

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105210981 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 06

(21) 申请号 201510587647. 3

(22) 申请日 2015. 09. 15

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所  
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 王晓群 高绍荣 吴倩 寇朝辉  
尹崇海

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任  
公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

*A01K 67/02*(2006. 01)

*C12N 5/073*(2010. 01)

*C12N 15/89*(2006. 01)

权利要求书1页 说明书7页  
序列表6页 附图4页

### (54) 发明名称

建立可应用于人类疾病研究的雪貂模型的方法及其应用

### (57) 摘要

本发明涉及一种建立可应用于疾病研究的雪貂模型的方法及其应用,属于生物学领域,具体涉及一种雪貂促排卵技术和一种雪貂体外受精技术,以及基于上述方面的利用 CRISPR/Cas9 的技术建立雪貂模型的方法,所述方法可应用于人类疾病研究。

1. 一种促进雪貂排卵的方法,所述方法使用PMSG(Pregnant Mare Serum Gonadotropin)、FSH(FollitropinAlfa)和HCG(Human Chorionic Gonadotropin)联合进行。

2. 根据权利要求1所述的方法,所述方法包括以下步骤:

1) 给母貂腹腔注射PMSG,优选注射200-300单位,更优选300单位;

2) 24-48小时后,肌肉注射第一针FSH,此后连续注射8-10天FSH,每次的FSH注射量优选为5-10单位,更优选为10单位;

3) 如果外阴肿胀,颜色由红变白则腹腔注射HCG,HCG的注射量优选为200-300单位,更优选为300单位;

4) 取卵,取卵时间优选在HCG注射后40-48小时,更优选为HCG注射后48小时。

3. 根据权利要求2所述的方法,第1)步和第2)步之间间隔24-48小时。

4. 根据权利要求2所述的方法,FSH的注射为每天两次,间隔12小时。

5. 一种雪貂体外授精方法,所述方法包括:

1) 取卵:手术取得雪貂的输卵管,用预热的HCZB培养液经输卵管伞口冲出卵丘卵母细胞复合体,用透明质酸酶消化成无卵丘细胞的单个卵母细胞,放入38.5℃,5%CO<sub>2</sub>预平衡3小时的IVF培养滴中备用;

2) 体外受精:将公貂,经附睾尾取出精液马上放入步骤1)中获得的含有卵母细胞的IVF培养滴中,共孵育,完成体外受精。

6. 根据权利要求5所述的方法,所述共孵育时间为3-4小时。

7. 根据权利要求5所述的方法,所述HCZB培养液的组成为:81.62mM氯化钠,4.83mM氯化钾,1.18mM磷酸二氢钾,1.18mM硫酸镁,5mM碳酸氢钠,1.7mM二水合氯化钙,31.3mM乳酸钠,0.27mM丙酮酸钠,20mMHepes,1mM谷氨酰胺,0.1mMEDTA 2Na,5.5mM葡萄糖,0.007%PVA,1N盐酸。

8. 一种建立雪貂模型的方法,所述方法包括以下步骤:

1) 针对目的基因设计sgRNA单向导RNA序列,并体外转录CAS9mRNA和sgRNA序列;

2) 根据权利要求1-4任一项所述的方法促雪貂排卵;

3) 根据权利要求5-7任一项所述的方法进行雪貂体外受精;

4) 将步骤1)获得的Cas9 mRNA和目的基因的sgRNA显微注射入受精卵;

5) 将步骤4)获得的受精卵移植入受体进行妊娠;

6) 鉴定子代转基因雪貂。

9. 根据权利要求8所述的方法,所述目的基因选自Aspm, Dcx, Disc1。

10. 根据权利要求8或9所述的方法用于人类疾病研究及针对人类疾病的药物筛选和/或安全性评价方面的用途。

## 建立可应用于人类疾病研究的雪貂模型的方法及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物学领域,具体涉及一种雪貂促排卵技术和一种雪貂体外受精技术,以及基于上述方面的利用 CRISPR/Cas9 的技术建立雪貂模型的方法,所述方法可应用于系统研究人类疾病。

### 背景技术

[0002] 大脑是人类控制认知、记忆、情感和活动的功能器官,某些与大脑发育相关基因的缺失或突变直接导致神经疾病的发生。高等哺乳动物的大脑皮层具有沟和回的结构,这一结构大大的增加了大脑皮层的表面积,研究表明这与高级认知等大脑功能密切相关。

[0003] 雪貂作为新型实验动物,已经被广泛的应用于呼吸道疾病等的研究,但是并没有在神经系统发育中普遍应用。虽然雪貂不属于灵长类动物,但是它与平滑脑的小鼠相比,雪貂的大脑具有沟和回的结构,并且是有社会性的动物,因此,应用雪貂作为模式动物,研究直接大脑发育型疾病以及精神类疾病的发病机理和临床治疗等,具有很大的现实意义。此外,雪貂还具有体形小、易饲养、繁殖周期短、一胎多崽的优点,是研究神经系统疾病发病机理的首选模式动物。

