(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109310784 B
(45)授权公告日 2022.08.19

(21)申请号 201680081179.5
(22)申请日 2016.12.07
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109310784 A
(43)申请公布日 2019.02.05
(30)优先权数据
62/264,262 2015.12.07 US
62/298,963 2016.02.23 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.08.06
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/065420 2016.12.07
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/100343 EN 2017.06.15
(73)专利权人 阿克生物公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 S·B·古尔格雄
(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴
(51)Int.Cl.
A61K 48/00(2006.01)
C12N 9/22(2006.01)
C12N 15/32(2006.01)
C12N 15/62(2006.01)
C12N 15/63(2006.01)
C12N 15/79(2006.01)
C12N 15/113(2006.01)
C12N 15/115(2006.01)
(56)对比文件
WO 2015089473 A1,2015.06.18
WO 2015089473 A1,2015.06.18
CN 103233028 A,2013.08.07
王菲等.CRISPR及其在原核生物防御系统中的作用.《热带医学杂志》.2008,第8卷(第10期),第1104-1106页.
Xiao A et al..Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish.《Nucleic Acids Res》.2013,第41卷(第14期),第1-11页.
审查员 许慧娜

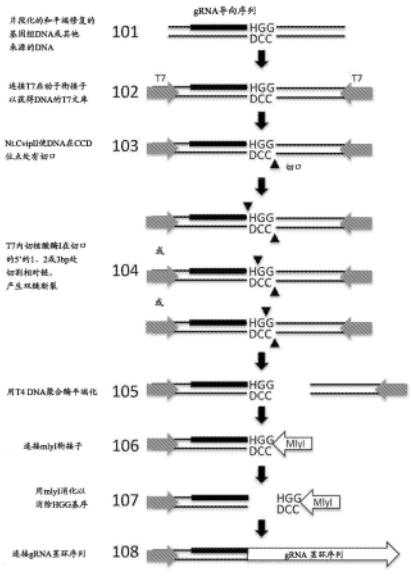
权利要求书2页 说明书205页 附图7页

(54)发明名称

用于制备和使用指导核酸的方法和组合物

(57)摘要

本文提供了从任何来源的核酸制备指导核酸(gNA)、编码gNA的核酸、gNA的集合和编码gNA的集合的核酸的方法和组合物。本文还提供了在多种应用中使用所得的gNA、编码gNA的核酸、gNA的集合和编码gNA的集合的核酸的方法和组合物。



CN 109310784 B

1.一种制备核酸的集合的方法,所述核酸的每个包含与编码核酸指导的核酸酶系统蛋白结合序列的DNA连接的编码导向序列的DNA,所述方法包括:

a.提供双链DNA分子,所述双链DNA分子的每个包含位于PAM序列的5'的感兴趣的序列,和相对链上的其反向互补序列;

b.对所述双链DNA分子进行酶促消化反应,其中,切割在所述PAM序列和/或相对链上的所述PAM序列的反向互补序列处产生,但是没有从所述双链DNA完全去除所述PAM序列和/或相对链上的所述PAM序列的反向互补序列;

c.连接包含识别序列的衔接子与步骤(b)的所得DNA分子;

d.使步骤(c)的DNA分子与识别步骤(c)的所述识别序列的限制酶接触,由此紧接在所述PAM序列的5'处生成包含平端化的双链断裂的DNA片段,由此去除所述PAM序列和含有所述酶识别位点的所述衔接子;和

e.连接步骤(d)所得的双链DNA片段与编码核酸指导的核酸酶系统蛋白结合序列的DNA,由此生成每个包含与编码核酸指导的核酸酶系统蛋白结合序列的DNA连接的编码导向序列的DNA的多个DNA片段。

2.权利要求1的方法,其中,所述核酸指导的核酸酶系统蛋白是CRISPR/Cas系统蛋白。

3.权利要求1的方法,其中,所述集合的起始DNA分子进一步包含位于所述PAM序列的5'的感兴趣的序列的上游的调控序列。

4.权利要求2的方法,其中,所述调控序列包含启动子。

5.权利要求4的方法,其中,所述启动子包含T7、Sp6或T3序列。

6.权利要求1的方法,其中,所述双链DNA分子是基因组DNA、完整的DNA或剪切的DNA。

7.权利要求6的方法,其中,所述基因组DNA是人的、小鼠的、禽类的、鱼的、植物的、昆虫的、细菌的或病毒的。

8.权利要求1的方法,其中,所述编码导向序列的DNA区段为至少22bp。

9.权利要求1的方法,其中,所述编码导向序列的DNA区段的大小范围为15-250bp。

10.权利要求1的方法,其中,所述PAM序列是AGG、CGG或TGG。

11.权利要求1的方法,其中,所述PAM序列对选自下组的CRISPR/Cas系统蛋白是特异性的:Cas9、Cpf1、Cas3、Cas8a-c、Cas10、Cse1、Csy1、Csn2、Cas4、Csm2和Cm5。

12.权利要求1的方法,其中,步骤(b)进一步包括:(1)使所述DNA分子与能够在CCD位点处在单链中产生切口的酶接触,由此生成每个在HGG序列之前包含感兴趣的序列的多个有切口的双链DNA分子,其中所述DNA分子在所述CCD位点是有切口的;和(2)使所述有切口的双链DNA分子与内切核酸酶接触,由此生成每个在HGG序列之前包含感兴趣的序列的多个双链DNA片段,其中来自HGG和/或CCD序列的残留核苷酸被留下。

13.权利要求1的方法,其中,步骤(d)进一步包括:在用识别步骤(c)的所述识别序列的限制酶切割之前,PCR扩增来自步骤(c)的衔接子连接的DNA片段,其中在PCR之后,所述识别序列位于所述PAM序列的3',并且调控序列位于所述PAM序列的5'远端。

14.权利要求1的方法,其中,步骤(b)的酶促反应包括使用Nt.CviPII酶和T7内切核酸酶I酶。

15.权利要求1的方法,其中,如果要连接的衔接子不包含突出端,步骤(c)进一步包括使用T4 DNA聚合酶的平端反应。

16.权利要求1的方法,其中,步骤(c)的衔接子:(1)如果所述衔接子是Y形的和包含突出端,那么是双链的,其在一条链中包含限制酶识别序列,并且在另一条链中包含调控序列;或(2)如果所述衔接子不是Y形的,那么在两条链中具有回文的酶识别序列。

17.权利要求1的方法,其中,步骤(d)的限制酶是MlyI。

18.权利要求1的方法,其中,步骤(d)进一步包括使所述DNA分子与XhoI酶接触。

19.权利要求1的方法,其中,在步骤(e)中,所述编码核酸指导的核酸酶系统蛋白结合序列的DNA编码包含序列GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU(SEQ ID NO:1)的RNA或编码包含序列GUUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUC(SEQ ID NO:2)的RNA。

20.权利要求1的方法,其中,所述感兴趣的靶序列在整个生物体的基因组中以每10,000bp或更少间隔。

用于制备和使用指导核酸的方法和组合物

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2015年12月7日提交的美国临时申请号62/264,262和2016年2月23日提交的美国临时申请号62/298,963的权益,其中的每个通过引用以其整体并入本文。

[0003] 通过引用并入序列表

[0004] 本申请与电子形式的序列表一起提交。序列表作为名为750592000340SeqList.txt的文件提供,创建于2016年12月5日,大小为816,451字节。电子形式的序列表的信息通过引用以其整体并入。

[0005] 背景

[0006] 人类临床DNA样品和样品文库诸如源自RNA的cDNA文库含有高丰度的几乎没有信息价值并且增加测序成本的序列。虽然已经开发了方法来消耗这些不想要的序列(例如,经由杂交捕获),但是这些方法经常是耗时的并且可能效率低。

[0007] 尽管指导核酸(gNA)介导的核酸酶系统(诸如指导RNA(gRNA)介导的Cas系统)可有效地消耗任何靶DNA,但是靶向消耗极高数量的独特DNA分子是不可行的。例如,源自人类血液的测序文库可含有>99%人类基因组DNA。使用基于gRNA介导的Cas9系统的方法来消耗该基因组DNA以检测在人类血液中循环的感染源,会需要极高数量的gRNA(约10,000,000-100,000,000gRNA),以确保每30-50个碱基对(bp)会存在gRNA,并且不会错过靶DNA。极大数量的gRNA可通过计算来预测,然后化学合成,但是成本过分昂贵。

[0008] 因此,在本领域中需要提供一种使任何DNA转化成gNA(例如gRNA)文库以能够例如从感兴趣的DNA序列中全基因组消耗不想要的DNA序列,而不事先知道它们的序列。本文提供的是解决该需要的方法和组合物。

发明内容

[0009] 本文提供的是从任何来源的核酸生成gNA和gNA的集合的组合物和方法。例如,gNA和gNA的集合可从来源DNA诸如基因组DNA生成。这样的gNA及其集合对于多种应用是有用的,所述应用包括消耗、分配、捕获或富集感兴趣的靶序列,全基因组标记,全基因组编辑,全基因组功能筛选和全基因组调控。

[0010] 在一方面,本文描述的发明提供了一种核酸的集合,所述集合中的多个核酸包含:第一区段,其包含调控区;第二区段,其编码导向序列(targeting sequence);和第三区段,其编码核酸指导的核酸酶系统蛋白结合序列,其中,所述集合中至少10%的所述核酸大小不同。在另一方面,本文描述的发明提供了一种核酸的集合,所述集合中的多个核酸包含:第一区段,其包含调控区;第二区段,其编码导向序列,其中所述第二区段的大小大于21bp;和第三区段,其编码核酸指导的核酸酶系统蛋白结合序列。在一些实施方案中,所述核酸指导的核酸酶系统蛋白是CRISPR/Cas系统蛋白。在一些实施方案中,所述第二区段的大小在整个所述核酸的集合中从15至250bp之间变化。在一些实施方案中,所述集合中至少10%的所述第二区段大于21bp。在一些实施方案中,所述第二区段的大小不是20bp。在一些实施方案中,所述第二区段的大小不是21bp。在一些实施方案中,所述核酸的集合是DNA的集合。在

一些实施方案中，所述第二区段是单链DNA。在一些实施方案中，所述第三区段是单链DNA。在一些实施方案中，所述第二区段是双链DNA。在一些实施方案中，所述第三区段是双链DNA。在一些实施方案中，所述调控区是能够结合转录因子的区域。在一些实施方案中，所述调控区包含启动子。在一些实施方案中，所述启动子选自下组：T7、SP6和T3。在一些实施方案中，所述导向序列针对哺乳动物基因组、真核基因组、原核基因组或病毒基因组。在一些实施方案中，所述导向序列针对重复或高丰度DNA。在一些实施方案中，所述导向序列针对线粒体DNA、核糖体DNA、Alu DNA、着丝粒DNA、SINE DNA、LINE DNA或STR DNA。在一些实施方案中，所述第二区段的序列选自表3和/或表4。在一些实施方案中，所述集合包含至少10^2个独特的核酸分子。在一些实施方案中，所述导向序列与位于PAM序列的5'的核苷酸序列相对的链至少80％互补。在一些实施方案中，所述集合包含导向序列，所述导向序列针对在生物体的整个基因组中间隔约每10,000bp或更少的感兴趣的序列。在一些实施方案中，所述PAM序列是AGG、CGG或TGG。在一些实施方案中，所述PAM序列对选自下组的CRISPR/Cas系统蛋白具有特异性：Cas9、Cpf1、Cas3、Cas8a-c、Cas10、Cse1、Csy1、Csn2、Cas4、Csm2和Cm5。在一些实施方案中，所述第三区段包含编码gRNA茎-环序列的DNA。在一些实施方案中，所述第三区段编码包含序列GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU(SEQ ID NO:1)的RNA或编码包含序列GUUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUC(SEQ ID NO:2)的RNA。在一些实施方案中，所述第三区段的序列编码crRNA和tracrRNA。在一些实施方案中，所述核酸指导的核酸酶系统蛋白来自细菌物种。在一些实施方案中，所述核酸指导的核酸酶系统蛋白来自古细菌物种。在一些实施方案中，所述CRISPR/Cas系统蛋白是I型、II型或III型蛋白。在一些实施方案中，所述CRISPR/Cas系统蛋白选自下组：Cas9、Cpf1、Cas3、Cas8a-c、Cas10、Cse1、Csy1、Csn2、Cas4、Csm2、Cm5、dCas9和cas9切口酶。在一些实施方案中，所述第三区段包含编码Cas9结合序列的DNA。在一些实施方案中，所述集合的多个第三区段编码第一核酸指导的核酸酶系统蛋白结合序列，并且所述集合的多个第三区段编码第二核酸指导的核酸酶系统蛋白结合序列。在一些实施方案中，所述集合的第三区段编码多个不同核酸指导的核酸酶系统蛋白的多个不同结合序列。

[0011] 在另一方面，本文描述的发明提供了一种指导RNA(gRNA)的集合，其包含：第一RNA区段，一种导向序列；和第二RNA区段，其包含核酸指导的核酸酶系统蛋白结合序列，其中，所述集合中至少10％的所述gRNA大小不同。在一些实施方案中，所述核酸指导的核酸酶系统蛋白是CRISPR/Cas系统蛋白。在一些实施方案中，所述第一区段的大小在整个所述gRNA的集合中从15-250bp之间变化。在一些实施方案中，所述集合中至少10％的所述第一区段大于21bp。在一些实施方案中，所述第一区段的大小不是20bp。在一些实施方案中，所述第一区段的大小不是21bp。在一些实施方案中，所述导向序列针对哺乳动物基因组、真核基因组、原核基因组或病毒基因组。在一些实施方案中，所述导向序列针对重复或高丰度DNA。在一些实施方案中，所述导向序列针对线粒体DNA、核糖体DNA、Alu DNA、着丝粒DNA、SINE DNA、LINE DNA或STR DNA。在一些实施方案中，所述第一区段的序列是由选自表3和/或表4的序列编码的RNA。在一些实施方案中，所述集合包含至少10^2个独特的gRNA。在一些实施方案中，所述gRNA包含胞嘧啶、鸟嘌呤和腺嘌呤。在一些实施方案中，所述gRNA的一个子集进一步包含胸腺嘧啶。在一些实施方案中，所述gRNA的一个子集进一步包含尿嘧啶。在一些实

施方案中，所述第一区段与感兴趣的靶基因组序列至少80％互补。在一些实施方案中，所述导向序列与位于PAM序列的5’的核苷酸序列相对的链至少80％互补。在一些实施方案中，所述PAM序列是AGG、CGG或TGG。在一些实施方案中，所述PAM序列对选自下组的CRISPR/Cas系统蛋白具有特异性：Cas9、Cpf1、Cas3、Cas8a-c、Cas10、Cse1、Csy1、Csn2、Cas4、Csm2和Cm5。在一些实施方案中，所述第二区段包含gRNA茎-环序列。在一些实施方案中，所述第三区段包含编码gRNA茎-环序列的DNA。在一些实施方案中，所述第三区段包含序列GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU(SEQ ID NO:1)或包含序列GUUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUC(SEQ ID NO:2)。在一些实施方案中，所述第二区段包含crRNA和tracrRNA。在一些实施方案中，所述核酸指导的核酸酶系统蛋白来自细菌物种。在一些实施方案中，所述核酸指导的核酸酶系统蛋白来自古细菌物种。在一些实施方案中，所述CRISPR/Cas系统蛋白是I型、II型或III型蛋白。在一些实施方案中，所述CRISPR/Cas系统蛋白选自下组：Cas9、Cpf1、Cas3、Cas8a-c、Cas10、Cse1、Csy1、Csn2、Cas4、Csm2、Cm5、dCas9和cas9切口酶。在一些实施方案中，所述第二区段包含Cas9结合序列。在一些实施方案中，所述集合中至少10％的gRNA在它们的5’末端序列不同。在一些实施方案中，所述集合包含导向序列，所述导向序列针对在生物体的整个基因组中间隔约每10,000bp或更少的感兴趣的序列。在一些实施方案中，所述集合的多个第二区段包含第一核酸指导的核酸酶系统蛋白结合序列，并且所述集合的多个第二区段包含第二核酸指导的核酸酶系统蛋白结合序列。在一些实施方案中，所述集合的第二区段包含多个不同核酸指导的核酸酶系统蛋白的多个不同结合序列。在一些实施方案中，所述集合的多个gRNA附接于基底。在一些实施方案中，所述集合的多个gRNA包含标记。在一些实施方案中，所述集合的多个gRNA包含不同标记。

[0012] 在另一方面，本文描述的发明提供了核酸，其包含：第一区段，其包含调控区；第二区段，其编码导向序列，其中，所述导向序列大于30bp；和第三区段，其编码编码核酸指导的核酸酶系统蛋白结合序列的核酸。在一些实施方案中，所述核酸指导的核酸酶是CRISPR/Cas系统蛋白。在一些实施方案中，所述核酸是DNA。在一些实施方案中，所述第二区段是单链DNA。在一些实施方案中，所述第三区段是单链DNA。在一些实施方案中，所述第二区段是双链DNA。在一些实施方案中，所述第三区段是双链DNA。在一些实施方案中，所述调控区是能够结合转录因子的区域。在一些实施方案中，所述调控区包含启动子。在一些实施方案中，所述启动子选自下组：T7、SP6和T3。在一些实施方案中，所述导向序列针对哺乳动物基因组、真核基因组、原核基因组或病毒基因组。在一些实施方案中，所述导向序列针对高丰度或重复DNA。在一些实施方案中，所述导向序列针对线粒体DNA、核糖体DNA、Alu DNA、着丝粒DNA、SINE DNA、LINE DNA或STR DNA。在一些实施方案中，所述第二区段的序列选自表3和/或表4。在一些实施方案中，所述导向序列与位于PAM序列的5’的核苷酸序列相对的链至少80％互补。在一些实施方案中，所述感兴趣的靶基因组序列是PAM序列的5’上游。在一些实施方案中，所述PAM序列对选自下组的CRISPR/Cas系统蛋白具有特异性：Cas9、Cpf1、Cas3、Cas8a-c、Cas10、Cse1、Csy1、Csn2、Cas4、Csm2和Cm5。在一些实施方案中，所述第三区段包含编码gRNA茎-环序列的DNA。在一些实施方案中，所述第三区段编码包含序列GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU

(SEQ ID NO:1)的RNA或编码包含序列GUUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUC(SEQ ID NO:2)的RNA。在一些实施方案中,所述核酸指导的核酸酶系统蛋白来自细菌物种。在一些实施方案中,所述核酸指导的核酸酶系统蛋白来自古细菌物种。在一些实施方案中,所述CRISPR/Cas系统蛋白是I型、II型或III型蛋白。在一些实施方案中,所述CRISPR/Cas系统蛋白选自下组:Cas9、Cpf1、Cas3、Cas8a-c、Cas10、Cse1、Csy1、Csn2、Cas4、Csm2、Cm5、dCas9和cas9切口酶。在一些实施方案中,所述第三区段包含编码Cas9结合序列的DNA。

[0013] 在另一方面,本文描述的发明提供了一种指导RNA,其包含:第一区段,其包含导向序列,其中,所述第一区段的大小大于30bp;和第二区段,其包含核酸指导的核酸酶系统蛋白结合序列。在一些实施方案中,所述核酸指导的核酸酶是CRISPR/Cas系统蛋白。在一些实施方案中,所述gRNA包含腺嘌呤、鸟嘌呤和胞嘧啶。在一些实施方案中,所述gRNA进一步包含胸腺嘧啶。在一些实施方案中,所述gRNA进一步包含尿嘧啶。在一些实施方案中,所述第一RNA区段的大小为30～250bp。在一些实施方案中,所述导向序列针对哺乳动物基因组、真核基因组、原核基因组或病毒基因组。在一些实施方案中,所述导向序列针对重复或高丰度DNA。在一些实施方案中,所述导向序列针对线粒体DNA、核糖体DNA、Alu DNA、着丝粒DNA、SINE DNA、LINE DNA或STR DNA。在一些实施方案中,所述第一区段与感兴趣的靶基因组序列至少80％互补。在一些实施方案中,所述导向序列与位于PAM序列的5'的核苷酸序列相对的链至少80％互补。在一些实施方案中,所述第二区段包含gRNA茎-环序列。在一些实施方案中,所述第二区段的序列包含GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU(SEQ ID NO:1)或包含GUUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUC(SEQ ID NO:2)。在一些实施方案中,所述第三区段的序列包含crRNA和tracrRNA。在一些实施方案中,所述核酸指导的核酸酶系统蛋白来自细菌物种。在一些实施方案中,所述核酸指导的核酸酶系统蛋白来自古细菌物种。在一些实施方案中,所述CRISPR/Cas系统蛋白是I型、II型或III型蛋白。在一些实施方案中,所述CRISPR/Cas系统蛋白选自下组:Cas9、Cpf1、Cas3、Cas8a-c、Cas10、Cse1、Csy1、Csn2、Cas4、Csm2、Cm5、dCas9和cas9切口酶。在一些实施方案中,所述第二区段是Cas9结合序列。

[0014] 在另一方面,本发明提供了一种复合物,其包含核酸指导的核酸酶系统蛋白,并且其包含第一区段,其包含导向序列,其中所述第一区段的大小大于30bp;和第二区段,其包含核酸指导的核酸酶系统蛋白结合序列。

[0015] 在另一方面,本文描述的发明提供了一种用于消耗和分配样品中的靶序列、富集非宿主核酸的样品、或连续消耗样品中的靶核酸的方法,其包括:提供从样品中提取的核酸;和使所述样品与多个复合物接触,所述多个复合物包含(i)本文提供的任何一个gRNA的集合;和(ii)核酸指导的核酸酶系统蛋白。在一些实施方案中,所述核酸指导的核酸酶系统蛋白是CRISPR/Cas系统蛋白。在一些实施方案中,所述CRISPR/Cas系统蛋白是Cas9蛋白。

[0016] 在另一方面,本发明提供了一种制备核酸的集合的方法,所述核酸的每个包含与编码核酸指导的核酸酶系统蛋白结合序列的DNA连接的编码导向序列的DNA,所述方法包括:(a)提供双链DNA分子,所述双链DNA分子每个包含位于PAM序列的5'的感兴趣的序列,和相对链上的其反向互补序列;(b)对所述双链DNA分子进行酶促消化反应,其中,切割在所述

PAM序列和/或相对链上的其反向互补序列处产生，但是没有完全从所述双链DNA中去除所述PAM序列和/或相对链上的其反向互补序列；(c)连接包含识别序列的衔接子与步骤b的所得DNA分子；(d)使步骤c的DNA分子与识别步骤c的识别序列的限制酶接触，由此紧接在所述PAM序列的5'处生成包含平端化的双链断裂的DNA片段，由此去除所述PAM序列和含有所述酶识别位点的衔接子；和(e)连接步骤d所得的双链DNA片段与编码核酸指导的核酸酶系统蛋白结合序列的DNA，由此生成每个包含与编码核酸指导的核酸酶系统蛋白结合序列的DNA连接的编码导向序列的DNA的多个DNA片段。在一些实施方案中，所述核酸指导的核酸酶是CRISPR/Cas核酸指导的核酸酶系统蛋白。在一些实施方案中，所述集合的起始DNA分子进一步包含位于所述PAM序列的5'的感兴趣的序列的上游的调控序列。在一些实施方案中，所述调控序列包含启动子。在一些实施方案中，所述启动子包含T7、Sp6或T3序列。在一些实施方案中，所述双链DNA分子是基因组DNA、完整的DNA或剪切的DNA。在一些实施方案中，所述基因组DNA是人的、小鼠的、禽的、鱼的、植物的、昆虫的、细菌的或病毒的。在一些实施方案中，所述编码导向序列的DNA区段为至少22bp。在一些实施方案中，所述编码导向序列的DNA区段的大小范围为15-250bp。在一些实施方案中，所述PAM序列是AGG、CGG或TGG。在一些实施方案中，所述PAM序列对选自下组的CRISPR/Cas系统蛋白具有特异性：Cas9、Cpf1、Cas3、Cas8a-c、Cas10、Cse1、Csy1、Csn2、Cas4、Csm2和Cm5。在一些实施方案中，步骤(b)进一步包括：(1)使所述DNA分子与能够在在CCD位点的单链中产生切口的酶接触，由此生成每个包含后面为HGG序列的感兴趣的序列的多个有切口的双链DNA分子，其中，所述DNA分子在CCD位点是有切口的；和(2)使所述有切口的双链DNA分子与内切核酸酶接触，由此生成每个包含后面为HGG序列的感兴趣的序列的多个双链DNA片段，其中来自HGG和/或CCD序列的残留核苷酸被留下。在一些实施方案中，步骤(d)进一步包括：在用识别步骤(c)的识别序列的限制酶切割之前，PCR扩增来自步骤(c)的衔接子连接的DNA片段，其中在PCR之后，所述识别序列位于PAM序列的3'，并且调控序列位于PAM序列的5'远端。在一些实施方案中，步骤(b)的酶促反应包括使用Nt.CviPII酶和T7内切核酸酶I酶。在一些实施方案中，如果要连接的衔接子不包含突出端，步骤(c)进一步包括使用T4DNA聚合酶的平端反应。在一些实施方案中，步骤(c)的衔接子(1)如果所述衔接子是Y形的和包含突出端，那么是双链的，其在一条链中包含限制酶识别序列，在另一条链中包含调控序列；或(2)如果所述衔接子不是Y形的，那么在两条链中具有回文的酶识别序列。在一些实施方案中，步骤(d)的限制酶是MlyI。在一些实施方案中，步骤(d)的限制酶是BaeI。在一些实施方案中，步骤(d)进一步包括使所述DNA分子与XhoI酶接触。在一些实施方案中，在步骤(e)中，所述编码核酸指导的核酸酶系统蛋白结合序列的DNA，编码包含序列GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU(SEQ ID NO:1)的RNA或编码包含序列GUUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUC(SEQ ID NO:2)的RNA。在一些实施方案中，所述感兴趣的靶序列在整个生物体的基因组中以每10,000bp或更少间隔。

[0017] 在另一方面，本发明提供了一种制备核酸的集合的方法，所述核酸的每个包含与编码核酸指导的核酸酶系统蛋白结合序列的DNA连接的编码导向序列的DNA，所述方法包括：(a)提供每个包含感兴趣的序列、NGG位点和其互补的CCN位点的多个双链DNA分子；(b)使所述分子与能够在CCN位点的单链中产生切口的酶接触，由此生成每个包含位于NGG位点

的5’的感兴趣的序列的多个有切口的双链DNA分子，其，其中，所述DNA分子在CCD位点是有切口的；(c)使所述有切口的双链DNA分子与内切核酸酶接触，由此生成每个包含感兴趣的序列的多个双链DNA片段，其中所述片段包含末端突出端；(d)使所述双链DNA片段与没有5’至3’外切核酸酶活性的酶接触以平端化双链DNA片段，由此生成每个包含感兴趣的序列的多个平端化的双链片段；(e)使步骤d的平端化的双链片段与切割末端NGG位点的酶接触；和(f)使步骤e所得的双链DNA片段与编码核酸指导的核酸酶系统蛋白结合序列的DNA连接，由此生成每个包含与编码核酸指导的核酸酶系统蛋白结合序列的DNA连接的导向序列的多个DNA片段。在一些实施方案中，所述核酸指导的核酸酶是CRISPR/Cas系统蛋白。在一些实施方案中，所述多个双链DNA分子具有NGG位点的5’上游的调控序列。在一些实施方案中，所述调控序列包含T7、SP6或T3序列。在一些实施方案中，所述NGG位点包含AGG、CGG或TGG，并且所述CCN位点包含CCT、CCG或CCA。在一些实施方案中，所述多个双链DNA分子，包含感兴趣的序列的每个包含基因组DNA的剪切片段。在一些实施方案中，所述基因组DNA是哺乳动物的、原核的、真核的、禽的、细菌的或病毒的。在一些实施方案中，步骤(a)中的多个双链DNA分子为至少500bp。在一些实施方案中，步骤b中的酶是Nt.CviPII酶。在一些实施方案中，步骤c中的酶是T7内切核酸酶I。在一些实施方案中，步骤d中的酶是T4DNA聚合酶。在一些实施方案中，在步骤f中，所述编码核酸指导的核酸酶系统蛋白结合序列的DNA，编码包含序列GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU(SEQ ID NO:1)的RNA或编码包含序列GUUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUC(SEQ ID NO:2)的RNA。在一些实施方案中，所述步骤e另外包括连接携带MlyI识别位点的衔接子和用MlyI酶消化。在一些实施方案中，所述感兴趣的序列在整个基因组中以每10,000bp或更少间隔。

[0018] 在另一方面，本发明提供了一种制备核酸的集合的方法，所述核酸的每个包含编码导向序列的DNA和编码核酸指导的核酸酶系统蛋白结合序列的DNA，所述方法包括：(a)提供包含多个感兴趣的序列的基因组DNA，其包含NGG和CCN位点；(b)使所述基因组DNA与能够在所述基因组DNA中产生切口的酶接触，由此生成在CCD位点有切口的有切口的基因组DNA；(c)使所述有切口的基因组DNA与内切核酸酶接触，由此生成具有突出端的双链DNA片段；(d)使来自步骤c的具有突出端的DNA与Y形衔接子连接，由此仅在NGG位点的3’处引入限制酶识别序列，并且在所述感兴趣的序列的5’引入调控序列；(e)使来自步骤d的产物与酶接触，所述酶将NGG位点连同携带所述酶识别序列的衔接子一起切掉；和(f)使步骤e所得的双链DNA片段与编码核酸指导的核酸酶系统蛋白结合序列的DNA连接，由此生成每个包含与编码核酸指导的核酸酶系统蛋白结合序列的DNA连接的感兴趣的序列的多个DNA片段。在一些实施方案中，所述核酸指导的核酸酶是CRISPR/Cas系统蛋白。在一些实施方案中，所述NGG位点包含AGG、CGG或TGG，并且所述CCN位点包含CCT、CCG或CCA。在一些实施方案中，所述调控序列包含启动子序列。在一些实施方案中，所述启动子序列包含T7、SP6或T3序列。在一些实施方案中，所述DNA片段是剪切的基因组DNA片段。

[0019] 在一些实施方案中，所述基因组DNA是哺乳动物的、原核的、真核的或病毒的。在一些实施方案中，所述片段为至少200bp。在一些实施方案中，步骤b中的酶是Nt.CviPII酶。在一些实施方案中，步骤c中的酶是T7内切核酸酶I。在一些实施方案中，步骤d进一步包括PCR扩增衔接子连接的DNA。在一些实施方案中，在步骤f中，所述编码核酸指导的核酸酶系统蛋

白结合序列的DNA,编码包含序列GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU(SEQ ID NO:1)的RNA或编码包含序列GUUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUC(SEQ ID NO:2)的RNA。在一些实施方案中,在步骤e中去除NGG位点的酶是MlyI。在一些实施方案中,所述集合的感兴趣的靶标在整个基因组中以每10,000bp或更少间隔。

[0020] 在另一方面,本发明提供了试剂盒和/或试剂,其对进行制备核酸的集合的方法是有用的,所述核酸的每个包含与编码核酸指导的核酸酶系统蛋白结合序列的DNA连接的编码导向序列的DNA,如本文的实施方案中所描述的。

[0021] 在另一方面,本文描述的发明提供了试剂盒,其包含核酸的集合,所述集合中的多个核酸包含:第一区段,其包含调控区;第二区段,其编码导向序列;和第三区段,其编码CRISPR/Cas系统蛋白结合序列,其中,所述集合中至少10%的所述核酸大小不同。

[0022] 在另一方面,本文描述的发明提供了一种试剂盒,其包含核酸的集合,所述集合中的多个核酸包含:第一区段,其包含调控区;第二区段,其编码导向序列,其中所述第二区段的大小大于21bp;和第三区段,其编码CRISPR/Cas系统蛋白结合序列。

[0023] 在另一方面,本文描述的发明提供了一种包含指导RNA的集合的试剂盒,所述指导RNA包含:第一RNA区段,其包含导向序列;和第二RNA区段,其包含核酸指导的核酸酶系统蛋白结合序列,其中,所述集合中至少10%的所述gRNA大小不同。

[0024] 在另一方面,本文描述的发明提供了一种制备指导核酸的集合的方法,其包括:a.获得在来源样品中的高丰度细胞;b.从所述高丰度细胞中收集核酸;和c.从所述核酸制备指导RNA(gRA)的集合。在一些实施方案中,所述高丰度细胞包含来自所述来源样品中一个或多个丰度最高的细菌物种的细胞。在一些实施方案中,所述高丰度细胞包含来自多个物种的细胞。在一些实施方案中,所述高丰度细胞包含人类细胞。在一些实施方案中,所述高丰度细胞包含动物细胞。在一些实施方案中,所述高丰度细胞包含植物细胞。在一些实施方案中,高丰度细胞包含细菌细胞。在一些实施方案中,其进一步包括使核酸指导的核酸酶与所述gNA的文库接触,以形成核酸指导的核酸酶-gNA复合物。在一些实施方案中,所述方法进一步包括使用所述核酸指导的核酸酶-gNA复合物,以在靶位点切割靶核酸,其中,所述gNA与所述靶位点是互补的。在一些实施方案中,所述靶核酸来自所述来源样品。在一些实施方案中,所述靶核酸的物种与所述来源样品的物种相同。在一些实施方案中,所述靶核酸的物种和所述来源样品的物种是人类。在一些实施方案中,所述靶核酸的物种和所述来源样品的物种是动物。在一些实施方案中,所述靶核酸的物种和所述来源样品的物种是植物。

[0025] 在另一方面,本文描述的发明提供了一种制备核酸的集合的方法,所述核酸的每个包含导向序列,所述方法包括:a.获得来源DNA;b.在切口酶识别位点用切口酶使所述来源DNA有切口,由此在近端切口产生双链断裂;和c.修复所述双链断裂的突出端,由此产生双链片段,其包含(i)导向序列和(ii)所述切口酶识别位点。在另一方面,本文描述的发明提供了一种制备核酸的集合的方法,所述核酸的每个包含导向序列,所述方法包括:a.获得来源DNA;b.在切口酶识别位点用切口酶使所述来源DNA有切口,由此产生切口;和c.从所述切口合成新链,由此产生包含导向序列的所述来源DNA的单链片段。在一些实施方案中,所述方法进一步包括从所述单链片段产生包含所述导向序列的双链片段。在一些实施方案中,所述产生所述双链片段包含随机引发和延伸。在一些实施方案中,所述随机引发用包含

随机n-mer区和启动子区的引物进行。在一些实施方案中，所述随机n-mer区是随机六核苷酸(hexamer)区。在一些实施方案中，所述随机n-mer区是随机八核苷酸(octamer)区。在一些实施方案中，所述启动子区是T7启动子区。在一些实施方案中，所述方法进一步包括使包含核酸酶识别位点的核酸酶识别位点核酸与所述双链片段连接。在一些实施方案中，所述核酸酶识别位点对应于这样的核酸酶：其在距离所述核酸酶识别位点一定距离处切割，所述距离等于所述切口酶识别位点长度。在一些实施方案中，所述核酸酶识别位点是MlyI识别位点。在一些实施方案中，所述核酸酶识别位点是BaeI识别位点。在一些实施方案中，所述方法进一步包括用所述核酸酶消化所述双链片段，由此从所述双链片段中去除所述切口酶识别位点。在一些实施方案中，所述方法进一步包括使所述双链片段与包含核酸指导的核酸酶系统蛋白识别位点的核酸指导的核酸酶系统蛋白识别位点核酸连接。在一些实施方案中，所述核酸指导的核酸酶系统蛋白识别位点包含指导RNA茎-环序列。在一些实施方案中，所述核酸酶识别位点对应于这样的酶：其在距所述核酸酶识别位点一定距离处切割，所述距离等于所述导向序列长度。在一些实施方案中，所述导向序列的长度为20个碱基对。在一些实施方案中，所述核酸酶识别位点是MmeI识别位点。在一些实施方案中，所述方法进一步包括用所述核酸酶消化所述双链片段。在一些实施方案中，所述核酸酶识别位点对应于这样的酶：其在距所述核酸酶识别位点一定距离处切割，所述距离等于所述导向序列的长度加上所述切口酶识别位点的长度。在一些实施方案中，所述导向序列的长度加上所述切口酶识别位点的长度为23个碱基对。在一些实施方案中，所述核酸酶识别位点是EcoP15I识别位点。在一些实施方案中，所述方法进一步包括用所述核酸酶消化所述双链片段。在一些实施方案中，所述方法进一步包括使所述双链片段与包含核酸指导的核酸酶系统蛋白识别位点的核酸指导的核酸酶系统蛋白识别位点核酸连接。在一些实施方案中，所述核酸指导的核酸酶系统蛋白识别位点包含指导RNA茎-环序列。

[0026] 在另一方面，本文描述的发明提供了一种试剂盒，其包含用于进行本文描述的发明的多个方面的方法的所有必要试剂和说明书。

附图说明

[0027] 图1示例说明了用于从基因组DNA产生gRNA的集合(gRNA文库)的示例性方案。

[0028] 图2示例说明了用于从基因组DNA产生gRNA的集合(gRNA文库)的另一个示例性方案。

[0029] 图3示例说明了用于使DNA有切口和随后用聚合酶处理以生成平端的示例性方案。

[0030] 图4示例说明了用于使用3个衔接子顺序产生gNA的文库的示例性方案。

[0031] 图5示例说明了用于使用一个衔接子和一个寡核苷酸顺序产生gNA的文库的示例性方案。

[0032] 图6示例说明了使用切口酶介导的DNA扩增(NEMDA)生成有平端的DNA片段的大库的示例性方案。

[0033] 图7示例说明了用于使用切口酶介导的DNA扩增(NEMDA)生成gNA的大库的示例性方案。

具体实施方案

[0034] 本领域需要可扩展的、低成本的方法以生成大量不同指导核酸(gNA)(例如gRNA、gDNA)用于多种下游应用。

[0035] 除非本文另有定义,否则本文所使用的所有技术和科学术语具有与发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。尽管与本文所述的方法和材料相似或等同的任何方法和材料可用于本发明的实践和测试,但是仍描述了优选的方法和材料。

[0036] 数值范围包含限定范围的数字。

[0037] 为了解释本说明书的目的,将应用以下定义,并且在任何适当时,以单数形式使用的术语也将包括复数形式,并且反之亦然。在下面列出的任何定义与通过引用并入本文的任何文件相矛盾的情况下,以所列出的定义为准。

[0038] 除非另有说明,如本文所使用的单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数形式的提及。

[0039] 应该理解的是本文所述的本发明的方面和实施方案包括“包含”方面和实施方案、“由方面和实施方案组成”和“基本上由方面和实施方案组成”。

[0040] 本文所使用的术语“约”指本技术领域的技术人员容易知道的相应值的通常误差范围。本文提及“约”一个值或参数包括(和描述)针对该值或参数本身的实施方案。

[0041] 本文所使用的术语“核酸”指包含一个或多个核酸亚单位的分子。核酸可包含选自腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)及其经修饰形式的一个或多个亚单位。核酸包含脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)、它们的组合或衍生物。核酸可以是单链和/或双链的。

[0042] 本文所使用的核酸包含“核苷酸”,所述核苷酸意欲包括含有嘌呤和嘧啶碱基的那些部分,及其经修饰的形式。这样的修饰包括甲基化的嘌呤或嘧啶、酰化的嘌呤或嘧啶、烷基化的核糖或其他杂环。另外,术语“核苷酸”或“多核苷酸”包括含有半抗原或荧光标记的那些部分,并且可以不但含有常规的核糖和脱氧核糖糖类,而且还含有其他糖类。经修饰的核苷、核苷酸或多核苷酸还包括对糖部分的修饰,例如,其中一个或多个羧基被卤素原子或脂族基团取代,或被官能化为酯、胺等。

[0043] 术语“核酸”和“多核苷酸”在本文中可互换使用。多核苷酸用来描述由核苷酸例如脱氧核糖核酸或核糖核酸组成的任何长度的核酸聚合物,例如,大于约2个碱基、大于约10个碱基、大于约100个碱基、大于约500个碱基、大于约1000个碱基、高达约10,000个或更多个碱基,并且可酶促或合成产生(例如,如美国专利号5,948,902和在此所引用的参考文献中所述的PNA),其可以与两种天然存在的核酸类似的序列特异性方式与天然存在的核酸杂交,例如可参与Watson-Crick碱基配对相互作用。天然存在的核苷酸包括鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤和胸腺嘧啶(分别是G、C、A和T)。DNA和RNA分别具有脱氧核糖和核糖糖骨架,而PNA的骨架由通过肽键连接的重复的N-(2-氨乙基)-甘氨酸单元组成。在PNA中,多种嘌呤和嘧啶碱基通过亚甲基羰基键与该骨架连接。锁核酸(LNA)经常称为不可达RNA(inaccessible RNA),是经修饰的RNA核苷酸。LNA核苷酸的核糖部分用连接2’氧和4’碳的额外桥修饰。该桥将核糖“锁定”在3’-内(北)构象(3’-endo(North)conformation)中,这经常在A形双链体中被发现。无论何时需要,LNA核苷酸均可在寡核苷酸中与DNA或RNA残基混合。术语“非结构性核酸”或“UNA”是含有彼此以减小的稳定性结合的非天然核苷酸的核酸。例如,非结构性核

酸可含有G'残基和C'残基,其中,这些残基对应于G和C的非天然存在的形式,即类似物,其彼此以减小的稳定性碱基配对,但是保持与天然存在的C和G残基分别碱基配对的能力。非结构性核酸在US20050233340中描述,其通过引用在此并入用于公开UNA。

[0044] 本文所使用的术语"寡核苷酸"指核苷酸的单链多聚体。

[0045] 除非另有说明,否则分别地以5'至3'方向从左至右书写核酸;以氨基至羧基方向从左至右书写氨基酸序列。

[0046] 本文所使用的术语"切割"指断裂双链DNA分子的两条链中两个相邻核苷酸之间的磷酸二酯键的反应,由此得到DNA分子的双链断裂。

[0047] 本文所使用的术语"使…有切口"指断裂双链DNA分子的仅一条链中两个相邻核苷酸之间的磷酸二酯键的反应,由此得到DNA分子的单链的断裂。

[0048] 本文所使用的术语"切割位点"指双链DNA分子已经被切割的位点。

[0049] "核酸指导的核酸酶-gNA复合物"指包含核酸指导的核酸酶蛋白和指导核酸(gNA,例如gRNA或gDNA)的复合物。例如"Cas9-gRNA复合物"指包含Cas9蛋白和指导RNA(gRNA)的复合物。核酸指导的核酸酶可以是任何类型的核酸指导的核酸酶,其包括但不限于野生型核酸指导的核酸酶,催化死亡的核酸指导的核酸酶(catalytically dead nucleic acid-guided nuclease)或核酸指导的核酸酶-切口酶。

[0050] 术语"与核酸指导的核酸酶有关的指导NA"指指导核酸(指导NA)。与核酸指导的核酸酶有关的指导NA可作为单独的核酸存在,或作为核酸指导的核酸酶-gNA复合物(例如Cas9-gRNA复合物)的一部分存在。

[0051] 术语"捕获"和"富集"在本文中可互换使用,并且指选择性分离含有以下的核酸区域的过程:感兴趣的序列、感兴趣的靶向位点、不感兴趣的序列或不感兴趣的靶向位点。

[0052] 术语"杂交"指核酸的一条链通过如本领域已知的碱基配对与互补链结合的过程。如果两个序列在中度至高度严格杂交和洗涤条件下特异性地互相杂交,则认为一个核酸与一个参考核酸序列"选择性杂交"。中度和高度严格杂交条件是已知的(参见,例如,Ausubel,et al.,Short Protocols in Molecular Biology,第三版.,Wiley&Sons 1995和Sambrook et al.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第三版,2001Cold Spring Harbor,N.Y.)。高度严格条件的一个实例包括在约42℃,在50%甲酰胺、5X SSC、5X Denhardt氏溶液、0.5%SDS和100μg/ml变性的载体DNA中杂交,然后在室温在2X SSC和0.5%SDS中洗涤两次,和在42℃在0.1X SSC和0.5%SDS中另外洗涤两次。

[0053] 本文所使用的术语"双链体"或"双链体的"描述了碱基配对即杂交在一起的两个互补的多核苷酸。

[0054] 本文所使用的术语"扩增"指使用靶核酸作为模板生成该靶核酸的一个或多个拷贝。

[0055] 本文所使用的术语"基因组区域"指基因组(例如动物或植物基因组,诸如人类、猴、大鼠、鱼或昆虫或植物的基因组)的区域。在某些情况中,在本文所述的方法中使用的寡核苷酸可使用参考基因组区域(即已知核苷酸序列的基因组区域,例如,序列储存在例如NCBI的Genbank数据库或其他数据库中的染色体区域)来设计。

[0056] 本文所使用的术语"基因组序列"指存在于基因组中的序列。因为RNA从基因组转录,该术语涵盖存在于生物体的核基因组中的序列,以及存在于从这样的基因组转录的RNA

(例如,mRNA)的cDNA拷贝中的序列。

[0057] 本文所使用的术语“基因组片段”指基因组(例如动物或植物基因组,诸如人类、猴、大鼠、鱼或昆虫或植物的基因组)的区域。基因组片段可以是整个染色体或染色体的片段。基因组片段可以是衔接子连接的(在这种情况下,其具有与该片段的一端或两端连接的衔接子或与分子的至少5’端连接的衔接子),或可以不是衔接子连接的。

[0058] 在某些情况下,在本文所述的方法中使用的寡核苷酸可使用参考基因组区域(即已知核苷酸序列的基因组区域,例如序列储存在例如NCBI的Genbank数据库或其他数据库中的染色体区域)来设计。这样的寡核苷酸可以用于使用含有测试基因组的样品的测定中,其中测试基因组含有该寡核苷酸的结合位点。

[0059] 本文所使用的术语“连接”指第一个DNA分子的5’端的末端核苷酸与第二个DNA分子的3’端的末端核苷酸的酶催化的连接。

[0060] 如果两个核酸是“互补的”,一个核酸的每个碱基与另一个核酸中相应的核苷酸碱基配对。术语“互补”和“完美互补”在本文中是同义使用。

[0061] 如本文所使用的术语“分离”指物理分离两个元件(例如通过尺寸或亲和力等)以及降解一个元件同时保持另一个完整。例如,尺寸排阻可用于分离核酸,所述核酸包括切割的靶向序列。

[0062] 在细胞中,DNA通常以双链形式存在,并且因此,具有在本文中称为“顶部”和“底部”链的核酸的两条互补链。在某些情况下,染色体区域的互补链可称为“正”链和“负”链,“第一条”链和“第二条”链、“编码”链和“非编码”链、“Watson”链和“Crick”链或“有义”链和“反义”链。成为顶部链或底部链的链的分配是任意的并且不暗示任何特定方向、功能或结构。第一条链和第二条链是不同的分子直到它们变为共价地连接。为了易于描述,其中的顶部链和底部链已经共价连接的双链核酸的“顶部”链和“底部”链仍然会被描述为“顶部”链和“底部”链。换言之,为了本公开的目的,双链DNA的顶部链和底部链不需要成为单独的分子。一些示例性哺乳动物染色体区域(例如,BAC、装配体、染色体等)的第一条链的核苷酸序列是已知的,并且可在例如NCBI的Genbank数据库中找到。

[0063] 如本文所使用的术语“顶部链”指核酸的任一条链而不是核酸的两条链。当寡核苷酸或引物“仅与顶部链”结合或退火时,其仅与一条链结合,而不与另一条链结合。如本文所使用的术语“底部链”指与“顶部链”互补的链。当寡核苷酸“仅与一条链”结合或退火时,其仅结合一条链,例如,第一条链或第二条链,而不结合另一条链。如果寡核酸与双链DNA的两条链结合或退火,该寡核苷酸可具有两个区域,与双链DNA的顶部链杂交的第一个区域,和与双链DNA的底部链杂交的第二个区域。

[0064] 术语“双链DNA分子”指其中的顶部链和底部链没有共价连接的双链DNA分子,以及其中的顶部链和底部链共价连接的双链DNA分子。双链DNA的顶部链和底部链通过Watson-Crick相互作用彼此碱基配对。

[0065] 如本文所使用的术语“变性”指通过将双链体置于合适的变性条件中分离核酸的至少一部分碱基对。变性条件是本领域公知的。在一个实施方案中,为了变性核酸双链体,可使双链体暴露于高于双链体的T_m的温度,由此从双链体的另一条链中释放一条链。在某些实施方案中,可通过暴露于至少90℃的温度持续适量的时间(例如至少30秒,最多30分钟)来使核酸变性。在某些实施方案中,完全变性条件可用于完全分离双链体的碱基对。在

其他实施方案中，部分变性条件(例如，具有比完全变性条件更低的温度)可用于分离双链体的某些部分的碱基对(例如，富集A-T碱基对的区域可分离，同时富集G-C碱基对的区域可保持配对)。核酸还可化学地(例如使用尿素或NaOH)变性。

[0066] 如本文所使用的术语“基因分型”指核酸序列的任何类型的分析，并且包括测序、多态性(SNP)分析和分析以识别重排。

[0067] 如本文所使用的术语“测序”指获得多核苷酸的连续核苷酸的身份(identity)的方法。

[0068] 术语“下一代测序”指所谓的平行合成测序平台或连接测序平台，例如，目前由Illumina,Life Technologies和Roche等采用的那些。下一代测序方法还可包括纳米孔测序方法或基于电子检测的方法，诸如由Life Technologies商业化的Ion Torrent技术。

[0069] 术语“互补DNA”或cDNA指通过以下方法从RNA样品产生的双链DNA样品：通过的逆转录(使用引物，诸如随机的六核苷酸或寡-dT引物)，然后通过使用RNA酶H消化RNA和通过DNA聚合酶合成来合成第二条链。

[0070] 术语“RNA启动子衔接子”是含有用于噬菌体RNA聚合酶(例如来自噬菌体T3、T7、SP6等的RNA聚合酶)的启动子的衔接子。

[0071] 其他术语定义可出现在整个说明书中。

[0072] 对于本文所述的任何结构和功能特征，确定这些特征的方法是本领域中已知的。

[0073] 指导核酸(gNA)

[0074] 本文提供了可源自任何核酸来源的指导核酸(gNA)。gNA可以是指导RNA(gRNA)或指导DNA(gDNA)。核酸来源可以是DNA或RNA。本文提供了从任何来源核酸生成gNA的方法，所述来源核酸包括来自单一生物体的DNA，或来自多个生物体的DNA的混合物，或来自多个物种的DNA的混合物，或来自临床样品的DNA，或来自法医样品的DNA，或来自环境样品的DNA，或来自宏基因组DNA样品的DNA(例如含有不止一个物种的生物体的样品)。任何来源DNA的实例包括但不限于任何基因组、任何基因组片段、cDNA、合成DNA或DNA集合(例如，SNP集合、DNA文库)。本文提供的gNA可用于全基因组应用。

[0075] 在一些实施方案中，gNA源自基因组序列(例如，基因组DNA)。在一些实施方案中，gNA源自哺乳动物基因组序列。在一些实施方案中，gNA源自真核基因组序列。在一些实施方案中，gNA源自原核基因组序列。在一些实施方案中，gNA源自病毒基因组序列。在一些实施方案中，gNA源自细菌基因组序列。在一些实施方案中，gNA源自植物基因组序列。在一些实施方案中，gNA源自微生物基因组序列。在一些实施方案中，gNA源自来自寄生虫例如真核寄生虫的基因组序列。

[0076] 在一些实施方案中，gNA源自重复DNA。在一些实施方案中，gNA源自高丰度DNA。在一些实施方案中，gNA源自线粒体DNA。在一些实施方案中，gNA源自核糖体DNA。在一些实施方案中，gNA源自着丝粒DNA。在一些实施方案中，gNA源自包含Alu元件的DNA(Alu DNA)。在一些实施方案中，gNA源自包含长散布核元件的DNA(LINE DNA)。在一些实施方案中，gNA源自包含短散布核元件的DNA(SINE DNA)。在一些实施方案中，高丰度DNA包含核糖体DNA。在一些实施方案中，高丰度DNA包含宿主DNA(例如，宿主基因组DNA或所有宿主DNA)。在一个实例中，gNA可源自宿主DNA(例如，人类、动物、植物)，用于消耗宿主DNA以允许更容易地分析存在的其他DNA(例如，细菌、病毒或其他宏基因组DNA)。在另外的实例中，gNA可源自混合样

品中的一个或多个最高丰度的类型(例如物种),诸如宏基因组样品中的一个或多个最高丰度的细菌物种。一个或多个最高丰度的类型(例如,物种)可包含2、3、4、5、6、7、8、9、10或多于10个最高丰度的类型(例如,物种)。最高丰度的类型可以是最高丰度的界、门(phyla或divisions)、纲、目、科、属、种或其他分类。最高丰度的类型可以是最高丰度的细胞类型,诸如上皮细胞、骨细胞、肌细胞、血细胞、脂肪细胞,或其他类型的细胞。最高丰度的类型可以是非癌细胞。最高丰度的类型可以是癌细胞。最高丰度的类型可以是动物、人类、植物、真菌、细菌或病毒。gNA可源自宿主和样品中的一个或多个最高丰度的非宿主类型(例如,物种),诸如源自人类DNA和一个或多个最高丰度的细菌物种的DNA。在一些实施方案中,高丰度DNA包含来自样品中的更高丰度或最高丰度的细胞的DNA。例如,对于特定样品,可提取高度丰度的细胞,并且可将它们的DNA用来产生gNA;这些gNA可用于产生消耗文库并应用于原始样品以能够测序或检测低丰度靶标,或增强低丰度靶标的测序或检测。

[0077] 在一些实施方案中,gNA源自包含短末端重复序列(STR)的DNA。

[0078] 在一些实施方案中,gNA源自包含基因组的一个区域的基因组片段或整个基因组本身。在一个实施方案中,基因组是DNA基因组。在另一个实施方案中,基因组是RNA基因组。

[0079] 在一些实施方案中,gNA源自真核或原核生物体;源自哺乳动物生物体或非哺乳动物生物体;源自动物或植物;源自细菌或病毒;源自动物寄生虫;源自病原体。

[0080] 在一些实施方案中,gNA源自任何哺乳动物生物体。在一个实施方案中,哺乳动物是人类。在另一个实施方案中,哺乳动物是家畜动物,例如马、绵羊、牛、猪或驴。在另一个实施方案中,哺乳动物生物体是家养宠物,例如猫、狗、沙鼠、小鼠、大鼠。在另一个实施方案中,哺乳动物是一种类型的猴。

[0081] 在一些实施方案中,gNA源自任何鸟或禽类生物体。禽类生物体包括但不限于鸡、火鸡、鸭或鹅。

[0082] 在一些实施方案中,gNA源自植物。在一个实施方案中,植物是水稻、玉米、小麦、玫瑰、葡萄、咖啡、水果、番茄、马铃薯或棉花。

[0083] 在一些实施方案中,gNA源自一个物种的细菌。在一个实施方案中,细菌是导致肺结核的细菌。

[0084] 在一些实施方案中,gNA源自病毒。

[0085] 在一些实施方案中,gNA源自一个物种的真菌。

[0086] 在一些实施方案中,gNA源自一个物种的藻类。

[0087] 在一些实施方案中,gNA源自任何哺乳动物寄生虫。

[0088] 在一些实施方案中,gNA源自任何哺乳动物寄生虫。在一个实施方案中,寄生虫是蠕虫。在另一个实施方案中,寄生虫是导致疟疾的寄生虫。在另一个实施方案中,寄生虫是导致利什曼病的寄生虫。在另一个实施方案中,寄生虫是阿米巴变形虫。

[0089] 在一些实施方案中,gNA源自核酸靶标。预期的靶标包括但不限于病原体;单核苷酸多态性(SNP)、插入、缺失、串联重复或易位;人类SNP或STR;潜在毒素;或动物、真菌和植物。在一些实施方案中,gNA源自病原体,并且是病原体特异性gNA。

[0090] 在一些实施方案中,本发明的指导NA包含第一NA区段,其包含导向序列,其中导向序列为15-250bp;和第二NA区段,其包含核酸指导的核酸酶系统(例如,CRISPR/Cas系统)蛋白结合序列。在一些实施方案中,导向序列大于21bp、大于22bp、大于23bp、大于24bp、大于

25bp、大于26bp、大于27bp、大于28bp、大于29bp、大于30bp、大于40bp、大于50bp、大于60bp、大于70bp、大于80bp、大于90bp、大于100bp、大于110bp、大于120bp、大于130bp、大于140bp或甚至大于150bp。在示例性实施方案中，导向序列大于30bp。在一些实施方案中，本发明的导向序列大小在30-50bp的范围内。在一些实施方案中，本发明的导向序列大小在30-75bp的范围内。在一些实施方案中，本发明的导向序列大小在30-100bp的范围内。例如，导向序列可为至少15bp、20bp、25bp、30bp、35bp、40bp、45bp、50bp、55bp、60bp、65bp、70bp、75bp、80bp、85bp、90bp、95bp、100bp、110bp、120bp、130bp、140bp、150bp、160bp、170bp、180bp、190bp、200bp、210bp、220bp、230bp、240bp或250bp。在具体的实施方案中，导向序列为至少22bp。在具体的实施方案中，导向序列为至少30bp。

[0091] 在一些实施方案中，靶特异性gNA可包含核酸序列，所述核酸序列与位于PAM序列的5'的靶核酸序列的相对链上的区域是互补的，其可被核酸指导的核酸酶系统(例如，CRISPR/Cas系统)蛋白识别。在一些实施方案中，靶核酸序列紧接在PAM序列的5'处。在具体的实施方案中，与靶核酸中的区域互补的gNA的核酸序列为15-250bp。在具体的实施方案中，与靶核酸中的区域互补的gNA的核酸序列为22、23、24、25、30、35、40、45、50、60、70、75、80、90或100bp。

[0092] 在一些具体的实施方案中，导向序列不是20bp。在一些具体的实施方案中，导向序列不是21bp。

[0093] 在一些实施方案中，gNA包含任何嘌呤或嘧啶(和/或其经修饰的形式)。在一些实施方案中，gNA包含腺嘌呤、尿嘧啶、鸟嘌呤和胞嘧啶(和/或其经修饰的形式)。在一些实施方案中，gNA包含腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤和胞嘧啶(和/或其经修饰的形式)。

[0094] 在一些实施方案中，gNA包含标记，附接于标记，或是能够被标记的。在一些实施方案中，gNA包含能够进一步附接于标记的部分。标记包括但不限于酶、酶底物、抗体、抗原结合片段、肽、发色团、发光团、荧光团、色原、半抗原、抗原、放射性同位素、磁性粒子、金属纳米粒子、氧化还原活性标志物基团(能够经受氧化还原反应)、适配体、结合对的一个成员、FRET对的一个成员(供体或受体荧光团)，以及它们的组合。

