



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111321171 A

(43)申请公布日 2020.06.23

(21)申请号 201811535721.7

A01K 67/027(2006.01)

(22)申请日 2018.12.14

(71)申请人 江苏集萃药康生物科技有限公司

地址 210032 江苏省南京市浦口区江北新区生物医药谷产业区内加速器三期A01栋

(72)发明人 琚存祥 赵静 张明坤 吴丹

侯欢欢 高翔

(74)专利代理机构 南京艾普利德知识产权代理

事务所(特殊普通合伙)

32297

代理人 张铂

(51)Int.Cl.

C12N 15/90(2006.01)

C12N 9/22(2006.01)

权利要求书2页 说明书18页

序列表34页 附图7页

(54)发明名称

一种应用CRISPR/Cas9介导ES打靶技术制备基因打靶动物模型的方法

(57)摘要

本发明公开了一种应用CRISPR/Cas9系统基因打靶的方法,通过选择具有DNA单链切割能力的Cas9的突变体,针对每个打靶位点使用一条tracrRNA/crRNA二元复合体或者一条sgRNA,Cas9的突变体识别打靶位点附近的保守的间隔相邻基序,产生DNA单链切口,而不产生DNA双链断裂,诱导单链切口同源重组修复。本发明还提供了利用所述方法介导ES打靶技术制备基因打靶动物模型的方法。本发明降低了基因打靶过程中HMEJ修复带来的插入缺失突变,获得高效打靶阳性克隆。本发明可作为平台技术广泛用于基因打靶动物模型的制备。

1. 一种应用CRISPR/Cas9系统基因打靶的方法,其特征在于基于CRISPR/Cas9系统,选择具有DNA单链切割能力的Cas9的突变体,针对每个打靶位点使用一条tracrRNA/crRNA二元复合体或者一条sgRNA,Cas9的突变体识别打靶位点附近的保守的间隔相邻基序,产生DNA单链切口,而不产生DNA双链断裂,诱导单链切口同源重组修复。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于所述基因打靶包括基因敲除、基因敲入。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于所述Cas9的突变体选自Cas9n D10A和/或H840A。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于针对每个靶基因设计至少2个打靶位点,每个打靶位点的间隔不小于100bp。

5. 一种应用CRISPR/Cas9系统制备基因打靶ES细胞的方法,其特征在于包括如下步骤:

(1) 根据基因打靶的类型和靶基因选择合适的打靶位点,设计同源DNA供体和鉴定方案;

(2) 采用权利要求1-4任一项所述的方法,制备Cas9的突变体或其表达载体,根据靶基因和打靶位点设计并制备sgRNA或者tracrRNA/crRNA二元复合体或各自的表达载体;

或者,制备Cas9的突变体、sgRNA或者crRNA和tracrRNA的共表达载体;

(3) 将步骤(1)制备得到的Cas9的突变体、sgRNA或者tracrRNA/crRNA二元复合体,或者各自的表达载体或共表达载体转染入ES细胞,根据基因打靶的类型选择同时转染同源DNA模板使打靶位点发生碱基删除或将外源DNA插入到基因组;

(4) 提取ES细胞DNA进行PCR鉴定和/或Southern Blot检测与核型鉴定,鉴定通过的克隆即为基因打靶阳性ES细胞。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于所述步骤(2)还包括进一步检测制得的sgRNA或者crRNA和tracrRNA二元复合体的切割效率。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于所述检测包括核酸内切酶检测法、SSA报告载体检测法、Sanger测序法、Digenome-Seq技术。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于所述核酸内切酶选自SURVEYOR酶、T7EN1酶。

9. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于将野生型Cas9蛋白、sgRNA或者tracrRNA/crRNA二元复合体,或者各自的表达载体或共表达载体转染ES细胞,提取细胞基因组并用特异引物扩增目标切割区域,对获得的PCR产物进行T7EN1酶切,酶切后进行电泳检测,检测结果显示比对照组多出一条或多条条带的视为有效切割,或者对获得的PCR产物进行Sanger测序,测序结果比对显示,sgRNA区域出现双峰视为有效切割;筛选出高效sgRNA或crRNA和tracrRNA。

10. 根据权利要求5-9任一项所述的方法,其特征在于所述转染ES细胞的方法包括病毒转染、脂质体转染、电转染。

11. 一种应用CRISPR/Cas9介导ES打靶技术制备基因打靶动物模型的方法,其特征在于采用权利要求5-10任一项所述的方法制备得到基因打靶阳性ES细胞注射到动物囊胚中,将囊胚分别移植到代孕母体中,进行饲养,生产出的后代即为F0代嵌合体动物,F0代性成熟后与同背景野生型动物配繁获得F1代,通过基因鉴定的阳性F1代动物即为基因打靶动物模型。

12. 根据权利要求11所述的方法,其特征在于基因打靶动物模型为哺乳动物。

13. 根据权利要求12所述的方法,其特征在于基因打靶动物模型选自小鼠或大鼠。

14. 根据权利要求11所述的方法,其特征在于基因打靶动物模型为KO、CKO、KI、KO first、TM小鼠模型。

15. 根据权利要求14所述的方法,其特征在于基因打靶动物模型为PRKAA1-KI、CD27-KI、ANXA8-CKO动物模型。

16. 一种提高基于CRISPR/Cas9系统介导ES打靶阳性克隆筛选效率的方法,其特征在于利用CRISPR/Cas9系统,选择具有DNA单链切割能力的Cas9的突变体,针对每个打靶位点使用一条tracrRNA/crRNA二元复合体或者一条sgRNA,Cas9的突变体识别打靶位点附近的保守的间隔相邻基序,产生DNA单链切口,而不产生双链断裂,诱导单链切口同源重组修复。

## 一种应用CRISPR/Cas9介导ES打靶技术制备基因打靶动物模型的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于基因编辑技术领域,具体涉及一种应用CRISPR/Cas9介导ES打靶技术制备基因打靶动物模型的方法。

[0002] 研究背景

[0003] 动物模型是研究人类医药和健康必不可缺的工具,它们在生命活动中的生理和病理过程,与人类都有很多相似之处,可以作为人类研究的参照物。通过不同的基因编辑方法,可以获得基因修饰的动物模型,从而研究相关疾病的发生与治疗等。

[0004] 基因编辑是通过对细胞基因组中目的基因的一段核苷酸序列甚至是单个核苷酸进行替换、切除,增加或者是插入外源的DNA序列,使之产生可遗传的改变。与射线或化学诱变剂导致的DNA随机突变不同的是,基因编辑技术是定向改变基因的组成和结构,具有高效、可控和定向操作的特点。因此,基因编辑技术被麻省理工科技评论评为2014年十大突破性科学技术,其中CRISPR获得了2015年度生命科学突破奖。

[0005] 在细胞内DNA分子单链断裂或缺失后容易被细胞内的各种修复机制所修复而不产生任何改变,但DNA双链断裂的结果则有很大的不同。细胞内DNA双链断裂的修复主要有两种方式,即同源重组修复(Homology directed repair,HDR)和非同源末端链接修复(Non-Homologous End Join,NHEJ)。当DNA发生双链断裂后,如果细胞内存在与裂口两端同源的序列,则进行同源重组修复,外源DNA片段可借此插入断裂序列中对原来的基因进行敲除或将外源基因插入基因组DNA而形成所谓的基因敲入;若细胞内无同源序列存在,双链断裂的DNA分子则通过NHEJ连接,由于无模板可以利用,这种“硬”连接容易导致碱基的缺失、增加或改变而引起突变。DNA双链断裂对基因组而言是严重的伤害,但这种变化正是研究基因功能所需要的。

[0006] 传统ES细胞(胚胎干细胞)打靶,是借助同源重组与胚胎干细胞等技术基础上的分子生物学技术。尽管同源重组介导的基因打靶可高度精确的改变同源序列,但目的基因的重组效率却非常低下,给大规模应用基因打靶实验带来了巨大的挑战。

[0007] 近年来,对于CRISPR/Cas9技术的研究与应用,为优化基因打靶技术提供了新的思路。CRISPR/Cas9是细菌和古细菌为应对病毒和质粒不断攻击而演化来的获得性免疫防御机制。在这一系统中,crRNA(CRISPR-derived RNA)通过碱基配对与tracrRNA(trans-activating RNA)结合形成双链RNA,此tracrRNA/crRNA二元复合体指导Cas9蛋白在crRNA引导序列靶定位点切断双链DNA。在基因组编辑过程中,tracrRNA和crRNA可以融合成为1条单导向核苷酸(single guide RNA,sg RNA)表达同样可以起到靶向剪切的作用,细胞通过对断裂的双链进行修复,从而实现基因组的精确编辑。但双链的断裂会在相关位点引入不容忽视的脱靶突变,给临床应用带来风险。Cas9是通过两个核酸酶结构域RuvC和HNH来产生双链断裂,将这两个关键结构与中的一个残基转换成丙氨酸(D10A或H840A),就形成了产生单链切口的核酸酶Cas9nickase(Cas9n)。Cas9n需要通过一对sgRNA引导来实现靶向双链切割,降低脱靶效应。

[0008] 然而在利用Cas9蛋白介导ES打靶技术进行基因改造时,不论是WT Cas9还是Cas9n蛋白,由于引入双链断裂,会造成基因组的HMEJ修复,导致鉴定基因型时出现非目的条带,干扰阳性条带判断,不利于挑选阳性克隆用于注射遗传。

[0009] 此外,同源重组是否能够高效发生受多因素影响,Thomas等(Thomas KR,Capecci MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells.Cell,1987,51(3): 503-12)发现当同源序列的长度由4kb增加到9kb时,其同源重组效率可以增加10倍。但同源序列过长会增加PCR方法鉴定的难度,权衡打靶效率和PCR鉴定难度,目前过长的同源序列,尚无很好的方法解决PCR鉴定的难题。

## 发明内容

[0010] 本发明针对现有技术不足,利用Cas9突变体产生DNA单链断裂的特性,针对每个打靶位点使用一条tracrRNA/crRNA二元复合体或者一条gRNA产生DNA单链切口,而不产生DNA双链断裂,诱导单链切口同源重组修复,降低HMEJ修复带来的插入缺失突变。进一步的,本发明将CRISPR/Cas9基因编辑技术与传统ES打靶结合,先用ES细胞(胚胎干细胞)进行sgRNA切割效率的测试,筛选出高效率的sgRNA。然后在ES打靶过程中添加Cas9突变体蛋白和筛选出的靶向重组位点的高效sgRNA,可明显提高中靶效率。

[0011] 本发明具体技术方案如下:

[0012] 一种应用CRISPR/Cas9系统基因打靶的方法,基于CRISPR/Cas9系统,选择具有DNA单链切割能力的Cas9的突变体,针对每个打靶位点使用一条tracrRNA/crRNA二元复合体或者一条sgRNA,Cas9的突变体识别打靶位点附近的保守的间隔相邻基序,产生DNA单链切口,而不产生DNA双链断裂,诱导单链切口同源重组修复。

[0013] 本发明所述方法中基因打靶的类型包括基因敲除、基因敲入。

[0014] 本发明所述方法中Cas9的突变体优选为Cas9n D10A和/或H840A。

[0015] 进一步的,本发明所述方法可以针对每个靶基因设计至少2个打靶位点以提高打靶效率或同时进行多个基因打靶,每个打靶位点的间隔不小于100bp,保证相邻的DNA单链切口间隔足够的距离而不产生双链断裂。

[0016] 本发明的另一目的在于提供一种应用CRISPR/Cas9系统制备基因打靶ES细胞的方法,包括如下步骤:

[0017] (1) 根据基因打靶的类型和靶基因选择合适的打靶位点,设计同源DNA供体和鉴定方案;

[0018] (2) 采用本发明所述应用CRISPR/Cas9系统基因打靶的方法,制备Cas9的突变体或其表达载体,根据靶基因和打靶位点设计并制备sgRNA或者tracrRNA/crRNA二元复合体或各自的表达载体;

[0019] 或者,制备Cas9的突变体、sgRNA或者crRNA和tracrRNA的共表达载体;

[0020] (3) 将步骤(1)制备得到的Cas9的突变体、sgRNA或者tracrRNA/crRNA二元复合体,或者各自的表达载体或共表达载体转染入ES细胞,可根据基因打靶的类型选择无同源DNA模板使打靶位点发生碱基插入或删除,或者同时转染同源供体DNA将外源DNA插入到基因组;

[0021] (4) 提取ES细胞DNA进行PCR鉴定和/或Southern Blot检测与核型鉴定,鉴定通过

的克隆即为基因打靶阳性ES细胞。

[0022] 本发明可以直接制备Cas9的突变体、sgRNA或者tracrRNA/crRNA二元复合体转染入ES细胞,也可制备各自的表达载体或共表达载体染入ES细胞,优选直接制备Cas9的突变体、sgRNA或者tracrRNA/crRNA二元复合体转染入ES细胞,可以避免表达载体或共表达载体染入ES细胞后的表达效率问题。

[0023] 上述方法,优选的,所述步骤(2)还包括进一步检测制得的sgRNA或者crRNA和tracrRNA二元复合体的切割效率和脱靶效应。所述检测包括核酸内切酶检测法、SSA报告载体检测法、Sanger测序法、Digenome-Seq技术。优选核酸内切酶检测法,所述核酸内切酶选自SURVEYOR酶、T7EN1酶。

[0024] 本发明一个具体的实施方式,将野生型Cas9、sgRNA或者tracrRNA/crRNA二元复合体,或者各自的表达载体或共表达载体转染ES细胞,提取细胞基因组并用特异引物扩增目标切割区域,对获得的PCR产物进行进行T7EN1酶切,酶切后进行电泳检测,检测结果显示比对照组多出一条或多条条带的视为有效切割;或者,对获得的PCR产物进行Sanger测序,测序结果比对显示,sgRNA区域出现双峰视为有效切割;筛选出高效sgRNA或crRNA和tracrRNA。

[0025] 本发明所述方法,转染ES细胞的方法包括病毒转染、脂质体转染、电转染。

[0026] 本发明的另一目的在于提供一种应用CRISPR/Cas9介导ES打靶技术制备基因打靶动物模型的方法,将本发明所述应用CRISPR/Cas9系统制备基因打靶ES细胞的方法制备得到的基因打靶阳性ES细胞注射到动物囊胚中,将囊胚分别移植到代孕母体中,进行饲养,生产出的后代即为F0代基因打靶动物模型。优选的,本发明所述基因打靶动物模型为哺乳动物,优选小鼠或大鼠。优选的,本发明所述基因打靶动物模型为KO、cKO、KI、KO first、TM小鼠模型。

[0027] 本发明所述方法适用于所有基因的敲入或敲除。本发明中具体列举的打靶动物模型为 PRKAA1-KI、CD27-KI、ANXA8-CKO小鼠模型。

[0028] 本发明的另一目的在于提供一种提高基于CRISPR/Cas9系统介导ES打靶阳性克隆筛选效率的方法,利用CRISPR/Cas9系统,选择具有DNA单链切割能力的Cas9的突变体,针对每个打靶位点使用一条tracrRNA/crRNA二元复合体或者一条sgRNA,Cas9的突变体识别打靶位点附近的保守的间隔相邻基序,产生DNA单链切口,而不产生双链断裂,诱导单链切口同源重组修复。

[0029] 本发明所述的野生型Cas9和突变体Cas9n或其表达载体可参考现有技术制备而成(Cong,Le,et al."Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems." Science (2013): 1231143.)也可委托商业公司制备得到。sgRNA或者tracrRNA/crRNA设计并制备针对改造位点的sgRNA可使用Cas9sgRNA设计网站,根据打靶基因和打靶位点设计sgRNA,例如使用网站<http://crispr.mit.edu/>分析sgRNA特异性。选择得分60分以上的sgRNA,评分越高,说明sgRNA特异性越高,相应的脱靶效应越小。

[0030] 可参考现有技术构建sgRNA转录载体或委托商业公司制备。

[0031] 具体的操作如下:

[0032] 1) sgRNA引物设计;

[0033] 将sgRNA序列作为正向引物订购,sgRNA序列反向互补序列作为反向引物订购。

- [0034] 2) 构建sgRNA转录载体;
- [0035] 将正反向引物退火形成双链,在与BsaI单酶切的pUC57-T7载体连接,构建得到含有 sgRNA序列的转录载体。
- [0036] 3) 通过PCR扩增制备体外转录模板;
- [0037] 以PrimerStar Max体系,sgRNA-F、sgRNA-R为引物,序列正确的pUC57-sgRNA质粒为模板进行PCR,95°C 5min,95°C 30s,58°C 30s,72°C 40s,72°C 5min,30个循环。程序结束后进行琼脂糖凝胶电泳,切目的条带进行胶回收,回收获得的终产物为转录模板。
- [0038] 4) 使用转录模板进行体外转录并纯化。
- [0039] 试剂I:HiScribe™ T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit (NEB#E2050S);
- [0040] 试剂II:Ambion MEGAclean kit (Ambion AM1908);
- [0041] 按HiScribe™ T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit (NEB#E2050S)的操作手册进行 RNA体外转录,按Ambion MEGAclean kit (Ambion AM1908)的操作手册进行RNA纯化。回收获得的RNA通过紫外分光光度计测浓度,并取1μl RNA样品加入9μl 1×Loading buffer,进行琼脂糖凝胶电泳。其余RNA样品-80°C保存。
- [0042] 本发明优点:
- [0043] (1) 本发明利用Cas9突变体产生DNA单链断裂的特性,针对每个打靶位点使用一条 tracrRNA/crRNA二元复合体或者一条sgRNA产生DNA单链切口,而不产生DNA双链断裂,诱导单链切口同源重组修复,降低HMEJ修复带来的插入缺失突变。
- [0044] (2) 本发明将CRISPR/Cas9基因编辑技术与传统ES打靶结合,先用ES细胞(胚胎干细胞)进行sgRNA切割效率的测试,筛选出高效率的sgRNA。然后在ES打靶过程中添加 Cas9突变体蛋白和筛选出的靶向重组位点的高效sgRNA,可明显提高中靶效率。
- [0045] (3) 本发明利用CRISPR/Cas9介导ES打靶的基因编辑技术,以体外表达获得的蛋白和通过ES细胞筛选获得的高效sgRNA组合,实现基因组多位点打靶,对靶基因上的多个位点实行剪切,在不增加同源臂长度的同时,提高打靶效率,实现基因组改造的目的,可作为平台技术广泛用于基因打靶动物模型的制备。

## 附图说明

- [0046] 图1. 实施例1sgRNA切割T7EN1酶切比对图。
- [0047] 图2. 实施例1WT Cas9介导ES打靶PCR检测中靶克隆图。
- [0048] 图3. 实施例1Cas9n D10A介导ES打靶PCR检测中靶克隆图。
- [0049] 图4. 实施例1WT或D10A Cas9介导ES打靶Southern检测中靶克隆图。
- [0050] 图5. 实施例2sgRNA切割测序比对图。
- [0051] 图6. 实施例2PCR检测中靶克隆图。
- [0052] 图7. 实施例2Southern检测中靶克隆图。
- [0053] 图8. 实施例2小鼠基因型检测图。
- [0054] 图9. 实施例3sgRNA切割测序比对图。
- [0055] 图10. 实施例3PCR检测中靶克隆图。
- [0056] 图11. 实施例3Southern检测中靶克隆图。
- [0057] 图12. 实施例3小鼠基因型检测图。

## 具体实施方式

[0058] 以下通过实施例说明本发明的具体步骤,但不受实施例限制。

[0059] 在本发明中所使用的术语,除非另有说明,一般具有本领域普通技术人员通常理解的含义。下面结合具体实施例并参照数据进一步详细描述本发明。应理解,该实施例只是为了举例说明本发明,而非以任何方式限制本发明的范围。

[0060] 在以下实施例中,未详细描述的各种过程和方法是本领域中公知的常规方法。

[0061] 下面结合具体实施例对本发明进一步说明。

[0062] 实施例1Prkaa1-KI ES细胞的制备

[0063] 本发明使用的WT Cas9和Cas9n D10A,购自于苏州强耀生物科技有限公司,检测其核酸酶活性,用于后续实验。

[0064] 一、sgRNA的设计、制备及切割活性检测

[0065] 1. 设计并制备针对目的位点的sgRNA

[0066] 1) 使用Cas9sgRNA设计网站设计针对目的位点的sgRNA

[0067] 使用网站<http://crispr.mit.edu/>分析sgRNA特异性。选择得分60分以上的sgRNA,评分越高,说明sgRNA特异性越高,相应的脱靶效应越小。

[0068] 由于同源DNA供体片段两端各有约5kb大小的同源臂,整体偏度较长,本发明在2个同源臂100bp以内各设计并筛选获得1条可切割的sgRNA。

[0069] sgRNA序列如下:

[0070]

sgRNA名称	序列	PAM
Prkaa1-5S1	gaacacuagugcacuuaucc (SEQ ID NO:1)	CGG
Prkaa1-3S2	uccugaaaugacuucuggug (SEQ ID NO:2)	CGG

[0071] 2) sgRNA引物设计;

[0072] 将sgRNA序列作为正向引物订购,sgRNA序列反向互补序列作为反向引物订购。

[0073] 3) 构建sgRNA转录载体;

[0074] 将正反向引物退火形成双链,再与BsaI单酶切的pUC57-T7载体连接,构建得到含有sgRNA序列的转录载体。

[0075] 4) 通过PCR扩增制备体外转录模板;

[0076] 以PrimerStar Max体系,sgRNA-F、sgRNA-R为引物,序列正确的pUC57-sgRNA质粒为模板进行PCR,95°C 5min,95°C 30s,58°C 30s,72°C 40s,72°C 5min,30个循环。

[0077] 程序结束后进行琼脂糖凝胶电泳,切目的条带进行胶回收,回收获得的终产物为转录模板。

[0078] 2. 使用转录模板进行体外转录并纯化

[0079] 试剂I:HiScribe™ T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit (NEB#E2050S)

[0080] 试剂II:Ambion MEGAclear kit (Ambion AM1908)

[0081] 按HiScribe™ T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit (NEB#E2050S)的操作手册进行RNA体外转录,按Ambion MEGAclear kit (Ambion AM1908)的操作手册进行RNA纯化。

[0082] 回收获得的RNA通过紫外分光光度计测浓度,并取1μl RNA样品加入9μl 1×



Loading buffer,进行琼脂糖凝胶电泳。其余RNA样品-80℃保存。

[0083] 3.将sgRNA与WT Cas9蛋白通过电转方式进入小鼠ES细胞中

[0084] 1) 准备ES细胞:复苏液氮中冻存的ES细胞,通过传代进行扩增,电转前一天计数传代,每个10cm dish接种 $5 \times 10^6$ 细胞量。

[0085] 2) 电转样品准备:在电转当天下午14:00,在无RNA条件下,根据电转要求,将Cas9与sgRNA混合,作为电转样品。

[0086] 3) 细胞电转:前一天接种的细胞消化终止后,取 $1 \times 10^6$ 细胞,离心1000rpm 5min,负压吸去上清。用100 $\mu$ l电转buffer重悬后,加入混好的电转样品,混匀后转入电激杯中。电转后,向电激杯中加入500 $\mu$ lES-DMEM,转入铺有明胶的6孔板中。

[0087] 4) 48h后,收细胞,提DNA鉴定切割效果。

[0088] 4. 基因鉴定获得高切割效率sgRNA。

[0089] PCR体系按表1进行加样,PCR引物见表2,PCR程序见表3。PCR产物通过T7EN1酶切,酶切结果如图1所示。图1中左图为5端同源臂内测sgRNA切割比对图,右图为3端同源臂内测sgRNA切割比对图,图中显示T7EN1酶切后出现2条带,说明5端同源臂内测sgRNA和3端同源臂内测sgRNA可切割目的基因组。

