



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107002020 B

(45) 授权公告日 2021.12.21

(21) 申请号 201580056204.X

(22) 申请日 2015.07.21

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107002020 A

(43) 申请公布日 2017.08.01

(30) 优先权数据
62/036652 2014.08.13 US(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.04.13(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2015/041256 2015.07.21(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/025131 EN 2016.02.18(73) 专利权人 纳幕尔杜邦公司
地址 美国特拉华州

(72) 发明人 R. 弗里施 X. 范 S-P. 洪

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 唐华东 黄希贵

(51) Int. Cl.

C12N 1/19 (2006.01)

(续)

(56) 对比文件

CN 103945689 A, 2014.07.23

Yangbin Gao等. Self-processing of
ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs in
vitro and in vivo for CRISPR-mediated
genome editing.《Journal of Integrative
Plant Biology》.2014,第56卷(第4期),Yangbin Gao等. Self-processing of
ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs in
vitro and in vivo for CRISPR-mediated
genome editing.《Journal of Integrative
Plant Biology》.2014,第56卷(第4期),Yangbin Gao等. Self-processing of
ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs in
vitro and in vivo for CRISPR-mediated
genome editing.《Journal of Integrative
Plant Biology》.2014,第56卷(第4期),James E.DiCarlo等. Genome engineering
in Saccharomyces cerevisiae using CRISPR-
Cas systems.《Nucleic Acids Research》
.2013,第41卷(第7期), (续)

审查员 王晶晶

权利要求书3页 说明书64页

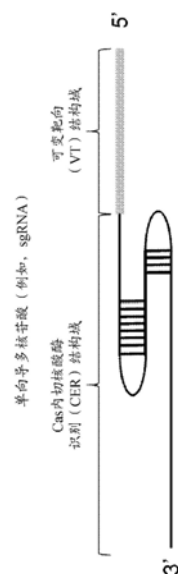
序列表164页 附图26页

(54) 发明名称

使用RNA引导的内切核酸酶在非常规酵母中
基因靶向

(57) 摘要

本文公开了非常规酵母,其包含至少一种RNA引导的内切核酸酶(RGEN),所述RNA引导的内切核酸酶包含至少一种不具有5'端的RNA组分。该未封端的RNA组分包含与酵母中的染色体或附加体中的靶位点序列互补的序列。RGEN可结合到,并任选地切割靶位点序列处的一个或两个DNA链。本文的RGEN的示例是Cas9蛋白质与向导RNA的复合物。在某些实施方案中使用核酶以提供缺乏5'端的RNA组分。本文还公开了在非常规酵母中基因靶向的方法。



[转续页]

[接上页]

(51) Int.Cl.

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/55 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/90 (2006.01)

(56) 对比文件

Andrei A.Sibirny等.Thematic section
'Biochemistry, Genetics, Biotechnology
and Ecology of Non-conventional Yeasts'.
《FEMS Yeast Research》.2002,第2卷

Rachel E. Haurwitz等.Sequence- and
Structure-Specific RNA Processing by a
CRISPR Endonuclease.《SCIENCE》.2010,第329
卷(第1355期),

Jake Z. Jacobs.Implementation of the
CRISPR-Cas9 system.《NATURE
COMMUNICATIONS》.2014,

齐波.CRISPR干扰:一种由假说到现实的基
因沉默技术.《遵义医学院学报》.2014,第37卷
(第3期),第348-352页.

1. 一种不是糖酵母属 (*Saccharomyces*) 或裂殖酵母属 (*Schizosaccharomyces*) 物种的酵母, 其包含Cas内切核酸酶和多核苷酸序列, 所述多核苷酸序列包含可操作地连接至至少一个核苷酸序列的RNA聚合酶II启动子, 其中所述核苷酸序列包含编码核酶的DNA序列、编码RNA组分的DNA序列和转录终止序列, 其中所述编码核酶的DNA序列位于所述编码RNA组分的DNA序列的上游, 且所述转录终止序列位于所述编码RNA组分的DNA序列的下游, 并且所述核苷酸序列不包含位于核酶-RNA组分下游的核酶序列, 其中所述RNA组分包含与所述酵母中的染色体或附加体上的靶位点序列互补的可变靶向结构域, 且其中所述RNA组分和所述Cas内切核酸酶能够形成RNA-引导的内切核酸酶 (RGEN), 其中所述RGEN能够结合到所述靶位点序列。

2. 权利要求1的酵母, 其中 (i) 所述RGEN能够结合到并切割所述靶位点序列, 和/或 (ii) 所述酵母为选自下列的属的成员: 耶氏酵母属、毕赤酵母属、许旺氏酵母属、克鲁维酵母属、*Arxula*属、丝孢酵母属、假丝酵母属、黑粉菌属、球拟酵母属、接合酵母属、三角酵母属、隐球酵母属、红酵母属、法夫酵母属、掷孢酵母属和管囊酵母属。

3. 权利要求1或权利要求2的酵母, 其中所述RGEN包含CRISPR-缔合的Cas9氨基酸序列, 其中CRISPR是指聚集状规则间隔的短回文重复序列, 且Cas9是指Cas蛋白质-9。

4. 权利要求1或2的酵母, 其中由所述核苷酸序列转录的RNA自催化地去除所述核酶以产生所述RNA组分, 其中所述RNA组分不具有5' 帽。

5. 权利要求1或2的酵母, 其中所述核酶为锤头核酶、丁型肝炎病毒核酶、I组内含子核酶、RnaseP核酶、或发夹型核酶。

6. 权利要求1或2的酵母, 其中由所述核苷酸序列转录的RNA不自催化地去除所述核酶, 切割所述核酶的5' 的任何RNA序列, 和产生不具有5' 帽的核酶-RNA组分融合分子。

7. 一种用于修饰不是糖酵母属或裂殖酵母属物种的酵母中的染色体或附加体上的靶位点的方法, 所述方法包括向所述酵母提供第一重组DNA构建体和第二重组DNA构建体, 所述第一重组DNA构建体包含编码Cas内切核酸酶的DNA序列, 且所述第二重组DNA构建体包含 (i) 编码RNA组分上游的核酶的DNA序列和RNA组分序列下游的转录终止序列, 所述RNA组分含有与所述靶位点中的DNA序列互补的序列, 其中所述第二重组DNA构建体不包含位于核酶-RNA组分下游的核酶序列, 其中由所述第二重组DNA构建体转录的RNA自催化地去除所述核酶以产生所述RNA组分, 且其中所述RNA组分和所述Cas内切核酸酶形成在所述靶位点处引入单链或双链断裂的RGEN; 或 (ii) 编码核酶-RNA组分融合分子的DNA序列, 其中所述第二重组DNA构建体不包含位于所述核酶-RNA组分下游的核酶序列, 其中所述核酶-RNA组分融合分子和Cas内切核酸酶能够形成在所述靶位点处引入单链或双链断裂的RGEN, 且其中所述RNA组分通过从RNA聚合酶II启动子转录而产生, 其中RGEN是指RNA-引导的内切核酸酶。

8. 权利要求7的方法, 所述方法还包括鉴定至少一种在所述靶位点处具有修饰的酵母细胞, 其中所述修饰包括所述靶位点中的一个或多个核苷酸的至少一个缺失、添加或替换。

9. 权利要求7的方法, 所述方法还包括向所述酵母提供供体DNA, 其中所述供体DNA包含目的多核苷酸。

10. 权利要求9的方法, 所述方法还包括鉴定至少一种在其染色体或附加体中包含整合在所述靶位点处的所述目的多核苷酸的酵母细胞。

11. 一种用于编辑不是糖酵母属或裂殖酵母属物种的酵母中的染色体或附加体上的核

核苷酸序列的方法,所述方法包括向所述酵母提供多核苷酸修饰模板DNA,第一重组DNA构建体,和第二重组DNA构建体,所述第一重组DNA构建体包含编码Cas内切核酸酶的DNA序列,所述第二重组DNA构建体包含编码RNA组分上游的核酶的DNA序列和RNA组分序列下游的转录终止序列,所述RNA组分含有与靶位点中的DNA序列互补的序列,其中由所述第二重组DNA构建体转录的RNA自催化地去除所述核酶以产生所述RNA组分,其中所述DNA序列不包含位于核酶-RNA组分下游的核酶序列,且其中所述RNA组分和所述Cas内切核酸酶形成在所述酵母的所述染色体或附加体中的靶位点处引入单链或双链断裂的RGEN,其中所述多核苷酸修饰模板DNA包含所述核苷酸序列的至少一个核苷酸修饰,且其中所述RNA组分通过从RNA聚合酶II启动子转录而产生,其中RGEN是指RNA-引导的内切核酸酶。

12. 一种用于使不是糖酵母属或裂殖酵母属物种的酵母中的染色体或附加体上的核苷酸序列沉默的方法,所述方法包括向所述酵母提供至少第一重组DNA构建体和至少第二重组DNA构建体,所述第一重组DNA构建体包含编码失活的Cas9内切核酸酶的DNA序列,且所述第二重组DNA构建体包含可操作地连接至至少一个多核苷酸的启动子和RNA组分序列下游的转录终止序列,其中所述至少一个多核苷酸编码核酶-RNA组分融合分子,其中所述多核苷酸不包含位于所述核酶-RNA组分下游的核酶序列,且其中所述核酶-RNA组分融合分子和所述失活的Cas9内切核酸酶能够形成RGEN,所述RGEN结合到所述酵母的所述染色体或附加体中的所述核苷酸序列,从而阻断所述核苷酸序列的转录,且其中所述RNA组分通过从RNA聚合酶II启动子转录而产生,其中RGEN是指RNA-引导的内切核酸酶。

13. 一种用于产生多重引导RNA用于不是糖酵母属或裂殖酵母属物种的酵母中的基因修饰的高通量方法,所述方法包括:

(a) 提供重组DNA构建体,所述重组DNA构建体包含以5'至3'的顺序可操作地连接的下列序列:RNA聚合酶II启动子、编码核酶的第一DNA序列、编码反向选择剂的第二DNA序列、编码引导RNA的CER结构域的第三DNA序列和终止子序列;

(b) 向(a)的所述重组DNA构建体提供至少一个寡核苷酸双链体,其中所述寡核苷酸双链体源自包含能够编码引导RNA靶序列的可变靶向结构域(VT)的DNA序列的第一单链寡核苷酸与包含编码所述可变靶向结构域的所述DNA序列的互补序列的第二单链寡核苷酸的组合;

(c) 将(a)的所述反向选择剂与(b)的所述至少一个寡双链体交换,从而形成重组DNA构建体库,所述重组DNA构建体各自包含能够编码引导RNA的可变靶向结构域的DNA序列;以及,

(d) 转录(c)的所述重组DNA构建体库,从而产生核酶-引导RNA分子库。

14. 根据权利要求13所述的方法,所述方法还包括诱导所述核酶-引导RNA分子库,使得(i)所述分子自催化地去除所述核酶和所述核酶上游的任何RNA序列,以产生不包含5'帽的引导RNA分子库;或(ii)所述分子切割所述核酶上游的任何RNA序列,以产生不包含5'帽的核酶-gRNA融合分子。

15. 一种重组DNA分子,其包含(i) RNA聚合酶II启动子,所述RNA聚合酶II启动子可操作地连接至(ii)编码核酶和引导RNA的核苷酸序列,以及RNA组分序列下游的转录终止序列,其中所述核酶在所述引导RNA的上游,其中由(ii)的所述核苷酸序列转录的RNA自催化地去除所述核酶以产生所述引导RNA,其中所述重组DNA序列不包含位于所述核酶-RNA组分

下游的核酶序列,并且其中所述引导RNA能够形成RGEN,所述RGEN能够识别、结合到和任选地切割不是糖酵母属或裂殖酵母属物种的酵母的基因组中的靶位点,其中RGEN是指RNA-引导的内切核酸酶。

使用RNA引导的内切核酸酶在非常规酵母中基因靶向

[0001] 本申请要求2014年8月13日提交的美国临时申请62/036652的权益,该文献全文以引用方式并入本文。

技术领域

[0002] 本发明涉及分子生物学领域。具体地,本发明涉及使用RNA引导的内切核酸酶(RGEN)在非常规酵母中基因靶向。

[0003] 以电子方式递交的序列表的引用

[0004] 通过EFS-Web以电子方式将序列表的正式文本作为ASCII格式的序列表递交,该文件名称为“20150721_CL6272W0PCT_SequenceListing_ST25.txt”,创建日期为2015年7月21日,文件大小为411千字节,并且该文件与本说明书同时提交。在这一ASCII格式的文件中包含的序列表为所述说明书的一部分并且全文以引用方式并入本文。

背景技术

[0005] 理解基因在生物体内的功能的有效方法是抑制其表达。基因表达的抑制可例如通过中断或删除基因的DNA序列,产生基因的“敲除”来实现(Austin等人,Nat.Genetics 36:921-924)。基因敲除主要通过同源重组(HR)(适用于从细菌到哺乳动物的大量生物体的技术)来进行。用于研究基因功能的另一种工具可通过基因“敲入”,其也通常由HR来进行。用于基因靶向目的的HR(敲除或敲入)可利用外源提供的DNA的存在,所述DNA具有与靶位点的同源性。

[0006] 虽然由HR靶向基因是有效的工具,但其可能是复杂的劳动密集型程序。使用HR的大部分研究通常已经限于敲除路径中的单个基因而不是多个基因,因为HR通常难以以高性价比方式放大。该困难在其中HR不是有效的生物体中加剧。此类低效率通常迫使实践者依赖可选的表型或外源性标记物来帮助鉴定发生期望的HR事件的细胞。

[0007] 已经示出用于基因靶向的HR在靶向DNA位点包含双链断裂时增强(Rudin等人,Genetics 122:519-534;Smih等人,Nucl.Acids Res.23:5012-5019)。用于引入双链断裂的策略因此有利于开发HR介导的DNA靶向。例如,已将锌指核酸酶工程化来切割特异性DNA位点,从而导致当供体DNA存在时在该位点处增强的HR水平(Bibikova等人,Science300:764;Bibikova等人,Mol.Cell.Biol21:289-297)。类似地,还已经开发了人造大范围核酸酶(归位内切核酸酶)和转录激活因子样效应物(TALE)核酸酶用于HR介导的DNA靶向(Epinat等人,Nucleic Acids Res.31:2952-2962;Miller等人,Nat.Biotech.29:143-148)。

[0008] 编码CRISPR(聚集状规则间隔的短回文重复序列)DNA切割体系的基因座唯一地存在于约40%细菌基因组和大多数古细菌基因组中(Horvath和Barrangou,Science 327:167-170;Karginov和Hannon,Mol.Cell 37:7-19)。具体地讲,已经开发了II型CRISPR体系的CRISPR缔合的(Cas)RNA引导的内切核酸酶(RGEN),Cas9,作为引入位点特异性DNA链断裂的方式((2015年3月19日公布的国专利申请US 2015-0082478 A1和2015年2月26日公布的US2015-0059010A1,两者均全文以引用方式并入本文)。可设计Cas9的RNA组分的序列使得

Cas9识别并切割包含下列的DNA: (i) 与RNA组分的一部分互补的序列和(ii) 前间区序列邻近基序(PAM)序列。

[0009] 天然Cas9/RNA复合物包含两个RNA序列,CRISPR RNA(crRNA)和反式激活CRISPR RNA(tracrRNA)。crRNA包含,在5'-至-3'方向上,与DNA靶位点互补的独特序列和由CRISPR基因座(crRNA源自所述基因座)的重复区编码的序列的一部分。tracrRNA包含,在5'-至-3'方向上,与crRNA的重复区退火的序列和包含茎环的部分。目前的工作已经导致了向导RNA(gRNA)的开发,所述向导RNA为嵌合序列,其包含在5'-至-3'方向上连接至tracrRNA的crRNA(美国临时专利申请61/868,706,提交于2013年8月22日)。

[0010] 在真核细胞中表达RNA组分,诸如gRNA以进行Cas9介导的DNA靶向的方法已经使用RNA聚合酶III(Pol III)启动子,其允许具有预先限定的未修饰的5'-端和3'-端的RNA的转录(DiCarlo等人,Nucleic Acids Res.41:4336-4343;Ma等人,Mol.Ther.Nucleic Acids 3:e161)。该策略已经成功应用于多种不同物种的细胞,包括玉米和大豆(美国临时专利申请61/868,706,2013年8月22日提交),以及人类、小鼠、斑马鱼、木霉属和酿酒酵母。

[0011] 然而,如现在在本专利申请中所公开的,使用Pol III启动子-转录gRNA在非常规酵母诸如解脂耶氏酵母中进行Cas9-介导的DNA靶向已被证明是困难的。因此,用于产生Cas9的RNA组分的其它方式对于在非常规酵母中提供Cas9介导的DNA靶向是有意义的。

发明内容

[0012] 在一个实施方案中,本公开涉及一种非常规酵母,其包含至少一种RNA引导的内切核酸酶(RGEN),所述RNA引导的内切核酸酶包含至少一种不具有5'-端的RNA组分,其中所述RNA组分包含与酵母中的染色体或附加体上的靶位点序列互补的序列,其中所述RGEN可结合到靶位点序列。RGEN还可结合到并切割靶位点。

[0013] 在一个实施方案中,非常规酵母为选自下列属的成员:耶氏酵母属、毕赤酵母属、许旺氏酵母属、克鲁维酵母属、Arxula属、丝孢酵母属、假丝酵母属、黑粉菌属、球拟酵母属、接合酵母属、三角酵母属、隐球酵母属、红酵母属、法夫酵母属、掷孢酵母属和管囊酵母属。

[0014] 在一个实施方案中,所述RGEN包含CRISPR(聚集状规则间隔的短回文重复序列)-缔合的(Cas)蛋白质-9(Cas9)氨基酸序列。Cas9蛋白质可以为链球菌Cas9蛋白质,然而RNA组分可包含向导RNA(gRNA),所述向导RNA包含可操作地连接至反式激活CRISPR RNA(tracrRNA)的CRISPR RNA(crRNA)。PAM(前间区序列邻近基序)序列可邻近靶位点序列。RGEN还可结合到并切割靶位点。由核苷酸序列转录的RNA可自催化地去除核酶以产生所述RNA组分,其中所述RNA组分不具有5'端。所述核酶可包括锤头核酶、丁型肝炎病毒核酶、I组内含子核酶、RnaseP核酶、或发夹型核酶。由核苷酸序列转录的RNA可以为不自催化地去除核酶从而产生不具有5'端的核酶-RNA组分融合分子的RNA分子。

[0015] 在一个实施方案中,本公开涉及一种非常规酵母,其包含Cas内切核酸酶和多核苷酸序列,所述多核苷酸序列包含可操作地连接至至少一个核苷酸序列的启动子,其中所述核苷酸序列包含编码在编码RNA组分的DNA序列上游的核酶的DNA序列,其中所述RNA组分包含与酵母中染色体或附加体上的靶位点序列互补的可变靶向结构域,其中所述RNA组分可与Cas内切核酸酶形成RNA-引导的内切核酸酶(RGEN),其中所述RGEN可结合到靶位点序列。

[0016] 在一个实施方案中,本文所述的方法包括一种用于修饰非常规酵母中的染色体或

附加体上的靶位点的方法,所述方法包括向非常规酵母提供第一重组DNA构建体,所述第一重组DNA构建体包含编码Cas内切核酸酶的DNA序列,和第二重组DNA构建体,所述第二重组DNA构建体包含编码RNA组分上游的核酶的DNA序列,其中由第二重组DNA构建体转录的RNA自催化地去除核酶以产生所述RNA组分,其中所述Cas9内切核酸酶在所述靶位点处引入单链或双链断裂。

[0017] 在一个实施方案中,本文所述的方法包括一种用于修饰非常规酵母中的染色体或附加体上的靶位点的方法,所述方法包括向非常规酵母提供第一重组DNA构建体,所述第一重组DNA构建体包含编码Cas内切核酸酶的DNA序列,和第二重组DNA构建体,所述第二重组DNA构建体包含编码核酶-RNA组分融合分子的DNA序列,其中所述核酶-RNA组分融合分子和Cas9内切核酸酶可形成RGEN,所述RGEN在所述靶位点处引入单链或双链断裂。

[0018] 所述方法还可包括鉴定在所述靶位点处具有修饰的至少一种非常规酵母细胞,其中所述修饰包括所述靶位点中的一个或多个核苷酸的至少一个缺失或替换。所述方法还可包括向所述酵母提供供体DNA,其中所述供体DNA包含目的多核苷酸。

[0019] 在一个实施方案中,本文所述的方法包括一种用于编辑非常规酵母中的染色体或附加体上的核苷酸序列的方法,所述方法包括向非常规酵母提供多核苷酸修饰模板DNA,包含编码Cas内切核酸酶的DNA序列的第一重组DNA构建体,和包含编码RNA组分上游的核酶的DNA序列的第二重组DNA构建体,其中由第二重组DNA构建体转录的RNA自催化地去除核酶以产生所述RNA组分,其中所述Cas9内切核酸酶在所述酵母的染色体或附加体中的所述靶位点处引入单链或双链断裂,其中所述多核苷酸修饰模板DNA包含所述核苷酸序列的至少一个核苷酸修饰。

[0020] 在一个实施方案中,本文所述的方法包括一种用于使非常规酵母中的染色体或附加体上的核苷酸序列沉默的方法,所述方法包括向非常规酵母提供至少第一重组DNA构建体,所述第一重组DNA构建体包含编码失活的Cas9内切核酸酶的DNA序列,和至少第二重组DNA构建体,所述第二重组DNA构建体包含可操作地连接至至少一个多核苷酸的启动子,其中所述至少一个多核苷酸编码核酶-RNA组分融合分子,其中所述核酶-RNA组分融合分子和失活的Cas9内切核酸酶可形成RGEN,所述RGEN结合到所述酵母的染色体或附加体中的所述核苷酸序列,从而阻断所述核苷酸序列的转录。

[0021] 在一个实施方案中,本文所述的方法包括用于产生非常规酵母中基因修饰用多重向导RNA的高通量方法,所述方法包括:a) 提供重组DNA构建体,所述重组DNA构建体包含以5'至3'的顺序可操作地连接至下列的启动子:编码核酶的第一DNA序列、编码反向选择剂的第二DNA序列、编码向导RNA的CER结构域的第三DNA序列和终止子序列;b) 向(a)的重组DNA构建体提供至少一个寡核苷酸双链体,其中所述寡核苷酸双链体源自包含能够编码向导RNA靶序列的可变靶向结构域(VT)的DNA序列的第一单链寡核苷酸与包含编码可变靶向结构域的DNA序列的互补序列的第二单链寡核苷酸的组合;c) 将(a)的反向选择剂与(b)的至少一个寡双链体交换,从而形成重组DNA构建体库,其各自包含能够编码向导RNA的可变靶向结构域的DNA序列;以及,

[0022] d) 转录(c)的重组DNA构建体库,从而形成核酶-向导RNA库。

[0023] 附图和序列简述

[0024] 图1:单向导多核苷酸诸如单向导RNA(sgRNA)的结构模型。可变靶向(VT)结构域示

为灰色。Cas9内切核酸酶识别(CER)结构域示为黑色。

[0025] 图2A:经耶氏酵母密码子优化的Cas9表达盒。FBA1启动子示为黑色,并且编码具有C末端SV40核定位信号(NLS)的Cas9的开放阅读框示为浅灰色。

[0026] 图2B:经耶氏酵母优化的pre-sgRNA RGR表达盒(RGR,核酶-sgRNA-核酶)。FBA1启动子示为黑色,锤头(HH)核酶示为深灰色,单向导RNA(sgRNA)示为浅灰色,并且HDV核酶以竖条纹形式示出。

[0027] 图2C:经耶氏酵母优化的pre-sgRNA RG表达盒(RG,核酶-sgRNA)。FBA1启动子示为黑色,锤头(HH)核酶示为深灰色,单向导RNA(sgRNA)示为浅灰色,并且Sup4终止子以竖条纹形式示出。

[0028] 图3A:pZUFCas9(SEQ ID NO:14)质粒包含图2A中所示的经耶氏酵母密码子优化的Cas9表达盒。复制起点(ARS 18,f1 ori,ColE1)以交叉影线示出,并且可选标记物(Ura3,Amp)呈灰色。

[0029] 图3B:pZUFCas9/PolIII-sgRNA质粒包含图2A中所示的经耶氏酵母密码子优化的Cas9表达盒,和用于在耶氏酵母中靶向Leu2-3的Y1 Snr52(Pol III启动子,表示为“Y152”)-sgRNA表达盒。尽管未示出,但sgRNA盒还包含酿酒酵母Sup4基因转录终止子序列。复制起点(ARS 18,f1 ori,ColE1)以交叉影线示出,并且可选标记物(Ura3,Amp)呈灰色。

[0030] 图3C:pRF38质粒(SEQ ID NO:19)包含用于靶向解脂耶氏酵母中CAN1基因的序列SEQ ID NO:18的经耶氏酵母优化的pre-sgRNA表达盒(FBA1启动子以白色示出,RGR pre-sgRNA以斜条纹示出)。复制起点(ARS 18,f1 ori,ColE1)以交叉影线示出,并且可选标记物(Ura3,Amp)呈灰色。

[0031] 图4B:利用(i)仅pZUFCas9(SEQ ID NO:14)或者(ii)pZUFCas9和包含SEQ ID NO:18的经耶氏酵母优化的pre-sgRNA表达盒的线性DNA转化的解脂耶氏酵母细胞中的瞬时靶向效率(参见实施例3)。y轴指示利用pZUFCas9转化的细胞的频率(即,Ura⁺细胞),所述细胞也是刀豆氨酸抗性的(Can^R)。误差线表示标准偏差。

[0032] 图5:利用pZUFCas9(SEQ ID NO:14)和包含SEQ ID NO:18的经耶氏酵母优化的pre-sgRNA表达盒的线性DNA转化的解脂耶氏酵母细胞的CAN1编码区中的Cas9/sgRNA切割位点的序列图(参见实施例3)。参见野生型(WT)CAN1序列,Can1-1靶位点序列以粗体示出,PAM序列加下划线。预测切割位点紧接PAM上游的第三核苷酸的5'。插入的核苷酸以斜体表示。每一类突变体(1-18)的数目和频率在右侧表示。该图中示出的序列以SEQ ID NO:71-89包括在序列表中,如图中所编号的。

[0033] 图6:利用(i)仅pZUFCas9(SEQ ID NO:14),(ii)pZUFCas9和包含SEQ ID NO:18的经耶氏酵母优化的pre-sgRNA表达盒(RGR)的线性DNA,或(iii)pZUFCas9和包含SEQ ID NO:25的经耶氏酵母优化的pre-sgRNA表达盒(RG)的线性DNA转化的解脂耶氏酵母细胞中的瞬时靶向效率(参见实施例4)。y轴指示利用pZUFCas9转化的细胞的频率(即,Ura⁺细胞),所述细胞也是刀豆氨酸抗性的(Can^R)。误差线表示标准偏差。

[0034] 图7:比较通过HR和NHEJ DNA修复路径的突变频率。测定在转化中提供多核苷酸修饰模板DNA序列时,由HR(深灰)和NHEJ(浅灰)进行的Cas9/sgRNA-介导的DNA双链断裂修复的总频率(参见实施例5)。误差线表示标准偏差。

[0035] 图8:由于多核苷酸修饰模板DNA序列的类型,在Cas9/sgRNA-介导的DNA双链断裂

位点处的HR频率。示出使用点突变模板DNA(深灰)、移码模板DNA(浅灰)、和大缺失模板DNA(白色)的HR频率(参见实施例5)。误差线表示标准偏差。

[0036] 图9:耶氏酵母中在CAN1基因座处的突变频率(在被Cas9/sgRNA切割的Can1-1位点处修复)不受多核苷酸修饰模板DNA存在的影响。由不包括多核苷酸修饰模板DNA(深灰色,无模板DNA)或包括多核苷酸修饰模板DNA(浅灰色,具有模板DNA)(两个转化组均包括pZUFCas9(SEQ ID NO:14)和RGR表达盒[SEQ ID NO:18])的转化产生的细胞的刀豆氨酸抗性频率(参见实施例5)。y轴指示利用pZUFCas9转化的细胞的频率(即,Ura⁺细胞),所述细胞也是刀豆氨酸抗性的(Can^R)。误差线表示标准偏差。

[0037] 图10A:pRF84质粒(SEQ ID NO:41)包含图2A中所示的经耶氏酵母密码子优化的Cas9表达盒和SEQ ID NO:18的经耶氏酵母优化的RGR pre-sgRNA盒(RGR pre-sgRNA编码区[“Can1 RGR”]由斜线示出)。复制起点(ARS 18,f1 ori,ColE1)以交叉影线示出,并且可选标记物(Ura3,Amp)呈灰色。

[0038] 图10B:pRF85质粒(SEQ ID NO:42)包含图2A中所示的经耶氏酵母密码子优化的Cas9表达盒和SEQ ID NO:25的经耶氏酵母优化的RG pre-sgRNA盒(RG pre-sgRNA编码区[“Can1 RG”]由斜线示出)。复制起点(ARS 18,f1 ori,ColE1)以交叉影线示出,并且可选标记物(Ura3,Amp)呈灰色。

[0039] 图11:通过仅表达Cas9(pZUFCas9,SEQ ID NO:14),或表达(i) Cas9和(ii) RGR pre-sgRNA(pRF84)或RG sgRNA(pRF85),在耶氏酵母中在CAN1基因座处的突变频率(参见实施例6)。y轴指示利用每种相应载体转化的细胞的频率(即,Ura⁺细胞),所述细胞也是刀豆氨酸抗性的(Can^R)。误差线表示标准偏差。

[0040] 图12A-12B:构建HDV-sgRNA融合表达盒的高通量克隆盒的示例。图12-A以黑色框示出启动子序列,以灰色框示出编码HDV核酶的DNA序列,以水平阴影框示出的是侧接有II型限制性位点的克隆菌株的反向可选择标记物,以黑色虚线框示出的是与Cas9相互作用的sgRNA的CER结构域,并且以斜线阴影框示出的是转录终止子。当包含编码可变靶向结构域的DNA序列和II型限制性位点的适当突出物的DNA双链体(竖直阴影框VT)与质粒,DNA连接酶和II型酶混合时,编码可变靶向结构域(VT)的DNA序列将置换反向可选择标记物,从而形成HDV-sgRNA表达盒(启动子-HDV-VT-CER-终止子)。当转录HDV-sgRNA表达盒时,其产生RNA转录物(HDV-VT-CER转录物),其中HDV核酶切割任何5'序列。图12-B示出双链DNA分子(SEQ ID NO:99和SEQ ID NO:100的寡聚双链)的一个示例,其包含编码Can1-1靶位点的DNA序列和克隆入质粒pRF291中的适当突出物。

[0041] 图13A-13B:构建HH-sgRNA表达盒的高通量克隆盒的示例。图13-A以黑色框示出启动子序列;以水平阴影框示出侧接有II型限制性位点的克隆菌株的反向可选择标记物;以黑色虚线框示出的是与Cas9相互作用的sgRNA的CER结构域,以斜线阴影框示出的是转录终止子。当包含编码DNA的靶位点特异性锤头核酶的DNA双链体(竖直阴影框HH、靶向序列和II型位点的适当突出物(虚线框TS))与质粒、DNA连接酶和II型酶混合时,HH-靶位点双链体置换反向可选择标记物,从而形成HH-sgRNA表达盒。当转录表达盒时,其产生转录体并且HH核酶切除其本身和任何5'序列。图13B示出双链DNA分子(SEQ ID NO:162和SEQ ID NO:163)的示例,其包含用于靶向ds-temp-1靶位点的可变靶向结构域(VT)和编码DNA(HH)的序列特异性HH核酶,以及克隆入质粒pRF291中的适当突出物。

[0042] 图14:来自由pRF303 (SEQ ID NO:103) 和Can1短编辑模板 (SEQ ID NO:157) 转化的细胞的Can1基因座的凝胶电泳的示例。标记MW的泳道是分子量标记物。泳道1-16表示来自划线纯化的转化体的单独菌落。较高MW带是WT Can1基因座 (SEQ ID NO:160) 或具有小插入缺失 (indel) 突变的Can1基因座的正确尺寸。较小分子量带是由短Can1编辑模板 (SEQ ID NO:157) 编辑的Can1基因座 (SEQ ID NO:161) 的正确尺寸。

[0043] 图15示出来自菌落PCR的质粒和基因组URA3基因的代表性测序结果及其比对。虚线和粗体分别示出缺失和插入。PAM序列加下划线。

[0044] 图16-A示出耶氏酵母URA3基因内RGR-URA3.1、RGR-URA3.2和RGR-URA3.3的靶向序列的相对位置。

[0045] 图16-B示出在包含5-FOA的SC培养基上生长的pYRH222转化体的菌落PCR的测序结果和序列比对。粗体表示插入。PAM序列加下划线。“N”表示混合序列。图16-C示出在包含5-FOA的SC培养基上生长的pYRH282转化体的菌落PCR的测序结果和序列比对。虚线表示缺失。PAM序列加下划线。“N”表示混合序列。图16-D示出在包含5-FOA的SC培养基上生长的pYRH283转化体的菌落PCR的测序结果和序列比对。虚线表示缺失。PAM序列加下划线。“N”表示混合序列。

[0046] 图17示出来自pYRH282 (菌落号23和24) 和pYRH283 (菌落号27和36) 转化体的PCR产物的不同迁移。来自梯状物的DNA尺寸在右侧示出。

[0047] 图18示出Can1靶序列的代表性测序结果。虚线分别指示缺失。PAM序列以粗体示出。

[0048] 表1

[0049] 核酸和蛋白质序列号概述

	说明	核酸 SEQ ID NO.	蛋白质 SEQ ID NO.
	gRNA 的 Cas9 内切核酸酶识别 (CER) 结构域。	1 (80 个碱基)	
[0050]	解脂耶氏酵母 Leu2-1 靶位点, 或另选地, 编码 gRNA 的 Leu2-1 可变靶向结构域的 DNA。	2 (20 个碱基)	
	解脂耶氏酵母 Leu2-2 靶位点, 或另选地, 编码 gRNA 的 Leu2-2 可变靶向结构域的 DNA。	3 (20 个碱基)	

[0051]

解脂耶氏酵母 Leu2-3 靶位点，或编码 gRNA 的 Leu2-2 可变靶向结构域的 DNA。	4 (20 个碱基)	
酿酒酵母 (<i>S. cerevisiae</i>) Snr52 启动子。	5 (300 个碱基)	
酿酒酵母 Rpr1 启动子	6 (300 个碱基)	
解脂耶氏酵母 Snr52 启动子	7 (300 个碱基)	
酿酒酵母 Sup4 启动子	8 (20 个碱基)	
其经密码子优化以在解脂耶氏酵母中表达的化脓链球菌 Cas9 开放阅读框	9 (4107 个碱基)	
包括 C 末端接头和 SV40 NLS 的化脓链球菌 Cas9 (“Cas9-NLS”)；其经密码子优化以在解脂耶氏酵母中表达的开放阅读框	10 (4140 个碱基)	11 (1379 aa)
解脂耶氏酵母 FBA1 启动子	12 (543 个碱基)	
Cas9-NLS 表达盒 (启动子和 Cas9-NLS 开放阅读框)。	13 (4683 个碱基)	
pZUFCas9 质粒。	14 (10706 个碱基)	
锤头 (HH) 核酶。	15 (43 个碱基)	
HDV 核酶。	16 (68 个碱基)	
解脂耶氏酵母 Can1-1 靶位点，或另选地，编码 gRNA 的 Can1-1 可变靶向结构域的 DNA。	17 (20 个碱基)	
FBA1 启动子：HH-sgRNA-HDV (RGR) pre-sgRNA 表达盒，或另选地，“RGR”表达盒。	18 (760 个碱基)	
pRF38 质粒。	19 (6793 个碱基)	
RGR 正向 PCR 引物。	20 (19 个碱基)	
RGR 反向 PCR 引物。	21 (19 个碱基)	

[0052]

CAN1 正向 PCR 引物。	22 (20 个碱基)	
CAN1 反向 PCR 引物。	23 (21 个碱基)	
CAN1 测序引物。	24 (21 个碱基)	
FBA1 启动子: HH-sgRNA-Sup4 终止子 (RG) pre-sgRNA 表达盒, 或另选地, “RG” 表达盒。	25 (709 个碱基)	
聚-A。	26 (10 个碱基)	
聚-T。	27 (10 个碱基)	
CAN1 移码模板 DNA。	28 (100 个碱基)	
CAN1 移码模板 DNA 互补序列。	29 (100 个碱基)	
CAN1 点突变模板 DNA。	30 (106 个碱基)	
CAN1 点突变模板 DNA 互补序列。	31 (106 个碱基)	
CAN1 上游模板臂。	32 (655 个碱基)	
用于扩增 CAN1 上游模板臂的正向 PCR 引物。	33 (29 个碱基)	
用于扩增 CAN1 上游模板臂的反向 PCR 引物。	34 (37 个碱基)	
CAN1 下游模板臂。	35 (658 个碱基)	
用于扩增 CAN1 下游模板 DNA 臂的正向 PCR 引物。	36 (37 个碱基)	
用于扩增 CAN1 下游模板 DNA 臂的反向 PCR 引物。	37 (22 个碱基)	
CAN1 大缺失模板 DNA。	38 (1276 个碱基)	
RG/RGR 正向 PCR 引物。	39 (31 个碱基)	
RG/RGR 反向 PCR 引物	40	

[0053]

	(29 个碱基)	
pRF84 质粒。	41 (11568 个碱基)	
pRF85 质粒。	42 (11507 个碱基)	
RNA 成环序列 (GAAA)。	43 (4 个碱基)	
RNA 成环序列 (CAAA)。	44 (4 个碱基)	
RNA 成环序列 (AAAG)。	45 (4 个碱基)	
Cas9 靶位点的示例: PAM 序列。	46 (23 个碱基)	
PAM 序列 NGG。	47 (3 个碱基)	
PAM 序列 NNAGAA。	48 (6 个碱基)	
PAM 序列 NNAGAAW。	49 (7 个碱基)	
PAM 序列 NGGNG。	50 (5 个碱基)	
PAM 序列 NNNNGATT。	51 (8 个碱基)	
PAM 序列 NAAAAC。	52 (6 个碱基)	
PAM 序列 NG。	53 (2 个碱基)	
TracrRNA 配对序列示例 1。	54 (22 个碱基)	
TracrRNA 配对序列示例 2。	55 (15 个碱基)	
TracrRNA 配对序列示例 3。	56 (12 个碱基)	
TracrRNA 配对序列示例 4。	57 (13 个碱基)	
TracrRNA 示例 1。	58 (60 个碱基)	
TracrRNA 示例 2。	59 (45 个碱基)	
TracrRNA 示例 3。	60 (32 个碱基)	
TracrRNA 示例 4。	61 (85 个碱基)	

[0054]

TracrRNA 示例 5。	62 (77 个碱基)	
TracrRNA 示例 6。	63 (65 个碱基)	
gRNA 示例 1。	64 (131 个碱基)	
gRNA 示例 2。	65 (117 个碱基)	
gRNA 示例 3。	66 (104 个碱基)	
gRNA 示例 4。	67 (99 个碱基)	
gRNA 示例 5。	68 (81 个碱基)	
gRNA 示例 6。	69 (68 个碱基)	
gRNA 示例 7。	70 (100 个碱基)	
WT 序列示于图 5 中。	71	
序列 1 示于图 5 中。	72	
序列 2 示于图 5 中。	73	
序列 3 示于图 5 中。	74	
序列 4 示于图 5 中。	75	
序列 5 示于图 5 中。	76	
序列 6 示于图 5 中。	77	
序列 7 示于图 5 中。	78	
序列 8 示于图 5 中。	79	
序列 9 示于图 5 中。	80	
序列 10 示于图 5 中。	81	
序列 11 示于图 5 中。	82	
序列 12 示于图 5 中。	83	
序列 13 示于图 5 中。	84	
序列 14 示于图 5 中。	85	
序列 15 示于图 5 中。	86	
序列 16 示于图 5 中。	87	
序列 17 示于图 5 中。	88	
序列 18 示于图 5 中。	89	
引物 AarI-去除-1	90	
引物 AarI-去除-2	91	

[0055]

质粒 pRF109	92	
修饰的 Aar1- Cas9 基因	93	
质粒 pRF141	94	
高通量克隆盒	95	
yl52 启动子	96	
大肠杆菌反向选择盒 rpsL	97	
质粒 pRF291	98	
寡核苷酸 Can1-1F	99	
寡核苷酸 Can1-1R	100	
Can1-1 靶位点和 PAM 序列	101	
用于靶向 Can1-1 的重组 HDV-sgRNA 表达盒	102	
质粒 pRF303	103	
HDV 核酶-向导 RNA	104	
来自解脂耶氏酵母的 Can1 基因	105	
Can1-2 靶位点	106	
Sou2-1 靶位点	107	
Sou2-2 靶位点	108	
Can1-2 的可变靶向结构域	109	
Sou2-1 的可变靶向结构域	110	
Sou2-2 的可变靶向结构域	111	
Tgl1-1 靶位点	112	
Acso10-1 靶位点	113	
Fat1-1 靶位点	114	
ura3-1 的可变靶向结构域	115	
URa3-1 靶位点	116	
Cas9-SV40 NLS D10A H840A		117
引物 D10AF	118	
引物 D10AR	119	
经耶氏酵母优化的 Cas9 D10A 基因	120	
质粒 pRF111	121	
引物 H840A1	122	
引物 H840A2	123	
经耶氏酵母密码子优化的失活的 Cas9 基因	124	
pRF143	125	
经耶氏酵母优化的 dsREDexpress ORF	126	
经耶氏酵母优化的 dsREDexpress 克隆片段	127	
FBA1-dsREDexpress 表达盒	128	
pRF165	129	
来自 PmeI NotI 片段上的 pRF165 的 FBA1 耶氏酵母 dsREDexpress 盒	130	
p2PO69 整合载体	131	
pRF201	132	

[0056]

来自 pRF201 的 AscI/SphI 整合片段	133	
HY026	134	
HY027	135	
pRF169	136	
GPD 启动子	137	
GPD 启动子-反向可选择标记物-CER-终止子	138	
ds-temp-1 靶位点	139	
ds-temp-2 靶位点	140	
ds-nontemp-3 靶位点	141	
锤头核酶-VTD 融合体	142	
锤头核酶-VTD 融合体	143	
ds-temp-1F	144	
ds-temp-1R	145	
ds-temp-2F	146	
ds-temp-2R	147	
ds-nontemp-1F	148	
ds-nontemp-1R	149	
pRF296	150	
pRF298	151	
pRF300	152	
pRF339	153	
pRF341	154	
pRF343	155	
pRF80	156	
编辑模板的短 Can1 缺失	157	
引物 80F	158	
引物 80R	159	
Can1 基因座 WT (野生型)	160	
Can1 基因座缺失菌株	161	
图 13-B 的正向寡核苷酸	162	
图 13-B 的反向寡核苷酸	163	
pre-sgRNA URA3.1 (RGR-URA3.1)	164	
URA3.1 靶序列	165	
pre-sgRNA URA3.2 (RGR-URA3.2)	166	
URA3.2 靶序列	167	
FBA1L 启动子	168	
乙酰羟酸合酶基因	169	
引物 RHO705	170	
引物 RHO719	171	
引物 RHO733	172	
引物 RHO734	173	
引物 RHO707	174	
野生型 URA3 序列的片段	175	
来自菌落 1 的质粒 URA3 的片段	176	

[0057]

来自菌落 2 的质粒 URA3 的片段	177	
来自菌落 3 的质粒 URA3 的片段	178	
来自菌落 5 的质粒 URA3 的片段	179	
来自菌落 6 的质粒 URA3 的片段	180	
来自菌落 1 的基因组 URA3 的片段	181	
来自菌落 2 的基因组 URA3 的片段	182	
来自菌落 3 的基因组 URA3 的片段	183	
来自菌落 5 的基因组 URA3 的片段	184	
来自菌落 6 的基因组 URA3 的片段	185	
潮霉素抗生素抗性选择标记物	186	
TDH1 或 GPD 启动子	187	
引物 RHO804	188	
引物 RHO805	189	
TDH1 启动子-RGR-URA3.3 融合体	190	
pre-sgRNA URA3.3 (RGR-URA3.3)	191	
引物 RHO610	192	
引物 RHO611	193	
引物 RHO704	194	
野生型 URA3 序列的片段	195	
来自菌落 3 的 URA3 序列的片段	196	
来自菌落 4 的 URA3 序列的片段	197	
来自菌落 5 的 URA3 序列的片段	198	
来自菌落 6 的 URA3 序列的片段	199	
来自菌落 9 的 URA3 序列的片段	200	
来自菌落 10 的 URA3 序列的片段	201	
野生型 URA3 序列的片段	202	
来自菌落 23 的 URA3 序列的片段	203	
来自菌落 24 的 URA3 序列的片段	204	
野生型 URA3 序列的片段	205	
来自菌落 27 的 URA3 序列的片段	206	
来自菌落 36 的 URA3 序列的片段	207	
ARS18 序列	208	
经耶氏酵母密码子优化的铜绿假单胞菌 Csy4	209	
耶氏酵母 FBA1 启动子	210	
TDH1:28bp-gCAN1-28bp	211	
Csy4 识别序列	212	
Csy4 识别序列侧接的 sgRNA	213	
CAN1 靶序列	214	
野生型 CAN1 序列的片段	215	
来自菌落 14 的 CAN1 的片段	216	
来自菌落 16 的 CAN1 的片段	217	
来自菌落 18 的 CAN1 的片段	218	

[0058]	来自菌落 19 的 CAN1 的片段	219	
	来自菌落 24 的 CAN1 的片段	220	
	来自菌落 25 的 CAN1 的片段	221	
	由 Csy4 处理的 sgRNA	222	
	Csy4 切割后的 5' 旁侧序列	223	
	Csy4 切割后的 3' 旁侧序列	224	

具体实施方式

[0059] 本文引用的所有专利和非专利文献的公开全文以引用方式并入本文。

[0060] 如本文所用,术语“发明”或“所公开的本发明”不旨在限制但一般适用于权利要求中所限定的或本文所述的任何发明。这些术语在本文中可互换使用。

[0061] 本文的术语“非常规酵母”是指不是酵母属 (*Saccharomyces*) (例如,酿酒酵母 (*S.cerevisiae*)) 或裂殖 (*Schizosaccharomyces*) 酵母物种的任何酵母。非常规酵母描述于以下文献中: *Non-Conventional Yeasts in Genetics, Biochemistry and Biotechnology: Practical Protocols* (K.Wolf、K.D.Breunig、G.Barth编辑, Springer-Verlag, Berlin, Germany, 2003), 其以引用方式并入本文。在某些实施方案中,非常规酵母可另外(或另选地)为比由同源重组 (HR) 介导的修复过程更偏好非同源末端接合 (NHEJ) DNA 修复过程的酵母。沿这些线索(比HR优选NHEJ)定义非常规酵母-还由Chen等人 (PLoS ONE 8:e57952) 公开,其以引用方式并入本文。本文优选的非常规酵母为耶氏酵母属(例如,解脂耶氏酵母)的那些。本文的术语“酵母”是指主要以单细胞形式存在的真菌物种。酵母可另选地在本文中被称为“酵母细胞”。

[0062] 本文中,术语“RNA引导的内切核酸酶”(RGEN)是指包含至少一个CRISPR(聚集状规则间隔的短回文重复序列) 缔合 (Cas) 蛋白质和至少一种RNA组分的复合物。简单地讲,RGEN的RNA组分包含与靶位点序列中的DNA序列互补的序列。基于该互补性,RGEN可特异性识别并切割特定DNA靶位点序列。本文的RGEN可包含四种已知的CRISPR体系 (Horvath和Barrangou, Science 327:167-170) 诸如I型、II型或III型CRISPR体系中任一种的一种或多种Cas蛋白质和一种或多种合适的RNA组分。在优选的实施方案中,RGEN包含Cas9内切核酸酶 (CRISPR II体系) 和至少一种RNA组分 (例如,crRNA和tracrRNA,或gRNA)。

[0063] 术语“CRISPR”(聚集状规则间隔的短回文重复序列)是指I类、II类或III类DNA切割体系的某些遗传基因座编码因子,其例如由细菌或古细菌细胞使用以破坏外来DNA (Horvath和Barrangou, Science 327:167-170)。本文利用CRISPR体系的组分用于非常规酵母细胞中的DNA靶向。

[0064] 本文术语“II型CRISPR体系”和“II型CRISPR-Cas体系”互换使用并且是指利用与至少一种RNA组分复合的Cas9内切核酸酶的DNA切割体系。例如,Cas9可与CRISPR RNA (crRNA) 和反式激活CRISPR RNA (tracrRNA) 复合。在另一个示例中,Cas9可与向导RNA复合。因此,crRNA、tracrRNA和向导RNA是本文中RNA组分的非限制性示例。

[0065] 本文的术语CRISPR缔合的(“Cas”)内切核酸酶是指由Cas基因编码的Cas蛋白质。在某些实施方案中,当与合适RNA组分复合时,Cas内切核酸酶能够切割全部或部分特定DNA靶序列。例如,其能够在特定DNA靶序列中引入单链或双链断裂;其可另选地被表征为能够切割特定DNA靶序列的一个或两条链。Cas内切核酸酶在靶序列处使DNA双链体解旋并且切

割至少一个DNA链,如通过由与Cas复合的crRNA或向导RNA识别靶序列介导的。此类通过Cas内切核酸酶识别并切割靶序列通常在正确的前间区序列邻近基序(PAM)位于或邻近DNA靶序列的3'端时进行。另选地,本文的Cas蛋白质可缺乏DNA切割或切口活性,但当与合适的RNA组分复合时,仍然能够特异性结合到DNA靶序列。本文的优选的Cas蛋白质为Cas9。

[0066] 本文的“Cas9”(以前称为Cas5、Csn1或Csx12)是指为了特异性识别和切割全部或部分DNA靶序列,与crRNA和tracrRNA,或与向导RNA形成复合物的II型CRISPR体系的Cas内切核酸酶。Cas9蛋白质包含RuvC核酸酶结构域和HNH(H-N-H)核酸酶结构域,其各自在靶序列处切割单DNA链(两个结构域的协同作用导致DNA双链切割,然而一个结构域的活性导致切口)。一般来讲,RuvC结构域包含亚结构域I、II和III,其中结构域I位于Cas9的N末端附近,并且亚结构域II和III位于蛋白质的中间,HNH结构域的旁侧(Hsu等人,Cell 157:1262-1278)。“Apo-Cas9”是指不与RNA组分复合的Cas9。Apo-Cas9可结合DNA,但以非特异性方式进行该结合,并且不能切割DNA(Stenberg等人,Nature 507:62-67)。

[0067] 在一些实施方案中,Cas内切核酸酶可包含Cas9多肽的改性形式。Cas9多肽的改性形式可包括降低Cas9蛋白质的天然存在的核酸酶活性的氨基酸变化(例如,缺失、插入或替换)。例如,在一些情况下,Cas9蛋白质的改性形式具有小于50%、小于40%、小于30%、小于20%、小于10%、小于5%、或小于1%的对应野生型Cas9多肽的核酸酶活性(2014年3月6日公布的美国专利申请US20140068797 A1)。在一些情况下,Cas9多肽的改性形式不具有显著的核酸酶活性并且被称为催化上“失活的Cas9”或“灭活的cas9(dCas9)。”无催化活性的Cas9变体包括在HNH和RuvC核酸酶结构域中包含突变的Cas9变体。这些无催化活性的Cas9变体能够与sgRNA相互作用并且结合到体内的靶位点但不能切割靶DNA的任一条链。该作用模式,结合但不使DNA断裂可用于瞬时减少染色体中特异性基因座的表达,但不导致永久性基因改变。

[0068] 无催化活性的Cas9可融合至异源序列(2014年3月6日公布的美国专利申请US20140068797 A1)。合适的融合对象包括但不限于多肽,所述多肽提供通过直接作用于靶DNA或与靶DNA缔合的多肽(例如,组蛋白或其它DNA结合蛋白)而间接增加转录的活性。另外合适的融合对象包括但不限于,提供以下活性的多肽:甲基转移酶活性、脱甲基酶活性、乙酰转移酶活性、脱乙酰酶活性、激酶活性、磷酸酶活性、泛素连接酶活性、去泛素化活性、腺苷酰化活性、去腺苷酰化活性、SUMO化活性、去SUMO化活性、核糖基化活性、去核糖基化活性、豆蔻酰化活性、或去豆蔻酰化活性。其它合适的融合对象包括但不限于直接提供靶核酸的增加的转录的多肽(例如,转录激活因子或其片段,募集转录激活因子的蛋白质或其片段,小分子/药物应答转录调控因子等)。无催化活性的Cas9也可融合至FokI核酸酶以产生双链断裂(Guillinger等人,Nature biotechnology,第32卷,第6号,2014年6月)。

[0069] 本文的术语“RNA组分”是指包含与DNA靶序列的链互补的核糖核酸序列的RGEN的RNA组分。该互补序列在本文中被称作“向导序列”或“可变靶向结构域”序列。本文的合适的RNA组分的示例包括crRNA和向导RNA。另外,本文的RNA组分不具有5' -端。

[0070] 本文的术语“CRISPR RNA”(crRNA)是指可与一种或多种Cas蛋白质(例如,Cas9)形成复合物并且向所述复合物提供DNA结合特异性的RNA序列。crRNA提供DNA结合特异性,因为其包含与DNA靶序列的链互补的“向导序列”(“可变靶向结构域”[VT])。crRNA还包含由crRNA源自其中的CRISPR基因座的重复区编码的“重复序列”(“tracr RNA匹配序列”)。

crRNA的重复序列可与tracrRNA的5'端处的序列退火。天然CRISPR体系中的crRNA源自CRISPR基因座转录的“pre-crRNA”。pre-crRNA包含间隔区和重复区；间隔区包含与DNA靶位点序列互补的独特序列。天然体系中的Pre-crRNA被加工成多个不同的crRNA,其各自具有向导序列连同重复序列的一部分。CRISPR体系利用crRNA,例如用于DNA靶向特异性。

[0071] 本文的术语“反式激活CRISPR RNA”(tracrRNA)是指用于II型CRISPR体系的非编码RNA,并且在5'-至-3'方向上,包含:(i)与CRISPR II型crRNA的重复区退火的序列,和(ii)包含茎环的部分(Deltcheva等人,Nature 471:602-607)。

[0072] 术语“向导RNA”(gRNA)和“单向导RNA”(sgRNA)在本文中可互换使用。本文的gRNA可指包含可操作地连接至tracrRNA的crRNA的嵌合序列。另选地,gRNA可指例如crRNA和tracrRNA的合成融合体。Jinek等人(Science 337:816-821)公开了一些gRNA特征。gRNA还可根据以下特征来表征:具有向导序列(可变靶向结构域),之后是Cas内切核酸酶识别(CER)结构域[2015年2月26日公布的W02015026883,2015年3月19日公布的美国专利申请US 2015-0082478 A1,和2015年2月26日公布的US 2015-0059010 A1,其全部以引用方式全文并入本文]。CER结构域包含tracrRNA配对序列,之后是tracrRNA序列。

[0073] 术语“靶位点序列”、“靶位点”、“靶序列”、“靶DNA”、“DNA靶序列”、“靶基因座”、“基因组靶位点”、“基因组靶序列”、“基因组靶基因座”和“前间区序列”在本文中可互换使用。靶位点序列是指在非常规酵母的基因组中的染色体、附加体、或任何其它DNA分子上的多核苷酸序列,本文的RGEN可对其识别、结合并任选地切口或切割。靶位点可以为:(i)酵母中的内源性/天然位点,(ii)对酵母异源的,并且因此不是天然存在于基因组中的,或(iii)与其天然存在之处相比,存在于异源基因组位置中。

[0074] 本文的靶位点序列的长度为至少13个核苷酸并具有链,所述链具有与(crRNA或gRNA)的向导序列的足够互补性从而能够与向导序列杂交并引导Cas蛋白质或Cas蛋白质复合物与靶序列的序列-特异性结合(在某些实施方案中,在合适的PAM邻近靶序列时)。切割/切口位点(适用于内切核酸Cas或切口Cas)可在靶序列内(,例如使用Cas9)或者切割/切口位点可在靶序列外(例如,使用融合至异源内切核酸酶结构域的Cas9,诸如源自FokI酶的Cas9)。

[0075] 本文的“人工靶位点”或“人工靶序列”是指已被引入非常规酵母的基因组中的靶序列。在一些实施方案中,人工靶序列可以为在序列上与酵母的基因组中的天然靶序列相同,但位于基因组中的不同位置(异源位置)处,或者如果位于酵母的基因组中的相同位置处,则其可不同于天然靶序列。

[0076] 本文的“附加体”是指除了酵母细胞的染色体之外,可自主存在于酵母细胞中的DNA分子(可复制和传递到子细胞)。附加DNA可以是天然的或与酵母细胞异源的。本文的天然附加体的示例包括线粒体DNA(mtDNA)。本文的异源附加体的示例包括质粒和酵母人工染色体(YAC)。

[0077] 本文的“前间区序列邻近基序(PAM)”是指通过本文的RGEN识别的短序列。本文的PAM的序列和长度可根据所用的Cas蛋白质或Cas蛋白质复合物而不同,但通常例如为2、3、4、5、6、7或8个核苷酸长。

[0078] 术语“5'-端”和“7-甲基鸟苷酸(^m7G)端”在本文中可互换使用。7-甲基鸟苷酸残基位于真核生物中信使RNA(mRNA)的5'末端。RNA聚合酶II(Pol II)转录真核生物中的mRNA。

信使RNA封端通常如下进行:通过RNA末端磷酸酶去除mRNA转录物的最末端5' 磷酸酯基团,保留两个末端磷酸酯。通过鸟苷酰转移酶将鸟苷一磷酸酯(GMP)添加到转录物的末端磷酸酯,从而在转录物末端处保留5'-5'三磷酸酯连接的鸟嘌呤。最终,该末端胍基的7-氮被甲基转移酶甲基化。

[0079] 本文的术语“不具有5'-端”用来指具有例如5'-羟基基团,而不是5'-端的RNA。此类RNA可被称为例如“未封端的RNA”。未封端的RNA可以在转录后在核中更好的积聚,因为5'-封端的RNA经受核输出。本文的一种或多种RNA组分未封端。

[0080] 术语“核酶”和“核糖核酸酶”在本文中可互换使用。核酶是指形成次级、三级和/或四级结构的一个或多个RNA序列,其可在特定位点处切割RNA。核酶包括能够在相对于核酶序列的顺式位点处切割RNA(即,自催化,或自切割)的“自切割核酶”。已经描述了核酶裂解活性的一般性质(例如,Lilley,Biochem.Soc.Trans.39:641-646)。本文的“锤头核酶”(HHR)可包含由三个碱基配对的茎和催化时涉及的高度保守的非互补核苷酸的芯组成的小催化RNA基序。Pley等人(Nature 372:68-74)和Hammann等人(RNA 18:871-885)(所述文献以引用方式并入本文)公开了锤头核酶结构和活性。本文的锤头核酶可包含“最小锤头”序列,如例如由Scott等人所公开的(Cell 81:991-1002,以引用方式并入本文)。

[0081] 在本公开的一个实施方案中,所述方法包括将RNA引导的内切核酸酶(RGEN)靶向到非常规酵母中的染色体或附加体上的靶位点序列的方法,所述方法包括向所述酵母提供第一重组DNA构建体,所述第一重组DNA构建体包含编码Cas内切核酸酶的DNA序列,和至少第二重组DNA构建体,所述第二重组DNA构建体包含编码RNA组分上游的核酶的DNA序列,其中由第二重组DNA构建体转录的RNA自催化地去除核酶以产生所述RNA组分,其中RNA组分和Cas9内切核酸酶可形成RGEN,所述RGEN可结合到全部或部分靶位点序列。

[0082] 在本公开的一个实施方案中,非常规酵母包含多核苷酸序列,所述多核苷酸序列包含可操作地连接至至少一个核苷酸序列的启动子,其中所述核苷酸序列包含编码在编码RNA组分的DNA序列上游的核酶的DNA序列,其中所述RNA组分包含与酵母中染色体或附加体上的靶位点序列互补的可变靶向结构域,其中所述RNA组分可形成RNA-引导的内切核酸酶(RGEN),其中所述RGEN可结合到全部或部分靶位点序列,其中由核苷酸序列转录的RNA自催化地去除核酶以产生所述RNA组分,其中所述RNA组分不具有5'端。

[0083] 核酶还包括切割其自身序列的5',去除任何前述转录物但保留完整核酶序列的核酶。

[0084] 在本公开的一个实施方案中,非常规酵母包含多核苷酸序列,所述多核苷酸序列包含可操作地连接至至少一个核苷酸序列的启动子,其中所述核苷酸序列包含编码在编码RNA组分的DNA序列上游的核酶的DNA序列,其中所述RNA组分包含与酵母中染色体或附加体上的靶位点序列互补的可变靶向结构域,其中所述RNA组分可形成RNA-引导的内切核酸酶(RGEN),其中所述RGEN可结合到全部或部分靶位点序列,其中由核苷酸序列转录的RNA自催化地去除核酶以产生所述RNA组分,其中由核苷酸序列转录的RNA不自催化地去除核酶,从而产生不具有5'端的核酶-RNA组分融合分子。

[0085] 术语“靶向”、“基因靶向”、“DNA靶向”、“编辑”、“基因编辑”和“DNA编辑”在本文中可互换使用。本文的DNA靶向可以为在特定DNA序列处,诸如在非常规酵母的染色体或附加体中,特异性引入插入缺失(indel)、敲除或敲入。一般来讲,DNA靶向在本文中可通过利用

与合适的RNA组分缔合的Cas蛋白质在非常规酵母中的特定DNA序列处切割一个或两条链来进行。此类DNA切割,如果是双链断裂(DSB),则可促进NHEJ过程,这可导致靶位点处插入缺失(indel)形成。另外,不考虑切割是单链断裂(SSB)或DSB,在DNA缺口或切割位点处提供合适的供体DNA多核苷酸时,可促进HR过程。取决于供体DNA多核苷酸的序列,此类HR方法可用于在靶位点处引入敲除或敲入。

[0086] 另选地,本文的DNA靶向可指本文的Cas/RNA组分复合物与靶DNA序列的特异性缔合,其中Cas蛋白质切割或不切割DNA链(取决于Cas蛋白质的内切核酸酶结构域的状态)。

[0087] 本文的术语“插入缺失(indel)”是指在染色体或附加体的靶DNA序列中的核苷酸碱基的插入或缺失。此类插入或缺失可具有例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个碱基。在某些实施方案中,插入缺失可甚至更大,至少约20、30、40、50、60、70p、80、90或100个碱基,如果在基因的开放阅读框(ORF)内引入插入缺失时,则有时插入缺失通过形成移码突变来破坏由ORF编码的蛋白质的野生型表达。

[0088] 术语“敲除”、“基因敲除”和“基因组敲除”在本文中可互换使用。敲除表示通过利用Cas蛋白质靶向而使本文的非常规酵母的DNA序列部分或完全不起作用;此类DNA序列在敲除之前例如可编码氨基酸序列,或可具有调控功能(例如,启动子)。可通过插入缺失(通过NHEJ)或通过特异性去除序列产生敲除,其减少或完全破坏靶位点处或附近的序列功能。本文的敲除DNA多核苷酸序列可另选地表征为例如部分或完全破坏或减量调节。

[0089] 在一个实施方案中,本公开涉及一种非常规酵母,其包含Cas9内切核酸酶和多核苷酸序列,所述多核苷酸序列包含可操作地连接至至少一个核苷酸序列的启动子,其中所述核苷酸序列包含编码在编码RNA组分的DNA序列上游的核酶的DNA序列,其中所述RNA组分包含与酵母中染色体或附加体上的靶位点序列互补的可变靶向结构域,其中所述RNA组分可与Cas内切核酸酶形成RNA-引导的内切核酸酶(RGEN),其中所述RGEN可结合到靶位点序列。Cas9内切核酸酶可作为蛋白质引入酵母中或可经由重组DNA构建体引入。Cas9内切核酸酶可通过本领域已知的任何方法以稳定或瞬时方式表达。

[0090] 术语“敲入”、“基因敲入”和“基因组敲入”在本文中可互换使用。敲入表示通过利用Cas蛋白质靶向置换或插入非常规酵母中的特定DNA序列处的DNA序列。敲入的示例为在基因的编码区中特异性插入异源氨基酸编码序列,或在遗传基因座中特异性插入转录调控元件。

[0091] 术语“供体多核苷酸”、“供体DNA”、“靶向多核苷酸”和“靶向DNA”在本文中可互换使用。供体多核苷酸是指包含与位于或靠近DNA靶位点处的序列同源的至少一个序列的DNA序列(例如,由本文的Cas蛋白质特异性靶向的序列)。包括多核苷酸(在与待编辑的核苷酸序列相比时,包含至少一个核苷酸修饰)的供体DNA多核苷酸也称为“多核苷酸修饰模板”、“多核苷酸修饰模板DNA”或“模板DNA”。核苷酸修饰可为至少一个核苷酸的替换、添加或缺失。任选地,多核苷酸修饰模板还可包含至少一种核苷酸修饰旁侧的同源核苷酸序列,其中旁侧同源核苷酸序列向待编辑的所需核苷酸序列提供充分的同源性。

[0092] 本文的供体多核苷酸内的“同源序列”可包含或由至少约25个核苷酸的序列组成,所述序列与位于或靠近靶位点处的序列具有100%同一性,或与位于或靠近靶位点处的序列具有至少约95%、96%、97%、98%或99%同一性。

[0093] 在某些实施方案中,供体DNA多核苷酸可具有由与靶位点处的序列异源的序列隔

开的两个同源序列。此类供体多核苷酸的这两个同源序列可被称为“同源臂”，其侧接异源序列。靶位点与具有两个同源臂的供体多核苷酸之间的HR通常导致靶位点处的序列被供体多核苷酸的异源序列置换（位于与供体多核苷酸的同源臂同源的DNA序列之间的靶位点序列由供体多核苷酸的异源序列置换）。在具有两个同源臂的供体多核苷酸中，所述臂可由1个或多个核苷酸隔开（即，供体多核苷酸中的异源序列的长度可以为至少1个核苷酸）。可在本文的非常规酵母中进行的各种HR程序公开于例如，DNA Recombination: Methods and Protocols: 第1版（H.Tsubouchi编辑，Springer-Verlag, New York, 2011）中，其以引用方式并入本文。

[0094] 在一个实施方案中，供体DNA构建体包含待插入Cas内切核酸酶的靶位点中的目的多核苷酸，其中供体DNA构建体还包括侧接目的多核苷酸的第一同源性区域和第二同源性区域。供体DNA的第一同源性区域和第二同源性区域分别与存在于植物基因组的靶位点中或旁侧的第一基因组区域和第二基因组区域共享同源性。

[0095] 术语“以体积计的百分比”、“体积百分比”、“体积%”和“v/v%”在本文中可互换使用。溶液中溶质的体积百分比可使用下式确定： $[(\text{溶质体积}) / (\text{溶液体积})] \times 100\%$ 。

[0096] 术语“以重量计的百分比”、“重量百分比（重量%）”以及“重量-重量百分比（重量/重量%）”在本文中可互换使用。重量%是指物质在其被包含于组合物、混合物或溶液中时以质量计的百分比。

[0097] 术语“多核苷酸”、“多核苷酸序列”和“核酸序列”在本文中可互换使用。这些术语涵盖核苷酸序列等。多核苷酸可为DNA或RNA的聚合物，所述DNA或RNA可为单链或双链，任选地包含合成的、非天然的或改变的核苷酸碱基。多核苷酸可由cDNA、基因组DNA、合成DNA、或它们的混合物的一个或多个片段构成。核苷酸（核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸）可以用如下单字母名称来表示：“A”表示腺苷酸或脱氧腺苷酸（分别针对RNA或DNA），“C”表示胞苷酸或脱氧胞苷酸（分别针对RNA或DNA），“G”表示鸟苷酸或脱氧鸟苷酸（分别针对RNA或DNA），“U”表示尿苷酸（针对RNA），“T”表示脱氧胸苷酸（针对DNA），“R”表示嘌呤（A或G），“Y”表示嘧啶（C或T），“K”表示G或T，“H”表示A或C或T，“I”表示肌苷，“W”表示A或T，并且“N”表示任意核苷酸（例如，如果涉及DNA序列，N可以为A、C、T或G；如果涉及RNA序列，N可以为A、C、U或G）。本文所公开的任何RNA序列（例如，crRNA、tracrRNA、gRNA）可通过合适的DNA序列编码。

[0098] 如本文所用，术语“分离的”是指已经从其天然来源全部或部分纯化的多核苷酸或多肽分子。在一些情况下，分离的多核苷酸或多肽分子是较大组合物、缓冲体系或试剂混合物的一部分。例如，分离的多核苷酸或多肽分子可以异源方式包含在细胞或生物体内。

[0099] 如本文所用，术语“基因”是指由编码区表达RNA（RNA由DNA多核苷酸序列转录）的DNA多核苷酸序列，所述RNA可以为信使RNA（编码蛋白质）或非蛋白质编码RNA（例如，本文的crRNA、tracrRNA或gRNA）。基因可指单独的编码区，或可包括在编码区上游和/或下游的调控序列（例如，启动子、5'-非翻译区、3'-翻译终止子区）。编码蛋白质的编码区可另选地在本文中被称作“开放阅读框”[ORF]。“天然的”或“内源性的”基因是指天然存在的具有其自身调控序列的基因；此类基因位于其在宿主细胞的基因组中的天然位置处。“嵌合基因”是指不是天然基因的任何基因，包含在天然情况下不是一起存在的调控序列和编码序列（即，调控区和编码区彼此异源）。因此，嵌合基因可包括源于不同来源的调控序列和编码序列，或者包括源于同一来源但以不同于天然存在的方式排列的调控序列和编码序列。“外来”或

“异源”基因是指通过基因转移引入宿主生物体中的基因。外来基因可包括插入非天然生物体内的天然基因、引入天然宿主内的新位置中的天然基因、或嵌合基因。本文所公开的某些实施方案中的多核苷酸序列为异源的。“转基因”是已通过转化方法被引入基因组中的基因。“密码子优化的”开放阅读框具有经设计用以模仿宿主细胞优选的密码子使用频率的其密码子使用频率。

[0100] 天然氨基酸序列或多核苷酸序列是天然存在的,而非天然氨基酸序列或多核苷酸序列在自然界中不存在。

[0101] 如本文所用的“调控序列”是指位于基因的转录起始位点上游(例如启动子)、5′非翻译区和3′非编码区的核苷酸序列,并且其可影响由基因转录的RNA的转录、加工或稳定性,或者翻译。本文的调控序列可包括启动子、增强子、沉默子、5′非翻译前导序列、内含子、多腺苷酸化识别序列、RNA加工位点、效应子结合位点、茎-环结构以及参与基因表达调控的其它元件。本文的一个或多个调控元件可以是与本文的编码区异源的。

[0102] 如本文所用,“启动子”是指能够控制由基因转录RNA的DNA序列。一般来讲,启动子序列在基因的转录起始位点的上游。启动子可整个源于原生基因,或者由源于天然存在的不同启动子的不同元件构成,或者甚至包含合成的DNA片段。造成基因在大多数时间在大多数细胞类型中表达的启动子通常称为“组成型启动子”。本文的一个或多个启动子可以是与本文的编码区异源的。

[0103] 如本文所用,“强启动子”是指每单位时间可引导相对大量的生产性启动的启动子,和/或为驱动比酵母中基因的平均转录水平更高基因转录水平的启动子。

[0104] 如本文所用,术语“3′非编码序列”、“转录终止子”和“终止子”是指位于编码序列下游的DNA序列。这包括多腺苷酸化识别序列和编码能够影响mRNA加工或基因表达的调控信号的其它序列。

[0105] 如本文所用,术语“盒”是指可操作地连接至编码蛋白质的序列或非蛋白质编码RNA的启动子。盒可任选地可操作地连接至3′非编码序列。

[0106] 如本文所用,与多核苷酸相关的术语“上游”和“下游”分别是指“5′的”和“3′的”。

[0107] 如本文所用,术语“表达”是指(i)由编码区转录RNA(例如,mRNA或非蛋白质编码RNA,诸如crRNA、tracrRNA或gRNA),或(ii)由mRNA翻译多核苷酸。

[0108] 当用于描述基因或多核苷酸序列的表达时,术语“减量调节”、“破坏”、“抑制”、“失活”和“沉默”在本文中可互换使用,是指多核苷酸序列的转录减少或消除的情况。这导致减少或消除来自多核苷酸序列的RNA转录物,从而导致减少或消除源自多核苷酸序列的蛋白质表达(在基因包含ORF时)。另选地,减量调节可指其中来自自由多核苷酸序列产生的转录物的蛋白质翻译减少或消除的情况。另选地,减量调节可指其中由多核苷酸序列表达的蛋白质活性下降的情况。细胞中上述过程中任一种(转录、翻译、蛋白质活性)的减少可以为相对于合适的对照细胞的转录、翻译或蛋白质活性减少约40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%。减量调节可以为如本文所公开的靶向事件的结果(例如,插入缺失、敲除)。

[0109] 术语“对照细胞”和“合适的对照细胞”在本文中互换使用并且可指其中已经进行了特定修饰的细胞(例如过表达的多核苷酸、减量调节的多核苷酸)(即,“实验细胞”)。对照细胞可为不具有或不表达实验细胞的特定修饰的任何细胞。因此,对照细胞可为未转化的野生型细胞或可为经基因转化但不表达基因转化的细胞。例如,对照细胞可为实验细胞的

直系亲本,该直系亲本细胞不具有实验细胞中的特定修饰。作为另外一种选择,对照细胞可为通过一代或多代去除的实验细胞的亲本。作为另外一种选择,对照细胞可为实验细胞的同胞细胞,该同胞细胞不包含存在于实验细胞中的特定修饰。

[0110] 如本文所用,术语“增加”可指增加的数量或活性与相比较的数量或活性相比,数量或活性高至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。术语“增加的”、“大于”、和“提高的”本文互换使用。术语“增加的”可用于表征编码蛋白质的多核苷酸的表达,例如,其中“提高的表达”也可意指“过表达”。

[0111] 如本文所用,术语“可操作地连接”是指两个或更多个核酸序列缔合使得一个核酸序列的功能受另一个核酸序列影响。例如,当启动子能够影响编码序列的表达时,它可操作地与编码序列连接。即,编码序列处于启动子的转录控制下。编码序列可例如可操作地连接至调控序列。另外,例如,crRNA可以可操作地连接(融合至)本文的tracrRNA,使得crRNA的tracrRNA配对序列与tracrRNA的5'序列退火。此类可操作的连接可包含合适的成环序列,诸如GAAA (SEQ ID NO:43)、CAAA (SEQ ID NO:44)、或AAAG (SEQ ID NO:45)。

[0112] 如本文所用,术语“重组”是指例如通过化学合成或通过用基因工程技术操纵分离的核酸片段而实现的两个原本分离的序列片段的人工组合。术语“重组的”、“转基因的”、“转化的”、“工程化的”或“修饰用于外源基因表达的”在本文中可互换使用。

[0113] 用于制备本文的重组构建体/载体(例如,编码本文的核酶-RNA组分盒的DNA多核苷酸,或编码本文的Cas蛋白质的DNA多核苷酸)的方法可按照标准重组DNA和分子克隆技术,如由J.Sambrook和D.Russell (Molecular Cloning: A Laboratory Manual,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY,2001);T.J.Silhavy等人 (Experiments with Gene Fusions,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY,1984);和F.M.Ausubel等人 (Short Protocols in Molecular Biology,第5版,Current Protocols,John Wiley and Sons,Inc.,NY,2002)所述的。

[0114] 如本文所用,术语“转化”指将核酸分子转移至宿主生物体或宿主细胞中。例如,核酸分子可以为在细胞中自主复制,或整合到宿主生物体/细胞的基因组中,或在细胞中瞬时存在但不复制或整合的核酸分子。适用于转化的核酸分子的非限制性示例在本文中公开,诸如质粒和线性DNA分子。包含转化的核酸片段的宿主生物体/细胞(例如本文的非常规酵母)可被称为“转基因”、“重组”、“转化”或“转化体”。

[0115] 如本文所用,相对于多核苷酸或多肽序列的术语“序列同一性”或“同一性”是指在指定的比较窗口上为获得最大对应而比对时两个序列中相同的核酸残基或氨基酸残基。因此,“序列同一性百分比”或“同一性百分比”指通过比较窗口上比较两个最佳对齐的序列而测得的值,其中在与参考序列(其不包含添加或缺失)进行比较时,比较窗口中的多核苷酸或多肽序列的部分可包含添加或缺失(即空位)以实现两个序列的最佳比对。通过以下方式计算这种百分比:确定在两个序列中出现相同核酸碱基或氨基酸残基的位置的数目以得到匹配的位置的数目,将匹配的位置的数目除以比较窗口中位置的总数目,然后将结果乘以100以得到序列同一性百分比。应当理解,当计算DNA序列和RNA序列之间的序列同一性时,将DNA序列的T残基与RNA的U残基比对,并且可认为与RNA序列的U残基“相同”。出于测定第一核苷酸和第二核苷酸的互补度百分比的目的,可通过测定下列来获得该百分比:(i)例

如,第一多核苷酸和第二多核苷酸的互补序列之间的同一性百分比(或反之亦然),和/或(ii)可形成标准Watson和Crick碱基对的第一多核苷酸和第二多核苷酸之间的碱基的百分比。

[0116] 在National Center for Biotechnology Information (NCBI) 网站在线可用的Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 算法可用于例如测量本文所公开的两个或更多个多核苷酸序列 (BLASTN算法) 或多肽序列 (BLASTP算法) 之间的同一性百分比。另选地,序列间的同一性百分比可使用Clustal算法(例如ClustalW或ClustalV) 进行计算。对于使用Clustal比对方法的多重比对,默认值可对应于空位罚分=10、以及空位长度罚分=10。用Clustal方法进行成对比对和蛋白质序列的同一性百分比计算的默认参数可为KTUPLE=1、空位罚分=3、窗口=5、以及保留对角线=5。对于核酸,这些参数可为KTUPLE=2,空位罚分=5,窗口=4、以及保留对角线=4。另选地,序列间的同一性百分比可以利用EMBOSS算法(例如,needle) 进行,其中参数诸如空位开放=10、空位延伸=0.5、END GAP PENALTY=false、END GAP OPEN=10、END GAP EXTEND=0.5,利用BLOSUM矩阵(例如,BLOSUM62)。

[0117] 本文中,与第二序列“互补”的第一序列可另选地被称为与第二序列呈“反义”取向。

[0118] 本文公开了多种多肽氨基酸序列和多核苷酸序列作为所公开发明的某些实施方案的特征。可使用这些序列的与本文公开的序列至少约70%-85%、85%-90%或90%-95%相同的变体。或者,变体氨基酸序列或多核苷酸序列可与本文公开的序列具有至少70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。变体氨基酸序列或多核苷酸序列可具有与公开序列相同的功能/活性,或者具有公开序列的功能/活性的至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0119] 例举了在本文的Cas9蛋白质的每个氨基酸位置处的本文所公开的所有氨基酸残基。鉴于某些氨基酸彼此共享类似的结构和/或电荷特征(即保守的),在Cas9中的每个位置处的氨基酸可以公开的序列提供或用保守的氨基酸残基替换(“保守氨基酸替换”),如下:

[0120] 1. 下列小的脂族、非极性或非极性残基可以相互替换:Ala (A)、Ser (S)、Thr (T)、Pro (P)、Gly (G);

[0121] 2. 下列极性、带负电的残基和它们的酰胺可相互替换:Asp (D)、Asn (N)、Glu (E)、Gln (Q);

[0122] 3. 下列极性、带正电的残基可相互替换:His (H)、Arg (R)、Lys (K);

[0123] 4. 下列脂族、非极性的残基可相互替换:Ala (A)、Leu (L)、Ile (I)、Val (V)、Cys (C)、Met (M);并且

[0124] 5. 下列大的芳族残基可相互替换:Phe (F)、Tyr (Y)、Trp (W)。

[0125] 如下文实施例1中所示,使用Pol III启动子-转录gRNA在非常规酵母诸如解脂耶氏酵母中进行Cas9-介导的DNA靶向已被证明是困难的。因此,用于产生Cas9的RNA组分的其它方式对于在非常规酵母中提供Cas9介导的DNA靶向是有意义的。

[0126] 所公开发明的实施方案涉及非常规酵母,其包含至少一种RNA引导的内切核酸酶

(RGEN),所述RNA引导的内切核酸酶包含至少一种不具有5'端的RNA组分。该未封端的RNA组分包含与酵母中染色体或附加体中的靶位点序列互补的序列。RGEN可结合到,并任选地切割全部或部分靶位点序列。

[0127] 显著地,RGEN介导的DNA靶向在这些非常规酵母中进行,如通过在RGEN靶位点序列和外源提供的供体DNA序列之间的插入缺失形成或增加的同源重组(HR)水平所表现的。在本公开之前,非常规酵母通常难以通过HR基因靶向,通常依赖于靶位点处的随机的不频繁DNA断裂来促进其利用供体DNA进行HR。这是由于非常规酵母具有低HR活性并且反而有利于非同源端部接合(NHEJ)活性。因此,在非常规酵母中通过HR进行基因靶向现在可如在与NHEJ过程相比偏好HR的常规酵母诸如酿酒酵母中一样可行。虽然不受任何理论的束缚,但据信在非常规酵母细胞中提供至少一种不具有5'端的RNA组分导致RNA组分在所述RNA可参与RGEN介导的DNA靶向的核中更好的积聚。

[0128] 已经描述了RNA处理工具,诸如基于Csy4(Cas6)的RNA处理工具(Nissim等人,2014,Molecular Cell 54:698-710)。Csy4结合pre-crRNA茎环重复序列并特异性切割其同源底物以产生包含侧接有重复序列的片段的间隔序列的成熟crRNA(Sternberg等人,2012.RNA,18(4):661-72)。本文公开了(实施例12)使用Csy4以处理向导RNA,使得其产生不具有5'端的RNA组分(向导RNA),其中RNA组分可形成RGEN,所述RGEN可结合到并切割非常规酵母的基因组中的靶位点。

[0129] 本文的非常规酵母不是“常规”(“模型”)酵母,诸如酵母属(例如酿酒酵母,也称为芽殖酵母、面包酵母、和/或啤酒酵母)或裂殖酵母(例如,粟酒裂殖酵母(*S. pombe*),其也称为裂殖酵母)物种。在某些实施方案中,常规酵母是与由NHEJ介导的修复过程相比偏好HR DNA修复过程的酵母。

[0130] 在某些实施方案中,非常规酵母可以是与由HR介导的修复过程相比偏好NHEJ DNA修复过程的酵母。常规酵母诸如酿酒酵母和粟酒裂殖酵母通常表现出供体DNA与短旁侧同源臂(30-50bp)以超过70%的常规效率特异性整合,然而非常规酵母如巴斯德毕赤酵母、多形汉逊酵母、解脂耶氏酵母、树干毕赤酵母和乳酸克鲁维酵母通常示出与相似结构化供体DNA以小于1%的效率特异性整合(Chen等人,PLoS ONE 8:e57952)。因此,可以例如通过利用合适的供体DNA转化酵母并确定其与预测由供体DNA靶向的基因组位点特异性重组的程度来判定对HR过程的偏好。例如,如果此类测定在酵母基因组中产生供体DNA的高度随机整合,则可表现出对NHEJ的偏好(或对HR的低偏好)。用于确定酵母中DNA的特异性(HR-介导的)和/或随机(NHEJ-介导的)整合率的测定是本领域已知的(例如,Ferreira和Cooper,Genes Dev.18:2249-2254;Corrigan等人,PLoS ONE 8:e69628;Weaver等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.78:6354-6358;Keeney和Boeke,Genetics 136:849-856)。

[0131] 鉴于其低水平的HR活性,本文的非常规酵母可(i)表现出例如小于约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%或8%的由具有30-50bp旁侧同源臂的适宜供体DNA进行的特异性靶向率,和/或(ii)表现出例如大于约65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%或75%的前述供体DNA的随机整合率。适宜供体DNA的这些(i)特异性靶向率和/或(ii)随机整合率可在非常规酵母被提供如本文所公开的RGEN之前存在时来表征所述非常规酵母。在某些实施方案中,对非常规酵母提供RGEM的目的是形成位点特异性DNA单链断裂(SSB)或双链断裂(DSB),用于使酵母在特定位点处偏向HR。因此,包含本文的适宜RGEN的非

常规酵母通常应表现出利用特定供体DNA的增加的HR率。此类增加的比率可以比合适的对照(例如,利用相同供体DNA,但缺乏合适RGEN转化的相同非常规酵母)中的HR率高至少约2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍。

[0132] 在本文的某些方面,非常规酵母可以是无性繁殖(无性型)或有性繁殖(有性型)的非常规酵母。虽然本文的非常规酵母通常以单细胞形式存在,但这些酵母的某些类型可任选地能够形成假菌丝(连接的芽殖细胞串)。在其它方面,非常规酵母可以为单倍体或二倍体,和/或可以具有以这些倍数性形式中的任一种存在的能力。

[0133] 本文的非常规酵母可以本领域中已知的任何方式培养,诸如Non-Conventional Yeasts in Genetics,Biochemistry and Biotechnology:Practical Protocols(K.Wolf、K.D.Breunig、G.Barth编辑,Springer-Verlag,Berlin,Germany,2003),Yeasts in Natural and Artificial Habitats(J.F.T.Spencer、D.M.Spencer编辑,Springer-Verlag,Berlin,Germany,1997),和/或Yeast Biotechnology:Diversity and Applications(T.Satyanarayana、G.Kunze编辑,Springer,2009)中所述的,其全部均以引用方式全文并入本文。

[0134] 本文的非常规酵母的非限制性示例包括以下属的酵母:耶氏酵母属、毕赤酵母属、许旺氏酵母属、克鲁维酵母属、Arxula属、丝孢酵母属、假丝酵母属、黑粉菌属、球拟酵母属、接合酵母属、三角酵母属、隐球酵母属、红酵母属、法夫酵母属、掷孢酵母属和管囊酵母属。耶氏酵母属物种的合适的示例为解脂耶氏酵母。毕赤酵母属物种的适宜示例包括:巴斯德毕赤酵母、甲醇毕赤酵母、木糖发酵酵母、异常毕赤酵母和安格斯毕赤酵母。许旺氏酵母属(Schwanniomyces)物种的合适示例包括卡斯坦氏许旺酵母(*S.castellii*)、河岸许旺酵母(*S.alluvius*)、人许旺酵母(*S.hominis*)、西方许旺酵母(*S.occidentalis*)、*S.capriottii*、埃切许旺酵母(*S.etchellsii*)、多形许旺酵母(*S.polymorphus*)、拟多形许旺酵母(*S.pseudopolymorphus*)、范丽德许旺酵母(*S.vanrijae*)和山田许旺酵母(*S.yamadae*)。克鲁维酵母属(Kluyveromyces)物种的合适示例包括乳酸克鲁维酵母(*K.lactis*)、马克斯克鲁维酵母(*K.marxianus*)、脆壁克鲁维酵母(*K.fragilis*)、果蝇克鲁维酵母(*K.drosophilum*)、耐热克鲁维酵母(*K.thermotolerans*)、*K.phaseolusporus*、范式克鲁维酵母(*K.vanudenii*)、克鲁维酵母(*K.waltii*)、非洲克鲁维酵母(*K.africanus*)和多孢克鲁维酵母(*K.polysporus*)。Arxula物种的合适示例包括A.adeninivorans和A.terrestre。丝孢酵母属(Trichosporon)物种的合适示例包括皮状丝孢酵母(*T.cutaneum*)、头状丝孢酵母(*T.capitatum*)、皮瘤丝孢酵母(*T.inkin*)和*T.beemeri*。假丝酵母属(Candida)物种的合适示例包括白假丝酵母(*C.albicans*)、*C.ascalaphidarum*、*C.amphixiae*、南极假丝酵母(*C.antarctica*)、*C.argentea*、大西洋假丝酵母(*C.atlantica*)、*C.atmosphaerica*、蟑螂假丝酵母(*C.blattae*)、*C.bromeliacearum*、果生假丝酵母(*C.carpophila*)、*C.carvajalis*、*C.cerambycidarum*、*C.chauliodes*、延胡索假丝酵母(*C.corydali*)、*C.dosseyi*、都柏林假丝酵母(*C.dublinsiensis*)、*C.ergatensis*、*C.fructus*、光滑假丝酵母(*C.glabrata*)、发酵假丝酵母(*C.fermentati*)、吉利蒙假丝酵母(*C.guilliermondii*)、黑马朗假丝酵母(*C.haemulonii*)、*C.insectamens*、昆虫假丝酵母(*C.insectorum*)、中型假丝酵母(*C.intermedia*)、*C.jeffresii*、乳酒假丝酵母(*C.kefyr*)、*C.keroseneae*、克鲁斯假丝酵母(*C.krusei*)、葡萄牙假丝酵母(*C.lusitaniae*)、*C.lyxosophila*、麦芽糖假丝酵母

(*C.maltosa*)、*C.marina*、璞膜假丝酵母 (*C.membranlfaciens*)、梅林假丝酵母 (*C.milleri*)、莫格假丝酵母 (*C.mogii*)、嗜油假丝酵母 (*C.oleophila*)、俄勒同假丝酵母 (*C.oregonensis*)、近平滑假丝酵母 (*C.parapsilosis*)、桔假丝酵母 (*C.quercitrusa*)、皱褶假丝酵母 (*C.rugosa*)、清酒假丝酵母 (*C.sake*)、休哈塔假丝酵母 (*C.shehatea*)、*C.temnochilae*、纤细假丝酵母 (*C.tenuis*)、*C.theae*、*C.tolerans*、热带假丝酵母 (*C.tropicalis*)、*C.tsuchiya*、*C.sinolaborantium*、酱油假丝酵母 (*C.sojae*)、*C.subhashii*、维斯假丝酵母 (*C.viswanathii*)、产朊假丝酵母 (*C.utilis*)、*C.ubatubensis* 和酵母类假丝酵母 (*C.zemplanina*)。黑粉菌属 (*Ustilago*) 物种的合适示例包括燕麦散黑粉菌 (*U.avenae*)、菰黑粉菌 (*U.esculenta*)、大麦坚黑粉菌 (*U.hordei*)、玉米黑粉菌 (*U.maydis*)、大麦散黑粉菌 (*U.nuda*) 和小麦散黑粉菌 (*U.tritici*)。球拟酵母属 (*Torulopsis*) 物种的合适示例包括 *T.Geochares*、*T.azyma*、光滑球拟酵母 (*T.glabrata*) 和白球拟酵母 (*T.candida*)。接合酵母属 (*Zygosaccharomyces*) 物种的合适示例包括拜耳接合酵母 (*Z.bailii*)、二孢接合酵母 (*Z.bisporus*)、产香接合酵母 (*Z.cidri*)、发酵接合酵母 (*Z.fermentati*)、佛罗伦萨接合酵母 (*Z.florentinus*)、*Z.kombuchaensis*、缓慢接合酵母 (*Z.lentus*)、蜂蜜接合酵母 (*Z.mellis*)、小椭圆接合酵母 (*Z.microellipsoides*)、*Z.mrakii*、假鲁氏接合酵母 (*Z.pseudorouxii*) 和鲁氏接合酵母 (*Z.rouxii*)。三角酵母属 (*Trigonopsis*) 物种的合适示例包括变异三角酵母 (*T.variabilis*)。隐球酵母属 (*Cryptococcus*) 物种的合适示例包括罗伦隐球酵母 (*C.laurentii*)、浅白隐球酵母 (*C.albidus*)、新型隐球酵母 (*C.neoformans*)、格特隐球酵母 (*C.gattii*)、指甲隐球酵母 (*C.uniguttulatus*)、*C.adeliensis*、浅黄隐球酵母 (*C.aerius*)、*C.albidosimilis*、南极隐球酵母 (*C.antarcticus*)、水生隐球酵母 (*C.aquaticus*)、黑隐球酵母 (*C.ater*)、*C.bhutanensis*、*C.consortionis*、弯曲隐球酵母 (*C.curvatus*)、*C.phenolicus*、斯金纳隐球酵母 (*C.skinneri*)、地生隐球酵母 (*C.terreus*) 和 *C.Vishniacci*。红酵母属 (*Rhodotorula*) 物种的合适示例包括瘦果红酵母 (*R.acheniorum*)、*R.tula*、*R.acuta*、美洲红酵母 (*R.americana*)、南美杉红酵母 (*R.araucariae*)、北极红酵母 (*R.arctica*)、*R.armeniaca*、橙黄红酵母 (*R.aurantiaca*)、黑木耳红酵母 (*R.auriculariae*)、*R.bacarum*、海洋红酵母 (*R.benthica*)、*R.biourgei*、茂物红酵母 (*R.bogoriensis*)、*R.bronchialis*、巴方氏红酵母 (*R.buffonii*)、巨白蛤红酵母 (*R.calyptogenae*)、*R.chungnamensis*、*R.cladiensis*、珊瑚红酵母 (*R.corallina*)、*R.cresolica*、*R.crocea*、*R.cycloclastica*、*R.dairenensis*、流散红酵母 (*R.diffluens*)、*R.evergladiensis*、*R.ferulica*、*R.foliorum*、草莓红酵母 (*R.fragaria*)、粪球红酵母 (*R.fujisanensis*)、*R.futroneis*、*R.gelatinosa*、*R.glacialis*、胶粘红酵母 (*R.glutinis*)、瘦弱红酵母 (*R.gracilis*)、禾本红酵母 (*R.graminis*)、*R.grinbergisii*、*R.himalayensis*、*R.hinnulea*、*R.histolytica*、*R.hylophila*、*R.incarnata*、牧草红酵母 (*R.mgeniosa*)、爪哇红酵母 (*R.javanica*)、小石川氏红酵母 (*R.koishikawensis*)、乳糖红酵母 (*R.lactosa*)、瓣鳃红酵母 (*R.lamellibrachiae*)、*R.laryngis*、木生红酵母 (*R.lignophila*)、亚麻红酵母 (*R.lini*)、*R.longissima*、路德氏红酵母 (*R.ludwigii*)、*R.lysinophila*、海滨红酵母 (*R.marina*)、*R.martyniae-fragantis*、*R.matritensis*、*R.meli*、小红酵母 (*R.minuta*)、胶红酵母 (*R.mucilaginis*)、*R.nitens*、*R.nothofagi*、*R.oryzae*、太平洋红酵母 (*R.pacifica*)、浅红红酵母 (*R.pallida*)、对虾红酵母

(*R.peneaus*)、*R.philyla*、*R.phylloplana*、皮拉特红酵母(*R.pilatii*)、果蝇红酵母(*R.pilimanae*)、松树红酵母(*R.pinicola*)、*R.plicata*、多形红酵母(*R.polymorpha*)、*R.psychrophenolica*、*R.psychrophila*、*R.pustula*、*R.retinophila*、*R.rosacea*、*R.rosulata*、*R.rubefaciens*、*R.rubella*、*R.rubescens*、深红酵母(*R.rubra*)、*R.rubrorugosa*、*R.rufula*、*R.rutila*、*R.sanguinea*、*R.sanniei*、*R.sartoryi*、*R.silvestris*、单纯红酵母(*R.simplex*)、中国红酵母(*R.sinensis*)、斯鲁菲亚红酵母(*R.slooffiae*)、*R.sonckii*、*R.straminea*、*R.subericola*、*R.suganii*、台湾红酵母(*R.taiwanensis*)、*R.taiwaniana*、*R.terpenoidalis*、*R.terrea*、*R.texensis*、*R.tokyoensis*、*R.ulzamae*、*R.vanillica*、*R.vuilleminii*、亚罗红酵母(*R.yarrowii*)、云南红酵母(*R.yunnanensis*)和*R.Zsoltii*。法夫酵母属(*Phaffia*)物种的合适示例包括红法夫酵母(*P.rhodozyma*)。掷孢酵母属(*Sporobolomyces*)物种的合适示例包括浅红掷孢酵母(*S.alborubescens*)、版纳掷孢酵母(*S.bannaensis*)、北京掷孢酵母(*S.beijingensis*)、秋枫掷孢酵母(*S.bischoffiae*)、棒状掷孢酵母(*S.clavatus*)、*S.coprosmae*、*S.coprosmicola*、*S.corallinus*、*S.dimmenae*、*S.dracophylli*、长形掷孢酵母(*S.elongatus*)、纤细掷孢酵母(*S.gracilis*)、肌醇掷孢酵母(*S.inositophilus*)、约氏掷孢酵母(*S.johnsonii*)、*S.koalae*、*S.magnisporus*、*S.novozealandicus*、香气掷孢酵母(*S.odorus*)、*S.patagonicus*、*S.productus*、玫红掷孢酵母(*S.roseus*)、*S.sasicola*、*S.shibatanus*、独特掷孢酵母(*S.singularis*)、*S.subbrunneus*、对称掷孢酵母(*S.symmetricus*)、*S.syzygii*、*S.taupoensis*、铁杉布勒掷孢酵母(*S.tsugae*)、*S.Xanthus*和云南掷孢酵母(*S.yunnanensis*)。管囊酵母属(*Pachysolen*)物种的合适示例包括嗜鞣管囊酵母(*P.tannophilus*)。

[0135] 在本文所公开的某些实施方案中,优选解脂耶氏酵母。合适的解脂耶氏酵母的示例包括以下得自美国典型培养物保藏中心(ATCC,Manassas,VA)的分离物:菌株名称:ATCC# 20362、#8862、#8661、#8662、#9773、#15586、#16617、#16618、#18942、#18943、#18944、#18945、#20114、#20177、#20182、#20225、#20226、#20228、#20327、#20255、#20287、#20297、#20315、#20320、#20324、#20336、#20341、#20346、#20348、#20363、#20364、#20372、#20373、#20383、#20390、#20400、#20460、#20461、#20462、#20496、#20510、#20628、#20688、#20774、#20775、#20776、#20777、#20778、#20779、#20780、#20781、#20794、#20795、#20875、#20241、#20422、#20423、#32338、#32339、#32340、#32341、#34342、#32343、#32935、#34017、#34018、#34088、#34922、#34922、#38295、#42281、#44601、#46025、#46026、#46027、#46028、#46067、#46068、#46069、#46070、#46330、#46482、#46483、#46484、#46436、#60594、#62385、#64042、#74234、#76598、#76861、#76862、#76982、#90716、#90811、#90812、#90813、#90814、#90903、#90904、#90905、#96028、#201241、#201242、#201243、#201244、#201245、#201246、#201247、#201249、和/或#201847。

[0136] 解脂耶氏酵母以及本文的任何其它非常规酵母可以是产油的(例如,产生其干细胞重量的至少25%的油)和/或产生一种或多种多不饱和脂肪酸(例如 ω -6或 ω -3)。此类油性可以是由于将酵母遗传工程化以产生与其野生型形式相比升高的脂质的量。产油解脂耶氏酵母菌株的示例公开与美国专利申请公布2009/0093543、2010/0317072、2012/0052537和2014/0186906中,所述文献均以引用方式并入本文。

[0137] 本文所公开的非常规酵母的实施方案还可应用于其它微生物,诸如真菌。在某些实施方案中,真菌可以是相比于由HR介导的修复过程偏好NHEJ DNA修复过程的真菌。本文的真菌可以为担子菌、接合菌、壶菌纲或子囊菌真菌。本文所述的丝状真菌的示例包括以下属的那些:木霉属、金孢子菌属、梭孢壳菌属、脉孢菌(例如,粗糙脉孢菌、好食链孢霉)、栗疫属(例如,栗疫病菌)、短梗霉属(例如,出芽短梗霉菌)、*Filibasidium*、*Piromyces*、隐球菌、支顶孢属、*Tolypocladium*、小柱孢属、裂褶菌、侧孢霉属、青霉属(例如,比莱青霉、沙门柏干酪青霉菌、石斛青霉、产黄青霉、扩展青霉、绳状青霉菌、灰绿青霉、马尔尼菲青霉、萎地青霉、纯绿青霉、鲜绿青霉)、赤霉属(例如,*G.acuminata*、燕麦赤霉、桑生浆果赤霉、*G.circinata*、*G.cyanogena*、藤仓赤霉、错综赤霉、*G.pulicaris*、束梗镰孢赤霉、*G.tricineta*、玉米赤霉)、毁丝霉属、毛霉属(例如,鲁西氏毛霉菌、卷枝毛霉菌)、曲霉属(例如黑曲霉、米曲霉、构巢曲霉、黄曲霉、浅曲霉、土曲霉、棒曲霉、烟曲霉)、镰孢属(例如禾谷镰刀菌、尖孢镰刀菌、*F.bubigenum*、茄腐镰孢菌、尖孢镰刀菌、轮枝样镰刀菌、层生镰刀菌、*F.venenatum*)、和腐质霉属、以及其无性型和有性型。如果需要,可通过如Barnett和Hunter (Illustrated Genera of Imperfect Fungi,第3版,Burgess Publishing Company,1972)中所公开的形态来限定本文真菌的属和物种。真菌可以任选地被表征为有害生物/病原体,诸如动物(例如,人类)的有害生物/病原体。

[0138] 在本文的某些方面,木霉属(*Trichoderma*)物种包括侵占木霉(*T.aggressivum*)、*T.amazonicum*、棘孢木霉(*T.asperellum*)、深绿木霉(*T.atroviride*)、黄绿木霉(*T.aureoviride*)、澳洲康宁木霉(*T.austrokingii*)、短蜜木霉(*T.brevicompactum*)、雪白雪木霉(*T.candidum*)、加勒比木霉(*T.caribbaeum*)、低头木霉(*T.catoptron*)、奶油木霉(*T.cremeum*)、陶瓷木霉(*T.ceramicum*)、蜡素木霉(*T.cerinum*)、绿孢木霉(*T.chlorosporum*)、色精木霉(*T.chromospermum*)、肉桂色木霉(*T.cinnamomeum*)、橘绿木霉(*T.citrinoviride*)、厚木霉(*T.crassum*)、奶油木霉(*T.cremeum*)、丁莉亚木霉(*T.dingleyeae*)、多罗西木霉(*T.dorotheae*)、平展木霉(*T.effusum*)、猬木霉(*T.erinaceum*)、爱莎尼亚木霉(*T.estonicum*)、可育木霉(*T.fertile*)、明胶木霉(*T.gelatinosus*)、加纳木霉(*T.ghanense*)、钩状木霉(*T.hamatum*)、哈茨木霉(*T.harzianum*)、旋状木霉(*T.helicum*)、交织木霉(*T.intricatum*)、长枝康宁木霉(*T.konilangbra*)、康宁木霉(*T.koningii*)、拟康宁木霉(*T.koningiopsis*)、长枝木霉(*T.longibrachiatum*)、长毛木霉(*T.longipile*)、微孢木霉(*T.minutisporum*)、矩孢木霉(*T.oblongisporum*)、卵孢木霉(*T.ovalisporum*)、彼得森木霉(*T.petersenii*)、竹生木霉(*T.phyllostahydis*)、洋大戟草木霉(*T.piluliferum*)、侧耳木霉(*T.pleuroticola*)、平菇木霉(*T.pleurotum*)、多孢木霉(*T.polysporum*)、假康宁木霉(*T.pseudokoningii*)、软毛木霉(*T.pubescens*)、里氏木霉(*T.reesei*)、罗杰氏木霉(*T.rogersonii*)、俄罗斯木霉(*T.rossicum*)、土星孢木霉(*T.saturnisporum*)、中国木霉(*T.sinensis*)、弯梗木霉(*T.Sinuosum*)、螺旋木霉(*T.spirale*)、草黄木霉(*T.stramineum*)、硬毛木霉(*T.strigosum*)、子座木霉(*T.stromaticum*)、球座木霉(*T.surrotundum*)、台湾木霉(*T.taiwanense*)、泰国木霉(*T.thailandicum*)、革菌木霉(*T.thelephoricolum*)、可可木霉(*T.theobromicola*)、绒毛木霉(*T.tomentosum*)、毛簇木霉(*T.velutinum*)、绿木霉(*T.virens*)、绿色木霉(*T.viride*)和渐绿木霉(*T.viridescens*)。本文的木霉属物种可例

如,如Trichoderma: Biology and Applications (P.K.Mukherjee等人编辑,CABI, Oxfordshire,UK,2013)中所述培养和/或操纵,所述文献以引用方式并入本文。

[0139] 在某些实施方案中,微生物细胞为藻类细胞。例如,藻类细胞可以来自下列中任一种:绿藻类(绿藻类(green algae))、红藻类(红藻类(red algae))、褐藻类(褐藻类(brown algae))、硅藻类(硅藻类(diatoms))和鞭毛藻类(鞭毛藻类(dinoflagellates))。在其它方面,藻类细胞可以是微藻类(例如浮游植物、微球藻或浮游藻类)或大型藻类(海带、海藻)。又如,本文的藻类细胞可以为紫菜属(紫菜)、红皮藻属如掌状红皮藻(掌状红皮藻(dulse))、节旋属如钝顶节旋藻(钝顶节旋藻(spirulina))、小球藻(例如,海水小球藻(C.protothecoides)、角叉菜属诸如角叉菜(爱尔兰藓(Irish moss))、丝囊藻属、马尾藻属、Cochayuyo、葡萄藻属(例如布朗葡萄藻)、杜氏藻属(例如,杜氏盐藻)、Gracilaria、颗石藻属(例如,颗石藻)、针形纤维藻、小环藻属、汉坦草属、Nannochloris、微拟球藻、菱形藻属、褐指藻属(例如,三角褐指藻)、栅藻属、Stichococcus、扁藻属(例如,肩突四鞭藻)、海链藻属(例如,伪矮海链藻)、隐甲藻属(例如,隐甲藻)、Neochloris(例如,N.oleoabundans)、或裂壶藻。本文的藻类物种可例如,如Thompson(Algal Cell Culture. Encyclopedia of Life Support System (EOLSS) Biotechnology,第1卷中所述培养和/或操纵,可在eolss.net/sample-chapters互联网网站获得),其以引用方式并入本文。

[0140] 本文的包含至少一种RGEN的非常规酵母不存在于自然界中,所述RGEN包含至少一种不具有5'端的RNA组分。不受任何特定理论的束缚,据信此类酵母不天然存在,因为已经发现本文的RGEN仅在例如原核生物中出现。另外,据信酵母的某些实施方案由于包含具有含gRNA的RNA组分的RGEN,所以不天然存在,所述gRNA表示crRNA与tracrRNA的异源连接。

[0141] 本文的RGEN是指包含至少一种Cas蛋白质和至少一种RNA组分的复合物。合适的Cas蛋白质的示例包括I型、II型或III型CRISPR体系的一种或多种Cas内切核酸酶(Bhaya等人,Annu.Rev.Genet.45:273-297,其以引用方式并入本文)。I型CRISPR Cas蛋白质可以为,例如Cas3或Cas4蛋白质。II型CRISPR Cas蛋白质可以为,例如Cas9蛋白质。III型CRISPR Cas蛋白质可以为,例如Cas10蛋白质。在优选的实施方案中,使用Cas9蛋白质。在某些实施方案中,Cas蛋白质可以为细菌或古细菌蛋白质。本文的I-III型CRISPR Cas蛋白质通常来源于原核生物;I型和III型Cas蛋白质可源自细菌或古细菌物种,然而II型Cas蛋白质(即,Cas9)可源自例如细菌物种。在其它实施方案中,合适的Cas蛋白质包括下列中的一种或多种:Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4、其同源物、或其修饰型式。

[0142] 在所公开发明的其它方面,本文的Cas蛋白质可以为以下属中的任一种: Aeropyrum、Pyrobaculum、硫化裂片菌(Sulfolobus)、古球状菌属(Archaeoglobus)、嗜盐小盒菌属(Haloarcula)、甲烷杆菌属(Methanobacterium)、产甲烷球菌属(Methanococcus)、甲烷八叠球菌属(Methanosarcina)、Methanopyrus、火球菌属(Pyrococcus)、灼热嗜酸古菌(Picrophilus)、Thermioplasmia、棒状杆菌(Corynebacterium)、分支杆菌(Mycobacterium)、链霉菌(Streptomyces)、产液菌属(Aquifrx)、卟啉单胞菌属(Porphromonas)、绿菌属(Chlorobium)、栖热菌属(Thermus)、杆菌(Bacillus)、利斯特菌

(*Listeria*)、葡萄球菌 (*Staphylococcus*)、梭菌属 (*Clostridium*)、热厌氧杆菌属 (*Thermoanaerobacter*)、支原体属 (*Mycoplasma*)、梭杆菌属 (*Fusobacterium*)、蓝细菌属 (*Azarcus*)、色杆菌属 (*Chromobacterium*)、奈瑟菌属 (*Neisseria*)、亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*)、脱硫弧菌 (*Desulfovibrio*)、地杆菌 (*Geobacter*)、*Myrococcus*、弯曲杆菌 (*Campylobacter*)、*Wolinella*、不动细菌属 (*Acinetobacter*)、欧文氏菌 (*Erwinia*)、埃希氏菌属 (*Escherichia*)、军团杆菌 (*Legionella*)、甲基球菌属 (*Methylococcus*)、巴斯德氏菌属 (*Pasteurella*)、光杆菌属 (*Photobacterium*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*)、黄单胞菌属 (*Xanthomonas*)、耶尔森菌属 (*Yersinia*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、密螺旋体属 (*Treponema*)、氟朗西斯氏菌属 (*Francisella*) 或栖热袍菌属 (*Thermotoga*)。另选地, 本文的 Cas 蛋白质可例如通过 SEQ ID NO: 462-465、467-472、474-477、479-487、489-492、494-497、499-503、505-508、510-516 或 517-521 中任一个编码, 如美国专利申请公布 2010/0093617 中所公开的, 该文献以引用的方式并入本文。

[0143] 在某些实施方案中, RGEN 包含 Cas9 氨基酸序列。本文的 Cas9 蛋白质的氨基酸序列, 以及本文的某些其它 Cas 蛋白质可源自例如链球菌 (例如, 化脓链球菌、肺炎链球菌、嗜热链球菌、无乳链球菌、副溶血链球菌、口腔链球菌、唾液链球菌、猕猴链球菌、停乳链球菌、咽峡炎链球菌、星座链球菌、*S. pseudoporcinus*、变形链球菌)、李斯特菌 (例如无害利斯特氏菌)、螺原体属 (例如, 蜂螺旋原体、*S. syrphidicola*)、消化链球菌、*Atopobium*、卟啉单胞菌属 (例如 *P. catoniae*)、普雷沃菌属 (例如中间普雷沃菌)、韦荣球菌属、密螺旋体 (例如, *T. socranskii*、齿垢密螺旋体)、噬二氧化碳菌、大芬戈尔德菌 (例如, 大芬戈尔德菌)、*Coriobacteriaceae* (例如, *C. bacterium*)、*Olsenella* (例如, *O. profusa*)、嗜血杆菌属 (例如, 唾液嗜血杆菌、*H. pittmamae*)、巴斯德菌属 (例如, 贝氏巴斯德菌)、*Olivibacter* (例如, *O. sitiensis*)、*Epilithonimonas* (例如, *E. tenax*)、*Mesonina* (例如, *M. mobilis*)、乳酸菌属 (例如, 胚牙乳杆菌)、杆菌属 (例如, 蜡样芽胞杆菌)、*Aquimarina* (例如, *A. muelleri*)、金黄杆菌属 (例如, *C. palustre*)、多形杆状菌 (例如, *B. graminisolvens*)、奈瑟氏菌属 (例如, 脑膜炎奈瑟氏菌)、弗朗西斯氏菌属 (例如, *F. novicida*)、或者黄杆菌属 (例如, 黄杆菌属、土壤杆菌) 物种。在本文的某些方面, 优选化脓链球菌 Cas9。又如, Cas9 蛋白质可以为 Chylinski 等人 (RNA Biology 10:726-737) 中所公开的 Cas9 蛋白质中任一种, 所述文献以引用方式并入本文。

