



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I686477 B

(45)公告日：中華民國 109 (2020) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：107114066

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 04 月 25 日

(51)Int. Cl. :	<i>C12N5/04</i>	(2006.01)	<i>C12N5/10</i>	(2006.01)
	<i>C12N15/05</i>	(2006.01)	<i>C12N15/09</i>	(2006.01)
	<i>C12N15/33</i>	(2006.01)	<i>C12N15/29</i>	(2006.01)
	<i>C12N15/63</i>	(2006.01)	<i>C12N15/82</i>	(2006.01)
	<i>C12N15/87</i>	(2006.01)	<i>C12Q1/68</i>	(2018.01)
	<i>A01H1/00</i>	(2006.01)	<i>A01H5/00</i>	(2018.01)

(71)申請人：國立成功大學(中華民國) NATIONAL CHENG KUNG UNIVERSITY (TW)
臺南市東區大學路 1 號

(72)發明人：張清俊 CHANG, CHING-CHUN (TW)；黃致豪 HUANG, CHIH-HAO (TW)；沈家儀 SHEN, JIA-YI (TW)；劉育彰 LIU, YU CHANG (TW)

(74)代理人：郭雨嵐；林發立

(56)參考文獻：

CN 102770539B

US 20160298128A1

Sprink, Thorben, Janina Metje, and Frank Hartung. "Plant genome editing by novel tools: TALEN and other sequence specific nucleases." *Current Opinion in Biotechnology* 32 (2015): 47-53.

Marton, Ira, et al. "From Agrobacterium to viral vectors: genome modification of plant cells by rare cutting restriction enzymes." *International Journal of Developmental Biology* 57.6-7-8 (2013): 639-650.

審查人員：劉建宏

申請專利範圍項數：20 項 圖式數：5 共 67 頁

(54)名稱

特異性造成植物葉綠體基因變異的轉殖載體、套組、方法及利用其產生之轉殖植物細胞與農桿菌

(57)摘要

本申請案提出一種產生葉綠體基因變異的轉殖植物細胞的方法，包括：建構一對前述之細胞核基因轉殖載體；透過農桿菌將所述一對細胞核基因轉殖載體併入植物細胞；以及篩選及培養植物細胞。細胞核基因轉殖載體包括啟動子、葉綠體訊息蛋白基因、重組 TALEN 蛋白域、終結子以及 T-DNA 的右邊界區及左邊界區。如此一來利用細胞核基因轉殖達到造成植物葉綠體基因變異的目標，能夠避免傳統葉綠體基因轉殖效率低、篩選時間長、耗費人力及物力等問題並達到相同目標。

The present application provides a method for generating chloroplast gene modified plant cells, comprising: constructing a pair of nuclear gene modifying vectors; transforming the pair of nuclear gene modifying vectors into plant cells via Agrobacterium; and selecting and culturing the plant cells. The nuclear gene modifying vectors comprises a promoter, a recombinant gene conferred the chloroplast transit peptide and TALEN protein domain, a terminator as well as right border and left border of T-DNA regions. Thus, by using nuclear transformation to mutate chloroplast gene, the problems such as low transformation

efficiency, long selection time, labor-intensive and high cost encountering in chloroplast transformation would be avoided.

指定代表圖：

符號簡單說明：

無

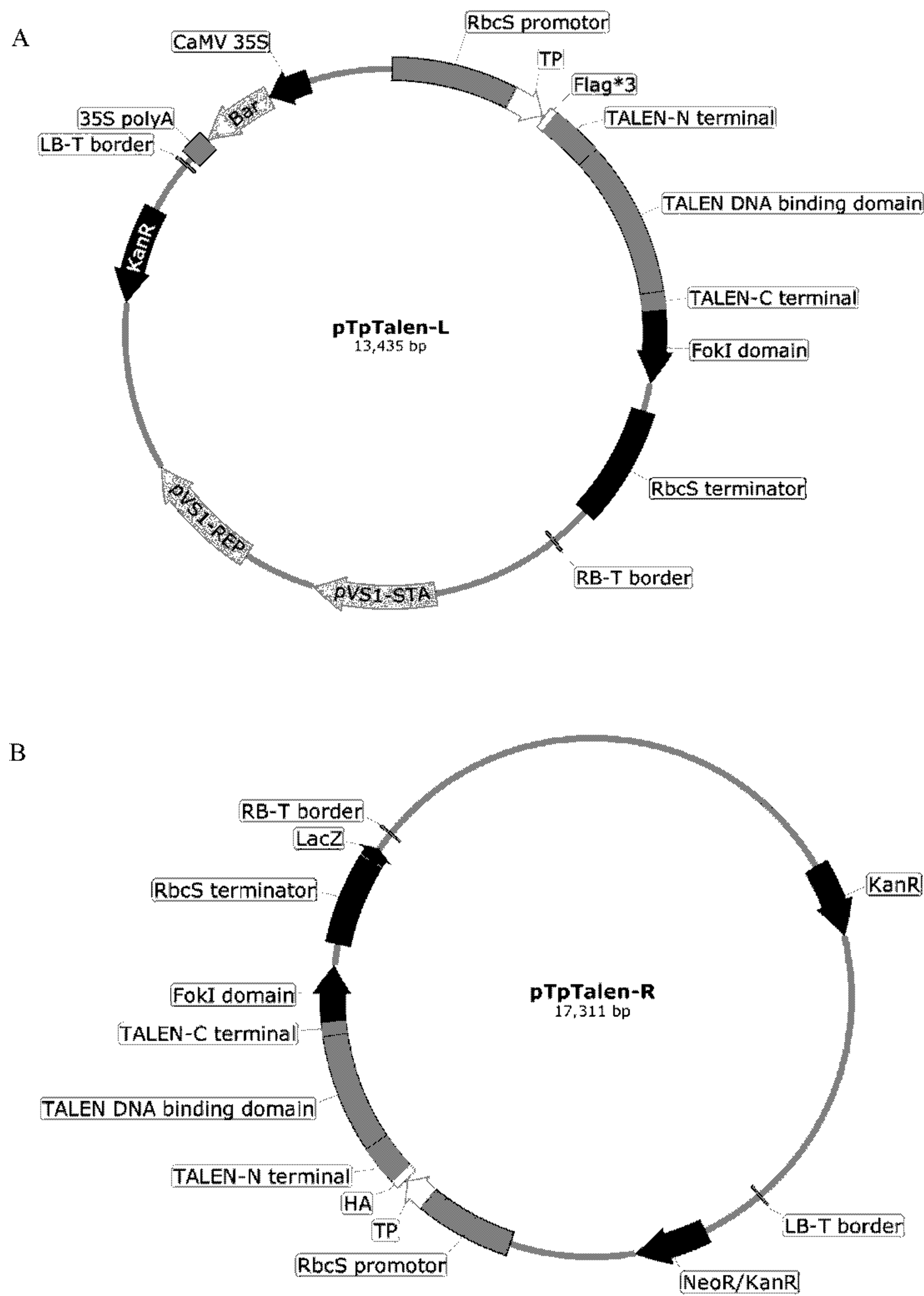


圖 1

I686477

【發明摘要】

【中文發明名稱】 特異性造成植物葉綠體基因變異的轉殖載體、套組、方法及利用其產生之轉殖植物細胞與農桿菌

【英文發明名稱】 Cloning vector, kit, and method for specifically inducing mutagenesis in chloroplast genes, and transgenic plant cells and *Agrobacterium* generated by the same

【中文】

本申請案提出一種產生葉綠體基因變異的轉殖植物細胞的方法，包括：建構一對前述之細胞核基因轉殖載體；透過農桿菌將所述一對細胞核基因轉殖載體併入植物細胞；以及篩選及培養植物細胞。細胞核基因轉殖載體包括啟動子、葉綠體訊息蛋白基因、重組TALEN蛋白域、終結子以及T-DNA的右邊界區及左邊界區。如此一來利用細胞核基因轉殖達到造成植物葉綠體基因變異的目標，能夠避免傳統葉綠體基因轉殖效率低、篩選時間長、耗費人力及物力等問題並達到相同目標。

【英文】

The present application provides a method for generating chloroplast gene modified plant cells, comprising: constructing a pair of nuclear gene modifying vectors; transforming the pair of nuclear gene modifying vectors into plant cells via *Agrobacterium*; and selecting and culturing the plant cells. The nuclear gene modifying vectors comprises a promoter, a recombinant gene conferred the chloroplast

transit peptide and TALEN protein domain, a terminator as well as right border and left border of T-DNA regions. Thus, by using nuclear transformation to mutate chloroplast gene, the problems such as low transformation efficiency, long selection time, labor-intensive and high cost encountering in chloroplast transformation would be avoided.

【指定代表圖】 圖1。

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 特異性造成植物葉綠體基因變異的轉殖載體、套組、方法及利用其產生之轉殖植物細胞與農桿菌

【英文發明名稱】 Cloning vector, kit, and method for specifically inducing mutagenesis in chloroplast genes, and transgenic plant cells and Agrobacterium generated by the same

【技術領域】

【0001】 本發明關於一種植物基因轉殖載體及方法，特別是關於一種植物細胞核基因轉殖載體及方法，其可用來造成葉綠體基因的變異。

【先前技術】

【0002】 傳統上要進行植物葉綠體基因的靜默、修飾與編輯，需要先行構築含有欲修飾的基因序列之葉綠體表現載體，接著利用基因槍轟擊法，將表現載體導入葉綠體內，再經由同源重組的方式取代原有的基因序列（Bock, 2015）。但是基因槍轟擊法的技術門檻高，需要訓練有素、經驗豐富的技術人員和昂貴的儀器去操作執行，而且基因槍耗材需求的成本高，於葉綠體的轉殖效率低。此外，由於一個植物細胞含有數十至數百個葉綠體，一個葉綠體也含有數十或上百個基因組，因此基因槍轟擊法所需篩選過程的時間冗長。

【0003】 除了基因槍轟擊法，也可利用PEG（polyethylene glycol）媒介法進行葉綠體基因轉殖，亦有報導可以成功地將表現載體經由原生質體（protoplasts）導入少數植物的葉綠體中（Bock, 2015）。此方法雖然不需要昂貴

的儀器，但是需要製備原生質體，而原生質體脆弱、操作不易，而且轉殖後又需自原生質體再生成植株。雖然耗材成本較低，但原生質體的再生技術門檻高，且再生過程所需的時間很長，大部分植物尚未建立此技術，現行只有少數植物可行。此外，PEG媒介法也有可能會產生出多倍體的細胞、轉殖效率低、篩選過程時間冗長等問題。

【0004】 總而言之，現有葉綠體基因轉殖技術仍有許多缺點、問題有待克服和改進，包括門檻高、轉殖效率低、篩選過程的時間冗長、需投入甚多人力和物力等。此外，由於葉綠體基因組較小且基因密度高，一般皆是利用同源重組的方式將外源基因插入基因組中，相較於細胞核轉殖的隨機地插入細胞核基因組中的方式，葉綠體轉殖效率低很多。

【發明內容】

【0005】 有鑒於上述先前技術的問題，本發明的目的就是在提供一種細胞核基因轉殖載體、套組及方法，來造成葉綠體基因的變異，能夠有效改善傳統葉綠體基因轉殖效率低、篩選時間長、耗費人力及物力等問題。

【0006】 根據本發明之一目的，提出一種細胞核基因轉殖載體，包括：啟動子；葉綠體訊息蛋白基因，其位於啟動子下游；重組TALEN蛋白域，包含如SEQ ID NO: 21或SEQ ID NO: 22所示之序列；以及第一邊界區及第二邊界區，例如T-DNA的左邊界區及右邊界區。其中啟動子、葉綠體訊息蛋白基因、重組TALEN蛋白域及依序位於第一邊界區與第二邊界區之間。

【0007】 較佳地，啟動子可為*rbcS*啟動子。

【0008】 較佳地，重組TALEN蛋白域可包括編碼DNA辨識蛋白及核酸內

切酶的DNA序列。更佳地，核酸內切酶可為Fok I，而該DNA辨識蛋白可辨識葉綠體之*rpoB*基因之片段。最佳地，編碼DNA辨識蛋白之DNA序列可包括如SEQ ID NO: 3或SEQ ID NO: 4所示之序列。

【0009】 較佳地，轉殖載體可更包括篩選基因，篩選基因可為抗藥性篩選基因、非抗藥性篩選基因、或其組合。更佳地，篩選基因可包括卡那黴素（kanamycin）抗性基因或甲硫胺酸磺醯亞胺（methionine sulfoximine, MSO）殺草劑抗性基因。最佳地，卡那黴素抗性基因包括*nptII*或該甲硫胺酸磺醯亞胺殺草劑抗性基因包括*bar*。

【0010】 較佳地，轉殖載體可更包括編碼標誌物之序列。更佳地，標誌物可包含選自由發光分子、化學發光分子、螢光染料、螢光猝滅劑、脂質、有色分子、放射性同位素、閃爍劑、生物素、抗生物素蛋白、鏈黴親和素、蛋白質A、蛋白質G、抗體或其片段、聚組胺酸、Ni²⁺、Flag標籤、myc標籤、HA標籤、和酶所組成的群組中的可檢測標記物。

【0011】 較佳地，轉殖載體可包含如SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 2所示之序列。

【0012】 較佳地，轉殖載體可更包括*rbcS*基因的3端非轉錄區，其位於重組TALEN蛋白域下游。

【0013】 根據本發明之又一目的，提出一種特異性造成植物葉綠體基因變異的套組，包括：一對前述之細胞核基因轉殖載體。較佳地，套組可包括第一轉殖載體及第二轉殖載體。第一轉殖載體包括：第一啟動子；第一葉綠體訊息蛋白基因，其位於第一啟動子下游；第一重組TALEN蛋白域，包含如SEQ ID NO: 21所示之序列；以及第一邊界區及第二邊界區，其中第一啟動子、第一葉綠體訊息

蛋白基因及第一重組TALEN蛋白域依序位於第一邊界區與第二邊界區之間。第二轉殖載體包括：第二啟動子；第二葉綠體訊息蛋白基因，其位於第二啟動子下游；第二重組TALEN蛋白域，包含如SEQ ID NO: 22所示之序列；以及第三邊界區及第四邊界區，其中第二啟動子、第二葉綠體訊息蛋白基因及第二重組TALEN蛋白域依序位於第三邊界區與第四邊界區之間。

【0014】 根據本發明之再一目的，提出一種產生細胞核基因轉殖植物細胞並造成葉綠體基因變異的方法，包括：建構一對前述之細胞核基因轉殖載體；透過農桿菌將所述一對細胞核基因轉殖載體併入植物細胞；以及篩選及培養植物細胞。

【0015】 較佳地，併入可包含同源性導向的修復機制或非同源性末端接合導向的修復機制。

【0016】 較佳地，方法可更包括轉殖細胞核基因轉殖載體至農桿菌。

【0017】 較佳地，方法可更包括分析植物細胞並確認細胞核基因轉殖載體併入該植物細胞。

【0018】 根據本發明之再一目的，提出一種細胞核基因轉殖植物細胞，其係以前述之方法所建構。

【0019】 根據本發明之再一目的，提出一種農桿菌，包括前述之細胞核基因轉殖載體。

【0020】 總的來說，本案透過於細胞核表現重組TALEN蛋白的方式來造成葉綠體基因變異的方式，至少可解決前述傳統葉綠體基因轉殖的問題，並至少提供以下優點：

【0021】 (1) 提昇轉殖效率並解決傳統葉綠體基因轉殖技術門檻高之問

題。

【0022】 (2) 由於利用細胞核基因轉殖，篩選的時間較短。

【0023】 (3) 利用農桿菌媒介法進行細胞核基因轉殖的成本低，故無須昂貴的儀器及製備原生質體。

【0024】 本案所請發明的上述以及其它目的、特徵與優點，在參照以下的詳細說明與較佳實施例和隨文檢附的圖式後，將變得明顯。

【圖式簡單說明】

【0025】 圖 1係根據本案所請發明一實施例的細胞核基因轉殖載體的圖譜。其中，A部分及B部分分別為pTpTalen-L與pTpTalen-R，皆為細胞核基因表現的農桿菌雙偶載體，並且為具葉片組織特異性的表現載體。pTpTalen-L的骨架為來自pZGB9R，具有KanR (*npt II*) 基因做為篩選標誌；而pTpTalen-R的骨架為來自pBinPlus，其具有*bar*基因做為篩選標誌。各縮寫代表之涵義為：LB-T Border與RB-T Border分別為農桿菌T-DNA的左右邊界。CaMV 35S為Califlower mosaic virus 35S 轉錄子的啟動子。35S polyA為Califlower mosaic virus 35S 轉錄子的3'UTR。RbcS promoter為*rbcS*基因的啟動子。RbcS terminator為*rbcS*基因的3'UTR。KanR (*npt II*) 為抗卡那黴素 (kanamycin) 的篩選標誌基因，而*bar*為抗殺草劑 (Methionine sulfoximine, MSO) 的篩選標誌基因。TP為葉綠體訊息蛋白的序列。Flag為Flag標籤，而HA為HA標籤。

【0026】 圖 2係於本案所請發明一實施例中利用PCR確認共轉殖pTpTalen-L與pTpTalen-R後基因是否嵌入菸草基因組中。(A)所使用之PCR引子對Check-F (SEQ ID NO: 5; AATTCACCTCATTGGATTTCATAGAAG) 與Check-

R (SEQ ID NO: 6; CTGTAGCCGAGCGTGCGTAG) 位於 pTpTalen-L 和 pTpTalen-R 載體上的位置。(B) 將6個共轉殖菸草品系 (M0、M11、M14、M17、M39、M42)、對照組 (Wt 為未轉殖菸草)、pTpTalen-L (Lp) 和 pTpTalen-Rp (Rp) 載體等的DNA，使用特異性引子對 (Check-F 與 Check-R) 進行 PCR 擴增放大，再將 PCR 產物以2.2%的瓊膠電泳進行分離。圖中，M 為100 bp DNA 標誌。箭頭處為預期PCR產物大小分別為482 bp 和452 bp。

【0027】 圖 3係為根據本案發明一實施例之經細胞核基因轉殖的菸草品系之植株外表型態。如圖所示，經細胞核基因轉殖之4個不同轉殖品系呈現不同程度葉片白化或黃化的外表性狀。WT為對照組 (未轉殖菸草)。M0為全株白化的植物品系。M11為2個分別生長在培養基或泥土的不同個體。M17為2個分別生長在培養基或泥土的不同個體。M29為2個分別生長在泥土中的不同個體。

【0028】 圖 4係利用高解析度解離 (High Resolution Melting, HRM) 分析根據本案發明一實施例之菸草葉綠體 *rpoB* 基因的突變。自WT對照組 (未轉殖菸草) 的葉片組織和2個不同轉殖品系 (M11和M17) 的白色葉片組織萃取DNA，接著利用一對引子 (SEQ ID NO: 7; GGATTTAATCAGATACAATTTGAAG) 和 (SEQ ID NO: 8; TTCCAAATTAATCCCGCGGATAC) 進行Q-PCR (Fast Evagreen[®] qPCR Master Mix, Biotium)，以擴增放大重組TELEN蛋白作用區域附近的DNA (229 bp)，將PCR產物進行高解析度解離分析 (HRM, LightCycler[®] Nano, Roche)。結果顯示，轉殖植物的白色葉片組織 (M11-W和M17-W) 與WT對照組有明顯的熔解曲線之差異，因此推測 *rpoB* 基因發生核苷酸之變異。

【0029】 圖 5係顯示重組TALEN蛋白造成根據本案發明一實施例之菸草葉片之葉綠體 *rpoB* 基因序列的變異。萃取對照組 (WT) 和4個不同轉殖品系 (M0,

M11, M17 和M29) 的葉片組織，其中M11和M17品系植物的DNA又分別萃取自白色(M11-W和M17-W)和綠色(M11-G和M17-G)葉片組織。以一對引子(SEQ ID NO: 9; AGCAGAAGTCTGTTTCTAGGGATGT)和(SEQ ID NO: 10; TAGCTGATGATAGAACTAGAATA)利用PCR去擴增放大DNA，並將PCR產物進行定序，將定序結果利用CLC Genomics Workbench 9.5.2 軟體進行多重序列比對。結果顯示，在轉殖品系M0, M11, M17和M29的白色或黃化葉片組織(M0-W; M11-W, M17-W, M29)的*rpoB*-295位置明顯有發生A突變至T的情形。但是在M11和M17的綠色葉片組織(M11-G、M17-G)的*rpoB*基因序列則與對照組相同。箭頭處為發生變異之核苷酸。

【0030】 在以下的詳細描述中，為了解釋本發明，提供了許多具體細節，以便能徹底理解所揭露的實施方式。然而，顯而易見的是，一個或多個的實施方式可以在沒有所述具體細節的情況下實現。在其它情況中，為了簡化附圖，習知的結構和流程將以示意性的方式顯示。