[0090] 表1:

适于引物序号: 1, 2		
试剂	体积 ( $\mu$ l)	规格
10X Buffer	2.5	
ddH <sub>2</sub> O	16.75	
Primer	1	10 $\mu$ M
Primer	1	10 $\mu$ M
Mg <sup>2+</sup>	2	25mM
dNTPs	0.5	10mM each
Taq	0.25	5U/ $\mu$ l
Template	1	$\approx$ 100ng/ $\mu$ l

[0092] 表2:

[0093]

编号	引物名称	引物序列	TM	GC%	条带大小	引物说明
1	2628-PRKAA1-5S-intF1	acttttacctgctgagccta (SEQ ID NO:3)	54.3	45.0	Wt=440bp	5'in
	2628-PRKAA1-5S-intR1	gtgtatgtgctaagctagtggg (SEQ ID NO:4)	58.3	45.5		
2	2628-PRKAA1-3S-intF1	gaactctgactggcacttttg (SEQ ID NO:5)	57.8	41.7	Wt=247bp	3'in
	2628-PRKAA1-3S-intR1	ggccaatgtgtacttttatgtc (SEQ ID NO:6)	55.5	39.1		

[0094] 注:1和2引物分别为包含5端sgRNA和3端sgRNA位置的扩增引物。

[0095] 表3:

降落 PCR 程序 (touch down)				
适用引物序号 1, 2				
Seg.	Temp.	Time	Cycle	±Temp/cycle
1	95°C	5min		
2	98°C	30s		
3	65°C	30s		-0.5
4	72°C	45s	2-4,20×	
5	98°C	30s		
6	55°C	30s		
7	72°C	45s	5-7,20×	
8	72°C	5min		
9	10°C	hold		

[0096] 二、利用Cas9 D10A介导ES打靶技术,筛选获得阳性ES克隆(同时使用WT Cas9介导ES打靶作为对照)

[0098] i. 电转前一天铺制feeder细胞于6cm dish中。

[0099] ii. 实验当天提前将所需的ES-DMEM、ES-0、胰酶放入37度水浴锅中预热。打开电转仪,根据细胞系设置好参数。

[0100] iii. 用胰酶将细胞消化下来,ES-0中和后收细胞离心,1000rpm5min,用电吸引器软管部分连接已高压灭菌的吸管(吸管事先放入超净台内),负压吸去上清。

[0101] iv. 用Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>free PBS 20ml重悬,计数。取2×10<sup>6</sup>细胞,离心1000rpm 5min,负压吸去上清。

[0102] v. 用100μl电转buffer重悬后,加入混好的Cas9D10A蛋白与sgRNA以及同源DNA供体(序列如SEQ ID NO:7所示,同源DNA供体包含敲入位点同源臂、替换区CDS、抗性筛选原件(G418),混匀后转入电激杯中。

[0103] vi. 电转后,向电激杯中加入500μlES-DMEM,转入铺有feeder细胞的6cm dish中。

[0104] vii. 48h后,更换为含200ug/ml G418的新鲜ES-M+G418。放入二氧化碳培养箱,37°C, 5%CO<sub>2</sub>培养筛选7天。

[0105] viii. 7天后,挑取单克隆至铺有feeder的96孔板中,ES细胞长至80%融合时,以1:3传代,其中一盘用于提DNA,另两盘用于冻存至-80度的冰箱中。

[0106] ix. 96孔板DNA进行PCR鉴定。

[0107] x. 96孔板细胞扩增:PCR阳性的克隆确认后,从-80度的冰箱中将96孔板中取出,酒精喷表面,擦干净酒精,放置到培养箱中,大约30min,期间变动96孔板放置的位置(变动2-3次,未完全融化的96孔板放置一个位置10分钟后,底部温度会变低,这时移动位置可使96孔板底部重新处于37°C以便其快速融化),待冰晶全部化掉后,将细胞全部吸取到24孔板中,每个阳性克隆复苏到一个24孔内,标记清楚。每个克隆经过换液,传代等,扩增至2个10cm dish上,一皿用于冻存,一皿用于提DNA。

[0108] xi. Southern鉴定与核型检测:扩增后的细胞DNA用于southern检测,鉴定通过的克隆即为打靶阳性克隆。

[0109] PCR检测体系及结果:

[0110] PCR体系如表4,PCR引物如表5,PCR程序如表6。

[0111] 表4:

[0112]	适于引物序号: 1,3		
	<b>试剂 (Takara RR02MA)</b>	<b>体积 (μl)</b>	<b>规格</b>
	10X Buffer	2.5	
	ddH <sub>2</sub> O	15.25	
	Primer	1	10mM
	Primer	1	10mM
	Mg <sup>2+</sup>	2	25mM
	dNTPs	2	10mM each
	LA Taq	0.25	5U/μl
	Template	1	

[0113] 表5:

[0114]

序号	引物名称	引物序列	GC %	Tm	条带大小	引物说明
1	100692-PRKAA1-ES-5F1	ggttctcataccgccactgctt (SEQ ID NO:8)	54.5	57.0	KIn=5938bp Wt=none	5'LR-PCR
	100692-PRKAA1(A)-ES-5R1	ggcctgcgtacaatctctctg (SEQ ID NO:9)	57.1	56.7		
2	100692-PRKAA1-ES-3F1	caccagctttctgtacaaagtgg (SEQ ID NO:10)	48.0	58.0	KIn=5828bp Wt=none	3'LR-PCR
	100692-PRKAA1-ES-3R1	gcacagctgccactatcagtcatgc (SEQ ID NO:11)	56.0	61.8		

[0115] 注:5' LR-PCR引物为跨越5端同源序列扩增引物,3' LR-PCR引物为跨越3端同源序列扩增引物。

[0116] 表6:

常规 PCR 程序			
适于引物序号: 1,3			
Seg.	Temp.	Time	Cycle
1	95°C	5min	
2	95°C	30s	
3	62°C	30s	
4	68°C	45s	2-4,40×
5	68°C	5min	
6	10°C	hold	

[0118] WT Cas9介导ES打靶PCR检测中靶克隆结果如图2所示,其中:B6为阴性对照,是 B6基因组DNA;N为空白对照,无模板的对照;P为阳性对照;TRANS 2K条带: 8000bp\5000bp\3000bp\2000bp\1000bp\750bp\500bp\250bp\100bp;A1-H6为不同克隆编号的样品。5' LR-PCR扩增阳性克隆与3' LR-PCR扩增阳性克隆编号吻合即为正确重组的阳性克隆。从A1-H6编号的48个克隆中得到阳性克隆:E1,H2,E3,H3,H4,E6;阳性率: 6/48=12.5%其余为野生型或阴性。

[0119] Cas9n D10A介导ES打靶PCR检测中靶克隆结果如图3所示,其中:B6为阴性对照,是 B6基因组DNA;N为空白对照,无模板的对照;P为阳性对照;TRANS 2K条带: 8000bp\5000bp\3000bp\2000bp\1000bp\750bp\500bp\250bp\100bp;A1-G4为不同克隆编号的样品。5' LR-PCR扩增阳性克隆与3' LR-PCR扩增阳性克隆编号吻合即为正确重组的阳性克隆。从A1-G6编

号的40个克隆中得到阳性克隆:A1,A3,A5,A6,B1,B3,B4,B5, B6,C3,C5,C6,E1,E3,F2,F4, F5,F6,G1,G2,G3;阳性率:21/40=52.5%其余为野生型或阴性。

[0120] 结论:对比图2与图3的PCR鉴定结果显示,CIRSPR/D10A介导PRKAA1基因重组的效率高于WT蛋白。

[0121] Southern检测及结果:

[0122] 酶切方案如表7所示,探针引物明细如表8所示,模板使用小鼠BAC:RP23-240A23。

表7:

[0123]

分析位端 [5'-end/3'-end/other]	限制性内切酶	Wildtype 片段长度[KB]	Targeted 片段长度[KB]	是否选用
5'	<i>BamH I</i>	14.1	10.0	选用
5'	<i>Bstz17 I+Hpa I</i>	21.3	12.0	
3'	<i>EcoR I</i>	7.6	14.6	选用
3'	<i>Aat II</i>	12.9	16.2	
3'	<i>Kpn I</i>	11.0	8.2	
3'in	<i>EcoR I</i>	/	14.7	选用
3'in	<i>Aat II</i>	/	16.2	

[0124] 注:通过酶切产生不同片段的的方式区分中靶基因型与野生型的差异。

[0125] 表8:

[0126]

序号	引物名称	引物序列	产物长度	引物说明	是否选用
1	100692-PRKAA1-P5F1	ccttcggtgttacctttaggct (SEQ ID NO:12)	439bp	P5-1	选用
	100692-PRKAA1-P5R1	tctggaggaagagatggagtg (SEQ ID NO:13)			
2	100692-PRKAA1-P3F1	cccttctccaccattgctg (SEQ ID NO:14)	430bp	P3-1	选用
	100692-PRKAA1-P3R1	ccattttgccttcctacacc (SEQ ID NO:15)			

[0127] 注:引物1和2分别为5端和3端探针的扩增引物,放在各自同源臂外侧,检测中靶条带,排除随机插入干扰。

[0128] WT或D10A Cas9介导ES打靶Southern检测中靶克隆结果如图4.所示,其中:B6N为阴性对照,是B6基因组DNA;Marker条带:15000bp\10000bp\7500bp\5000bp\2500bp\1000bp\250bp; :非目的条带。结果显示:使用Cas9n D10A蛋白,基因组不会出现断裂,检测条带只有Target条带和WT条带;使用Cas9WT蛋白,基因组出现DSB,除了Target条带和WT条带,还有非目的带。

[0129] 实施例2Cas9n D10A介导ES打靶技术制备CD27-KI小鼠模型

[0130] 一、sgRNA的设计、制备及切割活性检测

[0131] 参照实施例2的方法,设计、制备sgRNA,并检测切割活性。

[0132] sgRNA序列如下:

[0133]

sgRNA名称	序列	PAM
CD27-5S1	uggcauggccaccuccuac (SEQ ID NO:16)	TGG
CD27-3S2	acgggcaagagcacaccg (SEQ ID NO:17)	AGG

[0134] PCR体系按表9进行加样,PCR引物见表10,PCR程序见表11。

[0135] 表9:

适于引物序号: 1, 2		
试剂	体积 (μl)	规格
10X Buffer	2.5	
ddH <sub>2</sub> O	16.75	
Primer	1	10μM
Primer	1	10μM
Mg <sup>2+</sup>	2	25mM
dNTPs	0.5	10mM each
Taq	0.25	5U/μl
Template	1	≈100ng/μl

[0137] 表10:

[0138]

序号	引物名称	引物序列	GC%	Tm	条带大小	引物说明
1	YF000093-HuCD27-5S-in-tF1	catgtctgtgaagctcagcaga (SEQ ID NO:18)	50.0	53.0	Wt=540bp	5'in 第二轮
	YF000093-HuCD27-5S-in-tR1	gaatgtacctgagagcagagg (SEQ ID NO:19)	52.4	48.1		
2	YF000093-HuCD27-3S-in-tF1	tctgtagccctcacattcagag (SEQ ID NO:20)	50.0	51.1	Wt=622bp	3'in 第二轮
	YF000093-HuCD27-3S-in-tR1	tctgtgcaaacacaatcggtcag (SEQ ID NO:21)	47.8	57.4		

[0139] 注:1和2引物分别为包含5端sgRNA和3端sgRNA位置的扩增引物。

[0140] 表11:

降落 PCR 程序 (touch down)				
适用引物序号 1, 2				
Seg.	Temp.	Time	Cycle	±Temp/cycle
1	95°C	5min		
2	98°C	30s		
3	65°C	30s		-0.5
4	72°C	45s	2-4,20×	
5	98°C	30s		
6	55°C	30s		
7	72°C	45s	5-7,20×	
8	72°C	5min		
9	10°C	hold		

[0142] sgRNA切割测序比对结果如图5所示,其中:左图为3端同源臂内测sgRNA切割比对图,右图为5端同源臂内测sgRNA切割比对图,标黑区为sgRNA序列。测序比对图显示, sgRNA位置出现双峰,说明该位置出现了切割,导致碱基插入与缺失,证明sgRNA可切割目的基因组。

[0143] 一、利用Cas9n D10A介导ES打靶技术,筛选获得阳性ES克隆

[0144] 参照实施例2中的方法,采用Cas9n D10A介导ES打靶技术,筛选获得阳性ES克隆。同源DNA供体序列如SEQ ID NO:22所示。

[0145] PCR检测体系及结果:PCR体系如表12,PCR引物如表13,PCR程序如表14。

[0146] 表12:

适于引物序号: 1,3		
试剂 (Takara RR02MA)	体积 (μl)	规格
10X Buffer	2.5	
ddH <sub>2</sub> O	15.25	
Primer	1	10mM
Primer	1	10mM
Mg <sup>2+</sup>	2	25mM
dNTPs	2	10mM each
LA Taq	0.25	5U/μl
Template	1	

[0148] 表13:

[0149]

序号	引物名称	引物序列	GC %	T <sub>m</sub>	条带大小	引物说明
1	YF000168-HCD27-5d-ESF1	gcagactcaagtaccagtgaaggg (SEQ ID NO:23)	54.2	55.9	Positive: 5644bp	鉴定 5 端同源臂内测
	YF000168-HCD27-5d-ESR1	tagtgcctctctggcagctctt (SEQ ID NO:24)	56.5	58.4		
2	YF000168-HCD27-3d-ESF1	cctattacagcccaaagatccct (SEQ ID NO:25)	47.8	54.6	Positive:50 56 bp	鉴定 3 端同源臂内测
	YF000168-HCD27-3d-ESR1	agcactccccagccttgatag (SEQ ID NO:26)	57.1	54.9		

[0150] 注:5' LR-PCR引物为跨越5端同源序列扩增引物,3' LR-PCR引物为跨越3端同源序列扩增引物。

[0151] 表14:

常规 PCR 程序			
适于引物序号: 1,3			
Seg.	Temp.	Time	Cycle
1	95°C	5min	
2	95°C	30s	
3	62°C	30s	
4	68°C	45s	2-4,40×
5	68°C	5min	
6	10°C	hold	

[0153] PCR检测中靶克隆结果如图6所示,其中:129及B6为阴性对照,是129及B6基因组DNA;N为空白对照,无模板的对照;P为阳性对照;TRANS 2K条带:8000bp\5000bp\ 3000bp\ 2000bp\1000bp\750bp\500bp\250bp\100bp;A1-G12为不同克隆编号的样品;5' LR- PCR扩增阳性克隆与3' LR-PCR扩增阳性克隆编号吻合即为正确重组的阳性克隆。从A1-P6 编号的96个克隆中得到阳性克隆:A3,F3,G3,E5,C6,E6,F10,G11,阳性率:8/96=8.3%,其余为野生型或阴性。

[0154] Southern检测及结果:

[0155] 酶切方案如表15,探针引物明细如表16,模板使用小鼠BAC:RP23-394N13。

[0156] 表15:

[0157]

分析位端 [5'-end/3'-end/other]	限制性内切酶	Wildtype 片段长度[bp]	Targeted 片段长度[kb]	是否选用
5'end	BclII	12.1	9.7kb	选用
5'end	SphI	10.0	12.5kb	
3'end	AflII	9.9	6.7	
3'end	SspI	9.2	16.4	选用
IN	NheI	\	12.1	
IN	SspI	\	16.4	选用

[0158] 注:通过酶切产生不同片段的的方式区分中靶基因型与野生型的差异。

[0159] 表16:

[0160]

序号	引物编号	引物名称	引物序列	产物长度	引物说明	是否选用
1	YF000168-HCD27-p5-1	YF000168-HCD27-p5F1	catgaggtagctggtaggacct (SEQ ID NO:27)	401bp	5 端同源臂内测探针	选用
		YF000168-HCD27-p5R1	ctttgtgaggggctcagaggat (SEQ ID NO:28)			
2	YF000168-HCD27-p3-1	YF000168-HCD27-p3F1	ccaaatgctcccatgtgcagt (SEQ ID NO:29)	430bp	3 端同源臂内测探针	选用
		YF000168-HCD27-p3R1	acctggaactcactgtagagag (SEQ ID NO:30)			
3	Pin-1 (DDSDC-NEO)	已有探针不用制备			In 探针	选用

[0161] 注:引物1和2分别为5端和3端探针的扩增引物,放在各自同源臂外侧,检测中靶条带,排除随机插入干扰,3为内部引物,验证中靶区域的完整性。

[0162] Southern检测中靶克隆结果如图7所示,其中,:B6N为阴性对照,是B6基因组 DNA; Marker条带:15000bp\10000bp\7500bp\5000bp\2500bp\1000bp\250bp;LR-PCR阳性克隆的DNA使用上表的酶切方案及相应的探针,检测出的条带,通过与阴性对照及Marker 的条带参照,判断两端重组中靶及完整性通过的阳性克隆。

[0163] Southern鉴定结果显示:A3,C6,E6,F3,G3,G11:为中靶及完整性通过的阳性克隆,但 E5存在随机插入,A3中靶条带较弱,不推荐注射。

[0164] 三、进行阳性ES克隆注射及移植

[0165] i. 准备2.5天受体鼠:挑选周龄体重合格的ICR雌鼠,下午3:30将结扎雄鼠与雌鼠1:2合笼,第二天上午8:00开始对受体进行检栓,见栓鼠标记为0.5天,取见栓2.5天小鼠,作为当天胚胎移植实验的受体。

[0166] ii. 准备3.5天胚胎:挑选合适周龄雌鼠进行超级排卵操作(注射PMSG、HCG),下午3:30 将结扎雄鼠与雌鼠1:2合笼,第二天上午8:00开始对受体进行检栓,见栓鼠标记为0.5天,脱颈椎处死见栓2.5天供体雌鼠,剪出子宫及输卵管,用吸有D-PBS的注射针从输卵管伞口处冲洗输卵管及子宫,将8细胞期的胚胎挑选出来,清洗干净后转移到提前1小时准备好

的 M16液滴的培养皿内,放入37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱培养过夜。

[0167] iii.注射细胞准备:在注射当天早上10:00,根据注射要求,提供阳性ES细胞给注射人员。

[0168] iv.注射:制备合适的固定管、注射针、操作皿,用注射针挑选一些小而亮且边缘比较光滑的ES细胞10-15个,用固定管将胚胎固定,轻轻地用注射针转动胚胎,寻找细胞间隙处进针,注射针进入囊腔后轻轻将ES细胞吹入囊腔。将注射ES细胞的囊胚移入ES-medium中培养,恢复3-4小时。

[0169] v.胚胎移植:囊胚完全恢复后,将胚胎移植到E2.5天受体子宫内。将做完移植手术的小鼠放在干净鼠笼内,37℃热台上保温直到小鼠苏醒。将苏醒后的小鼠转移入相应的动物饲养房,等待生仔。

[0170] 小鼠繁育:移植受体生出的小鼠标记为嵌合鼠,对毛色嵌合率超过50%的雄鼠进行配繁,后代小鼠标记为F1。按照繁育目标,制定繁育计划,将3-5只基因型符合要求的F1按照计划进行繁育,建系。

[0171] 鉴定:在F1小鼠出生后1周内进行剪尾,鉴定基因型,并检测突变检测;建系过程中产生的所有小鼠进行基因型鉴定,以保证小鼠基因的遗传稳定性。

[0172] PCR体系及程序如表17,PCR引物如表18,使用小鼠的鼠尾DNA作为鉴定模板。

[0173] 表17:

[0174]

PCR Reaction Component			
Seg.	reaction component		Volume (μl)
1	2 × Taq Master Mix , Dye Plus, (Vazyme P112-03)		12.5
2	ddH <sub>2</sub> O		9.5
3	Primer A(10pmol/μl)		1
4	Primer B(10pmol/μl)		1
5	Template(≈100ng/μl)		1
PCR program			
Seg.	Temp.	Time	Cycle
1	95℃	5min	
2	98℃	30s	20×
3	65℃ (-0.5℃/cycle)	30s	
4	72℃	45s	
5	98℃	30s	20×
6	55℃	30s	
7	72℃	45s	
8	72℃	5min	
9	10℃	hold	

[0175] 表18:



[0176]

PCR 序号	引物名称	引物详细名称	引物序列	产物大小	备注
①KIN	F1	DDSDC3.1-tF3	tcttatcatgtctggatccggg (SEQ ID NO:31)	KIn=778bp KI=Wt=0bp	
	R1	YF000168-hCD27-TR2	tgtcaagagagaatgtcaaaggtc (SEQ ID NO:32)		
② KIN/KI	F2	YF000168-hCD27-TF1	cagtgactcggtaacaagcagttg (SEQ ID NO:33)	KIn=409bp KI=409bp Wt=0bp	
	R2	YF000168-hCD27-TR1	gtcacagtccttcacgaggaatg (SEQ ID NO:34)		
③KI	F3	YF000168-hCD27-TF3	gaagatgggtgggctgaatgag (SEQ ID NO:35)	KI=859bp KIn=5660bp Wt:0bp	
	R3	YF000168-hCD27-TR3	gggacaaattccttctggcatc (SEQ ID NO:36)		
④WT	F4	YF000168-hCD27-wt-tF1	aactgcacagtcactgccaatg (SEQ ID NO:37)	Wt=358bp KI=KIn=0bp	
	R4	YF000168-hCD27-wt-tR1	gaaacagacagagcgagtcacaag (SEQ ID NO:38)		

[0177] 注:KI及KIN为中靶基因型鉴定;WT为野生型鉴定。

[0178] 小鼠基因型检测结果如图8所示,其中:数字为鼠尾号,P为阳性对照,WT为C57BL/6J 野生型,N为negative空白对照,M为DNA Marker Marker条带:8000bp\5000bp\3000bp\2000bp\1000bp\750bp\500bp\250bp\100bp。107#,108#,110#,112#小鼠为KI阳性F1代小鼠。

[0179] 实施例3Cas9n D10A介导ES打靶技术制备Anxa8-CK0小鼠模型

[0180] 一、sgRNA的设计、制备及切割活性检测

[0181] 参照实施例2的方法,设计、制备sgRNA,并检测切割活性。

[0182] sgRNA序列如下:

[0183]

sgRNA名称	序列	PAM
Anxa8-5S1	caaguguguaagacga (SEQ ID NO:39)	GGG
Anxa8-3S1	ucuggucagucagcgug (SEQ ID NO:40)	GGG

[0184] PCR体系按表19进行加样,PCR引物见表20,PCR程序见表21。

[0185] 表19:

[0186]

试剂	体积(μl)	规格
10X Buffer	2.5	
ddH <sub>2</sub> O	17.75	
primer	0.5	10uM
primer	0.5	10uM
Mg <sup>2+</sup>	2	25mM
dNTPs	0.5	10mM each
Taq	0.25	5U/μl
Template	1	

[0187] 表20:

[0188]

序号	引物名称	引物序列	GC %	Tm	条带大小	引物说明
1	708225-Anxa8-5inF1	ggacacagaaagatgccttgtt (SEQ ID NO:41)	45.5	52.5	1007bp	5 端同源臂内测 sgRNA
	708225-Anxa8-5inR1	actaaggacttcccctgggct (SEQ ID NO:42)	57.1	54.8		
2	708225-Anxa8-3inF1	caggaggtccctaccttt (SEQ ID NO:43)	55	51.4	1030bp	3 端同源臂内测 sgRNA
	708225-Anxa8-3inR1	cttggtcccatctccaac (SEQ ID NO:44)	55	53.2		

[0189] 注:1和2引物分别为包含5端sgRNA和3端sgRNA位置的扩增引物。

[0190] 表21:

PCR 程序			
Seg.	Temp.	Time	Cycle
1	95℃	5min	
2	95℃	30s	
3	65℃	30s	2-4,35×
4	72℃	45s	
5	72℃	5min	
6	16℃	hold	

[0191] sgRNA切割测序比对结果如图9所示,其中:左图为3端同源臂内测sgRNA切割比对图,右图为5端同源臂内测sgRNA切割比对图,标黑区为sgRNA序列。测序比对图显示, sgRNA位置出现双峰,说明该位置出现了切割,导致碱基插入与缺失,证明sgRNA可切割目的基因组。

[0192] 二、利用Cas9D10A介导ES打靶技术,筛选获得阳性ES克隆

[0193] 参照实施例2中的方法,采用Cas9n D10A介导ES打靶技术,筛选获得阳性ES克隆。

[0194] 同源DNA供体序列如SEQ ID NO:45所示。

[0195] PCR检测体系及结果:

[0196] PCR体系如表22,PCR引物如表23,PCR程序如表24。

[0197] 表22:

适于引物序号: 1		
试剂 (Takara RR02MA)	体积 (μl)	规格
10X Buffer	2.5	\
ddH <sub>2</sub> O	15.25	\
Primer	1	10μM
Primer	1	10μM
Mg <sup>2+</sup>	2	25mM
dNTPs	2	10mM each
LA Taq	0.25	5U/μl
Template	1	

[0198] 表23:

[0201]

常规 PCR 程序				降落 PCR 程序 (touch down)				
适于引物序号: 1				适用引物序号: 6				
Seg.	Temp.	Time	Cycle	Seg.	Temp.	Time	Cycle	±Temp/cycle
1	95°C	5min		1	95°C	5min		
2	95°C	30s		2	98°C	30s		
3	62°C	30s		3	65°C	30s		-0.5
4	68°C	45s	2-4,40×	4	72°C	45s	2-4,20×	
5	68°C	5min		5	98°C	30s		
6	10°C	hold		6	55°C	30s		
\				7	72°C	45s	5-7,20×	
\				8	72°C	5min		
\				9	10°C	hold		

[0202] 表24:

[0203]

序号	引物编号	引物名称	引物序列	GC%	Tm	条带大小	引物说明
1	\	708225-Anxa8-ES-5tF1	cctaagtaaacttctgccagcctc (SEQ ID NO:46)	50.0	54.8	5089bp	5 端同源臂内测
	\	DDSDC-tR2	caccagctttctgtacaaagtg (SEQ ID NO:47)	45.8	54.8		
2	\	708225-Anxa8-loxP-tF2	atgggatgggagtttaggtgtg (SEQ ID NO:48)	50.0	54.3	377bp	检测 3 端同源臂内测 loxP
	\	708225-Anxa8-loxP-tR2 测序	aaacagtgggtatgaggatgcag (SEQ ID NO:49)	47.8	54.7		

[0204] 注:5' LR-PCR引物为跨越5端同源序列扩增引物,3' PCR引物为跨越3端同源序列扩增引物。

[0205] PCR检测中靶克隆结果如图10所示,其中,B6为阴性对照,是B6基因组DNA;N为空白对照,无模板的对照;TRANS 2K条带:8000bp\5000bp\3000bp\2000bp\1000bp\750bp\500bp\250bp\100bp;A1-H12为不同克隆编号的样品;5' LR-PCR扩增阳性克隆与3' LR-PCR扩增阳性克隆编号吻合即为正确重组的阳性克隆。PCR阳性克隆(3端同源臂内测短引物):B 1,C3,F3,D4,A5,E5,F9,B10,D10,E10,E11,C12,阳性率:12/96=12.5%,其余为野生型或阴性。

[0206] Southern检测及结果:

[0207] 酶切方案如表25,探针引物明细如表26,模板使用小鼠BAC:RP23-20D5。

[0208] 表25:

分析位端 [5'-end/3'-end/other]	限制性内切酶	Wildtype 片段长度[KB]	Targeted 片段长度[KB]	是否选用
3'end	BclI	11.5	9.6	
3' end	SSP1	16.3	10.0	选用
5' end	AflII	13.0	18.1	选用
5' end	SSP1	16.3	11.5	
IN	StuI	/	9.7	
IN	AflII	/	18.1	
IN	SSP1	/	11.5	选用

[0211] 注:通过酶切产生不同片段的的方式区分中靶基因型与野生型的差异。

[0212] 表26:

[0213]

序号	引物编号	引物名称	引物序列	产物长度	引物说明	是否选用
1		708225-Anxa8-P3F1	gagtgttacctcagtgactccaggc (SEQ ID NO:50)	440bp	3 端同源臂内测探针	选用
		708225-Anxa8-P3R1	catagggatagaggagggaggt (SEQ ID NO:51)			
2		708225-Anxa8-P5F2	gtgggtcattgacatcactg (SEQ ID NO:52)	470bp	5 端同源臂内测探针	选用
		708225-Anxa8-P5R2	gtgtgatgatgggtcagg (SEQ ID NO:53)			
3		708225-Anxa8-P3F2	ccatgtccatagcacatcttg (SEQ ID NO:54)	450bp	3 端同源臂内测探针	备用
		708225-Anxa8-P3R2	gagggtgactgaggcttaag (SEQ ID NO:55)			
4	Pin-1 (DDSDC-NEO)	已有探针不用制备			In 探针	选用

[0214] 注:引物1和2分别为3端和5端探针的扩增引物,放在各自同源臂外侧,排除随机插入干扰,4为内部引物,验证中靶区域的完整性。

[0215] Southern检测中靶克隆结果如图11所示,其中:B6N为阴性对照,是B6基因组 DNA; Marker条带:15000bp\10000bp\7500bp\5000bp\2500bp\1000bp\250bp; LR-PCR阳性克隆的DNA使用上表的酶切方案及相应的探针,检测出的条带,通过与阴性对照及Marker 的条带参照,判断两端重组中靶及完整性通过的阳性克隆。

[0216] Southern鉴定结果显示:A5,B10,C12,D10,E5,E10,E11:为中靶及完整性通过的阳性克隆。

[0217] 三、阳性ES克隆注射及移植;

[0218] 参照实施例2的方法,进行阳性ES克隆注射及移植、小鼠繁育及鉴定。

[0219] PCR体系及程序如表27所示,PCR引物如表28所示。

[0220] 表27:

PCR Reaction Component			
Seg.	reaction component	Volume (μl)	
1	2 × Taq Master Mix , Dye Plus, (Vazyme P112-03)	12.5	
2	ddH <sub>2</sub> O	9.5	
3	Primer A(10pmol/μl)	1	
4	Primer B(10pmol/μl)	1	
5	Template(≈100ng/μl)	1	
PCR program			
Seg.	Temp.	Time	Cycle

[0221]

[0222]	1	95℃	5min	
	2	98℃	30s	20×
	3	65℃ (-0.5℃/cycle)	30s	
	4	72℃	45s	
	5	98℃	30s	20×
	6	55℃	30s	
	7	72℃	45s	
	8	72℃	5min	
	9	10℃	hold	

[0223] 表28:

[0224]

PCR 序号	引物名称	引物详细名称	引物序列	产物大小	备注
①3'arm+wt	F1	708225-Anxa8-loxP-tF1	acacacacttcccaatccatcag (SEQ ID NO:56)	Fln=429bp Fl=429bp	Wt=323bp
	R1	708225-Anxa8-loxP-tR1	gtgggtatgaggatgcagtctagg (SEQ ID NO:57)		
②5'arm	F2	708225-Anxa8-loxP-tF3	tctccatctgaaggaaccaggtc (SEQ ID NO:58)	Fln=320bp Fl=none	Wt=none
	R2	DDSDC-tR1	tcttatecatgtctggatccggg (SEQ ID NO:59)		
③Neo	F3	708225-Anxa8-loxP-tF3	tctccatctgaaggaaccaggtc (SEQ ID NO:60)	Fln=5300bp Fl=492bp	Wt=269bp
	R3	708225-Anxa8-loxP-tR3	atcgtattgggcagagggttaag (SEQ ID NO:61)		

[0225] 注:Fln及Fl为中靶基因型鉴定;WT为野生型鉴定。

[0226] 小鼠基因型检测结果如图12所示,其中:数字为鼠尾号,P为阳性对照,WT为C57BL/6J野生型,N为negative空白对照,M为DNAMarker Marker条带:8000bp\5000bp\3000 bp\2000bp\1000bp\750bp\500bp\250bp\100bp。56#,59#,62#,65#,66#,72#,73#,77#,80#,84#,85#,87#,89#,91#,92#,97#,98#,102#,109#,119#,120#,122#,128 #,134#:小鼠为阳性F1代小鼠。

## 序列表

- <110> 江苏集萃药康生物科技有限公司
- <120> 一种应用CRISPR/Cas9介导ES打靶技术制备基因打靶动物模型的方法
- <160> 61
- <170> SIPOSequenceListing 1.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- <400> 1
- gaacacuagu gcacuuaucc 20
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- <400> 2
- uccugaaaug acuucuggug 20
- <210> 3
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- <400> 3
- acttttacct gctgagccta 20
- <210> 4
- <211> 22
- <212> DNA
- <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- <400> 4
- gtgtatgtgc taagctagtg gt 22
- <210> 5
- <211> 24
- <212> DNA
- <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- <400> 5
- gaactcttga ctggcactt tttg 24
- <210> 6
- <211> 23
- <212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 6

ggccaatgtg ttacttttat gtc 23

<210> 7

<211> 18829

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 7

ctcctggcctt gttttgctct tacctacca taagtgtgcc aagcaggctc ccaactgggc 60  
 cctggccctg gctgttcctt cccctgccc actteacett cctcctggcc aaggtagtct 120  
 gctcctccct tccttgggga tctgctctgg tgtactctgt gaccttctg gcatgctctg 180  
 cctcttactt aattactgtc tgtgtcctgg ccctgcac aagaacataa caaacttgct 240  
 tactgtctgt ctctggcac ctgcatcagg accataaca aacaggaga ttggctttgc 300  
 tccccacag acttctagca gctagcacag tacctggat cttatagggt cttagtaaat 360  
 ctttactgaa tggatgaata cacgtgtttt aatattagta gataatgtt tctctacca 420  
 ggtaccaggc catcagtaca ccatctgata ttttcatggt gatggaatat gtctctggag 480  
 gagagctatt tgattatata tgtaaaaatg gaagggtgag cagttctcat ttaattctgt 540  
 acacagtttg gtaactctct gtccccctta ttgcattata gtgtcagcaa gcaattttca 600  
 gaggtctggt tagtaataag tccccttagc atgaatttgt gtagcatcat aggctaata 660  
 gaaggaaagg acctcaaaag tgatccctga tcccatttaa ttgacatgga tataaagact 720  
 acttggtgag tatttgttca aggtcacgtg atttactagt gatttacaga gttcacgtaa 780  
 gtcccataaaa tttattatcc tcagatttaa gtttttagc aaaacaaact tttatttatt 840  
 tttttggaga cagggtcaca ctatgccact gtgactgcca thtagatcag gctggcctcc 900  
 agtgcatagc catgcccctg tctctgtctc ccaagtgtct ggattgaagg tgtgcctggt 960  
 ctgtgctcac ccttaatgtg cttcctaaac tttcctaaac cgctttccta tgtgggcctc 1020  
 ccaaaatacg tcagtaagta cttaaacgat gtaggccttg ttcttcaacc ctggccacat 1080  
 ttcagttgtg ctctgtgtt gttttctgat gtgcctgcag tagaaaggaa tagggatttt 1140  
 gaaggagcta ggaagtagac ttacagggt tagtgttga agaaccttg aagacgttta 1200  
 gttctaagca caaattctga gcaccgtccc ctgcccatac gactctcac gttatctgac 1260  
 tggcacagcg ccctgtgaa aggccccaca ctaggagag aagagagcct ggctcccctt 1320  
 cagtcggaag ctatttgcac tcttcattct tcatgttac gactgtctc tctttaatca 1380  
 ggatcagact cattaagcac gctagtctgt tttttctcaa tgtggttaat ttctacctaa 1440  
 agttttccct ttctcactct tcaaggecct attcctgtcc actggaggaa ttcttccaaa 1500  
 ttgatcaatg cctgcatttc tcactctctt ctttttttcc tcccatttgt catttctagt 1560  
 cattttgcta tacattgtgg ggacgtcttt agtgttacct tttgaatgcc aaccttcag 1620  
 ctgtcacatg tttgtatttc agatttctgc cttattttct gaaattccct ttggatagct 1680  
 gcctgtttgg ccttacctgt ttgagaatga cattttggtt ttaaattgtct tttggccact 1740  
 gcaccgtccc gttttccgtg ctttccgtc gcctctcttt ttttttcccc ctttctgttc 1800  
 attttgtctc ccccccccc aacctccca tactcttagt cagatatctg gccattctta 1860

gctgtccact taaatttcag aacaaagtca caccacatgc caagccagtg gatgtgtgct 1920  
gtttatgggt ttccctcagg ttgcattggt ggagacatta attttgtag ggtaaattct 1980  
ttgctcacia gcacaagtgt ttttcttcgt ttgatttgggt atctgctttt tcctattttc 2040  
ttgaaggat tggtttagct gttggaactg agtcgggaga tggggtcagg tctttcctgt 2100  
tagtatgcac ataatctaca tcttccttaa cggcctggcc aacccgagga gctacaggtc 2160  
ttactcccc ttggtggtac ctacagctt ctgcacaggc ctgctgtctt gtttccgtcc 2220  
gccccctcatt gcttcagaaa gtcattggtgc acccactgct cagcgttccc agggttccgc 2280  
tgtgcaactg cgttcatttt ctctctagg atttggtttt gcttttctct cttttgctga 2340  
gttttcatct gctgtccata cattctctt gatggccgt gtctctccat ctttttgttt 2400  
tatgggcctt gtgtgttgc gacagcacc tggggcgaca caacaggag tgacacaaaa 2460  
gactcagtgt gggatgtta tcagcttggga gtgttctttt acatggctca tcttccttta 2520  
gtcgtgcca ttctttgtac tgtattttta taataaaat tcttttcacc tttgcagcct 2580  
ttctgttact tatcatttgt taagttttct ctctctctg cataatttt ttttaataa 2640  
acatctactt gaacaaagg gtgagattgc aaaagtatta atgtctttt ctttaaggag 2700  
aggacctac atttcagggt aagggtatgc tacacttcag tagcattttt aattttgtat 2760  
tcaaagcaat ggctggttc tctttgtccc acgttatcca tgcggtgaag gtgtggggtt 2820  
ctggatttag aatgctcact cctgacctgc caaggacctc atgtgagcat cttgacctgg 2880  
gccagtagct cacttatcga atcccctgtc ctggaaccg ggcaaagcag tgctgcttcc 2940  
cctgctgagc aaacgccaga aaatgcagag actggaagat gatttttaaa agattgtact 3000  
taaaaattgt aattgtagtg taagtgtttt ccttcaggaa agatgcaaag ggtaaattgt 3060  
ctaaggattt tcttttgggt aagtgaaac atcttagacc tgaagagatg gcacctatgt 3120  
caggtggctc tcgattgtaa ctccgggtcc agaggacca acattcttag cattcttgct 3180  
tctgtaggca cctgcaggca gatgcacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca 3240  
cacacacata cacacacata cacacacata cacacacaca cacacata cacacacaca 3300  
cacacacata cacacacata cacacacata cacacacaca cacacata cacacacaca 3360  
cacacacaca cacacacaca cacacacact taaaatagc ttaaatttca gactacaggc 3420  
tatctttgcg ttgtggctca attccaatac ttacctgtca cttctttgtg gtctgtaatc 3480  
gtcccccatg caagcatcac ttggtatatt ctctttttct tcccctttc tccgattaga 3540  
tttgcctttt gacagttgct tccatgtgtt ctgcgcctc tgtgtacgct cccacctga 3600  
cccccttctc tctcttccc tctcctctgc aggtcctgg tttactca tgactttgtt 3660  
ctgttctggg aaccactgag tttgactaga agcatctgtt tcccctggg tttgatctg 3720  
ctcattggaa cgtttctgt atcactctgt gacctttt tcccactgtt acgctcatgt 3780  
ttggtttgg tttggcctta tttgtctac tagagtaggg cttctctctc actcatctct 3840  
gtgctatgga tatctaacca gtacagcata ttgaatatct aatactatgg atatctaacc 3900  
agtacagcat attgaaatgt ctcaagaaat atttgttgaa ggaggaagg attaaacacc 3960  
actaattgga aaacattccc agtttcagggt agaagttgaa agtactagaa atagcccatg 4020  
agctccagaa gaagatgtgt ttttaagtgt agtttatata tgtgatagg tcaaagagtt 4080  
gagttgctga tttggctccc gtaagccctt gcttggcatt tcagtgtagg gctgcaggcc 4140  
ttacttgccc atttcaaagt acctcatggg tgaagttcgc ctggaagctt tcaggcgttg 4200



acagtccaca ggctggagaa ttataagaat gttttcattg agagacacag cttaaaatgc 4260  
 ctttcttctt ttcttagttg gacgaaaagg aaagccgccg tctgttccag cagatccttt 4320  
 ccggtgtgga ttattgtcac aggcatatgg tggccacag agatttgaac cctgagaacg 4380  
 tcctgcttga tgcacacatg aatgcaaaga tagccgactt tggtaaggat gtttgtgatg 4440  
 tttaatgagc ataagtatca tcttctggta gtgtttatgg ggtgcactag aacccactc 4500  
 tgcaagtgaa cattcagaag ggaaaacagt aaggtacgcg cgcgcgcgcg cgcgcacaca 4560  
 cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cgccacagga tagctttggg 4620  
 ggatgtttct attcttccag cacgtgggtc ttagagggtg gatttaggtt gtcaggcatg 4680  
 gtggttaagca cttttacctg ctgagcctac ctgccagccc tgaattcag ttttgtgatc 4740  
 ttaaatattt caacttctta acattagaga gatcatttga aaagaaaaga ctattatttg 4800  
 tcaagaaggt agcaacttga tttctaatat ttctttttgg tggagtatgg agaaaatgga 4860  
 aagtgggatg gaattattga cataacattg gaatctagaa agatgaatta tatgaggaaa 4920  
 ctttttttat aaaattaata tttaaatgct gtaaagttgg ttttcagatg tagtggttagg 4980  
 tgccttcagt ctaagaattc cagagatgga ggccgataac ttcgtatagc atacattata 5040  
 cgaagttatg tagagatctt tctgttcagc tgggtctatt ttgcctagca gtatccatat 5100  
 taaaaggtag acatttcaag gatcttctag tattcaaac caccactagc ttagcacata 5160  
 cacattaaac tctagatggt gaaattcatt gtacattttg tgtataaggt cagaatattt 5220  
 aagaaataaa gactataatc aagttaaaag tttttgtttt tttgtttttt ttttctgttt 5280  
 ttatttttatt ttattttatt acatattttc ctcaattaca tttccaatgc tatectaaaa 5340  
 gtccccata cctcccccc ccacttcctt accactcat tcccattttt tttggcctg 5400  
 gcgttcccct gtactggggc atataaagtt tgtgtgtcca atgggcctct ctttcagtg 5460  
 atggccgact agaccatcgt ttgatacata tgcagctaga gtcaagagct ccaggatact 5520  
 ggtagttca taatgttgtt ccacctatag gtttcagac ccctttagct ctttggttac 5580  
 tttctctagc tcctccattg ggagtttttt tttctgtttt acttgctttt tgccttaag 5640  
 aactcttgac tggtcacttt ttgtcatttc aggtctttca aacatgatgt cagatggtga 5700  
 atttttaaga acaagctgtg gctcaccaa ttatgcagct ccagaagtca tttcaggaag 5760  
 attgtacgca ggccccgagg tggacatctg gacgagcggg gtcattctct atgctttgct 5820  
 gtgtggaacc ctcccctttg atgatacca tgtgccaact ctttttaaga agatatgtga 5880  
 tgggatcttt tatacccctc agtacttaaa cccttcagta atcagccttt tgaacatat 5940  
 gctgcaggtg gatcccatga agagggccgc aataaaagat atcagggaac acgagtgggt 6000  
 taaacaggac cttccgaagt atctctttcc tgaggacca tcttatagtt caacctgat 6060  
 cgatgacgaa gccttgaaag aagtgtgtga gaagttcgag tgttcggagg aggaggtcct 6120  
 cagctgcctg tacaacagaa accaccagga cccactagcc gtcgcctacc acctcatcat 6180  
 agacaacagg agaataatga atgaagccaa agatttctac ctagcaacca gccacctga 6240  
 ctctttcctg gacgaccacc atttaactcg gcctcacctt gaaagagtac cgttcttgg 6300  
 tgccgaaaca ccacgggccc ggcacaccct ggatgaatta aaccacaga aatccaaaca 6360  
 ccaaggtgta cggaaggcaa aatggcattt gggaattcga agtcaaagcc gacccaatga 6420  
 tatcatggca gaagtttga gagcaatcaa gcagttggat tatgaatgga aggttgtaaa 6480  
 cccctattat ttgcgtgtac gaaggaagaa tcctgtgaca agcacatttt ccaaatgag 6540

tctacagcta taccaagtgg atagtaggac ttacttggtg gatttccgta gtattgatga 6600  
tgagattaca gaagccaaat cagggactgc tactccacag agatcgggat ccatcagcaa 6660  
ctatcgatct tgccaaagga gtgactctga tgccgaagct caaggaaagc cctcagacgt 6720  
ctcccttacc tcatctgtca cctccctcga ctctcccct gtcgacgtag ctccaagacc 6780  
aggaagtcat acaatagaat tttttgaaat gtgtgcaaat ctaattaaaa ttcttgacaca 6840  
gtaactgtaa gtctgcagaa attgatgac tattaaacaa taaagatgtc cactaaaatg 6900  
gaagtttttc ctgtcatact ttgttaagaa ggtgagaac agagtaccta cattttgaat 6960  
ggaaggattg gagctacggg ggtgggggtg ggtgaggatt agataaatgc ctgctcttta 7020  
ctgaaggctc ttactattg ctttatgata atgtttcata gttggatata ataatttaa 7080  
caagcaaaac caaattaagg gccagctcat tctcccact catgatctat agatctatag 7140  
atctctcgtg ggatcattgt tttctcttg attcccact tgtggttcta agtactgtgg 7200  
tttccaaatg tgtcagtttc atagcctgaa gaacgagatc agcagcctct gttccacata 7260  
cacttcattc tcagtattgt ttgccaagt tctaattcca tcagaagctt gcagatctgc 7320  
gactctagag gatcgactgt gccttctagt tgccagccat ctggtgtttg cccctcccc 7380  
gtgccttctc tgaccctgga aggtgccact cccactgtcc tttcctaata aatgaggaa 7440  
attgcatcgc attgtctgag taggtgtcat tctattctgg ggggtgggtt ggggcaggac 7500  
agcaagggggg aggattggga agacaatagc aggcattctg gggatgcggt gggctctatg 7560  
gctgcgactc tagaggatca taatcagcca taccacattt gtagaggttt tacttgcttt 7620  
aaaaaacgtt taaacctccc acacctccc ctgaacctga aacataaaat gaatgcaatt 7680  
gttgttgta acttgttat tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca 7740  
aatttcacia ataaagcatt tttttactg cattctagtt gtggtttgtc caaactcatc 7800  
aatgtatctt atcatgtctg gatctgcgac tctagaggat cataatcagc cataccacat 7860  
ttgtagagggt ttacttgct ttaaaaaacc tcccacacct cccctgaac ctgaaacata 7920  
aatgaatgc aattgttgtt gttacttgt ttattgcagc ttataatggt tacaataaa 7980  
gcaatagcat cacaaattc acaataaag cattttttc actgcattct agttgtggtt 8040  
tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tctggatctg cgactctaga ggatcataat 8100  
cagccatacc acattttag aggttttact tgctttaaaa aacctccac acctccccct 8160  
gaacctgaaa cataaaatga atgcaattgt tgttgtaac ttgtttattg cagcttataa 8220  
tggttacaaa taaagcaata gcatcaciaa tttcaciaa aaagcatttt tttactgca 8280  
ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga tccccatcaa 8340  
gctgataaca tacgctctcc atcaaaacia aacgaaacia acaaactag caaaataggc 8400  
tgtccccagt gcaagtgcag gtgccagAAC atttctctaa ggcgcataac gataccacga 8460  
tatcaacaag tttgtacaaa aaagcaggct ggcgccgaa cgcatgcaga tctacgcgtg 8520  
attaacttta aataattggc attatttaa gttattaatt aacccccca aaaaaagggt 8580  
gcctatcacc cttctgcta cctgtgtatc ctccagcat ggtgggctc tctggttggc 8640  
agaaagcaca acaaagcctc ttcactctat actacttctc ttgaccagat gccagtcta 8700  
atatgaactg caatcctcta tacacaaaaa gttcatgggg gcaccgtgag gtcccactcc 8760  
acctcagcca attccttgtt gctgccccac tcacctctg agcctcctc tgtttctgt 8820  
ccaccttca gcttccctct caggctggga gcaggggcca gtagcagcac ccacgtccac 8880