[0144] 因此, 本文的 Cas9 蛋白质的序列可包含例如以如下 GenBank 登录号所公开的 Cas9 氨基酸序列中任一种: G3ECR1 (嗜热链球菌)、WP_026709422、WP_027202655、WP_027318179、WP_027347504、WP_027376815、WP_027414302、WP_027821588、WP_027886314、WP_027963583、WP_028123848、WP_028298935、Q03JI6 (嗜热链球菌)、EGP66723、EGS38969、EGV05092、EHI65578 (*S. pseudoporcinus*)、EIC75614 (口腔链球菌)、EID22027 (星座链球菌)、EIJ69711、EJP22331 (口腔链球菌)、EJP26004 (咽峡炎链球菌)、EJP30321、EPZ44001 (化脓链球菌)、EPZ46028 (化脓链球菌)、EQL78043 (化脓链球菌)、EQL78548 (化脓链球菌)、ERL10511、ERL12345、ERL19088 (化脓链球菌)、ESA57807 (化脓链球菌)、ESA59254 (化脓链球菌)、ESU85303 (化脓链球菌)、ETS96804、UC75522、EGR87316 (停乳链球菌)、EGS33732、EGV01468 (口腔链球菌)、EHJ52063 (猕猴链球菌)、EID26207 (口腔链球菌)、EID33364、EIG27013 (副溶血链球菌)、EJF37476、EJO19166 (链球菌属 BS35b)、EJU16049、EJU32481、YP_

006298249、ERF61304、ERK04546、ETJ95568 (无乳链球菌)、TS89875、ETS90967 (链球菌属SR4)、ETS92439、EUB27844 (链球菌属BS21)、AFJ08616、EUC82735 (链球菌属CM6)、EWC92088、EWC94390、EJP25691、YP_008027038、YP_008868573、AGM26527、AHK22391、AHB36273、Q927P4、G3ECR1或Q99ZW2 (化脓链球菌),其以引用方式并入。可使用这些Cas9蛋白质序列中任一种的变体,但当与本文的RNA组分缔合时,应具有针对DNA的特异性结合活性,和任选的内切核酸酶活性。此类变体可包含与参考Cas9的氨基酸序列至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0145] 另选地,本文的Cas9蛋白质可由例如以下SEQ ID NO中的任一个编码:462 (嗜热链球菌)、474 (嗜热链球菌)、489 (无乳链球菌)、494 (无乳链球菌)、499 (变形链球菌)、505 (化脓链球菌)或518 (化脓链球菌),如美国专利申请公布2010/0093617所述(以引用方式并入本文)。另选地,本文的Cas9蛋白质可包含,例如SEQ ID NO:11的氨基酸序列,或SEQ ID NO:11的残基1-1368。另选地,Cas9蛋白质可包含例如与前述氨基酸序列中的任一个至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。当与本文的RNA组分缔合时,此类变体Cas9蛋白质应具有针对DNA的特异性结合活性,和任选地切割或切口活性。

[0146] 本文所用的Cas蛋白质(例如Cas9)的起源可来自RNA组分源自其中的相同物种,或其可来自不同物种。例如,包含源自链球菌物种(例如,化脓链球菌或嗜热链球菌)的Cas9蛋白质的RGEN可与具有源自相同链球菌物种的序列(例如crRNA重复序列、tracrRNA序列)的至少一种RNA组分复合。另选地,本文所用的Cas蛋白质(例如Cas9)的起源可来自RNA组分源自其中的不同物种(Cas蛋白质和RNA组分可彼此异源);此类异源Cas/RNA组分RGEN应具有DNA靶向活性。

[0147] 可以通过本领域已知的任何合适的测定法来评估确定本文的Cas蛋白质针对特异性靶DNA序列的结合活性和/或内切核酸酶活性,例如美国专利号8697359中所公开的,其以引用方式在本文中公开。可例如通过以下方法来进行测定:在非常规酵母中表达Cas蛋白质和合适的RNA组分,并且然后检查预测的DNA靶位点的插入缺失存在(该特定测定法中的Cas蛋白质可具有完整的内切核酸酶活性[双链切割活性])。可例如经由DNA测序方法或通过测定靶序列的功能丧失来推测插入缺失形成来进行对于预测的靶位点处插入缺失的存在的检查。在另一个示例中,可通过在非常规酵母中表达Cas蛋白质和合适的RNA组分来测定Cas蛋白质活性,已向所述非常规酵母提供供体DNA,所述供体DNA包含与靶位点处或附近的序列同源的序列。在靶位点处的供体DNA序列的存在(诸如可通过供体和靶序列之间的成功HR所预测的)可指示靶向存在。

[0148] 本文的Cas蛋白质诸如Cas9通常还包含异源核定位序列(NLS)。例如,本文的异源NLS氨基酸序列可具有足够的强度以驱动Cas蛋白质以可检测的量在本文酵母细胞的核中积累。NLS可包含碱基的一个(单倍体)或多个(例如,二倍体)短序列(例如,2至20个残基)、带正电的残基(例如,赖氨酸和/或精氨酸),并且可位于Cas氨基酸序列的任何位置处但使得其暴露于蛋白质表面上。例如,NLS可以可操作地连接至本文Cas蛋白质的N末端或C末端。例如,两个或更多个NLS序列可连接至Cas蛋白质,诸如在Cas蛋白质的N末端和C末端两者上。本文的适宜NLS序列的非限制性示例包括在美国专利6660830和7309576中公开的那些

(例如,其中的表1),上述文献均以引用方式并入本文。可用于本文的NLS的另一个示例包括SEQ ID NO:11的氨基酸残基1373-1379。

[0149] 在某些实施方案中,Cas蛋白质及其通过Cas蛋白质引导DNA特异性靶向的相应RNA组分(例如crRNA)与本发明所公开的非常规酵母异源。这些RGEN组分的异源性质是由于以下事实:Cas蛋白质及其相应RNA组分仅已知存在于原核生物(细菌和古细菌)中。

[0150] 本文的Cas蛋白质可任选地使用其经密码子优化以在酵母细胞中表达的开放阅读框(ORF)在非常规酵母细胞中表达。本文的“经密码子优化的”序列是其密码子使用频率经设计用以模仿宿主细胞优选的密码子使用频率的ORF。在其中解脂耶氏酵母为非常规酵母细胞的方面,ORF的密码子优化可按照如美国专利7125672中提供的解脂耶氏酵母密码子使用特征图来进行,所述专利文献以引用方式并入本文。

[0151] 在一些实施方案中,Cas蛋白质为包含一个或多个异源蛋白质结构域(例如,除了Cas蛋白质之外,1个、2个、3个或更多个结构域)的融合蛋白的部分。此类融合蛋白可包含任何附加的蛋白质序列,和任选地在任何两个结构域之间,诸如在Cas和第一异源结构域之间的接头序列。可融合至本文的Cas蛋白质的蛋白质结构域的示例包括但不限于表位标签(例如组氨酸[His]、V5、FLAG、流感血凝素[HA]、myc、VSV-G、硫氧还蛋白[Trx]),报告分子(例如谷胱甘肽-S-转移酶[GST]、辣根过氧化物酶[HR]、氯霉素乙酰转移酶[CAT]、 β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖醛酸糖苷酶[GUS]、荧光素酶、绿色荧光蛋白[GFP]、HcRed、DsRed、青色荧光蛋白[CFP]、黄色荧光蛋白[YFP]、蓝色荧光蛋白[BFP]),以及具有以下活性中一个或多个活性的结构域:甲基化酶活性、脱甲基酶活性、转录激活活性(例如,VP16或VP64)、转录抑制活性、转录释放因子活性、组蛋白修饰活性、RNA切割活性和核酸结合活性。在其它实施方案中,Cas蛋白质可与结合DNA分子或其它分子的蛋白质,诸如麦芽糖结合蛋白(MBP)、S-tag、Lex A DNA结合结构域(DBD)、GAL4A DNA结合结构域、和单纯疱疹病毒(HSV) VP16融合。可以为包含本文的Cas蛋白质的融合蛋白的部分的附加结构域公开于美国专利申请公布2011/0059502中,该文献以引用的方式并入本文。在其中Cas蛋白质融合至异源蛋白质(例如转录因子)的某些实施方案中,Cas蛋白质具有DNA识别和结合活性(当与本文的合适的RNA组分复合时),但不具有DNA切口活性或切割活性。

[0152] 本文的RGEN可结合到,并且任选地切割DNA靶序列处的DNA链。在某些实施方案中,RGEN可切割DNA靶序列的一个或两条链。例如,RGEN可切割DNA靶序列的两条链。

[0153] 本文可切割DNA靶序列的两条链的RGEN通常包含其全部内切核酸酶结构域处于功能态的Cas蛋白质(例如,保留每个内切核酸酶结构域中的一些或全部活性的野生型内切核酸酶结构域或其变体)。因此,保留Cas蛋白质的每个内切核酸酶结构域中的一些或全部活性的野生型Cas蛋白质(例如,本文所公开的Cas9蛋白质)或其变体是可切割DNA靶序列的两条链的RGEN的适宜示例。包含功能性RuvC和HNH核酸酶结构域的Cas9蛋白质是可切割DNA靶序列的两条链的Cas蛋白质的示例。本文可切割DNA靶序列的两条链的RGEN通常在相同位置处切割两条链,使得在切割位点处形成平端(即,无核苷酸突出物)。

[0154] 本文可切割DNA靶序列的一条链的RGEN可在本文中表征为具有切口酶活性(例如,部分切割能力)。本文的Cas切口酶(例如,Cas9切口酶)通常包含使得Cas仅切割DNA靶序列的一条链(即,形成切口)的一个功能性内切核酸酶结构域。例如,Cas9切口酶可包含(i)突变的、功能失调的RuvC结构域和(ii)功能性HNH结构域(例如野生型HNH结构域)。又如,Cas9

切口酶可包含 (i) 功能性RuvC结构域 (例如,野生型RuvC结构域) 和 (ii) 突变的、功能失调的HNH结构域。

[0155] 适用于本文的Cas9切口酶的非限制性示例由Gasiunas等人 (Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.109:E2579-E2586), Jinek等人 (Science 337:816-821), Sapranaukas等人 (Nucleic Acids Res.39:9275-9282) 和美国专利申请公布2014/0189896中所描述的,这些申请以引用的方式并入本文。例如,本文的Cas9切口酶可包含嗜热链球菌Cas9,其具有Asp-31替换 (例如,Asp-31-Ala) (突变的RuvC结构域的示例)、或His-865替换 (例如,His-865-Ala)、Asn-882替换 (例如,Asn-882-Ala)、或Asn-891替换 (例如,Asn-891-Ala) (突变的HNH结构域的示例)。另外,例如,本文的Cas9切口酶可包含化脓链球菌Cas9,其具有Asp-10替换 (例如,Asp-10-Ala)、Glu-762替换 (例如Glu-762-Ala)、或Asp-986替换 (例如,Asp-986-Ala) (突变的RuvC结构域的示例)、或His-840替换 (例如,His-840-Ala)、Asn-854替换 (例如,Asn-854-Ala)、或Asn-863替换 (例如,Asn-863-Ala) (突变的HNH结构域的示例)。关于化脓链球菌Cas9,三个RuvC亚结构域一般分别位于氨基酸残基1-59、718-769和909-1098处,并且HNH结构域位于氨基酸残基775-908处 (Nishimasu等人,Cell 156:935-949)。

[0156] 本文的Cas9切口酶可出于各种目的用于所公开发明的非常规酵母中。例如,Cas9切口酶可用于利用合适的供体多核苷酸在DNA靶位点序列处或附近刺激HR。因为经切口的DNA不是NHEJ过程的底物,但通过HR过程识别,所以在特定靶位点处将DNA切口应当使所述位点更易接受利用合适的供体多核苷酸进行HR。

[0157] 又如,一对Cas9切口酶可用于增加DNA靶向的特异性。一般来讲,这可通过提供两个Cas9切口酶来进行,由于与具有不同向导序列的RNA组分缔合,所以两个Cas9切口酶在期望靶向的区域中的相对链上的DNA序列附近靶向和切口。这种每个DNA链附近的切割形成DSB (即,具有单链突出物的DSB),这然后被识别为NHEJ的底物 (导致插入缺失形成) 或HR的底物 (则导致与合适的供体多核苷酸 (如果提供) 重组)。在这些实施方案中,每个切口可以为例如彼此分开的至少约5个、10个、15个、20个、30个、40个、50个、60个、70个、80个、90个或100个 (或介于5和100之间的任何整数) 碱基。本文的一个或两个Cas9切口酶蛋白质可用于如上所述的Cas9切口酶对。例如,可使用具有突变RuvC结构域,但功能性HNH结构域的Cas9切口酶 (即,Cas9HNH⁺/RuvC⁻) (例如,化脓链球菌Cas9HNH⁺/RuvC⁻)。可通过使用具有将每个切口酶靶向到每个特异性DNA位点的向导RNA序列的本文的适宜RNA组分,将每个Cas9切口酶 (例如,Cas9HNH⁺/RuvC⁻) 引导至彼此附近的特异性DNA位点 (至多间隔100个碱基对)。

[0158] 在某些实施方案中,rgen可结合到DNA靶位点序列,但不切割靶位点序列处的任何链。此类rgen可包含Cas蛋白质,其中其核酸酶结构域全部均是突变的、功能失调的。例如,本文可结合到DNA靶位点序列,但不切割靶位点序列处的任何链的Cas9蛋白质可包含突变的功能失调的RuvC结构域和突变的功能失调的HNH结构域两者。此类Cas9蛋白质的非限制性示例包含上文所公开的RuvC和HNH核酸酶结构域突变体中任一个 (例如,具有Asp-10替换 (诸如Asp-10-Ala) 和His-840替换 (诸如His-840-Ala) 的化脓链球菌Cas9)。本文结合但不切割靶DNA序列的Cas蛋白质可用于调节基因表达,例如,在这种情况下,Cas蛋白质可以与转录因子 (或其部分) (例如,阻遏物或激活子,例如本文所公开的那些中的任一种) 融合。例如,包含具有Asp-10替换 (例如Asp-10-Ala) 和His-840替换 (例如His-840-Ala) 的化脓链球

菌Cas9的Cas9可融合至VP16或VP64转录激活结构域。用于此类RGEN的RNA组分中的向导序列可例如与基因启动子或其它调控元件(例如,内含子)中的DNA序列互补。

[0159] 在某些方面,酵母可包含(i)可切割DNA靶序列的一个或两个DNA链的RGEN,和(ii)包含与DNA靶位点序列处或附近的序列同源的至少一个序列的供体多核苷酸(通过本文的Cas蛋白质特异性靶向的序列)。如果靶位点包含SSB或DSB(诸如可使用本文Cas蛋白质引入),则合适的供体多核苷酸能够经历由DNA靶位点处或附近的序列进行的HR。本文的供体多核苷酸内的“同源序列”可包含或由至少约25、50、75、100、150、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000或10000个核苷酸,或约50-500、50-550、50-600、50-650或50-700个核苷酸的序列组成,所述序列与靶位点序列处或附近的序列具有100%的同一性,或与靶位点序列处或附近的序列具有例如至少约95%、96%、97%、98%或99%同一性。

[0160] 本文的供体多核苷酸可具有两个同源序列(同源臂),所述同源序列例如由与靶位点序列处或附近的序列异源的序列隔开。此类供体多核苷酸和靶位点序列之间的HR通常导致靶位点处的序列被供体多核苷酸的异源序列置换(位于与供体多核苷酸的同源臂同源的靶位点序列之间的靶位点序列被供体多核苷酸的异源序列置换)。在具有两个同源臂的供体多核苷酸中,所述臂可由例如,至少约1、2、3、4、5、10、20、30、40、50、75、100、250、500、1000、2500、5000、10000、15000、20000、25000或30000个核苷酸隔开(即,供体多核苷酸中的异源序列的长度为至少约1、2、3、4、5、10、20、30、40、50、75、100、250、500、1000、2500、5000、10000、15000、20000、25000或30000个核苷酸)。每个同源臂的长度(例如上文所公开的同源序列的长度中的任一个)可以相同或不同。每个臂与靶位点处或附近的相应同源序列的同一性百分比(例如,上文所公开的同源序列的同一性%中任一个)可以相同或不同。

[0161] 与供体多核苷酸的对应同源序列同源的在靶位点序列处或附近(另选地,本地或附近)的DNA序列可以距靶序列中预测Cas蛋白质切割位点(DSB或切口)例如在约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、450、500、750、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、20000、30000、40000、50000或60000(或介于1和60000之间的任何整数)个核苷酸内(例如,约1-1000、100-1000、500-1000、1-500或100-500个核苷酸)。这些核苷酸距离可以沿切割位点的上游或下游方向,从切割位点到同源序列的第一个核苷酸标记。例如,与供体多核苷酸中的对应序列同源的靶序列附近的序列可在靶序列的预测Cas蛋白质切割位点下游的500个核苷酸碱基对处起始。例如,在本文采用具有两个同源臂(例如,由异源序列分开的第一同源臂和第二同源臂)的供体多核苷酸的实施方案中,同源序列(对应于与供体的第一同源臂的同源性)可在预测的Cas切割位点的上游,并且同源序列(对应于与供体的第二同源臂的同源性)可在预测的Cas切割位点的下游。例如,这些上游和下游的同源序列中每一个距预测切割位点的核苷酸距离可以相同或不同,并且可以为上文所公开的核苷酸距离中的任一个。例如,同源序列的3'端(对应于与供体的第一同源臂的同源性)可位于预测Cas切割位点上游600个核苷酸碱基对处,并且同源序列的5'端(对应于与供体的第二同源臂的同源性)可位于预测Cas切割位点下游400个核苷酸碱基对处。

[0162] 本文的RGEN可结合到,并任选地切割非常规酵母的基因组中染色体、附加体或任何其它DNA分子中的靶位点序列处的DNA链。鉴于RGEN的RNA组分包含与靶序列的链互补的

序列(向导序列),靶序列的这种识别和结合是特异性的。在某些实施方案中,靶位点可以是独特的(即,在目标基因组中存在靶位点序列的单次出现)。

[0163] 本文的靶序列的长度可以为例如,至少13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸;介于13-30个核苷酸之间;介于17-25个核苷酸之间,或介于17-20个核苷酸之间。该长度可包括或排除PAM序列。另外,本文靶序列的链具有与(crRNA或gRNA的)向导序列的足够互补性从而与向导序列杂交并引导Cas蛋白质或Cas蛋白质复合物与靶序列的序列-特异性结合(在合适的PAM邻近靶序列时,参见下文)。向导序列及其对应DNA靶序列的链之间的互补度为例如,至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。本文的靶位点可位于例如编码基因产品(例如蛋白质或RNA)的序列或非编码序列(例如,调控序列或“垃圾”序列)中。

[0164] PAM(前间区序列邻近基序)序列可邻近靶位点序列。PAM序列是由本文的RGEN识别的短DNA序列。DNA靶序列的缔合PAM和前11个核苷酸对于Cas9/gRNA靶向和切割可能是重要的(Jiang等人,Nat.Biotech.31:233-239)。本文的PAM序列的长度可根据所用的Cas蛋白质或Cas蛋白质复合物而不同,但通常例如为2、3、4、5、6、7或8个核苷酸的长度。例如,PAM序列紧接靶位点序列的下游、或在靶位点序列下游的2个或3个核苷酸内,所述靶位点序列与靶位点中的链互补,所述靶位点中的链继而与RNA组分向导序列互补。在本文的实施方案中,其中RGEN为与RNA组分复合的内切核酸酶活性Cas9蛋白质,Cas9按照RNA组分引导而结合到靶序列,并切割紧邻PAM序列上游的第三核苷酸位置的5'的两条链。考虑靶位点:PAM序列的以下示例:

[0165] 5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNXGG-3' (SEQ ID NO:46)。

[0166] 在该示例性序列中,N可以为A、C、T或G,并且X可以为A、C、T或G(X也可被称为N_{PAM})。该示例中的PAM序列为XGG(加下划线)。合适的Cas9/RNA组分复合物可切割紧接双下划线N的5'的该靶。SEQ ID NO:46中N的串表示靶序列,所述靶序列与本文RNA组分的向导序列为例如至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同(其中,DNA靶序列的任何T可与RNA向导序列的任何U比对)。在该靶序列(其代表本文的靶位点)处识别和结合时,Cas9复合物的RNA组分的向导序列可与N的串的互补序列退火;向导序列和靶位点互补序列之间的互补度百分比为例如至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。如果Cas9切口酶用于靶向基因组中的SEQ ID NO:46,则切口酶可紧邻双下划线N的5'或在互补链的相同位置处切口,这取决于切口酶中哪个内切核酸酶结构域是功能失调的。如果不具有溶核活性的Cas9(RuvC和HNH结构域两者均功能失调)用于靶向基因组中的SEQ ID NO:46,在其可识别并结合靶序列,但不对所述序列进行任何切割。

[0167] 本文的PAM通常根据所用RGEN的类型来选择。例如,本文的PAM序列可以为通过RGEN识别的PAM序列,所述RGEN包含Cas,诸如Cas9,其源自Cas可源自其中的本文所公开的物种中的任一种。在某些实施方案中,PAM序列可以为由RGEN识别的PAM序列,所述RGEN包含源自化脓链球菌、嗜热链球菌、无乳链球菌、脑膜炎奈瑟菌、牙质齿菌或新凶手弗氏杆菌的Cas9。例如,源自化脓链球菌的适宜Cas9可用于靶向具有NGG的PAM序列的基因组序列(SEQ ID NO:47;N可以为A、C、T或G)。又如,当靶向具有以下PAM序列的DNA序列时,合适的Cas9可源自以下物种中的任一种:嗜热链球菌(NNAGAA[SEQ ID NO:48])、无乳链球菌(NGG[SEQ ID

NO:47])、NNAGAAW[SEQ ID NO:49,W为A或T]、NGGNG[SEQ ID NO:50])、脑膜炎奈瑟菌(NNNNGATT[SEQ ID NO:51])、牙质齿菌(NAAAAC[SEQ ID NO:52])、或新凶手弗氏杆菌(NG[SEQ ID NO:53]) (其中所有这些特定PAM序列中的N为A、C、T或G)。可用于本文的Cas9/PAM的其它示例包括在Shah等人(RNA Biology 10:891-899)和Esvelt等人(Nature Methods 10:1116-1121)中公开的那些,所述文献以引用方式并入本文。本文的靶序列的示例遵循SEQ ID NO:46,但其中‘XGG’ PAM由前述PAM中任一个置换。

[0168] 在本文实施方案中,至少一种不具有5'端的RNA组分包含于RGEN中。该未封端的RNA组分包含与非常规酵母中的染色体或附加体的靶位点序列互补的序列。基于该序列互补度,RGEN特异性结合到并任选地切割该靶位点处的DNA链。因此,在本发明所公开的实施方案中,RNA组分的互补序列还可被称为向导序列或可变靶向结构域。

[0169] 本文的RNA组分的向导序列(例如,crRNA或gRNA)的长度可以为至少13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核糖核苷酸,介于13-30个核糖核苷酸的长度之间;介于17-25个核糖核苷酸的长度之间;或介于17-20个核糖核苷酸的长度之间。一般来讲,本文的向导序列具有与靶DNA序列的链足够的互补性从而与靶序列杂交并引导Cas蛋白质或Cas蛋白质复合物与靶序列的序列-特异性结合(在合适的PAM邻近靶序列时)。向导序列及其对应DNA靶序列之间的互补度为例如,至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。可相应地将向导序列工程化以将RGEN靶向到酵母细胞中的DNA靶序列。

[0170] 本文的RNA组分可包含例如crRNA,其包含向导序列和重复(tracrRNA配对)序列。向导序列通常位于crRNA的5'端处或附近(在1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个碱基内)。crRNA的向导序列的下游是“重复”或“tracrRNA配对”序列,其与tracrRNA的5'端处的序列互补并与所述序列杂交。向导序列和tracrRNA配对序列可紧邻,或通过例如1、2、3、4或更多个碱基隔开。tracrRNA配对序列具有例如与tracrRNA的5'端的至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列互补度。一般来讲,互补度可参考tracrRNA配对序列与tracrRNA序列的最佳比对,连同两个序列中较短者的长度。本文的tracrRNA配对序列的长度可以为,例如至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18个核糖核苷酸,并且与tracrRNA的5'端处的相同或相似长度的序列杂交(例如,加上或减去1、2、3、4或5个碱基)。本文的tracrRNA配对序列的适宜示例包含SEQ ID NO:54(guuuuuguacucucaagauuuu)、SEQ ID NO:55(guuuuuguacucuca)、SEQ ID NO:56(guuuuagagcua,参见实施例)、或SEQ ID NO:57(guuuuagagcuag),或其变体,其(i)具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性,并且(ii)可与tracrRNA的5'端序列退火。本文的crRNA的长度可以为例如至少约18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46或48个核糖核苷酸;或约18-48个核糖核苷酸;或约25-50个核糖核苷酸。

[0171] tracrRNA应当连同crRNA一起包含于实施方案中,在该实施方案中II型CRISPR体系的Cas9蛋白质包含于RGEN中。本文的tracrRNA包含,在5'-至-3'方向上,(i)与crRNA的重复区(tracrRNA配对序列)退火的序列和(ii)包含茎环的部分。(i)的序列长度可以例如与上文所公开的tracrRNA配对序列长度中的任一个相同或相似(例如,加上或减去1、2、3、4、或5个碱基)。本文的tracrRNA的总长度(即,序列组分[i]和[ii])可为例如至少约30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85或90(或者介于30和90之间的任何整数)个核糖核苷酸。

tracrRNA还可包括3'端处的1、2、3、4、5或更多个尿嘧啶残基,其可借助于利用转录终止子序列表达tracrRNA而存在。

[0172] 例如,本文的tracrRNA可源自上文所列的菌种中任一种,Cas9序列可源自所述菌种。合适的tracrRNA序列的示例包括美国专利8697359和Chylinski等人(RNA Biology 10: 726-737)中所公开的那些,所述文献以引用方式并入本文。本文的优选tracrRNA可源自链球菌属物种tracrRNA(例如,化脓链球菌、嗜热链球菌)。本文的tracrRNA的其它合适的示例可包括:

[0173] SEQ ID NO:58:

[0174] uagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucacuugaaaaaguggcaccgagucggugc(参见实施例),

[0175] SEQ ID NO:59:

[0176] uagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucacuugaaaaagug,或

[0177] SEQ ID NO:60:

[0178] uagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuauc,

[0179] 其可源自化脓链球菌tracrRNA。本文的tracrRNA的其它合适的示例可包括:

[0180] SEQ ID NO:61:

[0181] uaaaucuugcagaagcuacaaagauaaggcuucaugccgaaaucaacacccugucuuuuuauggcagg
guguuuucguuuuuuaa,

[0182] SEQ ID NO:62:

[0183] ugcagaagcuacaaagauaaggcuucaugccgaaaucaacacccugucuuuuuauggcaggguguuuu
cguuuuuua、或

[0184] SEQ ID NO:63:

[0185] ugcagaagcuacaaagauaaggcuucaugccgaaaucaacacccugucuuuuuauggcagggugu,

[0186] 其可源自嗜热链球菌tracrRNA。

[0187] 本文的tracrRNA的其它示例为这些tracrRNA SEQ ID NO的变体,其(i)与其具有至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性,和(ii)可用作tracrRNA(例如,5'端序列可与crRNA的tracrRNA配对序列退火,5'端序列下游的序列可形成一个或多个发夹状物,变体tracrRNA可与Cas9蛋白质形成复合物)。

[0188] 本文所公开的RGEN的RNA组分可包含例如,向导RNA(gRNA),其包含可操作地连接至,或融合至tracrRNA的crRNA。在某些优选的实施方案中,gRNA的crRNA组分在tracrRNA组分的上游(即,此类gRNA包含在5'-至-3'方向上,可操作地连接tracrRNA的crRNA)。如本文(例如,上述实施方案)所公开的任何crRNA和/或tracrRNA(和/或其部分,诸如crRNA重复序列、tracrRNA配对序列、或tracrRNA 5'端序列)可例如包含在gRNA中。

[0189] 本文gRNA的crRNA组分的tracrRNA配对序列应当能够与tracrRNA组分的5'端退火,从而形成发夹状结构。例如,关于(crRNA组分的)tracrRNA配对序列和(tracrRNA组分的)5'端序列的长度和两者之间互补度百分比的上文公开内容中的任一个可表征gRNA的crRNA和tracrRNA组分。为有利于该退火,crRNA和tracrRNA组分的可操作连接或融合优选包含合适的成环核糖核苷酸序列(即,成环序列可将crRNA和tracrRNA组分连接在一起,从而形成gRNA)。RNA成环序列的合适的示例包括GAAA(SEQ ID NO:43,参见实施例)、CAAA(SEQ

ID NO:44) 和AAAG (SEQ ID NO:45)。然而,可使用较长或较短的环序列,如可交替环序列。环序列优选包含核糖核苷酸三联体(例如,AAA)和在所述三联体的任一端处的附加核糖核苷酸(例如,C或G)。

[0190] 本文的gRNA形成发夹状物(“第一发夹状物”),其中其(crRNA组分的)tracrRNA配对序列和tracrRNA 5'端序列部分退火。一个或多个(例如、1、2、3或4个)附加发夹状结构可在该第一发夹状物下游形成,这取决于gRNA的tracrRNA组分的序列。因此,gRNA可具有例如至多五个发夹状结构。例如,gRNA还可包括在gRNA序列末端之后的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或更多个残基,其可借助于利用转录终止子序列表达gRNA而存在。这些附加残基可以全部为U残基,或例如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%为U残基,其取决于终止序列的选择。

[0191] 可用于所公开发明中的适宜gRNA的非限制性示例可包括:

[0192] SEQ ID NO:64:

[0193] NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNg u u u u g u a c u c u c a a g a u u u a G A A A u a a a u c u u g c a g a a g c u a c a a a g a u a a g g c u u c a u g c c g a a a u c a a c a c c c u g u c a u u u u a u g g c a g g g u g u u u c g u u a u u u a a、

[0194] SEQ ID NO:65:

[0195] NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNg u u u u g u a c u c u c a G A A A u g c a g a a g c u a c a a a g a u a a g g c u u c a u g c c g a a a u c a a c a c c c u g u c a u u u u a u g g c a g g g u g u u u c g u u a u u u a a、

[0196] SEQ ID NO:66:

[0197] NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNg u u u u g u a c u c u c a G A A A u g c a g a a g c u a c a a a g a u a a g g c u u c a u g c c g a a a u c a a c a c c c u g u c a u u u u a u g g c a g g g u g u、

[0198] SEQ ID NO:67:

[0199] NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNg u u u u g u a c u c u c a G A A A u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u g a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u c、

[0200] SEQ ID NO:68:

[0201] NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNg u u u u a g a g c u a G A A A u a g c a a g u u a a a a a a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u g a a a a g u g、

[0202] SEQ ID NO:69:

[0203] NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNg u u u u a g a g c u a G A A A u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a、或

[0204] SEQ ID NO:70:

[0205] NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNg u u u u a g a g c u a G A A A u a g c a a g u u a a a a u a a g g c u a g u c c g u u a u c a a c u g a a a a g u g g c a c c g a g u c g g u c u u u u (参见实施例)。

[0206] 在SEQ ID NO:64-70的每一个中,加单下划线的序列表示gRNA的crRNA部分。每个“N”表示合适向导序列的核糖核苷酸碱基(A、U、G或C)。第一块小写字母表示tracrRNA配对序列。第二块小写字母表示gRNA的tracrRNA部分。双下划线序列近似与tracrRNA配对序列退火以形成第一发夹状物的tracrRNA序列的部分。环序列(GAAA,SEQ ID NO:43)以大写字母示出,其可操作地连接每个gRNA的crRNA和tracrRNA部分。本文gRNA的其它示例包括前述gRNA的变体,所述变体(i)与这些序列具有至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、

95%、96%、97%、98%或99%序列同一性(在该计算中排除向导序列),并且(ii)可用作gRNA,其特异性靶向Cas9蛋白质以与靶DNA序列结合并任选地切口或切割靶DNA序列。

[0207] 本文的gRNA还可根据具有向导序列(VT结构域),之后是Cas内切核酸酶识别(CER)结构域来表征。CER结构域包含tracrRNA配对序列,之后是tracrRNA序列。可用于本文的CER结构域的示例包括上述SEQ ID NO:64-70中所包含的那些(每个中的CER结构域是VT结构域的N之后的序列)。CER结构域的另一合适示例是SEQ ID NO:1(参见实施例),其在5'-至-3'方向上包含SEQ ID NO:56的tracrRNA配对序列、SEQ ID NO:43的成环序列(GAAA)、以及SEQ ID NO:58的tracrRNA序列。

[0208] 本发明所公开的RGEN的RNA组分不具有5'端(7-甲基鸟苷酸[m⁷G]端)。因此,本文的RNA组分不具有在其5'末端处的7-甲基鸟苷酸[m⁷G]端。本文的RNA组分可具有,例如5'-羟基基团而不是5'-端。另选地,本文的RNA组分可具有,例如5'-磷酸酯而不是5'-端。据信RNA组分可在转录之后在核中更好的积聚,因为5'-封端的RNA(例如,具有5' m⁷G端的RNA)经受核输出。本文未封端的RNA组分的优选示例包括合适的gRNA、crRNA、和/或tracrRNA。在某些实施方案中,本文的RNA组分缺乏5'端,并且任选地具有替代的5'-羟基基团,这是由于RNA由RNA组分前体的5'端处的核酶序列进行自加工(即,在RNA组分上游包含核酶序列的前体RNA,诸如gRNA经历核酶介导的自加工以去除核酶序列,从而保留不具有5'端的下游RNA组分)。在某些其它实施方案中,本文的RNA组分不通过由RNA聚合酶III(Pol III)启动子转录来产生。

[0209] 在某些实施方案中,酵母还包含DNA多核苷酸序列,所述DNA多核苷酸序列包含(i)可操作地连接至(ii)编码RNA组分的核苷酸序列的启动子。该多核苷酸序列由酵母使用以表达与Cas蛋白质复合从而形成RGEN的RNA组分。此类多核苷酸序列可以呈下列形式:例如,质粒、酵母人工染色体(YAC)、粘粒、噬菌粒、细菌人工染色体(BAC)、病毒或线性DNA(例如线性PCR产物)、或可用于将多核苷酸序列转移到非常规酵母细胞中的任何其它类型的载体或构建体。该多核苷酸序列可瞬时(即,不整合到基因组中)或稳定(即,整合到基因组中)存在于本文的酵母细胞中。另外,该多核苷酸序列可包括或缺乏一种或多种合适的标记物序列(例如,选择或表型标记物)。

[0210] 适用于表达本文RNA组分的包含于多核苷酸序列中的启动子可在非常规酵母细胞中操作,并且可以是例如组成型或诱导型的。在某些方面,启动子可包含强启动子,其是每单位时间可引导相对大量的生产性启动的启动子,和/或驱动比包含酵母的酵母中基因的平均转录水平更高转录水平的启动子。

[0211] 可用于本文的强启动子的示例包括在公开于以下专利申请公布中的那些:2012/0252079(DGAT2)、2012/0252093(EL1)、2013/0089910(ALK2)、2013/0089911(SPS19)、2006/0019297(GPD和GPM)、2011/0059496(GPD和GPM)、2005/0130280(FBA、FBAIN、FBAINm)、2006/0057690(GPAT)和2010/0068789(YAT1),所述专利文献以引用方式并入本文。合适的强启动子的其它示例包括列于表2中的那些。

[0212] 表2:强启动子

[0213]	启动子名称	天然基因	参考序列 ^a
	XPR2	碱性细胞外蛋白酶	美国专利 No. 4937189; EP220864
	TEF	翻译延伸因子 EF1- α (<i>tef</i>)	美国专利 6265185
	GPD、GPM	甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (<i>gpd</i>)、 磷酸甘油酸变位酶 (<i>gpm</i>)	美国专利 No. 7259255 和 7459546
	GPDIN	甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (<i>gpd</i>)	美国专利 No. 7459546
	GPM/FBAIN	嵌合磷酸甘油酸变位酶 (<i>gpm</i>) /果糖-二磷酸醛缩酶 (<i>fbal</i>)	美国专利 No. 7202356
	FBA、 FBAIN、 FBAINm	果糖-二磷酸醛缩酶 (<i>fbal</i>)	美国专利 No. 7202356
	GPAT	甘油-3-磷酸 O-酰基转移酶 (<i>gpat</i>)	美国专利 No. 7264949
	YAT1	铵转运蛋白酶 (<i>yat1</i>)	美国专利申请公布 No. 2006/0094102
	EXP1	输出蛋白	美国专利 No. 7932077

[0214] a该表中的每个参考序列以引用方式并入本文。

[0215] 尽管上文所列的强启动子来自解脂耶氏酵母,但据信例如来自本文所公开的任何非常规酵母的其相应启动子(例如,同源物)均可以用作强启动子。因此,强启动子可包含例如XPR2、TEF、GPD、GPM、GPDIN、FBA、FBAIN、FBAINm、GPAT、YAT1、EXP1、DGAT2、EL1、ALK2或SPS19启动子。另选地,强启动子诸如对应于前述启动子中任一种的任一种可来自其它类型的酵母(例如,酿酒酵母、粟酒裂殖酵母)(例如,在美国专利申请公布2010/0150871中所公开的强启动子中的任一种,该文献以引用的方式并入本文)。可用于本文的强启动子的其它示例包括PGK1、ADH1、TDH3、TEF1、PHO5、LEU2和GAL1启动子,以及在Velculescu等人(Cell 88:243-251)中所公开的强酵母启动子,其以引用方式并入本文。可用于本文的强启动子的另一个示例可包含SEQ ID NO:12(耶氏酵母FBA1启动子序列)。

[0216] 在某些实施方案中,本文的启动子可包含RNA聚合酶II(Pol II)启动子。据信,所有上文所列的强启动子均为合适的Pol II启动子的示例。例如,由Pol II启动子转录可涉及至少约12个蛋白质(例如,RPB1-RPN12个蛋白质)的RNA聚合酶II复合物的形成。由本文的Pol II启动子转录的RNA通常为5'-封端的(例如,在5'端处包含m⁷G基团)。因为本文RNA组分不具有5'端,因此如果其由本文的Pol II启动子表达,则应当采用从RNA组分去除5'端的方式。适用于从本文Pol II-转录的RNA组分有效去除5'端的方式包括适当使用一种或多种核酶(参见下文),例如,组1自剪接内含子和组2自剪接内含子。

[0217] 例如,编码RNA组分的本文的核苷酸序列还可编码在编码RNA组分的序列上游的核酶。因此,在某些实施方案中,酵母还包含DNA多核苷酸序列,所述DNA多核苷酸序列包含(i)启动子,其可操作地连接至(ii)在5'-至-3'方向上编码核酶和RNA组分的核苷酸序列。由此类多核苷酸序列表达的转录物自催化地去除核酶序列以产生RNA,所述RNA不具有5'端但包含RNA组分序列。这种“自加工”RNA可以包含例如crRNA或gRNA,并且可与Cas蛋白质如Cas9复合,从而形成RGEN。

[0218] 本文核酶可以为例如锤头(HH)核酶、丁型肝炎病毒(HDV)核酶、I组内含子核酶、RnaseP核酶、或发夹型核酶。本文核酶的其他非限制性示例包括Varkud卫星(VS)核酶、葡萄糖胺-6-磷酸激活核酶(glmS)、和CPEB3核酶。Lilley(Biochem.Soc.Trans.39:641-646)公开了涉及核酶结构和活性的信息。应当适用于本文的核酶的示例包括公开于EP0707638和美

国专利6063566、5580967、5616459和5688670中的核酶，其以引用方式并入本文。

[0219] 在某些优选的实施方案中，使用锤头核酶。该类型的核酶可以为I型、II型或III型锤头核酶，例如，如Hammann等人(RNA 18:871-885)中所公开的，其以引用方式并入本文。鉴定编码锤头核酶的DNA的多种方式公开于Hammann等人中，其可相应地用于本文。本文的锤头核酶可源自例如病毒、类病毒、植物病毒卫星RNA、原核生物(例如古细菌、蓝藻细菌、酸杆菌)或真核生物诸如植物(例如拟南芥、康乃馨)、原生生物(例如变形虫、眼虫)、真菌(例如曲霉属、解脂耶氏酵母)、两栖动物(例如蝾螈、青蛙)、血吸虫、昆虫(例如蟋蟀)、软体动物、哺乳动物(例如小鼠、人类)、或线虫。

[0220] 本文的锤头核酶通常包含三个碱基配对的螺旋体，其各自分别被称为螺旋体I、螺旋体II和螺旋体III，由保守序列的短接头分开。锤头核酶(I-III)的三种类型通常基于核酶的5'和3'端包含于哪个螺旋体中。例如，如果锤头核酶序列的5'和3'端有助于茎I，则其可以被称为I型锤头核酶。在三种可能形貌类型中，I型可存在于原核生物、真核生物和RNA植物病原体的基因组中，然而II型锤头核酶仅描述于原核生物中，并且III型锤头核酶大多数存在于植物、植物病原体和原核生物中。在某些实施方案中，锤头核酶为I型锤头核酶。

[0221] 在某些实施方案中，编码锤头核酶的序列可包含至少约40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140或150个(或者介于40和150之间的任何整数)核苷酸，40-100个核苷酸，或40-60个核苷酸。

[0222] 编码锤头核酶的序列在编码RNA组分的序列的上游。编码本文的锤头核酶的序列可以为例如紧接编码RNA组分的向导序列(例如，向导序列可以为crRNA或gRNA的向导序列)的序列的5'，或在5'的至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个核苷酸处。锤头核酶的前5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个核糖核苷酸应当分别与紧邻锤头核酶序列下游的序列的第一相同编号的核糖核苷酸互补。例如，如果本文的多核苷酸序列编码包含紧邻RNA组分的向导序列上游的锤头核酶序列的RNA，则核酶的例如前6个核糖核苷酸可与向导序列的前6个核糖核苷酸互补。在该示例中，锤头核酶可切割紧邻向导序列的第一位置上游的RNA转录物(或以另一方式来说，锤头核酶可切割紧邻核酶序列下游的RNA转录物)。该逻辑同样适用于其它前述示例性实施方案。例如，如果本文的多核苷酸序列编码包含为RNA组分的向导序列上游的8个残基的锤头核酶序列的RNA(例如，存在8个残基间隔序列)，则核酶的例如前6个核糖核苷酸可与紧接核酶序列的3'的6个核糖核苷酸互补。在该示例中，锤头核酶可切割紧邻核酶序列下游的RNA转录物。又如，如果本文的多核苷酸序列编码包含紧邻RNA组分的向导序列上游的锤头核酶序列的RNA，则核酶的例如前10个核糖核苷酸可与向导序列的前10个核糖核苷酸互补。在该示例中，锤头核酶可切割紧邻向导序列的第一位置上游的RNA转录物(或以另一方式来说，锤头核酶可切割紧邻核酶序列下游的RNA转录物)。

[0223] 锤头核酶序列的示例如下表示：

[0224] NNNNNNcugaugaguccgugaggacgaaacgaguaagcucguc (SEQ ID NO:15, N可以为A、U、C或G;参见实施例)。SEQ ID NO:15的前6个残基可被设计成与紧接由本文DNA多核苷酸表达的RNA转录物中的SEQ ID NO:15之后的(例如，本文所公开的crRNA或gRNA向导序列的)前6个残基互补(退火)。核酶可切割紧接SEQ ID NO:15之后的转录物。虽然SEQ ID NO:15示出具有用于与紧接SEQ ID NO:15之后的序列残基退火的6个残基("N")，但出于该目的，在该核酶的开始处可具有5至15个"N"残基。应注意，在RNA转录物包含SEQ ID NO:15的情况下，

(i) 锤头核酶的螺旋体I可通过N残基与紧接转录物中SEQ ID NO:15之后的前6个残基退火而形成, (ii) 螺旋体II可通过由单下划线指示的互补序列的退火形成, 并且(iii) 螺旋体III可通过由双下划线指示的互补序列退火形成。因此, 在某些实施方案中, 锤头核酶可以为SEQ ID NO:15的变体, 其具有(i) 与SEQ ID NO:15至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性(在计算中排除“N”序列); 以及(ii) 与彼此退火以形成螺旋体II和III的SEQ ID NO:15的单下划线和双下划线区对齐的区域(螺旋体I由适当选择“N”残基形成)。

[0225] 可连接至SEQ ID NO:15的序列的示例及其各种实施方案(上述)包括包含SEQ ID NO:64-70中一个的gRNA。

[0226] 本文编码包含连接至RNA组分的5' 锤头核酶的RNA序列的DNA多核苷酸(本文的“核酶-RNA组分盒”)可被设计成驱动5' -端紧接锤头核酶序列起始的转录物的转录(即核酶序列在转录起始位点处起始)。另选地, DNA多核苷酸可被设计成驱动具有核酶-RNA组分盒上游的非核酶序列的转录物的转录。例如, 此类5' 非核酶转录物序列可短至几个核苷酸(1-10个)长, 最多长达5000-20000个核苷酸(当核酶从RNA组分切割自身时, 从RNA组分去除核酶该5' 序列)。

[0227] 在某些实施方案中, 包含核酶-RNA组分盒的DNA多核苷酸可包含RNA组分序列下游的合适的转录终止序列。可用于本文中的转录终止序列的示例公开于美国专利申请公布2014/0186906中, 该专利以引用方式并入本文。例如, 可使用酿酒酵母Sup4基因转录终止序列(例如, SEQ ID NO:8)。此类实施方案通常不包含位于核酶-RNA组分盒下游的核酶序列。另外, 取决于终止序列的选择, 此类实施方案通常包含在RNA组分序列的端部之后的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或更多个残基。这些附加残基可以全部为U残基, 或例如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%为U残基, 其取决于终止序列的选择。另选地, 核酶序列(例如, 锤头核酶或HDV核酶)可以为RNA组分序列的3' (例如, 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个核苷酸); 此类实施方案中的RNA组分序列可侧接有上游和下游核酶。3' 核酶序列可相应地定位成使得其从RNA组分序列切割自身; 此类切割可使得转录物正好在RNA组分序列的端部处终止, 或具有在RNA组分序列的端部之后例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更多个残基。

[0228] 在某些实施方案中, DNA多核苷酸可包含(i) 启动子, 所述启动子可操作地连接至(ii) 包含多于一个核酶-RNA组分盒(即, 串联盒)的序列。由此类DNA多核苷酸表达的转录物可具有例如2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个核酶-RNA组分盒。在每个RNA组分序列之后可任选地包含3' 核酶序列(例如, 如上所述)以允许从下游转录物序列切割和分离RNA组分。此类实施方案中的每个RNA组分通常被设计成将本文RGEN引导至独特的DNA靶位点。因此, 此类DNA多核苷酸可相应地用于非常规酵母中以同时靶向例如多个不同的靶位点; 此类使用可任选地表征为多路方法。连接至RNA组分(其连接至3' 核酶)的5' 锤头核酶可在本文中被称为“核酶-RNA组分-核酶盒”。可设计本文用于表达包含串联核酶-RNA组分-核酶盒的转录物的DNA多核苷酸, 使得在每个盒之间存在约10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或更多个核苷酸(例如, 非编码间隔序列)。每个盒之间的距离可以相同或不同。

[0229] 虽然上述实施方案中某些已经根据锤头核酶序列来进行描述, 但此类实施方案还

可相应地根据本文任何其它核酶序列(例如,HDV核酶),而不是锤头核酶序列来表征。本领域普通技术人员应当理解如何定位此类其它核酶序列以在特定位点处切割。

[0230] 在某些实施方案中,酵母还包含DNA多核苷酸序列,所述DNA多核苷酸序列包含(i)启动子,所述启动子可操作地连接至(ii)编码Cas蛋白质(例如Cas9)的核苷酸序列。该多核苷酸序列由酵母使用以表达与RNA组分复合从而形成RGEN的Cas蛋白质。此类多核苷酸序列可以呈下列形式:质粒、YAC、粘粒、噬菌粒、BAC、病毒或线性DNA(例如线性PCR产物)、或可用于将多核苷酸序列转移到非常规酵母细胞中的任何其它类型的载体或构建体。例如,可使用本文所公开的任何Pol II启动子。上文关于用于表达RNA组分的DNA多核苷酸序列所公开的任何特征因此可应用于用于表达Cas蛋白质的DNA多核苷酸序列。该多核苷酸序列可瞬时(即,不整合到基因组中)或稳定(即,整合到基因组中)存在于本文的酵母细胞中。在其它方面,除了用于表达Cas蛋白质的DNA多核苷酸之外,酵母还可具有用于表达RNA组分的DNA多核苷酸(例如,如上所述的)。这些DNA多核苷酸均可以对酵母是稳定或瞬时的;另选地,用于表达Cas蛋白质的DNA多核苷酸可以是稳定的,并且用于表达RNA组分的DNA多核苷酸可以是瞬时的(或反之亦然)。

[0231] DNA多核苷酸序列可另选地为用于表达Cas蛋白质和适用于在酵母细胞中提供RGEN的RNA组分两者的DNA多核苷酸序列。此类DNA多核苷酸可包含,例如,(i)可操作地连接至编码(RGEN的)RNA组分的核苷酸序列的启动子(RNA组分盒),和(ii)可操作地连接至编码Cas蛋白质(例如,Cas9)的核苷酸序列的启动子(Cas盒)。关于用于表达Cas蛋白质或RNA组分的DNA多核苷酸的上述特征中的任一个可例如应用于用于在非常规酵母细胞中表达Cas蛋白质和合适的RNA组分两者的DNA多核苷酸序列。另外,本文所公开的Cas蛋白质和RNA组分(例如,crRNA或gRNA)中的任一个可由该DNA多核苷酸序列表达。在某些实施方案中,一种或多种RNA组分和/或Cas盒可包含在DNA多核苷酸序列内。在其它方面,一个或多个RNA组分可如上所述串联表达。用于Cas盒和RNA盒的启动子可以相同或不同。设想此类DNA多核苷酸序列可用于在非常规酵母和常规酵母两者中表达RGEN。

[0232] 公开的发明还涉及将RNA引导的内切核酸酶(RGEN)靶向到非常规酵母中的染色体或附加体中的靶位点序列的方法。该方法包括向酵母的核提供RGEN,所述RGEN包含至少一种不具有5'端的RNA组分,其中所述RNA组分包含与靶位点序列互补的序列,并且其中RGEN结合到,并任选地切割全部或部分靶位点序列。

[0233] 例如,可使用关于方法特征中每一个(例如,酵母类型、RGEN、RNA组分等)的上文所公开的实施方案或下文实施例中的任一个来进行该靶向方法。因此,上文或实施例中所公开的特征中的任一个,或这些特征的任何组合可适当用于表征本文靶向方法的实施方案。以下靶向方法特征是示例。

[0234] 在本文靶向方法的某些实施方案中,非常规酵母可以为以下属中任一个的成员:耶氏酵母属、毕赤酵母属、许旺氏酵母属、克鲁维酵母属、Arxula属、丝孢酵母属、假丝酵母属、黑粉菌属、球拟酵母属、接合酵母属、三角酵母属、隐球酵母属、红酵母属、法夫酵母属、掷孢酵母属和管囊酵母属。解脂耶氏酵母是本文的合适的耶氏酵母。可用于靶向方法的非常规酵母的其它非限制性示例公开于本文中。

[0235] 适用于本文靶向方法的RGEN可包含I型、II型或III型CRISPR体系的Cas蛋白质。Cas9蛋白质可用于某些实施方案中,诸如链球菌Cas9。适用于靶向方法中的链球菌Cas9蛋

白质的示例包括包含源自下列的氨基酸序列的Cas9蛋白质：化脓链球菌、嗜热链球菌、肺炎链球菌、无乳链球菌、副溶血链球菌、口腔链球菌、唾液链球菌、猕猴链球菌、停乳链球菌、咽峡炎链球菌、星座链球菌、*S. pseudoporcinus*或变形链球菌Cas9蛋白质。可用于本文靶向方法的RGEN和Cas9蛋白质的其它非限制性示例公开于本文中。例如，可使用可切割DNA靶序列处的一个或两条链的RGEN。

[0236] 用于本文靶向方法的RGEN的RNA组分可包含例如，gRNA，其包含可操作地连接至，或融合至tracrRNA的crRNA。如本文所公开的任何crRNA和/或tracrRNA（和/或其部分，诸如crRNA配对序列、或tracrRNA5'端序列）可例如包含在gRNA中。另外，例如，本文所公开的任何gRNA可用于靶向方法。

[0237] 例如，PAM（前间区序列邻近基序）序列可邻近靶位点序列。在本文靶向方法的某些实施方案中，PAM序列紧接靶位点序列的下游、或在靶位点序列的下游的2个或3个核苷酸内，所述靶位点序列与靶位点中的链互补，所述靶位点中的链继而与RNA组分向导序列互补。在本文的实施方案中，其中RGEN为与RNA组分复合的内切核酸酶活性Cas9蛋白质，Cas9按照RNA组分引导而结合到靶序列，并切割紧邻PAM序列上游的第三核苷酸位置的5'的两条链。合适的PAM序列的示例包括化脓链球菌（NGG[SEQ ID NO:47]）和嗜热链球菌（NNAGAA[SEQ ID NO:48]）PAM序列，其可分别用于利用源自每个物种的Cas9蛋白质靶向。另外，例如，如本文所公开的任何PAM序列可用于靶向方法。

[0238] 在本文的靶向方法的某些实施方案中，酵母还包含DNA多核苷酸序列，所述DNA多核苷酸序列包含（i）启动子，所述启动子可操作地连接至（ii）编码RNA组分的核苷酸序列。利用此类DNA多核苷酸可向酵母的核提供RGEN的RNA组分，因为RNA组分由DNA多核苷酸转录。适用于在酵母核中表达（RGEN）的RNA组分的DNA多核苷酸序列的示例在本文中公开。如本文所公开的启动子中任一种可用于此类DNA多核苷酸序列中，例如，强启动子和/或包含Pol II启动子序列的启动子。在某些实施方案中，编码RNA组分的DNA多核苷酸可用于在酵母中提供RNA组分，所述RNA组分已被工程化来表达Cas蛋白质（例如，稳定的Cas表达）。

[0239] 例如，编码RNA组分的本文的核苷酸序列还可编码在编码RNA组分的序列上游的核酶。因此，在本文靶向方法的某些实施方案中，酵母可包含DNA多核苷酸序列，所述DNA多核苷酸序列包含（i）启动子，所述启动子可操作地连接至（ii）在5'-至-3'方向上编码核酶和RNA组分的核苷酸序列。利用此类DNA多核苷酸可向酵母的核提供RGEN的RNA组分，因为RNA组分由DNA多核苷酸转录。本文核酶可以为例如锤头核酶、丁型肝炎病毒（HDV）核酶、I组内含子核酶、RnaseP核酶、或发夹型核酶。例如，如本文所公开的任何核酶，以及如本文所公开的编码连接至RNA组分的核酶的任何多核苷酸序列可用于靶向方法。

[0240] 在本文靶向方法的某些实施方案中，酵母还包含DNA多核苷酸序列，所述DNA多核苷酸序列包含（i）启动子，所述启动子可操作地连接至（ii）编码Cas蛋白质（例如Cas9）的核苷酸序列。利用此类DNA多核苷酸，可在酵母中提供RGEN的Cas蛋白质组分。适用于在酵母中表达（RGEN的）Cas蛋白质组分的DNA多核苷酸序列的示例在本文中公开。如本文所公开的启动子中任一种可用于此类DNA多核苷酸序列中，例如，强启动子。

[0241] 在靶向方法的某些实施方案中，还可向酵母提供包含与DNA靶位点序列处或附近的序列同源的至少一个序列的供体多核苷酸（连同提供在靶位点序列处切口或切割的RGEN）。合适的示例包括具有同源臂的供体多核苷酸。例如，如本文所公开的任何供体多核

苷酸可用于靶向方法中。该方法的此类实施方案通常涉及供体多核苷酸和靶序列之间的HR (在靶序列的RGEN介导的切口或切割之后);因此,这些方法还可任选地被称为在非常规酵母中进行HR的方法。本文公开了可通过该方法进行的HR策略的示例。用于在酵母细胞中靶向的供体DHA多核苷酸的合适量可以为至少约300、400、500、600、700或800分子的供体DNA/酵母细胞。

[0242] 包含本文所述用于表达RGEN组分的DNA多核苷酸的任何构建体或载体可通过任何标准技术引入非常规酵母细胞中。这些技术包括例如转化(例如,乙酸锂转化 (Methods in Enzymology, 194:186-187)、基因枪轰击、电穿孔和显微注射。例如,美国专利4880741和5071764,和Chen等人 (Appl. Microbiol. Biotechnol. 48:232-235), 上述文献以引用方式并入本文,描述了用于解脂耶氏酵母的DNA转化技术。

[0243] 可进行本文靶向方法,以用于在非常规酵母中形成插入缺失的目的。此类方法可如上文所公开的进行,但不另外提供可在靶DNA位点处或附近经历HR的供体DNA多核苷酸(即,在该方法中诱导NHEJ)。可形成的插入缺失的示例在本文中公开。插入缺失的尺寸可以为例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个碱基。在某些实施方案中,插入缺失可以甚至更大,诸如至少约20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140或150个碱基。在其它实施方案中,插入或缺失可以为至少约500、750、1000或1500个碱基。在某些实施方案中,当试图形成插入缺失时,单碱基替换可替代地在靶位点序列中形成。因此,可进行本文的靶向方法以例如用于形成单碱基替换的目的。

[0244] 在目的在于插入缺失形成的本文靶向方法的某些实施方案中,非常规酵母(例如,解脂耶氏酵母)中的插入缺失形成频率显著高于可在常规酵母诸如酿酒酵母中使用相同或相似靶向策略观察到的。例如,虽然常规酵母中的插入缺失形成频率可以为约0.0001至0.001 (DiCarlo等人, Nucleic Acids Res. 41:4336-4343), 但本文非常规酵母中的频率可以为至少约0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50、0.55、0.60、0.65、0.70、0.75或0.80。因此,在本文非常规酵母中的插入缺失形成频率可以比可在常规酵母中使用相同或相似Cas介导的靶向策略观察到的高例如至少约50、100、250、500、750、1000、2000、4000或8000倍。这些实施方案的某些方面可关于不包括供体DNA,和/或其中RGEN组分(Cas和合适的RNA组分)由相同载体/构建体表达的靶向方法。

[0245] 本文的靶向方法可例如以在所述方法中靶向2个或更多个DNA靶位点的方式来进行。此类方法可包括向酵母提供DNA多核苷酸,其表达包含如本文所公开的串联核酶-RNA组成盒(例如,串联核酶-RNA组分-核酶盒)的转录物。该方法可靶向非常接近相同序列的DNA位点(例如,启动子或开放阅读框,和/或彼此间隔的位点(例如,在不同基因和/或染色体中))。取决于期望的靶向结果,此类方法可在具有(对于HR)或不具有(对于导致插入缺失和/或碱基替换的NHEJ)合适的供体DNA多核苷酸的情况下进行。

[0246] 在某些实施方案中,可进行靶向方法以破坏编码蛋白质和非编码RNA的一个或多个DNA多核苷酸序列。可被靶向用于破坏的此类序列的示例为编码标记物的序列(例如,标记基因)。本文标记物的非限制性示例包括可筛选标记物和可选择标记物。本文的可筛选标记物可以为在合适条件下使酵母在视觉上不同的标记物。可筛选标记物的示例包括编码 β -葡萄糖醛酸糖苷酶(GUS)、 β -半乳糖苷酶(lacZ)和荧光蛋白(例如GFP、RFP、YFP、BFP)的多核苷酸。本文的可选择标记物可以为使得酵母对选择性试剂或选择性环境具有抗性的标记物。

可选择标记物的示例为营养缺陷型标记物,诸如HIS3、LEU2、TRP1、MET15或URA3,其使得酵母在不存在外源提供的组氨酸、亮氨酸、色氨酸、甲硫氨酸或尿嘧啶的情况下存活。可选择标记物的其它示例是抗生素(抗真菌)-抗性标记物,诸如对潮霉素B、诺尔丝菌素、腐草霉素、嘌呤霉素或新霉素(例如G418)具有酵母抗性的那些。

[0247] 在某些实施方案中,破坏标记物的至少一个目的可以是用于标记物再循环。标记物再循环是一种方法,例如,包括(i)用标记物和异源DNA序列转化酵母,(ii)选择包含标记物和异源DNA序列的经转化酵母(其中标记物可选择酵母通常具有包含异源DNA序列的更高机会),(iii)破坏标记物,并且然后根据需要重复步骤(i)-(iii)多次(使用相同的标记物,但每次循环使用不同的异源DNA序列)以利用多个异源DNA序列转化酵母。在该过程中,一个或多个异源序列可包含呈供体多核苷酸形式的标记物本身(例如,侧接有用于靶向特定基因座的同源臂的标记物)。本文的标记物再循环方法的示例包括使用URA3作为非常规酵母诸如解脂耶氏酵母中的标记物的那些。

[0248] 本文所公开的组合物和方法的非限制性示例如下:

[0249] 1.一种非常规酵母,其包含至少一种RNA引导的内切核酸酶(RGEN),所述RNA引导的内切核酸酶包含至少一种不具有5'-端的RNA组分,其中所述RNA组分包含与酵母中的染色体或附加体上的靶位点序列互补的序列,其中所述RGEN可结合到全部或部分靶位点序列。

[0250] 2.根据实施方案1所述的非常规酵母,其中所述RGEN可结合到并切割全部或部分靶位点序列。

[0251] 3.根据实施方案1所述的酵母,其中所述酵母为选自下列属的成员:耶氏酵母属,毕赤酵母属、许旺氏酵母属、克鲁维酵母属、Arxula属、丝孢酵母属、假丝酵母属、黑粉菌属、球拟酵母属、接合酵母属、三角酵母属、隐球酵母属、红酵母属性、法夫酵母属、掷孢酵母属和管囊酵母属。

[0252] 4.根据实施方案1所述的酵母,其中所述RGEN包含CRISPR(聚集状规则间隔的短回文重复序列)-缔合的(Cas)蛋白质-9(Cas9)氨基酸序列。

[0253] 5.根据实施方案4所述的酵母,其中所述Cas9蛋白质为链球菌Cas9蛋白质。

[0254] 6.根据实施方案4所述的酵母,其中所述RNA组分包含向导RNA(gRNA),所述向导RNA包含可操作地连接至反式激活CRISPR RNA(tracrRNA)的CRISPR RNA(crRNA)。

[0255] 7.根据实施方案4所述的酵母,其中PAM(前间区序列邻近基序)序列邻近靶位点序列。

[0256] 8.一种非常规酵母,其包含多核苷酸序列,所述多核苷酸序列包含可操作地连接至至少一个核苷酸序列的启动子,其中所述核苷酸序列包含编码在编码RNA组分的DNA序列上游的核酶的DNA序列,其中所述RNA组分包含与酵母中染色体或附加体上的靶位点序列互补的可变靶向结构域,其中所述RNA组分可形成RNA-引导的内切核酸酶(RGEN),其中所述RGEN可结合到全部或部分靶位点序列。

[0257] 9.根据实施方案8所述的非常规酵母,其中所述RGEN可结合到并切割全部或部分靶位点序列。

[0258] 10.根据实施方案8所述的非常规酵母,其中由核苷酸序列转录的RNA自催化地去除核酶以产生所述RNA组分,其中所述RNA组分不具有5'端。

[0259] 11. 根据实施方案10所述的非常规酵母,其中所述核酶为锤头核酶、丁型肝炎病毒核酶、I组内含子核酶、RnaseP核酶、或发夹型核酶。

[0260] 12. 根据实施方案8所述的非常规酵母,其中由核苷酸序列转录的RNA不自催化地去除核酶以产生不具有5'端的核酶-RNA组分融合分子。

[0261] 13. 根据实施方案12所述的非常规酵母,其中所述核酶为HDV核酶。

[0262] 14. 根据实施方案8所述的非常规酵母,其中所述启动子为强启动子。

[0263] 15. 根据实施方案8所述的非常规酵母,其中所述启动子包含Poi II启动子序列。

[0264] 16. 一种将RNA引导的内切核酸酶(RGEN)靶向到非常规酵母中的染色体或附加体上的靶位点序列的方法,所述方法包括向所述酵母提供RGEN,所述RGEN包含至少一种不具有5'端的RNA组分,其中所述RNA组分包含与靶位点序列互补的序列,其中所述RGEN结合到全部或部分靶位点序列。

[0265] 17. 根据实施方案16所述的方法,其中所述RGEN可结合到并切割全部或部分靶位点序列。

[0266] 18. 一种将RNA引导的内切核酸酶(RGEN)靶向到非常规酵母中的染色体或附加体上的靶位点序列的方法,所述方法包括向所述酵母提供RGEN,所述RGEN包含至少一个核酶-RNA组分融合分子,其中所述RNA组分包含与靶位点序列互补的序列,其中所述RGEN结合到全部或部分靶位点序列。

[0267] 19. 根据实施方案18所述的方法,其中所述RGEN可结合到并切割全部或部分靶位点序列。

[0268] 20. 一种将RNA引导的内切核酸酶(RGEN)靶向到非常规酵母中的染色体或附加体上的靶位点序列的方法,所述方法包括向所述酵母提供第一重组DNA构建体,所述第一重组DNA构建体包含编码Cas内切核酸酶的DNA序列,和至少第二重组DNA构建体,所述第二重组DNA构建体包含编码RNA组分上游的核酶的DNA序列,其中由所述第二重组DNA构建体转录的RNA自催化地去除核酶以产生所述RNA组分,其中所述RNA组分和Cas9内切核酸酶可形成RGEN,所述RGEN可结合到全部或部分靶位点序列。

[0269] 21. 根据实施方案20所述的方法,其中所述RGEN可结合到并切割全部或部分靶位点序列。

[0270] 22. 一种将RNA引导的内切核酸酶(RGEN)靶向到非常规酵母中的染色体或附加体上的靶位点序列的方法,所述方法包括向所述酵母提供第一重组DNA构建体,所述第一重组DNA构建体包含编码Cas内切核酸酶的DNA序列,和至少第二重组DNA构建体,所述第二重组DNA构建体包含编码核酶-RNA组分融合分子的DNA序列,其中所述核酶-RNA组分融合分子和Cas9内切核酸酶可形成RGEN,所述RGEN可结合到并任选地切割全部或部分靶位点序列。

[0271] 23. 根据实施方案22所述的方法,其中所述RGEN可结合到并切割全部或部分靶位点序列。

[0272] 24. 一种用于修饰非常规酵母中的染色体或附加体上的靶位点的方法,所述方法包括向非常规酵母提供第一重组DNA构建体,所述第一重组DNA构建体包含编码Cas内切核酸酶的DNA序列,和第二重组DNA构建体,所述第二重组DNA构建体包含编码RNA组分上游的核酶的DNA序列,其中由所述第二重组DNA构建体转录的RNA自催化地去除核酶以产生不具有5'端的所述RNA组分,其中所述Cas9内切核酸酶在所述靶位点处引入单链或双链断裂。

[0273] 25. 一种用于修饰非常规酵母中的染色体或附加体上的靶位点的方法, 所述方法包括向非常规酵母提供第一重组DNA构建体, 所述第一重组DNA构建体包含编码Cas内切核酸酶的DNA序列, 和第二重组DNA构建体, 所述第二重组DNA构建体包含编码不具有5'端的核酶-RNA组分融合分子的DNA序列, 其中所述核酶-RNA组分融合分子和Cas9内切核酸酶可形成RGEN, 所述RGEN在所述靶位点处引入单链或双链断裂。

[0274] 26. 一种用于修饰非常规酵母中的染色体或附加体上的多个靶位点的方法, 所述方法包括向非常规酵母提供至少第一重组DNA构建体, 所述第一重组DNA构建体包含编码Cas内切核酸酶的DNA序列, 和至少第二重组DNA构建体, 所述第二重组DNA构建体包含可操作地连接至至少一个多核苷酸的启动子, 其中所述至少一个多核苷酸编码包含RNA组分上游的核酶的RNA分子, 其中所述RNA分子自催化地去除核酶以产生所述RNA组分, 其中Cas9内切核酸酶在所述靶位点处引入单链或双链断裂。

[0275] 27. 一种用于修饰非常规酵母中的染色体或附加体上的多个靶位点的方法, 所述方法包括向非常规酵母提供至少第一重组DNA构建体, 所述第一重组DNA构建体包含编码Cas内切核酸酶的DNA序列, 和至少第二重组DNA构建体, 所述第二重组DNA构建体包含可操作地连接至至少一个多核苷酸的启动子, 其中所述至少一个多核苷酸编码核酶-RNA组分融合分子, 其中所述核酶-RNA组分融合分子和Cas9内切核酸酶可形成RGEN, 所述RGEN在所述靶位点处引入单链或双链断裂。

[0276] 28. 根据实施方案22-25中任一项所述的方法, 所述方法还包括鉴定在所述靶位点处具有修饰的至少一种非常规酵母细胞, 其中所述修饰包括所述靶位点中的一个或多个核苷酸的至少一个缺失、添加或替换。

[0277] 29. 根据实施方案24-28中任一项所述的方法, 所述方法还包括向所述酵母提供供体DNA, 其中所述供体DNA包含目的多核苷酸。

[0278] 30. 根据实施方案29所述的方法, 所述方法还包括鉴定在其染色体或附加体中包含整合在所述靶位点处的目的多核苷酸的至少一种酵母细胞。

[0279] 31. 一种用于编辑非常规酵母中的染色体或附加体上的核苷酸序列的方法, 所述方法包括向非常规酵母提供多核苷酸修饰模板DNA, 第一重组DNA构建体, 所述第一重组DNA构建体包含编码Cas内切核酸酶的DNA序列, 和第二重组DNA构建体, 所述第二重组DNA构建体包含编码RNA组分上游的核酶的DNA序列, 其中由第二重组DNA构建体转录的RNA自催化地去除核酶以产生不具有5'端的所述RNA组分, 其中所述Cas9内切核酸酶在所述酵母的染色体或附加体中的靶位点处引入单链或双链断裂, 其中所述多核苷酸修饰模板DNA包含所述核苷酸序列的至少一个核苷酸修饰。

[0280] 32. 一种用于编辑非常规酵母中的染色体或附加体上的核苷酸序列的方法, 所述方法包括向非常规酵母提供多核苷酸修饰模板DNA, 第一重组DNA构建体, 所述第一重组DNA构建体包含编码Cas内切核酸酶的DNA序列, 和第二重组DNA构建体, 所述第二重组DNA构建体包含编码不具有5'端的核酶-RNA组分融合分子的DNA序列, 其中所述核酶-RNA组分融合分子和Cas9内切核酸酶可形成RGEN, 所述RGEN在所述酵母的染色体或附加体中的靶位点处引入单链或双链断裂, 其中所述多核苷酸修饰模板DNA包含所述核苷酸序列的至少一个核苷酸修饰。

[0281] 33. 一种用于编辑非常规酵母中的染色体或附加体上的核苷酸序列的方法, 所述

方法包括向非常规酵母提供至少一种多核苷酸修饰模板DNA、至少第一重组DNA构建体,所述第一重组DNA构建体包含编码Cas内切核酸酶的DNA序列,和至少第二重组DNA构建体,所述第二重组DNA构建体包含可操作地连接至至少一个多核苷酸的启动子,其中所述至少一个多核苷酸编码包含RNA组分上游的核酶的RNA分子,其中所述RNA分子自催化地去除核酶以产生不具有5'端的所述RNA组分,其中所述Cas9内切核酸酶在所述酵母的染色体或附加体中的靶位点处引入单链或双链断裂,其中所述多核苷酸修饰模板DNA包含所述核苷酸序列的至少一个核苷酸修饰。

[0282] 34.一种用于编辑非常规酵母中的染色体或附加体上的核苷酸序列的方法,所述方法包括向非常规酵母提供至少一个多核苷酸修饰模板DNA、至少第一重组DNA构建体,所述第一重组DNA构建体包含编码Cas内切核酸酶的DNA序列的,和至少第二重组DNA构建体,所述第二重组DNA构建体包含可操作地连接至至少一个多核苷酸的启动子,其中所述至少一个多核苷酸编码不具有5'端的核酶-RNA组分融合分子,其中所述核酶-RNA组分融合分子和Cas9内切核酸酶可形成RGEN,所述RGEN在所述酵母的染色体或附加体中的靶位点处引入单链或双链断裂,其中所述多核苷酸修饰模板DNA包含所述核苷酸序列的至少一个核苷酸修饰。

[0283] 35.根据实施方案24-34中任一项所述的方法,其中所述第一重组DNA和第二重组DNA位于相同质粒上。

[0284] 36.根据实施方案24-34中任一项所述的方法,其中所述第一重组DNA和第二重组DNA位于独立的质粒上。

[0285] 37.一种用于使非常规酵母中的染色体或附加体上的核苷酸序列沉默的方法,所述方法包括向非常规酵母提供至少第一重组DNA构建体,所述第一重组DNA构建体包含编码失活的Cas内切核酸酶的DNA序列,和至少第二重组DNA构建体,所述第二重组DNA构建体包含可操作地连接至至少一个多核苷酸的启动子,其中至少一个多核苷酸编码不具有5'端的核酶-RNA组分融合分子,其中所述核酶-RNA组分融合分子和失活的Cas9内切核酸酶可形成RGEN,所述RGEN结合到所述酵母的染色体或附加体中的所述核苷酸序列,从而阻断所述核苷酸序列的转录。

[0286] 38.一种用于生产非常规酵母中的基因修饰用多重向导RNA的高通量方法,所述方法包括:

[0287] a) 提供重组DNA构建体,其包含以5'至3'的顺序可操作地连接至下列的启动子:编码核酶的第一DNA序列、编码反向选择剂的第二DNA序列、编码向导RNA的CER结构域的第三DNA序列和终止序列;

[0288] b) 向(a)的重组DNA构建体提供至少一个寡核苷酸双链体,其中所述寡核苷酸双链体源自包含能够编码向导RNA靶序列的可变靶向结构域(VT)的DNA序列的第一单链寡核苷酸与包含编码可变靶向结构域的DNA序列的互补序列的第二单链寡核苷酸的组合;

[0289] c) 将(a)的反向选择剂与(b)的至少一个寡双链体交换,从而形成重组DNA构建体库,其各自包含能够编码向导RNA的可变靶向结构域的DNA序列;以及,

[0290] d) 转录(c)的重组DNA构建体库,从而形成核酶-向导RNA分子库。

[0291] 39.根据实施方案38所述的方法,所述方法还包括诱导核酶-向导RNA分子库使得所述分子自催化地去除核酶和核酶上游的任何RNA序列,以产生不包含5'端的向导RNA分子

库。

[0292] 40. 根据实施方案38所述的方法,所述方法还包括诱导核酶-向导RNA分子库使得所述分子切割核酶上游的任何RNA序列,以产生不包含5'端的核酶-gRNA融合分子。

[0293] 41. 一种重组DNA序列,其包含(i)聚合酶II启动子,所述聚合酶II启动子可操作地连接至(ii)编码核酶和向导RNA的核苷酸序列,其中所述核酶在所述向导RNA上游,其中由(ii)的核苷酸序列转录的RNA自催化地去除核酶以产生所述向导RNA,并且其中所述向导RNA可形成RGEN,所述RGEN可识别、结合到、和任选地切割非常规酵母的基因组中的靶位点。

[0294] 42. 一种重组RNA序列,其包含核酶和向导RNA,其中所述核酶在所述向导RNA的上游,其中所述核酶可被自催化地去除以产生所述向导RNA,并且其中所述向导RNA可形成RGEN,所述RGEN可识别、结合到和任选地切割非常规酵母的基因组中的靶位点。

[0295] 43. 一种重组DNA序列,其包含(i)聚合酶II启动子,所述聚合酶II启动子可操作地连接至(ii)编码核酶和向导RNA的核苷酸序列,其中所述核酶在所述向导RNA的上游,其中由(ii)的核苷酸序列转录的RNA产生核酶-向导RNA融合分子,并且其中所述核酶-向导融合分子可形成RGEN,所述RGEN可识别、结合到和任选地切割非常规酵母的基因组中的靶位点。

[0296] 44. 一种重组RNA序列,其包含核酶-向导RNA融合分子,其中所述核酶-向导RNA融合分子可形成RGEN,所述RGEN可识别、结合到和任选地切割非常规酵母的基因组中的靶位点。

[0297] 实施例

[0298] 所公开的本发明将在以下的实施例中进一步阐述。应该理解,尽管这些实施例说明了本发明的某些优选方面,但仅是以例证的方式给出的。通过上述论述和这些实施例,本领域的技术人员可确定本发明的必要特征,并且在不脱离本发明的实质和范围内的前提下,可对本发明进行各种变化和修改以适应多种用途和条件。

[0299] 实施例1

[0300] 由耶氏酵母中的Po1 III启动子表达的sgRNA不将Cas9引导至靶位点并介导DNA切割

[0301] 该示例公开了被设计用于表达靶向Leu2基因座的解脂耶氏酵母中的sgRNA和Cas9蛋白质的载体和盒。如果该酵母中产生的sgRNA和Cas9可与靶位点相互作用、找到并切割靶位点,则突变应当经由靶位点处的易错非同源末端接合(NHEJ)产生。

[0302] 图1示出了sgRNA分子,其为单个RNA分子,所述RNA分子包含两个区域,可变靶向结构域(VT)(向导序列)和Cas内切核酸酶识别结构域(CER)。VT区可以为具有与靶核酸分子同一性的RNA多核苷酸的20聚体。VT结构域指定了用于在位于PAM基序(例如NGG, SEQ ID NO: 47)的5'的靶位点中切割的靶位点。CER结构域与Cas9蛋白质相互作用并使得VT结构域相互作用并引导Cas9蛋白质切割(Jinek等人, Science 337:816-821)。VT结构域和CER结构域两者都是sgRNA的功能所需要的

[0303] 编码将Cas9靶向到耶氏酵母的LEU2基因座的编码区中的三个独立靶位点(Leu2-1、Leu2-2、Leu2-3)的VT结构域的DNA序列列于表3中。表3还列出了编码靶向耶氏酵母CAN1基因座的编码区的VT结构域的DNA序列。

[0304] 表3

[0305] 编码用于利用Cas9靶向耶氏酵母中的LEU2或CAN1基因座的sgRNA VT结构域的DNA

序列

[0306]	Leu2-1 ^a (SEQ ID NO:2)	TCCAAGAAGATTGTTCTTCT
	Leu2-2 ^a (SEQ ID NO:3)	CTCCGTCATCCCCGGTTCTC
	Leu2-3 ^a (SEQ ID NO:4)	CGGCGACTTCTGTGGCCCCG
	Can1-1 ^b (SEQ ID NO:17)	TCAAACGATTACCCACCCTC

[0307] a由Leu2-1、Leu2-2和Leu2-3靶向的LEU2基因位点分别具有CGG、TGG或AGG作为PAM位点。

[0308] b由Can1-1靶向的CAN1基因位点具有CGG作为PAM位点。

[0309] 表3中LEU2靶向DNA序列中的每一个独立地融合至编码CER结构域 (SEQ ID NO:1) 的DNA序列,所述CER结构域与化脓链球菌Cas9蛋白质相互作用,从而形成编码具有CER结构域和VT结构域两者的完整sgRNA的DNA序列(注意,SEQ ID NO:1在5' -至-3' 方向上包含SEQ ID NO:56的tracrRNA配对序列、SEQ ID NO:43成环序列(GAAA)、和SEQ ID NO:58的tracrRNA序列)。为了在细胞核中表达这些sgRNA,并且回避核输出和5' 修饰体系,将编码sgRNA的DNA序列置于对来自酿酒酵母(Snr52[SEQ ID NO:5]或Rpr1[SEQ ID NO:6])或解脂耶氏酵母(Snr52[SEQ ID NO:7])的RNA Pol III启动子的控制下。具体地讲,将Sc Snr52融合至Leu2-1,将Sc Rpr1融合至Leu2-2,并且将Y1 Snr52融合至Leu2-3。将编码每种sgRNA的DNA序列的3' 端融合至来自酿酒酵母的Sup4基因的强终止子(SEQ ID NO:8)。因此,制备三种不同的Pol III-驱动的sgRNA盒。

[0310] 按照标准技术,将来自化脓链球菌M1 GAS(SF370)的Cas9基因的开放阅读框经密码子优化以在耶氏酵母中表达,产生SEQ ID NO:9。在SEQ ID NO:9的最后有义密码子之后掺入编码猿猴病毒40(SV40)单倍体核定位信号(NLS)加上短接头(4个氨基酸)的DNA序列以得到SEQ ID NO:10。SEQ ID NO:10编码以SEQ ID NO:11示出的氨基酸序列。SEQ ID NO:11的最后七个氨基酸编码附加的NLS,然而在SEQ ID NO:11的位置1369-1372处的残基编码附加的接头。通过标准分子生物学技术,将经耶氏酵母密码子优化的Cas9-NLS序列(SEQ ID NO:10)融合至耶氏酵母组成型启动子,FBA1(SEQ ID NO:12)。经耶氏酵母密码子优化的Cas9表达盒(SEQ ID NO:13)的示例示于图2A中,其包含组成型FBA1启动子、经耶氏酵母密码子优化的Cas9和SV40NLS。将该Cas9表达盒(SEQ ID NO:13)克隆到质粒pZUF中,得到构建体pZUFCas9(图3A,SEQ ID NO:14)。

[0311] 将sgRNA表达盒(上述)中的每个独立地克隆到pZUFCas9(SEQ ID NO:14)的PacI/ClaI位点中,以获得pZUFCas9/sgRNA构建体,所述构建体可用于利用经耶氏酵母密码子优化的Cas9表达盒和Pol III驱动的sgRNA表达盒共转化酵母细胞。此类构建体的示例为pZUFCas9/PolIII-sgRNA(图3B),其包含用于在耶氏酵母中靶向Leu2-3的Y1 Snr52-sgRNA表达盒。

[0312] 利用200ng质粒pZUFCas9(SEQ ID NO:14)或特定的pZUFCas9/sgRNA(例如pZUFCas9/PolIII-sgRNA,图3B)转化尿嘧啶营养缺陷型解脂耶氏酵母细胞,并在缺乏尿嘧啶的完整最小板(CM-ura)上选择尿嘧啶原养型。在缺乏亮氨酸的完整最小板(CM-leu)上对在CM-ura板上产生的群落筛选亮氨酸营养缺陷型。尿嘧啶原养型转化体均不显示出亮氨酸营养缺陷型。这些结果表明经耶氏酵母密码子优化的Cas9和Pol III启动子驱动的sgRNA不被表达、不产生、不相互作用、不靶向DNA、和/或不切割DNA。如果该实验产生了亮氨酸营养

缺陷型,则该结果可能指示Cas9/sgrRNA复合物靶向并切割Leu2编码区,导致易错NHEJ和随后的插入缺失形成,从而形成移码突变。

[0313] 因此,其显示sgRNA的Pol III驱动表达不可用于在耶氏酵母中提供功能性Cas9-sgrRNA复合物。

[0314] 实施例2

[0315] 包含由DNA聚合酶II启动子驱动的5'-和3'-核酶的经耶氏酵母优化的sgRNA表达盒

[0316] 该实施例公开了经优化用于在耶氏酵母中表达和Cas9-介导的靶向的sgRNA。用于此类表达的每个盒包含Pol II启动子,其用于驱动融合至5'-核酶和3'-核酶的sgRNA(核酶-sgrRNA-核酶,或RGR)的转录。提供5'和3'核酶以从sgRNA去除Pol II启动子相关的转录修饰物,诸如5'端结构,仅保留sgRNA序列。这些表达盒允许用于sgRNA表达的更宽的启动子选择。另外,由这些盒转录的sgRNA不经受核输出,因为其缺乏5'-端结构。这些特征允许sgRNA在耶氏酵母细胞中的稳健表达,因此它们可以将Cas9内切核酸酶引导到体内基因组的靶区域。

[0317] 将5'-锤头(HH)核酶和3'-丁型肝炎病毒(HDV)核酶加入sgRNA序列中使得sgRNA由任何启动子表达但不考虑在由一些RNA聚合酶(例如Pol II)转录的启动子处发生的后转录修饰并绕过了当前对用于sgRNA表达的启动子的有限选择。当表达此类sgRNA时,核酶在pre-sgrRNA转录自切割时存在,从而与转录物分离,留下未修饰的sgRNA。

[0318] 对于每个测试的sgRNA,编码sgRNA的DNA序列(i)在其5'端处融合至编码5' HH核酶的序列(SEQ ID NO:15)并且(ii)在其3'端处融合至编码3' HDV核酶的序列(SEQ ID NO:16)。HH核酶的5'-连接是使得HH核酶的前6个核苷酸为sgRNA的VT区(向导序列)的前6个核苷酸的反向互补序列这样的连接。使用标准分子生物学技术将每个核酶侧接的pre-sgrRNA(RGR)融合至FBA1启动子(SEQ ID NO:12)以产生经耶氏酵母优化的sgRNA表达盒(最终的盒描述于图2B中)。此类盒的示例性序列以SEQ ID NO:18示出,其包含可操作地连接至编码RGR(HH-sgrRNA-HDV)的序列的FBA1启动子(SEQ ID NO:12),其中sgRNA包含由SEQ ID NO:17(Can1-1)编码的VT结构域和SEQ ID NO:1作为其CER结构域(注意,SEQ ID NO:18的CER结构域-编码区、pRF38(SEQ ID NO:19)和pRF84(SEQ ID NO:41)中的每个具有附加的“TGG”,其中此类“TGG”介于对应于SEQ ID NO:1(CER结构域)的位置73-74的残基位置之间)。该VT结构域靶向耶氏酵母CAN1基因开放阅读框(GenBank登录号NC_006068,YALI0B19338g,染色体B的~bp 2557513-2559231)的编码区中的位点。编码的HH核酶的前6个残基与sgRNA的前6个残基(即,VT结构域的前6个残基)互补。注意,在SEQ ID NO:18中存在紧接SEQ ID NO:12(FBA1启动子)之后的三个残基(ATG),据信其不影响pre-sgrRNA的表达和核酶介导的自催化。将SEQ ID NO:18克隆到称为pRF38的构建体中(图3C,SEQ ID NO:19)。

[0319] 因此,制备用于表达不具有5'和3' pol II启动子相关转录修饰的sgRNA的DNA盒。这些类型的盒用于实施例3中用于耶氏酵母中的Cas9基因靶向。

[0320] 实施例3

[0321] 经耶氏酵母优化的sgRNA可用于sgRNA/Cas9内切核酸酶体系中以切割染色体DNA

[0322] 该实施例公开了使用如实施例2中所述的经耶氏酵母优化的sgRNA表达盒以表达sgRNA,所述sgRNA可与Cas9一起用于识别和切割耶氏酵母中的染色体DNA。此类切割通过预

测的DNA切割位点的区域中突变的出现来表现,这是由于切割位点处的易错NHEJ DNA修复。

[0323] 靶向解脂耶氏酵母的CAN1基因用于切割。分别通过表型(刀豆氨酸抗性)和对突变频率和频谱的测序来检查耶氏酵母转化体中CAN1的成功靶向。

[0324] Ura⁻解脂耶氏酵母细胞(菌株Y2224,直接源自菌株ATCC 20362的尿嘧啶营养缺陷型,公开于美国专利申请公布2010/0062502中,其以引用方式并入本文)通过利用pZUFCas9(图3A,SEQ ID NO:14)和由包含用于靶向CAN1基因座的经耶氏酵母优化的RGR pre-sgRNA盒(包含于SEQ ID NO:18)的pRF38(图3C,SEQ ID NO:19)扩增的线性PCR产物,通过锂离子介导的转化(Ito等人,J.Bacteriology 153:163-168)来共转化。用于该PCR扩增的引物为SEQ ID NO:20(正向)和SEQ ID NO:21(反向)。仅利用pZUFCas9(SEQ ID NO:14)转化的Ura⁻解脂耶氏酵母细胞(Y2224)用作阴性对照。在CM-ura培养基上选择利用pZUFCas9(SEQ ID NO:14)和RGR pre-sgRNA表达盒转化的细胞作为尿嘧啶原养型。通过将CM-ura板平板复制到缺乏尿嘧啶、缺乏精氨酸并补充有60μg/ml有毒精氨酸类似物,刀豆氨酸的完整最小培养基(CM+can)上,筛选在CAN1基因中包含功能丧失突变的细胞。具有功能性CAN1基因的细胞可将刀豆氨酸传输到细胞中导致细胞死亡。在CAN1基因中具有功能丧失等位基因的细胞不传输刀豆氨酸并且能够在CM+can板上生长。

[0325] 对于仅利用Cas9转化的细胞,通过刀豆氨酸抗性的表型筛选回收的功能丧失突变体的频率为零(图4)。然而,当利用RGR pre-sgRNA表达盒共转化Cas9时,刀豆氨酸抗性转化体的频率增加至10%(图4)。

[0326] 使用正向(SEQ ID NO:22)和反向(SEQ ID NO:23)PCR引物扩增刀豆氨酸抗性菌落的CAN1基因座。使用ZymocleanTM和浓缩柱(Zymo Research,Irvine,CA)纯化PCR产物。使用测序引物SEQ ID NO:24对PCR产物进行测序(Sanger法)。将序列与包含靶位点的野生型(WT)耶氏酵母CAN1编码序列进行比对(图5)。在表达Cas9和sgRNA两者的细胞中的CAN1基因座处的主要功能丧失突变(测序分离物的73%)为Cas9切割位点处的-1移码突变(图5)。少量其它缺失和插入组成CAN1基因座处的剩余突变。总之,90%的突变为小缺失和插入(图5)。很少发生其它事件,诸如插入少量来自另一染色体的序列(4%),在切割位点处插入经耶氏酵母优化的sgRNA表达盒(1.5%),或较大缺失(1%)。3.5%经筛选的刀豆氨酸抗性菌落在CAN1基因座处具有复杂的重组,其不通过测序确定。总之,在CAN1靶位点处观察到的突变指示易错NHEJ用于细胞中以修复由Cas9/sgRNA复合物形成的切割。

[0327] (i)在转化以表达CAN1-特异性Cas9内切核酸酶的细胞中刀豆氨酸抗性菌落的频率增加,和(ii)指示刀豆氨酸抗性突变是由于预测Cas9切割位点处的易错NHEJ事件的测序数据两者均确认实施例2中所述的经耶氏酵母优化的Cas9和RGR pre-sgRNA表达盒切割耶氏酵母染色体DNA并形成突变。

[0328] 因此,表达不具有5'端的RGEN(例如Cas9)的RNA组分(例如,sgRNA),其中RNA组分的5'端通过核酶自催化地去除,允许在非常规酵母中对DNA序列进行RGEN-介导的靶向。

[0329] 实施例4

[0330] 由5'核酶但不由3'核酶表达的经耶氏酵母优化的sgRNA可用于sgRNA/Cas9内切核酸酶体系中用于切割染色体DNA

[0331] 在该实施例中,评价由经耶氏酵母优化的盒(其仅包含5'HH核酶,但不具有3'核酶)产生的sgRNA的功能性,以确定sgRNA是否可与Cas9相互作用、识别DNA靶序列、通过Cas9

诱导DNA切割、并由易错NHEJ导致突变。

[0332] 由Pol II启动子转录的RNA在其5'和3'端两者处被重加工和修饰,表明为了由Pol II启动子产生功能性sgRNA,必须切除5'和3'端。先前已经示出,在体外由旁侧区产生的sgRNA: (i) 如果存在5'-旁侧区则是非功能性的,和(ii) 如果存在3'旁侧区则是显著功能缺陷的(Gao等人, J. Integr. Plant Biol. 56:343-349)。如果包含5'核酶和3'旁侧区的pre-sgRNA连同Cas9一起表达酿酒酵母,则sgRNA不用于将Cas9引导至靶位点用于切割(Gao等人,同上)。

[0333] 为测试5'核酶-侧接的sgRNA(缺乏3'-定位的核酶)是否可在非常规酵母中起作用,构建经耶氏酵母优化的sgRNA表达盒(SEQ ID NO:25),其包含在5'-至-3'方向上的FBA1启动子(SEQ ID NO:12),所述启动子融合至HH核酶(SEQ ID NO:15),所述核酶融合至编码靶向Can1-1靶位点(SEQ ID NO:17)的sgRNA(示例为SEQ ID NO:70)的序列,所述Can1-1靶位点融合至来自酿酒酵母Sup4基因(SEQ ID NO:8)的强转录终止子(该盒可以表征为表达RG[核酶-sgRNA]RNA)。在RG表达盒中编码的sgRNA包含对应于SEQ ID NO:17的VT结构域,其连接至CER结构域(SEQ ID NO:1)。编码的HH核酶的前6个残基与sgRNA的前6个残基(即,VT结构域的前6个残基)互补。注意,在SEQ ID NO:25中存在紧接SEQ ID NO:12(FBA1启动子)之后的三个残基(ATG),据信其不影响pre-sgRNA的表达和核酶介导的自催化。该经耶氏酵母优化的RG表达盒(SEQ ID NO:25)示于图2C中。

[0334] 为测试经耶氏酵母优化的RG盒表达sgRNA的能力,所述sgRNA可与Cas9相互作用,将Cas9引导到DNA靶序列用于由Cas9切割,包含RG构建体(SEQ ID NO:25)或RGR构建体(SEQ ID NO:18,实施例2)的PCR产物利用pZUCas9(SEQ ID NO:14)通过锂离子介导的转化共转化到Ura⁻解脂耶氏酵母细胞(Y2224)中(Ito等人,同上)。将Ura⁺转化体平板复制到CM+can板上以筛选刀豆氨酸抗性细胞(如实施例3中所示),其中由RG或RGR pre-sgRNA产生的sgRNA用于引导Cas9以切割CAN1靶序列,从而导致通过NHEJ进行易错修复。经耶氏酵母优化的RG或RGR盒引导对靶位点的Cas9介导的切割的频率相同(图6)指示与使用酿酒酵母的Gao等人(J. Integr. Plant Biol. 56:343-349)的结果相反,3'核酶不是耶氏酵母中有效Cas9/sgrNA靶切割和突变所必需的。

[0335] 该实施例展示,在非常规酵母诸如耶氏酵母中,当使用核酶策略时,仅5'-侧接核酶看起来是由Pol II启动子产生功能性sgRNA所必需的。该结果与酿酒酵母(常规酵母)中所观察的相反,其中5'和3'核酶两者均是由Cas9进行靶序列的有效切割和突变所要求的(Gao等人,同上)。

[0336] 因此,该实施例还展示表达不具有5'端的RGEN(例如Cas9)的RNA组分(例如,sgRNA),其中RNA组分的5'端通过核酶自催化地去除,允许在非常规酵母中对DNA序列进行RGEN-介导的靶向。

[0337] 实施例5

[0338] 使用线性多核苷酸修饰模板以促进Cas9/sgrNA-诱导的DNA双链断裂的同源重组(HR)修复

[0339] 该示例公开了测试HR机制在耶氏酵母中使用线性多核苷酸修饰模板DNA序列修复由表达经耶氏酵母优化的Cas9和pre-sgRNA表达盒产生的双链断裂(DSB)的能力。制备三种不同的线性模板序列,其各自具有与染色体DNA中的Cas9/sgrNA靶向位点外的区域同源的

5' 臂序列和3' 臂序列。

[0340] 由互补的合成寡核苷酸产生前两种类型的多核苷酸修饰模板序列。将互补寡核苷酸退火,并且然后通过乙醇沉淀纯化。

[0341] 使用互补寡核苷酸 (SEQ ID NO:28和29) 产生第一多核苷酸修饰模板并且其被设计成删除20-核苷酸Can1-1靶位点 (SEQ ID NO:17)、3-核苷酸PAM结构域和紧接Can1-1靶位点上游的两个核苷酸,从而删除8个密码子和1个碱基对,从而在CAN1基因中产生-1bp移码。第一多核苷酸修饰模板通过退火SEQ ID NO:28和其反向互补序列SEQ ID NO:29来组装。第一供体DNA的同源臂 (各自约50-bp) 彼此直接靠近;在它们之间不具有异源序列。

[0342] 第二多核苷酸修饰模板使用互补寡核苷酸 (SEQ ID NO:30和31) 产生,并且被设计成在CAN1开放阅读框中产生两个框内翻译终止密码子 (即,无义突变)。其还被设计成破坏Can1-1靶位点下游的PAM序列 (利用ATG置换CGG) 和种子序列的第一个核苷酸 (即,SEQ ID NO:17的Can1-1靶序列的最后残基) (用G置换C)。该多核苷酸修饰模板通过退火SEQ ID NO:30和其反向互补序列SEQ ID NO:31来形成。如可由上文搜集的,第二供体DNA的同源臂 (各自约50-bp) 由异源序列的一些碱基对分隔开。

[0343] 第三多核苷酸修饰模板通过产生两个PCR产物部分地形成。在使用引物SEQ ID NO:33[正向]和SEQ ID NO:34[反向]由解脂耶氏酵母ATCC 20362基因组DNA扩增的一个PCR产物 (SEQ ID NO:32) 中,SEQ ID NO:32的位置638对应于CAN1开放阅读框起始密码子上游3bp的核苷酸。反向引物 (SEQ ID NO:34) 添加与位于CAN1开放阅读框下游37bp的序列互补的17个核苷酸。第二PCR产物 (SEQ ID NO:35,使用引物SEQ ID NO:36[正向]和SEQ ID NO:37[反向]由解脂耶氏酵母ATCC 20362基因组DNA扩增),包含在CAN1开放阅读框的终止密码子下游14个碱基对处起始的637个碱基对。正向引物 (SEQ ID NO:36) 添加与在CAN1开放阅读框上游2个碱基对终止的区域互补的20个核苷酸。上游 (SEQ ID NO:32) 和下游PCR产物 (SEQ ID NO:35) 两者均使用ZymocleanTM和浓缩柱纯化。这些PCR产物 (各自10ng) 在新的PCR反应中混合。上游产物的3'-最多37个核苷酸与下游产物的5'-最多37个核苷酸相同。上游和下游片段用于彼此引发,从而通过由包含上游序列和下游序列两者的重叠末端合成来产生单一产物 (SEQ ID NO:38) (由Horton等人在Biotechniques 54:129-133中描述的技术)。SEQ ID NO:38供体DNA的同源臂 (各自约600-bp) 彼此直接靠近;在它们之间不具有异源序列。该多核苷酸修饰模板可获得大缺失,所述缺失包括在Can1-1靶位点处的Cas9/sgrNA介导的双链断裂区中的整个CAN1开放阅读框。

[0344] 利用以下物质使用上述锂离子转化方法转化Ura⁻解脂耶氏酵母细胞 (Y2224): (i) pZUFCas9 (SEQ ID NO:14), (ii) 1μg的经耶氏酵母优化的RGR pre-sgrNA表达盒 (SEQ ID NO:18), 和 (iii) 1nmol的“移码模板”DNA (SEQ ID NO:28)、1nmol的“点突变模板”DNA (SEQ ID NO:30)、或1μg的“大缺失模板”DNA (SEQ ID NO:38)。转化细胞作为CM-ura板上尿嘧啶的原养型回收。通过平板复制到CM+can鉴定具有CAN1突变的刀豆氨酸抗性细胞来筛选原养型菌落。来自每个转化的Can^R菌落的CAN1基因座通过使用正向引物 (SEQ ID NO:22) 和反向引物 (SEQ ID NO:23) 的PCR扩增来筛选。每种PCR产物使用ExoSAP-IT[®] (Affymetrix, Santa Clara, CA) 纯化,并且使用测序引物SEQ ID NO:24进行测序 (Sanger方法)。Can^R菌落总数之外的表现出预测的同源重组事件的菌落频率 (根据在转化中使用了哪种特定模板DNA) 为约15% (图7)。

[0345] 三种不同多核苷酸修饰模板DNA序列具有略不同的HR修复效率(图8)。具体地讲,这些模板中每一个的HR频率大约在11%(大缺失和移码供体)和22%(点突变模板)之间(图8),这指示当提供多核苷酸修饰模板DNA时,使用HR路径以高准确度方式修复Can1-1靶位点处的一些Cas9/sgRNA产生的切割事件。

[0346] 使用DNA修复的两种主要途径,NHEJ或HR,展示出在耶氏酵母中对NHEJ的明显偏好(图7),这不同于对常规酵母中Cas9/sgRNA-介导的切割事件的修复的研究时所观察到的。例如,DiCarlo等人(Nucleic Acids Res.41:4336-4343)示出在提供供体DNA以修复Cas9/sgRNA介导的DNA切割时获得的几乎所有酿酒酵母突变体均经由HR产生,然而当不提供供体DNA时频率下降4至5个数量级,指示对HR的明显偏好。相反,在Cas9/sgRNA(sgRNA由RCR盒表达)切割位点处在耶氏酵母中的总突变频率不在接受或不接受多核苷酸修饰模板DNA的转化体之间变化(图9,示出对两种转化体的~15%突变率),并且在提供供体DNA时,HR仅占产生的突变转化体的约15%(图7)。因此,如上文所观察的耶氏酵母中利用多核苷酸修饰模板DNA序列的HR的频率仅为约2.25%,这与在常规酵母中具有供体DNA的情况下观察到的几乎100%HR介导的突变率形成鲜明对比(DiCarlo等人,同上)。

[0347] 因此,该示例还展示表达不具有5'端的RGEN(例如Cas9)的RNA组分(例如,sgRNA),其中RNA组分的5'端通过核酶自催化地去除,允许在非常规酵母中对DNA序列进行RGEN-介导的靶向。该实施例还展示如果提供合适的供体DNA(多核苷酸修饰模板),则可以通过HR以一定比率修复非常规酵母中的RGEN介导的切割。

[0348] 实施例6

[0349] 由单个稳定的载体表达Cas9和经耶氏酵母优化的RGR或RG Pre-sgRNA提供Cas9/sgRNA-介导的靶DNA切割

[0350] 在该实施例中,经耶氏酵母优化的RGR或RG Pre-sgRNA表达盒各自独立地移动到相同稳定表达质粒中作为经耶氏酵母优化的Cas9表达盒。具体地讲,SEQ ID NO:18(对于RGR表达)或SEQ ID NO:25(对于RG表达)各自独立地克隆到pZUFCas9中(图3A,SEQ ID NO:14)。这允许单组分转化以在细胞中表达Cas9内切核酸酶和RG或RGR pre-sgRNA,从而提供Cas9/sgRNA-介导的靶位点切割,之后进行易错NHEJ修复。

[0351] 使用正向(SEQ ID NO:39)和反向(SEQ ID NO:40)引物通过PCR扩增经耶氏酵母优化的RGR(SEQ ID NO:18)或RG(SEQ ID NO:25)sgRNA表达盒。将每个产物独立地克隆到PacI/ClaI限制位点处的质粒pZUFCas9(SEQ ID NO:14)中以形成两个新质粒,所述新质粒各自携带相应的盒用于Cas9表达和表达优化的RGR pre-sgRNA(pRF84,SEQ ID NO:41,图10A)或优化的RG pre-sgRNA(pRF85,SEQ ID NO:42,图10B)。

[0352] 为测试pRF84(SEQ ID NO:41)和pRF85(SEQ ID NO:42)质粒构建体各自有效地表达Cas9和sgRNA以提供Cas9/sgRNA介导的靶位点(Can1-1)切割的能力,使用上述锂离子转化方法利用200ng的pRF84(SEQ ID NO:41)、pRF85(SEQ ID NO:42)、或pZUFCas9(SEQ ID NO:14)转化Ura⁻解脂耶氏酵母细胞(Y2224)。选择由每种质粒转化的细胞作为CM-ura培养基上的尿嘧啶原养型。通过在CM+can上平板复制对于CAN1突变体筛选来自每个转化的尿嘧啶原养型。对于由pZUFCas9(仅表达Cas9)、pRF84(表达Cas9和RGR pre-sgRNA)、或pRF85(表达Cas9和RG pre-sgRNA)转化的细胞,将CM+can板上生长的菌落数用于产生CAN1突变频率(图11)。由pZUFCas9(SEQ ID NO:14)转化的耶氏酵母细胞具有CAN1基因座处的Cas9/sgRNA

介导的突变的0频率,然而表达(i) Cas9和(ii) RGR pre-sgRNA (pRF84) 或RG sgRNA (pRF85) 的细胞具有如由刀豆氨酸抗性所指示的类似的CAN1突变频率(□69%) (图11)。

[0353] 这些结果指示,由相同载体表达Cas9和pre-sgRNA导致显著更高的Cas9/sgrRNA介导的切割率,从而因此导致显著更高的在预测切割位点处的NHEJ介导的突变率。虽然由编码Cas9和pre-sgRNA (RGR或RG pre-sgRNA) 的单独序列转化的耶氏酵母细胞表现出约5%的靶向突变频率(实施例4,图6),在用于转化的相同载体上放置Cas9和sgRNA编码序列两者导致约69%的靶向突变频率(图11)。

[0354] 因此,与使用独立的构建体表达RGEN蛋白质和RNA组分相比,由用于转化非常规酵母的相同构建体表达Cas蛋白质及其对应的RNA组分导致在酵母中Cas介导的DNA靶向的更高比率。

[0355] 实施例7

[0356] 在解脂耶氏酵母中使用HDV核酶-sgRNA融合体的高效基因靶向

[0357] 该实施例讨论了使用单个向导RNA (由HDV核酶侧接于5'端上的sgRNA (核酶-单向向导RNA融合体)。当表达时,HDB核酶切割其自身序列的5',去除任何先前的转录物,但保留融合至sgRNA的5'端的HDV序列。

[0358] 质粒pZuf-Cas9 (SEQ ID NO:14) 使用Agilent QuickChange和以下引物AarI-去除-1 (AGAAGTATCCTACCATCTACcatctccGAAAGAACTCGTCGATTCC,SEQ ID NO:90) 和AarI-去除-2 (GGAATCGACGAGTTTCTTTCggagatgGTAGATGGTAGGATACTTCT,SEQ ID NO:91) 诱变以去除存在于pZuf-Cas9 (SEQ ID NO:14) 上的Cas9基因 (SEQ ID NO:10) 中的内切核酸酶AarI位点并产生pRF109 (SEQ ID NO:92)。以来自pRF109的NcoI/NotI片段形式将修饰的AarI-Cas9基因 (SEQ ID NO:93) 克隆到pZufCas9的NcoI/NotI位点中,从而利用AarI-Cas9基因置换存在的Cas9基因 (SEQ ID NO:10) 以产生pRF141 (SEQ ID NO:94)。

[0359] 高通量克隆盒 (图12A,SEQ ID NO:95) 由y152启动子 (SEQ ID NO:96)、HDV核酶 (SEQ ID NO:16)、大肠杆菌反向选择盒rpsL (SEQ ID NO:97)、编码向导RNA CER结构域 (SEQ ID NO:1) 的DNA和酿酒酵母Sup4终止子 (SEQ ID NO:8) 构成。侧接高通量克隆盒 (SEQ ID NO:95) 端部的是PacI和ClaI限制性酶识别位点。将高通量克隆盒克隆到pRF141 (SEQ ID NO:94) 的PacI/ClaI位点中以生成pRF291 (SEQ ID NO:98)。rpsL反向选择盒 (SEQ ID NO:97) 包含编码S12核糖体蛋白亚基的大肠杆菌基因rpsL的WT拷贝 (Escherichia coli and Salmonella typhimurium:Cellular and Molecular Biology,1987,第一版,American Society of Microbiology,Washington,DC)。S12亚基中的一些突变导致对抗生素链霉素的抗性 (Ozaki M,Mizushima S,Nomura M.,1969.Identification and functional characterization of the protein controlled by the streptomycin-resistant locus in E.coli.Nature 222:333-339),其以隐形方式进行 (Lederberg J.1951.Streptomycin resistance;a genetically recessive mutation.Journal of bacteriology 61:549-550),使得如果rpsL基因的野生型拷贝存在,则菌株是对链霉素在表型上敏感的。常见克隆菌株诸如Top10 (Life technologies) 在其染色体上具有rpsL的突变拷贝,使得细胞对链霉素具有抗性。

[0360] 将编码向导RNA的可变靶向结构域的DNA片段克隆到质粒 (诸如pRF291) 中,要求两个部分互补的寡核苷酸在退火时,包含编码可变靶向结构域的DNA片段,以及用于克隆到存

在于高通量克隆盒中的两个AarI位点中的正确突出物。将两种寡核苷酸Can1-1F (AATGGGA CtaaagcattacccaccctcGTTT, SEQ ID NO:99) 和Can1-1R (TCTAAACgagggtgggtaatcgtttg aGTCC, SEQ ID NO:100) 以100 μ M重新悬浮于双重缓冲液 (30mM HEPES, pH 7.5, 100mM 乙酸钠) 中。在单个试管中, 以50 μ M的最终浓度将Can1-1F (SEQ ID NO:99) 和Can1-1R (SEQ ID NO:100) 混合, 加热至95 $^{\circ}$ C并持续5分钟, 并且以0.1 $^{\circ}$ C/min冷却至25 $^{\circ}$ C, 以使两个寡核苷酸退火以形成小双链体DNA分子 (图12B), 其包含编码能够靶向Can1-1靶位点的向导RNA的可变靶向结构域的DNA片段 (示为SEQ ID NO:101, 其包括PAM序列CGG)。形成单管消化/连接反应物, 其包含50ng的pRF291, 由Can1-1F和Can1-1R 1x T4连接酶缓冲液 (50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM ATP, 10mM DTT, pH 7.5) 构成的2.5 μ M小双链体DNA, 0.5 μ M AarI寡核苷酸, 2单位AarI, 40单位T4DNA连接酶, 最终体积为20 μ l。还组装缺乏双重Can1-1F和Can1-1R双链体的第二对照反应物。反应物在37 $^{\circ}$ C下温育30分钟。将10 μ l的每种反应物转化到Top10大肠杆菌细胞中, 如前所述 (Green MR, Sambrook J., 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第四版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)。为了对pRF291 (其中Can1-1F和Can1-1R的双链体已经置换侧接有AarI限制性位点的rpsL反向选择标记物 (图12)) 的存在进行选择, 将细胞接种于溶原性液体培养基上, 所述培养基由包含100 μ g/ml氨苄青霉素和50 μ g/ml链霉素的1.5% (w/v) Bacto琼脂固化。包含高通量克隆盒的pRF291的存在产生对抗生素氨苄青霉素具有表型抗性但对抗生素链霉素具有敏感性的菌落, 这是由于质粒上存在反向选择盒。然而, 在其中反向选择盒经由AarI酶去除并且Can1-1双链体DNA连接到位点中的情况下 (去除AarI的识别序列), 由质粒转化的细胞具有氨苄青霉素抗性、链霉素抗性表型 (图12A)。包含编码Can1-1可变靶向结构域的DNA片段的pRF291靶向 (置换反向选择盒) 形成重组HDV-sgRNA表达盒 (SEQ ID NO:102), 所述表达盒包含融合至编码HDV核酶 (SEQ ID NO:16) 的DNA的y152启动子, 所述HDV核酶融合至编码Can1-1可变靶向结构域 (SEQ ID NO:17) 的DNA、所述Can1-1可变靶向结构域融合至编码向导CER结构域 (SEQ ID NO:1) 的DNA, 所述向导CER结构域融合至sup4终止子 (SEQ ID NO:8)。包含该构建体的质粒, pRF303 (SEQ ID NO:103) 用于编码HDV核酶-向导RNA (SEQ ID NO:104), 其能够 (当与Cas9内切核酸酶复合时) 靶向解脂耶氏酵母的Can1基因 (SEQ ID NO:21) 用于诱变。

