



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109456995 A

(43)申请公布日 2019.03.12

(21)申请号 201811325620.7

(22)申请日 2018.11.08

(71)申请人 杜以军

地址 250100 山东省济南市历城区桑园路8号

申请人 山东省农业科学院畜牧兽医研究所

(72)发明人 杜以军 齐静 隋超 吴香菊

(74)专利代理机构 北京索睿邦知识产权代理有限公司 11679

代理人 刘丽

(51)Int.Cl.

C12N 15/90(2006.01)

C12N 15/85(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

C12N 15/66(2006.01)

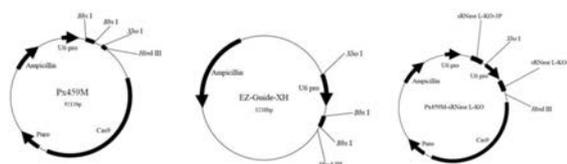
权利要求书1页 说明书5页
序列表2页 附图5页

(54)发明名称

基因敲除质粒、细胞系及制备方法和应用

(57)摘要

本发明涉及分子生物学技术领域,特别涉及基因敲除质粒和细胞系,此细胞系能明显抑制细胞rRNA的降解,促进PRV增殖,可以用于抗病毒作用研究。



1. 一种基因敲除质粒, 其特征在于在Px459质粒的*Hind* III酶切位点以及距离*Hind* III酶切位点最远的*Bbs*I酶切位点之间插入的核苷酸序列见序列表中序列1的核苷酸序列。

2. 一种权利要求1中所述基因敲除质粒的制备方法, 其特征在于是通过以下步骤得到的:

(1) 设计两对引物, 核苷酸序列如下:

sRNase L-KO-3Fwd: 5' -CACCTTCATGGAAGCCGCGTGTA-3' ,

sRNase L-KO-3Rev: 5' -AAACTACACGGCGGCTTCCATGAA-3' ,

sRNase L-KO-4Fwd: 5' -CACCCAGCCGAGCCAACGATAACG-3' ,

sRNase L-KO-4Rev: 5' -AAACCGTTATCGTTGGCTCGGCTG-3' ,

将引物sRNase L-KO-3Fwd和sRNase L-KO-3Rev进行磷酸化和退火, 得到sRNase L-KO-3P, 将引物sRNase L-KO-4Fwd和sRNase L-KO-4Rev进行磷酸化和退火, 得到sRNase L-KO-4P;

(2) 构建基因敲除质粒

用*Bbs*I双酶切质粒Px459M, 胶回收得到载体片段1, 用*Bbs*I双酶切质粒EZ-Guide-XH, 胶回收得到载体片段2, 将sRNase L-KO-3P和载体片段1相连, 得到Px459M-sRNase L-KO-3P, 将sRNase L-KO-4P和载体片段2相连, 得到EZ-Guide-XH-sRNase L-KO-4P, 用*Hind* III/*Xho*I双酶切Px459M-sRNase L-KO-3P得到载体片段3, 用*Hind* III/*Xho*I双酶切EZ-Guide-XH-sRNase L-KO-4P得到基因片段4, 将载体片段3和基因片段4连接, 得到基因敲除质粒Px459M-sRNase L-KO。

3. 根据权利要求2所述的制备方法, 其特征在于磷酸化和退火操作如下: 反应体系为10 μ L, 含sRNase L-KO-3Fwd和sRNase L-KO-3Rev或sRNase L-KO-4Fwd和sRNase L-KO-4Rev各10 μ mol/L, 10 \times T4 ligase buffer 1 μ L, T4 PNK 1 U, H₂O 6 μ L; 反应条件为: 37 $^{\circ}$ C 30 min, 95 $^{\circ}$ C 5 min, PCR梯度降温至25 $^{\circ}$ C, 速度为每秒降低0.1 $^{\circ}$ C, 25 $^{\circ}$ C 5 min, 4 $^{\circ}$ C 5 min。

4. 一种细胞系, 其特征在于权利要求1中的基因敲除质粒Px459M-sRNase L-KO转染PK-15细胞, 使用含有嘌呤霉素培养基筛选细胞, 存活的抗性细胞克隆即为sRNase L KO-PK细胞系。

5. 一种权利要求4所述的细胞系在研究猪RNase L的作用机制及抗PRV感染药物中的应用。

6. 根据权利要求5所述的应用, 其特征在于所述细胞系被poly (I: C) 转染, 能阻止细胞rRNA降解。

7. 根据权利要求5所述的应用, 其特征在于所述细胞系促进PRV增殖。

基因敲除质粒、细胞系及制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学技术领域,特别涉及一种基因敲除质粒,还涉及细胞系,还涉及此基因敲除质粒和细胞系的制备方法及应用。

背景技术

[0002] Ribonuclease L (RNase L) 属于2-5腺苷酸系统,具有核酸内切酶活性,在干扰素的抗病毒过程中发挥着重要的作用,猪RNase L基因全长14326 bp,包含6个外显子,编码744个氨基酸,从结构和功能上可分为氨基端的锚定蛋白区(A区)、中间的激酶样区(K区)和羧基端的RNA酶活性区(N区)三个区域。其中,锚定蛋白区是核酸与蛋白结合的区域,RNA酶活性区是RNase L蛋白中具有酶活性的区域。无活性RNase L的RNA酶活性区和激酶样区形成发夹结构,同时锚定蛋白区与RNA酶活性区以共价键连接,阻止二聚体的形成,从而抑制RNase L的核糖核酸酶活性。