[0095] 在一些实施方案中，gNA附接于基底。基底可由玻璃、塑料、硅、硅基材料、功能化聚苯乙烯、功能化聚乙二醇、功能化有机聚合物、硝化纤维素、尼龙膜、纸、棉花和适合于合成的材料制成。基底不需要是平的。在一些实施方案中，基底是二维阵列。在一些实施方案中，二维阵列是平的。在一些实施方案中，二维阵列不是平的，例如，该阵列是波浪样阵列。基底包括任何类型的形状，该形状包括球形(例如珠粒)。附接于基底的材料可附接于基底的任何部分(例如，可附接于有孔基底材料的内部)。在一些实施方案中，基底是三维阵列，例如，微球。在一些实施方案中，微球是磁性的。在一些实施方案中，微球是玻璃。在一些实施方案中，微球由聚苯乙烯制成。在一些实施方案中，微球是硅基的。在一些实施方案中，基底是具有内表面的阵列，例如，是吸管、管子、毛细管、圆筒或微流室(microfluidic chamber)阵列。在一些实施方案中，基底包含多个吸管、毛细管、管子、圆筒或室。

[0096] 编码gNA的核酸

[0097] 本文还提供了编码gNA(例如，gRNA或gDNA)的核酸。在一些实施方案中，编码意指gNA从编码gNA(例如，gRNA)的核酸的转录中得到。在一些实施方案中，编码意指核酸是用于gNA的转录的模板。在一些实施方案中，编码意指gNA从编码gNA的核酸的逆转录中得到。在

一些实施方案中，编码意指核酸是gNA的逆转录的模板。在一些实施方案中，gNA是从编码gNA的核酸的扩增中得到的。在一些实施方案中，编码意指核酸是gNA的扩增的模板。

[0098] 在一些实施方案中，编码gNA的核酸包含第一区段，其包含调控区；第二区段，其包含导向序列，其中第二区段可在15bp-250bp的范围内；和第三区段，其包含编码核酸指导的核酸酶系统(例如，CRISPR/Cas系统)蛋白结合序列的核酸。

[0099] 在一些实施方案中，编码gNA的核酸包含DNA。在一些实施方案中，第一区段是双链DNA。在一些实施方案中，第一区段是单链DNA。在一些实施方案中，第二区段是单链DNA。在一些实施方案中，第三区段是单链DNA。在一些实施方案中，第二区段是双链DNA。在一些实施方案中，第三区段是双链DNA。

[0100] 在一些实施方案中，编码gNA的核酸包含RNA。

[0101] 在一些实施方案中，编码gNA的核酸包含DNA和RNA。

[0102] 在一些实施方案中，调控区是能够结合转录因子的区域。在一些实施方案中，调控区包含启动子。在一些实施方案中，启动子选自下组：T7、SP6和T3。

[0103] gNA的集合

[0104] 本文提供了gNA的集合(可互换地称为文库)。

[0105] 如本文所使用的，gNA的集合指含有至少10^2个独特gNA的gNA的混合物。在一些实施方案中，gNA的集合含有至少10^2、至少10^3、至少10^4、至少10^5、至少10^6、至少10^7、至少10^8、至少10^9、至少10^{10}个独特gNA。在一些实施方案中，gNA的集合含有总共至少10^2、至少10^3、至少10^4、至少10^5、至少10^6、至少10^7、至少10^8、至少10^9、至少10^{10}个gNA。

[0106] 在一些实施方案中，gNA的集合包含第一NA区段，其包含导向序列；和第二NA区段，其包含核酸指导的核酸酶系统(例如，CRISPR/Cas系统)蛋白结合序列，其中，集合中的至少10％的gNA的大小不同。在一些实施方案中，第一和第二区段是5'-至3'的顺序。

[0107] 在一些实施方案中，第一区段的大小在整个gNA的集合中从15-250bp、或30-100bp、或22-30bp、或15-50bp、或15-75bp、或15-100bp、或15-125bp、或15-150bp、或15-175bp、或15-200bp、或15-225bp、或15-250bp、或22-50bp、或22-75bp、或22-100bp、或22-125bp、或22-150bp、或22-175bp、或22-200bp、或22-225bp、或22-250bp变化。

[0108] 在一些实施方案中，集合中的至少10％、或至少15％、或至少20％、或至少25％、或至少30％、或至少35％、或至少40％、或至少45％、或至少50％、或至少55％、或至少60％、或至少65％、或至少70％、或至少75％、或至少80％、或至少85％、或至少90％、或至少95％或100％的第一区段大于21bp。

[0109] 在一些实施方案中，集合中的至少10％、或至少15％、或至少20％、或至少25％、或至少30％、或至少35％、或至少40％、或至少45％、或至少50％、或至少55％、或至少60％、或至少65％、或至少70％、或至少75％、或至少80％、或至少85％、或至少90％、或至少95％或100％的第一区段大于25bp。

[0110] 在一些实施方案中，集合中的至少10％、或至少15％、或至少20％、或至少25％、或至少30％、或至少35％、或至少40％、或至少45％、或至少50％、或至少55％、或至少60％、或至少65％、或至少70％、或至少75％、或至少80％、或至少85％、或至少90％、或至少95％或100％的第一区段大于30bp。

[0111] 在一些实施方案中，集合中的至少10％、或至少15％、或至少20％、或至少25％、或

至少30%、或至少35%、或至少40%、或至少45%、或至少50%、或至少55%、或至少60%、或至少65%、或至少70%、或至少75%、或至少80%、或至少85%、或至少90%、或至少95%或100%的第一区段为15-50bp。

[0112] 在一些实施方案中，集合中的至少10%、或至少15%、或至少20%、或至少25%、或至少30%、或至少35%、或至少40%、或至少45%、或至少50%、或至少55%、或至少60%、或至少65%、或至少70%、或至少75%、或至少80%、或至少85%、或至少90%、或至少95%或100%的第一区段为30-100bp。

[0113] 在一些具体的实施方案中，第一区段的大小不是20bp。

[0114] 在一些具体的实施方案中，第一区段的大小不是21bp。

[0115] 在一些实施方案中，在gRNA的集合中gNA和/或gNA的导向序列包含独特的5'端。在一些实施方案中，gNA的集合在集合的所有成员中表现出导向序列的5'端的序列的可变性。在一些实施方案中，gNA的集合合在集合的所有成员中表现出导向序列的5'端的序列的至少5%、或至少10%、或至少15%、或至少20%、或至少25%、或至少30%、或至少35%、或至少40%、或至少45%、或至少50%、或至少55%、或至少60%、或至少65%、或至少70%、或至少75%的可变性。

[0116] 在一些实施方案中，gNA导向序列的3'端可以是任何嘌呤或嘧啶(和/或其经修饰的形式)。在一些实施方案中，gNA导向序列的3'端是腺嘌呤。在一些实施方案中，gNA导向序列的3'端是鸟嘌呤。在一些实施方案中，gNA导向序列的3'端是胞嘧啶。在一些实施方案中，gNA导向序列的3'端是尿嘧啶。在一些实施方案中，gNA导向序列的3'端是胸腺嘧啶。在一些实施方案中，gNA导向序列的3'端不是胞嘧啶。

[0117] 在一些实施方案中，gNA的集合包含导向序列，所述导向序列可与靶DNA碱基配对，其中感兴趣的靶标在整个感兴趣的基因组中间隔以至少每1bp、至少每2bp、至少每3bp、至少每4bp、至少每5bp、至少每6bp、至少每7bp、至少每8bp、至少每9bp、至少每10bp、至少每11bp、至少每12bp、至少每13bp、至少每14bp、至少每15bp、至少每16bp、至少每17bp、至少每18bp、至少每19bp、20bp、至少每25bp、至少每30bp、至少每40bp、至少每50bp、至少每100bp、至少每200bp、至少每300bp、至少每400bp、至少每500bp、至少每600bp、至少每700bp、至少每800bp、至少每900bp、至少每1000bp、至少每2500bp、至少每5000bp、至少每10,000bp、至少每15,000bp、至少每20,000bp、至少每25,000bp、至少每50,000bp、至少每100,000bp、至少每250,000bp、至少每500,000bp、至少每750,000bp或甚至至少每1,000,000bp间隔。

[0118] 在一些实施方案中，gNA的集合包含第一NA区段，其包含导向序列；和第二NA区段，其包含核酸指导的核酸酶系统(例如，CRISPR/Cas系统)蛋白结合序列，其中，集合中的gNA可具有对核酸指导的核酸酶系统(例如，CRISPR/Cas系统)的蛋白成员具有多种特异性的多种第二NA区段。例如，如本文所提供的gNA的集合可包含其第二区段包含对第一核酸指导的核酸酶系统(例如，CRISPR/Cas系统)蛋白具有特异性的核酸指导的核酸酶系统(例如，CRISPR/Cas系统)蛋白结合序列的成员；并且还包含其第二区段包含对第二核酸指导的核酸酶系统(例如，CRISPR/Cas系统)蛋白具有特异性的核酸指导的核酸酶系统(例如，CRISPR/Cas系统)蛋白结合序列的成员，其中第一和第二核酸指导的核酸酶系统(例如，CRISPR/Cas系统)蛋白不同。在一些实施方案中，如本文所提供的gNA的集合包含对至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、

至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19或甚至至少20个核酸指导的核酸酶系统(例如,CRISPR/Cas系统)蛋白表现出特异性的成员。在一个具体的实施方案中,如本文所提供的gNA的集合包含对Cas9蛋白和选自由Cpf1、Cas3、Cas8a-c、Cas10、Cse1、Csy1、Csn2、Cas4、Csm2和Cm5组成的组的另一个蛋白表现出特异性的成员。

[0119] 在一些实施方案中,集合的多个gNA成员附接于标记、包含标记或是能够被标记的。在一些实施方案中,gNA包含能够进一步附接于标记的部分。标记包括但不限于酶、酶底物、抗体、抗原结合片段、肽、发色团、发光团、荧光团、色原、半抗原、抗原、放射性同位素、磁性粒子、金属纳米粒子、氧化还原活性标志物基团(能够经受氧化还原反应)、适配体、结合对的一个成员、FRET对的一个成员(供体或受体荧光团),以及它们的组合。

[0120] 在一些实施方案中,集合的多个gNA成员附接于基底。基底可由玻璃、塑料、硅、硅基材料、功能化聚苯乙烯、功能化聚乙二醇、功能化有机聚合物、硝化纤维素、尼龙膜、纸、棉花和适合于合成的材料制成。基底不需要是平的。在一些实施方案中,基底是二维阵列。在一些实施方案中,二维阵列是平的。在一些实施方案中,二维阵列不是平的,例如,该阵列是波浪样阵列。基底包括任何类型的形状,该形状包括球形(例如珠粒)。附接于基底的材料可附接于基底的任何部分(例如,可附接于有孔基底材料的内部)。在一些实施方案中,基底是三维阵列,例如,微球。在一些实施方案中,微球是磁性的。在一些实施方案中,微球是玻璃。在一些实施方案中,微球由聚苯乙烯制成。在一些实施方案中,微球是硅基的。在一些实施方案中,基底是具有内表面的阵列,例如,是吸管、管子、毛细管、圆筒或微流室阵列。在一些实施方案中,基底包含多个吸管、毛细管、管子、圆筒或室。

[0121] 编码gNA的核酸的集合

[0122] 本文提供了编码gNA(例如,gRNA或gDNA)的核酸的集合(可互换地称为文库)。在一些实施方案中,编码意指gNA从编码gNA的核酸的转录中得到。在一些实施方案中,编码意指核酸是gNA的转录的模板。

[0123] 如本文所使用的,编码gNA的核酸的集合指含有至少10^2个独特的核酸的核酸混合物。在一些实施方案中,编码gNA的核酸的集合包含至少10^2个、至少10^3个、至少10^4个、至少10^5个、至少10^6个、至少10^7个、至少10^8个、至少10^9个、至少10^{10}个独特的编码gNA的核酸。在一些实施方案中,编码gNA的核酸的集合含有总共至少10^2个、至少10^3个、至少10^4个、至少10^5个、至少10^6个、至少10^7个、至少10^8个、至少10^9个、至少10^{10}个编码gNA的核酸。

[0124] 在一些实施方案中,编码gNA的核酸的集合包含第一区段,其包含调控区;第二区段,其包含导向序列;和第三区段,其包含编码核酸指导的核酸酶系统(例如,CRISPR/Cas系统)蛋白结合序列的核酸,其中,集合中的至少10%的核酸的大小不同。

[0125] 在一些实施方案中,第一、第二和第三区段是5'-至3'顺序。

[0126] 在一些实施方案中,编码gNA的核酸包含DNA。在一些实施方案中,第一区段是单链DNA。在一些实施方案中,第一区段是双链DNA。在一些实施方案中,第二区段是单链DNA。在一些实施方案中,第三区段是单链DNA。在一些实施方案中,第二区段是双链DNA。在一些实施方案中,第三区段是双链DNA。

[0127] 在一些实施方案中,编码gNA的核酸包含RNA。

[0128] 在一些实施方案中,编码gNA的核酸包含DNA和RNA。

[0129] 在一些实施方案中，调控区是能够结合转录因子的区域。在一些实施方案中，调控区包含启动子。在一些实施方案中，启动子选自下组：T7、SP6和T3。

[0130] 在一些实施方案中，集合中的第二区段(导向序列)的大小在整个gNA的集合中从15-250bp、或30-100bp、或22-30bp、或15-50bp、或15-75bp、或15-100bp、或15-125bp、或15-150bp、或15-175bp、或15-200bp、或15-225bp、或15-250bp、或22-50bp、或22-75bp、或22-100bp、或22-125bp、或22-150bp、或22-175bp、或22-200bp、或22-225bp、或22-250bp变化。

[0131] 在一些实施方案中，集合中的至少10％、或至少15％、或至少20％、或至少25％、或至少30％、或至少35％、或至少40％、或至少45％、或至少50％、或至少55％、或至少60％、或至少65％、或至少70％、或至少75％、或至少80％、或至少85％、或至少90％、或至少95％或100％的第二区段大于21bp。

[0132] 在一些实施方案中，集合中的至少10％、或至少15％、或至少20％、或至少25％、或至少30％、或至少35％、或至少40％、或至少45％、或至少50％、或至少55％、或至少60％、或至少65％、或至少70％、或至少75％、或至少80％、或至少85％、或至少90％、或至少95％或100％的第二区段大于25bp。

[0133] 在一些实施方案中，集合中的至少10％、或至少15％、或至少20％、或至少25％、或至少30％、或至少35％、或至少40％、或至少45％、或至少50％、或至少55％、或至少60％、或至少65％、或至少70％、或至少75％、或至少80％、或至少85％、或至少90％、或至少95％或100％的第二区段大于30bp。

[0134] 在一些实施方案中，集合中的至少10％、或至少15％、或至少20％、或至少25％、或至少30％、或至少35％、或至少40％、或至少45％、或至少50％、或至少55％、或至少60％、或至少65％、或至少70％、或至少75％、或至少80％、或至少85％、或至少90％、或至少95％或100％的第二区段为15-50bp。

[0135] 在一些实施方案中，集合中的至少10％、或至少15％、或至少20％、或至少25％、或至少30％、或至少35％、或至少40％、或至少45％、或至少50％、或至少55％、或至少60％、或至少65％、或至少70％、或至少75％、或至少80％、或至少85％、或至少90％、或至少95％或100％的第二区段为30-100bp。

[0136] 在一些具体的实施方案中，第二区段的大小不是20bp。

[0137] 在一些具体的实施方案中，第二区段的大小不是21bp。

[0138] 在一些实施方案中，在gNA的集合中gNA和/或gNA的导向序列包含独特的5’端。在一些实施方案中，gNA的集合在集合的所有成员中表现出导向序列的5’端的序列的可变性。在一些实施方案中，gNA的集合在集合的所有成员中表现出导向序列的5’端的序列的至少5％、或至少10％、或至少15％、或至少20％、或至少25％、或至少30％、或至少35％、或至少40％、或至少45％、或至少50％、或至少55％、或至少60％、或至少65％、或至少70％、或至少75％的可变性。

[0139] 在一些实施方案中，核酸的集合包含导向序列，其中，感兴趣的靶标在整个感兴趣的基因组中以至少每1bp、至少每2bp、至少每3bp、至少每4bp、至少每5bp、至少每6bp、至少每7bp、至少每8bp、至少每9bp、至少每10bp、至少每11bp、至少每12bp、至少每13bp、至少每14bp、至少每15bp、至少每16bp、至少每17bp、至少每18bp、至少每19bp、20bp、至少每25bp、至少每30bp、至少每40bp、至少每50bp、至少每100bp、至少每200bp、至少每300bp、至少每

400bp、至少每500bp、至少每600bp、至少每700bp、至少每800bp、至少每900bp、至少每1000bp、至少每2500bp、至少每5000bp、至少每10,000bp、至少每15,000bp、至少每20,000bp、至少每25,000bp、至少每50,000bp、至少每100,000bp、至少每250,000bp、至少每500,000bp、至少每750,000bp或甚至至少每1,000,000bp间隔。

[0140] 在一些实施方案中，编码gNA的核酸的集合包含编码核酸指导的核酸酶系统(例如，CRISPR/Cas系统)蛋白结合序列的第三区段，其中集合中的该区段对于核酸指导的核酸酶系统(例如，CRISPR/Cas系统)的蛋白成员的特异性不同。例如，如本文所提供的编码gNA的核酸的集合可包含其第三区段编码对第一核酸指导的核酸酶系统(例如，CRISPR/Cas系统)蛋白具有特异性的核酸指导的核酸酶系统(例如，CRISPR/Cas系统)蛋白结合序列的成员；并且还包含其第三区段编码对第二核酸指导的核酸酶系统(例如，CRISPR/Cas系统)蛋白具有特异性的核酸指导的核酸酶系统(例如，CRISPR/Cas系统)蛋白结合序列的成员，其中，第一和第二核酸指导的核酸酶系统(例如，CRISPR/Cas系统)蛋白不同。在一些实施方案中，如本文所提供的编码gNA的核酸的集合包含对至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19或甚至至少20个核酸指导的核酸酶系统(例如，CRISPR/Cas系统)蛋白表现出特异性的成员。在一个具体的实施方案中，如本文所提供的编码gNA的核酸的集合包含对Cas9蛋白和选自由Cpf1、Cas3、Cas8a-c、Cas10、Cse1、Csy1、Csn2、Cas4、Csm2和Cm5组成的组的另一个蛋白表现出特异性的成员。

[0141] 感兴趣的序列

[0142] 本文提供了源自任何来源的DNA(例如源自基因组DNA、cDNA、人工DNA、DNA文库)的gNA和gNA的集合，其可用来靶向样品中的感兴趣的序列用于多种应用，其包括但不限于富集、消耗、捕获、分配、标记、调控和编辑。gNA包含针对感兴趣的序列的导向序列。

[0143] 在一些实施方案中，感兴趣的序列是基因组序列(基因组DNA)。在一些实施方案中，感兴趣的序列是哺乳动物基因组序列。在一些实施方式中，感兴趣的序列是真核基因组序列。在一些实施方案中，感兴趣的序列是原核基因组序列。在一些实施方案中，感兴趣的序列是病毒基因组序列。在一些实施方案中，感兴趣的序列是细菌基因组序列。在一些实施方案中，感兴趣的序列是植物基因组序列。在一些实施方案中，感兴趣的序列是微生物基因组序列。在一些实施方案中，感兴趣的序列是来自寄生虫(例如，真核寄生虫)的基因组序列。在一些实施方案中，感兴趣的序列是宿主基因组序列(例如，微生物组(microbiome)、寄生虫或病原体的宿主生物体)。在一些实施方案中，感兴趣的序列是高丰度基因组序列，诸如来自样品中最高丰度物种的一个或多个基因组的序列。

[0144] 在一些实施方案中，感兴趣的序列包含重复DNA。在一些实施方案中，感兴趣的序列包含高丰度DNA。在一些实施方案中，感兴趣的序列包含线粒体DNA。在一些实施方案中，感兴趣的序列包含核糖体DNA。在一些实施方案中，感兴趣的序列包含包含Alu元件的DNA(Alu DNA)。在一些实施方案中，感兴趣的序列包含长散布核元件(LINE DNA)。在一些实施方案中，感兴趣的序列包含短散布核元件(SINE DNA)。在一些实施方案中，高丰度DNA包含核糖体DNA。

[0145] 在一些实施方案中，感兴趣的序列包含单核苷酸多态性(SNP)、短串联重复(STR)、癌症基因、插入、缺失、结构变异、外显子、基因突变或调控区。

[0146] 在一些实施方案中，感兴趣的序列可以是包含基因组的一个区域的基因组片段，或整个基因组本身。在一个实施方案中，基因组是DNA基因组。在另一个实施方案中，基因组是RNA基因组。

[0147] 在一些实施方案中，感兴趣的序列来自真核或原核生物体；来自哺乳动物生物体或非哺乳动物生物体；来自动物或植物；来自细菌或病毒；来自动物寄生虫；来自病原体。

[0148] 在一些实施方案中，感兴趣的序列来自任何哺乳动物生物体。在一个实施方案中，哺乳动物是人类。在另一个实施方案中，哺乳动物是家畜动物，例如马、绵羊、牛、猪或驴。在另一个实施方案中，哺乳动物生物体是家养宠物，例如猫、狗、沙鼠、小鼠、大鼠。在另一个实施方案中，哺乳动物是一种类型的猴。

[0149] 在一些实施方案中，感兴趣的序列来自任何鸟类或禽类生物体。禽类生物体包括但不限于鸡、火鸡、鸭和鹅。

[0150] 在一些实施方案中，感兴趣的序列来自植物。在一个实施方案中，植物是水稻、玉米、小麦、玫瑰、葡萄、咖啡、水果、番茄、马铃薯或棉花。

[0151] 在一些实施方案中，感兴趣的序列来自一个物种的细菌。在一个实施方案中，细菌是导致肺结核的细菌。

[0152] 在一些实施方案中，感兴趣的序列来自病毒。

[0153] 在一些实施方案中，感兴趣的序列来自一个物种的真菌。

[0154] 在一些实施方案中，感兴趣的序列来自一个物种的藻类。

[0155] 在一些实施方案中，感兴趣的序列来自任何哺乳动物寄生虫。

[0156] 在一些实施方案中，感兴趣的序列从任何哺乳动物寄生虫获得。在一个实施方案中，寄生虫是蠕虫。在另一个实施方案中，寄生虫是导致疟疾的寄生虫。在另一个实施方案中，寄生虫是导致利什曼病的寄生虫。在另一个实施方案中，寄生虫是阿米巴变形虫。

[0157] 在一些实施方案中，感兴趣的序列来自病原体。

[0158] 导向序列

[0159] 如本文所使用的导向序列是将gNA导向样品中的感兴趣的序列的序列。例如，导向序列靶向感兴趣的特定序列，例如导向序列靶向感兴趣的基因组序列。

[0160] 本文提供了包含包含导向序列的区段的gNA和gNA的集合。本文还提供了包含编码导向序列的区段的编码gNA的核酸和编码gNA的核酸的集合。

[0161] 在一些实施方案中，导向序列包含DNA。

[0162] 在一些实施方案中，导向序列包含RNA。

[0163] 在一些实施方案中，导向序列包含RNA，并且除了RNA包含代替胸腺嘧啶的尿嘧啶之外，与感兴趣的序列上的位于PAM序列的5’的序列共享至少70％序列同一性、至少75％序列同一性、至少80％序列同一性、至少85％序列同一性、至少90％序列同一性、至少95％序列同一性，或共享100％序列同一性。在一些实施方案中，PAM序列是AGG、CGG或TGG。

[0164] 在一些实施方案中，导向序列包含DNA，并且与感兴趣的序列上的位于PAM序列的5’的序列共享至少70％序列同一性、至少75％序列同一性、至少80％序列同一性、至少85％序列同一性、至少90％序列同一性、至少95％序列同一性，或共享100％序列同一性。

[0165] 在一些实施方案中，导向序列包含RNA，并且与位于PAM序列的5’的核苷酸序列的相对的链互补。在一些实施方案中，导向序列与位于PAM序列的5’的核苷酸序列的相对的链

至少70％互补、至少75％互补、至少80％互补、至少85％互补、至少90％互补、至少95％互补，或100％互补。在一些实施方案中，PAM序列是AGG、CGG或TGG。

[0166] 在一些实施方案中，导向序列包含DNA，并且与位于PAM序列的5’的核苷酸序列的相对的链互补。在一些实施方案中，导向序列与位于PAM序列的5’的核苷酸序列的相对的链至少70％互补、至少75％互补、至少80％互补、至少85％互补、至少90％互补、至少95％互补，或100％互补。在一些实施方案中，PAM序列是AGG、CGG或TGG。

[0167] 在一些实施方案中，编码gRNA的导向序列的DNA与位于PAM序列的5’的核苷酸序列的相对的链共享至少70％序列同一性、至少75％序列同一性、至少80％序列同一性、至少85％序列同一性、至少90％序列同一性、至少95％序列同一性，或共享100％序列同一性。在一些实施方案中，PAM序列是AGG、CGG或TGG。

[0168] 在一些实施方案中，编码gRNA的导向序列的DNA与位于PAM序列的5’的核苷酸序列相对的链互补，并且与感兴趣的序列上的位于PAM序列的5’的序列至少70％互补、至少75％互补、至少80％互补、至少85％互补、至少90％互补、至少95％互补，或100％互补。在一些实施方案中，PAM序列是AGG、CGG或TGG。

[0169] 核酸指导的核酸酶系统蛋白

[0170] 本文提供了包含包含核酸指导的核酸酶系统(例如，CRISPR/Cas系统)蛋白结合序列的区段的gNA和gNA的集合。本文还提供了包含编码核酸指导的核酸酶系统(例如，CRISPR/Cas系统)蛋白结合序列的区段的编码gNA的核酸和编码gNA的核酸的集合。核酸指导的核酸酶系统可以是RNA指导的核酸酶系统。核酸指导的核酸酶系统可以是DNA指导的核酸酶系统。

[0171] 本公开的方法可利用核酸指导的核酸酶。如本文所使用的“核酸指导的核酸酶”是切割DNA、RNA或DNA/RNA杂合体的任何核酸酶，并且其使用一个或多个指导核酸(gNA)来赋予特异性。核酸指导的核酸酶包括CRISPR/Cas系统蛋白以及非CRISPR/Cas系统蛋白。

[0172] 本文所提供的核酸指导的核酸酶可以是DNA指导的DNA核酸酶；DNA指导的RNA核酸酶；RNA指导的DNA核酸酶；或RNA指导的RNA核酸酶。核酸酶可以是内切核酸酶。核酸酶可以是外切核酸酶。在一个实施方案中，核酸指导的核酸酶是核酸指导的DNA内切核酸酶。在一个实施方案中，核酸酶指导的核酸酶是核酸指导的RNA内切核酸酶。

[0173] 核酸指导的核酸酶系统蛋白结合序列是结合核酸指导的核酸酶系统的任何蛋白成员的核酸序列。例如，CRISPR/Cas系统蛋白结合序列是结合CRISPR/Cas系统的任何蛋白成员的核酸序列。

[0174] 在一些实施方案中，核酸指导的核酸酶选自下组：CAS I类I型、CAS I类III型、CAS I类IV型、CAS II类II型和CAS II类V型。在一些实施方案中，CRISPR/Cas系统蛋白包括来自CRISPR I型系统、CRISPR II型系统和CRISPR III型系统的蛋白。在一些实施方案中，核酸指导的核酸酶选自下组：Cas9、Cpf1、Cas3、Cas8a-c、Cas10、Cse1、Csy1、Csn2、Cas4、Csm2、Cm5、Csf1、C2c2和NgAgo。

[0175] 在一些实施方案中，核酸指导的核酸酶系统蛋白(例如，CRISPR/Cas系统蛋白)可以来自任何细菌物种或古细菌物种。

[0176] 在一些实施方案中，核酸指导的核酸酶系统蛋白(例如，CRISPR/Cas系统蛋白)来自或源自来自以下的核酸指导的核酸酶蛋白(例如，CRISPR/Cas系统蛋白)：酿脓链球菌

(Streptococcus pyogenes)、金黄色葡萄球菌(Streptococcus pyogenes)、脑膜炎奈瑟氏球菌(Neisseria meningitidis)、嗜热链球菌(Streptococcus thermophiles)、齿垢密螺旋体(Treponema denticola)、土拉热弗朗西丝菌(Francisella tularensis)、多杀巴斯德菌(Pasteurella multocida)、空肠弯曲杆菌(Campylobacter jejuni)、红嘴鸥弯曲杆菌(Campylobacter lari)、鸡败血支原体(Mycoplasma gallisepticum)、Nitratifractor salsuginis、拉瓦氏小杆菌(Parvibaculum lavamentivorans)、肠道罗斯拜瑞氏菌(Roseburia intestinalis)、灰色奈瑟菌(Neisseria cinerea)、重氮营养葡糖酸醋杆菌(Gluconacetobacter diazotrophicus)、固氮螺菌属(Azospirillum)、球形单丝壳菌(Sphaerochaeta globus)、柱状黄杆菌(Flavobacterium columnare)、Fluviicola taffensis、嗜粪杆菌(Bacteroides coprophilus)、运动支原体(Mycoplasma mobile)、香肠乳杆菌(Lactobacillus farciminis)、巴斯德链球菌(Streptococcus pasteurianus)、约翰逊乳杆菌(Lactobacillus johnsonii)、假中间葡萄球菌(Staphylococcus pseudintermedius)、龈沟产线菌(Filifactor alocis)、嗜肺军团菌(Legionella pneumophila)、Suterella wadsworthensis或白喉棒状杆菌(Corynebacter diphtheria)。

[0177] 在一些实施方案中,核酸指导的核酸酶系统(例如,CRISPR/Cas系统)蛋白的实例可以是天然存在或经工程改造的形式。

[0178] 在一些实施方案中,天然存在的核酸指导的核酸酶系统(例如,CRISPR/Cas系统)蛋白包括Cas9、Cpf1、Cas3、Cas8a-c、Cas10、Cse1、Csy1、Csn2、Cas4、Csm2和Cm5。还可以采用工程改造形式的这样的蛋白。

[0179] 在一些实施方案中,核酸指导的核酸酶系统(例如,CRISPR/Cas系统)蛋白的工程改造的实例包括催化死亡的核酸指导的核酸酶系统蛋白。术语“催化死亡”通常指具有失活的核酸酶(例如HNH和RuvC核酸酶)的核酸指导的核酸酶系统蛋白。这样的蛋白可与任何核酸中的靶位点结合(其中靶位点通过指导NA确定),但是该蛋白不能切割靶核酸(例如,双链DNA),或使靶核酸(例如,双链DNA)有切口。在一些实施方案中,核酸指导的核酸酶系统催化死亡蛋白是催化死亡CRISPR/Cas系统蛋白,诸如催化死亡Cas9(dCas9)。因此,dCas9允许将混合物分成未结合的核酸和dCas9结合的片段。在一个实施方案中,dCas9/gRNA复合物与通过gRNA序列确定的靶标结合。dCas9结合可在其他操作进行的同时防止被Cas9切割。在另一个实施方案中,dCas9可与另外的酶(诸如转座酶)融合,以将该酶的活性靶向至特异性位点。还可以采用天然存在的催化死亡的核酸指导的核酸酶系统蛋白。

[0180] 在一些实施方案中,核酸指导的核酸酶(例如,CRISPR/Cas)系统蛋白的工程改造的实例还包括核酸指导的切口酶(例如,Cas切口酶)。核酸指导的切口酶指核酸指导的核酸酶系统蛋白的经修饰的形式,其含有单一失活的催化结构域。在一个实施方案中,核酸指导的切口酶是Cas切口酶,诸如Cas9切口酶。Cas9切口酶可含有单一失活的催化结构域,例如,RuvC-或HNH-结构域。仅具有一个活性核酸酶结构域,Cas9切口酶仅切割靶DNA的一条链,产生单链断裂或“切口”。根据使用哪种突变体,可以切割指导NA杂交链或非杂交链。与靶向相对链的2个gNA结合的核酸指导的切口酶会在靶双链DNA中产生双链断裂。该“双切口酶”策略可增加切割的特异性,因为它需要在形成双链断裂之前核酸指导的核酸酶/gNA(例如,Cas9/gRNA)复合物应该在一个位点特异性结合。还可采用天然存在的切口酶核酸指导的核酸酶系统蛋白。

[0181] 在一些实施方案中，核酸指导的核酸酶系统蛋白的工程改造的实例还包括核酸指导的核酸酶系统融合蛋白。例如，核酸指导的核酸酶(例如，CRISPR/Cas)系统蛋白可与另外的蛋白例如活化剂、抑制剂、核酸酶、荧光分子、放射性标签或转座酶融合。

[0182] 在一些实施方案中，核酸指导的核酸酶系统蛋白结合序列包含gNA(例如，gRNA)茎环序列。

[0183] 在一些实施方案中，编码gNA(例如，gRNA)茎环序列的双链DNA序列在一条链上包含以下DNA序列(5'>3'，GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTT)(SEQ ID NO:3)，并且在另一条链上包含其反向互补DNA(5'>3'，AAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC)(SEQ ID NO:4)。

[0184] 在一些实施方案中，编码gNA(例如，gRNA)茎环序列的单链DNA序列包含以下DNA序列：(5'>3'，AAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC)(SEQ ID NO:4)，其中，该单链DNA用作转录模板。

[0185] 在一些实施方案中，gNA(例如，gRNA)茎环序列包含以下RNA序列：(5'>3'，GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU)(SEQ ID NO:1)。

[0186] 在一些实施方案中，编码gNA(例如，gRNA)茎环序列的双链DNA序列在一条链上包含以下DNA序列(5'>3'，GTTTTAGAGCTATGCTGGAAACAGCATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTC)(SEQ ID NO:5)，并且在另一条链上包含其反向互补DNA(5'>3'，GAAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATGCTGTTTCCAGCATAGCTCTAAAAC)(SEQ ID NO:6)。

[0187] 在一些实施方案中，编码gNA(例如，gRNA)茎环序列的单链DNA序列包含以下DNA序列：(5'>3'，GAAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATGCTGTTTCCAGCATAGCTCTAAAAC)(SEQ ID NO:6)，其中，该单链DNA用作转录模板。

[0188] 在一些实施方案中，gNA(例如，gRNA)茎环序列包含以下RNA序列：(5'>3'，GUUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUC)(SEQ ID NO:2)。

[0189] 在一些实施方案中，本文提供了编码gNA(例如，gRNA)的核酸，其包含第一区段，其包含调控区；第二区段，其编码导向序列；和第三区段，其包含编码核酸指导的核酸酶(例如，CRISPR/Cas)系统蛋白结合序列的核酸。在一些实施方案中，第三区段包含单一转录组件，其在转录时产生NA(例如，RNA)茎环序列。在一些实施方案中，包含编码gNA(例如，gRNA)茎环序列的单一转录组件的第三区段是双链的，其在一条链上包含以下序列(5'>3'，GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTT)(SEQ ID NO:3)，并且在另一条链上包含其反向互补DNA(5'>3'，AAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC)(SEQ ID NO:4)。在一些实施方案中，包含编码gNA(例如，gRNA)茎环序列的单一转录组件的第三区段是单链的，并且包含以下DNA序列：(5'>3'，AAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC)(SEQ ID NO:4)，其中该单链DNA用作转录模板。在一些实施方案中，在从单一转录组件转录时，所得gNA(例如，gRNA)茎环序列包含以

下RNA序列：(5’>3’,GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU)(SEQ ID NO:1)。在一些实施方案中，包含编码gNA(例如，gRNA)茎环序列的单一转录组件的第三区段是双链的，其在一条链上包含以下DNA序列(5’>3’,GTTTTAGAGCTATGCTGGAAACAGCATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTC)(SEQ ID NO:5)，并且在另一条链上包含其反向互补DNA(5’>3’,GAAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATGCTGTTTCCAGCATAGCTCTAAAAC)(SEQ ID NO:6)。包含编码gNA(例如，gRNA)茎环序列的单一转录组件的第三区段是单链的，并且包含以下DNA序列：GAAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATGCTGTTTCCAGCATAGCTCTAAAAC)(SEQ ID NO:6)，其中该单链DNA用作转录模板。在一些实施方案中，在从单一转录组件转录时，所得gNA茎环序列包含以下RNA序列：(5’>3’,GUUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUC)(SEQ ID NO:2)。在一些实施方案中，第三区段包含两个亚区段，其在转录时编码crRNA和tracrRNA。在一些实施方案中，crRNA不包含N20加上可与tracrRNA杂交的额外序列。在一些实施方案中，crRNA包含可与tracrRNA杂交的额外序列。在一些实施方案中，两个亚区段独立地转录。在一些实施方案中，两个亚区段作为单一单元转录。在一些实施方案中，编码crRNA的DNA包含$N_{靶标}$GTTTTAGAGCTATGCTGTTTTG(SEQ ID NO:7)，其中，$N_{靶标}$代表导向序列。在一些实施方案中，编码tracrRNA的DNA包含序列GGAACCATTCAAAACAGCATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTT(SEQ ID NO:8)。

[0190] 在一些实施方案中，本文提供了编码gNA(例如，gRNA)的核酸，其包含第一区段，其包含调控区；第二区段，其编码导向序列；和第三区段，其包含编码核酸指导的核酸酶(例如，CRISPR/Cas)系统蛋白结合序列的核酸。在一些实施方案中，第三区段包含DNA序列，其在转录时产生能够结合核酸指导的核酸酶(例如，CRISPR/Cas)系统蛋白的gRNA茎环序列。在一个实施方案中，DNA序列可以是双链的。在一些实施方案中，第三区段双链DNA在一条链上包含以下DNA序列(5’>3’,GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTT)(SEQ ID NO:3)，并且在另一条链上包含其反向互补DNA(5’>3’,AAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC)(SEQ ID NO:4)。在一些实施方案中，第三区段双链DNA在一条链上包含以下DNA序列(5’>3’,GTTTTAGAGCTATGCTGGAAACAGCATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTC)(SEQ ID NO:5)，并且在另一条链上包含其反向互补DNA(5’>3’,GAAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATGCTGTTTCCAGCATAGCTCTAAAAC)(SEQ ID NO:6)。在一些实施方案中，DNA序列可以是单链的。在一些实施方案中，第三区段单链DNA包含以下DNA序列(5’>3’,AAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC)(SEQ ID NO:4)，其中该单链DNA用作转录模板。在一些实施方案中，第三区段单链DNA包含以下DNA序列(5’>3’,GAAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATGCTGTTTCCAGCATAGCTCTAAAAC)(SEQ ID NO:6)，其中该单链DNA用作转录模板。在一些实施方案中，第三区段包含DNA序列，其在转录时产生能够与第二RNA序列形成杂交物(hybrid)的第一RNA序列，并且其杂合体能够CRISPR/Cas系统蛋白结合。在一些实施方案

中,第三区段是双链DNA,其在一条链上包含DNA序列:(5'>3',GTTTTAGAGCTATGCTGTTTTG)(SEQ ID NO:9),在另一条链上包含其反向互补DNA序列:(5'>3',CAAAACAGCATAGCTCTAAAAC)(SEQ ID NO:10)。在一些实施方案中,第三区段是单链DNA,其包含(5'>3',CAAAACAGCATAGCTCTAAAAC)(SEQ ID NO:10)的DNA序列。在一些实施方案中,第二区段和第三区段一起编码crRNA序列。在一些实施方案中,能够与由编码gRNA的核酸的第三区段编码的第一RNA序列形成杂交物的第二RNA序列是tracrRNA。在一些实施方案中,tracrRNA包含序列(5'>3',GGAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU)(SEQ ID NO:11)。在一些实施方案中,tracrRNA由包含(5'>3',GGAACCATTCAAAACAGCATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTT)(SEQ ID NO:8)序列的双链DNA编码,并且在其5'端与调控序列任选地融合。在一些实施方案中,调控序列可通过转录因子结合。在一些实施方案中,调控序列是启动子。在一些实施方案中,调控序列是T7启动子,其包含(5'>3',GCCTCGAGCTAATACGACTCACTATAGAG)(SEQ ID NO:12)序列。

[0191] 在一些实施方案中,本文提供了编码gNA的核酸,其包含第一区段,其包含调控区;第二区段,其编码导向序列;和第三区段,其包含编码核酸指导的核酸酶(例如,CRISPR/Cas)系统蛋白结合序列的核酸。在一些实施方案中,第三区段编码RNA序列,所述RNA序列在转录后切割时,产生第一RNA区段和第二RNA区段。在一些实施方案中,第一RNA区段包含crRNA,并且第二RNA区段包含tracrRNA,其可形成杂交物并一起提供核酸指导的核酸酶(例如,CRISPR/Cas)系统蛋白结合。在一些实施方案中,第三区段在第一RNA区段的转录单元和第二RNA区段之间进一步包含间隔区,该间隔区包含酶切割位点。

[0192] 在一些实施方案中,本文提供了gNA(例如,gRNA),其包含第一NA区段,其包含导向序列,和第二NA区段,其包含核酸指导的核酸酶(例如,CRISPR/Cas)系统蛋白结合序列。在一些实施方案中,第一区段的大小大于30bp。在一些实施方案中,第二区段包含单一区段,其包含gRNA茎环序列。在一些实施方案中,gRNA茎环序列包含以下RNA序列:(5'>3',GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU)(SEQ ID NO:1)。在一些实施方案中,gRNA茎环序列包含以下RNA序列:(5'>3',GUUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUC)(SEQ ID NO:2)。在一些实施方案中,第二区段包含两个亚区段:与第二RNA亚区段(tracrRNA)形成杂交物的第一RNA亚区段(crRNA),二者一起起作用以指导核酸指导的核酸酶(例如,CRISPR/Cas)系统蛋白结合。在一些实施方案中,第二亚区段的序列包含GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG。在一些实施方案中,第一RNA区段和第二RNA区段一起形成crRNA序列。在一些实施方案中,会与第二RNA区段形成杂交物的其他RNA是tracrRNA。在一些实施方案中,tracrRNA包含5'>3'GGAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU(SEQ ID NO:11)序列。

[0193] CRISPR/Cas系统核酸指导的核酸酶

[0194] 在一些实施方案中,CRISPR/Cas系统蛋白用于本文提供的实施方案中。在一些实施方案中,CRISPR/Cas系统蛋白包括来自CRISPR I型系统、CRISPR II型系统和CRISPR III型系统的蛋白。

[0195] 在一些实施方案中,CRISPR/Cas系统蛋白可来自任何细菌或古细菌物种。

[0196] 在一些实施方案中,CRISPR/Cas系统蛋白是分离、重组产生的或合成的。

[0197] 在一些实施方案中,CRISPR/Cas系统蛋白来自或源自来自以下的CRISPR/Cas系统蛋白:酿脓链球菌、金黄色葡萄球菌、脑膜炎奈瑟氏球菌、嗜热链球菌、齿垢密螺旋体、土拉热弗朗西丝菌、多杀巴斯德菌、空肠弯曲杆菌、红嘴鸥弯曲杆菌、鸡败血支原体、Nitratifractor salsuginis、拉瓦氏小杆菌、肠道罗斯拜瑞氏菌、灰色奈瑟菌、重氮营养葡糖酸醋杆菌、固氮螺菌属、球形单丝壳菌、柱状黄杆菌、Fluviicola taffensis、嗜粪杆菌、运动支原体、香肠乳杆菌、巴斯德链球菌、约翰逊乳杆菌、假中间葡萄球菌、龈沟产线菌、嗜肺军团菌、Suterella wadsworthensis或白喉棒状杆菌。

[0198] 在一些实施方案中,CRISPR/Cas系统蛋白的实例可以是天然存在的或工程改造的形式。

[0199] 在一些实施方案中,天然存在的CRISPR/Cas系统蛋白可属于CAS I类I型、III型或IV型,或者CAS II类II型或V型,并且可包括Cas9、Cas3、Cas8a-c、Cas10、Cse1、Csy1、Csn2、Cas4、Csm2、Cmr5、Csf1、C2c2和Cpf1。

[0200] 在示例性实施方案中,CRISPR/Cas系统蛋白包含Cas9。

[0201] “CRISPR/Cas系统蛋白-gNA复合物”指包含CRISPR/Cas系统蛋白和指导NA(例如gRNA或gDNA)的复合物。当gNA是gRNA时,gRNA可由两个分子(即一个RNA("crRNA")(其与靶标杂交并提供序列特异性)和一个RNA("tracrRNA",其能够与crRNA杂交))组成。或者,指导RNA可以是含有crRNA和tracrRNA序列的单一分子(即gRNA)。

[0202] CRISPR/Cas系统蛋白可以与野生型CRISPR/Cas系统蛋白至少60%相同(例如,至少70%、至少80%或至少90%相同,至少95%相同、至少98%相同或至少99%相同)。CRISPR/Cas系统蛋白可具有野生型CRISPR/Cas系统蛋白的所有功能,或仅一个或一些功能,其包括结合活性、核酸酶活性和核酸酶活性。

[0203] 术语“与CRISPR/Cas系统蛋白有关的指导NA”指指导NA。与CRISPR/Cas系统蛋白有关的指导NA可作为单独的NA存在,或作为CRISPR/Cas系统蛋白-gNA复合物的一部分存在。

[0204] 在一些实施方案中,CRISPR/Cas系统蛋白的核酸指导的核酸酶是Cas9或包含Cas9。本发明的Cas9可以是分离的、重组产生的或合成的。

[0205] 可用于本文的实施方案中的Cas9蛋白的实例可在F.A.Ran,L.Cong,W.X.Yan,D.A.Scott,J.S.Gootenberg,A.J.Kriz,B.Zetsche,O.Shalem,X.Wu,K.S.Makarova,E.V.Koonin,P.A.Sharp,和F.Zhang;“In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9,”Nature 520,186-191(09April 2015)doi:10.1038/nature14299(其通过引用并入本文)中找到。

[0206] 在一些实施方案中,Cas9是源自酿脓链球菌、金黄色葡萄球菌、脑膜炎奈瑟氏球菌、嗜热链球菌、齿垢密螺旋体、土拉热弗朗西丝菌、多杀巴斯德菌、空肠弯曲杆菌、红嘴鸥弯曲杆菌、鸡败血支原体、Nitratifractor salsuginis、拉瓦氏小杆菌、肠道罗斯拜瑞氏菌、灰色奈瑟菌、重氮营养葡糖酸醋杆菌、固氮螺菌属、球形单丝壳菌、柱状黄杆菌、Fluviicola taffensis、嗜粪杆菌、运动支原体、香肠乳杆菌、巴斯德链球菌、约翰逊乳杆菌、假中间葡萄球菌、龈沟产线菌、嗜肺军团菌、Suterella wadsworthensis或白喉棒状杆菌的II型CRISPR系统。

[0207] 在一些实施方案中,Cas9是源自酿脓链球菌的II型CRISPR系统,并且PAM序列是位

于紧接靶特异性指导序列的3'端的NGG。来自示例性细菌物种的II型CRISPR系统的PAM序列还可包括:酿脓链球菌(NGG)、金黄色葡萄球菌(NNGRRT)、脑膜炎奈瑟氏球菌(NNNNGA TT)、嗜热链球菌(NNAGAA)、齿垢密螺旋体(NAAAAC),其在不背离本发明的情况下都是可用的。

[0208] 在一个示例性实施方案中,Cas9序列可例如从以下方法获得:来自pX330质粒(从Addgene获得),通过PCR重新扩增,然后克隆到pET30(来自EMD biosciences)中以在细菌中表达,并且纯化重组6His标记的蛋白。

[0209] "Cas9-gNA复合物"指包含Cas9蛋白和指导NA的复合物。Cas9蛋白可以与野生型Cas9蛋白例如与酿脓链球菌Cas9蛋白至少60%相同(例如,至少70%、至少80%或90%相同,至少95%相同或至少98%相同或至少99%相同)。Cas9蛋白可具有野生型Cas9蛋白的所有功能,或仅具有一个或一些功能,包括结合活性、核酸酶活性和核酸酶活性。

[0210] 术语"与Cas9有关的指导NA"指如上所述的指导NA。与Cas9有关的指导NA可单独存在,或作为Cas9-gNA复合物的一部分存在。

[0211] 非CRISPR/Cas系统核酸指导的核酸酶

[0212] 在一些实施方案中,非CRISPR/Cas系统蛋白用于本文所提供的实施方案中。

[0213] 在一些实施方案中,非CRISPR/Cas系统蛋白可来自任何细菌或古细菌物种。

[0214] 在一些实施方案中,非CRISPR/Cas系统蛋白是分离的、重组产生的或合成的。

[0215] 在一些实施方案中,非CRISPR/Cas系统蛋白来自或源自超嗜热菌(Aquifex aeolicus)、嗜热栖热菌(Thermus thermophilus)、酿脓链球菌、金黄色葡萄球菌、脑膜炎奈瑟氏球菌、嗜热链球菌、齿垢密螺旋体、土拉热弗朗西丝菌、多杀巴斯德菌、空肠弯曲杆菌、红嘴鸥弯曲杆菌、鸡败血支原体、Nitratifractor salsuginis、拉瓦氏小杆菌、肠道罗斯拜瑞氏菌、灰色奈瑟菌、重氮营养葡糖酸醋杆菌、固氮螺菌属、球形单丝壳菌、柱状黄杆菌、Fluviicola taffensis、嗜粪杆菌、运动支原体、香肠乳杆菌、巴斯德链球菌、约翰逊乳杆菌、假中间葡萄球菌、龈沟产线菌、嗜肺军团菌、Suterella wadsworthensis、格氏盐碱杆菌(Natronobacterium gregoryi)或白喉棒状杆菌。

[0216] 在一些实施方案中,非CRISPR/Cas系统蛋白可以是天然存在的或工程改造的形式。

[0217] 在一些实施方案中,天然存在的非CRISPR/Cas系统蛋白是NgAgo(来自格氏盐碱杆菌的Argonaute)。

[0218] "非CRISPR/Cas系统蛋白-gNA复合物"指包含非CRISPR/Cas系统蛋白和指导NA(例如gRNA或gDNA)的复合物。当gNA是gRNA时,gRNA可以由两个分子(即一个RNA("crRNA")(其与靶标杂交并提供序列特异性)和一个RNA("tracrRNA",其能够与crRNA杂交))组成。或者,指导RNA可以是含有crRNA和tracrRNA序列的单一分子(即gRNA)。

[0219] 非CRISPR/Cas系统蛋白可以与野生型非CRISPR/Cas系统蛋白至少60%相同(例如,至少70%、至少80%或90%相同,至少95%相同或至少98%相同或至少99%相同)。非CRISPR/Cas系统蛋白可具有野生型非CRISPR/Cas系统蛋白的所有功能,或仅一个或一些功能,包括结合活性、核酸酶活性和核酸酶活性。

[0220] 术语"与非CRISPR/Cas系统蛋白有关的指导NA"指指导NA。与非CRISPR/Cas系统蛋白有关的指导NA可作为单独的NA存在,或作为非CRISPR/Cas系统蛋白-gNA复合物的一部分存在。

[0221] 催化死亡的核酸指导的核酸酶

[0222] 在一些实施方案中，核酸指导的核酸酶的工程改造的实例包括催化死亡的核酸指导的核酸酶(CRISPR/Cas系统核酸指导的核酸酶或非CRISPR/Cas系统核酸指导的核酸酶)。术语“催化死亡的”通常指具有失活的核酸酶(例如失活的HNH和RuvC核酸酶)的核酸指导的核酸酶。这样的蛋白质可与任何核酸中的靶位点结合(其中，靶位点通过指导NA确定)，但是该蛋白质不能切割该核酸或使该核酸有切口。

[0223] 因此，催化死亡的核酸指导的核酸酶允许使混合物分成未结合的核酸和催化死亡的核酸指导的核酸酶结合的片段。在一个示例性实施方案中，dCas9/gRNA复合物与通过gRNA序列确定的靶标结合。dCas9结合可在其他操作进行的同时防止被Cas9切割。

[0224] 在另一个实施方案中，催化死亡的核酸指导的核酸酶可与另外的酶诸如转座酶融合，以将该酶的活性靶向到特异性位点。

[0225] 在一些实施方案中，催化死亡的核酸指导的核酸酶是dCas9、dCpf1、dCas3、dCas8a-c、dCas10、dCse1、dCsy1、dCsn2、dCas4、dCsm2、dCm5、dCsf1、dC2C2或dNgAgo。

[0226] 在一个示例性实施方案中，催化死亡的核酸指导的核酸酶蛋白是dCas9。

[0227] 核酸指导的核酸酶切口酶

[0228] 在一些实施方案中，核酸指导的核酸酶的工程改造的实例包括核酸指导的核酸酶切口酶(可互换地称为切口酶核酸指导的核酸酶)。

[0229] 在一些实施方案中，核酸指导的核酸酶的工程改造的实例包括CRISPR/Cas系统切口酶或非CRISPR/Cas系统切口酶，含有单一失活的催化结构域。

[0230] 在一些实施方案中，核酸指导的核酸酶切口酶是Cas9切口酶、Cpf1切口酶、Cas3切口酶、Cas8a-c切口酶、Cas10切口酶、Cse1切口酶、Csy1切口酶、Csn2切口酶、Cas4切口酶、Csm2切口酶、Cm5切口酶、Csf1切口酶、C2C2切口酶或NgAgo切口酶。

[0231] 在一些实施方案中，核酸指导的核酸酶切口酶是Cas9切口酶。

[0232] 在一些实施方案中，核酸指导的核酸酶切口酶可用来与靶序列结合。在仅具有一个活性核酸酶结构域，核酸指导的核酸酶切口酶仅切割靶DNA的一条链，产生单链断裂或“切口”。根据使用哪种突变体，可切割指导NA杂交链或非杂交链。与靶向相对链的2个gNA结合的核酸指导的核酸酶切口酶可在该核酸中产生双链断裂。该“双切口酶”策略增加了切割的特异性，因为它需要在形成双链断裂之前核酸指导的核酸酶/gNA复合物应该在一个位点特异性结合。

[0233] 在示例性实施方案中，Cas9切口酶可用来结合靶序列。术语“Cas9切口酶”指Cas9蛋白的经修饰的形式，其含有单一失活的催化结构域，即RuvC-结构域或HNH-结构域。仅具有一个活性核酸酶结构域，Cas9切口酶仅切割靶DNA的一条链，产生单链断裂或“切口”。根据使用哪种突变体，可切割指导RNA杂交链或非杂交链。与靶向相对链的2个gRNA结合的Cas9切口酶会在DNA中产生双链断裂。该“双切口酶”策略可增加切割的特异性，因为它需要在形成双链断裂之前核酸指导的核酸酶/gNA复合物应该在一个位点特异性结合。

[0234] DNA的捕获可使用核酸指导的核酸酶切口酶进行。在一个示例性实施方案中，核酸指导的核酸酶切口酶切割双链核酸的单链，其中该双链区域包含甲基化的核苷酸。

[0235] 可解离的和热稳定的核酸指导的核酸酶

[0236] 在一些实施方案中，热稳定的核酸指导的核酸酶用于本文所提供的方法中(热稳

定的CRISPR/Cas系统核酸指导的核酸酶或热稳定的非CRISPR/Cas系统核酸指导的核酸酶)。在这样的实施方案中,升高反应温度,诱导蛋白质的解离;降低反应温度,允许生成另外的切割的靶序列。在一些实施方案中,当至少75℃保持至少1分钟时,热稳定的核酸指导的核酸酶保持至少50%活性、至少55%活性、至少60%活性、至少65%活性、至少70%活性、至少75%活性、至少80%活性、至少85%活性、至少90%活性、至少95%活性、至少96%活性、至少97%活性、至少98%活性、至少99%活性或100%活性。在一些实施方案中,当至少在75℃、至少在80℃、至少在85℃、至少在90℃、至少在91℃、至少在92℃、至少在93℃、至少在94℃、至少在95℃,96℃、至少在97℃、至少在98℃、至少在99℃或至少在100℃保持至少1分钟时,热稳定的核酸指导的核酸酶保持至少50%活性。在一些实施方案中,当至少在75℃保持至少1分钟、2分钟、3分钟、4分钟或5分钟时,热稳定的核酸指导的核酸酶保持至少50%活性。在一些实施方案中,当升高温度,降低至25℃-50℃时,热稳定的核酸指导的核酸酶保持至少50%活性。在一些实施方案中,温度降低至25℃、至30℃、至35℃、至40℃、至45℃或至50℃时。在一个示例性实施方案中,在95℃一分钟后,热稳定的酶保留至少90%活性。

[0237] 在一些实施方案中,热稳定的核酸指导的核酸酶是热稳定的Cas9、热稳定的Cpf1、热稳定的Cas3、热稳定的Cas8a-c、热稳定的Cas10、热稳定的Cse1、热稳定的Csy1、热稳定的Csn2、热稳定的Cas4、热稳定的Csm2、热稳定的Cm5、热稳定的Csf1、热稳定的C2C2或热稳定的NgAgo。

[0238] 在一些实施方案中,热稳定的CRISPR/Cas系统蛋白是热稳定的Cas9。

[0239] 热稳定的核酸指导的核酸酶可以是分离的,例如在嗜热菌嗜热链球菌和强烈炽热球菌(Pyrococcus furiosus)的基因组中通过序列同源性鉴定的。然后可以将核酸指导的核酸酶基因克隆到表达载体中。在一个示例性实施方案中,热稳定的Cas9蛋白是分离的。

[0240] 在另一个实施方案中,热稳定的核酸指导的核酸酶可通过非热稳定的核酸指导的核酸酶的体外进化获得。可诱变核酸指导的核酸酶的序列以改善其热稳定性。

[0241] 制备gNA的集合的方法

[0242] 本文提供了能够从任何来源的核酸(例如DNA)生成大量不同gRNA、gNA的集合的方法。本文提供的方法可采用酶促方法,其包括但不限于消化、连接、延伸、突出端充填、转录、逆转录、扩增。

[0243] 一般地,该方法可包括提供核酸(例如DNA);采用第一酶(或第一酶的组合),其以留下来自PAM序列的残留核酸序列的方式切割核酸中的PAM序列的一部分;连接衔接子,所述衔接子将限制酶typeIIS位点(一种外切但接近其识别基序的酶)放置在位于一定距离以消除PAM序列;采用第二typeIIS酶(或第二酶的组合)消除PAM序列和所述衔接子;和融合可由核酸指导的核酸酶(例如,CRISPR/Cas)系统的蛋白成员识别的序列,例如gRNA茎环序列。在一些实施方案中,第一个酶促反应以留下来自PAM序列的残留核苷酸序列的方式切割PAM序列的一部分,并且紧接在PAM序列的5'处的核苷酸序列可以是任何嘌呤或嘧啶,不仅仅是位于PAM序列的5'具有胞嘧啶的核苷酸序列,例如,不仅仅是C/NGG或C/TAG等。

[0244] 表1显示示例性策略/方案以使用不同限制酶将任何来源的核酸(例如,DNA)转化成gNA(例如gRNA)的集合。

[0245] 表1.用于制备指导核酸的集合的示例性策略。

[0246]