[0361] 在以下情况下转化解脂耶氏酵母 (如Richard M, Quijano RR, Bezzate S, Bordon-Pallier F, Gaillardin C. 2001. Journal of bacteriology 183:3098-3107): 不具有质粒, 或者100ng的不携带sgRNA表达盒 (pRF291, SEQ ID NO:98) 的质粒, 携带RGR表达盒 (SEQ ID NO:41) 的pRF84质粒, 携带RG盒的pRF85质粒, 其中5' 核酶自身从sgRNA (SEQ ID NO:42) 去除, 或携带HDV-sgRNA融合表达盒 (SEQ ID NO:102) 的pRF303 (SEQ ID NO:103), 所述HDV-sgRNA融合表达盒靶向耶氏酵母中的Can1-1靶位点。选择尿嘧啶原养型的转化体, 并通过对精氨酸类似物刀豆氨酸的表型抗性对Can1基因中的突变进行评级。表达HDV-sgRNA融合体的质粒以表达从核酶释放的任一个sgRNA的质粒的相同频率造成Can1基因中的功能丧失突变, 这表明HDV核酶对靶向Can1-1的sgRNA的5' 融合不影响sgRNA功能 (表4)。

[0362] 表4

[0363] 经由不同sgRNA变体的Can1-1靶序列的突变频率。

	质粒	sgRNA 变体	Can ^R 频率± SD
[0364]	pRF291	无 sgRNA	0±0
	pRF84	产生 sgRNA 的 RGR	0.70±0.04
	pRF85	产生 sgRNA 的 RG	0.73±0.11
	pRF303	HDV-sgRNA 融合体	0.81±0.15

[0365] 使用如上所述和图12A中所示的相同策略,将编码靶向多个附加靶位点的可变靶向结构域的多个附加DNA片段(表5)克隆到pRF291 (SEQ ID NO:98) 质粒中。包括编码在Can1 基因 (SEQ ID NO:105) 内靶向的可变靶向结构域的DNA片段,所述可变靶向结构域靶向第二靶位点、can1-2靶位点 (SEQ ID NO:106) 和其它靶位点,诸如sou2-1 (SEQ ID NO:107)、Sou2-2 (SEQ ID NO:108)、Tgl1-1 (SEQ ID NO:112)、Acos10-1 (SEQ ID NO:113)、Fat1-1 (SEQ ID NO:114) 和Ura3-1 (SEQ ID NO:116)。

[0366] 表5

[0367] 编码利用Cas9靶向耶氏酵母中的不同基因座的sgRNA VT结构域的DNA序列

	编码 sgRNA 的可变靶向结构域的 DNA	耶氏酵母靶位点+ PAM 序列 (粗体)
[0368]	Can1-2	SEQ ID NO: 106 的碱基 1-20 GGCCCACTCGGATGACTCAGAGG (SEQ ID NO: 106)
	Sou2-1	SEQ ID NO: 107 的碱基 1-24 GTCTGGACCTTCCACCCTCGCCACGGG (SEQ ID NO: 107)
	Sou2-2	SEQ ID NO: 108 的碱基 1-22 GCAGTCCCGTGGCGAGGGTGGAAAGG (SEQ ID NO: 108)
	TGL1-1	SEQ ID NO: 112 的碱基 1-20 CAGCTCGAGACGTCCTAGAACGG (SEQ ID NO: 112)
	Acos10-1	SEQ ID NO: 113 的碱基 1-20 ttcctctgtcacagacgttcgg (SEQ ID NO: 113)
	Fat1-1	SEQ ID NO: 114 的碱基 1-20 GAAAAGTGCGTTTTGATTCTCGG (SEQ ID NO: 114)
[0369]		(SEQ ID NO: 114)
	ura3-1	SEQ ID NO: 116 的碱基 1-20 GCCGCTCGAGTGCTCAAGCTCG (SEQ ID NO: 116)

[0370] 靶位点的突变频率指示所有HDV-sgRNA融合体均能够形成与Cas9内切核酸酶的复合物,其继而在相应靶位点处生成切割,这导致经由NHEJ的突变(表6)。

[0371] 表6

[0372] 使用HDV-sgRNA融合体在解脂耶氏酵母中的不同靶位点处的突变频率

	靶位点	突变频率± SD
[0373]	Can1-2	0.76±0.15
	Sou2-1	0.19
	Sou2-2	0.30
	TGL1-1	0.88
	Acos10-1	0.36
	Fat1-1	0.50
	ura3-1	0.92

[0374] 实施例8

[0375] 使用失活的Cas9和HDV-sgRNA融合体进行基因沉默。

[0376] 包含HNH和RuvC核酸酶结构域(SEQ ID NO:117)中突变的无催化活性的Cas9变体能够与sgRNA相互作用并且结合到体内的靶位点但不能切割靶DNA的任一条链。该作用模式,结合但不使DNA断裂可用于瞬时减少染色体中特异性基因座的表达,但不导致永久性基因改变。

[0377] 为了生成解脂耶氏酵母的无催化活性的Cas9表达盒,将D10A突变引入质粒pZufCas9(SEQ ID NO:14),其使用快变定点诱变(Stratagene)来进行,如由引物D10AF(GA AATACTCCATCGGCCTGGCCATTGGAACCACTCTGTCG,SEQ ID NO:118)和D10AR(CGACAGAGTTGGTT CCAATGGCCAGGCCGATGGAGTATTTC,SEQ ID NO:119)描述。这利用使RuvC核酸酶(SEQ ID NO:120)失活的D10A突变和包含该构建体的相应质粒,pRF111(SEQ ID NO:121)产生经耶氏酵母密码子优化的Cas9基因。为了使第二核酸酶结构域(HNH)失活,使用以下物质进行另一轮的快变诱变(Stratagene):引物H840A1(TCAGCGACTACGATGTGGACGCCATTGTCCCTCAATCCTTT CT,SEQ ID NO:122)和H840A2(AGAAAGGATTGAGGGACAATGGCGTCCACATCGTAGTCGCTGA,SEQ ID NO:123),将其H840A突变引入经耶氏酵母密码子优化的D10A基因中从而形成经耶氏酵母密码子优化的Cas9失活基因(SEQ ID NO:124),以及携带用于在耶氏酵母中表达的基因的质粒,pRF143(SEQ ID NO:125)。

[0378] 为了评估解脂耶氏酵母中的基因沉默,形成经耶氏酵母密码子优化的dsREDexpress开放阅读框(SEQ ID NO:126)作为具有5'NcoI限制性位点和3'NotI限制性位点的克隆片段(SEQ ID NO:127)。将克隆片段(SEQ ID NO:127)克隆到pZufCas9的NcoI/NotI位点中以形成FBA1启动子(SEQ ID NO:12),所述启动子融合至经耶氏酵母优化的dsREDexpress克隆片段(SEQ ID NO:127),从而形成FAB1-dsRED融合盒(SEQ ID NO:128),所述融合盒被包含于质粒pRF165(SEQ ID NO:129)上。为了将FBA1-dsREDexpress盒(SEQ ID NO:128)整合到染色体中,将包含盒(SEQ ID NO:130)的PmeI-NotI片段连接到整合质粒p2P069(SEQ ID NO:131)的PmeI/NotI位点中以形成携带FBA1-dsREDexpress表达盒的整合载体,pRF201(SEQ ID NO:132)。通过使用标准技术选择亮氨酸原养型,将携带FBA1-dsREDexpress融合体的pRF201的SphI/AscI片段和Leu2基因(SEQ ID NO:133)的拷贝整合到耶氏酵母的染色体中(Richard M, Quijano RR, Bezzate S, Bordon-Pallier F, Gaillardin C, 2001. Tagging morphogenetic genes by insertional mutagenesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. Journal of bacteriology 183:3098-3107)。使用标准PCR技术和引物HY026(GCGCGTTTAAACCATCATCTAAGGGCCTCAAACTACC,SEQ ID NO:134)和HY027(GAGAGCGGCCGCTTAAAGAAACAGATGGTGTCTTCCCT,SEQ ID NO:135)确认耶氏酵母基因组中FBA1-dsREDexpress表达盒的存在。为进一步使用,选择包含FBA1-dsREDexpress盒(SEQ ID NO:128)的两个独立菌株,YRF41和YRF42。

[0379] 为形成用于靶向经耶氏酵母优化的dsREDexpress表达盒(SEQ ID NO:128)的sgRNA,使用类似于实施例12的策略。质粒构建体,pRF169(SEQ ID NO:136)包含来自耶氏酵母的GPD启动子(SEQ ID NO:137)反向选择标记物、编码向导RNA CER结构域(SEQ ID NO:1)的DNA和Sup4终止子(SEQ ID NO:8)盒(SEQ ID NO:138),如图13A所示。将编码靶向耶氏酵母中靶位点的sgRNA的可变靶向结构域的DNA(连接至编码HH核酶的DNA片段)克隆到pRF169(SEQ ID NO:136)中,如实施例12所述,不同的是编码HH核酶的DNA片段为锤头核酶的前6个核苷酸是可变靶向结构域的前6个核苷酸的反向互补序列那样的DNA片段,如图13B所示。当

具有正确突出物的双链寡核苷酸置换AarI位点之间的反向选择盒时,产生核酶-向导RNA (RG) 表达盒(图13-A)。当转录时,HH核酶从核酶-向导RNA分子中去除5'转录物及自身,在细胞中保留完整的sgRNA。形成靶向dsREDexpress开放阅读框(SEQ ID NO:126)的三个向导RNA;两个靶向模板链,ds-temp-1(SEQ ID NO:139)、ds-temp-2(SEQ ID NO:140);并且一个靶向非模板链,ds-nontemp-1(SEQ ID NO:141)。

[0380] 就每个靶位点而言,设计两种寡核苷酸,其包含编码靶特异性锤头核酶的DNA序列、可变靶向结构域(VTD)和用于克隆到pRF169的AarI位点中的正确重叠端。每个位点的寡核苷酸;ds-temp-1F(SEQ ID NO:144)、ds-temp-1R(SEQ ID NO:145)、ds-temp-2F(SEQ ID NO:146)、ds-temp-2R(SEQ ID NO:147)、ds-nontemp-1F(SEQ ID NO:148)、和ds-nontemp-1R(SEQ ID NO:149)双链化以形成具有正确突出物的双链DNA分子,所述突出物用于克隆到pRF169的高通量盒(图13A和13B)中保留的AarI突出物中,并且如实施例12对于克隆到pRF291中所述来进行。插入编码sgRNA的可变靶向结构域的DNA片段,置换反向选择盒,对于每个靶位点产生新质粒,所述质粒携带融合至锤头核酶-靶位点双链DNA的GPD启动子,所述锤头核酶-靶位点双链DNA融合至编码向导RNA CER结构域的DNA,所述向导RNA CER结构域融合至图13A的Sup4终止子。包含这些双链体的质粒为pRF296(ds-temp-1,SEQ ID NO:150)、pRF298(ds-temp-2,SEQ ID NO:151)、pRF300(ds-nontemp-1,SEQ ID NO:152)。

[0381] 为了形成用于基因沉默的构建体,使用标准技术将来自pRF143(SEQ ID NO:125)的失活Cas9克隆到pRF296、pRF298和pRF300中作为NcoI/NotI片段并且置换位于那些质粒的NcoI/NotI位点中的功能性Cas9(SEQ ID NO:93)以分别形成质粒pRF339(SEQ ID NO:153)、pRF341(SEQ ID NO:154)和pRF342(SEQ ID NO:155)。

[0382] 使用标准技术由pRF339、pRF341和pRF343将菌株YRF41和YRF42转化成尿嘧啶原养型(Richard M, Quijano RR, Bezzate S, Bordon-Pallier F, Gaillardin C. 2001. Tagging morphogenetic genes by insertional mutagenesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. Journal of bacteriology 183:3098-3107)。对于每次转化,将12个转化体在缺乏尿嘧啶的板上进行划线纯化以保持质粒。每个分离物用于接种2ml的CM-ura液体培养基(Teknova),并在30℃,250RPM下生长过夜。将每个过夜物中的2-5μl稀释到200μl ddH₂O中,并在Accuri流动细胞仪的dsREDexpress通道中分析,以评估每个细胞内的dsREDexpress蛋白质的量。从每个培养物分析7,151和10,000个之间的细胞。从分析的每种培养物的平均荧光中减去不具有dsREDexpress表达盒的耶氏酵母细胞的平均荧光,以获得每个菌株/质粒组合内的经校正的平均荧光,将其平均并测定标准偏差(表7)。与核酶-SgRBA (RG) 组合的失活的Cas9通过靶向目的基因的表达载体来表达,使2至10个折叠之间的基因的表达沉默。折叠沉默根据靶位点的位置和成链度和/或侧接sgRNA的核酶在耶氏酵母细胞中以功能形式由DNA聚合酶启动子表达的能力而变化(表7)。

[0383] 表7

[0384] 通过两个FBA-dsREDexpress整合菌株中的三个靶位点进行的基因沉默

[0385]

菌株	质粒	靶位点	平均荧光±SD	无靶的折叠
YRF41	无	无	540.6±2.9	1
YRF41	pRF339(SEQ ID NO:69)	ds-temp-1	299.2±138.7	0.55±0.26
YRF41	pRF341(SEQ ID NO:70)	ds-temp-2	257.9±139.3	0.48±0.26

YRF41	pRF343 (SEQ ID NO:71)	ds-nontemp-1	169.4±45.3	0.31±0.08
YRF42	无	无	871.2±36.9	1
YRF42	pRF339 (SEQ ID NO:69)	ds-temp-1	194.3±121.1	0.22±0.14
YRF42	pRF341 (SEQ ID NO:70)	ds-temp-2	168.7±191.6	0.19±0.22
YRF42	pRF343 (SEQ ID NO:71)	ds-nomemp-1	94.9±109.6	0.11±0.13

[0386] 实施例9

[0387] 使用由单一质粒表达的Cas9和HDV核酶-sgRNA融合体 (RG) 进行精确基因编辑

[0388] 在该实施例中,展示由相同稳定载体表达的Cas9和HDV-sgRNA融合体的稳定表达可在耶氏酵母的靶位点中形成DNA双链断裂,其可以为用于通过同源重组进行精确基因编辑的底物。

[0389] 描述于实施例4中的Can1缺失多核苷酸修饰模板DNA (SEQ ID NO:38) 由HindIII消化并且使用标准技术克隆到pUC18的HindIII位点中以形成pRF80 (SEQ ID NO:156)。较短的Can1缺失编辑模板 (SEQ ID NO:157) 使用标准PCR技术和引物80F (AGCTTGCTACGTTAGGAGAA, SEQ ID NO:158) 和80R (TATGAGCTTATCCTGTATCG, SEQ ID NO:159) 由pRF80扩增以形成大量编辑模板。

[0390] 使用标准技术转化Ura营养缺陷型耶氏酵母细胞 (Richard M, Quijano RR, Bezzate S, Bordon-Pallier F, Gaillardin C. 2001. Tagging morphogenetic genes by insertional mutagenesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. Journal of bacteriology 183:3098-3107), 其利用100ng的携带Cas9基因的拷贝但不具有sgRNA的质粒pRF291和携带Cas9基因的拷贝和Can1-1靶位点HDV-sgRNA表达盒的pRF303, 连同没有编辑模板DNA或1000ng的短Can1缺失编辑模板 (SEQ ID NO:157)。在CM-ura培养基 (Teknova) 上选择转化体。对于每个转化体, 将20个单独菌落在CM-ura培养基 (Teknova) 上进行划线纯化。对于每个划线纯化的菌落, 将4个单独菌落 (每次转化共计80个) 贴片到包含60μg/ml的L-刀豆氨酸的CM-arg板上, 以筛选在Can1基因中包含功能丧失等位基因的菌落。对展示刀豆氨酸抗性的贴片进行评级并且对基因失活的频率进行评级 (表8)。为了确定哪些菌落由于同源重组而丧失Can1功能以及哪些菌落由于NHEJ而丧失Can1功能, Can1基因座 (SEQ ID NO:160) 使用Can1-PCRF (GGAAGGCACATATGGCAAGG, SEQ ID NO:22) 和Can1-PCRR (GTAAGAGTGGTTTGCTCCAGG, SEQ ID NO:23) 来扩增。在如先前实施例中所述的具有小插入缺失的细胞中, PCR产物应当与包含缺失的菌株中的WT Can1基因座 (SEQ ID NO:160) 的尺寸 (2125bp) 非常相似, 所述缺失是由于与Can1缺失编辑模板同源重组, 具有Can1-PCRF (SEQ ID NO:22) 和Can1-PCRR (SEQ ID NO:23) 的PCR片段 (SEQ ID NO:161) 将更小 (392bp)。通过电泳分辨2μl的PCR产物, 并使用标准技术成像 (图14)。使用在划线纯化时 (具有对应于由编辑模板 (SEQ ID NO:161) 重组的短带) 产生1或多个菌落的最初20个划线菌落的百分比来测定HR的频率 (表8)。在接收pRF303 (SEQ ID NO:103) 的细胞中, 无论细胞是否接收编辑模板, 刀豆氨酸抗性菌落的频率是相似的 (表8)。在总转化细胞群中, 在接收pRF303 (SEQ ID NO:103) 和Can1短编辑模板 (SEQ ID NO:157) 两者的细胞中, 约1/10包含由编辑模板 (SEQ ID NO:157) 对Can1基因座的精确编辑 (表8)。

[0391] 表8

[0392] 刀豆氨酸抗性频率和精确编辑的频率

[0393]

质粒	sgRNA	编辑模板	Can ^R 频率± SD	HR 频率± SD
pRF291 (SEQ ID NO: 98)	无	无	0 ± 0	未测定
pRF291 (SEQ ID NO: 98)	无	Can1 短 (SEQ ID NO: 157)	0 ± 0	未测定
pRF303 (SEQ ID NO: 103)	HDV-Can1-1 sgRNA	无	0.80 ± 0.10	未测定
pRF303 (SEQ ID NO: 103)	HDV-Can1-1 sgRNA	Can1 短 (SEQ ID NO: 157)	0.72 ± 0.12	0.09±0.05

[0394] 实施例10

[0395] 耶氏酵母中的URA3基因失活

[0396] 本实施例描述了分别或一起表达单向导RNA (sgRNA) 和Cas9内切核酸酶的质粒的构建和其用于耶氏酵母中的URA3基因失活的用途。

[0397] pYRH235和pYRH236分别表达侧接靶向URA3.1靶序列 (5'-ctgttcagagacagtttcct-3'; SEQ ID NO:165) 的pre-sgRNA (RGR-URA3.1; SEQ ID NO:164) 的核酶和侧接靶向URA3.2靶序列 (5'-taacatccagagaagcacac-3'; SEQ ID NO:167) 的pre-sgRNA (RGR-URA3.2; SEQ ID NO:166) 的核酶。将编码RGR-URA3.1的DNA片段的NcoI-NotI限制性消化片段和编码RGR-URA3.2的BspHI-NotI限制性消化片段融合至FBA1L启动子 (SEQ ID NO:168) 以分别产生pYRH235和pYRH236。pYRH235和pYRH236质粒包含天然乙酰羟酸合酶的标记物基因 (AHAS或乙酰乳酸合酶; E.C.4.1.3.18; SEQ ID NO:169), 其具有赋予磺酰脲抗性的单氨基酸变化 (W497L)。

[0398] 耶氏酵母菌株ATCC20362的Ura⁻负衍生物 (Y2224) 首先利用线性化的pZufCas9 (SEQ ID NO:14) 通过SphI-BsiWI限制性消化来转化, 并且在缺乏尿嘧啶的完整最小 (CM) 板上选择转化体。将线性化Cas9表达盒随机整合到耶氏酵母基因组中, 并且因此转化体包含URA3基因的至少两个拷贝。随后, 将表达sgRNA的pYRH235或pYRH236转化到表达Cas9的耶氏酵母菌株中, 并且在包含600mg/L磺酰脲的CM板上选择转化体。将50个转化体在CM-ura板和具有5-FOA的SC板上进行贴片, 以发现通过URA3的Cas9和sgRNA进行URA3基因失活的频率。94%和100%的pYRH235和pYRH236转化体分别变成尿嘧啶营养缺陷型。

[0399] 进行靶位点URA3.1或URA3.2处突变的测序确认。随机选择pZufCas9和pYRH235的20个转化体用于测序分析, 并且对每个菌落分析质粒pZufCas9和来自天然基因组URA3的URA3基因的突变。为对来自质粒pZufCas9的URA3基因进行测序, 将URA3的引物RH0705 (SEQ ID NO:170) 和FBA1启动子序列的RH0719 (SEQ ID NO:171) 用于区域的PCR扩增, 并且将引物RH0733 (SEQ ID NO:172) 或RH0734 (SEQ ID NO:173) 用于利用PCR扩增产物作为模板的测序。为对天然基因组源的URA3基因进行测序, 将引物RH0705 (SEQ ID NO:170) 和RH0707 (SEQ ID NO:174) 用于PCR扩增, 并且将引物RH0733 (SEQ ID NO:172) 和RH0734 (SEQ ID NO:173) 用于利用PCR扩增产物作为模板的测序。所有20个菌落均包含在质粒和基因组来源的URA3基因两者处的突变 (图15)。对于5个代表性菌落的质粒和基因组来源的URA3基因 (菌落1、2、3、5和6; 分别为SEQ ID NO:176、177、178、179和180和SEQ ID NO:181、182、183、184和185) 与野生型URA3.1 (SEQ ID NO:175) 的测序结果的片段比对在图15中示出。这些结果示出由

耶氏酵母中的sgRNA/Cas9内切核酸酶体系靶向并使相同细胞中基因的多个拷贝突变。

[0400] 实施例11

[0401] 耶氏酵母中URA3基因突变或缺失。

[0402] 本实施例描述了构造并使用在相同载体体系上表达两种sgRNA和Cas9内切核酸酶的质粒,用于耶氏酵母中的URA3基因突变或缺失,以用于标记物再循环。

[0403] pYRH222在FBA1启动子(SEQ ID NO:12)和FBA1L启动子下表达Cas9内切核酸酶(SEQ ID NO:10),所述启动子驱动编码侧接靶向URA3.2靶序列(SEQ ID NO:167)的pre-sgRNA(RGR-URA3.2;SEQ ID NO:166)的核酶的DNA片段,其示于图16A中。pYRH222载体包含在TDH1(也称为GPD)启动子(SEQ ID NO:187)下表达的潮霉素抗生素抗性选择标记物(SEQ ID NO:186),以及适应质粒的染色体外复制的自主复制序列(ARS18;SEQ ID NO:208)(PNAS,Fournier,P.等人,1993,90:4912-4916)。当不存在选择压力时,ARS18的存在使得细胞损失质粒。

[0404] pYRH282源自pYRH222。融合至编码来自pYRH235的RGR-URA3.1(SEQ ID NO:164)的DNA片段的FBA1L启动子(SEQ ID NO:168)使用引物RH0804(SEQ ID NO:188)和RH0805(SEQ ID NO:189)进行PCR扩增。然后PCR产物利用BsiWI消化,并且克隆到pYRH222中。通过测序确认克隆基因的取向和序列同一性,并且将构建体命名为pYRH282。

[0405] pYRH283源自pYRH222。由融合至编码RGR-URA3.3(SEQ ID NO:191)的DNA的TDH1启动子(SEQ ID NO:187)构成的,侧接有BsiWI位点(SEQ ID NO:190)的合成DNA片段由IDT(Coralville,Iowa)合成并且在BsiWI位点处克隆到pYRH222中。通过测序确认克隆基因的取向和序列同一性,并且将构建体命名为pYRH283。

[0406] 利用pYRH222、pYRH282和pYRH283转化耶氏酵母菌株ATCC20362的后代,并在包含300mg/L潮霉素的YPD板上选择转化体。在无DNA对照板上观察到相对高的背景生长(表9)。随机选择每种构建体的30个转化体,并且在具有5-FOA的SC板上划线以对尿嘧啶营养缺陷型进行反选择。在来自无DNA对照板的菌落的情况下,没有观察到生长。在pYRH222、pYRH282和pYRH283转化体的情况下,4至11个贴片示出生长。利用引物RH0610(SEQ ID NO:192)和RH0611(SEQ ID NO:193)进行菌落PCR以扩增包含sgRNA靶位点的DNA区,并且经PCR扩增的产物示出在琼脂糖凝胶上的不同迁移(图17)。利用PCR产物作为模板和测序引物RH0704(SEQ ID NO:194)进行测序。

[0407] 在pYRH222转化体的情况下,11次测序中的6次成功进行,并且其全部在URA3.2靶位点处突变(图16B;SEQ ID NO:195-201)。在pYRH282的情况下,所有的成功测序示出在一个或多个靶位点处的突变,并且其中2个示出两个靶位点之间的缺失(图16C;SEQ ID NO:202-204)。就pYRH283而言,8次成功测序中的7次示出在一个或多个靶位点处的突变,并且其中2个示出两个靶位点之间的缺失(图16D;SEQ ID NO:205-207),从而形成URA3基因的几乎完全缺失。

[0408] 该实施例示出在相同质粒上表达两个向导RNA,以使用耶氏酵母中的sgRNA/Cas9内切核酸酶体系,在两个靶位点之间形成靶向缺失,其中通过运行凝胶或通过测序进行鉴定。在没有选择压力时,在这些质粒上存在ARS18(SEQ ID NO:208)使细胞损失质粒,使得质粒可以重复地用于URA3标记物再循环。

[0409] 表9:

[0410] pYRH222、pYRH282和pYRH283转化体的分析。记录不包括DNA对照在内的每个转化板的转化体数。

[0411]		Hyg 板上的菌落	在 5-FOA 上贴片	在 5-FOA 上生长	靶向突变/测序
	无 DNA 对照	131	30	0	-
	pYRH222 (URA3.2)	352	30	11	6/6
	pYRH282 (URA3.2+URA3.1)	244	30	4	4/4 (2 个缺失)
	pYRH283 (URA3.2+3.3)	178	30	10	7/8 (2 个缺失)

[0412] 实施例12

[0413] 在耶氏酵母中使用Csy4 (Cas6) 用于基因失活

[0414] 本发明实施例描述了使用Csy4 (也称为Cas6) 以形成不具有5'端的向导RNA,其能够在非常规酵母中形成可靶向DNA序列 (诸如但不限于,CAN1) 的RGEN复合物。

[0415] 将编码Csy4 (也称为Cas6) 的基因与编码靶向侧接有28bp Csy4识别位点的sgRNA的CAN1的DNA一起引入Cas9表达质粒上,用于耶氏酵母中的CAN1基因失活。

[0416] pYRH290在FBA1启动子 (SEQ ID NO:12) 下表达Cas9内切核酸酶 (SEQ ID NO:10) 并且经解脂耶氏酵母密码子优化的基因用于在FBA1启动子 (SEQ ID NO:210) 下的Csy4表达 (SEQ ID NO:209)。pYRH290还包含编码28bp Csy4内切核酸酶识别序列 (SEQ ID:212) 的DNA片段 (TDH1:28bp-gCAN1-28bp;SEQ ID NO:211),所述内切核酸酶识别序列侧接靶向CAN1靶序列 (SEQ ID NO:214) 的pre-sgRNA (SEQ ID NO:213)。在由Csy4加工之后,所得的sgRNA (SEQ ID NO:222) 包含8-核苷酸5'-旁侧序列 (SEQ ID NO:223) 和20-核苷酸3'-旁侧序列 (SEQ ID NO:224)。

[0417] 利用pYRH290转化耶氏酵母菌株ATCC20362的Ura-负衍生物 (Y2224),并在缺乏尿嘧啶的CM板上选择转化体。将86个转化体平板复制到包含刀豆氨酸的CM板以选择can1突变体。86个转化体中40个在包含刀豆氨酸的CM板上赋予生长。对40个刀豆氨酸抗性菌落中的16个进行测序以确认在CAN1靶位点处 (SEQ ID NO:214) 的突变,并且确认14个菌落在CAN1靶位点处具有突变。图18示出包含CAN1靶位点 (SEQ ID NO:215) 的野生型CAN1基因的片段与菌落14、16、18、19、24和25中CAN1靶序列处的突变 (分别为SEQ ID NO:216-221) 的比对。

[0001]	序列表	
[0002]	<110> E. I. du Pont de Nemours and Company	
[0003]	Fan, Xiaochun	
[0004]	Frisch, Ryan	
[0005]	Hong, Seung-Pyo	
[0006]	<120> 使用RNA引导的内切核酸酶在非常规酵母中基因靶向	
[0007]	<130> CL6272	
[0008]	<150> 62/036652	
[0009]	<151> 2014-08-13	
[0010]	<160> 224	
[0011]	<170> 专利版本3.5	
[0012]	<210> 1	
[0013]	<211> 80	
[0014]	<212> RNA	
[0015]	<213> 人工序列	
[0016]	<220>	
[0017]	<223> Cas9内切核酸酶识别(CER)结构域	
[0018]	<400> 1	
[0019]	guuuuagagc uagaaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu	60
[0020]	ggcaccgagu cggugcuuuu	80
[0021]	<210> 2	
[0022]	<211> 20	
[0023]	<212> DNA	
[0024]	<213> 解脂耶氏酵母	
[0025]	<400> 2	
[0026]	tccaagaaga ttgttcttct	20
[0027]	<210> 3	
[0028]	<211> 20	
[0029]	<212> DNA	
[0030]	<213> 解脂耶氏酵母	
[0031]	<400> 3	
[0032]	ctccgtcatc cccggttctc	20
[0033]	<210> 4	
[0034]	<211> 20	
[0035]	<212> DNA	
[0036]	<213> 解脂耶氏酵母	
[0037]	<400> 4	
[0038]	cggcgacttc tgtggccccg	20
[0039]	<210> 5	
[0040]	<211> 300	
[0041]	<212> DNA	

[0042]	<213>	酿酒酵母	
[0043]	<400>	5	
[0044]		aacaattatc tcaaaattca cccactcttc atctttgaaa agataatgta tgattatgct	60
[0045]		ttcactcata ttatatacaga aacttgatgt tttctttcga gtatatacaa ggtgattaca	120
[0046]		tgtacgtttg aagtacaact ctagattttg tagtgccttc ttgggctagc ggtaaagggtg	180
[0047]		cgcatttttt cacaccctac aatgtttctgt tcaaaagatt ttggtcaaac gctgtagaag	240
[0048]		tgaaagttgg tgcgcatgtt tcggcggttc aaactttctcc gcagtgaag ataaatgac	300
[0049]	<210>	6	
[0050]	<211>	300	
[0051]	<212>	DNA	
[0052]	<213>	酿酒酵母	
[0053]	<400>	6	
[0054]		taaaaatcaa tcaatcatcg tgtgttttat atgtctctta tctaagtata agaatatcca	60
[0055]		tagttaatat tcacttacgc taccttttaa cctgtaatca ttgtcaacag gatatgttaa	120
[0056]		cgaccacat tgataaacgc tagtatttct ttttctctt cttattggcc ggctgtctct	180
[0057]		atactccct atagtctgtt tcttttcgtt tcgattgtt tacgtttgag gcctcgtggc	240
[0058]		gcacatggta cgctgtgggtg ctgcggctg ggaacgaaac tctgggagct gcgattggca	300
[0059]	<210>	7	
[0060]	<211>	300	
[0061]	<212>	DNA	
[0062]	<213>	解脂耶氏酵母	
[0063]	<400>	7	
[0064]		atTTTTTTtg attttctttt ttgacccgt cttcaattac acttcccaac tgggaacacc	60
[0065]		cctctttatc gaccatttt aggttaattta ccctagccca ttgtctccat aaggaatatt	120
[0066]		accctaacc acagtccagg gtgcccagg cttcttttg ccaaatttta acttcggtcc	180
[0067]		tatggcacag cggtagcgcg tgagattgca aatcttaagg tcccgagtc gaatctcgtt	240
[0068]		gggacctagt tatTTTtgat agataatttc gtgatgatta gaaacttaac gcaaaataat	300
[0069]	<210>	8	
[0070]	<211>	20	
[0071]	<212>	DNA	
[0072]	<213>	酿酒酵母	
[0073]	<400>	8	
[0074]		TTTTTTTgtt TTTtatgtct	20
[0075]	<210>	9	
[0076]	<211>	4107	
[0077]	<212>	DNA	
[0078]	<213>	人工序列	
[0079]	<220>		
[0080]	<223>	化脓链球菌Cas9	
[0081]	<400>	9	
[0082]		atggacaaga aatactccat cggcctggac attggaacca actctgtcgg ctgggctgtc	60
[0083]		atcaccgacg agtacaaggT gccctccaag aaattcaagg tctcggaaa caccgatcga	120

[0084]	cactccatca agaaaaacct cattggtgcc ctgttggtcg attctggcga gactgccgaa	180
[0085]	gctaccagac tcaagcgaac tgctcggcga cgttacaccc gacggaagaa ccgaatctgc	240
[0086]	tacctgcagg agatcttttc caacgagatg gccaaagtgg acgattcgtt ctttcacga	300
[0087]	ctggaggaat ccttcctcgt cgaggaagac aagaaacacg agcgtcatcc catctttggc	360
[0088]	aacattgtgg acgaggttgc ttaccacgag aagtatccta ccatctacca cctgcgaaag	420
[0089]	aaactcgtcg attccaccga caaggcggat ctcagactta tctacctcgc tctggcacac	480
[0090]	atgatcaagt ttcgaggtca tttcctcatc gagggcgatc tcaatcccga caacagcgat	540
[0091]	gtggacaagc tgttcattca gctcgttcag acctacaacc agctgttcga ggaaaacccc	600
[0092]	atcaatgcct ccggagtcca tgcaaaggcc atcttgtctg ctcgactctc gaagagcaga	660
[0093]	cgactggaga acctcattgc ccaacttcct ggcgagaaaa agaacggact gtttggcaac	720
[0094]	ctcattgccc tttctcttgg tctcacaccc aacttcaagt ccaacttcga tctggcggag	780
[0095]	gacgccaagc tccagctgtc caaggacacc tacgacgatg acctcgacaa cctgcttgca	840
[0096]	cagattggcg atcagtacgc cgacctgttt ctcgtgccca agaacctttc ggatgctatt	900
[0097]	ctcttgtctg acattctgcg agtcaacacc gagatcacia aggctccctt ttctgcctcc	960
[0098]	atgatcaagc gatacgacga gcaccatcag gatctcacac tgctcaaggc tcttgtccga	1020
[0099]	cagcaactgc ccgagaagta caaggagatc tttttcgatc agtcgaagaa cggctacgt	1080
[0100]	ggatacatcg acggcggagc ctctcaggaa gagttctaca agttcatcaa gccaatcttc	1140
[0101]	gagaagatgg acggaaccga ggaactgctt gtcaagctca atcgagagga tctgcttcgg	1200
[0102]	aagcaacgaa ccttcgacaa cggcagcatt cctcatcaga tccacctcgg tgagctgcac	1260
[0103]	gccattcttc gacgtcagga agactttctac ccttttctca aggacaaccg agagaagatc	1320
[0104]	gagaagattc ttacctttcg aatcccctac tatgttggtc ctcttgccag aggaaactct	1380
[0105]	cgatttgctt ggatgactcg aaagtccgag gaaacatca ctccctggaa cttcgaggaa	1440
[0106]	gtcgtggaca aggggtccctc tgcacagtcc ttcacgagc gaatgaccaa cttcgacaag	1500
[0107]	aatctgcccc acgagaaggt tcttcccaag cattcgtcgc tctacgagta ctttacagtc	1560
[0108]	tacaacgaac tcaccaaagt caagtacgtt accgagggaa tgcgaaagcc tgccttcttg	1620
[0109]	tctggcgaac agaagaaagc cattgtcgat ctctgttca agaccaaccg aaaggtcact	1680
[0110]	gttaagcagc tcaaggagga ctacttcaag aaaatcgagt gtttcgacag cgtcgagatt	1740
[0111]	tccggagtth aggaccgatt caacgcctct ttgggcacct atcacgatct gctcaagatt	1800
[0112]	atcaaggaca aggattttct cgacaacgag gaaaacgagg acattctgga ggacatcgtg	1860
[0113]	ctcactctta cctgttcca agatcgggag atgatcgagg aacgactcaa gacatacgt	1920
[0114]	cacctgttcg acgacaaggt catgaaacaa ctcaagcgac gtagatacac cggctgggga	1980
[0115]	agactttcgc gaaagctcat caacggcatc agagacaagc agtccggaaa gaccattctg	2040
[0116]	gactttctca agtccgatgg ctttgccaac cgaaacttca tgcagctcat tcacgacgat	2100
[0117]	tctcttacct tcaaggagga catccagaag gcacaagtgt ccggtcaggg cgacagcttg	2160
[0118]	cacgaacata ttgccaacct ggctggttcg ccagccatca agaaaggcat tctccagact	2220
[0119]	gtcaaggttg tcgacgagct ggtgaaggtc atgggacgtc acaagcccga gaacattgtg	2280
[0120]	atcgagatgg ccagagagaa ccagacaact caaaagggtc agaaaaactc gcgagagcgg	2340
[0121]	atgaagcgaa tcgaggaagg catcaaggag ctgggatccc agattctcaa ggagcatccc	2400
[0122]	gtcgagaaca ctcaactgca gaacgagaag ctgtatctct actatctgca gaatggtcga	2460
[0123]	gacatgtacg tggatcagga actggacatc aatcgtctca gcgactacga tgtggaccac	2520
[0124]	attgtccctc aatcctttct caaggacgat tctatcgaca acaaggtcct tacacgatcc	2580
[0125]	gacaagaaca gaggcaagtc ggacaacgtt cccagcgaag aggtggtcaa aaagatgaag	2640

[0126]	aactactggc gacagctgct caacgccaag ctcattaccc agcgaaagtt cgacaatctt	2700
[0127]	accaaggccg agcgaggcgg tctgtccgag ctcgacaagg ctggcttcat caagcgtcaa	2760
[0128]	ctcgtcgaga ccagacagat cacaaagcac gtgcacaga ttctcgattc tcggatgaac	2820
[0129]	accaagtacg acgagaacga caagctcatc cgagaggta aggtgattac tctcaagtcc	2880
[0130]	aaactgggtct ccgatttccg aaaggacttt cagttctaca aggtgcgaga gatcaacaat	2940
[0131]	taccaccatg cccacgatgc ttacctcaac gccgtcgttg gcaactgcgt catcaagaaa	3000
[0132]	tacccaagc tcgaaagcga gtctgtttac ggcgattaca aggtctacga cgttcgaaag	3060
[0133]	atgattgcca agtccgaaca ggagattggc aaggctactg ccaagtactt cttttactcc	3120
[0134]	aacatcatga actttttcaa gaccgagatc accttgcca acggagagat tcgaaagaga	3180
[0135]	ccacttatcg agaccaacgg cgaaactgga gagatcgtgt gggacaaggg tcgagacttt	3240
[0136]	gcaaccgtgc gaaaggttct gtgatgcct caggtcaaca tcgtcaagaa aaccgaggtt	3300
[0137]	cagactggcg gatttctcaa ggagtcgatt ctgccaagc gaaactccga caagctcatc	3360
[0138]	gctcgaaaga aagactggga tccaagaaa tacggtggct tcgattctcc taccgtcgcc	3420
[0139]	tattccgtgc ttgtcgttg gaaggtcgag aagggaagc ccaaaaagct caagtccgtc	3480
[0140]	aaggagctgc tcggaattac catcatggag cgatcgagct tcgagaagaa tcccatcgac	3540
[0141]	ttcttgaag ccaagggtta caaggagtc aagaaagacc tcattatcaa gctgccaag	3600
[0142]	tactctctgt tcgaactgga gaacggtcga aagcgtatgc tcgcctccgc tggcgagctg	3660
[0143]	cagaaggga acgagcttgc cttgccttcg aagtacgtca actttctcta tctggcttct	3720
[0144]	cactacgaga agctcaaggg ttctcccgag gacaacgaac agaagcaact cttcgttgag	3780
[0145]	cagcacaac attacctga cgagattatc gagcagattt ccgagtttgc gaagcgagtc	3840
[0146]	atcttgctg atgccaactt ggacaagtg ctctctgcct acaacaagca tcgggacaaa	3900
[0147]	ccattcgag aacaggcgga gaacatcatt cacctgttta ctcttacc aa cctgggtgct	3960
[0148]	cctgcagctt tcaagtactt cgataccact atcgaccgaa agcggtagac atccaccaag	4020
[0149]	gaggttctcg atgccaccct gattcaccag tccatcactg gcctgtacga gaccgaatc	4080
[0150]	gacctgtctc agcttggtgg cgactaa	4107
[0151]	<210> 10	
[0152]	<211> 4140	
[0153]	<212> DNA	
[0154]	<213> 人工序列	
[0155]	<220>	
[0156]	<223> 具有NLS的化脓链球菌Cas9	
[0157]	<400> 10	
[0158]	atggacaaga aatactccat cggcctggac attggaacca actctgtcgg ctgggctgtc	60
[0159]	atcaccgacg agtacaaggt gccctccaag aaattcaagg tcctcgaaa caccgatcga	120
[0160]	cactccatca agaaaaacct cattggtgcc ctgttggtcg attctggcga gactgccgaa	180
[0161]	gctaccagac tcaagcgaac tgctcggcga cgttacaccc gacggaagaa ccgaatctgc	240
[0162]	tacctgcagg agatcttttc caacgagatg gccaaagtg acgattcgtt ctttcatcga	300
[0163]	ctggaggaat ctttctcgt cgaggaagac aagaaacacg agcgtcatcc catctttggc	360
[0164]	aacattgtgg acgaggttgc ttaccacgag aagtatccta ccatctacca cctgcgaaag	420
[0165]	aaactcgtcg attccaccga caaggcggat ctgagactta tctacctgc tctggcacac	480
[0166]	atgatcaagt ttcgaggtca tttctcatc gagggcgatc tcaatcccga caacagcgat	540
[0167]	gtggacaagc tgttcattca gctcgttcag acctacaacc agctgttcga ggaaaacccc	600

[0168]	atcaatgcct ccggagtcga tgcaaaggcc atcttgtctg ctgactctc gaagagcaga	660
[0169]	cgactggaga acctcattgc ccaacttcct ggcgagaaaa agaacggact gtttggcaac	720
[0170]	ctcattgccc tttctcttgg tctcacaccc aacttcaagt ccaacttcga tctggcggag	780
[0171]	gacgccaagc tccagctgtc caaggacacc tacgacgatg acctcgacaa cctgcttgca	840
[0172]	cagattggcg atcagtacgc cgacctgttt ctgctgccca agaacctttc ggatgctatt	900
[0173]	ctcttgtctg acattctgcg agtcaacacc gagatcacaa aggctcccct ttctgcctcc	960
[0174]	atgatcaagc gatacgacga gcaccatcag gatctcacac tgctcaaggc tcttgtccga	1020
[0175]	cagcaactgc ccgagaagta caaggagatc tttttcgatc agtcgaagaa cggctacgct	1080
[0176]	ggatacatcg acggcggagc ctctcaggaa gagttctaca agttcatcaa gccaatctc	1140
[0177]	gagaagatgg acggaaccga ggaactgctt gtcaagctca atcgagagga tctgcttcgg	1200
[0178]	aagcaacgaa ccttcgacaa cggcagcatt cctcatcaga tccacctcgg tgagctgcac	1260
[0179]	gccattcttc gacgtcagga agacttctac ccccttctca aggacaaccg agagaagatc	1320
[0180]	gagaagattc ttacctttcg aatcccctac tatgttggtc ctcttgccag aggaaactct	1380
[0181]	cgatttgctt ggatgactcg aaagtccgag gaaacatca ctccctggaa cttcgaggaa	1440
[0182]	gtcgtggaca aggggtccctc tgcacagtcc ttcatcgagc gaatgaccaa cttcgacaag	1500
[0183]	aatctgcccc acgagaaggt tcttcccaag cattcgtctc tctacagta ctttacagtc	1560
[0184]	tacaacgaac tcaccaaagt caagtacgtt accgagggaa tgcgaaagcc tgccttcttg	1620
[0185]	tctggcgaac agaagaaagc cattgtcgat ctctgttca agaccaaccg aaaggtcact	1680
[0186]	gttaagcagc tcaaggagga ctacttcaag aaaatcgagt gtttcgacag cgtcgagatt	1740
[0187]	tccggagtig aggaccgatt caacgcctct ttgggcacct atcacgatct gctcaagatt	1800
[0188]	atcaaggaca aggattttct cgacaacgag gaaaacgagg acattctgga ggacatcgtg	1860
[0189]	ctcactctta ccctgttcga agatcgggag atgatcgagg aacgactcaa gacatacgtc	1920
[0190]	cacctgttcg acgacaaggt catgaaacaa ctcaagcgac gtagatacac cggctgggga	1980
[0191]	agactttcgc gaaagctcat caacggcatc agagacaagc agtccggaaa gaccattctg	2040
[0192]	gactttctca agtccgatgg ctttgccaac cgaaacttca tgcagctcat tcacgacgat	2100
[0193]	tctcttacct tcaaggagga catccagaag gcacaagtgt ccggtcaggg cgacagcttg	2160
[0194]	cacgaacata ttgccaacct ggctggttcg ccagccatca agaaaggcat tctccagact	2220
[0195]	gtcaaggttg tcgacgagct ggtgaaggtc atgggacgtc acaagcccga gaacattgtg	2280
[0196]	atcgagatgg ccagagagaa ccagacaact caaaagggtc agaaaaactc gcgagagcgg	2340
[0197]	atgaagcgaa tcgaggaagg catcaaggag ctgggatccc agattctcaa ggagcatccc	2400
[0198]	gtcgagaaca ctcaactgca gaacgagaag ctgtatctct actatctgca gaatggctga	2460
[0199]	gacatgtacg tggatcagga actggacatc aatcgtctca gcgactacga tgttgaccac	2520
[0200]	attgtccctc aatcctttct caaggacgat tctatcgaca acaaggctct tacacgatcc	2580
[0201]	gacaagaaca gaggcaagtc ggacaacgtt ccagcgaaag aggtggtcaa aaagatgaag	2640
[0202]	aactactggc gacagctgct caacgccaag ctcatcacc agcgaaagtt cgacaatctt	2700
[0203]	accaaggccg agcgaggcgg tctgtccgag ctcgacaagg ctggcttcat caagcgtcaa	2760
[0204]	ctcgtcgaga ccagacagat cacaaagcac gtgcacaga ttctcgattc tcgatgaac	2820
[0205]	accaagtagc acgagaacga caagctcatc cgagaggtca aggtgattac tctcaagtcc	2880
[0206]	aaactggctc ccgatttccg aaaggacttt cagttctaca aggtgcgaga gatcaacaat	2940
[0207]	taccaccatg cccacgatgc ttacctcaac gccgtcgttg gcaactgcgt catcaagaaa	3000
[0208]	tacccaagc tcgaaagcga gttcgtttac ggcgattaca aggtctacga cgttcgaaag	3060
[0209]	atgattgcc agtccgaaca ggagattggc aaggctactg ccaagtactt cttttactcc	3120

[0210]	aacatcatga actttttcaa gaccgagatc accttggcca acggagagat tcgaaagaga	3180
[0211]	ccacttatcg agaccaacgg cgaaactgga gagatcgtgt gggacaaggg tcgagacttt	3240
[0212]	gcaaccgtgc gaaaggttct gtgatgcct caggtcaaca tcgtcaagaa aaccgaggtt	3300
[0213]	cagactggcg gattctccaa ggagtcgatt ctgccaagc gaaactccga caagctcatc	3360
[0214]	gctcgaaaga aagactggga tcccaagaaa tacggtggct tcgattctcc taccgtcgcc	3420
[0215]	tattccgtgc ttgtcgttgc gaaggtcgag aagggaagc ccaaaaagct caagtccgtc	3480
[0216]	aaggagctgc tcggaattac catcatggag cgatcgagct tcgagaagaa tcccatcgac	3540
[0217]	ttcttgaag ccaagggtta caaggagtc aagaaagacc tcattatcaa gctgccaag	3600
[0218]	tactctctgt tcgaactgga gaacggtcga aagcgtatgc tcgcctccgc tggcgagctg	3660
[0219]	cagaaggga acgagcttgc cttgccttcg aagtacgtca actttctcta tctggcttct	3720
[0220]	cactacgaga agctcaaggg ttctcccag gacaacgaac agaagcaact cttcgttgag	3780
[0221]	cagcacaac attacctga cgagattatc gagcagattt ccgagtttcc gaagcgagtc	3840
[0222]	atcttgctg atgccaactt ggacaagtg ctctctgcct acaacaagca tcgggacaaa	3900
[0223]	cccatcagag aacaggcgga gaacatcatt cacctgttta ctcttacc aa cctgggtgct	3960
[0224]	cctgcagctt tcaagtactt cgataccact atcgaccgaa agcggtagac atccaccaag	4020
[0225]	gaggttctcg atgccacct gattcaccag tccatcactg gctgtacga gacccgaatc	4080
[0226]	gacctgtctc agcttggtgg cgactccaga gccgatccca agaaaaagcg aaaggtctaa	4140
[0227]	<210> 11	
[0228]	<211> 1379	
[0229]	<212> PRT	
[0230]	<213> 人工序列	
[0231]	<220>	
[0232]	<223> 具有NLS的化脓链球菌Cas9	
[0233]	<400> 11	
[0234]	Met Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val	
[0235]	1 5 10 15	
[0236]	Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe	
[0237]	20 25 30	
[0238]	Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile	
[0239]	35 40 45	
[0240]	Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu	
[0241]	50 55 60	
[0242]	Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys	
[0243]	65 70 75 80	
[0244]	Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser	
[0245]	85 90 95	
[0246]	Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys	
[0247]	100 105 110	
[0248]	His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr	
[0249]	115 120 125	
[0250]	His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp	
[0251]	130 135 140	

[0252]	Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His		
[0253]	145	150	155 160
[0254]	Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro		
[0255]	165	170	175
[0256]	Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr		
[0257]	180	185	190
[0258]	Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala		
[0259]	195	200	205
[0260]	Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn		
[0261]	210	215	220
[0262]	Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn		
[0263]	225	230	235 240
[0264]	Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe		
[0265]	245	250	255
[0266]	Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp		
[0267]	260	265	270
[0268]	Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp		
[0269]	275	280	285
[0270]	Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp		
[0271]	290	295	300
[0272]	Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser		
[0273]	305	310	315 320
[0274]	Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys		
[0275]	325	330	335
[0276]	Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe		
[0277]	340	345	350
[0278]	Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser		
[0279]	355	360	365
[0280]	Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp		
[0281]	370	375	380
[0282]	Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg		
[0283]	385	390	395 400
[0284]	Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu		
[0285]	405	410	415
[0286]	Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe		
[0287]	420	425	430
[0288]	Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile		
[0289]	435	440	445
[0290]	Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp		
[0291]	450	455	460
[0292]	Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu		
[0293]	465	470	475 480

[0294]	Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr		
[0295]		485	490 495
[0296]	Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser		
[0297]		500	505 510
[0298]	Leu Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys		
[0299]		515	520 525
[0300]	Tyr Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln		
[0301]		530	535 540
[0302]	Lys Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr		
[0303]		545	550 555 560
[0304]	Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp		
[0305]		565	570 575
[0306]	Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly		
[0307]		580	585 590
[0308]	Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp		
[0309]		595	600 605
[0310]	Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr		
[0311]		610	615 620
[0312]	Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala		
[0313]		625	630 635 640
[0314]	His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg Arg Arg Tyr		
[0315]		645	650 655
[0316]	Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp		
[0317]		660	665 670
[0318]	Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Ser Asp Gly Phe		
[0319]		675	680 685
[0320]	Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His Asp Asp Ser Leu Thr Phe		
[0321]		690	695 700
[0322]	Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val Ser Gly Gln Gly Asp Ser Leu		
[0323]		705	710 715 720
[0324]	His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly Ser Pro Ala Ile Lys Lys Gly		
[0325]		725	730 735
[0326]	Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu Leu Val Lys Val Met Gly		
[0327]		740	745 750
[0328]	Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln		
[0329]		755	760 765
[0330]	Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg Glu Arg Met Lys Arg Ile		
[0331]		770	775 780
[0332]	Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln Ile Leu Lys Glu His Pro		
[0333]		785	790 795 800
[0334]	Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu Lys Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu		
[0335]		805	810 815

[0336]	Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp Gln Glu Leu Asp Ile Asn Arg		
[0337]	820	825	830
[0338]	Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp His Ile Val Pro Gln Ser Phe Leu Lys		
[0339]	835	840	845
[0340]	Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu Thr Arg Ser Asp Lys Asn Arg		
[0341]	850	855	860
[0342]	Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu Val Val Lys Lys Met Lys		
[0343]	865	870	875
[0344]	Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys Leu Ile Thr Gln Arg Lys		
[0345]	885	890	895
[0346]	Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly Gly Leu Ser Glu Leu Asp		
[0347]	900	905	910
[0348]	Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr		
[0349]	915	920	925
[0350]	Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp		
[0351]	930	935	940
[0352]	Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser		
[0353]	945	950	955
[0354]	Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg		
[0355]	965	970	975
[0356]	Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val		
[0357]	980	985	990
[0358]	Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe		
[0359]	995	1000	1005
[0360]	Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala		
[0361]	1010	1015	1020
[0362]	Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe		
[0363]	1025	1030	1035
[0364]	Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala		
[0365]	1040	1045	1050
[0366]	Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu		
[0367]	1055	1060	1065
[0368]	Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val		
[0369]	1070	1075	1080
[0370]	Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr		
[0371]	1085	1090	1095
[0372]	Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys		
[0373]	1100	1105	1110
[0374]	Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro		
[0375]	1115	1120	1125
[0376]	Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val		
[0377]	1130	1135	1140

[0378]	Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys	
[0379]	1145 1150 1155	
[0380]	Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser	
[0381]	1160 1165 1170	
[0382]	Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys	
[0383]	1175 1180 1185	
[0384]	Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu	
[0385]	1190 1195 1200	
[0386]	Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly	
[0387]	1205 1210 1215	
[0388]	Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val	
[0389]	1220 1225 1230	
[0390]	Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser	
[0391]	1235 1240 1245	
[0392]	Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys	
[0393]	1250 1255 1260	
[0394]	His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys	
[0395]	1265 1270 1275	
[0396]	Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala	
[0397]	1280 1285 1290	
[0398]	Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn	
[0399]	1295 1300 1305	
[0400]	Ile Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala	
[0401]	1310 1315 1320	
[0402]	Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser	
[0403]	1325 1330 1335	
[0404]	Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr	
[0405]	1340 1345 1350	
[0406]	Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp	
[0407]	1355 1360 1365	
[0408]	Ser Arg Ala Asp Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val	
[0409]	1370 1375	
[0410]	<210> 12	
[0411]	<211> 543	
[0412]	<212> DNA	
[0413]	<213> 解脂耶氏酵母	
[0414]	<400> 12	
[0415]	tcgacgttta aaccatcatc taagggcctc aaaactacct cggaactgct gcgctgatct	60
[0416]	ggacaccaca gaggttccga gcactttagg ttgcacaaaa tgtcccacca ggtgcaggca	120
[0417]	gaaaacgctg gaacagcgtg tacagtttgt cttaacaaaa agtgaggcg ctaggtcgca	180
[0418]	gcagggtggt gtgacttggt atagccttta gagctgcgaa agcgcgtatg gatttggtc	240
[0419]	atcaggccag attgagggtc tgtggacaca tgtcatgtta gtgtacttca atcgcacct	300

[0420]	ggatatagcc cgcacaatag gccgtggcct catttttttg ccttccgcac atttccattg	360
[0421]	ctcggtagcc acaccttgct tctcctgcac ttgccaacct taatactggg ttacattgac	420
[0422]	caacatctta caagcggggg gcttgtctag ggtatatata aacagtggct ctcccaatcg	480
[0423]	gttgccagtc tcttttttcc tttctttccc cacagattcg aaatctaaac tacacatcac	540
[0424]	acc	543
[0425]	<210> 13	
[0426]	<211> 4683	
[0427]	<212> DNA	
[0428]	<213> 人工序列	
[0429]	<220>	
[0430]	<223> Cas9-NLS表达盒	
[0431]	<400> 13	
[0432]	tcgacgttta aaccatcatc taagggcctc aaaactacct cggaactgct gcgctgatct	60
[0433]	ggacaccaca gaggttccga gcacttagg ttgcacaaa tgtccacca ggtgcaggca	120
[0434]	gaaaacgctg gaacagcgtg tacagtttgt cttaacaaaa agtgaggcg ctgaggtcga	180
[0435]	gcagggtggg gtgacttgtt atagccttta gagctgcgaa agcgcgtatg gatttggtc	240
[0436]	atcaggccag attgagggtc tgtggacaca tgtcatgta gtgtacttca atcgccccct	300
[0437]	ggatatagcc cgcacaatag gccgtggcct catttttttg ccttccgcac atttccattg	360
[0438]	ctcggtagcc acaccttgct tctcctgcac ttgccaacct taatactggg ttacattgac	420
[0439]	caacatctta caagcggggg gcttgtctag ggtatatata aacagtggct ctcccaatcg	480
[0440]	gttgccagtc tcttttttcc tttctttccc cacagattcg aaatctaaac tacacatcac	540
[0441]	accatggaca agaaatactc catcggcctg gacattggaa ccaactctgt cggctgggct	600
[0442]	gtcatcaccg acgagtacaa ggtgccctcc aagaaattca aggtcctcgg aaacaccgat	660
[0443]	cgacactcca tcaagaaaaa cctcattggg gccctgttgt tcgattctgg cgagactgcc	720
[0444]	gaagctacca gactcaagcg aactgctcgg cgacgttaca cccgacggaa gaaccgaatc	780
[0445]	tgctacctgc aggagatctt ttccaacgag atggccaagg tggacgattc gttctttcat	840
[0446]	cgactggagg aatccttctt cgtcgaggaa gacaagaaac acgagcgtca tcccatcttt	900
[0447]	ggcaacattg tggacgaggt tgcttaccac gagaagtatc ctaccatcta ccacctgcga	960
[0448]	aagaaactcg tcgattccac cgacaaggcg gatctcagac ttatctacct cgctctggca	1020
[0449]	cacatgatca agtttcgagg tcatttcctc atcgaggcg atctcaatcc cgacaacagc	1080
[0450]	gatgtggaca agctgttcat tcagctcgtt cagacctaca accagctgtt cgaggaaaac	1140
[0451]	cccatcaatg cctccggagt cgatgcaaag gccatcttgt ctgctcgact ctggaagagc	1200
[0452]	agacgactgg agaacctcat tgcccaactt cctggcgaga aaaagaacgg actgtttggc	1260
[0453]	aacctcattg ccttttctct tgggtctcaca cccaacttca agtccaactt cgatctggcg	1320
[0454]	gaggacgcca agctccagct gtccaaggac acctacgacg atgacctcga caacctgctt	1380
[0455]	gcacagattg gcgatcagta cgccgacctg tttctcgtcg ccaagaacct ttcgatgct	1440
[0456]	attctcttgt ctgacattct gcgagtcaac accgagatca caaaggtcc cttttctgcc	1500
[0457]	tccatgatca agcgatacga cgagcaccat caggatctca cactgctcaa ggctcttgct	1560
[0458]	cgacagcaac tgcccagaa gtacaaggag atctttttcg atcagtcgaa gaacggctac	1620
[0459]	gctggataca tcgacggcgg agcctctcag gaagagttct acaagttcat caagccaatt	1680
[0460]	ctcgagaaga tggacggaac cgaggaaactg cttgtcaagc tcaatcgaga ggatctgctt	1740
[0461]	cggaagcaac gaaccttcca caacggcagc attcctcatc agatccacct cggtagctg	1800

[0462]	cacgccattc ttcgacgtca ggaagacttc tacccttttc tcaaggacaa ccgagagaag	1860
[0463]	atcgagaaga ttcttacctt tcgaatcccc tactatgttg gtcctcttgc cagaggaaac	1920
[0464]	tctcgatttg cttggatgac tcgaaagtcc gaggaacca tcactccctg gaacttcgag	1980
[0465]	gaagtcgtgg acaagggtgc ctctgcacag tccttcatcg agcgaatgac caacttcgac	2040
[0466]	aagaatctgc ccaacgagaa ggttcttccc aagcattcgc tgctctacga gtactttaca	2100
[0467]	gtctacaacg aactcaccaa agtcaagtac gttaccgagg gaatgcgaaa gcctgccttc	2160
[0468]	ttgtctggcg aacagaagaa agccattgtc gatctcctgt tcaagaccaa ccgaaaggtc	220
[0469]	actgttaagc agctcaagga ggactacttc aagaaaatcg agtgtttcga cagcgtcgag	2280
[0470]	atttccggag ttgaggaccg attcaacgcc tctttgggca cctatcacga tctgtcgaag	2340
[0471]	attatcaagg acaaggattt tctcgacaac gaggaacacg aggacattct ggaggacatc	2400
[0472]	gtgtctactc ttacctgtt cgaagatcgg gagatgatcg aggaacgact caagacatac	2460
[0473]	gtcacctgt tcgacgacaa ggtcatgaaa caactcaagc gacgtagata caccggctgg	2520
[0474]	ggaagacttt cgcgaaagct catcaacggc atcagagaca agcagtccgg aaagaccatt	2580
[0475]	ctggactttc tcaagtccga tggctttgcc aaccgaaact tcatgcagct cattcacgac	2640
[0476]	gattctctta ctttcaagga ggacatccag aaggcacaag tgtccgggtca gggcgacagc	2700
[0477]	ttgcacgaac atattgccaa cctggctggt tcgccagcca tcaagaaagg cattctccag	2760
[0478]	actgtcaagg ttgtcgacga gctggtgaag gtcatgggac gtcacaagcc cgagaacatt	2820
[0479]	gtgatcgaga tggccagaga gaaccagaca actcaaaagg gtcagaaaaa ctcgcgagag	2880
[0480]	cggatgaagc gaatcgagga aggcatacaag gagctgggat cccagattct caaggagcat	2940
[0481]	cccgtcgaga aactcaact gcagaacgag aagctgtatc tctactatct gcagaatggt	3000
[0482]	cgagacatgt acgtggatca ggaactggac atcaatcgtc tcagcgacta cgatgtggac	3060
[0483]	cacattgtcc ctcaatcctt tctcaaggac gattctatcg acaacaaggt ccttacacga	3120
[0484]	tccgacaaga acagaggcaa gtcggacaac gttcccagcg aagagggtgt caaaaagatg	3180
[0485]	aagaactact ggcgacagct gctcaacgcc aagctcatta cccagcgaaa gttcgacaat	3240
[0486]	cttaccaagg ccgagcgagg cggctctgtc gagctcgaca aggctggctt catcaagcgt	3300
[0487]	caactcgtcg agaccagaca gatcacaagc cagctcgac agattctcga ttctcggatg	3360
[0488]	aacaccaagt acgacgagaa cgacaagctc atccgagagg tcaaggatgat tactctcaag	3420
[0489]	tccaaactgg tctccgattt ccgaaaggac tttcagttct acaagggtcg agagatcaac	3480
[0490]	aattaccacc atgccacga tgcttacctc aacgccgtcg ttggcactgc gtcatacaag	3540
[0491]	aaatacccca agctcgaaag cgagttcgtt tacggcgatt acaaggctta cgacgttcga	3600
[0492]	aagatgattg ccaagtccga acaggagatt ggcaaggcta ctgccaagta cttcttttac	3660
[0493]	tccaacatca tgaacttttt caagaccgag atcaccttg ccaacggaga gattcgaaag	3720
[0494]	agaccactta tcgagaccaa cggcgaaact ggagagatcg tgtgggacaa gggtcgagac	3780
[0495]	tttgcaaccg tgcgaaagg tctgtcgatg cctcaggtca acatcgtcaa gaaaaccgag	3840
[0496]	gttcagactg gcgattctc caaggagtgc attctgccc agcgaaactc cgacaagctc	3900
[0497]	atcgctcgaa agaaagactg ggatcccaag aaatacgggt gcttcgattc tcctaccgtc	3960
[0498]	gcctattccg tgcttgcgt tgcgaaggtc gagaagggca agtccaaaaa gctcaagtcc	4020
[0499]	gtcaaggagc tgctcggaat taccatcatg gagegatcga gcttcgagaa gaatcccatc	4080
[0500]	gacttcttgg aagccaaggg ttacaaggag gtcaagaaag acctcattat caagctgccc	4140
[0501]	aagtactctc tgttcgaact ggagaacggt cgaaagcgta tgctcgcctc cgctggcgag	4200
[0502]	ctgcagaagg gaaacgagct tgccttgctc tcgaagtacg tcaactttct ctatctggct	4260
[0503]	tctcactacg agaagctcaa gggttctccc gaggacaacg aacagaagca actcttcgtt	4320

[0504]	gagcagcaca aacattacct cgacgagatt atcgagcaga tttccgagtt ttcgaagcga	4380
[0505]	gtcatcctgg ctgatgccaa cttggacaag gtgctctctg cctacaacaa gcatcgggac	4440
[0506]	aaacccattc gagaacaggc ggagaacatc attcacctgt ttactcttac caacctgggt	4500
[0507]	gctcctgcag ctttcaagta cttcgatacc actatcgacc gaaagcggta cacatccacc	4560
[0508]	aaggaggttc tcgatgccac cctgattcac cagtccatca ctggcctgta cgagacccca	4620
[0509]	atcgacctgt ctgagcttgg tggcgactcc agagccgac ccaagaaaaa gcgaaaggtc	4680
[0510]	taa	4683
[0511]	<210> 14	
[0512]	<211> 10706	
[0513]	<212> DNA	
[0514]	<213> 人工序列	
[0515]	<220>	
[0516]	<223> pZUFCas9质粒	
[0517]	<400> 14	
[0518]	catggacaag aaatactcca tcggcctgga cattggaacc aactctgtcg gctgggctgt	60
[0519]	catcaccgac gagtacaagg tgccctccaa gaaattcaag gtctctggaa acaccgatcg	120
[0520]	acactccatc aagaaaaacc tcattgggtgc cctgttggtc gattctggcg agactgccga	180
[0521]	agctaccaga ctcaagcgaa ctgctcgcg acgttacacc cgacggaaga accgaatctg	240
[0522]	ctacctgcag gagatctttt ccaacgagat ggccaagggtg gacgattcgt tctttcatcg	300
[0523]	actggaggaa tccttcctcg tcgaggaaga caagaaacac gagegtcatc ccatctttgg	360
[0524]	caacattgtg gacgaggttg cttaccacga gaagtatcct accatctacc acctgcgaaa	420
[0525]	gaaactcgtc gattccaccg acaaggcgga tctcagactt atctacctcg ctctggcaca	480
[0526]	catgatcaag tttcgaggtc atttctcat cgagggcgat ctcaatcccg acaacagcga	540
[0527]	tgtggacaag ctgttcatc agctcgttca gacctacaac cagctgttcg aggaaaaccc	600
[0528]	catcaatgcc tcggagtcg atgcaaagge catcttgtct gctcgactct cgaagagcag	660
[0529]	acgactggag aacctcattg cccaacttcc tggcgagaaa aagaacggac tgtttgcaa	720
[0530]	cctcattgcc ctttctcttg gtctcacacc caacttcaag tccaacttcg atctggcgga	780
[0531]	ggacccaag ctccagctgt ccaaggacac ctacgacgat gacctcgaca acctgcttgc	840
[0532]	acagattggc gatcagtagc ccgacctgtt tctcgtgcc aagaaccttt cggatgctat	900
[0533]	tctctgtct gacattctgc gagtcaacac cgagatcaca aaggctcccc tttctgcctc	960
[0534]	catgatcaag cgatacgacg agcaccatca ggatctcaca ctgctcaagg ctcttgtccg	1020
[0535]	acagcaactg cccgagaagt acaaggagat ctttttcgat cagtcgaaga acggctacgc	1080
[0536]	tggatacatc gacggcggag cctctcagga agagttctac aagttcatca agccaattct	1140
[0537]	cgagaagatg gacggaaccg aggaactgct tgtcaagctc aatcgagagg atctgcttcg	1200
[0538]	gaagcaacga accttcgaca acggcagcat tcctcatcag atccacctcg gtgagctgca	1260
[0539]	cgccattctt cgacgtcagg aagacttcta cccctttctc aaggacaacc gagagaagat	1320
[0540]	cgagaagatt cttaccttgc gaatccccta ctatgttggt cctcttgcca gaggaactc	1380
[0541]	tcgatttgc tggatgactc gaaagtccga ggaaaccatc actccctgga acttcgagga	1440
[0542]	agtcgtggac aagggtgcct ctgcacagtc cttcatcgag cgaatgacca acttcgacaa	1500
[0543]	gaatctgccc aacgagaagg ttcttcccaa gcattcgctg ctctacgagt actttacagt	1560
[0544]	ctacaacgaa ctacacaaag tcaagtacgt taccgaggga atgcgaaagc ctgccttctt	1620
[0545]	gtctggcgaa cagaagaaag ccattgtcga tctctgttc aagaccaacc gaaaggctac	1680

[0546]	tgtaaagcag ctcaaggagg actacttcaa gaaaatcgag tgtttcgaca gcgtcgagat	1740
[0547]	ttccggagtt gaggaccgat tcaacgcctc tttgggcacc tatcacgata tgctcaagat	1800
[0548]	tatcaaggac aaggattttc tcgacaacga ggaaaacgag gacattcttg aggacatcgt	1860
[0549]	gctcactctt accctgttcg aagatcgga gatgatcgag gaacgactca agacatacgc	1920
[0550]	tcacctgttc gacgacaagg tcatgaacaa actcaagcga cgtagataca ccggctgggg	1980
[0551]	aagactttcg cgaaagctca tcaacggcat cagagacaag cagtccggaa agaccattct	2040
[0552]	ggactttctc aagtccgatg gctttgccaa ccgaaacttc atgcagctca ttcacgacga	2100
[0553]	ttctcttacc ttcaaggagg acatccagaa ggcacaagtg tccggtcagg gcgacagctt	2160
[0554]	gcacgaacat attgccaacc tggctggttc gccagccatc aagaaaggca ttctccagac	2220
[0555]	tgtaagggtt gtcgacgagc tggatgaagg catgggacgt cacaagcccga agaacttgt	2280
[0556]	gatcgagatg gccagagaga accagacaac tcaaaagggt cagaaaaact cgcgagagcg	2340
[0557]	gatgaagcga atcgaggaag gcatcaagga gctgggatcc cagattctca aggagcatcc	2400
[0558]	cgtcgagaac actcaactgc agaacgagaa gctgtatctc tactatctgc agaattgtcg	2460
[0559]	agacatgtac gtggatcagg aactggacat caatcgtctc agcgactacg atgtggacca	2520
[0560]	cattgtccct caatcctttc tcaaggacga ttctatcgac aacaaggctc ttacacgata	2580
[0561]	cgacaagaac agaggcaagt cggacaacgt tccagcgaa gaggtggtca aaaagatgaa	2640
[0562]	gaactactgg cgacagctgc tcaacgcaa gctcattacc cagcgaaagt tcgacaatct	2700
[0563]	taccaaggcc gagcgaggcg gtctgtccga gtcgacaag gctggcttca tcaagcgtca	2760
[0564]	actcgtcgag accagacaga tcacaaagca cgtcgacag attctcgatt ctcgatgaa	2820
[0565]	caccaagtac gacgagaacg acaagctcat ccgagaggtc aagggtgatta ctctcaagtc	2880
[0566]	caaactggtc tccgatttcc gaaaggactt tcagttctac aagggtcgag agatcaacaa	2940
[0567]	ttaccacat gccacgatg cttacctcaa cgccgtcgtt ggcaactgcg tcactcaagaa	3000
[0568]	ataccccaag ctcgaaagcg agttcgttta cggcgattac aagggtctac acgttcgaaa	3060
[0569]	gatgattgcc aagtccgaac aggagattgg caaggctact gccaaagtact tcttttactc	3120
[0570]	caacatcatg aactttttca agaccgatg caccctggcc aacggagaga ttcgaaagag	3180
[0571]	accacttata gagaccaacg gcgaaactgg agagatcgtg tgggacaagg gtcgagactt	3240
[0572]	tgcaaccgtg cgaaagggtc tgcgatgcc tcaggtaaac atcgtcaaga aaaccgaggt	3300
[0573]	tcagactggc ggattctcca aggagtcgat tctgcccagg cgaaactccg acaagctcat	3360
[0574]	cgtcgaaaag aaagactggg atcccaagaa atacggtggc ttcgattctc ctaccgtcgc	3420
[0575]	ctattccgtg cttgtcgttg cgaaggctga gaaggcgaag tccaaaaagc tcaagtccgt	3480
[0576]	caaggagctg ctcggaatta ccatcatgga gcgatcgagc ttcgagaaga atcccatcga	3540
[0577]	cttcttgga gccaaagggtt acaaggaggt caagaaagac ctcatattca agctgcccga	3600
[0578]	gtactctctg ttcgaaactgg agaacggtcg aaagcgtatg ctgcctccg ctggcgagct	3660
[0579]	gcagaaggga aacgagcttg ccttgccctc gaagtacgtc aactttctct atctggcttc	3720
[0580]	tcactacgag aagctcaagg gttctccga ggacaacgaa cagaagcaac tcttcgttga	3780
[0581]	gcagacaaa cattacctg acgagattat cgagcagatt tccgagtttt cgaagcgagt	3840
[0582]	catcctggct gatgccaact tggacaagggt gctctctgcc tacaacaagc atcgggacaa	3900
[0583]	acccattcga gaacaggcgg agaactcat tcacctgttt actcttacca acctgggtgc	3960
[0584]	tcctgcagct ttcaagtact tcgataccac tatcgaccga aagcggatca catccacaa	4020
[0585]	ggaggttctc gatgccaccc tgattacca gtccatcact ggctgtacg agaccgaat	4080
[0586]	cgacctgtct cagcttggtg gcgactccag agccgatccc aagaaaaagc gaaaggctca	4140
[0587]	agcggccgca agtgtggatg gggaagtga tgcccgttc tgtgtgcaca attggcaatc	4200

[0588]	caagatggat ggattcaaca cagggatata gcgagctacg tgggtggtgcg aggatatagc	4260
[0589]	aacggatatt tatgtttgac acttgagaat gtacgataca agcactgtcc aagtacaata	4320
[0590]	ctaaacatac tgtacatact catactcgta cccgggcaac ggtttctactt gagtgcagtg	4380
[0591]	gctagtgtct ttactcgtac agtgtgcaat actgcgtatc atagtctttg atgtatatcg	4440
[0592]	tattcattca tgtagttgc gtacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tggggtgcct	4500
[0593]	aatgagtgag ctaactcaca ttaattgcgt tgcgctcact gcccgcttcc cagtcgggaa	4560
[0594]	acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta	4620
[0595]	ttgggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg actcgtcgcg ctcggtcgtt cggctgcggc	4680
[0596]	gagcggatc agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg	4740
[0597]	caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt	4800
[0598]	tgctggcggt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgtcaa	4860
[0599]	gtcagagggt gcgaaaccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct	4920
[0600]	ccctcgtgcg ctctcctgtt ccgacctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc	4980
[0601]	cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cagcgtgtag gtatctcagt tcggtgtagg	5040
[0602]	tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgac cgctgcgcct	5100
[0603]	tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccaactggcag	5160
[0604]	cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtgtaca gatttcttga	5220
[0605]	agtggtggcc taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggatatctgc gctctgtga	5280
[0606]	agccagttac cttcggaaaa agagttggtg gctcttgatc cggcaaacaa accaccgtg	5340
[0607]	gtagcgggtg tttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag	5400
[0608]	aagatccttt gatcttttct acggggctcg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag	5460
[0609]	ggattttggt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaat	5520
[0610]	gaagttttaa atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct	5580
[0611]	taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg ttcattccata gttgcctgac	5640
[0612]	tccccgtcgt gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgcgtcaa	5700
[0613]	tgataccgag agaccacgc tcaccggctc cagatttatc agcaataaac cagccagccg	5760
[0614]	gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt	5820
[0615]	gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttgttgcca	5880
[0616]	ttgctacagg catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggtat ggttcattc agctccggtt	5940
[0617]	cccaacgata aaggcgagtt acatgatccc ccatgttggtg caaaaaagcg gttagctcct	6000
[0618]	tcggtcctcc gatcgttgtc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg	6060
[0619]	cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactggtg	6120
[0620]	agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg	6180
[0621]	cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa	6240
[0622]	aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgtatg	6300
[0623]	aaccactcgt tgcaccaaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt	6360
[0624]	gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat aaggcgaca cggaatgtt	6420
[0625]	gaatactcat actcttccct tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca	6480
[0626]	tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat	6540
[0627]	ttccccgaaa agtgccacct gacgcgcct gtacggcgcc attaagcgcg gcgggtgtgg	6600
[0628]	tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcccgt ctttctgctt	6660
[0629]	tcttcccttc ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagcteta aatcgggggc	6720

[0630]	tccctttagg gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg	6780
[0631]	gtgatgggtt acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg	6840
[0632]	agtccacgtt ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aacctatct	6900
[0633]	cggctctattc ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctatttg ttaaaaaatg	6960
[0634]	agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgctt acaatttcca	7020
[0635]	ttcgccattc aggctgcgca actggttgga agggcgatcg gtgcgggcct cttcgctatt	7080
[0636]	acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt	7140
[0637]	ttcccagtcg cgacgttgta aaacgacggc cagtgaattg taatacgact cactataggg	7200
[0638]	cgaattgggt accgggcccc ccctcgaggc cgatggtgtc gataagcttg atatcgaatt	7260
[0639]	catgtcacac aaaccgatct tcgcctcaag gaaacctaat tctacatccg agagactgcc	7320
[0640]	gagatccagt ctacactgat taattttcgg gccaaataatt taaaaaaatc gtgttatata	7380
[0641]	atattatatg tattatata atacatcatg atgatactga cagtcatgct ccattgctaa	7440
[0642]	atagacagac tccatctgcc gcctccaact gatgtttctca atattttaagg ggtcatctcg	7500
[0643]	cattgtttta taataaacag actccatcta ccgcctccaa atgatgttct caaaatata	7560
[0644]	tgtatgaact tatttttatt acttagtatt attagacaac ttacttgctt tatgaaaaac	7620
[0645]	acttcttatt taggaaacaa ttataatgg cagttcgttc atttaacaat ttatgtagaa	7680
[0646]	taaatgttat aaatgcgtat gggaaatctt aaatatggat agcataaatg atatctgcat	7740
[0647]	tgctaattc gaaatcaaca gcaacgaaaa aaatcccttg tacaacataa atagtcatcg	7800
[0648]	agaaatatca actatcaaag aacagctatt cacacgttac tattgagatt attattggac	7860
[0649]	gagaatcaca cactcaactg tctttctctc ttctagaaat acaggtaaca gtatgtacta	7920
[0650]	ttctcattgt tcatacttct agtcatttca tcccacatat tcttggatt tctctccaat	7980
[0651]	gaatgacatt ctatcttgca aattcaacaa ttataataag atataccaaa gtagcggtat	8040
[0652]	agtggaatc aaaaagcttc tctggtgtgc ttctcgtatt tatttttatt ctaatgatcc	8100
[0653]	attaaaggta tatatttatt tcttgttata taatcctttt gtttattaca tgggctggat	8160
[0654]	acataaaggc attttgattt aattttttgc ttaaattcaa tccccctcg ttcagtgtca	8220
[0655]	actgtaatgg taggaaatta ccatactttt gaagaagcaa aaaaaatgaa agaaaaaaa	8280
[0656]	aatcgtattt ccaggtaga cgttccgcag aatctagaat gcggtatgcg gtacattgtt	8340
[0657]	cttcgaacgt aaaagtgcg ctccctgaga tattgtacat ttttgctttt acaagtacaa	8400
[0658]	gtacatcgta caactatgta ctactgttga tgcattcaca acagtttgtt ttgttttttt	8460
[0659]	ttgttttttt tttttcta atgattcattac cgctatgtat acctacttgt acttgtagta	8520
[0660]	agccgggtta ttggcggtca attaatcata gacttatgaa tctgcacggt gtgcgctgcg	8580
[0661]	agttactttt agcttatgca tgctacttgg gtgtaatatt gggatctgtt cggaatcaa	8640
[0662]	cggatgctca atcgatttcg acagtaatta attaatcat acacaagtca gctttcttcg	8700
[0663]	agcctcatat aagtataagt agttcaacgt attagcactg taccagcat ctccgtatcg	8760
[0664]	agaaacacaa caacatgccc cattggacag atcatgcgga tacacagggt gtgcagtatc	8820
[0665]	atacactctc gatcagacag gtcgtctgac catcatacaa gctgaacaag cgctccatac	8880
[0666]	ttgcacgctc tctatataca cagttaaatt acatatccat agtctaacct ctaacagtta	8940
[0667]	atcttctggt aagcctccca gccagccttc tggatctgct tggcctcctc aataggatct	9000
[0668]	cggttctggc cgtacagacc tcggccgaca attatgatat ccgttccggt agacatgaca	9060
[0669]	tcctcaacag ttcggtactg ctgtccgaga gcgtctccct tgctcgtcaag acccaccg	9120
[0670]	ggggtcagaa taagccagtc ctgagagtcg cccttaggtc ggttctgggc aatgaagcca	9180
[0671]	accacaaact cggggtcgga tcgggcaagc tcaatggtct gcttgagta ctcgccagt	9240

[0672]	gccagagagc ccttgcaaga cagctcggcc agcatgagca gacctctggc cagcttctcg	9300
[0673]	ttgggagagg ggactaggaa ctcttgttac tgggagttct cgtagtcaga gacgtcctcc	9360
[0674]	ttcttctgtt cagagacagt ttctcggca ccagctcgca ggccagcaat gattccggtt	9420
[0675]	ccgggtacac cgtgggcgtt ggtgatatcg gaccactcgg cgattcggtg acaccgttac	9480
[0676]	tggtgcttga cagtgttgcc aatatctcgc aactttctgt cctcgaacag gaagaaaccg	9540
[0677]	tgcttaagag caagttcctt gagggggagc acagtgccgg cgtaggtgaa gtcgtcaatg	9600
[0678]	atgtcgatat gggttttgat catgcacaca taaggtccga cttatcggc aagctcaatg	9660
[0679]	agctccttgg tggtgtaac atccagagaa gcacacaggt tggttttctt ggctgccacg	9720
[0680]	agcttgagca ctcgagcggc aaaggcggac ttgtggacgt tagctcgagc ttcgtaggag	9780
[0681]	ggcatttttg tggtgaagag gagactgaaa taaatttagt ctgcagaact ttttatcgga	9840
[0682]	accttatctg gggcagtgaa gtatatgtta tggtaatagt tacgagttag ttgaacttat	9900
[0683]	agatagactg gactatacgg ctatcgggcc aaattagaaa gaacgtcaat ggctctcttg	9960
[0684]	gcgtgcctt tgccgacaaa aatgtgatca tgatgaaagc cagcaatgac gttgcagctg	10020
[0685]	atatgttgt cgccaaccg cgccgaaaac gcagctgtca gaccacagc ctccaacgaa	10080
[0686]	gaatgtatcg tcaaagtgat ccaagcacac tcatagttgg agtcgtactc caaaggcggc	10140
[0687]	aatgacgagt cagacagata ctgctcgacg tttaaacat catctaaggc cctcaaaact	10200
[0688]	acctcggaac tgctgcgtg atctggacac cacagaggtt ccgagcactt taggttgac	10260
[0689]	caaatgtccc accagtgca ggcagaaaac gctggaacag cgtgtacagt ttgtcttaac	10320
[0690]	aaaaagttag ggcgctgagg tcgagcaggg tgggtgact tgttatagcc tttagagctg	10380
[0691]	cgaaagcgcg tatggatttg gctcatcagg ccagattgag ggtctgtgga cacatgtcat	10440
[0692]	gttagtgtag ttcaatgcc ccctggatat agccccgaca ataggccgtg gcctcatttt	10500
[0693]	tttgccttcc gcacatttcc attgctcggc acccacacct tgcttctcct gcacttgcca	10560
[0694]	accttaatac tggtttacat tgaccaacat cttacaagcg gggggcttgt ctaggggtata	10620
[0695]	tataaacagt ggctctccca atcggttgcc agtctctttt ttctttctt tccccacaga	10680
[0696]	ttcgaaatct aaactacaca tcacac	10706
[0697]	<210> 15	
[0698]	<211> 43	
[0699]	<212> RNA	
[0700]	<213> 人工序列	
[0701]	<220>	
[0702]	<223> 锤头(HH)核酶	
[0703]	<220>	
[0704]	<221> misc_feature	
[0705]	<222> (1) .. (6)	
[0706]	<223> n = A、C、U或G	
[0707]	<400> 15	
[0708]	nnnnnncuga ugaguccgug aggacgaaac gaguaagcuc guc	43
[0709]	<210> 16	
[0710]	<211> 68	
[0711]	<212> RNA	
[0712]	<213> 丁型肝炎病毒	
[0713]	<400> 16	

[0714]	ggccggcaug gucccagccu ccucgcuggc gccggcuggg caacaugcuu cggcauggcg	60
[0715]	aaugggac	68
[0716]	<210> 17	
[0717]	<211> 20	
[0718]	<212> DNA	
[0719]	<213> 解脂耶氏酵母	
[0720]	<400> 17	
[0721]	tcaaacgatt acccaccctc	20
[0722]	<210> 18	
[0723]	<211> 760	
[0724]	<212> DNA	
[0725]	<213> 人工序列	
[0726]	<220>	
[0727]	<223> RGR表达盒	
[0728]	<400> 18	
[0729]	tcgacgttta aaccatcatc taagggcctc aaaactacct cggaactgct gcgctgatct	60
[0730]	ggacaccaca gaggttccga gcactttagg ttgcacaaa tgtcccacca ggtgcaggca	120
[0731]	gaaaacgctg gaacagcgtg tacagtttgt cttacaaaa agtgaggcg ctgaggtcga	180
[0732]	gcagggtggt gtgacttggt atagccttta gagctgcgaa agcgcgtatg gatttggtc	240
[0733]	atcaggccag attgagggtc tgtggacaca tgtcatgtta gtgtacttca atcgccccct	300
[0734]	ggatatagcc ccgacaatag gccgtggcct cttttttttg ctttcgcac atttcattg	360
[0735]	ctcggtagcc acacctgct tctcctgcac ttgccaacct taatactggt ttacattgac	420
[0736]	caacatctta caagcggggg gcttgcttag ggtatatata aacagtggct ctcccaatcg	480
[0737]	gttgccagtc tcttttttcc tttctttccc cacagattcg aaatctaaac tacacatcac	540
[0738]	accatggttt gactgatgag tccgtgagga cgaaacgagt aagctcgtct caaacgatta	600
[0739]	cccaccctcg ttttagagct agaaatagca agttaaaata aggctagtcc gttatcaact	660
[0740]	tgaaaaagtg gcaccgagtc ggtggtgctt ttggccggca tgggtcccagc ctctctgctg	720
[0741]	gcgccggctg ggcaacatgc ttcggcatgg cgaatgggac	760
[0742]	<210> 19	
[0743]	<211> 6793	
[0744]	<212> DNA	
[0745]	<213> 人工序列	
[0746]	<220>	
[0747]	<223> pRF38质粒	
[0748]	<400> 19	
[0749]	catggtttga ctgatgagtc cgtgaggacg aaacgagtaa gctcgtctca aacgattacc	60
[0750]	caccctcggt ttagagctag aaatagcaag ttaaaataag gctagtccgt tatcaacttg	120
[0751]	aaaaagtggc accgagtcgg tgggtgcttt ggccggcatg gtcccagcct cctcgctggc	180
[0752]	gccggtggg caacatgctt cggcatggcg aatgggacaa gcttgggggc ggccgcaagt	240
[0753]	gtggatgggg aagtgagtg cgggttctgt gtgcacaatt ggcaatccaa gatggatgga	300
[0754]	ttcaacacag ggatatagcg agctacgtgg tgggtgcgagg atatagcaac ggatatattat	360
[0755]	gtttgacact tgagaatgta cgatacaagc actgtccaag tacaatacta aacatactgt	420

[0756]	acatactcat actcgtaccc gggcaacggt ttcacttgag tgcagtggt agtgctctta	480
[0757]	ctcgtacagt gtgcaatact gcgtatcata gtctttgatg tatatcgtat tcattcatgt	540
[0758]	tagttgcgta cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaata gagtgagcta	600
[0759]	actcacatta attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc tgtcgtgcca	660
[0760]	gctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcggg ttgcgtattg ggcgctcttc	720
[0761]	cgcttcctcg ctactgact cgctgcgctc ggctcgttcgg ctgcggcgag cggatatcagc	780
[0762]	tcactcaaag gcggtaatac gggttatccac agaatacagg gataacgcag gaaagaacat	840
[0763]	gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcggtttt	900
[0764]	ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg	960
[0765]	aaacccgaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc	1020
[0766]	tcctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt	1080
[0767]	ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa	1140
[0768]	gctgggctgt gtgcacgaac ccccggttca gcccgaccgc tgcgccttat ccgtaacta	1200
[0769]	tcgtcttgag tccaacccgg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccaactgtaa	1260
[0770]	caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa	1320
[0771]	ctacggctac actagaagga cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt	1380
[0772]	cggaaaaaga gttgtagct cttgatccgg caaacaacc accgctggtg gcggtggttt	1440
[0773]	ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga tctcaagaag atcctttgat	1500
[0774]	cttttctacg gggctctgacg ctacttgaa cgaaaactca cgtaaggga ttttggtcat	1560
[0775]	gagattatca aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc	1620
[0776]	aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagtaggc	1680
[0777]	acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta	1740
[0778]	gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga	1800
[0779]	cccacgctca ccggctccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg	1860
[0780]	cagaagtggc cctgcaactt tatccgcctc catccagtct attaattgtt gccgggaagc	1920
[0781]	tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt gcgcaacgtt gttgccattg ctacaggcat	1980
[0782]	cgtgggtgtc cgctcgtcgt ttggtatggc ttatttcagc tccggttccc aacgatcaag	2040
[0783]	gcgagttaca tgatcccca tgttgtgcaa aaaagcgggt agctccttcg gtcctccgat	2100
[0784]	cgttgtcaga agtaagtgg ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa	2160
[0785]	ttctcttact gtcattgcat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa	2220
[0786]	gtcattctga gaatagtgtg tgcggcgacc gagttgctct tgcccggcgt caatacggga	2280
[0787]	taataccgcg ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac gttcttcggg	2340
[0788]	gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac ccaactcgtc	2400
[0789]	acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg	2460
[0790]	aaggcaaat gccgcaaaaa agggaataag ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact	2520
[0791]	cttccttttt caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcgatacat	2580
[0792]	atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc ccgaaaagt	2640
[0793]	gccacctgac gcgccctgta gcggcgcat aagcgcggcg ggtgtggtgg ttacgcgcag	2700
[0794]	cgtgaccgct acacttgcca gcgccctagc gccgcctcct ttcgctttct tcccttcctt	2760
[0795]	tctgccacg ttcgccggt ttccccgtca agctctaaat cgggggctcc ctttagggtt	2820
[0796]	ccgatttagt gctttacggc acctcgaccc caaaaaactt gattagggtg atggttcacg	2880
[0797]	tagtgggcca tcgccctgat agacggtttt tcgccctttg acgttggagt ccacgttctt	2940

[0798]	taatagtgga ctcttgttcc aaactggaac aacactcaac cctatctcgg tctattcttt	3000
[0799]	tgatttataa gggattttgc cgatttcggc ctattgggta aaaaatgagc tgatttaaca	3060
[0800]	aaaatttaac gcgaatttta acaaaatatt aacgcttaca atttccattc gccattcagg	3120
[0801]	ctgcgcaact gttgggaagg gcgatcgggt cgggcctctt cgctattacg ccagctggcg	3180
[0802]	aaagggggat gtgctgcaag gcgattaagt tgggtaacgc cagggttttc ccagtcacga	3240
[0803]	cgttgtaaaa cgacggccag tgaattgtaa tacgactcac tataggcgca attgggtacc	3300
[0804]	gggccccccc tcgaggtcga tgggtgcgat aagcttgata tcgaattcat gtcacacaaa	3360
[0805]	ccgatcttcg cctcaaggaa acctaattct acatccgaga gactgccgag atccagtcta	3420
[0806]	cactgattaa ttttcgggcc aataatttaa aaaaatcgtg ttatataata ttatatgtat	3480
[0807]	tatatatata catcatgatg atactgacag tcatgtccca ttgctaaata gacagactcc	3540
[0808]	atctgccgcc tccaactgat gttctcaata ttttaagggt catctcgcat tgtttaataa	3600
[0809]	taaacagact ccatctaccg cctccaaatg atgttctcaa aatatattgt atgaacttat	3660
[0810]	ttttattact tagtattatt agacaactta cttgctttat gaaaaacact tcctatttag	3720
[0811]	gaaacaattt ataatggcag ttcgttcatt taacaattta tgtagaataa atgttataaa	3780
[0812]	tgcgtatggg aaatcttaaa tatggatagc ataaatgata tctgcattgc ctaattcgaa	3840
[0813]	atcaacagca acgaaaaaaa tcccttgtag aacataaata gtcatcgaga aatatcaact	3900
[0814]	atcaaagaac agctattcac acgttactat tgagattatt attggacgag aatcacacac	3960
[0815]	tcaactgtct ttctctcttc tagaaataca ggtacaagta tgtactattc tcattgttca	4020
[0816]	tacttctagt catttcatcc cacatatctc ttggatttct ctccaatgaa tgacattcta	4080
[0817]	tcttgcaaat tcaacaatta taataagata taccaaagta gcggtatagt ggcaatcaaa	4140
[0818]	aagcttctct ggtgtgcttc tcgtatttat ttttattcta atgatccatt aaaggtatat	4200
[0819]	atttatttct tgttatataa tccttttgtt tattacatgg gctggataca taaaggtatt	4260
[0820]	ttgatttaat tttttgctta aattcaatcc cccctcgttc agtgtcaact gtaatggtag	4320
[0821]	gaaattacca tacttttgaa gaagcaaaaa aaatgaaaga aaaaaaaaaat cgtatttcca	4380
[0822]	ggttagacgt tccgcagaat ctagaatgcg gtatgcggta cattgttctt cgaacgtaaa	4440
[0823]	agttgcgctc cctgagatat tgtacatttt tgctttttaca agtacaagta catcgtacaa	4500
[0824]	ctatgtacta ctggtgatgc atccacaaca gtttgttttg tttttttttg tttttttttt	4560
[0825]	ttctaatagat tcattaccgc tatgtatacc tacttgtact tgtagtaagc cgggttattg	4620
[0826]	gcgttcaatt aatcatagac ttatgaatct gcacgggtgt cgctgcgagt tacttttagc	4680
[0827]	ttatgcatgc tacttgggtg taatattggg atctgttcgg aaatcaacgg atgctcaatc	4740
[0828]	gatttcgaca gtaattaatt aagtcataca caagtcagct ttcttcgagc ctcatataag	4800
[0829]	tataagtagt tcaacgtatt agcactgtac ccagcatctc cgtatcgaga aacacaacaa	4860
[0830]	catgccccat tggacagatc atgcgggatac acaggttggt cagtatcata catactcgat	4920
[0831]	cagacaggtc gtctgaccat catacaagct gaacaagcgc tccatacttg cacgctctct	4980
[0832]	atatacacag ttaaattaca tatccatagt ctaacctcta acagttaatc ttcttgtaag	5040
[0833]	cctcccagcc agccttctgg tatcgcttgg cctcctcaat aggatctcgg ttctggccgt	5100
[0834]	acagacctcg gccgacaatt atgatatccg ttccggtaga catgacatcc tcaacagttc	5160
[0835]	ggtactgctg tccgagagcg tctcccttgt cgtcaagacc caccgccggg gtcagaataa	5220
[0836]	gccagtcttc agagtcgccc ttaggtcgggt tctgggcaat gaagccaacc acaaaactcg	5280
[0837]	ggtcggatcg ggcaagctca atggctctgt tggagtactc gccagtggcc agagagccct	5340
[0838]	tgcaagacag ctcgccagc atgagcagac ctctggccag cttctcgttg ggagagggga	5400
[0839]	ctaggaactc cttgtactgg gagttctcgt agtcagagac gtctctcttc ttctgttcag	5460

[0840]	agacagtttc ctcggcacca gctcgcaggc cagcaatgat tccggttccg ggtacaccgt	5520
[0841]	gggcgttggt gatatcggac cactcggcga ttcggtgaca ccggtactgg tgcttgacag	5580
[0842]	tgttgccaat atctgcgaac tttctgtcct cgaacaggaa gaaaccgtgc ttaagagcaa	5640
[0843]	gttccttgag ggggagcaca gtgccggcgt aggtgaagtc gtcaatgatg tcgatatggg	5700
[0844]	ttttgatcat gcacacataa ggtccgacct tatcggcaag ctcaatgagc tccttggtgg	5760
[0845]	tggtaacatc cagagaagca cacagggttg ttttcttggc tgccacgagc ttgagcactc	5820
[0846]	gagcggcaaa ggcggacttg tggacgttag ctcgagcttc gtaggagggc attttggtgg	5880
[0847]	tgaaggagg actgaaataa atttagtctg cagaactttt tatcggaacc ttatctgggg	5940
[0848]	cagtgaagta tatgttatgg taatagttac gagttagtgt aacttataga tagactggac	6000
[0849]	tatacggcta tcggtccaaa ttagaaagaa cgtcaatggc tctctgggcg tcgcctttgc	6060
[0850]	cgacaaaaat gtgatcatga tgaaagccag caatgacgtt gcagctgata ttgttgctgg	6120
[0851]	ccaaccgcgc cgaaaacgca gctgtcagac ccacagcctc caacgaagaa tgtatcgtca	6180
[0852]	aagtgatcca agcacactca tagttggagt cgtactccaa aggcggcaat gacgagtcag	6240
[0853]	acagatactc gtcgacgttt aaaccatcat ctaagggcct caaaactacc tcggaactgc	6300
[0854]	tgcgctgatac tggacaccac agaggttccg agcactttag gttgcaccaa atgtcccacc	6360
[0855]	aggtgcaggc agaaaacgct ggaacagcgt gtacagtttg tcttaacaaa aagtgagggc	6420
[0856]	gctgaggctg agcagggtgg tgtgacttgt tatagccttt agagctgcga aagcgcgtat	6480
[0857]	ggatttggtc catcaggcca gattgagggt ctgtggacac atgtcatgtt agtgtacttc	6540
[0858]	aatcgcccc tggatatagc cccgacaata ggccgtggcc tcattttttt gccttccgca	6600
[0859]	catttccatt gctcggtagc cacaccttgc ttctctgca cttgccaacc ttaatactgg	6660
[0860]	tttacattga ccaacatctt acaagcgggg ggcttgctta gggtatatat aaacagtggc	6720
[0861]	tctcccaatc ggttgccagt ctcttttttc ctttctttcc ccacagattc gaaatctaaa	6780
[0862]	ctacacatca cac	6793
[0863]	<210> 20	
[0864]	<211> 19	
[0865]	<212> DNA	
[0866]	<213> 人工序列	
[0867]	<220>	
[0868]	<223> RGR正向PCR引物	
[0869]	<400> 20	
[0870]	cgagtcagac agatactcg	19
[0871]	<210> 21	
[0872]	<211> 19	
[0873]	<212> DNA	
[0874]	<213> 人工序列	
[0875]	<220>	
[0876]	<223> RGR反向PCR引物	
[0877]	<400> 21	
[0878]	ccctgtgttg aatccatcc	19
[0879]	<210> 22	
[0880]	<211> 20	
[0881]	<212> DNA	

[0882]	<213>	解脂耶氏酵母	
[0883]	<400>	22	
[0884]		ggaaggcaca tatggcaagg	20
[0885]	<210>	23	
[0886]	<211>	21	
[0887]	<212>	DNA	
[0888]	<213>	解脂耶氏酵母	
[0889]	<400>	23	
[0890]		gtaagagtgg ttgctccag g	21
[0891]	<210>	24	
[0892]	<211>	21	
[0893]	<212>	DNA	
[0894]	<213>	解脂耶氏酵母	
[0895]	<400>	24	
[0896]		gcacaggtat ttctgccctt c	21
[0897]	<210>	25	
[0898]	<211>	709	
[0899]	<212>	DNA	
[0900]	<213>	人工序列	
[0901]	<220>		
[0902]	<223>	RG表达盒	
[0903]	<400>	25	
[0904]		tcgacgttta aaccatcatc taagggcctc aaaactacct cggaactgct gcgctgatct	60
[0905]		ggacaccaca gaggttccga gcactttagg ttgcacaaaa tgtcccacca ggtgcaggca	120
[0906]		gaaaacgctg gaacagcgtg tacagtttgt cttaacaaaa agtgaggcg ctgaggtcga	180
[0907]		gcagggtggt gtgacttggt atagccttta gagctgcgaa agcgcgtatg gatttggtc	240
[0908]		atcaggccag attgagggtc tgtggacaca tgcatgtta gtgtacttca atcgccccct	300
[0909]		ggatatagcc ccgacaatag gccgtggcct catttttttg cttccgcac atttccattg	360
[0910]		ctcggtaccc acaccttget tctctgcac ttgccaacct taatactggt ttacattgac	420
[0911]		caacatctta caagcggggg gcttgtctag ggtatatata aacagtggct ctcccaatcg	480
[0912]		gttgccagtc tcttttttcc tttctttccc cacagattcg aaatctaaac tacacatcac	540
[0913]		accatggttt gactgatgag tccgtgagga cgaaacgagt aagctcgtct caaacgatta	600
[0914]		cccaccctcg ttttagagct agaaatagca agttaaaata aggctagtcc gttatcaact	660
[0915]		tgaaaaagtg gcaccgagtc ggtgcttttt ttttttgttt tttatgtct	709
[0916]	<210>	26	
[0917]	<211>	10	
[0918]	<212>	DNA	
[0919]	<213>	未知	
[0920]	<220>		
[0921]	<223>	聚-A	
[0922]	<400>	26	
[0923]		aaaaaaaaa	10

[0924]	<210>	27	
[0925]	<211>	10	
[0926]	<212>	DNA	
[0927]	<213>	未知	
[0928]	<220>		
[0929]	<223>	聚-T	
[0930]	<400>	27	
[0931]	tttttttttt		10
[0932]	<210>	28	
[0933]	<211>	100	
[0934]	<212>	DNA	
[0935]	<213>	人工序列	
[0936]	<220>		
[0937]	<223>	CAN1移码供体	
[0938]	<400>	28	
[0939]	ccttaacgac cctgccgtct ccatccatcc gaccacaatg gaaaagacat gactgaggcc	60	
[0940]	cacatccaca tcaaccacac ggcccactcg gatgactcag		100
[0941]	<210>	29	
[0942]	<211>	100	
[0943]	<212>	DNA	
[0944]	<213>	人工序列	
[0945]	<220>		
[0946]	<223>	CAN1移码供体互补序列	
[0947]	<400>	29	
[0948]	ctgagtcatc cgagtgggcc gtgtggttga tgtggatgtg ggcctcagtc atgtcttttc	60	
[0949]	cattgtggtc ggatggatgg agacggcagg gtcgttaagg		100
[0950]	<210>	30	
[0951]	<211>	106	
[0952]	<212>	DNA	
[0953]	<213>	人工序列	
[0954]	<220>		
[0955]	<223>	CAN1点突变供体	
[0956]	<400>	30	
[0957]	ccatccatcc gaccacaatg gaaaagacat tttcaaacga ttaccacccc tgatgaactg	60	
[0958]	aggcccacat ccacatcaac cacacggccc actcggatga ctcaga		106
[0959]	<210>	31	
[0960]	<211>	106	
[0961]	<212>	DNA	
[0962]	<213>	人工序列	
[0963]	<220>		
[0964]	<223>	CAN1点突变供体互补序列	
[0965]	<400>	31	

[0966]	tctgagtcac cccagtgaggc cgtgtgggtg atgtggatgt gggcctcagt tcatcagggt	60
[0967]	gggtaatcgt ttgaaaatgt cttttccatt gtggtcggat ggatgg	106
[0968]	<210> 32	
[0969]	<211> 655	
[0970]	<212> DNA	
[0971]	<213> 人工序列	
[0972]	<220>	
[0973]	<223> CAN1上游供体臂	
[0974]	<400> 32	
[0975]	gggaagcctt gctacgttag gagaagacgc acggcgatga tacgggtacc cctcatgaca	60
[0976]	tcaatatccg ctgcccctct tgccagcaag gcgtcagcag gtgctttttt cgctattttt	120
[0977]	accagaccac agcctttttt cttgtgtctc atcttggatt ccttcaaagg caactcaccg	180
[0978]	cacctccgag tcgtgtgaac aatgtaataa taggtattg acttttttcc cactgttta	240
[0979]	gcgccaacc caaagcgctt ttgccccca ctgcagcccg atggaaggca catatggcaa	300
[0980]	gggaaaagtc ttccagtaac acatgcctgc tgcaactata tgtactctga ctattccct	360
[0981]	cagacgtggg tcatagacag ctgttttaaa ccgggcaaata caatctctgt cgcacaggta	420
[0982]	tttctgcctt tcaaaaccag gttgccacat cagattccat caaagttttt cagactaact	480
[0983]	tcaatcttaa acggcatctc acaacaagcg aattggacgg aaaaaagcg tctatcatta	540
[0984]	ccggcaccta tccacactaa gacagtacta aaggacgacg ctccccacga aacgacgttt	600
[0985]	cgacctaac gacctgccc tctccatcca tccgacct cccgacgctc tctcc	655
[0986]	<210> 33	
[0987]	<211> 29	
[0988]	<212> DNA	
[0989]	<213> 人工序列	
[0990]	<220>	
[0991]	<223> 用于扩增CAN1上游供体臂的正向PCR引物	
[0992]	<400> 33	
[0993]	gggaagcctt ctacgttagg agaagacgc	29
[0994]	<210> 34	
[0995]	<211> 37	
[0996]	<212> DNA	
[0997]	<213> 人工序列	
[0998]	<220>	
[0999]	<223> 用于扩增CAN1上游供体臂的反向PCR引物	
[1000]	<400> 34	
[1001]	ggagagagcg tcgggagtgg tcggatggat ggagacg	37
[1002]	<210> 35	
[1003]	<211> 658	
[1004]	<212> DNA	
[1005]	<213> 人工序列	
[1006]	<220>	
[1007]	<223> CAN1下游供体臂	

[1008]	<400> 35	
[1009]	cgtctccatc catccgacca ctcccgcgc tctctcctgg agcaaaccac tcttaccaag	60
[1010]	catatagcat atataataac gtattgaatt tattaactga ttgaattgag agtaaagcca	120
[1011]	gtagcgttgt acggctgtag ctttttagaa aagtggcaga tgagcgatgg tggatatgaa	180
[1012]	agtaccttta cggcatgtag cgacacaaga tcgcttccaa gaactcgaca ttcaagccca	240
[1013]	gctcgtacaa gaaaatgaac tagccaatca tatgaactag cacattgaag tcaccgcatc	300
[1014]	atctctgttg gaaacgcgc gcatgtactc gtgcgtagta aatccgtatc tgtacactcg	360
[1015]	aaagattaca gtatgtagta gtagcatgac taacgatgta acgtccaaat aacgctctgt	420
[1016]	gcctactcct gtagatgcat tagaccacct gctaacgtct acacgttatg tccgttagct	480
[1017]	ccaagattgc acttttccct caaagactct gctgggttac gtcattgtct ctttcgggtc	540
[1018]	tctggtccgt tctctgcccg cccatatccg cccaggctgc tacgatacag gataagctca	600
[1019]	taagcttaga ttatttttcc ggaatgacat cacgatgcag tgggtggaagg atgtatgg	658
[1020]	<210> 36	
[1021]	<211> 37	
[1022]	<212> DNA	
[1023]	<213> 人工序列	
[1024]	<220>	
[1025]	<223> 用于扩增CAN1下游供体臂的正向PCR引物	
[1026]	<400> 36	
[1027]	cgtctccatc catccgacca ctcccgcgc tctctcc	37
[1028]	<210> 37	
[1029]	<211> 22	
[1030]	<212> DNA	
[1031]	<213> 人工序列	
[1032]	<220>	
[1033]	<223> 用于扩增CAN1下游供体臂的反向PCR引物	
[1034]	<400> 37	
[1035]	ccatacatcc ttccaccact gc	22
[1036]	<210> 38	
[1037]	<211> 1276	
[1038]	<212> DNA	
[1039]	<213> 人工序列	
[1040]	<220>	
[1041]	<223> CAN1大缺失供体	
[1042]	<400> 38	
[1043]	gggaagcctt gctacgttag gagaagacgc acggcgatga tacgggtacc cctcatgaca	60
[1044]	tcaatatccg ctgccctctt tgccagcaag gcgtcagcag gtgctttttt cgctattttt	120
[1045]	accagaccac agcctttttt cttgtgtctc atcttggatt ctttcaaagg caactcaccg	180
[1046]	cacctccgag tcgtgtgaac aatgtaataa taggctattg acttttttcc cacctgttta	240
[1047]	gcgccaacc caaagcgctt ttcgccccca ctgcagcccg atggaaggca catatggcaa	300
[1048]	gggaaaagtc ttcagtaaat acatgcctgc tgcaactata tgtactctga ctattccct	360
[1049]	cagacgtggg tcatagacag ctgtttttaa cggggcaaat caatctctgt cgcacaggta	420

[1050]	tttctgccct tcaaaaccag gttgccacat cagattccat caaagttttt cagactaact	480
[1051]	tcaatcttaa acggcatctc acaacaagcg aattggacgg aaaaaaagcg tctatcatta	540
[1052]	ccggcaccta tccacactaa gacagtacta aaggacgacg ctccccacga aacgacgttt	600
[1053]	cgaccttaac gaccctgccg tctccatcca tccgaccact cccgacgctc tctcctggag	660
[1054]	caaaccactc ttaccaagca tatagcatat ataataacgt attgaattta ttaactgatt	720
[1055]	gaattgagag taaagccagt agcgttgtag ggctgtagct ttttagaaaa gtggcagatg	780
[1056]	agcgatgggtg gatatgaaag tacctttacg gcatgtagcg acacaagatc gcttccaaga	840
[1057]	actcgacatt caagcccagc tcgtacaaga aaatgaacta gccaatcata tgaactagca	900
[1058]	cattgaagtc accgcatcat ctctgttggg aacgacgctc atgtactcgt gcgtagtaaa	960
[1059]	tccgtatctg tacactcgaa agattacagt atgtagtagt agcatgacta acgatgtaac	1020
[1060]	gtccaaataa cgctctgtgc ctactcctgt agatgcatta gaccacctgc taacgtctac	1080
[1061]	acgttatgtc cgttagctcc aagattgcac ttttccctca aagactctgc tgggttacgt	1140
[1062]	catggtctct ttcgggtctc tgggtccgtc tctgcccgcc catatccgcc caggctgcta	1200
[1063]	cgatacagga taagctcata agcttagatt atttttccgg aatgacatca cgatgcagtg	1260
[1064]	gtggaaggat gtatgg	1276
[1065]	<210> 39	
[1066]	<211> 31	
[1067]	<212> DNA	
[1068]	<213> 人工序列	
[1069]	<220>	
[1070]	<223> RG/RGR正向PCR引物	
[1071]	<400> 39	
[1072]	ggggttaatt aacgagtcag acagatactc g	31
[1073]	<210> 40	
[1074]	<211> 29	
[1075]	<212> DNA	
[1076]	<213> 人工序列	
[1077]	<220>	
[1078]	<223> RG/RGR反向PCR引物	
[1079]	<400> 40	
[1080]	ggggatcgat ccctgtgttg aatccatcc	29
[1081]	<210> 41	
[1082]	<211> 11568	
[1083]	<212> DNA	
[1084]	<213> 人工序列	
[1085]	<220>	
[1086]	<223> pRF84质粒	
[1087]	<400> 41	
[1088]	cgatccctgt gttgaatcca tccatcttgg attgccaatt gtgcacacag aaccgggcac	60
[1089]	tcacttcccc atccacactt gcggccgccc ccaagcttgt cccattcgcc atgccgaagc	120
[1090]	atgttgccca gccggcgcca gcgaggagcg tgggaccatg ccggccaaaa gcaccaccga	180
[1091]	ctcgggtgcca ctttttcaag ttgataacgg actagcctta ttttaacttg ctattttctag	240

