

# *Bnc2-P2A-CreERT2* 基因敲入小鼠模型制作方案

---

设计人：张雪婷

审核人：李晓晶

时间：2023年3月14日

创新模型 无限可能

股票简称：药康生物 科创板代码：688046

# 目录

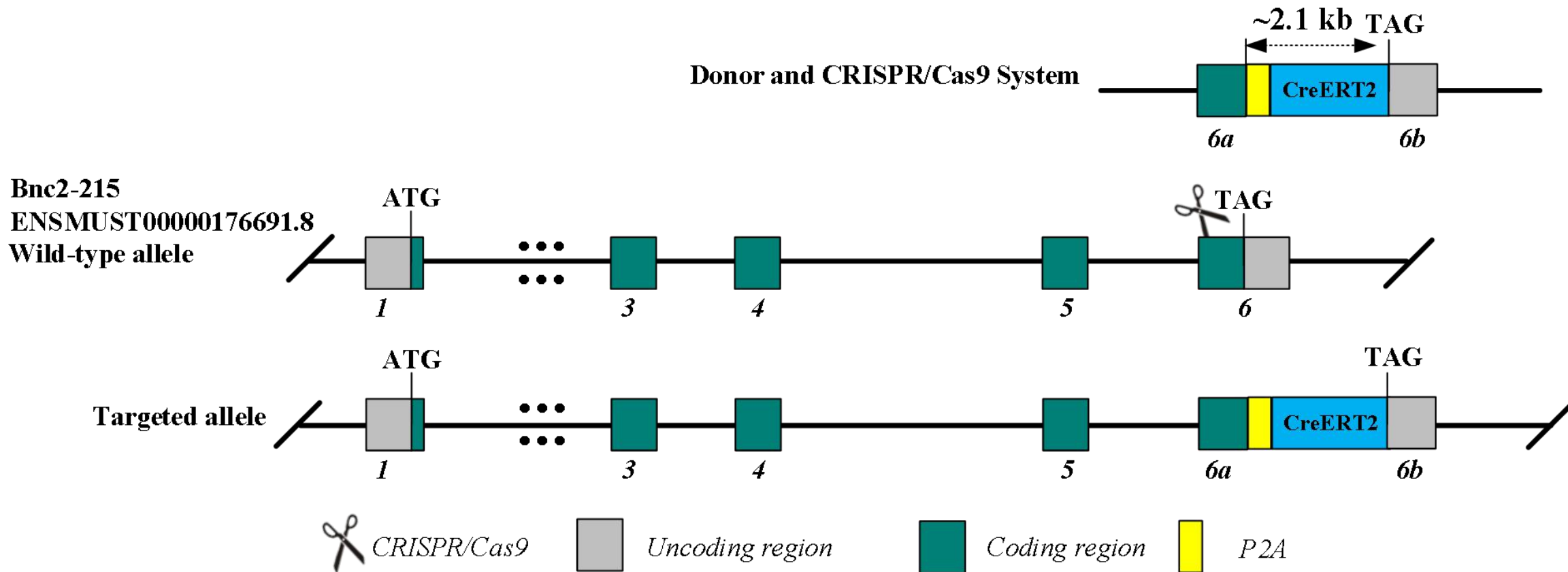
## Contents

- 一、项目名称：Bnc2-P2A-CreERT2
- 二、项目类型：Cas9-KI
- 三、遗传背景：C57BL/6JGpt
- 四、项目周期：5-8个月

# 敲入策略



此模型采用CRISPR-Cas9技术对*Bnc2*基因进行基因编辑，原理示意图如下：



- 根据ensemble网站信息，*Bnc2*基因有22个转录本，其中有1个转录本具有完整的CCDS。
- 根据*Bnc2*基因，选择转录本*Bnc2*-215 (ENSMUST00000176691.8)转录本进行制作，将*P2A-CreERT2*插入到*Bnc2*基因翻译终止位点前，理论上*CreERT2*在内源*Bnc2*基因的调控下表达。
- *Bnc2*-215转录本包含6个exons，翻译起始位点ATG位于exon 1，翻译终止位点TAG均位于exon 6，编码1032 aa。
- 本项目采用CRISPR-Cas9技术对*Bnc2*基因进行修饰。简要过程如下：体外构建载体，将CRISPR-Cas9体系和Donor载体显微注射到C57BL/6JGpt小鼠的受精卵中，获得F0代小鼠。经PCR和测序验证正确的F0代阳性小鼠与C57BL/6JGpt小鼠交配获得可稳定遗传的F1代阳性小鼠模型。

