



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103224947 A

(43) 申请公布日 2013. 07. 31

(21) 申请号 201310157216. 4

(22) 申请日 2013. 04. 28

(71) 申请人 陕西师范大学

地址 710062 陕西省西安市长安南路 199 号

(72) 发明人 夏海滨 张伟锋 刘思也

(74) 专利代理机构 西安永生专利代理有限责任
公司 61201

代理人 申忠才

(51) Int. Cl.

C12N 15/63(2006. 01)

权利要求书1页 说明书8页
序列表15页 附图2页

(54) 发明名称

一种基因打靶系统

(57) 摘要

一种基因打靶系统,由位点特异性切割核酸酶表达载体和打靶载体两部分组成,打靶载体包含 2 ~ 10 个供体 DNA 片段,每个供体 DNA 片段的 5' 端和 3' 端分别插入位点特异性切割核酸酶的识别序列,供体 DNA 由上游同源臂、下游同源臂和位于两者之间的外源 DNA 序列组成。位点特异性切割核酸酶表达载体是携带锌指核酸酶的表达载体、转录激活子样效应因子核酸酶的表达载体、RNA 介导的核酸酶 RNA:Cas9 的表达载体中的任意一种。

1. 一种基因打靶系统,由位点特异性切割核酸酶表达载体和打靶载体两部分组成,其特征在于:所述的打靶载体包含2~10个供体DNA片段,每个供体DNA片段的5'端和3'端分别插入位点特异性切割核酸酶的识别序列,供体DNA由上游同源臂、下游同源臂和位于两者之间的外源DNA序列组成;

上述的位点特异性切割核酸酶表达载体是携带锌指核酸酶的表达载体、转录激活因子样效应因子核酸酶的表达载体、RNA介导的核酸酶RNA:Cas9的表达载体中的任意一种。

2. 根据权利要求1所述的基因打靶系统,其特征在于:所述的位点特异性切割核酸酶的识别序列是基因组上位点特异性切割核酸酶结合的长度为20bp~50bp的DNA序列。

3. 根据权利要求1所述的基因打靶系统,其特征在于:所述的外源DNA序列是长度为1bp~3000bp的DNA片段。

4. 根据权利要求1所述的基因打靶系统,其特征在于:所述的上游同源臂、下游同源臂是分别与位点特异性切割核酸酶识别位点上游和下游的部分基因组序列同源的两段长度为50bp~3000bp的DNA片段。

5. 根据权利要求4所述的基因打靶系统,其特征在于:所述的部分基因组序列是距离锌指核酸酶识别位点1bp~3000bp的DNA序列。

一种基因打靶系统

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种基因打靶系统。

技术背景

[0002] 基因组的靶向修饰包括对基因组内源性基因序列的改造或者在基因组的特定位置插入外源性基因片段。这项技术为研究特定基因功能提供了有力工具,此外研究人员可以利用该技术建立特定的动物模型来进行基因功能研究或新药物的研发。传统的基因靶向修饰技术是依赖于自然状态下的同源重组(Homologous recombination, HR),效率非常低,大约为 10^{-6} ,因而大大限制了该技术的应用。近几年来锌指核酸酶(Zinc finger nucleases, ZFN)、转录激活子样效应因子核酸酶(Transcription activator-like effector nucleases, TALEN)、RNA 介导的 Cas9 核酸酶(RNA:Cas9)等位点特异性切割核酸酶技术的出现给基因组靶向修饰带来了希望。

[0003] ZFN、TALEN、RNA:Cas9 等位点特异性切割核酸酶技术是近年来发展起来的一项新的技术,通过人工设计的 ZFN、TALEN 或 sgRNA:Cas9 在基因组 DNA 的特定位置切割产生双链断裂(DSB),继而通过细胞内源性的修复机制对断裂部位的基因进行修饰。同自然状态下的同源重组技术相比较,该技术可以使基因组靶向修饰的效率提高了 $10^3 \sim 10^5$ 倍。位点特异性切割核酸酶介导的基因定点修饰已经在多种体外培养的细胞中获得成功,包括人的胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES)和诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS)、植物、果蝇、爪蟾、线虫、斑马鱼、小鼠、大鼠等的细胞,显示出该技术的广泛适用性,这将有力地推动基因靶向修饰技术的应用研究。

[0004] 位点特异性切割核酸酶介导的基因靶向修饰需要将位点特异性切割核酸酶和供体 DNA 同时导入到靶细胞中,其中对供体 DNA 的需求量要高于位点特异性切割核酸酶,多数情况下将位点特异性切割核酸酶和供体 DNA 导入靶细胞的比例为 1:5 ~ 1:10,如何有效提高将供体 DNA 导入到靶细胞中的效率成为影响基因靶向修饰效率的重要因素,尤其是对于那些转染效率低的细胞或者在体内基因靶向修饰中。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题在于克服上述供体 DNA 导入靶细胞效率的不足,提供一种能产生多个供体 DNA 片段、效率高的基因打靶系统。

[0006] 解决上述技术问题所采用的技术方案是:由位点特异性切割核酸酶表达载体和打靶载体两部分组成。本发明的打靶载体包含 2 ~ 10 个供体 DNA 片段,每个供体 DNA 片段的 5' 端和 3' 端分别插入位点特异性切割核酸酶的识别序列,供体 DNA 由上游同源臂、下游同源臂和位于两者之间的外源 DNA 序列组成。上述的位点特异性切割核酸酶表达载体是携带锌指核酸酶的表达载体、转录激活子样效应因子核酸酶的表达载体、RNA 介导的核酸酶 RNA:Cas9 的表达载体中的任意一种。

[0007] 本发明的位点特异性切割核酸酶的识别序列是基因组上位点特异性切割核酸酶

结合的长度为 20bp ~ 50bp 的 DNA 序列。

[0008] 本发明的外源 DNA 序列是长度为 1bp ~ 3000bp 的 DNA 片段。

[0009] 本发明的上游同源臂、下游同源臂是分别与位点特异性切割核酸酶识别位点上游和下游的部分基因组序列同源的两段长度为 50bp ~ 3000bp 的 DNA 片段。

[0010] 本发明的部分基因组序列是距离锌指核酸酶识别位点 1bp ~ 3000bp 的 DNA 序列。

[0011] 本发明采用由位点特异性切割核酸酶表达载体和携带多个供体 DNA 片段的打靶载体组成的基因打靶系统,在供体 DNA 片段之间引入了位点特异性切割核酸酶的识别序列,通过位点特异性切割核酸酶在细胞内对打靶载体的切割产生多个供体 DNA 片段,有效地提高供体 DNA 进入靶细胞的水平,从而提高基因打靶的效率。

附图说明

[0012] 图 1. 是 AAVS1ZFN 表达载体结构图。

[0013] 图 2 是 AAVS11000F 供体 DNA 结构图。

[0014] 图 3. 是携带多个供体 DNA 片段的打靶载体结构图。

[0015] 图 4 是 pE1/EGFP/4×AAVS1-TSF-Donor 靶向修饰效率检测。

[0016] 图 5 是 CCR5ZFN 表达载体结构图。

[0017] 图 6 是携带 SNCA ZFN 表达元件的腺病毒结构图。

[0018] 图 7 是携带靶向 SNCA 位点的供体 DNA 的腺病毒结构图。

具体实施方式

[0019] 下面结合附图和实施例对本发明进一步详细说明,但本发明不限于这些实施例。

[0020] 实施例 1

[0021] 以靶向 AAVS1 位点的基因打靶系统为例,其组成如下:

[0022] 1、表达 AAVS1ZFN 的锌指核酸酶表达载体

[0023] 在质粒载体 pshuttle(购买自安捷伦公司)的多克隆位点依次引入了真核启动子 CMV、靶向 AAVS1 位点的锌指核酸酶 AAVS1ZFN、转录终止信号 TKpA,其中 AAVS1ZFN 包含左侧锌指核酸酶 AAVS1ZFNL 和右侧锌指核酸酶 AAVS1ZFNR 两部分,左侧锌指核酸酶 AAVS1ZFNL 与右侧锌指核酸酶 AAVS1ZFNR 之间由自剪切多肽 T2A 相连(即 AAVS1ZFNL-T2A-AAVS1ZFNR),表达 AAVS1ZFN 的锌指核酸酶表达载体的结构见图 1。本实施例的靶向 AAVS1 位点的锌指核酸酶 AAVS1ZFN 也可以用靶向 AAVS1 位点的转录激活因子样效应因子核酸酶(AAVS1TALEN)、RNA 介导的 Cas9 核酸酶(AAVS1gRNA-Cas9)中的任意一个替换。

[0024] AAVS1ZFNL-T2A-AAVS1ZFNR 的序列见序列表 <210>1 到 ttttga2166。

[0025] 2、靶向 AAVS1 位点的打靶载体

[0026] 在 pshuttle 的多克隆位点携带有串联重复的 4 个供体 DNA 片段 AAVS1-1000F,每个供体 DNA 片段的 5' 端和 3' 端均插入了 AAVS1ZFN 的识别序列 AAVS1-TSF,供体 DNA 片段由上游同源臂 AAVS1UP、下游同源臂 AAVS1DOWN 和位于两者之间的外源 DNA 序列(Cla I 酶切位点,长度为 6bp)组成,供体 DNA 片段结构见图 2,上游同源臂是基因组上距离 AAVS1-TSF1bp 长度为 500bp 的 DNA 序列,下游同源臂是基因组上距离 AAVS1TSF3bp 长度为 500bp 的 DNA 序列,该靶向 AAVS1 位点的打靶载体命名为 4×AAVS1-TSF-1000F,打靶载体结

构见图 3。

[0027] AAVS1-TSF 的序列如下：

[0028] accccacagtggggccactaggacaggat

[0029] AAVS1-1000F 的序列见序列列表 <210>3 到 cgtcctggca gggctg 1006。

[0030] 4×AAVS1-TSF-1000F 的序列见序列列表 <210>4 到 agatct 4206。

[0031] 上述靶向 AAVS1 位点的基因打靶系统的构建方法步骤如下：

[0032] 1、构建表达 AAVS1ZFN 的锌指核酸酶表达载体

[0033] 在上海生工合成引物，序列如下：

[0034] P1:KBL for CGGATCCATCGATACTAGTGC GGCCGCGTCGACA；

[0035] P2:KBL reverse

[0036] GATCTGTCGACGGCCGCACTAGTATCGATGGATCCGGTAC；

[0037] 将 KBL for 和 KBL reverse 在室温退火获得 KBL 片段 (Kpn I -BamH I -Cla I -Spe I -Not I -Sal I -Bgl II)。将 KBL 片段与经过 Kpn I 和 Bgl II 酶切处理的 pshuttle 载体用 Solution I 试剂盒 (Takara 公司购买) 连接，将连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α 细胞，并涂布于卡那抗性的培养基上，经过质粒提取、酶切鉴定获得阳性克隆，命名为 pE1shuttle。

