



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116670154 A

(43) 申请公布日 2023. 08. 29

(21) 申请号 202180064967.4

(22) 申请日 2021.07.26

(30) 优先权数据

63/056,125 2020.07.24 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.03.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/043151 2021.07.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/020800 EN 2022.01.27

(71) 申请人 总医院公司

地址 美国马萨诸塞州

申请人 哈佛大学

(72) 发明人 J·K·乔昂格 P·卡贝塞拉斯

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事

务所(普通合伙) 11277

专利代理师 李茂家 闫俊萍

(51) Int.Cl.

C07K 14/01 (2006.01)

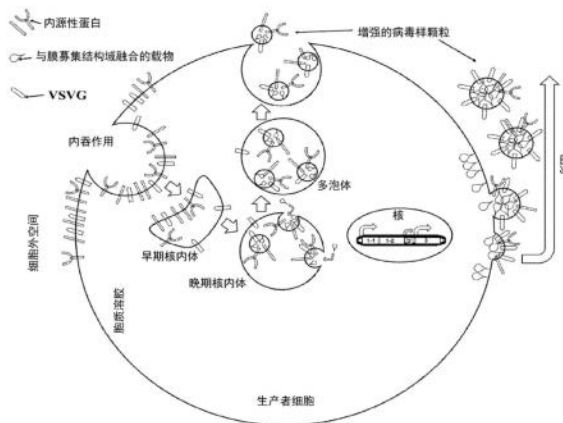
权利要求书2页 说明书61页 附图24页

(54) 发明名称

增强的病毒样颗粒及使用其递送至细胞的方法

(57) 摘要

一种增强的病毒样颗粒 (eVLP), 其包括: 在外侧的、包含具有一种或多种源自病毒的糖蛋白的磷脂双层的膜; 和在膜的内侧的、配置在eVLP的核心的载物, 其中eVLP不包含外源性gag/pol蛋白, 以及使用其将载物递送至细胞的方法。



1. 一种增强的病毒样颗粒(eVLP),其包括:
在外侧的、包含具有一种或多种源自病毒的糖蛋白、任选如表1中所示的糖蛋白的磷脂双层的膜;和
在所述膜的内侧的、配置在eVLP的核心的载物,
其中所述eVLP不包含外源性gag和/或pol蛋白。
2. 根据权利要求1所述的eVLP,其中所述载物为治疗性蛋白质或诊断性蛋白质或者编码治疗性蛋白质或诊断性蛋白质的核酸、或者化学物质、任选地治疗性小分子或诊断性小分子。
3. 根据权利要求1所述的eVLP,其中所述载物为基因编辑试剂。
4. 根据权利要求1所述的eVLP,其中所述基因编辑试剂包含锌指(ZF)、转录激活因子样效应物(TALE)、和/或基于CRISPR的基因组编辑或调节蛋白;编码锌指(ZF)、转录激活因子样效应物(TALE)、和/或基于CRISPR的基因组编辑或调节蛋白的核酸;或包含基于CRISPR的基因组编辑或调节蛋白的核糖核蛋白复合物(RNP)。
5. 根据权利要求4所述的eVLP,其中所述基因编辑试剂选自表2、3、4和5中列出的蛋白质。
6. 根据权利要求4所述的eVLP,其中所述基因编辑试剂包含基于CRISPR的基因组编辑或调节蛋白,并且所述eVLP进一步包含一种或多种向导RNA,所述向导RNA结合至所述基于CRISPR的基因组编辑或调节蛋白,并且将所述基于CRISPR的基因组编辑或调节蛋白引导至靶序列。
7. 根据权利要求1-6所述的eVLP,其中所述载物包含与细胞质膜募集结构域、优选如表6中所示的细胞质膜募集结构域的融合物。
8. 一种将载物递送至靶细胞的方法,所述靶细胞任选为体内细胞或体外细胞,所述方法包括使所述细胞与包含所述载物的权利要求1-7所述的eVLP接触。
9. 一种生产包含载物的eVLP的方法,所述方法包括:
提供表达一种或多种源自病毒的糖蛋白(任选如表1中所示)和载物的细胞,其中所述细胞不表达外源性gag和/或pol蛋白;和
将所述细胞维持在使所述细胞生产eVLP的条件下。
10. 根据权利要求9所述的方法,其进一步包括收获和任选地纯化和/或浓缩生产的eVLP。
11. 根据权利要求9所述的方法,其中所述载物为治疗性蛋白质或诊断性蛋白质或者编码治疗性蛋白质或诊断性蛋白质的核酸、或者小分子、任选地治疗性小分子或诊断性小分子。
12. 根据权利要求9所述的方法,其中所述载物为基因编辑试剂。
13. 根据权利要求9所述的方法,其中所述基因编辑试剂包含锌指(ZF)、转录激活因子样效应物(TALE)、和/或基于CRISPR的基因组编辑或调节蛋白;编码锌指(ZF)、转录激活因子样效应物(TALE)、和/或基于CRISPR的基因组编辑或调节蛋白的核酸;或包含基于CRISPR的基因组编辑或调节蛋白的核糖核蛋白复合物(RNP)。
14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述基因编辑试剂选自表2、3、4和5中列出的蛋白质。

15. 根据权利要求13所述的方法,其中所述基因编辑试剂包含基于CRISPR的基因组编辑或调节蛋白,并且所述eVLP进一步包含一种或多种向导RNA,所述向导RNA结合至所述基于CRISPR的基因组编辑或调节蛋白,并且将所述基于CRISPR的基因组编辑或调节蛋白引导至靶序列。

16. 根据权利要求9-15所述的方法,其中所述载体包含与细胞质膜募集结构域、优选如表6中所示的细胞质膜募集结构域的融合物。

17. 一种表达一种或多种源自病毒的糖蛋白(任选如表1中所示)和载物的细胞,其中所述细胞不表达外源性gag蛋白。

18. 根据权利要求17所述的细胞,其中所述载体为治疗性蛋白质或诊断性蛋白质或者编码治疗性蛋白质或诊断性蛋白质的核酸、或者小分子、任选地治疗性小分子或诊断性小分子。

19. 根据权利要求17所述的细胞,其中所述载体为基因编辑试剂。

20. 根据权利要求17所述的细胞,其中所述基因编辑试剂包含锌指(ZF)、转录激活因子样效应物(TALE)、和/或基于CRISPR的基因组编辑或调节蛋白;编码锌指(ZF)、转录激活因子样效应物(TALE)、和/或基于CRISPR的基因组编辑或调节蛋白的核酸;或包含基于CRISPR的基因组编辑或调节蛋白的核糖核蛋白复合物(RNP)。

21. 根据权利要求20所述的细胞,其中所述基因编辑试剂选自表2、3、4和5中列出的蛋白质。

22. 根据权利要求20所述的细胞,其中所述基因编辑试剂包含基于CRISPR的基因组编辑或调节蛋白,并且所述eVLP进一步包含一种或多种向导RNA,所述向导RNA结合至所述基于CRISPR的基因组编辑或调节蛋白,并且将所述基于CRISPR的基因组编辑或调节蛋白引导至靶序列。

23. 根据权利要求17-22所述的细胞,其中所述载体包含与细胞质膜募集结构域、优选如表6中所示的细胞质膜募集结构域的融合物。

24. 根据权利要求17-23所述的细胞,其中所述细胞为原代或稳定的人细胞系。

25. 根据权利要求24所述的细胞,其为人胚肾(HEK)293细胞或HEK293T细胞。

增强的病毒样颗粒及使用其递送至细胞的方法

[0001] 优先权要求

[0002] 本申请要求于2020年7月24日提交的美国临时专利申请系列号63/056,125的权益。前述申请的全部内容通过引用在此并入本文。

[0003] 联邦资助的研究或开发

[0004] 本发明由美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health) 授予的授权号 GM118158 在政府的支持下完成。美国政府享有本发明的某些权利。

技术领域

[0005] 本文中描述了增强的病毒样颗粒 (eVLP), 其包括: 在外侧的、包含具有一种或多种源自病毒的糖蛋白的磷脂双层的膜; 和在膜的内侧的、配置在eVLP的核心的载物 (cargo), 其中eVLP不包含来自任何人内源性或外源性病毒gag或pol的蛋白, 以及使用其将载物递送至细胞的方法。

背景技术

[0006] 例如蛋白质、核酸和/或化学物质等载物向活细胞的胞质溶胶中的递送已是生物治疗学的发展中的一项重大障碍。

发明内容

[0007] 本文中描述了增强的病毒样颗粒 (eVLP), 其能够将多种多样的有效负载物 (payload), 例如, 包括核酸 (DNA、RNA) 或蛋白质的生物分子、包括小分子的化学化合物、和/或其它分子、及其任意组合包装和递送至真核细胞中。本文中描述的非病毒eVLP系统具有比传统的人工衍生的脂质/金纳米颗粒和基于病毒颗粒的递送系统更简单、更有效和更安全的潜能, 这至少因为, 除了ENV以外, eVLP不具有源自病毒的组分, eVLP可以利用但是不需要基于化学物质的二聚体, 并且eVLP具有包装和递送以下物质的能力: 特殊的 (specialty) 单链和/或双链DNA分子 (例如, 质粒、微环、封闭末端线性DNA、AAV DNA、附加体、噬菌体DNA、同源定向修复模板等)、单链和/或双链RNA分子 (例如, 单向导RNA、引导编辑 (prime editing) 向导RNA、信使RNA、转移RNA、长链非编码RNA、环状RNA、RNA复制子、环状或线性剪接RNA、微小RNA、小干扰RNA、短发夹RNA、piwi相互作用RNA、支点开关RNA、可以由RNA结合蛋白结合的RNA、噬菌体RNA、含有RNA的内部核糖体进入位点等)、蛋白质、化学化合物和/或分子, 以及以上列出的载物的组合 (例如AAV颗粒)。本文中描述的eVLP不同于传统的逆转录病毒颗粒、病毒样颗粒 (VLP)、外泌体 (exosome) 和其它先前描述的可负载有载物的细胞外囊泡, 这是因为膜构成、很多不同的可能的载物 (借助新型、创新性负载策略而使其成为可能)、缺少限制性DNA/RNA长度约束、缺少源自任何病毒gag或pol的蛋白质、和细胞进入的机制。

[0008] 本文中描述了用于载物递送的组合物和方法, 其可与多种多样的蛋白质和核酸分子, 包括适用于许多疾病疗法的基因组编辑试剂、表观基因组调节试剂、转录组编辑试剂和

蛋白质组调节试剂一起使用。

[0009] 因此,本文中提供了eVLP,其包括:在外侧的、包含具有一种或多种源自病毒的糖蛋白(例如,如表1中所示)的磷脂双层的膜;和任选在膜的内侧的、配置在eVLP的核心的载物,其中eVLP不包含任何gag和/或pol蛋白。

[0010] 本文中还提供用于将载物递送至靶细胞例如体内细胞或体外细胞的方法。该方法包括使细胞与包含生物分子和/或化学物质作为载物的如本文中所述的eVLP接触。

[0011] 此外,本文中提供了用于生产例如包含生物分子载物的eVLP的方法。该方法包括提供表达一种或多种源自病毒的糖蛋白(ENV)(例如,如表1中所示)、和载物生物分子和/或化学物质的细胞,其中该细胞不表达外源性gag和/或pol蛋白;和将该细胞维持在使该细胞生产eVLP的条件下。

[0012] 在一些实施方案中,该方法包括收获和任选地纯化和/或浓缩生产的eVLP。

[0013] 在一些实施方案中,该方法包括使用这样的细胞,其已经过或未经过操作以表达除了ENV(例如,如表1中所示)以外的任何外源性蛋白,和根据需要的细胞质膜募集结构域(例如,如表6中所示)。在该实施方案中,通过利用与载物混合的纯化颗粒的核转染、脂质、聚合物、或CaCl₂转染、超声处理、冻融和/或热冲击,所生产的“空”颗粒可负载有载物。在所有实施方案中,生产者细胞不表达任何病毒gag蛋白。这种类型的负载允许载物通过与细胞质膜募集结构域的融合而不被修饰,并且显示与先前的VLP技术相比的重大进步。

[0014] 本文中还提供表达一种或多种源自病毒的糖蛋白(例如,如表1中所示)和载物的细胞,其中该细胞不表达外源性gag蛋白。在一些实施方案中,该细胞为原代或稳定的人细胞系,例如,人胚肾(HEK)293细胞或HEK293 T细胞。

[0015] 在一些实施方案中,颗粒的外表面可以包含scFv、纳米抗体、darpins和/或其它靶向肽以使细胞特异性进入成为可能。

[0016] 在一些实施方案中,生物分子载物为治疗性蛋白质或诊断性蛋白质或者编码治疗性蛋白质或诊断性蛋白质的核酸。

[0017] 在一些实施方案中,载物为化学化合物或分子。

[0018] 在一些实施方案中,化学分子是蛋白质-蛋白质二聚化或多聚化的触发器,例如A/C异二聚物或雷帕霉素。

[0019] 在一些实施方案中,化学化合物为DNA PK抑制剂,例如有效地增强同源定向修复基因编辑的M3814、NU7026或NU7441。

[0020] 在一些实施方案中,载物为基因编辑试剂。

[0021] 在一些实施方案中,基因编辑试剂包含锌指(ZF)、转录激活因子样效应物(TALE)、和/或基于CRISPR的基因组编辑或调节蛋白;编码锌指(ZF)、转录激活因子样效应物(TALE)、和/或基于CRISPR的基因组编辑或调节蛋白的核酸;或包含基于CRISPR的基因组编辑或调节蛋白的核糖核蛋白复合物(RNP)。

[0022] 在一些实施方案中,基因编辑试剂选自表2、3、4和5中列出的蛋白质。

[0023] 在一些实施方案中,基因编辑试剂包含基于CRISPR的基因组编辑或调节蛋白,并且eVLP进一步包含一种或多种向导RNA,所述向导RNA结合至基于CRISPR的基因组编辑或调节蛋白,并且将基于CRISPR的基因组编辑或调节蛋白引导至靶序列。

[0024] 在一些实施方案中,载物包含与细胞质膜募集结构域、优选如表6中所示的细胞质

膜募集结构域的共价或非共价连接。共价连接,例如,可包括从单一阅读框产生的直接的蛋白质-蛋白质融合、可形成肽键的内含肽、可在R基团和/或RNA剪接处形成共价连接的其它蛋白质。非共价连接,例如,可包括DNA/DNA、DNA/RNA和/或RNA/RNA杂交体(核酸通过氢键相互作用与其它核酸碱基配对)、需要或不需化学化合物/分子诱导蛋白质-蛋白质结合的二聚化或多聚化的蛋白结构域、单链可变片段、纳米抗体、亲和体、与DNA和/或RNA结合的蛋白质、具有四级结构相互作用的蛋白质、在特定光波长的存在下可二聚化或多聚化的光遗传(optogenetic)蛋白结构域和/或自然重构分裂蛋白。

[0025] 在一些实施方案中,载物包含与二聚化结构域或蛋白质-蛋白质结合结构域的融合物,其可以需要或可以不需要分子来触发二聚化或蛋白质-蛋白质结合。

[0026] 在一些实施方案中,生产者细胞是FDA批准的细胞系、同种异体细胞和/或源自供体的自体细胞。

[0027] 在一些实施方案中,人CD47的完整或活性肽结构域可并入eVLP表面以降低免疫原性。

[0028] 本文包括的AAV蛋白的示例是AAV REP 52、REP 78和VP1-3。可插入蛋白质的衣壳位点是从VP1氨基酸计数开始的T138。例如,可在衣壳的这二位点处插入二聚化结构域。

[0029] 本文包括的可以需要或可以不需要小分子诱导剂的二聚化结构域的示例是dDZF1、dDZF2、DmrA、DmrB、DmrC、FKBP、FRB、GCN4 scFv、1 0x/24x GCN4、GFP纳米抗体和GFP。

[0030] 本文包括的断裂型内含肽(split intein)的示例是Npu DnaE、Cfa、Vma和Ssp DnaE。

[0031] 本文包括的其它一起形成共价键的断裂型蛋白质(split protein)的示例是Spy Tag和Spy Catcher。

[0032] 本文包括的RNA结合蛋白的示例是MS2、Com和PP7。

[0033] 本文包括的合成的DNA结合锌指的示例是ZF6/10、ZF8/7、ZF9、MK10、锌指268和锌指268/NRE。

[0034] 由本文包括的四级结构导致的多聚化的蛋白质的示例是大肠杆菌(E.coli)铁蛋白和铁蛋白的其它嵌合形式。

[0035] 本文包括的光遗传“光诱导蛋白”的示例是Cry2、CIBN和Lov2-Ja。

[0036] 本文包括的增强转导肽的示例是L17E、Vectofusin、KALA和不同形式的乳酸链球菌肽(nisin)。

[0037] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同。本文描述了用于本发明的方法和材料也可以使用本领域已知的其它合适的方法和材料。材料、方法和实施例仅是说明性的而不是限制性的。本文提及的所有出版物、专利申请、专利、序列、数据库条目和其它参考文献均通过引用整体并入。如有冲突,以本说明书(包括定义)为准。

[0038] 本发明的其它特征和优点将从以下详细描述和附图以及权利要求中显而易见。

附图说明

[0039] 图1:用于RNP/蛋白质递送的示例性T2eVLP/T4eVLP生产和转导的描述。所有eVLP表达构建体稳定地整合在生产者细胞的基因组中。构建体1-1对应于磷脂双层募集结构域。

1-2对应于载物。2对应于任选的向导RNA。1-1和1-2在胞质溶胶中翻译,其中1-1和1-2在募集至磷脂双层之前与向导RNA复合。3对应于源自病毒的糖蛋白(VSVG)。源自病毒的糖蛋白在细胞质膜上作为跨膜蛋白表达并且有助于驱动含有载物的eVLP从细胞质膜至细胞外空间的出芽(budding)。这些颗粒被纯化,并能够与靶细胞融合以及通过与在靶细胞表面的表面受体相互作用来递送载物。

[0040] 图2:纯化的eVLP进入靶细胞并将载物递送至胞质溶胶中的描述。重要的是,只要载物具有核定位序列,磷脂双层募集结构域允许载物进入靶细胞核。

[0041] 图3:在具有或不具有来自hPLC δ 1或hAKT1的PH结构域的情况下,在VSVG假型化的T2eVLP中递送Cas9 RNP。PH结构域经由10个氨基酸的甘氨酸/丝氨酸多肽接头与Cas9的N末端融合。将HepG2、U2OS、HEK293T、CFPAC1、BeWo、Jurkat、K562和原代T细胞用经纯化且100x浓缩的T2eVLP处理72小时。VEGF位点#3的靶基因修饰百分比通过扩增子测序来确定。x轴标签对应于各T2eVLP制备物的内容物。Cas9(无融合)缺少PH结构域融合。Benzonase(Benz)用于降解VLP外部的RNA和DNA,并且包括经Benzonase处理的样品作为对照。

[0042] 图4:T1eVLP/T3eVLP生产的描述。参与转染的质粒DNA构建体编码载物、任选的向导RNA和源自病毒的糖蛋白(VSVG)。质粒或其它类型的DNA分子将分布在整个生产细胞中,因此置于核中的构建体将表达eVLP组分和载物,置于细胞质膜或核内体附近的构建体将被包封在出芽的eVLP中。

[0043] 图5A-B:示例性T1eVLP递送的spCas9体外基因组编辑。A)用含有与spCas9和sgRNA融合的劳氏肉瘤病毒gag的VLP、含有与spCas9和sgRNA融合的PLC pleckstrin异体同形(PH)的T1eVLP、或含有与SV40核定位序列(NLS)和sgRNA融合的劳氏肉瘤病毒gag的VLP转导的U2OS eGFP和HEK293 eGFP细胞系。sgRNA靶向GFP。转导后72小时进行流式细胞术或T7E1。劳氏肉瘤病毒gag VLP用作对照。B)来自图5A中的实验的U2OS或293细胞的亚群的T7E1分析。将eVLP和VLP用VSVG假型化。

[0044] 图6:示例性T1eVLP递送的spCas9体外基因组编辑。用靶向HEK位点#3或VEGF位点#2的、含有与spCas9融合的PLC PH的T1eVLP转导的U2OS细胞。将eVLP用VSVG假型化。基因修饰通过扩增子测序来测量。

[0045] 图7:示例性T1eVLP递送的spCas9体外基因组编辑。用靶向VEGF位点#3的、含有与spCas9融合的PLC PH或hAkt PH的T1eVLP转导的U2OS细胞。将eVLP用VSVG假型化。基因修饰通过扩增子测序来测量。

[0046] 图8:示例性T1eVLP递送的spCas9体外碱基编辑。用靶向VEGF位点#2的、含有与spCas9 BE3或Gam-BE4以及sgRNA融合的劳氏肉瘤病毒gag的VLP或者靶向VEGF位点#2的、含有与spCas9 BE3或Gam-BE4以及sgRNA融合的PLC PH的T1 eVLP转导的HEK293T细胞。将eVLP和VLP用VSVG假型化。基因修饰通过扩增子测序来测量。劳氏肉瘤病毒gag VLP用作阳性对照。

[0047] 图9:示例性T1eVLP递送的spCas9体外碱基编辑。用靶向HEK位点#3的、含有与密码子优化的spCas9 BE4融合的PLC PH的T1eVLP转导的HEK293T细胞。将eVLP用VSVG假型化。基因修饰通过扩增子测序来测量。

[0048] 图10:示例性T1eVLP递送的spCas9体外碱基编辑。用靶向VEGF位点#3的、含有与密码子优化的spCas9 ABE融合的PLC PH的T1eVLP转导的HEK293T细胞。将eVLP用VSVG假型化。

基因修饰通过扩增子测序来测量。

[0049] 图11:示例性T1eVLP递送的spCas9体外碱基编辑。用靶向HEK位点#3的、含有与密码子优化的spCas9 ABE融合的PLC PH的T1eVLP转导的HEK293T细胞。将eVLP用VSVG假型化。基因修饰通过扩增子测序来测量。

[0050] 图12:示例性T1eVLP递送的asCas12a体外基因组编辑。用含有劳氏肉瘤病毒gag的VLP或含有与asCas12a融合的PLC PH的T1eVLP转导的HEK293细胞。VLP和eVLP通过crRNA靶向FANCF位点#1。基因修饰通过T7E1来测量。劳氏肉瘤病毒gag VLP用作阳性对照。

[0051] 图13:示例性T1eVLP递送的spCas9体外基因组编辑。用含有与RNA结合蛋白MS2融合的PLC PH的T1eVLP转导的HEK293细胞。MS2结合至sgRNA中的MS2茎环,所述MS2茎环与Cas9复合,并且MS2与用于有效eVLP负载的PH结构域融合。eVLP通过sgRNA靶向GFP位点#1。基因修饰通过T7E1来测量。

[0052] 图14:示例性T1eVLP递送的spCas9体外基因组编辑。用含有与二聚化结构域(DmrC)融合的PLC PH的T1eVLP转导的HEK293细胞。在A/C异二聚物分子的存在下,DmrC结合至与Cas9直接融合的DmrA。eVLP通过sgRNA靶向GFP位点#1。基因修饰通过T7E1来测量。

[0053] 图15:示例性T1eVLP递送的asCas9体外基因组编辑。用含有与GNC4蛋白结构域重复序列(repeats)融合的PLC PH的T1eVLP转导的HEK293细胞。scFv结合至GNC4重复序列,并且scFv与Cas9直接融合。eVLP通过sgRNA靶向GFP位点#1。基因修饰通过T7E1来测量。

[0054] 图16-40:各种示例性eVLP构成和可能的载物的示意性说明。

具体实施方式

[0055] 治疗性蛋白质和核酸具有极大的前景,但对于这些大生物分子中的许多,递送至细胞中是临床开发的障碍。基因组编辑试剂,例如锌指核酸酶(ZFN)或RNA向导的、酶活性/非活性DNA结合蛋白例如Cas9,在特异性和可执行的编辑类型方面取得了快速进展,但安全体内递送的障碍仍然妨碍有效的基因编辑疗法。本文中描述了增强的病毒样颗粒(eVLP)的各种实施方案以及提供用于基因组编辑试剂的递送的新型且最佳的平台的eVLP的各种实施方案的特征,并且将eVLP与规范递送方式进行了对比。

[0056] 已开发逆转录病毒颗粒,例如慢病毒,以递送逆转录为DNA的RNA,该DNA可能会或可能不会整合至基因组DNA中。已开发VLP,其以它们的自组装能力模拟病毒颗粒,但由于它们缺少一些核心病毒基因,不具有传染性。慢病毒和VLP载体通常是通过采用质粒瞬时转染生产者细胞系来生产的,所述质粒编码生产慢病毒颗粒或VLP必要的所有组分。本发明人已发现的关于通过这种传统瞬时转染方法生产的慢病毒颗粒和基于VSVG的VLP的一个主要缺陷是,除了它们的常规载物外,这些颗粒包装和递送在初始瞬时转染中使用的质粒DNA。这种非目的质粒DNA递送可以是产生免疫原性的并导致不期望的作用,例如质粒DNA整合至基因组DNA中。指定在颗粒中待递送的生物分子/化学物质的类型是重要的,并且eVLP已被设计为具有这种恰当的能力。

[0057] 本文中描述的eVLP可以递送多种多样的载物,包括仅DNA、DNA+RNA+蛋白质、或RNA+蛋白质。重要的是,eVLP是第一种基于VSVG的VLP递送方式,其可以控制载物的形式(DNA、蛋白质和/或RNA)。除了目的蛋白质和/或RNA载物以外,先前描述的基于VSVG的囊泡和病毒颗粒包装并且递送通过瞬时转染引入颗粒生产者细胞的不需要的质粒DNA(或其它类型的

基于DNA的基因表达构建体)。

[0058] eVLP的另一方面为eVLP的表面上的ENV蛋白。在不希望被理论束缚的情况下,ENV蛋白单独负责eVLP颗粒生成和eVLP有效地将载物递送至细胞中的能力。慢病毒和VLP通常需要GAG和ENV蛋白来通过生产者细胞的细胞质膜出芽进入细胞培养基来驱动颗粒形成。此外,大多数逆转录病毒ENV蛋白需要以ENV蛋白的胞内结构域(ICD)的蛋白水解切割形式翻译后修饰,以激活ENV蛋白的融合性(fusogenicity);这对于病毒感染性是重要的。表1中描述的包膜蛋白均源自病毒。然而,这些eVLP ENV蛋白不需要用于颗粒形成的外源性GAG,并且它们不需要ICD切割以实现融合性。¹⁻³ ENV是eVLP的唯一源自病毒的组分,并且eVLP的外表面上的这些ENV糖蛋白用于促进eVLP融合/进入靶细胞,这是因为已知它们具有天然融合性。此外,eVLP不同于先前描述的病毒颗粒、VLP和细胞外囊泡,这是因为eVLP由核外颗粒体和外泌体的混合物构成,如果需要,可以将所述混合物通过纯化来分离。由于上述设计简化和优化,eVLP特别适用于递送包括以下的载物:DNA、RNA、蛋白质、或生物分子和/或化学物质的组合,例如编码DNA或基于RNP的基因组编辑试剂。

[0059] 包括蛋白质和蛋白质复合体的大生物分子例如基因组编辑试剂、尤其是基于CRISPR-CAS、锌指和TAL核酸酶的试剂具有潜能成为用于包括遗传疾病的许多疾病的治疗的体内治疗剂,但用于将这些试剂递送至细胞中的技术是严重受限或对患者不安全的。传统的治疗性单克隆抗体递送在利用对于蛋白质的直接注射是成功的。不幸的是,用于基因编辑蛋白,例如Cas9的直接注射的策略被免疫原性、降解、无效的细胞特异性以及无法穿过细胞质膜或逃逸核内体/溶酶体所阻碍。⁴⁻¹⁰蛋白质治疗和基因编辑的更广泛应用可通过将治疗性蛋白质载物递送至细胞的内部来实现。例如,Cas9不能有效地穿过磷脂双层进入细胞,并且已显示具有先天性和适应性免疫原性潜能。⁴⁻⁸因此,通过直接注射或作为与具有细胞毒性和免疫原性性质的脂质、蛋白质或基于金属的纳米颗粒的外部/内部缀合物递送Cas9是不切实际或不是有利的,并且通常产生低水平的期望的基因修饰。⁹⁻²⁰

[0060] 包封载物的纳米颗粒是另一种递送策略,其可用于将DNA、蛋白质、RNA和RNP递送至细胞中。⁹⁻¹⁸纳米颗粒可对于细胞特异性工程化,并可触发内吞作用和随后的核内体裂解。然而,由于人工衍生的载体外壳,纳米颗粒可具有不同水平的免疫原性。⁹⁻²⁰许多纳米颗粒依赖强的相反电荷分布来维持颗粒结构的完整性,并且静电可使其有毒且不适用于许多体内治疗情况。⁹递送RNA的纳米颗粒在最近的临床试验中已取得了成功,但大多数仅已用于递送siRNA或shRNA。来自这种纳米颗粒的毒性仍然是一个主要的担忧。⁹递送编码基因组编辑RNP的mRNA的纳米颗粒最近也已取得了成功,但与蛋白质递送相比,这些产生了更多数量的脱靶作用,并且RNA稳定性低于蛋白质的稳定性。¹⁷递送基因组编辑RNP和DNA的纳米颗粒已是一项重大突破,因为它们可充分利用同源定向修复(HDR)和非同源末端连接(NHEJ),但在体外和体内表现出极低的基因修饰频率,因此目前在体内作为基因编辑治疗剂的应用有限。¹⁵

[0061] 目前,用于递送基因组编辑治疗剂的临床标准载体是腺相关病毒(AAV)。尽管AAV载体是一种有前景的递送方式,其可成功地将DNA递送至真核细胞中,但AAV不能有效地包装和递送大于4.5kb的DNA构建体,且这妨碍了需要更大DNA表达构建体的许多基于CRISPR的基因编辑试剂的递送。基于CRISPR的基因编辑试剂可拆分成多个不同的AAV颗粒,但这种策略极大降低递送和编辑效率。根据所需的剂量,AAV和腺病毒载体可具有不同水平的免疫

原性。此外, AAV DNA构建体中的反向末端重复序列(ITR)可促进自发的附加体的形成, 导致基因组编辑试剂的延长的表达和增加的脱靶作用。ITR还可促进不期望的AAV DNA整合至基因组DNA中。²¹⁻²⁴

[0062] 最近, VLP已被利用于将mRNA和蛋白质载物递送至细胞的胞质溶胶中。^{2,3,25-30} VLP已显现作为逆转录病毒颗粒的替代递送方式。VLP可被设计为缺少整合逆转录病毒DNA的能力, 并设计为包装和递送蛋白质/RNP/DNA。然而, 至今已知的大多数VLP包括最近构思的递送基因组编辑试剂的VLP, 利用HIV或其它病毒衍生的gag-pol蛋白融合物和病毒蛋白酶以产生逆转录病毒样颗粒。^{25-27,29,30} 第二, 一些含有RGN的VLP还必须包装和表达来自慢病毒DNA转录物的向导RNA。²⁷ 第三, 为了形成功能颗粒并释放基因组编辑载物, 一些VLP需要病毒蛋白酶。^{25-27,29} 由于这种病毒蛋白酶在多个氨基酸基序识别并切割, 它可引起对蛋白质载物的损坏, 这可能对治疗性应用有害。第四, 迄今为止, 大多数公布的递送基因组编辑蛋白的VLP方式由于低的包装和转导效率而表现出低的体外和体内基因修饰效率。²⁵⁻²⁷ 第五, 这些VLP组分利用的复杂病毒基因组具有多个阅读框并使用RNA剪接, 这可导致递送虚假的融合蛋白产物。^{25-27,29,30} 第六, 由于免疫原性和脱靶编辑问题, 这些VLP中逆转录酶、整合酶、衣壳和病毒衍生的包膜蛋白的存在对于大多数治疗性应用不理想。最后, 大多数逆转录病毒颗粒, 例如慢病毒颗粒, 都是VSVG假型化的, 并且迄今为止, 几乎所有描述的递送基因组编辑试剂的VLP具有并依赖VSVG。^{2,3,25-30} 本发明人已发现通过瞬时转染生产者细胞形成的基于VSVG的颗粒包装并递送转染的DNA。基于VSVG的VLP的目前的版本无法防止这种DNA的无意的递送, 这阻碍了VLP在需要最小免疫原性和脱靶作用的情况下的使用。

[0063] 细胞外囊泡是另一种递送方式, 其可在外泌体和核外颗粒体中包装和递送载物。^{31,32} 与VLP类似, 细胞外囊泡包括来自哺乳动物细胞的磷脂双层。与VLP不同, 细胞外囊泡缺少病毒组分, 并因此具有有限的免疫原性。而由于外部融合糖蛋白(VSVG), VLP具有进入细胞的强大能力, 细胞外囊泡主要依赖于通过微胞饮作用的细胞摄取, 这限制了细胞外囊泡的递送效率。

[0064] 与先前描述的VLP、细胞外囊泡、AAV和纳米颗粒相比, eVLP是一种更安全且更有效的替代物, 尤其是用于基因组编辑试剂的递送, 这是因为, 除了已在HIV-1 gag疫苗(VSVG)的临床试验中证明在人体中安全的源自病毒的糖蛋白以外, eVLP由全部人类组分构成,³³ eVLP缺乏除了安全的糖蛋白以外的所有其它逆转录病毒组分, eVLP具有递送DNA+RNP或单独的RNP的能力, 而其它先前描述的VLP则不能防止瞬时转染DNA被无意地包装和递送, eVLP可递送特殊的DNA分子, 而先前描述的VLP、纳米颗粒和AAV不能或不可以, 并且eVLP可采用已源自患者的细胞(自体eVLP)和其它FDA批准的细胞系(同种异体eVLP)生产, 以进一步降低不良免疫反应的风险。本文, 本发明人描述了用于生产、纯化和施用eVLP的方法和组合物, 用于例如基因组编辑、表观基因组调节、转录组编辑和蛋白质组调节的体外和体内应用。期望的编辑结果取决于治疗性情况(context), 并且将需要不同的基因编辑试剂。酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*) Cas9 (spCas9) 和氨基酸球菌属(*acidaminococcus sp.*) Cas12a (功能化) 是两种最流行的用于编辑的RNA向导的酶, 它们充分利用用于引入终止密码子或缺失的NHEJ, 或用于导致插入的HDR。³⁴⁻³⁶ Cas9-脱氨酶融合物, 也称为碱基编辑器, 是目前用于单核苷酸的精确编辑而无双链DNA切割的标准。^{37,38} 重要的是, 这些方法解决了在VLP中的无意的DNA递送现象, 并且第一次控制待递送的生物分子类型(DNA、RNA和/或蛋白

质),从而增加可能的治疗性体内基因组修饰的类型,并使有害的脱靶作用最小化。

[0065] 第1部分:DNA、蛋白质和RNA的eVLP介导的递送

[0066] 已被工程化以包封和递送基于蛋白质的载物的常规VLP一般地将载物融合至INT或GAG多聚蛋白。^{25-27,29,30,39,40}在生产质粒DNA构建体的瞬时转染后,这些蛋白融合物在常规的VLP生产细胞系的胞质溶胶中被翻译,gag基质(matrix)被乙酰化并募集至细胞膜,并且当VLP从膜上出芽进入细胞外空间时,gag融合物被包封在VLP内(瞬时转染DNA也被无意地包封)。

[0067] 相比之下,在一些实施方案中,本文描述的eVLP可通过将所有生产DNA整合至生产细胞系的基因组DNA中来包装基于蛋白质的载物。一旦创建了细胞系,可以组成型或诱导型方式生产蛋白质递送eVLP。通过将选择的人源磷脂双层募集结构域融合至基于蛋白质的载物来将蛋白质包装至eVLP中(例如,如表6中所示)。一种用于该目的的此类人源磷脂双层募集结构域为人pleckstrin同源(PH)结构域。PH结构域与生物膜中的磷脂酰肌醇脂质和蛋白质例如PIP2、PIP3、GPCR的 $\beta\gamma$ -亚基和PKC相互作用。^{41,42}可选地,人Arc蛋白可以与基于蛋白质的载物融合,以将载物募集至磷脂双层的胞质侧。⁴³无论载物内一个或多个核定位序列(NLS)的位置如何,通过不同长度的多肽接头,这些人源磷脂双层募集结构域可融合至基于蛋白质的载物的N末端或C末端。优选地,基于蛋白质的载物和磷脂双层募集结构域之间的接头是多肽接头,长度为5-20、例如8-12、例如10个氨基酸,主要由甘氨酸和丝氨酸构成。人源磷脂双层募集结构域将载物定位至磷脂双层,并且这种蛋白质载物被包装在eVLP内,所述eVLP利用糖蛋白来引发颗粒从生产者细胞出芽进入细胞外空间(图1)。这些人源结构域和蛋白质可促进载物定位至eVLP生产细胞内细胞质膜的胞质面,并且它们还允许载物定位至转导eVLP的细胞的核,而不使用外源性逆转录病毒gag/pol或基于化学物质和/或光的二聚化系统(图2)。例如,与没有细胞质膜募集结构域的情况相比,Cas9的递送在融合至细胞质膜募集结构域的情况下是显著更有效的(图3)。

[0068] 在一些实施方案中,如果eVLP是通过生产细胞系的瞬时转染生产的,eVLP也可包装和递送DNA和RNA的组合。转染至细胞中的DNA将具有尺寸依赖的流动性,因此一部分转染的DNA将保留在胞质溶胶中,而另一部分转染的DNA将定位至核中。⁴⁴⁻⁴⁶在核中的一部分转染的DNA将表达创建eVLP所需的组分,并且在胞质溶胶中/细胞质膜附近的其它部分将在eVLP中被包封并递送(图4)。

[0069] eVLP“载物”是指可以递送的任何有效负载物,包括化学物质例如小分子化合物、和生物分子,包括DNA、RNA、RNP、蛋白质及其组合,包括DNA和RNP的组合、RNP、DNA和蛋白质的组合、或蛋白质、以及病毒及其部分,例如,用于治疗性或诊断性用途,或用于基因组编辑、表观基因组调节和/或转录组调节的应用。为了简化这些区别,DNA和RNP的组合在本文中称为1型载物(T1eVLP),RNP在本文中称为2型载物(T2eVLP),DNA和蛋白质的组合在本文中称为3型载物(T3eVLP),并且蛋白质在本文中称为4型载物(T4eVLP)。在该上下文中的RNA包括例如单向导RNA(sgRNA)、成簇的规律间隔的回文重复序列(CRISPR)RNA(crRNA)和/或编码载物的mRNA。

[0070] 如本文中所使用的,“小分子”指分子量在约3,000道尔顿以下的有机或无机小分子。通常,用于本发明的小分子具有小于3,000道尔顿(Da)的分子量。小分子可以是例如从至少约100Da至约3,000Da(例如,约100至约3,000Da之间、约100至约2500Da、约100至约2,

000Da、约100至约1,750Da、约100至约1,500Da、约100至约1,250Da、约100至约1,000Da、约100至约750Da、约100至约500Da、约200至约1500、约500至约1000、约300至1000Da或约100至约250Da)。

[0071] 载物受到颗粒直径的限制,例如,在一些实施方案中,其范围为30nm至500nm。

[0072] 为基因组编辑的应用开发的载物还包括核酸酶和碱基编辑器。核酸酶包括FokI和AclI ZFN,以及转录激活因子样效应物核酸酶 (TALEN) 和基于CRISPR的核酸酶或其功能衍生物(例如,如表2中所示)(ZFN描述于例如在美国专利公开20030232410;20050208489;20050026157;20050064474;20060188987;20060063231;和国际公开W0 07/014275中)(TALEN描述于例如在美国专利公开US9393257B2中;和国际公开W02014134412A1中)(基于CRISPR的核酸酶描述于例如在美国专利公开US8697359B1;US20180208976A1;和国际公开W02014093661A2;W02017184786A8中)。³⁴⁻³⁶这项工作描述的碱基编辑器包括任何基于CRISPR的核酸酶直向同源物(wt、切口酶或催化失活(CI)),例如,如表2中所示,使用不同长度的多肽接头,在N末端融合至脱氨酶或其功能衍生物(例如,如表3中所示),在C末端具有或不具有与一种或多种尿嘧啶糖基化酶抑制剂(UGI)的融合(碱基编辑器描述于例如在美国专利公开US20150166982A1;US20180312825A1;US10113163B2;和国际公开W02015089406A1;W02018218188A2;W02017070632A2;W02018027078A8;W02018165629A1中)。^{37,38}此外,prime编辑器也与eVLP递送方式兼容(例如,在PMID:31634902中描述了prime编辑器)。