[0003] RNase L作为一种核酸内切酶,在先天性免疫过程当中发挥着重要的作用。当病毒感染细胞后,病毒RNA或者DNA在复制和转录过程当中形成的双链RNA(dsRNA)能够激活2'-5'寡聚腺苷酸合成酶(OAS),进而催化ATP合成2'-5'寡聚腺苷酸(2-5A),2-5A能够与RNase L的锚定蛋白区结合,激活RNase L,暴露出RNA酶活性区和二聚化区域,解除锚定蛋白造成的抑制作用。活化的RNase L能够降解宿主当中的ssRNA(单链RNA),发挥抗病毒作用;降解核糖体RNA,阻断病毒蛋白质的合成;诱导细胞凋亡,控制病毒感染。

[0004] 鉴于RNase L在先天性免疫当中的关键作用,敲除RNase L基因是其功能研究中十分重要的手段。目前关于猪RNase L(sRNase L)基因的相关研究较少,其功能上的研究仅限于过表达,由于实验方法上的局限性,造成了无法对sRNase L具体功能进行更加深入的研究,为了解决这一问题,十分有必要开发一种从猪细胞基因组中敲除sRNase L基因的方法。CRISPR-Cas9技术是近年来兴起的一种基因编辑技术,其具有操作简单,特异性高的特点,现在成为了科研人员用于研究基因功能和潜在基因治疗应用的重要工具。

发明内容

[0005] 为了更进一步的研究猪RNase L的相关功能,我们以CRISPR-Cas9技术为基础,开发了一种从基因组中稳定敲除猪RNase L基因的基因敲除质粒Px459M-sRNase L-KO和细胞系sRNase L KO-PK,将为研究猪RNase L功能打下基础。

[0006] 本发明还提供了所述基因敲除质粒Px459M-sRNase L-KO和细胞系sRNase L KO-PK的制备方法。

[0007] 本发明还提供了所述细胞系sRNase L KO-PK的应用。

[0008] 本发明是通过以下步骤得到的:

一种基因敲除质粒,在Px459质粒的Hind III酶切位点以及距离Hind III酶切位点最远的Bbs I酶切位点之间插入的核苷酸序列见序列表中序列1的核苷酸序列。

[0009] 一种基因敲除质粒的制备方法,其特征在于是通过以下步骤得到的:

(1) 设计两对引物,核苷酸序列如下:

sRNase L-K0-3Fwd: 5' -CACCTTCATGGAAGCCGCCGTGTA-3' ,

sRNase L-K0-3Rev: 5' -AAACTACACGGCGGCTTCCATGAA-3' ,

sRNase L-K0-4Fwd: 5' -CACCCAGCCGAGCCAACGATAACG-3' ,

sRNase L-K0-4Rev: 5' -AAACCGTTATCGTTGGCTCGGCTG-3' ,

将引物sRNase L-K0-3Fwd和sRNase L-K0-3Rev进行磷酸化和退火,得到sRNase L-K0-3P,将引物sRNase L-K0-4Fwd和sRNase L-K0-4Rev进行磷酸化和退火,得到sRNase L-K0-4P;

(2) 构建基因敲除质粒

用*Bbs* I双酶切质粒Px459M,胶回收得到载体片段1,用*Bbs* I双酶切质粒EZ-Guide-XH,胶回收得到载体片段2,将sRNase L-K0-3P和载体片段1相连,得到Px459M-sRNase L-K0-3P,将sRNase L-K0-4P和载体片段2相连,得到EZ-Guide-XH-sRNase L-K0-4P,用*Hind* III/*Xho* I双酶切Px459M-sRNase L-K0-3P得到载体片段3,用*Hind* III/*Xho* I双酶切EZ-Guide-XH-sRNase L-K0-4P得到基因片段4,将载体片段3和基因片段4连接,得到基因敲除质粒Px459M-sRNase L-K0。

[0010] 所述的制备方法,优选磷酸化和退火操作如下:反应体系为10 μ L,含sRNase L-K0-3Fwd和sRNase L-K0-3Rev或sRNase L-K0-4Fwd和sRNase L-K0-4Rev各10 μ mol/L,10 \times T4 ligase buffer 1 μ L,T4 PNK 1 U,H₂O 6 μ L;反应条件为:37 $^{\circ}$ C 30 min,95 $^{\circ}$ C 5 min,PCR梯度降温至25 $^{\circ}$ C,速度为每秒降低0.1 $^{\circ}$ C,25 $^{\circ}$ C 5 min,4 $^{\circ}$ C 5 min。

[0011] 一种细胞系,由基因敲除质粒Px459M-sRNase L-K0转染PK-15细胞,使用含有嘌呤霉素培养基筛选细胞,存活的抗性细胞克隆即为sRNase L K0-PK细胞系。

[0012] 所述的细胞系在研究猪RNase L的作用机制及抗PRV感染药物中的应用。

[0013] 所述的应用,优选所述细胞系被poly (I: C)转染,能阻止细胞rRNA降解。

[0014] 所述的应用,优选所述细胞系促进PRV增殖。

[0015] 本发明的有益效果:

(1) 本发明构建的sRNase L K0-PK细胞系可以在转染poly (I: C)的条件下,明显抑制了细胞rRNA的降解,产生区别于PK-15细胞的RNA电泳图谱,能够应用于猪RNase L作用机制的研究;