[0038] 在上海生工合成 CMV 启动子和转录终止信号 TKpA，

[0039] CMV 序列见序列列表 <210>7 到 tactagt547。

[0040] TKpA 序列见序列列表 <210>8 到 gcggccgc428。

[0041] 用 BamH I 和 Spe I 酶切 CMV 片段，用 Spe I 和 Not I 酶切 TKpA 片段，通过琼脂糖凝胶电泳回收 CMV 和 TKpA 片段，与经过 BamH I 和 Not I 酶切处理的 pE1shuttle 载体用 Solution I 试剂盒 (Takara 公司购买) 连接，连接条件如下：100ng/ μ l pE1shuttle 载体 0.5 μ l, 100ng/ μ l CMV 片段 2 μ l, 100ng/ μ l TkpA 片段 2 μ l, Solution I 5 μ l, 用水补至 10 μ l, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。经过质粒提取，酶切鉴定获得阳性克隆命名为 pE1/CMV-TKpA。

[0042] 在上海生工合成引物，序列如下：

[0043] P3:EHL for AATTgATCGATACTAGTt；

[0044] P4:EHL reverse AGCTaACTAGTATCGATc；

[0045] 将 EHL for 和 EHL reverse 在室温退火获得 EHL 片段 (EcoR I M-Cla I -Spe I -Hind III M)。将 EHL 片段与经过 EcoR I 和 Hind III 酶切处理的 pUC19 载体用 Solution I 试剂盒 (Takara 公司购买) 连接，连接产物经过转化、质粒提取、酶切鉴定获得阳性克隆，命名为 pUC19/EHL。

[0046] 在上海生工合成锌指核酸酶基础结构，即 NLS-Flag-Fok I DD-T2A-NLS-HA-Fok I RR，并在序列的两端引入 Cla I 和 Spe I 位点，在 Flag 和 Fok I DD 之间引入 Hind III 和 Xho I 位点用于插入左侧的锌指蛋白 AAVS1ZFL，在 HA 和 Fok I RR 之间引入 Kpn I 和 BamH I 位点用于插入右侧的锌指蛋白 AAVS1ZFR。锌指核酸酶基础结构的序列见序列列表 <210>11 到 aacttttgaa ctagt1525。

[0047] 将合成的锌指核酸酶基础结构用 Cla I 和 Spe I 酶切处理后与经过同样酶切处理的 pUC19/EHL 用 Solution I 试剂盒 (Takara 公司购买) 连接，将连接产物转化感受态的 DH5 α 细胞，并涂布于含有 100 μ g/ml 的氨苄青霉素的 LB 平板中。挑取菌落接种到含有

100 μ g/ml 的氨苄青霉素的 LB 培养液中, 14 ~ 16 小时后, 经碱性裂解法提取质粒 DNA, 通过酶切鉴定阳性克隆。将所获得阳性克隆命名为 pUC19/EHL/Fok I DD-T2A-Fok I RR。

[0048] 根据已经报道的靶向 AAVS1 位点的锌指蛋白的序列, 在上海生工合成靶向 AAVS1 位点的一对锌指蛋白基因, 分别命名为 AAVS1ZFL 和 AAVS1ZFR。并且在 AAVS1ZFL 和 AAVS1ZFR 的两端分别引入了 Hind III -Sal I 和 Kpn I -Bgl II 酶切位点。序列如下:

[0049] AAVS1ZFL 的序列见序列表 <210>12 到 attcatgtcgcgaca 353。

[0050] AAVS1ZFR 的序列见序列表 <210>13 到 attcatagatcta 353。

[0051] 将 AAVS1ZFL 用 Hind III 和 Sal I 酶切, 与经过 Hind III 和 Xho I 酶切处理的 pUC19/EHL/Fok I DD-T2A-Fok I RR 载体用 Solution I 试剂盒(Takara 公司购买)连接, 经过转化、提取质粒、酶切鉴定, 获得阳性克隆命名为 pUC19/EHL/AAVS1ZFL-Fok I DD-T2A-Fok I RR。将 AAVS1ZFR 用 Kpn I 和 Bgl II 酶切处理, 与经过 Kpn I 和 BamH I 酶切处理的 pUC19/EHL/AAVS1ZFL-Fok I DD-T2A-Fok I RR 载体用 Solution I 试剂盒(Takara 公司购买)连接, 经过转化、提取质粒、酶切鉴定, 获得阳性克隆命名为 pUC19/EHL/AAVS1ZFN(即 pUC19/EHL/AAVS1ZFL-Fok I DD-T2A-AAVS1ZFR-Fok I RR)。靶向 AAVS1 的一对锌指核酸酶基因 AAVS1ZFN(AAVS1ZFL-Fok I DD)和 AAVS1ZFN(AAVS1ZFR-Fok I RR)之间通过自剪切多肽 T2A 相连。

[0052] 将 pUC19/EHL/AAVS1ZFN 用 Cla I 和 Spe I 酶切并通过琼脂糖凝胶电泳回收 AAVS1ZFN 片段, 与经过同样酶切处理的 pE1/CMV-TKpA 载体用 Solution I 试剂盒(Takara 公司购买)连接, 经过转化、质粒提取及酶切鉴定获得阳性克隆命名为 pE1/AAVS1ZFN (如图 1)。至此获得表达 AAVS1ZFN 的锌指核酸酶表达载体。

[0053] 2、构建携带多个供体 DNA 片段的打靶载体

[0054] 依据 AAVS1 位点的基因组序列设计引物用于扩增上游同源臂和下游同源臂, 引物序列如下:

[0055] P5:AAVS1UP Sal I for AGTCGACcttcactcgcctgggttcc

[0056] P6:AAVS1UP Cla I reverse AATCGATggaggggacagataaaaag

[0057] P7:AAVS1DOWN Cla I for AATCGATgtgacagaaaagccccatc

[0058] P8:AAVS1DOWN Bgl II reverse AAGATCTTTCTCGAGcagccctgccaggacggg

[0059] P9:AAVS1TSF for

[0060] TCGACcaccacacagtggggccactaggacaggattCTCGAGGGATCCA

[0061] P10:AAVS1TSF reverse

[0062] GATCTGGATCCCTCGAGaatcctgtccctagtggccccactgtggggtgG

[0063] P11:EGFP Cla I for AATCGATATGGTGAGCAAGGGCGAGG

[0064] P12:EGFP Spe I reverse AACTAGTTTACTTGTACAGCTCGTCCAT

[0065] 以 pEGFP-N1 (Clontech 公司购买)为模板, P11/P12 为引物, 通过聚合酶链式反应扩增 EGFP 基因, 聚合酶链式反应的条件按照 PrimeSTAR[®] HS DNA 聚合酶试剂盒的说明书进行。将 EGFP 基因克隆入 pGEM-T Easy 载体, 经过酶切鉴定及测序鉴定获得阳性克隆命名为 pGEMT/EGFP。将 pGEMT/EGFP 用 Cla I 和 Spe I 酶切, 与经过同样酶切处理的 pE1/CMV-TKpA 用 Solution I 试剂盒(Takara 公司购买)连接获得 pE1/EGFP。

[0066] 取 P9 (20 μ M) 和 P10 (20 μ M) 各 15 μ l, 于室温退火获得 AAVS1TSF 片段, 与经过

SaI I 和 Bgl II 酶切处理的 pE1/EGFP 载体相连获得 pE1/EGFP/AAVS1-TSF。

[0067] 采用飞捷生物试剂公司的微量基因组 DNA 极速抽提试剂盒从 HEK293 细胞中提取人基因组 DNA, 并以此基因组 DNA 为模板, 用引物 P5/P6 通过聚合酶链式反应获得上游同源臂 AAVS1UP。聚合酶链式反应的条件按照 PrimeSTAR® HS DNA 聚合酶试剂盒的说明书进行。用同样的方法以 P7 和 P8 为引物, 可获得下游同源臂 AAVS1DOWN。将 AAVS1UP 和 AAVS1DOWN 分别与 pGEM-T Easy 载体用 Solution I 试剂盒 (Takara 公司购买) 连接。将连接产物转化、提取质粒、酶切鉴定并测序获得阳性克隆, 分别命名为 pGEMT/AAVS1UP 和 pGEMT/AAVS1DOWN。

[0068] 将 pGEMT/AAVS1UP 用 SaI I 和 Cla I 酶切处理, pGEMT/AAVS1DOWN 用 Cla I 和 Bgl II 处理, 通过琼脂糖凝胶电泳分别回收 AAVS1UP 片段和 AAVS1DOWN 片段, 与经过 SaI I 和 Bgl II 酶切处理的 pE1/EGFP 载体用 Solution I 试剂盒 (Takara 公司购买) 连接。经过转化、提取质粒、酶切鉴定获得阳性克隆, 命名为 pE1/EGFP/AAVS11000F。将 pE1/EGFP/AAVS11000F 用 SaI I 和 Bgl II 酶切并回收 AAVS11000F 片段, 与经过 Xho I 和 Bgl II 酶切处理的 pE1/EGFP/AAVS1-TSF 载体相连, 经过转化、提取质粒、酶切鉴定获得阳性克隆, 命名为 pE1/EGFP/AAVS1-TSF-1000F。用 SaI I 和 Bgl II 酶切 pE1/EGFP/AAVS1-TSF-1000F, 通过琼脂糖凝胶电泳回收 AAVS1-TSF-1000F 片段, 与经过 Xho I 和 Bgl II 酶切处理的 pE1/EGFP/AAVS1-TSF-1000F 载体用 Solution I 试剂盒 (Takara 公司购买) 连接, 获得 pE1/EGFP/2×AAVS1-TSF-1000F 至此获得了携带两个供体 DNA 片段的打靶载体。将 AAVS1-TSF-1000F 片段用 Solution I 试剂盒 (Takara 公司购买) 连接到 Xho I 和 Bgl II 酶切处理的 pE1/EGFP/2×AAVS1-TSF-1000F 载体可获得 pE1/EGFP/3×AAVS1-TSF-1000F, 以此方法可获得 pE1/EGFP/4×AAVS1-TSF-1000F、pE1/EGFP/5×AAVS1-TSF-1000F、pE1/EGFP/6×AAVS1-TSF-1000F、pE1/EGFP/7×AAVS1-TSF-1000F、pE1/EGFP/8×AAVS1-TSF-1000F、pE1/EGFP/9×AAVS1-TSF-1000F、pE1/EGFP/10×AAVS1-TSF-1000F。将 AAVS1-1000F 片段与经过 Xho I 和 Bgl II 酶切处理的 pE1/EGFP/AAVS1-1000F 载体用 Solution I 试剂盒 (Takara 公司购买) 连接, 获得对照载体 pE1/EGFP/2×AAVS1-1000F, 同样的方法可以获得 pE1/EGFP/3×AAVS1-1000F、pE1/EGFP/4×AAVS1-1000F、pE1/EGFP/5×AAVS1-1000F、pE1/EGFP/6×AAVS1-1000F、pE1/EGFP/7×AAVS1-1000F、pE1/EGFP/8×AAVS1-1000F、pE1/EGFP/9×AAVS1-1000F、pE1/EGFP/10×AAVS1-1000F。