[0073] sgRNA在包装过程中与基因组编辑试剂复合,并在eVLP中共同递送。至今,已通过实验在体外验证了该概念,所述实验证实了融合至作为蛋白质的脱氨酶和UGI(碱基编辑器)的RGN和CI RGN的T1eVLP或T2eVLP递送用于外源性和内源性位点的位点特异性编辑的目的(图3、5、6、7、8、9、10、11和12)。例如,为了编辑外源性GFP以及内源性HEK位点#3和VEGF位点#2和#3的目的,T1eVLP已用于将Cas9 RNP递送至U2OS和HEK293细胞(图4、5、6和7)。此外,为了碱基编辑内源性VEGF位点#2和#3以及HEK位点#3的目的,T1eVLP已用于将BE3和BE4 RNP递送至HEK293T细胞(图8、9、10和11)。为了编辑内源性FANCF位点#1的目的,T1eVLP还已用于将Cas12a RNP递送至HEK293细胞(图12)。

[0074] 为表观基因组调节的目的而设计的载物包括与表观基因组调节子或表观基因组调节子的组合或其功能衍生物通过一个或多个不同长度的多肽接头连接在一起而融合的基于CI CRISPR的核酸酶、锌指(ZF)和TALE(表2和表4)。为转录组编辑的目的设计的T1-T4载物包括与表3中的脱氨酶通过一个或多个不同长度的多肽接头而融合的表5中基于CRISPR的核酸酶或其任何功能衍生物或表5中基于CI CRISPR的核酸酶或其任何功能衍生物。

[0075] 载物还可包括任何治疗上或诊断上有用的蛋白质、DNA、RNP,或DNA、蛋白质和/或RNP的组合。参见,例如,W02014005219;US10137206;US20180339166;US5892020A;EP2134841B1;W02007020965A1。例如,可将编码或由核酸酶或碱基编辑器蛋白或RNP或其衍生物组成的载物递送至视网膜细胞,用于纠正导致Leber先天性黑蒙10型的剪接位点缺陷的目的。在哺乳动物内耳中,用于编辑β-连环蛋白(β-连环蛋白Ser 33编辑为Tyr、Pro或Cys)以更好地稳定β-连环蛋白的目的,碱基编辑试剂或HDR促进载物至例如耳蜗支持细胞和毛细胞等感觉细胞的eVLP递送,可以帮助扭转听力损失。

[0076] 在另一应用中, RNA编辑试剂或蛋白质组干扰试剂的eVLP递送可导致一种或多种感兴趣的特异性蛋白质在细胞水平(潜在地, 在全身水平、特异性器官或特异性细胞亚群例如肿瘤中)暂时降低, 并且当可施用二级药物时, 这可创建治疗上可操作的窗口(不存在感兴趣的蛋白质或存在更低水平的感兴趣蛋白质下这种二级药物更有效)。例如, 在威罗菲尼(vemurafenib)/达拉非尼(dabrafenib)抗性BRAF驱动的肿瘤细胞中, RNA编辑试剂或蛋白质组干扰试剂的eVLP递送可触发MAPK和PI3K/AKT蛋白及相关mRNA的靶向降解, 这可为威罗菲尼/达拉非尼的施用打开窗口, 因为BRAF抑制剂抗性被暂时消除(基于在MAPK/PI3K/AKT通路中的抗性机制被eVLP载物暂时下调)。当与抗原可诱导并因此对肿瘤细胞具有特异性的eVLP结合时, 该示例尤其相关。

[0077] 在一些实施方案中, eVLP可用于将例如包括山中因子(Yamanaka factors) Oct3/4、Sox2、Klf4和c-Myc的因子递送至例如人或小鼠成纤维细胞等细胞, 以产生诱导性多能干细胞。

[0078] 在一些实施方案中, eVLP可以递送蛋白质的显性失活形式以引起治疗作用。

[0079] 抗原特异性(即, 肿瘤抗原特异性)的eVLP可靶向癌细胞以递送促凋亡蛋白BIM、BID、PUMA、NOXA、BAD、BIK、BAX、BAK和/或HRK, 以触发癌细胞的凋亡。肿瘤抗原是本领域已知的并且包括。

[0080] 90%的胰腺癌患者存在不可切除的疾病。约30%的具有不可切除的胰腺肿瘤患者将因局部疾病进展而死亡, 因此期望采用消融(ablative)放射治疗局部晚期胰腺肿瘤, 但肠道不能耐受导致肿瘤消融所需的高剂量放射。肠道的选择性辐射防护使胰腺肿瘤的消融放射治疗成为可能, 同时使对周围胃肠道的造成的损害最小化。为此, eVLP可负载有与转录抑制因子KRAB融合的dCas9, 和靶向EGLN的向导RNA。已显示EGLN抑制显著降低来自消融放射治疗的胃肠道毒性, 因为它会导致胃肠道而非胰腺肿瘤的选择性辐射保护。⁴⁷本文中提供此类融合蛋白、eVLP以及其制造和使用方法。

[0081] 未结合的类固醇受体存在于胞质溶胶中。与配体结合后, 这些受体将转移至核并启动应答基因的转录。eVLP可将结合并破坏胞质溶胶类固醇受体的单链可变片段(scFv)抗体递送至细胞的胞质溶胶中。例如, scFv可与糖皮质激素受体结合并阻止其与地塞米松结合, 这将阻止应答基因的转录, 例如与肿瘤发生有关的金属硫蛋白1E。⁴⁸

[0082] eVLP可用于参与蛋白质的靶向破坏的治疗。例如, eVLP可用于通过将抗体/scFv递送至细胞的胞质溶胶中, 靶向和破坏细胞的胞质溶胶中的蛋白质。经典地, 将抗体通过细胞质膜递送至细胞的胞质溶胶已众所周知是困难的和低效的。这种蛋白质的抑制模式类似于靶向小分子如何结合并破坏胞质溶胶中的蛋白质, 并且可用于治疗多种疾病。⁴⁹⁻⁵¹此类融合蛋白、eVLP以及其制造和使用方法。

[0083] 此外, 被靶向的小分子的靶向限于特定尺寸的含有与催化功能或蛋白质-蛋白质相互作用相关的结合口袋的蛋白质。scFv不会受到这些限制的阻碍, 因为为了破坏催化作用和与其它蛋白质的相互作用, 可产生与蛋白质的许多不同部分结合的scFv。例如, RAS癌蛋白涉及多种癌症亚型, 并且RAS是癌症中最常见的癌基因之一。例如, 国际癌症基因组联盟(International Cancer Genome Consortium)在其胰腺腺癌样本的95%中发现KRAS是突变的。已知RAS亚型激活不同的在人类癌症中失调的通路, 如PI3K和MAPK通路。尽管RAS在癌症中扮演着异常的角色, 但尚未开发出RAS的有效的药理学直接或间接小分子抑制剂并

批准临床使用。靶向RAS的一种策略可以是eVLP, eVLP可特异性地向癌细胞递送结合并破坏多种RAS亚型的功能的scFv。⁴⁹⁻⁵¹

[0084] 第2部分:eVLP组成、生产、纯化和应用

[0085] eVLP可以由生产者细胞系生产,所述生产者细胞系采用至少一种质粒瞬时转染或稳定表达已整合至生产者细胞系基因组DNA中的构建体。在一些实施方案中,对于T1和T3eVLP,如果在转染中使用单一的质粒,其应包含编码以下的序列:一种或多种源自病毒的糖蛋白(例如,如表1中所示)、与细胞质膜募集结构域(例如,如表6中所示)融合或不融合的载物(例如,治疗性蛋白质或基因编辑试剂,例如锌指、转录激活因子样效应物(TALE)和/或基于CRISPR的基因组编辑/调节蛋白和/或RNP,例如见于表2、3、4和5中的那些),以及如有必要,向导RNA。优选地,在转染中使用两至三种质粒。这两至三种质粒可包括以下(任何两种或更多种可组合在单一质粒中):

[0086] 1. 包含与细胞质膜募集结构域融合或不融合的编码治疗性蛋白质或基因组编辑试剂的序列的质粒。

[0087] 2. 包含一种或多种源自病毒的糖蛋白(例如,如在表1中所列举的)的质粒。

[0088] 3. 如果来自质粒1的基因组编辑试剂需要一种或多种向导RNA,包含一种或多种适用于质粒1中的基因组编辑试剂的向导RNA的质粒。

[0089] 如果期望递送质粒以外的DNA分子类型,可采用双链封闭末端线性DNA、附加体、微环、双链寡核苷酸和/或其它特殊的DNA分子进行上述转染。或者,对于T2和T4eVLP,可使生产者细胞系稳定表达以上转染中描述的构建体(1至3)。

[0090] 如前所述,在一些实施方案中,该方法包括使用经操作或未经操作从而表达除了病毒包膜(例如,如表1中所示)以外的任何外源性蛋白和根据需要的细胞质膜募集结构域(例如,如表6中所示)的细胞。在该实施方案中,通过利用与载物混合的纯化颗粒的核转染、脂质、聚合物、或CaCl₂转染、超声处理、冻融、和/或热冲击,所生产的“空”颗粒可以负载有载物。在所有实施方案中,生产者细胞不表达任何gag蛋白。这种类型的负载允许载物通过与细胞质膜募集结构域的融合而不被修饰,并且显示与先前的VLP技术相比的重大进步。

[0091] 本领域已知的或以上描述的质粒或其它类型的特殊的DNA分子还可以优选地包括其它元件以驱动编码序列的表达或翻译,例如启动子序列;增强子序列,例如5'非翻译区(UTR)或3'UTR;多腺苷酸化位点;绝缘子序列;或另外的增加或控制表达的序列(例如,诱导型启动子元件)。

[0092] 优选地,合适的生产者细胞系是对转染试剂的作用和由于源自病毒的糖蛋白导致的融合作用耐受(refractory)的原代或稳定的人细胞系。合适的细胞系的示例包括人胚肾(HEK)293细胞、HEK293 T/17 SF细胞、肾脏来源的Phoenix-AMPHO细胞和胎盘来源的BeWo细胞。例如,可针对它们作为贴壁细胞或悬浮细胞生长的能力来选择这类细胞。在一些实施方案中,生产者细胞可在血清条件下、无血清条件下或无外泌体血清条件下的经典的DMEM中培养。eVLP例如T1和T3eVLP可从已源自患者(自体eVLP)的细胞和其它FDA批准的细胞系(同种异体eVLP)中生产,只要这些细胞可通过本领域已知的不同的技术采用编码上述eVLP生产组分的DNA构建体转染即可。

[0093] 此外,如果是期望的,转染中可包括一种以上的基因组编辑试剂。DNA构建体可设计为在生产者细胞系中过表达蛋白质。例如,转染中使用的质粒骨架是本领域技术人员熟

悉的,例如使用用于RNA聚合酶II转录的CMV启动子或用于RNA聚合酶III转录的U6启动子的pCDNA3骨架。本领域已知的不同的技术可用于将核酸分子引入生产者细胞。这种技术包括使用化合物例如磷酸钙、阳离子脂质、阳离子聚合物的化学促进转染,例如阳离子脂质体如LIPOFECTAMINE (LIPOFECTAMINE 2000或3000和TransIT-X2)等脂质体介导的转染,聚乙烯亚胺,例如电穿孔、粒子轰击或显微注射等非化学方法。

[0094] 以组成型和/或诱导型方式稳定表达必要的eVLP组分的人生产者细胞系可用于T2和T4eVLP的生产。T2和T4eVLP可从已源自患者的细胞(自体eVLP)和其它FDA批准的细胞系(同种异体eVLP)生产,如果这些细胞已转变为表达上述eVLP组分的稳定细胞系的话。

[0095] 本文中还提供了生产者细胞本身。

[0096] 负载载物的eVLP和组合物的生产

[0097] 优选地,在转染后36-48小时或当eVLP在生产者细胞的培养基中达到最大浓度时(生产者细胞将颗粒排出至培养基中,并且在某个时间点,培养基中的颗粒浓度将是对于收获颗粒最佳的),从细胞培养基上清液中收获eVLP。上清液可通过本领域任何已知的方法纯化,例如离心、超速离心、沉淀、超滤和/或色谱法。在一些实施方案中,例如,首先过滤上清液,以去除大于1 μ m的颗粒,例如通过0.45孔径的聚偏二氟乙烯亲水膜(Millipore Millex-HV)或0.8 μ m孔径的混合纤维素酯亲水膜(Millipore Millex-AA)。过滤后,可进一步纯化和浓缩上清液,例如使用超速离心,例如以80,000至100,000 \times g的速度、在1 $^{\circ}$ C至5 $^{\circ}$ C之间的温度下1至2小时,或以8,000至15,000g的速度、在1 $^{\circ}$ C和5 $^{\circ}$ C之间的温度下10至16小时。在此离心步骤后,eVLP以离心物(沉淀物)的形式浓缩,可将其重悬浮至期望的浓度、与转导增强试剂混合、经历缓冲液交换或按原样使用。在一些实施方案中,可将含有eVLP的上清液过滤、沉淀、离心和重悬浮至浓缩溶液。例如,聚乙二醇(PEG)例如PEG 8000,或与eVLP表面蛋白或膜组分结合的抗体-珠缀合物可用于沉淀颗粒。纯化的颗粒是稳定的,可在4 $^{\circ}$ C下储存长达一周或在-80 $^{\circ}$ C下储存数年而不会失去明显的活性。

[0098] 优选地,eVLP被重悬浮或经历缓冲液交换,使得颗粒悬浮在合适的载体中。在一些实施方案中,可通过超滤(Sartorius Vivaspin 500 MWC0 100,000)进行缓冲液交换。用于体外应用的用于eVLP的示例性合适的载体将优选是适合于待由eVLP转导的细胞的细胞培养基。可混合至用于体外应用的纯化和浓缩的eVLP溶液中的转导增强试剂包括本领域技术人员已知的试剂(Miltenyi Biotec Vectofusin-1、Millipore Polybrene、Takara Retronectin、Sigma Protamine Sulfate等)。将在合适载体中的eVLP应用于待转导的细胞后,可通过离心进一步提高转导效率。优选地,可在室温下以1,150g的速度离心含有应用于细胞的eVLP的板30分钟。离心后,将细胞放回合适的细胞培养箱(37 $^{\circ}$ C、具有5%CO₂的加湿孵育箱)。

[0099] 用于施用于哺乳动物、尤其是人的eVLP的合适载体将优选是药学上可接受的组合物。“药学上可接受的组合物”指任何类型的无毒半固体、液体或雾化填充剂、稀释剂、包装材料、胶体悬浮剂或制剂助剂。优选地,该组合物适用于注射。这些可以特别是等渗的、无菌的、盐溶液(磷酸一钠或磷酸二钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙或氯化镁以及和类似的溶液或这些盐的混合物)、或根据情况在加入无菌水或生理盐水时允许注射溶液的构成的干燥的、尤其是冷冻干燥的组合物。另一种合适的药物形式将是用于通过鼻内吸入或气管内插管施用的雾化颗粒。

[0100] 适用于注射使用的药物形式包括无菌水溶液或悬浮剂。溶液或悬浮剂可包含与eVLP相容且不防止eVLP进入靶细胞的添加剂。在所有情况下,该形式必须是无菌的,并且必须是可采用注射器施用该形式的程度的流体。它在制造和储存条件下必须是稳定的,并且必须防止微生物例如细菌和真菌的污染作用。合适溶液的示例是缓冲液,例如磷酸盐缓冲盐水。

[0101] 配制合适的药物组合物的方法是本领域已知的,参见例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第21版,2005;以及系列书籍Drugs and the Pharmaceutical Sciences:a Series of Textbooks and Monographs (Dekker,NY)。例如,用于肠胃外、皮内或皮下应用的溶液或悬浮剂可包括以下组分:无菌稀释剂,例如注射用水、盐水溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂;抗菌剂,例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,例如乙二胺四乙酸;缓冲液,例如醋酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐,以及调节张力的试剂,例如氯化钠或葡萄糖。pH值可采用酸或碱调节,例如盐酸或氢氧化钠。肠胃外制剂可封装在安瓿、一次性注射器或玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。

[0102] 适用于注射使用的药物组合物可包括无菌水溶液(在水溶性的情况下)或分散剂以及用于临时制备无菌注射溶液或分散剂的无菌粉末。对于静脉施用,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™ (BASF,Parsippany,NJ)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,组合物必须是无菌的并且应该是达到容易注射的程度的流体。它在制造和储存条件下应该是稳定的,并且必须防止微生物例如细菌和真菌的污染作用。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物的溶剂或分散剂介质。合适的流动性可例如通过例如卵磷脂的涂层的使用、在分散剂的情况下通过所需的颗粒尺寸的维持,以及通过表面活性剂的使用来保持。微生物的作用的防止可通过不同抗菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等实现。在许多情况下,优选在组合物中包括等渗剂,例如糖、多元醇例如甘露醇、山梨糖醇、氯化钠。注射组合物的延长吸收可通过在组合物中包括延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸铝和明胶来实现。

[0103] 无菌注射溶液可通过将所需量的活性化合物引入合适的溶剂中来制备,根据需要,具有以上列举的一种成分或多种成分的组合,然后过滤除菌。通常,分散剂是通过将活性化合物引入至无菌载体中制备的,该载体含有基本的分散剂介质和来自以上列举的那些所需的其它成分。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,这产生活性成分加上来自其先前无菌过滤的溶液的任何附加的期望成分的粉末。

[0104] 包含负载载物的eVLP的组合物可与施用说明一起包括在容器、包装或分配器中。

[0105] 实施例

[0106] 在以下实施例中进一步描述本发明,但不限制权利要求书中所述的本发明的范围。

[0107] 方法

[0108] 在以下实施例中使用以下方法。通过使用基于聚乙烯亚胺(PEI)的质粒转染的HEK293T细胞生产eVLP颗粒。PEI是25kD线性聚乙烯亚胺(Polysciences#23966-2)。为了制备储备“PEI MAX”溶液,将1g PEI添加至预先加热至~80°C的1L无内毒素dH₂O中,并冷却至

室温。通过添加10N NaOH将此混合物中和至pH 7.1,并采用0.22 μ m聚醚砜(PES)过滤除菌。PEI MAX储存在-20 $^{\circ}$ C。

[0109] HEK293T细胞在转染时分裂至达到70%-90%的汇合度,并在10%FBS DMEM培养基中培养。用U6启动子-sgRNA编码质粒和VSV-G包膜质粒pMD2.G(Addgene#12259)共转染载体,例如编码驱动hPLC81 PH与密码子优化的Cas9的融合物的表达的CMV启动子的载体载体。在减血清培养基(Opti-MEM;GIBCO#31985-070)中组装转染反应物(transfection reactions)。为了在10cm板上生产eVLP颗粒,将7.5 μ g PH-Cas9表达质粒、7.5 μ g sgRNA表达质粒和5 μ g pMD2.G混合在1mL Opti-MEM中,然后添加27.5 μ l PEI MAX。在室温下孵育20-30分钟后,将转染反应物逐滴分散在HEK293T细胞上。

[0110] 在转染后48-72小时收获eVLP。eVLP上清液使用0.45 μ m乙酸纤维素或0.8 μ m PES膜过滤器过滤,并转移至与SW28转子(Beckman Coulter#326823)一起使用的聚丙烯Beckman超速离心管中。每个超速离心管装有来自3个10cm板的含有eVLP的上清液,以达到约35-37.5ml的最终体积。eVLP上清液在4 $^{\circ}$ C下以大约100,000 \times g或25,000rpm经历超速离心2小时。超速离心后,倒出上清液,将eVLP沉淀物重悬浮在DMEM 10%FBS培养基中,使其现在比超速离心前浓缩约1,000倍。将eVLP逐滴添加至在转导前24小时接种在24孔板中的细胞中。如有必要,补充聚凝胺(细胞培养基中5-10 μ g/mL;Sigma-Aldrich#TR-1003-G)以提高转导效率。如有必要,补充Vectofusin-1(细胞培养基中10 μ g/mL,Miltenyi Biotec#130-111-163)以提高转导效率。如有必要,加入eVLP后,立即将24孔板在室温下以1,150 \times g离心30分钟以提高转导效率。

[0111] 实施例1

[0112] Cas9 RNP在具有或不具有与PH结构域的融合物的VSVG假型化的VLP中递送。将含有具有或不具有PH融合物的Cas9和靶向VEGF的sgRNA的T2eVLP施加至HepG2、U2OS、HEK293T、CFPAC1、BeWo、Jurkat、K562、和原代T细胞48小时。VEGF内靶位点的基因修饰频率通过扩增子测序来获得。图3证实了与来自hPLC δ 1或hAKT1的PH结构域融合显著地提高T2eVLP中的Cas9的递送/编辑效率。

[0113] 将与Cas9的Gag融合物或与Cas9的PH融合物和靶向GFP的向导RNA分别包装在VLP或T1eVLP中。在转染VSVG、Cas9融合物和向导RNA表达质粒后48小时,将稳定地表达单拷贝的GFP的U2OS或HEK293细胞系用这些先前从HEK293T细胞培养基(DMEM)纯化的颗粒处理。通过PVDF过滤和以100,000 \times g超速离心2小时进行颗粒纯化和浓缩。基因修饰频率通过T7E1和流式细胞术来确定。结果在图5A-B中示出。

[0114] 在图6中,将与密码子优化的Cas9的hPLC δ 1 PH融合物和靶向HEK位点#3或VEGF位点#2的向导RNA包装在T1eVLP中。在转染VSVG、Cas9融合物和向导RNA表达质粒后48小时,将U2OS细胞用这些先前从HEK293T细胞培养基(DMEM,10%FBS)纯化的颗粒来处理。通过过滤和以100,000 \times g超速离心2小时进行颗粒纯化和浓缩。基因修饰频率通过扩增子测序来确定。

[0115] 在图7中,将与密码子优化的Cas9的hPLC δ 1(左图)或hAkt PH(右图)融合物和靶向VEGF位点#3的向导RNA包装在T1eVLP中。在转染VSVG、Cas9融合物和向导RNA表达质粒后48小时,将U2OS细胞用这些先前从HEK293T细胞培养基(DMEM,10%FBS)纯化的颗粒来处理。通过过滤和以100,000 \times g超速离心2小时进行颗粒纯化和浓缩。基因修饰频率通过扩增子测

序来确定。

[0116] 在图8中,将与基于Cas9的碱基编辑器(BE3和BE4)的N末端或C末端的gag融合物或与BE3和BE4的N末端或C末端的PH融合物和靶向VEGF位点#2的向导RNA分别包装在VLP和eVLP中。在转染VSVG、碱基编辑器融合物和向导RNA表达质粒后48小时,将HEK293T细胞用这些先前从HEK293T细胞培养基(DMEM)纯化的颗粒来处理。通过过滤和以 $100,000 \times g$ 超速离心2小时进行颗粒纯化和浓缩。基因修饰频率通过扩增子测序来确定。

[0117] 在图9中,将与基于Cas9的碱基编辑器(密码子优化的BE4)的N末端的hPLC δ 1融合物和靶向HEK位点#3的向导RNA包装在eVLP中。在转染VSVG、碱基编辑器融合物和向导RNA表达质粒后48小时,将HEK293T细胞用这些先前从HEK293T细胞培养基(DMEM)纯化的颗粒来处理。通过过滤和以 $100,000 \times g$ 超速离心2小时进行颗粒纯化和浓缩。基因修饰频率通过扩增子测序来确定。

[0118] 在图10中,将与基于Cas9的碱基编辑器(密码子优化的ABE)的N末端的hPLC δ 1融合物和靶向VEGF位点#3的向导RNA包装在eVLP中。在转染VSVG、碱基编辑器融合物和向导RNA表达质粒后48小时,将HEK293T细胞用这些先前从HEK293T细胞培养基(DMEM)纯化的颗粒来处理。通过过滤和以 $100,000 \times g$ 超速离心2小时进行颗粒纯化和浓缩。基因修饰频率通过扩增子测序来确定。

[0119] 在图11中,将与基于Cas9的碱基编辑器(密码子优化的ABE)的N末端的hPLC δ 1融合物和靶向HEK位点#3的向导RNA包装在eVLP中。在转染VSVG、碱基编辑器融合物和向导RNA表达质粒后48小时,将HEK293T细胞用这些先前从HEK293T细胞培养基(DMEM)纯化的颗粒来处理。通过过滤和以 $100,000 \times g$ 超速离心2小时进行颗粒纯化和浓缩。基因修饰频率通过扩增子测序来确定。

[0120] 在图12中,将与Cas12a的gag融合物或与Cas12a的hPLC δ 1 PH融合物和靶向FANCF位点#1的向导RNA分别包装在VLP和eVLP中。在转染VSVG、Cas12a融合物和向导RNA表达质粒后48小时,将HEK293细胞用这些先前从HEK293T细胞培养基(DMEM)纯化的颗粒来处理。通过PVDF过滤和以 $100,000 \times g$ 超速离心2小时进行颗粒纯化和浓缩。基因修饰频率通过T7E1来确定。

[0121] 在图13中,将与MS2的hPLC δ 1 PH融合物和靶向GFP位点#1的MS2-茎环向导RNA与Cas9包装在eVLP中。在转染VSVG、Cas9、PH-MS2融合物和MS2茎环向导RNA表达质粒后48小时,将HEK293细胞用这些先前从HEK293T细胞培养基(DMEM)纯化的颗粒来处理。通过PVDF过滤和以 $100,000 \times g$ 超速离心2小时进行颗粒纯化和浓缩。基因修饰频率通过T7E1来确定。

[0122] 在图14中,将与DmrC的hPLC δ 1 PH融合物、靶向GFP位点#1的向导RNA和与DmrA重复序列融合的Cas9包装在eVLP中。在转染VSVG、DmrA-Cas9、PH-DmrC融合物和向导RNA表达质粒后48小时,将HEK293细胞用这些先前从HEK293T细胞培养基(DMEM)纯化的颗粒来处理。通过PVDF过滤和以 $100,000 \times g$ 超速离心2小时进行颗粒纯化和浓缩。基因修饰频率通过T7E1来确定。

[0123] 在图15中,将与GCN4重复序列的hPLC δ 1 PH融合物、靶向GFP位点#1的向导RNA和与scFv融合的Cas9包装在eVLP中。在转染VSVG、scFv-Cas9、PH-GCN4融合物和向导RNA表达质粒后48小时,将HEK293细胞用这些先前从HEK293T细胞培养基(DMEM)纯化的颗粒来处理。通过PVDF过滤和以 $100,000 \times g$ 超速离心2小时进行颗粒纯化和浓缩。基因修饰频率通过T7E1

来确定。

[0124] 图16-40示出eVLP构成和可能的载物的各种非限制性实例。

[0125] 表1| 示例性源自病毒的糖蛋白。

[0126]	源自病毒的糖蛋白
	水疱性口炎病毒糖蛋白 (VSVG)
	GP64
	GP160
	RD114
	BaEVTR
	BaEVTRless
	FuG-E
	FuG-E (P440E)
	MLV ENV (嗜亲性)
	MLV ENV (双嗜性)
	MLV 10A1

[0127] 表2| 示例性潜在的Cas9和Cas12a直向同源物

[0128]	DNA结合Cas直向同源物	酶类型	切口酶突变	CI突变
	SpCas9	II-A型	D10A	D10A、H840A
	SaCas9	II-A型	D10A	D10A
	CjCas9	II-C型	D8A	D8A
	NmeCas9	II-C型	D16A	D16A、H588A
	asCas12a	II-C型		D908A、E993A
	1bCas12a	II-C型		D832A、E925A

[0129] 切口酶突变残基代表酶的位置,或已知是保守的RuvC核酸酶结构域的催化活性所需的,或是其中缺少结构信息、基于与CjCas9的序列比对而预测为对于该催化活性所需的。所有位置信息指从uniprot.org获得的野生型蛋白质序列。

[0130] 表3| 示例性脱氨酶结构域及其底物序列偏好。

[0131]	脱氨酶	核苷酸序列偏好
	hAID	5' -WRC
	rAPOBEC1*	5' -TC \geq CC \geq AC>GC
	mAPOBEC3	5' -TYC
	hAPOBEC3A	5' -TCG
	hAPOBEC3B	5' -TCR>TCT
	hAPOBEC3C	5' -WYC
	hAPOBEC3F	5' -TTC
	hAPOBEC3G	5' -CCC
	hAPOBEC3H	5' -TTCA \sim TTCT \sim TTCG>ACCCA>TGCA
	ecTadA	

hAdar1	
hAdar2	

[0132] 根据IUPAC代码注释未明确指定或允许两个或更多个核苷酸的核苷酸位置,其中W=A或T,R=A或G,Y=C或T。

[0133] 表4| 示例性表观遗传调节子结构域。

表观遗传调节子	表观遗传调节
VP16	转录激活
VP64	转录激活
P65	转录激活
RTA	转录激活
KRAB	转录抑制
MeCP2	转录抑制
Tet1	甲基化
Dnmt3a	甲基化

[0135] 表5| 示例性的基于CRISPR的RNA向导的RNA结合酶

RNA结合Cas直向同源物	酶类型
LshCas13a	VI型
LwaCas13a	VI型
PspCas13b	VI型
RfxCas13d	VI型

[0137] 表6| 示例性细胞质膜募集结构域

#	细胞质膜募集结构域	取代
1.	人磷脂酶 Cδ1(hPLCδ1)的 Pleckstrin 同源结构域	
2.	人 Akt1(hAkt1)的 Pleckstrin 同源结构域	
3.	人 Akt1 的突变的 Pleckstrin 同源结构域	E17K
4.	人 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1(hPDK1)的 Pleckstrin 同源结构域	
5.	人 CD9	
6.	人 CD47	
7.	人 CD63	
8.	人 CD81	
[0138]	人 Dapp1 的 Pleckstrin 同源结构域	
	小鼠 Grp1 的 Pleckstrin 同源结构域	
	人 Grp1 的 Pleckstrin 同源结构域	
	人 OSBP 的 Pleckstrin 同源结构域	
	人 Btk1 的 Pleckstrin 同源结构域	
	人 FAPP1 的 Pleckstrin 同源结构域	
	人 CERT 的 Pleckstrin 同源结构域	
	人 PKD 的 Pleckstrin 同源结构域	
	人 PHLPP1 的 Pleckstrin 同源结构域	
	人 SWAP70 的 Pleckstrin 同源结构域	
	人 MAPKAP1 的 Pleckstrin 同源结构域	

[0139] 示例性相关蛋白质序列:

[0140] 智人:人Dapp1的Pleckstrin同源结构域

[0141] MQTGRTEDDLVTAPSLGTKEGYLTKQGGLVKTWKTRWFTLHRNELKYFKDQMSPEP
IRILDLTECSAVQFDYSQERVNCFCLVFPFRIFYLCAKTGVEADEWIKLRWKSQIRKQ
LNQGEGTIR (SEQ ID NO:1)

[0142] 小鼠:小鼠Grp1的Pleckstrin同源结构域

[0143] PFKIPEDDGNLTHFFNPDRGWLLKLGGRVKTWKRRWFILTDNCLYFFEYTTDKEP
RGIIPLENLSIREVEDPRKPNCFELYNPSHKGQVIKACKTEADGRVVEGNHVYRISAPS
PEEKEEWMKSIKASISRDPFYDMLATRKRRRIANKK (SEQ ID NO:2)

[0144] 智人:人Grp1的Pleckstrin同源结构域

[0145] NPDRGWLLKLGGRVKTWKRRWFILTDNCLYFFEYTTDKEPRGIIPLENLSIREVEDP
RKNCFELYNPSHKGQVIKACKTEADGRVVEGNHVYRISAPSPREEEWMKSIKASIS
(SEQ ID NO:3)

[0146] 智人:人OSBP的Pleckstrin同源结构域

[0147] SGSAREGWLFKWTNYIKGYQRRWFVLSNGLLSYYRSKAEMRHTCRGTINLATANITVE
DSCNFIIISNGGAQTYHLKASSEVERQRWWTALELAKAKAVK (SEQ ID NO:4)

[0148] 智人:人Btk1的Pleckstrin同源结构域

[0149] MAAVILESIFLKRSQQKKKTSPLNFKKRLFLTVMHLSYYEYDFERGRGSKKGSIDVEKI
TCVETVPEKNPPPERQIPRRGEESSEMEQISIIERFPYPFQVYDEGPLYVFSPTTELR
KRWIHQLKNVIRYNSDLVQKYHPCFWIDGQYLCCSQTAKNAMGCQILENRNGSLKP
(SEQ ID NO:5)

- [0150] 智人:人FAPP1的Pleckstrin同源结构域
MEGVLYKWTNYLTGWQPRWFLDNGILSYYSQDDVCKGSKGSIKMAVCEIKVHSAD
- [0151] NTRMELIIPGEQHFYMKAVNAERQRWLVALGSSKACLTDT (SEQ ID NO:6)
- [0152] 智人:人CERT的Pleckstrin同源结构域
MSDNQSWNSSGSEEDPETESGPPVERCGVLSKWTNYIHGWQDRWVVLKNNALSYYK
- [0153] SEDETEYGCGRSICLSKAVITPHDFDECRFDISVNSVWYLRAQDPDHRQQWIDAIEQH
KTESGYG (SEQ ID NO:7)
- [0154] 智人:人PKD的Pleckstrin同源结构域
TVMKEGWMMVHYTSKDTLRKRHYWRDLSKCITLFQNDTGSRYEKEIPLSEILSLEPVKTS
- [0155] ALIPNGANPHCFEITTANVVYVGENVNPSSPSPNSVLTSGVGADVARMWEIAIQHA
LM (SEQ ID NO:8)
- [0156] 智人:人PHLPP1的Pleckstrin同源结构域
RIQLSGMYNVRKGMQLPVNRWTRRQVILCGTCLIVSSVKDSLTKGMHVLPLIGGKVEE
- [0157] VKKHQHCLAFSSSGPQSQTYYICFDTFTEYLRWLRQVSKVAS (SEQ ID NO:9)
- [0158] 智人:人SWAP70的Pleckstrin同源结构域
DVLKQGYMMKKGHRKRWTERWFLKPNIISSYYVSEDLKDKKGDILLDENCCVESLPD
- [0159] KDGKKCLFLVKCFDKTFEISASDKKKKQEWIQAIIHSTIH (SEQ ID NO:10)
- [0160] 智人:人MAPKAP1的Pleckstrin同源结构域
DMLSSHYYKSFKVSMIHRLRFTTDVQLGISGDKVEIDPVTNQKASTKFWIKQKPISIDSD
- [0161] LLCACDLAEEKSPSHAIFKLTYSNHDYKHLFYFESDAATVNEIVLKVNYILES (SEQ ID
NO:11)
- [0162] 狒狒内源性逆转录病毒糖蛋白 (BaEVTR)
MGFTTKIIFLYNLVLYAGFDDPRKAIELVQKRYGRPCDCSGGQVSEPPSDRVSQVTCS
GKTAYLMPDQRWKCKSIPKDTSPSGPLQECPCNSYQSSVHSSCYTSYQQCRSGNKTY
YTATLLKTQTGGTSDVQVLGSTNKLIQSPCNGIKGQSICWSTTAPIHVSDGGGPLDTTRI
KSVQRKLEEIHKALYPELQYHPLAIPKVRDNLMVDAQTLNILNATYNLLLMSNTSLVDDC
WLCLKLGPPPTLAIPNFLLSYVTRSSDNISCLIIPLLQPMQFSNSSCLFSPSYNSTEEI
- [0163] DLGHVAFSNCTSITNVTGPICAVNGSVFLCGNNMAYTYLPTNWTGLCVLATLLPDIDIIP
GDEPVPIPAIDHFIYRPKRAIQFIPLLAGLGITAAFTTGATGLGVSVTQYTKLSNQLISDVQI
LSSTIQDLQDQVDSLAEVVLQNRRLDLLTAEQGGICLALQECCFYVNKSGIVRDKIKT
LQEELERRRKDLASNPLWTGLQGLLPYLLPFLGPLLTLTLLLTIGPCIFNRLVQFVKDRIS
VVQALVLTQQYHQLKPLEYEP (SEQ ID NO:12)
- [0164] 修饰的狒狒内源性逆转录病毒糖蛋白 (BaEVTRless)
MGFTTKIIFLYNLVLYAGFDDPRKAIELVQKRYGRPCDCSGGQVSEPPSDRVSQVTCS
GKTAYLMPDQRWKCKSIPKDTSPSGPLQECPCNSYQSSVHSSCYTSYQQCRSGNKTY
YTATLLKTQTGGTSDVQVLGSTNKLIQSPCNGIKGQSICWSTTAPIHVSDGGGPLDTTRI
KSVQRKLEEIHKALYPELQYHPLAIPKVRDNLMVDAQTLNILNATYNLLLMSNTSLVDDC
WLCLKLGPPPTLAIPNFLLSYVTRSSDNISCLIIPLLQPMQFSNSSCLFSPSYNSTEEI
- [0165] DLGHVAFSNCTSITNVTGPICAVNGSVFLCGNNMAYTYLPTNWTGLCVLATLLPDIDIIP
GDEPVPIPAIDHFIYRPKRAIQFIPLLAGLGITAAFTTGATGLGVSVTQYTKLSNQLISDVQI
LSSTIQDLQDQVDSLAEVVLQNRRLDLLTAEQGGICLALQECCFYVNKSGIVRDKIKT
LQEELERRRKDLASNPLWTGLQGLLPYLLPFLGPLLTLTLLLTIGPCIFNRLTAFINDKLNII
HAM (SEQ ID NO:13)

- [0166] 印第安纳水疱性口炎病毒和狂犬病病毒糖蛋白的融合蛋白 (FuG-E)
 MVPQVLLFVLLLGFSLCFGKFPYITPDELGPWSPIDIHHLSCPNNLVEDEGCTNLSEFS
 YMELKVGYSIAIKVNGFTCTGVVTEAETYTNFVGYVTTTTFKRKHFRPTPDACRAAYNWK
 MAGDPRYEESLHNPYPDYHWLRTVTRTTKESLIISPSVTDLDPYDKSLHSRVFPGGKCS
 GITVSSTYCSNHDYTIWMPENPRPRTPCDIFTNSRGKRASNGNKTCGFVDERGLYKS
- [0167] LKGACRLKLCGVLGLRLMDGTWAMQTSDETKWCPPDQLVNLHDFRSDEIEHLVVEE
 LVKKREECLDALESIMTTKSVSFRRLSHLRKLVPFGFKAYTIFNKTLMEADAHYKSVRT
 WNEIIPSKGCLKVGGRCHPHVNGVFFNGIILGPDDHVLIPEMQSSLLQQHMELLESSVIP
 LMHPLADPSTVFKEGDEAEDFVEVHLPKNPIELVEGWFSWKSSIASFFFIIGLIIGLFLVL
 RVGIHLICIKLHKTKKRQIYTDIEMNRLGK (SEQ ID NO:14)
- [0168] 印第安纳水疱性口炎病毒和狂犬病病毒糖蛋白的修饰融合蛋白 (FuG-E (P440E))
 MVPQVLLFVLLLGFSLCFGKFPYITPDELGPWSPIDIHHLSCPNNLVEDEGCTNLSEFS
 YMELKVGYSIAIKVNGFTCTGVVTEAETYTNFVGYVTTTTFKRKHFRPTPDACRAAYNWK
 MAGDPRYEESLHNPYPDYHWLRTVTRTTKESLIISPSVTDLDPYDKSLHSRVFPGGKCS
 GITVSSTYCSNHDYTIWMPENPRPRTPCDIFTNSRGKRASNGNKTCGFVDERGLYKS
- [0169] LKGACRLKLCGVLGLRLMDGTWAMQTSDETKWCPPDQLVNLHDFRSDEIEHLVVEE
 LVKKREECLDALESIMTTKSVSFRRLSHLRKLVPFGFKAYTIFNKTLMEADAHYKSVRT
 WNEIIPSKGCLKVGGRCHPHVNGVFFNGIILGPDDHVLIPEMQSSLLQQHMELLESSVIP
 LMHPLADPSTVFKEGDEAEDFVEVHLEKNPIELVEGWFSWKSSIASFFFIIGLIIGLFLVL
 RVGIHLICIKLHKTKKRQIYTDIEMNRLGK (SEQ ID NO:15)
- [0170] 双嗜性鼠白血病毒 (MLV ENV (双嗜性))
 MARSTLSKPPQDKINPWKPLIVMGVLLGVGMAESPHQVFNVWTRVTNLMTGRTANAT
 SLLGTVQDAFPKLYFDLCLDVGEEWDPDQEPYVGYGCKYPAGRQRTRTFDFYVCPG
 HTVKSGCGGPGEGYCGKWGCETTQAYWKPTSSWDLISLKRGNTPWDTGCSKVAC
 GPCYDLKSVNSFQGATRGGRCNPLVLEFTDAGKKANWDGPKSWGRLRYRTGTDIPIT
 MFSLTRQVLNVGPRVPIGNPVLDPQRLPSSPIEIVPAPQPPSPLNTSYPPSTTSTPSTS
- [0171] PTSPVPPPPGTGDRLLALVKGAYQALNLTNPDKTQECWLCLVSGPPYEGVAVVG
 TYTNHSTAPANCTATSQHKLTLEVTGQGLCMGAVPKTHQALCNTTQSAGSGSYLLAA
 PAGTMWACSTGLTPCLSTTVLNLTTDYCVLVELWPRVIYHSPDYMYGQLEQRTKYKRE
 PVSLTLALLLGGLTMGGIAAGIGTGTTALIKTQQFEQLHAAIQTDLNEVEKSITNLEKSLTS
 LSEVVLQNRRLDLLFLKEGGLCAALKEECCFYADHTGLVRDMSMAKLRERLNQRQKLF
 ETGQGWFEGLFNRSWFSTLISTIMGPLIVLLLILLFGPCILNRLVQFVKDRISVVQALVLT
 QQYHQLKPIEYEP (SEQ ID NO:16)
- [0172] 嗜亲性鼠白血病毒 (MLV ENV (嗜亲性))
 MARSTLSKPLKNKVNPRGPIPLILLMLRGVSTASPGSSPHQVYNITWEVTNGDRETWW
 ATSGNHPLWTWWPDLTPDLCMLAHHGPSYWGLEYQSPFSSPPGPPCCSGGSSPGC
 SRDCEPLTSLTPRCNTAWNRLKLDQTTKSNEGFYVCPGPHRPRESKSCGGPDSFY
 CAYWGCETTGRAYWKPSSWDFITVNNNLTSDQAVQVCKDNKWCNPLVIRFTDAGR
 VTSWTTGHYWGLRLYVSGQDPGLTFGIRLRYQNLGPRVPIGNPVLADQQPLSKPKPV
- [0173] KPSVTKPPSGTPLSPTQLPPAGTENRLLNLVDGAYQALNLTSPDKTQECWLCLVAGP
 PYYEGVAVLGTYSNHTSAPANCSVASQHKLTLEVTGQGLCIGAVPKTHQALCNTTQT
 SSRGSYLLVAPTGMTWACSTGLTPCISTTILNLTDDYCVLVELWPRVYHSPSYVYGLF
 ERSNRHKREPVSLTLALLLGGLTMGGIAAGIGTGTTALMATQQFQQLQAAVQDDLREV
 EKSISNLEKSLTSLSEVVLQNRRLDLLFLKEGGLCAALKEECCFYADHTGLVRDMSMAK
 LRERLNQRQKLFESTQGWFEGLFNRSWFSTLISTIMGPLIVLLMILLFGPCILNRLVQFV
 KDRISVVQALVLTQQYHQLKPIEYEP (SEQ ID NO:17)
- [0174] 莫洛尼鼠白血病毒10A1株糖蛋白 (MLV 10A1)

