



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114525304 B

(45) 授权公告日 2023. 12. 22

(21) 申请号 202011326638.6

C12N 15/90 (2006.01)

(22) 申请日 2020.11.23

C12N 15/55 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 114525304 A

(43) 申请公布日 2022.05.24

(73) 专利权人 南京启真基因工程有限公司

地址 211306 江苏省南京市高淳区经济开发区花山路17号6幢南京健康产业研究院3楼

(72) 发明人 牛冬 汪滔 曾为俊 马翔 王磊

程锐 黄彩云

(74) 专利代理机构 北京领科知识产权代理事务所

(特殊普通合伙) 11690

专利代理师 徐丹丹 张丹

(56) 对比文件

US 2018/0334685 A1, 2018.11.22

US 2020056191 A1, 2020.02.20

CN 106591364 A, 2017.04.26

WO 2020225287 A1, 2020.11.12

马林媛. 猪转基因友好整合位点的筛选与应用. 中国博士学位论文全文数据库 农业科技辑. 2020, 全文.

KY657281.1. Synthetic plasmid, complete sequence. Genbank. 2017, 全文.

审查员 王思佳

(51) Int. Cl.

C12N 15/85 (2006.01)

权利要求书3页 说明书24页

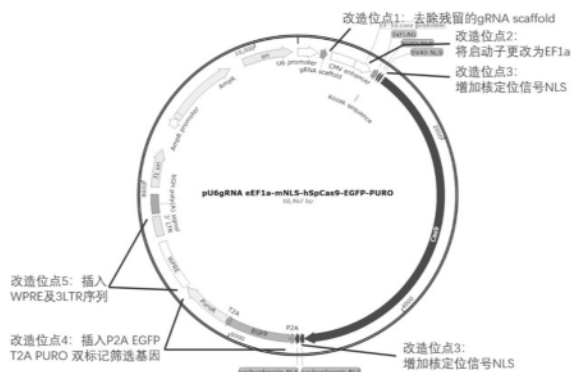
序列表53页 附图18页

(54) 发明名称

一种基因编辑的方法

(57) 摘要

本发明提供了一种基因编辑的方法, 所述的方法包括将包含外源基因的安全港位点载体、sgRNA载体和Cas载体共转染至宿主细胞。本发明还提供了一种SEQ ID NO:2所示的Cas载体, 其与现有载体相比, 具有更高的基因编辑效率。



1. 一种基因编辑的方法,其特征在于,所述的方法包括将包含外源基因的安全港位点载体、sgRNA载体和Cas载体共转染至宿主细胞,安全港位点载体上的外源基因分别整合入ROSA26、AAVS1、H11或COL1A1任一个或两个以上安全港位点;

所述的Cas载体的核苷酸序列从5' -3' 依次为:CMV增强子、EF1a启动子、核定位信号、核定位信号、编码Cas蛋白的核苷酸序列、核定位信号,核定位信号、编码自剪切多肽P2A的核苷酸序列、编码EGFP的核苷酸序列、编码自裂解多肽T2A的核苷酸序列、编码Puro蛋白的核苷酸序列、WPRES序列元件、3' LTR序列元件和polyA信号序列元件;

所述的Cas蛋白为Cas9;

所述的宿主细胞来源于非人动物或人,

所述的非人动物选自猪或小鼠。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的编码Cas蛋白的核苷酸序列为SEQ ID NO:2的第1037-5161位。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的编码EGFP蛋白的核苷酸序列为SEQ ID NO:2的第5333-6046位。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的编码Puro蛋白的核苷酸序列为SEQ ID NO:2的第6110-6703位。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的CMV增强子的核苷酸序列为SEQ ID NO:2的第395-680位。

6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的EF1a启动子的核苷酸序列为SEQ ID NO:2的第682-890位。

7. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,编码所述的核定位信号的核苷酸序列为SEQ ID NO:2的第986-1006、1016-1036、5162-5209或5219-5266位。

8. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的自剪切多肽P2A的氨基酸序列为ATNFSLLKQAGDVEENPGP。

9. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的自裂解多肽T2A的氨基酸序列为EGRGSLLTCGDVEENPGP。

10. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的WPRES元件的核苷酸序列为SEQ ID NO:2的第6722-7310位。

11. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的3' LTR序列元件的核苷酸序列为SEQ ID NO:2的第7382-7615位。

12. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的polyA信号序列元件的核苷酸序列为SEQ ID NO:2的第7647-7871位。

13. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的Cas载体的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

14. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,ROSA26安全港位点区域及其上下游各500bp的核苷酸序列如SEQ ID NO:8所示,AAVS1安全港位点区域及其上下游各500bp的核苷酸序列如SEQ ID NO:9所示,H11安全港位点区域及其上下游各500bp的核苷酸序列如SEQ ID NO:10所示,COL1A1安全港位点区域及其上下游各500bp的核苷酸序列如SEQ ID NO:11所示。

15. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, 所述的sgRNA载体包含靶向ROSA26、AAVS1、H11或COL1A1安全港位点的sgRNA, 其中,

靶向ROSA26的sgRNA的核苷酸序列如SEQ ID NO:45-48任一所示, 靶向AAVS1的sgRNA的核苷酸序列如SEQ ID NO:49-52任一所示, 靶向H11的sgRNA的核苷酸序列如SEQ ID NO:53-56任一所示, 靶向COL1A1的sgRNA的核苷酸序列如SEQ ID NO:57-60任一所示。

16. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, 所述的安全港位点载体包含与ROSA26、AAVS1、H11或COL1A1安全港位点5'端同源的5'同源臂和3'端同源的3'同源臂。

17. 根据权利要求16所述的方法, 其特征在于, 所述的安全港位点载体还包含绝缘子区域、EF-1 α 启动子, 编码EGFP蛋白的核苷酸序列, EF-1 α poly(A)信号序列, PGK启动子, 编码mCherry蛋白的核苷酸序列, bGH poly(A)信号序列, loxP-puro-loxP表达框区域, pCAG启动子, 和/或 β -globin poly(A)信号序列。

18. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, ROSA26安全港位点载体如SEQ ID NO:4所示, AAVS1安全港位点载体如SEQ ID NO:5所示, H11安全港位点载体如SEQ ID NO:6所示, COL1A1安全港位点载体如SEQ ID NO:7所示。

19. 根据权利要求16所述的方法, 其特征在于, 所述的外源基因的核苷酸序列位于安全港位点5'同源臂与3'同源臂之间。

20. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, 所述的安全港位点载体为环状质粒。

21. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, 所述的sgRNA载体为环状质粒。

22. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, 所述的Cas载体为环状质粒。

23. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, 所述的宿主细胞为猪的成纤维细胞。

24. 一种Cas载体, 其特征在于, 所述的Cas载体的核苷酸序列从5'-3'依次为: CMV增强子、EF1a启动子、核定位信号、核定位信号、编码Cas蛋白的核苷酸序列、核定位信号、核定位信号、编码自剪切多肽P2A的核苷酸序列、编码EGFP的核苷酸序列、编码自裂解多肽T2A的核苷酸序列、编码Puro蛋白的核苷酸序列、WPRE序列元件、3' LTR序列元件和polyA信号序列元件;

所述的Cas蛋白为Cas9。

25. 根据权利要求24所述的Cas载体, 其特征在于, 所述的编码Cas蛋白的核苷酸序列为SEQ ID NO:2的第1037-5161位。

26. 根据权利要求24所述的Cas载体, 其特征在于, 所述的编码EGFP蛋白的核苷酸序列为SEQ ID NO:2的第5333-6046位。

27. 根据权利要求24所述的Cas载体, 其特征在于, 所述的编码Puro蛋白的核苷酸序列为SEQ ID NO:2的第6110-6703位。

28. 根据权利要求24所述的Cas载体, 其特征在于, 所述的CMV增强子的核苷酸序列为SEQ ID NO:2的第395-680位。

29. 根据权利要求24所述的Cas载体, 其特征在于, 所述的EF1a启动子的核苷酸序列为SEQ ID NO:2的第682-890位。

30. 根据权利要求24所述的Cas载体, 其特征在于, 编码所述的核定位信号的核苷酸序列为SEQ ID NO:2的第986-1006、1016-1036、5162-5209或5219-5266位。

31. 根据权利要求24所述的Cas载体, 其特征在于, 所述的自剪切多肽P2A的氨基酸序列

为ATNFSLLKQAGDVEENPGP。

32. 根据权利要求24所述的Cas载体,其特征在于,所述的自裂解多肽T2A的氨基酸序列为EGRGSLTTCGDVEENPGP。

33. 根据权利要求24所述的Cas载体,其特征在于,所述的WPRE元件的核苷酸序列为SEQ ID NO:2的6722-7310位。

34. 根据权利要求24所述的Cas载体,其特征在于,所述的3' LTR序列元件的核苷酸序列为SEQ ID NO:2的7382-7615位。

35. 根据权利要求24所述的Cas载体,其特征在于,所述的polyA信号序列元件的核苷酸序列为SEQ ID NO:2的7647-7871位。

36. 根据权利要求24所述的Cas载体,其特征在于,所述的Cas载体的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示,所述的Cas载体为环状质粒。

37. 一种靶向ROSA26的sgRNA,其特征在于,所述的靶向ROSA26的sgRNA的核苷酸序列如SEQ ID NO:45-48任一所示。

38. 一种靶向AAVS1的sgRNA,其特征在于,所述的靶向AAVS1的sgRNA的核苷酸序列如SEQ ID NO:49-52任一所示。

39. 一种靶向H11的sgRNA,其特征在于,所述的靶向H11的sgRNA的核苷酸序列如SEQ ID NO:53-56任一所示。

40. 一种靶向COL1A1的sgRNA,其特征在于,所述的靶向COL1A1的sgRNA的核苷酸序列如SEQ ID NO:57-60任一所示。

41. 一种sgRNA载体,其特征在于,所述的sgRNA载体包含权利要求37所述的ROSA26的sgRNA,或,权利要求38所述的靶向AAVS1的sgRNA,或,权利要求39所述的靶向H11的sgRNA,或,权利要求40所述的靶向COL1A1的sgRNA。

42. 一种sgRNA载体的制备方法,其特征在于,所述的制备方法包括:

1) 提供权利要求37所述的ROSA26的sgRNA,或,权利要求38所述的靶向AAVS1的sgRNA,或,权利要求39所述的靶向H11的sgRNA,或,权利要求40所述的靶向COL1A1的sgRNA;

2) 采用步骤1)中的sgRNA制备双链DNA分子;

3) 将步骤2)获得的双链DNA分子连接至相应的载体骨架,获得相应的sgRNA载体,其中,所述的载体骨架的核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示。

43. 一种安全港位点载体,其特征在于,所述的安全港位点载体包含与ROSA26、AAVS1、H11或COL1A1安全港位点5'端同源的5'同源臂和3'端同源的3'同源臂;

ROSA26安全港位点载体如SEQ ID NO:4所示,AAVS1安全港位点载体如SEQ ID NO:5所示,H11安全港位点载体如SEQ ID NO:6所示,COL1A1安全港位点载体如SEQ ID NO:7所示。

44. 一种基因编辑的试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒中包含权利要求24-36任一所述的Cas载体、权利要求37-40任一所述的sgRNA、权利要求41所述的sgRNA载体和/或权利要求43所述的安全港位点载体。

一种基因编辑的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基因编辑的方法,具体涉及采用新研发的Cas载体优化CRISPR/Cas9基因编辑方法,对猪进行基因编辑。

背景技术

[0002] 转基因技术目前已被广泛用于生物生产、药物筛选和治疗等多个方面,但通常采用的病毒转染或转座子系统会导致随机和多拷贝插入,导致转基因表达的不稳定,并可能干扰内源基因的表达,且不可能达到纯合插入,导致外源基因较难稳定地遗传。

[0003] 将外源基因插入基因组的特定位点需要采用基因编辑技术,该技术是近年来发展的一种生物技术,其包括从基于同源重组的基因敲入到基于核酸酶的ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9等编辑手段,其中CRISPR/Cas9技术是当前最先进的基因编辑技术。目前,基因编辑技术被越来越多地应用到动植物及微生物的转基因中。

[0004] 将外源基因稳定整合到基因组的安全港位点是目前较好的解决方案。例如,专利CN111088282A公开了AAVS1、H11安全港位点在重组表达蛋白中的应用,即利用人基因组上的AAVS1、H11位点作为整合位点高表达重组人血白蛋白,并且以人肝细胞直接作为表达细胞,得到的人血清白蛋白更加安全,大大降低了其安全性风险,但是该专利并没有完全公开安全位点的具体位置,同时,基于人与猪基因组序列的差异性比较大,是否可以将此安全位点直接用于猪,以及如何用于猪的基因编辑现有技术仍然无法确定。

发明内容

[0005] 为解决上述问题,本发明以猪为研究对象,获得特定靶向猪基因组不同安全港位点的sgRNA,揭示适合外源基因表达的最佳安全位点靶向序列,同时,创造性的获得了优化的携带编码Cas蛋白核苷酸序列的Cas载体,显著提高了基因编辑效率,更重要的是可以稳定遗传,为基于猪基因组的研究如构建转基因猪模式动物奠定基础。

[0006] 本发明的第一方面,提供了一种基因编辑的方法,所述的方法包括将包含外源基因的安全港位点载体、sgRNA载体和Cas载体共转染至宿主细胞。

[0007] 所述的Cas载体包含编码Cas蛋白、EGFP和Puro蛋白的核苷酸序列。优选的,所述的Cas载体还包含EF1a启动子、WPRE元件和3' LTR序列元件。进一步优选的,所述的Cas载体的核苷酸序列从5' -3' 依次为:CMV增强子、EF1a启动子、核定位信号NLS(优选为SV40NLS)、核定位信号NLS(优选为SV40 NLS)、编码Cas蛋白的核苷酸序列、核定位信号NLS(优选为nucleoplasmin NLS)、核定位信号NLS(优选为nucleoplasmin NLS)、编码自剪切多肽P2A(自剪切多肽P2A的氨基酸序列为“ATNFSLLKQAGDVEENPGP”,发生自剪切的断裂位置为C端开始第一个氨基酸残基和第二个氨基酸残基之间)的核苷酸序列、编码EGFP的核苷酸序列、编码自裂解多肽T2A(自裂解多肽T2A的氨基酸序列为“EGRGSLTTCGDVEENPGP”,发生自裂解的断裂位置为C端开始第一个氨基酸残基和第二个氨基酸残基之间)的核苷酸序列、编码Puro蛋白的核苷酸序列、WPRE序列元件、3' LTR序列元件和poly A信号序列元件(即bGH poly(A)

signal序列元件)。

[0008] 优选的,所述的Cas蛋白选自Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas5d、Cas5t、Cas5h、Cas5a、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Csy4、Cse1、Cse2、Cse3、Cse4、Cse5e、Csc1、Csc2、Csa5、Csn1、Csn2、Csm1、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx1S、Csf1、Csf2、Cs0、Csf4、Csd1、Csd2、Cst1、Cst2、Csh1、Csh2、Csa1、Csa2、Csa3、Csa4、Csa5、C2c1、C2c2、C2c3、Cpf1、CARF、DinG、其同源物或其修饰形式。

[0009] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的Cas蛋白为Cas9蛋白。

[0010] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的Cas载体的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0011] 所述的方法包括将包含外源基因的安全港位点载体、sgRNA载体和Cas载体共转染至宿主细胞中,使安全港位点载体上的外源基因分别整合入ROSA26、AAVS1、H11或COL1A1任一个或两个以上安全港位点。

[0012] 例如,可以将包含外源基因的ROSA26安全港位点载体、sgRNA载体和Cas载体共转染至宿主细胞中,使ROSA26安全港位点载体上的外源基因整合入ROSA26安全港位点。或者将包含外源基因的AAVS1安全港位点载体、sgRNA载体和Cas载体共转染至宿主细胞中,使AAVS1安全港位点载体上的外源基因整合入AAVS1安全港位点。或者将包含外源基因的H11安全港位点载体、sgRNA载体和Cas载体共转染至宿主细胞中,使H11安全港位点载体上的外源基因整合入H11安全港位点。或者将包含外源基因的COL1A1安全港位点载体、sgRNA载体和Cas载体共转染至宿主细胞中,使COL1A1安全港位点载体上的外源基因整合入COL1A1安全港位点。

[0013] 其中,外源基因可以代表一个单独的基因、两个基因的拼接或者具有某种功能的核苷酸片段。

[0014] 当然,也可以按照上述描述将两个或其以上相同或者不同的外源基因同时分别整合入不同的安全港位点。

[0015] 优选的,ROSA26安全港位点区域及其上下游各500bp的核苷酸序列如SEQ ID NO:8所示,AAVS1安全港位点区域及其上下游各500bp的核苷酸序列如SEQ ID NO:9所示,H11安全港位点区域及其上下游各500bp的核苷酸序列如SEQ ID NO:10所示,COL1A1安全港位点区域及其上下游各500bp的核苷酸序列如SEQ ID NO:11所示。

[0016] 所述的sgRNA载体包含靶向ROSA26、AAVS1、H11或COL1A1安全港位点的sgRNA。优选的,靶向ROSA26的sgRNA的核苷酸序列如SEQ ID NO:45-48任一所示,靶向AAVS1的sgRNA的核苷酸序列如SEQ ID NO:49-52任一所示,靶向H11的sgRNA的核苷酸序列如SEQ ID NO:53-56任一所示,靶向COL1A1的sgRNA的核苷酸序列如SEQ ID NO:57-60任一所示。

[0017] 所述的安全港位点载体包含与ROSA26、AAVS1、H11或COL1A1安全港位点5'端同源的5'同源臂和/或3'端同源的3'同源臂。优选的,还包含绝缘子区域、EF-1d启动子,编码EGFP蛋白的核苷酸序列,EF-1d poly(A)信号序列,PGK启动子,编码mCherry蛋白的核苷酸序列,bGH poly(A)信号序列,loxP-puro-loxP表达框区域,pCAG启动子,和/或 β -globin poly(A)信号序列。进一步优选的,ROSA26安全港位点载体如SEQ ID NO:4所示,AAVS1安全港位点载体如SEQ ID NO:5所示,H11安全港位点载体如SEQ ID NO:6所示,COL1A1安全港位

点载体如SEQ ID NO:7所示。

[0018] 优选的,所述的安全港位点载体、sgRNA载体或Cas载体均为环状质粒。

[0019] 优选的,所述的外源基因的核苷酸序列位于安全港位点5'同源臂与3'同源臂之间。其中,所述的外源基因可以为任何欲导入宿主细胞进行表达的基因,包括但不限于RAG1、绿色荧光蛋白(GFP)、红色荧光蛋白DsRed及其变体突变体mBanana、mOrange、dTomato、mTangerine、mStrawberry和mCherry,蓝色荧光蛋白(BFP)及其变体Azurite、橙色荧光蛋白及其变体mCitrine、mVenus、Topaz、YPet,黄色荧光蛋白(YFP)、青色荧光蛋白(CFP)等等。

[0020] 所述的宿主细胞来源于非人动物或人,所述的非人动物选自猪、狗、牛、羊、猴或小鼠。优选的,所述的宿主细胞来源于猪,进一步优选为猪的成纤维细胞。

[0021] 优选的,所述的宿主细胞还可以选自胚胎干细胞、成体干细胞、造血干细胞、骨髓间充质干细胞、神经干细胞、肝干细胞、肌肉卫星细胞、皮肤表皮干细胞、肠上皮干细胞、视网膜干细胞、胰腺干细胞、体细胞、成纤维细胞、肌细胞、胶质细胞、脂肪细胞或生殖细胞等等。

[0022] 本发明的第二方面,提供了一种Cas载体,所述的Cas载体包含编码Cas蛋白、EGFP和Puro蛋白的核苷酸序列。

[0023] 优选的,所述的Cas载体还包含EF1a启动子、WPRE元件和3'LTR序列元件。进一步优选的,所述的Cas载体的核苷酸序列从5'-3'依次为:CMV增强子、EF1a启动子、核定位信号NLS(优选为SV40 NLS)、核定位信号NLS(优选为SV40 NLS)、编码Cas蛋白的核苷酸序列、核定位信号NLS(优选为nucleoplasmin NLS)、核定位信号NLS(优选为nucleoplasmin NLS)、编码自剪切多肽P2A(自剪切多肽P2A的氨基酸序列为“ATNFSLLKQAGDVEENPGP”,发生自剪切的断裂位置为C端开始第一个氨基酸残基和第二个氨基酸残基之间)的核苷酸序列、编码EGFP的核苷酸序列、编码自裂解多肽T2A(自裂解多肽T2A的氨基酸序列为“EGRGSLTTCGDVEENPGP”,发生自裂解的断裂位置为C端开始第一个氨基酸残基和第二个氨基酸残基之间)的核苷酸序列、编码Puro蛋白的核苷酸序列、WPRE序列元件、3'LTR序列元件和poly A信号序列元件(即bGH poly(A) signal序列元件)。

[0024] 优选的,所述的Cas蛋白选自Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas5d、Cas5t、Cas5h、Cas5a、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Csy4、Cse1、Cse2、Cse3、Cse4、Cse5e、Csc1、Csc2、Csa5、Csn1、Csn2、Csm1、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx1S、Csf1、Csf2、Cs0、Csf4、Csd1、Csd2、Cst1、Cst2、Csh1、Csh2、Csa1、Csa2、Csa3、Csa4、Csa5、C2c1、C2c2、C2c3、Cpf1、CARF、DinG、其同源物或其修饰形式。

[0025] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的Cas蛋白为Cas9蛋白。

[0026] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的Cas载体的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0027] 优选的,所述的Cas载体为环状质粒。

[0028] 本发明的第三方面,提供了一种靶向ROSA26的sgRNA,所述的靶向ROSA26的sgRNA的核苷酸序列如SEQ ID NO:45-48任一所示。

[0029] 本发明的第四方面,提供了一种靶向AAVS1的sgRNA,所述的靶向AAVS1的sgRNA的

核苷酸序列如SEQ ID NO:49-52任一所示。

[0030] 本发明的第五方面,提供了一种靶向H11的sgRNA,所述的靶向H11的sgRNA的核苷酸序列如SEQ ID NO:53-56任一所示。

[0031] 本发明的第六方面,提供了一种靶向COL1A1的sgRNA,所述的靶向COL1A1的sgRNA的核苷酸序列如SEQ ID NO:57-60任一所示。

[0032] 本发明的第七方面,提供了一种sgRNA载体,所述的sgRNA载体包含上述的靶向ROSA26、AAVS1、H11或COL1A1的sgRNA。

[0033] 优选的,所述的sgRNA载体为环状质粒。

[0034] 本发明的第八方面,提供了一种sgRNA载体的制备方法,所述的制备方法包括:

[0035] 1) 提供上述的靶向ROSA26、AAVS1、H11或COL1A1的sgRNA;

[0036] 2) 采用步骤1) 中的sgRNA制备双链DNA分子;

[0037] 3) 将步骤2) 获得的双链DNA分子连接至相应的载体骨架,获得相应的sgRNA载体。

[0038] 优选的,所述的载体骨架的核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示。

[0039] 本发明的第九方面,提供了一种ROSA26安全港位点载体,所述的ROSA26安全港位点载体包含与ROSA26安全港位点5' 端同源的5' 同源臂和/或3' 端同源的3' 同源臂。优选的,还包含绝缘子区域、EF-1d启动子,编码EGFP蛋白的核苷酸序列,EF-1dpoly(A) 信号序列,PGK启动子,编码mCherry蛋白的核苷酸序列,bGH poly(A) 信号序列,loxP-puro-loxP表达框区域,pCAG启动子,和/或 β -globin poly(A) 信号序列。进一步优选的,ROSA26安全港位点载体如SEQ ID NO:4所示。

[0040] 所述的ROSA26安全港位点载体采用引物对SH1-L-F(SEQ ID NO:70)/SH1-L-R(SEQ ID NO:71) 进行ROSA26安全港位点切点左侧(5' 同源臂) 基因组序列的PCR扩增,采用引物对SH1-R-F(SEQ ID NO:72)/SH1-R-R(SEQ ID NO:73) 进行ROSA26安全港位点切点右侧(3' 同源臂) 基因组序列的PCR扩增。然后,选择8只猪中序列保守的区域进一步分别采用引物对SH1-LR-F(SEQ ID NO:75)/SH1-LR-R(SEQ ID NO:76) 和SH1-RR-F(SEQ ID NO:77)/SH1-RR-R(SEQ ID NO:78) 进行ROSA26安全港位点切点左侧和右侧基因组同源序列的扩增。

[0041] 优选的,所述的安全港位点载体还包含外源基因的核苷酸序列,所述的外源基因的核苷酸序列位于安全港位点5' 同源臂与3' 同源臂之间。其中,所述的外源基因可以为任何欲导入宿主细胞进行表达的基因,包括但不限于RAG1、绿色荧光蛋白(GFP)、红色荧光蛋白DsRed及其变体突变体mBanana、mOrange、dTomato、mTangerine、mStrawberry和mCherry,蓝色荧光蛋白(BFP) 及其变体Azurite、橙色荧光蛋白及其变体mCitrine、mVenus、Topaz、YPet,黄色荧光蛋白(YFP)、青色荧光蛋白(CFP) 等等。

[0042] 本发明的第十方面,提供了一种AAVS1安全港位点载体,所述的AAVS1安全港位点载体包含与AAVS1安全港位点5' 端同源的5' 同源臂和/或3' 端同源的3' 同源臂。优选的,还包含绝缘子区域、EF-1 α 启动子,编码EGFP蛋白的核苷酸序列,EF-1 α poly(A) 信号序列,PGK启动子,编码mCherry蛋白的核苷酸序列,bGH poly(A) 信号序列,loxP-puro-loxP表达框区域,pCAG启动子,和/或 β -globin poly(A) 信号序列。进一步优选的,AAVS1安全港位点载体如SEQ ID NO:5所示。

[0043] 所述的AAVS1安全港位点载体采用引物对SH2-L-F(SEQ ID NO:83)/SH2-L-R(SEQ ID NO:84) 进行AAVS1安全港位点切点左侧基因组序列的PCR扩增,采用引物对SH2-R-F(SEQ

ID NO:85)/SH2-R-R(SEQ ID NO:86)进行AAVS1安全港位点切点右侧基因组序列的PCR扩增。然后,选择8只猪中序列保守的区域进一步分别采用引物对SH2-LR-F(SEQ ID NO:87)/SH2-LR-R(SEQ ID NO:88)和SH2-RR-F(SEQ ID NO:89)/SH2-RR-R(SEQ ID NO:90)进行AAVS1安全港位点切点左侧和右侧基因组同源序列的扩增。

[0044] 本发明的第十一方面,提供了一种H11安全港位点载体,所述的H11安全港位点载体包含与H11安全港位点5'端同源的5'同源臂和/或3'端同源的3'同源臂。优选的,还包含绝缘子区域、EF-1 α 启动子,编码EGFP蛋白的核苷酸序列,EF-1 α poly(A)信号序列,PGK启动子,编码mCherry蛋白的核苷酸序列,bGH poly(A)信号序列,loxP-puro-loxP表达框区域,pCA6启动子,和/或 β -globin poly(A)信号序列。进一步优选的,H11安全港位点载体如SEQ ID NO:6所示。

[0045] 所述的H11安全港位点载体采用引物对SH3-L-F(SEQ ID NO:95)/SH3-L-R(SEQ ID NO:96)进行H11安全港位点切点左侧基因组序列的PCR扩增,采用引物对SH3-R-F(SEQ ID NO:97)/SH3-R-R(SEQ ID NO:98)进行H11安全港位点切点右侧基因组序列的PCR扩增。然后,选择8只猪中序列保守的区域进一步分别采用引物对SH3-LR-F(SEQ ID NO:99)/SH3-LR-R(SEQ ID NO:100)和SH3-RR-F(SEQ ID NO:101)/SH3-RR-R(SEQ ID NO:102)进行H11安全港位点切点左侧和右侧基因组同源序列的扩增。

[0046] 本发明的第十二方面,提供了一种COL1A1安全港位点载体,所述的COL1A1安全港位点载体包含与COL1A1安全港位点5'端同源的5'同源臂和/或3'端同源的3'同源臂。优选的,还包含绝缘子区域、EF-1d启动子,编码EGFP蛋白的核苷酸序列,EF-1d poly(A)信号序列,PGK启动子,编码mCherry蛋白的核苷酸序列,bGH poly(A)信号序列,loxP-puro-loxP表达框区域,pCAG启动子,和/或 β -globin poly(A)信号序列。进一步优选的,COL1A1安全港位点载体如SEQ ID NO:7所示。

[0047] 所述的COL1A1安全港位点载体采用引物对SH4-L-F(SEQ ID NO:107)/SH4-L-R(SEQ ID NO:108)进行COL1A1安全港位点切点左侧基因组序列的PCR扩增,采用引物对SH4-R-F(SEQ ID NO:109)/SH4-R-R(SEQ ID NO:110)进行COL1A1安全港位点切点右侧基因组序列的PCR扩增,然后进行电泳并测序分析。通过测序结果,选择8只猪中序列保守的区域进一步分别采用引物对SH4-LR-F(SEQ ID NO:111)/SH4-LR-R(SEQ ID NO:112)和SH4-RR-F(SEQ ID NO:113)/SH4-RR-R(SEQ ID NO:114)进行H1安全港位点切点左侧和右侧基因组同源序列的扩增。

[0048] 本发明的第十三方面,提供了一种基因编辑的试剂盒,所述的试剂盒中包含上述的Cas载体、上述的sgRNA、上述的sgRNA载体和/或上述ROSA26、AAVS1、H11或COL1A1安全港位点载体。

[0049] 本发明所述的sgRNA载体可以转录成gRNA与Cas蛋白结合为复合物,靶向结合猪基因组特定区域,引起预期的DNA切割,从而对猪基因组进行编辑。

[0050] 术语“安全港位点”是染色体的一部分,当供体基因被整合进其中时,不会对宿主细胞或生物体产生不利影响,被用于基因安全敲入并能保证转入基因的正常稳定表达。参见Sadelain等人(2012)Nat.Rev.Cancer 12:51-58。

[0051] 术语“载体”是细胞内能够在自身控制下复制的多核苷酸,或者通过插入到宿主细胞染色体进行复制和/或表达的遗传元件,例如质粒、染色体、病毒、转座子。合适的载体包

括但不限于质粒、转座子、细菌噬菌体和粘粒。

[0052] 本发明所述的“gRNA”，也称指导RNA，是由sgRNA载体在细胞中转录得到的，对细胞中的靶序列具有特异性并且可与Cas蛋白形成复合体的RNA。

附图说明

[0053] 图1为质粒pX330的结构示意图。

[0054] 图2为质粒pKG-GE3的结构示意图。

[0055] 图3为质粒pKG-U6gRNA的结构示意图。

[0056] 图4为将20bp左右的DNA分子(用于转录形成gRNA的靶序列结合区)插入质粒pKG-U6gRNA的示意图。

[0057] 图5为ROSA26位点重组donor质粒的结构示意图。

[0058] 图6为AAVS1位点重组donor质粒的结构示意图。

[0059] 图7为H11位点重组donor质粒的结构示意图。

[0060] 图8为COL1A1位点重组donor质粒的结构示意图。

[0061] 图9A为实施例2中单gRNA质粒与Cas9质粒不同摩尔比的测序峰图。

[0062] 图9B为实施例2中质粒pKG-GE3 (RAG1-KG) 与质粒pX330 (RAG1-330) 进行基因编辑的测序峰图。

[0063] 图10为实施例3中以8只猪的基因组DNA为模板采用ROSA26-F195/ROSA26-R1092组成的引物对进行PCR扩增后的电泳图。

[0064] 图11为实施例3中各种具有粘性末端的双链DNA分子，其中A对应ROSA26-g1S和ROSA26-g1A，B对应ROSA26-g2S和ROSA26-g2A，C对应ROSA26-g3S和ROSA26-g3A，D对应ROSA26-g4S和ROSA26-g4A。

[0065] 图12为实施例4中以8只猪的基因组DNA为模板采用AAVS1-F101/AAVS1-R1088组成的引物对进行PCR扩增后的电泳图。

[0066] 图13为实施例4中各种具有粘性末端的双链DNA分子，其中，A对应AAVS1-g1S和AAVS1-g1A，B对应AAVS1-g2S和AAVS1-g2A，C对应AAVS1-g3S和AAVS1-g3A，D对应AAVS1-g4S和AAVS1-g4A。

[0067] 图14为实施例5中以8只猪的基因组DNA为模板采用H11-F3/H11-R843组成的引物对进行PCR扩增后的电泳图。

[0068] 图15为实施例5中各种具有粘性末端的双链DNA分子，其中，A对应H11-g1S和H11-g1A，B对应H11-g2S和H11-g2A，C对应H11-g3S和H11-g3A，D对应H11-g4S和H11-g4A。

[0069] 图16为实施例6中以8只猪的基因组DNA为模板采用COL1A1-F157/COL1A1-R1084组成的引物对进行PCR扩增后的电泳图。

[0070] 图17为实施例6中各种具有粘性末端的双链DNA分子，其中，A对应COL1A1-g1S和COL1A1-g1A，B对应COL1A1-g2S和COL1A1-g2A，C对应COL1A1-g3S和COL1A1-g3A，D对应COL1A1-g4S和COL1A1-g4A。

[0071] 图18为实施例3中采用ROSA26-F477和ROSA26-R899组成的引物对进行PCR扩增，然后进行测序确定不同靶点编辑效率的测序峰图。

[0072] 图19为实施例4中采用AAVS1-F378和AAVS1-R749组成的引物对进行PCR扩增，然后

进行测序确定不同靶点编辑效率的测序峰图。

[0073] 图20为实施例5中采用H11-F194和H11-R574组成的引物对进行PCR扩增,然后进行测序确定不同靶点编辑效率的测序峰图。

[0074] 图21为实施例6中采用COL1A1-F473和COL1A1-R870组成的引物对进行PCR扩增,然后进行测序确定不同靶点编辑效率的测序峰图。

[0075] 图22为安全港位点调控GFP绿色荧光表达图片。

[0076] 图23为安全港位点调控GFP转录水平荧光定量PCR结果。

[0077] 图24为GFP基因的流式细胞荧光分选检测,以比较GFP基因整合入四个不同安全港位点后GFP蛋白的表达情况。

具体实施方式

[0078] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。完全培养液(%为体积比):15%胎牛血清(Gibco)+83%DMEM培养基(Gibco)+1%Penicillin-Streptomycin(Gibco)+1%HEPES(Solarbio)。细胞培养条件:37℃,5%CO₂、5%O₂的恒温培养箱。

[0079] 实施例中的8只猪均为刚出生从江香猪,其中雌性4只(分别命名1、2、3、4)、雄性4只(分别命名为A、B、C、D)。

[0080] 制备猪原代成纤维细胞的方法:①取猪耳组织0.5g,除毛,然后用75%酒精浸泡30-40s,然后用含5%(体积比)Penicillin-Streptomycin(Gibco)的PBS缓冲液洗涤5次,然后用PBS缓冲液洗涤一次;②用剪刀将组织剪碎,采用5mL1%胶原酶溶液(Sigma),37℃消化1h,然后500g离心5min,弃上清;③将沉淀用1mL完全培养液重悬,然后铺入含10mL完全培养基并己用0.2%明胶(VWR)封盘的直径为9cm的细胞培养皿中,培养至细胞长满皿底60%左右;④完成步骤③后,采用胰蛋白酶消化并收集细胞,使用细胞冻存液(90%完全培养基+10%DMSO,体积比)将细胞冻存。

[0081] 用于实施例2至5的猪原代成纤维细胞均获自上述命名为1的猪原代成纤维细胞(雌性,血型A0)。

[0082] 实施例1:质粒的制备

[0083] 制备质粒pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9,如SEQ ID NO:1所示。质粒pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9,简称质粒pX330。

[0084] 制备质粒pU6gRNAeEF1a-mNLS-hSpCas9-EGFP-PURO,如SEQ ID NO:2所示。质粒pU6gRNAeEF1a-mNLS-hSpCas9-EGFP-PURO,简称质粒pKG-GE3。

[0085] 制备质粒pKG-U6gRNA,如SEQ ID NO:3所示。pKG-U6gRNA结构示意图见图3。

[0086] 制备质粒PB-1G 2R 3-puro-ROSA26,如SEQ ID NO:4所示,质粒PB-1G 2R 3-puro-ROSA26,简称ROSA26质粒。ROSA26质粒的结构示意图见图5。

[0087] 制备质粒PB-1G 2R 3-puro-AAVS1,如SEQ ID NO:5所示,质粒PB-1G 2R 3-puro-AAVS1,简称AAVS1质粒。AAVS1质粒的结构示意图见图6。

[0088] 制备质粒PB-1G 2R 3-puro-H11,如SEQ ID NO:6所示,质粒PB-1G 2R 3-puro-

H11,简称H11质粒。H11质粒的结构示意图见图7。

[0089] 制备质粒PB-1G 2R 3-puro-COL1A1,如SEQ ID NO:7所示,质粒PB-1G 2R 3-puro-COL1A1,简称COL1A1质粒。SH4质粒的结构示意图见图8。

[0090] 质粒pX330、质粒pKG-GE3、质粒pKG-U6gRNA、质粒ROSA26、质粒AAVS1、质粒H11、质粒COL1A1均为环形质粒。

[0091] 质粒pX330的结构示意图见图1。SEQ ID NO:1中,第440-725位核苷酸组成CMV增强子,第727-1208位核苷酸组成chicken β -actin启动子,第1304-1324位核苷酸编码SV40核定位信号(NLS),第1325-5449位核苷酸编码Cas9蛋白,第5450-5497位核苷酸编码nucleoplasmin核定位信号(NLS)。

[0092] 质粒pKG-GE3的结构示意图见图2。SEQ ID NO:2中,第395-680位核苷酸组成CMV增强子,第682-890位核苷酸组成EF1a启动子,第986-1006位核苷酸编码核定位信号(NLS),第1016-1036位核苷酸编码核定位信号(NLS),第1037-5161位核苷酸编码Cas9蛋白,第5162-5209位核苷酸编码核定位信号(NLS),第5219-5266位核苷酸编码核定位信号(NLS),第5276-5332位核苷酸编码自剪切多肽P2A(自剪切多肽P2A的氨基酸序列为“ATNFSLLKQAGDVEENPGP”,发生自剪切的断裂位置为C端开始第一个氨基酸残基和第二个氨基酸残基之间),第5333-6046位核苷酸编码EGFP蛋白,第6056-6109位核苷酸编码自裂解多肽T2A(自裂解多肽T2A的氨基酸序列为“EGRGSLTTCGDVEENPGP”,发生自裂解的断裂位置为C端开始第一个氨基酸残基和第二个氨基酸残基之间),第6110-6703位核苷酸编码Puromycin蛋白(简称Puro蛋白),第6722-7310位核苷酸组成WPRE序列元件,第7382-7615位核苷酸组成3' LTR序列元件,第7647-7871位核苷酸组成bGH poly(A) signal序列元件。SEQ ID NO:2中,第911-6706形成融合基因,表达融合蛋白。由于自剪切多肽P2A和自裂解多肽T2A的存在,融合蛋白自发形成如下三个蛋白:具有Cas9蛋白的蛋白、具有EGFP蛋白的蛋白和具有Puro蛋白的蛋白。

[0093] 与质粒pX330相比,质粒pKG-GE3主要进行了如下改造:①去除残留的gRNA骨架序列(GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTTT),降低干扰;②将原有chicken β -actin启动子改造为具更高表达活性的EF1a启动子,增加Cas9基因的蛋白表达能力;③在Cas9基因的上游和下游均增加核定位信号编码基因(NLS),增加Cas9蛋白的核定位能力;④原质粒无任何真核细胞筛选标记,不利于阳性转化细胞的筛选和富集,依次在Cas9基因的下游插入P2A-EGFP-T2A-PURO编码基因,赋予载体荧光和真核细胞抗性筛选能力;⑤插入WPRE元件和3' LTR序列元件,增强Cas9基因的蛋白翻译能力。

