为依附桑叶能力变差,几乎不能附着,到达五龄期后迅速进入晌食期,在五龄第四天左右就开始结茧,而吐出的丝往往只起到固定身体的作用,茧层很薄,晾干后一撕即碎(见图5),将薄薄的茧层放入0.5%的碳酸钠碱水中煮沸,冷却后发现茧层完全溶于水中,即可证明突变体的茧层中已经不存在不溶的丝素蛋白。在纯合子的续代培养中,由于五龄期进食桑叶较少,蛹慢慢变小,可能是家蚕的适应机制。按照家蚕经典取丝腺的解剖方法取出丝腺(图5~图6),发现在五龄第三天后部丝腺就开始融化,且丝腺整体都有开始融化现象。

[0104] 以上实施例获得丝素重链基因的三种突变体,3种突变体的突变类型均为多个碱

基插入型,碱基插入情况如图4所示。丝素重链基因突变体1的外显子部分碱基序列如SEQ ID NO:2所示,就整个基因而言,在+1366位碱基A与+1367位碱基C之间插入TGATACAGCACTCAGATAT碱基,见图4第二行;丝素重链基因突变体2的外显子部分碱基序列如SEQ ID NO:3所示,在+1364位碱基A与+1365位碱基A之间插入TACGTATCAAATC碱基,+1367位碱基C突变为碱基A,见图4第三行;丝素重链基因突变体3的外显子部分碱基序列如SEQ ID NO:4所示,在+1365位碱基A与+1366位碱基A插入GTCGTAGTAAAGTACGTATC碱基,见图4第四行,和野生型序列一起建立文件夹,应用蛋白质分析软件“Translator”,获得预测蛋白序列。

[0105] 丝素重链基因突变体1表达得到的蛋白序列如SEQ ID NO:5所示,丝素重链基因突变体2表达得到的蛋白序列如SEQ ID NO:6所示,丝素重链基因突变体3表达得到的蛋白序列如SEQ ID NO:7所示,野生型家蚕丝素重链基因表达的蛋白序列超过5千个氨基酸。与野生型家蚕丝素重链基因表达的蛋白序列相比,结果证明三种突变体均造成丝素重链基因翻译提前终止,即丝素重链蛋白表达被终止。

SEQUENCE LISTING

- <110> 云南纳博生物科技有限公司
 <120> 利用CRISPR/Cas技术获得家蚕丝素重链基因突变体及突变方法和应用
 <130> 20160808
 <160> 7
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 400
 <212> DNA
 <213> 家蚕
 <400> 1
 atgaaaaaat gatcaagacg ttcgttataa ccacggatc cgacggtaac gaggccattg 60
 tagaggaaga tgtgctcatg aagacaactt ccgatggtac tggctgctca agttatggtg 120
 ctgctgatgc gggagcatal tctcagagcg ggccatacgt atcaaacagt ggatacagca 180
 ctcatcaagg atatacagc gatttcagca ctagtgtgca agtcggtgca ggagctggtg 240
 cagggtgctgc cgctgggttct ggtgcgggtg ccggagctgg ttatggagct gcttctggtg 300
 ctggtgccgg tgctggggct ggtgccggag ctggttatgg aactggtgca ggtgcaggtg 360
 ccggagctgg ttatggagct ggtgcaggtg cagggtgccg 400
 <210> 2
 <211> 419
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 2
 atgaaaaaat gatcaagacg ttcgttataa ccacggatc cgacggtaac gaggccattg 60
 tagaggaaga tgtgctcatg aagacaactt ccgatggtac tggctgctca agttatggtg 120
 ctgctgatgc gggagcatal tctcagagcg ggccatacgt atcaaatgat acagcactca 180
 gatatcagtg gatacagcac tcatcaagga tatacagc atttcagcac tagtgctgca 240
 gtcggtgcag gagctggtgc aggtgctgcc gctgggttctg gtgcgggtgc cggagctggt 300
 tatggagctg cttctggtgc tggtgccggt gctggggctg gtgccggagc tggttatgga 360
 actggtgcag gtgcaggtgc cggagctggt tatggagctg gtgcaggtgc aggtgccg 419
 <210> 3
 <211> 413
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 3
 atgaaaaaat gatcaagacg ttcgttataa ccacggatc cgacggtaac gaggccattg 60
 tagaggaaga tgtgctcatg aagacaactt ccgatggtac tggctgctca agttatggtg 120
 ctgctgatgc gggagcatal tctcagagcg ggccatacgt atcatacgt tcaaatcaaa 180

