



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110312803 A

(43)申请公布日 2019. 10. 08

(21)申请号 201780079593.7

(74)专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司  
72003

(22)申请日 2017.12.20

代理人 付文川 吴小瑛

(30)优先权数据

62/437,347 2016.12.21 US

(51)Int.Cl.

C12N 15/73(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

C12N 15/66(2006.01)

2019.06.21

C12N 15/90(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/067484 2017.12.20

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2018/119021 EN 2018.06.28

(71)申请人 许景焜

地址 美国华盛顿州

申请人 林隆志 许益华

(72)发明人 林隆志 许益华

权利要求书2页 说明书12页

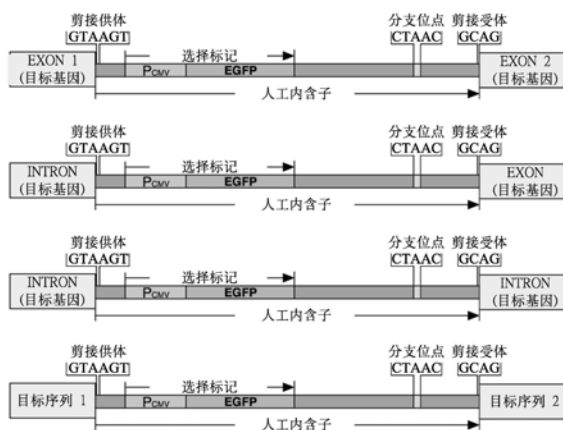
序列表35页 附图11页

## (54)发明名称

编辑核酸序列的组合物及方法

## (57)摘要

本公开提供一种用于在体外、离体或体内同时靶向核酸序列,并在细胞中提供内含子选择(intron selection)的组合物。该组合物包括一或多个核酸分子,每个核酸分子包含两端与封端序列(capping sequence)相接的人工核酸序列,以及核酸外切酶λ-核酸重组酶β蛋白质,或包含编码该核酸外切酶λ-核酸重组酶β蛋白质的核酸序列的线性或环状载体,其中每个封端序列与位于该目标核酸序列中的区域为同源(homologous),且该人工核酸序列为内含子序列。本公开还提供一种借由将该组合物引入细胞中以编辑目标核酸序列的方法。



1. 一种用于编辑目标核酸序列的组合物,包括:  
一或多个核酸分子,所述核酸分子各自包含两端与封端序列相接的人工核酸序列,其中,所述封端序列各自与位于所述目标核酸序列中的区域为同源,以及  
核酸外切酶 $\lambda$ -核酸重组酶 $\beta$ 蛋白质,或包含编码所述核酸外切酶 $\lambda$ -核酸重组酶 $\beta$ 蛋白质的核酸序列的线性或环状载体。
2. 根据权利要求1所述的组合物,其中,所述核酸分子是双链DNA。
3. 根据权利要求1所述的组合物,其中,所述人工核酸序列是内含子序列。
4. 根据权利要求3所述的组合物,其中,所述人工核酸序列包括剪接供体位点、剪接受体位点、分支位点、选择标记及其组合中的至少一者。
5. 根据权利要求4所述的组合物,其中,所述选择标记包括可操作地连接至报道基因的启动子。
6. 根据权利要求5所述的组合物,其中,所述启动子是组成型启动子、可诱导型启动子、或细胞或组织专一性启动子,以及所述报道基因是荧光报道基因、酶报道基因或抗生素选择基因。
7. 根据权利要求1所述的组合物,其中,位于所述目标核酸序列中的所述区域是外显子或内含子。
8. 根据权利要求1所述的组合物,进一步包括核酸外切酶及抗RecBCD蛋白质中的至少一者。
9. 根据权利要求1所述的组合物,其中,所述载体进一步包括可操作地连接至所述编码核酸外切酶 $\lambda$ -核酸重组酶 $\beta$ 蛋白质的核酸序列的启动子。
10. 根据权利要求9所述的组合物,其中,所述载体包括选自编码核酸外切酶的核酸序列、编码抗RecBCD蛋白质的核酸序列及报道基因所组成的组中的至少一者。
11. 根据权利要求10所述的组合物,其中,所述启动子是组成型启动子、可诱导型启动子、或细胞或组织专一性启动子,以及所述报道基因是荧光报道基因、酶报道基因或抗生素选择基因。
12. 根据权利要求10所述的组合物,其中,所述载体沿5'至3'的下游方向包含:所述启动子、所述编码核酸外切酶 $\lambda$ -核酸重组酶 $\beta$ 蛋白质的核酸序列、所述编码核酸外切酶的核酸序列及所述报道基因。
13. 根据权利要求1所述的组合物,其中,所述核酸分子以0.05 $\mu$ g至5 $\mu$ g的量存在。
14. 根据权利要求1所述的组合物,与选自锌指核酸酶、类转录活化因子效应物核酸酶及成簇规律间隔短回文重复序列/Cas系统中的至少一者组合使用。
15. 一种编辑目标核酸序列的方法,包括:  
将根据权利要求1所述的组合物引入细胞中,以诱导所述目标核酸序列中发生遗传改变。
16. 根据权利要求15所述的方法,进一步包括检测具有所述遗传改变的所述细胞。
17. 根据权利要求15所述的方法,其中,所述目标核酸序列的编辑选自重组工程、基因组修饰、基因敲入及基因敲除所组成的组中的至少一者。
18. 根据权利要求15所述的方法,其中,所述细胞是真核细胞。
19. 根据权利要求18所述的方法,其中,所述真核细胞是哺乳动物细胞。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中,所述哺乳动物细胞是人类细胞。

## 编辑核酸序列的组合物及方法

### 技术领域

[0001] 本公开涉及一种在体外、离体或体内用于编辑细胞中目标基因组基因座 (genomic locus) 的组合物及方法,更特定而言,涉及在真核细胞中用于重组工程、基因组修饰、基因敲入或基因敲除的组合物及方法。

### 背景技术

[0002] 细菌基因组编辑已被充分地确立及应用用于敲入/敲除 (knockin/knockout) 细菌基因,例如成簇规律间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 相关蛋白质 (CRISPR/Cas)、cre-lox 系统及  $\lambda$ -Red 系统。

[0003] 数十年来,cre-lox 系统已应用于真核系统的基因修饰。源自噬菌体的 cre-lox 系统主要用于经基因修饰的动物。对于借由 cre 蛋白质识别及同源重组的外源片段及目标生物体,需要一个特殊的 lox 序列。植入片段与选择标记及/或外源基因组合,并经 lox 序列双封端 (bi-capping) 的线性化 DNA。为了重组工程,应事先在目标生物体基因组上创建特殊序列 lox。

[0004] CRISPR/Cas 系统则完全不同于 cre-lox 系统,其衍生自细菌针对噬菌体的自我防卫及免疫记忆,如 lox 的特别序列是不必要的。用于 CRISPR/Cas 的机器为 Cas 蛋白质与引导 RNA (guidant RNA, gRNA) 所构成的核糖蛋白质复合物。该引导 RNA 携带短的同源区域 (大约 17bp 至 24bp) 以专一性地靶向基因组。用于 I 型及 II 型 CRISPR 的核心 Cas 蛋白质 Cas3 及 Cas9 作为核糖酶,用以切割目标序列附近的 DNA。此种机制被细菌及古细菌广泛采用。由于 Cas-gRNA 复合物的组合物,使衍生自聚球藻 (*Synechococcus* sp.) 的 II 型 CRISPR 较为简单且更容易在其他生物系统中进行编辑。

[0005] 目前,cre-lox 及 CRISPR/Cas 系统是在真核生物中进行基因组编辑的主要工具。但基于其机制的限制,使得遗传修饰既耗时且效率甚低。在基因转植动物中建立 cre-lox 系统以及在目标生物体上创建特殊序列 lox 是如此地困难,以致在大多数生物体中,位于预计位点的 lox 序列并不常见。相对地,CRISPR/Cas 较为优越,并采用使用者设计的序列。CRISPR/Cas 的 gRNA 靶向使用者设计的特定区域。但 gRNA 的序列太短而不能在整个基因组上定位,其将导致大量的非专一性靶向 (即所谓的脱靶效应 (off-target effect))。再者,CRISPR 在基因组编辑中的作用是通过引入由核心 Cas 蛋白质引起的双链断裂 (double-strand breaking, DSB),以及借由非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 整合外源片段而完成。但 NHEJ 的效率甚低,且经基因修饰的细胞无法直接有效地被选择,以致进一步限制了 CRISPR/Cas 的应用。

[0006]  $\lambda$ -Red 系统最初是在大肠杆菌 (*E. coli*) 的 recA 基因研究中被发现。于 recA 缺陷的大肠杆菌菌株中,在  $\lambda$  噬菌体中编码的系统显示重组效率增加了约 100 倍,而 recA<sup>+</sup> 的大肠杆菌菌株,其重组效率则显示下降。因此,该系统命名为“Red” (Recombination defective (重组缺陷)),以区别于大肠杆菌宿主中的重组系统。该  $\lambda$ -Red 系统包括  $\alpha$ 、 $\beta$  及  $\gamma$  蛋白质,其分别作用为核酸外切酶、单链 DNA (ssDNA) 退火 (annealing) 蛋白质及 RecBCD 复合物的抑制剂。已

知 $\lambda$ -Red重组包括三个主要步骤：(1)  $\alpha$ -蛋白质从5' 到3' 分解双链DNA (dsDNA)；(2)  $\beta$ -蛋白质结合dsDNA的粘端 (sticky end)；(3) 借由RecA的侵入将单链DNA (ssDNA) 与目标序列退火。 $\lambda$ -Red不仅能够构建包含选择标记及/或外源基因的大DNA片段，亦可借由在一或两个不同区域处同源的两个序列封盖该片段的两端而加以高度特定及重组。

[0007]  $\lambda$ -Red重组工程已在大肠杆菌中用于单基因敲入/敲除的可治愈质粒 (curable plasmid) 中构建。最近，其亦用于枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 的基因组编辑。另外，亦从其他噬菌体中发现类似的系统，并证实其在原核生物中的重组效率。但作为跨物种或多生物系统的基因组编辑的迫切要求，利用 $\lambda$ -Red及其相关噬菌体重组系统在真核细胞及生物体 (包括植物、动物及人类) 中提供更直接、有效及精确的基因组编辑方法仍是一个重要课题。

## 发明内容

[0008] 鉴于上述课题，本公开提供一种在体外、离体或体内用于编辑细胞中的目标核酸序列的组合物，其包括：一或多个核酸分子，每个核酸分子包含两端与封端序列 (capping sequence) 相接的人工核酸序列；以及核酸外切酶 $\lambda$ -核酸重组酶 $\beta$ 蛋白质，或包含编码该核酸外切酶 $\lambda$ -核酸重组酶 $\beta$ 蛋白质的核酸序列的载体。

[0009] 于本公开的一实施方式中，每个封端序列与目标核酸序列中的区域为同源 (homologous)。目标核酸序列可为外显子 (exon) 或内含子 (intron)，取决于目的，如敲入、敲除、框内插入 (in-frame insertion)、基因组修饰或重组工程。再者，人工核酸序列可为内含子序列。此外，该人工核酸序列可包含选择标记 (selection marker)，其允许直接、有效且精确地选择基因组中的整合体 (integrant)。另外，该载体可进一步包括可操作地连接至编码核酸外切酶 $\lambda$ -核酸重组酶 $\beta$ 蛋白质的核酸序列的启动子，及选自于由编码核酸外切酶的核酸序列、编码抗RecBCD蛋白质的核酸序列及报道基因 (reporter gene) 所组成的组中的至少一者。

[0010] 于本公开的一实施方式中，该组合物进一步包括核酸外切酶及抗RecBCD蛋白质中的至少一者。于本公开的另一实施方式中，该组合物与选自锌指核酸酶 (zinc-finger nucleases, ZFNs) 系统、类转录活化因子效应物核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases, TALENs) 系统及成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) /Cas系统中的至少一者组合使用。

[0011] 根据另一实施方式，本公开进一步提供一种在体外、离体或体内用于编辑细胞中的目标核酸序列的方法。该方法包括：将上述组合物引入细胞中，以诱导于该目标部位中发生遗传改变。该方法进一步包括在适于诱导核酸分子及目标核酸序列之间的同源重组的条件下培养该细胞。于本公开的一实施方式中，引入细胞中或由细胞中的载体编码的核酸外切酶 $\lambda$ -核酸重组酶 $\beta$ 蛋白质与核酸分子结合，并进一步促进核酸分子的封端序列与目标核酸序列中的区域之间的退火 (annealing)，借以在细胞中形成重组体 (recombinant)。此外，作为内含子序列的人工核酸序列将在目标核酸序列的RNA产物成熟期间借由RNA剪接而被除去，同时于细胞中发生遗传改变。于本公开的一实施方式中，可基于选择标记检测及克隆具有遗传改变的细胞。

[0012] 综上所述，本公开提供一种用于在体外、离体或体内同时靶向核酸序列，并在细胞中提供内含子选择 (包括选择标记的内含子) 的组合物。另外，本公开提供一种用于编辑细

胞中的目标部位以进行诸如重组工程、基因组修饰、基因敲入及基因敲除的更直接、有效且精确的方法。此外,该细胞可为真核细胞,包括但不限于哺乳动物细胞,例如人类细胞及人类诱导性多能干细胞。

### 附图说明

[0013] 本公开可借由参考附图并阅读下述实施例的详细描述,而更全面地理解的。

[0014] 图1A显示包含两端与封端序列相接的人工核酸序列的核酸分子的配置。

[0015] 图1B显示质粒pAB-mCherry的构建。

[0016] 图2A至图2C显示借由荧光显微镜术(图2A)或流式细胞测量术(图2B)观察到的使用GJB2-EX-AF及质粒pAB-mCherry以不同比率共转染人类HEK293T细胞48小时的结果图,并基于借由流式细胞测量术评估的EGFP阳性细胞数加以定量(图2C)。数据表示为平均值 $\pm$ sem,\* $p < 0.05$ ,\*\* $p < 0.01$ , $n = 5$ 。

[0017] 图2D显示源自GJB2-EX-AF及质粒pAB-mCherry共转染的HEK293T细胞的DNA,对EGFP基因及GJB2基因进行PCR扩增的电泳结果。

[0018] 图3是使用GJB2-EX-AF及质粒pAB-mCherry共转染人类诱导多能干细胞(iPSC)48小时的结果图。白色方框及箭头表示具有eGFP绿色荧光的两个独立的人类iPSC植株(左图及右图)。比例尺:100 $\mu$ m。

[0019] 图4A是两端与GJB2基因的外显子1及外显子2相接的人工内含子的示意图。GJB2\_EXON2\_wt表示GJB2基因的正常外显子2;GJB2\_EXON2\_c35\_mut表示GJB2基因的外显子2中的c.35delG突变;而GJB2\_EXON2\_c109\_mut表示GJB2基因的外显子2中的c.109G>A突变。

[0020] 图4B是使用质粒pAB-mCherry及GJB2-EX35-AF或GJB2-EX109-AF共转染人类HEK293T细胞48小时的结果图。观察到具有eGFP绿色荧光的HEK293T细胞。比例尺:100 $\mu$ m。

[0021] 图4C显示源自不同组转染的HEK293T细胞的DNA,对EGFP基因进行PCR扩增的电泳结果,其中泳道M、1、2及3分别表示kb梯标、c.35delG组、媒液对照组及c.109G>A组。

[0022] 图4D及图4E显示源自不同组转染的HEK293T细胞的DNA的GJB2基因的外显子2测序结果。

[0023] 图5A及图5B显示借由流式细胞测量术分析本公开的方法及CRISPR/Cas9n(D10A)系统(图5A)的GJB2基因c.35的基因编辑效率比较,并使用条形图表示(图5B),其中(a)为媒介(vehicle)对照组,(b)为GJB2-EX35-AF组,(c)为GJB2-EX35-AF+质粒pAB组,以及(d)为GJB2-EX35-AF+CRISPR/Cas9n(D10A)<sup>R+L</sup>组。数据表示为平均值 $\pm$ sem,\*\* $p < 0.01$ 相较于单独GJB2-EX-AF,# $p < 0.05$ , $n = 6$ 。

### 具体实施方式

[0024] 下述实施例为举例说明本公开。鉴于说明书所公开的内容,本技术领域技术人员可了解本公开的其他优点。本公开亦可如其他具体实施例所说明般的来实施或应用。于不违反本公开精神及范畴下,可根据不同的实施方案及应用进而修改及/或更改该实施例。

[0025] 本公开提供一种用于在体外、离体或体内编辑细胞中目标核酸序列的组合物。该组合物包括:一或多个核酸分子,每个核酸分子包含两端与封端序列相接的人工核酸序列;以及核酸外切酶 $\lambda$ -核酸重组酶 $\beta$ 蛋白质,或包含编码该核酸外切酶 $\lambda$ -核酸重组酶 $\beta$ 蛋白质的

核酸序列的载体。

[0026] 本公开的组合物可用于在体外、离体或体内同时靶向核酸序列,并于细胞中提供内含子选择。本文所述的术语“内含子选择”意指使用包括用于基因工程的选择标记的人工内含子序列的过程。

[0027] 于本公开的一实施方式中,该载体是环状质粒或线性DNA。

[0028] 于本公开的一实施方式中,每个封端序列与位于目标核酸序列中的区域为同源。于本公开的另一实施方式中,位于目标核酸序列的区域是外显子或内含子。

[0029] 于本公开的一实施方式中,每个封端序列各自独立地具有长度为10至5000个核苷酸;例如,每个封端序列的长度范围选自10至500、500至1000、1000至1500、1500至2000、2000至2500、2500至3000、3000至3500、3500至4000、4000至4500及4500至5000个核苷酸所组成的组。于本公开的另一实施方式中,两种封端序列均有长度为10至500个核苷酸。

[0030] 于本公开的一实施方式中,该载体可包括可操作地连接至编码核酸外切酶 $\lambda$ -核酸重组酶 $\beta$ 蛋白质的核酸序列的启动子。于本公开的另一实施方式中,该启动子是组成型启动子(constitutive promoter),例如:细胞巨大病毒(cytomegalovirus,CMV)启动子;可诱导型启动子,如四环素可诱导型启动子(四环素On及Off系统);或细胞或组织专一性启动子,如多巴胺神经元专一性启动子(酪氨酸羟化酶启动子)、星状细胞专一性启动子(GFAP启动子)及感觉毛细胞专一性启动子(Myosin启动子)。

[0031] 于本公开的一实施方式中,该载体进一步包括选自自由编码核酸外切酶的核酸序列、编码抗RecBCD蛋白质的核酸序列及报道基因所组成的组中的至少一者。于本公开的另一实施方式中,该核酸外切酶是5'至3'核酸外切酶,例如:T5或 $\lambda$ 核酸外切酶。于本公开的又一实施方式中,该报道基因是荧光报道基因、酶报道基因或抗生素选择基因。

[0032] 于本公开的一实施方式中,该载体包括启动子、编码核酸外切酶 $\lambda$ -核酸重组酶 $\beta$ 蛋白质的核酸序列、编码 $\lambda$ 核酸外切酶的核酸序列,以及报道基因。于本公开的另一实施方式中,该载体(环状质粒或线性DNA)沿5'至3'的下游方向包含:启动子、编码核酸外切酶 $\lambda$ -核酸重组酶 $\beta$ 蛋白质的核酸序列、编码核酸外切酶的核酸序列及报道基因。可理解的是,于本公开的另一实施方式中, $\lambda$ 核酸外切酶可由其他5'至3'核酸外切酶替代。

[0033] 于本公开的一实施方式中,该人工核酸序列是内含子序列。于本公开的另一实施方式中,该人工核酸序列包括剪接供体位点(splice donor site)、剪接受体位点(splice acceptor site)及分支位点(branch site)。

[0034] 于本公开的一实施方式中,该核酸分子是单链DNA或双链DNA。于一实施方式中,该核酸分子是双链DNA。于另一实施方式中,该核酸分子是聚合酶连锁反应(PCR)的产物。

[0035] 于本公开的一实施方式中,该人工核酸序列包括选择标记。于本公开的另一实施方式中,该选择标记包括可操作地连接至报道基因的启动子。于本公开的另一实施方式中,该报道基因是荧光报道基因、酶报道基因或抗生素抗性基因,且该启动子是组成型启动子,例如:细胞巨大病毒(cytomegalovirus,CMV)启动子;可诱导型启动子,如四环素可诱导型启动子(四环素On及Off系统);或细胞或组织专一性启动子,如多巴胺神经元专一性启动子(酪氨酸羟化酶启动子)、星状细胞专一性启动子(GFAP启动子)及感觉毛细胞专一性启动子(Myosin启动子)。

[0036] 于本公开的一实施方式中,该核酸分子以0.05 $\mu$ g至5 $\mu$ g的量存在于该组合物中。于

一实施方式中,该核酸分子量的下限值选自0.05 $\mu$ g、0.06 $\mu$ g、0.1 $\mu$ g、0.12 $\mu$ g、0.15 $\mu$ g及0.2 $\mu$ g,而其上限值选自0.25 $\mu$ g、0.5 $\mu$ g、1 $\mu$ g、1.2 $\mu$ g、1.5 $\mu$ g及2.5 $\mu$ g。于本公开的另一实施方式中,该核酸分子以0.05 $\mu$ g至1.5 $\mu$ g的量存在于该组合物中。于本公开的又一实施方式中,该核酸分子以0.1 $\mu$ g至1.5 $\mu$ g的量存在于该组合物中。于本公开的再一实施方式中,该核酸分子以0.12 $\mu$ g至1.2 $\mu$ g的量存在于该组合物中。本发明所属领域技术人员可了解该核酸分子的量可依据细胞密度而调整。

[0037] 于本公开的一实施方式中,该核酸分子对该载体的重量比为2:1至1:10,例如1:1至1:8。

[0038] 于本公开的一实施方式中,该组合物进一步包括核酸外切酶或抗RecBCD蛋白质。于本公开的另一实施方式中,该核酸外切酶是5'至3'核酸外切酶,例如T5或 $\lambda$ 核酸外切酶。于本公开的又一实施方式中,该组合物进一步包括 $\lambda$ 核酸外切酶及/或抗RecBCD蛋白质。

[0039] 于本公开的一实施方式中,该组合物进一步包括ZFN、TALEN或CRISPR/Cas系统。于本公开的另一实施方式中,该组合物与选自ZFN、TALEN或CRISPR/Cas系统的至少一者组合使用。

[0040] 依据本公开的再一实施方式,本公开提供一种用于在体外、离体或体内编辑细胞中目标核酸序列的方法。该方法包括将上述组合物引入细胞中,以诱导于目标核酸序列中发生遗传改变。