【實施方式】

【0031】 本發明之各個具體實例的細節說明如後。本發明之其他特徵將會經由以下各個具體實例中的詳細說明及申請專利範圍而清楚呈現。

【0032】 無須進一步的闡述，咸相信本發明所屬技術領域中具有通常知識者基於前述說明即可利用本發明至最廣的程度。因此，可以理解以下的說明僅僅是作為例示說明之用，而非以任何方式限制其餘的揭露內容。

【0033】 除非另有說明，否則此處使用之全部技術和科學名詞與本發明所屬技術領域中具有通常知識者通常所瞭解的意義相同。

【0034】 除非另有說明，所有百分比、部分、比例等皆以重量計。

【0035】 如本文中所用者，術語「由.....製成」(produced from)與「包含」(comprising)同義。如本文中所用者，術語「包含」(includes, including)、「包括」(comprises, comprising)、「具有」(has, having)、「含有」(contains, containing)、或其任何其他變型，係意欲涵蓋非排他性的涵括。例如，含有清單列出的複數元素的一組合物、製程、方法、製品或裝置不一定僅限於清單上所列出的這些元素而已，而是可以包括未明確列出但卻是該組合物、製程、方法、製品或裝置固有的其他元素。術語「包含」一般係以包括之意思被使用，此即係允許一或數種其他特徵或組成份之存在。

【0036】 本申請案的目的是在於提供一種細胞核基因轉殖載體，其在透過農桿菌或其他本發明所屬技術領域中具有通常知識者習知的方法轉殖至植物細胞核並經過細胞核的轉錄後，可於細胞質轉譯合成出重組TALEN蛋白。重組TALEN蛋白可以藉由位於N端的訊息蛋白之導引，經由葉綠體膜的傳送通道(Toc-Tic translocon)到達葉綠體基質內，而後該重組TALEN蛋白可特異性地結合於目標葉綠體DNA的特定位置。重組TALEN蛋白再由核酸內切酵素(例如Fok I)作用，造成雙股葉綠體DNA的斷裂，進而啟動葉綠體DNA之修復機制，包括為同源性導向的修復機制(homologous recombination, HR)或非同源性末端接合導向的修復機制(non-homologous end joining, NHEJ)。當利用葉綠體DNA的非同源性重組之修復機制，常導致目標基因變異，將進而導致目標基因失去活性。

【0037】 在一實施例中，如圖1所示，提供一種細胞核基因轉殖載體，包括：啟動子(promoter)；葉綠體訊息蛋白基因(TP)，其位於啟動子下游；重組TALEN蛋白域(TALEN)，其位於葉綠體訊息蛋白基因下游；以及T-DNA左

邊界區 (LB-T border) 及T-DNA右邊界區 (RB-T border) ，其中啟動子、葉綠體訊息蛋白基因及重組TALEN蛋白域依序位於T-DNA左邊界區與T-DNA右邊界區之間。

【0038】 在一實施態樣中，該細胞核基因轉殖載體可具有如SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 2所示之序列，並將該細胞核基因轉殖載體命名為pTpTalen-L或pTpTalen-R。

【0039】 值得注意的是，本發明所屬技術領域中具有通常知識者，可根據所欲重組TALEN蛋白辨識或切割的區域，而設計重組TALEN蛋白域的序列。轉殖載體中的其他元件，例如啟動子、篩選標記、終結子等，本發明所屬技術領域中具有通常知識者可依據實驗需求而自行選擇適合的元件進行替換。

【0040】 在一實施例中，提供一種產生細胞核基因轉殖植物細胞的方法，包括：建構一對前述之細胞核基因轉殖載體；透過農桿菌將所述一對細胞核基因轉殖載體併入植物細胞；以及篩選及培養植物細胞。

【0041】 在又一實施例中，透過前述的方法，可提供一種細胞核基因轉殖植物細胞或細胞核基因轉殖植物，或可提供一種包含前述細胞核基因轉殖載體的農桿菌。

【0042】 本文中所稱「植物」、「植物細胞」及「重組植物細胞」等術語於本文中可彼此相互交替使用，其可表示雙子葉植物、單子葉植物、裸子植物等的植物細胞，例如菸草、阿拉伯芥、馬鈴薯、大豆、番茄、蘭花、水稻、玉米、小麥、大麥、高粱、甘蔗等。可於該植物細胞中引入一或數種本案所述之載體或經基因工程方法插入欲表現基因的所述載體。如本發明所屬技術領域中通常知識者所瞭解，上述術語不僅意指特定之細胞，而且亦指該種細胞之後代或潛在可

能之後代。因為基因突變或環境之影響，後繼之世代中可能會出現改變，故該等細胞之後代實質上不會與親代之細胞相同，然而卻仍包括於本文中所使用之該術語之範圍內。

【0043】 本文中所稱「葉綠體訊息蛋白基因」係指一段核苷酸序列，在經過細胞核的轉錄、細胞質的轉譯後可合成出一訊息蛋白。此訊息蛋白會表現在蛋白質的一端，例如N端，此訊息蛋白包含了將蛋白質運送至葉綠體所需的導引訊息。如同「地址標籤」，此訊息蛋白能將蛋白質指引到葉綠體表面。而在葉綠體表面有一組特殊的傳送通道（Toc-Tic translocon），可辨識這個「地址標籤」，經辨識後，接受器會將含正確「地址標籤」的蛋白質轉運入葉綠體基質。在進入葉綠體基質後，這多出來的一段訊息蛋白便會被切除。

【0044】 本文中所稱「篩選基因」係用來確認前述載體是否有順利轉形（transform）進入宿主中。前述篩選基因可為但不限於：抗藥性篩選基因、非抗藥性篩選基因、或其組合。在一可行實施態樣中，前述篩選基因可為抗藥性篩選基因。舉例來說，前述抗藥性篩選基因可為卡那黴素或新黴素抗性基因。在此可行實施態樣中，順利轉形有前述載體的植物細胞（如，菸草或阿拉伯芥）便可以產生對卡那黴素或新黴素的抗性，而得以存活於含有卡那黴素或新黴素的環境。

【0045】 本文中所稱「非抗藥性篩選基因」係指非以對抗生素之抗性與否來確認轉形的基因。前述非抗藥性篩選基因例如但不限於：Phosphinothricin N-acetyltransferase 基因（*bar*或*pat*），其做為篩選基因可將含有殺草劑的成分草銨磷（glufosinate）或甲硫胺酸磺醯亞胺（methionine sulfoximine; MSO）等化合物進行乙醯基化而去掉其毒性，因此可以利用殺草劑譬如草銨磷等類化合物來進行轉基因植物的篩選。另外，突變或過量表現5-enolpyruvoyl-shikimate-3-

phosphate synthetase (EPSPS) 基因可以不受到含有嘉賽磷 (Glyphosate; N-(phosphonomethyl)glycine) 殺草劑的抑制，因此也可以做為篩選基因，利用殺草劑譬如嘉賽磷等來進行轉基因植物的篩選。

【0046】 在一較佳實施態樣中，前述非抗藥性篩選基因為營養缺乏篩選基因(如，cytosine deaminase (*codA*))、醣類代謝基因(如，phosphomannose isomerase (*manA*); xylose isomerase (*xylA*))、植物賀爾蒙相關基因(如，isopentenyl transferase (*ipt*))、重金屬抗性基因(如，鎘抗性基因)、D-胺基酸消旋酶(如，alanine racemase) 基因、熱休克蛋白質 (heat shock protein) 基因或報導基因 (如， β -glucuronidase (*GUS*); luciferase (*LUC*); fluorescent proteins (*FPS*))。

【0047】 本文中所稱「併入」、「經併入」或「將核酸送入細胞中」等術語係表示利用任何之方法，使細胞外之核酸(如載體)於有或無伴隨物質(例如另一載體或寡核苷酸)之下進入宿主細胞。「細胞併入」或「經併入之細胞」等術語係表示於該植物細胞或其子代細胞中送入細胞外之核酸，因此植物細胞含該細胞外之核酸。核酸送入細胞中，而使該核酸可與染色體結合成一體之片段形式或以染色體外之元件之形式進行複製，或是該核酸破壞細胞中內源基因的表現。

【0048】 在一實施例中，迫使含有外源基因的載體進入農桿菌體內有兩種方式，即電穿孔法及三親雜交法。電穿孔法就是透過電擊農桿菌的方式，使其產生暫時性通透孔使載體進入農桿菌中。三親雜交法就是將含有特殊質體的大腸桿菌(稱為幫助者菌系)與含有外源基因的大腸桿菌，及含有幫助者質體的農桿菌三種菌類一起培養，含有外源基因的載體即會進入含有幫助者質體的農桿菌

中。在一實施態樣中，進一步利用該含有外源基因載體的農桿菌，將外源基因送入目標細胞中，例如植物細胞。

【0049】 位於本文中之元素或成份之前的不定冠詞「一」及「一個」旨在非限制性地說明該元素或成份的實例數目（即出現數）。因此「一」或「一個」應理解為包括一個或至少一個，且該元素或成份的單數詞形也包括複數，除非該數目顯然是指單數。

【0050】 本文中之材料、方法及實例僅為說明性質，除非特別說明，否則非意欲為限制本發明。儘管可用類似或等效於本文所述的方法或材料來實施或測試本發明，然本文所述者為較適當的方法及材料。

【0051】 建構似轉錄活化因子核酸酶（Transcription activator-like effector nuclease; TALEN）

【0052】 TALEN是經由人為重組似轉錄活化因子（Transcription activator-like effector, TALE）的DNA辨識結合域和核酸內切酶活性區域而形成。TALE是由植物黃單胞菌（*Xanthomonas bacteria*）分泌的蛋白質，此蛋白質含有一個進核訊號（NLS）以及轉錄活化子，能幫助TALE蛋白從細胞質進入細胞核，然後專一性結合到宿主基因的啟動子，進而活化轉錄作用之進行。

【0053】 TALE的中間區域為多個串聯重複單元組成的串聯重複區，每個串聯重複單元一般含有34個胺基酸，其中第12和13位置的胺基酸之變異性高，被稱為重複可變區（repeat-variable diresidue, RVD）。每個串聯重複單元中的RVD可以辨認DNA的不同鹼基，並有簡單的一對一之對應關係。例如，RVD如果是NI（Asn-Ile）可辨認A，HD（His-Asp）可辨認C，NG（Asn-Gly）可辨認T，而NN（Asn-Asn）可辨認G/A。

【0054】 另一方面，核酸內切酶活性區域可為Fok I核酸內切酶，而Fok I核酸內切酶需形成二元體才可切割DNA。因此，目前可利用合成一對TALEN，以配對上任何所期望結合的DNA序列且特異性地用來切割其雙股DNA（Cermak et al., 2011）。

【0055】 在一實施例中，使用者可根據其目標基因設計重組TALEN蛋白域，使重組TALEN蛋白域中之重複可變區可辨識目標核酸序列。舉例而言，重組TALEN蛋白域可包含如SEQ ID NO: 21或SEQ ID NO: 22所示之序列，其中重複可變區以「NNNNNN」表示，亦即N可選自於A、T、C及G中任一個，以使所表現出的重複可變區為可辨認A之NI（Asn-Ile），可辨認C之HD（His-Asp），可辨認T之NG（Asn-Gly），或可辨認G或A之NN（Asn-Asn）。在一實施例中，設計一對細胞核基因轉殖載體，如圖1所示，pTpTalen-L和pTpTalen-R中所編碼的Talen-L與Talen-R為一對TALEN基因。在一實施例中，設計pTpTalen-L和pTpTalen-R中Talen-L與Talen-R的序列，使其轉譯後的蛋白質可辨識阿拉伯芥或菸草的葉綠體*rpoB*基因序列。

【0056】 設計TALEN欲作用於葉綠體基因之目標序列

【0057】 在本實施例中，以菸草葉綠體*rpoB*基因為例子，根據其序列設計Talen-L與Talen-R。*rpoB*基因位於葉綠體DNA的*rpoB-rpoC1-rpoC2*的操作基因組(Operon) (Little et al., 1988；Inada et al., 1996；Hajdukiewicz et al., 1997)。而根據先前研究顯示，若將*rpoB*基因自菸草的葉綠體DNA中剔除，雖仍有細胞核編碼的RNA合成酶維持部分葉綠體的功能，不會造成植株死亡，但會促使菸草形成白色的外表性狀，且生長發育也比正常的菸草植株來得緩慢（Allison et al.,

1996)。由於其較易於觀察，因此選擇 *rpoB* 基因作為 TALENs 進行葉綠體基因編輯的目標基因。

【0058】 首先，自NCBI資料庫下載阿拉伯芥與菸草的 *rpoB* 基因序列（Accession number 分別是 NC_000932.1 和 NC_001879.2）進行序列比對，擷取一段具有共同保留性較高的序列，並藉由TAL Effector Nucleotide Targeter 2.0 (<https://talent.cac.cornell.edu/node/add/talen>) 網頁設計 TALENs 的目標位。在一實施態樣中，選擇 Talen-L 與 Talen-R 所辨識的目標 DNA 序列分別為 5' - TCCAAAAATTGAA-3'（SEQ ID NO: 11）與 5' - TAATTGAAATTCA -3'（SEQ ID NO: 12）。

【0059】 構築細胞核重組TALEN基因的表現載體

【0060】 根據前述目標DNA序列，分別針對位於葉綠體*rpoB*基因的目標DNA序列SEQ ID NO: 11與SEQ ID NO: 12，使用 Golden Gate TALEN assembly kit (Cermak et al., 2011) 人工合成並構築合成出一對TALEN基因，使其所轉譯出的重複可變區的RVD 序列分別為N'-HD-HD-NI-NI-NI-NI-NI-NG-NG-NN-NI-NI-C' 與N'-NI-NI-NG-NG-NN-NI-NI-NI-NG-NG-HD-NI-C'，其可特異性辨識結合於上述目標DNA序列SEQ ID NO: 11與SEQ ID NO: 12。在一實施例中，依照 Golden Gate TALEN assembly kit的使用說明，構築前述RVD 序列時需分成前段與後段進行，將其分別命名為 pTALEN-L1、pTALEN-L2、pTALEN-R1 和 pTALEN-R2，且其 RVD 序列分別為N'-HD-HD-NI-NI-NI-NI-C'、N'-NI-NG-NG-NN-NI-C'、N'-NI-NI-NG-NG-NN-NI-C' 和 N'-NI-NI-NG-NG-HD-C'。

【0061】 接著，利用前述pTALEN-L1、pTALEN-L2、pTALEN-R1 和 pTALEN-R2構築重組TALEN基因的細胞核表現載體。簡言之，將合成出的

TALEN 基因片段重組於植物表現載體pImpactVector 4-1，基因表現卡匣最後的組成為*rbcS*的葉綠體訊息蛋白和HA 標籤或 Flag 標籤重組於TALEN的N端，並由*rbcS*基因啟動子來調控重組TALEN的表現。再將基因表現卡匣分別重組於農桿菌雙偶載體pBinPlus（含*nptII*基因做為篩選標誌）或pZGB9R（含*bar*基因做為篩選標誌），而分別得到 pTpTalen-R與pTpTalen-L的細胞核表現載體，如圖1所示。以下詳細說明實驗步驟：

【0062】 pTALEN-L1 和 pTALEN-R1 載體之構築：

【0063】 利用引子對 pFUSA-M6-R (AGCGGCGCCGGTCTCGATAGCC ; SEQ ID NO: 13) 和 pFUS-A-Del-F (AGCAAGCGGGTCTCACGGTGCAGCGGCTGTTG ; SEQ ID NO: 14) 以 pFUS-A 載體為模板進行 PCR 擴增放大，得到2,573 bp 的 DNA 片段。將 pFUS-A 之 PCR 放大片段 用限制酶 BsaI切割，再以1%的瓊膠電泳分離，並取2,560 bp DNA 片段進行純化。再利用引子對 pTC14-F3 (TCTGATGTTACATTGCACAAGA ; SEQ ID NO: 15) 和 pTC14-R3 (TGAACGCTCTCCTGAGTAGG ; SEQ ID NO: 16) 以 Module plasmid 載體 (pTALEN-L1 : pHD1、pHD2、pNI3、pNI4、pNI5、pNI6 ; pTALEN-R1 : pNI1、pNI2、pNG3、pNG4、pNN5、pNI6) 為模板各自進行 PCR 擴增放大並定量。將 Module plasmid 之 PCR 放大片段 混合後，用限制酶 BsaI 切割，再以2%的瓊膠電泳分離，並取79~100 bp DNA 片段進行純化。將 Module plasmid 的 PCR 產物經 BsaI 切割後之 DNA 片段與 pFUS-A 的 PCR 產物經 BsaI 切割後之 DNA 片段，進行黏合反應。經轉形大腸桿菌後，再經100mg/L Spectinomycin 篩選，分別得到3,087 bp 的 pTALEN-L1 和3,087 bp的 pTALEN-R1 載體。

【0064】 pTALEN-L2 和 pTALEN-R2 載體之構築：

【0065】 將 pFUS-B5 用限制酶 BsaI 切割，再以1%的瓊膠電泳分離，並取 2,557 bp DNA 片段進行純化。利用引子對 pTC14-F3 (TCTGATGTTACATTGCACAAGA ; SEQ ID NO: 15) 和 pTC14-R3 (TGAACGCTCTCCTGAGTAGG ; SEQ ID NO: 16) 以 Module plasmid 載體 (pTALENL2 : pNI1、pNG2、pNG3、pNN4、pNI5 ; pTALEN-R2 : pNI1、pNI2、pNG3、pNG4、pHD5) 為模板各自進行 PCR 擴增放大。將 Module plasmid 之 PCR 放大片段混合後，用限制酶BsaI切割，再以2%的瓊膠電泳分離，並取79~100 bpDNA 片段進行純化。將 Module plasmid 的 PCR 產物經 BsaI 切割後之DNA 片段與 pFUS-B5 經 BsaI 切割之片段，進行黏合反應。經轉形大腸桿菌後再經100 mg/L Spectinomycin 篩選，分別得到3,007 bp 的 pTALEN-L2 和3,007 bp 的 pTALEN-R2載體。

【0066】 pTALEN-L 載體之構築：

【0067】 將 pCS2TAL3-DD、pTALEN-L1 與 pTALEN-L2 載體用限制酶 Esp3I 切割，再以1%的瓊膠電泳分離，並分別取5,309 bp、616 bp 和536 bp DNA 片段進行純化。再將 pLR-NI 載體用限制酶Esp3I 切割，以2%的瓊膠電泳分離，並取89 bp DNA 片段進行純化。將 pCS2TAL3-DD、TALEN-L1、TALEN-L2 和 pLR-NI 經Esp3I 切割之片段進行黏合反應。經轉形大腸桿菌後，再經100 mg/L Ampicillin 篩選，得到6,550 bp 的 pTALEN-L載體。

【0068】 pTALEN-R 載體之構築：

【0069】 將 pCS2TAL3-RR、pTALEN-R1 與 pTALEN-R2 載體用限制酶 Esp3I 切割，再以1%的瓊膠電泳分離，並分別取5,339 bp、616 bp 和536 bp DNA

片段進行純化。再將 pLR-NI 載體用限制酶Esp3I 切割，以2%的瓊膠電泳分離，並取89 bp DNA 片段進行純化。將 pCS2TAL3-DD、TALEN-L1、TALEN-L2 和 pLR-NI 經Esp3I 切割之片段進行黏合反應。經轉形大腸桿菌後，再經100 mg/L Ampicillin 篩選，得到6,580 bp 的 pTALEN-R載體。

【0070】 構築植物組織特異性表現載體：

利用來自菊花 (*Chrysanthemum* spp.) 的 *rbcS* (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit) 基因啟動子 (Outchkourov et al., 2003) 來調控基因表現，其可在行光合作用的組織中啟動下游基因的表現。因此構築含有 *rbcS* 啟動子之載體，包含 pTpTalen-L 和 pTpTalen-R 與構築此二載體過程中的其他過渡載體。

【0071】 pIV4-TL 載體之構築：

【0072】 利 用 引 子 對 TAL-BamHI-F
(CATGGCTCCAAAGAAGGATCCTAAGGTA ; SEQ ID NO: 17) 和 TAL-NsiI-R (GCACCCGTCAGTGCATTGC ; SEQ ID NO: 18) ，以 pTALEN-L 為模板進行 PCR 擴增放大，再利用限制酶 *NsiI* 與 *BamHI* 切割 PCR 片段，並以1%瓊膠電泳分離，取460 bp DNA 片段進行純化。同時，將 pTALEN-L 與 ImpactVector™1.4 分別利用限制酶 *NotI/NsiI* 與 *NotI/BamHI* 切割，並以1%瓊膠電泳分離，分別取 2,233 bp 與 4,906 bp DNA 片段進行純化。再將經限制酶切割後之 ImpactVector™1.4 (4,906 bp)、pTALEN-L (2,233 bp) 和 pTALEN-L 之 PCR 產物 (460 bp) 的DNA 片段進行黏合反應，經轉形大腸桿菌後，再經 100 mg/L Ampicillin 篩選，得到7,598 bp 的 pIV4-TL 載體。