agtggataca gcactcatca aggatatacg agcgatttca gcactagtgc tgcagtcggt 240
gcaggagctg gtgcaggtgc tgccgctggt tctggtgcgg gtgccggagc tggttatgga 300
gctgcttctg gtgctggtgc cggtgctggg gctggtgccg gagctgggta tggaactggt 360
gcaggtgcag gtgccggagc tggttatgga gctggtgcag gtgcaggtgc cgg 413

<210> 4

<211> 420

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

atgaaaaaat gatcaagacg ttcgttataa ccacggatc cgacggtaac gagtccattg 60
tagaggaaga tgtgctcatg aagacaacttt ccgatggtag tgttgctcaa agttatgttg 120
ctgctgatgc gggagcatat tctcagagcg ggccatacgt atcaagtcgt agtaaagtac 180
gtatcacagt ggatacagca ctcatcaagg atatacagc gatttcagca ctagtgctgc 240
agtcggtgca ggagctggtg caggtgetgc cgetggttct ggtgcgggtg ccggagctgg 300
ttatggagct gcttctggtg ctggtgccgg tgetggggct ggtgccggag ctggttatgg 360
aactggtgca ggtgcaggtg ccggagctgg ttatggagct ggtgcaggtg caggtgccgg 420

<210> 5

<211> 153

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 5

Met Arg Val Lys Thr Phe Val Ile Leu Cys Cys Ala Leu Gln Tyr Val
1 5 10 15
Ala Tyr Thr Asn Ala Asn Ile Asn Asp Phe Asp Glu Asp Tyr Phe Gly
20 25 30
Ser Asp Val Thr Val Gln Ser Ser Asn Thr Thr Asp Glu Ile Ile Arg
35 40 45
Asp Ala Ser Gly Ala Val Ile Glu Glu Gln Ile Thr Thr Lys Lys Met
50 55 60
Gln Arg Lys Asn Lys Asn His Gly Ile Leu Gly Lys Asn Glu Lys Met
65 70 75 80
Ile Lys Thr Phe Val Ile Thr Thr Asp Ser Asp Gly Asn Glu Ser Ile
85 90 95
Val Glu Glu Asp Val Leu Met Lys Thr Leu Ser Asp Gly Thr Val Ala
100 105 110
Gln Ser Tyr Val Ala Ala Asp Ala Gly Ala Tyr Ser Gln Ser Gly Pro
115 120 125
Tyr Val Ser Asn Asp Thr Ala Leu Arg Tyr Gln Trp Ile Gln His Ser
130 135 140