[0094] 质粒pKG-U6gRNA的结构示意图见图3。SEQ ID NO:3中,第2280-2539位核苷酸组成hU6启动子,第2558-2637位核苷酸用于转录形成gRNA骨架。使用时,将20bp左右的DNA分子(用于转录形成gRNA的靶序列结合区)插入质粒pKG-U6gRNA,形成重组质粒,示意图见图4,在细胞中重组质粒转录得到gRNA。

[0095] SEQ ID NO:4中,第1-345位核苷酸组成ROSA26安全港位点左侧猪基因组区域(SH1左臂),第9184-10195位核苷酸组成ROSA26安全港位点右侧猪基因组区域(SH1右臂),第346-546、3132-3531、6506-6707、8975-9175位核苷酸分别组成4个不同的绝缘子区域,第1954-3131位核苷酸组成EF-1d启动子,第1216-1935位核苷酸编码EGFP蛋白,第637-1209位核苷酸组成EF-1 α poly(A)信号,第3543-4042位核苷酸组成PGK启动子,第4059-5769位核

核苷酸编码mCherry蛋白,第4791-5015位核苷酸组成bGH poly(A)信号,第5054-6504位核苷酸为loxP-puro-loxP表达框区域,第7259-8974位核苷酸组成pCAG启动子,第6969-7233位核苷酸组成 β -globin poly(A)信号。

[0096] SEQ ID NO:5中,第1-1081位核苷酸组成AAVS1安全港位点左侧猪基因组区域(SH2左臂),第9920-10179位核苷酸组成AAVS1安全港位点右侧猪基因组区域(SH2右臂),第1082-1282、3868-4267、7242-7442、9711-9911位核苷酸分别组成4个不同的绝缘子区域,第1373-1945位核苷酸组成EF-1d启动子,第1952-2671位核苷酸编码EGFP蛋白,第2690-3867位核苷酸组成EF-1 α poly(A)信号,第4279-4778位核苷酸组成PGK启动子,第4795-5502位核苷酸编码mCherry蛋白,第5527-5751位核苷酸组成bGH poly(A)信号,第5790-7240位核苷酸为loxP-puro-loxP表达框区域,第7995-9710位核苷酸组成pCAG启动子,第7705-7969位核苷酸组成 β -globin poly(A)信号。

[0097] SEQ ID NO:6中,第1-555位核苷酸组成H11安全港位点左侧猪基因组区域(SH3左臂),第9394-10402位核苷酸组成H11安全港位点右侧猪基因组区域(SH3右臂),第556-756、3342-3741、6716-6916、9185-9385位核苷酸分别组成4个不同的绝缘子区域,第2164-3341位核苷酸组成EF-1 α 启动子,第1426-2145位核苷酸编码EGFP蛋白,第847-1419位核苷酸组成EF-1d poly(A)信号,第3753-4252位核苷酸组成PGK启动子,第4269-4979位核苷酸编码mCherry蛋白,第5001-5225位核苷酸组成bGH poly(A)信号,第5264-6714位核苷酸为loxP-puro-loxP表达框区域,第7469-9184位核苷酸组成pCA6启动子,第7179-7443位核苷酸组成 β -globin poly(A)信号。

[0098] SEQ ID NO:7中,第1-886位核苷酸组成COL1A1安全港位点左侧猪基因组区域(SH4左臂),第9725-10451位核苷酸组成Co11A1安全港位点右侧猪基因组区域(SH4右臂),第887-1087、3673-4072、7047-7247、9516-9716位核苷酸分别组成4个不同的绝缘子区域,第2495-3672位核苷酸组成EF-1d启动子,第1757-2476位核苷酸编码EGFP蛋白,第1178-1750位核苷酸组成EF-1d poly(A)信号,第4084-4583位核苷酸组成PGK启动子,第4600-5310位核苷酸编码mCherry蛋白,第5332--5556位核苷酸组成bGH poly(A)信号,第5595-7045位核苷酸为loxP-puro-loxP表达框区域,第7800-9515位核苷酸组成pCA6启动子,第7510-7774位核苷酸组成 β -globin poly(A)信号。

[0099] 实施例2:质粒pX330和质粒pKG-GE3的效果比较

[0100] 选择位于RAG1基因的高效gRNA靶点:

[0101] RAG1-gRNA4的靶点:5'-AGTTATGGCAGAACTCAGTG-3'(SEQ ID NO:61)。

[0102] 用于扩增包含靶点的片段的引物为:

[0103] RAG1-nF126:5'-CCCCATCCAAAGTTTTTAAAGGA-3'(SEQ ID NO:62);

[0104] RAG1-nR525:5'-TGTGGCAGATGTCACAGTTTAGG-3'(SEQ ID NO:63)。

[0105] 一、制备重组质粒

[0106] 取质粒pKG-U6gRNA,用限制性内切酶BbsI进行酶切,回收载体骨架(约3kb的线性大片段)。

[0107] 分别合成RAG1-4S和RAG1-4A,然后混合并进行退火,得到具有粘性末端的双链DNA分子。将具有粘性末端的双链DNA分子和载体骨架连接,得到质粒pKG-U6gRNA(RAG1-4)。

[0108] RAG1-4S:5'-caccgAGTTATGGCAGAACTCAGTG-3'(SEQ ID NO:64);

[0109] RAG1-4A:5'-aaacCACTGAGTTCTGCCATAACTc-3' (SEQ ID NO:65)。

[0110] 二、质粒配比优化

[0111] 1、组别

[0112] 第一组:将质粒pKG-U6gRNA (RAG1-4) 和质粒pKG-GE3共转染猪原代成纤维细胞。配比:约20万个猪原代成纤维细胞:0.44 μ g质粒pKG-U6gRNA (RAG1-4) :1.56 μ g质粒pKG-GE3。即质粒pKG-U6gRNA (RAG1-4) 和质粒pKG-GE3的摩尔配比为:1:1。

[0113] 第二组:将质粒pKG-U6gRNA (RAG1-4) 和质粒pKG-GE3共转染猪原代成纤维细胞。配比:约20万个猪原代成纤维细胞:0.72 μ g质粒pKG-U6gRNA (RAG1-4) :1.28 μ g质粒pKG-GE3。即质粒pKG-U6gRNA (RAG1-4) 和质粒pKG-GE3的摩尔配比为:2:1。

[0114] 第三组:将质粒pKG-U6gRNA (RAG1-4) 和质粒pKG-GE3共转染猪原代成纤维细胞。配比:约20万个猪原代成纤维细胞:0.92 μ g质粒pKG-U6gRNA (RAG1-4) :1.08 μ g质粒pKG-GE3。即质粒pKG-U6gRNA (RAG1-4) 和质粒pKG-GE3的摩尔配比为:3:1。

[0115] 第四组:将质粒pKG-U6gRNA (RAG1-4) 转染致猪原代成纤维细胞。配比:约20万个猪原代成纤维细胞:1 μ g质粒pKG-U6gRNA (RAG1-4)。

[0116] 共转染采用电击转染的方式,采用哺乳动物核转染试剂盒 (Neon kit, Thermofisher) 与Neon TM transfection system电转仪 (参数设置为:1450V、10ms、3pulse)。

[0117] 2、完成步骤1后,采用完全培养液培养16-18小时,然后更换新的完全培养液进行培养。培养总时间为48小时。

[0118] 3、完成步骤2后,采用胰蛋白酶消化并收集细胞,提取基因组DNA,采用RAG1-nF126和RAG1-nR525组成的引物对进行PCR扩增,然后进行电泳。

[0119] 电泳后回收目的条带并进行测序,测序结果见图9A。

[0120] 通过利用SynthegoICE工具分析测序峰图得出不同靶点的编辑效率。第一组至第四组的编辑效率依次为9%、53%、66%和0%。结果表明,第三组编辑效率最高,确定单gRNA质粒与Cas9质粒最适用量为摩尔比3:1,质粒实际用量为0.92 μ g:1.08 μ g。

[0121] 三、质粒pX330和质粒pKG-GE3的效果比较

[0122] 1、共转染

[0123] RAG1-B组:将质粒pKG-U6gRNA (RAG1-4) 转染猪原代成纤维细胞。配比:约20万个猪原代成纤维细胞:0.92 μ g质粒pKG-U6gRNA (RAG1-4)。

[0124] RAG1-330组:将质粒pKG-U6gRNA (RAG1-4) 和质粒pX330共转染猪原代成纤维细胞。配比:约20万个猪原代成纤维细胞:0.92 μ g质粒pKG-U6gRNA (RAG1-gRNA4) :1.08 μ g质粒pX330。

[0125] RAG1-KG组:将质粒pKG-U6gRNA (RAG1-4) 和质粒pKG-GE3共转染猪原代成纤维细胞。配比:约20万个猪原代成纤维细胞:0.92 μ g质粒pKG-U6gRNA (RAG1-4) :1.08 μ g质粒pKG-GE3。

[0126] 共转染采用电击转染的方式,采用哺乳动物核转染试剂盒 (Neon kit, Thermofisher) 与Neon TM transfection system电转仪 (参数设置为:1450V、10ms、3pulse)。

[0127] 2、完成步骤1后,采用完全培养液培养16-18小时,然后更换新的完全培养液进行

培养。培养总时间为48小时。

[0128] 3、完成步骤2后,采用胰蛋白酶消化并收集细胞,提取基因组DNA,采用RAG1-nF126和RAG1-nR525组成的引物对进行PCR扩增,将产物进行测序。测序结果利用网页版Synthego ICE工具分析测序峰图得出RAG1-330组、RAG1-KG组的编辑效率分别为28%、68%,测序结果示例性峰图见图9B,结果表明,与采用质粒pX330相比,采用质粒pKG-GE3使得基因编辑效率显著提高。

[0129] 实施例3:ROSA26安全港位点猪基因组区域定位及ROSA26的高效切割靶点筛选

[0130] 一、猪ROSA26安全港位点及其临近基因组序列的保守性分析

[0131] 猪ROSA26安全港位点信息:通过将小鼠的ROSA26安全港位点序列与猪全基因组序列进行比对,将猪的ROSA26安全港位点区域定位在猪13号染色体,该区域及其上下游500bp序列如SEQ ID NO:8所示。

[0132] 分别以8只猪的基因组DNA为模板,采用引物ROSA26-F195/ROSA26-R1092组成的引物对进行PCR扩增,然后进行电泳,见图10。回收PCR扩增产物并进行测序,将测序结果与公共数据库中的基因序列进行比对分析。根据比对结果,设计用于检测突变的引物(引物本身避开可能的突变位点)。设计的用于检测突变的引物为:ROSA26-F477/ROSA26-R899。

[0133] ROSA26-F195:5'-ACAGGTGAGGAGAAAGCCAATGG-3'(SEQ ID NO:66);

[0134] ROSA26-R1092:5'-CTGCGCAACGTGGCAGGAAG-3'(SEQ ID NO:67);

[0135] ROSA26-F477:5'-GCATAAAATCAGGCTTAGGTGTTGC-3'(SEQ ID NO:68);

[0136] ROSA26-R899:5'-GGTGGGAGGCGCATGTTCTCC-3'(SEQ ID NO:69)。

[0137] 二、筛选靶点

[0138] 通过筛选NGG(避开可能的突变位点)初步筛选到若干靶点,经过预实验进一步从中筛选到4个靶点。

[0139] 4个靶点分别如下:

[0140] SgRNA_{ROSA26-g1}靶点:5'-CCAAGAATCAGGTTAAGCCA-3'(SEQ ID NO:45);

[0141] sgRNA_{ROSA26-g2}靶点:5'-CGAGAAGGAGCAAACACTGACA-3'(SEQ ID NO:46);

[0142] SgRNA_{ROSA26-g3}靶点:5'-GAAGGAGCAAACACTGACATGG-3'(SEQ ID NO:47);

[0143] SgRNA_{ROSA26-g4}靶点:5'-CAGGACAACGCCAAGAATC-3'(SEQ ID NO:48)。

[0144] 三、制备重组质粒

[0145] 取质粒pKG-U6gRNA,用限制性内切酶BbsI进行酶切,回收载体骨架(约3kb的线性大片段)。

[0146] 分别合成ROSA26-g1S和ROSA26-g1A,然后混合并进行退火,得到具有粘性末端的双链DNA分子(图11A)。将具有粘性末端的双链DNA分子和载体骨架连接,得到质粒pKG-U6gRNA(ROSA26-g1)。质粒pKG-U6gRNA(ROSA26-g1)表达SEQ ID NO:115所示的sgRNA_{ROSA26-g1}°

[0147] SEQ ID NO:115:

[0148] CCAAGAAUCAGGUUAAGCCAguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaaauaggcuaguccguuuaucaacuugaaa
aaguggcaccgagucggugcuuuu

[0149] 分别合成ROSA26-g2S和ROSA26-g2A,然后混合并进行退火,得到具有粘性末端的双链DNA分子(图11B)。将具有粘性末端的双链DNA分子和载体骨架连接,得到质粒pKG-

U6gRNA (ROSA26-g2)。质粒pKG-U6gRNA (ROSA26-g2) 表达SEQ ID NO:116所示的sgRNA_{ROSA26-g2}°

[0150] SEQ ID NO:116:

[0151] CGAGAAGGAGCAAACUGACAGuuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaaauaggcuaguccguuaucaacuugaaa
aaguggcaccgagucggugcuuuu

[0152] 分别合成ROSA26-g3S和ROSA26-g3A,然后混合并进行退火,得到具有粘性末端的双链DNA分子(图11C)。将具有粘性末端的双链DNA分子和载体骨架连接,得到质粒pKG-U6gRNA (ROSA26-g3)。质粒pKG-U6gRNA (ROSA26-g3) 表达SEQ ID NO:117所示的sgRNA_{ROSA26-g3}°

[0153] SEQ ID NO:117:

[0154] GAAGGAGCAAACUGACAUGGuuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaaauaggcuaguccguuaucaacuugaaa
aaguggcaccgagucggugcuuuu

[0155] 分别合成ROSA26-g4S和ROSA26-g4A,然后混合并进行退火,得到具有粘性末端的双链DNA分子(图11D)。将具有粘性末端的双链DNA分子和载体骨架连接,得到质粒pKG-U6gRNA (ROSA26-g4)。质粒pKG-U6gRNA (ROSA26-g4) 表达SEQ ID NO:118所示的sgRNA_{ROSA26-g4}°

[0156] SEQ ID NO:118:

[0157] CAGGACAACGCCCAAGAAUCuuuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaaauaggcuaguccguuaucaacuugaaa
aaguggcaccgagucggugcuuuu

[0158] sgRNA-ROSA26-1S:5' -caccgCCAAGAATCAGGTTAAGCCA-3';SEQ ID NO:13

[0159] sgRNA-ROSA26-1A:5' -aaacTGGCTTAACCTGATTCTTGGc-3'。SEQ ID NO:14

[0160] sgRNA-ROSA26-2S:5' -caccgCGAGAAGGAGCAAACCTGACA-3';SEQ ID NO:15

[0161] sgRNA-ROSA26-2A:5' -aaacTGTCAGTTTGCTCCTTCTCGc-3'。SEQ ID NO:16

[0162] sgRNA-ROSA26-3S:5' -caccGAAGGAGCAAACCTGACATGG-3';SEQ ID NO:17

[0163] sgRNA-ROSA26-3A:5' -aaacCCATGTTCAGTTTGCTCCTTC-3'。SEQ ID NO:18

[0164] sgRNA-ROSA26-4S:5' -caccgCAGGACAACGCCCAAGAATC-3';SEQ ID NO:19

[0165] sgRNA-ROSA26-4A:5' -aaacGATTCTTGGGCGTTGTCCTGc-3'。SEQ ID NO:20

[0166] sgRNA-ROSA26-1S、sgRNA-ROSA26-1A、sgRNA-ROSA26-2S、sgRNA-ROSA26-2A、sgRNA-ROSA26-3S、sgRNA-ROSA26-3A、sgRNA-ROSA26-4S、sgRNA-ROSA26-4A均为单链DNA分子。

[0167] 四、不同靶点的编辑效率比较

[0168] 1、共转染

[0169] 第一组:将质粒pKG-U6gRNA (ROSA26-g1) 和质粒pKG-GE3共转染猪原代成纤维细胞。配比:约20万个猪原代成纤维细胞:0.92μg质粒pKG-U6gRNA (ROSA26-g1):1.08μg质粒pKG-GE3。

[0170] 第二组:将质粒pKG-U6gRNA (ROSA26-g2) 和质粒pKG-GE3共转染猪原代成纤维细胞。配比:约20万个猪原代成纤维细胞:0.92μg质粒pKG-U6gRNA (ROSA26-g2):1.08μg质粒pKG-GE3。

[0171] 第三组:将质粒pKG-U6gRNA (ROSA26-g3) 和质粒pKG-GE3共转染猪原代成纤维细

胞。配比:约20万个猪原代成纤维细胞:0.92 μ g质粒pKG-U6gRNA (ROSA26-g3):1.08 μ g质粒pKG-GE3。

[0172] 第四组:将质粒pKG-U6gRNA (ROSA26-g4)和质粒pKG-GE3共转染猪原代成纤维细胞。配比:约20万个猪原代成纤维细胞:0.92 μ g质粒pKG-U6gRNA (ROSA26-g4):1.08 μ g质粒pKG-GE3。

[0173] 第五组:猪原代成纤维细胞,未进行任何转染操作。

[0174] 共转染采用电击转染的方式,采用哺乳动物核转染试剂盒 (Neon kit, Thermofisher)与Neon TM transfection system电转仪(参数设置为:1450V、10ms、3pulse)。

[0175] 2、完成步骤1后,采用完全培养液培养16-18小时,然后更换新的完全培养液进行培养。培养总时间为48小时。

[0176] 3、完成步骤2后,采用胰蛋白酶消化并收集细胞,提取基因组DNA,采用ROSA26-F477和ROSA26-R899组成的引物对进行PCR扩增,然后进行电泳并测序,结果见图18。

[0177] 通过利用SynthegoICE工具分析测序峰图得出不同靶点的编辑效率。第一组至第五组的编辑效率依次为35%、3%、38%、14%和0%。结果表明,第三组编辑效率最高,sgRNA_{ROSA26-g3}为最优靶点。

[0178] 五、高效靶点两侧基因组区域同源臂序列扩增

[0179] 分别以8只猪的基因组DNA为模板,采用引物对SH1-L-F/SH1-L-R进行ROSA26安全港位点切点左侧基因组序列的PCR扩增,采用引物对SH1-R-F/SH1-R-R进行ROSA26安全港位点切点右侧基因组序列的PCR扩增,然后进行电泳并测序分析。通过测序结果,选择8只猪中序列保守的区域进一步分别采用引物对SH1-LR-F/SH1-LR-R和SH1-RR-F/SH1-RR-R进行ROSA26安全港位点切点左侧和右侧基因组同源序列的扩增。

[0180] SH1-L-F:5'-GACTCATTTCATCTCCACCCC-3';SEQ ID NO:70

[0181] SH1-L-R:5'-ATGGGTGCTTGAGGTGGTCTGAC-3';SEQ ID NO:71

[0182] SH1-R-F:5'-GGGTAAGGACTATGGAGGGTAGC-3';SEQ ID NO:72

[0183] SH1-R-R:5'-TCTCTGCTGCCTCCTTTTCCTAA-3';SEQ ID NO:73

[0184] SH1-LR-F:5'-TCTTGTATAGATATCGGCGCGCCCTCTACCTGCTCTCGGACCCGTGGG-3';SEQ ID NO:75

[0185] SH1-LR-R:5'-CCAGGCCCGGTCTGGGGCGGCCAGGGCAAAGAATCCCGCCATAATCG-3';SEQ ID NO:76

[0186] SH1-RR-F:5'-AGCATTGTACGCGTTGCTTAACCTGATTCTTGGGCGTTGTCCTG-3';SEQ ID NO:77

[0187] SH1-RR-R:5'-CTTTTATGGCGCCGCATAAGTACTTTTTGTAGGCATGTGTGGAAAATTG-3'。SEQ ID NO:78

[0188] 实施例4:AAVS1安全港位点猪基因组区域定位及AAVS1的高效切割靶点筛选

[0189] 一、猪AAVS1安全港位点信息:通过将人的AAVS1安全港位点序列与猪全基因组序列进行比对,将猪的AAVS1安全港位点区域定位在猪6号染色体PPP1R12C基因内,该区域及其上下游500bp序列如SEQ ID NO:9所示。

[0190] 分别以8只猪的基因组DNA为模板,采用引物AAVS1-F101/AAVS1-R1088组成的引物

对进行PCR扩增,然后进行电泳,见图12。回收PCR扩增产物并进行测序,将测序结果与公共数据库中的基因序列进行比对分析。根据比对结果,设计用于检测突变的引物(引物本身避开可能的突变位点)。设计的用于检测突变的引物为:AAVS1-F378/AAVS1-R749。

[0191] AAVS1-F101:5' -CTGTAGGCTCTCTCTTGGGGATG-3';SEQ ID NO:79

[0192] AAVS1-R1088:5' -AGCCGATTAAGACCCAGCATAG-3';SEQ ID NO:80

[0193] AAVS1-F378:5' -TGCTAGGTCCTCTCTCTCCACAA-3';SEQ ID NO:81

[0194] AAVS1-R749:5' -CTCTTCAGGCATCCTCCCCATTC-3'。SEQ ID NO:82

[0195] 二、筛选靶点

[0196] 通过筛选NGG(避开可能的突变位点)初步筛选到若干靶点,经过预实验进一步从中筛选到4个靶点。

[0197] 4个靶点分别如下:

[0198] sgRNA_{AAVS1-g1}靶点:5' -AAGACCCACTGCAGCCAGGC-3';SEQ ID NO:49

[0199] sgRNA_{AAVS1-g2}靶点:5' -GAGGAGTAGAGGCTCTCTG-3';SEQ ID NO:50

[0200] sgRNA_{AAVS1-g3}靶点:5' -CCCAAAGACCCACTGCAGCC-3';SEQ ID NO:51

[0201] sgRNA_{AAVS1-g4}靶点:5' -TGCAGTGGGTCTTTGGGGAC-3'。SEQ ID NO:52

[0202] 三、制备重组质粒

[0203] 取质粒pKG-U6gRNA,用限制性内切酶BbsI进行酶切,回收载体骨架(约3kb的线性大片段)。

[0204] 分别合成AAVS1-g1S和AAVS1-g1A,然后混合并进行退火,得到具有粘性末端的双链DNA分子(图13A)。将具有粘性末端的双链DNA分子和载体骨架连接,得到质粒pKG-U6gRNA(AAVS1-g1)。质粒pKG-U6gRNA(AAVS1-g1)表达SEQ ID NO:119所示的sgRNA_{AAVS1-g1}。

[0205] SEQ ID NO:119:

[0206] AAGACCCACUGCAGCCAGGCguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaaaaaggcuaguccguuaucaacuugaaa
aaguggcaccgagucggugcuuuu

[0207] 分别合成AAVS1-g2S和AAVS1-g2A,然后混合并进行退火,得到具有粘性末端的双链DNA分子(图13B)。将具有粘性末端的双链DNA分子和载体骨架连接,得到质粒pKG-U6gRNA(AAVS1-g2)。质粒pKG-U6gRNA(AAVS1-g2)表达SEQ ID NO:120所示的sgRNA_{AAVS1-g2}。

[0208] SEQ ID NO:120:

[0209] GAGGAGUAGAGGCUCUUCUGguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaaaaaggcuaguccguuaucaacuugaaa
aaguggcaccgagucggugcuuuu

[0210] 分别合成AAVS1-g3S和AAVS1-g3A,然后混合并进行退火,得到具有粘性末端的双链DNA分子(图13C)。将具有粘性末端的双链DNA分子和载体骨架连接,得到质粒pKG-U6gRNA(AAVS1-g3)。质粒pKG-U6gRNA(AAVS1-g3)表达SEQ ID NO:121所示的sgRNA_{AAVS1-g3}。

[0211] SEQ ID NO:121:

[0212] CCCAAAGACCCACUGCAGCCguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaaaaaggcuaguccguuaucaacuugaaa
aaguggcaccgagucggugcuuuu

[0213] 分别合成AAVS1-g4S和AAVS1-g4A,然后混合并进行退火,得到具有粘性末端的双链DNA分子(图13D)。将具有粘性末端的双链DNA分子和载体骨架连接,得到质粒pKG-U6gRNA(AAVS1-g4)。质粒pKG-U6gRNA(AAVS1-g4)表达SEQ ID NO:122所示的sgRNA_{AAVS1-g4}。

[0214] SEQ ID NO:122:

UGCAGUGGGUCUUUGGGGACguuuuagagcuagaaauagcaaguuuuuuuaggcuaguccguuaucaacuugaaa

[0215]

aaguggcaccgagucggugcuuuu

[0216] sgRNA-AAVS1-1S:5' -caccgAAGACCCACTGCAGCCAGGC-3' ;SEQ ID NO:21

[0217] sgRNA-AAVS1-1A:5' -aaacGCCTGGCTGCAGTGGGTCTTc-3' 。SEQ ID NO:22

[0218] sgRNA-AAVS1-2S:5' -caccgGAGGAGTAGAGGCTCTTCTG-3' ;SEQ ID NO:23

[0219] sgRNA-AAVS1-2A:5' -aaacCAGAAGAGCCTCTACTCCTC-3' 。SEQ ID NO:24

[0220] sgRNA-AAVS1-3S:5' -caccgCCCAAAGACCCACTGCAGCC-3' ;SEQ ID NO:25

[0221] sgRNA-AAVS1-3A:5' -aaacGGCTGCAGTGGGTCTTTGGGc-3' 。SEQ ID NO:26

[0222] sgRNA-AAVS1-4S:5' -caccgTGCAGTGGGTCTTTGGGGAC-3' ;SEQ ID NO:27

[0223] sgRNA-AAVS1-4A:5' -aaacGTCCCCAAAGACCCACTGCAC-3' 。SEQ ID NO:28

[0224] sgRNA-AAVS1-1S、sgRNA-AAVS1-1A、sgRNA-AAVS1-2S、sgRNA-AAVS1-2A、sgRNA-AAVS1-3S、sgRNA-AAVS1-3A、sgRNA-AAVS1-4S、sgRNA-AAVS1-4A均为单链DNA分子。

[0225] 四、不同靶点的编辑效率比较

[0226] 1、共转染

[0227] 第一组:将质粒pKG-U6gRNA (AAVS1-g1) 和质粒pKG-GE3共转染猪原代成纤维细胞。配比:约20万个猪原代成纤维细胞:0.92μg质粒pKG-U6gRNA (AAVS1-g1) :1.08μg质粒pKG-GE3。

[0228] 第二组:将质粒pKG-U6gRNA (AAVS1-g2) 和质粒pKG-GE3共转染猪原代成纤维细胞。配比:约20万个猪原代成纤维细胞:0.92μg质粒pKG-U6gRNA (AAVS1-g2) :1.08μg质粒pKG-GE3。

[0229] 第三组:将质粒pKG-U6gRNA (AAVS1-g3) 和质粒pKG-GE3共转染猪原代成纤维细胞。配比:约20万个猪原代成纤维细胞:0.92μg质粒pKG-U6gRNA (AAVS1-g3) :1.08μg质粒pKG-GE3。

[0230] 第四组:将质粒pKG-U6gRNA (AAVS1-g4) 和质粒pKG-GE3共转染猪原代成纤维细胞。配比:约20万个猪原代成纤维细胞:0.92μg质粒pKG-U6gRNA (AAVS1-g4) :1.08μg质粒pKG-GE3。

[0231] 第五组:猪原代成纤维细胞,未进行任何转染操作。

[0232] 共转染采用电击转染的方式,采用哺乳动物核转染试剂盒 (Neon kit, Thermofisher) 与Neon TM transfection system电转仪 (参数设置为:1450V、10ms、3pulse)。

[0233] 2、完成步骤1后,采用完全培养液培养16-18小时,然后更换新的完全培养液进行培养。培养总时间为48小时。

[0234] 3、完成步骤2后,采用胰蛋白酶消化并收集细胞,提取基因组DNA,采用AAVS1-F378和AAVS1-R749组成的引物对进行PCR扩增,然后进行电泳并测序,结果见图19。

[0235] 通过利用SynthegoICE工具分析测序峰图得出不同靶点的编辑效率。第一组至第五组的编辑效率依次为5%、27%、4%、30%和0%。结果表明,第四组编辑效率最高,sgRNA_{AAVS1-g4}为最优靶点。

[0236] 五、高效靶点两侧基因组区域同源臂序列扩增

[0237] 分别以8只猪的基因组DNA为模板,采用引物对SH2-L-F/SH2-L-R进行AAVS1安全港位点切点左侧基因组序列的PCR扩增,采用引物对SH2-R-F/SH2-R-R进行AAVS1安全港位点切点右侧基因组序列的PCR扩增,然后进行电泳并测序分析。通过测序结果,选择8只猪中序列保守的区域进一步分别采用引物对SH2-LR-F/SH2-LR-R和SH2-RR-F/SH2-RR-R进行AAVS1安全港位点切点左侧和右侧基因组同源序列的扩增。

[0238] SH2-L-F:5' -CGTGCTGAGTCCTTTTCCCATC-3' ;SEQ ID NO:83

[0239] SH2-L-R:5' -CCCCAAAGTAACCGAACCTGACG-3' ;SEQ ID NO:84

[0240] SH2-R-F:5' -CTGCCTCCATTGGTCTTGTGTTC-3' ;SEQ ID NO:85

[0241] SH2-R-R:5' -GTGCAGCTCCTCAGGAAGTGG-3' ;SEQ ID NO:86

[0242] SH2-LR-F:5' -TCTTGTTATAGATATCGGCGCGCCGTGCTGAGTCCTTTTCCCATCCCACCCACCTG-3' ;SEQ ID NO:87

[0243] SH2-LR-R:5' -CCAGGCCCGGGTCTGGGGCGCCCAAAGACCCACTGCAGCCAGGCAGG-3' ;SEQ ID NO:88

[0244] SH2-RR-F:5' -AGCCATTGTACGCGTTGGACAGGCCACAGAAGAGCCTCTACTCCTC-3' ;SEQ ID NO:89

[0245] SH2-RR-R:5' -CTTTTATGGCGGCCGCATTTTCCCTGAACTGCTCCTCTTCTGGG-3' 。SEQ ID NO:90

[0246] 实施例5:H11安全港位点猪基因组区域定位及H11的高效切割靶点筛选

[0247] 一、猪H11安全港位点信息:猪H11安全港位点位于Drg1和Eif4enif1基因之间的间隔区,该区域及其上下游500bp序列如SEQ ID NO:10所示。

[0248] 分别以8只猪的基因组DNA为模板,采用引物H11-F3/H11-R843组成的引物对进行PCR扩增,然后进行电泳,见图14。回收PCR扩增产物并进行测序,将测序结果与公共数据库中的基因序列进行比对分析。根据比对结果,设计用于检测突变的引物(引物本身避开可能的突变位点)。设计的用于检测突变的引物为:H11-F194/H11-R574。

[0249] H11-F3:5' -TGGCTTTGCTTGGTACCTACATCT-3' ;SEQ ID NO:91

[0250] H11-R843:5' -TTAGGGAAAATGGGGCCTCAGAG-3' ;SEQ ID NO:92

[0251] H11-F194:5' -TGCGAGAATTCTAAACTGGAGTA-3' ;SEQ ID NO:93

[0252] H11-R574:5' -GGTGACAGTCTCAAGCTCCTCAA-3' 。SEQ ID NO:94

[0253] 二、筛选靶点

[0254] 通过筛选NGG(避开可能的突变位点)初步筛选到若干靶点,经过预实验进一步从中筛选到4个靶点。

[0255] 4个靶点分别如下:

[0256] sgRNA_{H11-g1}靶点:5' -TTCCAGGAACATAAGAAAGT-3' ;SEQ ID NO:53

[0257] sgRNA_{H11-g2}靶点:5' -TGTTCTGGAAGTTTAGATC-3' ;SEQ ID NO:54

[0258] sgRNA_{H11-g3}靶点:5' -AGGCTACACTGTTAACTC-3' ;SEQ ID NO:55

[0259] sgRNA_{H11-g4}靶点:5' -GACCTACTTTCTTATGTTCC-3' 。SEQ ID NO:56

[0260] 三、制备重组质粒

[0261] 取质粒pKG-U6gRNA,用限制性内切酶BbsI进行酶切,回收载体骨架(约3kb的线性大片段)。

[0262] 分别合成H11-g1S和H11-g1A,然后混合并进行退火,得到具有粘性末端的双链DNA分子(图15A)。将具有粘性末端的双链DNA分子和载体骨架连接,得到质粒pKG-U6gRNA(H11-g1)。质粒pKG-U6gRNA(H11-g1)表达SEQ ID NO:123所示的sgRNA_{H11-g1}。

[0263] SEQ ID NO:123:

UCCAGGAACAUAAGAAAGUguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucacuugaaa

[0264]

aaguggcaccgagucggugcuuuu

[0265] 分别合成H11-g2S和H11-g2A,然后混合并进行退火,得到具有粘性末端的双链DNA分子(图15B)。将具有粘性末端的双链DNA分子和载体骨架连接,得到质粒pKG-U6gRNA(H11-g2)。质粒pKG-U6gRNA(H11-g2)表达SEQ ID NO:124所示的sgRNA_{H11-g2}。

[0266] SEQ ID NO:124:

UGUCCUGGAAGUUUAGAUCguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucacuugaaa

[0267]

aaguggcaccgagucggugcuuuu

[0268] 分别合成H11-g3S和H11-g3A,然后混合并进行退火,得到具有粘性末端的双链DNA分子(图15C)。将具有粘性末端的双链DNA分子和载体骨架连接,得到质粒pKG-U6gRNA(H11-g3)。质粒pKG-U6gRNA(H11-g3)表达SEQ ID NO:125所示的sgRNA_{H11-g3}。

[0269] SEQ ID NO:125:

AGGCUACACUGUUAACACUCguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucacuugaaa

[0270]

aaguggcaccgagucggugcuuuu

[0271] 分别合成H11-g4S和H11-g4A,然后混合并进行退火,得到具有粘性末端的双链DNA分子(图15D)。将具有粘性末端的双链DNA分子和载体骨架连接,得到质粒pKG-U6gRNA(H11-g4)。质粒pKG-U6gRNA(H11-g4)表达SEQ ID NO:126所示的sgRNA_{H11-g4}。

[0272] SEQ ID NO:126:

GACCUACUUUCUUAUGUCCguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucacuugaaa

[0273]

aaguggcaccgagucggugcuuuu

[0274] sgRNA-H11-1S:5'-caccgTTCCAGGAACATAAGAAAGT-3';SEQ ID NO:29

[0275] sgRNA-H11-1A:5'-aaacACTTTCTTATGTTCTGGAAC-3'。SEQ ID NO:30

[0276] sgRNA-H11-2S:5'-caccgTGTTCTGGAAGTTTAGATC-3';SEQ ID NO:31

[0277] sgRNA-H11-2A:5'-aaacGATCTAACTTCCAGGAACAc-3'。SEQ ID NO:32

[0278] sgRNA-H11-3S:5'-caccgAGGCTACACTGTTAACTC-3';SEQ ID NO:33

[0279] sgRNA-H11-3A:5'-aaacGAGTGTTAACAGTGTAGCCTc-3'。SEQ ID NO:34

[0280] sgRNA-H11-4S:5'-caccgGACCTACTTTCTTATGTTCC-3';SEQ ID NO:35

[0281] sgRNA-H11-4A:5'-aaacGGAACATAAGAAAGTAGGTc-3'。SEQ ID NO:36

[0282] sgRNA-H11-1S、sgRNA-H11-1A、sgRNA-H11-2S、sgRNA-H11-2A、sgRNA-H11-3S、sgRNA-H11-3A、sgRNA-H11-4S、sgRNA-H11-4A均为单链DNA分子。

[0283] 四、不同靶点的编辑效率比较

[0284] 1、共转染

[0285] 第一组:将质粒pKG-U6gRNA(H11-g1)和质粒pKG-GE3共转染猪原代成纤维细胞。配比:约20万个猪原代成纤维细胞:0.92μg质粒pKG-U6gRNA(H11-g1):1.08μg质粒pKG-GE3。

[0286] 第二组:将质粒pKG-U6gRNA(H11-g2)和质粒pKG-GE3共转染猪原代成纤维细胞。配

比:约20万个猪原代成纤维细胞:0.92 μ g质粒pKG-U6gRNA(H11-g2):1.08 μ g质粒pKG-GE3。

[0287] 第三组:将质粒pKG-U6gRNA(H11-g3)和质粒pKG-GE3共转染猪原代成纤维细胞。配比:约20万个猪原代成纤维细胞:0.92 μ g质粒pKG-U6gRNA(H11-g3):1.08 μ g质粒pKG-GE3。

[0288] 第四组:将质粒pKG-U6gRNA(H11-g4)和质粒pKG-GE3共转染猪原代成纤维细胞。配比:约20万个猪原代成纤维细胞:0.92 μ g质粒pKG-U6gRNA(H11-g4):1.08 μ g质粒pKG-GE3。

[0289] 第五组:猪原代成纤维细胞,未进行任何转染操作。

[0290] 共转染采用电击转染的方式,采用哺乳动物核转染试剂盒(Neon kit, Thermofisher)与Neon TM transfection system电转仪(参数设置为:1450V、10ms、3pulse)。

[0291] 2、完成步骤1后,采用完全培养液培养16-18小时,然后更换新的完全培养液进行培养。培养总时间为48小时。

[0292] 3、完成步骤2后,采用胰蛋白酶消化并收集细胞,提取基因组DNA,采用H11-F194和H11-R574组成的引物对进行PCR扩增,然后进行电泳并测序,结果见图20。

[0293] 通过利用SynthegoICE工具分析测序峰图得出不同靶点的编辑效率。第一组至第五组的编辑效率依次为60%、27%、26%、0%和0%。结果表明,第一组编辑效率最高,sgRNA_{H11-g1}为最优靶点。

[0294] 五、高效靶点两侧基因组区域同源臂序列扩增

[0295] 分别以8只猪的基因组DNA为模板,采用引物对SH3-L-F/SH3-L-R进行H11安全港位点切点左侧基因组序列的PCR扩增,采用引物对SH3-R-F/SH3-R-R进行H11安全港位点切点右侧基因组序列的PCR扩增,然后进行电泳并测序分析。通过测序结果,选择8只猪中序列保守的区域进一步分别采用引物对SH3-LR-F/SH3-LR-R和SH3-RR-F/SH3-RR-R进行H1安全港位点切点左侧和右侧基因组同源序列的扩增。

[0296] SH3-L-F:5'-AGACAGACCATGCTCAATCCACA-3';SEQ ID NO:95

[0297] SH3-L-R:5'-GATGCCCGATGTTGTCAATCCTG-3';SEQ ID NO:96

[0298] SH3-R-F:5'-AAGATACTCAGCAGCAGTCTCCT-3';SEQ ID NO:97

[0299] SH3-R-R:5'-GATGGACAGGTGAAGCAGGCAAG-3';SEQ ID NO:98

[0300] SH3-LR-F:5'-TCTTGTATAGATATCGGCGCGCCAAATACCCACGTTTATTGGGACAAAAG-3';SEQ ID NO:99

[0301] SH3-LR-R:5'-CCAGGCCCGGTCTGGGGCGGTTCTTATGTTTCCTGGAAGTTTAGATCAG-3';SEQ ID NO:100

[0302] SH3-RR-F:5'-AGCCATTGTACGCGTTGAGTAGGTCACATTCAGTAAAACCTGG-3';SEQ ID NO:101

[0303] SH3-RR-R:5'-CTTTTATGGCGCCGCATCTTTTCTACGGCCACTTCCAGGGCATATGG-3'。SEQ ID NO:102

[0304] 实施例6:Col11A1安全港位点猪基因组区域定位及Col11A1的高效切割靶点筛选

[0305] 一、猪COL1A1安全港位点信息:猪Col11A1安全港位点位于Col11A1基因的下游区域,该区域及其上下游500bp序列如SEQ ID NO:11所示。

[0306] 分别以8只猪的基因组DNA为模板,采用引物COL1A1-F157/COL1A1-R1084组成的引物对进行PCR扩增,然后进行电泳,见图16。回收PCR扩增产物并进行测序,将测序结果与公