【0073】 pIV4-TR 載體之構築：

【0074】 利 用 引 子 對 TAL-BamHI-F

(CATGGCTCCAAAGAAGGATCCTAAGGTA ; SEQ ID NO: 17) 和 TAL-NsiI-R (GCACCCGTCAGTGCATTGC ; SEQ ID NO: 18) , 以 pTALEN-R 為模板進行 PCR 擴增放大, 再利用限制酶 *NsiI* 與 *BamHI* 切割 PCR 擴增片段, 並以1%瓊膠電泳分離, 取 490 bp DNA 片段進行純化。同時, 將 pTALEN-R 與 ImpactVector™1.4 分別利用限制酶 *NotI/NsiI* 與 *NotI/BamHI* 切割, 並以1%瓊膠電泳分離, 分別取 2,233 bp 與 4,906 bp DNA 片段進行純化。再將經限制酶切割後之 ImpactVector™1.4 (4,906 bp) 、 pTALEN-R (2,233 bp) 和 pTALEN-R 之 PCR 產物 (490 bp) DNA 片段進行黏合反應, 經轉形大腸桿菌後, 再經 100 mg/L Ampicillin 篩選, 得到 7,628 bp 的 pIV4-TR 載體。

【0075】 pZGB-IV4 載體之構築**【0076】 利 用 引 子 對 AscI-IV-F**

(TGGCGCGCCAGACAAACACCCCTTGTTATAC ; SEQ ID NO: 19) 與 H3-PacI-IV-R (CATAAGCTTTTAATTAATGCGTCCACTATAGAC ; SEQ ID NO: 20) 以 ImpactVector™1.4 為模板進行 PCR 擴增放大, 再利用限制酶 *HindIII* 和 *AscI* 切割 PCR 擴增片段, 並以1%瓊膠電泳分離, 取 2,293 bp DNA 片段進行純化。同時, 將 pZGB9R 利用限制酶 *HindIII* 和 *AscI* 切割, 並以1%瓊膠電泳分離, 取 8,479 bp DNA 片段進行純化。再將經限制酶切割後之 pZGB9R (8,479 bp) 和 ImpactVector™1.4 之 PCR 產物 (2,293 bp) DNA 片段進行黏合反應, 經轉形大腸桿菌後, 再經 100 mg/L Kanamycin 篩選, 得到 10,747 bp 的 pZGB-IV4 載體。

【0077】 pTpTalen-L 載體之構築 :

【0078】 將 pIV4-TL 與 pZGB-IV4 分別利用限制酶 *AscI* 與 *PacI* 切割，並以1%瓊膠電泳分離，分別取4,953 bp 與8,478 bp DNA 片段進行純化。再將經限制酶切割後之 pZGB-IV4 (8,478 bp) 和 pIV4-TL (4,953 bp) DNA片段進行黏合反應，經轉形大腸桿菌後，再經100 mg/L Kanamycin 篩選，得到13,435 bp 的 pTpTalen-L 載體。其中，pTpTalen-L 載體之重組TALEN蛋白域中的重複可變區序列係包括如SEQ ID NO: 3所示的核苷酸序列。

【0079】 pTpTalen-R 載體之構築：

【0080】 將 pIV4-TR 與 pBinPLUS 分別利用限制酶 *AscI* 與 *PacI* 切割，並以1%瓊膠電泳分離，分別取4,983 bp 與12,328 bp DNA 片段進行純化。再將經限制酶切割後之 pBinPLUS (12,328 bp) 和 pIV4-TR (4,983 bp) DNA 片段進行黏合反應，經轉形大腸桿菌後，再經100 mg/L Kanamycin 篩選，得到17,311 bp 的 pTpTalen-R 載體。其中，pTpTalen-R載體之重組TALEN蛋白域中的重複可變區序列係包括如SEQ ID NO: 4所示的核苷酸序列

【0081】 表現載體的轉殖

【0082】 轉殖表現載體至菸草：

【0083】 簡言之，分別將前述構築的細胞核重組TALEN表現載體，利用電穿孔法分別轉入農桿菌中，經適當抗生素 (kanamycin或hygromycin) 篩選後，分別得到含有不同載體的轉殖農桿菌。將轉入pTpTalen-L與轉入pTpTalen-R的農桿菌培養液依相同菌液濃度比例混合後，再放入菸草葉圓盤組織，進行共轉殖 (Chang et al., 2007)。

【0084】 詳言之，從凍菌管中抽取2 μ L農桿菌菌液 (GV3101) 加入含有10 ml LB (含100 mg/L Rifomycin 和100 mg/L Gentamycin) 的試管中，於28 °C下，

150 rpm 震盪培養1 天。從培養1 天的菌液中抽取200 μ L 加入含有4 mL LB (含100 mg/L Rifomycin 和100 mg/L Gentamycin) 的試管中，於28 °C 下，150 rpm 震盪培養4 小時。取1.5 mL 倒入微量離心管內，以轉速6,000 rpm，於4 °C 下，離心3 分鐘，移除上清液，並重複此步驟直到所有菌體沉澱於微量離心管內。加入200 μ L 在冰上預冷的無菌10%甘油，將沉澱後菌體回溶，再以轉速6,000 rpm，於4 °C 下，離心3 分鐘，將上清液倒於廢液瓶中，重複此步驟一次。加入100 μ L 在冰上預冷的無菌10%甘油，將菌體回溶，置於冰上5 分鐘。加入1.5 μ g 質體。電擊前先將電擊管置於冰上。再將菌液移至電擊管中，以2,500 伏特、100 歐姆加以電擊 (BTX ECM399 Electroporation Generator, USA)。將菌液移至新的微量離心管，並加入1 mL LB，於28 °C 下，150 rpm 震盪培養1 小時。將菌液以5,000 rpm 離心1 分鐘，移除約950 μ L 上清液，剩下的上清液與菌體混合，並移至 LB 固態培養基上均勻塗抹。置於室溫培養，約2~3 天即可在培養盤上觀察轉形的農桿菌菌落出現。

【0085】 轉殖菸草組織的篩選和植物的再生：

【0086】 簡言之，將共同轉殖二個表現載體的植物組織，依照表現載體上帶有的篩選標誌基因，結合兩種不同的藥物 (kanamycin、methionine sulfoximine (MSO)) 進行篩選。轉殖菸草組織經由再生過程分化成植株，由白花授粉得到轉殖菸草種子(T₁子代)。T₁子代可經白花授粉得到轉殖T₂子代，詳細的菸草核基因轉殖過程如下所述：

【0087】 以白金接種環沾取含重組質體的農桿菌單一菌落，在5 mL 含有抗生素 (含150 μ g/L Rifampicin 和150 μ g/L Kanamycin) 的 LB 中混勻，於28 °C，150 rpm 震盪培養18~24小時。隔天將菌液放大培養至50 mL含適當抗生素 (150 μ g/L Rifampicin 和150 μ g/L Kanamycin)、1 mL的500 mM MES及5 μ L 的0.2M

Acetosyringone的LB培養液中，震盪培養18~24小時。將培養完成之菌液以轉速1,700 xg，於室溫下，離心10分鐘，並移除上清液。加入5 mL的infiltration buffer (10 mM MES 1 mL、10 mM MgCl₂)，震盪均勻回溶菌體。測量菌液的OD₆₀₀，並調整菌液至OD₆₀₀為1。將菌液與0.2 M Acetosyringone solution (1000:1的比例)混勻，以150 rpm搖晃培養3~4小時。接著以無菌針頭輕刮菸草葉背微管束組織。以針筒吸取0.1~0.3 mL的菌液，持注射針筒將其出口處靠在葉背傷口處，另一手以指腹輕壓葉面。開始緩慢注射菌液進入菸草葉片內部，可見液體在葉片中擴散且充滿內部。注射完後標記注射區域。

【0088】 將經注射後的煙草植株放入紙箱中避光黑暗培養2天，再光照培養3天後，將葉片注射範圍內的組織切割下來，以1.2~2%漂白水，搖晃殺菌10分鐘，殺菌完成後。利用手術刀在葉片外圍切出傷口，將切成適當大小之葉片，葉背朝上，置於含適當抗生素之 Tobacco shooting medium (TSM) 培養基，以透氣膠帶封好後置於25°C植物生長箱，以日照時間16小時培養，待其生長出癒傷組織和莖葉後，進行發根培養，最後移至土壤中。

【0089】 分析轉殖植物

【0090】 a. PCR分子檢測：

【0091】 根據前述實施例，培養獲得許多菸草轉殖品系，選擇其中6個轉殖品系M0、M11、M14、M17、M29及M42進行PCR擴增放大，藉此檢測外源基因 (TpTalen-L與TpTalen-R) 是否同時插入菸草DNA中。

【0092】 在一實施態樣中，利用Plant genomic DNA mini kit (Geneaid, Taiwan) 萃取植物葉片組織DNA。首先，秤取0.1 g植物葉片組織，並以液態氮研磨成粉末。加入400 µL GP1 buffer 與5 µL RNase A 混合後移至1.5 mL 微量離

心管中，並以60 °C加熱10分鐘，並於此時預熱 Elution buffer (200 µL /sample) 備用。再加入100 µL GP2 buffer 混合均勻後，置於冰上3分鐘。將植物組織液移到 Filter column 中並以轉速1,000 xg 離心1分鐘。將濾液移至新的1.5 mL 微量離心管，再加入1.5 倍體積的 GP3 buffer，並震盪5秒。將700 µL 植物組織混合液移至 GD column 中並以轉速14,000 xg 離心2分鐘後，移除濾液，重複此步驟，直至把植物組織混合液離完。加入400 µL W1 buffer 至 GD column 中並以轉速14,000 xg 離心30秒後，移除濾液。加入600 µL Wash buffer 至 GD column 中並以轉速14,000 xg 離心30秒後，移除濾液。再以14,000 xg 離心3分鐘，取出管柱置於新的1.5 mL 微量離心管。於管柱膜上加入50~100 µL 之 Elution buffer，靜置5分鐘，以14,000 xg 離心30秒，使 DNA 溶液自管柱中濾出，並收集至1.5 ml 微量離心管中，置於-20 °C保存。

【0093】 接著，將對照組 (WT) 與轉殖菸草的DNA (150 ng) 以一對引子 Check-F (SEQ ID NO: 5; AATTCACCTCATTGGATTCATAGAAG) 與 Check-R (SEQ ID NO: 6; CTGTAGCCGAGCGTGCGTAG) 進行PCR，以確認外源基因 (TpTalen-L與TpTalen-R) 是否同時插入菸草DNA中。PCR 的反應溫度與時間的三階段條件為，第一階段以95 °C反應2分鐘。第二階段分成三部分，先以95 °C反應30秒進行 Denaturation，再以61 °C反應30秒進行 Annealing，再以72 °C反應反應45秒進行 Elongation。而此階段約重複45次。第三階段則以72 °C反應5分鐘。再使用2.2%的瓊膠，以100 伏特40分鐘進行電泳分離。

【0094】 電泳結果如圖2 B部分所顯示，在這6個不同轉殖品系的電泳結果中都可以同時偵測到452 bp及482bp的PCR產物，即Talen-L和Talen-R基因皆同時

表現於6個轉殖品系中，而WT中則無偵測到Talen-L和Talen-R基因。這就表示已成功轉殖Talen-L和Talen-R基因至菸草中。

【0095】 b. 觀察轉殖植物之外表性狀：

【0096】 觀察不同轉殖植物品系與對照組間之外表性狀與生長發育情況之差異。結果如圖3顯示，轉殖植物的外表性狀和生長發育呈現多樣性。部分品系轉殖植物無任何外表性狀，部分品系轉殖植物的葉片呈現斑點狀白化或局部區域白化（如M29），或整個葉片白(黃)化（如M11、M17），而有些轉殖植物為全株白化(淡黃色)的植株（如M0）。此外，轉殖植物之生長發育也有不同程度的遲緩。如先前研究報導，當菸草葉綠體*rpoB*基因發生變異，會導致植物產生白化的外表性狀 (Allison et al., 1996)。因此，推測轉殖植物白化程度的差異可能與重組TALEN蛋白表現在轉殖植物葉片的量有關，而造成葉綠體*rpoB*基因受到不同程度的破壞而導致葉片產生這些不同程度的外表性狀。

【0097】 c. 高解析度解離分析葉綠體*rpoB*基因的突變：

【0098】 為研究造成植物白化性狀的產生是否與葉綠體*rpoB*基因的變異有關。因此選擇2個不同轉殖品系（M11和M17）的白化葉片組織，萃取DNA後，利用一對引子（SEQ ID NO: 7；GGATTTAATCAGATACAATTTGAAG）和（SEQ ID NO: 8；TTCAAATTAATCCCGCGGATAC）進行定量PCR(Q-PCR, Fast Evagreen[®] qPCR Master Mixer, Biotium)，以擴增放大重組TELEN蛋白作用於*rpoB*基因的附近DNA序列（預期PCR產物大小為229 bp），並將PCR產物進行高解析度解離分析（high resolution melting; HRM）分析後，與對照組（正常菸草）比較，觀察DNA序列是否有所變異。

【0099】 詳言之，將含有反應總體積為20 μ L的2X Fast Evagreen[®] qPCR Master Mixer (Biotium)、2.5 mM MgCl₂、0.2 μ M前述引子及20 ng 轉殖菸草DNA的混合物進行Q-PCR，預期產物為229 bp。Q-PCR及HRM皆是利用Roche Light Cycler[®] Nano 進行操作。首先，利用95 °C進行180秒的處理，接著進行兩階段的循環步驟，每次循環進行95 °C的denature 10秒及60 °C的annealing/extension 50秒，進行45次循環後，接著以95 °C進行60秒使雙股DNA完全解開，接著以40 °C進行60秒處理，使其形成異合子 (heterozygous) 的結構出現，最後以每秒0.05由65 °C逐漸升溫至95 °C進行HRM分析。

【0100】 結果如圖4顯示，轉殖植物的白色葉片組織 (M11-W和M17-W) 與對照組相比，有明顯的熔解曲線之差異，這就表示在這 2個轉殖品系的*rpoB*基因有發生核苷酸之變異。

【0101】 d. 葉綠體*rpoB*基因的定序分析：

【0102】 為研究重組TALEN蛋白在轉殖植物的表現是否最後造成葉綠體*rpoB*序列的突變，因此萃取對照組 (WT) 和4個不同轉殖品系 (M0, M11, M17和M29) 的葉片組織，其中M11和M17品系植物的DNA又分別萃取自白色 (M11-W和M17-W) 和綠色 (M11-G和M17-G) 的葉片組織。以一對引子 (SEQ ID NO: 9 ; AGCAGAAGTCTGTTTCTAGGGATGT) 和 (SEQ ID NO: 10 ; TAGCTGATGATAGAACTAGAATA) 利用PCR去擴增放大重組TALEN蛋白作用於*rpoB*基因的附近序列，並將PCR產物進行定序，將定序結果利用CLC Genomics Workbench 9.5.2 軟體進行多重序列比對。

【0103】 結果如圖5顯示，在轉殖品系M0，M11，M17和M29的白色或黃化葉片組織 (M0, M11-W, M17-W, M29) 的*rpoB*-295位置明顯有發生A突變至T

的情形，如箭頭所指處。但是在M11和M17的綠色葉片組織（M11-G，M17-G）的*rpoB*基因序列則與對照組相同。這就表示，透過pTpTalen-L及pTpTalen-R對菸草進行轉殖，可針對特定葉綠體基因進行突變，例如葉綠體*rpoB*基因的突變，進而導致植物外表性狀的改變。

【0104】 以上所述僅為示例性，而非為限制性。本發明所屬發明技術領域中具有通常知識者能依需求及所針對的核苷酸序列，設計重組TALEN蛋白域中之重複可變區，使重組TALEN蛋白可專一辨識目標核酸序列。任何未脫離本發明的精神與範疇，而對其進行的等效修改或變更，均應包含於申請專利範圍所界定的範圍中。

【0105】 參考文獻：

Allison, L. A., Simon, L. D. and Maliga, P. Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. *The European Molecular Biology Organization Journal* 15, 2802-2809, 1996 .

Bock, R. Engineering plastid genomes: methods, tools, and applications in basic research and biotechnology. *Annual Review of Plant Biology*, 66, 211-241, 2015.

Cermak, T., Doyle, E. L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., Baller, J. A., Somia, N. V., Bogdanove, A. J. and Voytas, D. F. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Research* 39, e28, 2011.

Chang, C. C., Huang, P. S., Lin, H. R., & Lu, C. H.. Transactivation of protein expression by rice HSP101 in planta and using Hsp101 as a selection marker for transformation. *Plant and cell physiology*, 48(8), 1098-1107, 2007

- Hajdukiewicz, P. T., Allison, L. A. and Maliga, P. The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *The European Molecular Biology Organization Journal* 16, 4041-4048, 1997.
- Inada, H., Kusumi, K., Nishimura, M. and Iba, K. Specific expression of the chloroplast gene for RNA polymerase (*rpoB*) at an early stage of leaf development in rice. *Plant and Cell Physiology* 37, 229-232, 1996.
- Little, M. C. and Hallick, R. B. Chloroplast *rpoA*, *rpoB*, and *rpoC* genes specify at least three components of a chloroplast DNA-dependent RNA polymerase active in tRNA and mRNA transcription. *The Journal of Biological Chemistry* 263, 14302-14307, 1988.
- Outchkourov, N. S., Peters, J., de Jong, J., Rademakers, W. and Jongsma, M. A. The promoter-terminator of chrysanthemum *rbcS1* directs very high expression levels in plants. *Planta* 6, 1003-1012, 2003.

【符號說明】

【0106】 無

序列表

- <110> 國立成功大學
- <120> 特異性造成植物葉綠體基因變異的轉殖載體、套組、方法及利用其產生之轉殖植物細胞與農桿菌
- <130> 18P0215(18Q0123)
- <160> 22
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 13435
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> pTpTalen-L載體序列
- <220>
<221> misc_feature
<222> (1834)..(1839)
<223> n i s a, c, g, o r t
- <220>
<221> misc_feature
<222> (1936)..(1941)
<223> n i s a, c, g, o r t
- <220>
<221> misc_feature
<222> (2038)..(2043)
<223> n i s a, c, g, o r t
- <220>
<221> misc_feature
<222> (2140)..(2145)
<223> n i s a, c, g, o r t
- <220>
<221> misc_feature
<222> (2242)..(2247)
<223> n i s a, c, g, o r t
- <220>
<221> misc_feature
<222> (2344)..(2349)
<223> n i s a, c, g, o r t
- <220>
<221> misc_feature
<222> (2446)..(2451)
<223> n i s a, c, g, o r t
- <220>
<221> misc_feature
<222> (2548)..(2553)

<223> n i s a, c, g, o r t

<220>

<221> misc_feature

<222> (2650)..(2655)

<223> n i s a, c, g, o r t

<220>

<221> misc_feature

<222> (2752)..(2757)

<223> n i s a, c, g, o r t

<220>

<221> misc_feature

<222> (2854)..(2859)

<223> n i s a, c, g, o r t

<220>

<221> misc_feature

<222> (2956)..(2961)