Ser Arg Ile Tyr Glu Arg Phe Gln His
145 150

<210> 6

<211> 151

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 6

Met Arg Val Lys Thr Phe Val Ile Leu Cys Cys Ala Leu Gln Tyr Val
1 5 10 15

Ala Tyr Thr Asn Ala Asn Ile Asn Asp Phe Asp Glu Asp Tyr Phe Gly
20 25 30

Ser Asp Val Thr Val Gln Ser Ser Asn Thr Thr Asp Glu Ile Ile Arg
35 40 45

Asp Ala Ser Gly Ala Val Ile Glu Glu Gln Ile Thr Thr Lys Lys Met
50 55 60

Gln Arg Lys Asn Lys Asn His Gly Ile Leu Gly Lys Asn Glu Lys Met
65 70 75 80

Ile Lys Thr Phe Val Ile Thr Thr Asp Ser Asp Gly Asn Glu Ser Ile
85 90 95

Val Glu Glu Asp Val Leu Met Lys Thr Leu Ser Asp Gly Thr Val Ala
100 105 110

Gln Ser Tyr Val Ala Ala Asp Ala Gly Ala Tyr Ser Gln Ser Gly Pro
115 120 125

Tyr Val Ser Tyr Val Ser Asn Gln Lys Trp Ile Gln His Ser Ser Arg
130 135 140

Ile Tyr Glu Arg Phe Gln His
145 150

<210> 7

<211> 283

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 7

Met Arg Val Lys Thr Phe Val Ile Leu Cys Cys Ala Leu Gln Tyr Val
1 5 10 15

Ala Tyr Thr Asn Ala Asn Ile Asn Asp Phe Asp Glu Asp Tyr Phe Gly
20 25 30

Ser Asp Val Thr Val Gln Ser Ser Asn Thr Thr Asp Glu Ile Ile Arg
35 40 45

Asp Ala Ser Gly Ala Val Ile Glu Glu Gln Ile Thr Thr Lys Lys Met

50	55	60
Gln Arg Lys Asn Lys Asn His Gly Ile Leu Gly Lys Asn Glu Lys Met		
65	70	75
Ile Lys Thr Phe Val Ile Thr Thr Asp Ser Asp Gly Asn Glu Ser Ile		
	85	90
Val Glu Glu Asp Val Leu Met Lys Thr Leu Ser Asp Gly Thr Val Ala		
	100	105
Gln Ser Tyr Val Ala Ala Asp Ala Gly Ala Tyr Ser Gln Ser Gly Pro		
	115	120
Tyr Val Ser Ser Arg Ser Lys Val Arg Ile Thr Val Asp Thr Ala Leu		
	130	135
Ile Lys Asp Ile Arg Ala Ile Ser Ala Leu Val Leu Gln Ser Val Gln		
	145	150
Glu Leu Val Gln Val Leu Pro Leu Val Leu Val Arg Val Pro Glu Leu		
	165	170
Val Met Glu Leu Leu Leu Val Leu Val Pro Val Leu Gly Leu Val Pro		
	180	185
Glu Leu Val Met Glu Leu Val Gln Val Gln Val Pro Glu Leu Val Met		
	195	200
Glu Leu Val Gln Val Gln Val Pro Glu Leu Val Met Gly Leu Val Gln		
	210	215
Val Gln Val Pro Glu Leu Val Met Glu Leu Val Gln Val Gln Val Pro		
	225	230
Glu Leu Val Met Gly Leu Val Gln Val Gln Val Pro Glu Leu Val Met		
	245	250
Glu Leu Val Arg Val Pro Val Pro Gly Leu Val Met Glu Leu Pro Leu		
	260	265
Val Leu Val Leu Ala Leu Gly Thr Asp Lys Glu		
	275	280

T7启动子 靶位点 (20bp) crRNA/tracrRNA序列

5'-TAATACGACTCACTATAGGGGCCATACGTATCAAACAGGTTTTAGAGCTAGAA...GTCGGTGCTTTT-3'

图1

5'-TAATACGACTCACTATAGGGGCCATACGTATCAAACAGGTTTTAG
 AGCTAGAAATAGCAAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGG
 CACCGAGTCGGTGCTTTT-3'

图2

bmhseq2f TTCCGACGGTAACGAGTCCA
 bmhseq2r CTACTCCTTGTCCGTACCCAG

图3

IATTCICAGAGCGGGCCATACGTATCAA-----A-----CAGTGGATACAGCACTCATCAAGG
 IATTCICAGAGCGGGCCATACGTATCAA-----ATGATACAGCACTCATCAAGTGGATACAGCACTCATCAAGG
 IATTCICAGAGCGGGCCATACGTATCATACGTATCAAATCA-----A-----AAGTGGATACAGCACTCATCAAGG
 IATTCICAGAGCGGGCCATACGTATCAAGTCTAGTAAAGTACGTATCA-----CAGTGGATACAGCACTCATCAAGG