[0069] 3、靶向 AAVS1 位点的基因打靶系统对靶位点的修饰效率检测

[0070] 以 1×10^6 的密度将 HEK293 细胞接种于 A、B、C 三个 60mm 培养皿。次日, 通过电转染将质粒导入细胞。电转染条件如下: 120V, 950 μ F。转染质粒为: A 盘 5 μ g pE1/AAVS1ZFN+20 μ g pE1/EGFP/AAVS1-1000F; B 盘 5 μ g pE1/AAVS1ZFN+20 μ g pE1/EGFP/AAVS1-TSF-1000F; C 盘 5 μ g pE1/AAVS1ZFN+20 μ g pE1/EGFP/4×AAVS1-TSF-1000F。转染后的第五天收集细胞, 用血液 / 细胞 / 组织基因组 DNA 提取试剂盒 (天根生化科技有限公司, DP304-02) 提取基因组 DNA, 通过聚合酶链式反应扩增靶位点附近 1kb 的 DNA 片段, 聚合酶链式反应的条件按照 PrimeSTAR® HS DNA 聚合酶试剂盒的说明书进行。引物序列如下:

[0071] P13: AAVS1detection primer for tgggtcctctccgggcatctct

[0072] P14: AAVS1detection primer back gggagttttccacacggacac

[0073] 取 500ng 的该聚合酶链式反应的产物, 用 20U 的 Cla I 酶处理 3 小时后, 跑 DNA 凝

胶电泳检测,用 DNA 凝胶成像系统拍照。结果如图 4。

[0074] 由图 4 可见,转染 pE1/EGFP/AAVS1-TSF-1000F 的 HEK293 细胞 AAVS1 位点靶向修饰效率远高于对照组 pE1/EGFP/AAVS11000F。而转染 pE1/EGFP/4×AAVS1-TSF-1000F 的 HEK293 细胞 AAVS1 位点的靶向修饰效率相比转染 pE1/EGFP/AAVS1-TSF-1000F 组进一步提高约 3 倍。

[0075] 实施例 2

[0076] 以靶向 CCR5 位点的基因打靶系统为例,其组成如下:

[0077] (1) 表达 CCR5ZFN 的锌指核酸酶表达载体

[0078] 该表达 CCR5ZFN 的锌指核酸酶表达载体由两个载体组成,其中一个携带左侧锌指核酸酶 CCR5ZFN_L,另一个携带右侧锌指核酸酶 CCR5ZFN_R。该载体以质粒载体 pshuttle 为基础,在 pshuttle 的多克隆位点依次引入了真核启动子 CMV、靶向 CCR5 位点的左侧锌指核酸酶 CCR5ZFN_L 或者右侧锌指核酸酶 CCR5ZFN_R、转录终止信号 TKpA,构成表达 CCR5ZFN 的锌指核酸酶表达载体。该锌指核酸酶表达载体的结构见图 5。

[0079] CCR5ZFN_L 的序列见序列表 <210>24 到 gaaatcaact tctag 1035。

[0080] CCR5ZFN_R 的序列见序列表 <210>25 到 ataaactttt ga 1062。

[0081] (2) 靶向 CCR5 位点的打靶载体

[0082] 在 pshuttle 的多克隆位点携带有串联重复的 10 个供体 DNA 片段 CCR5-100F,每个供体 DNA 片段的 5' 端和 3' 端均插入了 CCR5ZFN 的识别序列 CCR5-TSF,供体 DNA 片段由上游同源臂 CCR5UP、下游同源臂 CCR5DOWN 和位于两者之间的外源 DNA 序列(一个碱基 G,造成移码突变)组成,上游同源臂是基因组上距离 CCR5-TSF1bp 长度为 50bp 的 DNA 序列,下游同源臂是基因组上距离 CCR5-TSF2bp 长度为 50bp 的 DNA 序列。该靶向 CCR5 位点的打靶载体命名为 10×CCR5-TSF-100F。

[0083] CCR5-TSF 的序列如下:

[0084] Ggtcaccctcctcctgataaactgcaaaagg

[0085] CCR5-100F 的序列如下:

[0086] cctccgctctactcactgggtgttcatctttggttttgtgggcaacatgctGtgaagagcatgactgacatctacc tgctcaacctggcca tctctgacctg

[0087] 10×CCR5-TSF-100F 的序列见序列表 <210>28 到 ctcgagtttag atct1454。

[0088] 上述靶向 CCR5 位点的基因打靶系统的构建方法步骤如下:

[0089] 1、携带 CCR5ZFN 的锌指核酸酶表达载体的构建

[0090] 在上海生工合成左侧锌指核酸酶基础骨架,序列见序列表 <210>29 到 gt 722。

[0091] 合成右侧锌指核酸酶基础骨架,序列见序列表 <210>30 到 ttttgaacta gt 752。

[0092] 将合成的左侧锌指核酸酶基础结构和右侧锌指核酸酶基础结构分别用 Cla I 和 Spe I 酶切处理后,分别与经过同样酶切处理的 pUC19/EHL 用 Solution I 试剂盒(Takara 公司购买)连接,将连接产物转化感受态的 DH5 α 细胞,并涂布于含有 100 μg/ml 的氨苄青霉素的 LB 平板中。挑取菌落接种到含有 100 μg/ml 的氨苄青霉素的 LB 培养液中,14 ~ 16 小时后,经碱性裂解法提取质粒 DNA,通过酶切鉴定阳性克隆。将所获得阳性克隆分别命名为 pUC19/EHL/Fok I DD、pUC19/EHL/Fok I RR。

[0093] 根据已经报道的靶向 CCR5 位点的锌指蛋白的序列,在上海生工合成靶向 CCR5 位

点的一对锌指蛋白基因,分别命名为 CCR5ZFL 和 CCR5ZFR。并且在 CCR5ZFL 和 CCR5ZFR 的两端分别引入了 Hind III -Sal I 和 Kpn I -Bgl II 酶切位点。序列如下:

[0094] CCR5ZFL 的序列见序列列表 <210>31 到 attcatgtcg aca 353。

[0095] CCR5ZFR 的序列见序列列表 <210>32 到 caccaaaatt catagatcta 350。

[0096] 将 CCR5ZFL 用 Hind III 和 Sal I 酶切,与经过 Hind III 和 Xho I 酶切处理的 pUC19/EHL/Fok I DD 载体用 Solution I 试剂盒(Takara 公司购买)连接,经过转化、提取质粒、酶切鉴定,获得阳性克隆命名为 pUC19/EHL/CCR5ZFNL。将 CCR5ZFR 用 Kpn I 和 Bgl II 酶切处理,与经过 Kpn I 和 BamH I 酶切处理的 pUC19/EHL/Fok I RR 载体用 Solution I 试剂盒(Takara 公司购买)连接,经过转化、提取质粒、酶切鉴定,获得阳性克隆命名为 pUC19/EHL/CCR5ZFNR。至此获得携带 CCR5ZFNL 和 CCR5ZFNR 的锌指核酸酶表达载体。

[0097] 其它步骤与实施例 1 相同。

[0098] 实施例 3

[0099] 以靶向 AAVS1 位点的基因打靶系统为例,其组成如下:

[0100] 本实施例的(2)靶向 AAVS1 位点的打靶载体由以下结构组成,

[0101] 在 pshuttle 的多克隆位点携带有串联重复的 2 个供体 DNA 片段 AAVS1-2000F,每个供体 DNA 片段的 5' 端和 3' 端分别插入了 AAVS1ZFN 的识别序列 AAVS1-TSF,供体 DNA 片段由上游同源臂 AAVS1UP、下游同源臂 AAVS1DOWN 和位于两者之间的外源 DNA 序列(CMV-eGFP-T2A-luciferase-SV40pA,3000bp 片段)组成,上游同源臂是基因组上距 AAVS1-TSF3000bp 的长度为 1000bp 的 DNA 序列,下游同源臂是基因组上距离 AAVS1-TSF100bp 的长度为 1000bp 的 DNA 序列。

[0102] AAVS1-2000F 的序列见序列列表 <210>33 到 gctggggttg agtgg 5385。

[0103] 其它结构与实施例 1 相同。

[0104] 实施例 4

[0105] 以靶向 SNCA 位点的基因打靶系统为例,其组成如下:

[0106] (1) 表达 AAVS1ZFN 的锌指核酸酶表达载体

[0107] 在腺病毒载体 pAdEasy-1 的 E1 区携带有锌指核酸酶表达原件 CMV-SNCA ZFNL-F2A-SNCA ZFNR-SV40pA,由 CMV 启动子同时表达左侧锌指核酸酶 SNCA ZFNL 和右侧锌指核酸酶 SNCA ZFNR,左侧锌指核酸酶 SNCA ZFNL 与右侧锌指核酸酶 SNCA ZFNR 之间通过自剪切多肽 F2A 相连。表达 SNCA ZFN 的锌指核酸酶表达载体的结构见图 6。本实施例的腺病毒载体也可以用非整合型慢病毒载体、腺相关病毒载体、杆状病毒载体中的任意一种替换。

[0108] SNCA ZFNL-F2A-SNCA ZFNR 的序列见序列列表 <210>34 到 ataaactttt ga 2472。

[0109] (2) 靶向 SNCA 位点的打靶载体

[0110] 在腺病毒载体 pAdEasy-1 的 E1 区携带有串联重复的 2 个供体 DNA 片段 SNCA-3500F,每个供体 DNA 片段的 5' 端和 3' 端均插入了 SNCA ZFN 的识别序列 SNCA-TSF,供体 DNA 片段由上游同源臂 SNCA UP、下游同源臂 SNCA DOWN 和位于两者之间的外源 DNA 序列(1oxp 序列)组成,上游同源臂是基因组上距 SNCA-TSF1bp 的长度为 3000bp 的 DNA 序列,下游同源臂是基因组上距离 SNCA-TSF1bp 的长度为 500bp 的 DNA 序列,靶向 SNCA 位点的打靶载体的结构见图 7。本实施例的腺病毒载体也可以用非整合型慢病毒载体、腺相关病毒载体、杆状病毒载体中的任意一种替换。

[0111] SNCA-TSF 的序列如下：

[0112] GGAGTGGTGCATGGTGTGGCAACAGGTAAGCTCCATTGTGC

[0113] SNCA-3500F 的序列见序列表 <210>36 到 attttaggct ggc 3534。

[0001]