(2) 通过PRV感染实验证明,在相同的条件下,本发明构建的sRNase L K0-PK细胞系比PK-15细胞系更有利于PRV的增殖,所述细胞系可以应用于猪RNase L抗病毒作用的研究。

[0016] 附图说明:

图1为构建猪RNase L基因敲除细胞系的质粒图谱,左图为Px459M的质粒图谱;中图为EZ-Guide-XH的质粒图谱;右图为Px459M-sRNase L-K0的质粒图谱;

图2为Px459M和EZ-Guide-XH质粒的*Bbs* I双酶切电泳图,其中M为8,000 bp DNA Marker,1代表Px459M质粒对照;2代表Px459M质粒*Bbs* I双酶切结果(载体片段1);3代表EZ-Guide-XH质粒对照;4代表EZ-Guide-XH质粒*Bbs* I双酶切结果(载体片段2);

图3为Px459M-sRNase L-K0-3P和EZ-Guide-XH-sRNase L-K0-4P的PCR鉴定图谱,其中M为8,000 bp DNA Marker;1代表Px459M-sRNase L-K0-3P的PCR结果;2代表EZ-Guide-XH-sRNase L-K0-4P的PCR结果;

图4为Px459M-sRNase L-KO-3P质粒和EZ-Guide-XH-sRNase L-KO-4P质粒的Hind III/Xho I双酶切电泳图,M为5,000 bp DNA Marker;1代表EZ-Guide-XH-sRNase L-KO-4P质粒Hind III/Xho I双酶切结果(基因片段4);2代表Px459M-sRNase L-KO-3P质粒的Hind III/Xho I双酶切结果(载体片段3);

图5为Px459M-sRNase L-KO质粒的Hind III/Xho I的双酶切鉴定图谱,M为5,000 bp DNA Marker;1和2代表基因敲除质粒Px459M-sRNase L-KO的双酶切鉴定图谱;

图6为sRNase L KO-PK细胞系的鉴定,M为5,000 bp DNA Marker;1代表PK-15细胞系扩增RNase L全长的RT-PCR结果;2代表sRNase L KO-PK细胞系扩增RNase L全长的RT-PCR结果;

图7为sRNase L KO-PK细胞系RNase L基因的测序结果,sRNase L WT为PK-15细胞系的RNase L基因序列;sRNase L knockout为sRNase L KO-PK细胞系RNase L基因序列;

图8为sRNase L KO-PK和PK-15细胞系的rRNA降解实验,1代表PK-15细胞系转染poly (I: C)的RNA电泳图谱;3代表sRNase L KO-PK细胞系转染poly (I: C)的RNA电泳图谱;2和4分别代表PK-15细胞系和sRNase L KO-PK细胞系不转染poly (I: C)的RNA电泳图谱;

图9为PRV分别感染sRNase L KO-PK和PK-15细胞系,分别取样,测定一步生长曲线。

具体实施方式

[0017] 下面结合具体实施例对本申请的技术方案进行具体说明。

[0018] 实施例1:猪RNase L基因敲除质粒Px459M-sRNase L-KO的构建

1.1 引物设计

设计两对引物,分别为sRNase L-KO-3Fwd/sRNase L-KO-3Rev和sRNase L-KO-4Fwd/sRNase L-KO-4Rev,引物的5'端带有Bbs I酶切后的核苷酸序列,序列如下:

sRNase L-KO-3Fwd: 5'-CACCTTCATGGAAGCCGCCGTGTA-3'

sRNase L-KO-3Rev: 5'-AAACTACACGGCGGCTTCCATGAA-3'

sRNase L-KO-4Fwd: 5'-CACCCAGCCGAGCCAACGATAACG-3'

sRNase L-KO-4Rev: 5'-AAACCGTTATCGTTGGCTCGGCTG-3'

两对向导RNA对于猪RNase L基因的两个外显子区域同时发生编辑,发生编辑后的基因经过转录,反映在mRNA上,相对于正常的RNase L基因减少840 bp左右。

[0019] 1.2 引物的磷酸化与退火

将引物sRNase L-KO-3Fwd和sRNase L-KO-3Rev或sRNase L-KO-4Fwd和sRNase L-KO-4Rev稀释到100 μM,两对引物分别进行磷酸化和退火,得到sRNase L-KO-3P和sRNase L-KO-4P。反应体系为10 μL,含sRNase L-KO-3Fwd和sRNase L-KO-3Rev或sRNase L-KO-4Fwd和sRNase L-KO-4Rev各10 μM,10×T4 ligase buffer 1 μL,T4 PNK 1 U,H₂O 6 μL。反应条件为:37 °C 30 min,95 °C 5 min,PCR梯度降温至25 °C,速度为每秒降低0.1 °C,25 °C 5 min,4 °C 5 min。反应产物置于冰上或者-20 °C备用。

[0020] 1.3 基因敲除质粒的构建与鉴定

基因敲除质粒Px459M和EZ-Guide-XH的质粒图谱见图1,用Bbs I双酶切质粒Px459M,胶回收得到载体片段1,用Bbs I双酶切质粒EZ-Guide-XH,胶回收得到载体片段2,结果见图2,将sRNase L-KO-3P和载体片段1相连,得到Px459M-sRNase L-KO-3P,将sRNase L-KO-4P和

载体片段2相连,得到EZ-Guide-XH-sRNase L-KO-4P,转化DH5 α 感受态细菌,37 °C过夜培养16 h,挑取单菌落于氨苄青霉素抗性的LB培养基中,37 °C过夜振荡培养,提取质粒,Px459M-sRNase L-KO-3P使用sRNase L-KO-3Fwd和CAG-R进行PCR鉴定,CAG-R引物序列如下:

CAG-R: 5' -GTACTGGGCACAATGCCAG-3'

EZ-Guide-XH-sRNase L-KO-4P使用sRNase L-KO-4Fwd和M13F通用引物(5' -TGTA AACGACGGCCAGT-3')进行PCR鉴定,结果见图3。鉴定结果为阳性的质粒交由生工公司测序,用DNastar软件分析插入的片段序列。用Hind III/Xho I双酶切Px459M-sRNase L-KO-3P得到载体片段3,用Hind III/Xho I双酶切EZ-Guide-XH-sRNase L-KO-4P得到基因片段4,结果见图4,将载体片段3和基因片段4连接,得到重组质粒转化DH5 α 感受态细菌,37 °C过夜培养16 h,挑取单菌落于氨苄青霉素抗性的LB培养基中,37 °C过夜振荡培养,提取质粒,进行Hind III/Xho I双酶切鉴定,结果见图5,鉴定为阳性的质粒Px459M-sRNase L-KO交由生工公司测序,Px459M-sRNase L-KO质粒图谱见图1,质粒当中插入的序列见序列1。

[0021] 实施例2:猪RNase L基因敲除细胞系sRNase L KO-PK的构建

2.1 PK-15细胞嘌呤霉素耐受性的测试

消化PK-15细胞,用含10%的胎牛血清的DMEM(不含抗生素)稀释细胞,使其密度达到 1×10^4 个细胞/mL,在12孔细胞板上每孔接种1 mL,于含5% CO₂、37 °C的培养箱中培养。第二天按照下列浓度加嘌呤霉素进行耐受性测试:0.1、1、5、10、100、200和500 μ g/mL。筛选到第4天时,引起细胞全部死亡的嘌呤霉素浓度作为PK-15细胞进行单克隆筛选的最佳药物作用浓度。本发明筛选的最佳嘌呤霉素作用浓度为5 μ g/mL。

[0022] 2.2 基因敲除质粒Px459M-sRNase L-KO转染PK-15细胞

具体按Lipofectamine[®] 3000(Invitrogen)说明书操作,转染在12孔细胞板上进行,在转染的前一天,消化PK-15细胞,用含10%胎牛血清的DMEM(不含抗生素)稀释细胞,使其密度达到 1×10^4 个细胞/mL,在12孔细胞板上每孔接种1 mL,于含5% CO₂、37 °C的培养箱中培养。在灭菌的1.5 mL的离心管中先加入37 °C预热的OPTI-MEM无血清培养基50 μ L,然后加入2 μ L P3000和1 μ g的重组质粒Px459M-sRNase L-KO,轻轻混匀;在另一个灭菌的1.5 mL的离心管中先加入37 °C预热的OPTI-MEM无血清培养基50 μ L,然后加入2.5 μ L Lipofectamine[®] 3000转染试剂,轻轻混匀,将两个1.5 mL的离心管中的液体混匀在一起,室温放置10 min;从CO₂培养箱中取出细胞板,把液体混合物轻轻加入到含细胞培养基的细胞当中,放入CO₂培养箱继续培养。同时设未转染的PK-15细胞对照。

[0023] 2.3 sRNase L KO-PK细胞系的筛选

转染24小时后,将12孔板中换成含有5 μ g/mL的嘌呤霉素培养基筛选细胞。筛选到第4天时,对照未转染的PK-15细胞全部死亡,转染Px459M-sRNase L-KO的PK-15细胞出现存活的抗性细胞克隆。将抗性细胞换成含10%胎牛血清的DMEM培养基继续培养,挑取细胞克隆,采用有限稀释法稀释细胞,接种96孔细胞培养板,使得每个孔细胞数量约为1个,于含5% CO₂、37 °C的培养箱中培养,长满单层后,将96孔板中每个孔的细胞扩大培养至24孔板中,当24孔板中的细胞长满后,消化细胞,从每个孔中取出50%的细胞进行鉴定,剩余的细胞继续培养。鉴定为阳性的细胞系扩大培养,命名为sRNase L KO-PK细胞系。

[0024] 实施例3:sRNase L KO-PK细胞系的鉴定

3.1 PCR鉴定

将从24孔板中取出的细胞和作为对照的PK-15细胞提取RNA并反转录成cDNA,以反转录的cDNA为模板,使用扩增猪RNase L基因序列的引物进行PCR扩增,引物序列如下:

sRNase L-Fwd: 5' -ATGGAGACCAAGCGCCATAACAAC-3'

sRNase L-Rev: 5' -CTAGGTCTGGCCATCACCAGCTC-3'

PCR反应体系为25 μ L,含cDNA 1 μ L, dNTP 200 μ mol/L,10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, sRNase L-Fwd和sRNase L-Rev各400 nmol/L, TaKaRa TaqTM 0.25 U.反应条件为:预变性95 $^{\circ}$ C 5 min;然后进行35个循环,循环条件为95 $^{\circ}$ C 45 s,60 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 2 min;然后72 $^{\circ}$ C延伸10 min,PCR产物进行1%的琼脂糖凝胶电泳,结果见图6,筛选到的sRNase L KO-PK细胞电泳条带在1392 bp,而对照PK-15细胞的电泳条带在2232 bp。