<223> n i s a, c, g, o r t

<400> 1

taggcgcgcc aagcttagac aaacaccct tgttatacaa agaatttcgc tttacaaaat	60
caaattcgag aaaataatat atgcactaaa taagatcatt cggatctaata ctaaccaatt	120
acgatacgtc ttgggtacac ttgatttttg tttcagtggt tacatatatc ttgttttata	180
tgctatcttt aaggatctgc acaaagatta tttgttgatg ttcttgatgg ggctcagaag	240
atttgatatg atacactcta atcttttagga gataccagcc aggattatat tcagtaagac	300
aatcaaattt tacgtgttca aactcgttat cttttcattc aaaggatgag ccagaatctt	360
tatagaatga ttgcaatcga gaatatgttc ggccgatatg cctttgttgg cttcaatatt	420
ctacatatca cacaagaatc gaccgtattg taccctcttt ccataaagga aaacacaata	480
tgcagatgct tttttccac atgcagtaac atataggtat tcaaaaatgg ctaaaagaag	540
ttggataaca aattgacaac tatttccatt tctgttatat aaatttcaca acacacaaaa	600
gcccgtaatc aagagtctgc ccatgtacga aataacttct attatttggc attgggccta	660
agcccagctc agagtacgtg ggggtaccac atataggaag gtaacaaaat actgcaagat	720
agccccataa cgtaccagcc tctccttacc acgaagagat aagatataag acccaccctg	780
ccacgtgtca catcgtcatg gtgggttaatg ataaggatt acatccttct atgtttgttg	840
acatgatgca tgtaatgtca tgagccacaa gatccaatgg ccacaggaac gtaagaatgt	900
agatagattt gatthttgtcc gttagatagc aaacaacatt ataaaaggtg tgtatcaata	960
ggaactaatt cactcattgg attcatagaa gtccattcct cctaagtatc taaaatggcc	1020
tcgatctctt cctccgctgt cgcaaccgtc aacaggacca cctctgctca agctagcatg	1080

gtggctccat tcaccgggct taagtccaac gtcgctttcc cagtcaccaa gaagtctaac 1140
gacttctcat cctcctccag caacgggtgga agagtgcaat gcatgaagg acaatatata 1200
acttaaataa taacgtgaac acttattata atgcagtaga tataatgact aacattttat 1260
aaaatatata tatagggtgtg gccaccattg ggtttgaaga agtccatgga tcctaaggta 1320
gactacaaag accatgacgg tgattataaa gatcatgaca tcgattacaa ggatgacgat 1380
gacaagggtg cegtggatct acgcacgctc ggctacagtc agcagcagca agagaagatc 1440
aaaccgaagg tgcgttcgac agtggcgag caccacgagg cactgggtggg ccatgggttt 1500
acacacgcgc acatcgttgc gctcagccaa cacccggcag cgtagggac cgtcgtctgc 1560
acgtatcagc acataatcac ggcttgcca gaggcgacac acgaagacat cgtaggcgtc 1620
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgccctg gaggccttgc tcacggatgc gggggagttg 1680
agaggtccgc cgttacagtt ggacacaggc caacttgtga agattgcaaa acgtggcggc 1740
gtgaccgcaa tggaggcagt gcatgcatcg cgcaatgcac tgacgggtgc cccctgaac 1800
ctgaccccg accaagtggg ggctatcgcc agcnnnnng gcggcaagca agcgtcgaa 1860
acggtgcagc ggctgttgc ggtgctgtgc caggaccatg gcctgactcc ggaccaagtg 1920
gtggctatcg ccagcnnnn nggcggcaag caagcgtcg aaacggtgca gcggctgttg 1980
ccggtgctgt gccaggacca tggcctgacc ccggaccaag tgggtggctat cgccagcnn 2040
nnngcggca agcaagcgt cgaaacggtg cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggac 2100
catggcctga ccccgacca agtgggtggct atcgccagcn nnnnngcgg caagcaagcg 2160
ctcgaaacgg tgcagcggct gttgccggtg ctgtgccagg accatggcct gaccccgac 2220
caagtgggtg ctatcgccag cnnnnnggc ggcaagcaag cgctcgaaac ggtgcagcgg 2280
ctgttgccgg tgctgtgcca ggaccatggc ctgaccccg accaagtggg ggctatcgcc 2340
agcnnnnng gcggcaagca agcgtcgaa acggtgcagc ggctgttgc ggtgctgtgc 2400
caggaccatg gcctgacccc ggaccaagtg gtggctatcg ccagcnnnn nggcggcaag 2460
caagcgtcg aaacggtgca gcggctgttg ccggtgctgt gccaggacca tggcctgacc 2520
ccggaccaag tgggtggctat cgccagcnn nnggcggca agcaagcgt cgaaacggtg 2580
cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggac catggcctga ccccgacca agtgggtggct 2640
atcgccagcn nnnnngcgg caagcaagcg ctcgaaacgg tgcagcggct gttgccggtg 2700
ctgtgccagg accatggcct gaccccgac caagtgggtg ctatcgccag cnnnnnggc 2760
ggcaagcaag cgctcgaaac ggtgcagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggaccatggc 2820
ctgaccccg accaagtggg ggctatcgcc agcnnnnng gcggcaagca agcgtcgaa 2880

acggtgcagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggaccatg	gcctgacccc	ggaccaagtg	2940
gtggctatcg	ccagcnnnnn	nggcggcaag	caagcgcctc	aaagcattgt	ggcccagctg	3000
agccggcctg	atccggcgtt	ggccgcgttg	accaacgacc	acctcgtcgc	cttggcctgc	3060
ctcggcggac	gtcctgccat	ggatgcagtg	aaaaagggat	tgccgcacgc	gccggaattg	3120
atcagaagag	tcaatcgccg	tattggcgaa	cgcacgtccc	atcgcgttgc	cggatcccaa	3180
ctagtcaaaa	gtgaactgga	ggagaagaaa	tctgaacttc	gtcataaatt	gaaatatgtg	3240
cctcatgaat	atattgaatt	aattgaaatt	gccagaaatt	ccactcagga	tagaattctt	3300
gaaatgaagg	taatggaatt	ttttatgaaa	gtttatggat	atagaggtaa	acatttgggt	3360
ggatcaagga	aaccggacgg	agcaatttat	actgtcggat	ctcctattga	ttacgggtgtg	3420
atcgtggata	ctaaagctta	tagcggaggt	tataatctgc	caattggcca	agcagatgaa	3480
atgcaagact	atgtcgaaga	aaatcaaaca	cgaaacaaac	atatcaacc	taatgaatgg	3540
tggaaagtct	atccatcttc	tgtaacggaa	tttaagtttt	tatttgtgag	tggtcacttt	3600
aaaggaaact	acaaagctca	gcttacacga	ttaaatcata	tcactaattg	taatggagct	3660
gttcttagtg	tagaagagct	tttaattggt	ggagaaatga	ttaaagccgg	cacattaacc	3720
ttagaggaag	tgcgccggaa	atttaataac	ggcgagataa	acttttaatc	tagaactata	3780
gtgagtcgta	ttacgtagat	ccagacatga	taagatacat	tgatgagttt	ggacaaacca	3840
caactagaat	gcagtgaaaa	aaatgcttta	tttgtgaaat	ttgtgatgct	attgctttat	3900
ttgtaacat	tataagctgc	aataaacaag	ttaacaacaa	caattgcatt	cattttatgt	3960
ttcaggttca	gggggaggtg	tgggaggttt	tttaattcgc	ggccgcagat	ctccaataag	4020
agctctgac	tcataagccc	gatggctact	aagttttact	atttaccaag	acttttgaat	4080
attaaccttc	ttgtaacgag	tcggttaaat	ttgattgttt	agggttttgt	attatTTTTT	4140
tttggctctt	taattcatca	ctttaattcc	ctaattgtct	gttcatttcg	ttgtttgttt	4200
ccggatcgat	aatgaaatgt	aagagatata	atatataaat	aataaattgt	cgtttcataat	4260
ttgcaatctt	ttttttacaa	acctttaatc	gttgtatgta	tgacattttc	ttcttgttat	4320
attaggggga	aataatgtta	aataaaagta	caaaataaac	tacagtacat	cgtactgaat	4380
aaattaccta	gccaaaaagt	acacctttcc	atatacttcc	tacatgaagg	cattttcaac	4440
atTTTcaaat	aaggaatgct	acaaccgcat	aataacatcc	acaaatTTTT	ttataaaata	4500
acatgtcaga	cagtgattga	aagatTTTat	tatagTTTcg	ttatcttctt	ttctcattaa	4560
gcgaatcact	acctaacacg	tcattTTTgtg	aaatTTTTtt	tgaatTTTTt	tatatagTTg	4620

tagcattcct cttttcaaat tagggtttgt ttgagatagc atttcagccg gttcatacaa 4680
cttaaaagca tactctaattg ctggaaaaaa gactaaaaaa tcttgtaagt tagcgcagaa 4740
tattgacca aattatatac acacatgacc ccatatagag actaattaca cttttaacca 4800
ctaataatta ttactgtatt ataacatcta ctaattaaac ttgtgagttt ttgctagaat 4860
tattatcata tataactaaa ggcaggaacg caaacattgc cccggtactg tagcaactac 4920
ggtagacgca ttaattgtct atagtggacg cattaattaa aagcttggtg accagctcga 4980
atttccccga tcgttcaaac atttggcaat aaagtttctt aagattgaat cctgttgccg 5040
gtcttgcgat gattatcata taatttctgt tgaattacgt taagcatgta ataattaaca 5100
tgtaatgcat gacgttattt atgagatggg tttttatgat tagagtcccc caattataca 5160
tttaatacgc gatagaaaac aaaatatagc gcgcaaaacta ggataaatta tcgcgcgcgg 5220
tgtcatctat gttactagat cgggaattaa actatcagtg ttgacagga tatattggcg 5280
ggtaaaccta agagaaaaga gcgtttatta gaataacgga tatttaaaag ggcgtgaaaa 5340
ggtttatccg ttcgtccatt tgtatgtgca tgccaaccac agggttcccc tcgggatcaa 5400
agtactttga tccaaccctt ccgctgctat agtgcagtcg gcttctgacg ttcagtgcag 5460
ccgtcttctg aaaacgacat gtcgcacaag tcctaagtta cgcgacaggc tgccgccctg 5520
cccttttctt ggcgttttct tgtcgcgtgt tttagtcgca taaagtagaa tacttgcgac 5580
tagaaccgga gacattacgc catgaacaag agcgcgcccg ctggcctgct gggctatgcc 5640
cgcgtcagca ccgacgacca ggacttgacc aaccaacggg ccgaactgca cgcggccggc 5700
tgcaccaagc tgttttccga gaagatcacc ggcaccaggc gcgaccgccc ggagctggcc 5760
aggatgcttg accacctacg ccctggcgac gttgtgacag tgaccaggct agaccgcctg 5820
gcccgcagca cccgcgacct actggacatt gccgagcgca tccaggaggc cggcgcgggc 5880
ctgcgtagcc tggcagagcc gtgggcccgc accaccacgc cggcccggccg catggtgttg 5940
accgtgttcg ccggcattgc cgagttcgag cgttccctaa tcatcgaccg caccgggagc 6000
gggcgcgagg ccgccaaggc ccgaggcgtg aagtttggcc cccgccctac cctcaccctg 6060
gcacagatcg cgcacgcccc cgagctgatc gaccaggaag gccgcaccgt gaaagaggcg 6120
gctgcactgc ttggcgtgca tcgctcgacc ctgtaccgcg cacttgagcg cagcgaggaa 6180
gtgacgccc a ccgaggccag gcggcgcggt gccttccgtg aggacgcatt gaccgaggcc 6240
gacgccctgg cggcccgcga gaatgaacgc caagaggaac aagcatgaaa ccgcaccagg 6300
acggccagga cgaaccgttt ttcaattaccg aagagatcga ggcggagatg atcgcggccg 6360
ggtacgtgtt cgagcccgcc gcgcacgtct caaccgtgcg gctgcatgaa atcctggccc 6420

gtttgtctga tgccaagctg gcggcctggc cggccagctt ggccgctgaa gaaaccgagc 6480
gccgccgtct aaaaaggtga tgtgtatctg agtaaaacag cttgcgtcat gcggtcgtg 6540
cgtatatgat gcgatgagta aataaacaac tacgcaaggg gaacgcatga aggttatcgc 6600
tgtacttaac cagaaaggcg ggtcaggcaa gacgaccatc gcaaccatc tagcccgcgc 6660
cctgcaactc gccggggccg atgttctgtt agtcgattcc gatccccagg gcagtgcccg 6720
cgattggggc gccgtgcggg aagatcaacc gctaaccgtt gtcggcatcg accgcccagc 6780
gattgaccgc gacgtgaagg ccatcggccg gcgcgacttc gtagtgatcg acggagcgc 6840
ccaggcggcg gacttggctg tgtccgcgat caaggcagcc gacttcgtgc tgattccggt 6900
gcagccaagc ccttacgaca tatgggccac cgccgacctg gtggagctgg ttaagcagcg 6960
cattgaggtc acggatggaa ggctacaagc ggccctttgtc gtgtcgcggg cgatcaaagg 7020
cacgcgcatc ggcgggtgagg ttgccgaggc gctggccggg tacgagctgc ccattcttga 7080
gtcccgtatc acgcagcgcg tgagctacc caggcactgcc gccgccggca caaccgttct 7140
tgaatcagaa cccgagggcg acgctgcccg cgaggtccag gcgctggccg ctgaaattaa 7200
atcaaaactc atttgagtta atgaggtaaa gagaaaatga gcaaaagcac aaacacgcta 7260
agtgccggcc gtccgagcgc acgcagcagc aaggctgcaa cgttggccag cctggcagac 7320
acgccagcca tgaagcgggt caactttcag ttgccggcgg aggatcacac caagctgaag 7380
atgtacgcgg tacgccaagg caagaccatt accgagctgc tatctgaata catcgcgcag 7440
ctaccagagt aatgagcaa atgaataaat gagtagatga attttagcgg ctaaaggagg 7500
cggcatggaa aatcaagaac aaccaggcac cgacgccgtg gaatgcccc a tgtgtggagg 7560
aacgggcggt tggccaggcg taagcggctg ggttgtctgc cggccctgca atggcactgg 7620
aacccccag cccgaggaat cggcgtgacg gtcgcaaacc atccggcccc gtacaaatcg 7680
gcgcggcgct gggatgatgac ctggtggaga agttgaaggc cgcgcaggcc gccagcggc 7740
aacgcatcga ggcagaagca cgccccggtg aatcgtggca agcggccgct gatcgaatcc 7800
gcaaagaatc ccggcaaccg ccggcagccg gtgcgccgtc gattaggaag ccgccaagg 7860
gcgacgagca accagatctt ttcgttccga tgctctatga cgtgggcacc cgcgatagtc 7920
gcagcatcat ggacgtggcc gttttccgtc tgtcgaagcg tgaccgacga gctggcgagg 7980
tgatccgcta cgagcttcca gacgggcacg tagaggtttc cgcagggccg gccggcatgg 8040
ccagtgtgtg ggattacgac ctggtactga tggcggtttc ccatctaacc gaatccatga 8100
accgataccg ggaaggggaag ggagacaagc ccggccgcgt gttccgtcca cacgttgcgg 8160

acgtactcaa	gttctgccgg	cgagccgatg	gcggaaagca	gaaagacgac	ctggtagaaa	8220
cctgcattcg	gttaaaccacc	acgcacgttg	ccatgcagcg	tacgaagaag	gccaagaacg	8280
gccgcctggt	gacggtatcc	gagggtgaag	ccttgattag	ccgctacaag	atcgtaaaga	8340
gcgaaaccgg	gcggccggag	tacatcgaga	tcgagctagc	tgattggatg	taccgcgaga	8400
tcacagaagg	caagaacccg	gacgtgctga	cggttcaccc	cgattacttt	ttgatcgatc	8460
ccggcatcgg	ccgttttctc	taccgcctgg	cacgccgcgc	cgcaggcaag	gcagaagcca	8520
gatggttggt	caagacgatc	tacgaacgca	gtggcagcgc	cggagagttc	aagaagtctt	8580
gtttcacctg	gcgcaagctg	atcgggtcaa	atgacctgcc	ggagtacgat	ttgaaggagg	8640
aggcggggca	ggctggcccc	atcctagtca	tgcgctaccg	caacctgatc	gagggcgaag	8700
catccgccgg	ttcctaattg	acggagcaga	tgctagggca	aattgcccta	gcaggggaaa	8760
aaggtcgaaa	aggtctcttt	cctgtggata	gcacgtacat	tgggaacca	aagccgtaca	8820
ttgggaaccg	gaacccttac	attgggaacc	caaagccgta	cattgggaac	cggtcacaca	8880
tgtaagtgac	tgatataaaa	gagaaaaaag	gcgatttttc	cgcctaaaac	tctttaaaac	8940
ttattaaaac	tcttaaaacc	cgcctggcct	gtgcataact	gtctggccag	cgcacagccg	9000
aagagctgca	aaaagcgcct	acccttcggt	cgctgcgctc	cctacgcccc	gccgcttcgc	9060
gtcggcctat	cgcggccgct	ggccgctcaa	aaatggctgg	cctacggcca	ggcaatctac	9120
cagggcgcgg	acaagccgcg	ccgtcgccac	tcgaccgccc	gcgcccacat	caaggcaccc	9180
tgctcgcgc	gtttcggtga	tgacggtgaa	aacctctgac	acatgcagct	cccggagacg	9240
gtcacagctt	gtctgtaagc	ggatgccggg	agcagacaag	cccgtcaggg	cgcgtcagcg	9300
ggtgttggcg	ggtgtcgggg	cgcagccatg	accagtcac	gtagcgatag	cggagtgtat	9360
actggcttaa	ctatgcggca	tcagagcaga	ttgtactgag	agtgcaccat	atgcggtgtg	9420
aaataccgca	cagatgcgta	aggagaaaat	accgcatcag	gcgctcttcc	gcttcctcgc	9480
tactgactc	gctgcgctcg	gtcgttcggc	tgcggcgagc	ggtatcagct	cactcaaagg	9540
cggtaatacg	gttatccaca	gaatcagggg	ataacgcagg	aaagaacatg	tgagcaaaag	9600
gccagcaaaa	ggccaggaac	cgtaaaaagg	ccgcgttgct	ggcgtttttc	cataggctcc	9660
gccccctga	cgagcatcac	aaaaatcgac	gctcaagtca	gaggtggcga	aaccgcacag	9720
gactataaag	ataccaggcg	tttccccctg	gaagctccct	cgtgcgctct	cctgttccga	9780
ccctgccgct	taccggatac	ctgtccgcct	ttctcccttc	gggaagcgtg	gcgctttctc	9840
atagctcacg	ctgtaggtat	ctcagttcgg	tgtaggtcgt	tcgctccaag	ctgggctgtg	9900
tgcacgaacc	ccccgttcag	cccgaccgct	gcgccttata	cggtaaactat	cgtcttgagt	9960

ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca 10020
gagcgaggta tntagggcgt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca 10080
ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag 10140
ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt tttgtttgca 10200
agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg 10260
ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat tttggtcatt cattctaggt 10320
actaaaacaa ttcattccagt aaaatataat attttatttt ctcccaatca ggcttgatcc 10380
ccagtaagtc aaaaaatagc tcgacatact gttcttcccc gatatectcc ctgatcgacc 10440
ggacgcagaa ggcaatgtca taccacttgt ccgcccctgcc gcttctccca agatcaataa 10500
agccacttac tttgccaatc ttcacaaaga tgttgctgtc tcccaggctc ccgtgggaaa 10560
agacaagttc ctcttcgggc ttttccgtct ttaaaaaatc atacagctcg cgcggatctt 10620
taaatggagt gtcttcttcc cagttttcgc aatccacatc ggccagatcg ttattcagta 10680
agtaatccaa ttcggctaag cggctgtcta agctattcgt atagggacaa tccgatatgt 10740
cgatggagtg aaagagcctg atgcactccg catacagctc gataatcttt tcagggcttt 10800
gttcatcttc atactcttcc gagcaaagga cgccatcggc ctactcatg agcagattgc 10860
tccagccatc atgcccgttc aagtgcagga cctttggaac aggcagcttt ccttccagcc 10920
atagcatcat gtccttttcc cgttccacat cataggtggg ccctttatac cggctgtccg 10980
tcatttttaa atataggttt tcattttctc ccaccagctt atatacctta gcaggagaca 11040
ttccttccgt atcttttacg cagcgggtatt tttcgatcag ttttttcaat tccggtgata 11100
ttctcatttt agccatttat tatttccctc ctcttttcta cagtatttaa agatacceca 11160
agaagctaat tataacaaga cgaactccaa ttcactgttc cttgcattct aaaacctta 11220
ataccagaaa acagcttttt caaagtgtt ttcaaagttg gcgtataaca tagtatcgac 11280
ggagccgatt ttgaaaccgc ggtgatcaca ggcagcaacg ctctgtcctc gttacaatca 11340
acatgctacc ctccgcgaga tcatccgtgt ttcaaaccgc gcagcttagt tgccgttctt 11400
ccgaatagca tcggtaacat gagcaaagtc tgccgcctta caacggctct cccgctgacg 11460
ccgtcccgga ctgatgggct gcctgtatcg agtgggtgatt ttgtgccgag ctgccggctc 11520
gggagctgtt ggctggctgg tggcaggata tattgtgggt taaacaaatt gacgcttaga 11580
caacttaata acacattgcg gacgttttta atgtactgaa ttaacgccga attaattcgg 11640
gggatctgga ttttagtact ggattttggg ttttaggaatt agaaatttta ttgatagaag 11700

tattttacaa	atacaaatac	atactaaggg	tttcttata	gctcaacaca	tgagcgaaac	11760
cctataggaa	ccctaattcc	cttatctggg	aactactcac	acattattat	ggagaaactc	11820
gagtcaaatc	tcggtgacgg	gcaggaccgg	acggggcggt	accggcaggc	tgaagtccag	11880
ctgccagaaa	cccacgtcat	gccagttccc	gtgcttgaag	ccggccgccc	gcagcatgcc	11940
gcggggggca	tatccgagcg	cctcgtgcat	gcgcacgctc	gggtcgttgg	gcagccccgat	12000
gacagcgacc	acgctcttga	agccctgtgc	ctccagggac	ttcagcaggt	gggtgtagag	12060
cgtggagccc	agtcccgtcc	gctgggtggcg	gggggagacg	tacacggtcg	actcggccgt	12120
ccagtcgtag	gcgttgcgtg	ccttccaggg	gcccgcgtag	gcgatgccgg	cgacctcgcc	12180
gtccacctcg	gcgacgagcc	agggatagcg	ctcccgcaga	cggacgaggt	cgtccgtcca	12240
ctcctgcggt	tcctgcggct	cggtacggaa	gttgaccgtg	cttgtctcga	tgtagtggtt	12300
gacgatgggtg	cagaccgccc	gcatgtccgc	ctcgggtggca	cggcggatgt	cggccggggcg	12360
tcgttctggg	ctcatggtag	actcgagaga	gatagatttg	tagagagaga	ctggtgattt	12420
cagcgtgtcc	tctccaaatg	aaatgaactt	ccttatatag	aggaaggtct	tgcgaaggat	12480
agtgggattg	tgcgtcatcc	cttacgtcag	tggagatatac	acatcaatcc	acttgctttg	12540
aagacgtggt	tggaacgtct	tctttttcca	cgatgctcct	cgtgggtggg	ggtccatctt	12600
tgggaccact	gtcggcagag	gcatcttgaa	cgatagcctt	tcctttatcg	caatgatggc	12660
at ttgtaggt	gccaccttcc	ttttctactg	tccttttgat	gaagtgacag	atagctgggc	12720
aatggaatcc	gaggaggttt	cccgatatta	ccctttgttg	aaaagtctca	atagcccctt	12780
ggtcttctga	gactgtatct	ttgatattct	tggagtagac	gagagtgtcg	tgctccacca	12840
tgttcacatc	aatccacttg	ctttgaagac	gtggttggaa	cgtcttcttt	ttccacgatg	12900
ctcctcgtgg	gtgggggtcc	atctttggga	ccactgtcgg	cagaggcatc	ttgaacgata	12960
gcctttcctt	tatcgcaatg	atggcatttg	taggtgccac	cttccttttc	tactgtcctt	13020
ttgatgaagt	gacagatagc	tgggcaatgg	aatccgagga	ggtttcccga	tattaccctt	13080
tgttgaaaag	tctcaatagc	cctttggtct	tctgagactg	tatctttgat	attcttggag	13140
tagacgagag	tgtcgtgctc	caccatgttg	gcaagctgct	ctagccaata	cgcaaaccgc	13200
ctctccccgc	gcgttggccg	attcattaat	gcagctggca	cgacaggttt	cccgactgga	13260
aagcgggcag	tgagcgcaac	gcaattaatg	tgagttagct	cactcattag	gcaccccagg	13320
ctttacactt	tatgcttccg	gctcgtatgt	tgtgtggaat	tgtgagcgga	taacaatttc	13380
acacaggaaa	cagctatgac	atgattacga	attcgagctc	ggtaccggg	gatcc	13435