[0041] 于本公开的一实施方式中,将上述组合物引入细胞后,该核酸分子结合于细胞中被引入或是借由载体所编码的核酸外切酶 $\lambda$ -核酸重组酶 $\beta$ 蛋白质。再者,该核酸外切酶 $\lambda$ -核酸重组酶 $\beta$ 蛋白质促进核酸分子的封端序列与位于目标核酸序列中与封端序列同源的区域之间的退火,以形成重组体。于本公开的一实施方式中,在适于诱导核酸分子与目标核酸序列之间同源重组的条件下培养该细胞。

[0042] 于本公开的一实施方式中,该人工核酸序列是内含子序列,其可于细胞中具有遗传改变的目标核酸序列的RNA产物成熟期间借由RNA剪接去除。

[0043] 于本公开的一实施方式中,该目标核酸序列的编辑选自重组工程、基因组修饰、基因敲入及基因敲除所组成的组中的至少一者。

[0044] 于本公开的一实施方式中,该细胞可为真核细胞。于一实施方式中,该真核细胞可为哺乳动物细胞。于另一实施方式中,该哺乳动物细胞可为人类细胞。于又一实施方式中,该人类细胞是干细胞,例如:诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells,iPSCs);或转分化细胞,如诱导性神经元或诱导性心肌细胞。

[0045] 实施例

[0046] 菌株及培养基

[0047] 使用细菌菌株大肠杆菌DH5a(Yeastern Biotech Co.,Ltd.)来培育克隆载体及构建。大肠杆菌DH5a在由0.5%的酵母提取物(DIFCO,USA)、1%的胰蛋白胨(tryptone)(DIFCO,USA)、1%的NaCl(第一化工,台湾)所构成的Luria-bertani培养基中培养。应用100 $\mu$ g/ml氨苄青霉素(ampicillin)培养重组的大肠杆菌,以选择及维持质粒。

[0048] 人胚胎肾(HEK293T)细胞的培养

[0049] 将人胚胎肾(HEK293T)细胞(ATCC<sup>®</sup> CRL-3216<sup>™</sup>)维持在含有10%的胎牛血清(FBS,GIBCO)、1%的青霉素及链霉素溶液(GIBCO)的Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM,



GIBCO) 中,并在37℃、5%的CO<sub>2</sub>培养箱中培养。细胞每周分裂两次。

[0050] 人类诱导多能干细胞 (hiPSC) 的产生

[0051] 人类 iPSCs 由正常人类真皮纤维母细胞 (NHDF, PromoCell) 产生。如先前所述 (Maekawa 等, Nature, 2011, 474 (7350) : 225-9), iPSC 借由转导编码四种转录因子的逆转录病毒载体而重新编程。简而言之, 质粒 pMXs-OCT4、SOX2、KLF4 及 GLIS1 (Addgene) 各别地包装成逆转录病毒颗粒, 借由使用 TransIT-X2 (Mirus) 转染至纤维母细胞。逆转录病毒转导每隔一天进行两次。转导 1 周后, 将  $1 \times 10^5$  的感染的纤维母细胞重新接种在作为喂养细胞 (feeder cell) 的失活的鼠胚胎纤维母细胞 (MEF) 上。该 MEF 细胞的初代培养物如先前所述 (Lei Y, Methods Mol. Biol., 2013, 1031: 59-64)。隔一天, 将培养基换成人胚胎干细胞 (hESC) 培养基, 并每天更换。在接种 21 至 28 天后, 将细胞群各自转移至器官培养皿 (ODC; BD) 中的喂养细胞培养物, 以发展出额外用于表征的细胞群。

[0052] DNA 转染

[0053] 所有使用的 DNA 构建体在大肠杆菌中繁殖, 并借由 Midi 质粒试剂盒 (Geneaid) 分离。HEK293T 细胞与 iPSC 的转染借由分别使用 TransITX2 及 TransIT-LT1 (Mirus) 而实现。依据用户手册得知, 在每个转染中需要 80% 汇合 (confluent) 的 HEK293T 细胞, 且每个转染是在 6 孔板中每孔含有 7.5  $\mu$ l 的 TransITX2 及 2.5  $\mu$ g 的 DNA。此外, 人类 iPSC 的转染条件如下所述: 每个转染中含有  $2 \times 10^6$  的细胞、4  $\mu$ g 的 DNA 及 12  $\mu$ l 的 TransIT-LT1。

[0054] 实施例 1: 质粒 pAB-mCherry、pAB 及 pAF-INTRON 的构建

[0055] 为了构建质粒 pAB-mCherry (图 1B, 使用 SnapGene<sup>®</sup> 创建), PCR 引物经设计以扩增源自携带  $\lambda$ -Red 系统的质粒 pKD46 (Coli Genetics Stock Center, CGSC) 的 bet 与 exo 基因、源自质粒 pRECEIVER-L122 的 IRES 序列 (Genecopoeia) 及 pcDNA3.1-mCherry 的骨架 (Genecopoeia)。所有 PCR 产物借由单步恒温 DNA 装配 (one-step ISO DNA assembly) (Gibson DG, Methods Enzymol., 2011, 498: 349-61) 于 50℃ 纯化及连接。pAB-mCherry 的序列如 SEQ ID NO.1 所示。

[0056] 无 mCherry 的质粒 pAB 衍生于 pAB-mCherry, 该 pAB-mCherry 借由 XbaI 分解除去 mCherry 基因, 并随后自我连接。作为阴性对照组的无能力质粒 pABDN 借由 SpeI-NheI 分解从质粒 pAB 去除 CMV 启动子而构建。

[0057] 为了在本公开的一实施方式中构建用于制备包含两端与封端序列相接的人工核酸序列的核酸分子的质粒 pAF-INTRON, 源自 pRECEIVER-LV122 的 CMV 启动子及 EGFP 基因借由 PCR 扩增及单步恒温 DNA 装配, 作为质粒 pQE-EGFP 次克隆至质粒 pQE70 (QIAGEN) 中。所有的剪接点、剪接供体及受体, 以及分支点皆借由定点突变方法创建 (Kunkel TA, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82: 488-92)。将构建体转形到大肠杆菌 DH5a 中, 并借由 DNA 定序证实具有全部人工剪接点。所获 pAF-INTRON 序列如 SEQ ID NO.2 所示。

[0058] 实施例 2: GJB2-EX-AF、GJB2-EX35-AF 及 GJB2-EX109-AF 的制备

[0059] 从人类 HEK293T 细胞的基因组 DNA 中分别扩增 GJB2 基因的外显子 1 及 2。借由 PCR 从质粒 pAF-INTRON 制备线性化人工内含子。GJB2 外显子 1 及 2, 以及线性化人工内含子借由单步恒温 DNA 装配而组装, 并次克隆至质粒 pQE70 中, 获得质粒 pQE-GJB2-EXAF。质粒 pQE-GJB2-EXAF 借由 PCR 于 GJB2 基因的外显子 2 上产生缺失突变 (c.35delG) 或从 G 至 A (c.109G>A) 的点突变, 并使用 DpnI 消除原始质粒的模板, 以获得质粒 pQE-GJB2-EX35AF 及 pQE-GJB2-

EX109AF。正常或含突变c.35delG或c.109G>A的GJB2基因的外显子2分别如SEQ ID NOs.3至5所示。

[0060] 为富集线性化的GJB2-EX-AF、GJB2-EX35-AF及GJB2-EX109-AF，源自质粒pQE-GJB2-EXAF、pQE-GJB2-EX35AF及pQE-GJB2-EX109AF的PCR扩增借由用于克隆GJB2基因的外显子1及2(图4A)的引物进行。GJB2-EX-AF、GJB2-EX35-AF及GJB2-EX109-AF的序列分别如SEQ ID NOs.6至8所示。

[0061] 下述表1表示用于实施例1及2的引物序列。

[0062] 表1

[0063]

质粒	引物	序列 (5' 至 3' )	SEQ ID NO.
pAB-mCherry	CMVpro-r	GCA GTA CTC ATG GTG GCG AGC TCG GTA CCA AGC TTA AGT	9
	cher-f	AGA CGA CCT TCC GCC ACC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG	10
	bet-f	CTT GGT ACC GAG CTC GCC ACC ATG AGT ACT GCA CTC GCA ACG	11
	bet-r	CCG CGG ATC TCA CTA TCA TGC TGC CAC CTT CTG CTC T	12
	IRES-I-f	AAG GTG GCA GCA TGA TAG TGA GAT CCG CGG CCG CA	13
	IRES-I-r	CGG TGT CAT GGT GGC GGA AGG TCG TCT CCT TGT GGG	14
	exo-f	AGA CGA CCT TCC GCC ACC ATG ACA CCG GAC ATT ATC CTG C	15
	exo-r	GCC GCG GAT CTC TAG ATC ATC GCC ATT GCT CCC CAA AT	16
	IRES-II-f	GAG CAA TGG CGA TGA TCT AGA GAT CCG CGG CCG CA	17

[0064]

	IRES-II-r	CCT TGC TCA CCA TGG TGG CGG AAG GTC GTC TCC TTG TGG G	18
pAF-INTRON	EB-VEC-f	ACG CCT GGG GTA ATG ACT CTC T	19
	EB-VEC-r	CTC GAG GTG AAG ACG AAA GGG	20
	L122-VEC-f	CCC TTT CGT CTT CAC CTC GAG GTA AGT TAG GCA GGG ATA TTC ACC AT	21
	L122-U-r	TCC CTA GTT AGC GAG AGA GCT CCC A	22
	L122-D-f	GGG AGC TCT CTC GCT AAC TAG GGA A	23
	L122-VEC-r	AGA GAG TCA TTA CCC CAG GCG TCT GCA TAA ATA AAA AAA ATT AGT CAG C	24
pQE-GJB2-EXAF	GJB-EX1-f	GGG GTG CGG TTA AAA GGC G	25
	GJB-EX1-FU-r	GTG AAT ATC CCT GCC TAA CTT ACC TGC GTC GGG AGG AAG C	26
	GJB-EX2-FU-f	TGA CTA ATT TTT TTT ATT TAT GCA GAG CAA ACC GCC CAG AGT AG	32
	GJB-EX2-r	ATG TCT CCG GTA GGC CAC GT	33
	AF-INTRON-f	AGG TAA GTT AGG CAG GGA TAT TC	34
	AF-INTRON-r	CTG CAT AAA TAA AAA AAA	35

[0065]

		TTA GTC AGC	
	M3-GJ-f	GAA GTT CAT CAA GGG CAG CTC ACT CAA AGG CGG TAA TA	36
	M3-GJ-r	TCG GTG AAT TTA AAA CTC GAG GTG AAG ACG AAA GGG	37
突变 c. 35delG	GJB-35delG-f	CTG GGG GTG TGA ACA AAC ACT	38
	GJB-35delG-r	TTT GTT CAC ACC CCC AGG ATC	39
突变 c. 109G>A	GJB-109G/A-f	TGA TCC TCA TTG TGG CTG CAA A	40
	GJB-109G/A-r	GCA GCC ACA ATG AGG ATC ATA AT	41

[0066] 实施例3:质粒pAB-mCherry及GJB2-EX-AF至人类HEK293T细胞及iPSC细胞的共转染

[0067] 使用不同比例的pAB-mCherry及GJB2-EX-AF转染至人类HEK293T及iPSC细胞,并在6孔板中培养48小时。借由荧光显微镜术观察结果。再者,借由流式细胞测量术分析重组效率。

[0068] 荧光显微镜术的观察

[0069] 如图2A所示,大部分HEK293T细胞表达eGFP,其由包埋于GJB2-EX-AF人工内含子的EGFP所编码,并以CMV启动子驱动。再者,还观察到两个独立人类iPSC植株中eGFP的表达(图3)。因此,此种结果证实于GJB2-EX-AF与人类HEK293T细胞及iPS细胞中的目标部位之间发生重组。

[0070] 流式细胞测量术的分析

[0071] 使用流式细胞测量术进行定量分析以进一步评估重组效率。具体而言,所有的分析均使用SH800细胞分选系统(Sony),其由马偕纪念医院(台湾新北市)的流式细胞仪核心设备提供。使用SH800软件(Sony)进行数据分析。根据前向角及侧向散射光圈选(gating),将坏死细胞及碎片排除在分析之外。尽可能收集10,000个圈选事件进行分析。

[0072] 表2表示图2B及图2C显示不同比例的pAB-mCherry与GJB2-EX-AF的人类HEK293T细胞中的重组效率。

[0073] 表2

[0074]	(pAB-mCherry : GJB2-EX-AF)	(1 $\mu$ g : 0.12 $\mu$ g)	(1 $\mu$ g : 1.2 $\mu$ g)
	EGFP-阳性细胞 (%)	42%	71%

[0075] 此外,将经1 $\mu$ g的pAB-mCherry及0.12 $\mu$ g的GJB2-EX-AF转染的人类HEK293T细胞中的EGFP(+)/mCherry(+)细胞分选,以验证GJB2-EX-AF整合入GJB2基因部位,并借由RT-PCR分析内源性GJB2mRNA的表达。如图2D所示,结果显示pAB重组工程系统并不会干扰HEK293T细胞的内源性GJB2基因mRNA的表达。

[0076] 实施例4:将GJB2-EX35-AF及GJB2-EX109-AF与质粒pAB-mCherry共转染至人类HEK293T细胞

[0077] 如实施例2所述,GJB2-EX35-AF及GJB2-EX109-AF设计为在GJB2基因的外显子2中分别含有c.35delG或c.109G>A突变。于GJB2基因的c.35delG及c.109G>A突变在高加索人的耳聋突变中占大多数,故已确定其等为听力损伤的重要遗传原因。

[0078] 将GJB2-EX35-AF及GJB2-EX109-AF分别与pAB-mCherry一起转染至HEK293T细胞48小时(线性DNA:载体=0.12 $\mu$ g:1 $\mu$ g),并借由荧光显微镜观察结果。如图4B所示,一些HEK293T细胞表达eGFP,其在GJB2-EX35-AF及GJB2-EX109-AF的人工内含子中编码,并借由CMV启动子驱动。

[0079] 此外,借由凝胶电泳确认源自经转染的HEK293T细胞的基因组DNA的PCR扩增EGFP基因。如图4C所示,泳道2是不含DNA样品的媒介对照组,且仅泳道1及3(即c.35delG及c.109G>A突变)显示EGFP条带,其证明基因组编辑。

[0080] 此外,经转染的HEK293T细胞的基因组DNA借由DNA测序进一步证实。如图4D及图4E所示,测序结果显示GJB2基因的遗传改变确实发生在使用GJB2-EX35-AF或GJB2-EX109-AF转染的HEK293T细胞中。

[0081] 因此,此种结果证明于GJB2-EX35-AF及GJB2-EX109-AF与人类HEK293T细胞中的目标部位之间发生重组。另外,此种结果显示,本公开导致人类细胞中从突变型外显子至正常外显子的目标置换。类似地,可以理解的是,透过本公开的使用,可将特定疾病中的突变外显子替换为正常外显子。即证实本公开有用于基因组编辑及基因治疗。

[0082] 实施例5:pAB重组工程系统与CRISPR/Cas9n(D10A)的基因靶向效率的比较

[0083] 产生c.35突变的质粒经设计及构建成pCRISPR/Cas9n(D10A)<sup>L</sup>(SEQ ID NO.27)及pCRISPR/Cas9n(D10A)<sup>R</sup>(SEQ ID NO.28),其由Cold Spring Biotech Corp(台湾)生产。合成pCRISPR/Cas9n(D10A)<sup>R</sup>及pCRISPR/Cas9n(D10A)<sup>L</sup>的gRNA,其序列分别如SEQ ID NO.29及SEQ ID NO.30所示。GJB2基因的c.35delG借由Cas9蛋白质与gRNA进行,其从质粒pCRISPR/Cas9n(D10A)<sup>R</sup>表达。亦使用NdeI降解启动子区域,以去活化gRNA及cas9基因的表达,借以构建作为阴性对照的无能力质粒pCRISPR/Cas9n(D10A)<sup>DN</sup>(SEQ ID NO.31)。

[0084] 将人类HEK293T细胞与媒介(vehicle)处理以作为对照组,或与GJB2-EX35-AF及pAB或CRISPR/Cas9n(D10A)<sup>R+L</sup>共转染48小时。然后,使用流式细胞测量术观察并分析表达GFP的HEK293T细胞。进一步分析及分选GFP(+)细胞,以评估基因靶向的效率。

[0085] 如图5A及图5B所示,人类HEK293T细胞经(a)媒介、(b)GJB2-EX35-AF、(c)GJB2-EX35-AF及质粒pAB、或(d)GJB2-EX35-AF及CRISPR/Cas9n(D10A)<sup>R+L</sup>处理,其中pAB对于GJB2

基因c.35delG突变的基因编辑效率为52.4%，显著高于CRISPR/Cas9n (D10A) 的42.3%。

[0086] 根据上述实施例可知，本公开显示人工内含子EGFP报道基因与HEK293T细胞中的目标GJB2基因组基因座之间发生 $\lambda$ -Red重组。借由pAB重组工程系统在HEK293T细胞中成功编辑GJB2基因的耳聋基因突变c.35delG及c.109G>A，并由dsDNA/EGFP报道基因监测。上述数据表明，通过pAB重组工程系统可实现于HEK293T细胞中从野生型基因组序列至经设计的突变基因组序列的目标置换。因此，本公开的pAB重组工程系统借由利用dsDNA/EGFP报道基因及FACS系统的结合而提供用于人类基因组编辑的高效且易于选择的平台。其可应用于体外及体内创建人类疾病模型，以促进发现疾病机制及药物开发。总而言之，本公开的pAB重组工程系统不仅在基础科学领域中，且在临床及再生医学领域中皆能促进精确及高效的人类基因组靶向/编辑。

[0087] 上述为详细描述本公开的示例性实施例。但应理解，本公开的范围不限于所公开的实施例。反之，其意在涵盖各种修改及类似的重新排列。是以，权利要求应赋予最广泛的解释，以涵盖所有此种修改及类似的安排。

## 序列表

&lt;110&gt; 林隆志 (Lin, Lung-Jr)

许益华 (Hsu, Yi-Hua)

许景焜 (Hsu, Ethan)

&lt;120&gt; 编辑核酸序列的组合物及方法

&lt;130&gt; 29649US

&lt;150&gt; US 62/437,347

&lt;151&gt; 2016-12-21

&lt;160&gt; 41

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 9536

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; pAB-mCherry

&lt;400&gt; 1

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg 60  
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120  
cgagcaaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180  
ttagggtttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240  
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 300  
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360  
cccgccatt gacgtcaata atgacgatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420  
attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgcca cttggcagta catcaagtgt 480  
atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540  
atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttgca gtacatctac gtattagtca 600  
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660  
actcacgggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720  
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg 780  
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca 840  
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagaccaa gctggctagc 900  
gtttaaactt aagcttggta ccgagctcgc caccatgagt actgactcg caacgctggc 960  
tgggaagctg gctgaacgtg tcggcatgga ttctgtcgac ccacaggaa tgatcaccac 1020  
tcttcgccag acggcattta aagtgatgc cagcgatgcg cagttcatcg cactactgat 1080  
cgttgccaac cagtacggcc ttaatccgtg gacgaaagaa atttacgct ttctgataa 1140  
gcagaatggc atcgttccgg tgggtggcgt tgatggctgg tcccgcata tcaatgaaaa 1200  
ccagcagttt gatggcatgg actttgagca ggacaatgaa tcctgtacat gccgattta 1260



ccgcaaggac cgtaatcatc cgatctgcgt taccgaatgg atggatgaat gccgccgca 1320  
 accattcaaa actcgcgaag gcagagaaat cacggggccg tggcagtcgc atcccaaagc 1380  
 gatgttacgt cataaagcca tgattcagtg tgcccgtctg gccttcggat ttgctggtat 1440  
 ctatgacaag gatgaagccg agcgcattgt cgaaaatact gcatacactg cagaacgtca 1500  
 gccggaacgc gacatcactc cggttaacga tgaaacatg caggagatta acactctgct 1560  
 gatcgccctg gataaaacat gggatgacga cttattgccg ctctgttccc agatatttcg 1620  
 ccgcgacatt cgtgcatcgt cagaactgac acaggccgaa gcagtaaaag ctcttgatt 1680  
 cctgaaacag aaagccgcag agcagaaggt ggcagcatga tagtgagatc cgcgccgca 1740  
 tagataactg atccagtggt ctggaattaa ttcgctgtct gcgaggcca gctgttgggg 1800  
 tgagtactcc ctctcaaaag cgggcatgac ttctgcgcta agattgtcag tttccaaaa 1860  
 cgaggaggat ttgatattca cctggcccgc ggtgatgctt ttgagggtgg ccgcgtccat 1920  
 ctggtcagaa aagacaatct ttttgttgc aagcttgagg tgtggcaggc ttgagatctg 1980  
 gccatacact tgagtgacaa tgacatccac tttgccttc tctccacagg tgtccactcc 2040  
 caggccaac tgcaggtcga gcatgcatct agggcgcca attccgccc tctcccccc 2100  
 acccctctcc ctccccccc cctaacgta ctggccgaag ccgcttgaa taaggccgt 2160  
 gtgcgtttgt ctatatgta tttccacca tattgccgtc ttttgcaat gtgaggccc 2220  
 ggaaacctgg ccctgtctc ttgacgagca ttctagggg tctttccct ctcgcaaag 2280  
 gaatgcaagg tctgttgaat gtcgtgaagg aagcagttc tctggaagct tcttgaagac 2340  
 aaacaacgtc tgtagcgacc ctttgaggc agcggaacc cccacctggc gacaggtgcc 2400  
 tctgcccga aaagccacgt gtataagata cacctgcaa ggcggcaca cccagtgcc 2460  
 acgttgtagg ttgatagtt gtgaaagag tcaaatggt ctctcaagc gtattcaaca 2520  
 aggggctgaa ggatgcccag aaggtacccc attgtatggg atctgatctg gggcctcgt 2580  
 gcacatgctt tacatgtgtt tagtcgaggt taaaaaacg tctaggccc ccgaaccag 2640  
 gggacgtggg tttccttga aaaacacgat gataagcttg ccacaacca caaggagac 2700  
 acctccgcc accatgacac cggacattat cctgcagcgt accgggatcg atgtgagagc 2760  
 tgtcgaacag ggggatgat cgtggcaca attacggctc ggcgtcatca ccgcttcaga 2820  
 agttcacaac gtgatagcaa aaccccgtc cggaaagaag tggcctgaca tgaatatgtc 2880  
 ctacttcac acctgcttg ctgaggttg caccggtgtg gctccggaag ttaacgctaa 2940  
 agcactggcc tgggaaaac agtacgagaa cgacgccaga acctgtttg aattcacttc 3000  
 cggcgtgaat gtactgaat cccgatcat ctatcgcgac gaaagtatgc gtaccgctg 3060  
 ctctcccgat ggtttatgca gtgacggcaa cggcctgaa ctgaaatgcc cgtttacctc 3120  
 ccgggatttc atgaagtcc ggctcgggtg ttctgagcc ataaagtacg cttacatggc 3180  
 ccaggatgac tacagcatgt gggtagcgc aaaaaatgcc tggactttg ccaactatga 3240  
 cccgcgatg aagcgtgaag gctgcatta tgtcgtgatt gagcgggatg aaaagtacat 3300  
 ggcgagttt gacgagatcg tgccggagt catcgaaaa atggacgagg cactggctga 3360  
 aattggttt gtatttgggg agcaatggc atgatctaga gatccgccc gcgatagata 3420  
 actgatccag tgtctggaa ttaattcgt gtctgcgagg gccagctgtt ggggtgagta 3480  
 ctccctctca aaagcgggca tgacttctgc gctaagattg tcagttcca aaaacagga 3540  
 ggatttgata ttcacctggc ccgcggtgat gccttgagg gtggccgct ccatctggtc 3600