[0025] 3.2 基因测序鉴定

将上述步骤中电泳大小在1392 bp的条带进行胶回收,回收产物交由生工公司测序,测序结果见图7,核苷酸序列见序列表中序列2.对比RNase L基因序列,发现在399-1238 bp之间出现了碱基缺失。

[0026] 实施例4:sRNase L KO-PK细胞系的应用

4.1 sRNase L降解核糖体RNA的研究

消化sRNase L KO-PK和PK-15细胞,在12孔板上每孔接种1 mL,细胞长满单层后,按Lipofectamine[®] 3000 (Invitrogen)说明书中转染RNA的方法进行,在灭菌的1.5 mL的离心管中先加入37 $^{\circ}$ C预热的OPTI-MEM无血清培养基50 μ L,然后加入2 μ g的poly (I: C),轻轻混匀;在另一个灭菌的1.5 mL的离心管中先加入37 $^{\circ}$ C预热的OPTI-MEM无血清培养基50 μ L,然后加入2.5 μ L Lipofectamine[®] 3000转染试剂,轻轻混匀,将两个1.5 mL的离心管中的液体混匀在一起,室温放置10 min,把液体混合物轻轻加入到12孔板中含培养基的细胞当中,放入CO₂培养箱继续培养,7 h以后,用TRIzol试剂提取总RNA,进行1%的琼脂糖凝胶电泳,结果如图8,可以发现PK-15细胞的RNA在28 S和18 S之间以及18 S和5.8 S之间有明显的降解条带出现,而sRNase L KO-PK的RNA没有任何降解条带出现,对比RNA电泳的结果证明sRNase L KO-PK可以应用于sRNase L基因功能的相关研究。

[0027] 4.2 sRNase L抗病毒作用研究

将sRNase L KO-PK和PK-15细胞铺到12孔板上,同时感染1个MOI的猪伪狂犬病毒(PRV),分别于12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h收取上清液100 μ L,在PK-15细胞上测定每个时间点收集病毒上清液的TCID₅₀,结果见图9,发现PRV在sRNase L KO-PK细胞比PK-15细胞上具有更强的增殖能力,所以sRNase L KO-PK细胞系可以应用于sRNase L抗病毒方面的相关研究。

[0028] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受实施例的限制,其它任何未背离本发明的精神实质与原理下所做的改变、修饰、组合、替代、简化均应为等效替换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

序列表

<110> 基因敲除质粒、细胞系及制备方法和应用

<120> 杜以军, 山东省农业科学院畜牧兽医研究所

<160> 2

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 567

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 1

```

ggacgaaaca cttcatgga agccgccgtg tagttttaga gctagaaata gcaagttaa 60
ataaggctag tccgttatca acttgaaaa gtggcaccga gtcggtgctt ttttgtttta 120
gagctagaaa tagcaagta aaataaggct agtccgtttt tagcgcgtgc gccaatctg 180
cagacaaatg gctctagagt cgacactagt ctcgaggagg gcctatttcc catgattcct 240
tcatatttgc atatacgata caaggctggt agagagataa ttggaattaa tttgactgta 300
aacacaaaga tattagtaca aaatacgtga cgtagaaagt aataatttct tgggtagttt 360
gcagttttta aattatgttt taaaatggac tatcatatgc ttaccgtaac ttgaaagtat 420
ttcgatttct tggctttata tatcttgtgg aaaggacgaa acaccagcc gagccaacga 480
taacggtttt agagctagaa atagcaagtt aaaataaggc tagtccgta tcaacttgaa 540
aaagtggcac cgagtcggtg ctttttt 567

```

<210> 2

<211> 1392

<212> DNA

<213> PCR

<400> 2

```

atggagacca agcgccataa caaccctcag gaaacacca caccctctag tgatgggggg 60
gcttccttgg aagaaatgtt gactcaagct gttcaagaag cagacattga gcaggtccgg 120
caattgctag aaagaggggc tgatgccaat ttccaggaag agaatgggg ctggtcacct 180
ttgcatagtg cagtgcaaat ggacagtgag gaccttgtgg ctcttctgct gaagcatggc 240
gccgaccctt gtctgcggaa gaggaatggg gccactcct tcatcatcgc tggcatcacc 300
gggaacgtga ggctgctcca actcttactt ctaacgtgg aagatgtgaa cgagtgtgat 360
gttaatggct tcacagcttt catggaagcc gccgtgtata acgtggtgac gttctatggc 420
agtgagagcg acgggagctg tctgcatgtg tgctctcgc tgtgtgagta cacgctgcag 480
gagcacttgg ccaaccaccg aggggacgct gtgccaaacg aggaggatga gtctgcccga 540
aacatcctct cgtctctgtt taaagetatt ggagaactec atcgtctctg atactctcac 600
caggatctgc agccacaaaa catcttaata gattccaaga atggtacttt cctggcagat 660
tttgataaaa gcatcaaatg ggctgaagat ccacagaaaa tcaaaagaga tctagaggcc 720
ctaggattgc tggctctcta tgtggtaaaa aaggagaca tttcttttga gacctgaag 780