CRISPR/Cas系统物种	PAM序列	第一酶/组分	策略	具有typeIIS酶位点的3'衔接子序列 (仅提供一条链序列5'>3')
酿脓链球菌(SP); SpCas9	NGG	CviPII	紧接CCD序列的5'使其有切口，用T7内切核酸酶I使另一条链有切口，用T4 DNA聚合酶平端化；与衔接子连接；用MlyI切割以去除PAM和衔接子；在3'端连接gRNA茎-环序列	ggGACTCggatccctatagtc (SEQ ID NO: 4421)
金黄色葡萄球菌(SA); SaCas9	NNGRRT或NNGRR(N)	AlwI	切割，用T4 DNA聚合酶平端化;与衔接子SA连接；用EcoP15I切割以去除PAM和衔接子；使末端平端化；在3'端连接gRNA茎-环序列	ttttagcggccgcctgctgCTCtacaaagacgatgacgacaagcgt (SEQ ID NO: 4422)
脑膜炎奈瑟氏球菌(NM)	NNNNGATT	TfiI	切割，用T4 DNA聚合酶平端化;与衔接子NM连接;用EcoRI切割以消除不想要的DNA和用EcoP15I切割以去除PAM 和衔接子；使末端平端化；在3'端连接gRNA茎-环序列	TCgcggccgctttttattctgctgCTCtacaaagacgatgacgacaagcgt (SEQ ID NO: 4428)
嗜热链球菌(ST)	NNAGAAW	BsmI	切割，用T4 DNA聚合酶平端化;与衔接子ST连接；用EcoP15I切割以去除PAM和衔接子；使末端平端化；在3'端连接gRNA茎-环序列	ttgcggccgcttttattctgctgCTCtacaaagacgatgacgacaagcgt (SEQ ID NO: 4429)
齿垢密螺旋体(TD)	NAAAAC	Cly7489II	切割，用T4 DNA聚合酶平端化;与衔接子TD连接；用EcoP15I切割以去除PAM和衔接子	tttagcggccgcctgctgCTCtacaaagacgatgacgacaagcgt (SEQ ID NO: 4430)

[0247] 表2显示另外的示例性策略/方案以使用不同限制酶将任何来源的核酸(例如，DNA)转化成gNA(例如，gRNA)的集合。

[0248] 表2.另外的用于制备指导核酸的集合的示例性策略。

[0249]

CRISPR/Cas系统物种	PAM序列	第一酶/组分	示例性策略	衔接子寡核苷酸序列 (具有肌苷突出端，全部以5'>3'的方向)
酿脓链球菌(SP); SpCas9	NGG	CviPII	紧接CCD序列的5'使其有切口，用T7内切核酸酶I使另一条链有切口；与衔接子连接;用MlyI切割以去除PAM和3'衔接子；在3'端连接gRNA茎-环序列	衔接子寡核苷酸1: ggggGACTCggatccctatagtgatacaaagacgatgacgacaagcg (SEQ ID NO: 4404) 衔接子寡核苷酸2: gcctcgagc*t*a*atacgactcactatagggatccaagtccc (*表示硫代磷酸酯骨架连接) (SEQ ID NO: 4405)
金黄色葡萄球菌(SA); SaCas9	NNGRRT 或NNGRR(N)	AlwI	切割;与衔接子SA连接;用EcoP15I切割以去除PAM和3'衔接子；使末端平端化；在3'端连接gRNA茎-环序列	衔接子寡核苷酸1: Ittttagcggccgcctgctg CTCtacaaagacgatgacgacaagcgt (SEQ ID NO: 4422) 衔接子寡核苷酸2: gagatcagcttctgcattgatgcGAGcagcaggcggccgctaaaa (SEQ ID NO: 4423)
脑膜炎奈瑟氏球菌(NM)	NNNNGATT	TfiI	切割;与衔接子NM连接；用EcoP15I切割以去除PAM和3'衔接子；使末端平端化；在3'端连接gRNA茎-环序列	衔接子寡核苷酸1: attTCgcggccgcttttattctgctgCTCtacaaagacgatgacgacaagcgt (SEQ ID NO: 4424) 衔接子寡核苷酸2: gagatcagcttctgcattgatgcGAGcagcagaataaaagcggccgcGA (SEQ ID NO: 4425)
嗜热链球菌	NNAGAAW	BsmI	切割;与衔接子ST连接；用	衔接子寡核苷酸1:

[0250]

CRISPR/Cas系统物种	PAM序列	第一酶/组分	示例性策略	衔接子寡核苷酸序列（具有肌苷突出端，全部以5'>3'的方向）
(ST)			EcoP15I切割以去除PAM和3'衔接子；使末端平端化；在3'端连接gRNA茎-环序列	gcggccgcttttattctgctgCTCtacaaa gacgatgacgacaagcgt (SEQ ID NO: 4426) 衔接子寡核苷酸2: gagatcagcttctgcattgatgcGAGcag cagaataaaagcggccgcIG (SEQ ID NO: 4427)

[0251] 在图1、图2、图3、图4、图5、图6和图7中提供了本文所述的组合物和方法的示例性应用。这些图描绘了本发明的非限制性示例性实施方案，包括从输入核酸(例如，DNA)诸如基因组DNA(例如，人类基因组DNA)构建gNA文库(例如，gRNA文库)的方法。

[0252] 在图1中，起始材料可以是片段化的基因组DNA(例如，人类)或其他来源的DNA。这些片段在构建文库之前被平端化101。T7启动子衔接子与平端化的DNA片段连接102，然后PCR扩增。然后使用Nt.CviPII以紧接在CCD序列的5'处在PCR产物的一条链生成切口103。T7内切核酸酶I在切口的5'的1、2或3bp处的相对链上切割104。用T4DNA聚合酶平端化所得DNA片段，在DNA片段的末端留下HGG序列105。清洁所得DNA，并在珠粒上回收。将携带MlyI识别位点的衔接子在紧接HGG序列的3'处连接平端化的DNA片段106。MlyI在紧接HGG序列的5'处生成平端切割，去除HGG和衔接子序列107。清洁所得DNA片段，并且再次从珠粒上回收。然后将gRNA茎环序列与被MlyI切割的平端连接，形成覆盖人类基因组的gRNA文库108。然后PCR扩增该DNA的文库，并在珠粒上清洁，为体外转录做准备。

[0253] 在图2中，起始材料可以是整个基因组DNA(例如，人类)或其他来源的DNA 201。Nt.CviPII和T7内切核酸酶I用来在人类基因组DNA的每条链上生成切口，得到较小DNA片段202。在珠粒上尺寸选择200-600bp的DNA片段，然后与在5'上携带GG突出端的Y形衔接子连接。Y形衔接子的一条链含有MlyI识别位点，其中，另一条链含有突变的MlyI位点和T7启动子序列203。由于这些特征，在PCR扩增后，T7启动子序列在HGG序列的远端，并且MlyI在HGG的近端204。用MlyI进行消化，紧接在HGG序列的5'处产生切割205。MlyI紧接在HGG序列的5'处产生平端切割，去除HGG连同衔接子序列206。然后将gRNA茎环序列与被MlyI切割的平端连接，形成覆盖人类基因组的gRNA文库。然后PCR扩增该DNA的文库，并在珠粒上清洁，为体外转录做准备。

[0254] 在图3中，可例如用切口酶使来源DNA(例如，基因组DNA)其有切口301。在一些情况下，切口酶可具有长度为3个或更少碱基的识别位点。在一些情况下，使用CviPII，其可在CCD的序列处识别并使其有切口(其中，D表示除C之外的碱基)。切口可以是邻近的，在含有将被用来产生指导RNA N20序列的序列(由粗线表示)的区域附近。当切口邻近时，可发生双链断裂并产生5'或3'突出端302。这些突出端可例如用聚合酶(例如，T4聚合酶)修复。在一些情况下，诸如对于5'链，修复可包括合成互补链。在一些情况下，诸如对于3'链，修复可包

含去除突出端。修复可导致平端，所述平端包含N20指导序列和与切口识别序列互补的序列(例如，HGG，其中H表示除G之外的碱基)。

[0255] 在图4中，例如从图3的结尾继续，衔接子的不同组合可与DNA连接以允许所希望的切割。可以连接具有核酸酶的识别位点的衔接子(例如，MlyI)，所述核酸酶从该位点切割3个碱基对401，并且在该位点的消化可用来去除剩余序列，诸如HGG序列402。具有从该位点切割20个碱基对的核酸酶(例如，MmeI)的识别位点的衔接子403。这些衔接子还可包括核酸酶的第二识别位点(例如，BsaXI)，所述核酸酶从该位点切割适当数量的核苷酸，以后来去除第一个识别位点。第一酶可用来切下20个核苷酸，由此保留N20序列404。然后，可将启动子衔接子(例如T7)连接在N20序列旁边405。然后，可使用对应于第二个识别位点的核酸酶(例如，BsaXI)去除切割20个核苷酸的位点(例如，MmeI)的衔接子406。最终，指导RNA茎环序列衔接子可与N20序列连接407以准备指导RNA的产生。

[0256] 或者，图5中所示的方案可跟随诸如图3所示的方案的结尾。可将具有核酸酶(例如，EcoP15I)的识别位点的衔接子与DNA连接501，所述核酸酶从该位点切割25个核苷酸。这些衔接子还可包括核酸酶(例如BaeI)的第二识别位点，所述核酸酶从该位点切割适当数量的核苷酸，以后来去除第一识别位点和任何其它剩余序列诸如HGG。然后可使用对应于第一识别位点的酶(例如，EcoP15I)在N20序列之后切割502。然后，可以将启动子衔接子(例如，T7)连接到N20序列503之后。然后可使用对应于第二个识别位点的酶(例如，BaeI)去除识别位点和任何剩余序列(例如HGG)504。最后，可以将指导RNA茎环序列衔接子与N20序列连接(例如，通过单链连接)505。

[0257] 作为诸如图3所示的方案的替代方案，图6所示的方案可用于准备诸如图4或图5所示的方案。可通过切口酶(例如，CviPII)引入切口601。在一些情况下，切口识别位点的长度为三个或更少碱基。在某些情况下，使用CviPII，其可以在CCD的序列处识别并使其有切口。然后可使用聚合酶(例如，Bst大片段DNA聚合酶)在置换旧链的同时从缺口开始合成新的DNA链602。由于DNA合成，可将缺口密封并使其可以再次有切口603。随后的使其有切口和合成的循环可以用来产生大量的靶序列604。靶序列的这些单链拷贝可例如通过随机引发和延伸制成双链。然后可以通过本文公开的方法(诸如图4或图5所示的那些)进一步处理这些包含N20序列的双链核酸。

[0258] 作为诸如图3或图6所示的方案的另一个替代方案，如图7所示的方案可以用于制备诸如图4或图5所示的方案。可通过切口酶(例如，CviPII)引入切口701。在一些情况下，切口酶识别位点的长度为三个或更少碱基。在某些情况下，使用CviPII，其可在CCD的序列处识别并使其有切口。然后可使用聚合酶(例如，Bst大片段DNA聚合酶)在置换旧链的同时从切口开始合成新的DNA链(例如，切口核酸内切酶介导的链置换DNA扩增(NEMDA))。可以调整反应参数以控制产生的单链DNA的大小。例如，可以调整切口酶:聚合酶比率(例如，CviPII:Bts大片段聚合酶比率)。也可以调整反应温度。接下来，可添加寡核苷酸704，所述寡核苷酸(在5'>3'方向)具有启动子(例如T7启动子)702，随后是随机n-mer(例如，随机6-mer、随机8-mer)703。随机n-mer区域可结合先前产生的单链DNA的区域。例如，可以通过在高温下变性然后快速冷却来进行结合，这可使随机n-mer区域结合由NEMDA产生的单链DNA。在一些情况下，使DNA在98℃变性7分钟，然后迅速冷却至10℃。可以使用延伸和/或扩增来产生双链DNA。可以例如通过酶促方法(例如，通过在20℃用DNA聚合酶I处理)产生平端。这可导致一

端以启动子(例如,T7启动子)结束,另一端以任何切口酶识别位点(例如,任何CCD位点)结束。然后可以通过例如大小选择(例如,通过凝胶纯化、毛细管电泳或其他片段分离技术)来纯化这些片段。在一些情况下,靶片段的长度约为50个碱基对(衔接子序列(例如,T7衔接子)+靶N20序列+切口酶识别位点或互补序列(complement)(例如,HGG))。然后可将片段与包含核酸酶的核酸酶识别位点的衔接子连接,所述核酸酶切割适当的距离以去除切口酶识别位点705。例如,对于3个核苷酸长的切口酶识别位点(例如,用于CviPII的CCD),可以使用BaeI。然后可以使用适当的核酸酶(例如,BaeI)去除核酸酶识别位点和切口酶识别位点706。然后可以将剩余的核酸序列(例如,N20位点)与指导RNA的最后的茎环序列连接707。可进行扩增(例如,PCR)。可产生指导RNA。

[0259] 在一些实施方案中,产生靶向人类线粒体DNA(mtDNA)的gNA(例如,gRNA)的集合,其可用于指导核酸指导的核酸酶(例如,Cas9)蛋白,因为其包含核酸指导的核酸酶(例如,Cas9)靶序列。在一些实施方案中,该gNA的集合(例如,gRNA)的导向序列由包含表3(如果NGG序列在正链上)和表4(如果NGG序列在负链上)的右边第二列中提供的至少20nt序列的DNA序列编码。在一些实施方案中,如本文提供的对人线粒体DNA具有特异性的gRNA核酸的集合包含多个成员,其中这些成员包含表3的右列开始的第二列和/或表4的右边第二列中提供的多个导向序列。

[0260] 表3.在(+)链上携带NGG序列的人mtDNA的gRNA靶序列。

[0261]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有gRNA靶序列随后NGG的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
13	35	ATCACCCTATTAACCACTCACGG	13	ATCACCCTATTAACCACTCA	436
14	36	TCACCCTATTAACCACTCACGGG	14	TCACCCTATTAACCACTCAC	437
32	54	ACGGGAGCTCTCCATGCATTTGG	15	ACGGGAGCTCTCCATGCATT	438
45	67	ATGCATTTGGTATTTTCGTCTGG	16	ATGCATTTGGTATTTTCGTC	439
46	68	TGCATTTGGTATTTTCGTCTGGG	17	TGCATTTGGTATTTTCGTCT	440
47	69	GCATTTGGTATTTTCGT	18	GCATTTGGTATTTTCG	441

[0262]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有gRNA靶序列随后NGG的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		CTGGGG		TCTG	
48	70	CATTTGGTATTTTCGTCTGGGGG	19	CATTTGGTATTTTCGTCTGG	442
49	71	ATTTGGTATTTTCGTCTGGGGGG	20	ATTTGGTATTTTCGTCTGGG	443
79	101	GCGATAGCATTGCGAGACGCTGG	21	GCGATAGCATTGCGAGACGC	444
85	107	GCATTGCGAGACGCTGGAGCCGG	22	GCATTGCGAGACGCTGGAGC	445
163	185	GCACCTACGTTCAATATTACAGG	23	GCACCTACGTTCAATATTAC	446
207	229	GTTAATTAATTAATGCTTGTAGG	24	GTTAATTAATTAATGCTTGT	447
301	323	AACCCCCCCTCCCCCGCTTCTGG	25	AACCCCCCCTCCCCCGCTTC	448
388	410	AGATTTCAAATTTTATCTTTTGG	26	AGATTTCAAATTTTATCTTT	449
391	413	TTTCAAATTTTATCTTTTGGCGG	27	TTTCAAATTTTATCTTTTGG	450
604	626	ATACACTGAAAATGTTTAGACGG	28	ATACACTGAAAATGTTTAGA	451
605	627	TACACTGAAAATGTTTAGACGGG	29	TACACTGAAAATGTTTAGAC	452
631	653	ACATCACCCCATAAACAAATAGG	30	ACATCACCCCATAAACAAAT	453
636	658	ACCCCATAAACAAATAGGTTTGG	31	ACCCCATAAACAAATAGGTT	454

[0263]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有gRNA靶序列随后NGG的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
727	749	TCTAAATCACCACGATCAAAAGG	32	TCTAAATCACCACGATCAAA	455
788	810	TTAGCCTAGCCACACCCCCACGG	33	TTAGCCTAGCCACACCCCCA	456
789	811	TAGCCTAGCCACACCCCCACGGG	34	TAGCCTAGCCACACCCCCAC	457
851	873	AACTAAGCTATACTAACCCCAGG	35	AACTAAGCTATACTAACCCC	458
852	874	ACTAAGCTATACTAACCCCAGGG	36	ACTAAGCTATACTAACCCCA	459
856	878	AGCTATACTAACCCCAGGGTTGG	37	AGCTATACTAACCCCAGGGT	460
880	902	CAATTTCGTGCCAGCCACCGCGG	38	CAATTTCGTGCCAGCCACCG	461
912	934	TAACCCAAGTCAATAGAAGCCGG	39	TAACCCAAGTCAATAGAAGC	462
1009	1031	CACAAAATAGACTACGAAAGTGG	40	CACAAAATAGACTACGAAAG	463
1051	1073	ACAATAGCTAAGACCCAAACTGG	41	ACAATAGCTAAGACCCAAAC	464
1052	1074	CAATAGCTAAGACCCAAACTGGG	42	CAATAGCTAAGACCCAAACT	465
1148	1170	AGCCACAGCTTAAAACTCAAAGG	43	AGCCACAGCTTAAAACTCAA	466
1154	1176	AGCTTAAAACTCAAAGGACCTGG	44	AGCTTAAAACTCAAAGGACC	467
1157	1179	TTAAAACTCAAAGGACCTGGCGG	45	TTAAAACTCAAAGGACCTGG	468

[0264]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有gRNA靶序列随后NGG的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
1178	1200	GGTGCTTCATATCCCTCTAGAGG	46	GGTGCTTCATATCCCTCTAG	469
1267	1289	TCTTCAGCAAACCCTGATGAAGG	47	TCTTCAGCAAACCCTGATGA	470
1306	1328	AGTACCCACGTAAAGACGTTAGG	48	AGTACCCACGTAAAGACGTT	471
1312	1334	CACGTAAAGACGTTAGGTCAAGG	49	CACGTAAAGACGTTAGGTCA	472
1326	1348	AGGTCAAGGTGTAGCCCATGAGG	50	AGGTCAAGGTGTAGCCCATG	473
1329	1351	TCAAGGTGTAGCCCATGAGGTGG	51	TCAAGGTGTAGCCCATGAGG	474
1339	1361	GCCCATGAGGTGGCAAGAAATGG	52	GCCCATGAGGTGGCAAGAAA	475
1340	1362	CCCATGAGGTGGCAAGAAATGGG	53	CCCATGAGGTGGCAAGAAAT	476
1389	1411	GATAGCCCTTATGAAACTTAAGG	54	GATAGCCCTTATGAAACTTA	477
1390	1412	ATAGCCCTTATGAAACTTAAGGG	55	ATAGCCCTTATGAAACTTAA	478
1397	1419	TTATGAAACTTAAGGGTCGAAGG	56	TTATGAAACTTAAGGGTCGA	479
1400	1422	TGAAACTTAAGGGTCGAAGGTGG	57	TGAAACTTAAGGGTCGAAGG	480
1441	1463	AGTAGAGTGCTTAGTTGAACAGG	58	AGTAGAGTGCTTAGTTGAAC	481
1442	1464	GTAGAGTGCTTAGTTGAACAGGG	59	GTAGAGTGCTTAGTTGAACA	482

[0265]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有gRNA靶序列随后NGG的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
1494	1516	CCTCCTCAAGTATACTTCAAAGG	60	CCTCCTCAAGTATACTTCAA	483
1530	1552	ACCCCTACGCATTTATATAGAGG	61	ACCCCTACGCATTTATATAG	484
1548	1570	AGAGGAGACAAGTCGTAACATGG	62	AGAGGAGACAAGTCGTAACA	485
1560	1582	TCGTAACATGGTAAGTGTACTGG	63	TCGTAACATGGTAAGTGTAC	486
1573	1595	AGTGTACTGGAAAGTGCACTTGG	64	AGTGTACTGGAAAGTGCACT	487
1620	1642	AAAGCACCCAACTTACACTTAGG	65	AAAGCACCCAACTTACACTT	488
1726	1748	CATTTACCCAAATAAAGTATAGG	66	CATTTACCCAAATAAAGTAT	489
1746	1768	AGGCGATAGAAATTGAAACCTGG	67	AGGCGATAGAAATTGAAACC	490
1770	1792	GCAATAGATATAGTACCGCAAGG	68	GCAATAGATATAGTACCGCA	491
1771	1793	CAATAGATATAGTACCGCAAGGG	69	CAATAGATATAGTACCGCAA	492
1809	1831	TAACCAAGCATAATATAGCAAGG	70	TAACCAAGCATAATATAGCA	493
1862	1884	TAACTAGAAATAACTTTGCAAGG	71	TAACTAGAAATAACTTTGCA	494
1947	1969	CCGTCTATGTAGCAAAATAGTGG	72	CCGTCTATGTAGCAAAATAG	495
1948	1970	CGTCTATGTAGCAAAATAGTGGG	73	CGTCTATGTAGCAAAATAGT	496

[0266]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有gRNA靶序列随后NGG的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
1960	1982	AAAATAGTGGGAAGATTTATAGG	74	AAAATAGTGGGAAGATTTAT	497
1966	1988	GTGGGAAGATTTATAGGTAGAGG	75	GTGGGAAGATTTATAGGTAG	498
1987	2009	GGCGACAAACCTACCGAGCCTGG	76	GGCGACAAACCTACCGAGCC	499
1997	2019	CTACCGAGCCTGGTGATAGCTGG	77	CTACCGAGCCTGGTGATAGC	500
2086	2108	ATTTAACTGTTAGTCCAAAGAGG	78	ATTTAACTGTTAGTCCAAAG	501
2099	2121	TCCAAAGAGGAACAGCTCTTTGG	79	TCCAAAGAGGAACAGCTCTT	502
2107	2129	GGAACAGCTCTTTGGACACTAGG	80	GGAACAGCTCTTTGGACACT	503
2152	2174	AAAAATTTAACACCCATAGTAGG	81	AAAAATTTAACACCCATAGT	504
2247	2269	CTGAACTCCTCACACCCAATTGG	82	CTGAACTCCTCACACCCAAT	505
2414	2436	CCTCACTGTCAACCCAACACAGG	83	CCTCACTGTCAACCCAACAC	506
2427	2449	CCAACACAGGCATGCTCATAAGG	84	CCAACACAGGCATGCTCATA	507
2432	2454	ACAGGCATGCTCATAAGGAAAGG	85	ACAGGCATGCTCATAAGGAA	508
2449	2471	GAAAGGTTAAAAAAAGTAAAAGG	86	GAAAGGTTAAAAAAAGTAAA	509
2456	2478	TAAAAAAAGTAAAAGGAACTCGG	87	TAAAAAAAGTAAAAGGAACT	510

[0267]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有gRNA靶序列随后NGG的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
2515	2537	TCTAGCATCACCAGTATTAGAGG	88	TCTAGCATCACCAGTATTAG	511
2546	2568	GCCCAGTGACACATGTTTAACGG	89	GCCCAGTGACACATGTTTAA	512
2552	2574	TGACACATGTTTAACGGCCGCGG	90	TGACACATGTTTAACGGCCG	513
2571	2593	GCGGTACCCTAACCGTGCAAAGG	91	GCGGTACCCTAACCGTGCAA	514
2599	2621	TAATCACTTGTTCCTTAAATAGG	92	TAATCACTTGTTCCTTAAAT	515
2600	2622	AATCACTTGTTCCTTAAATAGGG	93	AATCACTTGTTCCTTAAATA	516
2614	2636	TAAATAGGGACCTGTATGAATGG	94	TAAATAGGGACCTGTATGAA	517
2624	2646	CCTGTATGAATGGCTCCACGAGG	95	CCTGTATGAATGGCTCCACG	518
2625	2647	CTGTATGAATGGCTCCACGAGGG	96	CTGTATGAATGGCTCCACGA	519
2676	2698	AAATTGACCTGCCCGTGAAGAGG	97	AAATTGACCTGCCCGTGAAG	520
2679	2701	TTGACCTGCCCGTGAAGAGGCGG	98	TTGACCTGCCCGTGAAGAGG	521
2680	2702	TGACCTGCCCGTGAAGAGGCGGG	99	TGACCTGCCCGTGAAGAGGC	522
2711	2733	AGCAAGACGAGAAGACCCTATGG	100	AGCAAGACGAGAAGACCCTA	523
2755	2777	ACAGTACCTAACAAACCCACAGG	101	ACAGTACCTAACAAACCCAC	524

[0268]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有gRNA靶序列随后NGG的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
2789	2811	CAAACCTGCATTAAAAATTTCGG	102	CAAACCTGCATTAAAAATTT	525
2793	2815	CCTGCATTAAAAATTTCGGTTGG	103	CCTGCATTAAAAATTTCGGT	526
2794	2816	CTGCATTAAAAATTTCGGTTGGG	104	CTGCATTAAAAATTTCGGTT	527
2795	2817	TGCATTAAAAATTTCGGTTGGGG	105	TGCATTAAAAATTTCGGTTG	528
2804	2826	AATTTCGGTTGGGGCGACCTCGG	106	AATTTCGGTTGGGGCGACCT	529
2895	2917	TGATCCAATAACTTGACCAACGG	107	TGATCCAATAACTTGACCAA	530
2911	2933	CCAACGGAACAAGTTACCCTAGG	108	CCAACGGAACAAGTTACCCT	531
2912	2934	CAACGGAACAAGTTACCCTAGGG	109	CAACGGAACAAGTTACCCTA	532
2954	2976	CTAGAGTCCATATCAACAATAGG	110	CTAGAGTCCATATCAACAAT	533
2955	2977	TAGAGTCCATATCAACAATAGGG	111	TAGAGTCCATATCAACAATA	534
2974	2996	AGGGTTTACGACCTCGATGTTGG	112	AGGGTTTACGACCTCGATGT	535
2980	3002	TACGACCTCGATGTTGGATCAGG	113	TACGACCTCGATGTTGGATC	536
2992	3014	GTTGGATCAGGACATCCCGATGG	114	GTTGGATCAGGACATCCCGA	537
3010	3032	GATGGTGCAGCCGCTATTAAAGG	115	GATGGTGCAGCCGCTATTAA	538

[0269]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有gRNA靶序列随后NGG的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
3058	3080	TACGTGATCTGAGTTCAGACCGG	116	TACGTGATCTGAGTTCAGAC	539
3069	3091	AGTTCAGACCGGAGTAATCCAGG	117	AGTTCAGACCGGAGTAATCC	540
3073	3095	CAGACCGGAGTAATCCAGGTCGG	118	CAGACCGGAGTAATCCAGGT	541
3110	3132	CAAATTCCTCCCTGTACGAAAGG	119	CAAATTCCTCCCTGTACGAA	542
3125	3147	ACGAAAGGACAAGAGAAATAAGG	120	ACGAAAGGACAAGAGAAATA	543
3203	3225	ACCCACACCCACCCAAGAACAGG	121	ACCCACACCCACCCAAGAAC	544
3204	3226	CCCACACCCACCCAAGAACAGGG	122	CCCACACCCACCCAAGAACA	545
3217	3239	AAGAACAGGGTTTGTTAAGATGG	123	AAGAACAGGGTTTGTTAAGA	546
3227	3249	TTTGTTAAGATGGCAGAGCCCGG	124	TTTGTTAAGATGGCAGAGCC	547
3262	3284	ACTTAAAACTTTACAGTCAGAGG	125	ACTTAAAACTTTACAGTCAG	548
3294	3316	TCTTCTTAACAACATACCCATGG	126	TCTTCTTAACAACATACCCA	549
3336	3358	TGTACCCATTCTAATCGCAATGG	127	TGTACCCATTCTAATCGCAA	550
3370	3392	CTTACCGAACGAAAAATTCTAGG	128	CTTACCGAACGAAAAATTCT	551
3391	3413	GGCTATATACAACTACGCAAAGG	129	GGCTATATACAACTACGCAA	552

[0270]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有gRNA靶序列随后NGG的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
3406	3428	CGCAAAGGCCCCAACGTTGTAGG	130	CGCAAAGGCCCCAACGTTGT	553
3415	3437	CCCAACGTTGTAGGCCCCTACGG	131	CCCAACGTTGTAGGCCCCTA	554
3416	3438	CCAACGTTGTAGGCCCCTACGGG	132	CCAACGTTGTAGGCCCCTAC	555
3570	3592	CCTCCCCATACCCAACCCCCTGG	133	CCTCCCCATACCCAACCCCC	556
3586	3608	CCCCTGGTCAACCTCAACCTAGG	134	CCCCTGGTCAACCTCAACCT	557
3643	3665	GTTTACTCAATCCTCTGATCAGG	135	GTTTACTCAATCCTCTGATC	558
3644	3666	TTTACTCAATCCTCTGATCAGGG	136	TTTACTCAATCCTCTGATCA	559
3676	3698	AACTCAAACTACGCCCTGATCGG	137	AACTCAAACTACGCCCTGAT	560
3757	3779	CTATCAACATTACTAATAAGTGG	138	CTATCAACATTACTAATAAG	561
3828	3850	ACTCCTGCCATCATGACCCTTGG	139	ACTCCTGCCATCATGACCCT	562
3892	3914	ACCCCCTTCGACCTTGCCGAAGG	140	ACCCCCTTCGACCTTGCCGA	563
3893	3915	CCCCCTTCGACCTTGCCGAAGGG	141	CCCCCTTCGACCTTGCCGAA	564
3894	3916	CCCCTTCGACCTTGCCGAAGGGG	142	CCCCTTCGACCTTGCCGAAG	565
3913	3935	GGGGAGTCCGAACTAGTCTCAGG	143	GGGGAGTCCGAACTAGTCTC	566

[0271]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有gRNA靶序列随后NGG的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
3937	3959	TTCAACATCGAATACGCCGCAGG	144	TTCAACATCGAATACGCCGC	567
4015	4037	CTCACCACTACAATCTTCCTAGG	145	CTCACCACTACAATCTTCCT	568
4287	4309	ACTTTGATAGAGTAAATAATAGG	146	ACTTTGATAGAGTAAATAAT	569
4311	4333	GCTTAAACCCCCTTATTTCTAGG	147	GCTTAAACCCCCTTATTTCT	570
4386	4408	TCACACCCCATCCTAAAGTAAGG	148	TCACACCCCATCCTAAAGTA	571
4406	4428	AGGTCAGCTAAATAAGCTATCGG	149	AGGTCAGCTAAATAAGCTAT	572
4407	4429	GGTCAGCTAAATAAGCTATCGGG	150	GGTCAGCTAAATAAGCTATC	573
4428	4450	GGCCCATACCCCGAAAATGTTGG	151	GGCCCATACCCCGAAAATGT	574
4460	4482	TCCCGTACTAATTAATCCCCTGG	152	TCCCGTACTAATTAATCCCC	575
4494	4516	ATCTACTCTACCATCTTTGCAGG	153	ATCTACTCTACCATCTTTGC	576
4542	4564	CACTGATTTTTTACCTGAGTAGG	154	CACTGATTTTTTACCTGAGT	577
4692	4714	CTCTTCAACAATATACTCTCCGG	155	CTCTTCAACAATATACTCTC	578
4767	4789	ATAGCTATAGCAATAAAACTAGG	156	ATAGCTATAGCAATAAAACT	579
4799	4821	CTTTCACTTCTGAGTCCCAGAGG	157	CTTTCACTTCTGAGTCCCAG	580

[0272]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有gRNA靶序列随后NGG的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
4809	4831	TGAGTCCCAGAGGTTACCCAAGG	158	TGAGTCCCAGAGGTTACCCA	581
4827	4849	CAAGGCACCCCTCTGACATCCGG	159	CAAGGCACCCCTCTGACATC	582
4941	4963	TCAATCTTATCCATCATAGCAGG	160	TCAATCTTATCCATCATAGC	583
4950	4972	TCCATCATAGCAGGCAGTTGAGG	161	TCCATCATAGCAGGCAGTTG	584
4953	4975	ATCATAGCAGGCAGTTGAGGTGG	162	ATCATAGCAGGCAGTTGAGG	585
5010	5032	TACTCCTCAATTACCCACATAGG	163	TACTCCTCAATTACCCACAT	586
5202	5224	CCATCCACCCTCCTCTCCCTAGG	164	CCATCCACCCTCCTCTCCCT	587
5205	5227	TCCACCCTCCTCTCCCTAGGAGG	165	TCCACCCTCCTCTCCCTAGG	588
5223	5245	GGAGGCCTGCCCCCGCTAACCGG	166	GGAGGCCTGCCCCCGCTAAC	589
5239	5261	TAACCGGCTTTTTGCCCAAATGG	167	TAACCGGCTTTTTGCCCAAA	590
5240	5262	AACCGGCTTTTTGCCCAAATGGG	168	AACCGGCTTTTTGCCCAAAT	591
5500	5522	TAATAATCTTATAGAAATTTAGG	169	TAATAATCTTATAGAAATTT	592
5569	5591	CTTAATTTCTGTAACAGCTAAGG	170	CTTAATTTCTGTAACAGCTA	593
5646	5668	CTAAGCCCTTACTAGACCAATGG	171	CTAAGCCCTTACTAGACCAA	594

[0273]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有gRNA靶序列随后NGG的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
5647	5669	TAAGCCCTTACTAGACCAATGGG	172	TAAGCCCTTACTAGACCAAT	595
5697	5719	AGCTAAGCACCCTAATCAACTGG	173	AGCTAAGCACCCTAATCAAC	596
5723	5745	CAATCTACTTCTCCCGCCGCCGG	174	CAATCTACTTCTCCCGCCGC	597
5724	5746	AATCTACTTCTCCCGCCGCCGGG	175	AATCTACTTCTCCCGCCGCC	598
5732	5754	TCTCCCGCCGCCGGGAAAAAGG	176	TCTCCCGCCGCCGGGAAAAA	599
5735	5757	CCCGCCGCCGGGAAAAAAGGCGG	177	CCCGCCGCCGGGAAAAAGG	600
5736	5758	CCGCCGCCGGGAAAAAAGGCGGG	178	CCGCCGCCGGGAAAAAAGGC	601
5747	5769	AAAAAAGGCGGGAGAAGCCCCGG	179	AAAAAAGGCGGGAGAAGCCC	602
5751	5773	AAGGCGGGAGAAGCCCCGGCAGG	180	AAGGCGGGAGAAGCCCCGGC	603
5800	5822	ATTCAATATGAAAATCACCTCGG	181	ATTCAATATGAAAATCACCT	604
5806	5828	TATGAAAATCACCTCGGAGCTGG	182	TATGAAAATCACCTCGGAGC	605
5816	5838	ACCTCGGAGCTGGTAAAAAGAGG	183	ACCTCGGAGCTGGTAAAAAG	606
5928	5950	TCTACAAACCACAAAGACATTGG	184	TCTACAAACCACAAAGACAT	607
5949	5971	GGAACACTATACCTATTATTCGG	185	GGAACACTATACCTATTATT	608

[0274]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有gRNA靶序列随后NGG的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
5961	5983	CTATTATTCGGCGCATGAGCTGG	186	CTATTATTCGGCGCATGAGC	609
5970	5992	GGCGCATGAGCTGGAGTCCTAGG	187	GGCGCATGAGCTGGAGTCCT	610
6005	6027	CCTCCTTATTCGAGCCGAGCTGG	188	CCTCCTTATTCGAGCCGAGC	611
6006	6028	CTCCTTATTCGAGCCGAGCTGGG	189	CTCCTTATTCGAGCCGAGCT	612
6027	6049	GGCCAGCCAGGCAACCTTCTAGG	190	GGCCAGCCAGGCAACCTTCT	613
6108	6130	ATAGTAATACCCATCATAATCGG	191	ATAGTAATACCCATCATAAT	614
6111	6133	GTAATACCCATCATAATCGGAGG	192	GTAATACCCATCATAATCGG	615
6117	6139	CCCATCATAATCGGAGGCTTTGG	193	CCCATCATAATCGGAGGCTT	616
6144	6166	TGACTAGTTCCCCTAATAATCGG	194	TGACTAGTTCCCCTAATAAT	617
6158	6180	AATAATCGGTGCCCCCGATATGG	195	AATAATCGGTGCCCCCGATA	618
6236	6258	CCTGCTCGCATCTGCTATAGTGG	196	CCTGCTCGCATCTGCTATAG	619
6239	6261	GCTCGCATCTGCTATAGTGGAGG	197	GCTCGCATCTGCTATAGTGG	620
6243	6265	GCATCTGCTATAGTGGAGGCCGG	198	GCATCTGCTATAGTGGAGGC	621
6249	6271	GCTATAGTGGAGGCCGGAGCAGG	199	GCTATAGTGGAGGCCGGAGC	622

[0275]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有gRNA靶序列随后NGG的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
6255	6277	GTGGAGGCCGGAGCAGGAACAGG	200	GTGGAGGCCGGAGCAGGAAC	623
6282	6304	ACAGTCTACCCTCCCTTAGCAGG	201	ACAGTCTACCCTCCCTTAGC	624
6283	6305	CAGTCTACCCTCCCTTAGCAGGG	202	CAGTCTACCCTCCCTTAGCA	625
6300	6322	GCAGGGAACTACTCCCACCCTGG	203	GCAGGGAACTACTCCCACCC	626
6342	6364	ATCTTCTCCTTACACCTAGCAGG	204	ATCTTCTCCTTACACCTAGC	627
6360	6382	GCAGGTGTCTCCTCTATCTTAGG	205	GCAGGTGTCTCCTCTATCTT	628
6361	6383	CAGGTGTCTCCTCTATCTTAGGG	206	CAGGTGTCTCCTCTATCTTA	629
6362	6384	AGGTGTCTCCTCTATCTTAGGGG	207	AGGTGTCTCCTCTATCTTAG	630
6495	6517	TCTCTCCCAGTCCTAGCTGCTGG	208	TCTCTCCCAGTCCTAGCTGC	631
6552	6574	ACCACCTTCTTCGACCCCGCCGG	209	ACCACCTTCTTCGACCCCGC	632
6555	6577	ACCTTCTTCGACCCCGCCGGAGG	210	ACCTTCTTCGACCCCGCCGG	633
6558	6580	TTCTTCGACCCCGCCGGAGGAGG	211	TTCTTCGACCCCGCCGGAGG	634
6597	6619	CAACACCTATTCTGATTTTTCGG	212	CAACACCTATTCTGATTTTT	635
6630	6652	GTTTATATTCTTATCCTACCAGG	213	GTTTATATTCTTATCCTACC	636

[0276]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有gRNA靶序列随后NGG的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
6636	6658	ATTCTTATCCTACCAGGCTTCGG	214	ATTCTTATCCTACCAGGCTT	637
6669	6691	CATATTGTAACTTACTACTCCGG	215	CATATTGTAACTTACTACTC	638
6687	6709	TCCGGAAAAAAAGAACCATTTGG	216	TCCGGAAAAAAAGAACCATT	639
6696	6718	AAAGAACCATTTGGATACATAGG	217	AAAGAACCATTTGGATACAT	640
6701	6723	ACCATTTGGATACATAGGTATGG	218	ACCATTTGGATACATAGGTA	641
6723	6745	GTCTGAGCTATGATATCAATTGG	219	GTCTGAGCTATGATATCAAT	642
6732	6754	ATGATATCAATTGGCTTCCTAGG	220	ATGATATCAATTGGCTTCCT	643
6733	6755	TGATATCAATTGGCTTCCTAGGG	221	TGATATCAATTGGCTTCCTA	644
6768	6790	GCACACCATATATTTACAGTAGG	222	GCACACCATATATTTACAGT	645
6831	6853	ATAATCATCGCTATCCCCACCGG	223	ATAATCATCGCTATCCCCAC	646
6867	6889	AGCTGACTCGCCACACTCCACGG	224	AGCTGACTCGCCACACTCCA	647
6909	6931	GCTGCAGTGCTCTGAGCCCTAGG	225	GCTGCAGTGCTCTGAGCCCT	648
6933	6955	TTCATCTTTCTTTTCACCGTAGG	226	TTCATCTTTCTTTTCACCGT	649
6936	6958	ATCTTTCTTTTCACCGTAGGTGG	227	ATCTTTCTTTTCACCGTAGG	650

[0277]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有gRNA靶序列随后NGG的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
6945	6967	TTCACCGTAGGTGGCCTGACTGG	228	TTCACCGTAGGTGGCCTGAC	651
7032	7054	TTCCACTATGTCCTATCAATAGG	229	TTCCACTATGTCCTATCAAT	652
7053	7075	GGAGCTGTATTTGCCATCATAGG	230	GGAGCTGTATTTGCCATCAT	653
7056	7078	GCTGTATTTGCCATCATAGGAGG	231	GCTGTATTTGCCATCATAGG	654
7086	7108	CACTGATTTCCCCTATTCTCAGG	232	CACTGATTTCCCCTATTCTC	655
7140	7162	CATTTCACTATCATATTCATCGG	233	CATTTCACTATCATATTCAT	656
7176	7198	TTCTTCCCACAACACTTTCTCGG	234	TTCTTCCCACAACACTTTCT	657
7185	7207	CAACACTTTCTCGGCCTATCCGG	235	CAACACTTTCTCGGCCTATC	658
7205	7227	CGGAATGCCCCGACGTTACTCGG	236	CGGAATGCCCCGACGTTACT	659
7251	7273	TGAAACATCCTATCATCTGTAGG	237	TGAAACATCCTATCATCTGT	660
7358	7380	AGAAGAACCCTCCATAAACCTGG	238	AGAAGAACCCTCCATAAACC	661
7371	7393	ATAAACCTGGAGTGACTATATGG	239	ATAAACCTGGAGTGACTATA	662
7432	7454	ACATAAAATCTAGACAAAAAGG	240	ACATAAAATCTAGACAAAAA	663
7436	7458	AAAATCTAGACAAAAAAGGAAGG	241	AAAATCTAGACAAAAAAGGA	664

[0278]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有gRNA靶序列随后NGG的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
7457	7479	GGAATCGAACCCCCCAAAGCTGG	242	GGAATCGAACCCCCCAAAGC	665
7476	7498	CTGGTTTCAAGCCAACCCCATGG	243	CTGGTTTCAAGCCAACCCCA	666
7499	7521	CCTCCATGACTTTTTCAAAAAGG	244	CCTCCATGACTTTTTCAAAA	667
7544	7566	CTTTGTCAAAGTTAAATTATAGG	245	CTTTGTCAAAGTTAAATTAT	668
7567	7589	CTAAATCCTATATATCTTAATGG	246	CTAAATCCTATATATCTTAA	669
7586	7608	ATGGCACATGCAGCGCAAGTAGG	247	ATGGCACATGCAGCGCAAGT	670
7741	7763	TACTAACATCTCAGACGCTCAGG	248	TACTAACATCTCAGACGCTC	671
7831	7853	CATCCTTTACATAACAGACGAGG	249	CATCCTTTACATAACAGACG	672
7865	7887	TCCCTTACCATCAAATCAATTGG	250	TCCCTTACCATCAAATCAAT	673
7875	7897	TCAAATCAATTGGCCACCAATGG	251	TCAAATCAATTGGCCACCAA	674
7904	7926	ACCTACGAGTACACCGACTACGG	252	ACCTACGAGTACACCGACTA	675
7907	7929	TACGAGTACACCGACTACGGCGG	253	TACGAGTACACCGACTACGG	676
7955	7977	CCCCCATTATTCCTAGAACCAGG	254	CCCCCATTATTCCTAGAACC	677
8069	8091	TCATGAGCTGTCCCCACATTAGG	255	TCATGAGCTGTCCCCACATT	678

[0279]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有gRNA靶序列随后NGG的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
8093	8115	TTAAAAACAGATGCAATTCCCGG	256	TTAAAAACAGATGCAATTCC	679
8131	8153	CACTTTCACCGCTACACGACCGG	257	CACTTTCACCGCTACACGAC	680
8132	8154	ACTTTCACCGCTACACGACCGGG	258	ACTTTCACCGCTACACGACC	681
8133	8155	CTTTCACCGCTACACGACCGGGG	259	CTTTCACCGCTACACGACCG	682
8134	8156	TTTCACCGCTACACGACCGGGGG	260	TTTCACCGCTACACGACCGG	683
8144	8166	ACACGACCGGGGGTATACTACGG	261	ACACGACCGGGGGTATACTA	684
8165	8187	GGTCAATGCTCTGAAATCTGTGG	262	GGTCAATGCTCTGAAATCTG	685
8228	8250	CCCCTAAAAATCTTTGAAATAGG	263	CCCCTAAAAATCTTTGAAAT	686
8229	8251	CCCTAAAAATCTTTGAAATAGGG	264	CCCTAAAAATCTTTGAAATA	687
8370	8392	CCCAACTAAATACTACCGTATGG	265	CCCAACTAAATACTACCGTA	688
8551	8573	TTCATTGCCCCCACAATCCTAGG	266	TTCATTGCCCCCACAATCCT	689
8698	8720	ATAACCATACACAACACTAAAGG	267	ATAACCATACACAACACTAA	690
8761	8783	ATTGCCACAACTAACCTCCTCGG	268	ATTGCCACAACTAACCTCCT	691
8817	8839	ACTATCTATAAACCTAGCCATGG	269	ACTATCTATAAACCTAGCCA	692

[0280]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有gRNA靶序列随后NGG的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
8835	8857	CATGGCCATCCCCTTATGAGCGG	270	CATGGCCATCCCCTTATGAG	693
8836	8858	ATGGCCATCCCCTTATGAGCGGG	271	ATGGCCATCCCCTTATGAGC	694
8851	8873	TGAGCGGGCACAGTGATTATAGG	272	TGAGCGGGCACAGTGATTAT	695
8899	8921	CTAGCCCACTTCTTACCACAAGG	273	CTAGCCCACTTCTTACCACA	696
8973	8995	ACTCATTCAACCAATAGCCCTGG	274	ACTCATTCAACCAATAGCCC	697
9004	9026	CTAACCGCTAACATTACTGCAGG	275	CTAACCGCTAACATTACTGC	698
9028	9050	CACCTACTCATGCACCTAATTGG	276	CACCTACTCATGCACCTAAT	699
9243	9265	CCCAGCCCATGACCCCTAACAGG	277	CCCAGCCCATGACCCCTAAC	700
9244	9266	CCAGCCCATGACCCCTAACAGGG	278	CCAGCCCATGACCCCTAACA	701
9245	9267	CAGCCCATGACCCCTAACAGGGG	279	CAGCCCATGACCCCTAACAG	702
9273	9295	TCAGCCCTCCTAATGACCTCCGG	280	TCAGCCCTCCTAATGACCTC	703
9321	9343	TCCATAACGCTCCTCATACTAGG	281	TCCATAACGCTCCTCATACT	704
9358	9380	CACTAACCATATACCAATGATGG	282	CACTAACCATATACCAATGA	705
9390	9412	ACACGAGAAAGCACATACCAAGG	283	ACACGAGAAAGCACATACCA	706

[0281]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有gRNA靶序列随后NGG的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
9417	9439	CACACACCACCTGTCCAAAAAGG	284	CACACACCACCTGTCCAAAA	707
9429	9451	GTCCAAAAAGGCCTTCGATACGG	285	GTCCAAAAAGGCCTTCGATA	708
9430	9452	TCCAAAAAGGCCTTCGATACGGG	286	TCCAAAAAGGCCTTCGATAC	709
9471	9493	TCAGAAGTTTTTTTCTTCGCAGG	287	TCAGAAGTTTTTTTCTTCGC	710
9522	9544	CTAGCCCCTACCCCCCAATTAGG	288	CTAGCCCCTACCCCCCAATT	711
9525	9547	GCCCCTACCCCCCAATTAGGAGG	289	GCCCCTACCCCCCAATTAGG	712
9526	9548	CCCCTACCCCCCAATTAGGAGGG	290	CCCCTACCCCCCAATTAGGA	713
9532	9554	CCCCCCAATTAGGAGGGCACTGG	291	CCCCCCAATTAGGAGGGCAC	714
9543	9565	GGAGGGCACTGGCCCCCAACAGG	292	GGAGGGCACTGGCCCCCAAC	715
9606	9628	ACATCCGTATTACTCGCATCAGG	293	ACATCCGTATTACTCGCATC	716
9692	9714	ACTGCTTATTACAATTTTACTGG	294	ACTGCTTATTACAATTTTAC	717
9693	9715	CTGCTTATTACAATTTTACTGGG	295	CTGCTTATTACAATTTTACT	718
9756	9778	TCTCCCTTCACCATTTCCGACGG	296	TCTCCCTTCACCATTTCCGA	719
9765	9787	ACCATTTCCGACGGCATCTACGG	297	ACCATTTCCGACGGCATCTA	720

[0282]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有gRNA靶序列随后NGG的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
9789	9811	TCAACATTTTTTGTAGCCACAGG	298	TCAACATTTTTTGTAGCCAC	721
9798	9820	TTTGTAGCCACAGGCTTCCACGG	299	TTTGTAGCCACAGGCTTCCA	722
9816	9838	CACGGACTTCACGTCATTATTGG	300	CACGGACTTCACGTCATTAT	723
9885	9907	TTTACATCCAAACATCACTTTGG	301	TTTACATCCAAACATCACTT	724
9910	9932	TCGAAGCCGCCGCCTGATACTGG	302	TCGAAGCCGCCGCCTGATAC	725
9926	9948	ATACTGGCATTTTGTAGATGTGG	303	ATACTGGCATTTTGTAGATG	726
9963	9985	TATGTCTCCATCTATTGATGAGG	304	TATGTCTCCATCTATTGATG	727
9964	9986	ATGTCTCCATCTATTGATGAGGG	305	ATGTCTCCATCTATTGATGA	728
10122	10144	TTTTGACTACCACAACTCAACGG	306	TTTTGACTACCACAACTCAA	729
10155	10177	AAATCCACCCCTTACGAGTGCGG	307	AAATCCACCCCTTACGAGTG	730
10343	10365	CATCATCCTAGCCCTAAGTCTGG	308	CATCATCCTAGCCCTAAGTC	731
10365	10387	GCCTATGAGTGACTACAAAAAGG	309	GCCTATGAGTGACTACAAAA	732
10385	10407	AGGATTAGACTGAACCGAATTGG	310	AGGATTAGACTGAACCGAAT	733
10500	10522	GCATTTACCATCTCACTTCTAGG	311	GCATTTACCATCTCACTTCT	734

[0283]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有gRNA靶序列随后NGG的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
10551	10573	TCCTCCCTACTATGCCTAGAAGG	312	TCCTCCCTACTATGCCTAGA	735
10664	10686	CTTTGCCGCCTGCGAAGCAGCGG	313	CTTTGCCGCCTGCGAAGCAG	736
10667	10689	TGCCGCCTGCGAAGCAGCGGTGG	314	TGCCGCCTGCGAAGCAGCGG	737
10668	10690	GCCGCCTGCGAAGCAGCGGTGGG	315	GCCGCCTGCGAAGCAGCGGT	738
10704	10726	GTCTCAATCTCCAACACATATGG	316	GTCTCAATCTCCAACACATA	739
10972	10994	ACTCCTACCCCTCACAATCATGG	317	ACTCCTACCCCTCACAATCA	740
11128	11150	AACCACACTTATCCCCACCTTGG	318	AACCACACTTATCCCCACCT	741
11147	11169	TTGGCTATCATCACCCGATGAGG	319	TTGGCTATCATCACCCGATG	742
11174	11196	CAGCCAGAACGCCTGAACGCAGG	320	CAGCCAGAACGCCTGAACGC	743
11204	11226	TTCCTATTCTACACCCTAGTAGG	321	TTCCTATTCTACACCCTAGT	744
11252	11274	ATTTACACTCACAACACCCTAGG	322	ATTTACACTCACAACACCCT	745
11369	11391	ATAGTAAAGATACCTCTTTACGG	323	ATAGTAAAGATACCTCTTTA	746
11417	11439	CATGTCGAAGCCCCCATCGCTGG	324	CATGTCGAAGCCCCCATCGC	747
11418	11440	ATGTCGAAGCCCCCATCGCTGGG	325	ATGTCGAAGCCCCCATCGCT	748

[0284]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有gRNA靶序列随后NGG的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
11453	11475	GCCGCAGTACTCTTAAAACTAGG	326	GCCGCAGTACTCTTAAAACT	749
11456	11478	GCAGTACTCTTAAAACTAGGCGG	327	GCAGTACTCTTAAAACTAGG	750
11462	11484	CTCTTAAAACTAGGCGGCTATGG	328	CTCTTAAAACTAGGCGGCTA	751
11540	11562	TTCCTTGTACTATCCCTATGAGG	329	TTCCTTGTACTATCCCTATG	752
11669	11691	CAAACCCCCTGAAGCTTCACCGG	330	CAAACCCCCTGAAGCTTCAC	753
11696	11718	GTCATTCTCATAATCGCCCACGG	331	GTCATTCTCATAATCGCCCA	754
11697	11719	TCATTCTCATAATCGCCCACGGG	332	TCATTCTCATAATCGCCCAC	755
11777	11799	CGCATCATAATCCTCTCTCAAGG	333	CGCATCATAATCCTCTCTCA	756
11866	11888	ACCCCCCACTATTAACCTACTGG	334	ACCCCCCACTATTAACCTAC	757
11867	11889	CCCCCCACTATTAACCTACTGGG	335	CCCCCCACTATTAACCTACT	758
11927	11949	AATATCACTCTCCTACTTACAGG	336	AATATCACTCTCCTACTTAC	759
11985	12007	ACATATTTACCACAACACAATGG	337	ACATATTTACCACAACACAA	760
11986	12008	CATATTTACCACAACACAATGGG	338	CATATTTACCACAACACAAT	761
11987	12009	ATATTTACCACAACACAATGGGG	339	ATATTTACCACAACACAATG	762

[0285]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有gRNA靶序列随后NGG的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
12104	12126	CTCAACCCCGACATCATTACCGG	340	CTCAACCCCGACATCATTAC	763
12105	12127	TCAACCCCGACATCATTACCGGG	341	TCAACCCCGACATCATTACC	764
12164	12186	GATTGTGAATCTGACAACAGAGG	342	GATTGTGAATCTGACAACAG	765
12235	12257	TGCCCCCATGTCTAACAACATGG	343	TGCCCCCATGTCTAACAACA	766
12254	12276	ATGGCTTTCTCAACTTTTAAAGG	344	ATGGCTTTCTCAACTTTTAA	767
12272	12294	AAAGGATAACAGCTATCCATTGG	345	AAAGGATAACAGCTATCCAT	768
12279	12301	AACAGCTATCCATTGGTCTTAGG	346	AACAGCTATCCATTGGTCTT	769
12294	12316	GTCTTAGGCCCCAAAAATTTTGG	347	GTCTTAGGCCCCAAAAATTT	770
12608	12630	CTGTAGCATTGTTCGTTACATGG	348	CTGTAGCATTGTTCGTTACA	771
12742	12764	AACCTATTCCAACTGTTCATCGG	349	AACCTATTCCAACTGTTCAT	772
12750	12772	CCAACTGTTCATCGGCTGAGAGG	350	CCAACTGTTCATCGGCTGAG	773
12751	12773	CAACTGTTCATCGGCTGAGAGGG	351	CAACTGTTCATCGGCTGAGA	774
12757	12779	TTCATCGGCTGAGAGGGCGTAGG	352	TTCATCGGCTGAGAGGGCGT	775
12847	12869	GCAATCCTATACAACCGTATCGG	353	GCAATCCTATACAACCGTAT	776

[0286]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有gRNA靶序列随后NGG的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
12856	12878	TACAACCGTATCGGCGATATCGG	354	TACAACCGTATCGGCGATAT	777
12958	12980	CCAAGCCTCACCCCACTACTAGG	355	CCAAGCCTCACCCCACTACT	778
12979	13001	GGCCTCCTCCTAGCAGCAGCAGG	356	GGCCTCCTCCTAGCAGCAGC	779
12997	13019	GCAGGCAAATCAGCCCAATTAGG	357	GCAGGCAAATCAGCCCAATT	780
13030	13052	TGACTCCCCTCAGCCATAGAAGG	358	TGACTCCCCTCAGCCATAGA	781
13081	13103	TCAAGCACTATAGTTGTAGCAGG	359	TCAAGCACTATAGTTGTAGC	782
13156	13178	CAAACTCTAACACTATGCTTAGG	360	CAAACTCTAACACTATGCTT	783
13246	13268	TTCTCCACTTCAAGTCAACTAGG	361	TTCTCCACTTCAAGTCAACT	784
13267	13289	GGACTCATAATAGTTACAATCGG	362	GGACTCATAATAGTTACAAT	785
13345	13367	GCCATACTATTTATGTGCTCCGG	363	GCCATACTATTTATGTGCTC	786
13346	13368	CCATACTATTTATGTGCTCCGGG	364	CCATACTATTTATGTGCTCC	787
13393	13415	GAACAAGATATTCGAAAAATAGG	365	GAACAAGATATTCGAAAAAT	788
13396	13418	CAAGATATTCGAAAAATAGGAGG	366	CAAGATATTCGAAAAATAGG	789
13441	13463	ACTTCAACCTCCCTCACCATTGG	367	ACTTCAACCTCCCTCACCAT	790

[0287]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有gRNA靶序列随后NGG的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
13459	13481	ATTGGCAGCCTAGCATTAGCAGG	368	ATTGGCAGCCTAGCATTAGC	791
13477	13499	GCAGGAATACCTTTCCTCACAGG	369	GCAGGAATACCTTTCCTCAC	792
13612	13634	ATAATTCTTCTCACCCTAACAGG	370	ATAATTCTTCTCACCCTAAC	793
13686	13708	ACTAAACCCCATTAAACGCCTGG	371	ACTAAACCCCATTAAACGCC	794
13693	13715	CCCATTAAACGCCTGGCAGCCGG	372	CCCATTAAACGCCTGGCAGC	795
13708	13730	GCAGCCGGAAGCCTATTCGCAGG	373	GCAGCCGGAAGCCTATTCGC	796
13804	13826	GCCCTCGCTGTCACTTTCCTAGG	374	GCCCTCGCTGTCACTTTCCT	797
13894	13916	TTTTATTTCTCCAACATACTCGG	375	TTTTATTTCTCCAACATACT	798
13936	13958	CACCGCACAATCCCCTATCTAGG	376	CACCGCACAATCCCCTATCT	799
14059	14081	ATCATCACCTCAACCCAAAAAGG	377	ATCATCACCTCAACCCAAAA	800
14237	14259	TACAAAGCCCCCGCACCAATAGG	378	TACAAAGCCCCCGCACCAAT	801
14417	14439	ACCCCTGACCCCCATGCCTCAGG	379	ACCCCTGACCCCCATGCCTC	802
14579	14601	AATACTAAACCCCCATAAATAGG	380	AATACTAAACCCCCATAAAT	803
14585	14607	AAACCCCCATAAATAGGAGAAGG	381	AAACCCCCATAAATAGGAGA	804