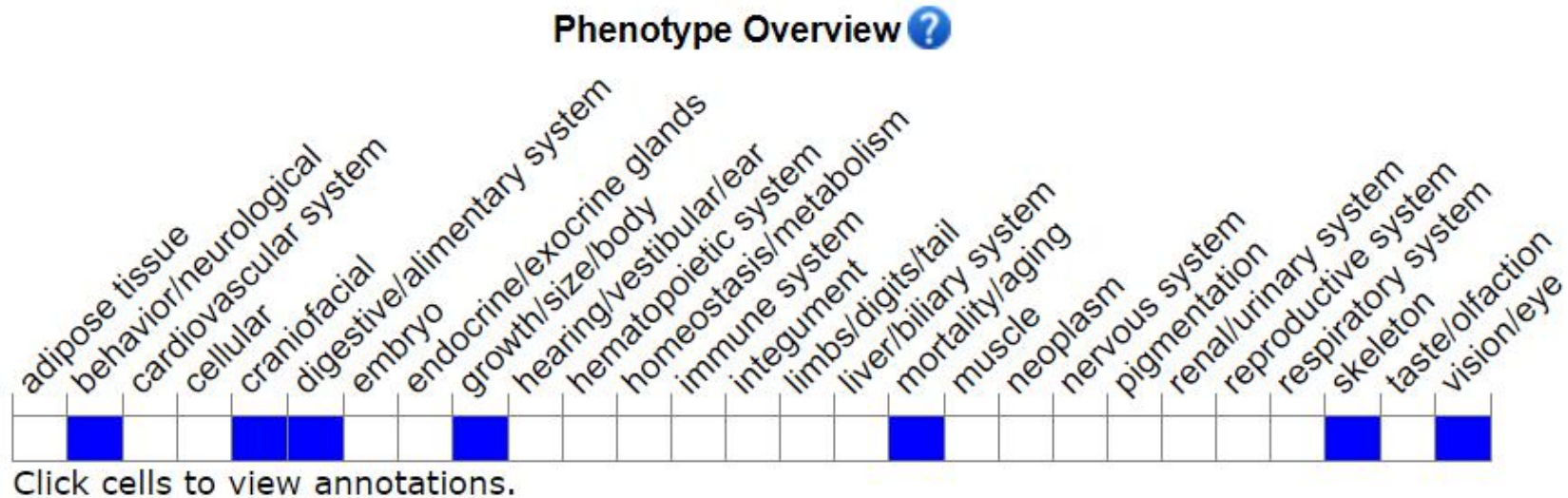
- 现有资料（MGI）显示，*Bnc2*基因敲除的纯合子小鼠出生后24h内全部死亡。
- 6号外显子将引入1~2个氨基酸突变。请确认。若课题要求不能引入同义突变，请及时反馈，我们将重新评估方案并签订相应的协议。
- 两个基因以P2A连接，两个基因共同转录和翻译，但是会剪切成两个蛋白分子，前面蛋白会带有P2A序列翻译出的多肽。
- 插入位置下游存在高度重复结构（CA），模型制作过程中存在突变。
- 编码转录本*Bnc2-204&206&207&210&211&213&216&217&218&219&220&222*的序列不完整，本策略对其影响未知。
- 本策略对非编码转录本*Bnc2-203&208&209&221*的影响未知。
- 编码转录本*Bnc2-214*的终止子位置和其它编码转录本的位置不一致，本策略对其影响未知。
- *Bnc2*基因位于4#染色体，如果将此基因插入小鼠与其他小鼠品系配繁，请避免两个基因位于同一染色体上，否则将无法得到双基因纯合阳性的小鼠后代。
- 本方案是根据现有数据库中的基因信息设计。在基因编码区和UTR之间插入外源序列，可能会影响基因表达、mRNA剪接等生物学过程，在现有技术水平下不能预测全部风险，建议在验证表达符合预期后，再进行进一步实验。