<210> 2
<211> 17311
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> pTpTalen-R載體序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (11387)..(11392)
<223> n i s a, c, g, o r t

<220>
<221> misc_feature
<222> (11489)..(11494)
<223> n i s a, c, g, o r t

<220>
<221> misc_feature
<222> (11591)..(11596)
<223> n i s a, c, g, o r t

<220>
<221> misc_feature
<222> (11693)..(11698)
<223> n i s a, c, g, o r t

<220>
<221> misc_feature
<222> (11795)..(11800)
<223> n i s a, c, g, o r t

<220>
<221> misc_feature
<222> (11897)..(11902)
<223> n i s a, c, g, o r t

<220>
<221> misc_feature
<222> (11999)..(12004)
<223> n i s a, c, g, o r t

<220>
<221> misc_feature
<222> (12101)..(12106)
<223> n i s a, c, g, o r t

<220>
<221> misc_feature
<222> (12203)..(12208)
<223> n i s a, c, g, o r t

<220>
<221> misc_feature
<222> (12305)..(12310)
<223> n i s a, c, g, o r t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12407)..(12412)
 <223> n i s a, c, g, o r t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12509)..(12514)
 <223> n i s a, c, g, o r t

<400> 2
 ccgggctggt tgcctcgcg gctgggctgg cggccgtcta tggccctgca aacgcgccag 60
 aaacgccgtc gaagccgtgt gcgagacacc gcggccgccg gcgttgtgga tacctcgcgg 120
 aaaacttggc cctcactgac agatgagggg cggacgttga cacttgaggg gccgactcac 180
 ccggcgcggc gttgacagat gaggggcagg ctcgatttcg gccggcgcagc tggagctggc 240
 cagcctcgcg aatcggcgaa aacgcctgat tttacgcgag tttcccacag atgatgtgga 300
 caagcctggg gataagtgcc ctgcggtatt gacacttgag gggcgcgact actgacagat 360
 gaggggcgcg atccttgaca cttgaggggc agagtgctga cagatgaggg gcgcacctat 420
 tgacatttga ggggctgtcc acaggcagaa aatccagcat ttgcaagggt ttccgcccgt 480
 ttttcggcca ccgctaacct gtcttttaac ctgcttttaa accaatattt ataaaccttg 540
 tttttaacca gggctgcgcc ctgtgcgcgt gaccgcgcac gccgaagggg ggtgcccccc 600
 cttctcgaac cctcccggcc cgctaacgcg ggccctcccat cccccaggg gctgcgcccc 660
 tcggccgcga acggcctcac cccaaaaatg gcagcgcctg cagtccttgc cattgccggg 720
 atcggggcag taacgggatg ggcgatcagc ccgagcgcga cgcccgggaag cattgacgtg 780
 ccgcaggtgc tggcatcgac attcagcgcg caggtgccgg gcagtgaggg cggcggcctg 840
 ggtggcggcc tgccttcac ttcggccgtc ggggcattca cggacttcat ggccggggccg 900
 gcaattttta ccttgggcat tcttggcata gtggtcgcgg gtgccgtgct cgtgttcggg 960
 ggtgcgataa acccagcgaa ccatttgagg tgataggtaa gattataacc aggtatgaaa 1020
 acgagaattg gacctttaca gaattactct atgaagcgc atatttataa agctaccaag 1080
 acgaagagga tgaagaggat gaggaggcag attgccttga atatatgac aatactgata 1140
 agataatata tcttttatat agaagatata gccgtatgta aggatttcag ggggcaaggc 1200
 ataggcagcg cgcttatcaa tatacttata gaatgggcaa agcataaaaa cttgcatgga 1260
 ctaatgcttg aaaccagga caataacctt atagcttgta aattctatca taattgggta 1320
 atgactcaa cttattgata gtgttttatg ttcagataat gcccgatgac tttgtcatgc 1380
 agctccaccg attttgagaa cgacagcgc ttcctccca gccgtgccag gtgctgcctc 1440

agattcaggt tatgccgctc aattcgctgc gtatatcgct tgctgattac gtgcagcttt 1500
cccttcaggc gggattcata cagcggccag ccatccgtca tccatatac cacgtcaaag 1560
ggtgacagca ggctcataag acgccccagc gtcgccatag tgcgttcacc gaatacgtgc 1620
gcaacaaccg tcttccggag actgtcatac gcgtaaaaca gccagcgtg gcgcgattta 1680
gccccgacat agccccactg ttcgtccatt tccgcgcaga cgatgacgtc actgccccggc 1740
tgtatgcgcg aggttactat gcggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac 1800
cgcatcaggc gctcttccgc ttctcgcctc actgactcgc tgcgctcggc cgttcggctg 1860
cggcgagcgg taticagctca ctcaaaggcg gtaatacggc tatccacaga atcaggggat 1920
aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaaggc cagcaaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc 1980
gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcaca aaatcgacgc 2040
tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga 2100
agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccgataacct gtcgccttt 2160
ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcggtg 2220
taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc 2280
gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccgcgtaa gacacgactt atcgccactg 2340
gcagcagggt accgactgcg gcctgagttt ttttaagtac gtaaaatcgt gttgaggcca 2400
acgcccataa tgcgggctgt tgcccggcat ccaacgccat tcatggccat atcaatgatt 2460
ttctgggtgcg taccgggttg agaagcggtg taagtgaact gcagttgcca tgttttacgg 2520
cagtgagagc agagatagcg ctgatgtccg gcggtgcttt tgccgttacg caccaccccg 2580
tcagtagctg aacaggaggg acagctgata gacacagaag ccaactggagc acctcaaaaa 2640
caccatcata cactaaatca gtaagttggc agcatcacc ataattgtgg tttcaaaatc 2700
ggctccgtcg atactatgtt atacgccaac tttgaaaaca actttgaaaa agctgttttc 2760
tggtatttaa ggttttagaa tgcaaggaac agtgaattgg agttcgtctt gttataatta 2820
gcttcttggg gtatctttaa atactgtaga aaagaggaag gaaataataa atggctaaaa 2880
tgagaatata accggaattg aaaaaactga tcgaaaaata ccgctgcgta aaagatacgg 2940
aaggaatgtc tccctgctaag gtatataagc tgggtgggaga aaatgaaaac ctatatttaa 3000
aaatgacgga cagccggtat aaagggacca cctatgatgt ggaacgggaa aaggacatga 3060
tgctatggct ggaaggaaag ctgcctgttc caaaggctct gcactttgaa cggcatgatg 3120
gctggagcaa tctgctcatg agtgaggccg atggcgtcct ttgctcggaa gagtatgaag 3180
atgaacaaag ccctgaaaag attatcgagc tgtatgcgga gtgcatcagg ctctttcact 3240

ccatcgacat atcggattgt ccctatacga atagcttaga cagccgctta gccgaattgg	3300
attacttact gaataacgat ctggccgatg tggattgcga aaactgggaa gaagacactc	3360
catttaaaga tccgcgcgag ctgtatgatt ttttaaagac ggaaaagccc gaagaggaac	3420
ttgtcttttc ccacggcgac ctgggagaca gcaacatctt tgtgaaagat ggcaaagtaa	3480
gtggctttat tgatcttggg agaagcggca gggcggacaa gtggatgac attgccttct	3540
gcgtccggtc gatcaggag gatatcgggg aagaacagta tgtcgagcta ttttttgact	3600
tactggggat caagcctgat tgggagaaaa taaaatatta tattttactg gatgaattgt	3660
tttagtacct agatgtggcg caacgatgcc ggcgacaagc aggagcgcac cgacttcttc	3720
cgcatacaagt gttttggctc tcaggccgag gccacggca agtatttggg caaggggtcg	3780
ctggtattcg tgcagggcaa gattcggaat accaagtacg agaaggacgg ccagacggtc	3840
tacgggaccg acttcattgc cgataaggtg gattatctgg acaccaaggc accaggcggg	3900
tcaaatcagg aataagggca cattgccccg gcgtgagtcg gggcaatccc gcaaggaggg	3960
tgaatgaatc ggacgtttga ccggaaggca tacaggcaag aactgatcga cgcggggttt	4020
tccgccgagg atgccgaaac catcgcaagc cgcaccgtca tgcgtgcgcc ccgcgaaacc	4080
ttccagtcg tcggctcgat ggtccagcaa gctacggcca agatcgagcg cgacagcgtg	4140
caactggctc cccctgccct gcccgcgcca tcggccgccc tggagcgttc gcgtcgtctc	4200
gaacaggagg cggcagggttt ggcgaaagtc atgaccatcg acacgcgagg aactatgacg	4260
accaagaagc gaaaaaccgc cggcgaggac ctggcaaaac aggtcagcga ggccaagcag	4320
gccgcgttgc tgaaacacac gaagcagcag atcaaggaaa tgcagctttc cttgttcgat	4380
attgcgccgt ggccggacac gatgcgagcg atgccaaacg acacggcccc ctctgccctg	4440
ttcaccacgc gcaacaagaa aatcccgcgc gaggcgctgc aaaacaaggt cattttccac	4500
gtcaacaagg acgtgaagat cacctacacc ggcgtcgagc tgcgggccga cgatgacgaa	4560
ctggtgtggc agcaggtgtt ggagtacgcg aagcgcaccc ctatcggcga gccgatcacc	4620
ttcacgttct acgagctttg ccaggacctg ggctggtcga tcaatggccg gtattacacg	4680
aaggccgagg aatgcctgtc gcgcctacag gcgacggcga tgggcttcac gtccgaccgc	4740
gttgggcacc tggaatcggt gtcgctgctg caccgcttcc gcgtcctgga ccgtggcaag	4800
aaaacgtccc gttgccaggt cctgatcgac gaggaaatcg tcgtgctgtt tgctggcgac	4860
cactacacga aattcatatg ggagaagtac cgcaagctgt cgccgacggc ccgacggatg	4920
ttcgactatt tcagctcgca ccgggagccc taccgcctca agctggaaac ctccgcctc	4980

atgtgcggat cggattccac ccgcgtgaag aagtggcgcg agcaggtcgg cgaagcctgc 5040
gaagagttgc gaggcagcgg cctggtggaa cacgcctggg tcaatgatga cctggtgcat 5100
tgcaaacgct agggccttgt ggggtcagtt ccggctgggg gttcagcagc cagcgcttta 5160
ctggcatttc aggaacaagc gggcactgct cgacgcactt gcttcgctca gtatcgctcg 5220
ggacgcacgg cgcgctctac gaactgccga taaacagagg attaaaattg acaattgtga 5280
ttaaggctca gattcgacgg cttggagcgg ccgacgtgca ggatttccgc gagatccgat 5340
tgtcggccct gaagaaagct ccagagatgt tcgggtccgt ttacgagcac gaggagaaaa 5400
agcccatgga ggcgttcgct gaacggttgc gagatgccgt ggcattcggc gcctacatcg 5460
acggcgagat cattgggctg tcggtcttca aacaggagga cggccccaag gacgctcaca 5520
aggcgcattc gtccggcgtt ttcgtggagc ccgaacagcg aggccgaggg gtcgccggta 5580
tgctgctgcg ggcgttgcg gcgggtttat tgctcgtgat gatcgtccga cagattccaa 5640
cgggaatctg gtggatgcgc atcttcatcc tcggcgcact taatatttcg ctattctgga 5700
gcttgttgtt tatttcggtc taccgcctgc cgggcgggggt cgcggcgacg gtaggcgctg 5760
tgcagccgct gatggtcgtg ttcactctctg ccgctctgct aggtagccccg atacgattga 5820
tggcggctct gggggctatt tgcggaactg cgggcgtggc gctgttggtg ttgacaccaa 5880
acgcagcgt agatcctgtc ggcgtcgcag cgggcctggc gggggcggtt tccatggcgt 5940
tcggaaccgt gctgaccgc aagtggcaac ctcccgtgcc tctgctcacc tttaccgct 6000
ggcaactggc ggccggagga cttctgctcg ttccagtagc tttagtgttt gatccgcaa 6060
tcccgatgcc tacaggaacc aatgttctcg gcctggcgtg gctcggcctg atcggagcgg 6120
gtttaaccta cttcctttgg ttccggggga tctcgcgact cgaacctaca gttgtttcct 6180
tactgggctt tctcagcccc agatctgggg tcgatcagcc ggggatgcat caggccgaca 6240
gtcggaactt cgggtccccg acctgtacca ttcggtgagc aatggatagg ggagttgata 6300
tcgtcaacgt tcaactctaa agaaatagcg ccaactcagct tccctcagcgg ctttatccag 6360
cgatttccta ttatgtcggc atagttctca agatcgacag cctgtcacgg ttaagcgaga 6420
aatgaataag aaggctgata attcggatct ctgcgagga gatgatattt gatcacaggc 6480
agcaacgctc tgtcatcgtt acaatcaaca tgctaccctc cgcgagatca tccgtgtttc 6540
aaaccggca gcttagttgc cgttcttccg aatagcatcg gtaacatgag caaagtctgc 6600
cgcttataa cggctctccc gctgacgccg tcccggactg atgggctgcc tgtatcgagt 6660
ggtgattht tgccgagctg ccggtcgggg agctgttggc tggctggtgg caggatata 6720
tgtggtgtaa acaaattgac gcttagacaa ctttaataaca cattgcggac gtttttaatg 6780

tactggggtg gtttttcttt tcaccagtga gacgggcaac agctgattgc ccttcaccgc 6840
ctggccctga gagagttgca gcaagcggtc cacgctggtt tgccccagca ggcgaaaatc 6900
ctgtttgatg gtggttccga aatcggcaaa atcccttata aatcaaaaga atagccccgag 6960
atagggttga gtgttgttcc agtttggaac aagagtccac tattaaagaa cgtggactcc 7020
aacgtcaaag ggcgaaaaac cgtctatcag ggcgatggcc cacaaactga aggcgggaaa 7080
cgacaatctg atcatgagcg gagaattaag ggagtcacgt tatgaccccc gccgatgacg 7140
cgggacaagc cgttttacgt ttggaactga cagaaccgca acgttgaagg agccactcag 7200
ccgcggggtt ctggagtta atgagctaag cacatacgtc agaaaccatt attgcgcggt 7260
caaaagtcgc ctaaggtcac taticagctag caaatatttc ttgtcaaaaa tgctccactg 7320
acgttccata aattcccctc ggtatccaat tagagtctca tattcactct caatccaaat 7380
aatctgcacc ggatctggat cgtttcgcac gattgaacaa gatggattgc acgcaggttc 7440
tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga caatcggctg 7500
ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcagggggcgc ccggttcttt ttgtcaagac 7560
cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat cgtggctggc 7620
cacgacgggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgtc actgaagcgg gaagggactg 7680
gctgctattg ggcgaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg ctctgccga 7740
gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc cggctacctg 7800
cccatcgcac caccaagcga aacatcgcac cgagcagca cgtactcgga tggaagccgg 7860
tcttgtcgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctgcgccag ccgaactgtt 7920
cgccaggctc aaggegcgca tgcccagcgg cgatgatctc gtcgtgacc atggcgatgc 7980
ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg actgtggccg 8040
gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata ttgctgaaga 8100
gcttggcggc gaatgggctg accgcttctt cgtgctttac ggtatcgccg ctcccgattc 8160
gcagcgcac gccttctatc gccttcttga cgagttcttc tgagcgggac tctggggttc 8220
gaaatgaccg accaagcgac gcccaacctg ccatcacgag atttcgattc caccgccgcc 8280
ttctatgaaa ggttgggctt cggaatcggt ttccgggacg ccggctggat gatcctccag 8340
cgcggggatc tcatgctgga gttcttcgcc cacgggatct ctgcggaaca ggcggtcgaa 8400
ggtgccgata tcattacgac agcaacggcc gacaagcaca acgccacgat cctgagcgac 8460
aatatgatcg ggcccggcgt ccacatcaac ggcgtcggcg gcgactgccc aggcaagacc 8520

gagatgcacc gcgatatctt gctgcgttcg gatattttcg tggagtccc gccacagacc 8580
cggatgatcc ccgatcgttc aaacatttgg caataaagtt tcttaagatt gaatcctggt 8640
gccggtcttg cgatgattat catataattt ctgttgaatt acgttaagca tgtaataatt 8700
aacatgtaat gcatgacgtt atttatgaga tgggttttta tgattagagt cccgcaatta 8760
tacatttaat acgcgataga aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa attatcgcgc 8820
gcggtgtcat ctatgttact agatcgggcc tcctgtcaat gctggcggcg gctctggtgg 8880
tggttctggt ggcggctctg aggggtggtgg ctctgagggt ggcggttctg aggggtggcgg 8940
ctctgaggga ggcggttccg gtggtggctc tggttccggt gatthttgatt atgaaaagat 9000
ggcaaacgct aataaggggg ctatgaccga aaatgccgat gaaaacgcgc tacagtctga 9060
cgctaaaggc aaacttgatt ctgtcgctac tgattacggt gctgctatcg atggtttcat 9120
tggtgacgtt tccggccttg ctaatggtaa tgggtctact ggtgatthttg ctggctctaa 9180
ttcccaaatg gctcaagtcg gtgacggtga taattcacct ttaatgaata atttccgtca 9240
atatttacct tccctccctc aatcggttga atgtcgccct thttgtctttg gcccaatacg 9300
caaaccgct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcacg acaggthttcc 9360
cgactggaaa gcgggcagtg agcgcaacgc aattaatgtg agttagctca ctcattaggc 9420
accccaggct ttacacttta tgcttccggc tcgtatgttg tgtggaattg tgagcggata 9480
acaatttcac acaggaaaca gctatgacca tgattacgcc aagctggcgc gccaaagctta 9540
gacaaacacc ccttgttata caaagaattt cgctttacaa aatcaaattc gagaaaataa 9600
tatatgcaact aaataagatc attcggatct aatctaacca attacgatac gctttgggta 9660
cacttgatth ttgtthtcagt ggttacatat atctthgttht atatgctatc thttaaggatc 9720
tgcacaaaga thattthgttg atgttcttga tggggctcag aagatthgat atgatacact 9780
ctaathctth ggagatacca gccaggatta thttcagtaa gacaathcaa thtttacgtgt 9840
tcaaactcgt thctthttca thcaaaggat gagccagaat cthttatagaa tgattgcaat 9900
cgagaathatg thcggccgat atgcctthgt tggctthcaat atthctacata tcacacaaga 9960
atcgaccgta thgtaccctc thttcataaa ggaaaacaca athatgcagat gctththttcc 10020
cacatgcagt aacathatagg thttcaaaaa tggcthaaaag aagthtgata acaathtgac 10080
aactaththcc aththctgtta thataaththc acaacacaca aaagcccgta athcaagagtc 10140
tgcccatgta cgaaathact thctaththth ggtaththggc thaaagcccag thcagagthc 10200
gtgggggtac cacathatagg aagthtaaaa aathactgcaa gatagcccca thaacgthaca 10260
gcctctcctt accacgaaga gathagathat aagaccacc thgccacgtg thcacathctc 10320