cttctgtcta gtaatgtcca acacctccct cagtccaaac actgctctgc atccatgtgg 8940  
ctccccatta tacctgaagc acttgatggg gcctcaatgt ttactagag cccaccccc 9000  
tgcaactctg agaccctctg gatttgtctg tcagtgcctc actggggcgt tggataattt 9060  
cttaaaaggc caagttccct cagcagcatt ctctgagcag tctgaagatg tgtgcttttc 9120  
acagttcaaa tccatgtggc tgtttcacc acctgcctgg ccttgggtta tctatcagga 9180  
cctagcctag aagcaggtgt gtggcactta acacctaagc tgagtgacta actgaacact 9240  
caagtggatg ccatctttgt cacttcttga ctgtgacaca agcaactcct gatgccaaag 9300  
ccctgcccac cctctcatg cccatatttg gacatggtag aggtcctcac tggccatggt 9360  
ctgtgaggtc ctggctctct ttgacttcat aattcctagg gccactagt atctataaga 9420  
ggaagagggt gctggctccc aggccacagc ccacaaaatt ccactgctc acaggttggc 9480  
tggtctgacc caggtgggtgt ccctgctct gagccagctc cggccaagc cagcggcgcg 9540  
ccgccacat ggggtgctagc gagctgatca tctctggctc ctctggagga ttctgagga 9600  
acatcggcaa ggagtaccag gagctgctg agaacttcat gagattcatg aatgaccagg 9660  
gagcctacgc ccctaacacc ctgagagacc tgaggctggg gttccactcc tgggctagat 9720  
gggtgccacgc tagacagctg gcctggttcc ctatctctcc tgagatggct agggagtact 9780  
tccttcagct gcacgatgct gacctggcct ctaccacat cgacaagcac tacgcatgc 9840  
tgaacatgct gctgtcccac tgtggcctgc ctctctgtc tgatgacaag tctgtgagcc 9900  
tggccatgag gagaatccgg agagaggctg ccaccgagaa gggagagaga accggccagg 9960  
ccatccctct gagatgggat gacctgaagc tgctggatgt gctgctgtct agatctgaga 10020  
gactgggtgga cctgaggaat agggccttcc tgtttgtggc ctacaacacc ctgatgagga 10080  
tgtctgagat ctctaggatc agagtgggag acctggacca gaccggagac accgtgacc 10140  
tgcacatctc ccacaccaag accatcacca ccgctgctgg cctggacaaa gtgctgtcta 10200  
ggaggaccac cgctgtgctg aatgactggc tggatgtgtc tggcctgaga gagcacctg 10260  
acgctgtgct gttccctcct atccaccgga gcaacaaggc taggatcacc accaccctc 10320  
tgaccgcccc tgccatggag aagatthttta gcatgacctg ggtgctgctg aacaagagg 10380  
atgccacccc taacaagggc cgctaccgga cctggaccgg cactctgct agagtgggag 10440  
ctgccatcga catggctgag aagcaagtgt ccatgggtga gatcatgcag gagggcacct 10500  
ggaaaaagcc tgagacactg atgagatacc tgaggagggg aggagtgtct gtgggagcca 10560  
actctaggct gatggactcc gctagcggcg ccggtcctaa gaagaagagg aaagtgtgag 10620  
gccacgtagg cccgcatga ataaatgaaa gcttgcatg ctgcgactct agaggatctg 10680  
cgactctaga ggatcataat cagccatacc acattttag aggttttact tgctttaaaa 10740  
aacctcccac acctccccct gaacctgaaa cataaatga atgcaattgt tgttgtaaac 10800  
ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcaciaa tttcaciaa 10860  
aaagcattht tttcaactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat 10920  
catgtctgga tctgcgactc tagaggatca taatcagcca taccacattt gtagaggttt 10980  
tacttgcttt aaaaaacctc ccacacctcc cctgaacct gaaacataaa atgaatgcaa 11040  
ttgttggtgt taacttgtht attgcagctt ataatggtta caaataaagc aatagcatca 11100  
caaatttcac aaataaagca tttttttcac tgcattctag ttgtggtttg tccaaactca 11160  
tcaatgtatc ttatcatgct tggatctgcg actctagagg atcataatca gccataccac 11220

attttagag gtttacttg ctttaaaaa cctcccacac ctccccctga acctgaaaca 11280  
taaaatgaat gcaattgttg ttgttaactt gtttattgca gcttataatg gttacaaata 11340  
aagcaatagc atcacaaatt tcacaaataa agcatttttt tcaactgcatt ctagttgtgg 11400  
tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttatca tgtctggatc cccatcaagc tgatccggaa 11460  
ccgcttggct gcaggtcgtc gaaattctac cgggtagggg aggcgctttt cccaaggcag 11520  
tctggagcat gcgctttagc agccccgctg ggcacttggc gctacacaag tggcctctgg 11580  
cctcgcacac attccacatc caccgtagg cgccaaccgg ctccgttctt tgggtggcccc 11640  
ttcgcgccac cttctactcc tcccctagtc aggaagtcc ccccccccc gcagctcgcg 11700  
tcgtgcagga cgtgacaaat ggaagtagca cgtctcacta gtctcgtgca gatggacagc 11760  
accgctgagc aatggaagcg ggtaggcctt tggggcagcg gccaatagca gctttgctcc 11820  
ttcgttttct gggtcagag gctgggaagg ggtgggtccg ggggcgggct caggggcggg 11880  
ctcagggcg gggcgggcgc ccgaaggtcc tccggaggcc cggcattctg cacgcttcaa 11940  
aagcgcacgt ctgccgctt gttctctct tctcctctc cgggcctttc gacctgcagc 12000  
ctgttgacaa ttaatcatcg gcatagtata tcggcatagt ataatacagc aaggtgagga 12060  
actaaaccat gggatcggcc attgaacaag atggattgca cgcaggttct ccggccgctt 12120  
gggtggagag gctattcggc tatgactggg cacaacagac aatcggctgc tctgatgccg 12180  
ccgtgttccg gctgtcagcg caggggcgcc cggttctttt tgtcaagacc gacctgtccg 12240  
gtgccctgaa tgaactgcag gacgaggcag cgcggctatc gtggctggcc acgacgggcg 12300  
ttccttgcgc agctgtgctc gacgttgca ctgaagcggg aaggactgg ctgctattgg 12360  
gcgaagtgcc ggggcaggat ctctgtcat ctacettgc tctgcccag aaagtatcca 12420  
tcatggctga tgcaatgcgg cggctgcata cgttgatcc ggctacctgc ccattcgacc 12480  
accaagcgaa acatcgcac gagcgagcac gtactcggat ggaagccggt cttgtcgatc 12540  
aggatgatct ggacgaagag catcagggc tcgcgccagc cgaactgttc gccaggctca 12600  
aggcgcgcat gcccagcggc gaggatctcg tcgtgacca tggcgatgcc tgcttgccga 12660  
atatcatggg gaaaaatggc cgcttttctg gattcatcga ctgtggccgg ctgggtgtgg 12720  
cggaccgcta tcaggacata gcgttgcta cccgtgatat tgctgaagag cttggcggcg 12780  
aatgggctga ccgcttcctc gtgctttacg gtatcgccgc tcccattcg cagcgcacgc 12840  
ccttctatcg ccttcttgac gagttctct gagcgggact ctggggttcg aaatgaccga 12900  
ccaagcgacg cccaacctgc catcacgaga ttctgattcc accgccgct tctatgaaag 12960  
gttgggcttc ggaatcgtt tccgggacgc cggtggatg atcctccagc gcggggatct 13020  
catgctggag ttcttcgccc accccccgga tctaagctct agataagtaa tgatcataat 13080  
cagccatata acatctgtag aggttttact tgctttaaaa aacctccac acctccccct 13140  
gaacctgaaa cataaaatga atgcaattgt tgttgtaac ttgtttattg cagcttataa 13200  
tggttacaaa taaagcaata gcatcaciaa ttccacaaat aaagcatttt tttcaactgca 13260  
ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga tccgggcggc 13320  
cgtaacttt aaataattgg cattatthaa agttacacc agctttcttg tacaaagtgg 13380  
ttgatatctc tatagtcgca gtaggcgggg taccgctagc ataacttcgt atagcataca 13440  
ttatacgaag ttatgtagag atctttctgt tcagctgggt ctatthtgcc tagcagtatc 13500  
catattaaaa ggtagacatt tcaagatct tctagtattc aaaaccacca ctagcttagc 13560

acatacacat taaactctag atgttgaaat tcattgtaca ttttgtgtat aaggtcagaa 13620  
 tatttaagaa ataaagacta taatcaagtt aaaagttttt gtttttttgt ttttttttc 13680  
 tgtttttatt ttattttatt ttattacata ttttctcaa ttacatttcc aatgctatcc 13740  
 taaaagtccc ccataccctc cccccccact tccctacca ctcattecca ttttttttgg 13800  
 ccctggcggt cccctgtact ggggcatata aagtttgtgt gtccaatggg cctctctttc 13860  
 cagtgatggc cgactagacc atcgtttgat acatatgcag ctagagtcaa gagctccagg 13920  
 atactggtta gttcataatg ttgttccacc tatagggttg cagaccctt tagctccttg 13980  
 ggtactttct ctagctcctc cattggggagt tttttttct gttttacttg ctttttgtcc 14040  
 ttaagaactc ttgactggtc actttttgtc atttcaggtc tttcaaacat gatgtcagat 14100  
 ggtgaatttt taagagacag ctgtggctca cccaattatg cagctccaga agtcatttca 14160  
 ggaaggtatt gctgccatta ggctactttt gatgtgectg ttgttgctta tttctcttaa 14220  
 gtttgtagt ctgtactgtc gccttgagga tgtgatgtca ctaacgagga cataaaagta 14280  
 acacattggc ctgtggtaac tgtcatctcc gaggtcgtc gcctcagtct gctaacgtag 14340  
 gtctaggcct ggaagcttct agcttgtgta caatctaate taggcctaga aagacttcag 14400  
 ctgctgagge ttgtctgtgg gtaagcgcgc ccttctctg ttctttctga tctatggctg 14460  
 attcaactca gatgttttgg ctctcaaact cctctccacg ataactgatt caatctggct 14520  
 tctctgggct tctctgaat ttgcctgtct tgacctcaa ctctgtcatc gttctaate 14580  
 ggctccttct cagtctctgc ttgttctgtc ttcacctgtg tctggcttgt ccttctctg 14640  
 caagctgtct ctgtacatct gtctgtgtac agtggcctcc tctcctgca ctgacctca 14700  
 agtacttctct ctctcttccc gtgagagggt gggcatatcc tattctgtca ggtctttttc 14760  
 tgatttgtca tttgtctgcc actcaattag aagttacttt caaacatggg tgctttcttc 14820  
 tatgaactaa ctttgccaca gggattaaaa gtgtgtgctg aggccgaggc acatcacaac 14880  
 tagaagcagc tttttcagta aataacacaa tcttgagggt ttacaatatg ataagatatc 14940  
 ctgcaacaga aagaaggaa tatatttctg tacttgcaga ttttctattt tatgaataat 15000  
 cacaaggagc tggagagatg gcttatttgg taagaggact tgctgtctct ctagaggact 15060  
 ggaatttggg acctggcaac cacaatctgg gtggctcaca gttgtctata actttgcctc 15120  
 caggagacc aacacactct tggtttttgc aagcagttac atacatgat gcacctcaac 15180  
 acacacacac acacacacac acacacacac acactaataa taataataat aataataata 15240  
 ataataataa tagaaataaa taaaaaaaaac aagtggaaaa acaagtccat ctttggagga 15300  
 gagtgttggg ttgcaagtca cagtaaagta gttagaatga agtgctttca tttttgtctc 15360  
 tgggtgggca attgaaagcc aaccagctgt aaaggtggat aagccgctga gaacctgcct 15420  
 actgcagtac tcaactcccga ggaatgcttt acttaggcga acattaaaa atgtaacatg 15480  
 atgggcaatc cttgctggta attctacacc ttctcatgac accatctcaa gaaaaccaa 15540  
 ccaaactaga ccgcacagag agcagaacag agttacaagt gtaacgtcac gtgtagttgt 15600  
 ataagtattc aaatagctgg cattcatgta gtagcttcat gttttatgag gaaggaaact 15660  
 aaagaagtgg tcctttaaaa aaacagacca gctgaatgta ttgcatgcct atagcctgag 15720  
 tatgcacat ggatgccaag acagggtat ataggcctgg tatcaaggaa aatcgaggtg 15780  
 aggtgagggg caagagggtt ataaaaaggg agaaggaagg agagagactc atttatgttc 15840  
 agtcttgatc tagatctgct agagattgaa gtgtaagact gctgaactct gaactactat 15900

ctagcactaa aggacggatg tattttcatt agttactttt taaatagcgt gaaaacaaaa 15960  
tttaatttgt gttttatttc cttgttttgt tcaaggttca agttcctcct cctcctcctc 16020  
tccttcctct ccctcctcct ctccttcctc tcctcctcct tctccttctc ctccctcctc 16080  
ctcctcttcc tcctctgtga tagagacagt tcattaacaa agagaaggca cgcctaaatt 16140  
tggaagtggg gtagtggctt gggaaaagat atttgcttaa agttgtaaaa tttaatttaa 16200  
aagacagact ttattttaaa ccatatatgt atgtgtgttt gtgtgagggt atgtgtacat 16260  
tagttaggtt gctgacagag gtcagagccc cccaacccca ccccccaat cctcacctt 16320  
cagctattgc tacgggcagt tgtaagctgc cttgtgtgtg tgtgtgtgtg ggggggtga 16380  
gaactaaacc agggacctct ataaaaacag cgcaggttct caatggctga gacatccctc 16440  
cagctcagag aatttattat tttttccat tttttaaatt taggtattta cttcatttac 16500  
atttcaaatg atateccgaa agtctccaat accctcccc aacctgctc cctaccacc 16560  
cactccccct ttttgccct ggtgttccc tgtactgggg catataaagt ttgcaagacc 16620  
aatgggcctc tcttcccaat gatggccgac taggcatct tctgatacat atgcagctag 16680  
aaacacgagc tccgggttac tggttagttc ataatgttgt tccacctata gggttgcaca 16740  
cccctcagc tccttgggta ctttcaactg ctctcttatt gggggccctg tgatccatcc 16800  
catagctgac tgtgagcatc cacttctgtg tttgctaggc acccgcatag cctcacaaga 16860  
gacagctata tcagggtcct ttcagcaaaa tcttgctggc gtagagaatt tatttttaag 16920  
atcaacgctt tggctaggct tgggtgtgca ccttaccag gaggttagac agcagtttgt 16980  
ctccagctca ggctccttag tgagacaggc ccagcttggg aataaataaa atgctcttgc 17040  
aaaaacaagc aagcaaagaa agaaataaaa aacaagtaaa agtcaaagca aacaaaaaca 17100  
cattgcttcc tcattgctgc tgaacacta atgaggtagg ggaggcctgt tgctcgccag 17160  
tgcccacaat cccgtccacc tcaaccattt cttgttttaa atgcttcaaa tggatgatga 17220  
cctaatttaa aaaaaaatcc ctgtgcttcc tatgttcatg tgcttatttt ttttgactg 17280  
ctcaaagaaa aggtaaatgaa gtgaattaaa aagattcatt tgtgttttct atcttaattc 17340  
ctttgatttg agaaaaatc aaaatctaga tgctacaggg aatataacta aagaaaaag 17400  
gcatgctca tgttcaagca tgcataaaat gggctcttgg ggaatgtac agtttgatg 17460  
tctttccttg aggtctgtgt gaataggagc actcattttg agaacagtgt ttactgctgt 17520  
ctataggaag gaagcactct cgtcactctg aggttctgtt ttccccctga aggcgcctc 17580  
ggatgattca gctggtttgc agctagttag aatccgtgct tccagtgctt cttcacgta 17640  
gacgactca cgcacgaaga gggcgagtgt tctgtgagct cactgacctg tggcttgctt 17700  
ctgcagctcc agcttctga actgtgatgt gagggtttta ggagaaatgg gttcagagtc 17760  
tgtcactaca gacttgaate atgggcccag cgagttggct cagctggtaa aacatttgct 17820  
gccaagtgcc tagagtctga cccctgaate ctgggtaaag gtaggagaga actgattcca 17880  
cagagctgtc atctcagctc cacaccact gtggcatgtg cacaccatac acacgcat 17940  
gcatgtgcac acacacacac acacacacac acacacacac actaaaagtt acttaaaggt 18000  
gagggtgggg gaacaaaaaa ggtactttaa aaaaactatc cctgtggctc aatcaacat 18060  
tgatcatgat ggctcaaggg ttgaccttat tggtaggaag tttgagggtc atagtaaggt 18120  
agtacaattt gacctatgga tcacaagtta caaaatagct tattttttaa caggtataac 18180  
tgataagact agtatcttta tgtgtgatgt gcaacaacca ctatagatac catattctga 18240

ccactgattt ctttaaaaat tattttctta tatttttcat aaagtatttg tatttgaaga 18300  
gtgttgaccg atgctttttg atatttgat taatacagtt agcattctct atgcagattg 18360  
tacgcaggcc ccgagggtga catctggagc agcggggta ttctctatgc tttgctgtgt 18420  
ggaaccctcc cttttgatga tgaccatgtg ccaactcttt ttaagaagat atgtgatggg 18480  
atcttttata cccctcagta cttaaaccct tcagtaatca gccttttgaa acatatgctg 18540  
caggtggatc ccatgaagag ggccgcaata aaagatatca ggtaactcac tttatctgcc 18600  
tacttgacca accagccaac aaaccatctg tctgtctgtc tgtctgtctg tctggactgt 18660  
gtagtcttgg ctatcctgga actcacteta aagacaaggc tggccctgcc tccctctgcc 18720  
acccgagtgc agtgctagga ttaaaggcgc gtggtattac cattgcacag caatattagg 18780  
tgatttttaa accaatgtat ttttctacct tttcgagtct ctagatacc 18829

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 8

ggtcttcata ccgccactgc tt 22

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 9

ggcctgcgta caatcttct g 21

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 10

caccagctt tcttgtaaa agtgg 25

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 11

gcacagctgc cactatcagt catgc 25

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 12

ccttcggtgt taccttgtag gct 23  
<210> 13  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 13  
tctggaggaa gagatggagt g 21  
<210> 14  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 14  
cccttcttcc accattgctg 20  
<210> 15  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 15  
ccattttgcc ttccgtacac c 21  
<210> 16  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 16  
uggcauggcc accuccuac 20  
<210> 17  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 17  
acgggcaaga gcacaccg 18  
<210> 18  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 18  
catgtctgtg aagctcagca ga 22  
<210> 19  
<211> 21