[0288]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有gRNA靶序列随后NGG的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
14664	14686	CATACATCATTATTCTCGCACGG	382	CATACATCATTATTCTCGCA	805
14825	14847	ATCTCCGCATGATGAAACTTCGG	383	ATCTCCGCATGATGAAACTT	806
14837	14859	TGAAACTTCGGCTCACTCCTTGG	384	TGAAACTTCGGCTCACTCCT	807
14867	14889	CTGATCCTCCAAATCACCACAGG	385	CTGATCCTCCAAATCACCAC	808
14951	14973	ATCACTCGAGACGTAAATTATGG	386	ATCACTCGAGACGTAAATTA	809
14981	15003	ATCCGCTACCTTCACGCCAATGG	387	ATCCGCTACCTTCACGCCAA	810
15020	15042	ATCTGCCTCTTCCTACACATCGG	388	ATCTGCCTCTTCCTACACAT	811
15021	15043	TCTGCCTCTTCCTACACATCGGG	389	TCTGCCTCTTCCTACACATC	812
15026	15048	CTCTTCCTACACATCGGGCGAGG	390	CTCTTCCTACACATCGGGCG	813
15038	15060	ATCGGGCGAGGCCTATATTACGG	391	ATCGGGCGAGGCCTATATTA	814
15071	15093	TACTCAGAAACCTGAACATCGG	392	TACTCAGAAACCTGAAACAT	815
15113	15135	ACTATAGCAACAGCCTTCATAGG	393	ACTATAGCAACAGCCTTCAT	816
15131	15153	ATAGGCTATGTCCTCCCGTGAGG	394	ATAGGCTATGTCCTCCCGTG	817
15149	15171	TGAGGCCAAATATCATTCTGAGG	395	TGAGGCCAAATATCATTCTG	818

[0289]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有gRNA靶序列随后NGG的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
15150	15172	GAGGCCAAATATCATTCTGAGGG	396	GAGGCCAAATATCATTCTGA	819
15151	15173	AGGCCAAATATCATTCTGAGGGG	397	AGGCCAAATATCATTCTGAG	820
15194	15216	CTATCCGCCATCCCATACATTGG	398	CTATCCGCCATCCCATACAT	821
15195	15217	TATCCGCCATCCCATACATTGGG	399	TATCCGCCATCCCATACATT	822
15221	15243	GACCTAGTTCAATGAATCTGAGG	400	GACCTAGTTCAATGAATCTG	823
15224	15246	CTAGTTCAATGAATCTGAGGAGG	401	CTAGTTCAATGAATCTGAGG	824
15334	15356	CCTCCTATTCTTGCACGAAACGG	402	CCTCCTATTCTTGCACGAAA	825
15335	15357	CTCCTATTCTTGCACGAAACGGG	403	CTCCTATTCTTGCACGAAAC	826
15353	15375	ACGGGATCAAACAACCCCCTAGG	404	ACGGGATCAAACAACCCCCT	827
15416	15438	TACACAATCAAAGACGCCCTCGG	405	TACACAATCAAAGACGCCCT	828
15476	15498	CTATTCTCACCAGACCTCCTAGG	406	CTATTCTCACCAGACCTCCT	829
15590	15612	CGATCCGTCCCTAACAAACTAGG	407	CGATCCGTCCCTAACAAACT	830
15593	15615	TCCGTCCCTAACAAACTAGGAGG	408	TCCGTCCCTAACAAACTAGG	831
15740	15762	CTCCTCATTCTAACCTGAATCGG	409	CTCCTCATTCTAACCTGAAT	832

[0290]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有gRNA靶序列随后NGG的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
15743	15765	CTCATTCTAACCTGAATCGGAGG	410	CTCATTCTAACCTGAATCGG	833
15776	15798	AGCTACCCTTTTACCATCATTGG	411	AGCTACCCTTTTACCATCAT	834
15861	15883	TTGAAAACAAAATACTCAAATGG	412	TTGAAAACAAAATACTCAAA	835
15862	15884	TGAAAACAAAATACTCAAATGGG	413	TGAAAACAAAATACTCAAAT	836
15906	15928	AATACACCAGTCTTGTAAACCGG	414	AATACACCAGTCTTGTAAAC	837
15928	15950	GAGATGAAAACCTTTTCCAAGG	415	GAGATGAAAACCTTTTTCCA	838
16012	16034	AACTATTCTCTGTTCTTTCATGG	416	AACTATTCTCTGTTCTTTCA	839
16013	16035	ACTATTCTCTGTTCTTTCATGGG	417	ACTATTCTCTGTTCTTTCAT	840
16014	16036	CTATTCTCTGTTCTTTCATGGGG	418	CTATTCTCTGTTCTTTCATG	841
16026	16048	CTTTCATGGGGAAGCAGATTTGG	419	CTTTCATGGGGAAGCAGATT	842
16027	16049	TTTCATGGGGAAGCAGATTTGGG	420	TTTCATGGGGAAGCAGATTT	843
16108	16130	CAGCCACCATGAATATTGTACGG	421	CAGCCACCATGAATATTGTA	844
16252	16274	AAAGCCACCCCTCACCCACTAGG	422	AAAGCCACCCCTCACCCACT	845
16348	16370	CAAATCCCTTCTCGTCCCCATGG	423	CAAATCCCTTCTCGTCCCCA	846

[0291]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有gRNA靶序列随后NGG的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
16367	16389	ATGGATGACCCCCCTCAGATAGG	424	ATGGATGACCCCCCTCAGAT	847
16368	16390	TGGATGACCCCCCTCAGATAGGG	425	TGGATGACCCCCCTCAGATA	848
16369	16391	GGATGACCCCCCTCAGATAGGGG	426	GGATGACCCCCCTCAGATAG	849
16434	16456	GAGTGCTACTCTCCTCGCTCCGG	427	GAGTGCTACTCTCCTCGCTC	850
16435	16457	AGTGCTACTCTCCTCGCTCCGGG	428	AGTGCTACTCTCCTCGCTCC	851
16449	16471	CGCTCCGGGCCCATAACACTTGG	429	CGCTCCGGGCCCATAACACT	852
16450	16472	GCTCCGGGCCCATAACACTTGGG	430	GCTCCGGGCCCATAACACTT	853
16451	16473	CTCCGGGCCCATAACACTTGGGG	431	CTCCGGGCCCATAACACTTG	854
16452	16474	TCCGGGCCCATAACACTTGGGGG	432	TCCGGGCCCATAACACTTGG	855
16482	16504	AGTGAACTGTATCCGACATCTGG	433	AGTGAACTGTATCCGACATC	856
16495	16517	CGACATCTGGTTCCTACTTCAGG	434	CGACATCTGGTTCCTACTTC	857
16496	16518	GACATCTGGTTCCTACTTCAGGG	435	GACATCTGGTTCCTACTTCA	858

[0292] 表4.在(-)链上携带NGG序列的人mtDNA的gRNA靶序列。

[0293]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
17	39	CCCTATTAACCACTCACGGGAGC	859	GCTCCCGTGAGTGGTTAATA	2628
18	40	CCTATTAACCACTCACGGGAGCT	860	AGCTCCCGTGAGTGGTTAAT	2629
26	48	CCACTCACGGGAGCTCTCCATGC	861	GCATGGAGAGCTCCCGTGAG	2630
43	65	CCATGCATTTGGTATTTTCGTCT	862	AGACGAAAATACCAAATGCA	2631
104	126	CCGGAGCACCCTATGTCGCAGTA	863	TACTGCGACATAGGGTGCTC	2632
112	134	CCCTATGTCGCAGTATCTGTCTT	864	AAGACAGATACTGCGACATA	2633
113	135	CCTATGTCGCAGTATCTGTCTTT	865	AAAGACAGATACTGCGACAT	2634
140	162	CCTGCCTCATCCTATTATTTATC	866	GATAAATAATAGGATGAGGC	2635
144	166	CCTCATCCTATTATTTATCGCAC	867	GTGCGATAAATAATAGGATG	2636
150	172	CCTATTATTTATCGCACCTACGT	868	ACGTAGGTGCGATAAATAAT	2637
166	188	CCTACGTTCAATATTACAGGCGA	869	TCGCCTGTAATATTGAACGT	2638
261	283	CCACTTTCCACACAGACATCATA	870	TATGATGTCTGTGTGGAAAG	2639
268	290	CCACACAGACATCATAACAAAAA	871	TTTTTGTTATGATGTCTGTG	2640
298	320	CCAAACCCCCCCTCCC	872	GAAGCGGGGGAGGG	2641

[0294]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		CCGCTTC		GGGGTT	
304	326	CCCCCCTCCCCCGCTTCTGGCCA	873	TGGCCAGAAGCGGGGGAGGG	2642
305	327	CCCCCTCCCCCGCTTCTGGCCAC	874	GTGGCCAGAAGCGGGGGAGG	2643
306	328	CCCCTCCCCCGCTTCTGGCCACA	875	TGTGGCCAGAAGCGGGGGAG	2644
307	329	CCCTCCCCCGCTTCTGGCCACAG	876	CTGTGGCCAGAAGCGGGGGA	2645
308	330	CCTCCCCCGCTTCTGGCCACAGC	877	GCTGTGGCCAGAAGCGGGGG	2646
311	333	CCCCCGCTTCTGGCCACAGCACT	878	AGTGCTGTGGCCAGAAGCGG	2647
312	334	CCCCGCTTCTGGCCACAGCACTT	879	AAGTGCTGTGGCCAGAAGCG	2648
313	335	CCCGCTTCTGGCCACAGCACTTA	880	TAAGTGCTGTGGCCAGAAGC	2649
314	336	CCGCTTCTGGCCACAGCACTTAA	881	TTAAGTGCTGTGGCCAGAAG	2650
324	346	CCACAGCACTTAAACACATCTCT	882	AGAGATGTGTTTAAGTGCTG	2651
348	370	CCAAACCCCAAAAACAAAGAACC	883	GGTTCTTTGTTTTTGGGGTT	2652
353	375	CCCCAAAAACAAAGAACCCTAAC	884	GTTAGGGTTCTTTGTTTTTG	2653
354	376	CCCAAAAACAAAGAACCCTAACA	885	TGTTAGGGTTCTTTGTTTTT	2654

[0295]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
355	377	CCAAAAACAAAGAACCCTAACAC	886	GTGTTAGGGTTCTTTGTTTT	2655
369	391	CCCTAACACCAGCCTAACCAGAT	887	ATCTGGTTAGGCTGGTGTTA	2656
370	392	CCTAACACCAGCCTAACCAGATT	888	AATCTGGTTAGGCTGGTGTT	2657
377	399	CCAGCCTAACCAGATTTCAAATT	889	AATTTGAAATCTGGTTAGGC	2658
381	403	CCTAACCAGATTTCAAATTTTAT	890	ATAAAATTTGAAATCTGGTT	2659
386	408	CCAGATTTCAAATTTTATCTTTT	891	AAAAGATAAAATTTGAAATC	2660
433	455	CCCCCCAACTAACACATTATTTT	892	AAAATAATGTGTTAGTTGGG	2661
434	456	CCCCCAACTAACACATTATTTTC	893	GAAAATAATGTGTTAGTTGG	2662
435	457	CCCCAACTAACACATTATTTTCC	894	GGAAAATAATGTGTTAGTTG	2663
436	458	CCCAACTAACACATTATTTTCCC	895	GGGAAAATAATGTGTTAGTT	2664
437	459	CCAACTAACACATTATTTTCCCC	896	GGGGAAAATAATGTGTTAGT	2665
456	478	CCCCTCCCACTCCCATACTACTA	897	TAGTAGTATGGGAGTGGGAG	2666
457	479	CCCTCCCACTCCCATACTACTAA	898	TTAGTAGTATGGGAGTGGGA	2667
458	480	CCTCCCACTCCCATAC	899	ATTAGTAGTATGGGA	2668

[0296]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		TACTAAT		GTGGG	
461	483	CCCACTCCCATACTACTAATCTC	900	GAGATTAGTAGTATGGGAGT	2669
462	484	CCACTCCCATACTACTAATCTCA	901	TGAGATTAGTAGTATGGGAG	2670
467	489	CCCATACTACTAATCTCATCAAT	902	ATTGATGAGATTAGTAGTAT	2671
468	490	CCATACTACTAATCTCATCAATA	903	TATTGATGAGATTAGTAGTA	2672
494	516	CCCCCGCCCATCCTACCCAGCAC	904	GTGCTGGGTAGGATGGGCGG	2673
495	517	CCCCGCCCATCCTACCCAGCACA	905	TGTGCTGGGTAGGATGGGCG	2674
496	518	CCCGCCCATCCTACCCAGCACAC	906	GTGTGCTGGGTAGGATGGGC	2675
497	519	CCGCCCATCCTACCCAGCACACA	907	TGTGTGCTGGGTAGGATGGG	2676
500	522	CCCATCCTACCCAGCACACACAC	908	GTGTGTGTGCTGGGTAGGAT	2677
501	523	CCATCCTACCCAGCACACACACA	909	TGTGTGTGTGCTGGGTAGGA	2678
505	527	CCTACCCAGCACACACACACCGC	910	GCGGTGTGTGTGTGCTGGGT	2679
509	531	CCCAGCACACACACACCGCTGCT	911	AGCAGCGGTGTGTGTGTGCT	2680
510	532	CCAGCACACACACACCGCTGCTA	912	TAGCAGCGGTGTGTGTGTGC	2681

[0297]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
524	546	CCGCTGCTAACCCCATACCCCGA	913	TCGGGGTATGGGGTTAGCAG	2682
534	556	CCCCATACCCCGAACCAACCAAA	914	TTTGGTTGGTTCGGGGTATG	2683
535	557	CCCATACCCCGAACCAACCAAAC	915	GTTTGGTTGGTTCGGGGTAT	2684
536	558	CCATACCCCGAACCAACCAAACC	916	GGTTTGGTTGGTTCGGGGTA	2685
541	563	CCCCGAACCAACCAAACCCCAAA	917	TTTGGGGTTTGGTTGGTTCG	2686
542	564	CCCGAACCAACCAAACCCCAAAG	918	CTTTGGGGTTTGGTTGGTTC	2687
543	565	CCGAACCAACCAAACCCCAAAGA	919	TCTTTGGGGTTTGGTTGGTT	2688
548	570	CCAACCAAACCCCAAAGACACCC	920	GGGTGTCTTTGGGGTTTGGT	2689
552	574	CCAAACCCCAAAGACACCCCCA	921	TGGGGGGTGTCTTTGGGGTT	2690
557	579	CCCCAAAGACACCCCCCACAGTT	922	AACTGTGGGGGGTGTCTTTG	2691
558	580	CCCAAAGACACCCCCCACAGTTT	923	AAACTGTGGGGGGTGTCTTT	2692
559	581	CCAAAGACACCCCCCACAGTTTA	924	TAAACTGTGGGGGGTGTCTT	2693
568	590	CCCCCCACAGTTTATGTAGCTTA	925	TAAGCTACATAAACTGTGGG	2694
569	591	CCCCCACAGTTTATGT	926	GTAAGCTACATAAAC	2695

[0298]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		AGCTTAC		TGTGG	
570	592	CCCCACAGTTTATGTAGCTTACC	927	GGTAAGCTACATAAACTGTG	2696
571	593	CCCACAGTTTATGTAGCTTACCT	928	AGGTAAGCTACATAAACTGT	2697
572	594	CCACAGTTTATGTAGCTTACCTC	929	GAGGTAAGCTACATAAACTG	2698
591	613	CCTCCTCAAAGCAATACACTGAA	930	TTCAGTGTATTGCTTTGAGG	2699
594	616	CCTCAAAGCAATACACTGAAAAT	931	ATTTTCAGTGTATTGCTTTG	2700
637	659	CCCCATAAACAAATAGGTTTGGT	932	ACCAAACCTATTTGTTTATG	2701
638	660	CCCATAAACAAATAGGTTTGGTC	933	GACCAAACCTATTTGTTTAT	2702
639	661	CCATAAACAAATAGGTTTGGTCC	934	GGACCAAACCTATTTGTTTA	2703
660	682	CCTAGCCTTTCTATTAGCTCTTA	935	TAAGAGCTAATAGAAAGGCT	2704
665	687	CCTTTCTATTAGCTCTTAGTAAG	936	CTTACTAAGAGCTAATAGAA	2705
705	727	CCCCGTTCCAGTGAGTTCACCCT	937	AGGGTGAACTCACTGGAACG	2706
706	728	CCCGTTCCAGTGAGTTCACCCTC	938	GAGGGTGAACTCACTGGAAC	2707
707	729	CCGTTCCAGTGAGTTCACCCTCT	939	AGAGGGTGAACTCACTGGAA	2708

[0299]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
712	734	CCAGTGAGTTCACCCTCTAAATC	940	GATTTAGAGGGTGAACTCAC	2709
724	746	CCCTCTAAATCACCACGATCAAA	941	TTTGATCGTGGTGATTTAGA	2710
725	747	CCTCTAAATCACCACGATCAAAA	942	TTTTGATCGTGGTGATTTAG	2711
736	758	CCACGATCAAAAGGAACAAGCAT	943	ATGCTTGTTCCTTTTGATCG	2712
792	814	CCTAGCCACACCCCCACGGGAAA	944	TTTCCCGTGGGGGTGTGGCT	2713
797	819	CCACACCCCCACGGGAAACAGCA	945	TGCTGTTTCCCGTGGGGGTG	2714
802	824	CCCCCACGGGAAACAGCAGTGAT	946	ATCACTGCTGTTTCCCGTGG	2715
803	825	CCCCACGGGAAACAGCAGTGATT	947	AATCACTGCTGTTTCCCGTG	2716
804	826	CCCACGGGAAACAGCAGTGATTA	948	TAATCACTGCTGTTTCCCGT	2717
805	827	CCACGGGAAACAGCAGTGATTAA	949	TTAATCACTGCTGTTTCCCG	2718
828	850	CCTTTAGCAATAAACGAAAGTTT	950	AAACTTTCGTTTATTGCTAA	2719
867	889	CCCCAGGGTTGGTCAATTTCGTG	951	CACGAAATTGACCAACCCTG	2720
868	890	CCCAGGGTTGGTCAATTTCGTGC	952	GCACGAAATTGACCAACCCT	2721
869	891	CCAGGGTTGGTCAATT	953	GGCACGAAATTGACC	2722

[0300]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		TCGTGCC		AACCC	
890	912	CCAGCCACCGCGGTCACACGATT	954	AATCGTGTGACCGCGGTGGC	2723
894	916	CCACCGCGGTCACACGATTAACC	955	GGTTAATCGTGTGACCGCGG	2724
897	919	CCGCGGTCACACGATTAACCCAA	956	TTGGGTTAATCGTGTGACCG	2725
915	937	CCCAAGTCAATAGAAGCCGGCGT	957	ACGCCGGCTTCTATTGACTT	2726
916	938	CCAAGTCAATAGAAGCCGGCGTA	958	TACGCCGGCTTCTATTGACT	2727
931	953	CCGGCGTAAAGAGTGTTTTAGAT	959	ATCTAAAACACTCTTTACGC	2728
956	978	CCCCCTCCCCAATAAAGCTAAAA	960	TTTTAGCTTTATTGGGGAGG	2729
957	979	CCCCTCCCCAATAAAGCTAAAAC	961	GTTTTAGCTTTATTGGGGAG	2730
958	980	CCCTCCCCAATAAAGCTAAAACT	962	AGTTTTAGCTTTATTGGGGA	2731
959	981	CCTCCCCAATAAAGCTAAAACTC	963	GAGTTTTAGCTTTATTGGGG	2732
962	984	CCCCAATAAAGCTAAAACTCACC	964	GGTGAGTTTTAGCTTTATTG	2733
963	985	CCCAATAAAGCTAAAACTCACCT	965	AGGTGAGTTTTAGCTTTATT	2734
964	986	CCAATAAAGCTAAAACTCACCTG	966	CAGGTGAGTTTTAGCTTTAT	2735

[0301]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
983	1005	CCTGAGTTGTAAAAAACTCCAGT	967	ACTGGAGTTTTTTACAACTC	2736
1001	1023	CCAGTTGACACAAAATAGACTAC	968	GTAGTCTATTTTGTGTCAAC	2737
1064	1086	CCCAAACTGGGATTAGATACCCC	969	GGGGTATCTAATCCCAGTTT	2738
1065	1087	CCAAACTGGGATTAGATACCCCA	970	TGGGGTATCTAATCCCAGTT	2739
1083	1105	CCCCACTATGCTTAGCCCTAAAC	971	GTTTAGGGCTAAGCATAGTG	2740
1084	1106	CCCACTATGCTTAGCCCTAAACC	972	GGTTTAGGGCTAAGCATAGT	2741
1085	1107	CCACTATGCTTAGCCCTAAACCT	973	AGGTTTAGGGCTAAGCATAG	2742
1098	1120	CCCTAAACCTCAACAGTTAAATC	974	GATTTAACTGTTGAGGTTTA	2743
1099	1121	CCTAAACCTCAACAGTTAAATCA	975	TGATTTAACTGTTGAGGTTT	2744
1105	1127	CCTCAACAGTTAAATCAACAAAA	976	TTTTGTTGATTTAACTGTTG	2745
1135	1157	CCAGAACACTACGAGCCACAGCT	977	AGCTGTGGCTCGTAGTGTTC	2746
1150	1172	CCACAGCTTAAAACTCAAAGGAC	978	GTCCTTTGAGTTTTAAGCTG	2747
1172	1194	CCTGGCGGTGCTTCATATCCCTC	979	GAGGGATATGAAGCACCGCC	2748
1190	1212	CCCTCTAGAGGAGCCT	980	ACAGAACAGGCTCCT	2749

[0302]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		GTTCTGT		CTAGA	
1191	1213	CCTCTAGAGGAGCCTGTTCTGTA	981	TACAGAACAGGCTCCTCTAG	2750
1203	1225	CCTGTTCTGTAATCGATAAACCC	982	GGGTTTATCGATTACAGAAC	2751
1223	1245	CCCCGATCAACCTCACCACCTCT	983	AGAGGTGGTGAGGTTGATCG	2752
1224	1246	CCCGATCAACCTCACCACCTCTT	984	AAGAGGTGGTGAGGTTGATC	2753
1225	1247	CCGATCAACCTCACCACCTCTTG	985	CAAGAGGTGGTGAGGTTGAT	2754
1233	1255	CCTCACCACCTCTTGCTCAGCCT	986	AGGCTGAGCAAGAGGTGGTG	2755
1238	1260	CCACCTCTTGCTCAGCCTATATA	987	TATATAGGCTGAGCAAGAGG	2756
1241	1263	CCTCTTGCTCAGCCTATATACCG	988	CGGTATATAGGCTGAGCAAG	2757
1253	1275	CCTATATACCGCCATCTTCAGCA	989	TGCTGAAGATGGCGGTATAT	2758
1261	1283	CCGCCATCTTCAGCAAACCCTGA	990	TCAGGGTTTGCTGAAGATGG	2759
1264	1286	CCATCTTCAGCAAACCCTGATGA	991	TCATCAGGGTTTGCTGAAGA	2760
1278	1300	CCCTGATGAAGGCTACAAAGTAA	992	TTACTTTGTAGCCTTCATCA	2761
1279	1301	CCTGATGAAGGCTACAAAGTAAG	993	CTTACTTTGTAGCCTTCATC	2762

[0303]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
1310	1332	CCCACGTAAAGACGTTAGGTCAA	994	TTGACCTAACGTCTTTACGT	2763
1311	1333	CCACGTAAAGACGTTAGGTCAAG	995	CTTGACCTAACGTCTTTACG	2764
1340	1362	CCCATGAGGTGGCAAGAAATGGG	996	CCCATTTCTTGCCACCTCAT	2765
1341	1363	CCATGAGGTGGCAAGAAATGGGC	997	GCCCATTTCTTGCCACCTCA	2766
1375	1397	CCCCAGAAAACTACGATAGCCCT	998	AGGGCTATCGTAGTTTTCTG	2767
1376	1398	CCCAGAAAACTACGATAGCCCTT	999	AAGGGCTATCGTAGTTTTCT	2768
1377	1399	CCAGAAAACTACGATAGCCCTTA	1000	TAAGGGCTATCGTAGTTTTC	2769
1394	1416	CCCTTATGAAACTTAAGGGTCGA	1001	TCGACCCTTAAGTTTCATAA	2770
1395	1417	CCTTATGAAACTTAAGGGTCGAA	1002	TTCGACCCTTAAGTTTCATA	2771
1465	1487	CCCTGAAGCGCGTACACACCGCC	1003	GGCGGTGTGTACGCGCTTCA	2772
1466	1488	CCTGAAGCGCGTACACACCGCCC	1004	GGGCGGTGTGTACGCGCTTC	2773
1483	1505	CCGCCCGTCACCCTCCTCAAGTA	1005	TACTTGAGGAGGGTGACGGG	2774
1486	1508	CCCGTCACCCTCCTCAAGTATAC	1006	GTATACTTGAGGAGGGTGAC	2775
1487	1509	CCGTCACCCTCCTCAA	1007	AGTATACTTGAGGAG	2776

[0304]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		GTATACT		GGTGA	
1493	1515	CCCTCCTCAAGTATACTTCAAAG	1008	CTTTGAAGTATACTTGAGGA	2777
1494	1516	CCTCCTCAAGTATACTTCAAAGG	1009	CCTTTGAAGTATACTTGAGG	2778
1497	1519	CCTCAAGTATACTTCAAAGGACA	1010	TGTCCTTTGAAGTATACTTG	2779
1531	1553	CCCCTACGCATTTATATAGAGGA	1011	TCCTCTATATAAATGCGTAG	2780
1532	1554	CCCTACGCATTTATATAGAGGAG	1012	CTCCTCTATATAAATGCGTA	2781
1533	1555	CCTACGCATTTATATAGAGGAGA	1013	TCTCCTCTATATAAATGCGT	2782
1601	1623	CCAGAGTGTAGCTTAACACAAAG	1014	CTTTGTGTTAAGCTACACTC	2783
1626	1648	CCCAACTTACACTTAGGAGATTT	1015	AAATCTCCTAAGTGTAAGTT	2784
1627	1649	CCAACTTACACTTAGGAGATTTC	1016	GAAATCTCCTAAGTGTAAGT	2785
1662	1684	CCGCTCTGAGCTAAACCTAGCCC	1017	GGGCTAGGTTTAGCTCAGAG	2786
1677	1699	CCTAGCCCCAAACCCACTCCACC	1018	GGTGGAGTGGGTTTGGGGCT	2787
1682	1704	CCCCAAACCCACTCCACCTTACT	1019	AGTAAGGTGGAGTGGGTTTG	2788
1683	1705	CCCAAACCCACTCCACCTTACTA	1020	TAGTAAGGTGGAGTGGGTTT	2789

[0305]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
1684	1706	CCAAACCCACTCCACCTTACTAC	1021	GTAGTAAGGTGGAGTGGGTT	2790
1689	1711	CCCACTCCACCTTACTACCAGAC	1022	GTCTGGTAGTAAGGTGGAGT	2791
1690	1712	CCACTCCACCTTACTACCAGACA	1023	TGTCTGGTAGTAAGGTGGAG	2792
1695	1717	CCACCTTACTACCAGACAACCTT	1024	AAGGTTGTCTGGTAGTAAGG	2793
1698	1720	CCTTACTACCAGACAACCTTAGC	1025	GCTAAGGTTGTCTGGTAGTA	2794
1706	1728	CCAGACAACCTTAGCCAAACCAT	1026	ATGGTTTGGCTAAGGTTGTC	2795
1714	1736	CCTTAGCCAAACCATTTACCCAA	1027	TTGGGTAAATGGTTTGGCTA	2796
1720	1742	CCAAACCATTTACCCAAATAAAG	1028	CTTTATTTGGGTAAATGGTT	2797
1725	1747	CCATTTACCCAAATAAAGTATAG	1029	CTATACTTTATTTGGGTAAA	2798
1732	1754	CCCAAATAAAGTATAGGCGATAG	1030	CTATCGCCTATACTTTATTT	2799
1733	1755	CCAAATAAAGTATAGGCGATAGA	1031	TCTATCGCCTATACTTTATT	2800
1764	1786	CCTGGCGCAATAGATATAGTACC	1032	GGTACTATATCTATTGCGCC	2801
1785	1807	CCGCAAGGGAAAGATGAAAAATT	1033	AATTTTTCATCTTTCCCTTG	2802
1812	1834	CCAAGCATAATATAGC	1034	AGTCCTTGCTATATTA	2803

[0306]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		AAGGACT		TGCT	
1837	1859	CCCCTATACCTTCTGCATAATGA	1035	TCATTATGCAGAAGGTATAG	2804
1838	1860	CCCTATACCTTCTGCATAATGAA	1036	TTCATTATGCAGAAGGTATA	2805
1839	1861	CCTATACCTTCTGCATAATGAAT	1037	ATTCATTATGCAGAAGGTAT	2806
1845	1867	CCTTCTGCATAATGAATTAACTA	1038	TAGTTAATTCATTATGCAGA	2807
1889	1911	CCAAAGCTAAGACCCCCGAAACC	1039	GGTTTCGGGGGTCTTAGCTT	2808
1901	1923	CCCCCGAAACCAGACGAGCTACC	1040	GGTAGCTCGTCTGGTTTCGG	2809
1902	1924	CCCCGAAACCAGACGAGCTACCT	1041	AGGTAGCTCGTCTGGTTTCG	2810
1903	1925	CCCGAAACCAGACGAGCTACCTA	1042	TAGGTAGCTCGTCTGGTTTC	2811
1904	1926	CCGAAACCAGACGAGCTACCTAA	1043	TTAGGTAGCTCGTCTGGTTT	2812
1910	1932	CCAGACGAGCTACCTAAGAACAG	1044	CTGTTCTTAGGTAGCTCGTC	2813
1922	1944	CCTAAGAACAGCTAAAAGAGCAC	1045	GTGCTCTTTTAGCTGTTCTT	2814
1946	1968	CCCGTCTATGTAGCAAAATAGTG	1046	CACTATTTTGCTACATAGAC	2815
1947	1969	CCGTCTATGTAGCAAAATAGTGG	1047	CCACTATTTTGCTACATAGA	2816

[0307]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
1996	2018	CCTACCGAGCCTGGTGATAGCTG	1048	CAGCTATCACCAGGCTCGGT	2817
2000	2022	CCGAGCCTGGTGATAGCTGGTTG	1049	CAACCAGCTATCACCAGGCT	2818
2005	2027	CCTGGTGATAGCTGGTTGTCCAA	1050	TTGGACAACCAGCTATCACC	2819
2024	2046	CCAAGATAGAATCTTAGTTCAAC	1051	GTTGAACTAAGATTCTATCT	2820
2057	2079	CCCACAGAACCCTCTAAATCCCC	1052	GGGGATTTAGAGGGTTCTGT	2821
2058	2080	CCACAGAACCCTCTAAATCCCCT	1053	AGGGGATTTAGAGGGTTCTG	2822
2066	2088	CCCTCTAAATCCCCTTGTAAATT	1054	AATTTACAAGGGGATTTAGA	2823
2067	2089	CCTCTAAATCCCCTTGTAAATTT	1055	AAATTTACAAGGGGATTTAG	2824
2076	2098	CCCCTTGTAAATTTAACTGTTAG	1056	CTAACAGTTAAATTTACAAG	2825
2077	2099	CCCTTGTAAATTTAACTGTTAGT	1057	ACTAACAGTTAAATTTACAA	2826
2078	2100	CCTTGTAAATTTAACTGTTAGTC	1058	GACTAACAGTTAAATTTACA	2827
2100	2122	CCAAAGAGGAACAGCTCTTTGGA	1059	TCCAAAGAGCTGTTCCTCTT	2828
2136	2158	CCTTGTAGAGAGAGTAAAAAATT	1060	AATTTTTTACTCTCTCTACA	2829
2164	2186	CCCATAGTAGGCCTAA	1061	GCTGCTTTTAGGCCT	2830

[0308]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		AAGCAGC		ACTAT	
2165	2187	CCATAGTAGGCCTAAAAGCAGCC	1062	GGCTGCTTTTAGGCCTACTA	2831
2175	2197	CCTAAAAGCAGCCACCAATTAAG	1063	CTTAATTGGTGGCTGCTTTT	2832
2186	2208	CCACCAATTAAGAAAGCGTTCAA	1064	TTGAACGCTTTCTTAATTGG	2833
2189	2211	CCAATTAAGAAAGCGTTCAAGCT	1065	AGCTTGAACGCTTTCTTAAT	2834
2217	2239	CCCACTACCTAAAAAATCCCAAA	1066	TTTGGGATTTTTTAGGTAGT	2835
2218	2240	CCACTACCTAAAAAATCCCAAAC	1067	GTTTGGGATTTTTTAGGTAG	2836
2224	2246	CCTAAAAAATCCCAAACATATAA	1068	TTATATGTTTGGGATTTTTT	2837
2234	2256	CCCAAACATATAACTGAACTCCT	1069	AGGAGTTCAGTTATATGTTT	2838
2235	2257	CCAAACATATAACTGAACTCCTC	1070	GAGGAGTTCAGTTATATGTT	2839
2254	2276	CCTCACACCCAATTGGACCAATC	1071	GATTGGTCCAATTGGGTGTG	2840
2261	2283	CCCAATTGGACCAATCTATCACC	1072	GGTGATAGATTGGTCCAATT	2841
2262	2284	CCAATTGGACCAATCTATCACCC	1073	GGGTGATAGATTGGTCCAAT	2842
2271	2293	CCAATCTATCACCCTATAGAAGA	1074	TCTTCTATAGGGTGATAGAT	2843

[0309]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
2282	2304	CCCTATAGAAGAACTAATGTTAG	1075	CTAACATTAGTTCTTCTATA	2844
2283	2305	CCTATAGAAGAACTAATGTTAGT	1076	ACTAACATTAGTTCTTCTAT	2845
2328	2350	CCTCCGCATAAGCCTGCGTCAGA	1077	TCTGACGCAGGCTTATGCGG	2846
2331	2353	CCGCATAAGCCTGCGTCAGATTA	1078	TAATCTGACGCAGGCTTATG	2847
2340	2362	CCTGCGTCAGATTAAAACACTGA	1079	TCAGTGTTTTAATCTGACGC	2848
2378	2400	CCCAATATCTACAATCAACCAAC	1080	GTTGGTTGATTGTAGATATT	2849
2379	2401	CCAATATCTACAATCAACCAACA	1081	TGTTGGTTGATTGTAGATAT	2850
2396	2418	CCAACAAGTCATTATTACCCTCA	1082	TGAGGGTAATAATGACTTGT	2851
2413	2435	CCCTCACTGTCAACCCAACACAG	1083	CTGTGTTGGGTTGACAGTGA	2852
2414	2436	CCTCACTGTCAACCCAACACAGG	1084	CCTGTGTTGGGTTGACAGTG	2853
2426	2448	CCCAACACAGGCATGCTCATAAG	1085	CTTATGAGCATGCCTGTGTT	2854
2427	2449	CCAACACAGGCATGCTCATAAGG	1086	CCTTATGAGCATGCCTGTGT	2855
2488	2510	CCCCGCCTGTTTACCAAAAACAT	1087	ATGTTTTTGGTAAACAGGCG	2856
2489	2511	CCCGCCTGTTTACCAA	1088	GATGTTTTTGGTAAA	2857

[0310]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		AAACATC		CAGGC	
2490	2512	CCGCCTGTTTACCAAAAACATCA	1089	TGATGTTTTTGGTAAACAGG	2858
2493	2515	CCTGTTTACCAAAAACATCACCT	1090	AGGTGATGTTTTTGGTAAAC	2859
2501	2523	CCAAAAACATCACCTCTAGCATC	1091	GATGCTAGAGGTGATGTTTT	2860
2513	2535	CCTCTAGCATCACCAGTATTAGA	1092	TCTAATACTGGTGATGCTAG	2861
2525	2547	CCAGTATTAGAGGCACCGCCTGC	1093	GCAGGCGGTGCCTCTAATAC	2862
2540	2562	CCGCCTGCCCAGTGACACATGTT	1094	AACATGTGTCACTGGGCAGG	2863
2543	2565	CCTGCCCAGTGACACATGTTTAA	1095	TTAAACATGTGTCACTGGGC	2864
2547	2569	CCCAGTGACACATGTTTAACGGC	1096	GCCGTTAAACATGTGTCACT	2865
2548	2570	CCAGTGACACATGTTTAACGGCC	1097	GGCCGTTAAACATGTGTCAC	2866
2569	2591	CCGCGGTACCCTAACCGTGCAAA	1098	TTTGCACGGTTAGGGTACCG	2867
2577	2599	CCCTAACCGTGCAAAGGTAGCAT	1099	ATGCTACCTTTGCACGGTTA	2868
2578	2600	CCTAACCGTGCAAAGGTAGCATA	1100	TATGCTACCTTTGCACGGTT	2869
2583	2605	CCGTGCAAAGGTAGCATAATCAC	1101	GTGATTATGCTACCTTTGCA	2870

[0311]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
2611	2633	CCTTAAATAGGGACCTGTATGAA	1102	TTCATACAGGTCCCTATTTA	2871
2624	2646	CCTGTATGAATGGCTCCACGAGG	1103	CCTCGTGGAGCCATTCATAC	2872
2639	2661	CCACGAGGGTTCAGCTGTCTCTT	1104	AAGAGACAGCTGAACCCTCG	2873
2670	2692	CCAGTGAAATTGACCTGCCCGTG	1105	CACGGGCAGGTCAATTTCAC	2874
2683	2705	CCTGCCCGTGAAGAGGCGGGCAT	1106	ATGCCCGCCTCTTCACGGGC	2875
2687	2709	CCCGTGAAGAGGCGGGCATAACA	1107	TGTTATGCCCGCCTCTTCAC	2876
2688	2710	CCGTGAAGAGGCGGGCATAACAC	1108	GTGTTATGCCCGCCTCTTCA	2877
2726	2748	CCCTATGGAGCTTTAATTTATTA	1109	TAATAAATTAAAGCTCCATA	2878
2727	2749	CCTATGGAGCTTTAATTTATTAA	1110	TTAATAAATTAAAGCTCCAT	2879
2761	2783	CCTAACAAACCCACAGGTCCTAA	1111	TTAGGACCTGTGGGTTTGTT	2880
2770	2792	CCCACAGGTCCTAAACTACCAAA	1112	TTTGGTAGTTTAGGACCTGT	2881
2771	2793	CCACAGGTCCTAAACTACCAAAC	1113	GTTTGGTAGTTTAGGACCTG	2882
2779	2801	CCTAAACTACCAAACCTGCATTA	1114	TAATGCAGGTTTGGTAGTTT	2883
2788	2810	CCAAACCTGCATTAAA	1115	CGAAATTTTTAATGC	2884

[0312]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		AATTTCG		AGGTT	
2793	2815	CCTGCATTAAAAATTTCGGTTGG	1116	CCAACCGAAATTTTTAATGC	2885
2821	2843	CCTCGGAGCAGAACCCAACCTCC	1117	GGAGGTTGGGTTCTGCTCCG	2886
2834	2856	CCCAACCTCCGAGCAGTACATGC	1118	GCATGTACTGCTCGGAGGTT	2887
2835	2857	CCAACCTCCGAGCAGTACATGCT	1119	AGCATGTACTGCTCGGAGGT	2888
2839	2861	CCTCCGAGCAGTACATGCTAAGA	1120	TCTTAGCATGTACTGCTCGG	2889
2842	2864	CCGAGCAGTACATGCTAAGACTT	1121	AAGTCTTAGCATGTACTGCT	2890
2867	2889	CCAGTCAAAGCGAACTACTATAC	1122	GTATAGTAGTTCGCTTTGAC	2891
2899	2921	CCAATAACTTGACCAACGGAACA	1123	TGTTCCGTTGGTCAAGTTAT	2892
2911	2933	CCAACGGAACAAGTTACCCTAGG	1124	CCTAGGGTAACTTGTTCCGT	2893
2927	2949	CCCTAGGGATAACAGCGCAATCC	1125	GGATTGCGCTGTTATCCCTA	2894
2928	2950	CCTAGGGATAACAGCGCAATCCT	1126	AGGATTGCGCTGTTATCCCT	2895
2948	2970	CCTATTCTAGAGTCCATATCAAC	1127	GTTGATATGGACTCTAGAAT	2896
2961	2983	CCATATCAACAATAGGGTTTACG	1128	CGTAAACCCTATTGTTGATA	2897

[0313]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
2985	3007	CCTCGATGTTGGATCAGGACATC	1129	GATGTCCTGATCCAACATCG	2898
3007	3029	CCCGATGGTGCAGCCGCTATTAA	1130	TTAATAGCGGCTGCACCATC	2899
3008	3030	CCGATGGTGCAGCCGCTATTAAA	1131	TTTAATAGCGGCTGCACCAT	2900
3020	3042	CCGCTATTAAAGGTTCGTTTGTT	1132	AACAAACGAACCTTTAATAG	2901
3056	3078	CCTACGTGATCTGAGTTCAGACC	1133	GGTCTGAACTCAGATCACGT	2902
3077	3099	CCGGAGTAATCCAGGTCGGTTTC	1134	GAAACCGACCTGGATTACTC	2903
3087	3109	CCAGGTCGGTTTCTATCTACNTT	1135	AANGTAGATAGAAACCGACC	2904
3116	3138	CCTCCCTGTACGAAAGGACAAGA	1136	TCTTGTCCTTTCGTACAGGG	2905
3119	3141	CCCTGTACGAAAGGACAAGAGAA	1137	TTCTCTTGTCCTTTCGTACA	2906
3120	3142	CCTGTACGAAAGGACAAGAGAAA	1138	TTTCTCTTGTCCTTTCGTAC	2907
3148	3170	CCTACTTCACAAAGCGCCTTCCC	1139	GGGAAGGCGCTTTGTGAAGT	2908
3164	3186	CCTTCCCCCGTAAATGATATCAT	1140	ATGATATCATTTACGGGGGA	2909
3168	3190	CCCCCGTAAATGATATCATCTCA	1141	TGAGATGATATCATTTACGG	2910
3169	3191	CCCCGTAAATGATATC	1142	TTGAGATGATATCAT	2911

[0314]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		ATCTCAA		TTACG	
3170	3192	CCCGTAAATGATATCATCTCAAC	1143	GTTGAGATGATATCATTTAC	2912
3171	3193	CCGTAAATGATATCATCTCAACT	1144	AGTTGAGATGATATCATTTA	2913
3204	3226	CCCACACCCACCCAAGAACAGGG	1145	CCCTGTTCTTGGGTGGGTGT	2914
3205	3227	CCACACCCACCCAAGAACAGGGT	1146	ACCCTGTTCTTGGGTGGGTG	2915
3210	3232	CCCACCCAAGAACAGGGTTTGTT	1147	AACAAACCCTGTTCTTGGGT	2916
3211	3233	CCACCCAAGAACAGGGTTTGTTA	1148	TAACAAACCCTGTTCTTGGG	2917
3214	3236	CCCAAGAACAGGGTTTGTTAAGA	1149	TCTTAACAAACCCTGTTCTT	2918
3215	3237	CCAAGAACAGGGTTTGTTAAGAT	1150	ATCTTAACAAACCCTGTTCT	2919
3245	3267	CCCGGTAATCGCATAAAACTTAA	1151	TTAAGTTTTATGCGATTACC	2920
3246	3268	CCGGTAATCGCATAAAACTTAAA	1152	TTTAAGTTTTATGCGATTAC	2921
3292	3314	CCTCTTCTTAACAACATACCCAT	1153	ATGGGTATGTTGTTAAGAAG	2922
3310	3332	CCCATGGCCAACCTCCTACTCCT	1154	AGGAGTAGGAGGTTGGCCAT	2923
3311	3333	CCATGGCCAACCTCCTACTCCTC	1155	GAGGAGTAGGAGGTTGGCCA	2924

[0315]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
3317	3339	CCAACCTCCTACTCCTCATTGTA	1156	TACAATGAGGAGTAGGAGGT	2925
3321	3343	CCTCCTACTCCTCATTGTACCCA	1157	TGGGTACAATGAGGAGTAGG	2926
3324	3346	CCTACTCCTCATTGTACCCATTC	1158	GAATGGGTACAATGAGGAGT	2927
3330	3352	CCTCATTGTACCCATTCTAATCG	1159	CGATTAGAATGGGTACAATG	2928
3340	3362	CCCATTCTAATCGCAATGGCATT	1160	AATGCCATTGCGATTAGAAT	2929
3341	3363	CCATTCTAATCGCAATGGCATTC	1161	GAATGCCATTGCGATTAGAA	2930
3363	3385	CCTAATGCTTACCGAACGAAAAA	1162	TTTTTCGTTCGGTAAGCATT	2931
3374	3396	CCGAACGAAAAATTCTAGGCTAT	1163	ATAGCCTAGAATTTTTCGTT	2932
3414	3436	CCCCAACGTTGTAGGCCCCTACG	1164	CGTAGGGGCCTACAACGTTG	2933
3415	3437	CCCAACGTTGTAGGCCCCTACGG	1165	CCGTAGGGGCCTACAACGTT	2934
3416	3438	CCAACGTTGTAGGCCCCTACGGG	1166	CCCGTAGGGGCCTACAACGT	2935
3429	3451	CCCCTACGGGCTACTACAACCCT	1167	AGGGTTGTAGTAGCCCGTAG	2936
3430	3452	CCCTACGGGCTACTACAACCCTT	1168	AAGGGTTGTAGTAGCCCGTA	2937
3431	3453	CCTACGGGCTACTACA	1169	GAAGGGTTGTAGTAG	2938

[0316]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		ACCCTTC		CCCGT	
3448	3470	CCCTTCGCTGACGCCATAAAACT	1170	AGTTTTATGGCGTCAGCGAA	2939
3449	3471	CCTTCGCTGACGCCATAAAACTC	1171	GAGTTTTATGGCGTCAGCGA	2940
3461	3483	CCATAAAACTCTTCACCAAAGAG	1172	CTCTTTGGTGAAGAGTTTTA	2941
3476	3498	CCAAAGAGCCCCTAAAACCCGCC	1173	GGCGGGTTTTAGGGGCTCTT	2942
3484	3506	CCCCTAAAACCCGCCACATCTAC	1174	GTAGATGTGGCGGGTTTTAG	2943
3485	3507	CCCTAAAACCCGCCACATCTACC	1175	GGTAGATGTGGCGGGTTTTA	2944
3486	3508	CCTAAAACCCGCCACATCTACCA	1176	TGGTAGATGTGGCGGGTTTT	2945
3493	3515	CCCGCCACATCTACCATCACCCT	1177	AGGGTGATGGTAGATGTGGC	2946
3494	3516	CCGCCACATCTACCATCACCCTC	1178	GAGGGTGATGGTAGATGTGG	2947
3497	3519	CCACATCTACCATCACCCTCTAC	1179	GTAGAGGGTGATGGTAGATG	2948
3506	3528	CCATCACCCTCTACATCACCGCC	1180	GGCGGTGATGTAGAGGGTGA	2949
3512	3534	CCCTCTACATCACCGCCCCGACC	1181	GGTCGGGGCGGTGATGTAGA	2950
3513	3535	CCTCTACATCACCGCCCCGACCT	1182	AGGTCGGGGCGGTGATGTAG	2951

[0317]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
3524	3546	CCGCCCCGACCTTAGCTCTCACC	1183	GGTGAGAGCTAAGGTCGGGG	2952
3527	3549	CCCCGACCTTAGCTCTCACCATC	1184	GATGGTGAGAGCTAAGGTCG	2953
3528	3550	CCCGACCTTAGCTCTCACCATCG	1185	CGATGGTGAGAGCTAAGGTC	2954
3529	3551	CCGACCTTAGCTCTCACCATCGC	1186	GCGATGGTGAGAGCTAAGGT	2955
3533	3555	CCTTAGCTCTCACCATCGCTCTT	1187	AAGAGCGATGGTGAGAGCTA	2956
3545	3567	CCATCGCTCTTCTACTATGAACC	1188	GGTTCATAGTAGAAGAGCGA	2957
3566	3588	CCCCCCTCCCCATACCCAACCCC	1189	GGGGTTGGGTATGGGGAGGG	2958
3567	3589	CCCCCTCCCCATACCCAACCCCC	1190	GGGGGTTGGGTATGGGGAGG	2959
3568	3590	CCCCTCCCCATACCCAACCCCCT	1191	AGGGGGTTGGGTATGGGGAG	2960
3569	3591	CCCTCCCCATACCCAACCCCCTG	1192	CAGGGGGTTGGGTATGGGGA	2961
3570	3592	CCTCCCCATACCCAACCCCCTGG	1193	CCAGGGGGTTGGGTATGGGG	2962
3573	3595	CCCCATACCCAACCCCCTGGTCA	1194	TGACCAGGGGGTTGGGTATG	2963
3574	3596	CCCATACCCAACCCCCTGGTCAA	1195	TTGACCAGGGGGTTGGGTAT	2964
3575	3597	CCATACCCAACCCCCT	1196	GTTGACCAGGGGGTT	2965

[0318]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		GGTCAAC		GGGTA	
3580	3602	CCCAACCCCCTGGTCAACCTCAA	1197	TTGAGGTTGACCAGGGGGTT	2966
3581	3603	CCAACCCCCTGGTCAACCTCAAC	1198	GTTGAGGTTGACCAGGGGGT	2967
3585	3607	CCCCCTGGTCAACCTCAACCTAG	1199	CTAGGTTGAGGTTGACCAGG	2968
3586	3608	CCCCTGGTCAACCTCAACCTAGG	1200	CCTAGGTTGAGGTTGACCAG	2969
3587	3609	CCCTGGTCAACCTCAACCTAGGC	1201	GCCTAGGTTGAGGTTGACCA	2970
3588	3610	CCTGGTCAACCTCAACCTAGGCC	1202	GGCCTAGGTTGAGGTTGACC	2971
3597	3619	CCTCAACCTAGGCCTCCTATTTA	1203	TAAATAGGAGGCCTAGGTTG	2972
3603	3625	CCTAGGCCTCCTATTTATTCTAG	1204	CTAGAATAAATAGGAGGCCT	2973
3609	3631	CCTCCTATTTATTCTAGCCACCT	1205	AGGTGGCTAGAATAAATAGG	2974
3612	3634	CCTATTTATTCTAGCCACCTCTA	1206	TAGAGGTGGCTAGAATAAAT	2975
3626	3648	CCACCTCTAGCCTAGCCGTTTAC	1207	GTAAACGGCTAGGCTAGAGG	2976
3629	3651	CCTCTAGCCTAGCCGTTTACTCA	1208	TGAGTAAACGGCTAGGCTAG	2977
3636	3658	CCTAGCCGTTTACTCAATCCTCT	1209	AGAGGATTGAGTAAACGGCT	2978

[0319]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
3641	3663	CCGTTTACTCAATCCTCTGATCA	1210	TGATCAGAGGATTGAGTAAA	2979
3654	3676	CCTCTGATCAGGGTGAGCATCAA	1211	TTGATGCTCACCCTGATCAG	2980
3689	3711	CCCTGATCGGCGCACTGCGAGCA	1212	TGCTCGCAGTGCGCCGATCA	2981
3690	3712	CCTGATCGGCGCACTGCGAGCAG	1213	CTGCTCGCAGTGCGCCGATC	2982
3716	3738	CCCAAACAATCTCATATGAAGTC	1214	GACTTCATATGAGATTGTTT	2983
3717	3739	CCAAACAATCTCATATGAAGTCA	1215	TGACTTCATATGAGATTGTT	2984
3740	3762	CCCTAGCCATCATTCTACTATCA	1216	TGATAGTAGAATGATGGCTA	2985
3741	3763	CCTAGCCATCATTCTACTATCAA	1217	TTGATAGTAGAATGATGGCT	2986
3746	3768	CCATCATTCTACTATCAACATTA	1218	TAATGTTGATAGTAGAATGA	2987
3782	3804	CCTTTAACCTCTCCACCCTTATC	1219	GATAAGGGTGGAGAGGTTAA	2988
3789	3811	CCTCTCCACCCTTATCACAACAC	1220	GTGTTGTGATAAGGGTGGAG	2989
3794	3816	CCACCCTTATCACAACACAAGAA	1221	TTCTTGTGTTGTGATAAGGG	2990
3797	3819	CCCTTATCACAACACAAGAACAC	1222	GTGTTCTTGTGTTGTGATAA	2991
3798	3820	CCTTATCACAACACAA	1223	GGTGTTCTTGTGTTGT	2992

[0320]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		GAACACC		GATA	
3819	3841	CCTCTGATTACTCCTGCCATCAT	1224	ATGATGGCAGGAGTAATCAG	2993
3831	3853	CCTGCCATCATGACCCTTGGCCA	1225	TGGCCAAGGGTCATGATGGC	2994
3835	3857	CCATCATGACCCTTGGCCATAAT	1226	ATTATGGCCAAGGGTCATGA	2995
3844	3866	CCCTTGGCCATAATATGATTTAT	1227	ATAAATCATATTATGGCCAA	2996
3845	3867	CCTTGGCCATAATATGATTTATC	1228	GATAAATCATATTATGGCCA	2997
3851	3873	CCATAATATGATTTATCTCCACA	1229	TGTGGAGATAAATCATATTA	2998
3869	3891	CCACACTAGCAGAGACCAACCGA	1230	TCGGTTGGTCTCTGCTAGTG	2999
3884	3906	CCAACCGAACCCCCTTCGACCTT	1231	AAGGTCGAAGGGGGTTCGGT	3000
3888	3910	CCGAACCCCCTTCGACCTTGCCG	1232	CGGCAAGGTCGAAGGGGGTT	3001
3893	3915	CCCCCTTCGACCTTGCCGAAGGG	1233	CCCTTCGGCAAGGTCGAAGG	3002
3894	3916	CCCCTTCGACCTTGCCGAAGGGG	1234	CCCCTTCGGCAAGGTCGAAG	3003
3895	3917	CCCTTCGACCTTGCCGAAGGGGA	1235	TCCCCTTCGGCAAGGTCGAA	3004
3896	3918	CCTTCGACCTTGCCGAAGGGGAG	1236	CTCCCCTTCGGCAAGGTCGA	3005

[0321]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
3903	3925	CCTTGCCGAAGGGGAGTCCGAAC	1237	GTTCGGACTCCCCTTCGGCA	3006
3908	3930	CCGAAGGGGAGTCCGAACTAGTC	1238	GACTAGTTCGGACTCCCCTT	3007
3920	3942	CCGAACTAGTCTCAGGCTTCAAC	1239	GTTGAAGCCTGAGACTAGTT	3008
3953	3975	CCGCAGGCCCCTTCGCCCTATTC	1240	GAATAGGGCGAAGGGGCCTG	3009
3960	3982	CCCCTTCGCCCTATTCTTCATAG	1241	CTATGAAGAATAGGGCGAAG	3010
3961	3983	CCCTTCGCCCTATTCTTCATAGC	1242	GCTATGAAGAATAGGGCGAA	3011
3962	3984	CCTTCGCCCTATTCTTCATAGCC	1243	GGCTATGAAGAATAGGGCGA	3012
3968	3990	CCCTATTCTTCATAGCCGAATAC	1244	GTATTCGGCTATGAAGAATA	3013
3969	3991	CCTATTCTTCATAGCCGAATACA	1245	TGTATTCGGCTATGAAGAAT	3014
3983	4005	CCGAATACACAAACATTATTATA	1246	TATAATAATGTTTGTGTATT	3015
4013	4035	CCCTCACCACTACAATCTTCCTA	1247	TAGGAAGATTGTAGTGGTGA	3016
4014	4036	CCTCACCACTACAATCTTCCTAG	1248	CTAGGAAGATTGTAGTGGTG	3017
4019	4041	CCACTACAATCTTCCTAGGAACA	1249	TGTTCCTAGGAAGATTGTAG	3018
4032	4054	CCTAGGAACAACATAT	1250	GTGCGTCATATGTTG	3019

[0322]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		GACGCAC		TTCCT	
4058	4080	CCCCTGAACTCTACACAACATAT	1251	ATATGTTGTGTAGAGTTCAG	3020
4059	4081	CCCTGAACTCTACACAACATATT	1252	AATATGTTGTGTAGAGTTCA	3021
4060	4082	CCTGAACTCTACACAACATATTT	1253	AAATATGTTGTGTAGAGTTC	3022
4088	4110	CCAAGACCCTACTTCTAACCTCC	1254	GGAGGTTAGAAGTAGGGTCT	3023
4094	4116	CCCTACTTCTAACCTCCCTGTTC	1255	GAACAGGGAGGTTAGAAGTA	3024
4095	4117	CCTACTTCTAACCTCCCTGTTCT	1256	AGAACAGGGAGGTTAGAAGT	3025
4106	4128	CCTCCCTGTTCTTATGAATTCGA	1257	TCGAATTCATAAGAACAGGG	3026
4109	4131	CCCTGTTCTTATGAATTCGAACA	1258	TGTTCGAATTCATAAGAACA	3027
4110	4132	CCTGTTCTTATGAATTCGAACAG	1259	CTGTTCGAATTCATAAGAAC	3028
4137	4159	CCCCCGATTCCGCTACGACCAAC	1260	GTTGGTCGTAGCGGAATCGG	3029
4138	4160	CCCCGATTCCGCTACGACCAACT	1261	AGTTGGTCGTAGCGGAATCG	3030
4139	4161	CCCGATTCCGCTACGACCAACTC	1262	GAGTTGGTCGTAGCGGAATC	3031
4140	4162	CCGATTCCGCTACGACCAACTCA	1263	TGAGTTGGTCGTAGCGGAAT	3032

[0323]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
4146	4168	CCGCTACGACCAACTCATACACC	1264	GGTGTATGAGTTGGTCGTAG	3033
4155	4177	CCAACTCATACACCTCCTATGAA	1265	TTCATAGGAGGTGTATGAGT	3034
4167	4189	CCTCCTATGAAAAAACTTCCTAC	1266	GTAGGAAGTTTTTTCATAGG	3035
4170	4192	CCTATGAAAAAACTTCCTACCAC	1267	GTGGTAGGAAGTTTTTTCAT	3036
4185	4207	CCTACCACTCACCCTAGCATTAC	1268	GTAATGCTAGGGTGAGTGGT	3037
4189	4211	CCACTCACCCTAGCATTACTTAT	1269	ATAAGTAATGCTAGGGTGAG	3038
4196	4218	CCCTAGCATTACTTATATGATAT	1270	ATATCATATAAGTAATGCTA	3039
4197	4219	CCTAGCATTACTTATATGATATG	1271	CATATCATATAAGTAATGCT	3040
4223	4245	CCATACCCATTACAATCTCCAGC	1272	GCTGGAGATTGTAATGGGTA	3041
4228	4250	CCCATTACAATCTCCAGCATTCC	1273	GGAATGCTGGAGATTGTAAT	3042
4229	4251	CCATTACAATCTCCAGCATTCCC	1274	GGGAATGCTGGAGATTGTAA	3043
4241	4263	CCAGCATTCCCCCTCAAACCTAA	1275	TTAGGTTTGAGGGGGAATGC	3044
4249	4271	CCCCCTCAAACCTAAGAAATATG	1276	CATATTTCTTAGGTTTGAGG	3045
4250	4272	CCCCTCAAACCTAAGA	1277	ACATATTTCTTAGGTT	3046