共数据库中的基因序列进行比对分析。根据比对结果,设计用于检测突变的引物(引物本身避开可能的突变位点)。设计的用于检测突变的引物为:COL1A1-F473/COL1A1-R870。

[0307] COL1A1-F157:5' -TGACCCAAACCAATCTTGCCTG-3';SEQ ID NO:103

[0308] COL1A1-R1084:5' -TGAGTTCTGGCTTCCTGGATTCT-3';SEQ ID NO:104

[0309] COL1A1-F473:5' -GATGCCACCAACTCTCTCGCTC-3';SEQ ID NO:105

[0310] COL1A1-R870:5' -CCAGAGGTCTCATGTTTGGGGAA-3'。SEQ ID NO:106

[0311] 二、筛选靶点

[0312] 通过筛选NGG(避开可能的突变位点)初步筛选到若干靶点,经过预实验进一步从中筛选到4个靶点。

[0313] 4个靶点分别如下:

[0314] sgRNA_{COL1A1-g1}靶点:5' -CTACCAAGAGAGTGACCAGC-3';SEQ ID NO:57

[0315] sgRNA_{COL1A1-g2}靶点:5' -GGTCCTGCTGGTCACTCTCT-3';SEQ ID NO:58

[0316] sgRNA_{COL1A1-g3}靶点:5' -GCAGTCTCAGCAACCACTGA-3';SEQ ID NO:59

[0317] sgRNA_{COL1A1-g4}靶点:5' -AGCCAGCAACAAGGCTCAAG-3'。SEQ ID NO:60

[0318] 三、制备重组质粒

[0319] 取质粒pKG-U6gRNA,用限制性内切酶BbsI进行酶切,回收载体骨架(约3kb的线性大片段)。

[0320] 分别合成COL1A1-g1S和COL1A1-g1A,然后混合并进行退火,得到具有粘性末端的双链DNA分子(图17A)。将具有粘性末端的双链DNA分子和载体骨架连接,得到质粒pKG-U6gRNA(COL1A1-g1)。质粒pKG-U6gRNA(COL1A1-g1)表达SEQ ID NO:127所示的sgRNA_{COL1A1-g1}。

[0321] SEQ ID NO:127:

[0322] CUACCAAGAGAGUGACCAGCguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaaaaaggcuaguccguuaucaacuugaaa
aaguggcaccgagucggugcuuuu

[0323] 分别合成COL1A1-g2S和COL1A1-g2A,然后混合并进行退火,得到具有粘性末端的双链DNA分子(图17B)。将具有粘性末端的双链DNA分子和载体骨架连接,得到质粒pKG-U6gRNA(COL1A1-g2)。质粒pKG-U6gRNA(COL1A1-g2)表达SEQ ID NO:128所示的sgRNA_{COL1A1-g2}。

[0324] SEQ ID NO:128:

[0325] GGUCCUGCUGGUCACUCUCUguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaaaaaggcuaguccguuaucaacuugaaa
aaguggcaccgagucggugcuuuu

[0326] 分别合成COL1A1-g3S和COL1A1-g3A,然后混合并进行退火,得到具有粘性末端的双链DNA分子(图17C)。将具有粘性末端的双链DNA分子和载体骨架连接,得到质粒pKG-U6gRNA(COL1A1-g3)。质粒pKG-U6gRNA(COL1A1-g3)表达SEQ ID NO:129所示的sgRNA_{COL1A1-g3}。

[0327] SEQ ID NO:129:

[0328] GCAGUCUCAGCAACCACUGAguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaaaaaggcuaguccguuaucaacuugaaa
aaguggcaccgagucggugcuuuu

[0329] 分别合成COL1A1-g4S和COL1A1-g4A,然后混合并进行退火,得到具有粘性末端的

双链DNA分子(图17D)。将具有粘性末端的双链DNA分子和载体骨架连接,得到质粒pKG-U6gRNA (COL1A1-g4)。质粒pKG-U6gRNA (COL1A1-g4)表达SEQ ID NO:130所示的sgRNA_{COL1A1-g4}。

[0330] SEQ ID NO:130:

AGCCAGCAACAAGGCUCAAGguuuuagagcuagaaaagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucacuugaaa

[0331]

aaguggcaccgagucggugcuuuu

[0332] sgRNA-COL1A1-1S:5'-caccgCTACCAAGAGAGTGACCAGC-3';SEQ ID NO:37

[0333] sgRNA-COL1A1-1A:5'-aaacGCTGGTCACTCTCTTGGTAGc-3'。SEQ ID NO:38

[0334] sgRNA-COL1A1-2S:5'-caccgGGTCTCTGCTGGTCACTCTCT-3';SEQ ID NO:39

[0335] sgRNA-COL1A1-2A:5'-aaacAGAGAGTGACCAGCAGGACCc-3'。SEQ ID NO:40

[0336] sgRNA-COL1A1-3S:5'-caccgGCAGTCTCAGCAACCACTGA-3';SEQ ID NO:41

[0337] sgRNA-COL1A1-3A:5'-aaacTCAGTGGTTGCTGAGACTGCc-3'。SEQ ID NO:42

[0338] sgRNA-COL1A1-4S:5'-caccgAGCCAGCAACAAGGCTCAAG-3';SEQ ID NO:43

[0339] sgRNA-COL1A1-4A:5'-aaacCTTGAGCCTTGTGCTGGCTc-3'。SEQ ID NO:44

[0340] sgRNA-COL1A1-1S、sgRNA-COL1A1-1A、sgRNA-COL1A1-2S、sgRNA-COL1A1-2A、sgRNA-COL1A1-3S、sgRNA-COL1A1-3A、sgRNA-COL1A1-4S、sgRNA-COL1A1-4A均为单链DNA分子。

[0341] 四、不同靶点的编辑效率比较

[0342] 1、共转染

[0343] 第一组:将质粒pKG-U6gRNA (COL1A1-g1)和质粒pKG-GE3共转染猪原代成纤维细胞。配比:约20万个猪原代成纤维细胞:0.92μg质粒pKG-U6gRNA (COL1A1-g1):1.08μg质粒pKG-GE3。

[0344] 第二组:将质粒pKG-U6gRNA (COL1A1-g2)和质粒pKG-GE3共转染猪原代成纤维细胞。配比:约20万个猪原代成纤维细胞:0.92μg质粒pKG-U6gRNA (COL1A1-g2):1.08μg质粒pKG-GE3。

[0345] 第三组:将质粒pKG-U6gRNA (COL1A1-g3)和质粒pKG-GE3共转染猪原代成纤维细胞。配比:约20万个猪原代成纤维细胞:0.92μg质粒pKG-U6gRNA (COL1A1-g3):1.08μg质粒pKG-GE3。

[0346] 第四组:将质粒pKG-U6gRNA (COL1A1-g4)和质粒pKG-GE3共转染猪原代成纤维细胞。配比:约20万个猪原代成纤维细胞:0.92μg质粒pKG-U6gRNA (COL1A1-g4):1.08μg质粒pKG-GE3。

[0347] 第五组:猪原代成纤维细胞,未进行任何转染操作。

[0348] 共转染采用电击转染的方式,采用哺乳动物核转染试剂盒(Neon kit, Thermofisher)与Neon™ transfection system电转仪(参数设置为:1450V、10ms、3pulse)。

[0349] 2、完成步骤1后,采用完全培养液培养16-18小时,然后更换新的完全培养液进行培养。培养总时间为48小时。

[0350] 3、完成步骤2后,采用胰蛋白酶消化并收集细胞,提取基因组DNA,采用COL1A1-F473和COL1A1-R870组成的引物对进行PCR扩增,然后进行电泳并测序,结果见图21。

[0351] 通过利用SynthegoICE工具分析测序峰图得出不同靶点的编辑效率。第一组至第五组的编辑效率依次为50%、49%、56%、45%和0%。结果表明,第三组编辑效率最高,sgRNA_{COL1A1-g3}为最优靶点。

[0352] 五、高效靶点两侧基因组区域同源臂序列扩增

[0353] 分别以8只猪的基因组DNA为模板,采用引物对SH4-L-F/SH4-L-R进行COL1A1安全港位点切点左侧基因组序列的PCR扩增,采用引物对SH4-R-F/SH4-R-R进行COL1A1安全港位点切点右侧基因组序列的PCR扩增,然后进行电泳并测序分析。通过测序结果,选择8只猪中序列保守的区域进一步分别采用引物对SH4-LR-F/SH4-LR-R和SH4-RR-F/SH4-RR-R进行H1安全港位点切点左侧和右侧基因组同源序列的扩增。

[0354] SH4-L-F:5' -CCGCTCTGTTCTTGCCTAATTG-3';SEQ ID NO:107

[0355] SH4-L-R:5' -AGCAACTCTCCAAGGCCCTG-3';SEQ ID NO:108

[0356] SH4-R-F:5' -GCAAGTTCTCTCCCTAGGCGAA-3';SEQ ID NO:109

[0357] SH4-R-R:5' -GCAAACCTCAAAGGCAAACCTCAGC-3';SEQ ID NO:110

[0358] SH4-LR-F:5' -TCTTGTTATAGATATCGGCGCGCCGGATGGGACTCATGTGAATTTTCTAAAG-3';SEQ ID NO:111

[0359] SH4-LR-R:5' -CCAGGCCCGGGTCTGGGGCGCGTGATGGTTCGGTCTGCTGGTCACTCTCTTG-3';SEQ ID NO:112

[0360] SH4-RR-F:5' -AGCCATTGTACGCGTTGGTGGTTGCTGAGACTGCGTGGGGGCCCAAG-3';SEQ ID NO:113

[0361] SH4-RR-R:5' -CTTTTATGGCGCCGCATATAGGAACAACTTTTGTACTAGCTG-3'。SEQ ID NO:114

[0362] 实施例7:使外源基因高效表达的安全港位点的筛选

[0363] 一、安全港位点荧光载体、靶点载体和Cas9载体混合电转猪原代成纤维细胞

[0364] 分别将PB-1G 2R 3-puro-不同安全港位点载体与对应的高效靶点载体(同sgRNA载体)以及高效Cas9表达载体(同Cas载体)共转染猪原代成纤维细胞。使用哺乳动物核转染试剂盒(Neon kit,Thermofisher)与Neon™ transfection system电转仪进行电转实验(参数设置为:1450V、10ms、3pulse)。

[0365] 共转染质粒组合及配比:

[0366] 第一组:将质粒PB-1G 2R 3-puro-ROSA26、质粒pKG-U6gRNA (ROSA26-g1)和质粒pKG-GE3共转染猪原代成纤维细胞。配比:约20万个猪原代成纤维细胞:1.6μg质粒PB-1G 2R3-puro-ROSA26、0.5μg质粒pKG-U6gRNA (ROSA26-g3):0.9μg质粒pKG-GE3。

[0367] 第二组:将质粒PB-1G 2R 3-puro-AAVS1、质粒pKG-U6gRNA (AAVS1-g4)和质粒pKG-GE3共转染猪原代成纤维细胞。配比:约20万个猪原代成纤维细胞:1.6μg质粒PB-1G 2R3-puro-AAVS1、0.5μg质粒pKG-U6gRNA (AAVS1-g4):0.9μg质粒pKG-GE3。

[0368] 第三组:将质粒PB-1G 2R 3-puro-H11、质粒pKG-U6gRNA (H11-g1)和质粒pKG-GE3共转染猪原代成纤维细胞。配比:约20万个猪原代成纤维细胞:1.6μg质粒PB-1G 2R 3-puro-H11、0.5μg质粒pKG-U6gRNA (H11-g1):0.9μg质粒pKG-GE3。

[0369] 第四组:将质粒PB-1G 2R 3-puro-COL1A1、质粒pKG-U6gRNA (COL1A1-g3)和质粒pKG-GE3共转染猪原代成纤维细胞。配比:约20万个猪原代成纤维细胞:1.6μg质粒PB-1G

2R3-puro-COL1A1、0.5 μ g质粒pKG-U6gRNA (COL1A1-g3) :0.9 μ g质粒pKG-GE3。

[0370] 第五组:猪原代成纤维细胞,同等电转参数不加任何质粒进行电转染操作。

[0371] 具体实施方法:

[0372] 细胞:电转前猪原代成纤维细胞融合度达到60%,0.25%胰蛋白酶消化,台盼蓝染色计数,取等量细胞进行五组电转。

[0373] 猪原代细胞电转:

[0374] (1) 将细胞用胰酶消化,得到的细胞悬液用PBS磷酸缓冲液(Solarbio)洗一遍,600g离心6min,弃去上清,使用58uL电转基本液R Buffer重悬细胞(11uL/个),重悬过程中要避免气泡的产生;

[0375] (2) 吸取10uL细胞悬液与质粒电转反应液混匀,混匀过程中注意切勿产生气泡;

[0376] (3) 将试剂盒带有的电转杯放置于Neon™ transfection system电转仪杯槽内,加入3mL E Buffer;

[0377] (4) 用电转枪吸取10uL步骤2)得到的混合液,插入电转杯内,选择电转程序(1450V 10ms3pulse),电击转染后立即在超净台内将电转枪中混合液转入到6孔板中,每孔3mL完全培养液(含15%胎牛血清(Gibco)+83%DMEM培养基(Gibco)+1%P/S(Gibco Penicillin-Streptomycin)+1%HEPES(Solarbio));

[0378] (5) 混匀后放置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂、5%O₂的恒温培养箱中进行培养;

[0379] (6) 电转18-24h换液,电转48h使用嘌呤霉素进行筛选阳性细胞。

[0380] 二、嘌呤霉素筛选

[0381] 细胞经质粒电转48h,加入1.5 μ g/ml嘌呤霉素筛选,每两天更换含有相同浓度嘌呤霉素的培养基,同时进行GFP绿色荧光拍照,连续筛选两周,待细胞内质粒完全降解后再继续加药筛选一周。通过GFP荧光表达的强弱判断安全港位点对外源基因表达效率的影响。

[0382] 嘌呤霉素筛选一周后,ROSA26、COL1A1安全港位点实验组荧光强度明显强于AAVS1、H11实验组;嘌呤霉素筛选两周后,荧光强度由强到弱依次为:COL1A1>ROSA26>H11>AAVS1,其中H11组部分荧光弱整体荧光强,ROSA26组整体荧光强度较均一,AAVS1组细胞荧光表达最弱,COL1A1组荧光细胞数增多,荧光最强;嘌呤霉素继续筛选三周后,荧光强度由强到弱依次为:COL1A1>ROSA26>H11>AAVS1,结果如图22。

[0383] 三、GFP基因转录水平检测

[0384] 为了比较GFP基因整合入四个不同安全港位点后其mRNA转录水平的差异性,即四个不同安全港位点是否参与GFP的表达调控及其对GFP表达量的影响。我们针对GFP基因设计一对引物,取嘌呤霉素筛选三周后的细胞,提取总RNA,反转录成cDNA,用于检测原代细胞在四个不同安全港位点整合GFP基因后的转录水平,同时用野生型原代细胞作为对照。以GAPDH为内参基因按照2^{- Δ Ct}法进行计算。

[0385] (1) 引物信息(表1)

[0386] 表1荧光定量PCR引物信息

	引物名称	引物序列(5-3)	产物大小 (bp)
--	------	-----------	-----------

	GAPDH-F	GGTCGGAGTGAACGGATTTG (SEQ ID NO: 12)	247
	GAPDH-R	CCATTTGATGTTGGCGGGAT (SEQ ID NO: 74)	
[0388]	GFP-F	AGATCCGCCACAACATCGAG (SEQ ID NO: 131)	206
	GFP-R	GTCCATGCCGAGAGTGATCC (SEQ ID NO: 132)	

[0389] (2) 细胞总RNA提取

[0390] 利用Bio Flux的Simply P总RNA提取试剂盒进行细胞总RNA提取。

[0391] (3) cDNA第一链获得

[0392] 根据Vazyme反转录试剂盒HiScript® II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (R211-01/02) 说明书合成cDNA第一链,具体步骤和程序如下:

[0393] 1) 配制第一链cDNA合成反应液

[0394] 在RNase-free离心管中配制如下混合液:

	成分	体积 (μL)
	RNase-free ddH ₂ O	To 20 μL
	2×RT Mix	10 μL
[0395]	HiScript II Enzyme Mix	2 μL
	Oligo(dT) ₂₃ VN (50 μM)	1 μL
	Random hexamers (50ng/μL)	1 μL
	Total RNA	1 μg

[0396] 用移液枪轻轻吹打混匀。

[0397] 2) 按下列条件进行第一链cDNA合成反应

	温度 (°C)	时间 (min)
	25°C	5min
[0398]	50°C	15min
	85°C	2min

[0399] 产物立即用于qPCR反应,或存放于-80°C保存,避免反复冻融。

[0400] (4) 荧光定量PCR

[0401] 利用实时荧光定量PCR法检测插入四组不同安全港位点 (ROSA26、AAVS1、H11、COL1A1) 猪原代成纤维细胞中GFP的表达量,GAPDH作为内参基因。操作步骤及程序如下:

[0402] 1) 反应体系配制如下

	成分	体积 (μL)
[0403]		

	2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix	10.0
	Primer1 (10 μ M)	0.5
[0404]	Primer2 (10 μ M)	0.5
	cDNA 模板	1.0
	ddH ₂ O	To 20 μ L

[0405] 2) qPCR反应程序如下

	程序	温度	时间	循环数
	预变性	95℃	10min	1
[0406]	循环反应	95℃	10s	40
		60℃	30s	

[0407] 3) 统计与分析

[0408] 用Prism5统计学软件进行数据分析,以(平均数±标准差)表示,采用双因素方差分析进行统计学分析。 $2^{-\Delta Ct}$ 值结果显示嘌呤霉素筛选三周后AAVS1、H11组GFP表达量较低,ROSA26、COL1A1组GFP表达量较高,且ROSA26、COL1A1组相对于AAVS1和H11组GFP转录水平差异极显著($P < 0.01$), $2^{-\Delta Ct}$ 值结果见表2,差异显著性分析结果如图23。

[0409] 表2 $2^{-\Delta Ct}$ 值信息

	分组	ROSA26	AAVS1	H11	COL1A1
		3.45249	2.13987	2.0459	3.19694
[0410]	$2^{-\Delta Ct}$	3.57184	2.13097	2.20931	3.56379
		3.33850	2.16986	2.2468	3.73321

[0411] 综上,根据培养细胞三周后的荧光信号强度与GFP基因实时荧光定量PCR的结果,可以得出如下结论,在ROSA26、AAVS1、H11、COL1A1这四个基因组安全港位点中,COL1A1位点插入基因后表达的最好,COL1A1位点是最适合猪原代细胞表达外源基因的安全港位点。

[0412] 三、GFP基因的流式细胞荧光分选检测

[0413] 为了比较GFP基因整合入四个不同安全港位点后GFP蛋白的表达情况。分别用胰蛋白酶消化细胞,400g离心4min后,弃上清。以1mL培养基重悬细胞,并将细胞悬液分别转移至流式管内。在BD FACSMelody流式细胞仪的FITC通道内检测GFP信号,并以野生型细胞作为阴性对照,收集 5×10^4 个细胞进行分析,结果如图24所示。结果显示GFP荧光信号COL1A1 > ROSA26 > H11 > AAVS1。

[0001]	序列表	
[0002]	<110> 南京启真基因工程有限公司	
[0003]	<120> 一种基因编辑的方法	
[0004]	<130> 1	
[0005]	<160> 132	
[0006]	<170> SIPOSequenceListing 1.0	
[0007]	<210> 1	
[0008]	<211> 8484	
[0009]	<212> DNA	
[0010]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0011]	<400> 1	
[0012]	gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaaggc tgtagagag	60
[0013]	ataattggaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag taaaaatac gtgacgtaga	120
[0014]	aagtaataat ttcttgggta gtttgcagtt taaaattat gttttaaata ggactatcat	180
[0015]	atgcttaccg taacttgaag gtatttcgat ttcttggcct tatatatctt gtggaagga	240
[0016]	cgaaacaccg ggtcttcgag aagacctgt ttagagctag aaatagcaag taaaataag	300
[0017]	gctagtccgt tatcaacttg aaaaagtggc accgagtcgg tgcttttttg ttttagagct	360
[0018]	agaaatagca agttaaata aggctagtc gtttttagcg cgtgcgcaa ttctgcagac	420
[0019]	aatggctct agaggtacc gttacataac ttacggtaa tggcccgct ggctgaccg	480
[0020]	ccaacgacc ccgcccattg acgtcaatag taacgccaat agggacttc cattgacgc	540
[0021]	aatgggtgga gtatttacgg taaactgcc acttggcagt acatcaagt tatcatatgc	600
[0022]	caagtacgc ccctattgac gtcaatgac gtaaattgcc cgctggcat tgtgcccagt	660
[0023]	acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgtatta	720
[0024]	ccatggtega ggtgagcccc acgttctgct tcaactctcc catctcccc ccctcccc	780
[0025]	ccccatttt gtatttatat attttttaata tattttgtgc agcgatgggg gcggggggg	840
[0026]	ggggggggcg gggcgagggg cggggcgggg cgaggcggag aggtgcggcg gcagccaatc	900
[0027]	agagcggcg gctccgaaag tttccttta tggcgaggcg gcggcggcg cgccctata	960
[0028]	aaaagcgaag cgcgcgccg gcgggagtc ctgcgcgctg ccttcgccc gtgcccgcgt	1020
[0029]	ccgcccgc ctgcgccgc ccgcccggc tctgactgac cgcgttact ccacaggtga	1080
[0030]	gcggcgggga cggccctct cctccgggt gtaattagct gagcaagagg taagggtta	1140
[0031]	agggatggtt ggttgggtgg gtattaatgt ttaattacct ggagcacct cctgaaatca	1200
[0032]	cttttttca ggttgaccg gtgccaccat ggactataag gaccacgac gagactaaa	1260
[0033]	ggatcatgat attgattaca aagacgatga cgataagatg gccccaaaga agaagcggaa	1320
[0034]	ggtcggatc cacggagtcc cagcagccga caagaagtac agcatcgcc tggacatcg	1380
[0035]	caccaactct gtgggctgg cctgatcac cgacagtac aaggtgcca gcaagaaatt	1440
[0036]	caagtgctg ggcaacacc accggcacag catcaagaag aacctgatc gagccctgct	1500
[0037]	gttcgacag gcgaaacag ccgaggccac ccggctgaag agaaccgcca gaagaagata	1560
[0038]	caccagacgg aagaaccgga tctgctatct gcaagagatc ttcagcaac agatggcaa	1620
[0039]	ggtggacgac agcttctcc acagactgga agagtcttc ctggtggaag aggataagaa	1680
[0040]	gcacgagcgg caccatct tcggcaacat cgtggacgag gtggcctacc acgagaagta	1740
[0041]	cccaccatc taccactga gaaagaact ggtggacagc accgacaag ccgacctgc	1800

[0042]	gctgatctat ctggccctgg cccacatgat caagttccgg ggccacttcc tgatcgaggg	1860
[0043]	cgacctgaac cccgacaaca gcgacgtgga caagctgttc atccagctgg tgcagaccta	1920
[0044]	caaccagctg ttcgagggaaa accccatcaa cgcacgagc gtggacgcca aggccatcct	1980
[0045]	gtctgccaga ctgagcaaga gcagacggct ggaaaatctg atcgcccagc tgcccggcga	2040
[0046]	gaagaagaat ggctgttcg gaaacctgat tgccctgagc ctgggcctga cccccaactt	2100
[0047]	caagagcaac ttcgacctgg ccgaggatgc caaactgcag ctgagcaagg acacctacga	2160
[0048]	cgacgacctg gacaacctgc tggcccagat cggcgaccag tacgcccagc tgtttctggc	2220
[0049]	cgccaagaac ctgtccgagc ccatcctgct gagcgacatc ctgagagtga acaccgagat	2280
[0050]	caccaaggcc cccctgagcg cctctatgat caagagatac gacgagcacc accaggacct	2340
[0051]	gacctgtctg aaagctctcg tgcggcagca gctgcctgag aagtacaaag agatthttctt	2400
[0052]	cgaccagagc aagaacggct acgccggcta cattgacggc ggagccagcc aggaagagtt	2460
[0053]	ctacaagttc atcaagccca tcttgaaaa gatggacggc accgaggaac tgctcgtgaa	2520
[0054]	gctgaacaga gaggacctgc tgcggaagca gcggacctc gacaacggca gcatccccc	2580
[0055]	ccgatccac ctgggagagc tgcacgccat tctgcgccg caggaagatt tttaccatt	2640
[0056]	cctgaaggac aaccgggaaa agatcgagaa gatcctgacc ttccgcatcc cctactacgt	2700
[0057]	gggcccctg gccaggggaa acagcagatt cgcttgatg accagaaaga gcgaggaac	2760
[0058]	catcaccccc tggaacttcg aggaagtgtt ggacaaggc gcttccgccc agagcttcat	2820
[0059]	cgagcggatg accaacttcg ataagaacct gcccaacgag aaggtgctgc ccaagcacag	2880
[0060]	cctgctgtac gactacttca ccgtgtataa cgagctgacc aaagtgaat acgtgaccga	2940
[0061]	gggaatgaga aagcccgcct tctgagcgg cgagcagaaa aaggccatcg tggacctgct	3000
[0062]	gttcaagacc aaccggaaag tgacctgaa gcagctgaaa gaggactact tcaagaaaat	3060
[0063]	cgagtgttc gactccgtgg aaatctccg cgtggaagat cggttcaac cctccctggg	3120
[0064]	cacataccac gatctgctga aaattatcaa ggacaaggac ttcctggaca atgaggaaaa	3180
[0065]	cgaggacatt ctggaagata tcgtgctgac cctgacactg tttgaggaca gagagatgat	3240
[0066]	cgaggaacgg ctgaaaacct atgcccacct gttcgacgac aaagtgatga agcagctgaa	3300
[0067]	gcggcggaga tacaccgct ggggcaggct gagccggaag ctgatcaac gcatccggga	3360
[0068]	caagcagtcc ggcaagacaa tcttgattt cctgaagtcc gacggcttcg ccaacagaaa	3420
[0069]	cttcatgcag ctgatccacg acgacagcct gacctttaaa gaggacatcc agaaagccca	3480
[0070]	ggtgtccggc cagggcgata gctgcacga gcacattgcc aatctggccg gcagccccgc	3540
[0071]	cattaagaag ggcacctgc agacagtga ggtggtggac gagctcgtga aagtgatggg	3600
[0072]	ccggcacaag cccgagaaca tcgtgatcga aatggccaga gagaaccaga ccaccagaa	3660
[0073]	gggacagaag aacagccgcg agagaatgaa gcggatcga gagggcatca aagagctggg	3720
[0074]	cagccagatc ctgaaagaac acccgtgga aaacaccag ctgcagaacg agaagctgta	3780
[0075]	cctgtactac ctgcagaatg ggcgggatat gtacgtggac caggaactgg acatcaaccg	3840
[0076]	gctgtccgac tacgatgtgg accatatcgt gcctcagagc tttctgaagg acgactccat	3900
[0077]	cgacaacaag gtgctgacca gaagcgacaa gaaccggggc aagagcgaca acgtgccctc	3960
[0078]	cgaagaggtc gtgaagaaga tgaagaacta ctggcggcag ctgctgaacg ccaagctgat	4020
[0079]	taccagaga aagttcgaca atctgaccaa ggccgagaga ggccgctga gcgaactgga	4080
[0080]	taaggccggc ttcatacaaga gacagctggt ggaaaccgg cagatcacia agcacgtggc	4140
[0081]	acagatcctg gactcccga tgaactacta gtacgacgag aatgacaagc tgatccggga	4200
[0082]	agtgaagtg atcacctga agtccaagct ggtgtccgat ttccggaag atttccagtt	4260
[0083]	ttacaaagtg cgcgagatca acaactacca ccacgccac gacgctacc tgaacgccgt	4320

[0084]	cgtgggaacc gccctgatca aaaagtaccc taagctggaa agcgagttcg tgtacggcga	4380
[0085]	ctacaaggtg tacgacgtgc ggaagatgat cgccaagagc gagcaggaaa tcggaaggc	4440
[0086]	taccgccaag tactttctt acagcaacat catgaacttt ttcaagaccg agattacct	4500
[0087]	ggccaacggc gagatccgga agcggcctct gatcgagaca aacggcgaaa ccggggagat	4560
[0088]	cgtgtgggat aagggccggg attttgccac cgtgcggaag gtgctgagca tgccccaagt	4620
[0089]	gaatatcgtg aaaaagaccg aggtgcagac aggcggttc agcaaagagt ctatcctgcc	4680
[0090]	caagaggaac agcgataagc tgatcgccag aaagaaggac tgggacccta agaagtacgg	4740
[0091]	cggttcgac agccccaccg tggcctatc tgtgctggtg gtggccaaag tggaaaagg	4800
[0092]	caagtccaag aactgaaga gtgtgaaaga gctgctgggg atcacatca tggaaagaag	4860
[0093]	cagcttcgag aagaatcca tcgactttct ggaagccaag ggctacaaag aagtgaaaa	4920
[0094]	ggacctgatc atcaagctgc ctaagtactc cctgttcgag ctggaaaacg gccggaagag	4980
[0095]	aatgctggcc tctgccggg aactgcagaa gggaaacgaa ctggccctgc cctccaaata	5040
[0096]	tgtgaacttc ctgtacctg ccagccacta tgagaagctg aagggtccc ccgaggataa	5100
[0097]	tgagcagaaa cagctgtttg tggaacagca caagcactac ctggacgaga tcatcgagca	5160
[0098]	gatcagcgag ttctccaaga gagtgatcct ggccgacgct aatctggaca aagtgctgtc	5220
[0099]	cgctacaac aagcaccggg ataagccat cagagagcag gccgagaata tcatccacct	5280
[0100]	gtttaccctg accaatctgg gagcccctgc cgccttcaag tactttgaca ccaccatcga	5340
[0101]	ccggaagagg tacaccagca ccaagaggt gctggacgcc accctgatcc accagagcat	5400
[0102]	caccggcctg tacgagacac ggatcgacct gtctcagctg ggaggcgaca aaaggccggc	5460
[0103]	ggccacgaaa aaggccggc aggcaaaaa gaaaaagtaa gaattcctag agctcgctga	5520
[0104]	tcagcctega ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg tttgcccctc ccccgctgc	5580
[0105]	tcctgacc tcggaaggtgc cactcccact gtcctttcct aataaaatga ggaaattgca	5640
[0106]	tcgattgtc tgagtaggtg tcattctatt ctggggggtg ggggtgggca ggacagcaag	5700
[0107]	gggaggatt gggaagagaa tagcaggcat gctggggagc ggccgcagga acccctagt	5760
[0108]	atggagtgg ccaactccctc tctgcgcgt cgctcgctca ctgaggccgg gcgaccaaag	5820
[0109]	gtcggccgac gcccggtt tgccccggc gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagctgc	5880
[0110]	ctgcaggggc gcctgatgcg gtattttctc cttacgcatc tgtgcggtat ttcacaccg	5940
[0111]	atactcaaa gaaccatag tacgcgcct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg	6000
[0112]	tggttacgg cagcgtgacc gctacaactg ccagcgcct agcgcccgt ctttctgctt	6060
[0113]	tcttccctc ctttctgcc acgttcgccc gctttcccc tcaagcteta aatcgggggc	6120
[0114]	tcctttagg gttccgattt agtgetttac ggcacctga ccccaaaaaa cttgatttgg	6180
[0115]	gtgatggtc acgtagtgg ccatcgcct gatagacggt ttttcgcct ttgacgttgg	6240
[0116]	agtccacgtt ctttaatagt ggactctgt tccaaactgg aacaacactc aactctatct	6300
[0117]	cggctatc ttttgattta taaggattt tgccgattc ggtctattgg ttaaaaaatg	6360
[0118]	agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaat attaacgttt acaattttat	6420
[0119]	ggtgactct cagtacaatc tgctctgatg ccgcatagt aagccagccc cgacaccgc	6480
[0120]	caacaccgc tgacgcgcc tgacgggct gtctgctccc ggcacccgt tacagacaag	6540
[0121]	ctgtgaccgt ctccgggagc tgcatgtgc agaggtttc accgtcatca ccgaaacgg	6600
[0122]	cgagacgaaa ggcctcgtg atacgcctat ttttataggt taatgtcatg ataataatgg	6660
[0123]	tttctagac gtcaggtggc acttttcggg gaaatgtgc cggaaccct atttgtttat	6720
[0124]	tttctaaat acattcaaat atgtatccgc tcatgagaca ataaccctga taaatgctc	6780
[0125]	aataatattg aaaaaggaag agtatgagta ttcaacatt ccgtgtcgc cttattccct	6840

[0126]	tttttgcggc attttgcctt cctgtttttg ctcaccaga aacgctggtg aaagtaaaag	6900
[0127]	atgctgaaga tcagttgggt gcacgagtg gttacatcga actggatctc aacagcggta	6960
[0128]	agatccttga gagttttgc cccgaagaac gttttccaat gatgagcact tttaaagttc	7020
[0129]	tgctatgtgg cgcggtatta tcccgtattg acgccgggca agagcaactc ggtcgcggca	7080
[0130]	tacactattc tcagaatgac ttggttgagt actcaccagt cacagaaaag catcttacgg	7140
[0131]	atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg ctgccataac catgagtgat aacactgcgg	7200
[0132]	ccaacttact tctgacaacg atcggaggac cgaaggagct aaccgctttt ttgcacaaca	7260
[0133]	tgggggatca tgtaactgc cttgatcgtt gggaaccgga gctgaatgaa gccataccaa	7320
[0134]	acgacgagcg tgacaccacg atgcctgtag caatggcaac aacgttgcgc aaactattaa	7380
[0135]	ctggcgaact acttactcta gcttcccggc aacaattaat agactggatg gaggcggata	7440
[0136]	aagttgcagg accacttctg cgctcggccc ttccggctgg ctggtttatt gctgataaat	7500
[0137]	ctggagccgg tgagcgtgga agccgcggta tcattgcagc actggggcca gatggtaagc	7560
[0138]	cctcccgtat cgtagttatc tacacgacgg ggagtcaggc aactatggat gaacgaaata	7620
[0139]	gacagatcgc tgagataggt gcctcactga ttaagcattg gtaactgtca gaccaagttt	7680
[0140]	actcatatat actttagatt gatttaaaac ttcattttta atttaaaag atctaggtga	7740
[0141]	agatcctttt tgataatctc atgacaaaaa tcccttaacg tgagttttcg ttccactgag	7800
[0142]	cgtcagacc cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tccttttttt ctgcgcgtaa	7860
[0143]	tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg ggtttgttg ccggatcaag	7920
[0144]	agctaccaac tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata ccaataactg	7980
[0145]	ttcttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat	8040
[0146]	acctcgtct gctaactctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta	8100
[0147]	ccgggttga ctcaagacga tagttaccgg ataaggcga gcggtcgggc tgaacggggg	8160
[0148]	gttcgtgcac acagcccagc ttggagcga cgacctacac cgaactgaga tacctacagc	8220
[0149]	gtgagctatg agaaagcgc acgcttcccg aaggagaaaa ggccgacagg tatccggtaa	8280
[0150]	gcggcagggt cggaacagga gagcgcacga gggagcttc agggggaaac gcctggtatc	8340
[0151]	tttatagtc tgctcgggtt cgccacctc gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt	8400
[0152]	cagggggcg gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg ttctggcct	8460
[0153]	tttgcggcc tttgctcac atgt	8484
[0154]	<210>	2
[0155]	<211>	10476
[0156]	<212>	DNA
[0157]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0158]	<400>	2
[0159]	gaggcctat ttccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaagc tgttagagag	60
[0160]	ataattgaa ttaattgac tgtaaacaca aagatattag taaaaatac gtgacgtaga	120
[0161]	aagtaataat ttcttgggta gtttgcagtt taaaattat gttttaaat ggactatcat	180
[0162]	atgcttaccg taacttgaat gtatttcgat ttcttggctt tatatatctt gtgaaagga	240
[0163]	cgaaacaccg ggtcttcgag aagacctgtt ttagagctag aaatagcaag taaaataag	300
[0164]	gctagtcctg tatcaacttg aaaaagtggc accgagtcgg tgcttttttc tagcgcgtgc	360
[0165]	gccaatctg cagacaaatg gctctagagg taccggttac ataacttac gtaaatggcc	420
[0166]	cgcttgctg accgccaac gaccccccc cattgacgtc aatagtaac ccaatagga	480
[0167]	ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccactg gcagtacatc	540

[0168]	aagtgtatca	tatgccaagt	acgcccccta	ttgacgtcaa	tgacggtaaa	tgccccgcct	600
[0169]	ggcattgtgc	ccagtacatg	accttatggg	actttcctac	ttggcagtac	atctacgtat	660
[0170]	tagtcatcgc	tattaccatg	ggggcagagc	gcacatcgcc	cacagtcccc	gagaagttgg	720
[0171]	ggggaggggt	cggcaattga	tccggtgcct	agagaaggtg	gcgcggggta	aactgggaaa	780
[0172]	gtgatgtcgt	gtactggctc	cgcctttttc	ccgagggtgg	gggagaaccg	tatataagtg	840
[0173]	cagtagtcgc	cgtgaacggt	ctttttcgca	acgggtttgc	cgccagaaca	caggttggac	900
[0174]	cgggtgccacc	atggactata	aggaccacga	cggagactac	aaggatcatg	atattgatta	960
[0175]	caaagacgat	gacgataaga	tggcccccaa	aaagaaacga	aaggtgggtg	ggtccccaaa	1020
[0176]	gaagaagcgg	aaggtcggta	tccacggagt	cccagcagcc	gacaagaagt	acagcatcgg	1080
[0177]	cctggacatc	ggcaccaact	ctgtgggctg	ggccgtgatc	accgacgagt	acaaggtgcc	1140
[0178]	cagcaagaaa	ttcaaggtgc	tgggcaacac	cgaccggcac	agcatcaaga	agaacctgat	1200
[0179]	cggagccctg	ctgttcgaca	gcggcgaaac	agccgagccc	acccggctga	agagaaccgc	1260
[0180]	cagaagaaga	tacaccagac	ggaagaaccg	gatctgctat	ctgcaagaga	tcttcagcaa	1320
[0181]	cgagatggcc	aaggtggacg	acagcttctt	ccacagactg	gaagagtcct	tcctggtgga	1380
[0182]	agaggataag	aagcacgagc	ggcaccccat	cttcggcaac	atcgtggacg	aggtggccta	1440
[0183]	ccacgagaag	tacccacca	tctaccacct	gagaaagaaa	ctggtggaca	gcaccgacaa	1500
[0184]	ggccgacctg	cggtgatct	atctggccct	ggcccacatg	atcaagtcc	ggggccactt	1560
[0185]	cctgatcgag	ggcgacctga	accccgacaa	cagcgacgtg	gacaagctgt	tcattccagct	1620
[0186]	ggtgcagacc	tacaaccagc	tgttcgagga	aaaccccatc	aacgccagcg	gcgtggacgc	1680
[0187]	caagccatc	ctgtctgcca	gactgagcaa	gagcagacgg	ctggaaaatc	tgatcgccca	1740
[0188]	gctgccggc	gagaagaaga	atggcctgtt	cggaaacctg	attgccctga	gcctgggctt	1800
[0189]	gacccccaac	ttcaagagca	acttcgacct	ggccgaggat	gccaaactgc	agctgagcaa	1860
[0190]	ggacacctac	gacgacgacc	tggacaacct	gctggcccag	atcggcgacc	agtacgccga	1920
[0191]	cctgtttctg	gccccaaga	acctgtccga	cgccatctg	ctgagcgaca	tcctgagagt	1980
[0192]	gaacaccgag	atcaccagg	ccccctgag	cgctctatg	atcaagagat	acgacgagca	2040
[0193]	ccaccaggac	ctgacctgc	tgaagctct	cgtgcggcag	cagctgcctg	agaagtacaa	2100
[0194]	agagattttc	ttcgaccaga	gcaagaacgg	ctacgccggc	tacattgacg	gcggagccag	2160
[0195]	ccaggaagag	ttctacaagt	tcatcaagcc	catcctggaa	aagatggacg	gcaccgagga	2220
[0196]	actgetcgtg	aagctgaaca	gagaggacct	gctgcggaag	cagcggacct	tcgacaacgg	2280
[0197]	cagcatcccc	caccagatcc	acctgggaga	gctgcacgcc	attctgcggc	ggcaggaaga	2340
[0198]	ttttaccaca	ttctgaagg	acaaccggga	aaagatcgag	aagatcctga	ccttccgcat	2400
[0199]	ccctactac	gtgggcctc	tggccagggg	aaacagcaga	ttgcctgga	tgaccagaaa	2460
[0200]	gagcaggaa	accatcacc	cctggaactt	cgaggaagtg	gtggacaagg	gcgcttccgc	2520
[0201]	ccagagcttc	atcgagcga	tgaccaactt	cgataagaac	ctgccaacg	agaaggtgct	2580
[0202]	gccaagcac	agcctgctgt	acgagtactt	caccgtgtat	aacgagctga	ccaaagtga	2640
[0203]	atactgacc	gaggaatga	gaaagcccgc	cttctgagc	ggcgagcaga	aaaaggccat	2700
[0204]	cgtggacctg	ctgttcaaga	ccaaccgga	agtgacctg	aagcagctga	aagaggacta	2760
[0205]	cttcaagaaa	atcgagtgt	tcgactccgt	ggaaatctcc	ggcgtggaag	atcggttcaa	2820
[0206]	cgctccctg	ggcacatacc	acgatctgct	gaaaattatc	aaggacaagg	acttctctgga	2880
[0207]	caatgaggaa	aacgaggaca	ttctggaaga	tatcgtgctg	accctgacac	tgtttgagga	2940
[0208]	cagagagatg	atcgaggaac	ggctgaaaac	ctatgccac	ctgttcgacg	acaaagtgat	3000
[0209]	gaagcagctg	aagcggcga	gatacaccgg	ctggggcagg	ctgagccgga	agctgatcaa	3060