# 现有模型信息



网址链接: <https://www.informatics.jax.org/allele/summary?markerId=MGI:2443805&alleleType=Targeted>

Allele Symbol Gene; Allele Name	Chr	Synonyms	Category	Abnormal Phenotypes Reported in these Systems
<a href="#">Bnc2<sup>tm1a</sup>(KOMP)Wtsi</a> basonuclin 2; targeted mutation 1a, Wellcome Trust Sanger Institute	4		Targeted (Conditional ready, Null/knockout, Reporter)	
<a href="#">Bnc2<sup>tm1b</sup>(KOMP)Wtsi</a> basonuclin 2; targeted mutation 1b, Wellcome Trust Sanger Institute	4		Targeted (Null/knockout, Reporter)	behavior, vision/eye
<a href="#">Bnc2<sup>tm1e</sup>(KOMP)Wtsi</a> basonuclin 2; targeted mutation 1e, Wellcome Trust Sanger Institute	4		Targeted (Null/knockout, Reporter) <b>(Cell Line)</b>	



Mice homozygous for a gene trap insertion die within 24 hrs of birth and display cleft palate, an overall size reduction of the head and tongue, and abnormal craniofacial bone development due to impaired multiplication of embryonic craniofacial mesenchymal cells.

<https://www.informatics.jax.org/marker/MGI:2443805>

# 目的基因



基因名称	<i>Bnc2</i>
基因ID (NCBI)	242509
基因NCBI链接 (NCBI)	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/242509">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/242509</a>
基因Ensembl链接	<a href="http://useast.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Summary?g=ENSMUSG00000028487;r=4:84193332-84593512">http://useast.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Summary?g=ENSMUSG00000028487;r=4:84193332-84593512</a>
基因组位置	Chr 4

# 基因名称和位置 (NCBI)



## Bnc2 basonuclin 2 [ *Mus musculus* (house mouse) ]

Download Datasets

Gene ID: 242509, updated on 7-Feb-2023

### Summary

**Official Symbol** Bnc2 provided by MGI  
**Official Full Name** basonuclin 2 provided by MGI  
**Primary source** MGI:MGI:2443805  
**See related** Ensembl:ENSMUSG00000028487 AllianceGenome:MGI:2443805  
**Gene type** protein coding  
**RefSeq status** VALIDATED  
**Organism** [Mus musculus](#)  
**Lineage** Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Myomorpha; Muroidea; Muridae; Murinae; Mus; Mus  
**Also known as** 5031434M05Rik; 8430420F16Rik  
**Summary** Enables DNA binding activity. Acts upstream of or within several processes, including endochondral bone growth; roof of mouth development; and tongue development. Located in nucleus. Is expressed in several structures, including genitourinary system; jaw; nervous system; nose; and skin. Orthologous to human BNC2 (basonuclin 2). [provided by Alliance of Genome Resources, Apr 2022]  
**Expression** Biased expression in limb E14.5 (RPKM 4.5), bladder adult (RPKM 2.8) and 13 other tissues [See more](#)  
**Orthologs** [human](#) [all](#)  
**NEW** Try the new [Gene table](#)  
Try the new [Transcript table](#)

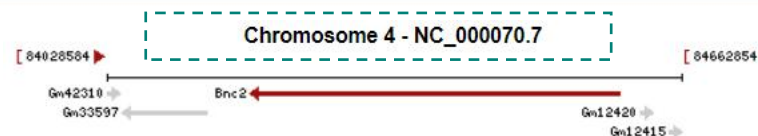
### Genomic context

Location: 4; 4 C3- C4

See Bnc2 in [Genome Data Viewer](#)

Exon count: 11

Annotation release	Status	Assembly	Chr	Location
<a href="#">109</a>	current	GRCm39 ( <a href="#">GCF_000001635.27</a> )	4	NC_000070.7 (84185041..84594132, complement)
108.20200622	previous assembly	GRCm38.p6 ( <a href="#">GCF_000001635.26</a> )	4	NC_000070.6 (84266804..84676029, complement)