[0004] 雪貂之所以没有被神经科学研究广泛应用,其中主要原因是转基因动物无法实现。随着 CRISPR/Cas9 技术的发展,转基因动物制备变得相对简便 [1, 2]。

[0005] CRISPR/Cas9 这一编辑基因的技术已经广泛应用于各种物种,包括小鼠、大鼠、猴等。以小鼠为例,主要实验过程如图 1 所示,将一个或者多个 sgRNA(单向导 RNA)和 Cas9mRNA 注射到受精卵里,sgRNA 介导 Cas9 核酸酶在小鼠受精卵的特定基因组位点上进行切割、修复,导致基因被改变。

[0006] 由于雪貂作为实验动物并没有被广泛应用,鲜有关于转基因雪貂的报道。雪貂作为实验动物的驯化和饲养条件要求比较严苛,而且生殖周期等生理习性并没有非常详尽的研究资料,目前已经报道的唯一一例转基因雪貂,是通过病毒结合核移植的方法获得的 [3, 4],主要方法过程如图 2 所示。正常的雪貂体细胞经过定向基因修饰变为改变遗传学特性的修饰后体细胞,然后在成熟的雪貂卵母细胞中通过显微操作的方法用修饰后的体细胞的细胞核替换卵母细胞的细胞核。核移植后的卵母细胞经过发育,胚胎的基因就可以得到相应的改变。

[0007] 然而,一方面,CRISPR/Cas9 作为新兴的技术,从未应用于雪貂这种模式动物;另一方面,病毒结合体细胞核移植的方法比较复杂,操作性不高,效率低下,只有 1-3%,而且使转基因动物有可能带上病毒的风险,此外,目前已经报道的雪貂的超排方案是针对 Marshall Ferret 的,用于 Angora Ferret 超排效率非常低,卵子不成熟,且无法做到雪貂的体外受精,无法满足高效制备转基因雪貂的要求。

### 发明内容

[0008] 本发明针对现有技术中建立可应用于人类疾病研究的雪貂模型的方法的不足,一

方面提供一种雪貂促排卵技术和一种雪貂体外受精技术,另一方面,在上述基础上,利用 CRISPR/Cas9 的技术,以 3 种基因(这三个基因都与神经系统疾病相关,一个是平滑脑症、一个是头小畸形症、一个是精神分裂症)为例,建立可应用于神经系统疾病研究的雪貂模型的方法,并将其用于相关疾病的致病机理研究,相关药物的筛选和安全性评价,以及临床手术治疗研究的模式动物。

[0009] 本发明首次应用 PMSG, FSH 和 HCG 联合超排卵方法结合体外受精技术,使得转基因雪貂的制备工作可以在尽量少的耗损实验动物的基础上顺利开展。在取得的雪貂受精卵中,本发明首次应用 CRISPR/Cas9 技术,对受精卵的特定的与神经系统疾病直接相关的基因,包括 *Dcx*, *Aspm*, *Disc1* 进行编辑,从而最终导致这三个基因突变,无法正常行使该基因的生物学功能,获得类似于人类由于这三个基因突变而导致的神经系统疾病。

[0010] 具体而言,本发明包括以下方面:

[0011] 1. 一种促进雪貂排卵的方法,所述方法使用 PMSG(Pregnant Mare Serum Gonadotropin)、FSH(FollitropinAlfa) 和 HCG(Human Chorionic Gonadotropin) 联合进行。

[0012] 2. 根据第 1 项所述的方法,所述方法包括以下步骤:

[0013] 1) 给母貂腹腔注射 PMSG,优选注射 200-300 单位,更优选 300 单位;

[0014] 2) 24-48 小时后,肌肉注射第一针 FSH,此后连续注射 8-10 天 FSH,每次的 FSH 注射量优选为 5-10 单位,更优选为 10 单位;

[0015] 3) 如果外阴肿胀,颜色由红变白则腹腔注射 HCG,HCG 的注射量优选为 200-300 单位,更优选为 300 单位;

[0016] 4) 取卵,取卵时间优选在 HCG 注射后 40-48 小时,更优选为 HCG 注射后 48 小时。

[0017] 3. 根据第 2 项所述的方法,第 1) 步和第 2) 步之间间隔 48 小时。

[0018] 4. 根据第 2 项所述的方法,FSH 的注射为每天两次,间隔 12 小时。

[0019] 5. 一种雪貂体外授精方法,所述方法包括:

[0020] 1) 取卵:手术取得雪貂的输卵管,用预热的 HCZB 培养液经输卵管伞口冲出卵丘卵母细胞复合体,用透明质酸酶消化成无卵丘细胞的单个卵母细胞,放入 38.5°C,5% CO<sub>2</sub> 预平衡 3 小时的 IVF 培养滴中备用;

[0021] 2) 体外受精:将公貂经附睾尾取出精液马上放入步骤 1) 中获得的含有卵母细胞的 IVF 培养滴中,共孵育,完成体外受精。

[0022] 6. 根据第 5 项所述的方法,所述共孵育时间为 3-4 小时。

[0023] 7. 根据第 5 项所述的方法,所述 HCZB 培养液的组成为:81.62mM 氯化钠,4.83mM 氯化钾,1.18mM 磷酸二氢钾,1.18mM 硫酸镁,5mM 碳酸氢钠,1.7mM 二水合氯化钙,31.3mM 乳酸钠,0.27mM 丙酮酸钠,20mMHepes,1mM 谷氨酰胺,0.1mM EDTA 2Na,5.5mM 葡萄糖,0.007% PVA,1N 盐酸。

[0024] 8. 一种建立雪貂模型的方法,所述方法包括以下步骤:

[0025] 1) 针对目的基因设计 sgRNA 单向导 RNA 序列,并体外转录 CAS9 mRNA 和 sgRNA 序列;

[0026] 2) 根据 1-4 任一项所述的方法促雪貂排卵;

[0027] 3) 根据 5-7 任一项所述的方法进行雪貂体外受精;

- [0028] 4) 将步骤 1) 获得的 Cas9 mRNA 和目的基因的 sgRNA 显微注射入受精卵；
- [0029] 5) 将步骤 4) 获得的受精卵移植入受体进行妊娠；
- [0030] 6) 鉴定子代转基因雪貂。
- [0031] 9. 根据第 8 项所述的方法, 所述目的基因选自 *Aspm*, *Dcx*, *Discl*。
- [0032] 10. 根据第 8 或 9 项所述的方法用于相关人类疾病研究及针对人类疾病的药物筛选和 / 或安全性评价方面的用途。
- [0033] 本发明首次使用 PMSG, FSH 和 HCG 联合促排卵, 排卵稳定高效, 达到 25-35 枚 / 只。而现有技术中仅有的可参考的超排方案是使用 PMSG 和 HCG 联合超排方案, 效率低, 卵不成熟。此外, 本发明首次使用雪貂的体外受精而不需要体外获能。另外本发明首次应用 CRISPR/Cas9 技术制备的转基因雪貂, 相比之前唯一一例应用病毒结合体细胞核移植的方法, 效率提高很多, 可以达到 80% 左右, 并且没有病毒危害性。本发明的模型可以例如模拟人由于 *Dcx* 基因突变或者 *Aspm* 基因突变引起的神经疾病, 成为最为合适的疾病模式动物。而之前已有的 *Dcx* 突变小鼠模型, 因小鼠的大脑没有沟回, 故不能复制人的疾病表型。

#### 附图说明

- [0034] 图 1. 应用 CRISPR/Cas9 技术制备转基因小鼠示意图。
- [0035] 图 2. 通过基因编辑体细胞核结合核移植的方法改变胚胎基因组的示意图。图 3. sgRNA 的设计, 其中对于每个基因设计了 2 个 sgRNA, 其中灰色带下划线的 GGT/GGA/GGG/GGC 序列为 Protospacer-adjacent motif (PAM), 其余灰色不带下划线的为基因干扰靶序列。
- [0036] 图 4. 三个不同品系的转基因雪貂经过 T7EN1 酶切鉴定, 可以被酶切的是基因突变雪貂, 被星号标出。
- [0037] 图 5. 三个不同品系的转基因雪貂经过测序分析具体的基因突变位点。与野生型比较, 删除的碱基用点表示, 增加的碱基用小写字母标注。同时, 括号内表示缺失了或者增加了几个碱基, 以及这种类型的结果在 20 个检测中所占数量。
- [0038] 图 6. *Dcx* 转基因雪貂的大脑结构改变。转基因雪貂大脑皮层变薄、沟回变少、脑室变大。
- [0039] 图 7. *Aspm* 转基因雪貂的大脑结构改变。转基因雪貂大脑变小、沟回变浅。

#### 具体实施方式

- [0040] 实施例 1. CRISPR/Cas9 靶向修饰基因载体构建和体外转录
- [0041] 1) sgRNA 转录载体的构建: 针对雪貂 *Aspm* (GenBank Accession No: XM\_004756200), *Dcx* (GenBank Accession No: XM\_004769082), *Discl* (GenBank Accession No: XM\_013047589) 三个基因, 设计了特异的 sgRNA 序列 (图 3), 具体序列参见表 1。
- [0042] 表 1
- [0043]