agaaaagaca atctttttgt tgtcaagctt gaggtgtggc aggcttgaga tctggccata 3660  
cacttgagtg acaatgacat ccactttgcc tttctctcca caggtgtcca ctcccaggtc 3720  
caactgcagg tcgagcatgc atctagggcg gccaatccg cccctctccc ccccaccctt 3780  
ctccctcccc cccccctaac gttactggcc gaagccgctt ggaataaggc cgggtgtcgt 3840  
ttgtctatat gttattttcc accatattgc cgtcttttgg caatgtgagg gcccggaaac 3900  
ctggccctgt cttcttgacg agcattccta ggggtctttc ccctctcgcc aaaggaatgc 3960  
aaggtctggt gaatgtcgtg aaggaagcag ttctctgga agcttcttga agacaaacia 4020  
cgtctgtagc gaccctttgc aggcagcgga accccccacc tggcgacagg tgcctctgcg 4080  
gccaaaagcc acgtgtataa gatacacctg caaaggcggc acaaccagcag tgccacgttg 4140  
tgagttggat agttgtggaa agagtcaaag ggctctctc aagcgtattc aacaaggggc 4200  
tgaaggatgc ccagaaggta cccattgta tgggatctga tctggggcct cgggtgcatc 4260  
gctttacatg tgtttagtcg aggttaaaaa aacgtctagg cccccgaac cacggggacg 4320  
tggttttctt ttgaaaaaca cgatgataag cttgccaca cccacaagga gacgacctc 4380  
cgccaccatg gtgagcaagg gcgaggagga taacatggcc atcatcaagg agttcatgcg 4440  
cttcaagggt cacatggagg gctccgtgaa cggccacgag ttcgagatcg agggcgaggg 4500  
cgagggccgc ccctacgagg gcaccagac cgccaagctg aaggtgacca agggtggccc 4560  
cctgcccttc gcctgggaca tctgtctccc tcagttcatg tacggctcca aggcctacgt 4620  
gaagcacccc gccgacatcc ccgactactt gaagctgtcc ttccccgagg gcttcaagtg 4680  
ggagcgcgtg atgaacttcg aggacggcgg cgtggtgacc gtgaccagc actcctcctt 4740  
gcaggacggc gaggttcatc acaaggtgaa gctgcgcggc accaacttcc cctccgacgg 4800  
ccccgtaatg cagaagaaga ccatgggctg ggaggcctcc tccgagcggg tgtacccga 4860  
ggacggcgcc ctgaaggcg agatcaagca gaggtgaa ctgaaggacg gcggccacta 4920  
cgacgctgag gtcaagacca cctacaaggc caagaagccc gtgcagctgc ccggcgccta 4980  
caacgtcaac atcaagttg acatcacctc ccacaacgag gactacacca tcgtggaaca 5040  
gtacgaacgc gccgagggcc gccactccac cggcggcatg gacgagctgt acaagtaatc 5100  
tagagggccc gtttaaaccg gctgatcagc ctgactgtg cttctagtt gccagccatc 5160  
tgtttgttgc ccctccccg tgccttctt gaccctggaa ggtgccactc cactgtctt 5220  
ttcctaataa aatgaggaaa ttgcatcga ttgtctgagt aggtgtcatt ctattctggg 5280  
gggtggggtg gggcaggaca gcaaggggga ggattggaa gacaatagca ggcattgctg 5340  
ggatgcggtg ggctctatgg cttctgaggc ggaaagaacc agctggggct ctagggggta 5400  
tccccacgcg ccctgtagcg gcgcattaag cgcggcgggt gtggtggtta cgcgcagcgt 5460  
gaccgctaca cttgccagcg ccctagcgcc cgtctcttc gctttcttc cttctttct 5520  
cgccacgttc gccggttcc cccgtcaagc tctaaatcgg gggctcctt tagggttccg 5580  
athtagtget ttacggcacc tcgaccccaaaa aacttgat tagggtgatg gttcacgtag 5640  
tgggcatcg ccctgataga cggtttttcg ccctttgacg ttggagtcca cgtttcttaa 5700  
tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaacct atctcggtct attcttttga 5760  
tttataaggg attttgcga tttcggccta ttggttaaaa aatgagctga ttttaaaaa 5820  
athtaacgcg aattaattct gtggaatgtg tgtcagttag ggtgtgaaa gtccccaggc 5880  
tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt agtcagcaac caggtgtgga 5940

aagtccccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca tgcatctcaa ttagtcagca 6000  
accatagtc ccgccctaac tccgccatc ccgccctaa ctccgccag ttccgccat 6060  
tctccgcccc atggctgact aatTTTTTTT atttatgcag aggccgaggc cgcctctgcc 6120  
tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc tTTTTTggag gcctaggctt ttgcaaaaag 6180  
ctccccgggag cttgtatata cattttcggg tctgatcaag agacaggatg aggatcgttt 6240  
cgcatgattg aacaagatgg attgcacgca gtttctccgg ccgcttgggt ggagaggcta 6300  
ttcggctatg actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg 6360  
tcagcgcagg ggcgcccgt tcttttgtc aagaccgacc tgtccgggtc cctgaatgaa 6420  
ctgcaggacg aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc ttgcgcagct 6480  
gtgctcgacg ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc tattgggca agtgccgggg 6540  
caggatctcc tgtcatctca ctttctctc gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca 6600  
atgcggcggc tgcatacget tgatccggct acctgccc atcgaccacca agcgaacat 6660  
cgcatcgagc gagcacgtac tcggatggaa gccggtcttg tcgatcagga tgatctggac 6720  
gaagagcatc aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gcgcatgccc 6780  
gacggcgagg atctcgtcgt gacccatggc gatgctctg tgccgaatat catggtggaa 6840  
aatggccgct tttctggatt catcgactgt ggccggctgg gtgtggcggc ccgctatcag 6900  
gacatagcgt tggctaccg tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg ggctgaccgc 6960  
ttcctcgtgc tttacggtat cggcctccc gattcgcagc gcatcgctt ctatcgctt 7020  
cttgacgagt tcttctgagc gggactctgg gtttcgaaat gaccgaccaa gcgacgccc 7080  
acctgccatc acgagattc gattccaccg ccgcttcta tgaaaggttg ggcttcggaa 7140  
tcgttttccg ggacccggc tggatgatcc tccagcgcgg ggatctcatg ctggagttct 7200  
tcgcccacc caacttgttt attgcagctt ataatggtta caaataaagc aatagcatca 7260  
caaatttcac aaataaagca ttttttcac tgcattctag ttgtggttg tccaaactca 7320  
tcaatgtatc ttatcatgct tgtataccgt cgacctctag ctagagcttg gcgtaatcat 7380  
ggctcatagct gtttctctg tgaattggt atccgctcac aattccacac aacatacag 7440  
ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggt cctaatgagt gagctaactc acattaattg 7500  
cgttgcgctc actgcccgt tccagtcgg gaaacctgc gtgccagctg cattaatgaa 7560  
tcggccaacg cgcggggaga ggcggttgc gtattggcg ctcttccgct tctcgtca 7620  
ctgactcgtc gcgctcgtc gttcggctgc ggcgagcgg atcagctcac tcaaaggcgg 7680  
taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc 7740  
agcaaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc 7800  
cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac 7860  
tataaagata ccaggcgtt cccctggaa gctcctctg gcgctctct gttccgacc 7920  
tgccgcttac cggatacctg tccgcttcc tccctcggg aagcgtggcg ctttctcata 7980  
gctcacgctg taggtatctc agttcgggt aggtcgttc ctccaagctg ggctgtgtgc 8040  
acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgc cttatccgg taactatcgt cttgagtcca 8100  
accggtaag acacgacta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag 8160  
cgaggatgt aggcggtgct acagagttct tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta 8220  
gaagaacagt atttggatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg 8280

gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tttttttggt tgcaagcagc 8340  
 agattacgcg cagaaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct acggggctctg 8400  
 acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt catgagatta tcaaaaagga 8460  
 tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat gaagttttaa atcaatctaa agtatatatg 8520  
 agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct 8580  
 gtctatttcg ttcatccata gttgcctgac tccccgtcgt gtagataact acgatacggg 8640  
 agggttacc atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc 8700  
 cagatttatac agcaataaac cagccagccg gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa 8760  
 ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgccggga agctagagta agtagttcgc 8820  
 cagttaatag tttgcgcaac gttgttgcca ttgctacagg catcgtgggtg tcacgctcgt 8880  
 cgtttggtat ggcttcattc agtccgggtt cccaacgatc aaggcgagtt acatgatccc 8940  
 ccatgttggtg caaaaaagcg gttagctect tcggctectc gatcgttgtc agaagtaagt 9000  
 tggccgcagt gttatcactc atggttatgg cagcactgea taattctctt actgtcatgc 9060  
 catccgtaag atgcttttct gtgactggtg agtactcaac caagtcattc tgagaatagt 9120  
 gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata 9180  
 gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga 9240  
 tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt aaccactcg tgcaccaac tgatcttcag 9300  
 catcttttac tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa 9360  
 aaaagggaaat aagggcgaca cggaaatggt gaatactcat actcttcctt tttcaatatt 9420  
 attgaagcat ttatcagggt tattgtctca tgagcggata catatttgaa tgtatttaga 9480  
 aaaataaaca aatagggggt cgcgcacat ttccccgaaa agtgccacct gacgtc 9536

<210> 2

<211> 5728

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pAF-INTRON

<400> 2

ctcgaggtaa gttaggcagg gatattcacc attatcgttt cagaccacc tccaacccc 60  
 gaggggacc gacaggccc aaggaataga agaagaagg ggagagagag acagagacag 120  
 atccattcga ttagtgaacg gatctcgacg gtatcgatac tagtattatg cccagtacat 180  
 gaccttatgg gactttccta cttggcagta catctacgta ttagtcatcg ctattacat 240  
 ggtgatgcgg ttttggcagt acatcaatgg gcgtggatag cggtttgact cacggggatt 300  
 tccaagtctc caccattg acgtcaatgg gagtttgtt tggcaccaaa atcaacggga 360  
 ctttcaaaa tgtcgtaaca actccgccc attgacgcaa atgggcgta ggcgtgtacg 420  
 gtgggaggtc tatataagca gagctcgttt agtgaaccgt cagatgcct ggagacgcca 480  
 tccacgctgt tttgacctc atagaagatt ctagaacat ggctagcgtg agcaaggcg 540  
 aggagctgtt caccggggtg gtgccatcc tggtcgagct ggacggcgac gtaaacggcc 600  
 acaagttcag cgtgtccggc gagggcgagg gcgatgccac ctacggcaag ctgaccctga 660

agttcatctg caccaccggc aagctgcccc tgccttgccc caccctcgtg accaccctga 720  
 cctacggcgt gcagtgcttc agccgctacc ccgaccacat gaagcagcac gactttctca 780  
 agtccgccat gcccgaaggc tacgtccagg agcgcacat cttcttcaag gacgacggca 840  
 actacaagac ccgcccggag gtgaagtctg agggcgacac cctggtgaac cgcacgagc 900  
 tgaagggcat cgacttcaag gaggacggca acatcctggg gcacaagctg gagtacaact 960  
 acaacagcca caacgtctat atcatggccc acaagcagaa gaacggcatc aaggtgaact 1020  
 tcaagatccg ccacaacatc gaggacggca gcgtgcagct cgccgaccac taccagcaga 1080  
 acacccccat cggcgacggc cccgtgctgc tgcccgacaa ccactacctg agcaccagct 1140  
 ccgccctgag caaagacccc aacgagaagc gcgacacat ggtcctgctg gaggctctga 1200  
 ccgccgccgg gatcactctc ggcatggacg agctgtacaa gtgatccgtt caactagcag 1260  
 accgtttaaa caattcaagc ttttttcaat tctcgacctc gagacaaatg gcagtattca 1320  
 tccacaattt taaaagaaaa ggggggattg gggggtacag tgcaggggaa agaatagtag 1380  
 acataatagc aacagacata caaactaaag aattacaaaa acaaattaca aaaattcaaa 1440  
 attttcgggt ttattacagg gacagcagag atccagtttg gccgcggctc gagggggttg 1500  
 gggttgcgcc ttttccaagg cagccctggg tttgcgcagg gacgcggctg ctctgggcgt 1560  
 ggttccggga aacgcagcgg cgccgaccct gggctctgca cattcttcac gtccgttcgc 1620  
 agcgtcaccg ggatcttcgc cgtaccctt gtgggcccc cggcgacgct tctgctccg 1680  
 cccctaagtc gggaaggttc cttgcggttc gcggcgtgcc ggacgtgaca aacggaagcc 1740  
 gcacgtctca ctagtaccct cgcagacgga cagcgcagg gagcaatggc agcgcgccga 1800  
 ccgcgatggg ctgtggccaa tagcggctgc tcagcaggc gcgccgagag cagcggccgg 1860  
 gaagggcgcg tgcgggaggc ggggtgtggg gcggtagtgt gggccctgtt cctgcccgcg 1920  
 cgggtttccg cattctgcaa gcctccggag cgcacgtcgg cagtcggctc cctcgttgac 1980  
 cgaatcaccg acctctctcc ccaggggat ccaccggagc ttaccatgac cgagtacaag 2040  
 cccacggctc gcctcgccac ccgacgacgac gtccccaggg cggtagcac cctcgccgcc 2100  
 gcgttcgccg actaccccgc cacgcgccac accgtcgatc cggaccgcca catcgagcgg 2160  
 gtcaccgagc tgcaagaact cttcctcacg cgcgtcgggc tcgacatcgg caaggtgtgg 2220  
 gtcgcggacg acggcgccgc ggtggcggtc tggaccacgc cggagagcgt cgaagcgggg 2280  
 gcggtgttcg ccgagatcgg cccgcgcatg gccgagttga gcggttcccg gctggccgcg 2340  
 cagcaacaga tggaaggcct cctggcgccc caccggccca aggagcccgc gtggttctctg 2400  
 gccaccgtcg gcgtctcgcc cgaccaccag ggcaagggtc tgggcagcgc cgtcgtgctc 2460  
 cccggagtgg aggcggccga gcgcgccggg gtgcccgcct tctggagac ctccgcgccc 2520  
 cgcaacctcc cttctacga gcggtctggc ttaccgtea ccgccagct cgaggtgccc 2580  
 gaaggaccgc gcacctggtg catgaccgc aagcccgtg cctgacgccc gccccacgac 2640  
 ccgcagcgc cgaccgaaag gagcgcacga cccatgcat cgttaagagc tcggtacctt 2700  
 taagaccaat gacttacaag gcagctgtag atcttagcca ctttttaaaa gaaaaggggg 2760  
 gactggaagg gctaattcac tcccacgaa gacaagatct gctttttgct tgtactgggt 2820  
 ctctctgggt agaccagatc tgagcctggg agctctctcg ctaactaggg aaccactgc 2880  
 ttaagcctca ataaagcttg ccttgagtgc ttcaagtagt gtgtgccctg ctgttggtgtg 2940  
 actctggtaa ctagagatcc ctacagacct tttagtcagt gtggaatc tctagcagta 3000

gtagttcatg tcatcttatt attcagtatt tataacttgc aaagaaatga atatcagaga 3060  
 gtgagaggaa cttgtttatt gcagcttata atggttacia ataaagcaat agcatcacia 3120  
 atttcacaaa taaagcattt ttttcaactgc attctagttg tggtttgtcc aaactcatca 3180  
 atgtatctta tcatgtctgg ctctagctat cccgccctca actccgccc tcccgccct 3240  
 aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga ctaatttttt ttattttatgc 3300  
 agacgcctgg ggtaatgact ctctagcttg aggcatcaaa taaaacgaaa ggctcagtcg 3360  
 aaagactggg cctttcgttt tatctgttgt ttgtcgggta acgctctcct gagtaggaca 3420  
 aatccgccct ctagagctgc ctgcgcggtt tcggtgatga cggtgaaaac ctctgacaca 3480  
 tgcagctccc ggagacggtc acagcttgtc tgtaagcggg tgccgggagc agacaagccc 3540  
 gtcagggcgc gtcagcgggt gttggcgggt gtcggggcgc agccatgacc cagtcacgta 3600  
 gcgatagcgg agtgtatact ggcttaacta tgcggcatca gagcagattg tactgagagt 3660  
 gcggccgctg cgggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc gcatcaggcg 3720  
 ctcttccgct tcctcgetca ctgactcget gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcgg 3780  
 atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa 3840  
 gaacatgtga gcaaaaaggcc agcaaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc 3900  
 gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag 3960  
 gtggcgaaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt ccccctggaa gctccctcgt 4020  
 gcgctctcct gttccgacct tgccgcttac cggataactg tccgcctttc tcccttcggg 4080  
 aagcgtggcg ctttctcata gctcagctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg 4140  
 ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ctttatccgg 4200  
 taactatcgt cttgagtcca acccgtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac 4260  
 tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcgggtct acagagttct tgaagtgggtg 4320  
 gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt 4380  
 taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg 4440  
 tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcaaaaa aaaggatctc aagaagatcc 4500  
 tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacggt aagggatttt 4560  
 ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaa aatgaagttt 4620  
 taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag 4680  
 tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcattc atagttgcct gactccccgt 4740  
 cgtgtagata actacgatac gggagggtct accatctggc cccagtctg caatgatacc 4800  
 gcgagaccca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc 4860  
 cgagcgcaga agtggctctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta attggtgccg 4920  
 ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgcgc aacgttggtg ccattgctac 4980  
 aggcatcgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggttca ttcagctccg gttcccaacg 5040  
 atcaaggcga gttacatgat ccccatggt gtgcaaaaa gcggttagct ctttcggctc 5100  
 tccgatcgtt gtcagaagta agttggccc agtgttatca ctcatggtta tggcagcact 5160  
 gcataattct ctactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc 5220  
 aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat 5280  
 acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc 5340

ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac 5400  
 tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa 5460  
 aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataaggcg acacggaat gttgaatact 5520  
 catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg 5580  
 atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg 5640  
 aaaagtgcca cctgacgtct aagaaacat tattatcatg acattaacct ataaaaatag 5700  
 gcgtatcacg aggccctttc gtcttcac 5728

<210> 3

<211> 322

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<220>

<221> 外显子

<222> (1) .. (322)

<400> 3

agc aaa ccg ccc aga gta gaa gat gga ttg ggg cac gct gca gac gat 48  
 Ser Lys Pro Pro Arg Val Glu Asp Gly Leu Gly His Ala Ala Asp Asp  
 1                    5                    10                    15  
 cct ggg ggg tgt gaa caa aca ctc cac cag cat tgg aaa gat ctg gct 96  
 Pro Gly Gly Cys Glu Gln Thr Leu His Gln His Trp Lys Asp Leu Ala  
                   20                    25                    30  
 cac cgt cct ctt cat ttt tcg cat tat gat cct cgt tgt ggc tgc aaa 144  
 His Arg Pro Leu His Phe Ser His Tyr Asp Pro Arg Cys Gly Cys Lys  
                   35                    40                    45  
 gga ggt gtg ggg aga tga gca ggc cga ctt tgt ctg caa cac cct gca 192  
 Gly Gly Val Gly Arg Ala Gly Arg Leu Cys Leu Gln His Pro Ala  
                   50                    55                    60  
 gcc agg ctg caa gaa cgt gtg cta cga tca cta ctt ccc cat ctc cca 240  
 Ala Arg Leu Gln Glu Arg Val Leu Arg Ser Leu Leu Pro His Leu Pro  
                   65                    70                    75  
 cat ccg gct atg ggc cct gca gct gat ctt cgt gtc cac gcc agc gct 288  
 His Pro Ala Met Gly Pro Ala Ala Asp Leu Arg Val His Ala Ser Ala  
 80                    85                    90                    95  
 cct agt ggc cat gca cgt ggc cta ccg gag aca t 322  
 Pro Ser Gly His Ala Arg Gly Leu Pro Glu Thr  
                   100                    105

<210> 4

<211> 321

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<220>

<221> 外显子

<222> (1) .. (321)

<400> 4

```

agc aaa ccg ccc aga gta gaa gat gga ttg ggg cac gct gca gac gat 48
Ser Lys Pro Pro Arg Val Glu Asp Gly Leu Gly His Ala Ala Asp Asp
1           5           10           15
cct ggg ggt gtg aac aaa cac tcc acc agc att gga aag atc tgg ctc 96
Pro Gly Gly Val Asn Lys His Ser Thr Ser Ile Gly Lys Ile Trp Leu
           20           25           30
acc gtc ctc ttc att ttt cgc att atg atc ctc gtt gtg gct gca aag 144
Thr Val Leu Phe Ile Phe Arg Ile Met Ile Leu Val Val Ala Ala Lys
           35           40           45
gag gtg tgg gga gat gag cag gcc gac ttt gtc tgc aac acc ctg cag 192
Glu Val Trp Gly Asp Glu Gln Ala Asp Phe Val Cys Asn Thr Leu Gln
           50           55           60
cca ggc tgc aag aac gtg tgc tac gat cac tac ttc ccc atc tcc cac 240
Pro Gly Cys Lys Asn Val Cys Tyr Asp His Tyr Phe Pro Ile Ser His
65           70           75           80
atc cgg cta tgg gcc ctg cag ctg atc ttc gtg tcc acg cca gcg ctc 288
Ile Arg Leu Trp Ala Leu Gln Leu Ile Phe Val Ser Thr Pro Ala Leu
           85           90           95
cta gtg gcc atg cac gtg gcc tac cgg aga cat 321
Leu Val Ala Met His Val Ala Tyr Arg Arg His
           100          105

```

<210> 5

<211> 322

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<220>

<221> 外显子

<222> (1) .. (322)