```

aatcaaagtt ttgaagaggt gattcaaggc tctccagatg aggagactcg ggacctcatt 840
catcacctgt tccaccagg ggacaatgtg gaggaccgtc tgagcagcct gctggctcat 900
cccttctttt ggagctggga gagccgttac aggaccctta gggacgtggg aaatgaatct 960
gacatcaaaa cgcgaaatca aaacagcaga atcctccagc tactgcaacc tggaacatct 1020
gaactttcta ctagttttgc ccagtggaca actaagattg acagctttgt tatggaagag 1080
atgaatgcat attataaaaa aataagcaaa aaaaagaagg caaacatac aaatgaaggc 1140
aatctctatc aggatacttt gggatgattg ctgaaattca tccggaactt gggagaacac 1200
atcaatgaac aaaagaataa aaagatgaag tcgataattg gagaaccttc tcagtatttt 1260
caggagaaat ttcccgatct ggtcatgtat gtctacacga aactacagaa cacagaatat 1320
atgaagcatt ttcccaaac tcacaatcca aacaagctga ggtgtgatgg agctggtgat 1380
ggccagacct ag 1392

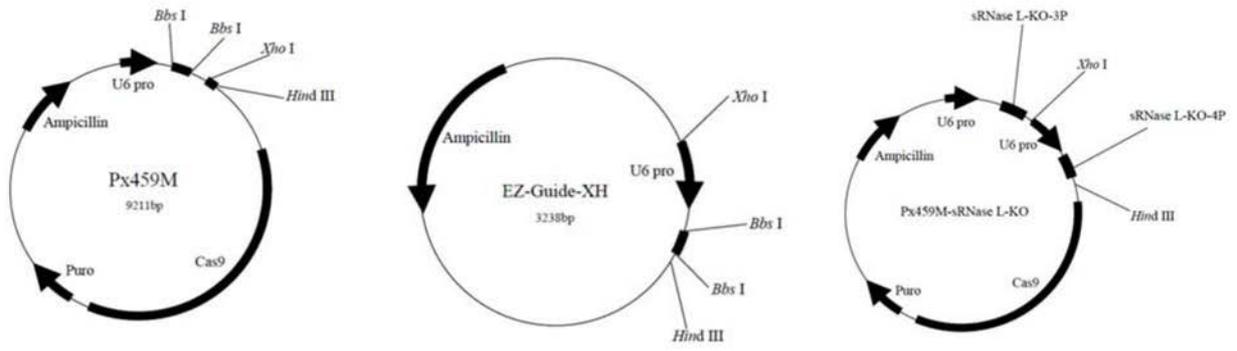


图1

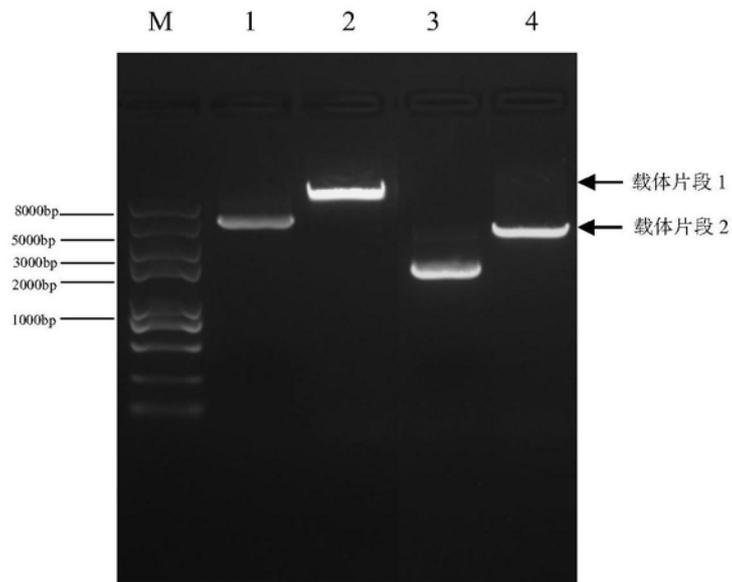


图2

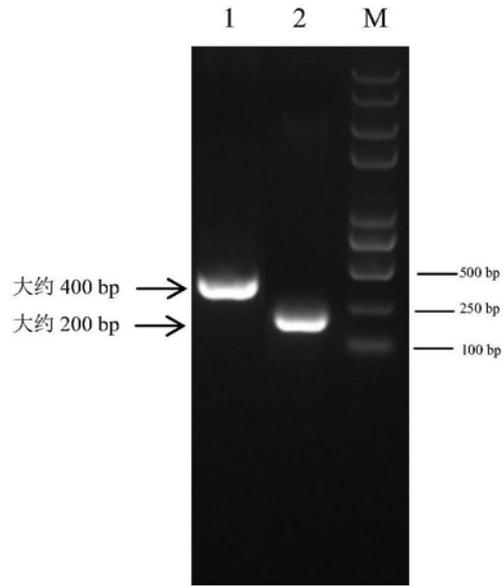


图3

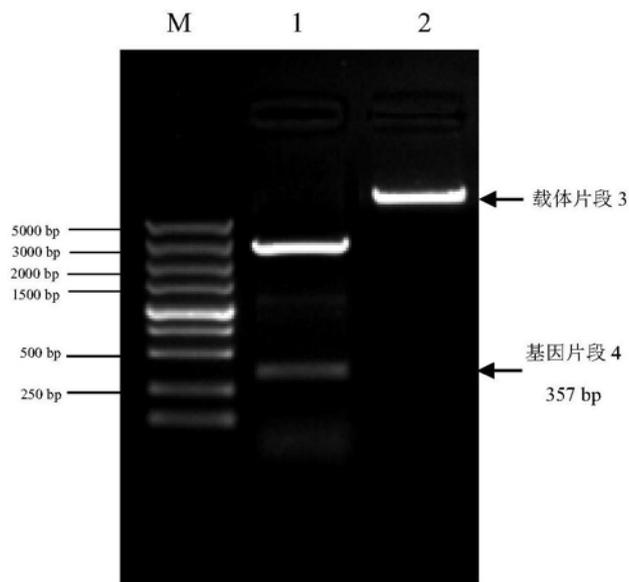


图4

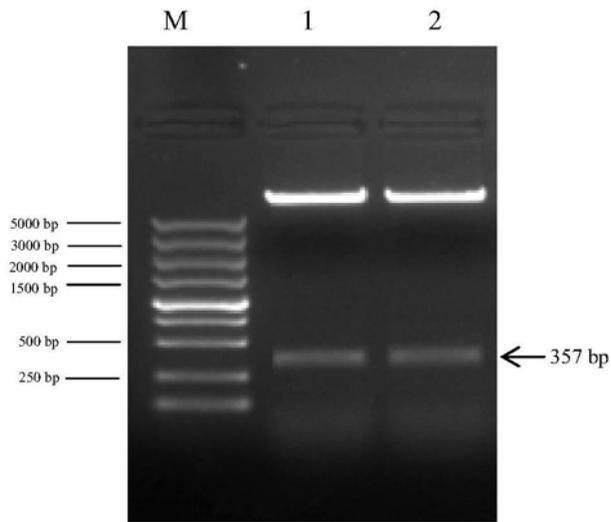


图5

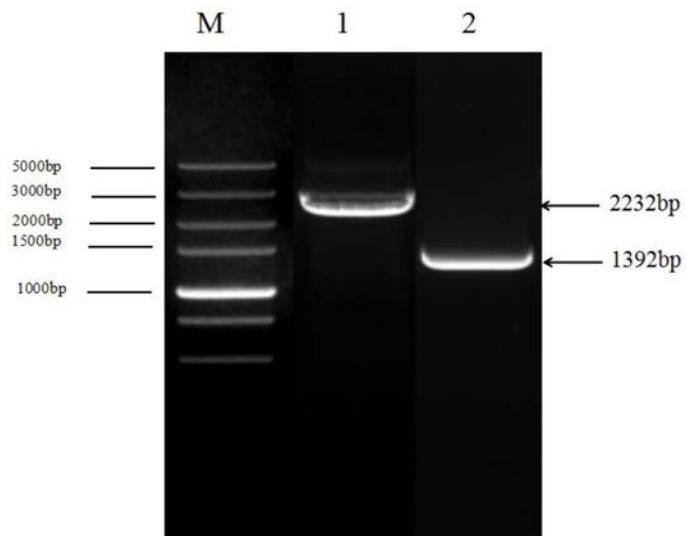


图6

```

360          370          380          390          400          410          420
351 CGAGTGTGATGTTAATGGCTTCACAGCTTTCAITGGAAAGCCGCCGTGTACGGTAGAGTCAAGCCCTTAAAG sRNase L WT.seq
324 CGAGTGTGATGTTAATGGCTTCACAGCTTTCAITGGAAAGCCGCCGTGTAT----- sRNase L knockout.seq
      TCCCTGTATAGAAATGGAGCAGACGTTGAAACATGCATCGAAAGACAAAAGCAGGATCAAGAGAGGATTCCGA Majority
      430          440          450          460          470          480          490
421 TTCCCTGTATAGAAATGGAGCAGACGTTGAAACATGCATCGAAAGACAAAAGCAGGATCAAGAGAGGATTCCGA sRNase L WT.seq
372 ----- sRNase L knockout.seq
      AAGGAGGGGGCCACCCGCCCTCATGGATGCTCTGAAAAGGGGCATGTGGGTGTTCGTGACGATCCTCCTCCA Majority