[1092]	ctctaaaacg aggggtgggta atcgtttgag acgagcttac tcgtttcgtc ctcacggact	300
[1093]	catcagtcaa accatgggtgt gatgtgtagt ttagatttcg aatctgtggg gaaagaaagg	360
[1094]	aaaaaagaga ctggcaaccg attgggagag ccactgttta tatataccct agacaagccc	420
[1095]	cccgttgta agatgttggc caatgtaaac cagtattaag gttggcaagt gcaggagaag	480
[1096]	caaggtgtgg gtaccgagca atggaaatgt gcggaaggca aaaaaatgag gccacggcct	540
[1097]	attgtcgggg ctatatccag ggggcgattg aagtacacta acatgacatg tgtccacaga	600
[1098]	ccctcaatct ggctgatga gccaaatcca tacgcgttt cgcagctcta aaggctataa	660
[1099]	caagtcacac caccctgctc gacctcagcg ccctcacttt ttgttaagac aaactgtaca	720
[1100]	cgctgttcca gcgttttctg cctgcacctg gtgggacatt tgggtgaacc taaagtgtc	780
[1101]	ggaacctctg tgggtgtccag atcagcgcag cagttccgag gtagttttga ggcccttaga	840
[1102]	tgatggttta aacgtcgacg agtatctgtc tgactcgta attaagtcac acacaagtca	900
[1103]	gctttcttcg agcctcatat aagtataagt agttcaacgt attagcactg taccagcat	960
[1104]	ctccgtatcg agaaacacaa caacatgccc cattggacag atcatgcgga tacacaggtt	1020
[1105]	gtgcagtatc atacatactc gatcagacag gtcgtctgac catcatacaa gctgaacaag	1080
[1106]	cgctccatac ttgcacgctc tctatataca cagttaaatt acatatccat agtctaacct	1140
[1107]	ctaacagtta atctttctgt aagcctccca gccagccttc tggtatcgtc tggectctc	1200
[1108]	aataggatct cggttctggc cgtacagacc tcggccgaca attatgatat ccgttccggt	1260
[1109]	agacatgaca tcctcaacag ttcggctactg ctgtccgaga gcgtctccct tgctgtcaag	1320
[1110]	accaccccg ggggtcagaa taagccagtc ctacagatcg cccttaggtc ggttctgggc	1380
[1111]	aatgaagcca accaaaact cggggtcgga tcgggcaagc tcaatggtct gcttgagta	1440
[1112]	ctcgccagtg gccagagagc ctttgcaaga cagctcgcc agcatgagca gacctctggc	1500
[1113]	cagcttctcg ttgggagagg ggactaggaa ctcttctgtac tgggagttct cgtagtcaga	1560
[1114]	gacgtcctcc ttcttctgtt cagagacagt ttctctggca ccagctcgca ggccagcaat	1620
[1115]	gattccggtt ccgggtacac cgtgggcgtt ggtgatatcg gaccactcgg cgattcgggtg	1680
[1116]	acaccggtac tgggtgcttga cagtgttgcc aatatctgcg aactttctgt cctcgaacag	1740
[1117]	gaagaaaccg tgcttaagag caagttcctt gagggggagc acagtgccgg cgtaggtgaa	1800
[1118]	gtcgtcaatg atgtcgatat gggttttgat catgcacaca taaggtccga ccttatcggc	1860
[1119]	aagtcfaatg agctccttgg tgggtgtaac atccagagaa gcacacaggt tggttttctt	1920
[1120]	ggctgccacg agcttgagca ctcgagcggc aaaggcggac ttgtggacgt tagctcgagc	1980
[1121]	ttcgtaggag ggcatttttg tgggtgaagag gagactgaaa taaatttagt ctgcagaact	2040
[1122]	ttttatcgga acctatctg gggcagtgaa gtatatgtta tggtaatagt tacgagttag	2100
[1123]	ttgaacttat agatagactg gactatacgg ctatcggctc aaattagaaa gaacgtcaat	2160
[1124]	ggctctctgg gcgtcgctt tgccgacaaa aatgtgatca tgatgaaagc cagcaatgac	2220
[1125]	gttgacgtg atattgttgt cggccaaccg cgccgaaaac gcagctgtca gaccacagc	2280
[1126]	ctccaacgaa gaatgtatcg tcaaagtgat ccaagcacac tcatagttag agtcgtactc	2340
[1127]	caaaggcggc aatgacaggt cagacagata ctgcgcgacg tttaaaccat catctaaggg	2400
[1128]	cctcaaaact acctcggaac tgctgcgtg atctggacac cacagaggtt ccgagcactt	2460
[1129]	taggttgca ccaatgtccc accagtgca ggcagaaaac gctggaacag cgtgtacagt	2520
[1130]	ttgtcttaac aaaaagttag ggcgtgagg tcgagcaggg tgggtgtgact tgttatagcc	2580
[1131]	tttagagctg cgaaagcgcg tatggatttg gctcatcagg ccagattgag ggtctgtgga	2640
[1132]	cacatgtcat gttagtgtac ttcaatcgcc ccctggatat agccccgaca ataggccgtg	2700
[1133]	gcctcatttt ttgcttcc gcacatttcc attgtcggg acccacacct tgcttctcct	2760

[1134]	gcacttgcca accttaatac tggtttacat tgaccaacat cttacaagcg gggggcttgt	2820
[1135]	ctaggggtata tataaacagt ggctctccca atcgggtgcc agtctctttt ttcctttctt	2880
[1136]	tccccacaga ttcgaaatct aaactacaca tcacaccatg gacaagaaat actccatcgg	2940
[1137]	cctggacatt ggaaccaact ctgtcggctg ggctgtcatc accgacgagt acaaggtgcc	3000
[1138]	ctccaagaaa ttcaaggtcc tcggaaacac cgatcgacac tccatcaaga aaaacctcat	3060
[1139]	tggtgccctg ttgttcgatt ctggcgagac tgccgaagct accagactca agcgaactgc	3120
[1140]	tcggcgacgt tacacccgac ggaagaaccg aatctgtctac ctgcaggaga tcttttccaa	3180
[1141]	cgagatggcc aaggtggacg attcgttctt tcatcgactg gaggaatcct tctctgtcga	3240
[1142]	ggaagacaag aaacacgagc gtcatcccat ctttggaac attgtggacg aggttgctta	3300
[1143]	ccacgagaag tatcctacca tctaccacct gcgaaagaaa ctctctgatt ccaccgacaa	3360
[1144]	ggcggatctc agacttatct acctcgctct ggcacacatg atcaagtttc gaggtcattt	3420
[1145]	cctcatcgag ggcgatctca atccccacaa cagcgatgtg gacaagctgt tcattcagct	3480
[1146]	cgttcagacc tacaaccagc tgttcgagga aaacccccatc aatgcctccg gagtcgatgc	3540
[1147]	aaaggccatc ttgtctgtc gactctcgaa gagcagacga ctggagaacc tcattgcccc	3600
[1148]	acttcctggc gaaaaaaga acggactgtt tggcaacctc attgcccttt ctcttggtct	3660
[1149]	cacacccaac ttcaagtcca acttcgatct ggcggaggac gccaaagtcc agctgtccaa	3720
[1150]	ggacacctac gacgatgacc tcgacaacct gcttgcacag attggcgatc agtacgccga	3780
[1151]	cctgtttctc gctgccaaga acctttcgga tgctattctc ttgtctgaca ttctgcgagt	3840
[1152]	caacaccgag atcacaaagg ctcccccttc tgcctccatg atcaagcgat acgacgagca	3900
[1153]	ccatcaggat ctacactgc tcaaggtctt tgtccgacag caactgcccg agaagtacaa	3960
[1154]	ggagatcttt ttgatcagt cgaagaacgg ctacgttgga tacatcgacg gcggagcctc	4020
[1155]	tcaggaagag ttctacaagt tcatcaagcc aattctcgag aagatggacg gaaccgagga	4080
[1156]	actgcttgtc aagctcaatc gagaggatct gcttcggaag caacgaacct tcgacaacgg	4140
[1157]	cagcattcct catcagatcc acctcgggtga gctgcacgcc attcttcgac gtcaggaaga	4200
[1158]	cttctacccc tttctcaagg acaaccgaga gaagatcgag aagattctta ctttctgaat	4260
[1159]	cccctactat gttggtctc ttgccagagg aaactctcga tttgcttgga tgactcgaaa	4320
[1160]	gtccgaggaa accatcactc cctggaactt cgaggaagtc gtggacaagg gtgcctctgc	4380
[1161]	acagtccttc atcgagcgaa tgaccaactt cgacaagaat ctgcccacg agaaggttct	4440
[1162]	tcccaagcat tcgtgtctt acgagtactt tacagtctac aacgaactca ccaagtcaa	4500
[1163]	gtacgttacc gagggaatgc gaaagcctgc cttcttgtct ggcgacaga agaaagccat	4560
[1164]	tgctgatctc ctgttcaaga ccaaccgaaa ggtcactgtt aagcagctca aggaggacta	4620
[1165]	cttcaagaaa atcgagtgtt tcgacagcgt cgagatttcc ggagttgagg accgattcaa	4680
[1166]	cgctcttttg ggcacctatc acgatctgct caagattatc aaggacaagg attttctcga	4740
[1167]	caacgaggaa aacgaggaca ttctggagga catcgtgtc actcttacct tgttcgaaga	4800
[1168]	tcgggagatg atcgaggaa gactcaagac atacgtcac ctgttcgacg acaaggtcat	4860
[1169]	gaaacaactc aagcgacgta gatacccggt ctggggaaga ctttcgcaa agctcatcaa	4920
[1170]	cggcatcaga gacaagcagt ccggaagac cattctggac tttctcaagt ccgatggctt	4980
[1171]	tgccaaccga aacttcatgc agctatttca cgacgattct cttaccttca aggaggacat	5040
[1172]	ccagaaggca caagtgtccg gtcaggcgca cagcttgac gaacatattg ccaacctggc	5100
[1173]	tggttcgcca gccatcaaga aaggcattct ccagactgtc aaggttgctg acgagctggt	5160
[1174]	gaaggtcatg ggacgtcaca agcccagaaa cattgtgatc gagatggcca gagagaacca	5220
[1175]	gacaactcaa aagggtcaga aaaactcgcg agagcggatg aagcgaatcg aggaaggcat	5280

[1176]	caaggagctg	ggatcccaga	ttctcaagga	gcatcccgtc	gagaacactc	aactgcagaa	5340
[1177]	cgagaagctg	tatctctact	atctgcagaa	tggtcgagac	atgtacgtgg	atcaggaact	5400
[1178]	ggacatcaat	cgtctcagcg	actacgatgt	ggaccacatt	gtccctcaat	cctttctcaa	5460
[1179]	ggacgattct	atcgacaaca	aggtccctac	acgatccgac	aagaacagag	gcaagtcgga	5520
[1180]	caacgttccc	agcgaagagg	tggtcaaaaa	gatgaagaac	tactggcgac	agctgctcaa	5580
[1181]	cgccaagctc	attacccagc	gaaagttcga	caatcttacc	aaggccgagc	gaggcggctt	5640
[1182]	gtccgagctc	gacaaggctg	gcttcatcaa	gcgtcaactc	gtcgagacca	gacagatcac	5700
[1183]	aaagcacgtc	gcacagattc	tcgattctcg	gatgaacacc	aagtacgacg	agaacgacaa	5760
[1184]	gctcatccga	gaggtcaagg	tgattactct	caagtccaaa	ctggctctccg	atttccgaaa	5820
[1185]	ggactttcag	ttctacaagg	tgcgagagat	caacaattac	caccatgccc	acgatgctta	5880
[1186]	cctcaacgcc	gtcgttggca	ctgcgctcat	caagaaatac	cccaagctcg	aaagcgagtt	5940
[1187]	cgtttacggc	gattacaagg	tctacgacgt	tcgaaagatg	attgccaaagt	ccgaacagga	6000
[1188]	gattggcaag	gctactgcca	agtacttctt	ttactccaac	atcatgaact	ttttcaagac	6060
[1189]	cgagatcacc	ttggccaacg	gagagattcg	aaagagacca	cttatcgaga	ccaacggcga	6120
[1190]	aactggagag	atcgtgtggg	acaagggtcg	agacttttga	accgtgcgaa	aggttctgtc	6180
[1191]	gatgcctcag	gtcaacatcg	tcaagaaaac	cgaggttcag	actggcggat	tctccaagga	6240
[1192]	gtcgattctg	cccaagcgaa	actccgacaa	gctcatcgct	cgaaagaaag	actgggatcc	6300
[1193]	caagaaatac	ggtggcttcg	attctcctac	cgtcgcctat	tccgtgcttg	tcgttgcgaa	6360
[1194]	ggtcgagaag	ggcaagtcca	aaaagctcaa	gtccgtcaag	gagctgctcg	gaattacat	6420
[1195]	catggagcga	tcgagcttcg	agaagaatcc	catcgacttc	ttggaagcca	agggttacaa	6480
[1196]	ggaggtcaag	aaagacctca	ttatcaagct	gccaagtac	tctctgttcg	aactggagaa	6540
[1197]	cggtcgaaag	cgtatgctcg	cctccgctgg	cgagctgcag	aagggaacg	agcttgctt	6600
[1198]	gccttcgaag	tacgtcaact	ttctctatct	ggcttctcac	tacgagaagc	tcaagggttc	6660
[1199]	tcccaggagc	aacgaacaga	agcaactctt	cgttgagcag	cacaaacatt	acctcgacga	6720
[1200]	gattatcgag	cagatttccg	agttttcgaa	gcgagtcac	ctggctgatg	ccaacttgga	6780
[1201]	caaggtgctc	tctgcctaca	acaagcatcg	ggacaaaccc	attcgagaac	aggcggagaa	6840
[1202]	catcattcac	ctgtttactc	ttaccaacct	gggtgctcct	gcagctttca	agtacttcga	6900
[1203]	taccactatc	gaccgaaagc	ggtacacatc	caccaaggag	gttctcgatg	ccaccctgat	6960
[1204]	tcaccagtcc	atcactggcc	tgtacgagac	ccgaatcgac	ctgtctcagc	ttgggtggcga	7020
[1205]	ctccagagcc	gatcccaaga	aaaagcgaaa	ggtctaagcg	gccgcaagtg	tggtatgggga	7080
[1206]	agtgagtgcc	cggttctgtg	tgcacaattg	gcaatccaag	atggatggat	tcaacacagg	7140
[1207]	gatatagcga	gctacgtggg	ggtgcgagga	tatagcaacg	gatatttatg	tttgacactt	7200
[1208]	gagaatgtac	gatacaagca	ctgtccaagt	acaatactaa	acatactgta	catactcata	7260
[1209]	ctcgtaccgg	ggcaacgggt	tcacttgagt	gcagtggcta	gtgctcttac	tcgtacagtg	7320
[1210]	tgcaatactg	cgtatcatag	tctttgatgt	atatcgtatt	cattcatggt	agttgcgtac	7380
[1211]	gagccggaag	cataaagtgt	aaagcctggg	gtgcctaagt	agtgagctaa	ctcacattaa	7440
[1212]	ttgcgttgcg	ctcactgccc	gctttccagt	cgggaaacct	gtcgtgccag	ctgcattaat	7500
[1213]	gaatcggcc	acgcgcgggg	agaggcggtt	tgcgtattgg	gcgctcttcc	gcttctctgc	7560
[1214]	tcactgactc	gctgcgctcg	gtcgttcggc	tgcggcgagc	ggtatcagct	cactcaaagg	7620
[1215]	cggtaatacg	gttatccaca	gaatcagggg	ataacgcagg	aaagaacatg	tgagcaaaag	7680
[1216]	gccagcaaaa	ggccaggaac	cgtaaaaagg	ccgcgttgct	ggcgtttttc	cataggctcc	7740
[1217]	gccccctga	cgagcatcac	aaaaatcgac	gctcaagtca	gaggtggcga	aaccgcacag	7800

[1218]	gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga	7860
[1219]	ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg gcgctttctc	7920
[1220]	atagctcagc ctgtaggtat ctgagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg	7980
[1221]	tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttata cggtaactat cgtcttgagt	8040
[1222]	ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca	8100
[1223]	gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca	8160
[1224]	ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag	8220
[1225]	ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggtttt ttgttttgca	8280
[1226]	agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg	8340
[1227]	ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat ttgtgtcatg agattatcaa	8400
[1228]	aaaggatctt cacctagatc cttttaaat aaanaatgaag ttttaaatca atctaaagta	8460
[1229]	tatatgagta aacttggctc gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag	8520
[1230]	cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag ataactacga	8580
[1231]	tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac	8640
[1232]	cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggtc	8700
[1233]	ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct agagtaagta	8760
[1234]	gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc gtggtgtcac	8820
[1235]	gctcgtcgtt tggtaggtc tcattcagct ccggttccca acgatcaagg cgagttacat	8880
[1236]	gatcccccat gttgtgcaaa aaagcggtta gtccttcggt tcctccgacg gttgtcagaa	8940
[1237]	gtaagttggc cgcagtgtta tcaactcatg ttatggcagc actgcataat tctcttactg	9000
[1238]	tcagccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag tcattctgag	9060
[1239]	aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc aatacgggat aataccgcgc	9120
[1240]	cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg cgaaaactct	9180
[1241]	caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat	9240
[1242]	cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaatg	9300
[1243]	ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatgttgaat actcatactc ttcctttttc	9360
[1244]	aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata tttgaatgta	9420
[1245]	tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagt ccacctgacg	9480
[1246]	cgccctgtag cggcgcatta agcgcggcgg gtgtggtggt tacgcgcagc gtgaccgcta	9540
[1247]	cacttgccag cgccctagcg cccgctcctt tcgctttctt cccttccttt ctcgccacgt	9600
[1248]	tcgccggctt tccccgtcaa gctctaaatc gggggctccc tttagggttc cgatttagtg	9660
[1249]	ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg attagggtga tggttcacgt agtgggcat	9720
[1250]	cgccctgata gacggttttt cgccctttga cgttggagtc cacgttcttt aatagtggac	9780
[1251]	tcttgttcca aactggaaca aactcaacc ctatctcggt ctattctttt gatttataag	9840
[1252]	ggattttgcc gatttcggcc tatttggtta aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg	9900
[1253]	cgaattttta caaaatatta acgcttaca tttccattcg ccattcaggc tgcgcaactg	9960
[1254]	ttgggaaggc cgatcgggtc gggcctcttc gctattacgc cagctggcga aagggggatg	10020
[1255]	tgctgcaagg cgattaagtt gggtaacgcc agggttttcc cagtcacgac gttgtaaaac	10080
[1256]	gacggccagt gaattgtaat acgactcact atagggcgaa ttgggtaccg ggccccccct	10140
[1257]	cgaggtcgat ggtgtcgata agcttgatat cgaattcatg tcacacaaac cgatcttcgc	10200
[1258]	ctcaaggaaa cctaattcta catccgagag actgccgaga tccagtctac actgattaat	10260
[1259]	tttcgggcca ataatttaaa aaaatcgtgt tatataatat tatatgtatt atatatatac	10320

[1260]	atcatgatga tactgacagt catgtcccat tgctaaatag acagactcca tctgccgcct	10380
[1261]	ccaactgatg ttctcaatat ttaaggggtc atctcgcatg gtttaataat aaacagactc	10440
[1262]	catctaccgc ctccaaatga tgtttctcaa atatattgta tgaacttatt tttattactt	10500
[1263]	agtattatta gacaacttac ttgctttatg aaaaacactt cctatttagg aaacaattta	10560
[1264]	taatggcagt tcgttcattt aacaatttat gtagaataaa tgttataaat gcgtatggga	10620
[1265]	aatcttaaat atggatagca taaatgatat ctgcattgcc taattcgaaa tcaacagcaa	10680
[1266]	cgaaaaaaat cccttgtaga acataaatag tcatcgagaa atatcaacta tcaaagaaca	10740
[1267]	gctattcaca cgttactatt gagattatta ttggacgaga atcacacact caactgtctt	10800
[1268]	tctctcttct agaaatacag gtacaagtat gtactattct cattgttcat acttctagtc	10860
[1269]	atttcatccc acatattcct tggatttctc tccaatgaat gacattctat cttgcaaatt	10920
[1270]	caacaattat aataagatat accaaagtag cggatatagtg gcaatcaaaa agcttctctg	10980
[1271]	gtgtgcttct cgtattttatt tttattctaa tgatccatta aaggtatata tttatttctt	11040
[1272]	gttatataat ctttttgttt attacatggg ctggatacat aaaggtattt tgatttaatt	11100
[1273]	ttttgcttaa attcaatccc ccctcgttca gtgtcaactg taatggtagg aaattacat	11160
[1274]	acttttgaag aagcaaaaaa aatgaaagaa aaaaaaatc gtatttccag gtagacgtt	11220
[1275]	ccgcagaatc tagaatcggg tatgcggtac attgtttctc gaacgtaaaa gttgcgctcc	11280
[1276]	ctgagatatt gtacattttt gcttttacia gtacaagtac atcgtacaac tatgtactac	11340
[1277]	tgttgatgca tccacaacag tttgttttgt ttttttttgt tttttttttt tctaatgatt	11400
[1278]	cattaccgct atgtatacct acttgtactt gtagtaagcc gggttattgg cgttcaatta	11460
[1279]	atcatagact tatgaatctg cacggtgtgc gctgcgagtt acttttagct tatgcatgct	11520
[1280]	acttgggtgt aatattggga tctgttcgga aatcaacgga tgctcaat	11568
[1281]	<210> 42	
[1282]	<211> 11507	
[1283]	<212> DNA	
[1284]	<213> 人工序列	
[1285]	<220>	
[1286]	<223> pRF85质粒	
[1287]	<400> 42	
[1288]	cgatccctgt gttgaatcca tccatcttgg attgccaat gtgcacacag aaccgggcac	60
[1289]	tcacttcccc atccacactt gcggccgcag acataaaaaa caaaaaaaa aagcaccgac	120
[1290]	tcggtgccac tttttcaagt tgataacgga ctagccttat tttaacttgc tattttctagc	180
[1291]	tctaaaacga ggggtgggtaa tcgtttgaga cgagcttact cgtttcgtcc tcacggactc	240
[1292]	atcagtcaaa ccatggtgtg atgtgtagtt tagatttcca atctgtgggg aaagaaagga	300
[1293]	aaaaagagac tggcaaccga ttgggagagc cactgtttat atatacccta gacaagcccc	360
[1294]	ccgcttgtaa gatgttggtc aatgtaaacc agtattaagg ttggcaagt caggagaagc	420
[1295]	aagggtgtggg taccgagcaa tggaaatgtg cggaaggcaa aaaaatgagg ccacggccta	480
[1296]	ttgtcggggc tatatccagg gggcgattga agtacactaa catgacatgt gtccacagac	540
[1297]	cctcaatctg gcctgatgag ccaaatccat acgcgcttcc gcagctctaa aggcataaac	600
[1298]	aagtcacacc accctgctcg acctcagcgc cctcactttt tgtaagaca aactgtacac	660
[1299]	gctgttccag cgttttctgc ctgcacctgg tgggacattt ggtgcaacct aaagtgtctg	720
[1300]	gaacctctgt ggtgtccaga tcagcgcagc agttccgagg tagttttgag gcccttagat	780
[1301]	gatgggttaa acgtcgacga gtatctgtct gactcgttaa ttaagtcata cacaagtcag	840

[1302]	ctttcttcga gcctcatata agtataagta gttcaacgta ttagcactgt acccagcatc	900
[1303]	tccgtatcga gaaacacaac aacatgcccc attggacaga tcatgcggat acacaggttg	960
[1304]	tgcagtatca tacatactcg atcagacagg tcgtctgacc atcatacaag ctgaacaagc	1020
[1305]	gctccatact tgcacgctct ctatatacac agttaaatta catatccata gtctaacctc	1080
[1306]	taacagttaa tcttctggta agcctcccag ccagccttct ggtatcgctt ggcctcctca	1140
[1307]	ataggatctc ggttctggcc gtacagacct cggccgacaa ttatgatatc cgttccggta	1200
[1308]	gacatgacat cctcaacagt tcgggtactgc tgtccgagag cgtctccctt gtctcaaga	1260
[1309]	cccaccccg gggtcagaat aagccagtc tcagagtcgc ccttaggtcg gttctgggca	1320
[1310]	atgaagccaa ccacaaactc ggggtcggat cgggcaagct caatggtctg cttggagtac	1380
[1311]	tcgccagtgg ccagagagcc cttgcaagac agctcggcca gcatgagcag acctctggcc	1440
[1312]	agcttctcgt tgggagagg gactaggaac tccttgtagt gggagtctc gtagtcagag	1500
[1313]	acgtcctcct tcttctgttc agagacagtt tctcggcac cagctcgcag gccagcaatg	1560
[1314]	attccggttc cgggtacacc gtggcgcttg gtgatatcgg accactcggc gattcggtag	1620
[1315]	caccggtact ggtgcttgac agtggtgcca atatctgcga actttctgtc ctgaacagg	1680
[1316]	aagaaaccgt gcttaagagc aagttccttg agggggagca cagtgccggc gtaggtgaag	1740
[1317]	tcgtcaatga tgtcgatatg ggttttgatc atgcacacat aaggtccgac cttatcggca	1800
[1318]	agctcaatga gctccttggg ggtggttaaca tccagagaag cacacaggtt ggttttcttg	1860
[1319]	gctgccacga gcttgagcac tcgagcggca aaggcggact tgtggacgtt agctcgagct	1920
[1320]	tcgtaggagg gcattttggt ggtgaagagg agactgaaat aaatttagtc tgcagaactt	1980
[1321]	tttatcggaa cttatcttgg ggcagtgaag tatatgttat ggtaatagtt acgagttagt	2040
[1322]	tgaacttata gatagactgg actatacggc tatcgggtcca aattagaaag aacgtcaatg	2100
[1323]	gctctctggg cgtcgctttt gccgacaaaa atgtgatcat gatgaaagcc agcaatgacg	2160
[1324]	ttgcagctga tattgtgtgc ggccaaccgc gccgaaaacg cagctgtcag acccacagcc	2220
[1325]	tccaacgaag aatgtatcgt caaagtgatc caagcacact catagttaga gtcgtactcc	2280
[1326]	aaaggcggca atgacgagtc agacagatac tcgtcgacgt ttaaaccatc atctaagggc	2340
[1327]	ctcaaaacta cctcggaaact gctgcgctga tctggacacc acagaggttc cgagcacttt	2400
[1328]	aggttgacc aaatgtccca ccaggtgcag gcagaaaacg ctggaacagc gtgtacagtt	2460
[1329]	tgtcttaaca aaaagtgagg gcgctgaggt cgagcagggt ggtgtgactt gttatagcct	2520
[1330]	ttagagctgc gaaagcgcgt atggatttgg ctcatcaggc cagattgagg gtctgtggac	2580
[1331]	acatgtcatg ttagtgtact tcaatcgccc cctggatata gccccgacaa taggccgtgg	2640
[1332]	cctcatTTTT ttgccttcg cacatttcca ttgctcggta cccacacctt gcttctcctg	2700
[1333]	cacttgccaa ccttaatact ggtttacatt gaccaacatc ttacaagcgg ggggcttgtc	2760
[1334]	taggttatat ataaacagtg gctctcccaa tcggttgcca gtctcttttt tcttttcttt	2820
[1335]	ccccacagat tcgaaatcta aactacacat cacaccatgg acaagaaata ctccatcggc	2880
[1336]	ctggacattg gaaccaactc tgtcggcttg gctgtcatca ccgacgagta caaggtgccc	2940
[1337]	tccaagaaat tcaaggtcct cggaacacc gatcgacact ccatcaagaa aaacctcatt	3000
[1338]	ggtgccctgt tgttcgattc tggcgagact gccgaagcta ccagactcaa gcgaactgct	3060
[1339]	cggcgacgtt acaccgacg gaagaaccga atctgctacc tgcaggagat cttttccaac	3120
[1340]	gagatggcca aggtggacga ttcgttcttt catcgactgg aggaatcctt cctcgtcgag	3180
[1341]	gaagacaaga aacacgagcg tcatcccatc tttggcaaca ttgtggacga ggttgcttac	3240
[1342]	cacgagaagt atcctaccat ctaccacctg cgaaagaaac tcgtcgattc caccgacaag	3300
[1343]	gcggatctca gacttatcta cctcgtctctg gcacacatga tcaagtttcg aggtcatttc	3360

[1344]	ctcatcgagg gcgatctcaa tcccgacaac agcgatgtgg acaagctggt cattcagctc	3420
[1345]	gttcagacct acaaccagct gttcgaggaa aaccccatca atgcctccgg agtcgatgca	3480
[1346]	aaggccatct tgtctgctcg actctcgaag agcagacgac tggagaacct cattgccc aa	3540
[1347]	cttcctggcg agaaaaagaa cggactgttt ggcaacctca ttgccctttc tcttggtctc	3600
[1348]	acaccaact tcaagtccaa cttcgatctg gcggaggacg ccaagctcca gctgtccaag	3660
[1349]	gacacctacg acgatgacct cgacaacctg cttgcacaga ttggcgatca gtacgccgac	3720
[1350]	ctgtttctcg ctgccaagaa cttttcggat gctattctct tgtctgacat tctgcgagtc	3780
[1351]	aacaccgaga tcacaaaggc tcccctttct gcctccatga tcaagcgata cgacgagcac	3840
[1352]	catcaggatc tcacactgct caaggctctt gtccgacagc aactgcccga gaagtacaag	3900
[1353]	gagatctttt tcgatcagtc gaagaacggc tacgctggat acatcgacgg cggagcctct	3960
[1354]	caggaagagt tctacaagtt catcaagcca attctcgaga agatggacgg aaccgaggaa	4020
[1355]	ctgcttgtea agtcaatcg agaggatctg cttcggaagc aacgaacctt cgacaacggc	4080
[1356]	agcattcttc atcagatcca cctcggtag ctgcacgcca ttcttcgacg tcaggaagac	4140
[1357]	ttctaccctt ttctcaagga caaccgagag aagatcgaga agattcttac ctttcgaatc	4200
[1358]	ccctactatg ttggtcctct tgccagagga aactctcgat ttgcttggtat gactcgaaag	4260
[1359]	tccgagga aa ccatcactcc ctggaacttc gaggaagtgc tggacaaggg tgctctgca	4320
[1360]	cagtccttca tcgagcgaat gaccaacttc gacaagaatc tgcccaacga gaaggttctt	4380
[1361]	cccaagcatt cgctgctcta cgagtacttt acagtctaca acgaactcac caaagtcaag	4440
[1362]	tacgttaccc agggaatgcg aaagcctgcc ttcttgctcg gcgaacagaa gaaagccatt	4500
[1363]	gtcgatctcc gtgtcaagac caaccgaaag gtactgtta agcagctcaa ggaggactac	4560
[1364]	ttcaagaaaa tcgagtgttt cgacagcgtc gagatttccg gagttgagga ccgattcaac	4620
[1365]	gcctctttgg gcacctatca cgatctgctc aagattatca aggacaagga ttttctcgac	4680
[1366]	aacgaggaaa acgaggacat tctggaggac atcgtgctca ctcttaccct gttcgaagat	4740
[1367]	cgggagatga tcgaggaacg actcaagaca tacgctcacc tgttcgacga caaggtcatg	4800
[1368]	aaacaactca agcgacgtag atacaccggc tggggaagac tttcgcgaaa gctcatcaac	4860
[1369]	ggcatcagag acaagcagtc cggaagacc attctggact ttctcaagtc cgatggcttt	4920
[1370]	gccaaaccgaa acttcatgca gctcattcac gacgattctc ttaccttcaa ggaggacatc	4980
[1371]	cagaaggcac aagtgtccgg tcagggcgac agcttgacag aacatattgc caacctggct	5040
[1372]	ggttcgccag ccatcaagaa aggcattctc cagactgtca aggttgctga cgagctggtg	5100
[1373]	aaggtcatgg gacgtcacia gcccgagaac attgtgatcg agatggccag agagaaccag	5160
[1374]	acaactcaaa agggtcagaa aaactcgcga gagcggatga agcgaatcga ggaaggcatc	5220
[1375]	aaggagctgg gatcccagat tctcaaggag catcccgtcg agaactca actgcagaac	5280
[1376]	gagaagctgt atctctacta tctgcagaat ggtcgagaca tgtacgtgga tcaggaactg	5340
[1377]	gacatcaatc gtctcagcga ctacgatgtg gaccacattg tccctcaatc ctttctcaag	5400
[1378]	gacgattcta tcgacaacaa ggtccttaca cgatccgaca agaacagagg caagtcggac	5460
[1379]	aacgttccca gcgaagaggt ggtcaaaaag atgaagaact actggcgaca gctgctcaac	5520
[1380]	gccaaactca ttaccagcg aaagttcgac aatcttacc aaggccgagcg aggcggtctg	5580
[1381]	tccgagctcg acaaggctgg cttcatcaag cgtcaactcg tcgagaccag acagatcaca	5640
[1382]	aagcacgtcg cacagattct cgattctcgg atgaacacca agtacgacga gaacgacaag	5700
[1383]	ctcatccgag aggtcaaggt gattactctc aagtccaaac tggctctccga tttccgaaag	5760
[1384]	gactttcagt tctacaaggt gcgagagatc aacaattacc accatgcccc cgatgcttac	5820
[1385]	ctcaacgccg tcgttggcac tgcgtcatc aagaaatacc ccaagctcga aagcgagttc	5880

[1386]	gtttacggcg attacaaggt ctacgacgtt cgaaagatga ttgccaagtc cgaacaggag	5940
[1387]	attggcaagg ctactgccaa gtacttcttt tactccaaca tcatgaactt tttcaagacc	6000
[1388]	gagatcacct tggccaacgg agagattcga aagagaccac ttatcgagac caacggcgaa	6060
[1389]	actggagaga tcgtgtggga caagggtcga gactttgcaa ccgtgcgaaa ggttctgtcg	6120
[1390]	atgcctcagg tcaacatcgt caagaaaacc gaggttcaga ctggcggatt ctccaaggag	6180
[1391]	tcgattctgc ccaagcgaaa ctccgacaag ctcatcgctc gaaagaaaga ctgggatccc	6240
[1392]	aagaaatacg gtggcttcca ttctctacc gtgcctatt ccgtgcttgt cgttgcgaag	6300
[1393]	gtcgagaagg gcaagtccaa aaagctcaag tccgtcaagg agctgctcgg aattaccatc	6360
[1394]	atggagcgat cgagcttcca gaagaatccc atcgacttct tggaagccaa gggttacaag	6420
[1395]	gaggtcaaga aagacctcat tatcaagctg cccaagtact ctctgttcga actggagaac	6480
[1396]	ggtcgaaaagc gtatgtctgc ctccgctggc gagctgcaga agggaaacga gcttgccttg	6540
[1397]	ccttcgaagt acgtcaactt tctctatctg gcttctcact acgagaagct caagggttct	6600
[1398]	cccaggaca acgaacagaa gcaactcttc gttgagcagc acaaacatta cctcgacgag	6660
[1399]	attatcgagc agatttccga gttttcgaag cgagtcatcc tggctgatgc caacttggac	6720
[1400]	aagtgctct ctgcctacaa caagcatcgg gacaaacca ttcgagaaca ggcggagaac	6780
[1401]	atcattcacc tgtttactct taccaacctg ggtgctcctg cagctttcaa gtacttcgat	6840
[1402]	accactatcg accgaaagcg gtacacatcc accaaggagg ttctcgatgc caccctgatt	6900
[1403]	caccagtcca tctctggcct gtacgagacc cgaatcgacc tgtctcagct tgggtggcgac	6960
[1404]	tccagagccg atcccaagaa aaagcgaaag gtctaagcgg ccgcaagtgt ggatggggaa	7020
[1405]	gtgagtgcgc ggttctgtgt gcacaattgg caatccaaga tgatggatt caacacaggg	7080
[1406]	atatacgag ctactgtgtg gtgcgaggat atagcaacgg atatttatgt ttgacacttg	7140
[1407]	agaatgtacg atacaagcac tgtccaagta caatactaaa catactgtac atactcatac	7200
[1408]	tcgtaccgag gcaacggttt cacttgagtg cagtggctag tgctcttact cgtacagtgt	7260
[1409]	gcaatactgc gtatcatagt ctttgatgta tatcgtattc attcatgtta gttgcgtacg	7320
[1410]	agccggaagc ataaagtgtg aagcctgggg tgcctaatga gtgagctaac tcacattaat	7380
[1411]	tgcgttgcgc tctactgccg ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg	7440
[1412]	aatcggccaa cgcgcgggga gaggcggttt gcgtattggg cgctcttcg cttcctcgt	7500
[1413]	cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct gcgcgagcgt gtatcagctc actcaaaggc	7560
[1414]	ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg	7620
[1415]	ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg	7680
[1416]	ccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg	7740
[1417]	actataaaga taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac	7800
[1418]	cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca	7860
[1419]	tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg ttaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt	7920
[1420]	gcacgaaccc ccggttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc	7980
[1421]	caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag	8040
[1422]	agcgaggtat gtaggcgggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac	8100
[1423]	tagaaggaca gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt	8160
[1424]	tggtagctct tgatccgga aacaaaccac cgctggtagc ggtgggtttt ttgtttgcaa	8220
[1425]	gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg	8280
[1426]	gtctgacgct cagtggaaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga gattatcaaa	8340
[1427]	aaggatcttc acctagatcc ttttaaatca aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat	8400

[1428]	atatgagtaa	acttggctctg	acagttacca	atgcttaatc	agtgaggcac	ctatctcagc	8460
[1429]	gatctgtcta	tttcgttcat	ccatagttgc	ctgactcccc	gtcgtgtaga	taactacgat	8520
[1430]	acgggagggc	ttaccatctg	gccccagtgc	tgcaatgata	ccgcgagacc	cacgctcacc	8580
[1431]	ggctccagat	ttatcagcaa	taaaccagcc	agccggaagg	gccgagcgca	gaagtgggcc	8640
[1432]	tgcaacttta	tccgcctcca	tccagtctat	taattgttgc	cgggaagcta	gagtaagtag	8700
[1433]	ttcgccagtt	aatagtttgc	gcaacgttgt	tgccattgct	acaggcatcg	tggtgtcacg	8760
[1434]	ctcgtcgttt	ggatgtgctt	cattcagctc	cggttcccaa	cgatcaaggc	gagttacatg	8820
[1435]	atcccccatg	ttgtgcaaaa	aagcggtag	ctccttcggt	cctccgatcg	ttgtcagaag	8880
[1436]	taagtgggcc	gcagtgttat	cactcatggt	tatggcagca	ctgcataatt	ctcttactgt	8940
[1437]	catgccatcc	gtaagatgct	tttctgtgac	tggtgagtac	tcaaccaagt	cattctgaga	9000
[1438]	atagtgtatg	cggcgaccga	gttgcctctg	cccggcgta	atacgggata	ataccgcgcc	9060
[1439]	acatagcaga	actttaaaag	tgctcatcat	tggaaaacgt	tcttcggggc	gaaaactctc	9120
[1440]	aaggatctta	ccgctgttga	gatccagttc	gatgtaaccc	actcgtgcac	ccaactgatc	9180
[1441]	ttcagcatct	tttactttca	ccagcgtttc	tgggtgagca	aaaacaggaa	ggcaaaatgc	9240
[1442]	cgcaaaaaag	ggaataaggg	cgacacggaa	atgttgaaata	ctcatactct	tcctttttca	9300
[1443]	atattattga	agcatttata	agggttattg	tctcatgagc	ggatacatat	ttgaatgtat	9360
[1444]	ttagaaaaat	aaacaaatag	gggttccgcg	cacatttccc	cgaaaagtgc	cacctgacgc	9420
[1445]	gccctgtagc	ggcgcatata	gcgcggcggg	tgtggtggtt	acgcgcagcg	tgaccgctac	9480
[1446]	acttgccagc	gccctagcgc	ccgctccttt	cgctttcttc	ccttcctttc	tcgccacgtt	9540
[1447]	cgccggcttt	ccccgtcaag	ctctaaatcg	ggggctccct	ttagggttcc	gatttagtgc	9600
[1448]	tttacggcac	ctcgacccca	aaaaacttga	ttaggggtgat	ggttcacgta	gtgggccatc	9660
[1449]	gccctgatag	acggtttttc	gccctttgac	gttggagtcc	acgttcttta	atagtggact	9720
[1450]	cttgttccaa	actggaacaa	cactcaaccc	tatctcggtc	tattcttttg	atttataagg	9780
[1451]	gattttgccg	atttcggcct	attgggttaa	aaatgagctg	atttaacaaa	aatttaacgc	9840
[1452]	gaattttaac	aaaatattaa	cgtttacaat	ttccattcgc	cattcaggct	gcgcaactgt	9900
[1453]	tgggaagggc	gatcggtgcg	ggcctctctg	ctattacgcc	agctggcgaa	agggggatgt	9960
[1454]	gctgcaaggc	gattaagttg	ggtaacgcca	gggttttccc	agtcacgacg	ttgtaaaacg	10020
[1455]	acggccagtg	aattgtaata	cgactcacta	tagggcgaaat	tgggtaccgg	gccccccctc	10080
[1456]	gaggtcgatg	gtgtcgataa	gcttgatata	gaattcatgt	cacacaaacc	gatcttcgcc	10140
[1457]	tcaaggaaac	ctaattctac	atccgagaga	ctgccgagat	ccagtctaca	ctgattaatt	10200
[1458]	ttcgggccaa	taatttaaaa	aaatcggtt	atataatatt	atatgtatta	tatatataca	10260
[1459]	tcatgatgat	actgacagtc	atgtcccatt	gctaaataga	cagactccat	ctgccgcctc	10320
[1460]	caactgatgt	tctcaatatt	taaggggtca	tctcgcattg	tttaataata	aacagactcc	10380
[1461]	atctaccgcc	tccaaatgat	gttctcaaaa	tatattgtat	gaacttattt	ttattactta	10440
[1462]	gtattattag	acaacttact	tgctttatga	aaaacacttc	ctatttagga	aacaatttat	10500
[1463]	aatggcagtt	cgttcattta	acaatttatg	tagaataaat	gttataaatg	cgtatgggaa	10560
[1464]	atcttaaaata	tggatagcat	aaatgatata	tgcatcgcct	aattcgaaat	caacagcaac	10620
[1465]	gaaaaaaatc	ccttgtacaa	cataaatagt	catcgagaaa	tatcaactat	caaagaacag	10680
[1466]	ctattcacac	gttactattg	agattattat	tggacgagaa	tcacacactc	aactgtcttt	10740
[1467]	ctctcttcta	gaaatacagg	tacaagtatg	tactattctc	attgttcata	cttctagtca	10800
[1468]	tttcatccca	catattcctt	ggatttctct	ccaatgaatg	acattctatc	ttgcaaattc	10860
[1469]	aacaattata	ataagatata	ccaaagtagc	ggtatagtgg	caatcaaaaa	gcttctctgg	10920

[1470]	tgtgcttctc gtatttattt ttatttcta atccattaa aggtatatat ttatttcttg	10980
[1471]	ttatataatc cttttgttta ttacatgggc tggatacata aaggtatttt gatttaattt	11040
[1472]	tttgcttaaa ttcaatcccc cctcggtcag tgtcaactgt aatggtagga aattaccata	11100
[1473]	cttttgaaga agcaaaaaaa atgaaagaaa aaaaaaatcg tatttccagg ttagacgttc	11160
[1474]	cgcagaatct agaatgcggt atgcggtaca ttgttcttcg aacgtaaaag ttgcgctccc	11220
[1475]	tgagatattg tacatttttg cttttacaag tacaagtaca tcgtacaact atgtactact	11280
[1476]	gttgatgcac ccacaacagt ttgttttgtt tttttttgtt tttttttttt ctaatgattc	11340
[1477]	attaccgcta tgtataccta cttgtacttg tagtaagccg ggttattggc gttcaattaa	11400
[1478]	tcatagactt atgaatctgc acggtgtgcg ctgcgagtta cttttagctt atgcatgcta	11460
[1479]	cttgggtgta atattgggat ctgttcggaa atcaacggat gctcaat	11507
[1480]	<210> 43	
[1481]	<211> 4	
[1482]	<212> RNA	
[1483]	<213> 未知	
[1484]	<220>	
[1485]	<223> RNA成环序列(GAAA)	
[1486]	<400> 43	
[1487]	gaaa	4
[1488]	<210> 44	
[1489]	<211> 4	
[1490]	<212> RNA	
[1491]	<213> 未知	
[1492]	<220>	
[1493]	<223> RNA成环序列(CAAA)	
[1494]	<400> 44	
[1495]	caaa	4
[1496]	<210> 45	
[1497]	<211> 4	
[1498]	<212> RNA	
[1499]	<213> 未知	
[1500]	<220>	
[1501]	<223> RNA成环序列(AAAG)	
[1502]	<400> 45	
[1503]	aaag	4
[1504]	<210> 46	
[1505]	<211> 23	
[1506]	<212> DNA	
[1507]	<213> 未知	
[1508]	<220>	
[1509]	<223> Cas9靶位点:PAM序列的示例	
[1510]	<220>	
[1511]	<221> misc_feature	

[1512]	<222>	(1) .. (20)	
[1513]	<223>	n = A、C、T或G	
[1514]	<220>		
[1515]	<221>	misc_feature	
[1516]	<222>	(21) .. (21)	
[1517]	<223>	n = A、C、T或G(在规格中表示为“X”)	
[1518]	<400>	46	
[1519]		nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn ngg	23
[1520]	<210>	47	
[1521]	<211>	3	
[1522]	<212>	DNA	
[1523]	<213>	未知	
[1524]	<220>		
[1525]	<223>	PAM序列NGG	
[1526]	<220>		
[1527]	<221>	misc_feature	
[1528]	<222>	(1) .. (1)	
[1529]	<223>	n = A、C、T或G	
[1530]	<400>	47	
[1531]		ngg	3
[1532]	<210>	48	
[1533]	<211>	6	
[1534]	<212>	DNA	
[1535]	<213>	未知	
[1536]	<220>		
[1537]	<223>	PAM序列NNAGAA	
[1538]	<220>		
[1539]	<221>	misc_feature	
[1540]	<222>	(1) .. (2)	
[1541]	<223>	n = A、C、T或G	
[1542]	<400>	48	
[1543]		nnagaa	6
[1544]	<210>	49	
[1545]	<211>	7	
[1546]	<212>	DNA	
[1547]	<213>	未知	
[1548]	<220>		
[1549]	<223>	PAM序列NNAGAAW	
[1550]	<220>		
[1551]	<221>	misc_feature	
[1552]	<222>	(1) .. (2)	
[1553]	<223>	n = A、C、T或G	

[1554]	<220>	
[1555]	<221>	misc_feature
[1556]	<222>	(7) .. (7)
[1557]	<223>	W=A或T
[1558]	<400>	49
[1559]	nnagaaw	7
[1560]	<210>	50
[1561]	<211>	5
[1562]	<212>	DNA
[1563]	<213>	未知
[1564]	<220>	
[1565]	<223>	PAM序列NGGNG
[1566]	<220>	
[1567]	<221>	misc_feature
[1568]	<222>	(1) .. (1)
[1569]	<223>	n = A、C、T或G
[1570]	<220>	
[1571]	<221>	misc_feature
[1572]	<222>	(4) .. (4)
[1573]	<223>	n = A、C、T或G
[1574]	<400>	50
[1575]	nggng	5
[1576]	<210>	51
[1577]	<211>	8
[1578]	<212>	DNA
[1579]	<213>	未知
[1580]	<220>	
[1581]	<223>	PAM序列NNNGATT
[1582]	<220>	
[1583]	<221>	misc_feature
[1584]	<222>	(1) .. (4)
[1585]	<223>	n = A、C、T或G
[1586]	<400>	51
[1587]	nnnngatt	8
[1588]	<210>	52
[1589]	<211>	6
[1590]	<212>	DNA
[1591]	<213>	未知
[1592]	<220>	
[1593]	<223>	PAM序列NAAAAC
[1594]	<220>	
[1595]	<221>	misc_feature

[1596]	<222>	(1) .. (1)	
[1597]	<223>	n = A、C、T或G	
[1598]	<400>	52	
[1599]		naaaac	6
[1600]	<210>	53	
[1601]	<211>	2	
[1602]	<212>	DNA	
[1603]	<213>	未知	
[1604]	<220>		
[1605]	<223>	PAM序列NG	
[1606]	<220>		
[1607]	<221>	misc_feature	
[1608]	<222>	(1) .. (1)	
[1609]	<223>	n = A、C、T或G	
[1610]	<400>	53	
[1611]		ng	2
[1612]	<210>	54	
[1613]	<211>	22	
[1614]	<212>	RNA	
[1615]	<213>	未知	
[1616]	<220>		
[1617]	<223>	TracrRNA配对序列示例1	
[1618]	<400>	54	
[1619]		guuuuuguac ucucaagauu ua	22
[1620]	<210>	55	
[1621]	<211>	15	
[1622]	<212>	RNA	
[1623]	<213>	未知	
[1624]	<220>		
[1625]	<223>	TracrRNA配对序列示例2	
[1626]	<400>	55	
[1627]		guuuuuguac ucuca	15
[1628]	<210>	56	
[1629]	<211>	12	
[1630]	<212>	RNA	
[1631]	<213>	未知	
[1632]	<220>		
[1633]	<223>	TracrRNA配对序列示例3	
[1634]	<400>	56	
[1635]		guuuuagagc ua	12
[1636]	<210>	57	
[1637]	<211>	13	

[1638]	<212>	RNA	
[1639]	<213>	未知	
[1640]	<220>		
[1641]	<223>	TracrRNA配对序列示例4	
[1642]	<400>	57	
[1643]		guuuuagagc uag	13
[1644]	<210>	58	
[1645]	<211>	60	
[1646]	<212>	RNA	
[1647]	<213>	化脓链球菌	
[1648]	<400>	58	
[1649]		uagcaaguua aaauaaggcu aguccguuau caacuugaaa aaguggcacc gagucggugc	60
[1650]	<210>	59	
[1651]	<211>	45	
[1652]	<212>	RNA	
[1653]	<213>	化脓链球菌	
[1654]	<400>	59	
[1655]		uagcaaguua aaauaaggcu aguccguuau caacuugaaa aagug	45
[1656]	<210>	60	
[1657]	<211>	32	
[1658]	<212>	RNA	
[1659]	<213>	化脓链球菌	
[1660]	<400>	60	
[1661]		uagcaaguua aaauaaggcu aguccguuau ca	32
[1662]	<210>	61	
[1663]	<211>	85	
[1664]	<212>	RNA	
[1665]	<213>	嗜热链球菌	
[1666]	<400>	61	
[1667]		uaaaucuugc agaagcuaca aagauaaggc uucaugccga aaucaacacc cugucauuuu	60
[1668]		auggcagggg guuuucguua uuuaa	85
[1669]	<210>	62	
[1670]	<211>	77	
[1671]	<212>	RNA	
[1672]	<213>	嗜热链球菌	
[1673]	<400>	62	
[1674]		ugcagaagcu acaaagauaa ggcuucaugc cgaaaucaac acccugucan uuuauggcag	60
[1675]		gguguuuucg uuauuuu	77
[1676]	<210>	63	
[1677]	<211>	65	
[1678]	<212>	RNA	
[1679]	<213>	嗜热链球菌	

[1680]	<400>	63	
[1681]	ugcagaagcu acaaagauaa ggcuucaugc cgaaaucaac acccugucan uuuauuggcag	60	
[1682]	ggugu	65	
[1683]	<210>	64	
[1684]	<211>	131	
[1685]	<212>	RNA	
[1686]	<213>	人工序列	
[1687]	<220>		
[1688]	<223>	gRNA示例1	
[1689]	<220>		
[1690]	<221>	misc_feature	
[1691]	<222>	(1) .. (20)	
[1692]	<223>	n = A、C、U或G	
[1693]	<400>	64	
[1694]	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuuguac ucucaagauu uagaaauaaa ucuugcagaa	60	
[1695]	gcuacaaaga uaaggcuuca ugccgaaauc aacaccuguc cauuuuauugc caggguuuuu	120	
[1696]	ucguuuuuua a	131	
[1697]	<210>	65	
[1698]	<211>	117	
[1699]	<212>	RNA	
[1700]	<213>	人工序列	
[1701]	<220>		
[1702]	<223>	gRNA示例2	
[1703]	<220>		
[1704]	<221>	misc_feature	
[1705]	<222>	(1) .. (20)	
[1706]	<223>	n = A、C、U或G	
[1707]	<400>	65	
[1708]	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuuguac ucucagaaau gcagaagcua caaagauaag	60	
[1709]	gcuucaugcc gaaaucaaca ccugucan uuauggcagg guguuuucgu uauuuua	117	
[1710]	<210>	66	
[1711]	<211>	104	
[1712]	<212>	RNA	
[1713]	<213>	人工序列	
[1714]	<220>		
[1715]	<223>	gRNA示例3	
[1716]	<220>		
[1717]	<221>	misc_feature	
[1718]	<222>	(1) .. (20)	
[1719]	<223>	n = A、C、U或G	
[1720]	<400>	66	
[1721]	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuuguac ucucagaaau gcagaagcua caaagauaag	60	

[1722]	gcuucaugcc gaaaucaaca ccugucuu uuauggcagg gugu	104
[1723]	<210> 67	
[1724]	<211> 99	
[1725]	<212> RNA	
[1726]	<213> 人工序列	
[1727]	<220>	
[1728]	<223> gRNA示例4	
[1729]	<220>	
[1730]	<221> misc_feature	
[1731]	<222> (1) .. (20)	
[1732]	<223> n = A、C、U或G	
[1733]	<400> 67	
[1734]	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuuguc ucucagaaau agcaaguuaa aaauaggcua	60
[1735]	guccguuau aacuugaaaa aguggcaccg agucggugc	99
[1736]	<210> 68	
[1737]	<211> 81	
[1738]	<212> RNA	
[1739]	<213> 人工序列	
[1740]	<220>	
[1741]	<223> gRNA示例5	
[1742]	<220>	
[1743]	<221> misc_feature	
[1744]	<222> (1) .. (20)	
[1745]	<223> n = A、C、U或G	
[1746]	<400> 68	
[1747]	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
[1748]	cguuaucaac uugaaaaagu g	81
[1749]	<210> 69	
[1750]	<211> 68	
[1751]	<212> RNA	
[1752]	<213> 人工序列	
[1753]	<220>	
[1754]	<223> gRNA示例6	
[1755]	<220>	
[1756]	<221> misc_feature	
[1757]	<222> (1) .. (20)	
[1758]	<223> n = A、C、U或G	
[1759]	<400> 69	
[1760]	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
[1761]	cguuauca	68
[1762]	<210> 70	
[1763]	<211> 100	

[1764]	<212>	RNA	
[1765]	<213>	人工序列	
[1766]	<220>		
[1767]	<223>	gRNA示例7	
[1768]	<220>		
[1769]	<221>	misc_feature	
[1770]	<222>	(1) .. (20)	
[1771]	<223>	n = A、C、U或G	
[1772]	<400>	70	
[1773]		nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
[1774]		cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu	100
[1775]	<210>	71	
[1776]	<211>	53	
[1777]	<212>	DNA	
[1778]	<213>	解脂耶氏酵母	
[1779]	<400>	71	
[1780]		caatggaaaa gacattttca aacgattacc caccctccgg gactgaggcc cac	53
[1781]	<210>	72	
[1782]	<211>	52	
[1783]	<212>	DNA	
[1784]	<213>	人工序列	
[1785]	<220>		
[1786]	<223>	序列1示于图5中	
[1787]	<400>	72	
[1788]		caatggaaaa gacattttca aacgattacc cacctccggg actgaggccc ac	52
[1789]	<210>	73	
[1790]	<211>	51	
[1791]	<212>	DNA	
[1792]	<213>	人工序列	
[1793]	<220>		
[1794]	<223>	序列2示于图5中	
[1795]	<400>	73	
[1796]		caatggaaaa gacattttca aacgattacc cactccggga ctgaggccca c	51
[1797]	<210>	74	
[1798]	<211>	49	
[1799]	<212>	DNA	
[1800]	<213>	人工序列	
[1801]	<220>		
[1802]	<223>	序列3示于图5中	
[1803]	<400>	74	
[1804]		caatggaaaa gacattttca aacgattacc caccgggact gaggcccac	49
[1805]	<210>	75	

[1806]	<211>	46	
[1807]	<212>	DNA	
[1808]	<213>	人工序列	
[1809]	<220>		
[1810]	<223>	序列4示于图5中	
[1811]	<400>	75	
[1812]		caatggaaaa gacattttca aacgattacc cgggactgag gcccac	46
[1813]	<210>	76	
[1814]	<211>	13	
[1815]	<212>	DNA	
[1816]	<213>	人工序列	
[1817]	<220>		
[1818]	<223>	序列5示于图5中	
[1819]	<400>	76	
[1820]		cactgaggcc cac	13
[1821]	<210>	77	
[1822]	<211>	54	
[1823]	<212>	DNA	
[1824]	<213>	人工序列	
[1825]	<220>		
[1826]	<223>	序列6示于图5中	
[1827]	<400>	77	
[1828]		caatggaaaa gacattttca aacgattacc caccactccg ggactgaggc ccac	54
[1829]	<210>	78	
[1830]	<211>	48	
[1831]	<212>	DNA	
[1832]	<213>	人工序列	
[1833]	<220>		
[1834]	<223>	序列7示于图5中	
[1835]	<400>	78	
[1836]		caatggaaaa gacattttca aacgattacc tccgggactg aggccac	48
[1837]	<210>	79	
[1838]	<211>	46	
[1839]	<212>	DNA	
[1840]	<213>	人工序列	
[1841]	<220>		
[1842]	<223>	序列8示于图5中	
[1843]	<400>	79	
[1844]		caatggaaaa gacattttca aacgattacc cgggactgag gcccac	46
[1845]	<210>	80	
[1846]	<211>	44	
[1847]	<212>	DNA	

[1848]	<213>	人工序列	
[1849]	<220>		
[1850]	<223>	序列9示于图5中	
[1851]	<400>	80	
[1852]		caatggaaaa gacattttca aacgattacc cacctgaggc ccac	44
[1853]	<210>	81	
[1854]	<211>	48	
[1855]	<212>	DNA	
[1856]	<213>	人工序列	
[1857]	<220>		
[1858]	<223>	序列10示于图5中	
[1859]	<400>	81	
[1860]		caatggaaaa gacattttca aacgattacc cacgggactg aggcccac	48
[1861]	<210>	82	
[1862]	<211>	40	
[1863]	<212>	DNA	
[1864]	<213>	人工序列	
[1865]	<220>		
[1866]	<223>	序列11示于图5中	
[1867]	<400>	82	
[1868]		caatggaaaa gacattttca aacgattaca cacggcccac	40
[1869]	<210>	83	
[1870]	<211>	37	
[1871]	<212>	DNA	
[1872]	<213>	人工序列	
[1873]	<220>		
[1874]	<223>	序列12示于图5中	
[1875]	<400>	83	
[1876]		caatggaaaa gacattttct ccgggactga ggcccac	37
[1877]	<210>	84	
[1878]	<211>	43	
[1879]	<212>	DNA	
[1880]	<213>	人工序列	
[1881]	<220>		
[1882]	<223>	序列13示于图5中	
[1883]	<400>	84	
[1884]		caatggaaaa gacattttca aacgctccgg gactgaggcc cac	43
[1885]	<210>	85	
[1886]	<211>	43	
[1887]	<212>	DNA	
[1888]	<213>	人工序列	
[1889]	<220>		

[1890]	<223>	序列14示于图5中	
[1891]	<400>	85	
[1892]		caatggaaaa gacattttca aacgatccgg gactgaggcc cac	43
[1893]	<210>	86	
[1894]	<211>	33	
[1895]	<212>	DNA	
[1896]	<213>	人工序列	
[1897]	<220>		
[1898]	<223>	序列15示于图5中	
[1899]	<400>	86	
[1900]		caatggaaaa gacattttca aacgataccc cac	33
[1901]	<210>	87	
[1902]	<211>	54	
[1903]	<212>	DNA	
[1904]	<213>	人工序列	
[1905]	<220>		
[1906]	<223>	序列16示于图5中	
[1907]	<400>	87	
[1908]		caatggaaaa gacattttca aacgattacc caccctccg ggactgaggc ccac	54
[1909]	<210>	88	
[1910]	<211>	49	
[1911]	<212>	DNA	
[1912]	<213>	人工序列	
[1913]	<220>		
[1914]	<223>	序列17示于图5中	
[1915]	<400>	88	
[1916]		caatggaaaa gacattttca aacgattacc ctccgggact gaggccac	49
[1917]	<210>	89	
[1918]	<211>	54	
[1919]	<212>	DNA	
[1920]	<213>	人工序列	
[1921]	<220>		
[1922]	<223>	序列18示于图5中	
[1923]	<400>	89	
[1924]		caatggaaaa gacattttca aacgattacc caccctccg ggactgaggc ccac	54
[1925]	<210>	90	
[1926]	<211>	47	
[1927]	<212>	DNA	
[1928]	<213>	人工序列	
[1929]	<220>		
[1930]	<223>	AarI-去除-1	
[1931]	<400>	90	

[1932]	agaagtatcc taccatctac catctccgaa agaaactcgt cgattcc	47
[1933]	<210> 91	
[1934]	<211> 47	
[1935]	<212> DNA	
[1936]	<213> 人工序列	
[1937]	<220>	
[1938]	<223> AarI-去除-2	
[1939]	<400> 91	
[1940]	ggaatcgacg agtttctttc ggagatggta gatggtagga tacttct	47
[1941]	<210> 92	
[1942]	<211> 10706	
[1943]	<212> DNA	
[1944]	<213> 人工序列	
[1945]	<220>	
[1946]	<223> pRF109	
[1947]	<400> 92	
[1948]	catggacaag aaatactcca tcggcctgga cattggaacc aactctgtcg gctgggctgt	60
[1949]	catcaccgac gagtacaagg tgccctccaa gaaattcaag gtccctcgaa acaccgatcg	120
[1950]	acactccatc aagaaaaacc tcattgggtgc cctgttggtc gattctggcg agactgccga	180
[1951]	agctaccaga ctcaagcgaa ctgctcggcg acgttacacc cgacggaaga accgaatctg	240
[1952]	ctacctgcag gagatctttt ccaacgagat ggccaagggtg gacgattcgt tctttcatcg	300
[1953]	actggaggaa tccttcctcg tcgaggaaga caagaaacac gagcgtcatc ccatctttgg	360
[1954]	caacattgtg gacgaggttg cttaccacga gaagtatcct accatctacc atctccgaaa	420
[1955]	gaaactcgtc gattccaccg acaaggcgga tctcagactt atctacctcg ctctggcaca	480
[1956]	catgatcaag tttcgaggtc atttctcat cgaggcgcat ctcaatcccg acaacagcga	540
[1957]	tgtggacaag ctgttcattc agctcgttca gacctacaac cagctgttcg agggaaaccc	600
[1958]	catcaatgcc tccggagtcg atgcaaaggc catcttgtct gctcgactct cgaagagcag	660
[1959]	acgactggag aacctcattg cccaacttcc tggcgagaaa aagaacggac tgtttggtcaa	720
[1960]	cctcattgcc ctttctcttg gtctcacacc caacttcaag tccaacttcg atctggcgga	780
[1961]	ggacgccaag ctccagctgt ccaaggacac ctacgacgat gacctcgaca acctgcttgc	840
[1962]	acagattggc gatcagtacg ccgacctgtt tctcgtgcc aagaaccttt cggatgctat	900
[1963]	tctcttgtct gacattctgc gagtcaacac cgagatcaca aaggctcccc tttctgcctc	960
[1964]	catgatcaag cgatacgacg agcaccatca ggatctcaca ctgctcaagg ctcttgctcg	1020
[1965]	acagcaactg cccgagaagt acaaggagat ctttttcgat cagtcgaaga acggctacgc	1080
[1966]	tggatacatc gacggcggag cctctcagga agagttctac aagttcatca agccaattct	1140
[1967]	cgagaagatg gacggaaccg aggaactgct tgtcaagctc aatcgagagg atctgcttcg	1200
[1968]	gaagcaacga accttcgaca acggcagcat tcctcatcag atccacctcg gtgagctgca	1260
[1969]	cgccattctt cgacgtcagg aagacttcta cccctttctc aaggacaacc gagagaagat	1320
[1970]	cgagaagatt cttacctttc gaatccccta ctatgttggt cctcttgcca gaggaactc	1380
[1971]	tcgatttgct tggatgactc gaaagtccga ggaaaccatc actccctgga acttcgagga	1440
[1972]	agtcgtggac aagggtgcct ctgcacagtc cttcatcgag cgaatgacca acttcgacaa	1500
[1973]	gaatctgccc aacgagaagg ttcttcccaa gcattcgtcg ctctacgagt actttacagt	1560

[1974]	ctacaacgaa ctcaccaaag tcaagtacgt taccgaggga atgcgaaagc ctgccttctt	1620
[1975]	gtctggcgaa cagaagaaag ccattgtcga tctcctgttc aagaccaacc gaaaggtcac	1680
[1976]	tgtaaagcag ctcaaggagg actacttcaa gaaaatcgag tgtttcgaca gcgtcgagat	1740
[1977]	ttccggagtt gaggaccgat tcaacgcctc tttgggcacc tatcacgacg tgctcaagat	1800
[1978]	tatcaaggac aaggattttc tcgacaacga ggaaaacgag gacattctgg aggacatcgt	1860
[1979]	gctcactctt accctgttcg aagatcggga gatgatcgag gaacgactca agacatacgc	1920
[1980]	tcacctgttc gacgacaagg tcatgaaaca actcaagcga cgtagatata ccggctgggg	1980
[1981]	aagactttcg cgaaagctca tcaacggcat cagagacaag cagtccggaa agaccattct	2040
[1982]	ggactttctc aagtccgatg gctttgcca ccgaaacttc atgcagctca ttcacgacga	2100
[1983]	ttctcttacc ttcaaggagg acatccagaa ggcacaagtg tccggtcagg gcgacagctt	2160
[1984]	gcacgaacat attgccaacc tggctggttc gccagccatc aagaaaggca ttctccagac	2220
[1985]	tgtcaaggtt gtcgacgagc tggatgaagt catgggacgt cacaagcccg agaacattgt	2280
[1986]	gatcgagatg gccagagaga accagacaac tcaaaagggt cagaaaaact cgcgagagcg	2340
[1987]	gatgaagcga atcgaggaag gcatcaagga gctgggatcc cagattctca aggagcatcc	2400
[1988]	cgtcgagaac actcaactgc agaacgagaa gctgtatctc tactatctgc agaattggtcg	2460
[1989]	agacatgtac gtggatcagg aactggacat caatcgtctc agcgactacg atgtggacca	2520
[1990]	cattgtccct caatcctttc tcaaggacga ttctatcgac aacaaggtcc ttacacgac	2580
[1991]	cgacaagaac agaggcaagt cggacaacgt tcccagcgaa gaggtggtca aaaagatgaa	2640
[1992]	gaactactgg cgacagctgc tcaacgcca gctcattacc cagcgaaagt tcgacaatct	2700
[1993]	taccaaggcc gagcgaggcg gtctgtccga gtcgacaag gctggcttca tcaagcgtca	2760
[1994]	actcgtcgag accagacaga tcacaaagca cgtcgacacag attctcgatt ctcgatgaa	2820
[1995]	caccaagtac gacgagaacg acaagctcat ccgagaggtc aaggtgatta ctctcaagtc	2880
[1996]	caaactggtc tccgatttcc gaaaggactt tcagttctac aaggtgcgag agatcaacaa	2940
[1997]	ttaccacat gccacgatg cttacctcaa cgccgtcgtt ggcaactgcgc tcatcaagaa	3000
[1998]	ataccccaag ctgaaaagcg agttcgttta cggcgattac aaggtctacg acgttcgaaa	3060
[1999]	gatgattgcc aagtccgaac aggagattgg caaggctact gccaaagtact tcttttactc	3120
[2000]	caacatcatg aactttttca agaccgagat caccttgccc aacggagaga ttcgaaagag	3180
[2001]	accacttatc gagaccaacg gcgaaactgg agagatcgtg tgggacaagg gtcgagactt	3240
[2002]	tgcaaccgtg cgaaagggtc tgcgatgcc tcaggtcaac atcgtcaaga aaaccgaggt	3300
[2003]	tcagactggc ggattctcca aggagtcat tctgcccagg cgaaactccg acaagctcat	3360
[2004]	cgtcgaaaag aaagactggg atcccaagaa atacggtggc ttcgattctc ctaccgtcgc	3420
[2005]	ctattccgtg cttgtcgttg cgaaggctga gaagggaag tccaaaaagc tcaagtccgt	3480
[2006]	caaggagctg ctcggaatta ccatcatgga gcatcgagc ttcgagaaga atcccatcga	3540
[2007]	cttcttgga gccaaagggtt acaaggaggt caagaaagac ctcatatca agctgcccga	3600
[2008]	gtactctctg ttcgaactgg agaacggtcg aaagcgtatg ctgcctccg ctggcgagct	3660
[2009]	gcagaaggga aacgagcttg cttgccttc gaagtacgtc aactttctct atctggcttc	3720
[2010]	tcactacgag aagctcaagg gttctccga ggacaacgaa cagaagcaac tcttcgttga	3780
[2011]	gcagcacaaa cattacctg acgagattat cgagcagatt tccgagtttt cgaagcgagt	3840
[2012]	catcctggct gatgccaact tggacaagg gctctctgcc tacaacaagc atcgggacaa	3900
[2013]	accattcga gaacaggcgg agaacatcat tcacctgtt actcttacca acctgggtgc	3960
[2014]	tcctgcagct ttcaagtact tcgataccac tatcgaccga aagcgggtaca catccacaa	4020
[2015]	ggaggttctc gatgccaccc tgattcacca gtccatcact ggctgtacg agaccgaa	4080

[2016]	cgacctgtct cagcttggtg gcgactccag agccgatccc aagaaaaagc gaaaggtcta	4140
[2017]	agcggccgca agtgtggatg gggaagttag tgcccgggtc tgtgtgcaca attggcaatc	4200
[2018]	caagatggat ggattcaaca cagggatata gcgagctacg tgggtggtgcg aggatatagc	4260
[2019]	aacggatatt tatgtttgac acttgagaat gtacgataca agcactgtcc aagtacaata	4320
[2020]	ctaaacatac tgtacatact catactcgta cccgggcaac ggtttcactt gagtgcagtg	4380
[2021]	gctagtgtct ttactcgtac agtgtgcaat actgcgtatc atagtctttg atgtatatcg	4440
[2022]	tattcattca tgtagttgc gtacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tggggtgcct	4500
[2023]	aatgagttag ctaactcaca ttaattgcgt tgcgtcact gcccgcttc cagtcgggaa	4560
[2024]	acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta	4620
[2025]	ttgggcgtc ttccgcttc tcgctcactg actcgtcgcg ctcggtcgtt cggctgcggc	4680
[2026]	gagcggatc agctcactca aaggcggtaa tacggttata cacagaatca ggggataacg	4740
[2027]	caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt	4800
[2028]	tgctggcgtt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa	4860
[2029]	gtcagaggtag gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct	4920
[2030]	ccctcgtgcg ctctcctgtt ccgacctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc	4980
[2031]	cttcgggaag cgtggcgtt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg	5040
[2032]	tcgttcgtc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgac cgtgcgcct	5100
[2033]	tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccaactggcag	5160
[2034]	cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtgtaca gatttcttga	5220
[2035]	agtggtggcc taactacggc taaactagaa ggacagtatt tggatatctgc gctctgctga	5280
[2036]	agccagttac cttcgaaaa agagttggtg gctcttgatc cggcaaacaa accaccgctg	5340
[2037]	gtagcggtag ttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag	5400
[2038]	aagatccttt gatcttttct acggggctcg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag	5460
[2039]	ggatttttgt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat	5520
[2040]	gaagtittaa atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct	5580
[2041]	taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg ttcattcata gttgcctgac	5640
[2042]	tccccgtcgt gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa	5700
[2043]	tgataccgcg agaccacgc tcaccggtc cagatttata agcaataaac cagccagccg	5760
[2044]	gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt	5820
[2045]	gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttgttgcca	5880
[2046]	ttgctacagg catcgtggtg tcacgctcgt cgttttggtat ggcttcattc agctccggtt	5940
[2047]	cccaacgata aaggcgagtt acatgatccc ccatgttggtg caaaaaagcg gttagctcct	6000
[2048]	tcggtcctcc gatcgttgtc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg	6060
[2049]	cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactggtg	6120
[2050]	agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg	6180
[2051]	cgtaataacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa	6240
[2052]	aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt	6300
[2053]	aaccactcgc tgcacccaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt	6360
[2054]	gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat aaggcgaca cggaaatgtt	6420
[2055]	gaatactcat actcttctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca	6480
[2056]	tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat	6540
[2057]	ttccccgaaa agtgccacct gacgcgcct gtagcggcgc attagcgcg gcgggtgtgg	6600

[2058]	tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcccgt cctttcgctt	6660
[2059]	tcttcccttc ctttctcgcc acgttcgccg gctttcccg tcaagctcta aatcgggggc	6720
[2060]	tccctttagg gttccgattt agtgccttac ggcacctga ccccaaaaaa cttgattagg	6780
[2061]	gtgatggttc acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg	6840
[2062]	agtcacggtt ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct	6900
[2063]	cggctctattc ttttgattta taagggaattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg	6960
[2064]	agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgctt acaatttcca	7020
[2065]	ttcgccattc aggtcgcgca actgtttgga agggcgatcg gtgcgggcct cttcgctatt	7080
[2066]	acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt	7140
[2067]	ttcccagtcg cgacgttgta aaacgacggc cagtgaattg taatacgact cactataggg	7200
[2068]	cgaattgggt accgggcccc ccctcgaggt cgatgggtgc gataagcttg atatcgatt	7260
[2069]	catgtcacac aaaccgatct tcgctcaag gaaacctaat tctacatccg agagactgcc	7320
[2070]	gagatccagt ctacactgat taattttcgg gccataaatt taaaaaaatc gtgttatata	7380
[2071]	atattatatg tattatatat atacatcatg atgatactga cagtcatgct ccattgctaa	7440
[2072]	atagacagac tccatctgcc gcctccaact gatgtttctca atatttaagg ggtcatctcg	7500
[2073]	cattgtttta taataaacag actccatcta ccgctccaa atgatgttct caaaatatat	7560
[2074]	tgtatgaact tatttttatt acttagtatt attagacaac ttacttgctt tatgaaaaac	7620
[2075]	acttctatt taggaaacaa ttataatgg cagttcgctc atttaacaat ttatgtagaa	7680
[2076]	taaatgttat aaatgcgtat gggaaatctt aaatatggat agcataaatg atatctgcat	7740
[2077]	tgctaattc gaaatcaaca gcaacgaaaa aaatcccttg tacaacataa atagtcatcg	7800
[2078]	agaaatatca actatcaaag aacagctatt cacacgttac tattgagatt attattggac	7860
[2079]	gagaatcaca cactcaactg tctttctctc ttctagaaat acaggtacaa gtatgtacta	7920
[2080]	ttctcattgt tcatacttct agtcatttca tcccacatat tccttggatt tctctccaat	7980
[2081]	gaatgacatt ctatcttgca aattcaacaa ttataataag atataccaaa gtagcgggtat	8040
[2082]	agtggcaatc aaaaagcttc tctgggtgctc ttctcgtatt tatttttatt ctaatgatcc	8100
[2083]	attaaaggta tatatttatt tcttgttata taatcctttt gtttattaca tgggctggat	8160
[2084]	acataaaggat attttgattt aattttttgc ttaaatcaa tccccctcg ttcagtgtca	8220
[2085]	actgtaatgg taggaaatta ccatactttt gaagaagcaa aaaaaatgaa agaaaaaaa	8280
[2086]	aatcgtaatt ccaggtaga cgttcgcgag aatctagaat gcggtatgct gtacattgtt	8340
[2087]	cttcgaacgt aaaagttgct ctcctgaga tattgtacat ttttgctttt acaagtacaa	8400
[2088]	gtacatcgta caactatgta ctactgttga tgcattcaca acagtttggt ttgttttttt	8460
[2089]	ttgttttttt tttttctaag gattcattac cgctatgtat acctacttgt acttgtagta	8520
[2090]	agccgggtta ttggcgttca attaatcata gacttatgaa tctgcacggt gtgcgctgctg	8580
[2091]	agttactttt agcttatgca tgctacttgg gtgtaatat gggatctgtt cggaaatcaa	8640
[2092]	cggatgctca atcgatttcg acagtaatta attaatcat acacaagtca gctttcttcg	8700
[2093]	agcctcatat aagtataagt agttcaacgt attagcactg taccagcat ctccgtatcg	8760
[2094]	agaaacacaa caacatgccc cattggacag atcatgcgga tacacagggt gtgcagtatc	8820
[2095]	atacatactc gatcagacag gtctgtgac catcatacaa gctgaacaag cgtccatac	8880
[2096]	ttgcacgctc tctatataca cagttaaatt acatatccat agtctaacct ctaacagtta	8940
[2097]	atcttctggt aagcctccca gccagccttc tggatcgct tggcctcctc aataggatct	9000
[2098]	cggttctggc cgtacagacc tcggccgaca attatgatat ccgttccggt agacatgaca	9060
[2099]	tcctcaacag ttcggtactg ctgtccgaga gcgtctccct tgtcgtcaag acccaccgcc	9120

[2100]	ggggtcagaa taagccagtc ctcagagtcg cccttaggtc ggttctgggc aatgaagcca	9180
[2101]	accacaaact cggggtcgga tcgggcaagc tcaatggtct gcttgagta ctgccagtg	9240
[2102]	gccagagagc cttgcaaga cagctcgcc agcatgagca gacctctggc cagcttctcg	9300
[2103]	ttgggagagg ggactaggaa ctcttgtac tgggagttct cgtagtcaga gacgtcctcc	9360
[2104]	ttcttctgtt cagagacagt ttctctggca ccagctcgca ggccagcaat gattccggtt	9420
[2105]	ccgggtacac cgtgggcgtt ggtgatatcg gaccactcgg cgattcgggtg acaccggtac	9480
[2106]	tgggtcttga cagtgttgcc aatatctcgc aactttctgt cctcgaacag gaagaaaccg	9540
[2107]	tgcttaagag caagttcctt gagggggagc acagtgccgg cgtaggtgaa gtcgtcaatg	9600
[2108]	atgtcgatat gggttttgat catgcacaca taaggtccga cttatcggc aagctcaatg	9660
[2109]	agctccttgg tgggtgtaac atccagagaa gcacacaggt tggttttctt ggctgccacg	9720
[2110]	agcttgagca ctcgagcggc aaaggcggac ttgtggacgt tagctcgagc ttctagtagg	9780
[2111]	ggcatttttg tggatgaagag gagactgaaa taaatttagt ctgcagaact ttttatcgga	9840
[2112]	accttatctg gggcagtgaa gtatatgta tggtaatagt tacgagttag ttgaacttat	9900
[2113]	agatagactg gactatacgg ctatcggctc aaattagaaa gaacgtcaat ggctctctgg	9960
[2114]	gcgtcgcctt tgccgacaaa aatgtgatca tgatgaaagc cagcaatgac gttgcagctg	10020
[2115]	atattgttgt cggccaaccg cgccgaaaac gcagctgtca gaccacagc ctccaacgaa	10080
[2116]	gaatgtatcg tcaaagtgat ccaagcacac tcatagttag agtcgtactc caaaggcggc	10140
[2117]	aatgacgagt cagacagata ctctgcgacg tttaaaccat catctaaggg cctcaaaact	10200
[2118]	acctcggaac tgctgcgtg atctggacac cacagaggtt ccgagcactt taggttgac	10260
[2119]	caaatgtccc accagtgca ggcagaaaac gctggaacag cgtgtacagt ttgtcttaac	10320
[2120]	aaaaagtgag ggcgtgagg tcgagcaggg tgggtgtgact tgttatagcc tttagagctg	10380
[2121]	cgaaagcgcg tatggatttg gctcatcagg ccagattgag ggtctgtgga cacatgtcat	10440
[2122]	gttagtgtag ttcaatcgcc ccctggatat agccccgaca ataggccgtg gcctcathtt	10500
[2123]	tttgcttcc gcacatttcc attgctcggc acccacacct tgcttctcct gcacttgcca	10560
[2124]	accttaatac tggtttacat tgaccaacat cttacaagcg gggggcttgt ctagggata	10620
[2125]	tataaacagt ggctctccca atcggttgcc agtctctttt ttcttttctt tccccacaga	10680
[2126]	ttcgaaatct aaactacaca tcacac	10706
[2127]	<210> 93	
[2128]	<211> 4140	
[2129]	<212> DNA	
[2130]	<213> 人工序列	
[2131]	<220>	
[2132]	<223> Aar1- Cas9基因	
[2133]	<400> 93	
[2134]	atggacaaga aatactccat cggcctggac attggaacca actctgtcgg ctgggctgtc	60
[2135]	atcaccgacg agtacaaggt gccctccaag aaattcaagg tcctcggaac caccgatcga	120
[2136]	cactccatca agaaaaacct cattgggtgcc ctgttgttcg attctggcga gactgccgaa	180
[2137]	gctaccagac tcaagcgaac tgctcggcga cgttacaccc gacggaagaa ccgaatctgc	240
[2138]	tacctgcagg agatcttttc caacgagatg gccaaagtgg acgattcgtt ctttcatcga	300
[2139]	ctggaggaat ctttctcgt cgaggaagac aagaaacacg agcgtcatcc catctttggc	360
[2140]	aacattgttg acgaggttgc ttaccacgag aagtatccta ccatctacca tctccgaaag	420
[2141]	aaactcgtcg attccaccga caaggcggat ctcagactta tctacctcgc tctggcacac	480

[2142]	atgatcaagt ttcgagggtca tttcctcatc gagggcgatc tcaatcccga caacagcgat	540
[2143]	gtggacaagc tggttattca gctcgttcag acctacaacc agctgttcga ggaaaacccc	600
[2144]	atcaatgcct ccggagtcga tgcaaaggcc atcttgtctg ctgactctc gaagagcaga	660
[2145]	cgactggaga acctcattgc ccaacttcct ggcgagaaaa agaacggact gtttggaac	720
[2146]	ctcattgccc tttctcttgg tctcacaccc aacttcaagt ccaacttcga tctggcggag	780
[2147]	gacgccaagc tccagctgtc caaggacacc tacgacgatg acctcgacaa cctgcttgca	840
[2148]	cagattggcg atcagtacgc cgacctgtt ctgctgcca agaacctttc ggatgctatt	900
[2149]	ctcttgtctg acattctgcg agtcaacacc gagatcaca aggtctccct tctgcctcc	960
[2150]	atgatcaagc gatacgacga gcaccatcag gatctcacac tgctcaaggc tcttgtccga	1020
[2151]	cagcaactgc ccgagaagta caaggagatc tttttcgatc agtcaagaa cggctacgct	1080
[2152]	ggatacatcg acggcggagc ctctcaggaa gagttctaca agttcatcaa gccaatctc	1140
[2153]	gagaagatgg acggaaccga ggaactgctt gtcaagctca atcgagagga tctgcttcgg	1200
[2154]	aagcaacgaa ccttcgacaa cggcagcatt cctcatcaga tccacctcgg tgagctgcac	1260
[2155]	gccattcttc gacgtcagga agacttctac ccctttctca aggacaaccg agagaagatc	1320
[2156]	gagaagattc ttacctttcg aatccccctac tatgttggtc ctcttgccag aggaaactct	1380
[2157]	cgatttgcct ggatgactcg aaagtccgag gaaacatca ctccctggaa cttcgaggaa	1440
[2158]	gtcgtggaca aggggtgcctc tgcacagtcc ttcctcgagc gaatgaccaa cttcgacaag	1500
[2159]	aatctgccc aacgagaaggt tcttcccaag cattcgtgc tctacgagta ctttacagtc	1560
[2160]	tacaacgaac tcaccaaagt caagtacgtt accgagggaa tgcgaaagcc tgccttcttg	1620
[2161]	tctggcgaa agaaagaaagc cattgtcgat ctctgttca agaccaaccg aaaggctact	1680
[2162]	gttaagcagc tcaaggagga ctacttcaag aaaatcgagt gtttcgacag cgtcgagatt	1740
[2163]	tccggagttg aggaccgatt caacgcctct ttgggcacct atcacgatct gctcaagatt	1800
[2164]	atcaaggaca aggattttct cgacaacgag gaaaacgagg acattctgga ggacatcgtg	1860
[2165]	ctcactctta ccctgttcga agatcgggag atgatcgagg aacgactcaa gacatacgtc	1920
[2166]	cacctgttcg acgacaaggt catgaaacaa ctcaagcgac gtagatacac cggctgggga	1980
[2167]	agactttcgc gaaagctcat caacggcatc agagacaagc agtccgaaa gaccattctg	2040
[2168]	gactttctca agtccgatgg ctttgccaac cgaaacttca tgcagctcat tcacgacgat	2100
[2169]	tctcttacct tcaaggagga catccagaag gcacaagtgt ccggtcaggc cgacagcttg	2160
[2170]	cacgaacata ttgccaaact ggctggttcg ccagccatca agaaaggcat tctccagact	2220
[2171]	gtcaaggttg tcgacgagct ggtgaaggtc atgggacgtc acaagcccga gaacattgtg	2280
[2172]	atcgagatgg ccagagagaa ccagacaact caaaagggtc agaaaaactc gcgagagcgg	2340
[2173]	atgaagcgaa tcgaggaagg catcaaggag ctgggatccc agattctcaa ggagcatccc	2400
[2174]	gtcgagaaca ctcaactgca gaacgagaag ctgtatctct actatctgca gaatggctga	2460
[2175]	gacatgtacg tggatcagga actggacatc aatcgtctca gcgactacga tgtggaccac	2520
[2176]	attgtccctc aatcctttct caaggacgat tctatcgaca acaaggtcct tacacgatcc	2580
[2177]	gacaagaaca gaggcaagtc ggacaacgtt cccagcgaag aggtggtcaa aaagatgaag	2640
[2178]	aactactggc gacagctgct caacgccaaag ctctattccc agcgaaagtt cgacaatctt	2700
[2179]	accaaggccg agcgaggcgg tctgtccgag ctcgacaagg ctggcttcat caagcgtcaa	2760
[2180]	ctcgtcgaga ccagacagat cacaagcac gtcgcacaga ttctcgattc tcggatgaac	2820
[2181]	accaagtacg acgagaacga caagctcatc cgagaggtca aggtgattac tctcaagtc	2880
[2182]	aaactggctc ccgatttccg aaaggacttt cagttctaca aggtgcgaga gatcaacaat	2940
[2183]	taccaccatg cccacgatgc ttacctcaac gccgtcgttg gcaactgcgt catcaagaaa	3000

[2184]	taccccaagc tcgaaagcga gttcgtttac ggcgattaca aggtctacga cgttcgaaag	3060
[2185]	atgattgcc aatccgaaca ggagattggc aaggctactg ccaagtactt cttttactcc	3120
[2186]	aacatcatga actttttcaa gaccgagatc accttggcca acggagagat tcgaaagaga	3180
[2187]	ccacttatcg agaccaacgg cgaaactgga gagatcgtgt gggacaaggg tcgagacttt	3240
[2188]	gcaaccgtgc gaaaggttct gtcgatgcct cagggtcaaca tcgtcaagaa aaccgaggtt	3300
[2189]	cagactggcg gattctccaa ggagtcgatt ctgcccaagc gaaactccga caagctcatc	3360
[2190]	gctcgaaaga aagactggga tcccaagaaa tacgggtggc tcgattctcc taccgtcgcc	3420
[2191]	tattccgtgc ttgtcgttgc gaaggtcgag aagggaagc ccaaaaagct caagtcctgc	3480
[2192]	aaggagctgc tcggaattac catcatggag cgatcgagct tcgagaagaa tcccatcgac	3540
[2193]	ttcttgaag ccaagggtta caaggaggc aagaaagacc tcattatcaa gctgccaag	3600
[2194]	tactctctgt tcgaactgga gaacggtcga aagcgtatgc tcgcctccgc tggcgagctg	3660
[2195]	cagaaggga acgagcttgc cttgccttcg aagtacgtca actttctcta tctggcttct	3720
[2196]	cactacgaga agctcaaggg ttctcccag gacaacgaac agaagcaact cttcgttgag	3780
[2197]	cagcacaac attacctga cgagattatc gagcagattt ccgagtttc gaagcgagtc	3840
[2198]	atcttggtg atgccaactt ggacaagggt ctctctgcct acaacaagca tcgggacaaa	3900
[2199]	cccattcgag aacaggcgga gaacatcatt cacctgttta ctcttacc aaactgggtgct	3960
[2200]	cctgcagctt tcaagtactt cgataccact atcgaccgaa agcggtagac atccaccaag	4020
[2201]	gaggttctcg atgccaccct gattcaccag tccatcactg gcctgtacga gacccgaatc	4080
[2202]	gacctgtctc agcttggtgg cgactccaga gccgatcca agaaaaagcg aaaggtctaa	4140
[2203]	<210> 94	
[2204]	<211> 10706	
[2205]	<212> DNA	
[2206]	<213> 人工序列	
[2207]	<220>	
[2208]	<223> pRF141	
[2209]	<400> 94	
[2210]	catggacaag aaatactcca tcggcctgga cattggaacc aactctgtcg gctgggctgt	60
[2211]	catcaccgac gagtacaagg tgccctccaa gaaattcaag gtcctcgga acaccgatcg	120
[2212]	aaactccatc aagaaaaacc tcattgggtgc cctgttgttc gattctggcg agactgccga	180
[2213]	agctaccaga ctcaagcgaa ctgctcggcg acgttacacc cgacggaaga accgaatctg	240
[2214]	ctacctgcag gagatctttt ccaacgagat ggccaagggt gacgattcgt tctttcatcg	300
[2215]	actggaggaa tccttcctcg tcgaggaaga caagaaacac gagcgtcatc ccatctttgg	360
[2216]	caacattgtg gacgaggttg cttaccacga gaagtatcct accatctacc atctccgaaa	420
[2217]	gaaactcgtc gattccaccg acaaggcgga tctcagactt atctacctcg ctctggcaca	480
[2218]	catgatcaag tttcgaggtc atttcctcat cgaggcgcat ctcaatccc acaacagcga	540
[2219]	tgtggacaag ctgttcattc agctcgttca gacctacaac cagctgttcg agggaaaccc	600
[2220]	catcaatgcc tccggagtcg atgcaaaggc catcttgtct gctcgactct cgaagagcag	660
[2221]	acgactggag aaactcattg cccaacttcc tggcgagaaa aagaacggac tgtttggcaa	720
[2222]	cctcattgcc ctttctcttg gtctcacacc caacttcaag tccaacttcg atctggcgga	780
[2223]	ggacgccaag ctccagctgt ccaaggacac ctacgacgat gacctcgaca acctgcttgc	840
[2224]	acagattggc gatcagtagc ccgacctgtt tctcgtgcc aagaacctt cggatgctat	900
[2225]	tctcttgtct gacattctgc gagtcaacac cgagatcaca aaggctcccc tttctgctc	960

[2226]	catgatcaag cgatacgacg agcaccatca ggatctcaca ctgctcaagg ctcttgtccg	1020
[2227]	acagcaactg cccgagaagt acaaggagat ctttttcgat cagtcgaaga acggctacgc	1080
[2228]	tggatacatc gacggcggag cctctcagga agagttctac aagttcatca agccaattct	1140
[2229]	cgagaagatg gacggaaccg aggaactgct tgtcaagctc aatcgagagg atctgcttcg	1200
[2230]	gaagcaacga accttcgaca acggcagcat tcctcatcag atccacctcg gtgagctgca	1260
[2231]	cgccattctt cgacgtcagg aagacttcta cccctttctc aaggacaacc gagagaagat	1320
[2232]	cgagaagatt cttacctttc gaatccccta ctatgttggc cctcttgcca gaggaaactc	1380
[2233]	tcgatttgct tggatgactc gaaagtccga ggaaaccatc actccctgga acttcgagga	1440
[2234]	agtcgtggac aagggtgcct ctgcacagtc cttcatcgag cgaatgacca acttcgacaa	1500
[2235]	gaatctgccc aacgagaagg ttcttcccaa gcattcgctg ctctacgagt actttacagt	1560
[2236]	ctacaacgaa ctcaccaaag tcaagtacgt taccgaggga atgcgaaagc ctgccttctt	1620
[2237]	gtctggcgaa cagaagaaag ccattgtcga tctctgttc aagaccaacc gaaaggtcac	1680
[2238]	tgtaagcag ctcaaggagg actacttcaa gaaaatcgag tgtttcgaca gcgtcgagat	1740
[2239]	ttccggagtt gaggaccgat tcaacgcctc tttgggcacc tatcacgac tgctcaagat	1800
[2240]	tatcaaggac aaggattttc tcgacaacga ggaaaacgag gacattctgg aggacatcgt	1860
[2241]	gctcactctt acctgttcg aagatcgga gatgatcgag gaacgactca agacatacgc	1920
[2242]	tcacctgttc gacgacaagg tcatgaaaca actcaagcga cgtagataca ccggctgggg	1980
[2243]	aagactttcg cgaaagctca tcaacggcat cagagacaag cagtcggaa agaccattct	2040
[2244]	ggactttctc aagtccgatg gctttgcaa cggaaacttc atgcagctca ttcacgacga	2100
[2245]	ttctcttacc ttcaaggagg acatccagaa ggcacaagtg tccggtcagg gcgacagctt	2160
[2246]	gcacgaacat attgccaacc tggctggttc gccagccatc aagaaaggca ttctccagac	2220
[2247]	tgtcaaggtt gtcgacgagc tggatgaagg catgggacgt cacaagccc agaacattgt	2280
[2248]	gatcgagatg gccagagaga accagacaac tcaaaagggt cagaaaaact cgcgagagcg	2340
[2249]	gatgaagcga atcgaggaag gcatcaagga gctgggatcc cagattctca aggagcatcc	2400
[2250]	cgtcgagaac actcaactgc agaacgagaa gctgtatctc tactatctgc agaatggtcg	2460
[2251]	agacatgtac gtggatcagg aactggacat caatcgtctc agcgactacg atgtggacca	2520
[2252]	cattgtccct caatcctttc tcaaggacga ttctatcgac aacaaggctc ttacacgac	2580
[2253]	cgacaagaac agaggcaagt cggacaacgt tcccagcga gaggtggtca aaaagatgaa	2640
[2254]	gaactactgg cgacagctgc tcaacgcaa gctcattacc cagcgaaagt tcgacaatct	2700
[2255]	taccaaggcc gagcgaggcg gtctgtccga gctcgacaag gctggcttca tcaagcgtca	2760
[2256]	actcgtcgag accagacaga tcacaaagca cgtcgacag attctcgatt ctcgatgaa	2820
[2257]	caccaagtac gacgagaacg acaagctcat ccgagaggtc aaggtgatta ctctcaagtc	2880
[2258]	caaactggtc tccgatttcc gaaaggactt tcagttctac aaggtgcgag agatcaacaa	2940
[2259]	ttaccacat gccacgatg cttacctcaa cgccgtcgtt ggcaactgcgc tcatcaagaa	3000
[2260]	ataccccaag ctcgaaagcg agttcgttta cggcgattac aaggtctacg acgttcgaaa	3060
[2261]	gatgattgcc aagtccgaac aggagattgg caaggctact gccaaagtact tcttttactc	3120
[2262]	caacatcatg aactttttca agaccgagat caccttgccc aacggagaga ttcgaaagag	3180
[2263]	accacttate gagaccaacg gcgaaactgg agagatcgtg tgggacaagg gtcgagactt	3240
[2264]	tgcaaccgtg cgaaagggtc tgtcgatgcc tcaggtcaac atcgtcaaga aaaccgaggt	3300
[2265]	tcagactggc ggatttcca aggagtcgat tctgccaag cgaaactccg acaagctcat	3360
[2266]	cgtcgaaaag aaagactggg atcccaagaa atacggtggc ttcgattctc ctaccgtcgc	3420
[2267]	ctattccgtg cttgtcgttg cgaaggctca gaagggaag tccaaaaagc tcaagtccgt	3480

[2268]	caaggagctg ctcggaatta ccatcatgga gcgatcgagc ttcgagaaga atcccatcga	3540
[2269]	cttcttgtaa gccaaagggtt acaaggaggt caagaaagac ctcattatca agctgcccaa	3600
[2270]	gtactctctg ttcgaactgg agaacggtcg aaagcgtatg ctcgcctccg ctggcgagct	3660
[2271]	gcagaaggga aacgagcttg cttgccttc gaagtacgtc aactttctct atctggcttc	3720
[2272]	tcactacgag aagctcaagg gttctcccga ggacaacgaa cagaagcaac tcttcgttga	3780
[2273]	gcagcacaaa cattacctcg acgagattat cgagcagatt tccgagtttt cgaagcgagt	3840
[2274]	catcctggct gatgccaaact tggacaaggt gctctctgcc tacaacaagc atcgggacaa	3900
[2275]	accatttcca gaacaggcgg agaacatcat tcacctgttt actcttacca acctgggtgc	3960
[2276]	tcctgcagct ttcaagtact tcgataccac tatcgaccga aagcgttaca catccaccaa	4020
[2277]	ggaggttctc gatgccaccc tgattcacca gtccatcact ggcctgtacg agaccggaat	4080
[2278]	cgacctgtct cagcttggtg gcgactccag agccgatccc aagaaaaagc gaaaggtcta	4140
[2279]	agcgcccgca agtgtggatg gggaagttag tgcgggttc tgtgtgcaca attggcaatc	4200
[2280]	caagatggat ggattcaaca caggatata gcgagctacg tgggtgtgagc aggatatagc	4260
[2281]	aacggatatt tatgtttgac acttgagaat gtacgataca agcactgtcc aagtacaata	4320
[2282]	ctaaacatac tgtacatact catactcgta cccgggcaac ggtttcactt gagtgcagtg	4380
[2283]	gctagtgtct ttactcgta agtgtgcaat actgcgtatc atagtctttg atgtatatcg	4440
[2284]	tattcattca tgtagttgc gtacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tggggtgcct	4500
[2285]	aatgagttag ctaactcaca ttaattgcgt tgcgctcact gcccgcttc cagtcgggaa	4560
[2286]	acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta	4620
[2287]	ttgggcgtc ttccgcttc tcgctcactg actcgctgcg ctcggtcgtt cggctgcggc	4680
[2288]	gagcggtatc agctcactca aaggcggtaa tacggttata cacagaatca ggggataacg	4740
[2289]	caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt	4800
[2290]	tgctggcggt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa	4860
[2291]	gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct	4920
[2292]	ccctcgtgag ctctcctgtt ccgacctgc cgtttaccgg atacctgtcc gcctttctcc	4980
[2293]	cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg	5040
[2294]	tcgttcgtc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgac cgctgcgcct	5100
[2295]	tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccaactggcag	5160
[2296]	cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtgtaca gagtcttga	5220
[2297]	agtggtggcc taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggatatctgc gctctgtga	5280
[2298]	agccagttac cttcgaaaa agagttggtg gctcttgatc cggcaaaaa accaccgctg	5340
[2299]	gtagcggtgg ttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag	5400
[2300]	aagatccttt gatcttttct acgggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag	5460
[2301]	ggattttggt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat	5520
[2302]	gaagtttta atcaatctaa agtatatatg agtaaaactg gtctgacagt taccaatgct	5580
[2303]	taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg ttcattcata gttgcctgac	5640
[2304]	tccccgtcgt gtagataact acgatacggg agggttacc atctggcccc agtgctgcaa	5700
[2305]	tgataccgag agaccacgc tcaccggtc cagatttata agcaataaac cagccagccg	5760
[2306]	gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt	5820
[2307]	gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttgttgcca	5880
[2308]	ttgctacagg catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcattc agctccggtt	5940
[2309]	cccaacgata aaggcgagtt acatgatccc ccatgttggt caaaaaagcg gttagctcct	6000

[2310]	tcggtcctcc gatcgttgtc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg	6060
[2311]	cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactgggtg	6120
[2312]	agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg	6180
[2313]	cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa	6240
[2314]	aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt	6300
[2315]	aaccctactcg tgcacccaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt	6360
[2316]	gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat aagggcgaca cggaaatgtt	6420
[2317]	gaatactcat actcttctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca	6480
[2318]	tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat	6540
[2319]	ttccccgaaa agtgccacct gacgcgccct gtagcggcgc attagcgcg gcgggtgtgg	6600
[2320]	tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcctt agcgccttct ctttctgctt	6660
[2321]	tcttcccttc ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc	6720
[2322]	tccctttagg gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg	6780
[2323]	gtgatgggtc acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg	6840
[2324]	agtcacagtt ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct	6900
[2325]	cggctctattc ttttgattta taagggtttt tgccgatttc ggcttattgg ttaaaaaatg	6960
[2326]	agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgctt acaatttcca	7020
[2327]	ttcgccattc aggtgcgca actgtttgga agggcgatcg gtgcgggcct cttcgctatt	7080
[2328]	acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt	7140
[2329]	ttccagtcga cgacgttgta aaacgacggc cagtgaattg taatacgact cactataggg	7200
[2330]	cgaattgggt accgggcccc cctcagagt cgatggtgtc gataagcttg atatcgaatt	7260
[2331]	catgtcacac aaaccgatct tcgcctcaag gaaacctaat tctacatccg agagactgcc	7320
[2332]	gagatccagt ctacactgat taattttcgg gccaaataatt taaaaaaatc gtgttatata	7380
[2333]	atattatatg tattatatat atacatcatg atgatactga cagtcatgtc ccattgctaa	7440
[2334]	atagacagac tccatctgcc gcctccaact gatgtttctca atattttaagg ggtcatctcg	7500
[2335]	cattgtttta taataaacag actccatcta ccgcctccaa atgatgttct caaaatatat	7560
[2336]	tgtatgaact tatttttatt acttagtatt attagacaac ttacttgctt tatgaaaaac	7620
[2337]	acttcctatt taggaaacaa ttataatgg cagttcgttc atttaacaat ttatgtagaa	7680
[2338]	taaatgttat aaatgcgtat gggaaatctt aaatatggat agcataaatg atatctgcat	7740
[2339]	tgctaattc gaaatcaaca gcaacgaaaa aaatcccttg tacaacataa atagtcatcg	7800
[2340]	agaaatatca actatcaaag aacagctatt cacacgttac tattgagatt attattggac	7860
[2341]	gagaatcaca cactcaactg tctttctctc ttctagaaat acaggtacaa gtatgtacta	7920
[2342]	ttctcattgt tcatacttct agtcatttca tcccacatat tccttggatt tctctccaat	7980
[2343]	gaatgacatt ctatcttgca aattcaacaa ttataataag atataccaaa gtagcggtat	8040
[2344]	agtggaatc aaaaagcttc tctggtgtgc ttctcgtatt tatttttatt ctaatgatcc	8100
[2345]	attaaaggta tatatttatt tcttgttata taatcctttt gtttattaca tgggctggat	8160
[2346]	acataaagggt attttgattt aattttttgc ttaaatccaa tccccctcg ttcagtgtca	8220
[2347]	actgtaatgg taggaaatta ccatactttt gaagaagcaa aaaaaatgaa agaaaaaaa	8280
[2348]	aatcgtattt ccaggtaga cgttccgcag aatctagaat gcggtatgcg gtacattgtt	8340
[2349]	cttcgaacgt aaaagttgcg ctccctgaga tattgtacat ttttgctttt acaagtacaa	8400
[2350]	gtacatcgta caactatgta ctactgttga tgcatccaca acagtttggt ttgttttttt	8460
[2351]	ttgttttttt tttttctaata gattcattac cgctatgtat acctacttgt acttgtagta	8520

[2352]	agccgggtta ttggcgttca attaatcata gacttatgaa tctgcacggt gtgcgctgcg	8580
[2353]	agttactttt agcttatgca tgctacttgg gtgtaatat gggatctgtt cggaaatcaa	8640
[2354]	cggatgctca atcgatttcg acagtaatta attaagtcac acacaagtca gctttcttcg	8700
[2355]	agcctcatat aagtataagt agttcaacgt attagcactg taccagcat ctccgtatcg	8760
[2356]	agaaacacaa caacatgccc cattggacag atcatgcgga tacacagggt gtgcagtatc	8820
[2357]	atacactctc gatcagacag gtgctctgac catcatacaa gctgaacaag cgctccatac	8880
[2358]	ttgcacgctc tctatatata cagttaaatt acatatccat agtctaacct ctaacagtta	8940
[2359]	atcttctggt aagcctccca gccagccttc tggatctgct tggcctcctc aataggatct	9000
[2360]	cggttctggc cgtacagacc tcggccgaca attatgatat ccgttccggt agacatgaca	9060
[2361]	tcctcaacag ttcggtagct ctgtccgaga gcgtctccct tgtcgtcaag acccaccccg	9120
[2362]	ggggtcagaa taagccagtc ctacagagtc cccttaggtc ggttctgggc aatgaagcca	9180
[2363]	accacaaact cggggtcgga tcgggcaagc tcaatggtct gcttgagta ctgccagtg	9240
[2364]	gccagagagc cttgcaaga cagctcgcc agcatgagca gacctctggc cagcttctcg	9300
[2365]	ttgggagagg ggactaggaa ctcttcttac tgggagttct cgtagtcaga gacgtcctcc	9360
[2366]	ttcttctgtt cagagacagt ttctctcgca ccagctcgca ggccagcaat gattccggtt	9420
[2367]	ccgggtacac cgtgggcgtt ggtgatctcg gaccactcgg cgattcgggt acaccggtac	9480
[2368]	tgggtcttga cagtgttgc aatatctcgc aactttctgt cctcgaacag gaagaaaccg	9540
[2369]	tgcttaagag caagttcctt gagggggagc acagtgccgg cgtaggtgaa gtcgtcaatg	9600
[2370]	atgtcgatat gggttttgat catgcacaca taagggtccga cttatcggc aagctcaatg	9660
[2371]	agtccttgg tgggtgtaac atccagagaa gcacacaggt tggttttctt ggctgccacg	9720
[2372]	agcttgagca ctcgagcggc aaaggcggac ttgtggacgt tagctcgagc ttcgtaggag	9780
[2373]	ggcattttgg tggtaagag gagactgaaa taaatttagt ctgcagaact ttttatcgga	9840
[2374]	accttatctg gggcagtgaa gtatatgtta tggtaatagt tacgagttag ttgaacttat	9900
[2375]	agatagactg gactatacgg ctatcggctc aaattagaaa gaacgtcaat ggctctctgg	9960
[2376]	gcgtcgctt tgccgacaaa aatgtgatca tgatgaaagc cagcaatgac gttgcagctg	10020
[2377]	atattgttgt cggccaaccg cgccgaaaac gcagctgtca gaccacagc ctccaacgaa	10080
[2378]	gaatgtatcg tcaaagtgat ccaagcacac tcatagttgg agtcgtactc caaaggcggc	10140
[2379]	aatgacgagt cagacagata ctgctcgagc tttaaaccat catctaaggc cctcaaaact	10200
[2380]	acctcggaac tgctgcgtg atctggacac cacagaggtt ccgagcaatt taggttgac	10260
[2381]	caaatgtccc accaggtgca ggcagaaaac gctggaacag cgtgtacagt ttgtcttaac	10320
[2382]	aaaaagtgag ggcgctgagg tcgagcaggg tgggtgtgact tgttatagcc tttagagctg	10380
[2383]	cgaagcgcg tatggatttg gctcatcagg ccagattgag ggtctgtgga cacatgtcat	10440
[2384]	gttagtgtac ttcaatcgcc ccctggatat agccccgaca ataggccgtg gcctcatttt	10500
[2385]	tttgccctcc gcacatttcc attgctcggc acccacacct tgccttctct gcacttgcca	10560
[2386]	accttaatac tggtttacat tgaccaacat cttacaagcg gggggcttgt ctaggggtata	10620
[2387]	tataaacagt ggctctccca atcggttgcc agtctctttt ttcctttctt tccccacaga	10680
[2388]	ttcgaaatct aaactacaca tcacac	10706
[2389]	<210> 95	
[2390]	<211> 1048	
[2391]	<212> DNA	
[2392]	<213> 人工序列	
[2393]	<220>	

[2394]	<223>	高通量克隆盒	
[2395]	<400>	95	
[2396]	gcgcacgtta attaaat ttttgatttt cttttttgac cccgtcttca attacacttc	60	
[2397]	ccaactggga acaccctct ttatcgaccc atttttagta atttacccta gccattgtc	120	
[2398]	tccataagga atattaccct aaccacagc ccagggtgcc caggtccttc ttggccaaa	180	
[2399]	ttttaacttc ggtcctatgg cacagcggta gcgcgtgaga ttgcaaactc taaggtccc	240	
[2400]	agttcgaatc tcggtgggac ctagttat tttgatagata atttcgtgat gattagaaac	300	
[2401]	ttaacgcaaa ataatggccg gcatgggtccc agcctcctcg ctggcgccgg ctgggcaaca	360	
[2402]	tgcttcggca tggcgaatgg gacgcaggtg atggcgggat cgttgtatat ttcttgacac	420	
[2403]	cttttcggca tcgccctaaa ttcggcgctc tcatattgtg tgaggacgtt ttattacgtg	480	
[2404]	tttacgaagc aaaagctaaa accaggagct atttaatggc aacagttaac cagctggtac	540	
[2405]	gcaaacacg tgctcgcaaa gttgcgaaaa gcaacgtgcc tgcgctggaa gcatgcccgc	600	
[2406]	aaaaacgtgg cgtatgtact cgtgtatata ctaccactcc taaaaaacg aactccgcgc	660	
[2407]	tgcgtaaagt atgccgtgtt cgtctgacta acggtttcga agtgacttcc tacatcgggtg	720	
[2408]	gtgaaggtca caacctgcag gagcactccg tgatcctgat ccgtggcggg cgtgttaaag	780	
[2409]	acctccggg tggtcgttac cacaccgtac gtggtgcgct tgactgctcc ggcggttaaag	840	
[2410]	accgtaagca ggctcgttcc aagtatggcg tgaagcgtcc taaggcttag gttataaca	900	
[2411]	ggcctgctgg taatcgagg cttttttatt ttacacctg cgttttagag ctgaaatag	960	
[2412]	caagttaaaa taaggctagt ccgttatcaa cttgaaaaag tggcaccgag tcggtgcttt	1020	
[2413]	ttttttgtt ttttatcgat gcgcgcac	1048	
[2414]	<210>	96	
[2415]	<211>	300	
[2416]	<212>	DNA	
[2417]	<213>	解脂耶氏酵母	
[2418]	<400>	96	
[2419]	at ttttttttg at ttttctttt ttgacccgt cttcaattac acttcccaac tgggaacacc	60	
[2420]	cctctttatc gaccatttt aggtaat tta ccctagccca ttgtctccat aaggaatatt	120	
[2421]	accctaacc acagtccagg gtgcccagg ctttctttgg ccaaatttta acttcggtcc	180	
[2422]	tatggcacag cggtagcgcg tgagattgca aatcttaagg tcccgagttc gaatctcggt	240	
[2423]	gggacctagt tatttttgat agataatttc gtgatgatta gaaacttaac gcaaaataat	300	
[2424]	<210>	97	
[2425]	<211>	544	
[2426]	<212>	DNA	
[2427]	<213>	大肠杆菌	
[2428]	<220>		
[2429]	<221>	misc_feature	
[2430]	<222>	(1) .. (544)	
[2431]	<223>	rpsL反向选择盒	
[2432]	<400>	97	
[2433]	atggcgggat cgttgtatat ttcttgacac ctttttcggca tcgccctaaa ttcggcgctc	60	
[2434]	tcatattgtg tgaggacgtt ttattacgtg ttacgaagc aaaagctaaa accaggagct	120	
[2435]	atttaatggc aacagttaac cagctggtac gcaaacacg tgctcgcaaa gttgcgaaaa	180	