[0175] MARSTLSKPLKDKINPWKSLMVMGVLLRVGMAESPHQVFNVWTRVTNLMTGRATANAT
 SLLGTVQDAFPRLYFDLDCDLVGEEWDPDQEPYVGYGCKYPGGRKRTRTFDFYVCPG
 HTVKSGCGGPREGYCGEWGCETTQAYWKPTSSWDLISLKRGNTPWDTGCSKMAC
 GPCYDLKSVNSFQGATRGGRCNPLVLEFTDAGKKANWDGPKSWGLRLYRTGTDPIT
 MFSLTRQVLNIGPRIPIGNPVITGQLPPSRPVQIRLPRPPQPPTGAASIVPETAPPSQ
 QPGTGDRLLNLVEGAYRALNLTNPDKTQECWLCLVSGPPYYEGVAVVGTYNHSTAP
 ASCTATSQHKLTLSEVTGQGLCMGAVPKTHQALCNTTQSAGSGSYLAAPAGTMWAC
 STGLTPCLSTTMLNLTTDYCVLVELWPRIIYHSPDYMYGQLEQRRTKYKREPVSLTLALLL
 GGLTMGGIAAGIGTGTTALIKTQQFEQLHAAIQTDLNEVEKSITNLEKSLTSLSEVVLQNR
 RGLDLLFLKEGGLCAALKECCFYADHTGLVRDSMAKLRERLNQRQKLFESGGQWFE
 GLFNRSWFVTTLISTIMGPLIVLLLILLFGPCILNRLVQFVKDRISVWQALVLTQQYHQLKPI
 EYEP (SEQ ID NO:18)

[0176] 褐家鼠和合成的:APOBEC1-XTEN L8-nspCas9-UGI-SV40 NLS

MSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELKRETCLLYEINWGGRRHSIWRHTSQNT
 NKHVEVNFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRYPHVTLFIYIARL
 YHHADPRNRQGLRDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFVNYSPSNEAHWPYPHLLWR
 LYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHYQRLPPHILWATGLKSGSETPGT
 SESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFD
 SGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKH
 ERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLN
 PDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKN
 GLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDYYDDLDNLLAQIGDQYADFLAAKN
 LSDAILSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPKEYKEIFFDQSK
 NGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHL
 GELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYVVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW
 NFEVVDKGGASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMR
 KPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYH
 DLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRY
 TGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSG
 QGDSLHEHIANLAGSPAIKKILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQ
 KNSRERMKRIEIGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRL
 SDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLI
 TQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIRE
 VKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVVREINNYHHAHDAYLNAVVGTAALIKKYPKLESEFVYGD
 YKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIV
 WDKGRDFATVRKVLSPQVNIKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKY
 GGFDSPTVAYSVLVAKVEKSKKLSVKELLGITIMERSSEKPNIDFLEAKGYKEVK
 KDIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLGKSPED
 NEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENIIHLF
 TLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSIETGLYETRIDLSQLGGDSGGSTN
 LSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVEIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEY
 KPVALVIQDSNGENKIKMLSGGSPKKRKV (SEQ ID NO:19)

[0178] 智人:AID

[0179] MDSLLMNRKFLYQFKNVRWAKGRRETYLCYVVKRRDSATSFSLDFGYLRNKNKNGCHV
 ELLFLRYISDWLDLDPGRCYRVTWFTSWSPCYDCARHVADFLRGNPNLSLRIFTARLYF
 CEDRKAPEGLRRLHRAGVQIAIMTFKDYFCWNTFVENHERTFKAWEGLHENSURLS
 RQLRRILLPLYEVDDLRFDAFRTLGL (SEQ ID NO:20)

- [0180] 智人:缺乏N末端RNA结合区域的AID_v溶解度变体(solubility variant)
LMDPHIFTSNFNNGIGRHKTYLCYEVEERLDSATSFSLDFGYLRNKNKGCHVELLFLRYISD
- [0181] WLDLPGRCYRVTWFTSWSPCYDCARHVADFLRGPNLSLRIFTARLYFCEDRKAPEE
GLRRLHRAGVQIAIMTFKDYFYCWNTFVENHERTFKAWEGLHENSVRLSRQLRILLPL
YEVDLDRDAFRTLGL (SEQ ID NO:21)
- [0182] 智人:缺乏N末端RNA结合区域和C末端结构不良区域的AID_v溶解度变体
MDPHIFTSNFNNGIGRHKTYLCYEVEERLDSATSFSLDFGYLRNKNKGCHVELLFLRYISD
- [0183] WLDLPGRCYRVTWFTSWSPCYDCARHVADFLRGPNLSLRIFTARLYFCEDRKAPEE
GLRRLHRAGVQIAIMTFKDYFYCWNTFVENHERTFKAWEGLHENSVRLSRQLRILLPL
(SEQ ID NO:22)
- [0184] 褐家鼠:APOBEC1
MSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELKETCLLYEINWGGRHSIWRHTSQNT
NKHVEVNFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRYPHVTLFIYIARL
- [0185] YHADPRNRQGLRDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFVNYSNEAHWPRYPHLWVR
LYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHYQLPAPHILWATGLK (SEQ
ID NO:23)
- [0186] 小家鼠:APOBEC3
MGPFCGLGCSHRKCYSPIRNLISQETFKFHFKNLGYAKGRKDTFLCYEVTRKDCDSPVSL
HHGVFKNKDNIHAEICFLYWFHDKVLKVLSPREEFKITWYMSWSPCFECAEQIVRFLAT
HHNLSLDIFSSRLYNVQDPETQQNLCRLVQEGAQVAAMDLYEFKCKWKKFVDNGGRR
FRPWKRLLTNFRYQDSKLQEILRRMDPLSEEEFYQFYQNRVKHLCYYHRMKPYLCYQ
- [0187] LEQFNGQAPLKGCLLSEKQKQAEILFLDKIRSMELSQVTITCYLTWSPCPNCAWQLAA
FKRDRPDILHIYTSRLYFHWKRPFKGLCSLWQSGILVDVMDLPQFTDCWTNFVNP
K
RPFPRWKGLEIISRRTQRRLRRIKESWGLQDLVNDFGNLQLGPPMSN (SEQ ID
NO:24)
- [0188] 小家鼠:APOBEC3催化结构域
MGPFCGLGCSHRKCYSPIRNLISQETFKFHFKNLGYAKGRKDTFLCYEVTRKDCDSPVSL
HHGVFKNKDNIHAEICFLYWFHDKVLKVLSPREEFKITWYMSWSPCFECAEQIVRFLAT
- [0189] HHNLSLDIFSSRLYNVQDPETQQNLCRLVQEGAQVAAMDLYEFKCKWKKFVDNGGRR
FRPWKRLLTNFRYQDSKLQEILRR (SEQ ID NO:25)
- [0190] 智人:APOBEC3A
MEASPASGPRHLMDPHIFTSNFNNGIGRHKTYLCYEVEERLDNGTSVKMDQHRGFLHN
QAKNLLCGFYGRHAELRFLDLVPSLQLDPAQIYRVTWFIWSPCFSWGCAGEVRAFLQ
- [0191] ENTHVRLRIFAARIYDYDPLYKEALQMLRDAGAQVSIMTYDEFKHCWDTFVDHQGCPF
QPWDGLDEHSQALSGRLRAILQNQGN (SEQ ID NO:26)
- [0192] 智人:APOBEC3G
MKPHFRNTVERMYRDTFSYNFYNRPILSRRNTVWLCYEVKTKGSPRPPLDAKIFRGQV
YSELKYHPEMRFFHWFSKWRKLHRDQEYEVWYISWSPCTKCTRDMATFLAEDPKVT
LTIFVARLYYFWDPDYQEARSLCQKRDGPRATMKIMNYDEFQHCWSKFVYSQRELFE
- [0193] PWNNLPKYYILLHIMLGEILRHSMDPPTFTFNNEPWRGRHETLYCYEVERMHNDT
WLLNQRRGFLCNQAPHKHGFLEGRHAELCFLDVIPFWKLDLDQDYRVTCTFSWSPC
FSCAQEMAKFISKNKHVSLCIFTARIYDDQGRCEGLRTLAEAGAKISIMTYSEFKHCW
DTFVDHQGCPFQPWDGLDEHSQDLSGRLRAILQNQEN (SEQ ID NO:27)

- [0194] 智人:APOBEC3G催化结构域
PPTFTFNFNNEPWWRGRHETYLCYEVERMHNDTWLLNQRRGFLCNQAPHKHGFLE
GRHAELCFLDVIPFWKLDLDQDYRVTCFTSWSPCFSCAQEMAKFISKNHVSLCIFTAR
- [0195] IYDDQGRCQEGLRTLAEAGAKISIMTYSEFKHCWDTFVDHQGCPFPWDGLDEHSQD
LSGRLRAILQNQEN (SEQ ID NO:28)
- [0196] 智人:APOBEC3H
MALLTAETFRLQFNNKRRLRRPYYPKALLCYQLTPQNGSTPTRGYFENKKKCHAEICF
INEIKSMGLDETQCYQVTCYLTWSPCSCAWELVDFIKAHDHLNLGIFASRLYYHWCKP
- [0197] QQKGLRLLCGSQVPVEVMGFPKFAWCWENFVDHEKPLSFNPYKMLEELDKNRAIKR
RLERIKIPGVRAQGRYMDILCDAEV (SEQ ID NO:29)
- [0198] 智人:APOBEC3F
MKPHFRNTVERMYRDTFSYNFYNRPILSRRNTVWLCYEVKTKGSPRRLDAKIFRGQV
YSQPEHHAEMCFLSWFCGNQLPAYKCFQITWVSWTPCPDCVAKLAEFLAHPNVTL
TISAARLYYYWERDYRRALCRLSQAGARVKIMDDEEFAYCWENFVYSEGQPFMPWYK
- [0199] FDDNYAFLHRTLKEILRNPEAMYPHIFYHFHFNLRKAYGRNESWLCFTMEVVKHHSP
VSWKRGVFRNQVDPETHCHAERCFLSWFCDDILSPNTNYEVTWYTSWSPCPECAGE
VAEFLARHSNVNLTIFTARLYYFWDTDYQEGLRSLSQEGASVEIMGYKDFKYCWENFV
YNDDEPFKPKWGLKYNFLFLDSKLQEILE (SEQ ID NO:30)
- [0200] 智人:APOBEC3F催化结构域
KEILRNPEAMYPHIFYHFHFNLRKAYGRNESWLCFTMEVVKHHSPVSWKRGVFRNQ
VDPETHCHAERCFLSWFCDDILSPNTNYEVTWYTSWSPCPECAGEVAEFLARHSNVN
- [0201] LTIFTARLYYFWDTDYQEGLRSLSQEGASVEIMGYKDFKYCWENFVYNDDEPFKPKWG
LKYNFLFLDSKLQEILE (SEQ ID NO:31)
- [0202] 大肠杆菌:TadA
MKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNN
RVIGEGWNRPIGRHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIH
SRIGRVVFGARDAKTGAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQ
- [0203] EIKAQKKAQSSTDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGSSSEVEFSHEYWM
RHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNRRVIGEGWNRRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVM
QNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIH SRIGRVVFGVRNAKTGAAGSLMDVLHYPGMNH
RVEITEGILADECAALLCYFFRMPRQVFNAQKKAQSSTD (SEQ ID NO:32)
- [0204] 智人;Adar1

[0205] MNPRQGYSLSGYYTHPFQGYEHRQLRYQQPGPGSSPSSFLLKQIEFLKQQLPEAPVIG
 KQTPSLPPSLPGLRPRFPVLLASSTRGRQVDIRGVPRGVHLGSQGLQRGFQHPSPRG
 RSLPQRGVDCLSHFQELSIYQDQEQRILKFLLEELGEGKATTAHDLSGKLGTPKKEINR
 VLYSLAKKGLQKEAGTPPLWKIAVSTQAWNQHSGVVRPDGHSQGAPNSDPSLEPED
 RNSTSVSEDLLEPFIAVSAQAWNQHSGVVRPDSHSQGSPNSDPGLEPEDSNSTSALE
 DPLEFLDMAEIKEKICDYLFNVSDSSALNLAKNIGLTKARDINAVLIDMERQGDVYRQGT
 TPPIWHLTDKKRERMQIKRNTNSVPETAPAAIPETKRNAEFLTCNIPTSNASNMMVTTEK
 VENGQEPVIKLENRQEARPEPARLKPPVHYNGPSKAGYVDFENGQWATDDIPDDLNSI
 RAAPGEFRAIMEMPSFYSHGLPRCSPYKLTTECQLKNPISGLLEYAQFASQTCEFNMI
 QSGPPHEPRFKFQVINGREFPPAEAGSKKQVAKQDAAMKAMTILLEEAKAKDSGKSEE
 SSHYSTEKESEKTAESQTPTPSATSFSSGKSPVTTLLECMHKLGNLSCFRLLSKEGPAH
 EPKFQYCVAVGAQTFPSVSAPSKKQVAKQMAAEEAMKALHGEATNSMASDNQPEGMIS
 ESLDNLESMMPNKVRKIGELVRYLNTNPVGGLEAYARSHGFAAEFKLVDQSGPPHEPK
 FVYQAKVGGRWFPVAVCAHSHKQKQEAADAALRVLIGENEKAERMGFTEVTPVTGAS
 LRRTMLLSRSPAQPKTLPLTGSTFHDQIAMLSHRCFNTLTNSFQPSLLGRKILAAIIMK
 KDSEDMGVVSLGTGNRCVKGDSLKGETVNDCHAEIISRRGFIRFLYSELMKYNSQT
 AKDSIFEPAKGGEKLQIKKTVSFHLIYISTAPCGDGFALFDKSCSDRAMESTESRHYPVFE
 NPKQGLRRTKVENEGGTIPVESSDIVPTWDGIRLGERLRTMSCSDKILRWNVGLQGL
 LTHFLQPIYLKSVTLGYLFSQGHLTRACCVRTRDGSFAFEDGLRHPFIVNHPKVGRVSIY
 DSKRQSGKTKETSVNWCLADGYDLEILDGTRGTVDGPRNELSRVSKKNIFLLFKKLCF
 RYRRDLLRLSYGEAKKAARDYETAKNYFKKGLKDMGYGNWISKPQEEKNFYLCPV
 (SEQ ID NO:33)

[0206] 酿脓链球菌:spCas9双向 (Bipartite)NLS

[0207] MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDS
 GETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLLEESFLVEE
 DKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFR
 GHFLIEGDLNPDNSVDKLFILQVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSR

RLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDITYDDDL
 DNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQD
 LTLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGT
 EELLVKNLREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIE
 KILTFRIPYYVGPLARGNSRFAMTRKSEETITPWNFEEVVDKASQAQSFIERM
 TNFDKNLPNEKVLPHSLLEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIV
 DLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKD
 FLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWG
 RLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSG
 QGDSLHEHIANLAGSPAIKKILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIAMARENQTT
 QKGQKNSRERMKRIEIEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMY
 VDQELDINRLSDYVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVK
 KMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHV
 AQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVINNYHHAHD
 AYLNNAVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSN
 IMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIKK
 TEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKGFFSPTVAYSVLVAKVEK
 GKSKKLSVKELLGITIMERSSEKKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIKLPKYSLFELEN
 GRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFYLYASHYEKLGKSPEDNEQKQLFVEQ
 HKHYLDEIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLNL
 GAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQSIITGLYETRIDLSQLGGDGGGGG
 GSGKRTADGSEFEPKKRKRKVS SGGDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK (SEQ ID
 NO:34)

[0208] 金黄色酿脓葡萄球菌:saCas9

MKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGARR
 LKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSAALL
 HLAKRGRVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKKDGE
 VRGSINRFKTSYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGPGE
 GSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRD
 ENEKLEYEYKFIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNL
 KVYHDIKDITARKEIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSELTQEEIEQISN
 LKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKVDLSQQKEIPTTLV
 DDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIKKYGLPNDIIELAREKNSKDAQKMINEMQKRNR
 QTNERIEEII RTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNNPFNYEVD
 HIIPRSVSFDNSFNKVLVKQEENS KKNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNL
 AKGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLRSYFRV
 NNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHAEDALIANADFIFKEWKKL
 DKAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETE QEYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVD
 KKP NRELINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLLKLINKSPEKLLMYH
 HDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNPLYKYYEETGNLYTKYSKKDNGPVIKKIKYYGN
 KLNALDITDDYPNSRNKVVKLSLKP YRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKENYY
 EVNSKCYEEAKLKKISNQAEFIASFYNNDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVNMI
 DITYREYLENMNDKRPPRIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG
 (SEQ ID NO:35)

[0210] 空肠弯曲菌:cjCas9

MARILAFDIGISSIGWAFSENDELKDCGVRIFTKVENPKTGESLALPRRLARSAR
 KRLARRKARLNHLKHLIANEFKLNEDYQSFDESLAKAYKGLISPYELRFRALN
 ELLSKQDFARVILHIAKRRGYDDIKNSDDKEKGAILKAIKQNEEKLANYSVGEY
 LYKEYFQKFKENSKEFTNVRNKKESYERCIASFLKDELKLIFKKQREFGFSFSK
 KFEEEVLSVAFYKRALKDFSHLVGNCSFFTDEKRAPKNSPLAFMFVALTRIINLL
 NNLKNTGILYTKDDLNALLNEVLKNGTLTYKQTKKLLGLSDDYEFKGEKGTYFI
 EFKKYKEFIKALGEHNSQDDLNEIAKDITLIKDEIKLKKALAKYDLNQNQIDSLSK
 LEFKDHLNISFKALKLVTPMLLEGKKYDEACNELNLKVAINEDKKDFLPAFNETY
 YKDEVTNPVVLRAIKEYRKVLNALLKKYGVHVKINIELAREVGKNHSQRAKIEKE
 [0211] QNENYKAKKDAELECEKLGKINSKNILKRLRFKEQKEFCAYSGEKIKISDLQDE
 KMLEIDHIYPYSRSFDDSYMNVLVFTKQNQEKLNQTPFEAFGNSAKWQKIEV
 LAKNLPKKQKRILDKNYKDKEQKNFKDRNLNDTRYIARLVNLYTKDYLDLPLS
 DDENTKLNDRQKGSKVHVEAKSGMLTSALRHTWGFSAKDRNNHLHHAIDAVIIA
 YANNSIVKAFSDFKKEQESNSAELYAKKISELDYKNKRKFFEPFSGFRQKVLDKI
 DEIFVSKPERKKPSGALHEETFRKEEEFYQSYGGKEGVKALELGKIRKVNGKIV
 KNGDMFRVDIFKHKTNKIFYAVPIYTMDFALKVLPNKAVARSKKGEIKDWILMD
 ENYEFCSLYKDSLILIQTKDMQEPEFVYNAFTSSTVSLIVSKHDNKFETLSKN
 QKILFKNANEKEVIAKSIGIQNLKVFEKYIVSALGEVTKAEFRQREDFKK (SEQ
 ID NO:36)

[0212] 脑膜炎奈瑟氏菌:nmeCas9

MAAFKPNINSINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEEENPIRLIDLGVRFERAEVPKTGD
 SLAMARRLARSVRRLTRRRRAHRLLRTRRLLKREGVLQAANFDENGLIKSLPNTN
 WQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGVA
 GNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRSYSHTFSRKDLQAEILLFE
 KQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAPKAANK
 TYAERFIWLTCLNLRILEQGSRPLTDTERATLMDEPYRKSCLTYAQARKLLG
 [0213] LEDTAFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPNLSPQLQ
 DEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRIQPEILEALLKHISFDKQVQISLALRRIVPLMEQ
 GKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVLRALSQARKVINGVV
 RRYGSPARIHIETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFBV
 EPKSKDILKRLRYEQQHKGKCLYSGKEINLGRLEKGYVEIDHALPFSRTWDDSF
 NNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRI
 LLQKFDEDEGFKERNLNDRYVNRFLCQFVADRMRLTGKGGKRVFASNGQITNL
 LRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTI
 DKETGEVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTLEKLRTLLA
 EKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGQGHMETVKSARLDEGVSVLRVPL
 TQLKLDLEKMNRREREPKLYEALKARLEAHKDDPAKAFAPFYKYDKAGNRT
 QQVKAVRVEQVQKTGVVVRNHNGIADNATMVRVDVFEKGDYKYLVIYSWQV
 AKGILPDRAVVQKDEEDWQLIDDSFNFKFSLHPNDLVEVITKARMFGYFASC
 HRGTGNINIRIHDLDHKIGKNGILEGIGVKTALSFKYQIDELGKEIRPCRLKRP
 PVR (SEQ ID NO:37)

[0214] 氨基酸球菌属:asCas12a

[0215] MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKPIID
 RIYKTYADQCLQLVQLDWENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDF
 IGRDNLTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLKQLGTVTTTEHENALLRSDFKF
 TTYFSGFYENRKNVFS AEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSLREH
 FENVKKAIGIFVSTSIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLN
 EVLNLAIQKNDETAHIIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKY
 KTLRLNENVLETAELFNELNSIDLTHIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALYER
 RISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEIISAAGKELSEAFKQKTSEILSHAHAA
 LDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDSSLGLYHLLDWFVAVDESNEVDPEFSARLTGIK
 LEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEKFKLNFQMPTLASGWDVNKEKNNGAILF
 VKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTTEKTSEGFDKMYDYDFPDAAKMIPKCS
 QLKAVTAHFQTHHTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNPEKEPKKFQTAYAKKTGDQ
 KGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTSSIDLSSLRPSQYKDLGEYYAELNPLLYHI
 SFQRIAEKEIMDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLA
 KTSIKLNGQAEFYRPKSRMKRMAHRLGEKMLNKKLKDQKTPIDTLYQELYDY
 VNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEIHKDRRFTSDKFFFHVPITLNYQAANS
 SKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVIDSTGKILEQRSLNTIQQFDYQK
 KLDNREKERVERAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDLMIHYQAVVLENLN
 FGFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGLNPNYQLTDQFT
 SFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWKTIKNHESRKHFLGDFDL
 HYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQF DAKGTPFIAGK
 RIVPVIENTHRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLENDSDHAIDT
 MVALIRSVLQMRNSNAATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPWPMDADANG
 AYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWLAYIQELRN (SEQ ID NO:38)

[0216] 毛螺菌科细菌:1bCas12a:

[0217] MSKLEKFTNCYLSKTLRFKAIPVGKTQENIDNKRLLEVEDEKRAEDYKGVKKLLD
 RYYLSFINDVLHSIKLKNLNNYISLFRKKTRTEKENKELENLEINLRKEIAKAFKGN
 EGYKSLFKKDIIETILPEFLDDKDEIALVNSFNGFTTAFTGFFDNRENMFSEEAKS
 TSIAFRGINENLTRYISNMDIFEKVD AIFDKHEVQEIKEKILNSDYDVEDFFEGEFF
 NFVLTQEGIDVYNAIIGGFVTESGEKIKGLNEYINLYNQKTKQKLPKFKPLYKQVL
 SDRESLSFYGEGYTSDEEVLEVFRNTLNKNSEIFSSIKKLEKLFKNFDEYSSAGI
 FVKNNGPAISTISKDIFGEWNVIRDKWNAEYDDIHLKKA VVTEKYEDDRRKSFKK
 IGSFSLEQLQEYADADLSVVEKLEKIIQKVDEIYKVYGSSEKLF DADFVLEKSLKK
 NDAVVAIMKDLLDSVKSFENYKAF FEGKETNRDES FYGDFVLAYDILLKVDHI
 YDAIRNYVTQKPYSKDKFKLYFQNPQFMGGW DDKKETDYRATILRYGSKYYLAI
 MDKKYAKCLQKIDKDDVNGNYEKINYKLLPGPNKMLPKVFFSKKWMAYYNPSE

DIQKIYKNGTFKKGDMFNLNDCHKLIDFFKDSISRYPKWSNAYDFNFSETEKYK
 DIAGFYREVVEEQGYKVSFESASKKEVDKLV EEGKLYMFQIYNKDFSDKSHGTP
 NLHTMYFKLLFDENNHGQIRLSGGAELFMRRASL KKEELVVHPANSPIANKNP
 NPKKTTLTSDYVYKDKRFSEDQYELHIPIAINKCPKNIFKINTEVRVLLKHDDNPY
 VIGIDRGERNLLYIVVVDGKGNIVEQYSLNEIINNFNGIRIKTDYHSLLDKKEKERF
 EARQNWTSIENIKELKAGYISQVVHKICELVEKYDAVIALEDLNSGFKNSRVKVE
 KQVYQKFEKMLIDKLNVMVDKKS NPCATGGALKGYQITNKFESFKSMSTQNGFI
 FYIPAWLTSKIDPSTGFVNLLKTKYTSIADSKKFISSFDRIMYVPEEDLFEFALDYK
 NFSRTDADYIKKWKLYSYGNRIRIFRNPKNVFDWEEVCLTSAYKELFNKYGI
 NYQQGDIRALLCEQSDKAFYSSFMALMSLMLQMRNSITGR TDVDFLISPVKNSD
 GIFYDSRNYEAQENAILPKNADANGAYNIARKVLWAIGQFKKAEDEKLDKVKIAI
 SNKEWLEYAQT SVKH (SEQ ID NO:39)

[0218] 沙氏纤毛菌(Leptotrichia shahii):LshCas13a

- MGNLFHGHRWYEVDRDKKDFKIKRKRKVKVRNYDGNKYILNINENNNKEKIDNNKFIRKYIN
YKKNNDILKEFTRKFHAGNILFKLKGKEGIIRIENDDFLETEEVVLYIEAYGKSEKLGALG
ITKKKIIDEAIRQGITKDDKKIEIKRQENEEEEIEIDIRDEYTNKTLNDCSILRIIENDELETKKS
IYEIFKNINMSLYKIEKIIENETEKVFENRYEEHLREKLLKDDKIDVILTNFMEIREKIKSNL
EILGFVKFYLVGGDKKSKNKKMLVEKILNINVDLTVEDIADFVIKELEFWNITKRIEKVK
KVNNEFLEKRRNRITYIKSYVLLDKHEKFKIERENKKDKIVKFFVENIKNNSIKEKIEKILAE
FKIDELIKKLEKELKKGNCDEIFGIFKKHYKVNFDKSKFSKKSDEEKELYKIIYRYLKGRI
EKILVNEQKVRLLKMEKIEIEKILNESILSEKILKRVKQYTLIHIMYLGKLRHNDIDMTTVNT
DDFSRLHAKEELDLELITFFASTNMELNKIFSRENINNDENIDFFGGDREKNYVLDKKILN
SKIKIIRDLDLFDNKNITNFFIRKFTKIGTNERNRILHAISKERDLQGTQDDYNKVINIIQNL
KISDEEVSKALNLDVVFVKDKKNIITKINDIKISEENNDIKYLPFSKVLPEILNLYRNNPKN
[0219] EPFDTIETEKIVLNALIYVNKELYKKLILEDLEENESKNIFLQELKKTGNIDEIDENIIENY
YKNAQISASKGNNKAIKKYQKKVIECYIGYLRKNYEELDFDSDFKMNIEIKKQIKDINDN
KTYERITVKTSDKTIVINDDFEYIISIFALLNSNAVINKIRNRFFATSVWLNTSEYQNIIDILD
EIMQLNTRLNECITENWNLNLEEFIQKMKIEKDFDDFKIQTKKEIFNNYEDIKNNILTEF
KDDINGCDVLEKLEKIVIFDDETKFEIDKKSNIKQDEQRKLSNINKKDLKKKVDQYIKDK
DQEIKSKILCRIIFNSDFLKKYKKEIDNLIEDMESENEKFKQEIYYPKERKNELIYKKNLFL
NIGNPNFDKIYGLISNDIKMADAKFLFNIDGKNIRKKNKISEIDAILKNLNDKLNKNGYSKEYKE
KYIKKLKENDDDFAKNIQNKYKSFEDYNRVSEYKKIRDLVEFNLYLNKIESYLIDINWKL
AIQMARFERDMHYIVNGLRELGIKLSGYNTGISRAYPKRNGSDGFYTTTAYYKFFDEES
YKKFEKICYGFGIDLSENSEINKPENESIRNYISHFYIVRNPADYSIAEQIDRVSNLLSYS
TRYNNSTYASVFEVFKKDVNLDYDELKFKLIGNNDILERLMKPKKVSLELESYNSDY
IKNLIIELLTKIENTNDTL (SEQ ID NO:40)
- [0220] 瓦氏纤毛菌 (*Leptotrichia wadeii*):LwaCas13a
MKVTKVDGISHKKYIEEGKLVKSTSEENRTSERLSELLSIRLDIYIKNPDNASEEENRIRR
ENLKKFFSNKVLHLKDSVLYLKNRKEKNAVQDKNYSEEDISEYDLKNKNSFVSKILLN
EDVNSEELEIFRKDVEAKLNKINSLKYSFEENKANYQKINENNVEKVGKSKRNIIYDYY
RESAKRNDYINNVQEAFDKLYKKEDIEKLFFLIENSKKHEKYKIREYYHKIIGRKNDKENF
[0221] AKIIEEIQNVNNIKELIEKIPDMSELKKSQVFKYKYYLDKEELNDKNIKYAFCHFVEIEMSQ
LLKNYVYKRLSNISNDKIKRIFEQNLKLIENKLLNKLDTYVRNCGKYNYYLQVGEIATS
DFIARNRQNEAFLRNIIGVSSVAYFSLRNILETENENGITGRMRGKTVKNNKGEEKYVSG
EVDKIYNENKQNEVKENLKMFSYDFNMDNKNEIEDFFANIDEAIISSIAHGIVHFNLELE
GKDIFAFKNIAPSEISKMFQNEINEKLLKLIKFKQLNSANVFNYYEKDVIIKYLKNTKFN
VNKNIPFVPSFTKLYNKIEDLRNTLKFVSWPKDKEEKDAQIYLLKNIYYGEFLNKFKVNS
KVFFKITNEVIKINKQRNQKTGHYKYQKFENIEKTVPEYLAIIQSREMINNQDKEEKNTYI
DFIQIFLKGFDYLNKNLKYIESNNNDNDIFSKIKIKDNKEKYDKILKNYEKHNK
EIPHEINEFVREIKLKGILKYTENLNMFYLIKLLNHKELTNLKSLEKYQSANKEETFSD
LELINLLNLDNRRVTEDFELEANEIGKFLDFNENKIKDRKELKFDNTKIYFDGENIHKHRA
FYNIKKYGMLNLEKIADKAKYKISLKEKEYSNKNEIEKNYTMQQLHRKYARPKKDE
KFNDEDYKEYEKAIGNIQKYTHLKNKVEFNELNLLQGLLLKILHRLVGYTSIWERDLRFR
KGEFPENHYIEEINFDNSKNVYKSGQIVEKYINFYKELYKDNVEKRSIYSDKKVKKL
QEKKDLYIANIAHFNYIPHAESLLEVLNLRKLLSYDRKLNKAIMKSIVDILKEYGFVATF
KIGADKKIEIQTLESEKIVHLKNLKKKLMTDRNSEELCELVKVMFEYKALE (SEQ
ID NO:41)
- [0222] 智人磷脂酶C δ 1 (hPLC δ 1)的Pleckstrin同源结构域
MDSGRDFLTLHGLQDDEDLQALLKGSQLLKVKSSSWRRERFYKLQEDCKTIW
[0223] QESRKVMRTPESQLFSIEDIQEVRMGRTEGLEKFARDVPEDRCFSIVFKDQR
NTLDLIAPSPADAQHWWLGLHKIIHSGSMDQRQKLQHWIHSCLRKADKNKDN
KMSFKELQNFLKELNIQ (SEQ ID NO:42)
- [0224] 智人Akt1 (hAkt)的Pleckstrin同源结构域

- [0225] MSDVAIVKEGWLHKGREYIKTWRPRYFLLKNDGTFIGYKERPQDQDQREAPLN
NFSVAQCQLMKTERPRPNTFIIRCLQWTTVIERTFHVETPEEREWTTAIQTVA
DGLKKQEEEEEMDFRSGSPSDNSGAEEMEVS LAKPKHRVTMNEFEYLKLLGKG
TFGKVDPPV (SEQ ID NO:43)
- [0226] 智人PDPK1 (hPDPK1)的Pleckstrin同源结构域
- [0227] KMGPVDKRRKGLFARRRQLLLTEGPHLYYVDPVNKVLKGEIPWSQELRPEAKNF
KTFVHTPNRTYYLMDPSGNAHKWCRKIQEVWRQRYQSH (SEQ ID
NO:44)
- [0228] 单纯性疱疹病毒(HSV)1型:VP16转录激活结构域
- [0229] PTDALDDFDLMLPADALDDFDLMLPADALDDFDLDM (SEQ ID NO:45)
- [0230] 单纯性疱疹病毒(HSV)1型&合成的:VP64
- [0231] GRADALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLDM
L (SEQ ID NO:46)
- [0232] 智人:P65
- [0233] SQYLPDTRDRHRIIEKRKRKYETFKSIMKKSPFSGPTDPRPPPRRIAVPSRSSA
SVPKPAPQYPFTSSLSTINYDEFPTMVFPSGQISQASALAPAPPQVLPQAPAP
APAPAMVSALAQAAPVPVLA PGPPQAVAPPAPKPTQAGEGTLSEALLQLQFD
DEDLGALLGNSTDPVFTDLASVDNSEFQQLLNQGIPVAPHTTEPMLMEYPEAI
TRLVTGAQRPPDPAPAPL GAPGLPNGLLSGDEDFSSIADMDFSALL (SEQ
ID NO:47)
- [0234] 与卡波西氏肉瘤相关的疱疹病毒反式激活因子:RTA
- [0235] RDSREGMFLPKPEAGSAISDVFE GREVCQPKRIRPFHPPGSPWANRPLPASLA
PTPTGPVHEPVGSLTPAPVPQLDPAPAVTPEASHLLEDPEETSQAVKALRE
MADTVIPQKEEAICGQMDLSHPPPRGHLDELTTTLESMTEDLNLDSP LTPELN
EILDFTLNDECLLHAMHISTGLSIFDTSLF (SEQ ID NO:48)
- [0236] 智人:KRAB
- [0237] MDAKSLTAWSR TLVTFKDVFDFTREEWKLLDTAQQIVYRNVMLENYKNLVSL
GYQLTKPDVILRLEKGEEP (SEQ ID NO:49)
- [0238] 智人:MeCP2
- [0239] EASVQVKRVLEKSPGKLLVKMPFQASPGGKGEGGGATTSAQVMVIKRPGRKR
KAEADPQAIPKKRGRKPGSVVAAAAAEAKKAVKESSIRSVQETVLP IKKRKRTR
ETVSIEVKEVVKPLL VSTLGEKSGKGLKTKCKSPGRKSKESSPKGRSSSASSPPK
KEHHHHHHHAESP KAPMPLPPPPPPPEPQSSDPISPPEPQDLSSSICKEEKM
PRAGSLESDGCPKEPAKTQPMVAAAATTTTTTTTTTVAEKYKHRGEGGERKDIVS
SSMPRPNREEPVDSRTPVERVS (SEQ ID NO:50)
- [0240] 智人:Tet1

[0241] LPTCSCDRVIQKDKGPYYTHLGAGPSVAAVREIMENRYGQKGNIRIEIVVYTG
KEGKSSHGCPIAKWVLRSSDEEKVLCVLRQRTGHHCP TAVMVVLMVWDGIP
LPMADRLYTELTENLKSYNHGHTDRRCTLNENRTCTCQGIDPETCGASFSGC
SWSMYFNGCKFGRSPSPRRFRIDPSSPLHEKNLEDNLQSLATRLAPIYKQYAP
VAYQNQVEYENVARECRLGSKEGRPFSGVTA CLDFCAHPHRDIHNMNGSTV
VCTLTREDNRSLGVIPQDEQLHVLPLYKLSDTDEFSGSKEGMEAKIKSGAIEVLAP
RRKKRTCFTQPVPRSGKKRAAMMTEVLAHKIRAVEKKPIPRIKRKNNSTTTNNS
KPSSLPTLGSNTETVQPEVKSETEPHFILKSSDNTKTYSLMPSAPHPVKEASPG
FSWSPKTASATPAPLKN DATASCGFSERSSTPHCTMPSGRLSGANAAAADGP
GISQLGEVAPLPTLSAPVMEPLINSEPSTGVTEPLTPHQPNHQPSFLTSPQDLA
SSPMEEDEQHSEADEPPSDEPLSDDPLSPAEEKLPHIDEYWSDSEHIFLDANIG
GVAIAPA HGSVLIECARRELHATTPVEHPNRNHPTRL SLVFYQHKNLNKPQHGF
ELNKIKFEAKEAKNKKMKASEQKDQAANEGPEQSSEVNELNQIPSHKALTLTHD
NVVTVSPYALTHVAGPYNHWV (SEQ ID NO:51)