      500          510          520          530          540          550          560
491 AAGGAGGGGGCCACCCGCCCTCATGGATGCTCTGAAAAGGGGCATGTGGGTGTTCGTGACGATCCTCCTCCA sRNase L WT.seq
372 ----- sRNase L knockout.seq
      CCGCATGAAGGCAGAGGTTCCATGCCCGTGAACAACATGGGCGAAGAAATGCTTTGGTCTATGCTCTTCTCAA Majority
      570          580          590          600          610          620          630
561 CCGCATGAAGGCAGAGGTTCCATGCCCGTGAACAACATGGGCGAAGAAATGCTTTGGTCTATGCTCTTCTCAA sRNase L WT.seq
372 ----- sRNase L knockout.seq
      CCCGACGATGGGAAGGCAGAGGCCATCACTCCCTCCTCTGGACCACGGGGCCGATGTCATATGTGAGGG Majority
      640          650          660          670          680          690          700
631 CCCGACGATGGGAAGGCAGAGGCCATCACTCCCTCCTCTGGACCACGGGGCCGATGTCATATGTGAGGG sRNase L WT.seq
372 ----- sRNase L knockout.seq
      GGGAAAGGAAGTAAGACGCCCTTGATCCTGGCAGTGGAAAAGGAAGAATCTGGATTGGTGCAGATGCTTC Majority
      710          720          730          740          750          760          770
701 GGGAAAGGAAGTAAGACGCCCTTGATCCTGGCAGTGGAAAAGGAAGAATCTGGATTGGTGCAGATGCTTC sRNase L WT.seq
372 ----- sRNase L knockout.seq
      GGAACAAGAAACAGATAGAAAGTGAATGACACAGACAGAGAGGGGCAAGACGGCCCTGCTGCTTGGCTGTCAA Majority
      780          790          800          810          820          830          840
771 GGAACAAGAAACAGATAGAAAGTGAATGACACAGACAGAGAGGGGCAAGACGGCCCTGCTGCTTGGCTGTCAA sRNase L WT.seq
372 ----- sRNase L knockout.seq
      CTCAGACTAGAGGAAATCGCCAAAGCTGCTGTGCCACAGAGGGGCCAGGCACAAATTGCGGGGACCTTGTGG Majority
      850          860          870          880          890          900          910
841 CTCAGACTAGAGGAAATCGCCAAAGCTGCTGTGCCACAGAGGGGCCAGGCACAAATTGCGGGGACCTTGTGG sRNase L WT.seq