[2436]	gcaacgtgcc tgcgctggaa gcatgcccgc aaaaacgtgg cgtatgtact cgtgtatata	240
[2437]	ctaccactcc taaaaaaccc aactccgcgc tgcgtaaagt atgccgtgtt cgtctgacta	300
[2438]	acggtttcga agtgacttcc tacatcggtg gtgaaggtca caacctgcag gagcactccg	360
[2439]	tgatcctgat ccgtggcggc cgtgttaaag acctcccggg tgttcgttac cacaccgtac	420
[2440]	gtggtcgcct tgactgctcc ggcgttaaag accgtaagca ggctcgttcc aagtatggcg	480
[2441]	tgaagcgtcc taaggcttag gttaataaca ggcctgctgg taatcgcagg cctttttatt	540
[2442]	ttta	544
[2443]	<210> 98	
[2444]	<211> 11714	
[2445]	<212> DNA	
[2446]	<213> 人工序列	
[2447]	<220>	
[2448]	<223> pRF291	
[2449]	<400> 98	
[2450]	cgataaaaaa caaaaaaaaa agcaccgact cgggtgccact ttttcaagtt gataacggac	60
[2451]	tagccttatt ttaacttgc atttctagct ctaaacgca ggtgtaaaaa taaaaaggcc	120
[2452]	tgcgattacc agcaggcctg ttattaacct aagccttagg acgcttcacg ccatacttgg	180
[2453]	aacgagcctg cttacggtct ttaacgccg agcagtcag cgcaccacgt acggtgtggt	240
[2454]	aacgaacacc cgggaggtct ttaacacgac cgccacggat caggatcacg gaggctcct	300
[2455]	gcaggttggt accttcacca ccgatgtagg aagtcacttc gaaaccgta gtcagacgaa	360
[2456]	cacggcatac tttagcagc gcggagttcg gttttttagg agtggttagta tatacacgag	420
[2457]	tacatacgcc acgtttttgc gggcatgctt ccagcgcagg cacgttgctt ttcgcaactt	480
[2458]	tgcgagcacg tggtttgcgt accagctggt taactgttgc cattaaatag ctctgtggtt	540
[2459]	tagcttttgc ttcgtaaaaa cgtaataaaa cgtcctcaca caatatgagg acgccgaatt	600
[2460]	tagggcgatg ccgaaaagg gtcaagaaat atacaacgat cccgccatca cctgcgtccc	660
[2461]	attcgccatg ccgaagcatg ttgccagcc ggcgccagcg aggaggctgg gaccatgccg	720
[2462]	gccattatth tgcgttaagt ttctaactcat caggaatta tctatcaaaa ataactaggt	780
[2463]	cccaccgaga ttcgaactcg ggaccttaag atttgcaatc tcacgcgcta ccgctgtgcc	840
[2464]	ataggaccga agttaaatt tggccaaaga aggacctggg caccctggac tgtgggttag	900
[2465]	ggtaatatth cttatggaga caatgggcta gggtaatta cctaaaatgg gtcgataaag	960
[2466]	aggggtgttc ccagttggga agtgtaattg aagacgggg caaaaaagaa aatcaaaaaa	1020
[2467]	aatttaatta agtcatacac aagtcagctt tcttcgagcc tcatataagt ataagtagtt	1080
[2468]	caacgtatta gactgtacc cagcatctcc gtatcgagaa acacaacaac atgccccatt	1140
[2469]	ggacagatca tgcggataca caggttgtgc agtatcatac atactcgatc agacaggtcg	1200
[2470]	tctgaccatc atacaagctg aacaagcgt ccatacttgc acgctctcta tatacacagt	1260
[2471]	taaattacat atccatagtc taacctctaa cagttaatct tctggtaagc ctcccagcca	1320
[2472]	gccttctggt atcgttggc ctctcaata ggatctcgtt tctggccgta cagacctcgg	1380
[2473]	ccgacaatta tgatatccgt tccggtagac atgacatcct caacagttcg gtaactgctg	1440
[2474]	ccgagagcgt ctcccttgc gtcaagaccc accccgggg tcagaataag ccagtcctca	1500
[2475]	gagtcgccct taggtcgggt ctgggcaatg aagccaacca caaactcggg gtcggatcgg	1560
[2476]	gcaagctcaa tggctcgtt ggagtactcg ccagtgccca gagagccctt gcaagacagc	1620
[2477]	tcggccagca tgagcagacc tctggccagc ttctcgttgg gagaggggac taggaactcc	1680

[2478]	ttgtactggg agttctcgta gtcagagacg tcctccttct tctgttcaga gacagtttcc	1740
[2479]	tcggcaccag ctgcgaggcc agcaatgatt ccggttccgg gtacaccgtg ggcgttgggtg	1800
[2480]	atatcggacc actcggcgat tcggtgacac cggtagctgt gcttgacagt gttgccaata	1860
[2481]	tctgcgaact ttctgtcctc gaacaggaag aaaccgtgct taagagcaag ttccttgagg	1920
[2482]	gggagcacag tgccggcgta ggtgaagtcg tcaatgatgt cgatatgggt tttgatcatg	1980
[2483]	cacacataag gtccgacctt atcggcaagc tcaatgagct ccttggtggt ggtaacatcc	2040
[2484]	agagaagcac acaggttgggt tttcttggct gccacgagct tgagcactcg agcggcaaag	2100
[2485]	gcggacttgt ggacgttagc tcgagcttcg taggagggca ttttgggtggt gaagaggaga	2160
[2486]	ctgaaataaa tttagtctgc agaacttttt atcggaaacct tatctggggc agtgaagtat	2220
[2487]	atgttatggt aatagttacg agttagttag acttatagat agactggact atacggctat	2280
[2488]	cgggtccaaat tagaaagaac gtcaatggct ctctgggcgt cgcctttgcc gacaaaaatg	2340
[2489]	tgatcatgat gaaagccagc aatgacgttg cagctgatat tgttgtcggc caaccgcgcc	2400
[2490]	gaaaacgcag ctgtcagacc cacagcctcc aacgaagaat gtatcgtcaa agtgatccaa	2460
[2491]	gcacactcat agttggagtc gtactccaaa ggcggcaatg acgagtcaga cagatactcg	2520
[2492]	tcgacgttta aaccatcatc taagggcctc aaaactacct cggaactgct gcgctgatct	2580
[2493]	ggacaccaca gaggttccga gcactttagg ttgcacaaaa tgtccacca ggtgcaggca	2640
[2494]	gaaaacgctg gaacagcgtg tacagtttgt cttaacaaaa agtgaggcg ctgaggtcga	2700
[2495]	gcagggtggt gtgacttgtt atagccttta gagctgcgaa agcgcgtatg gatttggctc	2760
[2496]	atcaggccag attgagggtc tgtggacaca tgtcatgta gtgtacttca atcgccccct	2820
[2497]	ggatatagcc ccgacaatag gccgtggcct catttttttg ccttccgcac atttccattg	2880
[2498]	ctcggtagcc acacctgtct tctcctgcac ttgccaaacct taatactggt ttacattgac	2940
[2499]	caacatctta caagcggggg gcttgtctag ggtatatata aacagtggct ctcccaatcg	3000
[2500]	gttgccagtc tcttttttcc tttctttccc cacagattcg aaatctaaac tacacatcac	3060
[2501]	acctggaca agaaatactc catcggcctg gacattggaa ccaactctgt cggctgggct	3120
[2502]	gtcatcaccc acgagtacaa ggtgccctcc aagaaattca aggtcctcgg aaacaccgat	3180
[2503]	cgacactcca tcaagaaaaa cctcattggt gccctgttgt tcgattctgg cgagactgcc	3240
[2504]	gaagctacca gactcaagcg aactgctcgg cgacgttaca cccgacggaa gaaccgaatc	3300
[2505]	tgctacctgc aggagatctt ttccaacgag atggccaagg tggacgattc gttctttcat	3360
[2506]	cgactggagg aatccttctc cgtcgaggaa gacaagaaac acgagcgtca tcccatcttt	3420
[2507]	ggcaacattg tggacgaggt tgcttaccac gagaagtatc ctaccatcta ccatctccga	3480
[2508]	aagaaactcg tcgattccac cgacaaggcg gatctcagac ttatctacct cgctctggca	3540
[2509]	cacatgatca agtttcgagg tcatttcctc atcgaggcg atctcaatcc cgacaacagc	3600
[2510]	gatgtggaca agctgttcat tcagctcgtt cagacctaca accagctgtt cgaggaaaac	3660
[2511]	cccatcaatg cctccggagt cgatgcaaag gccatcttgt ctgctcgact ctggaagagc	3720
[2512]	agacgactgg agaacctcat tgcccaactt cctggcgaga aaaagaacgg actgtttggc	3780
[2513]	aacctcattg ccctttctct tggtctcaca cccaacttca agtccaactt cgatctggcg	3840
[2514]	gaggacgcca agctccagct gtccaaggac acctacgacg atgacctcga caacctgctt	3900
[2515]	gcacagattg gcgatcagta cgcgcacctg tttctcgtg ccaagaacct ttcggtatgt	3960
[2516]	attctcttgt ctgacattct gcgagtcaac accgagatca caaaggtcc cttttctgcc	4020
[2517]	tccatgatca agcgatacga cgagcaccat caggatctca cactgctcaa ggctcttgct	4080
[2518]	cgacagcaac tgcccagaaa gtacaaggag atctttttcg atcagtcgaa gaacggctac	4140
[2519]	gctggataca tcgacggcgg agcctctcag gaagagttct acaagttcat caagccaatt	4200

[2520]	ctcgagaaga tggacggaac cgaggaactg cttgtcaagc tcaatcgaga ggatctgctt	4260
[2521]	cggaagcaac gaaccttcga caacggcagc attcctcatc agatccacct cggtagagctg	4320
[2522]	cacgccattc ttcgacgtca ggaagacttc tacccttttc tcaaggacaa ccgagagaag	4380
[2523]	atcgagaaga ttcttacctt tcgaatcccc tactatgttg gtcctcttgc cagaggaaac	4440
[2524]	tctcgatttg cttggatgac tcgaaagtcc gaggaacca tcaactccctg gaacttcgag	4500
[2525]	gaagtcgtgg acaagggtgc ctctgcacag tccttcatcg agcgaatgac caacttcgac	4560
[2526]	aagaatctgc ccaacgagaa ggttcttccc aagcattcgc tgctctacga gtactttaca	4620
[2527]	gtctacaacg aactcaccaa agtcaagtac gttaccgagg gaatgcgaaa gcctgccttc	4680
[2528]	ttgtctggcg aacagaagaa agccattgtc gatctcctgt tcaagaccaa ccgaaaggtc	4740
[2529]	actgttaagc agctcaagga ggactacttc aagaaaatcg agtgtttcga cagcgtcgag	4800
[2530]	atttccggag ttgaggaccg attcaacgcc tctttgggca cctatcacga tctgtcgaag	4860
[2531]	attatcaagg acaaggattt tctcgacaac gaggaaacg aggacattct ggaggacatc	4920
[2532]	gtgctcactc ttacctgtt cgaagatcgg gagatgatcg aggaacgact caagacatac	4980
[2533]	gctcacctgt tcgacgacaa ggtcatgaaa caactcaagc gacgtagata caccggctgg	5040
[2534]	ggaagacttt cgcgaaagct catcaacggc atcagagaca agcagtcagg aaagaccatt	5100
[2535]	ctggactttc tcaagtccga tggctttgcc aaccgaaact tcatgcagct cattcacgac	5160
[2536]	gattctctta cttcaagga ggacatccag aaggcacaag tgtccggtca gggcgacagc	5220
[2537]	ttgcacgaac atattgccaa cctggctggt tcgccagcca tcaagaaagg cattctccag	5280
[2538]	actgtcaagg ttgtcgacga gctggtgaag gtcatgggac gtcacaagcc cgagaacatt	5340
[2539]	gtgatcgaga tggccagaga gaaccagaca actcaaaaagg gtcagaaaaa ctcgcgagag	5400
[2540]	cggatgaagc gaatcgagga aggcatacag gagctgggat ccagattctt caaggagcat	5460
[2541]	cccgtcgaga aactcaact gcagaacgag aagctgtatc tctactatct gcagaatggt	5520
[2542]	cgagacatgt acgtggatca ggaactggac atcaatcgtc tcagcgacta cgatgtggac	5580
[2543]	cacattgtcc ctcaatcctt tctcaaggac gattctatcg acaacaaggt ctttacacga	5640
[2544]	tccgacaaga acagaggcaa gtcggacaac gttcccagcg aagagggtgt caaaaagatg	5700
[2545]	aagaactact ggcgacagct gctcaacgcc aagctcatta ccagcgaaa gttcgacaat	5760
[2546]	cttaccaagg ccgagcgagg cggctctgtc gagctcgaca aggctggctt catcaagcgt	5820
[2547]	caactcgtcg agaccagaca gatcacaaag cacgtcgac agattctcga ttctcggatg	5880
[2548]	aacaccaagt acgacgagaa cgacaagctc atccgagagg tcaaggtgat tactctcaag	5940
[2549]	tccaaactgg tctccgattt ccgaaaggac tttcagttct acaaggtgcg agagatcaac	6000
[2550]	aattaccacc atgcccacga tgcttacctc aacgccgtcg ttggcactgc gctcatcaag	6060
[2551]	aaatacccca agctcgaaag cgagttcgtt tacggcgatt acaaggtcta cgacgttcga	6120
[2552]	aagatgattg ccaagtccga acaggagatt ggcaaggcta ctgccaagta cttcttttac	6180
[2553]	tccaacatca tgaacttttt caagaccgag atcaccttgg ccaacggaga gattcgaaag	6240
[2554]	agaccactta tcgagaccaa cggcgaaact ggagagatcg tgtgggacaa gggtcgagac	6300
[2555]	tttgcaaccg tgcgaaaggt tctgtcgtatg cctcaggatc acatcgtcaa gaaaaccgag	6360
[2556]	gttcagactg gcggattctc caaggagtcg attctgcccc agcgaaactc cgacaagctc	6420
[2557]	atcgtcgaag agaaagactg ggatcccaag aaatacgggt gcttcgattc tctaccgtc	6480
[2558]	gcctattccg tgcttgcgtg tgcgaaggtc gagaagggtc agtccaaaaa gctcaagtcc	6540
[2559]	gtcaaggagc tgctcggaat taccatcatg gagcgatcga gcttcgagaa gaatcccatc	6600
[2560]	gacttcttgg aagccaaggg ttacaaggag gtcaagaaag acctcattat caagctgccc	6660
[2561]	aagtactctc tgttcgaact ggagaacggg cgaaagcgta tgctcgctc cgctggcgag	6720

[2562]	ctgcagaagg gaaacgagct tgccttgcct tcgaagtacg tcaactttct ctatctggct	6780
[2563]	tctcactacg agaagctcaa gggttctccc gaggacaacg aacagaagca actcttcgtt	6840
[2564]	gagcagcaca aacattacct cgacgagatt atcgagcaga tttccgagtt ttgaagcga	6900
[2565]	gtcatcctgg ctgatgcaa cttggacaag gtgctctctg cctacaacaa gcacgggac	6960
[2566]	aaacccattc gagaacaggc ggagaacatc attcacctgt ttactcttac caacctgggt	7020
[2567]	gctcctgcag ctttcaagta cttcgatacc actatcgacc gaaagcggta cacatccacc	7080
[2568]	aaggaggttc tcgatgccac cctgattcac cagtccatca ctggcctgta cgagaccga	7140
[2569]	atcgacctgt ctgagcttgg tggcgactcc agagccgac ccaagaaaaa gcgaaagtc	7200
[2570]	taagcggccg caagtgtgga tggggaagtg agtgcccgtt tctgtgtgca caattggcaa	7260
[2571]	tccaagatgg atggattcaa cacagggata tagcgagcta cgtgggtgtg cgaggatata	7320
[2572]	gcaacggata tttatgtttg acacttgaga atgtacgata caagcactgt ccaagtacaa	7380
[2573]	tactaaacat actgtacata ctcatctcg taccgggca acggtttcac ttgagtgcag	7440
[2574]	tggctagtgc tcttactcgt acagtgtgca atactgcgta tcatagtctt tgatgtatat	7500
[2575]	cgtattcatt catgttagtt gcgtacgagc cggaagcata aagtgtaaag cctggggtgc	7560
[2576]	ctaattgagt agctaactca cattaattgc gttgcgctca ctgcccgtt tccagtcggg	7620
[2577]	aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg	7680
[2578]	tattgggcgc tcttccgctt cctcgctcac tgactcgtg cgctcggtcg ttcggctgcg	7740
[2579]	gcgagcggta tcagctcact caaaggcggg aatacggtta tccacagaat caggggataa	7800
[2580]	cgcaggaaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc	7860
[2581]	gttgcctggc tttttccata ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa atcgacgtc	7920
[2582]	aagtcagagg tggcgaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag	7980
[2583]	ctccctcgtg cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct	8040
[2584]	cccttcggga agcgtggcgc tttctcatag ctacgctgt aggtatctca gttcgggtga	8100
[2585]	ggctgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccc accgctgcgc	8160
[2586]	cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa cccgtaaga cagacttat cgccactggc	8220
[2587]	agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt	8280
[2588]	gaagtgggtg cctaactacg gctacactag aaggacagta tttggtatct gcgctctgct	8340
[2589]	gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc	8400
[2590]	tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca	8460
[2591]	agaagatect ttgatctttt ctacggggtc tgacgtcag tggaacgaaa actcacgtta	8520
[2592]	agggattttg gtcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa	8580
[2593]	atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggcttgaca gttaccaatg	8640
[2594]	cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctatct cgttcaccca tagttgcctg	8700
[2595]	actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg ggagggtta ccatctggcc ccagtgtgc	8760
[2596]	aatgataccg cgagaccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc	8820
[2597]	cgggaaggcc gagcgagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa	8880
[2598]	ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttggtgc	8940
[2599]	cattgtctaca ggcatcgtgg tgtcacgtc gtggtttggt atggcttcat tcagctccgg	9000
[2600]	ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgac ccccatgttg tgcaaaaaag cggttagctc	9060
[2601]	cttcggctct ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat	9120
[2602]	ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg	9180
[2603]	tgagtactca accaagtcac tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc	9240

[2604]	ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg	9300
[2605]	aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat	9360
[2606]	gtaaccact cgtgcacca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg	9420
[2607]	gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgca cacggaaatg	9480
[2608]	ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct	9540
[2609]	catgagcgga tacatatattg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac	9600
[2610]	atttccccga aaagtccac ctgacgcgcc ctgtagcgcc gcattaagcg cggcggtgt	9660
[2611]	ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact tgccagcgcc cttagcggcg ctcctttcgc	9720
[2612]	tttcttcct tcctttctcg ccacgttcgc cggctttccc cgtcaagctc taaatcgggg	9780
[2613]	gctcccttta ggtttccgat ttagtgcttt acggcacctc gaccccaaaa aacttgatta	9840
[2614]	gggtgatggt tcacgtagtg ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacgtt	9900
[2615]	ggagtccacg ttctttaata gtggactctt gttccaaact ggaacaacac tcaacctat	9960
[2616]	ctcggctctat tcttttgatt tataagggat tttgccgatt tcggcctatt ggttaaaaaa	10020
[2617]	tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgc ttacaatttc	10080
[2618]	cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaaggcgcat cgggtcgggc ctcttcgcta	10140
[2619]	ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg	10200
[2620]	ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgaat tgtaatacga ctactatag	10260
[2621]	ggcgaattgg gtaccgggcc cccctcgag gtcgatggtg tcgataagct tgatatcgaa	10320
[2622]	ttcatgtcac acaaaccgat cttcgctca aggaaccta attctacatc cgagagactg	10380
[2623]	ccgagatcca gtctacactg attaattttc gggccaataa tttaaaaaaa tcgtgttata	10440
[2624]	taatattata tgtattatat atatacatca tgatgatact gacagtcagt tccattgct	10500
[2625]	aaatagacag actccatctg ccgcctccaa ctgatgttct caatatttaa ggggtcatct	10560
[2626]	cgcattgttt aataataaac agactccatc taccgcctcc aaatgatgtt ctcaaaatat	10620
[2627]	attgtatgaa cttattttta ttacttagta ttattagaca acttacttgc tttatgaaaa	10680
[2628]	acacttccta tttaggaaac aatttataat ggcagttcgt tcatttaaca atttatgtag	10740
[2629]	aataaatgtt ataaatgcgt atgggaaatc ttaaatatgg atagcataaa tgatatctgc	10800
[2630]	attgcctaatt tcgaaatcaa cagcaacgaa aaaaatccct tgtacaacat aaatagtcatt	10860
[2631]	cgagaaatat caactatcaa agaacagcta ttcacacgtt actattgaga ttattattgg	10920
[2632]	acgagaatca cacactcaac tgtctttctc tcttctagaa atacaggtac aagtatgtac	10980
[2633]	tattctcatt gttcatactt ctagtcattt catccacat attccttgga tttctctcca	11040
[2634]	atgaatgaca ttctatcttg caaattcaac aattataata agatatacca aagtagcgtt	11100
[2635]	atagtggcaa tcaaaaagct tctctgggtg gcttctcgta tttattttta ttctaattgat	11160
[2636]	ccattaaagg tatatattta tttcttggtt tataatcctt ttgtttatta catgggctgg	11220
[2637]	atacataaag gtattttgat ttaatttttt gcttaaatc aatccccct cgttcagtgt	11280
[2638]	caactgtaat ggtaggaaat taccatactt ttgaagaagc aaaaaaatg aaagaaaaaa	11340
[2639]	aaaatcgatat ttccagggtta gacgttcgc agaactctaga atgcggtatg cggtagattg	11400
[2640]	ttcttcgaac gtaaaagtgt cgctccctga gatattgtac atttttgctt ttacaagtac	11460
[2641]	aagtacatcg tacaactatg tactactgtt gatgcacca caacagtttg ttttgTTTTT	11520
[2642]	ttttgttttt ttttttctc atgattcatt accgctatgt atacctactt gtactttag	11580
[2643]	taagccgggt tattggcgtt caattaatca tagacttatg aatctgcacg gtgtgcgctg	11640
[2644]	cgagttactt ttagcttatg catgctactt ggggtgtaata ttgggatctg ttcggaaatc	11700
[2645]	aacggatgct caat	11714

[2646]	<210>	99	
[2647]	<211>	32	
[2648]	<212>	DNA	
[2649]	<213>	人工序列	
[2650]	<220>		
[2651]	<223>	Can1-1F	
[2652]	<400>	99	
[2653]		aatgggactc aaacgattac ccaccctcgt tt	32
[2654]	<210>	100	
[2655]	<211>	32	
[2656]	<212>	DNA	
[2657]	<213>	人工序列	
[2658]	<220>		
[2659]	<223>	Can1-1R	
[2660]	<400>	100	
[2661]		tctaaaacga gggtagggtaa tcgtttgagt cc	32
[2662]	<210>	101	
[2663]	<211>	23	
[2664]	<212>	DNA	
[2665]	<213>	解脂耶氏酵母	
[2666]	<220>		
[2667]	<221>	misc_feature	
[2668]	<222>	(1) .. (23)	
[2669]	<223>	Can1-1靶位点和PAM	
[2670]	<400>	101	
[2671]		tcaaacgatt acccaccctc cgg	23
[2672]	<210>	102	
[2673]	<211>	480	
[2674]	<212>	DNA	
[2675]	<213>	人工序列	
[2676]	<220>		
[2677]	<223>	Can1-1 gRNA表达盒	
[2678]	<400>	102	
[2679]		atTTTTTTtg atTTTctTTT ttgacCCcgt cttcaattac acttCCcaac tgggaacacc	60
[2680]		cctctttatc gaccatttt aggtaattta ccctagccca ttgtctccat aaggaatatt	120
[2681]		accctaacc acagtccagg gtgccaggt ctttctttgg ccaaatttta acttcggtcc	180
[2682]		tatggcacag cggtagcgcg tgagattgca aatcttaagg tcccgagttc gaatctcggt	240
[2683]		gggacctagt tATTTTgat agataattc gtgatgatta gaaacttaac gcaaaataat	300
[2684]		ggccggcatg gtccagcct cctcgctggc gccggctggg caacatgctt cggcatggcg	360
[2685]		aatgggactc aaacgattac ccaccctcgt tttagagcta gaaatagcaa ttaaaataag	420
[2686]		gctagtccgt tatcaacttg aaaaagtggc accgagtcgg tgctTTTTTT tttgTTTTTT	480
[2687]	<210>	103	

[2688]	<211>	11176	
[2689]	<212>	DNA	
[2690]	<213>	人工序列	
[2691]	<220>		
[2692]	<223>	pRF303	
[2693]	<400>	103	
[2694]	tctaaaacga	gggtgggtaa	tcgtttgagt cccattcgcc atgccgaagc atgttgccca 60
[2695]	gccggcgcca	gcgaggaggc	tgggaccatg cgggccatta ttttgcgtta agttttctaata 120
[2696]	catcacgaaa	ttatctatca	aaaataacta ggtcccaccg agattcgaac tcgggacctt 180
[2697]	aagatttgca	atctcacgcg	ctaccgctgt gccataggac cgaagttaaa atttggccaa 240
[2698]	agaaggacct	gggcaccctg	gactgtgggt tagggtaata ttccttatgg agacaatggg 300
[2699]	ctagggtaaa	ttacctaaaa	tgggtcgata aagaggggtg ttcccagttg ggaagtgtaa 360
[2700]	ttgaagacgg	ggtcaaaaaa	gaaaatcaaa aaaaatttaa ttaagtcata cacaagtcag 420
[2701]	ctttcttcga	gcctcatata	agtataagta gttcaacgta ttagcactgt acccagcatc 480
[2702]	tccgtatcga	gaaacacaac	aacatgcccc attggacaga tcatgcggat acacaggttg 540
[2703]	tgcagtatca	tacatactcg	atcagacagg tcgtctgacc atcatacaag ctgaacaagc 600
[2704]	gctccatact	tgcacgctct	ctatatacac agttaaatta catatccata gtctaacctc 660
[2705]	taacagttaa	tcttctggta	agcctcccag ccagccttct ggtatcgctt ggcctcctca 720
[2706]	ataggatctc	ggttctggcc	gtacagacct cggccgacaa ttatgatata cgttccggta 780
[2707]	gacatgacat	cctcaacagt	tcggtaactgc tgtccgagag cgtctccctt gtctgcaaga 840
[2708]	cccaccccg	gggtcagaat	aagccagtc ctagagtcgc ccttaggtcg gttctgggca 900
[2709]	atgaagccaa	ccacaaactc	ggggtcggat cgggcaagct caatggtctg cttggagtac 960
[2710]	tcgccagtgg	ccagagagcc	cttgcaagac agctcggcca gcatgagcag acctctggcc 1020
[2711]	agcttctcgt	tgggagaggg	gactaggaac tccttgtaact gggagtcttc gtagtcagag 1080
[2712]	acgtcctcct	tcttctgttc	agagacagtt tctcggcac cagctcgcag gccagcaatg 1140
[2713]	attccggttc	cgggtacacc	gtgggcgttg gtgatatcgg accactcggc gattcgggtga 1200
[2714]	caccggtact	ggtgcttgac	agtgttgcca atatctgcga actttctgtc ctgaacagg 1260
[2715]	aagaaccgt	gcttaagagc	aagtcccttg agggggagca cagtgccggc gtaggtgaag 1320
[2716]	tcgtcaatga	tgtcgatatg	ggttttgatc atgcacacat aaggtccgac cttatcggca 1380
[2717]	agctcaatga	gctccttggt	ggtggtaaca tccagagaag cacacaggtt ggttttcttg 1440
[2718]	gctgccacga	gcttgagcac	tcgagcggca aaggcggact tgtggacgtt agctcgagct 1500
[2719]	tcgtaggagg	gcattttggt	ggtgaagagg agactgaaat aaatttagtc tgcagaactt 1560
[2720]	tttatcgga	ccttatctgg	ggcagtgaag tatatgttat ggtaatagtt acgagttagt 1620
[2721]	tgaacttata	gatagactgg	actatacggc tatcggtcca aattagaaag aacgtcaatg 1680
[2722]	gctctctggg	cgctgccttt	gccgacaaaa atgtgatcat gatgaaagcc agcaatgacg 1740
[2723]	ttgcagctga	tattgttgtc	ggccaaccgc gccgaaaacg cagctgtcag acccacagcc 1800
[2724]	tccaacgaag	aatgtatcgt	caaagtgatc caagcacact catagttaga gtcgtactcc 1860
[2725]	aaaggcggca	atgacgagtc	agacagatac tcgtcgacgt ttaaaccatc atctaagggc 1920
[2726]	ctcaaaacta	cctcggaact	gctgcgctga tctggacacc acagaggttc cgagcacttt 1980
[2727]	aggttgacc	aaatgtccca	ccaggtgcag gcagaaaacg ctggaacagc gtgtacagtt 2040
[2728]	tgtcttaaca	aaaagtgagg	gcgctgaggt cgagcagggt ggtgtgactt gttatagcct 2100
[2729]	ttagagctgc	gaaagcgcgt	atggatttgg ctcatcaggc cagattgagg gtctgtggac 2160

[2730]	acatgtcatg ttagtgtact tcaatcgccc cctggatata gccccgacaa taggccgtgg	2220
[2731]	cctcattttt ttgccttccg cacatttcca ttgctcggtta cccacacctt gcttctcctg	2280
[2732]	cacttgccaa ccttaatact ggttttacatt gaccaacatc ttacaagcgg ggggcttgctc	2340
[2733]	tagggtatat ataaacagtg gctctcccaa tcggttgcca gtctcttttt tcttttcttt	2400
[2734]	ccccacagat tcgaaatcta aactacacat cacaccatgg acaagaaata ctccatcggc	2460
[2735]	ctggacattg gaaccaactc tgtcggctgg gctgtcatca ccgacgagta caaggtgccc	2520
[2736]	tccaagaaat tcaaggtcct cggaacacc gatcgacact ccatcaagaa aaacctcatt	2580
[2737]	ggtgccctgt tgttcgattc tggcgagact gccgaagcta ccagactcaa gcgaactgct	2640
[2738]	cggcgacgtt acacccgacg gaagaaccga atctgctacc tgcaggagat cttttccaac	2700
[2739]	gagatggcca aggtggacga ttctgtcttt catcgactgg aggaatcctt cctcgtcgag	2760
[2740]	gaagacaaga aacacgagcg tcatcccatc tttggcaaca ttgtggacga ggttgcttac	2820
[2741]	cacgagaagt atcctaccat ctaccatctc cgaaagaaac tcgtcgattc caccgacaag	2880
[2742]	gcgcatctca gacttatcta cctcgtctcg gcacacatga tcaagtttcg aggtcatttc	2940
[2743]	ctcatcgagg gcgatctcaa tcccgacaac agcgatgtgg acaagctgtt cattcagctc	3000
[2744]	gttcagacct acaaccagct gttcgaggaa aaccccatca atgcctccgg agtcgatgca	3060
[2745]	aaggccatct tgtctgctcg actctcgaag agcagacgac tggagaacct cattgcccga	3120
[2746]	cttcctggcg agaaaaagaa cggactgttt ggcaacctca ttgccctttc tcttggtctc	3180
[2747]	acaccaact tcaagtccaa cttcgatctg gcggaggacg ccaagctcca gctgtccaag	3240
[2748]	gacacctacg acgatgacct cgacaacctg cttgcacaga ttggcgatca gtacgccgac	3300
[2749]	ctgtttctcg ctgccaagaa cttttcggat gctattctct tgtctgacat tctgcgagtc	3360
[2750]	aacaccgaga tcacaaaggc tcccctttct gcctccatga tcaagcgata cgacgagcac	3420
[2751]	catcaggatc tcacactgct caaggctctt gtccgacagc aactgcccga gaagtacaag	3480
[2752]	gagatctttt tcgatcagtc gaagaacggc tacgtctggat acatcgacgg cggagcctct	3540
[2753]	caggaagagt tctacaagtt catcaagcca attctcgaga agatggacgg aaccgaggaa	3600
[2754]	ctgcttgtea agctcaatcg agaggatctg cttcggaagc aacgaacctt cgacaacggc	3660
[2755]	agcattcttc atcagatcca cctcggtag ctgcacgcca ttcttcgacg tcaggaagac	3720
[2756]	ttctaccctt ttctcaagga caaccgagag aagatcgaga agattcttac ctttcgaatc	3780
[2757]	ccctactatg ttggtcctct tgccagagga aactctcgat ttgcttggtg gactcgaaag	3840
[2758]	tccgaggaaa ccatcactcc ctggaacttc gaggaagtgc tggacaaggg tgctctgca	3900
[2759]	cagtccttca tcgagcgaat gaccaacttc gacaagaatc tgcccaacga gaaggttctt	3960
[2760]	cccaagcatt cgctgctcta cgagtacttt acagtctaca acgaactcac caaagtcaag	4020
[2761]	tacgttaccc agggaatgcg aaagcctgcc ttcttgctgt gcgaacagaa gaaagccatt	4080
[2762]	gtcgatctcc tgttcaagac caaccgaaag gtactgtta agcagctcaa ggaggactac	4140
[2763]	ttcaagaaaa tcgagtgttt cgacagcgtc gagatttccg gagttgagga ccgattcaac	4200
[2764]	gcctctttgg gcacctatca cgatctgctc aagattatca aggacaagga ttttctcgac	4260
[2765]	aacgaggaaa acgaggacat tctggaggac atcgtgtctc ctcttaccct gttcgaagat	4320
[2766]	cgggagatga tcgaggaacg actcaagaca tacgtcacc tgttcgacga caaggtcatg	4380
[2767]	aaacaactca agcgacgtag atacaccggc tggggaagac tttcgcgaaa gctcatcaac	4440
[2768]	ggcatcagag acaagcagtc cggaagacc attctggact ttctcaagtc cgatggcttt	4500
[2769]	gccaaccgaa acttcatgca gctcattcac gacgattctc ttaccttcaa ggaggacatc	4560
[2770]	cagaaggcac aagtgtccgg tcagggcgac agcttgacg aacatattgc caacctggct	4620
[2771]	ggttcgccag ccatcaagaa aggcattctc cagactgtca aggttgctga cgagctgggtg	4680

[2772]	aaggtcatgg gacgtcacia gcccagaaac attgtgatcg agatggccag agagaaccag	4740
[2773]	acaactcaaa aggggtcagaa aaactcgcga gagcggatga agcgaatcga ggaaggcatc	4800
[2774]	aaggagctgg gatcccagat tctcaaggag catcccgtcg agaactca actgcagaac	4860
[2775]	gagaagctgt atctctacta tctgcagaat ggtcgagaca tgtacgtgga tcaggaactg	4920
[2776]	gacatcaatc gtctcagcga ctacgatgtg gaccacattg tccctcaatc ctttctcaag	4980
[2777]	gacgattcta tcgacaacaa ggtccttaca cgatccgaca agaacagagg caagtcggac	5040
[2778]	aacgttccca gcgaagaggt ggtcaaaaag atgaagaact actggcgaca gctgctcaac	5100
[2779]	gccaaagctca ttaccagcg aaagttcgac aatcttaccaggccgagcg aggcgggtctg	5160
[2780]	tccgagctcg acaaggctgg cttcatcaag cgtcaactcg tcgagaccag acagatcaca	5220
[2781]	aagcacgtcg cacagattct cgattctcgg atgaacacca agtacgacga gaacgacaag	5280
[2782]	ctcatccgag aggtcaaggt gattactctc aagtccaaac tggctctccga tttccgaaag	5340
[2783]	gactttcagt tctacaaggt gcgagagatc aacaattacc accatgcccc cgatgcttac	5400
[2784]	ctcaacgccg tcgttgccac tgcgctcacc aagaaatacc ccaagctcga aagcgagttc	5460
[2785]	gtttacggcg attacaaggt ctacgacgtt cgaaagatga ttgccaaagtc cgaacaggag	5520
[2786]	attggcaagg ctactgccaa gtacttcttt tactccaaca tcatgaactt tttcaagacc	5580
[2787]	gagatcacct tggccaacgg agagattcga aagagaccac ttatcgagac caacggcgaa	5640
[2788]	actggagaga tcgtgtggga caagggtcga gactttgcaa ccgtgcgaaa ggttctgtcg	5700
[2789]	atgcctcagg tcaacatcgt caagaaaacc gaggttcaga ctggcggatt ctccaaggag	5760
[2790]	tcgattctgc ccaagcgaag ctccgacaag ctcatcgctc gaaagaaaga ctgggatccc	5820
[2791]	aagaaatacg gtggcttcca ttctctacc gtcgctatt ccgtgcttgt cgttgccaag	5880
[2792]	gtcgagaagg gcaagtccaa aaagctcaag tccgtcaagg agctgctcgg aattaccatc	5940
[2793]	atggagcgat cgagcttcca gaagaatccc atcgacttct tggaagccaa gggttacaag	6000
[2794]	gaggtcaaga aagacctcat tatcaagctg cccaagtact ctctgttcga actggagaac	6060
[2795]	ggtcgaaaagc gtatgctcgc ctccgctggc gagctgcaga agggaaacga gcttgccttg	6120
[2796]	ccttcgaagt acgtcaactt tctctatctg gcttctcact acgagaagct caagggttct	6180
[2797]	cccaggagca acgaacagaa gcaactcttc gttgagcagc acaaacatta cctcgacgag	6240
[2798]	attatcgagc agatttccga gttttcgaag cgagtcattc tggctgatgc caacttggaac	6300
[2799]	aaggtgctct ctgcctacaa caagcatcgg gacaaacca ttcgagaaca ggcggagaac	6360
[2800]	atcattcacc tgtttactct taccacactg ggtgctcctg cagctttcaa gtacttcgat	6420
[2801]	accactatcg accgaaagcg gtacacatcc accaaggagg ttctcgatgc caccctgatt	6480
[2802]	caccagtcca tcaactggct gtacgagacc cgaatcgacc tgtctcagct tgggtggcgac	6540
[2803]	tccagagccg atcccaagaa aaagcgaag gtctaagcgg ccgcaagtgt ggatggggaa	6600
[2804]	gtgagtgcgc ggttctgtgt gcacaattgg caatccaaga tggatggatt caacacaggg	6660
[2805]	atatagcgag ctacgtgggtg gtgcgaggat atagcaacgg atattttatgt ttgacacttg	6720
[2806]	agaatgtacg atacaagcac tgtccaagta caatactaaa catactgtac atactcatac	6780
[2807]	tcgtaccgagc gcaacggttt cacttgagtg cagtggctag tgctcttact cgtacagtgt	6840
[2808]	gcaatactgc gtatcatagt ctttgatgta tatcgattc attcatgtta gttgcgtacg	6900
[2809]	agccggaagc ataaagtgtg aagcctgggg tgcctaatga gtgagctaac tcacattaat	6960
[2810]	tgcgttgccg tcaactggcg ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg	7020
[2811]	aatcggccaa cgcgcgggga gagcggttt gcgtattggg cgctcttccg cttcctcgct	7080
[2812]	cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc	7140
[2813]	ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg	7200

[2814]	ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg	7260
[2815]	ccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg	7320
[2816]	actataaaga taccaggcgt tccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac	7380
[2817]	cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgcttttctca	7440
[2818]	tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg ttaggtcggt cgctccaagc tgggctgtgt	7500
[2819]	gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc	7560
[2820]	caacccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag	7620
[2821]	agcgaggatg ttaggcgggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac	7680
[2822]	tagaaggaca gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt	7740
[2823]	tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtgggtttt ttgtttgcaa	7800
[2824]	gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg	7860
[2825]	gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga gattatcaaa	7920
[2826]	aaggatcttc acctagatcc ttttaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat	7980
[2827]	atatgagtaa acttggtctg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc	8040
[2828]	gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat	8100
[2829]	acgggagggc ttaccatctg gccccagtgc tgcaatgata ccgcgagacc cacgctcacc	8160
[2830]	ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtgggcc	8220
[2831]	tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag	8280
[2832]	ttcgccagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg tgggtgcacg	8340
[2833]	ctcgtcggtt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg	8400
[2834]	atccccatg ttgtgcaaaa aagcggtag ctctctcggt cctccgatcg ttgtcagaag	8460
[2835]	taagtggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt	8520
[2836]	catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtagtac tcaaccaagt cattctgaga	8580
[2837]	atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgta atacgggata atacgcgcc	8640
[2838]	acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc	8700
[2839]	aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaaccc actcgtgcac ccaactgatc	8760
[2840]	ttcagcatct tttactttca ccagcgttcc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc	8820
[2841]	cgcaaaaaag ggaataaggc gcacacggaa atgttgaaata ctcatactct tcctttttca	8880
[2842]	atattattga agcatttata agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat	8940
[2843]	ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgc	9000
[2844]	gccctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg tgttggtggtt acgcgcagcg tgaccgctac	9060
[2845]	acttgccagc gccctagcgc ccgctccttt cgctttcttc ccttccttcc tcgccacgtt	9120
[2846]	cgcgggcttt ccccgtaag ctctaaatcg ggggctccct ttagggttcc gatttagtgc	9180
[2847]	tttacggcac ctgcacccca aaaaacttga ttaggggtgat ggttcacgta gtgggccatc	9240
[2848]	gccctgatag acggtttttc gccctttgac gttggagtcc acgttcttta atagtggact	9300
[2849]	cttgttccaa actggaacaa cactcaaccc tatctcggtc tattcttttg atttataagg	9360
[2850]	gattttgccg atttcggcct attgggttaa aaatgagctg atttaacaaa aatttaacgc	9420
[2851]	gaattttaac aaaatattaa cgcttacaat ttccattcgc cattcaggct gcgcaactgt	9480
[2852]	tgggaagggc gatcggtgcg ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt	9540
[2853]	gctgcaaggc gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg	9600
[2854]	acggccagtg aattgtaata cgactcacta tagggcgaaat tgggtaccgg gccccccctc	9660
[2855]	gaggtcgatg gtgtcgataa gcttgatata gaattcatgt cacacaaacc gatcttcgcc	9720

[2856]	tcaaggaaac ctaattctac atccgagaga ctgccgagat ccagtctaca ctgattaatt	9780
[2857]	ttcgggccaa taatttaaaa aaatcgtgtt atataatatt atatgtatta tatatatata	9840
[2858]	tcatgatgat actgacagtc atgtcccatt gctaaataga cagactccat ctgccgcctc	9900
[2859]	caactgatgt tctcaatatt taaggggtca tctcgcatg tttaataata aacagactcc	9960
[2860]	atctaccgcc tccaaatgat gttctcaaaa tatattgtat gaacttattt ttattactta	10020
[2861]	gtattattag acaacttact tgctttatga aaaacacttc ctatttagga aacaatttat	10080
[2862]	aatggcagtt cgttcattta acaatttatg tagaataaat gttataaatg cgtatgggaa	10140
[2863]	atcttaataa tggatagcat aaatgatatc tgcattgcct aattcgaaat caacagcaac	10200
[2864]	gaaaaaaatc cttgtacaa cataaatagt catcgagaaa tatcaactat caaagaacag	10260
[2865]	ctattcacac gttactattg agattattat tggacgagaa tcacacactc aactgtcttt	10320
[2866]	ctctcttcta gaaatacagg tacaagtatg tactattctc attgttcata cttctagtca	10380
[2867]	tttcatccca catattcctt ggatttctct ccaatgaatg acattctatc ttgcaaattc	10440
[2868]	aacaattata ataagatata ccaaagtagc ggtatagtgg caatcaaaaa gcttctctgg	10500
[2869]	tgtgcttctc gtatttattt ttattctaata gatccattaa aggtatatat ttatttcttg	10560
[2870]	ttatataatc cttttgttta ttacatgggc tggatacata aaggtatttt gatttaattt	10620
[2871]	tttgetttaa ttcaatcccc cctcgttcag tgtcaactgt aatggtagga aattaccata	10680
[2872]	cttttgaaga agcaaaaaaa atgaaagaaa aaaaaaatcg tatttccagg ttagacgttc	10740
[2873]	cgcagaatct agaatgcggt atgcggtaca ttgttcttcg aacgtaaaag ttgcgctccc	10800
[2874]	tgagatatg tacatttttg cttttacaag tacaagtaca tcgtacaact atgtactact	10860
[2875]	gttgatgcat ccacaacagt ttgttttggt tttttttgtt tttttttttt ctaatgattc	10920
[2876]	attaccgcta tgtataccta cttgtacttg tagtaagccg ggttattggc gttcaattaa	10980
[2877]	tcatagactt atgaatctgc acggtgtgcg ctgcgagtta cttttagctt atgcatgcta	11040
[2878]	cttgggtgta atattgggat ctgttcgga atcaacggat gctcaatcga taaaaaacia	11100
[2879]	aaaaaaaagc accgactcgg tgccactttt tcaagttgat aacggactag ccttatttta	11160
[2880]	acttgetatt tctagc	11176
[2881]	<210> 104	
[2882]	<211> 168	
[2883]	<212> RNA	
[2884]	<213> 人工序列	
[2885]	<220>	
[2886]	<223> Cas1-1的核酶-向导RNA	
[2887]	<400> 104	
[2888]	ggccggcaug gucccagccu ccucgcuggc gccggcuggg caacaugcuu cggcauggcg	60
[2889]	aaugggacuc aaacgauuac ccaccucgu uuuagagcua gaaauagcaa guaaaaauaa	120
[2890]	ggcuaguccg uuaucaacuu gaaaaagugg caccgagucg gugcuuuu	168
[2891]	<210> 105	
[2892]	<211> 1719	
[2893]	<212> DNA	
[2894]	<213> 解脂耶氏酵母	
[2895]	<220>	
[2896]	<221> misc_feature	
[2897]	<222> (1) .. (1719)	

[2898]	<223> Can1基因	
[2899]	<400> 105	
[2900]	atggaaaaga cattttcaaa cgattaccca ccttcggga ctgaggccca cateccatc	60
[2901]	aaccacacgg ccactcggg tgactcagag gaggtgccct cgcacaagga aaattacaac	120
[2902]	accagtggcc acgacctgga ggagtcggac ccgataaacc atgtcgggta gaccctcgag	180
[2903]	gtcaagcgag gtctcaagat gcgacacatc tccatgatct cgcttggagg aaccattggt	240
[2904]	accggtctct tcattgggtac cggaggagct ctccagcagg ccggtccctg tggcgccctc	300
[2905]	gtcgctacg tgttcattggc caccattgtc tactctgttg ccgagtctct tggagaactg	360
[2906]	gctacgtaca ttcccatcac cggtccctt gccgtcttta ctaccgata tctgtcacag	420
[2907]	tcgtttggtg cctccatggg ctggctatac tggttctcgt gggcgatcac cttcgccatc	480
[2908]	gagctcaaca ccattgggtc cgtgattgag tactggactg acgccgttcc tactgtctgc	540
[2909]	tggattgcca tcttcttctg cactctcact accatcaact tcttccccgt gggtctctat	600
[2910]	ggcgaagtcg agttctgggt ggcctccgtg aaggtcattg ccatcattgg atggctcatc	660
[2911]	tacgcgtctt gcatgacgtg tggagcagg gtaacaggtc ctgtgggatt cagatactgg	720
[2912]	aaccaccccg gacccatggg agacggaatc tggaccgacg gcgtgcccac tgtgcgaaac	780
[2913]	gcgcccggtc gacgattcat gggatggctc aattcgtctg ttaacgccg cttcacctac	840
[2914]	cagggtctgt agctggctgg agtcaactgc ggtgaggccc agaaccacag aaagtccgtc	900
[2915]	cctcgagcca tcaaccgagt ctttgctcga atttgcatct tctacattgg ctctatcttc	960
[2916]	ttcatgggca tgctcgtgcc ctttaacgac cccaagctga ccgatgactc ctccgtcatc	1020
[2917]	gcctcctctc cttttgttat tgccattatc aactctggca ccaaggtgct ccctcacatt	1080
[2918]	ttcaacgccg tcattctcat caccctgatt tcggcaggaa actccaacgt ctacattggc	1140
[2919]	tcgcgagtgg tctacgccct ggctgactcc ggaaccgcac caaagttctt caagcgaacc	1200
[2920]	accaagaagg gagtgccgta cgtggcagtc tgcttcacct cggcgtttgg tctgctggcc	1260
[2921]	ttcatgtctg tgctcgagtc gtcttccact gtcttcgact ggttcatcaa catctccgt	1320
[2922]	gtggccggcc tcattctgtt ggcttcatc tctgctccc acatccgatt catgcaagt	1380
[2923]	cttaagcaca gagggatctc cagagatacg ctgcccttca aggcacgatg gcagccattc	1440
[2924]	tactcatggt acgcgctcgt ctccatcatc ttcatcactc tcattccagg cttcacgtcc	1500
[2925]	ttctggcact ttaccgccg caagttcatg actgcataca tctccgtcat tgtctgggtc	1560
[2926]	ggtttgtaca ttattctcca gtgtctgttc cgatgcaagt tcttatccc tattgaggat	1620
[2927]	gtggacattg acaccggccg acgagagatt gacgacgatg tgtgggagga gaagatcccc	1680
[2928]	acaaagtggg acgagaagtt ttggaatatt attgcataa	1719
[2929]	<210> 106	
[2930]	<211> 23	
[2931]	<212> DNA	
[2932]	<213> 解脂耶氏酵母	
[2933]	<220>	
[2934]	<221> misc_feature	
[2935]	<222> (1) .. (23)	
[2936]	<223> Can1-2靶位点和PAM	
[2937]	<400> 106	
[2938]	ggccactcg gatgactcag agg	23
[2939]	<210> 107	

[2940]	<211>	27	
[2941]	<212>	DNA	
[2942]	<213>	解脂耶氏酵母	
[2943]	<220>		
[2944]	<221>	misc_feature	
[2945]	<222>	(1) .. (17)	
[2946]	<223>	Sou2-1靶位点和PAM	
[2947]	<400>	107	
[2948]		gtctggacct tccaccctcg ccacggg	27
[2949]	<210>	108	
[2950]	<211>	25	
[2951]	<212>	DNA	
[2952]	<213>	解脂耶氏酵母	
[2953]	<220>		
[2954]	<221>	misc_feature	
[2955]	<222>	(1) .. (25)	
[2956]	<223>	Sou2-2靶位点和PAM	
[2957]	<400>	108	
[2958]		gcagtcccgt ggcgagggtg gaagg	25
[2959]	<210>	109	
[2960]	<211>	20	
[2961]	<212>	RNA	
[2962]	<213>	人工序列	
[2963]	<220>		
[2964]	<223>	Can1-2的可变靶向结构域	
[2965]	<400>	109	
[2966]		ggcccacucg gaugacucag	20
[2967]	<210>	110	
[2968]	<211>	24	
[2969]	<212>	RNA	
[2970]	<213>	人工序列	
[2971]	<220>		
[2972]	<223>	Sou2-1的可变靶向结构域	
[2973]	<400>	110	
[2974]		gucuggaccu uccaccucg ccac	24
[2975]	<210>	111	
[2976]	<211>	22	
[2977]	<212>	RNA	
[2978]	<213>	人工序列	
[2979]	<220>		
[2980]	<223>	Sou2-2的可变靶向结构域	
[2981]	<400>	111	

[2982]	gcagucccgug ggcgagggug ga	22
[2983]	<210> 112	
[2984]	<211> 23	
[2985]	<212> DNA	
[2986]	<213> 解脂耶氏酵母	
[2987]	<400> 112	
[2988]	cagctcgaga cgtcctagaa cgg	23
[2989]	<210> 113	
[2990]	<211> 23	
[2991]	<212> DNA	
[2992]	<213> 解脂耶氏酵母	
[2993]	<400> 113	
[2994]	ttcctctgtc acagacgttt cgg	23
[2995]	<210> 114	
[2996]	<211> 23	
[2997]	<212> DNA	
[2998]	<213> 解脂耶氏酵母	
[2999]	<400> 114	
[3000]	gaaaagtgcg ttttgattct cgg	23
[3001]	<210> 115	
[3002]	<211> 19	
[3003]	<212> RNA	
[3004]	<213> 人工序列	
[3005]	<220>	
[3006]	<223> ura3-1的可变靶向结构域	
[3007]	<400> 115	
[3008]	gccgcucgag ugcucaagc	19
[3009]	<210> 116	
[3010]	<211> 22	
[3011]	<212> DNA	
[3012]	<213> 解脂耶氏酵母	
[3013]	<220>	
[3014]	<221> misc_feature	
[3015]	<222> (1) .. (22)	
[3016]	<223> URa3-1靶位点和PAM	
[3017]	<400> 116	
[3018]	gccgctcgag tgctcaagct cg	22
[3019]	<210> 117	
[3020]	<211> 1379	
[3021]	<212> PRT	
[3022]	<213> 人工序列	
[3023]	<220>	

[3024]	<223> Cas9-SV40 NLS D10A H840A																			
[3025]	<400> 117																			
[3026]	Met	Asp	Lys	Lys	Tyr	Ser	Ile	Gly	Leu	Ala	Ile	Gly	Thr	Asn	Ser	Val				
[3027]	1				5					10						15				
[3028]	Gly	Trp	Ala	Val	Ile	Thr	Asp	Glu	Tyr	Lys	Val	Pro	Ser	Lys	Lys	Phe				
[3029]				20					25					30						
[3030]	Lys	Val	Leu	Gly	Asn	Thr	Asp	Arg	His	Ser	Ile	Lys	Lys	Asn	Leu	Ile				
[3031]				35				40						45						
[3032]	Gly	Ala	Leu	Leu	Phe	Asp	Ser	Gly	Glu	Thr	Ala	Glu	Ala	Thr	Arg	Leu				
[3033]		50					55					60								
[3034]	Lys	Arg	Thr	Ala	Arg	Arg	Arg	Tyr	Thr	Arg	Arg	Lys	Asn	Arg	Ile	Cys				
[3035]	65					70				75						80				
[3036]	Tyr	Leu	Gln	Glu	Ile	Phe	Ser	Asn	Glu	Met	Ala	Lys	Val	Asp	Asp	Ser				
[3037]					85				90					95						
[3038]	Phe	Phe	His	Arg	Leu	Glu	Glu	Ser	Phe	Leu	Val	Glu	Glu	Asp	Lys	Lys				
[3039]				100					105					110						
[3040]	His	Glu	Arg	His	Pro	Ile	Phe	Gly	Asn	Ile	Val	Asp	Glu	Val	Ala	Tyr				
[3041]				115					120					125						
[3042]	His	Glu	Lys	Tyr	Pro	Thr	Ile	Tyr	His	Leu	Arg	Lys	Lys	Leu	Val	Asp				
[3043]		130					135					140								
[3044]	Ser	Thr	Asp	Lys	Ala	Asp	Leu	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Leu	Ala	His				
[3045]	145					150					155					160				
[3046]	Met	Ile	Lys	Phe	Arg	Gly	His	Phe	Leu	Ile	Glu	Gly	Asp	Leu	Asn	Pro				
[3047]					165				170					175						
[3048]	Asp	Asn	Ser	Asp	Val	Asp	Lys	Leu	Phe	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Thr	Tyr				
[3049]				180					185					190						
[3050]	Asn	Gln	Leu	Phe	Glu	Glu	Asn	Pro	Ile	Asn	Ala	Ser	Gly	Val	Asp	Ala				
[3051]			195					200					205							
[3052]	Lys	Ala	Ile	Leu	Ser	Ala	Arg	Leu	Ser	Lys	Ser	Arg	Arg	Leu	Glu	Asn				
[3053]		210					215						220							
[3054]	Leu	Ile	Ala	Gln	Leu	Pro	Gly	Glu	Lys	Lys	Asn	Gly	Leu	Phe	Gly	Asn				
[3055]	225					230					235					240				
[3056]	Leu	Ile	Ala	Leu	Ser	Leu	Gly	Leu	Thr	Pro	Asn	Phe	Lys	Ser	Asn	Phe				
[3057]				245					250					255						
[3058]	Asp	Leu	Ala	Glu	Asp	Ala	Lys	Leu	Gln	Leu	Ser	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp				
[3059]			260						265					270						
[3060]	Asp	Asp	Leu	Asp	Asn	Leu	Leu	Ala	Gln	Ile	Gly	Asp	Gln	Tyr	Ala	Asp				
[3061]			275						280					285						
[3062]	Leu	Phe	Leu	Ala	Ala	Lys	Asn	Leu	Ser	Asp	Ala	Ile	Leu	Leu	Ser	Asp				
[3063]		290					295						300							
[3064]	Ile	Leu	Arg	Val	Asn	Thr	Glu	Ile	Thr	Lys	Ala	Pro	Leu	Ser	Ala	Ser				
[3065]	305					310					315					320				

[3066]	Met	Ile	Lys	Arg	Tyr	Asp	Glu	His	His	Gln	Asp	Leu	Thr	Leu	Leu	Lys
[3067]							325				330				335	
[3068]	Ala	Leu	Val	Arg	Gln	Gln	Leu	Pro	Glu	Lys	Tyr	Lys	Glu	Ile	Phe	Phe
[3069]							340				345				350	
[3070]	Asp	Gln	Ser	Lys	Asn	Gly	Tyr	Ala	Gly	Tyr	Ile	Asp	Gly	Gly	Ala	Ser
[3071]							355				360				365	
[3072]	Gln	Glu	Glu	Phe	Tyr	Lys	Phe	Ile	Lys	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Met	Asp
[3073]							370				375				380	
[3074]	Gly	Thr	Glu	Glu	Leu	Leu	Val	Lys	Leu	Asn	Arg	Glu	Asp	Leu	Leu	Arg
[3075]							385				390				395	
[3076]	Lys	Gln	Arg	Thr	Phe	Asp	Asn	Gly	Ser	Ile	Pro	His	Gln	Ile	His	Leu
[3077]							405				410				415	
[3078]	Gly	Glu	Leu	His	Ala	Ile	Leu	Arg	Arg	Gln	Glu	Asp	Phe	Tyr	Pro	Phe
[3079]							420				425				430	
[3080]	Leu	Lys	Asp	Asn	Arg	Glu	Lys	Ile	Glu	Lys	Ile	Leu	Thr	Phe	Arg	Ile
[3081]							435				440				445	
[3082]	Pro	Tyr	Tyr	Val	Gly	Pro	Leu	Ala	Arg	Gly	Asn	Ser	Arg	Phe	Ala	Trp
[3083]							450				455				460	
[3084]	Met	Thr	Arg	Lys	Ser	Glu	Glu	Thr	Ile	Thr	Pro	Trp	Asn	Phe	Glu	Glu
[3085]							465				470				475	
[3086]	Val	Val	Asp	Lys	Gly	Ala	Ser	Ala	Gln	Ser	Phe	Ile	Glu	Arg	Met	Thr
[3087]							485				490				495	
[3088]	Asn	Phe	Asp	Lys	Asn	Leu	Pro	Asn	Glu	Lys	Val	Leu	Pro	Lys	His	Ser
[3089]							500				505				510	
[3090]	Leu	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Phe	Thr	Val	Tyr	Asn	Glu	Leu	Thr	Lys	Val	Lys
[3091]							515				520				525	
[3092]	Tyr	Val	Thr	Glu	Gly	Met	Arg	Lys	Pro	Ala	Phe	Leu	Ser	Gly	Glu	Gln
[3093]							530				535				540	
[3094]	Lys	Lys	Ala	Ile	Val	Asp	Leu	Leu	Phe	Lys	Thr	Asn	Arg	Lys	Val	Thr
[3095]							545				550				555	
[3096]	Val	Lys	Gln	Leu	Lys	Glu	Asp	Tyr	Phe	Lys	Lys	Ile	Glu	Cys	Phe	Asp
[3097]							565				570				575	
[3098]	Ser	Val	Glu	Ile	Ser	Gly	Val	Glu	Asp	Arg	Phe	Asn	Ala	Ser	Leu	Gly
[3099]							580				585				590	
[3100]	Thr	Tyr	His	Asp	Leu	Leu	Lys	Ile	Ile	Lys	Asp	Lys	Asp	Phe	Leu	Asp
[3101]							595				600				605	
[3102]	Asn	Glu	Glu	Asn	Glu	Asp	Ile	Leu	Glu	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Leu	Thr
[3103]							610				615				620	
[3104]	Leu	Phe	Glu	Asp	Arg	Glu	Met	Ile	Glu	Glu	Arg	Leu	Lys	Thr	Tyr	Ala
[3105]							625				630				635	
[3106]	His	Leu	Phe	Asp	Asp	Lys	Val	Met	Lys	Gln	Leu	Lys	Arg	Arg	Arg	Tyr
[3107]							645				650				655	

[3108]	Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp
[3109]	660 665 670
[3110]	Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Ser Asp Gly Phe
[3111]	675 680 685
[3112]	Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His Asp Asp Ser Leu Thr Phe
[3113]	690 695 700
[3114]	Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val Ser Gly Gln Gly Asp Ser Leu
[3115]	705 710 715 720
[3116]	His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly Ser Pro Ala Ile Lys Lys Gly
[3117]	725 730 735
[3118]	Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu Leu Val Lys Val Met Gly
[3119]	740 745 750
[3120]	Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln
[3121]	755 760 765
[3122]	Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg Glu Arg Met Lys Arg Ile
[3123]	770 775 780
[3124]	Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln Ile Leu Lys Glu His Pro
[3125]	785 790 795 800
[3126]	Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu Lys Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu
[3127]	805 810 815
[3128]	Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp Gln Glu Leu Asp Ile Asn Arg
[3129]	820 825 830
[3130]	Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp Ala Ile Val Pro Gln Ser Phe Leu Lys
[3131]	835 840 845
[3132]	Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu Thr Arg Ser Asp Lys Asn Arg
[3133]	850 855 860
[3134]	Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu Val Val Lys Lys Met Lys
[3135]	865 870 875 880
[3136]	Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys Leu Ile Thr Gln Arg Lys
[3137]	885 890 895
[3138]	Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly Gly Leu Ser Glu Leu Asp
[3139]	900 905 910
[3140]	Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr
[3141]	915 920 925
[3142]	Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp
[3143]	930 935 940
[3144]	Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser
[3145]	945 950 955 960
[3146]	Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg
[3147]	965 970 975
[3148]	Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val
[3149]	980 985 990

[3150]	Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe		
[3151]	995	1000	1005
[3152]	Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala		
[3153]	1010	1015	1020
[3154]	Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe		
[3155]	1025	1030	1035
[3156]	Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala		
[3157]	1040	1045	1050
[3158]	Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu		
[3159]	1055	1060	1065
[3160]	Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val		
[3161]	1070	1075	1080
[3162]	Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr		
[3163]	1085	1090	1095
[3164]	Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys		
[3165]	1100	1105	1110
[3166]	Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro		
[3167]	1115	1120	1125
[3168]	Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val		
[3169]	1130	1135	1140
[3170]	Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys		
[3171]	1145	1150	1155
[3172]	Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser		
[3173]	1160	1165	1170
[3174]	Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys		
[3175]	1175	1180	1185
[3176]	Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu		
[3177]	1190	1195	1200
[3178]	Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly		
[3179]	1205	1210	1215
[3180]	Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val		
[3181]	1220	1225	1230
[3182]	Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser		
[3183]	1235	1240	1245
[3184]	Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys		
[3185]	1250	1255	1260
[3186]	His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys		
[3187]	1265	1270	1275
[3188]	Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala		
[3189]	1280	1285	1290
[3190]	Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn		
[3191]	1295	1300	1305

[3192]	Ile Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala	
[3193]	1310 1315 1320	
[3194]	Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser	
[3195]	1325 1330 1335	
[3196]	Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr	
[3197]	1340 1345 1350	
[3198]	Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp	
[3199]	1355 1360 1365	
[3200]	Ser Arg Ala Asp Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val	
[3201]	1370 1375	
[3202]	<210> 118	
[3203]	<211> 41	
[3204]	<212> DNA	
[3205]	<213> 人工序列	
[3206]	<220>	
[3207]	<223> D10AF	
[3208]	<400> 118	
[3209]	gaaatactcc atcggcctgg ccattggaac caactctgtc g	41
[3210]	<210> 119	
[3211]	<211> 41	
[3212]	<212> DNA	
[3213]	<213> 人工序列	
[3214]	<220>	
[3215]	<223> D10AR	
[3216]	<400> 119	
[3217]	cgacagagtt ggttccaatg gccaggccga tggagtattt c	41
[3218]	<210> 120	
[3219]	<211> 4140	
[3220]	<212> DNA	
[3221]	<213> 人工序列	
[3222]	<220>	
[3223]	<223> 经耶氏酵母优化的Cas9 D10A	
[3224]	<400> 120	
[3225]	atggacaaga aatactccat cggcctggcc attggaacca actctgtcgg ctgggctgtc	60
[3226]	atcaccgacg agtacaaggt gccctccaag aaattcaagg tcctcggaaa caccgatcga	120
[3227]	cactccatca agaaaaacct cattggtgcc ctgttggtcg attctggcga gactgccgaa	180
[3228]	gctaccagac tcaagcgaac tgctcggcga cgttacaccc gacggaagaa ccgaatctgc	240
[3229]	tacctgcagg agatcttttc caacgagatg gccaaagtgg acgattcgtt ctttcacga	300
[3230]	ctggaggaat ctttcctcgt cgaggaagac aagaaacacg agcgtcatcc catctttggc	360
[3231]	aacattgttg acgaggttgc ttaccacgag aagtatccta ccatctacca cctgcgaaag	420
[3232]	aaactcgtcg attccaccga caaggcgat ctcagactta tctacctgc tctggcacac	480
[3233]	atgatcaagt ttcgaggtca tttcctcatc gagggcgatc tcaatcccga caacagcgat	540

[3234]	gtggacaagc	tgttcattca	gctcgttcag	acctacaacc	agctgttcga	ggaaaacccc	600
[3235]	atcaatgcct	ccggagtcga	tgcaaaggcc	atcttgtctg	ctcgactctc	gaagagcaga	660
[3236]	cgactggaga	acctcattgc	ccaacttcct	ggcgagaaaa	agaacggact	gtttggcaac	720
[3237]	ctcattgccc	tttctcttgg	tctcacaccc	aacttcaagt	ccaacttcga	tctggcggag	780
[3238]	gagccaagc	tccagctgtc	caaggacacc	tacgacgatg	acctcgacaa	cctgcttgca	840
[3239]	cagattggcg	atcagtacgc	cgacctgttt	ctcgctgcca	agaacctttc	ggatgctatt	900
[3240]	ctcttgtctg	acattctgcg	agtcaacacc	gagatcacaa	aggctccctt	ttctgcctcc	960
[3241]	atgatcaagc	gatacgacga	gcaccatcag	gatctcacac	tgctcaaggc	tcttgtccga	1020
[3242]	cagcaactgc	ccgagaagta	caaggagatc	tttttcgatc	agtcgaagaa	cggctacgct	1080
[3243]	ggatacatcg	acggcggagc	ctctcaggaa	gagttctaca	agttcatcaa	gccaatctct	1140
[3244]	gagaagatgg	acggaaccga	ggaactgctt	gtcaagctca	atcgagagga	tctgcttcgg	1200
[3245]	aagcaacgaa	ccttcgacaa	cggcagcatt	cctcatcaga	tccacctcgg	tgagctgcac	1260
[3246]	gccattcttc	gacgtcagga	agacttctac	ccctttctca	aggacaaccg	agagaagatc	1320
[3247]	gagaagattc	ttacctttcg	aatcccctac	tatgttggtc	ctcttgccag	aggaaactct	1380
[3248]	cgatttgctt	ggatgactcg	aaagtccgag	gaaacatca	ctccctggaa	cttcgaggaa	1440
[3249]	gtcgtggaca	agggtgcctc	tgcacagtcc	ttcatcgagc	gaatgaccaa	cttcgacaag	1500
[3250]	aatctgcccc	acgagaaggt	tcttccaag	cattcgctgc	tctacgagta	ctttacagtc	1560
[3251]	tacaacgaac	tcaccaaagt	caagtacgtt	accgagggaa	tgcgaaagcc	tgcttcttgc	1620
[3252]	tctggcgaac	agaagaaagc	cattgtcgat	ctcctgttca	agaccaaccg	aaaggtcact	1680
[3253]	gttaagcagc	tcaaggagga	ctacttcaag	aaaatcgagt	gtttcgacag	cgtcgagatt	1740
[3254]	tccggagtgc	aggaccgatt	caacgcctct	ttgggcacct	atcacgatct	gctcaagatt	1800
[3255]	atcaaggaca	aggattttct	cgacaacgag	gaaaacgagg	acattctgga	ggacatcgtg	1860
[3256]	ctcactctta	ccctgttcga	agatcgggag	atgatcgagg	aacgactcaa	gacatacgtc	1920
[3257]	cacctgttcg	acgacaaggt	catgaaacaa	ctcaagcgac	gtagatacac	cggctgggga	1980
[3258]	agactttcgc	gaaagctcat	caacggcatc	agagacaagc	agtcgggaaa	gaccattctg	2040
[3259]	gactttctca	agtcggatgg	ctttgccaac	cgaacttca	tgcagctcat	tcacgacgat	2100
[3260]	tctcttacct	tcaaggagga	catccagaag	gcacaagtgt	ccggtcaggg	cgacagcttg	2160
[3261]	cacgaacata	ttgccaacct	ggctggttcg	ccagccatca	agaaaggcat	tctccagact	2220
[3262]	gtcaaggttg	tcgacgagct	ggtgaaggtc	atgggacgtc	acaagcccga	gaacattgtg	2280
[3263]	atcgagatgg	ccagagagaa	ccagacaact	caaaagggtc	agaaaaactc	gcgagagcgg	2340
[3264]	atgaagcgaa	tcgaggaagg	catcaaggag	ctgggatccc	agattctcaa	ggagcatccc	2400
[3265]	gtcgagaaca	ctcaactgca	gaacgagaag	ctgtatctct	actatctgca	gaatggctga	2460
[3266]	gacatgtacg	tggatcagga	actggacatc	aatcgtctca	gcgactacga	tgtggaccac	2520
[3267]	attgtccctc	aatcctttct	caaggacgat	tctatcgaca	acaaggtcct	tacacgatcc	2580
[3268]	gacaagaaca	gaggcaagtc	ggacaacgtt	cccagcgaag	aggttgtcaa	aaagatgaag	2640
[3269]	aactactggc	gacagctgct	caacgccaa	ctcattaccc	agcgaaagtt	cgacaatctt	2700
[3270]	accaaggccg	agcgaggcgg	tctgtccgag	ctcgacaagg	ctggcttcat	caagcgtcaa	2760
[3271]	ctcgtcgaga	ccagacagat	cacaaagcac	gtcgcacaga	ttctcgattc	tcggatgaac	2820
[3272]	accaagtacg	acgagaacga	caagctcatc	cgagaggtca	aggtgattac	tctcaagtcc	2880
[3273]	aaactggctc	ccgatttccg	aaaggacttt	cagttctaca	aggtgcgaga	gatcaacaat	2940
[3274]	taccaccatg	cccacgatgc	ttacctcaac	gccgtcgttg	gcactgcgct	catcaagaaa	3000
[3275]	taccccaagc	tcgaaagcga	gttcgtttac	ggcgattaca	aggtctacga	cgttcgaaag	3060

[3276]	atgattgcca agtccgaaca ggagattggc aaggctactg ccaagtactt cttttactcc	3120
[3277]	aacatcatga actttttcaa gaccgagatc accttggcca acggagagat tcgaaagaga	3180
[3278]	ccacttatcg agaccaacgg cgaaactgga gagatcgtgt gggacaaggg tcgagacttt	3240
[3279]	gcaaccgtgc gaaaggttct gtcgatgcct caggtcaaca tcgtcaagaa aaccgaggtt	3300
[3280]	cagactggcg gatttctcaa ggagtcgatt ctgcccgaagc gaaactccga caagctcatc	3360
[3281]	gctcgaaga aagactggga tccaagaaa tacggtggct tcgatttctc taccgtcgcc	3420
[3282]	tattccgtgc ttgtcgttgc gaaggtcgag aagggaagt ccaaaaagt caagtcgctc	3480
[3283]	aaggagctgc tcggaattac catcatggag cgatcgagct tcgagaagaa tcccatcgac	3540
[3284]	ttcttgaag ccaagggtta caaggagtc aagaaagacc tcattatcaa gctgcccgaag	3600
[3285]	tactctctgt tcgaactgga gaacggtcga aagcgtatgc tcgcctccgc tggcgagctg	3660
[3286]	cagaaggga acgagcttgc cttgccttcg aagtacgtca actttctcta tctggcttct	3720
[3287]	cactacgaga agtcaaggg ttctcccag gacaacgaac agaagcaact cttcgttgag	3780
[3288]	cagcacaac attacctga cgagattatc gagcagattt ccgagtttcc gaagcgagtc	3840
[3289]	atcctggctg atgccaactt ggacaagggt ctctctgcct acaacaagca tcgggacaaa	3900
[3290]	cccattcgag aacaggcgga gaacatcatt cacctgttta ctcttaccac cctgggtgct	3960
[3291]	cctgcagctt tcaagtactt cgataccact atcgaccgaa agcggtagac atccaccaag	4020
[3292]	gaggttctcg atgccaccct gattcaccag tccatcactg gcctgtacga gacccgaatc	4080
[3293]	gacctgtctc agcttgggtg cgactccaga gccgatccca agaaaaagcg aaaggtctaa	4140
[3294]	<210> 121	
[3295]	<211> 10706	
[3296]	<212> DNA	
[3297]	<213> 人工序列	
[3298]	<220>	
[3299]	<223> pRF111	
[3300]	<400> 121	
[3301]	catggacaag aaatactcca tcggcctggc cattggaacc aactctgtcg gctgggctgt	60
[3302]	catcaccgac gagtacaagg tgccctccaa gaaattcaag gtcctcgga acaccgatcg	120
[3303]	acactccatc aagaaaaacc tcattgggtgc cctgttgttc gattctggcg agactgccga	180
[3304]	agctaccaga ctcaagcgaa ctgctcgcg acgttacacc cgacggaaga accgaatctg	240
[3305]	ctacctgcag gagatctttt ccaacgagat ggccaagggt gacgattcgt tctttcatcg	300
[3306]	actggaggaa tccttctctg tcgaggaaga caagaaacac gacgctcatc ccatctttgg	360
[3307]	caacattgtg gacgaggttg cttaccacga gaagtatcct accatctacc acctgcgaaa	420
[3308]	gaaactcgtc gattccaccg acaaggcgga tctcagactt atctacctcg ctctggcaca	480
[3309]	catgatcaag ttctgaggtc atttctctcat cgaggcgcat ctcaatcccg acaacagcga	540
[3310]	tgtggacaag ctgttcattc agctcgttca gacctacaac cagctgttcg agggaaaacc	600
[3311]	catcaatgcc tccggagtgc atgcaaaggc catcttgtct gctcgactct cgaagagcag	660
[3312]	acgactggag aacctcattg cccaacttcc tggcgagaaa aagaacggac tgtttggcaa	720
[3313]	cctcattgcc ctttctcttg gtctcacacc caacttcaag tccaacttcg atctggcgga	780
[3314]	ggacgccaaag ctccagctgt ccaaggacac ctacgacgat gacctcgaca acctgcttgc	840
[3315]	acagattggc gatcagtacg ccgacctgtt tctcgtgcc aagaaccttt cggatgctat	900
[3316]	tctcttgtct gacattctgc gagtcaacac cgagatcaca aaggctcccc ttctgtcctc	960
[3317]	catgatcaag cgatacgacg agcaccatca ggatctcaca ctgctcaagg ctcttgtccg	1020

[3318]	acagcaactg cccgagaagt acaaggagat ctttttcgat cagtcgaaga acggctacgc	1080
[3319]	tggatacatc gacggcggag cctctcagga agagttctac aagttcatca agccaattct	1140
[3320]	cgagaagatg gacggaaccg aggaactgct tgtcaagctc aatcgagagg atctgcttcg	1200
[3321]	gaagcaacga accttcgaca acggcagcat tcctcatcag atccacctcg gtgagctgca	1260
[3322]	cgccattctt cgacgtcagg aagacttcta cccctttctc aaggacaacc gagagaagat	1320
[3323]	cgagaagatt cttacctttc gaatccccta ctatgttggt cctcttgcca gaggaaactc	1380
[3324]	tcgatttgc tggatgactc gaaagtccga ggaaaccatc actccctgga acttcgagga	1440
[3325]	agtcgtggac aagggtgcct ctgcacagtc cttcatcgag cgaatgacca acttcgacaa	1500
[3326]	gaatctgccc aacgagaagg ttcttcccaa gcattcgctg ctctacgagt actttacagt	1560
[3327]	ctacaacgaa ctcaccaaag tcaagtacgt taccgaggga atgcgaaagc ctgccttctt	1620
[3328]	gtctggcgaa cagaagaaag ccattgtcga tctcctgttc aagaccaacc gaaaggtcac	1680
[3329]	tgtaagcag ctcaaggagg actacttcaa gaaaatcgag tgtttcgaca gcgtcgagat	1740
[3330]	ttccggagtt gaggaccgat tcaacgcctc tttgggcacc tatcacgac tgctcaagat	1800
[3331]	tatcaaggac aaggattttc tcgacaacga ggaaaacgag gacattctgg aggacatcgt	1860
[3332]	gctcactctt accctgttcg aagatcgga gatgatcgag gaacgactca agacatacgc	1920
[3333]	tcacctgttc gacgacaagg tcatgaaaca actcaagcga cgtagataca ccggctgggg	1980
[3334]	aagactttcg cgaaagctca tcaacggcat cagagacaag cagtccgga agaccattct	2040
[3335]	ggactttctc aagtccgatg gctttgcca ccgaaacttc atgcagctca ttcacgacga	2100
[3336]	ttctcttacc ttcaaggagg acatccagaa ggcacaagtg tccggtcagg gcgacagctt	2160
[3337]	gcacgaacat attgccaacc tggctggttc gccagccatc aagaaaggca ttctccagac	2220
[3338]	tgtcaagggt gtcgacgagc tgggtgaaggt catgggacgt cacaagccc agaacattgt	2280
[3339]	gatcgagatg gccagagaga accagacaac tcaaaagggt cagaaaaact cgcgagagcg	2340
[3340]	gatgaagcga atcgaggaag gcatcaagga gctgggatcc cagattctca aggagcatcc	2400
[3341]	cgtcgagaac actcaactgc agaacgagaa gctgtatctc tactatctgc agaatggtcg	2460
[3342]	agacatgtac gtggatcagg aactggacat caatcgtctc agegactacg atgtggacca	2520
[3343]	cattgtccct caatcctttc tcaaggacga ttctatcgac aacaaggtcc ttacacgac	2580
[3344]	cgacaagaac agaggcaagt cggacaacgt tcccagcgaa gaggtggtca aaaagatgaa	2640
[3345]	gaactactgg cgacagctgc tcaacgcca gctcattacc cagcgaaagt tcgacaatct	2700
[3346]	taccaaggcc gagcgaggcg gtctgtccga gctcgacaag gctggcttca tcaagcgtca	2760
[3347]	actcgtcgag accagacaga tcacaaagca cgtcgacag attctcgatt ctcgatgaa	2820
[3348]	caccaagtac gacgagaacg acaagctcat ccgagaggtc aaggtgatta ctctcaagtc	2880
[3349]	caaactggtc tccgatttcc gaaaggactt tcagttctac aaggtgagag agatcaacaa	2940
[3350]	ttaccacat gccacgatg cttacctcaa cgccgtcgtt ggcaactgcgc tcatcaagaa	3000
[3351]	ataccccaag ctcgaaagcg agttcgttta cggcgattac aaggtctacg acgttcgaaa	3060
[3352]	gatgattgcc aagtccgaac aggagattgg caaggctact gccaaagtact tcttttactc	3120
[3353]	caacatcatg aactttttca agaccgagat caccttgccc aacggagaga ttcgaaagag	3180
[3354]	accacttatc gagaccaacg gcgaaactgg agagatcgtg tgggacaagg gtcgagactt	3240
[3355]	tgcaaccgtg cgaaagggtc tgtcgatgcc tcaggtcaac atcgtcaaga aaaccgaggt	3300
[3356]	tcagactggc ggattctcca aggagtcatg tctgcccagg cgaaactccg acaagctcat	3360
[3357]	cgctcgaaag aaagactggg atcccaagaa atacggtggc ttcgattctc ctaccgtcgc	3420
[3358]	ctattccgtg cttgtcgttg cgaaggctga gaaggcgaag tccaaaaagc tcaagtccgt	3480
[3359]	caaggagctg ctcggaatta ccatcatgga gcgatcgagc ttcgagaaga atcccatcga	3540

[3360]	cttcttggaa gccaaagggtt acaaggaggt caagaaagac ctcattatca agctgccccaa	3600
[3361]	gtactctctg ttcgaactgg agaacggctg aaagcgtatg ctcgcctccg ctggcgagct	3660
[3362]	gcagaaggga aacgagcttg ccttgccctc gaagtacgtc aactttctct atctggcttc	3720
[3363]	tcactacgag aagctcaagg gttctcccgga ggacaacgaa cagaagcaac tcttcgttga	3780
[3364]	gcagcacaaa cattacctcg acgagattat cgagcagatt tccgagtttt cgaagcgagt	3840
[3365]	catcctggct gatgccaaact tggacaaggt gctctctgcc tacaacaagc atcgggacaa	3900
[3366]	acccattcga gaacaggcgg agaacatcat tcacctgttt actcttacca acctgggtgc	3960
[3367]	tcctgcagct ttcaagtact tcgataccac tatcgaccga aagcggtaga catccacaa	4020
[3368]	ggaggttctc gatgccaccc tgattcacca gtccatcact ggctgtacg agaccggaat	4080
[3369]	cgacctgtct cagcttggtg gcgactccag agccgatccc aagaaaaagc gaaaggtcta	4140
[3370]	agcgccgcca agtgtggatg gggaagttag tgcccggttc tgtgtgcaca attggcaatc	4200
[3371]	caagatgatg ggattcaaca caggatata gcgagctacg tgggtggtgcg aggatatagc	4260
[3372]	aacggatatt tatgtttgac acttgagaat gtacgataca agcactgtcc aagtacaata	4320
[3373]	ctaaacatac tgtacatact catactcgta cccgggcaac ggtttcaactt gagtgcagt	4380
[3374]	gctagtgtc ttactcgtag agtgtgcaat actgcgtatc atagtctttg atgtatatcg	4440
[3375]	tattcattca tgtagttgc gtacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tggggtgcct	4500
[3376]	aatgagttag ctaactcaca ttaattgcgt tgcgtcact gcccgcttc cagtcgggaa	4560
[3377]	acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta	4620
[3378]	ttgggcgctc ttccgcttc tcgctcactg actcgctgcg ctcggtcgtt cggctgcggc	4680
[3379]	gagcgtatc agctcactca aaggcggtaa tacggtatc cacagaatca ggggataacg	4740
[3380]	cagaaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt	4800
[3381]	tgctggcggt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgtcaa	4860
[3382]	gtcagagggt gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct	4920
[3383]	ccctcgtgcg ctctcctgtt ccgacctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc	4980
[3384]	cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg	5040
[3385]	tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgcg cgctgcgcct	5100
[3386]	tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccaactggcag	5160
[3387]	cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtgtaca gagtcttga	5220
[3388]	agtggtggcc taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggtagctgc gctctgtga	5280
[3389]	agccagttac cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaacaa accaccgtg	5340
[3390]	gtagcgggtg ttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag	5400
[3391]	aagatccttt gatcttttct acggggtctg acgctcagt gaacgaaaac tcacgttaag	5460
[3392]	ggattttggc catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat	5520
[3393]	gaagttttaa atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt taccaatgt	5580
[3394]	taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg ttcattcata gttgcctgac	5640
[3395]	tccccgtcgt gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa	5700
[3396]	tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc cagatttata agcaataaac cagccagccg	5760
[3397]	gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt	5820
[3398]	gttgccggga agctagagta agtagttgc cagttaatag tttgcgcaac gttgttgcca	5880
[3399]	ttgctacagg catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcattc agctccggtt	5940
[3400]	cccaacgatc aaggcgagtt acatgatccc ccatgttggt caaaaaagcg gtagctcct	6000
[3401]	tcggtcctcc gatcgttgtc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg	6060

[3402]	cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactgggtg	6120
[3403]	agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg	6180
[3404]	cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtct atcattggaa	6240
[3405]	aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgaatg	6300
[3406]	aaccactcgc tgcacccaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt	6360
[3407]	gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat aaggcgaca cggaatgtt	6420
[3408]	gaatactcat actcttcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca	6480
[3409]	tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat	6540
[3410]	ttccccgaaa agtgccacct gacgcgccct gtagcggcgc attagcgcg gcgggtgtgg	6600
[3411]	tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcccgtt ctttctgctt	6660
[3412]	tcttcccttc ctttctcgcc acgttcgccg gctttcccg tcaagctcta aatcgggggc	6720
[3413]	tccctttagg gttccgattt agtgccttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg	6780
[3414]	gtgatgggtc acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttgcacct ttgacgttgg	6840
[3415]	agtccacgtt ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct	6900
[3416]	cggctctattc ttttgattta taagggtatt tgccgatttc ggcctatttg ttaaaaaatg	6960
[3417]	agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgctt acaatttcca	7020
[3418]	ttcgccattc aggctgcgca actgtttgga agggcgatcg gtgcgggcct cttcgctatt	7080
[3419]	acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt	7140
[3420]	ttcccagtcg cgacgttgta aaacgacggc cagtgaattg taatacgact cactataggg	7200
[3421]	cgaattgggt accgggcccc ccctcgaggt cgatgggtgc gataagcttg atatcgatt	7260
[3422]	catgtcacac aaaccgatct tcgcctcaag gaaacctaat tctacatccg agagactgcc	7320
[3423]	gagatccagt ctacactgat taattttcgg gccataaatt taaaaaaatc gtgttatata	7380
[3424]	atattatatg tattatatat atacatcatg atgatactga cagtcatgtc ccattgctaa	7440
[3425]	atagacagac tccatctgcc gcctccaact gatgtttctca atattttaagg ggtcatctcg	7500
[3426]	cattgtttaa taataaacag actccatcta ccgcctccaa atgatgttct caaaatatat	7560
[3427]	tgtatgaact tatttttatt acttagtatt attagacaac ttacttgctt tatgaaaaac	7620
[3428]	acttcctatt taggaaacaa tttataatgg cagttcgttc atttaacaat ttatgtagaa	7680
[3429]	taaatgttat aaatgcgtat gggaaatctt aaatatggat agcataaatg atatctgcat	7740
[3430]	tgctaattc gaaatcaaca gcaacgaaaa aaatcccttg tacaacataa atagtcatcg	7800
[3431]	agaaatatca actatcaaag aacagctatt cacacgttac tattgagatt attattggac	7860
[3432]	gagaatcaca cactcaactg tctttctctc ttctagaaat acaggtacaa gtatgtacta	7920
[3433]	ttctcattgt tcatacttct agtcatttca tcccacatat tcccttgatt tctctccaat	7980
[3434]	gaatgacatt ctatcttgca aattcaacaa ttataataag atataccaaa gtagcgggtat	8040
[3435]	agtggaatc aaaaagcttc tctggtgtgc ttctcgtatt tatttttatt ctaatgatcc	8100
[3436]	attaaaggta tatatttatt tcttggtata taatcctttt gtttattaca tgggctggat	8160
[3437]	acataaagggt attttgattt aattttttgc ttaaaattcaa tccccctcg ttcagtgtca	8220
[3438]	actgtaatgg taggaaatta ccatactttt gaagaagcaa aaaaaatgaa agaaaaaaa	8280
[3439]	aatcgatatt ccaggttaga cgttccgcag aatctagaat gcggtatgcg gtacattgtt	8340
[3440]	cttcgaacgt aaaagtgcg ctccctgaga tattgtacat ttttgctttt acaagtacaa	8400
[3441]	gtacatcgta caactatgta ctactgttga tgcattccaca acagtttgtt ttgttttttt	8460
[3442]	ttgttttttt tttttctaatt gattcattac cgctatgtat acctacttgt acttgtagta	8520
[3443]	agccgggtta ttggcgttca attaatcata gacttatgaa tctgcacggt gtgcgctgcg	8580

[3444]	agttactttt agcttatgca tgctacttgg gtgtaatatt gggatctgtt cggaaatcaa	8640
[3445]	cggatgctca atcgatttcg acagtaatta attaagtcac acacaagtca gctttcttcg	8700
[3446]	agcctcatat aagtataagt agttcaacgt attagcactg taccagcat ctccgtatcg	8760
[3447]	agaaacacaa caacatgccc cattggacag atcatgcgga tacacaggtt gtgcagtatc	8820
[3448]	atacactctc gatcagacag gtcgtctgac catcatacaa gctgaacaag cgctccatac	8880
[3449]	ttgcacgctc tctatataca cagttaaatt acatatccat agtctaacct ctaacagtta	8940
[3450]	atcttctggt aagcctccca gccagccttc tggatctgct tggcctcctc aataggatct	9000
[3451]	cggttctggc cgtacagacc tcggccgaca attatgatat ccgttccggt agacatgaca	9060
[3452]	tcctcaacag ttccgtactg ctgtccgaga gcgtctccct tgcgtcaag acccaccctg	9120
[3453]	ggggtcagaa taagccagtc ctacagctcg cccttaggtc ggttctgggc aatgaagcca	9180
[3454]	accacaaact cggggtcgga tcgggcaagc tcaatggtct gcttgagta ctgccagtg	9240
[3455]	gccagagagc ccttgcaaga cagctcgcc agcatgagca gacctctggc cagcttctcg	9300
[3456]	ttgggagagg ggactaggaa ctcttctgac tgggagttct cgtagtcaga gacgtcctcc	9360
[3457]	ttcttctgtt cagagacagt ttctcggca ccagctcgca ggccagcaat gattccggtt	9420
[3458]	ccgggtacac cgtgggcgtt ggtgatctcg gaccactcgg cgattcgggt acaccggtag	9480
[3459]	tgggtgctga cagtgttgc aatatctcg aactttctgt cctcgaacag gaagaaaccg	9540
[3460]	tgcttaagag caagttcctt gagggggagc acagtccgg cgtaggtgaa gtcgtcaatg	9600
[3461]	atgtcgatat gggttttgat catgcacaca taaggtccga ccttatcggc aagctcaatg	9660
[3462]	agctccttgg tgggtgtaac atccagagaa gcacacaggt tggttttctt ggctgccacg	9720
[3463]	agcttgagca ctcgagcggc aaaggcggac ttgtggacgt tagctcgagc ttctgtaggag	9780
[3464]	ggcattttgg tgggtgaagag gagactgaaa taaatttagt ctgcagaact ttttatcgga	9840
[3465]	accttatctg gggcagtgaa gtatatgta tggtaatagt tacgagttag ttgaacttat	9900
[3466]	agatagactg gactatacgg ctatcggctc aaattagaaa gaacgtcaat ggctctctgg	9960
[3467]	gcgtgcctt tgccgacaaa aatgtgatca tgatgaaagc cagcaatgac gttgcagctg	10020
[3468]	atattgttgt cggccaaccg cgccgaaaac gcagctgtca gaccacagc ctccaacgaa	10080
[3469]	gaatgtatcg tcaaagtgat ccaagcacac tcatagttgg agtcgtactc caaaggcggc	10140
[3470]	aatgacgagt cagacagata ctctcgacg tttaaacat catctaagg cctcaaaact	10200
[3471]	acctcggaac tgctgcgtg atctggacac cacagaggtt ccgagcatt taggttgcac	10260
[3472]	caaatgtccc accagtgca ggcagaaaac gctggaacag cgtgtacagt ttgtcttaac	10320
[3473]	aaaaagtgag ggcgtgagg tcgagcaggg tgggtgtgact tgttatagcc tttagagctg	10380
[3474]	cgaagcgcg tatggatttg gctcatcagg ccagattgag ggtctgtgga cacatgtcat	10440
[3475]	gttagtgtac ttcaatcgcc ccctggatat agccccgaca ataggccgtg gcctcathtt	10500
[3476]	tttgcttcc gcacatttcc attgctcggc acccacacct tgcttctcct gcacttgcca	10560
[3477]	accttaatac tggtttacat tgaccaacat cttacaagcg gggggcttgt ctaggttata	10620
[3478]	tataaacagt ggctctccca atcggttgcc agtctctttt ttctttctt tccccacaga	10680
[3479]	ttcgaaatct aaactacaca tcacac	10706
[3480]	<210> 122	
[3481]	<211> 43	
[3482]	<212> DNA	
[3483]	<213> 人工序列	
[3484]	<220>	
[3485]	<223> H840A1	

[3486]	<400> 122	
[3487]	tcagcgacta cgatgtggac gccattgtcc ctcaatcctt tct	43
[3488]	<210> 123	
[3489]	<211> 43	
[3490]	<212> DNA	
[3491]	<213> 人工序列	
[3492]	<220>	
[3493]	<223> H840A2	
[3494]	<400> 123	
[3495]	agaaaggatt gagggacaat ggcgtccaca tcgtagtcgc tga	43
[3496]	<210> 124	
[3497]	<211> 4140	
[3498]	<212> DNA	
[3499]	<213> 人工序列	
[3500]	<220>	
[3501]	<223> 经耶氏酵母密码子优化的失活的Cas9	
[3502]	<400> 124	
[3503]	atggacaaga aatactccat cggcctggcc attggaacca actctgtcgg ctgggctgtc	60
[3504]	atcaccgacg agtacaaggt gccctccaag aaattcaagg tcctcggaaa caccgatcga	120
[3505]	cactccatca agaaaaacct catttggtgcc ctgttggtcg attctggcga gactgccgaa	180
[3506]	gctaccagac tcaagcgaac tgctcggcga cgttacaccc gacggaagaa ccgaatctgc	240
[3507]	tacctgcagg agatcttttc caacgagatg gccaaagggtg acgattcgtt ctttcatcga	300
[3508]	ctggaggaat ctttctctgt cgaggaagac aagaaacacg agcgtcatcc catctttggc	360
[3509]	aacattgttg acgaggttgc ttaccacgag aagtatccta ccatctacca cctgcgaaag	420
[3510]	aaactcgtcg attccaccga caaggcggat ctacagacta tctacctcgc tctggcacac	480
[3511]	atgatcaagt ttcgaggtca tttctctatc gagggcgatc tcaatcccga caacagcgat	540
[3512]	gtggacaagc tgttcattca gctcgttcag acctacaacc agctgttcga ggaaaacccc	600
[3513]	atcaatgcct ccggagtcga tgcaaaggcc atcttgtctg ctcgactctc gaagagcaga	660
[3514]	cgactggaga acctcattgc ccaacttctt ggcgagaaaa agaacggact gtttggcaac	720
[3515]	ctcattgccc tttctcttgg tctcacaccc aacttcaagt ccaacttcga tctggcggag	780
[3516]	gacgccaagc tccagctgtc caaggacacc tacgacgatg acctcgacaa cctgcttgca	840
[3517]	cagattggcg atcagtacgc cgacctgttt ctgctgcca agaacctttc ggatgctatt	900
[3518]	ctcttgtctg acattctcgc agtcaacacc gagatcacaa aggtctccct ttctgcctcc	960
[3519]	atgatcaagc gatacgacga gcaccatcag gatctcacac tgctcaaggc tcttgtccga	1020
[3520]	cagcaactgc ccgagaagta caaggagatc tttttcgatc agtcgaagaa cggctacgct	1080
[3521]	ggatacatcg acggcggagc ctctcaggaa gagttctaca agttcatcaa gccaatctctc	1140
[3522]	gagaagatgg acggaaccga ggaactgctt gtcaagctca atcgagagga tctgcttcgg	1200
[3523]	aagcaacgaa ccttcgacaa cggcagcatt cctcatcaga tccacctcgg tgagctgcac	1260
[3524]	gccattcttc gacgtcagga agacttctac ccctttctca aggacaaccg agagaagatc	1320
[3525]	gagaagattc ttacctttcg aatcccctac tatgttggtc ctcttgccag aggaaactct	1380
[3526]	cgatttgctt ggatgactcg aaagtcggag gaaacatca ctccctggaa cttcgaggaa	1440
[3527]	gtcgtggaca aggggtgcctc tgcacagtcc ttcacgagc gaatgaccaa cttcgacaag	1500

[3528]	aatctgcccc acgagaaggt tcttcccaag cattcgtgc tctacgagta ctttacagtc	1560
[3529]	tacaacgaac tcaccaaaagt caagtacgtt accgagggaa tgcgaaagcc tgccttcttg	1620
[3530]	tctggcgaac agaagaaagc cattgtcgat ctctgttca agaccaaccg aaaggtcact	1680
[3531]	gttaagcagc tcaaggagga ctacttcaag aaaatcgagt gtttcgacag cgtcgagatt	1740
[3532]	tccggagttg aggaccgatt caacgcctct ttgggcacct atcacgatct gctcaagatt	1800
[3533]	atcaaggaca aggattttct cgacaacgag gaaaacgagg acattctgga ggacatcgtg	1860
[3534]	ctcactctta ccctgttcga agatcgggag atgatcgagg aacgactcaa gacatacgtc	1920
[3535]	cacctgttcg acgacaaggt catgaaacaa ctcaagcgac gtagatacac cggctgggga	1980
[3536]	agactttcgc gaaagctcat caacggcatc agagacaagc agtccgaaa gaccattctg	2040
[3537]	gactttctca agtccgatgg ctttgccaac cgaaacttca tgcagctcat tcacgacgat	2100
[3538]	tctcttacct tcaaggagga catccagaag gcacaagtgt ccggtcaggg cgacagcttg	2160
[3539]	cacgaacata ttgccaacct ggctggttcg ccagccatca agaaaggcat tctccagact	2220
[3540]	gtcaaggttg tcgacgagct ggtgaagtc atgggacgtc acaagcccga gaacattgtg	2280
[3541]	atcgagatgg ccagagagaa ccagacaact caaaagggtc agaaaaactc gcgagagcgg	2340
[3542]	atgaagcgaa tcgaggaagg catcaaggag ctgggatccc agattctcaa ggagcatccc	2400
[3543]	gtcgagaaca ctcaactgca gaacgagaag ctgtatctct actatctgca gaatggctga	2460
[3544]	gacatgtacg tggatcagga actggacatc aatcgtctca gcgactacga tgtggacgcc	2520
[3545]	attgtccctc aatcctttct caaggacgat tctatcgaca acaaggtcct tacacgatcc	2580
[3546]	gacaagaaca gaggcaagtc ggacaacgtt ccagcgaag aggtggtcaa aaagatgaag	2640
[3547]	aactactggc gacagctgct caacgccaaag ctctattacc agcgaaagtt cgacaatctt	2700
[3548]	accaaggccg agcgaggcgg tctgtccgag ctcgacaagg ctggcttcat caagcgtcaa	2760
[3549]	ctcgtcgaga ccagacagat cacaagcac gtcgcacaga ttctcgattc tcggatgaac	2820
[3550]	accaagtacg acgagaacga caagctcatc cgagaggtca aggtgattac tctcaagtcc	2880
[3551]	aaactggtct ccgatttccg aaaggacttt cagttctaca aggtgcgaga gatcaacaat	2940
[3552]	taccaccatg cccacgatgc ttacctcaac gccgtcgttg gcaactgcgt catcaagaaa	3000
[3553]	tacccaagc tcgaaagcga gtctgtttac ggcgattaca aggtctacga cgttcgaaag	3060
[3554]	atgattgcca agtccgaaca ggagattggc aaggctactg ccaagtactt cttttactcc	3120
[3555]	aacatcatga actttttcaa gaccgagatc accttggcca acggagagat tcgaaagaga	3180
[3556]	ccacttatcg agaccaacgg cgaaactgga gagatcgtgt gggacaaggg tcgagacttt	3240
[3557]	gcaaccgtgc gaaaggttct gtcgatgcct caggtcaaca tcgtcaagaa aaccgaggtt	3300
[3558]	cagactggcg gatttctcaa ggagtcgatt ctgcccgaag gaaactccga caagctcatc	3360
[3559]	gctcgaaaga aagactggga tcccaagaaa tacggtggct tcgatttctc taccgtcgcc	3420
[3560]	tattccgtgc ttgtcgttgc gaaggtcgag aagggaagc ccaaaaagct caagtcgctc	3480
[3561]	aaggagctgc tcggaattac catcatggag cgatcgagct tcgagaagaa tcccatcgac	3540
[3562]	ttcttgaag ccaagggtta caaggagtc aagaaagacc tcattatcaa gctgccccag	3600
[3563]	tactctctgt tcgaactgga gaacggtcga aagcgtatgc tcgcctccgc tggcgagctg	3660
[3564]	cagaaggga acgagcttgc cttgccttcg aagtacgtca actttctcta tctggcttct	3720
[3565]	cactacgaga agctcaaggg ttctcccag gacaacgaac agaagcaact ctctgttgag	3780
[3566]	cagcacaac attacctga cgagattatc gagcagattt ccgagtttcc gaagcgagtc	3840
[3567]	atcctggctg atgccaactt ggacaaggtg ctctctgcct acaacaagca tcgggacaaa	3900
[3568]	cccattcgag aacaggcgga gaacatcatt cacctgttta ctcttacc aa cctgggtgct	3960
[3569]	cctgcagctt tcaagtactt cgataccact atcgaccgaa agcggtacac atccaccaag	4020

[3570]	gaggttctcg atgccaccct gattcaccag tccatcactg gcctgtacga gacccgaatc	4080
[3571]	gacctgtctc agcttggtgg cgactccaga gccgatccca agaaaaagcg aaaggtctaa	4140
[3572]	<210> 125	
[3573]	<211> 10706	
[3574]	<212> DNA	
[3575]	<213> 人工序列	
[3576]	<220>	
[3577]	<223> pRF143	
[3578]	<400> 125	
[3579]	catggacaag aaatactcca tcggcctggc cattggaacc aactctgtcg gctgggctgt	60
[3580]	catcaccgac gagtacaagg tgccctccaa gaaattcaag gtccctcgaa acaccgatcg	120
[3581]	acactccatc aagaaaaacc tcattgggtgc cctgttggtc gattctggcg agactgccga	180
[3582]	agctaccaga ctcaagcgaa ctgctcgcg acgttacacc cgacggaaga accgaatctg	240
[3583]	ctacctgcag gagatctttt ccaacgagat ggccaagggtg gacgattcgt tctttcatcg	300
[3584]	actggaggaa tccttcctcg tcgaggaaga caagaaacac gagcgatcgc ccatctttgg	360
[3585]	caacattgtg gacgaggttg cttaccacga gaagtatcct accatctacc acctgcgaaa	420
[3586]	gaaactcgtc gattccaccg acaaggcgga tctcagactt atctacctcg ctctggcaca	480
[3587]	catgatcaag ttctgaggtc atttctctcat cgaggcgcat ctcaatcccg acaacagcga	540
[3588]	tgtggacaag ctgttcattc agctcgttca gacctacaac cagctgttcg aggaaaaccc	600
[3589]	catcaatgcc tccggagtcg atgcaaaggc catcttgtct gctcgactct cgaagagcag	660
[3590]	acgactggag aacctcattg cccaacttcc tggcgagaaa aagaacggac tgtttggcaa	720
[3591]	cctcattgcc ctttctcttg gtctcacacc caacttcaag tccaacttcg atctggcgga	780
[3592]	ggacccaag ctccagctgt ccaaggacac ctacgacgat gacctcgaca acctgcttgc	840
[3593]	acagattggc gatcagtagc cggacctgtt tctcgtgcc aagaaccttt cggatgctat	900
[3594]	tctcttgtct gacattctgc gagtcaacac cgagatcaca aaggctcccc tttctgctc	960
[3595]	catgatcaag cgatacgacg agcaccatca ggatctcaca ctgctcaagg ctcttgtccg	1020
[3596]	acagcaactg cccgagaagt acaaggagat ctttttcgat cagtcgaaga acggctacgc	1080
[3597]	tggatacatc gacggcggag cctctcagga agagtcttac aagtctcatca agccaattct	1140
[3598]	cgagaagatg gacggaaccg aggaactgct tgtcaagctc aatcgagagg atctgcttcg	1200
[3599]	gaagcaacga accttcgaca acggcagcat tctctatcag atccacctcg gtgagctgca	1260
[3600]	cgccattctt cgacgtcagg aagacttcta cccctttctc aaggacaacc gagagaagat	1320
[3601]	cgagaagatt cttacctttc gaatccccta ctatgttggt cctcttgcca gaggaaactc	1380
[3602]	tcgatttgct tggatgactc gaaagtccga ggaaaccatc actccctgga acttcgagga	1440
[3603]	agtcgtggac aagggtgcct ctgcacagtc cttcatcgag cgaatgacca acttcgacaa	1500
[3604]	gaatctgccc aacgagaagg ttcttcccaa gcattcgtcg ctctacgagt actttacagt	1560
[3605]	ctacaacgaa ctacacaaag tcaagtacgt taccgaggga atgcgaaagc ctgccttctt	1620
[3606]	gtctggcgaa cagaagaaag ccattgtcga tctcctgttc aagaccaacc gaaaggtcac	1680
[3607]	tgtaagcag ctcaaggagg actacttcaa gaaaatcgag tgtttcgaca gcgtcgagat	1740
[3608]	ttccggagtt gaggaccgat tcaacgcctc tttgggcacc tatcacgacg tgctcaagat	1800
[3609]	tatcaaggac aaggattttc tcgacaacga ggaaaacgag gacattctgg aggacatcgt	1860
[3610]	gctcactctt acctgttcg aagatcgga gatgatcgag gaacgactca agacatacgc	1920
[3611]	tcacctgttc gacgacaagg tcatgaaaca actcaagcga cgtagatata ccggctgggg	1980

[3612]	aagacttttcg cgaagctca tcaacggcat cagagacaag cagtccggaa agaccattct	2040
[3613]	ggacttttctc aagtccgatg gctttgccaa ccgaaacttc atgcagctca ttcacgacga	2100
[3614]	ttctcttacc ttcaaggagg acatccagaa ggcacaagtg tccggtcagg ggcacagctt	2160
[3615]	gcacgaacat attgccaacc tggctggttc gccagccatc aagaaaggca ttctccagac	2220
[3616]	tgtaagggtt gtcgacgagc tggatgaagg catgggacgt cacaagccc agaacttgt	2280
[3617]	gatcgagatg gccagagaga accagacaac tcaaaagggt cagaaaaact cgcgagagcg	2340
[3618]	gatgaagcga atcgaggaag gcatcaagga gctgggatcc cagatttctca aggagcatcc	2400
[3619]	cgtcgagaac actcaactgc agaacgagaa gctgtatctc tactatctgc agaattgtcg	2460
[3620]	agacatgtac gtggatcagg aactggacat caatcgtctc agcgactacg atgtggacgc	2520
[3621]	cattgtccct caatcctttc tcaaggacga ttctatcgac aacaaggctc ttacacgac	2580
[3622]	cgacaagaac agaggcaagt cggacaacgt tcccagcgaa gaggtggtca aaaagatgaa	2640
[3623]	gaactactgg cgacagctgc tcaacgcca gctcattacc cagcgaaagt tcgacaatct	2700
[3624]	taccaaggcc gagcgaggcg gtctgtccga gctcgacaag gctggcttca tcaagcgtca	2760
[3625]	actcgtcgag accagacaga tcacaaagca cgtcgcacag attctcgatt ctcgatgaa	2820
[3626]	caccaagtac gacgagaacg acaagctcat ccgagaggtc aagggtgatta ctctcaagtc	2880
[3627]	caaactggtc tccgatttcc gaaaggactt tcagttctac aagggtcgag agatcaacaa	2940
[3628]	ttaccacat gccacgatg cttacctcaa cgccgtcgtt ggcaactgcgc tcatcaagaa	3000
[3629]	atacccaag ctcgaaagcg agttcgttta cggcgattac aagggtctac acgttcgaaa	3060
[3630]	gatgattgcc aagtccgaac aggagattgg caaggctact gccaaagtact tcttttactc	3120
[3631]	caacatcatg aactttttca agaccgagat caccttgccc aacggagaga ttcgaaagag	3180
[3632]	accacttatc gagaccaacg gcgaaactgg agagatcgtg tgggacaagg gtcgagactt	3240
[3633]	tgcaaccgtg cgaaagggtc tgtcgatgcc tcaggtcaac atcgtcaaga aaaccgaggt	3300
[3634]	tcagactggc ggatttcca aggagtcgat tctgccaag cgaaactccg acaagctcat	3360
[3635]	cgctcgaaag aaagactggg atcccaagaa atacgggtggc ttcgattctc ctaccgtcg	3420
[3636]	ctattccgtg cttgtcgttg cgaaggtcga gaagggaag tccaaaaagc tcaagtccgt	3480
[3637]	caaggagctg ctcggaatta ccatcatgga gcgatcgagc ttcgagaaga atcccatcga	3540
[3638]	cttcttgga gccaaagggtt acaaggaggt caagaaagac ctcatatca agctgccccaa	3600
[3639]	gtactctctg ttcgaaactgg agaacggtcg aaagcgtatg ctgcctccg ctggcgagct	3660
[3640]	gcgaaggga aacgagcttg ccttgcttc gaagtacgtc aactttctct atctggcttc	3720
[3641]	tcactacgag aagctcaagg gttctccga ggacaacgaa cagaagcaac tcttcgttga	3780
[3642]	gcagacaaa cattacctg acgagattat cgagcagatt tccgagtttt cgaagcgagt	3840
[3643]	catcctggct gatgccaact tggacaagggt gctctctgcc tacaacaagc atcgggacaa	3900
[3644]	accatttcca gaacaggcgg agaactcat tcacctgttt actcttacca acctgggtgc	3960
[3645]	tcctgcagct ttcaagtact tcgataccac tatcgaccga aagcgttaca catccacaa	4020
[3646]	ggaggttctc gatgccaccc tgattcacca gtccatcact ggctgtacg agaccgaat	4080
[3647]	cgacctgtct cagcttggtg gcgactccag agccgatccc aagaaaaagc gaaaggtcta	4140
[3648]	agcggccgca agtgtggatg gggaagttag tgcccggttc tgtgtgcaca attggcaatc	4200
[3649]	caagatggat ggattcaaca caggatata gcgagctacg tgggtggtcg aggatatagc	4260
[3650]	aacggatatt tatgtttgac acttgagaat gtacgataca agcactgtcc aagtacaata	4320
[3651]	ctaaacatac tgtacatact catactcgta cccgggcaac ggtttcaact gagtgcagtg	4380
[3652]	gctagtgtc ttactcgtac agtgtgcaat actgcgtatc atagtctttg atgtatatcg	4440
[3653]	tattcattea tgttagttgc gtacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tggggtgcct	4500