<400> 5

```

agc aaa ccg ccc aga gta gaa gat gga ttg ggg cac gct gca gac gat 48
Ser Lys Pro Pro Arg Val Glu Asp Gly Leu Gly His Ala Ala Asp Asp
1           5           10           15
cct ggg ggg tgt gaa caa aca ctc cac cag cat tgg aaa gat ctg gct 96
Pro Gly Gly Cys Glu Gln Thr Leu His Gln His Trp Lys Asp Leu Ala

```



20	25	30	
cac cgt cct ctt cat ttt tgc cat tat gat cct cat tgt ggc tgc aaa			144
His Arg Pro Leu His Phe Ser His Tyr Asp Pro His Cys Gly Cys Lys			
35	40	45	
gga ggt gtg ggg aga tga gca ggc cga ctt tgt ctg caa cac cct gca			192
Gly Gly Val Gly Arg Ala Gly Arg Leu Cys Leu Gln His Pro Ala			
50	55	60	
gcc agg ctg caa gaa cgt gtg cta cga tca cta ctt ccc cat ctc cca			240
Ala Arg Leu Gln Glu Arg Val Leu Arg Ser Leu Leu Pro His Leu Pro			
65	70	75	
cat ccg gct atg ggc cct gca gct gat ctt cgt gtc cac gcc agc gct			288
His Pro Ala Met Gly Pro Ala Ala Asp Leu Arg Val His Ala Ser Ala			
80	85	90	95
cct agt ggc cat gca cgt ggc cta ccg gag aca t			322
Pro Ser Gly His Ala Arg Gly Leu Pro Glu Thr			
100	105		

<210> 6

<211> 3815

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> GJB2-EX-AF

<220>

<221> prim\_转录

<222> (1)..(3815)

<400> 6

ggggtgcggt taaaaggcgc cacggcggga gacagtggtt gcggccccgc agcggccccgc 60  
cgctcctctc cccgactcgg agcccctcgg cggcgccccg cccaggacct gcctaggagc 120  
gcaggagccc cagcgcagag accccaacgc cgagaccccc gccccggccc cgccgcgctt 180  
cctcccgaag caggtaggta agttaggcag ggatattcac cattatcggt tcagacctac 240  
ctcccaacct cgaggggacc cgacaggccc gaaggaatag aagaagaagg tggagagaga 300  
gacagagaca gatccattcg attagtgaac ggatctcgac ggtatcgata ctagtattat 360  
gcccagtaca tgaccttatg ggactttctt acttggcagt acatctacgt attagtcac 420  
gctattacca tggatgatcg gttttggcag tacatcaatg ggcgtggata gcggtttgac 480  
tcacggggat ttccaagtct ccacccatt gacgtcaatg ggagtttggt ttggcaccaa 540  
aatcaacggg actttccaaa atgtcgtaac aactccgccc cattgacgca aatgggcggt 600  
aggcgtgtac ggtgggaggt ctatataagc agagctcggt tagtgaaccg tcagatcgcc 660  
tggagacgcc atccacgctg ttttgacctc catagaagat tctagaacca tggctagcgt 720  
gagcaagggc gaggagctgt tcaccggggt ggtgcccatc ctggtcgagc tggacggcga 780

cgtaaacggc cacaagttca gcgtgtccgg cgagggcgag ggcgatgcca cctacggcaa 840  
gctgaccctg aagttcatct gcaccaccgg caagctgccc gtgccctggc ccaccctcgt 900  
gaccaccctg acctacggcg tgcagtgtt cagccgctac cccgaccaca tgaagcagca 960  
cgacttcttc aagtccgcca tgcccgaagg ctacgtccag gagcgcacca tcttcttcaa 1020  
ggacgacggc aactacaaga cccgcgccga ggtgaagttc gagggcgaca ccctggtgaa 1080  
ccgcatcgag ctgaagggca tcgacttcaa ggaggacggc aacatcctgg ggcacaagct 1140  
ggagtacaac tacaacagcc acaacgtcta tatcatggcc gacaagcaga agaacggcat 1200  
caaggtgaac ttcaagatcc gccacaacat cgaggacggc agcgtgcagc tcgccgacca 1260  
ctaccagcag aacaccccca tcggcgacgg ccccgctgtg ctgcccgaca accactacct 1320  
gagcaccag tccgccctga gcaaagacc caacgagaag cgcgatcaca tggctctgct 1380  
ggagttcgtg accgcccgcg ggatcactct cggcatggac gagctgtaca agtgatccgt 1440  
tcaactagca gaccgtttaa acaattcaag ctttttcaa ttctcgacct cgagacaaat 1500  
ggcagtattc atccacaatt ttaaaagaaa aggggggatt ggggggtaca gtgcagggga 1560  
aagaatagta gacataatag caacagacat acaactaaa gaattacaaa aacaattac 1620  
aaaaattcaa aattttcggg tttattacag ggacagcaga gatccagttt ggccgcggct 1680  
cgaggggggt ggggttgcgc cttttccaag gcagccctgg gtttgcgcag ggacgcggct 1740  
gctctggggc tggttccggg aaacgcagcg gcgccgacc tgggtctcgc acattcttca 1800  
cgtccgttcg cagcgtcacc cggatcttcg ccgctacct tgtgggcccc ccggcgacgc 1860  
ttctgtctcc gccctaagt cggaaggtt cttgctggtt cgcggcgtgc cggacgtgac 1920  
aaacggaagc cgcacgtctc actagtacc tcgcagacgg acagcggcag ggagcaatgg 1980  
cagcgcgccg accgcgatgg gctgtggcca atagcggctg ctcagcaggg cgcgccgaga 2040  
gcagcggccg ggaagggggc gtgcgggagg cggggtgtgg ggcggtagtg tgggccctgt 2100  
tctgccccgc gcggtgttcc gcattctgca agcctccgga gcgcacgtcg gcagtcggct 2160  
ccctcgttga ccgaatcacc gacctctctc cccaggggga tccaccggag cttaccatga 2220  
ccgagtacaa gccacggtg cgcctcgcca cccgcgacga cgtccccagg gcggtacgca 2280  
ccctcggcgc cgcgttcgcc gactaccccg ccacgcgcca caccgtcgat ccggaccgcc 2340  
acatcgagcg ggtcaccgag ctgcaagaac tcttctcac gcgcgtcggg ctcgacatcg 2400  
gcaaggtgtg ggtcgcggac gacggcgccg cgggtggcgt ctggaccacg ccggagagcg 2460  
tcgaagcggg ggcggtgttc gccgagatcg gccgcgcat ggccgagttg agcggttccc 2520  
ggctggccgc gcagcaacag atggaaggcc tcttgccgc gcaccggccc aaggagcccc 2580  
cgtggttctt gccaccgtc ggcgtctcgc ccgaccaca gggcaagggt ctgggcagcg 2640  
ccgtcgtgct ccccgagtg gaggcggccg agcgcgccgg ggtgcccgc ttctggaga 2700  
cctccgcgcc ccgcaacctc ccttctacg agcggctcgg cttaccgtc accgccgacg 2760  
tcgagtgcc cgaaggaccg cgcacctggt gcatgaccg caagcccgg gctgacgcc 2820  
cgccccacga cccgcagcgc ccgaccgaaa ggagcgcacg accccatgca tcgttaagag 2880  
ctcggtaact ttaagaccaa tgacttacia ggcagctgta gatcttagcc actttttaa 2940  
agaaaagggg ggactggaag ggctaattca ctcccaacga agacaagatc tgctttttgc 3000  
ttgtactggg tctctctggt tagaccagat ctgagcctgg gagctctctc gtaactagg 3060  
gaaccactg cttaaacctc aataaagctt gccttgagt cttcaagtag tgtgtgccc 3120

tctgttgtgt gactctggta actagagatc cctcagacce ttttagtcag tgtggaaaat 3180  
 ctctagcagt agtagttcat gtcattttat tattcagtat ttataacttg caaagaaatg 3240  
 aatatcagag agtgagagga acttgtttat tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa 3300  
 tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt tttttcactg cattctagtt gtggtttgtc 3360  
 caaacatcatc aatgtatctt atcatgtctg gctctagcta tcccgccct aactccgcc 3420  
 atcccccccc taactccgcc cagttccgcc cattctccgc cccatggctg actaattttt 3480  
 tttattttatg cagagcaaac cgcccagagt agaagatgga ttggggcacg ctgcagacga 3540  
 tcctggggggg tgtgaacaaa cactccacca gcattggaaa gatctggctc accgtcctct 3600  
 tcatttttctg cattatgacg ctcgttgtgg ctgcaaagga ggtgtgggga gatgagcagg 3660  
 ccgactttgt ctgcaacacc ctgcagccag gctgcaagaa cgtgtgctac gatcactact 3720  
 tccccatctc ccacatccgg ctatgggcc tgcagctgat ctctgtgtcc acgccagcgc 3780  
 tcctagtggc catgcacgtg gcctaccgga gacat 3815

<210> 7

<211> 3814

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> GJB2-EX35-AF

<220>

<221> prim\_转录

<222> (1) .. (3814)

<400> 7

ggggtgcggt taaaaggcgc cacggcggga gacagtggtt gcggccccgc agcggcccgc 60  
 cgctcctctc cccgactcgg agcccctcgg cggcgccccg cccaggacc gcctaggagc 120  
 gcaggagccc cagcgcagag accccaacgc cgagaccccc gccccggccc cgccgcgctt 180  
 cctccccgacg caggtaggta agttaggcag ggatattcac cattatcggt tcagaccac 240  
 ctcccaaccc cgaggggacc cgacaggccc gaaggaatag aagaagaagg tggagagaga 300  
 gacagagaca gatccattcg attagtgaac ggatctcgac ggtatcgata ctagtattat 360  
 gcccagtaca tgaccttatg ggactttctt acttggcagt acatctacgt attagtcac 420  
 gctattacca tggatgatgc gttttggcag tacatcaatg ggcgtaggata gcggtttgac 480  
 tcacggggat ttccaagtct ccacccatt gacgtcaatg ggagtttggt ttggcaccaa 540  
 aatcaacggg actttccaaa atgtcgtaac aactccgcc cattgacgca aatgggcggt 600  
 aggcgtgtac ggtgggaggt ctatataagc agagctcgtt tagtgaaccg tcagatcgcc 660  
 tggagacgcc atccacgtg ttttgacctc catagaagat tctagaacca tggctagcgt 720  
 gagcaagggc gaggagctgt tcaccggggt ggtgcccac ctggtcgagc tggacggcga 780  
 cgtaaaccgc cacaagtca gcgtgtccgg cgagggcgag ggcgatgcca cctacggcaa 840  
 gctgaccctg aagtcatct gcaccaccg caagctgcc gtgccctggc ccaccctcgt 900  
 gaccaccctg acctacggcg tgcagtgtt cagccgtac cccgaccaca tgaagcagca 960  
 cgacttcttc aagtccgcca tgcccgaagg ctacgtccag gagcgcacca tcttcttcaa 1020

ggacgacggc aactacaaga cccgcgccga ggtgaagttc gagggcgaca ccctggtgaa 1080  
ccgcatcgag ctgaagggca tcgacttcaa ggaggacggc aacatcctgg ggcacaagct 1140  
ggagtacaac tacaacagcc acaacgtcta tatcatggcc gacaagcaga agaacggcat 1200  
caaggtgaac ttcaagatcc gccacaacat cgaggacggc agcgtgcagc tcgccgacca 1260  
ctaccagcag aacaccccc a tcggcgacgg ccccgtgctg ctgcccgaca accactacct 1320  
gagcaccag tccgccctga gcaaagacc caacgagaag cgcgatcaca tggctctgct 1380  
ggagtctgtg accgccgcc ggatcactct cggcatggac gagctgtaca agtgatccgt 1440  
tcaactagca gaccgtttaa acaattcaag ctttttcaa ttctcgacct cgagacaaat 1500  
ggcagtattc atccacaatt ttaaaagaaa aggggggatt ggggggtaca gtgcagggga 1560  
aagaatagta gacataatag caacagacat acaactaaa gaattacaaa aacaaattac 1620  
aaaaattcaa aattttcggg tttattacag ggacagcaga gatccagttt ggccgcggct 1680  
cgagggggtt ggggttgcgc cttttccaag gcagccctgg gtttgcgcag ggacgcggct 1740  
gctctgggcg tggttccggg aaacgcagcg gcgccgacc tgggtctcgc acattcttca 1800  
cgtccgttcg cagcgtcacc cggatcttcg ccgctacct tgtgggcccc ccggcgacgc 1860  
ttctgctcc gccctaagt cgggaaggtt ctttgcggtt cgcggcgtgc cggacgtgac 1920  
aaacggaagc cgcacgtctc actagtacc tcgcagacgg acagcgcag ggagcaatgg 1980  
cagcgcgccg accgcgatgg gctgtggcca atagcggctg ctcagcaggg cgcgccgaga 2040  
gcagcggccg ggaaggggcg gtgcgggagg cggggtgtgg ggcggtagtg tgggccctgt 2100  
tctgcccgc gcggtgttc gcattctgca agcctccgga gcgcacgtcg gcagtcggct 2160  
ccctcgttga ccgaatcacc gacctcttc cccagggga tccaccggag cttaccatga 2220  
ccgagtacaa gccacggtg cgcctcgcca cccgcgacga cgtccccagg gcggtacgca 2280  
ccctcgcgc cgcgttcgcc gactacccc ccacgcgcca caccgtcgat ccggaccgcc 2340  
acatcgagcg ggtcaccgag ctgcaagaac tcttctcacc gcgcgtcggg ctcgacatcg 2400  
gcaaggtgtg ggtcgcggac gacggcgccg cgggtggcgt ctggaccacg ccggagagcg 2460  
tcgaagcggg ggcggtgttc gccgagatcg gcccgcgcat ggccgagttg agcggttccc 2520  
ggctggccgc gcagcaacag atggaaggcc tcttggcgcc gcaccggccc aaggagcccg 2580  
cgtggttctt ggccaccgtc ggcgtctcgc ccgaccacca gggcaagggt ctgggcagcg 2640  
ccgtcgtgct ccccgagtg gaggcggccg agcgcgccgg ggtgcccgcc ttctggaga 2700  
cctccgcgcc ccgcaacctc ccttctacg agcggtcgg cttaccgtc accgccgacg 2760  
tcgaggtgcc cgaaggaccg cgcacctggt gatgaccg caagcccgg gctgacgcc 2820  
cgccccacga cccgcagcgc ccgaccgaaa ggagcgcag accccatgca tcgttaagag 2880  
ctcgtacct ttaagaccaa tgacttaca ggcagctgta gatcttagcc actttttaa 2940  
agaaaagggg ggactggaag ggctaattca ctccaacga agacaagatc tgctttttgc 3000  
ttgtactggg tctctctggt tagaccagat ctgagcctgg gagctctctc gtaactagg 3060  
gaaccactg cttaaacctc aataaagctt gccttgagt cttcaagtag tgtgtgcccc 3120  
tctgttgtg gactctggt aactagatc cctcagacc ttttagtcag tgtggaat 3180  
ctctagcagt agtagtcat gtcatttat tattcagtat ttataactg caaagaaatg 3240  
aatatcagag agtgagagga acttgtttat tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa 3300  
tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt ttttctactg cattctagtt gtggtttgtc 3360

caaactcatc aatgtatctt atcatgtctg gctctagcta tcccgccct aactccgccc 3420  
 atcccccccc taactccgcc cagttccgcc cattctccgc cccatggctg actaattttt 3480  
 tttatttatg cagagcaaac cgcccagagt agaagatgga ttggggcacg ctgcagacga 3540  
 tcctgggggt gtgaacaaac actccaccag cattggaaag atctggctca ccgtcctctt 3600  
 catttttcgc attatgatcc tcgttgtggc tgcaaaggag gtgtggggag atgagcaggc 3660  
 cgactttgtc tgcaacaccc tgcagccagg ctgcaagaac gtgtgctacg atcactactt 3720  
 ccccatctcc cacatccggc tatgggccct gcagctgac ttcgtgtcca cgccagcgct 3780  
 cctagtggcc atgcacgtgg cctaccggag acat 3814

<210> 8

<211> 3815

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> GJB2-EX109-AF

<220>

<221> prim\_转录

<222> (1) .. (3815)

<400> 8

ggggtgctgt taaaaggcgc cacggcggga gacagtggtt gcggccccgc agcggccgcg 60  
 cgctcctctc cccgactcgg agcccctcgg cggcgccccg cccaggacc gcctaggagc 120  
 gcaggagccc cagcgcagag accccaacgc cgagaccccc gccccggccc cgccgcgctt 180  
 cctccccgacg caggtaggta agttaggcag ggatattcac cattatcggt tcagaccac 240  
 ctcccaaccc cgaggggacc cgacaggccc gaaggaatag aagaagaagg tggagagaga 300  
 gacagagaca gatccattcg attagtgaac ggatctcgac ggtatcgata ctagtattat 360  
 gccagtagca tgaccttatg ggactttcct acttggcagt acatctacgt attagtcac 420  
 gctattacca tggatgatgc gttttggcag tacatcaatg ggcgtaggata gcggtttgac 480  
 tcacggggat ttccaagtct ccacccatt gacgtcaatg ggagtttggt ttggcaccaa 540  
 aatcaacggg actttccaaa atgtcgtaac aactccgccc cattgacgca aatgggcggt 600  
 aggcgtgtac ggtgggaggt ctatataagc agagctcgtt tagtgaaccg tcagatcgcc 660  
 tggagacgcc atccacgctg ttttgacctc catagaagat tctagaacca tggctagcgt 720  
 gagcaagggc gaggagctgt tcaccggggg ggtgcccac cttggtcgagc tggacggcga 780  
 cgtaaaccgc cacaagttca gcgtgtccgg cgagggcgag ggcgatgcca cctacggcaa 840  
 gctgaccctg aagttcatct gcaccaccgg caagctgccc gtgccctggc ccaccctcgt 900  
 gaccaccctg acctacggcg tgcagtgett cagccgctac cccgaccaca tgaagcagca 960  
 cgacttcttc aagtccgcca tgcccgaagg ctacgtccag gagcgcacca tctttctcaa 1020  
 ggacgacggc aactacaaga cccgcgccga ggtgaagttc gagggcgaca ccctggtgaa 1080  
 ccgcatcgag ctgaagggca tcgacttcaa ggaggacggc aacatcctgg ggcacaagct 1140  
 ggagtacaac tacaacagcc acaacgtcta tatcatggcc gacaagcaga agaacggcat 1200  
 caaggtgaac ttcaagatcc gccacaacat cgaggacggc agcgtgcagc tcgccgacca 1260

ctaccagcag aacaccccca tcggcgacgg ccccgtgctg ctgcccgaca accactacct 1320  
 gagcacccag tccgccctga gcaaagaccc caacgagaag cgcgatcaca tggctcctgt 1380  
 ggagttcgtg accgccgccg ggatcactct cggcatggac gagctgtaca agtgatccgt 1440  
 tcaactagca gaccgtttaa acaattcaag ctttttcaa ttctcgacct cgagacaaat 1500  
 ggcagtattc atccacaatt ttaaaagaaa aggggggatt ggggggtaca gtgcagggga 1560  
 aagaatagta gacataatag caacagacat acaaactaaa gaattacaaa aacaaattac 1620  
 aaaaaattcaa aattttcggg tttattacag ggacagcaga gatccagttt ggccgcggct 1680  
 cgaggggggtt ggggttgcgc cttttccaag gcagccctgg gtttgcgcag ggacgcggct 1740  
 gctctggggc tggttccggg aaacgcagcg gcgccgacc tgggtctcgc acattcttca 1800  
 cgtccgttcg cagcgtcacc cggatcttcg ccgctaccct tgtgggcccc ccggcgacgc 1860  
 ttctgctcc gccctaagt cgggaagggt cttgcggtt cgcggcgtgc cggacgtgac 1920  
 aaacggaagc cgcacgtctc actagtacc tcgcagacgg acagcgcag ggagcaatgg 1980  
 cagcgcgccg accgcgatgg gctgtggcca atagcggctg ctcagcaggg cgcgccgaga 2040  
 gcagcggccg ggaaggggcg gtgcgggagg cggggtgtgg ggcggtagtg tgggccctgt 2100  
 tctgccccgc gcggtgttcc gcattctgca agcctccgga gcgcacgtcg gcagtcggct 2160  
 ccctcgttga ccgaatcacc gacctctctc cccaggggga tccaccggag cttaccatga 2220  
 ccgagtacaa gcccacggtg cgctcgcga cccgcgacga cgtccccagg gcggtacgca 2280  
 ccctgccgc gcggttcgcc gactacccc ccacgcgcca caccgtcgat ccggaccgcc 2340  
 acatcgagcg ggtcaccgag ctgcaagaac tcttctc acgcgctcggg ctcgacatcg 2400  
 gcaaggtgtg ggtcgcggac gacggcgccg cgggtggcgt ctggaccacg ccggagagcg 2460  
 tcgaagcggg ggcggtgttc gccgagatcg gcccgcgat ggccgagttg agcggttccc 2520  
 ggctggccgc gcagcaacag atggaaggcc tcttggcgc gcaccggccc aaggagcccg 2580  
 cgtggttcct ggccaccgtc ggcgtctcgc ccgaccacca gggcaagggt ctgggcagcg 2640  
 ccgtcgtgct ccccggagtg gaggcggccg agcgcgccgg ggtgcccccc ttcttgaga 2700  
 cctccgcgcc ccgcaacctc cccttctac agcggctcgg cttaccgtc accgccgacg 2760  
 tcgaggtgcc cgaaggaccg cgcacctggt gcatgaccg caagcccgg gcctgacgcc 2820  
 cgccccacga cccgcagcgc ccgaccgaaa ggagcgcacg accccatgca tcgttaagag 2880  
 ctcggtacct ttaagaccaa tgacttaciaa ggcagctgta gatcttagcc actttttaa 2940  
 agaaaagggg ggactggaag ggctaattca ctcccaacga agacaagatc tgctttttgc 3000  
 ttgtactggg tctctctggt tagaccagat ctgagcctgg gagctctctc gtaactagg 3060  
 gaaccactg cttaaagctc aataaagctt gccttgagt cttcaagtag tgtgtgcccg 3120  
 tctgttgtgt gactctggta actagagatc cctcagacc ttttagtcag tgtggaaaat 3180  
 ctctagcagt agtagttcat gtcatttat tattcagtat ttataacttg caaagaaatg 3240  
 aatatcagag agtgagagga acttgtttat tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa 3300  
 tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt ttttctactg cattctagtt gtggtttgtc 3360  
 caaactcadc aatgtatctt atcatgtctg gctctagcta tcccgcctt aactccgcc 3420  
 atcccgcgcc taactccgcc cagttccgcc cattctccgc cccatggctg actaattttt 3480  
 tttatttatg cagagcaaac cgcccagagt agaagatgga ttggggcacg ctgcagacga 3540  
 tcttgggggg tgtaacaaa cactccacca gcattggaat gatctggctc accgtctctt 3600

tcatttttctg cattatgac ctcattgtgg ctgcaaagga ggtgtgggga gatgagcagg 3660  
ccgactttgt ctgcaacacc ctgcagccag gctgcaagaa cgtgtgctac gatcactact 3720  
tccccatctc ccacatccgg ctatgggccc tgcagctgat cttcgtgtcc acgccagcgc 3780  
tcctagtggc catgcacgtg gcctaccgga gacat 3815