[0210]	cggcatccgg gacaagcagt ccggcaagac aatcctggat ttctgaagt ccgacggctt	3120
[0211]	cgccaacaga aacttcatgc agctgatcca cgacgacagc ctgacctta aagaggacat	3180
[0212]	ccagaaagcc caggtgtccg gccagggcga tagcctgcac gagcacattg ccaatctggc	3240
[0213]	cggcagcccc gccattaaga agggcatcct gcagacagtg aaggtggtgg acgagctcgt	3300
[0214]	gaaagtgatg ggccggcaca agcccagaaa catcgtgatc gaaatggcca gagagaacca	3360
[0215]	gaccacccag aagggacaga agaacagccg cgagagaatg aagcggatcg aagagggcat	3420
[0216]	caaagagctg ggcagccaga tctgaaaaga acacccctg gaaaacacc agctgcagaa	3480
[0217]	cgagaagctg tacctgtact acctgcagaa tgggcgggat atgtacgtgg accaggaact	3540
[0218]	ggacatcaac cggctgtccg actacgatgt ggaccatata gtgcctcaga gctttctgaa	3600
[0219]	ggacgactcc atcgacaaca aggtgctgac cagaagcgac aagaaccggg gcaagagcga	3660
[0220]	caacgtgcc tccgaagagg tcgtgaagaa gatgaagaac tactggcggc agctgctgaa	3720
[0221]	cgccaagctg attaccaga gaaagtcca caatctgacc aaggccgaga gaggcggcct	3780
[0222]	gagcgaactg gataagccg gcttcatcaa gagacagctg gtggaaccc ggcagatcac	3840
[0223]	aaagcacgtg gcacagatcc tggactcccg gatgaacact aagtacgacg agaatgaaa	3900
[0224]	gctgatccgg gaagtgaag tgatcacct gaagtccaag ctggtgtccg atttccgaa	3960
[0225]	ggatttccag ttttcaaag tgcgcgagat caacaactac caccacgcc acgacgcta	4020
[0226]	cctgaacgcc gtcgtgggaa ccgccctgat caaaaagtac cctaagctgg aaagcgagtt	4080
[0227]	cgtgtacggc gactacaagg tgtacgacgt gcggaagatg atcgccaaga gcgagcagga	4140
[0228]	aatcggcaag gctaccgcca agtacttctt ctacagcaac atcatgaact ttttcaagac	4200
[0229]	cgagattacc ctggccaacg gcgagatccg gaagcggcct ctgatcgaga caaacggcga	4260
[0230]	aaccggggag atcgtgtggg ataagggccg ggattttgcc accgtgcgga aagtgtgag	4320
[0231]	catgccccaa gtgaatatcg tgaaaaagac cgaggtgcag acaggcggct tcagcaaaga	4380
[0232]	gtctatctg cccaagagga acagcgataa gctgatgcc agaaagaagg actgggacc	4440
[0233]	taagaagtac ggcggttcg acagccccac cgtggcctat tctgtgctgg tggtgccaa	4500
[0234]	agtggaaaag ggcaagtcca agaaactgaa gagtgtgaaa gagctgctgg ggatcacat	4560
[0235]	catgaaaaga agcagcttcg agaagaatcc catcgacttt ctggaagcca agggctaaa	4620
[0236]	agaagtgaaa aaggacctga tcatcaagct gcctaagtac tccctgttcg agctggaaa	4680
[0237]	cggccggaag agaatgctgg cctctgccg cgaactgcag aagggaacg aactggcct	4740
[0238]	gcccctcaaa tatgtgaact tctgtacct ggccagccac tatgagaagc tgaaggctc	4800
[0239]	ccccaggat aatgagcaga aacagctgtt tgtggaacag cacaagcact acctggacga	4860
[0240]	gatcatcgag cagatcagcg agttctcaa gagagtgatc ctggccgacg ctaatctgga	4920
[0241]	caaagtgtg tccgcctaca acaagcaccg ggataagccc atcagagagc aggccgagaa	4980
[0242]	tatcatccac ctgtttacc tgaccaatct gggagccct gccgcctca agtactttga	5040
[0243]	caccaccatc gaccggaaga ggtacaccag caccaaagag gtgctggacg ccaccctgat	5100
[0244]	ccaccagagc atcaccggcc tgtacgagac acggatcgac ctgtctcagc tgggaggcga	5160
[0245]	caaaaggccg gcggccacga aaaaggccg ccaggcaaaa aagaaaaagg gcggctcaa	5220
[0246]	gcggctgcc gcgacgaaga aagcgggaca ggccaagaaa aagaaaggat ccggcgcaac	5280
[0247]	aaacttctct ctgtgaaac aagccggaga tgtcgaagag aatcctggac cggtgagcaa	5340
[0248]	ggcgaggag ctgttcacc gggtggtgcc catcctggtc gagctggacg gcgacgtaa	5400
[0249]	cggccacaag ttcagctgt ccggcgaggg cgagggcgat gccacctacg gcaagctgac	5460
[0250]	cctgaagttc atctgcacca ccggcaagct gccctgccc tggcccacc tcgtgaccac	5520
[0251]	cctgacctac ggcgtgcagt gcttcagccg ctaccccgac cacatgaagc agcacgactt	5580

[0252] cttcaagtcc gccatgcccg aaggctacgt ccaggagcgc accatcttct tcaaggacga 5640
[0253] cggcaactac aagaccgcg ccgaggtgaa gttcgagggc gacaccctgg tgaaccgeat 5700
[0254] cgagctgaag ggcatcgact tcaaggagga cggcaacatc ctggggcaca agctggagta 5760
[0255] caactacaac agccacaacg tctatatcat ggccgacaag cagaagaacg gcatcaaggt 5820
[0256] gaacttcaag atccgccaca acatcgagga cggcagcgtg cagctcgccg accactacca 5880
[0257] gcagaacacc cccatcggcg acggccccgt gctgctgccc gacaaccact acctgagcac 5940
[0258] ccagtccgcc ctgagcaaag accccaacga gaagcgcgat cacatggtcc tgctggagtt 6000
[0259] cgtgaccgcc gccgggatca ctctcggcat ggacgagctg tacaagggtc ccggcgaggg 6060
[0260] caggggaagt cttetaacat gcggggacgt ggaggaanaat cccggcccaa ccgagtacaa 6120
[0261] gcccacggtg cgcctcgcca cccgcgacga cgtccccagg gccgtacgca ccctcgccgc 6180
[0262] cgcgttcgcc gactaccccg ccacgcgcca caccgtcgat ccggaccgcc acatcgagcg 6240
[0263] ggtcaccgag ctgcaagaac tcttctcac gcgcgtcggg ctcgacatcg gcaaggtgtg 6300
[0264] ggtcgcggac gacggcgcg cgggtggcgt ctggaccacg ccggagagcg tcgaagcggg 6360
[0265] ggcggtgttc gccgagatcg gcccgcgcat ggccgagttg agcggttccc ggctggccgc 6420
[0266] gcagcaacag atggaaggcc tcctggcgcc gcaccggccc aaggagcccg cgtggttctc 6480
[0267] ggccaccgtc ggagtctgc ccgaccacca gggcaagggt ctgggcagcg ccgtcgtget 6540
[0268] ccccgagtg gagcggccg agcgcgccg ggtgcccgc ttcttgaga cctccgcgc 6600
[0269] ccgcaacctc cccttctag agcggctcgg cttaccgtc accgcccagc tcgaggtgcc 6660
[0270] cgaaggaccg cgcacctggt gcatgaccg caagcccgtt gcctgaacgc gttaatcga 6720
[0271] caatcaacct ctgattaca aaatttgtga aagattgact ggtattctta actatgttg 6780
[0272] tccttttag ctatgtgat acgtctctt aatgccttg tatcatgcta ttgcttccc 6840
[0273] tatgctttc attttctct cttgtataa atcctggtt ctgtctctt atgaggagt 6900
[0274] gtggccggt gtcaggcaac gtggcgtggt gtgcaactg tttgctgac caacccccac 6960
[0275] tggttggggc attgccacca cctgtcagct ctttccggg actttcgct tccccctcc 7020
[0276] tattgccag gcggaactca tcgcccgct cttgcccgc tgctggacag gggctcggt 7080
[0277] gttgggact gacaattccg tggtgtgtc ggggaaatca tcgtccttc cttggctgt 7140
[0278] cgctgtgtt gccacctgga ttctgcgcg gacgtcctc tgctacgtc cttcgccct 7200
[0279] caatccagcg gaccttctt cccgcggcct gctgccggt ctgcggctc ttccgctct 7260
[0280] tcgcttgc cctcagacga gtcggatct ctttgggccc gcctccccgc gtcgacttta 7320
[0281] agaccaatga cttacaaggc agctgtagat cttagccact ttttaaaga aaagggggga 7380
[0282] ctggaaggc taattcact ccaacgaaga caagatctg ttttgttg tactgggtct 7440
[0283] ctctggttag accagatctg agcctgggag ctctctggt aactagggaa cccactgct 7500
[0284] aagcctcaat aaagcttgc ttgagtctt caagtagtgt gtgcccgtc gttgtgtgac 7560
[0285] tctgtaact agagatccct cagaccctt tagtcagtgt ggaaaatctc tagcagggcc 7620
[0286] cgtttaaac cgctgatcag cctcgactgt gccttctagt tgccagccat ctgttgttg 7680
[0287] cccctcccc gtgccttct tgacctgga aggtgccact cccactgtc tttcctaata 7740
[0288] aatgaggaa attgcatgc attgtctgag taggtgtcat tctattctg ggggtgggt 7800
[0289] ggggcaggac agcaagggg aggattggga agacaatagc aggcattgtg gggatgcgt 7860
[0290] gggctctatg gcctgcagg gcgcctgat cggtattttc tccttacgca tctgtgcgt 7920
[0291] attcacacc gcatactca aagcaacct agtacgcgc ctgtagcggc gcattaagcg 7980
[0292] cggcgggtgt ggtggttac gcgagctga ccgctacact tgccagcgc ttagcggcc 8040
[0293] ctcttttgc ttttcttct tctttctc ccacgttgc cggtttccc cgtcaagctc 8100

[0294]	taaatcgggg gctcccttta gggttccgat ttagtgcttt acggcacctc gaccccaaaa	8160
[0295]	aacttgattt gggatgatgt tcacgtagtg ggccatgcc ctgatagacg gtttttcgcc	8220
[0296]	ctttgacgtt ggagtcacag ttctttaata gtggactctt gttccaaact ggaacaacac	8280
[0297]	tcaactctat ctccggctat tcttttgatt tataagggat tttgccgatt tcggtctatt	8340
[0298]	ggttaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgt	8400
[0299]	ttacaatttt atgggtgact ctcagtacaa tctgctctga tgccgcatag ttaagccagc	8460
[0300]	cccacaccc gccaacaccc gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg	8520
[0301]	cttacagaca agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg tcagaggttt tcaccgtcat	8580
[0302]	caccgaaacg cgcgagacga aaggcctcg tgatagcct atttttatag gttaatgtca	8640
[0303]	tgataataat ggtttcttag acgtcaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaacc	8700
[0304]	ctatttgttt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataacct	8760
[0305]	gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg	8820
[0306]	cccttattcc cttttttgcg gcattttgcc ttctgtttt tgctcacca gaaacgtgg	8880
[0307]	tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc	8940
[0308]	tcaacacgcg taagatcctt gagagtttc gccccaaga acgttttcca atgatgagca	9000
[0309]	cttttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgat tgacgccggg caagagcaac	9060
[0310]	tcggtcgccg catacactat tctcagaatg acttggttga gtactacca gtcacagaaa	9120
[0311]	agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagt	9180
[0312]	ataacactgc ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt	9240
[0313]	ttttgcacaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg	9300
[0314]	aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc	9360
[0315]	gcaaacattt aactggcgaa ctacttactc tagcttccc gcaacaatta atagactgga	9420
[0316]	tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ctttccggct ggctggttta	9480
[0317]	ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg gaagcccgcg tatcattgca gcaactgggc	9540
[0318]	cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg	9600
[0319]	atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt	9660
[0320]	cagaccaagt ttactcatat atacattaga ttgatttaa acttcattt taatttaaaa	9720
[0321]	ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatccctaa cgtgagttt	9780
[0322]	cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatcctttt	9840
[0323]	ttctgcgct aatctgctgc ttgcaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt	9900
[0324]	tgccgatca agagctacca actcttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga	9960
[0325]	taccaaatac tgttcttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag	10020
[0326]	caccgcctac atacctcgt ctgctaacc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata	10080
[0327]	agtcgtgtct taccgggtg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg	10140
[0328]	gctgaacggg gggttcgtgc acacagcca gcttgagcg aacgacctac accgaactga	10200
[0329]	gatactaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttc cgaagggaga aaggcggaca	10260
[0330]	ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgac gagggagctt ccagggggaa	10320
[0331]	acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgattt	10380
[0332]	tgtgatgctc gtcaggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac	10440
[0333]	ggttctcggc cttttgctgg cttttgctc acatgt	10476
[0334]	<210>	3
[0335]	<211>	3120

[0336]	<212> DNA	
[0337]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0338]	<400> 3	
[0339]	gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatfff tataggttaa tgtcatgata ataatggttt	60
[0340]	cttagacgtc aggtggcact ttfcggggaa atgtgcgcgg aaccctatt tgtttatfff	120
[0341]	tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat	180
[0342]	aatattgaaa aaggaagagt atgagtatfc aacattfcg tgfcgcccft attcccfttt	240
[0343]	ttgcggcatt ttgccttccf gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg	300
[0344]	ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga	360
[0345]	tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactfff aaagttctgc	420
[0346]	tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggf cgccgatac	480
[0347]	actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcaac agaaaagcat cttacggatg	540
[0348]	gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtg ccataaccat gagtgataac actgcggcca	600
[0349]	acttacttct gacaacgacg ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg	660
[0350]	gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaagc	720
[0351]	acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg	780
[0352]	gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag	840
[0353]	ttgcaggacc acttctgcgc tccggccctc cggctggctg gtttattgct gataaatctg	900
[0354]	gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct	960
[0355]	cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac	1020
[0356]	agatcgcgtga gatagtgcc tcaactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact	1080
[0357]	catatatact ttagattgat ttaaaactfc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga	1140
[0358]	tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaactgta gttttcgttc cactgagcgt	1200
[0359]	cagaccccgt agaaaagatc aaaggatcft cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct	1260
[0360]	gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgt ttgtttgccg gatcaagagc	1320
[0361]	taccaactct ttttcgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgttc	1380
[0362]	ttctagtgta gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc	1440
[0363]	tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtctg tgtcttaccg	1500
[0364]	ggttgactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acggggggtt	1560
[0365]	cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg	1620
[0366]	agctatgaga aagcggccag cttcccgaag ggagaaagcc ggacaggtat ccggtaaagc	1680
[0367]	gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggatcttt	1740
[0368]	atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag	1800
[0369]	ggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt	1860
[0370]	gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta	1920
[0371]	ttaccgcctt tgagtgagct gataccgtc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcaggt	1980
[0372]	cagtgagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc	2040
[0373]	cgattcatta atgcagctgg cagcagaggt ttcccactg gaaagcgggc agtgagcgea	2100
[0374]	acgcaattaa tgtgagttag ctactcatt aggcacccca ggctttacac tttatgttc	2160
[0375]	cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg	2220
[0376]	acatgatta cgccaagctt gcatgcagcc ctctgcagtc gacgggcccg ggatccgatg	2280
[0377]	ataaacatgt gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaagcc	2340

[0378]	tgtagagag ataattggaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag taaaaaac	2400
[0379]	gtgacgtaga aagtaataat ttcttgggta gtttgcagtt taaaattat gttttaaat	2460
[0380]	ggactatcat atgcttaccg taacttgaag gtatttcgat ttcttggctt tatatatctt	2520
[0381]	gtgaaagga cgaacaccg ggtcttcgag aagacctgtt ttagagctag aaatagcaag	2580
[0382]	ttaaaataag gctagtccgt tatcaacttg aaaaagtggc accgagtcgg tgcttttttc	2640
[0383]	tagcgcgtgc gccaatctg cagacaaatg gctctagagg taccataga tctagatgca	2700
[0384]	ttcgcgaggt accgagctcg aattcaactg ccgctgcttt acaacgctgt gactgggaa	2760
[0385]	acctggcgt tacccaactt aatgccttg cagcacatcc ccctttcgc agctggcgta	2820
[0386]	atagcgaaga ggcccacc gatcgccctt ccaacagtt gcgcagcctg aatggcgaat	2880
[0387]	ggcgctgat gcggtatctt ctccttacgc atctgtcgg tatttcacac cgcatatggt	2940
[0388]	gcactctcag tacaatctgc tctgatccg catagttaag ccagccccga caccgccaa	3000
[0389]	caccgctga cgcgcctga cgggcttgc tgctcccggc atccgcttac agacaagctg	3060
[0390]	tgaccgtctc cgggagctgc atgtgtcaga gttttcacc gtcacaccg aaacgcgca	3120
[0391]	<210> 4	
[0392]	<211> 14138	
[0393]	<212> DNA	
[0394]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0395]	<400> 4	
[0396]	ggcgcgccct ctacctgctc tcggaccctg ggggtgggg ggtggaggaa ggagtgggg	60
[0397]	gtcggctctg ctggcttgg ggtgggaggc gcatgtctc caaaaaccg cgcgagctgc	120
[0398]	aatcctgagg gagctgcagt ggaggaggc gagagaaggc cgcaccctc tccgagggg	180
[0399]	gaggggagtg ccgcaatacc tttatgggag ttctctgctg cctcctttc ctaaggaccg	240
[0400]	ccctggcct agaaaaatcc ctccctccc cgcgatctg tcatgcctc catgtcagtt	300
[0401]	tgctccttct cgattatgg cggtattctt ttgccctggc gcgcccaga cccggcctg	360
[0402]	ggggcaagt cggggggcg ggggagctg ggcagggtcc cctgggagga tggggacgtg	420
[0403]	ctgtgccct agcggccacc agaggcacc aggacaccac tgcgctcgc tcagcggctc	480
[0404]	ctgccctggt cagggggcg caggtcctgc ccctcctggg gagggcggg ggcgagaagg	540
[0405]	gcgatttaa ttaaccacg tttcaacatg cacatcccag taatttggaa acattttgtt	600
[0406]	tccaaagatt cacttaacat tggtttagca acatgaagct ttctatgcaa cccaaggact	660
[0407]	cagtttttg cctgttttag tgacaggcaa tcagcaacat gctgcattc tctccagtgt	720
[0408]	tgtaatcaa gaaccctcc catagctta aatgatattc ctcccttc caattatgtg	780
[0409]	ggggaaaac aaccctattc tccaccaga agtgtaact caagaattac attttcaaga	840
[0410]	agttccaga ttcgtaaac cagaattaga tgtctttcac ctaaattgtc cgggtgtgac	900
[0411]	caaaggaaca cacagtttc tcatttaact ttttaatgg gtctcaaat tctgtgaca	960
[0412]	attttggtc aagttgttc cattaataag tactgattt aaaaactaat aacttaaac	1020
[0413]	tgccacacgc aaaaaagaa accaaagtg tccacaaac attctcctt ccttctgaag	1080
[0414]	gttttacgat gcattgtat cattaaccag tcttttacta ctaacttaa atggccaatt	1140
[0415]	gaaacaaaca gttctgagac cgttctcca ccaactgata agagtgggt ggcaggtatt	1200
[0416]	agggataatg ctagcttact tgtacagctc gtccatgcc agagtgatcc cggcggcgt	1260
[0417]	cacgaactcc agcaggacca tgtgatcgc cttctcgtg gggctttgc tcaggcgga	1320
[0418]	ctgggtgctc aggtagtgtg tgctggcag cagcacggg ccgctgccga tgggggtgtt	1380
[0419]	ctgctgtag tggctggcga gctgcacgct gccctcctc atgttgtggc ggatcttga	1440

[0420]	gttcaccttg atgccgttct tctgcttgtc ggccatgata tagacgttgt ggctgttgta	1500
[0421]	gttgactacc agcttgtgcc ccaggatgtt gccgtcctcc ttgaagtcga tgcccttcag	1560
[0422]	ctcgatgagg ttaccaggg tgtcgccctc gaacttcacc tcggcgcggg tctttagatt	1620
[0423]	gccgtcgtcc ttgaagaaga tgggtgcgtc ctggacgtag ccttcgggca tggcggactt	1680
[0424]	gaagaagtcg tgctgcttca tgtggtcggg gtagcggctg aagcactgca cgccgtaggt	1740
[0425]	cagggtggtc acgagggtgg gccagggcac gggcagcttg ccggtggtgc agatgaactt	1800
[0426]	cagggtcagc ttgccgtagg tggcatcgcc ctcgccctcg ccggacacgc tgaacttgtg	1860
[0427]	gccgtttacg tcgccgtcca gctcgaccag gatgggcacc accccggtga acagctcctc	1920
[0428]	gcccttgctc accatggtgg cgtcgaccgt acgtcacgac acctgaaatg gaagaaaaaa	1980
[0429]	actttgaacc actgtctgag gcttgagaat gaaccaagat ccaaactcaa aaagggcaaa	2040
[0430]	ttccaaggag aattacatca agtccaagc tggcctaact tcagtctcca cccactcagt	2100
[0431]	gtgggaaac tccatcgcat aaaaccctc ccccaacct aaagacgac tactccaaaa	2160
[0432]	gctcgagaac taatcgaggt gcctggacgg cggccgtac tccgtggagt cacatgaagc	2220
[0433]	gacggctgag gacggaaagg cccttttct ttgtgtgggt gactcaccg cccgctctcc	2280
[0434]	cgagcggcg gtctccatt ttgagctccc tgcagcagg ccgggaagcg gccatcttc	2340
[0435]	cgctcacgca actggtgcc accgggcccag cttgccgcc cagggcgggg cgatacacgg	2400
[0436]	cggcgcgagg ccaggcacca gagcaggccg gccagcttga gactacccc gtccgattct	2460
[0437]	cgggtggccg gctcgaggc cccgcctgc cgaacatgt cgctgggac cacgggcccc	2520
[0438]	gtgccgccc gcggcccaa aaaccgaaat accagtgtc agatcttggc ccgcatctac	2580
[0439]	aagactatct tgccagaaaa aaagcgtcg agcaggtcat caaaaattt aaatggctag	2640
[0440]	agacttatcg aaagcagca gacaggcgc aaggtgccac cagattcgca cggcgggcc	2700
[0441]	ccagcggcca ggccaggcct caactcaagc acgaggcga ggggctcctt aagcgcaagg	2760
[0442]	cctgaactc tcccaccac ttccaaccg aagctcggga tcaagaatca cgtactgcag	2820
[0443]	ccagtgaag taattcaagg cacgcaagg ccataaccg taaagaggc aggcccgcgg	2880
[0444]	gaaccacaca cggcacttac ctgtgttctg gcggcaaacc cgttgcgaaa aagaacgttc	2940
[0445]	acggcgacta ctgacttat atacggttct cccccacct cgggaaaaag gcggagccag	3000
[0446]	tacacgacat cactttcca gtttaccgg cgccacctc tctaggcacc ggttcaattg	3060
[0447]	ccgaccctc ccccaactt ctggggact gtgggcgatg tgcgctctgc ccaactgacgg	3120
[0448]	gcaccggagc cctagattcg attcctttg gggcaaaact caccgctaa tcccataa	3180
[0449]	ctctaccggg gagcccgtg gagagcagc gggctgacg tgcacactgc cggccatccc	3240
[0450]	aggataggac cgccgtattc aagtcgcct caggaaggac cctcgggca ccagaggcct	3300
[0451]	tcgaagcccc aatgagttag gcaactgagg gtcgcggtg ccattacaag gccagccaa	3360
[0452]	ggcctagagc caaggttga accgtgggg accccaagc cccacctgc caggaacagc	3420
[0453]	agacactggg acactttgtt tcaggtcctg cccaggcccc tcccactgtg aggttggat	3480
[0454]	ttgtcgcca ggtgcagat gagaagagt gggaaagcag tcctgagcca ggaaattcta	3540
[0455]	ccggtaggg gaggccttt tccaaggca gtctggagca tgcgcttag cagccccgct	3600
[0456]	gggacttgg cgctacacaa gtggcctctg gcctgcaca cattccat ccaccgtag	3660
[0457]	gcgcaaccg gctcgttct ttggtggccc cttegcgcca ctttctact cteccctagt	3720
[0458]	caggaagttc cccccgcc cgcagctgc gctgtcagg acgtgacaaa tggaagtagc	3780
[0459]	acgtctcact agtctcgtc agatggacag caccgctgag caatggaagc gggtaggcct	3840
[0460]	ttggggcagc ggccaatagc agctttgctc cttcgcttc tgggctcaga ggctgggaag	3900
[0461]	gggtgggtcc gggggcggc tcagggcgg gctcagggc ggggcgggc cccgaaggtc	3960

[0462]	ctccggaggc	ccggcattct	gcacgcttca	aaagcgcacg	tctgccgcgc	tgttctcctc	4020
[0463]	ttctcatct	ccgggccttt	cgacctcta	gggccacat	ggtgagcaag	ggcgaggacg	4080
[0464]	acaacatggc	catcatcaag	gagttcatgc	gcttcaaggt	gcacatggag	ggctccgtga	4140
[0465]	acggccacga	gttcgagatc	gagggcgagg	gcgagggccg	cccctacgag	ggcaccacga	4200
[0466]	ccgccaagct	gaaggtgacc	aagggcggcc	ccctgccctt	cgcttgggac	atcctgtccc	4260
[0467]	ctcagttcat	gtacggctcc	aaggcctacg	tgaagcacc	cgccgacatc	cccgactact	4320
[0468]	tgaagctgtc	cttccccgag	ggcttcaagt	gggagcgcgt	gatgaacttc	gaggacggcg	4380
[0469]	gcgtggtgac	cgtgaccag	gactctccc	tgcaggacgg	cgagttcatc	tacaaggtga	4440
[0470]	agctgcgcgg	caccaacttc	ccctccgacg	gccccgtaat	gcagaagaag	accatgggct	4500
[0471]	gggaggcctc	ctccgagcgg	atgtaccccg	aggacggcgc	cctgaagggc	gagatcaagc	4560
[0472]	agagctgaa	gctgaaggac	ggggccact	acgacgccga	ggtcaagacc	acctacaagg	4620
[0473]	ccaagaagcc	cgtgcagctg	cccggcgct	acaacgtcaa	catcaagctg	gacatcacct	4680
[0474]	cccacaacga	ggactacacc	atcgtggaac	agtacgagcg	cgccgagggc	cgccactcca	4740
[0475]	ccggcggcat	ggacgagctg	tacaagtgag	gatccgctga	tcagcctcga	ctgtgccttc	4800
[0476]	tagttgccag	ccatctgttg	tttgcccctc	ccccgtgcct	tccttgacc	tggaaggtgc	4860
[0477]	cactcccact	gtccttctc	aataaaatga	ggaaattgca	tcgcattgtc	tgagtaggtg	4920
[0478]	tcattctatt	ctggggggtg	gggtggggca	ggacagcaag	ggggaggatt	gggaagacaa	4980
[0479]	tagcaggcat	gctggggatg	cggtgggctc	tatggcttct	gaggcggaaa	gaacccttct	5040
[0480]	gaggcggaaa	gaaccagctg	ccttaatata	acttcgtata	atgtatgcta	tacgaagtta	5100
[0481]	ttaggtctga	agaggagttt	acgtccagcc	aattctgtgg	aatgtgtgtc	agttagggtg	5160
[0482]	tgaaaagtcc	ccaggtccc	cagcaggcag	aagtatgcaa	agcatgcatc	tcaattagtc	5220
[0483]	agcaaccagg	tgtgaaaagt	ccccaggctc	cccagcaggc	agaagtatgc	aaagcatgca	5280
[0484]	tctcaattag	tcagcaacca	tagtcccgcc	cctaactcgc	cccatcccgc	ccctaactcc	5340
[0485]	gcccagttcc	gcccattctc	cgccccatgg	ctgactaatt	ttttttattt	atgcagaggc	5400
[0486]	cgagccgcc	tctgctctg	agctattcca	gaagtagtga	ggaggctttt	ttggaggcct	5460
[0487]	aggcttttgc	aaaaagctcc	cgggagcttg	tatatccatt	ttcggcgccc	gcgccacat	5520
[0488]	gaccgagtac	aagcccacgg	tgcgcctcgc	caccgcgac	gacgtcccca	gggccgtacg	5580
[0489]	caccctcgcc	gcccgttcg	ccgactacc	cgccacgcgc	cacaccgtcg	atccggaccg	5640
[0490]	ccacatcgag	cgggtcaccg	agctgcaaga	actcttctc	acgcgcgtcg	ggctcgacat	5700
[0491]	cggcaagggtg	tgggtcgcgg	acgacggcgc	cgcggtggcg	gtctggacca	cgccggagag	5760
[0492]	cgtcgaagcg	ggggcggtgt	tcgccgagat	cggcccgcgc	atggccgagt	tgagcggttc	5820
[0493]	ccggctggcc	gcgcagcaac	agatggaagg	cctcctggcg	ccgcaccggc	ccaaggagcc	5880
[0494]	cgcttggttc	ctggccaccg	tcggagtctc	gcccgaccac	cagggcaagg	gtctgggcag	5940
[0495]	cgccgtcgtg	ctccccggag	tggaggcgcc	cgagcgcgcc	ggggtgccc	ccttctgga	6000
[0496]	gacctccgcg	ccccgaacc	tccccttcta	cgagcggctc	ggcttcaccg	tcaccgccga	6060
[0497]	cgtcagagtg	cccgaaggac	cgcgcacctg	gtgcatgacc	cgcaagccc	gtgcctgaga	6120
[0498]	attcgcggga	ctctggggtt	cgaaatgacc	gaccaagcga	cgcccaacct	gccatcacga	6180
[0499]	gatttcgatt	ccaccgccgc	cttctatgaa	aggttgggct	tcggaatcgt	tttccgggac	6240
[0500]	gccggtgga	tgatctcca	gcgcgggat	ctcatgctgg	agttcttctc	ccaccccaac	6300
[0501]	ttgtttattg	cagcttataa	tggttataaa	taaagcaata	gcatcaciaa	tttcaciaa	6360
[0502]	aaagcatttt	tttactgca	ttctagttgt	ggtttgtcca	aactcatcaa	tgtatcttat	6420
[0503]	catgtctgta	taccgctcga	ctagagcttg	cggaaccctt	aatataactt	cgtataatgt	6480

[0504]	atgctatacg	aagttattag	gtccgctggc	catctacgag	ccaagactt	tcaaatcttt	6540
[0505]	ggctgccttg	gccagtagga	ggcgacacga	aggatttct	gctgccttgg	gggatgggaa	6600
[0506]	ggaacctgaa	ggcatttttt	ccagagtggg	gcagtaccac	tgaggactgt	tgctgtattg	6660
[0507]	attaggaaaa	gagacagagt	aatttgcagt	ttgtttgatt	tatactgggc	tcaggtcga	6720
[0508]	gggatcttca	taagagaaga	gggacagcta	tgactgggag	tagtcaggag	aggaggaaaa	6780
[0509]	atctggctag	taaaacatgt	aaggaaaatt	ttagggatgt	taaagaaaa	aataacacaa	6840
[0510]	aacaaaatat	aaaaaaaaatc	taacctcaag	tcaaggcttt	tctatggaat	aaggaatgga	6900
[0511]	cagcaggggg	ctgtttcata	tactgatgac	ctctttatag	ccacctttgt	tcatggcagc	6960
[0512]	cagcatatgg	catatgttgc	caaactctaa	accaaatact	cattctgatg	ttttaaatga	7020
[0513]	tttgcctcc	catatgtcct	tccgagtgg	agacacaaaa	aattccaaca	cactattgca	7080
[0514]	atgaaaataa	atttccttta	ttagccagaa	gtcagatgct	caaggggctt	catgatgtcc	7140
[0515]	ccataatfff	tggcagaggg	aaaagatct	cagtgggtatt	tgtgagccag	ggcattggcc	7200
[0516]	acaccagcca	ccacctctg	ataggcagcc	tgcggtacct	tacatggtgg	cgaattcgtt	7260
[0517]	tgccaaaatg	atgagacagc	acaataacca	gcacgttgcc	caggagctgt	aggaaaaaga	7320
[0518]	agaaggcatg	aacatggtta	gcagaggtc	tagagccgcc	ggtcacacgc	cagaagccga	7380
[0519]	accccgccct	gccccgtccc	ccccgaagc	agccgtcccc	ctgcggcagc	cccaggctg	7440
[0520]	gagatggaga	aggggacggc	ggcgcgccga	cgcacgaagg	ccctccccgc	ccatttcctt	7500
[0521]	cctgccggcg	ccgaccgct	tcgcccgcg	ccgctagagg	gggtgcggcg	gcgctccca	7560
[0522]	gatttcggct	ccgccagatt	tgggacaaag	gaagtccctg	cgccctctcg	cacgattacc	7620
[0523]	ataaaaggca	atggctgcgg	ctcgccgcg	ctcgacagcc	gccggcgctc	cggggccgcc	7680
[0524]	gcgcccctcc	cccagccct	ccccggccc	aggcggcccc	gccccgccc	gcacccccac	7740
[0525]	ctgccgccac	ccccgccc	gcacggcgag	ccccgcgcca	cgccccgcac	ggagccccgc	7800
[0526]	acccgaagcc	gggcccgtct	cagcaactcg	gggagggggg	tgcagggggg	ggttacagcc	7860
[0527]	cgaccgccgc	gcccacacc	cctgctcacc	ccccacgca	cacaccccgc	acgcagcctt	7920
[0528]	tgttcccctc	gcagcccccc	cgcaccgcgg	ggcaccgccc	ccggccgcgc	tcccctcgcg	7980
[0529]	cacacgcgga	gcgcacaaag	ccccgcgccc	cgcccgcagc	gctcacagcc	gccgggcagc	8040
[0530]	gcgggcccga	cgcgccgctc	cccacgcaca	cacacacgca	cgcaccccc	gagccgctcc	8100
[0531]	ccccgcaca	aagggccctc	ccggagccct	ttaaggcttt	cacgcagcca	cagaaaagaa	8160
[0532]	acgagccgtc	attaaaccaa	gcgctaatta	cagcccggag	gagaagggcc	gtcccgccgc	8220
[0533]	ctcacctgtg	ggagtaacgc	ggtcagtcag	agccggggcg	ggcggcgcca	ggcggcgccg	8280
[0534]	agcggggcac	ggggcgaagg	caacgcagcg	actcccggcc	gccgcgcgct	tcgcttttta	8340
[0535]	tagggccgcc	gccgccccc	cctcgccata	aaaggaaact	ttcgagcgc	gccgctctga	8400
[0536]	ttggtgccc	ccgcacctct	ccgctcgcc	ccgccccgcc	cctcgccccg	ccccgccccg	8460
[0537]	cctggcgcg	gcccccccc	ccccgcccc	catcgctgca	caaaataatt	aaaaataaaa	8520
[0538]	taaatacaaa	attgggggtg	gggagggggg	ggagatgggg	agagtgaagc	agaacgtggg	8580
[0539]	gctcacctcg	acctatggta	atagcgatga	ctaatacgtg	gatgtactgc	caagtaggaa	8640
[0540]	agtcccataa	ggtcatgtac	tgggcataat	gccaggcggg	ccatttaccg	tcattgacgt	8700
[0541]	caataggggg	cgtacttggc	atatgataca	cttgatgtac	tgccaagtgg	gcagtttacc	8760
[0542]	gtaaatagtc	caccatttga	cgtcaatgga	aagtccctat	tggcgttact	atgggaacat	8820
[0543]	acgtcattat	tgacgtcaat	ggcggggggt	cgttggcgcg	tcagccaggc	gggccattta	8880
[0544]	ccgtaagtta	tgtaacgcgg	aactccatat	atgggctatg	aactaatgac	cccgtaattg	8940
[0545]	attactatta	ataactagtc	aataatcaat	gtcgtaaattg	tcgtaaattg	ctcagctagt	9000