atggtggtta atgataaggg attacatcct tctatgtttg tggacatgat gcatgtaatg 10380
tcatgagcca caagatccaa tggccacagg aacgtaagaa tgtagataga tttgattttg 10440
tccgttagat agcaaacaac attataaaag gtgtgtatca ataggaacta attcactcat 10500
tggattcata gaagtccatt cctcctaagt atctaaaatg gcctcgatct ctccctccgc 10560
tgtcgcaacc gtcaacagga ccacctctgc tcaagctagc atggtggctc cattcaccgg 10620
gcttaagtcc aacgtcgctt tcccagtcac caagaagtct aacgacttct catccctccc 10680
cagcaacggt ggaagagtgc aatgcatgaa ggtacaatat ataacttaaa taataacgtg 10740
aacacttatt ataatgcagt agatataatg actaacatit tataaaatat atatataggt 10800
gtggccacca ttgggtttga agaagtccat ggatcctaag gtatacccat acgatgttcc 10860
tgactatgcg ggctatccct atgacgtccc ggactatgca ggatcgtatc catatgacgt 10920
tccagattac gctgctcatg gtaccgtgga tctacgcacg ctcggctaca gtcagcagca 10980
gcaagagaag atcaaaccga aggtgcgttc gacagtggcg cagcaccacg aggcactggt 11040
gggcatggg ttacacacg cgcacatcgt tgcgctcagc caacacccgg cagcgtagg 11100
gaccgtcgct gtcacgtatc agcacataat cacggcgttg ccagaggcga cacacgaaga 11160
catcgttggc gtcggcaaac agtgggtccgg cgcacgcgcc ctggaggcct tgctcacgga 11220
tgcgggggag ttgagaggtc cgccgttaca gttggacaca ggccaacttg tgaagattgc 11280
aaaacgtggc ggcgtgaccg caatggaggc agtgcattgca tcgcgcaatg cactgacggg 11340
tgccccctg aacctgacc cggaccaagt ggtggctatc gccagcnnn nnggcggcaa 11400
gcaagcgctc gaaacggtgc agcggctggt gccggtgctg tgccaggacc atggcctgac 11460
cccggaccaa gtggtggcta tcgccagcnn nnnnggcggc aagcaagcgc tcgaaacggt 11520
gcagcggctg ttgccggtgc tgtgccagga ccatggcctg accccggacc aagtgggtggc 11580
tatgccagc nnnnnnggcg gcaagcaagc gctcgaaacg gtgcagcggc tgttgccggt 11640
gctgtgccag gaccatggcc tgaccccgga ccaagtgggt gctatcgcca gcnnnnnngg 11700
cggcaagcaa gcgctcgaaa cgggtgcagcg gctgttgccg gtgctgtgcc aggaccatgg 11760
cctgaccccg gaccaagtgg ttgctatcgc cagcnnnnn ggccggcaagc aagcgcctcga 11820
aacggtgcag cggctgttgc cgggtgctgtg ccaggacat ggccctgacc cggaccaagt 11880
ggtggctatc gccagcnnn nnggcggcaa gcaagcgctc gaaacggtgc agcggctggt 11940
gccggtgctg tgccaggacc atggcctgac cccggaccaa gtggtggcta tcgccagcnn 12000
nnnnggcggc aagcaagcgc tcgaaacggt gcagcggctg ttgccggtgc tgtgccagga 12060

ccatggcctg accccggacc aagtgggtggc tategccage nnnnnnggcg gcaagcaagc 12120
gctcgaaacg gtgcagcggc tgttgccggt gctgtgccag gaccatggcc tgaccccgga 12180
ccaagtgggtg gctatcgcca gcnnnnnngg cggcaagcaa gcgctcgaaa cgggtgcagcg 12240
gctgttgccg gtgctgtgcc aggacatgg cctgaccccg gaccaagtgg tggctatcgc 12300
cagcnnnnnn ggccggcaagc aagcgcctga aacgggtgcag cggctgttgc cgggtgctgtg 12360
ccaggacat ggccctgactc cggaccaagt ggtggctatc gccagcnnnn nnggcggcaa 12420
gcaagcgcctc gaaacgggtgc agcggctggt gccgggtgctg tgccaggacc atggcctgac 12480
cccggaccaa gtgggtggcta tcgccagcnn nnnnggcggc aagcaagcgc tcgaaagcat 12540
tgtggcccag ctgagccggc ctgatccggc gttggccgcg ttgaccaacg accacctcgt 12600
cgccttggcc tgccctcggcg gacgtcctgc catggatgca gtgaaaaagg gattgccgca 12660
cgcgccggaa ttgatcagaa gagtcaatcg ccgtattggc gaacgcacgt cccatcgcgt 12720
tgccggatcc caactagtca aaagtgaact ggaggagaag aaatctgaac ttcgtcataa 12780
attgaaatat gtgcctcatg aatatattga attaattgaa attgccagaa attccactca 12840
ggatagaatt ctgaaatga aggtaatgga attttttatg aaagtttatg gatatagagg 12900
taaacatttg ggtggatcaa ggaaaccgga cggagcaatt tatactgtcg gatctcctat 12960
tgattacggt gtgatcgtgg aactaaagc ttatagcggg ggttataatc tgccaattgg 13020
ccaagcacgt gaaatgcaac gatatgtcga agaaaatcaa acacgaaaca aacatatcaa 13080
ccctaatgaa tgggtgaaag tctatccatc ttctgtaacg gaatttaagt ttttatttgt 13140
gagtggtcac tttaaaggaa actacaaagc tcagcttaca cgattaaatc atatcactaa 13200
ttgtaatgga gctgttctta gtgtagaaga gcttttaatt ggtggagaaa tgattaaagc 13260
cggcacatta accttagagg aagtgcgccg gaaatttaat aacggcgaga taaactttta 13320
atctagaact atagtgagtc gtattacgta gatccagaca tgataagata cattgatgag 13380
tttgacaaa ccacaactag aatgcagtga aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat 13440
gctattgctt tatttgaac cattataagc tgcaataaac aagttaaca caacaattgc 13500
attcatttta tgtttcaggt tcagggggag gtgtgggagg ttttttaatt cgcggccgca 13560
gatctccaat aagagctctg atctcataag cccgatggct actaagtttt actatttacc 13620
aagacttttg aatattaacc ttcttgtaac gagtcggtta aatttgattg tttagggttt 13680
tgtattattt ttttttggtc ttttaattca tcactttaat tcctaattg tctgttcatt 13740
tcgttgtttg tttccggatc gataatgaaa tgtaagagat atcatatata aataataat 13800
tgtcgtttca tatttgcaat ctttttttta caaaccttta atcgttgtat gtatgacatt 13860

ttcttcttgt	tatattaggg	ggaaataatg	ttaaataaaa	gtacaaaata	aactacagta	13920
catcgtactg	aataaattac	ctagccaaaa	agtacacctt	tccatatact	tcctacatga	13980
aggcattttc	aacattttca	aataaggaat	gctacaaccg	cataataaca	tccacaaatt	14040
ttttataaaa	ataacatgtc	agacagtgat	tgaagatftt	tattatagtt	tcgttatcct	14100
cttttctcat	taagcgaatc	actacctaac	acgtcatttt	gtgaaatatt	ttttgaatgt	14160
ttttatatag	ttgtagcatt	cctcttttca	aattagggtt	tgtttgagat	agcatttcag	14220
ccggttcata	caacttaaaa	gcatactcta	atgctggaaa	aaagactaaa	aaatccttga	14280
agttagcgca	gaatattgac	ccaaattata	tacacacatg	accccatata	gagactaatt	14340
acacttttaa	ccactaataa	ttattactgt	attataacat	ctactaatta	aacttgtgag	14400
tttttgctag	aattattatc	atatatacta	aaaggcagga	acgcaaacat	tgccccggta	14460
ctgtagcaac	tacggtagac	gcattaattg	tctatagtgg	acgcattaat	taacaattca	14520
ctggccgctg	ttttacaacg	tcgtgactgg	gaaaaccctg	gcgttaccca	acttaatcgc	14580
cttgcagcac	atcccccttt	cgccagctgg	cgtaatagcg	aagaggcccc	caccgatcgc	14640
ccttcccaac	agttgcgcag	cctgaatggc	gcccgcctct	ttegcctttct	tcccttcctt	14700
tctcgccacg	ttcgccggct	ttccccgtca	agctctaaat	cgggggctcc	ctttagggtt	14760
ccgatttagt	gctttacggc	acctcgacce	caaaaaactt	gatttgggtg	atggttcaca	14820
aactatcagt	gtttgacagg	atataattggc	gggtaaacct	aagagaaaag	agcgtttatt	14880
agaataatcg	gatatttaaa	agggcgtgaa	aaggtttatac	cgttcgtcca	tttgtatgtg	14940
catgccaacc	acagggttcc	ccagatctgg	cgccggccag	cgagacgagc	aagattggcc	15000
gccgcccga	acgatccgac	agcgcgcccc	gcacaggtgc	gcaggcaaat	tgcaccaacg	15060
catacagcgc	cagcagaatg	ccatagtggg	cggtgacgtc	gttcgagtga	accagatcgc	15120
gcaggaggcc	cggcagcacc	ggcataatca	ggccgatgcc	gacagcgtcg	agcgcgacag	15180
tgctcagaat	tacgatcagg	ggtatgttgg	gtttcacgtc	tggcctccgg	accagcctcc	15240
gctgggtccga	ttgaacgcgc	ggattcttta	tactgataa	gttgggtggac	atattatggt	15300
tatcagtgat	aaagtgtcaa	gcatgacaaa	gttgcagccg	aatacagtga	tccgtgccgc	15360
cctggacctg	ttgaacgagg	tcggcgtaga	cggtctgacg	acacgcaaac	tggcggaacg	15420
gttggggggtt	cagcagccgg	cgctttactg	gcacttcagg	aacaagcggg	cgctgctcga	15480
cgcactggcc	gaagccatgc	tggcggagaa	tcatacgcac	tcggtgccga	gagccgacga	15540
cgactggcgc	tcatttctga	tcgggaatgc	ccgcagcttc	aggcaggcgc	tgctcgccta	15600

ccgcgatggc gcgcgcaccc atgccggcac gcgaccgggc gcaccgcaga tggaaacggc 15660
cgacgcgcag cttegcctcc tctgcgaggc gggtttttcg gccggggacg ccgtcaatgc 15720
gctgatgaca atcagctact tcaactgttg ggccgtgctt gaggagcagg ccggcgacag 15780
cgatgccggc gagcgcggcg gcaccgttga acaggctccg ctctcgccgc tgttgccggc 15840
cgcgatagac gccttcgacg aagccggctc ggacgcagcg ttcgagcagg gactcgcggt 15900
gattgtcgat ggattggcga aaaggaggct cgttgtcagg aacgttgaag gaccgagaaa 15960
gggtgacgat tgatcaggac cgctgccgga gcgcaacca ctactacag cagagccatg 16020
tagacaacat cccctcccc tttccaccgc gtcagacgcc cgtagcagcc cgctacgggc 16080
tttttcgatgc cctgccctag cgtccaagcc tcacggccgc gctcggcctc tctggcggcc 16140
ttctggcgct ctccgcttc ctgcctcact gactcgtgc gctcggctgt tcggctgcgg 16200
cgagcggtat cagctcctc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac 16260
gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg 16320
ttgctggcgt tttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca 16380
agtcagaggt ggcgaaacc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc 16440
tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgctttctc 16500
ccttcgggaa gcgtggcgct tttccgctgc ataaccctgc ttcgggggtca ttatagcgat 16560
tttttcggta tatccatcct ttttcgcacg atatacagga ttttgccaaa gggttcgtgt 16620
agactttcct tgggtgtatc aacggcgtca gccgggcagg ataggtgaag taggcccacc 16680
cgcgagcggg tgttccttct tcaactgtcc ttattcgcac ctggcgggtgc tcaacgggaa 16740
tctgtctctg cgaggctggc cggctaccgc cggcgtaaca gatgagggca agcggatggc 16800
tgatgaaacc aagccaacca ggaagggcag cccacctatc aaggtgtact gccttccaga 16860
cgaacgaaga gcgattgagg aaaaggcggc ggcggccggc atgagcctgt cggcctacct 16920
gctggccgct gccagggct acaaaatcac gggcgtcgtg gactatgagc acgtccgcga 16980
gctggccccg atcaatggcg acctgggccc cctgggcccg ctgctgaaac tctggctcac 17040
cgacgaccg cgacggcgc ggttcggtga tgccacgac ctgcacctgc tggcgaagat 17100
cgaagagaag caggacgagc ttggcaaggt catgatgggc gtggtccgcc cgagggcaga 17160
gcatgactt ttttagccgc taaaacggcc ggggggtgcg cgtgattgcc aagcacgtcc 17220
ccatgcgctc catcaagaag agcgacttcg cggagctggt gaagtacatc accgacgagc 17280
aaggcaagac cgagcgcctt tgcgacgctc a 17311

<210> 3
 <211> 1233
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> DNA辨識蛋白之DNA序列

<400> 3
 ctgacccccgg accaagtggg ggctatcgcc agccacgatg gcggcaagca agcgctcgaa 60
 acggtgcagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggaccatg gcctgactcc ggaccaagtg 120
 gtggctatcg ccagccacga tggcggcaag caagcgctcg aaacggtgca gcggctgttg 180
 ccggtgctgt gccaggacca tggcctgacc ccggaccaag tgggtggctat cgccagcaac 240
 attggcggca agcaagcgct cgaaacggtg cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggac 300
 catggcctga cccccgacca agtgggtggct atcgccagca acattggcgg caagcaagcg 360
 ctcgaaacgg tgcagcggct gttgccgggt ctgtgccagg accatggcct gacccccggac 420
 caagtgggtgg ctatcgccag caacattggc ggcaagcaag cgctcgaaac ggtgcagcgg 480
 ctgttgccgg tgctgtgcca ggaccatggc ctgacccccg accaagtggg ggctatcgcc 540
 agcaacattg gcggcaagca agcgctcgaa acggtgcagc ggctgttgcc ggtgctgtgc 600
 caggaccatg gcctgacccc ggaccaagtg gtggctatcg ccagcaacat tggcggcaag 660
 caagcgctcg aaacggtgca gcggctgttg ccggtgctgt gccaggacca tggcctgacc 720
 ccggaccaag tgggtggctat cgccagcaac ggtggcggca agcaagcgct cgaaacggtg 780
 cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggac catggcctga cccccgacca agtgggtggct 840
 atcgccagca acggtggcgg caagcaagcg ctcgaaacgg tgcagcggct gttgccgggt 900
 ctgtgccagg accatggcct gacccccggac caagtgggtg ctatcgccag caacaatggc 960
 ggcaagcaag cgctcgaaac ggtgcagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggaccatggc 1020
 ctgacccccg accaagtggg ggctatcgcc agcaacattg gcggcaagca agcgctcgaa 1080
 acggtgcagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggaccatg gcctgacccc ggaccaagtg 1140
 gtggctatcg ccagcaacat tggcggcaag caagcgctcg aaagcattgt ggcccagctg 1200
 agccggcctg atccggcggt ggccgcggtg acc 1233

<210> 4
 <211> 1233
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> DNA辨識蛋白之DNA序列

<400> 4
 ctgacccccgg accaagtggg ggctatcgcc agcaacattg gcggcaagca agcgctcgaa 60
 acgggtgcagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggaccatg gcctgacccc ggaccaagtg 120
 gtggctatcg ccagcaacat tggcggcaag caagcgctcg aaacgggtgca gcggctgttg 180
 ccgggtgctgt gccaggacca tggcctgacc ccggaccaag tgggtggctat cgccagcaac 240
 ggtggcggca agcaagcgct cgaaacgggt cagcggctgt tgccgggtgct gtgccaggac 300
 catggcctga ccccggacca agtgggtggct atcgccagca acgggtggcgg caagcaagcg 360
 ctcgaaacgg tgcagcggct gttgccgggt ctgtgccagg accatggcct gacccccggac 420
 caagtgggtg ctatcgccag caacaatggc ggcaagcaag cgctcgaaac ggtgcagcgg 480
 ctgttgccgg tgctgtgcca ggaccatggc ctgacccccg accaagtggg ggctatcgcc 540
 agcaacattg gcggcaagca agcgctcgaa acgggtgcagc ggctgttgcc ggtgctgtgc 600
 caggaccatg gcctgacccc ggaccaagtg gtggctatcg ccagcaacat tggcggcaag 660
 caagcgctcg aaacgggtgca gcggctgttg ccgggtgctgt gccaggacca tggcctgacc 720
 ccggaccaag tgggtggctat cgccagcaac attggcggca agcaagcgct cgaaacgggt 780
 cagcggctgt tgccgggtgct gtgccaggac catggcctga ccccggacca agtgggtggct 840
 atcgccagca acgggtggcgg caagcaagcg ctcgaaacgg tgcagcggct gttgccgggt 900
 ctgtgccagg accatggcct gacccccggac caagtgggtg ctatcgccag caacgggtggc 960
 ggcaagcaag cgctcgaaac ggtgcagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggaccatggc 1020
 ctgactccgg accaagtggg ggctatcgcc agccacgatg gcggcaagca agcgctcgaa 1080
 acgggtgcagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggaccatg gcctgacccc ggaccaagtg 1140
 gtggctatcg ccagcaacat tggcggcaag caagcgctcg aaagcattgt ggcccagctg 1200
 agccggcctg atccggcggt ggccgcggtg acc 1233

<210> 5
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Check-F引子

<400> 5
 aattcactca ttggattcat agaag 25

<210> 6
 <211> 20

<212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> Check-R引子

 <400> 6
 ctgtagccga gcgtgcgtag 20

 <210> 7
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> HRM F引子

 <400> 7
 ggatttaatc agatacaatt tgaag 25

 <210> 8
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> HRM R引子

 <400> 8
 ttccaaatta atcccgcgga tac 23

 <210> 9
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> sequence F引子

 <400> 9
 agcagaagtc tgtttctagg gatgt 25

 <210> 10
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> sequence R引子

 <400> 10
 tagctgatga tagaactaga ata 23

 <210> 11

<211> 13
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> TALEN辨識rpoB序列

 <400> 11
 tccaaaaatt gaa 13

<210> 12
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> TALEN辨識rpoB序列

 <400> 12
 taattgaaat tca 13

<210> 13
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> pFUSA-M6-R引子

 <400> 13
 agcggcgccg gtctcgatag cc 22

<210> 14
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> pFUS-A-De1-F引子

 <400> 14
 agcaagcggg tctcacggtg cagcggctgt tg 32

<210> 15
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> pTC14-F3引子

 <400> 15
 tctgatgtta cattgcacaa ga 22

<210>	16	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	pTC14-R3引子	
<400>	16	
	tgaacgctct cctgagtagg	20
<210>	17	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	TAL-BamHI-F引子	
<400>	17	
	catggctcca aagaaggatc ctaaggta	28
<210>	18	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	TAL-NsiI-R引子	
<400>	18	
	gcacccgtca gtgcattgc	19
<210>	19	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	AscI-IV-F引子	
<400>	19	
	tggcgcgcca gacaaacacc ccttggtata c	31
<210>	20	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	H3-PacI-IV-R引子	
<400>	20	
	cataagcttt taattaatgc gtccactata gac	33

<210> 21
<211> 2753
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> TALEN-L序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (819)..(824)
<223> n i s a, c, g, o r t