核 苷 酸 或 氨 基 酸 序 列 表

<110> 陕西师范大学
 <120> 一种基因打靶系统
 <160> 35

<210> 1
 <211> 2166
 <212> DNA
 <213> 人工合成
 <220>
 <221> CDS

<400> 1

```

atggcaccaa agaaaaagcg gaaggtagat tacaaagatc atgatggcga ttacaaggac      60
cacgatatcg actacaaaga tgacgatgat aagaagetta tggccgagag acccttccag      120
tgcaggatct gcatgcgga ctttagctac aactggcacc tgcagagaca tattaggacc      180
cacaccggcg aaaagccctt tgcttgcgac atttgcggac ggaatttoge caggagcgac      240
cacctgacca cccacacaaa gatccataca ggaagccaga agccatttca atgtagaatt      300
tgtatgagga atttctccca caactacgcc agggactgcc atatccggac acacacaggg      360
gagaaaccaa tcgectgtga tatctgtggc agaaagtgtg ccagaaacag caccagaatc      420
ggccacacca aaattcatgt cgagcagctg gtfaaatccg agttggaaga gaaaaagtct      480
gagctcgcgc ataagttgaa atacgtgcct cagcagatata tgaactgat cgagatcgcc      540
agaaactcaa cccaagacag gattttggaa atgaaagtga tggagtctct tatgaaggtc      600
tatggctata ggggaaagca cctcggcggg agcaggaagc ccgacggcgc cattataca      660
gtcgggtctc caatcgacta tggggtcact gtgacacta agccctatc cgggggttac      720
aacctcccaa tagggcagcg tgacgagatg caggactacg tggaggagaa ccaacaagg      780
aacaagcata taaacctaa cgagtgggtg aaagtatacc ctagttctgt tactgagttc      840
aagtttctct tcgtgagcgg acaactcaaa ggaaattaca aagctcaact gacaagactg      900
aatcatatta ctaactgtaa tggtgccgtc ctgtcagtgg aggaactgct gattggcggg      960
gagatgatca aggcaggcac ccttactctc gaagaagtgc ggcgaaagtt taataacggt      1020
gaaatcaact tctagtctag agaggcaga ggaagfctc taacatgcgg tgactggag      1080
gagaatcccg gccctgaatt catggcggcc aagaagaaac gaaaggtcta tcttacgat      1140
gtgccagact acgcccggta tccatatgat gtccctgact atgccggcag ctatccctat      1200
gacgtgcccg attatgcagc tcacggtacc atggccgaga gaccttcca gtgcaggatc      1260
tgcattcgga actttagcca gaccagcaac ctggccagac atattaggac ccacaccggc      1320
gaaaagccct ttgcttgcga catttgcgga cggaaattcg ccagaaccga ctacctggtg      1380
gaccacacaa agatccatac aggaagccag aagccatttc aatgtagaat ttgtatgagg      1440
aatttctct acaacacca cctgaccaga catatccgga cacacacagg ggagaaacca      1500
ttcgcctgtg atatctgtgg cagaaagttt gccagggtt acaacctggc cggccacacc      1560
aaaattcata gatccagtt ggtgaaatcc gactggagg agaaaaagtc agagctgcgc      1620
cacaaactca agtacgtgcc acaegaatac attgagctga tcgagatcgc caggaactcc      1680
acgcaggaca gaatcctgga gatgaagta atggaatttt tcatgaaggt gtacggctac      1740
agaggeaagc atctgggagg gtccecgcaag cctgatggag caatctacac cgtcgggaagc      1800
ccatagatt acggggtaat cgtcgatacc aaagcatata gtggcggata caacctgcca      1860
atcgccaag cccgggaaat gcagcgatac gtggaagaaa accagactag gaacaaacac      1920
atfaacccaa acgaatggtg gaaagtctat cctagctctg tgaccgagtt caagtttctc      1980
tttgtttccg gccatttcaa ggggaattac aaggetcage tgacaaggct gaatcatatt      2040
actaattgta acggggcctt tctctcagtg gaagagctgc tgattggcgg agagatgatt      2100
aaagccggca ccttaccctt ggaagagggt cggcggaaat tcacaatgg cgagataaac      2160
ttttga

```

<210> 2
 <211> 30

[0002]

<212> DNA
 <213> 人工合成
 <220>
 <221> misc_feature

<400> 2

accccacagt ggggccacta gggacaggat 30

<210> 3
 <211> 1006
 <212> DNA
 <213> 人工合成
 <220>
 <221> misc_feature

<400> 3

```

cittcaetge tgggttccct ttctctctc cttctgggce etgtgccate totcgtttct 60
taggatggcc ttctccgacg gatgtctccc ttgctgccg cctccccttc ttgtaggcct 120
gcacatcac cgtttttctg gacaacccca aagtaccocg tctccctgge tttagccacc 180
tctccatcct cttgctttct ttgctggac accccgttct cctgtggatt cgggtccact 240
ctcaactcctt tcatttgggc agctccccta cccccttac ctcctagtc tgtgctagct 300
cttccagccc cctgtcatgg catcttcag ggtccgaga gctcagtag tcttctctct 360
ccaaccggg ccctatgtc cacttcagga cagcatgtt gctgctcca gggatcctgt 420
gtcccagacc tgggaccacc ttatattccc agggccggtt aatgtgctc tggttctggg 480
tacttttata tctcccctc atcagatgta cagaaaagcc cctccttag gctcctcct 540
tctagctctc ctgatattgg gctcaccccc cactcctgt taggcagatt ccttatctgg 600
tgacacacce ccatttctg gagccatctc tctccttgc agaacctata aggtttgctt 660
acgatggacc cagagaggat cctgggaggg agagcttggc agggggtggg aggggaaggg 720
gggatgcgtg acctgcccgg ttctcagtgg ccacctgct ctacctctc ccagaacctg 780
agctgtctct acgcccctg ctggtgcgtt tcactgatcc tggctctgca gcttctctac 840
acttcccagc aggagaagca gtttggaaaa acaaaatcag aataagttgg tctctgcttc 900
taactttgga tcttaccctt tctagctccc aatttatatt gttctctcgt gctcagttt 960
tacctgtgag ataaggccag tagccagccc cgtcctgcca ggctctg 1006
    
```

<210> 4
 <211> 4206
 <212> DNA
 <213> 人工合成
 <220>
 <221> misc_feature

<400> 4

```

gtcgacacce cacagtgggg ccaactagga caggatctog accttcactc gctgggttcc 60
citttctctc tcttctggg gctgtgcca tctctctgtt cttaggatgg ccttctccga 120
cggatgtctc ccttgcgtcc egctccctct tctttaggce ctgcatcate accgttttct 180
tggacaacce caaagtacce cgtctccctg gctttagcca cctctccate ctcttgcctt 240
ctttgctctg acaccctgtt ctctctgcca ttctgggtc acctcactcc ttctatttgg 300
gcagctcccc taccctcctt acctctctag tctgtctag ctcttccage cccctgtcat 360
ggcatcttcc aggggtccga gagctcagct agtctctc ctccaaccgg ggcccctatg 420
tccacttcag gacagatgtt ttctgctc cagggatcct gcttcccga gctgggacca 480
ccttatcttc ccagggccgg ttaatgtgct tctggtctg ggtactttta tctgctccct 540
ccatcagatg gacagaaaag cccctcctt aggcctctc ctctctagtc tctgataatt 600
gggtctaac ccacctcctt gttaggcaga tctctatct ggtgacacac cccctttct 660
tggagccate tctctctgt ccagacctc taaggtttgc ttacgatgga gccagagagg 720
    
```

[0003]

序 列 表

atcctgggag	ggagagcttg	gcagggggtg	ggaggggaagg	gggggatgcg	tgacctgccc	780
ggtttcagtg	ggccaccctg	cgctaccctc	tcccagaacc	tgagctgctc	tgaccgcgcc	840
gtctggtgeg	tttcactgat	cctgggtctg	cagcttccct	acaacttcca	agaggagaag	900
cagtttggaa	aaacaaaaac	agaataagtt	ggctctgagt	tctaacttlg	gctcttcaac	960
tttctagtec	ccaatttata	ttgttctccc	gtgcgtcagt	tttacctgtg	agataaggcc	1020
agtagccage	ccgctctctg	cagggctctc	cgacacecca	cagtggggcc	actagggaca	1080
ggatctcgac	cttcaactgc	tgggttccct	tttctctctc	cttctggggc	ctgtgccatc	1140
tctcgtttct	taggatggcc	ttctccgacc	gatgtctccc	ttgctgcccg	ccctcccctc	1200
tttaggcct	gcateatcac	cgtttttctg	gacaacecca	aagtaceccg	tctectggcc	1260
tttagccacc	tctccatcct	cttgccttct	tggccgggac	accctgttct	ccctgiggatt	1320
cgggtccact	ctcactcctt	tcatttgggc	agctccccta	cccccttacc	ctctctagtc	1380
tgtctagctg	cttccagccc	cctgtcattg	catcttccag	gggtccgaga	gctcagctag	1440
tcttctcct	ccaaccggg	cccctatgct	cacttcagga	cagcatgttt	gctgcctcca	1500
ggtagctctg	gtcccggagc	tgggaccacc	ttatattccc	aggcccggtt	aatgtggctc	1560
tggttctggg	tacttttata	tgtcccctcc	atcgatgtga	cagaaaagcc	ccatccttag	1620
gcctctctct	tcttagtctc	ctgatatggg	gtctaaaccc	cacctctctg	taggcagatt	1680
ccttatctgg	tgacacaccc	ccatttctct	gagccatctc	tctcttggcc	agaaectcta	1740
aggtttgcct	acgatggagc	cagagaggat	cctgggaggg	agagcttggc	aggggggtggg	1800
aggggaagggg	gggatgcctg	acctgccctg	ttctcagttg	ccacctgctg	ctacctctc	1860
ccagaacctg	agctgctctg	accgggacct	ctggtgcctt	tcaactgacc	tgggtctgca	1920
gcttccctac	acttcccagg	aggagaagca	gtttggaaaa	acaaaatcag	aataagttgg	1980
tctctagttc	taactttggc	tcttcaactt	tctagctccc	aatttatatt	gttctccctg	2040
ggctcagttt	taccctggag	alaaggccag	tagecagecc	cgctccggca	gggcctctcg	2100
acaccccaca	gtggggccac	tagggacagg	atctcgacct	tcactcctct	ggttcccttt	2160
tctctctctc	tctggggcct	gtgccatctc	tctgttctta	ggatggcctt	ctcccagcga	2220
tgtctccctt	gcgtcccctc	tccccttctt	gtagcccctg	atcatcaccc	ttttctggga	2280
caaccccaca	gtaccocctc	tccctggctt	tagecacctc	tccatctctc	tgtttctttt	2340
gectggacac	cccttctctc	tgtggattcg	ggtaacctct	cactccttct	atttgggcag	2400
ctcccctacc	ccccttacct	ctctagctct	tgtctagctc	tccagccccc	tgtctatggca	2460
tcttccaggg	gtccgagagc	tcagctagtc	ttctctctcc	aaccggggcc	cctatgtcca	2520
cttcaggaca	gcctgtttgc	tgcctccagg	gatcctgtgt	ccccgagctg	ggaccacctt	2580
afattccag	ggccggttaa	tgtgctctct	gttctgggta	cttttatctg	tcccctccat	2640
cgatgtgaca	gaaaagcccc	atccttaggc	ctctcctctc	ctagctctct	gatattgggt	2700
ctaaacccca	cctctctgta	ggeagattcc	ttatctgggt	acacaccccc	atctctggga	2760
gcatctctc	tcttggccag	aacctctaa	gtttgcctac	gatggagcca	gagaggatcc	2820
tgggagggag	agcttggcag	ggggtgggag	ggaagggggg	gatgcctgac	ctgcccgggt	2880
ctcagtgccc	accctgcctc	acctctccc	agaacctgag	ctgctctgac	gcccgcctct	2940
ggtgccttct	actgatctct	gtctgcagc	ttctctacac	ttcccagag	gagaagcagt	3000
ttgganaaac	aaaatcagaa	taagttggct	ctgagttcta	actttggctc	ttcaacttct	3060
tagtcccaca	tttatattgt	tctcctctgc	gtcagtttta	cctgtgagat	aaggccagta	3120
gcagccccc	tcttggcagg	gtctctgac	accccacagt	ggggccacta	gggacaggat	3180
ctcgacctc	actgcctggg	ttcccttctc	cttctctctc	tggggcctgt	gcccctctct	3240
gtttcttagg	atggccttct	ccgacggatg	tctccttctc	gtcccgcctc	cccttcttct	3300
aggcctgcct	ctaccctgtt	tttctggaca	accccacagt	accccctctc	cctgcttcta	3360
gccacctctc	ctcctctctg	cttcttctgc	ctggacaccc	cgctctctct	tggatctggg	3420
tcacctctca	ctccttctct	ttgggcagct	cccctacccc	ccttacctct	ctagctctgtg	3480
ctagctctct	cagcccccct	tcctggcctc	ttccaggggt	ccgagagctc	agctagctct	3540
cttctctcaa	cccgggcccc	talgtccact	tcaggacagc	atgtttgctg	cccctcaggg	3600
tctctgtctc	ccgagctggg	accaccttat	attcccaggg	ccggttaatg	tggctctggt	3660
tctgggtact	ttatctctgc	ccctccatcg	atgtgacaga	aaagcccat	ccttaggcct	3720
ctccttctct	agtctctctg	tattgggtct	aaaccccacc	tctgtttagg	cagatctctt	3780
atctgggtgac	acaccccctc	ttctctgagc	catctctctc	cttccagaaa	ccctaaaggt	3840
ttcttctcga	tggagccaga	gaggatctct	ggagggagag	cttggcaggg	ggtgggaggg	3900
aaggggggga	tgcgtgacct	gcccggttct	cagtgccacc	ccctgcctac	ccctctcccag	3960
aacctgagct	gctctgacgc	ggccgtctgg	tgcgtttcac	tgatctctgt	gctgcagctt	4020
ccttacctct	cccagagga	gaagcagttt	ggaaaaacaa	aatcagaata	agttggctct	4080
gagttctaac	tttggctctt	caccttctct	gtcccacatt	tatatgttct	ctccgtcctg	4140
cagttttacc	tgtgagataa	ggccagtagc	cagccccctc	ctggcagggc	tgtctgagtt	4200
agatct						4206