基因	序列 (5'到 3')
Dcx	GTGCGCCCCAAGCTGGTGACCATCATCCGCAGTGGGGTGAAGC CTTGGAA(SEQ ID NO: 1)
Aspm	GGAAGGAGAAGCAGGAGCAGGGCTTCACTTGGTGGCTAAATT TTATATT(SEQ ID NO: 2)
Disc1	GGGTCCCCTCAGCCCCGGGCAGCTCTCAGGACACCTTTACCTCA A(SEQ ID NO: 3)

[0044] 每 2 条单链核酸序列 (表 2) 退火形成双链 DNA, 双链 DNA 连接到 px330 (Addgene, 42230) 载体中。

[0045] 表 2. sgRNA 克隆引物序列

[0046]

相关基因	引物方向	序列
<i>Dcx</i>	F	AAACAGTGAAGCCCTGCTCCTGCTC(SEQ ID NO: 4)
	R	CACCGGGTGACCATCATCCGCAGTG(SEQ ID NO: 5)
<i>Disc1</i>	F	CACCGAAGGTGTCCTGAGAGCTGCC(SEQ ID NO: 6)
	R	AAACGGCAGCTCTCAGGACACCTTC(SEQ ID NO: 7)
<i>Aspm</i>	F	CACCGAGCAGGAGCAGGGCTTCACT(SEQ ID NO: 8)
	R	AAACAGTGAAGCCCTGCTCCTGCTC(SEQ ID NO: 9)

[0047] 2) Cas9 和 sgRNA 体外转录: 利用表 3 中的引物将 T7 转录子通过 PCR 方法加入到 Cas9 和 sgRNA 的转录起始位点, Cas9 序列和参考文献 [2] 中一致, PCR 产物经过回收净化, 用 mMESSEGEEmMACHINE T7ULTRA 试剂盒 (Life Technologies) 进行体外转录。转录产生的 Cas9 mRNA 和 sgRNA 用 MEGAclear 试剂盒 (Life Technologies) 纯化并测量浓度。

[0048] 表 3. 连接 T7 转录子引物

[0049]

相关基因	引物方向	序列
T7- <i>Dcx</i> -sgRNA	F	ttaatacgactcactataggGGTGACCATCATCCGCAGTG(SEQ ID NO: 10)
T7- <i>Aspm</i> -sgRNA	F	ttaatacgactcactataggAGGAGCAGGGCTTCACTTGG(SEQ ID NO: 11)
T7- <i>Disc1</i> -sgRNA	F	ttaatacgactcactataggAAGGTGTCCTGAGAGCTGCC(SEQ ID NO: 12)
T7-sgRNA	R	AAACAGTGAAGCCCTGCTCCTGCTC(SEQ ID NO: 13)
T7-Cas9	F	ttaatacgactcactataggGGAGAATGGACTATAAGGACCACGAC(SEQ ID NO: 14)
T7-Cas9	R	GCGAGCTCTAGGAATTCTTAC(SEQ ID NO: 15)

[0050] 实施例 2. 雪貂促排卵

[0051] 选择 2-3 岁, 体重 1.5-2KG, 3 周左右未发情经产母貂, 腹腔注射 300 单位 PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) (宁波三生药业), 48 小时后肌肉注射第一针 FSH (Follitropin Alfa) (Merck Serono) 10 单位, 此后连续注射 10 天, 每天两次, 间隔 12 小时, 每次 10 单位, 在注射 FSH 后持续观察雪貂发情情况, 如果发情, 则腹腔注射 300 单位 HCG (Human Chorionic Gonadotropin) (Merck Serono)。注射 HCG 48 小时后取卵。本方法排卵稳定高效, 达到 25-35 枚 / 只, 在 Angora Ferret 中应用, 比之前文献报道的促排卵方法 (无成熟的卵母细胞) 提高效率约 100%, 并且均为成熟的卵母细胞。

[0052] 我们还使用其它 PMSG、FSH 和 HCG 浓度 (如 200、250 单位的 PMSG, 5、8 单位的 FSH, 200、250 单位的 HCG), 以及 FSH 注射前的其它间隔时间 (如 24、36 小时)、HCG 注射和取卵间的其它间隔时间 (如 40、44 小时), 均获得了与上述相似的促排卵效果。

[0053] 实施例 3. 雪貂体外授精

[0054] 1) 取卵: 手术取得雪貂的输卵管, 用预热的 HCZB 培养液 (81.62mM 氯化钠, 4.83mM 氯化钾, 1.18mM 磷酸二氢钾, 1.18mM 硫酸镁, 5mM 碳酸氢钠, 1.7mM 二水合氯化钙, 31.3mM 乳酸钠, 0.27mM 丙酮酸钠, 20mM HEPES, 1mM 谷氨酰胺, 0.1mM EDTA 2Na, 5.5mM 葡萄糖, 0.007% PVA, 1N 盐酸) 经输卵管伞口冲出卵丘卵母细胞复合体, 用透明质酸酶消化成无卵丘细胞的单个卵母细胞, 放入 38.5°C, 5% CO<sub>2</sub> 预平衡 3 小时的 IVF 培养滴 (Life Technologies) 中备用。