图4

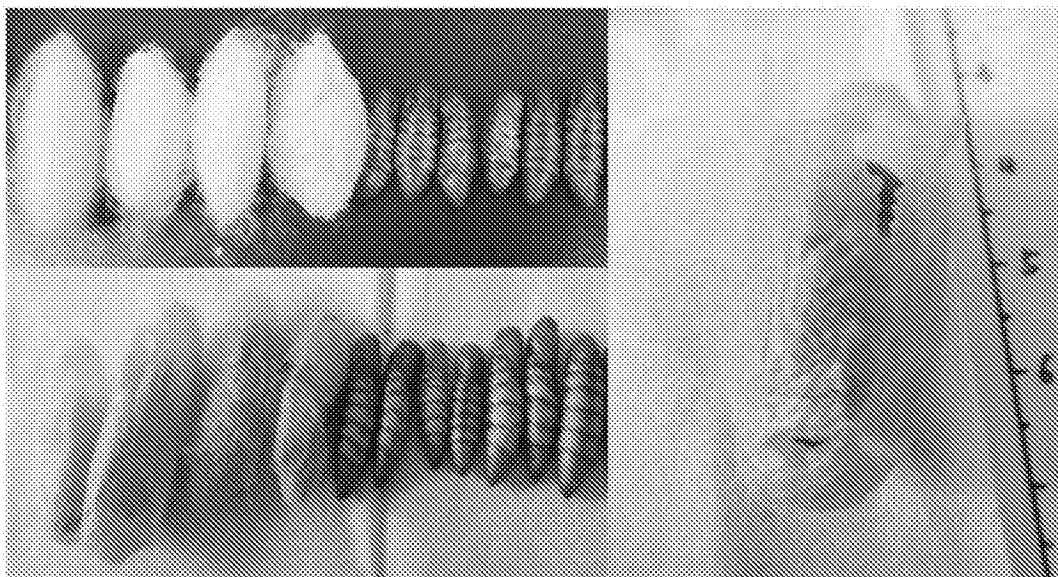


图5

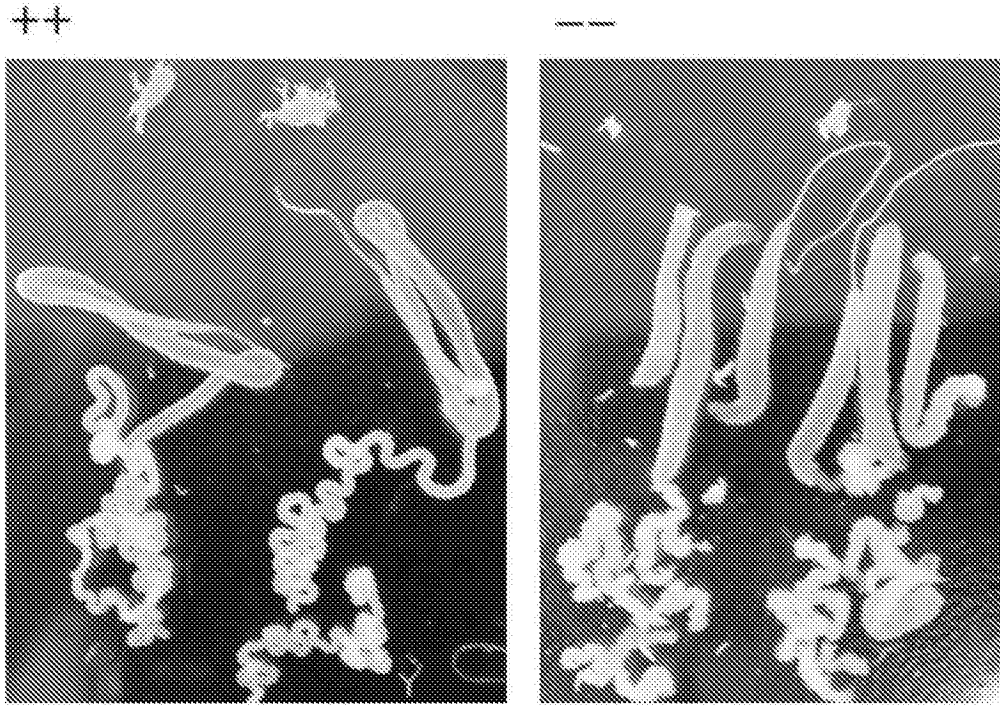


图6