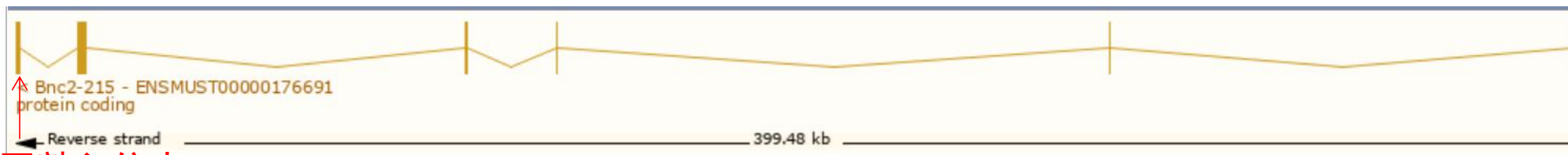


# 转录本信息 (Ensembl)

该基因有22个转录本，所有转录本信息如下图：

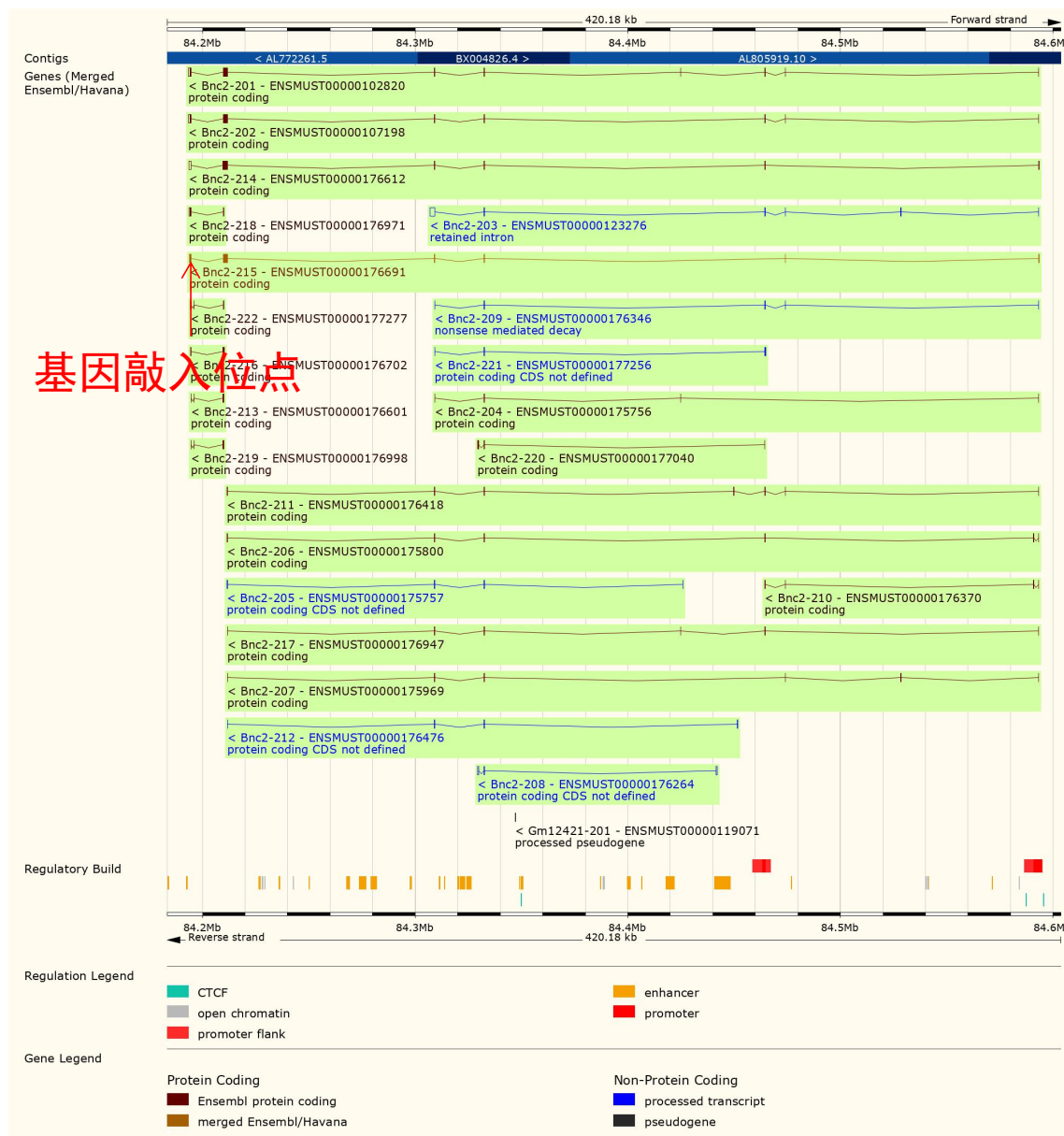
Transcript ID	Name	bp	Protein	Biotype	CCDS	UniProt Match	Flags
<a href="#">ENSMUST00000102820.9</a>	Bnc2-201	4133	<a href="#">1127aa</a>	Protein coding		<a href="#">Q8BMQ3-1</a>	Ensembl Canonical Gencode basic APPRIS ALT2 TSL:5
<a href="#">ENSMUST00000176612.8</a>	Bnc2-214	3963	<a href="#">861aa</a>	Protein coding		<a href="#">H3BLG6</a>	Gencode basic TSL:5
<a href="#">ENSMUST00000107198.9</a>	Bnc2-202	3948	<a href="#">1099aa</a>	Protein coding		<a href="#">H3BIU2</a>	Gencode basic APPRIS P4 TSL:5
<a href="#">ENSMUST00000176691.8</a>	Bnc2-215	3385	<a href="#">1032aa</a>	Protein coding	<a href="#">CCDS18301</a>	<a href="#">Q8BMQ3-2</a>	Gencode basic APPRIS ALT2 TSL:1
<a href="#">ENSMUST00000176418.8</a>	Bnc2-211	1236	<a href="#">405aa</a>	Protein coding		<a href="#">H3BKX5</a>	TSL:5 CDS 3' incomplete
<a href="#">ENSMUST00000175800.8</a>	Bnc2-206	1232	<a href="#">294aa</a>	Protein coding		<a href="#">H3BJ03</a>	TSL:5 CDS 3' incomplete
<a href="#">ENSMUST00000176971.2</a>	Bnc2-218	1127	<a href="#">239aa</a>	Protein coding		<a href="#">H3BL10</a>	TSL:5 CDS 5' incomplete
<a href="#">ENSMUST00000176947.8</a>	Bnc2-217	763	<a href="#">237aa</a>	Protein coding		<a href="#">H3BKJ2</a>	TSL:5 CDS 3' incomplete
<a href="#">ENSMUST00000176702.8</a>	Bnc2-216	723	<a href="#">241aa</a>	Protein coding		<a href="#">H3BIY6</a>	TSL:5 CDS 5' and 3' incomplete