[0546] caggtagtaa aagggtgcaa ctaggcagtg gcagagcagg attcaaattc agggctgttg 9060
[0547] tgatgcctcc gcagactctg agcgccacct ggtggtaatt tgtctgtgcc tcttctgacg 9120
[0548] tggaagaaca gcaactaaca cactaacacg gcatttacta tgggccagcc attgtacgcg 9180
[0549] ttgcttaacc tgattcttgg gcgttgcct gcaggggatt gagcaggtgt acgaggacga 9240
[0550] gcccaatttc tctatattcc cacagtcttg agtttgtgtc acaaaataat tatagtgggg 9300
[0551] tggagatggg aatgagtc ccaggcaacacc taagcctgat tttatgcatt gagactgcgt 9360
[0552] gttattacta aagatctttg tgtegcaatt tcttgatgaa gggagatagg ttaaaaagca 9420
[0553] cggatctact gagttttaca gtcacccat ttgtagactt ttgctacacc accaaagtat 9480
[0554] agcatctgag attaaatatt aatctccaaa ccttaggcc cctcacttgc atccttacgg 9540
[0555] tcagataact ctactcata ctttaagccc attttgtttg ttgtacttgc tcatccagtc 9600
[0556] ccagacatag cattggcttt ctctcacct gttttagta gccagcaagt catgaaatca 9660
[0557] gataagttcc accaccaatt aacactacc atcttgagca taggcccac agtgcattta 9720
[0558] ttctcattt actgatgtc gtgaatatt accttgattt tcattttttt ctttttetta 9780
[0559] agctgggatt ttactcctga ccctattcac agtcagatga tcttgactac cactgcgatt 9840
[0560] ggacctgagg ttcagcaata ctcccctta tgtcttttga atacctttca ataaatctgt 9900
[0561] ttgtattttc attagttagt aactgagtc agttgccgta atgctaatag cttccaaact 9960
[0562] agtgtctctg tctccagat ctgataaatc ttaggtgttg ctgggacagt tgcctaaaa 10020
[0563] ttaagataaa gcatgaaat aactgacaca actccattac tggctcctaa ctacttaaac 10080
[0564] aatgcattct atcatcacia atgtgaaaaa ggagttccct cagtggacta acctatctt 10140
[0565] ttctcaacac cttttcttt gcacaattt ccacacatgc ctacaaaaag tacttatgcg 10200
[0566] gccgccataa aagttttgtt actttataga agaaattttg agttttttgt ttttttaata 10260
[0567] aataaataaa cataaataaa ttgtttgttg aatttattat tagtatgtaa gtgtaaatat 10320
[0568] aataaaactt aatatctatt caaattaata aataaacctc gatatacaga ccgataaac 10380
[0569] acatgcgtca attttacaca tgattatctt taacgtacgt cacaatatga ttatctttct 10440
[0570] agggtaatc tagctgcgtg ttctgcagcg tgtegagcat cttcatctgc tccatcacgc 10500
[0571] tgtaaacac atttgcaccg cgagctgcc cgtcctccac gggttcaaaa acgtgaatga 10560
[0572] acgaggcgcg ctactggcc gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaac cctggcgta 10620
[0573] cccaacttaa tcgccttga gcacatccc ctttcgccag ctggcgtaat agcgaagagg 10680
[0574] cccgcaccga tcgccctcc caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg gacgcgccct 10740
[0575] gtagcggcgc attaacgcg gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg 10800
[0576] ccagcgccct agcgccgct ctttcgctt tcttccctc ctttctgcc acgttcgccg 10860
[0577] gctttcccgc tcaagcteta aatcgggggc tcccttagg gttccgatt agtgctttac 10920
[0578] ggcacctga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggtc acgtagtggg ccatcgccct 10980
[0579] gatagacggt ttttcgccct ttgacgttg agtccacgtt ctttaatagt ggactcttgt 11040
[0580] tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggctatct ttttgattta taagggattt 11100
[0581] tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt 11160
[0582] ttaacaaaat attaacgctt acaatttagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac 11220
[0583] ccctatttgt ttattttct aaatacatc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc 11280
[0584] ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt 11340
[0585] cgcccttatt ccctttttg cggcattttg ctttctgtt tttgctcacc cagaaacgct 11400
[0586] ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca tcgaaactgga 11460
[0587] tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag 11520

[0588] cacttttaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg ggcaagagca 11580
[0589] actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttgggt gagtactcac cagtcacaga 11640
[0590] aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taaccatgag 11700
[0591] tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc 11760
[0592] tttttgacac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac cggagctgaa 11820
[0593] tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt 11880
[0594] gcgcaaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg 11940
[0595] gatggaggcg gataaagtg caggaccact tctgcctcg gcccttccgg ctggctggtt 12000
[0596] tattgctgat aatctggag ccggtgagcg tggttcacgc ggtatcattg cagcactggg 12060
[0597] gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat 12120
[0598] ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact 12180
[0599] gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt ttttaatttaa 12240
[0600] aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt 12300
[0601] ttcgtccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt 12360
[0602] tttctgctgc gtaatctgct gcttgcacaac aaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg 12420
[0603] tttgccgat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca 12480
[0604] gataccaaat actgtccttc tagttagacc gtagttaggc caccacttca agaactctgt 12540
[0605] agcaccgct acatacctcg ctctgctaat cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga 12600
[0606] taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagta ccgataagg cgcagcggtc 12660
[0607] gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct acaccgaact 12720
[0608] gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga 12780
[0609] caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg 12840
[0610] aaacgcctgg tatcttata gtctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt 12900
[0611] tttgtgatgc tcgtcagggg ggccgagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt 12960
[0612] acggttctcg gccttttctt ggcttttgc tcacatgttc tttctgctg tateccctga 13020
[0613] ttctgtggat aaccgtatta ccgctttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac 13080
[0614] gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgccaatac gcaaaccgcc 13140
[0615] tctccccgcg cgttggccga ttcataatg cagctggcac gacaggttc ccgactggaa 13200
[0616] agcgggcagt gacgcaacg caattaatgt gagttagctc actcattagg caccaccaggc 13260
[0617] tttacacttt atgcttccgg ctctgtatgt gtgtggaatt gtgagcggat aacaatttca 13320
[0618] cacaggaaac agctatgacc atgattacgc caagcgcgcc cgccgggtaa ctcacgggtt 13380
[0619] atccatgtcc atttctcgg catccagcca ggataccctt cctcgtgac gtaatatccc 13440
[0620] agcgcgcac cgctgtcatt aatctgcaca ccggcacggc agttccggtt gtcgccgta 13500
[0621] ttgttcgggt tgctgatgag cttcgggctg accatccgga actgtgtccg gaaaagccgc 13560
[0622] gacgaactgg tatcccagg ggcctgaacg aacagttcac cgttaaaggc gtgcatggcc 13620
[0623] acacctccc gaatcatcat ggtaaactgt cgttttctg caacgtcaat gcagcagcag 13680
[0624] tcactctcgg caaactcttt ccatgccgct tcaacctcgc gggaaaaggc acgggcttct 13740
[0625] tctccccga tgcccagata gcgccagctt gggcgatgac tgagccggaa aaaagaccgc 13800
[0626] acgatatgat cctgatgcag ctagattaac cctagaaaga tagtctgctg aaaattgacg 13860
[0627] catgcattct tgaaatattg ctctctcttt ctaaatacgc cgaatccgtc gctgtgcatt 13920
[0628] taggacatct cagtcgccgc ttggagctcc cgtgaggcgt gcttgtcaat gcggtaaagt 13980
[0629] tcaactgattt tgaactataa cgaccgcgtg agtcaaaatg acgcatgatt atctttttacg 14040

[0630] tgacttttaa gatttaactc atacgataat tatattgta tttcatgttc tacttacgtg 14100
 [0631] ataacttatt atatatatat tttcttgta tagatata 14138
 [0632] <210> 5
 [0633] <211> 14122
 [0634] <212> DNA
 [0635] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0636] <400> 5
 [0637] ggcgcgccgt gctgagtcct tttcccatcc caccacactg gagctcccct cttccagtcc 60
 [0638] tgagccactt gaactggcct ggtttttgcc atcctgcgct gccctctctc cggactcgag 120
 [0639] ccaactgctga ggcctcagg ccagtcctc ctcgtcttgt ctctttcgcc ctgctctttc 180
 [0640] cccaccttga gcgctcttaa ccagcctggc ccgtgccacc tctactctgc catcgaatgc 240
 [0641] tgccccactt tctcgagtcc gccacttctc ccagcttcaac cggtaacceac tgtttcccct 300
 [0642] agtccaggca ggtaccactt tccctgagcg tctctctctc ctctctctggg cctgtgctgc 360
 [0643] ttcttttccc gctctctggc ctgggccggt tcttcggcca gccccgagc cttccatgcc 420
 [0644] ctttcttca ggtttctgct cttcatcctt ggtctctgcc atctgttgc atgtaagggt 480
 [0645] gctctttcct gagccatgc cctcaaggcg ctctgtctct caagtggatg cttccctcgc 540
 [0646] ctggetcacc tctgtctctc tctctgccc cttcacctg cgtgccctcc tcattctccc 600
 [0647] tctgtgccac ctctggcctt gcaactgtag ctctctcttg gggatgttc tcttctcca 660
 [0648] cacacttctc tttcactctg tctcttctt ttgtgtgggc ctgcagcgtt accctttttt 720
 [0649] ctgggcacac tcagagcacc ctctctttc tggttctggg ccacctgtct gtctctgggt 780
 [0650] catcttctc tctctgctg gatgccctcc tgtggtttg ggcagcttct cctctcttca 840
 [0651] gagtgcaccg ccagttctcc taggccggt cacttcccct tcccagggga cctagagccc 900
 [0652] tgctaggtcc tctctctcca caacctgggc ccccaaacct ttccaaaaca ctttgctttc 960
 [0653] tgctccatt ggtcttctgt tccagagcca gagtactat atgtcccaga accaggattc 1020
 [0654] cctctggttc tgaggcttt tctcctatcc cctgcctggc tgcagtgggt ctttgggcgc 1080
 [0655] cccagaccg ggcctggggg gcaagtcggg gggcgggggg aggtcgggca gggctcccctg 1140
 [0656] ggaggatggg gacgtgctgt gccctagcg gccaccagag ggcaccagga caccactgcg 1200
 [0657] gtcggctcag cggctcctgc cctggtcagg gggcgccagg tctgcccct cctggggagg 1260
 [0658] gcggggggcg agaaggcga ttttaattaa cccagtttc aacatgcaca tcccagtaat 1320
 [0659] ttgaaacat tttgtttcca aagattcact taacattggt ttagcaacat gaagctttct 1380
 [0660] atgcaacca aggactcagt ttttggcctg ttttagtgac aggcaatcag caacatgctg 1440
 [0661] catttctctc cagtgttcta atcaaagaaa ccctcccata gctttaaata atattccttc 1500
 [0662] ccttccaat tatgtggggg gaaaacaacc ctattctcca cccagaagtg ttaactcaag 1560
 [0663] aattacattt tcaagaagt tccagattcg taaaaccaga attagatgtc tttcacctaa 1620
 [0664] atgtctcggg gttgacaaa ggaacacaca ggtttctcat ttaacttttt taatgggtct 1680
 [0665] caaaattctg tgacaaattt ttggtcaagt tgtttccatt aaaaagtact gattttaaaa 1740
 [0666] actaataact taaaactgcc acacgcaaaa aagaaaacca aagtgggtcca caaaacattc 1800
 [0667] tctttcctt ctgaaggttt tacgatgat tgttatcatt aaccagtctt ttactactaa 1860
 [0668] acttaaatgg ccaattgaaa caaacagttc tgagaccgtt cttccaccac tgattaagag 1920
 [0669] tggggtggca ggtattaggg ataagtctag cttacttcta cagctcgtcc atgccgagag 1980
 [0670] tgatcccggc ggcggtcacg aactccagca ggaccatgtg atcgcgttc tcgttggggg 2040
 [0671] ctttctcag ggcggactgg gtgctcaggt agtggttgtc gggcagcagc acggggccct 2100

[0672]	cgccgatggg ggtgttctgc tggtagtggg cggcgagctg cacgctgccg tcctc gatgt 2160
[0673]	tgtggcggat cttgaagtgc accttgatgc cgttctctg cttgtcggcc atgatataga 2220
[0674]	cgttggtgct gttgtagttg tactccagct tgtgccccag gatggtgccg tcctccttga 2280
[0675]	agtcgatgcc cttcagctcg atgcggttca ccagggtgtc gccctcgaac ttcacctcgg 2340
[0676]	cgcggtctt gtagttgccg tcgtccttga agaagatggt gcgctcctgg acgtagcctt 2400
[0677]	cgggcatggc ggacttgaag aagtcgtgct gcttcatgtg gtcgggtag cggtgaagc 2460
[0678]	actgcacgcc gtaggtcagg gtggtcacga ggggtggcca gggcacgggc agcttgccgg 2520
[0679]	tggtagcat gaactcagg gtcagcttgc cgtaggtggc atcgcctcgc cctcgcggc 2580
[0680]	acacgctgaa cttgtggccg tttacgtcgc cgtccagctc gaccaggatg ggcaccacc 2640
[0681]	cggatgaacag ctctcgcgc ttgctacca tggtagctgc gaccgtactg cacgacacct 2700
[0682]	gaaatggaag aaaaaactt tgaacctg tctgaggctt gagaatgaac caagatccaa 2760
[0683]	actcaaaaag ggcaaatcc aaggagaatt acatcaagt ccaagctggc ctaacttcag 2820
[0684]	tctccacca ctacgtgtgg gaaactcca tcgataaaa cccctcccc caacctaaag 2880
[0685]	acgacgtact ccaaaagctc gagaactaat cgaggtgcct ggacgggcc cggtactccg 2940
[0686]	tggagtcaca tgaagcgacg gctgaggacg gaaaggcct tttccttgt gtgggtgact 3000
[0687]	caccgcccgc ctctcccag cgccgcgtcc tccatttga gctcctgca gcagggccg 3060
[0688]	gaagcgcca tcttccgct cacgcaactg gtgccgacc ggccagcct gccgccagg 3120
[0689]	gcggggcgat acacggcggc gcgaggccag gcaccagac aggccggcca gcttgagact 3180
[0690]	accccgctc gattctcgtt ggccgcgtc gcaggcccc cctcgcgaa catgtgcgt 3240
[0691]	gggacgcacg ggccccgctc ccgcccggc ccccaaaaac cgaaatacca gtgtgcagat 3300
[0692]	cttgccccgc atttacaaga ctatcttgc agaaaaaag cgtcgcagca ggtcatcaaa 3360
[0693]	aattttaaat ggctagagac ttatcgaag cagcgagaca ggcgcgaagg tgccaccaga 3420
[0694]	ttcgacgcg gcggccccag cgcccaggcc aggcctaac tcaagcacga ggcgaagggg 3480
[0695]	ctcttaagc gcaaggctc gaactctcc acccacttc aaccggaagc tcgggatcaa 3540
[0696]	gaatcacgta ctgcagccag tggaagtaat tcaaggcac caagggccat aaccgtaaa 3600
[0697]	gaggccaggc ccgcgggaac cacacaggc acttacctgt gttctggcg caaacccgtt 3660
[0698]	gcgaaaaaga acgttcacgg cgactactgc acttatatac gtttctccc caccctcggg 3720
[0699]	aaaaaggcgg agccagtaca cgacatcact ttcccagtt accccgcgc accttctcta 3780
[0700]	ggcaccggtt caattgccga cccctcccc caacttctc gggactgtgg gcgatgtgcg 3840
[0701]	ctctgccac tgacgggac cgagcccta gattcgatt cctttggggc aaaactcacc 3900
[0702]	gcctaatccc ctataactct accggggagc ccggtggaga gcagacgggc tgacgctgcc 3960
[0703]	acctgccggc catcccagga taggaccgcc gtattcaagt cgccctcagg aaggaccctc 4020
[0704]	ggggcaccag aggccttcca agcccaatg agtgaggcaa ctgagggtcg cgggtgccat 4080
[0705]	tacaaggccc agccaaggcc tagagccaag gcttgaaccg tgggggacc ccaagcccca 4140
[0706]	cctgccagg aacagcagac actgggacac tttgttccag gtctgcca ggcccctccc 4200
[0707]	actgtgaggc tgggatttgt cgcccagggt gcagatgaga agagtgggga aagcagctct 4260
[0708]	gagccaggaa attctaccgg gtaggggagg cgcttttccc aaggcagctt ggagcatgcg 4320
[0709]	ctttagcagc cccgctgggc acttggcgt acacaagtgg cctctggcct cgcacacatt 4380
[0710]	ccacatccac cggtaggcgc caaccgctc cgttctttgg tggccccctc gcgccacctt 4440
[0711]	ctactctcc cctagtcagg aagttcccc ccgccccga gctcgcgtc tgcaggacgt 4500
[0712]	gacaaatgga agtagcacgt ctactagtc tcgtgcagat ggacagcacc gctgagcaat 4560
[0713]	ggaagcgggt aggcctttgg ggcagcggcc aatagcagct ttgctcttc gctttctggg 4620

[0714]	ctcagaggct	gggaaggggt	gggtccgggg	gcgggctcag	gggcgggctc	aggggcgggg	4680
[0715]	cgggcgccc	aaggtcctcc	ggaggcccgg	cattctgcac	gcttcaaaag	cgcacgtctg	4740
[0716]	ccgcgtggt	ctctcttcc	tcatctccgg	gcctttcgac	ctcctagggc	caccatgggtg	4800
[0717]	agcaagggcg	aggacgacaa	catggccatc	atcaaggagt	tcatgcgctt	caaggtgcac	4860
[0718]	atggagggct	ccgtgaacgg	ccacgagttc	gagatcgagg	gcgagggcga	gggccgcccc	4920
[0719]	tacgagggca	cccagaccgc	caagctgaag	gtgaccaagg	gcggccccct	gcccttcgcc	4980
[0720]	tgggacatcc	tgtcccctca	gttcatgtac	ggctccaagg	cctacgtgaa	gcaccccgcc	5040
[0721]	gacatcccc	actactttaa	gctgtccttc	cccgagggct	tcaagtggga	gcgcgtgatg	5100
[0722]	aacttcgagg	acggcggcgt	ggtgaccgtg	accagagact	cctccctgca	ggacggcgag	5160
[0723]	ttcatctaca	aggtgaagct	gcgcggcacc	aacttcccct	ccgacggccc	cgtaatgcag	5220
[0724]	aagaagacca	tgggctggga	ggcctcctcc	gagcggatgt	accccagga	cggcgccctg	5280
[0725]	aagggcgaga	tcaagcagag	gctgaagctg	aaggacggcg	gccactacga	cgccgaggtc	5340
[0726]	aagaccacct	acaaggccaa	gaagcccgtg	cagctgccc	gcgcctacaa	cgtaacatc	5400
[0727]	aagctggaca	tcacctcca	caacgaggac	tacaccatcg	tggaacagta	cgagcgcgcc	5460
[0728]	gaggccgcc	actccaccgg	cggcatggac	gagctgtaca	agtgaggatc	cgctgatcag	5520
[0729]	cctcgactgt	gccttctagt	tgccagccat	ctgttgttt	cccccccc	gtgccttct	5580
[0730]	tgaccctgga	aggtgccact	cccactgtcc	tttctaata	aatgaggaa	attgcatcgc	5640
[0731]	attgtctgag	taggtgtcat	tctattctgg	ggggtgggg	ggggcaggac	agcaaggggg	5700
[0732]	aggattggga	agacaatagc	aggcatgctg	gggatgcggt	gggctctatg	gcttctgagg	5760
[0733]	cggaaagaac	ccttctgagg	cggaaagaac	cagctgcctt	aatataactt	cgataatgt	5820
[0734]	atgctatacg	aagttattag	gtctgaagag	gagtttacgt	ccagccaatt	ctgtggaatg	5880
[0735]	tgtgtcagtt	agggtgtgga	aagtcccag	gctcccagc	aggcagaagt	atgcaaagca	5940
[0736]	tgcatctcaa	ttagtcagca	accaggtgtg	gaaagtccc	aggctcccca	gcaggcagaa	6000
[0737]	gstatgcaaag	catgcactc	aattagtcag	caaccatagt	cccgcccta	actccgcca	6060
[0738]	tcccgccct	aactccgcc	agttccgcc	attctccgcc	ccatggctga	ctaattttt	6120
[0739]	ttatttatgc	agaggccgag	gccgcctctg	cctctgagct	attccagaag	tagtgaggag	6180
[0740]	gcttttttg	aggcctaggc	ttttgcaaaa	agctcccggg	agcttgata	tccattttc	6240
[0741]	gcggccgcgc	caccatgacc	gagtacaagc	ccacggtcgc	cctcgccacc	cgcgacgacg	6300
[0742]	tcccagggc	cgtagcacc	ctcgccgcc	cgttcgccga	ctacccgcc	acgcgccaca	6360
[0743]	ccgtcgatcc	ggaccgccac	atcgagcggg	tcaccgagct	gcaagaactc	ttcctcacgc	6420
[0744]	gcgtcgggct	cgacatcggc	aaggtgtggg	tcgcgacga	cggcgccgcg	gtggcggtct	6480
[0745]	ggaccacgcc	ggagagcgtc	gaagcggggg	cggtgttcgc	cgagatcggc	ccgcgcatgg	6540
[0746]	ccgagttgag	cggttcccgg	ctggccgcgc	agcaacagat	ggaaggctc	ctggcgccgc	6600
[0747]	accggcccaa	ggagcccgcg	tggttctctg	ccaccgtcgg	agtctcgccc	gaccaccagg	6660
[0748]	gcaaggtct	ggcagcgc	gtcgtctcc	ccggagtgga	ggcgccgag	cgccgggg	6720
[0749]	tgcccgcctt	cctggagacc	tccgcgccc	gcaacctccc	cttctacgag	cggtctggct	6780
[0750]	tcaccgtcac	cgccgacgtc	gaggtgccc	aaggaccgcg	cacctggtgc	atgaccgca	6840
[0751]	agcccgggtc	ctgagaattc	gcgggactct	ggggttcgaa	atgaccgacc	aagcgacgcc	6900
[0752]	caacctgcca	tcacgagatt	tcgattccac	cgccgccttc	tatgaaaggt	tgggcttcgg	6960
[0753]	aatcgttttc	cgggacccgc	gctggatgat	cctccagcgc	ggggatctca	tgctggagtt	7020
[0754]	cttcgcccac	cccaacttgt	ttattgcagc	ttataatggt	tacaaataaa	gcaatagcat	7080
[0755]	cacaaatttc	acaataaag	catttttttc	actgcattct	agttgtggtt	tgtccaaact	7140

[0756]	catcaatgta tcttatcatg tctgtatacc gctcgactag agcttgcgga acccttaata	7200
[0757]	taacttcgta taatgtatgc tatacgaagt tattaggtcc gctggccatc tacgagccaa	7260
[0758]	agactttcaa atctttggct gccttgGCCa gtaggagcgc acacgaagga tttgctgctg	7320
[0759]	ccttgGGGga tgggaaggaa cctgaaggca tttttccag agtggtgcag taccactgag	7380
[0760]	gactgttgct gtattgatta ggaaaagaga cagagtaatt tgcagtttgt ttgatttata	7440
[0761]	ctgggctgca ggtcgaggga tcttcataag agaagaggga cagctatgac tgggagtagt	7500
[0762]	caggagagga ggaaaaatct ggctagtaaa acatgtaagg aaaattttag ggatgttaaa	7560
[0763]	gaaaaaata acacaaaaca aaatataaaa aaaatctaac ctcaagtcaa ggcttttcta	7620
[0764]	tggaataagg aatggacagc agggggctgt ttcataact gatgacctct ttatagccac	7680
[0765]	ctttgttcat ggcagccagc atatggcata tgttgccaaa ctctaaacca aatactcatt	7740
[0766]	ctgatgtttt aatgatattg ccctccata tgtccttccg agtgagagac acaaaaaatt	7800
[0767]	ccaacacact attgcaatga aaataaattt cttttattag ccagaagtca gatgctcaag	7860
[0768]	gggcttcatg atgtcccat aatttttgGC agaggGaaa agatctcagt ggtattttgtg	7920
[0769]	agccaggGca ttggccacac cagccaccac cttctgatag gcagcctgcg gtaccttaca	7980
[0770]	tggtggcgaa ttcgtttgcc aaaatgatga gacagcaca taaccagcac gttgcccagg	8040
[0771]	agctgtagga aaaagaagaa ggcatgaaca tggttagcag aggctctaga gccgccggtc	8100
[0772]	acacgccaga agccgaacct cgccctgcc cgtcccccc gaaggcagcc gtccccctgc	8160
[0773]	ggcagccccg aggctggaga tggagaaggg gacggcgGcg cggcgacgca cgaaggccct	8220
[0774]	ccccgccat ttccttctg ccggcgccgc accgcttgc ccgcgcccgc tagagggggt	8280
[0775]	gcgGcgGcg ctcccagatt tggctccgc cagatttggg acaaaggaag tccctgcgc	8340
[0776]	ctctcgacg attaccataa aaggcaatgg ctgcggctcg ccgcgctcg acagccgccg	8400
[0777]	gcgctccggg gccgcccgc cctccccg agccctccc ggcccagagc ggccccgcc	8460
[0778]	cgcccggcac cccacctgc cgccacccc cgcccggcac ggcgagcccc gcgccagcc	8520
[0779]	ccgcacggag ccccgaccc gaagccggc cgtgctcagc aactcgggga ggggggtgca	8580
[0780]	ggggggggtt acagcccagc cgccgcgcc acacccctg ctcaccccc cagcacaca	8640
[0781]	ccccgacgc agcctttgtt ccctcgcag ccccccgca ccgcgggga ccgcccccg	8700
[0782]	ccgcctccc ctcggcaca cgcgagcgc acaaagcccc gcgcccgc ccgagcgtc	8760
[0783]	acagccgGcg ggcagcGcg gccgcagcgc gcgctccca cgcacacaca cacgcagca	8820
[0784]	cccccgagc cgctcccc cgcacaaagg gccctccgg agccctttaa ggctttcacg	8880
[0785]	cagccacaga aaagaaacga gccgtcatta aaccaagcgc taattacagc ccggaggaga	8940
[0786]	aggccGctc cgcccGctc cctgtgggag taacgcgGtc agtcagagcc ggggcggGcg	9000
[0787]	gcgcgagGcg gcgcggagc gggcacggg cgaaggcaac gcagcGact ccgcccGcg	9060
[0788]	cgGcttGcg tttttatag gccgcccGcg ccgcccGctc gccataaaag gaaactttGg	9120
[0789]	gagcGcGcg ctctgattgg ctgcccGcg acctctcGc ctGccccGc cccGccccctc	9180
[0790]	gccccGccc gccccGctg gcgcGcGccc cccccccc cgccccatc gctgcacaaa	9240
[0791]	ataattaaaa aataaataaa taaaaattg ggggtgggga ggggggggag atggggagag	9300
[0792]	tgaagcagaa cgtgggGctc acctgaccc atgGtaatag cgatgactaa tacgtagatg	9360
[0793]	tactGccaag taggaaagtc ccataagGtc atgtactggg cataatGcca ggGggGccat	9420
[0794]	ttaccGctc tgacGtaat agggggGgta cttggcatat gatacacttG atgtactGcc	9480
[0795]	aagtgGcag tttaccGtaa atagtcacc cattgacGtc aatggaaagt ccctattGgc	9540
[0796]	gttactatgg gaacatacgt cattattgac gtcaatggGc ggggGctGtt gggcGgtcag	9600
[0797]	ccagGcggGc catttaccGt aagttatgta acGcgGaaact ccatatGtg gctatGaaact	9660

[0798] aatgaccccg taattgatta ctattaataa ctagtcaata atcaatgtcg taaatgtcgt 9720
 [0799] aatgtctca gctagtcagg tagtaaaagg tgtcaactag gcagtgccag agcaggattc 9780
 [0800] aaattcaggg ctgtttgat gcctccgag actctgagcg ccacctggtg gtaattttgtc 9840
 [0801] tgtcctctt ctgacgtgga agaacagcaa ctaacacact aacacggcat ttactatggg 9900
 [0802] ccagccattg tacgcgttg acagggcaca gaagagcctc tactcctccc tctgtccccg 9960
 [0803] aggtgtctc cctcccagtc ttcccagtc aggccagtcc ccaggcctct cttccctgcc 10020
 [0804] agagcccgtc aggttcggtt actttggggc ccagagagga ccctgtgaag gaagcgtggg 10080
 [0805] taggggcacg ggaatgggga ggatgcctga agaggcccc ttagccagaa gaggagcaga 10140
 [0806] agaggagcag gtaccagaa gaggagcagt tcagggaaaa tgcggccgcc ataaaagttt 10200
 [0807] tgttacttta tagaagaaat tttgagttt tgttttttt aataaataa taaacataa 10260
 [0808] taaattgtt gttgaattt ttattagat gtaagttaa atataataa acttaatac 10320
 [0809] tattcaatt aataaataa cctcgatata cagaccgata aaacacatgc gtcaatttta 10380
 [0810] cacatgatta tctttaacgt acgtcacaat atgattatc ttctagggtt aatctagctg 10440
 [0811] cgtgtctgc agcgtgtga gcatctcat ctgctccatc acgctgtaa acacatttg 10500
 [0812] accgcgagtc tgcccgtcct ccacgggtc aaaaacgtga atgaacgagg cgcgctcact 10560
 [0813] ggccgtcgtt ttacaacgtc gtgactggga aaacctggc gttacceaac ttaatcgct 10620
 [0814] tgcagacat cccctttcg ccagctggcg taatagcga gaggcccga ccgatcgccc 10680
 [0815] ttccaacag ttgvcagcc tgaatggca atgggacgc ccctgtagc gcgattaag 10740
 [0816] cgcggcgggt gtggtggtt cgcgcagct gaccgtaca cttgccagc ccctagcgc 10800
 [0817] cgtcctttc gctttctcc ctctcttct cggcagttc gccggcttc cccgtcaage 10860
 [0818] tctaaatcg gggctccct tagggtccg atttagtct ttacggcacc tcgacccaa 10920
 [0819] aaaacttgat tagggtgat gttcacgtg tgggcatcg ccctgataga cggttttcg 10980
 [0820] cccttgacg ttggagcca cgttcttaa tagtggactc ttgttccaa ctggaacaac 11040
 [0821] actcaacct atctcgtct attctttga tttataagg attttgccga tttcggccta 11100
 [0822] ttggttaaaa aatgagctga tttacaaaa atttaacgc aattttaaca aaatattaac 11160
 [0823] gcttacaatt taggtggcac ttttcgggga aatgtgcgc gaaccctat ttgtttattt 11220
 [0824] ttctaaatac attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aacctgata aatgcttcaa 11280
 [0825] taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttc gtgtcgcct tattccctt 11340
 [0826] tttgcggcat tttgcttcc tgtttttct caccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat 11400
 [0827] gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaa tggatctcaa cagcggtaag 11460
 [0828] atccttgaga gtttcgccc cgaagaactc tttccaatga tgagcactt taaagttctg 11520
 [0829] ctatgtggcg cgttattatc ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgc tcgccgata 11580
 [0830] cactattctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat 11640
 [0831] ggcatgacag taagagaatt atgcagtct gccataacca tgagtataa cactgcggcc 11700
 [0832] aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgcttttt gcacaacatg 11760
 [0833] ggggatcatg taactgcct tgatcgttg gaaccggagc tgaatgaag catacacaac 11820
 [0834] gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca atggcaaca cgttgcgaa actattaact 11880
 [0835] ggcaactac ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga ggccgataaa 11940
 [0836] gttgcaggac cacttctgag ctccggcctt ccggctggct ggtttattgc tgataaatct 12000
 [0837] ggagccggtg agcgtggtc acgcggtatc attgcagcac tggggccaga tggttaagccc 12060
 [0838] tcccgatcg tagttatcta cagcagggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga 12120
 [0839] cagatcgctg agataggtgc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac 12180

[0840]	tcatatatac tttagattga tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat ctaggtgaag	12240
[0841]	atcctttttg ataatctcat gaccaaaatc ctttaacgtg agttttcgtt ccaactgagc	12300
[0842]	tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc	12360
[0843]	tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgttg tttgtttgcc ggatcaagag	12420
[0844]	ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc	12480
[0845]	cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac	12540
[0846]	ctcgetctgc taatctgtt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc	12600
[0847]	gggttgact caagacgata gttaccgat aaggcgcagc ggtcgggctg aacgggggt	12660
[0848]	tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt	12720
[0849]	gagctatgag aaagcggcag gcttcccga gggagaaagg cggacagta tccggtaagc	12780
[0850]	ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttcag ggggaaacgc ctggtatctt	12840
[0851]	tatagtctcg tcgggttctg ccacctctga cttgagcgtc gatttttctg atgctctca	12900
[0852]	ggggggcgga gcctatgaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt cctggcctt	12960
[0853]	tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt	13020
[0854]	attaccgcct ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcag	13080
[0855]	tcagtgagcg aggaagcgga agagcgccca atacgcaaac cgcctctccc cgcgcgttgg	13140
[0856]	ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg tttcccgaact ggaaagcggg cagtgagcgc	13200
[0857]	aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat taggcacccc aggctttaca ctttatgctt	13260
[0858]	ccggctcgta tgttgtgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacag aaacagctat	13320
[0859]	gaccatgatt acgccaagcg cgcccgcgg gtaactcacg gggatccat gtccatttct	13380
[0860]	gcggcatcca gccaggatac ccgtctctgc tgacgtaata tcccagcgc gcaccgctgt	13440
[0861]	cattaatctg cacaccgca cggcagttcc ggctgtgcc ggtattgttc gggttgctga	13500
[0862]	tgcgcttcgg gctgaccatc cggaaactgtg tccggaaaag ccgcgacgaa ctggtatccc	13560
[0863]	aggtggcctg aacgaacagt tcaccgttaa aggcgtgcat ggccacacct tcccgaatca	13620
[0864]	tcattgtaaa cgtgcgtttt cgctcaact caatgcagca gcagtcaccc tcggcaaac	13680
[0865]	ctttccatgc cgttcaacc tcgcgggaaa aggcacgggc ttcttctccc ccgatgccc	13740
[0866]	gatagcgcga gcttgggca tgactgagcc ggaaaaaaga cccgacgata tgatcctgat	13800
[0867]	gcagctagat taacctaga aagatagctc gcgtaaaatt gacgcatgca ttcttgaat	13860
[0868]	attgetctct ctttetaaat agcgcgaatc cgtcgtgtg catttaggac atctcagtcg	13920
[0869]	ccgcttgag ctcccgtgag gcgtgctgt caatgcgta agtgtcactg attttgaact	13980
[0870]	ataacaccg cgtgagtaa aatgacgat gattatctt tacgtgactt ttaagattta	14040
[0871]	actcacaaga taattatatt gttatttcat gttctactta cgtgataact tattatata	14100
[0872]	atattttctt gttatagata tc	14122
[0873]	<210>	6
[0874]	<211>	14345
[0875]	<212>	DNA
[0876]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0877]	<400>	6
[0878]	ggcgcgccc aatacccagc tttattggga caaaagtgt tagggaaaat ggggcctcag	60
[0879]	agttatgatt caagtcataa ttctttccat ttataattc actcgagact ctgttaactg	120
[0880]	attccttgtg tgttgtatct tactctcag ctcaataa cttttagtta ttcacctta	180
[0881]	ctgtatgaat aacagtggag aaaaggattc taccagaata ctctaattat ggttttgagt	240

[0882]	cccctttcca gactgaagat ttttcagtct ttttgatctg aggtgatttt tcagtctttt	300
[0883]	cgatctgagg tgacagtctc aagctcctca attcaccag tctcttgata cttgtccatt	360
[0884]	tagggccacc aaagctactt tgacttcata ctagagagtc aattaatgag gccattctct	420
[0885]	gatggacagg tgaagcaggc aaggtgacta tattttgact aaacggtaga aaacagcctg	480
[0886]	agtgtaaca gtgtagccta taaaaccag agctgccac cctgatctaa acttcagga	540
[0887]	acataagaac gcgccccaga cccgggctg gggggcaagt cggggggcgg ggggaggctg	600
[0888]	ggcagggtcc cctgggagga tggggacgtg ctgtgccct agcggccacc agagggcacc	660
[0889]	aggacaccac tgcggtcggc tcagcggctc ctgccctggt cagggggcgc caggtcctgc	720
[0890]	ccctcctggg gagggcgggg ggcgagaagg gcgatttta ttaaccacg tttcaacatg	780
[0891]	cacatcccag taatttgaa acattttgtt tccaaagatt cacttaacat tggtttagca	840
[0892]	acatgaagct ttctatgaa cccaaggact cagtttttg cctgttttag tgacaggca	900
[0893]	tcagcaacat gctgcatttc tctccagtgt tgtaatcaaa gaaacctcc catagcttta	960
[0894]	aatgatattc ctccccttc caattatgtg ggggaaaac aacctattc tccaccaga	1020
[0895]	agtgtaact caagaattac atttcaaga agtttcaga ttcgtaaac cagaattaga	1080
[0896]	tgtctttcac ctaaattgtc cgggttgac caaaggaaca cacaggttc tcatthaact	1140
[0897]	ttttaatgg gtctcaaaat tctgtgaaa atttttggtc aagttgttc cattaanaag	1200
[0898]	tactgatttt aaaaactaat aacttaaac tgccacacgc aaaaaagaa accaaagtgg	1260
[0899]	tccacaaaac attctcctt cttctgaag gttttacgat gcattgttat cattaaccag	1320
[0900]	tcttttacta ctaacttaa atggccaatt gaaacaaaca gttctgagac cgttcttcca	1380
[0901]	ccactgatta agagtgggt ggcaggtatt agggataatg ctagcttact tgtacagctc	1440
[0902]	gtccatgcc agagtgatc cggcggcgt cacgaactc agcaggacca tgtgatcgcg	1500
[0903]	cttctcgttg ggtctttgc tcagggcga ctgggtgctc aggtagtgtg tgtcggcag	1560
[0904]	cagcacgggg ccgtcgcga tgggggtgt ctgctgtag tggcggcga gctgcacgt	1620
[0905]	gccctcctcg atgttggtg ggatcttga gttcacctg atgccgttct tctgcttgc	1680
[0906]	ggccatgata tagacgttg ggctgttga gttgtactcc agcttgtgcc ccaggatgtt	1740
[0907]	gccctcctcc ttgaagtga tgccctcag ctcatgagg ttcaccaggg tgtcgcctc	1800
[0908]	gaactcacc tcggcgcggg tctttagtt gccctcgtc ttgaagaaga tggcgcgtc	1860
[0909]	ctggacgtag cttcgggca tggcggact gaagaagtgc tgctgctca tgtggtcggg	1920
[0910]	gtagcggctg aagcaactga cgccttagt caggggtgctc acgagggtgg gccaggcacc	1980
[0911]	gggcagcttg ccggtgtgc agatgaact cagggtcagc ttgccgtagg tggcatgcc	2040
[0912]	ctcgcctcgc ccggacacgc tgaactgtg gccgtttac tcgccgtcca gctcgaccag	2100
[0913]	gatgggcacc accccgtga acagctctc gcccttgcct accatggtgg cgtcgaccgt	2160
[0914]	acgtcacgac acctgaaatg gaagaaaaa actttgaacc actgtctgag gcttgagaat	2220
[0915]	gaaccaagat ccaactcaa aaagggcaa ttccaaggag aattacatca agtgccaagc	2280
[0916]	tggcctaact tcagtctca cccactcagt gtgggaaac tccatcgcac aaaaccctc	2340
[0917]	ccccaacct aaagacgac tactccaaa gctcgagaac taatcgaggt gcctggacgg	2400
[0918]	cgcccgttac tccgtggagt cacatgaag gacggctgag gacggaaagg cccttttct	2460
[0919]	ttgtgtgggt gactcaccg cccgctctc cgagcgcgc gtctccatt ttgagctccc	2520
[0920]	tgcagcagg ccgggaagc gccatcttc cgtcacgca actggtgcc accgggccag	2580
[0921]	ccttgccgc cagggcgggg cgatacacg cggcgcgagg ccaggacca gagcaggccg	2640
[0922]	gccagcttga gactacccc gtccgattct cgggtggcgc gctcgaggc cccgcctcgc	2700
[0923]	cgaacatgtg cgctgggac cacgggccc gtcgccccc gcggcccaa aaaccgaaat	2760