[0004]

<210> 5		
<211> 33		
<212> DNA		
<213> 人工合成		
<220>		
<221> misc_feature		
<400> 5		
cgatccatcg atactagtgcc gccgcgctcg aca		33
<210> 6		
<211> 42		
<212> DNA		
<213> 人工合成		
<220>		
<221> misc_feature		
<400> 6		
gatctgtcga cggggccgca ctagtatcga tggatccggc ac		42
<210> 7		
<211> 547		
<212> DNA		
<213> 人工合成		
<220>		
<221> Promoter		
<400> 7		
ggatccgtta cataacttac ggtaaatggc ccgcttgct gaccgcecaa cgacccccgc	60	
ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc caatagggac ttccattga	120	
cgccaatggg tggagtattt aeggtaaact gccacttgg cagtacatca agtgtatcat	180	
atgccaagta cgcacctat tgacgtcaat gacggtaaat ggccccctg gcattatgcc	240	
cagtacatga ccttatggga ctctccact tggcagtaaa ctacgtatt agtcacgct	300	
attaccatgg tgatggggt tggcagtaac atcaatgggc gttgatagcg gtttgactca	360	
cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcgatggga gtttgtttg gcacaaaat	420	
caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat tgacgcaaat gggcgtagg	480	
cgtgtacggt gggaggtcta tataagcaga gctegttag tgaaccgca gatatcgatt	540	
tactagt	547	
<210> 8		
<211> 428		
<212> DNA		
<213> 人工合成		
<220>		
<221> PolyA_signal		
<400> 8		
actagtgaaa tgaccgacca agcagcgc cc aacctgceat caccgattt cgattccacc	60	
gcgccttcl atgaaagggt gggttcgga atcgtttcc gggaccgccc ctggatgac	120	
ctccagcgcg gggatctcat gctggagttc ttcgcccacc ctagggggag gctaaactgaa	180	

[0005]

acacggaagg agacaatacc ggaaggaacc cgcgctatga eggcaataaa aagacagaat 240
 aaaacgcacg gtgttgggtc gtttggcat aaacgcgggg ttcggtccca gggctggcac 300
 tetgtogata ccccaccgag accccattgg ggccaatacg ccccggttcc ttccttttcc 360
 ccaccceacc ccccaagtcc gggfgaagge ccagggtctg cagccaacgt cggggcggea 420
 cgggccgc 428

<210> 9
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工合成
 <220>
 <221> misc_feature

<400> 9

aattgatcga tactagtt 18

<210> 10
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工合成
 <220>
 <221> misc_feature

<400> 10

agetaactag tategac 18

<210> 11
 <211> 1525
 <212> DNA
 <213> 人工合成
 <220>
 <221> CDS

<400> 11

atcgatatgg caccaaaaga aaagcgggaag gtagattaca aagatcatga tggcgattac 60
 aaggaccaacg atalcgacac caaagatgac galgataaga agcttgcctc gagecgggag 120
 getctcagct ggttaaatec gatttgggaag agaaaaagtc tgagctccgc cataagttga 180
 aatacgtgcc tcaagagtat atcgaactga tcgagatcgc cagaaactca aeccaagaca 240
 ggattttgga aatgaaagtg atggagtctc ttatgaaggt ctatggctat aggggaaage 300
 acctcggcgg gagecaggaag cccgacggcg ccattttatac agtcgggtct ccaatcgact 360
 atggggctcat cgttgacaact aaggcctatt cccgggggita caacctccca atagggcagg 420
 ctgacgagat gcaggactac gtggaggaga accaaacaag gaacaagcat ataaacccta 480
 acgagtgggtg gaaagtatac cctagtctctg ttaetgagtt caagtttctc ttcgtgagcg 540
 gacacttcaa aggaaattac aaagctcaac tgacaagact gaatcatatt actaactgta 600
 atgggtccctc cctgtcagtg gaggaactgc fgattggcgg agagatgac aaggcaggca 660
 cccttactct cgaagaagtg egcgnaagt ttaatacgg tgaateaac ttctctagag 720
 agggaagggg gtctctcctg acctgtgggg atgtggaaga aaatcccggt ccggaattca 780
 tggcgcccaa gaagaaacga aaggtctatc cttacgatgt gccagactac gcccgggtatc 840
 catatgatgt gectgactat gccggcagct atccctatga cgtgcccgat tatgcagctc 900
 acggtaccaaa ggatccctgg gtggatctca gttggtgaaa tccgagctgg aggagaaaaa 960
 gtcagagctg cgcacaaac tcaagtaact gccacacgaa tacattgagc tgatcgagat 1020
 cgcagggaac tcacgcagg acagaatcct ggagatgaag gtaatggat ttttcatgaa 1080
 ggtgtaoggc tacagaggca agcatctggg agggctccgc aagcctgatg gagcaatcta 1140

[0006]

```
caccgtogga agccccatag attacggggt aatgctgat accaaagcat atagtggcgg 1200
atacaacctg ccaatgggcc aagccgggga aatgcagcga tacgtggaag aaaaccagac 1260
taggaacaaa cacattaacc caaacgaatg gtggaaagtc tatcctaget ctgtgacgga 1320
glteaagttt ctctttgltt cgggccattt caaggggaat tacaaggctc agctgacaag 1380
getgaatcat attactaatt gtaacgggge cgttctctca gtggaagagc tgetgattgg 1440
cggagagatg attaaagcgg gcacccttac cctggaagag gtteggcgga aattcaacaa 1500
tggcgagata aacttttgaa ctagt 1525
```

<210> 12
 <211> 353
 <212> DNA
 <213> 人工合成
 <220>
 <221> CDS

<400> 12

```
aaagcttatg gcgagagac ccttccagtg caggatctgc atgcggaact ttagctacaa 60
ctggcaacctg cagagacata ttaggaccca caccggcgaa aagccctttg cttgagacat 120
ttgcggacgg aaattcgcca ggagcgacca cctgaccacc cacacaaaga tccatacagg 180
aagccagaag ccatttcaat gtagaatttg tatgaggaat ttcteccaca actacgccag 240
ggactgcat atccggacac acacagggga gaaaccattc gctgtgata tctgtggcag 300
aaagtttgc cagaacagea ccagaatgg ccacacaaa attcatgtg aca 353
```

<210> 13
 <211> 353
 <212> DNA
 <213> 人工合成
 <220>
 <221> CDS

<400> 13

```
aggtaccatg gcgagagac ccttccagtg caggatctgc atgcggaact ttagccagag 60
cagcaacctg gcagacata ttaggaccca caccggcgaa aagccctttg cttgagacat 120
ttgcggacgg aaattcgcca gaaccgacta cctggtggac cacacaaaga tccatacagg 180
aagccagaag ccatttcaat gtagaatttg tatgaggaat ttctctaca acaccacct 240
gaccagacat atccggacac acacagggga gaaaccattc gctgtgata tctgtggcag 300
aaagtttgc caggctaca acctggccgg ccacacaaa attcatagat cta 353
```

<210> 14
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工合成
 <220>
 <221> misc_feature

<400> 14

```
agtegacctt cactegctgg gtccc 25
```

<210> 15
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工合成

[0007]

<220>	
<221> misc_feature	
<400> 15	
aatcgatgga gggacagat aaaag	25
<210> 16	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工合成	
<220>	
<221> misc_feature	
<400> 16	
aatcgatgtg acagaaaagc cccatc	26
<210> 17	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人工合成	
<220>	
<221> misc_feature	
<400> 17	
aagatetttc tcgagcagcc ctgccaggac ggg	33
<210> 18	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> 人工合成	
<220>	
<221> misc_feature	
<400> 18	
tcgaccacc caccagtggg ccactagga caggattctc gaggatcca	50
<210> 19	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> 人工合成	
<220>	
<221> misc_feature	
<400> 19	
gactctggatc cctcgagaat cctgtcccta gtggcccac tgtggggtgg	50
<210> 20	
<211> 26	
<212> DNA	

[0008]

<213> 人工合成	
<220>	
<221> misc feature	
<400> 20	
aatcgatgatg gtgagcaagg gcgagg	26
<210> 21	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工合成	
<220>	
<221> misc feature	
<400> 21	
aactagttta cttgtacagc tegtccat	28
<210> 22	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工合成	
<220>	
<221> misc feature	
<400> 22	
tgggtcctct ccggcatct ct	22
<210> 23	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工合成	
<220>	
<221> misc feature	
<400> 23	
gggagttttc cacacggaca c	21
<210> 24	
<211> 1035	
<212> DNA	
<213> 人工合成	
<220>	
<221> CDS	
<400> 24	
atggcaccaa agaaaaagcg gaaggtagat tacaagatc atgatggcga ttacaaggac	60
cacgatatcg actacaaaga tgacgatgat aagaagetta tggccgagag acccttcag	120
tgcaaggatct gcatgaggaa ctttagcgac agaagcaacc tglccaggca tattaggacc	180
cacaccggcg aaaagecctt tgettgcgac atttggcgac ggaattcgc catctccagc	240
aacctgaata gccacacaaa gatccataca ggaagccaga agccattca atglagaatt	300