[0242] 智人:Dnmt3a

MPAMPSSGPGDTSSSAAEREEDRKDGEEQEPRGKEERQEPSTTARKVGRP
GRKRKHPPVESGDTPKDPAVISKSPSMAQDSGASELLPNGDLEKRSEPPQEE
GSPAGGQKGGAPAE GEGAAETLPEASRAVENGCCTPKEGRGAPAEAGKEQK
ETNIESMKMEGSRGRLRGGLGWESSLRQRMPRLTFQAGDPYYISKRKRDEW
LARWKREAEKKAKVIAGMNAVEENQGPGESQKVEEASPPAVQQPTDPASPTV
ATTPEPVGSDAGDKNATKAGDDEPEYEDGRGFGIGELVWGKLRGFSWWPGRI
VSWWMTGRSRAAEGTRWMMWFGDGKFSVVCVEKLMPLSSFCSAFHQATYN
[0243] KQPMYRKAIYEV LQVASSRAGKLPVCHDSDESDTAKAVEVQNKPMIEWALGG
FQPSGPKGLEPPEEEKNPYKEVYTDMMWEPEAAAYAPPPAKKPRKSTAEKP
KVKEIIDERTRERLVYEV RQKCRNIEDICISCGSLNVTLEHPLFVGGMCQNCKNC
FLECA YQYDDDDGYQSYCTICCGGREVL MCGNNCCRCFCVECVDLLVGPAA
QAAIKEDPWNCYMC GHKGTYGLRRREDWPSRLQMFFANNHDQEFDPKVY
PPVPAEKRKPIRVLSLFDGIATGLLV LKDLGIQVDRIYASEVCEDSITVGMVRHQ
GKIMYVGDVRSVTQKHIQEWGPFDLVIGGSPCNDLSIVNPARKGLYEGTGRLFF
EFYRLLHDARPKEGDDRPFFWLFENVVAMGVSDKRDISRFLESNPVMIDAKEV
SAAHRARYFWGNLPGMNRPLASTVNDKLELQECLEHGRIAKFSKVRTITTRSN
SIKQGKDQHFPVFMNEKEDILWCTEMERVFGFPVHYTDVSNMSRLARQRLGR
SWSVPVIRHLFAPLKEYFACV (SEQ ID NO:52)

[0244] 印第安纳水疱性病毒(Indian a vesiculovirus)、先前的印第安纳水疱性口炎病
毒G蛋白:VSVG

MKCLLYLAF LFIGVNCKFTIVFPHNQKGNWKNVPSNYHYCPSSSDLNWHNDLIG
TALQVKMPKSHKAIQADGWMCHASKWVTTCDFRWYGPKYITHSIRSFTPSVEQ
CKESIEQTKQGTWLNPGFPPQSCGYATVTD AEA VIVQVTPHHVLVDEYTG EW
DSQFINGKCSNYICPTVHNSTTWHS DYKVKGLCDSNLISMDITFFSE DGELSSL
[0245] GKEGTGFRSNYFAYETGGKACKMQYCKHWGVRLPSGVWFEMADKDLFAAAR
FPECPEGSSISAPSQTSVDVSLIQDVERILDYSLCQETWSKIRAGLPISPVDLSYL
APKNPGTGPAFTIINGTLKYFETRYIRVDIAAPILSRMVG MISGTTTERELWDDW
APYEDVEIGPNGVLR TSSGYKFLY MIGHGMLDSDLHLSSKAQVFEHPHIQDAA
SQLPDDES LFFGDTGLSKNPIELVEGW FSSWKSSIASFFFIIIGLIIGLFLVLRVGIH
LCIKLKHTKKRQIYTDIEMNRLGK (SEQ ID NO:53)

[0246] 杆状病毒包膜糖蛋白GP64

- [0247] MVSAILVYVLLAAAAHSAFAAEHCNAQMKTGPKIKNLDITPPKETLQKDVEITIV
ETDYNENVIIGYKGYQAYAYNGGSLDPNTRVEETMKTNLVNGKEDLLMWSIRQ
QCEVGEELIDRWGSDSDDCFRDNEGRGQWVKGKELVKRQNNNHFAHHTCNK
SWRCGISTSKMYSRLECQDDTDECQVYILDAEGNPINVTVDTVLHRDGVSMILK
QKSTFTTRQIKAACLLIKDDKNPESVTREHCLIDNDIYDLSKNTWNCKFNRCIK
RKVEHRVKKRPPTWRHNVRAKYTEGDTATKGDLMHIEELMYENDLLKMNIEL
MHAHINKLNMLHDLIVSVAKVDERLIGNLMNNSVSSTFLSDDTFLLMPCNPP
AHTSNCYNNISIYKEGRWANTDSSQCIDFSNYKELAIDDDVEFWIPTIGNTTYH
DSWKDASGWSFIAQQKSNLTTMENTKFGGVGTSLSDITSMAEGELAAKLSF
MFGHVNFVILVILFLYCMIRNRNRQY (SEQ ID NO:54)
- [0248] 人免疫缺陷病毒gp160
- [0249] MRVKEYQHLWRWGWRTMMLGMLMICSATEKLWVTVYYGVPVWKEATTT
LFCASDAKAYDTEVHNWATHACVPTDPNPQEVVLVNVTFNFMWKNMVE
QMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVSLKCTDLKNDTNTNSSSGRMIMEKGEIKN
CSFNISTSIRGKVQKEYAFFYKLDIIPIDNDTTSYKLTSCNTSVITQACPKVSFEPI
PIHYCAPAGFAILKCNNKTFNGTGPCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLLNGSLAEE
EVMIRSVNFTDNAKTIVQLNTSVEINCTRPNNNTRKRIRIQRGPGRFVTIGKIGN
MRQAHCNISRAKWNTLQKIASKLREQFGNNKTIIFKQSSGGDPEIVTHSFNCG
GEFFYCNSTQLFNSTWFNSTWSTEGSNTEGSDTITLPCRIKQIINMWQKVGKA
MYAPPISGQIRCSSNITGLLLTRDGGNSNNESEIFRPGGGDMRDNRSELYKY
KVKIEPLGVAPTAKRRVQREKRAVGIGALFLGFLGAAGSTMGAASMTLTVQ
ARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQQLLGI
WGCSGKLICTTAVPWNASWSNKSLEQIWNHTTWMEWDREINNYTSLIHSLIEE
SQNQEQEKNEQELLELDKWASLWNWFNITNWLWYIKLFIMIVGGLVGLRIVFAVL
SIVNRVRQGYSPFSFQTHLPTPRGPDRPEGIEEEGGERDRDRSIRLVNGSLALI
WDDLRSCLFSYHRLRDLILLIVTRIVELLGRRGWEALKYWWNLLQYWSQELKN
SAVSLLNATAIAVAEGTDRVIEVVQGACRAIRHIPRRIRQGLERILL (SEQ ID
NO:55)
- [0250] 内源性猫病毒RD114 ENV
- [0251] MKLPTGMVILCSLIIVRAGFDDPRKAIALVQKQHKGKPCCECSGGQVSEAPPNSIQ
QVTCPGKTAYLMTNQKWKCRVTPKISPSGGELQNCPCNTFQDSMHSSCYTEY
RQCRINKTYTATLLKIRSGSLNEVQILQNPQLLQSPCRGSINQPVCWSATA
PIHISDGGGPLDTRVWTVQKRLEQIHKAMTPELQYHPLALPKVRDDLSDART
FDILNTTFRLLQMSNFSLAQDCWLCLKLGTPPLAIPTPSLTYSLADSLANASCQI
IPPLLVPQMFSNSSCLSSPFINDTEQIDLGAVTFTNCTSVANVSSPLCALNGSV
FLCGNNMAYTYLPQNWTRLCVQASLLPDIDINPGDEPVPIPAIDHYIHRPKRAVQ
FIPLLAGLGITAAFTTGATGLGVSVTQYTKLSHQLISDVQVLSGTIQDLQDQVDSL
AEVVLQNRRLDLLTAEQGGICLALQEKCCFYANKSGIVRNKIRTLQEELQKRR
ESLATNPLWTGLQGFLPYLLPLLGPLLTLILLITIGPCVFSRLMAFINDRLNVVHA
MVLAQQYQALKAEEEEAQD (SEQ ID NO:56)
- [0252] 智人:CD9完全蛋白
- [0253] MSPVKGKTKCIKYLFGFNFIWLAGIAVLAIGLWLRFDSQTKSIFEQETNNNS
SFYTGVIYILIGALMMLVGFLGCCGAVQESQCMLGLFFGFLLVIFAIEIAAAIWG
YSHKDEVIKEVQEFYKDTYNKLTDEPQRETLKAIHYALNCCGLAGGVEQFIS
DICPKKDVLFTVKSCPDAIKEVFDNKFHIIGAVGIGIAVVMIFGMIFSMILCCAIR
RNREMV (SEQ ID NO:57)
- [0254] 智人:CD63完全蛋白

- [0255] MAVEGGMKCVKFLLYVLLLAFCACAVGLIAVGVGAQLVLSQTIIQGATPGSLLPV
VIIAVGVFLFLVAFVVGCCGACKENYCLMITFAIFLSLIMLVEVAAAAGYVFRDKVM
SEFNNNFRQQMENYPKNNHTASILDRMQADFKCCGAANYTDWEKIPSMKSKNR
VPDSCCINVTVGCGINFNEKAIHKEGCVKIGGWLRKNVLVAAAALGIAFVEVL
GIVFACCLVKSIRSGYEVN (SEQ ID NO:58)
- [0256] 智人:CD81完全蛋白
- [0257] MGVEGCTKCIKYLFFVFNFWLWLAGGVILGVALWLRHDPQTTNLLYLELGDKPA
PNTFYVGIYILIAVGAVMMFVGLGFCYGAIQESQCLLGTFFTCVLVIFACEVAAGI
WGFVNKDQIAKDVKQFYDQALQQA VVDDANNKAVVKTFFHETLDCCGSSTL
TALTTSVLKNLCPSPGSNIISNLFKEDCHQKIDDLFSGKLYLIGIAAIVVAVIMIFEM
ILSMVLCCGIRNSSVY (SEQ ID NO:59)
- [0258] 智人:CD47“自发夹”10氨基酸
- [0259] EVTELTREGE (SEQ ID NO:60)
- [0260] 智人:CD47“自发夹”21氨基酸
- [0261] GNYTCEVTELTREGETIIELEK (SEQ ID NO:61)
- [0262] 智人:CD47完全蛋白
- [0263] MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFTVNMEAQNTTEV
YVKWKFKGRDIYTFD GALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSH
TGNYTCEVTELTREGETIIELEKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLK
YRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILILLH
YYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLL
GLVYMKFVE (SEQ ID NO:62)
- [0264] AAV2:REP52
- [0265] MELVGWLVDKGITSEKQWIQEDQASYISFNAASNSRSQIKAALDNAGKIMSLTK
TAPDYL VGQQPVEDISSNRIYKILELNGYDPQYAASVFLGWATKKFGKRNTIWL
FGPATTGKTNIAEIAHTVPFYGCVNWTNENFPFNDCVDKMVIWWEWGKMTAK
VVESAKAILGGSKVRVDQKCKSSAQIDPTPVIVTSNTNMCAVIDGNSTTFEHQQ
PLQDRMFKFELTRRLDHDGFKVTKQEVKDFFRWAKDHVVEVEHEFYVKKGGA
KKRPAPSDADISEPKRVRESVAQPSTSDAEASINYADRYQNKCSRHVGMNMLML
FPCRQCERMNQNSNICFTHGQKDCLECFPVSESQPVSVVKKAYQKLCYIHHIM
GKVPDACTACDLVNVLDLDDCIFEQ (SEQ ID NO:63)
- [0266] AAV2:REP78
- [0267] MPGFYEIVIKVPSDLDEHLPGISDSFVNWVAEKELPPDSDMDLNLIEQAPLT
VAEKLQRDFLTEWRRVSKAPEALFFVQFEKGESYFHMHLVETTGVKSMVLGR
FLSQIREKLIQRIYRGIEPTLPNWFVAVTKTRNGAGGGNKVVDECYIPNYLLPKTQ
PELQWAWTNMEQYLSACLNLTERKRLVAQHLTHVSQTQEKNKENQNPNSDAP
VIRSKTSARYMELVGWLVDKGITSEKQWIQEDQASYISFNAASNSRSQIKAALD
NAGKIMSLTKTAPDYL VGQQPVEDISSNRIYKILELNGYDPQYAASVFLGWATKK
FGKRNTIWLFGPATTGKTNIAEIAHTVPFYGCVNWTNENFPFNDCVDKMVIW
WEEGKMTAKVVESAKAILGGSKVRVDQKCKSSAQIDPTPVIVTSNTNMCAVIDG
NSTTFEHQQPLQDRMFKFELTRRLDHDGFKVTKQEVKDFFRWAKDHVVEVEH
EFYVKKGGAKKRPA PSDADISEPKRVRESVAQPSTSDAEASINYADRYQNKCS
RHVGMNMLMLFPCRQCERMNQNSNICFTHGQKDCLECFPVSESQPVSVVKKAY
QKLCYIHHIMGKVPDACTACDLVNVLDLDDCIFEQ (SEQ ID NO:64)

- [0268] AAV2:VP1
MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKY
LGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERL
KEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSS
GTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPDQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSG
APMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQ
ISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRPRDWQRLINNNWGFPRKRL
NFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANLNTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPF
[0269] PADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNTFSYTFEDV
PFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRD
QSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL VNPGPAM
ASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGS
VSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHP
SPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWE
LQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL
(SEQ ID NO:65)
- [0270] AAV2:VP2
APGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPDQPLG
QPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRV
ITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS
PRDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANLNTSTVQVFTDS
EYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFP
[0271] SQMLRTGNNTFSYTFEDV PFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPS
GTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWT
GATKYHLNGRDSL VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEK
VMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQD
RDVYLQGPWAKIPHTDGHFHP SPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFS
AAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDT
NGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:66)
- [0272] AAV2:VP3
MATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITSTRTWALPTYN
NHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRPRDWQRLINNNWG
FRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANLNTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQ
GCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNTFS
SYTFEDV PFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQA
[0273] GASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL
VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNP
VATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPWAKIP
HTDGHFHP SPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTG
QVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTR
YLTRNL (SEQ ID NO:67)
- [0274] 合成的:Myc标签抗CD19 scFv
EQKLISEEDLDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYL N WYQQKPDGTV
KLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFG
[0275] GGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL
PDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWIGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSKVFLKMN
SLQTD DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGT SVTVSS (SEQ ID NO:68)
- [0276] 合成的:dDZF1

- [0277] FKCEHCRILFLDHVMFTIHMGCCHGFRDPFKCNMCGEKCDGPVGLFVHMARNA
HGEKPFYCEHCEITFRDVVMYSLHKGYHGFRDPFECNICGYHSQDRYEFSSHI
VRGEH (SEQ ID NO:69)
- [0278] 合成的:dDZF2
- [0279] HHCQHCDMYFADNILYTIHMGCCHSCDDVFKCNMCGEKCDGPVGLFVHMARNA
HGEKPTKCVHCGIVFLDEVMYALHMSCHGFRDPFECNICGYHSQDRYEFSSHI
VRGEH (SEQ ID NO:70)
- [0280] 合成的:DmrA
- [0281] MGRGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDSSRDRNKPFKFM
LGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVEL
LKLE (SEQ ID NO:71)
- [0282] 合成的:DmrB
- [0283] MASRGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKVDSSRDRNKPFKFM
MLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVE
LLKLE (SEQ ID NO:72)
- [0284] 合成的:DmrC
- [0285] MGSRLWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKET
SFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISK (SEQ ID
NO:73)
- [0286] 智人/合成的:FKBP
- [0287] MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDSSRDRNKPFKFM
KQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELL
LE (SEQ ID NO:74)
- [0288] 智人/合成的:FRB
- [0289] QGMLEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFN
QAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISK (SEQ ID
NO:75)
- [0290] 合成的:抗GCN4 scFv
- [0291] MGPDIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSTGAVTTSNYASWWQEKPGKLFKGLI
GGTNNRAPGVPSRFSGSLIGDKATLTISLQPEDFATYFCALWYSNHWVFGQG
TKVELKRGGGGSGGGGSSGGGSEVKLLESGGGLVQPGGSLKLSCAV
SGFSLTDYGVNWRQAPGRGLEWIGVIWGDGITDYN SALKDRFIISKDNGKNTV
YLQMSKVRSDDTALYYCVTGLFDYWGQGLTVTVSSYPYDVPDYAGGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:76)
- [0292] 合成的:10x-GCN4重复序列
- [0293] EELLSKNYHLENEVARLKKGSGSGEELLSKNYHLENEVARLKKGSGSGEELLS
KNYHLENEVARLKKGSGSGEELLSKNYHLENEVARLKKGSGSGEELLSKNYHL
ENEVARLKKGSGSGEELLSKNYHLENEVARLKKGSGSGEELLSKNYHLENEVA
RLKKGSGSGEELLSKNYHLENEVARLKKGSGSGEELLSKNYHLENEVARLKKG
SGSGEELLSKNYHLENEVARLKKGS (SEQ ID NO:77)
- [0294] 合成的:24x-GCN4重复序列

- [0314] 合成的:Spy标签
- [0315] VPTIVMVDAYKRYK (SEQ ID NO:88)
- [0316] 合成的:Spy Catcher
- [0317] MVTTL SGLSGEQGPSGDMTTEEDSATHIKFSKRDEEDGRELAGATMELRDSSG
KTISTWISDGHVKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQQQVTVNGE
ATKGDAHTGSSGS (SEQ ID NO:89)
- [0318] 噬菌体MS2:MS2 RNA结合蛋白
- [0319] MASNFTQFVLVDNNGGTGDVTVAPSNFANGVAEWISSNSRSQAYKVTCSVRQS
SAQNRKYTIKVEVPKVATQTVGGVELPVAAWRSYLNMEITPIFATNSDCELVK
AMQGLLKDGNPIPSAIAANSIY (SEQ ID NO:90)
- [0320] 噬菌体MS2:MS2 (N55K) RNA结合蛋白
- [0321] MASNFTQFVLVDNNGGTGDVTVAPSNFANGVAEWISSNSRSQAYKVTCSVRQS
SAQKRKYTIKVEVPKVATQTVGGVELPVAAWRSYLNMEITPIFATNSDCELVK
AMQGLLKDGNPIPSAIAANSIY (SEQ ID NO:91)
- [0322] 噬菌体MS2:MS2 (N55K) (V29I) RNA结合蛋白
- [0323] MASNFTQFVLVDNNGGTGDVTVAPSNFANGIAEWISSNSRSQAYKVTCSVRQSS
AQKRKYTIKVEVPKVATQTVGGVELPVAAWRSYLNMEITPIFATNSDCELVKA
MQGLLKDGNPIPSAIAANSIY (SEQ ID NO:92)
- [0324] 噬菌体PP7:PP7 RNA结合蛋白
- [0325] KTIVLSVGEATRTLTEIQSTADRQIFEEKVGPLVGRRLRTASLRQNGAKTAYRVN
LKLDQADVDSGLPKVRYTQVWSHDVTIVANSTEASRKSLYDLTKSLVATSQVE
DLVVNLVPLGRS (SEQ ID NO:93)
- [0326] 噬菌体Mu:COM RNA结合蛋白
- [0327] MKSIRCKNCNKLLFKADSFHIEIRCPRCKRHIIMLNACEHPTEKHCGKREKITH
SDETVRY (SEQ ID NO:94)
- [0328] 合成的:锌指ZF6/10
- [0329] STRPGERPFQCRICMRNFSIPNHLARHTRTHTGEKPFQCRICMRNFSQSAHLK
RHLRTHHTGEKPFQCRICMRNFSQDVSLVRHLKTHLRQKDGEPFQCRICMRNF
SSAQUALARHTRTHTGEKPFQCRICMRNFSQGGNLTRHLRTHHTGEKPFQCRICM
RNFSQHPLNRHLKTHLRGS (SEQ ID NO:95)
- [0330] 合成的:锌指ZF8/7
- [0331] SRPGERPFQCRICMRNFSTMAVLRHTRTHTGEKPFQCRICMRNFSRREVLN
HLRTHHTGEKPFQCRICMRNFSQTVNLDRLKTHLRQKDGEPFQCRICMRNFS
KKDHLRHTRTHTGEKPFQCRICMRNFSQRPHLTNHLRTHHTGEKPFQCRICMR
NFSVGASLKRHLKTHLRGS (SEQ ID NO:96)
- [0332] 合成的:锌指ZF9
- [0333] SRPGERPFQCRICMRNFSDKTKLRVHTRTHTGEKPFQCRICMRNFSVRHNLTR
HLRTHHTGEKPFQCRICMRNFSQSTSLQRHLKTHLRGF (SEQ ID NO:97)
- [0334] 合成的:锌指MK10

- [0335] SRPGERPFQCRICMRNFSRRHGLDRHTRTHTGEKPFQCRICMRNFS DHSSLK
RHLRTHHTGSQKPFQCRICMRNFSVRHNLTRHLRTHHTGEKPFQCRICMRNFS DH
SNLSRHLKTHHTGSQKPFQCRICMRNFSQRSSLVRHLRTHHTGEKPFQCRICMRN
FSESGHLKRHLRTHLRGS (SEQ ID NO:98)
- [0336] 合成的: 锌指268
- [0337] YACPVECDRRFSSRDELTRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSRSDHLTTHIRTHHT
GEKPFACDICGRKFARSDERKRHTKIHRLRQKD (SEQ ID NO:99)
- [0338] 合成的: 锌指NRE
- [0339] YACPVECDRRFSSQSHDLTKHIRIHTGQKPFQCRICMRNFS DSSKLSRHIRTHHT
GEKPFACDICGRKFARLDNRTAHTKIHRLRQKD (SEQ ID NO:100)
- [0340] 合成的: 锌指268/NRE
- [0341] YACPVECDRRFSSRDELTRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSRSDHLTTHIRTHHT
GEKPFACDICGRKFARSDERKRHTKIHRLRQKDGEPYACPVECDRRFSSQSHD
LTKHIRIHTGQKPFQCRICMRNFS DSSKLSRHIRTHHTGEKPFACDICGRKFARLD
NRTAHTKIHRLRQKD (SEQ ID NO:101)
- [0342] 合成的: 锌指268//NRE
- [0343] YACPVECDRRFSSRDELTRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSRSDHLTTHIRTHHT
GEKPFACDICGRKFARSDERKRHTKIHRLRQKGGGSERPYACPVECDRRFSS
QSHDLTKHIRIHTGQKPFQCRICMRNFS DSSKLSRHIRTHHTGEKPFACDICGRKF
ARLDNRTAHTKIHRLRQKD (SEQ ID NO:102)
- [0344] 合成的: 靶向GFP的FokI锌指核酸酶17-2
- [0345] SRPGERPFQCRICMRNFSTRQNLDTHTRTHTGEKPFQCRICMRNFSRRDTLER
HLRTHHTGEKPFQCRICMRNFSRPDALPRHLKTHLRGSQVLKSELEEKKSELRH
KLKYVPHEYIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHLGGSRKPDGAIY
TVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQTRNKHINPNEWWKV
YPSSVTEFKFLFVSGHFVSGHFKGNYKAQLTRLNHITNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGT
LTLEEVRRKFNNGEINF (SEQ ID NO:103)
- [0346] 合成的: 靶向GFP的FokI锌指核酸酶18-2
- [0347] SRPGERPFQCRICMRNFSSPSKLIRHTRTHTGEKPFQCRICMRNFS DGSNLAR
HLRTHHTGEKPFQCRICMRNFSRVDNLPRHLKTHLRGSQVLKSELEEKKSELRH
KLKYVPHEYIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHLGGSRKPDGAIY
TVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQTRNKHINPNEWWKV
YPSSVTEFKFLFVSGHFVSGHFKGNYKAQLTRLNHITNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGT
LTLEEVRRKFNNGEINF (SEQ ID NO:104)
- [0348] 合成的: 靶向CCR5的左FokI锌指核酸酶
- [0349] MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKMAPKKRKGVIHGVPAAAMAERPFQCRICM
RNFSDRSNLSRHIRTHHTGEKPFACDICGRKFATSGNLTRHTKIHRLRGSQVLK
SELEEKKSELRHKLKYVPHEYIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKH
LGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQTR
NKHINPNEWWKVYPSSVTEFKFLFVSGHFVSGHFKGNYKAQLTRLNHITNCNGAVLSV
EELLIGGEMIKAGTLTLEEVRRKFNNGEINF (SEQ ID NO:105)
- [0350] 合成的: 靶向CCR5的右FokI锌指核酸酶

- [0351] MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKMAPKKKRKVGIHGVPAAAMAERPFQCRIC
RNFSRSDNLSVHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQKINLQVHTKIHTGEKPFQCRIC
MRNFSRSDVLSEHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRNHRRTHTKIHLRGSQLVKS
ELEEKSELRHKLKYVPHEYIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHL
GGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQTRN
KHINPNEWVKVYPSSVTEFKFLFVSGHFKGNKYAQLTRLNHITNCNGAVLSVE
ELLIGGEMIKAGTLTLEEVRKFNNGEINF (SEQ ID NO:106)
- [0352] 合成的:FokI核酸酶结构域
- [0353] QLVKSELEEKSELRHKLKYVPHEYIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGY
RGKHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVEE
NQTRNKHINPNEWVKVYPSSVTEFKFLFVSGHFKGNKYAQLTRLNHITNCNGA
VLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVRKFNNGEINF (SEQ ID NO:107)
- [0354] 合成的:AcuI核酸酶结构域
- [0355] VHDHKLKELAKLIRNYETNRKECLNSRYNETLLRSDYLDPPFELLGWDIKNKAGK
PTNEREVVLEEALCASASEHSHKPDYTFRLFSEKFFLEAKKPSVHIESDNETAK
QVRRYGFTAKLKISVLSNFEYLVYDTSVKVDGDDTFNKARIKKYHYTEYETHFD
EICDLLGRESVYSGNFDKEWLSIENKINHFVDTL (SEQ ID NO:108)
- [0356] 合成的:截短的AcuI核酸酶结构域
- [0357] YNETLLRSDYLDPPFELLGWDIKNKAGKPTNEREVVLEEALCASASEHSHKPDY
TFRLFSEKFFLEAKKPSVHIESDNETAKQVRRYGFTAKLKISVLSNFEYLVYDTS
VKVDGDDT (SEQ ID NO:109)
- [0358] 大肠杆菌:铁蛋白
- [0359] MLKPEMIEKLNEQMNLELYSSLLYQQMSAWCSYHTFEGAAFLRRHAQEEMT
HMQRFLDYLDTDGNLPRINTVESPF AEYSSLDEL FQETYKHEQLITQKINELAHA
AMTNQDYPTFNFLQWYVSEQHEEEKLFKSIIDKLSLAGKSGEGLYFIDKELSTLD
TQN (SEQ ID NO:110)
- [0360] 大肠杆菌:铁蛋白(H34L)(T64I)
- [0361] MLKPEMIEKLNEQMNLELYSSLLYQQMSAWCSYLT FEGAAFLRRHAQEEMTH
MQRFLDYLDTDGNLPRINTVESPF AEYSSLDEL FQETYKHEQLITQKINELAHAA
MTNQDYPTFNFLQWYVSEQHEEEKLFKSIIDKLSLAGKSGEGLYFIDKELSTLDT
QN (SEQ ID NO:111)
- [0362] 小鼠&合成的:轻链&重链铁蛋白嵌合体
- [0363] MTSQIRQNYSTEVEAAVNRLVNLHLRASYTYLSLGGFFDRDDVALEGVGHFFRE
LAEKREGAERLLEFQNDRGGRALFQDVQKPSQDEWGTQEAMEAALAMEK
NLNQALLDLHALGSARADPHLCDFLESHYLDKEVKLIKKMGNHLTNLRVAGPQ
PAQTGAPQGSGLGEYLFERLTLKHDARGGGGSDYKDDDDKGGGSRVMTTAS
PSQVRQNYHQDAEAAINRQINLELYASYVYLSMSCYFDRDDVALKNFAKYFLH
QSHEEREHAEKLMKLQNQRGGRIFLQDIKKPDRDDWESGLNAMECALHLEKS
VNQSLLELHKLATDKNDPHLCDFIETYLYLSEQVKS IKELGDHVTNLRKMGAP EA
GMAEYLFDKHTLGHGDESTR (SEQ ID NO:112)
- [0364] 智人&合成的:轻链&重链铁蛋白嵌合体

[0365] SQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELA
 EEKREGYERLLKMQRGGRALFQDIKKPAEDEWKGKTPDAMKAAMALEKKLN
 QALLDLHALGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGL
 GEYLFERLTLKHDARGGGGSDYKDDDDKGGGGSRVMTTASTSQVRQNYHQD
 SEAINRQINLELYASYVYLSMSYFDRDDVALKNFAKYFLHQSHEEERHAEKL
 MKLQNRGGRIFLQDIKKPCDDWESGLNAMECALHLEKNVNQSLLELHKLAT
 DKNDPHLCDFIETHYLNQVKAIKELGDHVTNLRKMGAPESGLAEYLFDKHTLG
 DSDNES (SEQ ID NO:113)

[0366] 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*):Cry2

[0367] MKMDKKTIVWFRRDLRIEDNPALAAAAHEGSVFPVFIWCPEEEGQFYPGRASR
 WWMKQSLAHLSQLKALGSDLTIKTHNTISAILDCIRVTGATKVVFNHLYDPVS
 LVRDHTVKEKLVERGISVQSYNGDLLYEPWEIYCEKGPFTSFNSYWKCLDM
 SIESVMLPPPWRMLPITAAAEAIWAC SIEELGLENEAEKPSNALLTRAWSPGWS
 NADKLLNEFIEKQLIDYAKNSKKVVG NSTSLLSPYLHFGEISVRHVFQCARMKQII
 WARDKNSEGEESADFLRGIGLREYSRYICFNFPFTHEQSLLSHLRFFPWDADV
 DKFKAWRQGRTGYPLVDAGMRELWATGWMHNRIRVIVSSFAVKFLLLPWKWG
 MKYFWDTLLDADLECDILGWQYISGSIPDGHELDRLDNPALQGAKYDPEGEYIR
 QWLPELARLPTEWIHPWDAPLTVLKASGVELGTNYAKPIVDIDTARELLAKAIS
 RTREAQIMIGAAPDEIVADSFEALGANTIKEPGLCPSVSSNDQQVPSAVRYNGS
 AAVKPEEEEEERDMKKS RGFDERELFSTAESSSSSSVFFVSQSCSLASEGKNLE
 GIQDSSDQITTS LGKNGCK (SEQ ID NO:114)

[0368] 拟南芥:CIBN

[0369] MNGAIGDLLLLNFPDMSVLERQRAHLKYLNP TFDSPLAGFFADSSMITGGEMD
 SYLSTAGLNLPMYGETTVEGDSRLSISPETTLGTGNFKA AKFDTETKDCNEAA
 KKMTMNRDDLVEEGEEEEKSKITEQNGSTKSIKKMKHKAKKEENNFSNDSSKV
 TKELEKTDYI (SEQ ID NO:115)

[0370] 合成的:LoV2-Ja

[0371] SLATTLERIEKNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLQLTEYSREEILGRNCRFLQGPETD
 RATVRKIRDAIDNQTEVTVQLINYTKSGKKFWNL FHLQPMRDQKGDVQYFIGVQ
 LDGTEHVRDAAEREGVMLIKKTAENIDEAAKEL (SEQ ID NO:116)

[0372] 智人:全长WT ADAR2

[0373] DIEDEENMSSSSTDVKENRNLDNVSPKDGSTPGPGEGS QLSNNGGGGGPGRK
 RPLEEGSNGH SKYRLKKRRKTPGPVLPKNALMQLNEIKPGLQYTLLSQTGPVH
 APLFVMSVEVNGQVFEGSGPTKKKAKLHAAEKALRSFVQFPNASEAHLAMGRT
 LSVNTDFTSDQADFPDTL FNGFETPDKAEPFVYVGSNGDDSFSSSGDL SLSAS
 PVPASLAQPPLPVLPPFPSPGKNPVMILNELRPGLKYDFLSESGESHAKSFVM
 SVVVDGQFFEGSGRNKKLAKARAAQSALAAIFNLHLDQTPSRQPIPSEGLQLHL
 PQVLADAVSRLVLGKFGDLTDFSSPHARRKVLAGVVMTTGTDVKDAKVISVST
 GTKCINGEYMSDRGLALNDCHAEIISRRLRFLYTQLELYLNNKDDQKRSIFQK
 SERGGFRLKENVQFHLYISTSPCGDARIFSPHEPILEGSR SYTQAGVQWCNHG
 SLQPRPPGLLSDPSTSTFQGAGTTEPADRHPNRKARGQLRTKIESGEGTIPVRS
 NASIQTWGVLQGERLLTMSCSDKIARWNVVG IQGSLLSIFVEPIYFSS IILGSLY
 HGDHL SRAMYQRISNIEDLPPLYTLNKPLLSGISNAEARQPGKAPNFSVNWTVG
 DSAIEVINATTGKDELGRASRLCKHALYCRW MRVHGKVP SHLLRSKITKPNVYH
 ESKLAAKEYQAAKARLFTAFIKAGLGAWVEKPT EQDQFSLTP (SEQ ID
 NO:117)

[0374] 智人:全长WT ADAR2 (E488Q)

[0375] DIEEENMSSSSTDVKENRNLDNVSPKDGSTPGPGEGSQLSNGGGGGPGRK
RPLEEGSNHSHKYRLKRRKTPGPVLPKNALMQLNEIKPGLQYTLLSQTGPVH
APLFVMSVEVNGQVFEGSGPTKKKAKLHAAEKALRSFVQFPNASEAHLAMGRT
LSVNTDFTSDQADFPDTLFGFETPDKAEPFVVGSDSDFSSSGDLSLSAS
PVPASLAQPPLPVLPPFPSPGKNPVMILNELRPGLKYDFLSESGESHAKSFVM
SVVVDGQFFEGSGRNKKLAKARAAQSALAAIFNLHLDQTPSRQPIPSEGLQLHL
PQVLADAVSRLVLGKFGDLTDNFSSPHARRKVLAVGVMTTGTDVKDAKVISVST
GTCINGEYMSDRGLALNDCHAEIISRRSLLRFLYTQLELYLNNKDDQKRSIFQK
SERGGFRLKENVQFHLYISTSPCGDARIFSPHEPILEGSRSTYQAGVQWCNHG
SLQPRPPGLLSDPSTSTFQAGGTEPADRHPNRKARGQLRTKIESGQGTIPVR
SNASIQTDGVLQGERLLTMSCSDKIARWNVVGIIQGSLLSIFVEPIYFSSIILGSL
YHGDHLSRAMYQRISNIEDLPPLYTLNKPLLSGISNAEARQPGKAPNFSVNWTV
GDSAIEVINATTGKDELGRASRLCKHALYCRWMRVHGKVP SHLLRSKITKPNVY
HESKLAKEYQAAKARLFTAFIKAGLGAWWEKPT EQDQFSLTP (SEQ ID
NO:118)

[0376] 智人:截短的WT ADAR2

[0377] VLADAVSRLVLGKFGDLTDNFSSPHARRKVLAVGVMTTGTDVKDAKVISVSTGT
KINGEYMSDRGLALNDCHAEIISRRSLLRFLYTQLELYLNNKDDQKRSIFQKSE
RGGFRLKENVQFHLYISTSPCGDARIFSPHEPILEGSRSTYQAGVQWCNHGSL
QPRPPGLLSDPSTSTFQAGGTEPADRHPNRKARGQLRTKIESGEGTIPVRSN
ASIQTWDGVLQGERLLTMSCSDKIARWNVVGIIQGSLLSIFVEPIYFSSIILGSLYH
GDHLSRAMYQRISNIEDLPPLYTLNKPLLSGISNAEARQPGKAPNFSVNWTVGD
SAIEVINATTGKDELGRASRLCKHALYCRWMRVHGKVP SHLLRSKITKPNVYHE
SKLAAKEYQAAKARLFTAFIKAGLGAWWEKPT EQDQFSLTP (SEQ ID
NO:119)

[0378] 智人:截短的WT ADAR2 (E488Q)

[0379] VLADAVSRLVLGKFGDLTDNFSSPHARRKVLAVGVMTTGTDVKDAKVISVSTGT
KINGEYMSDRGLALNDCHAEIISRRSLLRFLYTQLELYLNNKDDQKRSIFQKSE
RGGFRLKENVQFHLYISTSPCGDARIFSPHEPILEGSRSTYQAGVQWCNHGSL
QPRPPGLLSDPSTSTFQAGGTEPADRHPNRKARGQLRTKIESGQGTIPVRSN
ASIQTWDGVLQGERLLTMSCSDKIARWNVVGIIQGSLLSIFVEPIYFSSIILGSLYH
GDHLSRAMYQRISNIEDLPPLYTLNKPLLSGISNAEARQPGKAPNFSVNWTVGD
SAIEVINATTGKDELGRASRLCKHALYCRWMRVHGKVP SHLLRSKITKPNVYHE
SKLAAKEYQAAKARLFTAFIKAGLGAWWEKPT EQDQFSLTP (SEQ ID
NO:120)

[0380] 智人&合成的:MS2-ADAR1脱氨酶结构域-核排斥信号(Nuclear Exclusion
Signal)

- [0381] MASNFTQFVLVDNNGGTGDVTVAPSNFANGIAEWISSNSRSQAYKVTC SVRQSS
 AQNRKYTIKVEVPKGAWRSYLN MELTIPIFATNSDCELIVKAMQGLLKDGNPIPS
 AIAANS GIYGGSGSGAGSGSPAGGGAPGSGGGGSKAERMGFTEVTPVTGASLR
 RTMLLLSR SPEAQPKTLPLTGSTFHDQIAMLSHRCFNLTNSFQPSLLGRKILAA
 IIMKKDSEDMGVVSLGTGNRCVKGDSLKGETVNDCHAEIISR RGFIRFLYSE
 LMKYNSQTAKDSIFEPAKGGEKLQIKKTVSFHLYISTAPCGDGALFDKSCSDRA
 MESTESRHYPVFENPKQGKLR TKVENGEGETIPVESSDIVPTWDGIRLGERLRT
 MSCSDKILRWNVLGLQGALLTHFLQPIYLKSVTLGYLFSQGH LTRAICCRVTRD
 GSAFEDGLRHPFIVNHPKVGRVSIYDSKRQSGKTKETS VNWCLADGYDLEILDG
 TRGTVDGPRNELSRVSKKNIFLLFKKLC SFRYRRDLLRLSYGEAKKAARDYETA
 KNYFKKGLKDMGYGNWISKPQEEKNFYLC PVGSGSGSLPPLERLT (SEQ ID
 NO:121)
- [0382] 智人&合成的:MS2-ADAR1脱氨酶结构域(E1008Q)-核排斥信号
- [0383] MASNFTQFVLVDNNGGTGDVTVAPSNFANGIAEWISSNSRSQAYKVTC SVRQSS
 AQNRKYTIKVEVPKGAWRSYLN MELTIPIFATNSDCELIVKAMQGLLKDGNPIPS
 AIAANS GIYGGSGSGAGSGSPAGGGAPGSGGGGSKAERMGFTEVTPVTGASLR
 RTMLLLSR SPEAQPKTLPLTGSTFHDQIAMLSHRCFNLTNSFQPSLLGRKILAA
 IIMKKDSEDMGVVSLGTGNRCVKGDSLKGETVNDCHAEIISR RGFIRFLYSE
 LMKYNSQTAKDSIFEPAKGGEKLQIKKTVSFHLYISTAPCGDGALFDKSCSDRA
 MESTESRHYPVFENPKQGKLR TKVENGGTIPVESSDIVPTWDGIRLGERLRT
 MSCSDKILRWNVLGLQGALLTHFLQPIYLKSVTLGYLFSQGH LTRAICCRVTRD
 GSAFEDGLRHPFIVNHPKVGRVSIYDSKRQSGKTKETS VNWCLADGYDLEILDG
 TRGTVDGPRNELSRVSKKNIFLLFKKLC SFRYRRDLLRLSYGEAKKAARDYETA
 KNYFKKGLKDMGYGNWISKPQEEKNFYLC PVGSGSGSLPPLERLTL (SEQ ID
 NO:122)
- [0384] 黄化瘤胃球菌(*Ruminococcus flavefaciens*):RfxCas13d (CasRx)
- [0385] EASIEKKKSFAKGMGVKSTLVSGSKVYMTTFAEGSDARLEKIVEGDSIRSVNEG
 EAFSAEMADKNAGYKIGNAKFSHPKGYAVVANNPLYTGPVQQDMLGLKETLEK
 RYFGESADGNDNICIQVIHNILDIEKILAEYITNAAYAVNNISGLDKDIIGFGKFSTV
 YTYDEFKDP EHHRAAFNNNDKLINA IKAQYDEFDNFLDN PRLGYFGQAFFSKEG
 RNYIINYGN ECDILALLSGLRHWV VHNNEEESRISRTWLYNL DKNLDNEYISTL
- [0386] NYLYDRITNELTNSFSKNSAANVNYIAETLGINPAEFAEQYFRFSIMKEQKNLGF
 NITKLREVM LDRKDMSEIRKNHKVFDSIRTKVYTMMD FVIYRYIEEDAKVAAAN
 KSLPDNEKSLSEKDIFVINLRGSFNDDQKDALY YDEANRIWRKLENIMHNIKEFR
 GNKTREYKKK DAPRLPRILPAGRDVSAFSKLMYAL TMFLDGKEINDLLTTLINKF
 DNIQSFLKVMPLIGVNAKFVEEYAFFKDSAKI ADELRLIKSFARMGEPIADARRA
 MYIDAIRILGTNLSYDELKALADTFSLDENG NKLKKGKHGMRNFIINNVISNKR FH
 YLIRYGDPAHLHEIAKNEAVVKFVLGRIADIQKKQGQNGKNQIDRYYETCIGKDK
 GKSVSEKVDALTKIITGMNYDQFDKRSVIEDT GRENAEREKFKKIISLYLTVIYHI
 LKNIVNINAR YVIGFHCVERDAQLYKEKGYDINLKKLEEKGFSSVTKLCAGIDETA
 PDKRKDVEKEMAERAKESIDSLESANPKLYANYIKYSDEKKAEEFTRQINREKA
 KTALNAYLRNTKWNVIREDLLRIDNKTCTLFRNKAVHLEVARYVHAYINDIAEVN
 SYFQLYHYIMQR IIMNEREYKSSGKVSEYF DAVNDEKKYNDRL LKLLCVPFGYCI
 PRFKNLSIEALFDRNEAAKFDKEKKK VSGNSGSG (SEQ ID NO:123)
- [0387] 黄化瘤胃球菌&合成的:失活 (dead) RfxCas13d (dCasRx)