[0924]	accagtgtgc agatcttggc ccgcatttac aagactatct tgccagaaaa aaagcgtcgc	2820
[0925]	agcaggtcat caaaaatttt aatggctag agacttatcg aaagcagcga gacaggcgcg	2880
[0926]	aagtgccac cagattcgca cgcggcgcc ccagcgccea ggccaggcct caactcaagc	2940
[0927]	acgaggcga ggggctcctt aagcgaagg cctcgaactc tcccaccac ttccaaccg	3000
[0928]	aagctcggga tcaagaatca cgtactgcag ccagtggag taattcaagg cacgcaagg	3060
[0929]	ccataaccg taaagaggcc aggcccgcg gaaccacaca cggcacttac ctgtgttctg	3120
[0930]	gcggaacc cgttgcgaaa aagaacgtc acggcgaacta ctgcacttat atacggttct	3180
[0931]	ccccaccct cgggaaaaag gcggagccag tacacgacat cactttccca gtttaccctg	3240
[0932]	cgccacctc tctaggcacc gttcaattg ccgaccctc ccccaactt ctcggggact	3300
[0933]	gtggcgatg tgcgctctgc cactgacgg gcaccggagc ctagattcg attcccttg	3360
[0934]	gggcaaaact caccgcctaa tcccataa ctctaccgg gagccgggtg gagagcagac	3420
[0935]	gggtgacgc tgccacctgc cggccatccc aggataggac cgcctatc aagtcgacct	3480
[0936]	caggaaggac cctcgggca ccagaggcct tcgaagcccc aatgagtgag gcaactgagg	3540
[0937]	gtcgcgggtg ccattacaag gccagccaa ggctagagc caaggctga accgtgggg	3600
[0938]	accccaagc cccacctgc caggaacagc agacactgg acactttgtt tcaggctctg	3660
[0939]	cccaggcccc tcccactgtg aggctgggat ttgtgccea ggggtcagat gagaagagt	3720
[0940]	gggaaagcag tctgagcca gaaattcta ccgggtaggg gaggcgttt tccaaggca	3780
[0941]	gtctggagca tgcgcttag cagccccct gggcacttg cgctacaca gtggcctctg	3840
[0942]	gcctgcaca cattccacat ccaccgtag gcgccaaccg gctccgttct ttggtggcc	3900
[0943]	cttcgcgca ctttactc ctcccctagt caggaagtc cccccgcc cgcagctcgc	3960
[0944]	gtcgtgacg acgtgacaaa tggaagtagc acgtctcact agtctcgtgc agatggacag	4020
[0945]	caccgctgag caatggaagc ggtaggcct ttggggcagc ggccaatagc agctttgctc	4080
[0946]	cttcgctttc tgggctcaga ggctgggaag ggggtgggtc gggggcggc tcaggggcgg	4140
[0947]	gctcagggc ggggcggcg cccgaagtc ctccggaggc ccggcattct gcacgttca	4200
[0948]	aaagcgcag tctgccgcgc tgttctctc ttctctctc ccgggcctt cgacctcta	4260
[0949]	ggccaccat ggtgagcaag ggcgaggac acaacatgg catcatcaag gaggttcatg	4320
[0950]	gctcaaggt gcacatggag ggctccgtga acggccacga gttcgagatc gagggcgagg	4380
[0951]	gcgaggccg cccctacgag ggcaccaga ccgccaagct gaaggtgacc aagggcggc	4440
[0952]	ccctgccct cgcctgggac atctgtccc ctacgttcat gtacggctcc aaggcctac	4500
[0953]	tgaagcacc cgcgacatc cccgactact tgaagctgc cttccccgag ggcttcaagt	4560
[0954]	gggagcgcg gatgaactc gaggacggc gcgtggtgac cgtgaccag gactctctcc	4620
[0955]	tgcaggacg cgagttcatc tacaaggtga agctgcgcg caccaactc ccctccgac	4680
[0956]	gcccgtaat gcagaagaag accatgggct gggaggctc ctccgagcgg atgtaccctg	4740
[0957]	aggacggc cctgaaggc gagatcaagc agaggctgaa gctgaaggac ggcggccact	4800
[0958]	acgacccga ggtcaagacc acctacaagg ccaagaagc cgtgcagctg cccggcgcct	4860
[0959]	acaactcaa catcaagctg gacatcact cccacaacga ggactacacc atcgtggaac	4920
[0960]	agtacgagc cgcgagggc cgcactcca ccggcggcat ggacgagctg tacaagtgag	4980
[0961]	gatccgctg tgcgctcga ctgtgcctc tagttgccag ccactctgtt tttgcccctc	5040
[0962]	ccccgtgct tcttgacc tggaaggtgc cactcccact gtccttctc aataaaatga	5100
[0963]	gaaattgca tcgcattgtc tgagtaggtg tcattctatt ctggggggtg ggggtgggca	5160
[0964]	ggacagcaag ggggaggatt gggaagaaa tagcaggcat gctggggatg cgggtgggctc	5220
[0965]	tatgcttct gaggcgaaa gaaccttct gaggcgaaa gaaccagctg ccttaataata	5280

[0966]	acttcgtata atgtatgcta tacgaagtta ttaggtctga agaggagttt acgtccagcc	5340
[0967]	aattctgtgg aatgtgtgtc agttaggggtg tggaaagtcc ccaggctccc cagcaggcag	5400
[0968]	aagtatgcaa agcatgcatc tcaattagtc agcaaccagg tgtggaaagt ccccaggctc	5460
[0969]	cccagcaggc agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca tagtccccgc	5520
[0970]	cctaactccg cccatcccgc ccctaactcc gccagttcc gccattctc cgccccatgg	5580
[0971]	ctgactaatt ttttttattt atgcagaggc cgaggccgcc tctgcctctg agctattcca	5640
[0972]	gaagtagtga ggaggettth ttggaggcct aggcctttgc aaaaagctcc cgggagcttg	5700
[0973]	tatatccatt ttcggcggcc gcgccaccat gaccgagtac aagcccacgg tgcgcctcgc	5760
[0974]	caccgcgac gacgtcccca gggccgtacg caccctgcc gccgcgttcg ccgactacc	5820
[0975]	cgccacgcgc cacaccgtcg atccggaccg ccacatcgag cgggtcaccg agctgcaaga	5880
[0976]	actcttctc acgcgcgtcg ggctcgacat cggcaagggtg tgggtcgcgg acgacggcgc	5940
[0977]	cgcggtggcg gtctggacca cgccggagag cgtcgaagcg ggggcggtgt tcgccgagat	6000
[0978]	cggcccgcgc atggccgagt tgagcggttc ccggctggcc gcgcagcaac agatggaagg	6060
[0979]	cctcctggcg ccgcaccggc ccaaggagcc cgcgtggttc ctggccaccg tcggagtctc	6120
[0980]	gcccaccac cagggcaagg gtctgggcag cgccgtctg ctccccggag tggaggcggc	6180
[0981]	cgagcgcgc ggggtgccc cttctctgga gacctcgcg ccccgcaacc tccccttcta	6240
[0982]	cgagcggctc ggcttcaccg tcaccgccga cgtcagagtg cccgaaggac cgcgcacctg	6300
[0983]	gtgcatgacc cgcaagccc gtgcctgaga attcgcggga ctctggggtt cgaatgacc	6360
[0984]	gaccaagcga cgcccaacct gccatcacga gatttcgatt ccaccgccgc cttctatgaa	6420
[0985]	aggttgggct tcggaatcgt tttccgggac gccggctgga tgatctcca gcgcgggat	6480
[0986]	ctcatgctgg agttcttgc ccaccccaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa	6540
[0987]	taaagcaata gcatcacaaa tttcacaat aaagcatttt tttactgca ttctagttgt	6600
[0988]	ggtttgcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgta taccgctcga ctagagcttg	6660
[0989]	cggaaccctt aatataactt cgtataatgt atgctatac aagttattag gtccgctggc	6720
[0990]	catctacgag ccaaagactt tcaaatctt ggctgccttg gccagtagga ggacacga	6780
[0991]	aggatttgc tgccttgg gggatgggaa ggaacctgaa ggcatttttt ccagagtgg	6840
[0992]	gcagtaccac tgaggactgt tgctgtattg attaggaaaa gagacagagt aatttgag	6900
[0993]	ttgtttgatt tatactgggc tgcaggtcga gggatctca taagagaaga gggacagcta	6960
[0994]	tgactgggag tagtcaggag aggaggaaaa atctggctag taaaacatgt aaggaaaatt	7020
[0995]	ttaggatgt taaagaaaa aataacacaa aacaaaatat aaaaaaatc taacctcaag	7080
[0996]	tcaaggcttt tctatggaat aaggaatgga cagcaggggg ctgtttcata tactgatgac	7140
[0997]	ctctttatag ccaccttgt tcatggcagc cagcatatgg catatggttc caaactctaa	7200
[0998]	accaaatact cattctgatg ttttaaatga tttgcctcc catatgtcct tccgagtgag	7260
[0999]	agacacaaaa aattccaaca cactattgca atgaaaataa atttcttta ttagccagaa	7320
[1000]	gtcagatgct caaggggctt catgatgtcc ccataatttt tggcagaggg aaaaagatct	7380
[1001]	cagtgttatt tgtgagccag ggcattggcc acaccagcca ccacctctg ataggcagcc	7440
[1002]	tgcggtacct tacatggtg cgaattcgtt tgccaaaatg atgagacagc acaataacca	7500
[1003]	gcacgttgc caggagctgt aggaaaaaga agaaggcatg aacatggtta gcagaggctc	7560
[1004]	tagagccgc ggtcacacgc cagaagccga accccgccct gccctgcc cccgaaggc	7620
[1005]	agccgtccc ctgcggcagc cccgaggctg gagatggaga aggggacggc ggcgcggcga	7680
[1006]	cgcacgaagg ccctccccgc catttctt cctgccggcg ccgcaccgct tcgcccgcgc	7740
[1007]	ccgctagagg ggggtcggcg gcgcctccca gatttcggtt ccgccagatt tgggacaaag	7800

[1008]	gaagtcctcg	cgccctctcg	cacgattacc	ataaaaggca	atggctgcgg	ctcgccgcgc	7860
[1009]	ctcgacagcc	gccggcgctc	cggggccgcc	gcgcccctcc	cccgagccct	ccccggcccc	7920
[1010]	aggcggcccc	gccccgccg	gcacccccac	ctgccgccac	ccccgcccc	gcacggcgag	7980
[1011]	ccccgcgcca	cgccccgcac	ggagccccgc	acccgaagcc	gggccgtgct	cagcaactcg	8040
[1012]	gggagggggg	tgcagggggg	ggttacagcc	cgaccgccgc	gcccacaccc	cctgctcacc	8100
[1013]	ccccacgca	cacaccccgc	acgcagcctt	tgttcccctc	gcagcccccc	cgccaccgcg	8160
[1014]	ggcaccgccc	ccggccgcgc	tcccctcgcg	cacacgcgga	gcgcacaaag	ccccgcgccc	8220
[1015]	cgccccgagc	gctcacagcc	gccgggcagc	gcggggccga	cgcgggcgctc	cccacgcaca	8280
[1016]	cacacacgca	cgccccccc	gagccgctcc	ccccgcaca	aagggccctc	ccggagccct	8340
[1017]	ttaaggcttt	cacgcagcca	cagaaaagaa	acgagccgtc	attaaccaa	gcgctaatta	8400
[1018]	cagcccggag	gagaagggcc	gtcccgccg	ctcacctgtg	ggagtaacgc	ggtcagtcag	8460
[1019]	agccggggcg	ggcggcgcca	ggcggcgccg	agcggggcac	ggggcgaagg	caacgcagcg	8520
[1020]	actcccgcc	gccgcgcgct	tcgcttttta	tagggccgcc	gccgccgccc	cctcgccata	8580
[1021]	aaaggaaact	ttcggagcgc	gccgctctga	ttggctgccg	ccgcacctct	ccgcctcgcc	8640
[1022]	ccgccccgcc	cctcgccccg	ccccgccccg	cctggcgcgc	gcccccccc	ccccgcccc	8700
[1023]	catcgctgca	caaataaatt	aaaaataaaa	taaatacaaa	attgggggtg	gggagggggg	8760
[1024]	ggagatgggg	agagtgaagc	agaacgtggg	gctcacctcg	acccatggta	atagcgatga	8820
[1025]	ctaatacgtg	gatgtactgc	caagtaggaa	agtcccataa	ggtcatgtac	tgggcataat	8880
[1026]	gccagcgggg	ccatttaccg	tattgacgt	caataggggg	cgtacttggc	atatgataca	8940
[1027]	cttgatgtac	tgccaagtgg	gcagtttacc	gtaaatagtc	caccattga	cgatcaatgga	9000
[1028]	aagtcctat	tggcgttact	atgggaacat	acgtcattat	tgacgtcaat	ggcggggggt	9060
[1029]	cgttggggcg	tcagccaggc	gggccattta	ccgtaagtta	tgtaacgcgg	aactccatat	9120
[1030]	atgggctatg	aactaatgac	cccgtaattg	attactatta	ataactagtc	aataatcaat	9180
[1031]	gtcgtaaatg	tcgtaaatgt	ctcagctagt	caggtagtaa	aagggtgcaa	ctaggcagtg	9240
[1032]	gcagagcagg	attcaaatc	agggctgttg	tgatgcctcc	gcagactctg	agcggccact	9300
[1033]	ggtgtaatt	tgtctgtgcc	tcttctgacg	tggaagaaca	gcaactaaca	cactaacacg	9360
[1034]	gcatttacta	tggccagcc	attgtacgcg	ttgagtaggt	cacatttcag	taaaacctgg	9420
[1035]	ctttgtggat	tgagcatggt	ctgtctcttc	ctggctactc	attagtcccc	taagtgggat	9480
[1036]	ttgtgagca	agactcctca	attacagaaa	tactccagtt	tagaattctc	gcaaaggctt	9540
[1037]	tttgtttcca	caagtagaat	ctagaaagca	atctcaagta	acaacagcag	agacctgaat	9600
[1038]	cccaatccat	ctttcctgtg	tgtcctcttt	tacctcctc	cctttcatgt	tgaaccaaca	9660
[1039]	gtcctttttc	agtctagaag	ctagtacgaa	agaaatgtac	agatgtaggt	accaagcaaa	9720
[1040]	gccattagcc	aataactggt	gagatggagc	taagagggaaa	taaaagtgtt	cctaagaata	9780
[1041]	gcacagcaga	agctagatcc	acagatctta	aaacaatttt	ggttgagtaa	gagtagaggc	9840
[1042]	aaaagaggaa	gctaataatg	cagtttttag	gagctaagag	ccagataaag	ggtaagggca	9900
[1043]	ggaggaagtg	ctatctcagc	taacgagata	catgaaacaa	cggtggaagt	ccagcaggca	9960
[1044]	caagatgagt	tgagaagcaa	tcagggccag	aaggatgtgc	aaggcctcaa	aataaaaaag	10020
[1045]	cacagggcca	cagggaacct	tatggaaatt	aaaaggaaga	ggatgcagtc	aggagaggaa	10080
[1046]	aaaatagtgc	tcctcccc	atgcccagg	aagcagctga	gcagccagta	cttgggaagt	10140
[1047]	tagtagtaat	aagttgtaa	gaggaggttc	tgttcgtggc	tcaatggta	acaaatcaga	10200
[1048]	ctagaaaccg	tgaggttgcg	ggtttgatcc	ctggccttgc	tcagtgggtt	aaggatccgg	10260
[1049]	cattgccgtg	acctgtggtg	taggtcacag	acgtggetca	gttcccgcgt	tcctgtgget	10320

[1050] ctggtgtagg ctggtggcta cagctctgat tagacccta ggctgggaac ctccatagc 10380
[1051] cctggaagtg gccgtagaaa agatgcggcc gccataaaag ttttgttact ttatagaaga 10440
[1052] aattttgagt ttttgTTTT tttataaat aaataaacat aaataaattg tttgttgaat 10500
[1053] ttattattag tatgtaagt taaatataat aaaacttaat atctattcaa attaataaat 10560
[1054] aaacctgat atacagaccg ataaaacaca tgcgtcaatt ttacacatga ttatctttaa 10620
[1055] cgtacgtcac aatatgatta tctttctagg gttaatctag ctgctgttc tgcagcgtgt 10680
[1056] cgagcatctt catctgctcc atcacgetgt aaaacacatt tgcaccgca gtctgcccgt 10740
[1057] cctccacggg ttcaaaaacg tgaatgaac aggcgcgctc actggccctc gttttacaac 10800
[1058] gtcgtgactg ggaaaacct ggcgttacc aacttaatcg cttgcagca catccccctt 10860
[1059] tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg cccttccca cagttgcgca 10920
[1060] gcctgaatgg cgaatgggac gcgccctgta gcggcgctt aagcgcggcg ggtgtggtgg 10980
[1061] ttacgcgag cgtgaccgt acacttgcca gcgccctagc gcccgctct ttcgctttct 11040
[1062] tccctcctt tctgccacg ttcgccgct tccccgca agctctaat cgggggctc 11100
[1063] ctttagggtt ccgatttagt gctttacggc acctcgacc caaaaaact gattagggtg 11160
[1064] atggttcacg tagtgggcca tcgccctgat agacggttt tcgcccttg acgttgaggt 11220
[1065] ccacgttctt taatagtga ctcttgttc aaactggaac aacactcaac cctatctcgg 11280
[1066] tctattctt tgattataa gggatttgc cgatttcggc ctattggtta aaaaatgagc 11340
[1067] tgatttaaca aaaattaac gcgaatttta acaaaatatt aacgcttaca atttagggtg 11400
[1068] cactttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc tatttgttta ttttctaaa tacattcaa 11460
[1069] tatgtatccg ctcatgagac aataacctg ataatgctt caataatatt gaaaaaggaa 11520
[1070] gagtatgagt attcaacatt tccgtgctc cttattccc tttttgctg cattttgctt 11580
[1071] tcctgtttt gctcaccag aaacgctgtt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg 11640
[1072] tgcacgagtg gttacatcg aactggatct caacagcggg aagatcctg agagtttctg 11700
[1073] ccccgaagaa cgttttcaa tgatgagcac ttttaaagt ctgctatgt gcgcggtatt 11760
[1074] atcccgtatt gacgccggc aagagcaact cggctgccgc atacactatt ctcagaatga 11820
[1075] cttggtgag tactcaccag tcacagaaaa gcatcttac gatggcatga cagtaagaga 11880
[1076] attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taacactgc gccacttac ttctgacaac 11940
[1077] gatcggagga ccgaaggagc taaccgctt tttgcacaac atgggggctc atgtaactcg 12000
[1078] cttgatcgt tgggaaccg agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac 12060
[1079] gatgcctgta gcaatggca caacgttgc caactatta actggcgaac tacttactct 12120
[1080] agttcccgg caacaattaa tagactgat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct 12180
[1081] gcgctcggc cttccgctg gctggttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg 12240
[1082] ttcacgctg atcattgcag cactggggc agatggtaag ccctcccgt tcgtagttat 12300
[1083] ctacacgagc gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg 12360
[1084] tgctcactg attaagcatt ggtaactgtc agaccaagt tactcatata tacttttagat 12420
[1085] tgatttaaaa ctcatTTTT aatttaaaag gatctaggtg aagatcctt ttgataatct 12480
[1086] catgaccaa atccctaac gtgagtttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa 12540
[1087] gatcaaagga tcttctgag atctttttt tctgcgctg atctgctgct tgcaaaaaa 12600
[1088] aaaaccaccg ctaccagcg tggtttgtt gccgatcaa gagctacaa ctctttttcc 12660
[1089] gaagtaact ggctcagca gagcgcagat accaaact gtccttctag tgtagccgta 12720
[1090] gttagccac cactcaaga actctgtagc accgctaca tacctgctc tgctaactct 12780
[1091] gttaccagt gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttg actcaagacg 12840

[1092]	atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag	12900
[1093]	cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc	12960
[1094]	cacgcttccc gaaggagaaa aggcggacag gtatccggtg agcggcaggg tcggaacagg	13020
[1095]	agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt	13080
[1096]	tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg	13140
[1097]	gaaaaacgcc agcaacgcgg cttttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca	13200
[1098]	catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg cttttgagtg	13260
[1099]	agctgatacc gctcgcgca gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc	13320
[1100]	ggaagagcgc ccaatacga aaccgcctct ccccgcgctg tggccgattc attaattgag	13380
[1101]	ctggcacgac aggtttcccg actggaaaagc gggcagtgag cgcaacgcaa ttaatgtgag	13440
[1102]	ttagctcact cattaggcac cccaggtttt acactttatg cttccggctc gtatgtttgtg	13500
[1103]	tggaattgtg agcggataac aatttcacac aggaaacagc tatgacctg attacgcaa	13560
[1104]	gcgcgcccgc cgggtaactc acggggatc catgtccatt tctgcggcat ccagccagga	13620
[1105]	taccgctcct cgctgacgta atatcccagc gccgcaccgc tgtcattaat ctgcacaccg	13680
[1106]	gcacggcagt tccggctgtc gccggtattg ttcgggttgc tgatgcgctt cgggctgacc	13740
[1107]	atccggaact gtgtccgga aagccgcgac gaactggtat cccaggtggc ctgaacgaa	13800
[1108]	agttcacctg taaaggcgtg catggccaca ctttccgaa tcatcatggt aaacgtgcgt	13860
[1109]	tttgcgtaa cgtaaatgca gcagcagtc tctcggcaa actctttcca tgccgcttca	13920
[1110]	acctcgcggg aaaaggcacg ggcttcttcc tccccgatgc ccagatagcg ccagcttggg	13980
[1111]	cgatgactga gccggaaaaa agaccgcagc atatgatcct gatgcagct gattaacct	14040
[1112]	agaaagatag tctgcgtaaa attgacgcat gcattcttga aatattgctc tctctttcta	14100
[1113]	aatagcgcga atccgtcgt gtgcatttag gacatctcag tcgccgcttg gagctcccgt	14160
[1114]	gaggcgtgct tgtcaatgcg gtaagtgtca ctgattttga actataacga ccgcgtgagt	14220
[1115]	caaaatgacg catgattatc ttttacgta cttttaagat ttaactcata cgataattat	14280
[1116]	attgtatttt catgttctac ttacgtgata acttattata tatatatttt cttgttatag	14340
[1117]	atatac	14345
[1118]	<210>	7
[1119]	<211>	14394
[1120]	<212>	DNA
[1121]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1122]	<400>	7
[1123]	ggcgcgccgg atggggactc atgtgaattt tctaaagggt ctattttaaac ggggggcacg	60
[1124]	agtgcggct ttggacaggg ccgctcctc tccaccttt cttcttcccc ctcgccgcc	120
[1125]	tctcaccccc tgaggcctct ctccccccac gacctctct ctctctctg aaacctctc	180
[1126]	ctctcagct gcatcccacc ctctgtgct ctctctctct ctgtctgtcc tgtgtctct	240
[1127]	ctactgggt ttcagagcac agatgcccc agcacaaaag cagttttccc ctgggggtggg	300
[1128]	aggaagcaag agactttgta cctattttgt atgtgtataa taatttgaga tgtttttaa	360
[1129]	tattttgatt gctggaataa agcatgtgga aatgacccaa accaatcttg cactggctc	420
[1130]	ctgatttct tcttggaga cggagggagg gggagacctg ggggagggcg cttggggggg	480
[1131]	ggtgggctct cttctttctg cgctcccccc cccacctcc aacacctga cgacctcc	540
[1132]	tgttccgct tgctttctc aggttttaac actttctct cgccctctca gcatgcgcat	600
[1133]	gcgcgtgct ctacctccc cgcacatcct ggctgccc cctgaatgg cctggcccag	660

[1134]	cgatgccacc aactctctcg ctccgtccac ggctggggag gggggcactc tgcagggttg	720
[1135]	ggggcactg ggaggtggg ttgggtgagg gaggggtgcc tgggccccca cccccagca	780
[1136]	agttctctcc ctaggcgaac tggagggtcg tctggcctct tgagccttgt tgctggctct	840
[1137]	gagctctacc aagagagtga ccagcaggac cgcacatca cgcgccccag acccgggcct	900
[1138]	gggggcaag tcggggggcg gggggagtc gggcagggtc ccctgggagg atggggacgt	960
[1139]	gctgtcccc tagcggccac cagaggccac caggacacca ctgcggtcgg ctgagcggct	1020
[1140]	cctgccctgg tcagggggcg ccaggtcctg cccctcctgg ggagggcggg gggcgagaag	1080
[1141]	ggcgatttta attaaccac gtttcaacat gcacatcca gtaatttga aacattttgt	1140
[1142]	ttcaaagat tcaactaaca ttggtttagc aacatgaagc tttctatgca acccaaggac	1200
[1143]	tcagtttttg gcctgtttta gtgacaggca atcagcaaca tgctgcattt ctctccagt	1260
[1144]	ttgtaataca agaaaccctc ccatagcttt aaatgatatt cttccctt ccaattatgt	1320
[1145]	gggggaaaa caacctatt ctccaccag aagtgttaac tcaagaatta cattttcaag	1380
[1146]	aagttccag attcgtaaaa ccagaattag atgtctttca cctaaatgc tcggtgttga	1440
[1147]	caaaggaac acacaggtt ctcatthaac ttttttaatg ggtctcaaaa ttctgtgaca	1500
[1148]	aatttttgt caagttgtt ccattaaaa gtactgattt taaaaactaa taacttaaaa	1560
[1149]	ctgccacag caaaaaagaa aaccaaagt gtccacaaaa cattctcctt tccttctgaa	1620
[1150]	ggttttacga tgcatgtta tcattaacca gtcttttact actaaacta aatggccaat	1680
[1151]	tgaacaaac agttctgaga ccgttctcc accactgatt aagagtggg tggcaggat	1740
[1152]	tagggataat gctagcttac ttgtacagct cgtccatgcc gagagtgat ccggcggcgg	1800
[1153]	tcacgaactc cagcaggacc atgtgatcgc gcttctcgtt ggggtctttg ctgagggcgg	1860
[1154]	actgggtgct caggtagtgg ttgtcgggca gcagcaggg gccgtcggc atgggggtgt	1920
[1155]	tctgctggta gtggtcggcg agctgcacgc tgccgtcctc gatgttgtgg cggatcttga	1980
[1156]	agttcacctt gatgccgtt ttctgctgt cggccatgat atagacgtt tggctgttgt	2040
[1157]	agttgtactc cagcttgtgc cccaggatgt tgccgtcctc cttgaagtc atgcccttca	2100
[1158]	gctcgatgcg gttaccagg gtgtcgcct cgaacttac ctggcgcgg gtctttagt	2160
[1159]	tgccgtcgtc cttgaagaag atggtgcgt cctggacgta gccttcgggc atggcggact	2220
[1160]	tgaagaagtc gtgctgctt atgtggtcgg ggtagcggct gaagcactgc acgccgtagg	2280
[1161]	tcagggtggt cacgagggtg ggccagggca cgggcagctt gccggtggtg cagatgaact	2340
[1162]	tcagggtcag cttgccgtag gtggcatcgc cctcgcctc gccggacag ctgaacttgt	2400
[1163]	ggccgtttac gtcgccgtc agctcgacca ggatgggcac cccccggtg aacagctcct	2460
[1164]	cgccttgct caccatggtg gcgtcgacc tacgtcacga cacctgaaat ggaagaaaa	2520
[1165]	aactttgaac cactgtctga ggcttgagaa tgaaccaaga tccaaactca aaaagggcaa	2580
[1166]	attcaagga gaattacatc aagtccaag ctggcctaac ttcagtctc acccactcag	2640
[1167]	tgtggggaaa ctccatcga taaaaccct ccccccaacc taaagacgac gtactccaaa	2700
[1168]	agctcgagaa ctaatcgagg tgcttgacg gcgcccggta ctccgtggag tcacatgaag	2760
[1169]	cgacggtga ggacggaaag gcccttttc tttgtgtgg tgactcacc gcccgctctc	2820
[1170]	ccgagcgcg cgtcctccat tttgagctc ctgcagcagg gccgggaag gcccatctt	2880
[1171]	ccgtcacgc aactggtgcc gaccgggcca gccttgccgc ccagggcggg gcgatacacg	2940
[1172]	gcggcgcgag gccaggcacc agagcaggcc ggccagctg agactaccc cgtccgattc	3000
[1173]	tcggtggccg cgctcgagg ccccgctcg ccgaacatgt gcgctgggac gcacgggcc	3060
[1174]	cgtcgccgcc cgggcccca aaaaccgaaa taccagtgtg cagatcttgg cccgattta	3120
[1175]	caagactatc ttgccagaaa aaaagcgtc cagcagggtca tcaaaaattt taaatggcta	3180

[1176]	gagacttatac	gaaagcagcg	agacaggcgc	gaaggtgcca	ccagattcgc	acgcggcggc	3240
[1177]	cccagcggcc	aggccaggcc	tcaactcaag	cacgaggcga	aggggctcct	taagcgcaag	3300
[1178]	gcctcgaact	ctcccacca	cttccaacce	gaagctcggg	atcaagaatc	acgtactgca	3360
[1179]	gccagtggaa	gtaattcaag	gcacgcaagg	gccataacce	gtaaagagge	caggccccgcg	3420
[1180]	ggaaccacac	acggcactta	cctgtgttct	ggcggcaaac	ccgttgcgaa	aaagaacgtt	3480
[1181]	cacggcgact	actgactta	tatacggttc	tccccaccc	tcgggaaaaa	ggcggagcca	3540
[1182]	gtacacgaca	tcactttccc	agttttaccc	gcgccacett	ctctaggcac	cggttcaatt	3600
[1183]	gccgaccct	cccccaact	tctcggggac	tgtgggcgat	gtgcgctctg	cccactgacg	3660
[1184]	ggcaccggag	ccctagattc	gattcccttt	ggggcaaac	tcaccgccta	atcccctata	3720
[1185]	actctaccgg	ggagcccggg	ggagagcaga	cgggctgacg	ctgccacctg	ccggccatcc	3780
[1186]	caggatagga	ccgccgtatt	caagtcgccc	tcaggaagga	ccctcggggc	accagaggcc	3840
[1187]	ttcgaagccc	caatgagtga	ggcaactgag	ggtcgcgggt	gccattacaa	ggcccagcca	3900
[1188]	aggcctagag	ccaaggcttg	aaccgtgggg	gacccccaa	ccccacctgc	ccaggaacag	3960
[1189]	cagacactgg	gacactttgt	ttcaggtcct	gcccaggccc	ctcccactgt	gaggctggga	4020
[1190]	tttctcggcc	agggtcgaga	tgagaagagt	ggggaaagca	gtcctgagcc	aggaaattct	4080
[1191]	accgggtagg	ggaggcgctt	ttcccaggc	agtctggagc	atgcgcttta	gcagccccgc	4140
[1192]	tgggcaactg	gcgctacaca	agtggcctct	ggcctcgcac	acattccaca	tccaccggta	4200
[1193]	ggcgccaacc	ggctccgttc	tttggtgccc	ccttcgcgcc	accttctact	cctcccctag	4260
[1194]	tcaggaagtt	ccccccggc	ccgcagctcg	cgctcgtcag	gacgtgacaa	atggaagtag	4320
[1195]	cacgtctcac	tagtctcgtg	cagatggaca	gcaccgctga	gcaatggaag	cgggtaggcc	4380
[1196]	tttggggcag	cggccaatag	cagctttgct	ccttcgcttt	ctgggctcag	aggctgggaa	4440
[1197]	ggggtgggtc	cggggcgggg	ctcagggcg	ggctcagggg	cggggcgggc	gcccgaaggt	4500
[1198]	cctccggagg	cccggcattc	tgcacgcttc	aaaagcgcac	gtctgccgcg	ctgtttctct	4560
[1199]	cttctcctc	tccgggcctt	tcgacctcct	agggccacca	tggtgagcaa	gggcgaggac	4620
[1200]	gacaacatgg	ccatcatcaa	ggagttcatg	cgcttcaagg	tgcacatgga	gggctccgtg	4680
[1201]	aacggccacg	agttcgagat	cgagggcgag	ggcgagggcc	gcccctacga	gggcacccag	4740
[1202]	accgccaagc	tgaagtgac	caagggcggc	cccctgccct	tcgcctggga	catcctgtcc	4800
[1203]	cctcagttca	tgtacggctc	caaggcctac	gtgaagcacc	ccgccgacat	ccccgactac	4860
[1204]	ttgaagctgt	ccttccccga	gggcttcaag	tgggagcgcg	tgatgaactt	cgaggacggc	4920
[1205]	ggcgtgggtg	ccgtgacca	ggactcctcc	ctgcaggacg	gcgagttcat	ctacaaggtg	4980
[1206]	aagctcgcg	gcaccaactt	cccctccgac	ggccccgtaa	tgcagaagaa	gaccatgggc	5040
[1207]	tgggaggcct	cctccgagcg	gatgtacccc	gaggacggcg	ccctgaaggg	cgagatcaag	5100
[1208]	cagaggctga	agctgaagga	cggcggccac	tacgacgccg	aggtaagac	cacctacaag	5160
[1209]	gccaagaagc	ccgtgcagct	gcccggcgcc	tacaacgtca	acatcaagct	ggacatcacc	5220
[1210]	tcccacaacg	aggactacac	catcgtggaa	cagtacgagc	gcgccgaggg	ccgccactcc	5280
[1211]	accggcggca	tggacgagct	gtacaagtga	ggatccgctg	atcagcctcg	actgtgcctt	5340
[1212]	ctagttgcca	gccatctgtt	gtttgccct	ccccgtgcc	ttccttgacc	ctggaaggtg	5400
[1213]	ccactcccac	tgtcctttcc	taataaaatg	aggaaattgc	atgcatttgt	ctgagtaggt	5460
[1214]	gtcattctat	tctggggggt	ggggtggggc	aggacagcaa	gggggaggat	tgggaagaca	5520
[1215]	atagcaggca	tgctggggat	gcggtgggct	ctatggcttc	tgaggcggaa	agaacccttc	5580
[1216]	tgaggcggaa	agaaccagct	gccttaatat	aacttcgtat	aatgtatgct	atacgaagtt	5640
[1217]	attaggtctg	aagaggagtt	tacgtccagc	caattctgtg	gaatgtgtgt	cagttagggt	5700

[1218]	gtggaaagtc	cccaggctcc	ccagcaggca	gaagtatgca	aagcatgcat	ctcaattagt	5760
[1219]	cagcaaccag	gtgtggaaag	tccccaggct	ccccagcagg	cagaagtatg	caaagcatgc	5820
[1220]	atctcaatta	gtcagcaacc	atagtcccgc	ccctaactcc	gcccatcccg	cccctaactc	5880
[1221]	cgcccagttc	cgcccattct	cgccccatg	gctgactaat	tttttttatt	tatgcagagg	5940
[1222]	ccgaggccgc	ctctgcctct	gagctatcc	agaagtagtg	aggaggcttt	tttgagggcc	6000
[1223]	taggcttttg	caaaaagctc	ccgggagctt	gtatatccat	tttcggcggc	cgcgccacca	6060
[1224]	tgaccgagta	caagcccacg	gtgcgcctcg	ccaccgcga	cgacgtcccc	agggccgtac	6120
[1225]	gcacctcgc	cgccgcgttc	gccgactacc	ccgccacgcg	ccacaccgtc	gatccggacc	6180
[1226]	gccacatcga	gcgggtcacc	gagctgcaag	aactcttct	cacgcgcgtc	gggctcgaca	6240
[1227]	tcggcaaggt	gtgggtcgcg	gacgacggcg	ccgcggtggc	ggtctggacc	acgccggaga	6300
[1228]	gcgtcgaagc	gggggcggtg	ttgccgaga	tcggcccgcg	catggccgag	ttgagcggtt	6360
[1229]	cccggctggc	cgcgcagcaa	cagatggaag	gcctctggc	gccgcaccgg	cccgaaggac	6420
[1230]	ccgctgggtt	cctggccacc	gtcggagtct	cgcccagca	ccagggcaag	ggtctgggca	6480
[1231]	gcgccgtcgt	gctccccgga	gtggaggcgg	ccgagcgcgc	cggggtgcc	gccttctctg	6540
[1232]	agacctccgc	gccccgaac	ctccccctt	acgagcggct	cggcttcacc	gtcaccgccg	6600
[1233]	acgtcgaggt	gcccgaagga	ccgcgcacct	ggtgcatgac	ccgcaagccc	ggtgcctgag	6660
[1234]	aattcgcggg	actctggggg	tcgaaatgac	cgaccaagcg	acgcccgaac	tgccatcacg	6720
[1235]	agatttcgat	tccaccgccg	ccttctatga	aaggttgggc	ttcggaatcg	ttttccggga	6780
[1236]	cgccggctgg	atgatcctcc	agcgcgggga	tctcatgctg	gagttcttcg	cccaccccaa	6840
[1237]	cttgtttatt	gcagcttata	atggttacia	ataaagcaat	agcatcacia	atttcacaaa	6900
[1238]	taaagcattt	ttttactgc	attctagtgt	tggtttgtcc	aaactcatca	atgtatctta	6960
[1239]	tcatgtctgt	ataccgctcg	actagagctt	gcggaaccct	taatataact	tcgtataatg	7020
[1240]	tatgtatac	gaagttatta	ggtccgctgg	ccatctacga	gccaaagact	ttcaaatctt	7080
[1241]	tggtgcctt	ggccagtagg	aggcgacacg	aaggatttgc	tgctgccttg	ggggatggga	7140
[1242]	aggaacctga	aggcattttt	tccagagtgg	tgcagtacca	ctgaggactg	ttgctgtatt	7200
[1243]	gattagaaa	agagacagag	taatttgcag	tttgttgat	ttatactggg	ctgcaggtcg	7260
[1244]	agggatcttc	ataagagaag	agggacagct	atgactggga	gtagttagga	gaggaggaaa	7320
[1245]	aatctggcta	gtaaaacatg	taagaaaat	tttagggatg	ttaaagaaaa	aaataacaca	7380
[1246]	aaacaaaata	taaaaaaat	ctaacctcaa	gtcaaggett	ttctatggaa	taaggaatgg	7440
[1247]	acagcagggg	gctgtttcat	atactgatga	cctctttata	gccaccttg	ttcatggcag	7500
[1248]	ccagcatatg	gcatatgttg	caaactcta	aaccaaatac	tcattctgat	gttttaaatg	7560
[1249]	atttgcctc	ccatagtcc	ttccgagtga	gagacacaaa	aaattccaac	acactattgc	7620
[1250]	aatgaaaata	aatttccttt	attagccaga	agtcagatgc	tcaaggggct	tcagtatgct	7680
[1251]	cccataattt	ttggcagagg	gaaaaagatc	tcagtggat	ttgtgagcca	gggcattggc	7740
[1252]	cacaccagcc	accaccttct	gataggcagc	ctgcggtacc	ttacatggtg	gcgaattcgt	7800
[1253]	ttgccaaaat	gatgagacag	cacaataacc	agcacgttgc	ccaggagctg	taggaaaaag	7860
[1254]	aagaaggcat	gaacatggtt	agcagaggct	ctagagccgc	cggtcacacg	ccagaagccg	7920
[1255]	aaccccgcc	tgccccgtcc	ccccgaagg	cagccgtccc	cctgcggcag	ccccgagget	7980
[1256]	ggagatggag	aaggggacgg	cggcgcggcg	acgcacgaag	gccctcccc	cccatttctc	8040
[1257]	tcctgccggc	gccgcaccgc	ttgccccgcg	cccgctagag	ggggtgcggc	ggcgcctccc	8100
[1258]	agatttcggc	tccgccagat	ttgggacaaa	ggaagtccct	gcgccctctc	gcacgattac	8160
[1259]	cataaaaggc	aatggtcgcg	gctcgcgcg	cctcgacagc	cgccggcget	ccggggccgc	8220