[0009]

```

tgtatgagga atttctccag aagcgacaac ctggccaggc atatccggac acacacaggg      360
gagaaacat tcgcctgtga tatctgtggc agaaagtitt ccaccagcgg caacctgacc      420
agacacacca aaattcatgt cgagcagctg gttaaatccg agttggaaga gaaaaagtct      480
gagctecgce ataagttgaa ataegtgcct cagcagtata tcgaactgat cgagatcgee      540
agaaactcaa cccaagacag gattttggaa atgaaagtga tggagtctct taigaaggtc      600
tatggctata ggggaaagca cctcggcggg agcaggaage ccgacggcgc catttataca      660
gtcgggtctc caatcgacta tggggtcctc gttgacaact aggcctatc cgggggttac      720
aacctcccaa tagggcaggc tgacgagatg caggactacg tggaggagna ccaaacaaagg      780
aacaagcata taaaccetaa cgagtgtgtg aaagtatacc ctagtctctg tactgagtte      840
aagtttctct tcgtgagcgg acaactcaaa ggaaattaca aagctcaact gacaagactg      900
aatcatatta ctaactgtaa tggcgcctc ctgtcagttg aggaactgct gattggcggg      960
gagatgatca aggcagcac ccttactctc gaagaagtgc ggcgaaagtt taataacggt      1020
gaaatcaact tctag

```

<210> 25
 <211> 1062
 <212> DNA
 <213> 人工合成
 <220>
 <221> CDS

<400> 25

```

atggcgccca agaagaaacg aaaggtctat ccttacgatg tgcagacta cgccgggtat      60
ccatatgatg tgcctgacta tgcggcagc tatecctatg acgtgcccg tttatgcagct      120
cacggtacca tggcagagag acccttcag tgcaggatct gcattcggaa ctttagcaga      180
agcgacaace tgcctgtgca tattaggacc cacaccggcg aaaagccctt tgettggac      240
atltggggac ggaatttcgc ccagaagatc aaectgcagg tgcacacaaa gatccataca      300
ggagagaaac cttttcaatg taggatttgc atgcgaatt tctccagaag cgactgtctg      360
agcgagcata tccggacaca cacaggggag aaaccattcg cctgtgatat ctgtggcaga      420
aagtttgccc agagaaacca cagaaccacc cacaccaaaa ttcattagatc ccagtgggtg      480
aatccgagc tggaggagaa aaagtcagag ctgcgccaca aactcaagta cgtgcccac      540
gaatacattg agctgatcga gatcgccagg aactccacgc aggacagaat cctggagatg      600
aaggtaatgg aattttcat gaagggttac ggctacagag gcaagcatct gggagggtcc      660
cgcaagcctg atggagcaat ctacaccgtc ggaagcccca tagattacgg ggtaatcgtc      720
gataccaaag catatagtgg cggatacaac ctgccaatcg gccaaagccg ggaatgcag      780
cgatactgtg aagaaaacca gactaggaac aaacacatta acccaaacga atggtgaaa      840
gtctatccta gctctgtgac ggagtteaag tttctctttg tttcggcca tttcaagggg      900
aattacaagg ctctgtgac aaggctgaat catattacta attgtaacgg ggccgtctc      960
tcagtggaag agctgtgat tggcggagag atgattaag ccgcaacct taccctggaa      1020
gaggttcggc ggaattcaa caatggcgag ataaactttt ga

```

<210> 26
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 人工合成
 <220>
 <221> misc_feature

<400> 26

```

ggctactctc atcctgataa actgcaaaag g      31

```

<210> 27
 <211> 101
 <212> DNA

[0010]

<213> 人工合成

<220>

<221> misc signal

<400> 27

```

cctcccctct actcaactggt gttcatcttt ggttttgtgg gcaacatget gtgaagagca      60
tgactgacat ctacctgctc aacctggcca tctctgaect g                               101

```

<210> 28

<211> 1454

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<221> misc_feature

<400> 28

```

gtcgaaggtc atctcatcc tgataaactg caaaaggctc gacctccgc tctactcaet      60
ggtgttccate tttggttttg tggcaacat gctgtgaaga gcatgactga catctacctg      120
ctcaacctgg ccatctctga cctgctcgac ggctatcctc atcctgataa actgcaaaag      180
getcgacctc cgcctctact cactgggttt catcttttgt tttgtgggca acatgctgtg      240
aagagcatga ctgacateta cctgctcaac ctggccatct ctgacctget cgacggctcat      300
cctcatcctg ataaactgca aaaggetega cctccgetc tactcaactgg tgtteatett      360
tggttttgtg ggcaacatgc tgtgaagagc atgactgaca tctacctgct caacctggcc      420
atctctgacc tgcctgacgg tcatcctcat cctgataaac tgcaaaaggc tggacctcc      480
getctactca ctggtgttca tctttggttt tgtgggcaac atgctgtgaa gageatgact      540
gacatctacc tgetcaacct ggccatctct gacctgetcg acggctatcc tcatcctgat      600
aaactgcaaa aggctcgacc ctccgeteta ctcaactggtg tteatctttg gttttgtggg      660
caacatgctg tgaagagcat gactgacatc tacttgetca acctggccat ctctgacctg      720
ctgcaaggtc atctcatcc tgataaactg caaaaggctc gacctccgc tctactcaet      780
ggtgttccate tttggttttg tggcaacat gctgtgaaga gcatgactga catctacctg      840
ctcaacctgg ccatctctga cctgctcgac ggctatcctc atcctgataa actgcaaaag      900
getcgacctc cgcctctact cactgggttt catcttttgt tttgtgggca acatgctgtg      960
aagagcatga ctgacateta cctgctcaac ctggccatct ctgacctget cgacggctcat      1020
cctcatcctg ataaactgca aaaggetega cctccgetc tactcaactgg tgtteatett      1080
tggttttgtg ggcaacatgc tgtgaagagc atgactgaca tctacctgct caacctggcc      1140
atctctgacc tgcctgacgg tcatcctcat cctgataaac tgcaaaaggc tggacctcc      1200
getctactca ctggtgttca tctttggttt tgtgggcaac atgctgtgaa gageatgact      1260
gacatctacc tgetcaacct ggccatctct gacctgetcg acggctatcc tcatcctgat      1320
aaactgcaaa aggctcgacc ctccgeteta ctcaactggtg tteatctttg gttttgtggg      1380
caacatgctg tgaagagcat gactgacatc tacttgetca acctggccat ctctgacctg      1440
ctgaggttag atct

```

<210> 29

<211> 722

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<221> misc_feature

<400> 29

```

atcgatatgg caccaaagaa aaagcggag gtagattaca aagatcatga tggcgattac      60
aaggaccacg alatcgacta caaagatgac gatgataaga agcttgtctc gagctgggag      120
gctctcagct ggttaaatcc gagttggaag agaaaaagtc tgagctccgc cataagttga      180
aatacgtgcc teacgagtat atcgaactga tcgagatcgc cagaaactca acccaagaca      240

```

[0011]

ggattttgga aatgaaagt atggagtct ttatgaagt ctatgctat aggggaaagc 300
 acctggcgg gagcaggaag cccgacggcg ecatttatac agtcgggtct ceaatcgact 360
 atggggcat cgttgacact aaggcctatt cgggggltt caacctceca atagggcagg 420
 ctgacgagat gcaggactac gtaggaggaga accaaacaag gaacaageat alaaacctta 480
 acgagtggtg gaaaglatac cctagttctg ttaetgagtl caagtttctc ttegtgagcg 540
 gacacttcaa aggaaattac aaagctcaac tgacaagact gaatcatatt actaactgta 600
 atggtgccgt cctgtcagtg gaggaactgc tgattggcgg agagatgac aaggcaggca 660
 ccttactct cgaagaagt cggcgaagt ttaataacgg tgaatcaac ttctaaacta 720
 gt 722

<210> 30
 <211> 752
 <212> DNA
 <213> 人工合成
 <220>
 <221> misc_feature

<400> 30

atcgatatgg cgeccaagna gaaacgaaag gtctatctt aegatgtgcc agactaogcc 60
 gggatatccat atgatgtgcc tgaotatgcc ggcagetate cctatgacgt gcccgattat 120
 gcagctcagc gtaaccaagga tccctgggtg gatctcagtt ggtgaaatcc gagctggagg 180
 agaaaaagtc agagctgegc cacaaactca agtacgtgcc acacgaatac attgagetga 240
 tcgagatgc caggaactcc aegcaggaca gaatcctgga gatgaaggtat atggaatctt 300
 teatgaaggt gtacggctac agaggcaagc atctgggagg gtcocgcaag cctgatggag 360
 caatctaac cgtegggaag cccatagatt acggggtaat cgtcgatacc aaageatata 420
 gtggcggata caacctgcca ateggecaag cccgggaaat gcagegatac gtggaagaaa 480
 accagactag gaacaaacac attaacccaa acgaaatgtg gaaagtctat cctagetctg 540
 tgacggagtt caagtttctc tttgtttccg gccatttcaa ggggaattac aaggetcagc 600
 tgacaaggct gaatcatatt actaattgta acggggccgt tctctcagtg gaagagetgc 660
 tgattggcgg agagatgatt aaagccggca ccttaccct ggaagaggtt cggcggaaat 720
 tcaacaatgg cgagataaac ttttgaacta gt 752

<210> 31
 <211> 353
 <212> DNA
 <213> 人工合成
 <220>
 <221> CDS

<400> 31

aaagcttatg gccgagagac ccttccagtg caggatctgc atgcggaact ttagcgacag 60
 aagcaacctg tccaggcata ttaggacca caccggcgaa aagcccttg cttgogacat 120
 ttgcggacgg aaattcgcca tctccagca cctgaatagc cacacaaaga tccatacagg 180
 aagccagaag ccatttcaat gtagaattg tatgaggaat tctctcagaa gcgacaacct 240
 ggccaggcat atccggacac acacagggga gaaaccattc gcctgtgata tctgtggcag 300
 aaagtttgcc accagcggca acctgaccag acacacaaa attcatgtcg aca 353

<210> 32
 <211> 350
 <212> DNA
 <213> 人工合成
 <220>
 <221> CDS

[0012]

<400> 32

```

aggtaccatg gccgagagac ccttccagtg caggatctgc atgcggaact ttagcagaag      60
cgacaacctg tccgtgcata ttaggacceca caccggcgaa aagccctttg cttgcgacat      120
ttcggcagcg aaattcgcgc agaagatcaa cctgcaggtg cacacaaaaga tccatacagg      180
agagaaacct ttccaatgta ggatttgcac ggcgaatttc tccagaageg acgtgctgag      240
cgagcatatc cggacacaca caggggagaa accattcgcc tgtgatatct gtggcagaaa      300
gittgcccag agaaccaca gaaccacceca caccaaaatt catagatcta      350
    
```