- EASIEKKKSFAGMGVVKSTLVSGSKVYMTTFAEGSDARLEKIVEGDSIRSVNEG
EAFSAEMADKNAGYKIGNAKFSPKGYAVVANNPLYTGPVQQDMLGLKETLEK
RYFGESADGNDNICIQVIHNILDIEKILAEYITNAAYAVNNISGLDKDIIGFGKFSTV
YTYDEFKDPPEHHRAAFNNNDKLINAIAKQYDEFDNFLDNPRLGYFGQAFFSKEG
RNYIINYGNECYDILALLSGLAHWVVANNEEESRISRTWLYNLDKNLDNEYISTL
NYLYDRITNELTNSFSKNSAANVNYIAETLGINPAEFAEQYFRFSIMKEQKNLGF
NITKLREVMLDRKDMSEIRKNHKVFDSIRTQVYTMMDVFIYRYIEEDAKVAAAN
KSLPDNEKSLSEKIDIFVINLRGSFNDDQKDALYDEANRIWRKLENIMHNIKEFR
GNKTREYKKKDAPRLPRILPAGRDVSAFSKLMYALTMFLDGKEINDLLTTLINKF
[0388] DNIQSFLKVMPLIGVNAKFVEEYAFFKDSAKIADELRLIKSFARMGEPIADARRA
MYIDAIRILGTNLSYDELKALADTFSLDENGKLLKKGKHGMRNFIINNVISNKRFB
YLIRYGDPAHLHEIAKNEAVVKFVLGRIADIQKKQGQNGKNQIDRYEYETCIGKDK
GKSVSEKVDALTKIITGMNYDQFDKRSVIEDTGRENAEREKFKKIIISLYLTVIYHI
LKNIVNINARVIGFHCVERDAQLYKEKGYDINLKKLEEKGFSSVTKLCAGIDETA
PDKRKDVEKEMAERAKESIDSLESANPKLYANYIKYSDEKKAEEFTRQINREKA
KTALNAYLRNTKWNVIREDLLRIDNKTCTLFANKAVALEVARYVHAYINDIAEVN
SYFQLYHYIMQRIIMNERYEKSSGKVSEYFDAVNDEKKYNDRLLKLLCVPFGYCI
PRFKNLSIEALFDRNEAAKFDKEKKKVSNGSGSGPKKKRQVAAAYPYDVPDYA
(SEQ ID NO:124)
- [0389] 普雷沃氏菌属(*Prevotella* sp.)P5-125:PspCas13b
MNIPALVENQKKYFGTYSVMAMLNAQTVLDHIQKVADIEGEQNNENLWFHP
VMSHLYNAKNGYDKQPEKTMFIERLQSYFPFLKIMAENQREYSNGKYKQNRV
EVNSNDIFEVLKRAFGVLKMYRDLTNHYKTYEEKLNDGCEFLTSTEQPLSGMIN
NYTVALRNMNERYGYKTEDLAFIQDKRFKFKVDAYGKKKSQVNTGFFLSLQD
[0390] YNGDTQKKLHLSGVGIALLICLFLDKQYINIFLSRLPIFSSYNAQSEERRIIISFGI
NSIKLPKDRIHSEKSNKSVAMDMLNEVKRCPDELFTTLSAEKQSRFRIISDDHNE
VLMKRSSDRFVPLLLQYIDYGKLFDHIRFHVNMGKLRYLLKADKTCIDGQTRVR
VIEQPLNGFGRLEEAETMRKQENGTFGNSGIRIRDFENMKRDDANPANYPIVD
TYTHYLENNKVEMFINDKEDSAPLLPVIEDDRYVVKTIPTSCRMSTLEIPAMAFHM
FLFGSKKTEKLIVDVHNRYKRLFQAMQKEEVTAENIASFGIAESDLPQKILDLSG
NAHGKDVDAFIRLTVDDMLTDERRIKRFKDDRKSIRSADNKMGRGFKQISTG
KLADFLAKDIVLFQPSVNDGENKITGLNYRIMQSAIAVYDSGDDYEAKQQFKLMF
EKARLIGKGTTEPHPLYKVFARSIPANAVEFYERYLIERKFYLTGLSNEIKKGNR
VDVPFIRRDQNKWKTTPAMKTLGRIYSEDLPVELPRQMFNDNEIKSHLKSPLQME
GIDFNNANVTYLIAEYMKRVLDDDFQTFYQWNRNYRYMDMLKGEYDRKGSLSQ
HCFTSVEEREGLWKERASRTERYRKQASNKIRSNRQMRNASSEIETILDKRLS
NSRNEYQKSEKVIIRYRVQDALLFLLAKKTLTELADFDGERFKLKEIMPDAEKGI
LSEIMPMSFTFEKGGKTYTITSEGMLKKNYGDFVFLASDKRIGNLLELVGSDIVS
KEDIMEEFNKYDQCRPEISSIVFNLEKWAFDTYPELSARVDREEKVDKFKSILKILL
NNKNINKEQSDILRKIRNAFDHNNYPDKGVVEIKALPEIAMSIIKAFGEYAIMKGS
LQ (SEQ ID NO:125)
- [0391] 合成的:L17E
- [0392] IWL TALKFLGKHA AKHEAKQQLSKL (SEQ ID NO:126)
- [0393] 合成的:L17E-跨膜
- [0394] IWL TALKFLGKHA AKHEAKQQLSKLNAVGGQDTQEVI VVPHSLPFKVVVISAILALV
VLTIIISLIILIMLWQKKPR (SEQ ID NO:127)
- [0395] 合成的:KALA
- [0396] WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEA (SEQ ID NO:128)

- [0397] 合成的:KALA-跨膜
WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEANAVGQDTQEIVVPHSLPFKVVIS
[0398] AILALVVLTIISLIILIMLWQKKPR (SEQ ID NO:129)
- [0399] 合成的:Vectofusin
[0400] KKALLHAALAHLLALAHLLALLKKA (SEQ ID NO:130)
- [0401] 合成的:Vectofusin-跨膜
[0402] KKALLHAALAHLLALAHLLALLKKANAVGQDTQEIVVPHSLPFKVVISAILAL
VVLTIISLIILIMLWQKKPR (SEQ ID NO:131)
- [0403] 合成的:跨膜结构域
[0404] NAVGQDTQEIVVPHSLPFKVVISAILALVVLTIISLIILIMLWQKKPR (SEQ ID
NO:132)
- [0405] 乳酸乳球菌:乳酸链球菌肽A
[0406] ITSISLCTPGCKTGALMGCMKTATCHCSIHVSK (SEQ ID NO:133)
- [0407] 乳酸乳球菌NIZO 22186:乳酸链球菌肽Z
[0408] ITSISLCTPGCKTGALMGCMKTATCNCSEIHVSK (SEQ ID NO:134)
- [0409] 乳酸乳球菌乳酸亚种F10:乳酸链球菌肽F
[0410] ITSISLCTPGCKTGALMGCMKTATCNCSEHVSK (SEQ ID NO:135)
- [0411] 乳酸乳球菌61-14:乳酸链球菌肽Q
[0412] ITSISLCTPGCKTGVMGCNLKTATCNCSEHVSK (SEQ ID NO:136)
- [0413] 猪肠链球菌(*Streptococcus hyointestinalis*):乳酸链球菌肽H
[0414] FTSISMCTPGCKTGALMTCNYKTATCHCSIKVSK (SEQ ID NO:137)
- [0415] 乳房链球菌(*Streptococcus uberis*):乳酸链球菌肽U
[0416] ITSKSLCTPGCKTGILMTCPLKTATCGCHFG (SEQ ID NO:138)
- [0417] 乳房链球菌:乳酸链球菌肽U2
[0418] VTSKSLCTPGCKTGILMTCPLKTATCGCHFG (SEQ ID NO:139)
- [0419] 解没食子酸链球菌巴氏亚种(*Streptococcus galloyticus* subsp.p
asteurianus):乳酸链球菌肽P
[0420] VTSKSLCTPGCKTGILMTCALKTATCGCHFG (SEQ ID NO:140)
- [0421] 乳酸乳球菌(*L.lactis*)NZ9800:乳酸链球菌肽A S29A
[0422] ITSISLCTPGCKTGALMGCMKTATCHCAIHVSK (SEQ ID NO:141)
- [0423] 乳酸乳球菌NZ9800:乳酸链球菌肽A S29D
[0424] ITSISLCTPGCKTGALMGCMKTATCHCDIHVSK (SEQ ID NO:142)
- [0425] 乳酸乳球菌NZ9800:乳酸链球菌肽A S29E
[0426] ITSISLCTPGCKTGALMGCMKTATCHCEIHVSK (SEQ ID NO:143)
- [0427] 乳酸乳球菌NZ9800:乳酸链球菌肽A S29G

- [0428] ITSISLCTPGCKTGALMGCNMKTATCHCGIHVSK (SEQ ID NO:144)
- [0429] 乳酸乳球菌NZ9800:乳酸链球菌肽A K22T
- [0430] ITSISLCTPGCKTGALMGCNMTTATCHCSIHVSK (SEQ ID NO:145)
- [0431] 乳酸乳球菌NZ9800:乳酸链球菌肽A N20P
- [0432] ITSISLCTPGCKTGALMGCPMKTATCHCSIHVSK (SEQ ID NO:146)
- [0433] 乳酸乳球菌NZ9800:乳酸链球菌肽A M21 V
- [0434] ITSISLCTPGCKTGALMGCNVKTATCHCSIHVSK (SEQ ID NO:147)
- [0435] 乳酸乳球菌NZ9800:乳酸链球菌肽A K22S
- [0436] ITSISLCTPGCKTGALMGCNMSTATATCHCSIHVSK (SEQ ID NO:148)
- [0437] 乳酸乳球菌NZ9800:乳酸链球菌肽Z N20K
ITSISLCTPGCKTGALMGCKMKTATCNCSIHVSK (SEQ ID NO:149)
- [0438] 乳酸乳球菌NZ9800:乳酸链球菌肽Z M21K
- [0439] ITSISLCTPGCKTGALMGCNKKTATCNCSIHVSK (SEQ ID NO:150)
- [0440] 相关RNA序列(5' -3')
- [0441] 合成的:具有终止子的用于sgRNA的MS2茎环spCas9支架RNA实例1
GUUUUAGAGCUAGGCCAACAUAGGAUCACCCAUGUCUGCAGGGCCUAG
CAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCCAACAUAGAGGAUCA
[0442] CCAUGUCUGCAGGGCCAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU (SEQ
ID NO:151)
- [0443] 合成的:具有终止子的用于sgRNA的MS2茎环spCas9支架RNA实例2
GUUUUAGAGCUAGGCCAACAUAGGAUCACCCAUGUCUGCAGGGCCUAG
CAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCCAACAUAGAGGAUCA
[0444] CCAUGUCUGCAGGGCCAAGUGGCACCGAGUCGGUGCGGGAGCACAUGA
GGAUCACCCAUGUGCGACUCCACAGUCACUGGGGAGUCUUCUUUUUU
UU (SEQ ID NO:152)
- [0445] 合成的:具有终止子的用于sgRNA的MS2茎环spCas9支架RNA实例3
GUUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUA AAAUAAGGCUAGUC
CGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCGGGAGCACAUGAG
[0446] GAUCACCCAUGUGCGACUCCACAGUCACUGGGGAGUCUUCUUUUUU
U (SEQ ID NO:153)
- [0447] 合成的:4xMS2茎环RNA支架实例
UUCUAGAUAUCGAAACAUGAGGAUCACCCAUAUCUGCAGUCGACAUCGA
[0448] AACAUAGGAUCACCCAUGUCUGCAGUCGACAUCGAAACAUGAGGAUCAC
CCAUGUCUGCAGUCGACAUCGAAACAUGAGGAUCACCCAUGUCUGCAGU
CGACAUCGAAUCGAUAAGCUUCAGAUCAGAUCUAG (SEQ ID NO:154)
- [0449] 合成的:MS2茎环实例1
- [0450] ACAUGAGGAUCACCCAUGU (SEQ ID NO:155)
- [0451] 合成的:MS2茎环实例2

- [0452] **ACAUGAGGAUCACCCAUAU (SEQ ID NO:156)**
- [0453] 合成的:MS2茎环实例3
- [0454] **CCACAGUCACUGGG (SEQ ID NO:157)**
- [0455] 合成的:2xMS2茎环实例
- [0456] **ACAUGAGGAUCACCCAUGUCUGCAGGGCCUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUA
GUCCGUUAUCAACUUGGCCAACAUAGAGGAUCACCCAUGU (SEQ ID
NO:158)**
- [0457] 合成的:具有终止子的用于sgRNA的2xPP7茎环spCas9支架RNA实例
- [0458] **GUUUUAGAGCUAGGCCGGAGCAGACGAUAUGGCGUCGCUCCGGCCUAGC
AAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCCGGAGCAGACGAUAU
GGCGUCGCUCCGGCCAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU (SEQ ID
NO:159)**
- [0459] 合成的:PP7茎环实例
- [0460] **GCCGGAGCAGACGAUAUGGCGUCGCUCCGGCC (SEQ ID NO:160)**
- [0461] 合成的:具有终止子的用于sgRNA的COM茎环spCas9支架RNA实例
- [0462] **GUUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC
CGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCCUGAAUGCCUGCG
AGCAUCUUUUUUU (SEQ ID NO:161)**
- [0463] 合成的:COM茎环实例
- [0464] **CUGAAUGCCUGCGAGCAUC (SEQ ID NO:162)**
- [0465] 合成的ZKSCAN1环状剪接RNA:上游内含子
- [0466] **AGUGACAGUGGAGAUUGUACAGUUUUUCCUCGAUUUGUCAGGAUUUUU
UUUUUUUGACGGAGUUUAACUUCUUGUCUCCAGGUAGGAAGUGCAGUG
GCGUAAUCUCGGCUCACUACAACCUCCACCUCUGGGUUC AAGCGUUUC
UCCUGCCUCAGCUUUCGAGUAGCUGGGAUUACAGGCGCCUGCCACCAU
GCCUGCUGACUUUUGUAUUUUUAGUAGAGACGGGGUUUCACCAUGUUG
GCCAGGCUGGUCUUGAACUCCUGACCGCAGGCGAUUGGCCUGCCUCGGC
CUCCCAAAGUGCUGAGAUUACAGGCGUGAGCCACCACCCCGGCCUCAG
GAGCGUUCUGAUAGUGCCUCGAUGUGCUGCCUCCUAUAAAGUGUUAGCA
GCACAGAUCACUUUUUGUAAAGGUACGUACUAAUGACUUUUUUUUUAUAC
UUCAGG (SEQ ID NO:163)**
- [0467] 合成的ZKSCAN1环状剪接RNA:下游内含子

- UAAGAAGCAAGGUUUCAUUUAGGGGAAGGGAAAUGAUUCAGGACGAGAG
UCUUUGUGCUGCUGAGUGCCUGUGAUGAAGAAGCAUGUUAGUCCUGGGC
AACGUAGCGAGACCCCAUCUCUACAAAAAUAGAAAAUUAGCCAGGUAU
AGUGGCGCACACCUGUGAUUCCAGCUACGCAGGAGGCUGAGGUGGGAGG
AUUGCUUGAGCCCAGGAGGUUGAGGCUGCAGUGAGCUGUAAUCAUGCCA
CUACUCCAACCUGGGCAACACAGCAAGGACCCUGUCUCAAAAGCUACUUA
CAGAAAAGAAUUAGGCUCGGCACGGUAGCUCACACCCUGUAAUCCCAGCAC
UUUGGGAGGCUGAGGCGGGCAGAUACAUUGAGGUCAGGAGUUUGAGACC
[0468] AGCCUGGCCAACAUUGGUGAAACCUUGUCUCUACUAAAAUAUGAAAAUUA
GCCAGGCAUGGUGGCACAUUCCUGUAAUCCCAGCUACUCGGGAGGCUGA
GGCAGGAGAAUCACUUGAACCCAGGAGGUGGAGGUUGCAGUAAGCCGAG
AUCGUACCACUGUGCUCUAGCCUUGGUGACAGAGCGAGACUGUCUAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAUUAUUAAAAUUUAAAAAAAAAUGAAAA
AAGCUGCAUGCUUGUUUUUGUUUUUAGUUUAUUCUACAUUGUUGUCAUU
AUUACCAAUAUUGGGGAAAAUACAACUACAGACCAAUCUCAGGAGUUA
AAUGUUACUACGAAGGCAAUGAACUAUGCGUAAUGAACCCUGGUAGGCAU
UAG (SEQ ID NO:164)
- [0469] 智人β-珠蛋白和免疫球蛋白重链基因:线性剪接RNA内含子
- [0470] GUAAGUAUCAAGGUUACAAGACAGGUUUAAGGAGACCAAUAGAAACUGGG
CUUGUCGAGACAGAGAAGACUCUUGCGUUUCUGAUAGGCACCUAUUGGU
CUUACUGACAUCCACUUUGCCUUUCUCUCCACAG (SEQ ID NO:165)
- [0471] 相关DNA序列(5' -3')
- [0472] 合成的:锌指ZF6/10结合位点
- [0473] **GAAGAAGCTGCAGGAGGT (SEQ ID NO:166)**
- [0474] 合成的:锌指ZF8/7结合位点
- [0475] **GCTGGAGGGGAAGTGGTC (SEQ ID NO:167)**
- [0476] 合成的:锌指ZF6/10&ZF8/7结合位点
- [0477] **GAAGAAGCTGCAGGAGGTGCTGGAGGGGAAGTGGTC (SEQ ID NO:168)**
- [0478] 合成的:锌指ZF6/10&ZF8/7结合位点8x重复序列实例
- [0479] TGAAGAAGCTGCAGGAGGTGCTGGAGGGGAAGTGGTCCGGATCTTGAAGA
AGCTGCAGGAGGTGCTGGAGGGGAAGTGGTCCGGATCTTGAAGAAGCTGC
AGGAGGTGCTGGAGGGGAAGTGGTCCGGATCTTGAAGAAGCTGCAGGAGG
TGCTGGAGGGGAAGTGGTCCGGATCTTGAAGAAGCTGCAGGAGGTGCTGG
AGGGGAAGTGGTCCGGATCTTGAAGAAGCTGCAGGAGGTGCTGGAGGGGA
AGTGGTCCGGATCTTGAAGAAGCTGCAGGAGGTGCTGGAGGGGAAGTGGT
CCGGATCTTGAAGAAGCTGCAGGAGGTGCTGGAGGGGAAGTGGTCC (SEQ
ID NO:169)
- [0480] 合成的:锌指ZF9结合位点
- [0481] **GTAGATGGA (SEQ ID NO:170)**
- [0482] 合成的:锌指MK10结合位点
- [0483] **CGGCGTAGCCGATGTCGCGC (SEQ ID NO:171)**
- [0484] 合成的:锌指268结合位点

- [0485] **AAGGGTTCA (SEQ ID NO:172)**
- [0486] 合成的:锌指NRE结合位点
- [0487] **GCGTGGGCG (SEQ ID NO:173)**
- [0488] 合成的:锌指268/NRE或268//NRE结合位点实例1
- [0489] **AAGGGTTCAGCGTGGGCG (SEQ ID NO:174)**
- [0490] 合成的:锌指268/NRE或268//NRE结合位点实例2
- [0491] **AAGGGTTCAGGCGTGGGCG (SEQ ID NO:175)**
- [0492] 合成的:锌指268/NRE或268//NRE结合位点实例3
- [0493] **AAGGGTTCAGTGCGTGGGCG (SEQ ID NO:176)**
- [0494] 合成的:在GFP中的FokI锌指核酸酶17-2&18-2结合位点
- [0495] **GATCCGCCACAACATCGAGGACGGCA (SEQ ID NO:177)**
- [0496] 人密码子优化的酿脓链球菌Cas9(spCas9)NLS

[0497]

ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGG
 CTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATTCAGGT
 GCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCC
 TGCTGTTGACAGCGGCGAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACC
 GCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACCGGATCTGCTATCTGCAAGAG
 ATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTG
 GAAGAGTCCTTCTGTTGGAAGAGGATAAGAAGCACGAGCGGCACCCCAT
 CTTGCGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCACCAT
 CTACCACCTGAGAAAGAACTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGC
 GGCTGATCTATCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCC
 TGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTC
 ATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTGAGGAAAACCCCATCAAC
 GCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAG
 CAGACGGCTGGAAAATCTGATCGCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAATG
 GCCTGTTCCGAAACCTGATTGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCAACTTCA
 AGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGATGCCAAACTGCAGCTGAGCAAGGAC
 ACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCAGATCGGCGACCAGTA
 CGCCGACCTGTTTCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGAG
 CGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCT
 CTATGATCAAGAGATACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAAG
 CTCTCGTGCGGCAGCAGCTGCCTGAGAAGTACAAAGAGATTTTCTTCGACC
 AGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATTGACGGCGGAGCCAGCCAGGAA
 GAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAAAAGATGGACGGCACCGAG
 GAACTGCTCGTGAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGAC
 CTTGACAACGGCAGCATCCCCACCAGATCCACCTGGGAGAGCTGCACG
 CCATTCTGCGGGCGCAGGAAGATTTTTACCCATTCTGAAGGACAACCGGG
 AAAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGCATCCCCTACTACGTGGGCCCTC
 TGGCCAGGGGAAACAGCAGATTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGCGAGGAA
 ACCATCACCCCTGGAACCTCGAGGAAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCCGC
 CCAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGATAAGAACCTGCCCAACGA
 GAAGGTGCTGCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTATAA
 CGAGCTGACCAAAGTGAAATACGTGACCGAGGGAATGAGAAAGCCCGCCTT
 CCTGAGCGGCGAGCAGAAAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCA
 ACCGGAAAGTGACCGTGAAGCAGCTGAAAGAGGACTACTTCAAGAAAATCG
 AGTGCTTCGACTCCGTGGAAATCTCCGGCGTGGAAAGATCGGTTCAACGCCT
 CCCTGGGCACATACCACGATCTGCTGAAAATTATCAAGGACAAGGACTTCC

TGGACAATGAGGAAAACGAGGACATTCTGGAAGATATCGTGCTGACCCTGA
 CACTGTTTGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAACGGCTGAAAACCTATGCCC
 ACCTGTTCGACGACAAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGAGATACACC
 GGCTGGGGCAGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGC
 AGTCCGGCAAGACAATCCTGGATTTCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACA
 GAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGAGGACA
 TCCAGAAAGCCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATT
 GCCAATCTGGCCGGCAGCCCCGCCATTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGT
 GAAGGTGGTGGACGAGCTCGTGAAAGTGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGA
 ACATCGTGATCGAAATGGCCAGAGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGACAG
 AAGAACAGCCGCGAGAGAATGAAGCGGATCGAAGAGGGCATCAAAGAGCT
 GGGCAGCCAGATCCTGAAAGAACACCCCGTGGAAAACACCCAGCTGCAGA
 ACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAATGGGCGGGATATGTACGTGG
 ACCAGGAAGCTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGATGTGGACCATATCG
 TGCCTCAGAGCTTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCA
 GAAGCGACAAGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCTCCGAAGAGGTC
 GTGAAGAAGATGAAGAATACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATT
 ACCCAGAGAAAAGTTCGACAATCTGACCAAGGCCGAGAGAGGGCGGCCTGAG
 CGAACTGGATAAGGCCGGCTTCATCAAGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGC
 AGATCACAAAGCACGTGGCACAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACTAAGT
 ACGACGAGAATGACAAGCTGATCCGGGAAGTGAAAGTGATCACCTGAAGT
 CCAAGCTGGTGTCCGATTTCCGGAAGGATTTCCAGTTTTACAAAGTGCGCG
 AGATCAACAATACTACCACCACGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTCGTGG
 GAACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAGCTGGAAAGCGAGTTCGTGTACG
 GCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAG
 GAAATCGGCAAGGCTACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACT
 TTTTCAAGACCGAGATTACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCTC
 TGATCGAGACAAACGGCGAAACCGGGGAGATCGTGTGGGATAAGGGCCGG
 GATTTTGCCACCGTGCAGAAAGTGCTGAGCATGCCCAAGTGAATATCGTG
 AAAAAGACCGAGGTGCAGACAGGCGGCTTCAGCAAAGAGTCTATCCTGCC
 AAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCAGAAAGAAGGACTGGGACCCTAA
 GAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTATTCTGTGCTGGTGG
 TGGCCAAAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAAACTGAAGAGTGTGAAAGAGC
 TGCTGGGGATCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCCATCG
 ACTTTCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTGA AAAAAGGACCTGATCATCA
 AGCTGCCTAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATGC
 TGGCCTCTGCCGGCGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCC
 AAATATGTGAACTTCTGTACCTGGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGC
 TCCCCCGAGGATAATGAGCAGAAACAGCTGTTTGTGGAACAGCACAAAGCAC
 TACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCTCCAAGAGAGTGATC
 CTGGCCGACGCTAATCTGGACAAAGTGCTGTCCGCCTACAACAAGCACCGG
 GATAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAATATCATCCACCTGTTTACCCTG
 ACCAATCTGGGAGCCCCTGCCGCCTTCAAGTACTTTGACACCACCATCGAC
 CGGAAGAGGTACACCAGCACCAAAGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCA
 CCAGAGCATACCCGGCCTGTACGAGACACGGATCGACCTGTCTCAGCTGG
 GAGGCGACGGATCCCCAAGAAGAAGAGGAAAGTCTCGAGCGACTACAAA
 GACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATG
 ACAAGGCTGCAGGATGA (SEQ ID NO:178)

[0498]

[0499] 人密码子优化的酿脓链球菌Cas9 (spCas9) 双向 (BP) NLS

[0500]

ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGG
 CTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATTCAAGGT
 GCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCCTGATCGGAGCCC
 TGCTGTTCGACAGCGGCGAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACC
 GCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACCGGATCTGCTATCTGCAAGAG
 ATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTG
 GAAGAGTCCTTCTGTTGGAAGAGGATAAGAAGCACGAGCGGCACCCCAT
 CTTGCGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCACCAT
 CTACCACCTGAGAAAGAACTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGC
 GGCTGATCTATCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCC
 TGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTC
 ATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAAAACCCCATCAAC
 GCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAG
 CAGACGGCTGGAAAATCTGATCGCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAATG
 GCCTGTTCGGAAACCTGATTGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCAACTTCA
 AGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGATGCCAAACTGCAGCTGAGCAAGGAC
 ACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCAGATCGGCGACCAGTA
 CGCCGACCTGTTTCTGGCCGCCAAGAACCCTGTCCGACGCCATCCTGCTGAG
 CGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCT
 CTATGATCAAGAGATACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAAG
 CTCTCGTGCGGCAGCAGCTGCCTGAGAAGTACAAAGAGATTTTCTTCGACC
 AGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATTGACGGCGGAGCCAGCCAGGAA
 GAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAAAAGATGGACGGCACCAG
 GAACTGCTCGTGAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGAC
 CTTGACAACGGCAGCATCCCCACCAGATCCACCTGGGAGAGCTGCACG
 CCATTCTGCGGGCGGAGGAAGATTTTTACCCATTCTGAAGGACAACCGGG
 AAAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGCATCCCCTACTACGTGGGCCCTC
 TGGCCAGGGGAAACAGCAGATTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGCGAGGAA
 ACCATCACCCCTGGAACCTCGAGGAAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCCGC
 CCAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGATAAGAACCCTGCCAACGA
 GAAGGTGCTGCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTATAA
 CGAGCTGACCAAAGTGAAATACGTGACCGAGGGAATGAGAAAGCCCGCCTT
 CCTGAGCGGCGAGCAGAAAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCA
 ACCGAAAGTGACCGTGAAGCAGCTGAAAGAGGACTACTTCAAGAAAATCG
 AGTGCTTCGACTCCGTGGAATCTCCGGCGTGGAAGATCGGTTCAACGCCT
 CCCTGGGCACATACCACGATCTGCTGAAAATTATCAAGGACAAGGACTTCC
 TGGACAATGAGGAAAACGAGGACATTCTGGAAGATATCGTGCTGACCCTGA
 CACTGTTTGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAACGGCTGAAAACCTATGCC
 ACCTGTTTCGACGACAAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGAGATACACC
 GGCTGGGGCAGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGC
 AGTCCGGCAAGACAATCCTGGATTTCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACA

[0501]

GAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGAGGACA
TCCAGAAAGCCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATT
GCCAATCTGGCCGGCAGCCCCGCCATTAAGAAGGGGCATCCTGCAGACAGT
GAAGGTGGTGGACGAGCTCGTCAAAGTGATGGGCCGGCACAAGCCCAGAGA
ACATCGTGATCGAAATGGCCAGAGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGACAG
AAGAACAGCCGCGAGAGAATGAAGCGGATCGAAGAGGGGCATCAAAGAGCT
GGGCAGCCAGATCCTGAAAGAACACCCCGTGGAAAACACCCAGCTGCAGA
ACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAATGGGCGGGATATGTACGTGG
ACCAGGAAGTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGATGTGGACCATATCG
TGCTCAGAGCTTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCA
GAAGCGACAAGAACCAGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCTCCGAAGAGGTC
GTGAAGAAGATGAAGAATACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATT
ACCCAGAGAAAAGTTCGACAATCTGACCAAGGCCGAGAGAGGGCGGCCTGAG
CGAACTGGATAAGGCCGGCTTCATCAAGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGC
AGATCACAAAGCACGTGGCACAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACTAAGT
ACGACGAGAATGACAAGCTGATCCGGGAAGTGAAAGTGATCACCTGAAGT
CCAAGCTGGTGTCCGATTTCCGGAAGGATTTCCAGTTTTACAAAGTGCGCG
AGATCAACAATACTACCACACGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTCGTGG
GAACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAGCTGGAAAGCGAGTTCGTGTACG
GCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAG
GAAATCGGCAAGGCTACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACT
TTTTCAAGACCGAGATTACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCTC
TGATCGAGACAAACGGCGAAACCAGGGGAGATCGTGTGGGATAAGGGCCGG
GATTTTGCCACCGTGCAGAAAGTGCTGAGCATGCCCAAGTGAATATCGTG
AAAAGACCGAGGTGCAGACAGGCGGCTTCAGCAAAGAGTCTATCCTGCC
AAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCAGAAAGAAGGACTGGGACCCTAA
GAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTATTCTGTGCTGGTGG
TGGCCAAAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAACTGAAGAGTGTGAAAGAGC
TGCTGGGGATCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCCATCG
ACTTTCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTGAAAAAGGACCTGATCATCA
AGCTGCCTAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATGC
TGGCCTCTGCCGGCGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCC
AAATATGTGAACTTCTGTACCTGGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGC
TCCCCGAGGATAATGAGCAGAAACAGCTGTTTGTGGAACAGCACAAAGCAC
TACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCTCCAAGAGAGTGATC
CTGGCCGACGCTAATCTGGACAAAGTGCTGTCCGCCTACAACAAGCACCGG
GATAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAATATCATCCACCTGTTTACCCTG
ACCAATCTGGGAGCCCCTGCCGCCTTCAAGTACTTTGACACCACCATCGAC
CGGAAGAGGTACACCAGCACCAAAGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCA
CCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACACGGATCGACCTGTCTCAGCTGG
GAGGCGACGGATCCGGCGGAGGCGGAAGCGGGAAAAGAACCAGCCGACGG
CAGCGAATTCGAGCCCAAGAAGAAGAGGAAAGTCTCGAGCGGAGGCGACT
ACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGA
CGATGACAAGTGA (SEQ ID NO:179)

[0502] 人密码子优化的酿脓链球菌Cas9(spCas9)BE4

[0503]

ATGAAACGGACAGCCGACGGAAGCGAGTTCGAGTCACCAAAGAAGAAGCG
 GAAAGTCTCCTCAGAGACTGGGCCTGTCGCCGTCGATCCAACCCTGCGCC
 GCCGGATTGAACCTCACGAGTTTGAAGTGTTCTTTGACCCCCGGGAGCTGA
 GAAAGGAGACATGCCTGCTGTACGAGATCAACTGGGGAGGCAGGCACTCC
 ATCTGGAGGCACACCTCTCAGAACACAAATAAGCACGTGGAGGTGAACTTC
 ATCGAGAAGTTTACCACAGAGCGGTACTTCTGCCCAATACCAGATGTAGC
 ATCACATGGTTTCTGAGCTGGTCCCCTTGCGGAGAGTGTAGCAGGGCCATC
 ACCGAGTTCCTGTCCAGATATCCACACGTGACACTGTTTATCTACATCGCCA
 GGCTGTATCACCACGCAGACCCAAGGAATAGGCAGGGCCTGCGCGATCTG
 ATCAGCTCCGGCGTGACCATCCAGATCATGACAGAGCAGGAGTCCGGCTA
 CTGCTGGCGGAACCTTCGTGAATTATTCTCCTAGCAACGAGGCCCACTGGCC
 TAGGTACCCACACCTGTGGGTGCGCCTGTACGTGCTGGAGCTGTATTGCAT
 CATCCTGGGCCTGCCCCCTTGTCTGAATATCCTGCGGAGAAAGCAGCCCCA
 GCTGACCTTCTTTACAATCGCCCTGCAGTCTTGTCACTATCAGAGGCTGCCA
 CCCACATCCTGTGGGCCACAGGCCTGAAGTCTGGAGGATCTAGCGGAGG
 ATCCTCTGGCAGCGAGACACCAGGAACAAGCGAGTCAGCAACACCAGAGA
 GCAGTGGCGGCAGCAGCGGCAGCGACAAGAAGTACAGCATCGGCCT
 GGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACA
 AGGTGCCCAGCAAGAAATTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGC
 ATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAACAGC
 CGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGA
 AGAACCGGATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGG
 TGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCCTTCCTGGTGGAAAGAGG
 ATAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTG
 GCCTACCACGAGAAGTACCCACCATCTACCACCTGAGAAAGAACTGGTG
 GACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTATCTGGCCCTGGCCCA
 CATGATCAAGTTCGGGGGCCACTTCTGATCGAGGGGCGACCTGAACCCCG
 ACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACC
 AGCTGTTTCGAGGAAAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCC
 ATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCTGATCGCC
 CAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAATGGCCTGTTTCGGAACCTGATTGCCCT
 GAGCCTGGGCCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGG
 ATGCCAAACTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAAC
 CTGCTGGCCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTTCTGGCCGCCAA
 GAACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACCGA
 GATACCAAGGCCCCCTGAGCGCCTCTATGATCAAGAGATACGACGAGCA
 CCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAAGCTCTCGTGCGGCAGCAGCTGCCTG
 AGAAGTACAAAGAGATTTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCT
 ACATTGACGGCGGAGCCAGCCAGGAAGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCA
 TCCTGGAAAAGATGGACGGCACCGAGGAACTGCTCGTGAAGCTGAACAGA
 GAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCA
 CCAGATCCACCTGGGAGAGCTGCACGCCATTCTGCGGCGGCAGGAAGATT
 TTTACCCATTCTGAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAGATCCTGACCT
 TCCGCATCCCCTACTACGTGGGCCCTCTGGCCAGGGGAAACAGCAGATTC
 GCCTGGATGACCAGAAAGAGCGAGGAAACCATCACCCCTGGAACCTCGA

[0504]

GGAAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCCGCCAGAGCTTCATCGAGCGGATGA
 CCAACTTCGATAAGAACCTGCCAACGAGAAGGTGCTGCCAAGCACAGCC
 TGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACCAAAGTGAAATACGT
 GACCGAGGGAAATGAGAAAGCCCGCCTTCTGAGCGGCGAGCAGAAAAAGG
 CCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAAGTGACCGTGAAGCAGC
 TGAAAGAGGACTACTTCAAGAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAAATCTC
 CGGCGTGGAAAGATCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACATAACCACGATCTGCT
 GAAAATTATCAAGGACAAGGACTTCTGACAAATGAGGAAAACGAGGACAT
 TCTGGAAGATATCGTGCTGACCCTGACACTGTTTGAGGACAGAGAGATGAT
 CGAGGAACGGCTGAAAACCTATGCCACCTGTTTCGACGACAAAAGTGATGAA
 GCAGCTGAAGCGGCGGAGATACACCGGCTGGGGCAGGCTGAGCCGGAAG
 CTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACAATCCTGGATTTT
 CTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACAGAACTTCATGCAGCTGATCCACGAC
 GACAGCCTGACCTTTAAAGAGGACATCCAGAAAGCCCAGGTGTCCGGCCA
 GGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCTGGCCGGCAGCCCCGCCA
 TTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGACGAGCTCGTGA
 GTGATGGGCCGGCACAAGCCCAGAACATCGTGATCGAAATGGCCAGAGA
 GAACCAGACCACCCAGAAGGGACAGAAGAAGCAGCCGCGAGAGAATGAAGC
 GGATCGAAGAGGGCATCAAAGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAACAC
 CCCGTGAAAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTG
 CAGAATGGGCGGGATATGTACGTGGACCAGGAACTGGACATCAACCGGCT
 GTCCGACTACGATGTGGACCATATCGTGCCTCAGAGCTTTCTGAAGGACGA
 CTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACAAGAACCAGGGGCAAGA
 GCGACAACGTGCCCTCCGAAGAGGTCGTGAAGAAGATGAAGAATACTGG
 CGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTCGACAATCTG
 ACCAAGGCCGAGAGAGGGCGGCTGAGCGAACTGGATAAGGCCGGCTTCAT
 CAAGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGCAGATCACAAAGCACGTGGCACAGA
 TCCTGGACTCCCGGATGAACACTAAGTACGACGAGAATGACAAGCTGATCC
 GGAAGTGAAAGTGATCACCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTTCCGGA
 AGGATTTCCAGTTTTTACAAAGTGCGCGAGATCAACAATAACCACACGCC
 ACGACGCCTACCTGAACGCCGTCGTGGGAACCGCCCTGATCAAAAAGTACC
 CTAAGCTGGAAAGCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGC
 GGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAAATCGGCAAGGCTACCGCCAAG
 TACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTTTTCAAGACCGAGATTACCCTGG
 CCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCTCTGATCGAGACAAACGGCGAAACC
 GGGGAGATCGTGTGGGATAAGGGCCGGGATTTTGCCACCGTGCGGAAAGT
 GCTGAGCATGCCCAAGTGAATATCGTGAAAAAGACCGAGGTGCAGACAG
 GCGGCTTCAGCAAAGAGTCTATCCTGCCCAAGAGGAACAGCGATAAGCTGA
 TCGCCAGAAAGAAGGACTGGGACCCTAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGC
 CCCACCGTGGCCTATTCTGTGCTGGTGGTGGCCAAAGTGAAAAAGGGCAA
 GTCCAAGAACTGAAGAGTGTGAAAGAGCTGCTGGGGATCACCATCATGGA
 AAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCCATCGACTTTCTGGAAGCCAAGGGCTA
 CAAAGAAGTGAAAAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCTAAGTACTCCCTGTT
 GAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATGCTGGCCTCTGCCGGCGAACTGCA
 GAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCCAAATATGTGAACTTCTGTACCT
 GGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCGAGGATAATGAGCAGA

[0505] AACAGCTGTTTGTGGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGC
 AGATCAGCGAGTTCTCCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCTAATCTGGACA
 AAGTGCTGTCCGCCTACAACAAGCACCCGGGATAAGCCCATCAGAGAGCAG
 GCCGAGAATATCATCCACCTGTTTACCCTGACCAATCTGGGAGCCCCTGCC
 GCCTTCAAGTACTTTGACACCACCATCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACC
 AAAGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATCACCCGGCCTGTA
 CGAGACACGGATCGACCTGTCTCAGCTGGGAGGTGACAGCGGCGGGAGC
 GGCGGGAGCGGGGGGAGCACTAATCTGAGCGACATCATTGAGAAGGAGAC
 TGGGAAACAGCTGGTCATTGAGGAGTCCATCCTGATGCTGCCTGAGGAGGT
 GGAGGAAGTGATCGGCAACAAGCCAGAGTCTGACATCCTGGTGCACACCG
 CCTACGACGAGTCCACAGATGAGAATGTGATGCTGCTGACCTCTGACGCCC
 CCGAGTATAAGCCTTGGGCCCTGGTCATCCAGGATTCTAACGGCGAGAATA
 AGATCAAGATGCTGAGCGGAGGATCCGGAGGATCTGGAGGCAGCACCAAC
 CTGTCTGACATCATCGAGAAGGAGACAGGCAAGCAGCTGGTCATCCAGGA
 GAGCATCCTGATGCTGCCCCAAGAAGTCGAAGAAGTGATCGGAAACAAGCC
 TGAGAGCGATATCCTGGTCCATACCGCCTACGACGAGAGTACCGACGAAAA
 TGTGATGCTGCTGACATCCGACGCCCCAGAGTATAAGCCCTGGGCTCTGGT
 CATCCAGGATTCCAACGGAGAGAACAATAAATCAAAATGCTGTCTGGCGGCTC
 AAAAGAACCGCCGACGGCAGCGAATTCGAGCCCAAGAAGAAGAGGAAAG
 TCTAA (SEQ ID NO:180)

[0506] 人密码子优化的酿脓链球菌Cas9 (spCas9) ABE

[0507] ATGAAACGGACAGCCGACGGAAGCGAGTTCGAGTCACCAAAGAAGAAGCG
 GAAAGTCTCTGAAGTCGAGTTTAGCCACGAGTATTGGATGAGGCACGCACT
 GACCCTGGCAAAGCGAGCATGGGATGAAAGAGAAGTCCCCGTGGGCGCCG
 TGCTGGTGCACAACAATAGAGTGATCGGAGAGGGATGGAACAGGCCAATC
 GGCCGCCACGACCCTACCGCACACGCAGAGATCATGGCACTGAGGCAGGG
 AGGCCTGGTCATGCAGAATTACCGCCTGATCGATGCCACCCTGTATGTGAC
 ACTGGAGCCATGCGTGATGTGCGCAGGAGCAATGATCCACAGCAGGATCG
 GAAGAGTGGTGTTCGGAGCACGGGACGCCAAGACCGGCGCAGCAGGCTC
 CCTGATGGATGTGCTGCACCACCCCGGCATGAACCACCGGGTGGAGATCA
 CAGAGGGAATCCTGGCAGACGAGTGCGCCGCCCTGCTGAGCGATTTCTTTA
 GAATGCGGAGACAGGAGATCAAGGCCCAGAAGAAGGCACAGAGCTCCACC
 GACTCTGGAGGATCTAGCGGAGGATCCTCTGGAAGCGAGACACCAGGCAC
 AAGCGAGTCCGCCACACCAGAGAGCTCCGGCGGCTCCTCCGGAGGATCCT
 CTGAGGTGGAGTTTTCCACGAGTACTGGATGAGACATGCCCTGACCCTGG
 CCAAGAGGGCACGCGATGAGAGGGGAGGTGCCTGTGGGAGCCGTGCTGGT
 GCTGAACAATAGAGTGATCGGCGAGGGCTGGAACAGAGCCATCGGCCTGC
 ACGACCCAACAGCCCATGCCGAAATTATGGCCCTGAGACAGGGCGGCCTG
 GTCATGCAGAACTACAGACTGATTGACGCCACCCTGTACGTGACATTCGAG
 CTTGCGTGATGTGCGCCGGCGCCATGATCCACTCTAGGATCGGCCGCGT
 GGTGTTTGGCGTGAGGAACGCAAAAACCGGCGCCGCAGGCTCCCTGATGG
 ACGTGCTGCACTACCCCGGCATGAATCACCGCGTCGAAATTACCGAGGGAA
 TCCTGGCAGATGAATGTGCCGCCCTGCTGTGCTATTTCTTTCCGGATGCCTA
 GACAGGTGTTCAATGCTCAGAAGAAGGCCCAGAGCTCCACCGACTCCGGA
 GGATCTAGCGGAGGCTCCTCTGGCTCTGAGACACCTGGCACAAGCGAGAG

[0508]

CGCAACACCTGAAAGCAGCGGGGGCAGCAGCGGGGGGTCAGACAAGAAG
TACAGCATCGGCCTGGCCATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGAT
CACCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATCAAGGTGCTGGGCAACA
CCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTGAC
AGCGGCGAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACCGCCAGAAGAA
GATACACCAGACGGAAGAACCGGATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCA
ACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCCT
TCCTGGTGGAAAGAGGATAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAAC
ATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCACCCTACCACCTG
AGAAAGAACTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGGCTGATCTA
TCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCGGGGGCCACTTCCTGATCGAGGG
CGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGT
GCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAAAACCCCATCAACGCCAGCGGCG
TGGACGCCAAGGCCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTG
GAAAATCTGATCGCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAAATGGCCTGTTGCG
AACCTGATTGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTT
CGACCTGGCCGAGGATGCCAACTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACG
ACGACCTGGACAACCTGCTGGCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTG
TTTCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTG
AGAGTGAACACCGAGATCACCAGGCCCCCTGAGCGCCTCTATGATCAAG
AGATACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAAGCTCTCGTGCG
GCAGCAGCTGCCTGAGAAGTACAAAGAGATTTTCTTCGACCAGAGCAAGAA
CGGCTACGCCGGCTACATTGACGGCGGAGCCAGCCAGGAAGAGTTCTACA
AGTTCATCAAGCCATCCTGGAAAAGATGGACGGCACCCGAGGAACTGCTCG
TGAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAAC
GGCAGCATCCCCACCAGATCCACCTGGGAGAGCTGCACGCCATTCTGCG
GCGGCAGGAAGATTTTTACCCATTCTGAAGGACAACCGGGAAAAGATCGA
GAAGATCCTGACCTTCCGCATCCCCTACTACGTGGGCCCTCTGGCCAGGG
GAAACAGCAGATTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGCGAGGAAACCATCACCC
CCTGGAACCTTCGAGGAAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCCGCCAGAGCTTC
ATCGAGCGGATGACCAACTTCGATAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTG
CCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACC
AAAGTGAAATACGTGACCGAGGGAATGAGAAAGCCCGCCTTCCTGAGCGG
CGAGCAGAAAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAAGT
GACCGTGAAGCAGCTGAAAGAGGACTACTTCAAGAAAATCGAGTGCTTCGA
CTCCGTGGAAATCTCCGGCGTGAAGATCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCA
CATAACCGATCTGCTGAAAATTATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAATGA
GGAAAACGAGGACATTCTGGAAGATATCGTGCTGACCCTGACACTGTTTGA
GGACAGAGAGATGATCGAGGAACGGCTGAAAACCTATGCCACCTGTTTGA
CGACAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGAGATACCCGGCTGGGGCA
GGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGCAAG
ACAATCCTGGATTTCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACAGAACTTCATG
CAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGAGGACATCCAGAAAGCC
CAGGTGTCCGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCTGGC
CGGCAGCCCCGCCATTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGG
ACGAGCTCGTGAAAGTGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATC

GAAATGGCCAGAGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGACAGAAGAACAGCCG
 CGAGAGAATGAAGCGGATCGAAGAGGGCATCAAAGAGCTGGGCAGCCAGA
 TCCTGAAAGAACACCCCGTGGAAAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGT
 ACCTGTACTACCTGCAGAATGGGCGGGATATGTACGTGGACCAGGAACTGG
 ACATCAACCGGCTGTCCGACTACGATGTGGACCATATCGTGCCTCAGAGCT
 TTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACAAGA
 ACCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCTCCGAAGAGGTCTGTGAAGAAGATG
 AAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCCAGAGAAAG
 TTCGACAATCTGACCAAGGCCGAGAGAGGGCGGCCTGAGCGAACTGGATAA
 GGCCGGCTTCATCAAGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGCAGATCACAAAGC
 ACGTGGCACAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACTAAGTACGACGAGAATG
 ACAAGCTGATCCGGGAAGTGAAAGTGATCACCCCTGAAGTCCAAGCTGGTGT
 CCGATTTCCGGAAGGATTTCCAGTTTTACAAAGTGCGCGAGATCAACAATA
 CCACCACGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTCTGTGGGAACCGCCCTGA
 TCAAAAAGTACCCTAAGCTGGAAAGCGAGTTCTGTACGGCGACTACAAGG
 TGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAAATCGGCAAG
 GCTACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTTTTCAAGACCG
 AGATTACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCTCTGATCGAGACA
 AACGGCGAAACCGGGGAGATCGTGTGGGATAAGGGCCGGGATTTTGCCAC
 CGTGCGGAAAGTGCTGAGCATGCCCAAGTGAATATCGTGAAAAAGACCGA
 GGTGCAGACAGGCGGCTTCAGCAAAGAGTCTATCCTGCCCAAGAGGAACA
 GCGATAAGCTGATCGCCAGAAAGAAGGACTGGGACCCTAAGAAGTACGGC
 GGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTATTCTGTGCTGGTGGTGGCCAAAGT
 GGAAAAGGGCAAGTCCAAGAACTGAAGAGTGTGAAAGAGCTGCTGGGGA
 TCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCCATCGACTTTCTGG
 AAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTGAAAAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCTA
 AGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATGCTGGCCTCTG
 CCGGCGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCCAAATATGTG
 AACTTCTGTACCTGGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAG
 GATAATGAGCAGAAACAGCTGTTTGTGGAACAGCACAAAGCACTACCTGGAC
 GAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCTCCAAGAGAGTGATCCTGGCCGAC
 GCTAATCTGGACAAAGTGCTGTCCGCCTACAACAAGCACCCGGGATAAGCCC
 ATCAGAGAGCAGGCCGAGAATATCATCCACCTGTTTACCCTGACCAATCTG
 GGAGCCCCTGCCGCCTTCAAGTACTTTGACACCACCATCGACCGGAAGAG
 GTACACCAGCACCAAAGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCA
 TCACCGGCCTGTACGAGACACGGATCGACCTGTCTCAGCTGGGAGGTGAC
 TCTGGCGGCTCAAAAAGAACCGCCGACGGCAGCGAATTCGAGCCCAAGAA
 GAAGAGGAAAGTCTAA (SEQ ID NO:181)

[0509]

[0510] 人密码子优化的VSVG

ATGAAATGTCTGCTGTACCTGGCTTTCTGTTTCATCGGCGTGAAGTGCAGT
 TCACCATCGTGTTCCTCACAAACGAGAAGGGCAACTGGAATAATGTGCCTA
 GCAACTACCACTACTGTCCTAGCTCTAGCGACCTTAATTGGCATAACGACCT
 GATCGGCACAGCCCTGCAGGTGAAGATGCCTAAGAGCCACAAGGCCATCC
 AGGCCGACGGATGGATGTGCCACGCCAGCAAGTGGGTCAACCTGTGAC
 TTCAGATGGTACGGCCCTAAATACATTACCACTCTATCAGAAGCTTCAACC

[0511]

CTTCTGTGGAACAATGTAAAGAGTCCATTGAGCAGACAAAGCAGGGCACCT
 GGCTGAACCCCGGCTTCCCCCCCCAGAGCTGCGGCTACGCCACCGTTACC
 GATGCCGAGGCCGTGATCGTGCAGGTGACACCTCACCACGTGCTGGTCGA
 TGAGTACACCGGCGAATGGGTGGACAGCCAATTTATCAACGGCAAATGCAG
 CAATTACATCTGCCCCACCGTGCACAACAGCACCACTGGCACAGCGATTA
 CAAGGTGAAAGGCCTGTGCGACAGCAACCTGATCTCTATGGACATCACCTT
 CTTCAGCGAGGACGGCGAGCTGTCTAGTCTGGGCAAGGAAGGCACAGGTT
 TTCGGAGCAACTACTTCGCCTACGAGACTGGCGGCAAGGCCTGCAAGATG
 CAGTACTGCAAGCACTGGGGCGTTAGACTGCCTTCAGGCGTGTGGTTTCGAG
 ATGGCCGATAAGGACCTGTTTCGCCGCTGCCAGATTCCCAGAGTGCCCTGA
 GGGCAGCTCCATCAGCGCCCCTTCCCAGACCTCCGTGGATGTGTCCCTGAT
 CCAGGACGTGGAAAGAATCCTGGACTACAGCCTCTGTCAGGAGACATGGTC
 [0512] CAAAATCAGAGCCGGACTCCCCATTAGCCCTGTGGACCTGAGCTACCTGGC
 CCCAAGAATCCTGGAACCGGCCCCGCCTTCACAATCATTAACGGCACCT
 GAAATACTTCGAGACCAGATACATCCGGGTGGACATCGCCGCTCCTATCCT
 GTCAAGAATGGTGGGCATGATTTCTGGCACAACAACAGAGAGGGAACTGTG
 GGACGACTGGGCCCTTACGAGGATGTGGAAATCGGCCCAAACGGCGTGC
 TCGGGACCAGCTCAGGCTATAAGTTCCCCCTGTACATGATCGGCCACGGCA
 TGCTGGATTCTGACCTGCACCTGAGCAGCAAGGCCAGGTCTTTGAGCACC
 CTCATATCCAAGACGCCGCCAGCCAGCTGCCTGATGACGAGAGCCTGTTTT
 TTGGAGATACAGGACTGAGCAAGAACCCCATCGAGCTGGTGGAAAGGCTGG
 TTTAGCAGCTGGAAGTCCAGCATAGCTAGCTTCTTCTTCATCATCGGCCTGA
 TCATCGGACTGTTCCCTGGTGTGAGAGTGGGGATCCACCTGTGCATCAAGC
 TGAAGCACACCAAAAAGAGACAGATCTACACCGACATCGAGATGAACCGGC
 TGGGGAAGTGA (SEQ ID NO:182)

[0513] 引用文献

[0514] 1.Parseval,N.et al.Survey of human aenes of retroviral origin: identification and transcriptome of the genes with coding capacity for complete envelope proteins.Journal of Virology 77,10414-10422,(2003) .

[0515] 2.Okimoto,T.et al.VSV-G envelope glycoprotein forms complexes with plasmid DNA and MLV retrovirus-like particles in cell-free conditions and enhances DNA transfection.Molecular Therapy 4,232-238,(2001) .

[0516] 3.Manaeot,P.et al.Protein transfer into human cells by VSV-G-induced nanovesicles.Molecular Therapy 19,1656-1666,(2011) .

[0517] 4.Wagner,D.et al.High prevalence of Streptococcus pyogenes Cas9-reactive T cells within the adult human population.Nature Medicine 25,242-248 (2019)

[0518] 5.Kim,S.et al.CRISPR RNAs trigger innate immune responses in human cells.Genome Research 28,1-7(2018) .

[0519] 6.Charlesworth,C.et al.Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans.Nature Medicine 25,249-254(2019)

[0520] 7.Ferdosi,S.et al.Multifunctional CRISPR-Cas9 with engineered immunosilenced human T cell epitopes.Nature Communications 10,Article number: 1842(2019) .

[0521] 8.Wang,D.et al.Adenovirus-mediated somatic genome editing of Pten by

CRISPR/Cas9 in mouse liver in spite of Cas9-specific immune responses. *Human Gene Therapy* 26,432-442(2015) .

[0522] 9.Devanabanda,M.et al.Immunotoxic effects of gold and silver nanoparticles:Inhibition of mitogen-induced proliferative responses and viability of human and murine lymphocytes in vitro. *Journal of Immunotoxicology* 13,1547-6901(2016) .

[0523] 10.Mout,R.et al.Direct cytosolic delivery of CRISPR/Cas9-ribonucleoprotein for efficient gene editing. *ACS Nano* 11,2452-2458(2017) .

[0524] 11.Yin,H.et al.structure-guided chemical modification of guide RNA enables potent non-viral in vivo genome editing. *Nature Biotechnology* 35,1179-1187(2017) .

[0525] 12.Qiao,J.et al.Cytosolic delivery of CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins for genome editing using chitosan-coated red fluorescent protein. *Chemical Communications* 55,4707-4710(2019) .

[0526] 13.Li,L.et al.A rationally designed semiconducting polymer brush for NIR-II imaging guided light-triggered remote control of CRISPR/Cas9 genome editing. *Advanced Materials* 1901187,1-9(2019) .

[0527] 14.Gao,X.et al.Treatment of autosomal dominant hearing loss by in vivo delivery of genome editing agents. *Nature* 553,217-221(2018)

[0528] 15.Lee,K.et al.Nanoparticle delivery of Cas9 ribonucleoprotein and donor DNA in vivo induces homology-directed DNA repair. *Nature Biomedical Engineering* 1,889-901(2017) .

[0529] 16.Staahl,B.et al.Efficient genome editing in the mouse brain by local delivery of engineered Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nature Biotechnology* 35,431-433(2017) .

[0530] 17.Zuris,J.et al.Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo. *Nature Biotechnology* 33,73-79(2015) .

[0531] 18.Finn,J.et al.A single administration of CRISPR/Cas9 lipid nanoparticles achieves robust and persistent in vivo genome editing. *Cell Reports* 22,2227-2235(2018) .

[0532] 19.Wang,H.et al.Nonviral gene editing via CRISPR/Cas9 delivery by membrane-disruptive and endosomolytic helical polypeptide. *PNAS* 115,4903-4908(2018) .

[0533] 20.Del'Guidice,T.et al.Membrane permeabilizing amphiphilic peptide delivers recombinant transcription factor and CRISPR-Cas9/Cpf1 ribonucleoproteins in hard-to-modify cells. *PLOS ONE* 13,e0195558(2018) .

[0534] 21.Colella,P et al.Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy. *Molecular Therapy:Methods&Clinical Development* 8,87-104(2018) .

- [0535] 22.Naso,F.et al.Adeno-Associated Virus(AAV) as a Vector for Gene Therapy.BioDrugs 31,317-334(2017) .
- [0536] 23.Handel,E.et al.Versatile and efficient genome editing in human cells by combining zinc-finger nucleases with adeno-associated viral vectors.Human Gene Therapy 23,321-329(2012) .
- [0537] 24.Chadwick,A.et al.Reduced Blood Lipid Levels With In Vivo CRISPR-Cas9 Base Editing of ANGPTL3.Circulation 137,975-977(2018) .
- [0538] 25.Schenkwein,D.et al.Production of HIV-1 Integrase Fusion Protein-Carrying Lentiviral Vectors for Gene Therapy and Protein Transduction.Human Gene Therapy 21,589-602(2010) .
- [0539] 26.Cai,Y.et al.Targeted genome editing by lentiviral protein transduction of zinc-finger and TAL-effector nucleases.eLife 3,e01911(2014) .
- [0540] 27.Choi,J.et al.Lentivirus pre-packed with Cas9 protein for safer gene editing.Gene Therapy 23,627-633(2016) .
- [0541] 28.Meyer,C.et al.Pseudotyping exosomes for enhanced protein delivery in mammalian cells.International Journal of Nanomedicine 12,3153-3170(2017) .
- [0542] 29.Mangeot,P.et al.Genome editing in primary cells and in vivo using viral-derived Nanoblades loaded with Cas9-sgRNA ribonucleoproteins.Nature Communications 10,Article number:45(2019) .
- [0543] 30.Lu,B.et al.Delivering SaCas9 mRNA by lentivirus-like bionanoparticles for transient expression and efficient genome editing.Nucleic Acids Research 47,e44(2019) .
- [0544] 31.Wang,Q.et al.ARMMS as a versatile platform for intracellular delivery of maeromoleeules.Nature Communications 9,1-7(2018) .
- [0545] 32.Lainscek,D.et al.Delivery of an Artificial Transcription Regulator dCas9-VPR by Extracellular Vesicles for Therapeutic Gene Activation.ACS Synthetic Biology 7,2715-2725(2018) .
- [0546] 33.Fuehs,J.et al.First-in-Human Evaluation of the Safety and Immunogenicity of a Recombinant Vesieular Stomatitis Virus Human Immunodeficiency Virus-1 gag Vaccine(HVTN 090) .Open Forum Infectious Diseases 2,1-9, (2015) .
- [0547] 34.Cong,L.et al.Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems.Scienee 339,819-823, (2013) .
- [0548] 35.Ran,F.et al.In vivo genome editing using Staphylococcus aureusCas9.Nature 520,186-191, (2015) .
- [0549] 36.Zetsche,B.et al.Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System.Cell 163,759-771, (2015) .
- [0550] 37.Komor,A.et al.PFogrammable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage.Nature 533,420-424, (2016) .

- [0551] 38.Gaudelli,N.et al.Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage.Nature 551,464-471,(2017) .
- [0552] 39.Voelkel,C.et al.Protein transduction from retroviral Gag precursors.Proc Natl Acad Sci USA 107,7805-7810,(2010) .
- [0553] 40.Kaczmarczyk,S.et al.Protein delivery using engineered virus-like particles.Proc Natl Acad Sci USA 108,16998-17003,(2011) .
- [0554] 41.Ebner,M.et al.PI(3,4,5)P₃ Engagement Restricts Akt Activity to Cellular Membranes.Mol Cell 65,416-431,(2017) .
- [0555] 42.Urano,E.et al.Substitution of the myristoylation signal of human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag with the phospholipase C-d1 pleckstrin homology domain results in infectious pseudovirion production.J.Gen Virology 89,3144-3149,(2008) .
- [0556] 43.Pastuzyn,E.et al.The Neuronal Gene Arc Encodes a Repurposed Retrotransposon Gag Protein that Mediates Intercellular RNA Transfer.Cell 172,275-288,(2018) .
- [0557] 44.Lukacs,G.et al.Size-dependent DNA Mobility in Cytoplasm and Nucleus.Journal of Biological Chemistry 275,1625-1629,(1999) .
- [0558] 45.Kreiss,P.et al.Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency.Nucleic Acids Research 27,3792-3798(1999) .
- [0559] 46.Nafissi,N.et al.DNA Ministrings:Highly Safe and Effective Gene Delivery Vectors.Molecular Therapy-Nucleic Acids 3,e165,(2014) .
- [0560] 47.Fujimoto,T.et al.Selective EGLN Inhibition Enables Ablative Radiotherapy and Improves Survival in Unresectable Pancreatic Cancer.Cancer Research 79,2327-2338(2019) .
- [0561] 48.Tai,S.et al.Differential Expression of Metallothionein 1 and 2 Isoforms in Breast Cancer Lines with Different Invasive Potential: Identification of a Novel Nonsilent Metallothionein-1H Mutant Variant.American Journal of Pathology 163,2009-2019(2003) .
- [0562] 49.Caussinus,E.et al.Fluorescent fusion protein knockout mediated by anti-GFP nanobody.Nature Structural&Molecular Biology 19,117-121,(2012) .
- [0563] 50.Zhao,W.et al.Quantitatively Predictable Control of Cellular Protein Levels through Proteasomal Degradation.ACS Synthetic Biology 7,540-552,(2018) .
- [0564] 51.Clift,D.et al.A Method for the Acute and Rapid Degradation of Endogenous Proteins.Cell 171,1692-1706,(2017) .
- [0565] 其它实施方案
- [0566] 应当理解,虽然已经结合其详细描述描述了本发明,但前述描述旨在说明而非限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求的范围限定。其它方面、优点和修改在所附