[1260]	cgcgcccc	ccccgagccc	tccccggccc	gaggcggccc	cgccccgccc	ggcaccccc	8280
[1261]	cctgccgcca	cccccgccc	ggcacggcga	gccccgcgcc	acgccccgca	cggagccccg	8340
[1262]	caccgaagc	ggggccgtgc	tcagcaactc	ggggaggggg	gtgcaggggg	gggttacagc	8400
[1263]	ccgaccgccg	cgccccaccc	ccctgctcac	ccccccacgc	acacaccccg	cacgcagcct	8460
[1264]	ttgttcccct	cgcagcccc	ccgaccgcg	gggcaccgcc	cccggccgcg	ctcccctcgc	8520
[1265]	gcacacgcgg	agcgcacaaa	gccccgcgcc	gcgcccgcag	cgctcacagc	cgccgggcag	8580
[1266]	cgcgggccgc	acgcggcgct	ccccacgcac	acacacacgc	acgcaccccc	cgagccgctc	8640
[1267]	cccccgcac	aaagggcct	cccggagccc	tttaaggctt	tcacgcagcc	acagaaaaga	8700
[1268]	aacgagccgt	cattaaacca	agcgcataatt	acagcccgga	ggagaagggc	cgtcccgcc	8760
[1269]	gctcacctgt	gggagtaacg	cggtcagtc	gagccggggc	gggcggcgcg	aggcggcgcg	8820
[1270]	gagcggggca	cggggcgaag	gcaacgcagc	gactcccgcc	cgccgcgcgc	ttcgcttttt	8880
[1271]	ataggccgc	cgccgccgcc	gcctcgccat	aaaaggaaac	tttcggagcg	cgccgctctg	8940
[1272]	attggtgcc	gccgcacctc	tccgctcgc	cccggcccgc	ccctcgcccc	gccccgcccc	9000
[1273]	gcctggcgcg	cgcccccccc	cccccgccc	ccatcgctgc	acaaaataat	taaaaataa	9060
[1274]	ataaatacaa	aattgggggt	ggggaggggg	gggagatggg	gagagtgaag	cagaacgtgg	9120
[1275]	ggctcacctc	gacccatggt	aatagcgatg	actaatacgt	agatgtactg	ccaagtagga	9180
[1276]	aagtccata	aggtcatgta	ctgggcataa	tgccaggcgg	gccatttacc	gtcattgacg	9240
[1277]	tcaatagggg	gcgtacttgg	catatgatac	acttgatgta	ctgccaagtg	ggcagtttac	9300
[1278]	cgtaaatagt	ccaccattg	acgtcaatgg	aaagtcctta	ttggcgttac	tatgggaaca	9360
[1279]	tacgtcatta	ttgacgtcaa	tgggcggggg	tcgttggcg	gtcagccagg	cgggccattt	9420
[1280]	accgtaagtt	atgtaacgcg	gaactccata	tatgggctat	gaactaatga	ccccgtaatt	9480
[1281]	gattactatt	aataactagt	caataatcaa	tgctgtaaat	gtcgtaaatg	tctcagctag	9540
[1282]	tcaggtagta	aaaggtgtca	actaggcagt	ggcagagcag	gattcaaatt	cagggctggt	9600
[1283]	gtgatccctc	cgcagactct	gagcgccacc	tggtggtaat	ttgtctgtgc	ctcttctgac	9660
[1284]	gtggaagaac	agcaactaac	acactaacac	ggcatttact	atgggccagc	cattgtacgc	9720
[1285]	gttggtggtt	gctgagactg	cgtggggggc	caaggagacc	tggagaaagg	aatgcttctc	9780
[1286]	gctccttctt	ctggggcccc	aggagagcct	tcccagggcc	ttggagaggt	gctgtccagg	9840
[1287]	gactaacctc	gtgctctagg	aaggctgcag	gccctgacca	gctgggcagg	tctgggtcc	9900
[1288]	ctctggcct	tctaagttcc	caaacatga	gacctctggg	tgtggggtgg	cctggggagg	9960
[1289]	tcattttgcc	cagccctac	ctctgccc	ttcctaacc	tttttaaaa	tctgtgcgtc	10020
[1290]	ctcttcttc	ttcttctcc	tccttcct	ttctgctcac	cctctgctgc	tggcctgaga	10080
[1291]	gccggaggcc	cccaggggga	aggcgactgg	tctcctccc	agtctcaggg	aagggagaca	10140
[1292]	gagaatccag	gaagccagaa	ctcagcagac	gaagcaccca	gggacctaga	gatgggttga	10200
[1293]	aaagttgaca	gctgtcccac	ctgcctccc	aggtctcagg	gcctaaacct	ccaaggcagg	10260
[1294]	aaagcccct	gtccctcct	gggtccata	gaaagaggga	caagtctgca	cggaccattt	10320
[1295]	gctgtaatat	taacaccttg	gctgtcatta	ggtagtcttg	gctgttaatt	atgtcctgtg	10380
[1296]	ataatgtatt	attagcacgc	cgaccacata	gggtagggaa	ctgcagctag	taaacaaaag	10440
[1297]	tttgttcta	tatgcggccg	ccataaaagt	ttgttactt	tatagaagaa	atthtgatt	10500
[1298]	tttgttttt	ttaataaata	aataaacata	aataaattgt	ttgttgaatt	tattattagt	10560
[1299]	atgtaagtgt	aaatataata	aaacttaata	tctattcaa	ttaataaata	aacctcgata	10620
[1300]	tacagaccga	taaacacat	gcgtcaattt	tacacatgat	tatctttaa	gtacgtcaca	10680
[1301]	atatgattat	ctttctaggg	ttaatctagc	tgcgtgttct	gcagcgtgtc	gagcatcttc	10740

[1302]	atctgctcca	tcacgctgta	aaacacattt	gcaccgcgag	tctgcccgtc	ctccacgggt	10800
[1303]	tcaaaaacgt	gaatgaacga	ggcgcgctca	ctggccgtcg	ttttacaacg	tcgtgactgg	10860
[1304]	gaaaaccctg	gcgttaccca	acttaatcgc	cttgacgac	atcccccttt	cgccagctgg	10920
[1305]	cgtaatagcg	aagaggcccg	caccgatcgc	ccttcccaac	agttgcgcag	cctgaatggc	10980
[1306]	gaatgggacg	cgccctgtag	cggcgcatta	agcgcggcgg	gtgtgggtgg	tacgcgcagc	11040
[1307]	gtgaccgcta	cacttgccag	cgccctagcg	cccgtcctt	tcgctttctt	cccttccttt	11100
[1308]	ctcgccacgt	tcgcccgtt	tccccgtaa	gctctaaatc	gggggctccc	tttagggttc	11160
[1309]	cgatttagtg	ctttacggca	cctcgacccc	aaaaaacttg	attagggtga	tggttcacgt	11220
[1310]	agtgggcat	cgccctgata	gacggttttt	cgcccttga	cgttggagtc	cacgttcttt	11280
[1311]	aatagtggac	tcttgttcca	aactggaaca	acactcaacc	ctatctcgg	ctattctttt	11340
[1312]	gatttataag	ggattttgcc	gatttcggcc	tattggttaa	aaaatgagct	gatttaacaa	11400
[1313]	aaatttaacg	cgaatttta	caaaatatta	acgcttaca	tttaggtg	acttttcggg	11460
[1314]	gaaatgtg	cggaaccct	atgtgttat	ttttctaaat	acattcaaat	atgtatccgc	11520
[1315]	tcatgagaca	ataaccctga	taaatgcttc	aataatattg	aaaaaggaag	agtatgagta	11580
[1316]	ttcaacattt	ccgtgtcgcc	cttattccct	tttttgcggc	atgttgcctt	cctgtttttg	11640
[1317]	ctcaccaga	aacgctggtg	aaagtaaaag	atgctgaaga	tcagttgggt	gcacgagtgg	11700
[1318]	gttacatcga	actggatc	aacagcggta	agatcctga	gagttttcgc	cccgaagaac	11760
[1319]	gtttccaat	gatgagcact	tttaaagttc	tgctatgtgg	cgcggtatta	tcccgtattg	11820
[1320]	acgccgggca	agagcaactc	ggtcgccgca	tacactattc	tcagaatgac	ttggttgagt	11880
[1321]	actcaccagt	cacagaaaag	catcttacgg	atggcatgac	agtaagagaa	ttatgcagtg	11940
[1322]	ctgccataac	catgagtgat	aacactgcgg	ccaacttact	tctgacaacg	atcggaggac	12000
[1323]	cgaaggagct	aaccgctttt	ttgcacaaca	tgggggatca	tgtaactcgc	cttgatcgtt	12060
[1324]	gggaaccgga	gctgaatgaa	gccataccaa	acgacgagcg	tgacaccacg	atgcctgtag	12120
[1325]	caatggcaac	aacgttgcgc	aaactattaa	ctggcgaact	acttactcta	gcttcccggc	12180
[1326]	aacaattaat	agactggatg	gaggcggata	aagttgcagg	accacttctg	cgctcggccc	12240
[1327]	ttccgctgg	ctggtttatt	gctgataaat	ctggagccgg	tgagcgtggt	tcacgcggta	12300
[1328]	tcattgcagc	actggggcca	gatggtaagc	cctcccgtat	cgtagttatc	tacacgacgg	12360
[1329]	ggagtcaggc	aactatggat	gaacgaaata	gacagatcgc	tgagataggt	gcctcactga	12420
[1330]	ttaagcattg	gtaactgtca	gaccaagttt	actcatatat	acttttagatt	gatttaaaac	12480
[1331]	ttcattttta	atttaaaagg	atctaggtga	agatcctttt	tgataatctc	atgacaaaa	12540
[1332]	tccttaacg	tgagttttcg	ttccactgag	cgctagacc	cgtagaaaag	atcaaaggat	12600
[1333]	cttcttgaga	tccttttttt	ctgcgcgtaa	tctgctgctt	gcaaacaaaa	aaaccaccgc	12660
[1334]	taccagcgg	ggtttgtttg	ccggatcaag	agctaccaac	tctttttccg	aaggtaactg	12720
[1335]	gcttcagcag	agcgcagata	caaataactg	tccttctagt	gtagccgtag	ttaggccacc	12780
[1336]	acttcaagaa	ctctgtagca	ccgcctacat	acctcgtct	gctaactctg	ttaccagtgg	12840
[1337]	ctgctgccag	tggcgataag	tcgtgtctta	ccgggttga	ctcaagacga	tagttaccgg	12900
[1338]	ataaggcgca	gcggtcgggc	tgaacggggg	gttcgtgcac	acagcccagc	ttggagcgaa	12960
[1339]	cgacctacac	cgaactgaga	tacctacagc	gtgagctatg	agaaagcgc	acgcttccc	13020
[1340]	aaggagaaaa	ggcggacagg	tatccggtaa	gcggcagggt	cggaacagga	gagcgcacga	13080
[1341]	gggagcttcc	agggggaaac	gcctggtatc	tttatagtc	tgctcgggtt	cgccacctct	13140
[1342]	gacttgagcg	tcgatttttg	tgatgctcgt	cagggggcgc	gagcctatgg	aaaaacgcca	13200
[1343]	gcaacgcggc	ctttttacgg	ttcctggcct	tttctgccc	ttttgctcac	atgttctttt	13260

[1344]	ctgcgttata ccctgattct gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga gctgataacc	13320
[1345]	ctcgccgcag ccgaacgacc gagcgcagcg agtcagttag cgaggaagcg gaagagcgcc	13380
[1346]	caatacga accgctctc cccgcgcgtt ggccgattca ttaatgcagc tggcacgaca	13440
[1347]	ggtttcccga ctggaagcg ggcagttagc gcaacgcaat taatgttagt tagctcactc	13500
[1348]	attaggcacc ccaggcttta cactttatgc ttccggctcg tatgtttgtt ggaattgtga	13560
[1349]	gcggataaca atttcacaca gaaacagct atgacatga ttacgccaag cgcgcccgc	13620
[1350]	gggtaactca cggggtatcc atgtccattt ctgcggcacc cagccaggat acccgctctc	13680
[1351]	gctgacgtaa tatcccagcg ccgaccgct gtcattaatc tgcacaccgg cacggcagtt	13740
[1352]	ccggctgtcg ccggtattgt tcgggttgc gatgcgcttc gggctgacca tccggaactg	13800
[1353]	tgtccgaaa agccgcgacg aactggtatc ccagggtggc tgaacgaaca gttcacctgt	13860
[1354]	aaaggcgtgc atggccacac cttcccgaat catcatggta aacgtgcgtt ttgctcaac	13920
[1355]	gtcaatgcag cagcagtcac cctcggcaaa ctctttccat gccgcttcaa cctcgcggga	13980
[1356]	aaaggcacgg gcttcttct ccccgatgc cagatagcgc cagcttgggc gatgactgag	14040
[1357]	ccggaaaaa gaccgacga tatgatcctg atgcagctag attaacccta gaaagatagt	14100
[1358]	ctgcgtaaaa ttgacgatc cattctttaa atattgctct ctctttctaa atagcgcgaa	14160
[1359]	tccgtcgtg tgcatttagg acatctcagt cgcgcttgg agctcccgtg aggcgtgctt	14220
[1360]	gtcaatgcgg taagtgtcac tgattttgaa ctataacgac cgcgtgagtc aaaatgacgc	14280
[1361]	atgattatct tttacgtgac ttttaagatt taactcatac gataattata ttgttatttc	14340
[1362]	atgttctact tacgtgataa cttattatat atatatttc ttgttataga tate	14394
[1363]	<210> 8	
[1364]	<211> 1101	
[1365]	<212> DNA	
[1366]	<213> Sus scrofa	
[1367]	<400> 8	
[1368]	aataaatgca ctggtgggcc tatgctcaag atgggtagtg ttaattggtg gtggaactta	60
[1369]	tctgatttca tgacttctg gctacctaaa acaggtgagg agaaagccaa tgggactggg	120
[1370]	actggatgag caagtacaac aaacaaaatg ggcttaaagt atgagtgaga gttatctgac	180
[1371]	cgtaaggatg caagtgagg ggcctaaggt ttggagatta atatttaac tcagatgcta	240
[1372]	tactttggtg gtgtagcaaa agtctacaaa tgggatgact gtaaaactca gtagatccgt	300
[1373]	gctttttaa ctatctcct tcatcaggaa attgcgacac aaagatcttt agtaataaca	360
[1374]	cgcagtctca atgcataaaa tcaggcttag gtgttgctg gactcattc ccatctccac	420
[1375]	cccactataa ttattttgtg acacaaactc aagactgtgg gaatatagag aaattgggct	480
[1376]	cgctctgta cacctgctca atccccgca ggacaacgcc caagaatcag gttaagccag	540
[1377]	ggcaaaagaa tcccgccat aatcgagaag gagcaaacg acatggaggc gatgacgaga	600
[1378]	tcgcggggga gggagggatt tttctaggcc caggcggct cttaggaaaa ggaggcagca	660
[1379]	gagaactccc ataaaggtat tgcggcactc ccctcccct gcggagaagg gtgcggcctt	720
[1380]	ctctccgct cctccactgc agctccctca ggattgcagc tcgcgagggt ttttgagaa	780
[1381]	catgcgctc ccaccacaa gccagcagga ccgaccccc actccttct ccacccccca	840
[1382]	ccccacggg tccgagagca ggtagagagc tagtctctgc cttcaggcgg cggacgccc	900
[1383]	ggcggagcc gcagtcacca ccaccagaa gcctcggccc ggcagcccgc ccccgctcc	960
[1384]	tgcgcgct tctgcccag ttgcgaggc gcgagggcc agacactgcg gcgctggcct	1020
[1385]	cggggagggc cgtaccaaag accgctccc tgcgactcg cgtagtgggt tcgctcattt	1080

[1386] gggaccaag ccaataaca g 1101
 [1387] <210> 9
 [1388] <211> 1056
 [1389] <212> DNA
 [1390] <213> Sus scrofa
 [1391] <400> 9
 [1392] tgctctctct cctgccccct tcacctgctg gccctctca ttctcectct gtgccacctc 60
 [1393] tggccttgca ctgtaggctc tctcttgggg atgtttctct ttctccacac acttctcttt 120
 [1394] cactctgtcc tcttgctttg tgtgggcctg cagcgttacc ctttttctg ggcacactca 180
 [1395] gaccaccctc ctctttctgg ttctgggcca cctgtctgtc ctcgggtcat cttgctctct 240
 [1396] ctgcttgat gccctctgt ggctttgggc agcttctccc tccttcagag tgcaccgcca 300
 [1397] gttctcctag gcccggtcac ttccccctcc caggggacct agagccctgc taggtctctc 360
 [1398] ctctccaca cctgggcccc caaaccttc caaacacct tgctttctgc ctccattggt 420
 [1399] cttgtgttcc agagccagag tcaactatg tcccagaacc aggattccct ctggttctga 480
 [1400] gggcttttat cgcattccc gcctggctgc agtgggtctt tggggacagg ccacagaaga 540
 [1401] gctctactc ctccctctgt ccccgagct gtctccctcc cagtcttccc agctcaggcc 600
 [1402] agtccccagg cctctcttcc ctgccagagc ccgtcaggtt cggttacttt ggggccaga 660
 [1403] gaggacctg tgaaggaagc gtgggtaggg gcacgggaat ggggaggatg cctgaagagg 720
 [1404] ccccttagc cagaagagga gcagaagagg agcaggtacc cagaagagga gcagttcagg 780
 [1405] gaaatagaag agtcccagc tcttttttt ttttttttt atttctttt ttttctttc 840
 [1406] ttttatggc agcatccgtg gtatatggag gttcccagcc taggggtcag atcatacctg 900
 [1407] caactgccag cctacaccac agccacagca ctcaggatcc gagctgcatc tgcggcttac 960
 [1408] gccacaggc acagcaacgc tggatcctta acccactgaa tgaggccagg gattgaacct 1020
 [1409] gcaacctcat gcacactatg ctgggtctt aatcgg 1056
 [1410] <210> 10
 [1411] <211> 1108
 [1412] <212> DNA
 [1413] <213> Sus scrofa
 [1414] <400> 10
 [1415] acttctctc gcccttacc tttatctggt tcttagctcc taaaaactgc attattagct 60
 [1416] tctcttttg cctctactct tactcaacca aaattgtttt aagatctgtg gatctagctt 120
 [1417] ctgctgtgct attcttagga acacttttat ttctcttag ctccatctca ccagttattg 180
 [1418] gctaatggct ttgcttggtta cctacatctg tacatttctt tcgtactagc ttctagactg 240
 [1419] aaaaaggact gttggttcaa catgaaaggg aaggaggtaa aagaggacac acaggaaaga 300
 [1420] tggattggga ttcaggtctc tgctgttgtt acttgagatt gctttctaga ttctacttgt 360
 [1421] ggaaacaaaa agcctttgcg agaattctaa actggagtat ttctgtaatt gaggagtctt 420
 [1422] gctcagcaaa tcccacttag gggactaatg aagtaccagg aagagacaga ccatgctcaa 480
 [1423] tccacaaagc caggttttac tgaatgtga cctactttct tatgttctg gaagttttaga 540
 [1424] tcagggtggg cagctctggg ttttatagge tacactgtta acactcagge tgttttctac 600
 [1425] cgtttagtca aatatagtc accttgctg cttcacctgt ccatcagaga atggcctcat 660
 [1426] taattgactc tctagatga agtcaaagta gctttggtgg ccctaaatgg acaagtatca 720
 [1427] agagactggg tgaattgagg agcttgagac tgtcacctca gatcgaagg actgaaaaat 780

[1428]	cacctcagat caaaaagact gaaaaatctt cagtctggaa aggggactca aaaccataat	840
[1429]	tagagtattc tggtagaatc cttttctcca ctgttattca tacagttaag gtgaataact	900
[1430]	aaaagtaatt gtgagctgag gagtaagata caacacacaa ggaatcagtt aacagagtct	960
[1431]	cgagtgaat tataaatgga aagaattatg acttgaatca taactctgag gccccatttt	1020
[1432]	ccctaacaac ttttgcacca ataacgtgg gtatttgttt gggagaaact atcatataca	1080
[1433]	tgattacca gtaaacagac tgtttact	1108
[1434]	<210>	11
[1435]	<211>	1288
[1436]	<212>	DNA
[1437]	<213>	Sus scrofa
[1438]	<400>	11
[1439]	actttgtacc tattttgtat gtgtataata atttgagatg tttttaatta ttttgattgc	60
[1440]	tggaataaag catgtggaaa tgacccaaac caatcttga ctggcctcct gatttccttc	120
[1441]	cttgagacg gagggagggg gagacctggg ggagggcgct tggggggggg tgggctctct	180
[1442]	tctttctgcg ctccccccc ccacctcaa caccttgacg acccctctg ctcccgcttg	240
[1443]	cctttctcag gctttaaac tttctcctcg ccctctcagc atgcgcatgc gcgtgcctct	300
[1444]	acctccccg cacatcctgg cctgcccacc ctgaatgtcc tggcccagcg atgccaccaa	360
[1445]	ctctctcgt cctgcccagg ctggggaggg gggcactctg cagggttggg gggcactggg	420
[1446]	aggctgggtt gggtagggga ggggtgcctg ggccccacc cccagcaag ttctctcct	480
[1447]	aggcgaactg gaggtcgtc tggcctctg agccttgtg ctggctctga gctctaccaa	540
[1448]	gagagtgacc agcaggaccg caccatcagt ggttgctgag actgcgtggg ggcccaagga	600
[1449]	gacctggaga aaggaatgct tctgctcct tcttctggg cccagagaga gccttcccag	660
[1450]	ggccttgag agttgtgtc cagggactaa ccctgtgctc taggaaggct gcaggccctg	720
[1451]	accagctggg caggctctgg gtccctcctg gccttetaag ttccccaaac atgagacctc	780
[1452]	tgggtgtggg gtggcctggg gaggtcattt tgcccagcc ctacctctg cccattccta	840
[1453]	acccttttta aaaatctgtg cgtcctcttc ttcttcttc tccctcctt ccttttctgc	900
[1454]	tcaccctctg ctgctggcct gagagccgga ggccccagg gggaaggcga ctggtctcct	960
[1455]	cccagctctc agggaaagga gacagagaat ccaggaagcc agaactcagc agacgaagca	1020
[1456]	cccagggacc tagagatggg ttgaaaagt gacagctgtc ccacctgct cccaaggtct	1080
[1457]	cagggcctac acccttctcc gcagggggag gggagtgcc caatacctt atgggagttc	1140
[1458]	tctgtgcct ctttttcta aggaccgcc tgggcctaga aaaatccctc cctccccgc	1200
[1459]	gatctgtca tcgctccat gtcagtttgc tcttctcga ttatgggcgg gattcttttg	1260
[1460]	cctggcgcg cccagaccc gggcctgg	1288
[1461]	<210>	12
[1462]	<211>	20
[1463]	<212>	DNA
[1464]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1465]	<400>	12
[1466]	ggtcggagtg aacggatttg	20
[1467]	<210>	13
[1468]	<211>	25
[1469]	<212>	DNA

- [1470] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1471] <400> 13
[1472] caccgccaag aatcaggtta agcca 25
[1473] <210> 14
[1474] <211> 25
[1475] <212> DNA
[1476] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1477] <400> 14
[1478] aaactggcctt aacctgattc ttggc 25
[1479] <210> 15
[1480] <211> 25
[1481] <212> DNA
[1482] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1483] <400> 15
[1484] caccgcgaga aggagcaaac tgaca 25
[1485] <210> 16
[1486] <211> 25
[1487] <212> DNA
[1488] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1489] <400> 16
[1490] aaactgtcag tttgctcctt ctcgc 25
[1491] <210> 17
[1492] <211> 24
[1493] <212> DNA
[1494] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1495] <400> 17
[1496] caccgaagga gcaaactgac atgg 24
[1497] <210> 18
[1498] <211> 24
[1499] <212> DNA
[1500] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1501] <400> 18
[1502] aaacctatgt cagtttgctc cttc 24
[1503] <210> 19
[1504] <211> 25
[1505] <212> DNA
[1506] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1507] <400> 19
[1508] caccgcagga caacgcccaa gaatc 25
[1509] <210> 20
[1510] <211> 25
[1511] <212> DNA

- [1512] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1513] <400> 20
[1514] aaacgattct tgggcgttgt cctgc 25
[1515] <210> 21
[1516] <211> 25
[1517] <212> DNA
[1518] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1519] <400> 21
[1520] caccgaagac ccaactgcagc caggc 25
[1521] <210> 22
[1522] <211> 25
[1523] <212> DNA
[1524] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1525] <400> 22
[1526] aaacgcctgg ctgcagtggg tcttc 25
[1527] <210> 23
[1528] <211> 25
[1529] <212> DNA
[1530] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1531] <400> 23
[1532] caccggagga gtagaggctc ttctg 25
[1533] <210> 24
[1534] <211> 25
[1535] <212> DNA
[1536] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1537] <400> 24
[1538] aaaccagaag agcctctact cctcc 25
[1539] <210> 25
[1540] <211> 25
[1541] <212> DNA
[1542] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1543] <400> 25
[1544] caccgcccaa agaccactg cagcc 25
[1545] <210> 26
[1546] <211> 25
[1547] <212> DNA
[1548] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1549] <400> 26
[1550] aaacggctgc agtgggtctt tgggc 25
[1551] <210> 27
[1552] <211> 25
[1553] <212> DNA

- [1554] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1555] <400> 27
[1556] caccgtgcag tgggtctttg gggac 25
[1557] <210> 28
[1558] <211> 25
[1559] <212> DNA
[1560] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1561] <400> 28
[1562] aaacgtcccc aaagaccac tgac 25
[1563] <210> 29
[1564] <211> 25
[1565] <212> DNA
[1566] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1567] <400> 29
[1568] caccgtcca ggaacataag aaagt 25
[1569] <210> 30
[1570] <211> 25
[1571] <212> DNA
[1572] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1573] <400> 30
[1574] aaacactttc ttatgttct ggaac 25
[1575] <210> 31
[1576] <211> 25
[1577] <212> DNA
[1578] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1579] <400> 31
[1580] caccgtgttc ctggaagttt agatc 25
[1581] <210> 32
[1582] <211> 25
[1583] <212> DNA
[1584] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1585] <400> 32
[1586] aaacgatcta aacttcagg aacac 25
[1587] <210> 33
[1588] <211> 25
[1589] <212> DNA
[1590] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1591] <400> 33
[1592] caccgaggct aactgttaa cactc 25
[1593] <210> 34
[1594] <211> 25
[1595] <212> DNA

- [1596] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1597] <400> 34
[1598] aaacgagtgt taacagtgta gcctc 25
[1599] <210> 35
[1600] <211> 25
[1601] <212> DNA
[1602] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1603] <400> 35
[1604] caccggacct actttcttat gttcc 25
[1605] <210> 36
[1606] <211> 25
[1607] <212> DNA
[1608] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1609] <400> 36
[1610] aaacgaaca taagaaagta ggtcc 25
[1611] <210> 37
[1612] <211> 25
[1613] <212> DNA
[1614] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1615] <400> 37
[1616] caccgctacc aagagagtga ccage 25
[1617] <210> 38
[1618] <211> 25
[1619] <212> DNA
[1620] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1621] <400> 38
[1622] aaacgctggt cactctcttg gtagc 25
[1623] <210> 39
[1624] <211> 25
[1625] <212> DNA
[1626] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1627] <400> 39
[1628] caccgggtcc tgctggtcac tctct 25
[1629] <210> 40
[1630] <211> 25
[1631] <212> DNA
[1632] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1633] <400> 40
[1634] aaacagagag tgaccagcag gaccc 25
[1635] <210> 41
[1636] <211> 25
[1637] <212> DNA

- [1638] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1639] <400> 41
[1640] caccggcagt ctcagcaacc actga 25
[1641] <210> 42
[1642] <211> 25
[1643] <212> DNA
[1644] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1645] <400> 42
[1646] aaactcagtg gttgctgaga ctgcc 25
[1647] <210> 43
[1648] <211> 25
[1649] <212> DNA
[1650] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1651] <400> 43
[1652] caccgagcca gcaacaaggc tcaag 25
[1653] <210> 44
[1654] <211> 25
[1655] <212> DNA
[1656] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1657] <400> 44
[1658] aaaccttgag ccttgttget ggctc 25
[1659] <210> 45
[1660] <211> 20
[1661] <212> DNA
[1662] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1663] <400> 45
[1664] ccaagaatca ggttaagcca 20
[1665] <210> 46
[1666] <211> 20
[1667] <212> DNA
[1668] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1669] <400> 46
[1670] cgagaaggag caaactgaca 20
[1671] <210> 47
[1672] <211> 20
[1673] <212> DNA
[1674] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1675] <400> 47
[1676] gaaggagcaa actgacatgg 20
[1677] <210> 48
[1678] <211> 20
[1679] <212> DNA

- [1680] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1681] <400> 48
[1682] caggacaacg cccaagaatc 20
[1683] <210> 49
[1684] <211> 20
[1685] <212> DNA
[1686] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1687] <400> 49
[1688] aagaccact gcagccaggc 20
[1689] <210> 50
[1690] <211> 20
[1691] <212> DNA
[1692] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1693] <400> 50
[1694] gaggagtaga ggctcttctg 20
[1695] <210> 51
[1696] <211> 20
[1697] <212> DNA
[1698] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1699] <400> 51
[1700] cccaaagacc cactgcagcc 20
[1701] <210> 52
[1702] <211> 20
[1703] <212> DNA
[1704] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1705] <400> 52
[1706] tgcagtgggt ctttggggac 20
[1707] <210> 53
[1708] <211> 20
[1709] <212> DNA
[1710] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1711] <400> 53
[1712] ttccaggaac ataagaaagt 20
[1713] <210> 54
[1714] <211> 20
[1715] <212> DNA
[1716] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1717] <400> 54
[1718] tgttcttggga agtttagatc 20
[1719] <210> 55
[1720] <211> 20
[1721] <212> DNA

- [1722] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1723] <400> 55
[1724] aggtacact gttaacactc 20
[1725] <210> 56
[1726] <211> 20
[1727] <212> DNA
[1728] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1729] <400> 56
[1730] gacctacttt cttatgttcc 20
[1731] <210> 57
[1732] <211> 20
[1733] <212> DNA
[1734] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1735] <400> 57
[1736] ctaccaagag agtgaccagc 20
[1737] <210> 58
[1738] <211> 20
[1739] <212> DNA
[1740] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1741] <400> 58
[1742] ggtcctgctg gtcactctct 20
[1743] <210> 59
[1744] <211> 20
[1745] <212> DNA
[1746] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1747] <400> 59
[1748] gcagtctcag caaccactga 20
[1749] <210> 60
[1750] <211> 20
[1751] <212> DNA
[1752] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1753] <400> 60
[1754] agccagcaac aaggctcaag 20
[1755] <210> 61
[1756] <211> 20
[1757] <212> DNA
[1758] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1759] <400> 61
[1760] agttatggca gaactcagtg 20
[1761] <210> 62
[1762] <211> 23
[1763] <212> DNA

- [1764] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1765] <400> 62
[1766] ccccatccaa agtttttaaa gga 23
[1767] <210> 63
[1768] <211> 23
[1769] <212> DNA
[1770] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1771] <400> 63
[1772] tgtggcagat gtcacagttt agg 23
[1773] <210> 64
[1774] <211> 25
[1775] <212> DNA
[1776] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1777] <400> 64
[1778] caccgagtta tggcagaact cagtg 25
[1779] <210> 65
[1780] <211> 25
[1781] <212> DNA
[1782] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1783] <400> 65
[1784] aaaccactga gttctgcat aactc 25
[1785] <210> 66
[1786] <211> 23
[1787] <212> DNA
[1788] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1789] <400> 66
[1790] acaggtgagg agaaagccaa tgg 23
[1791] <210> 67
[1792] <211> 20
[1793] <212> DNA
[1794] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1795] <400> 67
[1796] ctgcgcaacg tggcaggaag 20
[1797] <210> 68
[1798] <211> 25
[1799] <212> DNA
[1800] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1801] <400> 68
[1802] gcataaaatc aggcttaggt gttgc 25
[1803] <210> 69
[1804] <211> 21
[1805] <212> DNA

- [1806] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1807] <400> 69
[1808] ggtgggaggc gcatgttctc c 21
[1809] <210> 70
[1810] <211> 23
[1811] <212> DNA
[1812] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1813] <400> 70
[1814] gactcatttc ccactccac ccc 23
[1815] <210> 71
[1816] <211> 23
[1817] <212> DNA
[1818] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1819] <400> 71
[1820] atgggtgctt gagtggctt gac 23
[1821] <210> 72
[1822] <211> 23
[1823] <212> DNA
[1824] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1825] <400> 72
[1826] gggtaaggac tatggagggt agc 23
[1827] <210> 73
[1828] <211> 23
[1829] <212> DNA
[1830] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1831] <400> 73
[1832] tctctgctgc ctcctttcc taa 23
[1833] <210> 74
[1834] <211> 20
[1835] <212> DNA
[1836] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1837] <400> 74
[1838] ccatttgatg ttggcgggat 20
[1839] <210> 75
[1840] <211> 49
[1841] <212> DNA
[1842] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1843] <400> 75
[1844] tctgttata gatatcgcg cgcctctac ctgctctcg acccgtggg 49
[1845] <210> 76
[1846] <211> 51
[1847] <212> DNA

- [1848] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1849] <400> 76
[1850] ccaggcccggtgtctggggcg cgccagggca aaagaatccc gcccataatc g 51
[1851] <210> 77
[1852] <211> 45
[1853] <212> DNA
[1854] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1855] <400> 77
[1856] agccattgta cgcgttgctt aacctgattc ttgggcgttg tcctg 45
[1857] <210> 78
[1858] <211> 50
[1859] <212> DNA
[1860] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1861] <400> 78
[1862] cttttatggc ggccgataa gtactttttg taggcatgtg tggaaaattg 50
[1863] <210> 79
[1864] <211> 23
[1865] <212> DNA
[1866] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1867] <400> 79
[1868] ctgtaggctc tctcttgggg atg 23
[1869] <210> 80
[1870] <211> 23
[1871] <212> DNA
[1872] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1873] <400> 80
[1874] agccgattaa gaccccagca tag 23
[1875] <210> 81
[1876] <211> 23
[1877] <212> DNA
[1878] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1879] <400> 81
[1880] tgctaggtcc tctctetcca caa 23
[1881] <210> 82
[1882] <211> 23
[1883] <212> DNA
[1884] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1885] <400> 82
[1886] ctcttcaggc atctcccaca ttc 23
[1887] <210> 83
[1888] <211> 22
[1889] <212> DNA

- [1890] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1891] <400> 83
[1892] cgtgctgagt ccttttccca tc 22
[1893] <210> 84
[1894] <211> 23
[1895] <212> DNA
[1896] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1897] <400> 84
[1898] ccccaaagta accgaacctg acg 23
[1899] <210> 85
[1900] <211> 23
[1901] <212> DNA
[1902] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1903] <400> 85
[1904] ctgcctccat tggctttgtg ttc 23
[1905] <210> 86
[1906] <211> 21
[1907] <212> DNA
[1908] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1909] <400> 86
[1910] gtgcagctcc tcaggaagtg g 21
[1911] <210> 87
[1912] <211> 56
[1913] <212> DNA
[1914] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1915] <400> 87
[1916] tcttgttata gatatcggcg cgccgtgctg agtccttttc ccatcccacc cacctg 56
[1917] <210> 88
[1918] <211> 47
[1919] <212> DNA
[1920] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1921] <400> 88
[1922] ccaggccccg gtctggggcg cccaaagacc cactgcagcc aggcagg 47
[1923] <210> 89
[1924] <211> 46
[1925] <212> DNA
[1926] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1927] <400> 89
[1928] agccattgta cgcgttgac aggccacaga agagcctcta ctctc 46
[1929] <210> 90
[1930] <211> 44
[1931] <212> DNA

- [1932] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1933] <400> 90
[1934] cttttatggc ggccgcattt tcctgaact gctcctcttc tggg 44
[1935] <210> 91
[1936] <211> 24
[1937] <212> DNA
[1938] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1939] <400> 91
[1940] tggctttgct tggctacctac atct 24
[1941] <210> 92
[1942] <211> 23
[1943] <212> DNA
[1944] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1945] <400> 92
[1946] ttagggaaaa tggggcctca gag 23
[1947] <210> 93
[1948] <211> 23
[1949] <212> DNA
[1950] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1951] <400> 93
[1952] tgcgagaatt ctaaactgga gta 23
[1953] <210> 94
[1954] <211> 23
[1955] <212> DNA
[1956] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1957] <400> 94
[1958] ggtgacagtc tcaagctcct caa 23
[1959] <210> 95
[1960] <211> 23
[1961] <212> DNA
[1962] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1963] <400> 95
[1964] agacagacca tgctcaatcc aca 23
[1965] <210> 96
[1966] <211> 23
[1967] <212> DNA
[1968] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1969] <400> 96
[1970] gatgcccgat gttgtcaatc ctg 23
[1971] <210> 97
[1972] <211> 23
[1973] <212> DNA

- [1974] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1975] <400> 97
[1976] aagatactca gcagcagtct cct 23
[1977] <210> 98
[1978] <211> 23
[1979] <212> DNA
[1980] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1981] <400> 98
[1982] gatggacagg tgaagcaggc aag 23
[1983] <210> 99
[1984] <211> 52
[1985] <212> DNA
[1986] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1987] <400> 99
[1988] tcttgtata gatatcgcg cgcccaaata cccacgttta ttggacaaa ag 52
[1989] <210> 100
[1990] <211> 50
[1991] <212> DNA
[1992] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1993] <400> 100
[1994] ccagccccgg gtctggggcg cgttcttatg ttcttgaag tttagatcag 50
[1995] <210> 101
[1996] <211> 44
[1997] <212> DNA
[1998] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1999] <400> 101
[2000] agccattgta cgcgttgagt aggtcacatt tcagtaaac ctgg 44
[2001] <210> 102
[2002] <211> 48
[2003] <212> DNA
[2004] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2005] <400> 102
[2006] cttttatggc ggccgcatct tttctacggc cacttccagg gcatatgg 48
[2007] <210> 103
[2008] <211> 23
[2009] <212> DNA
[2010] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2011] <400> 103
[2012] tgacccaaac caatcttgca ctg 23
[2013] <210> 104
[2014] <211> 23
[2015] <212> DNA

- [2016] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2017] <400> 104
[2018] tgagttctgg cttcctggat tct 23
[2019] <210> 105
[2020] <211> 22
[2021] <212> DNA
[2022] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2023] <400> 105
[2024] gatgccacca actctctcgc tc 22
[2025] <210> 106
[2026] <211> 23
[2027] <212> DNA
[2028] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2029] <400> 106
[2030] ccagaggtct catgtttggg gaa 23
[2031] <210> 107
[2032] <211> 23
[2033] <212> DNA
[2034] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2035] <400> 107
[2036] ccgctctggt ccttgccctaa ttg 23
[2037] <210> 108
[2038] <211> 20
[2039] <212> DNA
[2040] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2041] <400> 108
[2042] agcaactctc caaggccctg 20
[2043] <210> 109
[2044] <211> 22
[2045] <212> DNA
[2046] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2047] <400> 109
[2048] gcaagttctc tcctaggcg aa 22
[2049] <210> 110
[2050] <211> 23
[2051] <212> DNA
[2052] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2053] <400> 110
[2054] gcaaactcaa aggcaaactc agc 23
[2055] <210> 111
[2056] <211> 53
[2057] <212> DNA

- [2058] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2059] <400> 111
[2060] tcttgttata gatatcggcg cgccggatgg ggactcatgt gaattttcta aag 53
[2061] <210> 112
[2062] <211> 53
[2063] <212> DNA
[2064] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2065] <400> 112
[2066] ccaggcccgg gtctggggcg cgtgatggg cggtcctgct ggtcactctc ttg 53
[2067] <210> 113
[2068] <211> 47
[2069] <212> DNA
[2070] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2071] <400> 113
[2072] agccattgta cgcgttggtg gttgctgaga ctgcgtgggg gcccaag 47
[2073] <210> 114
[2074] <211> 46
[2075] <212> DNA
[2076] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2077] <400> 114
[2078] cttttatggc ggccgcatat aggaacaaac ttttgtttac tagctg 46
[2079] <210> 115
[2080] <211> 100
[2081] <212> DNA/RNA
[2082] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2083] <400> 115
[2084] ccaagaauca guuaagcca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
[2085] cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
[2086] <210> 116
[2087] <211> 100
[2088] <212> DNA/RNA
[2089] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2090] <400> 116
[2091] cgagaaggag caaacugaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
[2092] cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
[2093] <210> 117
[2094] <211> 100
[2095] <212> DNA/RNA
[2096] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2097] <400> 117
[2098] gaaggagcaa acugacaugg guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
[2099] cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

- [2100] <210> 118
[2101] <211> 100
[2102] <212> DNA/RNA
[2103] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2104] <400> 118
[2105] caggacaacg cccaagaauuc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaaau aaggcuaguc 60
[2106] cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
[2107] <210> 119
[2108] <211> 100
[2109] <212> DNA/RNA
[2110] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2111] <400> 119
[2112] aagaccacu gcagccagc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaaau aaggcuaguc 60
[2113] cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
[2114] <210> 120
[2115] <211> 100
[2116] <212> DNA/RNA
[2117] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2118] <400> 120
[2119] gaggaguaga ggcucuucug guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaaau aaggcuaguc 60
[2120] cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
[2121] <210> 121
[2122] <211> 100
[2123] <212> DNA/RNA
[2124] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2125] <400> 121
[2126] cccaagacc cacugcagcc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaaau aaggcuaguc 60
[2127] cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
[2128] <210> 122
[2129] <211> 100
[2130] <212> DNA/RNA
[2131] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2132] <400> 122
[2133] ugcagugggu cuuuggggac guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaaau aaggcuaguc 60
[2134] cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
[2135] <210> 123
[2136] <211> 100
[2137] <212> DNA/RNA
[2138] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2139] <400> 123
[2140] uuccaggaac auaagaaagu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaaau aaggcuaguc 60
[2141] cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