[0055] 2) 体外受精: 选择 3-4 岁, 体重 2-4KG 的健康公貂, 经附睾尾取出精液马上放入含有卵母细胞的 IVF 培养滴中, 共孵育 3-4 小时, 完成体外受精。

[0056] 实施例 4. 雪貂受精卵显微注射

[0057] 1) 体外受精的受精卵: 在授精 3-4 小时后, 将卵母细胞自 IVF 培养基中取出, 移入显微操作的液滴中, 用 Piezo (Narishige) 将混合好的 Cas9mRNA (100ng/μl) 和目的基因的 sgRNAs (50ng/μl) 显微注射入卵细胞质内, 每枚注射量相当于一个原核的体积。注射结束后室温恢复 15 分钟, 移入 38.5°C, 5% CO<sub>2</sub> 预平衡好的 CZB 培养液 (81.62mM 氯化钠, 4.83mM 氯化钾, 1.18mM 磷酸二氢钾, 1.18mM 硫酸镁, 25mM 碳酸氢钠, 0.1mM EDTA 2Na, 5.5mM 葡萄

糖, 31.3mM 乳酸钠, 1.7mM 二水合氯化钙, 0.27mM 丙酮酸钠, 1mM 谷氨酰胺, 5g/1 牛血清白蛋白) 液滴中备用。

[0058] 2) 正常受精的受精卵: 取正常合笼 40-48 小时后的母貂, 手术取得输卵管, 经输卵管伞口冲出受精卵, 移入显微操作液滴中, 用 Piezo 将混合好的 Cas9mRNA (100ng/μl) 和 sgRNAs (50ng/μl) 显微注射入卵细胞质内, 每枚注射量相当于一个原核的体积。注射结束后室温恢复 15 分钟, 移入 38.5°C, 5% CO<sub>2</sub> 预平衡好的 CZB 培养液液滴中备用。

[0059] 实施例 5. 受精卵移植入受体

[0060] 将自然发情且与结扎公貂合笼 24 小时的母貂麻醉, 使其侧卧于手术台上, 在其左侧卵巢上方开 2-3 厘米的口, 把卵巢拉到体外, 经输卵管伞口移入显微注射过的胚胎 15-18 枚。并且观察卵巢是否已经排卵, 若有明显未排的卵泡, 则用 1ML 注射器将卵泡挑破。然后将卵巢恢复原位, 手术缝合伤口。并注射 20-30 单位 LH (Luteinizing Hormone) (宁波三生药业) 辅助着床。在胚胎移植后 21 天可用手检查母貂是否已经妊娠。

[0061] 实施例 6. 转基因雪貂的鉴定

[0062] 手术后母貂单独饲养, 在胚胎移植后 21 天可用手检查母貂是否已经妊娠。母貂自然分娩, 出生 2 周后, 小貂进行编号并取尾部组织并对小貂的基因型进行鉴定。组织经速冻研磨裂解, 提取基因组后, 对于干扰的目的基因进行 PCR 扩增。PCR 扩增引物见表 4, PCR 扩增产物经过 T7EN1 限制性内切酶 (NEB) 处理后, 经过凝胶电泳分离, 如果小貂基因被改变, 可以在凝胶电泳图中看到一系列低分子量的条带。应用本方法, 可以鉴定出目的基因被改变的小貂, 用星号标示 (图 4)。此外, 将确定为转基因雪貂的目的基因用上述方法和引物 (表 4), 进行 PCR 片段扩增, PCR 产物克隆到 pMD-19T 载体 (Takara) 中并进行测序, 获得被改变后基因组的序列 (图 5)。与野生型比较, Dcx 基因在不同的小貂中被删除 4-98 个碱基, 或者增加 1-2 个碱基。即使在同一只小貂里, Dcx 基因也有不同的编辑方式。Aspm 基因在不同的小貂里缺失了 2-15 个碱基。我们仅获得了一只 Disc1 转基因小貂, Disc1 基因增加了 1 个碱基或者缺失了 3 个碱基。

[0063] 表 4. 转基因雪貂基因型鉴定 PCR 引物

[0064]