<220>
<221> misc_feature
<222> (921)..(926)
<223> n i s a, c, g, o r t

<220>
<221> misc_feature
<222> (1023)..(1028)
<223> n i s a, c, g, o r t

<220>
<221> misc_feature
<222> (1125)..(1130)
<223> n i s a, c, g, o r t

<220>
<221> misc_feature
<222> (1227)..(1232)
<223> n i s a, c, g, o r t

<220>
<221> misc_feature
<222> (1329)..(1334)
<223> n i s a, c, g, o r t

<220>
<221> misc_feature
<222> (1431)..(1436)
<223> n i s a, c, g, o r t

<220>
<221> misc_feature
<222> (1533)..(1538)
<223> n i s a, c, g, o r t

<220>
<221> misc_feature
<222> (1635)..(1640)
<223> n i s a, c, g, o r t

<220>
<221> misc_feature
<222> (1737)..(1742)
<223> n i s a, c, g, o r t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1839)..(1844)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1941)..(1946)
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 21
 tggcctcgat ctcttctctc gctgtcgcaa ccgtcaacag gaccacctct gctcaagcta 60
 gcatggtggc tccattcacc gggcttaagt ccaacgtcgc tttcccagtc accaagaagt 120
 ctaacgactt ctcatccctc cccagcaacg gtggaagagt gcaatgcatg aaggtacaat 180
 atataactta aataataacg tgaacactta ttataatgca gtagatataa tgactaacat 240
 ttataaaat atatatatag gtgtggccac cattggggttt gaagaagtcc atggatccta 300
 aggtagacta caaagacat gacggtgatt ataaagatca tgacatcgat tacaaggatg 360
 acgatgacaa gggtaccgtg gatctacgca cgctcggcta cagtcagcag cagcaagaga 420
 agatcaaacc gaaggtgcgt tcgacagtgg cgcagcacca cgaggcactg gtgggcatg 480
 ggtttacaca cgcgcacatc gttgcgctca gccaacaccc ggcagcgfta gggaccgtcg 540
 ctgtcacgta tcagcacata atcacggcgt tgccagaggc gacacacgaa gacatcgttg 600
 gcgtcggcaa acagtggtec ggcgcacgcg ccctggagggc cttgctcacg gatgcggggg 660
 agttgagagg tccgccgfta cagttggaca caggccaact tgtgaagatt gcaaaacgtg 720
 gcggcgtgac cgcaatggag gcagtgcatt catcgcgcaa tgcaactgacg ggtgcccccc 780
 tgaacctgac cccggaccaa gtggtggcta tcgccagcnn nnnnggcggc aagcaagcgc 840
 tcgaaacggt gcagcggctg ttgccggtgc tgtgccagga ccatggcctg actccggacc 900
 aagtgggtggc tategccagc nnnnnnggcg gcaagcaagc gctcgaaacg gtgcagcggc 960
 tgttgccggt gctgtgccag gaccatggcc tgaccccgga ccaagtgggtg gctatcgcca 1020
 gcnnnnnngg cggcaagcaa gcgctcgaaa cgggtgcagcg gctgttgccg gtgctgtgcc 1080
 aggaccatgg cctgaccccc gaccaagtgg ttgctatcgc cagcnnnnnn ggccggcaagc 1140
 aagcgcctga aacggtgcag cggctgttgc cgggtgctgtg ccaggacat ggccctgacc 1200
 cggaccaagt ggtggctatc gccagcnnnn nnggcggcaa gcaagcgtc gaaacggtgc 1260
 agcggctgtt gccggtgctg tgccaggacc atggcctgac cccggaccaa gtggtggcta 1320
 tcgccagcnn nnnnggcggc aagcaagcgc tcgaaacggt gcagcggctg ttgccggtgc 1380
 tgtgccagga ccatggcctg accccggacc aagtgggtggc tategccagc nnnnnnggcg 1440

gcaagcaagc gctcgaaacg gtgcagcggc tgttgccggt gctgtgccag gaccatggcc 1500
tgaccccgga ccaagtgggtg gctatcgcca gcnnnnnngg cggcaagcaa gcgctcgaaa 1560
cgggtgcagcg gctgttgccg gtgctgtgcc aggaccatgg cctgaccccc gaccaagtgg 1620
tggctatcgc cagcnnnnn ggccggcaagc aagcgcctcga aacgggtgcag cggctgttgc 1680
cgggtgctgtg ccaggaccat ggccctgacce cggaccaagt ggtggctatc gccagcnnn 1740
nnggcggcaa gcaagcgcctc gaaacgggtgc agcggctgtt gccgggtgctg tgccaggacc 1800
atggcctgac cccggaccaa gtgggtggcta tcgccagcnn nnnnggcggc aagcaagcgc 1860
tcgaaacggt gcagcggctg ttgccgggtgc tgtgccagga ccatggcctg accccggacc 1920
aagtgggtggc tatcgccagc nnnnnnggcg gcaagcaagc gctcgaaagc attgtggccc 1980
agctgagccg gcctgatccg gcgttggccg cgttgaccaa cgaccacctc gtcgccttgg 2040
cctgcctcgg cggacgtcct gccatggatg cagtgaaaaa gggattgccg cacgcgccgg 2100
aattgatcag aagagtcaat cgccgtattg gcgaacgcac gtcccatcgc gttgccggat 2160
cccaactagt caaaagtgaa ctggaggaga agaaatctga acttcgtcat aaattgaaat 2220
atgtgcctca tgaatatatt gaattaattg aaattgccag aaattccact caggatagaa 2280
ttcttgaaat gaaggtaatg gaatTTTTTA tgaaagtTTA tggatataga ggtaaacatt 2340
tgggtggatc aaggaaaccg gacggagcaa tttatactgt cggatctcct attgattacg 2400
gtgtgatcgt ggatactaaa gcttatagcg gaggttataa tctgcccaatt ggccaagcag 2460
atgaaatgca agactatgtc gaagaaaatc aaacacgaaa caaacatata aaccctaatg 2520
aatgggtggaa agtctatcca tcttctgtaa cggaaTTTA gTTTTTattt gtgagtggtc 2580
actTTAaagg aaactacaaa gctcagctta cacgattaaa tcatactact aattgtaatg 2640
gagctgttct tagtgtagaa gagctTTTaa ttgggtggaga aatgattaaa gccggcaca 2700
taaccttaga ggaagtgcgc cggaaattTA ataacggcga gataaacttt taa 2753

<210> 22
<211> 2783
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> TALEN-R序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (849)..(854)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (951)..(956)
 <223> n i s a, c, g, o r t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1053)..(1058)
 <223> n i s a, c, g, o r t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1155)..(1160)
 <223> n i s a, c, g, o r t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1257)..(1262)
 <223> n i s a, c, g, o r t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1359)..(1364)
 <223> n i s a, c, g, o r t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1461)..(1466)
 <223> n i s a, c, g, o r t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1563)..(1568)
 <223> n i s a, c, g, o r t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1665)..(1670)
 <223> n i s a, c, g, o r t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1767)..(1772)
 <223> n i s a, c, g, o r t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1869)..(1874)
 <223> n i s a, c, g, o r t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1971)..(1976)
 <223> n i s a, c, g, o r t

<400> 22
 tggcctcgat ctcttctctcc gctgtcgcaa ccgtcaacag gaccacctct gctcaagcta

60

gcatggtggc tccattcacc gggcttaagt ccaacgtcgc tttcccagtc accaagaagt	120
ctaacgactt ctcatccctc cccagcaacg gtggaagagt gcaatgcatg aaggtacaat	180
atataactta aataataacg tgaacactta ttataatgca gtagatataa tgactaacat	240
ttataaaat atatatatag gtgtggccac cattgggttt gaagaagtcc atggatccta	300
aggtataccc atacgatggt cctgactatg cgggctatcc ctatgacgtc ccggactatg	360
caggatcgta tccatatgac gttccagatt acgctgctca tgggtaccgtg gatctacgca	420
cgctcggcta cagtcagcag cagcaagaga agatcaaacc gaaggtgcgt tcgacagtgg	480
cgcagcacca cgaggcactg gtgggccaatg ggtttacaca cgcgcacatc gttgcgctca	540
gccaacaccc ggcagcgta gggaccgtcg ctgtcacgta tcagcacata atcacggcgt	600
tgccagaggc gacacacgaa gacatcgttg gcgtcggcaa acagtgggtcc ggcgcacgcg	660
ccctggaggc cttgctcacg gatgcggggg agttgagagg tccgccgta cagttggaca	720
caggccaact tgtgaagatt gcaaaacgtg gcggcgtgac cgcaatggag gcagtgcatg	780
catcgcgcaa tgcactgacg ggtgcccccc tgaacctgac cccggaccaa gtggtggcta	840
tcgccagcnn nnnnggcggc aagcaagcgc tcgaaacggt gcagcggctg ttgccggtgc	900
tgtgccagga ccatggcctg accccggacc aagtgggtggc tatcgccagc nnnnnnggcg	960
gcaagcaagc gctcgaaacg gtgcagcggc tgttgccggt gctgtgccag gaccatggcc	1020
tgaccccgga ccaagtgggtg gctatcgcca gcnnnnnngg cggcaagcaa gcgctcgaaa	1080
cggtgcagcg gctgttgccg gtgctgtgcc aggaccatgg cctgaccccc gaccaagtgg	1140
tggtatcgc cagcnnnnn ggccgcaagc aagcgcctga aacggtgcag cggctgttgc	1200
cggtgctgtg ccaggaccat ggccctgacce cggaccaagt ggtggctatc gccagcnnn	1260
nnggcggcaa gcaagcgtc gaaacggtgc agcggctgtt gccggtgctg tgccaggacc	1320
atggcctgac cccggaccaa gtggtggcta tcgccagcnn nnnnggcggc aagcaagcgc	1380
tcgaaacggt gcagcggctg ttgccggtgc tgtgccagga ccatggcctg accccggacc	1440
aagtgggtggc tatcgccagc nnnnnnggcg gcaagcaagc gctcgaaacg gtgcagcggc	1500
tgttgccggt gctgtgccag gaccatggcc tgaccccgga ccaagtgggtg gctatcgcca	1560
gcnnnnnngg cggcaagcaa gcgctcgaaa cggtgcagcg gctgttgccg gtgctgtgcc	1620
aggaccatgg cctgaccccc gaccaagtgg tggctatcgc cagcnnnnn ggccgcaagc	1680
aagcgcctga aacggtgcag cggctgttgc cggtgctgtg ccaggaccat ggccctgacce	1740
cggaccaagt ggtggctatc gccagcnnn nnggcggcaa gcaagcgtc gaaacggtgc	1800
agcggctgtt gccggtgctg tgccaggacc atggcctgac tccggaccaa gtggtggcta	1860

tcgccagcnn nnnnggcggc aagcaagcgc tcgaaacggt gcagcggctg ttgccggtgc	1920
tgtgccagga ccatggcctg accccggacc aagtgggtggc tategccagc nnnnnnggcg	1980
gcaagcaagc gctcgaaagc attgtggccc agctgagccg gcctgatccg gcgttggccg	2040
cgttgaccaa cgaccacctc gtcgccttgg cctgcctcgg cggacgtcct gccatggatg	2100
cagtgaaaaa gggattgccg cacgcgccgg aattgatcag aagagtcaat cgccgtattg	2160
gcgaacgcac gtcccatcgc gttgccggat cccaactagt caaaagtga ctggaggaga	2220
agaaatctga acttcgtcat aaattgaaat atgtgcctca tgaatatatt gaattaattg	2280
aaattgccag aaattccact caggatagaa ttcttgaaat gaaggtaatg gaatTTTTTA	2340
tgaaagTTTA tggatataga ggtaaacatt tgggtggatc aaggaaaccg gacggagcaa	2400
TTTatactgt cggatctcct attgattacg gtgtgatcgt ggatactaaa gcttatagcg	2460
gaggttataa tctgccaatt ggccaagcac gtgaaatgca acgatatgtc gaagaaaatc	2520
aaacacgaaa caaacatata aaccctaata aatgggtggaa agtctatcca tcttctgtaa	2580
cggaatttaa gTTTTattt gtgagtggtc actTTaaagg aaactacaaa gctcagctta	2640
cacgattaaa tcatatcact aattgtaatg gagctgttct tagtgtagaa gagctTTTaa	2700
ttggtggaga aatgattaaa gccggcacat taaccttaga ggaagtgcgc cggaaattta	2760
ataacggcga gataaacttt taa	2783

【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種細胞核基因轉殖載體，包括：

一啟動子；

一葉綠體訊息蛋白基因，其位於該啟動子下游；

一重組TALEN蛋白域，包含如SEQ ID NO: 21或SEQ ID NO: 22所示之序列；以及

一第一邊界區及一第二邊界區，其中該啟動子、該葉綠體訊息蛋白基因及該重組TALEN蛋白域依序位於該第一邊界區與該第二邊界區之間；

其中該重組TALEN蛋白域包括編碼一DNA辨識蛋白的DNA序列；

其中該DNA辨識蛋白辨識葉綠體之*rpoB*基因之片段。

【第2項】 如請求項1所述之轉殖載體，其中該啟動子為*rbcS*啟動子。

【第3項】 如請求項1所述之轉殖載體，其中該重組TALEN蛋白域包括一核酸內切酶的DNA序列。

【第4項】 如請求項3所述之轉殖載體，其中該核酸內切酶為Fok I。

【第5項】 如請求項1所述之轉殖載體，其中編碼該DNA辨識蛋白之DNA序列具有如SEQ ID NO: 3或SEQ ID NO: 4所示之序列。

【第6項】 如請求項1所述之轉殖載體，更包括一篩選基因。

【第7項】 如請求項6所述之轉殖載體，其中該篩選基因為一抗藥性篩選基因、一非抗藥性篩選基因、或其組合。

【第8項】 如請求項6所述之轉殖載體，其中該篩選基因包括一卡那黴素（kanamycin）抗性基因或一甲硫胺酸磺醯亞胺（methionine sulfoximine, MSO）殺草劑抗性基因。

【第9項】 如請求項8所述之轉殖載體，其中該卡那黴素抗性基因包括*nptII*或該甲硫胺酸磺醯亞胺殺草劑抗性基因包括*bar*。

【第10項】 如請求項1所述之轉殖載體，更包括編碼一標誌物之序列。

【第11項】 如請求項10所述之轉殖載體，其中該標誌物包含選自由發光分子、化學發光分子、螢光染料、螢光猝滅劑、脂質、有色分子、放射性同位素、閃爍劑、生物素、抗生物素蛋白、鏈黴親和素、蛋白質A、蛋白質G、抗體或其片段、聚組胺酸、Ni²⁺、Flag標籤、myc標籤、HA標籤、和酶所組成的群組中的可檢測標記物。

【第12項】 如請求項1所述之轉殖載體，其包含如SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 2所示之序列。

【第13項】 如請求項1所述之轉殖載體，更包括一*rbcS*基因的3端非轉錄區，其位於該重組TALEN蛋白域下游。

【第14項】 一種特異性造成植物葉綠體基因變異的套組，包括：

一第一轉殖載體，包括：

一第一啟動子；

一第一葉綠體訊息蛋白基因，其位於該第一啟動子下游；

一第一重組TALEN蛋白域，包含如SEQ ID NO: 21所示之序列；以及

一第一邊界區及一第二邊界區，其中該第一啟動子、該第一葉綠體訊息蛋白基因及該第一重組TALEN蛋白域依序位於該第一邊界區與該第二邊界區之間；以及

一第二轉殖載體，包括：

一第二啟動子；

一第二葉綠體訊息蛋白基因，其位於該第二啟動子基因下游；

一第二重組TALEN蛋白域，包含如SEQ ID NO: 22所示之序列；以及
一第三邊界區及一第四邊界區，其中該第二啟動子、該第二葉綠體訊息
蛋白基因及該第二重組TALEN蛋白域依序位於該第三邊界區與該第四邊界
區之間；

其中該第一重組TALEN蛋白域和該第二重組TALEN蛋白域包括編碼一
DNA辨識蛋白的DNA序列；

其中該DNA辨識蛋白辨識葉綠體之*rpoB*基因之片段。

【第15項】 一種產生細胞核基因轉殖植物細胞的方法，包括：

建構一對如請求項1所述之細胞核基因轉殖載體；

透過一農桿菌將該細胞核基因轉殖載體併入一植物細胞；以及

篩選及培養該植物細胞。

【第16項】 如請求項15所述之方法，其中該併入包含一同源性導向的修復機
制或一非同源性末端接合導向的修復機制。

【第17項】 如請求項15所述之方法，更包括轉殖該細胞核基因轉殖載體至該
農桿菌。

【第18項】 如請求項15所述之方法，更包括分析該植物細胞並確認該細胞核
基因轉殖載體併入該植物細胞。

【第19項】 一種細胞核基因轉殖植物細胞，係以請求項15所述之方法所建
構。

【第20項】 一種農桿菌，包括如請求項1所述之細胞核基因轉殖載體。

【發明圖式】

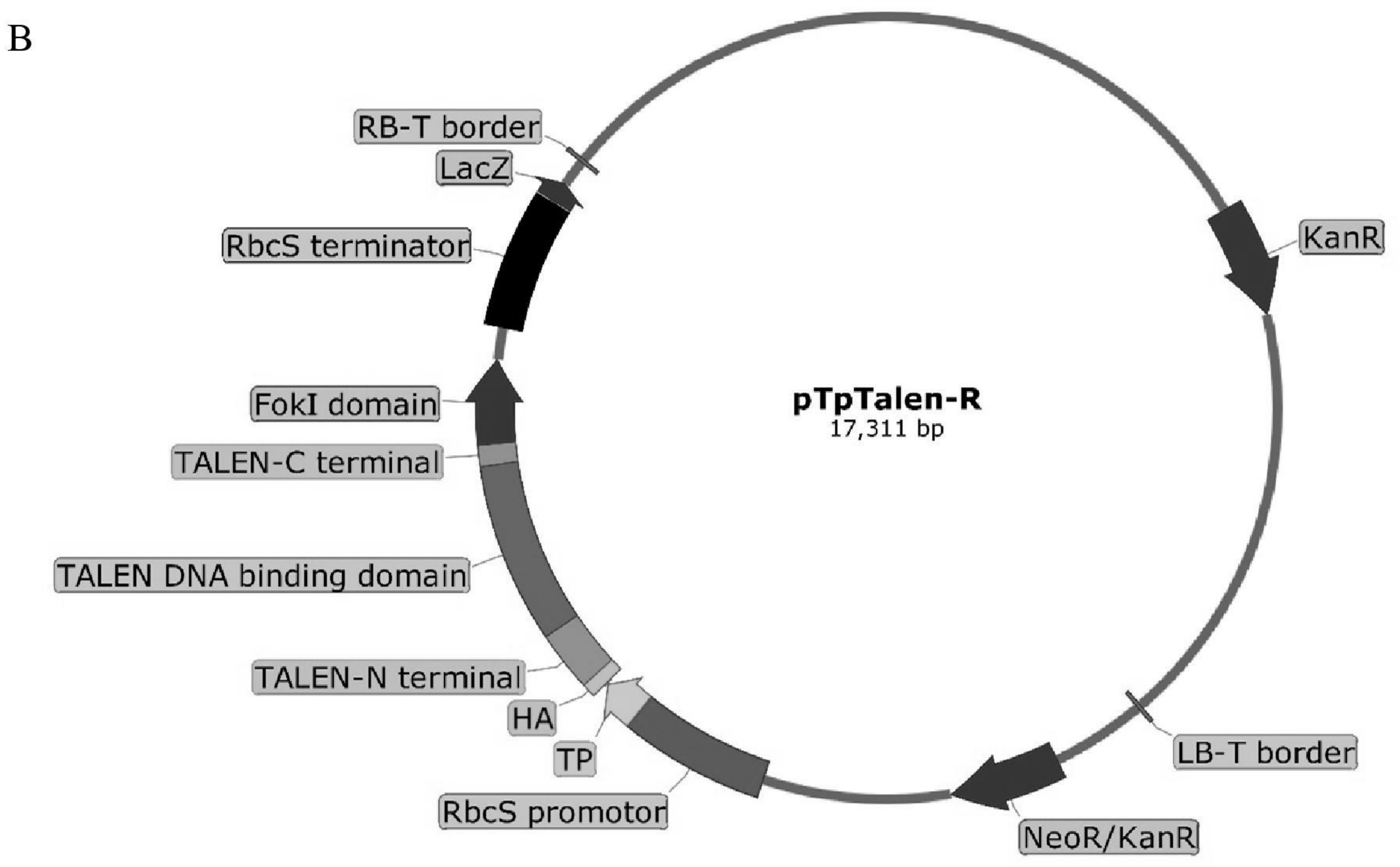
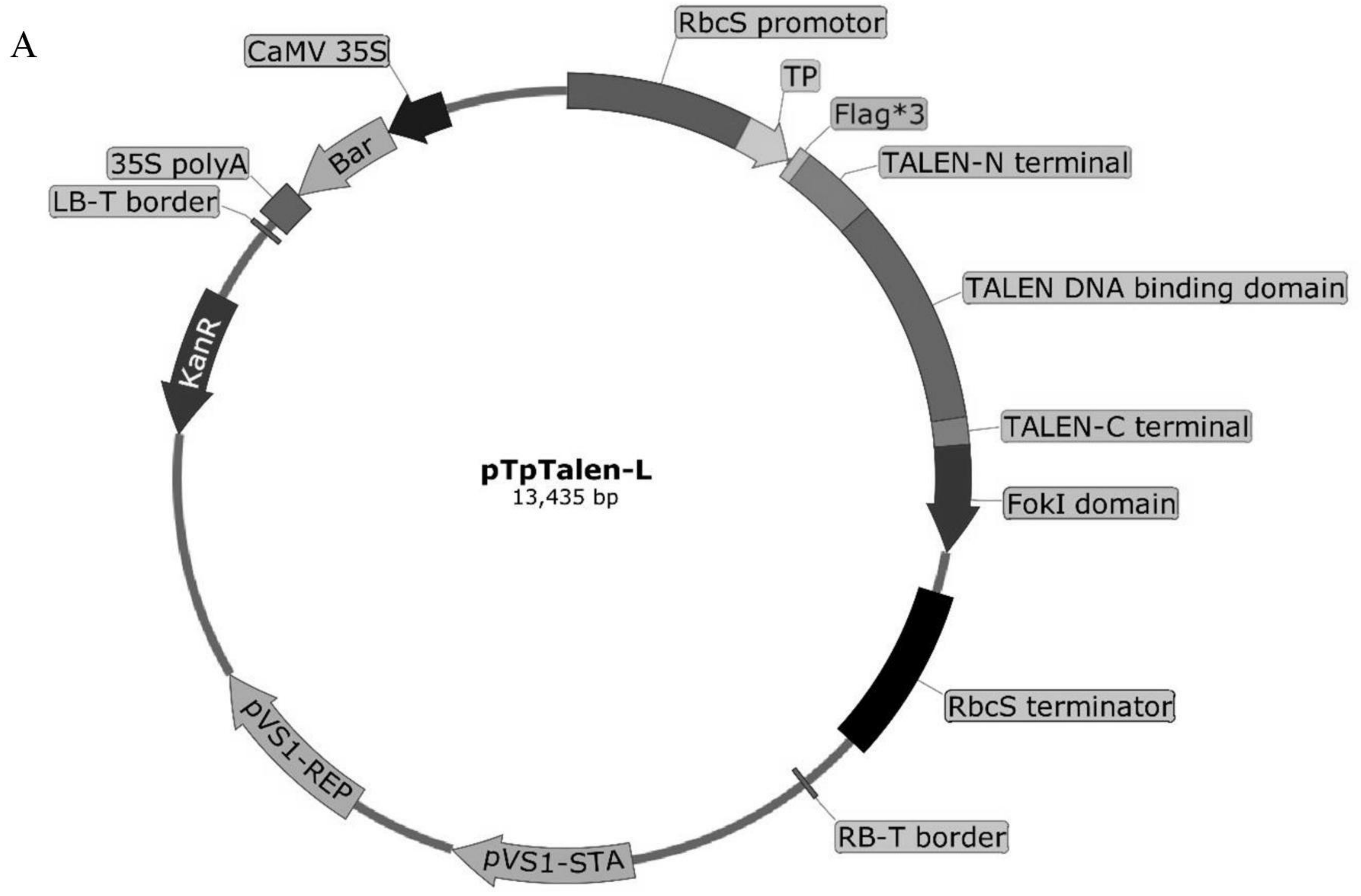