[3654]	aatgagtgag ctaactcaca ttaattgcgt tgcgctcact gcccgcttcc cagtcgggaa	4560
[3655]	acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta	4620
[3656]	ttgggcgtc ttcgcctcc tcgctcactg actcgctgcg ctcggctcgtt cggctgcggc	4680
[3657]	gagcggatc agctcactca aaggcggtaa tacggttata cacagaatca ggggataacg	4740
[3658]	caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt	4800
[3659]	tgctggcgtt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgtcaa	4860
[3660]	gtcagagggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct	4920
[3661]	ccctcgtgcg ctctcctgtt ccgacctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc	4980
[3662]	cttcgggaag cgtggcgtt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg	5040
[3663]	tcgttcgtc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgcg cgctgcgcct	5100
[3664]	tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccaactggcag	5160
[3665]	cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtgtaca gagttcttga	5220
[3666]	agtgtggcc taactacggc tacaactagaa ggacagtatt tggatatctgc gctctgtga	5280
[3667]	agccagttac cttcggaaaa agagttggtg gctcttgatc cggcaaaaa accaccgctg	5340
[3668]	gtagcgggtg ttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag	5400
[3669]	aagatccttt gatcttttct acggggctcg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag	5460
[3670]	ggattttggt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat	5520
[3671]	gaagtttta atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct	5580
[3672]	taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg ttcattcata gttgcctgac	5640
[3673]	tccccgtcgt gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa	5700
[3674]	tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc cagatttata agcaataaac cagccagccg	5760
[3675]	gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt	5820
[3676]	gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttgttgcca	5880
[3677]	ttgctacagg catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcattc agctccggtt	5940
[3678]	cccaacgata aaggcgagtt acatgatccc ccatgttggtg caaaaaagcg gttagctcct	6000
[3679]	tcggtcctcc gatcgttgtc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg	6060
[3680]	cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactgggtg	6120
[3681]	agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg	6180
[3682]	cgtaataacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa	6240
[3683]	aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt	6300
[3684]	aaccactcgt tgcacccaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt	6360
[3685]	gagcaaaaa acggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat aaggcgaca cggaaatgtt	6420
[3686]	gaatactcat actcttcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca	6480
[3687]	tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat	6540
[3688]	ttccccgaaa agtgccacct gacgcgccct gtagcggcgc attagcgcg gcgggtgtgg	6600
[3689]	tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcccgtt ctttctgctt	6660
[3690]	tcttcccttc ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc	6720
[3691]	tccctttagg gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg	6780
[3692]	gtgatggttc acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg	6840
[3693]	agtccacgtt ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct	6900
[3694]	cggctctattc ttttgattta taagggtatt tgccgatttc ggcctatttg ttaaaaaatg	6960
[3695]	agctgattta acaaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgtt acaatttcca	7020

[3696]	ttcgccattc aggctgcgca actgtttgga agggcgatcg gtgcgggcct cttcgctatt	7080
[3697]	acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt	7140
[3698]	ttcccagtea cgacgttgta aaacgacggc cagtgaattg taatacgact cactataggg	7200
[3699]	cgaattgggt accgggcccc ccctcgaggt cgatggtgtc gataagcttg atatcgaatt	7260
[3700]	catgtcacac aaaccgatct tcgcctcaag gaaacctaatt tctacatccg agagactgcc	7320
[3701]	gagatccagt ctacactgat taattttcgg gccaaataatt taaaaaaatc gtgttatata	7380
[3702]	atattatatg tattatatat atacatcatg atgatactga cagtcatgtc ccattgctaa	7440
[3703]	atagacagac tccatctgcc gcctccaact gatgtttctca atattttaagg ggtcatctcg	7500
[3704]	cattgtttta taataaacag actccatcta ccgcctccaa atgatgttct caaaatatat	7560
[3705]	tgatgaact tatttttatt acttagtatt attagacaac ttacttgctt tatgaaaaac	7620
[3706]	acttcttatt taggaaacaa ttataatgg cagttcgttc atttaacaat ttatgtagaa	7680
[3707]	taaatgttat aaatgcgtat gggaaatctt aaatatggat agcataaatg atatctgcat	7740
[3708]	tgccaatc gaaatcaaca gcaacgaaaa aaatcccttg tacaacataa atagtcatcg	7800
[3709]	agaaatatca actatcaaag aacagctatt cacacgttac tattgagatt attattggac	7860
[3710]	gagaatcaca cactcaactg tctttctctc ttctagaaat acaggtacaa gtatgtacta	7920
[3711]	ttctcattgt tcatacttct agtcatttca tcccacatat tccctggatt tctctccaat	7980
[3712]	gaatgacatt ctatcttgca aattcaacaa ttataataag atataccaaa gtagcggat	8040
[3713]	agtggaatc aaaaagcttc tctggtgtgc ttctcgtatt tatttttatt ctaatgatcc	8100
[3714]	attaaaggta tatatttatt tcttggtata taatcctttt gtttattaca tgggctggat	8160
[3715]	acataaagggt attttgattt aattttttgc ttaaattcaa tccccctcg ttcagtgtca	8220
[3716]	actgtaatgg taggaaatta ccatactttt gaagaagcaa aaaaaatgaa agaaaaaaa	8280
[3717]	aatcgtatct ccaggtaga cgttcgcgag aatctagaat gcggtatgcg gtacattgtt	8340
[3718]	cttgaacgt aaaagtgtcg ctccctgaga tattgtacat ttttgctttt acaagtacaa	8400
[3719]	gtacatcgta caactatgta ctactgttga tgcattcaca acagtttggt ttgttttttt	8460
[3720]	ttgttttttt tttttctaag gattcattac cgctatgtat acctacttgt acttgtagta	8520
[3721]	agccgggtta ttggcgttca attaatcata gacttatgaa tctgcacggt gtgcgctgcg	8580
[3722]	agttactttt agcttatgca tgctacttgg gtgtaattatt gggatctgtt cggaatcaa	8640
[3723]	cggatgctca atcgatttcg acagtaatta attaatcat acacaagtca gctttcttcg	8700
[3724]	agcctcatat aagtataagt agttcaacgt attagcactg taccagcat ctccgtatcg	8760
[3725]	agaaacacaa caacatgccc cattggacag atcatgcgga tacacaggtt gtgcagtatc	8820
[3726]	atacactctc gatcagacag gtcgtctgac catcatacaa gctgaacaag cgctccatac	8880
[3727]	ttgcacgctc tctatataca cagttaaatt acatatccat agtctaacct ctaacagtta	8940
[3728]	atcttctggt aagcctccca gccagccttc tggatcgtt tgccctctc aataggatct	9000
[3729]	cggttctggc cgtacagacc tcggccgaca attatgatat ccgttccggt agacatgaca	9060
[3730]	tcctcaacag ttcggtactg ctgtccgaga gcgtctccct tgcgtcaag acccaccg	9120
[3731]	ggggtcagaa taagccagtc ctgagagtc cccttaggtc ggttctgggc aatgaagcca	9180
[3732]	accacaaact cggggtcgga tcgggcaagc tcaatggtct gcttgagta ctgccagtg	9240
[3733]	gccagagagc ctttgcaaga cagctcgcc agcatgagca gacctctggc cagcttctcg	9300
[3734]	ttgggagagg ggactaggaa ctcttgttac tgggagttct cgtagtcaga gacgtctcc	9360
[3735]	ttcttctgtt cagagacagt ttctcggca ccagctcgca ggccagcaat gattccggtt	9420
[3736]	ccgggtacac cgtgggcgtt ggtgatctcg gaccactcgg cgattcgggt acaccggtac	9480
[3737]	tgggtgctga cagtgttgcc aatatctcgc aactttctgt cctcgaacag gaagaaaccg	9540

[3738]	tgcttaagag caagttcctt gagggggagc acagtgccgg cgtaggtgaa gtcgtcaatg	9600
[3739]	atgtcgatat gggttttgat catgcacaca taaggtccga cttatcggc aagctcaatg	9660
[3740]	agctccttgg tggtagtaac atccagagaa gcacacaggt tggttttctt ggctgccacg	9720
[3741]	agcttgagca ctcgagcggc aaaggcggac ttgtggacgt tagctcgagc ttcgtaggag	9780
[3742]	ggcatttttg tggtagaagag gagactgaaa taaatttagt ctgcagaact ttttatcgga	9840
[3743]	accttatctg gggcagtgaa gtatatgtta tggtaatagt tacgagttag ttgaacttat	9900
[3744]	agatagactg gactatacgg ctatcgggcc aaattagaaa gaacgtcaat ggctctcttg	9960
[3745]	gcgtcgccct tggcgacaaa aatgtgatca tgatgaaagc cagcaatgac gttgcagctg	10020
[3746]	atattgttgt cgccaaccg cgccgaaaac gcagctgtca gaccacagc ctccaacgaa	10080
[3747]	gaatgtatcg tcaaagtgat ccaagcacac tcatagttgg agtcgtactc caaaggcggc	10140
[3748]	aatgacgagt cagacagata ctgctcgagc tttaaacat catctaaggc cctcaaaact	10200
[3749]	acctcggaac tgctgcgtg atctggacac cacagaggtt ccgagcactt taggttgac	10260
[3750]	caaatgtccc accagtgca ggcagaaaac gctggaacag cgtgtacagt ttgtcttaac	10320
[3751]	aaaaagttag ggcgctgagg tcgagcaggg tgggtgtgact tgttatagcc tttagagctg	10380
[3752]	cgaagcgcg tatggatttg gctcatcagg ccagattgag ggtctgtgga cacatgtcat	10440
[3753]	gttagtgtac ttcaatcgcc ccctggatat agccccgaca ataggccgtg gcctcatttt	10500
[3754]	tttgccttcc gcacatttcc attgctcggc acccacacct tgcttctcct gcacttgcca	10560
[3755]	accttaatac tggtttacat tgaccaacat cttacaagcg gggggcttgt ctaggggtata	10620
[3756]	tataaacagt ggctctccca atcggttgcc agtctctttt ttcctttctt tccccacaga	10680
[3757]	ttcgaaatct aaactacaca tcacac	10706
[3758]	<210> 126	
[3759]	<211> 678	
[3760]	<212> DNA	
[3761]	<213> 人工序列	
[3762]	<220>	
[3763]	<223> 经耶氏酵母优化的dsREDexpress ORF	
[3764]	<400> 126	
[3765]	atggcctcct cggaggacgt catcaaggag ttcatgcgat tcaaggtccg aatggaaggc	60
[3766]	tccgtgaacg gtcacgagtt tgagattgag ggagagggtg aaggccgacc ctacgaaggc	120
[3767]	accagaccg cgaagctgaa ggtgaccaag ggtggacccc tgcccttcgc ctgggacatt	180
[3768]	ctgtctctc agtttcagta cggttctaag gtgtacgtga agcaccctgc tgacattccc	240
[3769]	gactacaaga aactttcctt tcccgagggc ttcaagtggg agcgagttat gaacttcgag	300
[3770]	gatggcggtg tcgttaccgt tactcaggac tcctcgctcc aggacggctc gttcatctac	360
[3771]	aaggttaagt tcatcggtgt caacttcctt agcgatggac ccgtcatgca aaagaaaact	420
[3772]	atgggatggg aagcctctac agagcggctg taccctcgag acggagtgtt gaaggcgag	480
[3773]	attcacaagg ccctgaagct caaggacggt ggacactatc tcgttgagtt taagtctatc	540
[3774]	tacatggcaa agaaaccctg gcagcttcca ggctactatt acgtcgattc caagctcgat	600
[3775]	atcaccagcc ataatgagga ctacactatt gtcgaacagt acgagcgtgc tgagggaaga	660
[3776]	caccatctgt ttctttaa	678
[3777]	<210> 127	
[3778]	<211> 696	
[3779]	<212> DNA	

[3780]	<213>	人工序列	
[3781]	<220>		
[3782]	<223>	经耶氏酵母优化的dsREDexpress克隆片段	
[3783]	<400>	127	
[3784]	ggggccatgg cctcctcgga ggacgtcatc aaggagtcca tgcgattcaa ggtccgaatg	60	
[3785]	gaaggctccg tgaacgggtca cgagtttgag attgaggagagg aggggtgaagg ccgaccctac	120	
[3786]	gaaggcaccc agaccgcgaa gctgaagggtg accaagggtg gacccctgcc cttcgcttg	180	
[3787]	gacattctgt ctctcagtt tcagtacggt tctaagggtg acgtgaagca ccctgctgac	240	
[3788]	attcccgact acaagaaact ttcctttccc gagggcttca agtgggagcg agttatgaac	300	
[3789]	ttcgaggatg gcggtgtcgt taccgttact caggactcct cgctccagga cggctcgttc	360	
[3790]	atctacaagg ttaagttcat cgggtgtcaac ttccctagcg atggaccctg catgcaaaag	420	
[3791]	aaaactatgg gatgggaagc ctctacagag cggctgtacc ctcgagacgg agtgttgaag	480	
[3792]	ggcgagattc acaaggccct gaagctcaag gacggtggac actatctcgt tgagttaaag	540	
[3793]	tctatctaca tggcaaagaa acccgtgcag cttccaggct actattacgt cgattccaag	600	
[3794]	ctcgatatca ccagccataa tgaggactac actattgtcg aacagtacga gcgtgctgag	660	
[3795]	ggaagacacc atctgtttct ttaagcggcc gcgggg	696	
[3796]	<210>	128	
[3797]	<211>	1212	
[3798]	<212>	DNA	
[3799]	<213>	人工序列	
[3800]	<220>		
[3801]	<223>	FBA1-dsREDexpress表达盒	
[3802]	<400>	128	
[3803]	aaaccatcat ctaagggcct caaaactacc tcggaactgc tgcgctgac tggacaccac	60	
[3804]	agaggttccg agcactttag gttgcaccaa atgtcccacc aggtgcaggc agaaaacgt	120	
[3805]	ggaacagcgt gtacagtttg tcttaacaaa aagtgagggc gctgaggtcg agcagggtg	180	
[3806]	tgtgacttgt tatagccttt agagctgcga aagcgcgtat ggatttggct catcaggcca	240	
[3807]	gattgagggt ctgtggacac atgtcatgtt agtgtacttc aatcgcccc tgatatagc	300	
[3808]	cccacaata ggccgtggcc tcattttttt gccttcgcga catttccatt gctcggtacc	360	
[3809]	cacaccttgc ttctcctgca cttgccaacc ttaatactgg ttacattga ccaacatctt	420	
[3810]	acaagcgggg ggcttgtcta gggatatatat aaacagtggc tctcccaatc gggttgccagt	480	
[3811]	ctcttttttc ctttctttcc ccacagattc gaaatctaaa ctacacatca caccatggcc	540	
[3812]	tcctcgaggg acgtcatcaa ggagttcatg cgattcaagg tccgaatgga aggctccgtg	600	
[3813]	aacggtcacg agtttgagat tgaggagag ggtgaaggcc gaccctacga aggcacccag	660	
[3814]	accgcgaagc tgaagggtgac caagggtgga cccctgccct tcgctggga cattctgtct	720	
[3815]	cctcagtttc agtacggttc taagggtgac gtgaagcacc ctgctgacat tcccgactac	780	
[3816]	aagaaacttt ctttcccga gggcttcaag tgggagcgag ttatgaactt cgaggatggc	840	
[3817]	ggtgtcggtt ccgttactca ggactcctcg ctccaggacg gctcgttcat ctacaaggtt	900	
[3818]	aagttcatcg gtgtcaactt ccctagcgat ggaccctgca tgcaaaagaa aactatggga	960	
[3819]	tgggaagcct ctacagagcg gctgtaccct cgagacggag tgttgaaggc cgagattcac	1020	
[3820]	aaggccctga agctcaagga cgggtggacac tatctcgttg agtttaagtc tatctacatg	1080	
[3821]	gcaaagaaac ccgtgcagct tccaggctac tattacgtcg attccaagct cgatatcacc	1140	

[3822]	agccataatg aggactacac tattgtcgaa cagtacgagc gtgctgaggg aagacaccat	1200
[3823]	ctgtttcttt aa	1212
[3824]	<210> 129	
[3825]	<211> 7244	
[3826]	<212> DNA	
[3827]	<213> 人工序列	
[3828]	<220>	
[3829]	<223> pRF165	
[3830]	<400> 129	
[3831]	ggccgcaagt gtggatgggg aagtgagtgc ccggttctgt gtgcacaatt ggcaatccaa	60
[3832]	gatggatgga ttcaacacag ggatatagcg agctacgtgg tgggtcgagg atatatgcaac	120
[3833]	ggatatattat gtttgacact tgagaatgta cgatacaagc actgtccaag tacaatacta	180
[3834]	aacatactgt acatactcat actcgtaccc gggcaacggt ttactttgag tgcagtggct	240
[3835]	agtgtcttta ctctgacagt gtgcaatact gcgtatcata gtctttgatg tatatcgtat	300
[3836]	tcattcatgt tagttgcgta cgagccgga gcataaagt taaagcctgg ggtgcctaata	360
[3837]	gagtga gcta actcacatta attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc	420
[3838]	tgctgtgcca gctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcggg ttgcgtattg	480
[3839]	ggcgtcttcc cgcttctctg ctactgact cgctgcgctc ggctcgttcg ctgcggcgag	540
[3840]	cggtatcagc tactcaaag gcgtaatac ggttatccac agaatacagg gataacgcag	600
[3841]	gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc	660
[3842]	tggcgttttt ccatagctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgtcaagtc	720
[3843]	agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc	780
[3844]	tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt	840
[3845]	cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg	900
[3846]	ttcgtccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca gcccagaccg tcgccttat	960
[3847]	ccgtaacta tcgtcttgag tccaacccgg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag	1020
[3848]	ccactggtaa caggattagc agagcgagg atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt	1080
[3849]	ggtggcctaa ctacggctac actagaagga cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc	1140
[3850]	cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc accgctggta	1200
[3851]	gcggtggttt ttttgttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga tctcaagaag	1260
[3852]	atcctttgat cttttctacg gggctctgacg ctacgtggaa cgaaaactca cgtaaggga	1320
[3853]	ttttgtcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat taaaaatgaa	1380
[3854]	gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa	1440
[3855]	tcagtgagc acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc	1500
[3856]	ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga	1560
[3857]	taccgcgaga cccacgtca ccggtccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa	1620
[3858]	gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt tatccgcctc catccagtct attaattgtt	1680
[3859]	gccgggaagc tagagtaagt agttcgcag ttaatagttt gcgcaacgtt gttgccattg	1740
[3860]	ctacaggcat cgtggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc ttcatcagc tccggttccc	1800
[3861]	aacgatcaag gcgagttaca tgatcccca tgttgtgcaa aaaagcgggt agctccttcg	1860
[3862]	gtctccgat cgttgtcaga agtaagtgg ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag	1920
[3863]	cactgcataa ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt	1980

[3864]	actcaaccaa gtcattctga gaatagtgtg tgcggcgacc gagttgctct tgcccggcgt	2040
[3865]	caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac	2100
[3866]	gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac	2160
[3867]	ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag	2220
[3868]	caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaaa aggggaataag ggcgacacgg aaatgttgaa	2280
[3869]	tactcatact cttccttttt caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga	2340
[3870]	gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc	2400
[3871]	cccgaagaat gccacctgac gcgccctgta gcggcgcatc aagcgcgggc ggtgtggtgg	2460
[3872]	ttacgcgcag cgtgaccgct acacttgcca gcgccctagc gcccgctcct ttcgctttct	2520
[3873]	tcccttcctt tctcgccacg ttccgcccgt tttcccgctc agctctaaat cgggggctcc	2580
[3874]	ctttagggtt cggatttagt gctttacggc acctcgaccc caaaaaactt gattagggtg	2640
[3875]	atggttcacg tagtgggcca tcgccctgat agacggtttt tcgccctttg acgttgaggt	2700
[3876]	ccacgttctt taatagtgga ctcttggtcc aaactggaac aacactcaac cctatctcgg	2760
[3877]	tctattcttt tgattataa gggattttgc cgatttcggc ctattggta aaaaatgagc	2820
[3878]	tgatttaaca aaaatttaac gcgaatttta acaaaatatt aacgcttaca atttccattc	2880
[3879]	gccattcagg ctgcgcaact gttgggaagg gcgatcgggt cgggcctctt cgctattacg	2940
[3880]	ccagctggcg aaaggggat gtgctgcaag gcgattaagt tgggtaacgc cagggttttc	3000
[3881]	ccagtcacga cgttgtaaaa cgacggccag tgaattgtaa tacgactcac tataggcgga	3060
[3882]	attgggtacc gggccccccc tcgaggtcga tgggtgctgat aagcttgata tcgaattcat	3120
[3883]	gtcacacaaa ccgatcttcg cctcaaggaa acctaatctt acatccgaga gactgccgag	3180
[3884]	atccagtcta cactgattaa ttttcgggcc aataatttaa aaaaatcgtt ttatataata	3240
[3885]	ttatatgtat tatatatata catcatgatg atactgacag tcatgtccca ttgctaaata	3300
[3886]	gacagactcc atctgccgcc tccaactgat gttctcaata tttaaggggt catctcgcat	3360
[3887]	tgtttaataa taaacagact ccatctaccg cctccaaatg atgttctcaa aatataattgt	3420
[3888]	atgaacttat ttttattact tagtattatt agacaactta cttgctttat gaaaaacact	3480
[3889]	tcctatttag gaaacaattt ataatggcag ttcgttcatt taacaattta tgtagaataa	3540
[3890]	atgttataaa tgcgtatggg aaatcttaaa tatggatagc ataaatgata tctgcattgc	3600
[3891]	ctaattcgaa atcaacagca acgaaaaaaa tccctgttac aacataaata gtcacgaga	3660
[3892]	aatatcaact atcaaagaac agctattcac acgttactat tgagattatt attggacgag	3720
[3893]	aatcacacac tcaactgtct ttctctcttc tagaaataca ggtacaagta tgtactattc	3780
[3894]	tcattgttca tacttctagt catttcatcc cacatatcc tttgatttct ctccaatgaa	3840
[3895]	tgacattcta tcttgcaaat tcaacaatta taataagata taccaaagta gcggtatagt	3900
[3896]	ggcaatcaaa aagcttctct ggtgtgcttc tcgtatttat ttttattcta atgatccatt	3960
[3897]	aaaggtatat atttatttct tgttatataa tctttttgtt tattacatgg gctggataca	4020
[3898]	taaaggtatt ttgatttaat tttttgctta aattcaatcc cccctcgctc agtgtcaact	4080
[3899]	gtaatggtag gaaattacca tacttttgaa gaagcaaaaa aaatgaaaga aaaaaaaaaat	4140
[3900]	cgtatttcca ggtagacgt tccgcagaat ctagaatgcg gtatgcggta cattgttctt	4200
[3901]	cgaacgtaaa agttgcgctc cctgagatat tgtacatttt tgcttttaca agtacaagta	4260
[3902]	catcgtaaca ctatgtacta ctgttgatgc atccacaaca gtttgttttg tttttttttg	4320
[3903]	tttttttttt ttctaattgat tcattaccgc tatgtatacc tacttgtact tgtagtaagc	4380
[3904]	cgggttattg gcgttcaatt aatcatagac ttatgaatct gcacggtgtg cgctgcgagt	4440
[3905]	tacttttagc ttatgcatgc tacttgggtg taatattggg atctgttcgg aaatcaacgg	4500

[3906]	atgctcaatc gatttcgaca gtaattaatt aagtcataca caagtcagct ttcttcgagc	4560
[3907]	ctcatataag tataagtagt tcaacgtatt agcactgtac ccagcatctc cgtatcgaga	4620
[3908]	aacacaacaa catgccccat tggacagatc atgcggatac acaggttgtg cagtatcata	4680
[3909]	catactcgat cagacaggtc gtctgaccat catacaagct gaacaagcgc tccatacttg	4740
[3910]	cacgctctct atatacacag ttaaattaca tatccatagt ctaacctcta acagttaatc	4800
[3911]	ttctggtaag cctcccagcc agccttctgg tatcgcttgg cctcctcaat aggatctcgg	4860
[3912]	ttctggccgt acagacctcg gccgacaatt atgatatccg ttccggtaga catgacatcc	4920
[3913]	tcaacagttc ggtactgctg tccgagagcg tctcccttgt cgtcaagacc cccccgggg	4980
[3914]	gtcagaataa gccagtcttc agagtcgccc ttaggtcggg tctgggcaat gaagccaacc	5040
[3915]	acaaactcgg ggtcggatcg ggcaagctca atggctctgct tggagtactc gccagtggcc	5100
[3916]	agagagccct tgcaagacag ctgggccagc atgagcagac ctctggccag cttctcgttg	5160
[3917]	ggagagggga ctaggaactc cttgtactgg gagttctcgt agtcagagac gtctctcttc	5220
[3918]	ttctgttcag agacagtttc ctggcacca gctcgcagcg cagcaatgat tccggttccg	5280
[3919]	ggtacaccgt gggcgttggg gatatcggac cactcggcga ttccgtgaca ccggtactgg	5340
[3920]	tgcttgacag gtgtgccaat atctgcgaac tttctgtcct cgaacaggaa gaaaccgtgc	5400
[3921]	ttaagagcaa gttccttgag ggggagcaca gtgccggcgt aggtgaagtc gtcaatgatg	5460
[3922]	tcgatatggg ttttgatcat gcacacataa ggtccgacct tatcggcaag ctcaatgagc	5520
[3923]	tccttggtgg tggtaacatc cagagaagca cacaggttgg ttttcttggc tgccacgagc	5580
[3924]	ttgagcactc gagcggcaaa ggcggacttg tggacgttag ctcgagcttc gtaggagggc	5640
[3925]	atthtgggtg tgaagaggag actgaaataa atthtagctg cagaactttt tatcggaacc	5700
[3926]	ttatctgggg cagtgaagta tatgttatgg taatagttag gagttagttag aacttataga	5760
[3927]	tagactggac tatacggcta tcggtccaaa ttagaaagaa cgtcaatggc tctctgggcg	5820
[3928]	tcgcctttgc cgacaaaaat gtgatcatga tgaaagccag caatgacgtt gcagctgata	5880
[3929]	ttgttgcgga ccaaccgcgc cgaaaacgca gctgtcagac ccacagcctc caacgaagaa	5940
[3930]	tgtatcgtea aagtgatcca agcactca tagttggagt cgtactccaa aggcggcaat	6000
[3931]	gacgagtcag acagatactc gtcgacgttt aaaccatcat ctaagggcct caaaactacc	6060
[3932]	tcggaactgc tgcgctgac tggacaccac agaggttccg agcactttag gttgcacaa	6120
[3933]	atgtcccacc aggtgcaggc agaaaacgct ggaacagcgt gtacagtttg tcttaacaaa	6180
[3934]	aagtgagggc gctgaggtcg agcagggtgg tgtgacttgt tatagccttt agagctgcga	6240
[3935]	aagcgcgtat ggatttggt catcaggcca gattgagggt ctgtggacac atgtcatgtt	6300
[3936]	agtgacttcc aatcgcccc tggatatagc cccgacaata ggccgtggcc tcatthtttt	6360
[3937]	gccttccgca catttccatt gctcggtagc cacacctgc ttctcctgca cttgccaacc	6420
[3938]	ttaatactgg ttacattga ccaacatctt acaagcgggg ggcttgtcta gggatatatat	6480
[3939]	aaacagtggc tctcccaatc ggttgccagt ctcttttttc ctttctttcc ccacagattc	6540
[3940]	gaaatctaaa ctacacatca caccatggcc tctcggagg acgtcatcaa ggagttcatg	6600
[3941]	cgattcaagg tccgaatgga aggctccgtg aacggtcacg agtttgagat tgaggagag	6660
[3942]	ggtgaaggcc gaccctacga aggcaccag accgcgaagc tgaagggtgac caagggtgga	6720
[3943]	ccctgccct tcgctggga cattctgtct cctcagtttc agtacggttc taagggtgac	6780
[3944]	gtgaagcacc ctgctgacat tccgactac aagaaacttt ctttcccgga gggcttcaag	6840
[3945]	tgggagcgag ttatgaactt cgaggatggc ggtgtcgtta ccgttactca ggactcctcg	6900
[3946]	ctccaggacg gctcgttcat ctacaagggt aagttcatcg gtgtcaactt ccctagcgat	6960
[3947]	ggacccgtca tgcaaaagaa aactatggga tgggaagcct ctacagagcg gctgtaccct	7020

[3948]	cgagacggag tgttgaaggg cgagattcac aaggccctga agctcaagga cgggtggacac	7080
[3949]	tatctcgttg agtttaagtc tatctacatg gcaaagaaac ccgtgcagct tccaggctac	7140
[3950]	tattacgtcg attccaagct cgatatcacc agccataatg aggactacac tattgtcgaa	7200
[3951]	cagtacgagc gtgctgaggg aagacaccat ctgtttcttt aagc	7244
[3952]	<210> 130	
[3953]	<211> 1214	
[3954]	<212> DNA	
[3955]	<213> 人工序列	
[3956]	<220>	
[3957]	<223> 来自PmeI NotI片段上的pRF165的FBA1耶氏酵母dsREDexpress盒	
[3958]	<400> 130	
[3959]	aaaccatcat ctaagggcct caaaactacc tcggaactgc tgcgctgac tggacaccac	60
[3960]	agaggttccg agcactttag gttgcaccaa atgtcccacc aggtgcaggc agaaaacgct	120
[3961]	ggaacagcgt gtacagtttg tcttaacaaa aagtgagggc gctgaggtcg agcagggtgg	180
[3962]	tgtgacttgt tatagccttt agagctgcga aagcgcgtat ggatttggct catcaggcca	240
[3963]	gattgagggc ctgtggacac atgtcatgtt agtgtacttc aatcgcccc tgatatagc	300
[3964]	cccacaata ggccgtggcc tcattttttt gccttccgca catttccatt gctcggtacc	360
[3965]	cacaccttgc ttctcctgca cttgccaacc ttaatactgg ttacattga ccaacatctt	420
[3966]	acaagcgggg ggcttgtcta gggatatatat aaacagtggc tctccaatc ggttgccagt	480
[3967]	ctcttttttc ctttctttcc ccacagattc gaaatctaaa ctacacatca caccatggcc	540
[3968]	tcctcgagg agctcatcaa ggagttcatg cgattcaagg tccgaatgga aggtccgtg	600
[3969]	aacggtcacg agtttgagat tgaggagag ggtgaaggcc gaccctacga aggcaccag	660
[3970]	accgcaagc tgaaggtgac caaggggtga cccctgccct tcgctggga cattctgtct	720
[3971]	cctcagtttc agtacggttc taaggtgtac gtgaagcacc ctgctgacat tccgactac	780
[3972]	aagaaacttt ctttccccga gggcttcaag tgggagcgag ttatgaactt cgaggatggc	840
[3973]	ggtgtcgta ccgttactca ggactcctcg ctccaggacg gctcgttcat ctacaaggtt	900
[3974]	aagttcatcg gtgtcaactt ccctagcgat ggaccctgca tgcaaaagaa aactatggga	960
[3975]	tgggaagcct ctacagagcg gctgtaccct cgagacggag tgttgaaggg cgagattcac	1020
[3976]	aaggccctga agctcaagga cgggtggacac tatctcgttg agtttaagtc tatctacatg	1080
[3977]	gcaaagaaac ccgtgcagct tccaggctac tattacgtcg attccaagct cgatatcacc	1140
[3978]	agccataatg aggactacac tattgtcgaa cagtacgagc gtgctgaggg aagacacat	1200
[3979]	ctgtttcttt aagc	1214
[3980]	<210> 131	
[3981]	<211> 11526	
[3982]	<212> DNA	
[3983]	<213> 人工序列	
[3984]	<220>	
[3985]	<223> p2P069整合载体	
[3986]	<400> 131	
[3987]	ggccgcaagt gtggatgggg aagtgagtgc ccggttctgt gtgcacaatt ggcaatcaa	60
[3988]	gatggatgga ttcaacacag ggatatagcg agctacgtgg tgggtcgagg atatagcaac	120
[3989]	ggatatattat gtttgacact tgagaatgta cgatacaagc actgtccaag tacaatacta	180

[3990]	aacatactgt acatactcat actcgtaccc gggcaacggt ttcacttgag tgcagtggct	240
[3991]	agtgtctctta ctctgtacagt gtgcaatact gcgtatcata gtctttgatg tatatcgtat	300
[3992]	tcattcatgt tagttgcgta cgggcgtcgt tgcttgtgtg atttttgagg acccatccct	360
[3993]	ttggtatata agtatactct ggggttaagg ttgcccgtgt agtctaggtt atagttttca	420
[3994]	tgtgaaatac cgagagccga gggagaataa acgggggtat ttggacttgt ttttttcgcg	480
[3995]	gaaaagcgtc gaatcaaccc tgcgggcctt gcacatgtc cacgacgtgt ttctcgcccc	540
[3996]	aattcgcccc ttgcacgtca aaattaggcc tccatctaga cccctccata acatgtgact	600
[3997]	gtggggaaaa gtataaggga aaccatgcaa ccatagacga cgtgaaagac ggggaggaaac	660
[3998]	caatggaggc caaagaaatg gggtagcaac agtccaggag acagacaagg agacaaggag	720
[3999]	agggcgcccc aaagatcgga aaaacaaca tgtccaattg gggcagtgac ggaaacgaca	780
[4000]	cggacacttc agtacaatgg accgaccatc tccaagccag ggttattccg gtatcacctt	840
[4001]	ggccgtaacc tcccgttgtt acctgatatt gtacacgttc acattcaata tactttcagc	900
[4002]	tacaataaga gaggtgttt gtctggcatg tgtgtccgtc gtatggggtg atgtccgagg	960
[4003]	gcgaaattcg ctacaagctt aactctggcg cttgtccagt atgaatagac aagtcaagac	1020
[4004]	cagtggtgcc atgattgaca gggaggtaca agacttcgat actcgagcat tactcggact	1080
[4005]	tgtggcgatt gaacagacgg gcgatcgtt ctccccgta ttgccggcgc gccagctgca	1140
[4006]	ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagagg cggtttgcgt attgggcgtt cttccgttc	1200
[4007]	ctcgtcact gactcgtgc gctcggctgt tccggtgcgg cgagcggat cagctcactc	1260
[4008]	aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc	1320
[4009]	aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag	1380
[4010]	gtccgcgcc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgtca agtcagaggt ggcgaaaccc	1440
[4011]	gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt	1500
[4012]	tccgacctg ccgcttaccg gatactgtc cgcctttctc ctttcgggaa gcgtggcgct	1560
[4013]	ttctcatagc tcacgtgta ggtatctcag ttccggttag gtcgttcgtt ccaagctggg	1620
[4014]	ctgtgtgcac gaacccccg ttccagccga ccgctgcgcc ttatccgta actatcgtct	1680
[4015]	tgagtccaac ccgtaagac acgacttacc gccactggca gcagccactg gtaacaggat	1740
[4016]	tagcagagcg aggtatgtag gcggtgtac agagtcttg aagtgggtgc ctaactacgg	1800
[4017]	ctacactaga agaacagtat ttggtatctg cgctctgtg aagccagtta ctttcggaaa	1860
[4018]	aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgtt ggtagcgggt gtttttttgt	1920
[4019]	ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc	1980
[4020]	tacggggtct gacgtcagt ggaacgaaaa ctacagttaa gggattttgg tcatgagatt	2040
[4021]	atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtitta aatcaatcta	2100
[4022]	aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagt aggcacctat	2160
[4023]	ctcagcgatc tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac	2220
[4024]	tacgatacgg gagggcttac catctggccc cagtgtgca atgataccgc gagaccacg	2280
[4025]	ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag	2340
[4026]	tggtcctgca actttatccg cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt	2400
[4027]	aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa cgttggtgcc attgctacag gcacgtgggt	2460
[4028]	gtcacgtcgc tcgtttggta tggttcatt cagctccggt tcccaacgat caaggcgagt	2520
[4029]	tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc ggtagctcc ttcggtcctc cgatcgttgt	2580
[4030]	cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct	2640
[4031]	tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggg gagtactcaa ccaagtcatt	2700

[4032]	ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatac	2760
[4033]	cgcgccacat agcagaactt taaaagtgtc catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa	2820
[4034]	actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg taaccactc gtgcacccaa	2880
[4035]	ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca	2940
[4036]	aaatgccgca aaaaaggga taagggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttcct	3000
[4037]	ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga	3060
[4038]	atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc	3120
[4039]	tgatgcggtg tgaataaccg cacagatgcg taaggagaaa ataccgcac aggaaattgt	3180
[4040]	aagcgtaaat attttgtaa aattcgcgtt aaatttttgt taaatcagct cattttttaa	3240
[4041]	ccaataggcc gaaatcggca aaatccctta taaatcaaaa gaatagaccg agatagggtt	3300
[4042]	gagtgttgtt ccagtttga acaagagtc actattaaag aacgtggact ccaacgtcaa	3360
[4043]	agggcgaaaa accgtctatc agggcgatgg ccactacgt gaaccatcac cctaatacag	3420
[4044]	ttttttgggg tcgagtgcc gtaaagcact aaatcggaac cctaaaggga gccccgatt	3480
[4045]	tagagcttga cggggaaagc cggcgaacgt ggcgagaaag gaagggaaga aagcgaaagg	3540
[4046]	agcgggcgct agggcgctgg caagtgtagc ggtcacgctg cgcgtaacca ccacaccgc	3600
[4047]	cgcgttaat gcgccgtac agggcgctc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg	3660
[4048]	gaaggcgat cgggtcgggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct	3720
[4049]	gcaaggcgat taagtgggt aacgccaggg ttttcccagt cacgacgtt taaaacgacg	3780
[4050]	gccagtgaat tgtaatacga ctactatag ggcgaattgg gcccgcgtc gcatgcgctg	3840
[4051]	atgacacttt ggtctgaaag agatgcattt tgaatccaa acttgcagt cccaagtgc	3900
[4052]	atacatctcc gcgttttga aaatgttcag aaacagtga ttgtgttga atggggaatg	3960
[4053]	gggaatggaa aaatgactca agtatcaatt ccaaaaactt ctctggctgg cagtacctac	4020
[4054]	tgtccatact actgcatttt ctccagtcag gccactctat actcgacgac acagtagtaa	4080
[4055]	aaccagata atttcgacat aaacaagaaa acagacccaa taatatttat atatagtcag	4140
[4056]	ccgtttgtcc agttcagact gtaatagccg aaaaaaatc caaagtttct attctaggaa	4200
[4057]	aatatattcc aatattttta attcttaatc tcatatttt tattctagcg aaatacattt	4260
[4058]	cagctacttg agacatgtga taccacaaa tcggattcgg actcggttgc tcagaagagc	4320
[4059]	atatggcatt cgtgctcgct tgttcacgta ttcttctgt tccatctctt ggccgacaat	4380
[4060]	cacacaaaaa tggggttttt tttttaattc taatgattca ttacagcaaa attgagatat	4440
[4061]	agcagaccac gtattccata atcaccaagg aagttcttgg gcgtcttaat taagttgcga	4500
[4062]	cacatgtctt gatagtatct tggtctctct ctcttgagct tttccataac aagttcttct	4560
[4063]	gcctccagga agtccatggt gaatgattct tatactcaga aggaaatgct taacgatttc	4620
[4064]	gggtgtgagt tgacaaggag agagagaaaa gaagagggaa ggtaattcgg ggacgggtgt	4680
[4065]	cttttatacc cttggctaaa gtcccaacca caaagcaaaa aaattttcag tagtctattt	4740
[4066]	tgcgtccggc atgggttacc cggatggcca gacaaagaaa ctagtacaaa gtctgaacaa	4800
[4067]	gcgtagattc cagactgcag taccctacgc ccttaacggc aagtgtggga accgggggag	4860
[4068]	gtttgatatg tgggtgaag ggggtctctg ccggggttgg gcccgctact gggtaattt	4920
[4069]	gggtcaatt ggggcaattg gggtgtttt ttgggacaca aatacgccgc caaccggtc	4980
[4070]	tctctgaat tctgcagatg ggctgcagga attccgtcgt cgcctgagtc gacatcattt	5040
[4071]	atttaccagt tggccacaaa cccttgacga tctcgtatgt cccctccgac atactccgg	5100
[4072]	ccggctgggg tacgttcgat agcgtatcgc gcatcgacaa ggtttgggtc cctagccgat	5160
[4073]	accgcactac ctgagtcaca atcttcggag gtttagtctt ccacatagca cgggcaaaag	5220

[4074]	tgcgtatata tacaagagcg tttgccagcc acagattttc actccacaca ccacatcaca	5280
[4075]	catacaacca cacacatcca caatggaacc cgaaactaag aagaccaaga ctgactccaa	5340
[4076]	gaagattgtt cttctcggcg gcgactttctg tggccccgag gtgattgccg aggccgtcaa	5400
[4077]	ggtgctcaag tctgttctg aggccctccg caccgagttt gtgtttgagg accgactcat	5460
[4078]	tggaggagct gccattgaga aggaggcgga gcccatcacc gacgctactc tcgacatctg	5520
[4079]	ccgaaaggct gactctatta tgctcgggtgc tgctcggaggc gctgccaaca ccgtatggac	5580
[4080]	cactcccgac ggacgaaccg acgtgcgacc cgagcagggt ctctctcaagc tgcgaaagga	5640
[4081]	cctgaacctg tacgccaacc tgcgacctg ccagctgctg tcgccccagc tcgccgatct	5700
[4082]	ctccccatc cgaaacgttg agggcaccga cttcatcatt gtccgagagc tcgtcggagg	5760
[4083]	tatctacttt ggagagcgaa aggaggatga cggatctggc gtcgcttccg acaccgagac	5820
[4084]	ctactccgtt cctgaggttg agcgaattgc ccgaatggcc gccttctctg cccttcagca	5880
[4085]	caacccccct cttcccggtg ggtctcttga caaggccaac gtgctggcct cctctcgact	5940
[4086]	ttggcgaaag actgtcactc gagtctctaa ggacgaattc cccagctcg agctcaacca	6000
[4087]	ccagctgacg gactcggccg ccatgatcct catcaagcag ccctccaaga tgaatggtat	6060
[4088]	catcatcacc accaakatgt ttggcgatat catctccgac gaggcctccg tcatccccgg	6120
[4089]	ttctctgggt ctgctgccct ccgctctctt ggcttctctg cccgacacca acgaggcgtt	6180
[4090]	cggctctgtac gagccctgtc acggatctgc cccgatctc ggcaagcaga aggtcaaccc	6240
[4091]	cattgccacc attctgtctg ccgccatgat gctcaagttc tctcttaaca tgaagccgc	6300
[4092]	cggtagcgtt gttgaggtg ccgtcaagga gtccgtcgag gctggtatca ctaccgccga	6360
[4093]	tatcggaggc tcttctcca cctccgaggt cggagacttg ttgccaacaa ggtcaaggag	6420
[4094]	ctgctcaaga aggagtaagt cgtttctacg acgcattgat ggaaggagca aactgacgcg	6480
[4095]	cctgcgggtt ggtctaccgg cagggtccgc tagtgtataa gactctataa aaagggcct	6540
[4096]	gcccgtctaa tgaaatgatg atttataatt taccggtgta gcaaccttga ctagaagaag	6600
[4097]	cagattgggt gtgtttgtag tggaggacag tggtagttt tggaacagt cttcttgaaa	6660
[4098]	gtgtcttgtc tacagtatat tcaatcataa cctcaatagc caagggtgta gtcggtttat	6720
[4099]	taaaggaagg gagttgtggc tgatgtggat agatatcttt aagctggcga ctgcacccaa	6780
[4100]	cgagtgtggt ggtagcttgt tagatctgta tattcggtaa gatataatctt gtggggtttt	6840
[4101]	agtggtgttt aaaccatcat ctaaggccct caaaactacc tcggaactgc tgcgctgac	6900
[4102]	tggacaccac agaggttccg agcactttag gttgcaccaa atgtcccacc aggtgcaggc	6960
[4103]	agaaaacgct ggaacagcgt gtacagtttg tcttaacaaa aagtgagggc gctgaggtcg	7020
[4104]	agcagggtgg tgtgacttgt tatagccttt agagctgcga aagcgcgtat ggatttggct	7080
[4105]	catcaggcca gattgagggt ctgtggacac atgtcatggt agtgtacttc aatcgcccc	7140
[4106]	tggatatagc cccgacaata ggccgtggcc tcattttttt gccttccgca catttccatt	7200
[4107]	gctcgtgacc cacaccttgc ttctctgca cttgccaacc ttaataactgg ttacattga	7260
[4108]	ccaacatctt acaagcgggg ggcttgtcta gggatatatat aaacagtggc tctcccaatc	7320
[4109]	ggttgccagt ctcttttttc ctttctttcc ccacagattc gaaatctaaa ctacacatca	7380
[4110]	caccatggac aagaaatact ccatcgccct ggacattgga accaactctg tcggctgggc	7440
[4111]	tgtcatcacc gacgagtaca aggtgcctc caagaaattc aaggtcctcg gaaacaccga	7500
[4112]	tcgacactcc atcaagaaaa acctcattgg tgccctgttg ttcgattctg gcgagactgc	7560
[4113]	cgaagctacc agactcaagc gaactgctcg gcgacgttac acccgacgga agaaccgaat	7620
[4114]	ctgctacctg caggagatct tttccaacga gatggccaag gtggacgatt cgttctttca	7680
[4115]	tcgactggag gaatccttcc tcgtcgagga agacaagaaa cagagcgtc atcccatctt	7740

[4116]	tggaacatt gtggacgagg ttgcttacca cgagaagtat cctaccatct accacctgcg	7800
[4117]	aaagaaactc gtcgattcca cgcacaaggc ggatctcaga cttatctacc tcgctctggc	7860
[4118]	acacatgata aagtttcgag gtcatttcct catcgagggc gatctcaatc cgcacaacag	7920
[4119]	cgatgtggac aagctgttca ttcagctcgt tcagacctac aaccagctgt tcgaggaaaa	7980
[4120]	ccccatcaat gcctccggag tcgatgcaaa ggccatcttg tctgctcgac tctcgaagag	8040
[4121]	cagacgactg gagaacctca ttgcccaact tcctggcgag aaaaagaacg gactgtttgg	8100
[4122]	caacctcatt gccctttctc ttgggtctcac acccaacttc aagtccaact tcgatctggc	8160
[4123]	ggaggacgcc aagctccagc tgtccaagga cacctacgac gatgacctcg acaacctgct	8220
[4124]	tgcacagatt ggcgatcagt acgccgacct gtttctcgct gccagaacc tttcggatgc	8280
[4125]	tattctcttg tctgacattc tgcgagtaa caccgagatc acaaaggctc ccctttctgc	8340
[4126]	ctccatgata aagcgatacg acgagacca tcaggatctc acactgctca aggctcttgt	8400
[4127]	ccgacagcaa ctgcccgaga agtacaagga gatctttttc gatcagtcga agaacggcta	8460
[4128]	cgctggatac atcgacggcg gaggctctca ggaagagttc tacaagttca tcaagccaat	8520
[4129]	tctcgagaag atggacggaa ccgaggaact gcttgtaag ctcaatcgag aggatctgct	8580
[4130]	tcggaagcaa cgaaccttcg acaacggcag cattcctcat cagatccacc tcggtgagct	8640
[4131]	gcacgccatt cttcgacgac aggaagactt ctacccttt ctcaaggaca accgagagaa	8700
[4132]	gatcgagaag attcttacct ttcgaatccc ctactatgtt ggtcctcttg ccagaggaaa	8760
[4133]	ctctcgattt gcttgatga ctcgaaagtc cgaggaaacc atcactccct ggaacttcga	8820
[4134]	ggaagtcgtg gacaaggggtg cctctgcaca gtccttcac gagcgaatga ccaacttcga	8880
[4135]	caagaatctg cccaacgaga aggttcttcc caagcattcg ctgctctacg agtactttac	8940
[4136]	agtctacaac gaactacca aagtcaagta cgttaccgag ggaatgcgaa agcctgcctt	9000
[4137]	cttgctctggc gaacagaaga aagccattgt cgatctcctg ttcaagacca accgaaaggt	9060
[4138]	cactgttaag cagctcaagg aggactactt caagaaaatc gagtgtttcg acagcgtcga	9120
[4139]	gatttccgga gttgaggacc gattcaacgc ctctttgggc acctatcacg atctgctcaa	9180
[4140]	gattatcaag gacaaggatt ttctcgacaa cgaggaaaac gaggacattc tggaggacat	9240
[4141]	cgctgcactc cttaccctgt tcgaagatcg ggagatgata gaggaacgac tcaagacata	9300
[4142]	cgctcacctg ttcgacgaca aggtcatgaa acaactcaag cgacgtagat acaccggctg	9360
[4143]	gggaagactt tcgcgaaagc tcatcaacgg catcagagac aagcagtcgg gaaagacat	9420
[4144]	tctggacttt ctcaagtccg atggctttgc caaccgaaac ttcatgcagc tcattcacga	9480
[4145]	cgattctctt acctcaagg aggacatcca gaaggcacia gtgtccggtc agggcgacag	9540
[4146]	cttgacgaa catattgcca acctggctgg ttcccgagcc atcaagaaag gcattctcca	9600
[4147]	gactgtcaag gttgtcgacg agctggtgaa ggtcatggga cgtcacaagc ccgagaacat	9660
[4148]	tgtgatcgag atggccagag agaaccagac aactcaaaag ggtcagaaaa actcgcgaga	9720
[4149]	gcggatgaag cgaatcgagg aaggcatcaa ggagctggga tcccagattc tcaaggagca	9780
[4150]	tcccgtcgag aacactcaac tgcagaacga gaagctgtat ctctactatc tgcagaatgg	9840
[4151]	tcgagacatg tacgtggatc aggaactgga catcaatcgt ctacgagact acgatgtgga	9900
[4152]	ccacattgtc cctcaatcct ttctcaagga cgattctatc gacaacaagg tccttacacg	9960
[4153]	atccgacaag aacagaggca agtcggacaa cgttcccagc gaagaggtgg tcaaaaagat	10020
[4154]	gaagaactac tggcgacagc tgctcaacgc caagctcatt acccagcgaa agttcgacaa	10080
[4155]	tcttaccaag gccgagcgag gcggtctgtc cgagctcgac aaggctggct tcatcaagcg	10140
[4156]	tcaactcgtc gagaccagac agatcacaaa gcacgtcgca cagattctcg attctcgat	10200
[4157]	gaacaccaag tacgacgaga acgacaagct catccgagag gtcaaggtga ttactctcaa	10260

[4158]	gtccaaactg gtctccgatt tccgaaagga ctttcagttc tacaaggtgc gagagatcaa	10320
[4159]	caattaccac catgcccacg atgcttacct caacgccgtc gttggcactg cgctcatcaa	10380
[4160]	gaaatacccc aagctcgaaa gcgagttcgt ttacggcgat tacaaggtct acgacgttcg	10440
[4161]	aaagatgatt gccaaagtcg aacaggagat tggcaaggct actgccaaagt actttctttta	10500
[4162]	ctccaacatc atgaactttt tcaagaccga gatcaccttg gccaacggag agattcgaaa	10560
[4163]	gagaccactt atcgagacca acggcgaaac tggagagatc gtgtgggaca agggctcgaga	10620
[4164]	ctttgcaacc gtgcgaaagg ttctgtcgat gcctcaggtc aacatcgtca agaaaaccga	10680
[4165]	ggttcagact ggcggtttct ccaaggagtc gattctgccc aagcgaaact ccgacaagct	10740
[4166]	catcgctcga aagaaagact gggatcccaa gaaatacggg ggcttcgatt ctctaccgt	10800
[4167]	cgcctattcc gtgcttgctg ttgcgaaggc cgagaagggc aagtccaaaa agctcaagtc	10860
[4168]	cgtcaaggag ctgctcgga ttaccatcat ggagcgatcg agcttcgaga agaattccat	10920
[4169]	cgacttcttg gaagccaagg gttacaagga ggtcaagaaa gacctcatta tcaagctgcc	10980
[4170]	caagtactct ctgttcgaac tggagaacgg tcgaaagcgt atgctcgcct ccgctggcga	11040
[4171]	gctgcagaag ggaaacgagc ttgccttgcc ttcgaagtac gtcaactttc tctatctggc	11100
[4172]	ttctcactac gagaagctca agggttctcc cgaggacaac gaacagaagc aactcttcgt	11160
[4173]	tgagcagcac aaacattacc tcgacgagat tatcgagcag atttccgagt tttcgaagcg	11220
[4174]	agtcacctcg gctgatgcca acttgacaa ggtgctctct gcctacaaca agcatcgga	11280
[4175]	caaaccatt cgagaacagg cggagaacat cattcacctg tttactctta ccaacctggg	11340
[4176]	tgctcctgca gctttcaagt acttcgatac cactatcgac cgaaagcggc acacatccac	11400
[4177]	caaggagggt ctgatgcca ccctgattca ccagtcctc actggcctgt acgagaccg	11460
[4178]	aatcgacctg tctcagcttg gtggcgactc cagagccgat cccaagaaaa agcgaaaggt	11520
[4179]	ctaagc	11526
[4180]	<210> 132	
[4181]	<211> 8064	
[4182]	<212> DNA	
[4183]	<213> 人工序列	
[4184]	<220>	
[4185]	<223> pRF201	
[4186]	<400> 132	
[4187]	aaaccatcat ctaaggcct caaaactacc tcggaactgc tgcgctgac tggacaccac	60
[4188]	agaggttccg agcactttag gttgcacaa atgtcccacc aggtgcaggc agaaaacgct	120
[4189]	ggaacagcgt gtacagtttg tcttaacaaa aagtgagggc gctgaggctg agcagggtgg	180
[4190]	tgtgacttgt tatagccttt agagctgcga aagcgcgtat ggatttggt catcaggcca	240
[4191]	gattgagggt ctgtggacac atgtcatgtt agtgtacttc aatcgcccc tggatatagc	300
[4192]	cccgacaata ggccgtggcc tcattttttt gccttcgcga catttccatt gctcggtacc	360
[4193]	cacaccttgc ttctcctgca cttgccaaacc ttaatactgg ttacattga ccaacatctt	420
[4194]	acaagcgggg ggcttgctta gggatatatat aaacagtggc tctcccaatc ggttgccagt	480
[4195]	ctcttttttc ctttctttcc ccacagattc gaaatctaaa ctacacatca caccatggcc	540
[4196]	tcctcgaggg acgtcatcaa ggagttcatg cgattcaagg tccgaatgga aggtctccgtg	600
[4197]	aacggtcacg agtttgagat tgaggagag ggtgaaggcc gaccctacga aggcaccag	660
[4198]	accggaagc tgaagtgac caagggtgga cccctgcct tcgcctggga cattctgtct	720
[4199]	cctcagtttc agtacgggtc taagggtgac gtgaagcacc ctgctgacat tcccactac	780

[4200]	aagaaacttt ctttcccga gggcttcaag tgggagcgag ttatgaactt cgaggatggc	840
[4201]	ggtgtcgtta ccgttactca ggactcctcg ctccaggacg gctcgttcat ctacaaggtt	900
[4202]	aagttcatcg gtgtcaactt ccctagcgat ggaccctca tgcaaaagaa aactatggga	960
[4203]	tgggaagcct ctacagagcg gctgtaccct cgagacggag tgttgaaggg cgagattcac	1020
[4204]	aaggccctga agctcaagga cgggtggacac tatctcgttg agtttaagtc tatctacatg	1080
[4205]	gcaaagaaac ccgtgcagct tccaggctac tattacgtcg attccaagct cgatatcacc	1140
[4206]	agccataatg aggactacac tattgtcgaa cagtacgagc gtgctgaggg aagacaccat	1200
[4207]	ctgtttcttt aagcgccgc aagtgtggat ggggaagtga gtgcccgtt ctgtgtgcac	1260
[4208]	aattggcaat ccaagatgga tggattcaac acagggatat agcgagctac gtggtgtgc	1320
[4209]	gaggatatag caacggatat ttatgtttga cacttgagaa tgtacgatac aagcactgtc	1380
[4210]	caagtacaat actaaacata ctgtacatac tcatactcgt acccgggcaa cggtttact	1440
[4211]	tgagtgcagt ggctagtgt cttactcgta cagtgtgcaa tactgcgtat catagtcttt	1500
[4212]	gatgtatatc gtattcattc atgttagttg cgtacggcg tcgttgcttg tgtgattttt	1560
[4213]	gaggacccat ccctttggta tataagtata ctctgggggtt aaggttgccc gtgtagtcta	1620
[4214]	ggttatagtt ttcatgtgaa ataccgagag ccgagggaga ataaacgggg gtatttggac	1680
[4215]	ttgttttttt cgcgaaaag cgtcgaatca accctgcggg ccttgcacca tgtccacgac	1740
[4216]	gtgtttctcg cccaattcg ccccttgcaac gtcaaaatta ggctccatc tagaccctc	1800
[4217]	cataacatgt gactgtgggg aaaagtataa gggaaacat gcaaccatag acgacgtgaa	1860
[4218]	agacggggag gaaccaatgg aggccaaaga aatggggtag caacagtcca ggagacagac	1920
[4219]	aaggagacaa ggagaggcg cccgaaagat cggaaaaaca aacatgtcca attggggcag	1980
[4220]	tgacggaaac gacacggaca cttcagtaca atggaccgac catctccaag ccagggttat	2040
[4221]	tccggtatca ccttgccgt aacctccgc tggtagctga tattgtacac gttcacattc	2100
[4222]	aataacttt cagctacaat aagagaggct gtttgtcggg catgtgtgtc cgtcgtatgg	2160
[4223]	ggtgatgtcc gagggcgaaa ttctgtacaa gcttaactct ggcgcttgtc cagtatgaat	2220
[4224]	agacaagtca agaccagtgg tgccatgatt gacaggaggg tacaagactt cgatactcga	2280
[4225]	gcattactcg gacttgtggc gattgaacag acgggcgacg gcttctcccc cgtattgccg	2340
[4226]	gcgcgccagc tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga gaggcggtt gcgtattggg	2400
[4227]	cgctcttccg cttcctcgct cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct gcgcgagcg	2460
[4228]	gtatcagctc actcaaagge ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga	2520
[4229]	aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg	2580
[4230]	gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgac ctcaagtcag	2640
[4231]	aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc	2700
[4232]	gtgcgtctc ctgttccgac cctgccgtt accggatacc tgtccgctt tctcccttcg	2760
[4233]	ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg ttaggtcgtt	2820
[4234]	cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgtg cgccttatcc	2880
[4235]	ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc	2940
[4236]	actggttaaca ggattagcag agcgaggatg gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg	3000
[4237]	tggcctaact acggctacac tagaagaaca gtatttggta tctgcgtctc gctgaagcca	3060
[4238]	gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc	3120
[4239]	ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat	3180
[4240]	cccttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg ttaagggtt	3240
[4241]	ttggatcatga gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaatta aaaatgaagt	3300

[4242]	tttaaatacaa tctaaagtat atatgagtaa acttggctctg acagttacca atgcttaatc	3360
[4243]	agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc	3420
[4244]	gtcgtgtaga taactacgat acgggagggc ttaccatctg gccccagtgc tgcaatgata	3480
[4245]	ccgcgagacc cacgctcacc ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg	3540
[4246]	gccgagcgca gaagtgggcc tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat taattgttgc	3600
[4247]	cgggaagcta gagtaagtag ttcgccagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct	3660
[4248]	acaggcatcg tgggtgtcacg ctcgctgttt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa	3720
[4249]	cgatcaaggc gagttacatg atcccccatg ttgtgcaaaa aagcggtttag ctcttctcggt	3780
[4250]	cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca	3840
[4251]	ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tgggtgagtac	3900
[4252]	tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgta	3960
[4253]	atacgggata ataccgcgcc acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt	4020
[4254]	tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaaccc	4080
[4255]	actcgtgcac ccaactgacg ttcagcatct tttactttca ccagcgttgc tgggtgagca	4140
[4256]	aaaacaggaa ggcaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggc cgacacggaa atgttgata	4200
[4257]	ctcatactct tcctttttca atattattga agcatttatac agggttattg tctcatgagc	4260
[4258]	ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc	4320
[4259]	cgaaaagtgc cacctgatgc ggtgtgaaat accgcacaga tgcgtaagga gaaaataccg	4380
[4260]	catcaggaaa ttgtaagcgt taatatattg ttaaaattcg cgttaaattt ttgttaaatac	4440
[4261]	agctcatattt ttaaccaata ggccgaaatc ggcaaaatcc cttataaatc aaaagaatag	4500
[4262]	accgagatag ggttgagtgt tgttccagtt tggaacaaga gtccactatt aaagaacgtg	4560
[4263]	gactccaacg tcaaagggcg aaaaaccgtc tatcagggcg atggccact acgtgaacca	4620
[4264]	tcaccctaata caagtttttt ggggtcgagg tgccgtaaag cactaaatcg gaaccctaaa	4680
[4265]	gggagcccc gatttagagc ttgacgggga aagccggcga acgtggcgag aaaggaagg	4740
[4266]	aagaaagcga aaggagcggc cgctagggcg ctggcaatg tagcggtcac gctgcgcgta	4800
[4267]	accaccacac ccgccgcgct taatgcgccg ctacagggcg cgtccattcg ccattcaggc	4860
[4268]	tgcgcaactg ttgggaaggc cgatcgggtc gggcctcttc gctattacgc cagctggcga	4920
[4269]	aagggggatg tgctgcaagg cgattaagtt gggtaacgcc agggttttcc cagtcacgac	4980
[4270]	gttgtaaaac gacggccagt gaattgtaat acgactcact atagggcgaa ttgggcccga	5040
[4271]	cgtcgcacgc gctgatgaca ctttggctctg aaagagatgc attttgaatc ccaaacttgc	5100
[4272]	agtgcccaag tgacatacat ctccgcgttt tggaatatgt tcagaaacag ttgattgtgt	5160
[4273]	tggaatgggg aatggggaat ggaaaaatga ctcaagtatc aattccaaaa acttctctgg	5220
[4274]	ctggcagtac ctactgtcca tactactgca ttttctccag tcaggccact ctatactcga	5280
[4275]	cgacacagta gtaaaaccca gataatttcg acataaacia gaaaacagac ccaataatat	5340
[4276]	ttatatatag tcagccgttt gtccagttca gactgtaata gccgaaaaaa aatccaaagt	5400
[4277]	ttctattcta ggaaaatata ttccaatatt tttaattctt aatctcattt attttattct	5460
[4278]	agcgaataac atttcagcta cttgagacat gtgataccca caaatcggat tcggactcgg	5520
[4279]	ttgttcagaa gagcatatgg cattcgtgct cgcttgttca cgtattcttc ctgttccatc	5580
[4280]	tcttgccgca caatcacaca aaaatggggg ttttttttta attctaataa ttcatcag	5640
[4281]	caaaattgag atatagcaga ccacgtattc cataatcacc aaggaagttc ttgggcgtct	5700
[4282]	taattaagtgt gcgacacatg tcttgatagt atcttggctt ctctctcttg agcttttcca	5760
[4283]	taacaagtgc ttctgcctcc aggaagtcca tggatgaatga ttcttatact cagaaggaaa	5820

[4284]	tgcttaacga tttcgggtgt gagttgacaa ggagagagag aaaagaagag gaaaggtaat	5880
[4285]	tcggggacgg tggctcttta tacccttggc taaagtccca accacaaagc aaaaaaattt	5940
[4286]	tcagtagtct attttgcgtc cggcatgggt taccggatg gccagacaaa gaaactagta	6000
[4287]	caaagtctga acaagcgtag attccagact gcagtaccct acgcccttaa cggcaagtgt	6060
[4288]	gggaaccggg ggaggtttga tatgtggggg gaagggggct ctgccgggg ttggggccgc	6120
[4289]	tactgggtca atttggggtc aattggggca attggggctg ttttttggga cacaaatacg	6180
[4290]	ccgccaaccc ggtctctcct gaattctgca gatgggctgc aggaattccg tcgtcgctg	6240
[4291]	agtcgacatc atttatttac cagttggcca caaaccttg acgatctcgt atgtccctc	6300
[4292]	cgacatactc ccggccggct ggggtacgtt cgatagcgct atcggcacgc acaaggtttg	6360
[4293]	ggtccctagc cgataccgca ctacctgagt cacaatcttc ggaggtttag tcttcacat	6420
[4294]	agcacgggca aaagtgcgta tatatacaag agcgtttgcc agccacagat tttcactcca	6480
[4295]	cacaccacat cacacataca accacacaca tccacaatgg aaccgaaac taagaagacc	6540
[4296]	aagactgact ccaagaagat tgttctctc ggcgcgact tctgtggccc cgaggtgatt	6600
[4297]	gccgaggccg tcaagggtct caagtctgtt gctgaggcct ccggcaccga gtttgtgtt	6660
[4298]	gaggaccgac tcattggagg agctgccatt gagaaggagg gcgagcccat caccgacgt	6720
[4299]	actctcgaca tctgccgaaa ggctgactct attatgctcg gtgctgtcgg aggcgctgcc	6780
[4300]	aacaccgtat ggaccactcc cgacggacga accgacgtgc gaccgagca gggctctctc	6840
[4301]	aagctcgcaa aggacctgaa cctgtacgcc aacctgcgac cctgccagct gctgtcgccc	6900
[4302]	aagctcgccg atctctcccc catccgaaac gttgagggca ccgacttcat cattgtccga	6960
[4303]	gagctcgctg gaggtatcta ctttgagag cgaaaggagg atgacggatc tggcgtcgct	7020
[4304]	tccgacaccg agacctactc cgttctctgag gttgagcga ttgcccgaat ggccgccttc	7080
[4305]	ctggcccttc agcacaaccc ccctcttccc gtgtggtctc ttgacaaggc caacgtgctg	7140
[4306]	gcctctctc gactttggcg aaagactgtc actcgagtcc tcaaggacga attccccag	7200
[4307]	ctcgagctca accaccagct gatcgactcg gccgccatga tcctcatcaa gcagccctcc	7260
[4308]	aagatgaatg gtatcatcat caccaccaac atgtttggcg atatcatctc cgacgaggcc	7320
[4309]	tccgtcatcc ccggttctct gggctctgtg ccctccgct ctctggcttc tctgccgac	7380
[4310]	accaacgagg cgttcggctc gtacgagccc tgtcacggat ctgccccga tctcggaag	7440
[4311]	cagaaggtea accccattgc caccattctg tctgccgcca tgatgctcaa gttctctctt	7500
[4312]	aacatgaagc ccgccgtga cgctgttag gctgccgta aggagtccgt cgaggctggt	7560
[4313]	atcactaccg ccgatatcgg aggtctctcc tccacctccg aggtcggaga cttgttgcca	7620
[4314]	acaaggtaaa ggagctgctc aagaaggagt aagtcgttcc tacgacgcac tgatggaagg	7680
[4315]	agcaaaactga cgcgctcgcg ggttggtcta ccggcagggt ccgctagtgt ataagactct	7740
[4316]	ataaaaaggg ccctgccctg ctaatgaaat gatgatttat aatttaccgg tgtagcaacc	7800
[4317]	ttgactagaa gaagcagatt ggggtgtgtt gtagtggagg acagtggtag gttttggaaa	7860
[4318]	cagtcttctt gaaagtgtct tgtctacagt atattcactc ataacctcaa tagccaagg	7920
[4319]	tgtagtcggt ttattaaagg aaggagttg tggctgatgt ggatagatat ctttaagctg	7980
[4320]	gcgactgcac ccaacgagtg tggtagtagc ttgttagatc tgtatatctg gtaagatata	8040
[4321]	ttttgtgggg ttttagtggt gttt	8064
[4322]	<210> 133	
[4323]	<211> 5356	
[4324]	<212> DNA	
[4325]	<213> 人工序列	

[4326]	<220>	
[4327]	<223>	来自pRF201的AscI/SphI整合片段
[4328]	<400>	133
[4329]	cgctgatgac actttggtct gaaagagatg cattttgaat cccaaacttg cagtgcccaa	60
[4330]	gtgacataca tctccgcgtt ttggaaaatg ttcagaaaca gttgattgtg ttggaatggg	120
[4331]	gaatggggaa tggaaaaatg actcaagtat caattccaaa aactttctctg gctggcagta	180
[4332]	cctactgtcc atactactgc attttctcca gtcaggccac tctatactcg acgacacagt	240
[4333]	agtaaaaccc agataatttc gacataaaca agaaaacaga cccaataata tttatatata	300
[4334]	gtcagccggt tgtccagttc agactgtaat agccgaaaaa aaatccaaag tttctattct	360
[4335]	agggaaatat attccaatat ttttaattct taatctcatt tattttattc tagcgaaata	420
[4336]	catttcagct acttgagaca tgtgataccc acaaatcgga ttcggactcg gttgttcaga	480
[4337]	agagcatatg gcattcgtgc tcgcttggtc acgtattctt cctgttccat ctcttggccg	540
[4338]	acaatcacac aaaaatgggg tttttttttt aattctaatag attcattaca gcaaaattga	600
[4339]	gatatagcag accacgtatt ccataatcac caaggaagtt cttgggcgtc ttaattaagt	660
[4340]	tgcgacacat gtcttgatag tatcttggtc tctctctctt gagcttttcc ataacaagtt	720
[4341]	cttctgcctc caggaagtcc atggtgaatg attcttatac tcagaaggaa atgcttaacg	780
[4342]	atttcgggtg tgagttgaca aggagagaga gaaaagaaga ggaaaggtaa ttcggggacg	840
[4343]	gtggtctttt atacccttg ctaaagtcac aaccacaaag caaaaaaatt ttcagtagtc	900
[4344]	tattttgcgt ccggcatggg ttacccggtg ggccagacaa agaaactagt acaaagtctg	960
[4345]	aacaagcgta gattccagac tgcagtaccc tacgccctta acggcaagtg tgggaaccgg	1020
[4346]	gggaggtttg atatgtgggg tgaagggggc tctcgccggg gttgggcccc ctactgggtc	1080
[4347]	aatttggggg caattggggc aattggggct gttttttggg acacaaatac gccgccaacc	1140
[4348]	cggctctctc tgaattctgc agatgggctg caggaattcc gtcgtcgcct gagtcgacat	1200
[4349]	catttattta ccagttggcc acaaaccctt gacgatctcg tatgtcccct ccgacatact	1260
[4350]	cccggccggc tggggtacgt tcgatagcgc tatcggcacg gacaagggtt gggtccctag	1320
[4351]	ccgataccgc actacctgag tcacaatctt cggaggttta gtcttccaca tagcacgggc	1380
[4352]	aaaagtgcgt atatatacaa gagcgtttgc cagccacaga ttttactc acacaccaca	1440
[4353]	tcacacatac aaccacacac atccacaatg gaaccgaaa ctaagaagac caagactgac	1500
[4354]	tccaagaaga ttgttctctt cggcggcgac ttctgtggcc ccgaggtgat tgccgaggcc	1560
[4355]	gtcaagggtg tcaagtctgt tgctgaggcc tccggcaccg agtttgtgtt tgaggaccga	1620
[4356]	ctcattggag gagctgccat tgagaaggag ggcgagccca tcaccgacgc tactctcgac	1680
[4357]	atctgccgaa aggctgactc tattatgctc ggtgctgtcg gaggcgctgc caacaccgta	1740
[4358]	tggaccactc ccgacggacg aaccgacgtg cgaccgcagc agggctctct caagctgcga	1800
[4359]	aaggacctga acctgtacgc caacctgcga ccctgccagc tgctgtcgcc caagctcgcc	1860
[4360]	gatctctccc ccatccgaaa cgttgagggc accgacttca tcattgtccg agagctcgtc	1920
[4361]	ggaggtatct actttggaga gcgaaaggag gatgacggat ctggcgtcgc ttccgacacc	1980
[4362]	gagacctact ccgttcttga ggttgagcga attgccgaa tggccgcctt cctggccctt	2040
[4363]	cagcacaacc cccctcttcc cgtgtggtct cttgacaagg ccaacgtgct ggctctctct	2100
[4364]	cgactttggc gaaagactgt cactcgagtc ctcaaggacg aattccccca gctcgagtc	2160
[4365]	aaccaccagc tgatcgactc ggccgccatg atctcatca agcagccctc caagatgaat	2220
[4366]	ggtatcatca tcaccaccaa catgtttggc gatatcatct ccgacgaggc ctccgtcatc	2280
[4367]	cccggttctc tgggtctgct gccctccgcc tctctggctt ctctgcccga caccaacgag	2340

[4368]	gcgttcggtc tgtacgagcc ctgtcacgga tctgcccccg atctcggcaa gcagaaggtc	2400
[4369]	aaccccatg ccaccattct gtctgccgcc atgatgtca agttctctct taacatgaag	2460
[4370]	cccgcgggtg acgtgttga ggctgccgtc aaggagtcgg tcgaggctgg tactactacc	2520
[4371]	gccgatatcg gaggtctctc ctccacctcc gaggtcggag acttggtgcc aacaaggtca	2580
[4372]	aggagctgct caagaaggag taagtcgttt ctacgacgca ttgatggaag gagcaaaactg	2640
[4373]	acgcgcctgc gggttggtct accggcaggg tccgctagtg tataagactc tataaaaagg	2700
[4374]	gccccgccct gctaataaaa tgatgattta taattttaccg gtgtagcaac cttgactaga	2760
[4375]	agaagcagat tgggtgtgtt tgtagtgagg gacagtggta cgttttggaa acagtcttct	2820
[4376]	tgaaagtgtc ttgtctacag tatattcact cataacctca atagccaagg gtgtagtcgg	2880
[4377]	tttattaaag gaaggaggtt gtggctgatg tggatagata tctttaagct ggcgactgca	2940
[4378]	cccaacgagt gtggtggtag cttgttagat ctgtatatc ggtaagatat attttgtggg	3000
[4379]	gttttagtgg tgtttaaacc atcatctaag ggcccaaaa ctacctcgga actgctgcgc	3060
[4380]	tgatctggac accacagagg ttccgagcac tttaggttgc accaaatgtc ccaccaggtg	3120
[4381]	caggcagaaa acgctggaac agcgtgtaca gtttgtctta acaaaaagtg agggcgctga	3180
[4382]	ggtcagcagc ggtggtgtga cttgttatag ctttagagc tgcgaaagcg cgtatggatt	3240
[4383]	tggtcatca ggccagattg agggctctgtg gacacatgtc atgttagtgt acttcaatcg	3300
[4384]	ccccctggat atagccccga caataggccg tggcctcatt tttttgcctt ccgcacattt	3360
[4385]	ccattgctcg gtaccacac cttgctctc ctgcacttgc caaccttaat actggtttac	3420
[4386]	attgaccaac atcttacaag cggggggcct gtctagggtg tatataaaca gtggctctcc	3480
[4387]	caatcggttg ccagtctctt ttttctttc tttcccaca gattcgaaat ctaactaca	3540
[4388]	catcacacca tggcctctc ggaggacgtc atcaaggagt tcatgcgatt caaggtccga	3600
[4389]	atggaaggct ccgtgaacgg tcacgagttt gagattgagg gagagggtga aggccgaccc	3660
[4390]	tacgaaggca ccagaccgc gaagctgaag gtgaccaagg gtggaccctt gcccttcgcc	3720
[4391]	tgggacattc tgtctctca gtttcagtag ggttctaagg tgtacgtgaa gcaccctgct	3780
[4392]	gacattcccg actacaagaa actttccttt cccgagggtc tcaagtggga gcgagttatg	3840
[4393]	aacttcgagg atggcggtgt cgttacgtt actcaggact cctcgtcca ggacggctcg	3900
[4394]	ttcatctaca aggttaagtt catcggtgtc aacttccta gcgatggacc cgtcatgcaa	3960
[4395]	aagaaaacta tgggatggga agcctctaca gagcggctgt accctcgaga cggagtgttg	4020
[4396]	aaggcgaga ttcacaaggc cctgaagctc aaggacggtg gacactatct cgttgagttt	4080
[4397]	aagtctatct acatggcaaa gaaaccgtg cagcttcag gctactatta cgtcgattcc	4140
[4398]	aagctcgata tcaccagcca taatgaggac tacactattg tcgaacagta cgagcgtgct	4200
[4399]	gagggaagac accatctgtt tctttaagcg gccgcaagtg tggatgggga agtgagtgcc	4260
[4400]	cggttctgtg tgcacaattg gcaatccaag atggatggat tcaacacagg gatatagcga	4320
[4401]	gctacgtggt ggtgcgagga tatagcaacg gatatttatg tttgacactt gagaatgtac	4380
[4402]	gatacaagca ctgtccaagt acaatactaa acatactgta catactcata ctcgtaccgc	4440
[4403]	ggcaacggtt tcacttgagt gcagtggtc gtgctcttac tcgtacagt tgcaatactg	4500
[4404]	cgtatcatag tctttgatgt atatcgtatt cattcatgtt agttgcgtac gggcgctggt	4560
[4405]	gcttgtgtga tttttgagga cccatccctt tggatatata gtatactctg gggtttaaggt	4620
[4406]	tgccgtgta gtctaggtta tagttttcat gtgaaatacc gagagccgag ggagaataaa	4680
[4407]	cgggggtatt tggacttggt tttttcgcg aaaagcgtc aatcaaccct gcgggccttg	4740
[4408]	caccatgtcc acgacgtgtt tctcgcccca attcgccct tgcacgtcaa aattaggcct	4800
[4409]	ccatctagac ccctccataa catgtgactg tggggaaaag tataagggaa accatgcaac	4860

[4410]	catagacgac gtgaaagacg gggaggaacc aatggaggcc aaagaaatgg ggtagcaaca	4920
[4411]	gtccaggaga cagacaagga gacaaggaga gggcgcccga aagatcggaa aaacaaacat	4980
[4412]	gtccaattgg ggcagtacg gaaacgacac ggacacttca gtacaatgga ccgaccatct	5040
[4413]	ccaagccagg gttattccgg tatcaccttg gccgtaacct cccgctggta cctgatattg	5100
[4414]	tacacgttca cattcaatat actttcagct acaataagag aggctgtttg tcgggcatgt	5160
[4415]	gtgtccgtcg tatggggtga tgtccgaggc cgaaattcgc tacaagctta actctggcgc	5220
[4416]	ttgtccagta tgaatagaca agtcaagacc agtgggtgcca tgattgacag ggaggtacaa	5280
[4417]	gacttcgata ctcgagcatt actcggactt gtggcgattg aacagacggg cgatcgcttc	5340
[4418]	tcccccgatat tgccgg	5356
[4419]	<210> 134	
[4420]	<211> 38	
[4421]	<212> DNA	
[4422]	<213> 人工序列	
[4423]	<220>	
[4424]	<223> HY026	
[4425]	<400> 134	
[4426]	gcgcgtttaa accatcatct aagggcctca aaactacc	38
[4427]	<210> 135	
[4428]	<211> 38	
[4429]	<212> DNA	
[4430]	<213> 人工序列	
[4431]	<220>	
[4432]	<223> HY027	
[4433]	<400> 135	
[4434]	gagagcggcc gcttaaagaa acagatgggtg tcttccct	38
[4435]	<210> 136	
[4436]	<211> 11952	
[4437]	<212> DNA	
[4438]	<213> 人工序列	
[4439]	<220>	
[4440]	<223> pRF169	
[4441]	<400> 136	
[4442]	catggacaag aaatactcca tcggcctgga cattggaacc aactctgtcg gctgggctgt	60
[4443]	catcaccgac gagtacaagg tgccctccaa gaaattcaag gtctctggaa acaccgatcg	120
[4444]	acactccatc aagaaaaacc tcattgggtgc cctgttgttc gattctggcg agactgccga	180
[4445]	agctaccaga ctcaagcgaa ctgctcgcg acgttacacc cgacggaaga accgaatctg	240
[4446]	ctacctgcag gagatctttt ccaacgagat ggccaagggtg gacgattcgt tctttcatcg	300
[4447]	actggaggaa tccttcctcg tcgaggaaga caagaaacac gagegtcatc ccatcttttg	360
[4448]	caacattgtg gacgaggttg cttaccacga gaagtatcct accatctacc atctccgaaa	420
[4449]	gaaactcgtc gattccaccg acaaggcgga tctcagactt atctacctcg ctctggcaca	480
[4450]	catgatcaag tttcgaggtc atttctcat cgaggcgcat ctcaatcccga acaacagcga	540
[4451]	tgtggacaag ctgttcatte agctcgttca gacctacaac cagctgttcg aggaaaaccc	600

[4452]	catcaatgcc tccggagtcg atgcaaaggc catcttgtct gctcgactct cgaagagcag	660
[4453]	acgactggag aacctcattg cccaacttcc tggcgagaaa aagaacggac tgtttggcaa	720
[4454]	cctcattgcc ctttctcttg gtctcacacc caacttcaag tccaacttcg atctggcgga	780
[4455]	ggacgccaag ctccagctgt ccaaggacac ctacgacgat gacctcgaca acctgcttgc	840
[4456]	acagattggc gatcagtacg cgcacctgtt tctcgtgcc aagaaccttt cggatgctat	900
[4457]	tctcttgtct gacattctgc gagtcaacac cgagatcaca aaggctcccc tttctgcctc	960
[4458]	catgatcaag cgatacgacg agcaccatca ggatctcaca ctgctcaagg ctcttgtccg	1020
[4459]	acagcaactg cccgagaagt acaaggagat ctttttcgat cagtcgaaga acggctacgc	1080
[4460]	tggatacatc gacggcggag cctctcagga agagtcttac aagttcatca agccaattct	1140
[4461]	cgagaagatg gacggaaccg aggaactgct tgtcaagctc aatcgagagg atctgcttcg	1200
[4462]	gaagcaacga accttcgaca acggcagcat tctcatcag atccacctcg gtgagctgca	1260
[4463]	cgccattctt cgacgtcagg aagacttcta cccctttctc aaggacaacc gagagaagat	1320
[4464]	cgagaagatt cttacctttc gaatccccta ctatgttggc cctcttgcca gaggaaactc	1380
[4465]	tcgatttgct tggatgactc gaaagtccga ggaaaccatc actccctgga acttcgagga	1440
[4466]	agtcgtggac aagggtgcct ctgcacagtc cttcatcgag cgaatgacca acttcgacaa	1500
[4467]	gaatctgccc aacgagaagg ttcttcccaa gcattcgtcg ctctacgagt actttacagt	1560
[4468]	ctacaacgaa ctcaccaaag tcaagtacgt taccgaggga atgcgaaagc ctgccttctt	1620
[4469]	gtctggcgaa cagaagaaag ccattgtcga tctcctgttc aagaccaacc gaaaggtcac	1680
[4470]	tgtaagcag ctcaaggagg actacttcaa gaaaatcgag tgtttcgaca gcgtcgagat	1740
[4471]	ttccggagtt gaggaccgat tcaacgcctc tttgggcacc tatcacgac tgctcaagat	1800
[4472]	tatcaaggac aaggattttc tcgacaacga ggaaaacgag gacattctgg aggacatcgt	1860
[4473]	gctcactctt accctgttcg aagatcggga gatgatcgag gaacgactca agacatacgc	1920
[4474]	tcacctgttc gacgacaagg tcatgaacaa actcaagcga cgtagatata ccggctgggg	1980
[4475]	aagactttcg cgaaagctca tcaacggcat cagagacaag cagtccggaa agaccattct	2040
[4476]	ggactttctc aagtccgatg gctttgcca cggaaacttc atgcagctca ttcacgacga	2100
[4477]	ttctcttacc ttcaaggagg acatccagaa ggcacaagtg tccggtcagg gcgacagctt	2160
[4478]	gcacgaacat attgccaacc tggctggttc gccagccatc aagaaaggca ttctccagac	2220
[4479]	tgtcaagggt gtgcacgagc tgggtgaaggt catgggacgt cacaagcccg agaacattgt	2280
[4480]	gatcgagatg gccagagaga accagacaac tcaaaagggt cagaaaaact cgcgagagcg	2340
[4481]	gatgaagcga atcgaggaag gcatcaagga gctgggatcc cagattctca aggagcatcc	2400
[4482]	cgtcgagaac actcaactgc agaacgagaa gctgtatctc tactatctgc agaattggtcg	2460
[4483]	agacatgtac gtggatcagg aactggacat caatcgtctc agcgactacg atgtggacca	2520
[4484]	cattgtccct caatcctttc tcaaggacga ttctatcgac aacaaggctc ttacacgac	2580
[4485]	cgacaagaac agaggcaagt cggacaacgt tcccagcgaa gaggtggtca aaaagatgaa	2640
[4486]	gaactactgg cgacagctgc tcaacgcca gctcattacc cagcgaaagt tcgacaatct	2700
[4487]	taccaaggcc gagcgaggcg gtctgtccga gctcgacaag gctggcttca tcaagcgtca	2760
[4488]	actcgtcgag accagacaga tcacaaagca cgtcgcacag attctcgatt ctcgatgaa	2820
[4489]	caccaagtac gacgagaacg acaagctcat ccgagaggtc aagggtgatta ctctcaagtc	2880
[4490]	caaactggtc tccgatttcc gaaaggactt tcagttctac aagggtcgag agatcaacaa	2940
[4491]	ttaccacat gccacgatg cttacctcaa cgccgtcgtt ggcaactgcgc tcatcaagaa	3000
[4492]	ataccccaag ctcgaaagcg agttcgttta cggcgattac aagggtctac acgttcgaaa	3060
[4493]	gatgattgcc aagtccgaac aggagattgg caaggctact gccaaagtact tcttttactc	3120

[4494]	caacatcatg aactttttca agaccgagat caccttggcc aacggagaga ttcgaaagag	3180
[4495]	accacttatc gagaccaacg gcgaaactgg agagatcgtg tgggacaagg gtcgagactt	3240
[4496]	tgcaaccgtg cgaaagggtc tgtc gatgcc tcaggtcaac atcgtcaaga aaaccgaggt	3300
[4497]	tcagactggc ggattctcca aggagtcgat tctgccccag cgaaactccg acaagctcat	3360
[4498]	cgctcgaaag aaagactggg atcccaagaa atacggtggc ttcgattctc ctaccgtcgc	3420
[4499]	ctattccgtg cttgtcgttg cgaaggtcga gaagggaag tccaaaaagc tcaagtccgt	3480
[4500]	caaggagctg ctcggaatta ccatcatgga gcgatcgagc ttcgagaaga atcccatcga	3540
[4501]	cttcttgga gccaagggtt acaaggaggt caagaaagac ctcatatca agctgcccaa	3600
[4502]	gtactctctg ttcgaaactgg agaacggctg aaagcgtatg ctgcctccg ctggcgagct	3660
[4503]	gcagaaggga aacgagcttg cttgccttc gaagtacgtc aactttctct atctggcttc	3720
[4504]	tcactacgag aagctcaagg gttctccga ggacaacgaa cagaagcaac tcttcgttga	3780
[4505]	gcagcacaaa cattacctg acgagattat cgagcagatt tccgagttt cgaagcgagt	3840
[4506]	catcctggct gatgccaaact tggacaagg gctctctgcc tacaacaagc atcgggacaa	3900
[4507]	accattcga gaacaggcgg agaacatcat tcacctgtt actcttacca acctgggtgc	3960
[4508]	tcctgcagct ttcaagtact tcgataccac tatcgaccga aagcgggtaca catccacaa	4020
[4509]	ggaggttctc gatgccaccc tgattcacca gtccatcact ggctgtacg agaccggaat	4080
[4510]	cgacctgtct cagcttggtg gcgactccag agccgatccc aagaaaaagc gaaaggtcta	4140
[4511]	agcggccgca agtgtggatg gggaagtga tgccccgttc tgtgtgcaca attggcaatc	4200
[4512]	caagatggat ggattcaaca cagggatata gcgagctacg tgggtggtgcg aggatatagc	4260
[4513]	aacggatatt tatgtttgac acttgagaat gtacgataca agcactgtcc aagtacaata	4320
[4514]	ctaaacatac tgtacatact catactcgta cccgggcaac ggtttctact gagtgcagtg	4380
[4515]	gctagtgtc ttactcgtac agtgtgcaat actgcgtatc atagtctttg atgtatatcg	4440
[4516]	tattcattca tgtagttgc gtacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tggggtgcct	4500
[4517]	aatgagtgag ctaactcaca ttaattgcgt tgcgtcact gcccgcttc cagtcgggaa	4560
[4518]	acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta	4620
[4519]	ttgggcgtc ttccgcttc tcgctcactg actcgtcgc ctcggtcgtt cggctgcggc	4680
[4520]	gagcggatc agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg	4740
[4521]	caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt	4800
[4522]	tgttgcggtt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgtcaa	4860
[4523]	gtcagaggtg gcgaaaccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct	4920
[4524]	ccctcgtgcg ctctcctgtt ccgacctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc	4980
[4525]	cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg	5040
[4526]	tcgttcgtc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgcg cgctgcgct	5100
[4527]	tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccaactggcag	5160
[4528]	cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtgtaca gatttcttga	5220
[4529]	agtggtggcc taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggatatctgc gctctgtga	5280
[4530]	agccagttac cttcgaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaaaa accaccgctg	5340
[4531]	gtagcgggtg tttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag	5400
[4532]	aagatccttt gatctttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag	5460
[4533]	ggattttggt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaat	5520
[4534]	gaagtttta atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct	5580
[4535]	taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg ttcattcata gttgcctgac	5640

[4536]	tccccgtcgt gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa	5700
[4537]	tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc cagatttacc agcaataaac cagccagccg	5760
[4538]	gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt	5820
[4539]	gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag ttgcgcaac gttgttgcca	5880
[4540]	ttgctacagg catcgtgggtg tcacgctcgt cgtttgggtat ggcttcattc agctccggtt	5940
[4541]	cccaacgata aaggcgagtt acatgatccc ccatgttggtg caaaaaagcg gttagctcct	6000
[4542]	tcggtcctcc gatcgttggtc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg	6060
[4543]	cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactgggtg	6120
[4544]	agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg	6180
[4545]	cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa	6240
[4546]	aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt	6300
[4547]	aaccactcgc tgcacccaac tgatcttcag catcttttac tttcaccage gtttctgggt	6360
[4548]	gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat aaggcgaca cggaaatgtt	6420
[4549]	gaatactcat actcttctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca	6480
[4550]	tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat	6540
[4551]	ttccccgaaa agtgccacct gacgcgcct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg	6600
[4552]	tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcct agcgcctcct cctttcgctt	6660
[4553]	tcttcccttc ctttctcgcc acgttcgccc gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc	6720
[4554]	tccctttagg gttccgattt agtgctttac ggcacctga ccccaaaaaa cttgattagg	6780
[4555]	gtgatgggtc acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccc tttgacgttg	6840
[4556]	agtcacggtt ctttaatagt ggactctgtg tccaaactgg aacaacactc aacctatct	6900
[4557]	cggctatttc ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctatttg ttaaaaaatg	6960
[4558]	agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgctt acaatttcca	7020
[4559]	ttcgccattc aggtgcgca actgttgga agggcgatcg gtgcgggcct cttcgctatt	7080
[4560]	acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt	7140
[4561]	ttcccagtcg cgacgttgta aaacgacggc cagtgaattg taatacgact cactatagg	7200
[4562]	cgaattgggt accgggcccc ccctcgaggt cgatgggtgc gataagcttg atatcgaatt	7260
[4563]	catgtcacac aaaccgatct tcgcctcaag gaaacctaat tctacatccg agagactgcc	7320
[4564]	gagatccagt ctacactgat taattttcgg gccataaatt taaaaaaatc gtgttatata	7380
[4565]	atattatatg tattatata atacatcatg atgatactga cagtcatgtc ccattgctaa	7440
[4566]	atagacagac tccatctgcc gcctccaact gatgttctca atatttaagg ggtcatctcg	7500
[4567]	cattgtttaa taataaacag actccatcta ccgcctcca atgatgttct caaaatata	7560
[4568]	tgtatgaact tatttttatt acttagtatt attagacaac ttacttgctt tatgaaaaac	7620
[4569]	acttcttatt taggaaacaa ttataatgg cagttcgttc atttaacaat ttatgtagaa	7680
[4570]	taaatgttat aaatgcgtat gggaaatctt aaatatggat agcataaatg atatctgcat	7740
[4571]	tgccctaattc gaaatcaaca gcaacgaaa aaatcccttg tacaacataa atagtcacgc	7800
[4572]	agaaatatca actatcaaag aacagctatt cacacgttac tattgagatt attattggac	7860
[4573]	gagaatcaca cactcaactg tctttctctc ttctagaaat acaggtacaa gtatgtacta	7920
[4574]	ttctcattgt tcatacttct agtcatttca tcccacatat tcttggtt tctctccaat	7980
[4575]	gaatgacatt ctatcttgca aattcaacaa ttataataag atatacaaaa gtagcggat	8040
[4576]	agtggaatc aaaaagcttc tctggtgtgc ttctcgtatt tatttttatt ctaatgatcc	8100
[4577]	attaaaggta tatatttatt tcttggtata taatcctttt gtttattaca tgggctggat	8160

[4578]	acataaaggt attttgattt aattttttgc ttaaattcaa tccccctcg ttcagtgtca	8220
[4579]	actgtaatgg taggaaatta ccatactttt gaagaagcaa aaaaaatgaa agaaaaaaaa	8280
[4580]	aatcgatatt ccaggttaga cgttccgcag aatctagaat gcggtatgcg gtacattgtt	8340
[4581]	cttcgaacgt aaaagttgcg ctccctgaga tattgtacat ttttgctttt acaagtacaa	8400
[4582]	gtacatcgta caactatgta ctactgttga tgcattccaca acagtttgtt ttgttttttt	8460
[4583]	ttgttttttt tttttctaatt gattcattac cgctatgtat acctacttgt actttagta	8520
[4584]	agccgggtta ttggcgttca attaatcata gacttatgaa tctgcacggt gtgcgctgcg	8580
[4585]	agttactttt agcttatgca tgctacttgg gtgtaatat gggatctgtt cggaaatcaa	8640
[4586]	cggatgctca atcgatcgcc agcaacgcgg ccttagacat aaaaaacaaa aaaaaaagc	8700
[4587]	accgactcgg tgccactttt tcaagttgat aacggactag cttattttt acttgctatt	8760
[4588]	tctagtctta aaacgcaggt gtaaaaaata aaaggcctgc gattaccagc aggctgtta	8820
[4589]	ttaacctaa ccttaggacg cttcacgcca tacttggaa gagcctgctt acggtcttta	8880
[4590]	acgccggagc agtcaagcgc accacgtacg gtgtggtaac gaacaccgag gaggtcttta	8940
[4591]	acacgaccgc cacggatcag gatcacggag tgctcctgca ggttgtgacc ttcaccaccg	9000
[4592]	atgtaggaag tcacttcgaa accgttagtc agacgaacac ggcatacttt acgcagcgcg	9060
[4593]	gagttcgggt ttttaggagt ggtagtatat acacgagtag atacgccacg tttttgcggg	9120
[4594]	catgcttcca gcgcaggcac gttgcttttc gcaactttgc gagcacgtgg tttgcgtacc	9180
[4595]	agctggttaa ctgttgccat taaatagctc ctggttttag cttttgcttc gtaaacacgt	9240
[4596]	aataaaacgt cctcacacaa tatgaggacg ccgaatttag ggcgatgccg aaaaggtgtc	9300
[4597]	aagaaatata caacgatccc gccatcgccg cgcccactg ctacgcatgg ttgatgtgtg	9360
[4598]	tttaattcaa gaatgaatat agagaagaga agaagaaaa agattcaatt gagccggcga	9420
[4599]	tgcagaccct tatataaatg ttgccttga cagacggagc aagcccgccc aaacctacgt	9480
[4600]	tcggtataat atgttaagct ttttaacaca aaggtttggc ttggggtaac ctgatgtggt	9540
[4601]	gcaaaaagacc gggcgttggc gagccattgc gcgggcgaat ggggtcgtga ctgctctcaa	9600
[4602]	attcgagggc gtgcctcaat tcgtgcccc gtggcttttt cccgccgtt cgcgccgtt	9660
[4603]	tgcaccactg cagccgcttc tttggttcgg acaccttgcg gcgagctagg tgccttgtgc	9720
[4604]	tacttaaaaa gtggcctccc aacaccaaca tgacatgagt gcgtgggcca agacacgttg	9780
[4605]	gcggggctgc agtcggctca atggcccga aaaaacgctg ctggagctgg ttcggacgca	9840
[4606]	gtccgccg gcgtatgat atccgcaagg ttccatagcg ccattgccct ccgtcggcgt	9900
[4607]	ctatcccgca accttaatta agtcatacac aagtcagctt tcttcgagcc tcatataagt	9960
[4608]	ataagtagtt caacgtatta gcaactgacc cagcatctcc gtatcgagaa acacaacaac	10020
[4609]	atgccccatt ggacagatca tgcggataga caggttgcg agtatcatc atactcgatc	10080
[4610]	agacaggctg tctgaccatc atacaagctg aacaagcgt ccatacttgc acgctctcta	10140
[4611]	tatacacagt taaattacat atccatagtc taacctctaa cagttaattct tctggttaagc	10200
[4612]	ctcccagcca gccttctggt atcgcttggc ctctcaata ggatctcgtt tctggccgta	10260
[4613]	cagacctcgg ccgacaatta tgatatccgt tccggttagac atgacatcct caacagttcg	10320
[4614]	gtactgctgt ccgagagcgt ctcccttgcg gtcaagaccc accccggggg tcagaataag	10380
[4615]	ccagtcctca gactgccct taggtcgggt ctgggcaatg aagccaacca caaactcggg	10440
[4616]	gtcggatcgg gcaagctcaa tggctctgct ggagtactcg ccagtggcca gagagccctt	10500
[4617]	gcaagacagc tcggccagca tgagcagacc tctggccagc ttctcgttgg gagaggggac	10560
[4618]	taggaactcc ttgtactggg agttctcgta gtcagagacg tcctccttct tctgttcaga	10620
[4619]	gacagtttcc tcggcaccag ctgcgaggcc agcaatgatt ccggttccgg gtacaccgtg	10680

[4620]	ggcgttggtg atatcggacc actcggcgat tcggtgacac cggtagctggt gcttgacagt	10740
[4621]	gttgccaata tctgcgaact ttctgtcctc gaacaggaag aaaccgtgct taagagcaag	10800
[4622]	ttccttgagg gggagcacag tgccggcgta ggtgaagtgc tcaatgatgt cgatatgggt	10860
[4623]	tttgatcatg cacacataag gtccgacctt atcggcaagc tcaatgagct ccttggtggt	10920
[4624]	ggtaacatcc agagaagcac acaggttggt tttcttggtc gccacgagct tgagcactcg	10980
[4625]	agcggcaaag gcggacttgt ggacgttagc tcgagcttcg taggaggga ttttggtggt	11040
[4626]	gaagaggaga ctgaaataaa tttagtctgc agaacttttt atcggaacct tatctggggc	11100
[4627]	agtgaagtat atgttatggt aatagttacg agttagtga acttatagat agactggact	11160
[4628]	atacggctat cgggtccaaat tagaaagaac gtcaatggct ctctgggcgt cgcctttgcc	11220
[4629]	gacaaaaatg tgatcatgat gaaagccagc aatgacgttg cagctgatat tgttgctggc	11280
[4630]	caaccgcgcc gaaaacgcag ctgtcagacc cacagcctcc aacgaagaat gtatcgtcaa	11340
[4631]	agtgatccaa gcacactcat agttggagtc gtactccaaa ggccggcaatg acgagtcaga	11400
[4632]	cagatactcg tcgacgttta aaccatcatc taagggcctc aaaactacct cggaactgct	11460
[4633]	gcgctgatct ggacaccaca gaggttccga gcactttagg ttgcacaaa tgtcccacca	11520
[4634]	ggtgcaggca gaaaacgctg gaacagcgtg tacagtttgt cttacaaaa agtgaggggc	11580
[4635]	ctgaggtcga gcagggtggt gtgacttgtt atagccttta gagctgcgaa agcgcgtatg	11640
[4636]	gatttggtc atcaggccag attgagggtc tgtggacaca tgtcatgtta gtgtacttca	11700
[4637]	atgccccct ggatatagcc ccgacaatag gccgtggcct catttttttg ccttcgcac	11760
[4638]	atttccattg ctcggtaccc acaccttgc tctcctgcac ttgccaacct taatactggt	11820
[4639]	ttacattgac caacatctta caagcggggg gcttgcttag ggtatatata aacagtggct	11880
[4640]	ctcccaatcg gttgccagtc tcttttttcc tttctttccc cacagattcg aaatctaaac	11940
[4641]	tacacatcac ac	11952
[4642]	<210> 137	
[4643]	<211> 564	
[4644]	<212> DNA	
[4645]	<213> 解脂耶氏酵母	
[4646]	<220>	
[4647]	<221> misc_feature	
[4648]	<222> (1) .. (564)	
[4649]	<223> GPD启动子	
[4650]	<400> 137	
[4651]	ggttgccgga tagacgccga cggagggcaa tggcgctatg gaaccttgcg gatatccata	60
[4652]	cgccgcggcg gactgcgtcc gaaccagctc cagcagcgtt ttttccgggc cattgagccg	120
[4653]	actgcgaccc cgccaacgtg tcttggtccca cgcactcatg tcatgttggt gttgggaggc	180
[4654]	cactttttta gtagcacaag gcacctagct cgcagcaagg tgtccgaacc aaagaagcgg	240
[4655]	ctgcagtggg gcaaacgggg cggaacggc gggaaaaagc cacgggggca cgaattgagg	300
[4656]	cacgccctcg aatttgagac gagtcacgac cccattcgcc cgcgcaatgg ctgcgaacg	360
[4657]	cccggtcttt tgcaccacat caggttaccc caagccaaac ctttgtgtta aaaagcttaa	420
[4658]	catattatac cgaacgtagg tttgggcggg cttgctccgt ctgtccaagg caacatttat	480
[4659]	ataagggtct gcatcgccgg ctcaattgaa tcttttttct tcttctcttc tctatattca	540
[4660]	ttcttgaatt aaacacacat caac	564
[4661]	<210> 138	

[4662]	<211>	1271	
[4663]	<212>	DNA	
[4664]	<213>	人工序列	
[4665]	<220>		
[4666]	<223>	GPD启动子-反向可选择标记物-CER-终止子	
[4667]	<400>	138	
[4668]	ttaattaagg ttgcgggata gacgccgacg gagggcaatg gcgctatgga accttgcgga	60	
[4669]	tatccatacg ccgcggcgga ctgcgtccga accagctcca gcagcgtttt ttccgggcca	120	
[4670]	ttgagccgac tgcgaccccg ccaacgtgtc ttggcccacg cactcatgtc atgttggtgt	180	
[4671]	tgggaggcca ctttttaagt agcacaaggc acctagctcg cagcaagggtg tccgaaccaa	240	
[4672]	agaagcggtc gcagtgggtc aaacggggcg gaaacggcg gaaaaagcca cgggggcacg	300	
[4673]	aattgaggca cgccctcgaa tttgagacga gtcacgacct cattcgcccg cgcaatggct	360	
[4674]	cgccaacgcc cggctctttg caccacatca ggttacccca agccaaacct ttgtgttaaa	420	
[4675]	aagcttaaca tattataccg aacgtaggtt tgggcgggct tgctccgtct gtccaaggca	480	
[4676]	acatttatat aagggtctgc atcgccggtc caattgaatc tttttcttc ttctcttctc	540	
[4677]	tatatctatt cttgaattaa acacacatca accatgcgta gcaggtgggc gcgccgatgg	600	
[4678]	cgggatcggt gtatatctct tgacaccttt tcggcatcgc cctaaattcg gcgtcctcat	660	
[4679]	attgtgtgag gacgttttat tacgtgttta cgaagcaaaa gctaaaacca ggagctattt	720	
[4680]	aatggcaaca gttaaccagc tggtagcaa accacgtgct cgcaaagttg cgaaaagcaa	780	
[4681]	cgtgcctgcg ctggaagcat gcccgcacaaa acgtggcgta tgtactcgtg tatatactac	840	
[4682]	cactcctaaa aaaccgaact ccgcgtgcg taaagtatgc cgtgttcgtc tgactaacgg	900	
[4683]	tttcgaagtg acttcctaca tcggtggtga aggtcacaac ctgcaggagc actccgtgat	960	
[4684]	cctgatccgt ggcggtcgtg ttaaagacct cccgggtgtt cgttaccaca ccgtacgtgg	1020	
[4685]	tgcgcttgac tgctccggcg ttaaagaccg taagcaggct cgttccaagt atggcgtgaa	1080	
[4686]	gcgtcctaag gcttaggtta ataacaggcc tgcttgtaat cgcaggcctt tttattttta	1140	
[4687]	cacctgcgtt ttagagctag aaatagcaag ttaaaataag gctagtccgt tatcaacttg	1200	
[4688]	aaaaagtggc accgagtcgg tgcttttttt ttttgttttt tatgtctaag gccgcgttgc	1260	
[4689]	tggcgatcga t	1271	
[4690]	<210>	139	
[4691]	<211>	23	
[4692]	<212>	DNA	
[4693]	<213>	人工序列	
[4694]	<220>		
[4695]	<223>	ds-temp-1靶位点	
[4696]	<400>	139	
[4697]	tcagtttcag tacggttcta agg	23	
[4698]	<210>	140	
[4699]	<211>	23	
[4700]	<212>	DNA	
[4701]	<213>	人工序列	
[4702]	<220>		
[4703]	<223>	ds-temp-2靶位点	

[4704]	<400> 140	
[4705]	cggtgtcgtt accgttactc agg	23
[4706]	<210> 141	
[4707]	<211> 23	
[4708]	<212> DNA	
[4709]	<213> 人工序列	
[4710]	<220>	
[4711]	<223> ds-nontemp-3靶位点	
[4712]	<400> 141	
[4713]	cttggtcacc ttcagcttcg cgg	23
[4714]	<210> 142	
[4715]	<211> 63	
[4716]	<212> DNA	
[4717]	<213> 人工序列	
[4718]	<220>	
[4719]	<223> 锤头核酶-VT融合体	
[4720]	<220>	
[4721]	<221> misc_feature	
[4722]	<222> (1) .. (6)	
[4723]	<223> N是a、c、g、或t	
[4724]	<220>	
[4725]	<221> misc_feature	
[4726]	<222> (44) .. (63)	
[4727]	<223> N是a、c、g、或t	
[4728]	<400> 142	
[4729]	nnnnnnctga tgagtccgtg aggacgaaac gagtaagctc gtcnnnnnnnn nnnnnnnnnnn	60
[4730]	nnn	63
[4731]	<210> 143	
[4732]	<211> 63	
[4733]	<212> RNA	
[4734]	<213> 人工序列	
[4735]	<220>	
[4736]	<223> 锤头核酶-VT融合体	
[4737]	<220>	
[4738]	<221> misc_feature	
[4739]	<222> (1) .. (6)	
[4740]	<223> n是a、c、g、或u	
[4741]	<220>	
[4742]	<221> misc_feature	
[4743]	<222> (44) .. (63)	
[4744]	<223> n是a、c、g、或u	
[4745]	<400> 143	

[4746]	nnnnnncuga ugaguccgug aggacgaaac gaguaagcuc gucnnnnnnnn nnnnnnnnnnn	60
[4747]	nnn	63
[4748]	<210> 144	
[4749]	<211> 75	
[4750]	<212> DNA	
[4751]	<213> 人工序列	
[4752]	<220>	
[4753]	<223> ds-temp-1F	
[4754]	<400> 144	
[4755]	catgcgtaaa ctgactgatg agtccgtgag gacgaaacga gtaagctcgt ctcagtttca	60
[4756]	gtacggttct agttt	75
[4757]	<210> 145	
[4758]	<211> 75	
[4759]	<212> DNA	
[4760]	<213> 人工序列	
[4761]	<220>	
[4762]	<223> 145 ds-temp-1R	
[4763]	<400> 145	
[4764]	tctaaaacta gaaccgtact gaaactgaga cgagcttact cgtttcgtcc tcacggactc	60
[4765]	atcagtcagt ttacg	75
[4766]	<210> 146	
[4767]	<211> 75	
[4768]	<212> DNA	
[4769]	<213> 人工序列	
[4770]	<220>	
[4771]	<223> 146 ds-temp-2F	
[4772]	<400> 146	
[4773]	catgcgtaac accgctgatg agtccgtgag gacgaaacga gtaagctcgt ccggtgtcgt	60
[4774]	taccgttact cgttt	75
[4775]	<210> 147	
[4776]	<211> 75	
[4777]	<212> DNA	
[4778]	<213> 人工序列	
[4779]	<220>	
[4780]	<223> ds-temp-2R	
[4781]	<400> 147	
[4782]	tctaaaacga gtaacggtaa cgacaccgga cgagcttact cgtttcgtcc tcacggactc	60
[4783]	atcagcgggtg ttacg	75
[4784]	<210> 148	
[4785]	<211> 75	
[4786]	<212> DNA	
[4787]	<213> 人工序列	

[4788]	<220>		
[4789]	<223>	ds-nontemp-1F	
[4790]	<400>	148	
[4791]	catgcgtaac caggctgatg agtccgtgag gacgaaacga gtaagctcgt ccttggtcac	60	
[4792]	cttcagcttc ggttt	75	
[4793]	<210>	149	
[4794]	<211>	75	
[4795]	<212>	DNA	
[4796]	<213>	人工序列	
[4797]	<220>		
[4798]	<223>	ds-nontemp-1R	
[4799]	<400>	149	
[4800]	tctaaaaccg aagctgaagg tgaccaagga cgagcttact cgtttcgtcc tcacggactc	60	
[4801]	atcagcctgg ttacg	75	
[4802]	<210>	150	
[4803]	<211>	11448	
[4804]	<212>	DNA	
[4805]	<213>	人工序列	
[4806]	<220>		
[4807]	<223>	pRF296	
[4808]	<400>	150	
[4809]	catggacaag aaatactcca tcggcctgga cattggaacc aactctgtcg gctgggctgt	60	
[4810]	catcaccgac gagtacaagg tgccctccaa gaaattcaag gtcctcggaa acaccgatcg	120	
[4811]	acactccatc aagaaaaacc tcattggtgc cctgttgttc gattctggcg agactgccga	180	
[4812]	agctaccaga ctcaagcgaa ctgctcggcg acgttacacc cgacggaaga accgaatctg	240	
[4813]	ctacctgcag gagatctttt ccaacgagat ggccaagtg gacgattcgt tctttcatcg	300	
[4814]	actggaggaa tccttcctcg tcgaggaaga caagaaacac gagcgtcatc ccatctttgg	360	
[4815]	caacattgtg gacgaggttg cttaccacga gaagtatcct accatctacc atctccgaaa	420	
[4816]	gaaactcgtc gattccaccg acaaggcgga tctcagactt atctacctcg ctctggcaca	480	
[4817]	catgatcaag ttctgaggtc atttctcat cgaggcgcat ctcaatccc acaacagcga	540	
[4818]	tgtggacaag ctgttcattc agctcgttca gacctacaac cagctgttcg agggaaaccc	600	
[4819]	catcaatgcc tccggagtcg atgcaaaggc catcttgtct gctcgactct cgaagagcag	660	
[4820]	acgactggag aacctcattg cccaacttcc tggcgagaaa aagaacggac tgtttgga	720	
[4821]	cctcattgcc ctttctcttg gtctcacacc caacttcaag tccaacttcg atctggcgga	780	
[4822]	ggacgccaag ctccagctgt ccaaggacac ctacgacgat gacctcgaca acctgcttgc	840	
[4823]	acagattggc gatcagtacg ccgacctgtt tctcgtgcc aagaacctt cggtatgtat	900	
[4824]	tctcttgtct gacattctgc gagtcaacac cgagatcaca aaggctcccc tttctgcctc	960	
[4825]	catgatcaag cgatacgacg agcaccatca ggatctcaca ctgctcaagg ctcttgctcg	1020	
[4826]	acagcaactg cccgagaagt acaaggagat ctttttcgat cagtcgaaga acggctacgc	1080	
[4827]	tggatacatc gacggcggag cctctcagga agagttctac aagttcatca agccaattct	1140	
[4828]	cgagaagatg gacggaaccg aggaactgct tgtcaagctc aatcgagagg atctgcttcg	1200	
[4829]	gaagcaacga accttcgaca acggcagcat tcctcatcag atccacctcg gtgagctgca	1260	