[0324]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		AATATGT		TGAG	
4251	4273	CCCTCAAACCTAAGAAATATGTC	1278	GACATATTTCTTAGGTTTGA	3047
4252	4274	CCTCAAACCTAAGAAATATGTCT	1279	AGACATATTTCTTAGGTTTG	3048
4259	4281	CCTAAGAAATATGTCTGATAAAA	1280	TTTTATCAGACATATTTCTT	3049
4318	4340	CCCCCTTATTTCTAGGACTATGA	1281	TCATAGTCCTAGAAATAAGG	3050
4319	4341	CCCCTTATTTCTAGGACTATGAG	1282	CTCATAGTCCTAGAAATAAG	3051
4320	4342	CCCTTATTTCTAGGACTATGAGA	1283	TCTCATAGTCCTAGAAATAA	3052
4321	4343	CCTTATTTCTAGGACTATGAGAA	1284	TTCTCATAGTCCTAGAAATA	3053
4349	4371	CCCATCCCTGAGAATCCAAAATT	1285	AATTTTGGATTCTCAGGGAT	3054
4350	4372	CCATCCCTGAGAATCCAAAATTC	1286	GAATTTTGGATTCTCAGGGA	3055
4354	4376	CCCTGAGAATCCAAAATTCTCCG	1287	CGGAGAATTTTGGATTCTCA	3056
4355	4377	CCTGAGAATCCAAAATTCTCCGT	1288	ACGGAGAATTTTGGATTCTC	3057
4364	4386	CCAAAATTCTCCGTGCCACCTAT	1289	ATAGGTGGCACGGAGAATTT	3058
4374	4396	CCGTGCCACCTATCACACCCCAT	1290	ATGGGGTGTGATAGGTGGCA	3059

[0325]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
4379	4401	CCACCTATCACACCCCATCCTAA	1291	TTAGGATGGGGTGTGATAGG	3060
4382	4404	CCTATCACACCCCATCCTAAAGT	1292	ACTTTAGGATGGGGTGTGAT	3061
4391	4413	CCCCATCCTAAAGTAAGGTCAGC	1293	GCTGACCTTACTTTAGGATG	3062
4392	4414	CCCATCCTAAAGTAAGGTCAGCT	1294	AGCTGACCTTACTTTAGGAT	3063
4393	4415	CCATCCTAAAGTAAGGTCAGCTA	1295	TAGCTGACCTTACTTTAGGA	3064
4397	4419	CCTAAAGTAAGGTCAGCTAAATA	1296	TATTTAGCTGACCTTACTTT	3065
4430	4452	CCCATACCCCGAAAATGTTGGTT	1297	AACCAACATTTTCGGGGTAT	3066
4431	4453	CCATACCCCGAAAATGTTGGTTA	1298	TAACCAACATTTTCGGGGTA	3067
4436	4458	CCCCGAAAATGTTGGTTATACCC	1299	GGGTATAACCAACATTTTCG	3068
4437	4459	CCCGAAAATGTTGGTTATACCCT	1300	AGGGTATAACCAACATTTTC	3069
4438	4460	CCGAAAATGTTGGTTATACCCTT	1301	AAGGGTATAACCAACATTTT	3070
4456	4478	CCCTTCCCGTACTAATTAATCCC	1302	GGGATTAATTAGTACGGGAA	3071
4457	4479	CCTTCCCGTACTAATTAATCCCC	1303	GGGGATTAATTAGTACGGGA	3072
4461	4483	CCCGTACTAATTAATC	1304	GCCAGGGGATTAATT	3073

[0326]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		CCCTGGC		AGTAC	
4462	4484	CCGTACTAATTAATCCCCTGGCC	1305	GGCCAGGGGATTAATTAGTA	3074
4476	4498	CCCCTGGCCCAACCCGTCATCTA	1306	TAGATGACGGGTTGGGCCAG	3075
4477	4499	CCCTGGCCCAACCCGTCATCTAC	1307	GTAGATGACGGGTTGGGCCA	3076
4478	4500	CCTGGCCCAACCCGTCATCTACT	1308	AGTAGATGACGGGTTGGGCC	3077
4483	4505	CCCAACCCGTCATCTACTCTACC	1309	GGTAGAGTAGATGACGGGTT	3078
4484	4506	CCAACCCGTCATCTACTCTACCA	1310	TGGTAGAGTAGATGACGGGT	3079
4488	4510	CCCGTCATCTACTCTACCATCTT	1311	AAGATGGTAGAGTAGATGAC	3080
4489	4511	CCGTCATCTACTCTACCATCTTT	1312	AAAGATGGTAGAGTAGATGA	3081
4504	4526	CCATCTTTGCAGGCACACTCATC	1313	GATGAGTGTGCCTGCAAAGA	3082
4555	4577	CCTGAGTAGGCCTAGAAATAAAC	1314	GTTTATTTCTAGGCCTACTC	3083
4565	4587	CCTAGAAATAAACATGCTAGCTT	1315	AAGCTAGCATGTTTATTTCT	3084
4593	4615	CCAGTTCTAACCAAAAAAATAAA	1316	TTTATTTTTTTGGTTAGAAC	3085
4603	4625	CCAAAAAAATAAACCCTCGTTCC	1317	GGAACGAGGGTTTATTTTTT	3086

[0327]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
4616	4638	CCCTCGTTCCACAGAAGCTGCCA	1318	TGGCAGCTTCTGTGGAACGA	3087
4617	4639	CCTCGTTCCACAGAAGCTGCCAT	1319	ATGGCAGCTTCTGTGGAACG	3088
4624	4646	CCACAGAAGCTGCCATCAAGTAT	1320	ATACTTGATGGCAGCTTCTG	3089
4636	4658	CCATCAAGTATTTCCTCACGCAA	1321	TTGCGTGAGGAAATACTTGA	3090
4649	4671	CCTCACGCAAGCAACCGCATCCA	1322	TGGATGCGGTTGCTTGCGTG	3091
4663	4685	CCGCATCCATAATCCTTCTAATA	1323	TATTAGAAGGATTATGGATG	3092
4669	4691	CCATAATCCTTCTAATAGCTATC	1324	GATAGCTATTAGAAGGATTA	3093
4676	4698	CCTTCTAATAGCTATCCTCTTCA	1325	TGAAGAGGATAGCTATTAGA	3094
4691	4713	CCTCTTCAACAATATACTCTCCG	1326	CGGAGAGTATATTGTTGAAG	3095
4711	4733	CCGGACAATGAACCATAACCAAT	1327	ATTGGTTATGGTTCATTGTC	3096
4723	4745	CCATAACCAATACTACCAATCAA	1328	TTGATTGGTAGTATTGGTTA	3097
4729	4751	CCAATACTACCAATCAATACTCA	1329	TGAGTATTGATTGGTAGTAT	3098
4738	4760	CCAATCAATACTCATCATTAATA	1330	TATTAATGATGAGTATTGAT	3099
4795	4817	CCCCCTTTCACTTCTGA	1331	TGGGACTCAGAAGTG	3100

[0328]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		GTCCCA		AAAGG	
4796	4818	CCCCTTTCACTTCTGAGTCCCAG	1332	CTGGGACTCAGAAGTGAAAG	3101
4797	4819	CCCTTTCACTTCTGAGTCCCAGA	1333	TCTGGGACTCAGAAGTGAAA	3102
4798	4820	CCTTTCACTTCTGAGTCCCAGAG	1334	CTCTGGGACTCAGAAGTGAA	3103
4814	4836	CCCAGAGGTTACCCAAGGCACCC	1335	GGGTGCCTTGGGTAACCTCT	3104
4815	4837	CCAGAGGTTACCCAAGGCACCCC	1336	GGGGTGCCTTGGGTAACCTC	3105
4825	4847	CCCAAGGCACCCCTCTGACATCC	1337	GGATGTCAGAGGGGTGCCTT	3106
4826	4848	CCAAGGCACCCCTCTGACATCCG	1338	CGGATGTCAGAGGGGTGCCT	3107
4834	4856	CCCCTCTGACATCCGGCCTGCTT	1339	AAGCAGGCCGGATGTCAGAG	3108
4835	4857	CCCTCTGACATCCGGCCTGCTTC	1340	GAAGCAGGCCGGATGTCAGA	3109
4836	4858	CCTCTGACATCCGGCCTGCTTCT	1341	AGAAGCAGGCCGGATGTCAG	3110
4846	4868	CCGGCCTGCTTCTTCTCACATGA	1342	TCATGTGAGAAGAAGCAGGC	3111
4850	4872	CCTGCTTCTTCTCACATGACAAA	1343	TTTGTCATGTGAGAAGAAGC	3112
4879	4901	CCCCCATCTCAATCATATACCAA	1344	TTGGTATATGATTGAGATGG	3113

[0329]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
4880	4902	CCCCATCTCAATCATATACCAAA	1345	TTTGGTATATGATTGAGATG	3114
4881	4903	CCCATCTCAATCATATACCAAAT	1346	ATTTGGTATATGATTGAGAT	3115
4882	4904	CCATCTCAATCATATACCAAATC	1347	GATTTGGTATATGATTGAGA	3116
4898	4920	CCAAATCTCTCCCTCACTAAACG	1348	CGTTTAGTGAGGGAGAGATT	3117
4908	4930	CCCTCACTAAACGTAAGCCTTCT	1349	AGAAGGCTTACGTTTAGTGA	3118
4909	4931	CCTCACTAAACGTAAGCCTTCTC	1350	GAGAAGGCTTACGTTTAGTG	3119
4925	4947	CCTTCTCCTCACTCTCTCAATCT	1351	AGATTGAGAGAGTGAGGAGA	3120
4931	4953	CCTCACTCTCTCAATCTTATCCA	1352	TGGATAAGATTGAGAGAGTG	3121
4951	4973	CCATCATAGCAGGCAGTTGAGGT	1353	ACCTCAACTGCCTGCTATGA	3122
4982	5004	CCAAACCCAGCTACGCAAAATCT	1354	AGATTTTGCGTAGCTGGGTT	3123
4987	5009	CCCAGCTACGCAAAATCTTAGCA	1355	TGCTAAGATTTTGCGTAGCT	3124
4988	5010	CCAGCTACGCAAAATCTTAGCAT	1356	ATGCTAAGATTTTGCGTAGC	3125
5014	5036	CCTCAATTACCCACATAGGATGA	1357	TCATCCTATGTGGGTAATTG	3126
5023	5045	CCCACATAGGATGAAT	1358	TGCTATTATTCATCCT	3127

[0330]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		AATAGCA		ATGT	
5024	5046	CCACATAGGATGAATAATAGCAG	1359	CTGCTATTATTCATCCTATG	3128
5052	5074	CCGTACAACCCTAACATAACCAT	1360	ATGGTTATGTTAGGGTTGTA	3129
5060	5082	CCCTAACATAACCATTCTTAATT	1361	AATTAAGAATGGTTATGTTA	3130
5061	5083	CCTAACATAACCATTCTTAATTT	1362	AAATTAAGAATGGTTATGTT	3131
5071	5093	CCATTCTTAATTTAACTATTTAT	1363	ATAAATAGTTAAATTAAGAA	3132
5099	5121	CCTAACTACTACCGCATTCCTAC	1364	GTAGGAATGCGGTAGTAGTT	3133
5110	5132	CCGCATTCCTACTACTCAACTTA	1365	TAAGTTGAGTAGTAGGAATG	3134
5117	5139	CCTACTACTCAACTTAAACTCCA	1366	TGGAGTTTAAGTTGAGTAGT	3135
5137	5159	CCAGCACCACGACCCTACTACTA	1367	TAGTAGTAGGGTCGTGGTGC	3136
5143	5165	CCACGACCCTACTACTATCTCGC	1368	GCGAGATAGTAGTAGGGTCG	3137
5149	5171	CCCTACTACTATCTCGCACCTGA	1369	TCAGGTGCGAGATAGTAGTA	3138
5150	5172	CCTACTACTATCTCGCACCTGAA	1370	TTCAGGTGCGAGATAGTAGT	3139
5167	5189	CCTGAAACAAGCTAACATGACTA	1371	TAGTCATGTTAGCTTGTTTC	3140

[0331]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
5193	5215	CCCTTAATTCCATCCACCCTCCT	1372	AGGAGGGTGGATGGAATTAA	3141
5194	5216	CCTTAATTCCATCCACCCTCCTC	1373	GAGGAGGGTGGATGGAATTA	3142
5202	5224	CCATCCACCCTCCTCTCCCTAGG	1374	CCTAGGGAGAGGAGGGTGGA	3143
5206	5228	CCACCCTCCTCTCCCTAGGAGGC	1375	GCCTCCTAGGGAGAGGAGGG	3144
5209	5231	CCCTCCTCTCCCTAGGAGGCCTG	1376	CAGGCCTCCTAGGGAGAGGA	3145
5210	5232	CCTCCTCTCCCTAGGAGGCCTGC	1377	GCAGGCCTCCTAGGGAGAGG	3146
5213	5235	CCTCTCCCTAGGAGGCCTGCCCC	1378	GGGGCAGGCCTCCTAGGGAG	3147
5218	5240	CCCTAGGAGGCCTGCCCCGCTA	1379	TAGCGGGGGCAGGCCTCCTA	3148
5219	5241	CCTAGGAGGCCTGCCCCCGCTAA	1380	TTAGCGGGGGCAGGCCTCCT	3149
5228	5250	CCTGCCCCCGCTAACCGGCTTTT	1381	AAAAGCCGGTTAGCGGGGGC	3150
5232	5254	CCCCCGCTAACCGGCTTTTTGCC	1382	GGCAAAAAGCCGGTTAGCGG	3151
5233	5255	CCCCGCTAACCGGCTTTTTGCCC	1383	GGGCAAAAAGCCGGTTAGCG	3152
5234	5256	CCCGCTAACCGGCTTTTTGCCCA	1384	TGGGCAAAAAGCCGGTTAGC	3153
5235	5257	CCGCTAACCGGCTTTT	1385	TTGGGCAAAAAGCCG	3154

[0332]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		TGCCCAA		GTTAG	
5242	5264	CCGGCTTTTTGCCCAAATGGGCC	1386	GGCCCATTTGGGCAAAAAGC	3155
5253	5275	CCCAAATGGGCCATTATCGAAGA	1387	TCTTCGATAATGGCCCATTT	3156
5254	5276	CCAAATGGGCCATTATCGAAGAA	1388	TTCTTCGATAATGGCCCATT	3157
5263	5285	CCATTATCGAAGAATTCACAAAA	1389	TTTTGTGAATTCTTCGATAA	3158
5294	5316	CCTCATCATCCCCACCATCATAG	1390	CTATGATGGTGGGGATGATG	3159
5303	5325	CCCCACCATCATAGCCACCATCA	1391	TGATGGTGGCTATGATGGTG	3160
5304	5326	CCCACCATCATAGCCACCATCAC	1392	GTGATGGTGGCTATGATGGT	3161
5305	5327	CCACCATCATAGCCACCATCACC	1393	GGTGATGGTGGCTATGATGG	3162
5308	5330	CCATCATAGCCACCATCACCCTC	1394	GAGGGTGATGGTGGCTATGA	3163
5317	5339	CCACCATCACCCTCCTTAACCTC	1395	GAGGTTAAGGAGGGTGATGG	3164
5320	5342	CCATCACCCTCCTTAACCTCTAC	1396	GTAGAGGTTAAGGAGGGTGA	3165
5326	5348	CCCTCCTTAACCTCTACTTCTAC	1397	GTAGAAGTAGAGGTTAAGGA	3166
5327	5349	CCTCCTTAACCTCTACTTCTACC	1398	GGTAGAAGTAGAGGTTAAGG	3167

[0333]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
5330	5352	CCTTAACCTCTACTTCTACCTAC	1399	GTAGGTAGAAGTAGAGGTTA	3168
5336	5358	CCTCTACTTCTACCTACGCCTAA	1400	TTAGGCGTAGGTAGAAGTAG	3169
5348	5370	CCTACGCCTAATCTACTCCACCT	1401	AGGTGGAGTAGATTAGGCGT	3170
5354	5376	CCTAATCTACTCCACCTCAATCA	1402	TGATTGAGGTGGAGTAGATT	3171
5365	5387	CCACCTCAATCACACTACTCCCC	1403	GGGGAGTAGTGTGATTGAGG	3172
5368	5390	CCTCAATCACACTACTCCCCATA	1404	TATGGGGAGTAGTGTGATTG	3173
5384	5406	CCCCATATCTAACAACGTAAAAA	1405	TTTTTACGTTGTTAGATATG	3174
5385	5407	CCCATATCTAACAACGTAAAAAT	1406	ATTTTTACGTTGTTAGATAT	3175
5386	5408	CCATATCTAACAACGTAAAAATA	1407	TATTTTTACGTTGTTAGATA	3176
5433	5455	CCCACCCCATTCCTCCCCACACT	1408	AGTGTGGGGAGGAATGGGGT	3177
5434	5456	CCACCCCATTCCTCCCCACACTC	1409	GAGTGTGGGGAGGAATGGGG	3178
5437	5459	CCCCATTCCTCCCCACACTCATC	1410	GATGAGTGTGGGGAGGAATG	3179
5438	5460	CCCATTCCTCCCCACACTCATCG	1411	CGATGAGTGTGGGGAGGAAT	3180
5439	5461	CCATTCCTCCCCACAC	1412	GCGATGAGTGTGGGG	3181

[0334]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		TCATCGC		AGGAA	
5444	5466	CCTCCCCACACTCATCGCCCTTA	1413	TAAGGGCGATGAGTGTGGGG	3182
5447	5469	CCCCACACTCATCGCCCTTACCA	1414	TGGTAAGGGCGATGAGTGTG	3183
5448	5470	CCCACACTCATCGCCCTTACCAC	1415	GTGGTAAGGGCGATGAGTGT	3184
5449	5471	CCACACTCATCGCCCTTACCACG	1416	CGTGGTAAGGGCGATGAGTG	3185
5461	5483	CCCTTACCACGCTACTCCTACCT	1417	AGGTAGGAGTAGCGTGGTAA	3186
5462	5484	CCTTACCACGCTACTCCTACCTA	1418	TAGGTAGGAGTAGCGTGGTA	3187
5467	5489	CCACGCTACTCCTACCTATCTCC	1419	GGAGATAGGTAGGAGTAGCG	3188
5477	5499	CCTACCTATCTCCCCTTTTATAC	1420	GTATAAAAGGGGAGATAGGT	3189
5481	5503	CCTATCTCCCCTTTTATACTAAT	1421	ATTAGTATAAAAGGGGAGAT	3190
5488	5510	CCCCTTTTATACTAATAATCTTA	1422	TAAGATTATTAGTATAAAAG	3191
5489	5511	CCCTTTTATACTAATAATCTTAT	1423	ATAAGATTATTAGTATAAAA	3192
5490	5512	CCTTTTATACTAATAATCTTATA	1424	TATAAGATTATTAGTATAAA	3193
5534	5556	CCAAGAGCCTTCAAAGCCCTCAG	1425	CTGAGGGCTTTGAAGGCTCT	3194

[0335]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
5541	5563	CCTTCAAAGCCCTCAGTAAGTTG	1426	CAACTTACTGAGGGCTTTGA	3195
5550	5572	CCCTCAGTAAGTTGCAATACTTA	1427	TAAGTATTGCAACTTACTGA	3196
5551	5573	CCTCAGTAAGTTGCAATACTTAA	1428	TTAAGTATTGCAACTTACTG	3197
5601	5623	CCCCACTCTGCATCAACTGAACG	1429	CGTTCAGTTGATGCAGAGTG	3198
5602	5624	CCCACTCTGCATCAACTGAACGC	1430	GCGTTCAGTTGATGCAGAGT	3199
5603	5625	CCACTCTGCATCAACTGAACGCA	1431	TGCGTTCAGTTGATGCAGAG	3200
5632	5654	CCACTTTAATTAAGCTAAGCCCT	1432	AGGGCTTAGCTTAATTAAAG	3201
5651	5673	CCCTTACTAGACCAATGGGACTT	1433	AAGTCCCATTGGTCTAGTAA	3202
5652	5674	CCTTACTAGACCAATGGGACTTA	1434	TAAGTCCCATTGGTCTAGTA	3203
5662	5684	CCAATGGGACTTAAACCCACAAA	1435	TTTGTGGGTTTAAGTCCCAT	3204
5677	5699	CCCACAAACACTTAGTTAACAGC	1436	GCTGTTAACTAAGTGTTTGT	3205
5678	5700	CCACAAACACTTAGTTAACAGCT	1437	AGCTGTTAACTAAGTGTTTG	3206
5706	5728	CCCTAATCAACTGGCTTCAATCT	1438	AGATTGAAGCCAGTTGATTA	3207
5707	5729	CCTAATCAACTGGCTT	1439	TAGATTGAAGCCAGT	3208

[0336]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		CAATCTA		TGATT	
5735	5757	CCCGCCGCCGGGAAAAAAGGCGG	1440	CCGCCTTTTTTCCCGGCGGC	3209
5736	5758	CCGCCGCCGGGAAAAAAGGCGGG	1441	CCCGCCTTTTTTCCCGGCGG	3210
5739	5761	CCGCCGGGAAAAAAGGCGGGAGA	1442	TCTCCCGCCTTTTTTCCCGG	3211
5742	5764	CCGGGAAAAAAGGCGGGAGAAGC	1443	GCTTCTCCCGCCTTTTTTCC	3212
5764	5786	CCCCGGCAGGTTTGAAGCTGCTT	1444	AAGCAGCTTCAAACCTGCCG	3213
5765	5787	CCCGGCAGGTTTGAAGCTGCTTC	1445	GAAGCAGCTTCAAACCTGCC	3214
5766	5788	CCGGCAGGTTTGAAGCTGCTTCT	1446	AGAAGCAGCTTCAAACCTGC	3215
5817	5839	CCTCGGAGCTGGTAAAAAGAGGC	1447	GCCTCTTTTTACCAGCTCCG	3216
5839	5861	CCTAACCCCTGTCTTTAGATTTA	1448	TAAATCTAAAGACAGGGGTT	3217
5844	5866	CCCCTGTCTTTAGATTTACAGTC	1449	GACTGTAAATCTAAAGACAG	3218
5845	5867	CCCTGTCTTTAGATTTACAGTCC	1450	GGACTGTAAATCTAAAGACA	3219
5846	5868	CCTGTCTTTAGATTTACAGTCCA	1451	TGGACTGTAAATCTAAAGAC	3220
5866	5888	CCAATGCTTCACTCAGCCATTTT	1452	AAAATGGCTGAGTGAAGCAT	3221

[0337]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
5882	5904	CCATTTTACCTCACCCCCACTGA	1453	TCAGTGGGGGTGAGGTAAAA	3222
5890	5912	CCTCACCCCCACTGATGTTCGCC	1454	GGCGAACATCAGTGGGGGTG	3223
5895	5917	CCCCCACTGATGTTCGCCGACCG	1455	CGGTCGGCGAACATCAGTGG	3224
5896	5918	CCCCACTGATGTTCGCCGACCGT	1456	ACGGTCGGCGAACATCAGTG	3225
5897	5919	CCCACTGATGTTCGCCGACCGTT	1457	AACGGTCGGCGAACATCAGT	3226
5898	5920	CCACTGATGTTCGCCGACCGTTG	1458	CAACGGTCGGCGAACATCAG	3227
5911	5933	CCGACCGTTGACTATTCTCTACA	1459	TGTAGAGAATAGTCAACGGT	3228
5915	5937	CCGTTGACTATTCTCTACAAACC	1460	GGTTTGTAGAGAATAGTCAA	3229
5936	5958	CCACAAAGACATTGGAACACTAT	1461	ATAGTGTTCCAATGTCTTTG	3230
5960	5982	CCTATTATTCGGCGCATGAGCTG	1462	CAGCTCATGCGCCGAATAAT	3231
5987	6009	CCTAGGCACAGCTCTAAGCCTCC	1463	GGAGGCTTAGAGCTGTGCCT	3232
6005	6027	CCTCCTTATTCGAGCCGAGCTGG	1464	CCAGCTCGGCTCGAATAAGG	3233
6008	6030	CCTTATTCGAGCCGAGCTGGGCC	1465	GGCCCAGCTCGGCTCGAATA	3234
6019	6041	CCGAGCTGGGCCAGCC	1466	GTTGCCTGGCTGGCC	3235

[0338]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		AGGCAAC		CAGCT	
6029	6051	CCAGCCAGGCAACCTTCTAGGTA	1467	TACCTAGAAGGTTGCCTGGC	3236
6033	6055	CCAGGCAACCTTCTAGGTAACGA	1468	TCGTTACCTAGAAGGTTGCC	3237
6041	6063	CCTTCTAGGTAACGACCACATCT	1469	AGATGTGGTCGTTACCTAGA	3238
6056	6078	CCACATCTACAACGTTATCGTCA	1470	TGACGATAACGTTGTAGATG	3239
6082	6104	CCCATGCATTTGTAATAATCTTC	1471	GAAGATTATTACAAATGCAT	3240
6083	6105	CCATGCATTTGTAATAATCTTCT	1472	AGAAGATTATTACAAATGCA	3241
6117	6139	CCCATCATAATCGGAGGCTTTGG	1473	CCAAAGCCTCCGATTATGAT	3242
6118	6140	CCATCATAATCGGAGGCTTTGGC	1474	GCCAAAGCCTCCGATTATGA	3243
6153	6175	CCCCTAATAATCGGTGCCCCCGA	1475	TCGGGGGCACCGATTATTAG	3244
6154	6176	CCCTAATAATCGGTGCCCCCGAT	1476	ATCGGGGGCACCGATTATTA	3245
6155	6177	CCTAATAATCGGTGCCCCCGATA	1477	TATCGGGGGCACCGATTATT	3246
6169	6191	CCCCCGATATGGCGTTTCCCCGC	1478	GCGGGGAAACGCCATATCGG	3247
6170	6192	CCCCGATATGGCGTTTCCCCGCA	1479	TGCGGGGAAACGCCATATCG	3248

[0339]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
6171	6193	CCCGATATGGCGTTTCCCCGCAT	1480	ATGCGGGGAAACGCCATATC	3249
6172	6194	CCGATATGGCGTTTCCCCGCATA	1481	TATGCGGGGAAACGCCATAT	3250
6186	6208	CCCCGCATAAACAACATAAGCTT	1482	AAGCTTATGTTGTTTATGCG	3251
6187	6209	CCCGCATAAACAACATAAGCTTC	1483	GAAGCTTATGTTGTTTATGC	3252
6188	6210	CCGCATAAACAACATAAGCTTCT	1484	AGAAGCTTATGTTGTTTATG	3253
6219	6241	CCTCCCTCTCTCCTACTCCTGCT	1485	AGCAGGAGTAGGAGAGAGGG	3254
6222	6244	CCCTCTCTCCTACTCCTGCTCGC	1486	GCGAGCAGGAGTAGGAGAGA	3255
6223	6245	CCTCTCTCCTACTCCTGCTCGCA	1487	TGCGAGCAGGAGTAGGAGAG	3256
6230	6252	CCTACTCCTGCTCGCATCTGCTA	1488	TAGCAGATGCGAGCAGGAGT	3257
6236	6258	CCTGCTCGCATCTGCTATAGTGG	1489	CCACTATAGCAGATGCGAGC	3258
6262	6284	CCGGAGCAGGAACAGGTTGAACA	1490	TGTTCAACCTGTTCCTGCTC	3259
6290	6312	CCCTCCCTTAGCAGGGAACTACT	1491	AGTAGTTCCCTGCTAAGGGA	3260
6291	6313	CCTCCCTTAGCAGGGAACTACTC	1492	GAGTAGTTCCCTGCTAAGGG	3261
6294	6316	CCCTTAGCAGGGAACT	1493	TGGGAGTAGTTCCCT	3262

[0340]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		ACTCCCA		GCTAA	
6295	6317	CCTTAGCAGGGAACTACTCCCAC	1494	GTGGGAGTAGTTCCCTGCTA	3263
6313	6335	CCCACCCTGGAGCCTCCGTAGAC	1495	GTCTACGGAGGCTCCAGGGT	3264
6314	6336	CCACCCTGGAGCCTCCGTAGACC	1496	GGTCTACGGAGGCTCCAGGG	3265
6317	6339	CCCTGGAGCCTCCGTAGACCTAA	1497	TTAGGTCTACGGAGGCTCCA	3266
6318	6340	CCTGGAGCCTCCGTAGACCTAAC	1498	GTTAGGTCTACGGAGGCTCC	3267
6325	6347	CCTCCGTAGACCTAACCATCTTC	1499	GAAGATGGTTAGGTCTACGG	3268
6328	6350	CCGTAGACCTAACCATCTTCTCC	1500	GGAGAAGATGGTTAGGTCTA	3269
6335	6357	CCTAACCATCTTCTCCTTACACC	1501	GGTGTAAGGAGAAGATGGTT	3270
6340	6362	CCATCTTCTCCTTACACCTAGCA	1502	TGCTAGGTGTAAGGAGAAGA	3271
6349	6371	CCTTACACCTAGCAGGTGTCTCC	1503	GGAGACACCTGCTAGGTGTA	3272
6356	6378	CCTAGCAGGTGTCTCCTCTATCT	1504	AGATAGAGGAGACACCTGCT	3273
6370	6392	CCTCTATCTTAGGGGCCATCAAT	1505	ATTGATGGCCCCTAAGATAG	3274
6385	6407	CCATCAATTTCATCACAACAATT	1506	AATTGTTGTGATGAAATTGA	3275

[0341]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
6420	6442	CCCCCTGCCATAACCCAATACCA	1507	TGGTATTGGGTTATGGCAGG	3276
6421	6443	CCCCTGCCATAACCCAATACCAA	1508	TTGGTATTGGGTTATGGCAG	3277
6422	6444	CCCTGCCATAACCCAATACCAAA	1509	TTTGGTATTGGGTTATGGCA	3278
6423	6445	CCTGCCATAACCCAATACCAAAC	1510	GTTTGGTATTGGGTTATGGC	3279
6427	6449	CCATAACCCAATACCAAACGCCC	1511	GGGCGTTTGGTATTGGGTTA	3280
6433	6455	CCCAATACCAAACGCCCCTCTTC	1512	GAAGAGGGGCGTTTGGTATT	3281
6434	6456	CCAATACCAAACGCCCCTCTTCG	1513	CGAAGAGGGGCGTTTGGTAT	3282
6440	6462	CCAAACGCCCCTCTTCGTCTGAT	1514	ATCAGACGAAGAGGGGCGTT	3283
6447	6469	CCCCTCTTCGTCTGATCCGTCCT	1515	AGGACGGATCAGACGAAGAG	3284
6448	6470	CCCTCTTCGTCTGATCCGTCCTA	1516	TAGGACGGATCAGACGAAGA	3285
6449	6471	CCTCTTCGTCTGATCCGTCCTAA	1517	TTAGGACGGATCAGACGAAG	3286
6463	6485	CCGTCCTAATCACAGCAGTCCTA	1518	TAGGACTGCTGTGATTAGGA	3287
6467	6489	CCTAATCACAGCAGTCCTACTTC	1519	GAAGTAGGACTGCTGTGATT	3288
6482	6504	CCTACTTCTCCTATCTC	1520	CTGGGAGAGATAGGA	3289

[0342]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		TCCCAG		GAAGT	
6491	6513	CCTATCTCTCCCAGTCCTAGCTG	1521	CAGCTAGGACTGGGAGAGAT	3290
6500	6522	CCCAGTCCTAGCTGCTGGCATCA	1522	TGATGCCAGCAGCTAGGACT	3291
6501	6523	CCAGTCCTAGCTGCTGGCATCAC	1523	GTGATGCCAGCAGCTAGGAC	3292
6506	6528	CCTAGCTGCTGGCATCACTATAC	1524	GTATAGTGATGCCAGCAGCT	3293
6539	6561	CCGCAACCTCAACACCACCTTCT	1525	AGAAGGTGGTGTTGAGGTTG	3294
6545	6567	CCTCAACACCACCTTCTTCGACC	1526	GGTCGAAGAAGGTGGTGTTG	3295
6553	6575	CCACCTTCTTCGACCCCGCCGGA	1527	TCCGGCGGGGTCGAAGAAGG	3296
6556	6578	CCTTCTTCGACCCCGCCGGAGGA	1528	TCCTCCGGCGGGGTCGAAGA	3297
6566	6588	CCCCGCCGGAGGAGGAGACCCCA	1529	TGGGGTCTCCTCCTCCGGCG	3298
6567	6589	CCCGCCGGAGGAGGAGACCCCAT	1530	ATGGGGTCTCCTCCTCCGGC	3299
6568	6590	CCGCCGGAGGAGGAGACCCCATT	1531	AATGGGGTCTCCTCCTCCGG	3300
6571	6593	CCGGAGGAGGAGACCCCATTCTA	1532	TAGAATGGGGTCTCCTCCTC	3301
6584	6606	CCCCATTCTATACCAACACCTAT	1533	ATAGGTGTTGGTATAGAATG	3302

[0343]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
6585	6607	CCCATTCTATACCAACACCTATT	1534	AATAGGTGTTGGTATAGAAT	3303
6586	6608	CCATTCTATACCAACACCTATTC	1535	GAATAGGTGTTGGTATAGAA	3304
6596	6618	CCAACACCTATTCTGATTTTTCG	1536	CGAAAAATCAGAATAGGTGT	3305
6602	6624	CCTATTCTGATTTTTCGGTCACC	1537	GGTGACCGAAAAATCAGAAT	3306
6623	6645	CCCTGAAGTTTATATTCTTATCC	1538	GGATAAGAATATAAACTTCA	3307
6624	6646	CCTGAAGTTTATATTCTTATCCT	1539	AGGATAAGAATATAAACTTC	3308
6644	6666	CCTACCAGGCTTCGGAATAATCT	1540	AGATTATTCCGAAGCCTGGT	3309
6648	6670	CCAGGCTTCGGAATAATCTCCCA	1541	TGGGAGATTATTCCGAAGCC	3310
6667	6689	CCCATATTGTAACTTACTACTCC	1542	GGAGTAGTAAGTTACAATAT	3311
6668	6690	CCATATTGTAACTTACTACTCCG	1543	CGGAGTAGTAAGTTACAATA	3312
6688	6710	CCGGAAAAAAAGAACCATTTGGA	1544	TCCAAATGGTTCTTTTTTTC	3313
6702	6724	CCATTTGGATACATAGGTATGGT	1545	ACCATACCTATGTATCCAAA	3314
6749	6771	CCTAGGGTTTATCGTGTGAGCAC	1546	GTGCTCACACGATAAACCCT	3315
6773	6795	CCATATATTTACAGTA	1547	CTATTCCTACTGTAA	3316

[0344]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		GGAATAG		ATATA	
6820	6842	CCTCCGCTACCATAATCATCGCT	1548	AGCGATGATTATGGTAGCGG	3317
6823	6845	CCGCTACCATAATCATCGCTATC	1549	GATAGCGATGATTATGGTAG	3318
6829	6851	CCATAATCATCGCTATCCCCACC	1550	GGTGGGGATAGCGATGATTA	3319
6845	6867	CCCCACCGGCGTCAAAGTATTTA	1551	TAAATACTTTGACGCCGGTG	3320
6846	6868	CCCACCGGCGTCAAAGTATTTAG	1552	CTAAATACTTTGACGCCGGT	3321
6847	6869	CCACCGGCGTCAAAGTATTTAGC	1553	GCTAAATACTTTGACGCCGG	3322
6850	6872	CCGGCGTCAAAGTATTTAGCTGA	1554	TCAGCTAAATACTTTGACGC	3323
6877	6899	CCACACTCCACGGAAGCAATATG	1555	CATATTGCTTCCGTGGAGTG	3324
6884	6906	CCACGGAAGCAATATGAAATGAT	1556	ATCATTTCATATTGCTTCCG	3325
6925	6947	CCCTAGGATTCATCTTTCTTTTC	1557	GAAAAGAAAGATGAATCCTA	3326
6926	6948	CCTAGGATTCATCTTTCTTTTCA	1558	TGAAAAGAAAGATGAATCCT	3327
6949	6971	CCGTAGGTGGCCTGACTGGCATT	1559	AATGCCAGTCAGGCCACCTA	3328
6959	6981	CCTGACTGGCATTGTATTAGCAA	1560	TTGCTAATACAATGCCAGTC	3329

[0345]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
7027	7049	CCCACTTCCACTATGTCCTATCA	1561	TGATAGGACATAGTGGAAGT	3330
7028	7050	CCACTTCCACTATGTCCTATCAA	1562	TTGATAGGACATAGTGGAAG	3331
7034	7056	CCACTATGTCCTATCAATAGGAG	1563	CTCCTATTGATAGGACATAG	3332
7043	7065	CCTATCAATAGGAGCTGTATTTG	1564	CAAATACAGCTCCTATTGAT	3333
7066	7088	CCATCATAGGAGGCTTCATTCAC	1565	GTGAATGAAGCCTCCTATGA	3334
7095	7117	CCCCTATTCTCAGGCTACACCCT	1566	AGGGTGTAGCCTGAGAATAG	3335
7096	7118	CCCTATTCTCAGGCTACACCCTA	1567	TAGGGTGTAGCCTGAGAATA	3336
7097	7119	CCTATTCTCAGGCTACACCCTAG	1568	CTAGGGTGTAGCCTGAGAAT	3337
7114	7136	CCCTAGACCAAACCTACGCCAAA	1569	TTTGGCGTAGGTTTGGTCTA	3338
7115	7137	CCTAGACCAAACCTACGCCAAAA	1570	TTTTGGCGTAGGTTTGGTCT	3339
7121	7143	CCAAACCTACGCCAAAATCCATT	1571	AATGGATTTTGGCGTAGGTT	3340
7126	7148	CCTACGCCAAAATCCATTTCACT	1572	AGTGAAATGGATTTTGGCGT	3341
7132	7154	CCAAAATCCATTTCACTATCATA	1573	TATGATAGTGAAATGGATTT	3342
7139	7161	CCATTTCACTATCATAT	1574	CGATGAATATGATAG	3343

[0346]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		TCATCG		TGAAA	
7181	7203	CCCACAACACTTTCTCGGCCTAT	1575	ATAGGCCGAGAAAGTGTTGT	3344
7182	7204	CCACAACACTTTCTCGGCCTATC	1576	GATAGGCCGAGAAAGTGTTG	3345
7199	7221	CCTATCCGGAATGCCCCGACGTT	1577	AACGTCGGGGCATTCCGGAT	3346
7204	7226	CCGGAATGCCCCGACGTTACTCG	1578	CGAGTAACGTCGGGGCATTC	3347
7212	7234	CCCCGACGTTACTCGGACTACCC	1579	GGGTAGTCCGAGTAACGTCG	3348
7213	7235	CCCGACGTTACTCGGACTACCCC	1580	GGGGTAGTCCGAGTAACGTC	3349
7214	7236	CCGACGTTACTCGGACTACCCCG	1581	CGGGGTAGTCCGAGTAACGT	3350
7232	7254	CCCCGATGCATACACCACATGAA	1582	TTCATGTGGTGTATGCATCG	3351
7233	7255	CCCGATGCATACACCACATGAAA	1583	TTTCATGTGGTGTATGCATC	3352
7234	7256	CCGATGCATACACCACATGAAAC	1584	GTTTCATGTGGTGTATGCAT	3353
7246	7268	CCACATGAAACATCCTATCATCT	1585	AGATGATAGGATGTTTCATG	3354
7259	7281	CCTATCATCTGTAGGCTCATTCA	1586	TGAATGAGCCTACAGATGAT	3355
7327	7349	CCTTCGCTTCGAAGCGAAAAGTC	1587	GACTTTTCGCTTCGAAGCGA	3356

[0347]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
7349	7371	CCTAATAGTAGAAGAACCCTCCA	1588	TGGAGGGTTCTTCTACTATT	3357
7365	7387	CCCTCCATAAACCTGGAGTGACT	1589	AGTCACTCCAGGTTTATGGA	3358
7366	7388	CCTCCATAAACCTGGAGTGACTA	1590	TAGTCACTCCAGGTTTATGG	3359
7369	7391	CCATAAACCTGGAGTGACTATAT	1591	ATATAGTCACTCCAGGTTTA	3360
7376	7398	CCTGGAGTGACTATATGGATGCC	1592	GGCATCCATATAGTCACTCC	3361
7397	7419	CCCCCCACCCTACCACACATTCG	1593	CGAATGTGTGGTAGGGTGGG	3362
7398	7420	CCCCCACCCTACCACACATTCGA	1594	TCGAATGTGTGGTAGGGTGG	3363
7399	7421	CCCCACCCTACCACACATTCGAA	1595	TTCGAATGTGTGGTAGGGTG	3364
7400	7422	CCCACCCTACCACACATTCGAAG	1596	CTTCGAATGTGTGGTAGGGT	3365
7401	7423	CCACCCTACCACACATTCGAAGA	1597	TCTTCGAATGTGTGGTAGGG	3366
7404	7426	CCCTACCACACATTCGAAGAACC	1598	GGTTCTTCGAATGTGTGGTA	3367
7405	7427	CCTACCACACATTCGAAGAACCC	1599	GGGTTCTTCGAATGTGTGGT	3368
7409	7431	CCACACATTCGAAGAACCCGTAT	1600	ATACGGGTTCTTCGAATGTG	3369
7425	7447	CCCGTATACATAAAAT	1601	TGTCTAGATTTTATGT	3370

[0348]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		CTAGACA		ATAC	
7426	7448	CCGTATACATAAAATCTAGACAA	1602	TTGTCTAGATTTTATGTATA	3371
7466	7488	CCCCCCAAAGCTGGTTTCAAGCC	1603	GGCTTGAAACCAGCTTTGGG	3372
7467	7489	CCCCCAAAGCTGGTTTCAAGCCA	1604	TGGCTTGAAACCAGCTTTGG	3373
7468	7490	CCCCAAAGCTGGTTTCAAGCCAA	1605	TTGGCTTGAAACCAGCTTTG	3374
7469	7491	CCCAAAGCTGGTTTCAAGCCAAC	1606	GTTGGCTTGAAACCAGCTTT	3375
7470	7492	CCAAAGCTGGTTTCAAGCCAACC	1607	GGTTGGCTTGAAACCAGCTT	3376
7487	7509	CCAACCCCATGGCCTCCATGACT	1608	AGTCATGGAGGCCATGGGGT	3377
7491	7513	CCCCATGGCCTCCATGACTTTTT	1609	AAAAAGTCATGGAGGCCATG	3378
7492	7514	CCCATGGCCTCCATGACTTTTTC	1610	GAAAAAGTCATGGAGGCCAT	3379
7493	7515	CCATGGCCTCCATGACTTTTTCA	1611	TGAAAAAGTCATGGAGGCCA	3380
7499	7521	CCTCCATGACTTTTTCAAAAAGG	1612	CCTTTTTGAAAAAGTCATGG	3381
7502	7524	CCATGACTTTTTCAAAAAGGTAT	1613	ATACCTTTTTGAAAAAGTCA	3382
7533	7555	CCATTTCATAACTTTGTCAAAGT	1614	ACTTTGACAAAGTTATGAAA	3383

[0349]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
7573	7595	CCTATATATCTTAATGGCACATG	1615	CATGTGCCATTAAGATATAT	3384
7626	7648	CCCCTATCATAGAAGAGCTTATC	1616	GATAAGCTCTTCTATGATAG	3385
7627	7649	CCCTATCATAGAAGAGCTTATCA	1617	TGATAAGCTCTTCTATGATA	3386
7628	7650	CCTATCATAGAAGAGCTTATCAC	1618	GTGATAAGCTCTTCTATGAT	3387
7650	7672	CCTTTCATGATCACGCCCTCATA	1619	TATGAGGGCGTGATCATGAA	3388
7665	7687	CCCTCATAATCATTTTCCTTATC	1620	GATAAGGAAAATGATTATGA	3389
7666	7688	CCTCATAATCATTTTCCTTATCT	1621	AGATAAGGAAAATGATTATG	3390
7681	7703	CCTTATCTGCTTCCTAGTCCTGT	1622	ACAGGACTAGGAAGCAGATA	3391
7693	7715	CCTAGTCCTGTATGCCCTTTTCC	1623	GGAAAAGGGCATACAGGACT	3392
7699	7721	CCTGTATGCCCTTTTCCTAACAC	1624	GTGTTAGGAAAAGGGCATAC	3393
7707	7729	CCCTTTTCCTAACACTCACAACA	1625	TGTTGTGAGTGTTAGGAAAA	3394
7708	7730	CCTTTTCCTAACACTCACAACAA	1626	TTGTTGTGAGTGTTAGGAAA	3395
7714	7736	CCTAACACTCACAACAAAACTAA	1627	TTAGTTTTGTTGTGAGTGTT	3396
7773	7795	CCGTCTGAACTATCCT	1628	GGCGGGCAGGATAGT	3397

[0350]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		GCCCGCC		TCAGA	
7786	7808	CCTGCCCGCCATCATCCTAGTCC	1629	GGACTAGGATGATGGCGGGC	3398
7790	7812	CCCGCCATCATCCTAGTCCTCAT	1630	ATGAGGACTAGGATGATGGC	3399
7791	7813	CCGCCATCATCCTAGTCCTCATC	1631	GATGAGGACTAGGATGATGG	3400
7794	7816	CCATCATCCTAGTCCTCATCGCC	1632	GGCGATGAGGACTAGGATGA	3401
7801	7823	CCTAGTCCTCATCGCCCTCCCAT	1633	ATGGGAGGGCGATGAGGACT	3402
7807	7829	CCTCATCGCCCTCCCATCCCTAC	1634	GTAGGGATGGGAGGGCGATG	3403
7815	7837	CCCTCCCATCCCTACGCATCCTT	1635	AAGGATGCGTAGGGATGGGA	3404
7816	7838	CCTCCCATCCCTACGCATCCTTT	1636	AAAGGATGCGTAGGGATGGG	3405
7819	7841	CCCATCCCTACGCATCCTTTACA	1637	TGTAAAGGATGCGTAGGGAT	3406
7820	7842	CCATCCCTACGCATCCTTTACAT	1638	ATGTAAAGGATGCGTAGGGA	3407
7824	7846	CCCTACGCATCCTTTACATAACA	1639	TGTTATGTAAAGGATGCGTA	3408
7825	7847	CCTACGCATCCTTTACATAACAG	1640	CTGTTATGTAAAGGATGCGT	3409
7834	7856	CCTTTACATAACAGACGAGGTCA	1641	TGACCTCGTCTGTTATGTAA	3410

[0351]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
7862	7884	CCCTCCCTTACCATCAAATCAAT	1642	ATTGATTTGATGGTAAGGGA	3411
7863	7885	CCTCCCTTACCATCAAATCAATT	1643	AATTGATTTGATGGTAAGGG	3412
7866	7888	CCCTTACCATCAAATCAATTGGC	1644	GCCAATTGATTTGATGGTAA	3413
7867	7889	CCTTACCATCAAATCAATTGGCC	1645	GGCCAATTGATTTGATGGTA	3414
7872	7894	CCATCAAATCAATTGGCCACCAA	1646	TTGGTGGCCAATTGATTTGA	3415
7888	7910	CCACCAATGGTACTGAACCTACG	1647	CGTAGGTTCAGTACCATTGG	3416
7891	7913	CCAATGGTACTGAACCTACGAGT	1648	ACTCGTAGGTTCAGTACCAT	3417
7905	7927	CCTACGAGTACACCGACTACGGC	1649	GCCGTAGTCGGTGTACTCGT	3418
7917	7939	CCGACTACGGCGGACTAATCTTC	1650	GAAGATTAGTCCGCCGTAGT	3419
7944	7966	CCTACATACTTCCCCCATTATTC	1651	GAATAATGGGGGAAGTATGT	3420
7955	7977	CCCCCATTATTCCTAGAACCAGG	1652	CCTGGTTCTAGGAATAATGG	3421
7956	7978	CCCCATTATTCCTAGAACCAGGC	1653	GCCTGGTTCTAGGAATAATG	3422
7957	7979	CCCATTATTCCTAGAACCAGGCG	1654	CGCCTGGTTCTAGGAATAAT	3423
7958	7980	CCATTATTCCTAGAAC	1655	TCGCCTGGTTCTAGG	3424

[0352]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		CAGGCGA		AATAA	
7966	7988	CCTAGAACCAGGCGACCTGCGAC	1656	GTCGCAGGTCGCCTGGTTCT	3425
7973	7995	CCAGGCGACCTGCGACTCCTTGA	1657	TCAAGGAGTCGCAGGTCGCC	3426
7981	8003	CCTGCGACTCCTTGACGTTGACA	1658	TGTCAACGTCAAGGAGTCGC	3427
7990	8012	CCTTGACGTTGACAATCGAGTAG	1659	CTACTCGATTGTCAACGTCA	3428
8017	8039	CCCGATTGAAGCCCCCATTCGTA	1660	TACGAATGGGGGCTTCAATC	3429
8018	8040	CCGATTGAAGCCCCCATTCGTAT	1661	ATACGAATGGGGGCTTCAAT	3430
8028	8050	CCCCCATTCGTATAATAATTACA	1662	TGTAATTATTATACGAATGG	3431
8029	8051	CCCCATTCGTATAATAATTACAT	1663	ATGTAATTATTATACGAATG	3432
8030	8052	CCCATTCGTATAATAATTACATC	1664	GATGTAATTATTATACGAAT	3433
8031	8053	CCATTCGTATAATAATTACATCA	1665	TGATGTAATTATTATACGAA	3434
8080	8102	CCCCACATTAGGCTTAAAAACAG	1666	CTGTTTTTAAGCCTAATGTG	3435
8081	8103	CCCACATTAGGCTTAAAAACAGA	1667	TCTGTTTTTAAGCCTAATGT	3436
8082	8104	CCACATTAGGCTTAAAAACAGAT	1668	ATCTGTTTTTAAGCCTAATG	3437

[0353]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
8111	8133	CCCGGACGTCTAAACCAAACCAC	1669	GTGGTTTGGTTTAGACGTCC	3438
8112	8134	CCGGACGTCTAAACCAAACCACT	1670	AGTGGTTTGGTTTAGACGTC	3439
8125	8147	CCAAACCACTTTCACCGCTACAC	1671	GTGTAGCGGTGAAAGTGGTT	3440
8130	8152	CCACTTTCACCGCTACACGACCG	1672	CGGTCGTGTAGCGGTGAAAG	3441
8139	8161	CCGCTACACGACCGGGGGTATAC	1673	GTATACCCCCGGTCGTGTAG	3442
8150	8172	CCGGGGGTATACTACGGTCAATG	1674	CATTGACCGTAGTATACCCC	3443
8194	8216	CCACAGTTTCATGCCCATCGTCC	1675	GGACGATGGGCATGAAACTG	3444
8207	8229	CCCATCGTCCTAGAATTAATTCC	1676	GGAATTAATTCTAGGACGAT	3445
8208	8230	CCATCGTCCTAGAATTAATTCCC	1677	GGGAATTAATTCTAGGACGA	3446
8215	8237	CCTAGAATTAATTCCCCTAAAAA	1678	TTTTTAGGGGAATTAATTCT	3447
8228	8250	CCCCTAAAAATCTTTGAAATAGG	1679	CCTATTTCAAAGATTTTTAG	3448
8229	8251	CCCTAAAAATCTTTGAAATAGGG	1680	CCCTATTTCAAAGATTTTTA	3449
8230	8252	CCTAAAAATCTTTGAAATAGGGC	1681	GCCCTATTTCAAAGATTTTT	3450
8252	8274	CCCGTATTTACCCTAT	1682	GGGTGCTATAGGGTA	3451

[0354]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		AGCACCC		AATAC	
8253	8275	CCGTATTTACCCTATAGCACCCC	1683	GGGGTGCTATAGGGTAAATA	3452
8262	8284	CCCTATAGCACCCCCTCTACCCC	1684	GGGGTAGAGGGGGTGCTATA	3453
8263	8285	CCTATAGCACCCCCTCTACCCCC	1685	GGGGGTAGAGGGGGTGCTAT	3454
8272	8294	CCCCCTCTACCCCCTCTAGAGCC	1686	GGCTCTAGAGGGGGTAGAGG	3455
8273	8295	CCCCTCTACCCCCTCTAGAGCCC	1687	GGGCTCTAGAGGGGGTAGAG	3456
8274	8296	CCCTCTACCCCCTCTAGAGCCCA	1688	TGGGCTCTAGAGGGGGTAGA	3457
8275	8297	CCTCTACCCCCTCTAGAGCCCAC	1689	GTGGGCTCTAGAGGGGGTAG	3458
8281	8303	CCCCCTCTAGAGCCCACTGTAAA	1690	TTTACAGTGGGCTCTAGAGG	3459
8282	8304	CCCCTCTAGAGCCCACTGTAAAG	1691	CTTTACAGTGGGCTCTAGAG	3460
8283	8305	CCCTCTAGAGCCCACTGTAAAGC	1692	GCTTTACAGTGGGCTCTAGA	3461
8284	8306	CCTCTAGAGCCCACTGTAAAGCT	1693	AGCTTTACAGTGGGCTCTAG	3462
8293	8315	CCCACTGTAAAGCTAACTTAGCA	1694	TGCTAAGTTAGCTTTACAGT	3463
8294	8316	CCACTGTAAAGCTAACTTAGCAT	1695	ATGCTAAGTTAGCTTTACAG	3464

[0355]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
8320	8342	CCTTTTAAGTTAAAGATTAAGAG	1696	CTCTTAATCTTTAACTTAAA	3465
8345	8367	CCAACACCTCTTTACAGTGAAAT	1697	ATTTCACTGTAAAGAGGTGT	3466
8351	8373	CCTCTTTACAGTGAAATGCCCCA	1698	TGGGGCATTTCACTGTAAAG	3467
8369	8391	CCCCAACTAAATACTACCGTATG	1699	CATACGGTAGTATTTAGTTG	3468
8370	8392	CCCAACTAAATACTACCGTATGG	1700	CCATACGGTAGTATTTAGTT	3469
8371	8393	CCAACTAAATACTACCGTATGGC	1701	GCCATACGGTAGTATTTAGT	3470
8385	8407	CCGTATGGCCCACCATAATTACC	1702	GGTAATTATGGTGGGCCATA	3471
8393	8415	CCCACCATAATTACCCCCATACT	1703	AGTATGGGGGTAATTATGGT	3472
8394	8416	CCACCATAATTACCCCCATACTC	1704	GAGTATGGGGGTAATTATGG	3473
8397	8419	CCATAATTACCCCCATACTCCTT	1705	AAGGAGTATGGGGGTAATTA	3474
8406	8428	CCCCCATACTCCTTACACTATTC	1706	GAATAGTGTAAGGAGTATGG	3475
8407	8429	CCCCATACTCCTTACACTATTCC	1707	GGAATAGTGTAAGGAGTATG	3476
8408	8430	CCCATACTCCTTACACTATTCCT	1708	AGGAATAGTGTAAGGAGTAT	3477
8409	8431	CCATACTCCTTACACT	1709	GAGGAATAGTGTAAG	3478

[0356]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		ATTCCTC		GAGTA	
8416	8438	CCTTACACTATTCCTCATCACCC	1710	GGGTGATGAGGAATAGTGTA	3479
8428	8450	CCTCATCACCCAACTAAAAATAT	1711	ATATTTTTAGTTGGGTGATG	3480
8436	8458	CCCAACTAAAAATATTAAACACA	1712	TGTGTTTAATATTTTTAGTT	3481
8437	8459	CCAACTAAAAATATTAAACACAA	1713	TTGTGTTTAATATTTTTAGT	3482
8464	8486	CCACCTACCTCCCTCACCAAAGC	1714	GCTTTGGTGAGGGAGGTAGG	3483
8467	8489	CCTACCTCCCTCACCAAAGCCCA	1715	TGGGCTTTGGTGAGGGAGGT	3484
8471	8493	CCTCCCTCACCAAAGCCCATAAA	1716	TTTATGGGCTTTGGTGAGGG	3485
8474	8496	CCCTCACCAAAGCCCATAAAAAT	1717	ATTTTTATGGGCTTTGGTGA	3486
8475	8497	CCTCACCAAAGCCCATAAAAATA	1718	TATTTTTATGGGCTTTGGTG	3487
8480	8502	CCAAAGCCCATAAAAATAAAAAA	1719	TTTTTTATTTTTATGGGCTT	3488
8486	8508	CCCATAAAAATAAAAAATTATAA	1720	TTATAATTTTTTATTTTTAT	3489
8487	8509	CCATAAAAATAAAAAATTATAAC	1721	GTTATAATTTTTTATTTTTA	3490
8513	8535	CCCTGAGAACCAAAATGAACGAA	1722	TTCGTTCATTTTGGTTCTCA	3491

[0357]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
8514	8536	CCTGAGAACCAAAATGAACGAAA	1723	TTTCGTTCATTTTGGTTCTC	3492
8522	8544	CCAAAATGAACGAAAATCTGTTC	1724	GAACAGATTTTCGTTCATTT	3493
8558	8580	CCCCCACAATCCTAGGCCTACCC	1725	GGGTAGGCCTAGGATTGTGG	3494
8559	8581	CCCCACAATCCTAGGCCTACCCG	1726	CGGGTAGGCCTAGGATTGTG	3495
8560	8582	CCCACAATCCTAGGCCTACCCGC	1727	GCGGGTAGGCCTAGGATTGT	3496
8561	8583	CCACAATCCTAGGCCTACCCGCC	1728	GGCGGGTAGGCCTAGGATTG	3497
8568	8590	CCTAGGCCTACCCGCCGCAGTAC	1729	GTACTGCGGCGGGTAGGCCT	3498
8574	8596	CCTACCCGCCGCAGTACTGATCA	1730	TGATCAGTACTGCGGCGGGT	3499
8578	8600	CCCGCCGCAGTACTGATCATTCT	1731	AGAATGATCAGTACTGCGGC	3500
8579	8601	CCGCCGCAGTACTGATCATTCTA	1732	TAGAATGATCAGTACTGCGG	3501
8582	8604	CCGCAGTACTGATCATTCTATTT	1733	AAATAGAATGATCAGTACTG	3502
8605	8627	CCCCCTCTATTGATCCCCACCTC	1734	GAGGTGGGGATCAATAGAGG	3503
8606	8628	CCCCTCTATTGATCCCCACCTCC	1735	GGAGGTGGGGATCAATAGAG	3504
8607	8629	CCCTCTATTGATCCCC	1736	TGGAGGTGGGGATCA	3505

[0358]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		ACCTCCA		ATAGA	
8608	8630	CCTCTATTGATCCCCACCTCCAA	1737	TTGGAGGTGGGGATCAATAG	3506
8619	8641	CCCCACCTCCAAATATCTCATCA	1738	TGATGAGATATTTGGAGGTG	3507
8620	8642	CCCACCTCCAAATATCTCATCAA	1739	TTGATGAGATATTTGGAGGT	3508
8621	8643	CCACCTCCAAATATCTCATCAAC	1740	GTTGATGAGATATTTGGAGG	3509
8624	8646	CCTCCAAATATCTCATCAACAAC	1741	GTTGTTGATGAGATATTTGG	3510
8627	8649	CCAAATATCTCATCAACAACCGA	1742	TCGGTTGTTGATGAGATATT	3511
8646	8668	CCGACTAATCACCACCCAACAAT	1743	ATTGTTGGGTGGTGATTAGT	3512
8657	8679	CCACCCAACAATGACTAATCAAA	1744	TTTGATTAGTCATTGTTGGG	3513
8660	8682	CCCAACAATGACTAATCAAACTA	1745	TAGTTTGATTAGTCATTGTT	3514
8661	8683	CCAACAATGACTAATCAAACTAA	1746	TTAGTTTGATTAGTCATTGT	3515
8684	8706	CCTCAAAACAAATGATAACCATA	1747	TATGGTTATCATTTGTTTTG	3516
8702	8724	CCATACACAACACTAAAGGACGA	1748	TCGTCCTTTAGTGTTGTGTA	3517
8726	8748	CCTGATCTCTTATACTAGTATCC	1749	GGATACTAGTATAAGAGATC	3518