372 ----- sRNase L knockout.seq
      CAATAGCGAGACCCCAATTACGACAGTGAACCTTGTGAAGTTCTTCGCCCTTCATAAAGCCGGAGAGATT Majority
      920          930          940          950          960          970          980
911 CAATAGCGAGACCCCAATTACGACAGTGAACCTTGTGAAGTTCTTCGCCCTTCATAAAGCCGGAGAGATT sRNase L WT.seq
372 ----- sRNase L knockout.seq
      TCGCCCTCCTTCTGAAAACCTGGAAGCCCTCAAGCTCACGCTGGGGGGGAGCGCCCTGAAAACATCTGCAACAG Majority
      990          1000          1010          1020          1030          1040          1050
981 TCGCCCTCCTTCTGAAAACCTGGAAGCCCTCAAGCTCACGCTGGGGGGGAGCGCCCTGAAAACCTCTGCACAG sRNase L WT.seq
372 ----- sRNase L knockout.seq
      ATATGGCGCCCATGATTGGCAAACTCAAAGATCTTCAATTGACGAAGAGTATAAAAATTGGGACACTGCTG Majority
      1060          1070          1080          1090          1100          1110          1120
1051 ATATGGCGCCCATGATTGGCAAACTCAAAGATCTTCAATTGACGAAGAGTATAAAAATTGGGACACTGCTG sRNase L WT.seq
372 ----- sRNase L knockout.seq
      AAGGGGGCATCTACCTGGGGCTCTATGAAAGACCAAGAGGTTGGCTGTGAAAGCGGTTCAAGTGAAGGCAGSCA Majority
      1130          1140          1150          1160          1170          1180          1190
1121 AAGGGGGCATCTACCTGGGGCTCTATGAAAGACCAAGAGGTTGGCTGTGAAAGCGGTTCAAGTGAAGGCAGSCA sRNase L WT.seq
372 ----- sRNase L knockout.seq
      ACGGGGACAAACAGGAAGTCTCTTGCCTGCAAGACAGCCGACCAACGATAAAGTGGTGAAGTTCTATAGGC Majority
      1200          1210          1220          1230          1240          1250          1260
1191 ACGGGGACAAACAGGAAGTCTCTTGCCTGCAAGACAGCCGACCAACGATAAAGTGGTGAAGTTCTATAGGC sRNase L WT.seq
372 ----- sRNase L knockout.seq
  
```

图7

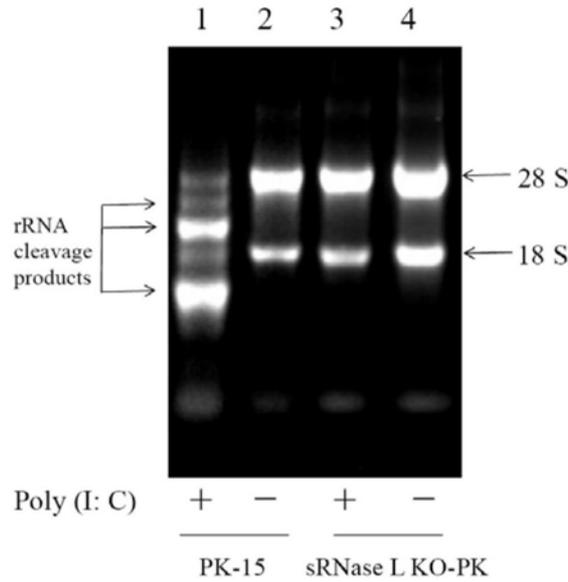


图8

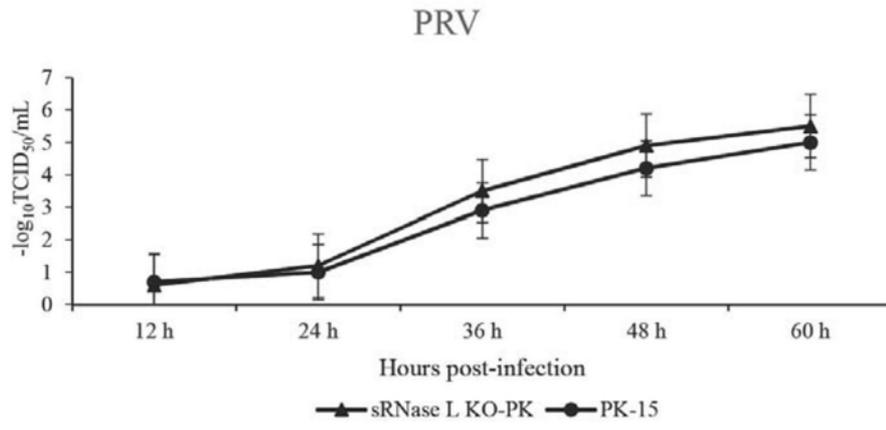


图9