<212> DNA  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 19  
 gaatgtacct gagagcagag g 21  
 <210> 20  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 20  
 tctgtagccc tcacattcag ag 22  
 <210> 21  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 21  
 tctgtgcaaa cacaatcggc cag 23  
 <210> 22  
 <211> 21864  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 22  
 agcatgttca acgcagtgag ccacctctgc tgccctccatc caccgatgca atgcatcggc 60  
 ccagcgccca ggtaaacctgc tgccccttca tetccactcc ttgcgacttg cagactcaag 120  
 taccagttaa ggggaaaagg cacaagtatc ctctgagccc ctcaacaaag tatttttagtt 180  
 agggttttac tgctgtgaaa agtcacatg accccagcaa ctcgtttttg gttggttggc 240  
 tggtttgggt ggttgggttg ttggtttggt tggttggttg gttggtttgg ttggttgggt 300  
 ggttgggttg tttggttggc tggttggctg gttggtttgg ttggttgggt ggttgggttg 360  
 tttggttggc tggttggttg gtcggttggc tggttggtta gtttgggttg ttggttagtt 420  
 tggttggttg gtttgggttg ttggttgggt ggttgggttg gttggttggc ttggttgggt 480  
 ggttgggttg tttggttggc tggttgggtg gtttgggttg ttgattggtt ggttgggttg 540  
 gttggttggc tggttggttg gttgtttatt gctttcccag acaatggtcc cctccctggc 600  
 atctttgagg atttgcttta ctagctgat ctcccagac caaacctc aggacgcagc 660  
 attaaagcgg cacacaccaa ttcacgtgac atctgcttc ctaaaccagc ctacttctc 720  
 gtcaggattg cctccctaca ccgtgggcac atgcaacct gagtgtttagc aggccttacg 780  
 acaaaaacag agagagaaa gaaaccacaa aggaggcacc cggaacctgt gacctcagct 840  
 cccacaacaa acacctgaaa cactgcacca cgctttcaca ttagggttca gtcaccaga 900  
 aagaaatggg caaaagggtg gacatgtggc tcaactagta gattgttctc tcaaatagac 960  
 tcagtgctaa gggcgggggg ggggttattt ttgggttttt ttgagacagg atttctctgt 1020  
 gtagccctgg ctgttctctc tntagaccag actggtgtca aagtcagaga tctgcctgcc 1080

tctgccttcc aaatgctggg attaaaggtg tgagccacct ctgcctgact gatgttaggt 1140  
ttaacattta gcactgcata aactaggtgt ggtggtgcat ggctctcatc cttatcatac 1200  
atatatacat acacacacat acacacacat atatataatga catatatatt atgtatatat 1260  
catatatatg ataaagatga gggacatata tatatatgta tgtatatgaa tgataagaat 1320  
gtatatgtgt gtgtgtgtgt atcactaaca tcagaaagga atgtcaagta ccatggctgg 1380  
ggacagcact gaatccagag gcagctgcca aggcgctgtc agcaagcact gtccagagct 1440  
tcgcttacc agagtctgag aaagaaaacc gttagagcta ccagacagga cactggacaa 1500  
taaatectcc taaataaagt agaagcetta agggaatcta aacaaagagc cggaacctac 1560  
tcaacaattc agaagctcag ccatttgtct gtcceaaaa atgtcttccc agagggcctc 1620  
aaaacagcac ctgctgtagc cttgctcctg ctgtcaccac agtcagatgt gaagacccta 1680  
ttgctgaaaa cgtaacacag tgtgggcagt gtggctgcta gagagatagt tctgggttat 1740  
atagaaagca ggttgagcaa gccagtaagt gctgtceccc tgtgatctct gcttcagttc 1800  
ctgcctccag gttctgtaag tcagaagtct aaaggaggcc tcagccaggg atgcagctca 1860  
cggcctggcc tcagccccc actcattgcc ctcatcttc ttcctcttg caaatcagca 1920  
atgagtcctc atatgactgc ttgtttgttc ttctgcttc acttgagacc acttaatatg 1980  
cccagcagag ctgtgcacct ctttaatccc aagcattcag gtggcagagg caggtggatc 2040  
tcagagtttg agaccagcat ggtctacaga tgtaaacaac accgagagac agggctctcc 2100  
tggttgccac aggcttcggc cttttcttc tcccagcatg agattcctgg ggaaattcca 2160  
gtttcttggg ggaccatttt tgcaatcatt tctgtagcca aaggatatct tcattcctac 2220  
cagggcagga gaataaaaac attcaaacac ataaaataaa caaaccttt gaaattattt 2280  
taaaatattt tcaaaaacat atttctaata agagattagt atctgaaca gtaactaaaa 2340  
tcaagatgat tagaacagaa gcaaaagacc taataacat ttcttcagag aagaggtaca 2400  
attctcgata agcatgtgaa aggctaagga gaggagaatt gggatctcac ggtttagcag 2460  
gtatggagtt tggggttata ttgcttgttc atgtatgagg gggagggcgt tggctcact 2520  
gcttctggcc aggatggctc cctggactta aatgaccct cccactcaag ctcccagga 2580  
ccaagaacct cagacaggca catgtcatca tgtccagctt aagagttcca attttatagt 2640  
ataaagagaa tatacagatg aaaggtgatg cgttggtgt catggttaca gcgaaactac 2700  
ttcagaagac aacttgaag gagaaaggag ttgacttcgg ttcacagtgt cagagatgtc 2760  
aacctctgac tgactagtgc cattgcttct ggcctgtgg tgaagcagaa ctttatggtg 2820  
aaaaggggtg ggcagagtc tctcactca cagcatctag aaagcagaga caccgagga 2880  
gacggagaga ggaaggaagg ccatgaggat aagacacacc attcaaaggc ttgattctag 2940  
tgagccacta attctaactt ggccccactg cctatttagc catgtagtca tcaagggagt 3000  
acttcgtgga tgaagcctgc ttacctccc atggcactgc tgctccagcc atgagccctc 3060  
tgcgttacac ttcatatcta cettgttagg gtttcattg ctgtgaagag acaccatggc 3120  
cagggcaact cttataaagg aaagcatttc attggggctg gcttacagtt tcagaggttt 3180  
agtccattat catcatggca ggaagcatgg cagtgtgaag aaggcacggt gcgggaggag 3240  
atgagagatc tacatcttga tcctaaggca gccaggagac tttcatccac actgggtaga 3300  
gcctgagcat tggaggaaac cttaaagcca caactataca cttcttcag caaagccata 3360  
ctctaaccag gccacacctc ctaaaaatgc cactccctgg gccaagcatt caagcacatg 3420

agtctatggg gcccaaactt attcaaacca ccacattagg caaacctaac accagtgtta 3480  
cttcaggaga gccaggcagg cctgtccct gtctgagcc tgtggaggaa gatagacttt 3540  
gaacctagag gtggaggctt tagatgagga cacaactcat ggtctggcca agatgttaag 3600  
ttctctgtgc actcaaagcc tcttttttagc aactttcttt ctacagttct tcaacgccag 3660  
gtcctattca ttctacagc gtcagccgtc agctccccgc accatgaca tctgtcttca 3720  
gatttatgac taacggtgaa gatgttggag cctgggaatg aggaaggaaa ttccttccgt 3780  
tgtaaagttg tcgcggcctc tgctgggcat gtggtggagg gtggtttcct ttaaacagaa 3840  
catgctgcag ctctggctc gagtggacc ttgaagagct gtagtggggg ctggggaaag 3900  
ggaggagggt ggaaaaaatg aagagacagg aagctgaagc atgagataga aagaacagat 3960  
ctaacaatccc ccaggtgcga ccacagggtc gtgacatttc accaacta tggaaacaac 4020  
tgtgaagccc ccaaatgaga catatccttg agataagtc gcaggggaaa gtagtggagg 4080  
ggttcaatgg cccgtgctc tccagtgtag caactccagc atcctcaaat cagaattccc 4140  
agaggagcat gaggttaag atgatggccc acgtaggtgc ccaccttcaa tcccatgtgc 4200  
ccagggccat gaagagagat ggctcaggta cctgaagata ctagtacca agccagccag 4260  
aagcaggaag gataaaaaatg ggattaggtc aagaaggaag tttggcaaaa gttccccag 4320  
gcagtgggtc acatctgtgt cacaggctgg cattaagaag aaataaaacc aggctggagt 4380  
ggtagctcag tcaggaaaatg acaaggcctc gtagtctgat gccaaaacc agtttttgag 4440  
ttcatttctt tgtttgttg ttttgctaaa ggatcccagg gtttgatggt catccagcct 4500  
cctctactag gcaagttgca ggccagtgc aaataataat ctccatctc tttatcatca 4560  
ccaccacat catcatcatc atcgatgtcc ctgaggaatg aaaccaaggt tgtcccctga 4620  
cctccatag catgaacacc tacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca 4680  
cacacacaca catgtgcaca caaggattaa aggacttga tatcacagaa cagaaaaaga 4740  
cacagggaac acagggctaa ctcttgcct caattgtatg caatgttcaa gagcttgtat 4800  
agccagaaac tcaaacctca gttatataag gctggttgc atgactctc ccctttatac 4860  
atgcaatagc tttgctgcgt gtgctgtgtc caagctggga atatagctca gacagcagt 4920  
tttgcctagg atgcaaaaag ccctggggtt catccccagt accacataaa cgggatgcgg 4980  
cagcacagcg ctatggcacc agcagcagt gcttggtagc aaaccctgca acaccaggaa 5040  
cactcaggag agggaggcag aaagatcaga agtccaagt catcctcagc taccaagcaa 5100  
ccttgaggct accttggcat atataagacc gtcttccaaa ctgttgtgct tagccgtgtc 5160  
acccacctc taatggggtg ttttgtggta ctagttttag gcaaaatctg aaaatgtcat 5220  
gattttaaaa ctaacctgcc cctaggagct tcagaaataa tctgtaatct gctcctatct 5280  
ggtcacctct ggaagggtg ggctatgaga gaggacact gccagggaca gatgagggca 5340  
cccagcgtcc atccctatca acaggtccgg cggctgtggg tattcattac tgagagaggt 5400  
gcccaagggg ggcacatgtc tgtgaagctc agcagagctg ggtttacccc ttcatagtct 5460  
ctccggagtg cggaaaagag aagggggtg aggctgctga gagagagaca aagaaaacca 5520  
aaacagccac aactgcctc aaagtcggt ttaccacca agtggagtcg cagtggctgc 5580  
tgcccagagc acataggagc caccagtgc tcggtacaag cagttggggc tcagaaaaga 5640  
tctccctggg caggagctat ggcacggcca catccctggt ggctgtgcgt tctggggacc 5700  
ctggtggggc tctcagctac tccagcccc aagagctgcc cagagaggca ctactgggt 5760

cagggaaagc tgtgctgcca gatgtgtgag ccaggtaaga gggggccttg gtaagggcca 5820  
ggtgagtggc gaaagagaga ggactggggt taatacagta aataggcgca gggtagact 5880  
gagctcaagc aaggagggaa atcctgcagc tgtggggagg caccaccttg aagagggcag 5940  
agaaccagcc cttctcaggc cttgatccct taccctctcc tcccaggaac attcctcgtg 6000  
aaggactgtg accagcatag aaaggctgct cagtgtgatc cttgcatacc gggggtctcc 6060  
ttctctcctg accaccacac ccggccccac tgtgagagct gtcggcactg taactctggt 6120  
gaggtgggca aggggtgtga ggtggggacg atggacaagc atctggggga gcaaggctgg 6180  
tgacggggtt ggggggtgcaa ggaggatgac ggggccaag ctttggcctt cttcaaggct 6240  
cacagcaagt ggagccaatg ctgggaaatg cggcacccta ggtggggcat gaattaacgt 6300  
gggcagacat ctagtattcc aggaaaggga taaatagaat ttgaggatt ggtgagaacg 6360  
ggtctatgga taggatcaag acaataaaat gagagaagtg gctctatgac cccagatttc 6420  
gggcaagcaa cccccaacca ataaactgac tgtgttccca gactgcacat gtgcaggttg 6480  
gccattggga atttgggaata catctttcta aggaataac aaagcaacc aataggtaac 6540  
aacctttttt tgcacaaaag ccaatttgag aaaatgagta tgtatgtagc ctgtgttttt 6600  
attttatagt tccaaaaaaa aaggtttttt ttaaactaag aagtataata tctgcagttg 6660  
tgcttatgaa tgctgttatt atttctccat cttcgctaca atttcagaaa ctacggccag 6720  
tatacactag aatagcaggc tttaaagtgg cccctttgaa caaatgttct ctagcaagac 6780  
actttttaga accaggtaac tgtaactatt aaactaccta cttgcaaac gtgtttggtg 6840  
tcaactgggtc tcttgggtact gggttttggt ttgttttagtt tagagacaag gtctagctct 6900  
gtcaccagcag ctggagtgca gtggtgcaat catagctccc cacagccttg aactcctggg 6960  
ctcaagcaat cttctagtct cagcctctga aagtgccagg attacaggtg tgagctgtag 7020  
tgctgtgtcc cgtaaaaaca aaaacaaaa ccaacaccag atgtggtggc tcatgcctat 7080  
aatcccagca cttgggaggc caaggcagaa gggatattgc atattttgta gagacttgag 7140  
cccaggagct tgagaccagc tgggcaacat agtgagacct tgtctctaaa aaaattggct 7200  
ggtcatggta gtgcacctgc agtcccagct acttgggagg ctgagatggg aagatcactt 7260  
gagcccaaga ggtcccaag aggtccaggc tgctcacatc actgcactcc agcctgggta 7320  
acagagcaaaa accctttttc acacacacac acacacacac acaaaaagcc agagcagttg 7380  
ctcacacttg taatcccagc actttaggag gccaaaggcag gcgatccct tgagcccagg 7440  
agtttaagaa caccctgggc aacatggcaa aaccctgtct ctactaaaaa taaaaaagt 7500  
tagccaggcg tggtagcagc aacctgtagt cccagctact cagaaggctg aagtgagaag 7560  
atcacttgag tccaggaagt ggaggctgca gtgagccgtg actgtaccac tgcactccag 7620  
cttgggagac agagtgagca gagtgagacc ctgtttccaa aaaaaaaaaag aaaacaaaag 7680  
cttttccatt gcaaatcaac caaaaaggaa cgtctttaat acacaagaaa tattcttcag 7740  
tctacttaac ttaaaaaatgt aactgtaata gatgcttttc tcttgacagc ggccccggca 7800  
gggttggaac ttttcttagt caaaaccccc ctactcactc tgcagacct tctgaaggt 7860  
cttcgcccc a tactgagccc atcttcagtc cttcacttg ttccaaacta gcccaatcca 7920  
tgacccttct ctgggagctc agccaataga tcccaaagta ccacagcagc acctggctgc 7980  
agaaggacc ccgggaaatg cagtcagggg tgagaagatg ggtgggctga atgagctcgg 8040  
ccctctctgg gccttagtgc tggcatctat gagatgagga catgcctgaa gtcagcctgg 8100

aattttgagc ccagggtaaa ggcgcataac gataccacga tatcaacaag tttgtacaaa 8160  
aaagcaggct ggcgccgaa cgcattcaga tctacgcgtg attaacttta aataattggc 8220  
attatttaaa gttattaatt aacccccca aaaaaaggt gcctatcacc cttctgccta 8280  
cctgtgtatc ctcaggacat ggtgggctc tctggttggc agaaagcaca acaaagcctc 8340  
ttcatcctat actacttctc ttgaccagat gccaaagtta atatgaactg caatcctcta 8400  
tacaccaaaa gttcatgggg gcaccgtgag gtcccactcc acctcagcca attccttgtt 8460  
gctgccccac tcacctcctg agcctcctc tgtttcctgt ccacctttca gcttcctct 8520  
caggctggga gcaggggcca gtagcagcac ccacgtccac cttctgtcta gtaatgtcca 8580  
acacctcct cagtccaaac actgctctgc atccatgtgg ctcccattta tacctgaagc 8640  
acttgatggg gcctcaatgt tttactagag cccaccccc tgcaactctg agaccctctg 8700  
gatttgctctg tcagtgcctc actggggcgt tggataattt cttaaaggt caagttcctt 8760  
cagcagcatt ctctgagcag tctgaagatg tgtgcttttc acagttcaaa tccatgtggc 8820  
tgtttcacc acctgcctgg ccttgggtta tctatcagga cctagcctag aagcaggtgt 8880  
gtggcactta acacctaagc tgagtgacta actgaacact caagtggatg ccatctttgt 8940  
cacttcttga ctgtgacaca agcaactcct gatgcaaag cctgccccac cctctcatg 9000  
cccatatttg gacatggtac aggtcctcac tggccatggt ctgtgaggtc ctggtcctct 9060  
ttgacttcat aattcctagg ggccactagt atctataaga ggaagagggt gctggctccc 9120  
aggccacagc ccacaaaatt ccacctgctc acaggttggc tggtctgacc caggtggtgt 9180  
cccctgctct gagccagctc ccggccaagc cagcggcgcg ccgccacat ggggtgctagc 9240  
gagctgatca tctctggctc ctctggagga ttctgagga acatcggcaa ggagtaccag 9300  
gaggctgctg agaacttcat gagattcatg aatgaccagg gagcctacgc ccctaacacc 9360  
ctgagagacc tgaggctggt gttccactcc tgggctagat ggtgccacgc tagacagctg 9420  
gcctggttcc ctatctctcc tgagatggct agggagtact tccttcagct gcacgatgct 9480  
gacctggcct ctaccacat cgacaagcac tacgcatgc tgaacatgct gctgtcccac 9540  
tgtggcctgc ctctctgctc tgatgacaag tctgtgagcc tggccatgag gagaatccgg 9600  
agagaggctg ccaccgagaa gggagagaga accggccagg ccatccctct gagatgggat 9660  
gacctgaagc tgctggatgt gctgctgtct agatctgaga gactggtgga cctgaggaat 9720  
aggccttcc tgtttgtggc ctacaacacc ctgatgagga tgtctgagat ctctaggatc 9780  
agagtgggag acctggacca gaccggagac acctgacctc tgcacatctc ccacaccaag 9840  
accatcacca ccgctgctgg cctggacaaa gtgctgtcta ggaggaccac cgctgtgctg 9900  
aatgactggc tggatgtgtc tggcctgaga gagaccctg acgctgtgct gttccctcct 9960  
atccaccgga gcaacaagc taggatcacc accaccctc tgaccgccc tgccatggag 10020  
aagattttta gcgatgcctg ggtgctgctg aacaagagg atgccaccc taacaagggc 10080  
cgctaccgga cctggaccgg ccaactctgct agagtgggag ctgcatcga catggctgag 10140  
aagcaagtgt ccatggtgga gatcatgcag gagggcacct ggaaaaagcc tgagacactg 10200  
atgagatacc tgaggagggg aggagtgtct gtgggagcca actctaggct gatggactcc 10260  
gctagcggcg ccggtcctaa gaagaagagg aaagtgtgag gccacgtagg cccgcgatga 10320  
ataaatgaaa gcttgcatg ctgctgactct agaggatctg cgactctaga ggatcataat 10380  
cagccatacc acattttag aggttttact tgcttttaaa aacctccac acctcccct 10440

gaacctgaaa cataaaatga atgcaattgt tgttgtaac ttgtttattg cagcttataa 10500  
 tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa ttccacaaat aaagcatttt ttctactgca 10560  
 ttctagttgt ggtttgcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga tctgcgactc 10620  
 tagaggatca taatcagcca taccacattt gtagaggttt tacttgcttt aaaaaacctc 10680  
 ccacacctcc ccctgaacct gaaacataaa atgaatgcaa ttgttgttgt taacttgttt 10740  
 attgcagctt ataatggta caaataaagc aatagcatca caaatcac aaataaagca 10800  
 tttttttcac tgcaattctag ttgtggttg tccaaactca tcaatgtatc ttatcatgtc 10860  
 tggatctgcg actctagagg atcataatca gccataccac atttgtagag gttttacttg 10920  
 ctttaaaaaa cctcccacac ctccccctga acctgaaaca taaaatgaat gcaattggtg 10980  
 ttgttaactt gtttattgca gcttataatg gttacaaata aagcaatagc atcacaaatt 11040  
 tcacaaataa agcatttttt tcaactgcatt ctagttgtgg ttgttccaaa ctcatcaatg 11100  
 tatcttatca tgtctggatc cccatcaagc tgatccggaa ccgcttggct gcaggctgctc 11160  
 gaaattctac cgggtagggg aggcgctttt cccaaggcag tctggagcat gcgcttttagc 11220  
 agccccgctg ggcaactggc gctacacaag tggcctctgg cctcgcacac attccacatc 11280  
 caccggtagg cgccaaccgg ctccgttctt tgggtgcccc ttcgcgccac cttctactcc 11340  
 tcccctagtc aggaagtcc ccccccccc gcagctcgcg tcgtgcagga cgtgacaaat 11400  
 ggaagtagca cgtctcacta gtctcgtgca gatggacagc accgctgagc aatggaagcg 11460  
 ggtaggcctt tggggcagcg gccaatagca gctttgctcc ttcgctttct gggctcagag 11520  
 gctgggaagg ggtgggtccg ggggcgggct caggggcggg ctcagggcg gggcgggcg 11580  
 ccgaaggctc tccggaggcc cggcattctg cacgcttcaa aagcgcacgt ctgccgcgct 11640  
 gttctctctc tcctcatctc cgggcctttc gacctgcagc ctgttgacaa ttaatcatcg 11700  
 gcatagtata tcggcatagt ataatacgac aaggtgagga actaaacct gggatcggcc 11760  
 attgaacaag atggattgca cgcaggttct ccggccgctt ggggtgagag gctattcggc 11820  
 tatgactggg cacaacagac aatcggctgc tctgatgccg ccgtgttccg gctgtcagcg 11880  
 caggggcgcc cggttctttt tgtcaagacc gacctgtccg gtgccctgaa tgaactgcag 11940  
 gacgaggcag cgcggtatc gtggctggcc acgacggcg ttccttgccg agctgtgctc 12000  
 gacgttgca ctgaagcggg aagggactgg ctgctattgg gcgaagtgcc ggggcaggat 12060  
 ctctgtcat ctcaccttgc tcctgccgag aaagtatcca tcatggctga tgcaatgcgg 12120  
 cggctgcata cgcttgatcc ggctacctgc ccattcgacc accaagcga acatcgcac 12180  
 gagcgagcac gtactcgat ggaagccggt cttgtcgatc aggatgatct ggacgaagag 12240  
 catcaggggc tcgcgccagc cgaactgttc gccaggctca aggcgcgat gcccgacggc 12300  
 gaggatctcg tcgtgacca tggcgatgcc tgcttgccga atatcatggt ggaaaatggc 12360  
 cgcttttctg gattcatcga ctgtggccgg ctgggtgtgg cggaccgcta tcaggacata 12420  
 gcgttggtc cccgtgatat tgetgaagag cttggcggcg aatgggctga ccgcttctc 12480  
 gtgctttacg gtatcgccgc tcccgatctc cagcgcacgc cttctatcg cttcttgac 12540  
 gagttcttct gagcgggact ctggggttcg aatgaccga ccaagcagc cccaacctgc 12600  
 catcacgaga ttctgatcc accgccct tctatgaaag gttgggcttc ggaatcgttt 12660  
 tccgggacgc cggctgatg atcctccagc gcgggatct catgctggag ttcttcgcc 12720  
 accccccgga tctaagctct agataagtaa tgatcataat cagccatc acatctgtag 12780

aggttttact tgctttaaaa aacctccac acctcccct gaacctgaaa cataaaatga 12840  
 atgcaattgt tgttgtaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata 12900  
 gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca 12960  
 aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga tccgggcggc cgctaacttt aaataattgg 13020  
 cattatttaa agttacaccc agctttcttg tacaaagtgg ttgatatctc tatagtcgca 13080  
 gtaggcggta cctggtaaat agaactcca ggtctccgga tactcaccac taaaacaata 13140  
 gcacctcatt gtttttgttt tgttttgttt tgttttttaa ttatacttta agttctaggg 13200  
 tacatgtaca caatgtgcag gtttgttaca taggtataca tgtgccatgt tgggtgtgctg 13260  
 cacccattaa ctcatcattt acattaggta tatctcctaa tgctatccct cctccctccc 13320  
 cacacccac gacaggcccc agtgtgtgat gttecccttc ctgtgtccaa gtgttctcat 13380  
 tgttcaattc ccacctacga gtgagaacac attgttttta accctccca gcagcttctt 13440  
 taaccctcc atttccctt tggeggagac cttgtcctc actcctctct accaccagtg 13500  
 ctctcccctc ctgcaactgc ccagcttcc tcattcttcc cttgcaggtc cttatccaac 13560  
 atggctcaca attcctggga agccacaagg aaaccaaat ctagtagcaa ctgagagtc 13620  
 gcattcatta gcaggtcaca gggccataag gatgccaaga aggaatttgt ccctctcctt 13680  
 gtctgacaa aaggcataag tagaagaaaa ttgttaggtt tggttatgac ctttgacatt 13740  
 ctctctttga catcctccct ttctgcacc ctcttccacc tgtcagggca ctagggctc 13800  
 cccgggtccc cacaagtgc tgcctaagg cccaccaggc tttcttgag cctgtcccac 13860  
 atctgggtgt cactgccttc ctctgaatca ccctctctc aaaccagccg ccagcgagcc 13920  
 cagcccagcc cagctagtgc cctaccacac ccgccccag gataattaac acccagccac 13980  
 ccagcatcgg acctctacac ttgagcaaaa tgtatatttt aaaggcaat tctcacgctt 14040  
 gtaatcccag cactttggga ggccaaggcg ggcggtcac gaggtcagga gattgagacc 14100  
 atcctggcta acacggtgaa acccgtctc tactaaaaat acaaaaaatt agccaggtgt 14160  
 ggtggcacac acctgtaatc ccagctacta gggaggctga ggcaggagaa tcaattgaac 14220  
 tcaggaggcg gaggttgac tgagccgaga tcgtgccact gcactccaac ctgggcgaca 14280  
 aagcaagact ctgtcaaaaa acaacaac aaataaagg ctaagtaact gtaatcaagt 14340  
 aactatttat tatttattta ttttagtgta tccacaggtt gtgcagccat caacactatc 14400  
 taattctata acattttcgt taccccagag aaacttgta cccttagcaa tgactccca 14460  
 tttcttccc ccaaccaacc ccagccccag cccagcccc tgggaatccc taatatactt 14520  
 tgttttgttt tttgttggtg gtgtttgaga caggatctca ctctgtcacc caggctggag 14580  
 cgcagtatca tgatctcagc tcaactgtaac ctccacctc cgggctcaag cgatcctccc 14640  
 acctcagcct cccagtagc ttgggectac aggtgtgcac caccacacc agctaatttt 14700  
 tgtatttttt gtagagacgg ggtttacca tgttgccag gctggtctca aactcctgag 14760  
 ctcaagcaat ccaccacct caactccca aagtgtcggg attacaggcg taagccactg 14820  
 cacctggcta tttctttct ttcttttct ttttttttt ttttgagac gagtttact 14880  
 ctgttgccca ggctggagt cagtggcgtg atctcgctc actgcaactt ccacctccc 14940  
 ggttcaagca attccctgcc tcaccggct atttatatt tgttgatctg ctgctggtta 15000  
 tgctgtgag ccaaattgt acaaattctt aagctttaca atcatgcgtg cctctctgta 15060  
 cgtatattat actttaatta aaagtatta aagtattggg gccgagcaca gtggctcac 15120