圖 1

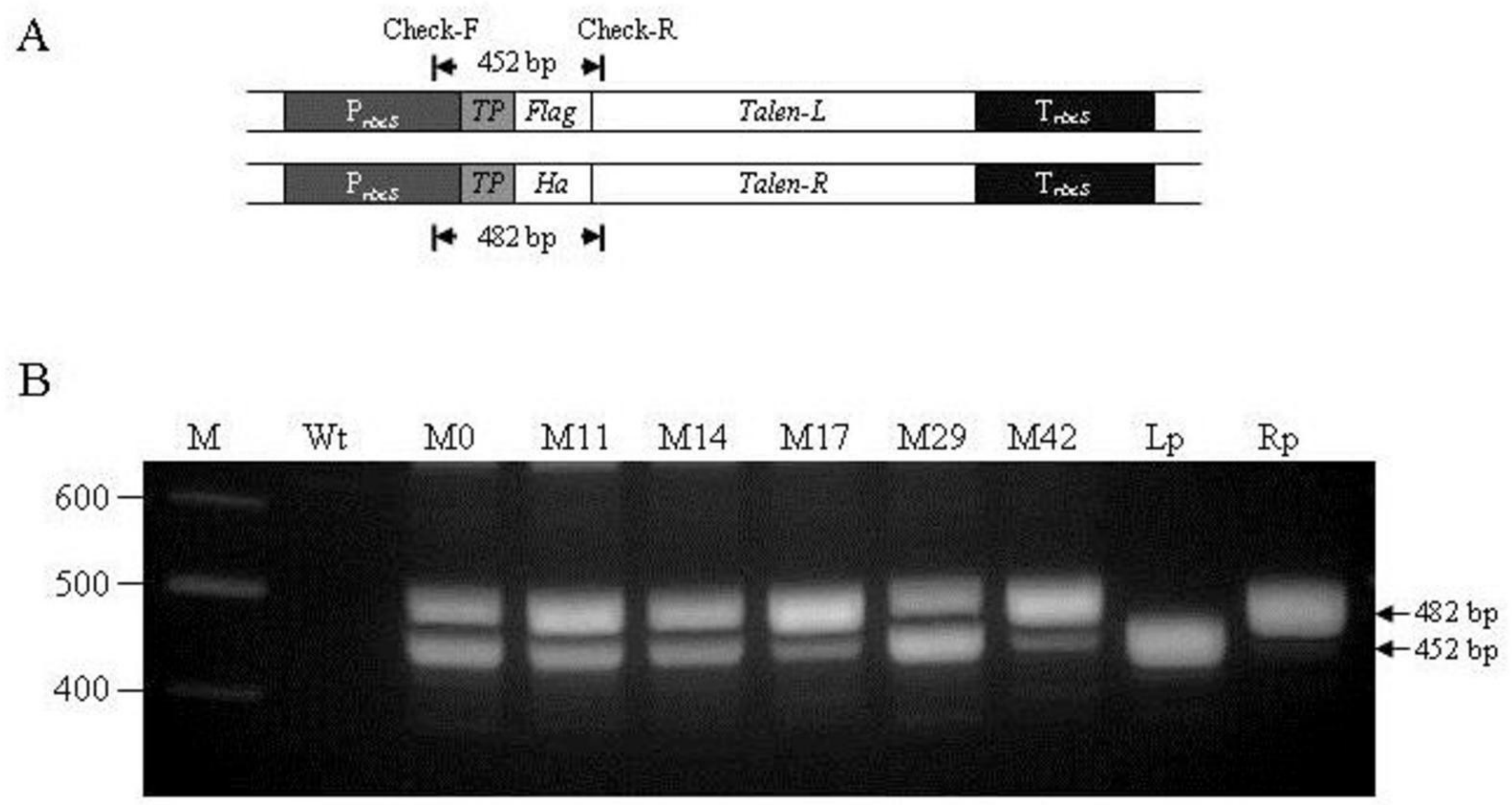


圖 2

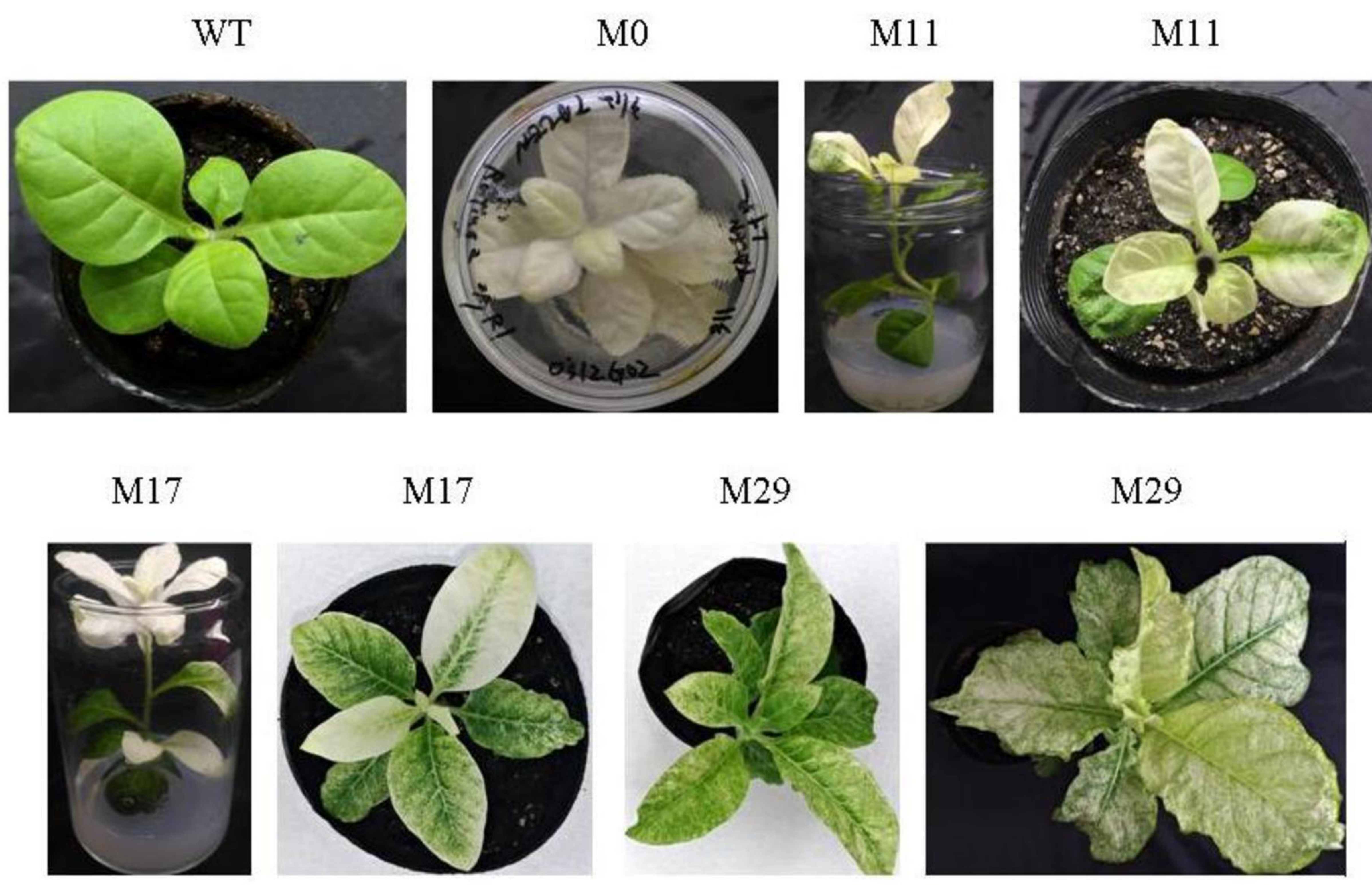


圖 3

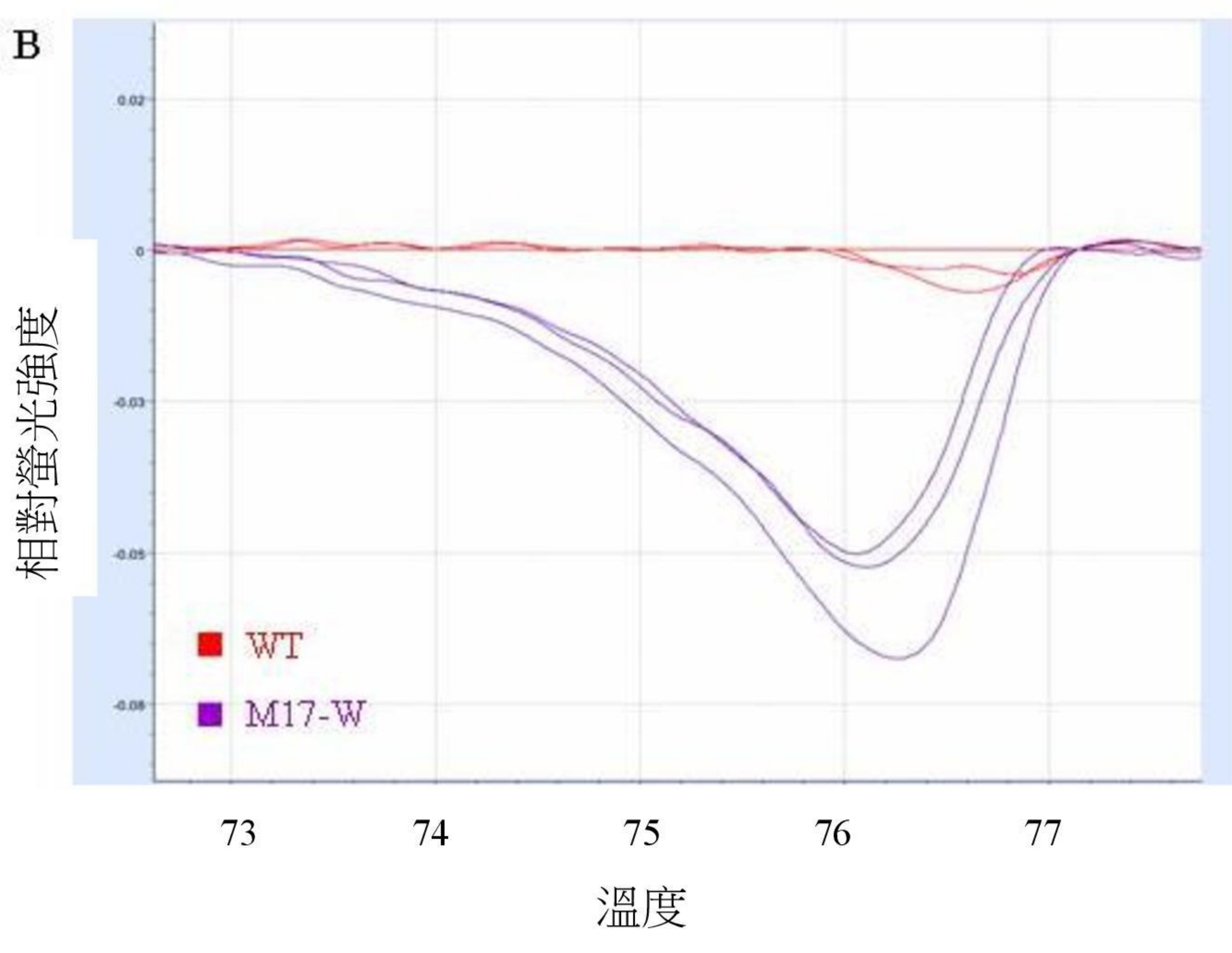
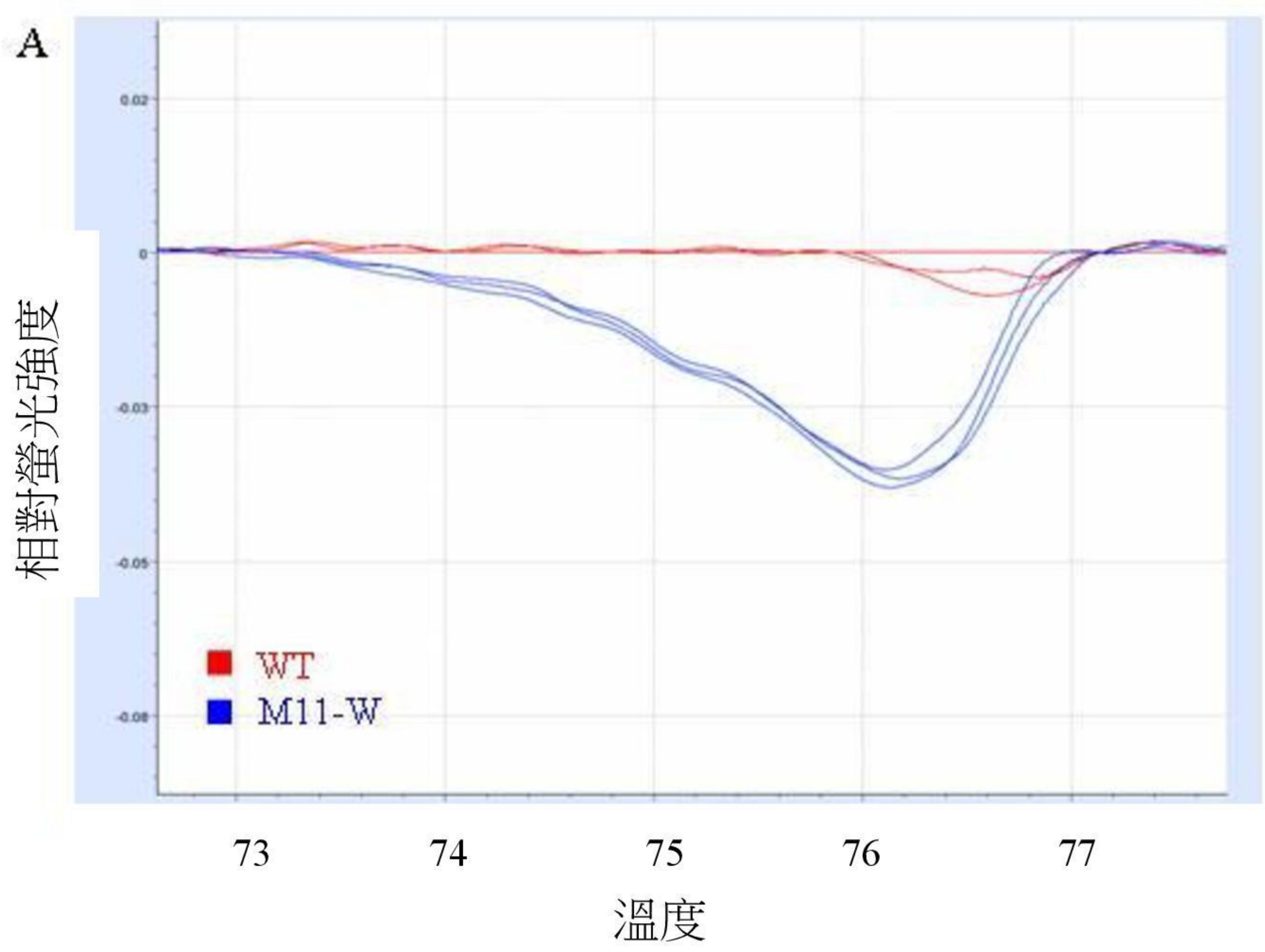


圖 4

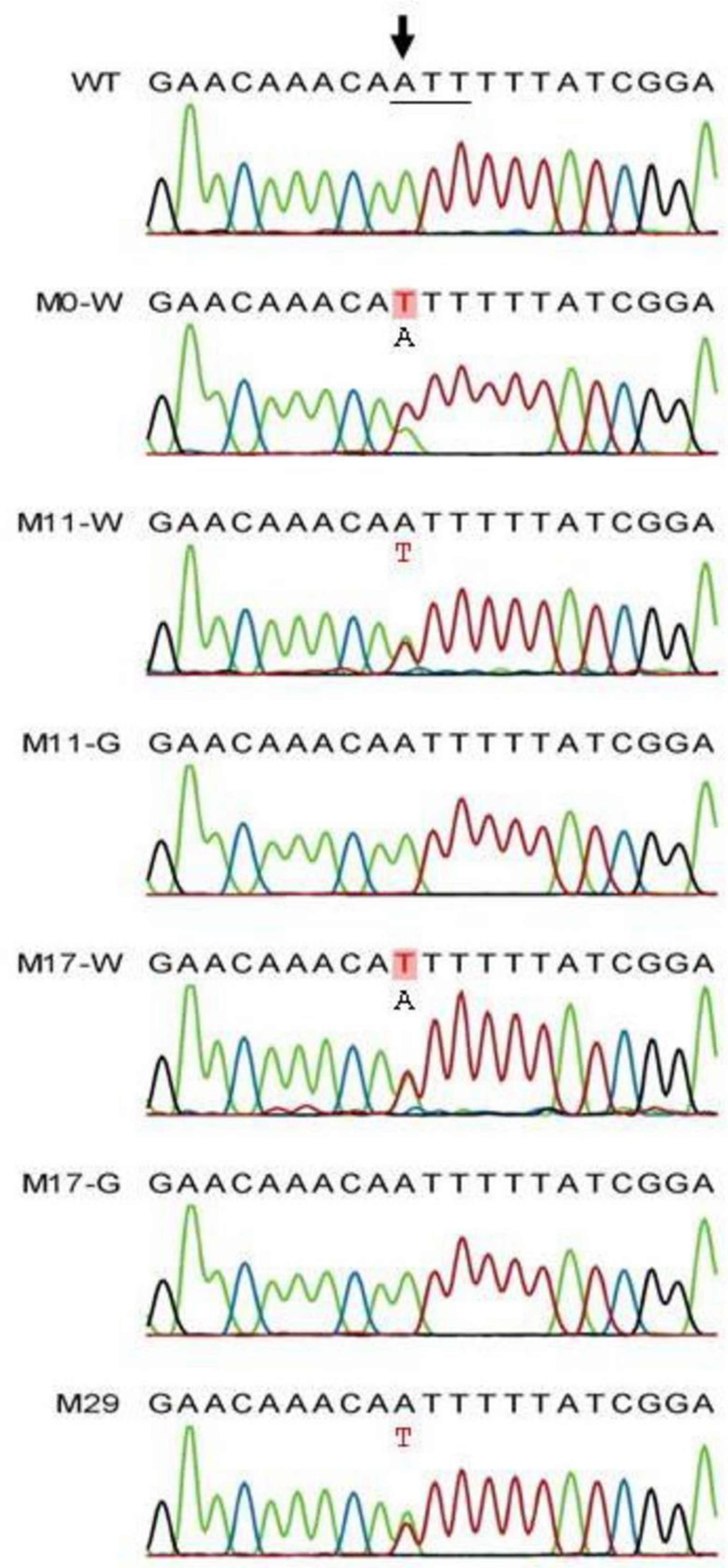


圖 5