<210> 9

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CMVpro-r

<220>

<221> 引物\_结合

<222> (1) .. (39)

<400> 9

gcagtactca tgggtggcgag ctcggtacca agcttaagt 39

<210> 10

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> cher-f

<220>

<221> 引物\_结合

<222> (1) .. (39)

<400> 10

agacgacctt ccgccaccat ggtgagcaag ggcgaggag 39

<210> 11

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> bet-f

<220>

<221> 引物\_结合

<222> (1) .. (42)

<400> 11

cttggtagcg agctcgccac catgagtact gcactcgcaa cg 42

<210> 12

<211> 37

<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> bet-r  
<220>  
<221> 引物\_结合  
<222> (1) .. (37)  
<400> 12  
ccgcggatct cactatcatg ctgccacett ctgetct 37  
<210> 13  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> IRES-I-f  
<220>  
<221> 引物\_结合  
<222> (1) .. (35)  
<400> 13  
aaggtggcag catgatagtg agatccgcgg ccgca 35  
<210> 14  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> IRES-I-r  
<220>  
<221> 引物\_结合  
<222> (1) .. (36)  
<400> 14  
cgggtgcatg gtggcggaag gtcgtctect tgtggg 36  
<210> 15  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> exo-f  
<220>  
<221> 引物\_结合



<222> (1) .. (40)  
<400> 15  
agacgacctt ccgccaccat gacaccggac attatcctgc 40  
<210> 16  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> exo-r  
<220>  
<221> 引物\_结合  
<222> (1) .. (38)  
<400> 16  
gccgcggatc tctagatcat cgccattgct ccccaaat 38  
<210> 17  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> IRES-II-f  
<220>  
<221> 引物\_结合  
<222> (1) .. (35)  
<400> 17  
gagcaatggc gatgatctag agatccgcgg ccgca 35  
<210> 18  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> IRES-II-r  
<220>  
<221> 引物\_结合  
<222> (1) .. (40)  
<400> 18  
ccttgctcac catggtggcg gaaggtcgtc tccttggtggg 40  
<210> 19  
<211> 22  
<212> DNA

<213> 人工序列  
<220>  
<223> EB-VEC-f  
<220>  
<221> 引物\_结合  
<222> (1) .. (22)  
<400> 19  
acgcctgggg taatgactct ct 22  
<210> 20  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> EB-VEC-r  
<220>  
<221> 引物\_结合  
<222> (1) .. (21)  
<400> 20  
ctcgagggtga agacgaaagg g 21  
<210> 21  
<211> 47  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> L122-VEC-f  
<220>  
<221> 引物\_结合  
<222> (1) .. (47)  
<400> 21  
ccctttcgtc ttcacctcga ggtaagttag gcagggatat tcacat 47  
<210> 22  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> L122-U-r  
<220>  
<221> 引物\_结合  
<222> (1) .. (25)

<400> 22  
tccctagtta gcgagagagc tccca 25  
<210> 23  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> L122-D-f  
<220>  
<221> 引物\_结合  
<222> (1) .. (25)  
<400> 23  
gggagctctc tcgctaacta gggaa 25  
<210> 24  
<211> 49  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> L122-VEC-r  
<220>  
<221> 引物\_结合  
<222> (1) .. (49)  
<400> 24  
agagagtcat taccccaggc gtctgcataa ataaaaaaaa ttagtcagc 49  
<210> 25  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> GJB-EX1-f  
<220>  
<221> 引物\_结合  
<222> (1) .. (19)  
<400> 25  
gggggtgcggt taaaaggcg 19  
<210> 26  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
 <223> GJB-EX1-FU-r  
 <220>  
 <221> 引物\_结合  
 <222> (1) .. (40)  
 <400> 26  
 gtgaatatcc ctgcctaact tacctgcgtc gggaggaagc 40  
 <210> 27  
 <211> 9177  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> pCRISPR/Cas9n (D10A) L  
 <400> 27  
 gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaaggc tgttagagag 60  
 ataattggaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag taaaaatac gtgacgtaga 120  
 aagtaataat ttcttgggta gtttgcagtt taaaattat gttttaaaat ggactatcat 180  
 atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttggctt tatatatctt gtggaaagga 240  
 cgaaacaccg cccaatccat cttctactcg ttttagagct agaaatagca agttaaata 300  
 aggctagtcc gttatcaact tgaaaaagtg gcaccgagtc ggtgcttttt tgtttttagag 360  
 ctagaaatag caagttaaaa taaggctagt ccgtttttag cgcgtgcgcc aattctgcag 420  
 acaaatggct ctagaggtag ccgttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc 480  
 gcccaacgac ccccgccat tgacgtcaat agtaacgcca atagggactt tccattgacg 540  
 tcaatgggtg gagtatttac ggtaaacgca ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat 600  
 gcccaagtacg ccccctattg acgtcaatga cggtaaattg cccgcctggc attgtgcccc 660  
 gtacatgacc ttatgggact ttctacttgc gcagtacatc tacgtattag tcatcgcgat 720  
 taccatggtc gaggtgagcc ccacgttctg cttcactctc cccatctccc ccccctccc 780  
 acccccaatt ttgtatttat ttatttttta attattttgc gcagcgatgg gggcgggggg 840  
 gggggggggg cgcgcgccag gcggggcggg gcggggcgag gggcggggcg gggcggggcg 900  
 gagaggtgcg gcggcagcca atcagagcgg cgcgctccga aagtttcctt ttatggcgag 960  
 gcggcggcgg cggcggccct ataaaaagcg aagcgcgcgg cgggcgggag tcgctgagac 1020  
 gctgccttcg ccccgctgcc cgtctccgcg ccgctcgcg ccgcccgcc cggctctgac 1080  
 tgaccgcgtt actcccacag gtgagcgggc gggacggccc ttctctcctg ggctgtaatt 1140  
 agctgagcaa gaggtgaggg ttttaaggat ggttggttgg tggggtatta atgtttaatt 1200  
 acctggagca cctgcctgaa atcaactttt ttcaggttgg accggtgcca ccatggacta 1260  
 taaggaccac gacggagact acaaggatca tgatattgat taaaagacg atgacgataa 1320  
 gatggcccca aagaagaagc ggaaggtcgg tatccacgga gtcccagcag ccgacaagaa 1380  
 gtacagcatc ggctggcca tcggcaccaa ctctgtgggc tgggccgtga tcaccgacga 1440  
 gtacaaggtg cccagcaaga aattcaaggt gctgggcaac accgaccggc acagcatcaa 1500

gaagaacctg atcggagccc tgctgttcga cagcggcgaa acagccgagg ccacccggct 1560  
gaagagaacc gccagaagaa gatacaccag acggaagaac cggatctgct atctgcaaga 1620  
gatcttcagc aacgagatgg ccaaggtgga cgacagcttc ttccacagac tggaagagtc 1680  
cttcctgggtg gaagaggata agaagcacga gcggcacccc atcttcggca acatcgtgga 1740  
cgaggtggcc taccacgaga agtaccaccac catctaccac ctgagaaaga aactggtgga 1800  
cagcaccgac aaggccgacc tgcggctgat ctatctggcc ctggcccaca tgatcaagtt 1860  
ccggggccac ttctgatcg agggcgacct gaaccccgac aacagcgacg tggacaagct 1920  
gttcatccag ctggtgcaga cctacaacca gctgttcgag gaaaaccca tcaacgccag 1980  
cggcgtggac gccaaaggcca tctgtctgc cagactgagc aagagcagac ggctggaaaa 2040  
tctgatcgcc cagctgcccg gcgagaagaa gaatggcctg ttcggcaacc tgattgccct 2100  
gagcctgggc ctgaccccca acttcaagag caacttcgac ctggccgagg atgccaaact 2160  
gcagctgagc aaggacacct acgacgacga cctggacaac ctgctggccc agatcggcga 2220  
ccagtacgcc gacctgtttc tggccgcca gaacctgtcc gacgccatcc tgctgagcga 2280  
catcctgaga gtgaacaccg agatcaccaa ggccccctg agcgcctcta tgatcaagag 2340  
atacagcgag caccaccagg acctgacct gctgaaagct ctctgctggc agcagctgcc 2400  
tgagaagtac aaagagattt tcttcgacca gagcaagaac ggctacgccg gctacattga 2460  
cggcggagcc agccaggaag agttctacaa gttcatcaag cccatcctgg aaaagatgga 2520  
cggcaccgag gaactgctcg tgaagctgaa cagagaggac ctgctgcgga agcagcggac 2580  
cttcgacaac ggcagcatcc cccaccagat ccacctggga gagctgcacg ccattctgcg 2640  
gcggcaggaa gatTTTTacc cattcctgaa ggacaaccgg gaaaagatcg agaagatcct 2700  
gaccttcgc atcccctact acgtgggccc tctggccagg gaaacagca gattcgcctg 2760  
gatgaccaga aagagcgagg aaaccatcac cccctggaac ttcgaggaag tggtggacia 2820  
ggcgcttcc gccagagct tcatcgagcg gatgaccaac ttcgataaga acctgcccga 2880  
cgagaagggtg ctgcccagc acagcctgct gtacgagtac ttcacctgtg ataacgagct 2940  
gaccaaagtg aaatacgtga ccgagggaaat gagaaagccc gccttctga gcggcgagca 3000  
gaaaaaggcc atcgtggacc tgctgttcaa gaccaaccgg aaagtgaccg tgaagcagct 3060  
gaaagaggac tacttcaaga aaatcgagtg cttcgactcc gtggaaatct ccggcgtgga 3120  
agatcggttc aacgcctccc tgggcacata ccacgatctg ctgaaaatta tcaaggacia 3180  
ggacttctg gacaatgagg aaaacgagga cattctggaa gatatcgtgc tgacctgac 3240  
actgtttgag gacagagaga tgatcgagga acggctgaaa acctatgcc acctgttcga 3300  
cgacaaagtg atgaagcagc tgaagcggcg gagatacacc ggctggggca ggctgagccg 3360  
gaagctgatc aacggcatcc gggacaagca gtccggcaag acaatcctgg atttctgaa 3420  
gtccgacggc ttcgccaaca gaaacttcat gcagctgatc cacgacgaca gcctgacctt 3480  
taaagaggac atccagaaaag cccaggtgtc cggccagggc gatagcctgc acgagcatat 3540  
tgccaatctg gccggcagcc ccgccattaa gaagggcatc ctgcagacag tgaaggtggt 3600  
ggacgagctc gtgaaagtga tgggcccggca caagcccag aacatcgtga tcgaaatggc 3660  
cagagagaac cagaccaccc agaagggaca gaagaacagc cgcgagagaa tgaagcggat 3720  
cgaagagggc atcaaagagc tgggcagcca gatcctgaaa gaacaccccg tggaaaacac 3780  
ccagctgcag aacgagaagc tgtacctgta ctacctgcag aatgggcggg atatgtactg 3840

ggaccaggaa ctggacatca accggctgtc cgactacgat gtggaccata tcgtgcctca 3900  
gagctttctg aaggacgact ccatcgacaa caaggtgctg accagaagcg acaagaaccg 3960  
gggcaagagc gacaacgtgc cctccgaaga ggtcgtgaag aagatgaaga actactggcg 4020  
gcagctgctg aacgccaagc tgattacca gagaaagttc gacaatctga ccaaggccga 4080  
gagaggcggc ctgagcgaac tggataaggc cggcttcac aagagacagc tggtggaac 4140  
ccggcagatc acaaagcacg tggcacagat cctggactcc cggatgaaca ctaagtacga 4200  
cgagaatgac aagctgatcc gggaagtga agtgatcacc ctgaagtcca agctggtgtc 4260  
cgatttccgg aaggatttcc agttttacaa agtgcgagc atcaacaact accaccacgc 4320  
ccacgacgcc tacctgaacg ccgtcgtggg aaccgcctg atcaaaaagt accctaagct 4380  
ggaaagcgag ttcgtgtacg gcgactacaa ggtgtacgac gtgcggaaga tgatcgccaa 4440  
gagcgagcag gaaatcggca aggtaccgc caagtactt ttctacagca acatcatgaa 4500  
ctttttcaag accgagatta cctggccaa cggcgagatc cgggaagcggc ctctgatcga 4560  
gacaaacggc gaaaccgggg agatcgtgtg ggataagggc cgggattttg ccaccgtgcg 4620  
gaaagtgctg agcatgcccc aagtgaatat cgtgaaaaag accgaggtgc agacaggcgg 4680  
cttcagcaaa gagtctatcc tgcccaagag gaacagcgt aagctgatcg ccagaaagaa 4740  
ggactgggac cctaagaagt acggcggctt cgacagcccc accgtggcct attctgtgct 4800  
ggtggtggcc aaagtggaaa agggcaagtc caagaaactg aagagtgtga aagagctgct 4860  
ggggatcacc atcatggaaa gaagcagctt cgagaagaat cccatcgact ttctggaagc 4920  
caagggtac aaagaagtga aaaaggacct gatcatcaag ctgcctaagt actccctgtt 4980  
cgagctggaa aacggccgga agagaatgct ggctctgcc ggcgaactgc agaagggaaa 5040  
cgaactggcc ctgccctcca aatatgtgaa ctctctgtac ctggccagcc actatgagaa 5100  
gctgaagggc tccccgagg ataatgagca gaaacagctg tttgtggaac agcacaagca 5160  
ctacctggac gagatcatcg agcagatcag cgagttctcc aagagagtga tcctggccga 5220  
cgctaactctg gacaaagtgc tgtccgcta caacaagcac cgggataagc ccatcagaga 5280  
gcaggccgag aatatcatcc acctgtttac cctgaccaat ctgggagccc ctgccgcctt 5340  
caagtacttt gacaccacca tcgaccggaa gaggtacacc agcaccaaag aggtgctgga 5400  
cgccaccctg atccaccaga gcatcaccgg cctgtacgag acacggatcg acctgtctca 5460  
gctgggaggc gacaaaaggc cggcggccac gaaaaaggcc ggccaggcaa aaaagaaaaa 5520  
ggaattcggc agtggagagg gcagaggaag tctgctaaca tgcggtgacg tcgaggagaa 5580  
tcctggccca atgaccgagt acaagcccac ggtgcgcctc gccaccgcg acgacgtccc 5640  
cagggccgta cgcaccctcg ccgccgcgtt cgccgactac cccgccacgc gccacaccgt 5700  
cgatccggac cgccacatcg agcgggtcac cgagctgcaa gaactcttcc tcacgcgcgt 5760  
cgggctcgac atcggaagg tgtgggtcgc ggacgacggc gccgcggtgg cggctctggac 5820  
cacgccggag agcgtcgaag cgggggcggt gtctgccgag atcgccccgc gcatggccga 5880  
gttgagcggc tcccggctgg ccgcgcagca acagatggaa ggcctctctg cgcgcaccg 5940  
gccaaggag cccgcgtggt tcctggccac cgtcggcgtc tcgcccagc accagggcaa 6000  
gggtctgggc agcgcctcg tctccccg agtggaggcg gccgagcgc cgggggtgcc 6060  
cgccttctg gagacctcc cgccccaaa cctcccctc tacgagcgcg tcggcttcac 6120  
cgtcaccgcc gacgtcgagg tgcccgaagg accgcgcacc tggatcatga cccgaagcc 6180

cggtgccctga gaattctaac tagagctcgc tgatcagcct cgactgtgcc ttctagttgc 6240  
 cagccatctg ttgtttgccc ctccccctg ctttccttga ccctggaagg tgccactccc 6300  
 actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgcatt gtctgagtag gtgtcattct 6360  
 attctggggg gtgggggtggg gcaggacagc aagggggagg attgggaaga gaatagcagg 6420  
 catgctgggg agcggccgca ggaacccta gtgatggagt tggccactcc ctctctgcgc 6480  
 gctcgtcgc tcactgaggc cgggcgacca aaggtcgccc gacgcccggg ctttgcccgg 6540  
 gcggcctcag tgagcgagcg agcgcgcagc tgctgcagg ggcgctgat gcggtatfff 6600  
 ctcccttacgc atctgtcgg tatttcacac cgcatacgtc aaagcaacca tagtacgcgc 6660  
 cctgtagcgg cgcattaagc gcggcgggtg tgggtggtac gcgcagcgtg accgctacac 6720  
 ttgccagcgc cctagcgcgc gctccttctg ctttcttccc ttctttctc gccacgttcg 6780  
 ccggctttcc ccgtcaaget ctaaateggg ggctcccttt agggttccga tttagtgtt 6840  
 tacggcacct cgaccccaaa aaacttgatt tgggtgatgg ttcacgtagt gggccatcgc 6900  
 cctgatagac ggtttttcgc cctttgacgt tggagtccac gttctttaat agtggactct 6960  
 tgttccaaac tggaacaaca ctcaacccta tctcgggcta ttcttttgat ttataaggga 7020  
 ttttgccgat ttcggcctat tggttaaaaa atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga 7080  
 attttaacaa aatattaacg tttacaattt tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg 7140  
 atgccgcata gttaagccag ccccacacc cgccaacacc cgctgacgcg ccctgacggg 7200  
 cttgtctgct cccggcatcc gcttacagac aagctgtgac cgtctccggg agctgcatgt 7260  
 gtcagaggtt ttcaccgtca tcaccgaaac gcgcgagacg aaagggcctc gtgatacgcc 7320  
 tatttttata ggtaaatgic atgataataa tggtttctta gacgtcaggt ggcacttttc 7380  
 ggggaaatgt gcgcggaacc cctatttggt tatttttcta aatacattca aatatgtatc 7440  
 cgctcatgag acaataacc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga 7500  
 gtattcaaca tttccgtgic gcccttattc ctttttttgc ggcattttgc ctctctgttt 7560  
 ttgctcacc agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag 7620  
 tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cgccccgaag 7680  
 aacgttttcc aatgatgagc acttttaag ttctgctatg tggcgcggta ttatcccgtta 7740  
 ttgacgccgg gcaagagcaa ctcggtcgcc gatacacta ttctcagaat gacttggttg 7800  
 agtactcacc agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca 7860  
 gtgctgccat aacctgagat gataaactg cggccaactt acttctgaca acgatcggag 7920  
 gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca acatggggga tcatgtaact cgccttgatc 7980  
 gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg 8040  
 tagcaatggc aacaacgttg cgcaactat taactggcga actacttact ctagcttccc 8100  
 ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagttgc aggaccactt ctgcgctcgg 8160  
 cccttccggc tggtgtggtt attgctgata aatctggagc cgggtgagcgt ggaagccgcg 8220  
 gtatcattgc agcactgggg ccagatggta agccctccc tatcgtagtt atctacacga 8280  
 cggggagtca ggcaactat gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac 8340  
 tgattaagca ttggtaactg tcagaccaag tttactcata tatactttag attgatttaa 8400  
 aacttcattt ttaatttaaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca 8460  
 aaatccctta acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag 8520

gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac 8580  
cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa 8640  
ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc 8700  
accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaate ctgttaccag 8760  
tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac 8820  
cggataaggc gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc 8880  
gaacgacctc caccgaactg agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc 8940  
ccgaagggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaaca ggagagcgca 9000  
cgaggagctc tccaggggga aacgcctggc atctttatag tcctgtcggg tttcgccacc 9060  
tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg 9120  
ccagcaacgc ggctttttta cggttcctgg ccttttctg gccttttctg cacatgt 9177  
<210> 28  
<211> 8508  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> pCRISPR/Cas9n (D10A) R  
<400> 28  
gagggcctat ttccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaaggc tgttagagag 60  
ataattggaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag taaaaatac gtgacgtaga 120  
aagtaataat ttcttgggta gtttgagtt taaaattat gttttaaat ggactatcat 180  
atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttggctt tatatatctt gtggaaagga 240  
cgaaacaccg acaaacactc caccagcatg ttttagagct agaaatagca agttaaata 300  
aggctagtcc gttatcaact tgaaaaagtg gcaccgagtc ggtgcttttt tgtttttagag 360  
ctagaaatag caagttaaaa taaggctagt ccgtttttag cgcgtgcgcc aattctgcag 420  
acaaatggct ctagaggtag ccgttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc 480  
gccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat agtaacgcca atagggactt tccattgacg 540  
tcaatgggtg gagtatttac ggtaaacgta ccacttgcca gtacatcaag tgtatcatal 600  
gccaagtacg cccctattg acgtcaatga cggtaaatg cccgcctggc attgtgccc 660  
gtacatgacc ttatgggact ttctacttg gcagtacatc tacgtattag tcatcgtat 720  
taccatggtc gaggtgagcc ccacgttctg ctactctc cccatctccc cccctcccc 780  
accccccaatt ttgtatttat ttatttttta attattttgt gcagcgatgg gggcgggggg 840  
gggggggggg cgcgcgccag gcggggcggg gcggggcgag gggcggggcg gggcgaggcg 900  
gagaggtgcg gcggcagcca atcagagcgg cgcgctccga aagtttctt ttatggcgag 960  
gcggcggcgg cggcggccct ataaaaagcg aagcgcgcgg cgggcgggag tcgctgcgac 1020  
gctgccttcg ccccggtccc cgtccgccc ccgctcgcg ccgcccgcc cggtcttgac 1080  
tgaccgcgtt actcccacag gtgagcgggc gggacggccc ttctctccg ggctgtaatt 1140  
agctgagcaa gaggtaaagg ttaagggat ggttggttg tgggtatta atgtttaatt 1200  
acctggagca cctgcctgaa atcacttttt ttcaggttg accggtgcca ccatggacta 1260