<a href="#">ENSMUST00000175969.8</a>	Bnc2-207	636	<a href="#">181aa</a>	Protein coding		<a href="#">H3BL54</a>	TSL:5 CDS 3' incomplete
<a href="#">ENSMUST00000177040.2</a>	Bnc2-220	626	<a href="#">126aa</a>	Protein coding		<a href="#">H3BJR1</a>	TSL:5 CDS 5' incomplete
<a href="#">ENSMUST00000176370.2</a>	Bnc2-210	566	<a href="#">29aa</a>	Protein coding		<a href="#">H3BJE5</a>	TSL:5 CDS 3' incomplete
<a href="#">ENSMUST00000177277.8</a>	Bnc2-222	561	<a href="#">85aa</a>	Protein coding		<a href="#">H3BKY6</a>	TSL:5 CDS 5' incomplete
<a href="#">ENSMUST00000175756.8</a>	Bnc2-204	364	<a href="#">87aa</a>	Protein coding		<a href="#">H3BKR9</a>	TSL:5 CDS 3' incomplete
<a href="#">ENSMUST00000176601.2</a>	Bnc2-213	280	<a href="#">86aa</a>	Protein coding		<a href="#">H3BKQ4</a>	TSL:5 CDS 5' incomplete
<a href="#">ENSMUST00000176998.8</a>	Bnc2-219	276	<a href="#">82aa</a>	Protein coding		<a href="#">H3BK78</a>	TSL:5 CDS 5' incomplete
<a href="#">ENSMUST00000176346.8</a>	Bnc2-209	692	<a href="#">64aa</a>	Nonsense mediated decay		<a href="#">H3BJD5</a>	TSL:3
<a href="#">ENSMUST00000176264.2</a>	Bnc2-208	845	No protein	Protein coding CDS not defined		-	TSL:5
<a href="#">ENSMUST00000175757.8</a>	Bnc2-205	792	No protein	Protein coding CDS not defined		-	TSL:3
<a href="#">ENSMUST00000177256.8</a>	Bnc2-221	545	No protein	Protein coding CDS not defined		-	TSL:5
<a href="#">ENSMUST00000176476.8</a>	Bnc2-212	541	No protein	Protein coding CDS not defined		-	TSL:5
<a href="#">ENSMUST00000123276.8</a>	Bnc2-203	2986	No protein	Retained intron		-	TSL:2