<210> 33

<211> 5385

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<221> misc_feature

<400> 33

```

tccttaccat ccttccctcg acttcccctc ttccgatgtt gageccctcc agccggctct      60
ggactttgtc tccttccctg ccttgccttc tccgaaacct gagecagctc ccatagctca      120
gtctggtcta tetgcctggc cctggccatt gtcactttgc gctgcccctc tctcgccecc      180
gagtgccctt gctgtgcctg eggaaactct cctctaaag ctgcctcttc tctcctgagt      240
ccggaccaact ttgagctcta ctggtctctg cgcgcctctt ggcccactgt ttccccttcc      300
ctgcagcttg tggactgggt cactctacg gctggcccag atccttccct gccgcctcct      360
tcaggttccg tcttctctca ctccctcttc ccttctctct ctgctgtgtt gctgcocaag      420
gatgettttt ccggagcaact tccttctcgg cgtgcacca cgtgatgtcc tctgagcggg      540
tcctcccctg gctcgggtcc tctccgggca tctctctctc ctcacccaac cccatgcctg      600
cttcaactgc tgggttccct ttctcttctc cttctggggc ctgtgcaate tctcgtttct      660
taggatggcc ttctccgacg gatgtctccc ttgcgtcccg cctccccttc ttgtaggctct      720
gcatacctac cgtttttctg gacaacccca aagtaccctg tctccttggc tttagcacc      780
tctccactct ctgtcttctt ttgcttgac accccttctc cctgtggatt cgggtcacct      840
ctcactctct tcatttgggc agctccccta cccccttac ctctctagtc tctgctagct      900
cttccagccc cctgtcatgg catcttccag gggctcgaga gctcagctag tcttctctct      960
ccaaccgggg cccctatgic cacttcagga cagcatglll gllacalaac llaaggtaaa      1020
tggcccgcct ggtgaccgc ccaacgacce ccgcccattg acgtcaataa tgacttatgt      1080
tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgactcnaa tgggtggagt atttacggta      1140
aaactgcccac ttggcagtac atcaagtgtc tcatatgcca agtaaccctc ctattgactg      1200
caatgaccgt aaatggcccg cctggcatta tgeccagtac atgaccttat gggactttcc      1260
tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgtattacc atggtgatgc ggttttggca      1320
glacatcaat gggcgtggal agcgglltga ctacggggga ttccaagtc tccaccccat      1380
tgacttcaat gggagtttgt ttggaccaca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcttaa      1440
caactcggcc ccattgacgc aaatggggcg taggcctgta cgggtggagg tctatataag      1500
cagagctcgt ttagtgaacc gtcagatag gtgagcaagg gcgaggagct gttcacccgg      1560
gtggtgccc a tctggtcga gctggaagcc gactaaacg gccacaagtt cagcgtgtcc      1620
ggcagaggcg agggcgatgc caactacggc aagetgacce tgaagttcat ctgcaccaec      1680
ggcaagctgc cctgcccctg gcccaacctc gtgaccacce tgacctacgg cgtgcagtgc      1740
ttcagccgct accccgacca catgaagcag cactctct tcaagtccgc catgcccgaa      1800
ggctacgtcc aggagcgcac catcttcttc aaggacgacg gcaactacaa gaccgcgcgc      1860
gaggtgaagt tccagggcga caccctgggt aaccgcatcg agctgaaggg catcacttc      1920
aaggaggacg gcaacatcct ggggcacaag ctggagtaca actacaacag ccacaacgtc      1980
tatatcatgg ccgacaagca gaagaacggc atcaaggtga acttcaagat ccgccacaac      2040
atcgagggaag gcagcgtgca gctcgcgcac cactaccagc agaacacccc catcggcgac      2100
ggccccgtgc tgetgcccga caaccactac ctgagcacc cagtcccccct gagcaagac      2160
cccacagaga agcgcgatca catggtctct ctggagtctg tgaccgcgc cgggatcact      2220
ctcggcatgg acgagctgta caaggaggcg agaggaagtc ttctaacatg cgggtacgtg      2280
gaggagaate ccggccctat ggaagacgcc aaaaacataa agaaaggecc ggcgcattc      2340
tctccctggt aagatggaac cgtggagag caactgcata aggetatgaa gagatacgc      2400
    
```

[0013]

ctggttcctg	gaacaattgc	tttacagat	gcacatateg	agggtggacat	cacttaoget	2460
gagtacttgc	aaatgtccgt	tcggttgcca	gaagctatga	aacgatatgg	gotgaataca	2520
aatcacagaa	tegtctatg	cagtgaanaac	tctcttcact	tctttatgcc	ggtgttgggc	2580
gcgttattta	tcggagttgc	agttgcgcc	gcgaacgaca	tttataatga	acgtgaattg	2640
ctcaacagta	tgggcatttc	gcagcctacc	gtggtgttcg	tttccaaaa	ggggttgcaa	2700
aaaattttga	acgtgcaaaa	aaagctccca	atcatccaaa	aaattattat	catggattct	2760
aaaaacggatt	accagggatt	tcagtcgatg	tacaegtctg	tcacatctca	tetacctccc	2820
ggttttaatg	aatacgattt	tgtgccagag	tccttcgata	gggacaagac	aattgcaotg	2880
atcatgaact	cctctggate	tactggctcg	cctaaagggtg	tcgctctgce	tcatagaact	2940
gcctgcgtga	gattctcgca	tgccagagat	cctatTTTTg	gcaatcaaat	cattccggat	3000
actgogattt	taagtgttgt	tcattccat	caeggTTTTg	gaatgtttac	tacactcgga	3060
tatttgatat	gtggatttcg	agtcgtctta	atgtatagat	ttgaagaaga	getgtttctg	3120
aggagccttc	aggattacaa	gattcaaaat	gcgctgctgg	tgccaacct	attctccttc	3180
ttcgccaaaa	gcactctgat	tgacaaatac	gatttatcta	atttacacga	aattgettct	3240
ggtgcgcctc	cctctcttaa	ggaagtcggg	gaagcggftg	ccaagaggft	ccatctgcca	3300
ggtaicagcc	aaggatagga	gclacatcag	clattctgat	tacaccagag		3360
ggggatgata	aaccgggcgc	ggtcggtaaa	gttctccat	ttttgaaag	gaaggttgtg	3420
gatctggata	ccgggaaaae	gctgggcggt	aatcaaaagag	gcgaactgtg	tgtgagaggt	3480
cctatgatta	tgtccggtta	tgtaaacaat	ccggaagcga	ccaacgcctt	gattgacaag	3540
gatggatggc	tacattctgg	agacatagct	tactgggacg	aagacgaaca	cttcttcact	3600
gttgaccgcc	tgaagtctct	gattaagtac	aaaggctatc	agggtgctcc	cgtgaattg	3660
gaatccatct	tgtcccaaca	ccccaacatc	ttcgacgcag	gtgtcgcagg	tcttcccgac	3720
gatgacgcgc	gtgaacttcc	cgcgcgcgtt	gttgttttgg	agcacggnaa	gaecatgaec	3780
gaaaaagaga	tcgttgalla	cglcgcaglt	caaglaacaa	ccgcgaaaaa	glgctcgcca	3840
ggagtttgtt	ttgtggacga	agtaccgaaa	ggtcttaccg	gaaaactcga	cgaagaaaa	3900
atcagagaga	tcttcataaa	ggccaagaag	ggcggaaaaga	tcgcogtcta	acaccgggg	3960
gagatccaga	catgataaga	tacattgatg	agtttggaca	aaccacaact	agaatgcagt	4020
gaaaaaaatg	ctttatttgt	gaaatttgtg	atgetattgc	tttatttcta	accattataa	4080
gctgcaataa	acaagttaac	aacaacaatt	gcattcattt	tatgttccag	gttcasgggg	4140
agggtgtggga	ggttttttaa	agcaagtaaa	acctctacaa	atgtggatg	getgattatg	4200
atcccgctcg	cctcgcgcgt	ttcggctgat	acggtgaaaa	cctcttgaca	catgcagctc	4260
ccggagacgg	tcacagcttg	tcgttaagcg	gatgcgggga	gcagacaagc	cgtcaggggc	4320
gcgtcagcgg	glgttggcgg	glgtcggggc	gcagccatga	ggtcgaactt	agtcaccgcg	4380
gtggcgcagg	gcgccactgt	gaaccaggca	gacaacgagg	gctggacgcc	actgcacgtg	4440
gcgcctcct	gtggetacct	agatatcgcc	agggtaggca	agggagggcc	gggcaggacc	4500
tggtcggggg	gggggectgg	accctcagcc	ctgaccagcc	cccaccccca	ggtacctcct	4560
gagccacggg	gccaacatcg	ccgccgcaa	cagtgcaggg	gacctgccc	tggacctgge	4620
cgagtcggac	gccatggagg	ggctgctgaa	ggcggagatc	gcccgcagag	gtggctctg	4680
gtgtctctg	tgtgggttgg	gggacacctc	ctcaccctg	gtctccagcc	tgagagcttt	4740
agaggcggcc	tgggcaccga	ggctgacct	gcttctagg	attgtctttc	tttgtcctc	4800
agtttctca	cctgtgaaat	gggggtgtag	gggctgctc	ccaggattgc	ttggagccca	4860
gcacacgcac	aggatgagaa	ctcaaacccc	taccaactgg	gactgtcaat	ccccctgagt	4920
aactgagggg	attggaatgc	cggggggggg	tgggtgggtg	gagggactca	cccaggagtg	4980
cgttaggtag	gattgtgga	accctgcgc	aggctttct	gggaggggat	ggtttactt	5040
gggggggagt	agggcatgc	aggggttgc	aggactggt	ctcctgtcc	ctgagactc	5100
atcgtacccc	aggagccttc	atatgggtc	caggagcccc	tgaactgtg	cttgccagg	5160
ttcatttttc	tagggaaggg	gtgttcttc	tagcaggtgt	gtgatgcca	cacaggatcc	5220
ctgggtcccc	agcatgtctt	ctaaagtct	ggccttgct	cccagctctg	cctgtgactg	5280
gtgactccag	gcacgtccct	gaagcttct	tccttgattt	cctaaaacag	gaccactggt	5340
gccgcttcat	ggggtggtt	tcagggtctg	gctgggttgg	agtggt		5385

- <210> 34
- <211> 2472
- <212> DNA
- <213> 人工合成
- <220>
- <221> misc_feature

[0014]

<400> 34

```

atctglatga gaaactttag catcaggac tacctgatca agcacatcag aactcataca 1440
ggcgagaage catttgectg cgacatctgc ggcaggaagt tcgctagacc ctacaccctc 1500
agactgcata ccaagatcca caccgggagc cagaagccct tocagtgcag aatctgcatg 1560
agaaacttta gtcagagegg cgacctgacc agacacatca gaaccacac tggagagaaa 1620
cefttcgctt ggcacatttg tggcagggaag tttgcccaaca gaagcgacag gaccagacac 1680
accanaatte acaccatcc cagagccccc atcccaaaage ctttccagtg tagaatctgc 1740
atgaggaaact teageccagtc cggcgcactg gccagacata tcaggacceca caccggcgaa 1800
aagecatttg cttgtgacat ctgcggcaga aagitegeca gaagcgacaa cctgagagag 1860
cacaccaaga tccatagatc ccagttgggtg aaatccgagc tggaggagaa aaagtcagag 1920
ctgcgccaca aactcaagta cgtgccacac gaatacattg agctgatcga gategccagg 1980
aactccacgc aggacagaat cctggagatg aaggtaatgg aatitttcat gaaggtgtac 2040
ggctacagag ccaagcatct gggagggtcc cgcaagcctg atggagcaat ctacaccctc 2100
ggaaegccca tgattacgg ggtaatcgtc gataccaaag catatagtgg cggatacaac 2160
ctgccaatcg gccaaegccg ggaaatcgag cgatacgtgg aagaaaacca gactaggaac 2220
aaacacatta acccaaacga atggtggaaa gctataccta gctctgtgac ggagltcaag 2280
tttctctttg tttccggcca tttcaagggg aattacaagg ctccagctgac aaggetgaat 2340
catattacta attgtaacgg ggccttctc tcagtggag agctgctgat tggcggagag 2400
atgatlaaag ccggcacctt tacctggaa gaggttcggc ggaaattcaa caatggcgag 2460
ataaactttt ga 2472