[0359]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
8747	8769	CCTTAATCATTTTTATTGCCACA	1750	TGTGGCAATAAAAATGATTA	3519
8765	8787	CCACAACTAACCTCCTCGGACTC	1751	GAGTCCGAGGAGGTTAGTTG	3520
8775	8797	CCTCCTCGGACTCCTGCCTCACT	1752	AGTGAGGCAGGAGTCCGAGG	3521
8778	8800	CCTCGGACTCCTGCCTCACTCAT	1753	ATGAGTGAGGCAGGAGTCCG	3522
8787	8809	CCTGCCTCACTCATTTACACCAA	1754	TTGGTGTAAATGAGTGAGGC	3523
8791	8813	CCTCACTCATTTACACCAACCAC	1755	GTGGTTGGTGTAAATGAGTG	3524
8806	8828	CCAACCACCCAACTATCTATAAA	1756	TTTATAGATAGTTGGGTGGT	3525
8810	8832	CCACCCAACTATCTATAAACCTA	1757	TAGGTTTATAGATAGTTGGG	3526
8813	8835	CCCAACTATCTATAAACCTAGCC	1758	GGCTAGGTTTATAGATAGTT	3527
8814	8836	CCAACTATCTATAAACCTAGCCA	1759	TGGCTAGGTTTATAGATAGT	3528
8829	8851	CCTAGCCATGGCCATCCCCTTAT	1760	ATAAGGGGATGGCCATGGCT	3529
8834	8856	CCATGGCCATCCCCTTATGAGCG	1761	CGCTCATAAGGGGATGGCCA	3530
8840	8862	CCATCCCCTTATGAGCGGGCACA	1762	TGTGCCCGCTCATAAGGGGA	3531
8844	8866	CCCCTTATGAGCGGGC	1763	TCACTGTGCCCGCTC	3532

[0360]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		ACAGTGA		ATAAG	
8845	8867	CCCTTATGAGCGGGCACAGTGAT	1764	ATCACTGTGCCCGCTCATAA	3533
8846	8868	CCTTATGAGCGGGCACAGTGATT	1765	AATCACTGTGCCCGCTCATA	3534
8897	8919	CCCTAGCCCACTTCTTACCACAA	1766	TTGTGGTAAGAAGTGGGCTA	3535
8898	8920	CCTAGCCCACTTCTTACCACAAG	1767	CTTGTGGTAAGAAGTGGGCT	3536
8903	8925	CCCACTTCTTACCACAAGGCACA	1768	TGTGCCTTGTGGTAAGAAGT	3537
8904	8926	CCACTTCTTACCACAAGGCACAC	1769	GTGTGCCTTGTGGTAAGAAG	3538
8914	8936	CCACAAGGCACACCTACACCCCT	1770	AGGGGTGTAGGTGTGCCTTG	3539
8926	8948	CCTACACCCCTTATCCCCATACT	1771	AGTATGGGGATAAGGGGTGT	3540
8932	8954	CCCCTTATCCCCATACTAGTTAT	1772	ATAACTAGTATGGGGATAAG	3541
8933	8955	CCCTTATCCCCATACTAGTTATT	1773	AATAACTAGTATGGGGATAA	3542
8934	8956	CCTTATCCCCATACTAGTTATTA	1774	TAATAACTAGTATGGGGATA	3543
8940	8962	CCCCATACTAGTTATTATCGAAA	1775	TTTCGATAATAACTAGTATG	3544
8941	8963	CCCATACTAGTTATTATCGAAAC	1776	GTTTCGATAATAACTAGTAT	3545

[0361]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
8942	8964	CCATACTAGTTATTATCGAAACC	1777	GGTTTCGATAATAACTAGTA	3546
8963	8985	CCATCAGCCTACTCATTCAACCA	1778	TGGTTGAATGAGTAGGCTGA	3547
8970	8992	CCTACTCATTCAACCAATAGCCC	1779	GGGCTATTGGTTGAATGAGT	3548
8983	9005	CCAATAGCCCTGGCCGTACGCCT	1780	AGGCGTACGGCCAGGGCTAT	3549
8990	9012	CCCTGGCCGTACGCCTAACCGCT	1781	AGCGGTTAGGCGTACGGCCA	3550
8991	9013	CCTGGCCGTACGCCTAACCGCTA	1782	TAGCGGTTAGGCGTACGGCC	3551
8996	9018	CCGTACGCCTAACCGCTAACATT	1783	AATGTTAGCGGTTAGGCGTA	3552
9003	9025	CCTAACCGCTAACATTACTGCAG	1784	CTGCAGTAATGTTAGCGGTT	3553
9008	9030	CCGCTAACATTACTGCAGGCCAC	1785	GTGGCCTGCAGTAATGTTAG	3554
9027	9049	CCACCTACTCATGCACCTAATTG	1786	CAATTAGGTGCATGAGTAGG	3555
9030	9052	CCTACTCATGCACCTAATTGGAA	1787	TTCCAATTAGGTGCATGAGT	3556
9042	9064	CCTAATTGGAAGCGCCACCCTAG	1788	CTAGGGTGGCGCTTCCAATT	3557
9056	9078	CCACCCTAGCAATATCAACCATT	1789	AATGGTTGATATTGCTAGGG	3558
9059	9081	CCCTAGCAATATCAAC	1790	GTTAATGGTTGATAT	3559

[0362]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		CATTAAC		TGCTA	
9060	9082	CCTAGCAATATCAACCATTAACC	1791	GGTTAATGGTTGATATTGCT	3560
9074	9096	CCATTAACCTTCCCTCTACACTT	1792	AAGTGTAGAGGGAAGGTTAA	3561
9081	9103	CCTTCCCTCTACACTTATCATCT	1793	AGATGATAAGTGTAGAGGGA	3562
9085	9107	CCCTCTACACTTATCATCTTCAC	1794	GTGAAGATGATAAGTGTAGA	3563
9086	9108	CCTCTACACTTATCATCTTCACA	1795	TGTGAAGATGATAAGTGTAG	3564
9129	9151	CCTAGAAATCGCTGTCGCCTTAA	1796	TTAAGGCGACAGCGATTTCT	3565
9146	9168	CCTTAATCCAAGCCTACGTTTTC	1797	GAAAACGTAGGCTTGGATTA	3566
9153	9175	CCAAGCCTACGTTTTCACACTTC	1798	GAAGTGTGAAAACGTAGGCT	3567
9158	9180	CCTACGTTTTCACACTTCTAGTA	1799	TACTAGAAGTGTGAAAACGT	3568
9183	9205	CCTCTACCTGCACGACAACACAT	1800	ATGTGTTGTCGTGCAGGTAG	3569
9189	9211	CCTGCACGACAACACATAATGAC	1801	GTCATTATGTGTTGTCGTGC	3570
9211	9233	CCCACCAATCACATGCCTATCAT	1802	ATGATAGGCATGTGATTGGT	3571
9212	9234	CCACCAATCACATGCCTATCATA	1803	TATGATAGGCATGTGATTGG	3572

[0363]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
9215	9237	CCAATCACATGCCTATCATATAG	1804	CTATATGATAGGCATGTGAT	3573
9226	9248	CCTATCATATAGTAAAACCCAGC	1805	GCTGGGTTTTACTATATGAT	3574
9243	9265	CCCAGCCCATGACCCCTAACAGG	1806	CCTGTTAGGGGTCATGGGCT	3575
9244	9266	CCAGCCCATGACCCCTAACAGGG	1807	CCCTGTTAGGGGTCATGGGC	3576
9248	9270	CCCATGACCCCTAACAGGGGCCC	1808	GGGCCCCTGTTAGGGGTCAT	3577
9249	9271	CCATGACCCCTAACAGGGGCCCT	1809	AGGGCCCCTGTTAGGGGTCA	3578
9255	9277	CCCCTAACAGGGGCCCTCTCAGC	1810	GCTGAGAGGGCCCCTGTTAG	3579
9256	9278	CCCTAACAGGGGCCCTCTCAGCC	1811	GGCTGAGAGGGCCCCTGTTA	3580
9257	9279	CCTAACAGGGGCCCTCTCAGCCC	1812	GGGCTGAGAGGGCCCCTGTT	3581
9268	9290	CCCTCTCAGCCCTCCTAATGACC	1813	GGTCATTAGGAGGGCTGAGA	3582
9269	9291	CCTCTCAGCCCTCCTAATGACCT	1814	AGGTCATTAGGAGGGCTGAG	3583
9277	9299	CCCTCCTAATGACCTCCGGCCTA	1815	TAGGCCGGAGGTCATTAGGA	3584
9278	9300	CCTCCTAATGACCTCCGGCCTAG	1816	CTAGGCCGGAGGTCATTAGG	3585
9281	9303	CCTAATGACCTCCGGC	1817	TGGCTAGGCCGGAGG	3586

[0364]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		CTAGCCA		TCATT	
9289	9311	CCTCCGGCCTAGCCATGTGATTT	1818	AAATCACATGGCTAGGCCGG	3587
9292	9314	CCGGCCTAGCCATGTGATTTCAC	1819	GTGAAATCACATGGCTAGGC	3588
9296	9318	CCTAGCCATGTGATTTCACTTCC	1820	GGAAGTGAAATCACATGGCT	3589
9301	9323	CCATGTGATTTCACTTCCACTCC	1821	GGAGTGGAAGTGAAATCACA	3590
9317	9339	CCACTCCATAACGCTCCTCATAC	1822	GTATGAGGAGCGTTATGGAG	3591
9322	9344	CCATAACGCTCCTCATACTAGGC	1823	GCCTAGTATGAGGAGCGTTA	3592
9332	9354	CCTCATACTAGGCCTACTAACCA	1824	TGGTTAGTAGGCCTAGTATG	3593
9344	9366	CCTACTAACCAACACACTAACCA	1825	TGGTTAGTGTGTTGGTTAGT	3594
9352	9374	CCAACACACTAACCATATACCAA	1826	TTGGTATATGGTTAGTGTGT	3595
9364	9386	CCATATACCAATGATGGCGCGAT	1827	ATCGCGCCATCATTGGTATA	3596
9371	9393	CCAATGATGGCGCGATGTAACAC	1828	GTGTTACATCGCGCCATCAT	3597
9407	9429	CCAAGGCCACCACACACCACCTG	1829	CAGGTGGTGTGTGGTGGCCT	3598
9413	9435	CCACCACACACCACCTGTCCAAA	1830	TTTGGACAGGTGGTGTGTGG	3599

[0365]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
9416	9438	CCACACACCACCTGTCCAAAAAG	1831	CTTTTTGGACAGGTGGTGTG	3600
9423	9445	CCACCTGTCCAAAAAGGCCTTCG	1832	CGAAGGCCTTTTTGGACAGG	3601
9426	9448	CCTGTCCAAAAAGGCCTTCGATA	1833	TATCGAAGGCCTTTTTGGAC	3602
9431	9453	CCAAAAAGGCCTTCGATACGGGA	1834	TCCCGTATCGAAGGCCTTTT	3603
9440	9462	CCTTCGATACGGGATAATCCTAT	1835	ATAGGATTATCCCGTATCGA	3604
9458	9480	CCTATTTATTACCTCAGAAGTTT	1836	AAACTTCTGAGGTAATAAAT	3605
9469	9491	CCTCAGAAGTTTTTTTCTTCGCA	1837	TGCGAAGAAAAAAACTTCTG	3606
9505	9527	CCTTTTACCACTCCAGCCTAGCC	1838	GGCTAGGCTGGAGTGGTAAA	3607
9512	9534	CCACTCCAGCCTAGCCCCTACCC	1839	GGGTAGGGGCTAGGCTGGAG	3608
9517	9539	CCAGCCTAGCCCCTACCCCCCAA	1840	TTGGGGGGTAGGGGCTAGGC	3609
9521	9543	CCTAGCCCCTACCCCCCAATTAG	1841	CTAATTGGGGGGTAGGGGCT	3610
9526	9548	CCCCTACCCCCCAATTAGGAGGG	1842	CCCTCCTAATTGGGGGGTAG	3611
9527	9549	CCCTACCCCCCAATTAGGAGGGC	1843	GCCCTCCTAATTGGGGGGTA	3612
9528	9550	CCTACCCCCCAATTAG	1844	TGCCCTCCTAATTGG	3613

[0366]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		GAGGGCA		GGGGT	
9532	9554	CCCCCCAATTAGGAGGGCACTGG	1845	CCAGTGCCCTCCTAATTGGG	3614
9533	9555	CCCCCAATTAGGAGGGCACTGGC	1846	GCCAGTGCCCTCCTAATTGG	3615
9534	9556	CCCCAATTAGGAGGGCACTGGCC	1847	GGCCAGTGCCCTCCTAATTG	3616
9535	9557	CCCAATTAGGAGGGCACTGGCCC	1848	GGGCCAGTGCCCTCCTAATT	3617
9536	9558	CCAATTAGGAGGGCACTGGCCCC	1849	GGGGCCAGTGCCCTCCTAAT	3618
9555	9577	CCCCCAACAGGCATCACCCCGCT	1850	AGCGGGGTGATGCCTGTTGG	3619
9556	9578	CCCCAACAGGCATCACCCCGCTA	1851	TAGCGGGGTGATGCCTGTTG	3620
9557	9579	CCCAACAGGCATCACCCCGCTAA	1852	TTAGCGGGGTGATGCCTGTT	3621
9558	9580	CCAACAGGCATCACCCCGCTAAA	1853	TTTAGCGGGGTGATGCCTGT	3622
9571	9593	CCCCGCTAAATCCCCTAGAAGTC	1854	GACTTCTAGGGGATTTAGCG	3623
9572	9594	CCCGCTAAATCCCCTAGAAGTCC	1855	GGACTTCTAGGGGATTTAGC	3624
9573	9595	CCGCTAAATCCCCTAGAAGTCCC	1856	GGGACTTCTAGGGGATTTAG	3625
9582	9604	CCCCTAGAAGTCCCACTCCTAAA	1857	TTTAGGAGTGGGACTTCTAG	3626

[0367]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
9583	9605	CCCTAGAAGTCCCACTCCTAAAC	1858	GTTTAGGAGTGGGACTTCTA	3627
9584	9606	CCTAGAAGTCCCACTCCTAAACA	1859	TGTTTAGGAGTGGGACTTCT	3628
9593	9615	CCCACTCCTAAACACATCCGTAT	1860	ATACGGATGTGTTTAGGAGT	3629
9594	9616	CCACTCCTAAACACATCCGTATT	1861	AATACGGATGTGTTTAGGAG	3630
9599	9621	CCTAAACACATCCGTATTACTCG	1862	CGAGTAATACGGATGTGTTT	3631
9610	9632	CCGTATTACTCGCATCAGGAGTA	1863	TACTCCTGATGCGAGTAATA	3632
9640	9662	CCTGAGCTCACCATAGTCTAATA	1864	TATTAGACTATGGTGAGCTC	3633
9650	9672	CCATAGTCTAATAGAAAACAACC	1865	GGTTGTTTTCTATTAGACTA	3634
9671	9693	CCGAAACCAAATAATTCAAGCAC	1866	GTGCTTGAATTATTTGGTTT	3635
9677	9699	CCAAATAATTCAAGCACTGCTTA	1867	TAAGCAGTGCTTGAATTATT	3636
9727	9749	CCCTCCTACAAGCCTCAGAGTAC	1868	GTACTCTGAGGCTTGTAGGA	3637
9728	9750	CCTCCTACAAGCCTCAGAGTACT	1869	AGTACTCTGAGGCTTGTAGG	3638
9731	9753	CCTACAAGCCTCAGAGTACTTCG	1870	CGAAGTACTCTGAGGCTTGT	3639
9739	9761	CCTCAGAGTACTTCGA	1871	GGGAGACTCGAAGTA	3640

[0368]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		GTCTCCC		CTCTG	
9759	9781	CCCTTCACCATTTCCGACGGCAT	1872	ATGCCGTCGGAAATGGTGAA	3641
9760	9782	CCTTCACCATTTCCGACGGCATC	1873	GATGCCGTCGGAAATGGTGA	3642
9766	9788	CCATTTCCGACGGCATCTACGGC	1874	GCCGTAGATGCCGTCGGAAA	3643
9772	9794	CCGACGGCATCTACGGCTCAACA	1875	TGTTGAGCCGTAGATGCCGT	3644
9805	9827	CCACAGGCTTCCACGGACTTCAC	1876	GTGAAGTCCGTGGAAGCCTG	3645
9815	9837	CCACGGACTTCACGTCATTATTG	1877	CAATAATGACGTGAAGTCCG	3646
9848	9870	CCTCACTATCTGCTTCATCCGCC	1878	GGCGGATGAAGCAGATAGTG	3647
9866	9888	CCGCCAACTAATATTTCACTTTA	1879	TAAAGTGAAATATTAGTTGG	3648
9869	9891	CCAACTAATATTTCACTTTACAT	1880	ATGTAAAGTGAAATATTAGT	3649
9892	9914	CCAAACATCACTTTGGCTTCGAA	1881	TTCGAAGCCAAAGTGATGTT	3650
9916	9938	CCGCCGCCTGATACTGGCATTTT	1882	AAAATGCCAGTATCAGGCGG	3651
9919	9941	CCGCCTGATACTGGCATTTTGTA	1883	TACAAAATGCCAGTATCAGG	3652
9922	9944	CCTGATACTGGCATTTTGTAGAT	1884	ATCTACAAAATGCCAGTATC	3653

[0369]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
9970	9992	CCATCTATTGATGAGGGTCTTAC	1885	GTAAGACCCTCATCAATAGA	3654
10012	10034	CCGTTAACTTCCAATTAACTAGT	1886	ACTAGTTAATTGGAAGTTAA	3655
10022	10044	CCAATTAACTAGTTTTGACAACA	1887	TGTTGTCAAAACTAGTTAAT	3656
10069	10091	CCTTAATTTTAATAATCAACACC	1888	GGTGTTGATTATTAAAATTA	3657
10090	10112	CCCTCCTAGCCTTACTACTAATA	1889	TATTAGTAGTAAGGCTAGGA	3658
10091	10113	CCTCCTAGCCTTACTACTAATAA	1890	TTATTAGTAGTAAGGCTAGG	3659
10094	10116	CCTAGCCTTACTACTAATAATTA	1891	TAATTATTAGTAGTAAGGCT	3660
10099	10121	CCTTACTACTAATAATTATTACA	1892	TGTAATAATTATTAGTAGTA	3661
10131	10153	CCACAACTCAACGGCTACATAGA	1893	TCTATGTAGCCGTTGAGTTG	3662
10159	10181	CCACCCCTTACGAGTGCGGCTTC	1894	GAAGCCGCACTCGTAAGGGG	3663
10162	10184	CCCCTTACGAGTGCGGCTTCGAC	1895	GTCGAAGCCGCACTCGTAAG	3664
10163	10185	CCCTTACGAGTGCGGCTTCGACC	1896	GGTCGAAGCCGCACTCGTAA	3665
10164	10186	CCTTACGAGTGCGGCTTCGACCC	1897	GGGTCGAAGCCGCACTCGTA	3666
10184	10206	CCCTATATCCCCCGCC	1898	GGACGCGGGCGGGG	3667

[0370]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		CGCGTCC		GATATA	
10185	10207	CCTATATCCCCCGCCCGCGTCCC	1899	GGGACGCGGGCGGGGGATAT	3668
10192	10214	CCCCCGCCCGCGTCCCTTTCTCC	1900	GGAGAAAGGGACGCGGGCGG	3669
10193	10215	CCCCGCCCGCGTCCCTTTCTCCA	1901	TGGAGAAAGGGACGCGGGCG	3670
10194	10216	CCCGCCCGCGTCCCTTTCTCCAT	1902	ATGGAGAAAGGGACGCGGGC	3671
10195	10217	CCGCCCGCGTCCCTTTCTCCATA	1903	TATGGAGAAAGGGACGCGGG	3672
10198	10220	CCCGCGTCCCTTTCTCCATAAAA	1904	TTTTATGGAGAAAGGGACGC	3673
10199	10221	CCGCGTCCCTTTCTCCATAAAAT	1905	ATTTTATGGAGAAAGGGACG	3674
10205	10227	CCCTTTCTCCATAAAATTCTTCT	1906	AGAAGAATTTTATGGAGAAA	3675
10206	10228	CCTTTCTCCATAAAATTCTTCTT	1907	AAGAAGAATTTTATGGAGAA	3676
10213	10235	CCATAAAATTCTTCTTAGTAGCT	1908	AGCTACTAAGAAGAATTTTA	3677
10240	10262	CCTTCTTATTATTTGATCTAGAA	1909	TTCTAGATCAAATAATAAGA	3678
10267	10289	CCCTCCTTTTACCCCTACCATGA	1910	TCATGGTAGGGGTAAAAGGA	3679
10268	10290	CCTCCTTTTACCCCTACCATGAG	1911	CTCATGGTAGGGGTAAAAGG	3680

[0371]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
10271	10293	CCTTTTACCCCTACCATGAGCCC	1912	GGGCTCATGGTAGGGGTAAA	3681
10278	10300	CCCCTACCATGAGCCCTACAAAC	1913	GTTTGTAGGGCTCATGGTAG	3682
10279	10301	CCCTACCATGAGCCCTACAAACA	1914	TGTTTGTAGGGCTCATGGTA	3683
10280	10302	CCTACCATGAGCCCTACAAACAA	1915	TTGTTTGTAGGGCTCATGGT	3684
10284	10306	CCATGAGCCCTACAAACAACTAA	1916	TTAGTTGTTTGTAGGGCTCA	3685
10291	10313	CCCTACAAACAACTAACCTGCCA	1917	TGGCAGGTTAGTTGTTTGTA	3686
10292	10314	CCTACAAACAACTAACCTGCCAC	1918	GTGGCAGGTTAGTTGTTTGT	3687
10307	10329	CCTGCCACTAATAGTTATGTCAT	1919	ATGACATAACTATTAGTGGC	3688
10311	10333	CCACTAATAGTTATGTCATCCCT	1920	AGGGATGACATAACTATTAG	3689
10330	10352	CCCTCTTATTAATCATCATCCTA	1921	TAGGATGATGATTAATAAGA	3690
10331	10353	CCTCTTATTAATCATCATCCTAG	1922	CTAGGATGATGATTAATAAG	3691
10349	10371	CCTAGCCCTAAGTCTGGCCTATG	1923	CATAGGCCAGACTTAGGGCT	3692
10354	10376	CCCTAAGTCTGGCCTATGAGTGA	1924	TCACTCATAGGCCAGACTTA	3693
10355	10377	CCTAAGTCTGGCCTAT	1925	GTCACTCATAGGCCA	3694

[0372]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		GAGTGAC		GACTT	
10366	10388	CCTATGAGTGACTACAAAAAGGA	1926	TCCTTTTTGTAGTCACTCAT	3695
10399	10421	CCGAATTGGTATATAGTTTAAAC	1927	GTTTAAACTATATACCAATT	3696
10466	10488	CCAAATGCCCCTCATTTACATAA	1928	TTATGTAAATGAGGGGCATT	3697
10473	10495	CCCCTCATTTACATAAATATTAT	1929	ATAATATTTATGTAAATGAG	3698
10474	10496	CCCTCATTTACATAAATATTATA	1930	TATAATATTTATGTAAATGA	3699
10475	10497	CCTCATTTACATAAATATTATAC	1931	GTATAATATTTATGTAAATG	3700
10507	10529	CCATCTCACTTCTAGGAATACTA	1932	TAGTATTCCTAGAAGTGAGA	3701
10544	10566	CCTCATATCCTCCCTACTATGCC	1933	GGCATAGTAGGGAGGATATG	3702
10552	10574	CCTCCCTACTATGCCTAGAAGGA	1934	TCCTTCTAGGCATAGTAGGG	3703
10555	10577	CCCTACTATGCCTAGAAGGAATA	1935	TATTCCTTCTAGGCATAGTA	3704
10556	10578	CCTACTATGCCTAGAAGGAATAA	1936	TTATTCCTTCTAGGCATAGT	3705
10565	10587	CCTAGAAGGAATAATACTATCGC	1937	GCGATAGTATTATTCCTTCT	3706
10612	10634	CCCTCAACACCCACTCCCTCTTA	1938	TAAGAGGGAGTGGGTGTTGA	3707

[0373]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
10613	10635	CCTCAACACCCACTCCCTCTTAG	1939	CTAAGAGGGAGTGGGTGTTG	3708
10621	10643	CCCACTCCCTCTTAGCCAATATT	1940	AATATTGGCTAAGAGGGAGT	3709
10622	10644	CCACTCCCTCTTAGCCAATATTG	1941	CAATATTGGCTAAGAGGGAG	3710
10627	10649	CCCTCTTAGCCAATATTGTGCCT	1942	AGGCACAATATTGGCTAAGA	3711
10628	10650	CCTCTTAGCCAATATTGTGCCTA	1943	TAGGCACAATATTGGCTAAG	3712
10636	10658	CCAATATTGTGCCTATTGCCATA	1944	TATGGCAATAGGCACAATAT	3713
10647	10669	CCTATTGCCATACTAGTCTTTGC	1945	GCAAAGACTAGTATGGCAAT	3714
10654	10676	CCATACTAGTCTTTGCCGCCTGC	1946	GCAGGCGGCAAAGACTAGTA	3715
10669	10691	CCGCCTGCGAAGCAGCGGTGGGC	1947	GCCCACCGCTGCTTCGCAGG	3716
10672	10694	CCTGCGAAGCAGCGGTGGGCCTA	1948	TAGGCCCACCGCTGCTTCGC	3717
10691	10713	CCTAGCCCTACTAGTCTCAATCT	1949	AGATTGAGACTAGTAGGGCT	3718
10696	10718	CCCTACTAGTCTCAATCTCCAAC	1950	GTTGGAGATTGAGACTAGTA	3719
10697	10719	CCTACTAGTCTCAATCTCCAACA	1951	TGTTGGAGATTGAGACTAGT	3720
10714	10736	CCAACACATATGGCCT	1952	GTAGTCTAGGCCATA	3721

[0374]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		AGACTAC		TGTGT	
10727	10749	CCTAGACTACGTACATAACCTAA	1953	TTAGGTTATGTACGTAGTCT	3722
10745	10767	CCTAAACCTACTCCAATGCTAAA	1954	TTTAGCATTGGAGTAGGTTT	3723
10751	10773	CCTACTCCAATGCTAAAACTAAT	1955	ATTAGTTTTAGCATTGGAGT	3724
10757	10779	CCAATGCTAAAACTAATCGTCCC	1956	GGGACGATTAGTTTTAGCAT	3725
10777	10799	CCCAACAATTATATTACTACCAC	1957	GTGGTAGTAATATAATTGTT	3726
10778	10800	CCAACAATTATATTACTACCACT	1958	AGTGGTAGTAATATAATTGT	3727
10796	10818	CCACTGACATGACTTTCCAAAAA	1959	TTTTTGGAAAGTCATGTCAG	3728
10812	10834	CCAAAAAACACATAATTTGAATC	1960	GATTCAAATTATGTGTTTTT	3729
10842	10864	CCACCCACAGCCTAATTATTAGC	1961	GCTAATAATTAGGCTGTGGG	3730
10845	10867	CCCACAGCCTAATTATTAGCATC	1962	GATGCTAATAATTAGGCTGT	3731
10846	10868	CCACAGCCTAATTATTAGCATCA	1963	TGATGCTAATAATTAGGCTG	3732
10852	10874	CCTAATTATTAGCATCATCCCTC	1964	GAGGGATGATGCTAATAATT	3733
10870	10892	CCCTCTACTATTTTTTAACCAAA	1965	TTTGGTTAAAAAATAGTAGA	3734

[0375]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
10871	10893	CCTCTACTATTTTTTAACCAAAT	1966	ATTTGGTTAAAAAATAGTAG	3735
10888	10910	CCAAATCAACAACAACCTATTTA	1967	TAAATAGGTTGTTGTTGATT	3736
10903	10925	CCTATTTAGCTGTTCCCCAACCT	1968	AGGTTGGGGAACAGCTAAAT	3737
10917	10939	CCCCAACCTTTTCCTCCGACCCC	1969	GGGGTCGGAGGAAAAGGTTG	3738
10918	10940	CCCAACCTTTTCCTCCGACCCCC	1970	GGGGGTCGGAGGAAAAGGTT	3739
10919	10941	CCAACCTTTTCCTCCGACCCCCT	1971	AGGGGGTCGGAGGAAAAGGT	3740
10923	10945	CCTTTTCCTCCGACCCCCTAACA	1972	TGTTAGGGGGTCGGAGGAAA	3741
10929	10951	CCTCCGACCCCCTAACAACCCCC	1973	GGGGGTTGTTAGGGGGTCGG	3742
10932	10954	CCGACCCCCTAACAACCCCCTC	1974	GAGGGGGGTTGTTAGGGGGT	3743
10936	10958	CCCCCTAACAACCCCCCTCCTAA	1975	TTAGGAGGGGGGTTGTTAGG	3744
10937	10959	CCCCTAACAACCCCCCTCCTAAT	1976	ATTAGGAGGGGGGTTGTTAG	3745
10938	10960	CCCTAACAACCCCCCTCCTAATA	1977	TATTAGGAGGGGGGTTGTTA	3746
10939	10961	CCTAACAACCCCCCTCCTAATAC	1978	GTATTAGGAGGGGGGTTGTT	3747
10947	10969	CCCCCCTCCTAATACT	1979	GGTAGTTAGTATTAG	3748

[0376]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		AACTACC		GAGGG	
10948	10970	CCCCCTCCTAATACTAACTACCT	1980	AGGTAGTTAGTATTAGGAGG	3749
10949	10971	CCCCTCCTAATACTAACTACCTG	1981	CAGGTAGTTAGTATTAGGAG	3750
10950	10972	CCCTCCTAATACTAACTACCTGA	1982	TCAGGTAGTTAGTATTAGGA	3751
10951	10973	CCTCCTAATACTAACTACCTGAC	1983	GTCAGGTAGTTAGTATTAGG	3752
10954	10976	CCTAATACTAACTACCTGACTCC	1984	GGAGTCAGGTAGTTAGTATT	3753
10968	10990	CCTGACTCCTACCCCTCACAATC	1985	GATTGTGAGGGGTAGGAGTC	3754
10975	10997	CCTACCCCTCACAATCATGGCAA	1986	TTGCCATGATTGTGAGGGGT	3755
10979	11001	CCCCTCACAATCATGGCAAGCCA	1987	TGGCTTGCCATGATTGTGAG	3756
10980	11002	CCCTCACAATCATGGCAAGCCAA	1988	TTGGCTTGCCATGATTGTGA	3757
10981	11003	CCTCACAATCATGGCAAGCCAAC	1989	GTTGGCTTGCCATGATTGTG	3758
10999	11021	CCAACGCCACTTATCCAGTGAAC	1990	GTTCACTGGATAAGTGGCGT	3759
11005	11027	CCACTTATCCAGTGAACCACTAT	1991	ATAGTGGTTCACTGGATAAG	3760
11013	11035	CCAGTGAACCACTATCACGAAAA	1992	TTTTCGTGATAGTGGTTCAC	3761

[0377]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
11021	11043	CCACTATCACGAAAAAAACTCTA	1993	TAGAGTTTTTTTCGTGATAG	3762
11044	11066	CCTCTCTATACTAATCTCCCTAC	1994	GTAGGGAGATTAGTATAGAG	3763
11061	11083	CCCTACAAATCTCCTTAATTATA	1995	TATAATTAAGGAGATTTGTA	3764
11062	11084	CCTACAAATCTCCTTAATTATAA	1996	TTATAATTAAGGAGATTTGT	3765
11073	11095	CCTTAATTATAACATTCACAGCC	1997	GGCTGTGAATGTTATAATTA	3766
11094	11116	CCACAGAACTAATCATATTTTAT	1998	ATAAAATATGATTAGTTCTG	3767
11130	11152	CCACACTTATCCCCACCTTGGCT	1999	AGCCAAGGTGGGGATAAGTG	3768
11140	11162	CCCCACCTTGGCTATCATCACCC	2000	GGGTGATGATAGCCAAGGTG	3769
11141	11163	CCCACCTTGGCTATCATCACCCG	2001	CGGGTGATGATAGCCAAGGT	3770
11142	11164	CCACCTTGGCTATCATCACCCGA	2002	TCGGGTGATGATAGCCAAGG	3771
11145	11167	CCTTGGCTATCATCACCCGATGA	2003	TCATCGGGTGATGATAGCCA	3772
11160	11182	CCCGATGAGGCAACCAGCCAGAA	2004	TTCTGGCTGGTTGCCTCATC	3773
11161	11183	CCGATGAGGCAACCAGCCAGAAC	2005	GTTCTGGCTGGTTGCCTCAT	3774
11173	11195	CCAGCCAGAACGCCTG	2006	CTGCGTTCAGGCGTT	3775

[0378]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		AACGCAG		CTGGC	
11177	11199	CCAGAACGCCTGAACGCAGGCAC	2007	GTGCCTGCGTTCAGGCGTTC	3776
11185	11207	CCTGAACGCAGGCACATACTTCC	2008	GGAAGTATGTGCCTGCGTTC	3777
11206	11228	CCTATTCTACACCCTAGTAGGCT	2009	AGCCTACTAGGGTGTAGAAT	3778
11217	11239	CCCTAGTAGGCTCCCTTCCCCTA	2010	TAGGGGAAGGGAGCCTACTA	3779
11218	11240	CCTAGTAGGCTCCCTTCCCCTAC	2011	GTAGGGGAAGGGAGCCTACT	3780
11229	11251	CCCTTCCCCTACTCATCGCACTA	2012	TAGTGCGATGAGTAGGGGAA	3781
11230	11252	CCTTCCCCTACTCATCGCACTAA	2013	TTAGTGCGATGAGTAGGGGA	3782
11234	11256	CCCCTACTCATCGCACTAATTTA	2014	TAAATTAGTGCGATGAGTAG	3783
11235	11257	CCCTACTCATCGCACTAATTTAC	2015	GTAAATTAGTGCGATGAGTA	3784
11236	11258	CCTACTCATCGCACTAATTTACA	2016	TGTAAATTAGTGCGATGAGT	3785
11268	11290	CCCTAGGCTCACTAAACATTCTA	2017	TAGAATGTTTAGTGAGCCTA	3786
11269	11291	CCTAGGCTCACTAAACATTCTAC	2018	GTAGAATGTTTAGTGAGCCT	3787
11307	11329	CCCAAGAACTATCAAACTCCTGA	2019	TCAGGAGTTTGATAGTTCTT	3788

[0379]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
11308	11330	CCAAGAACTATCAAACTCCTGAG	2020	CTCAGGAGTTTGATAGTTCT	3789
11325	11347	CCTGAGCCAACAACTTAATATGA	2021	TCATATTAAGTTGTTGGCTC	3790
11331	11353	CCAACAACTTAATATGACTAGCT	2022	AGCTAGTCATATTAAGTTGT	3791
11381	11403	CCTCTTTACGGACTCCACTTATG	2023	CATAAGTGGAGTCCGTAAAG	3792
11395	11417	CCACTTATGACTCCCTAAAGCCC	2024	GGGCTTTAGGGAGTCATAAG	3793
11407	11429	CCCTAAAGCCCATGTCGAAGCCC	2025	GGGCTTCGACATGGGCTTTA	3794
11408	11430	CCTAAAGCCCATGTCGAAGCCCC	2026	GGGGCTTCGACATGGGCTTT	3795
11415	11437	CCCATGTCGAAGCCCCCATCGCT	2027	AGCGATGGGGGCTTCGACAT	3796
11416	11438	CCATGTCGAAGCCCCCATCGCTG	2028	CAGCGATGGGGGCTTCGACA	3797
11427	11449	CCCCCATCGCTGGGTCAATAGTA	2029	TACTATTGACCCAGCGATGG	3798
11428	11450	CCCCATCGCTGGGTCAATAGTAC	2030	GTACTATTGACCCAGCGATG	3799
11429	11451	CCCATCGCTGGGTCAATAGTACT	2031	AGTACTATTGACCCAGCGAT	3800
11430	11452	CCATCGCTGGGTCAATAGTACTT	2032	AAGTACTATTGACCCAGCGA	3801
11454	11476	CCGCAGTACTCTTAAA	2033	GCCTAGTTTTAAGAG	3802

[0380]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		ACTAGGC		TACTG	
11494	11516	CCTCACACTCATTCTCAACCCCC	2034	GGGGGTTGAGAATGAGTGTG	3803
11512	11534	CCCCCTGACAAAACACATAGCCT	2035	AGGCTATGTGTTTTGTCAGG	3804
11513	11535	CCCCTGACAAAACACATAGCCTA	2036	TAGGCTATGTGTTTTGTCAG	3805
11514	11536	CCCTGACAAAACACATAGCCTAC	2037	GTAGGCTATGTGTTTTGTCA	3806
11515	11537	CCTGACAAAACACATAGCCTACC	2038	GGTAGGCTATGTGTTTTGTC	3807
11532	11554	CCTACCCCTTCCTTGTACTATCC	2039	GGATAGTACAAGGAAGGGGT	3808
11536	11558	CCCCTTCCTTGTACTATCCCTAT	2040	ATAGGGATAGTACAAGGAAG	3809
11537	11559	CCCTTCCTTGTACTATCCCTATG	2041	CATAGGGATAGTACAAGGAA	3810
11538	11560	CCTTCCTTGTACTATCCCTATGA	2042	TCATAGGGATAGTACAAGGA	3811
11542	11564	CCTTGTACTATCCCTATGAGGCA	2043	TGCCTCATAGGGATAGTACA	3812
11553	11575	CCCTATGAGGCATAATTATAACA	2044	TGTTATAATTATGCCTCATA	3813
11554	11576	CCTATGAGGCATAATTATAACAA	2045	TTGTTATAATTATGCCTCAT	3814
11580	11602	CCATCTGCCTACGACAAACAGAC	2046	GTCTGTTTGTCGTAGGCAGA	3815

[0381]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
11587	11609	CCTACGACAAACAGACCTAAAAT	2047	ATTTTAGGTCTGTTTGTCGT	3816
11602	11624	CCTAAAATCGCTCATTGCATACT	2048	AGTATGCAATGAGCGATTTT	3817
11635	11657	CCACATAGCCCTCGTAGTAACAG	2049	CTGTTACTACGAGGGCTATG	3818
11643	11665	CCCTCGTAGTAACAGCCATTCTC	2050	GAGAATGGCTGTTACTACGA	3819
11644	11666	CCTCGTAGTAACAGCCATTCTCA	2051	TGAGAATGGCTGTTACTACG	3820
11658	11680	CCATTCTCATCCAAACCCCCTGA	2052	TCAGGGGGTTTGGATGAGAA	3821
11668	11690	CCAAACCCCCTGAAGCTTCACCG	2053	CGGTGAAGCTTCAGGGGGTT	3822
11673	11695	CCCCCTGAAGCTTCACCGGCGCA	2054	TGCGCCGGTGAAGCTTCAGG	3823
11674	11696	CCCCTGAAGCTTCACCGGCGCAG	2055	CTGCGCCGGTGAAGCTTCAG	3824
11675	11697	CCCTGAAGCTTCACCGGCGCAGT	2056	ACTGCGCCGGTGAAGCTTCA	3825
11676	11698	CCTGAAGCTTCACCGGCGCAGTC	2057	GACTGCGCCGGTGAAGCTTC	3826
11688	11710	CCGGCGCAGTCATTCTCATAATC	2058	GATTATGAGAATGACTGCGC	3827
11712	11734	CCCACGGGCTTACATCCTCATTA	2059	TAATGAGGATGTAAGCCCGT	3828
11713	11735	CCACGGGCTTACATCC	2060	GTAATGAGGATGTAA	3829

[0382]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		TCATTAC		GCCCG	
11727	11749	CCTCATTACTATTCTGCCTAGCA	2061	TGCTAGGCAGAATAGTAATG	3830
11743	11765	CCTAGCAAACTCAAACTACGAAC	2062	GTTCGTAGTTTGAGTTTGCT	3831
11788	11810	CCTCTCTCAAGGACTTCAAACTC	2063	GAGTTTGAAGTCCTTGAGAG	3832
11815	11837	CCCACTAATAGCTTTTTGATGAC	2064	GTCATCAAAAAGCTATTAGT	3833
11816	11838	CCACTAATAGCTTTTTGATGACT	2065	AGTCATCAAAAAGCTATTAG	3834
11848	11870	CCTCGCTAACCTCGCCTTACCCC	2066	GGGGTAAGGCGAGGTTAGCG	3835
11857	11879	CCTCGCCTTACCCCCCACTATTA	2067	TAATAGTGGGGGGTAAGGCG	3836
11862	11884	CCTTACCCCCCACTATTAACCTA	2068	TAGGTTAATAGTGGGGGGTA	3837
11867	11889	CCCCCCACTATTAACCTACTGGG	2069	CCCAGTAGGTTAATAGTGGG	3838
11868	11890	CCCCCACTATTAACCTACTGGGA	2070	TCCCAGTAGGTTAATAGTGG	3839
11869	11891	CCCCACTATTAACCTACTGGGAG	2071	CTCCCAGTAGGTTAATAGTG	3840
11870	11892	CCCACTATTAACCTACTGGGAGA	2072	TCTCCCAGTAGGTTAATAGT	3841
11871	11893	CCACTATTAACCTACTGGGAGAA	2073	TTCTCCCAGTAGGTTAATAG	3842

[0383]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
11881	11903	CCTACTGGGAGAACTCTCTGTGC	2074	GCACAGAGAGTTCTCCCAGT	3843
11910	11932	CCACGTTCTCCTGATCAAATATC	2075	GATATTTGATCAGGAGAACG	3844
11919	11941	CCTGATCAAATATCACTCTCCTA	2076	TAGGAGAGTGATATTTGATC	3845
11938	11960	CCTACTTACAGGACTCAACATAC	2077	GTATGTTGAGTCCTGTAAGT	3846
11970	11992	CCCTATACTCCCTCTACATATTT	2078	AAATATGTAGAGGGAGTATA	3847
11971	11993	CCTATACTCCCTCTACATATTTA	2079	TAAATATGTAGAGGGAGTAT	3848
11979	12001	CCCTCTACATATTTACCACAACA	2080	TGTTGTGGTAAATATGTAGA	3849
11980	12002	CCTCTACATATTTACCACAACAC	2081	GTGTTGTGGTAAATATGTAG	3850
11994	12016	CCACAACACAATGGGGCTCACTC	2082	GAGTGAGCCCCATTGTGTTG	3851
12018	12040	CCCACCACATTAACAACATAAAA	2083	TTTTATGTTGTTAATGTGGT	3852
12019	12041	CCACCACATTAACAACATAAAAC	2084	GTTTTATGTTGTTAATGTGG	3853
12022	12044	CCACATTAACAACATAAAACCCT	2085	AGGGTTTTATGTTGTTAATG	3854
12041	12063	CCCTCATTCACACGAGAAAACAC	2086	GTGTTTTCTCGTGTGAATGA	3855
12042	12064	CCTCATTCACACGAGA	2087	GGTGTTTTCTCGTGTG	3856

[0384]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		AAACACC		AATG	
12063	12085	CCCTCATGTTCATACACCTATCC	2088	GGATAGGTGTATGAACATGA	3857
12064	12086	CCTCATGTTCATACACCTATCCC	2089	GGGATAGGTGTATGAACATG	3858
12079	12101	CCTATCCCCCATTCTCCTCCTAT	2090	ATAGGAGGAGAATGGGGGAT	3859
12084	12106	CCCCCATTCTCCTCCTATCCCTC	2091	GAGGGATAGGAGGAGAATGG	3860
12085	12107	CCCCATTCTCCTCCTATCCCTCA	2092	TGAGGGATAGGAGGAGAATG	3861
12086	12108	CCCATTCTCCTCCTATCCCTCAA	2093	TTGAGGGATAGGAGGAGAAT	3862
12087	12109	CCATTCTCCTCCTATCCCTCAAC	2094	GTTGAGGGATAGGAGGAGAA	3863
12094	12116	CCTCCTATCCCTCAACCCCGACA	2095	TGTCGGGGTTGAGGGATAGG	3864
12097	12119	CCTATCCCTCAACCCCGACATCA	2096	TGATGTCGGGGTTGAGGGAT	3865
12102	12124	CCCTCAACCCCGACATCATTACC	2097	GGTAATGATGTCGGGGTTGA	3866
12103	12125	CCTCAACCCCGACATCATTACCG	2098	CGGTAATGATGTCGGGGTTG	3867
12109	12131	CCCCGACATCATTACCGGGTTTT	2099	AAAACCCGGTAATGATGTCG	3868
12110	12132	CCCGACATCATTACCGGGTTTTC	2100	GAAAACCCGGTAATGATGTC	3869

[0385]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
12111	12133	CCGACATCATTACCGGGTTTTCC	2101	GGAAAACCCGGTAATGATGT	3870
12123	12145	CCGGGTTTTCCTCTTGTAAATAT	2102	ATATTTACAAGAGGAAAACC	3871
12132	12154	CCTCTTGTAAATATAGTTTAACC	2103	GGTTAAACTATATTTACAAG	3872
12153	12175	CCAAAACATCAGATTGTGAATCT	2104	AGATTCACAATCTGATGTTT	3873
12194	12216	CCCCTTATTTACCGAGAAAGCTC	2105	GAGCTTTCTCGGTAAATAAG	3874
12195	12217	CCCTTATTTACCGAGAAAGCTCA	2106	TGAGCTTTCTCGGTAAATAA	3875
12196	12218	CCTTATTTACCGAGAAAGCTCAC	2107	GTGAGCTTTCTCGGTAAATA	3876
12205	12227	CCGAGAAAGCTCACAAGAACTGC	2108	GCAGTTCTTGTGAGCTTTCT	3877
12237	12259	CCCCCATGTCTAACAACATGGCT	2109	AGCCATGTTGTTAGACATGG	3878
12238	12260	CCCCATGTCTAACAACATGGCTT	2110	AAGCCATGTTGTTAGACATG	3879
12239	12261	CCCATGTCTAACAACATGGCTTT	2111	AAAGCCATGTTGTTAGACAT	3880
12240	12262	CCATGTCTAACAACATGGCTTTC	2112	GAAAGCCATGTTGTTAGACA	3881
12288	12310	CCATTGGTCTTAGGCCCCAAAAA	2113	TTTTTGGGGCCTAAGACCAA	3882
12302	12324	CCCCAAAAATTTTGGT	2114	GAGTTGCACCAAAAT	3883

[0386]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		GCAACTC		TTTTG	
12303	12325	CCCAAAAATTTTGGTGCAACTCC	2115	GGAGTTGCACCAAAATTTTT	3884
12304	12326	CCAAAAATTTTGGTGCAACTCCA	2116	TGGAGTTGCACCAAAATTTT	3885
12324	12346	CCAAATAAAAGTAATAACCATGC	2117	GCATGGTTATTACTTTTATT	3886
12341	12363	CCATGCACACTACTATAACCACC	2118	GGTGGTTATAGTAGTGTGCA	3887
12359	12381	CCACCCTAACCCTGACTTCCCTA	2119	TAGGGAAGTCAGGGTTAGGG	3888
12362	12384	CCCTAACCCTGACTTCCCTAATT	2120	AATTAGGGAAGTCAGGGTTA	3889
12363	12385	CCTAACCCTGACTTCCCTAATTC	2121	GAATTAGGGAAGTCAGGGTT	3890
12368	12390	CCCTGACTTCCCTAATTCCCCCC	2122	GGGGGGAATTAGGGAAGTCA	3891
12369	12391	CCTGACTTCCCTAATTCCCCCA	2123	TGGGGGGAATTAGGGAAGTC	3892
12377	12399	CCCTAATTCCCCCCATCCTTACC	2124	GGTAAGGATGGGGGGAATTA	3893
12378	12400	CCTAATTCCCCCCATCCTTACCA	2125	TGGTAAGGATGGGGGGAATT	3894
12385	12407	CCCCCCATCCTTACCACCCTCGT	2126	ACGAGGGTGGTAAGGATGGG	3895
12386	12408	CCCCCATCCTTACCACCCTCGTT	2127	AACGAGGGTGGTAAGGATGG	3896

[0387]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
12387	12409	CCCCATCCTTACCACCCTCGTTA	2128	TAACGAGGGTGGTAAGGATG	3897
12388	12410	CCCATCCTTACCACCCTCGTTAA	2129	TTAACGAGGGTGGTAAGGAT	3898
12389	12411	CCATCCTTACCACCCTCGTTAAC	2130	GTTAACGAGGGTGGTAAGGA	3899
12393	12415	CCTTACCACCCTCGTTAACCCTA	2131	TAGGGTTAACGAGGGTGGTA	3900
12398	12420	CCACCCTCGTTAACCCTAACAAA	2132	TTTGTTAGGGTTAACGAGGG	3901
12401	12423	CCCTCGTTAACCCTAACAAAAAA	2133	TTTTTTGTTAGGGTTAACGA	3902
12402	12424	CCTCGTTAACCCTAACAAAAAAA	2134	TTTTTTTGTTAGGGTTAACG	3903
12411	12433	CCCTAACAAAAAAAACTCATACC	2135	GGTATGAGTTTTTTTTGTTA	3904
12412	12434	CCTAACAAAAAAAACTCATACCC	2136	GGGTATGAGTTTTTTTTGTT	3905
12432	12454	CCCCCATTATGTAAAATCCATTG	2137	CAATGGATTTTACATAATGG	3906
12433	12455	CCCCATTATGTAAAATCCATTGT	2138	ACAATGGATTTTACATAATG	3907
12434	12456	CCCATTATGTAAAATCCATTGTC	2139	GACAATGGATTTTACATAAT	3908
12435	12457	CCATTATGTAAAATCCATTGTCG	2140	CGACAATGGATTTTACATAA	3909
12449	12471	CCATTGTCGCATCCAC	2141	AATAAAGGTGGATGC	3910

[0388]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		CTTTATT		GACAA	
12461	12483	CCACCTTTATTATCAGTCTCTTC	2142	GAAGAGACTGATAATAAAGG	3911
12464	12486	CCTTTATTATCAGTCTCTTCCCC	2143	GGGGAAGAGACTGATAATAA	3912
12483	12505	CCCCACAACAATATTCATGTGCC	2144	GGCACATGAATATTGTTGTG	3913
12484	12506	CCCACAACAATATTCATGTGCCT	2145	AGGCACATGAATATTGTTGT	3914
12485	12507	CCACAACAATATTCATGTGCCTA	2146	TAGGCACATGAATATTGTTG	3915
12504	12526	CCTAGACCAAGAAGTTATTATCT	2147	AGATAATAACTTCTTGGTCT	3916
12510	12532	CCAAGAAGTTATTATCTCGAACT	2148	AGTTCGAGATAATAACTTCT	3917
12542	12564	CCACAACCCAAACAACCCAGCTC	2149	GAGCTGGGTTGTTTGGGTTG	3918
12548	12570	CCCAAACAACCCAGCTCTCCCTA	2150	TAGGGAGAGCTGGGTTGTTT	3919
12549	12571	CCAAACAACCCAGCTCTCCCTAA	2151	TTAGGGAGAGCTGGGTTGTT	3920
12557	12579	CCCAGCTCTCCCTAAGCTTCAAA	2152	TTTGAAGCTTAGGGAGAGCT	3921
12558	12580	CCAGCTCTCCCTAAGCTTCAAAC	2153	GTTTGAAGCTTAGGGAGAGC	3922
12566	12588	CCCTAAGCTTCAAACTAGACTAC	2154	GTAGTCTAGTTTGAAGCTTA	3923

[0389]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
12567	12589	CCTAAGCTTCAAACTAGACTACT	2155	AGTAGTCTAGTTTGAAGCTT	3924
12593	12615	CCATAATATTCATCCCTGTAGCA	2156	TGCTACAGGGATGAATATTA	3925
12606	12628	CCCTGTAGCATTGTTCGTTACAT	2157	ATGTAACGAACAATGCTACA	3926
12607	12629	CCTGTAGCATTGTTCGTTACATG	2158	CATGTAACGAACAATGCTAC	3927
12632	12654	CCATCATAGAATTCTCACTGTGA	2159	TCACAGTGAGAATTCTATGA	3928
12669	12691	CCCAAACATTAATCAGTTCTTCA	2160	TGAAGAACTGATTAATGTTT	3929
12670	12692	CCAAACATTAATCAGTTCTTCAA	2161	TTGAAGAACTGATTAATGTT	3930
12708	12730	CCTAATTACCATACTAATCTTAG	2162	CTAAGATTAGTATGGTAATT	3931
12716	12738	CCATACTAATCTTAGTTACCGCT	2163	AGCGGTAACTAAGATTAGTA	3932
12734	12756	CCGCTAACAACCTATTCCAACTG	2164	CAGTTGGAATAGGTTGTTAG	3933
12744	12766	CCTATTCCAACTGTTCATCGGCT	2165	AGCCGATGAACAGTTGGAAT	3934
12750	12772	CCAACTGTTCATCGGCTGAGAGG	2166	CCTCTCAGCCGATGAACAGT	3935
12788	12810	CCTTCTTGCTCATCAGTTGATGA	2167	TCATCAACTGATGAGCAAGA	3936
12815	12837	CCCGAGCAGATGCCAA	2168	TGCTGTGTTGGCATCT	3937

[0390]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		CACAGCA		GCTC	
12816	12838	CCGAGCAGATGCCAACACAGCAG	2169	CTGCTGTGTTGGCATCTGCT	3938
12827	12849	CCAACACAGCAGCCATTCAAGCA	2170	TGCTTGAATGGCTGCTGTGT	3939
12839	12861	CCATTCAAGCAATCCTATACAAC	2171	GTTGTATAGGATTGCTTGAA	3940
12852	12874	CCTATACAACCGTATCGGCGATA	2172	TATCGCCGATACGGTTGTAT	3941
12861	12883	CCGTATCGGCGATATCGGTTTCA	2173	TGAAACCGATATCGCCGATA	3942
12885	12907	CCTCGCCTTAGCATGATTTATCC	2174	GGATAAATCATGCTAAGGCG	3943
12890	12912	CCTTAGCATGATTTATCCTACAC	2175	GTGTAGGATAAATCATGCTA	3944
12906	12928	CCTACACTCCAACTCATGAGACC	2176	GGTCTCATGAGTTGGAGTGT	3945
12914	12936	CCAACTCATGAGACCCACAACAA	2177	TTGTTGTGGGTCTCATGAGT	3946
12927	12949	CCCACAACAAATAGCCCTTCTAA	2178	TTAGAAGGGCTATTTGTTGT	3947
12928	12950	CCACAACAAATAGCCCTTCTAAA	2179	TTTAGAAGGGCTATTTGTTG	3948
12941	12963	CCCTTCTAAACGCTAATCCAAGC	2180	GCTTGGATTAGCGTTTAGAA	3949
12942	12964	CCTTCTAAACGCTAATCCAAGCC	2181	GGCTTGGATTAGCGTTTAGA	3950

[0391]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
12958	12980	CCAAGCCTCACCCCAC TACTAGG	2182	CCTAGTAGTGGGGTG AGGCT	3951
12963	12985	CCTCACCCCACTACTA GGCCTCC	2183	GGAGGCCTAGTAGTG GGGTG	3952
12968	12990	CCCCACTACTAGGCCT CCTCCTA	2184	TAGGAGGAGGCCTAG TAGTG	3953
12969	12991	CCCACTACTAGGCCTC CTCCTAG	2185	CTAGGAGGAGGCCTA GTAGT	3954
12970	12992	CCACTACTAGGCCTCC TCCTAGC	2186	GCTAGGAGGAGGCCT AGTAG	3955
12981	13003	CCTCCTCCTAGCAGCA GCAGGCA	2187	TGCCTGCTGCTGCTA GGAGG	3956
12984	13006	CCTCCTAGCAGCAGCA GGCAAAT	2188	ATTTGCCTGCTGCTGC TAGG	3957
12987	13009	CCTAGCAGCAGCAGGC AAATCAG	2189	CTGATTTGCCTGCTGC TGCT	3958
13010	13032	CCCAATTAGGTCTCCA CCCCTGA	2190	TCAGGGGTGGAGACC TAATT	3959
13011	13033	CCAATTAGGTCTCCAC CCCTGAC	2191	GTCAGGGGTGGAGAC CTAAT	3960
13023	13045	CCACCCCTGACTCCCC TCAGCCA	2192	TGGCTGAGGGGAGTC AGGGG	3961
13026	13048	CCCCTGACTCCCCTCA GCCATAG	2193	CTATGGCTGAGGGGA GTCAG	3962
13027	13049	CCCTGACTCCCCTCAG CCATAGA	2194	TCTATGGCTGAGGGG AGTCA	3963
13028	13050	CCTGACTCCCCTCAGC	2195	TTCTATGGCTGAGGG	3964

[0392]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		CATAGAA		GAGTC	
13035	13057	CCCCTCAGCCATAGAAGGCCCCA	2196	TGGGGCCTTCTATGGCTGAG	3965
13036	13058	CCCTCAGCCATAGAAGGCCCCAC	2197	GTGGGGCCTTCTATGGCTGA	3966
13037	13059	CCTCAGCCATAGAAGGCCCCACC	2198	GGTGGGGCCTTCTATGGCTG	3967
13043	13065	CCATAGAAGGCCCCACCCCAGTC	2199	GACTGGGGTGGGGCCTTCTA	3968
13053	13075	CCCCACCCCAGTCTCAGCCCTAC	2200	GTAGGGCTGAGACTGGGGTG	3969
13054	13076	CCCACCCCAGTCTCAGCCCTACT	2201	AGTAGGGCTGAGACTGGGGT	3970
13055	13077	CCACCCCAGTCTCAGCCCTACTC	2202	GAGTAGGGCTGAGACTGGGG	3971
13058	13080	CCCCAGTCTCAGCCCTACTCCAC	2203	GTGGAGTAGGGCTGAGACTG	3972
13059	13081	CCCAGTCTCAGCCCTACTCCACT	2204	AGTGGAGTAGGGCTGAGACT	3973
13060	13082	CCAGTCTCAGCCCTACTCCACTC	2205	GAGTGGAGTAGGGCTGAGAC	3974
13070	13092	CCCTACTCCACTCAAGCACTATA	2206	TATAGTGCTTGAGTGGAGTA	3975
13071	13093	CCTACTCCACTCAAGCACTATAG	2207	CTATAGTGCTTGAGTGGAGT	3976
13077	13099	CCACTCAAGCACTATAGTTGTAG	2208	CTACAACTATAGTGCTTGAG	3977