[4830]	cgccattctt cgacgtcagg aagacttcta cccctttctc aaggacaacc gagagaagat	1320
[4831]	cgagaagatt cttacctttc gaatccccta ctatgttggc cctcttgcca gaggaactc	1380
[4832]	tcgatttgct tggatgactc gaaagtccga ggaaccatc actccctgga acttcgagga	1440
[4833]	agtcgtggac aagggtgcct ctgcacagtc cttcatcgag cgaatgacca acttcgacaa	1500
[4834]	gaatctgccc aacgagaagg ttcttcccaa gcattcgctg ctctacgagt actttacagt	1560
[4835]	ctacaacgaa ctcaccaaag tcaagtacgt taccgaggga atgcgaaagc ctgccttctt	1620
[4836]	gtctggcgaa cagaagaaag ccattgtcga tctcctgttc aagaccaacc gaaaggtcac	1680
[4837]	tgtaaagcag ctcaaggagg actacttcaa gaaaatcgag tgtttcgaca gcgtcgagat	1740
[4838]	ttccggagtt gaggaccgat tcaacgcctc tttgggcacc tatcacgac tgctcaagat	1800
[4839]	tatcaaggac aaggattttc tcgacaacga ggaaaacgag gacattctgg aggacatcgt	1860
[4840]	gctcactctt accctgttcg aagatcgga gatgatcgag gaacgactca agacatacgc	1920
[4841]	tcacctgttc gacgacaagg tcatgaaaca actcaagcga cgtagataca ccggctgggg	1980
[4842]	aagactttcg cgaaagctca tcaacggcat cagagacaag cagtccgga agaccattct	2040
[4843]	ggactttctc aagtccgatg gctttgcaa ccgaaacttc atgcagctca ttcacgacga	2100
[4844]	ttctcttacc ttcaaggagg acatccagaa ggcacaagtg tccggtcagg gcgacagctt	2160
[4845]	gcacgaacat attgccaacc tggctgttc gccagccatc aagaaaggca ttctccagac	2220
[4846]	tgtcaaggtt gtcgacgagc tggatgaagt catgggacgt cacaagccc agaacattgt	2280
[4847]	gatcgagatg gccagagaga accagacaac tcaaaagggt cagaaaaact cgcgagagcg	2340
[4848]	gatgaagcga atcgaggaag gcatcaagga gctgggatcc cagatttctca aggagcatcc	2400
[4849]	cgtcgagaac actcaactgc agaacgagaa gctgtatctc tactatctgc agaattggtcg	2460
[4850]	agacatgtac gtggatcagg aactggacat caatcgtctc agegactacg atgtggacca	2520
[4851]	cattgtccct caatcctttc tcaaggacga ttctatcgac aacaaggtcc ttacacgac	2580
[4852]	cgacaagaac agaggcaagt cggacaacgt tcccagcgaa gaggtggtca aaaagatgaa	2640
[4853]	gaactactgg cgacagctgc tcaacgcaa gctcattacc cagcgaaagt tcgacaatct	2700
[4854]	taccaaggcc gagcgaggcg gtctgtccga gctcgacaag gctggcttca tcaagcgtca	2760
[4855]	actcgtcgag accagacaga tcacaaagca cgtcgcacag attctcgatt ctcgatgaa	2820
[4856]	caccaagtac gacgagaacg acaagctcat ccgagaggtc aagggtgatta ctctcaagtc	2880
[4857]	caaactggtc tccgatttcc gaaaggactt tcagttctac aagggtcgag agatcaacaa	2940
[4858]	ttaccaccat gccacgatg cttacctcaa cgcgctcgtt ggactgcgc tcatcaagaa	3000
[4859]	ataccccaag ctcgaaagcg agttcgttta cggcgattac aagggtctac acgttcgaaa	3060
[4860]	gatgattgcc aagtccgaac aggagattgg caaggctact gccaaagtact tcttttactc	3120
[4861]	caacatcatg aactttttca agaccgagat caccttgcc aacggagaga ttcgaaagag	3180
[4862]	accacttatc gagaccaacg gcgaaactgg agagatcgtg tgggacaagg gtcgagactt	3240
[4863]	tgcaaccgtg cgaaaggttc tgtcgatgcc tcaggtcaac atcgtcaaga aaaccgaggt	3300
[4864]	tcagactggc ggatttcca aggagtcgat tctgccaag cgaaactccg acaagctcat	3360
[4865]	cgctcgaaag aaagactggg atcccaagaa atacggtggc ttcgattctc ctaccgtcgc	3420
[4866]	ctattccgtg cttgtcgttg cgaaggtcga gaagggaag tccaaaaagc tcaagtccgt	3480
[4867]	caaggagctg ctcggaatta ccatcatgga gcgatcgagc ttcgagaaga atcccatcga	3540
[4868]	cttcttgga gccaagggtt acaaggaggt caagaaagac ctcatatca agctgcccga	3600
[4869]	gtactctctg ttcgaactgg agaacggtcg aaagcgtatg ctgcctccg ctggcgagct	3660
[4870]	gcagaaggga aacgagcttg cttgccttc gaagtacgtc aactttctct atctggcttc	3720
[4871]	tcactacgag aagctcaagg gttctcccga ggacaacgaa cagaagcaac tcttcgttga	3780

[4872]	gcagcacaaa cattacctcg acgagattat cgagcagatt tccgagtttt cgaagcgagt	3840
[4873]	catcctggct gatgccaaact tggacaaggt gctctctgcc tacaacaagc atcgggacaa	3900
[4874]	acccattcga gaacaggcgg agaacatcat tcacctgttt actcttacca acctgggtgc	3960
[4875]	tcctgcagct ttcaagtact tcgataccac tatcgaccga aagcggtaga catccaccaa	4020
[4876]	ggaggttctc gatgccaccc tgattcacca gtccatcact ggcctgtacg agacccgaat	4080
[4877]	cgacctgtct cagcttgggtg gcgactccag agccgatccc aagaaaaagc gaaaggtcta	4140
[4878]	agcggccgca agtgtggatg gggaagttag tgcccggttc tgtgtgcaca attggcaatc	4200
[4879]	caagatggat ggattcaaca caggatata gcgagctacg tgggtggtgcg aggatatagc	4260
[4880]	aacggatatt tatgtttgac acttgagaat gtacgataca agcactgtcc aagtacaata	4320
[4881]	ctaaacatac tgtacatact catactcgta cccgggcaac ggtttcactt gagtgcagtg	4380
[4882]	gctagtgtct ttactcgtag agtgtgcaat actgcgtatc atagtctttg atgtatatcg	4440
[4883]	tattcattca tgtagttgc gtacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tggggtgcct	4500
[4884]	aatgagttag ctaactcaca ttaattgcgt tgcgtcact gcccgcttc cagtcgggaa	4560
[4885]	acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta	4620
[4886]	ttgggcgtct ttccgcttc tcgctcactg actcgtcgcg ctcggtcgtt cggctgcggc	4680
[4887]	gagcgtatc agctcactca aaggcggtaa tacggttata cacagaatca ggggataacg	4740
[4888]	caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt	4800
[4889]	tgctggcggt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgtcaa	4860
[4890]	gtcagaggtag gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct	4920
[4891]	ccctcgtgcg ctctcctgtt ccgacctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc	4980
[4892]	cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg	5040
[4893]	tcgttcgtct caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgac cgctgcgcct	5100
[4894]	tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccaactggcag	5160
[4895]	cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtagctaca gatttcttga	5220
[4896]	agtggtggcc taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggtagctgc gctctgtga	5280
[4897]	agccagttac cttcggaaaa agagttggtg gctcttgatc cggcaaacaa accaccgctg	5340
[4898]	gtacgggtgg ttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag	5400
[4899]	aagatccttt gatcttttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag	5460
[4900]	ggattttggc catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat	5520
[4901]	gaagtttta atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct	5580
[4902]	taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg ttcattcata gttgcctgac	5640
[4903]	tccccgtcgt gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa	5700
[4904]	tgataccgag agaccacgc tcaccggctc cagatttatc agcaataaac cagccagccg	5760
[4905]	gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt	5820
[4906]	gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttgttgcca	5880
[4907]	ttgctacagg catcgtgggtg tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcattc agctccggtt	5940
[4908]	cccaacgata aaggcgagtt acatgatccc ccatgttggt caaaaaagcg gttagctcct	6000
[4909]	tcggtcctcc gatcgttggtc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg	6060
[4910]	cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactgggtg	6120
[4911]	agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccg	6180
[4912]	cgtcaatacgg gataataacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa	6240
[4913]	aacgtttctt ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcagatg	6300

[4914]	aaccactcg tgcaccaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt	6360
[4915]	gagcaaaaac aggaaggcaa aatgcccaa aaaagggaat aaggcgaca cggaaatgtt	6420
[4916]	gaatactcat actcttcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca	6480
[4917]	tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat	6540
[4918]	ttccccgaaa agtgccacct gacgcgcct gtagcggcgc attagcgcg gcgggtgtgg	6600
[4919]	tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcct agcgcgcct ctttcgctt	6660
[4920]	tcttcccttc ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc	6720
[4921]	tccccttagg gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg	6780
[4922]	gtgatggttc acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg	6840
[4923]	agtcacggtt ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct	6900
[4924]	cggctctattc ttttgattta taagggtatt tgccgatttc ggcctatttg ttaaaaaatg	6960
[4925]	agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgctt acaatttcca	7020
[4926]	ttcgccattc aggtcgcga actgttggga agggcgatcg gtgcgggcct cttcgctatt	7080
[4927]	acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt	7140
[4928]	ttcccagtca cgacgttgta aaacgacggc cagtgaattg taatacgact cactataggg	7200
[4929]	cgaattgggt accgggcccc cctcagagt cgatggtgtc gataagcttg atatcgaatt	7260
[4930]	catgtcacac aaaccgatct tcgcctcaag gaaacctaat tctacatccg agagactgcc	7320
[4931]	gagatccagt ctacactgat taattttcgg gccataaatt taaaaaaatc gtgttatata	7380
[4932]	atattatatg tattatatat atacatcatg atgatactga cagtcatgct ccattgctaa	7440
[4933]	atagacagac tccatctgcc gcctccaact gatgtttctca atattttaagg ggtcatctcg	7500
[4934]	cattgtttta taataaacag actccatcta ccgcctccaa atgatgttct caaaatatat	7560
[4935]	tgtatgaact tatttttatt acttagtatt attagacaac ttacttgctt tatgaaaaac	7620
[4936]	acttctatt taggaaacaa tttataatgg cagttcgttc atttaacaat ttatgtagaa	7680
[4937]	taaatgttat aaatgcgtat gggaaatctt aaatatggat agcataaatg atatctgcat	7740
[4938]	tgctaattc gaaatcaaca gcaacgaaaa aaatcccttg tacaacataa atagtcatcg	7800
[4939]	agaaatatca actatcaaag aacagctatt cacacgttac tattgagatt attattggac	7860
[4940]	gagaatcaca cactcaactg tctttctctc ttctagaaat acaggtacaa gtatgtacta	7920
[4941]	ttctcattgt tcatacttct agtcatttca tcccacatat tccttggatt tctctccaat	7980
[4942]	gaatgacatt ctatcttgea aattcaacaa ttataataag atataccaaa gtagcggtat	8040
[4943]	agtggaatc aaaaagcttc tctggtgtgc ttctcgtatt tatttttatt ctaatgatcc	8100
[4944]	attaaaggta tatatttatt tcttgttata taatcctttt gtttattaca tgggctggat	8160
[4945]	acataaaggat attttgattt aattttttgc ttaaatcaa tccccctcg ttcagtgtca	8220
[4946]	actgtaatgg taggaaatta ccatactttt gaagaagcaa aaaaaatgaa agaaaaaaa	8280
[4947]	aatcgtatct ccaggtaga cgttccgcag aatctagaat gcggtatgcg gtacattgtt	8340
[4948]	cttcgaacgt aaaagttgcg ctccctgaga tattgtacat ttttgctttt acaagtacaa	8400
[4949]	gtacatcgta caactatgta ctactgttga tgcattcaca acagtttgtt ttgttttttt	8460
[4950]	ttgttttttt tttttctaag gattcattac cgctatgtat acctacttgt acttgtagta	8520
[4951]	agccgggtta ttggcgttca attaatcata gacttatgaa tctgcacggt gtgcgctgcg	8580
[4952]	agttactttt agcttatgca tgctacttgg gtgtaatatt gggatctgtt cggaaatcaa	8640
[4953]	cggatgctca atcgatcgcc agcaacgcgg ccttagacat aaaaaacaaa aaaaaaagc	8700
[4954]	accgactcgg tgccactttt tcaagttgat aacggactag cttattttta acttgctatt	8760
[4955]	tctagctcta aaactagaac cgtactgaaa ctgagacgag cttactcgtt tcgtcctcac	8820

[4956]	ggactcatca gtcagtttac gcatggttga tgtgtgttta attcaagaat gaatatagag	8880
[4957]	aagagaagaa gaaaaaagat tcaattgagc cggcgatgca gacccttata taaatgttgc	8940
[4958]	cttggacaga cggagcaagc ccgccccaaac ctacgttcgg tataatatgt taagcttttt	9000
[4959]	aacacaaagg tttggcttgg ggtaacctga tgtggtgcaa aagaccgggc gttggcgagc	9060
[4960]	cattgcgcgg gcgaatgggg tcgtgactcg tctcaaattc gagggcgtgc ctcaattcgt	9120
[4961]	gccccgtgg ctttttcccg ccgtttccgc cccgtttgca ccactgcagc cgcttctttg	9180
[4962]	gttcggacac cttgctgcga gctaggtgcc ttgtgctact taaaaagtgg cctcccaaca	9240
[4963]	ccaacatgac atgagtgcgt gggccaagac acgttggcgg ggtcgcagtc ggctcaatgg	9300
[4964]	cccggaaaaa acgctgctgg agctggttcg gacgcagtc gccgcggcgt atggatatcc	9360
[4965]	gcaaggttcc atagcgcctat tgccctccgt cggcgtctat cccgcaacct taattaagtc	9420
[4966]	atacacaagt cagctttctt cgagcctcat ataagtataa gtagttcaac gtattagcac	9480
[4967]	tgtaccacgc atctccgtat cgagaaacac aacaacatgc cccattggac agatcatgcg	9540
[4968]	gatacacagg ttgtgcagta tcatacatac tcgatcagac aggtcgtctg accatcatac	9600
[4969]	aagctgaaca agcgtcccat acttgcacgc tctctatata cacagttaa ttacatatcc	9660
[4970]	atagtctaac ctctaacagt taatcttctg gtaagcctcc cagccagcct tctggtatcg	9720
[4971]	cttggcctcc tcaataggat ctcggttctg gccgtacaga cctcggccga caattatgat	9780
[4972]	atccgttccg gtagacatga catcctcaac agttcggtag tgcgtgccga gagcgtctcc	9840
[4973]	cttgcgtca agaccacccc cgggggtcag aataagccag tcctcagagt cgcccttagg	9900
[4974]	tcggttctgg gcaatgaagc caaccacaaa ctcggggtcg gatcgggcaa gctcaatggt	9960
[4975]	ctgcttgag tactcgccag tggccagaga gcccttgcaa gacagctcgg ccagcatgag	10020
[4976]	cagacctctg gccagcttct cgttgggaga ggggactagg aactccttgt actgggagtt	10080
[4977]	ctcgtagtca gagacgtcct ctttcttctg ttcagagaca gtttcctcgg caccagctcg	10140
[4978]	caggccagca atgattccgg ttccgggtac accgtggcgg ttggtgatat cggaccactc	10200
[4979]	ggcgattcgg tgacaccggt actggtgctt gacagtgttg ccaatatctg cgaactttct	10260
[4980]	gtcctcgaa aggaagaaac cgtgcttaag agcaagttcc ttgaggggga gcacagtgcc	10320
[4981]	ggcgtaggtg aagtcgtcaa tgatgtcgat atgggttttg atcatgcaca cataaggtcc	10380
[4982]	gaccttatcg gcaagctcaa tgagctcctt ggtggtggta acatccagag aagcacacag	10440
[4983]	gttggttttc ttggctgcca cgagcttgag cactcgagcg gcaaaggcgg acttgtggac	10500
[4984]	gttagctcga gcttcgtagg agggcatttt ggtggtgaag aggagactga aataaattta	10560
[4985]	gtctgcagaa ctttttatcg gaaccttata tggggcagtg aagtatatgt tatggttaata	10620
[4986]	gttacgagtt agttgaactt atagatagac tggactatac ggctatcggc ccaaataga	10680
[4987]	aagaacgtca atggctctct gggcgtcgcc tttgccgaca aaaatgtgat catgatgaaa	10740
[4988]	gccagcaatg acgttgagc tgatattgtt gtcggccaac cgcgccgaaa acgcagctgt	10800
[4989]	cagaccacaa gcctccaacg aagaatgtat cgtcaaagt atccaagcac actcatagtt	10860
[4990]	ggagtcgtac tccaaaggcg gcaatgacga gtcagacaga tactcgtcga cgtttaaacc	10920
[4991]	atcatctaag ggctcaaaa ctacctgga actgctgcgc tgatctggac accacagagg	10980
[4992]	ttccgagcac tttaggttgc accaaatgtc ccaccagggt caggcagaaa acgctggaac	11040
[4993]	agcgtgtaca gtttgtctta acaaaaagtg agggcgtga ggtcgagcag ggtggtgtga	11100
[4994]	cttggtatag ctttagagc tgcgaaagcg cgtatggatt tggctcatca ggccagattg	11160
[4995]	agggtctgtg gacacatgtc atgttagtgt acttcaatcg cccctggat atagccccga	11220
[4996]	caataggccg tggcctcatt ttttgcctt ccgcacattt ccattgctcg gtaccacac	11280
[4997]	cttgcttctc ctgcacttgc caaccttaat actggtttac attgaccaac atcttacaag	11340

[4998]	cggggggctt gtctagggtat tatataaaca gtggctctcc caatcggttg ccagtctctt	11400
[4999]	ttttcctttc tttccccaca gattcgaaat ctaaactaca catcacac	11448
[5000]	<210> 151	
[5001]	<211> 11448	
[5002]	<212> DNA	
[5003]	<213> 人工序列	
[5004]	<220>	
[5005]	<223> pRF298	
[5006]	<400> 151	
[5007]	catggacaag aaatactcca tcggcctgga cattggaacc aactctgtcg gctgggctgt	60
[5008]	catcaccgac gactacaagg tgccctccaa gaaattcaag gtctctggaa acaccgatcg	120
[5009]	acactccatc aagaaaaacc tcattgggtgc cctgttggtc gattctggcg agactgccga	180
[5010]	agctaccaga ctcaagcgaa ctgctcggcg acgttacacc cgacggaaga accgaatctg	240
[5011]	ctacctgcag gagatctttt ccaacgagat ggccaagggtg gacgattcgt tctttcatcg	300
[5012]	actggaggaa tccttcctcg tcgaggaaga caagaaacac gagcgtcatc ccatctttgg	360
[5013]	caacattgtg gacgaggttg cttaccacga gaagtatcct accatctacc atctccgaaa	420
[5014]	gaaactcgtc gattccaccg acaaggcgga tctcagactt atctacctcg ctctggcaca	480
[5015]	catgatcaag tttcgaggtc atttctcat cgaggcgcat ctcaatcccg acaacagcga	540
[5016]	tgtggacaag ctgttcattc agctcgttca gacctacaac cagctgttcg agggaaaccc	600
[5017]	catcaatgcc tccggagtcg atgcaaaggc catcttgtct gctcgactct cgaagagcag	660
[5018]	acgactggag aaacctattg cccaacttcc tggcgagaaa aagaacggac tgtttgga	720
[5019]	cctcattgcc ctttctcttg gtctcacacc caacttcaag tccaacttcg atctggcgga	780
[5020]	ggacgccaag ctccagctgt ccaaggacac ctacgacgat gacctcgaca acctgcttgc	840
[5021]	acagattggc gatcagtagc cgcacctgtt tctcgtgcc aagaaccttt cggatgctat	900
[5022]	tctctgtct gacattctgc gactcaacac cgagatcaca aaggctcccc tttctgctc	960
[5023]	catgatcaag cgatacgacg agcaccatca ggatctcaca ctgctcaagg ctcttgtccg	1020
[5024]	acagcaactg cccgagaagt acaaggagat ctttttcgat cagtcgaaga acggctacgc	1080
[5025]	tggatacatc gacggcggag cctctcagga agagtcttac aagtctcatca agccaattct	1140
[5026]	cgagaagatg gacggaaccg aggaactgct tgtcaagctc aatcgagagg atctgcttcg	1200
[5027]	gaagcaacga accttcgaca acggcagcat tctctatcag atccacctcg gtgagctgca	1260
[5028]	cgccattctt cgacgtcagg aagacttcta cccctttctc aaggacaacc gagagaagat	1320
[5029]	cgagaagatt cttacctttc gaatccccta ctatgttggt cctcttgcca gaggaactc	1380
[5030]	tcgatttgcg tggatgactc gaaagtccga ggaaaccatc actccctgga acttcgagga	1440
[5031]	agtcgtggac aagggtgcct ctgcacagtc cttcatcgag cgaatgacca acttcgacaa	1500
[5032]	gaatctgccc aacgagaagg ttcttcccaa gcattcgtcg ctctacgagt actttacagt	1560
[5033]	ctacaacgaa ctcaccaaag tcaagtacgt taccgaggga atgcgaaagc ctgccttctt	1620
[5034]	gtctggcgaa cagaagaaag ccattgtcga tctcctgttc aagaccaacc gaaaggtcac	1680
[5035]	tgtaagcag ctcaaggagg actacttcaa gaaaatcgag tgtttcgaca gcgtcgagat	1740
[5036]	ttccggagtt gaggaccgat tcaacgcctc tttgggcacc tatcacgacg tgctcaagat	1800
[5037]	tatcaaggac aaggattttc tcgacaacga ggaaaacgag gacattctgg aggacatcgt	1860
[5038]	gctcactctt accctgttcg aagatcgga gatgatcgag gaacgactca agacatacgc	1920
[5039]	tcacctgttc gacgacaagg tcatgaaaca actcaagcga cgtagatata ccggctgggg	1980

[5040]	aagacttttcg cgaagctca tcaacggcat cagagacaag cagtccggaa agaccattct	2040
[5041]	ggacttttctc aagtccgatg gctttgccaa ccgaaacttc atgcagctca ttcacgacga	2100
[5042]	ttctcttacc ttcaaggagg acatccagaa ggcacaagtg tccggtcagg gcgacagctt	2160
[5043]	gcacgaacat attgccaacc tggctggttc gccagccatc aagaaaggca ttctccagac	2220
[5044]	tgtaagggtt gtcgacgagc tggatgaaggt catgggacgt cacaagcccg agaacattgt	2280
[5045]	gatcgagatg gccagagaga accagacaac tcaaaagggt cagaaaaact cgcgagagcg	2340
[5046]	gatgaagcga atcgaggaag gcatcaagga gctgggatcc cagatttctca aggagcatcc	2400
[5047]	cgtcgagaac actcaactgc agaacgagaa gctgtatctc tactatctgc agaattggtcg	2460
[5048]	agacatgtac gtggatcagg aactggacat caatcgtctc agcgactacg atgtggacca	2520
[5049]	cattgtccct caatcctttc tcaaggacga ttctatcgac aacaagggtcc ttacacgac	2580
[5050]	cgacaagaac agaggcaagt cggacaacgt tcccagcgaa gaggtggtca aaaagatgaa	2640
[5051]	gaactactgg cgacagctgc tcaacgccaa gctcattacc cagcgaaagt tcgacaatct	2700
[5052]	taccaaggcc gagcgaggcg gtctgtccga gctcgacaag gctggcttca tcaagcgtca	2760
[5053]	actcgtcgag accagacaga tcacaaagca cgtcgcacag attctcgatt ctcgatgaa	2820
[5054]	caccaagtac gacgagaacg acaagctcat ccgagaggtc aagggtgatta ctctcaagtc	2880
[5055]	caaactggtc tccgatttcc gaaaggactt tcagttctac aagggtcgag agatcaacaa	2940
[5056]	ttaccaccat gccacgatg cttacctcaa cgccgtcgtt ggcaactgcgc tcatcaagaa	3000
[5057]	ataccccaag ctcgaaagcg agttcgttta cggcgattac aagggtctac acgttcgaaa	3060
[5058]	gatgattgcc aagtccgaac aggagattgg caaggctact gccaaagtact tcttttactc	3120
[5059]	caacatcatg aactttttca agaccgagat caccttggcc aacggagaga ttcgaaagag	3180
[5060]	accacttate gagaccaacg gcgaaactgg agagatcgtg tgggacaagg gtcgagactt	3240
[5061]	tgcaaccgtg cgaaagggtc tgatcgatgcc tcaggtcaac atcgtcaaga aaaccgaggt	3300
[5062]	tcagactggc ggatttcca aggagtcgat tctgccaag cgaaactccg acaagctcat	3360
[5063]	cgctcgaaag aaagactggg atcccaagaa atacggtggc ttcgattctc ctaccgtcgc	3420
[5064]	ctattccgtg cttgtcgttg cgaaggtcga gaagggaag tccaaaaagc tcaagtccgt	3480
[5065]	caaggagctg ctcggaatta ccatcatgga gcgatcgagc ttcgagaaga atcccatcga	3540
[5066]	cttcttgga gccaagggtt acaaggaggt caagaaagac ctcatatca agctgcccaa	3600
[5067]	gtactctctg ttcgaaactgg agaacggtcg aaagcgtatg ctgcctccg ctggcgagct	3660
[5068]	gcagaaggga aacgagcttg ccttgcttc gaagtacgtc aactttctct atctggcttc	3720
[5069]	tcactacgag aagctcaagg gttctccga ggacaacgaa cagaagcaac tcttcgttga	3780
[5070]	gcagacaaaa cattacctg acgagattat cgagcagatt tccgagtttt cgaagcgagt	3840
[5071]	catcctggct gatgccaact tggacaaggt gctctctgcc tacaacaagc atcgggacaa	3900
[5072]	accatttcca gaacaggcgg agaactcat tcacctgttt actcttacca acctgggtgc	3960
[5073]	tcctgcagct ttcaagtact tcgataccac tatcgaccga aagcgttaca catccacaa	4020
[5074]	ggaggttctc gatgccaccc tgattcacca gtccatcact ggctgtacg agaccgaat	4080
[5075]	cgacctgtct cagcttggtg gcgactccag agccgatccc aagaaaaagc gaaaggtcta	4140
[5076]	agcggccgca agtgtggatg gggaagttag tgcccgggtc tgtgtgcaca attggcaatc	4200
[5077]	caagatggat ggattcaaca caggatata gcgagctacg tgggtggtcg aggatatagc	4260
[5078]	aacggatatt tatgtttgac acttgagaat gtacgataca agcactgtcc aagtacaata	4320
[5079]	ctaaacatac tgtacatact catactcgta cccgggcaac ggtttcactt gagtgcagtg	4380
[5080]	gctagtgtct ttactcgtac agtgtgcaat actgcgtatc atagtctttg atgtatatcg	4440
[5081]	tattcattca tgtagttgc gtacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tggggtgcct	4500

[5082]	aatgagtgag ctaactcaca ttaattgcgt tgcgtcact gcccgctttc cagtcgggaa	4560
[5083]	acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta	4620
[5084]	ttgggcgtc ttcgccttc tgcgtcactg actcgtcgc ctcggtcgtt cggctgcggc	4680
[5085]	gagcggatc agctcactca aaggcggtaa tacggttata cacagaatca ggggataacg	4740
[5086]	caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt	4800
[5087]	tgctggcgtt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgtcaa	4860
[5088]	gtcagagggt gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct	4920
[5089]	ccctcgtgcg ctctcctgtt ccgacctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc	4980
[5090]	cttcgggaag cgtggcgtt tctcatagct cacgtgtag gtatctcagt tcggtgtagg	5040
[5091]	tcgttcgtc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgac cgctgcgcct	5100
[5092]	tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccaactggcag	5160
[5093]	cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtgtaca gagttcttga	5220
[5094]	agtggtggcc taactacggc taaactagaa ggacagtatt tggtagctgc gctctgtga	5280
[5095]	agccagttac cttcgaaaa agagttggtg gctcttgatc cggcaaaaa accaccgctg	5340
[5096]	gtagcgggtg ttttttgtt tgcaagcagc agattacgc cagaaaaaa ggatctcaag	5400
[5097]	aagatccttt gatctttctt acggggctcg acgctcagt gaacgaaaac tcacgttaag	5460
[5098]	ggattttggt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat	5520
[5099]	gaagtttta atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct	5580
[5100]	taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg ttcattcata gttgcctgac	5640
[5101]	tccccgtcgt gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa	5700
[5102]	tgataccgcg agaccacgc tcaccgctc cagatttata agcaataaac cagccagccg	5760
[5103]	gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt	5820
[5104]	gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag ttgcgcaac gttgttgcca	5880
[5105]	ttgctacagg catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcattc agctccggtt	5940
[5106]	cccaacgatc aaggcgagtt acatgatccc ccatgttggt caaaaaagcg gttagctcct	6000
[5107]	tcggtcctcc gatcgttgtc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg	6060
[5108]	cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactggtg	6120
[5109]	agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg	6180
[5110]	cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa	6240
[5111]	aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt	6300
[5112]	aaccactcgt tgcacccaac tgatcttcag catcttttac tttaccagc gtttctgggt	6360
[5113]	gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat aaggcgaca cggaaatgtt	6420
[5114]	gaataactcat actcttcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca	6480
[5115]	tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat	6540
[5116]	ttccccgaaa agtgccacct gacgcgccct gtagcggcgc attagcgcg gcgggtgtgg	6600
[5117]	tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcccgt ctttcgctt	6660
[5118]	tcttccttc ctttctcgcc acgttcgccg gctttcccc tcaagctcta aatcgggggc	6720
[5119]	tccctttagg gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg	6780
[5120]	gtgatggttc acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg	6840
[5121]	agtccacgtt ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct	6900
[5122]	cggctctattc ttttgattta taagggtttt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg	6960
[5123]	agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgctt acaatttcca	7020

[5124]	ttcgccattc aggctgcgca actgtttgga agggcgatcg gtgcgggcct cttcgctatt	7080
[5125]	acgccagctg gcgaaaggg gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtta cgccagggtt	7140
[5126]	ttcccagtea cgacgttgta aaacgacgcg cagtgaattg taatacgact cactataggg	7200
[5127]	cgaattgggt accgggcccc ccctcgaggt cgatggtgtc gataagcttg atatcgaatt	7260
[5128]	catgtcacac aaaccgatct tcgcctcaag gaaacctaatt tctacatccg agagactgcc	7320
[5129]	gagatccagt ctacactgat taattttcgg gccataaatt taaaaaaatc gtgttatata	7380
[5130]	atattatatg tattatatat atacatcatg atgatactga cagtcatgtc ccattgctaa	7440
[5131]	atagacagac tccatctgcc gcctccaact gatgtttctca atattttaagg ggtcatctcg	7500
[5132]	cattgtttta taataaacag actccatcta ccgcctccaa atgatgttct caaaatatat	7560
[5133]	tgatgaact tatttttatt acttagtatt attagacaac ttacttgctt tatgaaaaac	7620
[5134]	acttcttatt taggaaacaa ttataatgg cagttcgttc atttaacaat ttatgtagaa	7680
[5135]	taaatgttat aaatgcgtat gggaaatctt aaatatggat agcataaatg atatctgcat	7740
[5136]	tgccaatte gaaatcaaca gcaacgaaaa aaatcccttg tacaacataa atagtcatcg	7800
[5137]	agaaatatca actatcaaag aacagctatt cacacgttac tattgagatt attattggac	7860
[5138]	gagaatcaca cactcaactg tctttctctc ttctagaaat acaggtacaa gtatgtacta	7920
[5139]	ttctcattgt tcatacttct agtcatttca tccacatat tccctggatt tctctccaat	7980
[5140]	gaatgacatt ctatcttgc aattcaacaa ttataataag atataccaaa gtagcggat	8040
[5141]	agtggaatc aaaaagcttc tctggtgtgc ttctcgtatt tatttttatt ctaatgatcc	8100
[5142]	attaaaggta tatatttatt tcttgttata taatcctttt gtttattaca tgggctggat	8160
[5143]	acataaagg attttgattt aattttttgc ttaaattcaa tccccctcg ttcagtgtca	8220
[5144]	actgtaatgg taggaaatta ccatactttt gaagaagcaa aaaaaatgaa agaaaaaaa	8280
[5145]	aatcgtattt ccaggtaga cgttccgcag aatctagaat gcggtatgcg gtacattgtt	8340
[5146]	cttcgaacgt aaaagtgcg ctccctgaga tattgtacat ttttgctttt acaagtacaa	8400
[5147]	gtacatcgta caactatgta ctactgttga tgcattcaca acagtttgtt ttgtttttt	8460
[5148]	ttgtttttt tttttcta atgattcattac cgctatgtat acctacttgt acttgtagta	8520
[5149]	agccgggtta ttggcgttca attaatcata gacttatgaa tctgcacggt gtgcgctgcg	8580
[5150]	agttactttt agcttatgca tgctacttgg gtgtaatat gggatctgtt cggaaatcaa	8640
[5151]	cggatgctca atcgatcgcc agcaacgcgg ccttagacat aaaaaacaaa aaaaaaagc	8700
[5152]	accgactcgg tgccactttt tcaagttgat aacggactag cttattttta acttgctatt	8760
[5153]	tctagctcta aaacgagtaa cggtaacgac accggacgag cttactcgtt tcgtcctcac	8820
[5154]	ggactcatca gcggtgttac gcatggttga tgtgtgttta attcaagaat gaatatagag	8880
[5155]	aagagaagaa gaaaaaagat tcaattgagc cggcgatgca gacccttata taaatgttgc	8940
[5156]	cttggacaga cggagcaagc ccgcccacac ctacgttcgg tataatatgt taagcttttt	9000
[5157]	aacacaaagg tttggcttgg ggtaacctga tgtggtgcaa aagaccgggc gttggcgagc	9060
[5158]	cattgcgcgg gcgaatgggg tcgtgactcg tctcaaatc gagggcgtgc ctcaattcgt	9120
[5159]	gccccgtgg ctttttcccg ccgtttccgc cccgtttgca ccactgcagc cgcttctttg	9180
[5160]	gttcggacac cttgctgcga gctaggtgcc ttgtgctact taaaaagtgg cctccaaca	9240
[5161]	ccaacatgac atgagtgcgt gggccaagac acgttggcgg ggtcgcagtc ggctcaatgg	9300
[5162]	cccggaaaa acgctgctgg agctggttcg gacgcagtc gccgcggcgt atggatatcc	9360
[5163]	gcaaggttcc atagcgccat tgccctccgt cggcgtctat cccgcaacct taattaagtc	9420
[5164]	atacacaagt cagctttctt cgagcctcat ataagtataa gtagttcaac gtattagcac	9480
[5165]	tgtaccagc atctccgtat cgagaaacac aacaacatgc ccattggac agatcatgcg	9540

[5166]	gatacacagg ttgtgcagta tcatacatatc tcgatcagac aggtcgtctg accatcatac	9600
[5167]	aagctgaaca agcgtccat acttgacgc tctctatata cacagttaaa ttacatatcc	9660
[5168]	atagtctaac ctctaacagt taatcttctg gtaagcctcc cagccagcct tctggtatcg	9720
[5169]	cttgccctcc tcaataggat ctcggttctg gccgtacaga cctcgccga caattatgat	9780
[5170]	atccgttccg gtagacatga catcctcaac agttcggtag tgctgtccga gagcgtctcc	9840
[5171]	cttgcgtca agaccacccc cgggggtcag aataagccag tcctcagagt cgcccttagg	9900
[5172]	tcggttctgg gcaatgaagc caaccacaaa ctcggggtcg gatcgggcaa gctcaatggt	9960
[5173]	ctgcttgag tactcgccag tggccagaga gcccttgcaa gacagctcgg ccagcatgag	10020
[5174]	cagacctctg gccagcttct cgttgggaga ggggactagg aactccttgt actgggagtt	10080
[5175]	ctcgtagtca gagacgtcct ctttcttctg ttcagagaca gtttcctcgg caccagctcg	10140
[5176]	caggccagca atgattccgg ttccgggtac accgtgggag ttggtgatat cggaccactc	10200
[5177]	ggcgattcgg tgacaccggt actggtgctt gacagtgtt ccaatatctg cgaactttct	10260
[5178]	gtcctgaac aggaagaaac cgtgcttaag agcaagttcc ttgaggggga gcacagtgc	10320
[5179]	ggcgtaggtag aagtcgtcaa tgatgtcgat atgggttttg atcatgcaca cataaggtcc	10380
[5180]	gacctatcg gcaagctcaa tgagctcctt ggtggtggtg acatccagag aagcacacag	10440
[5181]	gttggttttc ttggtgcca cgagcttgag cactcgagcg gcaaaggcgg acttgtggac	10500
[5182]	gttagctcga gcttcgtagg agggcatttt ggtggtgaag aggagactga aataaattta	10560
[5183]	gtctgcagaa ctttttatcg gaaccttacc tggggcagtg aagtatatgt tatggttaata	10620
[5184]	gttacgagtt agttgaactt atagatagac tggactatac ggctatcggg ccaaattaga	10680
[5185]	aagaacgtca atggctctct gggcgtcgcc ttgcccagaca aaaatgtgat catgatgaaa	10740
[5186]	gccagcaatg acgttgacg tgatattgtt gtcggccaac cgcgccgaaa acgcagctgt	10800
[5187]	cagaccacaca gcctccaacg aagaatgtat cgtcaaagtg atccaagcac actcatagtt	10860
[5188]	ggagtcgtac tccaaaggcg gcaatgacga gtcagacaga tactcgtcga cgtttaaacc	10920
[5189]	atcatctaag ggctcaaaa ctacctcgga actgctgcgc tgatctggac accacagagg	10980
[5190]	ttccgagcac tttaggttgc accaaatgtc ccaccagtg caggcagaaa acgctggaac	11040
[5191]	agcgtgtaca gtttgtctta acaaaaagtg agggcgctga ggtcgagcag ggtggtgtga	11100
[5192]	cttggtatag ctttagagc tgcgaaagcg cgtatggatt tggctcatca ggccagattg	11160
[5193]	agggtctgtg gacacatgtc atgttagtgt acttcaatcg cccctggat atagccccga	11220
[5194]	caataggecg tggcctcatt ttttgcctt ccgcacattt ccattgctcg gtaccacac	11280
[5195]	cttgcttctc ctgcacttgc caaccttaat actggtttac attgaccaac atcttacaag	11340
[5196]	cggggggcctt gtctagggtg tatataaaca gtggtctctc caatcggttg ccagtctctt	11400
[5197]	tttcccttc tttccccaca gattcgaaat ctaaaactaca catcacac	11448
[5198]	<210> 152	
[5199]	<211> 11448	
[5200]	<212> DNA	
[5201]	<213> 人工序列	
[5202]	<220>	
[5203]	<223> pRF300	
[5204]	<400> 152	
[5205]	catggacaag aaatactcca tcggcctgga cattggaacc aactctgtcg gctgggctgt	60
[5206]	catcaccgac gagtacaagg tgccctccaa gaaattcaag gtcctcgga acaccgatcg	120
[5207]	acactccatc aagaaaaacc tcattggtgc cctgttgttc gattctggcg agactgccga	180

[5208]	agctaccaga ctcaagcgaa ctgctcggcg acgttacacc cgacggaaga accgaatctg	240
[5209]	ctacctgcag gagatctttt ccaacgagat ggccaagggt gacgattcgt tctttcatcg	300
[5210]	actggaggaa tccttcctcg tcgaggaaga caagaaacac gagcgtcatc ccatctttgg	360
[5211]	caacattgtg gacgaggttg cttaccacga gaagtatcct accatctacc atctccgaaa	420
[5212]	gaaactcgtc gattccaccg acaaggcgga tctcagactt atctacctcg ctctggcaca	480
[5213]	catgatcaag tttcgaggtc atttctcat cgaggcgcat ctcaatcccg acaacagcga	540
[5214]	tgtggacaag ctgttcattc agctcgttca gacctacaac cagctgttcg aggaaaaccc	600
[5215]	catcaatgcc tccggagtcg atgcaaaggc catcttgtct gctcgactct cgaagagcag	660
[5216]	acgactggag aacctcattg cccaacttcc tggcgagaaa aagaacggac tgtttgcaa	720
[5217]	cctcattgcc ctttctcttg gtctcacacc caacttcaag tccaacttcg atctggcgga	780
[5218]	ggacgccaag ctccagctgt ccaaggacac ctacgacgat gacctcgaca acctgcttgc	840
[5219]	acagattggc gatcagtacg ccgacctgtt tctcgtgcc aagaaccttt cggatgctat	900
[5220]	tctctgtct gacattctgc gagtcaacac cgagatcaca aaggctcccc tttctgcctc	960
[5221]	catgatcaag cgatacgacg agcaccatca ggatctcaca ctgctcaagg ctcttgtccg	1020
[5222]	acagcaactg cccgagaagt acaaggagat ctttttcgat cagtcgaaga acggctacgc	1080
[5223]	tggatacatc gacggcggag cctctcagga agagttctac aagttcatca agccaattct	1140
[5224]	cgagaagatg gacggaaccg aggaactgct tgtcaagctc aatcgagagg atctgcttcg	1200
[5225]	gaagcaacga accttcgaca acggcagcat tcctcatcag atccacctcg gtgagctgca	1260
[5226]	cgccattctt cgacgtcagg aagacttcta cccctttctc aaggacaacc gagagaagat	1320
[5227]	cgagaagatt cttacctttc gaatccccta ctatgttggc cctcttgcca gaggaaactc	1380
[5228]	tcgatttgc tggatgactc gaaagtccga ggaaaccatc actccctgga acttcgagga	1440
[5229]	agtcgtggac aagggtgcct ctgcacagtc cttcatcgag cgaatgacca acttcgacaa	1500
[5230]	gaatctgccc aacgagaagg ttcttcccaa gcattcgtcg ctctacgagt actttacagt	1560
[5231]	ctacaacgaa ctcaccaaag tcaagtacgt taccgaggga atgcgaaagc ctgccttctt	1620
[5232]	gtctggcgaa cagaagaaag ccattgtcga tctctgttc aagaccaacc gaaaggtcac	1680
[5233]	tgtaagcag ctcaaggagg actacttcaa gaaaatcgag tgtttcgaca gcgtcgagat	1740
[5234]	ttccggagtt gaggaccgat tcaacgcctc tttgggcacc tatcacgatc tgctcaagat	1800
[5235]	tatcaaggac aaggattttc tcgacaacga ggaaaacgag gacattctgg aggacatcgt	1860
[5236]	gctcactctt acctgttcg aagatcgga gatgatcgag gaacgactca agacatacgc	1920
[5237]	tcacctgttc gacgacaagg tcatgaaaca actcaagcga cgtagatata ccggctgggg	1980
[5238]	aagactttcg cgaaagctca tcaacggcat cagagacaag cagtccgga agaccattct	2040
[5239]	ggactttctc aagtccgatg gctttgcaa ccgaaacttc atgcagctca ttcacgacga	2100
[5240]	ttctcttacc ttcaaggagg acatccagaa ggcacaagtg tccggtcagg gcgacagctt	2160
[5241]	gcacgaacat attgccaacc tggtctgttc gccagccatc aagaaaggca ttctccagac	2220
[5242]	tgtcaaggtt gtcgacgagc tggatgaagg catgggacgt cacaagcccg agaacattgt	2280
[5243]	gatcgagatg gccagagaga accagacaac tcaaaagggt cagaaaaact cgcgagagcg	2340
[5244]	gatgaagcga atcgaggaag gcatcaagga gctgggatcc cagattctca aggagcatcc	2400
[5245]	cgtcgagaac actcaactgc agaacgagaa gctgtatctc tactatctgc agaatggtcg	2460
[5246]	agacatgtac gtggatcagg aactggacat caatcgtctc agcgactacg atgtggacca	2520
[5247]	cattgtccct caatccttcc tcaaggacga ttctatcgac aacaaggctc ttacacgatc	2580
[5248]	cgacaagaac agaggcaagt cggacaacgt tcccagcgaa gaggtggtca aaaagatgaa	2640
[5249]	gaactactgg cgacagctgc tcaacgcaa gctcattacc cagcgaaagt tcgacaatct	2700

[5250]	taccaaggcc gagcgaggcg gtctgtccga gctcgacaag gctggcttca tcaagcgtca	2760
[5251]	actcgtcgag accagacaga tcacaaagca cgtcgcacag attctcgatt ctcggatgaa	2820
[5252]	caccaagtac gacgagaacg acaagctcat ccgagaggtc aaggtgatta ctctcaagtc	2880
[5253]	caaaactggtc tccgatttcc gaaaggactt tcagttctac aaggtgcgag agatcaacaa	2940
[5254]	ttaccacat gccacgatg cttacctcaa cgccgtcgtt ggcaactgcgc tcatcaagaa	3000
[5255]	ataccccaag ctcgaaagcg agttcgttta cggcgattac aaggtctacg acgttcgaaa	3060
[5256]	gatgattgcc aagtccgaac aggagattgg caaggtact gccaaagtact tcttttactc	3120
[5257]	caacatcatg aactttttca agaccgagat caccttggcc aacggagaga ttcgaaagag	3180
[5258]	accacttatc gagaccaacg gcgaaactgg agagatcgtg tgggacaagg gtcgagactt	3240
[5259]	tgcaaccgtg cgaaagggtc tgtcgatgcc tcaggtcaac atcgtcaaga aaaccgaggt	3300
[5260]	tcagactggc ggattctcca aggagtcgat tctgccaag cgaaactccg acaagctcat	3360
[5261]	cgctcgaaag aaagactggg atcccaagaa atacggtggc ttcgattctc ctaccgtcgc	3420
[5262]	ctattccgtg cttgtcgttg cgaaggtcga gaagggaag tccaaaaagc tcaagtccgt	3480
[5263]	caaggagctg ctcggaatta ccatcatgga gcgatcgagc ttcgagaaga atcccatcga	3540
[5264]	cttcttgga gccaagggtt acaaggaggt caagaaagac ctcatattca agctgcccaa	3600
[5265]	gtactctctg ttcgaaactgg agaacggtcg aaagcgtatg ctgcctccg ctggcgagct	3660
[5266]	gcagaaggga aacgagcttg cttgccttc gaagtacgtc aactttctct atctggcttc	3720
[5267]	tcactacgag aagctcaagg gttctccga ggacaacgaa cagaagcaac tcttcgttga	3780
[5268]	gcagcacaaa cattacctcg acgagattat cgagcagatt tccgagttt cgaagcgagt	3840
[5269]	catcctgget gatgccaact tggacaaggt gctctctgcc tacaacaagc atcgggacaa	3900
[5270]	accatttga gaacaggcgg agaacatcat tcacctgtt actcttacca acctgggtgc	3960
[5271]	tcctgcagct ttcaagtact tcgataccac tatcgaccga aagcgtaca catccacaa	4020
[5272]	ggaggttctc gatgccaccc tgattacca gtccatcact ggcctgtacg agaccgaa	4080
[5273]	cgacctgtct cagcttggtg gcgactccag agccgatccc aagaaaaagc gaaaggtcta	4140
[5274]	agcgccgca agtgtggatg gggaagtga tgcccgttc tgtgtgcaca attggcaatc	4200
[5275]	caagatggat ggattcaaca caggatata gcgagctacg tgggtggtgcg aggatatagc	4260
[5276]	aacggatatt tatgtttgac acttgagaat gtacgataca agcactgtcc aagtacaata	4320
[5277]	ctaaacatac tgtacatact catactcgta cccgggcaac ggtttcactt gagtgcagt	4380
[5278]	gctagtgtc ttactcgtac agtgtgcaat actgcgtatc atagtctttg atgtatatcg	4440
[5279]	tattcattca tgtagttgc gtacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tggggtgcct	4500
[5280]	aatgagtga ctaactcaca ttaattgcgt tgcgtcact gcccgcttc cagtcgggaa	4560
[5281]	acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta	4620
[5282]	ttgggcgtc ttccgcttcc tcgtcactg actcgtcgcg ctcggtcgtt cggctgcggc	4680
[5283]	gagcgtatc agctcactca aaggcggtaa tacggttata cacagaatca ggggataacg	4740
[5284]	caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt	4800
[5285]	tgctggcgtt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgtcaa	4860
[5286]	gtcagagggtg gcgaaaccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct	4920
[5287]	ccctcgtgcg ctctcctgtt ccgacctgc cgttaccgg atacctgtcc gcctttctcc	4980
[5288]	cttcgggaag cgtggcgtt tctcatagct cacgtgtag gtatctcagt tcggtgtagg	5040
[5289]	tcgttcgtc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgac cgctgcgcct	5100
[5290]	tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg cactggcag	5160
[5291]	cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtgtaca gatttcttga	5220

[5292]	agtgggtggcc taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggatatctgc gctctgctga	5280
[5293]	agccagttac cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaacaa accaccgctg	5340
[5294]	gtagcgggtgg tttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag	5400
[5295]	aagatccttt gatcttttct acggggctctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag	5460
[5296]	ggattttggg catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat	5520
[5297]	gaagttttaa atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct	5580
[5298]	taatcagtgga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg ttcattccata gttgcctgac	5640
[5299]	tccccgtcgt gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa	5700
[5300]	tgataccgcg agaccacgac tcaccggctc cagattttatc agcaataaac cagccagccg	5760
[5301]	gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt	5820
[5302]	gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttgttgcca	5880
[5303]	ttgctacagg catcgtgggtg tcacgctcgt cgtttgggtat ggcttcattc agctccggtt	5940
[5304]	cccaacgatc aaggcgagtt acatgatccc ccatgttggtg caaaaaagcg gttagctcct	6000
[5305]	tcggtcctcc gatcgttggtc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg	6060
[5306]	cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactgggtg	6120
[5307]	agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgccccg	6180
[5308]	cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa	6240
[5309]	aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt	6300
[5310]	aaccctactcg tgcaccaaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt	6360
[5311]	gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat aaggcgaca cggaaatgtt	6420
[5312]	gaatactcat actcttcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca	6480
[5313]	tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat	6540
[5314]	ttccccgaaa agtgccacct gacgcgcct gttagcggcg attaagcgcg gcgggtgtgg	6600
[5315]	tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcct agcgcctcgt cctttcgctt	6660
[5316]	tcttcccttc ctttctcgcc acgttcgccc gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc	6720
[5317]	tccctttagg gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg	6780
[5318]	gtgatgggtc acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg	6840
[5319]	agtcacagtt ctttaatagt ggactcttgt tccaaacttg aacaacactc aaccctatct	6900
[5320]	cggctctattc ttttgattta taagggtttt tgccgatttc ggcttattgg ttaaaaaatg	6960
[5321]	agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgctt acaatttcca	7020
[5322]	ttcgccattc aggtcgcgca actgtttggga agggcgatcg gtgcgggcct cttcgctatt	7080
[5323]	acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtta cgcaggggtt	7140
[5324]	ttcccagtcg cgacgttgta aaacgacggc cagtgaattg taatacgact cactataggg	7200
[5325]	cgaattgggt accgggcccc cctcagaggt cgatgggtgc gataagcttg atatcgattt	7260
[5326]	catgtcacac aaaccgatct tcgcctcaag gaaacctaat tctacatccg agagactgcc	7320
[5327]	gagatccagt ctacactgat taattttcgg gccataaatt taaaaaaatc gtgttatata	7380
[5328]	atattatatg tatttatatat atacatcatg atgatactga cagtcatgtc ccattgctaa	7440
[5329]	atagacagac tccatctgcc gcctccaact gatgtttctca atattttaagg ggtcatctcg	7500
[5330]	cattgtttta taataaacag actccatcta ccgcctccaa atgatgttct caaaatatat	7560
[5331]	tgtatgaact tatttttatt acttagtatt attagacaac ttacttgctt tatgaaaaac	7620
[5332]	acttcctatt taggaacaaa tttataatgg cagttcgttc atttaacaat ttatgtagaa	7680
[5333]	taaagtgtat aaatgcgtat gggaaatctt aaatatggat agcataaatg atatctgcat	7740

[5334]	tgcctaattc gaaatcaaca gcaacgaaaa aaatcccttg tacaacataa atagtcatcg	7800
[5335]	agaaatatca actatcaaag aacagctatt cacacgttac tattgagatt attattggac	7860
[5336]	gagaatcaca cactcaactg tctttctctc ttctagaaat acaggtacaa gtatgtacta	7920
[5337]	ttctcattgt tcatacttct agtcatttca tcccacatat tccttggtatt tctctccaat	7980
[5338]	gaatgacatt ctatcttgca aattcaacaa ttataataag atataccaaa gtagcgggat	8040
[5339]	agtggcaatc aaaaagcttc tctgggtgac ttctcgtatt tattttttatt ctaatgatcc	8100
[5340]	attaaaggta tatatttatt tcttggtata taatcctttt gtttattaca tgggctggat	8160
[5341]	acataaaggt attttgattt aattttttgc ttaaattcaa tccccctcg ttcagtgtca	8220
[5342]	actgtaatgg taggaaatta ccatactttt gaagaagcaa aaaaaatgaa agaaaaaaaa	8280
[5343]	aatcgatatt ccaggttaga cgttccgcag aatctagaat gcggtatgag gtacattggt	8340
[5344]	cttcgaacgt aaaagtggc ctcctgaga tattgtacat ttttgctttt acaagtacaa	8400
[5345]	gtacatcgta caactatgta ctactgttga tgcattcaca acagtttgtt ttgttttttt	8460
[5346]	ttgttttttt tttttctaata gattcattac cgctatgtat acctacttgt acttgtagta	8520
[5347]	agccgggtta ttggcgttca attaatcata gacttatgaa tctgcacggt gtgcgctgag	8580
[5348]	agttactttt agcttatgca tgctacttgg gtgtaatat gggatctgtt cggaaatcaa	8640
[5349]	cggatgctca atcgatcgcc agcaacgcgg ccttagacat aaaaaacaaa aaaaaaaagc	8700
[5350]	accgactcgg tgccactttt tcaagttgat aacggactag ccttatttta acttgctatt	8760
[5351]	tctagctcta aaaccgaagc tgaaggtgac caaggacgag cttactcgtt tcgtcctcac	8820
[5352]	ggactcatca gcctgggttac gcatgggtga tgtgtgttta attcaagaat gaatatagag	8880
[5353]	aagagaagaa gaaaaaagat tcaattgagc cggcagtgca gacccttata taaatgttgc	8940
[5354]	cttggacaga cggagcaagc ccgcccacac ctacgttcgg tataatatgt taagcttttt	9000
[5355]	aacacaaagg tttggcttgg ggtaacctga tgtggtgcaa aagaccgggc gttggcgagc	9060
[5356]	cattgcgcgg gcgaatgggg tcgtgactcg tctcaaattc gagggcgtgc ctcaattcgt	9120
[5357]	gccccgtgg ctttttcccg ccgtttccgc cccgtttgca ccactgcagc cgcttctttg	9180
[5358]	gttcggacac cttgctgcga gctaggtgcc ttgtgctact taaaaagtgg cctcccaaca	9240
[5359]	ccaacatgac atgagtgcgt gggccaagac acgttggcgg ggtcgcagtc ggctcaatgg	9300
[5360]	cccggaaaaa acgctgctgg agctggttcg gacgcagtc gccgcggcgt atggatatcc	9360
[5361]	gcaaggttcc atagcgccat tgccctccgt cggcgtctat cccgcaacct taattaagtc	9420
[5362]	atacacaagt cagctttctt cgagcctcat ataagtataa gtagttcaac gtattagcac	9480
[5363]	tgtaccacgc atctccgtat cgagaaacac aacaacatgc cccattggac agatcatgag	9540
[5364]	gatacacagg ttgtgcagta tcatacatat tcgatcagac aggtcgtctg accatcatac	9600
[5365]	aagctgaaca agcgtcccat acttgacgc tctctatata cacagttaaa ttacatatcc	9660
[5366]	atagtctaac ctctaacagt taatcttctg gtaagcctcc cagccagcct tctggtatcg	9720
[5367]	cttggcctcc tcaataggat ctcggttctg gccgtacaga cctcgccga caattatgat	9780
[5368]	atccgttccg gtagacatga catcctcaac agttcgttac tgctgtccga gagcgtctcc	9840
[5369]	cttgcgtca agaccaccc cgggggtcag aataagccag tctcagagt cgcccttagg	9900
[5370]	tcggttctgg gcaatgaagc caaccacaaa ctcggggtcg gatcgggcaa gctcaatggt	9960
[5371]	ctgcttgag tactcgccag tggccagaga gcccttgcaa gacagctcgg ccagcatgag	10020
[5372]	cagacctctg gccagcttct cgttgggaga ggggactagg aactccttgt actgggagtt	10080
[5373]	ctcgtagtca gagacgtcct ctttcttctg ttcagagaca gtttcctcgg caccagctcg	10140
[5374]	caggccagca atgattccgg ttccgggtac accgtgggag ttggtgatat cggaccactc	10200
[5375]	ggcgattcgg tgacaccggt actggtgctt gacagtgttg ccaatatctg cgaactttct	10260

[5376]	gtcctcgaac aggaagaaac cgtgcttaag agcaagttcc ttgaggggga gcacagtgcc	10320
[5377]	ggcgtaggtg aagtcgtcaa tgatgtcgat atgggttttg atcatgcaca cataaggtcc	10380
[5378]	gacctatcg gcaagctcaa tgagctcctt ggtggtgta acatccagag aagcacacag	10440
[5379]	gttggttttc ttggctgcca cgagcttgag cactcgagcg gcaaaggcgg acttgtggac	10500
[5380]	gttagctcga gcttcgtagg agggcatttt ggtggtgaag aggagactga aataaattta	10560
[5381]	gtctgcagaa ctttttatcg gaaccttatac tggggcagtg aagtatatgt tatggtaata	10620
[5382]	gttacgagtt agttgaactt atagatagac tggactatac ggctatcggg ccaaattaga	10680
[5383]	aagaacgtca atggctctct gggcgctgcc tttgccgaca aaaatgtgat catgatgaaa	10740
[5384]	gccagcaatg acgttgacgc tgatatgtt gtcggccaac cgcgccgaaa acgcagctgt	10800
[5385]	cagaccaca gcctccaacg aagaatgtat cgtcaaagtg atccaagcac actcatagtt	10860
[5386]	ggagtcgtac tccaaaggcg gcaatgacga gtcagacaga tactcgtcga cgtttaaacc	10920
[5387]	atcatctaag ggcctcaaaa ctacctcgga actgctgcgc tgatctggac accacagagg	10980
[5388]	ttccgagcac tttaggttgc accaaatgtc ccaccagtg caggcagaaa acgctggaac	11040
[5389]	agcgtgtaca gtttgtctta acaaaaagtg agggcgctga ggtcgagcag ggtggtgtga	11100
[5390]	cttgttatag ctttagagc tgcgaaagcg cgtatggatt tggctcatca ggccagattg	11160
[5391]	agggtctgtg gacacatgtc atgttagtgt acttcaatcg cccctggat atagccccga	11220
[5392]	caataggccg tggcctcatt tttttgcctt ccgcacattt ccattgctcg gtaccacac	11280
[5393]	cttgcttctc ctgcacttgc caaccttaat actggtttac attgaccaac atcttacaag	11340
[5394]	cggggggctt gtctagggtg tatataaaca gtggctctcc caatcggtt ccagtctctt	11400
[5395]	ttttctttc tttcccaca gattcgaaat ctaactaca catcacac	11448
[5396]	<210> 153	
[5397]	<211> 11448	
[5398]	<212> DNA	
[5399]	<213> 人工序列	
[5400]	<220>	
[5401]	<223> pRF339	
[5402]	<400> 153	
[5403]	catggacaag aaatactcca tcggcctggc cattggaacc aactctgtcg gctgggctgt	60
[5404]	catcaccgac gagtacaagg tgccctccaa gaaattcaag gtctcggaa acaccgatcg	120
[5405]	acactccatc aagaaaaacc tcattggtgc cctgttgttc gattctggcg agactgccga	180
[5406]	agctaccaga ctcaagcgaa ctgctcggcg acgttacacc cgacggaaga accgaatctg	240
[5407]	ctacctgcag gagatctttt ccaacgagat ggccaagggtg gacgattcgt tctttcatcg	300
[5408]	actggaggaa tccttcctcg tcgaggaaga caagaaacac gagcgatc ccatctttgg	360
[5409]	caacattgtg gacgaggtg cttaccacga gaagtatcct accatctacc acctgcgaaa	420
[5410]	gaaactcgtc gattccaccg acaaggcgga tctcagactt atctacctcg ctctggcaca	480
[5411]	catgatcaag tttcgaggtc atttctcat cgaggcgcat ctcaatccc acaacagcga	540
[5412]	tgtggacaag ctgttcattc agctcgttca gacctacaac cagctgttcg aggaaaaccc	600
[5413]	catcaatgcc tccggagtcg atgcaaaggc catcttgtct gctcgactct cgaagagcag	660
[5414]	acgactggag aacctcattg cccaacttcc tggcgagaaa aagaacggac tgtttgcaa	720
[5415]	cctcattgcc ctttctcttg gtctcacacc caacttcaag tccaacttcg atctggcgga	780
[5416]	ggacccaag ctccagctgt ccaaggacac ctacgacgat gacctcgaca acctgcttgc	840
[5417]	acagattggc gatcagtagc ccgacctgtt tctcgtgcc aagaacctt cgatgctat	900

[5418]	tctcttgtct gacattctgc gagtcaacac cgagatcaca aaggctcccc tttctgcctc	960
[5419]	catgatcaag cgatacgacg agcaccatca ggatctcaca ctgctcaagg ctcttgtccg	1020
[5420]	acagcaactg cccgagaagt acaaggagat ctttttcgat cagtcgaaga acggctacgc	1080
[5421]	tggatacatc gacggcggag cctctcagga agagttctac aagttcatca agccaattct	1140
[5422]	cgagaagatg gacggaaccg aggaactgct tgtcaagctc aatcgagagg atctgcttcg	1200
[5423]	gaagcaacga accttcgaca acggcagcat tcctcatcag atccacctcg gtgagctgca	1260
[5424]	cgccattctt cgacgtcagg aagacttcta cccctttctc aaggacaacc gagagaagat	1320
[5425]	cgagaagatt cttacctttc gaatcccccta ctatgttggt cctcttgcca gaggaaactc	1380
[5426]	tcgatttgct tggatgactc gaaagtccga ggaaaccatc actccctgga acttcgagga	1440
[5427]	agtcgtggac aagggtgcct ctgcacagtc cttcatcgag cgaatgacca acttcgacaa	1500
[5428]	gaatctgccc aacgagaagg ttcttcccaa gcattcgtcg ctctacgagt actttacagt	1560
[5429]	ctacaacgaa ctcaccaaag tcaagtacgt taccgaggga atgcgaaagc ctgccttctt	1620
[5430]	gtctggcgaa cagaagaaag ccattgtcga tctcctgttc aagaccaacc gaaaggtcac	1680
[5431]	tgtaagcag ctcaaggagg actacttcaa gaaaatcgag tgtttcgaca gcgtcgagat	1740
[5432]	ttccggagtt gaggaccgat tcaacgcctc tttgggcacc tatcacgac tgctcaagat	1800
[5433]	tatcaaggac aaggattttc tcgacaacga ggaaaacgag gacattctgg aggacatcgt	1860
[5434]	gctcactctt accctgttcg aagatcggga gatgatcgag gaacgactca agacatacgc	1920
[5435]	tcacctgttc gacgacaagg tcatgaaaca actcaagcga cgtagataca ccggctgggg	1980
[5436]	aagactttcg cgaaagctca tcaacggcat cagagacaag cagtccggaa agaccattct	2040
[5437]	ggactttctc aagtccgatg gctttgccaa ccgaaacttc atgcagctca ttcacgacga	2100
[5438]	ttctcttacc ttcaaggagg acatccagaa ggcacaagtg tccggtcagg gcgacagctt	2160
[5439]	gcacgaacat attgccaacc tggctggttc gccagccatc aagaaaggca ttctccagac	2220
[5440]	tgtaagggtt gtcgacgagc tgggtgaaggt catgggacgt cacaagcccg agaacattgt	2280
[5441]	gatcgagatg gccagagaga accagacaac tcaaaagggt cagaaaaact cgcgagagcg	2340
[5442]	gatgaagcga atcgaggaag gcatcaagga gctgggatcc cagattctca aggagcatcc	2400
[5443]	cgtcgagaac actcaactgc agaacgagaa gctgtatctc tactatctgc agaatggtcg	2460
[5444]	agacatgtac gtggatcagg aactggacat caatcgtctc agcgactacg atgtggacgc	2520
[5445]	cattgtccct caatcctttc tcaaggacga ttctatcgac aacaaggctc ttacacgac	2580
[5446]	cgacaagaac agaggcaagt cggacaacgt tcccagcgaa gaggtggtca aaaagatgaa	2640
[5447]	gaactactgg cgacagctgc tcaacgcaa gctcattacc cagcgaaagt tcgacaatct	2700
[5448]	taccaaggcc gagcgaggcg gtctgtccga gctcgacaag gctggttca tcaagcgtca	2760
[5449]	actcgtcgag accagacaga tcacaaagca cgtcgcacag attctcgatt ctcgatgaa	2820
[5450]	caccaagtac gacgagaacg acaagctcat ccgagaggtc aagggtgatta ctctcaagtc	2880
[5451]	caaactggtc tccgatttcc gaaaggactt tcagttctac aagggtcgag agatcaacaa	2940
[5452]	ttaccaccat gccacgatg cttacctcaa cgccgtcgtt ggcaactgcgc tcatcaagaa	3000
[5453]	ataccccaag ctcgaaagcg agttcgttta cggcgattac aagggtctacg acgttcgaaa	3060
[5454]	gatgattgcc aagtccgaac aggagattgg caaggctact gccaaagtact tcttttactc	3120
[5455]	caacatcatg aactttttca agaccgagat caccttgccc aacggagaga ttcgaaagag	3180
[5456]	accacttata gagaccaacg gcgaaactgg agagatcgtg tgggacaagg gtcgagactt	3240
[5457]	tgcaaccgtg cgaaagggtc tgtcgatgcc tcaggtcaac atcgtcaaga aaaccgaggt	3300
[5458]	tcagactggc ggatttcca aggagtcgat tctgcccgaag cgaaactccg acaagctcat	3360
[5459]	cgctcgaaag aaagactggg atcccaagaa atacggtggc ttcgattctc ctaccgtcgc	3420

[5460]	ctattccgtg cttgtcgttg cgaaggtcga gaagggcaag tccaaaaagc tcaagtccgt	3480
[5461]	caaggagctg ctcggaatta ccatcatgga gcgatcgagc ttcgagaaga atcccatcga	3540
[5462]	cttcttgga gccaagggtt acaaggaggt caagaaagac ctcattatca agctgcccaa	3600
[5463]	gtactctctg ttcgaactgg agaacggtcg aaagcgtatg ctcgcctccg ctggcgagct	3660
[5464]	gcagaaggga aacgagcttg ccttgccctc gaagtacgtc aactttctct atctggcttc	3720
[5465]	tcactacgag aagctcaagg gttctcccga ggacaacgaa cagaagcaac tcttcgttga	3780
[5466]	gcagcacaaa cattacctcg acgagattat cgagcagatt tccgagtttt cgaagcgagt	3840
[5467]	catcctggct gatgccaaact tggacaaggt gctctctgcc tacaacaagc atcgggacaa	3900
[5468]	acccattcga gaacaggcgg agaacatcat tcacctgttt actcttacca acctgggtgc	3960
[5469]	tcctgcagct ttcaagtact tcgataccac tatcgaccga aagcgggtaca catccaccaa	4020
[5470]	ggaggttctc gatgccaccc tgattcacca gtccatcact ggctgtacg agaccggaat	4080
[5471]	cgacctgtct cagcttggtg gcgactccag agccgatccc aagaaaaagc gaaaggtcta	4140
[5472]	agcggccgca agtgtggatg gggaagtga tgcccgttc tgtgtgcaca attggcaatc	4200
[5473]	caagatggat ggattcaaca caggatata gcgagctacg tgggtgtgcg aggatatagc	4260
[5474]	aacggatatt tatgtttgac acttgagaat gtacgataca agcactgtcc aagtacaata	4320
[5475]	ctaaacatac tgtacatact catactcgta cccgggcaac ggtttcaatt gagtgcagtg	4380
[5476]	gctagtgtc ttactcgtag agtgtgcaat actgcgtatc atagtctttg atgtatatcg	4440
[5477]	tattcattca tgtagttgc gtacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tggggtgcct	4500
[5478]	aatgagtga ctaactcaca ttaattgcgt tgcgctcact gcccgcttc cagtcgggaa	4560
[5479]	acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta	4620
[5480]	ttgggcgtc ttccgcttc tcgctcaactg actcgctgcg ctcggctgtt cggctgcggc	4680
[5481]	gagcggatc agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg	4740
[5482]	caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt	4800
[5483]	tgctggcggt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgtcaa	4860
[5484]	gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct	4920
[5485]	ccctcgtgcg ctctcctgtt ccgacctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc	4980
[5486]	cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cagcgttag gtatctcagt tcggtgtagg	5040
[5487]	tcgttcgtc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgcg cgctgcgcct	5100
[5488]	tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccaactggcag	5160
[5489]	cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtgtaca gatttcttga	5220
[5490]	agtggtggcc taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggatatctgc gctctgtga	5280
[5491]	agccagttac cttcggaaaa agagttggtg gctcttgatc cggcaaaaa accaccgctg	5340
[5492]	gtagcggtgg tttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag	5400
[5493]	aagatccttt gatcttttct acggggctcg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag	5460
[5494]	ggatttttgt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaat	5520
[5495]	gaagtttta atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct	5580
[5496]	taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg ttcattcata gttgcctgac	5640
[5497]	tccccgtcgt gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa	5700
[5498]	tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc cagatttatc agcaataaac cagccagccg	5760
[5499]	gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt	5820
[5500]	gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag ttgtcgcaac gttgttgcca	5880
[5501]	ttgctacagg catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcattc agctccggtt	5940

[5502]	cccaacgatac aaggcgagtt acatgatccc ccatgttgtg caaaaaagcg gttagctcct	6000
[5503]	tcggtccctcc gatcgttgtc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg	6060
[5504]	cagcaactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactgggtg	6120
[5505]	agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg	6180
[5506]	cgtcaatacgg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa	6240
[5507]	aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt	6300
[5508]	aaccactcgg tgcaccaaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt	6360
[5509]	gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat aaggcgaca cggaaatgtt	6420
[5510]	gaatactcat actcttcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca	6480
[5511]	tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat	6540
[5512]	ttccccgaaa agtgccacct gacgcgccct gtagcggcgc attagcgcg gcgggtgtgg	6600
[5513]	tggttacggc cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcccgt cctttcgctt	6660
[5514]	tcttcccttc ctttctcgcc acgttcgcgg gctttcccg tcaagctcta aatcgggggc	6720
[5515]	tccctttagg gttccgattt agtgctttac ggcacctga ccccaaaaaa cttgattagg	6780
[5516]	gtgatgggtc acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg	6840
[5517]	agtccacgtt ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aacctatct	6900
[5518]	cggctctattc ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctatttg ttaaaaaatg	6960
[5519]	agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgctt acaatttcca	7020
[5520]	ttcgccattc aggctgcgca actgttggga agggcgatcg gtgcgggcct cttcgctatt	7080
[5521]	acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt	7140
[5522]	ttcccagtea cgacgttgta aaacgacggc cagtgaattg taatacgact cactataggg	7200
[5523]	cgaattgggt accgggcccc ccctcgaggt cgatggtgtc gataagcttg atatcgaatt	7260
[5524]	catgtcacac aaaccgatct tcgcctcaag gaaacctaat tctacatccg agagactgcc	7320
[5525]	gagatccagt ctacactgat taattttcgg gccaaataatt taaaaaaatc gtgttatata	7380
[5526]	atattatatg tattatatat atacatcatg atgatactga cagtcatgtc ccattgctaa	7440
[5527]	atagacagac tccatctgcc gcctccaact gatgtttctca atatttaagg ggtcatctcg	7500
[5528]	cattgtttaa taataaacag actccatcta ccgcctccaa atgatgttct caaaatatat	7560
[5529]	tgtatgaact tatttttatt acttagtatt attagacaac ttacttgctt tatgaaaaac	7620
[5530]	acttccatatt taggaaacaa ttataatgg cagttcgttc atttaacaat ttatgtagaa	7680
[5531]	taaatgttat aaatgcgtat gggaaatctt aaatatggat agcataaatg atatctgcat	7740
[5532]	tgccctaattc gaaatcaaca gcaacgaaaa aaatcccttg tacaacataa atagtcacgc	7800
[5533]	agaaatatca actatcaaag aacagctatt cacacgttac tattgagatt attattggac	7860
[5534]	gagaatcaca cactcaactg tctttctctc ttctagaaat acaggtagaa gtatgtacta	7920
[5535]	ttctcatgtt tcatacttct agtcatttca tcccacatat tccctggatt tctctccaat	7980
[5536]	gaatgacatt ctatcttgca aattcaacaa ttataataag atataccaaa gtagcggtat	8040
[5537]	agtggaatc aaaaagcttc tctggtgtgc ttctcgtatt tatttttatt ctaatgatcc	8100
[5538]	attaaaggta tatatttatt tcttgttata taatcctttt gtttattaca tgggctggat	8160
[5539]	acataaagggt attttgattt aattttttgc ttaaattcaa tccccctcg ttcagtgtca	8220
[5540]	actgtaatgg taggaaatta ccatactttt gaagaagcaa aaaaaatgaa agaaaaaaa	8280
[5541]	aatcgtattt ccaggtaga cgttccgcag aatctagaat gcggtatgcg gtacattgtt	8340
[5542]	cttcgaacgt aaaagtgtcg ctccctgaga tattgtacat ttttgctttt acaagtacaa	8400
[5543]	gtacatcgta caactatgta ctactgttga tgcacccaca acagtttgtt ttgttttttt	8460

[5544]	ttgttttttt tttttcta	gattcattac cgctatgtat	acctacttgt acttgtagta	8520
[5545]	agccgggtta ttggcgttca	attaatcata gacttatgaa	tctgcacggt gtgcgctgcg	8580
[5546]	agttactttt agcttatgca	tgctacttgg gtgtaatat	gggatctgtt cggaaatcaa	8640
[5547]	cggatgctca atcgatcgcc	agcaacgcgg ccttagacat	aaaaaacaaa aaaaaaagc	8700
[5548]	accgactcgg tgccactttt	tcaagttgat aacggactag	ccttatittta acttgctatt	8760
[5549]	tctagtctta aaactagaac	cgtactgaaa ctgagacgag	cttactcggt tcgtcctcac	8820
[5550]	ggactcatca gtcagtttac	gcatggttga tgtgtgttta	attcaagaat gaatatagag	8880
[5551]	aagagaagaa gaaaaaagat	tcaattgagc cggcgatgca	gacccttata taaatgttgc	8940
[5552]	cttgacaga cggagcaagc	ccgcccacac ctacgttcgg	tataatatgt taagcttttt	9000
[5553]	aacacaaagg tttggcttgg	ggtaacctga tgtggtgcaa	aagaccgggc gttggcgagc	9060
[5554]	cattgcgcgg gcgaatgggg	tcgtgactcg tctcaaattc	gagggcgtgc ctcaattcgt	9120
[5555]	gccccgtgg ctttttcccg	ccgtttccgc cccgtttgca	ccactgcagc cgcttctttg	9180
[5556]	gttcggacac cttgctgcga	gctagtgccc ttgtgctact	taaaaagtgg cctcccaaca	9240
[5557]	ccaacatgac atgagtgcgt	gggccaagac acgttggcgg	ggtcgcagtc ggctcaatgg	9300
[5558]	cccggaaaaa acgctgctgg	agctggttcg gacgcagtc	gccgcggcgt atggatatcc	9360
[5559]	gcaaggttcc atagcgccat	tgccctccgt cggcgctctat	cccgaacct taattaagtc	9420
[5560]	atacacaagt cagctttctt	cgagcctcat ataagtataa	gtagttcaac gtattagcac	9480
[5561]	tgtaccagc atctccgtat	cgagaaacac aacaacatgc	cccattggac agatcatgcg	9540
[5562]	gatacacagg ttgtgcagta	tcatacatat tcgatcagac	aggtcgtctg accatcatac	9600
[5563]	aagtgaaca agcgtcccat	acttgacgcg tctctatata	cacagttaaa ttacatatcc	9660
[5564]	atagtctaac ctctaacagt	taatcttctg gtaagcctcc	cagccagcct tctggtatcg	9720
[5565]	cttgccctcc tcaataggat	ctcggttctg gccgtacaga	cctcggccga caattatgat	9780
[5566]	atccgttccg gtagacatga	catcctcaac agttcggtag	tgctgtccga gacgctctcc	9840
[5567]	cttgcgtca agaccacccc	cgggggtcag aataagccag	tcctcagagt cgcccttagg	9900
[5568]	tcggttctgg gcaatgaagc	caaccacaaa ctcggggtcg	gatcgggcaa gctcaatggt	9960
[5569]	ctgcttgagg tactcgccag	tgccagaga gcccttgcaa	gacagctcgg ccagcatgag	10020
[5570]	cagacctctg gccagcttct	cgttgggaga ggggactagg	aactccttgt actgggagtt	10080
[5571]	ctcgtagtca gagacgtcct	ccttcttctg ttcagagaca	gtttcctcgg caccagctcg	10140
[5572]	caggccagca atgattccgg	ttccgggtac accgtgggcg	ttggtgatat cggaccactc	10200
[5573]	ggcgattcgg tgacaccggt	actggtgctt gacagtgttg	ccaatatctg cgaactttct	10260
[5574]	gtcctcgaac aggaagaaac	cgtgcttaag agcaagttcc	ttgaggggga gcacagtgcc	10320
[5575]	ggcgtagggt aagtcgtcaa	tgatgtcgat atgggttttg	atcatgcaca cataaggtcc	10380
[5576]	gaccttatcg gcaagctcaa	tgagctcctt ggtggtggta	acatccagag aagcacacag	10440
[5577]	gttggttttc ttggctgcc	cgagcttgag cactcgagcg	gcaaaggcgg acttgtagac	10500
[5578]	gttagctcga gcttcgtagg	agggcatttt ggtggtgaag	aggagactga aataaattta	10560
[5579]	gtctgcagaa ctttttatcg	gaaccttata tggggcagtg	aagtatatgt tatggttaata	10620
[5580]	gttacgagtt agttgaactt	atagatagac tggactatac	ggctatcggg ccaaattaga	10680
[5581]	aagaacgtca atggctctct	gggcgtcgcc tttgccgaca	aaaatgtgat catgatgaaa	10740
[5582]	gccagcaatg acgttgacgc	tgatattgtt gtcggccaac	cgcgccgaaa acgcagctgt	10800
[5583]	cagaccacac gcctccaacg	aagaatgtat cgtcaaagtg	atccaagcac actcatagtt	10860
[5584]	ggagtcgtac tccaaaggcg	gcaatgacga gtcagacaga	tactcgtcga cgtttaaacc	10920
[5585]	atcatcetaag ggctcaaaaa	ctacctcgga actgctgcgc	tgatctggac accacagagg	10980

[5586]	ttccgagcac tttaggttgc accaaatgtc ccaccaggtg caggcagaaa acgctggaac	11040
[5587]	agcgtgtaca gtttgtctta acaaaaagtg agggcgctga ggtcgagcag ggtggtgtga	11100
[5588]	cttgttatag cttttagagc tgcgaaagcg cgtatggatt tggctcatca ggccagattg	11160
[5589]	agggtctgtg gacacatgtc atgttagtgt acttcaatcg cccctggat atagccccga	11220
[5590]	caataggccg tggcctcatt tttttgcctt ccgcacattt ccattgctcg gtaccacac	11280
[5591]	cttgcttctc ctgcacttgc caaccttaat actggtttac attgaccaac atcttacaag	11340
[5592]	cggggggctt gtctagggtg tatataaaca gtggctctcc caatcggttg ccagtctctt	11400
[5593]	ttttccttcc tttccccaca gattcgaaat ctaaaactaca catcacac	11448
[5594]	<210> 154	
[5595]	<211> 11448	
[5596]	<212> DNA	
[5597]	<213> 人工序列	
[5598]	<220>	
[5599]	<223> pRF341	
[5600]	<400> 154	
[5601]	catggacaag aaatactcca tcggcctggc cattggaacc aactctgtcg gctgggctgt	60
[5602]	catcacccgac gagtacaagg tgccctccaa gaaattcaag gtctcggaa acaccgatcg	120
[5603]	acactccatc aagaaaaacc tcattgggtg cctgttgttc gattctggcg agactgccga	180
[5604]	agctaccaga ctcaagcgaa ctgctcggcg acgttacacc cgacggaaga accgaatctg	240
[5605]	ctacctgcag gagatctttt ccaacgagat ggccaagggtg gacgattcgt tctttcatcg	300
[5606]	actggaggaa tccttcctcg tcgaggaaga caagaaacac gacgctcatc ccattcttgg	360
[5607]	caacattgtg gacgaggttg cttaccacga gaagtatcct accatctacc acctgcgaaa	420
[5608]	gaaactcgtc gattccaccg acaaggcgga tctcagactt atctacctcg ctctggcaca	480
[5609]	catgatcaag tttcgaggtc atttctcat cgaggcgcat ctcaatcccg acaacagcga	540
[5610]	tgtggacaag ctgttcattc agctcgttca gacctacaac cagctgttcg agggaaaccc	600
[5611]	catcaatgcc tccggagtcg atgcaaagc catcttgtct gctcgactct cgaagagcag	660
[5612]	acgactggag aacctcattg cccaacttc tggcgagaaa aagaacggac tgtttgcaa	720
[5613]	cctcattgcc ctttctcttg gtctcacacc caacttcaag tccaacttcg atctggcgga	780
[5614]	ggacccaag ctccagctgt ccaaggacac ctacgacgat gacctcgaca acctgcttgc	840
[5615]	acagattggc gatcagtagc ccgacctgtt tctcgtgcc aagaaccttt cggatgctat	900
[5616]	tctctgtct gacattctgc gagtcaacac cgagatcaca aaggctcccc tttctgcctc	960
[5617]	catgatcaag cgatacgacg agcaccatca ggatctcaca ctgctcaagg ctcttgtccg	1020
[5618]	acagcaactg cccgagaagt acaaggagat ctttttcgat cagtcgaaga acggctacgc	1080
[5619]	tggatacatc gacggcggag cctctcagga agagttctac aagttcatca agccaattct	1140
[5620]	cgagaagatg gacggaaccg aggaactgct tgtcaagctc aatcgagagg atctgcttcg	1200
[5621]	gaagcaacga accttcgaca acggcagcat tcctcatcag atccacctcg gtgagctgca	1260
[5622]	cgccattctt cgacgtcagg aagacttcta cccctttctc aaggacaacc gagagaagat	1320
[5623]	cgagaagatt cttaccttcc gaatccccta ctatgttggc cctcttgcca gaggaactc	1380
[5624]	tcgatttgct tggatgactc gaaagtccga ggaaaccatc actccctgga acttcgagga	1440
[5625]	agtcgtggac aagggtgcct ctgcacagtc cttcatcgag cgaatgacca acttcgacaa	1500
[5626]	gaatctgccc aacgagaagg ttcttcccaa gcattcgctg ctctacgagt actttacagt	1560
[5627]	ctacaacgaa ctcaccaaag tcaagtacgt taccgaggga atgcgaaagc ctgccttctt	1620

[5628]	gtctggcgaa cagaagaaag ccattgtcga tctcctgttc aagaccaacc gaaaggtcac	1680
[5629]	tgtaaagcag ctcaaggagg actacttcaa gaaaatcgag tgtttcgaca gcgtcgagat	1740
[5630]	ttccggagtt gaggaccgat tcaacgcctc ttggggcacc tatcacgata tgcctcaagat	1800
[5631]	tatcaaggac aaggattttc tcgacaacga ggaaaacgag gacattcttg aggacatcgt	1860
[5632]	gctcactctt accctgttcg aagatcgagg gatgatcgag gaacgactca agacatacgc	1920
[5633]	tcacctgttc gacgacaagg tcatgaaaca actcaagcga cgtagatata ccggctgggg	1980
[5634]	aagactttcg cgaaagctca tcaacggcat cagagacaag cagtccggaa agaccattct	2040
[5635]	ggactttctc aagtccgatg gctttgccaa ccgaaacttc atgcagctca ttcacgacga	2100
[5636]	ttctcttacc ttcaaggagg acatccagaa ggcacaagtg tccggtcagg gcgacagctt	2160
[5637]	gcacgaacat attgccaaac tggctgttgc gccagccatc aagaaaggca ttctccagac	2220
[5638]	tgtcaagggt gtcgacgagc tggatgaagt catgggacgt cacaagcccga agaacttgt	2280
[5639]	gatcgagatg gccagagaga accagacaac tcaaaagggt cagaaaaact cgcgagagcg	2340
[5640]	gatgaagcga atcgaggaag gcatcaagga gctgggatcc cagattctca aggagcatcc	2400
[5641]	cgtcgagaac actcaactgc agaacgagaa gctgtatctc tactatctgc agaattggtcg	2460
[5642]	agacatgtac gtggatcagg aactggacat caatcgtctc agcgactacg atgtggacgc	2520
[5643]	cattgtccct caatccttcc tcaaggacga ttctatcgac aacaaggctc ttacacgata	2580
[5644]	cgacaagaac agaggcaagt cggacaacgt tcccagcgaa gaggtggtca aaaagatgaa	2640
[5645]	gaactactgg cgacagctgc tcaacgcaa gctcattacc cagcgaaagt tcgacaatct	2700
[5646]	taccaaggcc gagcgaggcg gtctgtccga gctcgacaag gctggcttca tcaagcgtca	2760
[5647]	actcgtcgag accagacaga tcacaaagca cgtcgacag attctcgatt ctcgatgaa	2820
[5648]	caccaagtac gacgagaacg acaagctcat ccgagaggtc aagggtgatta ctctcaagtc	2880
[5649]	caaaactggc tccgatttcc gaaaggactt tcagttctac aagggtcgag agatcaacaa	2940
[5650]	ttaccacat gccacgatg cttacctcaa cgccgtcgtt ggcaactgcg tcatcaagaa	3000
[5651]	ataccccaag ctgaaagcg agttcgttta cggcgattac aagggtctac acgttcgaaa	3060
[5652]	gatgattgcc aagtccgaac aggagattgg caaggctact gccaaagtact tcttttactc	3120
[5653]	caacatcatg aactttttca agaccgagat cactttggcc aacggagaga ttcgaaagag	3180
[5654]	accacttata gagaccaacg gcgaaactgg agagatcgtg tgggacaagg gtcgagactt	3240
[5655]	tgcaaccgtg cgaaagggtc tgcgatgcc tcaggtaaac atcgtcaaga aaaccgaggt	3300
[5656]	tcagactggc ggattctcca aggagtcgat tctgccaag cgaaactccg acaagctcat	3360
[5657]	cgctcgaaag aaagactggg atcccaagaa atacggtggc ttcgattctc ctaccgtcgc	3420
[5658]	ctattccgtg cttgtcgttg cgaaggctga gaaggcgaa tccaaaaagc tcaagtccgt	3480
[5659]	caaggagctg ctcggaatta ccatcatgga gcgatcgagc ttcgagaaga atcccatcga	3540
[5660]	cttcttgtaa gccaaagggt acaaggaggt caagaaagac ctcatatca agctgccccaa	3600
[5661]	gtactctctg ttcgaaactgg agaacggtcg aaagcgtatg ctgcctccg ctggcgagct	3660
[5662]	gcagaaggga aacgagcttg cttgccttc gaagtacgtc aactttctct atcttgcttc	3720
[5663]	tcactacgag aagctcaagg gttctcccga ggacaacgaa cagaagcaac tcttcgttga	3780
[5664]	gcagcacaaa cattacctg acgagattat cgagcagatt tccgagtttt cgaagcgagt	3840
[5665]	catcctggt gatgccaact tggacaagg gctctctgcc tacaacaagc atcgggacaa	3900
[5666]	accattcga gaacaggcgg agaactcat tcacctgtt actcttacc accctgggtgc	3960
[5667]	tcctgcagct ttcaagtact tcgataccac tatcgaccga aagcgttaca catccacaa	4020
[5668]	ggaggttctc gatgccaccc tgattacca gtccatcact ggcctgtacg agaccggaat	4080
[5669]	cgacctgtct cagcttggtg gcgactccag agccgatccc aagaaaaagc gaaaggtcta	4140

[5670]	agcgcccgca agtgtggatg gggaagtga tgcccgggtc tgtgtgcaca attggcaatc	4200
[5671]	caagatggat ggattcaaca caggatata gcgagctacg tgggtgtgcg aggatatagc	4260
[5672]	aacggatatt tatgtttgac acttgagaat gtacgataca agcactgtcc aagtacaata	4320
[5673]	ctaaacatac tgtacatact catactcgta cccgggcaac ggtttcactt gagtgcagtg	4380
[5674]	gctagtgtc ttactcgtac agtgtgcaat actgcgtatc atagtctttg atgtatatcg	4440
[5675]	tattcattca tgtagttgc gtacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tggggtgcct	4500
[5676]	aatgagtga ctaactcaca ttaattgcgt tgcgtcact gcccgcttc cagtcgggaa	4560
[5677]	acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta	4620
[5678]	ttgggcgtc ttccgcttc tcgctcactg actcgtcgc ctcggtcgtt cggctgcggc	4680
[5679]	gagcgtatc agctcactca aaggcggtaa tacggtatc cacagaatca ggggataacg	4740
[5680]	caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt	4800
[5681]	tgctggcgtt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgtcaa	4860
[5682]	gtcagagggt gcgaaaccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct	4920
[5683]	ccctcgtgcg ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc	4980
[5684]	cttcgggaag cgtggcgtt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg	5040
[5685]	tcgttcgtc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgac cgtgcgcct	5100
[5686]	tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccaactggcag	5160
[5687]	cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtgtaca gagtcttga	5220
[5688]	agtggtggcc taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggatatctgc gctctgtga	5280
[5689]	agccagttac cttcggaaaa agagttggtg gctcttgatc cggcaaacaa accaccgtg	5340
[5690]	gtacgggtgg ttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag	5400
[5691]	aagatccttt gatctttctt acggggtctg acgctcagt gaacgaaaac tcacgttaag	5460
[5692]	ggattttggt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat	5520
[5693]	gaagtttta atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct	5580
[5694]	taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatctcg ttcattccata gttgcctgac	5640
[5695]	tccccgtcgt gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgcgtcaa	5700
[5696]	tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc cagatttatc agcaataaac cagccagccg	5760
[5697]	gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt	5820
[5698]	gttgccgga agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttgttgcca	5880
[5699]	ttgctacagg catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcattc agctccggtt	5940
[5700]	cccaacgatc aaggcgagtt acatgatccc ccatgttgtg caaaaaagcg gttagctcct	6000
[5701]	tcggtcctcc gatcgttgtc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg	6060
[5702]	cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactggtg	6120
[5703]	agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg	6180
[5704]	cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa	6240
[5705]	aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgtatg	6300
[5706]	aaccactcgc tgcacccaac tgatcttcag catcttttac tttaccagc gtttctgggt	6360
[5707]	gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat aaggcgaca cggaaatgtt	6420
[5708]	gaatactcat actcttcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca	6480
[5709]	tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat	6540
[5710]	ttccccgaaa agtgccacct gacgcgcct gtagcggcgc attagcgcg gcgggtgtgg	6600
[5711]	tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcct agcgcgcgt cctttcgtt	6660

[5712]	tcttcccttc ctttctcgcc acgttcgccc gctttccccc tcaagctcta aatcgggggc	6720
[5713]	tccctttagg gtccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg	6780
[5714]	gtgatgggtc acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg	6840
[5715]	agtccacgtt ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct	6900
[5716]	cggctctattc ttttgattta taagggtatt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg	6960
[5717]	agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgctt acaatttcca	7020
[5718]	ttcgccattc aggctgcgca actgttgcca agggcgatcg gtgcgggcct cttcgctatt	7080
[5719]	acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt	7140
[5720]	ttcccagtca cgacgttgta aaacgacggc cagtgaattg taatacgact cactataggg	7200
[5721]	cgaattgggt accgggcccc ccctcgaggt cgatggtgtc gataagcttg atatcgaatt	7260
[5722]	catgtcacac aaaccgatct tcgcctcaag gaaacctaat tctacatccg agagactgcc	7320
[5723]	gagatccagt ctacactgat taattttcgg gccataaatt taaaaaaatc gtgttatata	7380
[5724]	atattatatg tattatatat atacatcatg atgatactga cagtcatgtc ccattgctaa	7440
[5725]	atagacagac tccatctgcc gcctccaact gatgttttca atatttaagg ggtcatctcg	7500
[5726]	cattgtttta taataaacag actccatcta ccgcctccaa atgatgttct caaaatatat	7560
[5727]	tgtatgaact tatttttatt acttagtatt attagacaac ttacttgctt tatgaaaaac	7620
[5728]	acttcctatt taggaaacaa ttataaatgg cagttcgttc atttaacaat ttatgtagaa	7680
[5729]	taaaagtatt aaatgcgtat gggaaatcct aaatatggat agcataaatg atatctgcat	7740
[5730]	tgctaattc gaaatcaaca gcaacgaaaa aaatcccttg tacaacataa atagtcatcg	7800
[5731]	agaaatatca actatcaaag aacagctatt cacacgttac tattgagatt attattggac	7860
[5732]	gagaatcaca cactcaactg tctttctctc ttctagaaat acaggtacaa gtatgtacta	7920
[5733]	ttctcattgt tcatacttct agtcatttca tcccacatat tccttggatt tctctccaat	7980
[5734]	gaatgacatt ctatcttgca aattcaacaa ttataataag atataccaaa gtagcggat	8040
[5735]	agtggcaatc aaaaagcttc tctggtgtgc ttctcgtatt tatttttatt ctaatgatcc	8100
[5736]	attaaaggta tatatttatt tcttggtata taatcctttt gtttattaca tgggctggat	8160
[5737]	acataaaggt attttgattt aattttttgc ttaaattcaa tccccctcg ttcagtgtca	8220
[5738]	actgtaatgg taggaaatta ccatactttt gaagaagcaa aaaaaatgaa agaaaaaaaa	8280
[5739]	aatcgatttt ccaggtaga cgttccgcag aatctagaat gcggtatgcg gtacattggt	8340
[5740]	cttcgaacgt aaaagtgcg ctccctgaga tattgtacat ttttgctttt acaagtacaa	8400
[5741]	gtacatcgta caactatgta ctactgttga tgcattcaca acagtttggt ttgttttttt	8460
[5742]	ttgttttttt tttttctaatt gattcattac cgctatgtat acctacttgt acttgtagta	8520
[5743]	agccgggtta ttggcgttca attaatcata gacttatgaa tctgcacggt gtgcgctgcg	8580
[5744]	agttactttt agcttatgca tgctacttgg gtgtaatat gggtatctgt cggaatcaa	8640
[5745]	cggatgctca atcgatcgcc agcaacgcgg ccttagacat aaaaaacaaa aaaaaaagc	8700
[5746]	accgactcgg tgccactttt tcaagttgat aacggactag cttattttta acttgctatt	8760
[5747]	tctagctcta aaacgagtaa cggtaacgac accggacgag ctactcgtt tcgtcctcac	8820
[5748]	ggactcatca gcggtgttac gcatggttga tgtgtgttta attcaagaat gaatatagag	8880
[5749]	aagagaagaa gaaaaaagat tcaattgagc cggcgatgca gacccttata taaatgttgc	8940
[5750]	cttggacaga cggagcaagc ccgccccaac ctacgttcgg tataatatgt taagcttttt	9000
[5751]	aacacaaagg tttggcttgg ggtaacctga tgtggtgcaa aagaccgggc gttggcgagc	9060
[5752]	cattgcgcgg gcgaatgggg tcgtgactcg tctcaaattc gagggcgtgc ctcaattcgt	9120
[5753]	gccccgtgg ctttttcccc ccgtttccgc cccgtttgca ccactgcagc cgcttctttg	9180

[5754]	gttcggacac cttgctgcga gctaggtgcc ttgtgctact taaaaagtgg cctcccaaca	9240
[5755]	ccaacatgac atgagtgcgt gggccaagac acgttggcgg ggtcgcagtc ggctcaatgg	9300
[5756]	cccgaaaaa acgtgctggt agctggttcg gacgcagtcc gccgcggcgt atggatatcc	9360
[5757]	gcaaggttcc atagcgccat tgccctccgt cggcgtctat cccgcaacct taattaagtc	9420
[5758]	atacacaagt cagctttctt cgagcctcat ataagtataa gtagttcaac gtattagcac	9480
[5759]	tgtaccacgc atctccgtat cgagaaacac aacaacatgc ccattggac agatcatgcg	9540
[5760]	gatacacagg ttgtgcagta tcatacatatc tcgatcagac aggtcgtctg accatcatac	9600
[5761]	aagctgaaca agcgtcccat acttgacgc tctctatata cacagttaaa ttacatatcc	9660
[5762]	atagtctaac ctctaacagt taatcttctg gtaagcctcc cagccagcct tctggtatcg	9720
[5763]	cttggcctcc tcaataggat ctcggttctg gccgtacaga cctcggccga caattatgat	9780
[5764]	atccgttccg gtagacatga catcctcaac agttcggtag tgctgtccga gagcgtctcc	9840
[5765]	cttgcgtca agaccacccc cgggggtcag aataagccag tcctcagagt cgcccttagg	9900
[5766]	tcggttctgg gcaatgaagc caaccacaaa ctcggggtcg gatcgggcaa gctcaatggt	9960
[5767]	ctgcttgagg tactcgccag tggccagaga gcccttgcaa gacagctcgg ccagcatgag	10020
[5768]	cagacctctg gccagcttct cgttgggaga ggggactagg aactccttgt actgggagtt	10080
[5769]	ctcgtagtca gagacgtcct ccttcttctg ttcagagaca gtttctcctg caccagctcg	10140
[5770]	caggccagca atgattccgg ttccgggtac accgtggcgg ttggtgatat cggaccactc	10200
[5771]	ggcgattcgg tgacaccggg actggtgctt gacagtgttg ccaatatctg cgaactttct	10260
[5772]	gtcctcgaac aggaagaaac cgtgcttaag agcaagttcc ttgaggggga gcacagtgcc	10320
[5773]	ggcgtagggt agtgcgtcaa tgatgtcgat atgggttttg atcatgcaca cataagggtc	10380
[5774]	gaccttatcg gcaagctcaa tgagctcctt ggtggtggtg acatccagag aagcacacag	10440
[5775]	gttggttttc ttggctgcca cgagcttgag cactcgagcg gcaaaggcgg acttgtggac	10500
[5776]	gttagctcga gcttcgtagg agggcatttt ggtggtgaag aggagactga aataaattta	10560
[5777]	gtctgcagaa ctttttatcg gaaccttata tggggcagtg aagtatatgt tatggttaata	10620
[5778]	gttacgagtt agttgaactt atagatagac tggactatac ggctatcggg ccaaattaga	10680
[5779]	aagaacgtca atggctctct gggcgtcgcc tttgccgaca aaaatgtgat catgatgaaa	10740
[5780]	gccagcaatg acgttgacgc tgatatgtgt gtcggccaac cgcgccgaaa acgcagctgt	10800
[5781]	cagaccacaa gcctccaacg aagaatgtat cgtcaaagtg atccaagcac actcatagtt	10860
[5782]	ggagtcgtac tccaaaggcg gcaatgacga gtcagacaga tactcgtcga cgtttaaacc	10920
[5783]	atcatctaag ggcctcaaaa ctacctcgga actgctgcgc tgatctggac accacagagg	10980
[5784]	ttccgagcac tttaggttgc accaaatgtc ccaccagtg caggcagaaa acgctggaac	11040
[5785]	agcgtgtaca gtttgtctta acaaaaagtg agggcgtga ggtcgcagc ggtggtgtga	11100
[5786]	cttgttatag cttttagagc tgcgaaagcg cgtatggatt tggtcatca ggccagattg	11160
[5787]	agggtctgtg gacacatgtc atgttagtgt acttcaatcg cccctggat atagccccga	11220
[5788]	caataggccg tgccctcatt tttttgcctt ccgcacattt ccattgctcg gtaccacac	11280
[5789]	cttgcttctc ctgcacttgc caaccttaat actggtttac attgaccaac atcttacaag	11340
[5790]	cggggggcct gtctagggtg tatataaaca gtggctctcc caatcgggtg ccagtctctt	11400
[5791]	ttttccttcc tttccccaca gattcgaaat ctaaaactaca catcacac	11448
[5792]	<210> 155	
[5793]	<211> 11448	
[5794]	<212> DNA	
[5795]	<213> 人工序列	

[5796]	<220>	
[5797]	<223>	pRF343
[5798]	<400>	155
[5799]	catggacaag aaatactcca tcggcctggc cattggaacc aactctgtcg gctgggctgt	60
[5800]	catcaccgac gagtacaagg tgccctccaa gaaattcaag gtcctcggaa acaccgatcg	120
[5801]	acactccatc aagaaaaacc tcattggtgc cctgttggtc gattctggcg agactgccga	180
[5802]	agctaccaga ctcaagcgaa ctgctcggcg acgttacacc cgacggaaga accgaatctg	240
[5803]	ctacctgcag gagatctttt ccaacgagat ggccaaggtg gacgattcgt tctttcatcg	300
[5804]	actggaggaa tccttcctcg tcgaggaaga caagaaacac gagcgtcatc ccatctttgg	360
[5805]	caacattgtg gacgaggttg cttaccacga gaagtatcct accatctacc acctgcgaaa	420
[5806]	gaaactcgtc gattccaccg acaaggcgga tctcagactt atctacctcg ctctggcaca	480
[5807]	catgatcaag tttcgaggtc atttctcat cgaggcgat ctcaatcccg acaacagcga	540
[5808]	tgtggacaag ctgttcattc agctcgttca gacctacaac cagctgttcg agggaaaccc	600
[5809]	catcaatgcc tccggagtcg atgcaaaggc catcttgtct gctcgactct cgaagagcag	660
[5810]	acgactggag aacctcattg cccaacttcc tggcgagaaa aagaacggac tgtttgcaa	720
[5811]	cctcattgcc ctttctcttg gtctcacacc caacttcaag tccaacttcg atctggcgga	780
[5812]	ggacgccaag ctccagctgt ccaaggacac ctacgacgat gacctcgaca acctgcttgc	840
[5813]	acagattggc gatcagtacg ccgacctgtt tctcgtgcc aagaaccttt cggatgctat	900
[5814]	tctcttgtct gacattctgc gagtcaacac cgagatcaca aaggctcccc tttctgcctc	960
[5815]	catgatcaag cgatacgacg agcaccatca ggatctcaca ctgctcaagg ctcttgtccg	1020
[5816]	acagcaactg cccgagaagt acaaggagat ctttttcgat cagtcgaaga acggctacgc	1080
[5817]	tggatacatc gacggcggag cctctcagga agagtcttac aagtctcatc agccaattct	1140
[5818]	cgagaagatg gacggaaccg aggaactgct tgtcaagctc aatcgagagg atctgcttcg	1200
[5819]	gaagcaacga accttcgaca acggcagcat tcctcatcag atccacctcg gtgagctgca	1260
[5820]	cgccattctt cgacgtcagg aagacttcta cccctttctc aaggacaacc gagagaagat	1320
[5821]	cgagaagatt cttacctttc gaatccccta ctatgttggt cctcttgcca gaggaaactc	1380
[5822]	tcgatttgct tggatgactc gaaagtccga ggaaaccatc actccctgga acttcgagga	1440
[5823]	agtcgtggac aagggtgcct ctgcacagtc cttcatcgag cgaatgacca acttcgacaa	1500
[5824]	gaatctgccc aacgagaagg ttcttcccaa gcattcgtcg ctctacgagt actttacagt	1560
[5825]	ctacaacgaa ctcaccaaag tcaagtacgt taccgaggga atgcgaaagc ctgccttctt	1620
[5826]	gtctggcgaa cagaagaaag ccattgtcga tctcctgttc aagaccaacc gaaaggtcac	1680
[5827]	tgtaagcag ctcaaggagg actacttcaa gaaaatcgag tgtttcgaca gcgtcgagat	1740
[5828]	ttccggagtt gaggaccgat tcaacgcctc tttgggcacc tatcacgac tgctcaagat	1800
[5829]	tatcaaggac aaggattttc tcgacaacga ggaaaacgag gacattctgg aggacatcgt	1860
[5830]	gtcactctt accctgttcg aagatcggga gatgatcgag gaacgactca agacatacgc	1920
[5831]	tcacctgttc gacgacaagg tcatgaacaa actcaagcga cgtagataca ccggctgggg	1980
[5832]	aagactttcg cgaaagctca tcaacggcat cagagacaag cagtccggaa agaccattct	2040
[5833]	ggactttctc aagtccgatg gctttgccaa ccgaaacttc atgcagctca ttcacgacga	2100
[5834]	ttctcttacc ttcaaggagg acatccagaa ggcacaagtg tccggtcagg gcgacagctt	2160
[5835]	gcacgaacat attgccaacc tggctgggtc gccagccatc aagaaaggca ttctccagac	2220
[5836]	tgtcaagggt gtgcacgagc tgggtgaaggt catgggacgt cacaagcccg agaacattgt	2280
[5837]	gatcgagatg gccagagaga accagacaac tcaaaagggt cagaaaaact cgcgagagcg	2340

[5838]	gatgaagcga atcgaggaag gcatcaagga gctgggatcc cagattctca aggagcatcc	2400
[5839]	cgtcgagaac actcaactgc agaacgagaa gctgtatctc tactatctgc agaatggtcg	2460
[5840]	agacatgtac gtggatcagg aactggacat caatcgtctc agcgactacg atgtggacgc	2520
[5841]	cattgtccct caatcctttc tcaaggacga ttctatcgac aacaaggtcc ttacacgac	2580
[5842]	cgacaagaac agaggcaagt cggacaacgt tcccagcgaa gaggtggtca aaaagatgaa	2640
[5843]	gaactactgg cgacagctgc tcaacgcaa gctcattacc cagcgaaagt tcgacaatct	2700
[5844]	taccaaggcc gagcgaggcg gtctgtccga gctcgacaag gctggcttca tcaagcgtca	2760
[5845]	actcgtcgag accagacaga tcacaaagca cgtcgcacag attctcgatt ctcgatgaa	2820
[5846]	caccaagtac gacgagaacg acaagctcat ccgagaggtc aaggtgatta ctctcaagtc	2880
[5847]	caaactggtc tccgatttcc gaaaggactt tcagttctac aaggtgagag agatcaacaa	2940
[5848]	ttaccacat gccacgatg cttacctcaa cgccgtcgtt ggactgcgc tcatcaagaa	3000
[5849]	ataccccaag ctcgaaagcg agttcgttta cggcgattac aaggtctacg acgttcgaaa	3060
[5850]	gatgattgcc aagtccgaac aggagattgg caaggctact gccaggtact tcttttactc	3120
[5851]	caacatcatg aactttttca agaccgagat caccttggcc aacggagaga ttcgaaagag	3180
[5852]	accacttatc gagaccaacg gcgaaactgg agagatcgtg tgggacaagg gtcgagactt	3240
[5853]	tgcaaccgtg cgaaaggttc tgtcgatgcc tcaggtcaac atcgtcaaga aaaccgaggt	3300
[5854]	tcagactggc ggattctcca aggagtcgat tctgccaag cgaaactccg acaagctcat	3360
[5855]	cgctcgaaag aaagactggg atcccaagaa atacggtggc ttcgattctc ctaccgtcgc	3420
[5856]	ctattccgtg cttgtcgttg cgaaggtcga gaagggaag tccaaaaagc tcaagtccgt	3480
[5857]	caaggagctg ctcggaatta ccatcatgga gcgatcgagc ttcgagaaga atcccatcga	3540
[5858]	cttcttgga gccaaagggtt acaaggaggt caagaaagac ctcatatca agctgccccaa	3600
[5859]	gtactctctg ttcgaactgg agaacggtcg aaagcgtatg ctgcctccg ctggcgagct	3660
[5860]	gcagaaggga aacgagcttg cttgccttc gaagtacgtc aactttctct atctggcttc	3720
[5861]	tcactacgag aagctcaagg gttctccga ggacaacgaa cagaagcaac tcttcgttga	3780
[5862]	gcagcacaaa cattacctg acgagattat cgagcagatt tccgagttt cgaagcgagt	3840
[5863]	catcctggct gatgccaaact tggacaaggt gctctctgcc tacaacaagc atcgggacaa	3900
[5864]	accattcga gaacaggcgg agaacatcat tcacctgtt actcttacca acctgggtgc	3960
[5865]	tcctgcagct ttcaagtact tcgataccac tatcgaccga aagcgggtaca catccacaa	4020
[5866]	ggaggttctc gatgccaccc tgattacca gtccatcact ggctgtacg agaccggaat	4080
[5867]	cgacctgtct cagcttggtg gcgactccag agccgatccc aagaaaaagc gaaaggtcta	4140
[5868]	agcggccgca agtgtggatg gggaagttag tgcccgttc tgtgtgcaca attggcaatc	4200
[5869]	caagatggat ggattcaaca caggatata gcgagctacg tgggtggtgcg aggatatagc	4260
[5870]	aacggatatt tatgtttgac acttgagaat gtacgataca agcactgtcc aagtacaata	4320
[5871]	ctaaacatac tgtacatact catactcgta cccgggcaac ggtttctactt gagtgcagtg	4380
[5872]	gctagtgtc ttactcgtac agtgtgcaat actgcgtatc atagtctttg atgtatatcg	4440
[5873]	tattcattca tgtagttgc gtacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tggggtgcct	4500
[5874]	aatgagttag ctaactcaca ttaattgcgt tgcgtcact gccgcttcc cagtcgggaa	4560
[5875]	acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta	4620
[5876]	ttgggcgtc ttccgttcc tcgctcactg actcgtcgcg ctcggtcgtt cggctgcggc	4680
[5877]	gagcggatc agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg	4740
[5878]	caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt	4800
[5879]	tgctggcggt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgtcaa	4860

[5880]	gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct	4920
[5881]	ccctcgtgcg ctctcctggt ccgacctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc	4980
[5882]	cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg	5040
[5883]	tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgac cgctgcgcct	5100
[5884]	tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccaactggcag	5160
[5885]	cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gatttcttga	5220
[5886]	agtggtaggc taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggtagctgc gctctgctga	5280
[5887]	agccagttac cttcggaata agagttggta gctcttgatc cggcaataaa accaccgctg	5340
[5888]	gtagcggtagg ttttttgggt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag	5400
[5889]	aagatccttt gatcctttct acggggctcg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag	5460
[5890]	ggattttggt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat	5520
[5891]	gaagtttta atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct	5580
[5892]	taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg ttcattcata gttgcctgac	5640
[5893]	tccccgtcgt gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa	5700
[5894]	tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc cagatttatc agcaataaac cagccagccg	5760
[5895]	gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt	5820
[5896]	gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag ttgcgcaac gttgttgcca	5880
[5897]	ttgctacagg catcgtgggt tcacgctcgt cgtttggtag ggcttcattc agctccggtt	5940
[5898]	cccaacgata aaggcgagtt acatgatccc ccatgttggt caaaaaagcg gttagctcct	6000
[5899]	tcggtcctcc gatcgttggt agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg	6060
[5900]	cagcaactga taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactgggtg	6120
[5901]	agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgccccg	6180
[5902]	cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa	6240
[5903]	aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt	6300
[5904]	aaccactcgc tgcacccaac tgatcttcag catcttttac tttaccagc gtttctgggt	6360
[5905]	gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat aaggcgaca cggaaatgtt	6420
[5906]	gaatactcat actcttctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca	6480
[5907]	tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat	6540
[5908]	ttccccgaaa agtgccacct gacgcgcct gtagcggcgc attagcgcg gcgggtgtgg	6600
[5909]	tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcct agcgcgcct cctttcgctt	6660
[5910]	tcttccttc ctttctcgcc acgttcgcg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc	6720
[5911]	tccctttagg gttccgattt agtgctttac ggcacctga ccccaaaaaa cttgattagg	6780
[5912]	gtgatgggtt acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg	6840
[5913]	agtccacgtt ctttaatagt ggactctgt tccaaactgg aacaacactc aacctatct	6900
[5914]	cggctctattc ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctatttg ttaaaaaatg	6960
[5915]	agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgctt acaatttcca	7020
[5916]	ttcgccattc aggtgcgca actgttgga agggcgatcg gtgcgggcct cttcgctatt	7080
[5917]	acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt	7140
[5918]	ttccagtcga cgacgttgta aaacgacggc cagtgaattg taatacgact cactataggg	7200
[5919]	cgaattgggt accgggcccc cctcagaggt cgatggtgtc gataagcttg atatcgaatt	7260
[5920]	catgtcacac aaaccgatct tcgcctcaag gaaacctaatt tctacatccg agagactgcc	7320
[5921]	gagatccagt ctacactgat taattttcgg gccataaatt taaaaaaatc gtgttatata	7380