taaggaccac gacggagact acaaggatca tgatattgat tacaagacg atgacgataa 1320  
 gatggcccca aagaagaagc ggaaggtcgg tatccacgga gtcccagcag ccgacaagaa 1380  
 gtacagcatc ggccctggcca tcggcaccaa ctctgtgggc tgggccgtga tcaccgacga 1440  
 gtacaaggtg cccagcaaga aattcaaggt gctgggcaac accgaccggc acagcatcaa 1500  
 gaagaacctg atcggagccc tgctgttcga cagcggcgaa acagccgagg ccaccggct 1560  
 gaagagaacc gccagaagaa gatacaccag acggaagaac cggatctgct atctgcaaga 1620  
 gatcttcagc aacgagatgg ccaaggtgga cgacagcttc ttccacagac tggaagagtc 1680  
 cttcctgggtg gaagaggata agaagcacga gcggcacccc atcttcggca acatcgtgga 1740  
 cgaggtggcc taccacgaga agtaccceac catctaccac ctgagaaaga aactggtgga 1800  
 cagcaccgac aaggccgacc tgcggctgat ctatctggcc ctggcccaca tgatcaagtt 1860  
 ccggggccac ttctgatcg agggcgacct gaaccccgac aacagcgacg tggacaagct 1920  
 gttcatccag ctggtgcaga cctacaacca gctgttcgag gaaaaccca tcaacgccag 1980  
 cggcgtggac gccaaaggcca tctgtctgc cagactgagc aagagcagac ggctggaaaa 2040  
 tctgatcgcc cagctgcccg gcgagaagaa gaatggcctg ttcggcaacc tgattgcct 2100  
 gagcctgggc ctgaccccca acttcaagag caacttcgac ctggccgagg atgccaaact 2160  
 gcagctgagc aaggacacct acgacgacga cctggacaac ctgctggccc agatcggcga 2220  
 ccagtacgcc gacctgttcc tggccgcca gaacctgtcc gacgccatcc tgctgagcga 2280  
 catcctgaga gtgaacaccg agatcaccaa ggccccctg agcgcctcta tgatcaagag 2340  
 atacgacgag caccaccagg acctgaccct gctgaaagct ctctgctggc agcagctgcc 2400  
 tgagaagtac aaagagattt tcttcgacca gagcaagaac ggctacgccg gctacattga 2460  
 cggcggagcc agccaggaag agttctacaa gttcatcaag cccatcctgg aaaagatgga 2520  
 cggcaccgag gaactgctcg tgaagctgaa cagagaggac ctgctgcgga agcagcggac 2580  
 cttcgacaac ggcagcatcc cccaccagat ccacctggga gagctgcacg ccattctgcg 2640  
 gcggcaggaa gatttttacc cattcctgaa ggacaaccgg gaaaagatcg agaagatcct 2700  
 gaccttccgc atcccctact acgtgggccc tctggccagg ggaaacagca gattcgcctg 2760  
 gatgaccaga aagagcgagg aaaccatcac ccctggaac ttcgaggaag tggtggacaa 2820  
 gggcgcttcc gccagagct tcatcgagcg gatgaccaac ttcgataaga acctgcccga 2880  
 cgagaaggtg ctgcccgaag acagcctgct gtacgagtag ttaccgtgtg ataacgagct 2940  
 gaccaaagtg aaatacgtga ccgagggaaat gagaaagccc gccttcctga gcggcgagca 3000  
 gaaaaaggcc atcgtggacc tgctgttcaa gaccaaccgg aaagtgaccg tgaagcagct 3060  
 gaaagaggac tacttcaaga aaatcgagtg cttcgactcc gtggaaatct ccggcgtgga 3120  
 agatcggttc aacgcctccc tgggcacata ccacgatctg ctgaaaatta tcaaggacaa 3180  
 ggacttcctg gacaatgagg aaaacgagga cattctggaa gatatcgtgc tgaccctgac 3240  
 actgtttgag gacagagaga tgatcgagga acggctgaaa acctatgccc acctgttcga 3300  
 cgacaaagtg atgaagcagc tgaagcggcg gagatacacc ggctggggca ggctgagccg 3360  
 gaagctgata aacggcatcc gggacaagca gtccggcaag acaatcctgg atttctgaa 3420  
 gtccgacggc ttcgccaaca gaaacttcat gcagctgata cacgacgaca gcctgacctt 3480  
 taaagaggac atccagaaaag cccaggtgtc cggccagggc gatagcctgc acgagcatat 3540  
 tgccaatctg gccggcagcc ccgccattaa gaaggcatc ctgcagacag tgaaggtggt 3600

ggacgagctc gtgaaagtga tgggccggca caagcccag aacatcgtga tcgaaatggc 3660  
 cagagagaac cagaccaccc agaagggaca gaagaacagc cgcgagagaa tgaagcggat 3720  
 cgaagagggc atcaaagagc tgggcagcca gatcctgaaa gaacaccccg tggaaaacac 3780  
 ccagctgcag aacgagaagc tgtacctgta ctacctgcag aatgggcggg atatgtacct 3840  
 ggaccaggaa ctggacatca accggctgtc cgactacgat gtggaccata tcgtgcctca 3900  
 gagctttctg aaggacgact ccatcgacaa caaggtgctg accagaagcg acaagaaccg 3960  
 gggcaagagc gacaacgtgc cctccgaaga ggtcgtgaag aagatgaaga actactggcg 4020  
 gcagctgctg aacgccaagc tgattacca gagaaagttc gacaatctga ccaaggccga 4080  
 gagaggcggc ctgagcgaac tggataaggc cggcttcac aagagacagc tggtggaac 4140  
 ccggcagatc acaaagcacg tggcacagat cctggactcc cggatgaaca ctaagtacga 4200  
 cgagaatgac aagctgatcc gggaaagtga agtgatcacc ctgaagtcca agctgggtgtc 4260  
 cgatttccgg aaggatttcc agttttacaa agtgcgcgag atcaacaact accaccacgc 4320  
 ccacgacgcc tacctgaacg ccgtcgtggg aaccgcctg atcaaaaagt accctaagct 4380  
 ggaaagcgag ttcgtgtacg gcgactacaa ggtgtacgac gtgcggaaga tgatcgccaa 4440  
 gagcgagcag gaaaatcgga aggtaccgc caagtactt ttctacagca acatcatgaa 4500  
 ctttttcaag accgagatta ccctggccaa cggcgagatc cggaagcggc ctctgatcga 4560  
 gacaaacggc gaaaccgggg agatcgtgtg ggataagggc cgggattttg ccaccgtgcg 4620  
 gaaagtgctg agcatgcccc aagtgaatat cgtgaaaaag accgaggtgc agacaggcgg 4680  
 cttcagcaaa gagtctatcc tgcccaagag gaacagcgat aagctgatcg ccagaaagaa 4740  
 ggactgggac cctaagaagt acggcggctt cgacagcccc accgtggcct attctgtgct 4800  
 ggtggtggcc aaagtggaaa agggcaagtc caagaaactg aagagtgtga aagagctgct 4860  
 ggggatcacc atcatggaaa gaagcagctt cgagaagaat cccatcgact ttctggaagc 4920  
 caagggctac aaagaagtga aaaaggacct gatcatcaag ctgcctaagt actccctgtt 4980  
 cgagctggaa aacggccgga agagaatgct ggctctgccc ggcgaaactgc agaagggaaa 5040  
 cgaactggcc ctgccctcca aatatgtgaa cttctgtac ctggccagcc actatgagaa 5100  
 gctgaagggc tccccgagg ataatgagca gaaacagctg tttgtggaac agcacaagca 5160  
 ctacctggac gagatcatcg agcagatcag cgagttctcc aagagagtga tcctggccga 5220  
 cgctaactctg gacaaagtgc tgtccgcta caacaagcac cgggataagc ccatcagaga 5280  
 gcaggccgag aatatcatcc acctgtttac cctgaccaat ctgggagccc ctgccgcctt 5340  
 caagtacttt gacaccacca tcgaccgga gaggtacacc agcaccaaag aggtgctgga 5400  
 cgccaccctg atccaccaga gcatcaccgg cctgtacgag acacggatcg acctgtctca 5460  
 gctgggaggc gacaaaaggc cggcggccac gaaaaaggcc ggccaggcaa aaaagaaaaa 5520  
 ggaattctaa ctagagctcg ctgatcagcc tcgactgtgc cttctagttg ccagccatct 5580  
 gttgtttgcc cctccccgt gcttctctg acctggaag gtgccactcc cactgtcctt 5640  
 tcctaataaa atgaggaaat tgcacgcat tgtctgagta ggtgtcattc tattctgggg 5700  
 ggtgggggtg ggcaggacag caagggggag gattgggaag agaatagcag gcatgctggg 5760  
 gagcggccgc aggaaccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcctcg 5820  
 ctactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccg gctttgccc ggcgccctca 5880  
 gtgagcgagc gagcgcgag ctgcctgcag gggcgctga tgcggtattt tctccttacg 5940

catctgtgcg gtatttcaca ccgcatacgt caaagcaacc atagtacgcg ccctgtagcg 6000  
gcgcattaag cgcggcgggt gtgggtggtta cgcgcagcgt gaccgctaca cttgccagcg 6060  
ccctagcgcc cgctcctttc gctttcttcc cttcctttct cgccacgttc gccggctttc 6120  
cccgtcaagc tctaaatcgg gggctccctt tagggttccg atttagtgct ttacggcacc 6180  
tcgaccccaa aaaacttgat ttgggtgatg gttcacgtag tgggccatcg ccctgataga 6240  
cggtttttcg ccctttgacg ttggagtcca cgttctttaa tagtggactc ttgttccaaa 6300  
ctggaacaac actcaaccct atctcgggct attcttttga tttataaggg attttgccga 6360  
tttcggccta ttggttaaaa aatgagctga tttacaacaaa atttaacgcg aattttaaca 6420  
aaatattaac gtttacaatt ttatggtgca ctctcagtac aatctgctct gatgccgcat 6480  
agttaagcca gccccgacac ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc 6540  
tcccggcatc cgcttacaga caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt 6600  
tttcaccgtc atcaccgaaa cgcgcgagac gaaaggcct cgtgatacgc ctatTTTTAT 6660  
aggttaatgt catgataata atggtttctt agacgtcagg tggcactttt cggggaaatg 6720  
tgcgcggaac ccctatttgt ttatTTTTct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga 6780  
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 6840  
atTTccgtgt cgcccttatt ccctTTTTtg cggcattttg ctttctgtt tttgctcacc 6900  
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 6960  
tcgaaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 7020  
caatgatgag cacttttaaa gttctgctat gtggcgcgggt attatcccgt attgacgccg 7080  
ggcaagagca actcggtcgc cgatacact attctcagaa tgacttggtt gactactcac 7140  
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtctgcca 7200  
taacatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 7260  
agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac 7320  
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 7380  
caacaacggt gcgcaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 7440  
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 7500  
ctggctgggt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tggaagccgc ggtatcattg 7560  
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 7620  
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 7680  
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 7740  
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatec ttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 7800  
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag acccctaga aaagatcaaa ggatcttctt 7860  
gagatccttt ttttctgccc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag 7920  
cggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 7980  
gcagagcgca gataccaaat actgtccttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca 8040  
agaactctgt agcaccgect acatacctcg ctctgctaat cctgttacca gtggctgctg 8100  
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg 8160  
cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct 8220  
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 8280

gaaaggcggg caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 8340  
 ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 8400  
 agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 8460  
 cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgt 8508

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> gRNA C35R

<400> 29

gacaaacact ccaccagcat 20

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> gRNA C35L

<400> 30

gccaatcca tcttctactc t 21

<210> 31

<211> 8088

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pCRISPR/Cas9n (D10A) DN

<400> 31

gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaaggc tgttagagag 60  
 ataattggaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag taaaaatac gtgacgtaga 120  
 aagtaataat ttcttgggta gtttgcagtt taaaattat gttttaaaat ggactatcat 180  
 gccaaagtacg cccctattg acgtcaatga cggtaaattg cccgcctggc attgtgcccc 240  
 gtacatgacc ttatgggact ttctacttg gcagtacatc tacgtattag tcategctat 300  
 taccatggtc gaggtgagcc ccacgttctg ctteactetc cccatctccc cccctcccc 360  
 accccaatt ttgtatttat ttatTTTTTA attattttgt gcagcgatgg gggcgggggg 420  
 ggggggggggg cgcgcgccag gcggggcggg gcggggcgag gggcggggcg gggcgaggcg 480  
 gagaggtgcg gcggcagcca atcagagcgg cgcgctccga aagtttctt ttatggcgag 540  
 gcggcggcgcg cggcggccct ataaaaagcg aagcgcgcgg cgggcgggag tcgctgcgac 600  
 gctgccttcg ccccggtgcc cgctccgccg ccgctcgcg ccgcccgcc cggtcttgac 660  
 tgaccgcgtt actcccacag gtgagcgggc gggacggccc ttctctccg ggctgtaatt 720

agctgagcaa gaggtaaggg ttttaaggat ggttggttgg tggggtatta atgtttaatt 780  
 acctggagca cctgcctgaa atcacttttt ttcaggttgg accggtgcca ccatggacta 840  
 taaggaccac gacggagact acaaggatca tgatattgat tacaagacg atgacgataa 900  
 gatggcccca aagaagaagc ggaaggtcgg tatccacgga gtcccagcag ccgacaagaa 960  
 gtacagcatc ggcttgcca tcggcaccaa ctctgtgggc tgggccgtga tcaccgacga 1020  
 gtacaaggtg cccagcaaga aattcaaggt gctgggcaac accgaccggc acagcatcaa 1080  
 gaagaacctg atcggagccc tgctgttcga cagcggcgaa acagccgagg ccaccggct 1140  
 gaagagaacc gccagaagaa gatacaccag acggaagaac cggatctgct atctgcaaga 1200  
 gatcttcagc aacgagatgg ccaaggtgga cgacagcttc ttccacagac tggaagagtc 1260  
 cttcctgggtg gaagaggata agaagcacga gcggcaccac atcttcggca acatcgtgga 1320  
 cgagggtggc taccacgaga agtaccaccac catctaccac ctgagaaaga aactggtgga 1380  
 cagcaccgac aaggccgacc tgcggtgat ctatctggcc ctggcccaca tgatcaagtt 1440  
 ccggggccac ttctgatcg agggcgacct gaaccccgac aacagcgacg tggacaagct 1500  
 gttcatccag ctggtgcaga cctacaacca gctgttcgag gaaaaccca tcaacgccag 1560  
 cggcgtggac gccaaaggcca tctgtctgc cagactgagc aagagcagac ggctggaaaa 1620  
 tctgatcgcc cagctgcccg gcgagaagaa gaatggcctg ttcggcaacc tgattgcct 1680  
 gagcctgggc ctgacccca acttcaagag caacttcgac ctggccgagg atgccaaact 1740  
 gcagctgagc aaggacacct acgacgacga cctggacaac ctgctggccc agatcggcga 1800  
 ccagtacgcc gacctgtttc tggccgcaa gaacctgtcc gacgccatcc tgctgagcga 1860  
 catcctgaga gtgaacaccg agatcaccaa ggccccctg agcgcctcta tgatcaagag 1920  
 atacgacgag caccaccagg acctgaccct gctgaaagct ctctgtcggc agcagctgcc 1980  
 tgagaagtac aaagagattt tcttcgacca gagcaagaac ggctacgccg gctacattga 2040  
 cggcggagcc agccaggaag agttctacia gttcatcaag cccatcctgg aaaagatgga 2100  
 cggcaccgag gaactgctcg tgaagctgaa cagagaggac ctgctgcgga agcagcggac 2160  
 cttcgacaac ggcagcatcc cccaccagat ccacctggga gagctgcacg ccattctgcg 2220  
 gcggcaggaa gatttttacc cattcctgaa ggacaaccgg gaaaagatcg agaagatcct 2280  
 gaccttccgc atcccctact acgtgggccc tctggccagg ggaaacagca gattcgcctg 2340  
 gatgaccaga aagagcgagg aaaccatcac ccctggaac ttcgaggaag tgggtggaaa 2400  
 gggcgcttcc gccagagct tcatcgagcg gatgaccaac ttcgataaga acctgcccga 2460  
 cgagaaggtg ctgcccgaag acagcctgct gtacgagtag ttcaccgtgt ataacgagct 2520  
 gaccaaagtg aaatacgtga ccgaggggat gagaaagccc gccttctga gcggcgagca 2580  
 gaaaaaggcc atcgtggacc tgctgttcaa gaccaaccgg aaagtgaccg tgaagcagct 2640  
 gaaagaggac tacttcaaga aaatcgagtg ctctgactcc gtggaaatct ccggcgtgga 2700  
 agatcggttc aacgcctccc tgggcacata ccacgatctg ctgaaaatta tcaaggacaa 2760  
 ggacttctctg gacaatgagg aaaacgagga cattctggaa gatatcgtgc tgaccctgac 2820  
 actgtttgag gacagagaga tgatcgagga acggctgaaa acctatgccc acctgttcga 2880  
 cgacaaagtg atgaagcagc tgaagcggcg gagatacacc ggctggggca ggctgagccg 2940  
 gaagctgatc aacggcatcc gggacaagca gtccggcaag acaatcctgg atttcctgaa 3000  
 gtccgacggc ttcgccaaca gaaacttcat gcagctgatc cacgacgaca gcctgacctt 3060

taaagaggac atccagaaag cccaggtgtc cggccagggc gatagcctgc acgagcacat 3120  
 tgccaatctg gccggcagcc ccgccattaa gaagggcatc ctgcagacag tgaaggtggt 3180  
 ggacgagctc gtgaaagtga tgggccggca caagcccag aacatcgtga tcgaaatggc 3240  
 cagagagaac cagaccaccc agaagggaca gaagaacagc cgcgagagaa tgaagcggat 3300  
 cgaagagggc atcaaagagc tgggcagcca gatcctgaaa gaacaccccg tggaaaacac 3360  
 ccagctgcag aacgagaagc tgtacctgta ctacctgcag aatgggcggg atatgtacct 3420  
 ggaccaggaa ctggacatca accggtgtc cgactacgat gtggaccata tcgtgcctca 3480  
 gagctttctg aaggacgact ccatcgacaa caaggtgctg accagaagcg acaagaaccg 3540  
 gggcaagagc gacaacgtgc cctccgaaga ggtcgtgaag aagatgaaga actactggcg 3600  
 gcagctgctg aacgccaagc tgattacca gagaaagttc gacaatctga ccaaggccga 3660  
 gagaggcggc ctgagcgaac tggataaggc cggcttcate aagagacagc tggtggaaac 3720  
 ccggcagatc acaaagcacg tggcacagat cctggactcc cggatgaaca ctaagtacga 3780  
 cgagaatgac aagctgatcc ggggaagtga agtgatcacc ctgaagtcca agctggtgtc 3840  
 cgatttccgg aaggatttcc agttttacaa agtgcgcgag atcaacaact accaccacgc 3900  
 ccacgacgcc tacctgaacg ccgtcgtggg aaccgcctg atcaaaaagt accctaagct 3960  
 ggaaagcgag ttcgtgtacg gcgactacaa ggtgtacgac gtgcggaaga tgatcgccaa 4020  
 gagcgagcag gaaaatcgca aggtaccgc caagtacttc ttctacagca acatcatgaa 4080  
 ctttttcaag accgagatta ccctggccaa cggcgagatc cggaaagcggc ctctgatcga 4140  
 gacaaacggc gaaaccgggg agatcgtgtg ggataagggc cgggattttg ccaccgtgcg 4200  
 gaaagtgctg agcatgcccc aagtgaatat cgtgaaaaag accgaggtgc agacaggcgg 4260  
 cttcagcaaa gagtctatcc tgcccaagag gaacagcgat aagctgatcg ccagaaagaa 4320  
 ggactgggac cctaagaagt acggcggctt cgacagcccc accgtggcct attctgtgct 4380  
 ggtggtggcc aaagtggaaa agggcaagtc caagaaactg aagagtgtga aagagctgct 4440  
 ggggatcacc atcatggaag gaagcagctt cgagaagaat cccatcgact ttctggaagc 4500  
 caagggtac aaagaagtga aaaaggacct gatcatcaag ctgcctaagt actccctggt 4560  
 cgagctggaa aacggccgga agagaatgct ggctctgccc ggcgaaactgc agaagggaaa 4620  
 cgaactggcc ctgccctcca aatatgtgaa cttctgtac ctggccagcc actatgagaa 4680  
 gctgaagggc tccccgagg ataatgagca gaaacagctg tttgtggaac agcacaagca 4740  
 ctacctggac gagatcatcg agcagatcag cgagttctcc aagagagtga tcctggccga 4800  
 cgctaactctg gacaaaagtgc tgtccgcta caacaagcac cgggataagc ccatcagaga 4860  
 gcaggccgag aatatcatcc acctgtttac cctgaccaat ctgggagccc ctgccgcctt 4920  
 caagtacttt gacaccacca tcgaccgga gaggtacacc agcaccaaag aggtgctgga 4980  
 cgccaccctg atccaccaga gcatcaccgg cctgtacgag acacggatcg acctgtctca 5040  
 gctgggagc gacaaaaggc cggcggccac gaaaaaggcc ggccaggcaa aaaagaaaaa 5100  
 ggaattctaa ctagagctcg ctgatcagcc tcgactgtgc cttctagttg ccagccatct 5160  
 gttgtttgcc cctccccctg gccttcctt accctggaag gtgccactcc cactgtcctt 5220  
 tcctaataaa atgaggaaat tgcacgcat tgtctgagta ggtgtcattc tattctgggg 5280  
 ggtgggggtg ggcaggacag caagggggag gattgggaag agaatagcag gcatgctggg 5340  
 gagcggccgc aggaaccctt agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgtcgc 5400

ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccc ggcggcctca 5460  
gtgagcgagc gagcgcgag ctgcctgcag gggcgcctga tgcggtatth tctccttacg 5520  
catctgtgcg gtatttcaca ccgcatacgt caaagcaacc atagtacgcg ccctgtagcg 5580  
gcgcattaag cgcggcgggt gtggtgggta cgcgcagcgt gaccgctaca cttgccagcg 5640  
ccctagcgcc cgctccttc gctttcttc cttcctttct cgccacgttc gccggctttc 5700  
cccgtcaagc tctaaatcgg gggctccctt tagggttccg atttagtgct ttacggcacc 5760  
tcgaccccaa aaaacttgat ttgggtgatg gttcacgtag tgggccatcg ccctgataga 5820  
cggtttttcg ccctttgacg ttggagtcca cgttctttaa tagtggactc ttgttccaaa 5880  
ctggaacaac actcaaccct atctcgggct attcttttga tttataaggg attttgccga 5940  
tttcggccta ttggttaaaa aatgagctga tttacaataa atttaacgcg aattttaaca 6000  
aaatattaac gtttacaatt ttatggtgca ctctcagtac aatctgctct gatgccgat 6060  
agttaagcca gccccgacac ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc 6120  
tcccggcatc cgcttacaga caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt 6180  
tttcaccgtc atcaccgaaa cgcgcgagac gaaaggcct cgtgatacgc ctatthttat 6240  
aggttaatgt catgataata atggtttctt agacgtcagg tggcacttht cggggaaatg 6300  
tgcgcggaac ccctatthgt ttatthttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga 6360  
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 6420  
atthccgtgt cgcccttatt ccctthtttg cggcattthg ccttctgtt thtgtcacc 6480  
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtcacga gtgggttaca 6540  
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagtht tcgccccgaa gaacgtthtc 6600  
caatgatgag cactthttaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg 6660  
ggcaagagca actcggctgc cgatacact attctcagaa tgacttggtt gactactcac 6720  
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgtgccca 6780  
taacatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 6840  
agctaaccgc thttthgcac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttggaac 6900  
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 6960  
caacaacgth gcgcaaaacta ttaactggcg aactacttac tctagctthc cggcaacaat 7020  
taatagactg gatggaggcg gataaagthg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 7080  
ctggctggtt thttgtgat aaatctggag ccggtgagcg tggaagccgc ggtatcattg 7140  
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt thcttacag acggggagtc 7200  
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 7260  
atthgtaact gtcagaccaa gthtactcat atatacttht gattgattta aaacttcatt 7320  
thtaatttht aaggatctag gtgaagatec thtttgataa tctcatgacc aaaatccctt 7380  
aacgtgagth ttcgthccac tgagcgtcag acccctaga aaagatcaaa ggatctthctt 7440  
gagatcctth thttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag 7500  
cggtggtthg thtgccggat caagagctac caactcttht tccgaaggta actggcttca 7560  
gcagagcgca gataccaaat actgtccttc tagtgtagcc gtagthtagc caccacttca 7620  
agaactctgt agcaccgct acatacctcg ctctgctaat cctgthtaca gtggctgctg 7680  
ccagtggcga taagctgtht cttaccgggt tggactcaag acgatagtht ccgataagg 7740

cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 7800  
 acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 7860  
 gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 7920  
 ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 7980  
 agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 8040  
 cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgt 8088

<210> 32

<211> 44

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> GJB-EX2-FU-f

<220>

<221> 引物\_结合

<222> (1) .. (44)

<400> 32

tgactaatTT tttttattta tgcagagcaa accgcccaga gtag 44

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> GJB-EX2-r

<220>

<221> 引物\_结合

<222> (1) .. (20)

<400> 33

atgtctccgg taggccacgt 20

<210> 34

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> AF-INTRON-f

<220>

<221> 引物\_结合

<222> (1) .. (23)

<400> 34

aggtaagtta ggcaggata ttc 23



<210> 35  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> AF-INTRON-r  
<220>  
<221> 引物\_结合  
<222> (1) .. (27)  
<400> 35  
ctgcataaat aaaaaaaatt agtcagc 27  
<210> 36  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> M3-GJ-f  
<220>  
<221> 引物\_结合  
<222> (1) .. (38)  
<400> 36  
gaagttcatc aagggcagct cactcaaagg cgtaata 38  
<210> 37  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> M3-GJ-r  
<220>  
<221> 引物\_结合  
<222> (1) .. (36)  
<400> 37  
tcggtgaatt taaaactcga ggtgaagacg aaaggg 36  
<210> 38  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> GJB-35delG-f

<220>  
<221> 引物\_结合  
<222> (1) .. (21)  
<400> 38  
ctgggggtgt gaacaaacac t 21  
<210> 39  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> GJB-35delG-r  
<220>  
<221> 引物\_结合  
<222> (1) .. (21)  
<400> 39  
tttgttcaca cccccaggat c 21  
<210> 40  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> GJB-109G/A-f  
<220>  
<221> 引物\_结合  
<222> (1) .. (22)  
<400> 40  
tgatcctcat tgtggctgca aa 22  
<210> 41  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> GJB-109G/A-r  
<220>  
<221> 引物\_结合  
<222> (1) .. (23)  
<400> 41  
gcagccacaa tgaggatcat aat 23