cctgtaatcc caacactttg ggaggctgag gctggtgcat cacctgaggt caggagtta 15180  
ataccagcct ggccaataca gtaaaacccc gtcttacta aaaatacaaa aaattagccg 15240  
ggtgtggtgg cacacacctg taatcccagc tacttgggag gctgaggcag gagaattgct 15300  
tgaacccggg aggcagaggt tgcaacgagc caaggtcacg ccattgcact ccagcctcgg 15360  
caacaagagc gagactccat ctcaaaaaaa taaataaaaa ataaaaaatg tatcagggag 15420  
tacaagagaa agtcatataa gctctttcta cttttcatgg tttctatgtc tgaacccatg 15480  
aatcttcctt ctgaaagtc caactttctt ctttaataac aataataatg gcaaaggcat 15540  
tgggggaccg tgagcaaagg gcaggccttt gcaggggtgg gaatggaaag ggaagcacgt 15600  
ccctagaggt gggcctggga tgggggttgg gggatgaagc aagtggacct tgaaggtctc 15660  
cacaggtctg agtgtcctat gtcctctggg cctctcttcc cccaggtctt ctctgttcga 15720  
actgcacat cactgccaat gctgagtgtg cctgtctgca tggctggcag tgcagggaca 15780  
aggagtgcac cgagtgtgat cctcttccaa acccttctct gaccgtctgg tctctcagg 15840  
ccctgagccc acaccctcag cccaccact taccttatgt cagtggtaag ttccaggcaa 15900  
ctctctgtgc catcacgtgg ggtagcggtg ataccceaac cagtactccc cactctacc 15960  
cctagataag gtcagcctgt ttctgccttc ccateccatc cagcacctct caggccttca 16020  
gatgtgccct atggggctcc ctgctgtctac tcattctgtc tctgtttttc cagagatgct 16080  
ggaggccagg acagctgggc acatgcagac tctggctgac ttcaggcagc tgctgtcccg 16140  
gactctctct acccactggc cacgtgagtt ttctccttaa tccccaccgc tagagagaat 16200  
gcatacacga ggggcccagga ggggaagccag acagaaagct cctaggatta gggataagag 16260  
gaggggaaaa agcagagtcc actgttttagg agaggagttg gccaacggtg gcgggtggga 16320  
tagaataagg tgggggaaag gggagaggca aggtgacagg agggctgggc tgaggagacc 16380  
aagggctaga ccctccccta acccctgtgt gtcccctctt attacagccc aaagatccct 16440  
gtgcagctcc gattttatc gcattcttgt gactctctcc agcatgtttc ttatcttctg 16500  
cctgggtgca atcttgttct tccatcaaag aagaaaccac gggccaagta agacacaggc 16560  
cttcccctct gtctctcagc tgtgtctacc acacctaag ccccccacc tactccacc 16620  
acctactctg gctcctcaag tgtccttccc ccagactccc caagcccccc agctctcagc 16680  
cctccacttg ggcttttctc ctcttttctc ccttccact ttcttctctc cactgtctgac 16740  
cgattgtgtt tgcacagatg aagaccgca ggcagtgcct gaagagcctt gtccttacag 16800  
ctgccccagg gaagaggagg gcagtgtctat ccctatccag gaggactacc gaaaccga 16860  
gcctgctttc tacccttgac cgggtgtctg tggggcctt tctgacgagg ggccatccac 16920  
agagacctca atggtggcct gctcccctgt catggctatc agaaccctt cctgtgaata 16980  
ctcaacaaac tgcccttctg agaccaacag ggacaagagc aggatcccag tgtgtggccc 17040  
agcaagctgg ggagactcag gctctagcta taaagcacac ttactctaag tgaaccgtc 17100  
cagctgacaa aactacatgc caggggtgga aatggctcac caagggctcc agagggggct 17160  
tggcagtgag gagcacgaag tgttctcca gaggaccaga gtttgattcc cagcactgtc 17220  
aaatggatcg aaaccagctg taactctact ttcagagggt ctgacacctt tgacctctc 17280  
tggcatctac aaacacagga cggacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca 17340  
cacgattaaa aataataatt ttttttaaaa aaatggaatg agccaccggc aggtgccctg 17400  
gtaccagaag gactgactgc cgtgagagac actatctaca gacacacaga cttcttgccc 17460



ttggttctgt cttctctgta agttgtgaca gtgctgtggg aaagctgagg ctgagacttt 17520  
ctctcagttg agctaaaact ataaataaat tcatttgtct acttctatac acattgtccc 17580  
ttctctctgt gcaggcaaac actggaaccc ggagccaagc cttacggccc aggactcta 17640  
gtaacaagcc agctatggac actctccatg tgctattccc cttcctacag aatgagggtta 17700  
ggggaacaag aggaggagga ggaagaagaa aaaaaagaag ggacagtgaa ctaggaagaa 17760  
ggatagtgtta aatgctaact tcaaatacgc acacctatac ctgaaacaaa caaacaaaca 17820  
atccctcagt gtggccctga gcttgtaatt caaggggtta agtggtgtga caagggcggg 17880  
gcttgagta gagacagcag gagatcactg ctgtgcttgt tggctacca acaattccag 17940  
gttcagaaaag agacctgtc tctgaagaat aaggtgggtt aatagagcaa gacaccagt 18000  
gccctcaccg agcctccaca cacaggcagg gctgggcata ctcaccaca caagtgtata 18060  
caccgcatat acacaaatac aagttaaaag tgagacttea catagctgtc cagcctccta 18120  
aaattccaat cctagaacta ggccacacc catctctctt gttcgatcac agatctgaac 18180  
agggagttgt caccagggca gacccaaagg atttaacatg gactgaaagg aagaagggtc 18240  
cagagtaccg gggaatctat cttctggctc caccctctt ccagcctct catagttggg 18300  
gctgatggga aagctgatgt ggtgatacca ggttttgaaa tcacctgggg atttcttggg 18360  
tgcgggggtg accttaggga gaacagaaag cagagctggc tgcagccatt actggcctcg 18420  
ggcggggcggc cacagaggca gttgaagtga aagtgaagaa gaaacgataa gagaacggag 18480  
accacaggtg ctaagtgagg gtgctcacag aaccctctt tcagccagag atcactagca 18540  
ggggaactgt ggagaaggca gccagcaagg aagagcctga gactagcctc catgggcttg 18600  
gagcccagct ggtatctgct gctctgtttg gctgtctctg gggcagcagg gactggtgag 18660  
tgcggagacc aggtctggggc ctgggggact gggggggagg aagcgccaag ctaaaggagc 18720  
cccaggaagc caccttctca gaacagcacc agcttgtctg ctaagcccag caaatgagtg 18780  
cggcactcac aacatgcgga accagtttg agaggggtac ggcagagAAC tcacagaaaa 18840  
ggggggcttc ctgatggga aggcagggtg ttagcattct gtgggacagc tctactgcct 18900  
gagttgaatc cttagaagag gaaggggctc cccaggctaa gaaatcattg gtttgggtgac 18960  
tcctgggtgg cgtggctatg gcagaaagca gaggcctctg ggaaagtgg gtgatgagaa 19020  
aaaggttgtc aatgtcccta ggaacagcag tgtcttggct cctctcccct gtggcagtat 19080  
ttcttattcc ttttttttt ttttttttt aacctgagaa ttctttcca gaaattccct 19140  
tgcattccac agctgagact cagaaataca aagcataaac ccctctggct ttgatcagga 19200  
cagatctagg acttgaata actcacagag ccgctgctg agtagcaggt gcctcagcag 19260  
aagctgggtt tatagatgac accaggacag cggggctcag aaggcacctt tacctgctgc 19320  
tcagcccggg gcttggtgaa ggggtgggaa gagtgtggag gacgagggtg cttgttccac 19380  
tttccctgca gaccctccca cagcggccac cacagcagaa agacagcggc agcccacgga 19440  
catcatctta gactgcttct tgggtgacaga agacaggcac cgcggggctt ttgccagcag 19500  
tggggacagg gagaggcct tgettgtgct gaagcaggtta ccagtgctgg atgatggctc 19560  
cctggaaggc atcacagatt tccaggggag cactgagacc aaacaggatt cacctgttat 19620  
ctttgaggcc tcaggtaaaa tctccccatc ctaggcttcc tccacaggaa cagccccgtt 19680  
cccagttcta tctaccacg cctgcccccc ccccccccgt gtctggcgtt gtccatcaa 19740  
cattacttct gtatgctgcc cttctcccca gtggacttgg tacagattcc ccaggcagag 19800

gcgttgctcc atgctgactg cagcgggaag gcagtgacct gcgagatctc caagtatttc 19860  
 ctccaggcca gacaagaggc cacttttgag aaagcacatt ggttcatcag caacatgcag 19920  
 gtttctagag gtggccccag tgtctccatg gtgatgaaga ctctaagaga tgctgaagtt 19980  
 ggagctgtcc ggcaccctac actgaacctc cctctgagtg cccagggcac agtgaagact 20040  
 caaggtgaga aaacaaaatg cagtggcaca ggaacatttt gtattattgt gtgtgtgtgt 20100  
 gtgtgtgctc gtccatgctc acatacgtgt gcacatgcc aagcacatag gtagagatca 20160  
 gaggacagct tatagaacct accatgtggt ttccagggat tgaactagtt cactatgctt 20220  
 ggcagcaagc actttatgca ctatgccatc tcaatagccc caagatagtt ttttggtttt 20280  
 ttggttttgg tttttttttt tttttggggg gggggttggt gtttttttaa tttgtttttt 20340  
 gtttgtttgg ttggtttggt ggttggtatt ttgttttctt ttgtggttag agatgggata 20400  
 gaaggaagaa aacaaaatc ccacaggtcc tctgaggtc cccatagagc ttcattcttt 20460  
 ctttctaaaa tatcctgagt caagaagagg ggatgctagg agatccttat tcgagcaagc 20520  
 atcaaaacat aataatcctc aggtattttc tccaaagtgg ggaagcaaca catgaggaca 20580  
 ctgtagctac acatgtcact aactcttat ttagccaaac tcatgtttcc tcccaggag 20640  
 agggagtctg gtctggtgct tcatggcaat tacagcagag cacagggaga aagaagtgct 20700  
 cagtagctct tactagtgag cccattctc attctctccc acttagtacc tctaccagg 20760  
 ttcaaaaacca agaggaaaca tattgacagg cacctggaga gtccagttca ttattttgcc 20820  
 tcaaaaagg agaaaatcaa gtccacagaa gatgacgatg agggggcccc tctctatcc 20880  
 ctgcaaaccc ctaaacatt agcctttagt attatgtgt cccatactga ggatagaacc 20940  
 tagagccttg tgctaaacac gagctctact actaaactac agcttcaatt cttttttcag 21000  
 ttttattgtg aaacaggggt ctccaccaga tgccttgcca ggcttgaaa cttgtgattc 21060  
 tgtcatgcct ccttagtagc tgatggtaca ggcatatact accacacct ccggtctac 21120  
 agtcccttct gaatgtgctc tgccacatca gaaaagatgt tcagcatctc ctatccttg 21180  
 ccatgggtag tttagtgtt ctccctttt gaacttattc agatctaca ataaatgaaa 21240  
 caacataccc ccaccagcc gtgacttatt tctgacctat ttcgtcagct gtcatagttc 21300  
 ctctctacc gactaacata gatatctcc cctggactga ctaggctgta gggaccacaa 21360  
 cacttacc ccacaaatgctc ccatgtgcag ttagggctga tagctgaaag tcaaggccac 21420  
 tctgcttcac aataaccaag gatcccaaaa gcctatcaag gctggggagt gctctactca 21480  
 cagtaacaag gtccagtg acacaggact taacagtatt tcattcatgg aaagacgtga 21540  
 ctattgaagc tggacgtact gtccacatct gcagtccttg cacttgagg gactgaacca 21600  
 cgaagattgt gggtttaggc tctcatgtgt gccttctgctc accattaatt tatggctcca 21660  
 ctggacagga aatgaactca gtaccactgt ccagggaagg gagccggagc tgtctgtcca 21720  
 tggctcagag gccagggtgac ctaaggaag aaacagtctg taagtcacc tttctttctc 21780  
 tctacagtgg agttccaggt gacatcagag acccaaaccc tgaaccacct gctggggctc 21840  
 tctgtctccc tgcactgcag tttc 21864

<210> 23

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 23  
gcagactcaa gtaccagtga aggg 24  
<210> 24  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 24  
tagtgcctct ctgggcagct ctt 23  
<210> 25  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 25  
cctattacag cccaaagatc cct 23  
<210> 26  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 26  
agcactcccc agccttgata g 21  
<210> 27  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 27  
catgaggtag ctggtaggac ct 22  
<210> 28  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 28  
ctttgttgag gggctcagag gat 23  
<210> 29  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 29  
ccaaatgctc ccatgtgcag t 21  
<210> 30

<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 30  
acctggaact ccactgtaga gag 23  
<210> 31  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 31  
tcttatcatg tctggatccg gg 22  
<210> 32  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 32  
tgtcaaagag agaatgtcaa aggtc 25  
<210> 33  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 33  
cagtgactcg gtacaagcag ttg 23  
<210> 34  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 34  
gtcacagtcc ttcacgagga atg 23  
<210> 35  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 35  
gaagatgggt gggctgaatg ag 22  
<210> 36  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 36  
gggacaaatt ccttcttggc atc 23  
<210> 37  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 37  
aactgcacag tcaactgcaa tg 22  
<210> 38  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 38  
gaaacagaca gagcgagtca caag 24  
<210> 39  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 39  
caagugugua agacga 16  
<210> 40  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 40  
ucuggucagu cagcgug 17  
<210> 41  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 41  
ggacacagaa agatgccttg tt 22  
<210> 42  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 42  
actaaggact tcccctgggc t 21  
<210> 43

<211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 43  
 caggaggttc ccctaccttt 20  
 <210> 44  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 44  
 cttggttccc catctccaac 20  
 <210> 45  
 <211> 15858  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 45  
 gtgaggacc tatccatgt tgtaatatct caagttctgt gtgtctccat tgctcagtga 60  
 aggaagaatg tgggcacacg tccggtagat aagggggtgc tgtatcatgc caggggcaca 120  
 tggtaacatg aagcttacct gaagctacat ggatgggatg gtttagccca gaatccctgc 180  
 agaggctggc ccttttctg ggctatccaa gggccctcaa cattgctgct ccttcagggg 240  
 acccatctca gtcacctgta ctgcctgact tgggctagac cettccggtt ccagaatcac 300  
 tggctctaga gactcacatg catgtccctg tacggacatc tcgatataaa caagcatggg 360  
 tgtccaccaa cctaaaaatg taggggaatc caagcttccg aaggcctgga atgtgtccgc 420  
 catcactttg tgctgaggca gctgggaccg tcttccttc gctgcattgc actgcactgt 480  
 tgctcaatgg atctccaggt tccctgcagc tctgctcagt agctgccttc ccagggcag 540  
 gctaccttcc tcctctctgc ttgccagccc agatccatcc ctacctatcc ctgcccacgc 600  
 cacaagaaag agatgacaac tctgtttgta gaacaaagaa cactggagtc aggggtggga 660  
 actttgaaca tttcacatca cgggaccatt cataaaaggc tgttctgcaa cctcgggtgc 720  
 cccacaatgg ggtctgagct ggatcatgag atgcttgact cctctgcagg gcatatgaga 780  
 cagctttctc tcctggttct gaaatggact cctggcatca tgcagagtga catggaccgg 840  
 gaaactgcct atggcttctt catgctgggt agcctgtaca taatgtaggg tcgagcctcg 900  
 tgtgtagact gctggggacc caggcaactg tggtctgcag gtctctgctgc tggatgagg 960  
 gcagtgttg cttccagctt gttctgggct tgtgctatag gcctctacat ggaccagtta 1020  
 aaactggact ggacatggaa ttggtgctg aggcagccag tacagaaggc cctaatgaag 1080  
 caaggctgtc aggactggct ggggctgaag actgggacat taaaacctga cccttcagaa 1140  
 agaaaaagaa acattctgca aggtttcctt ggatttaaaa gtcacatga gggctgagag 1200  
 ctttaggagc cttcctggaa ctgggtgatg ctcccagagg cagcagcctc aactgaaag 1260  
 gtagctagct aggagctagc ttagttaagg gatcctataa gaagagttgt gctgagggag 1320  
 agttgaagaa aagtaggaaa ttcccaaaat tgagcttctt ggaagctagt tgggaatagt 1380

actcctgccc cttggcaact agcatctcct acccegeccc tcccctatggg aggcagcagc 1440  
ctctcacccc atgagagttg gtacacagtc actctgtttg cacaacaact gtcatttaag 1500  
caaataatct aggtgcttgc gaatggttcc ctctagcaca ggaactcata cctgcttctc 1560  
aagactgtga tcatgaccca aggatccgtc gttacaagat ggttaaagag gaatttagac 1620  
acagtgcacc ccaggaata ggggtggctg tttctgtgtc ctttgctgaa ctctattgtgc 1680  
tgctaagtat gcaaagatgg cagtaagcag aagggtctgc cgctgccggt cccttctctc 1740  
tgtgattgag gtctagccaa cctcaagaag ctatagccat gtttactttc aaacgctacc 1800  
tcagagtffc caagctatgt gacagccaca gcccacaat tctcaggga gcccgggca 1860  
gtgtctgggt ggggtctggg agtcacagga gggcccaga gccaagcga gcctgaggtg 1920  
gagggagga gggctgggtg gggctggacc tgtgtacaca accacaccta ctatcgggga 1980  
gtagctgtgt ccagtcactg agcagaggcc aactagtgtt tcttcatctc cctgggaaa 2040  
gcagcagaca ggatggcctg gtggaaagcc tgggtaagtt gaaatggtct ggggagatgg 2100  
gtcccctagtc cttgttggga gtgtggagga cacaaaagt aaagctgaac ctgcgaggcc 2160  
aagtcccgtt gaggaactg ggagaaaaac cctgtccacg cttagaaaag ttaaggtttg 2220  
aaaggtaaga cagttaaaaa taaaacaaga acatTTTTTT ttttaatttt taactgcaa 2280  
gagaaagcta aaggattcga gtgtccagag ggagacttct gtaggggaaa agctacttta 2340  
gtgcctctgt ggatatgtgc aatgtgtgag tttgtgcttg gagagactct agcaggctgc 2400  
tccttgacaga agtagcagtg tgtgaaagcc gctagggggc ccaggaagtt gactttggaa 2460  
aacattgccc tgtttgagca tttgaatgtt cagatgggtt ggatctaggt ctggagagga 2520  
tcccggatgg aaggaacatc gagggacttg aatgacagcc taagggttg gagctcgact 2580  
tccaaacagt acggagccac ctctaccac atgtacagcc gaaacacctc atgggcagcc 2640  
acacggctac atgtgctatg caccttctc gtcccagctg gggcactcaa agagggaaa 2700  
gctgaggttc tgggacacca ggtagcttgc tcaggtccct cggacagctt agactagaga 2760  
aagcccaaag tctctgcaca gtctccgggc tccttatagg cagaagatcc aagttggccc 2820  
agcttcagga aaatctttgt tgctgtgcca ccaccagag agaagctgta ggtgtagatg 2880  
ccccgggaag gggggggggg cgtctctgga cagataggac agactagaag gcaggaagag 2940  
atgagctatc atcctgacct tcaggagaaa gcagcccag cagtggctgt gcatagcttc 3000  
acagcagctg ctggcaatac gccttgtgca ggtgcacaca gcaggctct gagtgttggg 3060  
cagttcctgc agtcagatgc tggccaaaat agcctgattc taggccctgc actccatagg 3120  
gcaggggcag gggccatcct cttggggacc tgattggatt ggttggtact ctcagaacct 3180  
tctgtatgga tggggacact cctgtcggca tctctacca ctgtcactgg aacctcacag 3240  
caagtctgta ggatgggtg ctttacacac aagggtggaa atggagactc cagtaccaca 3300  
gctgccacac tagtaagggt ttaggtctgg gcagcctggg tccggatgca ctcagtcac 3360  
cagcatctct gacccttggg agagcagact cagggcagca agccttctgt atctgtccag 3420  
gctgccagtg aggacaaaat gtcccctgag taaaagtgt gattaaatac aggactggag 3480  
aggtaaaaag agtgacagag agtgctgtc ttcaaacag gttccccctt tgtggtgaag 3540  
agatcagaca aaagtatgcc agatcctgca tgccatgac agacggtgtt ctagacatag 3600  
catcaaaaat tgctgaatt gccttttcc tgggtgtgtg atggtctgga atcactggcc 3660  
tcagggtagc tccatcagaa gcctgaggct gacatggaag ctgggataga tgctcctaa 3720

tctccactct aggcagtgtc ccatccttgg caccagaac gctgatctct ttctatagaa 3780  
ccttagcaag ggaagagaga caggcttctc aatgtggtga tatctgagcc acccctggag 3840  
ctgctgacaa atacaggctc cagaatggta tgggggacac tcctcaatga ctaagtttct 3900  
gacacttctt tgggtcaggc agagaaacta ggaagtgaga acttaaagtc tgcccacccc 3960  
acacccctca gaaaacccac atgtctatgg gtgaggctct ctgcagtga acattccaat 4020  
aaaacccagt gtctggaaaa gtgtgaatca tctgaagagt gggggaggta gacagagctc 4080  
aggttgtgaa ccaggctgtg ggtgaagtgc cagcttacta gccaagccac caagcccagg 4140  
ctcctaatac gactgctgga gaagtgga ggctgagcaa catgcttaac gcactttaca 4200  
gagaatgctc aagtagactt ctagtagtag cagtgtgtga cctcagaagc aaggagtgtg 4260  
tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tggcagcatt tggctcactg gagaaacttt 4320  
ccctaggaat tatttctaac agttcctgtt ataaagcatg gtgcaataaa tgggaagga 4380  
aactctattt ttggacacgt gaaaatcaac caaggacac agaaagatgc cttgttcctt 4440  
tctcagaagc aggaccctta tggaggtggg gacctgtgt gtatttccag ggtctagcct 4500  
gaggcttgag gggacagaca atgagtgtag ggagaaaagg aaagataggt ggagggtgct 4560  
tgagaagaaa ctaagagaaa aggaggcaaa cgggggagga gaggagacgg aaagaaggaa 4620  
gccggacgaa ggggaagggc aggcaggtgg gtgtaaggac cctgcagcct gggtagagaa 4680  
ttggatgaatg gttgggcgaa cgtgtgaggt gaaagcagg tgggtggatg gggaacaaca 4740  
gaagagctgt gtgagcaggt gggatgaacga ccagaggggt tcgactaac tctccatctg 4800  
aaggaaccag gtctcccctc aaccctacc ctagtcccc cactcttca ccaccctcc 4860  
ccctaaaaca cacagggtcc tgcactctaa gcactgata aattatgcgg agcacacaga 4920  
taagtggcct ttacactggc cccgcctact gcgactatag agatatcaac cactttgtac 4980  
aagaaagctg ggtgtcgaca agcttgatat aacttcgtat agcatacatt atacgaagtt 5040  
attaacttta aataatgcc attatttaa gttactcgac gcggtacccc cggatccaga 5100  
catgataaga tacattgat agtttgaca aaccacaact agaatgcagt gaaaaaatg 5160  
ctttatttgt gaaatttgt atgctattgc tttatttgta accattataa gctgcaataa 5220  
acaagttaac aacaacaatt gcattcattt tatgtttcag gttcagggg aggtgtggga 5280  
ggttttttaa agcaagtaaa acctctacag atgtgatag gctgattatg atcattactt 5340  
atctagagct tagatccggg ggggtggcga agaactccag catgagatcc ccgctgga 5400  
ggatcatcca gccggcgtcc cggaaaacga ttccgaagcc caaccttca tagaaggcgg 5460  
cggtggaatc gaaatctcgt gatggcaggt tgggcgtcgc ttggtcggtc atttcgaacc 5520  
ccagagtccc gctcagaaga actcgtcaag aaggcagatg aaggcagatc gctgcgaatc 5580  
gggagcggcg ataccgtaaa gcacaggaa gcggtcagcc cattcgcgc caagctcttc 5640  
agcaatatca cgggtagcca acgctatgtc ctgatagcgg tccgccacac ccagccggcc 5700  
acagtcgatg aatccagaaa agcggccatt ttccacatg atattcgca agcagcatc 5760  
gccatgggtc acgacgagat cctcgcctc gggcatgcgc gccttgagcc tggcgaacag 5820  
ttcggtggc gcgagccct gatgtcttc gtccagatca tctgatcga caagaccgc 5880  
ttccatccga gtacgtgctc gctcgatgc atgtttcgt tgggtgctga atgggcaggt 5940  
agccggatca agcgtatgca gccgccgat tgcacagcc atgatgata ctttctcggc 6000  
aggagcaagg tgagatgaca ggagatcctg ccccgccact tcgccaata gcagccagtc 6060