权利要求的范围内。

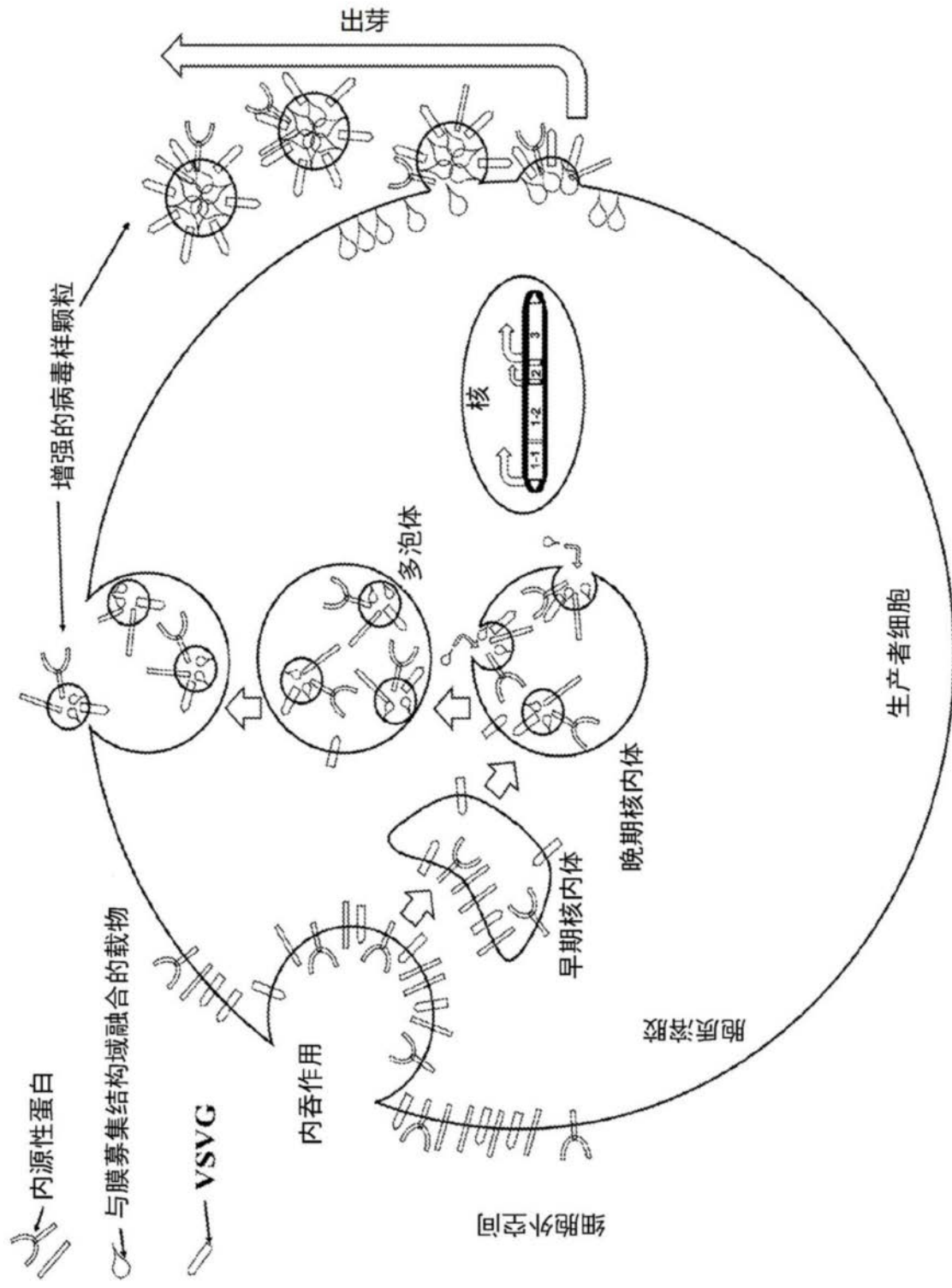


图1

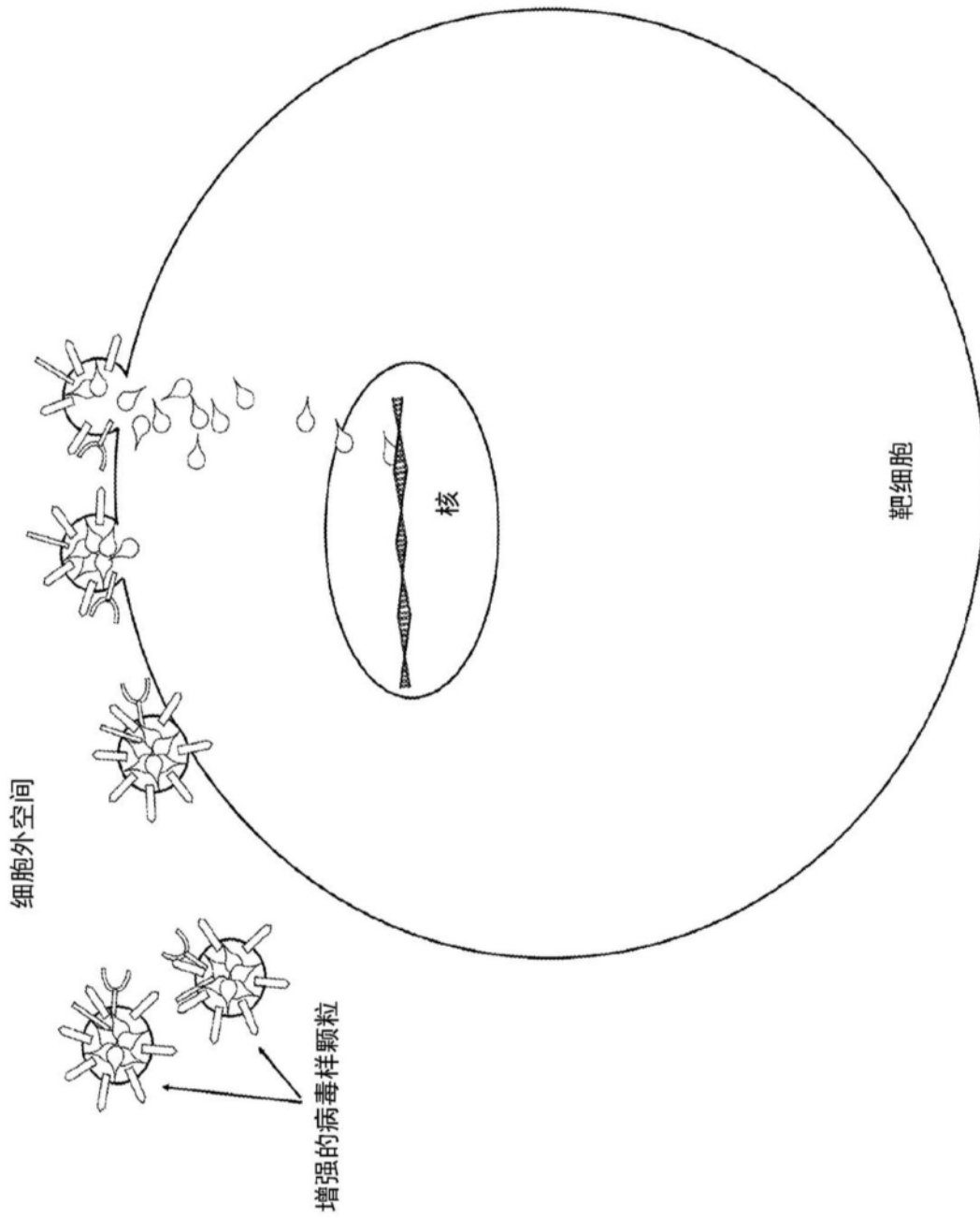


图2

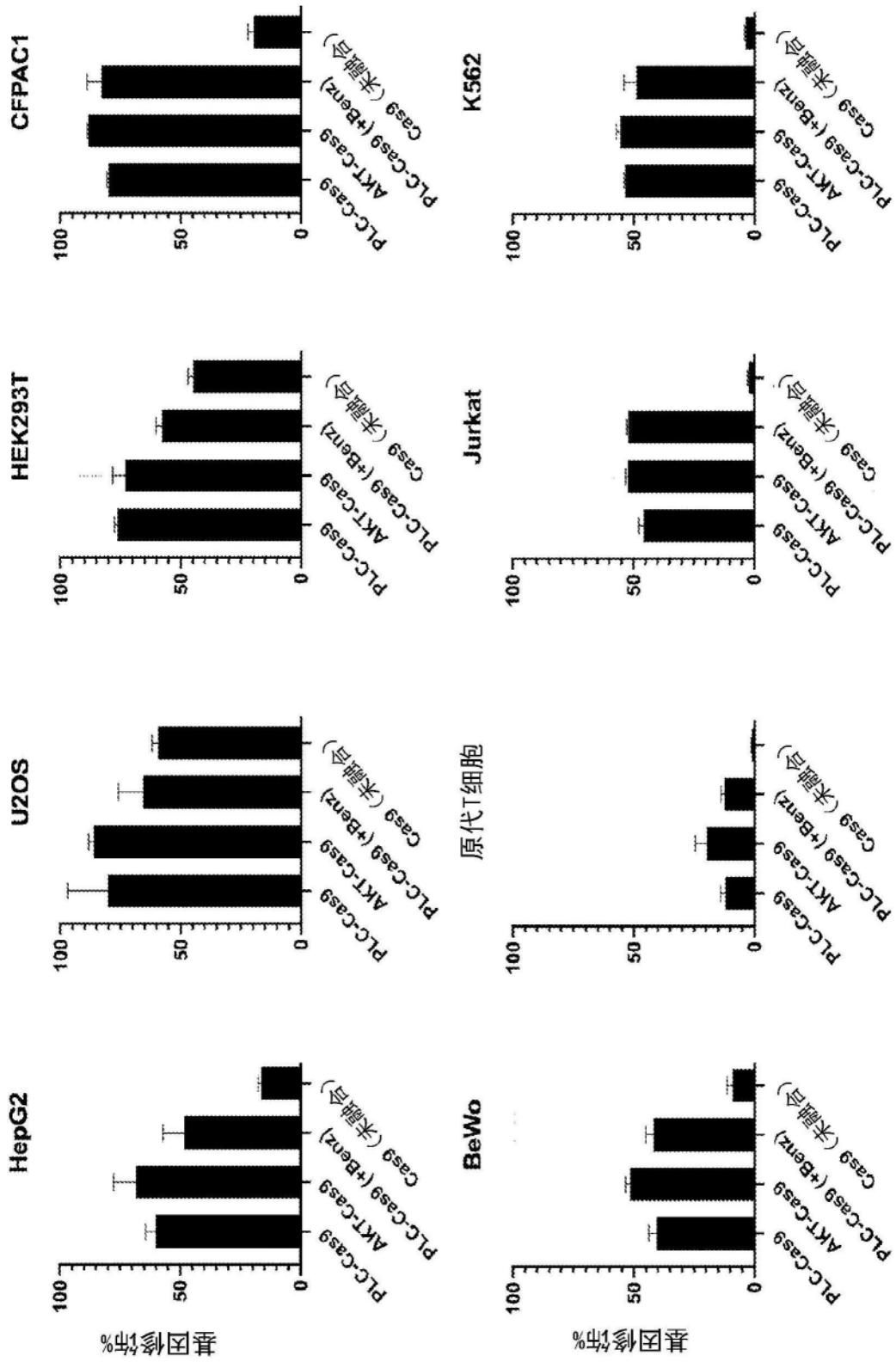


图3

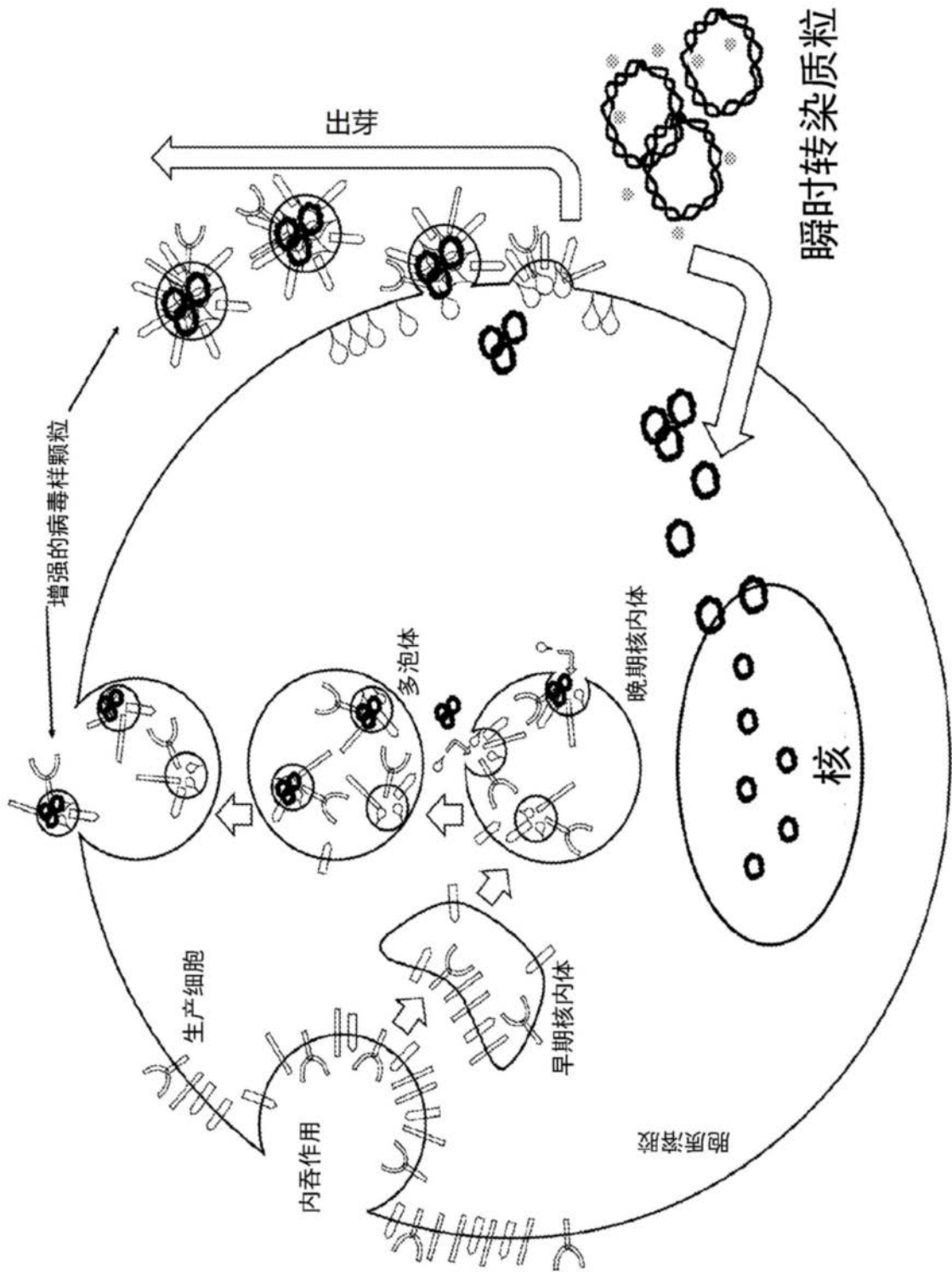


图4

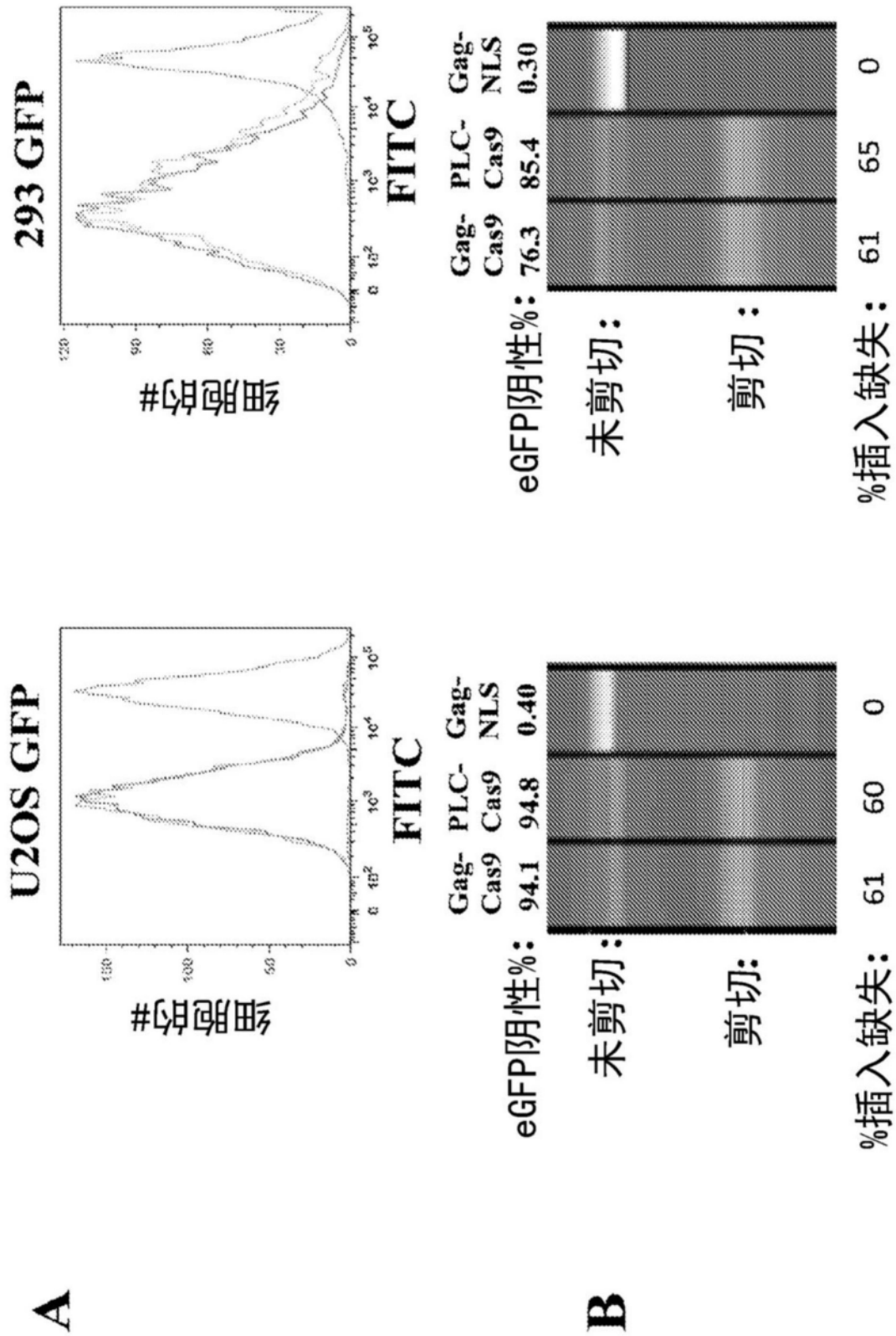


图5A-B

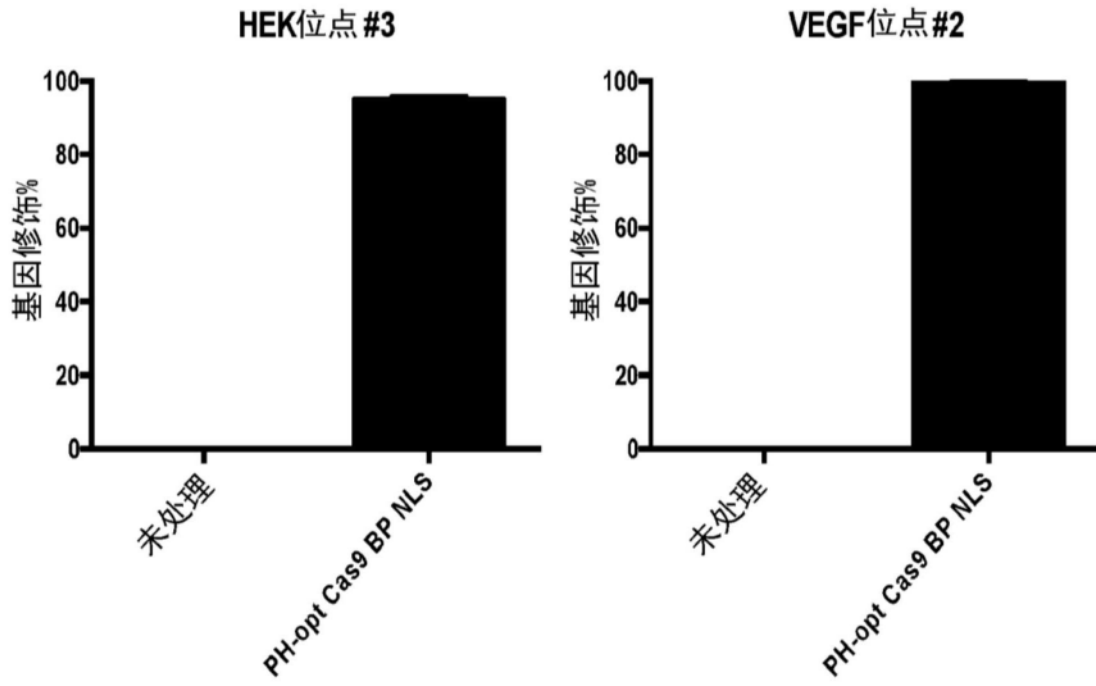


图6

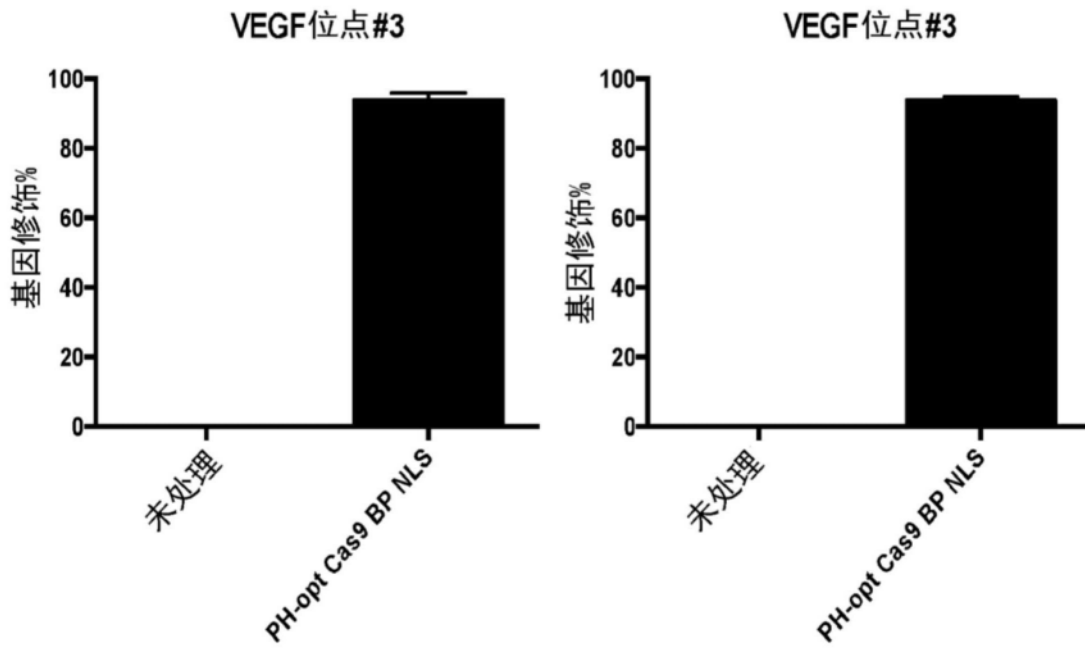


图7

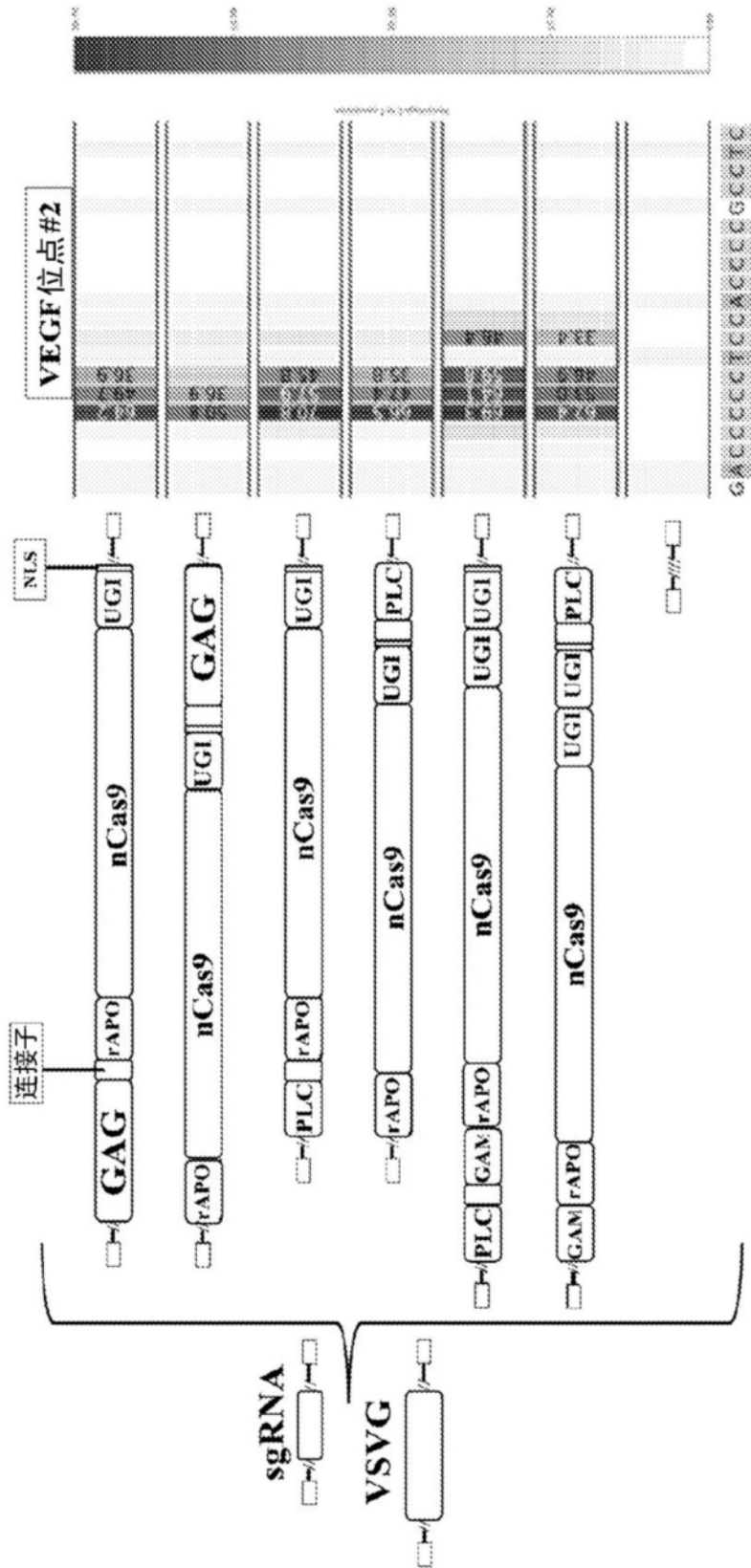


图8

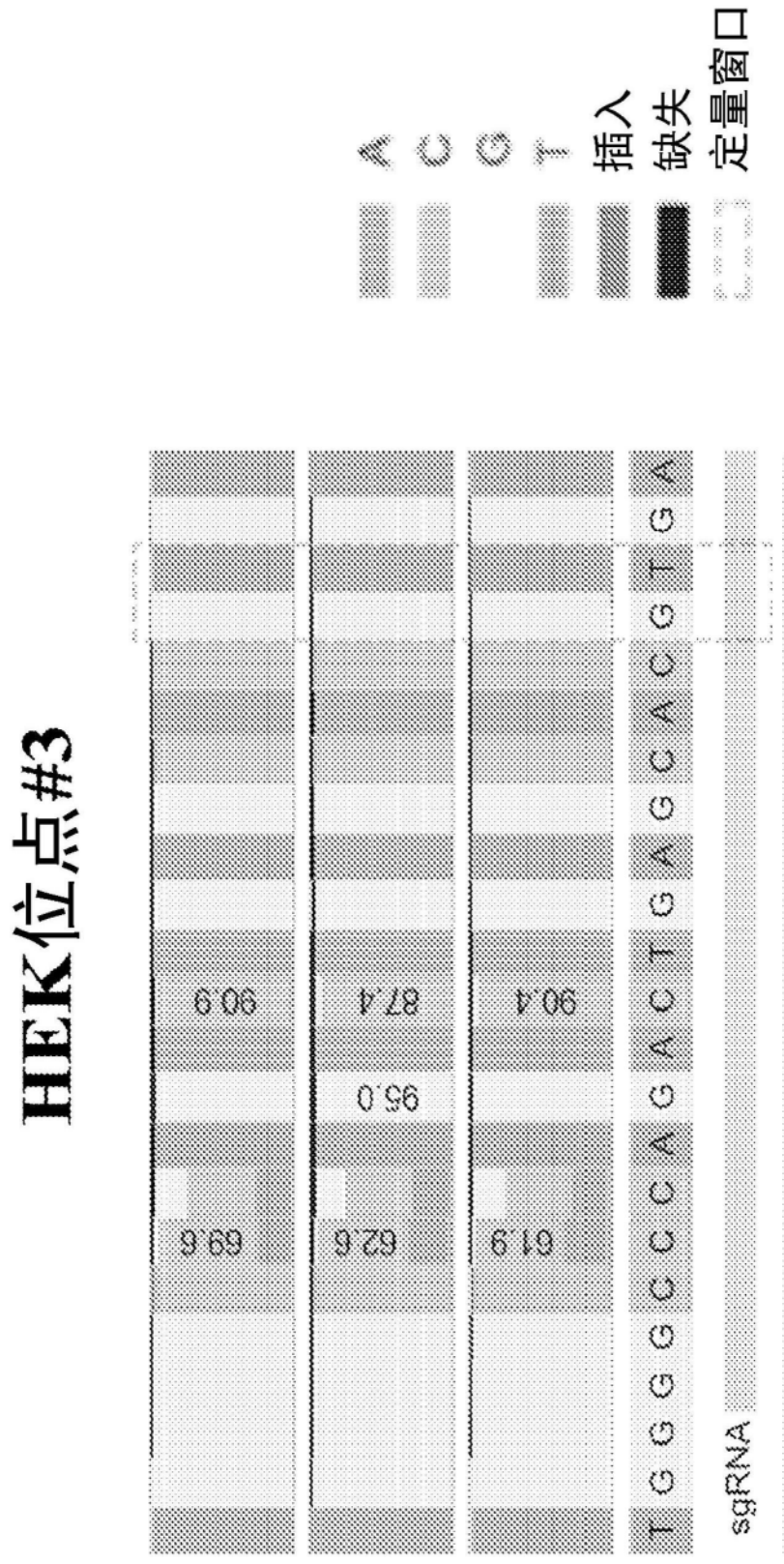


图9

VEGF位点#3

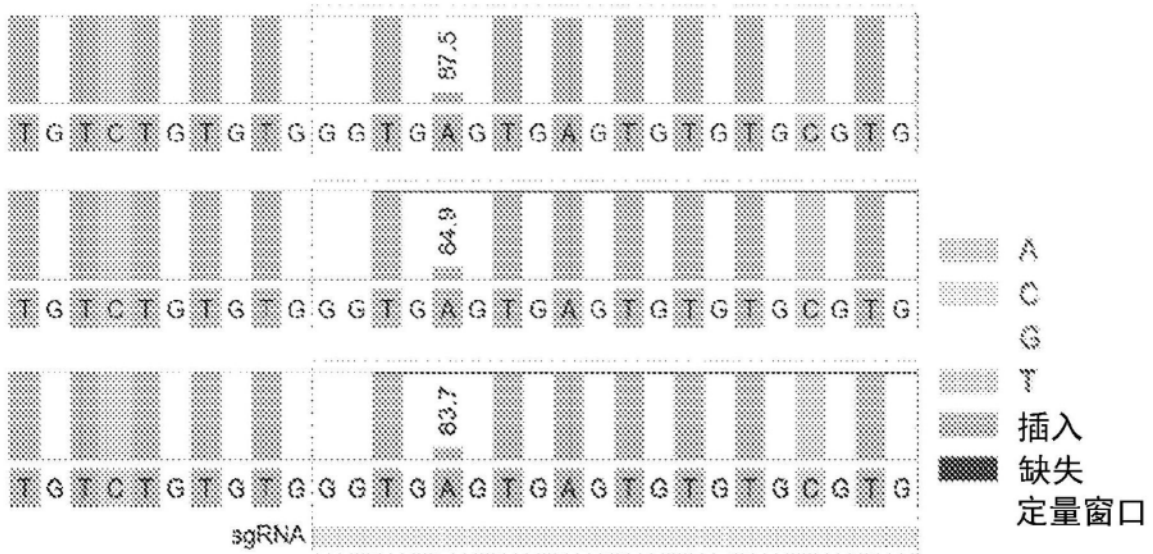


图10

HEK位点#3

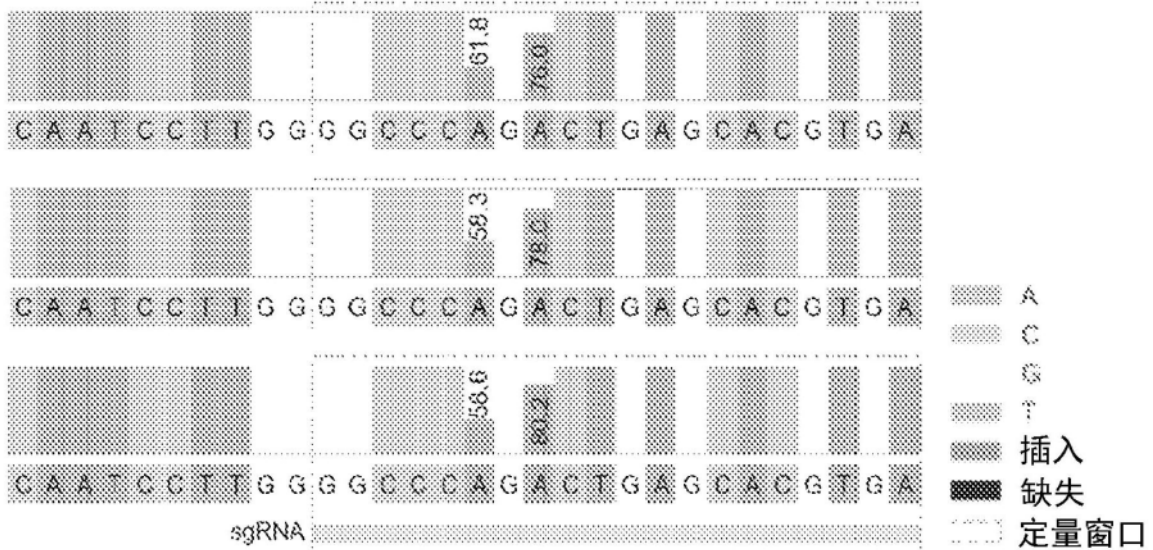


图11

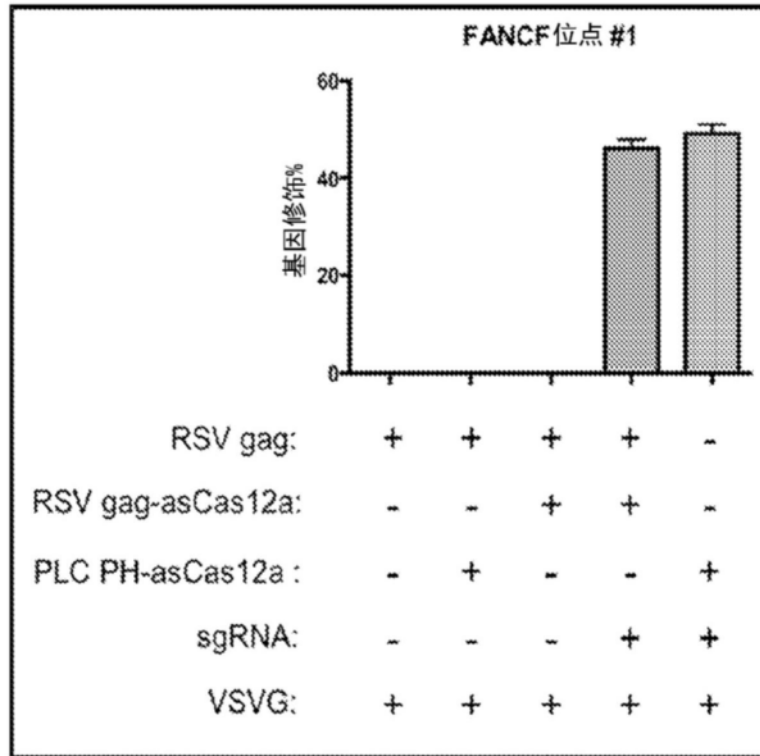


图12

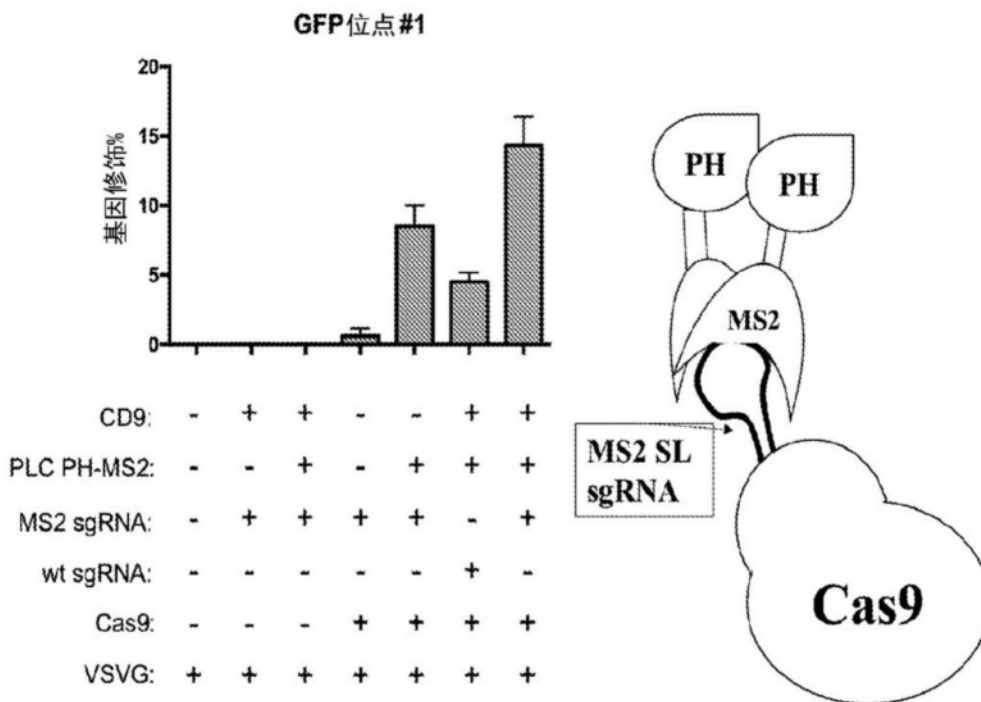


图13

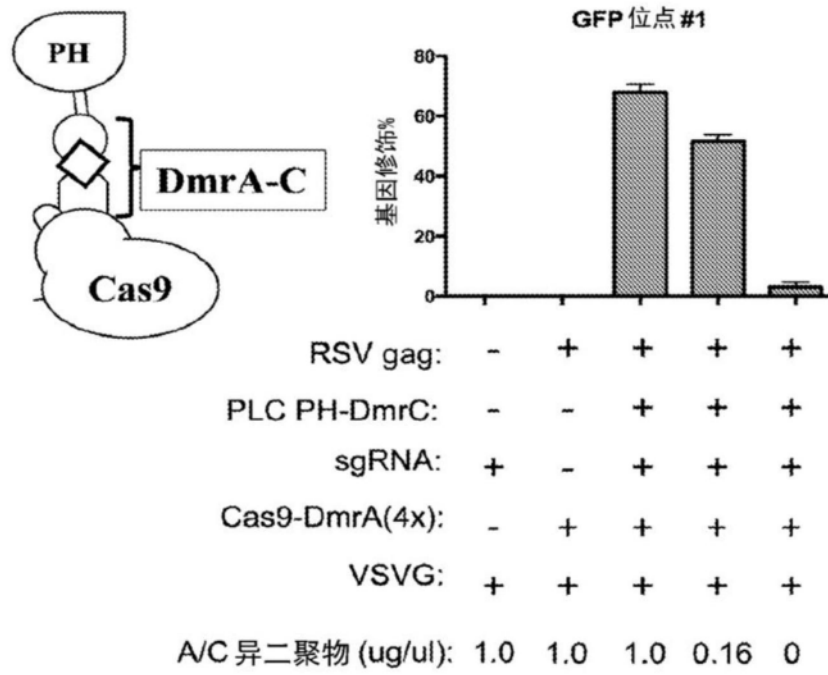


图14

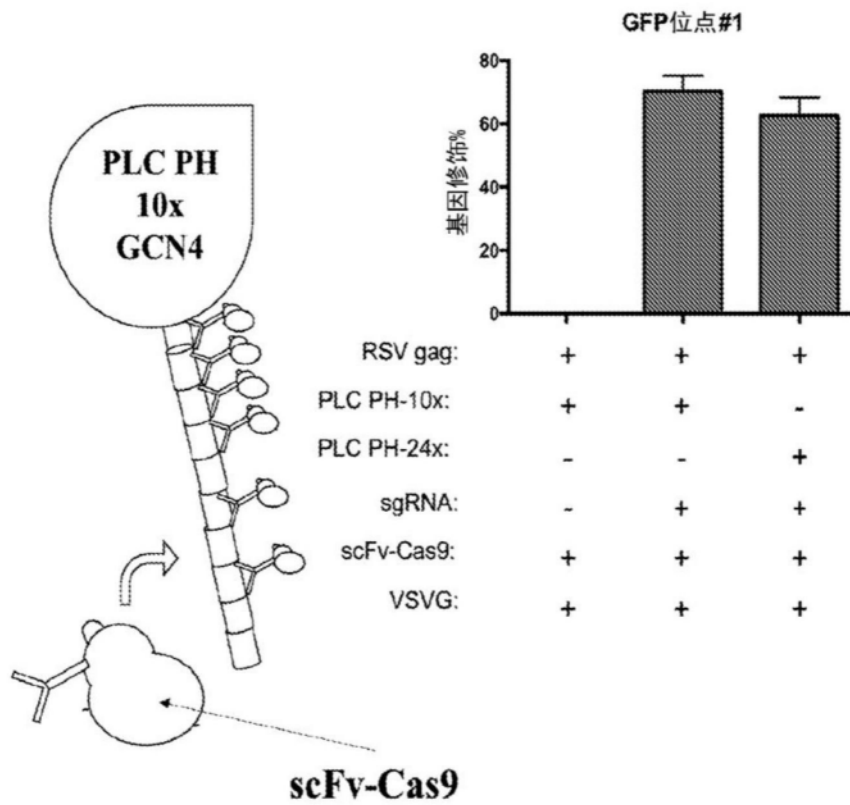


图15

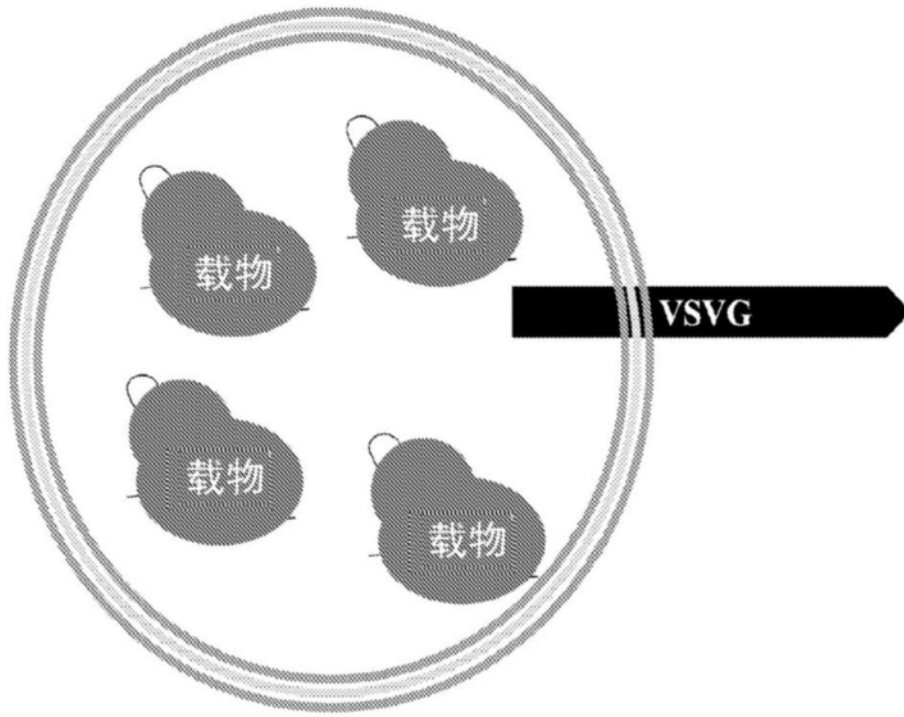


图16

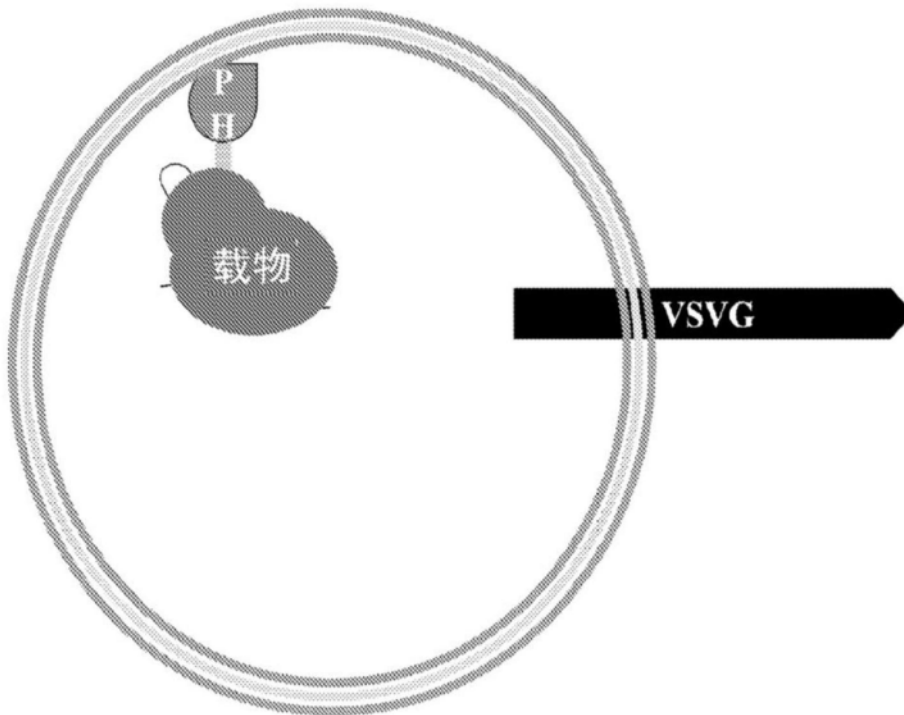


图17

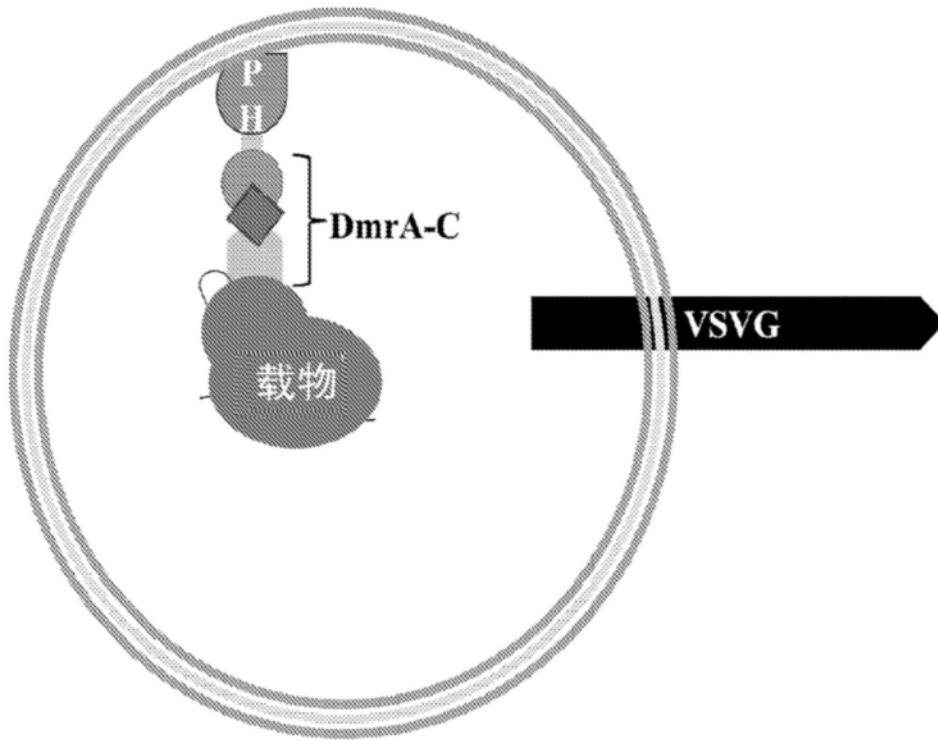


图18

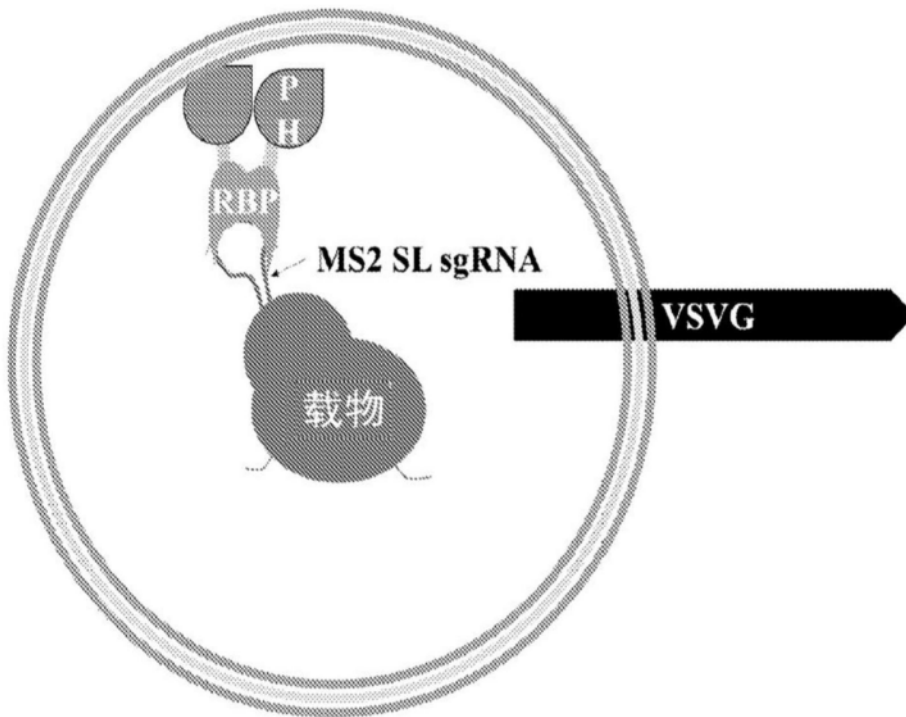


图19

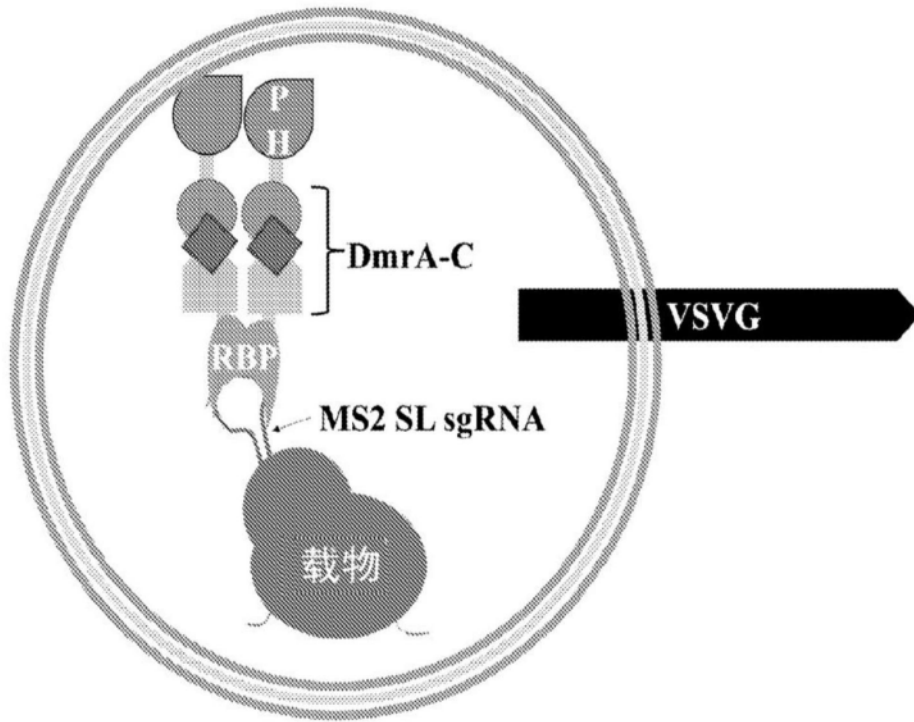