[5922]	atattatatg tattatatat atacatcatg atgatactga cagtcagtgc ccatttgctaa	7440
[5923]	atagacagac tccatctgcc gcctccaact gatgtttctca atattttaagg ggtcatctcg	7500
[5924]	cattgtttta taataaacag actccatcta cgcctccaa atgatgttct caaaatatat	7560
[5925]	tgtatgaact ttttttatt acttagtatt attagacaac ttacttgctt tatgaaaaac	7620
[5926]	acttcctatt taggaacaa tttataatgg cagttcgttc atttaacaat ttatgtagaa	7680
[5927]	taaagtgtat aaatgcgtat gggaaatctt aaatatggat agcataaatg atatctgcat	7740
[5928]	tgctaattc gaaatcaaca gcaacgaaaa aaatcccttg tacaacataa atagtcatcg	7800
[5929]	agaaatatca actatcaaag aacagctatt cacacgttac tattgagatt attattggac	7860
[5930]	gagaatcaca cactcaactg tctttctctc ttctagaaat acaggtacaa gtatgtacta	7920
[5931]	ttctcattgt tcatacttct agtcatttca tcccacatat tccttggtt tctctccaat	7980
[5932]	gaatgacatt ctatcttgca aattcaacaa ttataataag atataccaaa gtagcggtat	8040
[5933]	agtggcaatc aaaaagcttc tctgggtgctc ttctcgtatt ttttttatt ctaatgatcc	8100
[5934]	attaaaggta tatatttatt tcttggtata taatcctttt gtttattaca tgggctggat	8160
[5935]	acataaaggat attttgattt aattttttgc ttaaatcaa tccccctcg ttcagtgtca	8220
[5936]	actgtaatgg taggaatta ccatactttt gaagaagcaa aaaaaatgaa agaaaaaaaa	8280
[5937]	aatcgtatit ccaggtaga cgttccgcag aatctagaat gcggtatgct gtacattgtt	8340
[5938]	cttcgaacgt aaaagttgct ctccctgaga tattgtacat ttttgctttt acaagtacaa	8400
[5939]	gtacatcgta caactatgta ctactgttga tgcattcaca acagtttgtt ttgttttttt	8460
[5940]	ttgttttttt tttttctaatt gattcattac cgctatgtat acctacttgt acttgtagta	8520
[5941]	agccgggtta ttggcgttca attaatcata gacttatgaa tctgcacggt gtgcgctgctg	8580
[5942]	agttactttt agcttatgca tgctacttgg gtgtaatat gggtatctgtt cggaaatcaa	8640
[5943]	cggatgctca atcgatcgcc agcaacgcgg ccttagacat aaaaaacaaa aaaaaaagc	8700
[5944]	accgactcgg tgccactttt tcaagttgat aacggactag ccttatttta acttgctatt	8760
[5945]	tctagctcta aaaccgaagc tgaagtgac caaggacgag cttactcgtt tcgtcctcac	8820
[5946]	ggactcatca gcctggttac gcatggttga tgtgtgttta attcaagaat gaatatagag	8880
[5947]	aagagaagaa gaaaaaagat tcaattgagc cggcgatgca gacccttata taaatgttgc	8940
[5948]	cttgacaga cggagcaagc ccgcccacac ctacgttcgg tataatatgt taagcttttt	9000
[5949]	aacacaaagg tttggcttgg ggtaacctga tgtggtgcaa aagaccgggc gttggcgagc	9060
[5950]	cattgcgctg gcgaatgggg tcgtgactcg tctcaaatc gagggcgtgc ctcaattcgt	9120
[5951]	gccccgtgg ctttttcccg ccgtttccgc ccggtttgca ccaactgcagc cgcttctttg	9180
[5952]	gttcggacac cttgctgcga gctagtgctc ttgtgctact taaaaagtgg cctccaaca	9240
[5953]	ccaacatgac atgagtgcgt gggccaagac acgttggcgg ggtcgcagtc ggctcaatgg	9300
[5954]	cccggaaaaa acgtgcttgg agctggttcg gacgcagtc gccgcggcgt atggatatcc	9360
[5955]	gcaaggttcc atagcgccat tgccctccgt cggcgtctat cccgcaacct taattaagtc	9420
[5956]	atacacaagt cagctttctt cgagcctcat ataagtataa gtagttcaac gtattagcac	9480
[5957]	tgtaccagc atctccgtat cgagaaacac aacaacatgc ccatttgac agatcatgctg	9540
[5958]	gatacacagg ttgtgcagta tcatacatac tcgatcagac aggtcgtctg accatcatac	9600
[5959]	aagctgaaca agcgtcccat acttgacgc tctctatata cacagttaaa ttacatatcc	9660
[5960]	atagctaac ctctaacagt taatcttctg gtaagcctcc cagccagcct tctggtatcg	9720
[5961]	cttgccctcc tcaataggat ctcggttctg gccgtacaga cctcgccga caattatgat	9780
[5962]	atccgttccg gtagacatga catcctcaac agttcggtag tgctgtccga gagcgtctcc	9840
[5963]	cttgcgtca agaccaccc cgggggtcag aataagccag tctcagagt cgcccttagg	9900

[5964]	tcggttcttg gcaatgaagc caaccacaaa ctcggggtcg gatcgggcaa gctcaatggt	9960
[5965]	ctgcttgag tactcgccag tggccagaga gcccttgcaa gacagctcgg ccagcatgag	10020
[5966]	cagacctctg gccagcttct cgttgggaga ggggactagg aactccttgt actgggagtt	10080
[5967]	ctcgtagtca gagacgtcct ctttcttctg ttcagagaca gtttcctcgg caccagctcg	10140
[5968]	caggccagca atgattccgg ttccgggtac accgtgggcg ttggtgatat cggaccactc	10200
[5969]	ggcgattcgg tgacaccggt actggtgctt gacagtgttg ccaatatctg cgaactttct	10260
[5970]	gtcctcgaac aggaagaaac cgtgcttaag agcaagttcc ttgaggggga gcacagtgcc	10320
[5971]	ggcgtaggtg aagtcgtcaa tgatgtcgat atgggttttg atcatgcaca cataaggtcc	10380
[5972]	gacctatcgc gcaagctcaa tgagctcctt ggtggtggtg acatccagag aagcacacag	10440
[5973]	gttggttttc ttggctgcca cgagcttgag cactcgagcg gcaaaggcgg acttgtggac	10500
[5974]	gttagctcga gcttcgtagg agggcatttt ggtggtgaag aggagactga aataaattta	10560
[5975]	gtctgcagaa ctttttatcg gaacctatc tggggcagtg aagtatatgt tatggtaata	10620
[5976]	gttacgagtt agttgaactt atagatagac tggactatac ggctatcggc ccaaattaga	10680
[5977]	aagaacgtca atggctctct gggcgtcgcc tttgccgaca aaaatgtgat catgatgaaa	10740
[5978]	gccagcaatg acgttcgagc tgatatgtt gtcggccaac cgcgccgaaa acgcagctgt	10800
[5979]	cagaccacaa gcctccaacg aagaatgtat cgtcaaagtg atccaagcac actcatagtt	10860
[5980]	ggagtcgtac tccaaaggcg gcaatgacga gtcagacaga tactcgctga cgtttaaacc	10920
[5981]	atcatctaag ggcctcaaaa ctacctgga actgctgcgc tgatctggac accacagagg	10980
[5982]	ttccgagcac tttaggttgc accaaatgtc ccaccagggtg caggcagaaa acgctggaac	11040
[5983]	agcgtgtaca gtttgtctta acaaaaagtg agggcgctga ggtcgagcag ggtggtgtga	11100
[5984]	cttggtatag cttttagagc tgcgaaagcg cgtatggatt tggctcatca ggccagattg	11160
[5985]	agggtctgtg gacacatgtc atgttagtgt acttcaatcg cccctggat atagccccga	11220
[5986]	caataggccg tggcctcatt tttttgcctt ccgcacattt ccattgctcg gtaccacac	11280
[5987]	cttgcttctc ctgcacttgc caaccttaat actggtttac attgaccaac atcttacaag	11340
[5988]	cggggggctt gtctagggtg tatataaaca gtgctctcc caatcggtg ccagtctctt	11400
[5989]	ttttctttc tttcccaca gattcgaaat ctaactaca catcacac	11448
[5990]	<210> 156	
[5991]	<211> 3901	
[5992]	<212> DNA	
[5993]	<213> 人工序列	
[5994]	<220>	
[5995]	<223> pRF80	
[5996]	<400> 156	
[5997]	agcttgctac gttaggagaa gacgcacggc gatgatacgg gtaccctca tgacatcaat	60
[5998]	atccgctgcc cctcttgcca gcaaggcgtc agcagggtgt tttttcgcta ttttcaccag	120
[5999]	accacagcct ttttcttgt gtctcatctt ggattccttc aaaggcaact caccgcacct	180
[6000]	ccgagtcgtg tgaacaatgt aataataggc tattgacttt tttcccacct gtttagcgcc	240
[6001]	aaacccaaag cgcttttcgc cccactgca gccgatgga aggcacatat ggcaagggaa	300
[6002]	aagtcttcag gtaatacatg cctgctgcaa ctatatgtac tctgactcat tccctcagac	360
[6003]	gtgggtcata gacagctgtt ttaaaccggg caaatcaatc tctgtcgcac aggtatttct	420
[6004]	gcccttcaaa accaggttgc cacatcagat tccatcaaag tttttcagac taacttcaat	480
[6005]	cttaaacggc atctcacaac aagcgaattg gacggaaaaa aagcgtctat cattaccggc	540

[6006]	acctatccac actaagacag tactaaagga cgacgtccc cagaaacga cgtttcgacc	600
[6007]	ttaacgaccc tgccgtctcc atccatccga ccactcccga cgctctctcc tggagcaaac	660
[6008]	cactcttacc aagcatatag catatataat aacgtattga atttattaac tgattgaatt	720
[6009]	gagagtaaag ccagtagcgt tgtacggctg tagcttttta gaaaagtggc agatgagcga	780
[6010]	tggtggatat gaaagtacct ttacggcatg tagcgacaca agatcgcttc caagaactcg	840
[6011]	acattcaagc ccagctcgta caagaaaatg aactagccaa tcatatgaac tagcacattg	900
[6012]	aagtcaccgc atcatctctg ttggaaacga cgcgcatgta ctctgtcgta gtaaatecgt	960
[6013]	atctgtacac tcgaaagatt acagtatgta gtagtagcat gactaacgat gtaacgtcca	1020
[6014]	aataacgctc tgtgcctact cctgtagatg cattagacca cctgctaacg tctacacgtt	1080
[6015]	atgtccgtta gtcceaagat tgcacttttc cctcaaagac tctgctgggt tacgtcatgg	1140
[6016]	tctctttcgg gtctctggtc cgttctctgc ccgcccatat ccgccaggc tgctacgata	1200
[6017]	caggataagc tcataagctt gcatgcctgc aggtcgactc tagaggatcc ccgggtaccg	1260
[6018]	agctcgaatt cgtaatcatg gtcatactg tttcctgtgt gaaattgtta tccgctcaca	1320
[6019]	attccacaca acatacgagc cggaagcata aagtgtaaag cctgggggtgc ctaatgagt	1380
[6020]	agctaaactca cattaattgc gttgcgctca ctgcccgtt tccagtcggg aaacctgtcg	1440
[6021]	tgccagctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattgggcgc	1500
[6022]	tcttccgctt cctcgtcac tgactcgtg cgctcggtcg ttcggctgcg gcgagcggta	1560
[6023]	tcagctcact caaaggcggg aatacgggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag	1620
[6024]	aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg	1680
[6025]	ttttccata ggctccgcc ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg	1740
[6026]	tggcgaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc ccctggaag ctccctcgtg	1800
[6027]	cgctctctg ttcgaccct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga	1860
[6028]	agcgtggcgc tttctcatag ctacgctgt aggtatctca gttcgggtga ggctcgttcgc	1920
[6029]	tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagccc accgctgcgc cttatccggt	1980
[6030]	aactatcgtc ttgagtccaa cccggttaaga cagacttat cgccactggc agcagccact	2040
[6031]	ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtgttg	2100
[6032]	cctaactacg gctacactag aaggacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt	2160
[6033]	accttcgga aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcgg	2220
[6034]	ggttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct	2280
[6035]	ttgatcttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa actcacgtta agggattttg	2340
[6036]	gtcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatcctt taaattaaaa atgaagtttt	2400
[6037]	aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggctgaca gttaccaatg cttaatcagt	2460
[6038]	gaggcaccta tctcagcgat ctgtctatct cgttcacca tagttgctg actccccgtc	2520
[6039]	gtgtagataa ctacgatacg ggagggtta ccatctggcc ccagtgtgc aatgataccg	2580
[6040]	cgagaccac gtcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaagggcc	2640
[6041]	gagcgagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg	2700
[6042]	gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttggttc cattgctaca	2760
[6043]	ggcatcgtgg tgtcacgctc gtcgtttggt atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga	2820
[6044]	tcaaggcgag ttacatgatc ccccatgttg tgcaaaaaag cggttagctc cttcggctct	2880
[6045]	ccgatcggtg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg	2940
[6046]	cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca	3000
[6047]	accaagtcac tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc ggcttcaata	3060

[6048]	cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct	3120
[6049]	tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaacccact	3180
[6050]	cgtgcacca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttcttg gtgagcaaaa	3240
[6051]	acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgca cacggaaatg ttgaatactc	3300
[6052]	atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga	3360
[6053]	tacatatattg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga	3420
[6054]	aaagtgccac ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga cattaaccta taaaaatagg	3480
[6055]	cgtatcacga ggccctttcg tctcgcgcgt ttcggtgatg acggtgaaaa cctctgacac	3540
[6056]	atgcagctcc cggagacggc cacagcttgt ctgtaagcgg atgccgggag cagacaagcc	3600
[6057]	cgtcagggcg cgtcagcggg tgttgccggg tgctggggct ggcttaacta tgcggcatca	3660
[6058]	gagcagattg tactgagagt gcacatatg cgggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg	3720
[6059]	agaaaatacc gcatcaggcg ccattcgcca ttcaggctgc gcaactgttg ggaagggcga	3780
[6060]	tcggtgcggg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaag ggggatgtgc tgcaaggcga	3840
[6061]	ttaagttggg taacgccagg gttttcccag tcacgacgtt gtaaaacgac ggccagtgcc	3900
[6062]	a	3901
[6063]	<210> 157	
[6064]	<211> 1215	
[6065]	<212> DNA	
[6066]	<213> 人工序列	
[6067]	<220>	
[6068]	<223> 短Can1缺失编码模板	
[6069]	<400> 157	
[6070]	agcttgctac gttaggagaa gacgcacggc gatgatacgg gtaccctca tgacatcaat	60
[6071]	atccgctgcc cctcttgcca gcaaggcgtc agcagggtgt tttttcgcta ttttcaccag	120
[6072]	accacagcct ttttccttgt gtctcatctt ggattccttc aaaggcaact caccgcacct	180
[6073]	ccgagtcgtg tgaacaatgt aataatagcg tattgacttt tttccacct gtttagcgcc	240
[6074]	aaacccaaag cgcttttcgc cccactgca gcccgatgga aggcacatat ggcaagggaa	300
[6075]	aagtcttcag gtaatacatg cctgctgcaa ctatatgtac tctgactcat tccctcagac	360
[6076]	gtgggtcata gacagctgtt ttaaacggg caaatcaatc tctgtcgac aggtattttct	420
[6077]	gcccttcaa accaggttgc cacatcagat tccatcaaag tttttcagac taacttcaat	480
[6078]	cttaaacggc atctcacaac aagcgaattg gacggaaaaa aagcgtctat cattaccggc	540
[6079]	acctatccac actaagacag tactaaagga cgacgtccc cacgaaacga cgtttcgacc	600
[6080]	ttaacgaccc tgccgtctcc atccatccga ccactcccga cgctctctcc tggagcaaac	660
[6081]	cactcttacc aagcatatag catatataat aacgtattga atttattaac tgattgaatt	720
[6082]	gagagtaaag ccagtagcgt tgtacggctg tagcttttta gaaaagtggc agatgagcga	780
[6083]	tggtggatat gaaagtacct ttacggcatg tagcgacaca agatcgcttc caagaactcg	840
[6084]	acattcaagc ccagctcgta caagaaaatg aactagccaa tcatatgaac tagcacattg	900
[6085]	aagtcaccgc atcatctctg ttggaaacga cgcgcatgta ctctgtcgta gtaaatccgt	960
[6086]	atctgtacac tcgaaagatt acagtatgta gtagtagcat gactaacgat gtaacgtcca	1020
[6087]	aataacgctc tgtgcctact cctgtagatg cattagacca cctgctaacg tctacacgtt	1080
[6088]	atgtccgtta gtcceaagat tgcacttttc cctcaaagac tctgctgggt tacgtcatgg	1140
[6089]	tctctttcgg gtctctggtc cgttctctgc ccgccatat ccgccaggc tgctacgata	1200

[6090]	caggataagc tcata	1215
[6091]	<210> 158	
[6092]	<211> 20	
[6093]	<212> DNA	
[6094]	<213> 人工序列	
[6095]	<220>	
[6096]	<223> 引物80F	
[6097]	<400> 158	
[6098]	agcttgctac gttaggagaa	20
[6099]	<210> 159	
[6100]	<211> 20	
[6101]	<212> DNA	
[6102]	<213> 人工序列	
[6103]	<220>	
[6104]	<223> 引物80R	
[6105]	<400> 159	
[6106]	tatgagctta tcctgtatcg	20
[6107]	<210> 160	
[6108]	<211> 2125	
[6109]	<212> DNA	
[6110]	<213> 解脂耶氏酵母	
[6111]	<220>	
[6112]	<221> misc_feature	
[6113]	<222> (1) .. (2125)	
[6114]	<223> Can1基因座WT(野生型)	
[6115]	<400> 160	
[6116]	ggaaggcaca tatggcaagg gaaaagtctt caggtaatac atgcctgctg caactatatg	60
[6117]	tactctgact cattccctca gacgtgggtc atagacagct gttttaaacc gggcaaatac	120
[6118]	atctctgtcg cacaggtatt tctgcccttc aaaaccaggt tgccacatca gattccatca	180
[6119]	aagtttttca gactaacttc aatcttaaac ggcattctac aacaagcgaa ttggacggaa	240
[6120]	aaaaagcgtc tatcattacc ggcacctatc cacactaaga cagtactaaa ggacgacgct	300
[6121]	ccccacgaaa cgacgtttcg accttaacga ccctgccgtc tccatccatc cgaccacaat	360
[6122]	ggaaaagaca ttttcaaacg attaccacc ctcgggact gaggcccaca tccacatcaa	420
[6123]	ccacacggcc cactcgatg actcagagga ggtgccctcg cacaaggaaa attacaacac	480
[6124]	cagtggccac gacctggagg agtccgaccc ggataaccat gtcggtgaga ccctcgaggt	540
[6125]	caagcgaggt ctcaagatgc gacacatctc catgatctcg cttggaggaa ccattggtac	600
[6126]	cggctctctt attggtaccg gaggagctct ccagcaggcc ggtccctgtg gcgccctcgt	660
[6127]	cgcctacgtg ttcatggcca ccattgtcta ctctgttgcc gagtctcttg gagaactggc	720
[6128]	tacgtacatt cccatcaccc gctcctttgc cgtctttact acccgatata tgtcacagtc	780
[6129]	gtttggtgcc tccatgggct ggctatactg gttctcgtgg gcgatcacct tcgccatcga	840
[6130]	gctcaacacc attggtcccg tgattgagta ctggactgac gccgttccta ctgctgcctg	900
[6131]	gattgccatc ttcttcgtca tcctcactac catcaacttc ttccccgtgg gcttctatgg	960

[6132]	cgaagtcgag ttctgggtgg cctccgtgaa ggtcattgcc atcattggat ggctcatcta	1020
[6133]	cgcgctctgc atgacgtgtg gacgaggtgt aacaggtcct gtgggattca gatactggaa	1080
[6134]	ccaccccgga cccatgggag acggaatctg gaccgacggc gtgcccattg tgcgaaacgc	1140
[6135]	gcccggtega cgattcatgg gatggctcaa ttcgctcggt aacgccgcct tcacctacca	1200
[6136]	gggctgtgag ctggtcggag tcactgccgg tgaggcccag aacccagaa agtccgtccc	1260
[6137]	tcgagccatc aaccgagtct ttgctcgaat ttgcatcttc tacattggct ctatcttctt	1320
[6138]	catgggcatg ctctgtccct ttaacgaccc caagctgacc gatgactcct ccgtcatcgc	1380
[6139]	ctcctctect tttgttattg ccattatcaa ctctggcacc aaggtgctcc ctcacatttt	1440
[6140]	caacgccgtc attctcatca ccctgatttc ggcaggaaac tccaacgtct acattggctc	1500
[6141]	gcgagtggtc tacgccctgg ctgactccgg aaccgcacca aagttcttca agcgaaccac	1560
[6142]	caagaaggga gtgccgtacg tggcagtctg cttcacctcg gcgtttggtc tgctggcctt	1620
[6143]	catgtctgtg tccgagtcgt cgtccactgt cttcgactgg ttcataca tctccgtgt	1680
[6144]	ggccggcctc atctgttggg ctttcatctc tgcctccac atccgattca tgcaagtgt	1740
[6145]	taagcacaga gggatctcca gagatacgt gcccttcaag gcacgatggc agccattcta	1800
[6146]	ctcatggtag gcgctcgtct ccatcatctt catcactctc atccagggtc tcacgtcctt	1860
[6147]	ctggcacttt accgccgcca agttcatgac tgcatacatc tccgtcattg tctgggtcgg	1920
[6148]	tttgtacatt atcttccagt gtctgttccg atgcaagttc cttatcccta ttgaggatgt	1980
[6149]	ggacattgac accggccgac gagagattga cgacgatgtg tgggaggaga agatccccac	2040
[6150]	aaagtggtag gagaagtttt ggaatattat tgcataagaa gatcggggat tcccgacgt	2100
[6151]	ctctcctgga gcaaaccact cttac	2125
[6152]	<210> 161	
[6153]	<211> 392	
[6154]	<212> DNA	
[6155]	<213> 人工序列	
[6156]	<220>	
[6157]	<223> Can1基因座缺失菌株	
[6158]	<400> 161	
[6159]	ggaaggcaca tatggcaagg gaaaagtctt caggtataac atgcctgctg caactatatg	60
[6160]	tactctgact cattccctca gacgtgggtc atagacagct gttttaaacc gggcaaatca	120
[6161]	atctctgtcg cacaggtatt tctgcccttc aaaaccaggt tgccacatca gattccatca	180
[6162]	aagtttttca gactaacttc aatcttaaac ggcattctac aacaagcgaa ttggacggaa	240
[6163]	aaaaagcgtc tatcattacc ggcacctatc cacactaaga cagtactaaa ggacgacgt	300
[6164]	ccccacgaaa cgacgtttcg accttaacga ccctgccgtc tccatccatc cgaccactcc	360
[6165]	cgacgtcttc tctggagca aaccactctt ac	392
[6166]	<210> 162	
[6167]	<211> 73	
[6168]	<212> DNA	
[6169]	<213> 人工序列	
[6170]	<220>	
[6171]	<223> 图13-B的正向寡核苷酸	
[6172]	<400> 162	
[6173]	catgcgtaaa ctgactgatg agtccgtgag gacgaaacga gtaagctcgt cagtttcagt	60

[6174]	acggttctag ttt	73
[6175]	<210> 163	
[6176]	<211> 75	
[6177]	<212> DNA	
[6178]	<213> 人工序列	
[6179]	<220>	
[6180]	<223> 图13-B的反向寡核苷酸	
[6181]	<400> 163	
[6182]	tctaaaacta gaaccgtact gaaactgaga cgagcttact cgtttcgtcc tcacggactc	60
[6183]	atcagtcagt ttacg	75
[6184]	<210> 164	
[6185]	<211> 211	
[6186]	<212> RNA	
[6187]	<213> 人工序列	
[6188]	<220>	
[6189]	<223> pre-sgRNA URA3.1 (RGR-URA3.1)	
[6190]	<400> 164	
[6191]	gaacagcuga ugaguccgug aggacgaaac gaguaagcuc guccuguuca gagacaguuu	60
[6192]	ccuguuuuag agcuagaaaau agcaaguuaa aaauaggcua guccguuauac aacuugaaaa	120
[6193]	aguggcaccg agucggugcu uuuggccggc augguccag ccuccucgcu ggcgccggcu	180
[6194]	gggcaacaug cuucggcaug gcgaauaggga c	211
[6195]	<210> 165	
[6196]	<211> 20	
[6197]	<212> DNA	
[6198]	<213> 解脂耶氏酵母	
[6199]	<400> 165	
[6200]	ctgttcagag acagtttcct	20
[6201]	<210> 166	
[6202]	<211> 211	
[6203]	<212> RNA	
[6204]	<213> 人工序列	
[6205]	<220>	
[6206]	<223> pre-sgRNA URA3.2 (RGR-URA3.2	
[6207]	<400> 166	
[6208]	auguuacuga ugaguccgug aggacgaaac gaguaagcuc gucuacauc cagagaagca	60
[6209]	cacguuuuag agcuagaaaau agcaaguuaa aaauaggcua guccguuauac aacuugaaaa	120
[6210]	aguggcaccg agucggugcu uuuggccggc augguccag ccuccucgcu ggcgccggcu	180
[6211]	gggcaacaug cuucggcaug gcgaauaggga c	211
[6212]	<210> 167	
[6213]	<211> 20	
[6214]	<212> DNA	
[6215]	<213> 解脂耶氏酵母	

[6216]	<400>	167	
[6217]	taacatccag agaagcacac		20
[6218]	<210>	168	
[6219]	<211>	838	
[6220]	<212>	DNA	
[6221]	<213>	人工序列	
[6222]	<220>		
[6223]	<223>	FBA1L启动子	
[6224]	<400>	168	
[6225]	gtttaaacag tgtacgcagt actatagagg aacaattgcc ccggagaaga cggccaggcc	60	
[6226]	gcctagatga caaattcaac aactcacagc tgactttctg ccattgccac tagggggggg	120	
[6227]	cctttttata tggccaagcc aagctctcca cgtcggttgg gctgcacca acaataaatg	180	
[6228]	ggtagggttg caccaacaaa gggatgggat ggggggtaga agatacgagg ataacggggc	240	
[6229]	tcaatggcac aaataagaac gaatactgcc attagactc gtgatccagc gactgacacc	300	
[6230]	attgcatcat ctaagggcct caaaactacc tcggaactgc tgcgctgac tggacaccac	360	
[6231]	agaggttccg agcactttag gttgcaccaa atgtcccacc aggtgcaggc agaaaacgct	420	
[6232]	ggaacagcgt gtacagtttg tcttaacaaa aagtgagggc gctgaggtcg agcagggttg	480	
[6233]	tgtgacttgt tatagccttt agagctgcga aagcgcgtat ggatttggct catcaggcca	540	
[6234]	gattgagggt ctgtggacac atgtcatgtt agtgtacttc aatcgcccc tggatatagc	600	
[6235]	cccacaata ggccgtggcc tcatTTTTTT gccttcgcga catttccatt gctcgggtacc	660	
[6236]	cacaccttgc ttctcctgca cttgccaaacc ttaatactgg ttacattga ccaacatctt	720	
[6237]	acaagcgggg ggcttgtcta gggatatatat aaacagtggc tctcccaatc ggttgccagt	780	
[6238]	ctcttttttc ctttctttcc ccacagattc gaaatctaaa ctacacatca caccatgg	838	
[6239]	<210>	169	
[6240]	<211>	1839	
[6241]	<212>	DNA	
[6242]	<213>	人工序列	
[6243]	<220>		
[6244]	<223>	乙酰羟酸合酶基因	
[6245]	<400>	169	
[6246]	atggacgagt cttcatcgg aatgtctgga ggagagatct tccacgagat gatgctgcga	60	
[6247]	cacaacgtcg acactgtctt cggttacccc ggtggagcca ttctccccgt ctttgacgcc	120	
[6248]	attcacaact ctgaatactt caactttgtg ctccctcgac acgagcaggg tgccggccac	180	
[6249]	atggccgagg gctacgctcg agcctctggt aagcccggtg tcgttctcgt cacctctggc	240	
[6250]	cccggtgcca ccaacgtcat ccccccatg caggacgctc tttccgatgg taccctatg	300	
[6251]	gttgcttca ccggtcaggt cctgacctcc gttatcggca ctgacgcctt ccaggaggcc	360	
[6252]	gatgttgtcg gcatctccc atcttgacc aagtggaaac tcatgggtcaa gaacgttgct	420	
[6253]	gagctcccc gacgaatcaa cgaggccttt gagattgcta ctccggccg acccggtccc	480	
[6254]	gttctcgtcg atctgcccga ggatgttact gctgccatcc tgcgagagcc catccccacc	540	
[6255]	aagtccacca ttccctcgca ttctctgacc aacctcacct ctgccgccgc caccgagttc	600	
[6256]	cagaagcagg ctatccagcg agccgccaac ctcatcaacc agtccaagaa gcccgctcctt	660	
[6257]	tacgtcggac agggtatcct tggctccgag gagggtccta agctgcttaa ggagctggct	720	

[6258]	gagaaggccg agattcccgt caccactact ctgcagggtc ttggtgcctt tgacgagcga	780
[6259]	gacccaagt ctctgcacat gctcggtatg cacggttccg gctacgcaa catggccatg	840
[6260]	cagaacgtg actgtatcat tgctctcggc gcccgatttg atgaccgagt taccggtcc	900
[6261]	atccccaagt ttgccccga ggctcgagcc gctgcccttg agggtcgagg tggattgtt	960
[6262]	cactttgaga tccaggccaa gaacatcaac aaggttggtc aggccaccga agccgttgag	1020
[6263]	ggagacgtta ccgagtctgt ccgacagctc atccccctca tcaacaaggt ctctgccgt	1080
[6264]	gagcgagctc cctggactga gactatccag tcttggaaagc agcagttccc ctctctcttc	1140
[6265]	gaggctgaag gtgaggatgg tgttatcaag ccccgatccg tcattgctct gctctctgac	1200
[6266]	ctgacagaga acaacaagga caagaccatc atcaccaccg gtgttggtca gcatcagatg	1260
[6267]	tggactgccc agcatttccg atggcgacac cctcgaaaca tgatcacttc tgggtggtctt	1320
[6268]	ggaactatgg gttacggcct gcccgccgt atcggcgcca aggttgcccc acctgactgc	1380
[6269]	gacgtcattg acattgatgg tgacgttctt ttcaacatga ctctgaccga gctgtccacc	1440
[6270]	gccgttcagt tcaacattgg cgtcaagct attgtctca acaacagga acagggtatg	1500
[6271]	gtcaccaccg tgacgtctct cttctacgag aaccgatact gccacactca tcagaagaac	1560
[6272]	cccgaattca tgaagctggc cgagtcgatg ggcataagg gtatccgaat cactcacatt	1620
[6273]	gaccagctgg aggcgggtct caaggagatg ctgcataca agggccctgt gctcgttgag	1680
[6274]	gttgtgtgac acaagaagat ccccgctctt cctatggttc ccgctggtaa ggctttgcat	1740
[6275]	gagttccttg tctacgacgc tgacgccgag gctgcttctc gaccgatcg actgaagaat	1800
[6276]	gccccgccc ctcacgtcca ccagaccacc tttgagaac	1839
[6277]	<210>	170
[6278]	<211>	30
[6279]	<212>	DNA
[6280]	<213>	人工序列
[6281]	<220>	
[6282]	<223>	RH0705
[6283]	<400>	170
[6284]	gtacagacct cggccgacaa ttatgatatc	30
[6285]	<210>	171
[6286]	<211>	30
[6287]	<212>	DNA
[6288]	<213>	人工序列
[6289]	<220>	
[6290]	<223>	RH0719
[6291]	<400>	171
[6292]	gttccgaggt agttttgagg cccttagatg	30
[6293]	<210>	172
[6294]	<211>	30
[6295]	<212>	DNA
[6296]	<213>	人工序列
[6297]	<220>	
[6298]	<223>	RH0733
[6299]	<400>	172

[6300]	gttgggagag gggactagga actccttgta	30
[6301]	<210> 173	
[6302]	<211> 30	
[6303]	<212> DNA	
[6304]	<213> 人工序列	
[6305]	<220>	
[6306]	<223> RH0734	
[6307]	<400> 173	
[6308]	ctacgaagct cgagctaacg tccacaagtc	30
[6309]	<210> 174	
[6310]	<211> 30	
[6311]	<212> DNA	
[6312]	<213> 人工序列	
[6313]	<220>	
[6314]	<223> RH0707	
[6315]	<400> 174	
[6316]	gtcgggtggct acaatacgtg agtcagaagg	30
[6317]	<210> 175	
[6318]	<211> 53	
[6319]	<212> DNA	
[6320]	<213> 解脂耶氏酵母	
[6321]	<400> 175	
[6322]	cgtcctcctt cttctgttca gagacagttt cctcggcacc agctcgcagg cca	53
[6323]	<210> 176	
[6324]	<211> 52	
[6325]	<212> DNA	
[6326]	<213> 人工序列	
[6327]	<220>	
[6328]	<223> 来自菌落1的质粒URA3的片段	
[6329]	<400> 176	
[6330]	cgtcctcctt cttctgttca gagacagtcc ctcggcacca gctcgcaggc ca	52
[6331]	<210> 177	
[6332]	<211> 51	
[6333]	<212> DNA	
[6334]	<213> 人工序列	
[6335]	<220>	
[6336]	<223> 来自菌落2的质粒URA3的片段	
[6337]	<400> 177	
[6338]	cgtcctcctt cttctgttca gagacagtcc tcggcaccag ctcgcaggcc a	51
[6339]	<210> 178	
[6340]	<211> 52	
[6341]	<212> DNA	

[6342]	<213>	人工序列	
[6343]	<220>		
[6344]	<223>	来自菌落3的质粒URA3的片段	
[6345]	<400>	178	
[6346]		cgctcctcctt cttctgttca gagacagttc ctcggcacca gctcgcaggc ca	52
[6347]	<210>	179	
[6348]	<211>	52	
[6349]	<212>	DNA	
[6350]	<213>	人工序列	
[6351]	<220>		
[6352]	<223>	来自菌落5的质粒URA3的片段	
[6353]	<400>	179	
[6354]		cgctcctcctt cttctgttca gagacagttc ctcggcacca gctcgcaggc ca	52
[6355]	<210>	180	
[6356]	<211>	52	
[6357]	<212>	DNA	
[6358]	<213>	人工序列	
[6359]	<220>		
[6360]	<223>	来自菌落6的质粒URA3的片段	
[6361]	<400>	180	
[6362]		cgctcctcctt cttctgttca gagacagttc ctcggcacca gctcgcaggc ca	52
[6363]	<210>	181	
[6364]	<211>	39	
[6365]	<212>	DNA	
[6366]	<213>	人工序列	
[6367]	<220>		
[6368]	<223>	来自菌落1的基因组URA3的片段	
[6369]	<220>		
[6370]	<221>	misc_feature	
[6371]	<222>	(29) .. (29)	
[6372]	<223>	N是a、c、g、或t	
[6373]	<220>		
[6374]	<221>	misc_feature	
[6375]	<222>	(32) .. (32)	
[6376]	<223>	N是a、c、g、或t	
[6377]	<400>	181	
[6378]		cgctcctcctt cttctgttca gagacagtnc cncggcccc	39
[6379]	<210>	182	
[6380]	<211>	54	
[6381]	<212>	DNA	
[6382]	<213>	人工序列	
[6383]	<220>		

[6384]	<223>	来自菌落2的基因组URA3的片段	
[6385]	<400>	182	
[6386]		cgtcctcctt cttctgttca gagacagttt acctcggcac cagctcgag gcc	54
[6387]	<210>	183	
[6388]	<211>	44	
[6389]	<212>	DNA	
[6390]	<213>	人工序列	
[6391]	<220>		
[6392]	<223>	来自菌落3的基因组URA3的片段	
[6393]	<400>	183	
[6394]		cgtcctcctt cttctgttca gagacagttt cagctcgag gcc	44
[6395]	<210>	184	
[6396]	<211>	49	
[6397]	<212>	DNA	
[6398]	<213>	人工序列	
[6399]	<220>		
[6400]	<223>	来自菌落5的基因组URA3的片段	
[6401]	<220>		
[6402]	<221>	misc_feature	
[6403]	<222>	(23) .. (23)	
[6404]	<223>	N是a、c、g、或t	
[6405]	<220>		
[6406]	<221>	misc_feature	
[6407]	<222>	(38) .. (38)	
[6408]	<223>	N是a、c、g、或t	
[6409]	<400>	184	
[6410]		cgtcctcctt cttctgttca ganacagttt ggcaccanct cgcaggcca	49
[6411]	<210>	185	
[6412]	<211>	54	
[6413]	<212>	DNA	
[6414]	<213>	人工序列	
[6415]	<220>		
[6416]	<223>	来自菌落6的基因组URA3的片段	
[6417]	<400>	185	
[6418]		cgtcctcctt cttctgttca gagacagttt ccctcggcac cagctcgag gcc	54
[6419]	<210>	186	
[6420]	<211>	1029	
[6421]	<212>	DNA	
[6422]	<213>	人工序列	
[6423]	<220>		
[6424]	<223>	潮霉素抗生素抗性选择标记物	
[6425]	<400>	186	

[6426]	atggccaaaa agcctgaact caccgcgacg tctgtcgaga agtttctgat cgaaaagttc	60
[6427]	gacagcgtct cgcacctgat gcagctctcg gagggcgaag aatctcgtgc ttctagcttc	120
[6428]	gatgtaggag ggcgtggata tgtctctcgg gtaaatagct gcgccgatgg ttctacaaa	180
[6429]	gatcgttatg ttatcggca ctttgcacg gccgcgtcc cgattccgga agtgcttgac	240
[6430]	attggggagt tcagcgagag cctgacctat tgcacatccc gccgtgcaca ggggtgcacg	300
[6431]	ttgcaagacc tgcctgaaac cgaactgccc gctgttctgc agccggctgc ggaggctatg	360
[6432]	gatgcgatcg ctgcggccga tcttagccag acgagcgggt tcggcccatt cggaccgcaa	420
[6433]	ggaatcggtc aatacactac atggcgtgat ttcatatgcg cgattgctga tccccatgtg	480
[6434]	tatcactggc aaactgtgat ggacgacacc gtcagtgcgt ccgtcgcgca ggctctcgat	540
[6435]	gagctgatgc tttgggccga ggactgcccc gaagtcgggc acctcgtgca cgcggatttc	600
[6436]	ggctccaaca atgtcctgac ggacaatggc cgcataacag cggtcattga ctggagcgag	660
[6437]	gcgatgttcg gggattccca atacgagtc gccaacatct tcttctggag gccgtggttg	720
[6438]	gcttgatagg agcagcagac gcgctacttc gagcggaggc atccggagct tgcaggatcg	780
[6439]	ccgcggctcc gggcgtatat gctccgcatt ggtcttgacc aactctatca gagcttggtt	840
[6440]	gacggcaatt tcgatgatgc agcttggcgc cagggtcgat gcgacgcaat cgtccgatcc	900
[6441]	ggagccggga ctgtcggcg tacacaaac gccgcagaa gcgcggccgt ctggaccgat	960
[6442]	ggctgtgtag aagtactcgc cgatagtga aaccgacgcc ccagcactcg tccgaggga	1020
[6443]	aaggaatag	1029
[6444]	<210>	187
[6445]	<211>	565
[6446]	<212>	DNA
[6447]	<213>	人工序列
[6448]	<220>	
[6449]	<223>	TDH1或GPD启动子
[6450]	<400>	187
[6451]	ggttgccgga tagacgccga cggagggcaa tggcgtatg gaaccttgcg gatatccata	60
[6452]	cgccgcggcg gactgcgtcc gaaccagctc cagcagcgtt tttccgggc cattgagccg	120
[6453]	actgcgaccc cgccaacgtg tcttggccca cgcactcatg tcatgttggt gttgggaggc	180
[6454]	cactttttaa gtagcacaag gcacctagct cgcagcaagg tgtccgaacc aaagaagcgg	240
[6455]	ctgcagtggg gcaaacgggg cggaacggc gggaaaaagc cacgggggca cgaattgagg	300
[6456]	cacgccctcg aatttgagac gagtcacggc cccattcgcc cgcgcaatgg ctccccaacg	360
[6457]	cccgtcttt tgcaccacat caggttacct caagccaaac ctttgtgta aaaagcttaa	420
[6458]	catattatac cgaacgtagg tttgggcggg cttgctccgt ctgtccaagg caacatttat	480
[6459]	ataaggtct gcacgccgg ctcaattgaa tttttttct tcttctcttc tctatattca	540
[6460]	ttcttgaatt aaacacacat caacc	565
[6461]	<210>	188
[6462]	<211>	43
[6463]	<212>	DNA
[6464]	<213>	人工序列
[6465]	<220>	
[6466]	<223>	RH0804
[6467]	<400>	188

[6468]	gatcaacgta cgagtgtacg cagtactata gaggaacaat tgc	43
[6469]	<210> 189	
[6470]	<211> 44	
[6471]	<212> DNA	
[6472]	<213> 人工序列	
[6473]	<220>	
[6474]	<223> RH0805	
[6475]	<400> 189	
[6476]	gatcaacgta cgccccaagc ttgtccatt cgccatgccg aagc	44
[6477]	<210> 190	
[6478]	<211> 746	
[6479]	<212> DNA	
[6480]	<213> 人工序列	
[6481]	<220>	
[6482]	<223> TDH1启动子-RGR-URA3.3融合体	
[6483]	<400> 190	
[6484]	gatcaacgta cgatacgccg cggcggactg cgtccgaacc agctccagca gcgttttttc	60
[6485]	cgggccattg agccgactgc gaccccgcca acgtgtcttg gccacgcac tcatgtcatg	120
[6486]	ttgggtgttg gaggccactt ttttaagtagc acaaggcacc tagctcgag caaggtgtcc	180
[6487]	gaaccaaaga agcggctgca gtggtgcaaa cggggcggaac acggcgggaa aaagccacgg	240
[6488]	gggcacgaat tgaggcacgc cctcgaaatt gagacgagtc acggcccat tcgccgcgc	300
[6489]	aatggctcgc caacgcccg tcttttgac cacatcaggt taccacaagc caaacctttg	360
[6490]	tgttaaaaag cttaacatat tataccgaac gtaggtttg gcgggcttgc tccgtctgtc	420
[6491]	caagcaaca tttatataag ggtctgcatc gccggtcaa ttgaatctt tttcttctc	480
[6492]	tcttctctat attcattctt gaattaaaca cacatcaaca atgacagttc tgatgagtc	540
[6493]	gtgaggacga aacgagtaag ctctgcaact gtagagggt agactagtt tagagctaga	600
[6494]	aatagcaagt taaaataagg ctagtccgtt atcaactga aaaagtggca ccgagtcggt	660
[6495]	gcttttgcc gccatggtcc cagcctctc gctggcgccg gctgggcaac atgcttcggc	720
[6496]	atggcgaatg ggaccgtacg agtcag	746
[6497]	<210> 191	
[6498]	<211> 211	
[6499]	<212> RNA	
[6500]	<213> 人工序列	
[6501]	<220>	
[6502]	<223> pre-sgRNA URA3.3 (RGR-URA3.3)	
[6503]	<400> 191	
[6504]	acaguucuga ugaguccgug aggacgaac gaguaagcuc gucaacuguu agagguuaga	60
[6505]	cuaguuuuag agcuagaaau agcaaguuaa aaauaggcua guccguuau aacuugaaaa	120
[6506]	aguggcaccg agucggugcu uuuggccggc augguccag ccuccugcu ggcgccggcu	180
[6507]	gggcaacaug cuucggcaug gcgaauugga c	211
[6508]	<210> 192	
[6509]	<211> 43	

[6510]	<212>	DNA	
[6511]	<213>	人工序列	
[6512]	<220>		
[6513]	<223>	RH0610	
[6514]	<400>	192	
[6515]		ggcggcttaa ttaagttgcg acacatgtct tgatagtatc ttg	43
[6516]	<210>	193	
[6517]	<211>	44	
[6518]	<212>	DNA	
[6519]	<213>	人工序列	
[6520]	<220>		
[6521]	<223>	RH0611	
[6522]	<400>	193	
[6523]		ggcggcttaa ttaacgagta tctgtctgac tcgtcattgc cgcc	44
[6524]	<210>	194	
[6525]	<211>	30	
[6526]	<212>	DNA	
[6527]	<213>	人工序列	
[6528]	<220>		
[6529]	<223>	RH0704	
[6530]	<400>	194	
[6531]		catatacttc actgccccag ataaggttcc	30
[6532]	<210>	195	
[6533]	<211>	39	
[6534]	<212>	DNA	
[6535]	<213>	解脂耶氏酵母	
[6536]	<400>	195	
[6537]		aaaccaacct gtgtgcttct ctggatgtta ccaccacca	39
[6538]	<210>	196	
[6539]	<211>	24	
[6540]	<212>	DNA	
[6541]	<213>	人工序列	
[6542]	<220>		
[6543]	<223>	来自菌落3的URA3序列的片段	
[6544]	<220>		
[6545]	<221>	misc_feature	
[6546]	<222>	(17) .. (17)	
[6547]	<223>	N是a、c、g、或t	
[6548]	<220>		
[6549]	<221>	misc_feature	
[6550]	<222>	(19) .. (23)	
[6551]	<223>	N是a、c、g、或t	

[6552]	<400>	196	
[6553]	aaaccaacct gtgttgntnn nnng		24
[6554]	<210>	197	
[6555]	<211>	37	
[6556]	<212>	DNA	
[6557]	<213>	人工序列	
[6558]	<220>		
[6559]	<223>	来自菌落4的URA3序列的片段	
[6560]	<220>		
[6561]	<221>	misc_feature	
[6562]	<222>	(21) .. (21)	
[6563]	<223>	N是a、c、g、或t	
[6564]	<220>		
[6565]	<221>	misc_feature	
[6566]	<222>	(24) .. (25)	
[6567]	<223>	N是a、c、g、或t	
[6568]	<220>		
[6569]	<221>	misc_feature	
[6570]	<222>	(27) .. (29)	
[6571]	<223>	N是a、c、g、或t	
[6572]	<400>	197	
[6573]	aaaccaacct gtgtgtttct nggnntnnnc cccccc		37
[6574]	<210>	198	
[6575]	<211>	39	
[6576]	<212>	DNA	
[6577]	<213>	人工序列	
[6578]	<220>		
[6579]	<223>	来自菌落5的URA3序列的片段	
[6580]	<220>		
[6581]	<221>	misc_feature	
[6582]	<222>	(38) .. (39)	
[6583]	<223>	N是a、c、g、或t	
[6584]	<400>	198	
[6585]	aaaccaacct gtgtgtgtct ctggatgtta ccaccacnn		39
[6586]	<210>	199	
[6587]	<211>	28	
[6588]	<212>	DNA	
[6589]	<213>	人工序列	
[6590]	<220>		
[6591]	<223>	来自菌落6的URA3序列的片段	
[6592]	<220>		
[6593]	<221>	misc_feature	

[6594]	<222>	(21) .. (22)	
[6595]	<223>	N是a、c、g、或t	
[6596]	<220>		
[6597]	<221>	misc_feature	
[6598]	<222>	(25) .. (27)	
[6599]	<223>	N是a、c、g、或t	
[6600]	<400>	199	
[6601]		aaaccaacct gtgtgttttc nnggnnt	28
[6602]	<210>	200	
[6603]	<211>	29	
[6604]	<212>	DNA	
[6605]	<213>	人工序列	
[6606]	<220>		
[6607]	<223>	来自菌落9的URA3序列的片段	
[6608]	<400>	200	
[6609]		aaaccaacct gtgttgcttc tctggatgt	29
[6610]	<210>	201	
[6611]	<211>	39	
[6612]	<212>	DNA	
[6613]	<213>	人工序列	
[6614]	<220>		
[6615]	<223>	来自菌落10的URA3序列的片段	
[6616]	<220>		
[6617]	<221>	misc_feature	
[6618]	<222>	(14) .. (15)	
[6619]	<223>	N是a、c、g、或t	
[6620]	<220>		
[6621]	<221>	misc_feature	
[6622]	<222>	(19) .. (22)	
[6623]	<223>	N是a、c、g、或t	
[6624]	<220>		
[6625]	<221>	misc_feature	
[6626]	<222>	(24) .. (27)	
[6627]	<223>	N是a、c、g、或t	
[6628]	<220>		
[6629]	<221>	misc_feature	
[6630]	<222>	(29) .. (29)	
[6631]	<223>	N是a、c、g、或t	
[6632]	<220>		
[6633]	<221>	misc_feature	
[6634]	<222>	(32) .. (32)	
[6635]	<223>	N是a、c、g、或t	

[6636]	<220>	
[6637]	<221>	misc_feature
[6638]	<222>	(38) .. (38)
[6639]	<223>	N是a、c、g、或t
[6640]	<400>	201
[6641]	aaaccaacct gtgnnttcnn nngnnntnc cnccccna	39
[6642]	<210>	202
[6643]	<211>	351
[6644]	<212>	DNA
[6645]	<213>	解脂耶氏酵母
[6646]	<400>	202
[6647]	aaaccaacct gtgtgcttct ctggatgta ccaccacaa ggagtcatt gagcttgccg	60
[6648]	ataaggtcgg accttatgtg tgcatgatca agaccatat cgacatcatt gacgacttca	120
[6649]	cctacgccgg cactgtgctc cccctcaagg agcttgctct taagcacggt ttcttcctgt	180
[6650]	tcgaggacag aaagttcgca gatattggca acactgtcaa gcaccagtac aagaacgggtg	240
[6651]	tctaccgaat cgccgagtg tccgatatca ccaacgcca cggtgtacct ggagccggaa	300
[6652]	tcattgctgg cctgcgagct ggtgccgagg aaactgtctc tgaacagaag a	351
[6653]	<210>	203
[6654]	<211>	34
[6655]	<212>	DNA
[6656]	<213>	人工序列
[6657]	<220>	
[6658]	<223>	来自菌落23的URA3序列的片段
[6659]	<400>	203
[6660]	aaaccaacct gtgaaactgt ctctgaacag aaga	34
[6661]	<210>	204
[6662]	<211>	34
[6663]	<212>	DNA
[6664]	<213>	人工序列
[6665]	<220>	
[6666]	<223>	来自菌落24的URA3序列的片段
[6667]	<400>	204
[6668]	aaaccaacct gtgaaactgt ctctgaacag aaga	34
[6669]	<210>	205
[6670]	<211>	803
[6671]	<212>	DNA
[6672]	<213>	解脂耶氏酵母
[6673]	<400>	205
[6674]	aaaccaacct gtgtgcttct ctggatgta ccaccacaa ggagtcatt gagcttgccg	60
[6675]	ataaggtcgg accttatgtg tgcatgatca agaccatat cgacatcatt gacgacttca	120
[6676]	cctacgccgg cactgtgctc cccctcaagg agcttgctct taagcacggt ttcttcctgt	180
[6677]	tcgaggacag aaagttcgca gatattggca acactgtcaa gcaccagtac aagaacgggtg	240

[6678]	tctaccgaat cgccgagtgg tccgatatca ccaacgcca cggtgtaccc ggagccggaa	300
[6679]	tcattgctgg cctgcgagct ggtgccgagg aaactgtctc tgaacagaag aaggaggacg	360
[6680]	tctctgacta cgagaactcc cagtacaagg agttcttggc cccctctccc aacgagaagc	420
[6681]	tggccagagg tctgctcatg ctggccgagc tgtcttgcaa gggctctctg gccactggcg	480
[6682]	agtactccaa gcagaccatt gagcttgccc gatccgaccc cgagtttgtg gttggcttca	540
[6683]	ttgcccagaa ccgacctaa ggcgactctg aggactggct tattctgacc cccgggggtg	600
[6684]	gtcttgacga caaggagac gctctcggac agcagtaccg aactgttgag gatgtcatgt	660
[6685]	ctaccggaac ggatatcata attgtcggcc gaggtctgta cggccagaac cgagatccta	720
[6686]	ttgaggaggc caagcgatac cagaaggctg gctgggaggc ttaccagaag attaactgtt	780
[6687]	agaggttaga ctatggatat gta	803
[6688]	<210>	206
[6689]	<211>	27
[6690]	<212>	DNA
[6691]	<213>	人工序列
[6692]	<220>	
[6693]	<223>	来自菌落27的URA3序列的片段
[6694]	<400>	206
[6695]	aaaccaacct gtgtctatgg atatgta	27
[6696]	<210>	207
[6697]	<211>	21
[6698]	<212>	DNA
[6699]	<213>	人工序列
[6700]	<220>	
[6701]	<223>	来自菌落36的URA3序列的片段
[6702]	<400>	207
[6703]	aaaccaacct gtggatatgt a	21
[6704]	<210>	208
[6705]	<211>	1346
[6706]	<212>	DNA
[6707]	<213>	人工序列
[6708]	<220>	
[6709]	<223>	ARS18序列
[6710]	<400>	208
[6711]	aattcatgtc acacaaaccg atcttcgcct caaggaaacc taattctaca tccgagagac	60
[6712]	tgccgagatc cagtctacac tgattaattt tcgggccaat aatttaaaaa aatcgtgtta	120
[6713]	tataatatta tatgtattat atatatacat catgatgata ctgacagtca tgtccattg	180
[6714]	ctaaatagac agactccatc tgccgcctcc aactgatgtt ctcaatattt aaggggtcat	240
[6715]	ctcgcatgtt ttaataataa acagactcca tctaccgcct ccaaatgatg ttctcaaaat	300
[6716]	atattgtatg aacttatttt tattacttag tattattaga caacttactt gctttatgaa	360
[6717]	aaacacttcc tatttaggaa acaatttata atggcagttc gttcatttaa caatttatgt	420
[6718]	agaataaatg ttataaatgc gtatgggaaa tcttaaatat ggatagcata aatgatattc	480
[6719]	gcattgccta attcgaatc aacagcaacg aaaaaaatcc cttgtacaac ataaatagtc	540

[6720]	atcgagaaat atcaactatc aaagaacagc tattcacacg ttactattga gattattatt	600
[6721]	ggacgagaat cacacactca actgtctttc tctcttctag aaatacaggt acaagtatgt	660
[6722]	actattctca ttgttcatac ttctagtcac ttcatccac atattccttg gatttctctc	720
[6723]	caatgaatga cattctatct tgcaaattca acaattataa taagatatac caaagtagcg	780
[6724]	gtatagtggc aatcaaaaag cttctctggg gtgcttctcg tatttatttt tattctaattg	840
[6725]	atccattaaa ggtatatatt ttttcttgt tatataatcc ttttgtttat tacatgggct	900
[6726]	ggatacataa aggtattttg atttaatttt ttgcttaaat tcaatccccc ctggttcagt	960
[6727]	gtcaactgta atggtaggaa attaccatac ttttgaagaa gcaaaaaaaa tgaaagaaaa	1020
[6728]	aaaaaatcgt atttccaggt tagacgttc gcagaatcta gaatgcggtg tgcggtacat	1080
[6729]	tgttcttga acgtaaaagt tgcgctccct gagatattgt acatttttgc ttttacaagt	1140
[6730]	acaagtacat cgtacaacta tgtactactg ttgatgcac cacaacagtt tgttttgttt	1200
[6731]	ttttttgttt ttttttttc taatgattca ttaccgtat gtataacctac ttgtacttgt	1260
[6732]	agtaagccgg gttattggcg ttcaattaat catagactta tgaatctgca cgggtgtgcgc	1320
[6733]	tgcgagttac ttttagctta tgcattg	1346
[6734]	<210> 209	
[6735]	<211> 564	
[6736]	<212> DNA	
[6737]	<213> 人工序列	
[6738]	<220>	
[6739]	<223> 经耶氏酵母密码子优化的铜绿假单胞菌Csy4	
[6740]	<400> 209	
[6741]	atggaccact acctggatat cagactccga cccgaccag agttccctcc tgcccagctc	60
[6742]	atgtccgtct tgtttgcaa gctgcacaa gctctcgtgg ccaggggtgg agaccgaatt	120
[6743]	ggcgtgtcgt tccccgattt ggacgagtc cgttctcgac ttggagaaag actccgtatt	180
[6744]	catgcttctg cagacgatct cagagctctg cttgccccgac cctggctgga gggctctccga	240
[6745]	gatcatctgc agttcggcga gcctgccgtg gttccccatc ctaccccata ccgacaggtg	300
[6746]	tctcgggttc aggccaaaag caaccccgag cgactcagac ggcgtcttat gcgaagacac	360
[6747]	gacctgtccg aggaggaagc ccgaaagcgg atccccgaca ccgttgctcg agcgttggac	420
[6748]	cttcctttcg tcacactgcg atctcaatcg actggtcagc actttcgaact gttcatcaga	480
[6749]	cacggacccc tgcaggtcac cgcagaggaa ggcggtttta cttgctatgg actgtccaag	540
[6750]	ggtggctttg tccccgtt ctaa	564
[6751]	<210> 210	
[6752]	<211> 530	
[6753]	<212> DNA	
[6754]	<213> 人工序列	
[6755]	<220>	
[6756]	<223> 耶氏酵母FBA1启动子	
[6757]	<400> 210	
[6758]	catcatctaa gggcctcaaa actacctcgg aactgctgcg ctgatctgga caccacagag	60
[6759]	gttccgagca ctttaggttg caccaaatgt cccaccaggt gcaggcagaa aacgctggaa	120
[6760]	cagcgtgtac agtttgcctt aacaaaaagt gagggcgtg aggtcgagca ggggtggtgtg	180
[6761]	acttgttata gcctttagag ctgcgaaagc gcgtatggat ttggctcatc aggccagatt	240

[6762]	gagggtctgt ggacacatgt catgttagtg tacttcaatc gccccctgga tatagccccg	300
[6763]	acaataggcc gtggcctcat ttttttgctt tccgcacatt tccattgctc ggtaccacaca	360
[6764]	ccttgcttct cctgcacttg ccaaccttaa tactggttta cattgaccaa catcttataa	420
[6765]	gcggggggct tgtctagggt atatataaac agtggctctc ccaatcggtt gccagtctct	480
[6766]	tttttccttt ctttccccac agattcgaaa tctaaactac acatcacacc	530
[6767]	<210>	211
[6768]	<211>	659
[6769]	<212>	DNA
[6770]	<213>	人工序列
[6771]	<220>	
[6772]	<223>	TDH1:28bp-gCAN1-28bp
[6773]	<400>	211
[6774]	cggcgactg cgtccgaacc agctccagca gcgttttttc cgggccattg agccgactgc	60
[6775]	gaccccgcca acgtgtcttg gccacgcac tcatgtcatg ttggtgttg gagccactt	120
[6776]	tttaagtagc acaaggcacc tagctcgag caaggtgtcc gaaccaaaga agcggctgca	180
[6777]	gtggtgcaaa cggggcgga acggcgga aaagccacgg gggcacgaat tgaggcacgc	240
[6778]	cctcgaattt gagacgagtc acggcccat tcgcccgcgc aatggctcgc caacgcccgg	300
[6779]	tcttttgca ccatcaggt taccacaagc caaaccttg tgttaaaaag cttacatat	360
[6780]	tataccgaac gtaggttttg gcgggcttgc tccgtctgtc caaggcaaca tttatataag	420
[6781]	ggtctgcatc gccggtcaa ttgaatcttt tttcttctt tttctctat attcattctt	480
[6782]	gaattaaaca cacatcaaca atggttact gccgtatagg cagctaagaa atcaaagat	540
[6783]	taccaccct cgttttagag ctagaaatag caagttaaaa taaggctagt ccgttatcaa	600
[6784]	cttgaaaaag tggcaccgag tcggtgcttt tgttcactgc cgtataggca gctaagaaa	659
[6785]	<210>	212
[6786]	<211>	28
[6787]	<212>	RNA
[6788]	<213>	铜绿假单胞菌
[6789]	<400>	212
[6790]	guucacugcc guauaggcag cuaagaaa	28
[6791]	<210>	213
[6792]	<211>	156
[6793]	<212>	RNA
[6794]	<213>	人工序列
[6795]	<220>	
[6796]	<223>	与Csy4识别序列侧接的sgRNA
[6797]	<400>	213
[6798]	guucacugcc guauaggcag cuaagaaauc aaacgauuac ccaccucgu uuuagagcua	60
[6799]	gaaauagcaa guuaaaauaa ggcuaguccg uuaucaacu gaaaaagugg caccgagucg	120
[6800]	gugcuuuugu ucacugccgu auaggcagcu aagaaa	156
[6801]	<210>	214
[6802]	<211>	23
[6803]	<212>	DNA

[6804]	<213>	解脂耶氏酵母	
[6805]	<400>	214	
[6806]	tcaaacgatt acccaccctc cgg		23
[6807]	<210>	215	
[6808]	<211>	45	
[6809]	<212>	DNA	
[6810]	<213>	解脂耶氏酵母	
[6811]	<400>	215	
[6812]	gaaaagacat tttcaaacga ttaccacccc tccgggactg aggcc		45
[6813]	<210>	216	
[6814]	<211>	44	
[6815]	<212>	DNA	
[6816]	<213>	人工序列	
[6817]	<220>		
[6818]	<223>	来自菌落14的CAN1的片段	
[6819]	<400>	216	
[6820]	gaaaagacat tttcaaacga ttaccacact ccgggactga ggcc		44
[6821]	<210>	217	
[6822]	<211>	44	
[6823]	<212>	DNA	
[6824]	<213>	人工序列	
[6825]	<220>		
[6826]	<223>	来自菌落16的CAN1的片段	
[6827]	<400>	217	
[6828]	gaaaagacat tttcaaacga ttaccacact ccgggactga ggcc		44
[6829]	<210>	218	
[6830]	<211>	44	
[6831]	<212>	DNA	
[6832]	<213>	人工序列	
[6833]	<220>		
[6834]	<223>	来自菌落18的CAN1的片段	
[6835]	<400>	218	
[6836]	gaaaagacat tttcaaacga ttaccacact ccgggactga ggcc		44
[6837]	<210>	219	
[6838]	<211>	44	
[6839]	<212>	DNA	
[6840]	<213>	人工序列	
[6841]	<220>		
[6842]	<223>	来自菌落19的CAN1的片段	
[6843]	<400>	219	
[6844]	gaaaagacat tttcaaacga ttaccacact ccgggactga ggcc		44
[6845]	<210>	220	

[6846]	<211>	44	
[6847]	<212>	DNA	
[6848]	<213>	人工序列	
[6849]	<220>		
[6850]	<223>	来自菌落24的CAN1的片段	
[6851]	<400>	220	
[6852]		gaaaagacat tttcaaacga ttaccacact ccgggactga ggcc	44
[6853]	<210>	221	
[6854]	<211>	44	
[6855]	<212>	DNA	
[6856]	<213>	人工序列	
[6857]	<220>		
[6858]	<223>	来自菌落25的CAN1的片段	
[6859]	<400>	221	
[6860]		gaaaagacat tttcaaacga ttaccacact ccgggactga ggcc	44
[6861]	<210>	222	
[6862]	<211>	128	
[6863]	<212>	RNA	
[6864]	<213>	人工序列	
[6865]	<220>		
[6866]	<223>	由Csy4处理的gRNA	
[6867]	<400>	222	
[6868]		cuaagaauc aaacgauuac ccaccucgu uuuagagcua gaaauagcaa guaaaaauaa	60
[6869]		ggcuaguccg uuaucaacuu gaaaaagugg caccgagucg gugcuuuugu ucacugccgu	120
[6870]		auaggcag	128
[6871]	<210>	223	
[6872]	<211>	8	
[6873]	<212>	RNA	
[6874]	<213>	人工序列	
[6875]	<220>		
[6876]	<223>	Csy4切割后的5' 旁侧序列	
[6877]	<400>	223	
[6878]		cuaagaaa	8
[6879]	<210>	224	
[6880]	<211>	20	
[6881]	<212>	RNA	
[6882]	<213>	人工序列	
[6883]	<220>		
[6884]	<223>	Csy4切割后的3' 旁侧序列	
[6885]	<400>	224	
[6886]		guucacugcc guauaggcag	20

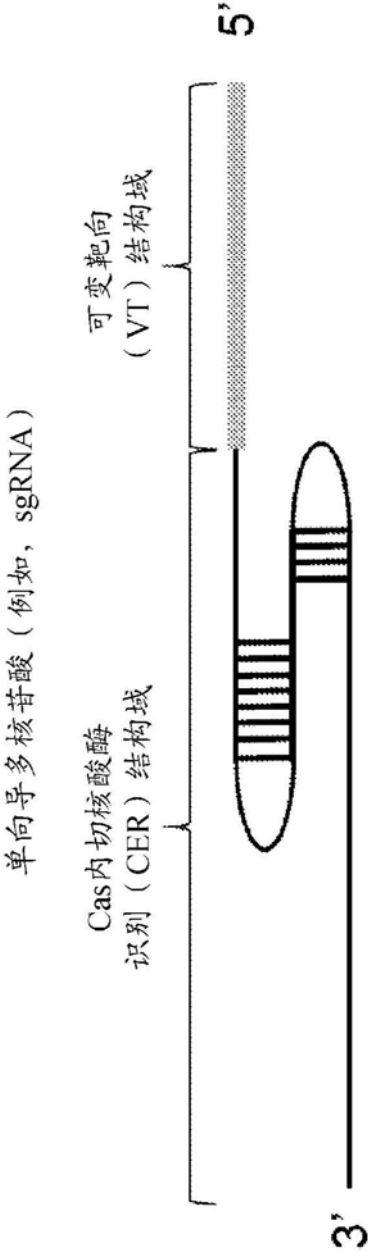


图1

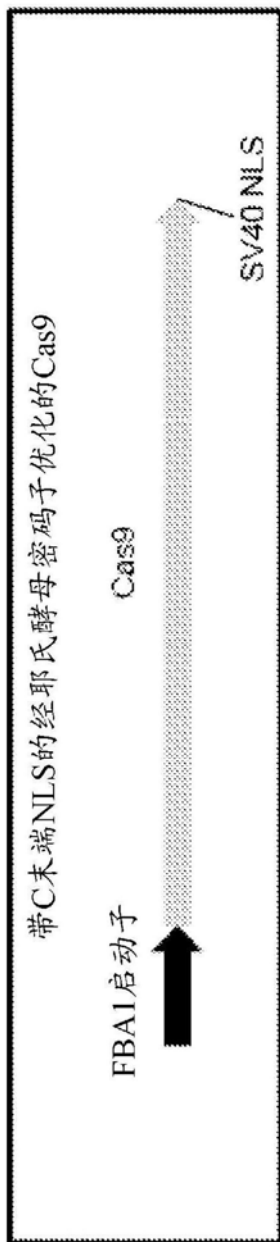


图2A

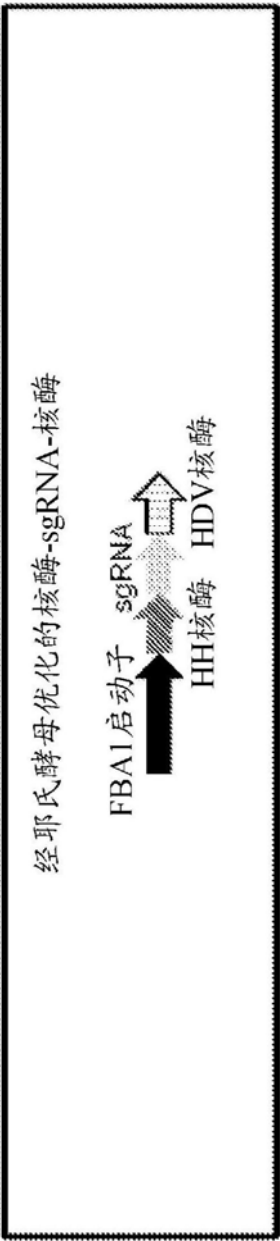


图2B

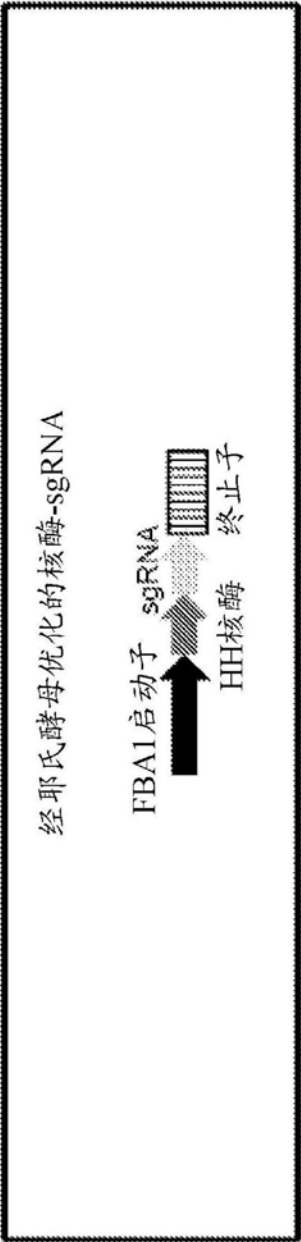


图2C

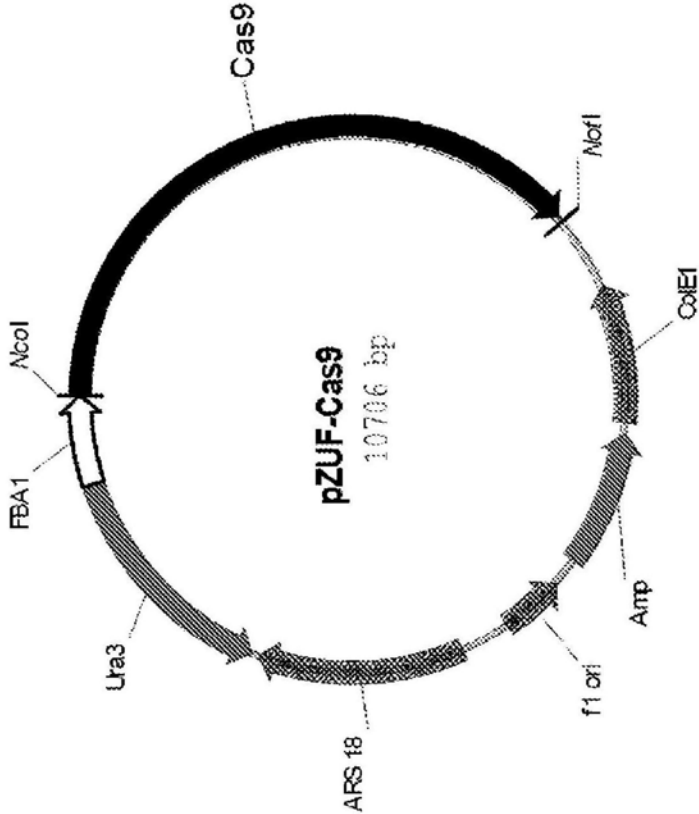


图3A

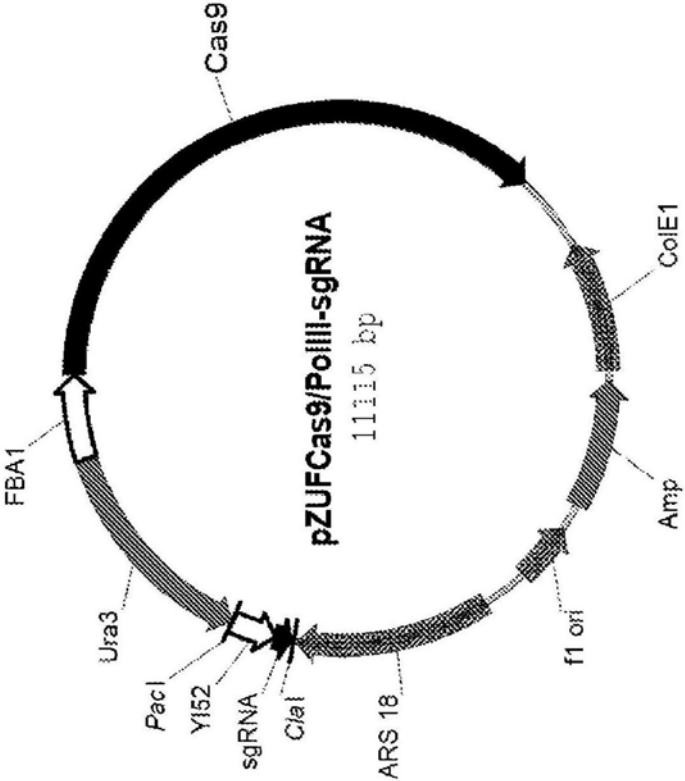


图3B

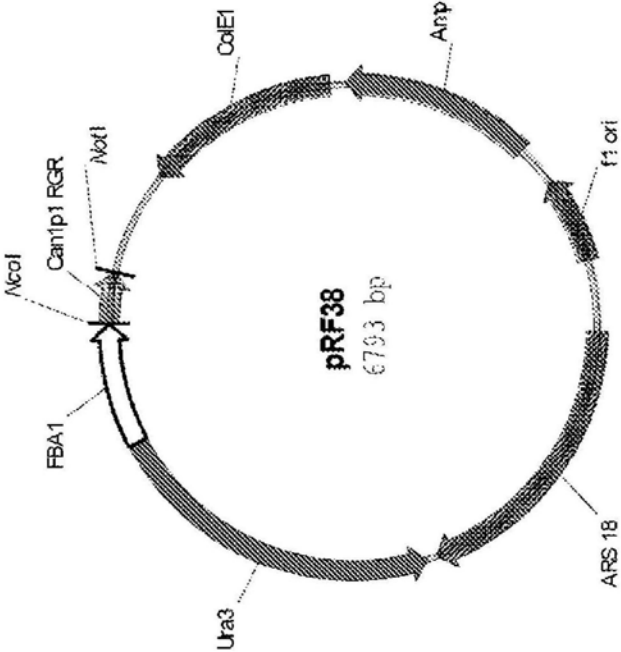


图3C

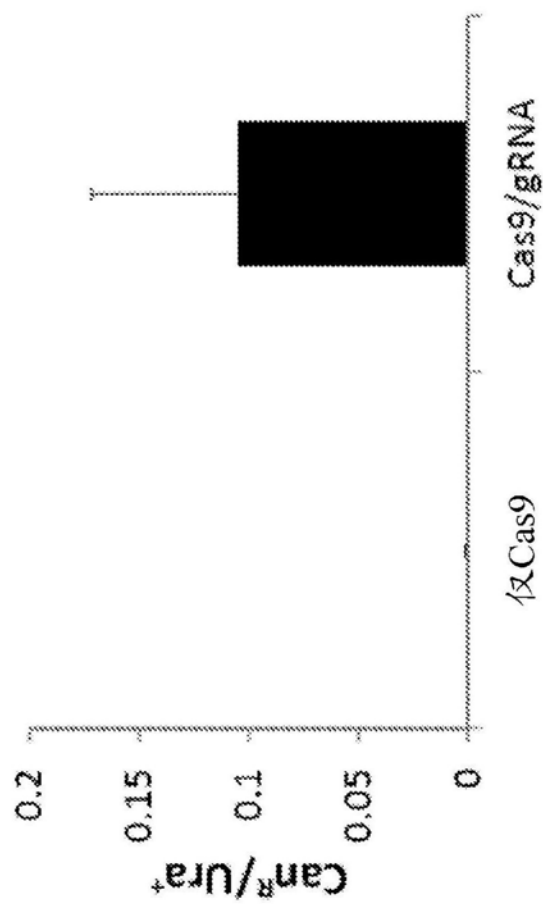


图4

名称	序列	编号	频率	SEQ ID NO
WT	CAATGGAAAAGACATTTTCAAACGATTACCCACC-CTCCGGGACTGAGGCCCCAC	0	0	71
1	CAATGGAAAAGACATTTTCAAACGATTACCCACC--TCCGGGACTGAGGCCCCAC	141	0.73	72
2	CAATGGAAAAGACATTTTCAAACGATTACCCACC--TCCGGGACTGAGGCCCCAC	11	0.057	73
3	CAATGGAAAAGACATTTTCAAACGATTACCCACC-----GGGACTGAGGCCCCAC	3	0.015	74
4	CAATGGAAAAGACATTTTCAAACGATTACCC-----GGGACTGAGGCCCCAC	2	0.010	75
5	C-----ACTGAGGCCCCAC	2	0.010	76
6	CAATGGAAAAGACATTTTCAAACGATTACCCACCCTCCGGGACTGAGGCCCCAC	2	0.010	77
7	CAATGGAAAAGACATTTTCAAACGATTACCC-----TCCGGGACTGAGGCCCCAC	1	0.005	78
8	CAATGGAAAAGACATTTTCAAACGATTACCC-----GGGACTGAGGCCCCAC	1	0.005	79
9	CAATGGAAAAGACATTTTCAAACGATTACCC-----TGAGGCCCCAC	1	0.005	80
10	CAATGGAAAAGACATTTTCAAACGATTACCC-----CGGACTGAGGCCCCAC	1	0.005	81
11	CAATGGAAAAGACATTTTCAAACGATTACAC-----GGGCCAC	1	0.005	82
12	CAATGGAAAAGACATTTTC-----TCCGGGACTGAGGCCCCAC	1	0.005	83
13	CAATGGAAAAGACATTTTCAAACG-----CTCCGGGACTGAGGCCCCAC	1	0.005	84
14	CAATGGAAAAGACATTTTCAAACGAT-----CCGGGACTGAGGCCCCAC	1	0.005	85
15	CAATGGAAAAGACATTTTCAAACGATAC-----CCAC	1	0.005	86
16	CAATGGAAAAGACATTTTCAAACGATTACCCCTCCGGGACTGAGGCCCCAC	1	0.005	87
17	CAATGGAAAAGACATTTTCAAACGATTACCC-----TCCGGGACTGAGGCCCCAC	1	0.005	88
18	CAATGGAAAAGACATTTTCAAACGATTACCCCTCCGGGACTGAGGCCCCAC	1	0.005	89

图5

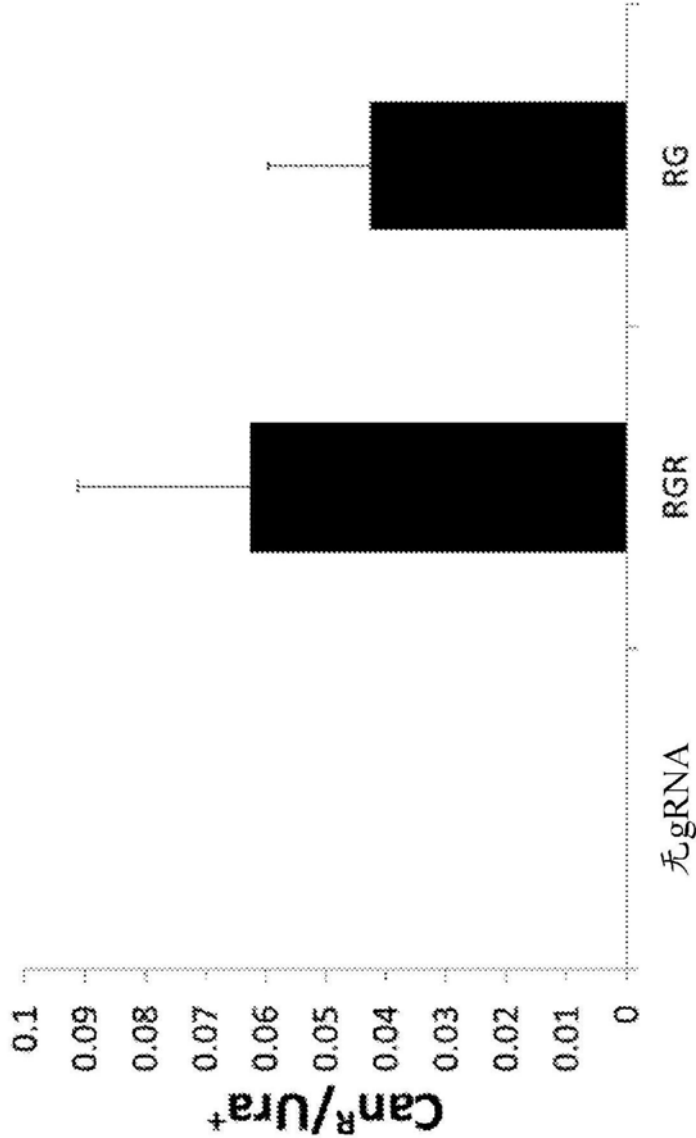


图6

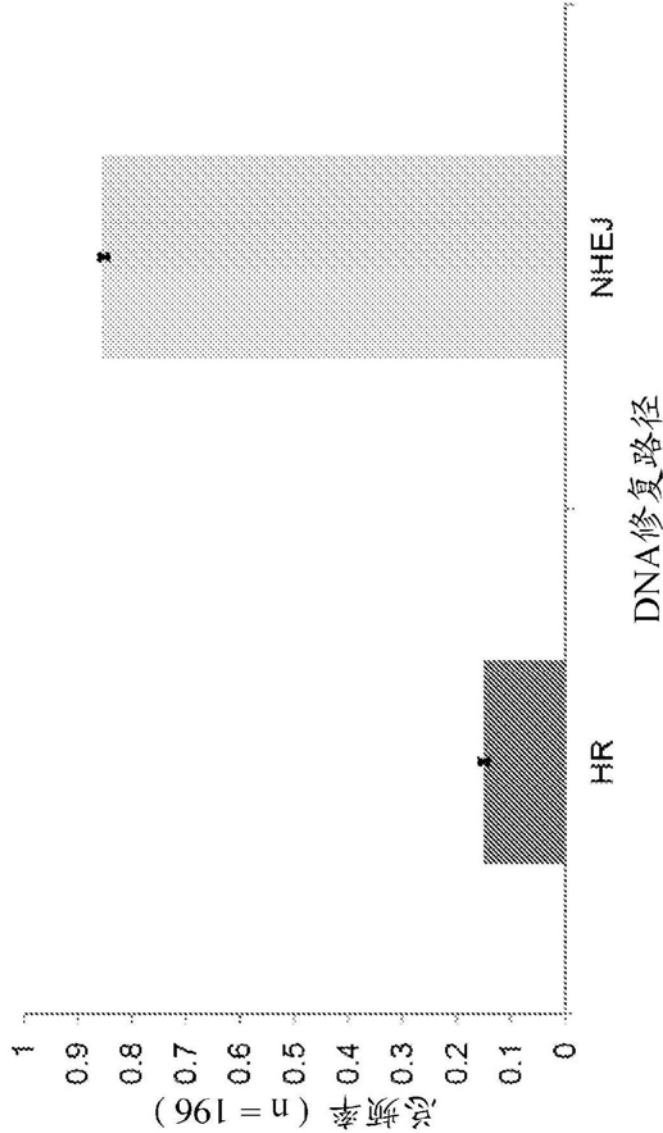


图7

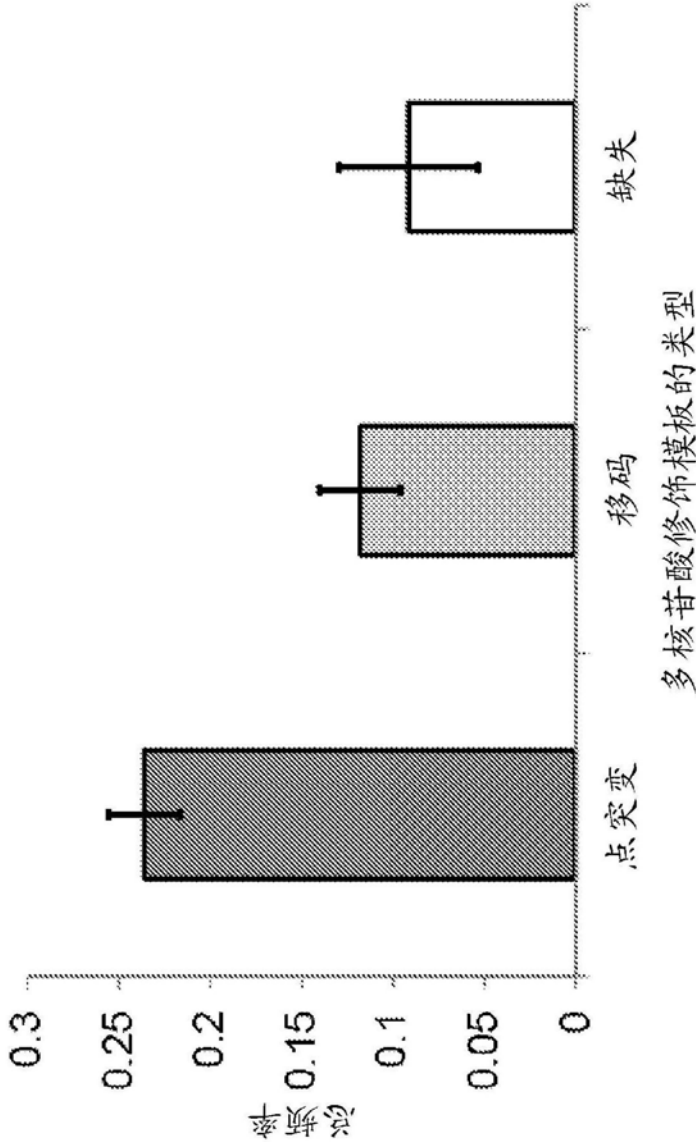


图8

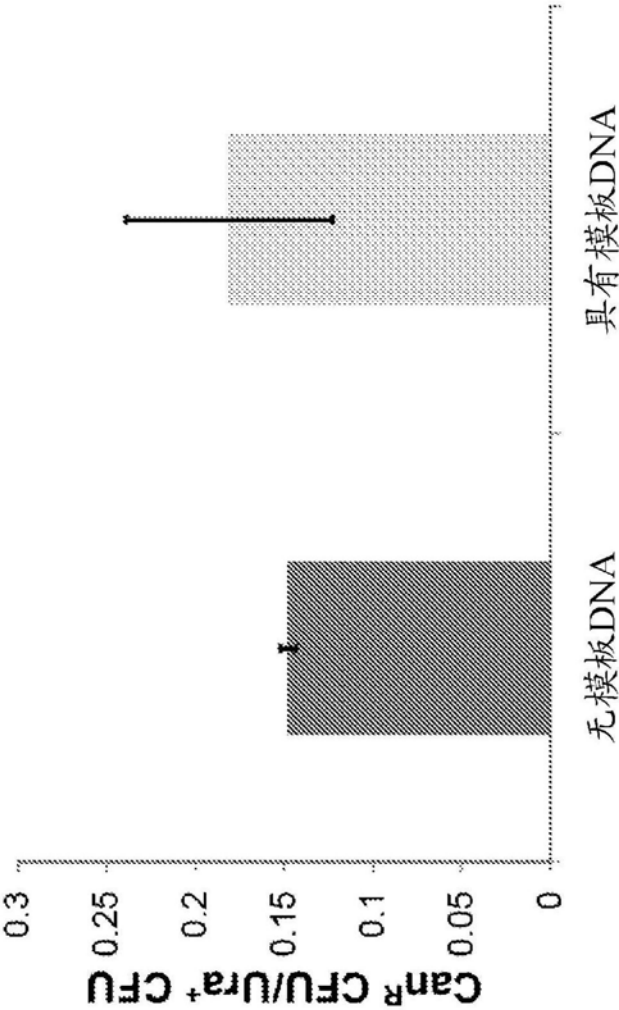


图9

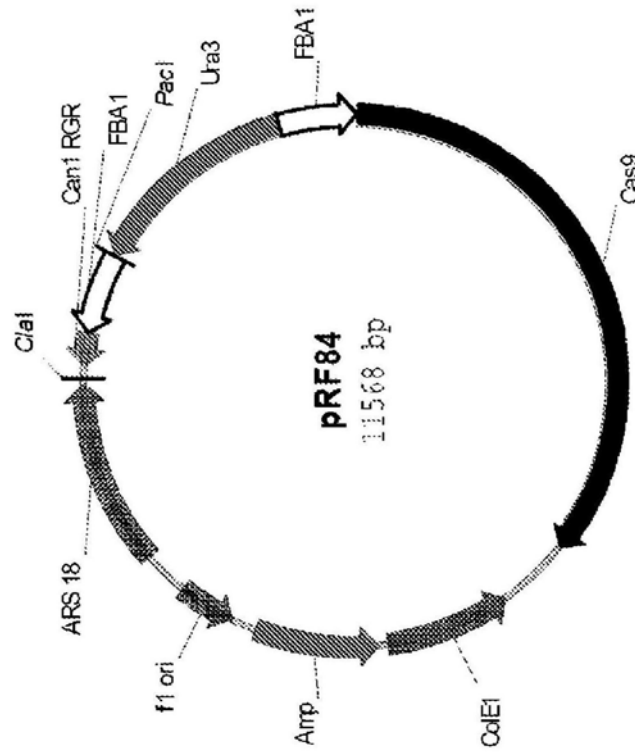


图10A

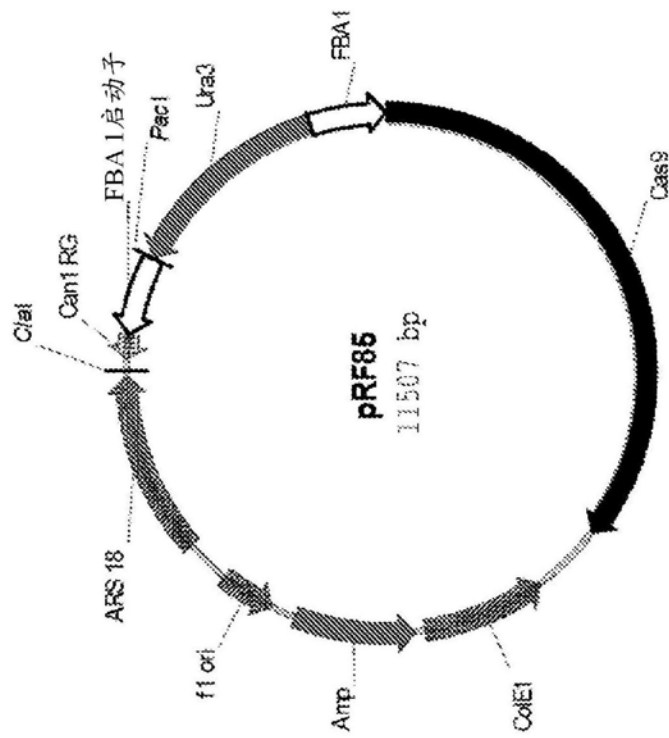


图10B

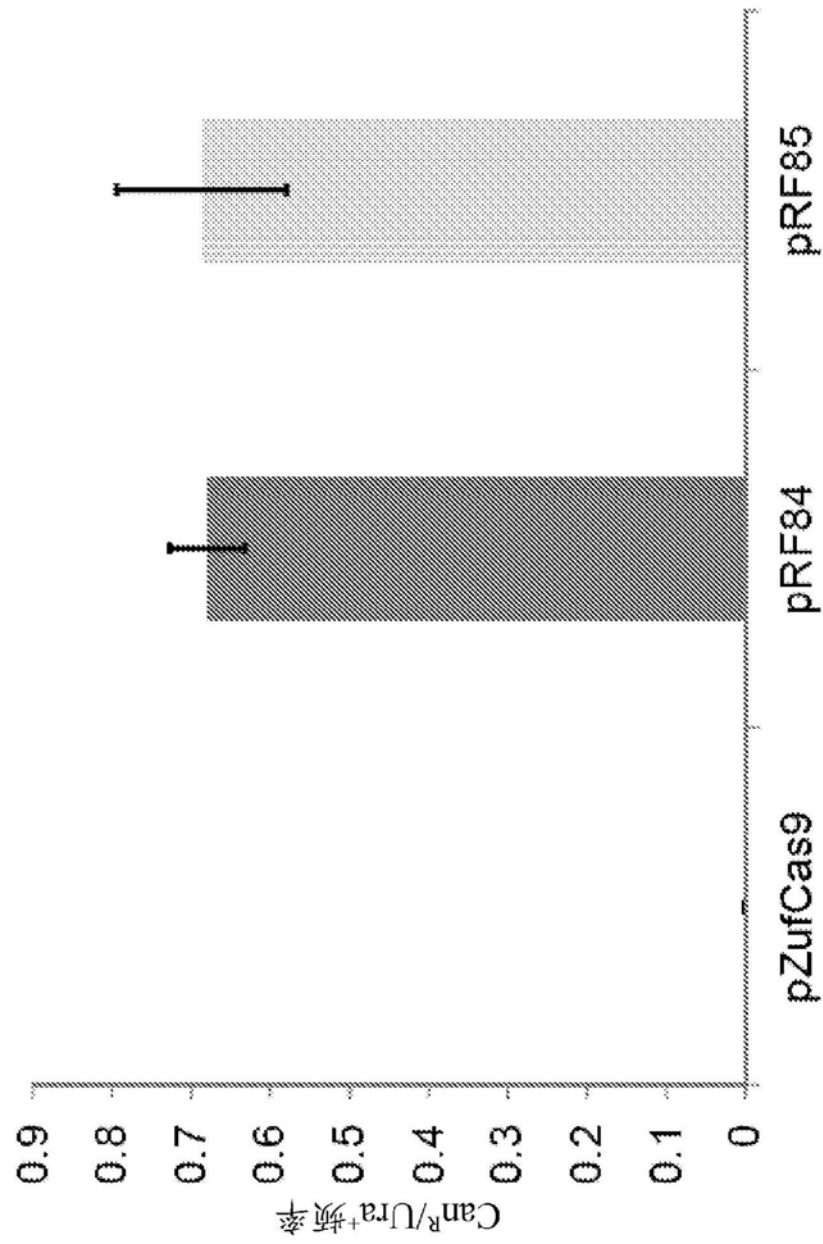


图11

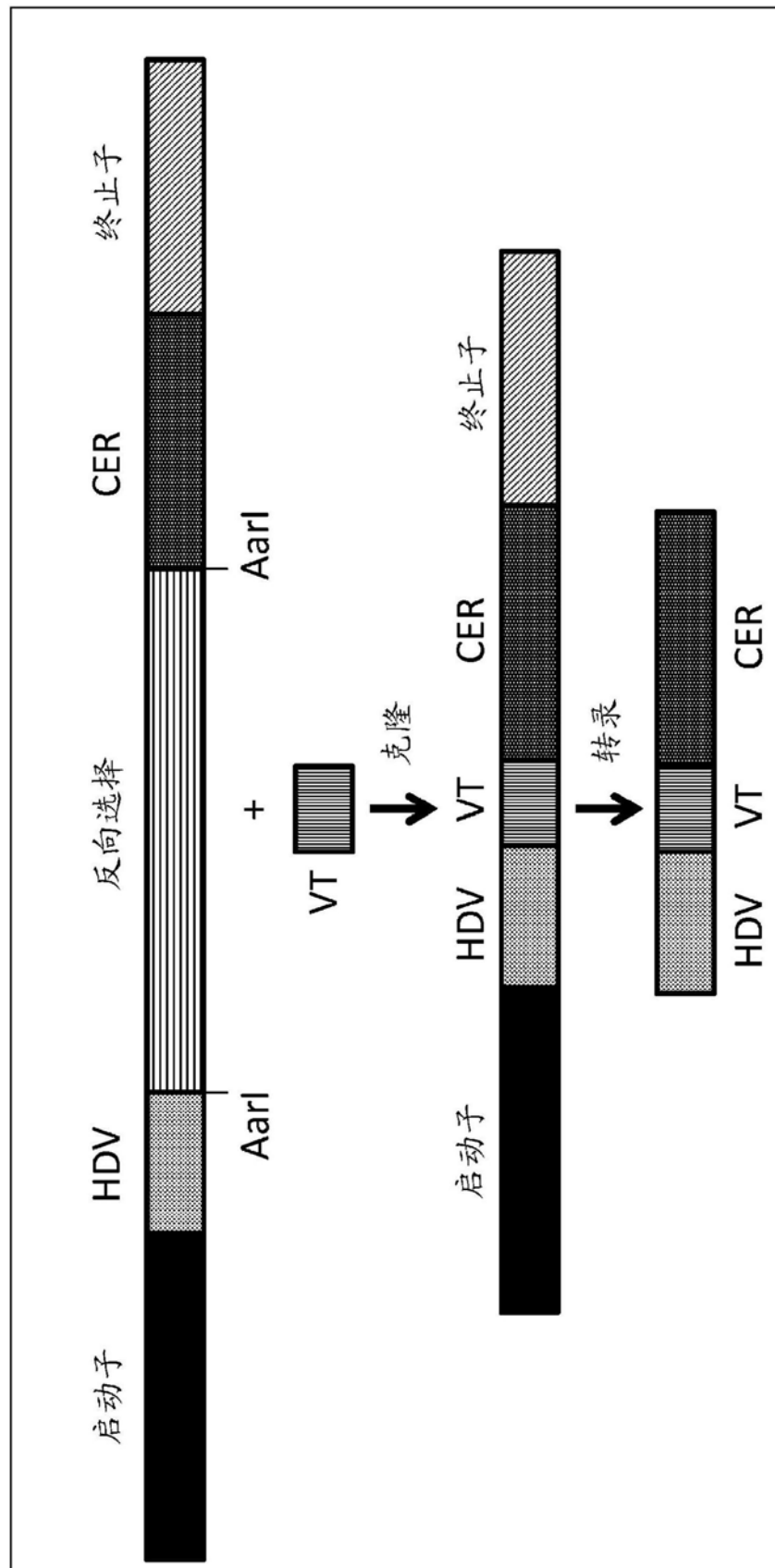


图12-A

AATGGGACTcaaacgattaccacccctcGTTT
CCTGagtttgctaatgggtgggagCAAAATCT

SEQ ID NO: 99
SEQ ID NO: 100

图12-B

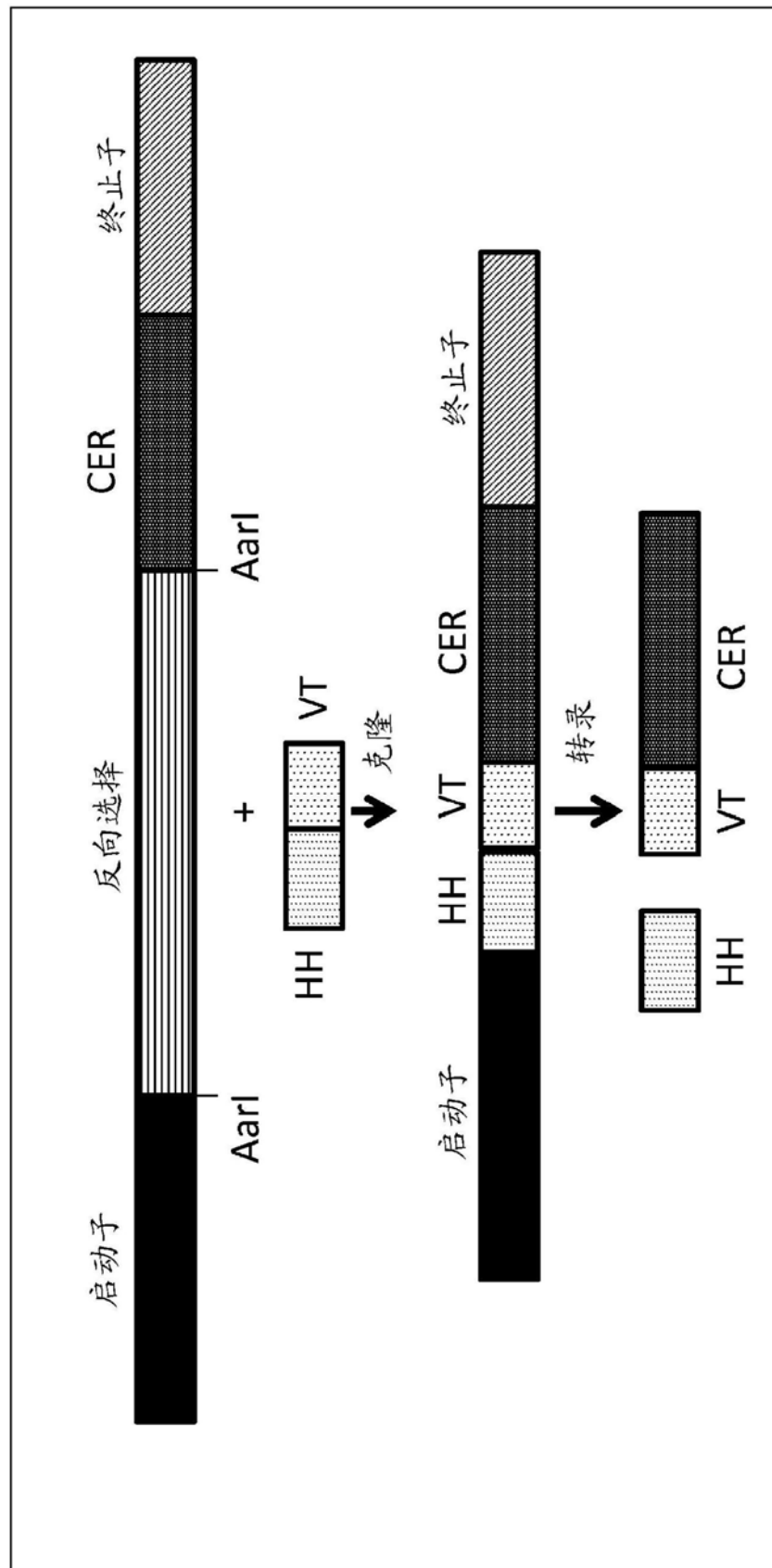


图13-A

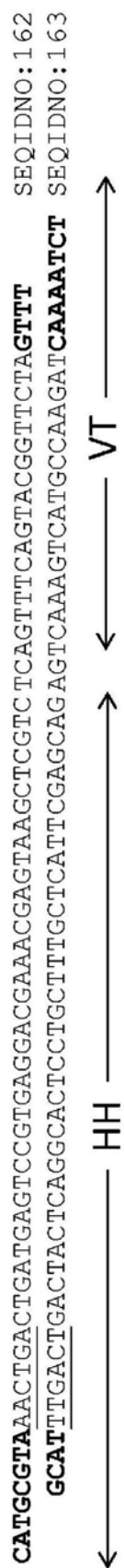


图13-B

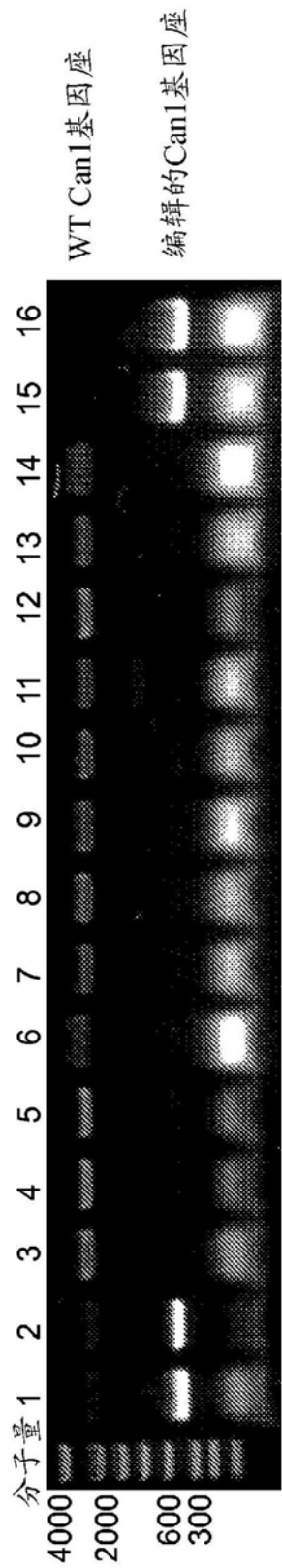


图14

<u>质粒URA3</u>	
URA3.1	CGTCCTCCTTCTTCTGTTTCAGAGACAGTTTCCTCGGCACCAAGCTCGCAGGCCA SEQ ID NO: 175
菌落1	CGTCCTCCTTCTTCTGTTTCAGAGACAGTT-CCTCGGCACCAAGCTCGCAGGCCA SEQ ID NO: 176
菌落2	CGTCCTCCTTCTTCTGTTTCAGAGACAGT--CCTCGGCACCAAGCTCGCAGGCCA SEQ ID NO: 177
菌落3	CGTCCTCCTTCTTCTGTTTCAGAGACAGTT-CCTCGGCACCAAGCTCGCAGGCCA SEQ ID NO: 178
菌落5	CGTCCTCCTTCTTCTGTTTCAGAGACAGTT-CCTCGGCACCAAGCTCGCAGGCCA SEQ ID NO: 179
菌落6	CGTCCTCCTTCTTCTGTTTCAGAGACAGTT-CCTCGGCACCAAGCTCGCAGGCCA SEQ ID NO: 180
<u>基因组URA3</u>	
URA3.1	CGTCCTCCTTCTTCTGTTTCAGAGACAGTTTCCTCGGCACCAAGCTCGCAGGCCA SEQ ID NO: 175
菌落1	CGTCCTCCTTCTTCTGTTTCAGAGACAGTN-CCNCGGCCCC SEQ ID NO: 181
菌落2	CGTCCTCCTTCTTCTGTTTCAGAGACAGTT A CCTCGGCACCAAGCTCGCAGGCCA SEQ ID NO: 182
菌落3	CGTCCTCCTTCTTCTGTTTCAGAGACAGTTT-----CAGCTCGCAGGCCA SEQ ID NO: 183
菌落5	CGTCCTCCTTCTTCTGTTTCAGANACAGTTT---GGCACCANCTCGCAGGCCA SEQ ID NO: 184
菌落6	CGTCCTCCTTCTTCTGTTTCAGAGACAGTTT C CCTCGGCACCAAGCTCGCAGGCCA SEQ ID NO: 185

图15

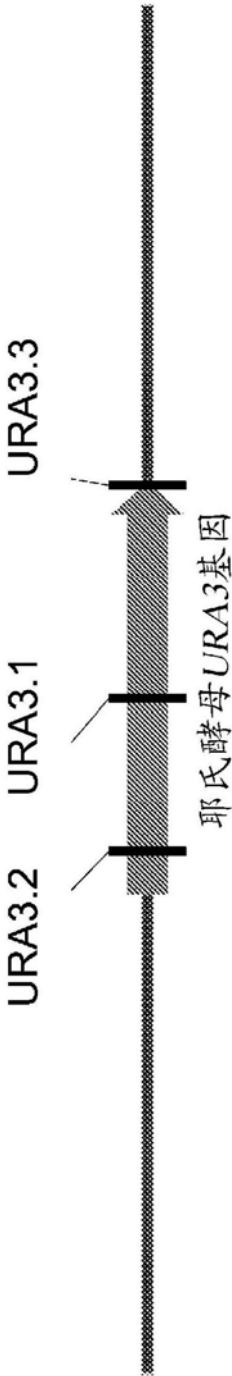


图16-A

pYRH222	URA3.2			
WT	AAACCAACCTGTGTGCTTCTCTGGATGTTACCAACCA	SEQ ID NO:	195	
菌落3	AAACCAACCTGTGT T GNTNNNG	SEQ ID NO:	196	
菌落4	AAACCAACCTGTGT TT CTNGGNTNNNCCCCCCC	SEQ ID NO:	197	
菌落5	AAACCAACCTGTGT TTG TCTCTGGATGTTACCAACNN	SEQ ID NO:	198	
菌落6	AAACCAACCTGTGT TT TCNNGGNNNT	SEQ ID NO:	199	
菌落9	AAACCAACCTGTGT TT GCCTTCTCTGGATGT	SEQ ID NO:	200	
菌落10	AAACCAACCTGTGNTTTCNNNNNGNNNTNCCNCCCCNA	SEQ ID NO:	201	

图16-B

PVRH282		URA3.2	URA3.1	SEQ ID NO
WT	AAACCAA	CCT GTGTGCTTCTCTGGATGTT	GCTGGTGG CCG AGGAAACTGTCTCTGAACAGAAAGA	202
23	AAACCAA	CCT GTG-----	-----AAACTGTCTCTGAACAGAAAGA	203
24	AAACCAA	CCT GTG-----	-----AAACTGTCTCTGANCNNAANA	204

缺失
缺失

图16-C

PVRH283		URA3.2		URA3.3		SEQ ID NO
WT	AAACCAACCTGTGTGCTTCTCTGGATGTT	ATTAACCTGTAGAGGTTAGACTA	TGGATATGTA	205		
27	AAACCAACCTGTGT	缺失	CTATGGATATGTA	206		
36	AAACCAACCTGTG	缺失	GATATGTA	207		

图16-D

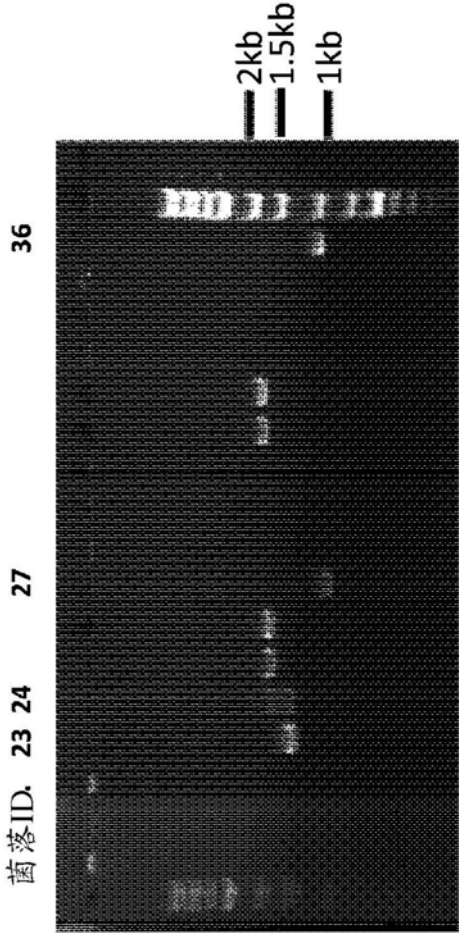


图17

CAN1-WT	GAAAAGACATTTTCAAACGATTACCCACCCCTCC CGGG ACTGAGGCC	SEQ ID NO:	215
菌落 14	GAAAAGACATTTTCAAACGATTACCCACCC-TCC CGGG ACTGAGGCC	SEQ ID NO:	216
菌落 16	GAAAAGACATTTTCAAACGATTACCCACCCCTCC CGGG ACTGAGGCC	SEQ ID NO:	217
菌落 18	GAAAAGACATTTTCAAACGATTACCCACCC-TCC CGGG ACTGAGGCC	SEQ ID NO:	218
菌落 19	GAAAANACNTTTTCAAACGATTACCCACCC-TCC CGGG ACTGAGGCC	SEQ ID NO:	219
菌落 24	GAAAAGACATTTTCAAACGATTACCCACCC-TCC CGGG ACTGAGGCC	SEQ ID NO:	220
菌落 25	GAAAAGACATTTTCAAACGATTACCCACCC-TCC CGGG ACTGAGGCC	SEQ ID NO:	221

图18