ccttcccgct tcagtgacaa cgtcgagcac agctgcgcaa ggaacgcccg tcgtggccag 6120  
ccacgatagc cgcgctgcct cgtcctgcag ttattcagg gcaccggaca ggtcggcttt 6180  
gacaaaaaga accgggcgcc cctgcgctga cagccggaac acggcggcat cagagcagcc 6240  
gattgtctgt tgtgcccagt catagccgaa tagcctctcc acccaagcgg ccggagaacc 6300  
tgcgtgcaat ccatcttggt caatggccga tcccatgggt tagttcctca cttgtcgtta 6360  
ttatactatg ccgataact atgccgatga ttaattgtca acaggctgca ggtcgaaagg 6420  
cccggagatg aggaagagga gaacagcgcg gcagacgtgc gcttttgaag cgtgcagaat 6480  
gccgggcctc cggaggacct tcgggcgccc gccccgccc tgagcccgcc cctgagcccg 6540  
cccccgacc cacccttcc cagcctctga gccagaaag cgaaggagca aagctgctat 6600  
tgcccgctgc cccaaaggcc taccgcttc cattgctcag cgggtgctgc catctgcacg 6660  
agactagtga gacgtgctac ttccatttgt cagctctgc acgacgcgag ctgcggggcg 6720  
ggggggaact tcctgactag gggaggagta gaaggtggcg cgaaggggcc accaaagaac 6780  
ggagccggtt ggccctacc ggtggatgtg gaatgtgtgc gaggccagag gccacttggtg 6840  
tagcccaag tgcccagcgg ggctgctaaa gcgcattgctc cagactgcct tgggaaaagc 6900  
gcctccccta cccggtagaa tttcgacgac ctgcagccaa gcggttccgg atcagcttga 6960  
tggggatcca gacatgataa gatacattga tgagtttga caaacacaa ctagaatgca 7020  
gtgaaaaaaaa tgctttattt gtgaaatttg tgatgctatt gctttatttg taaccattat 7080  
aagctgcaat aaacaagta acaacaacaa ttgcattcat tttatgtttc aggttcaggg 7140  
ggaggtgtgg gaggtttttt aaagcaagta aaacctctac aatgttgta tggctgatta 7200  
tgatcctcta gattcgcaga tccagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc 7260  
acaactagaa tgcaatgaaa aaaatgcttt atttgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta 7320  
tttghtaacca ttataagctg caataaaca gttacaaca acaattgcat tcattttatg 7380  
tttcaggctc agggggaggt gtgggaggtt ttttaaagca agtaaacct ctacaaatgt 7440  
ggtatggctg attatgatcc tctagagtcg cagatccaga catgataaga tacattgatg 7500  
agtttgaca aaccacaact agaatgcagt gaaaaaatg ctttatttgt gaaatttgtg 7560  
atgctattgc tttatttga accattataa gctgcaataa acaagttaac aacaacaatt 7620  
gcattcattt tatgtttcag gttcagggg aggtgtggga ggttttttaa agcaagtaaa 7680  
acctctacaa atgtggtatg gctgattatg atcctctaga gtcgcagatc ctctagagtc 7740  
gcagatctgc aagctttcat ttattcatcg cggcctacg tggcctcaca ctttctctt 7800  
cttcttagga ccggcgcgcg tagcggagtc catcagccta gagttggctc ccacagacac 7860  
tcctcccctc ctccaggtatc tcatcagtg ctcaggcttt ttccagggtc cctcctgcat 7920  
gatctccacc atggacactt gcttctcagc catgtcgatg gcagctccca ctctagcaga 7980  
gtggccggtc caggtccggt agcggccctt gttaggggtg gcatccctct tgttcagcag 8040  
caccagga tcgctaaaaa tcttctccat ggcagggcg gtcagagggg tgggtggtgat 8100  
cctagccttg ttgctccggt ggataggagg gaacagcaca gcgtcagggt gctctctcag 8160  
gccagacaca tccagccagt cattcagcac agcggtggtc ctctagaca gcactttgtc 8220  
caggccagca gcggtggtga tggctcttggt gtgggagatg tgcagggtca cgggtctctc 8280  
ggtctggtcc aggtctccca ctctgatcct agagatctca gacatctca tcagggtggt 8340  
gtaggccaca aacaggaagg ccctattcct caggtccacc agtctctcag atctagacag 8400

cagcacatcc agcagcttca ggtcatccca tctcagaggg atggcctggc cggttctctc 8460  
tcccttctcg gtggcagcct ctctccggat tctcctcatg gccaggctca cagacttgctc 8520  
atcagacaga ggaggcaggc cacagtggga cagcagcatg ttcagcatgg cgtagtgctt 8580  
gtcgatgggtg gtagaggcca ggtcagcatc gtgcagctga aggaagtact ccctagccat 8640  
ctcaggagag ataggaacc aggccagctg tctagcgtgg caccatctag cccaggagtg 8700  
gaacaccagc ctcaggtctc tcagggtgtt aggggcgtag gctccctggg cattcatgaa 8760  
tctcatgaag ttctcagcag cctcctggta ctcttgccg atgttctca ggaatcctcc 8820  
agaggagcca gagatgatca gctcgttagc acctatgggt gcggcgcgcc gctggcttgg 8880  
ccgggagctg gctcagagca ggggacacca cctgggtcga gccagccaac ctgtgagcag 8940  
gtggaatttt gtggctgtg gctggggagc cagcacctc ttctcttat agatactagt 9000  
ggcccctagg aattatgaag tcaaagagga ccaggacctc acagaccatg gccagtgagg 9060  
acctgtacca tgtccaaata tgggcatgag aggggtgggc agggcttgg catcaggagt 9120  
tgcttgtgtc acagtcaaga agtgacaaag atggcatcca cttgagtgtt cagttagtca 9180  
ctcagcttag gtgttaagt ccacacacct gcttctaggc taggtctga tagataacc 9240  
aaggccaggc aggtgggtga aacagccaca tggattttaa ctgtgaaaag cacacatctt 9300  
cagactgctc agagaatgct gctgaggaa cttgacctt taagaaatta tccaacgccc 9360  
cagtgaggca ctgacagaca aatccagagg gtctcagagt tgcagggggg tgggctctag 9420  
taaacattg aggccccatc aagtgttca ggtataaatg ggagccacat ggatgcagag 9480  
cagtgtttgg actgaggggag gtgttgaca ttactagaca gaaggtggac gtgggtgctg 9540  
ctactggccc ctgctcccag cctgagaggg aagctgaaag gtggacagga aacagaggga 9600  
ggctcaggag gtgagtgggg cagcaacaag gaattggctg aggtggagtg ggacctcacg 9660  
gtgccccat gaacttttgg tgtatagagg attgcagttc atattagact tggcatctgg 9720  
tcaagagaag tagtatagga tgaagaggct ttgttgtgtt ttctgccaac cagagaggcc 9780  
caccatgtcc tgaggataca caggtaggca gaagggtgat aggcacctt ttttggggg 9840  
ggttaattaa taactttaa taatgccaat tatttaaagt taatcacgcg tagatctgca 9900  
tgcgttccgg cgccagcctg ctttttgtg caaacttgtt gatatcgtgg tatcgttatg 9960  
cgccttaata ttctggattg caagtgtgta agacgagggt ctgggtactt tggttatcaa 10020  
gtttattcca taatccatag aatatccatc ctacagttct ctctaaactt aaccctctgc 10080  
ccaatacgat cccatggtct tgcaaacacc ctgagctttg gggatgctca gcgtgtctcc 10140  
tggccctctg aaatagccac acctcaccac aggaaagacc agaataggct tagaaccttc 10200  
ctcacaagaa aaaaaaaaaatg tccagatgcc acatccagac acaaagccac tccttgtgag 10260  
tttatttcca cccattctgc tgtacacggg gcggatgaga actgtgtgtg accagtccgc 10320  
tatctgccct cagccaacag gtaatttctt ttataagct ctggtcccag ctgcaccagt 10380  
ctattagttg gagcaccag tcacacctg caaggctcca tctggtctca gagcccaggg 10440  
gaagtcctta gttaacaaa gtagactaca tggttaagcca ggaggttccc ctaccttcc 10500  
tgtattttcc atcatgagca gacctgtttg tcttcaggt tgaacaggag ggcgtcagcg 10560  
tgaagggtag ttctcattc aaccagacc ctgatgcaga gacctctac aaagccatga 10620  
aggggattgg tgagttacca cccatggcct ggccgctggg gcctcacatc ccacatctc 10680  
agaaagtgga tgccaggac agtcaggcat agacggggcc cccattttac taagtgactt 10740

agttacttac agcatcacac cggctctgag ttgagtggct gttccttccc aagtgacaat 10800  
 gacaggggaag gccatcatta atctgaagtt tctcacttgt aaaacggctg ccaggactct 10860  
 ggactcgata gttctcttct gcttcataaa cacacacttc ccaatccatc aggggaagat 10920  
 ggattggcac caggcccact gtgggcatgg gatgggagtt taggtgtggc actgaggcca 10980  
 gggcgatcag ccacatggat cctgcagctt gtctcttacc ccacgctgac tgaccagaca 11040  
 gtcagctgct tcccgtctta gaactagtgg atcccctcga gggacctaata aacttcgtat 11100  
 agcatacatt atacgaagtt atattaaggg ttattgaata tgatcggaat tgggctgccc 11160  
 atacctcaca tgagcgtgag tgggaaggga ccggtttacc ctaggatttg gtctcgctcc 11220  
 aggtaggagt catctctcag ctggctctgc ccagtgagtc aggacactaa agagaactgc 11280  
 cgtgcccmeta ggggcctaga ctgcatctc ataccactg tttccatgaa aactttactg 11340  
 ttatccccac ttctaataata agcaaatgca ggctccagga aatgagcctt ctctgcatg 11400  
 acatacaagg cagactctca gacccaatgg tctagaattc gctgtgatat tctctaatg 11460  
 tgaccaacac aagggaaga cttaaaatat ctcccttggg catgcttcaa aggtccacag 11520  
 ttgttgcca aagctccctg cccttggtt ctatgctatg aagtcaagcc tgagccatac 11580  
 ccaacactat gtaagttgga gatggggaac caagaggtgc actacctgga tgccttgttt 11640  
 acaccatgga aattggacgt ttgcagctc cccccctca gtcttttctg atgccccccc 11700  
 ccagaggtag aagggttct cactactgtac actcctacag gaaccaatga gcaggccatc 11760  
 atagacgtgc tcaccaagag gagcaatgtg cagaggcagc agattgcaa gtcttcaag 11820  
 gctcaatttg gaaaggtaag caggttgggt gccaaagacc aggcagttcc tcccagaatg 11880  
 gaaatgtgta catagggcat attgcattaa aacaatactt ccattcatct gtggtcaagt 11940  
 ttctctggct gttctggtt tttgtttgtt tttttgttgc aagagccatt tatagctccc 12000  
 gtttttgggt tttttttgt tttttgtt tttttctgc aagagccatt tatagctccc 12060  
 aagccccagc atgacattag ccttgcagtg tctagccca tttcttccct gttctctctc 12120  
 cagctttgct gtcccactac ctgaaactgac ctccatata cctgctccct ggcaacacct 12180  
 ggctcccttc tgtttcacag cacaggcaca tgcttctcac aggggagtta ctgtgtgtt 12240  
 cctctcctgc ctgtggatac tctaggggca ctttgctgc tcccagccct tagcacagaa 12300  
 ccagaggcgc acagtgaatg ccagaggtt gtgcataggc atgtgggtgc ctagagtctc 12360  
 cccatttgct cacagattta acacaaaagc atcagtgatg aagtttagtg aagccatag 12420  
 taactccttt cccctccaag ctacacatta tctccagat tcaacatcag aaaggttgag 12480  
 taatttcta aggtccaga gctcttaagt gacagtctga cagccctgta caaatcagct 12540  
 ggggtgacc tagtggttc ttgtagttgt gtgtgcctc aggaagagtc aggttgagac 12600  
 agaatcttgg aatctcttc tttcttccc tctctctct ctctccaacc cctctttcc 12660  
 ctctcctcac tgaatcatgt aataagttaa gcatggagct gccacctcc gatcttgag 12720  
 tcccgaagc aatggcaatc ctatcttct gagtttagaa tgtgcccagt actggactgt 12780  
 gtgctgagct gtcacatgct tgtgtcatca caccaacagg acagagtcca tgtgggaagg 12840  
 aagaaagagt ccccaggcca gccttaacca cctgectgca ctgcagtggg cttagaagat 12900  
 aagtcactc gacctttct tctgctgtc ttaggacctc actgagacct taaagtcaga 12960  
 gctgagtggc aaatttgaga gactcatcgt ggccctcatg taccgcat acagctacga 13020  
 ggccaaggag ctgcacgat ccatgaaggt actccactt gccataaatc agagtggcca 13080

cctgggcctg actgacctaa tgagcttgca acctgctcca acagccgccc agcagtgggg 13140  
ctgaccagtc acaataaagg tctagatcag tacttcttag aatagggttg gaccagcagg 13200  
agtgcagggg aatcggaaat ccatctctgc agtctgagca ctgccccttg gccatccttt 13260  
gcttcatcat tcctgttact ctacagatt aggtggtact ggagaccag aagccacaac 13320  
atccccacta aaaggatact cagtacagtc tatgccaggc attttacagc tgtgacctct 13380  
aagccacct tcagggtagg cttgcctcat tctctcact aacagatggc agtgcttaag 13440  
ggtgggaagg tggagccacc taggtgagac caccagcta aggaaagaga gctgaggtag 13500  
cttacagcat tagctgtcct aagaaacaat ggtggggatt caatatcacc ctccaacaga 13560  
agagggcaga agaggcagtg gccatagctt cttagaagat agggcaggcg gagcaggaga 13620  
ccaagggcag agcactccag aacacagagg tctctgtccc cagggttag gaaccaaaga 13680  
aggagtcatc attgagatcc tagcttctcg gaccaagaac cagctgagag agataatgaa 13740  
ggcatatgag gaaggtaagg ggttgcaaag atggtggggg ggaacctag acatggccta 13800  
cgttttggca acctgatagg gaaaaggagt caggcagttc ccaagggaac tcaaccagag 13860  
tggaaaggag cctttggaag gtcttctgag ataaagtcca actagtgcc acgggtgcca 13920  
aatcctgtac ccaacagtaa ttgagcatgg ctacagatg gggagagtga tgtgtgcccc 13980  
gatgagctca tgtcccttaa tgctgtggca gtgctgggga cgggggcagc agtgggcaag 14040  
agtacttggt ggctgcacat gggttgacct agaactag agagggtcat ctgccagggc 14100  
cccattatgc taggggagcc ccactggctt actctctat atagtgccta gccttccagg 14160  
caagcaaagg ccagccagtc ctccatgttg tgcttctggc caagggagtc taaaggctct 14220  
ggctttgctc aacttgcaa tgaaatagtc tcagtctgca ggctctggtc tggctctctg 14280  
gcctgatcta tttctctctc tagcttggtt gcacatttat gtcaacatct gaatgattac 14340  
ctagctagat gtctgccaat ttggacatct aaatgggggtg tacaccttct gtaccaagaa 14400  
cttgtccgcc cgttgggaga agtgtgggaa gcaggtctgg aggaaggaag tggaccctga 14460  
caggccctgg gtcactcact gtccattacc tctggttctg ttttctgca gactatggat 14520  
ctaccctgga agaagacatc caaggagaca cgagtggcta tctggagcgg attctggtgt 14580  
gtctcctgca ggtaacacaa tccagattcc agaactctgt ggcttaaaga tccaaagaga 14640  
gccatcccag cacagccctt gagtcatgac tcccagttag ggctgggcta tgggaaacc 14700  
cagcgatctg gaagcacat ctgtgtgca gcacaaaagg aggtcctcc ctgagagcct 14760  
catgcctctc tttccttacc ctagtgggct ctgctcacta gtgtggctca ctgaatccac 14820  
cattccaatg aagtagctca tctactttcg tggtaacaaat gccaacagtg aggcatggtg 14880  
aggatggctg ctggcttgca ggtctcatgg atcagaagca atagtctttt cctacctgcc 14940  
ctctgtacct cactgtcccc tcagcccagt gttctgagtc ctgacctgcc ttacagagtg 15000  
atthtctctg atcctagggc agcagagatg atgtgagcgg ctttgtggat ccaggactgg 15060  
tcctccaaga tgacacagta aaacggtacc ttgacctac cacctgaact ctgagcttta 15120  
tgatcccctt tgccaaggag agctttcttt aatatagacc cgtctctgca gcctccacca 15180  
tgtgtgact aaggaggaaa gcaggatata tgggaaactc aatggaagaa aaggaaaaat 15240  
ggagaagctg ggaagggagg agctaaggct gtcaggcaga gcgagcctcc ctgagcccag 15300  
agcttgctca tgtgcacatc tctgtgtatc tattggtaga gtgcttgta ctcagtgtct 15360  
ccagagacaa tgggggaagg agaattttct aaagaagctg atggcccagg acagaggaga 15420

gccaacacta ttagaggaac aggagttcag gacagtgagc caccatgtta ggctcactga 15480  
tggtgagcta gaattctctc tcacctccac ctctctctgt cccaattcta ggccctgcat 15540  
gaagcgggtg agaagattat gggaaccgat gagatgaagt tcatcactat cctgtgcaca 15600  
cgcagtgcca ctcacctgat gagaggtaca gggcagaagt gggacacgca ggggtgtgtg 15660  
gctgccctag ccacgtggcc tctgcctttg tgtggaaggt ctgatgtgta gtcttaagca 15720  
gcttagactt ggggagagag ccatggagac cttgactctt ccccatgtgc caagatggag 15780  
gcagaaatgt gctcactactg cactcaggtg cagcgcgtaa tctacgtatc ccttacgtgg 15840  
atgcttctct ccatagtg 15858

<210> 46

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 46

cctaagtaaa cttctgccag cctc 24

<210> 47

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 47

caccagctt tcttgtaaa agtg 24

<210> 48

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 48

atgggatggg agtttagtg tg 22

<210> 49

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 49

aaacagtggg tatgaggatg cag 23

<210> 50

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 50

gagtgttacc tcagtgactc caggc 25

<210> 51

<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 51  
catagggata gagggaggag gt 22  
<210> 52  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 52  
gtgggttcat tgacatcact tg 22  
<210> 53  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 53  
gtgtgtgatg atgggtcagg 20  
<210> 54  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 54  
ccatgtccat agcacatctt gg 22  
<210> 55  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 55  
gagggtgact gaggctttaa g 21  
<210> 56  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 56  
acacacactt cccaatccat cag 23  
<210> 57  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 57  
gtgggtatga ggatgcagtc tagg 24  
<210> 58  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 58  
tctccatctg aaggaaccag gtc 23  
<210> 59  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 59  
tcttatcatg tctggatccg gg 22  
<210> 60  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 60  
tctccatctg aaggaaccag gtc 23  
<210> 61  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 61  
atcgtattgg gcagagggtt aag 23

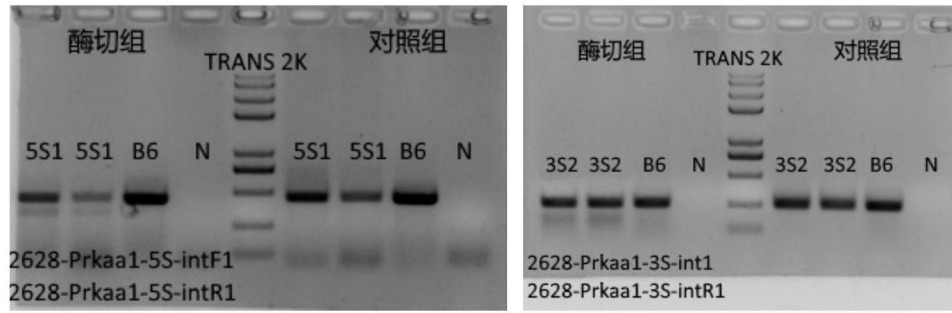


图1

5'LR-PCR 扩增结果:

3'LR-PCR 扩增结果:

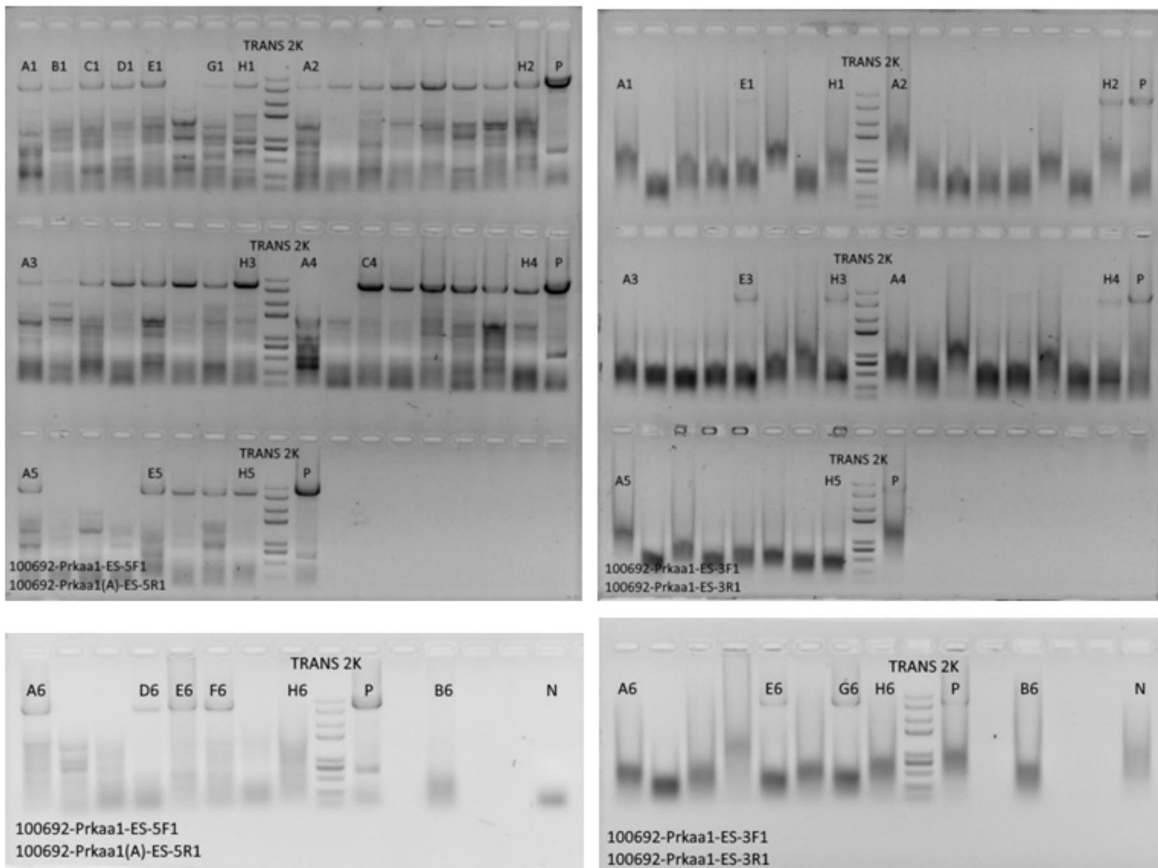


图2



5' LR-PCR 扩增结果:

3' LR-PCR 扩增结果:

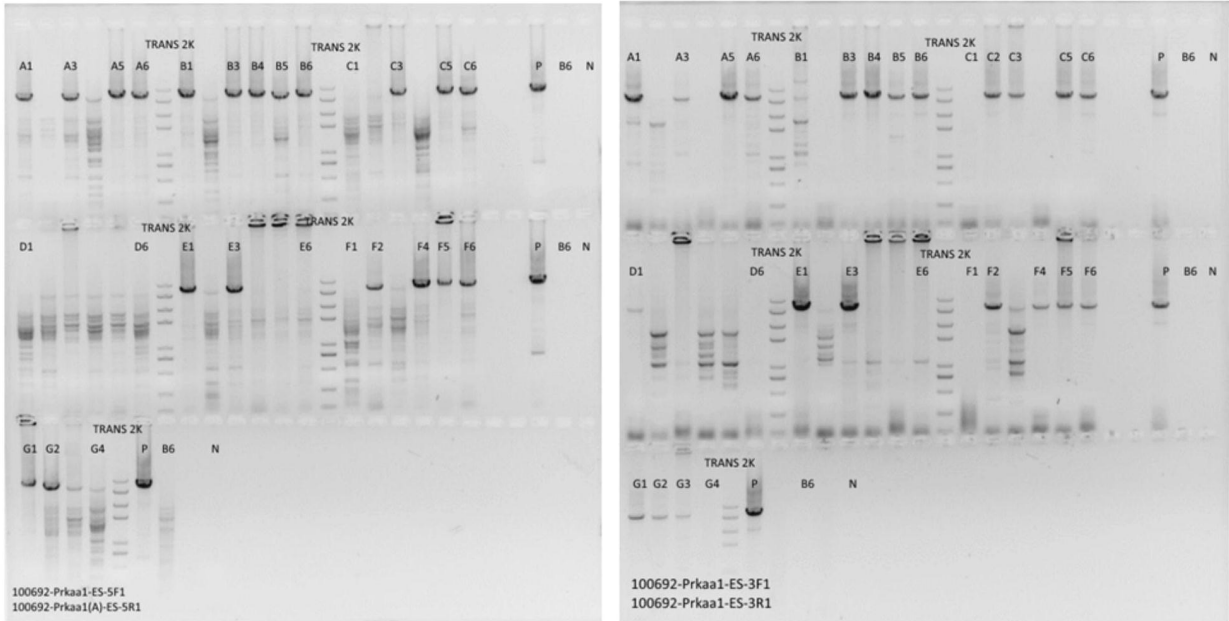


图3

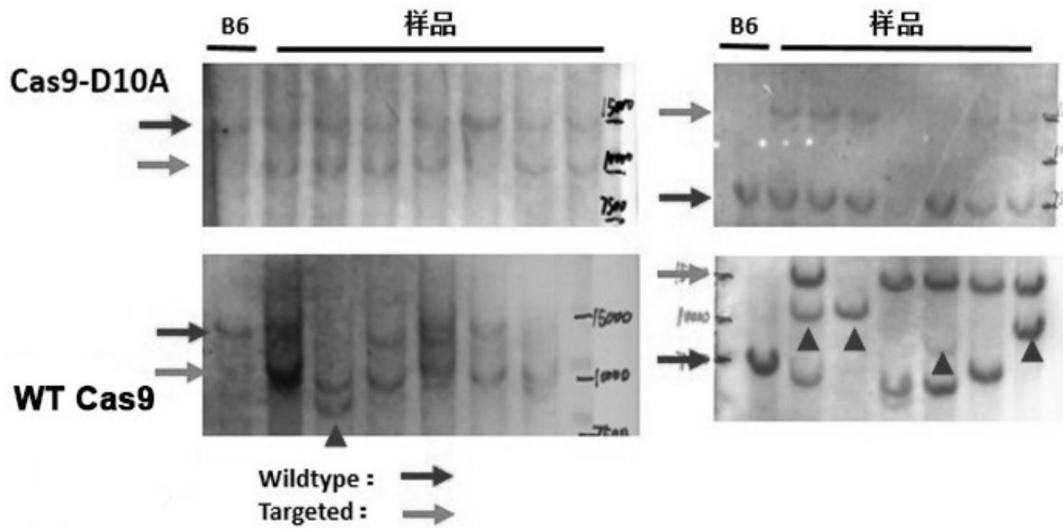


图4

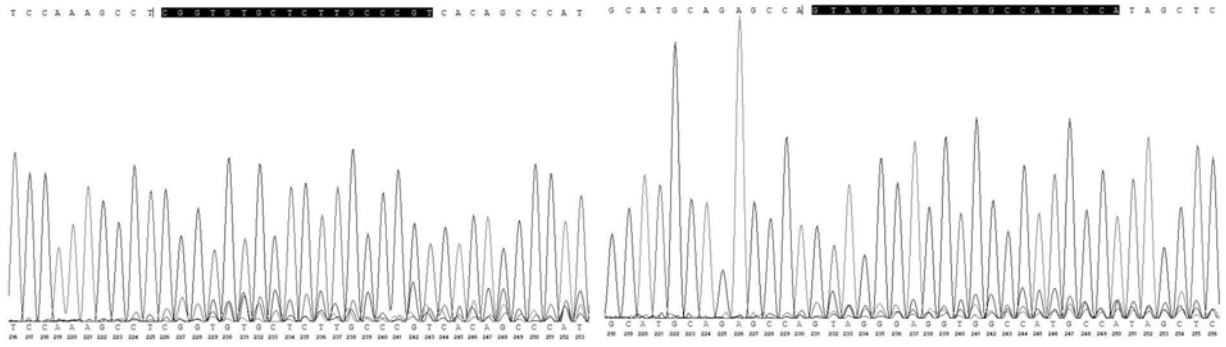


图5

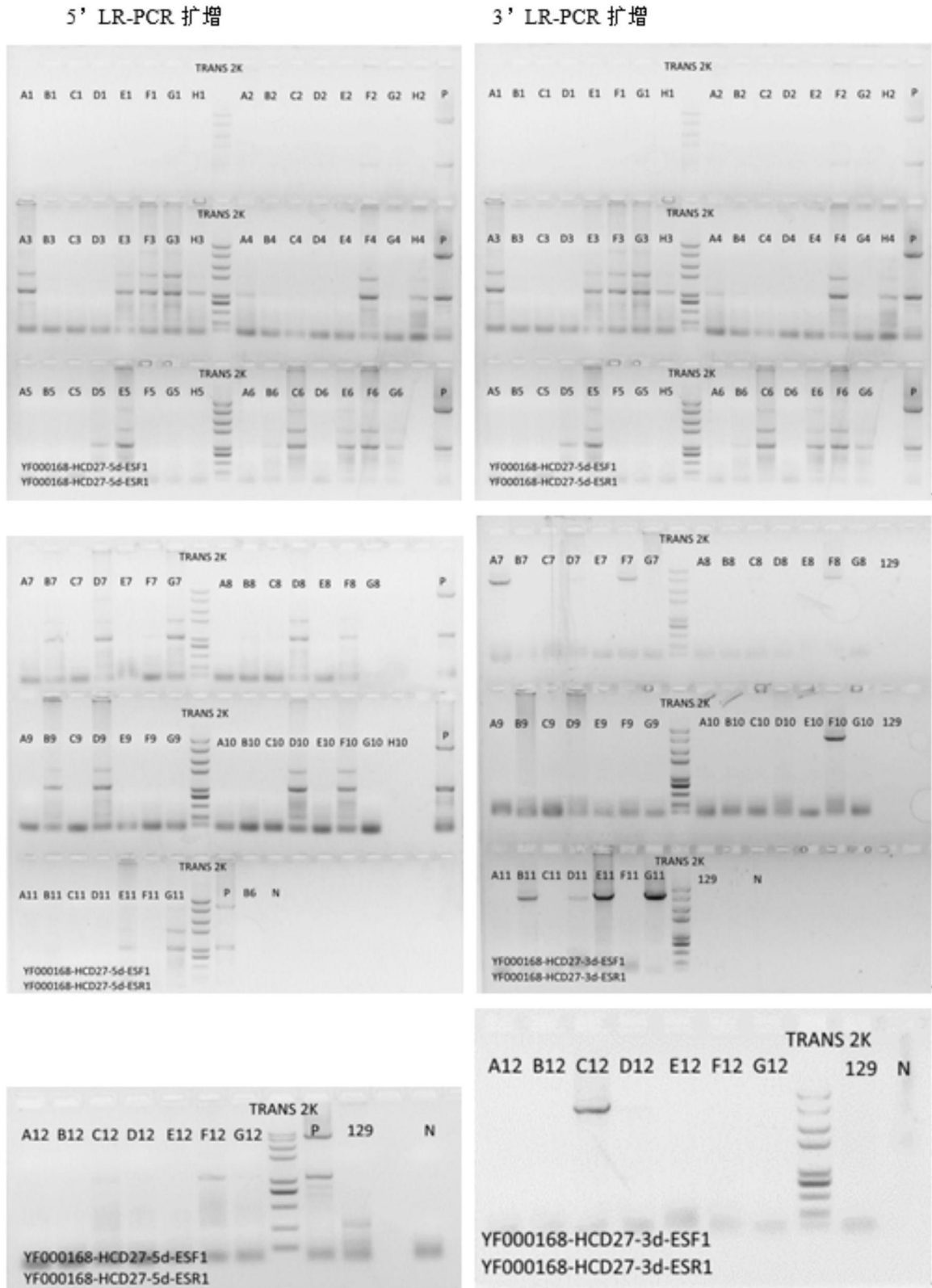


图6

5'end:

3'end:

IN

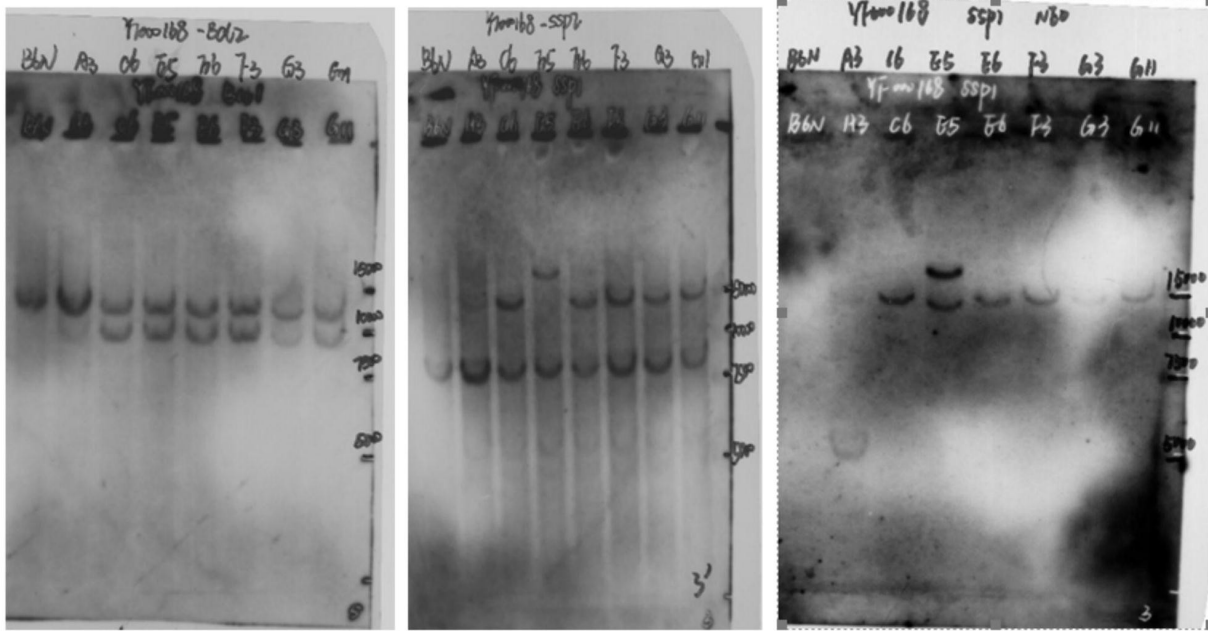


图7

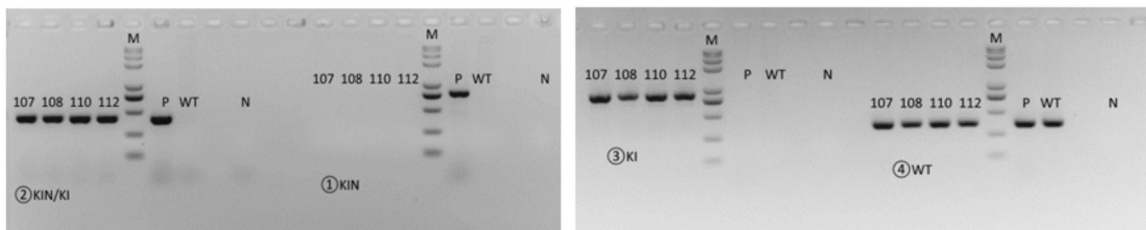


图8

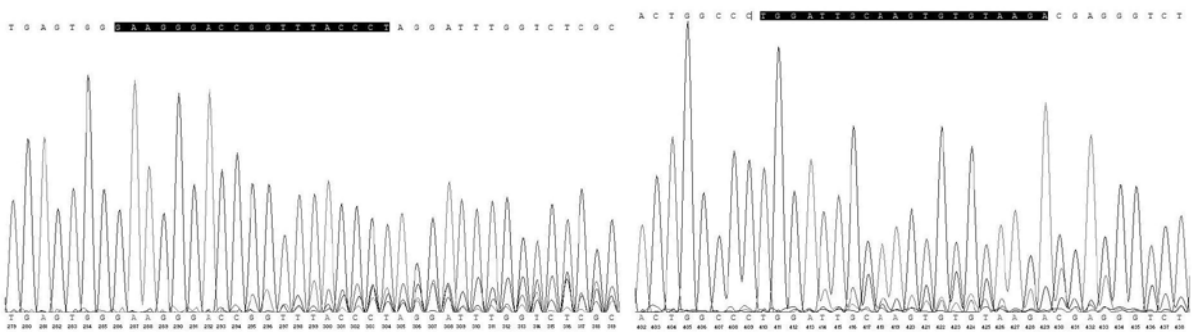


图9

5'LR-PCR 结果:

3'PCR 结果:

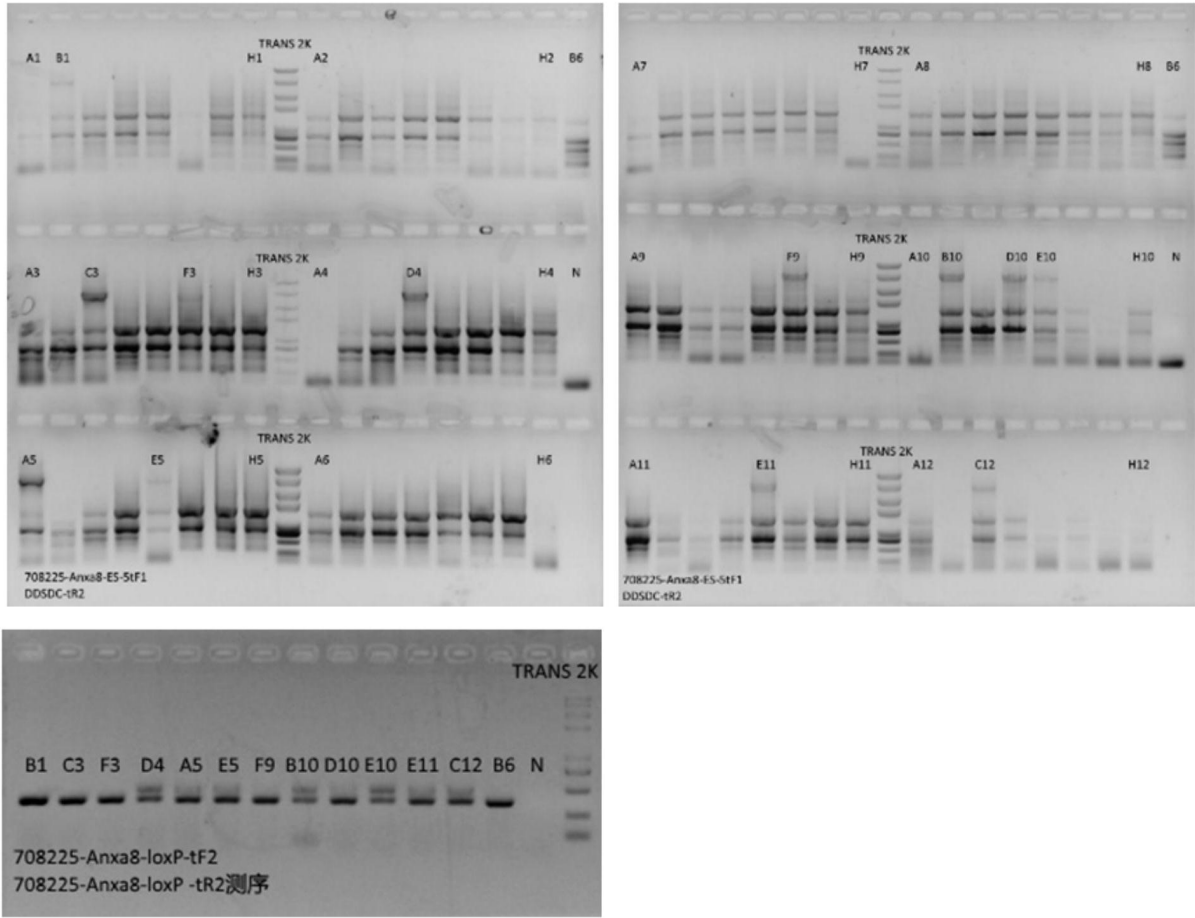


图10

5end

3end

IN

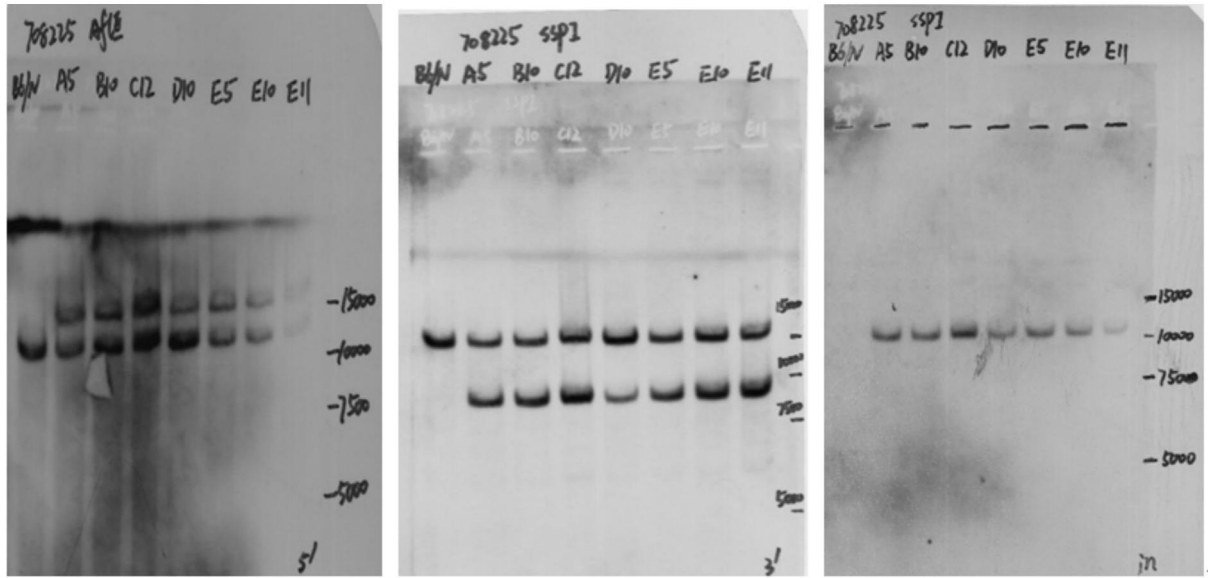


图11

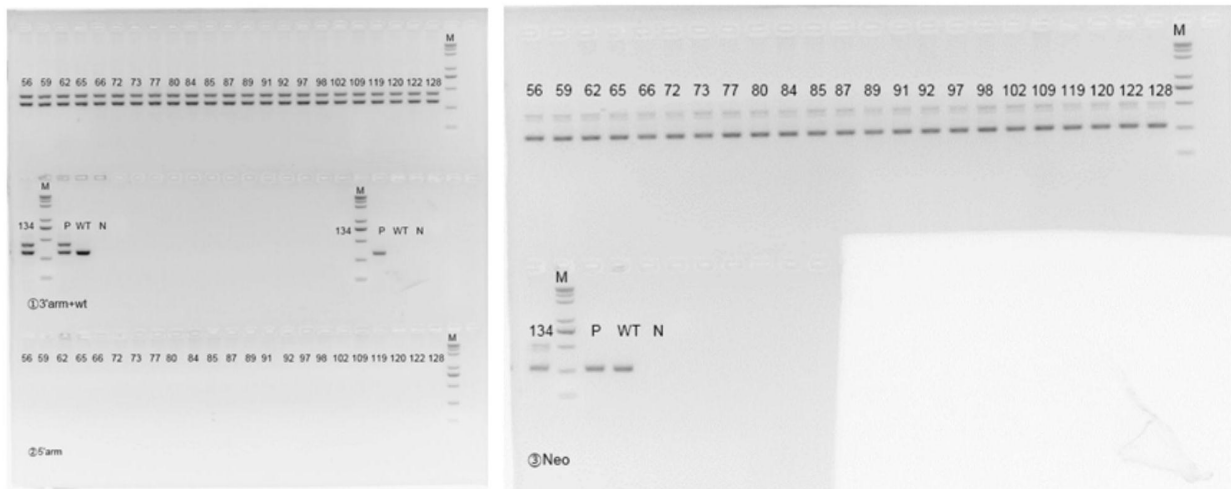


图12