基因	引物方向	序列
<i>Dcx</i>	F	CGAGGTGAGTTGTTAGAGAGACAG (SEQ ID NO: 16)
	R	CTCAGACATATGGTCCATTGCTTG (SEQ ID NO: 17)
<i>Aspm</i>	F	CACCGAGCAGGAGCAGGGCTTCACT (SEQ ID NO: 18)
	R	AAACAGTGAAGCCCTGCTCCTGCTC (SEQ ID NO: 19)
<i>Disc1</i>	F	TCCAAGTTGGCACCACACTG (SEQ ID NO: 20)
	R	GAGAGAGAAGTCGAGGGTGTTTC (SEQ ID NO: 21)

[0065] 实施例 7. 转基因雪貂的相关表型分析

[0066] 由于 Dcx 基因与人类大脑沟回的产生密切相关, 因此, 应用小动物磁共振成像设



备 (Siemens), 对于 14 周大的幼年雪貂进行脑结构的成像分析。发现在 *Dcx* 基因被突变后的幼年雪貂的大脑呈现了沟回明显缺失和脑腔变大的表型 (图 6)。此外, *Aspm* 基因与人脑小畸形症直接相关, 经过小动物磁共振成像技术检测, 幼年雪貂在 *Aspm* 基因突变后, 也呈现了脑体积减小和沟回变浅的表型 (图 7)。

[0067] 参考文献

[0068] 1. *Cell*. 2013Sep 12 ;154(6):1370-9. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. Yang H, Wang H, Shivalila CS, Cheng AW, Shi L, Jaenisch R.

[0069] 2. *Cell*. 2013May 9 ;153(4):910-8. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. 3. *J Clin Invest*. 2008Apr ;118(4):1578-83. Adeno-associated virus-targeted disruption of the *CFTR* gene in cloned ferrets. Sun X, Yan Z, Yi Y, Li Z, Lei D, Rogers CS, Chen J, Zhang Y, Welsh MJ, Leno GH, Engelhardt JF.

[0070] 4. *Dev Biol*. 2006May 15 ;293(2):439-48. Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer. Li Z, Sun X, Chen J, Liu X, Wisely SM, Zhou Q, Renard JP, Leno GH, Engelhardt JF.

[0071] 5. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003Nov 7 ;1:83. Progress toward generating a ferret model of cystic fibrosis by somatic cell nuclear transfer. Li Z, Engelhardt JF.

## [0001]

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> 建立可应用于人类疾病研究的雪貂模型的方法及其应用

<130> IB157934

<160> 21

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

gtgcgcccca agctggtgac catcatccgc agtggggtga agccttggaa

50

<210> 2

<211> 49

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

ggaaggagaa gcaggagcag ggcttcactt ggtggcctaaa ttttatatt

49

<210> 3

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

## [0002]

<400> 3

gggtccctc agccccgggc agctctcagg acacctttac ctcaa

45

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

aaacagtga gccctgctcc tgctc

25

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

caccgggtga ccatcatccg cagtg

25

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 6

caccgaaggt gtcctgagag ctgcc

25

<210> 7

<211> 25

[0003]

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 7

aaacggcagc tctcaggaca ccttc

25

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 8

caccgagcag gagcaggget tcaact

25

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 9

aaacagtgaa gcctgctec tgcte

25

<210> 10

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 10

ttaatacgac teactatagg ggtgaccate atccgcagtg

40

[0004]

<210> 11

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 11

ttaatacgcac tcactatagg aggagcaggg cttcacttgg 40

<210> 12

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 12

ttaatacgcac tcactatagg aaggtgtcct gagagctgcc 40

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 13

aaacagtgaa gccctgctcc tgetc 25

<210> 14

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工序列

[0005]

<400> 14

traatacgcac tcactatagg ggagaatgga ctataaggac caccgac

46

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 15

gcgagctcta ggaattctta c

21

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 16

cgaggtgagt tgtagagag acag

24

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 17

ctcagacata tgggccattg cttg

24

<210> 18

<211> 25

[0006]