```

<210> 35

<211> 41

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<221> misc feature

<400> 35

```

ggagtgtgtc atggtgtggc aacaggtaag ctccattgtg c 41

```

<210> 36

<211> 3534

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<221> misc feature

<400> 36

```

tttagctact ttaaaaataa aattccaaaa aggaaatgtg atagcaactt ttagaataga 60
tatagecaaa tetaaccttt gacattaac aaaattataa aattaatata tggttttgaa 120
ttgttataca agtaaatatg tatatttaaa tatacatatg taaatatgga tttaaagaaa 180
ataaatttaa aacaatttac taaggaaatt taaatcataa tatgttgaaa attagttttg 240
ttcattatga tgaataaaat ttataagaat caaaaccttc agaaaatctc cagtgtttaga 300
aatttcttta tactatactt gcatgaaaaa taagtaactt tatacatag gtttattttt 360
aaagfacctt aaaaaacata tcattcagta agtttaatta aacacatttt catatatttc 420
tataatatga tgcattaaat tgataactga aataatttec tgagateaaa cagccaggat 480
ttaaagttgt ggatttttca ttgatattat ctaactagga taatttattt tatttgaact 540
ttgtaggtag aaagttcccg gcccaagttt actgaagtc gtatttctcc cctgecccaac 600
cgaaaaaaa aagctaatgg gatgaattta ggggaaattg tttctttaat attagaagat 660
aatattaggt actatgtaaf aattcttgt ttccttgcac taagacttgt agcaagaaca 720
attaacgatt agttagcact taafatgtac ccataatana cattttacat caggcataat 780
atgcaatta ttctccctct cttaaacat tgaagtgtaa ttattttatt tcttctcata 840
atttagactta agcactttat attaaataac cctattcaaa aagttaatte atttatctga 900

```

[0015]

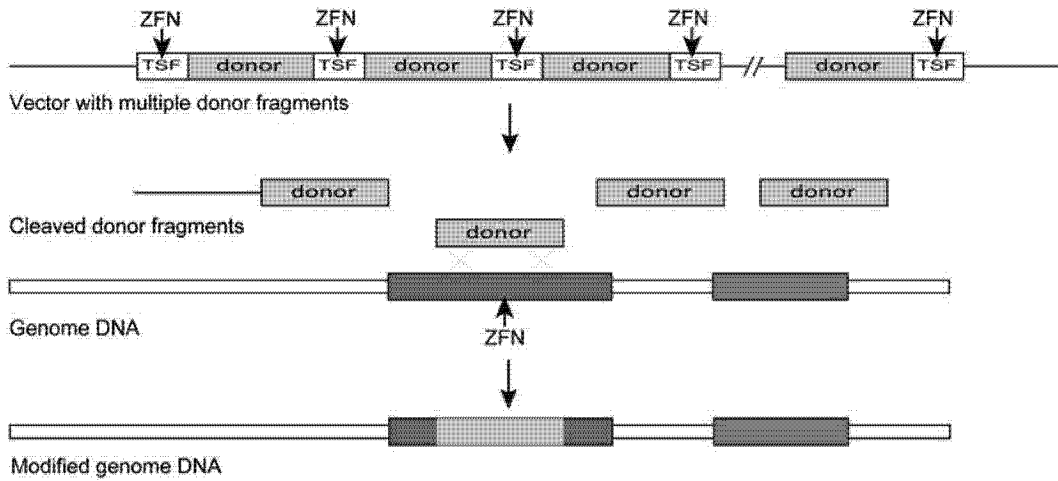
tgtggaagag	gaatgattat	gatagcaget	gatttatecc	aatgtgtttc	tcatagecat	960
actagttatg	acagcatttt	fggttatttc	actactgeca	gggtggtcca	tgggtgcaat	1020
cgctgtaaat	attgcacatg	ctgaaatcac	catgtcetta	ctgectagea	acatttecca	1080
tagttttctg	tggaaeacta	gtttcaattc	accetagtta	ctaatgaaga	aagttttcaa	1140
faatcaaaaa	gtttgaataa	ccctgatttt	aactatgtaa	tgcaaatctc	tttactgtag	1200
gacatctcag	attccttaat	acgetaaaga	gaaaaataag	tatacaaatg	ctcccaacat	1260
tgtacaatgt	tagaaactta	agattgtgag	ccactgtcct	tcagaaaaca	ttttataaaa	1320
tgtctaatgt	tacaaacttc	agtctctctc	tctctctcac	acacacgeac	acacacacac	1380
acacacacac	acacacagat	atgtgtttac	atittggeat	tctggaaaag	actaaaaaaa	1440
tgcageccat	ctccacagtc	tccattagat	catcagggtg	cagtaatagt	tgggttcttt	1500
aatttttacc	actgactcca	gaacttgcca	catgcttctc	tgtttcttaa	acctcatggg	1560
ttctctctca	actactaaat	ggaacaccat	tcctctaggt	tgaccgtctt	cagatagtgg	1620
agtctccacc	tgtctgttat	ctagtcttta	ttataatcat	gttcacaaat	atcataatta	1680
taggaggtcc	ctagaaggca	tcatagtcca	cttacttaac	tacttctctg	ttggattgca	1740
acagagecca	ttaaagggtg	acaattaaet	tctaacagaa	ctagtttcaa	aggagtctgt	1800
tttattttta	cactctgatt	tttaaatcaa	aagtattcat	ttaaagaaat	atttttctcc	1860
actagttgta	aaaatgttgc	acaagaaagt	tcactataaa	actataagta	acacttataa	1920
aatacatatt	gtttgtcttt	gtttccaga	tgttttgtgt	acattaattc	actgaattat	1980
tttatagatg	aggaagctaa	atcacacaga	ggtgaagaat	cttgcaaaaa	acacacagct	2040
ggtaaggagt	aageaggaag	ttgaaccaag	aagactctgac	tctgtgtttt	ttagtcatat	2100
ccacaacact	gtattaagat	tcccatatca	ttgtctctcat	ttccatttta	gaagtcagtg	2160
ataggaacat	tttatttgta	taggcaactat	tgtgtttaat	gotttccgat	tatataaatt	2220
atatttctga	ttatattctt	tgcttccaca	catctgceag	gaaacgtgga	gtacttacia	2280
cagaaaactt	aattacagea	agtctgtggg	cttttaattt	gttaaatttt	ggttctctct	2340
tgatttctct	atttctggca	ctctcatcct	catcttctct	aacatctgat	gatgattatc	2400
atccttttca	tcatttttga	tatttcttga	ttgtaaacct	aattgacttg	ttcaaatctc	2460
cggtaaattt	aggecaaatg	aataafataa	tcagaaatgt	aataattgca	caataatatt	2520
tgtacaaata	getataceat	aacaatacaa	agataaatac	aataaacatt	ttactgactg	2580
tccaagggtg	tttctgtaaa	tgcactctga	attatcaaaag	gaatattgta	atcaacataa	2640
tttaagggtca	aaatattttta	ctgtaaatcaa	cagaaatttt	acttttttta	aaattatggc	2700
aatattcaca	ttttattttt	gtcagcagtt	tgtcaataca	tttttggtca	gaatatttaa	2760
atgcccactt	actataaatt	aaacataget	tatcaattca	aagccctcat	tattcttggc	2820
aagtatattt	tttatttata	atcaatattt	acctttttta	aaatacttta	taaagaattc	2880
agtttcaata	agaetgatat	gttcttagaa	tgtcagtgta	ttgttttaca	atitcatagg	2940
aatcttgaat	actgggecac	actaatcact	agatacttta	aatatcatct	ttggatataa	3000
ataacttctg	ataatgtatg	ctatacgaag	ttatctctct	ggttttggag	ctacaaaaaa	3060
caaattcaag	acataagtct	caagctagcc	ttaaattgct	gattagctag	ttttcaatac	3120
aactaattta	aaaatctcaa	tcttcagaag	tatatatatt	attatatctt	cagggaaga	3180
aaaaaatata	tataiatate	ctaaaactag	aagaaggaaac	tcagtaacc	accacaataa	3240
atagaagaaa	geccagctaa	caggaggtcc	tctccaatta	cgattttage	acaaaaataa	3300
gactttatcc	ctttgttcc	cacatcacat	gtcaacttac	agaggagaaa	aaagaatgag	3360
afaacacegg	ggcccagtg	gaagataatt	ttgaattcag	aactgtagaa	gctttaaaag	3420
tacagacta	gagacagatc	agtcaacca	tgaacaacaaa	gggaagaagg	atggagagaa	3480
ggctttaaca	tgtgctgaac	accattatg	taaaaaaaac	attttaggct	gggc	3534



图 1



图 2



Gene targeting with donor with multiple donor fragments

图 3

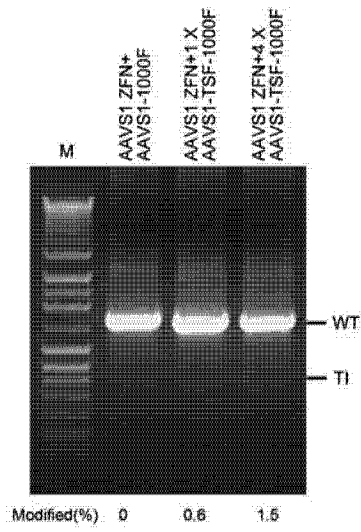


图 4

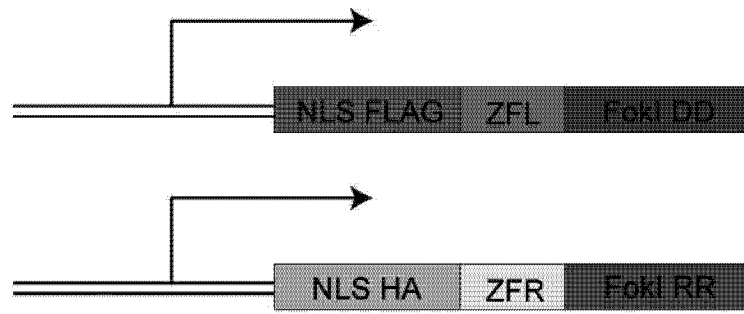


图 5



图 6

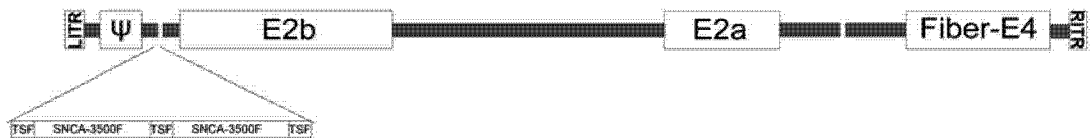


图 7