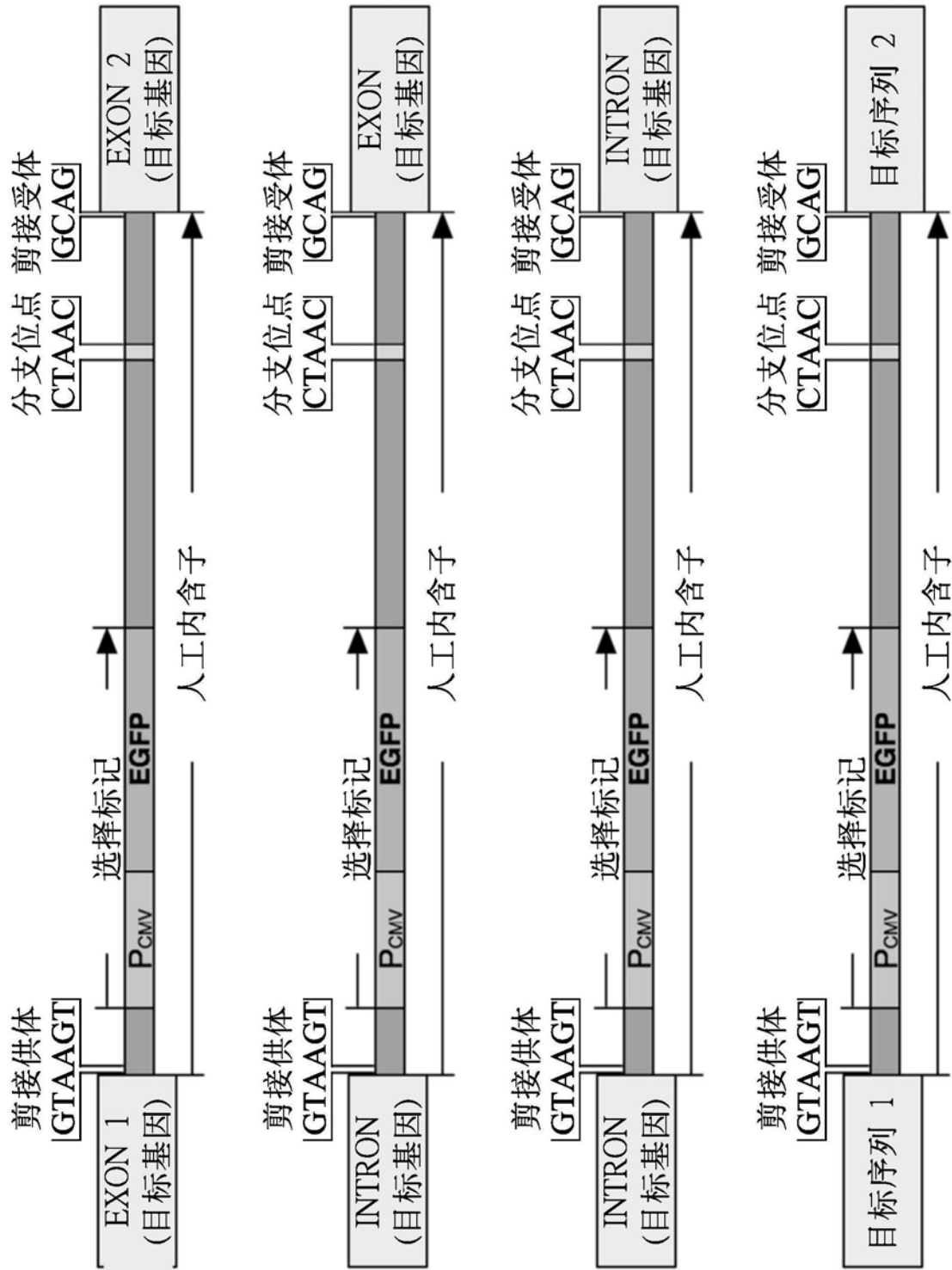


图1A

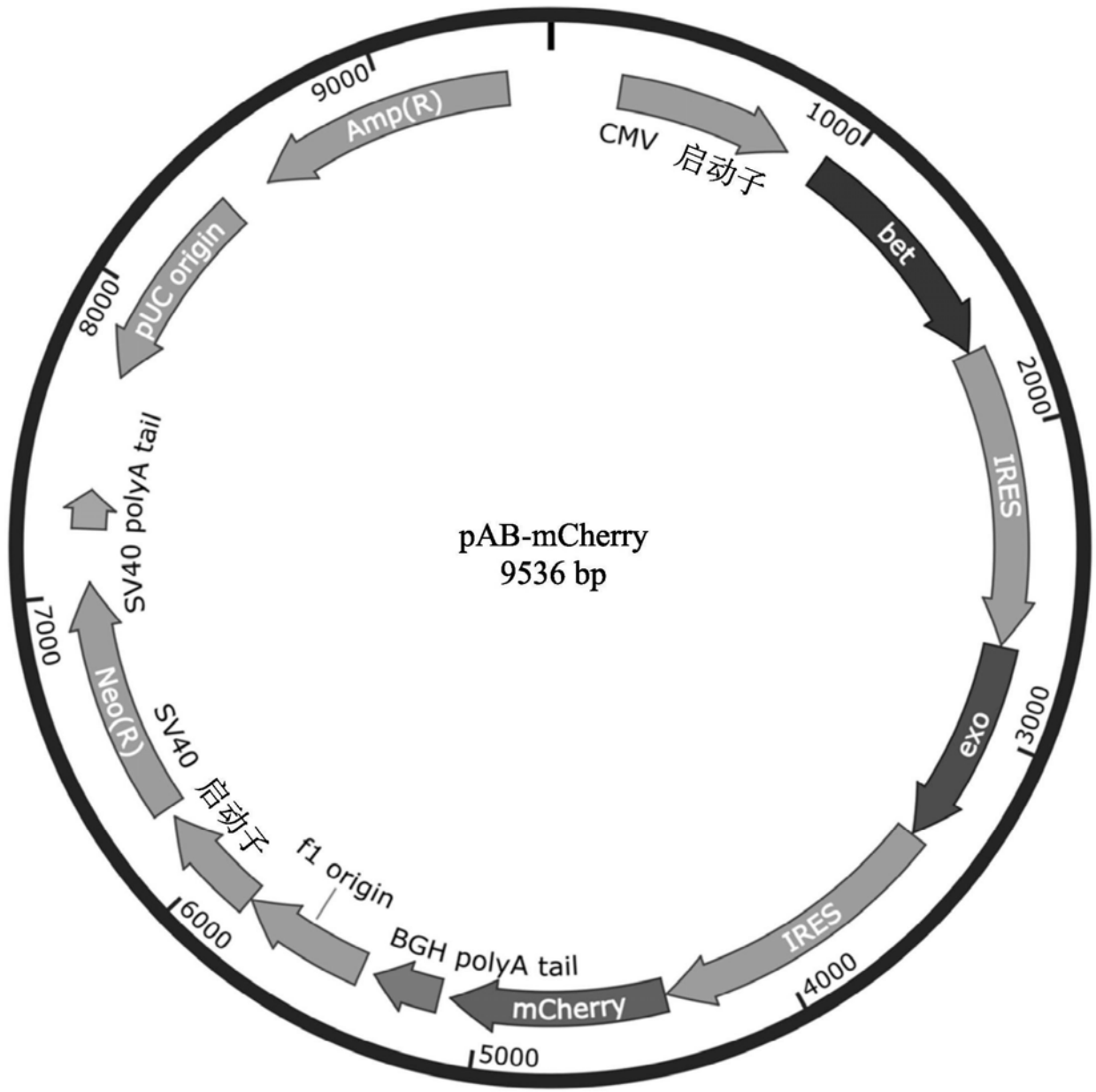


图1B

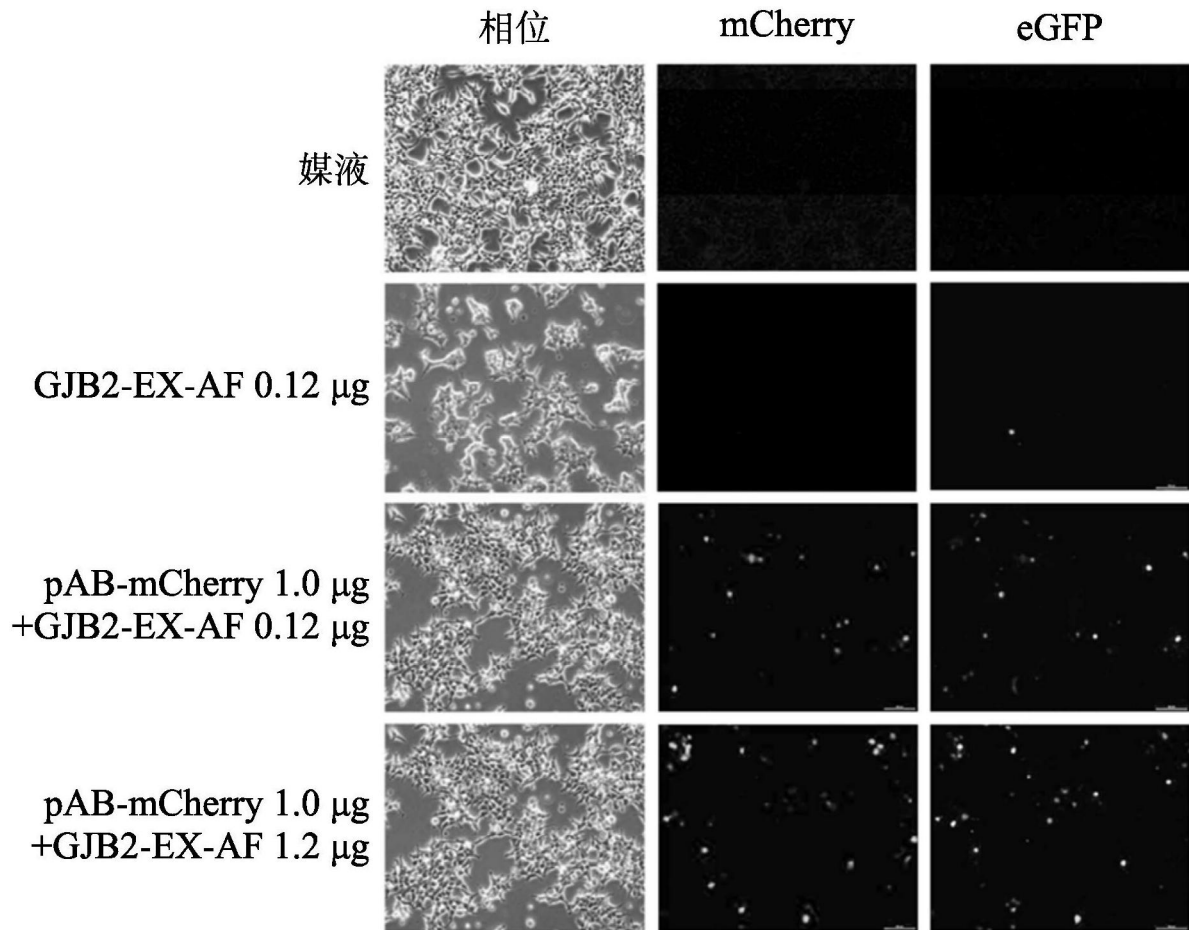


图2A

pAB-mCherry  
: GJB2-EX-AF

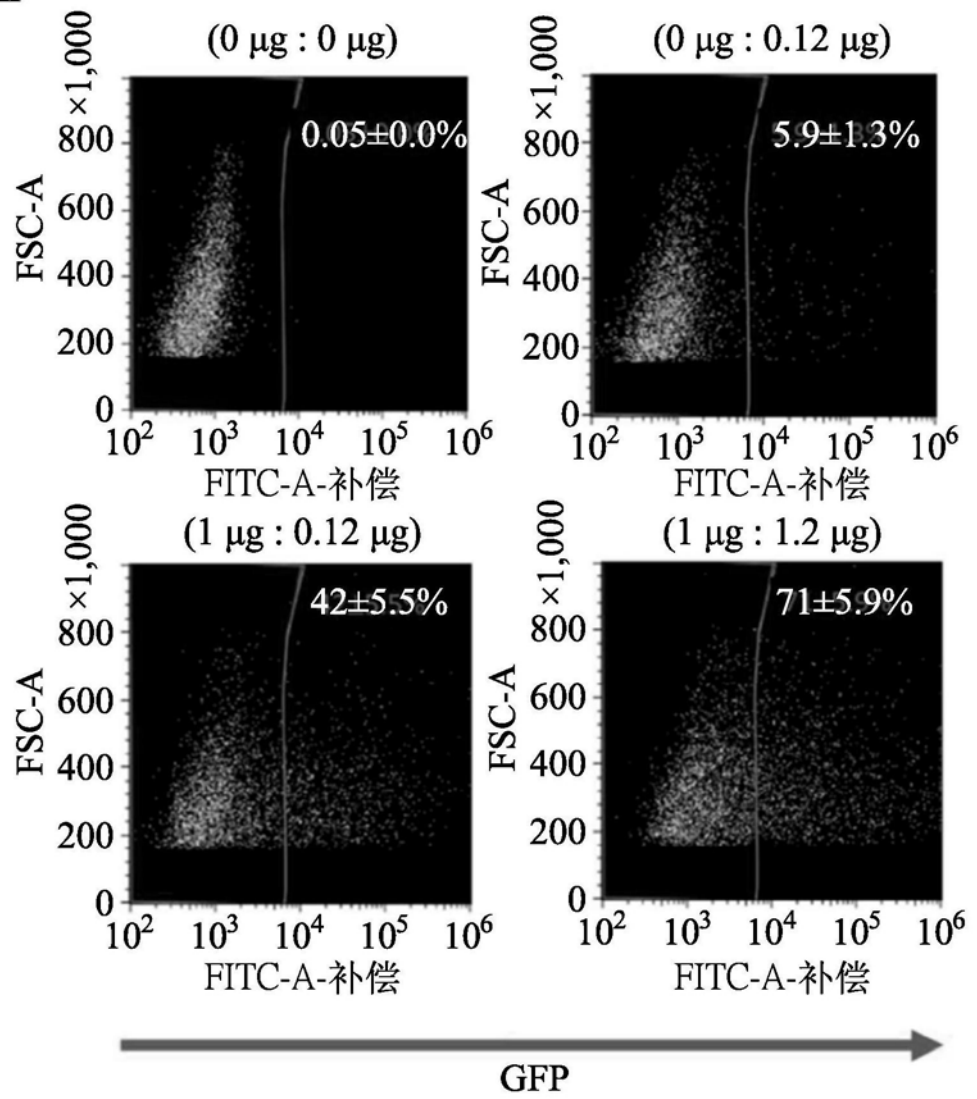


图2B

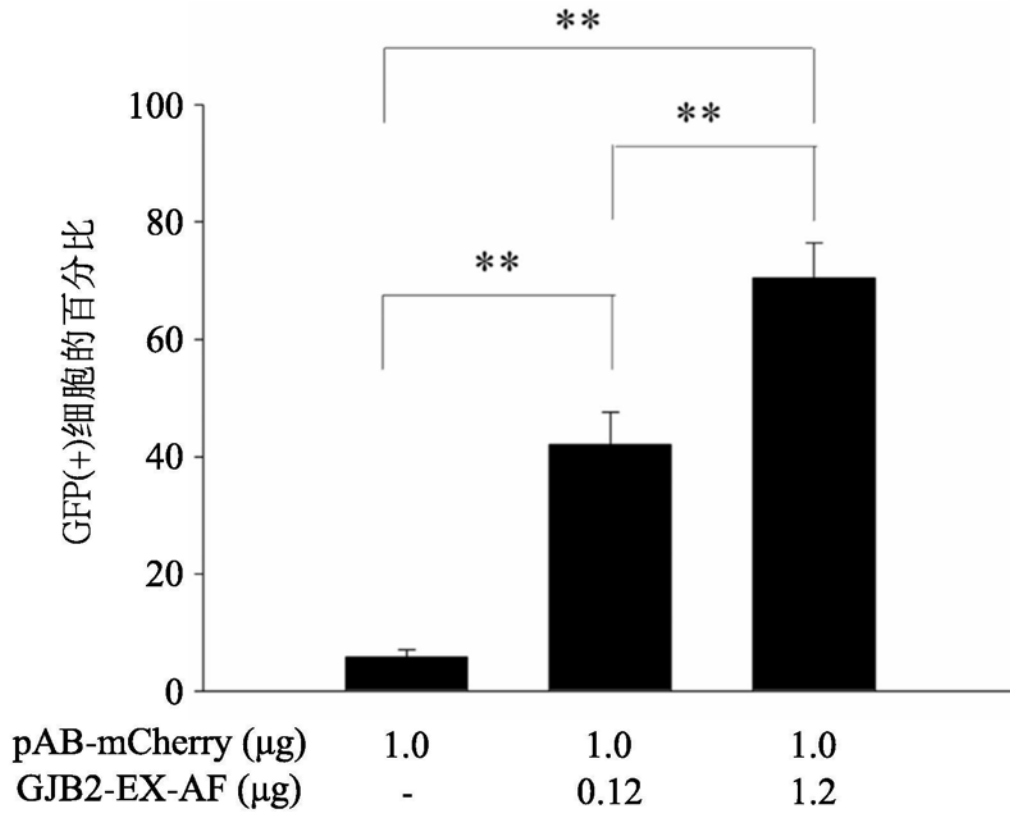


图2C

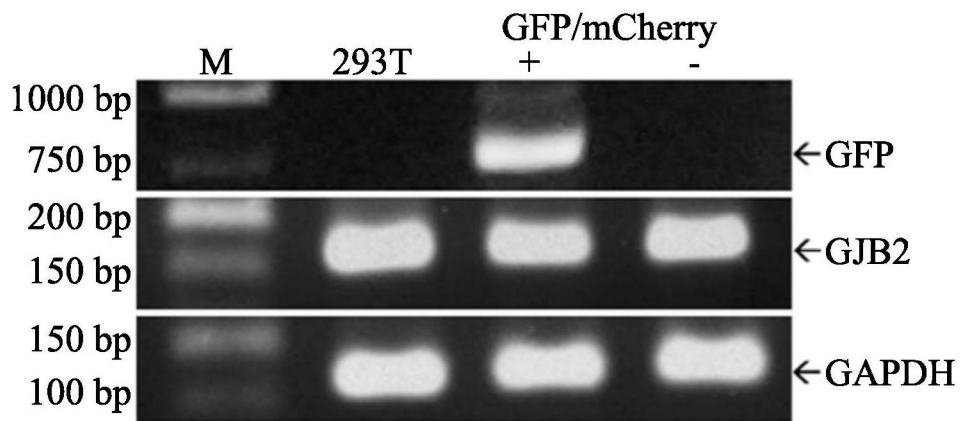


图2D

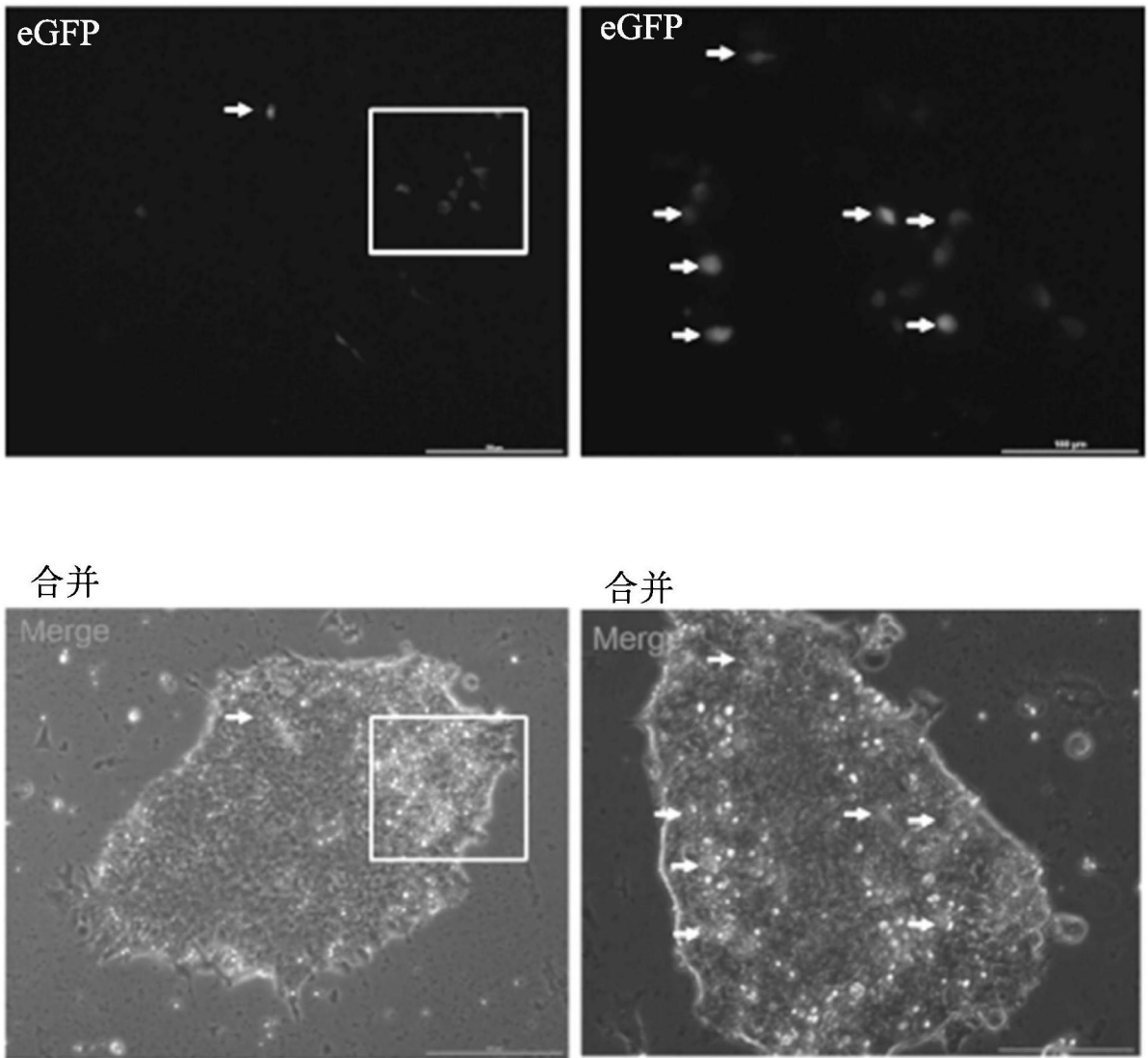


图3



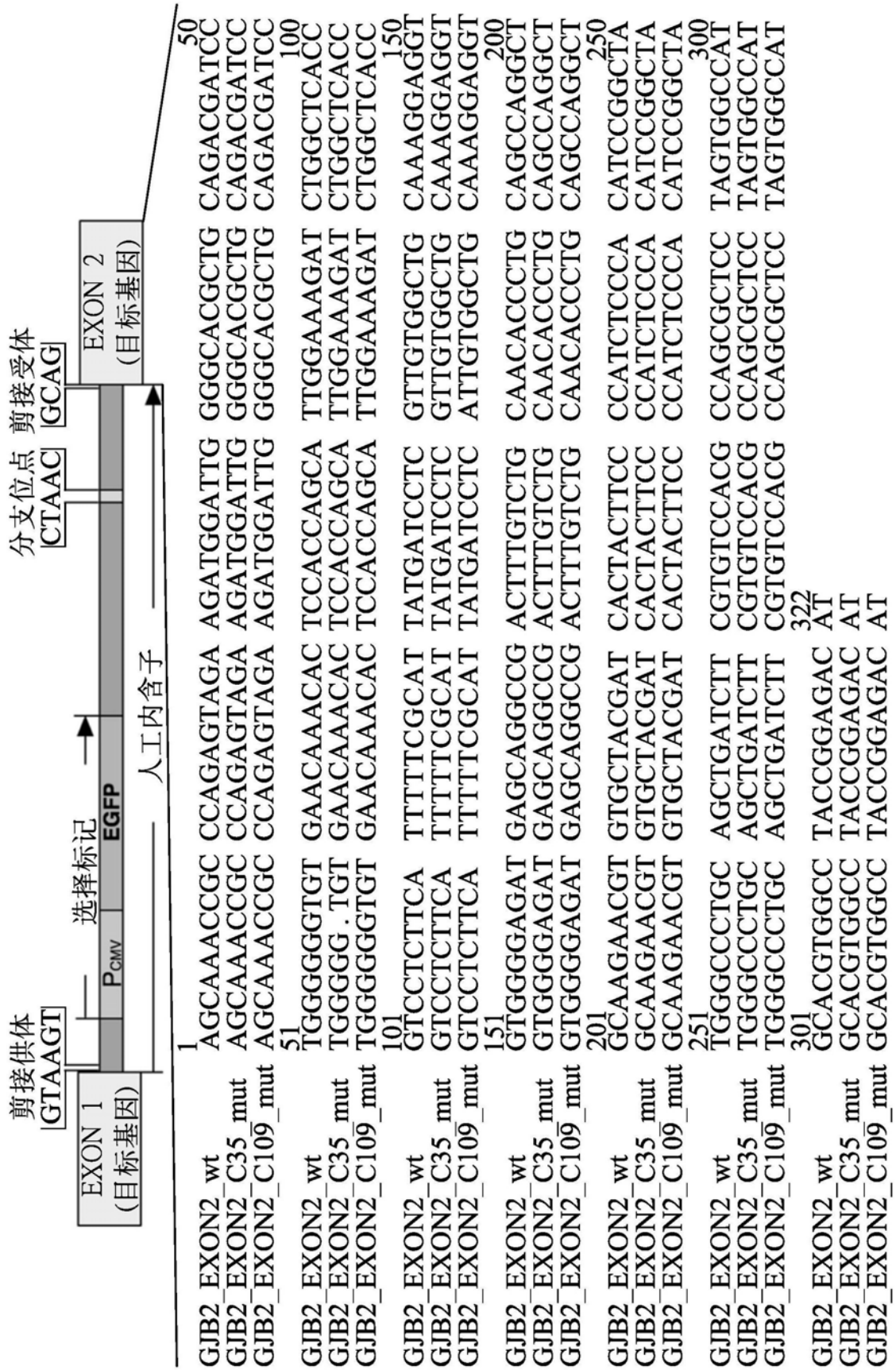


图4A

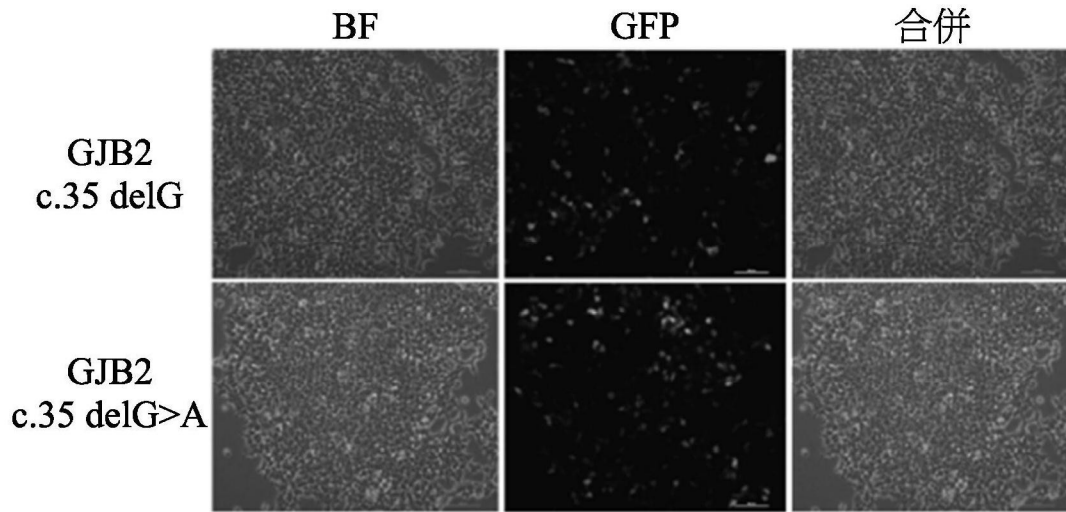


图4B

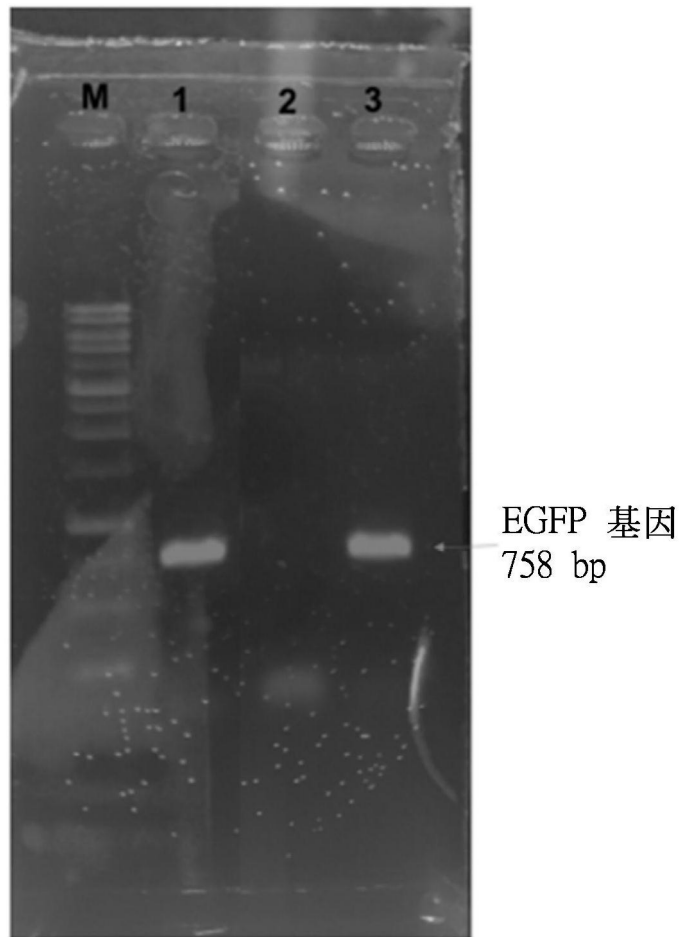


图4C

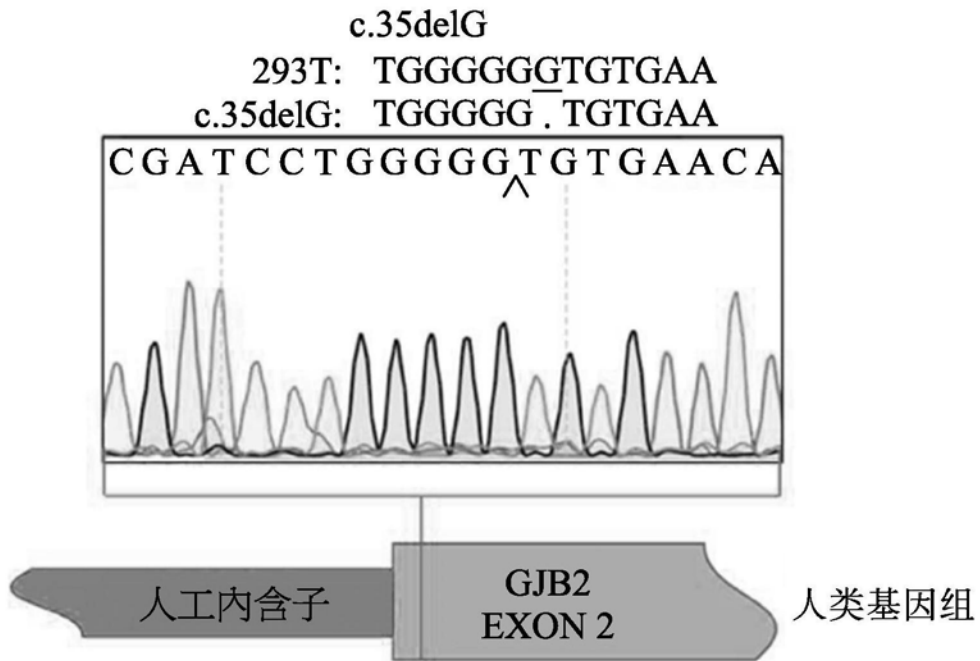


图4D

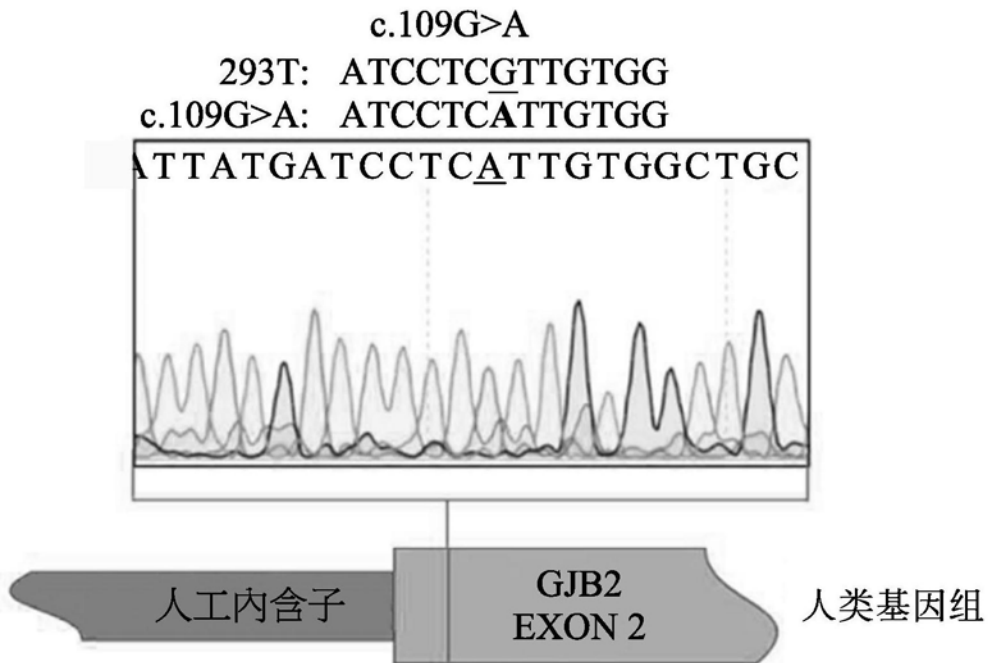


图4E

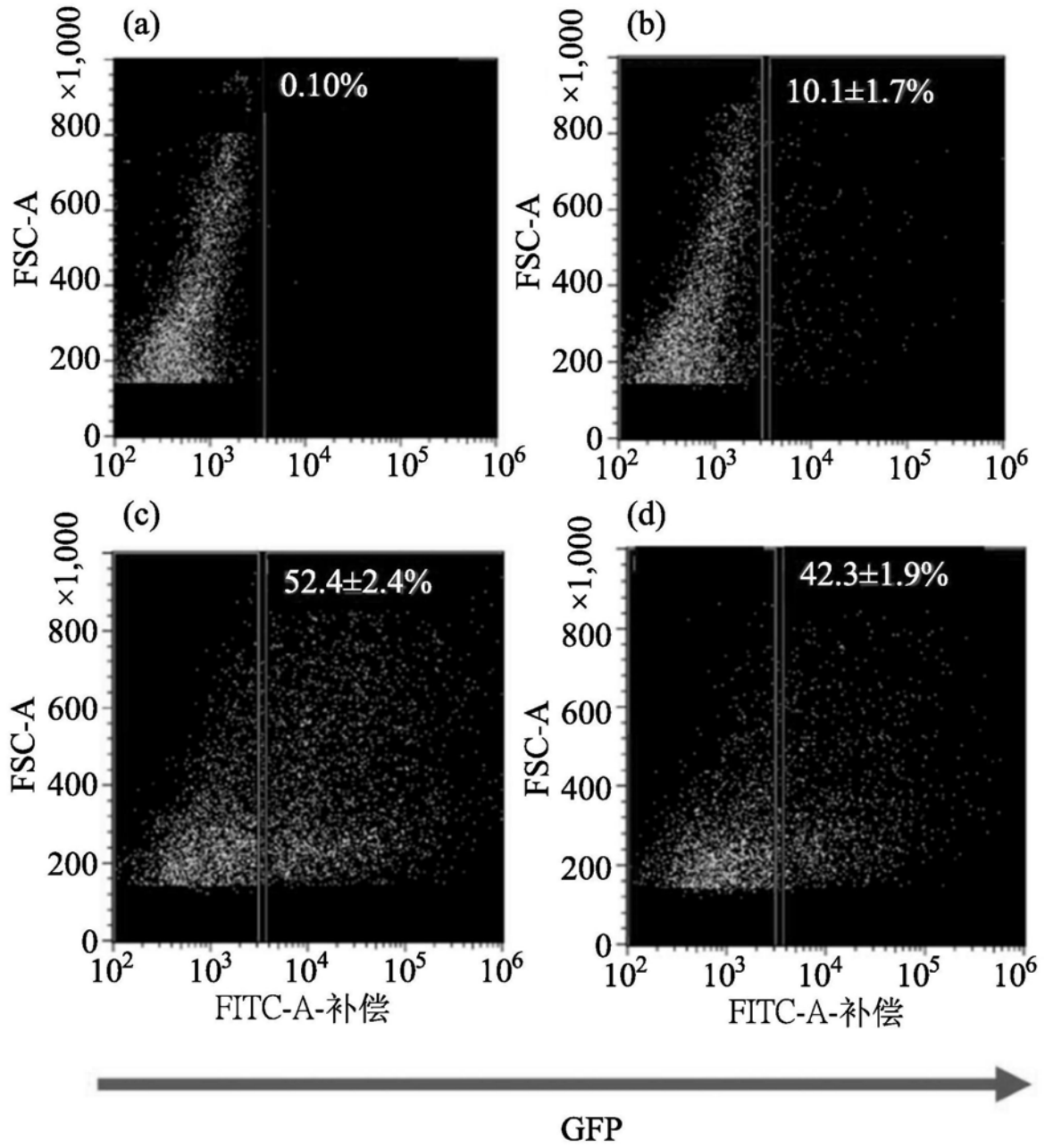


图5A

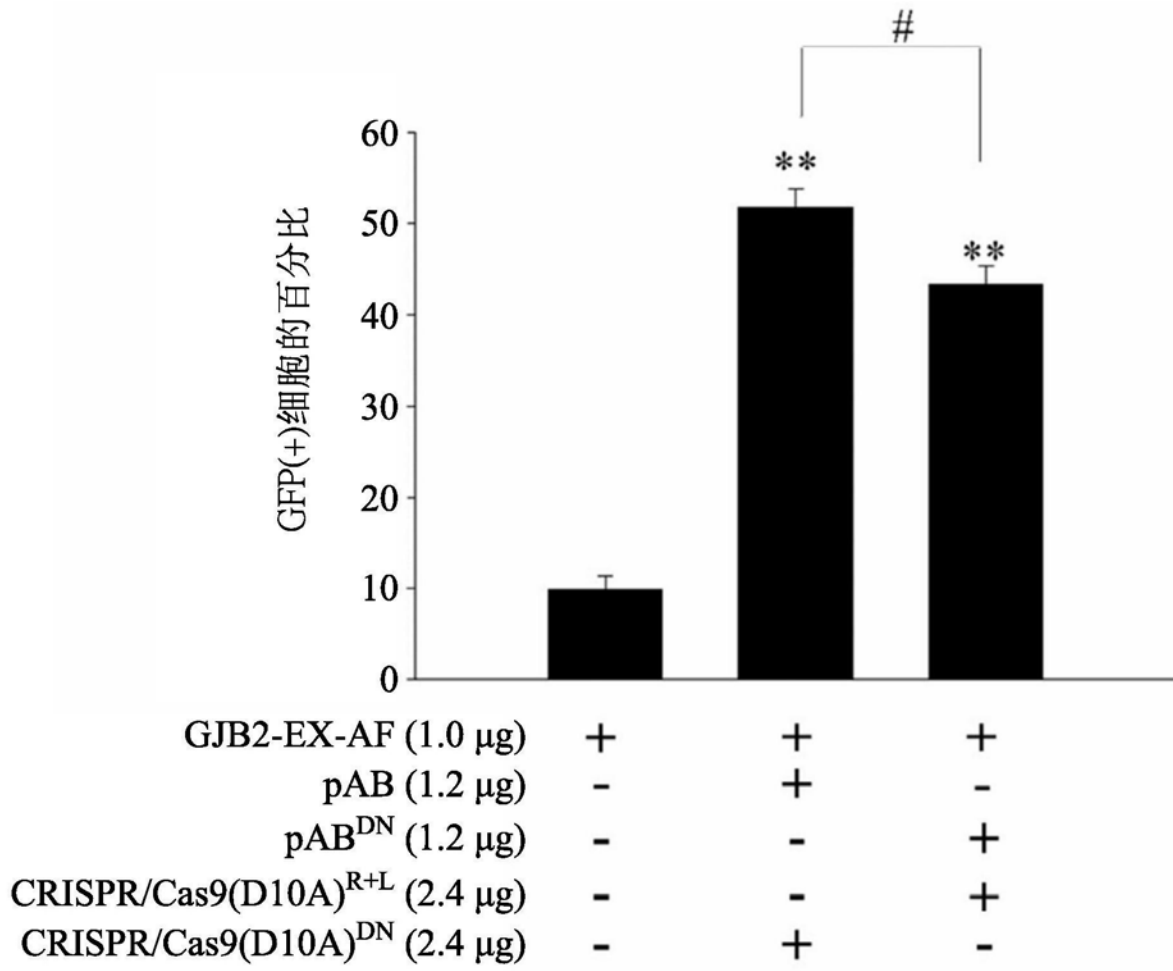


图5B