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 18

caccgagcag ggcagggtc tcact

25

<210> 19

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 19

aaacagtga gcccgtctcc tgctc

25

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 20

tccaagttgg caccacactg

20

<210> 21

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 21

gagagagaag tcgagggtgt tc

22

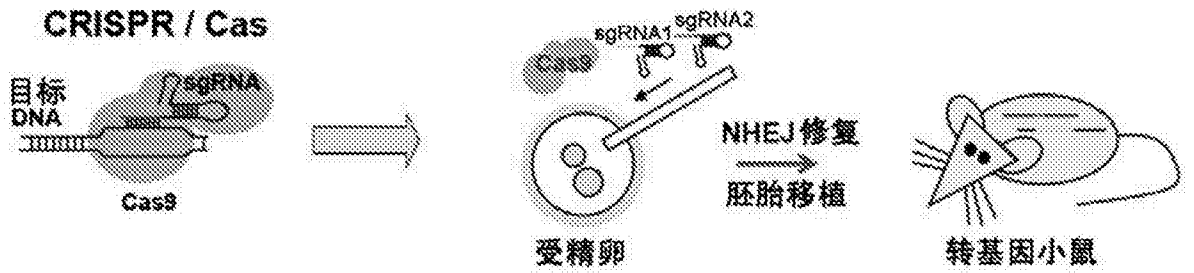


图 1

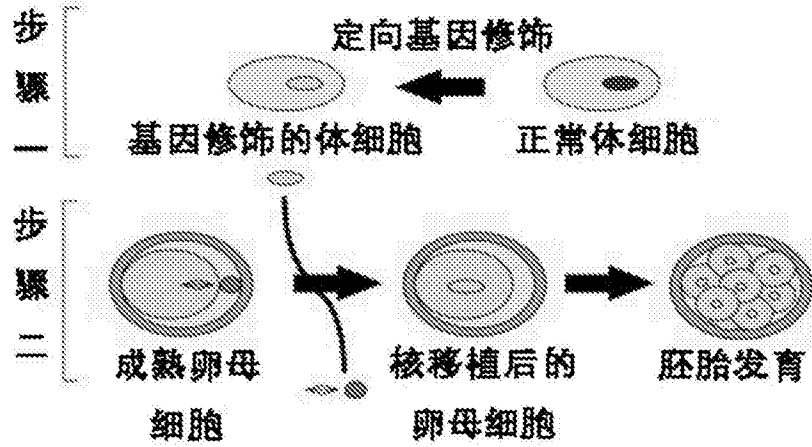


图 2



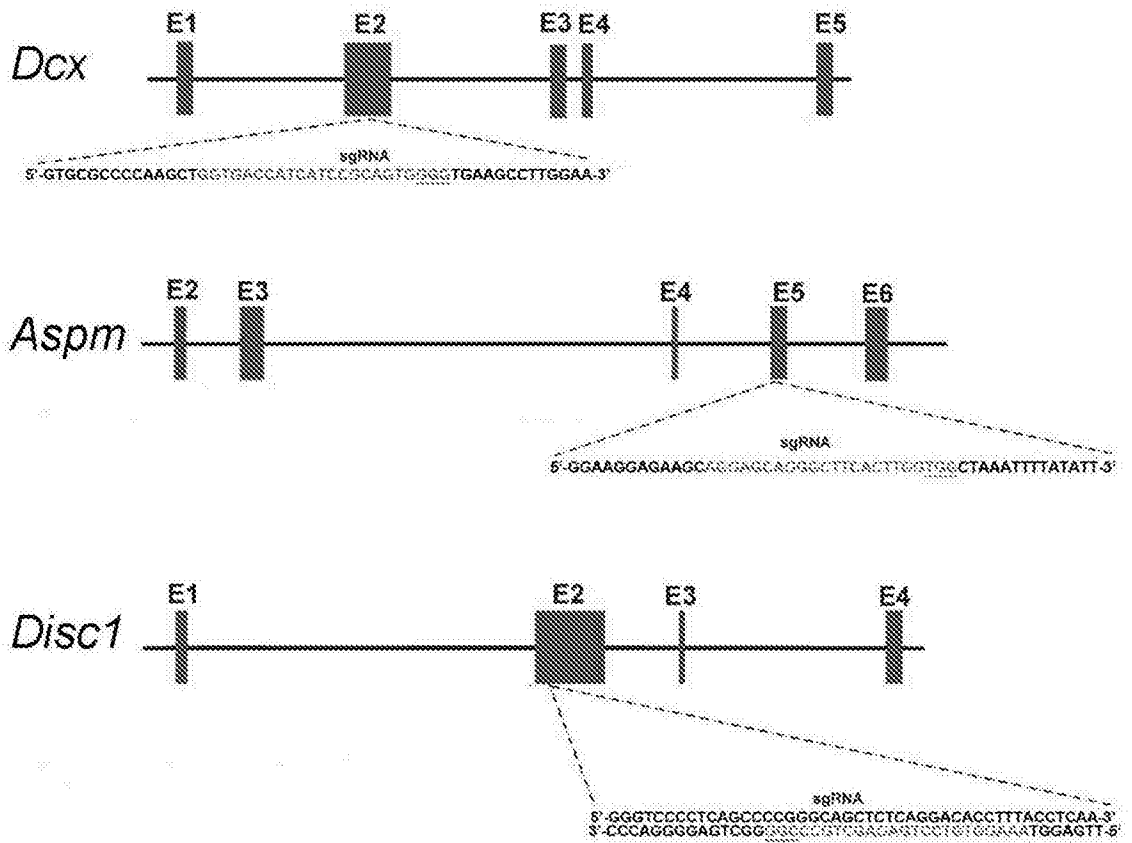


图 3

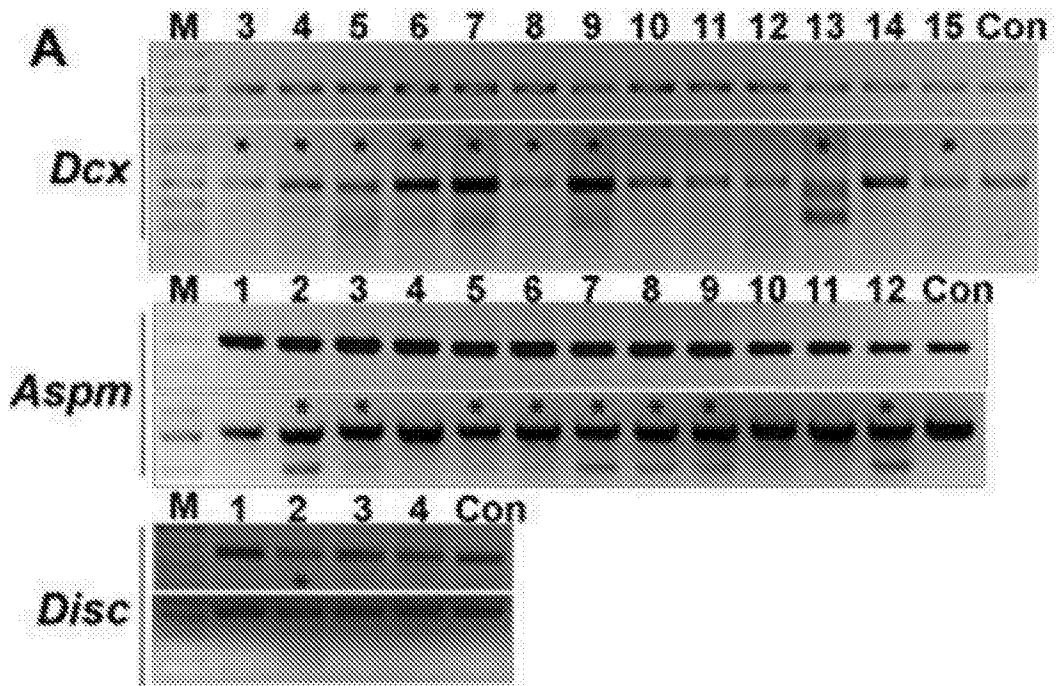


图 4



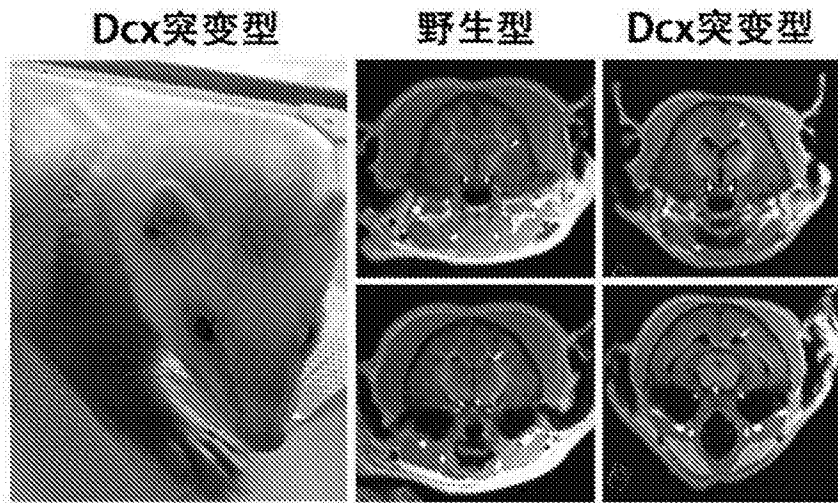


图 6

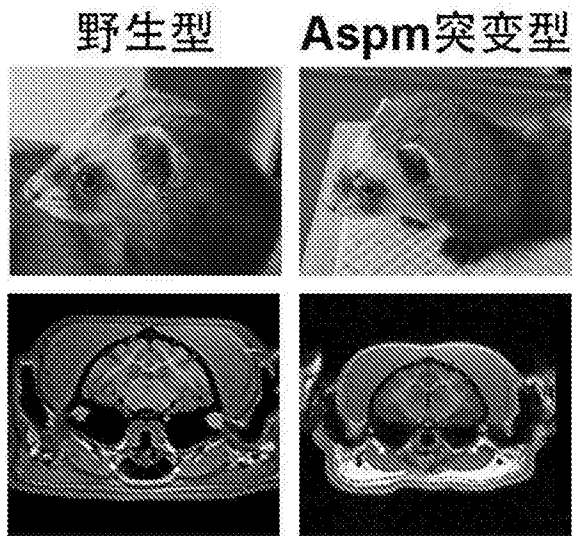


图 7