图20

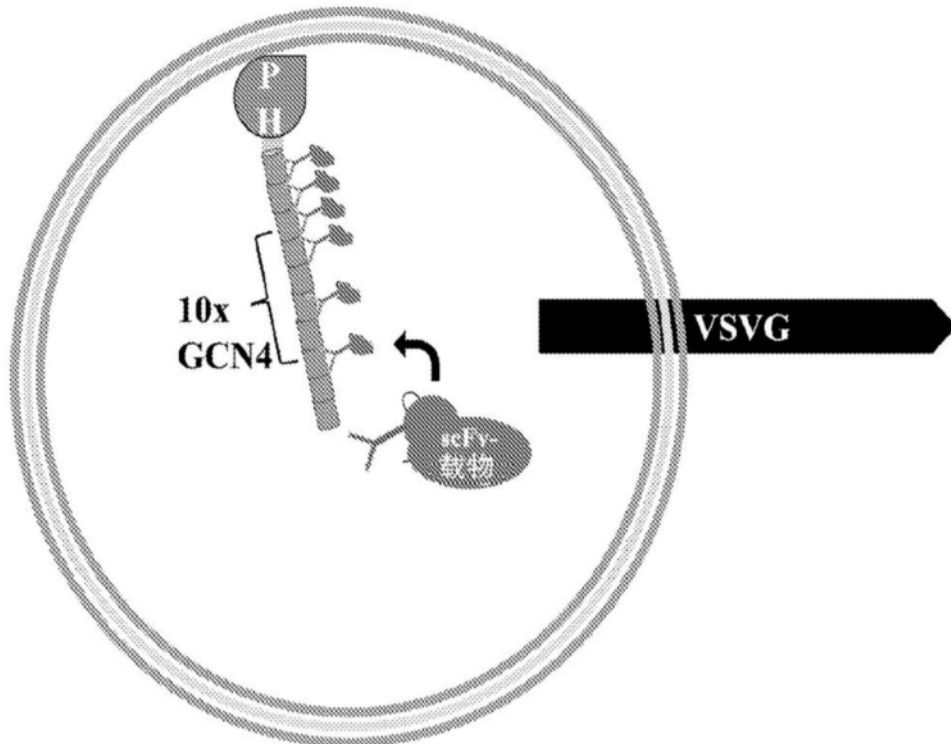


图21

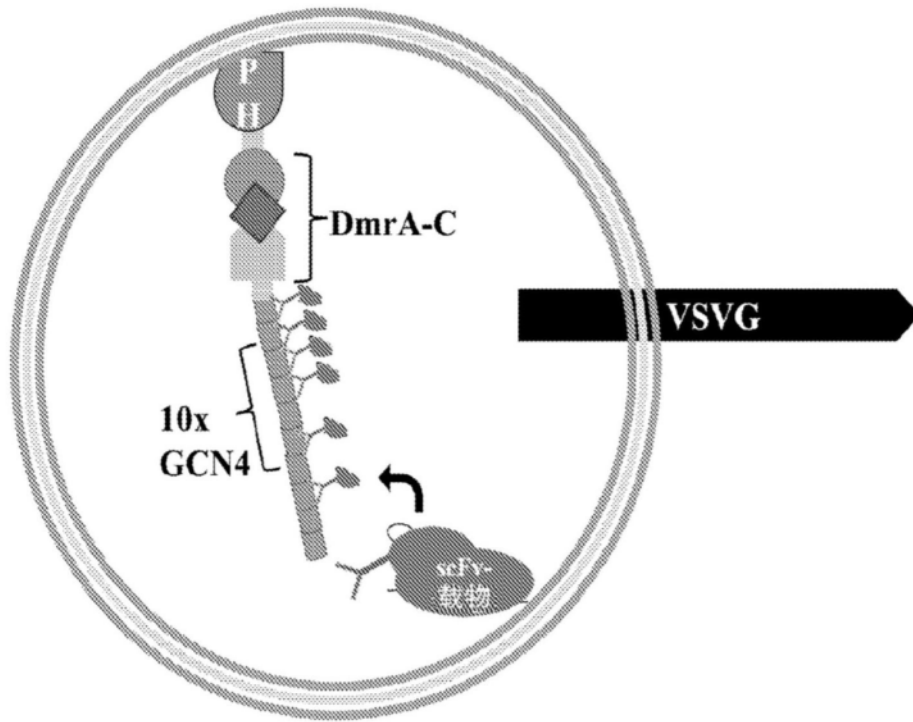


图22

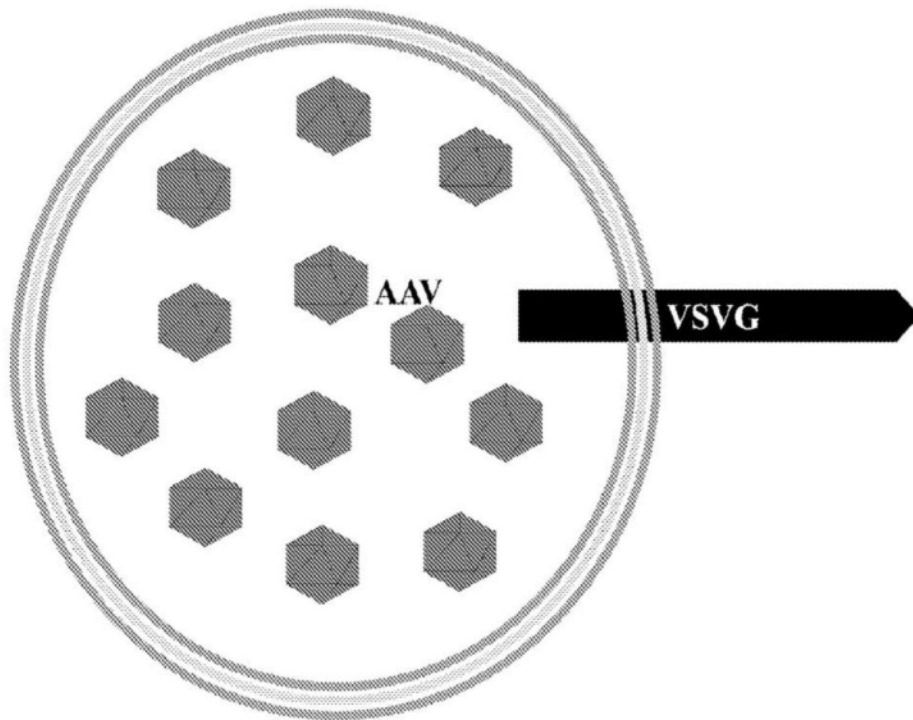


图23

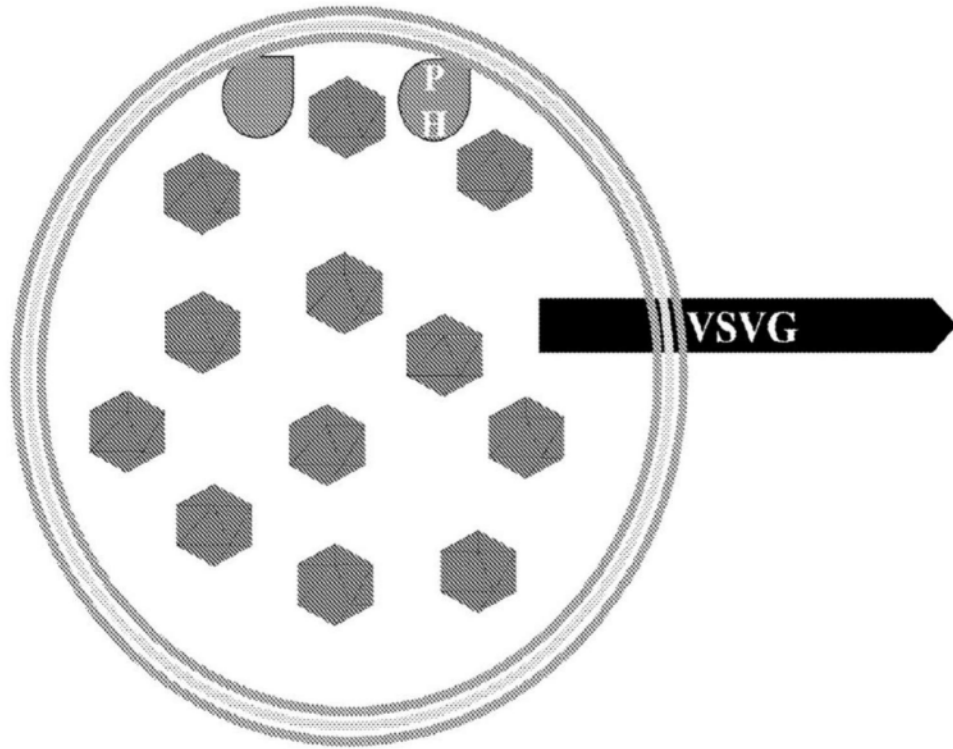


图24

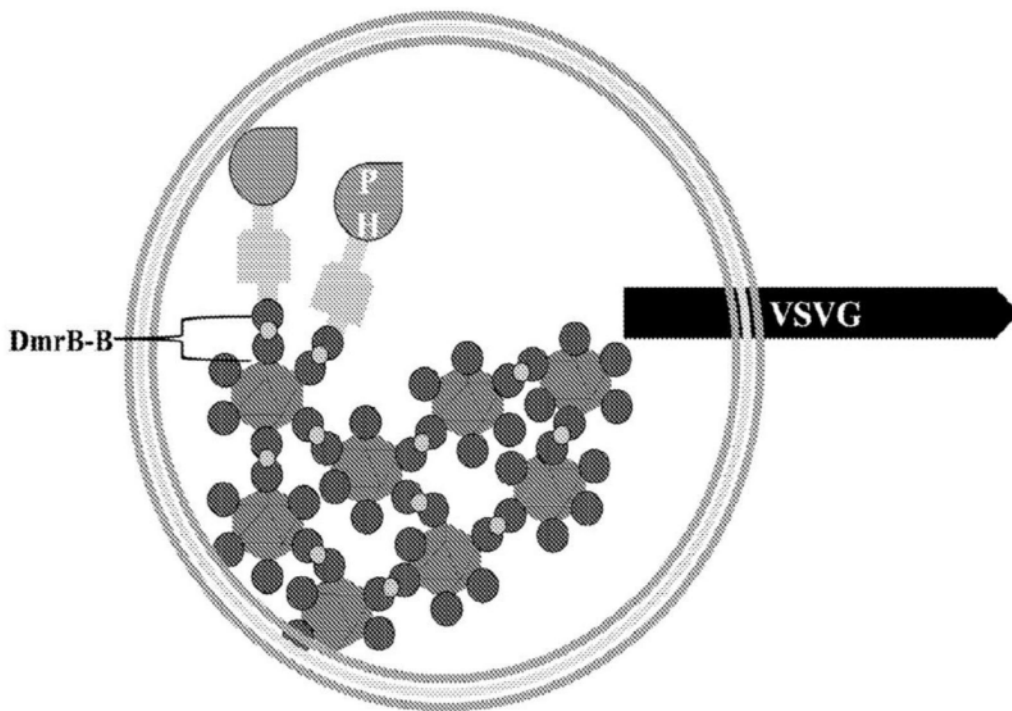


图25

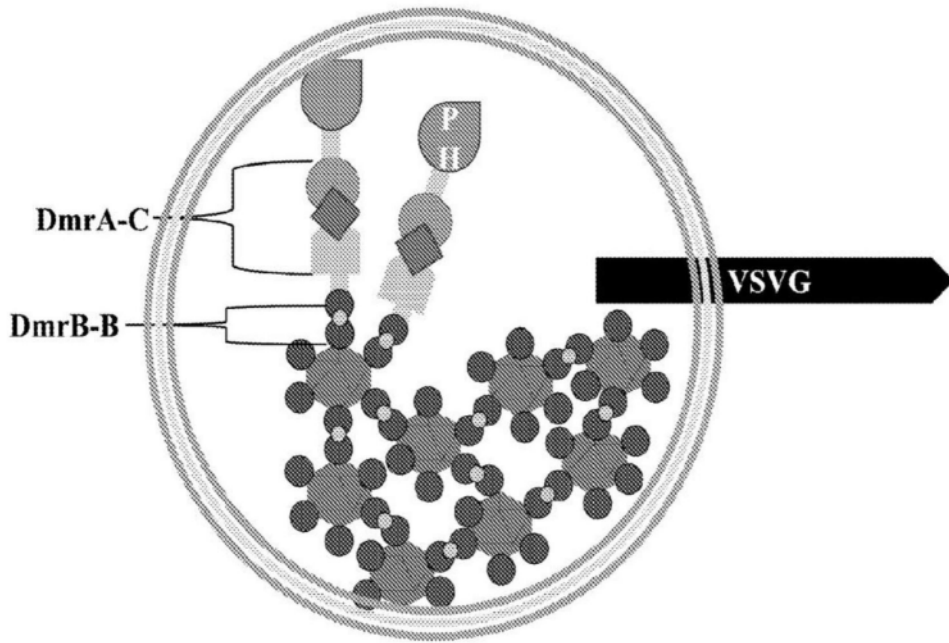


图26

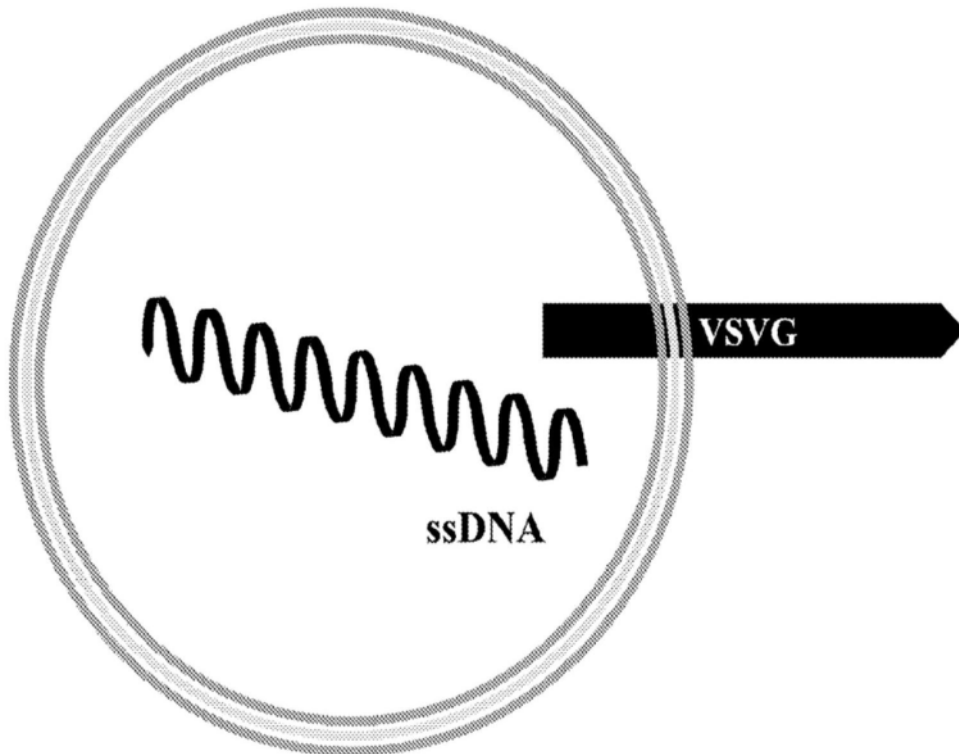


图27

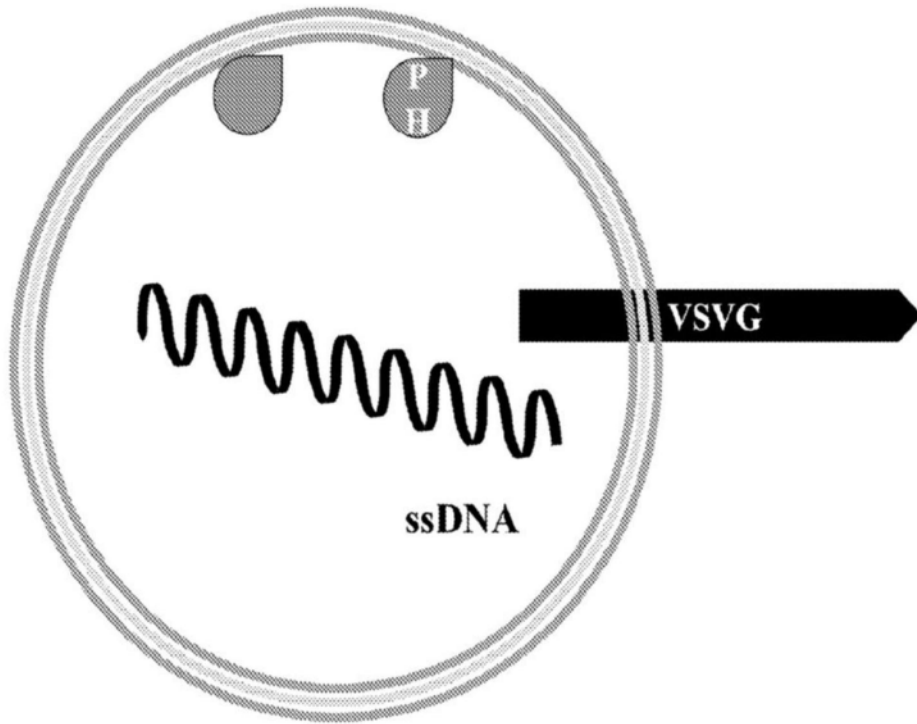


图28

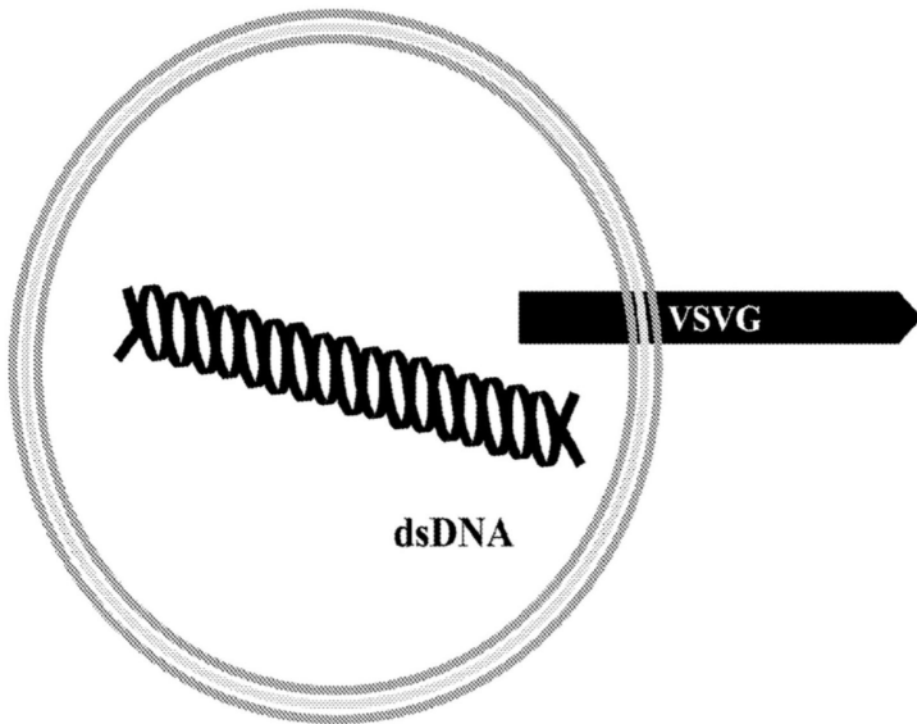


图29

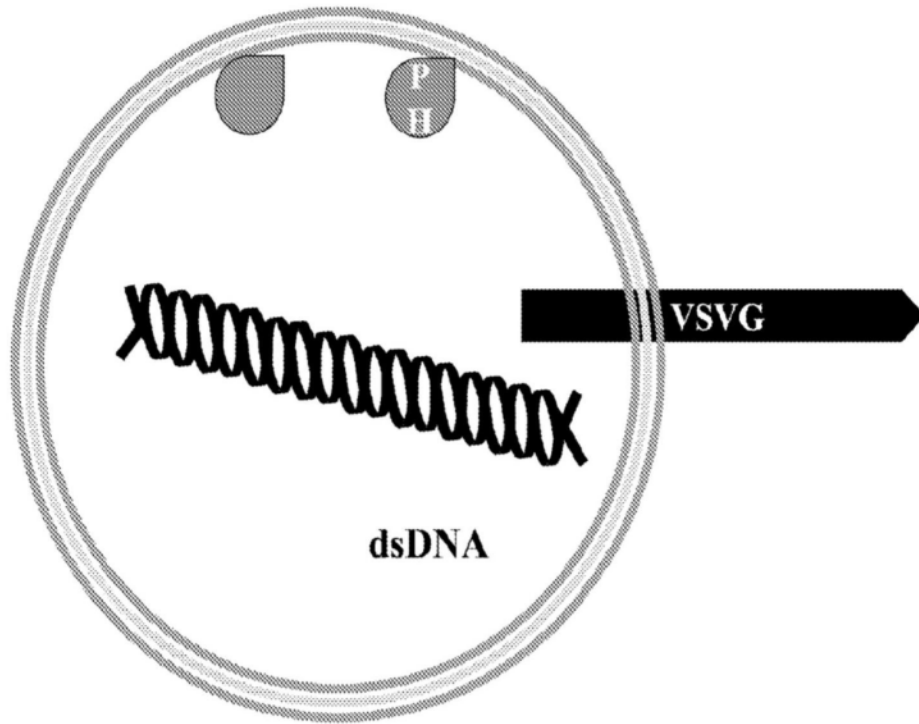


图30

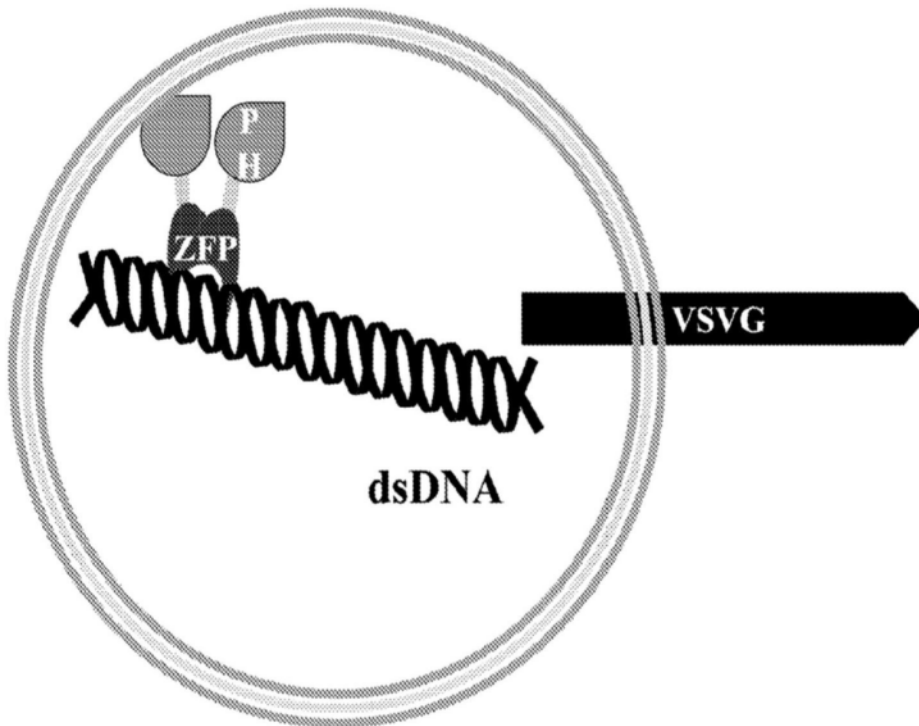


图31

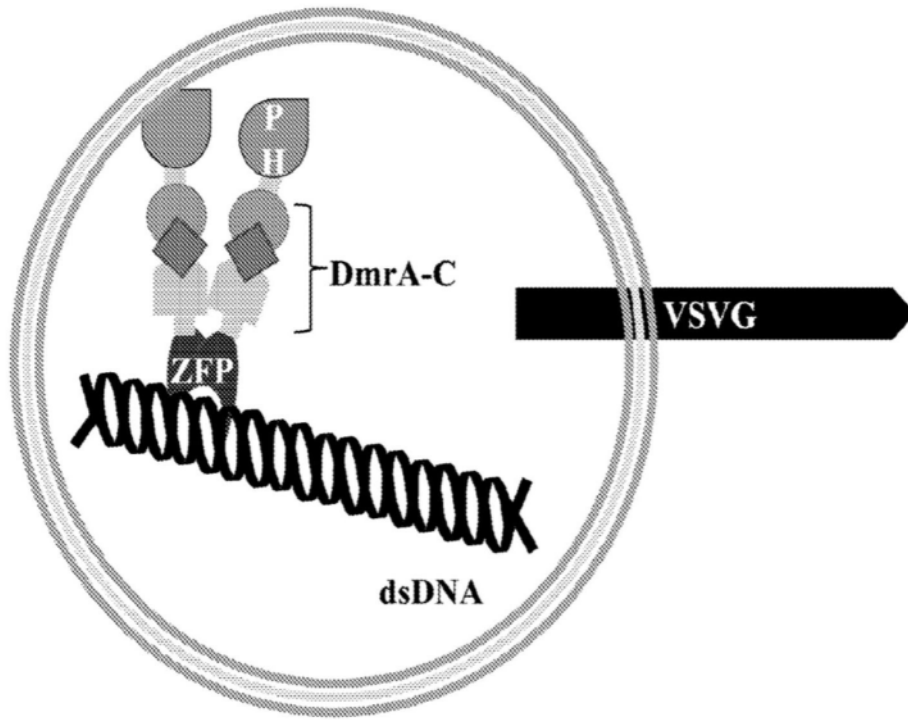


图32

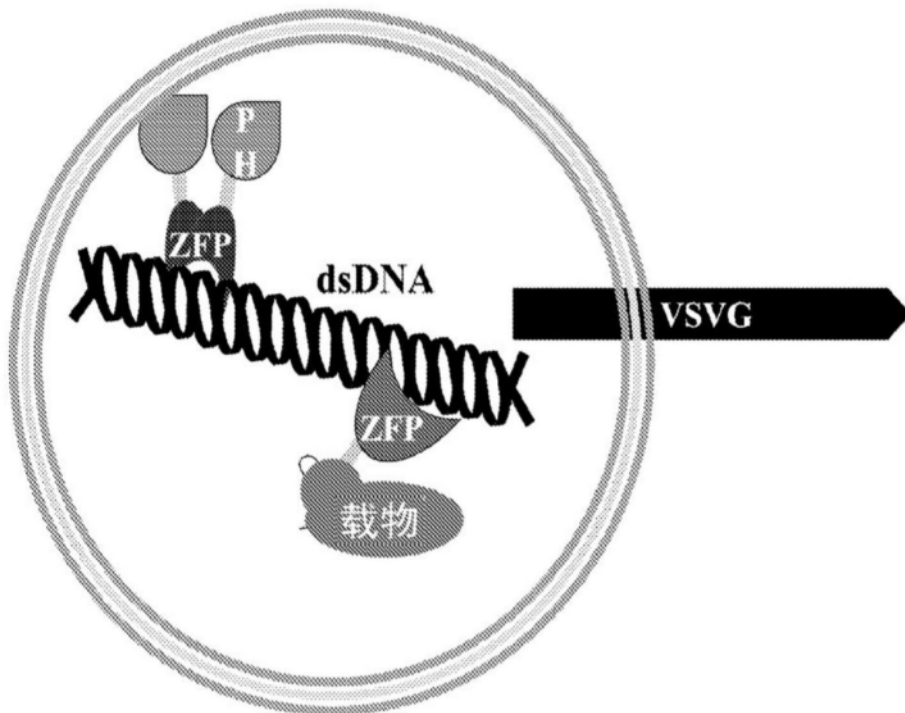


图33

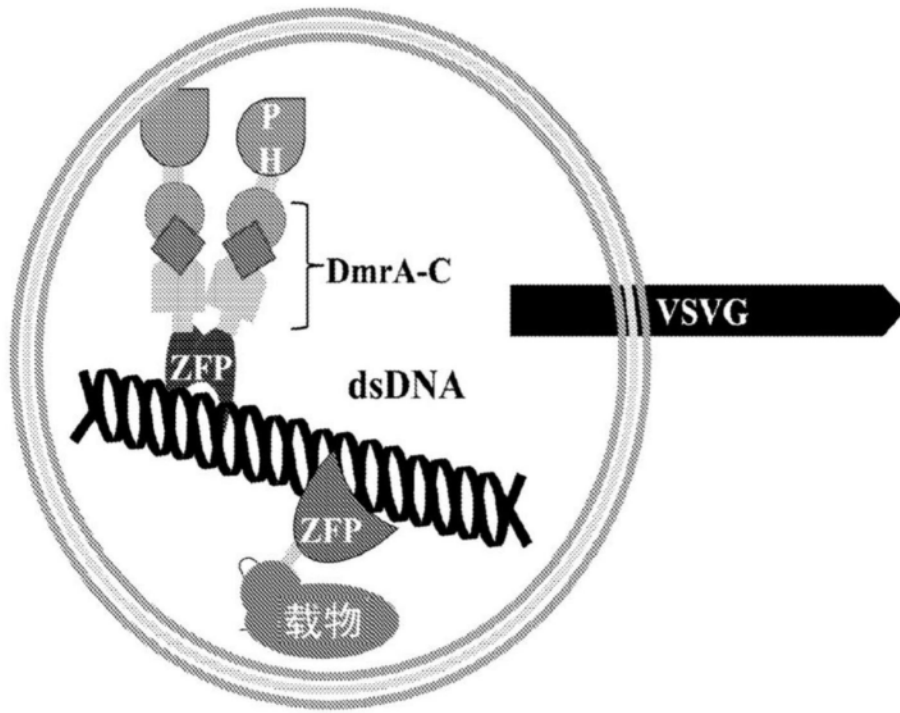


图34

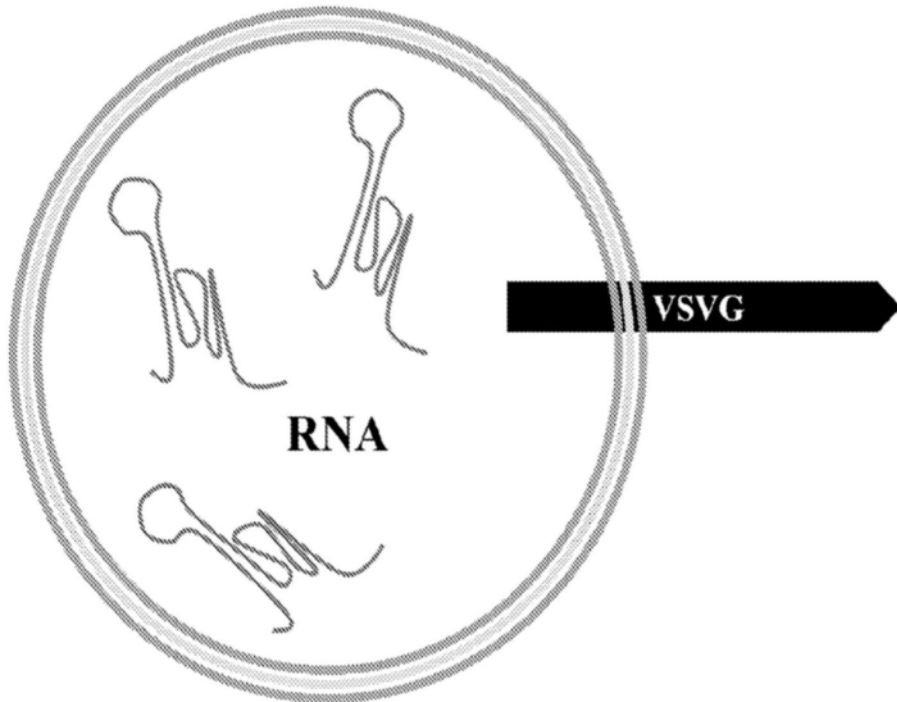


图35

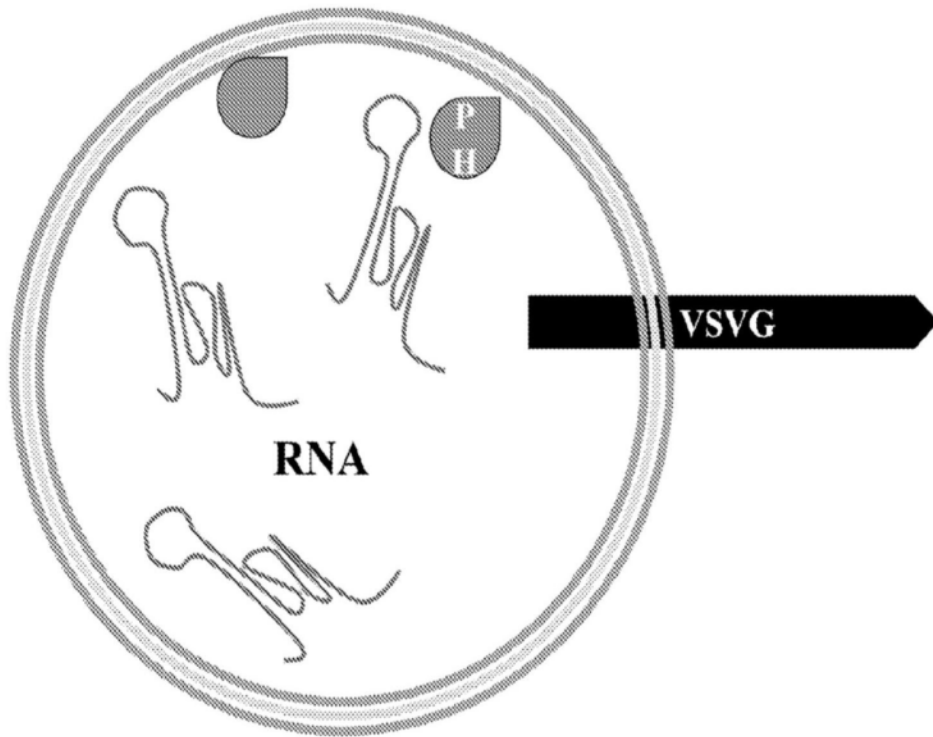


图36

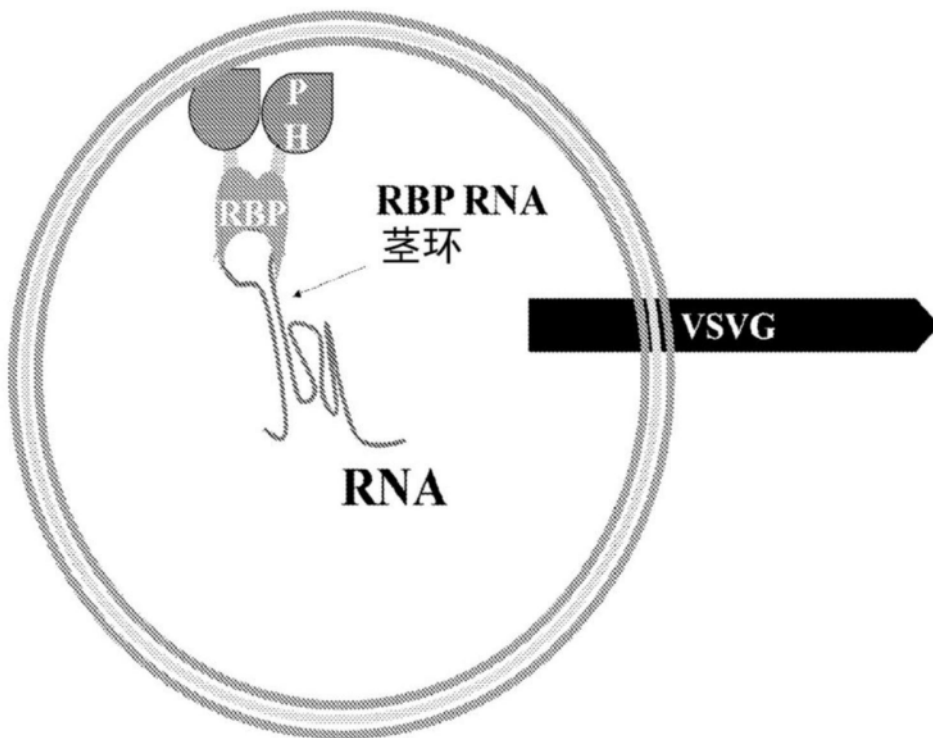


图37

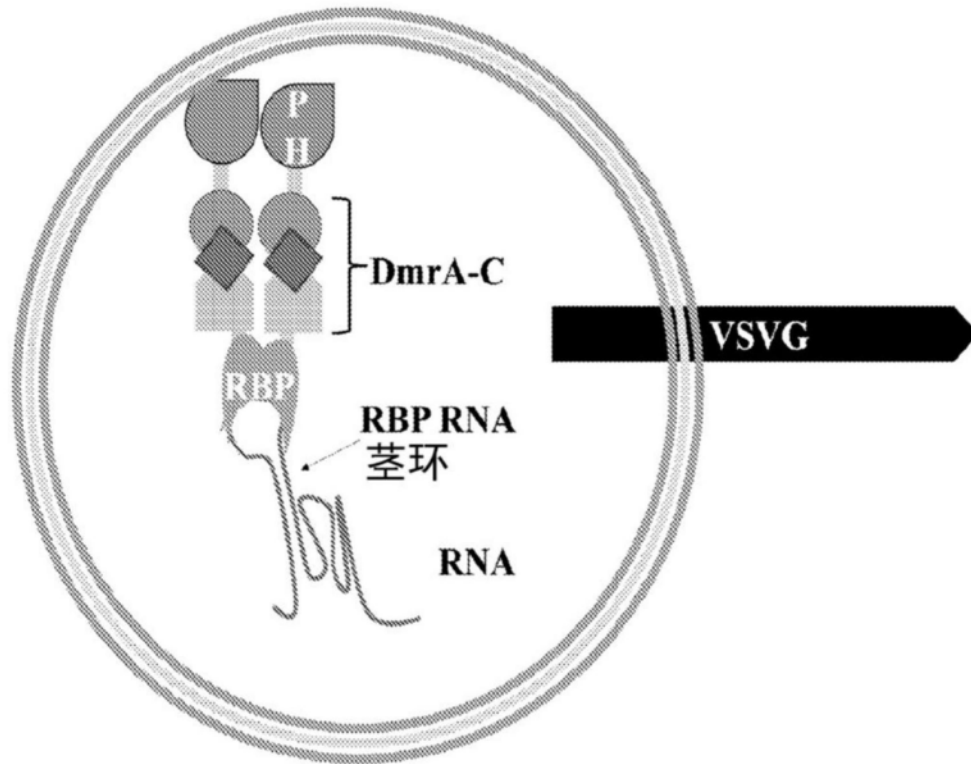


图38

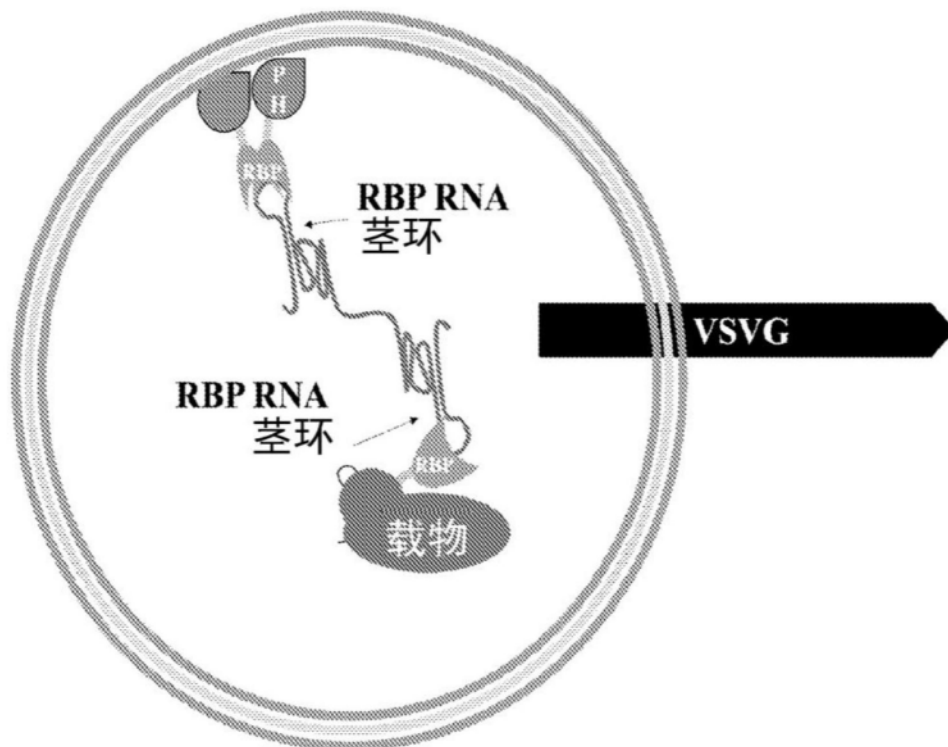


图39

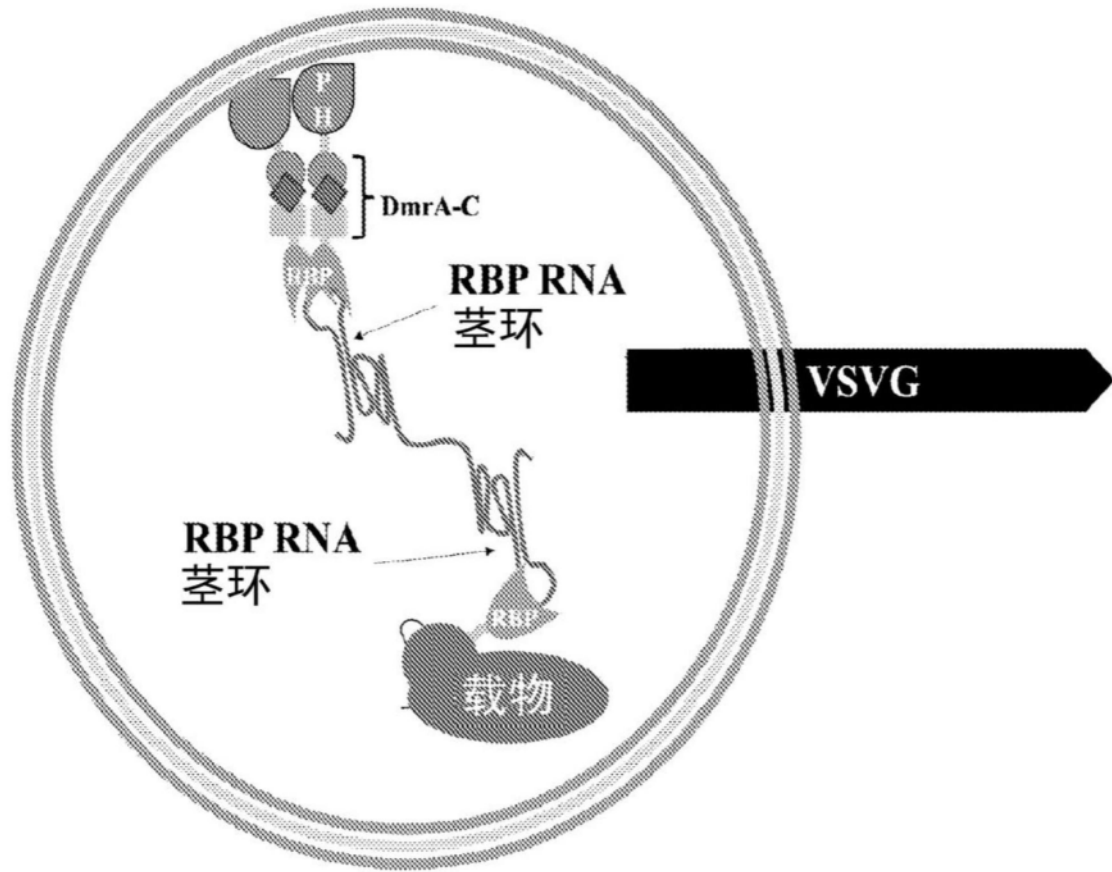


图40