该方案基于Bnc2-215转录本设计，该转录本编码6个exons，转录本长3385 bps，编码1032个氨基酸



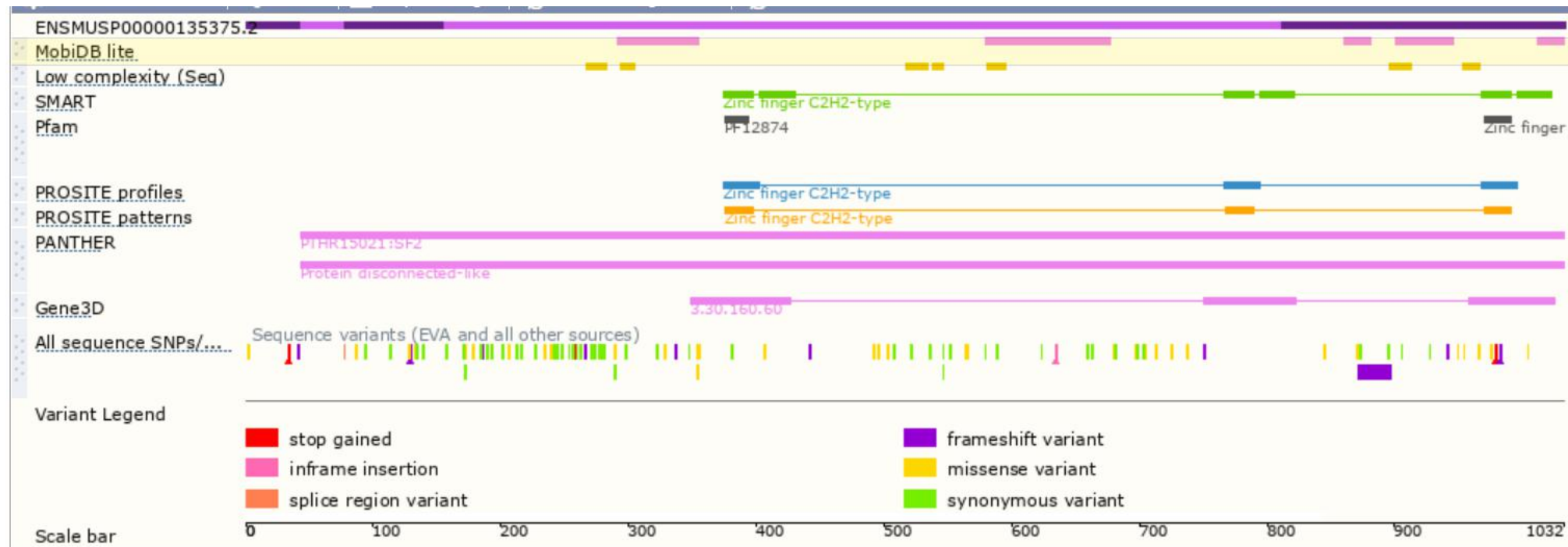
基因敲入位点

# 基因位置分布



基因敲入位点

# 蛋白结构域







Models to Defy Impossible 创新模型 无限可能

**THANKS**

400-9660-890

江苏集萃药康生物科技股份有限公司