[0393]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
13119	13141	CCGCTTCCACCCCCTAGCAGAAA	2209	TTTCTGCTAGGGGGTGGAAG	3978
13125	13147	CCACCCCCTAGCAGAAAATAGCC	2210	GGCTATTTTCTGCTAGGGGG	3979
13128	13150	CCCCCTAGCAGAAAATAGCCCAC	2211	GTGGGCTATTTTCTGCTAGG	3980
13129	13151	CCCCTAGCAGAAAATAGCCCACT	2212	AGTGGGCTATTTTCTGCTAG	3981
13130	13152	CCCTAGCAGAAAATAGCCCACTA	2213	TAGTGGGCTATTTTCTGCTA	3982
13131	13153	CCTAGCAGAAAATAGCCCACTAA	2214	TTAGTGGGCTATTTTCTGCT	3983
13146	13168	CCCACTAATCCAAACTCTAACAC	2215	GTGTTAGAGTTTGGATTAGT	3984
13147	13169	CCACTAATCCAAACTCTAACACT	2216	AGTGTTAGAGTTTGGATTAG	3985
13155	13177	CCAAACTCTAACACTATGCTTAG	2217	CTAAGCATAGTGTTAGAGTT	3986
13187	13209	CCACTCTGTTCGCAGCAGTCTGC	2218	GCAGACTGCTGCGAACAGAG	3987
13211	13233	CCCTTACACAAAATGACATCAAA	2219	TTTGATGTCATTTTGTGTAA	3988
13212	13234	CCTTACACAAAATGACATCAAAA	2220	TTTTGATGTCATTTTGTGTA	3989
13244	13266	CCTTCTCCACTTCAAGTCAACTA	2221	TAGTTGACTTGAAGTGGAGA	3990
13250	13272	CCACTTCAAGTCAACT	2222	GAGTCCTAGTTGACT	3991

[0394]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		AGGACTC		TGAAG	
13296	13318	CCAACCACACCTAGCATTCCTGC	2223	GCAGGAATGCTAGGTGTGGT	3992
13300	13322	CCACACCTAGCATTCCTGCACAT	2224	ATGTGCAGGAATGCTAGGTG	3993
13305	13327	CCTAGCATTCCTGCACATCTGTA	2225	TACAGATGTGCAGGAATGCT	3994
13314	13336	CCTGCACATCTGTACCCACGCCT	2226	AGGCGTGGGTACAGATGTGC	3995
13328	13350	CCCACGCCTTCTTCAAAGCCATA	2227	TATGGCTTTGAAGAAGGCGT	3996
13329	13351	CCACGCCTTCTTCAAAGCCATAC	2228	GTATGGCTTTGAAGAAGGCG	3997
13334	13356	CCTTCTTCAAAGCCATACTATTT	2229	AAATAGTATGGCTTTGAAGA	3998
13346	13368	CCATACTATTTATGTGCTCCGGG	2230	CCCGGAGCACATAAATAGTA	3999
13364	13386	CCGGGTCCATCATCCACAACCTT	2231	AAGGTTGTGGATGATGGACC	4000
13370	13392	CCATCATCCACAACCTTAACAAT	2232	ATTGTTAAGGTTGTGGATGA	4001
13377	13399	CCACAACCTTAACAATGAACAAG	2233	CTTGTTCATTGTTAAGGTTG	4002
13383	13405	CCTTAACAATGAACAAGATATTC	2234	GAATATCTTGTTCATTGTTA	4003
13430	13452	CCATACCTCTCACTTCAACCTCC	2235	GGAGGTTGAAGTGAGAGGTA	4004

[0395]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
13435	13457	CCTCTCACTTCAACCTCCCTCAC	2236	GTGAGGGAGGTTGAAGTGAG	4005
13448	13470	CCTCCCTCACCATTGGCAGCCTA	2237	TAGGCTGCCAATGGTGAGGG	4006
13451	13473	CCCTCACCATTGGCAGCCTAGCA	2238	TGCTAGGCTGCCAATGGTGA	4007
13452	13474	CCTCACCATTGGCAGCCTAGCAT	2239	ATGCTAGGCTGCCAATGGTG	4008
13457	13479	CCATTGGCAGCCTAGCATTAGCA	2240	TGCTAATGCTAGGCTGCCAA	4009
13467	13489	CCTAGCATTAGCAGGAATACCTT	2241	AAGGTATTCCTGCTAATGCT	4010
13486	13508	CCTTTCCTCACAGGTTTCTACTC	2242	GAGTAGAAACCTGTGAGGAA	4011
13491	13513	CCTCACAGGTTTCTACTCCAAAG	2243	CTTTGGAGTAGAAACCTGTG	4012
13508	13530	CCAAAGACCACATCATCGAAACC	2244	GGTTTCGATGATGTGGTCTT	4013
13515	13537	CCACATCATCGAAACCGCAAACA	2245	TGTTTGCGGTTTCGATGATG	4014
13529	13551	CCGCAAACATATCATACACAAAC	2246	GTTTGTGTATGATATGTTTG	4015
13553	13575	CCTGAGCCCTATCTATTACTCTC	2247	GAGAGTAATAGATAGGGCTC	4016
13559	13581	CCCTATCTATTACTCTCATCGCT	2248	AGCGATGAGAGTAATAGATA	4017
13560	13582	CCTATCTATTACTCTCA	2249	TAGCGATGAGAGTAA	4018

[0396]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		TCGCTA		TAGAT	
13583	13605	CCTCCCTGACAAGCGCCTATAGC	2250	GCTATAGGCGCTTGTCAGGG	4019
13586	13608	CCCTGACAAGCGCCTATAGCACT	2251	AGTGCTATAGGCGCTTGTCA	4020
13587	13609	CCTGACAAGCGCCTATAGCACTC	2252	GAGTGCTATAGGCGCTTGTC	4021
13598	13620	CCTATAGCACTCGAATAATTCTT	2253	AAGAATTATTCGAGTGCTAT	4022
13625	13647	CCCTAACAGGTCAACCTCGCTTC	2254	GAAGCGAGGTTGACCTGTTA	4023
13626	13648	CCTAACAGGTCAACCTCGCTTCC	2255	GGAAGCGAGGTTGACCTGTT	4024
13639	13661	CCTCGCTTCCCCACCCTTACTAA	2256	TTAGTAAGGGTGGGGAAGCG	4025
13647	13669	CCCCACCCTTACTAACATTAACG	2257	CGTTAATGTTAGTAAGGGTG	4026
13648	13670	CCCACCCTTACTAACATTAACGA	2258	TCGTTAATGTTAGTAAGGGT	4027
13649	13671	CCACCCTTACTAACATTAACGAA	2259	TTCGTTAATGTTAGTAAGGG	4028
13652	13674	CCCTTACTAACATTAACGAAAAT	2260	ATTTTCGTTAATGTTAGTAA	4029
13653	13675	CCTTACTAACATTAACGAAAATA	2261	TATTTTCGTTAATGTTAGTA	4030
13677	13699	CCCCACCCTACTAAACCCCATTA	2262	TAATGGGGTTTAGTAGGGTG	4031

[0397]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
13678	13700	CCCACCCTACTAAACCCCATTAA	2263	TTAATGGGGTTTAGTAGGGT	4032
13679	13701	CCACCCTACTAAACCCCATTAAA	2264	TTTAATGGGGTTTAGTAGGG	4033
13682	13704	CCCTACTAAACCCCATTAAACGC	2265	GCGTTTAATGGGGTTTAGTA	4034
13683	13705	CCTACTAAACCCCATTAAACGCC	2266	GGCGTTTAATGGGGTTTAGT	4035
13692	13714	CCCCATTAAACGCCTGGCAGCCG	2267	CGGCTGCCAGGCGTTTAATG	4036
13693	13715	CCCATTAAACGCCTGGCAGCCGG	2268	CCGGCTGCCAGGCGTTTAAT	4037
13694	13716	CCATTAAACGCCTGGCAGCCGGA	2269	TCCGGCTGCCAGGCGTTTAA	4038
13704	13726	CCTGGCAGCCGGAAGCCTATTCG	2270	CGAATAGGCTTCCGGCTGCC	4039
13712	13734	CCGGAAGCCTATTCGCAGGATTT	2271	AAATCCTGCGAATAGGCTTC	4040
13719	13741	CCTATTCGCAGGATTTCTCATTA	2272	TAATGAGAAATCCTGCGAAT	4041
13754	13776	CCCCCGCATCCCCCTTCCAAACA	2273	TGTTTGGAAGGGGGATGCGG	4042
13755	13777	CCCCGCATCCCCCTTCCAAACAA	2274	TTGTTTGGAAGGGGGATGCG	4043
13756	13778	CCCGCATCCCCCTTCCAAACAAC	2275	GTTGTTTGGAAGGGGGATGC	4044
13757	13779	CCGCATCCCCCTTCCA	2276	TGTTGTTTGGAAGGG	4045

[0398]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		AACAACA		GGATG	
13763	13785	CCCCCTTCCAAACAACAATCCCC	2277	GGGGATTGTTGTTTGGAAGG	4046
13764	13786	CCCCTTCCAAACAACAATCCCCC	2278	GGGGGATTGTTGTTTGGAAG	4047
13765	13787	CCCTTCCAAACAACAATCCCCCT	2279	AGGGGGATTGTTGTTTGGAA	4048
13766	13788	CCTTCCAAACAACAATCCCCCTC	2280	GAGGGGGATTGTTGTTTGGA	4049
13770	13792	CCAAACAACAATCCCCCTCTACC	2281	GGTAGAGGGGGATTGTTGTT	4050
13782	13804	CCCCCTCTACCTAAAACTCACAG	2282	CTGTGAGTTTTAGGTAGAGG	4051
13783	13805	CCCCTCTACCTAAAACTCACAGC	2283	GCTGTGAGTTTTAGGTAGAG	4052
13784	13806	CCCTCTACCTAAAACTCACAGCC	2284	GGCTGTGAGTTTTAGGTAGA	4053
13785	13807	CCTCTACCTAAAACTCACAGCCC	2285	GGGCTGTGAGTTTTAGGTAG	4054
13791	13813	CCTAAAACTCACAGCCCTCGCTG	2286	CAGCGAGGGCTGTGAGTTTT	4055
13805	13827	CCCTCGCTGTCACTTTCCTAGGA	2287	TCCTAGGAAAGTGACAGCGA	4056
13806	13828	CCTCGCTGTCACTTTCCTAGGAC	2288	GTCCTAGGAAAGTGACAGCG	4057
13821	13843	CCTAGGACTTCTAACAGCCCTAG	2289	CTAGGGCTGTTAGAAGTCCT	4058

[0399]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
13838	13860	CCCTAGACCTCAACTACCTAACC	2290	GGTTAGGTAGTTGAGGTCTA	4059
13839	13861	CCTAGACCTCAACTACCTAACCA	2291	TGGTTAGGTAGTTGAGGTCT	4060
13845	13867	CCTCAACTACCTAACCAACAAAC	2292	GTTTGTTGGTTAGGTAGTTG	4061
13854	13876	CCTAACCAACAAACTTAAAATAA	2293	TTATTTTAAGTTTGTTGGTT	4062
13859	13881	CCAACAAACTTAAAATAAAATCC	2294	GGATTTTATTTTAAGTTTGT	4063
13880	13902	CCCCACTATGCACATTTTATTTC	2295	GAAATAAAATGTGCATAGTG	4064
13881	13903	CCCACTATGCACATTTTATTTCT	2296	AGAAATAAAATGTGCATAGT	4065
13882	13904	CCACTATGCACATTTTATTTCTC	2297	GAGAAATAAAATGTGCATAG	4066
13904	13926	CCAACATACTCGGATTCTACCCT	2298	AGGGTAGAATCCGAGTATGT	4067
13923	13945	CCCTAGCATCACACACCGCACAA	2299	TTGTGCGGTGTGTGATGCTA	4068
13924	13946	CCTAGCATCACACACCGCACAAT	2300	ATTGTGCGGTGTGTGATGCT	4069
13938	13960	CCGCACAATCCCCTATCTAGGCC	2301	GGCCTAGATAGGGGATTGTG	4070
13947	13969	CCCCTATCTAGGCCTTCTTACGA	2302	TCGTAAGAAGGCCTAGATAG	4071
13948	13970	CCCTATCTAGGCCTTCT	2303	CTCGTAAGAAGGCCT	4072

[0400]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		TACGAG		AGATA	
13949	13971	CCTATCTAGGCCTTCTTACGAGC	2304	GCTCGTAAGAAGGCCTAGAT	4073
13959	13981	CCTTCTTACGAGCCAAAACCTGC	2305	GCAGGTTTTGGCTCGTAAGA	4074
13971	13993	CCAAAACCTGCCCCTACTCCTCC	2306	GGAGGAGTAGGGGCAGGTTT	4075
13977	13999	CCTGCCCCTACTCCTCCTAGACC	2307	GGTCTAGGAGGAGTAGGGGC	4076
13981	14003	CCCCTACTCCTCCTAGACCTAAC	2308	GTTAGGTCTAGGAGGAGTAG	4077
13982	14004	CCCTACTCCTCCTAGACCTAACC	2309	GGTTAGGTCTAGGAGGAGTA	4078
13983	14005	CCTACTCCTCCTAGACCTAACCT	2310	AGGTTAGGTCTAGGAGGAGT	4079
13989	14011	CCTCCTAGACCTAACCTGACTAG	2311	CTAGTCAGGTTAGGTCTAGG	4080
13992	14014	CCTAGACCTAACCTGACTAGAAA	2312	TTTCTAGTCAGGTTAGGTCT	4081
13998	14020	CCTAACCTGACTAGAAAAGCTAT	2313	ATAGCTTTTCTAGTCAGGTT	4082
14003	14025	CCTGACTAGAAAAGCTATTACCT	2314	AGGTAATAGCTTTTCTAGTC	4083
14023	14045	CCTAAAACAATTTCACAGCACCA	2315	TGGTGCTGTGAAATTGTTTT	4084
14043	14065	CCAAATCTCCACCTCCATCATCA	2316	TGATGATGGAGGTGGAGATT	4085

[0401]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
14051	14073	CCACCTCCATCATCACCTCAACC	2317	GGTTGAGGTGATGATGGAGG	4086
14054	14076	CCTCCATCATCACCTCAACCCAA	2318	TTGGGTTGAGGTGATGATGG	4087
14057	14079	CCATCATCACCTCAACCCAAAAA	2319	TTTTTGGGTTGAGGTGATGA	4088
14066	14088	CCTCAACCCAAAAAGGCATAATT	2320	AATTATGCCTTTTTGGGTTG	4089
14072	14094	CCCAAAAAGGCATAATTAAACTT	2321	AAGTTTAATTATGCCTTTTT	4090
14073	14095	CCAAAAAGGCATAATTAAACTTT	2322	AAAGTTTAATTATGCCTTTT	4091
14100	14122	CCTCTCTTTCTTCTTCCCACTCA	2323	TGAGTGGGAAGAAGAAAGAG	4092
14115	14137	CCCACTCATCCTAACCCTACTCC	2324	GGAGTAGGGTTAGGATGAGT	4093
14116	14138	CCACTCATCCTAACCCTACTCCT	2325	AGGAGTAGGGTTAGGATGAG	4094
14124	14146	CCTAACCCTACTCCTAATCACAT	2326	ATGTGATTAGGAGTAGGGTT	4095
14129	14151	CCCTACTCCTAATCACATAACCT	2327	AGGTTATGTGATTAGGAGTA	4096
14130	14152	CCTACTCCTAATCACATAACCTA	2328	TAGGTTATGTGATTAGGAGT	4097
14136	14158	CCTAATCACATAACCTATTCCCC	2329	GGGGAATAGGTTATGTGATT	4098
14149	14171	CCTATTCCCCCGAGCA	2330	TTGAGATTGCTCGGG	4099

[0402]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		ATCTCAA		GGAAT	
14155	14177	CCCCCGAGCAATCTCAATTACAA	2331	TTGTAATTGAGATTGCTCGG	4100
14156	14178	CCCCGAGCAATCTCAATTACAAT	2332	ATTGTAATTGAGATTGCTCG	4101
14157	14179	CCCGAGCAATCTCAATTACAATA	2333	TATTGTAATTGAGATTGCTC	4102
14158	14180	CCGAGCAATCTCAATTACAATAT	2334	ATATTGTAATTGAGATTGCT	4103
14186	14208	CCAACAAACAATGTTCAACCAGT	2335	ACTGGTTGAACATTGTTTGT	4104
14204	14226	CCAGTAACTACTACTAATCAACG	2336	CGTTGATTAGTAGTAGTTAC	4105
14227	14249	CCCATAATCATACAAAGCCCCCG	2337	CGGGGGCTTTGTATGATTAT	4106
14228	14250	CCATAATCATACAAAGCCCCCGC	2338	GCGGGGGCTTTGTATGATTA	4107
14244	14266	CCCCCGCACCAATAGGATCCTCC	2339	GGAGGATCCTATTGGTGCGG	4108
14245	14267	CCCCGCACCAATAGGATCCTCCC	2340	GGGAGGATCCTATTGGTGCG	4109
14246	14268	CCCGCACCAATAGGATCCTCCCG	2341	CGGGAGGATCCTATTGGTGC	4110
14247	14269	CCGCACCAATAGGATCCTCCCGA	2342	TCGGGAGGATCCTATTGGTG	4111
14252	14274	CCAATAGGATCCTCCCGAATCAA	2343	TTGATTCGGGAGGATCCTAT	4112

[0403]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
14262	14284	CCTCCCGAATCAACCCTGACCCC	2344	GGGGTCAGGGTTGATTCGGG	4113
14265	14287	CCCGAATCAACCCTGACCCCTCT	2345	AGAGGGGTCAGGGTTGATTC	4114
14266	14288	CCGAATCAACCCTGACCCCTCTC	2346	GAGAGGGGTCAGGGTTGATT	4115
14275	14297	CCCTGACCCCTCTCCTTCATAAA	2347	TTTATGAAGGAGAGGGGTCA	4116
14276	14298	CCTGACCCCTCTCCTTCATAAAT	2348	ATTTATGAAGGAGAGGGGTC	4117
14281	14303	CCCCTCTCCTTCATAAATTATTC	2349	GAATAATTTATGAAGGAGAG	4118
14282	14304	CCCTCTCCTTCATAAATTATTCA	2350	TGAATAATTTATGAAGGAGA	4119
14283	14305	CCTCTCCTTCATAAATTATTCAG	2351	CTGAATAATTTATGAAGGAG	4120
14288	14310	CCTTCATAAATTATTCAGCTTCC	2352	GGAAGCTGAATAATTTATGA	4121
14309	14331	CCTACACTATTAAAGTTTACCAC	2353	GTGGTAAACTTTAATAGTGT	4122
14328	14350	CCACAACCACCACCCCATCATAC	2354	GTATGATGGGGTGGTGGTTG	4123
14334	14356	CCACCACCCCATCATACTCTTTC	2355	GAAAGAGTATGATGGGGTGG	4124
14337	14359	CCACCCCATCATACTCTTTCACC	2356	GGTGAAAGAGTATGATGGGG	4125
14340	14362	CCCCATCATACTCTTTC	2357	GTGGGTGAAAGAGTA	4126

[0404]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		ACCCAC		TGATG	
14341	14363	CCCATCATACTCTTTCACCCACA	2358	TGTGGGTGAAAGAGTATGAT	4127
14342	14364	CCATCATACTCTTTCACCCACAG	2359	CTGTGGGTGAAAGAGTATGA	4128
14358	14380	CCCACAGCACCAATCCTACCTCC	2360	GGAGGTAGGATTGGTGCTGT	4129
14359	14381	CCACAGCACCAATCCTACCTCCA	2361	TGGAGGTAGGATTGGTGCTG	4130
14367	14389	CCAATCCTACCTCCATCGCTAAC	2362	GTTAGCGATGGAGGTAGGAT	4131
14372	14394	CCTACCTCCATCGCTAACCCCAC	2363	GTGGGGTTAGCGATGGAGGT	4132
14376	14398	CCTCCATCGCTAACCCCACTAAA	2364	TTTAGTGGGGTTAGCGATGG	4133
14379	14401	CCATCGCTAACCCCACTAAAACA	2365	TGTTTTAGTGGGGTTAGCGA	4134
14389	14411	CCCCACTAAAACACTCACCAAGA	2366	TCTTGGTGAGTGTTTTAGTG	4135
14390	14412	CCCACTAAAACACTCACCAAGAC	2367	GTCTTGGTGAGTGTTTTAGT	4136
14391	14413	CCACTAAAACACTCACCAAGACC	2368	GGTCTTGGTGAGTGTTTTAG	4137
14406	14428	CCAAGACCTCAACCCCTGACCCC	2369	GGGGTCAGGGGTTGAGGTCT	4138
14412	14434	CCTCAACCCCTGACCCCCATGCC	2370	GGCATGGGGGTCAGGGGTTG	4139

[0405]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
14418	14440	CCCCTGACCCCCATGCCTCAGGA	2371	TCCTGAGGCATGGGGGTCAG	4140
14419	14441	CCCTGACCCCCATGCCTCAGGAT	2372	ATCCTGAGGCATGGGGGTCA	4141
14420	14442	CCTGACCCCCATGCCTCAGGATA	2373	TATCCTGAGGCATGGGGGTC	4142
14425	14447	CCCCCATGCCTCAGGATACTCCT	2374	AGGAGTATCCTGAGGCATGG	4143
14426	14448	CCCCATGCCTCAGGATACTCCTC	2375	GAGGAGTATCCTGAGGCATG	4144
14427	14449	CCCATGCCTCAGGATACTCCTCA	2376	TGAGGAGTATCCTGAGGCAT	4145
14428	14450	CCATGCCTCAGGATACTCCTCAA	2377	TTGAGGAGTATCCTGAGGCA	4146
14433	14455	CCTCAGGATACTCCTCAATAGCC	2378	GGCTATTGAGGAGTATCCTG	4147
14445	14467	CCTCAATAGCCATCGCTGTAGTA	2379	TACTACAGCGATGGCTATTG	4148
14454	14476	CCATCGCTGTAGTATATCCAAAG	2380	CTTTGGATATACTACAGCGA	4149
14471	14493	CCAAAGACAACCATCATTCCCCC	2381	GGGGGAATGATGGTTGTCTT	4150
14481	14503	CCATCATTCCCCCTAAATAAATT	2382	AATTTATTTAGGGGGAATGA	4151
14489	14511	CCCCCTAAATAAATTAAAAAAAC	2383	GTTTTTTTAATTTATTTAGG	4152
14490	14512	CCCCTAAATAAATTAA	2384	AGTTTTTTTAATTTAT	4153

[0406]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		AAAAACT		TTAG	
14491	14513	CCCTAAATAAATTAAAAAAACTA	2385	TAGTTTTTTTAATTTATTTA	4154
14492	14514	CCTAAATAAATTAAAAAAACTAT	2386	ATAGTTTTTTTAATTTATTT	4155
14519	14541	CCCATATAACCTCCCCCAAAATT	2387	AATTTTGGGGGAGGTTATAT	4156
14520	14542	CCATATAACCTCCCCCAAAATTC	2388	GAATTTTGGGGGAGGTTATA	4157
14528	14550	CCTCCCCCAAAATTCAGAATAAT	2389	ATTATTCTGAATTTTGGGGG	4158
14531	14553	CCCCCAAAATTCAGAATAATAAC	2390	GTTATTATTCTGAATTTTGG	4159
14532	14554	CCCCAAAATTCAGAATAATAACA	2391	TGTTATTATTCTGAATTTTG	4160
14533	14555	CCCAAAATTCAGAATAATAACAC	2392	GTGTTATTATTCTGAATTTT	4161
14534	14556	CCAAAATTCAGAATAATAACACA	2393	TGTGTTATTATTCTGAATTT	4162
14557	14579	CCCGACCACACCGCTAACAATCA	2394	TGATTGTTAGCGGTGTGGTC	4163
14558	14580	CCGACCACACCGCTAACAATCAA	2395	TTGATTGTTAGCGGTGTGGT	4164
14562	14584	CCACACCGCTAACAATCAATACT	2396	AGTATTGATTGTTAGCGGTG	4165
14567	14589	CCGCTAACAATCAATACTAAACC	2397	GGTTTAGTATTGATTGTTAG	4166

[0407]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
14588	14610	CCCCCATAAATAGGAGAAGGCTT	2398	AAGCCTTCTCCTATTTATGG	4167
14589	14611	CCCCATAAATAGGAGAAGGCTTA	2399	TAAGCCTTCTCCTATTTATG	4168
14590	14612	CCCATAAATAGGAGAAGGCTTAG	2400	CTAAGCCTTCTCCTATTTAT	4169
14591	14613	CCATAAATAGGAGAAGGCTTAGA	2401	TCTAAGCCTTCTCCTATTTA	4170
14620	14642	CCCCACAAACCCCATTACTAAAC	2402	GTTTAGTAATGGGGTTTGTG	4171
14621	14643	CCCACAAACCCCATTACTAAACC	2403	GGTTTAGTAATGGGGTTTGT	4172
14622	14644	CCACAAACCCCATTACTAAACCC	2404	GGGTTTAGTAATGGGGTTTG	4173
14629	14651	CCCCATTACTAAACCCACACTCA	2405	TGAGTGTGGGTTTAGTAATG	4174
14630	14652	CCCATTACTAAACCCACACTCAA	2406	TTGAGTGTGGGTTTAGTAAT	4175
14631	14653	CCATTACTAAACCCACACTCAAC	2407	GTTGAGTGTGGGTTTAGTAA	4176
14642	14664	CCCACACTCAACAGAAACAAAGC	2408	GCTTTGTTTCTGTTGAGTGT	4177
14643	14665	CCACACTCAACAGAAACAAAGCA	2409	TGCTTTGTTTCTGTTGAGTG	4178
14694	14716	CCACGACCAATGATATGAAAAAC	2410	GTTTTTCATATCATTGGTCG	4179
14700	14722	CCAATGATATGAAAAA	2411	ACGATGGTTTTTCAT	4180

[0408]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		CCATCGT		ATCAT	
14716	14738	CCATCGTTGTATTTCAACTACAA	2412	TTGTAGTTGAAATACAACGA	4181
14744	14766	CCAATGACCCCAATACGCAAAAC	2413	GTTTTGCGTATTGGGGTCAT	4182
14751	14773	CCCCAATACGCAAAACTAACCCC	2414	GGGGTTAGTTTTGCGTATTG	4183
14752	14774	CCCAATACGCAAAACTAACCCCC	2415	GGGGGTTAGTTTTGCGTATT	4184
14753	14775	CCAATACGCAAAACTAACCCCCT	2416	AGGGGGTTAGTTTTGCGTAT	4185
14770	14792	CCCCCTAATAAAATTAATTAACC	2417	GGTTAATTAATTTTATTAGG	4186
14771	14793	CCCCTAATAAAATTAATTAACCA	2418	TGGTTAATTAATTTTATTAG	4187
14772	14794	CCCTAATAAAATTAATTAACCAC	2419	GTGGTTAATTAATTTTATTA	4188
14773	14795	CCTAATAAAATTAATTAACCACT	2420	AGTGGTTAATTAATTTTATT	4189
14791	14813	CCACTCATTCATCGACCTCCCCA	2421	TGGGGAGGTCGATGAATGAG	4190
14806	14828	CCTCCCCACCCCATCCAACATCT	2422	AGATGTTGGATGGGGTGGGG	4191
14809	14831	CCCCACCCCATCCAACATCTCCG	2423	CGGAGATGTTGGATGGGGTG	4192
14810	14832	CCCACCCCATCCAACATCTCCGC	2424	GCGGAGATGTTGGATGGGGT	4193

[0409]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
14811	14833	CCACCCCATCCAACATCTCCGCA	2425	TGCGGAGATGTTGGATGGGG	4194
14814	14836	CCCCATCCAACATCTCCGCATGA	2426	TCATGCGGAGATGTTGGATG	4195
14815	14837	CCCATCCAACATCTCCGCATGAT	2427	ATCATGCGGAGATGTTGGAT	4196
14816	14838	CCATCCAACATCTCCGCATGATG	2428	CATCATGCGGAGATGTTGGA	4197
14820	14842	CCAACATCTCCGCATGATGAAAC	2429	GTTTCATCATGCGGAGATGT	4198
14829	14851	CCGCATGATGAAACTTCGGCTCA	2430	TGAGCCGAAGTTTCATCATG	4199
14854	14876	CCTTGGCGCCTGCCTGATCCTCC	2431	GGAGGATCAGGCAGGCGCCA	4200
14862	14884	CCTGCCTGATCCTCCAAATCACC	2432	GGTGATTTGGAGGATCAGGC	4201
14866	14888	CCTGATCCTCCAAATCACCACAG	2433	CTGTGGTGATTTGGAGGATC	4202
14872	14894	CCTCCAAATCACCACAGGACTAT	2434	ATAGTCCTGTGGTGATTTGG	4203
14875	14897	CCAAATCACCACAGGACTATTCC	2435	GGAATAGTCCTGTGGTGATT	4204
14883	14905	CCACAGGACTATTCCTAGCCATG	2436	CATGGCTAGGAATAGTCCTG	4205
14896	14918	CCTAGCCATGCACTACTCACCAG	2437	CTGGTGAGTAGTGCATGGCT	4206
14901	14923	CCATGCACTACTCACC	2438	GGCGTCTGGTGAGTA	4207

[0410]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		AGACGCC		GTGCA	
14915	14937	CCAGACGCCTCAACCGCCTTTTC	2439	GAAAAGGCGGTTGAGGCGTC	4208
14922	14944	CCTCAACCGCCTTTTCATCAATC	2440	GATTGATGAAAAGGCGGTTG	4209
14928	14950	CCGCCTTTTCATCAATCGCCCAC	2441	GTGGGCGATTGATGAAAAGG	4210
14931	14953	CCTTTTCATCAATCGCCCACATC	2442	GATGTGGGCGATTGATGAAA	4211
14946	14968	CCCACATCACTCGAGACGTAAAT	2443	ATTTACGTCTCGAGTGATGT	4212
14947	14969	CCACATCACTCGAGACGTAAATT	2444	AATTTACGTCTCGAGTGATG	4213
14983	15005	CCGCTACCTTCACGCCAATGGCG	2445	CGCCATTGGCGTGAAGGTAG	4214
14989	15011	CCTTCACGCCAATGGCGCCTCAA	2446	TTGAGGCGCCATTGGCGTGA	4215
14997	15019	CCAATGGCGCCTCAATATTCTTT	2447	AAAGAATATTGAGGCGCCAT	4216
15006	15028	CCTCAATATTCTTTATCTGCCTC	2448	GAGGCAGATAAAGAATATTG	4217
15025	15047	CCTCTTCCTACACATCGGGCGAG	2449	CTCGCCCGATGTGTAGGAAG	4218
15031	15053	CCTACACATCGGGCGAGGCCTAT	2450	ATAGGCCTCGCCCGATGTGT	4219
15049	15071	CCTATATTACGGATCATTTCTCT	2451	AGAGAAATGATCCGTAATAT	4220

[0411]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
15081	15103	CCTGAAACATCGGCATTATCCTC	2452	GAGGATAATGCCGATGTTTC	4221
15100	15122	CCTCCTGCTTGCAACTATAGCAA	2453	TTGCTATAGTTGCAAGCAGG	4222
15103	15125	CCTGCTTGCAACTATAGCAACAG	2454	CTGTTGCTATAGTTGCAAGC	4223
15126	15148	CCTTCATAGGCTATGTCCTCCCG	2455	CGGGAGGACATAGCCTATGA	4224
15142	15164	CCTCCCGTGAGGCCAAATATCAT	2456	ATGATATTTGGCCTCACGGG	4225
15145	15167	CCCGTGAGGCCAAATATCATTCT	2457	AGAATGATATTTGGCCTCAC	4226
15146	15168	CCGTGAGGCCAAATATCATTCTG	2458	CAGAATGATATTTGGCCTCA	4227
15154	15176	CCAAATATCATTCTGAGGGGCCA	2459	TGGCCCCTCAGAATGATATT	4228
15174	15196	CCACAGTAATTACAAACTTACTA	2460	TAGTAAGTTTGTAATTACTG	4229
15198	15220	CCGCCATCCCATACATTGGGACA	2461	TGTCCCAATGTATGGGATGG	4230
15201	15223	CCATCCCATACATTGGGACAGAC	2462	GTCTGTCCCAATGTATGGGA	4231
15205	15227	CCCATACATTGGGACAGACCTAG	2463	CTAGGTCTGTCCCAATGTAT	4232
15206	15228	CCATACATTGGGACAGACCTAGT	2464	ACTAGGTCTGTCCCAATGTA	4233
15223	15245	CCTAGTTCAATGAATC	2465	CTCCTCAGATTCATTG	4234

[0412]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		TGAGGAG		AACT	
15263	15285	CCCACCCTCACACGATTCTTTAC	2466	GTAAAGAATCGTGTGAGGGT	4235
15264	15286	CCACCCTCACACGATTCTTTACC	2467	GGTAAAGAATCGTGTGAGGG	4236
15267	15289	CCCTCACACGATTCTTTACCTTT	2468	AAAGGTAAAGAATCGTGTGA	4237
15268	15290	CCTCACACGATTCTTTACCTTTC	2469	GAAAGGTAAAGAATCGTGTG	4238
15285	15307	CCTTTCACTTCATCTTGCCCTTC	2470	GAAGGGCAAGATGAAGTGAA	4239
15302	15324	CCCTTCATTATTGCAGCCCTAGC	2471	GCTAGGGCTGCAATAATGAA	4240
15303	15325	CCTTCATTATTGCAGCCCTAGCA	2472	TGCTAGGGCTGCAATAATGA	4241
15318	15340	CCCTAGCAACACTCCACCTCCTA	2473	TAGGAGGTGGAGTGTTGCTA	4242
15319	15341	CCTAGCAACACTCCACCTCCTAT	2474	ATAGGAGGTGGAGTGTTGCT	4243
15331	15353	CCACCTCCTATTCTTGCACGAAA	2475	TTTCGTGCAAGAATAGGAGG	4244
15334	15356	CCTCCTATTCTTGCACGAAACGG	2476	CCGTTTCGTGCAAGAATAGG	4245
15337	15359	CCTATTCTTGCACGAAACGGGAT	2477	ATCCCGTTTCGTGCAAGAAT	4246
15367	15389	CCCCCTAGGAATCACCTCCCATT	2478	AATGGGAGGTGATTCCTAGG	4247

[0413]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
15368	15390	CCCCTAGGAATCACCTCCCATTC	2479	GAATGGGAGGTGATTCCTAG	4248
15369	15391	CCCTAGGAATCACCTCCCATTCC	2480	GGAATGGGAGGTGATTCCTA	4249
15370	15392	CCTAGGAATCACCTCCCATTCCG	2481	CGGAATGGGAGGTGATTCCT	4250
15381	15403	CCTCCCATTCCGATAAAATCACC	2482	GGTGATTTTATCGGAATGGG	4251
15384	15406	CCCATTCCGATAAAATCACCTTC	2483	GAAGGTGATTTTATCGGAAT	4252
15385	15407	CCATTCCGATAAAATCACCTTCC	2484	GGAAGGTGATTTTATCGGAA	4253
15390	15412	CCGATAAAATCACCTTCCACCCT	2485	AGGGTGGAAGGTGATTTTAT	4254
15402	15424	CCTTCCACCCTTACTACACAATC	2486	GATTGTGTAGTAAGGGTGGA	4255
15406	15428	CCACCCTTACTACACAATCAAAG	2487	CTTTGATTGTGTAGTAAGGG	4256
15409	15431	CCCTTACTACACAATCAAAGACG	2488	CGTCTTTGATTGTGTAGTAA	4257
15410	15432	CCTTACTACACAATCAAAGACGC	2489	GCGTCTTTGATTGTGTAGTA	4258
15432	15454	CCCTCGGCTTACTTCTCTTCCTT	2490	AAGGAAGAGAAGTAAGCCGA	4259
15433	15455	CCTCGGCTTACTTCTCTTCCTTC	2491	GAAGGAAGAGAAGTAAGCCG	4260
15451	15473	CCTTCTCTCCTTAATGA	2492	TTAATGTCATTAAGG	4261

[0414]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		CATTAA		AGAGA	
15459	15481	CCTTAATGACATTAACACTATTC	2493	GAATAGTGTTAATGTCATTA	4262
15485	15507	CCAGACCTCCTAGGCGACCCAGA	2494	TCTGGGTCGCCTAGGAGGTC	4263
15490	15512	CCTCCTAGGCGACCCAGACAATT	2495	AATTGTCTGGGTCGCCTAGG	4264
15493	15515	CCTAGGCGACCCAGACAATTATA	2496	TATAATTGTCTGGGTCGCCT	4265
15502	15524	CCCAGACAATTATACCCTAGCCA	2497	TGGCTAGGGTATAATTGTCT	4266
15503	15525	CCAGACAATTATACCCTAGCCAA	2498	TTGGCTAGGGTATAATTGTC	4267
15516	15538	CCCTAGCCAACCCCTTAAACACC	2499	GGTGTTTAAGGGGTTGGCTA	4268
15517	15539	CCTAGCCAACCCCTTAAACACCC	2500	GGGTGTTTAAGGGGTTGGCT	4269
15522	15544	CCAACCCCTTAAACACCCTCCC	2501	GGGAGGGGTGTTTAAGGGGT	4270
15526	15548	CCCCTTAAACACCCCTCCCCACA	2502	TGTGGGGAGGGGTGTTTAAG	4271
15527	15549	CCCTTAAACACCCCTCCCCACAT	2503	ATGTGGGGAGGGGTGTTTAA	4272
15528	15550	CCTTAAACACCCCTCCCCACATC	2504	GATGTGGGGAGGGGTGTTTA	4273
15537	15559	CCCCTCCCCACATCAAGCCCGAA	2505	TTCGGGCTTGATGTGGGGAG	4274

[0415]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
15538	15560	CCCTCCCCACATCAAGCCCGAAT	2506	ATTCGGGCTTGATGTGGGGA	4275
15539	15561	CCTCCCCACATCAAGCCCGAATG	2507	CATTCGGGCTTGATGTGGGG	4276
15542	15564	CCCCACATCAAGCCCGAATGATA	2508	TATCATTCGGGCTTGATGTG	4277
15543	15565	CCCACATCAAGCCCGAATGATAT	2509	ATATCATTCGGGCTTGATGT	4278
15544	15566	CCACATCAAGCCCGAATGATATT	2510	AATATCATTCGGGCTTGATG	4279
15554	15576	CCCGAATGATATTTCCTATTCGC	2511	GCGAATAGGAAATATCATTC	4280
15555	15577	CCGAATGATATTTCCTATTCGCC	2512	GGCGAATAGGAAATATCATT	4281
15568	15590	CCTATTCGCCTACACAATTCTCC	2513	GGAGAATTGTGTAGGCGAAT	4282
15576	15598	CCTACACAATTCTCCGATCCGTC	2514	GACGGATCGGAGAATTGTGT	4283
15589	15611	CCGATCCGTCCCTAACAAACTAG	2515	CTAGTTTGTTAGGGACGGAT	4284
15594	15616	CCGTCCCTAACAAACTAGGAGGC	2516	GCCTCCTAGTTTGTTAGGGA	4285
15598	15620	CCCTAACAAACTAGGAGGCGTCC	2517	GGACGCCTCCTAGTTTGTTA	4286
15599	15621	CCTAACAAACTAGGAGGCGTCCT	2518	AGGACGCCTCCTAGTTTGTT	4287
15619	15641	CCTTGCCCTATTACTAT	2519	GGATGGATAGTAATA	4288

[0416]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		CCATCC		GGGCA	
15624	15646	CCCTATTACTATCCATCCTCATC	2520	GATGAGGATGGATAGTAATA	4289
15625	15647	CCTATTACTATCCATCCTCATCC	2521	GGATGAGGATGGATAGTAAT	4290
15636	15658	CCATCCTCATCCTAGCAATAATC	2522	GATTATTGCTAGGATGAGGA	4291
15640	15662	CCTCATCCTAGCAATAATCCCCA	2523	TGGGGATTATTGCTAGGATG	4292
15646	15668	CCTAGCAATAATCCCCATCCTCC	2524	GGAGGATGGGGATTATTGCT	4293
15658	15680	CCCCATCCTCCATATATCCAAAC	2525	GTTTGGATATATGGAGGATG	4294
15659	15681	CCCATCCTCCATATATCCAAACA	2526	TGTTTGGATATATGGAGGAT	4295
15660	15682	CCATCCTCCATATATCCAAACAA	2527	TTGTTTGGATATATGGAGGA	4296
15664	15686	CCTCCATATATCCAAACAACAAA	2528	TTTGTTGTTTGGATATATGG	4297
15667	15689	CCATATATCCAAACAACAAAGCA	2529	TGCTTTGTTGTTTGGATATA	4298
15675	15697	CCAAACAACAAAGCATAATATTT	2530	AAATATTATGCTTTGTTGTT	4299
15700	15722	CCCACTAAGCCAATCACTTTATT	2531	AATAAAGTGATTGGCTTAGT	4300
15701	15723	CCACTAAGCCAATCACTTTATTG	2532	CAATAAAGTGATTGGCTTAG	4301

[0417]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
15709	15731	CCAATCACTTTATTGACTCCTAG	2533	CTAGGAGTCAATAAAGTGAT	4302
15727	15749	CCTAGCCGCAGACCTCCTCATTC	2534	GAATGAGGAGGTCTGCGGCT	4303
15732	15754	CCGCAGACCTCCTCATTCTAACC	2535	GGTTAGAATGAGGAGGTCTG	4304
15739	15761	CCTCCTCATTCTAACCTGAATCG	2536	CGATTCAGGTTAGAATGAGG	4305
15742	15764	CCTCATTCTAACCTGAATCGGAG	2537	CTCCGATTCAGGTTAGAATG	4306
15753	15775	CCTGAATCGGAGGACAACCAGTA	2538	TACTGGTTGTCCTCCGATTC	4307
15770	15792	CCAGTAAGCTACCCTTTTACCAT	2539	ATGGTAAAAGGGTAGCTTAC	4308
15781	15803	CCCTTTTACCATCATTGGACAAG	2540	CTTGTCCAATGATGGTAAAA	4309
15782	15804	CCTTTTACCATCATTGGACAAGT	2541	ACTTGTCCAATGATGGTAAA	4310
15789	15811	CCATCATTGGACAAGTAGCATCC	2542	GGATGCTACTTGTCCAATGA	4311
15810	15832	CCGTACTATACTTCACAACAATC	2543	GATTGTTGTGAAGTATAGTA	4312
15832	15854	CCTAATCCTAATACCAACTATCT	2544	AGATAGTTGGTATTAGGATT	4313
15838	15860	CCTAATACCAACTATCTCCCTAA	2545	TTAGGGAGATAGTTGGTATT	4314
15845	15867	CCAACTATCTCCCTAA	2546	TTTTCAATTAGGGAG	4315

[0418]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		TTGAAAA		ATAGT	
15855	15877	CCCTAATTGAAAACAAAATACTC	2547	GAGTATTTTGTTTTCAATTA	4316
15856	15878	CCTAATTGAAAACAAAATACTCA	2548	TGAGTATTTTGTTTTCAATT	4317
15885	15907	CCTGTCCTTGTAGTATAAACTAA	2549	TTAGTTTATACTACAAGGAC	4318
15890	15912	CCTTGTAGTATAAACTAATACAC	2550	GTGTATTAGTTTATACTACA	4319
15912	15934	CCAGTCTTGTAAACCGGAGATGA	2551	TCATCTCCGGTTTACAAGAC	4320
15925	15947	CCGGAGATGAAAACCTTTTTCCA	2552	TGGAAAAAGGTTTTCATCTC	4321
15938	15960	CCTTTTTCCAAGGACAAATCAGA	2553	TCTGATTTGTCCTTGGAAAA	4322
15945	15967	CCAAGGACAAATCAGAGAAAAAG	2554	CTTTTTCTCTGATTTGTCCT	4323
15977	15999	CCACCATTAGCACCCAAAGCTAA	2555	TTAGCTTTGGGTGCTAATGG	4324
15980	16002	CCATTAGCACCCAAAGCTAAGAT	2556	ATCTTAGCTTTGGGTGCTAA	4325
15989	16011	CCCAAAGCTAAGATTCTAATTTA	2557	TAAATTAGAATCTTAGCTTT	4326
15990	16012	CCAAAGCTAAGATTCTAATTTAA	2558	TTAAATTAGAATCTTAGCTT	4327
16052	16074	CCACCCAAGTATTGACTCACCCA	2559	TGGGTGAGTCAATACTTGGG	4328

[0419]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
16055	16077	CCCAAGTATTGACTCACCCATCA	2560	TGATGGGTGAGTCAATACTT	4329
16056	16078	CCAAGTATTGACTCACCCATCAA	2561	TTGATGGGTGAGTCAATACT	4330
16071	16093	CCCATCAACAACCGCTATGTATT	2562	AATACATAGCGGTTGTTGAT	4331
16072	16094	CCATCAACAACCGCTATGTATTT	2563	AAATACATAGCGGTTGTTGA	4332
16082	16104	CCGCTATGTATTTCGTACATTAC	2564	GTAATGTACGAAATACATAG	4333
16107	16129	CCAGCCACCATGAATATTGTACG	2565	CGTACAATATTCATGGTGGC	4334
16111	16133	CCACCATGAATATTGTACGGTAC	2566	GTACCGTACAATATTCATGG	4335
16114	16136	CCATGAATATTGTACGGTACCAT	2567	ATGGTACCGTACAATATTCA	4336
16133	16155	CCATAAATACTTGACCACCTGTA	2568	TACAGGTGGTCAAGTATTTA	4337
16147	16169	CCACCTGTAGTACATAAAAACCC	2569	GGGTTTTTATGTACTACAGG	4338
16150	16172	CCTGTAGTACATAAAAACCCAAT	2570	ATTGGGTTTTTATGTACTAC	4339
16167	16189	CCCAATCCACATCAAAACCCCCT	2571	AGGGGGTTTTGATGTGGATT	4340
16168	16190	CCAATCCACATCAAAACCCCCTC	2572	GAGGGGGTTTTGATGTGGAT	4341
16173	16195	CCACATCAAAACCCCC	2573	ATGGGGAGGGGGTTT	4342

[0420]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		TCCCCAT		TGATG	
16184	16206	CCCCCTCCCCATGCTTACAAGCA	2574	TGCTTGTAAGCATGGGGAGG	4343
16185	16207	CCCCTCCCCATGCTTACAAGCAA	2575	TTGCTTGTAAGCATGGGGAG	4344
16186	16208	CCCTCCCCATGCTTACAAGCAAG	2576	CTTGCTTGTAAGCATGGGGA	4345
16187	16209	CCTCCCCATGCTTACAAGCAAGT	2577	ACTTGCTTGTAAGCATGGGG	4346
16190	16212	CCCCATGCTTACAAGCAAGTACA	2578	TGTACTTGCTTGTAAGCATG	4347
16191	16213	CCCATGCTTACAAGCAAGTACAG	2579	CTGTACTTGCTTGTAAGCAT	4348
16192	16214	CCATGCTTACAAGCAAGTACAGC	2580	GCTGTACTTGCTTGTAAGCA	4349
16221	16243	CCCTCAACTATCACACATCAACT	2581	AGTTGATGTGTGATAGTTGA	4350
16222	16244	CCTCAACTATCACACATCAACTG	2582	CAGTTGATGTGTGATAGTTG	4351
16250	16272	CCAAAGCCACCCCTCACCCACTA	2583	TAGTGGGTGAGGGGTGGCTT	4352
16256	16278	CCACCCCTCACCCACTAGGATAC	2584	GTATCCTAGTGGGTGAGGGG	4353
16259	16281	CCCCTCACCCACTAGGATACCAA	2585	TTGGTATCCTAGTGGGTGAG	4354
16260	16282	CCCTCACCCACTAGGATACCAAC	2586	GTTGGTATCCTAGTGGGTGA	4355

[0421]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
16261	16283	CCTCACCCACTAGGATACCAACA	2587	TGTTGGTATCCTAGTGGGTG	4356
16266	16288	CCCACTAGGATACCAACAAACCT	2588	AGGTTTGTTGGTATCCTAGT	4357
16267	16289	CCACTAGGATACCAACAAACCTA	2589	TAGGTTTGTTGGTATCCTAG	4358
16278	16300	CCAACAAACCTACCCACCCTTAA	2590	TTAAGGGTGGGTAGGTTTGT	4359
16286	16308	CCTACCCACCCTTAACAGTACAT	2591	ATGTACTGTTAAGGGTGGGT	4360
16290	16312	CCCACCCTTAACAGTACATAGTA	2592	TACTATGTACTGTTAAGGGT	4361
16291	16313	CCACCCTTAACAGTACATAGTAC	2593	GTACTATGTACTGTTAAGGG	4362
16294	16316	CCCTTAACAGTACATAGTACATA	2594	TATGTACTATGTACTGTTAA	4363
16295	16317	CCTTAACAGTACATAGTACATAA	2595	TTATGTACTATGTACTGTTA	4364
16320	16342	CCATTTACCGTACATAGCACATT	2596	AATGTGCTATGTACGGTAAA	4365
16327	16349	CCGTACATAGCACATTACAGTCA	2597	TGACTGTAATGTGCTATGTA	4366
16353	16375	CCCTTCTCGTCCCCATGGATGAC	2598	GTCATCCATGGGGACGAGAA	4367
16354	16376	CCTTCTCGTCCCCATGGATGACC	2599	GGTCATCCATGGGGACGAGA	4368
16363	16385	CCCCATGGATGACCCC	2600	TCTGAGGGGGGTCAT	4369

[0422]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		CCTCAGA		CCATG	
16364	16386	CCCATGGATGACCCCCCTCAGAT	2601	ATCTGAGGGGGGTCATCCAT	4370
16365	16387	CCATGGATGACCCCCCTCAGATA	2602	TATCTGAGGGGGGTCATCCA	4371
16375	16397	CCCCCCTCAGATAGGGGTCCCTT	2603	AAGGGACCCCTATCTGAGGG	4372
16376	16398	CCCCCTCAGATAGGGGTCCCTTG	2604	CAAGGGACCCCTATCTGAGG	4373
16377	16399	CCCCTCAGATAGGGGTCCCTTGA	2605	TCAAGGGACCCCTATCTGAG	4374
16378	16400	CCCTCAGATAGGGGTCCCTTGAC	2606	GTCAAGGGACCCCTATCTGA	4375
16379	16401	CCTCAGATAGGGGTCCCTTGACC	2607	GGTCAAGGGACCCCTATCTG	4376
16393	16415	CCCTTGACCACCATCCTCCGTGA	2608	TCACGGAGGATGGTGGTCAA	4377
16394	16416	CCTTGACCACCATCCTCCGTGAA	2609	TTCACGGAGGATGGTGGTCA	4378
16400	16422	CCACCATCCTCCGTGAAATCAAT	2610	ATTGATTTCACGGAGGATGG	4379
16403	16425	CCATCCTCCGTGAAATCAATATC	2611	GATATTGATTTCACGGAGGA	4380
16407	16429	CCTCCGTGAAATCAATATCCCGC	2612	GCGGGATATTGATTTCACGG	4381
16410	16432	CCGTGAAATCAATATCCCGCACA	2613	TGTGCGGGATATTGATTTCA	4382

[0423]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
16425	16447	CCCGCACAAGAGTGCTACTCTCC	2614	GGAGAGTAGCACTCTTGTGC	4383
16426	16448	CCGCACAAGAGTGCTACTCTCCT	2615	AGGAGAGTAGCACTCTTGTG	4384
16446	16468	CCTCGCTCCGGGCCCATAACACT	2616	AGTGTTATGGGCCCGGAGCG	4385
16453	16475	CCGGGCCCATAACACTTGGGGGT	2617	ACCCCCAAGTGTTATGGGCC	4386
16458	16480	CCCATAACACTTGGGGGTAGCTA	2618	TAGCTACCCCCAAGTGTTAT	4387
16459	16481	CCATAACACTTGGGGGTAGCTAA	2619	TTAGCTACCCCCAAGTGTTA	4388
16494	16516	CCGACATCTGGTTCCTACTTCAG	2620	CTGAAGTAGGAACCAGATGT	4389
16507	16529	CCTACTTCAGGGTCATAAAGCCT	2621	AGGCTTTATGACCCTGAAGT	4390
16527	16549	CCTAAATAGCCCACACGTTCCCC	2622	GGGGAACGTGTGGGCTATTT	4391
16536	16558	CCCACACGTTCCCCTTAAATAAG	2623	CTTATTTAAGGGGAACGTGT	4392
16537	16559	CCACACGTTCCCCTTAAATAAGA	2624	TCTTATTTAAGGGGAACGTG	4393
16546	16568	CCCCTTAAATAAGACATCACGAT	2625	ATCGTGATGTCTTATTTAAG	4394
16547	16569	CCCTTAAATAAGACATCACGATG	2626	CATCGTGATGTCTTATTTAA	4395
16548	16570	CCTTAAATAAGACATC	2627	CCATCGTGATGTCTT	4396

[0424]

染色体起始位置(+链)	染色体终止位置(+链)	在(+)链上含有CNN序列随后gRNA靶序列的反向互补序列的nt序列	SEQ ID NO	20 nt gRNA靶序列(会编码gRNA导向序列)	SEQ ID NO
		ACGATGG		ATTTA	

[0425] 应用

[0426] 本文提供的gNA(例如,gRNA)和gNA(例如,gRNA)的集合对于多种应用是有用的,包括消耗、分配、捕获或富集感兴趣的靶序列;全基因组标记;全基因组编辑;全基因组功能筛选;和全基因组调控。

[0427] 在一个实施方案中,gNA对于来自宿主的生物样品中的宿主核酸是选择性的,但是对于来自宿主的生物样品中的非宿主核酸不是选择性的。在一个实施方案中,gNA对于来自宿主的生物样品中的非宿主核酸是选择性的,但是对于样品中的宿主核酸不是选择性的。在一个实施方案中,gNA对于来自宿主的生物样品中的宿主核酸和非宿主核酸亚组两者是选择性的。例如,当复杂的生物样品包含宿主核酸和来自多于一个非宿主生物体的核酸时,gNA可以对多于一个非宿主物种是选择性的。在这样的实施方案中,gNA用来连续消耗或分配不感兴趣的序列。例如,来自人的唾液含有人DNA,以及多于一个细菌物种的DNA,但是还可含有未知病原生物体的基因组材料。在这样的实施方案中,针对人类DNA和已知细菌的gNA可用来连续消耗人类DNA和已知细菌的DNA,因此产生包含未知病原生物体的基因组材料的样品。

[0428] 在示例性实施方案中,gNA对于从来自宿主的生物样品中获得的人类宿主DNA是选择性的,但是不与来自同样从该样品中获得的未知病原体的DNA杂交。

[0429] 在一些实施方案中,gNA对于消耗和分配样品中的靶序列,富集非宿主核酸的样品或连续消耗样品中的靶核酸是有用的,包括:提供从样品中提取的核酸;和使样品与多各复合物接触,所述复合物包含(i)本文所述的gNA的集合中的任何一个和(ii)核酸指导的核酸酶(例如,CRISPR/Cas)系统蛋白。

[0430] 在一些实施方案中,gNA对于消耗和分配样品中的靶序列的方法是有用的,所述方法包括:提供从样品中提取的核酸,其中提取的核酸包含感兴趣的序列和用于消耗或分配的靶序列;在核酸指导的核酸酶系统蛋白切割样品中的核酸的条件下,使样品与多个复合物接触,所述复合物包含(i)本文提供的gNA的集合;和(ii)核酸指导的核酸酶(例如,CRISPR/Cas)系统蛋白。

[0431] 在一些实施方案中,gNA对富集非宿主核酸的样品是有用的,包括:提供包含宿主核酸和非宿主核酸的样品;在核酸指导的核酸酶系统蛋白切割样品中的宿主核酸的条件下,使样品与多个复合物接触,所述复合物包含(i)本文提供的包含针对宿主核酸的导向序列的gNA集合;和(ii)核酸指导的核酸酶(例如,CRISPR/Cas)系统蛋白,由此消耗宿主核酸的样品,并允许富集非宿主核酸。

[0432] 在一些实施方案中,gNA对连续消耗样品中的靶核酸的一种方法是有用的,所述方法包括:提供来自宿主的包含宿主核酸和非宿主核酸的生物样品,其中所述非宿主核酸包含来自至少一种已知非宿主生物体的核酸和来自未知非宿主生物体的核酸;提供多个复合

物,所述复合物包含(i)针对宿主核酸的本文提供的gNA的集合;和(ii)核酸指导的核酸酶(例如,CRISPR/Cas)系统蛋白;使来自生物样品的核酸与被配置为与宿主核酸中的靶序列杂交的gNA-核酸指导的核酸酶系统蛋白复合物(例如,gRNA-CRISPR/Cas系统蛋白复合物)混合,其中至少一部分的复合物与宿主核酸中的靶序列杂交,并且其中至少一部分的宿主核酸被切割;使剩余的来自生物样品的核酸与被配置成与至少一种已知非宿主核酸中的靶序列杂交的gNA-核酸指导的核酸酶系统蛋白复合物混合,其中至少一部分的复合物与在至少一种非宿主核酸中的靶序列杂交,并且其中至少一部分的非宿主核酸被切割;并分离剩余的来自未知的非宿主生物体的核酸并且准备进一步分析。

[0433] 在一些实施方案中,本文生成的gNA用来在细胞的群体中进行全基因组的或者靶向的功能筛选。在这样的实施方案中,以可以对整个基因组的序列或对基因组的特定区域实现gNA指导的核酸指导的核酸酶系统蛋白编辑的方式,可将体外转录的gNA(例如,gRNA)或编码gNA的载体的文库经由转染或本领域已知的其它实验室技术,连同核酸指导的核酸酶(例如,CRISPR/Cas)系统蛋白一起引入到细胞的群体中。在一个实施方案中,核酸指导的核酸酶系统蛋白可以作为DNA引入。在一个实施方案中,核酸指导的核酸酶系统蛋白可以作为mRNA导入。在一个实施方案中,核酸指导的核酸酶系统蛋白可以作为蛋白质引入。在一个示例性实施方案中,核酸指导的核酸酶系统蛋白是Cas9。

[0434] 在一些实施方案中,本文生成的gNA用于选择性捕获和/或富集感兴趣的核酸序列。例如,在一些实施方案中,本文生成的gNA用于捕获靶核酸序列,包括:提供包含多个核酸的样品;并使样品与多个复合物接触,所述复合物包含(i)本文提供的gNA的集合;和(ii)核酸指导的核酸酶(例如,CRISPR/Cas)系统蛋白。一旦感兴趣的序列被捕获,它们可以被进一步连接以产生例如测序文库。

[0435] 在一些实施方案中,本文生成的gNA用于在感兴趣的靶位点引入标记的核苷酸,包括:(a)提供包含多个核酸片段的样品;(b)使样品与多个复合物接触,所述复合物包含(i)本文提供的gNA的集合;和(ii)核酸指导的核酸酶(例如,CRISPR/Cas)系统蛋白-切口酶(例如,Cas9-切口酶),其中gNA与核酸片段中的感兴趣的靶位点互补,由此在感兴趣的靶位点处产生多个有切口的核酸片段;和(c)使多个有切口的核酸片段与能够在有切口的位点处开始核酸合成的酶以及标记的核苷酸接触,由此生成在感兴趣的靶位点中包含标记的核苷酸的多个核酸片段。