- [2142] <210> 124
[2143] <211> 100
[2144] <212> DNA/RNA
[2145] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2146] <400> 124
[2147] uguuccugga aguuuagauc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaaau aaggcuaguc 60
[2148] cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
[2149] <210> 125
[2150] <211> 100
[2151] <212> DNA/RNA
[2152] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2153] <400> 125
[2154] aggcucacacu guuaacacuc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaaau aaggcuaguc 60
[2155] cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
[2156] <210> 126
[2157] <211> 100
[2158] <212> DNA/RNA
[2159] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2160] <400> 126
[2161] gaccuacuuu cuuanguucc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaaau aaggcuaguc 60
[2162] cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
[2163] <210> 127
[2164] <211> 100
[2165] <212> DNA/RNA
[2166] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2167] <400> 127
[2168] cuaccaagag agugaccagc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaaau aaggcuaguc 60
[2169] cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
[2170] <210> 128
[2171] <211> 100
[2172] <212> DNA/RNA
[2173] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2174] <400> 128
[2175] gguccugcug gucacucucu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaaau aaggcuaguc 60
[2176] cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
[2177] <210> 129
[2178] <211> 100
[2179] <212> DNA/RNA
[2180] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2181] <400> 129
[2182] gcagucucag caaccacuga guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaaau aaggcuaguc 60
[2183] cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

- [2184] <210> 130
[2185] <211> 100
[2186] <212> DNA/RNA
[2187] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2188] <400> 130
[2189] agccagcaac aaggcucaag guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
[2190] cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
[2191] <210> 131
[2192] <211> 20
[2193] <212> DNA
[2194] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2195] <400> 131
[2196] agatccgcca caacatcgag 20
[2197] <210> 132
[2198] <211> 20
[2199] <212> DNA
[2200] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2201] <400> 132
[2202] gtccatgccg agagtgatcc 20

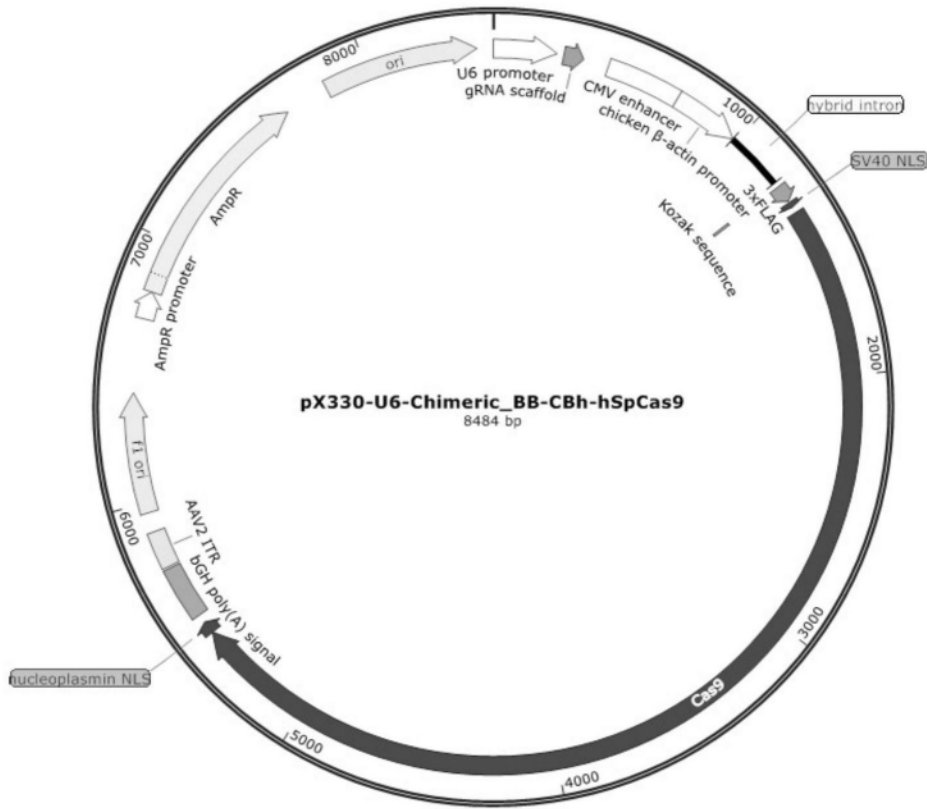


图1

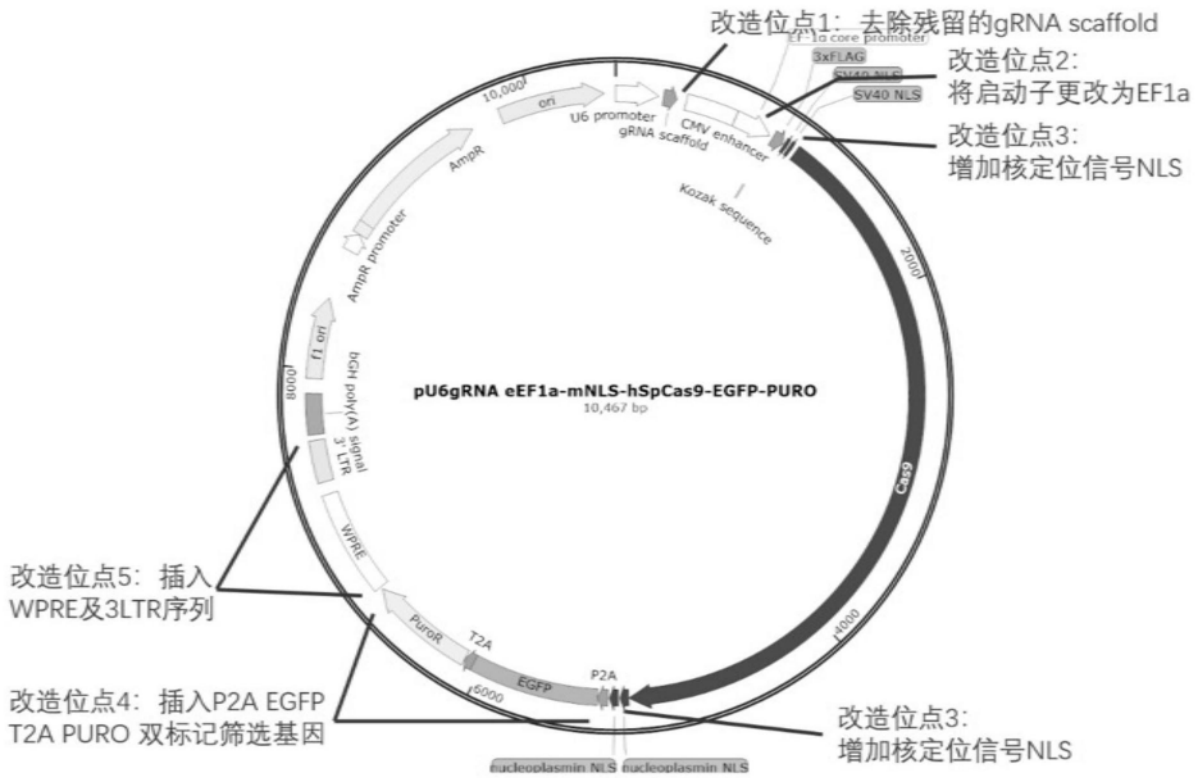


图2



图3

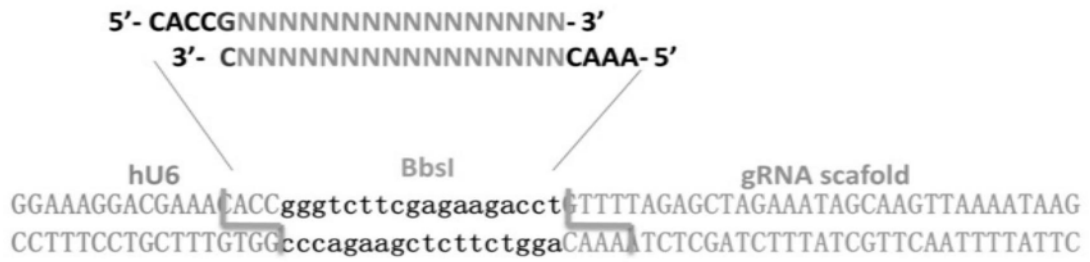


图4



图5



图6



图7

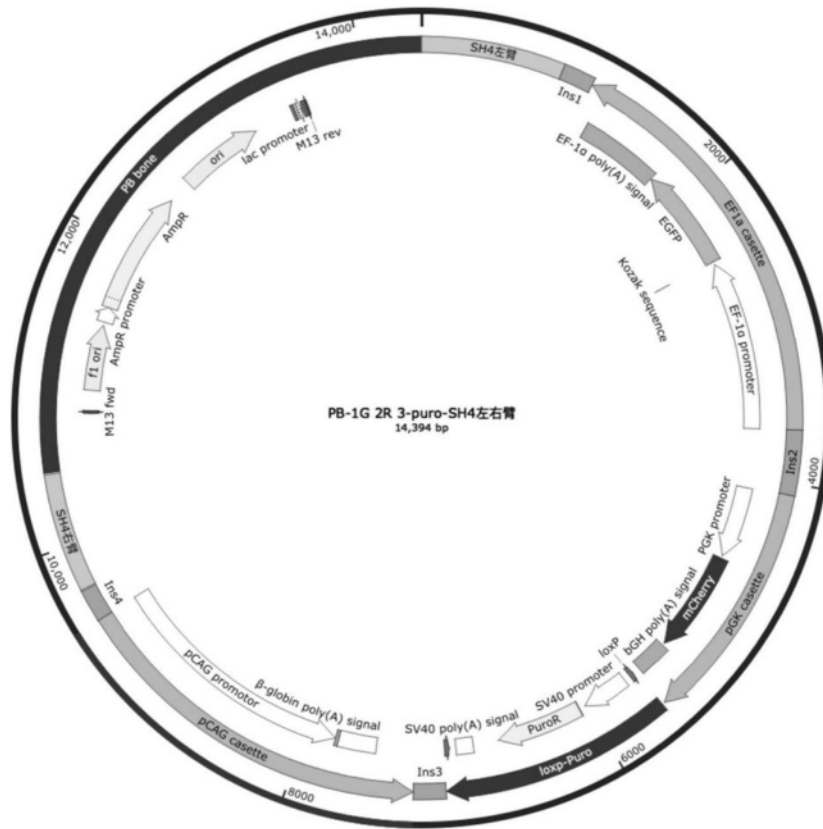
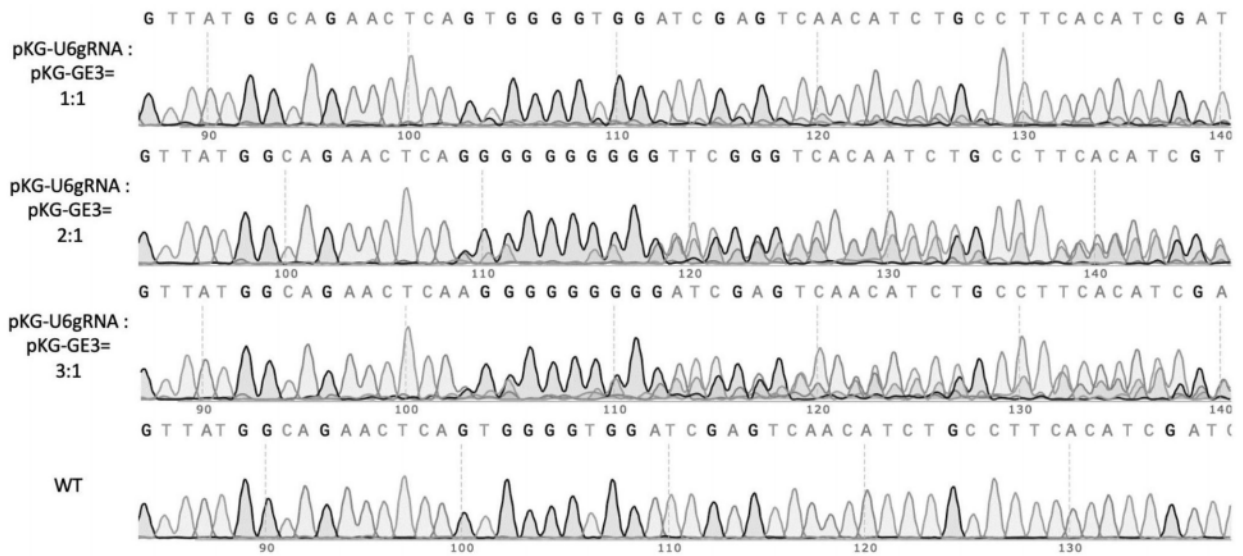
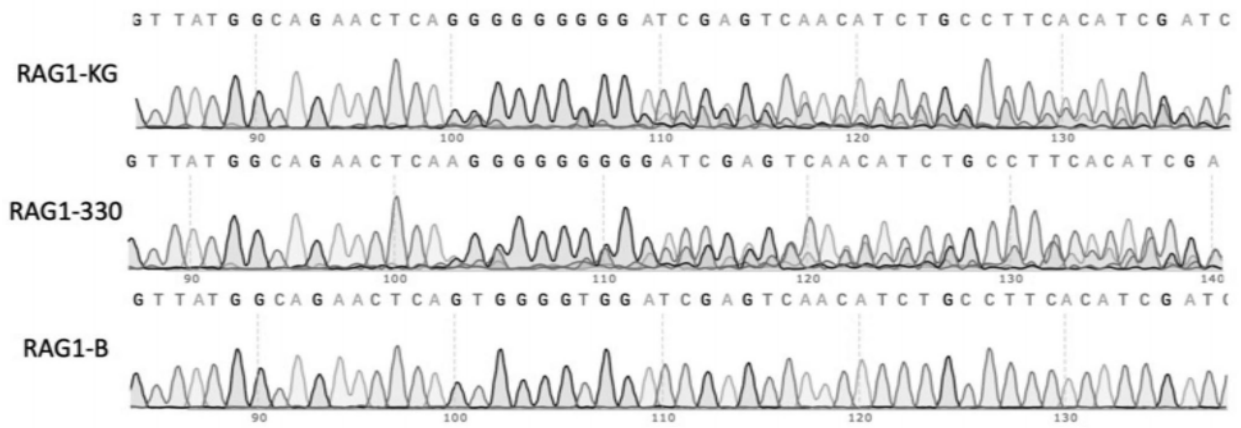


图8



A



B

图9

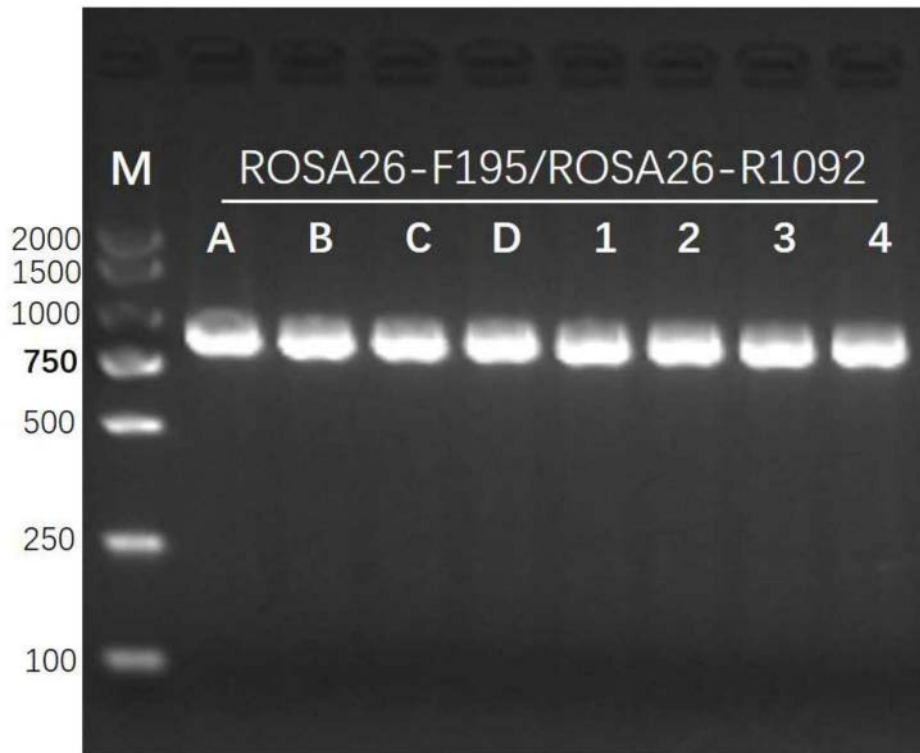


图10

5' CACCGCCAAGAATCAGGTTAAGCCA 3'
|||||
3' CGGTTCTTAGTCCAATTCGGTCAAA 5'

A

5' CACCGCGAGAAGGAGCAAAGTACA 3'
|||||
3' CGCTCTTCCTCGTTTGACTGTCAAA 5'

B

5' CACCGAAGGAGCAAAGTACATGG 3'
|||||
3' CTCCTCGTTTGACTGTACCCAAA 5'

C

5' CACCGCAGGACAACGCCCAAGAATC 3'
|||||
3' CGTCCTGTTGCGGGTCTTAGCAAA 5'

D

图11

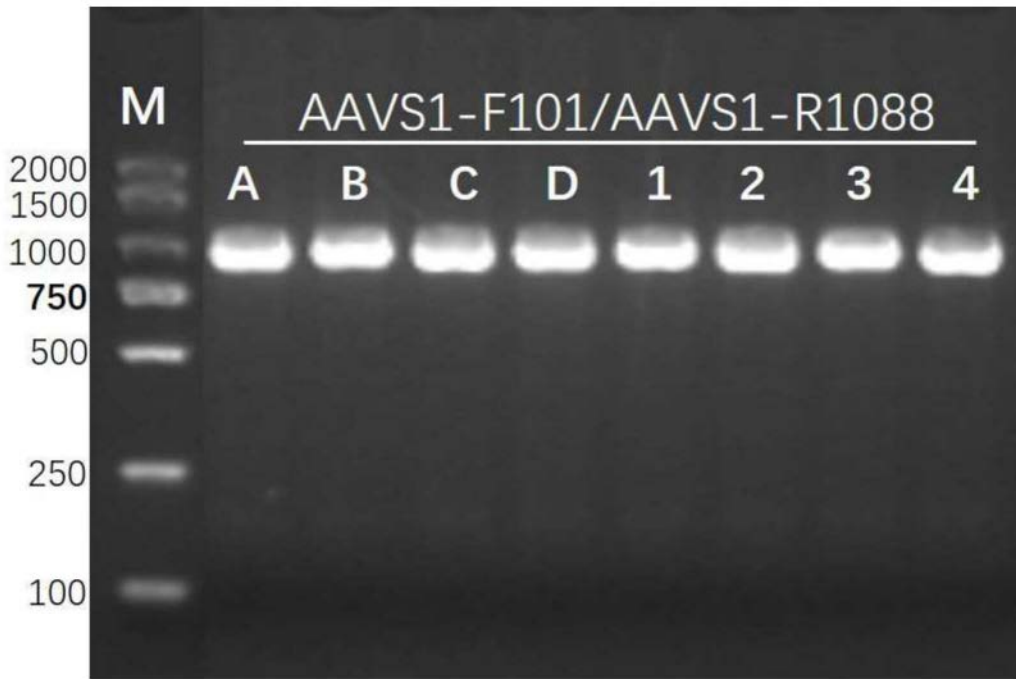


图12

5' CACCGAAGACCCACTGCAGCCAGGC 3'
|||||
3' CTTCTGGGTGACGTCGGTCCGCAA 5'

A

5' CACCGGAGGAGTAGAGGCTCTTCTG 3'
|||||
3' CCTCCTCATCTCCGAGAAGACCAA 5'

B

5' CACCGCCCAAAGACCCACTGCAGCC 3'
|||||
3' CGGGTTTCTGGGTGACGTCGGCAA 5'

C

5' CACCGTGCAGTGGGTCTTTGGGGAC 3'
|||||
3' CACGTCACCCAGAAACCCCTGCAA 5'

D

图13

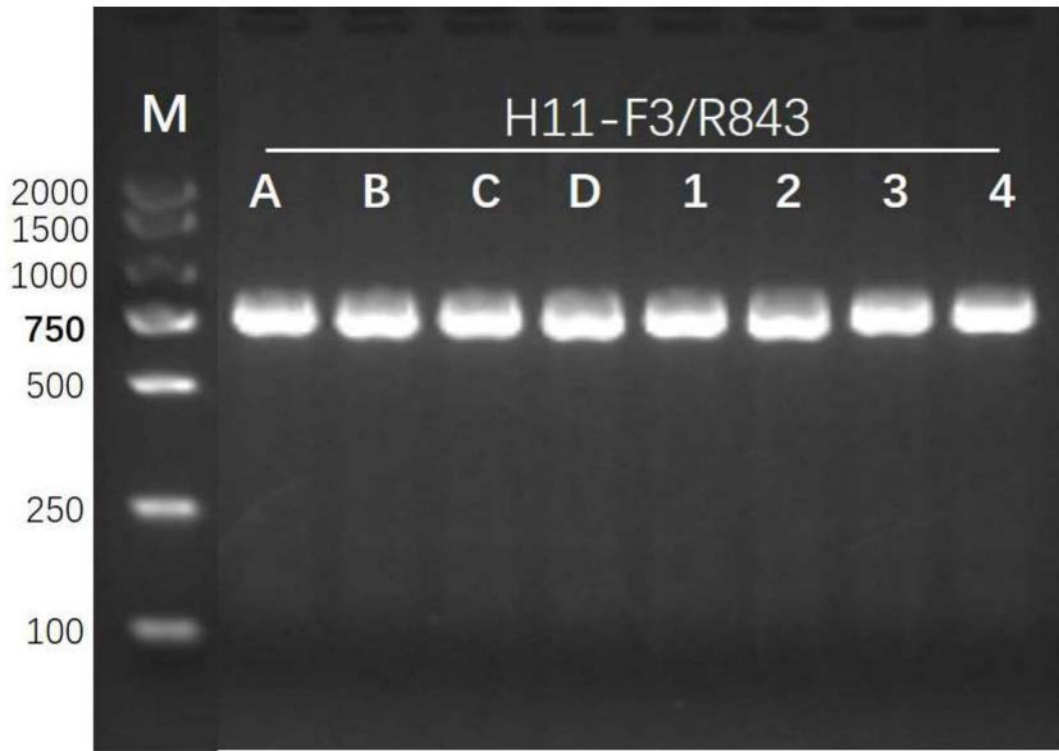


图14

5' CACCGTTCCAGGAACATAAGAAAGT 3'
|||||
3' CAAGGTCCTTGTATTCTTTCACAAA 5'

A

5' CACCGTGTTCCCTGGAAGTTTAGATC 3'
|||||
3' CACAAGGACCTTCAAATCTAGCAAA 5'

B

5' CACCGAGGCTACACTGTAAACACTC 3'
|||||
3' CTCCGATGTGACAATTGTGAGCAAA 5'

C

5' CACCGGACCTACTTTCTTATGTTCC 3'
|||||
3' CCTGGATGAAAGAATACAAGGCAAA 5'

D

图15

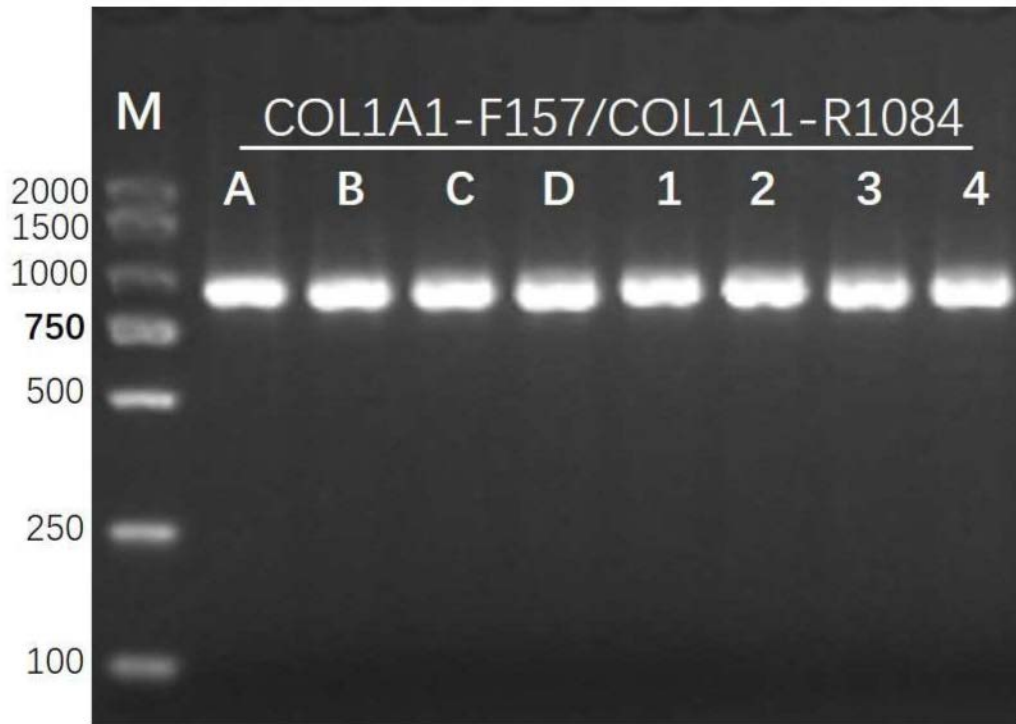


图16

5' CACCGCTACCAAGAGAGTGACCAGC 3'
 |||
 3' CGATGGTTCTCTCACTGGTCGCAAA 5'

A

5' CACCGGGTCCTGCTGGTCACTCTCT 3'
 |||
 3' CCCAGGACGACCAGTGAGAGACAAA 5'

B

5' CACCGGCAGTCTCAGCAACCACTGA 3'
 |||
 3' CCGTCAGAGTCGTTGGTGA CTCAA 5'

C

5' CACCGAGCCAGCAACAAGGCTCAAG 3'
 |||
 3' CTCGGTCGTTGTTCCGAGTTCCAAA 5'

D

图17

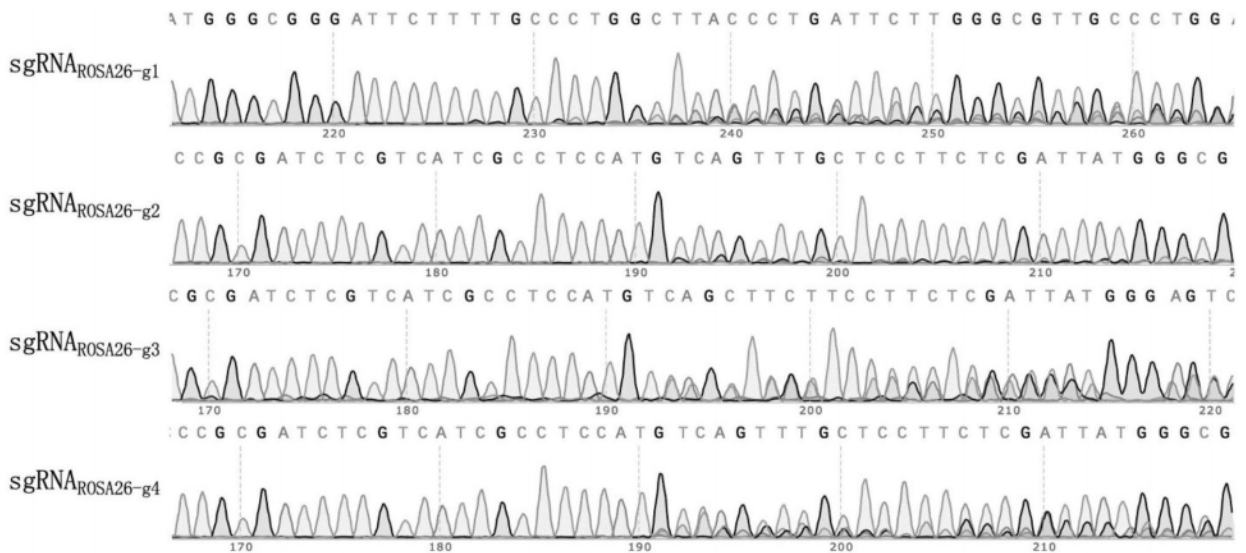


图18

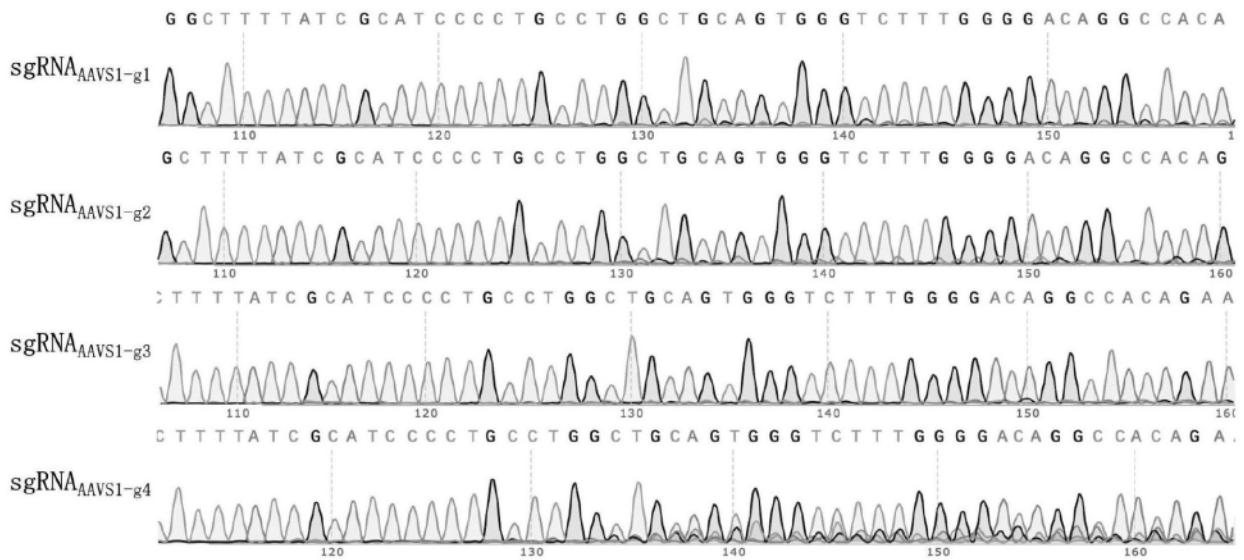


图19

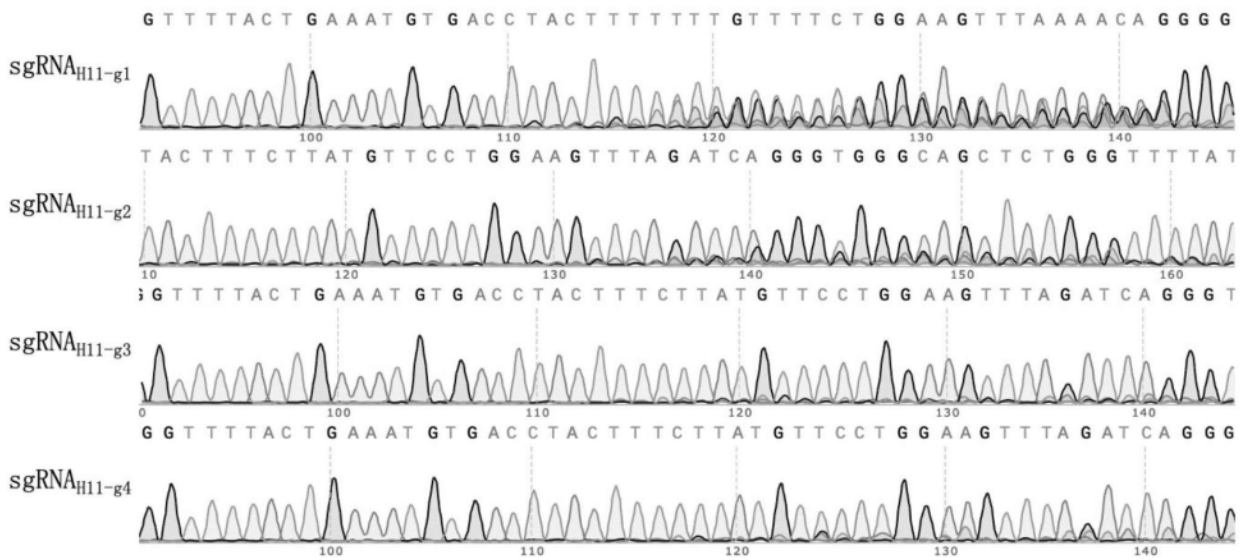


图20

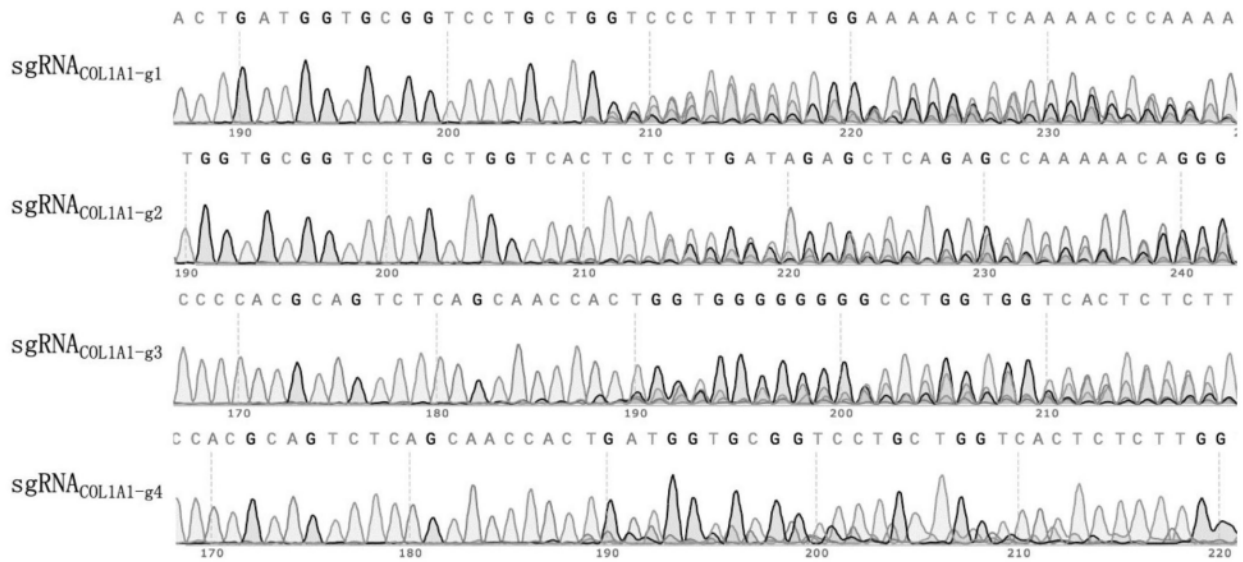


图21

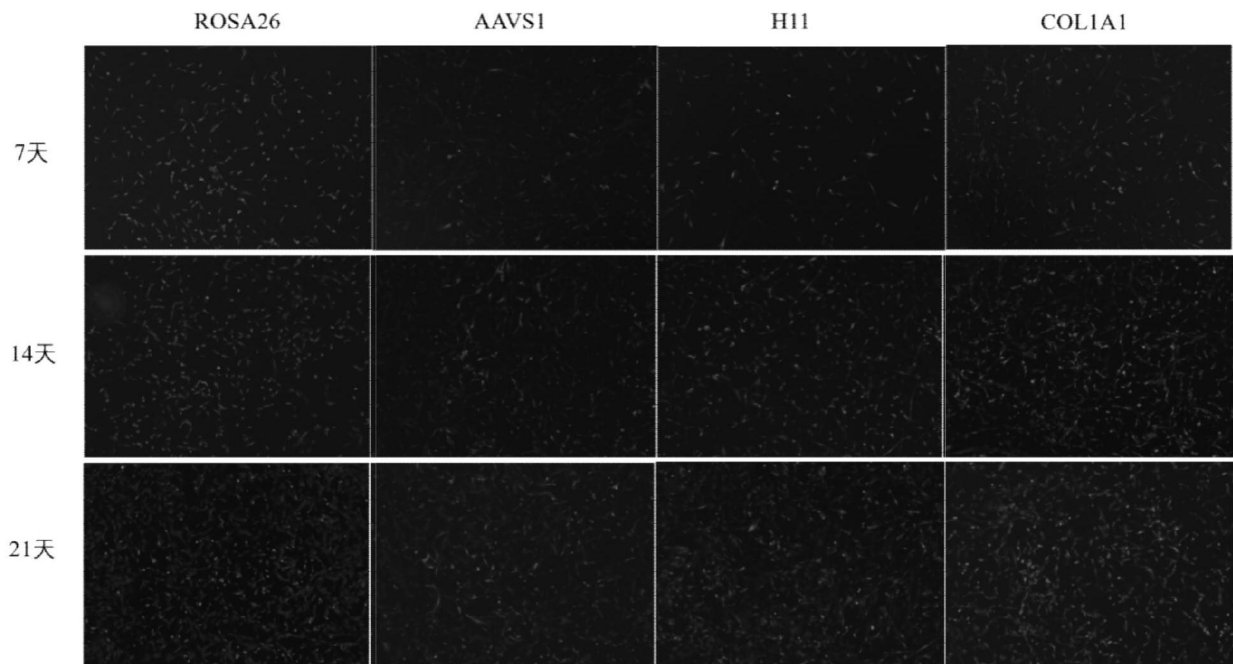


图22

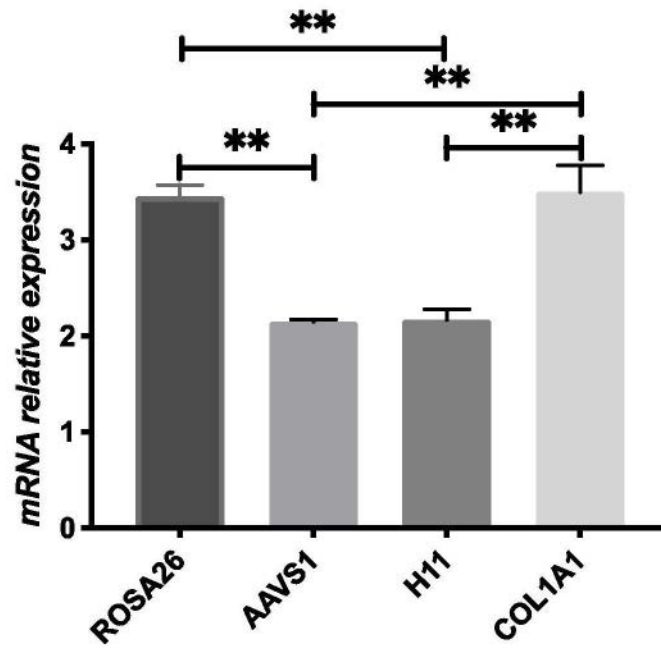


图23

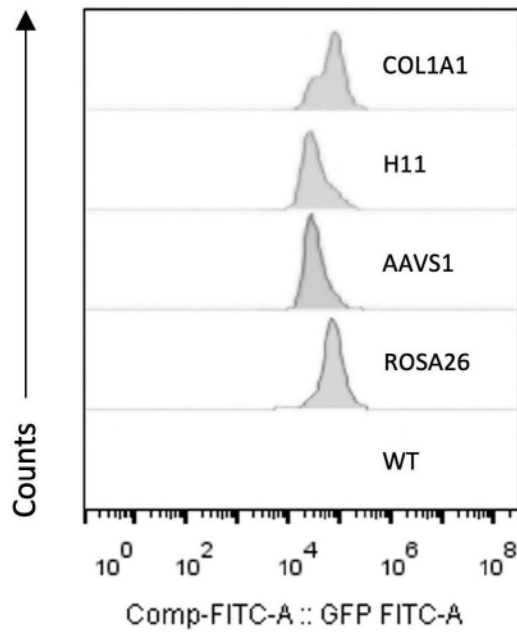


图24