[0436] 在一些实施方案中,本文生成的gNA用于捕获感兴趣的靶核酸序列,包括:(a)提供包含多个衔接子连接的核酸的样品,其中核酸在一端与第一衔接子连接并在另一端与第二衔接子连接;和(b)使样品与包含多个死亡的核酸指导的核酸酶-gNA复合物(例如,dCas9-gRNA复合物)的gNA的集合接触,其中死亡的核酸指导的核酸酶(例如,dCas9)与转座酶融合,其中gNA与核酸亚组中包含的靶位点互补,并且其中死亡的核酸指导的核酸酶-gNA转座酶复合物(例如,dCas9-gRNA转座酶复合物)负载有多个第三衔接子以生成多个核酸片段,所述核酸片段在一端包含第一或第二衔接子,在另一端包含第三衔接子。在一个实施方案中,该方法进一步包括使用第一或第二衔接子和第三衔接子特异性PCR扩增步骤(b)的产物。

[0437] 在一些实施方案中,本文生成的gNA用于在细胞的群体中进行全基因组的或靶向的激活或抑制。在这样的实施方案中,以可在整个基因组的序列或基因组的特定区域上实

现gNA-指导的催化死亡的核酸指导的核酸酶系统蛋白介导的激活或抑制的方式，可经由转染或本领域已知的其他实验室技术，将体外转录的gNA(例如，gRNA)或编码所述gNA的载体的文库连同与活化剂(activator)或抑制剂(suppressor)结构域融合的催化死亡的核酸指导的核酸酶(例如，CRISPR/Cas)系统蛋白一起(催化死亡的核酸指导的核酸酶系统蛋白-融合蛋白)引入到细胞的群体中。在一个实施方案中，催化死亡的核酸指导的核酸酶系统蛋白-融合蛋白可作为DNA引入。在一个实施方案中，催化死亡的核酸指导的核酸酶系统蛋白-融合蛋白可作为mRNA引入。在一个实施方案中，催化死亡的核酸指导的核酸酶系统蛋白-融合蛋白可作为蛋白质引入。在一些实施方案中，gNA的集合或编码gNA的核酸的集合展示出对多于一种核酸指导的核酸酶系统蛋白的特异性。在一个示例性实施方案中，催化死亡的核酸指导的核酸酶系统蛋白是dCas9。

[0438] 在一些实施方案中，该集合包含编码对于Cas9和选自Cpf1、Cas3、Cas8a-c、Cas10、Cse1、Csy1、Csn2、Cas4、Csm2和Cm5的一个或多个CRISPR/Cas系统蛋白具有特异性的gRNA或编码gRNA的核酸。在一些实施方案中，所述集合包含对与不同荧光团融合的多种催化死亡的CRISPR/Cas系统蛋白具有特异性的gRNA或编码gRNA的核酸，例如用于标记和/或可视化不同基因组或基因组部分，用于标记和/或可视化不同染色体区域，或用于标记和/或可视化病毒基因/基因组整合到基因组中。

[0439] 在一些实施方案中，gNA(或编码gNA的核酸)的集合对不同的核酸指导的核酸酶(例如，CRISPR/Cas)系统蛋白具有特异性，并靶向不同的感兴趣的序列，例如来自不同物种的感兴趣的序列。例如，可首先使靶向来自第一物种的基因组的来自gNA的集合(或从编码这样的gNA的核酸的群体转录的gRNA的集合)的第一亚组的gNA与第一核酸指导的核酸酶系统蛋白成员(或工程改造的形式)混合；并且可以使靶向来自第一物种的基因组的来自gNA的集合(或从编码这样的gNA的核酸的群体转录的gRNA的集合)的第二亚组的gNA首与第二不同的核酸指导的核酸酶系统蛋白成员(或工程改造的形式)混合。在一个实施方案中，核酸指导的核酸酶系统蛋白可以是与不同荧光团融合的催化死亡的形式(例如dCas9)，从而可以通过不同的荧光标记来标记不同的感兴趣的靶序列例如不同的物种基因组或一个物种的不同染色体。例如，可以通过不同的gRNA-靶向的dCas9-荧光团标记不同的染色体区域，用于可视化基因易位。例如，可以通过不同的gRNA靶向的dCas9-荧光团标记不同的病毒基因组，用于可视化不同病毒基因组整合到宿主基因组中。在另一个实施方案中，核酸指导的核酸酶系统蛋白可以是与激活域或抑制结构域融合的dCas9，从而使不同的感兴趣的靶序列，例如基因组的不同染色体可以被差异调控。在另一个实施方案中，核酸指导的核酸酶系统蛋白可以是融合可以被不同的抗体识别的不同蛋白结构域的dCas9，使得不同的感兴趣的靶序列，例如样品混合物中的不同DNA序列，可以被差异分离。

[0440] 示例性的本发明的组合物

[0441] 在一个实施方案中，本文提供了包含核酸片段、切口酶核酸指导的核酸酶-gNA复合物和标记的核苷酸的组合物。在一个示例性实施方案中，本文提供了包含核酸片段、切口酶Cas9-gRNA复合物和标记的核苷酸的组合物。在这样的实施方案中，所述核酸可以包含DNA。所述核苷酸可以是例如生物素标记的。所述核苷酸可以是抗体-缀合物对的一部分。

[0442] 在一个实施方案中，本文提供了包含核酸片段和催化死亡的核酸指导的核酸酶-gNA复合物的组合物，其中所述催化死亡的核酸指导的核酸酶与转座酶融合。在一个示例性

实施方案中，本文提供了包含DNA片段和dCas9-gRNA复合物的组合物，其中dCas9与转座酶融合。

[0443] 在一个实施方案中，本文提供了包含含有甲基化核苷酸的核酸片段、切口酶核酸指导的核酸酶-gNA复合物和未甲基化的核苷酸的的组合物。在一个示例性实施方案中，本文提供了包含含有甲基化核苷酸的DNA片段、切口酶Cas9-gRNA复合物和未甲基化的核苷酸的组合物。

[0444] 在一个实施方案中，本文提供了与核酸指导的-DNA内切核酸酶复合的gDNA。在示例性实施方案中，核酸指导的-DNA内切核酸酶是NgAgo。

[0445] 在一个实施方案中，本文提供了与核酸指导的RNA内切核酸酶复合的gDNA。

[0446] 在一个实施方案中，本文提供了与核酸指导的-DNA内切核酸酶复合的gRNA。

[0447] 在一个实施方案中，本文提供了与核酸指导的RNA内切核酸酶复合的gRNA。在一个实施方案中，核酸指导的RNA内切核酸酶包含C2c2。

[0448] 试剂盒和制品

[0449] 本申请提供了包含任何一个或多个本文所述的组合物(不限于衔接子、gNA(例如，gRNA)、gNA集合(例如，gRNA集合)、编码gNA集合的核酸分子等)的试剂盒。

[0450] 在一个示例性实施方案中，试剂盒包含能够转录成gRNA文库的DNA分子的集合，其中gRNA靶向人类基因组或其他来源的DNA序列。

[0451] 在一个实施方案中，试剂盒包含gNA的集合，其中gNA靶向人类基因组或其他来源的DNA序列。

[0452] 在一些实施方案中，本文提供了包含任何如本文所述的编码gNA的核酸的集合的试剂盒。在一些实施方案中，本文提供了包含任何如本文所述的gNA的集合的试剂盒。

[0453] 本申请还提供了用于进行如本文所述的制备gNA和编码gNA的核酸的集合的方法的所有必要的试剂和说明书。在一些实施方案中，本文提供了包含用于进行如本文所述的制备单个gNA和gNA的集合的方法的所有必要的试剂和说明书的试剂盒。

[0454] 本文还提供了在将样品与本文产生的gNA集合接触之前和之后监测信息的计算机软件。在一个示例性实施方案中，该软件可以在提供gNA集合之前和之后计算并报告样品中非靶序列的丰度，以确保不发生脱靶靶向，并且其中该软件可以通过比较向样品提供gNA集合之前和之后的靶序列的丰度检查靶向的消耗/富集/捕获/分配/标记/调控/编辑的功效。

[0455] 包括以下实施例用于示例说明的目的，并不意图限制本发明的范围。

[0456] 实施例

[0457] 实施例1：从T7启动子人类DNA文库构建gRNA文库

[0458] T7启动子文库构建

[0459] 使用S2Covaris超声波仪(Covaris)8个循环片段化人类基因组DNA(400ng)，以产生长度为200-300bp的片段。使用NEBNext End Repair Module(NEB)修复片段化的DNA并且在25℃温育30分钟，然后在75℃热失活20分钟。为制备T7启动子衔接子，寡核苷酸T7-1(5’GCCTCGAGC*T*A*ATACGACTCACTATAGAG3’，*表示硫代磷酸酯骨架连接)(SEQ ID NO:4397)和T7-2(序列5’Phos-CTCTATAGTGAGTCGTATTA3’)(SEQ ID NO:4398)以15μM混合，加热至98℃持续3分钟，然后缓慢冷却(0.1℃/分钟)至30℃。然后将T7启动子平端衔接子(总共15pmol)添加到平端化的人类基因组DNA片段，并且在25℃与Blunt/TA Ligase Master Mix(NEB)温

育30分钟(图1中的(2))。使用Hi-Fidelity 2X Master Mix(NEB)用2μM寡核苷酸T7-1进行10个循环的PCR(98℃20s,63℃20s,72℃35s)来扩增连接物。通过在琼脂糖凝胶电泳上运行小的等分试样来验证扩增。使用0.6X AxyPrep珠粒(Axygen)根据制造商的说明回收PCR扩增产物,并重悬于15μL的10mM Tris-HCl pH 8中。

[0460] DNA的消化

[0461] 在37℃在10μL的NEB缓冲液2(50mM NaCl,10mM Tris-HCl pH 7.9,10mM $MgCl_2$,100μg/mL BSA)中用0.1μL的Nt.CviPII(NEB)消化PCR扩增的T7启动子DNA(每次消化总共2μg)10分钟(图1中的(3)),然后在75℃热失活20分钟。向反应中添加另外的10μL的NEB缓冲液2和1μL的T7内切核酸酶I(NEB),并在37℃温育20分钟(图1中的(4))。通过琼脂糖凝胶电泳验证DNA的酶消化。根据制造商的说明,通过添加0.6X AxyPrep珠粒(Axygen)来回收消化的DNA,并重悬于15μL的10mM Tris-HCl pH8中。

[0462] 衔接子的连接和HGG的去除

[0463] 然后在25℃使用T4DNA聚合酶(NEB)使DNA平端化20分钟,随后在75℃热失活20分钟(图1中的(5))。

[0464] 为了制备MlyI衔接子,将寡核苷酸MlyI-1(序列5'>3',5'Phos-GGGACTCGGATCCCTATAGTGATACAAAGACGATGACGACAAG CG)(SEQ ID NO:4399)和MlyI-2(序列5'>3',TCACTATAGGGATCCGAGTCCC)(SEQ ID NO:4400)以15μM混合,加热至98℃3分钟,然后缓慢冷却(0.1℃/分钟)至30℃。然后将MlyI衔接子(总共15pmol)添加到T4DNA聚合酶平端化的DNA中,并在25℃用Blunt/TA Ligase Master Mix(NEB)温育30分钟(图1中的(6))。将连接物在75℃热失活20分钟,然后用MlyI和XhoI(NEB)在37℃消化1小时,从而消除HGG基序(图1中的(7))。然后使用0.8X AxyPrep珠粒(Axygen)清洁消化物,并将DNA重悬于10μL的10mM Tris-Cl pH 8中。

[0465] 为了制备StlgR衔接子,将寡核苷酸stlgR(序列5'>3',5'Phos-GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTT ATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTGGATCCGATGC)(SEQ ID NO:4401)和stlgRev(序列5'>3',GGATCCAAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAAC GGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC)(SEQ ID NO:4402)以15μM混合,加热至98℃3分钟,然后缓慢冷却(0.1℃/分钟)至60℃。将StlgR衔接子(总共5pmol)添加至去除HGG的DNA片段中,并在25℃与Blunt/TA Ligase Master Mix(NEB)温育30分钟(图1中的(8))。然后,将连接物与Hi-Fidelity 2X Master Mix(NEB)使用2μM的寡核苷酸T7-1和gRU(序列5'>3',AAAAAAAGCACCGACTCGGTG)(SEQ ID NO:4403)温育,并使用20个循环的PCR(98℃20秒,60℃20秒,72℃35秒)扩增。通过在琼脂糖凝胶电泳上运行小的等分试样来验证扩增。根据制造商的说明使用0.6X AxyPrep珠粒(Axygen)回收PCR扩增产物,并重悬于15μL的10mM Tris-HCl pH 8中。

[0466] 体外转录

[0467] 然后使用HiScribe T7体外转录试剂盒(NEB)将T7/gRU扩增的PCR产物文库用作体外转录的模板。根据制造商的说明,将500-1000ng的模板在37℃温育过夜。为了将指导文库转录成gRNA,组合了以下体外转录反应混合物:10μL纯化的文库(～500ng),6.5μL的H_2O,2.25μL的ATP,2.25μL的CTP,2.25μL的GTP,2.25μL的GTP,2.25μL的UTP,2.25μL的10X反应缓冲液(NEB)和2.25μL的T7RNA聚合酶混合物。将反应物在37℃温育24小时,然后使用RNA清除

试剂盒(Life Technologies)纯化,用100μL的无RNA酶水洗脱,定量并储存在-20℃直至使用。

[0468] 实施例2:从完整人类基因组DNA构建gRNA文库

[0469] DNA的消化

[0470] 在37℃在40μL的NEB缓冲液2(50mM NaCl,10mM Tris-HCl pH 7.9,10mM $MgCl_2$,100μg/mL BSA)中用0.1μL的Nt.CviPII(NEB)消化人类基因组DNA(图2中的(1);每次消化总共20μg)10分钟,然后在75℃热失活20分钟。将另外40μL的NEB缓冲液2和1μL的T7核酸内切酶I(NEB)添加到反应中,在37℃温育20分钟(例如,图2中的(2))。通过琼脂糖凝胶电泳用小的等分试样验证基因组DNA的片段化。通过添加0.3X AxyPrep珠粒(Axygen)回收200-600bp的DNA片段,在25℃温育5分钟,在磁性支架上捕获珠粒并将上清液转移至新管中。低于600bp的DNA片段不以该珠粒/DNA比例与珠粒结合并保留在上清液中。然后将0.7X AxyPrep珠粒(Axygen)添加到上清液中(这会结合所有长于200bp的DNA分子),允许其结合5分钟。在磁性支架上捕获珠粒并用80%乙醇洗涤两次,空气干燥。然后将DNA重新悬浮于15μL的10mM Tris-HCl pH 8中。使用Qbit测定(Life Technologies)确定DNA浓度。

[0471] 衔接子的连接

[0472] 为了制备T7/MlyI衔接子,将寡核苷酸MlyI-1(序列5'>3',5'Phos-GGGGGACTCGGATCCCTATAGTGATACAAAGACGATGACGACA AGCG)(SEQ ID NO:4404)和T7-7(序列5'>3',GCCTCGAGC*T*A*ATACGACTCACTATAGGGATCCAAGTCCC,*表示硫代磷酸酯骨架连接)(SEQ ID NO:4405)以15μM混合,加热至98℃3分钟,然后缓慢冷却(0.1℃/分钟)至30℃。然后在25℃使用Blunt/TA Ligase Master Mix(NEB)将纯化的Nt.CviPII/T7内切核酸酶I消化的DNA(100ng)与15pmol的T7/MlyI衔接子连接30分钟(图2中的(3))。然后使用Hi-Fidelity 2X Master Mix(NEB),和2μM的两种寡核苷酸T7-17(GCCTCGAGC*T*A*ATACGACTCACTATAGGG*表示硫代磷酸酯骨架连接)(SEQ ID NO:4406)和Flag(序列5'>3',CGCTTGTCGTCATCGTCTTTGTA)(SEQ ID NO:4407)通过10个循环的PCR(98℃20s,60℃20s,72℃35s)扩增连接物。PCR扩增增加了DNA的产量,并且鉴于我们使用的Y形衔接子的性质,总是导致T7启动子被添加到HGG位点的远端,并且MlyI位点被添加到HGG基序后(图2中的(4))。

[0473] 然后在37℃用MlyI和XhoI(NEB)消化PCR产物1小时,并在75℃热失活20分钟(图2中的(5))。之后,在25℃使用Blunt/TA Ligase Master Mix(NEB)将5pmol的衔接子StlgR(在实施例1中)连接30分钟(图2中的(6))。然后使用Hi-Fidelity 2X Master Mix(NEB),2μM的寡核苷酸T7-7和gRU(在实施例1中)和20个PCR循环(98℃20秒,60℃20s,72℃35秒)扩增连接物。通过在琼脂糖凝胶电泳上运行小等分试样来验证扩增。使用0.6X AxyPrep珠粒(Axygen)根据制造商的说明回收PCR扩增产物,并重悬于15μL的10mM Tris-HCl pH 8中。

[0474] 然后将样品用作实施例1中所述的体外转录反应的模板。

[0475] 实施例3:用CviPII直接切割

[0476] 在37℃用2单位的NtCviPII(New England Biolabs)消化30μg的人类基因组DNA 1小时,然后在75℃热失活20分钟。使用片段分析仪仪器(Advanced Analytical)验证片段的大小为200-1,000个碱基对。通过添加100单位的T4DNA聚合酶(New England Biolabs),100μM dNTP并在12℃温育30分钟,将5'或3'突出末端(例如如图3所示)转化为平端。然后使用

PCR清洁试剂盒(Zymo)回收DNA,并在20μL洗脱缓冲液中洗脱。然后将DNA与MlyI衔接子(参见例如实施例4)或BaeI/EcoP15I衔接子(参见例如实施例4)或BaeI/EcoP15I衔接子(参见例如实施例5)连接。

[0477] 实施例4:MlyI衔接子的使用

[0478] 通过在40μL水中合并2μmol的MlyI Ad1和MlyAd2来制备衔接子MlyI。通过在40μL水中合并2μmol寡核苷酸BsMm-Ad1和2μmol寡核苷酸BsMm-Ad2来制备衔接子BsaXI/MmeI。通过在100μL水中合并1.5μmolT7-Ad1和T7-Ad2寡核苷酸来制备T7衔接子。通过在100μL水中合并1.5μmol的gR-top和gR-bot寡核苷酸来制备茎环衔接子。在所有情况下,混合后在热循环仪中将衔接子加热至98℃3分钟,然后以1℃/分钟的冷却速率冷却至室温。

[0479] 表5.与MlyI衔接子一起使用的寡核苷酸。

[0480]

SEQ ID NO	寡核苷酸名称	序列 (5'>3')	修饰
4408	MlyI-Ad1	gagatcagcttctgcattgatgccagcagcccgagtcag	无
4409	MlyI-Ad2	ctgactcgggctgctgtacaaagacgatgacgacaagcgtta	5'磷酸
4410	BsMm-Ad1	gagatcagcttctgcattgatgcGGAGCCGCAGTACACTATCCAAC	无
4411	BsMm-Ad2	GTTGGATAGTGTACTGCGGCTCCtacaaagacgatgacgacaagcg	5'磷酸
4412	T7-Ad1	gcctcgagctaatacgactcactatagagNN	无
4398	T7-Ad2	Ctctatagtgagtcgtatta	5'磷酸
4413	gR-top	ttagagctagaaatagcaagttaaaataaggctagtccgttatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgcttttt	5'磷酸
4414	gR-bot	aaaaaagcaccgactcggtgccactttttcaagttgataacggactagccttattttaacttgctatttctagctctaaaac	无

[0481] 然后在室温使用blunt/TA ligation master mix(New England Biolabs)将含有CCD平端的DNA(来自前面部分)连接至50pmol的衔接子MlyI 30分钟。然后通过以下步骤回收DNA:与0.6X Kapa SPRI珠粒(Kapa Biosystems)温育5分钟,用磁力架捕获珠粒,用80%乙醇洗涤两次,空气干燥珠粒5分钟,最后将DNA重悬浮于50μl缓冲液4(50mM乙酸钾,20mM Tris-乙酸,10mM乙酸镁,100μg/mL BSA,pH7.9)中。这些步骤消除了小的(<100个核苷酸)DNA和MlyI衔接子二聚体。

[0482] 然后通过添加20单位的MlyI(New England Biolabs)并在37℃温育1小时消化纯化的DNA以消除源自衔接子的序列和CCD(和互补HGG)基序。通过以下步骤从消化物中回收DNA:与0.6X Kapa SPRI珠粒(Kapa Biosystems)温育5分钟,用磁力架捕获珠粒,用80%乙醇洗涤两次,空气干燥珠粒5分钟,最后将DNA重悬于30μL缓冲液4中。

[0483] 然后在室温下使用blunt/TA ligation master mix(New England Biolabs)将纯化的DNA连接至50pmol的衔接子BsaXI/MmeI 30分钟。然后通过以下步骤回收DNA与0.6X Kapa SPRI珠粒(Kapa Biosystems)温育5分钟,用磁力架捕获珠粒,用80%乙醇洗涤两次,空气干燥珠粒5分钟,最后将DNA重悬于50μl缓冲液4(50mM乙酸钾,20mM Tris-乙酸,10mM乙

酸镁,100μg/mL BSA,pH7.9)中。然后在37℃通过添加20单位MmeI(New England Biolabs)和40pmol/μLSAM(S-腺苷甲硫氨酸)消化DNA 1小时,然后在75℃热失活20分钟。然后在室温下使用blunt/TA ligation master mix(New England Biolabs)将DNA连接至30pmol T7衔接子30分钟。然后使用PCR清洁试剂盒(Zymo)回收DNA并在20μL缓冲液4中洗脱,然后在37℃用20单位的BsaXI消化1小时。在室温下通过添加15pmol茎环衔接子并使用blunt/TA ligation master mix(New England Biolabs)来添加指导RNA茎环序列30分钟。然后使用PCR清洁试剂盒(Zymo)回收DNA,在20μL洗脱缓冲液中洗脱,并使用HiFidelity 2X master mix(New England Biolabs)进行PCR扩增。使用引物T7-Ad1和gRU(序列5'>3' AAAAAAGCACCGACTCGGTG)(SEQ ID NO:4419)以下列设置(98℃3分钟;98℃20秒,60℃30秒,72℃20秒,30个循环)扩增。使用PCR清洁试剂盒清洁PCR扩增子并通过DNA测序验证,然后用作体外转录反应的模板以生成指导RNA。

[0484] 实施例5:BaeI/EcoP15I衔接子的使用

[0485] 通过在40μL水中合并2μmol的BE Ad1和BE Ad2来制备衔接子BaeI/EcoP15I。通过在100μL水中合并1.5μmol的T7-Ad3和T7-Ad4寡核苷酸来制备T7-E衔接子。在所有情况下,混合后在热循环仪中将衔接子加热至98℃3分钟,然后以1℃/分钟的冷却速率冷却至室温。

[0486] 表6.与BaeI/EcoP15I衔接子一起使用的寡核苷酸。

[0487]

SEQ ID NO:	寡核苷酸名称	序列 (5'>3')	修饰
4415	BE Ad1	ActgctgacACAAgtatcTTTTTTTTTTgtttaaacTTTTTTTTTTgatacACAAgtcagcagA	5'磷酸
4416	Be Ad2	TctgctgacTTGTgtatcAAAAAAAAAAgtttaaacAAAAAAAAAAgatacTTGTgtcagcagT	5'磷酸
12	T7-Ad3	gcctcgagctaatacgactcactatagag	无
4417	T7-Ad4	NNctctatagtgagtcgtatta	5'磷酸
4418	stlgR	ttagagctagaaatagcaagttaaaataaggctagtccgttatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgcttttttt	5'腺苷酸化

[0488] 然后在室温下使用blunt/TA ligation master mix(New England Biolabs)将含有CCD平端的DNA(来自前面部分)连接至50pmol的衔接子BaeI/EcoP15I30分钟。然后通过以下步骤回收DNA:与0.6X Kapa SPRI珠粒(Kapa Biosystems)温育5分钟,用磁力架捕获珠粒,用80%乙醇洗涤两次,空气干燥珠5分钟,最后将DNA重悬于50μl缓冲液4(50mM乙酸钾20mM Tris-乙酸,10mM乙酸镁,100μg/mL BSA,pH7.9)中。然后在37℃用20单位PmeI消化回收的DNA 30分钟;通过以下步骤回收DNA:与1.2X Kapa SPRI珠粒(Kapa Biosystems)温育5分钟,用磁力架捕获珠粒,用80%乙醇洗涤两次,空气干燥珠粒5分钟,最后将DNA重悬于50μL缓冲液4中。这些步骤消除了小的(<100个核苷酸)DNA和BaeI/EcoP15I衔接子多聚体。

[0489] 然后通过在37℃添加20单位EcoP15I(New England Biolabs)和1mM ATP消化DNA 1小时,随后在75℃热失活20分钟。然后在室温使用blunt/TA ligation master mix(New England Biolabs)将DNA与30pmol T7-E衔接子连接30分钟。然后使用PCR清洁试剂盒(Zymo)回收DNA,并在20μL缓冲液4中洗脱。

[0490] 然后通过添加20单位的BaeI(New England Biolabs)、40pmol/μL SAM(S-腺苷甲硫氨酸)并在37℃温育1小时消化纯化的DNA,以消除源自衔接子的序列和CCD(和互补HGG)基序。然后使用PCR清洁试剂盒(Zymo)回收DNA,并在20μL洗脱缓冲液中洗脱。

[0491] 然后使用热稳定的5'AppDNA/RNA连接酶(New England Biolabs),通过添加在20μL ss连接缓冲液(10mM Bis-Tris-丙烷-HCl,10mM $MgCl_2$,1mM DTT,2.5mM $MnCl_2$,pH 7@25℃)中的20单位连接酶、20pmol stlgR寡核苷酸,并在65℃温育1小时,将回收的DNA与stlgR寡核苷酸连接,随后在90℃热失活5分钟。然后使用HiFidelity 2X master mix(New England Biolabs)PCR扩增DNA产物。使用引物T7-Ad3和gRU(序列5'>3'AAAAAAGCACCGACTCGGTG)(SEQ ID NO:4419)以以下设置(98℃3分钟;98℃20秒,60℃30秒,72℃20秒,30个循环)扩增。使用PCR清洁试剂盒清洁PCR扩增子并通过DNA测序验证,然后用作体外转录反应的模板以生成指导RNA。

[0492] 实施例6:NEMDA方法

[0493] 使用50ng的人类基因组DNA进行NEMDA(切口内切核酸酶介导的DNA扩增)。在热循环仪中在100μL补充有0.3mM dNTP、40单位的Bst大片段DNA聚合酶和0.1单位的NtCviPII(New England Biolabs)的热聚合酶缓冲液(20mM Tris-HCl,10mM $(NH_4)_2SO_4$,10mM KCl,6mM $MgSO_4$,0.1% Triton® X-100,pH 8.8)中温育DNA在55℃进行45分钟,然后在65℃进行30分钟,最后在80℃进行20分钟。

[0494] 然后用300μL的补充有200pmol的T7-RND8寡核苷酸(序列5'>3'gcctcgagctaatacgactcactatagagnnnnnnnn)(SEQ ID NO:4420)的缓冲液4稀释DNA并在98℃煮沸10分钟,然后快速冷却至10℃持续5分钟。然后将反应物补充40单位的大肠杆菌(E.coli)DNA聚合酶I和0.1mM dNTP(New England Biolabs)并在室温温育20分钟,随后在75℃热失活20分钟。然后使用PCR清洁试剂盒(Zymo)回收DNA,并在30μL洗脱缓冲液中洗脱。

[0495] 然后在室温使用blunt/TA ligation master mix(New England Biolabs)将DNA与50pmol衔接子BaeI/EcoP15I连接持续30分钟。然后通过与0.6X Kapa SPRI珠粒(Kapa Biosystems)温育5分钟来回收DNA,用磁力架捕获珠粒,用80%乙醇洗涤两次,空气干燥珠粒5分钟,最后将DNA重悬于50μl缓冲液4(50mM乙酸钾,20mM Tris-乙酸,10mM乙酸镁,100μg/mL BSA,pH7.9)中。然后在37℃用20单位PmeI消化回收的DNA30分钟;通过与1.2X Kapa SPRI珠粒(Kapa Biosystems)温育5分钟回收DNA,用磁力架捕获珠粒,用80%乙醇洗涤两次,空气干燥珠粒5分钟,最后将DNA重悬于50μL缓冲液4中。这些步骤消除了小的(<100个核苷酸)DNA和BaeI/EcoP15I衔接子多聚体。

[0496] 然后通过添加20单位BaeI(New England Biolabs)、40pmol/μL SAM(S-腺苷甲硫氨酸)并在37℃温育1小时消化纯化的DNA以消除源自衔接子的序列和CCD(和互补HGG)基序。然后使用PCR清洁试剂盒(Zymo)回收DNA,并在20μL洗脱缓冲液中洗脱。

[0497] 然后使用热稳定的5'的AppDNA/RNA连接酶(New England Biolabs)通过在20μL ss连接缓冲液(10mM Bis-Tris-丙烷-HCl,10mM $MgCl_2$,1mM DTT,2.5mM $MnCl_2$,pH 7@25℃)中添加20单位的连接酶、20pmol stlgR寡核苷酸并在65℃温育1小时,将回收的DNA与stlgR寡核苷酸连接,然后在90℃热失活5分钟。然后使用HiFidelity 2X master mix(New England Biolabs)PCR扩增D NA产物。使用以下设置(98℃3分钟;98℃20秒,60℃30秒,72℃20秒,30个循环)使用引物T7-Ad3(序列5'>3'gcctcgagctaatacgactcactatagag)(SEQ ID

NO:12)和gRU(序列5'>3'AAAAAAGCACCGACTCGGTG)(SEQ ID NO:4419)来扩增。使用PCR清洁试剂盒清洁PCR扩增子并通过DNA测序验证,然后用作体外转录反应的模板以生成指导RNA。

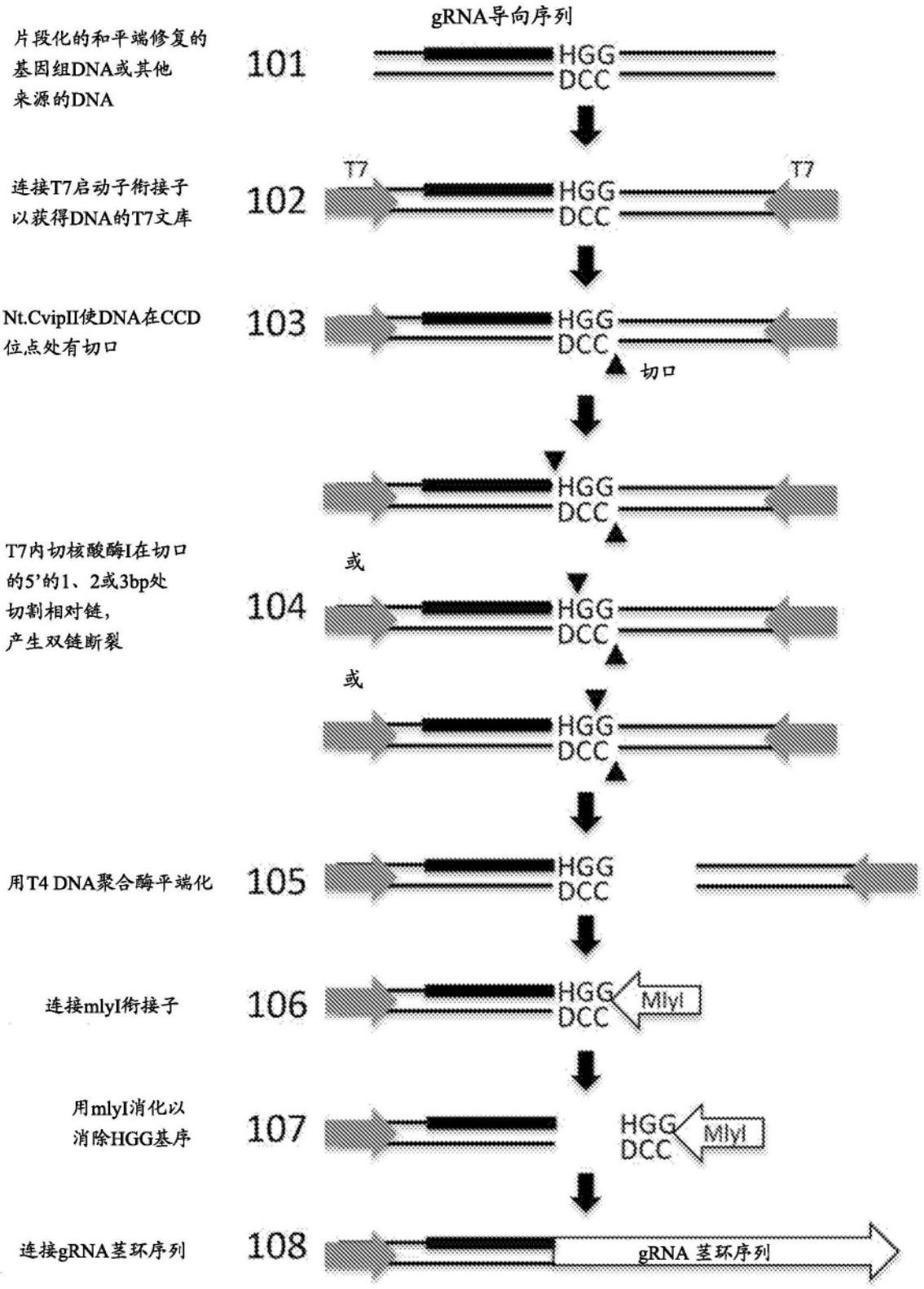

gRNA导向序列
片段化的和平端修复的基因组DNA或其他来源的DNA
101
HGG
DCC
连接T7启动子衔接子以获得DNA的T7文库
102
T7
T7
Nt.CvipII使DNA在CCD位点处有切口
103
切口
T7内切核酸酶I在切口的5'的1、2或3bp处切割相对链，产生双链断裂
104
或
或
用T4 DNA聚合酶平端化
105
连接mlyI衔接子
106
MlyI
用mlyI消化以消除HGG基序
107
连接gRNA茎环序列
108
gRNA 茎环序列

图1

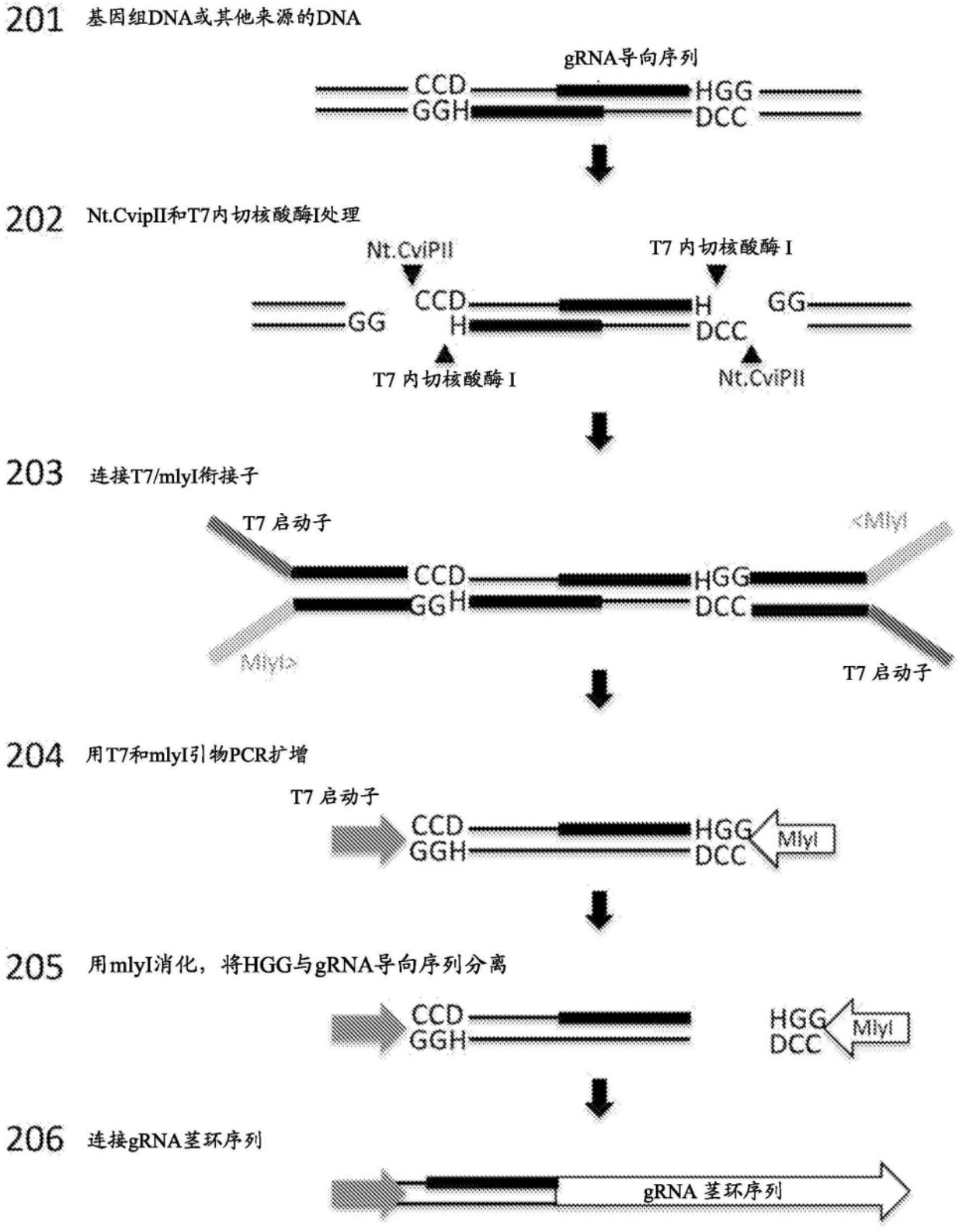

201
基因组DNA或其他来源的DNA
gRNA导向序列
CCD
GGH
HGG
DCC
202
Nt.CvipII和T7内切核酸酶I处理
Nt.CviPII
T7 内切核酸酶 I
GG
CCD
H
H
DCC
GG
T7 内切核酸酶 I
Nt.CviPII
203
连接T7/mlyI衔接子
T7 启动子
<MlyI
CCD
GGH
HGG
DCC
MlyI>
T7 启动子
204
用T7和mlyI引物PCR扩增
T7 启动子
CCD
GGH
HGG
DCC
MlyI
205
用mlyI消化，将HGG与gRNA导向序列分离
CCD
GGH
HGG
DCC
MlyI
206
连接gRNA茎环序列
gRNA 茎环序列

图2

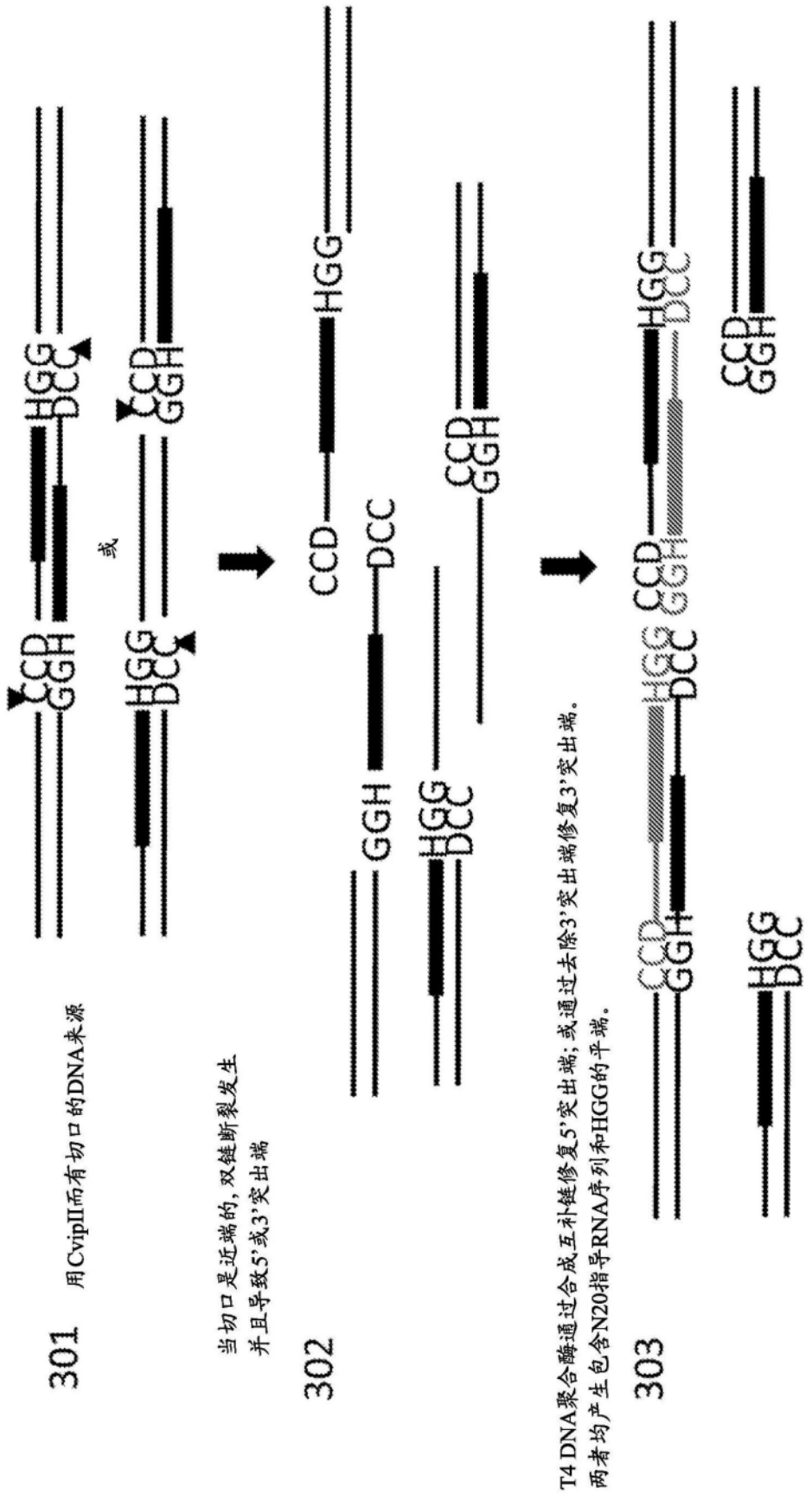

N20(指导RNA序列)
301
用CvipII而有切口的DNA来源
或
当切口是近端的，双链断裂发生
并且导致5'或3'突出端
302
T4 DNA聚合酶通过合成互补链修复5'突出端；或通过去除3'突出端修复3'突出端。
两者均产生包含N20指导RNA序列和HGG的平端。
303

图3

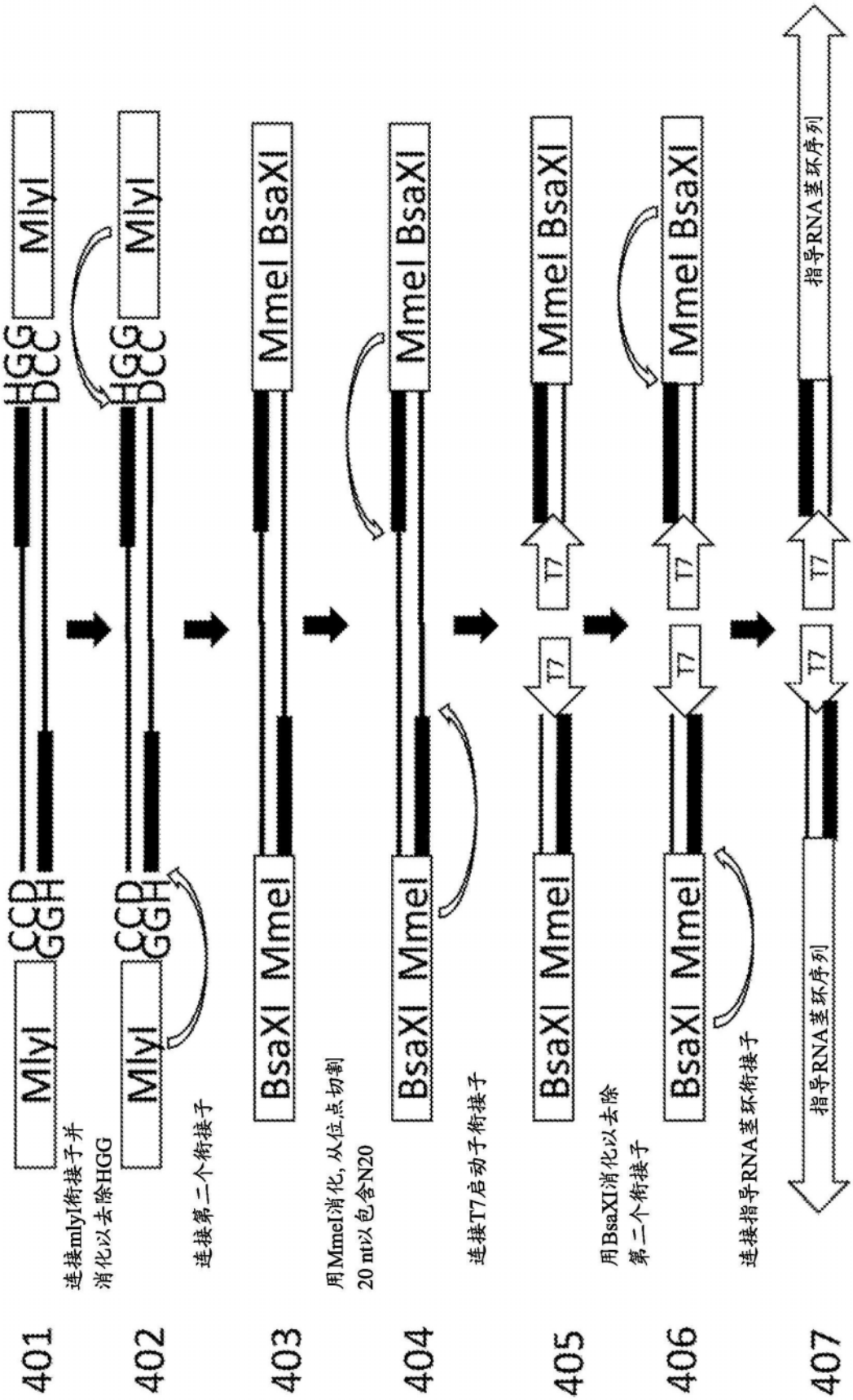

401
MlyI
GGCH
HGGC
连接mlyI衔接子并
消化以去除HGG
402
MlyI
GGCH
HGGC
连接第二个衔接子
403
BsaXI MmeI
用MmeI消化，从位点切割
20 nt以包含N20
404
BsaXI MmeI
连接T7启动子衔接子
405
BsaXI MmeI
T7
用BsaXI消化以去除
第二个衔接子
406
BsaXI MmeI
T7
连接指导RNA茎环衔接子
407
指导RNA茎环序列
T7

图4

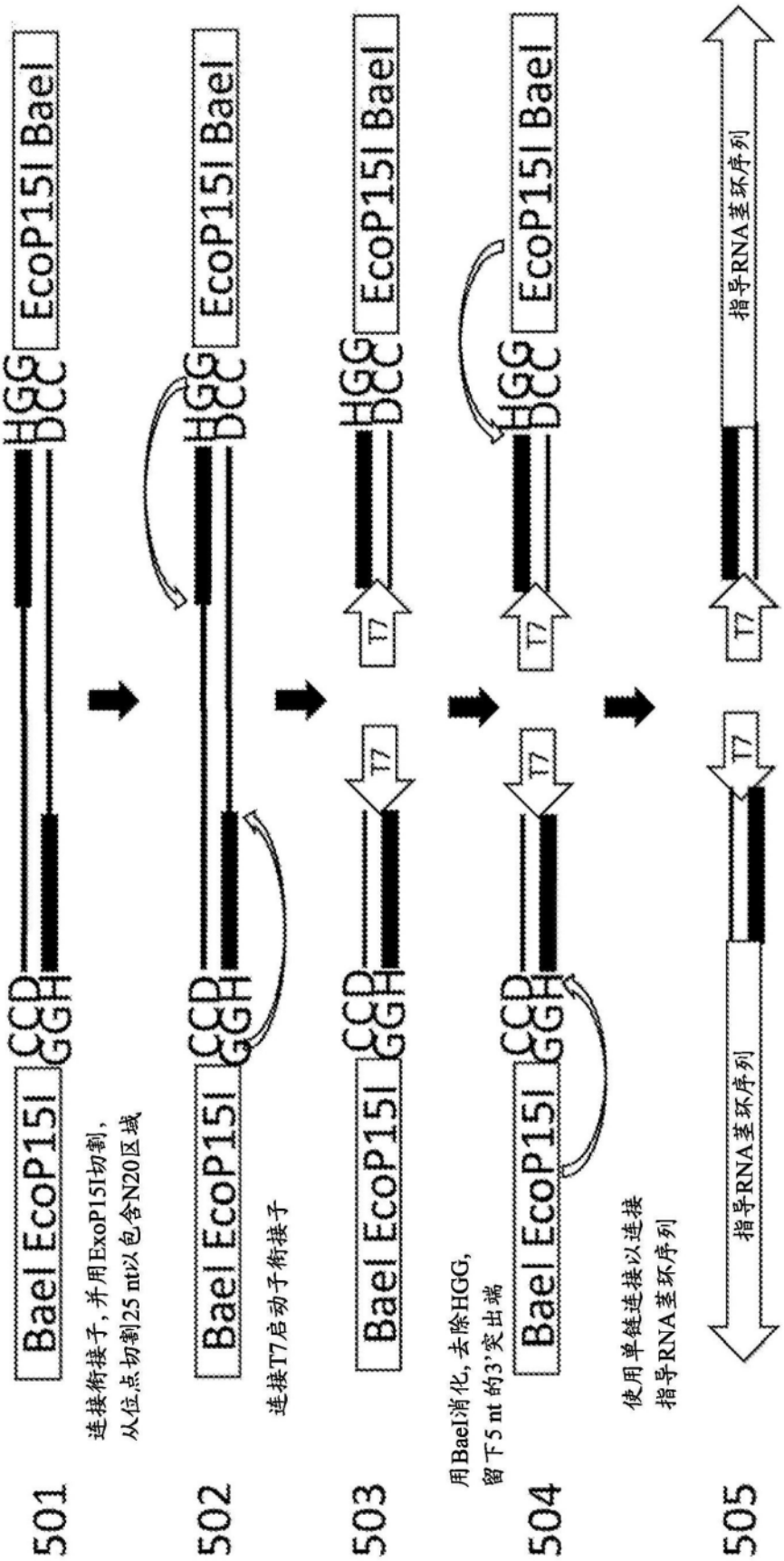

501
BaeI EcoP15I
CCA
GGH
HGG
BCC
连接衔接子，并用ExoP15I切割，
从位点切割25 nt以包含N20区域
502
BaeI EcoP15I
连接T7启动子衔接子
503
T7
用BaeI消化，去除HGG，
留下5 nt 的3’突出端
504
使用单链连接以连接
指导RNA茎环序列
505
指导RNA茎环序列

图5

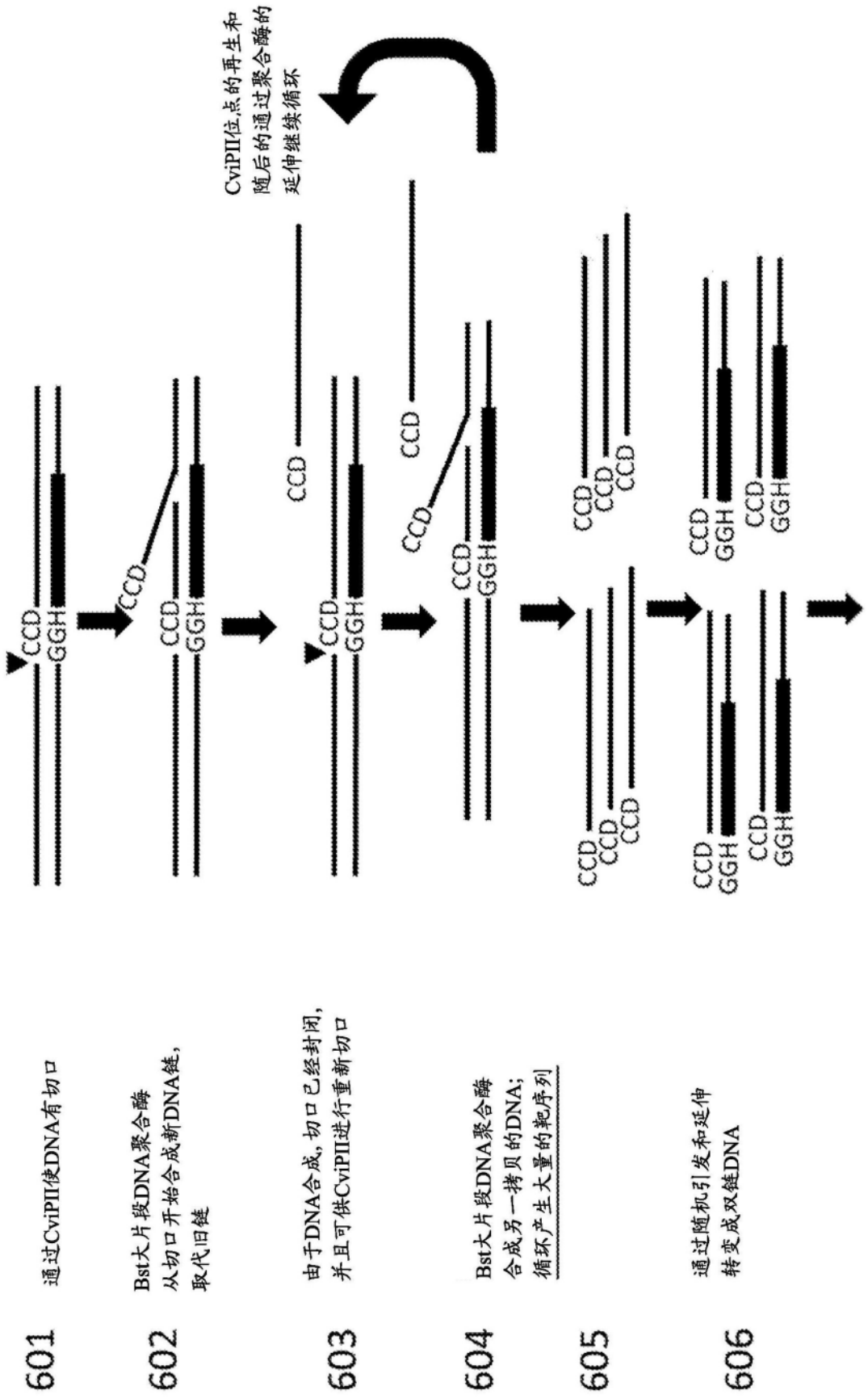

601
通过CviPII使DNA有切口
602
Bst大片段DNA聚合酶
从切口开始合成新DNA链，
取代旧链
603
由于DNA合成，切口已经封闭，
并且可供CviPII进行重新切口
604
Bst大片段DNA聚合酶
合成另一拷贝的DNA；
循环产生大量的靶序列
605
606
通过随机引发和延伸
转变成双链DNA
CviPII位点的再生和
随后的通过聚合酶的
延伸继续循环
CCD
GGH

图6

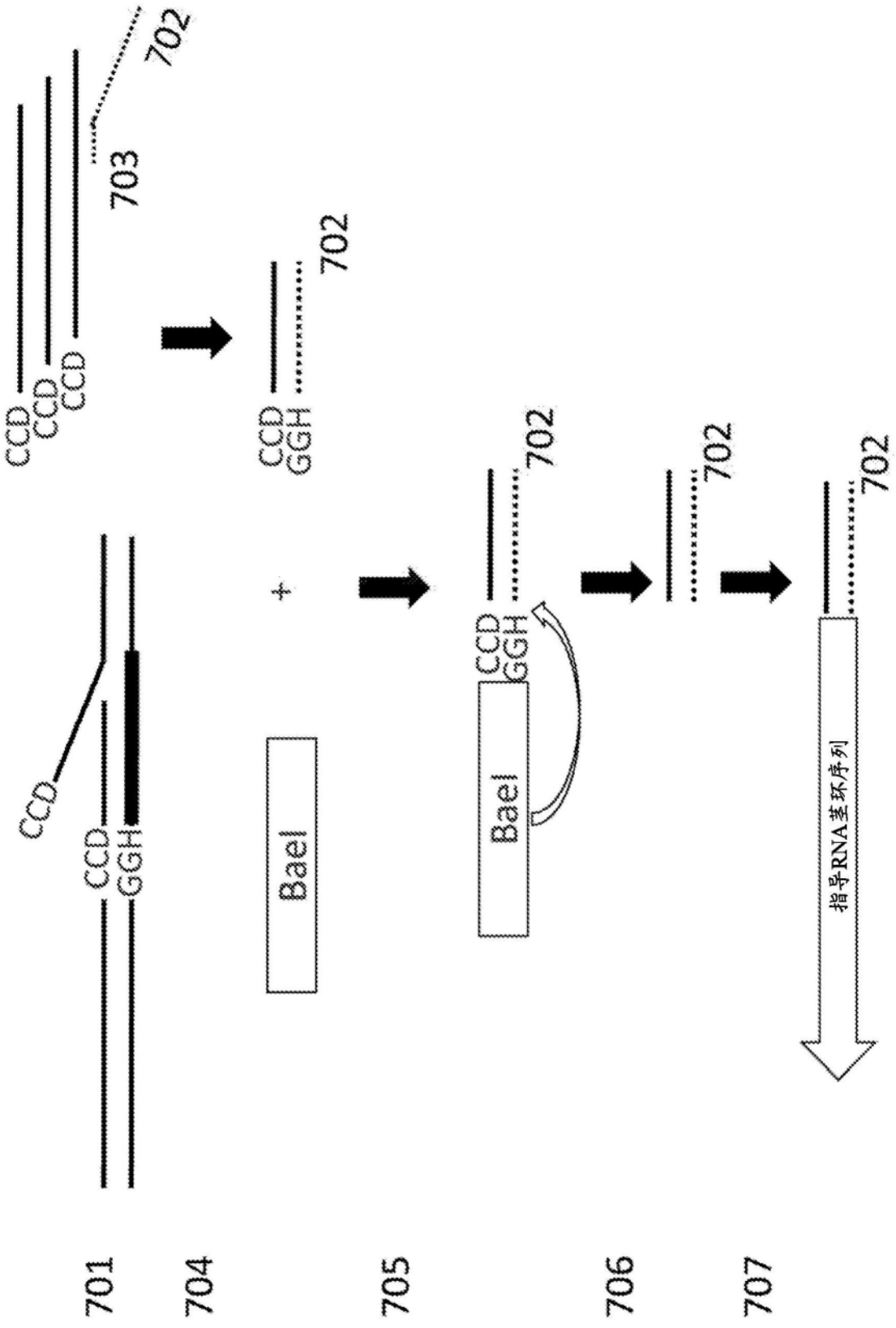

CCD
CCD
GGH
CCD
CCD
CCD
703
702
CCD
GGH
702
+
Bael
CCD
GGH
702
Bael
702
指导RNA茎环序列
702
701
704
705
706
707

图7